การพัฒนากระบวนการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดยยีสต์สายพันธุ์ทนร้อน *Ogataea thermomethanolica* ภายใต้การควบคุมการแสดงออกตลอดเวลาด้วยโปรโมเตอร์ *OthGAP*

โดย

นายสมพจน์ อันติมานนท์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

การพัฒนากระบวนการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดยยีสต์สายพันธุ์ทนร้อน *Ogataea thermomethanolica* ภายใต้การควบคุมการแสดงออกตลอดเวลาด้วยโปรโมเตอร์ *OthGAP*

โดย

นายสมพจน์ อันติมานนท์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

PROCESS DEVELOPMENT OF RECOMBINANT PROTEIN PRODUCTION BY THERMOTOLERANT YEAST *Ogataea thermomethanolica* USING CONSTITUTIVE *OthGAP* PROMOTER

BY

MR. SOMPOT ANTIMANON

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY
FACULTY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
THAMMASAT UNIVERSITY
ACADEMIC YEAR 2015
COPYRIGHT OF THAMMASAT UNIVERSITY

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

วิทยานิพนธ์

ของ

นายสมพจน์ อันติมานนท์

เรื่อง

การพัฒนากระบวนการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดยยีสต์สายพันธุ์ทนร้อน *Ogataea thermomethanolica* ภายใต้การควบคุมการแสดงออกตลอดเวลาด้วยโปรโมเตอร์ *OthGAP*

ได้รับการตรวจสอบและอนุมัติ ให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

เมื่อ วันที่ 14 ตุลาคม พ.ศ. 2558

ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ____________________
(อาจารย์ ดร. รสสุคนธ์ ทองวิเชียร)

กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ____________________
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เทพปัญญา เจริญรัตน์)

กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ____________________
(ดร. นิรันดร์ รุ่งสว่าง)

กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ____________________
(ดร. กอบกุล เหล่าเท้ง)

คณบดี ____________________
(รองศาสตราจารย์ ปกรณ์ เสริมสุข)

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนากระบวนการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดยยีสต์สายพันธุ์ทนร้อน *Ogataea thermomethanolica* ภายใต้การควบคุมการแสดงออกตลอดเวลาด้วยโปรโมเตอร์ *OthGAP*
ชื่อผู้เขียน	นายสมพจน์ อันติมานนท์
ชื่อปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา/คณะ/มหาวิทยาลัย	ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เทพปัญญา เจริญรัตน์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร. นิรันดร์ รุ่งสว่าง
ปีการศึกษา	2558

บทคัดย่อ

การพัฒนากระบวนการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดยยีสต์สายพันธุ์ทนร้อน *Ogataea thermomethanolica* ภายใต้การควบคุมการแสดงออกตลอดเวลาด้วยโปรโมเตอร์ *OthGAP* ในงานวิจัยนี้ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 5 ส่วน คือ 1. การศึกษารูปแบบการเติบโตของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ในฟลาสก์เขย่าสำหรับเตรียมกล้าเชื้อเพื่อเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ 2. การศึกษาอิทธิพลของพีเอชและอุณหภูมิต่อการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสในถังปฏิกรณ์ชีวภาพโดยใช้กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ 3. การศึกษารูปแบบการเติมสับสเทรตในระยะการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ 4. การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และ 5. การศึกษาอิทธิพลของการเพิ่มอุณหภูมิในระยะเฟด-แบทช์ต่อการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตส

การศึกษารูปแบบการเติบโตของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ในฟลาสก์เขย่าได้ทำการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิ (แปรผันอุณหภูมิเท่ากับ 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส) และระยะเวลาที่เหมาะสมในการเตรียมกล้าเชื้อขั้นที่ 1 และกล้าเชื้อขั้นที่ 2 สำหรับการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ จากผลจากการทดลองพบว่า การเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ส่งผลให้ความเข้มข้นของเซลล์และอัตราการเติบโตจำเพาะมีค่าสูงสุดเท่ากับ 12.00±0.24 กรัมต่อลิตร และ 0.26 ต่อชั่วโมง นอกจากนี้ ระยะเวลาที่เหมาะสมในการเตรียมกล้าเชื้อขั้นที่ 1 ในอาหารเหลว YPD

และระยะเวลาที่เหมาะสมในการเตรียมกล้าเชื้อขั้นที่ 2 ในอาหารสังเคราะห์สูตร Syn6 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส คือ 16 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ

การศึกษา อิทธิพลของพีเอชและอุณหภูมิต่อการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตส ในกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ โดยแปรผันค่าพีเอชเท่ากับ 4.0, 5.0, 6.0, 6.5 และ 7.0 และควบคุมสภาวะอื่นให้คงที่ (อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 1000 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 ลิตรต่อลิตร.นาที) ผลการทดลองพบว่า การเพาะเลี้ยงที่พีเอช 4.0-6.5 เซลล์มีรูปแบบการเติบโตคล้ายกัน โดยพีเอชที่เหมาะสมที่สุดต่อการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสคือ พีเอช 6.0 เนื่องจากให้ค่าความเข้มข้นของเซลล์และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสสูงสุดเท่ากับ 14.00±0.21 กรัมต่อลิตร และ 7.83±0.04 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังนั้น พีเอชที่เหมาะสมต่อการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสคือ พีเอช 6.0 ส่วนการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิทำการแปรผันอุณหภูมิเท่ากับ 30, 34, 38, 40 และ 42 องศาเซลเซียส และควบคุมสภาวะอื่นให้คงที่ (พีเอช 6.0 อัตราการกวน 1000 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 ลิตรต่อลิตร.นาที) ผลการทดลองพบว่าเซลล์สามารถเติบโตได้ในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 30-40 องศาเซลเซียส โดยการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิสูงกว่า 34 องศาเซลเซียส ส่งผลให้ความเข้มข้นของเซลล์ อัตราการเติบโตจำเพาะ และกิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสมีค่าลดลง อย่างไรก็ตาม การเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 และ 34 องศาเซลเซียส ให้ผลการเติบโตและการผลิตไม่ต่างกันมากนัก ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกอุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิควบคุมเพื่อลดต้นทุนในการผลิต

การศึกษา รูปแบบการเติมสับสเทรตในการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์เพื่อเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์ และการผลิตเอนไซม์ไฟเตส โดยหลีกเลี่ยงการสร้างผลพลอยได้ในรูปเอทานอลและกรดอะ-ซิติก ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษารวมทั้งสิ้น 4 รูปแบบ ได้แก่ การเติมแบบเอกซ์โพเนนเชียล การเติมแบบคงที่ การเติมแบบครั้งคราว และการเติมโดยอาศัยค่าออกซิเจนละลายเป็นตัวควบคุม (DO stat) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การเติมแบบเอกซ์โพเนนเชียลส่งผลให้เซลล์เติบโตได้อย่างรวดเร็วในระยะแรกของการเติมสับสเทรต จากนั้นเซลล์มีการสร้างผลิตภัณฑ์รองในรูป เอทานอล และกรดอะซิ-ติกอย่างต่อเนื่องซึ่งมีค่าเท่ากับ 48.70±3.55 และ 12.79±0.21 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ การเติมแบบคงที่และการเติมแบบครั้งคราวส่งผลให้ความเข้มข้นของเซลล์ และผลได้ของเซลล์จากสับสเทรตมีค่าใกล้เคียงกัน แต่เมื่อพิจารณาค่ากิจกรรมเอนไซม์ของไฟเตสพบว่า การเติมแบบครั้งคราวให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตส (166.58±2.26 หน่วยต่อมิลลิลิตร) สูงกว่าการเติมแบบคงที่ (66.41±0.50 หน่วยต่อมิลลิลิตร) อย่างไรก็ตาม การเติมสับสเทรตแบบครั้งคราวอาจเกิดความยุ่งยากในทางปฏิบัติ เนื่องจากผู้ปฏิบัติงานต้องคอยติดตามค่าออกซิเจนละลายของระบบอย่างใกล้ชิดเพื่อเติมสับสเทรตในครั้งถัดไป ดังนั้นผู้วิจัยศึกษาการเติมสับสเทรตโดย ใช้ค่าออกซิเจนละลายเป็นตัวควบคุม การเติมสับสเทรต ผลการศึกษาพบว่า เซลล์สามารถเติบโตและผลิตเอนไซม์ไฟเตสได้อย่างต่อเนื่องและตรวจ ไม่

พบผลิตภัณฑ์รองในระบบการเพาะเลี้ยง ดังนั้นการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ที่มีการควบคุมการเติมสับสเทรตโดยใช้ค่าออกซิเจนละลายจึงมีความเหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica*

จากการศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนในการ เพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* เพื่อผลิตเอนไซม์ไฟเตส จากผลการศึกษาพบว่า การเพาะเลี้ยงแบบแบทช์เซลล์มีรูปแบบการเติบโตและให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสใกล้เคียงกับการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ส่วนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์โดยอาศัยค่าออกซิเจนละลายเป็นตัวควบคุม การเติมสับสเทรตพบว่า ค่าความเข้มข้นของเซลล์ กิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตส และพารามิเตอร์อื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเติบโตและการสร้างผลิตภัณฑ์มีค่าใกล้เคียงกับการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าน้ำตาลซูโครสสามารถนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* เพื่อผลิตเอนไซม์ไฟเตสภายใต้การควบคุมการแสดงออกของโปรโมเตอร์ *OthGAP* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

การศึกษาอิทธิพลของการเพิ่มอุณหภูมิในระยะเฟด-แบทช์ต่อการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตส ซึ่งการเพาะเลี้ยงในระยะแบทช์ทำการควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 34 องศาเซลเซียส เมื่อเข้าสู่ระยะเฟด-แบทช์ทำการเติมสับสเทรตโดยอาศัยค่าออกซิเจนละลายเป็นตัวควบคุม และทำการเพิ่มอุณหภูมิเป็น 38, 40 และ 42 องศาเซลเซียส ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การเพิ่มอุณหภูมิเป็น 38 และ 40 องศาเซลเซียส เซลล์สามารถเติบโตและผลิตเอนไซม์ไฟเตสได้อย่างต่อเนื่อง ส่วนการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ไม่สามารถควบคุมการเติมสับสเทรตโดยใช้ค่าออกซิเจนละลาย ทั้งนี้การเพิ่มอุณหภูมิส่งผลให้ความเข้มข้นของเซลล์ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตส และพารามิเตอร์อื่นๆ มีค่าลดลง โดยการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสสูงกว่าอุณหภูมิ 40 และ 42 องศาเซลเซียส ประมาณ 3.1 และ 5.7 เท่า ตามลำดับ

คำสำคัญ: การเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์, *Ogataea thermomethanolica*, เอนไซม์ไฟเตส, รีคอมบิแนนท์โปรตีน, ยีสต์สายพันธุ์ทนร้อน

Thesis Title	Process development of recombinant protein production by thermotolerant yeast *Ogataea thermomethanolica* using constitutive *OthGAP* promoter
Author	Mr. Sompot Antimanon
Degree	Master of science
Department/Faculty/University	Department of Biotechnology Faculty of science and technology Thammasat University
Thesis Advisor	Assistant Professor Theppanya Charoenrat, Ph.D.
Thesis Co-Advisor	Niran Roongsawang, Ph.D.
Academic Years	2015

ABSTRACT

The improvement of recombinant protein production by thermotolerant yeast *Ogataea thermomethanolica* using constitutive *OthGAP* promoter was divided to 5 parts, including the study of growth profile of recombinant *O. thermomethanolica* in shake-flask, the influence of pH and temperature on growth and phytase production in batch fermentation, the study of substrate feeding strategies in fed-batch fermentation, the study of possibility of using sucrose as a carbon source, and the influence of increased temperature on growth and phytase production in fed-batch fermentation.

To investigate the optimum temperature and cultivation time for inoculum preparation, cells were cultivated at various temperatures (30, 35, and 40°C) in shake-flask culture, and the growth profile was analyzed. The results showed that the highest cell concentration (12.00±0.24 g/L) and specific growth rate (0.26 h^{-1}) were obtained at 35°C. Moreover, optimum cultivation time for primary inoculum in YPD medium and secondary inoculum in Syn6 medium were 16 h and 24 h, respectively.

The influence of pH on growth and phytase production in batch culture was examined at various pH (4.0, 5.0, 6.0 6.5, and 7.0) and other parameters were controlled at 30°C, 1000 rpm of agitation, and 1 vvm of aeration. The similar growth profiles were observed in the process at pH range of 4.0-6.5. The optimum pH for cell growth and phytase production was at pH 6.0 which were 14.00±0.21 g/L and 7.83±0.04 U/mL, respectively. Thus, pH 6.0 was chosen for further study. In batch culture, the influence of temperature was also studied at 30, 34, 38, 40 and 42°C and other parameters were controlled at pH 6.0, 1000 rpm of agitation, and 1 vvm of aeration. The result showed that cells could grow at a broad range of temperature, 30-40°C and the highest specific growth rate and cell concentration were obtained at 34°C. When temperature was increased over than 34°C, the reduction of cell concentration, specific growth rate, and phytase activity was observed. Therefore, cultivation at 34°C was chosen for further experiment.

Fed-batch fermentation for high-cell-density cultivation for eliminating by-product formation (ethanol and acetic acid) and enhancing phytase production were performed. Four feeding strategies (exponential, constant, intermittent, and DO stat control feeding) were carried out. In the exponential feeding, cells could dramatically grow in the early fed batch phase. Cells then continuously produced ethanol and acetic acid, which were 48.70±3.55 and 12.79±0.21 g/L, respectively. In the intermittent feeding, phytase activity (166.58±2.26 U/mL) was higher than that of the culture with constant feeding (66.41±0.50 U/mL) even though the cell concentration and biomass yield had the similar values. Although intermittent feeding gave the highest phytase activity, it might be not practiced because the dissolved oxygen has to be monitored carefully for controlling the substrate feeding. Therefore, DO stat control feeding was applied. The results showed that using DO stat control feeding cell concentration and phytase activity were continuously increased without by-product formation. Indicating that this feeding strategy is efficient for phytase production.

Sucrose was selected as an alternative cheaper carbon source. There was no significant difference in maximum cell concentration and phytase activity in batch

cultivation when compared to the culture using glucose. In fed-batch cultivation, DO stat control feeding was applied for phytase production by high-cell-density cultivation. The results showed that cell concentration, phytase activity, and other kinetics parameters were similar with the culture using glucose was as a carbon source. This result suggests that sucrose is the potential carbon source for phytase production under the control of constitutive *OthGAP* promoter in recombinant *O. thermomethanolica*.

The influence of increasing temperature on growth and phytase production was carried out by fed-batch fermentation. In batch stage, the temperature was controlled at 34°C and further increased to 38, 40, and 42°C in fed-batch stage. In the fed-batch stage, DO stat control feeding was applied for addition of substrate. At 38, and 40°C, DO stat feeding could be applied throughout cultivation. However, when temperature was increased to 42°C, substrate feeding could not be controlled efficiently. The result showed that increasing temperature decreased cell concentration, phytase activity, and other kinetics parameters. The highest phytase activity was observed when temperature of fed-batch stage was increased to 38°C, which was higher than that of 40 and 42°C about 3.1 and 5.7 times, respectively.

Keywords: fed-batch fermentation, *Ogataea thermomethanolica*, phytase, recombinant protein, thermotolerant yeast

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.เทพปัญญา เจริญรัตน์ อาจารย์ที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์ที่ได้มอบโอกาส และวิชาความรู้อันเป็นประโยชน์ทั้งในเรื่องการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วง คอยอบรมสั่งสอนในเรื่องการดำเนินชีวิตเพื่อก้าวเข้าสู่การใช้ชีวิตในสังคมจริง

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.นิรันดร์ รุ่งสว่าง อาจารย์ที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์ ร่วม อ.ดร. รสสุคนธ์ ทองวิเชียร ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ดร.กอบกุล เหล่าเท้ง กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำ คำปรึกษา และความรู้ที่เป็นประโยชน์ต่อการทำวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่มอบทุนการศึกษาสำหรับการศึกษาในระดับปริญญาโท

ขอกราบขอบพระคุณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและ เทคโนโลยีชีวภาพ แห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ที่ได้อนุเคราะห์ทุนวิจัยสำหรับการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ที่คอยช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ และท้ายสุดขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัวของข้าพเจ้า ที่คอยเป็นกำลังใจและสร้างแรงผลักให้ข้าพเจ้าสามารถสำเร็จการศึกษาในระดับปริญญาโท

นายสมพจน์ อันติมานนท์
มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
พ.ศ. 2558

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย (	1)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ (	4)
กิตติกรรมประกาศ (	7)
สารบัญตาราง (	13)
สารบัญภาพ (	14)
รายการสัญลักษณ์และคำย่อ (	17)
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 *Ogataea thermomethanolica*	4
2.2 ระบบควบคุมการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ยีนโดยยีสต์ *O. thermomethanolica*	6
2.2.1 ระบบการควบคุมแบบชักนำ	6
2.2.2 ระบบควบคุมการแสดงตลอดเวลา	7
2.3 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน	7
2.3.1 สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้าน	8

2.3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ 8
2.3.3 อิทธิพลของพีเอช 9
2.3.4 อิทธิพลของอุณหภูมิ 9
2.3.5 อิทธิพลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและพลังงาน 10
2.3.6 อิทธิพลของค่าออกซิเจนละลายและอัตราการใช้ออกซิเจน 11
2.3.7 รูปแบบการเติมสับสเทรตในการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ 12
2.4 รูปแบบกระบวนการเพาะเลี้ยง 13
2.4.1 กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ 13
2.4.2 กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทซ์ 19
2.5 เอนไซม์ไฟเตส 20
2.5.1 การจัดกลุ่มเอนไซม์ไฟเตส 20
2.5.2 แหล่งของเอนไซม์ไฟเตส 21
2.5.2.1 เอนไซม์ไฟเตสจากพืช 21
2.5.2.2 เอนไซม์ไฟเตสจากสัตว์ 21
2.5.2.3 เอนไซม์ไฟเตสจากจุลินทรีย์ 21
2.5.3 การประยุกต์เอนไซม์ไฟเตสในอุตสาหกรรม 22

บทที่ 3 วิธีการวิจัย 24

3.1 อุปกรณ์และสายพันธุ์จุลินทรีย์ 24
3.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ 24
3.1.2 สายพันธุ์จุลินทรีย์ 24
3.2 การเก็บรักษารีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* 25
3.3 การศึกษารูปแบบการเติบโตของรีคอมบิแนนท์ยีสต์
O. thermomethanolica ในฟลาสก์ 25
3.3.1 อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการเติบโตของรีคอมบิแนนท์
ยีสต์ *O. thermomethanolica* 25
3.3.2 การเติบโตของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica*
ในฟลาสก์ 26

3.4 กระบวนการเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* เพื่อผลิตเอนไซม์ไฟเตส 26
3.4.1 การเตรียมกล้าเชื้อ 26
3.4.2 การเตรียมถังปฏิกรณ์ชีวภาพ 27
3.4.3 การศึกษาอิทธิพลของค่าพีเอชและอุณหภูมิต่อการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตส 27
3.4.4 การเพิ่มความหนาแน่นเซลล์โดยใช้กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ 28
3.5 การศึกษารูปแบบการเติมสับสเทรตในการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไฟเตส 28
3.6 การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้แหล่งคาร์บอนราคาถูกในการผลิตเอนไซม์ไฟเตส 29
3.7 การศึกษาอิทธิพลของการเพิ่มอุณหภูมิในระยะเฟด-แบทช์ต่อการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตส 30

บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล 31

4.1 การทดลองที่ I: การศึกษารูปแบบการเติบโตของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ในระดับฟลาสก์ 31
4.1.1 อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการเติบโตของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ในระดับฟลาสก์ 31
4.1.2 รูปแบบการเติบโตของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* เพื่อใช้ในการเตรียมกล้าเชื้อ 32
4.2 การทดลองที่ II: การศึกษาอิทธิพลของค่าพีเอชและอุณหภูมิต่อการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสในถังปฏิกรณ์ชีวภาพโดยใช้กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ 34
4.2.1 อิทธิพลของค่าพีเอช 34
4.2.1.1 อิทธิพลของค่าพีเอชต่อการเติบโตของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* 36
4.2.1.2 อิทธิพลของค่าพีเอชต่อการผลิตเอนไซม์เตสโดยรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* 37

4.2.2 อิทธิพลของอุณหภูมิ 39
4.2.2.1 อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการเติบโตของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* 40
4.2.2.2 อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์ไฟเตสโดยรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* 43
4.2.2.3 การเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* โดยไม่มีการควบคุมอุณหภูมิระหว่างการเพาะเลี้ยง 45
4.3 การทดลองที่ III: การศึกษารูปแบบการเติมสับสเทรตที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไฟเตสในการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ 47
4.3.1 การเติมสับสเทรตด้วยอัตราเพิ่มขึ้นแบบเอกซ์โพเนนเชียล 47
4.3.2 การเติมสับสเทรตด้วยอัตราการเติมแบบคงที่ 50
4.3.3 การเติมแบบครั้งคราว 53
4.3.4 การเปรียบเทียบการเติมสับสเทรตทั้ง 3 รูปแบบ 55
4.3.5 การเติมสับสเทรตโดยอาศัยค่าออกซิเจนละลายเป็นตัวควบคุม (DO stat) 59
4.4 การทดลองที่ IV: การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้แหล่งคาร์บอนราคาถูกในการผลิตเอนไซม์ไฟเตส 62
4.4.1 การเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสโดยใช้กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ 63
4.4.2 การเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสในการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ 65
4.5 การทดลองที่ V: การศึกษาอิทธิพลของการเพิ่มอุณหภูมิในระยะเฟด-แบทช์ต่อการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตส 69
4.5.1 อิทธิพลของการเพิ่มอุณหภูมิในระยะเฟด-แบทช์ 69
4.5.1.1 การเพิ่มอุณหภูมิในระยะเฟด-แบทช์เท่ากับ 38 องศาเซลเซียส 70
4.5.1.2 การเพิ่มอุณหภูมิในระยะเฟด-แบทช์เท่ากับ 40 องศาเซลเซียส 72
4.5.1.3 การเพิ่มอุณหภูมิในระยะเฟด-แบทช์เท่ากับ 42 องศาเซลเซียส 74
4.5.1.4 การเปรียบเทียบอิทธิพลของการเพิ่มอุณหภูมิในระยะเฟด-แบทช์ต่อการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตส 77

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 79

5.1 การศึกษารูปแบบการเติบโตของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *Ogataea thermomethanolica* ในระดับฟลาสก์ 79
5.2 การศึกษาอิทธิพลของค่าพีเอชและอุณหภูมิต่อการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสในถังปฏิกรณ์ชีวภาพโดยใช้กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ 79
5.3 การศึกษารูปแบบการเติมสับสเทรตในการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไฟเตส 80
5.4 การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้แหล่งคาร์บอนราคาถูกในการผลิตเอนไซม์ไฟเตส 81
5.5 การศึกษาอิทธิพลของการเพิ่มอุณหภูมิในระยะเฟด-แบทช์ต่อการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตส 82

รายการอ้างอิง 84

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ 94
ภาคผนวก ข วิธีวิเคราะห์ 97
ภาคผนวก ค การคำนวนอัตราการเติมสับสเทรตในการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ 118
ภาคผนวก ง ข้อมูลจากการทดลอง 127

ประวัติผู้เขียน 145

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2-1 การจัดจำแนก *O. thermomethanolica* 5

2-2 อัตราการการเติบโตจำเพาะในระยะต่างๆของการเติบโต 16

2-3 บริษัทที่ผลิตเอนไซม์ไฟเตสทางการค้า 22

3-1 รูปแบบการเติมสับสเทรตในการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ 29

4-1 ข้อมูลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ที่มีการแปรผันค่าพีเอชในถังปฏิกรณ์ชีวภาพโดยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ 39

4-2 ข้อมูลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ที่มีการแปรผันอุณหภูมิในถังปฏิกรณ์ชีวภาพโดยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ 43

4-3 เปรียบเทียบผลจากการเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส และไม่มีการควบคุมอุณหภูมิในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ 46

4-4 ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ จากกระบวนการผลิตเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* โดยใช้อัตราการเติมสับสเทรตแบบเอกซ์โพเนนเชียล แบบคงที่ และแบบครั้งคราว 58

4-5 ข้อมูลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* โดยใช้แหล่งคาร์บอนต่างกันในถังปฏิกรณ์ชีวภาพโดยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ 65

4-6 ค่าพารามิเตอร์ต่างๆจากกระบวนการผลิตเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* โดยใช้แหล่งคาร์บอนต่างกันในถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ 68

4-7 ค่าพารามิเตอร์ต่างๆจากกระบวนการผลิตเอนไซม์ไฟเตสโดยรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* เมื่อปรับอุณหภูมิในระยะเฟด-แบทช์เท่ากับ 34, 38, 40, 42 องศาเซลเซียส และไม่มีการควบคุมอุณหภูมิ 76

ข-1 การเจือจางสารละลายมาตรฐาน KH_2PO_4 และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ของสารละลาย KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้นต่างๆ 100

ข-2 การเจือจางสารละลาย BSA มาตรฐานและค่า OD_{595} ที่ความเข้มข้นต่างๆ 103

ข-3 ปริมาณสารละลายต่างๆ ที่ต้องเติมในการเตรียม separating gel ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร 108

ข-4 ปริมาณสารละลายต่างๆ ที่ต้องเติมในการเตรียม stacking gel ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร 108
ข-5 พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานเอทานอล 112
ข-6 พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานกรดอะซิติก 113
ข-7 พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานซูโครส 114
ข-8 การเจือจางสารละลายกลูโคส 116
ค-1 การเทียบค่าการทำงานของปั๊มสำหรับการเติมแบบเอกซ์โพเนนเชียล 121
ค-2 อัตราการเติมสารอาหารและความเร็วในการทำงานของปั๊มที่ระยะเวลาต่างๆ ของการหมักแบบเฟด-แบทช์สำหรับการเติมแบบเอกซ์โพเนนเชียล 122
ค-3 การเทียบค่าการทำงานของปั๊มสำหรับการเติมแบบคงที่ 123
ค-4 อัตราการเติมสารอาหารและความเร็วในการทำงานของปั๊มที่ระยะเวลาต่างๆ ของการหมักแบบเฟด-แบทช์สำหรับการเติมแบบคงที่ 125
ค-5 ปริมาตรของอาหาร Syn6 Feed ที่ใช้การเติมแต่ละครั้ง 125
ง-1 การศึกษารูปแบบการเติบโตของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ที่อุณหภูมิ 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส ในฟลาสก์เขย่า 127
ง-2 การศึกษารูปแบบการเติบโตของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ระหว่างการเตรียมกล้าเชื้อขั้นที่ 1 ในอาหารเหลว YPD และกล้าเชื้อขั้นที่ 2 ในอาหารสังเคราะห์สูตร Syn6 127
ง-3 การเพาะเลี้ยงและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 4.0 128
ง-4 การเพาะเลี้ยงและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 5.0 128
ง-5 การเพาะเลี้ยงและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 6.0 129
ง-6 การเพาะเลี้ยงและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 6.5 129

ง-7 การเพาะเลี้ยงและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 130

ง-8 การเพาะเลี้ยงและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ที่พีเอช 6.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 130

ง-9 การเพาะเลี้ยงและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ที่พีเอช 6.0 อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส 131

ง-10 การเพาะเลี้ยงและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ที่พีเอช 6.0 อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส 131

ง-11 การเพาะเลี้ยงและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ที่พีเอช 6.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 132

ง-12 การเพาะเลี้ยงและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ที่พีเอช 6.0 อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส 132

ง-13 การเพาะเลี้ยงและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ที่พีเอช 6.0 และไม่มีการควบคุมอุณหภูมิระหว่างการเพาะเลี้ยง 133

ง-14 การเพาะเลี้ยงและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์โดยใช้อัตราการเติมสับสเทรตแบบเอกซ์โพเนนเชียล 134

ง-15 การเพาะเลี้ยงและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์โดยใช้อัตราการเติมสับสเทรตแบบคงที่ 135

ง-16 การเพาะเลี้ยงและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์โดยใช้อัตราการเติมสับสเทรตแบบครั้งคราว 136

ง-17 การเพาะเลี้ยงและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์โดยใช้ค่าออกซิเจนละลายเป็นตัวควบคุมการเติมสับสเทรต 139

ง-18 การเพาะเลี้ยงและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์โดยใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน 140

ง-19 การเพาะเลี้ยงและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์โดยใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และอาศัยค่าออกซิเจนละลายเป็นตัวควบคุมการเติมสับสเทรต 141

ง-20 การเพาะเลี้ยงและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* เมื่อมีการเพิ่มอุณหภูมิในระยะเฟด-แบทช์เท่ากับ 38 องศาเซลเซียส 142

ง-21 การเพาะเลี้ยงและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* เมื่อมีการเพิ่มอุณหภูมิในระยะเฟด-แบทช์เท่ากับ 40 องศาเซลเซียส 143

ง-22 การเพาะเลี้ยงและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* เมื่อมีการเพิ่มอุณหภูมิในระยะเฟด-แบทช์เท่ากับ 42 องศาเซลเซียส 144

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2-1 ลักษณะของยีสต์ *Ogataea thermomethanolica* 4

2-2 ระยะการเติบโตของจุลินทรีย์ในการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ 14

2-3 อิทธิพลของความเข้มข้นของสับสเทรตที่เหลืออยู่ต่ออัตราการเติบโตจำเพาะ 18

2-4 การทำงานของเอนไซม์ไฟเตสเพื่อปลดปล่อย inorganic phosphate รวมถึงไอออนของโลหะต่างๆที่จับอยู่กับ phytic acid 20

4-1 อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการเติบโตของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ในระดับฟลาสก์ 32

4-2 รูปแบบการเติบโตของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ระหว่างการเตรียมกล้าเชื้อขั้นที่ 1 ในอาหารเหลว YPD ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 33

4-3 รูปแบบการเติบโตของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ระหว่างการเตรียมกล้าเชื้อขั้นที่ 2 ในอาหารสังเคราะห์สูตร Syn6 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 34

4-4 อิทธิพลของพีเอชต่อรูปแบบการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* 35

4-5 อิทธิพลของค่าพีเอชต่อการเติบโตของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* 37

4-6 อิทธิพลของค่าพีเอชต่อการผลิตเอนไซม์ไฟเตสของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* 38

4-7 อิทธิพลของอุณหภูมิต่อรูปแบบการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* 41

4-8 อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการเติบโตของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* 42

4-9 อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์ไฟเตสของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* 44

4-10 รูปแบบการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* เมื่อไม่มีการควบคุมอุณหภูมิระหว่างการเพาะเลี้ยง 45

4-11 รูปแบบการเติบโต การผลิตเอนไซม์ไฟเตส และการสร้างผลิตภัณฑ์รองจากการเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์โดยใช้อัตราการเติมสับสเตรตแบบเอกซ์โพเนนเชียล 49

4-12 การติดตามเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica*
ด้วย กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์โดยใช้อัตราการเติมสับสเตรตแบบ
เอกซ์โพเนนเชียล 50
4-13 รูปแบบการเติบโต การผลิตเอนไซม์ไฟเตส และการสร้างผลิตภัณฑ์รองจากการเพาะ
เลี้ยงรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบ
เฟด-แบทช์โดยใช้อัตราการเติมแบบคงที่ 51
4-14 การติดตามเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica*
ด้วย กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์โดยใช้อัตราการเติมสับสเตรตแบบคงที่ 52
4-15 การเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ด้วยกระบวนการเพาะ
เลี้ยงแบบเฟด-แบทช์โดยใช้อัตราการเติมแบบครั้งคราว 54
4-16 การติดตามเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica*
ด้วย กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์โดยใช้อัตราการเติมสับสเตรตแบบครั้งคราว 55
4-17 การเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* เพื่อผลิตเอนไซม์ไฟเตส
โดยใช้กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์โดยใช้อัตราการเติมสับสเทรตแบบ
เอกซ์โพเนนเชียลแบบคงที่ และแบบครั้งคราว 57
4-18 การเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. Thermomethanolica* ด้วยกระบวนการเพาะ
เลี้ยงแบบเฟด-แบทช์โดยอาศัยค่าออกซิเจนละลายเป็นตัวควบคุมการเติมสับสเทรต 60
4-19 การติดตามเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ด้วย
กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์โดยอาศัยค่าออกซิเจนละลายเป็นตัวควบคุม
การเติมสับสเทรต 62
4-20 รูปแบบการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสของรีคอมบิแนนท์ยีสต์
O. thermomethanolica เมื่อใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน 63
4-21 รูปแบบการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O.
thermomethanolica* ในกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์เมื่อใช้กลูโคส
และซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน 64
4-22 รูปแบบการเติบโต การผลิตเอนไซม์ไฟเตส และการสร้างผลิตภัณฑ์รองจากการ
เพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* โดยใช้ซูโครสเป็นแหล่ง
คาร์บอนด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์โดยอาศัยค่าออกซิเจนละลาย
เป็นตัวควบคุมการเติมสับสเทรต 66

4-23 การติดตามเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* จากกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์โดยใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน 66

4-24 รูปแบบการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสจากการเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในระยะเฟด-แบทช์เท่ากับ 38 องศาเซลเซียส 71

4-25 การติดตามเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* เมื่อมีการเพิ่มอุณหภูมิในระยะเฟด-แบทช์เท่ากับ 38 องศาเซลเซียส 71

4-26 รูปแบบการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสจากการเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในระยะเฟด-แบทช์เท่ากับ 40 องศาเซลเซียส 73

4-27 การติดตามเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* เมื่อมีการเพิ่มอุณหภูมิในระยะเฟด-แบทช์เท่ากับ 40 องศาเซลเซียส 73

4-28 รูปแบบการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสจากการเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในระยะเฟด-แบทช์เท่ากับ 42 องศาเซลเซียส 75

4-29 การติดตามเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* เมื่อมีการเพิ่มอุณหภูมิในระยะเฟด-แบทช์เท่ากับ 42 องศาเซลเซียส 75

4-30 อิทธิพลของการเพิ่มอุณหภูมิในระยะเฟด-แบทช์ต่อการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตส 78

ข-1 ตัวอย่างกราฟมาตรฐาน KH_2PO_4 101

ข-2 ตัวอย่างกราฟมาตรฐาน BSA 103

ข-3 ตัวอย่างกราฟมาตรฐานเอทานอล 113

ข-4 ตัวอย่างกราฟมาตรฐานกรดอะซิติก 114

ข-5 ตัวอย่างกราฟมาตรฐานซูโครส 115

ข-6 ตัวอย่างกราฟมาตรฐานกลูโคส 117

ค-1 การวางขวดสารละลายบนเครื่องชั่งเมื่อทำการเทียบค่าการทำงานของปั๊ม 120

ค-2 กราฟมาตรฐานในการเติมอาหารสำหรับการเติมแบบเอกซ์โพเนนเชียล 122

ค-3 กราฟมาตรฐานในการเติมอาหารสำหรับการเติมแบบคงที่ 124

รายการสัญลักษณ์และคำย่อ

สัญลักษณ์/คำย่อ	คำเต็ม/คำจำกัดความ
X_0	ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)
X	ความเข้มข้นของเซลล์ (กรัมต่อลิตร)
S_0	ความเข้มข้นของสับสเทรตเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)
S	ความเข้มข้นของสับสเทรต (กรัมต่อลิตร)
P_0	ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์เริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)
P	ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ (กรัมต่อลิตร)
μ	อัตราการเติบโตจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)
μ_{max}	อัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุด (ต่อชั่วโมง)
$Y_{x/s}$	ผลได้ของเซลล์จากสับสเทรต (กรัม$_{\text{เซลล์}}$ต่อกรัม$_{\text{สับสเทรต}}$)
$Y_{p/s}$	ผลได้ของผลิตภัณฑ์จากสับสเทรต (หน่วยต่อกรัม$_{\text{สับสเทรต}}$)
$Y_{p/x}$	ผลได้ของผลิตภัณฑ์จากเซลล์ (หน่วยต่อกรัม$_{\text{เซลล์}}$)
q_s	อัตราการใช้สับสเทรตจำเพาะ (กรัมต่อกรัม.ชั่วโมง)
Q_p	อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์เชิงปริมาตร (หน่วยต่อลิตร.ชั่วโมง)
t_d	ระยะเวลาที่ใช้ในการแบ่งเซลล์เพิ่มเป็นสองเท่า (ชั่วโมง)
t	เวลาของการเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)
C_S^F	ความเข้มข้นของสับสเทรตที่ใช้เติม (กรัมต่อลิตร)
F_0	อัตราการเติมสับสเทรตเริ่มต้น (ลิตรต่อชั่วโมง)
F	อัตราการเติมสับสเทรตที่เวลาต่างๆ (ลิตรต่อชั่วโมง)
V	ปริมาตรของน้ำหมัก (ลิตร)
GAP	กลีเซอลรอลดีไฮทด์-3-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส
AOX	แอลกอฮอล์ออกซิเดส
DO stat	การควบคุมการเติมสับสเทรตโดยอาศัยค่าออกซิเจน
vvm	ลิตรของอากาศต่อลิตรของอาหาร.นาที

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันมีความต้องการใช้โปรตีนในหลายหน่วยงาน เช่น ใช้ในการวิจัย การเกษตร การแพทย์ งานทางด้านสิ่งแวดล้อม และอุตสาหกกรม ซึ่งโปรตีนที่ใช้อาจอยู่ในรูปแบบต่างๆ เช่น เอนไซม์ แอนติเจน และแอนติบอดี เป็นต้น ทั้งนี้แนวโน้มความต้องการใช้โปรตีนมีสูงขึ้นทั้งในแง่ของปริมาณและชนิดของโปรตีน ทำให้งานวิจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับเทคโนโลยีการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนและการพัฒนาการผลิตได้รับความสนใจเพิ่มขึ้นตามไปด้วย ซึ่งระบบการแสดงออกของรีคอม-บิแนนท์โปรตีนในยีสต์ เช่น *Saccharomyces cerevisiae* และ *Pichia pastoris* เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพสูง และสามารถดำเนินการได้ง่าย (Higgins and cregg, 1998; Böer *et al*., 2007) โดยได้มีการรายงานว่าการใช้ยีสต์ *P. pastoris* เพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนร่วมกับการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพสามารถผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนได้ในปริมาณสูงและมีประสิทธิภาพ (Macauuley-Patrick *et al*., 2005; Higgins and Cregg, 1998) อย่างไรก็ตาม ยีสต์สายพันธุ์เหล่านี้อาจไม่เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้จริงในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเติบโตของยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ ดังกล่าวอยู่ในระดับที่ไม่สูง (25-30 องศาเซลเซียส) ทำให้มีค่าใช้จ่ายในระบบหล่อเย็นที่สูงมากเมื่อมีการผลิตในระดับอุตสาหกรรม นอกจากนี้ การนำยีสต์สายพันธุ์การค้ามาใช้ในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนจะต้องเสียค่าใช้จ่ายที่สูงมากในการรับสิทธิจากต่างประเทศ (license) ดังนั้น การพัฒนายีสต์ทนร้อนสายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตรี - คอมบิแนนท์โปรตีนจึงเป็นทางเลือกหนึ่งเพื่อนำไปใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนในภาคอุตสาหกรรมภายในประเทศ

ยีสต์ทนร้อน *Ogataea thermomethanolica* หรือ *Pichia thermomethanolica* BCC16875 เป็นยีสต์สายพันธุ์ใหม่ที่มีความสามารถในการใช้เมทานอล และแยกได้ภายในประเทศ (Limtong *et al*., 2005, 2008) ซึ่งงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า ยีสต์ชนิดนี้มีศักยภาพในการนำมาเป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน กล่าวคือ สามารถผลิตเอนไซม์ไฟเตสลูกผสมในระดับฟลาสก์ด้วยโปรโมเตอร์แบบแสดงออกตลอดเวลา (*OthGAP*) ได้ในช่วงอุณหภูมิกว้าง ประมาณ 30-42 องศาเซลเซียส (Harnpicharnchai *et al*., 2014) และเมื่อใช้โปรโมเตอร์แบบ ชักนำ (*OthAOX*) สามารถแสดงออกได้ในช่วงอุณหภูมิ 30-45 องศาเซลเซียส (Promdonkoy *et al*., 2014)

ในระยะแรกของการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดยใช้ยีสต์เป็นเซลล์เจ้าบ้าน เช่น *Hansenula polymorpha, Canida boidinii* หรือ *P. pastoris* จะใช้ระบบการแสดงออกแบบชักนำในการผลิต (inducible expression system) ซึ่งโปรโมเตอร์ที่ใช้จะถูก ชักนำด้วยเมทานอล ได้แก่ โปรโมเตอร์ *MOX* ใน *H. polymorpha* โปรโมเตอร์ *AOD1* ใน *C. boidinii* และโปรโมเตอร์ *AOX1* ใน *P. pastoris* อย่างไรก็ตาม แม้ว่าการใช้โปรโมเตอร์นี้จะมีประสิทธิภาพและข้อดีหลายประการ แต่ในขณะเดียวกันก็มีข้อเสียเช่นเดียวกัน ได้แก่ เมทานอลเป็นสารที่มีอันตราย ติดไฟได้ง่าย มีความเป็นพิษสูงซึ่งไม่เหมาะต่อการผลิตโปรตีนเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและการแพทย์ ในกระบวนการเพาะเลี้ยงต้องการแหล่งคาร์บอนมากกว่าหนึ่งชนิดเพื่อใช้ในการเติบโตและการผลิตทำให้เกิดความยุ่งยากในการเพาะเลี้ยง ภายใต้ความหนาแน่นของเซลล์สูงจะมีความต้องการออกซิเจนปริมาณมาก อาจต้องมีการเติมออกซิเจนบริสุทธิ์เข้าสู่กระบวนการเพาะเลี้ยงส่งผลให้ต้นทุนในการผลิตสูงขึ้น และการวัดความเข้มข้นของเมทานอลในระหว่างการเพาะเลี้ยง (on-line) ทำได้ยากและต้องอาศัยเครื่องมือเฉพาะ จากข้อจำกัดของโปรโมเตอร์นี้ทำให้มีการพัฒนาโปรโมเตอร์ *GAP* ซึ่งเป็นโปรโมเตอร์ที่แสดงออกตลอดเวลา (constitutive expression) ในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน (Waterham *et al.*, 1997) จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่ายีสต์ทนร้อน *O. thermomethanolica* และโปรโมเตอร์ *OthGAP* น่าจะสามารถนำไปใช้ในการผลิตระดับอุตสาหกรรมได้ อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันยังขาดองค์ความรู้ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดยยีสต์สายพันธุ์นี้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ รวมถึงการผลิตในระดับฟลาสก์มีข้อจำกัดหลายประการประกอบกับการได้ผลผลิตในระดับต่ำ ดังนั้น เพื่อเป็นการเพิ่มศักยภาพในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนในระดับใหญ่โดยยีสต์สายพันธุ์นี้ และเพื่อให้มีกระบวนการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมสำหรับรองรับระบบการแสดงออกภายใต้ระบบโปรโมเตอร์แบบแสดงออกตลอดเวลา งานวิจัยนี้จึงวางแผน ในการศึกษาปัจจัยพื้นฐานที่เกี่ยวข้องกับการเติบโตและการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนในการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ และทำการพัฒนากระบวนการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วยระบบการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ ซึ่งผู้วิจัยคาดหวังว่าจะได้กระบวนการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนจากยีสต์ทนร้อนที่มีประสิทธิภาพสูง เพื่อลดค่าใช้จ่ายในแง่พลังงานที่ต้องใช้ในระบบทำความเย็น

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาอิทธิพลของพีเอชและอุณหภูมิต่อการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสโดยยีสต์ทนร้อน *O. thermomethanolica*

2. เพื่อพัฒนาวิธีการเติมสับสเทรตในกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ เพื่อเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์ เพิ่มความเข้มข้นของผลผลิต และลดการสร้างผลพลอยได้ในรูปของเอทานอล

3. เพื่อพัฒนากระบวนการเพาะเลี้ยงยีสต์ทนร้อน *O. thermomethanolica* เพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน โดยใช้แหล่งคาร์บอนราคาถูก

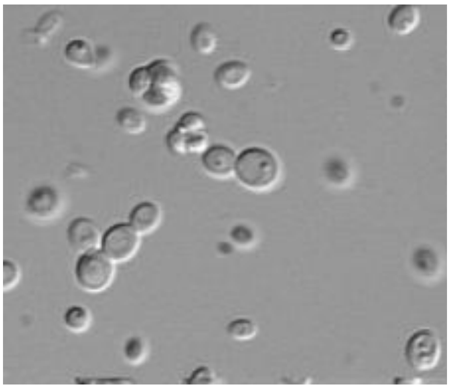
4. เพื่อศึกษาอิทธิพลของการเพิ่มอุณหภูมิในระยะเฟด-แบทช์ต่อการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตส

บทที่ 2
วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 *Ogataea thermomethanolica*

O. thermomethanolica (ภาพที่ 2-1) มีการจัดหมวดหมู่ดังตารางที่ 2-1 ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตจำพวกยูคาริโอต มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว (unicellular) ที่มีความสามารถในการใช้เมทานอลเป็นแหล่งของคาร์บอนและแหล่งพลังงาน (methylotrophic yeast) โดยยีสต์เหล่านี้มีโปรโมเตอร์ *AOX* ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีน *AOX* ในการสร้างเอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเด ส (alcohol oxidase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกระบวนการเมตาบอลิซึมของเมทานอล (Duoma *et al*., 1985) โดย *O. thermomethanolica* เป็นยีสต์ที่สามารถทนต่ออุณหภูมิสูง (ประมาณ 40 องศาเซลเซียส) และถูกค้นพบในประเทศไทย (Limtong *et al*., 2005, 2008)

<u>ภาพที่ 2-1</u>
ลักษณะของยีสต์ *O. thermomethanolica*



ที่มา : Limtong *et al*. (2005)

ตารางที่ 2-1

การจัดจำแนก *O. thermomethanolica*

Kingdom	Fungi
Division	Ascomycota
Class	Saccharomycetes
Order	Saccharomycetales
Family	Pichiaceae
Genus	*Ogataea*
Species	*Ogataea thermomethanolica*

ที่มา : http://eol.org/pages/11938828/names

ในปี ค.ศ. 2014 Harnpicharnchai และคณะ ได้ศึกษาการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนจากยีสต์ *O. thermomethanolica* ภายใต้การควบคุมการแสดงออกตลอดเวลาด้วยโปรโมเตอร์ *OthGAP* ในระดับฟลาสก์พบว่า ยีสต์ชนิดนี้สามารถเติบโตและผลิต รีคอมบิแนนท์โปรตีน ได้ในช่วงอุณหภูมิกว้าง (30-42 องศาเซลเซียส) สอดคล้องกับการรายงานของ Promdonkoy และคณะ (2014) ที่ได้ทำการศึกษาการผลิต รีคอมบิแนนท์โปรตีนจากยีสต์ *O. thermomethanolica* ภายใต้การควบคุมการแสดงออกแบบเหนี่ยวนำด้วยโปรโมเตอร์ *OthAOX* ในระดับฟลาสก์พบว่า เซลล์สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนได้ในช่วงอุณหภูมิ 30-45 องศาเซลเซียส จากข้อมูลข้างต้น หากนำระบบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ยีนโดยยีสต์ *O. thermomethanolica* ไปประยุกต์ในระดับอุตสาหกรรมน่าจะสามารถลดต้นทุนในการผลิตในแง่พลังงานที่ใช้สำหรับเครื่องทำความเย็น และน่าจะสามารถลดปัญหาเกี่ยวกับการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ ยิ่งไปกว่านั้นยังสามารถควบคุมให้เซลล์ปลดปล่อยผลิตภัณฑ์ออกสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ โดยอาศัยสื่อสัญญาณปลดปล่อย (secretion signal) ทำให้ง่ายในต่อการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้ยังพบว่า ยีสต์ชนิดนี้มีกลไกที่สำคัญต่อการสังเคราะห์ยูคาริโอติคโปรตีน (eukaryotic protein) รวมทั้งเมื่อเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงและระบบการถ่ายยีน พบว่าการทำงานในระบบยีสต์มีความง่ายและซับซ้อนน้อยกว่าระบบการแสดงออกโดยเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และ/หรือ แบคคิวโลไวรัส เซลล์แมลง ดังนั้นการใช้ *O. thermomethanolica* เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจและมีแนวโน้มในการพัฒนาไปสู่การใช้งานจริงได้

2.2 ระบบควบคุมการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ยีนโดยยีสต์ *O. thermomethanolica*

ระบบควบคุมการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ยีนโดยยีสต์ *O. thermomethanolica* สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ระบบ คือ ระบบการควบคุมแบบชักนำ (inducible expression system) และระบบควบคุมการแสดงออกตลอดเวลา (constitutive expression system) ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

2.2.1 ระบบการควบคุมแบบชักนำ

ระบบควบคุมการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ยีนแบบชักนำที่ใช้กันมากจะอาศัยการทำงานของโปรโมเตอร์ *AOX* ซึ่งโดยปกติแล้วจะทำหน้าที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์ชนิดแรกในวิถีเมทา-นอลเมทาบอลิซึม ซึ่งข้อดีของระบบนี้คือ สามารถกำหนดเวลาการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ยีนได้ ซึ่งมีความเหมาะสมสำหรับใช้ควบคุมการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่เป็นพิษต่อเซลล์เจ้าบ้าน โดยเริ่มจากการเพาะเลี้ยงยีสต์จนมีความหนาแน่นของเซลล์สูงในอาหารที่กดการแสดงออกของยีน จากนั้นจึงเหนี่ยวนำให้มีการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน อย่างไรก็ตาม จากการรายงานของ Promdonkoy และคณะ (2014) ที่ได้ศึกษาการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนจากยีสต์ *O. thermomethanolica* ภายใต้โปรโมเตอร์ *OthAOX* พบว่า การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนสามารถเกิดขึ้นได้ก่อนระยะชักนำและสามารถแสดงออกได้แม้อุณหภูมิจะสูงถึง 45 องศาเซลเซียส ซึ่งให้ผลแตกต่างจาก การแสดงของรีคอมบิแนนท์โปรตีนภายใต้โปรโมเตอร์ *AOX* ของยีสต์ *Pichia pastoris* ที่ระบุว่า หากอุณหภูมิสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส โปรโมเตอร์จะไม่สามารถทำงานได้ (Tanapongpipat *et al*., 2012) ทั้งนี้การใช้โปรโมเตอร์ *AOX* เพื่อควบคุมการแสดงออกของรีคอม-บิแนนท์โปรตีนก็มีข้อเสียอยู่เช่นกันนั่นคือ

1. เมทานอลเป็นสารที่มีอันตราย ติดไฟได้ง่าย มีความเป็นพิษสูงซึ่งไม่เหมาะต่อการผลิตโปรตีนเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและการแพทย์
2. ในกระบวนการเพาะเลี้ยงต้องการแหล่งคาร์บอนมากกว่าหนึ่งชนิดเพื่อใช้ในการเติบโตและการผลิตทำให้เกิดความยุ่งยากในการเพาะเลี้ยง นอกจากนี้ ภายใต้ความหนาแน่นของเซลล์สูงจะมีความต้องการออกซิเจนปริมาณมาก อาจต้องมีการเติมออกซิเจนบริสุทธิ์เข้าสู่กระบวนการเพาะเลี้ยงส่งผลให้ต้นทุนในการผลิตสูงขึ้น
3. การวัดความเข้มข้นของเมทานอลในระหว่างการเพาะเลี้ยง (on-line) ทำได้ยากและต้องอาศัยเครื่องมือเฉพาะ (Macauley-Patrick *et al*., 2005; Bollok *et al*., 2009)

2.2.2 ระบบควบคุมการแสดงตลอดเวลา

การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ยีนจากโปรโมเตอร์ในกลุ่มนี้จะแสดงออกอย่างต่อเนื่องตลอดเวลาเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสมซึ่งโปรโมเตอร์ที่นิยมใช้คือ โปรโมเตอร์ *GAP* โดยจะควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในวิถีไกลโคไลซิส (glycolysis pathway) โดยจะเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันและการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ glyceraldehyde-3-phosphate ร่วมกับ Pi และ NAD^+ ได้ผลิตภัณฑ์คือ 1,3-bisphosphoglycerate จากการรายงานของ Waterham และคณะ (1993) และ Zhang และคณะ (2009) พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ถูกควบคุมโดยโปรโมเตอร์ *GAP* ซึ่งเป็นโปรโมเตอร์ที่สามารถแสดงออกในระดับสูง (strong constitutive promoter) และแสดงออกได้มากเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้ในยีสต์ *P. pastoris* และ *H. polymorpha* มีการรายงานถึงประสิทธิภาพที่ดีกว่าของการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ถูกควบคุมโดยโปรโมเตอร์ *GAP* เมื่อเปรียบเทียบกับโปรโมเตอร์ *AOX1* เช่น การแสดงออกของ carboxyl esterase ภายใต้โปรโมเตอร์ *GAP* จะได้ผลิตภัณฑ์มากกว่าการควบคุมการแสดงออกโดยโปรโมเตอร์ *AOX1* ประมาณ 2 เท่า (Delroisse *et al.*, 2005) การผลิต peptide transporter ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ *GAP* จะได้ผลิตภัณฑ์มากกว่าการควบคุมการแสดงออกโดยโปรโมเตอร์ *AOX1* ประมาณ 5 เท่า (Doring *et al.*, 1998) รวมถึงการผลิต human serum albumin ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ *GAP* ส่งผลให้อัตราการผลิตจำเพาะสูงกว่าการควบคุมการแสดงออกโดยโปรโมเตอร์ *MOX* (Heo *et al.,* 2003) ซึ่งข้อดีของระบบนี้คือ การแสดงออกของผลิตภัณฑ์จะเกิดขึ้นตั้งแต่เริ่มกระบวนการเพาะเลี้ยง การควบคุมกระบวนการเพาะเลี้ยงทำได้ง่ายเนื่องจากแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการเติบโตและการผลิตส่วนใหญ่เป็นชนิดเดียวกัน รวมถึงระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงจะสั้นกว่าระบบที่มีการเหนี่ยวนำประมาณ 2.7 เท่า (Menendez *et al.*, 2004; Heo *et al.,* 2003) ทำให้เป็นการลดพลังงานที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงด้วย

2.3 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน

การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนให้ได้ปริมาณมากและมีคุณภาพนั้นขึ้นกับหลายปัจจัย ได้แก่ สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิต อาหารเลี้ยงเชื้อ ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและพลังงาน รวมถึงสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงและการผลิตด้วย ทั้งนี้ เนื่องจากระบบการแสดงออกของรีคอม-บิแนนท์โปรตีนโดยยีสต์ *O. thermomethanolica* เป็นระบบใหม่ ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับระบบการแสดงออกโดยระบบนี้จึงมีอยู่อย่างจำกัดดังนั้น ข้อมูลที่อ้างอิงในส่วนนี้จึงอ้างอิงจากปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดยยีสต์ *P. pastoris*

2.3.1 สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้าน

ในงานวิจัยนี้เลือกใช้ยีสต์ *O. thermomethanolica* ที่มีการแสดงออกของยีน ไฟเตส จากเชื้อรา *Aspergillus niger* BCC18081 ภายใต้การควบคุมการแสดงออกโดยโปรโมเตอร์ *GAP* ของตัวเอง (*OthGAP*) จากการรายงานก่อนหน้านี้พบว่า ยีสต์ดังกล่าวสามารถผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนได้แม้จะทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิสูงถึง 40 องศาเซลเซียส ซึ่งโปรตีนที่ได้มีการไกลโคซิเลตทำให้โปรตีนมีความเสถียร (Tanapongpipat *et al*., 2012; Harnpicharnchai *et al*., 2014) ดังนั้นจึงมีความเหมาะสมอย่างยิ่งที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตโปรตีนทนร้อนในระดับอุตสาหกรรมเพื่อเป็นการลดต้นทุนในแง่ของพลังงานที่ต้องใช้ในระบบหล่อเย็น

2.3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงยีสต์สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

(1) อาหารสังเคราะห์

อาหารสังเคราะห์ (synthetic medium) เป็นอาหารที่ทราบองค์ประกอบแน่นอนโดยส่วนประกอบหลักจะเป็นเกลือต่างๆและวิตามิน ซึ่งมีข้อดีคือ เป็นอาหารที่มีราคาถูก เก็บเกี่ยวและทำให้ผลิตภัณฑ์บริสุทธิ์ได้ง่ายเนื่องจากในอาหารไม่มีโปรตีนอื่นเป็นองค์ประกอบ (Bruschi *et al*., 2014) อย่างไรก็ตาม เนื่องจากอาหารชนิดนี้มีความเข้มข้นของเกลือค่อนข้างสูงทำให้เป็นอุปสรรคต่อการทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความบริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (Charoenrat *et al*., 2006) ประกอบกับการที่อาหารมีความเข้มข้นของเกลือสูง (ค่าการนำไฟฟ้าประมาณ 40 มิลลิ-ซีเมนต์ต่อเซนติเมตร) ทำให้ค่าร้อยละการตายของเซลล์สูงกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือต่ำ (ค่าการนำไฟฟ้าประมาณ 10 มิลลิซีเมนต์ต่อเซนติเมตร) รวมทั้งการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ด้วยโครมาโตกราฟีแบบดูดซับชนิดฐานขยาย (expended-bed adsorption) จะทำได้ยากกว่า (Jahic *et al*., 2006) ตัวอย่างอาหารในกลุ่มนี้ที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยง *P. pastoris* ในถังหมักคือ อาหารสูตร Basal salts หรืออาหาร BS (Wegner, 1983) และอาหารสูตร FM22 (Stratton *et al*., 1998) เนื่องจากให้ความหนาแน่นของเซลล์สูงกว่า 100 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้พบว่าในการเพาะเลี้ยงยีสต์ *H. polymorpha* เพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนนิยมใช้อาหารสังเคราะห์เช่นเดียวกัน โดยอาหารที่นิยมใช้คือ อาหาร Syn6 (Syn6 medium) (Stockmann *et al*., 2003; Eilert *et al*., 2012)

กรณีที่สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นสายพันธุ์ auxotroph ต่อสารอาหารชนิดใด จะมีความจำเป็นต้องเติมสารอาหารนั้นเพิ่มเข้าไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น *P. pastoris* ที่ทำมิวเตชันที่ยีน hitidinol dehydrogenase ทำให้ไม่สามารถผลิตกรดอะมิโนโนฮีสทิดีนได้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการ

เติมกรดอะมิโนฮีสทิดีนลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งปริมาณของกรดอะมิโนฮีสทิดีนที่ Goodrick และคณะ (2001) ใช้สำหรับสายพันธุ์ที่ไม่สามารถผลิตกรดอะมิโนฮิสทิดีนคือ 2 กรัมต่อลิตร

(2) Enrich medium

อาหารในกลุ่มนี้เป็นอาหารไม่ทราบองค์ประกอบที่แน่นอนส่วนประกอบที่สำคัญของอาหารในกลุ่มนี้ได้แก่ ยีสต์สกัดเปปโตนและแหล่งคาร์บอน อาหารในกลุ่มนี้นิยมใช้ในการเก็บรักษาสายพันธุ์ การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้นและการเพาะเลี้ยงในระบบที่ไม่สามารถควบคุมพีเอชได้ เช่น ในหลอดหรือฟลาสก์เขย่าแต่ไม่นิยมใช้เพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เนื่องจากเป็นอาหารที่มีราคาสูง

สำหรับงานวิจัยนี้เลือกใช้อาหารสังเคราะห์ชนิด Syn6 (Stockmann *et al*., 2003) เนื่องจากในการศึกษาขั้นต้นพบว่ายีสต์ *O. thermomethanolica* เติบโตช้ามาก เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BS และ FM22 ในขณะที่เมื่อใช้อาหาร Syn6 จะให้ค่าอัตราการเติบโตสูง ผลได้ของเซลล์สูงและช่วงเวลาปรับตัวสั้น

2.3.3 อิทธิพลของพีเอช

พีเอชมีอิทธิพลต่อการเติบโต การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน และความเสถียรของรีคอมบิแนนท์โปรตีน ตัวอย่างเช่น *P. pastoris* สามารถเติบโตได้ในช่วงพีเอชระหว่าง 3-7 โดยการเพาะเลี้ยงในช่วงดังกล่าวทำให้อัตราการเติบโตต่างกันเล็กน้อย อย่างไรก็ตาม พีเอชที่เหมาะสมต่อการเติบโตที่สุดคือ พีเอช 5.0 (Wegner, 1983)

นอกจากนี้ความสำเร็จในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนทั้งในด้านอัตราการผลิตคุณภาพและกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสก็ขึ้นอยู่กับพีเอชด้วยเช่นกัน (Chiruvolue *et al*., 1998; Charoenrat *et al*., 2013) การเปลี่ยนพีเอชในระยะการเพาะเลี้ยงเพื่อการเติบโตและระยะการผลิตเป็นเทคนิคที่ใช้กันมากเพื่อหาพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน (Clare *et al*., 1991; Sreekrishna *et al*., 1997; Inan *et al*., 1999) โดย Jahic และคณะ (2003) ได้รายงานว่าการเปลี่ยนพีเอชจากพีเอช 5.0 เป็นพีเอช 4.0 ทำให้การผลิตและความเสถียรของฟิวชันโปรตีน CBM-CALB (cellulose-binding module *Candida antarctica* lipase B) เพิ่มขึ้น 90 เปอร์เซ็นต์

2.3.4 อิทธิพลของอุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลกระทบต่อการผลิตรีคอมบิแนนท์โดยอุณหภูมิมีผลต่อการเสื่อมสลาย (degradation) ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน โดยจากรายงานการวิจัยพบว่า การลดอุณหภูมิสามารถทำให้อัตราการเกิดโปรติไลซิส (proteolysis) ลดลง เนื่องจากเอนไซม์โปรติเอสลดลง (Li *et*

al., 2001; Hong *et al*., 2002) นอกจากนี้ อุณหภูมิสูงอาจมีผลทำให้โครงสร้างของรีคอมบิแนนท์โปรตีนมีการม้วนพับที่ไม่ถูกต้อง (protein misfolding) ทั้งนี้ อาจเป็นผลเนื่องจากการถูกทำลายที่อุณหภูมิสูงโดยตรงหรือที่อุณหภูมิสูงขึ้นส่งผลให้อัตราการสังเคราะห์โปรตีนสูงขึ้น ในขณะที่อัตราการม้วนพับเพื่อให้ได้โครงสร้างโปรตีนที่สมบูรณ์เป็นปัจจัยที่จำกัด ซึ่งโปรตีนที่มีการม้วนพับไม่ถูกต้องจะถูกจดจำให้เกิดการย่อยสลายโดยเอนไซม์โปรติเอสของเซลล์เจ้าบ้าน

ในปี 1999 Cassland และ Jönsson ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ laccase โดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* และ *P. pastoris* เป็นเซลล์เจ้าบ้านโดยในส่วนของ *P. pastoris* ได้ศึกษาการแสดงออกของ laccase ภายใต้การควบคุมการแสดงออกของโปรโมเตอร์ *AOX1* และพบว่าการลดอุณหภูมิจาก 28 เป็น 19 องศาเซลเซียส ส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ laccase เพิ่มขึ้น 16 เท่าสอดคล้องกับรายงานของ Jahic และคณะ (2003) ที่ทำการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตฟิวชันโปรตีน CBM-CALB พบว่า เมื่อลดอุณหภูมิในระยะการผลิตจาก 30 องศาเซลเซียส เป็น 22 องศาเซลเซียส ทำให้การเกิดโปรติโอไลซิสลดลง จากข้อมูลเหล่านี้เป็นการยืนยันว่าการลดอุณหภูมิระหว่างกระบวนการผลิตสามารถเพิ่มผลได้ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน เนื่องจากอัตราการเกิดโปรติโอไลซิสลดลง สอดคล้องกับการรายงานของ Zhong และคณะ (2014) ที่กล่าวว่า การเพิ่มอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง *P. pastoris* จาก 20 เป็น 30 องศาเซลเซียส ส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์และการผลิต human interleukin-10 ลดลง อย่างไรก็ตาม ระดับการแสดงออกของยีนภายใต้โปรโมเตอร์แต่ละชนิดมีระดับที่ต่างกันในแต่ละอุณหภูมิด้วย (Amuel *et al*., 2000; Romano *et al*., 2004) เช่น อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิต human serum albumin จากยีสต์ทนร้อน *Kluyveromyces marxianus* คือ 15 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิต glucoamylase จากยีสต์ทนร้อน *Kluyveromyces marxianus* คือ 40 องศาเซลเซียส (Raimondi *et al*., 2013) นอกจากนี้ อุณหภูมิ มีผลต่อความสามารถในการละลายของออกซิเจนในของเหลว โดยเมื่ออุณหภูมิต่ำลง ความสามารถในการละลายของออกซิเจนและอัตราการถ่ายเทมวลออกซิเจนจะสูงขึ้น (Vogelaar *et al*., 2000)

2.3.5 อิทธิพลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและพลังงาน

อิทธิพลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและพลังงาน สามารถแบ่งออกตามโปรโม - เตอร์ที่ใช้ควบคุมการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ยีนได้เป็น 2 กรณีคือ อิทธิพลของความเข้มข้นของกลูโคสต่อการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ *GAP* และภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ *AOX1* ซึ่งในส่วนนี้ขอกล่าวเฉพาะอิทธิพลของความเข้มข้นของกลูโคสต่อการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ *GAP* เท่านั้น เนื่องจากในงานวิจัยนี้เลือกใช้โปรโมเตอร์ *GAP*

จากการรายงานก่อนหน้าพบว่าในระบบที่ใช้โปรโมเตอร์ *GAP* จะมีการแสดงออกได้สูงเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (Waterham *et al*., 1997) โดยกลูโคสเป็นน้ำตาลที่ยีสต์สามารถนำไปใช้ในกระบวนการหมัก (fermentable sugar) และทำให้เกิด Crabtree effect ในยีสต์ที่เป็น Crabtree-positive เช่น *S. cerevisiae* นั่นคือ เมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ชนิดนี้ในสภาวะที่มีอากาศและใช้กลูโคสที่ความเข้มข้นสูงเป็นแหล่งคาร์บอน (ประมาณ 100-200 มิลลิกรัมต่อลิตร) ก็สามารถเกิดการหมักได้ (Fermentative metabolism) (Verduyn *et al*., 1984; Woehrer and Roehr, 1981; Rao *et al*., 1998) และผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นคือ เอทานอล ซึ่งจัดเป็นผลิตภัณฑ์รอง (by-product) ที่ไม่ต้องการเนื่องจากจะส่งผลยับยั้งการเติบโตและทำให้ผลิตภัณฑ์หลักของเซลล์ลดลง (Kalina, 1993) สำหรับยีสต์ที่เป็น Crabtree-negative จะสร้างผลิตภัณฑ์รองได้น้อยถึงแม้จะใช้กลูโคสที่ความเข้มข้นสูงก็ตาม นั่นคือสามารถสร้างเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพในสภาวะที่มีอากาศ โดยในปัจจุบันยังไม่มีการรายงานเกี่ยวกับการผลิตเอทานอลในรูปของผลิตภัณฑ์รองจาก *O. thermomethanolica* อย่างไรก็ตาม พบว่ายีสต์ Methylotrophic ชนิดอื่น ได้แก่ *H. polymorpha* และ *P. pastoris* สามารถสังเคราะห์เอทานอลและอะซิเตทเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (Inan and Meagher, 2001; Jeude *et al*., 2006) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้สูงที่ *O. thermomethanolica* จะผลิตเอ-ทานอลได้ในระหว่างกระบวนการเพาะเลี้ยง ทำให้งานวิจัยนี้เลือกศึกษารูปแบบการเติมสับสเทรตในระยะเฟด-แบทช์เพื่อหากระบวนการที่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์รองในรูปเอทานอลต่ำที่สุด รวมทั้งศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยง *O. thermomethanolica* เพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ไฟเตส แทนการใช้น้ำตาลกลูโคส เนื่องจากน้ำตาลซูโครสมีราคาถูกและสามารถหาได้ง่ายในท้องตลาด จากการรายงานก่อนหน้าพบว่า *S. cerevisiae* สามารถใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ ดังนั้น จึงมีการนำน้ำตาลซูโครสมาใช้ในการผลิตเอทานอลเพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิต (Stambuk *et al*., 2000; Basso *et al*., 2011) นอกจากนี้ น้ำตาลซูโครสเป็นน้ำตาลอีกชนิดหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดย *H. polymorpha* ด้วยเช่นกัน (Krasovska *et al*., 2007)

2.3.6 อิทธิพลของค่าออกซิเจนละลายและอัตราการใช้ออกซิเจน

ค่าออกซิเจนละลายเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่ส่งผลต่อการเติบโตและการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน ในปี ค.ศ. 2002 Jahic และคณะ ได้รายงานถึงผลเสียในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนจาก *P. pastoris* ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ *AOX* อันเนื่องมาจากสภาวะจำกัดออกซิเจนว่าอาจทำให้เกิดการสะสมเมทานอลในระบบ และเมทาบอลิซึมของเมทานอลเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ส่งผลให้เกิดการสะสมฟอร์มาลดีไฮด์ไว้ภายในเซลล์ โดยทั้งเมทานอลและฟอร์มาลดีไฮด์นั้นมีความเป็นพิษต่อเซลล์หากมีความเข้มข้นที่มากเกิน ซึ่งสนับสนุนโดยรายงานของ Bushell และคณะ (2003) ที่กล่าวว่า ใน

กระบวนการผลิต human serum albumin อัตราการสร้างผลผลิตจำเพาะเป็นค่าที่ขึ้นกับค่าออกซิเจนละลาย ซึ่งหากกระบวนการเพาะเลี้ยงควบคุมค่าออกซิเจนละลายต่ำกว่า 15 เปอร์เซ็นต์ จะไม่สามารถตรวจพบผลิตภัณฑ์ ทั้งนี้สามารถแก้ไขปัญหาค่าออกซิเจนละลายที่ต่ำเกินไปได้โดย การผสมออกซิเจนบริสุทธิ์เข้าไปในถังพร้อมกับอากาศ การลดอุณหภูมิเพื่อให้ค่าการละลายเพิ่มขึ้น หรือแม้กระทั้งการลดความเข้มข้นของเซลล์ในการเพาะเลี้ยง

แม้ว่ากลูโคสเป็นสับสเทรตที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เมื่อมีความเข้มข้นสูง แต่หากระบบการเพาะเลี้ยงใช้ยีสต์ที่เป็น Crabtree-positive รวมถึงอยู่ในสภาวะที่จำกัดออกซิเจนจะทำให้ยีสต์นั้นสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์รองในรูปเอทานอลได้ ซึ่งจะส่งผลเสียต่อระบบทั้งในแง่การเติบโตและการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน ดังนั้นเพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาดังกล่าวในระบบการเพาะเลี้ยงที่ต้องการความหนาแน่นของเซลล์สูงจึงใช้กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ โดยควบคุมอัตราการเติมสับสเทรตให้มีความเข้มข้นอยู่ในระดับที่เหมาะสมเพื่อให้ได้อัตราการเติบโตและผลได้ของเซลล์ที่สูง อย่างไรก็ตาม ค่าออกซิเจนละลายจะมีค่าที่สูงหรือต่ำขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ ประเภทของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ อัตราการกวน อัตราการให้อากาศ ความดันภายในระบบ รวมถึงความหนืดของอาหารที่ใช้

2.3.7 รูปแบบการเติมสับสเทรตในการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์

กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนอย่างแพร่หลาย เนื่องจากกระบวนการดังกล่าวมีข้อดีหลายประการ เช่น ให้ความเข้มข้นของเซลล์สูง หลีกเลี่ยงการเกิด glucose effect และให้อัตราการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ (Goodrick *et al*., 2001; Yamane and Shimizu, 1984) ทั้งนี้ การเติมสับสเทรตเข้าสู่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพมีด้วยกันหลายรูปแบบ ได้แก่ การเติมแบบเอกซ์โพเนนเชียล การเติมแบบคงที่ และการเติมแบบครั้งคราว เป็นต้น ซึ่งการเติมในแต่ละรูปแบบมีข้อดีข้อเสียรวมถึงส่งผลต่อการเติบโตและการสร้างผลิตภัณฑ์ที่แตกต่างกัน จากการรายงานของ Calik และคณะ (2013) พบว่า การเติมสับสเทรตแบบเอกซ์โพเนนเชียลในการเพาะเลี้ยง *P. pastoris* เพื่อผลิต human growth hormone ส่งผลให้อัตราการเติบโตจำเพาะ การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน และผลได้ของเซลล์จากสับสเทรตมีค่าสูง อย่างไรก็ตาม รูปแบบการเติมสับสเทรตก็มีผลต่ออัตราการสร้างผลิตภัณฑ์ และการสร้างผลิตภัณฑ์รองที่ไม่ต้องการด้วย เช่น การเติมสับสเทรตแบบคงที่ (constant feed) ส่งผลให้อัตราการผลิตไขมันจาก *Rhodosporidium toruloides* Y4 มากกว่าการเติมแบบครั้งคราว (intermittent feed) ประมาณ 1.5 เท่า (Zhao *et al*., 2011) ในขณะที่การเติมแบบ ครั้งคราวส่งผลให้อัตราการผลิต γ-decalactone ในยีสต์ Yarrowia lipolytica สูงกว่าการเติมแบบคงที่

ประมาณ 1.9 เท่า (Gomes *et al*., 2012) และการเติมแบบ เอกซ์โพเนนเชียลสามารถสร้างผลิตภัณฑ์รองในรูปของอะซิเตทแม้อยู่ในสภาวะที่มีออกซิเจน (Xu *et al*., 1999) ดังนั้นรูปแบบการเติมสับสเทรตจึงมีผลต่อการสร้างผลิตภัณฑ์แต่ละชนิดแตกต่างกัน และนอกจากการเติมสับสเทรตทั้ง 3 รูปแบบดังกล่าวแล้ว ปัจจุบันได้มีการประยุกต์ใช้ค่าพารามิเตอร์อื่นๆ เพื่อควบคุมการเติมสับสเทรต เช่น ค่าพีเอช ค่าออกซิเจนละลาย และค่าคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นต้น จากการรายงานของ Pepeliaev และคณะ (2011) ได้มีการประยุกต์ใช้ค่าออกซิเจนละลายในการควบคุมการเติมสับ-สเทรตเข้าสู่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพในการเพาะเลี้ยง *P. pastoris* เพื่อผลิต human enteropeptidase light chain เช่นเดียวกับ Ferreira และคณะ (2012) ที่กล่าวว่า การเติมสับสเทรตในระยะเฟด-แบทช์โดยอาศัยค่าออกซิเจนละลายเป็นตัวควบคุมเป็นวิธีที่ให้ผลผลิตที่สูงรวมถึงลดปัญหาเกี่ยวกับการถ่ายเทออกซิเจนในระบบอีกด้วย

2.4 รูปแบบกระบวนการเพาะเลี้ยง

รูปแบบกระบวนการเพาะเลี้ยงในงานวิจัยนี้มี 2 รูปแบบ คือ

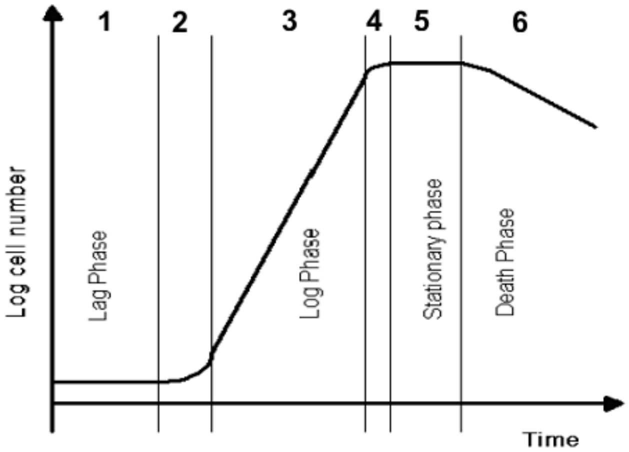
2.4.1 กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ (Batch cultivation process)

การเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ หมายถึง การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยระหว่างการเพาะเลี้ยงไม่มีการเติมสารใดๆเข้าสู่ระบบ ยกเว้น กรดและด่างเพื่อควบคุมค่าพีเอช และสารต้านการเกิดฟอง (antifoam) เพื่อควบคุมระดับฟอง การเพาะเลี้ยงจะดำเนินไปจนสิ้นสุดกระบวนการ โดยไม่มีการนำน้ำหมักออกจากระบบระหว่างกระบวนการ ยกเว้นการเก็บตัวอย่าง ด้วยเหตุนี้ทำให้ปริมาตรน้ำหมักภายในถังค่อนข้างคงที่ตลอดการเพาะเลี้ยง จุลินทรีย์จะเติบโตภายใต้สภาวะควบคุม โดยองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนแปลงตลอดเวลาเนื่องจากการใช้สารอาหารและการสร้างผลิตภัณฑ์ต่างๆ

โดยทั่วไปรูปแบบการเติบโตของจุลินทรีย์ในการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์สามารถแบ่งได้เป็น 6 ระยะ ดังภาพที่ 2-2

ภาพที่ 2-2

ระยะการเติบโตของจุลินทรีย์ในการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์



1. ระยะปรับตัว (lag phase)
2. ระยะการเติบโตเร่ง (accelerating growth phase)
3. ระยะการเติบโตแบบเอกซ์โพเนนเชียล (log phase/exponential growth)
4. ระยะการเติบโตลด (decelerated growth phase)
5. ระยะคงที่ (stationary phase)
6. ระยะเสื่อมถอย (decline / death phase)

ในกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ หลังจากที่มีเติมกล้าเชื้อเข้าลงสู่ถังหมักแล้วระบบจะเข้าสู่ระยะการปรับตัว ซึ่งในระยะนี้เชื้อจะมีการปรับตัวเข้าสู่สิ่งแวดล้อมใหม่หรืออาหารชนิดใหม่ โดยในกระบวนการเพาะเลี้ยงจะต้องมีการใช้เวลาในการปรับตัวให้สั้นที่สุด โดยเฉพาะอย่างยิ่งกระบวนการเพาะเลี้ยงในระบบอุตสาหกรรม เนื่องจากระยะเวลาในการหมักที่เพิ่มขึ้นหมายถึงต้นทุนที่เพิ่มสูงขึ้นด้วย ทั้งนี้ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมและปราศจากสารยับยั้งการเติบโตพบว่าอัตราการเติบโตของจุลินทรีย์จะมีค่าสูงสุดในระยะการเติบโตแบบเอกซ์โพเนนเชียลซึ่งสามารถอธิบายการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นดังสมการต่อไปนี้

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \qquad (1)$$

เมื่อ x คือ ความเข้มข้นของเซลล์ (กรัมต่อลิตร)

t คือ เวลา (ชั่วโมง)

μ คือ อัตราการเติบโตจำเพาะ หรือ specific growth rate (ต่อชั่วโมง)

โดยอัตราการเติบโตจำเพาะจะมีค่าสูงสุดในระยะการเติบโตแบบเอกซ์โพเนนเชียล หรือกล่าวได้ว่าการเติบโตของเซลล์จะขึ้นอยู่กับปริมาณเซลล์ที่มีอยู่ และเมื่ออินทิเกรทสมการ (1) โดยกำหนดให้ $x=x_0$ ที่ $t=0$ จะได้ว่า

$$\ln x = \ln x_0 + \mu t \qquad (2)$$

หรือ

$$\ln \frac{x}{x_0} = \mu t \qquad (3)$$

และ

$$x = x_0 e^{\mu t} \qquad (4)$$

เมื่อ x_0 คือ ความเข้มข้นของเซลล์ ณ เวลา $t=0$ (กรัมต่อลิตร)

x คือ ความเข้มข้นของเซลล์ ณ เวลาใด (กรัมต่อลิตร)

ซึ่งอัตราการการเติบโตจำเพาะในระยะการเติบโตแบบเอกซ์โพเนนเชียลจะมีเท่ากับอัตราการการเติบโตจำเพาะสูงสุด (maximum specific growth rate; μ_{max}) เนื่องจากเซลล์นั้นได้ผ่านระยะการปรับตัว พร้อมทั้งอยู่ในสภาวะที่มีอาหารสมบูรณ์และไม่มีการยับยั้งการเติบโต ทั้งนี้ค่าอัตราการการเติบโตจำเพาะในระยะอื่นๆ แสดงดังตารางที่ 2-2

<u>ตารางที่ 2-2</u>

อัตราการการเติบโตจำเพาะในระยะต่างๆ ของเซลล์จุลินทรีย์

ระยะการเติบโต	อัตราการเติบโตจำเพาะ
- ระยะปรับตัว (lag phase)	$\mu \approx 0$
- ระยะการเติบโตเร่ง (accelerating growth phase)	$\mu < \mu_{max}$
-ระยะการเติบโตแบบเอกซ์โพเนนเซียล (log phase/exponential growth)	$\mu \approx \mu_{max}$
-ระยะการเติบโตลด (decelerated growth phase)	$\mu < \mu_{max}$
-ระยะคงที่ (stationary phase)	$\mu = 0$
-ระยะเสื่อมถอย (decline / death phase)	$\mu < 0$

นอกจากนี้ยังมีพารามิเตอร์อื่นๆที่สามารถหาได้โดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในระยะการเติบโตแบบเอกซ์โพเนนเซียล คือ

1. ระยะเวลาที่ใช้ในการแบ่งเซลล์ (doubling time; t_d) คือ ระยะเวลาที่จุลินทรีย์ใช้เพื่อเพิ่มปริมาณเป็น 2 เท่า นั่นคือ $x = 2x_0$ และ $t = t_d$ แล้วแทนค่าลงในสมการ (2) จะได้ว่า

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0.693}{\mu} \qquad (5)$$

2. ผลได้ของเซลล์จากสับสเทรต (biomass yield; $Y_{X/S}$) คือ สัดส่วนระหว่างปริมาณเซลล์ที่เพิ่มขึ้นต่อปริมาณสับสเทรตที่ถูกใช้ไป โดย

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \qquad (6)$$

หรือ $X-X_0 = Y(S_0-S)$

เมื่อ X_0, S_0 คือ ปริมาณของเซลล์และอาหารณ เวลา t=0 (กรัม)

X, S คือ ปริมาณของเซลล์และอาหาร ณ เวลาใดๆ (กรัม)

3. ผลได้ของผลิตภัณฑ์จากสับสเทรต (product yield; $Y_{P/S}$) คือ สัดส่วนระหว่างปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มขึ้นต่อปริมาณสับสเทรตที่ถูกใช้ไป โดย

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \qquad (7)$$

หรือ $P\text{-}P_0 = Y(S_0\text{-}S)$

เมื่อ P_0, S_0 คือ ปริมาณของผลิตภัณฑ์และอาหาร ณ เวลา t=0 (กรัม)

P, S คือ ปริมาณของผลิตภัณฑ์และอาหาร ณ เวลาใดๆ (กรัม)

4. อัตราจำเพาะของการใช้สับสเทรต (specific substrate uptake rate; q_s)

ความสัมพันธ์ของจุลินทรีย์ในการใช้สารอาหารในช่วงระยะเวลาหนึ่งๆ สามารถอธิบายได้ดังสมการที่ 8

$$\frac{ds}{dt} = q_s x \qquad (8)$$

เมื่อ q_S คืออัตราการใช้สับสเทรตจำเพาะ (กรัมต่อกรัม.ชั่วโมง)

ในทำนองเดียวกัน การใช้สับสเทรตก็มีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเพิ่มจำนวนของเซลล์ดังสมการ (9)

$$\frac{ds}{dx} = Y_{S/X} = \frac{1}{Y_{X/S}} \qquad (9)$$

การเปลี่ยนแปลงของสับสเทรต เนื่องจากการใช้ของจุลินทรีย์มีการเปลี่ยนแปลงดังนี้

$$q_s x = \frac{\mu x}{Y_{X/S}} \qquad (10)$$

และ

$$q_s = \frac{\mu}{Y_{X/S}} \qquad (11)$$

สำหรับการลดลงของอัตราการเติบโต ตลอดจนการหยุดการเติบโตของจุลินทรีย์ เนื่องจากการหมดไปของสับสเทรต อธิบายได้โดยสมการของโมนอด (Monod equation) ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเติบโตจำเพาะและปริมาณสับสเทรตที่เหลืออยู่ ดังสมการที่ 12

$$\mu = \frac{\mu_{max} s}{s + K_S} \qquad (12)$$

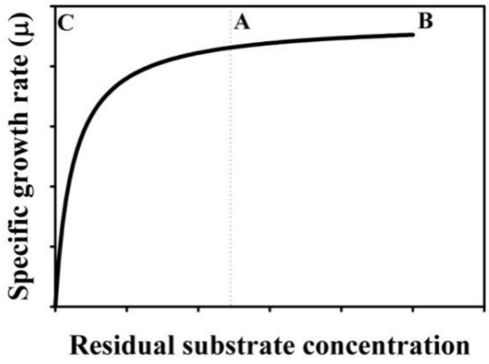
เมื่อ μ_{max} คือ อัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุด (ชั่วโมง$^{-1}$)

K_S คือ ค่าคงที่อิ่มตัวซึ่งมีค่าเท่ากับความเข้มข้นของสารอาหารที่ทำให้ $\mu = 1/2\mu_{max}$ (กรัม/ลิตร)

เมื่อเขียนกราฟระหว่างความเข้มข้นของสับสเทรตที่เหลืออยู่ต่ออัตราการเติบโตจำเพาะของเซลล์ จะได้ความสัมพันธ์ดังภาพที่ 2-3

ภาพที่ 2-3

อิทธิพลของความเข้มข้นของสับสเทรตที่เหลืออยู่ต่ออัตราการเติบโตจำเพาะ



จากภาพช่วง A-B อยู่ในระยะการเติบโตเอกซ์โพเนนเชียล ซึ่งความเข้มข้นของสับสเทรตมีค่าเพียงพอทำให้จุลินทรีย์เติบโตด้วยอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) ช่วง C-A อยู่ในระยะการเติบโตลด เนื่องจากการเติบโตของจุลินทรีย์ส่งผลให้ความเข้มข้นของสับสเทรตลดลงจนทำให้จุลินทรีย์เติบโตด้วยอัตราที่ต่ำกว่าอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุด

2.4.2 กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทซ์ (Fed-batch cultivation process)

กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์เป็นการเพาะเลี้ยงที่มีการเติมสับสเทรตหรือสารตั้งต้นลงไปในถังหมักอย่างต่อเนื่อง โดยไม่มีการนำน้ำหมักออกมานอกจากการเก็บตัวอย่างเท่านั้น โดยสารที่เติมส่วนใหญ่เป็นแหล่งคาร์บอนมากกว่าที่จะเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งโดยทั่วไปจะเติมสั บสเทรตที่มีความเข้มข้นสูงเท่าที่ จะทำให้ระบบสามารถดำเนินต่อไปได้เพื่อให้ปริมาตรของน้ำหมักเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุด

การเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์นิยมใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวและสารเมทาบอไลท์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) เนื่องจากสามารถควบคุมความเข้มข้นของสับสเทรตให้อยู่ในระดับที่ต้องการได้ โดยการเพาะเลี้ยงแบบนี้ถูกนำมาประยุกต์ใช้เพื่อวัตถุประสงค์ 2 ประการคือ

1. ควบคุมอัตราการเกิดปฏิกิริยา (reaction rate control) เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาด้านข้อจำกัดของถังหมัก เช่น ระบบหล่อเย็น ระบบการให้อากาศซึ่งในระหว่างการเพาะเลี้ยงพบว่าจะเกิดปฏิกิริยาคายความร้อนในปริมาณที่มากกว่าความสามารถในการควบคุมอุณหภูมิของถังหมัก รวมถึงอัตราการเจริญเติบโตที่สูงส่งผลให้เกิดความต้องการออกซิเจนมากกว่าออกซิเจนที่ละลายได้ในถังหมัก โดยทั้ง 2 เหตุการณ์ที่เกิดขึ้นนี้จะส่งผลเสียต่อกระบวนการหมักจึงต้องมีการควบคุมการเกิดปฏิกิริยาให้เหมาะสม

2. ควบคุมเมทาบอลิซึม (metabolism control) เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาที่เกิดจากสับ - สเทรตที่มีความเข้มข้นสูงเช่น การยับยั้งการเติบโตและการสร้างผลิตภัณฑ์ catabolite repression และ overflow-metabolism

กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ถูกนำมาประยุกต์ในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน โดย *P. pastoris* เพื่อให้มีความหนาแน่นของเซลล์สูงและสามารถผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนได้ในปริมาณมาก (Jahic *et al.*, 2002; Heyland *et al.*, 2010) ซึ่งรูปแบบในการควบคุมกระบวนการหมักสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 วิธี คือ

1. การควบคุมแบบย้อนกลับ (feedback regulation) เป็นการควบคุมอัตราการเติมสับสเทรตแบบอัตโนมัติ ซึ่งอาจจะควบคุมความเข้มข้นของสับสเทรตโดยตรง หรือเป็นการควบคุมทางอ้อม โดยอาศัยพารามิเตอร์ต่างๆที่มีความสัมพันธ์กับการเติบโตและการใช้สับสเทรต เช่น ค่าออกซิเจนละลาย (dissolve oxygen tension; DOT) ค่าพีเอชและปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์เป็นต้น

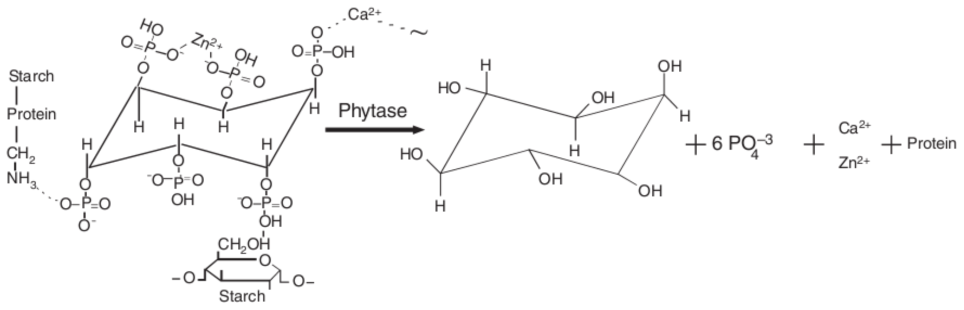
2. การควบคุมแบบที่มีการกำหนดรูปแบบการเติมไว้ล่วงหน้า (feed forword regulation) ซึ่งประกอบด้วย 3 รูปแบบ คือ การเติมอาหารเป็นระยะ (intermittent feeding) การควบคุมการเติมอาหารด้วยอัตราการเติมคงที่ (constant feeding) และการควบคุมการเติมอาหารด้วยอัตราการเติมแบบเอกซ์โพเนนเชียล (exponential feeding)

การหมักแบบเฟด-แบทช์เป็นรูปแบบการหมักที่ออกแบบเพื่อหลีกเลี่ยงการยับยั้งการเติบโตเนื่องจากสับสเทรตโดยสามารถดำเนินการโดยควบคุมระดับความเข้มข้นของสับสเทรตระหว่างการหมักไว้ที่ความเข้มข้นต่ำๆ เนื่องจากการหมักแบบนี้เป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถลดการเกิดผลผลิตอื่น (by-product) ทำให้เทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่มีการใช้สับสเทรตอย่างมีประสิทธิภาพสูง

2.5 เอนไซม์ไฟเตส (Phytase)

เอนไซม์ไฟเตส หรือ *myo*-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate phosphohydrolase เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม phosphatase ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเพื่อสลายพันธะฟอสโฟ-โมโนเอสเตอร์ของกรดไฟติค (phytic acid) ซึ่งเป็นสับสเทรตของเอนไซม์ไฟเตส และปลดปล่อย inorganic phosphate รวมถึงไอออนของโลหะต่างๆที่จับอยู่กับกรดไฟติคออกมา (Yao *et al.*, 2012) ดังภาพที่ 2-4

ภาพที่ 2-4
การทำงานของเอนไซม์ไฟเตสเพื่อปลดปล่อย inorganic phosphate
รวมถึงไอออนของโลหะต่างๆที่จับอยู่กับ phytic acid



ที่มา : Yao *et al*. (2012)

2.5.1 การจัดกลุ่มเอนไซม์ไฟเตส

ปัจจุบันเอนไซม์ไฟเตสสามารถแบ่งเป็น 3 กลุ่ม โดยสถาบัน IUPAC-IUBMB (the International Union of Pure and Applied Chemistry and the International Union of Biochemistry and Molecular Biology) ซึ่งแบ่งกลุ่มตามตำแหน่งเริ่มต้นที่มีการตัดพันธะฟอสโฟ-โมโนเอสเตอร์จากคาร์บอนในวงแหวน inositol และปลดปล่อย inorganic phosphate ออกมา

ได้แก่ 3-phytases, 5-phytases และ 4/6-phytases (Vats and Banerjee, 2004) นอกจากนี้ ยังสามารถจัดกลุ่มตามสภาวะความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ acid phosphatases, neutral phosphatases และ alkaline phosphatases ทั้งนี้ในปัจจุบันเอนไซม์ไฟเตสในกลุ่ม acid phosphatases ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ ดังนั้นงานวิจัยก่อนหน้านี้จึงมุ่งเน้นพัฒนาเอนไซม์ไฟเตสในกลุ่มนี้เป็นหลัก โดยเอนไซม์ในกลุ่มนี้สามารถแบ่งออกเป็น 3 ชนิด ตามโครงสร้างของเอนไซม์ ได้แก่ histidine acid phosphatases (HAP), β-properller phytase (BPP) และ purple acid phosphatases (PAP) (Mullaney and Ullah, 2003)

2.5.2 แหล่งของเอนไซม์ไฟเตส

เอนไซม์ไฟเตสสามารถพบได้ทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ (Dvorakova, 1998)

2.5.2.1 เอนไซม์ไฟเตสจากพืช

เอนไซม์ไฟเตสสามารถพบได้ในพืชหลายชนิด ได้แก่ ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ถั่วเหลือง ข้าวโพด มันฝรั่ง หัวไชเท้า ละอองเกสรดอกลิลลี่ ฯลฯ โดยงานวิจัยก่อนหน้าพบว่า เมล็ดที่กำลังงอกจะมีกิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสที่สูง (Chen and Pan, 1977) ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวจะถูกผลิตขึ้นทั้งในระหว่างการงอกของเมล็ด และก่อนหน้าการงอกของเมล็ด (Nayni and Markakis, 1986)

2.5.2.2 เอนไซม์ไฟเตสจากสัตว์

เอนไซม์ไฟเตสสามารถพบได้ในสัตว์หลายชนิดได้แก่ ลูกวัว นก และสัตว์เลื้อยคลาน ฯลฯ โดยในปี ค.ศ. 1908 McCollum และ Hart ได้รายงานถึงการค้นพบกิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสในเลือดปลาฉลามเป็นครั้งแรก และในปี ค.ศ. 1972 Bitar และ Reinhold ได้ศึกษาเอนไซม์ไฟเตสในลำไส้เล็กของหนู ไก่ ลูกวัว และมนุษย์ ซึ่งพบว่าเอนไซม์ดังกล่าวแตกต่างจากเอนไซม์ในกลุ่ม acid phosphatase ทำให้มีข้อคิดเห็นเกี่ยวกับการทำงานของเอนไซม์ไฟเตสที่มาจากสัตว์ถึงการไม่มีบทบาทในการนำ phytic acid มาใช้ แต่เกิดจากเอนไซม์ไฟเตสที่มาจากจุลินทรีย์ที่อยู่ในทางเดินอาหาร (Frolich *et al.*, 1990)

2.5.2.3 เอนไซม์ไฟเตสจากจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ไม่ว่าจะเป็น แบคทีเรีย ยีสต์ และเชื้อรา สามารถผลิตเอนไซม์ไฟเตสได้ ซึ่งเอนไซม์ที่ผลิตได้จะถูกจัดแบ่งในกลุ่มที่ต่างกัน เช่น เอนไซม์ไฟเตสจากเชื้อรา *A.niger* NRRL 3135

และ *A. niger* BCC18081 ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม histidine acid phosphatases เอนไซม์ไฟเตสจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม β-properller phytase (Mullaney and Ullah, 2003)

2.5.3 การประยุกต์เอนไซม์ไฟเตสในอุตสาหกรรม

จากสมบัติของเอนไซม์ไฟเตสที่สามารถย่อยสับสเทรตในรูปกรดไฟติคได้เป็นอย่างดี และกรดไฟติคเป็นองค์ประกอบที่พบในธัญพืชต่างๆ ดังนั้นจึงมีการนำเอนไซม์ไฟเตสมาประยุกต์ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาหารสัตว์ปีกและสุกร เนื่องจากสัตว์เหล่านี้ไม่มีเอนไซม์ไฟเตสเพื่อใช้ในการย่อยกรดไฟติคให้ได้ฟอสเฟตอิสระ ดังนั้นจึงไม่สามารถดูดซึมฟอสเฟตเหล่านี้ไปใช้ประโยชน์ได้ และยังช่วยลดต้นทุนการผลิตโดยเป็นการลดการเติมธาตุอาหารกลุ่มฟอสเฟตในอาหารด้วย นอกจากนี้ยังเป็นการช่วยลดปริมาณฟอสเฟตที่ถูกขับถ่ายออกมาพร้อมมูลสัตว์ ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดมลพิษทางน้ำอีกด้วย (Lei *et al*., 2012)

การผลิตเอนไซม์ไฟเตสในปัจจุบันได้นำความรู้ทางด้านพันธุวิศวกรรมมาใช้เพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตเอนไซม์และให้ได้เอนไซม์ที่มีสมบัติตามต้องการ เช่น มีการตัดต่อยีนในการผลิตเอนไซม์ไฟเตสจากเชื้อรา *A. niger* BCC18081 เข้าสู่จีโนมของยีสต์ *P. pastoris* เพื่อให้ผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณมาก (Promdonkoy *et al*., 2009) โดยแหล่งของเอนไซม์และเซลล์เจ้าบ้านในการผลิตที่มีการนำมาใช้จริงเพื่อผลิตเอนไซม์ไฟเตสทางการค้าแสดงดังตารางที่ 2-3

<u>ตารางที่ 2-3</u>

บริษัทที่ผลิตเอนไซม์ไฟเตสทางการค้า

Product	Company	Protein origin	Host stain
Finase® P/L	AB vista	*Aspergillus niger* PhyB	*Trichoderma reesei*
OptiPhos	Enzyvia	*Escherichia coli* AppA2	*Pichia pastoris*
Finase® EC	AB vista	*Escherichia coli* AppA	*Trichoderma reesei*

ที่มา : Lei *et al*. (2012)

ในการผลิตอาหารสัตว์จะมีการผสมเอนไซม์ไฟเตสเข้ากับวัตถุดิบ อาหารสัตว์ชนิดต่างๆ จากนั้นจะนำไปอบด้วยความร้อนก่อนการอัดเม็ด ซึ่งอุณหภูมิที่ใช้ในกระบวนการดังกล่าวอยู่ระหว่าง 60-95 องศาเซลเซียส ดังนั้นเอนไซม์ที่ใช้จะต้องเป็นเอนไซม์ที่ทนความร้อนและต้องทำงานได้ดีเมื่ออยู่ในระบบย่อยอาหารของสัตว์ ซึ่งมีค่าพีเอชประมาณ 3.5-5.0 รวมทั้งทนต่อเอนไซม์ในกลุ่มโปรติเอส จากสมบัติทั้งหมดที่กล่าวมาพบว่า เอนไซม์ไฟเตสจากเชื้อรา *A. niger* BCC18081 ที่ผลิตจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris* เหมาะต่อการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์เป็นอย่างยิ่ง (Promdonkoy *et al*., 2009) และหากระบบการผลิตเกิดขึ้นในเซลล์เจ้าบ้านที่ทนต่ออุณหภูมิสูงหรือสามารถเติบโตได้ในช่วงอุณหภูมิกว้างแล้วน่าจะช่วยลดต้นทุนในการผลิตเอนไซม์ไฟเตสได้อย่างยิ่ง

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และสายพันธุ์จุลินทรีย์

3.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 20 ลิตร รุ่น BIOSTAT®C plus (Sartorius Stedim Biotech) พร้อมชุดควบคุม
2. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator Shaker, Innova 4230, New Brunswick Scientific; USA)
3. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Microfuge 16, Beckman Coulter; Germany)
4. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer, Biochrom Libra22; England)
5. ตู้อบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator, Memmert; Germany)
6. ตู้ดูดความชื้น (Dessicator, Weifo Dry-60; Taiwan)
7. เครื่องวัดค่าการนำไฟฟ้า (Conductivity/°C meter, Ecoscan CON 6, EUTECH instruments)
8. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด -ด่าง (pH meter, PSI 50 bench top pH meter, Beckman)
9. เครื่อง Electrophoresis และชุดอุปกรณ์ (Bio-Rad, PowerPac1000; USA)
10. ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar Flow, Microflow, Bioquell UK Ltd; United Kingdom)
11. ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven, Memmert; Germany)
12. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath, Memmert; Germany)
13. เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับงานด้านจุลชีววิทยา
14. เครื่องแก้วและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

3.1.2 สายพันธุ์จุลินทรีย์

สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้คือ *Ogataea thermomethanolica* ที่มีการแสดงออกของยีนไฟเตสจากเชื้อรา *Aspergillus niger* BCC18081 ซึ่งได้จากหน่วยปฏิบัติการวิจัย

เทคโนโลยีทรัพยากรชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ พลาสมิดที่ใช้ในการนำยีนไฟเตสเข้าสู่เซลล์คือ pOthGAPZαA โดยพลาสมิดดังกล่าวมี ส่วนประกอบ ของโปรโมเตอร์ *OthGAP* สำหรับควบคุมการแสดงออกของยีน และ α-factor sequence สำหรับปลดปล่อยรีคอม - บิแนนท์โปรตีนออกนอกเซลล์ (Harnpicharnchai *et al.*, 2014)

3.2 การเก็บรักษารีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica*

เขี่ยเชื้อยีสต์ *O. thermomethanolica* ลงบนอาหารแข็ง YPD ที่มียาปฏิชีวนะ ซีโอซิ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 10 จาน เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นจึงเติมสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ปลอดเชื้อลงในจานเพาะเชื้อ ชะเซลล์ออกจากอาหารแข็งทำการรวบรวมเซลล์แขวนลอยทั้งหมดลงในขวดปลอดเชื้อและปรับปริมาตรจนครบ 200 มิลลิลิตร โดยใช้สารละลายกลีเซอรอลปลอดเชื้อความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แล้วแบ่งเซลล์แขวนลอยใส่ในหลอดฝาเกลียวขนาด 15 มิลลิลิตร หลอดละ 5 มิลลิลิตรนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการเตรียมกล้าเชื้อต่อไป

3.3 การศึกษารูปแบบการเติบโตของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ในฟลาสก์เขย่า

การศึกษารูปแบบการเติบโตของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ในฟลาสก์เข่า เพื่อหาอุณหภูมิและระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมสำหรับนำสารแขวนลอยเซลล์ที่ได้ไปใช้เป็นกล้าเชื้อในการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

3.3.1 อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการเติบโตของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica*

นำเชื้อยีสต์ (stock culture) ที่เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเหลว YPD ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที จากนั้นเก็บตัวอย่างเชื้อทุกๆ 4 ชั่วโมง เพื่อนำไปวัดค่าความขุ่นของเซลล์และน้ำหนักเซลล์แห้ง เพื่อหาอุณหภูมิที่เซลล์สามารถเติบโตได้สูงสุดเป็นอุณหภูมิควบคุมในการเพาะเลี้ยงเพื่อเตรียมกล้าเชื้อ

3.3.2 การเติบโตของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ในฟลาสก์เขย่า

1. ศึกษารูปแบบการเติบโตของการกล้าเชื้อขั้นที่ 1 โดยนำเชื้อยีสต์ที่เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเหลว YPD ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่มีซีโอซิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที จากนั้นเก็บตัวอย่างเชื้อทุกๆ 4 ชั่วโมง เพื่อนำไปวัดค่าความขุ่นของเซลล์และน้ำหนักเซลล์แห้ง นำผลการเติบโตของยีสต์ที่อยู่ในช่วงการเติบโตที่เรียกว่าช่วงการเติบโตลด (decelerated growth phase) มาใช้ในการเตรียมเป็นกล้าเชื้อขั้นที่ 2

2. ศึกษารูปแบบการเติบโตของการกล้าเชื้อขั้นที่ 2 โดยนำกล้าเชื้อขั้นที่ 1 ที่มีระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงตามต้องการจากการศึกษาในขั้นต้นถ่ายลงในอาหารเหลว Syn6 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยกำหนดค่าความขุ่นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 1 (OD_{600}~1) นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 4 ชั่วโมง เพื่อนำไปวัดค่าความขุ่นของเซลล์และน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยข้อมูลที่ต้องการคือช่วงของการเติบโตที่อยู่ในระยะการเติบโตลด

3.4 กระบวนการเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* เพื่อผลิตเอนไซม์ไฟเตส

3.4.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

การเตรียมกล้าเชื้อแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน

(1) เตรียมกล้าเชื้อขั้นที่ 1 โดยนำเชื้อยีสต์ (stock culture) ที่เก็บในกลีเซอรอลความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติมลงในอาหารเหลว YPD ปริมาตร 20 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีซีโอซิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่ 35 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

(2) เตรียมกล้าเชื้อขั้นที่ 2 โดยนำกล้าเชื้อในขั้นที่ 1 ถ่ายลงในอาหารเหลว Syn6 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 4 ฟลาสก์ โดยกำหนดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์เริ่มต้นให้เท่ากับ 1 เพาะเลี้ยงที่ 35 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.4.2 การเตรียมถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

ประกอบถังปฏิกรณ์ชีวภาพ และต่ออิเล็กโทรดต่างๆ ที่ผ่านการเทียบค่าแล้วเข้ากับถังปฏิกรณ์ชีวภาพและหน่วยควบคุม ได้แก่ พีเอช อุณหภูมิ และปริมาณออกซิเจนละลาย เป็นต้น จากนั้นทำให้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที ซึ่งถังปฏิกรณ์ชีวภาพรุ่นนี้มีระบบการทำให้ปลอดเชื้อในตัว (*in situ* sterilization) โดยในถังปฏิกรณ์ชีวภาพบรรจุน้ำกลั่นปริมาตร 15 ลิตร

เมื่อระบบการทำให้ปลอดเชื้อของถังปฏิกรณ์ชีวภาพเสร็จสิ้น รอให้อุณหภูมิของถังปฏิกรณ์ชีวภาพลดลง เปิดวาล์วเพื่อนำน้ำกลั่นออกจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพจนหมด จากนั้นจึงเติมอาหาร Syn6 ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 3.8 ลิตร ที่ผ่านการทำให้ปลอดเชื้อแล้วที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที ทำการตั้งค่าสภาวะควบคุมต่างๆ คือ อัตราการกวน อัตราการให้อากาศ อุณหภูมิ และพีเอช จากนั้นทำการทดสอบระบบการทำงานทั้งหมดอีกครั้งก่อนเริ่มการเพาะเลี้ยง

3.4.3 การศึกษาอิทธิพลของค่าพีเอชและอุณหภูมิต่อการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตส

การศึกษาในส่วนนี้จะใช้กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ โดยเริ่มจาก ถ่ายกล้าเชื้อจากฟลาสก์ทั้งหมด 200 มิลลิลิตรลงในถังหมักขนาด 20 ลิตร ที่มีอาหารสูตร Syn6 ปริมาตร 3.8 ลิตร สภาวะที่ใช้ในกระบวนการหมักคือ อัตราการกวน 1000 รอบต่อนาที อัตราการการให้อากาศ 1 ลิตรต่อลิตร.นาที (vvm) แปรผันอุณหภูมิและค่าพีเอชดังนี้

(1) การศึกษาอิทธิพลของพีเอชโดยทำการแปรผันค่าพีเอชเท่ากับ 4.0, 5.0, 6.0, 6.5 และ 7.0 ด้วยสารละลายแอมโมเนีย 25 เปอร์เซ็นต์ และควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส

(2) การศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิทำการแปรผันอุณหภูมิเท่ากับ 30, 34, 38, 40, 42 องศาเซลเซียส และไม่มีการควบคุมอุณหภูมิในระหว่างการเพาะเลี้ยง สำหรับพีเอชควบคุมที่ใช้ ได้อาศัยข้อมูลที่ได้จากการศึกษาอิทธิพลของพีเอช

ในระหว่างการเพาะเลี้ยง ทำการเก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง เพื่อนำไปวัดค่าความขุ่นของเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส และกิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตส รวมถึง การวิเคราะห์หาค่าอัตราการเติบโตจำเพาะ (μ) ระยะปรับตัว (lag time) และผลได้ของเซลล์จากสับสเทรต ($Y_{x/s}$)

3.4.4 การเพิ่มความหนาแน่นเซลล์โดยใช้กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์

เริ่มต้นกระบวนการโดยการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ ซึ่ง ทำการ ควบคุมสภาวะในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมที่สุดต่อการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสจากข้อมูลข้อ 3.4.3 จากนั้นเมื่อกลูโคสถูกใช้จนหมด โดยสังเกตจากค่าออกซิเจนละลายที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจึงเริ่มกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ โดยเติมอาหาร Syn6 ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 500 กรัมต่อลิตร โดยอาศัยค่าอัตราการเติบโตจำเพาะที่ได้จากกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ในการคำนวณอัตราการเติมอาหาร

ในระหว่างการเพาะเลี้ยงทำการเก็บตัวอย่างทุก 4-6 ชั่วโมง เพื่อนำไปวัดค่าความขุ่นของเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส กิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสและความเข้มข้นของโปรตีน รวมถึงนำผลที่ได้มาวิเคราะห์หาค่าอัตราการเติบโตจำเพาะ (μ) ผลได้ของเซลล์จากสับสเทรต ($Y_{x/s}$) ผลได้ของผลิตภัณฑ์จากสับสเทรต ($Y_{p/s}$) ผลได้ของผลิตภัณฑ์จากเซลล์ ($Y_{p/x}$) อัตราจำเพาะของการสร้างผลิตภัณฑ์ (q_p) และอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์เชิงปริมาตร (Q_p)

3.5 การศึกษารูปแบบการเติมสับสเทรตในการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไฟเตส

การศึกษาในส่วนนี้มุ่งเน้นรูปแบบการเติมสับสเทรตในระยะการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ เพื่อเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์และการผลิตเอนไซม์ไฟเตส โดยหลีกเลี่ยงการสร้างผลิ ตภัณฑ์พลอยได้ในรูปของเอทานอลและกรดอะซิติก ซึ่งรูปแบบการเติมสับสเทรตที่ทำการศึกษาสามารถแบ่งออกเป็น 2 วิธีหลักๆ คือ 1. การเติมแบบที่มีการกำหนดรูปแบบการเติมไว้ล่วงหน้า (feed forward regulation) และ 2. การเติมแบบย้อนกลับ (feedback regulation)

1. การเติมแบบที่มีการกำหนดรูปแบบการเติมไว้ล่วงหน้า (feed forward regulation) ทำการศึกษาทั้งหมด 3 รูปแบบ ได้แก่

- การเติมแบบเอกซ์โพเนนเซียล (exponential feeding)
- การเติมแบบคงที่ (constant feeding)
- การเติมแบบครั้งคราว (intermittent feeding)

โดยในกรณีของการเติมแบบเอกซ์โพเนนเซียลสามารถคำนวณอัตราการเติมสับสเทรตเริ่มต้น (F_0) และอัตราการเติมที่เวลาต่างๆ (F_t) ดังสมการ

$$F_0 = \frac{\mu}{C_S^F Y_{x/s}}(C_x V_x)$$

$$F(t) = F_0 e^{\mu t}$$

สำหรับอัตราการเติมแบบคงที่ใช้ค่าอัตราการเติมสับสเทรตเท่ากับอัตราการเติมสับสเทรตเริ่มต้น และอัตราการเติมแบบครั้งคราวกำหนดให้ความเข้มข้นของกลูโคสหลังจากการเติมในแต่ละครั้งเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร ซึ่งแสดงตังตารางที่ 3-1

<u>ตารางที่ 3-1</u>

รูปแบบการเติมสับสเทรตในการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์

รูปแบบการเติม	อัตราการเติม	ความเข้มข้นของกลูโคสในน้ำหมัก (กรัมต่อลิตร)
การเติมแบบคงที่	$F_t = F_0$	น้อยมาก
การเติมแบบเอกซ์โพเนนเซียล	$F_t = F_0 e^{\mu t}$	น้อยมาก
การเติมแบบครั้งคราว	-	0-20

2. การเติมแบบย้อนกลับ (feedback regulation) ในงานวิจัยนี้อาศัยค่าออกซิเจนละลายเป็นพารามิเตอร์ในการควบคุมการเติมสับสเทรต (DO stat feeding control) โดยกำหนดค่าออกซิเจนละลายในระบบประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์

3.6 การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้แหล่งคาร์บอนราคาถูกในการผลิตเอนไซม์ไฟเตส

ในส่วนนี้มุ่งเน้นการใช้แหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกและหาได้ง่ายในท้องตลาด ซึ่งจากรายงานก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่ากลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ *GAP* (Waterham *et al.*, 1997) แต่เนื่องจาก กลูโคสมีราคาค่อนข้างสูงจึงทำให้ต้นทุนในการผลิตสูง ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องหาแหล่งคาร์บอนอื่นมาทดแทน โดยงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้น้ำตาลซูโครส (น้ำตาลทรายตามท้องตลาด) ซึ่งเป็นน้ำตาลที่มีราคาถูกกว่าน้ำตาลกลูโคสประมาณ 2 เท่า (อ้างอิงจากบริษัทผู้แทนจำหน่าย http://www.alibaba.com/product-detail; http://www.priceza.com) มาเป็นแหล่งคาร์บอนเนื่องจากมีรายงานก่อนหน้านี้ว่าเชื้อชนิดนี้สามารถใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ (Limtong *et al.*, 2005)

การศึกษาในส่วนนี้เริ่มจากการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ โดยใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงตามการทดลองข้อที่ 3.4.3 และนำผลที่ได้มาวิเคราะห์หาค่าอัตราการเติบโตจำเพาะ (μ) ผลได้ของเซลล์จากสับสเทรต ($Y_{x/s}$) จากนั้นจึงเข้าสู่กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ ซึ่งใช้รูปแบบการเติมที่เหมาะสมตามการทดลองข้อที่ 3.5 นำผลที่ได้เปรียบเทียบประสิทธิภาพกับการเพาะเลี้ยงที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

3.7 การศึกษาอิทธิพลของการเพิ่มอุณหภูมิในระยะเฟด-แบทช์ต่อการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตส

การลดต้นทุนในการผลิตในแง่ของพลังงานที่ใช้ในระบบหล่อเย็นเป็นจุดประสงค์ที่สำคัญประการหนึ่ง เมื่อทำการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนในระดับอุตสาหกรรม และจากการรายงานของ Romano และคณะ (2004) ยังพบว่า อุณหภูมิส่งผลต่อระดับการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน ซึ่งขึ้นกับโปรโมเตอร์แต่ละชนิด ดังนั้นงานวิจัยในส่วนนี้จึงมุ่งเน้นที่จะลดการใช้พลังงานในระบบหล่อเย็นรวมถึงศึกษารูปแบบการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสเมื่อมีการเพิ่มอุณหภูมิในระยะเฟด-แบทช์ ซึ่งมีวิธีการทดลองดังนี้

เริ่มจากการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยง โดยทำการควบคุมพีเอชที่ 6.0 และอุณหภูมิที่ 34 องศาเซลเซียส ตามผลการทดลองข้อที่ 3.4.3 จากนั้นเมื่อเข้าสู่ระยะเฟด-แบทช์ทำการเติมสับสเทรตเข้าสู่ระบบโดยอาศัยค่าออกซิเจนละลายเป็นตัวควบคุม (DO stat control) พร้อมทั้งเพิ่มอุณหภูมิขึ้นอีก 4, 6 และ 8 องศาเซลเซียส (หรือเพิ่มขึ้นเป็น 38, 40 และ 42 องศาเซลเซียส) ทั้งนี้กำหนดให้อัตราการเพิ่มอุณหภูมิมีค่าเท่ากับ 2 องศาเซลเซียสต่อชั่วโมง

ในระหว่างการเพาะเลี้ยงทำการเก็บตัวอย่างทุก 4-6 ชั่วโมง เพื่อวัดค่าความขุ่นของเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส กิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตส และความเข้มข้นของโปรตีน รวมถึงนำผลที่ได้มาวิเคราะห์หาค่าผลได้ของเซลล์จากสับสเทรต ($Y_{x/s}$) ผลได้ของผลิตภัณฑ์จากสับสเทรต ($Y_{p/s}$) ผลได้ของผลิตภัณฑ์จากเซลล์ ($Y_{p/x}$) อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์เชิงปริมาตร (Q_p) และอัตราจำเพาะของการสร้างผลิตภัณฑ์ (q_p)

บทที่ 4
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

การพัฒนากระบวนการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดยยีสต์สายพันธุ์ทนร้อน *O. thermomethanolica* ภายใต้การควบคุมการแสดงออกของยีนตลอดเวลาด้วยโปรโมเตอร์ *OthGAP* ซึ่งการศึกษาในวิทยานิพนธ์นี้ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 5 ส่วน คือ ส่วนที่ 1 การศึกษารูปแบบการเติบโตของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ในระดับฟลาสก์ เขย่าเพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเตรียมกล้าเชื้อสำหรับเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ส่วนที่ 2 การศึกษาอิทธิพลของพีเอชและอุณหภูมิต่อการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสในถังปฏิกรณ์ชีวภาพโดยใช้กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ ส่วนที่ 3 การศึกษารูปแบบการเติมสับสเทรตในระยะการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ ส่วนที่ 4 การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และส่วน ที่ 5 การศึกษาอิทธิพลของการเพิ่มอุณหภูมิในระยะเฟด-แบทช์ต่อการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตส ซึ่งมีการกล่าวถึงรายละเอียดในแต่ละส่วนดังนี้

4.1 การทดลองที่ I: การศึกษารูปแบบการเติบโตของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ในฟลาสก์เขย่า

4.1.1 อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการเติบโตของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ในฟลาสก์เขย่า

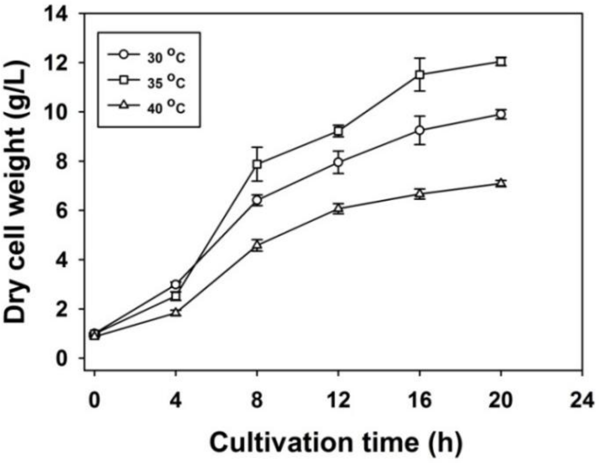
เนื่องจากยีสต์ *O. thermomethanolica* เป็นยีสต์สายพันธุ์ทนร้อนซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเติบโตของยีสต์ดังกล่าวอาจจะสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส (Ryabova *et al.*, 2003) ดังนั้นงานวิจัยในส่วนนี้จึงได้ทำการศึกษา อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการเติบโตของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ในระดับฟลาสก์เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเติบโตสำหรับเตรียมกล้าเชื้อ โดยการทดลองในส่วนนี้ได้ทำการเพาะเลี้ยง รีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ในอาหารเหลวสูตร YPD และแปรผันอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงที่ 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 4-1

จากผลการทดลอง (ภาพที่ 4-1) พบว่า เซลล์สามารถเติบโตได้อย่างต่อเนื่องในทั้ง 3 อุณหภูมิเพาะเลี้ยง ซึ่งหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ความเข้มข้นของเซลล์ที่อุณหภูมิ 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส มีค่าใกล้เคียงกันในช่วง 2.0-2.5 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นอัตราการเติบโตค่อนข้าง

แตกต่างกัน โดยเมื่อพิจารณาค่าอัตราการเติบโตจำเพาะพบว่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ให้ค่าสูงสุดเท่ากับ 0.26±0.01 ต่อชั่วโมง รองลงมา คือ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 0.23±0.00 ต่อชั่วโมง และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส มีค่าน้อยสุดเท่า 0.20±0.01 ต่อชั่วโมง สอดคล้องกับความเข้มข้นของเซลล์สุดท้ายมีค่าสูงสุดเมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ซึ่งมีค่าเท่ากับ 12.00±0.24 กรัมต่อลิตร ดังนั้น อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเติบโตของ รี-คอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* สำหรับเตรียมกล้าเชื้อในฟลาสก์เขย่าคือ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

<u>ภาพที่ 4-1</u>

อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการเติบโตของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ในฟลาสก์เขย่า



4.1.2 รูปแบบการเติบโตของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* เพื่อใช้ในการเตรียมกล้าเชื้อ

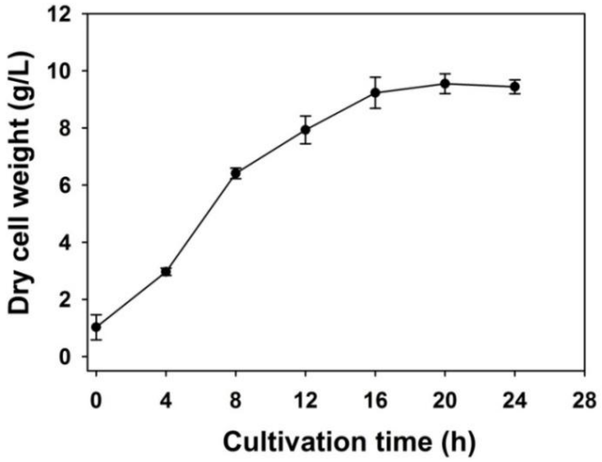
ปริมาณและคุณภาพของกล้าเชื้อที่ใช้ในกระบวนการหมักถือเป็นตัวแปรที่มีความสำคัญต่อความสำเร็จของกระบวนการหมัก ทั้งนี้ พบว่ากล้าเชื้อที่มีคุณภาพต่ำจะทำให้ระยะเวลาในช่วงปรับตัวนาน (Pham *et al*., 1998) ทำให้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเพิ่มขึ้น และส่งผลให้ต้นทุนการผลิตเพิ่มขึ้นด้วย ทั้งนี้ จากงานวิจัยก่อนหน้าโดย Charoenrat และคณะ (2013) ได้รายงานว่าการใช้อาหารที่มีองค์ประกอบใกล้เคียงกับอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพสำหรับเตรียมกล้าเชื้อทำให้ระยะเวลาที่เชื้อใช้ในการปรับตัวสั้น ดังนั้น ในการวิจัยนี้จึงเลือกใช้อาหาร Syn6 ในการเตรียมกล้าเชื้อซึ่งเป็นอาหารชนิดเดียวกับอาหารที่ใช้ในถังหมัก โดยได้ทำ การศึกษา

รูปแบบการเติบโตของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ในระดับฟลาสก์ 2 ขั้นตอน คือ การเตรียมกล้าเชื้อขั้นที่ 1 ในอาหารเหลว YPD และการเตรียม กล้าเชื้อขั้นที่ 2 ในอาหารสังเคราะห์สูตร Syn6

จากการศึกษาการเตรียมกล้าเชื้อขั้นที่ 1 (ภาพที่ 4-2) เมื่อนำเชื้อยีสต์ที่เก็บ รักษาในกลีเซอ-รอลที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ถ่ายลงในอาหารเหลว YPD พบว่าความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 1.00±0.03 กรัมต่อลิตร จากนั้นเชื้อสามารถเติบโตได้อย่างต่อเนื่อง จนมีความเข้มข้นของเซลล์สูงสุดเท่ากับ 9.25±0.58 กรัมต่อลิตร หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 16 ชั่วโมง โดยมีค่าอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.25±0.00 ต่อชั่วโมง ทั้งนี้ พบว่าหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 16 ชั่วโมง เชื้อได้เข้าสู่ระยะการเติบโตลด (deceleration growth phase) ซึ่งระยะดังกล่าวมีปริมาณเซลล์ค่อนข้างมาก และเซลล์ส่วนใหญ่เป็นเซลล์ที่พร้อมจะเจริญต่อไป ได้ทันทีหลังจากเติมกล้าเชื้อลงในอาหารที่เหมาะสม (เทพปัญญา และ วรสิทธิ์, 2553) ดังนั้น ผู้วิจัยจึงเลือกกล้าเชื้อที่มีอายุ 16 ชั่วโมง ถ่ายลงสู่อาหารสังเคราะห์สูตร Syn6 เพื่อศึกษารูปแบบการเติบโตกล้าเชื้อขั้นที่ 2 ต่อไป

<u>ภาพที่ 4-2</u>

รูปแบบการเติบโตของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ในการเตรียมกล้าเชื้อขั้นที่ 1 ในอาหารเหลว YPD ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

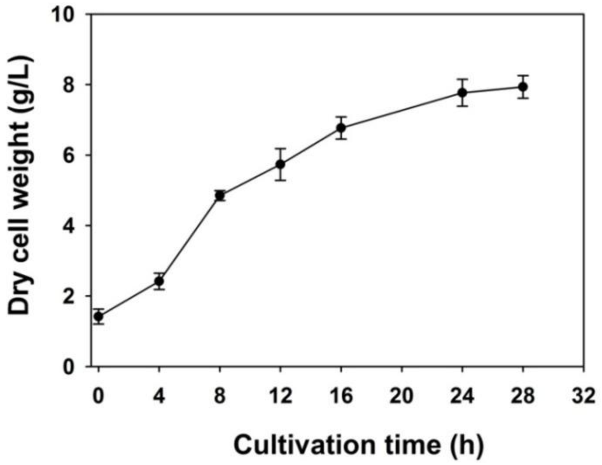


การเตรียมกล้าเชื้อขั้นที่ 2 ทำโดยถ่ายกล้าเชื้อขั้นที่ 1 อายุ 16 ชั่วโมง ลงในอาหารสังเคราะห์สูตร Syn6 ซึ่งกำหนดค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นเท่ากับ 1 ($OD_{600}\approx 1$) พบว่า ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 1.42±0.21 กรัมต่อลิตร และเชื้อสามารถเติบโตได้ทันทีโดยไม่พบระยะการปรับตัว

รวมถึงเชื้อสามารถเติบโตได้อย่างต่อเนื่อง ซึ่งมีค่าอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.15±0.01 ต่อชั่วโมง ทั้งนี้ พบว่าหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อเริ่มเข้าสู่ระยะการเติบโตลด และมีความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 7.77±0.39 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4-3) ดังนั้น ผู้วิจัยจึงเลือกระยะเวลาในการเตรียมกล้าเชื้อขั้นที่ 2 เท่ากับ 24 ชั่วโมง สำหรับเตรียมกล้าเชื้อในการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพต่อไป

<u>ภาพที่ 4-3</u>

รูปแบบการเติบโตของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ในการเตรียมกล้าเชื้อขั้นที่ 2 ในอาหารสังเคราะห์สูตร Syn6 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส



4.2 การทดลองที่ II: การศึกษาอิทธิพลของ ค่าพีเอชและอุณหภูมิต่อการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสในถังปฏิกรณ์ชีวภาพโดยใช้กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์

4.2.1 อิทธิพลของค่าพีเอช

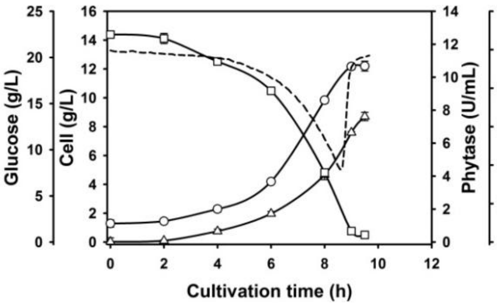
พีเอชเป็นปัจจัยที่ส่งผลทั้งการเติบโต การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน รวมถึงความเสถียรของรีคอมบิแนนท์โปรตีน (Jahic *et al*., 2003; Sreekrishna *et al*., 1997) จากการรายงานก่อนหน้า นี้พบว่าในระบบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดยยีสต์ *P. pastoris* พีเอชส่งผลต่อความสำเร็จในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนทั้งในด้านอัตราการผลิต คุณภาพของโปรตีนเป้าหมายและกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (Chiruvolue *et al*., 1998; Charoenrat *et al*., 2013) เมื่อพิจารณาจากงานวิจัยที่เกี่ยวข้องพบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนขึ้นอยู่กับชนิดของโปรตีนเป้าหมายด้วยเช่นกัน เช่น พีเอช 4.0 มีความเหมาะสมในการผลิตฟิวชันโปรตีน CBM-CALB (cellulose-binding module *Candida antarctica* lipase B) (Jahic *et al*., 2003)

ในขณะที่พีเอช 5.0 เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เอนโดกลูแคเนสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris* KM71 (Charoenrat *et al*., 2013) สำหรับงานวิจัยในส่วนนี้มุ่งเน้นศึกษาอิทธิพลของค่าพีเอชต่อการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสในถังปฏิกรณ์ชีวภาพโดยใช้กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ ซึ่งทำการศึกษาที่ 5 พีเอชควบคุม คือ พีเอช 4.0, พีเอช 5.0, พีเอช 6.0, พีเอช 6.5 และพีเอช 7.0 โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 1000 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหาร.นาที (vvm) ซึ่งสภาวะดังกล่าวอ้างอิงจากสภาวะมาตรฐานในการเพาะเลี้ยงยีสต์ *P. pastoris* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (Jahic *et al*., 2002)

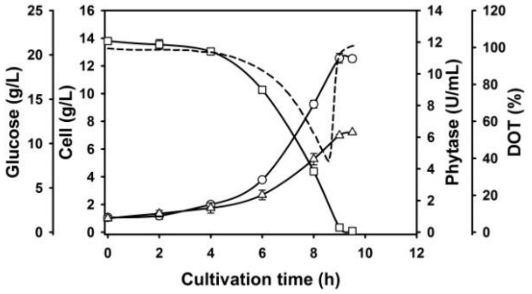
<u>ภาพที่ 4-4</u>

อิทธิพลของพีเอชต่อรูปแบบการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* (ก) พีเอช 4.0 (ข) พีเอช 5.0 (ค) พีเอช 6.0 (ง) พีเอช 6.5 และ (จ) พีเอช 7.0

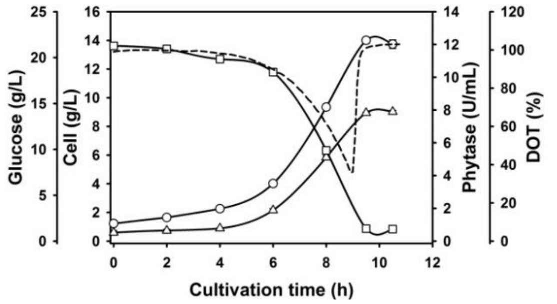
(ก) พีเอช 4.0



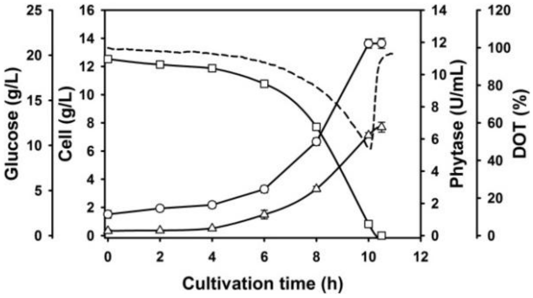
(ข) พีเอช 5.0



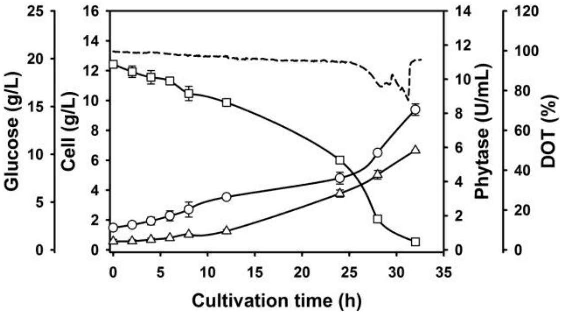
(ค) พีเอช 6.0

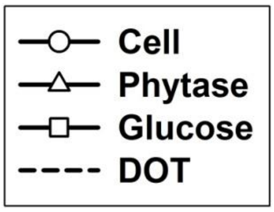


(ง) พีเอช 6.5



(จ) พีเอช 7.0





4.2.1.1 อิทธิพลของค่าพีเอชต่อการเติบโตของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica*

จากผลการทดลอง (ภาพที่ 4-4 และตารางที่ 4-1) พบว่า การเพาะเลี้ยงรีคอม - บิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ที่พีเอช 4.0, 5.0, 6.0 และ 6.5 เซลล์สามารถเติบโตได้อย่างต่อเนื่องหลังจากถ่ายกล้าเชื้อลงสู่ถังหมัก สอดคล้องกับความเข้มข้นของกลูโคสที่มีค่าลดลง โดยมีระยะปรับ ตัวประมาณ 2.5-3.5 ชั่วโมง และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงอยู่ในช่วง 9.5-10.5 ชั่วโมง ในขณะที่การเพาะเลี้ยงที่พีเอช 7.0 พบว่ามีระยะการปรับตัวและระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงมากกว่าที่พีเอชอื่นประมาณ 3 เท่า (ภาพที่ 4-4จ) ทั้งนี้ เมื่อเรียงลำดับความ เข้มข้นของเซลล์สูงสุด ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในแต่ละพีเอช พบว่าที่พีเอช 6.0 มีความเข้มข้นเซลล์สูงสุดเท่ากับ 14.00±0.21 กรัมต่อลิตร รองลงมา คือ พีเอช 6.5 (13.62±0.32 กรัมต่อลิตร), พีเอช 5.0 (12.86±0.34 กรัมต่อลิตร), พีเอช 4.0 (12.17±0.21 กรัมต่อลิตร) และมีค่าน้อยสุดที่พีเอช 7.0 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 9.39±0.39 กรัมต่อลิตร สำหรับค่าอัตราการเติบโตจำเพาะ (μ) ในการเพาะเลี้ยงที่พีเอช 4.0-6.5 มีค่าใกล้เคียงกันอยู่ในช่วง 0.33-0.37 ต่อชั่วโมง ในขณะที่การเพาะเลี้ยงที่พีเอช 7.0 มีค่าอัตราการเติบโตจำเพาะน้อยกว่าประมาณ 4.5 เท่า (ภาพที่ 4-5)

จากผลการศึกษาในภาพที่ 4-5 พบว่าคล้ายกับการรายงานก่อนหน้าโดย Wegner ในปี ค.ศ. 1983 ที่กล่าวถึงการเพาะเลี้ยงยีสต์ *P. pastoris* ว่าพีเอชในการเพาะเลี้ยงในช่วง 3.0-7.0 ส่งผลให้อัตราการเติบโตต่างกันเล็ก น้อย เมื่อไม่มีปัจจัยอื่นเข้ามาเกี่ยวข้อง อย่างไรก็ตาม สำหรับการศึกษานี้ไม่ได้ทำการศึกษาที่พีเอช 3.0 และการเพิ่มพีเอชในการเพาะเลี้ยงเป็นพีเอช 7.0 ส่งผลให้อัตราการเติบโตจำเพาะลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้ จากผลการทดลองดังกล่าวพบว่ายีสต์ *O. thermomethanolica* สามารถเติบโตได้ในช่วงพีเอชที่กว้างคือ พีเอช 4.0-6.5 และมีค่าอัตราการการเติบโตจำเพาะที่ใกล้เคียงกันซึ่งส่งผลดีในการนำมาใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านเพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนเมื่อโปรตีนดังกล่าวมีความเสถียรในช่วงพีเอชที่แตกต่างกัน

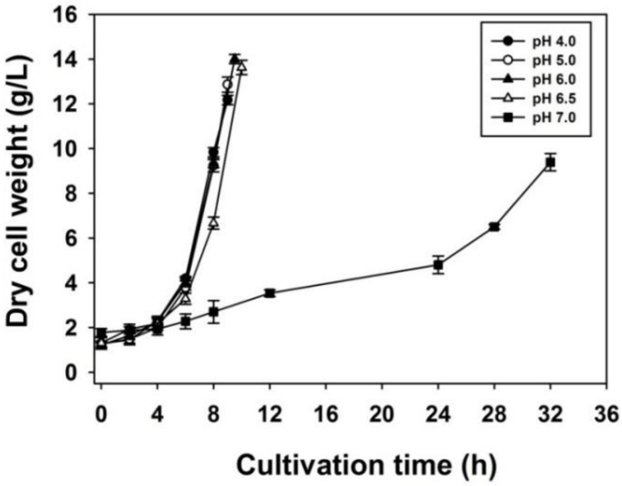
เมื่อพิจารณาผลได้ของเซลล์จากสับสเทรต ($Y_{x/s}$) พบว่า การเพิ่มค่าพีเอชจาก 4.0 เป็น 6.0 ส่งผลให้ค่าผลได้ของเซลล์จากสับสเทรตเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจาก 0.51±0.01 $กรัม_{เซลล์}$ต่อ$กรัม_{สับสเทรต}$ เป็น 0.64±0.03 $กรัม_{เซลล์}$ต่อ$กรัม_{สับสเทรต}$ อย่างไรก็ตาม ที่ค่าพีเอช 7.0 ทำให้ค่าผลได้ของเซลล์จากสับสเทรตลดลงเหลือ 0.43±0.03 $กรัม_{เซลล์}$ต่อ$กรัม_{สับสเทรต}$ ซึ่งสอดคล้องกับการเกิดตะกอนของอาหาร Syn6 ที่มากขึ้นเมื่อค่าพีเอชของอาหารสูงขึ้น โดยเป็นไปได้ว่าที่พีเอช 7.0 ธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเติบโตของเซลล์ในอาหาร Syn6 อาจเกิดการตกตะกอนและอยู่ในรูปที่เซลล์ไม่สามารถนำไปใช้ได้ ทำให้เซลล์เติบโตได้น้อยและใช้ระยะเวลาในการปรับตัวนาน

<u>ภาพที่ 4-5</u>

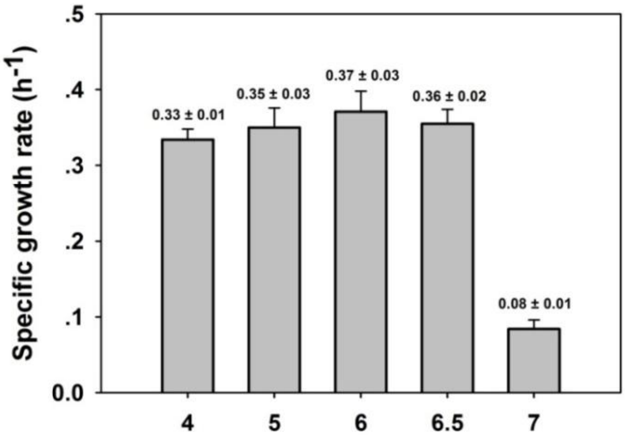
อิทธิพลของค่าพีเอชต่อการเติบโตของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica*

(ก) น้ำหนักเซลล์แห้ง และ (ข) อัตราการเติบโตจำเพาะ

(ก) น้ำหนักเซลล์แห้ง



(ข) อัตราการเติบโตจำเพาะ



4.2.1.2 อิทธิพลของค่าพีเอชต่อการผลิตเอนไซม์เตสโดยรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica*

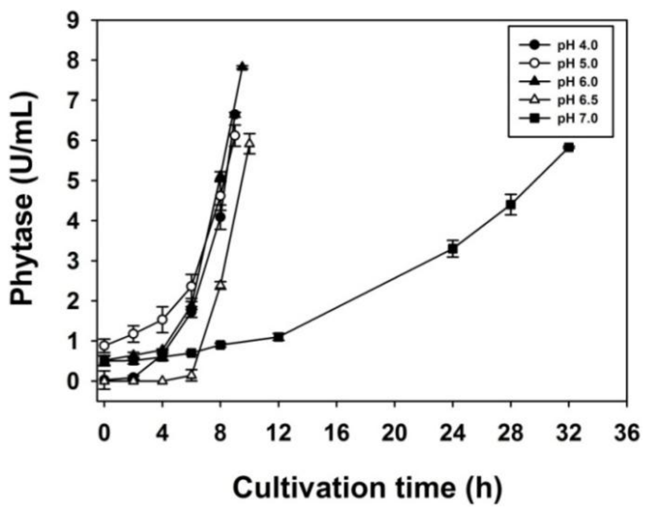
จากผลการทดลอง (ภาพที่ 4-4) พบว่า หลังจากถ่ายกล้าเชื้อลงสู่ถังหมักเซลล์สามารถผลิตเอนไซม์ไฟเตสได้อย่างต่อเนื่องพร้อมกับการเติบโต ซึ่งการเพาะเลี้ยงที่พีเอชต่างๆ ส่งผล

ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสสูงสุดมีค่าแตกต่างกัน โดยการเพาะเลี้ยงที่พีเอช 6.0 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสสูงที่สุดเท่ากับ 7.83±0.04 หน่วยต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 4-6 และ ตารางที่ 4-1) และมีค่ามากกว่าการเพาะเลี้ยงที่พีเอช 4.0, 5.0, 6.5 และ 7.0 ประมาณ 15.2, 21.8, 20.4 และ 25.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อพิจารณาค่าพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างผลผลิต ได้แก่ ผลได้ของผลิตภัณฑ์จากสับสเทรต ($Y_{p/s}$) และอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์เชิงปริมาตร (Q_p) พบว่า การเพาะเลี้ยงที่พีเอช 6.0 ให้ค่าสูงสุดเช่นกันซึ่งมีค่าเท่ากับ 366.86±1.84 หน่วยต่อกรัม$_{\text{สับสเทรต}}$ และ 769.11±3.86 หน่วยต่อลิตร.ชั่วโมง ตามลำดับ ทั้งนี้ จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเซลล์มีการสร้างผลิตภัณฑ์ไปพร้อมกับการเติบโตและยังคงมีการสร้างผลิตภัณฑ์อยู่ถึงแม้ว่าเซลล์จะหยุดการเติบโตแล้วก็ตาม จากรูปแบบการสร้างผลิตภัณฑ์ดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าระบบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดยยีสต์ *O. thermomethanolica* มีการสร้างผลิตภัณฑ์ในลักษณะ mixed growth associated product

เมื่อพิจารณาอิทธิพลของพีเอชต่อการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสพบว่า พีเอช 6.0 เป็นพีเอชที่มีความเหมาะสมที่สุด เนื่องจากการเพาะเลี้ยงที่พีเอช 6.0 ให้ค่าความเข้มข้นของเซลล์สูงสุดจึงส่งผลให้ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตส และค่าพารามิเตอร์อื่นๆ ที่แสดงถึงความสามารถในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนมีค่าสูงสุด ดังนั้น ผู้วิจัยจึงเลือกพีเอช 6.0 เป็นพีเอชควบคุมเพื่อใช้ในการศึกษาในระบบการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ต่อไป

<u>ภาพที่ 4-6</u>

อิทธิพลของค่าพีเอชต่อการผลิตเอนไซม์ไฟเตสของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica*



ตารางที่ 4-1

ข้อมูลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ที่มีการแปรผันค่าพีเอช ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพโดยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์

ข้อมูลจากกระบวนเพาะเลี้ยง	พีเอชที่ควบคุม				
	พีเอช 4.0	พีเอช 5.0	พีเอช 6.0	พีเอช 6.5	พีเอช 7.0
น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	12.17 ±0.21	12.86 ±0.34	14.00 ±0.21	13.62 ±0.32	9.39 ±0.39
กิจกรรมเอนไซม์ไฟเตส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	6.64 ±0.06	6.12 ±0.06	7.83 ±0.04	6.23 ±0.16	5.82 ±0.03
อัตราการเติบโตจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)	0.33 ±0.01	0.35 ±0.03	0.37 ±0.03	0.36 ±0.02	0.08 ±0.01
ผลได้ของเซลล์จากสับสเทรต (กรัม$_{เซลล์}$ต่อกรัม$_{สับสเทรต}$)	0.51 ±0.01	0.56 ±0.06	0.64 ±0.03	0.62 ±0.05	0.43 ±0.03
ผลได้ของผลิตภัณฑ์จากสับสเทรต (หน่วยต่อกรัม$_{สับสเทรต}$)	311.00 ±2.84	249.13 ±10.20	366.86 ±1.84	324.60 ±5.92	286.62 ±1.32
อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์เชิงปริมาตร (หน่วยต่อลิตร.ชั่วโมง)	735.00 ±6.73	582.10 ±23.83	769.11 ±3.86	593.75 ±10.83	166.45 ±0.76
ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)	9.50	9.50	10.50	10.50	32.00
ระยะปรับตัว (ชั่วโมง)	2.56	2.52	2.41	3.85	10.08

4.2.2 อิทธิพลของอุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการเติบโต การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน รวมถึงการเสื่อมสลายของรีคอมบิแนนท์โปรตีน จากการรายงานของ Cos และคณะ (2006) พบว่า การเพิ่มอุณหภูมิสูงกว่า 32 องศาเซลเซียส ในการเพาะเลี้ยง *P. pastoris* ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเติบโตและการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน นอกจากนี้ อุณหภูมิ ยังมีผลต่อการเสื่อมสลาย (degradation) และการม้วน/พับตัว (protein folding) ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน ซึ่งมีการรายงานว่าการลดอุณหภูมิสามารถลดการเกิดโปรติไลซิส (proteolysis) เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสลดลง (Li *et al*., 2001; Hong *et al*., 2002) นอกจากนี้ ระดับของการแสดงออกของยีน

ภายใต้การควบคุมการแสดงออกโดยโปรโมเตอร์แต่ละชนิดมีระดับที่ต่างกันในแต่ละอุณหภูมิด้วย (Amuel *et al.*, 2000; Romano *et al.*, 2004) ประกอบกับ Limtong และคณะ (2005) ได้รายงานว่า ยีสต์ *O. thermomethanolica* สามารถเติบโตได้ในช่วงอุณหภูมิ 30-42 องศาเซลเซียส ดังนั้นงานวิจัยในส่วนนี้ได้ทำการแปรผันอุณหภูมิที่ 30, 34, 38, 40 และ 42 องศาเซลเซียส รวมถึงการเพาะเลี้ยงโดยไม่มีการควบคุมอุณหภูมิ เพื่อศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสโดยควบคุมพีเอชที่ 6.0 อัตราการกวน 1000 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 ลิตรต่อ.ลิตรนาที ซึ่งผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4-7

4.2.2.1 อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการเติบโตของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica*

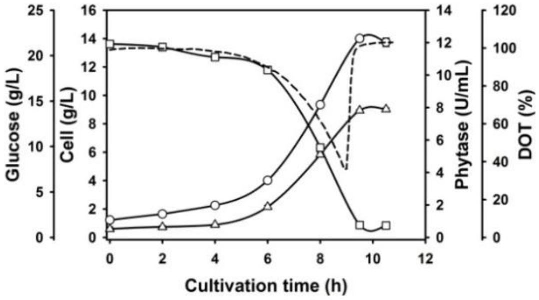
จากผลการทดลอง (ภาพที่ 4-7) พบว่าการเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ที่อุณหภูมิ 30 และ 34 องศาเซลเซียส มีรูปแบบการเติบโตและระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงใกล้เคียงกันประมาณ 9 ชั่วโมง โดยมีความเข้มข้นของเซลล์สูงสุดเท่ากับ 14.00±0.21 และ 14.13±0.26 กรัมต่อลิตร ค่าผลได้ของเซลล์จากสับสเทรต ($Y_{x/s}$) เท่ากับ 0.64±0.03 และ 0.64±0.01 กรัม$_{\text{เซลล์}}$ต่อกรัม$_{\text{สับสเทรต}}$ และอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.37±0.03 และ 0.43±0.01 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ ทั้งนี้การเพิ่มอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงที่สูงกว่า 34 องศาเซลเซียส ส่งผลให้ความเข้มข้นของเซลล์สูงสุด ผลได้ของเซลล์จากสับสเทรต และอัตราการเติบโตจำเพาะมีค่าลดลง รวมถึงใช้ระยะเวลาในการปรับตัวและการเพาะเลี้ยงที่มากขึ้น (ภาพที่ 4-8 และตารางที่ 4-2) นอกจากนี้จากผลการทดลองดังกล่าวพบว่า รีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* สามารถเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตาม การเพิ่มอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงถึง 42 องศาเซลเซียส ไม่พบการเติบโตของเซลล์แม้ว่าทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 84 ชั่วโมง (ภาพที่ 4-7จ) ดังนั้น จากผลการทดลองข้างต้น จึงกล่าวได้ว่า รีคอมบิแนนท์ยีส ต์ *O. thermomethanolica* สามารถเติบโตได้ในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 30-40 องศาเซลเซียส ซึ่งผลที่ได้ไม่สอดคล้องกับการรายงานของ Harnpicharnchai และคณะ (2014) ที่ระบุว่ายีสต์ *O. thermomethanolica* สามารถเติบโตได้ในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 30-42 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตาม การรายงานของ Harnpicharnchai และคณะ (2014) เป็นการรายงานผลที่ได้จากการศึกษาในระดับฟลาสก์ ซึ่งรูปแบบการถ่ายโอนความร้อนมีความแตกต่างจากระบบการเพาะเลี้ยงในถังหมัก นอกจากนี้เมื่อพิจารณากราฟ Arrhenius plot (ภาพที่ 4-8ค) พบว่า เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นส่งผลให้อัตราการเติบโตจำเพาะของเซลล์ค่อยๆ เพิ่มขึ้น (30-34 องศาเซลเซียส) แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเติบโตส่งผลให้อัตราการเติบโต จำเพาะ ของเซลล์ลดลงอย่างรวดเร็ว

(มากกว่า 34 องศาเซลเซียส) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Jahic และคณะ (2003) ที่กล่าวว่าการเพิ่มหรือลดอุณหภูมิจากอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเติบโตส่งผลให้อัตราการเติบโตจำเพาะมีค่าลดลง

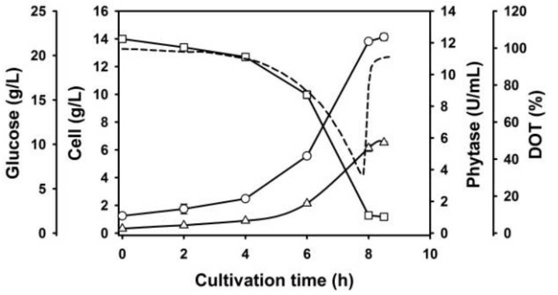
<u>ภาพที่ 4-7</u>

อิทธิพลของอุณหภูมิต่อรูปแบบการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* (ก) อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (ข) อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส (ค) 38 องศาเซลเซียส (ง) 40 องศาเซลเซียส และ (จ) 42 องศาเซลเซียส

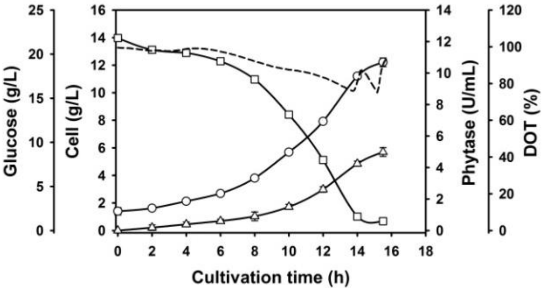
(ก) 30 องศาเซลเซียส



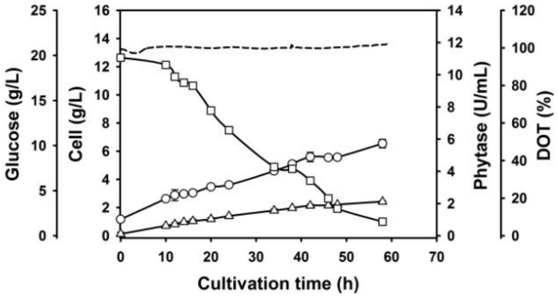
(ข) 34 องศาเซลเซียส



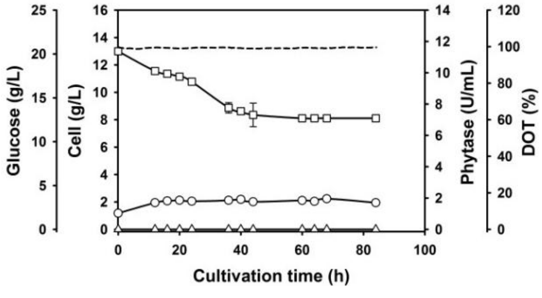
(ค) 38 องศาเซลเซียส

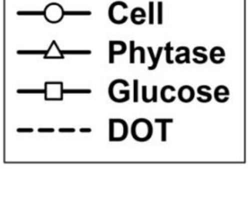


(ง) 40 องศาเซลเซียส



(จ) 42 องศาเซลเซียส

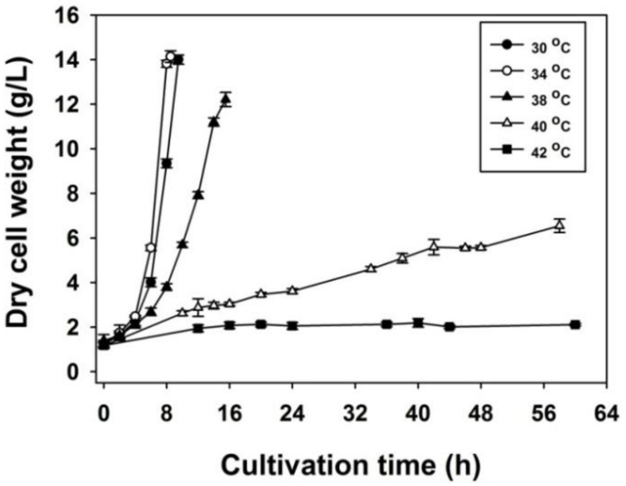




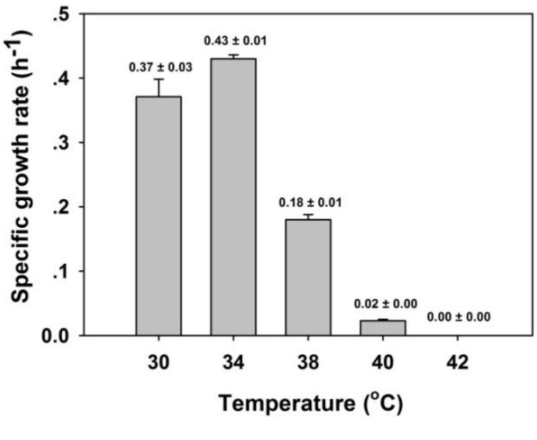
<u>ภาพที่ 4-8</u>

อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการเติบโตของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* (ก) น้ำหนักเซลล์แห้ง (ข) อัตราการเติบโตจำเพาะ และ (ค) การศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการเติบโตในรูปของกราฟ Arrhenius

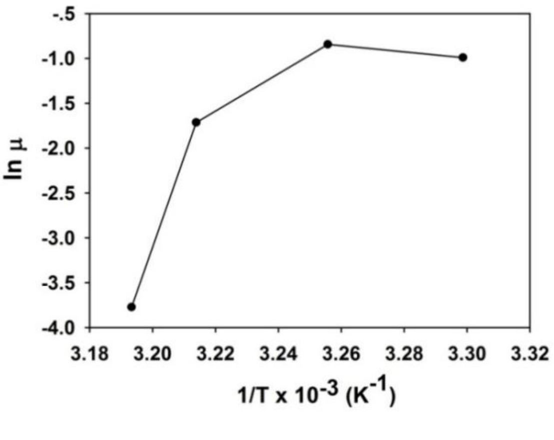
(ก) น้ำหนักเซลล์แห้ง



(ข) อัตราการเติบโตจำเพาะ



(ค) การศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการเติบโตในรูปของกราฟ Arrhenius



ตารางที่ 4-2

ข้อมูลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ที่มีการแปรผันอุณหภูมิในถังปฏิกรณ์ชีวภาพโดยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์

ข้อมูลจากกระบวนเพาะเลี้ยง	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)				
	30	34	38	40	42
น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	14.00 ±0.21	14.13 ±0.26	12.21 ±0.32	6.54 ±0.30	1.94 ±0.09
กิจกรรมเอนไซม์ไฟเตส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	7.89 ±0.09	5.72 ±0.05	4.99 ±0.28	2.12 ±0.05	-
อัตราการเติบโตจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)	0.37 ±0.03	0.43 ±0.01	0.18 ±0.01	0.02 ±0.00	0
ผลได้ของเซลล์จากสับสเทรต (กรัม$_{\text{เซลล์}}$ต่อกรัม$_{\text{สับสเทรต}}$)	0.64 ±0.03	0.64 ±0.01	0.52 ±0.05	0.29 ±0.02	-
ผลได้ของผลิตภัณฑ์จากสับสเทรต (หน่วยต่อกรัม$_{\text{สับสเทรต}}$)	366.86 ±1.84	271.21 ±2.44	240.02 ±13.41	110.03 ±2.68	-
อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์เชิงปริมาตร (หน่วยต่อลิตร.ชั่วโมง)	769.11 ±3.86	639.03 ±5.75	321.75 ±17.97	34.60 ±0.84	-
ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)	10.50	8.50	15.50	58.00	84.00
ระยะปรับตัว (ชั่วโมง)	2.41	2.45	2.40	-	-

หมายเหตุ : 1) เนื่องจากที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เซลล์ไม่มีการเติบโตจึงไม่สามารถคำนวณค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ได้

2) สัญลักษณ์ – คือ ไม่ได้ทำการวิเคราะห์

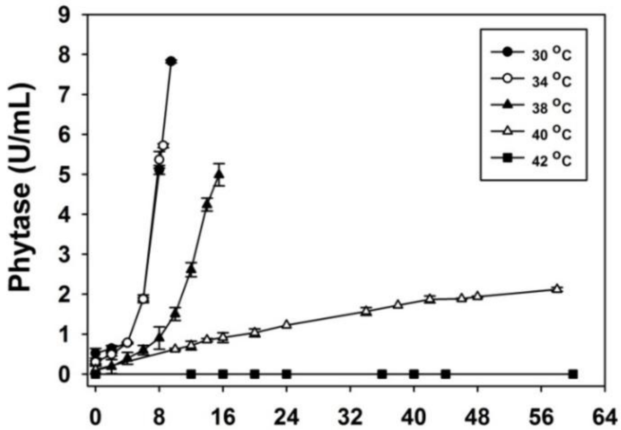
4.2.2.2 อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์ไฟเตสโดยรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica*

จากผลการทดลอง (ภาพที่ 4-7) พบว่า หลังจากถ่ายกล้าเชื้อลงสู่ถังหมักเซลล์สามารถผลิตเอนไซม์ไฟเตสได้อย่างต่อเนื่องพร้อมกับการเติบโต ซึ่งการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิต่างๆ ส่งผลให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสสูงสุดมีค่าแตกต่างกัน ทั้งนี้การเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30-40

องศาเซลเซียสพบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสมีค่าลดลงเมื่ออุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม ไม่สามารถตรวจพบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสในการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เนื่องจากไม่มีการเติบโต ของเซลล์ โดยการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสสูงสุดเท่ากับ 7.89±0.09 หน่วยต่อมิลลิลิตร รองลงมาคืออุณหภูมิ 34, 38 และ 40องศาเซลเซียส ซึ่งให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสสูงสุดเท่ากับ 5.72±0.05, 4.99±0.28 และ 2.12±0.05 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 4-9 และ ตารางที่ 4-2) นอกจากนี้ ค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์จากสับ-สเทรต ($Y_{p/s}$) และอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์เชิงปริมาตร (Q_p) มีค่าสูงสุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เช่นกัน โดยมีค่าเท่ากับ 366.86±1.84 หน่วยต่อกรัม $_{\text{สับสเทรต}}$ และ 769.11±3.86 หน่วยต่อลิตร.ชั่วโมง ตามลำดับ และผลการทดลองที่ได้มีความสอดคล้องกับการรายงานของ Cassland และ Jönsson (1999) ที่กล่าวว่าการลดอุณหภูมิส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส (laccase) มีค่าสูงขึ้น รวมถึง Zhang และคณะ (2007) ได้รายงานว่าการลดอุณหภูมิในกระบวนการผลิตส่งผลให้อัตราการผลิตสูงขึ้นด้วย อย่างไรก็ตาม เนื่องจากงานวิจัยนี้มุ่งเน้นที่จะพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงยีสต์ *O. thermomethanolica* เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งการลดต้นทุนในการผลิตถือเป็นจุดประสงค์หลักที่สำคัญ และจากผลการทดลองพบว่าการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 และ 34 องศาเซลเซียส ให้ผลการเติบโตและการผลิตไม่ต่างกันมากนัก ดังนั้น ผู้วิจัยจึงเลือกอุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิควบคุมเพื่อใช้ในการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

<u>ภาพที่ 4-9</u>

อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์ไฟเตสของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica*



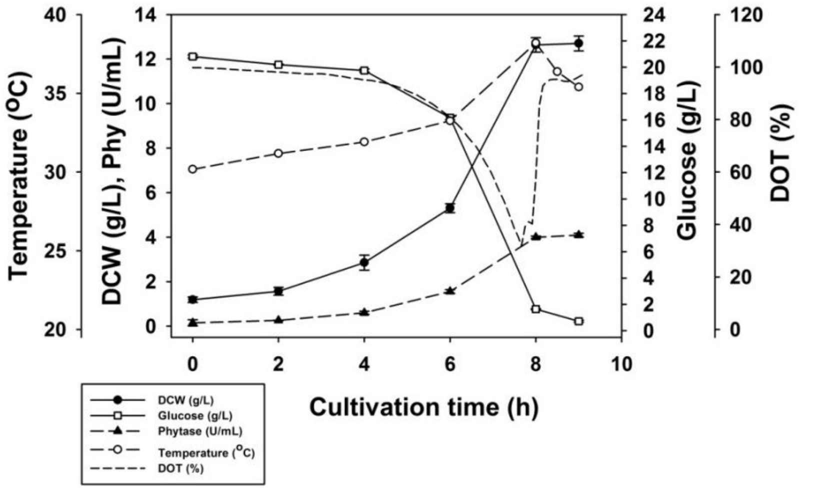
4.2.2.3 การเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* โดยไม่มีการควบคุมอุณหภูมิระหว่างการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์

เนื่องจากยีสต์ *O. thermomethanolica* เป็นยีสต์สายพันธุ์ทนร้อน (Limtong *et al.*, 2008) ที่สามารถทนอุณหภูมิได้ถึง 40 องศาเซลเซียส (จากผลการทดลองข้อ 4.2.2.1) ดังนั้น จึงมีความเป็นไปได้ที่จะดำเนินการเพาะเลี้ยง โดยไม่มีการควบคุมอุณหภูมิ ซึ่ง งานวิจัยในส่วนนี้ทำการศึกษารูปแบบการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตส จาก รีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* โดยไม่มีการควบคุมอุณหภูมิระหว่างการเพาะเลี้ยง ซึ่งอุณหภูมิเริ่มต้นก่อนการถ่ายกล้าเชื้อ เท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิของ ห้องที่ทำการทดลองเท่ากับ 24 องศาเซลเซียส โดยควบคุมพีเอชที่ 6.0 อัตราการกวน 1000 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 ลิตรต่อลิตร.นาที

<u>ภาพที่ 4-10</u>

รูปแบบการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสของรีคอมบิแนนท์ยีสต์

O. thermomethanolica เมื่อไม่มีการควบคุมอุณหภูมิระหว่างการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์



จากการเพาะเลี้ยง เมื่อไม่มีการควบคุมอุณหภูมิ โดยที่ อุณหภูมิของ ห้องที่ทำการทดลองมีค่าคงที่ เท่ากับ 24 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 4-10) พบว่า หลังจากถ่ายกล้าเชื้อลงสู่ถัง หมักเซลล์สามารถเติบโตได้อย่างต่อเนื่องซึ่งรูปแบบการเติบโตคล้ายกับการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 และ 34 องศาเซลเซียส โดยมีระยะปรับตัวค่อนข้างสั้น คือ 1.85 ชั่วโมง ในระหว่างที่เ ซลล์มีการเติบโต อุณหภูมิของน้ำหมัก มีค่าเพิ่มสูงขึ้นจากอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ไปจนถึง 38 องศาเซลเซียส (8 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง) จากนั้นเมื่อสับสเทรตถูกใช้จนหมดและเซลล์หยุดการเติบโตอุณหภูมิของน้ำ

หมักจะลดลงอย่างรวดเร็ว แสดงให้เห็นว่าในระหว่างที่เซลล์มีการเติบโตเกิดการ คายความร้อนจากกระบวนการเมทาบอลิซึมออกสู่น้ำหมัก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระยะการเติบโตแบบเอกซ์โพเนนเชียล (exponential phase) การเพาะเลี้ยงดังกล่าวใช้ระยะเวลา 9 ชั่วโมง มีค่า ความเข้มข้นของเซลล์สูงสุดเท่ากับ 12.70±0.33 กรัมต่อลิตร กิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสมีค่าเท่ากับ 4.09±0.08 หน่วยต่อมิลลิลิตร และอัตราการเติบโตจำเพาะมีค่าเท่ากับ 0.37±0.01 ต่อชั่วโมง อย่างไรก็ตาม อุณหภูมิระหว่างการเพาะเลี้ยงมีการแปรผันอยู่ในช่วงที่เซลล์สามารถเติบโตและผลิตเอนไซม์ไฟเตสได้นั่นคืออยู่ในช่วง อุณหภูมิ 30-38 องศาเซลเซียส และเมื่อเปรียบเทียบค่าพารามิเตอร์ ที่เกี่ยวข้องกับการเติบโตและการสร้างผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงนี้กับการเพาะเลี้ยงที่ควบคุม อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการเติบโตพบว่า ให้ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ต่ำกว่าประมาณ 28.5 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4-3) และจากผลการทดลองดังกล่าวจึงได้ทำการศึกษาอิทธิพลของการเพิ่มอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ ซึ่งจะกล่าวในหัวข้อถัดไป

ตารางที่ 4-3

เปรียบเทียบผลจากการเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส และไม่มีการควบคุมอุณหภูมิในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

ข้อมูลจากกระบวนเพาะเลี้ยง	**ควบคุมอุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส**	**ไม่มีการควบคุมอุณหภูมิ**
น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	14.13±0.26	12.70±0.33
กิจกรรมเอนไซม์ไฟเตส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	5.72±0.05	4.09±0.08
อัตราการเติบโตจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)	0.43±0.01	0.37±0.01
ผลได้ของเซลล์จากสับสเทรต (กรัม$_{เซลล์}$ต่อกรัม$_{สับสเทรต}$)	0.64±0.01	0.59±0.03
ผลได้ของผลิตภัณฑ์จากสับสเทรต (หน่วยต่อกรัม$_{สับสเทรต}$)	271.21±2.44	200.43±4.30
อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์เชิงปริมาตร (หน่วยต่อลิตร.ชั่วโมง)	639.03±5.75	480.21±10.31
ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)	8.50	9.00
ระยะปรับตัว (ชั่วโมง)	2.45	1.85

4.3 การทดลองที่ III: การศึกษารูปแบบการเติมสับสเทรตที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไฟเตสในการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์

จากการรายงานก่อนหน้าเกี่ยวกับรูปแบบการเติมสับสเทรตในการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ พบว่า รูปแบบการเติมสับสเทรตมีผลต่ออัตราการสร้างผลิตภัณฑ์ และผลิตภัณฑ์รองที่เกิดขึ้น เช่น การเติมสับสเทรตแบบคงที่ (constant feeding) ส่งผลให้อัตราการผลิตไขมันจาก *Rhodosporidium toruloides* Y4 มากกว่าการเติมแบบครั้งคราว (intermittent feeding) ประมาณ 1.53 เท่า (Zhao *et al*., 2011) ในขณะที่การเติมแบบเอกซ์โพเนนเชียล (exponential feeding) สามารถสร้างผลิตภัณฑ์รองในรูปของอะซิเตทแม้อยู่ในสภาวะที่มีออกซิเจน (Xu *et al*., 1999) ดังนั้นรูปแบบการเติมสับสเทรตจึง มักมีผลต่อการสร้างผลิตภัณฑ์แต่ละชนิดแตกต่างกัน งานวิจัยในส่วนนี้จึงได้ทำการศึกษารูปแบบการเติมสับสเทรตในระยะการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ เพื่อเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์และผลผลิตเอนไซม์ไฟเตส โดยหลีกเลี่ยงการสร้างผลผลิตพลอยได้ในรูปเอทานอล และกรดอะซิติก ทั้งนี้ การเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีความหนาแน่นของเซลล์สูงส่งผลให้อัตราการผลิตเชิงปริมาตรมีค่าสูงขึ้นซึ่งถือเป็นวัตถุประสงค์ที่สำคัญในการผลิตระดับอุตสาหกรรม (Shojaosadati *et al*., 2008; Riesenberg and Guthke, 1999) อัตราการเติมสับสเทรตในงานวิจัยนี้ประกอบด้วย 2 รูปแบบหลัก คือ 1. การเติมสับสเทรตแบบกำหนดการเติมไว้ล่วงหน้า (feed forward regulation) ได้แก่ การเติมแบบเอกซ์โพเนนเชียล การเติมแบบคงที่ และการเติมแบบครั้งคราว (ปริมาตรสับสเทรตที่ใช้ในการเติม คือ 4 ลิตร) และ 2. การเติมสับสเทรตแบบย้อนกลับ (feedback regulation) โดยอาศัยค่าออกซิเจนละลายเป็นตัวควบคุมการเติมสับสเทรต (DO stat control feeding) (ปริมาตรสับสเทรตที่ใช้ในการเติม คือ 3 ลิตร) กระบวนการเพาะเลี้ยง ที่ใช้แบ่งออกเป็น 2 ระยะ คือ ระยะแบทช์ และระยะเฟด-แบทช์โดยการเพาะเลี้ยงเริ่มจากการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน จากนั้นเมื่อกลูโคสถูกใช้จนหมดจึงเข้าสู่ระยะเฟด-แบทช์โดยใช้การเติมสับสเทรตในรูปแบบต่างๆ ข้างต้น สภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง คือ ควบคุมอุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส พีเอช 6.0 อัตราการกวน 1000 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 ลิตรต่อลิตร.นาที

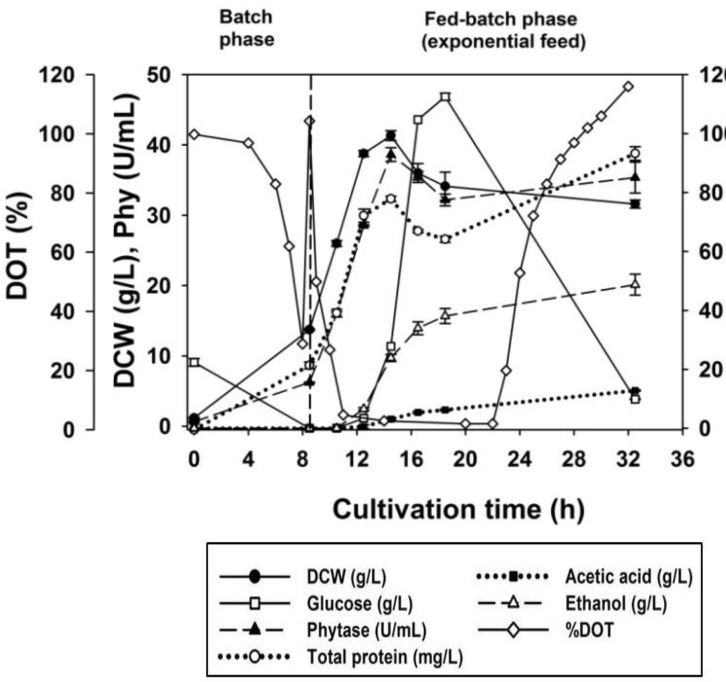
4.3.1 การเติม สับสเทรตด้วยอัตราเพิ่มขึ้น แบบเอกซ์โพเนนเชียล (exponential feeding)

จากผลการทดลองพบว่า การเพาะเลี้ยงในระยะแบทช์ใช้เวลา 8.5 ชั่วโมง จากนั้นจึงเข้าสู่ระยะเฟด-แบทช์โดยใช้อัตราการเติมแบบเอกซ์โพเนนเชียลที่มีอัตราการเติมสับสเทรตเริ่มต้นเท่ากับ 55.30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง หรือเท่ากับ 27.65 กรัม$_{\text{กลูโคส}}$ต่อชั่วโมง ซึ่งระยะเวลาที่ใช้ในการเติมสับ - สเทรตคือ 8 ชั่วโมง (ภาพที่ 4-11) ทั้งนี้ เมื่อพิจารณาการเติมสับสเทรตใน 5 ชั่วโมงแรกพบว่า เซลล์

สามารถเติบโตได้อย่างรวดเร็วโดยความเข้มข้นของเซลล์เพิ่มจาก 13.71±0.05 กรัมต่อลิตร เป็น 38.78±0.44 กรัมต่อลิตร เช่นเดียวกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตส และความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดมีค่าสูงขึ้นอย่างรวดเร็วเช่นกัน อย่างไรก็ตาม การเพิ่มอัตราการเติมสับสเทรตอย่างต่อเนื่องด้วยอัตราเอกซ์โพเนนเชียลทำให้ค่าอัตราการใช้สับสเทรตเพิ่มขึ้นด้วยอัตราเอกซ์โพเนนเชียลเช่นเดียวกัน ทั้งนี้ ระบบการเพาะเลี้ยงที่ดำเนินการมีการควบคุมอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศ รวมถึงสภาวะควบคุมอื่นให้คงที่ ดังนั้น ค่าอัตราการถ่ายเทมวลของออกซิเจนให้กับระบบจึงมีค่าคงที่ที่ค่าหนึ่ง ในขณะที่ความต้องการออกซิเจนของระบบเพิ่มขึ้นในอัตราที่สัมพันธ์กับอัตราการเติมสับสเทรตที่เพิ่มขึ้น ดังนั้น การเพิ่มอัตราการเติมสับสเทรตอย่างต่อเนื่องด้วยอัตราเพิ่มขึ้นแบบเอกซ์โพเนนเชียลจึงทำให้ค่าออกซิเจนละลายลดลงอย่างต่อเนื่องและระบบเกิดสภาวะจำกัดออกซิเจนที่ชั่วโมงที่ 5 ของการเติมสับสเทรต ณ เวลาการเพาะเลี้ยงนี้ อัตราการใช้สับสเทรตของระบบเริ่มถูกจำกัดด้วยอัตราการถ่ายเทมวลของออกซิเจน ซึ่งการเติมสับสเทรตด้วยอัตราเอกซ์โพเนนเชียลต่อไปส่งผลให้อัตราการเติมสับสเทรตสูงกว่าอัตราการใช้สับ สเทรตของระบบ และเริ่มเกิดการสะสมสับ-สเทรต ทำให้ ความเข้มข้นของกลูโคสมีค่าเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยมีความเข้มข้นสูงสุดเท่ากับ 112.50±1.18 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4-11) ซึ่งในสภาวะดังกล่าวพบว่ารีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* มีการสร้างผลิตภัณฑ์รองในรูปของเอทานอล และกรดอะซิติกได้ รวมถึงความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์รองเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องจนสิ้นสุดกระบวนการ ซึ่งหลังจากการเติมสับ - สเทรตจนครบ 4 ลิตร พบว่าความเข้มข้นของเซลล์ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตส และความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดมีค่าลดลง (12.5 ชั่วโมง ของการเพาะเลี้ยง) ซึ่งการลดลงดังกล่าวอาจเกิดจาก 2 สาเหตุ นั้นคือ 1) เกิดจากการเพิ่มปริมาตรของน้ำหมักอย่างรวดเร็ว เนื่องจากการใช้อัตราการเติมแบบเอกซ์โพเนนเชียล และ 2) เกิดจากการที่ผลิตภัณฑ์รองที่มีอยู่ในระบบยับยั้งการเติบโตและทำให้ผลิตภัณฑ์หลักของเซลล์ที่ได้จากสับสเทรตลดลง (Kalina, 1993; Kubota *et al*., 2004)

<u>ภาพที่ 4-11</u>

รูปแบบการเติบโต การผลิตเอนไซม์ไฟเตส และการสร้างผลิตภัณฑ์รองจากการเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ โดยใช้อัตราการเติมสับสเตรตแบบเอกซ์โพเนนเชียล



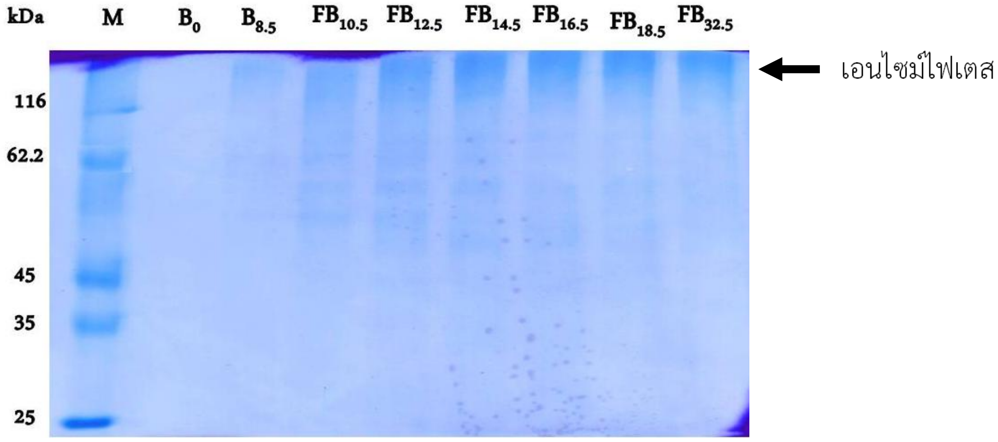
ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์โดยใช้อัตราการเติมแบบเอกซ์โพเนนเชียล คือ 32.5 ชั่วโมง โดยมีค่าความเข้มข้นเซลล์เท่ากับ 31.59±0.57 กรัมต่อลิตร ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟ - เตสเท่ากับ 35.360±2.195 หน่วยต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดมีค่าเท่ากับ 139.99±3.50 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของเอทานอลและกรดอะซิติกมีค่าเท่ากับ 48.70±3.55 และ 12.79±0.21 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อพิจารณาค่าพารามิเตอร์ต่างๆ พบว่า ผลได้ของเซลล์จากสับสเทรต ($Y_{x/s}$) มีค่าเท่ากับ 0.10±0.00 กรัม$_{\text{เซลล์}}$ต่อกรัม$_{\text{สับสเทรต}}$ ผลได้ของผลิตภัณฑ์จากสับสเทรต ($Y_{p/s}$) มีค่าเท่ากับ 117.77±2.63หน่วยต่อกรัม$_{\text{สับสเทรต}}$ ผลได้ของผลิตภัณฑ์จากเซลล์ ($Y_{p/x}$) มีค่าเท่ากับ 1107.84±24.73หน่วยต่อกรัม$_{\text{เซลล์}}$ อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์เชิงปริมาตร (Q_p) มีค่าเท่ากับ 1076.78±24.04 หน่วยต่อลิตร.ชั่วโมง และอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะ (q_p) มีค่าเท่ากับ 34.09±0.76 หน่วยต่อกรัม$_{\text{เซลล์}}$.ชั่วโมง

ผลจากการติดตามเอนไซม์ไฟเตสและการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE (ความเข้มข้นเจล 10 เปอร์เซ็นต์) แสดงดังภาพที่ 4-12 พบว่า แถบโปรตีนที่คาดว่าเป็นเอนไซม์

ไฟเตสมีน้ำหนักโมเลกุล มากกว่า 116 กิโลดาลตัน สอดคล้องกับการรายงานของ Tanapongpipat และคณะ (2012) ที่กล่าวว่าน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ภายใต้การควบคุมของ *OthGAP* มีค่าสูงกว่า 116 กิโลดาลตัน ทั้งนี้ แถบของโปรตีนเริ่มปรากฏอย่างชัดเจนเมื่อเข้าสู่ระยะเฟด-แบทช์ และความเข้มของแถบเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น สอดคล้องกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสที่มีค่าเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเช่นกัน

<u>ภาพที่ 4-12</u>

การติดตามเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์โดยใช้อัตราการเติมสับสเตรตแบบเอกซ์โพเนนเชียล; M คือ โปรตีนมาตรฐาน (กิโลดาลตัน), B คือ ตัวอย่างในระยะแบทช์, FB คือ ตัวอย่างในระยะเฟด-แบทช์ และ ตัวเลข คือ ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)



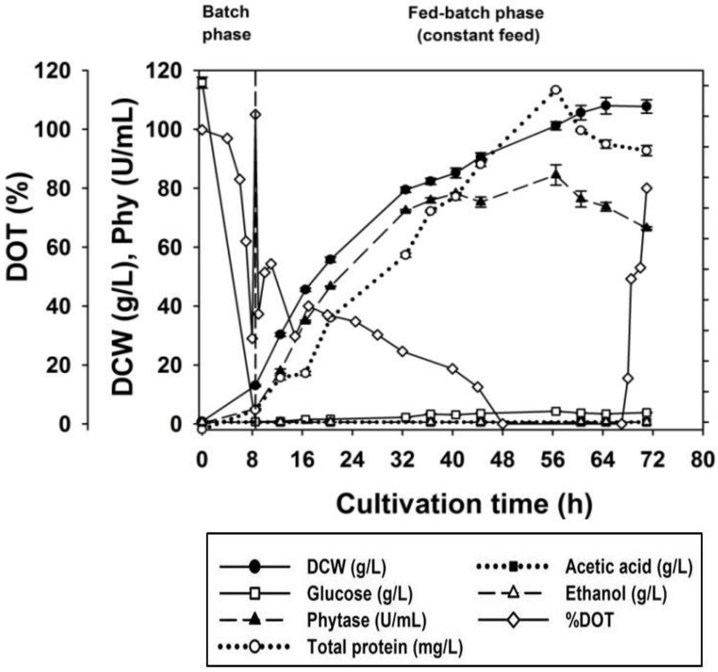
4.3.2 การเติมสับสเทรตด้วยอัตราการเติมแบบคงที่ (constant feeding)

ผล จากการศึกษารูปแบบการเติมสับสเทรตในระยะเฟด-แบทช์โดยใช้อัตราการเติมแบบคงที่ (65 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง หรือ เท่ากับ 32.5 กรัม$_{\text{กลูโคส}}$ต่อชั่วโมง) พบว่า ระยะเวลาที่ใช้ในการเติมสับ - สเทรต คือ 62.5 ชั่วโมง ซึ่งใช้เวลามากกว่าการเติมแบบเอกซ์โพเนนเชียล 54.5 ชั่วโมง เนื่องจากอัตราการเติมสับสเทรตที่เวลาต่างๆ จะเท่ากับอัตราการเติมสับสเทรตเริ่มต้น จากภาพที่ 4-13 เซลล์สามารถเติบโตได้อย่างต่อเนื่องแต่มีอัตราการเติบโตที่แตกต่างกัน โดยหลังจากการเติมสับสเทรตเป็นเวลา 23.5 ชั่วโมง (8.5-32.0 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง) เชื้อสามารถเติบโตได้อย่างรวดเร็ว ส่งผลให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสและความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดมีค่าสูงขึ้นอย่างรวดเร็วเช่นกัน สอดคล้องกับค่าออกซิเจนละลายที่มีค่าลดลงในระหว่างที่เชื้อมีการเติบโต หลังจากนั้นอัตราการเติบโตของเซลล์มีค่าลดลง ซึ่งในระหว่างการเพาะเลี้ยงพบว่าค่าออกซิเจนละลายลดต่ำลงถึง 0

เปอร์เซ็นต์ (48.0-67.0 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง) และช่วงเวลาดังกล่าวอัตราการเติบโตของเซลล์ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตส และความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดมีค่าลดลง ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจาก เมื่อเกิดสภาวะจำกัดออกซิเจน เซลล์มีอัตราการเติบโตที่ลดลง รวมถึงการสร้างผลผลิตลดลงด้วยเช่นกัน แต่ยังคงมีการเติมสับสเทรตเข้าสู่ระบบทำให้ความเข้มข้นลดลงเนื่องจากปริมาตรของน้ำหมักที่เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม การใช้อัตราการเติมแบบคงที่ไม่พบการสร้างผลิตภัณฑ์รองในรูปของเอทานอล และกรดอะซิติก ตลอดระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง ทั้งนี้ เนื่องจากการเติมสับสเทรตแบบคงที่มีอัตราการเติมที่น้อยเมื่อเปรียบเทียบกับการเติมแบบเอกซ์โพเนนเชียลทำให้ความเข้มข้นของสับสเทรตในระบบอยู่ในระดับต่ำกล่าวคือ เชื้อสามารถใช้สับสเทรตเพื่อการเติบโตและการสร้างผลิตภัณฑ์หลักได้อย่างรวดเร็วและต่อเนื่องแม้ในระหว่างการเพาะเลี้ยงค่าออกซิเจนละลายจะมีค่าลดลงและเกิดสภาวะจำกัดออกซิเจนในระยะหนึ่งก็ตาม

<u>ภาพที่ 4-13</u>

รูปแบบการเติบโต การผลิตเอนไซม์ไฟเตส และการสร้างผลิตภัณฑ์รองจากการเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์โดยใช้อัตราการเติมแบบคงที่



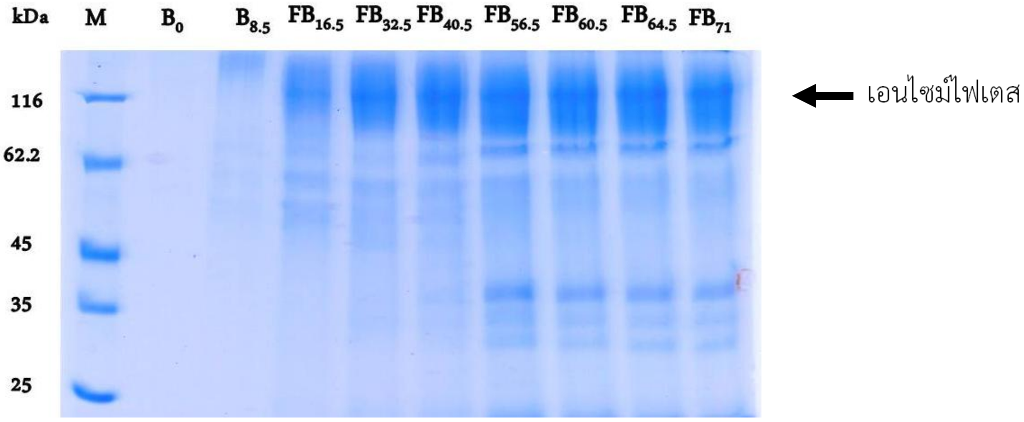
ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์โดยใช้อัตราการเติมแบบคงที่ คือ 71.0 ชั่วโมง โดยมีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 107.73±2.30 กรัมต่อลิตร ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสเท่ากับ

66.41±0.50 หน่วยต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดมีค่าเท่ากับ 543.54±9.93 มิลลิกรัมต่อลิตร และไม่พบการสร้างผลิตภัณฑ์รองในรูปของเอทานอล และกรดอะซิติก นอกจากนี้ ผลได้ของเซลล์จากสับสเทรต ($Y_{x/s}$) มีค่าเท่ากับ 0.38±0.01 กรัม$_{เซลล์}$ต่อกรัม$_{สับสเทรต}$ ผลได้ของผลิตภัณฑ์จากสับสเทรต($Y_{p/s}$) มีค่าเท่ากับ 233.26±1.73 หน่วยต่อกรัม$_{สับสเทรต}$ ผลได้ของผลิตภัณฑ์จากเซลล์ ($Y_{p/x}$) มีค่าเท่ากับ 615.25±4.56 หน่วยต่อกรัม$_{เซลล์}$ อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์เชิงปริมาตร (Q_p) มีค่าเท่ากับ 933.56±6.93 หน่วยต่อลิตร.ชั่วโมง และ อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะ (q_p) มีค่าเท่ากับ 8.67±0.06 หน่วยต่อกรัม$_{เซลล์}$.ชั่วโมง

ผลจากการติดตามเอนไซม์ไฟเตสและการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE (ความเข้มข้นเจล 10 เปอร์เซ็นต์) แสดงดังภาพที่ 4-14 ซึ่งพบว่า แถบโปรตีนมีลักษณะเป็นแถบกว้างโดยมีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 62 กิโลดาลตัน และมีแถบหลักอยู่ที่ 116 กิโลดาลตัน ซึ่งการเกิดแถบในลักษณะดังกล่าวอาจเกิดจากการเติมหมู่น้ำตาล (glycosylation) ให้กับเอนไซม์ไฟเตสในระดับที่ต่างกัน Tanapongpipat และคณะ (2012) นอกจากนี้ แถบของโปรตีนเริ่มปรากฏอย่างชัดเจนเมื่อเข้าสู่ระยะเฟด-แบทช์

<u>ภาพที่ 4-14</u>

การติดตามเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์โดยใช้อัตราการเติมสับสเทรตแบบคงที่; M คือ โปรตีนมาตรฐาน (กิโลดาลตัน), B คือ ตัวอย่างในระยะแบทช์, FB คือ ตัวอย่างในระยะเฟด-แบทช์ และ ตัวเลข คือ ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)



4.3.3 การเติมแบบครั้งคราว (intermittent feeding)

จากผลการทดลอง พบว่า การเพาะเลี้ยงในระยะแบทช์ใช้เวลา 8.5 ชั่วโมง จากนั้นจึงเข้าสู่ระยะเฟด-แบทช์โดยใช้อัตราการเติมแบบครั้งคราว ซึ่งการเติมแต่ละครั้งกำหนดให้ความเข้มข้นของกลูโคสมีค่าประมาณ 20 กรัมต่อลิตร โดยทำการเติมทั้งหมดจำนวน 21 ครั้ง (ตารางผนวก ค-5) ทั้งนี้อาศัยค่าออกซิเจนละลายที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วเป็นพารามิเตอร์ในการบ่งบอกว่าสับสเทรตถูกใช้จนหมดจึงทำการเติมสับสเทรตในครั้งถัดไป (ภาพที่ 4-15) ผลการทดลองพบว่า ในระยะเฟด-แบทช์เซลล์สามารถเติบโตได้อย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาที่มีการเติมสับสเทรตเข้าสู่ระบบ สอดคล้องกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสและความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดที่มีค่าสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องเช่นกัน โดยความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วง 0-20 กรัมต่อลิตร ทั้งนี้ การเติมสับสเทรตในแต่ละครั้งส่งผลให้ค่าออกซิเจนละลายลดลงอย่างรวดเร็วและมีค่าเท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 1.5-2.0 ชั่วโมง (ภาพที่ 4-15ข)

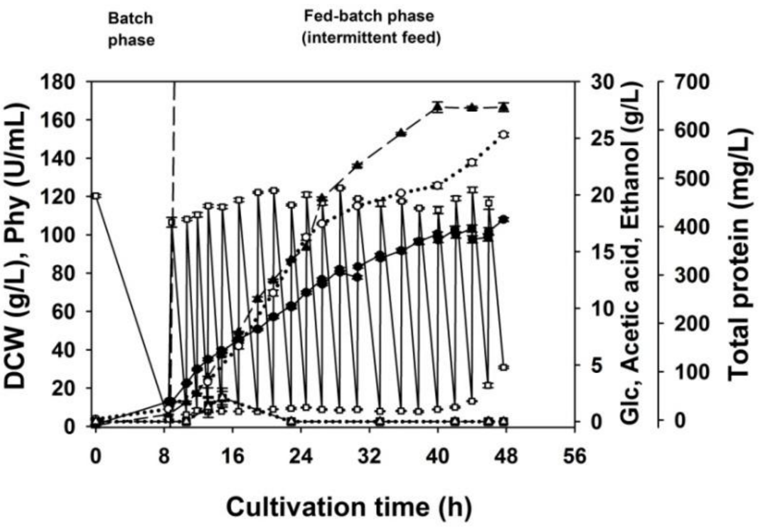
การใช้อัตราการเติมแบบครั้งคราวสามารถตรวจพบผลิตภัณฑ์รองในรูปของเอทานอล และกรดอะซิติกในช่วงต้นของระยะเฟด-แบทช์เท่านั้น (10-14 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง) ซึ่งมีความเข้มข้นที่ต่ำเท่ากับ 2.08±0.59 และ 2.12±0.04 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ทั้งนี้ สาเหตุที่ตรวจพบผลิตภัณฑ์รองในช่วงต้น ของระยะเฟด-แบทช์อาจเกิดจากในช่วงดังกล่าวเซลล์มีความเข้มข้นไม่สูง เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัดและมีความเข้มข้นของกลูโคสที่สูง (สัดส่วนระหว่างความเข้มข้นของกลูโคสต่อความเข้มข้นเซลล์มีค่าสูง) จึงเกิดการสร้างผลิตภัณฑ์รองขึ้น จากนั้นเมื่อเซลล์มีความเข้มข้นสูงขึ้น (สัดส่วนระหว่างความเข้มข้นของกลูโคสต่อความเข้มข้นเซลล์มีค่าต่ำ) การสร้างผลิตภัณฑ์รอง อาจจะเกิดขึ้นน้อยหรือไม่เกิด จึงทำให้ไม่สามารถตรวจพบผลิตภัณฑ์รอง และเนื่องจากผลิตภัณฑ์รอง ที่เกิดขึ้นมีความเข้มข้นต่ำจึงส่งผลต่อการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสน้อย สอดคล้องกับการรายงานของ (Charoenrat *et al.*, 2009) ที่กล่าวว่าความเข้มข้นของเอทานอลในช่วง 0-5 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเติบโตและการผลิตเบต้ากลูโคซิเดสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris* ในระดับต่ำ

ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์โดยใช้อัตราการเติมแบบครั้งคราว คือ 48 ชั่วโมง โดยให้ความเข้มข้นเซลล์เท่ากับ 107.95±0.95 กรัมต่อลิตร ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสเท่ากับ 166.58±2.26 หน่วยต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดมีค่าเท่ากับ 589.89±3.97 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้ ผลได้ของเซลล์จากสับสเทรต ($Y_{x/s}$) มีค่าเท่ากับ 0.32±0.00 กรัม$_{\text{เซลล์}}$ต่อกรัม$_{\text{สับสเทรต}}$ ผลได้ของผลิตภัณฑ์จากสับสเทรต ($Y_{p/s}$) มีค่าเท่ากับ 492.27±6.70 หน่วยต่อกรัม$_{\text{สับสเทรต}}$ ผลได้ของผลิตภัณฑ์จากเซลล์ ($Y_{p/x}$) มีค่าเท่ากับ 1539.79±20.96หน่วยต่อกรัม$_{\text{เซลล์}}$ อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์เชิงปริมาตร (Q_p) มีค่าเท่ากับ 3486.16±47.46 หน่วยต่อลิตร.ชั่วโมง และ อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะ (q_p) มีค่าเท่ากับ 32.30±0.44 หน่วยต่อกรัม$_{\text{เซลล์}}$ชั่วโมง

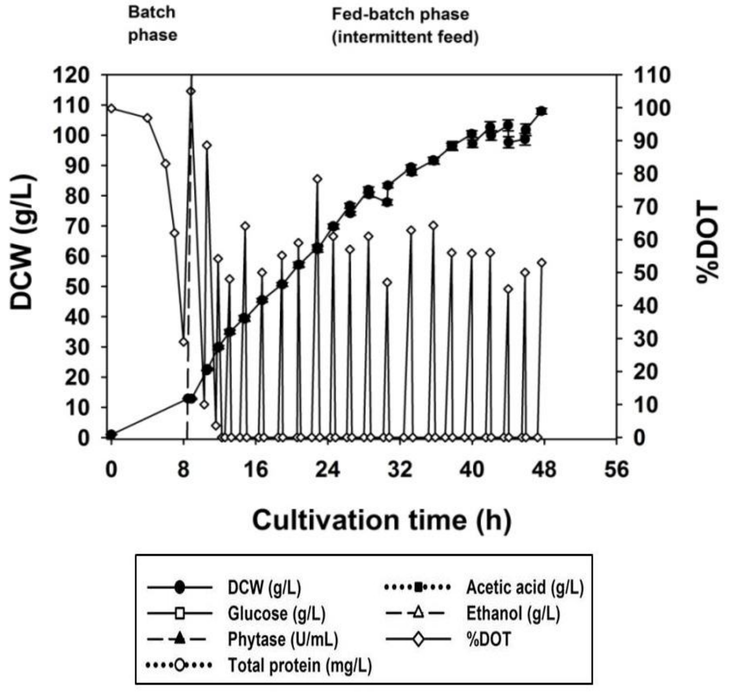
<u>ภาพที่ 4-15</u>

การเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์โดยใช้อัตราการเติมสับสเทรตแบบครั้งคราว (ก) รูปแบบการเติบโต การผลิตเอนไซม์ไฟเตส และการสร้างผลิตภัณฑ์รอง และ (ข) ค่าออกซิเจนละลายระหว่างการเพาะเลี้ยง

(ก) รูปแบบการเติบโต การผลิตเอนไซม์ไฟเตส และการสร้างผลิตภัณฑ์รอง



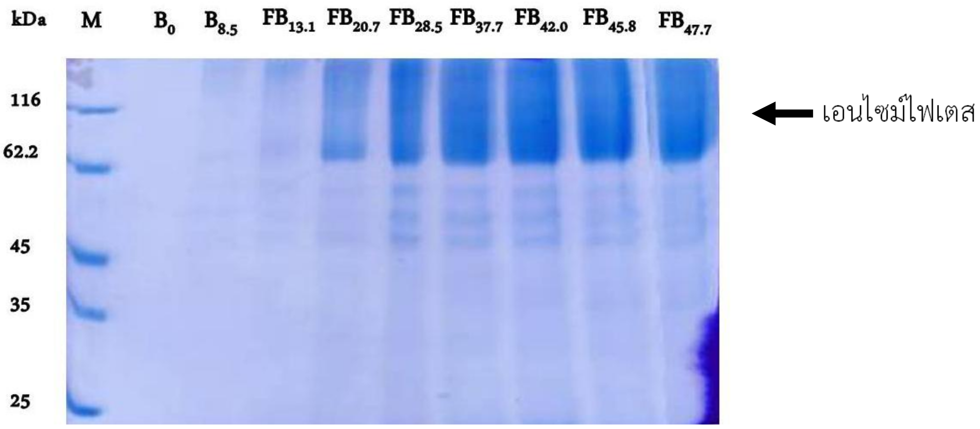
(ข) ค่าออกซิเจนละลายระหว่างการเพาะเลี้ยง



ผลจากการติดตามเอนไซม์ไฟเตสและการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE (ความเข้มข้นเจล 10 เปอร์เซ็นต์) แสดงดังภาพที่ 4-16 ซึ่งพบว่า แถบโปรตีนมีลักษณะเป็นแถบกว้างโดยมีน้ำหนักโมเลกุล มากกว่า 62 กิโลดาลตัน เช่นเดียวกับแถบโปรตีนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโดยใช้การเติมแบบคงที่ นอกจากนี้แถบของโปรตีนเริ่มปรากฏอย่างชัดเจนเมื่อเข้าสู่ระยะเฟด-แบทช์

<u>ภาพที่ 4-</u>16

การติดตามเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์โดยใช้อัตราการเติมสับสเทรตแบบครั้งคราว; M คือ โปรตีนมาตรฐาน (กิโลดาลตัน), B คือ ตัวอย่างในระยะแบทช์, FB คือ ตัวอย่างในระยะเฟด-แบทช์ และ ตัวเลข คือ ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)



4.3.4 การเปรียบเทียบการเติมสับสเทรตทั้ง 3 รูปแบบ

จากผลการศึกษาการเติมสับสเทรตในระยะเฟด-แบทช์ทั้ง 3 รูปแบบ พบว่าระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยการเติมแบบเอกซ์โพเนนเชียลใช้ระยะเวลา น้อยที่สุดเท่ากับ 32.5 ชั่วโมง รองลงมา คือ การเติมแบบครั้งคราว และการเติมแบบคงที่ โดยใช้ระยะเวลาเท่ากับ 48 และ 71 ชั่วโมง ตามลำดับ (ตารางที่ 4-4) อย่างไรก็ตาม ในระหว่างการเพาะเลี้ยงโดยใช้การเติมแบบเอกซ์โพเนนเชียลเกิดสภาวะจำกัดออกซิเจนเป็นระยะเวลานาน รวมถึงเกิดการสะสมของกลูโคสในความเข้มข้นสูง ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์รองในรูปของเอทานอล และกรดอะซิติก ส่งผลให้การเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสลดลง ซึ่งเมื่อสิ้นสุดกระบวนการเพาะเลี้ยง ความเข้มข้นเซลล์มีค่าเท่ากับ 31.59±0.57 กรัมต่อลิตร กิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสมีค่าเท่ากับ 35.36±2.19 หน่วยต่อมิลลิลิตร ส่งผลให้ผลได้ของเซลล์จากสับสเทรตและผลได้ของผลิตภัณฑ์จากสับสเทรตมีค่าน้อยที่สุด

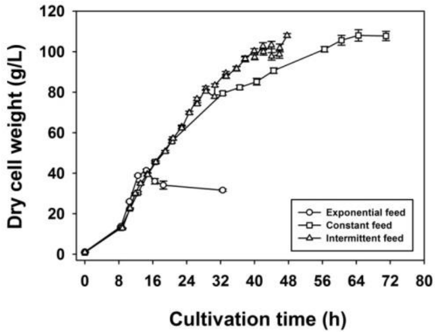
เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการเติมสับสเทรตทั้ง 3 รูปแบบ แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการนำสับสเทรตไปใช้เพื่อการสร้างเซลล์และใช้เพื่อสร้างผลิตภัณฑ์มีค่าน้อย แต่จะนำไปใช้เพื่อสร้างผลิตภัณฑ์รองที่ไม่ต้องการ ซึ่งเป็นผลเสียต่อระบบการเพาะเลี้ยง รวมถึงความคุ้มทุนในการผลิต ทั้งนี้ เนื่องจากระบบการเพาะเลี้ยงดังกล่าวต้องการหลีกเลี่ยงการเติมออกซิเจนบริสุทธิ์เข้าสู่ระบบเพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิต ดังนั้น จึงเกิดสภาวะออกซิเจนจำกัดขึ้นเมื่อเซลล์มีความเข้มข้นสูง อย่างไรก็ตาม หากระบบการเพาะเลี้ยงไม่ถูกจำกัดด้วยค่าออกซิเจนละลาย ผู้วิจัยคิดว่าการเติมแบบเอกซ์โพเนนเชียลน่าจะเป็นรูปแบบการเติมที่สามารถใช้เพิ่มเพิ่มความหนาแน่นเซลล์และผลผลิตได้ดีอีกรูปแบบหนึ่ง เนื่องจากอัตราการเติมสับสเทรตมีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเติบโต (ภาคผนวก ค)

จากการรายงานของ Lee และคณะ (1997) พบว่า การเติมสับสเทรตแบบเอกซ์โพเนนเชียลเป็นรูปแบบการเติมที่สามารถรักษาค่าอัตราการเติบโตจำเพาะให้คงที่ได้ ทำให้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเพื่อการสร้างเซลล์น้อยลง เมื่อพิจารณาการเติม สับสเทรต แบบคงที่ และแบบครั้งคราว พบว่าทั้ง 2 รูปแบบ ส่งผลให้ความเข้มข้นของเซลล์ และผลได้ของเซลล์จากสับสเทรตมีค่าใกล้เคียงกัน นั่น คือ เซลล์สามารถนำสับสเทรตไปใช้เพื่อการสร้างเซลล์ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน แต่เมื่อพิจารณาค่ากิจกรรมเอนไซม์ไฟเตส พบว่า การเติมแบบครั้งคราวให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสมาก กว่าการเติมแบบคงที่ประมาณ 2.5 เท่า และเมื่อเปรียบเทียบผลได้ของผลิตภัณฑ์จากสับสเทรต ผลได้ของผลิตภัณฑ์จากเซลล์ และอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์เชิงปริมาตร ของการเติมทั้ง 2 รูปแบบ พบว่าการเติมแบบครั้งคราวมีค่าสูงที่สุด (ภาพที่ 4-17) และใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงสั้นกว่าประมาณ 23 ชั่วโมง ดังนั้น เมื่อพิจารณาถึงความคุ้มค่าในการสร้างผลิตภัณฑ์จากค่าพารามิเตอร์ข้างต้น พบว่า การเติมแบบครั้งคราวเป็นรูปแบบการเติมที่มีความเหมาะสมที่สุดในการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มความหนาแน่นเซลล์ เพิ่มผลผลิต และลดผลพลอยได้ในรูปของเอทานอลและกรดอะซิติก ทั้งนี้ จากผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับการรายงานของ Heo และคณะ (2003) ที่ระบุว่า การเพาะเลี้ยงยีสต์ *Hansenula polymorpha* เพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์ human serum albumin ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ *GAP* โดยอาศัยการเติมสับสเทรตแบบครั้งคราวส่งผลให้ความเข้มข้นของเซลล์ และความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์มีค่าสูง รวมทั้งใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงน้อยกว่า 32 ชั่วโมง

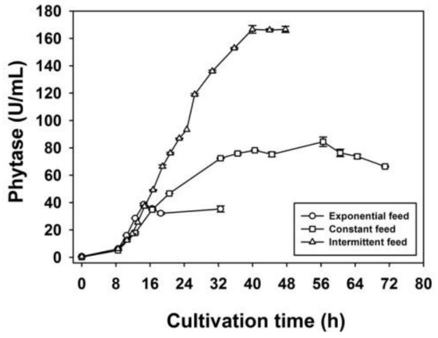
<u>ภาพที่ 4-17</u>

การเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* เพื่อผลิตเอนไซม์ไฟเตส โดยใช้กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์โดยใช้อัตราการเติมสับสเทรตแบบเอกซ์โพเนนเชียลแบบคงที่และแบบครั้งคราว (ก) น้ำหนักเซลล์แห้ง (ข) ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไฟเตส (ค) ผลได้ของผลิตภัณฑ์จากสับสเทรต (ง) ผลได้ของผลิตภัณฑ์จากเซลล์ และ (จ) อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์เชิงปริมาตร

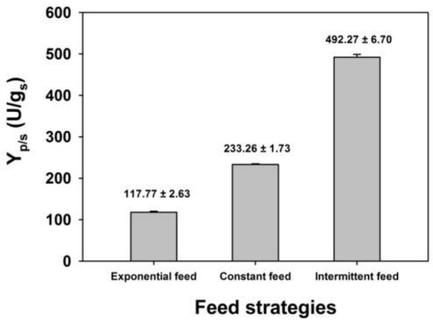
(ก) น้ำหนักเซลล์แห้ง



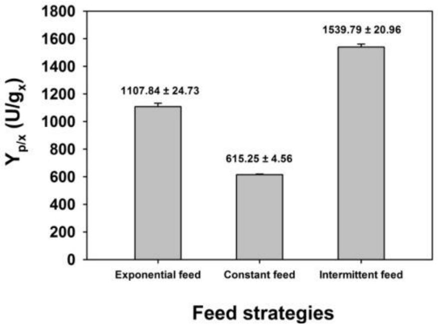
(ข) ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไฟเตส



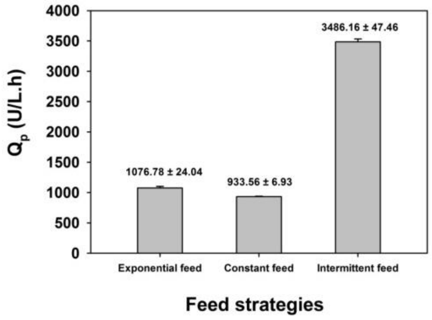
(ค) ผลได้ของผลิตภัณฑ์จากสับสเทรต



(ง) ผลได้ของผลิตภัณฑ์จากเซลล์



(จ) อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์เชิงปริมาตร



ตารางที่ 4-4

ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ จากกระบวนการผลิตเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* โดยใช้อัตราการเติมสับสเทรตแบบเอกซ์โพเนนเชียล แบบคงที่ และแบบครั้งคราว

ข้อมูลจากกระบวนการหมัก	รูปแบบการเติมสับสเทรต		
	การเติมแบบเอกซ์โพเนนเชียล	การเติมแบบคงที่	การเติมแบบครั้งคราว
น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	31.59±0.57	107.73±2.30	107.95±0.95
กิจกรรมเอนไซม์ไฟเตส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	35.36±2.19	66.41±0.50	166.58±2.26
โปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อลิตร)	139.99±3.50	543.54±9.93	589.89±3.97
ผลได้ของเซลล์จากสับสเทรต ($กรัม_{เซลล์}ต่อกรัม_{สับสเทรต}$)	0.10±0.00	0.38±0.01	0.32±0.00
ผลได้ของผลิตภัณฑ์จากสับสเทรต ($หน่วยต่อกรัม_{สับสเทรต}$)	117.77±2.63	233.26±1.73	492.27±6.70
ผลได้ของผลิตภัณฑ์จากเซลล์ ($หน่วยต่อกรัม_{เซลล์}$)	1107.84±24.73	615.25±4.56	1539.79±20.96
อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์เชิงปริมาตร (หน่วยต่อลิตร.ชั่วโมง)	1076.78±24.04	933.56±6.93	3486.16±47.46
อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะ ($หน่วยต่อกรัม_{เซลล์}$.ชั่วโมง)	34.09±0.76	8.67±0.06	32.30±0.44
เอทานอล (กรัมต่อลิตร)	48.70±3.55	ไม่พบ	ไม่พบ
กรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)	12.79±0.21	ไม่พบ	ไม่พบ
ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)	32.50	71.00	48.00

สำหรับการพิจารณาผลจากการเพาะเลี้ยงในระยะแบทช์ไม่สามารถตรวจพบผลิตภัณฑ์รอง แม้อยู่ในสภาวะไม่จำกัดออกซิเจนและมีความเข้มข้นของกลูโคสเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร ซึ่งผลการทดลองที่ได้สามารถยืนยันได้ว่ายีสต์ *O. thermomethanolica* เป็นยีสต์ชนิด Crab-tree negative เช่นเดียวกับยีสต์ *P. pastoris* (นิภารัตน์, 2552) ในขณะที่ยีสต์ชนิด Crab-tree positive เช่น *Saccharomyces cerevisiae* สามารถผลิตเอทานอลได้เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะไม่จำกัดออกซิเจน และมีความเข้มข้นของกลูโคสเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร (Rao *et al*., 1998)

จากข้อมูลที่ได้ พบว่า การเติมสับสเทรต แบบครั้งคราวอาจเกิดความยุ่งยากในทางปฏิบัติ เนื่องจากผู้ปฏิบัติงานต้องคอยติดตามค่าออกซิเจนละลายของระบบอย่างใกล้ชิดเพื่อเติมสับสเทรตในครั้งถัดไป และหากต้องการเติมสับสเทรตในปริมาตรที่มากขึ้นส่งผลให้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงนานขึ้นด้วย ดังนั้น ผู้วิจัยจึงเลือกใช้การเติมสับสเทรตแบบย้อนกลับ (feedback regulation) โดยอาศัยค่าออกซิเจนละลายเป็นตัวควบคุม (DO stat regulation) ซึ่งการเติมในลักษณะดังกล่าวมีความคล้ายกับการเติมแบบครั้งคราวแต่ จะไม่ทำให้ เกิดสภาวะจำกัดออกซิเจน รวมทั้งความยุ่งยากในการดำเนินการน้อยลงด้วย (Baumann *et al*., 2008; Ferreira *et al*., 2012)

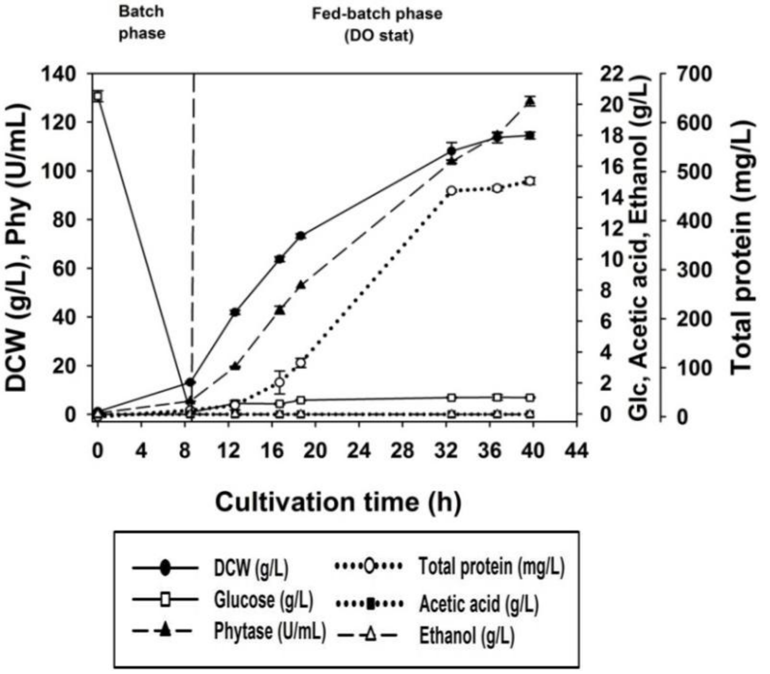
4.3.5 การเติมสับสเทรตโดยอาศัยค่าออกซิเจนละลายเป็นตัวควบคุม (DO stat regulation)

เนื่องจากผลการทดลองในข้อ 4.3.3 พบว่า การเติมสับสเทรตแบบครั้งคราวส่งผลให้ความเข้มข้นของเซลล์ และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสมีค่าสูงสุด รวมถึงเกิดผลิตภัณฑ์รองในรูปของเอ - ทานอลและกรดอะซิติกในระดับต่ำ อย่างไรก็ตาม การเติมสับสเทรตด้วยวิธีดังกล่าวอาจไม่เหมาะสมในการปฏิบัติงานจริง เนื่องจากต้องค่อยติดตามค่าออกซิเจนละลายของระบบอย่างใกล้ชิด เพื่อเติมสับสเทรตในครั้งถัดไป ดังนั้นเพื่อลดความยุ่งยากในการปฏิบัติงาน ผู้วิจัยจึงเลือกใช้การเติมสับสเทรตแบบย้อนกลับโดยอาศัยค่าออกซิเจนละลายเป็นตัวควบคุม (DO stat regulation) โดยกำหนดให้ค่าออกซิเจนละลายเฉลี่ยของระบบเท่ากับ 15 เปอร์เซ็นต์ และสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงคือ ควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 34 องศาเซลเซียส พีเอช 6.0 อัตราการกวน 1000 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 ลิตรต่อลิตร.นาที

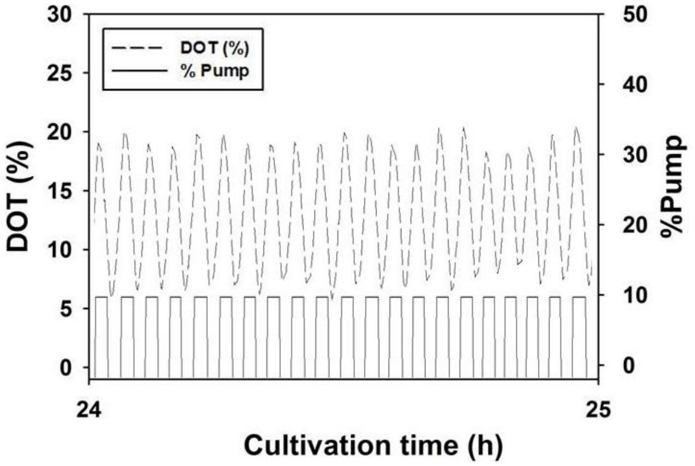
ภาพที่ 4-18

การเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์โดยอาศัยค่าออกซิเจนละลายเป็นตัวควบคุมการเติมสับสเทรต (ก) รูปแบบการเติบโต การผลิตเอนไซม์ไฟเตส และการสร้างผลิตภัณฑ์รองและ (ข) ค่าออกซิเจนละลายและการทำงานของปั๊ม

(ก) รูปแบบการเติบโต และการผลิตเอนไซม์ไฟเตส



(ข) ค่าออกซิเจนละลายและการทำงานของปั๊ม



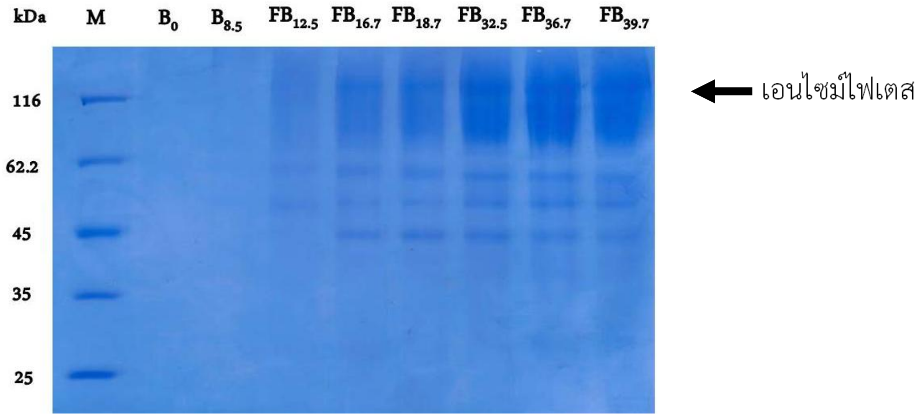
จากภาพที่ 4-18 เมื่อกลูโคสในระยะแบทช์ถูกใช้จนหมด (ค่าออกซิเจนละลายเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว) จึงทำการเติมสับสเทรตเข้าสู่ระบบโดยใช้อัตราการเติมแบบคงที่เพื่อทำให้ค่าออกซิเจนละลายค่อยๆลดลงและเพื่อไม่ให้เกิดการสะสมของกลูโคสในระบบ ซึ่งใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงเริ่มการเติมสับสเทรตโดยอาศัยค่าออกซิเจนละลายเป็นตัวควบคุมซึ่งกำหนดให้ค่าออกซิเจนละลายเฉลี่ยของระบบเท่ากับ 15 เปอร์เซ็นต์ ตลอดการเพาะเลี้ยงเพื่อไม่ให้เกิดสภาวะจำกัดออกซิเจนและหลีกเลี่ยงการสร้างผลิตภัณฑ์รอง โดยอัตราการเติมสับสเทรตมีค่าเท่ากับ 123.50 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง หรือเท่ากับ 61.75 กรัม$_{\text{กลูโคส}}$ต่อชั่วโมง ผลทดลองพบว่า ในระยะเฟด-แบทช์เซลล์สามารถเติบโตและผลิตเอนไซม์ไฟเตสได้อย่างต่อเนื่อง โดยการเติมสับสเทรตภายใน 8 ชั่วโมงแรก เซลล์มีอัตราการเติบโตค่อนข้างสูงนั่นคือ ความเข้มข้นของเซลล์เพิ่มจาก 13.12±0.26 กรัมต่อลิตร เป็น 63.69±1.02 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นอัตราการเติบโตค่อยๆ ลดลง ในขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสมีค่าสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยง นอกจากนี้การเติมสับสเทรตโดยอาศัยค่าออกซิเจนละลายเป็นตัวควบคุมไม่พบการสะสมของกลูโคสในระบบ และตรวจไม่พบผลิตภัณฑ์รองในรูปของเอทานอลและกรดอะซิติก

ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์โดยอาศัยค่าออกซิเจนละลายเป็นตัวควบคุมคือ 40 ชั่วโมง โดยให้ความเข้มข้นเซลล์เท่ากับ 114.51±1.43 กรัมต่อลิตร ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสเท่ากับ 128.60±1.99 หน่วยต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดมีค่าเท่ากับ 480.54±7.05 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้ผลได้ของเซลล์จากสับสเทรต ($Y_{x/s}$) มีค่าเท่ากับ 0.46±0.02 กรัม $_{\text{เซลล์}}$ ต่อกรัม $_{\text{สับสเทรต}}$ ผลได้ของผลิตภัณฑ์จากสับสเทรต ($Y_{p/s}$) มีค่าเท่ากับ 519.67±8.05 หน่วยต่อกรัม$_{\text{สับสเทรต}}$ ผลได้ของผลิตภัณฑ์จากเซลล์ ($Y_{p/x}$) มีค่าเท่ากับ 1118.81±17.36 หน่วยต่อกรัม$_{\text{เซลล์}}$ อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์เชิงปริมาตร (Q_p) มีค่าเท่ากับ 3227.10±50.06 หน่วยต่อลิตร.ชั่วโมง และ อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะ (q_p) มีค่าเท่ากับ 28.18±0.44 หน่วยต่อกรัม $_{\text{เซลล์}}$ ชั่วโมงจาก ผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า การเติมสับสเทรตโดยอาศัยค่าออกซิเจนละลายเป็นตัวควบคุมเป็นการเติมอีกรูปแบบหนึ่งที่ให้ความเข้มข้นของเซลล์และผลิตภัณฑ์ที่สูงสอดคล้องกับการรายงานของ Ferreira และคณะ (2012) ที่กล่าวว่า การเติมสับสเทรตในระยะเฟด-แบทช์โดยอาศัยค่าออกซิเจนละลายเป็นตัวควบคุมเป็นวิธีที่ให้ผลผลิตที่สูงรวมถึงลดปัญหาเกี่ยวกับการถ่ายเทออกซิเจนในระบบ และเมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้กับผลการผลิตเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris* ภายใต้การควบคุมการแสดงออกของยีนด้วยโปรโมเตอร์ *AOX* พบว่า ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสที่สูงกว่าประมาณ 22 เปอร์เซ็นต์ และใช้ระยะเวลาในการผลิตน้อยกว่าประมาณ 2.85 เท่า คือ ลดลงจาก 114 ชั่วโมง เหลือ 40 ชั่วโมง (Promdonkoy *et al*., 2009)

ผลจากการติดตามเอนไซม์ไฟเตสและการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE (ความเข้มข้นเจล 10 เปอร์เซ็นต์) แสดงดังภาพที่ 4-19 ซึ่งพบว่า แถบโปรตีนมีลักษณะเป็นแถบกว้างโดยมีน้ำหนักโมเลกุล มากกว่า 62 กิโลดาลตัน เช่นเดียวกับแถบโปรตีนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโดยใช้การเติมแบบคงที่และแบบครั้งคราวและแถบของโปรตีนเข้มขึ้นอย่างต่อเนื่องตามระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง สอดคล้องกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง (ภาพที่ 4-18)

<u>ภาพที่ 4-19</u>

การติดตามเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์โดยอาศัยค่าออกซิเจนละลายเป็นตัวควบคุมการเติมสับสเทรต; M คือ โปรตีนมาตรฐาน (กิโลดาลตัน), B คือ ตัวอย่างในระยะแบทช์, FB คือ ตัวอย่างในระยะเฟด-แบทช์ และ ตัวเลข คือ ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)



4.4 การทดลองที่ IV: การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้แหล่งคาร์บอนราคาถูกในการผลิตเอนไซม์ไฟเตส

จากการรายงานของ Waterham และคณะ (1997) ที่กล่าวว่าการแสดงออกของรีคอม - บิแนนท์โปรตีนภายใต้การควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ *GAP* สามารถแสดงออกได้สูงเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน อย่างไรก็ตาม กลูโคสมีราคาค่อนข้างสูงจึงทำให้ต้นทุนในการผลิตสูงขึ้นตามไปด้วย ดังนั้น จึงมีความจำเป็นที่จะต้องหาแหล่งคาร์บอนอื่นมาทดแทน จากการรายงานก่อนหน้าพบว่า ยีสต์ *O. thermomethanolica* มีความสามารถในการใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน (Limtong *et al.*, 2005) ประกอบกับน้ำตาลซูโครสมีราคาถูกกว่าน้ำตาลกลูโคสประมาณ 2 เท่า ดังนั้น งานในส่วน

นี้จึงมุ่งเน้นศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้น้ำตาลซูโครส (น้ำตาลทรายตามท้องตลาด) ในการผลิตเอนไซม์ไฟเตส

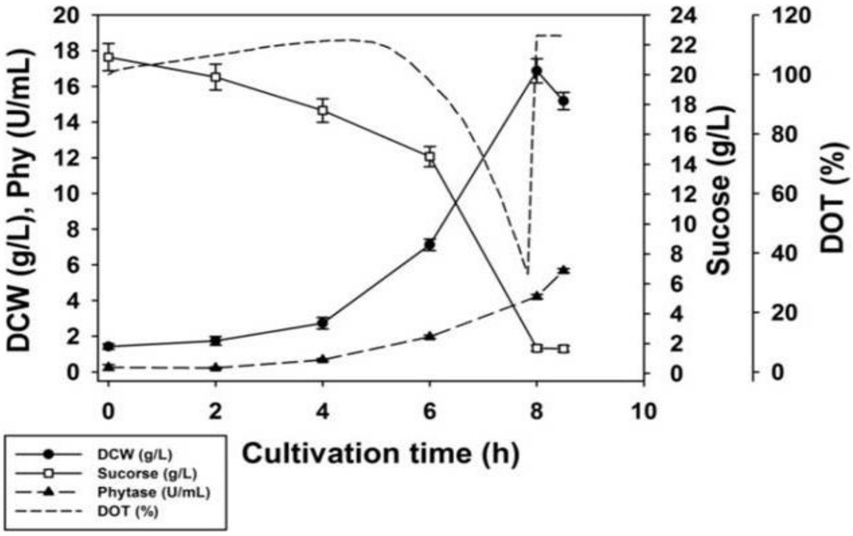
4.4.1 การเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสโดยใช้กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์

การทดลองในส่วนนี้เป็นการศึกษารูปแบบการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสโดยรีคอม - บิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ โดยใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน สภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง คือ ควบคุมอุณหภูมิที่ 34 องศาเซลเซียส พีเอช 6.0 (จากผลการทดลองข้อ 4.2) อัตราการกวน 1000 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ลิตรต่อลิตร.นาที ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4-20

จากผลการทดลองพบว่า เมื่อถ่ายกล้าเชื้อลงสู่ถังหมักความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 1.43±0.15 กรัมต่อลิตร จากนั้นเซลล์สามารถเติบโตได้อย่างต่อเนื่องพร้อมกับการผลิตเอนไซม์ไฟเตสซึ่งสอดคล้องกับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสและค่าออกซิเจนละลายที่มีค่าลดลง โดยระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงคือ 8.5 ชั่วโมง ให้ความเข้มข้นของเซลล์สูงสุดเท่ากับ 16.87±0.68 กรัมต่อลิตร อัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.46±0.03 ต่อชั่วโมง ระยะปรับตัว 2.6 ชั่วโมง และกิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสสูงสุดมีค่าเท่ากับ 5.67±0.11 หน่วยต่อมิลลิลิตร

<u>ภาพที่ 4-20</u>

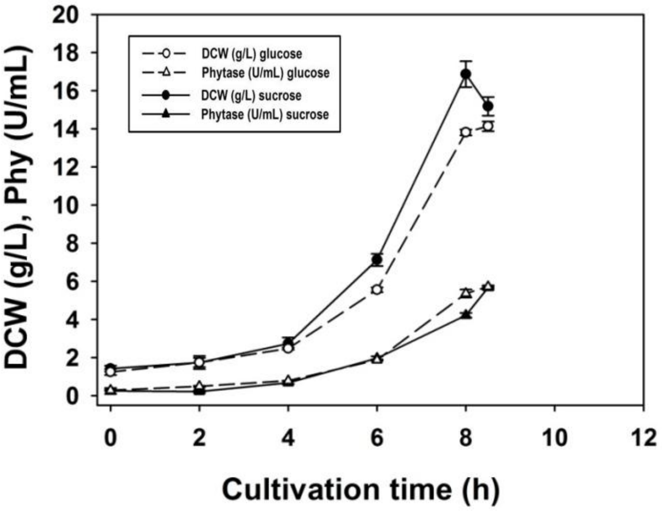
รูปแบบการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสของรีคอมบิแนนท์ยีสต์
O. thermomethanolica เมื่อใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน



เมื่อเปรียบเทียบผลในการเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* โดยใช้กลูโคสและซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน (ภาพที่ 4-21) พบว่า รูปแบบการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสของการใช้แหล่งคาร์บอนทั้ง 2 ชนิด มีลักษณะที่เหมือนกันนั่นคือ เซลล์สามารถเติบโตได้อย่างต่อเนื่องพร้อมทั้งผลิตเอนไซม์ไฟเตสออกสู่น้ำหมัก โดยความเข้มข้นของเซลล์สูงสุดเมื่อใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนมีค่ามากกว่าการใช้กลูโคสประมาณ 2 กรัมต่อลิตร ในขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ไฟ - เตสสูงสุดมีค่าใกล้เคียงกัน นอกจากนี้เมื่อพิจารณาพารามิเตอร์ต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการเติบโตและการสร้างผลผลิตพบว่ามีค่าใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 4-5) ดังนั้น จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าน้ำตาลซูโครสเป็นน้ำตาลที่สามารถนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* เพื่อผลิตเอนไซม์ไฟเตสภายใต้การควบคุมการแสดงออกของโปรโมเตอร์ *OthGAP* ได้ ซึ่งสามารถที่จะช่วยลดต้นทุนในการผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้

<u>ภาพที่ 4-21</u>

รูปแบบการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ในกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์เมื่อใช้กลูโคสและซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน



ตารางที่ 4-5

ข้อมูลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* โดยใช้แหล่งคาร์บอนต่างกันโดยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

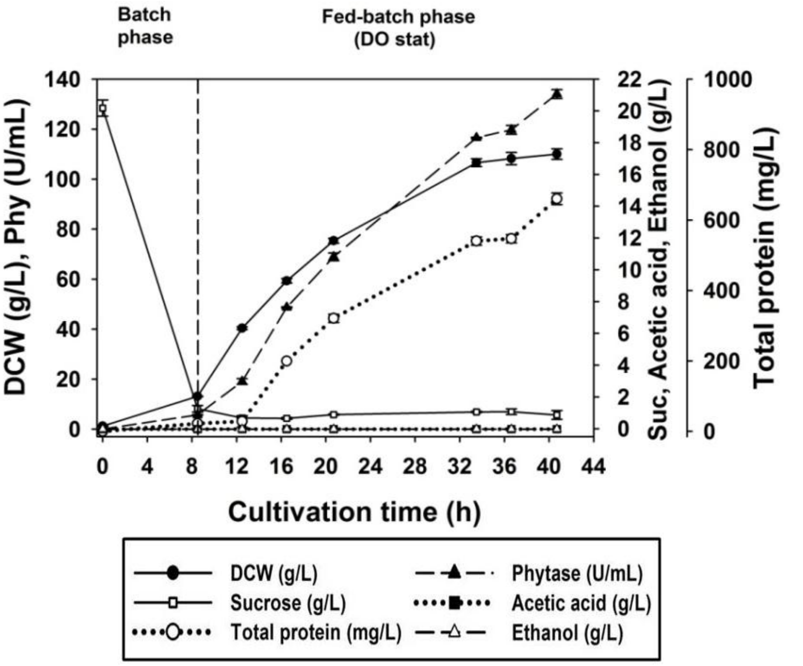
ข้อมูลจากกระบวนการหมัก	แหล่งคาร์บอน	
	กลูโคส	ซูโครส
น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	14.13±0.26	16.87±0.68
กิจกรรมเอนไซม์ไฟเตส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	5.72±0.05	5.67±0.11
อัตราการเติบโตจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)	0.43±0.01	0.46±0.03
ผลได้ของเซลล์จากสับสเทรต (กรัม$_{เซลล์}$ต่อกรัม$_{สับสเทรต}$)	0.64±0.01	0.70±0.03
ผลได้ของผลิตภัณฑ์จากสับสเทรต (หน่วยต่อกรัม$_{สับสเทรต}$)	271.21±2.44	277.65±5.69
อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์เชิงปริมาตร (หน่วยต่อลิตร.ชั่วโมง)	639.03±5.75	637.70±13.83
ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)	8.50	8.50
ระยะปรับตัว (ชั่วโมง)	2.45	2.60

4.4.2 การเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสในการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์

จากผลการทดลองข้อ 4.4.1 พบว่ารีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* สามารถเติบโตและผลิตเอนไซม์ไฟเตสได้เมื่อใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน อย่างไรก็ตาม กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์นั้นให้ผลผลิตในระดับต่ำ (Goodrick *et al*., 2001; Pepeliaev *et al*., 2011) ดังนั้นผู้วิจัยได้ทำการเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์โดยอาศัยค่าออกซิเจนละลายเป็นตัวควบคุมการเติมสับสเทรตซึ่งอัตราการเติมมีค่าเท่ากับ 127 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง หรือเท่ากับ 63.5 กรัม$_{กลูโคส}$ต่อชั่วโมง และ สภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงคือสภาวะเดียวกับการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์โดยผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4-22

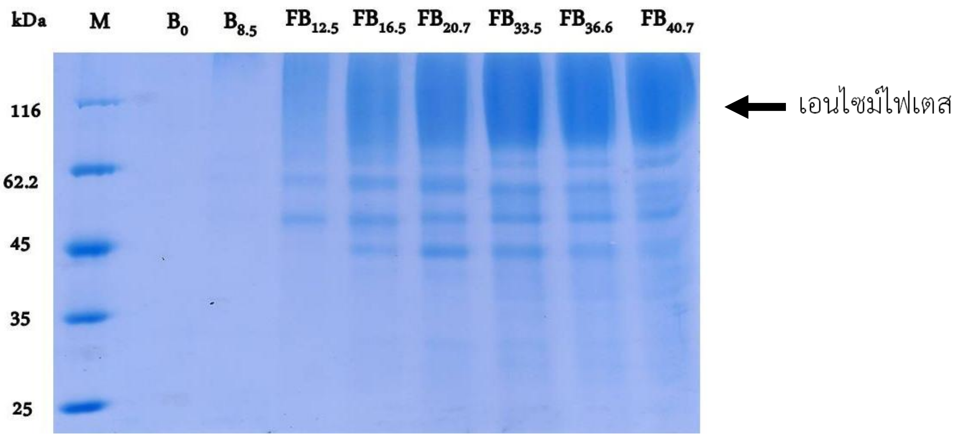
ภาพที่ 4-22

รูปแบบการเติบโต การผลิตเอนไซม์ไฟเตส และการสร้างผลิตภัณฑ์รองจากการเพาะเลี้ยง รีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* โดยใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์โดยอาศัยค่าออกซิเจนละลายเป็นตัวควบคุมการเติมสับสเทรต



ภาพที่ 4-23

การติดตามเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* จากกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์โดยใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน M คือ โปรตีนมาตรฐาน (กิโลดาลตัน), B คือ ตัวอย่างในระยะแบทช์, FB คือ ตัวอย่างในระยะเฟด-แบทช์ และ ตัวเลข คือ ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)



จากผลการทดลองพบว่า การเติบโตในระยะแบทช์ใช้เวลา 8.5 ชั่วโมง เช่นเดียวกับการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยให้ความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 14.11±0.11 กรัมต่อลิตร และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสเท่ากับ 5.71±0.77 หน่วยต่อมิลลิลิตร จากนั้นจึงเข้าสู่ระยะเฟด-แบทช์ โดยการเติมซูโครสปริมาตร 3 ลิตร เข้าสู่ถังหมักซึ่งอาศัยค่าออกซิเจนละลายเป็นตัวควบคุมและกำหนดค่าออกซิเจนละลายเฉลี่ยเท่ากับ 15 เปอร์เซ็นต์ ในช่วงแรกของระยะเฟด-แบทช์เซลล์มีอัตราการเติบโตที่สูงโดยหลังจากการเติมสับสเทรตเป็นเวลา 8 ชั่วโมง ความเข้มข้นของเซลล์ มีค่าเท่ากับ 59.31±0.11 กรัมต่อลิตร จากนั้นอัตราการเติบโตของเซลล์ค่อยๆลดลง อย่างไรก็ตาม พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสมีค่าสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องตลอดการเพาะเลี้ยง นอกจากนี้ ระบบการเพาะเลี้ยงดังกล่าวไม่พบการสะสมของซูโครสในระบบรวมถึงไม่สามารถตรวจพบการสร้างผลิตภัณฑ์รองในรูปของเอทานอลและกรดอะซิติก

ผลจากการติดตามเอนไซม์ไฟเตสและการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE (ความเข้มข้นเจล 10 เปอร์เซ็นต์) แสดงดังภาพที่ 4-23 ซึ่งพบว่า แถบโปรตีนมีลักษณะเป็นแถบกว้างโดยมีน้ำหนักโมเลกุล มากกว่า 62 กิโลดาลตัน เช่นเดียวกับแถบโปรตีนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งแถบของโปรตีนเข้มขึ้นอย่างต่อเนื่องตามระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง สอดคล้องกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ภาพที่ 4-22

ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ คือ 41 ชั่วโมง โดยให้ความเข้มข้นเซลล์เท่ากับ 110.00±2.13กรัมต่อลิตร ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสเท่ากับ 134.05±1.77 หน่วยต่อมิลลิลิตรความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดมีค่าเท่ากับ 660.13±16.46 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้ ค่าพารามิเตอร์อื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสสามารถแสดงได้ดังตารางที่ 4-6

<u>ตารางที่ 4-6</u>

ค่าพารามิเตอร์ต่างๆจากกระบวนการผลิตเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* โดยใช้แหล่งคาร์บอนต่างกันด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

ข้อมูลจากกระบวนการหมัก	แหล่งคาร์บอน	
	กลูโคส	ซูโครส
น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	114.51±1.43	110.00±2.13
กิจกรรมเอนไซม์ไฟเตส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	128.60±1.99	134.05±1.77
โปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อลิตร)	480.54±7.05	660.13±16.46
ผลได้ของเซลล์จากสับสเตรต (กรัม$_{เซลล์}$ต่อกรัม$_{สับสเตรต}$)	0.46±0.02	0.44±0.02
ผลได้ของผลิตภัณฑ์จากสับสเตรต (หน่วยต่อกรัม$_{สับสเตรต}$)	519.67±8.05	539.59±7.13
ผลได้ของผลิตภัณฑ์จากเซลล์ (หน่วยต่อกรัม$_{เซลล์}$)	1118.81±17.36	1218.63±16.11
อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์เชิงปริมาตร (หน่วยต่อลิตร.ชั่วโมง)	3227.10±50.06	3293.59±43.53
อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะ (หน่วยต่อกรัม$_{เซลล์}$.ชั่วโมง)	28.18±0.44	29.94±0.40
เอทานอล (กรัมต่อลิตร)	ไม่พบ	ไม่พบ
กรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)	ไม่พบ	ไม่พบ
ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)	40	41

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองในการเพาะเลี้ยง รีคอมบิแนนท์ ยีสต์ *O. thermomethanolica* ในกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์โดยใช้กลูโคสและซูโครสเป็นแหล่ง

คาร์บอนพบว่า ระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง อัตราการเติมสับสเทรตความเข้มข้นของเซลล์ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตส รวมถึงค่าพารามิเตอร์ต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสมีค่าใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 4-6) สอดคล้องกับการรายงานของ Bruschi และคณะ (2014) ที่กล่าวว่า การใช้น้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Escherichia coli* เพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดยใช้กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ส่งผลให้ความเข้มข้นของเซลล์และความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ไม่แตกต่างกัน

จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าน้ำตาลซูโครสสามารถนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* เพื่อผลิตเอนไซม์ไฟเตสภายใต้การควบคุมการแสดงออกของโปรโมเตอร์ *OthGAP* ได้อย่างมีประสิทธิภาพซึ่งจะเป็นการลดต้นทุนการผลิตได้ในระดับหนึ่ง

4.5 การทดลองที่ V: การศึกษาอิทธิพลของการเพิ่มอุณหภูมิในระยะเฟด-แบทช์ต่อการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตส

การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนในระดับอุตสาหกรรมการลดต้นทุนในการผลิตในแง่ของพลังงานที่ใช้ในระบบหล่อเย็นเป็นจุดประสงค์ที่สำคัญ ซึ่งจาการรายงานของ Romano และคณะ (2004) พบว่า การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนภายใต้โปรโมเตอร์แต่ละชนิดมีระดับการแสดงออกที่ต่างกันเมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิต่างๆ เช่นเดียวกับผลการศึกษาของ Raimondi และคณะ (2013) ที่พบว่า อุณหภูมิส่งผลต่อระดับการแสดงการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนจากยีสต์ทนร้อน *Kluyveromyces marxianus* และจากผลการทดลองข้อที่ 4.2.2 แสดงให้เห็นว่ารีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* สามารถเติบโตและผลิตเอนไซม์ไฟเตสได้เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส ดังนั้นงานวิจัยในส่วนนี้มุ่งเน้นที่จะศึกษารูปแบบการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสเมื่อมีการเพิ่มอุณหภูมิในระยะเฟด-แบทช์

4.5.1 อิทธิพลของการเพิ่มอุณหภูมิในระยะเฟด-แบทช์

การศึกษาในส่วนนี้เริ่มจากการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 34 องศาเซลเซียสจากนั้นเมื่อเข้าสู่ระยะเฟด-แบทช์ทำการเติมสับสเทรตโดยอาศัยค่าออกซิเจนละลายเป็นตัวควบคุม (DO stat regulation) โดยกำหนดให้ค่าออกซิเจนละลายเฉลี่ยเท่ากับ 15 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรของอาหารเท่ากับ 3 ลิตร) พร้อมทั้งเพิ่มอุณหภูมิเท่ากับ 4, 6 และ 8 องศาเซลเซียส จากอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตส (หรือเท่ากับ 38, 40 และ 42 องศาเซลเซียส) โดยกำหนดให้อัตราการเพิ่มอุณหภูมิมีค่าเท่ากับ 2 องศาเซลเซียสต่อชั่วโมง

4.5.1.1 การเพิ่มอุณหภูมิในระยะเฟด-แบทช์เท่ากับ 38 องศาเซลเซียส

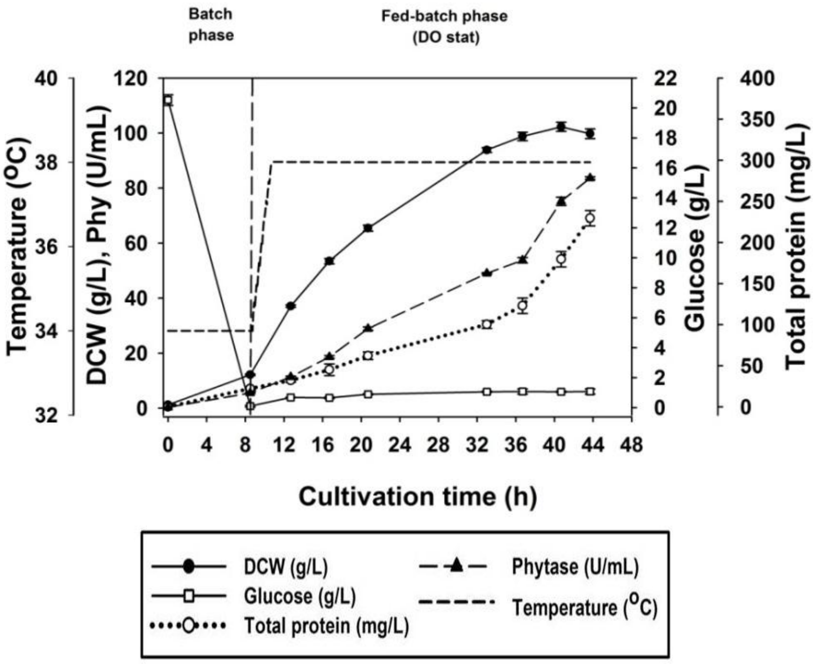
การเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ที่มีการเพิ่มอุณหภูมิในระยะเฟด-แบทช์เท่ากับ 38 องศาเซลเซลเซียส พร้อมทั้งควบคุมสภาวะในการเพาะเลี้ยงคือ พีเอช 6.0 อัตราการกวน 1000 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ลิตรต่อลิตร.นาที ผลการทดลอง (ภาพที่ 4-24) พบว่า เมื่อระบบเข้าสู่ระยะเฟด-แบทช์พร้อมทั้งค่อยๆเพิ่มอุณหภูมิจาก 34 องศาเซลเซียส เป็น 38 องศาเซลเซลเซียส โดยใช้ระยะเวลา 2 ชั่วโมง เซลล์สามารถเติบโตและผลิตเอนไซม์ไฟเตสได้อย่างต่อเนื่อง โดยอัตราการเติบโตมีแนวโน้มลดลงและให้ความเข้มข้นของเซลล์สุดท้ายใกล้เคียงกับการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 4-18) อย่างไรก็ตาม ระบบสามารถเติมสับสเทรตโดยอาศัยค่าออกซิเจนละลายเป็นตัวควบคุมได้ตลอดการเพาะเลี้ยง ซึ่งมีอัตราการเติมเท่ากับ 113 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง หรือเท่ากับ 56.5 กรัม$_{\text{กลูโคส}}$ต่อชั่วโมง โดยไม่ทำให้เกิด การสะสมของกลูโคสในระบบและไม่สามารถตรวจพบการสร้างผลิตภัณฑ์รองในรูปของเอทานอลและกรดอะซิติก

ผลจากการติดตามเอนไซม์ไฟเตสและการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE (ความเข้มข้นเจล 10 เปอร์เซ็นต์) แสดงดังภาพที่ 4-25 ซึ่งพบว่า แถบโปรตีนมีลักษณะเป็นแถบกว้างโดยมีน้ำหนักโมเลกุล มากกว่า 62 กิโลดาลตัน เช่นเดียวกับแถบโปรตีนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส และแถบของโปรตีนเข้มขึ้นอย่างต่อเนื่องตามระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง สอดคล้องกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องเช่นกัน

ทั้งนี้ ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงคือ 44 ชั่วโมง โดยให้ความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 99.76±1.75 กรัมต่อลิตร ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสเท่ากับ 83.62±0.05 หน่วยต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดมีค่าเท่ากับ 229.46±9.41 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าพารามิเตอร์อื่นๆ แสดงดังตารางที่ 4-7

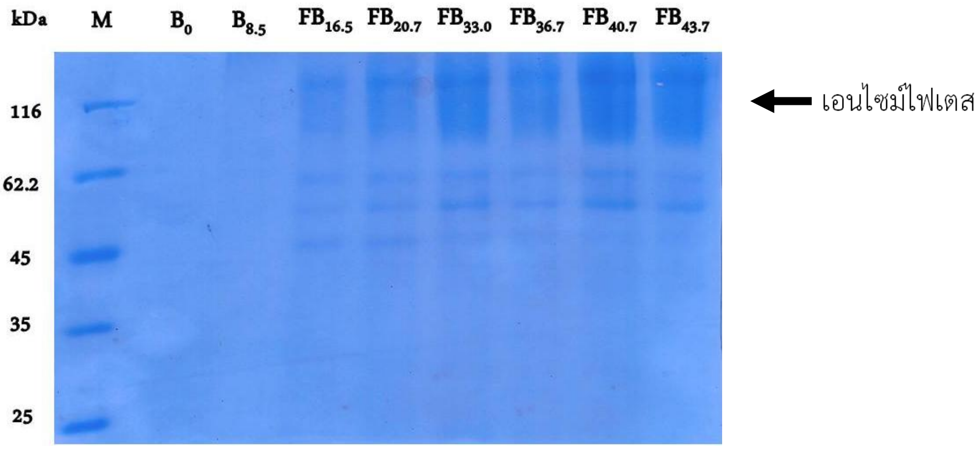
<u>ภาพที่ 4-24</u>

รูปแบบการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสจากการเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* โดยเพิ่มอุณหภูมิในระยะเฟด-แบทช์เท่ากับ 38 องศาเซลเซียส



<u>ภาพที่ 4-25</u>

การติดตามเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* โดยการเพิ่มอุณหภูมิในระยะเฟด-แบทช์เท่ากับ 38 องศาเซลเซียส; M คือ โปรตีนมาตรฐาน (กิโลดาลตัน), B คือ ตัวอย่างในระยะแบทช์, FB คือ ตัวอย่างในระยะเฟด-แบทช์ และ ตัวเลข คือ ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)



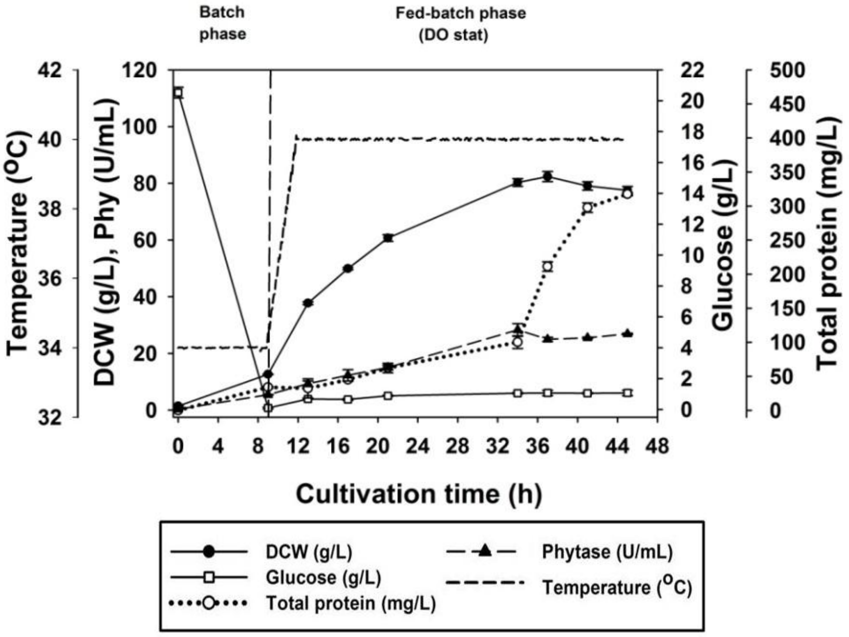
4.5.1.2 การเพิ่มอุณหภูมิในระยะเฟด-แบทช์เท่ากับ 40 องศาเซลเซียส

จากการเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* โดยเพิ่มอุณหภูมิในระยะเฟด-แบทช์เท่ากับ 40 องศาเซลเซียส พบว่าระยะเวลาที่ใช้ในการเพิ่มอุณหภูมิจาก 34 องศาเซลเซียส เป็น 40 องศาเซลเซียส เท่ากับ 3 ชั่วโมง ซึ่งในช่วงดังกล่าวเซลล์สามารถเติบโตได้อย่างต่อเนื่องแต่ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย (ภาพที่ 4-26) ในระหว่างการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เซลล์ยังมีความสามารถในการเติบโต และระบบสามารถเติมสับสเทรตโดยอาศัยค่าออกซิเจนละลายเป็นตัวควบคุมได้ตลอดการเพาะเลี้ยงซึ่งมีอัตราการเติมเท่ากับ 96 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง หรือเท่ากับ 48 กรัม$_{\text{กลูโคส}}$ต่อชั่วโมง โดยไม่ทำให้เกิดการสะสมกลูโคสในระบบ และไม่พบผลิตภัณฑ์รองในรูปของเอทานอลและกรดอะซิติก อย่างไรก็ตาม การเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ส่งผลให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ ซึ่งหลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 45 ชั่วโมง ความเข้มข้นของเซลล์มีค่าเท่ากับ 77.52±1.37 กรัมต่อลิตร กิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสมีค่าเท่ากับ 26.88±0.25 หน่วยต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดมีค่าเท่ากับ 317.596±2.35 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าพารามิเตอร์อื่นๆแสดงดังตารางที่ 4-7

ผลจากการติดตามเอนไซม์ไฟเตสและการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE (ความเข้มข้นเจล 10 เปอร์เซ็นต์) แสดงดังภาพที่ 4-27 พบว่า แถบโปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 116 กิโลดาลตัน และแถบของโปรตีนเข้มขึ้นอย่างต่อเนื่องตามระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง

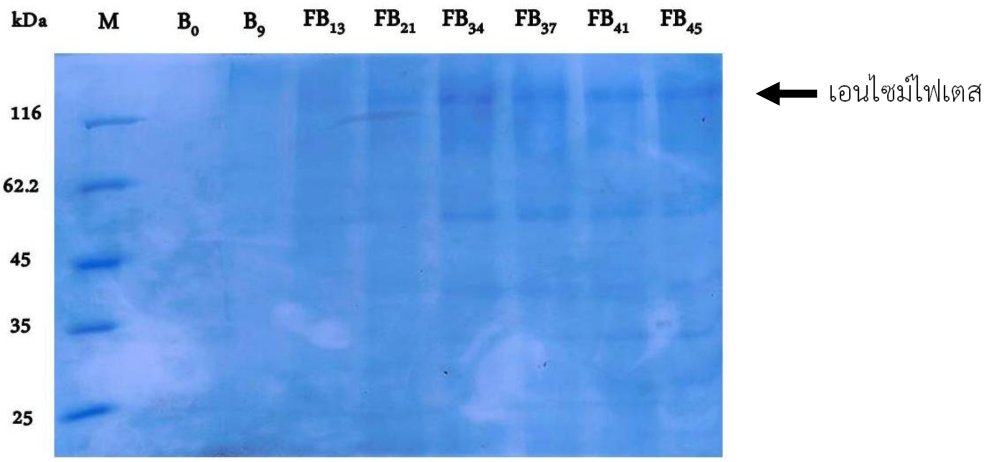
<u>ภาพที่ 4-26</u>

รูปแบบการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสจากการเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* โดยเพิ่มอุณหภูมิในระยะเฟด-แบทช์เท่ากับ 40 องศาเซลเซียส



<u>ภาพที่ 4-27</u>

การติดตามเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* โดยการเพิ่มอุณหภูมิในระยะเฟด-แบทช์เท่ากับ 42 องศาเซลเซียส; M คือ โปรตีนมาตรฐาน (กิโลดาลตัน), B คือ ตัวอย่างในระยะแบทช์, FB คือ ตัวอย่างในระยะเฟด-แบทช์และตัวเลขคือ ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)



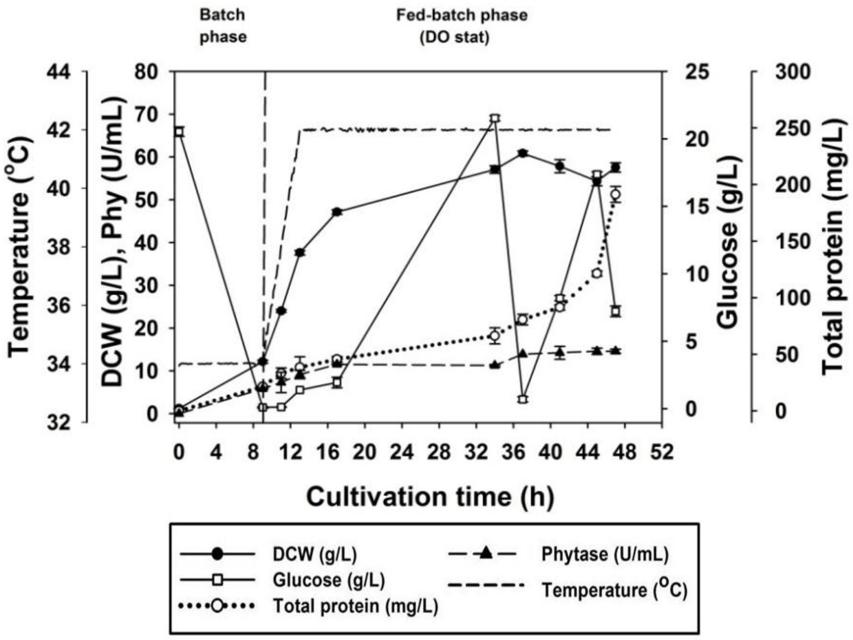
4.5.1.3 การเพิ่มอุณหภูมิในระยะเฟด-แบทช์เท่ากับ 42 องศาเซลเซียส

จากการเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* โดยอาศัยค่าออกซิเจนละลายเป็นตัวควบคุมการเติมสับสเทรตและมีการเพิ่มอุณหภูมิในระยะเฟด-แบทช์เท่ากับ 42 องศาเซลเซียส พบว่าระยะเวลาที่ใช้ในการเพิ่มอุณหภูมิจาก 34 องศาเซลเซลเซียส เป็น 42 องศาเซลเซียส เท่ากับ 4 ชั่วโมง ในช่วงเวลาดังกล่าวเซลล์สามารถเติบโตได้อย่างต่อเนื่องซึ่งความเข้มข้นของเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 12.14±0.36 กรัมต่อลิตรเป็น 37.60±0.53 กรัมต่อลิตร ขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสมีค่าเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยจาก 5.79±0.09 หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็น 9.13±0.99 หน่วยต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 4-28) อย่างไรก็ตาม การเติมสับสเทรตโดย อาศัยค่าออกซิเจนละลายเป็นตัวควบคุมสามารถดำเนินการได้เพียง 18 ชั่วโมงเท่านั้น (9-27 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง) หลังจากนั้นค่าออกซิเจนละลายเพิ่มสูงขึ้นเท่ากับ 32 เปอร์เซ็นต์ และมีแนวโน้มที่สูงขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งอาจเกิดจากเซลล์มีความสามารถที่จะทนต่ออุณหภูมิสูงได้เพียงระยะเวลาสั้นๆ เท่านั้นเพื่อความอยู่รอดของเซลล์ และเมื่อระบบไม่สามารถที่จะเติมสับสเทรต โดยอาศัยค่าออกซิเจนละลายเป็นตัวควบคุม ได้ ผู้วิจัยจึงเปลี่ยนรูปแบบการเติมสับสเทรตเป็นการเติมแบบคงที่โดยใช้อัตราการเติมเท่ากับ 103 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง หรือ 51.5 กรัม$_{\text{สับสเทรต}}$ต่อชั่วโมง และแม้ว่าการเติมแบบคงที่จะใช้อัตราการเติมในระดับต่ำแต่ก็ยังสามารถพบการสะสมของกลูโคสในระบบสูงถึง 20 กรัมต่อลิตร ซึ่งในช่วงดังกล่าวความเข้มข้นของเซลล์มีค่าแปรผันอยู่ในช่วง 57-60 กรัมต่อลิตร และกิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสมีค่าอยู่ในช่วง 13-14 หน่วยต่อมิลลิลิตร

ผลจากการติดตามเอนไซม์ไฟเตสและการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE (ความเข้มข้นเจล 10 เปอร์เซ็นต์) แสดงดังภาพที่ 4-29 ซึ่งพบว่า แถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 62 กิโลดาลตัน มีอยู่น้อยมากเมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส และ 38 องศาเซลเซียส แต่สามารถสังเกตเห็นแถบโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลประมาณ 45 กิโลดาลตัน อย่างชัดเจนและเข้มขึ้นอย่างต่อเนื่องตามระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง โดยระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงคือ 47 ชั่วโมง ให้ความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 57.53±3.10 กรัมต่อลิตร ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสเท่ากับ 14.58±0.50 หน่วยต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดมีค่าเท่ากับ 191.22±7.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของกลูโคสที่เหลือในระบบเท่ากับ 7.22±0.39 กรัมต่อลิตร และค่าพารามิเตอร์อื่นๆ แสดงดังตารางที่ 4-7

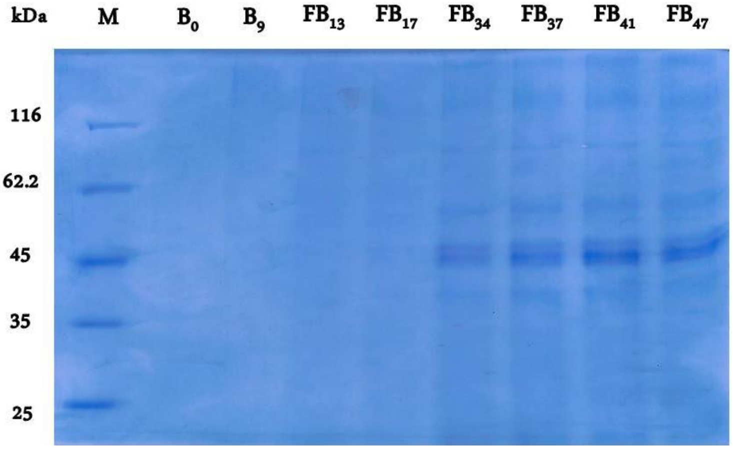
ภาพที่ 4-28

รูปแบบการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสจากการเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* โดยเพิ่มอุณหภูมิในระยะเฟด-แบทช์เท่ากับ 42 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 4-29

การติดตามเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* โดยการเพิ่มอุณหภูมิในระยะเฟด-แบทช์เท่ากับ 42 องศาเซลเซียส; M คือ โปรตีนมาตรฐาน (กิโลดาลตัน), B คือ ตัวอย่างในระยะแบทช์, FB คือ ตัวอย่างในระยะเฟด-แบทช์ และ ตัวเลข คือ ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)



<u>ตารางที่ 4-7</u>

ค่าพารามิเตอร์ต่างๆจากกระบวนการผลิตเอนไซม์ไฟเตสโดยรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* โดยปรับอุณหภูมิในระยะเฟด-แบทช์เท่ากับ 34, 38, 40 และ 42 องศาเซลเซียส

ข้อมูลจากกระบวนการหมัก	อุณหภูมิในระยะเฟด-แบทช์ (องศาเซลเซียส)			
	34	38	40	42
น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	114.51 ±1.43	99.76 ±1.75	77.52 ±1.37	57.53 ±3.10
กิจกรรมเอนไซม์ไฟเตส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	128.60 ±1.99	83.62 ±0.05	26.88 ±0.25	14.58 ±0.50
โปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อลิตร)	480.54 ±7.05	229.46 ±9.41	317.59 ±2.35	191.22 ±7.05
ผลได้ของเซลล์จากสับสเทรต (กรัม$_{\text{เซลล์}}$ต่อกรัม$_{\text{สับสเทรต}}$)	0.46 ±0.02	0.39 ±0.01	0.31 ±0.01	0.23 ±0.02
ผลได้ของผลิตภัณฑ์จากสับสเทรต (หน่วยต่อกรัม$_{\text{สับสเทรต}}$)	519.67 ±8.05	332.62 ±1.98	106.32 ±0.99	60.83 ±2.04
ผลได้ของผลิตภัณฑ์จากเซลล์ (หน่วยต่อกรัม$_{\text{เซลล์}}$)	1118.81 ±17.36	835.07 ±4.98	342.40 ±3.20	253.43 ±8.64
อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์เชิงปริมาตร (หน่วยต่อลิตร.ชั่วโมง)	3227.10 ±50.06	1906.24 ±12.32	589.86 ±5.52	310.23 ±10.57
อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะ (หน่วยต่อกรัม$_{\text{เซลล์}}$.ชั่วโมง)	28.18 ±0.44	19.11 ±0.11	7.61 ±0.07	5.39 ±0.18
เอทานอล (กรัมต่อลิตร)	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
กรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)	40	44	45	47

4.5.1.4 การเปรียบเทียบอิทธิพลของการเพิ่มอุณหภูมิในระยะเฟด-แบทช์ต่อการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตส

จากการเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ที่มีการเพิ่มอุณหภูมิในระยะเฟด-แบทช์เท่ากับ 38, 40 และ 42 องศาเซลเซียส พบว่าการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 38 และ 40 องศาเซลเซียส ระบบสามารถเติมสับสเทรตโดยอาศัยค่าออกซิเจนละลายเป็นตัวควบคุมได้ตลอดการเพาะเลี้ยง ซึ่งระยะเวลาที่ใช้ในการดำเนินการใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 4-7) แต่การเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส สามารถเติมสับสเทรตโดยอาศัยค่าออกซิเจนละลายเป็นตัวควบคุมได้เพียง 18 ชั่วโมงเท่านั้น และหลังจากนั้นจึงเปลี่ยนรูปแบบการเติมเป็นการเติมแบบคงที่ ทั้งนี้อาจเกิดจากเซลล์มีความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิสูงได้เพียงระยะเวลาสั้นๆ เท่านั้นและสับ-สเทรตที่ถูกใช้ไปอาจจะนำไปใช้เพื่อซ่อมแซมเซลล์มากกว่าการเพิ่มจำนวน สอดคล้องกับการรายงานของ Zhong และคณะ (2014) ที่กล่าวว่า การเพิ่มอุณหภูมิจาก 20 เป็น 30 องศาเซลเซียส ในการเพาะเลี้ยง *P. pastoris* เพื่อผลิต human interleukin-10 ส่งผลให้เซลล์มีอัตราการตายสูงขึ้น และผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนได้น้อยลง

จากผลการทดลองดังกล่าวพบว่า ระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 34, 38, 40 และ 42 องศาเซลเซียส อยู่ในช่วง 40-47 ชั่วโมง โดยเมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองในการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ที่มีการแปรผันอุณหภูมิ (ผลการทดลองข้อที่ 4.2.2) พบว่าผลที่ได้มีความแตกต่างกัน เนื่องจากระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน รวมทั้งการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เซลล์ไม่สามารถเติบโตได้ อย่างไรก็ตาม การแปรผันอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์กล้าเชื้อได้ถูกถ่ายลงสู่ถังหมักที่อุณหภูมิต่างๆ ซึ่งเมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิสูงทำให้ผลต่างระหว่างอุณหภูมิของกล้าเชื้อและอุณหภูมิในถัง หมักมีค่าต่างกันมากทำให้เซลล์อาจจะเกิดความเครียดจากอุณหภูมิสูงส่งผลให้ระยะเวลาในการปรับตัวนานขึ้นหรือไม่สามารถเติบโตได้ ในขณะที่การเพิ่มอุณหภูมิในระยะเฟด-แบทช์ได้มีการเพิ่มอุณหภูมิอย่างช้าๆ ในอัตรา 2 องศาเซลเซียสต่อชั่วโมง จึงทำให้เซลล์ค่อยๆปรับตัวเพื่อเติบโตที่อุณหภูมิสูง นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงในระยะแบทช์เซลล์มีการเติบโตที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดทำให้เซลล์อยู่ในระยะที่พร้อมจะเติบโตต่อไป

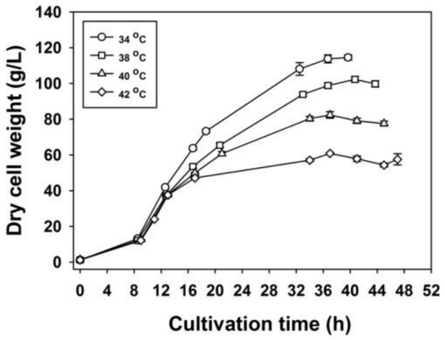
เมื่อพิจารณาผลของการเพิ่มอุณหภูมิในระยะเฟด-แบทช์พบว่า การเพิ่มอุณหภูมิส่งผลให้ความเข้มข้นของเซลล์ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตส และค่าพารามิเตอร์อื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเติบโตและการสร้างผลิตภัณฑ์มีค่าลดลง (ภาพที่ 4-30 และตารางที่ 4-7) โดยการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส ให้ค่าความเข้มข้นของเซลล์สูงกว่าการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 และ 42 องศาเซลเซียส ประมาณ 1.3 และ 1.7 เท่า ตามลำดับ และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตส สูงกว่าประมาณ 3.1 และ 5.7 เท่า ตามลำดับ และจากผลการทดลองดังกล่าวพบว่า หากต้องการลด

พลังงานที่ใช้ในระบบหล่อเย็นเพื่อเป็นการลดต้นทุนการผลิตและให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสในระดับสูงนั้น การเพาะเลี้ยงที่ อุณหภูมิ 34-38 องศาเซลเซียส น่าจะมีความ เป็นไปได้ในการผลิตเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* และหากต้องการขยายขนาดในการผลิตในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งการควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในระดับที่ต้องการตลอดเวลาเป็นสิ่งที่ทำได้ค่อนข้างยาก โดยอุณหภูมิอาจมีการแปรผันจากค่าควบคุม ดังนั้น หากอุณหภูมิในระหว่างการเพาะเลี้ยงแปรผันอยู่ในช่วง 34-38 องศาเซลเซียส ก็ยังอยู่ในช่วงอุณหภูมิที่ให้ผลผลิตในระดับที่สูง ซึ่งถือเป็นข้อดีของระบบการผลิตและทำให้การควบคุมอุณหภูมิทำได้ง่ายขึ้น

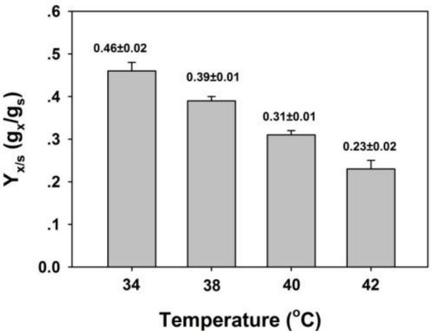
<u>ภาพที่ 4-30</u>

อิทธิพลของการเพิ่มอุณหภูมิในระยะเฟด-แบทช์ต่อการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* (ก) น้ำหนักเซลล์แห้ง (ข) ผลได้ของเซลล์จากสับสเทรต (ค) กิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตส และ (ง) อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์เชิงปริมาตร

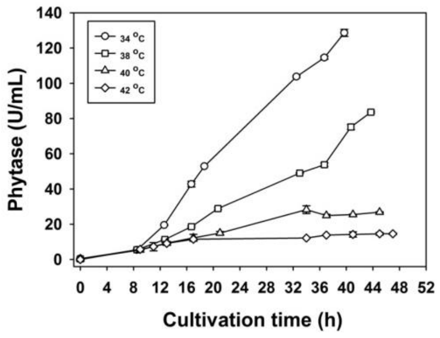
(ก) น้ำหนักเซลล์แห้ง



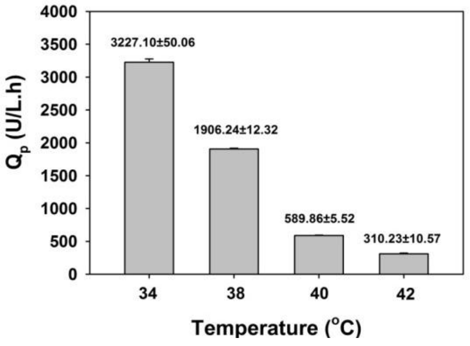
(ข) ผลได้ของเซลล์จากสับสเทรต



(ค) กิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตส



(ง) อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์เชิงปริมาตร



บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 การศึกษารูปแบบการเติบโตของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *Ogataea thermomethanolica* ในฟลาสก์เขย่า

งานวิจัยในส่วนนี้ได้ทำการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการเติบโตของ รีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* เพื่อใช้ในการเตรียมกล้าเชื้อ รวมถึงหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเตรียมกล้าเชื้อขั้นที่ 1 และกล้าเชื้อขั้นที่ 2 สำหรับการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพซึ่งผลจากการศึกษาพบว่า

1) การเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ส่งผลให้ความเข้มข้นของเซลล์และอัตราการเติบโตจำเพาะมีค่าสูงสุดเท่ากับ 12.00±0.24 กรัมต่อลิตร และ 0.26±0.01 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกอุณหภูมิเท่ากับ 35 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิควบคุมสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อเตรียมกล้าเชื้อขั้นที่ 1 และกล้าเชื้อขั้นที่ 2

2) ระยะเวลาในการเตรียมกล้าเชื้อขั้นที่ 1 ในอาหารเหลว YPD คือ 16 ชั่วโมง ซึ่งมีความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 9.25±0.58 กรัมต่อลิตร และอัตราการเติบโตจำเพาะมีค่าเท่ากับ 0.25±0.00 ต่อชั่วโมง จากนั้นจึงถ่ายกล้าเชื้อขั้นที่ 1 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงในอาหารสังเคราะห์สูตร Syn6 (ค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นเท่ากับ 1) เพื่อใช้สำหรับเตรียมกล้าเชื้อขั้นที่ 2 ซึ่งระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงคือ 24 ชั่วโมง ให้ความเข้มข้นของเซลล์มีค่าเท่ากับ 7.77±0.39 กรัมต่อลิตร และมีค่าอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.15±0.01 ต่อชั่วโมง

5.2 การศึกษาอิทธิพลของ ค่าพีเอชและอุณหภูมิต่อการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสในถังปฏิกรณ์ชีวภาพโดยใช้กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์

งานวิจัยในส่วนนี้ได้ทำการศึกษา อิทธิพลของ ค่าพีเอชและอุณหภูมิ ที่มีผลต่อการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ซึ่งผลจากการศึกษาพบว่า

1) รีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* สามารถเติบโตและผลิตเอนไซม์ไฟเตสได้ในช่วงพีเอชที่กว้างคือ พีเอช 4.0-6.5 อย่างไรก็ตาม พีเอชที่เหมาะสมที่สุดต่อการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสคือพีเอช 6.0 เนื่องจากให้ค่าความเข้มข้นของเซลล์และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสสูงสุดเท่ากับ 14.00±0.21 กรัมต่อลิตร และ 7.83±0.04 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่การ

เพาะเลี้ยงที่พีเอช 7.0 ส่งผลให้ความเข้มข้นของเซลล์ อัตราการเติบโต และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสมีค่าต่ำทั้งนี้อาจเกิดจากการเกิดตะกอนของอาหาร Syn6 ที่มากขึ้นเมื่อค่าพีเอชของอาหารสูงขึ้น โดยเป็นไปได้ว่าที่พีเอช 7.0 ธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเติบโตของเซลล์ในอาหาร Syn6 อาจเกิดการตกตะกอนและอยู่ในรูปที่เซลล์ไม่สามารถนำไปใช้ได้

2) รีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* สามารถเติบโตและผลิตเอนไซม์ไฟเตสได้ในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 30-40 องศาเซลเซียส และเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 34 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของเซลล์ อัตราการเติบโตจำเพาะ และกิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสมีค่าลดลง อย่างไรก็ตาม งานวิจัยนี้มุ่งเน้นที่จะพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยง รีคอมบิแนนท์ ยีสต์ *O. thermomethanolica* เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งการลดต้นทุนในการผลิตจึงเป็นจุดประสงค์หลักที่สำคัญ และจากผลการทดลองดังกล่าวพบว่าการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 และ 34 องศาเซลเซียส ให้ผลการเติบโตและการผลิตไม่ต่างกันมากนัก ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกอุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิควบคุม

นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงแบบแบทช์โดยไม่มีการควบคุมอุณหภูมิสามารถดำเนินการได้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 20 ลิตร รวมทั้งให้ผลการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสเช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 และ 34 องศาเซลเซียส

5.3 การศึกษารูปแบบการเติมสับสเทรตในการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไฟเตส

งานวิจัยในส่วนนี้ได้ทำการศึกษารูปแบบการเติมสับสเทรตในการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ เพื่อเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์เซลล์ และการผลิตเอนไซม์ไฟเตส โดยหลีกเลี่ยงการสร้างผลพลอยได้ในรูปเอทานอลและกรดอะซิติก ซึ่งรูปแบบการเติมสับสเทรตที่ได้ทำการศึกษาในงานวิจัยนี้คือ การเติมแบบเอกซ์โพเนนเชียล การเติมแบบคงที่ การเติมแบบครั้งคราว และการเติมโดยอาศัยค่าออกซิเจนละลายเป็นตัวควบคุม (DO stat regulation)

จากการศึกษาพบว่า การเติมแบบเอกซ์โพเนนเชียลส่งผลให้เซลล์สร้างผลิตภัณฑ์รองในรูปเอทานอล และกรดอะซิติก ซึ่งมีค่าเท่ากับ 48.70±3.55 และ 12.79±0.21 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เนื่องจากเกิดสภาวะจำกัดออกซิเจนและเกิดการสะสมของกลูโคสสูงสุดเท่ากับ 112.50±1.18 กรัมต่อลิตร การเติมแบบคงที่ และการเติมแบบครั้งคราวส่งผลให้ความเข้มข้นของเซลล์ และผลได้ของเซลล์จากสับสเทรตมีค่าใกล้เคียงกัน แต่เมื่อพิจารณาค่ากิจกรรมเอนไซม์ไฟเตสพบว่าการเติมแบบครั้งคราวให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสสูงกว่าแม้ว่าในช่วงต้นของการเติมสับสเทรตเซลล์สามารถสร้างเอทานอลและกรดอะซิติกออกสู่น้ำหมักก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบการเติมสับสเทรตทั้ง 3 รูปแบบ พบว่าการ

เติมแบบครั้งคราวให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสสูงกว่าการเติมแบบเอกซ์โพเนนเชียล และการเติมแบบคงที่ประมาณ 4.7 และ 2.5 เท่า ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม การเติมสับสเทรต แบบครั้งคราวอาจเกิดความยุ่งยากในทางปฏิบัติ เนื่องจากผู้ปฏิบัติงานต้องคอยติดตามค่าออกซิเจนละลายของระบบอย่างใกล้ชิดเพื่อเติมสับสเทรตในครั้งถัดไป ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้การเติมสับสเทรตโดยอาศัยค่าออกซิเจนละลายเป็นตัวควบคุม ซึ่งการเติมในลักษณะดังกล่าวมีความคล้ายกับการเติมแบบครั้งคราวแต่ไม่เกิดสภาวะจำกัดออกซิเจน รวมทั้งความยุ่งยากในการดำเนินการน้อยลงด้วย

จากการศึกษาการเติม สับสเทรตโดยอาศัยค่าออกซิเจนละลายเป็นตัวควบคุม พบว่า ระบบสามารถเติมสับสเทรตเข้าสู่ถังหมักได้อย่างต่อเนื่อง โดยมีความเข้มข้นของเซลล์สุดท้าย 114.51±1.43 กรัมต่อลิตร ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสเท่ากับ 128.60±1.99 หน่วยต่อมิลลิลิตร และตรวจไม่พบผลิตภัณฑ์รองในระบบการเพาะเลี้ยง ดังนั้นการเติมสับสเทรตโดย อาศัยค่าออกซิเจนละลายเป็นตัวควบคุมจึงมีความเหมาะสมในการเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* เพิ่มความหนาแน่นของเซลล์ เพิ่มการผลิตเอนไซม์ไฟเตส และลดผลพลอยได้ในรูปของเอทานอลและกรดอะซิ - ติก

5.4 การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้แหล่งคาร์บอนราคาถูกในการผลิตเอนไซม์ไฟเตส

การศึกษาในส่วนนี้ได้ทำการเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์และแบบเฟด-แบทช์โดยใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อลดต้นทุนในแง่ของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต เอนไซม์ไฟเตส จากผลการศึกษาพบว่า การเพาะเลี้ยงแบบแบทช์เซลล์มีรูปแบบการเติบโตและให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสใกล้เคียงกับการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีความเข้มข้นของเซลล์สูงสุดเท่ากับ 16.87±0.68 กรัมต่อลิตร ค่าอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.46±0.03 ต่อชั่วโมง และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสสูงสุดเท่ากับ 5.67±0.11 หน่วยต่อมิลลิลิตร ส่วนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์โดย อาศัยค่าออกซิเจนละลายเป็นตัวควบคุม การเติมสับสเทรตพบว่า ค่าความเข้มข้นของเซลล์ กิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตส และพารามิเตอร์อื่นๆที่เกี่ยวข้องกับการเติบโตและการสร้างผลิตภัณฑ์มีค่าใกล้เคียงกับการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ดังนั้นน้ำตาลซูโครสสามารถนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ ยีสต์ *O. thermomethanolica* เพื่อผลิตเอนไซม์ไฟเตสภายใต้การควบคุมการแสดงออกของโปรโมเตอร์ *OthGAP* ได้อย่างมีประสิทธิภาพซึ่งจะเป็นการลดต้นทุนการผลิตได้ในระดับหนึ่ง

5.5 การศึกษาอิทธิพลของการเพิ่มอุณหภูมิในระยะเฟด-แบทช์ต่อการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตส

การศึกษาในส่วนนี้ได้ทำการเพาะเลี้ยง รีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพโดยเริ่มจากการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 34 องศาเซลเซียส จากนั้นเมื่อเข้าสู่ระยะเฟด-แบทช์ทำการเติมสับสเทรตโดยอาศัยค่าออกซิเจนละลายเป็นตัวควบคุม (DO stat regulation) และทำการเพิ่มอุณหภูมิเท่ากับ 38, 40 และ 42 องศาเซลเซียส โดยกำหนดให้อัตราการเพิ่มอุณหภูมิมีค่าเท่ากับ 2 องศาเซลเซียสต่อชั่วโมง จากผลการศึกษาพบว่า เมื่อเพิ่มอุณหภูมิเท่ากับ 38 และ 40 องศาเซลเซียส เซลล์สามารถเติบโตและผลิตเอนไซม์ไฟเตสได้อย่างต่อเนื่องและสามารถเติมสับสเทรตโดยอาศัยค่าออกซิเจนละลายเป็นตัวควบคุมได้ตลอดการเพาะเลี้ยง แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 42 องศาเซลเซียส ระบบ สามารถเติมสับสเทรตโดยอาศัยค่าออกซิเจนละลายเป็นตัวควบคุมได้เพียง 18 ชั่วโมงเท่านั้น หลังจากนั้นจึงเปลี่ยนรูปแบบการเติมเป็นการเติมแบบคงที่ ทั้งนี้อาจเกิดจากเซลล์มีความสามารถในการทนต่อ อุณหภูมิสูงได้เพียงระยะเวลาสั้นๆเท่านั้น นอกจากนี้การเพิ่มอุณหภูมิส่งผลให้ความเข้มข้นของเซลล์ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตส และพารามิเตอร์อื่นๆที่เกี่ยวข้องกับการเติบโตและการสร้างผลิตภัณฑ์มีค่าลดลง โดยการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส ให้ค่าความเข้มข้นของเซลล์สูงกว่าการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 และ 42 องศาเซลเซียส ประมาณ 1.3 และ 1.7 เท่า ตามลำดับ และให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสสูงกว่าประมาณ 3.1 และ 5.7 เท่า ตามลำดับ

สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* เพื่อผลิตเอนไซม์ไฟเตสภายใต้การควบคุมการแสดงออกอย่างต่อเนื่องตลอดเวลาด้วยโปรโมเตอร์ *OthGAP* พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเตรียมกล้าเชื้อคือ 35 องศาเซลเซียส โดยระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับเตรียมกล้าเชื้อขั้นที่ 1 ในอาหาร YPD และกล้าเชื้อขั้นที่ 2 ในอาหารสังเคราะห์ Syn6 คือ 16 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสคือ พี-เอช 6.0 และอุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส ตามลำดับ การเติมสับสเทรตแบบครั้งคราวส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสมีค่าสูงสุด อย่างไรก็ตาม การเติมในรูปแบบดังกล่าวอาจไม่เหมาะสมในการปฏิบัติงานจริง เนื่องจากผู้ปฏิบัติงานต้องคอยติดตามค่าออกซิเจนละลายของระบบอย่างใกล้ชิดเพื่อเติมสับสเทรตในครั้งถัดไป ดังนั้น จึงมีการประยุกต์ใช้การเติมสับสเทรตโดยอาศัยค่าออกซิเจนละลายเป็นตัวควบคุม (DO stat regulation) เพื่อให้การปฏิบัติงานง่ายขึ้น ซึ่งวิธีดังกล่าวส่งผลให้ความเข้มข้นของเซลล์และกิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสมีค่าสูงเช่นเดียวกัน รวมถึงตรวจไม่พบการสร้าง

ผลิตภัณฑ์รองในรูปของเอทานอลและกรดอะซิติก นอกจากนี้ ในการเพาะเลี้ยงสามารถนำน้ำตาลซูโครสมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ ซึ่งผลจากการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์และการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์โดยอาศัยค่าออกซิเจนละลายเป็นตัวควบคุมแสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้นของเซลล์และกิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสมีค่าใกล้เคียงกับการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และในการศึกษาอิทธิพลของการเพิ่มอุณหภูมิในระยะเฟด-แบทช์พบว่า การเพิ่มอุณหภูมิสูงกว่า 34 องศาเซลเซียส ส่งผลให้การเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสมีค่าลดลง และหากอุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส เซลล์สามารถเติบโตได้ในระยะเวลาสั้นๆ เท่านั้น

จากผลการทดลองที่กล่าวมาในงานวิจัยนี้พบว่า ผลการศึกษาที่ได้เป็นไปตามวัตถุประสงค์ของการทดลองที่วางไว้ และคาด หวังว่าผลการทดลองที่ได้จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ หรือพัฒนาต่อไปในระดับอุตสาหกรรม

ข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่ายีสต์ *O. thermomethanolica* มีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน ซึ่งอาจจะนำมาใช้ทดแทนยีสต์สายพันธุ์การค้าในปัจจุบัน อย่างไรก็ตาม การเพาะเลี้ยงและผลิตโปรตีนภายใต้อุณหภูมิสูง โปรตีนเป้าหมายจำเป็นที่จะต้องมีความเสถียรเมื่ออยู่ในอุณหภูมิสูงด้วย นอกจากนี้ กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ที่อาศัยค่าออกซิเจนละลายเป็นตัวควบคุมการเติมสับสเทรตอาจจะไม่เหมาะสมหากต้องการขยายขนาดเพื่อนำไปผลิตในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจาก อาจจะเกิดข้อจำกัดจากอุปกรณ์และเครื่องมือ ดังนั้น อาจจะประยุกต์ใช้การเติมสับสเทรตแบบคงที่ โดยมีการเพิ่มอัตราการเติมสับสเทรตแบบลำดับขั้น (stepwise constant feeding) เพื่อให้อัตราการเติมสับสเทรตมีความสัมพันธ์กับอัตราการเติบโตของเซลล์ โดยในระหว่างการเพาะเลี้ยงหากอุณหภูมิมีการแปรผันอยู่ในช่วง 34-38 องศาเซลเซียส ก็ยังสามารถให้ผลผลิตที่สูงซึ่งถือเป็นข้อดีของระบบ รวมถึงน้ำตาลซูโครส (น้ำตาลทรายตามท้องตลาด) สามารถนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงยีสต์ *O. thermomethanolica* เพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนภายใต้การควบคุมการแสดงออกอย่างต่อเนื่องตลอดเวลาด้วยโปรโมเตอร์ *OthGAP*

ดังนั้น เพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิตในระดับอุตสาหกรรมและให้ผลผลิตที่สูงสามารถทำได้โดยใช้กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์โดยใช้การเติมสับสเทรตแบบคงที่ ที่มีการเพิ่มอัตราการเติมสับสเทรตแบบลำดับขั้น ใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และอุณหภูมิระหว่างการเพาะเลี้ยงมีการแปรผันอยู่ในช่วง 34-38 องศาเซลเซียส

รายการอ้างอิง

1. เทพปัญญา เจริญรัตน์ และ วรสิทธิ์ โทจำปา. (2553). เอกสารการเรียนการสอนปฏิบัติการเทคโนโลยีการหมัก ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

2. นิภารัตน์ ประมวล. (2552). การควบคุมการเกิด overflow metabolism ระหว่างการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนแบบต่อเนื่องตลอดเวลาโดย *Pichia pastoris*. ปทุมธานี : วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

3. Amuel, C., Gellissen, G., Hollenberg, C.P. and Suckow, M. (2000) Analysis of heat shock promoters in *Hansenula polymorpha*: The *TPS1* promoter, a novel element for heterologous gene expression. Biotechnol. Bioprocess Eng. 5: 247-252.

4. Associarion of Official Analytical Chemists (AOAC). (1990) Official methods of analysis. 15th ed., The Associarion of Official Agricultural Chemists, Virginia. 2: 613.

5. Baumann, M., Maurer, M., Dragosits, M., Cos, O. Ferrer, P. and Mattanovich, D. (2008) Hypoxic fed-batch cultivation of *Pichia pastoris* increases specific and volumetric productivity of recombinant proteins. Biotechnol. Bioeng. 100: 177-183.

6. Basso, T.O., de Kok, S., Dario, M., Espirito-Santo, J.A., Muller, G., Schlolg, P.S., Silva, C.P., Tonso, A., Daran, J.M., Gombert, A.K., Maris, A., Pronk, J,T. and Stambuk, B.U. (2011) Engineering topology and kinetics of sucrose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* for improved ethanol yield. Metabolic. Eng. 13: 694–703.

7. Bitar, I.C. and Reinhold, J.G. (1972) Phytase and alkaline phosphatase activities in intestinal mucosae of rat, chicken, calf, and man. Biochim. Biophys. Acta. 268: 442-452.

8. Böer, E., Steinborn, G., Kunze, G. and Gellissen, G. (2007) Yeast expression platforms. Appl. Microb. Biotechnol. 77: 513–523.

9. Boyce, A., Casey, A. and Walsh, G. (2004) A phytase enzyme-based biochemistry practical particularly suited to students undertaking courses in biotechnology and environmental science. Biochem. Mol. Biol. Educ. 32(5): 336-340.

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

11. Bruschi, M., Kromer, J.O., Steen, J.A. and Nielsen, L.K. (2014) Production of the short peptide surfactant DAMP4 from glucose or sucrose in high cell density cultures of *Escherichia coli* BL21 (DE3). Microb. Cell. Fac. 13(99): 1-9.

12. Bushell, M. E., Rowe, M., Avignone-Rossa, C.A. and Wardell, J.N. (2003) Cyclic Fed-batch culture for production of human serum albumin in *Pichia pastoris.* Biotech. Bioeng. 82(6): 678-683.

13. Calik, P., Bozkurt, B., Zerze, G., Inankur, B., Bayraktar, E., Boy, E., Orman, M.A., Acik, E. and Ozdamar, T. (2013) Effect of co-substrate sorbitol different feeding strategies on human growth hormone production by recombinant *Pichia pastoris*. J. Chem. Technol. Biotechnol. 88: 1631-1640.

14. Cassland, P. and Jönsson, L.J. (1999) Characterization of a gene encoding Trametes versicolor laccase A and improved heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* by decreased cultivation temperature. Appl. Microbiol. Biotechnol. 52: 393-400.

15. Charoenrat, T., Ketudat-Cairns, M., Jahic, M., Enfors, S.O. and Veide, A. (2006) Recovery of recombinant β-glucosidase by expanded bed adsorption from *Pichia pastoris* high-cell-density culture broth. J. Biotechnol. 122: 86-98.

16. Charoenrat, T., Khumruaengsri, N., Promdonkoy, P., Rattanaphan, N., Eurwilaichitr, L., Tanapongpipat, S. and Roongsawang, N. (2013) Improvement of recombinant endoglucanase produced in *Pichia pastoris* KM71 through the use of synthetic medium for inoculum and pH control of proteolysis. J. Biosci. Bioeng. 116(2): 193-198.

17. Chiruvolu, V., Eskridge, K., Cregg, J. and Meagher, M. (1998) Effect of glycerol concentration and pH on growth of recombinant *Pichia pastoris* yeast. Appl. Biochem. Biotechnol. 75: 163-173.

18. Chen, L.H. and Pan, S.H. (1779) cited in J.V. Erdman Jr.: Oilseed phytates: nutritional implications. J. Am. Oil Chem. Soc. 56: 739-741.

19. Clare, J.J., Romanos, M., Rayment, F.B., Rovedder, 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.

20. Cos, O., Ramón, R., Montesinos, J.L. and Valero, F. (2006) Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: A review. Microb Cell. Fact. 5:17. Doi: 10.1186/1475-2859-5-17.

21. Delroisse, J.M., Dannau, M., Gilsoul, J.J., El Mejdoub, T., Destain, J., Portetelle, D., Thonart, P., Haubruge, E. and Vandenbol, M. (2005) Expression of a synthetic gene encoding a *Tribolium castaueum* carboxylesterase in *Pichia pastoris*. Protein Expr. Purif. 42: 286–294.

22. Doran, P.M. (2013) Bioprocess Engineering Principle. Academic Press, London.

23. Doring, F., Klapper, M., Theis, S. and Daniel, H. (1998) Use of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter for production of functional mammalian membrane transport proteins in the yeast *Pichia pastoris*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 250: 531–535.

24. Douma, A. C., Veenhuis, M., de Konig, W. and Harder, W. (1985) Dihydroxyacetune synthase is located in the peroxisomal matrix of methanol-grown *Hansenula polymorpha*. Arch. Microbiol. 143: 237-243.

25. Dvorakova, J. (1998) Phytase: sources, preparation and exploitation. Folia Microbiol. 43(4): 323-338.

26. Eilert, E., Hollenberg, C., Piontek, M. and Suckow, M. (2012) The use of highly expressed FTH1 as carrier protein for cytosolic targeting in Hansenula polymorpha. Jou. of biotechnol. 152: 172-176.

27. Ferreira, A.R., Ataide, F., Stosch, M.V., Dias, J.M.L., Clemente, J.J., Cunha, A.E. and Oliveira, R. (2012) Application of adaptive DO-stat feeding control to Pichia pastoris X33 cultures expressing a single chain antibody fragment (scFv). Bioprecess. Biosyst. Eng. 35: 1603-1614.

28. Frolich, W. (1990) Chelating properties of dietary fiber and phytate. The role for mineral availability. Adv. ExpA. Med. Biol. 270: 83-93.

29. Gomes, N., Teixeira, J. and Belo, Isabel. (2012) Fed-batch versus batch cultures of *Yarrowia lipolytica* for γ-decalactone production from methyl ricinoleate. Biotechnol. 34: 649-654.

30. Goodrick, J.C., Xu, M., Finnegan, R., Schilling, B.M., Schiavi, S., Hoppe, H. and Wan, N.C. (2001) High-level expression and stabilization of recombinant human chitinase produced in a continuous constitutive *Pichia pastoris* expression system. Biotech. Bioeng. 74(6): 492-497.

31. Harnpicharnchai, P., Promdonkoy, P., Sae-Tang, K., Roongsawang, N. and Tanapongpipat, S. (2014) Use of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter from a thermotolerant yeast, *Pichia thermomethanolica*, for heterologous gene expression, especially at elevated temperature. Ann. Microbiol. 64: 1457-1462.

32. Heo, J.M., Hong, W.K., Cho, E.Y., Kim, M.W., Kim, J.Y., Kim, C.H., Rhee, S.K. and Kang, H.A. (2003) Properties of the *Hansenula polymorpha*-derived constitutive *GAP* promoter, assessed using an HSA reporter gene. FEMS. Yeast Rese. 4: 175-184.

33. Heyland, J., Fu, J., Blank, L.M. and Schmid, R. (2010) Quantitative physiology of *Pichia pastoris* during glucose-limited high-cell density fed-batch cultivation for recombinant protein production. Biotechnol. Bioeng. 107(2): 357-368.

34. Higgins, D.R. and Cregg, J.M. (1998) Method in molecular biology: *Pichia* protocols. Totowa, New Jersey. Humana Press. 1-15.

35. Hong, F., Meinander, N.Q., and Johnsson, L.J. (2002) Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris*. Biotechnol. Bioeng. 79: 438-449.

36. HPLC Columns for Carbohydrates. (1997) Sigma-Aldrich Co.

37. Inan, M. and Meagher, M.M. (2001) Non-repressing carbon source for alcohol oxidase (*AOX1*) promoter of *Pichia pastoris*. J. Biosci. Bioeng. 92: 585-589.

38. Jahic, M., Gustavsson, M., Jansen, A-K., Martinelle, M. and Enfors, S.O. (2003) Analysis and control of proteolysis of a fusion protein in *Pichia pastoris* fed-batch processes. J. Biotechnol. 102: 45-53.

39. Jahic, M., Wallberg, F., Bollok, M., Garcia, P. and Enfors, S.O. (2003) Temperature limited fed-batch technique for control of proteolysis in *Pichia pastoris* bioreactor cultures. Microb. Cell. Fac. 2: 1-11.

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

41. Jahic, M., Knoblechner, J., Charoenrat, T., Enfors, S.O. and Veide, A. (2006) Interfacing *Pichia pastoris* cultivation with expanded bed adsorption. Biotechnol. Bioeng. 93(6): 1040-1049.

42. 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. Biotechnol. Bioeng. 95(3): 433-445.

43. Kalina, V. (1993) Dynamics of microbial growth and metabolic activity and their control by aeration. Antonie van Leewenhoek Int. J. Gen. Mol. Microbiol. 63: 353-373.

44. Krasovska, O.S., Stasyk, O.G., Nahorny, V.O., Stasyk, O.V., Granovski, N., Ko rdium, V.A., Vozianov, O.F. and Sibirny, A.A. (2007) Glucose-induced production of recombinant proteins in *Hansenula polymorpha* mutants deficient in catabolite repression. Biotechnol. Bioeng. 97(4): 858-870.

45. Kubota, S., Takeo, I., Kume, K., Kanai, M., Shitamukai, A., Mizunuma, M., Miyakawa, T., Shimoi, H., Iefuji, H. and Hirata, D. (2004) Effect of ethanol on cell growth of budding yeast: genes that are important for cell growth in the presence of ethanol. Biosci. Biotechnol. Biochem. 64: 968-972.

46. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structure protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.

47. Lee, J., Lee, S.Y. and Park, S. (1997) Fed-batch culture of *Escherichia coli* W by exponential feeding of sucrose as a carbon source. Biotechnol. Techniq. 11: 59-62.

48. Lei, X.G., Weaver, J.D., Mullaney, E., Ullah, A.H. and Azain M.J. (2013) Phytase, a New Life for an“Old” Enzyme. Annu. Rev. Anim. Biosci. 1: 283–309.

49. Li, Z., Xiong, F., Lin, Q., Anojou, M., Daugulis, A.J., Yang, D.S.C. and Hew, C.L. (2001) Low-temperature increase the yield of biologically active herring antifreeze protein in *Pichia pastoris*. Protein Expr. Purif. 21: 438-445.

50. Limtong, S., Srisuk, N., Yongmanitchai, W., Yurimoto, H., Nakase, T. and Kato, N. (2005) *Pichia thermomethanolica* sp. nov., a novel thermotolerant, methylotrophic yeast isolated in Thailand. Int. J Syst Evol Microbiol. 55: 2225–2229.

51. Limtong, S., Srisuk, N., Yongmanitchai, W., Yurimoto, H. and Nakase, T. (2008) *Ogataea chonburiensis* sp. nov. and *Ogataea nakhonphanomensis* sp. nov., thermotolerant, methylotrophic yeast species isolated in Thailand, and transfer of *Pichia siamensis* and *Pichia thermomethanolica* to the genus Ogataea. Int. J Syst Evol Microbiol. 58: 302–307

52. 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.

53. McCollum, E.V. and Hart, E.B. (1908) On the occurrence of a phytin-splitting enzyme in animal tissue. J. Biol. Chem. 4: 497-500.

54. Menendez, C., Hernández, L., Banguela, A. and Pais, J. (2004) Functional production and secretion of the *Gluconacetobacter diazotrophicus* fructose-releasing exo-levanase (LsdB) in *Pichia pastoris.* Enz. Microb. Technol. 34: 446-452.

55. Miller, L.G. (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Anal. Chem. 31: 426-438.

56. Mullaney, E.J. and Ullah, A.H. (2003) The term phytase comprises several different classes of enzymes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 312(1): 179–184.

57. Nayini, N.R and Markakis, P. (1984) The phytase of yeast. Lehensm. Wiss. Technol 17: 24-26.

58. Pepeliaev, S., Krahulec, J., Cerny, Z., Jílková, J., Tlustá, M. and Dostálová, J. (2011) High level expression of human enteropeptidase light chain in *Pichia pastoris.* Jour. of. Biotechnol. 156: 67-73.

59. Promdonkoy, P., Tang, K., Sornlake, W., Harnpicharnchai, P., Kobayashi Sriprang, R., Ruanglek, V., Upathanpreecha, T., Vesaratchavest, M., Eurwilaichitr, L. and

Tanapongpipat, S. (2009) Expression and characterization of *Aspergillus* thermostable phytases in *Pichia pastoris*. FEMS Microbiol. Lett. 290: 18–24.

60. Promdonkoy, P., Tirasophon, W., Roongsawang, N., Eurwilaichitr, L. and Tanapongpipat, S. (2014) Methanol-inducible promoter of thermotolerant methylotrophic yeast *Ogataea thermomethanolica* BCC16875 potential for production of heterologous protein at high temperatures. Curr. Microbiol. 69: 143–148.

61. Rao, K.J., Kim, C.K., Chung, B.H., Sohn, J.H., and Rhee, S.K. (1998) Effect of galactose feeding on the improved production of hirudin in fed-batch cultures of recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. Bioprocess eng. 19: 385-388.

62. Raimondi, S., Zanni, E., Amaretti, A., Palleschi, C., Uccelletti, D. and Rossi, M. (2013) Thermal adaptability of *Kluyveromyces marxianus* in recombinant protein production. Microb. Cell. Fac. 12: 1-7.

63. Riesenberg, D., Guthke, R. (1999). High cell density cultivation of microorganism. Appl. Microbiol. Biotechnol. 51: 422-430.

64. Romano, I., Gellissen, G. and DeVirgilio, C. (2004) Heat-inducible promoter. US patent application, US2004/0086998

65. Ryabova, O.B., Chmil, O.M. and Sibirny, A.A. (2003) Xylose and cellobiose fermentation to ethanol by the thermotolerant methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. FEMS Yeast Res. 4: 157-164.

66. Shojaosadati, S.A., Kolaei, S.M.V., Babaeipour, V. and Farnoud, A.M. (2008) Recent advances in high cell density cultivation for production of recombinant protein. Iran. Jour. of. Biotechnol. 6(2): 63-84.

67. Sreekrishna, K., Brankamp, R.G., Kropp, K.E., Blankenship, D.T., Tsay, J.T., Smith, P.L., Wierschke, J.D., Subramaniam, A. and Birkenberger, L.A. (1997) Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Gene 190: 55-62.

68. Stambuk, B.U., Batista, A.S. and De Araujo, P.S. (2000) Kinetics of active sucrose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biosci. Bioeng. 89: 212–214.

69. Stockmann, C., Maier, U., Anderlei, T., Knocke, C., Gellissen, G. and Buchs, J. (2003) The oxygen transfer rate as key parameter for the characterization of *Hansenula polymorpha* screening cultures. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 30: 613–622.

70. Stratton, J., Chiruvolu, V. and Meagher, M.M.(1998) High cell-density fermentation. In Higgens, D.R. and Cregg, J.M. editors 1998. Methods in molecular biology: *Pichia* protocols. 103: 107-120.

71. Tanapongpipat, S., Promdonkoy, P., Watanabe, T., Tirasophon, W., Roongsawang, N., Chiba, Y. and Eurwilaichitr, L. (2012) Heterologous protein expression in *Pichia thermomethanolica* BCC16875, a thermotolerant methylotrophic yeast and characterization of N-linked glycosylation in secreted protein. FEMS Microbiol. Lett. 334: 127–134.

72. Vats, P. and Banerjee, U.C. (2004) Production studies and catalytic properties of phytases (*myo*-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases): an overview. Enzy. Microb. Technol. 35: 3–14.

73. Verduyn, C., Zomerdijk T.P.L., van Dijken, J.P. and Scheffers, W.A. (1984). Continuous measurements of ethanol production by aerobic yeast suspensions with an enzyme electrode. Appl. Microbiol. Biotechnol. 19: 181-185.

74. Vogelaar, J.C.T., Klapwijk, A., Van Lier, J.B. and Rulkens, W.H. (2000) Temperature effect on the oxygen transfer rate between 20 and 55^{o}C. Wat. Res. 34(3): 1037-1041.

75. 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.

76. Wegner, E.H. (1983) Biochemical conversions by yeast fermentation at high-cell densities. U. S. Patent 4414329

77. Woehrer, J. and Roehr, M. (1981) Regulatory aspects of bakers' yeast metabolism in aerobic fed-batch cultures. Biotechnol. Bioeng. 23: 567-581.

78. Xu, B., Jahic, M., Blomsten, G., and Enfors, S-O. (1999) Glucose overflow metabolism and mixed-acid fermentation in aerobic large-scale fed-batch process with *Escherichia coli*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 51: 564-571.

79. Yamane, T. and Shimizu, S. (1984) Fed-batch techniques in microbial processes. Adv. Biochem. Eng. Biotechol. 30: 147-194.

80. Yao, M.-Z., Zhang, Y.-H., Lu, W.-L., Hu, M.-Q., Wang, W. and Liang, A.-H. (2012) Phytases: crystal structures, protein engineering and potential biotechnological applications. J. Appl. Microbiol. 112(1): 1-14.

81. Zhang, A.L., Luo, J.X., Zhang, T.Y., Pan, Y.W., Tan, Y.H., Fu, C.Y. and Tu, F.Z. (2009) Recent advances on the *GAP* promoter derived expression system of *Pichia pastoris*. Mol. Biol. Rep. 36: 1611–1619.

82. Zhao, X., Hu, C., Wu, S., and Shen, H. (2011) Lipid production by *Rhodosporidium toruloides* Y4 using different substrate feeding strategies. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 38: 627-632.

83. Zhong, Y., Yang, L., Guo, Y., Fang, F., Wang, D., Li, R., Jiang, M., Kang, W., Ma, J., Sun, J. and Xiao, W. (2014) High-temperature cultivation of recombinant *Pichia pastoris* increases endoplasmic reticulum stress and decreases production of human interleukin-10. Microb. Cell. Fac. 13: 1-10.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหาร Yeast extracts Peptone Dextrose (YPD)

Yeast extract	10.0	กรัม
Peptone	20.0	กรัม
Dextrose	20.0	กรัม

ละลายองค์ประกอบของอาหารตามลำดับด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร แล้วนำไปทำให้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ในกรณีอาหารแข็งเติมวุ้น 15-20 กรัม ก่อนนำไปทำให้ปลอดเชื้อรอให้อาหารเย็นและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. อาหารสังเคราะห์สูตร Syn6

2.1 Basic medium

Glucose monohydrate	22.0 กรัม	หรือ ซูโครส 20 กรัม
$NH_4H_2PO_4$	13.3 กรัม	
KCl	3.3 กรัม	
$MgSO_4.7H_2O$	3.0 กรัม	
NaCl	0.33 กรัม	

ละลายองค์ประกอบของอาหารตามลำดับด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 980 มิลลิลิตร แล้วนำไปทำให้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที หลังจากทำให้ปลอดเชื้อ รอให้อาหารเย็น เติมธาตุอาหารรองทั้ง 4 ชนิด ชนิดละ 5 มิลลิลิตร

2.2 ธาตุอาหารรอง

1. สารละลาย Calcium (stock solution)

$CaCl_2.2H_2O$ 132.42 กรัม

ละลายและปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นแล้วนำไปทำให้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที หลังจากทำให้ปลอดเชื้อ รอให้อาหารเย็นและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. สารละลาย Microelement (stock solution)

$Fe(NH_4)_3(C_6H_5O_7)_2$	16.54	กรัม
$CuSO_4 . 5H_2O$	1.1	กรัม
$ZnSO_4 . 7H_2O$	4.0	กรัม
$MnSO_4 . H_2O$	4.52	กรัม
EDTA disodium salt	13.3	กรัม

ละลายองค์ประกอบข้างต้นตามลำดับ ด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร แล้วนำไปทำให้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที หลังจากทำให้ปลอดเชื้อ รอให้อาหารเย็นและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. สารละลาย Vitamin (stock solution)

D-biotin	0.04	กรัม
Thiaminechloride hydrochloride	13.35	กรัม

ละลายและปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นนำไปทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านกระดาษกรอง 0.2 ไมโครเมตร และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. สารละลาย Trace element (stock solution)

$NiSO_4 . 6H_2O$	0.13	กรัม
$CoCl_2 . 6H_2O$	0.13	กรัม
H_3BO_3	0.13	กรัม
KI	0.13	กรัม
$Na_2MoO_4 . 2H_2O$	0.13	กรัม

ละลายองค์ประกอบข้างต้นตามลำดับ ด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร นำไปทำให้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที หลังจากทำให้ปลอดเชื้อ รอให้อาหารเย็นและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. อาหาร Syn6 Feed ใช้สำหรับเติมในการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์

Glucose monohydrate	550.0 กรัม	หรือ ซูโครส	500	กรัม
$NH_4H_2PO_4$	13.3 กรัม			
KCl	3.3 กรัม			
$MgSO_4.7H_2O$	3.0 กรัม			
NaCl	0.33 กรัม			

ละลายองค์ประกอบของอาหารตามลำดับด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 940 มิลลิลิตร แล้วนำไปทำให้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที หลังจากทำให้ปลอดเชื้อ รอให้อาหารเย็น เติมธาตุอาหารรองทั้ง 4 ชนิดข้างต้น ชนิดละ 15 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

วิธีวิเคราะห์

1. ความเข้มข้นของเซลล์

1.1 ค่าความขุ่น

นำตัวอย่างเซลล์แขวนลอยมาเจือจางด้วยสารละลายกรดฟอสฟอริก ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสม จากนั้นนำไปวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ (Biochem Libra S22 Visible Spectrophotometer) ซึ่งค่าความขุ่นของเซลล์ที่เหมาะสมควรอยู่ในช่วง 0.1-0.5

1.2 น้ำหนักเซลล์แห้ง

การหาค่าน้ำหนักแห้งมีความสำคัญมากต่อการวิเคราะห์หาพารามิเตอร์อื่นๆ อาทิเช่น ผลได้ต่างๆ อัตราการเติบโต และอัตราการผลิต ซึ่งมีขั้นตอนการหาโดยตรง ดังนี้

1. เตรียมหลอดทดลองที่อบแห้งและทราบน้ำหนักแน่นอนจำนวน 6 หลอด
2. ดูดตัวอย่างสารแขวนลอยเซลล์ 1.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง
3. นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที รินส่วนใสเก็บไว้เพื่อใช้วิเคราะห์หาความเข้มข้นของโปรตีน กิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตส ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนและความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์รอง
4. เติมสารละลายกรดฟอสฟอริกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองเขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อกำจัดเกลือ
5. รินส่วนใสทิ้ง แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง
6. รินส่วนใสทิ้ง แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
7. ทิ้งให้เย็นในเดสิกเคเตอร์ (desiccator) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นชั่งน้ำหนักที่แน่นอน
8. คำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้ง มีหน่วยเป็นกรัมต่อลิตรโดยใช้สูตร

$$\text{น้ำหนักเซลล์ (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักหลอดที่มีเซลล์ (กรัม)} - \text{น้ำหนักหลอดเปล่า (กรัม)}}{\text{ปริมาตรของตัวอย่าง (มิลลิลิตร)} \times 10^{-3}}$$

2. การหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตส

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสทำตามวิธีของ Boyce และคณะ (2004) วิธีนี้อาศัยหลักการ วัดหมู่ฟอสเฟต อนินทรีย์ ที่ปลดปล่อยออกมาจากโมเลกุลของเกลือโซเดียมของกรดไฟติค (phytic acid sodium salt) เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ไฟเตสโดยหมู่ฟอสเฟตจะเกิดปฏิกิริยาเคมีกับแอมโมเนียมโมลิบเดท (ammonium molybdate) ให้สารประกอบเชิงซ้อนเรียกว่า α-Keggin ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (OD_{660})

สารเคมีและวิธีวิเคราะห์

<u>สารละลาย</u>

สารละลาย โซเดียมอะซิเตท บัฟเฟอร์ (Sodium acetate buffer) ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 5.5

ชั่งโซเดียมอะซิเตท (MW 136.08) 27.2 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร จากนั้นปรับพีเอช เท่ากับ 5.5 ด้วยสารละลาย กรดอะซิติก ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ เก็บสารละลายโซเดียมอะซิเตท บัฟเฟอร์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สารละลาย กรดอะซิติก (Acetic acid) ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์

ดูดสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น (glacial acetic acid) ปริมาตร 12 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิห้อง

สารละลาย กรดไตรคลอโรอะซิติก (Trichloroacetic acid) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์

ชั่งกรดไตรคลอโรอะซิติก (MW 163.39) 8.16 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิห้อง

สารละลาย A

ชั่งเฟอร์ริกซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) 5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายของแอมโมเนียมโมลิบเดท (ammonium molybdate) ความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร (เตรียมก่อนใช้ทุกครั้ง)

สารละลาย แอมโมเนียมโมลิบเดท ความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์

ชั่งแอมโมเนียมโมลิบเดท 8 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกรดซัลฟิลริก (H_2SO_4) ความเข้มข้น 10 โมลาร์ ปริมาตร 27 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิห้อง

สารละลาย กรดซัลฟิลริก (H_2SO_4) ความเข้มข้น 10 โมลาร์

ดูดสารละลายกรดซัลฟิลริกเข้มข้น ปริมาตร 55.3 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิห้อง

สารละลาย เกลือโซเดียมของกรดไฟติค (Phytic acid sodium salt) ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์

ชั่งเกลือโซเดียมของกรดไฟติค (MW 660.04) 0.1 กรัม ละลายด้วยสารละลายโซเดียมอะซิ-เตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 5.5 ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สารละลายมาตรฐาน KH_2PO_4 ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์

ชั่ง KH_2PO_4 (MW 136.09) 0.027 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 200 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

<u>วิธีวิเคราะห์</u>

1. บ่มสารละลายเกลือโซเดียมของกรดไฟติคซึ่งใช้เป็นสับสเตรต ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

2. เติมสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3. เติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา

4. เติมสารละลาย A ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที เพื่อทำปฏิกิริยากับหมู่ฟอสเฟต

5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

6. คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตส โดยกำหนดให้หนึ่งหน่วยของกิจกรรมมีค่าเท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ปลดปล่อยหมู่ฟอสเฟต 1 ไมโครโมลในหนึ่งนาที ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พีเอช 5.5 ซึ่งคำนวณโดยอาศัยสมการ ดังนี้

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตส} = \frac{\text{ความเข้มข้นของฟอสเฟต (มิลลิโมลาร์)} \times \text{อัตราการเจือจาง}}{(15 \times 0.5)}$$

โดย 15 คือ ระยะเวลาที่ใช้ในการบ่ม (นาที)

0.5 คือ ปริมาตรของสารละลายตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

<u>การทำกราฟมาตรฐานของ</u> KH_2PO_4

1. เจือจางสารละลายมาตรฐาน KH_2PO_4 ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ดังตาราง ข-1
2. ดูดสารละลาย KH_2PO_4 ที่เจือจางแล้วปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง
3. เติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
4. เติมสารละลาย A ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และตั้งทิ้งไว้ 5 นาที
5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และสร้างกราฟมาตรฐาน
6. จากกราฟมาตรฐานคำนวณค่าความเข้มข้นของฟอสเฟตในสารละลายตัวอย่างได้โดยอาศัยสมการ

$$\text{ความเข้มข้นของฟอสเฟต (มิลลิโมลาร์)} = \frac{OD_{660} \times \text{อัตราการเจือจาง}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน}}$$

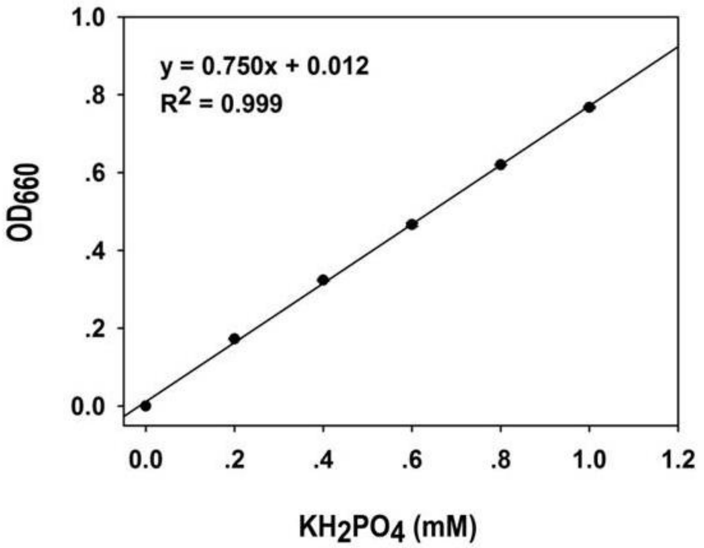
<u>ตารางผนวก ข-1</u>

การเจือจางสารละลายมาตรฐาน KH_2PO_4 และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ของสารละลาย KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของ KH_2PO_4 (มิลลิโมลาร์)	สารละลายมาตรฐาน KH_2PO_4 ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ (มิลลิลิตร)	น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	OD_{660}
0.0	0.0	2.0	0.000±0.000
0.2	0.4	1.6	0.173±0.001
0.4	0.8	1.2	0.324±0.002
0.6	1.2	0.8	0.466±0.004
0.8	1.6	0.4	0.610±0.001
1.0	0.0	0.0	0.768±0.002

ภาพผนวก ข-1

ตัวอย่างกราฟมาตรฐาน KH_2PO_4



3. การวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดโดยวิธี Bradford

วิธีการหาปริมาณโปรตีนทั้งหมดโดยวิธี Bradford (Bradford, 1976) ซึ่งพัฒนาจากวิธี Biuret และ Follin-Lowry โดยสีที่เกิดขึ้นจะเกิดจากปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนกับสี Coomassie Brilliant Blue G-250 ในสภาพที่เป็นกรด ซึ่งวิธีนี้มีข้อดีคือ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นใช้เวลาสั้นและสีที่เกิดขึ้นมีความคงตัวนานถึง 1 ชั่วโมง รวมทั้งวิธีนี้มีสารรบกวนน้อยโดยสารที่จะรบกวนจะเป็นสารจำพวกสารซักฟอกเช่น triton x-100 และ SDS

สารเคมีและวิธีวิเคราะห์

<u>สารละลาย</u>

Bradford stock solution

เอทานอล	95 เปอร์เซ็นต์	100 มิลลิลิตร
กรดฟอสฟอริก	85 เปอร์เซ็นต์	200 มิลลิลิตร
สีย้อม Serva Blue G		350 มิลลิกรัม

ผสมให้เข้ากัน และ เก็บรักษาได้นานที่อุณหภูมิห้อง

Pre-working buffer

น้ำกลั่น 425 มิลลิลิตร

เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 15 มิลลิลิตร

กรดฟอสฟอริก 85 เปอร์เซ็นต์ 30 มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน และเก็บรักษาได้นานที่อุณหภูมิห้อง

Bradford working buffer

Pre-working buffer 47 มิลลิลิตร

Bradford stock solution 3 มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 และเก็บรักษาในขวดสีชาได้นาน 2-3 สัปดาห์

<u>วิธีวิเคราะห์</u>

1. ดูดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง

2. เติม Bradford working buffer ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

3. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร หลังจากทำปฏิกิริยา 20 นาที แต่ไม่เกิน 1 ชั่วโมง

4. ทำ blank โดยใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่าง

5. การทำกราฟมาตรฐาน (standard curve) โดยใช้ Bovine Serum Albumin (BSA) ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารมาตรฐาน โดยเติมสารละลาย BSA ที่ความเข้มข้นต่างๆ (ตารางผนวก ข- 2) ลงใน Bradford working buffer ผสมให้เข้ากัน แล้วทำวิธีเดียวกันกับตัวอย่าง

$$\text{ความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)} = \frac{OD_{595} \times \text{อัตราการเจือจาง}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน}}$$

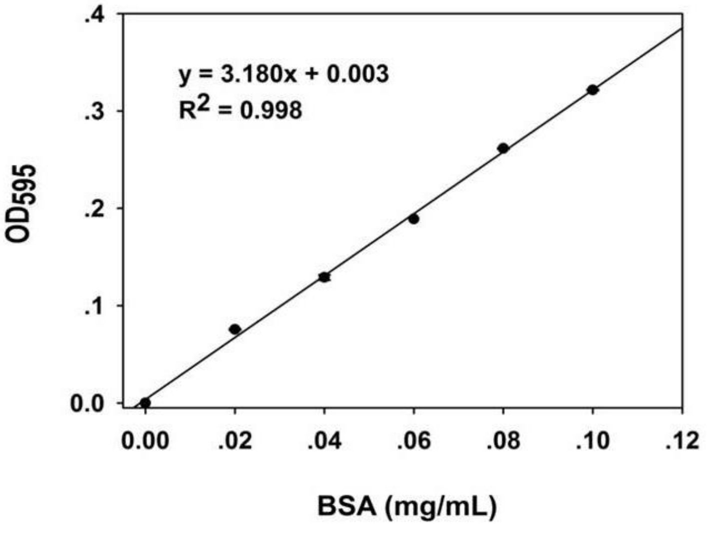
<u>ตารางผนวก ข-2</u>

การเจือจางสารละลาย BSA มาตรฐานและค่า OD_{595} ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของ BSA (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	สารละลาย BSA มาตรฐาน (มิลลิลิตร)	น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	OD_{595}
0.00	0.0	1.0	0.000±0.000
0.02	0.1	0.9	0.076±0.001
0.04	0.2	0.8	0.129±0.002
0.06	0.3	0.7	0.189±0.000
0.08	0.4	0.6	0.262±0.001
0.10	0.5	0.5	0.322±0.001

<u>ภาพผนวก ข-2</u>

ตัวอย่างกราฟมาตรฐาน BSA



4. การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ไฟเตสและการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีน

ในการหาน้ำหนักโมเลกุลและความบริสุทธิ์ของโปรตีน ในงานวิจัยนี้เลือกใช้วิธีโซเดียมโดดีซิลซัลเฟต พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซีส (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis; SDS-PAGE) ที่พัฒนาขึ้นโดย Leammli (1970) ซึ่งเป็นเทคนิค ในการแยกและวิเคราะห์โมเลกุลของสารโดยอาศัยความแตกต่างของน้ำหนักของโมเลกุลที่ศึกษา โมเลกุลที่มีประจุจะตอบสนองต่อสนามไฟฟ้า โดยแต่ละโมเลกุลจะเคลื่อนที่เข้าหาขั้วไฟฟ้าที่มีประจุตรงข้ามกับประจุของโมเลกุล ทั้งนี้การเคลื่อนที่จะเร็วหรือช้าขึ้นกับคุณสมบัติของโมเลกุล เช่น ชนิดของโมเลกุล ขนาดรูพรุนของเจล และความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการทำอิเล็กโทรฟอริซิส ผลที่เกิดขึ้น คือ การแยกแต่ละโมเลกุลที่มีความแตกต่างของขนาดออกเป็นแถบ (band) สิ่งสำคัญที่ควรคำนึงถึงในการทำอิเล็กโทรฟอริสิส ได้แก่ ขนาดของรูพรุนของเจล (gel pore size) ระบบของบัฟเฟอร์ที่ใช้และคุณสมบัติของโมเลกุลที่ต้องการแยก

จากการรายงานของ Harnpichanchai และคณะ (2014) ได้มีการรายงานว่าเอนไซม์ ไฟเตสที่ได้จากเชื้อรา *Aspergillus niger* BCC18081 ที่ทำการผลิตในยีสต์ *O. thermomethanolica* มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 116 กิโลดาลตัน

<u>สารเคมี</u>

- อะคริลาไมด์สำหรับงานอิเล็กโทรฟอริซิส
- บิส-อะคริลาไมด์ (N,N’-methylene-bisacrylamide)
- Tris (2-hydroxymethyl-2-methyl-1,3-propanediol)
- SDS (Sodium dodecyl sulfate)
- TEMED (N,N’N’-tetramethylenediamine)
- แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (Ammoniumpersulfate; APS)
- 2-mercaptoethanol
- Bromophenol blue
- ไกลซีน (Glycine)
- กลีเซอรอล (Glycerol)
- กรดไฮโดรคลอริก (HCl)
- DTT (Dithiothreitol)
- เมทานอล (Methanol)
- กรดอะซิติก (glacial acetic acid)
- Coomassie Brilliant Blue R-250

อุปกรณ์

- ชุดอุปกรณ์สำหรับทำพอลิอะคริลาไมด์อิเล็กโทรฟอรีซิส รุ่น Mini-Protein lll ของบริษัท Bio-Rad
- เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (power supply; capacity 200v, 500mA)
- อ่างน้ำร้อน (100 องศาเซลเซียส)
- เครื่องดูดสารอัตโนมัติ (auto pipette) ขนาดต่างๆ
- เครื่องหมุนเหวี่ยงสำหรับหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1
- กระดาษ kimwipe®
- ถุงมือ

สารละลายเผื่อใช้ (stock solution)

สารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl พีเอช 8.8 ความเข้มข้น 2 โมลาร์

ชั่ง Tris-base 24.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 80 มิลลิลิตร ปรับพีเอชโดยการเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นอย่างช้าๆ ให้ได้พีเอช 8.8 จากนั้นปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

สารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl พีเอช 6.8 ความเข้มข้น 1 โมลาร์ (100 มิลลิลิตร)

ชั่ง Tris-base 12.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วปรับพีเอชโดยการเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นอย่างช้าๆ ให้ได้พีเอช 6.8 จากนั้นปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

สารละลาย SDS ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

ชั่ง SDS 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร โดยสารละลาย SDS สามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

สารละลาย Bromophenol blue ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

ชั่ง Bromophenol blue 100 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับ ปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปกรองเพื่อกำจัดตะกอน

<u>สารละลายทำงาน (working solution)</u>

สารละลาย ก. (สารละลายอะคริลาไมด์ ความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์)

ชั่งอะคริลาไมด์โมโนเมอร์ 38.93 กรัม และบิส-อะคริลาไมด์ 1.067 กรัม ผสมสารทั้งสองให้ละลายอย่างสมบูรณ์ในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร สามารถเก็บรักษาสารละลายในตู้เย็นไว้เป็นระยะเวลานาน

ข้อควรระวัง : อะคริลาไมด์ที่ยังไม่เป็นพอลิเมอร์จะระคายเคืองต่อผิวหนังและเป็นพิษต่อระบบประสาท ดังนั้นจึงควรทำงานในตู้ดูดควัน (hood) และสวมถุงมือในขณะทำงาน

สารละลาย ข. (สารละลาย separating gel buffer ความเข้มข้น 4 เท่า)

ตวงสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl พีเอช 8.8 ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 75 มิลลิลิตร (หลังจากผสมแล้วจะมีความเข้มข้นสุดท้าย 1.5 โมลาร์) และตวงสารละลาย SDS ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร (หลังจากผสมแล้วจะมีความเข้มข้นสุดท้าย 0.4 โมลาร์) จากนั้นเติมน้ำกลั่ นปริมาตร 21 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันและสามารถเก็บสารละลายในตู้เย็นไว้ใช้งานได้หลายเดือน

สารละลาย ค. (สารละลาย stacking gel buffer ความเข้มข้น 4 เท่า)

ตวงสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl พีเอช 6.8 ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (หลังจากผสมแล้วจะมีความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 โมลาร์) และตวงสารละลาย SDS ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร (หลังจากผสมแล้วจะมีความเข้มข้นสุดท้าย 0.4 โมลาร์) จากนั้นเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 46 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันและสามารถเก็บสารละลายในตู้เย็นไว้ใช้งานได้หลายเดือน

สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์

ชั่งแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 0.5 กรัม ละลายและปรับปริมาตรในน้ำกลั่นจนครบ 5 มิลลิลิตร

สารละลาย running buffer (สารละลาย Tris-glycine buffer พีเอช 8.3)

ชั่ง Tris-base 3 กรัม (หลังจากผสมแล้วจะมีความเข้มข้นสุดท้าย 25 มิลลิโมลาร์) ชั่ง glycine 14.4 กรัม (หลังจากผสมแล้วจะมีความเข้มข้นสุดท้าย 192 มิลลิโมลาร์) และชั่ง SDS 1 กรัม (หลังจากผสมแล้วจะมีความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 เปอร์เซ็นต์) ผสมสารให้เข้ากันด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร พีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ได้มีค่าประมาณ 8.3 ทั้งนี้สามารถเตรียมสารละลายในรูปสารละลายเข้มข้น 5-10 เท่า โดยสามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องได้นาน

สารละลาย sample buffer ความเข้มข้น 5 เท่า

ดูดสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl พีเอช 6.8 ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร สารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร สารละลาย SDS ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 2 มิลลิลิตร 2-mercaptoethanol ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และสารละลาย bromophenol blue ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 0.9 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน และสามารถเก็บรักษาได้หลายเดือนที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สารละลายสีย้อมเจล Coomassie Brilliant Blue (Coomassie Gel stain)

ชั่ง Coomassie Brilliant Blue R-250 1 กรัม เติมเมทานอลปริมาตร 450 มิลลิลิตร น้ำกลั่นปริมาตร 450 มิลลิลิตร และกรดอะซิติกปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้สารละลายสีย้อมเจล Coomassie Brilliant Blue ละลายอย่างสมบูรณ์ หุ้มภาชนะที่ใส่สีย้อมเจล Coomassie Brilliant Blue ด้วยแผ่นฟลอยด์และสามารถเก็บสารละลายสีย้อมเจล Coomassie Brilliant Blue ไว้ได้นานที่อุณหภูมิห้อง

สารละลายสำหรับล้างสี Coomassie Brilliant Blue (coomassie gel destain) (1 ลิตร)

ตวงเมทานอลปริมาตร 100 มิลลิลิตร และกรดอะซิติกปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ผสมสารละลายสำหรับล้างสี Coomassie Brilliant Blue ให้เข้ากันและสามารถเก็บสารละลายสำหรับล้างสี Coomassie Brilliant Blue ไว้ได้นานที่อุณหภูมิห้อง

<u>วิธีวิเคราะห์</u>

1. เตรียมกระจกสำหรับเตรียมเจล

2. คำนวณปริมาตรของเจลที่ต้องเตรียม พร้อมทั้งเตรียมเจล โดยเตรียม separating gel ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ โดยดูดสารตามปริมาณในตารางผนวก ข-3 เมื่อมีการเติม APS และ TEMED ควรรีบผสม โดยหมุนวนภาชนะผสมในอากาศ และเติ มสารละลายผสมลงในแผ่นกระจกที่เตรียมไว้ โดยให้ปลายเครื่องดูดสารอัตโนมัติสัมผัสกับ spacer เพื่อป้องกันการเกิดฟองอากาศ ความสูงของ separating gel ประมาณ 4.5 เซนติเมตร จากนั้นใช้เครื่องดูดสารอัตโนมัติดูดน้ำกลั่นเติมทับลงบนชั้นเจล เพื่อให้ผิวหน้าของ เจลเรียบ ปล่อยให้เกิดการพอลิเมอไรซ์ โดยปกติจะใช้เวลาประมาณ 30 ถึง 60 นาที ทั้งนี้สามารถสังเกตการเกิดพอลิเมอไรซ์ได้จากสารละลายผสมที่เหลือในภาชนะเตรียมเจล เมื่อเจลในชั้น separating มีการพอลิเมอไรซ์แล้ว จะสังเกตเห็นรอยต่อระหว่างชั้นเจลกับน้ำกลั่นที่เททับลงบนเจล จากนั้นเทน้ำกลั่นที่เททับบนเจลออก พร้อมทั้งเตรียม stacking gel ความ

เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ตามตารางผนวก ข-4 เติมสารละลายผสมทับลงบน separating gel จนเต็ม จากนั้นเสียบ comb ลงบน stacking gel โดยระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ ปล่อยให้เกิดการพอลิเมอไรซ์ โดยปกติจะใช้เวลาประมาณ 30 นาที ทั้งนี้สามารถสังเกตการเกิดพอลิเมอไรซ์ได้จา ก สารละลายผสมที่เหลือในภาชนะเตรียมเจล เมื่อเกิดการพอลิเมอไรซ์อย่างสมบูรณ์จึงดึง หวี (comb) ออกอย่างเบาๆ

<u>ตารางผนวก ข-3</u>

ปริมาณสารละลายต่างๆ ที่ต้องเติมในการเตรียม separating gel

ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

สารละลาย	ปริมาตร (มิลลิลิตร)
น้ำกลั่น	4.9
สารละลาย ก	2.5
สารละลาย ข	2.5
APS 10%	0.1
TEMED	0.005
ปริมาตรรวม	10

<u>ตารางผนวก ข-4</u>

ปริมาณสารละลายต่างๆ ที่ต้องเติมในการเตรียม stacking gel

ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร

สารละลาย	ปริมาตร (มิลลิลิตร)
น้ำกลั่น	2.5
สารละลาย ก	0.5
สารละลาย ค	1.0
APS 10 %	0.04
TRMED	0.005
ปริมาตรรวม	4

3. การเตรียมตัวอย่าง

การเตรียมตัวอย่างทำโดย ผสมตัวอย่าง ปริมาตร 40 ไมโครลิตร กับ สารละลาย sample buffer ความเข้มข้น 5 เท่า ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ส่วนโปรตีนมาตรฐานจะนำมา 10 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย sample buffer ความเข้มข้น 5 เท่า ปริมาตร 5 ไมโครลิตร นำไปต้ม ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น นำตัวอย่างมาตกตะกอนอนุภาคที่ไม่ละลายด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงประมาณ 1 นาที ส่วนใสที่ได้จะนำไปใช้ในการทำอิเล็กโทรฟอริซิส

4. การประกอบชุดอิเล็กโทรฟอริซิส

เมื่อถอดแผ่นกระจกจากชุดเตรียมเจลแล้ว ประกอบแผ่นกระจกเข้ากับชุดทำอิเล็กโทรฟอริซิส เติม running buffer ลงไปบางส่วนเพื่อทดสอบว่ามีรอยรั่วเกิดขึ้นหรือไม่เมื่อระบบไม่มีการรั่วของสารละลาย running buffer จึงเติม running buffer จนเต็มช่องกระจกทางด้านใน ใช้เครื่องดูดสารอัตโนมัติดูดสารละลาย running buffer ขึ้นลงในแต่ละหลุม (well) เพื่อกำจัดเจลส่วนเกินที่จะเป็นปัญหาในการเติมตัวอย่าง จากนั้นติดตั้ง sample loading guide เข้ากับชุดอิเล็กโทรฟอริซิส ซึ่งเป็นอุปกรณ์ที่ช่วยบอกตำแหน่งของหลุม ใช้เครื่องดูดสารอัตโนมัติดูดตัวอย่างโปรตีนที่เตรียมไว้ค่อยๆ เติมลงในหลุม ซึ่งในงานวิจัยนี้เติมตัวอย่างหลุมละ 1 2.5 ไมโครลิตร สำหรับการเติม Protein marker เติม 7.5 ไมโครลิตร เมื่อเติมตัวอย่างเสร็จแล้ว จะเติมสารละลาย running buffer ให้มีระดับสูงใกล้เคียงกับช่องกระจกด้านใน เพื่อลดความร้อนที่เกิดจากการทำอิเล็กโทรฟอริสิส

5. การติดตั้งชุดอิเล็กโทรฟอริซิสเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า

ครอบฝาที่มีขั้วไฟฟ้าเข้ากับชุดอิเล็กโทรฟอริซิส โดยต้องปิดฝาครอบให้สีของขั้วไฟฟ้าตรงกัน จากนั้นเสียบสายไฟจากฝาครอบเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า โดยให้สีของปลั๊กของฝาครอบและเต้ารับของเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าตรงกัน

6. การทำอิเล็กโทรฟอริซิส

เปิดเครื่อง ตั้งค่าการทำงานให้ค่าความต่างศักย์คงที่ที่ 80 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นกดปุ่ม Run เพื่อเริ่มดำเนินการ หลังจากนั้นจึงเปลี่ยน ค่าความต่างศักย์ เป็น 100 โวลต์ เมื่อสีของ Bromophenol blue เคลื่อนตัวลงมาจนถึงขอบล่างของ ให้กดปุ่ม End เพื่อหยุดการทำงาน ปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า ถอดปลั๊กฝาครอบออกจากเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า จากนั้นนำกระจกที่มีเจลออกจากชุดทำอิเล็กโทรฟอริซิส และนำเจลออกจากกระจกอย่างระมัดระวังเพื่อนำไปย้อมสีต่อไป

7. การย้อมสีเจล

เทสีย้อมเจล Coomassie Brilliant Blue ลงในภาชนะที่มีขนาดพอเหมาะกับขนาดของเจล จากนั้นนำเจลที่ได้ใส่ลงในสีย้อม นำไปวางบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วในการเขย่าต่ำเป็นเวลา 10 ชั่วโมง

8. การล้างสีเจล

เมื่อครบเวลาจึงเทสีย้อมเจลออก จากนั้นเติมสารละลายล้างสี Coomassie Brilliant Blue ลงในภาชนะให้ท่วมเจล แล้วนำไปวางบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วในการเขย่าต่ำเป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง พร้อมเปลี่ยนสารละลายล้างสี Coomassie Brilliant Blue ทำเช่นนี้จนสามารถเห็นแถบโปรตีนอย่างชัดเจน และในการล้างสีเจลนี้สามารถใส่กระดาษ kimwipe® ลงไปเพื่อให้กระดาษช่วยในการซับสี Coomassie Brilliant Blue ซึ่งจะช่วยลดเวลาในการทำงานด้วย

9. เก็บข้อมูลเจล

ในการทำให้เจลแห้งนั้นเจลอาจเกิดความเสียหายได้ ดังนั้นจึงได้มีการเก็บข้อมูลของเจลด้วยการใช้เครื่องสแกนในการสแกนเจล โดยนำเจลวางบนเครื่องสแกนซึ่งสามารถสแกนได้โดยตรง

5. การวิเคราะห์ความเข้มข้นของเอทานอล กรดอะซิติก และน้ำตาลซูโครสด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

HPLC เป็นเครื่องมือใช้สำหรับแยกสารประกอบที่สนใจที่ผสมอยู่ในตัวอย่าง โดยกระบวนการแยกสารประกอบที่สนใจจะเกิดขึ้นระหว่างเฟส 2 เฟส คือ เฟสอยู่กับที่ (column) และเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) จะถูกแยกออกมาในเวลา ที่ต่างกัน โดยสารที่ถูกแยกออกมาได้จะถูกตรวจวัดสัญญาณด้วยตัวตรวจวัดและจะแสดงออกมาในลักษณะกราฟที่เรียกว่า โครมาโตแกรม

สารเคมีและวิธีวิเคราะห์

<u>สารละลาย</u>

สารละลายเอทานอลมาตรฐาน ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร

เจือจางเอทานอล 99.99 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร

สารละลายกรดอะซิติกมาตรฐาน ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร

เจือจางกรดอะซิติก 99.99 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร

สารละลายซูโครสมาตรฐาน ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

ชั่งน้ำตาลซูโครส 10 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร

สารละลายกลูโคสสมาตรฐาน ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

ชั่งน้ำตาลกลูโคส 10 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร

สารละลายฟรุกโตสมาตรฐาน ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

ชั่งน้ำตาลฟรุกโตส 10 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร

สารละลายไอโซโพรพานอล ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร

เจือจางไอโซโพรพานอล 99.99 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ด้วย สารละลายกรดฟอสฟอริกความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จากนั้น ปรับปริมาตร จนครบ 1000 มิลลิลิตร

สารละลายกรดฟอสฟอริก (เฟสเคลื่อนที่) ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

เจือจางกรดฟอสฟอริก 85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.7 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรจนครบ 1000 มิลลิลิตร

<u>อุปกรณ์</u>

1. เครื่อง High Performance Liquid Chromatography
2. คอลัมน์ รุ่น Supelcogel H (250 x 4.6 มิลลิเมตร)
3. ดีเทคเตอร์
4. เครื่องบันทึกผล

<u>วิธีวิเคราะห์</u>

1. นำสารละลายตัวอย่างมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
2. ผสมสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และสารละลายไอโซโพรพานอล (internal standard) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที
3. กรองผ่านเมมเบรนที่มีขนาดรูพรุน 0.2 ไมโครเมตร ใส่ในขวดสำหรับวิเคราะห์ตัวอย่าง
4. ตัวแปรต่างๆ และสภาวะที่ใช้ในการปฏิบัติงาน ของเครื่อง HPLC

- เฟสเคลื่อนที่ (สารละลายกรดฟอสฟอริก)
- อุณหภูมิในการฉีด 30 องศาเซลเซียส

- อัตราการไหล 0.17 มิลลิลิตรต่อนาที

5. ทำการฉีดสารละลายตัวอย่างที่เติมสารละลาย internal standard ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จะได้โครมาโตแกรมของสารที่ต้องการวิเคราะห์ เช่น เอทานอล กรดอะซิติก เป็นต้น รวมถึง ไอโซโพรพานอล คำนวณหาพื้นที่ใต้โครมาโตแกรมระหว่างสารที่ต้องการวิเคราะห์ต่อไอโซโพรพานอล

6. นำค่าสัดส่วนพื้นที่ใต้โครมาโตแกรมระหว่างสารที่ต้องการวิเคราะห์ต่อไอโซโพรพานอล ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานในภาพผนวก ข- 5 โดยการเตรียมกราฟมาตรฐาน สามารถ เตรียมดังตาราง ผนวก ข-5

$$\text{ความเข้มข้นเอทานอล (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{พื้นที่ใต้กราฟเอทานอล/พื้นที่ใต้กราฟไอโซโพรพานอล}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน}}$$

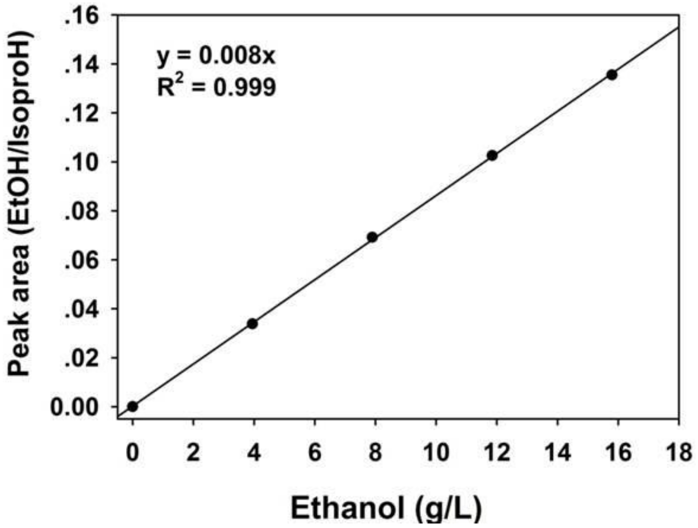
<u>ตารางผนวก ข-5</u>

พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานเอทานอล

เอทานอล (กรัมต่อลิตร)	พื้นที่ใต้กราฟ เอทานอล	พื้นที่ใต้กราฟ ไอโซโพรพานอล	พื้นที่ใต้กราฟเอทานอล ต่อไอโซโพรพานอล
0.00	0	10458609	0
3.95	351773	10400054	0.034
7.90	714799	10332686	0.069
11.85	1080732	10536400	0.103
15.80	1439183	10623441	0.135

ภาพผนวก ข-3

ตัวอย่างกราฟมาตรฐานเอทานอล



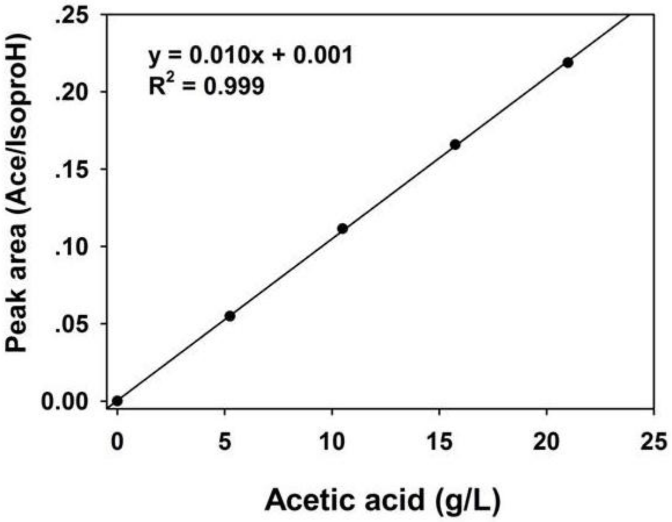
ตารางผนวก ข-6

พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานกรดอะซิติก

กรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)	พื้นที่ใต้กราฟ กรดอะซิติก	พื้นที่ใต้กราฟ ไอโซโพรพานอล	พื้นที่ใต้กราฟกรดอะซิติก ต่อไอโซโพรพานอล
0	0	10458609	0
5.25	570071	10400054	0.055
10.50	1150969	10332686	0.111
15.75	1746754	10536400	0.166
21.00	2323495	10623441	0.219

<u>ภาพผนวก ข-4</u>

ตัวอย่างกราฟมาตรฐานกรดอะซิติก



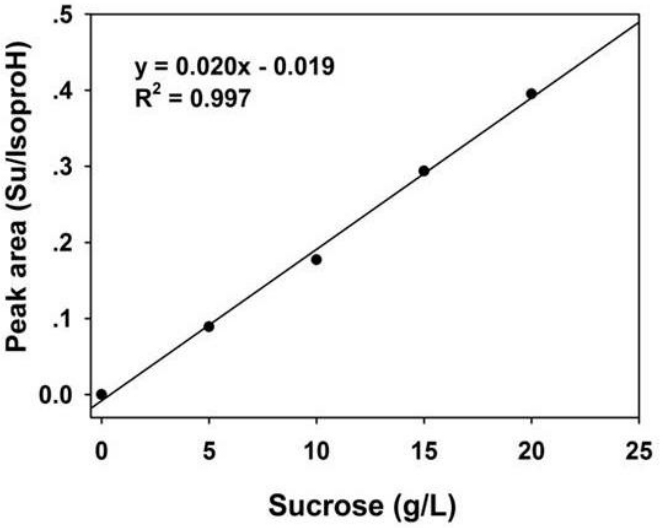
<u>ตารางผนวก ข-7</u>

พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานซูโครส

ซูโครส (กรัมต่อลิตร)	พื้นที่ใต้กราฟ ซูโครส	พื้นที่ใต้กราฟ ไอโซโพรพานอล	พื้นที่ใต้กราฟซูโครส ต่อไอโซโพรพานอล
0	0	10458609	0
5	930815	10400054	0.089
10	1833197	10332686	0.177
15	3099629	10536400	0.294
20	4205018	10623441	0.395

ภาพผนวก ข-5

ตัวอย่างกราฟมาตรฐานซูโครส



6. การวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid

สารเคมีและวิธีวิเคราะห์

สารละลาย

สารละลาย DNS

ชั่ง NaOH 32 กรัม K-Na tartate (Rochelle salts) 300 กรัม และ 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS) 10 กรัม ผสมสารทีละชนิดตามลำดับ แต่หลังจากเติม K – Na tartate แล้ว สารละลายจะมีอุณหภูมิลดลงอย่างมากจึงจำเป็นที่จะต้องให้ความร้อนแก่สารแล้วจึงเติม DNS ทำการผสมสารให้ละลายอย่างสมบูรณ์ พร้อมทั้งปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

สารละลายเผื่อใช้ (stock solution) กลูโคส (ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร)

ชั่งกลูโคส (MW 180) 0.1 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร

วิธีวิเคราะห์

1. เจือจางสารละลายตัวอย่างในอัตราส่วนที่เหมาะสม

2. ผสมสารละลายตัวอย่างปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร กับสารละลาย DNS (3,5-dinitrosalicylic acid) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที

3. แช่น้ำเย็น 5 นาที และเติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร

4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร พร้อมทั้งหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของกลูโคส

5. การทำกราฟมาตรฐาน (standard curve) โดยใช้กลูโคสความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารมาตรฐาน โดยเติมสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ (ตารางผนวก ข- 8) ลงในสารละลาย DNS ผสมให้เข้ากัน แล้วทำวิธีเดียวกันกับตัวอย่าง

$$\text{ความเข้มข้นของกลูโคส (กรัมต่อลิตร)} = \frac{OD_{540} \times \text{อัตราการเจือจาง}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} \times 1000}$$

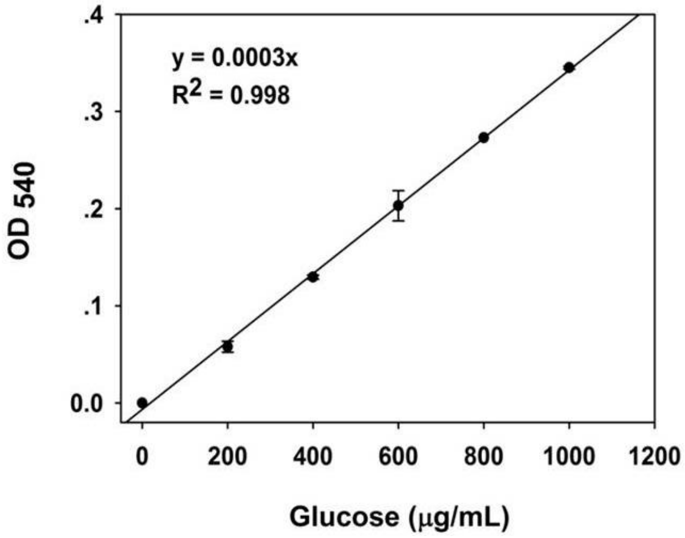
ตารางผนวก ข-8

การเจือจางสารละลายกลูโคส

ความเข้มข้นกลูโคส (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	สารละลายกลูโคสมาตรฐาน (ไมโครลิตร)	น้ำกลั่น (ไมโครลิตร)	OD_{540}
0	0	1000	0.000±0.000
200	200	800	0.058±0.006
400	400	600	0.130±0.002
600	600	400	0.203±0.016
800	800	200	0.273±0.000
1000	1000	0	0.345±0.001

ภาพผนวก ข-6

ตัวอย่างกราฟมาตรฐานกลูโคส



ภาคผนวก ค

การคำนวณอัตราการเติมสับสเทรตในกระบวนการหมักแบบเฟด-แบทช์

ในการเพาะเลี้ยงแบบ เฟด-แบทช์ จะมีการเติมอาหารเข้าสู่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ซึ่ง อัตราการเติมสับสเทรตในงานวิจัยนี้มีด้วยกัน 4 รูปแบบ คือการเติมแบบ เอกซ์โพเนนเชียล การเติมแบบคงที่ และการเติมแบบครั้งคราว ซึ่งเป็นการเติมสับสเทรตแบบกำหนดการเติมไว้ล่วงหน้า (feed forward) นอกจากนี้ยังมีเติมสับสเทรตแบบย้อนกลับ (feedback regulation) โดยอาศัยค่าออกซิเจนละลายเป็นตัวควบคุมการเติมสับสเทรตด้วย

1. อัตราการเติมแบบเอกซ์โพเนนเชียล สามารถคำนวณได้โดยอาศัยสมดุลมวลของสับสเทรตจากสมการ

$$ds/dt = \frac{F}{V}(Si-S) - \frac{\mu X}{Y_{x/s}}$$

เมื่อ

S	คือ ความเข้มข้นของสับสเทรต (กรัมต่อลิตร)
t	คือ ระยะเวลาตั้งแต่เริ่มเติมสับสเทรต (ชั่วโมง)
F	คือ อัตราการเติมสับสเทรต (ลิตรต่อชั่วโมง)
V	คือ ปริมาตรน้ำหมัก (ลิตร)
s_i	คือ ความเข้มข้นของสับสเทรตในอาหารที่ใช้เติม
μ	คือ อัตราการเติบโตจำเพาะ (ชั่วโมง)
$Y_{X/S}$	คือ ผลได้ของเซลล์จากสับสเทรต (กรัมเซลล์ต่อกรัมสับสเทรต)
X	คือ ความเข้มข้นของเซลล์ (กรัมต่อลิตร)

ภายใต้สภาวะที่สับสเทรตมีอยู่อย่างจำกัดจะทำให้ค่า s ~ 0 นอกจากนี้เมื่อพิจารณาให้ความเข้มข้นของสับสเทรตในถังหมักให้คงที่จะได้ ds/dt ~ 0 จากสภาวะดังกล่าวทำให้เราสามารถหาอัตราการเติมสับสเทรตเริ่มต้น (F_0) ได้จากสมการ

$$F_0 = \frac{\mu X_0 V_0}{Y_{x/s}\, s_i}$$

เมื่อ

F_0 คือ อัตราการเติมสับสเทรตเมื่อเริ่มต้นการเติมสับสเทรต(มิลลิลิตรต่อชั่วโมง)

V_0 คือ ปริมาตรน้ำหมักเริ่มต้นก่อนการเติมสับสเทรต (ลิตร)

X_0 คือ ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นก่อนการเติมสับสเทรต (กรัมต่อลิตร)

จากการทำปฏิบัติการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ ได้ข้อมูลดังนี้

V_0	= 4	(ลิตร)
μ	= 0.40	(ชั่วโมง)
$Y_{x/s}$	= 0.64	(กรัมเซลล์ต่อกรัมสับสเทรต)
X_0	= 13	(กรัมต่อลิตร)

โดยในการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ครั้งนี้ ความเข้มข้นของสับสเทรตในอาหารที่ใช้เติมมีค่า 500 กรัมต่อลิตร หรือ si = 500 (กรัมต่อลิตร) ดังนั้น

$$F_0 = \frac{0.40 \times 13 \times 4}{0.64 \times 500}$$

= 55.25 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง

ในกระบวนการหมักแบบเฟด-แบทช์ ปริมาณและความเข้มข้นของเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา ซึ่งทำให้อัตราการเติมสับสเทรตเปลี่ยนแปลงตลอดเวลาด้วย หรืออาจกล่าวได้ว่าความเข้มข้นของเซลล์และอัตราการเติมสับสเทรตเป็นฟังก์ชันของเวลา ซึ่งสามารถคำนวณความเข้มข้นเซลล์และอัตราการเติมสับสเทรตได้โดยอาศัยสมการดังนี้

$$X(t) = X e^{\mu t}$$

$$F(t) = F_0 e^{\mu t}$$

เมื่อคำนวณอัตราการเติมสับสเทรตเรียบร้อยแล้ว จำเป็นต้องมีการเทียบค่าการทำงานของปั๊มเพื่อให้อัตราการเติมสับสเทรตในช่วงเวลาต่างๆเป็นไปอย่างถูกต้องตามที่ได้คำนวณไว้

<u>การเทียบค่าการทำงานของปั๊ม</u>

การเทียบค่าการทำงานของปั๊ม คือ การหาว่าที่ความเร็วของปั๊มค่าหนึ่งจะมีอัตราเร็วในการปั๊มสารละลายได้เท่าไหร่ ทั้งนี้ อัตราเร็วในการปั๊มสารละลายยังเป็นค่าที่มีความเกี่ยวข้องกับขนาดของสายยางที่ใช้รวมถึงความหนืดของสารละลายด้วย ในการทดลองนี้จะใช้สายยางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 3 มิลลิเมตร ขั้นตอนการทำงานมีรายละเอียดดังนี้

1. เตรียมสารละลายที่ต้องใช้ คือ อาหารสังเคราะห์สูตร Syn6 Feed ซึ่งมีค่าความหนาแน่นเท่ากับ 1.18 กรัมต่อมิลลิลิตร (คำนวณจาก D = M/V)

2. ต่อสายยางที่ใช้ในการเติมสารละลายเข้ากับปั๊มและขวดเก็บสารละลาย โดยวางขวดเก็บสารละลายบนเครื่องชั่งดังภาพผนวก ค-1 เพื่อหาน้ำหนักเริ่มต้นก่อนทำการเทียบค่า

<u>ภาพผนวก ค-1</u>

การวางขวดสารละลายบนเครื่องชั่งเมื่อทำการเทียบค่าการทำงานของปั๊ม

3. ตั้งค่าความเร็วในการทำงานของปั๊มค่าใดค่าหนึ่ง ตามปกติค่าความเร็วในการทำงานของปั๊มจะมีค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ของการทำงานสูงสุด แล้วจดน้ำหนักเริ่มต้นของสารละลาย

4. เปิดเครื่องให้ปั๊มทำงานเป็นเวลา 2 นาที จึงปิดเครื่องโดยจดระยะเวลาที่แน่นอน ทำการบันทึกน้ำหนักของสารละลายที่เหลืออยู่ ซึ่งควรทำซ้ำ 3 ครั้ง และหาค่าเฉลี่ยน้ำหนักของสารละลายที่เหลืออยู่ เพื่อให้ได้ค่าน้ำหนักสารละลายที่แน่นอน

5. ทำการทดลองซ้ำข้อ 4 และ 5 โดยเปลี่ยนค่าความเร็วในการทำงานของปั๊ม ตัวอย่างผลการทดลองแสดงดังตารางผนวก ค-1

6. เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วของปั๊ม (%) และอัตราการเติมสาร (มิลลิลิตรต่อชั่วโมง) แสดงดังภาพผนวก ค-2 และผลการทดลองแสดงดังตารางผนวก ค-2

ตารางผนวก ค-1

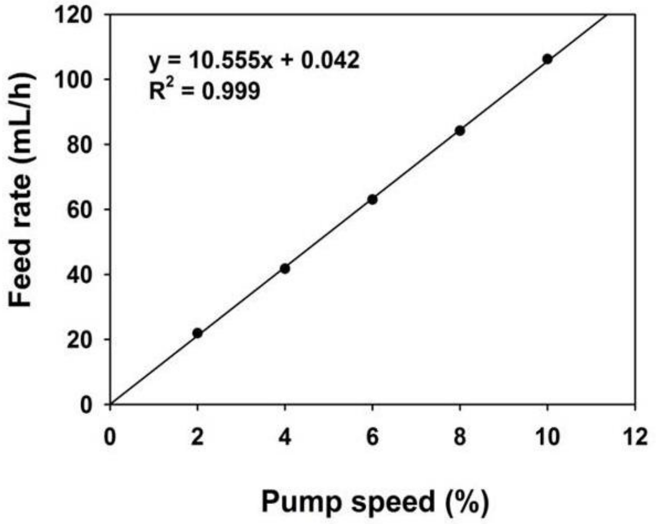
การเทียบค่าการทำงานของปั๊มสำหรับการเติมแบบเอกซ์โพเนนเชียล

ความเร็วของปั๊ม (เปอร์เซ็นต์)	อัตราการเติม (กรัม/นาที)	อัตราการเติมเฉลี่ย (กรัม/นาที)	อัตราการเติม (กรัม/ ชั่วโมง)	อัตราการเติม (มิลลิลิตร/ชั่วโมง)
2	0.47	0.43±0.04	25.80	21.86
	0.38			
	0.44			
4	0.79	0.82±0.03	49.20	41.69
	0.84			
	0.84			
6	1.26	1.24±0.02	74.30	62.97
	1.23			
	1.23			
8	1.66	1.65±0.01	99.30	84.15
	1.64			
	1.66			
10	2.06	2.09±0.05	125.30	106.19
	2.06			
	2.15			

หมายเหตุ : อัตราการเติมสับสเทรตสามารถคำนวณได้โดยอาศัยความหนาแน่นของอาหาร Syn6 Feed ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.18 กรัมต่อมิลลิลิตร

ภาพผนวก ค-2

กราฟมาตรฐานในการเติมอาหารสำหรับการเติมแบบเอกซ์โพเนนเชียล



ตารางผนวก ค-2

อัตราการเติมสารอาหารและความเร็วในการทำงานของปั๊มที่ระยะเวลาต่างๆ

ของการหมักแบบเฟด-แบทช์สำหรับการเติมแบบเอกซ์โพเนนเชียล

เวลาในการเติม (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	อัตราการเติมสับสเทรต (มิลลิลิตรต่อชั่วโมง)	ความเร็วของปั๊ม (เปอร์เซ็นต์)
0.0	13.71	65.00	6.15
0.5	15.26	79.39	7.52
1.0	18.21	96.97	9.18
1.5	21.20	118.44	11.22
2.0	25.98	144.66	13.70
2.5	27.70	176.69	16.74
3.0	30.25	215.81	20.44
3.5	34.86	263.59	24.97
4.0	38.76	321.95	30.50

2. อัตราการเติมแบบคงที่เป็นการเติมสับสเทรตที่กำหนดอัตราการเติมเพียงหนึ่งค่าตลอดการเพาะเลี้ยง ซึ่งสามารถคำนวณได้จากสมการ

$$F_0 = F_t = \frac{\mu X_0 V_0}{Y_{x/s}\, s_i}$$

เมื่อ

F_0 คือ อัตราการเติมสับสเทรตเมื่อเริ่มต้นการเติมสับสเทรต(มิลลิลิตรต่อชั่วโมง)

F_t คือ อัตราการเติมสับสเทรตที่เวลา t ใดๆ (มิลลิลิตรต่อชั่วโมง)

V_0 คือ ปริมาตรน้ำหมักเริ่มต้นก่อนการเติมสับสเทรต (ลิตร)

X_0 คือ ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นก่อนการเติมสับสเทรต (กรัมต่อลิตร)

ทั้งนี้ก่อนการเพาะเลี้ยงจำเป็นต้องมีการเทียบค่าการทำงานของปั๊มซึ่งมีวิธีการเช่นเดียวกับการเติมสับสเทรตแบบเอกซ์โพเนนเชียล จากนั้นนำค่าที่ได้ (ตารางผนวก ค- 3) มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วของปั๊ม (%) และอัตราการเติมสาร (มิลลิลิตรต่อชั่วโมง) แสดงดังภาพผนวก ค-3 และผลการทดลองแสดงดังตารางผนวก ค-4

<u>ตารางผนวก ค-3</u>

การเทียบค่าการทำงานของปั๊มสำหรับการเติมแบบคงที่

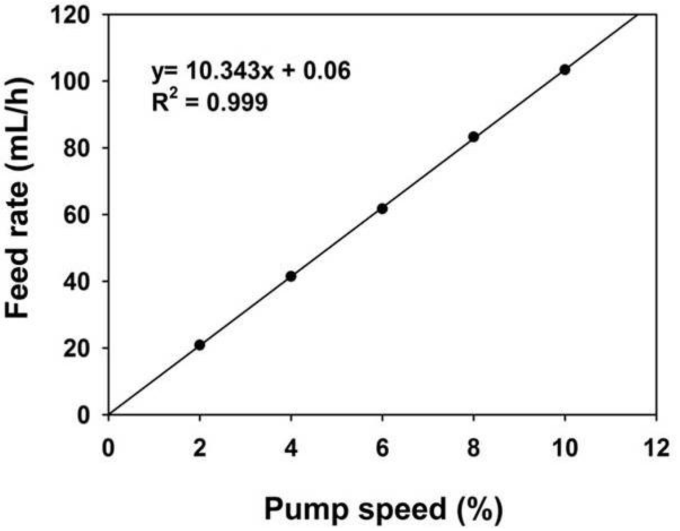
ความเร็วของปั๊ม (เปอร์เซ็นต์)	อัตราการเติม (กรัม/นาที)	อัตราการเติมเฉลี่ย (กรัม/นาที)	อัตราการเติม (กรัม/ ชั่วโมง)	อัตราการเติม (มิลลิลิตร/ชั่วโมง)
2	0.42	0.41±0.02	24.60	20.85
	0.38			
	0.43			
4	0.83	0.82±0.01	48.90	41.44
	0.81			
	0.81			
6	1.23	1.21±0.01	72.80	61.69
	1.21			
	1.20			

8	1.62	1.64±0.02	98.20	83.22
	1.66			
	1.63			
10	2.04	2.03±0.01	122.00	103.39
	2.04			
	2.02			

หมายเหตุ : อัตราการเติมสับสเทรตสามารถคำนวณได้โดยอาศัยความหนาแน่นของอาหาร Syn6 Feed ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.18 กรัมต่อมิลลิลิตร

ภาพผนวก ค-3

กราฟมาตรฐานในการเติมอาหารสำหรับการเติมแบบคงที่



ตารางผนวก ค-4

อัตราการเติมสารอาหารและความเร็วในการทำงานของปั๊มที่ระยะเวลาต่างๆของการหมักแบบเฟด-แบทช์สำหรับการเติมแบบคงที่

เวลาในการเติม (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	อัตราการเติมสับสเทรต (มิลลิลิตรต่อชั่วโมง)	ความเร็วของปั๊ม (เปอร์เซ็นต์)
0.0	13.00	65.00	6.28
2.0	21.20	65.00	6.28
4.0	30.31	65.00	6.28
6.0	36.80	65.00	6.28
8.0	45.54	65.00	6.28
10.0	52.00	65.00	6.28
12.0	55.76	65.00	6.28
14.0	60.17	65.00	6.28
16.0	64.00	65.00	6.28

3. อัตราการเติมแบบครั้งคราว ซึ่งการเติมในรูปแบบนี้มีการเติมอาหาร Syn6 Feed ลงในถังหมัก โดย กำหนดให้ความเข้มข้นของกลูโคสหลังจากการเติมในแต่ละครั้งเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร จากนั้นเมื่อกลูโคสถูกใช้จนหมด (สังเกตจากค่าออกซิเจนละลายจะเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว) จึงทำการเติมอาหารในครั้งถัดไป ซึ่งปริมาตรของอาหารที่ใช้การเติมแต่ละครั้งแสดงดังตารางผนวก ค-5

ตารางผนวก ค-5

ปริมาตรของอาหาร Syn6 Feed ที่ใช้การเติมแต่ละครั้ง

ครั้งที่เติม	ปริมาตรของอาหาร Syn6 Feed (มิลลิลิตร)
1	156
2	159
3	162
4	166
5	169
6	173

7	176
8	180
9	184
10	188
11	193
12	197
13	201
14	207
15	212
16	217
17	222
18	228
19	234
20	240
21	136

4. การเติมสับสเทรตโดยอาศัยค่าออกซิเจนละลายเป็นตัวควบคุม เป็นการควบคุมการเติมสับสเทรตด้วยระบบอัตโนมัติ ซึ่งในระหว่างกระบวนการเพาะเลี้ยงจะควบคุมค่าออกซิเจนละลายโดยเฉลี่ยเท่ากับ 15 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นเมื่อค่าออกซิเจนละลายสูงกว่า 15 เปอร์เซ็นต์ ปั๊มจะทำงานโดยการเติมสับสเทรตเข้าสู่ระบบ และเมื่อค่าออกซิเจนละลายต่ำกว่า 15 เปอร์เซ็นต์ ปั๊มจะหยุดทำงาน เป็นเช่นนี้ต่อไปเรื่อยๆจนกว่าสับสเทรตจะถูกเติมจนหมด

ภาคผนวก ง
ข้อมูลจากการทดลอง

1. ข้อมูลจากการทดลองที่ I

ตารางผนวก ง-1

การศึกษารูปแบบการเติบโตของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ที่อุณหภูมิ 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส ในฟลาสก์เขย่า

เวลาเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)		
	30 องศาเซลเซียส	35 องศาเซลเซียส	40 องศาเซลเซียส
0	1.00±0.03	0.98±0.05	0.87±0.08
4	2.98±0.10	2.52±0.17	1.82±0.16
8	6.41±0.22	7.88±0.68	4.53±0.15
12	7.95±0.45	9.48±0.26	5.90±0.24
16	9.25±0.57	11.51±0.66	6.60±0.28
20	9.93±0.32	12.00±0.24	7.00±0.23

ตารางผนวก ง-2

การศึกษารูปแบบการเติบโตของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ระหว่างการเตรียมกล้าเชื้อขั้นที่ 1 ในอาหารเหลว YPD และกล้าเชื้อขั้นที่ 2 ในอาหารสังเคราะห์สูตร Syn6

เวลาเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	
	กล้าเชื้อขั้นที่ 1 (YPD)	กล้าเชื้อขั้นที่ 2 (Syn6)
0	1.00±0.30	1.42±0.21
4	2.98±0.10	2.42±0.23
8	6.41±0.22	4.85±0.14
12	7.95±0.45	5.73±0.45
16	9.25±0.57	6.80±0.32
20	9.38±0.40	7.28±0.28
24	9.23±0.35	7.77±0.38
28	-	7.90±0.27

2. ข้อมูลจากการทดลองที่ II

<u>ตารางผนวก ง-3</u>

การเพาะเลี้ยงและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 4.0

เวลาเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์ไฟเตส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)
0	1.29±0.26	22.47±0.28	0.03±0.23
2.0	1.44±0.14	22.06±0.55	0.09±0.05
4.0	2.29±0.21	19.56±0.31	0.66±0.13
6.0	4.19±0.10	16.39±0.24	1.72±0.13
8.0	9.83±0.20	7.53±0.20	4.09±0.30
9.0	12.17±0.21	1.19±0.00	6.64±0.06
9.5	12.20±0.34	0.78±0.00	7.62±0.25

<u>ตารางผนวก ง-4</u>

การเพาะเลี้ยงและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 5.0

เวลาเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์ไฟเตส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)
0	1.07±0.13	21.56±0.24	0.88±0.17
2.0	1.18±0.25	21.17±0.55	1.17±0.20
4.0	2.00±0.13	20.39±0.08	1.53±0.32
6.0	3.78±0.10	16.06±0.24	2.36±0.30
8.0	9.23±0.28	6.81±0.20	4.61±0.36
9.0	12.86±0.34	0.53±0.04	6.12±0.06
9.5	12.02±0.23	0.14±0.04	6.31±0.01

ตารางผนวก ง-5

การเพาะเลี้ยงและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 6.0

เวลาเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์ไฟเตส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)
0	1.22±0.10	21.28±0.39	0.52±0.12
2.0	1.64±0.18	20.94±0.00	0.64±0.07
4.0	2.26±0.19	19.83±0.31	0.78±0.02
6.0	4.01±0.19	18.42±0.04	1.89±0.10
8.0	9.34±0.19	9.89±0.08	5.11±0.11
9.5	14.00±0.21	1.36±0.04	7.83±0.04
10.5	13.73±0.30	1.31±0.08	7.90±0.09

ตารางผนวก ง-6

การเพาะเลี้ยงและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 6.5

เวลาเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์ไฟเตส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)
0	1.51±0.27	19.58±0.20	0.29±0.07
2.0	1.93±0.21	18.97±0.28	0.32±0.03
4.0	2.18±0.22	18.56±0.24	0.46±0.03
6.0	3.29±0.25	16.83±0.31	1.31±0.27
8.0	6.67±0.07	12.06±0.24	2.90±0.16
10.0	13.62±0.32	1.29±0.18	6.23±0.16
10.5	13.64±0.36	0.00±0.00	6.73±0.31

ตารางผนวก ง-7

การเพาะเลี้ยงและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0

เวลาเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์ไฟเตส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)
0	1.48±0.18	19.42±0.20	0.50±0.12
2.0	1.68±0.15	18.64±0.59	0.51±0.09
4.0	1.93±0.26	18.06±0.71	0.60±0.09
6.0	2.28±0.33	17.67±0.08	0.70±0.04
8.0	2.70±0.51	16.31±0.75	0.90±0.05
12.0	3.53±0.15	15.42±0.20	1.10±0.09
24.0	4.80±0.40	9.39±0.08	3.30±0.21
28.0	6.50±0.11	3.22±0.08	4.40±0.26
32.0	9.39±0.39	0.83±0.16	5.83±0.03

ตารางผนวก ง-8

การเพาะเลี้ยงและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ ที่พีเอช 6.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เวลาเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์ไฟเตส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)
0	1.22±0.10	21.28±0.39	0.52±0.12
2.0	1.64±0.18	20.94±0.00	0.64±0.07
4.0	2.26±0.19	19.83±0.31	0.78±0.02
6.0	4.01±0.19	18.42±0.04	1.89±0.10
8.0	9.34±0.19	9.89±0.08	5.11±0.11
9.5	14.00±0.21	1.36±0.04	7.83±0.04
10.5	13.73±0.30	1.31±0.08	7.90±0.09

ตารางผนวก ง-9

การเพาะเลี้ยงและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ ที่พีเอช 6.0 อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส

เวลาเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์ไฟเตส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)
0	1.24±0.16	21.86±0.35	0.29±0.04
2.0	1.74±0.35	20.92±0.28	0.49±0.04
4.0	2.48±0.05	19.83±0.08	0.79±0.01
6.0	5.56±0.12	15.58±0.43	1.87±0.04
8.0	13.81±0.15	2.00±0.00	5.36±0.21
8.5	14.13±0.26	1.83±0.00	5.72±0.05

ตารางผนวก ง-10

การเพาะเลี้ยงและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ ที่พีเอช 6.0 อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส

เวลาเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์ไฟเตส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)
0	1.40±0.27	21.83±0.16	0.00±0.00
2.0	1.62±0.11	20.50±0.24	0.19±0.18
4.0	2.12±0.17	20.14±0.27	0.4±0.15
6.0	2.69±0.17	19.20±0.27	0.60±0.12
8.0	3.80±0.15	17.14±0.04	0.90±0.28
10.0	5.69±0.12	13.14±0.04	1.50±0.16
12.0	7.92±0.15	8.00±0.00	2.61±0.18
14.0	11.20±0.18	1.58±0.20	4.24±0.16
15.5	12.21±0.32	1.05±0.08	4.99±0.28

ตารางผนวก ง-11

การเพาะเลี้ยงและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ ที่พีเอช 6.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

เวลาเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์ไฟเตส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)
0	1.17±0.13	19.75±0.19	0.11±0.11
10.0	2.62±0.11	18.94±0.39	0.62±0.02
12.0	2.88±1.39	17.64±0.20	0.72±0.11
14.0	2.97±0.15	16.97±0.28	0.85±0.04
16.0	3.03±0.08	16.64±0.20	0.91±0.12
20.0	3.47±0.09	13.89±0.39	1.03±0.10
24.0	3.61±0.12	11.69±0.35	1.22±0.00
34.0	4.60±0.11	7.64±0.04	1.57±0.10
38.0	5.09±0.21	7.42±0.04	1.72±0.00
42.0	5.59±0.34	6.11±0.00	1.87±0.09
46.0	5.54±0.09	4.14±0.04	1.89±0.01
48.0	5.57±0.09	3.00±0.08	1.94±0.01
58.0	6.54±0.30	1.56±0.24	2.12±0.05

ตารางผนวก ง-12

การเพาะเลี้ยงและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ ที่พีเอช 6.0 อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส

เวลาเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์ไฟเตส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)
0	1.18±0.14	20.31±0.04	-
12.0	1.94±0.15	18.06±0.08	-
16.0	2.08±0.14	17.75±0.12	-
20.0	2.12±0.10	17.42±0.12	-
24.0	2.06±0.15	16.83±0.00	-

36.0	2.12±0.10	13.86±0.59	-
40.0	2.19±0.19	13.47±0.35	-
44.0	2.01±0.08	13.06±1.34	-
60.0	2.11±0.05	12.67±0.00	-
64.0	2.04±0.11	12.67±0.00	-
68.0	2.23±0.11	12.67±0.00	-
84.0	1.94±0.10	12.67±0.08	-

หมายเหตุ : สัญลักษณ์ – คือ ไม่ได้ทำการวิเคราะห์

<u>ตารางผนวก ง-13</u>

การเพาะเลี้ยงและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ ที่พีเอช 6.0 และไม่มีการควบคุมอุณหภูมิระหว่างการเพาะเลี้ยง

เวลาเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์ไฟเตส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)
0	1.19±0.12	20.81±0.12	0.15±0.14
2.0	1.57±0.17	20.19±0.04	0.26±0.01
4.0	2.86±0.34	19.75±0.12	0.60±0.07
6.0	5.30±0.20	16.17±0.16	1.56±0.08
8.0	12.63±0.32	1.64±0.04	3.99±0.06
9.0	12.70±0.33	0.72±0.08	4.09±0.08

3. ข้อมูลจากการทดลองที่ III

ตารางผนวก ง-14

การเพาะเลี้ยงและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์

โดยใช้อัตราการเติมสับสเทรตแบบเอกซ์โพเนนเซียล

เวลาเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์ไฟเตส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	โปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อลิตร)	เอทานอล (กรัมต่อลิตร)	กรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)
0	1.17±0.11	22.36±1.29	0.64±0.12	0.00±0.00	0	0
8.5	13.71±0.13	0.00±0.00	6.23±0.05	32.59±1.75	0	0
10.5	25.98±0.41	0.01±0.02	15.96±0.36	59.13±1.95	0	0
12.5	38.76±0.44	3.38±0.00	28.55±0.12	108.49±3.31	6.56±0.42	0.52±0.71
14.5	41.32±0.69	27.77±0.00	38.64±0.97	117.02±1.36	23.86±1.21	3.11±0.51
16.5	36.00±1.34	104.72±0.00	35.62±0.61	100.66±0.78	33.94±2.16	5.35±0.35
18.5	34.11±2.01	112.50±1.17	32.17±0.85	96.53±1.56	38.09±2.55	6.21±0.28
32.5	31.58±0.56	9.86±0.11	35.36±2.19	139.98±3.50	48.70±3.55	12.79±0.21

<u>ตารางผนวก ง-15</u>

การเพาะเลี้ยงและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์*O. thermomethanolica* ด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์

โดยใช้อัตราการเติมสับสเทรตแบบคงที่

เวลาเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์ไฟเตส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	โปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อลิตร)	เอทานอล (กรัมต่อลิตร)	กรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)
0	0.85±0.27	22.19±0.35	0.22±0.05	0.00±0.00	0	0
8.5	13.00±0.32	0.02±0.04	5.11±0.15	37.92±0.39	0	0
12.5	30.31±0.61	0.05±0.04	17.91±0.74	101.12±3.97	0	0
16.5	45.54±0.54	0.18±0.02	34.85±0.37	109.55±3.97	0	0
20.5	55.75±0.87	0.19±0.00	46.67±0.12	217.69±1.98	0	0
32.5	79.44±0.88	0.32±0.02	72.40±0.37	339.89±3.97	0	0
36.5	82.34±1.06	0.53±0.04	75.88±0.86	425.56±1.98	0	0
40.5	85.16±1.64	0.48±0.02	78.23±0.24	453.65±5.96	0	0
44.5	90.62±1.35	0.57±0.02	75.27±1.72	516.85±3.97	0	0
56.5	101.16±1.35	0.71±0.02	84.48±3.44	661.52±1.98	0	0
60.5	105.61±2.44	0.59±0.02	76.31±2.70	582.86±1.98	0	0
64.5	108.00±2.81	0.54±0.02	73.70±1.47	556.18±7.94	0	0
71.0	107.73±2.29	0.62±0.02	66.40±0.49	543.54±9.93	0	0

ตารางผนวก ง-16

การเพาะเลี้ยงและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์*O. thermomethanolica* ด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์

โดยใช้อัตราการเติมสับสเทรตแบบครั้งคราว

เวลาเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์ไฟเตส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	โปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อลิตร)	เอทานอล (กรัมต่อลิตร)	กรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)
0	0.98±0.08	19.92±0.12	0.55±0.08	1.69±0.59	-	-
8.50	12.88±0.06	0.21±0.02	6.20±0.11	22.61±0.20	-	-
8.88	12.80±0.21	17.58±0.43	-	-	-	-
10.58	22.20±0.09	0.63±0.02	12.53±0.63	-	0	0
10.65	22.65±0.31	17.86±0.12	-	-	-	-
11.82	29.70±0.51	0.97±0.20	17.16±0.13	-	-	-
11.88	29.95±0.48	18.25±0.20	-	-	-	-
13.10	34.93±0.73	0.88±0.06	25.60±0.00	78.65±11.92	-	-
13.14	34.92±0.58	19.03±0.12	-	-	1.29±0.92	1.44±0.64
14.71	39.58±0.79	0.92±0.04	37.24±0.63	-	-	-
14.80	39.23±0.74	18.94±0.16	-	-	2.12±0.84	2.08±0.59
16.70	45.37±0.66	0.90±0.02	49.24±0.25	153.09±5.96	-	-
16.73	45.45±0.45	19.56±0.16	-	-	-	-

18.91	50.72±0.52	0.90±0.02	66.40±1.13	-	-	-
18.97	50.62±0.58	20.22±0.08	-	-	-	-
20.74	57.10±0.88	1.10±0.02	76.18±0.63	262.64±5.96	-	-
20.82	57.13±0.72	20.39±0.08	-	-	-	-
22.84	62.90±0.83	1.17±0.08	86.93±0.25	-	0	0
22.87	62.25±0.95	19.11±0.08	-	-	0	0
24.59	69.90±0.70	1.25±0.04	93.33±0.00	377.81±5.96	-	-
24.65	69.75±0.78	20.03±0.20	-	-	-	-
26.44	76.65±0.81	1.07±0.06	118.93±0.75	405.90±1.99	-	-
26.50	74.13±0.61	19.31±0.20	-	-	-	-
28.51	81.90±0.96	1.01±0.06	-	-	-	-
28.56	80.38±0.89	20.61±0.08	-	-	-	-
30.57	77.77±0.88	1.07±0.06	136.00±0.75	442.42±1.99	-	-
30.66	83.35±0.74	19.67±0.08	-	-	-	-
33.23	89.35±0.85	0.92±0.04	-	-	0	0
33.31	87.78±0.98	19.25±0.27	-	-	-	-
35.70	91.68±1.03	0.94±0.04	152.89±0.50	469.10±0.00	-	-
35.78	91.52±1.08	19.44±0.08	-	-	-	-
37.73	96.33±1.00	0.89±0.08	-	-	-	-

37.82	96.45±1.46	18.83±0.08	-	-	-	-
39.95	100.38±1.11	1.08±0.04	166.58±2.77	484.55±5.96	-	-
40.03	97.20±1.26	18.67±0.31	-	-	-	-
42.00	102.65±1.83	1.28±0.08	-	-	0	0
42.10	99.92±1.61	19.69±0.20	-	-	-	-
43.98	103.25±1.81	1.81±0.04	166.04±1.01	532.30±5.96	-	-
44.03	97.65±1.86	20.44±0.24	-	-	-	-
45.86	98.67±1.95	3.19±0.20	-	-	0	0
45.95	101.78±1.94	19.28±0.55	-	-	0	0
47.68	107.95±0.94	4.79±0.10	166.58±2.26	589.89±3.97	0	0

หมายเหตุ : สัญลักษณ์ – คือ ไม่มีการวัดค่า

ตารางผนวก ง-17

การเพาะเลี้ยงและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* ด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์

โดยใช้ค่าออกซิเจนละลายเป็นตัวควบคุมการเติมสับสเตรต

เวลาเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์ไฟเตส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	โปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อลิตร)	เอทานอล (กรัมต่อลิตร)	กรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)
0	1.14±0.24	20.53±0.35	0.47±0.22	0.00±0.00	0	0
8.5	13.12±0.26	0.10±0.58	5.42±0.04	12.97±2.35	0	0
12.6	41.88±0.86	0.68±0.02	9.95±0.25	23.38±9.41	0	0
16.7	63.69±1.02	0.65±0.06	42.78±1.61	69.84±23.52	0	0
18.7	73.26±0.90	0.88±0.04	52.88±0.00	109.74±9.41	0	0
32.5	108.08±3.54	1.06±0.04	103.73±0.62	460.59±2.35	0	0
36.7	113.71±2.23	1.06±0.18	114.54±0.99	465.58±4.70	0	0
39.7	114.51±1.43	1.05±0.04	128.60±1.99	450.55±7.05	0	0

4. ข้อมูลจากการทดลองที่ IV

ตารางผนวก ง-18

การเพาะเลี้ยงและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์*O. thermomethanolica*

ด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์โดยใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน

เวลาเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของซูโครส (กรัมต่อลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์ไฟเตส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)
0	1.43±0.15	21.18±0.91	0.25±0.16
2.0	1.74±0.24	19.84±0.86	0.22±0.06
4.0	2.73±0.32	17.61±0.78	0.68±0.07
6.0	7.12±0.32	14.51±0.67	1.97±0.10
8.0	16.87±0.68	1.69±0.21	4.22±0.12
8.5	15.18±0.49	1.65±0.21	5.67±0.11

ตารางผนวก ง-19

การเพาะเลี้ยงและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์*O. thermomethanolica*

ด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์โดยใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน

และอาศัยค่าออกซิเจนละลายเป็นตัวควบคุมการเติมสับสเทรต

เวลาเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์ไฟเตส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	โปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อลิตร)	เอทานอล (กรัมต่อลิตร)	กรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)
0	1.23±0.23	21.52±0.35	0.00±0.04	0.00±0.04	0	0
8.50	13.11±0.15	0.10±0.58	5.71±0.08	22.12±2.59	0	0
12.50	40.38±0.55	0.68±0.02	19.06±1.14	28.27±16.49	0	0
16.50	59.31±0.92	0.75±0.16	48.68±0.25	199.53±0.00	0	0
20.70	75.34±1.00	0.88±0.04	68.90±1.52	320.92±11.76	0	0
33.50	106.57±1.55	1.26±0.04	116.51±0.25	540.41±11.76	0	0
36.63	108.22±2.47	1.06±0.18	119.73±1.77	547.06±11.76	0	0
40.70	110.00±2.13	0.86±2.77	134.05±1.77	660.13±16.46	0	0

5. ข้อมูลจากการทดลองที่ V

ตารางผนวก ง-20

การเพาะเลี้ยงและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* เมื่อมีการเพิ่มอุณหภูมิในระยะเฟด-แบทช์เท่ากับ 38 องศาเซลเซียส

เวลาเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์ไฟเตส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	โปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อลิตร)	เอทานอล (กรัมต่อลิตร)	กรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)
0	1.22±0.11	21.53±0.25	0.32±0.00	0.00±0.00	0	0
8.50	12.13±0.30	0.10±0.58	5.52±0.10	22.28±0.94	0	0
12.70	37.10±0.44	0.48±0.12	11.33±0.37	32.24±2.35	0	0
16.70	53.46±0.98	0.25±0.06	18.62±0.50	45.13±7.05	0	0
20.70	65.41±1.07	0.78±0.04	28.90±0.62	62.24±4.70	0	0
33.00	93.83±0.85	1.01±0.14	49.01±0.25	100.19±4.70	0	0
36.70	98.78±1.53	0.56±0.18	53.75±0.99	123.05±9.41	0	0
40.70	102.26±1.64	1.05±0.04	75.19±1.49	179.58±9.41	0	0
43.70	99.76±1.75	0.23±0.12	83.62±0.50	229.46±9.41	0	0

ตารางผนวก ง-21

การเพาะเลี้ยงและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* เมื่อมีการเพิ่มอุณหภูมิในระยะเฟด-แบทช์เท่ากับ 40 องศาเซลเซียส

เวลาเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์ไฟเตส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	โปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อลิตร)	เอทานอล (กรัมต่อลิตร)	กรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)
0	1.42±0.30	21.53±0.25	0.33±0.05	0.00±0.00	0	0
9	12.63±0.11	0.50±0.48	5.41±0.12	33.92±1.41	0	0
13	37.71±0.50	0.38±0.12	9.31±0.99	32.24±14.11	0	0
17	49.89±0.40	0.25±0.06	12.30±1.99	45.13±2.35	0	0
21	60.69±1.16	0.67±0.11	15.02±0.87	62.24±7.05	0	0
34	80.29±1.36	1.01±0.14	28.28±2.24	100.19±9.41	0	0
37	82.37±1.79	0.78±0.04	24.95±0.75	211.17±7.05	0	0
41	79.06±1.48	0.48±0.12	25.47±0.25	297.64±7.05	0	0
45	77.52±1.37	0.25±0.09	26.88±0.25	317.59±2.35	0	0

<u>ตารางผนวก ง-22</u>

การเพาะเลี้ยงและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *O. thermomethanolica* เมื่อมีการเพิ่มอุณหภูมิในระยะเฟด-แบทช์เท่ากับ 42 องศาเซลเซียส

เวลาเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์ไฟเตส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	โปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อลิตร)	เอทานอล (กรัมต่อลิตร)	กรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)
0	1.20±0.16	20.53±0.35	0.00±0.00	0.00±0.00	0	0
9	12.14±0.36	0.10±0.06	5.79±0.09	21.45±0.71	0	0
11	24.01±0.31	0.13±0.02	7.29±2.36	33.21±4.70	0	0
13	37.60±0.52	1.39±0.00	9.13±0.99	38.42±9.41	0	0
17	47.12±0.53	1.94±0.39	11.51±0.12	45.63±2.35	0	0
34	57.04±0.87	21.53±0.20	12.21±0.12	66.25±7.05	0	0
37	60.82±0.57	0.69±0.20	13.88±0.00	80.63±4.70	0	0
41	57.82±1.53	8.19±0.20	14.23±1.49	91.45±2.35	0	0
45	54.32±1.06	17.36±0.20	14.58±0.75	121.38±2.35	0	0
47	57.53±3.09	7.22±0.39	14.58±0.50	191.22±7.05	0	0

ประวัติการศึกษา

ชื่อ	นายสมพจน์ อันติมานนท์
วันเดือนปีเกิด	21 เมษายน 2534
วุฒิการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) เกียรตินิยมอันดับ 2 ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปีการศึกษา 2556
ทุนการศึกษา (ถ้ามี)	ทุนเรียนดี คณะ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ทุนสนับสนุนการวิจัยศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
ผลงานทางวิชาการ	กัญญาลักษณ์ สังข์ประไพ , สมพจน์ อันติมานนท์ , เทพปัญญา เจริญรัตน์ , นิรันดร์ รุ่งสว่าง และสุทิพา ธนพงษ์พิพัฒน์ (2557) พีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสโดยรีคอมบิแนนท์ *Pichia pastoris* ด้วยกระบวนการหมักแบบเฟด-แบทช์ . วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (ภาษาไทย) มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. 22(5): 650-663.
ประสบการณ์การทำงาน	ผู้ช่วยสอน วิชา ทช 476 เทคโนโลยีการหมัก ประจำภาคเรียนที่ 2/2556 และ 2/2557 ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์