เหงียน ทิ แทง ซุง : การผลิตและการทำบริสุทธิ์เอ็นไซม์รีคอมบิแนนท์เทอโรไคเนสสายสั้น (rEK_L) จากเชื้อ *Pichia pastoris* (PRODUCTION AND PURIFICATION OF RECOMBINANT ENTEROKINASE LIGHT CHAIN (rEK_L) FROM *Pichia pastoris*). อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อภิชาติ บุญทาวัน, 87 หน้า

ในปัจจุบัน เอ็นเทอโรไคเนสได้กลายเป็นเครื่องมือที่สำคัญสำหรับการตัดฟิวชั่นรีคอมบิแนนท์โปรตีนในหลอดทดลองเนื่องจากมีความจำเพาะเจาะจงสูงต่อตำแหน่งตัดจำเพาะ ($(Asp)_4$–Lys) และ มีความคงทนต่อสภาวะในการทำปฏิกิริยาที่หลากหลาย ในการทดลองนี้ ได้ทำการผลิตเอ็นไซม์รีคอมบิแนนท์เอ็นเทอร์โรไคเนสสายสั้น (rEK_L) โดยเชื้อ *Pichia pastoris* Y11430 จากการทดลองกระบวนการหมักแบบกึ่งกะอย่างง่าย พบว่าสามารถประสบความสำเร็จในการเลี้ยงเซลล์ให้ได้ความเข้มข้นสูง โดยมีการควบคุมอัตราการเจริญจำเพาะคงที่ ที่แตกต่างกันดังนี้คือ 0.006, 0.0075, และ 0.0105 ต่อชั่วโมง ซึ่งค่าเหล่านี้ได้ถูกเลือกนำมาใช้การให้อาหารที่มีเมธานอลเป็นส่วนประกอบ (อาหาร MF) แบบเอ็กโปเนนเชียลในช่วงของการผลิตด้วยเมธานอล ที่อัตราการเจริญจำเพาะคงที่ 0.0075 ต่อชั่วโมง พบว่าความหนาแน่นของเซลล์สูงสุด 128 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นโดยรวมของโปรตีน 343.19 มิลลิกรัมต่อลิตร และ กิจกรรมของเอ็นไซม์อยู่ที่ 38,125 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อทำการเปรียบเทียบกับค่าอัตราการเจริญจำเพาะคงที่ 0.0105 ต่อชั่วโมง พบว่าเกิดการยับยั้งอย่างรุนแรงต่อการเจริญของเซลล์และมีการผลิตผลิตภัณฑ์ที่ต่ำ เนื่องจากการใช้อัตราการป้อนเมธานอลที่สูงเกิดไป สำหรับการป้อนที่อัตราการเจริญจำเพาะคงที่ 0.006 ต่อชั่วโมง พบว่าความเข้มข้นของเซลล์มีค่าต่ำสุด เนื่องจากอัตราการป้อนที่ต่ำ ที่สุดนั่นเอง ถึงแม้ว่าอัตราการเจริญจำเพาะคงที่ที่ 0.006 ต่อชั่วโมง จะไม่ทำให้การสะสมของรีคอมบิแนนท์เอ็นเทอร์โรไคเนส สูงสุด แต่ทำให้การแสดงออกจำเพาะของเอ็นไซม์มีค่าสูงสุดที่ 389,326 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อเปรียบเทียบกับ 122,975 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ที่อัตราการเจริญจำเพาะคงที่ 0.0075 ต่อชั่วโมง หลังจากผ่านชั่วโมงที่ 117 ของเวลาชักนำให้เกิดการแสดงออกของเอ็นไซม์ นอกจากนี้ การเพิ่มขึ้นของเวลาชักนำจนถึงชั่วโมงที่ 117 สำหรับค่าอัตราการเจริญจำเพาะคงที่ของทั้ง 0.006 และ 0.0075 ต่อชั่วโมง ส่งผลให้มีการเพิ่มขึ้นของความหนาแน่นของเซลล์ ความเข้มข้นโดยรวมของโปรตีน การสะสมของเอ็นไซม์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการแสดงออกจำเพาะของเอ็นไซม์รีคอมบิแนนท์เอ็นเทอร์โรไคเนสสายสั้น ซึ่งเป็นค่าที่สูงกว่ารายงานการวิจัยก่อนหน้า เป็นอย่างมาก

ได้มีการทำบริสุทธิ์เอ็นไซม์รีคอมบิแนนท์เอ็นเทอร์โรไคเนสสายสั้น โดยใช้เทคนิคโครมาโตกร๊าฟฟี่แบบแลกเปลี่ยนประจุลบ (SP-FF คอลัมน์) ซึ่งผลการทดลองพบว่า ได้ ปริมาณของเอ็นไซม์รีคอมบิแนนท์เอ็นเทอร์โรไคเนสสายสั้นบริสุทธิ์จำนวน 3,542 ไมโครกรัม จากของเหลวใส

330 มิลลิลิตรที่ได้จากอัตราการเจริญจำเพาะที่ 0.0075 ต่อชั่วโมง นอกจากนี้ รีคอมบิแนนท์ฟิวชันโปรตีน Os1BGlu4-Trx จากข้าวได้ถูกตัดจนเกือบสมบูรณ์โดยใช้เอ็นไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์นี้

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2553 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

NGUYEN THI THANH DUNG : PRODUCTION AND PURIFICATION OF RECOMBINANT ENTEROKINASE LIGHT CHAIN (rEK_L) FROM *Pichia pastoris*, THESIS ADVISOR : ASST. PROF. APICHAT BOONTAWAN, Ph.D., 87 PP.

ENTEROKINASE/HIGH CELL DENSITY/PICHIA PASTORIS/ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY

Recently, enterokinase has become a useful tool for an *in vitro* digestion of recombinant fusion protein because of its high specificity for the recognition sequences $(Asp)_4$–Lys, and its tolerance to a wide range of reaction conditions. In this work, a high activity recombinant enterokinase light chain (rEK_L) was produced by *Pichia pastoris* Y11430. With a simple fed-batch technique, high cell density cultivation was successfully achieved. Different constant specific growth rates (μ_{set}) 0.006, 0.0075, and 0.0105 hr^{-1} were chosen to pre-determine the exponential feeding strategy of methanol feed medium (MF medium) during the methanol production phase. At μ_{set} 0.0075 hr^{1}, the highest cell density, total protein concentration, and accumulation of the rEK_L were obtained at approximately 128 $g.L^{-1}$, 343.19 $mg.L^{-1}$ and 38125 $U.mL^{-1}$, respectively. In comparison, the μ_{set} 0.0105 hr^{-1} resulted in severe inhibition of cell growth and low product formation due to excessive feeding rate. The feeding rate at μ_{set} 0.006 hr^{-1} resulted in the lowest cell concentration clearly due to the lowest feeding rate. The highest rEK_L accumulation could not be obtained at μ_{set} 0.006 hr^{-1}; however, the highest specific activity reached the maximum value of 389,326 $U.mg^{-1}$ proteins, compared to 122,975 $U.mg^{-1}$proteins at the μ_{set} 0.0075 hr^{1}

after 117 hr of the induction time. In addition, an increase of the induction time to 117 hr for both μ_{set} 0.006 and 0.0075 hr^{-1} resulted in the higher cell density, total protein concentration, rEK_L accumulation, and specially specific activity of rEK_L which was much higher than all previously reported articles.

Finally, purification of the recombinant EK_L was performed using a simple procedure based on the cation exchange chromatography (SP_FF column). The experimental result showed that 3,542 µg pure and active rEK_L was obtained from 330 ml culture broth supernatant in the process at μ_{set} 0.0075 $hr^{-1}$and that the recombinant fusion protein, rice Os1BGlu-Trx, was completely cleaved by using this purified rEK_L.

School of Biotechnology

Academic Year

Student's Signature_____

Advisor's Signature _____

Co-advisor's Signature_____