รายงานการวิจัย (Research project)

การพัฒนากระบวนผลิต Human Growth Hormone (hGH) ที่ผลิตได้จากเชื้อ Recombinant *Pichia pastoris* โดยใช้เทคนิคการวัดค่า และควบคุมป้อนอาหารแบบ Methanol Online

Online Methanol Monitor and Control Feeding Strategy for Production of Recombinant Human Growth Hormone (hGH) Produced from Recombinant *Pichia pastoris*

หัวหน้าโครงการ

ผศ.ดร. อนันต์ ทองทา

คณะทรัพยากรชีวภาพ และเทคโนโลยี สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (บางขุนเทียน)

49 ถนนบางขุนเทียนชายทะเล แขวงท่าข้าม เขตบางขุนเทียน กรุงเทพฯ 10150

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยในการได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมด้วยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

บทคัดย่อภาษาไทยและบทคัดย่อภาษาอังกฤษ (Abstract)

งานวิจัยชิ้นนี้เป็นการทดลองเพาะเลี้ยงยีสต์ *Pichia pastoris* เพื่อเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีน rhGH ซึ่งเป็นโปรตีนที่เราสนใจ เริ่มต้นโดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์ใน flask ขนาด 250 ml จนได้ปริมาณเซลล์ยีสต์ที่เข้มข้นสูง จากนั้นจะทำการถ่ายเซลล์ยีสต์ลงในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยมีปริมาตรของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์ (BSM) เริ่มต้นไม่เกิน 1 ลิตร โดยการเพาะเลี้ยงจะแบ่งเป็น 3 ระยะ ได้แก่ ระยะของการเพาะเลี้ยงแบบกะ แบบกึ่งกะ และระยะของการเหนี่ยวนำให้ยีสต์ผลิตโปรตีนที่ต้องการ

ในส่วนของการเพาะเลี้ยงแบบกะ และแบบกึ่งกะจะทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์จนได้ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นอยู่ในช่วง 100 – 150 g/L โดยใช้เทคนิคการป้อนอาหารแบบ Exponential feed ในช่วงของการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะ หลังจากได้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่ต้องการแล้วจึงทำการเหนี่ยวนำให้ยีสต์ผลิตโปรตีนที่สนใจ ซึ่งจะใช้ 100% Methanol เป็นตัวเหนี่ยวนำให้ยีสต์ผลิตโปรตีน ในงานวิจัยนี้จะทำการทดลองโดยแปรค่าความเข้มข้นของ methanol ภายในน้ำหมัก ดังนี้ 0.5, 2, 4 และ 8 g/L ตามลำดับ

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการควบคุมความเข้มข้นของ Methanol ในถังหมักที่ 2 g/L จะให้ปริมาณโปรตีนรวมสูงสุด และเมื่อเทียบอัตราส่วนของโปรตีนรวมกับค่าเฉลี่ยความเข้มข้นเซลล์ยีสต์ในระยะเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีน รวมทั้งเทียบอัตราส่วนของโปรตีนรวมกับความเข้มข้นเริ่มต้นของเซลล์ยีสต์ก่อนเข้าสู่ระยะเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีน ก็มีอัตราส่วนที่สูงสุด จากผลการทดลองดังกล่าวจึงเพียงพอที่จะสรุปได้ว่าการผลิตโปรตีนโดยควบคุมการป้อน Methanol โดยใช้ระบบ Methanol Online Program สามารถผลิตโปรตีนรวมได้มากกว่า 1,000 mg และสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการควบคุมความเข้มข้น Methanol คือการควบคุมปริมาณความเข้มข้น Methanol ในถังหมักที่ 2 g/L

คำสำคัญ : Methanol Online/ Human Growth Hormone/ High Cell Density Cultivation

Abstract

This main objective for this study is focused on rhGH protein production by yeast *Pichia pastoris*. The yeast cells were cultured in a 250 ml flask until a high density of yeast cells was obtained. Starter yeast cultures were then transferred to the 2-liter fermented tank supplied with BSM medium (<1 litre at started point) for further experiment.

Fermentation steps of yeast cells were divided into 3 phases; batched, semi-batched and induction step. The yeast cells were first cultivated in BSM medium for batched cultivation until 100 - 150 g / L cell density was obtained. At this time, exponential feed technique was performed for the semi-batched fermentation phase. The induction phase was performed using 100% Methanol as inducer in the yeast culture. Concentration of Methanol in the culture was a variable factor and varied from 0.5, 2, 4 and 8 g/L, respectively.

The results showed a maximum protein production was obtained from 2 g/L Methanol induction culture. An average ratio for both total protein per yeast cell concentration and total protein concentration per yeast cells prior to the induction phase also shown the highest number at this induction point. Therefore, 2g/L of Methanol was selected for protein production using Methonol Online Program to control Methanol concentration in the reactor. The results showed that at 2g/L of Methanol concentration, more than 1,000 mg of interested protein was produced under experimental condition.

คำสำคัญ : Methanol Online/ Human Growth Hormone/ High Cell Density Cultivation

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

บทนำ (Introduction) 10

การผลิต Recombinant protein โดยใช้ P. pastoris ในถังหมัก 11

วัตถุประสงค์ของโครงการ 12

ขอบเขตการวิจัย 12

วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุปทฤษฎี และ/หรือแนวทางความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย 13

การนำยีสต์ Pichia pastoris มาใช้เป็นแหล่งผลิตโปรตีนทางการแพทย์ 13

ปัจจัยที่มีผลต่อการหมักยีสต์ Pichia pastoris 15

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 16

วิธีดำเนินการวิจัย (Materials & Method) 16

การทดลองในถังหมักขนาด 2 ลิตร 18

การพัฒนาการควบคุมการป้อน Glycerol 20

การพัฒนาโปรแกรมควบคุมการป้อน Methanol 20

การวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำหมัก 21

ผลการวิจัย (Results) 23

การควบคุมโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำหรับป้อน Methanol ในกระบวนการเหนี่ยวนำยีสต์ให้ผลิตโปรตีน 24

ผลของการศึกษาความเข้มข้นของเซลล์ก่อนเข้าสู่ระยะเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีน 29

ผลการทดลองเมื่อควบคุมความเข้มข้น Methanol ในถังหมัก 0.5 g/L 29

ผลการทดลองเมื่อควบคุมความเข้มข้น Methanol ในถังหมัก 2 g/L 31

ผลการทดลองเมื่อควบคุมความเข้มข้น Methanol ในถังหมัก 4 g/L 33

ผลการทดลองเมื่อควบคุมความเข้มข้น Methanol ในถังหมัก 8 g/L 34

เปรียบเทียบการใช้ Methanol ในแต่ละสภาวะการทดลองในถังหมักขนาด 2 ลิตร 35

เปรียบเทียบผลการทดลองแต่ละสภาวะของการควบคุมความเข้มข้น Methanol ในถังหมักขนาด 2 ลิตร 36

สรุปและเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นต่อไป 37

38

บรรณานุกรม (Bibliography)

ประวัติคณะผู้วิจัย 41

สารบัญตาราง (List of tables)

ตารางที่ 1	แสดงผลการเปรียบเทียบปริมาณการใช้ Methanol ในแต่ละสภาวะการทดลอง (ในถังหมักขนาด 2 ลิตร)	35
ตารางที่ 2	เปรียบเทียบการทดลองทั้ง 4 Batch โดยการควบควบความเข้มข้นเมทานอล ในถังหมักที่ต่างกัน	36

สารบัญภาพ (List of Illustrations)

รูปที่1	แสดงขั้นตอนการเหนี่ยวนำให้ยีสต์ผลิตโปรตีนที่สนใจ (Induction phase) โดยใช้เทคนิค Methanol Online Controlling	12
รูปที่ 2	Methanol metabolism pathway in *H. polymorpha* (Gellissen et al. 2005)	14
รูปที่ 3	ภาพถังหมัก (research bioreactor) ขนาด 2 ลิตร ในภาพแสดงการชั่งน้ำหนัก ถังหมักและถัง feed และการเก็บข้อมูลเข้าสู่ computer	19
รูปที่ 4	แสดงโปรแกรมรับค่าสัญญาณไฟฟ้าเป็น volt จากเครื่อง methanol sensor	24
รูปที่ 5	แสดงโปรแกรมแปลงค่าที่ได้ให้อยู่ในรูปความเข้มข้นเมทานอลเป็น g/L	25
รูปที่6	สมการ Polynomial ได้มาจากการทำ calibration กับ HPLC	26
รูปที่7	แสดงรายละเอียดโปรแกรม Code ส่วนควบคุม pump	27
รูปที่ 8	แสดงรายละเอียด Flow Chart ของโปรแกรมควบคุม Methanol Online	28
รูปที่ 9	ผลการทดลองเมื่อควบคุมความเข้มข้นในถังหมัก 0.5 g/L	31
รูปที่ 10	ผลการทดลองเมื่อควบคุมความเข้มข้นในถังหมัก 2 g/L	32
รูปที่ 11	ผลการทดลองเมื่อควบคุมความเข้มข้นในถังหมัก 4 g/L	33
รูปที่ 12	ผลการทดลองเมื่อควบคุมความเข้มข้นในถังหมัก 8 g/L	34

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations)

μ_{set} = controlled specific growth rate

$Y_{X/S}$ = yield coefficient biomass per glycerol concentration

X = biomass concentration

X_0 = biomass concentration when feed started

S_0 = glycerol concentration in feed tank

V_0 = volume of liquid when feed started

บทนำ (Introduction)

กระบวนการผลิตยาโดยใช้จุลินทรีย์เป็นแหล่งผลิต Therapeutic Protein เป็นเทคโนโลยีการผลิตยาที่กำลังได้รับความนิยมในต่างประเทศ และมีการขยายการผลิตในระดับอุตสาหกรรมอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะอย่างยิ่งการผลิตยาจากเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อยีสต์ ซึ่งยาที่ผลิตได้จะเรียกว่า Biopharmaceutical อย่างไรก็ตามในประเทศไทยยังไม่มีการศึกษากระบวนการผลิตตัวยาเหล่านี้อย่างจริงจังทั้งในระดับอุตสาหกรรม และในระดับห้องปฏิบัติการ งานวิจัยชิ้นนี้เป็นการพัฒนาการผลิตฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโตของคน หรือ Human Growth Hormone (hGH) ซึ่งปัจจุบันประเทศไทยต้องนำเข้าฮอร์โมนชนิดนี้จากต่างประเทศเพื่อนำมาใช้กับผู้ป่วยซึ่งมีภาวะขาดฮอร์โมน โดยที่ฮอร์โมนชนิดนี้มีราคาค่อนข้างแพง ดังนั้นหากประเทศไทยสามารถผลิตฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโตนี้ขึ้นมาใช้เอง และสามารถจำหน่ายได้ในราคาที่ถูกกว่าการนำเข้า ก็เป็นหนทางที่ดีที่จะทำให้ผู้ป่วยในประเทศไทยได้มีโอกาสใช้ฮอร์โมนชนิดนี้มากขึ้น

Pichia pastoris เป็น host ที่ได้รับความนิยมในปัจจุบันในการนำมาผลิต recombinant proteins เนื่องจาก *P. pastoris* มีความสามารถในการผลิต recombinant protein ได้ความเข้มข้นสูงในสภาวะเฉพาะโดยใช้ alcohol oxidase (*AOX*) promoter โดย *P. pastoris* ยังสามารถทำการเลี้ยงได้ง่ายโดยใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ (ถังหมัก) โดยใช้เทคนิคเดียวกับการเลี้ยง *S. cerevisiae* โดยในปัจจุบันมีการผลิต heterologous protein มากกว่า 100 ชนิด ได้รายงานไว้โดยใช้ *P. pastoris* (Gerngross, T.U., 2004) ในการทดลองผลิต hGH ที่ผลิตได้จากยีสต์ *P. pastoris* โดยใช้กระบวนการหมักพบว่าสามารถเหนี่ยวนำให้ยีสต์ผลิตโปรตีนที่ต้องการได้โดยใช้ Methanol เป็นตัวเหนี่ยวนำ หรือกระตุ้นให้สร้างโปรตีน อย่างไรก็ตามข้อจำกัดบางประการของการเหนี่ยวนำให้ยีสต์ผลิตโปรตีนด้วย Methanol คือ ปริมาณความเข้มข้นของ Methanol ในน้ำหมักไม่ควรเกิน 4 g/L ด้วยเหตุดังกล่าวจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องพัฒนากระบวนการป้อน Methanol อย่างเหมาะสม

ในงานวิจัยนี้จะ Optimize กระบวนการผลิต hGH ที่ผลิตโดยใช้ *P. pastoris* strain KM71 ที่ได้รับการดัดแปลงพันธุกรรม เพื่อการผลิต HSA โดยใช้ถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยใช้เทคนิคการวัดค่า และควบคุมการป้อน Methanol แบบ Online เพื่อควบคุมปริมาณ Methanol ในน้ำหมักได้อย่างเหมาะสม จนสามารถเหนี่ยวนำให้ยีสต์ผลิต hGH โปรตีนได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด

การผลิต Recombinant protein โดยใช้ P. pastoris ในถังหมัก

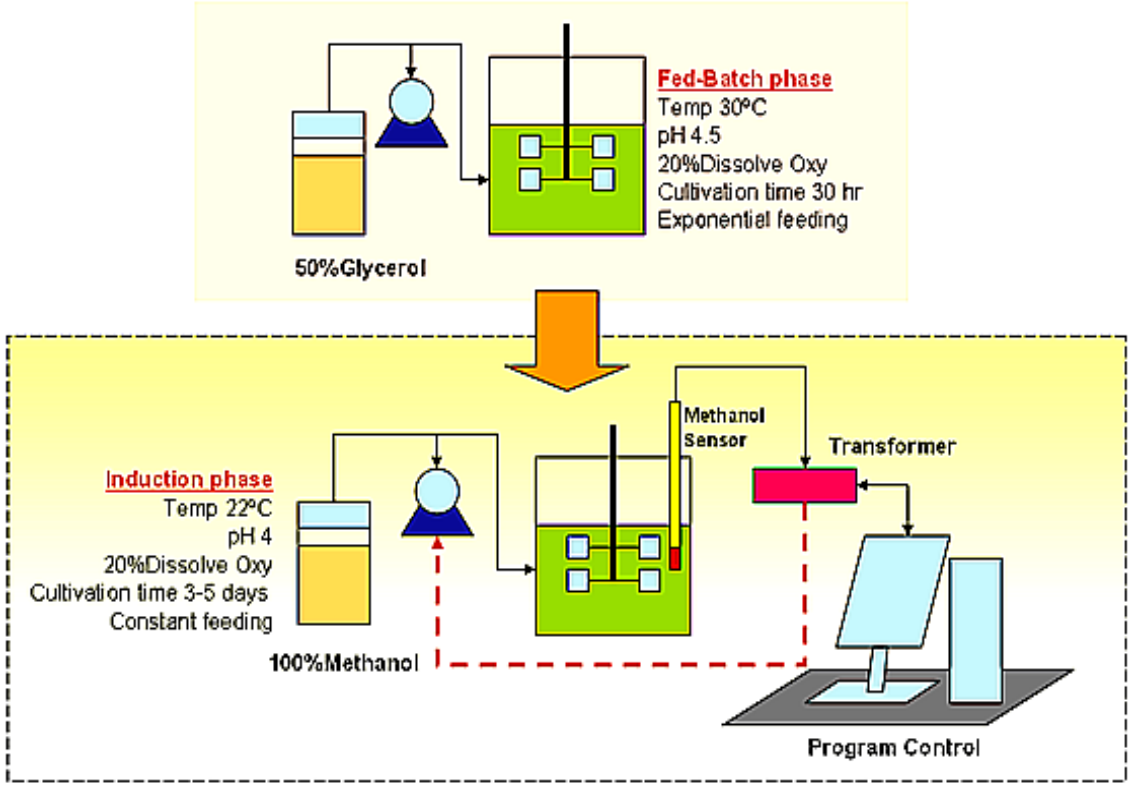
การเลี้ยง *P. pastoris* เพื่อการผลิต recombinant protein ในถังหมัก (Bioreactor) (A. Thipayarat, 2002) มักจะเริ่มจากการเตรียม inoculum ใน YPD medium 100 ml โดยทำการเลี้ยงเชื้อในขวดเขย่าเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อตั้งต้นในการเลี้ยงในถังหมัก โดยทั่วไปจะได้ปริมาณเซลล์ 2-5 OD_{600} จากนั้นจึง transfer ลงถังหมักโดยใช้ basal salt medium (BSM) with trace element เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อโดยทำการหมักแบบ batch โดยมีความเข้มข้นของ Glycerol อยู่ประมาณ 40 g/l จากนั้นจึงเลี้ยง cell แบบ fed batch โดยใช้ glycerol with trace element ที่มีความเข้มข้นของ glycerol สูงๆ (500-600 g/l) โดย feed แบบ exponential เพื่อให้ cell โตแบบ exponential (high cell density cultivation) จากนั้นจึง induce ให้สร้าง recombinant protein โดย feed methanol with trace element ในแบบ fed batch และ/หรือ mixed feed โดยใช้ความเข้มข้นของ methanol สูงๆ (600-700 g/l) โดยควบคุมความเข้มข้นของ methanol ในถังหมักอยู่ที่ 4-5 กรัมต่อลิตร โดยต้องควบคุมให้ ออกซิเจนในถังหมักอยู่ที่มากกว่า 20-30% saturation pH อยู่ที่ 4.5 และ อุณหภูมิควบคุมอยู่ที่ประมาณ 30 °C โดยในขั้นตอนการ induction อาจมีการลดอุณหภูมิมาควบคุมอยู่ที่ 22 °C และ pH 4 เพื่อลดการสูญเสีย protein จากการทำลายของ protease (O'Conner, G *et al.*, 1992) โดยในการผลิต protein จะมีการควบคุมความเข้มข้นของเซลล์ก่อนการ induction ที่เหมาะสม (Jahic, M., 2003, Tongta, A., 2001)

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษากระบวนการเหนี่ยวนำให้ผลิต Recombinant Human Growth Hormone โดยใช้เทคนิคการวัดค่า และควบคุมการป้อน Methanol แบบ Online
2. เพื่อพัฒนากระบวนการหมักที่เหมาะสมในการผลิต Recombinant Human Growth Hormone ให้มีประสิทธิภาพสูงสุด

ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. พัฒนากระบวนผลิต Recombinant Human Growth Hormone ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ให้ได้ปริมาณโปรตีนรวม (Total Protein) ในถังหมักมากกว่า 1000 mg/L
2. ศึกษากระบวนการเหนี่ยวนำให้ผลิต Recombinant Human Growth Hormone โดยใช้เทคนิคการวัดค่าและควบคุมการป้อน Methanol แบบ Online
3. เขียนโปรแกรมควบคุมการป้อน Methanol แบบ Online แสดงดังรูปที่ 1



รูปที่1 แสดงขั้นตอนการเหนี่ยวนำให้ยีสต์ผลิตโปรตีนที่สนใจ (Induction phase) โดยใช้เทคนิค Methanol Online Controlling

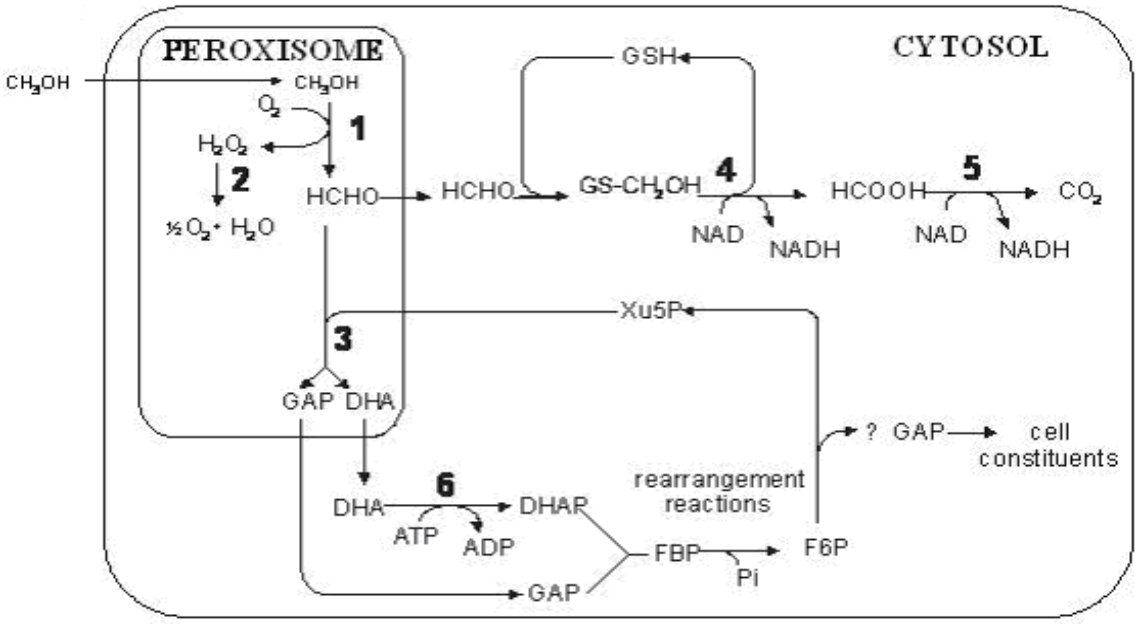
วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุปทฤษฎี และ/หรือแนวทางความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย

ปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์มากมายที่มาจากจุลินทรีย์ที่มนุษย์นำมาใช้ประโยชน์ จุลินทรีย์เป็นแหล่งผลิตสารที่มีประโยชน์ทางการแพทย์ แม้จะมีโรคหลากหลายชนิดที่เกิดขึ้นจากจุลินทรีย์ก่อโรค หรือเชื้อโรคชนิดต่างๆ แต่ยังมีจุลินทรีย์อีกหลายชนิดที่มีการสร้างสารที่มีประโยชน์ในทางการแพทย์ได้ เช่น ยาเพนนิซิลิน ที่เรารู้จักกันดีว่าเป็นสารปฏิชีวนะ และมีผลในการฆ่าแบคทีเรียก็ผลิตได้จากราเพนนิซิลเลียม และยังมีสารปฏิชีวนะอีกหลายชนิดที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย เช่น ยาเททราไซคลิน เป็นต้น เนื่องจากจุลินทรีย์เจริญเติบโตได้รวดเร็ว จึงถูกนำมาใช้เป็นตัวกลางในการผลิตสารที่จำเป็นบางอย่างที่เกี่ยวข้องกับทางการแพทย์และการรักษาโรค

โดยอาศัยเทคนิคทางรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอหรือพันธุวิศวกรรม ทำให้เราสามารถทำการตัดต่อยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารชนิดนั้นๆ เข้ากับดีเอ็นเอพาหะแล้วใส่เข้าไปในจุลินทรีย์ เพื่อหลอกให้จุลินทรีย์สร้างสารเหล่านี้ขึ้นมา เรียกว่า สารรีคอมบิแนนต์ (Recombinant products) โดยมีคุณสมบัติเหมือนสารธรรมชาติ จุลินทรีย์ตัวกลางที่นิยมใช้คือ ยีสต์ ที่ได้รับการพิสูจน์แล้วว่าปลอดภัย เนื่องจากมนุษย์ใช้ยีสต์เหล่านี้ เป็นอาหารมานานนับหลายพันปี

การนำยีสต์ Pichia pastoris มาใช้เป็นแหล่งผลิตโปรตีนทางการแพทย์

ยีสต์ *Pichia pastoris* เป็นยีสต์ที่สามารถใช้ methanol เป็นแหล่งคาร์บอนได้ (Methylotrophic yeast) (Jahic, M., 2003) โดยกระบวนการนำ methanol ไปใช้นั้นยีสต์จะถูกกระตุ้นด้วย methanol ซึ่งในตัวยีสต์จะมี *AOX* gene เมื่อถูกกระตุ้นแล้วจะผลิตเอ็มไซม์ Alcohol Oxidase ซึ่งสามารถเปลี่ยน methanol ให้เป็น formaldehyde และเปลี่ยนเป็นแหล่งพลังงานในที่สุด กระบวนการที่กล่าวมานั้นจะเกิดภายในโครงสร้างพิเศษภายในเซลล์ที่เรียกว่า peroxizome แสดงดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 Methanol metabolism pathway in *H. polymorpha* (Gellissen et al. 2005). 1 - alcohol oxidase, 2 – catalase, 3 – dihydroxyacetone synthase, 4 – formaldehyde dehydrogenase, 5 – formate dehydrogenase, 6 – dihydroxyacetone kinase, 7 – GSH – glutathione, Xu5P – xylulose-5-phosphate, FBP – fructose-1,6-bisphosphate.

การนำยีสต์ *Pichia pastoris* มาตัดต่อพันธุ์กรรม และใช้เป็นแหล่งผลิต Therapeutics protein นั้นมีความน่าสนใจในการวิจัย ศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการ และระดับโรงงานต้นแบบ โดยมีรายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องอยู่อย่างมากมาย ซึ่งในปี 1995 ได้มีการนำยีสต์ชนิดนี้มาผลิตเป็น Single cell protein ใช้ในเชิงพาณิชย์อาศัยคุณสมบัติการเพาะเลี้ยงยีสต์ได้ในปริมาณความเข้มข้นเซลล์สูงๆ (High cell density cultivation) (d'Anjou, M.C. and Daugulis, A.J., 2000) และได้มีการนำมาเป็น host สำหรับตัดต่อเอายีนที่สนใจลงไปหลายชนิด (Trinh, L.B., 2003) ข้อได้เปรียบที่สำคัญของยีสต์ชนิดนี้มีอยู่ 4 ประการ ได้แก่

- ยีสต์ *P. pastoris* สามารถเพาะเลี้ยงให้มีความเข้มข้นสูงๆ ได้โดยใช้แหล่งอาหารที่มีราคาถูก
- การตัดต่อพันธุกรรมโดยนำยีนที่สนใจจะตัดต่อผ่าน AOX promoter ซึ่งเป็น strong promoter ทำให้สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์โปรดักส์ที่ต้องการได้ในปริมาณมาก
- เนื่องจากยีสต์เป็น eukaryote cell ซึ่งเป็นเซลล์แบบเดียวกับในมนุษย์ทำให้มีกระบวนการตัดแต่งโปรตีนก่อน หรือ Post translation modification โปรตีนที่ได้จึงสามารถนำไปใช้ในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงได้ทันที

- ยีสต์ *P. pastoris* สามารถหลั่งโปรตีนที่ผลิตได้เป็นจำนวนมากออกมาภายนอกเซลล์ ทำให้ง่ายสำหรับการแยกโปรตีนบริสุทธิ์ในส่วนของ Down Stream Purification Process

ปัจจัยที่มีผลต่อการหมักยีสต์ Pichia pastoris

ปัจจัยที่สำคัญ และมีผลต่อการหมักยีสต์ *Pichia pastoris* ได้แก่ ความเข้มข้นเซลล์ ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และความต้องการธาตุอาหารของยีสต์ (Nimmarairat N., 2004) โดยเฉพาะการเพาะเลี้ยงยีสต์ให้ได้ความเข้มข้นก่อนเข้าสู่ระยะเหนี่ยวนำที่เหมาะสมเป็นปัจจัยสำคัญอีกประการหนึ่งที่จะช่วยให้การผลิต hGH โปรตีนเป็นไปได้อย่างมีประสิทธิภาพคือการเพาะเลี้ยงยีสต์ในสภาวะความเข้มข้นสูง (High cell density concentration) โดยใช้เทคนิคการป้อนอาหาร (Glycerol) แบบ Exponential feed ซึ่งถูกนำมาใช้ในงานวิจัยก่อนหน้านี้ ในช่วงการหมักแบบกะ (Nimmarairat N., 2004) อย่างไรก็ตามในระยะของการเหนี่ยวนำให้ผลิต hGH โปรตีนด้วย Methanol (Induction phase) ยังคงต้องพัฒนากระบวนการป้อน Methanol ให้เหมาะสมยิ่งขึ้น เพื่อปรับปริมาณความเข้มข้นของ Methanol ในน้ำหมัก (< 4 g/L) และเพิ่มปริมาณโปรตีนรวม (Total Protein) ในถังหมักให้ได้มากกว่า 1000 mg/L

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

งานวิจัยชิ้นนี้เป็นการพัฒนาการผลิต Recombinant Human Growth Hormone ที่ต้องใช้ในการรักษาทางการแพทย์ ซึ่งปัจจุบันประเทศไทยต้องนำเข้าโปรตีนชนิดนี้จากต่างประเทศเพื่อนำมาใช้กับผู้ป่วย เป็นจำนวนมาก ดังนั้นหากประเทศไทยสามารถผลิตโปรตีนชนิดนี้ขึ้นมาใช้เอง และสามารถจำหน่ายได้ในราคาที่ถูกกว่าการนำเข้า ก็เป็นหนทางที่ดีที่จะทำให้ผู้ป่วยในประเทศไทยได้มีโอกาสใช้โปรตีนชนิดนี้มากขึ้น ในขณะเดียวกันการพัฒนากระบวนการผลิตนี้เป็นกระบวนการต่อเนื่องจากการผลิตฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโตในคนที่กลุ่มวิจัยได้เคยทดลองมาแล้ว ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ถูกนำไปใช้เป็นยา จึงเป็นการต่อยอดงานวิจัยที่เป็นเทคโนโลยีขั้นสูง และเป็นการพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อใช้ทางการแพทย์ ซึ่งเป็นการพัฒนาเทคโนโลยีเป็นของตนเอง เพื่อสามารถก้าวทันเทคโนโลยีได้ในระดับนานาชาติ

วิธีดำเนินการวิจัย (Materials & Method)

วัตถุดิบ

1) Recombinant *Pichia pastoris* KM71.

2) Standard Human Growth Hormone.

เครื่องมือ

1) Fermentor 2 Liters : Biostat B
2) pH meter : Bench pH meter cyberscan pH 510, Holland
3) Analytica balance: Satorious analytic model CP221s, Germany
4) Hot Plate Stirrer: HL instrument HS-115
5) Magnetic Stirrer
6) Vortex: Genie 2, Sciencetific Industries
7) Micro Pipet 20μL: Gilson P20, Made in France
8) Methanol Sensor
9) Suction for HPLC: Supelco 5-8070
10) Sterilized Membrane 0.45 μm: Pall Corporation

11) HPLC: Shimazu

12) Computer

13) Lab View Program

13.3 สารเคมี

1) Yeast extract

2) Meat peptone

3) Glucose

4) Glycerol

5) Methanol

6) Potassium Sulfate

7) Magnesium Sulfate

8) Calcium Sulfate

9) Potassium Hydroxide

10) Phosphoric acid

11) Ammonium Hydroxide

12) Anti Foam

13) PTM 1

14) Biotin

13.4 คอลัมน์

1) Animex Column

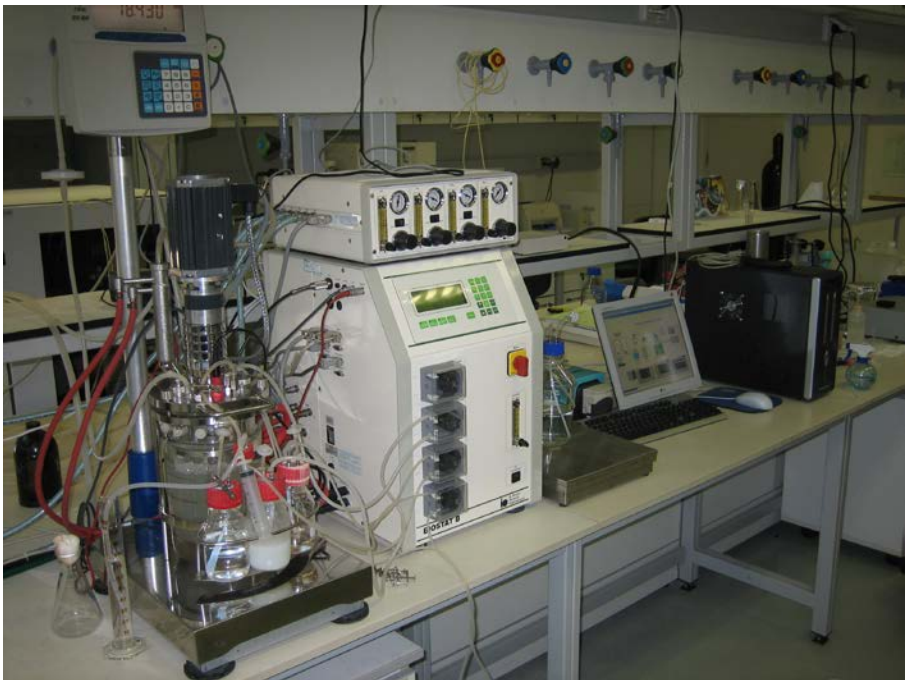
13.5 วิธีการทดลอง

การทดลองในถังหมักขนาด 2 ลิตร

การศึกษาวิจัยนี้วัตถุประสงค์เพื่อต้องการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต Recombinant Human Growth Hormone จากยีสต์ *Pichia pastoris* KM71 โดยใช้เทคนิคการเลี้ยงแบบ High cell density cultivation โดยในการทดลองนี้ศึกษาถึงปัจจัยที่ส่งเสริมให้มีการผลิตโปรตีนดังกล่าวในปริมาณสูง ได้แก่ ความเข้มข้นของเซลล์ก่อนเข้าสู่ช่วงการเหนี่ยวนำให้สร้าง hGH (induction phase) ค่าความเข้มข้นของ Methanol (<4 g/L) ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ และการควบคุมอุณหภูมิในช่วง induction phase โดยทำการศึกษาสภาวะดังกล่าวในระดับ Lab scale ซึ่งใช้ถังหมักขนาด 2 ลิตร

การทดลองเริ่มต้นโดยเลี้ยง *Pichia pastoris* ในฟลาสก์ขนาด 250 ml โดยใช้อาหาร YPD โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 30°C ที่ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นถ่ายเชื้อที่เพาะเลี้ยงได้ลง Basal salt medium ปรับ pH 4.5 โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 30°C ที่ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 14 วัน สุ่มตัวอย่างเพื่อวัดค่า optical density (OD) ให้ได้ประมาณ 6 - 9 ที่ความเข้มแสงของเครื่อง spectrophotometer 600 nm หลังจากนั้นนำเชื้อที่เพาะในฟลาสก์ถ่ายลงสู่ถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่มีอาหาร basal salt medium ซึ่งปริมาณ medium เริ่มต้นเป็น 1 ลิตร

กระบวนการหมักแบ่งออกเป็น 3 ระยะ ได้แก่ ระยะหมักแบบกะ (Batch phase) โดยใช้ glycerol ความเข้มข้นเริ่มต้นประมาณ 40 g/l ตามด้วยระยะการหมักแบบกึ่งกะ (Fed-Batch phase) และระยะเหนี่ยวนำด้วยการ feed 100% methanol แบบต่อเนื่องเพื่อให้ยีสต์สร้างโปรตีน (Induction phase) สำหรับการเพาะเลี้ยงในระยะหมักแบบกะ และกึ่งกะได้ควบคุมสภาวะการเลี้ยงไว้อย่างคงที่ โดยควบคุม อุณหภูมิที่ 30°C ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ pH 4.5 ความเร็วรอบใบกวนเริ่มต้นที่ 600 ค่าการให้อากาศ Air flow rate เป็น 2 vvm และค่าการละลายออกซิเจนในน้ำ (Disslove oxygen; DO) 20% ซึ่งการควบคุมค่า DO นี้จะตั้งการควบคุมโดยการควบคุมค่าความเร็วรอบใบกวน และค่า Air flow rate เมื่อค่าการละลายออกซิเจนในน้ำต่ำกว่า 20% controller จะสั่งให้ใบพัดทำงานในรอบการกวนที่สูงขึ้น เพื่อเพิ่มปริมาณออกซิเจนในน้ำจนกระทั่งการทำงานถึงขีดสุด (Maximum stirrer speed) ถ้าการละลายออกซิเจนในน้ำยังไม่เพียงพอจะเพิ่มอากาศเข้ามาในระบบ จากนั้นจะนำก๊าซออกซิเจน 99.5% เข้ามาผสมในอัตราส่วน 50:50 เพื่อรักษาระดับค่าการละลายออกซิเจนในน้ำให้เป็นไปตามที่ต้องการ ในช่วงการหมักแบบกะจะทำการป้อนสารอาหาร (glycerol) โดยใช้สมการการป้อนแบบ exponential เพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์เข้มข้นสูง (high cell density cultivation) และลดการสะสมของ by-product ที่ไม่ต้องการ จากการใช้วิธีการนี้จะทำให้ได้ปริมาณเซลล์เข้มข้นสูงได้ถึง 150 - 200 g DW/l



รูปที่ 3 ภาพถังหมัก (research bioreactor) ขนาด 2 ลิตร ในภาพแสดงการชั่งน้ำหนัก ถังหมักและถัง feed และการเก็บข้อมูลเข้าสู่ computer

เมื่อได้ปริมาณความเข้มข้นเซลล์ที่ต้องการแล้ว ก่อนจะเข้าสู่ระยะเหนี่ยวนำด้วยการ Feed 100% methanol แบบต่อเนื่องเพื่อให้ยีสต์สร้างโปรตีน (Induction phase) ควรจะรอให้ยีสต์ใช้ glycerol ในน้ำหมักจนหมดเสียก่อน (สังเกตได้จากการที่ค่า DO สูงขึ้นอย่างรวดเร็ว) จากนั้นจึงเข้าสู่ระยะการเหนี่ยวนำให้ยีสต์สร้างโปรตีนที่ต้องการ

การพัฒนาการควบคุมการป้อน Glycerol

การป้อนกลีเซอรอลจะทำโดยคำนวณปริมาณการป้อนด้วยสมการ Exponential Feed เพื่อควบคุมปริมาณความเข้มข้นเซลล์ยีสต์ให้ได้ตามที่ต้องการ โดยสมการการป้อนแสดงได้ดังนี้

$$FeedRate = \frac{\mu_{set}}{S_0 Y_{X/S}} X_0 V_0 e^{\mu_{set}(t-t_0)}$$

μ_{set} = controlled specific growth rate

$Y_{X/S}$ = yield coefficient biomass per glycerol concentration

X = biomass concentration

X_0 = biomass concentration when feed started

S_0 = glycerol concentration in feed tank

V_0 = volume of liquid when feed started

การพัฒนาโปรแกรมควบคุมการป้อน Methanol

ในส่วนของการพัฒนาโปรแกรมควบคุมการป้อน Methanol ทำได้โดยการใช้โปรแกรม Lab View ที่จะรับค่าจาก Methanol Sensor ซึ่งอ่านค่าปริมาณ methanol ในน้ำหมัก แล้วแปลงค่าที่อ่านได้เป็นค่าความเข้มข้นของ Methanol เพื่อควบคุมการป้อน methanol เข้าสู่ระบบการหมักให้เหมาะสมตามที่ต้องการ

จากการศึกษาของคณะวิจัยมหาวิทยาลัย Budapest ประเทศฮังการี พบว่าความเข้มข้นของ methanol ภายในถังหมักที่ไม่ทำให้เกิด metabolic inhibition อยู่ระหว่าง 0.45 – 8.85 g/L (Bálint Kupcsulik and Béla Sevella, 2004) ดังนั้นในงานวิจัยชิ้นนี้จะทำการทดลองโดยจะควบคุมค่าความเข้มข้นของ Methanol ให้อยู่ระหว่าง 0.45 – 8.85 g/L จากนั้นจะทำการเลือกความเข้มข้นของ methanol ที่เหมาะสมที่สุด ที่จะเหนี่ยวนำให้ยีสต์ผลิต hGH โปรตีนที่ต้องการ

การวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำหมัก

- **การหาความเข้มข้นของเซลล์ (cell dry weight)**

ตรวจวัดความเข้มข้นของเซลล์โดยใช้ตัวอย่างจากถังหมัก 1 ml ทำการปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก โดยใช้เครื่องปั่นแยก (Centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 9000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ควบคุมอุณหภูมิระหว่างการปั่นแยกที่ 4 องศาเซลเซียส ส่วนน้ำหมักที่แยกได้จะนำไปวิเคราะห์ต่อไปนำเซลล์ที่แยกได้ ล้างและปั่นแยก 2 ครั้งโดยน้ำกลั่น ทำให้เจือจางโดยการเติมน้ำกลั่นให้ความเข้มข้นเหมาะสมและตรวจวัดการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) ที่ค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เพื่อเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก จ)

- **การหาปริมาณกลีเซอรอลและเมทานอล ในน้ำหมัก**

ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณกลีเซอรอลและเมทานอลในน้ำหมักด้วยวิธีโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography, HPLC) โดยใช้คอลัมน์ Aminex HPX-87 H Column (Bio Rad) และ 0.3 mM sulfuric acid (H_2SO_4) เป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) และค่าอัตราการไหล (Flow rate) 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิระหว่างการวิเคราะห์ที่ 45 องศาเซลเซียส

- **การวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนการเจริญเติบโตของมนุษย์**

วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนจากน้ำหมักด้วยวิธี Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) โดยใช้เจล 15 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วยวิธี Western Blot โดยโปรตีนที่อยู่บนเจลจะถูกเคลื่อนย้ายมายังแผ่นไนโตรเซลลูโลส เมมเบรน (nitrocellulose membrane) โดยใช้ vertical electrophoresis unit (TE 22 Mini Transfer Tank) โปรตีนจะถูกตรึงอยู่บนแผ่นเมมเบรน โดยใช้บัฟเฟอร์ BSA/TBST 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ต่อจากนั้นล้างแผ่นเมมเบรน ด้วยบัฟเฟอร์ 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที บ่มแผ่นเมมเบรน ที่ได้ด้วย mouse anti-hGH ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างแผ่นเมมเบรนด้วยบัฟเฟอร์ 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที ตามด้วย goat-alkaline phosphatase anti-mouse IgG ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างแผ่นเมมเบรนด้วยบัฟเฟอร์ 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที ซับแผ่นเมมเบรน พอหมาด

และทำให้เห็นแถบของโปรตีนโดยย้อมด้วย 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro-blue tetrazolium (BCIP/NBT) วัดแถบโปรตีนเทียบกับค่ามาตรฐานโดยใช้เครื่องวัดความเข้มของแถบโปรตีน (densitometer)

- **การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนสุทธิ (Total Protein)**

วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนสุทธิจากน้ำหมักโดยวิธีวัดการจับกับสีคูมาสซี่ (Bradford assay) โดยผสมน้ำหมักปริมาตร 100 มิลลิลิตร กับสารละลายสี (protein dye reagent) ที่เจือจางด้วยน้ำ de-ionize อัตราส่วน 1 ต่อ 4 เท่า ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที และวัดสีที่เกิดขึ้นโดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ค่าการดูดกลืนแสง ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร เทียบปริมาณโปรตีนสุทธิที่ได้กับสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (BSA)

- **การวิเคราะห์ hGH โดยวิธีโครมาโตกราฟี**

วิเคราะห์ hGH โดยใช้โครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography, HPLC) โดยใช้คอลัมน์ Jupiter 5 u C4 ขนาด 25 cm×4.6 mm I.D., pore diameter 300 Å เฟสเคลื่อนที่ ประกอบด้วยบัฟเฟอร์ Tris-HCl 71 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้น 50 mM pH 7.5 และ n-propanol 29 เปอร์เซ็นต์ และค่าอัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิระหว่างการวิเคราะห์ที่ 45 องศาเซลเซียส

ผลการวิจัย (Results)

จากการทดลองเพาะเลี้ยงยีสต์ *Pichia pastoris* เพื่อเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีน rhGH ซึ่งเป็นโปรตีนที่น่าสนใจ โดยนำไปใช้ทางการแพทย์เพื่อการรักษาผู้ป่วย โดยงานวิจัยนี้จะเริ่มต้นโดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์ใน flask ขนาด 250 ml จนได้ปริมาณเซลล์ยีสต์ที่เข้มข้นสูง จากนั้นจะทำการถ่ายเซลล์ยีสต์ลงในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยมีปริมาตรของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์ (BSM) เริ่มต้นไม่เกิน 1 ลิตร โดยการเพาะเลี้ยงจะแบ่งเป็น 3 ระยะ ได้แก่ ระยะของการเพาะเลี้ยงแบบกะ แบบกึ่งกะ และระยะของการเหนี่ยวนำให้ยีสต์ผลิตโปรตีนที่ต้องการ

ในส่วนของการเพาะเลี้ยงแบบกะ และแบบกึ่งกะจะทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์จนได้ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นอยู่ในช่วง 100 – 150 g/L โดยใช้เทคนิคการป้อนอาหารแบบ Exponential feed ในช่วงของการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะ หลังจากได้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่ต้องการแล้วจึงทำการเหนี่ยวนำให้ยีสต์ผลิตโปรตีนที่สนใจ ซึ่งจะใช้ 100% Methanol เป็นตัวเหนี่ยวนำให้ยีสต์ผลิตโปรตีน ในงานวิจัยนี้จะทำการทดลองโดยแปรค่าความเข้มข้นของ methanol ภายในน้ำหมัก ดังนี้ 0.5, 2, 4 และ 8 g/L ตามลำดับ โดยผลการทดลองแสดงดังนี้

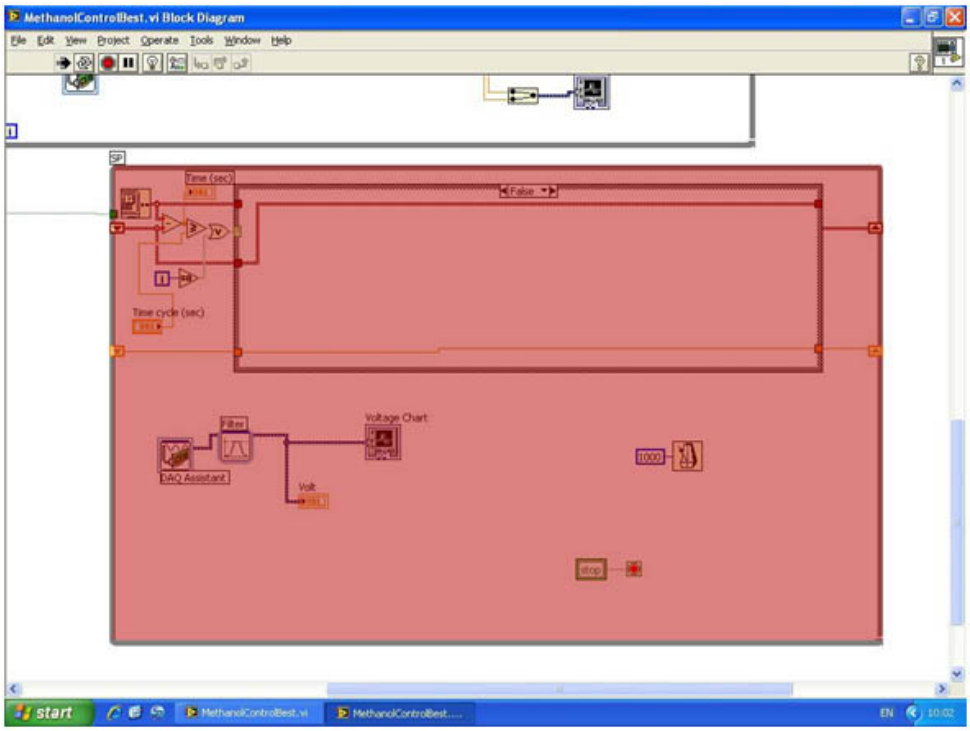
การทดลองจะทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์ใน flask จนได้ความเข้มข้นเซลล์ยีสต์ที่มากพอที่จะนำมาเพาะเลี้ยงต่อในถังหมักขนาด 2 ลิตร ซึ่งการเพาะเลี้ยงจะเริ่มต้นจากการหมักแบบกะโดยใช้ความเข้มข้น glycerol เริ่มต้น 50 g/L การเพาะเลี้ยงจะปล่อยให้ยีสต์กิน glycerol จนหมด ภายใต้การควบคุมอุณหภูมิ 30 ^{o}C pH 4.5 และปริมาณ DO (dissolve oxygen) ไม่ต่ำกว่า 20% เซลล์ยีสต์จะเพิ่มจำนวนเป็น 30 g/L หลังจากนั้นจะทำการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะ ซึ่งจะป้อน 50% glycerol การป้อน glycerol จะป้อนโดยใช้เทคนิคการป้อนแบบ exponential feed จนได้เซลล์ยีสต์ที่มีความเข้มข้นประมาณ 150 g/L หลังจากเพาะเลี้ยงยีสต์จนได้ความเข้มข้นที่ต้องการแล้ว จะทำการเหนี่ยวนำให้ยีสต์ผลิตโปรตีน (Induction) ด้วยการป้อน 100% Methanol ลงในถังหมัก ในการทดลองนี้จะควบคุมความเข้มข้นของ Methanol ภายในถังหมักไม่เกิน 0.5 g/L ซึ่งจะควบคุมโดยใช้ Methanol Sensor เป็นเครื่องมือในการตรวจวัดปริมาณ methanol ในถังหมัก และควบคุมการป้อน methanol โดยใช้โปรแกรม Lab View การควบคุมการป้อน methanol ในถังหมักแสดงดังรูป

การควบคุมการป้อน Methanol online โดยใช้โปรแกรมควบคุมโดยการรับข้อมูลจาก Methanol Sensor จากนั้นจะส่งข้อมูลมาประมวลผลในโปรแกรมควบคุมเพื่อป้อนสารละลาย Methanol ลงในถังหมัก และควบคุมปริมาณความเข้มข้น Methanol ในถังหมักแสดงดังรูปที่ 1

โดยการป้อน Methanol เพื่อเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนที่ต้องการจะป้อนตั้งแต่ช่วงเวลาที่ 100 ถึง 180 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงด้วยปริมาณความเข้มข้นเซลล์ยีสต์เริ่มต้น 150 g/L ซึ่งการป้อน 100% Methanol ลงในน้ำหมักต้องมีช่วงเวลาที่ทำให้เซลล์ยีสต์ปรับตัว ด้วยการเติม methanol 4 g/L แล้วทิ้งช่วงไว้ 4 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์ยีสต์ปรับตัว หลังจากผ่านไป 4 ชั่วโมงแล้ว จะเข้าสู่ระยะเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนที่ต้องการ (induction phase) โดยการป้อน methanolอย่างต่อเนื่อง และควบคุมปริมาณ methanol ในน้ำหมักไม่ให้เกิน 0.5 g/L เมื่อทำการป้อน methanol ลงในน้ำหมักแล้วปริมาณความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์ในถังหมักลดลง และเพิ่มขึ้นจนได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 180 g/L ในขณะเดียวกันปริมาณโปรตีนรวมในน้ำหมัก (Total Protein) เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จนได้ปริมาณโปรตีนรวมสุดท้ายประมาณ 1.2 g/L

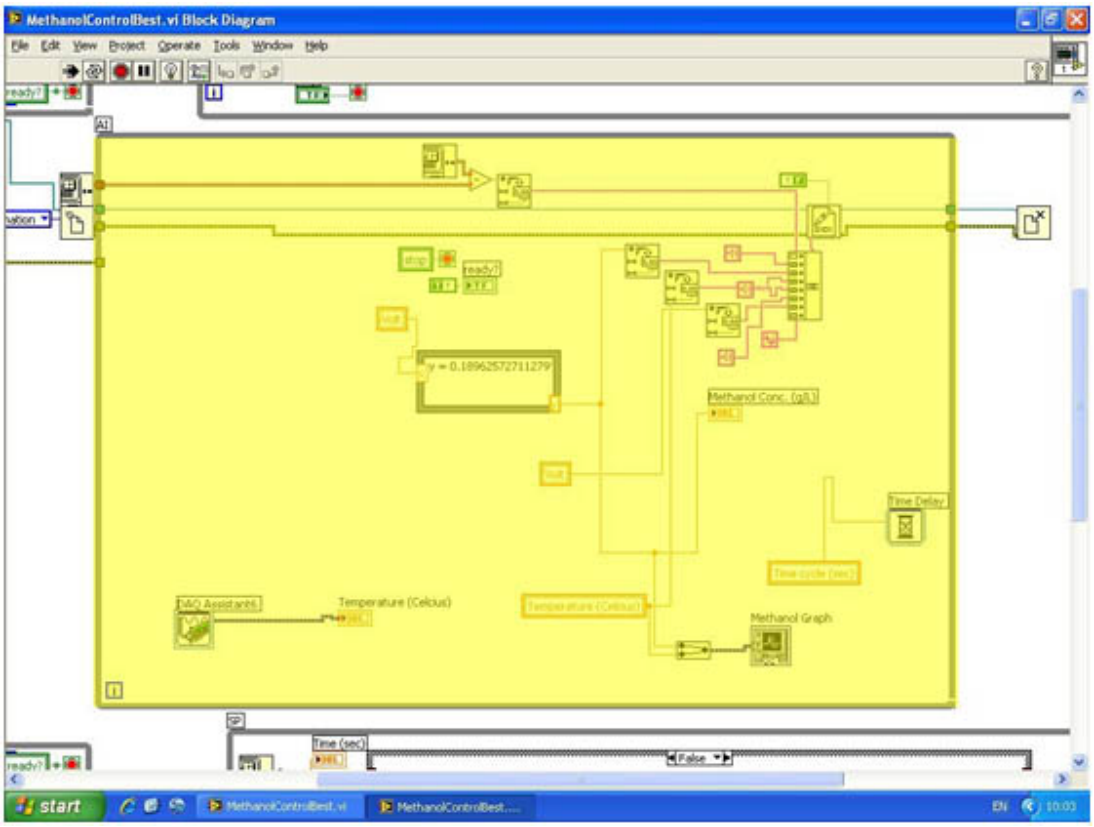
การควบคุมโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำหรับป้อน Methanol ในกระบวนการเหนี่ยวนำยีสต์ให้ผลิตโปรตีน

1. โปรแกรมรับค่าสัญญาณไฟฟ้าเป็น volt จากเครื่อง methanol sensor โดยรอบเวลาในการรับค่าขึ้นอยู่กับ response time ของเครื่อง methanol sensor ซึ่งจะอยู่ในช่วง 3-5 นาที โดยโปรแกรมสามารถปรับค่า Sample Rate (ค่าในการเก็บตัวอย่างเป็นวินาที) ได้ 180-300 วินาที ดัง รูป code ที่ได้ทำ Highlight สีแดงข้างล่างนี้



รูปที่ 4 แสดงโปรแกรมรับค่าสัญญาณไฟฟ้าเป็น volt จากเครื่อง methanol sensor

2. เมื่อโปรแกรมรับค่า Volt แล้วจะแปลงค่าที่ได้ให้อยู่ในรูปความเข้มข้นเมทานอลเป็น g/L ดังรูป code ที่ highlight สีเหลือง



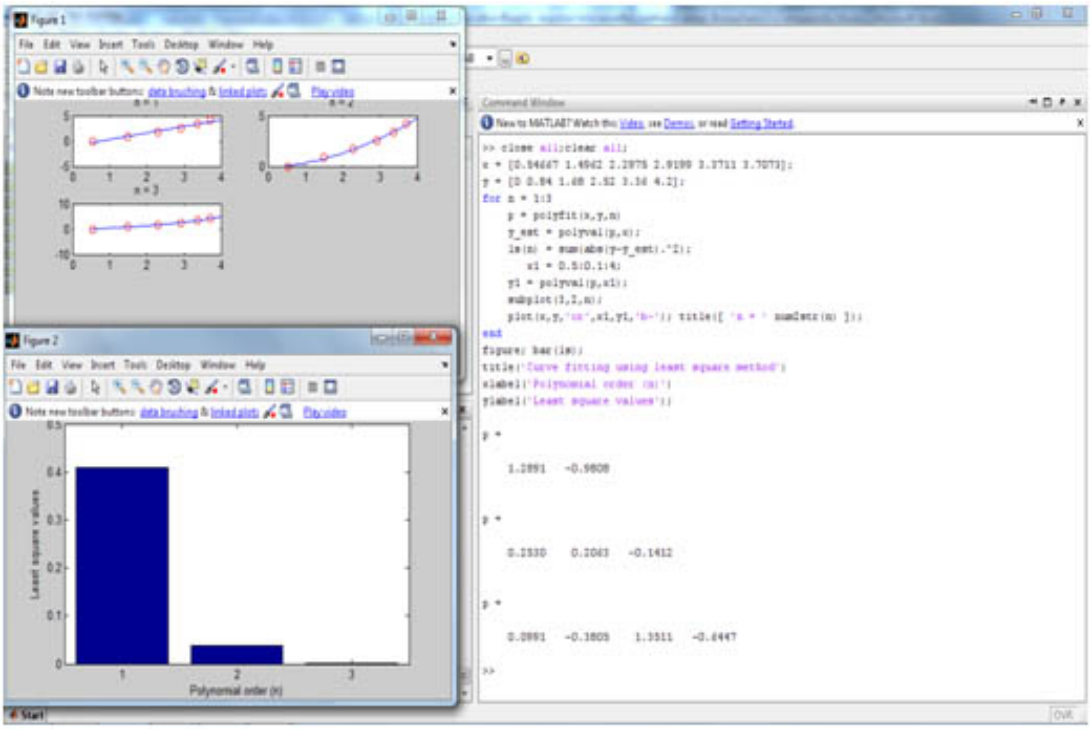
รูปที่ 5 แสดงโปรแกรมแปลงค่าที่ได้ให้อยู่ในรูปความเข้มข้นเมทานอลเป็น g/L

โดยใช้สมการ Polynomial คือ $y=ax^{n+1}+bx^{n}+c$

ตัว x คือสัญญาณ Volt

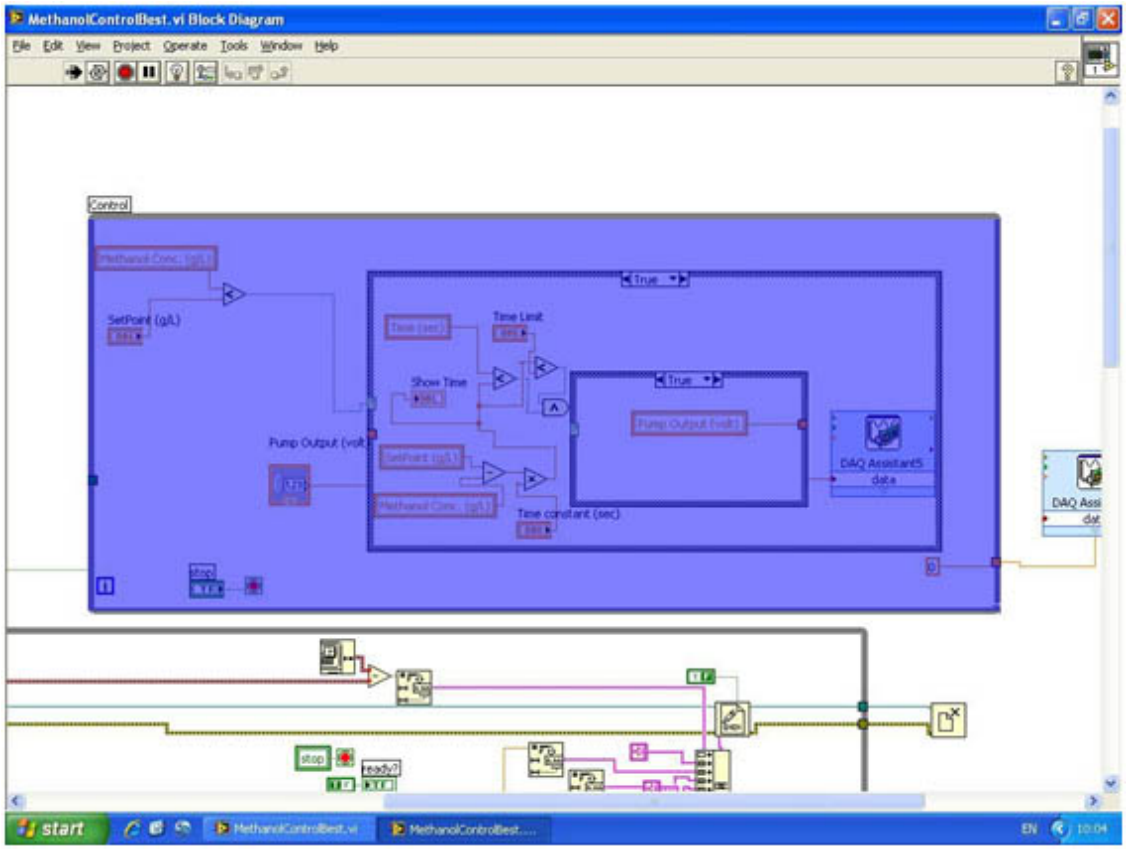
y คือความเข้มข้น methanol (g/L)

สมการ Polynomial ได้มาจากการทำ calibration กับ HPLC แล้วใช้ฟังค์ชั่น Poly-fit ของโปรแกรม MATLAB fit curve ดังรูปข้างล่างนี้

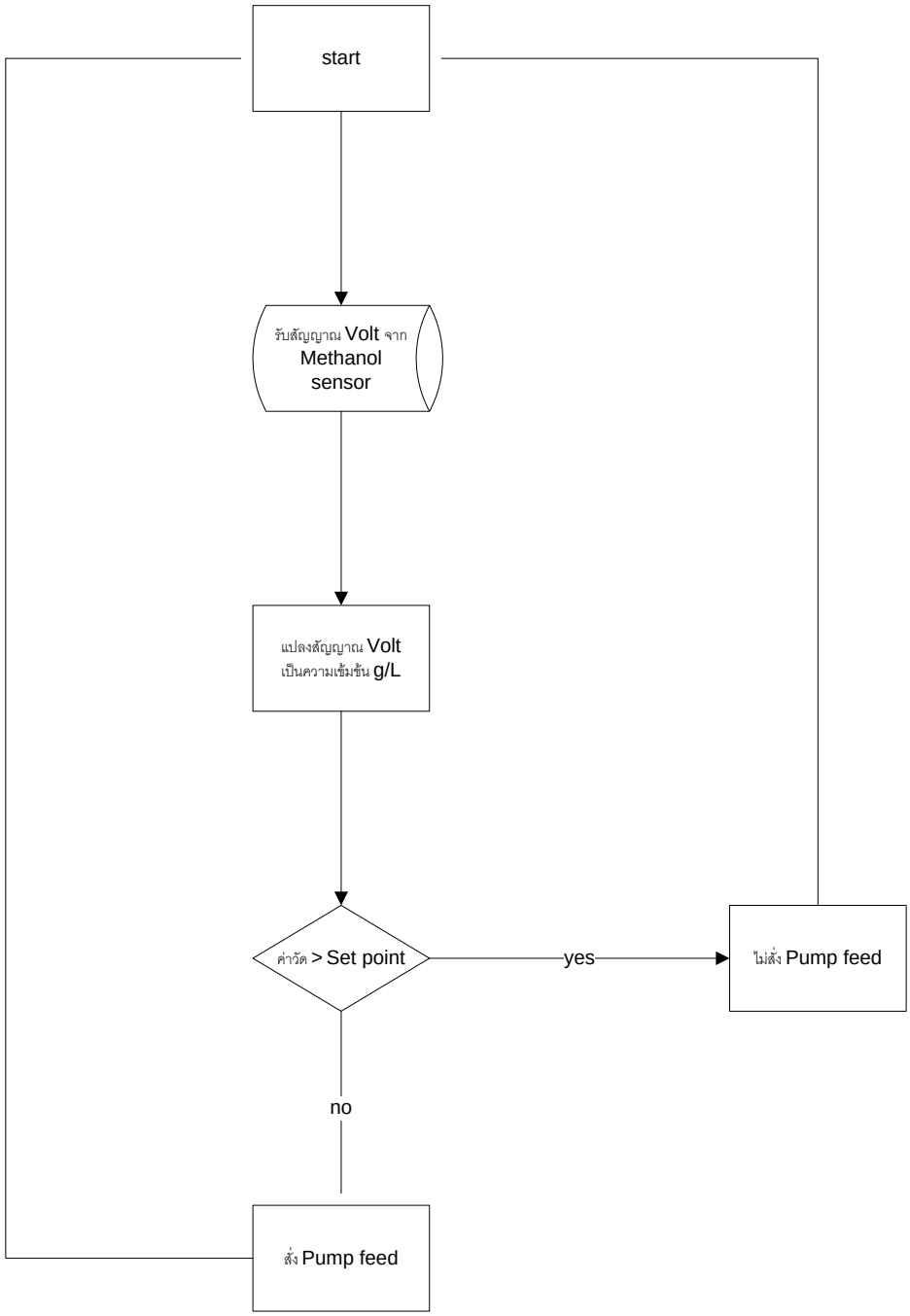


รูปที่6 สมการ Polynomial ได้มาจากการทำ calibration กับ HPLC

3. ค่าสัญญาณ methanol ที่แปลงอยู่ในรูปความเข้มข้น g/L จะนำไปเปรียบเทียบกับ set point ถ้าค่าต่ำกว่า set point โปรแกรมจะสั่งให้ pump feed methanol ลงไปในถังหมัก โดยปริมาณ ที่ feed methanol ลงไป มาจากการเทียบว่าค่าห่างจาก set point อยู่กี่ g/L เช่น ค่าวัดได้ 3 g/L แต่ set point เป็น 4 g/L แสดงว่าค่าห่างอยู่ g/L pump จะต้อง feed ลงไป 1 g/L ซึ่ง pump ได้ทำการ Calibrate มาก่อนเรียบร้อยแล้ว รูป code ส่วนควบคุม pump ดังรูป code ที่ highlight สีน้ำเงิน



รูปที่7 แสดงรายละเอียดโปรแกรม Code ส่วนควบคุม pump



<u>รูปที่8</u> แสดงรายละเอียด Flow Chart ของโปรแกรมควบคุม Methanol Online

ผลของการศึกษาความเข้มข้นของเซลล์ก่อนเข้าสู่ระยะเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีน

การทดลองเริ่มต้นโดยเลี้ยง *Pichia pastoris* ในฟลาสก์ขนาด 250 ml โดยใช้อาหาร basal salt medium ปรับ pH 4 โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 30°C ที่ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 7-14 วัน สุ่มตัวอย่างเพื่อวัดค่า optical density (OD) ให้ได้ประมาณ 6 ที่ความเข้มแสงของเครื่อง spectrophotometer 600 nm หลังจากนั้นนำเชื้อที่เพาะในฟลาสก์ถ่ายลงสู่ถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่มีอาหาร basal salt medium ซึ่งปริมาณ medium เริ่มต้นเป็น 1 ลิตร

กระบวนการหมักแบ่งออกเป็น 3 ระยะ ได้แก่ ระยะหมักแบบกะ (Batch phase) โดยใช้ glycerol ความเข้มข้นเริ่มต้นประมาณ 40 g/l ตามด้วยระยะการหมักแบบกึ่งกะ (Fed-Batch phase) และระยะเหนี่ยวนำด้วยการ feed 50% methanol แบบต่อเนื่องเพื่อให้ยีสต์สร้างโปรตีน (Induction phase) สำหรับการเพาะเลี้ยงในระยะหมักแบบกะ และกึ่งกะได้ควบคุมสภาวะการเลี้ยงไว้อย่างคงที่ โดยควบคุม อุณหภูมิที่ 30°C ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ pH 5 ความเร็วรอบใบกวนเริ่มต้นที่ 600 ค่าการให้อากาศ Air flow rate เป็น 2 vvm และค่าการละลายออกซิเจนในน้ำ (Disslove oxygen; DO) 20% ซงการควบคุมค่า DO นี้จะตั้งการควบคุมโดยการควบคุมค่าความเร็วรอบใบกวนและค่า Air flow rate เมื่อค่าการละลายออกซิเจนในน้ำต่ำกว่า 20% controller จะสั่งให้ใบพัดทำงานในรอบการกวนที่สูงขึ้น เพื่อเพิ่มปริมาณออกซิเจนในน้ำจนกระทั่งการทำงานถึงขีดสุด (Maximum stirrer speed) ถ้าการละลายออกซิเจนในน้ำยังไม่เพียงพอจะเพิ่มอากาศเข้ามาในระบบ จากนั้นจะนำก๊าซออกซิเจน 99.5% เข้ามาผสมในอัตราส่วน 50:50 เพื่อรักษาระดับค่าการละลายออกซิเจนในน้ำให้เป็นไปตามที่ต้องการ ในช่วงการหมักแบบกะจะทำการป้อนสารอาหาร (glycerol) โดยใช้สมการการป้อนแบบ exponential เพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์เข้มข้นสูง (high cell density cultivation) และลดการสะสมของ by-product ที่ไม่ต้องการ (Valentinotti, 2003) จากการใช้วิธีการนี้จะทำให้ได้ปริมาณเซลล์เข้มข้นสูงได้ถึง 200 g DW/l (Nimmararairat, 2004)

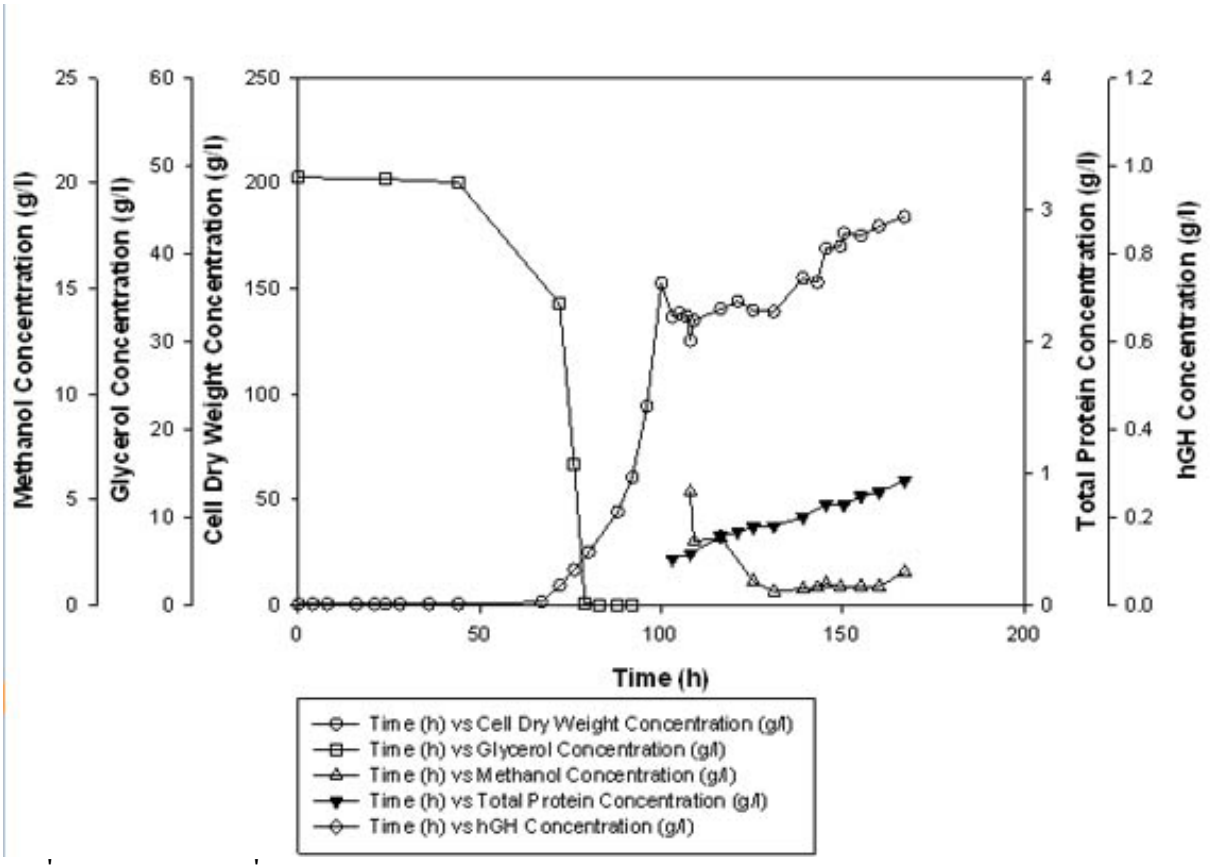
ผลการทดลองเมื่อควบคุมความเข้มข้น Methanol ในถังหมัก 0.5 g/L

การทดลองที่ 1 จะควบคุมความเข้มข้น Methanol ในน้ำหมักไม่เกิน 0.5 g/L ในระยะการเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีน เริ่มต้นทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์ใน flask จนได้ความเข้มข้นเซลล์ยีสต์ที่มากพอที่จะนำมาเพาะเลี้ยงต่อในถังหมักขนาด 2 ลิตร ซึ่งการเพาะเลี้ยงจะเริ่มต้นจากการหมักแบบกะโดยใช้ความเข้มข้น glycerol เริ่มต้น 50

g/L การเพาะเลี้ยงจะปล่อยให้ยีสต์ใช้ glycerol จนหมด ภายใต้การควบคุมอุณหภูมิ 30°C pH 4.5 และปริมาณ DO (dissolve oxygen) ไม่ต่ำกว่า 20% เซลล์ยีสต์จะเพิ่มจำนวนเป็น 25-30 g/L หลังจากนั้นจะทำการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะ ซึ่งจะป้อน 50% glycerol การป้อน glycerol จะป้อนโดยใช้เทคนิคการป้อนแบบ exponential feed จนได้เซลล์ยีสต์ที่มีความเข้มข้นประมาณ 120-150 g/L

หลังจากเพาะเลี้ยงยีสต์จนได้ความเข้มข้นที่ต้องการแล้ว จะทำการเหนี่ยวนำให้ยีสต์ผลิตโปรตีน (Induction) ด้วยการป้อน 100% Methanol ลงในถังหมัก ก่อนการป้อนจะต้อง calibrate สายป้อนสารอาหารเพื่อคำนวนปริมาณสารอาหารที่ต้องใช้ในการป้อนเข้าสู่ระบบ โดยในการทดลองนี้จะควบคุมความเข้มข้นของ Methanol ภายในถังหมักไม่เกิน 2 g/L ซึ่งจะควบคุมโดยใช้ Methanol Sensor เป็นเครื่องมือในการตรวจวัดปริมาณ methanol ในถังหมัก และควบคุมการป้อน methanol โดยใช้โปรแกรม Lab View การควบคุมการป้อน methanol ในถังหมักโดยการป้อน Methanol เพื่อเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนที่ต้องการจะป้อนตั้งแต่ช่วงเวลาที่ 100 ถึง 150 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงด้วยปริมาณความเข้มข้นเซลล์ยีสต์เริ่มต้น 120 - 150 g/L โดยค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นเซลล์ยีสต์ตลอดช่วงการเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนคือ 170.8371 g/L หลังจากได้ปริมาณความเข้มข้นยีสต์ที่ต้องการแล้ว จะทำการป้อน 100% Methanol ในถังหมักเพื่อเหนี่ยวนำให้ยิสต์ผลิตโปรตีน ซึ่งการป้อน 100% Methanol ลงในน้ำหมักต้องมีช่วงเวลาที่ทำให้เซลล์ยีสต์ปรับตัว ด้วยการเติม methanol 4 g/L แล้วทิ้งช่วงไว้ 4 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์ยีสต์ปรับตัว

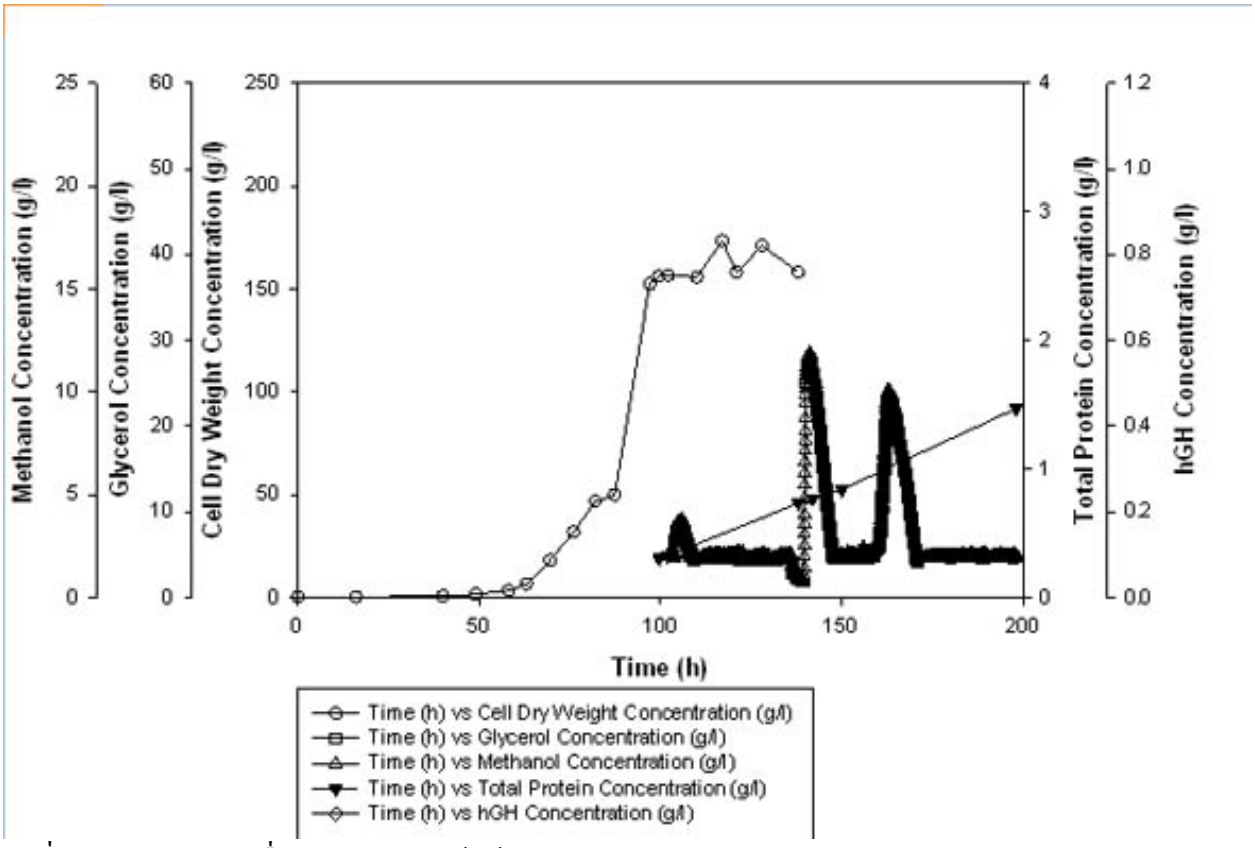
หลังจากผ่านไป 4 ชั่วโมงแล้ว จะเข้าสู่ระยะเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนที่ต้องการ (induction phase) โดยการป้อน methanolอย่างต่อเนื่อง และควบคุมปริมาณ methanol ในน้ำหมักไม่ให้เกิน 0.5 g/L เมื่อทำการป้อน methanol ลงในน้ำหมักแล้วปริมาณความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์ในถังหมักลดลง และเพิ่มขึ้นจนได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 170 g/L ในขณะเดียวกันปริมาณโปรตีนรวมในน้ำหมัก (Total Protein) เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จนได้ปริมาณโปรตีนรวมสูงสุดประมาณ 0.9468 g/L



รูปที่9 ผลการทดลองเมื่อควบคุมความเข้มข้นในถังหมัก 0.5 g/L

ผลการทดลองเมื่อควบคุมความเข้มข้น Methanol ในถังหมัก 2 g/L

การทดลองที่ 2 จะควบคุมความเข้มข้น Methanol ในน้ำหมักไม่เกิน 2 g/L ในระยะการเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนเริ่มต้นทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์ใน flask จนได้ความเข้มข้นเซลล์ยีสต์ที่มากพอที่จะนำมาเพาะเลี้ยงต่อในถังหมักขนาด 2 ลิตร ซึ่งการเพาะเลี้ยงจะเริ่มต้นจากการหมักแบบกะโดยใช้ความเข้มข้น glycerol เริ่มต้น 50 g/L การเพาะเลี้ยงจะปล่อยให้ยีสต์ใช้ glycerol จนหมด ภายใต้การควบคุมอุณหภูมิ 30^{o}C pH 4.5 และปริมาณ DO (dissolve oxygen) ไม่ต่ำกว่า 20% เซลล์ยีสต์จะเพิ่มจำนวนเป็น 25-30 g/L หลังจากนั้นจะทำการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะ ซึ่งจะป้อน 50% glycerol การป้อน glycerol จะป้อนโดยใช้เทคนิคการป้อนแบบ exponential feed จนได้เซลล์ยีสต์ที่มีความเข้มข้นประมาณ 120-150 g/L



รูปที่10 ผลการทดลองเมื่อควบคุมความเข้มข้นในถังหมัก 2 g/L

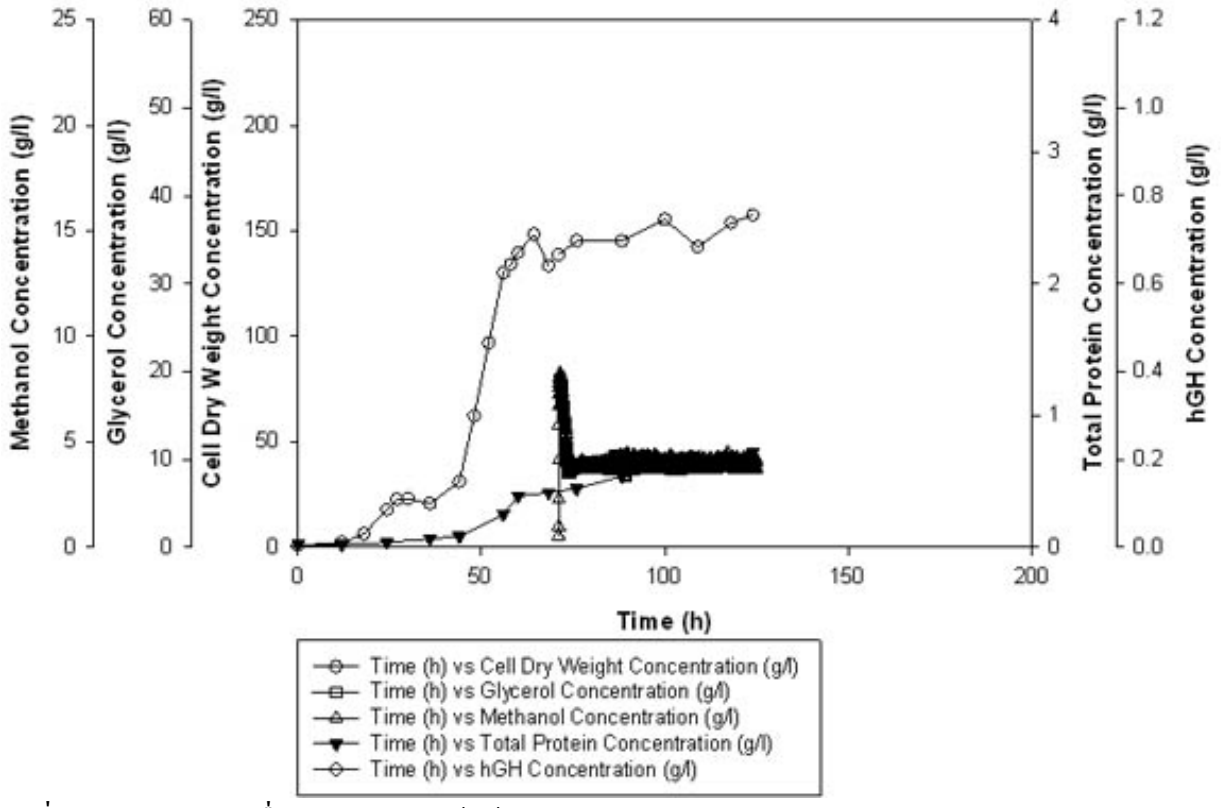
หลังจากเพาะเลี้ยงยีสต์จนได้ความเข้มข้นที่ต้องการแล้ว จะทำการเหนี่ยวนำให้ยีสต์ผลิตโปรตีน (Induction) ด้วยการป้อน 100% Methanol ลงในถังหมัก ก่อนการป้อนจะต้อง calibrate สายป้อนสารอาหารเพื่อคำนวนปริมาณสารอาหารที่ต้องใช้ในการป้อนเข้าสู่ระบบ โดยในการทดลองนี้จะควบคุมความเข้มข้นของ Methanol ภายในถังหมักไม่เกิน 2 g/L ซึ่งจะควบคุมโดยใช้ Methanol Sensor เป็นเครื่องมือในการตรวจวัดปริมาณ methanol ในถังหมัก และควบคุมการป้อน methanol โดยใช้โปรแกรม Lab View การควบคุมการป้อน methanol ในถังหมักโดยการป้อน Methanol เพื่อเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนที่ต้องการจะป้อนตั้งแต่ช่วงเวลาที่ 100 ถึง 150 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงด้วยปริมาณความเข้มข้นเซลล์ยีสต์เริ่มต้น 120 - 150 g/L ซึ่งการป้อน 100% Methanol ลงในน้ำหมักต้องมีช่วงเวลาที่ทำให้เซลล์ยีสต์ปรับตัว ด้วยการเติม methanol 4 g/L แล้วทิ้งช่วงไว้ 4 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์ยีสต์ปรับตัว

หลังจากผ่านไป 4 ชั่วโมงแล้ว จะเข้าสู่ระยะเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนที่ต้องการ (induction phase) โดยการป้อน methanolอย่างต่อเนื่อง และควบคุมปริมาณ methanol ในน้ำหมักไม่ให้เกิน 2 g/L เมื่อทำการป้อน methanol ลงในน้ำหมักแล้วปริมาณความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์ในถังหมักลดลง และเพิ่มขึ้นจนได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 160

g/L ในขณะเดียวกันปริมาณโปรตีนรวมในน้ำหมัก (Total Protein) เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จนได้ปริมาณโปรตีนรวมสูงสุดประมาณ 1.5 g/L

ผลการทดลองเมื่อควบคุมความเข้มข้น Methanol ในถังหมัก 4 g/L

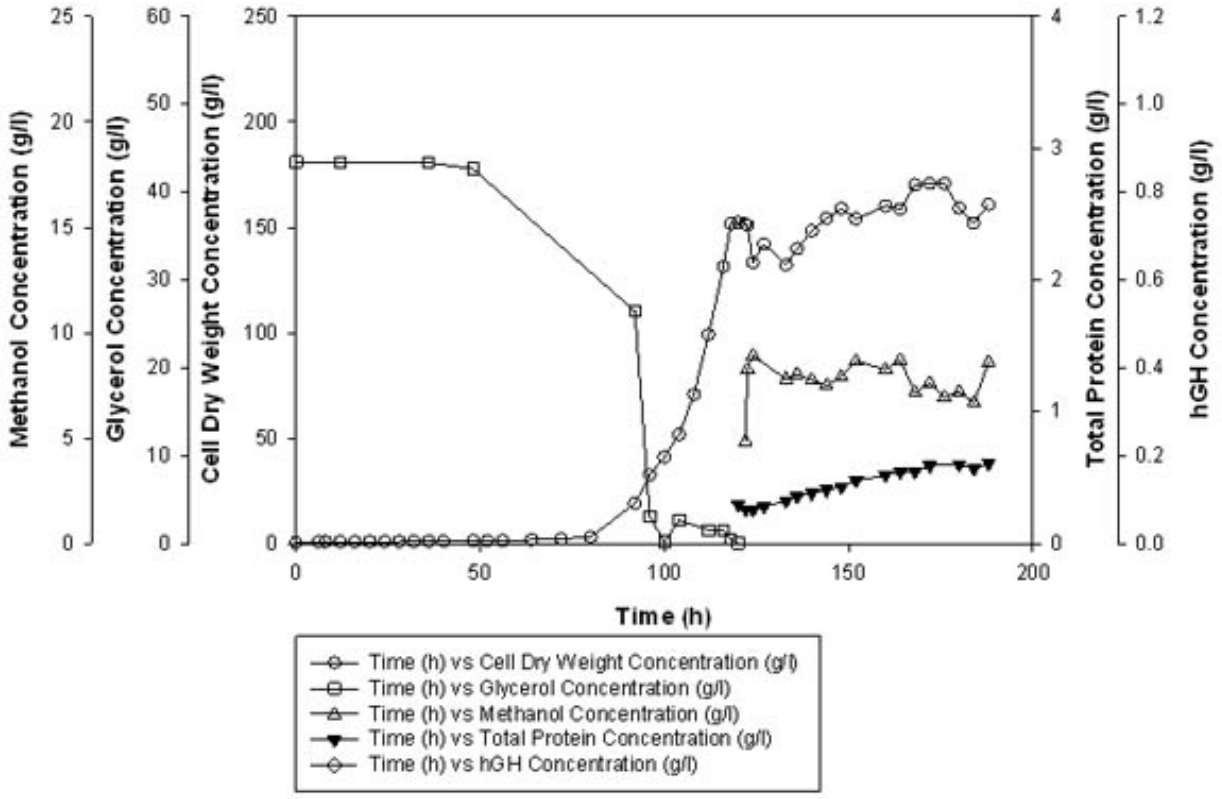
การทดลองที่ 3 จะควบคุมความเข้มข้น Methanol ในน้ำหมักไม่เกิน 4 g/L ในระยะการเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนเริ่มต้นทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์ใน flask จนได้ความเข้มข้นเซลล์ยีสต์ที่มากพอที่จะนำมาเพาะเลี้ยงต่อในถังหมักขนาด 2 ลิตร ซึ่งการเพาะเลี้ยงจะเริ่มต้นจากการหมักแบบกะโดยใช้ความเข้มข้น glycerol เริ่มต้น 50 g/L การเพาะเลี้ยงจะปล่อยให้ยีสต์ใช้ glycerol จนหมด ภายใต้การควบคุมอุณหภูมิ 30°C pH 4.5 และปริมาณ DO (dissolve oxygen) ไม่ต่ำกว่า 20% เซลล์ยีสต์จะเพิ่มจำนวนเป็น 25-30 g/L หลังจากนั้นจะทำการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะ ซึ่งจะป้อน 50% glycerol การป้อน glycerol จะป้อนโดยใช้เทคนิคการป้อนแบบ exponential feed จนได้เซลล์ยีสต์ที่มีความเข้มข้นประมาณ 120-150 g/L



รูปที่11 ผลการทดลองเมื่อควบคุมความเข้มข้นในถังหมัก 4 g/L

การทดลองนี้จะได้ปริมาณโปรตีนรวม 0.719378 g/L โดยการป้อนเมทานอลจะทำการเหนี่ยวนำในช่วงความเข้มข้นเซลล์ยีสต์เริ่มต้นที่ 138.70 g/L

ผลการทดลองเมื่อควบคุมความเข้มข้น Methanol ในถังหมัก 8 g/L



รูปที่12 ผลการทดลองเมื่อควบคุมความเข้มข้นในถังหมัก 8 g/L

การทดลองที่ 3 จะควบคุมความเข้มข้น Methanol ในน้ำหมักไม่เกิน 8 g/L ในระยะการเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนเริ่มต้นทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์ใน flask จนได้ความเข้มข้นเซลล์ยีสต์ที่มากพอที่จะนำมาเพาะเลี้ยงต่อในถังหมักขนาด 2 ลิตร ซึ่งการเพาะเลี้ยงจะเริ่มต้นจากการหมักแบบกะโดยใช้ความเข้มข้น glycerol เริ่มต้น 50 g/L การเพาะเลี้ยงจะปล่อยให้ยีสต์ใช้ glycerol จนหมด ภายใต้การควบคุมอุณหภูมิ 30°C pH 4.5 และปริมาณ DO (dissolve oxygen) ไม่ต่ำกว่า 20% เซลล์ยีสต์จะเพิ่มจำนวนเป็น 25-30 g/L หลังจากนั้นจะทำการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะ ซึ่งจะป้อน 50% glycerol การป้อน glycerol จะป้อนโดยใช้เทคนิคการป้อนแบบ exponential feed จนได้

เซลล์ยีสต์ที่มีความเข้มข้นประมาณ 136.61 g/L ซึ่งใช้เวลาในการเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีน 66 ชั่วโมง โดยได้ความเข้มข้นโปรตีนรวมที่ประมาณ 0.610 g/L

เปรียบเทียบการใช้ Methanol ในแต่ละสภาวะการทดลองในถังหมักขนาด 2 ลิตร

ตารางที่ 1 แสดงผลการเปรียบเทียบปริมาณการใช้ Methanol ในแต่ละสภาวะการทดลอง (ในถังหมักขนาด 2 ลิตร)

รายละเอียด	ความเข้มข้น MeOH ที่ควบคุม (g/L)			
	0.5	2	4	8
ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นก่อน induction (g/L)	151.43	171	138.7	136.61
ความเข้มข้นเซลล์เฉลี่ยในช่วง induction (g/L)	170.8371	164.54	166.2711	163.4106
ระยะเหนี่ยวนำ (hour)	64	68	64	66
อัตราการบริโภค Methanol [g-met/g-cell*hour]	0.033	0.033	0.033	0.033
ปริมาณ Methanol ที่ถูกใช้ (gram)	360.81	369.23	351.16	355.91

จากข้อมูลในตารางที่ 1 จะคำนวนจากอัตราการบริโภค Methanol ที่ 0.033 [g-met/g-cell*hour] ผลการคำนวนแสดงดังตาราง ได้แก่ เมื่อควบคุมความเข้มข้น methanol ที่ 0.5, 2, 4 และ 8 g/L จะใช้ Methanol ไป 360.81, 369.23, 351.16 และ 355.91 g ตามลำดับ จะสังเกตเห็นว่าปริมาณการใช้ Methanol แต่ละการทดลองไม่แตกต่างกันมาก

เปรียบเทียบผลการทดลองแต่ละสภาวะของการควบคุมความเข้มข้น Methanol ในถังหมักขนาด 2 ลิตร

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบการทดลองทั้ง 4 Batch โดยการควบควบความเข้มข้นเมทานอลในถังหมักที่ต่างกัน

รายละเอียด	ความเข้มข้น MeOH ที่ควบคุม (g/L)			
	0.5	2	4	8
ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นก่อน induction (g/L)	151.43	171.00	138.70	136.61
ความเข้มข้นเซลล์เฉลี่ยในช่วง induction (g/L)	170.8371	164.54	166.2711	163.4106
ความเข้มข้นโปรตีนรวม Total Protein (g/L)	0.946895	1.102	0.719378	0.610
ระยะเหนี่ยวนำ (hour)	64	68	64	66
อัตราส่วนโปรตีนรวม/ความเข้มข้นเซลล์เฉลี่ย	0.0055	0.0067	0.0043	0.0037
อัตราส่วนโปรตีนรวม/ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นก่อน induction	0.0063	0.0064	0.0052	0.0045

จากการทดลองทั้ง 4 Batch โดยความคุมความเข้มข้นเมททานอลในน้ำหมักที่ 0.5, 2, 4 และ 8 g/L โดยในแต่ละการทดลองจะควบคุมปริมาณความเข้มข้นเซลล์ยีสต์เริ่มต้นก่อนเข้าสู่ระยะเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนที่ 120 – 170 g/L หลังจากสิ้นสุดการหมักจะได้โปรตีนรวมในช่วง 600 – 1,100 mg/L เมื่อหาอัตราส่วนของโปรตีนรวมต่อความเข้มข้นเซลล์ยีสต์เฉลี่ยพบว่า การหมักโดยควบคุมความเข้มข้นเมททานอลในถังหมักที่ 2 g/L มีค่าสูงสุดคือ 0.0067 และอัตราส่วนโปรตีนรวมต่อความเข้มข้นเมททานอลที่ถูกควบคุมในถังหมักที่ 8 g/L มีค่าต่ำที่สุดคือ 0.0037 เมื่อพิจารณาอัตราส่วนโปรตีนรวมต่อความเข้มข้นเซลล์ยีสต์เริ่มต้นก่อนเข้าสู่ Induction phase มีค่าสูงสุดที่ 0.0064 ในการทดลองที่ความคุมความเข้มข้น methanol ในถังหมักที่ 2 g/L และอัตราส่วนของโปรตีนรวมต่อความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นก่อนเข้าสู่ Induction phase มีค่าน้อยที่สุดคือ 0.0045 ในการทดลองที่ควบคุมความเข้มข้น methanol ไม่เกิน 8 g/L

สรุปและเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นต่อไป ตลอดจนประโยชน์ในทางประยุกต์ของผลการวิจัยที่ได้

จากผลการทดลองขั้นต้นแสดงให้เห็นว่าการควบคุมความเข้มข้นของ Methanol ในถังหมักที่ 2 g/L จะให้ปริมาณโปรตีนรวมสูงสุด และเมื่อเทียบอัตราส่วนของโปรตีนรวมกับค่าเฉลี่ยความเข้มข้นเซลล์ยีสต์ในระยะเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีน รวมทั้งเทียบอัตราส่วนของโปรตีนรวมกับความเข้มข้นเริ่มต้นของเซลล์ยีสต์ก่อนเข้าสู่ระยะเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีน ก็มีอัตราส่วนที่สูงสุด จากผลการทดลองดังกล่าวจึงเพียงพอที่จะสรุปได้ว่าการผลิตโปรตีนโดยควบคุมการป้อน Methanol โดยใช้ระบบ Methanol Online Program สามารถผลิตโปรตีนรวมได้มากกว่า 1,000 mg และสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการควบคุมความเข้มข้น Methanol คือการควบคุมปริมาณความเข้มข้น Methanol ในถังหมักที่ 2 g/L

อย่างไรก็ตามเราสามารถพัฒนาการควบคุมปริมาณความเข้มข้นของ Methanol ในถังหมักได้ในระดับ Pilot scale ซึ่งจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตโปรตีนที่เราสนใจได้ดียิ่งขึ้น โดยทีมวิจัยจะทำการพัฒนากระบวนการควบคุมในงานวิจัยชิ้นต่อไป

บรรณานุกรม (Bibliography)

Ashok, K., Patra, R., Mukhopadhyay, R., Anuja, K., and Amulya, K., 2000, "Optimization of Inclusion Body Solubilization and Renaturation of Recombinant Human Growth Hormone from *Escherichia coli* " , Protein Expression and Purification, Vol. 18, pp. 182-190.

Cereghino, J.L. and Cregg, J.M., 2000, Heterologous Protein Production in *Pichia pastoris*, **FEMS Microbiology Review**, Vol. 15, pp. 621-627.

Creg, J.M., Cereghino, L., Shi, J., Higgins D.R., 2000, "Recombinant Protein Expression in *Pichia pastoris*" **Molecular Biotechnology**, Vol. 16, pp. 23-52.

d'Anjou, M.C. and Daugulis, A.J., 2000, "Mixed-Feed Exponential Feeding for Fed-Batch Culture of Recombinant Methylotrophic Yeast", **Biotechnology Letters**, Vol. 22, pp. 341-346.

Eurwilaichitr, L., Roytrakul, S., Suprasongsin, C. and Panyim, S., 2001, "Expression and secretion of a synthetic human growth hormone in *Pichia pastoris*" In **the symposium on Physiology of yeasts and filamentous fungi**, 5-8 July 2001, Hindsgavl castle, Denmark.

Faber, K.N., Harder, W., Ab, G., Veenhuis, M. 1995, "Reveiw: Methylotrophic Yeasts as Factories for the Production of Foreign Protein." **Yeast**, Vol. 11, pp. 1331-1344.

Gerngross, T.U., 2004 "Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi", Nature Biotechnology, Vol.22, No.11,pp.1409-1414.

Gellissen G et al. (2005) New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and dimorphic *Arxula adeninivorans* and *Yarrowia lipolytica*– a comparison. FEMS Yeast Res. 5, 1079-1096.

Holmquist, M., Tssier, D.C. and Cygler, M., 1997, "High-level production of recombinant *Geotrichum candidum* lipases in yeast *Pichia pastoris*", **Protein Expression Purification**, Vol. 11, pp. 35-40.

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

Jahic, M., 2003, **Process Techniques for Production of Recombinant Proteins with *Pichia pastoris***, M.Sc, Royal Institute of Technology, department of biotechnology, Kungl Tekniska Högskolan**.**

Jennifer E. Kalish, Christiane Theda, James C. Morrell, Jeremy M. Berg, and Stephen J.Gould, 1995, "Formation of the Peroxisome Lumen Is Abolished by Loss of *Pichia pastoris* Pas7p, a Zinc-Binding Integral Membrane Protein of the Peroxisome", **Molecular and Cellular Biology**, pp. 6406–6419.

Kang, H.A., Choi, E.-S., Hong, W.-K., Kim, J.-Y., Ko, S.-M., Sohn, J.-H. and Rhee, S.K., 2000, "proteolytic stability of recombinant human serum albumin secreted in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*", **Apply Microbiology Biotechnology**, Vol. 53, 575-582.

Kobayashi, K., Kuwae, S., Ohya, T., Ohda, T., Ohyama, M., Ohi, H., Tomomitsu, K. and Ohmura, T., 2000, "High-Level Expression of Recombinant Human Serum Albumin from the Methylotrophic Yeast *Pichia pastoris* with Minimal Protease Production and Activation", Journal of Bioscience and Biotechnology, Vol. 89, pp. 55-61.

Lefort, S. and Ferrara, P., 1986, "Hydrophobic Adsorbants for the Isolation and Purification of Biosynthetic Human Growth Hormone from Crude Fermentation Mixture", **Chromatography**, Vol. 361, pp. 209-216.

Thipayarat, A., 2002, "Production of human serum albumin by immobilized yeast", Ph.D. Dissertation, Syracuse University, Syracuse, NY.

Trinh, L.B., Phue, J.N. and Shiloach, J., 2003, "Effect of Methanol Feeding Strategies on Production and Yield of Recombinant Mouse Endostatin from *Pichia pastoris*", **Biotechnology Bioengineering**, Vol. 82, pp. 438-444.

ประวัติคณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

1.ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) ผศ.ดร. อนันต์ ทองทา

(ภาษาอังกฤษ) Assistant Professor Anan Tongta

2.เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 1005 03240 29 3

3.ตำแหน่งปัจจุบัน : ผู้ช่วยศาสตราจารย์

4.หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)

คณะทรัพยากรชีวภาพ และเทคโนโลยี สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (บางขุนเทียน)

83 หมู่ 8 ถนนบางขุนเทียนชายทะเล แขวงท่าข้าม เขตบางขุนเทียน กรุงเทพฯ 10150

หมายเลขโทรศัพท์ (02)-452 3456

e-mail: a_tongta@yahoo.com, anan.ton@kmutt.ac.th

5.ประวัติการศึกษา

คุณวุฒิ	ปี พ.ศ.ที่จบ	ชื่อสถานที่ศึกษา
Ph.D. (Chemical Engineering)	2538	University of Missouri-Rolla, Rolla, Missouri, USA
M.S. (Chemical Engineering)	2536	University of Missouri-Rolla, Rolla, Missouri, USA
B.Sc. (Chemical Engineering)	2532	จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

6.สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

Biochemical/Bioprocess Engineering

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย

7.1.ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ชื่อแผนงานวิจัย -

7.2.หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย

1. Development of the Production Process of Human Growth Hormone (hGH) using *Pichia pastoris* in Laboratory Scale and in 15 L Bioreactor.

2. Software Sensor for Control and Optimization of Bioprocess.

3. A Mathematical Model of an Amperometric Enzyme Biosensor for the Determination of Glucose Concentration, submitted to National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), Thailand, August 1997.

4. Mathematical Modeling of Heat Generated from Banana Respiration, submitted to National Energy Policy Office (NEPO), January 2000.

5. Development of Solid State Fermentation using Rotating Drum Bioreactor submitted to National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), Thailand, September 2003.

7.3.งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน (อาจมากกว่า 1 เรื่อง)

A. Tongta, A.I. Liapis, D.J.Siehr, Equilibrium and Kinetic Parameters of the Adsorption of Alpha-Chymotrypsinogen A onto Hydrophobic Porous Adsorbent Particles, J. Chromatogr. A, 686 (1994) 21-29.

A.I. Liapis, Y. Xu, O.K. Crosser, and A. Tongta, “Perfusion Chromatography”: The Effects of Intra-Particle Convective Velocity and Microsphere Size on Column Performance, J. Chromatogr. A, 702 (1995) 45-57

A.I. Liapis, A. Tongta, and O.K. Crosser. Finite Bath Affinity Adsorption of Adsorbates into Spherical Porous Particles: Parameter Estimation in the Laplace Transform Domain, Accepted for Publication in Mathematical Modelling and Scientific Computing, September, 1995.

A. Tongta, A.I. Liapis, and S. Hagen, Synthesis of Anion Exchange Adsorbent Particles by Surface Functionalization of Polystyrene-Divinylbenzene Based Spherical Porous Matrices, Separations Technology, 6 (1996) 77-89.

M. Somasundrum, A. Tongta, M. Tanticharoen, and K. Kirtikara, A Kinetic Model for the Reduction of Enzyme-generated H2O2 at a Metal-dispersed Conducting Polymer Film, Journal of Electroanalytical Chemistry 440 (1997) 259-264

Michell, D.A., Tongta, A., Stuart, D.M., and Krieger, N., 2002, "The Potential for Establishment of Axial Temperature Profiles during Solid-State Fermentation in Rotating Drum Bioreactors", Biotechnology and Bioengineering, Vol. 80, No. 1, pp. 114-122.

Tongta. A. Software Sensor for Monitoring of Bioreactor, accepted for publication in Thai Journal of Biotechnology.

Tongta, A., Nopharatana, M., Saartrat, S., and Sukumprasertsri, M. Production of Feed Supplement from Soy Bean Pulp by *Aspergillus oryzae*, accepted for publication in Thai Journal of Biotechnology.

Tongta, A., Nopharatana, M., Chanatrutipun, W., and Rakmae, S. Production of Amylase and Protease by Solid State Fermentation of *Aspergillus oryzae* Using Tray and Pilot Scale Rotating Drum Bioreactor, submitted for publication.

Srimarut, Y., Tongta, A., Nopharatana, M., Smitinont, T., and Valyasevi, R. Modeling the Effect of Temperature on Growth and Substrate Utilization of Lactobacillus plantarum in Simulated Thai Fermented Sausage, submitted for publication.

7.4.งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัยว่าได้ทำการวิจัยลุล่วงแล้วประมาณร้อยละเท่าใด

1. Development of the Production Process of Human Growth Hormone (hGH) using *Pichia pastoris* in Laboratory Scale and in 15 L Bioreactor: (Principle Investigator): BIOTEC/GPO: 2004-2007, 90%.

2. Software Sensor for Control and Optimization of Bioprocess (Principle Investigator): BIOTEC: 2003-2007, 95%.

3. The Fermentation Rate and Production of Metabolite Compounds during the Fermentation of Cultured Nham (Co-investigator) (phase II) BIOTEC: 2007-2008, 10%.

ประวัติผู้ร่วมวิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นาย นาง นางสาว ยศ
   นาย นิวัฒน์ ชนะสุทธิประภา
   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr, Mrs, Miss, Rank
   Mr. Niwat Chanasutthiprapa
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน
   3 1015 02096 82 3
3. ตำแหน่งปัจจุบัน
   วิศวกร
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)
   สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (บางขุนเทียน) : 83 หมู่ 8 แขวงท่าข้าม, เขตบางขุนเทียน, กรุงเทพฯ 10150
   โทร.02-4523456 โทรสาร.02-4523455

5. ประวัติการศึกษา

- วิศวกรรมศาสตร์บัณฑิต วิศวกรรมเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- วิศวกรรมศาสตร์มหาบัณฑิต วิศวกรรมเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
   วิศวกรรมชีวเคมี

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละผลงานวิจัย

   ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ชื่อแผนงานวิจัย

   หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย

   งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน (อาจมากกว่า 1 เรื่อง)

   งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัยว่าได้ทำการวิจัยลุล่วงแล้วประมาณร้อยละเท่าใด

Online Methanol Monitor and Control Feeding Strategy for Production of Recombinant Human Growth Hormone (hGH) Produced from Recombinant *Pichia pastoris*, *2008 - 2009*

แหล่งทุน: ทุน ว.1

ทำวิจัยไปแล้ว 50%

ประวัติผู้ร่วมวิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นาย นาง นางสาว ยศ
   นาย คณิต นิมมาลัยรัตน์
   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr, Mrs, Miss, Rank
   Mr. Kanit Nimmarrairat
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน
   3 1012 01405 08 8
3. ตำแหน่งปัจจุบัน
   ผู้ช่วยนักวิจัย

4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)

   ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

   113 อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย ถนนพหลโยธิน ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

   โทรศัพท์ 02-4707563 โทรสาร 02-4523455

5. ประวัติการศึกษา

- วิทยาศาสตร์บัณฑิต จุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
- วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต เทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

   เทคโนโลยีชีวภาพ

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละผลงานวิจัย

   ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ชื่อแผนงานวิจัย

   หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย

   งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน (อาจมากกว่า 1 เรื่อง)

   งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัยว่าได้ทำการวิจัยลุล่วงแล้วประมาณร้อยละเท่าใด

Development and optimization of therapeutic protein production process by recombinant *Pichia pastoris*: human growth hormone production, *2006 -Present*

แหล่งทุน: องค์การเภสัชกรรม

ทำวิจัยไปแล้ว 90%

Development of a Chromatographic Process for Purification of Recombinant Human Growth Hormone Produced from Recombinant *Pichia pastoris*, *2007 - 2008*.

แหล่งทุน: ทุน ว.1

ทำวิจัยไปแล้ว 90%

Development of a Chromatographic Process for Purification of Recombinant Human Serum Albumin (HAS) Produced from Recombinant *Pichia pastoris*, *2007 - 2008*.

แหล่งทุน: ทุน ว.1

ทำวิจัยไปแล้ว 90%