# **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

**บรรณานุกรม (Bibliography)** 38

**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)

$\mu_{set}$ = 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