

รหัสโครงการ SUT3-304-46-24-23



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนในถังหมัก

**The Study for Optimum Production Conditions  
of Recombinant Proteins in Bioreactor**

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก  
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT3-304-46-24-23



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนในถังหมัก

**The Study for Optimum Production Conditions  
of Recombinant Proteins in Bioreactor**

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มาริษา เกตุทัต-คาร์นส์

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นครราชสีมา 30000

ผู้ร่วมวิจัย

นายเทพปัญญา เจริญรัตน์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2546-2547

กันยายน 2549

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของชุดโครงการวิจัยโปรตีน ซึ่งได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประจำปีงบประมาณ 2545-2547

ผู้วิจัยขอขอบคุณ The Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden (KTH) ที่ได้ อนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการในการทำการผลิตเอนไซม์

ผู้วิจัยขอขอบคุณ รศ. ดร. เจมส์ เกตุทัต-คาร์นส์ และ Prof. Sven-Olof Enfors ที่ให้ คำปรึกษา แนะนำการทำงาน อีกทั้งให้การสนับสนุนสารเคมีและห้องปฏิบัติการในการดำเนินงาน ส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ศ. ดร. นันทกร บุญเกิด ผู้อำนวยการชุดโครงการวิจัยโปรตีนที่ได้ให้ความ อนุเคราะห์และประสานงานชุดโครงการ

คณะผู้วิจัย

## บทคัดย่อ

รีคอมบิแนนท์โปรตีน หมายถึง โปรตีนที่สร้างขึ้นในสิ่งมีชีวิตอื่นที่ไม่ใช่ต้นกำเนิดของโปรตีนนั้นๆ ทั้งนี้ ในปัจจุบันเทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องกับการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนเป็นอีกกลุ่มงานวิจัยที่ได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก เนื่องจากความต้องการใช้โปรตีนชนิดต่างๆ ทั้งในระดับงานวิจัยและระดับอุตสาหกรรมมีแนวโน้มสูงขึ้น โดยยีสต์ *Pichia pastoris* เป็นเซลล์เจ้าบ้านที่ได้รับการรายงานอย่างกว้างขวางว่ามีประสิทธิภาพในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนจาก *P. pastoris* ในถังหมัก โดยใช้เอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสเป็นโปรตีนต้นแบบ

ในขั้นต้นของโครงการวิจัย ได้ทำการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสด้วยกระบวนการหมักแบบ batch พบว่าพีเอชต่ำกว่า 5.0 จะทำให้ทั้งอัตราการเติบโตและการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสต่ำ โดยค่าพีเอชในช่วง 5.0-5.25 เป็นช่วงพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสมากที่สุด และเมื่อทำการเพิ่มพีเอชจนถึง 5.5 มีผลทำให้อัตราการเติบโตสูงขึ้น ในขณะที่อัตราการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสลดลง ดังนั้น จึงเลือกใช้พีเอชในช่วง 5.0-5.25 ในการศึกษาการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสด้วยกระบวนการหมักแบบกึ่งกะ อย่างง่าย พบว่าเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักความเข้มข้นของเซลล์และเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสสูงกว่ากระบวนการหมักแบบกะ 1.6 และ 4 เท่า ตามลำดับ

สำหรับการพัฒนากระบวนการหมักสู่กระบวนการหมักแบบกึ่งกะ ที่ใช้ระบบควบคุมการเติมสารอาหารแบบย้อนกลับ เมื่อสิ้นสุดการหมักทำให้ความหนาแน่นของเซลล์ และเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสมีค่าสูงกว่ากระบวนการหมักแบบกะ ประมาณ 6-7 เท่า และ 85-95 เท่า ตามลำดับ เนื่องจากระบบที่ใช้ควบคุมการเติมสารอาหารที่ใช้ในงานวิจัยนี้มี 2 ระบบ คือ Methanol limited fed-batch (MLFB) และ Oxygen limited fed-batch (OLFB) เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของทั้งสองกระบวนการ พบว่ากระบวนการแบบ OLFB เป็นกระบวนการที่สามารถประยุกต์ใช้ในการเพิ่มอัตราการถ่ายเทออกซิเจน โดยส่งผลให้ปริมาณเมธานอลที่ใช้ไปทั้งหมด ปริมาณเซลล์และเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสที่ผลิตได้ มีค่าสูงกว่ากระบวนการแบบ MLFB ทั้งนี้ไม่พบว่าสภาวะจำกัดออกซิเจนในกระบวนการแบบ OLFB จะทำให้ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตลดลง หรือมีการสร้าง by-product ดังนั้น กระบวนการแบบ OLFB จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดย *P. pastoris*

## Abstract

Recombinant protein is a protein which produced in other organism (host) than that-of its origin. Now a day, recombinant protein technology has high impact because the increase amount and type of protein required for both research and industrial uses. *Pichia pastoris* has been reported as an effective host for recombinant protein production. Thus this work focused on optimizing the condition for production of recombinant protein by *P. pastoris* in fermenter. Thai Rosewood  $\beta$ -glucosidase was used as the model protein.

At the beginning, the optimum pH for production of  $\beta$ -glucosidase was studied in batch fermentation technique. The optimum cultivation pH was found to be between 5.0 and 5.25. When the cultivation pH increased to 5.5, cell growth rate increased but  $\beta$ -glucosidase production rate-decreased. When the cultivation pH was lower than 5.0, both the cell growth rate and the  $\beta$ -glucosidase production rate decreased. Therefore, the pH in the range of 5.0-5.25 was chosen for  $\beta$ -glucosidase production in the simple fed-batch culture. The final cell density and  $\beta$ -glucosidase concentration were higher 1.6 and 4 times than in the batch culture.

The fed-batch fermentation with feedback regulation was developed. The results showed about 6-7 times higher cell density and 85-95 times higher  $\beta$ -glucosidase concentration compared to batch culture. Two feedback regulation techniques, methanol limited fed-batch (MLFB) and oxygen limited fed-batch (OLFB), were applied for the production of  $\beta$ -glucosidase by *P. pastoris*, and the efficiency of them were compared. The OLFB-technique was used to increase the oxygen transfer rate. This technique gave rise to higher methanol uptake, cell density and  $\beta$ -glucosidase concentration compared to the standard MLFB technique. Furthermore, the oxygen limitation in OLFB technique did not affect the cell viability nor generated any major by-product. Thus, OLFB technique can be used as an alternative technique for recombinant protein production by *P. pastoris*.

## สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	I
บทคัดย่อ.....	II
Abstract.....	III
สารบัญ.....	IV
สารบัญตาราง.....	V
สารบัญรูปภาพ.....	VI
สารบัญคำย่อ.....	VII
บทที่ 1: บทนำ.....	1
บทที่ 2: งานวิจัยส่วนที่ 1 อิทธิพลของพีเอชต่อการเติบโตและการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน โดย <i>P. pastoris</i> .....	6
บทที่ 3: งานวิจัยส่วนที่ 2 กระบวนการหมักแบบกึ่งกะ อย่างง่าย สำหรับการผลิตรีคอม บิแนนท์โปรตีน โดย <i>P. pastoris</i> .....	11
บทที่ 4: งานวิจัยส่วนที่ 3 การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน โดย <i>P. pastoris</i> ในถังหมักขนาด 10 ลิตร ด้วยกระบวนการหมักแบบกึ่งกะ ที่ใช้ระบบควบคุมการเติมสารอาหารแบบ ย้อนกลับ.....	16
บทที่ 5: บทสรุปและข้อเสนอแนะ.....	26
บรรณานุกรม.....	28
ภาคผนวก.....	31
ภาคผนวก ก ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ Thai Journal of Biotechnology.....	32
ภาคผนวก ข ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ Bioprocess Biosystem Engineering.....	38
ประวัตินักวิจัย.....	45

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	กระบวนการเพาะเลี้ยง <i>P. pastoris</i> แบบกะ.....	7
3.1	กระบวนการเพาะเลี้ยง <i>P. pastoris</i> แบบกึ่งกะ โดยใช้การเติมสารอาหารอย่างง่าย	12
3.2	ค่าจลนพลศาสตร์ของกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะ โดยใช้ระบบเติมสารอาหารอย่างง่าย ที่จำนวนครั้งของการเติมเมธานอลต่างๆ.....	14

## สารบัญภาพ

รูปภาพที่	หน้า
2.1 ผลของกระบวนการหมัก ในกระบวนการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส โดย <i>P. pastoris</i> ที่พีเอชต่างๆ.....	8
2.2 จลนพลศาสตร์ของกระบวนการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส โดย <i>P. pastoris</i> ที่พีเอชต่างๆ.....	9
3.1 ผลของการหมักแบบกึ่งกะ อย่างง่าย ในกระบวนการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส โดย <i>P. pastoris</i> .....	13
4.1 ระบบควบคุมการเติมเมธานอลแบบ Methanol limited fed-batch.....	18
4.2 ระบบควบคุมการเติมเมธานอลแบบ Oxygen limited fed-batch.....	18
4.3 a) รูปแบบการเติบโต, การสร้างผลิตภัณฑ์ และปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต จากกระบวนการแบบ MLFB และจากกระบวนการแบบ MLFB b) อัตราการผลิตเบต้ากลูโคซิเดสจำเพาะ ( $q_p$ ).....	19
4.4 การเปรียบเทียบ a) DOT, b) OUR, c) RRR และ d) ความเข้มข้นของเมธานอลและปริมาณเมธานอลที่ใช้ไปทั้งหมด จากกระบวนการแบบ MLFB และจากกระบวนการแบบ OLFB.....	21
4.5 สมดุลมวลของคาร์บอน จากกระบวนการแบบ MLFB และจากกระบวนการแบบ OLFB.....	22
4.6 การเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดส จากกระบวนการแบบ MLFB และจากกระบวนการแบบ OLFB.....	24
4.7 Specific activity ของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส จากกระบวนการแบบ MLFB และจากกระบวนการแบบ OLFB.....	25



## คำอธิบายสัญลักษณ์

AOX	Alcohol oxidase enzyme
<i>aox</i>	Alcohol oxidase gene
BMGY	Buffered glycerol complex medium
BMMY	Buffered methanol complex medium
cDNA	Complementary DNA
DOT	Dissolved oxygen tension
GBS	Glycerol basal salt medium
MLFB	Methanol limited fed-batch
OLFB	Oxygen limited fed-batch
OTR	Oxygen transfer rate
OUR	Oxygen uptake rate
PI	Propidium iodide
$q_p$	Specific production rate
$Q_p$	Volumetric production rate
rpm	Revolution per minute
RRR	Relative rate of respiration
vvm	Volume per volume per minute
$Y_{CO_2/s}^C$	Carbon yield coefficient of CO <sub>2</sub> from methanol
$Y_{x/s}^C$	Carbon yield coefficient of cell from methanol
Yp/s	Product yield
Yx/s	Biomass yield
$\mu$	Specific growth rate

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา

*Pichia pastoris* เป็นยีสต์ที่สามารถใช้เมธานอลเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน (methylotrophic yeast) ในสถานะที่ปราศจากสารยับยั้งการแสดงออก (repressor) ของ *aox* promoter เช่น กลีเซอรอล และกลูโคส โดย *aox* promoter ทำหน้าที่ในการควบคุมการแสดงออกของยีน *aox* ในการสร้างเอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดส (alcohol oxidase, AOX) ซึ่งเอนไซม์นี้จะทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดแรกในกระบวนการเมตาบอลิซึมของเมธานอล (Duoma et al., 1985)

ตามปกติแล้วเอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดสเป็นเอนไซม์ที่มีอัตราการเกิดปฏิกิริยาต่ำ ซึ่งยีสต์ *P. pastoris* มีการปรับตัวเพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าวโดยเพิ่มปริมาณการผลิตเอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดส ทั้งนี้พบว่าในสถานะเพาะเลี้ยงที่มีเมธานอล ปริมาณโปรตีนที่ละลายในเซลล์มากกว่า 30% คือเอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดส จากคุณสมบัติที่ยีน *aox* จะแสดงออกเป็นปริมาณมากเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีเมธานอล ยีสต์ *P. pastoris* จึงถูกพัฒนามาใช้ในการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ยีนภายใต้การควบคุมการแสดงออกของ *aox1* promoter (Couderc and Barette, 1980)

ระบบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ยีนโดยยีสต์ *P. pastoris* ภายใต้การควบคุมของ *aox1* promoter เป็นระบบที่มีการรายงานว่ามีความเหมาะสมต่อการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนเป็นอย่างมาก โดยพบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนหลายชนิดที่ไม่สามารถผลิตได้ในแบคทีเรีย, ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* หรือ เซลล์แมลง (insect cell) สามารถผลิตได้ในรูปแบบของ active protein เมื่อใช้ระบบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ยีนโดยยีสต์ *P. pastoris* (Lin Cereghino et al., 2001)

*P. pastoris* เป็นยีสต์ที่ง่ายต่อการตัดแต่งในระดับยีน และสามารถผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนได้ในปริมาณมากทั้งในรูปแบบที่สะสมผลผลิตในเซลล์ (intracellular) และปลดปล่อยผลผลิตออกสู่น้ำหมัก (extracellular) นอกจากนี้ *P. pastoris* ยังมีความสามารถในการเกิดกระบวนการ protein modification ในหลายรูปแบบ เช่น glycosylation, disulfide-bond formation และ proteolytic processing ซึ่งเป็นข้อจำกัดของระบบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ยีนใน *E. coli*

จากข้อดีของระบบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ยีนใน *P. pastoris* ทำให้ระบบนี้ได้รับความนิยมอย่างกว้างขวางในระดับงานวิจัย (Cregg et al., 2000; Lin Cereghino et al., 2001)

ในด้านการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน ถึงแม้ว่าการเพาะเลี้ยง *P. pastoris* เพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนสามารถทำได้ในฟลาสก์เขย่า อย่างไรก็ตาม มีข้อดีหลายประการของการผลิตในถังหมักที่เหนือกว่าการผลิตในฟลาสก์เขย่า คือ อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงในถังหมักเป็นอาหารสังเคราะห์ที่มีราคาถูก และไม่มีโปรตีนอื่น ทำให้ง่ายต่อการทำโปรตีนผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ นอกจากนี้ สภาพต่างๆ ในการเพาะเลี้ยงยังสามารถควบคุมได้เป็นอย่างดีในถังหมัก เช่น พีเอช, อัตราการให้อากาศ, อัตราการกวน รวมถึงอัตราการเติมสับสเตรท (Lin Cereghino et al., 2001) ทั้งนี้ มีรายงานว่า การเพาะเลี้ยง *P. pastoris* ในถังหมัก สามารถเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์จนมีค่ามากกว่า 150 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง (Jahic et al., 2003)

พบว่าในกระบวนการเพาะเลี้ยง *P. pastoris* มีพารามิเตอร์ (parameter) หลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน ตัวอย่างเช่น ความเข้มข้นของเมทานอล ปริมาณออกซิเจนละลาย (DOT) อัตราการถ่ายเทออกซิเจน อุณหภูมิ และพีเอช อย่างไรก็ตาม ในช่วงเริ่มต้นงานวิจัยในถังหมักขนาด 2 ลิตรที่ใช้ไม่สามารถควบคุมความเข้มข้นของเมทานอล และปริมาณออกซิเจนละลายได้ รวมถึงอัตราการถ่ายเทออกซิเจนที่ใช้เป็นค่าสูงที่สุดที่ถังหมักรุ่นนี้สามารถทำงานได้ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงมุ่งเน้นที่การศึกษาพีเอชที่เหมาะสมในการเลี้ยงและการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน โดย *P. pastoris* ที่ผ่านการตัดต่อยีนแล้วในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ (defined medium) โดยกระบวนการหมักแบบ batch ภายใต้สภาวะที่ควบคุมในถังหมักแบบกวน (stirred-tank bioreactor) ดังรายละเอียดใน บทที่ 2 (งานวิจัยส่วนที่ 1)

ถึงแม้ว่ากระบวนการเพาะเลี้ยงแบบ batch จะเป็นกระบวนการที่ง่ายต่อการทำงาน แต่ผลผลิตที่ได้จากกระบวนการแบบนี้มักจะต่ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ในกระบวนการที่ใช้สับสเตรทที่มีความเป็นพิษ และ/หรือ สับสเตรทที่สามารถยับยั้ง (inhibit) การสร้างผลผลิตและการเติบโตของเซลล์ เนื่องจากกระบวนการที่ใช้สับสเตรทดังกล่าวไม่สามารถใช้สับสเตรทที่ความเข้มข้นสูงได้ และกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบ batch เป็นกระบวนการที่ไม่มีการเติมสับสเตรทในระหว่างกระบวนการหมัก ทำให้ปริมาณสับสเตรททั้งหมดที่ใช้ไปมีปริมาณน้อยมากเมื่อเทียบกับกระบวนการแบบ fed-batch ที่มีการเติมสับสเตรทในระหว่างกระบวนการหมัก ทำให้ปริมาณสับสเตรทที่ใช้ไปทั้งหมดในกระบวนการหมักแบบ fed-batch มีค่าสูง ส่งผลให้ผลผลิตที่ได้สูงขึ้นด้วย ในการ

ทดลองนี้จึงทำการเพิ่มผลผลิตโดยประยุกต์ใช้กระบวนการหมักแบบ fed-batch ที่มีการเติมสับสเตรทแบบง่ายในถังหมักขนาด 2 ลิตร ดังรายละเอียดใน บทที่ 3 (งานวิจัยส่วนที่ 2)

จากการศึกษาพารามิเตอร์ที่มีผลต่อการเติบโต และสร้างผลผลิตโดยใช้กระบวนการแบบ batch ในถังหมักขนาด 2 ลิตร และการศึกษากระบวนการเพาะแบบ fed-batch ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ทำให้ได้ข้อมูลต่างๆ ที่สามารถนำมาใช้ในการเพิ่มกำลังการผลิตในถังหมักขนาดที่ใหญ่ขึ้นในถังหมัก ขนาด 10 ลิตร โดยระบบที่ใช้ในการควบคุมในถังหมักขนาด 10 ลิตร เป็นระบบที่มีความซับซ้อนมากขึ้น ซึ่งคาดว่าจะทำให้ได้อัตราการเติบโตและผลผลิตที่สูงขึ้น ดังรายละเอียดใน บทที่ 4 (งานวิจัยส่วนที่ 3)

ในงานวิจัยนี้ ได้ใช้เอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส (EC 3.2.1.21) จากต้นพุง (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre, Thai rosewood) เป็นโปรตีนต้นแบบ โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ. ดร. มรว. ชัยณัฐร สวัสดิวัฒน์ (Ketudat-Cairns et al., 2000) เอนไซม์ดังกล่าวอยู่ในกลุ่ม ไกลโคซิลไฮโดรเลส ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสอัลคิล- และอาริล-เบต้ากลูโคไซด์ รวมทั้ง ไคโตโอลิโกไซด์ และโอลิโกแซคคาไรด์ เพื่อปลดปล่อยกลูโคสและอะไกลโคน (Reese, 1977)

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนจาก *P. pastoris* ในถังหมักขนาดเล็ก
2. เพื่อเปรียบเทียบปริมาณเซลล์, โปรตีน และผลได้ (yields) จากรูปแบบการหมักที่แตกต่างกัน
3. พัฒนาระบบการหมัก และเพิ่มขนาดการผลิต โดยอาศัยข้อมูลจากวัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยข้อที่ 1. และ 2.

## 1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาสภาวะในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนจากเชื้อยีสต์ *P. pastoris* ที่ผ่านการตัดต่อขึ้นมาแล้วในถังหมักขนาดเล็ก (2 ลิตร) เพื่อให้ได้ข้อมูลปัจจัยการผลิตและรูปแบบการผลิตที่เหมาะสม และสามารถพัฒนาเพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณการผลิตในถังหมักที่มีขนาดใหญ่ขึ้นได้

## 1.4 วิธีการดำเนินการวิจัย

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเติบโตและการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน โดย *P. pastoris* ที่ผ่านการตัดต่อยีนมาแล้วในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ (defined medium) โดยกระบวนการหมักแบบ batch ภายใต้สภาวะที่ควบคุมในถังหมักแบบกวน (stirred-tank bioreactor) วิเคราะห์หาปริมาณเซลล์และโปรตีนที่ผลิตได้ เปรียบเทียบค่า volumetric rate และ specific rate ที่ได้จากสภาวะควบคุมที่แตกต่างกัน

2. ศึกษาการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน โดยกระบวนการหมักแบบ fed-batch

อาศัยข้อมูลจากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเติบโต และการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน โดย *P. pastoris* โดยกระบวนการหมักแบบ batch ในการพัฒนากระบวนการหมักสู่กระบวนการหมักแบบ fed-batch โดยใช้การเติมอาหารแบบง่าย วิเคราะห์และเปรียบเทียบปริมาณเซลล์, โปรตีน และผลได้ จากกระบวนการหมักแบบ batch และแบบ fed-batch

3. ศึกษาการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนในถังหมักขนาด 10 ลิตร โดยระบบควบคุมการเติมอาหารแบบย้อนกลับ (feed back control)

จากกระบวนการหมักแบบ fed-batch ที่ใช้การเติมอาหารแบบง่ายในถังหมักขนาดเล็ก กระบวนการหมักจะถูกพัฒนาสู่กระบวนการเติมอาหารที่ซับซ้อนขึ้น โดยใช้ระบบควบคุมการเติมอาหารแบบย้อนกลับ และจากถังหมักขนาดเล็กสู่ถังหมักขนาด 10 ลิตร

## 1.5 ประโยชน์ที่ได้รับ

1. ได้รูปแบบในการหมัก กรรมวิธีในการหมัก และสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน โดย *P. pastoris* ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อไปในการนำไปประยุกต์เป็นต้นแบบ สำหรับการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนชนิดอื่นๆ โดย *P. pastoris* ต่อไป

2. สามารถผลิตโปรตีนเบต้าแคสทินโคสิเคสที่ใช้เป็นโปรตีนต้นแบบได้ในปริมาณมาก และได้ นำโปรตีนไปทำให้บริสุทธิ์สำหรับใช้ในการศึกษาโครงสร้างของโปรตีนต่อไป

3. ได้นักวิจัยที่มีความรู้ ความสามารถ ซึ่งเป็นกำลังสำคัญในการพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีของประเทศไทยต่อไปในอนาคต

4. ได้ผลงานที่สามารถตีพิมพ์ในวารสารวิชาการที่เป็นที่ยอมรับ จากการทำวิจัยนี้ได้มีผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการภายในประเทศ 1 ครั้ง และตีพิมพ์ผลงานในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ 1 ครั้ง ดังแสดงในภาคผนวก ก-ข ยิ่งไปกว่านั้นผลของงานวิจัยนี้ยังเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับใช้ในงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ซึ่งมีการนำเสนอผลงานในที่ประชุมทั้งภายในและต่างประเทศ รวมถึงวารสารวิชาการอีกหลายฉบับ

## บทที่ 2

### งานวิจัยส่วนที่ 1

#### อิทธิพลของพีเอชต่อการเติบโต

#### และการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน โดย *Pichia pastoris*

### 2.1 อุปกรณ์และวิธีการ

#### สายพันธุ์จุลินทรีย์

สายพันธุ์จุลินทรีย์เจ้าบ้าน (host strain) ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือ *P. pastoris* สายพันธุ์ Y-11430 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก Lin Cereghino (Lin Cereghino และ Cregg, 2000) พลาสมิด pPICZαB ที่มียีนเบต้ากลูโคสิดีสจากคันทิงงูได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ. ดร. มรว. ชัยฉัตร สวัสดิวัฒน์ (Ketudat-Cairns et al., 2000) การทรานฟอร์มพลาสมิดที่มียีนเบต้ากลูโคสิดีสจากคันทิงงูเข้าสู่จีโนมของ *P. pastoris* สายพันธุ์ Y-11430 ใช้วิธีการมาตรฐานที่แนะนำใน Invitrogen manual และตรวจสอบหาเชื้อที่มีพลาสมิดโดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหารที่มี zeocin สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ได้จะสร้างผลผลิตเบต้ากลูโคสิดีสแล้วปลดปล่อยสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ (extracellular product)

#### การเตรียมกล้าเชื้อในฟลาสก์

การเตรียมกล้าเชื้อสำหรับกระบวนการหมักในถังหมักแบ่งเป็นสองขั้นตอน ขั้นตอนแรกทำการเชื้อยีสต์จากอาหารวุ้น YPD 1 โคลโณ ลงในอาหารเหลว YPD ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายลงในอาหาร glycerol basal salt พีเอช 5.0 (GBS: ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย glycerol 20.0 กรัม, 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 26.7 มิลลิลิตร, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 กรัม, CaSO<sub>4</sub> 0.93 กรัม, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 18.2 กรัม, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 14.9 กรัม, KOH 4.13 กรัม และ PTM1 trace salts (ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 6.0 กรัม, KI 0.08 กรัม, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 3.0 กรัม, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.2 กรัม, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.02 กรัม, ZnCl<sub>2</sub> 20.0 กรัม, FeCl<sub>3</sub> 13.7 กรัม, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.9 กรัม, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5.0 มิลลิลิตร และ biotin 0.2 กรัม) 4.35 มิลลิลิตร) ปริมาตร 130 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 1 ลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การศึกษาอิทธิพลของพีเอชต่อการเติบโตและการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน โดย *P. pastoris*

ถ่ายกล้าเชื้อจากฟลาสก์ทั้งหมด 150 มิลลิลิตร ลงในถังหมัก (Biostat B., B.Braun Germany) ขนาด 2 ลิตร ที่มีอาหาร GBS 1.35 ลิตร ที่มี PTM1 4.35 มิลลิลิตรต่อลิตร สภาพควบคุมในกระบวนการหมัก ได้แก่ อุณหภูมิ, พีเอช, อัตราการให้อากาศ, อัตราการกวน และการควบคุมระดับของการเกิดฟอง จะใช้ระบบควบคุมแบบอัตโนมัติ โดยใช้กรดฟอสฟอริก ( $H_3PO_4$ ) และสารละลาย NaOH 3 โมลาร์ ในการปรับพีเอช ซึ่งกระบวนการหมักแบบ batch จะแบ่งเป็น 2 ช่วง แสดงในตารางที่ 2.1

**ตารางที่ 2.1** กระบวนการเพาะเลี้ยง *P. pastoris* แบบ batch

Stage	Approximate time (h)	Mode	Substrate
1) Growth	0-18	Batch	Glycerol
2) Production	18-...	Batch	Methanol

ช่วงที่ 1 Glycerol batch phase

กระบวนการในช่วงนี้จะทำการควบคุมสถานะในกระบวนการหมักที่อุณหภูมิ 30°C, พีเอช 5.0, อัตราการให้อากาศ 1 vvm และอัตราการกวน 600 rpm โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ โดยอาศัยกระบวนการหมักแบบ batch กระบวนการในช่วงนี้จะสิ้นสุดเมื่อเชื้อยีสต์ใช้กลีเซอรอลจนหมด สังเกตได้จากการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วของ DOT โดยจะใช้เวลาประมาณ 18-24 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างทุก 2-4 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์หาความหนาแน่นของเซลล์ และกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส

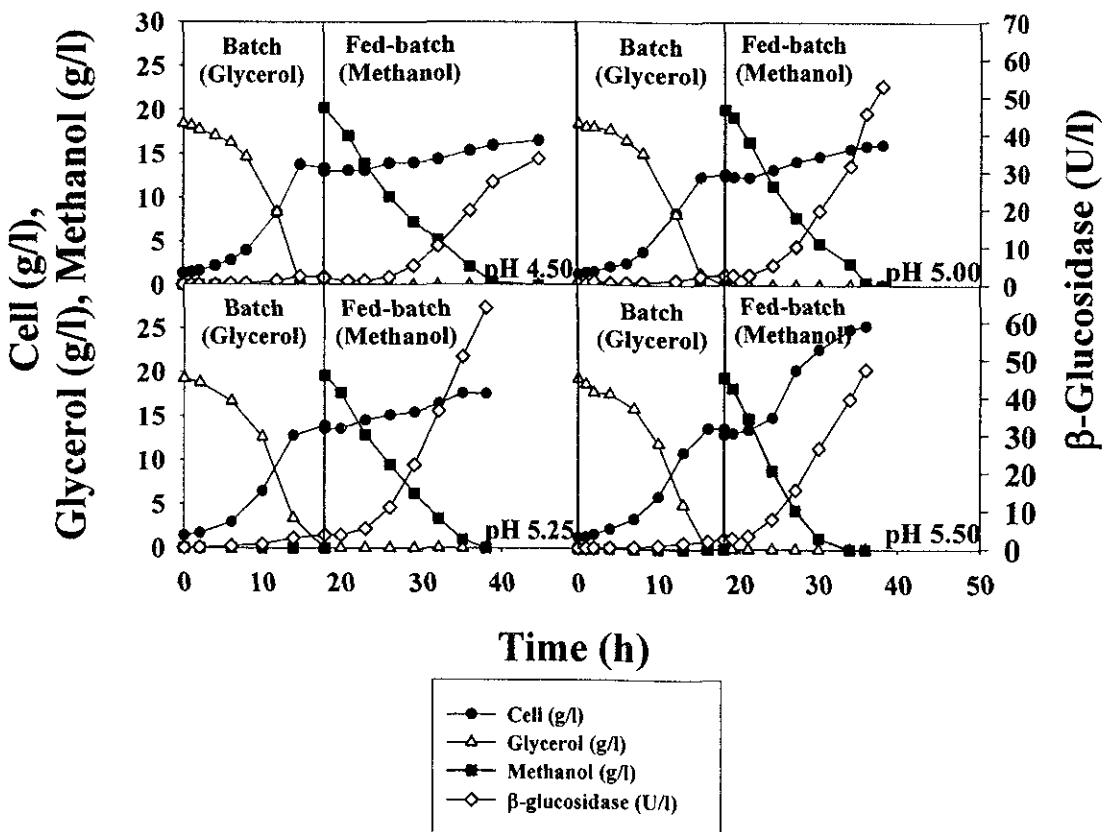
ช่วงที่ 2 Production phase

ช่วงนี้จะเริ่มต้นเมื่อสิ้นสุด glycerol batch phase โดยเติมเมธานอล 99.5% ที่มี PTM1 trace salt 12 มิลลิลิตรต่อลิตร เข้าสู่ถังหมักเพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายประมาณ 20 กรัมต่อลิตร ทำการควบคุมสถานะในกระบวนการหมักเหมือนในช่วง glycerol batch phase ยกเว้นพีเอชซึ่งเป็น parameter ที่ต้องการศึกษา จะเปลี่ยนแปลงในแต่ละการทดลอง ทั้งนี้จะทำการทดลองทั้งหมด 4 การทดลอง โดยแต่ละการทดลองทำการควบคุมพีเอชที่ 4.5, 5.0, 5.25 และ 5.5 ทำการเก็บตัวอย่างทุก 2-4 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์หาความหนาแน่นของเซลล์ และกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส



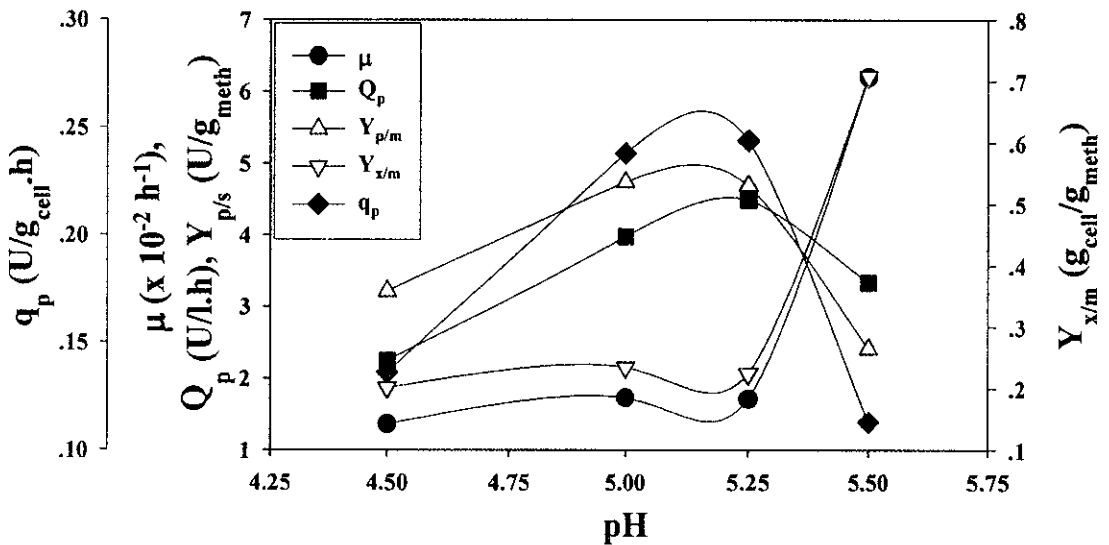
## 2.2 ผลการทดลองและวิจารณ์

เนื่องจากสภาวะควบคุมในระยะ glycerol batch phase ที่ใช้ในทุกระบวนการทดลองมีการควบคุมที่เหมือนกัน ทำให้รูปแบบการเติบโตและการใช้กลีเซอรอลของทุกระบวนการทดลองมีความคล้ายคลึงกัน ทั้งนี้พบว่า กลีเซอรอลจะถูกใช้จนหมดที่เวลาประมาณ 18 ชั่วโมง ของการหมัก เมื่อสิ้นสุดกระบวนการในระยะนี้ ความหนาแน่นของเซลล์มีค่าประมาณ 13.5 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง และพบการสะสมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสประมาณ 3 หน่วยต่อลิตร (ภาพที่ 2.1) การตรวจพบเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสในระยะที่ไม่มีการเติม inducer (เมทานอล) เป็นไปตามปรากฏการณ์ derepression (Jahic et al., 2002) กล่าวคือ จะมีการแสดงออกของ *aox1* ขึ้น ในสภาวะที่สารยับยั้งการแสดงออก (repressor) ของ *aox1* ขึ้น มีความเข้มข้นต่ำ โดยไม่จำเป็นต้องมี inducer



ภาพที่ 2.1 ผลของกระบวนการหมัก ในกระบวนการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส โดย *P. pastoris* ที่พีเอชต่างๆ

กระบวนการหมักในระยะ production phase จะเริ่มต้นหลังจากสิ้นสุดกระบวนการในระยะ glycerol batch phase โดยการเติมเมธานอลลงไปในถังหมักให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายประมาณ 20 กรัมต่อลิตร ทำการควบคุมพีเอชในกระบวนการหมักระยะนี้ในแต่ละการทดลองแตกต่างกัน คือ พีเอช 4.5, 5.0 5.25 และ 5.5 อิทธิพลของพีเอชต่อการเติบโตและการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส แสดงดังภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2.2 จลนพลศาสตร์ของกระบวนการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส โดย *P. pastoris* ที่พีเอชต่างๆ

เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก พบว่าความหนาแน่นของเซลล์ของกระบวนการในระยะนี้ ที่พีเอช 4.5, 5.0 และ 5.25 มีค่าใกล้เคียงกัน คือ ประมาณ 17 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง สำหรับการเพาะเลี้ยงที่พีเอช 5.5 มีค่าสูงกว่า คือ ประมาณ 25 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง ผลของน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้นี้สามารถอธิบายได้โดยอาศัยค่าผลได้ของเซลล์จากเมทานอล ( $Y_{x/m}$ ) (ภาพที่ 2.2) ซึ่งมีค่าประมาณ 0.22 กรัมเซลล์ต่อกรัมเมทานอล สำหรับกระบวนการที่พีเอช 4.5, 5.0 และ 5.25 และมีค่ามากกว่า (0.71 กรัมเซลล์ต่อกรัมเมทานอล) เมื่อทำการควบคุมพีเอชที่ 5.5 ยิ่งไปกว่านั้น อัตราการเติบโตจำเพาะ ( $\mu$ ) (ภาพที่ 2.2) จากการเพาะเลี้ยงที่พีเอช 4.5, 5.0 และ 5.25 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกัน เป็นค่าที่ต่ำกว่าค่าที่ได้จากกระบวนการที่พีเอช 5.5 ถึงประมาณ 4 เท่า จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าพีเอชเป็นพารามิเตอร์ที่มีผลอย่างมากต่อการเติบโตของเซลล์ ซึ่งแตกต่าง

จากการรายงานของ Chiruvolu et al. (1998) ที่กล่าวว่า พีเอชในช่วง 3.0-7.0 มีผลต่อการเติบโตของ *P. pastoris* น้อยมาก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสายพันธุ์เจ้าบ้านที่แตกต่างกัน

เมื่อพิจารณาถึงอิทธิพลของพีเอชต่อการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส พบว่าอัตราการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส ( $Q_p$ ) มีค่าต่ำเมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่พีเอช 4.5 (2.25 หน่วยต่อลิตร.ชั่วโมง) และเพิ่มเป็น 3.98 และ 5.25 หน่วยต่อลิตร.ชั่วโมง ที่พีเอช 5.0 และ 5.25 ตามลำดับ จากนั้นเมื่อพีเอชเพิ่มขึ้นจนเท่ากับ 5.5 ค่า  $Q_p$  จะลดลงอีกครั้ง (3.33 หน่วยต่อลิตร.ชั่วโมง) ทั้งนี้การลดลงของ  $Q_p$  ที่พีเอช 4.5 น่าจะเกี่ยวข้องกับความสำเร็จของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส ซึ่งอาจเสถียรภาพเมื่อพีเอชต่ำกว่า 5.0 สำหรับการลดลงของ  $Q_p$  ที่พีเอช 5.5 เป็นผลมาจากการเพิ่มขึ้นของ  $Y_{x/m}$  ทำให้อัตราส่วนของเมธานอลสำหรับการสร้างผลิตภัณฑ์ลดลง ส่งผลให้ผลได้ของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจากเมธานอล ( $Y_{p/m}$ ) มีค่าลดลง จากผลการทดลองนี้แสดงว่ากระบวนการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนเป็นกระบวนการที่มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการเติบโตต่างจากพีเอชที่เหมาะสมต่อการสร้างผลิตภัณฑ์ โดยสำหรับอัตราการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจำเพาะ ( $q_p$ ) มีแนวโน้มในทิศทางเดียวกับ  $Q_p$  (ภาพที่ 2.2)

### 2.3 วิเคราะห์และสรุปผลการทดลอง

พีเอชถือเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญยิ่งในกระบวนการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน โดย *P. pastoris* ทั้งนี้ พีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนแต่ละชนิดมีการรายงานว่ามีความต่างกัน ตัวอย่างเช่น human serum albumin เหมาะที่จะผลิตที่พีเอช 6.0 (Kobayashi et al., 2000) ในขณะที่พีเอช 3.0 เหมาะสำหรับการผลิต insulin-like growth factor-I (Brierley et al., 1994) ดังนั้น ก่อนที่จะเริ่มต้นกระบวนการหมักเพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนชนิดใดชนิดหนึ่ง จึงจำเป็นต้องศึกษาหาพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนในแต่ละชนิดของโปรตีน โดยพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสมีค่าอยู่ในช่วง 5.0-5.25

## บทที่ 3

### งานวิจัยส่วนที่ 2

#### กระบวนการหมักแบบ fed-batch อย่างง่าย

#### สำหรับการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน โดย *Pichia pastoris*

#### 3.1 อุปกรณ์และวิธีการ

##### สายพันธุ์จุลินทรีย์

สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยส่วนที่ 2 นี้ เป็นชนิดเดียวกับที่ใช้ในการศึกษาอิทธิพลของพีเอชต่อการเติบโตและการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน โดย *P. pastoris* (บทที่ 2 งานวิจัยส่วนที่ 1)

##### การเตรียมกล้าเชื้อในฟลาสก์

วิธีการเตรียมกล้าเชื้อที่ใช้ในงานวิจัยส่วนที่ 2 นี้ เป็นวิธีเดียวกับที่ใช้ในการศึกษาอิทธิพลของพีเอชต่อการเติบโตและการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน โดย *P. pastoris* (บทที่ 2 งานวิจัยส่วนที่ 1)

##### กระบวนการหมักแบบ fed-batch โดยใช้การเติมสารอาหารอย่างง่าย

จากผลการทดลองในการศึกษาอิทธิพลของพีเอชต่อการเติบโตและการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน โดย *P. pastoris* พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตรีคอมบิแนนท์เบต้ากาแลคโตสิดเอสที่สุดคือพีเอช 5.25 จึงเลือกใช้พีเอชดังกล่าวในการศึกษาการกระบวนการหมักแบบ fed-batch โดยใช้การเติมสารอาหารอย่างง่าย

ถ่ายกล้าเชื้อจากฟลาสก์ทั้งหมด 150 มิลลิลิตร ลงในถังหมัก (Biostat B., B.Braun Germany) ขนาด 2 ลิตร ที่มีอาหาร GBS 1.35 ลิตร ที่มี PTM1 4.35 มิลลิลิตรต่อลิตร สภาวะควบคุมในกระบวนการหมัก ได้แก่ อุณหภูมิ, พีเอช, อัตราการให้อากาศ, อัตราการกวน และการควบคุมระดับของการเกิดฟอง จะใช้ระบบควบคุมแบบอัตโนมัติ โดยใช้กรดฟอสฟอริก ( $H_3PO_4$ ) และ

สารละลาย NaOH 3 โมลาร์ ในการปรับพีเอช ซึ่งกระบวนการหมักแบบ fed-batch โดยใช้การเติมสารอาหารอย่างง่าย จะแบ่งเป็น 2 ช่วง แสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 กระบวนการเพาะเลี้ยง *P. pastoris* แบบ fed-batch โดยใช้การเติมสารอาหารอย่างง่าย

Stage	Approximate time (h)	Mode	Substrate
1) Growth	0-18	Batch	Glycerol
2) Fed-batch	18-...	Fed-batch	Methanol

#### ช่วงที่ 1 Glycerol batch phase

กระบวนการในช่วงนี้จะทำการควบคุมสถานะในกระบวนการหมักที่อุณหภูมิ 30°C, พีเอช 5.0, อัตราการให้อากาศ 1 vvm และอัตราการกวน 600 rpm โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ โดยอาศัยกระบวนการหมักแบบ batch กระบวนการในช่วงนี้จะสิ้นสุดเมื่อเชื้อยีสต์ใช้กลีเซอรอลจนหมด สังเกตได้จากการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วของ DOT โดยจะใช้เวลาประมาณ 18-24 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างทุก 2-4 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์หาความหนาแน่นของเซลล์ และกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส

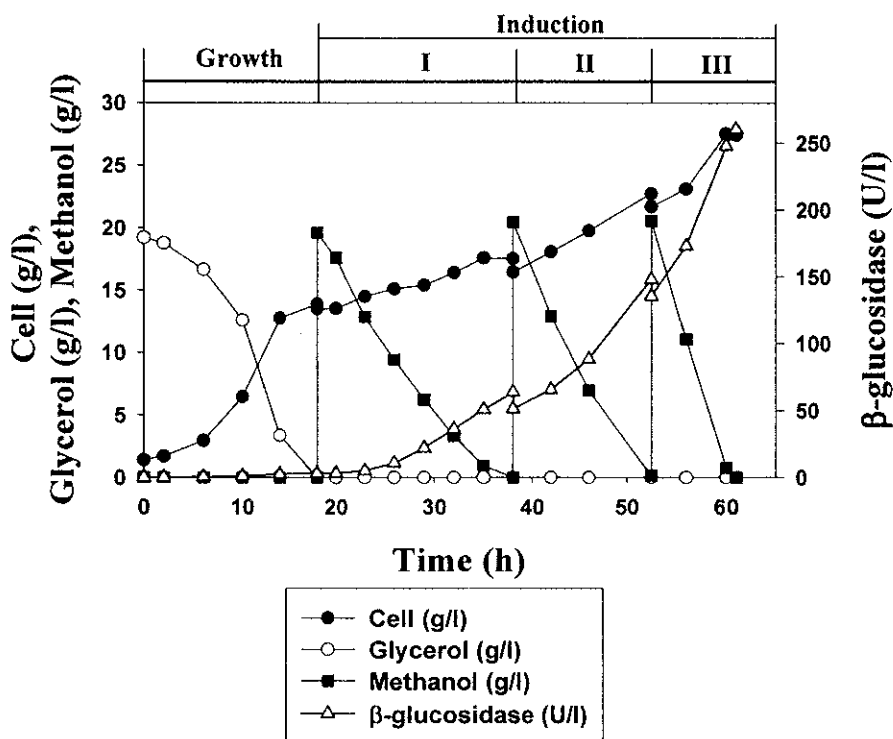
#### ช่วงที่ 2 Fed-batch production phase

ช่วงนี้จะเริ่มต้นเมื่อสิ้นสุด glycerol batch phase โดยเติมเมทานอล 99.5% ที่มี PTM1 trace salt 12 มิลลิกรัมต่อลิตร เข้าสู่ถังหมักเพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายประมาณ 20 กรัมต่อลิตร ทำการควบคุมสถานะในกระบวนการหมักเหมือนในช่วง glycerol batch phase ยกเว้นพีเอชซึ่งทำการควบคุมที่พีเอช 5.25 เมื่อเมทานอลถูกใช้จนหมดซึ่งสังเกตได้จากการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วของ DOT จึงทำการเติมเมทานอล 99.5% ที่มี PTM1 trace salt 12 มิลลิกรัมต่อลิตร เข้าสู่ถังหมักอีกครั้งเพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายประมาณ 20 กรัมต่อลิตร ดำเนินการทำลองเช่นนี้จนการเติมเมทานอลครบ 3 ครั้ง ทำการเก็บตัวอย่างทุก 2-4 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์หาความหนาแน่นของเซลล์ และกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส

### 3.2 ผลการทดลองและวิจารณ์

เนื่องจากสถานะควบคุมในระยะ glycerol batch phase ที่ใช้เหมือนกับที่ใช้ในการการศึกษาอิทธิพลของพีเอชต่อการเติบโตและการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน โดย *P. pastoris* ทำให้รูปแบบ

การเติบโตและการใช้กลีเซอรอลมีความคล้ายคลึงกัน ทั้งนี้พบว่า กลีเซอรอลจะถูกใช้จนหมดที่เวลาประมาณ 18 ชั่วโมง ของการหมัก เมื่อสิ้นสุดกระบวนการในระบายนี้นี้ ความหนาแน่นของเซลล์มีค่าประมาณ 13.5 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง และพบการสะสมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสประมาณ 3 หน่วยต่อลิตร (ภาพที่ 3.1)



ภาพที่ 3.1 ผลของการหมักแบบ fed-batch อย่างง่าย ในกระบวนการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส โดย *P. pastoris*

ในระบายนี้นี้ fed-batch production phase หลังจากทำการเติมเมธานอลครั้งที่ 1 ความเข้มข้นของเมธานอลจะลดลงอย่างช้าๆ ซึ่งใช้เวลาประมาณ 20 ชั่วโมง จึงใช้เมธานอลหมด โดยทำให้ความหนาแน่นของเซลล์เพิ่มขึ้นอีกประมาณ 4 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง และความเข้มข้นของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสเพิ่มขึ้นประมาณ 60 หน่วยต่อลิตร (ภาพที่ 3.1)

เมื่อทำการเติมเมธานอลครั้งที่ 2 และครั้งที่ 3 แนวโน้มของอัตราการใช้เมธานอลมีค่าเร็วขึ้น ซึ่งสามารถใช้เมธานอลจนหมดในเวลา 14.5 และ 8.5 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยความเข้มข้นของเซลล์และเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสเมื่อสิ้นสุดการเติมเมธานอลครั้งที่ 3 มีค่า 27.5 กรัมต่อลิตร น้ำหนัก

เซลล์แห้ง และ 260 หน่วยต่อลิตร ตามลำดับ ทั้งนี้ทำให้ได้ความหนาแน่นของเซลล์สูงกว่าการหมักแบบ batch ประมาณ 10 กรัมต่อลิตร และมีกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสมากกว่ากระบวนการแบบ batch ถึง 4 เท่า

ตารางที่ 3.2 ค่าจลนพลศาสตร์ของกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch โดยใช้ระบบเติมสารอาหารอย่างง่าย ที่จำนวนครั้งของการเติมเมธานอลต่างๆ

Parameters	Induction 1	Induction 2	Induction 3
$\mu$ ( $h^{-1}$ )	$1.707 \times 10^{-2}$	$2.229 \times 10^{-2}$	$3.203 \times 10^{-2}$
$q_p$ (U/g <sub>cell</sub> ·h)	0.244	0.278	0.377
$Q_p$ (U/l.h)	4.490	7.972	15.194

เมื่อพิจารณาอัตราการเติบโตจำเพาะ ( $\mu$ ) ของการเติมเมธานอลในแต่ละครั้ง พบว่าแนวโน้มการเติบโตของเซลล์เร็วขึ้น (ตารางที่ 3) คือ มีค่าเท่ากับ  $1.707 \times 10^{-2}$ ,  $2.229 \times 10^{-2}$  และ  $3.203 \times 10^{-2}$  ชั่วโมง<sup>-1</sup> ตามลำดับ ยิ่งไปกว่านั้น ทั้งค่าอัตราการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส ( $Q_p$ ) และค่าอัตราการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจำเพาะ ( $q_p$ ) ก็มีแนวโน้มสูงขึ้นด้วย โดยพบว่าค่า  $q_p$  ของการเติมเมธานอลครั้งที่ 3 มีค่าสูงกว่าการเติมเมธานอลครั้งที่ 1 ประมาณ 0.1 หน่วยต่อกรัมเซลล์.ชั่วโมง และค่า  $Q_p$  ของการเติมเมธานอลครั้งที่ 3 สูงกว่าการเติมเมธานอลครั้งแรกถึง 3 เท่า

การลดระยะเวลาที่ใช้ในแต่ละครั้งของการเติมเมธานอลอาจอธิบายได้ว่า *P. pastoris* ต้องการเวลาสำหรับปรับตัวก่อนเริ่มต้นการใช้เมธานอลเป็นสับสเตรท กล่าวคือ ทำการผลิตเอนไซม์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเมตาบอลิซึมของเมธานอล โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดส (Cino, 1999) ทำให้ระยะเวลาที่ใช้ในการเติมเมธานอลครั้งที่ 2 และ 3 สั้นลง เนื่องจากเซลล์มีการปรับตัวเพื่อใช้เมธานอลเป็นสับสเตรทแล้วในช่วงการเติมเมธานอลครั้งที่ 1

### 3.3 วิเคราะห์และสรุปผลการทดลอง

กระบวนการหมักแบบ fed-batch เป็นกระบวนการที่สามารถใช้แก้ปัญหาคาร์บอนที่ยังการเติบโต และความเป็นพิษของสับสเตรท โดยงานวิจัยในส่วนนี้ได้ใช้ความเข้มข้นของเมธานอล

ประมาณ 20 กรัมต่อลิตร ซึ่งทำการเติมเมธานอล 3 ครั้ง รวมปริมาณเมธานอลที่เติมลงในถังหมักเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร ทั้งนี้เป็นไปได้ที่จะทำการหมักแบบ batch โดยใช้ความเข้มข้นของเมธานอลสูงถึง 60 กรัมต่อลิตร เนื่องจากเมธานอลที่ความเข้มข้นดังกล่าวจะเป็นอันตรายต่อเซลล์เป็นอย่างมาก

การใช้กระบวนการแบบ fed-batch สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการหมักเปรียบเทียบกับกระบวนการแบบ batch ทั้งในรูปของการสร้างเซลล์ การสร้างผลิตภัณฑ์ อัตราการเติบโต และอัตราการสร้างผลผลิต อย่างไรก็ตาม การใช้ระบบควบคุมการเติมเมธานอลที่ซับซ้อนขึ้นสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการหมักให้สูงขึ้น ดังรายละเอียดที่จะกล่าวต่อไปในบทที่ 4 งานวิจัยส่วนที่ 3



## บทที่ 4

### งานวิจัยส่วนที่ 3

การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน โดย *Pichia pastoris* ในถังหมักขนาด 10 ลิตร  
ด้วยกระบวนการแบบ fed-batch ที่ใช้ระบบควบคุมการเติมสารอาหารแบบย้อนกลับ

#### 4.1 อุปกรณ์และวิธีการ

##### สายพันธุ์จุลินทรีย์

สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยส่วนที่ 3 นี้ เป็นชนิดเดียวกับที่ใช้ในการศึกษาอิทธิพลของพีเอชต่อการเติบโตและการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน โดย *P. pastoris* (บทที่ 2 งานวิจัยส่วนที่ 1)

##### การเตรียมกล้าเชื้อในฟลาस्क

การเตรียมกล้าเชื้อสำหรับกระบวนการหมักในถังหมักแบ่งเป็นสองขั้นตอน ขั้นตอนแรกทำการเชื้อเชื้อยีสต์ จากอาหารฐาน YPD 1 โคลโลนี ลงในอาหารเหลว YPD ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ในฟลาस्कขนาด 250 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายลงในอาหารเหลว BMGY ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ในฟลาस्कขนาด 1 ลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

##### กระบวนการหมักแบบ fed-batch โดยใช้ระบบควบคุมการเติมเมธานอลแบบย้อนกลับ

งานวิจัยในส่วนนี้ จะทำการศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบการเติมเมธานอลแบบย้อนกลับสองรูปแบบ คือ Methanol limited fed-batch และ Oxygen limited fed-batch ดังรายละเอียดที่จะกล่าวต่อไป

ทำการถ่ายกล้าเชื้อจากฟลาस्कทั้งหมด 100 มิลลิลิตร ลงในถังหมัก (Belach Bioteknik, Stockholm, Sweden) ขนาด 10 ลิตร ที่มีอาหาร glycerol basal salt (GBS: glycerol 40.0 กรัมต่อลิตร, 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 26.7 มิลลิลิตรต่อลิตร, CaSO<sub>4</sub>, 0.93 กรัมต่อลิตร, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 18.2 กรัมต่อลิตร,

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 14.9 กรัมต่อลิตร, KOH 4.13 กรัมต่อลิตร, และ PTM1 trace salts 4.35 มิลลิลิตรต่อลิตร) สำหรับ PTM1 trace salts ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 6.0 กรัม, KI 0.08 กรัม, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 3.0 กรัม, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.2 กรัม, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.02 กรัม, ZnCl<sub>2</sub> 20.0 กรัม, FeCl<sub>3</sub> 13.7 กรัม, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.9 กรัม, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5.0 มิลลิลิตร และ biotin 0.2 กรัม ในกระบวนการหมักนี้ อุณหภูมิ, พีเอช, DOT (ค่าการละลายของออกซิเจน), อัตราการให้อากาศ, ความดัน, อัตราการกวน และการควบคุมระดับของการเกิดฟอง จะใช้ระบบควบคุมแบบอัตโนมัติ โดยกระบวนการหมักจะแบ่งเป็น 4 ช่วง คือ

1. Glycerol batch phase: เป็นขั้นตอนการเพิ่มจำนวนเซลล์โดยอาศัยกระบวนการหมักแบบ batch กระบวนการในช่วงนี้จะสิ้นสุดเมื่อเชื้อยีสต์ใช้กลีเซอรอลจนหมด สังเกตได้จากการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วของ DOT โดยจะใช้เวลาประมาณ 18-24 ชั่วโมง

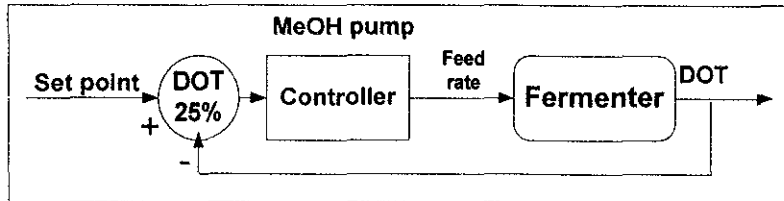
2. Glycerol fed-batch phase: เป็นขั้นตอนการเพิ่มจำนวนเซลล์โดยอาศัยกระบวนการหมักแบบ fed-batch กระบวนการในช่วงนี้จะมีการเติมกลีเซอรอล 500 กรัมต่อลิตร ที่มี 12 มิลลิลิตรต่อลิตร ของ PTM1 trace salt อัตราการเติมอาหารจะเป็นการเติมแบบ exponential กระบวนการในช่วงนี้จะสิ้นสุดเมื่อความหนาแน่นของเซลล์มีค่าประมาณ 40 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง ในช่วงนี้จะใช้เวลาประมาณ 3.5 ชั่วโมง

3. Methanol induction phase: เป็นขั้นตอนการกระตุ้นการผลิตโปรตีนโดยอาศัยกระบวนการหมักแบบ fed-batch กระบวนการในขั้นนี้จะเติมเมทานอล 99.5% ที่มี PTM1 trace salt 12 มิลลิลิตรต่อลิตร เข้าสู่ถังหมักด้วยอัตราการเติมที่ต่ำมาก (ประมาณ 2 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) เพื่อให้ยีสต์มีเวลาในการปรับตัวที่จะใช้เมทานอลเป็นสารกระตุ้น เป็นแหล่งคาร์บอน และเป็นแหล่งพลังงาน กระบวนการในช่วงนี้จะใช้เวลาประมาณ 3 ชั่วโมง

4. Production phase: เป็นขั้นตอนที่สำคัญมาก เนื่องจากต้องควบคุมอัตราการเติมเมทานอลให้พอเหมาะต่อการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน โดยไม่มากจนเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ การควบคุมเติมเมทานอลที่ใช้ในงานวิจัยในส่วนนี้เป็นระบบการควบคุมแบบย้อนกลับ ได้แก่ Methanol limited fed-batch (MLFB) (ภาพที่ 4.1) และ Oxygen limited fed-batch (OLFB) (ภาพที่ 4.2)

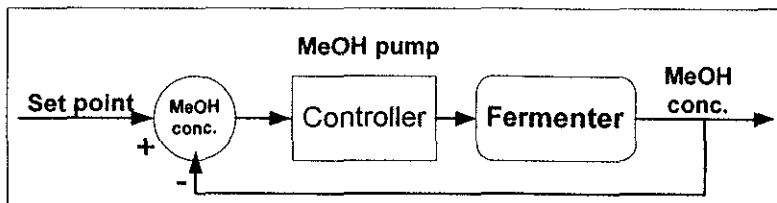
### ระบบควบคุมการเติมเมธานอล

ในกระบวนการแบบ MLFB จะควบคุมค่า DOT ให้คงที่ที่ 25% โดยอาศัยค่า DOT ที่อ่านได้ในการควบคุมการเติมเมธานอลแบบย้อนกลับ ทั้งนี้ปั๊มจะเพิ่มอัตราการทำงานเมื่อค่า DOT สูงกว่า 25% และลดค่าอัตราการเติมเมธานอลเมื่อค่า DOT ต่ำกว่า 25% (ภาพที่ 4.1)



ภาพที่ 4.1 ระบบควบคุมการเติมเมธานอลแบบ Methanol limited fed-batch

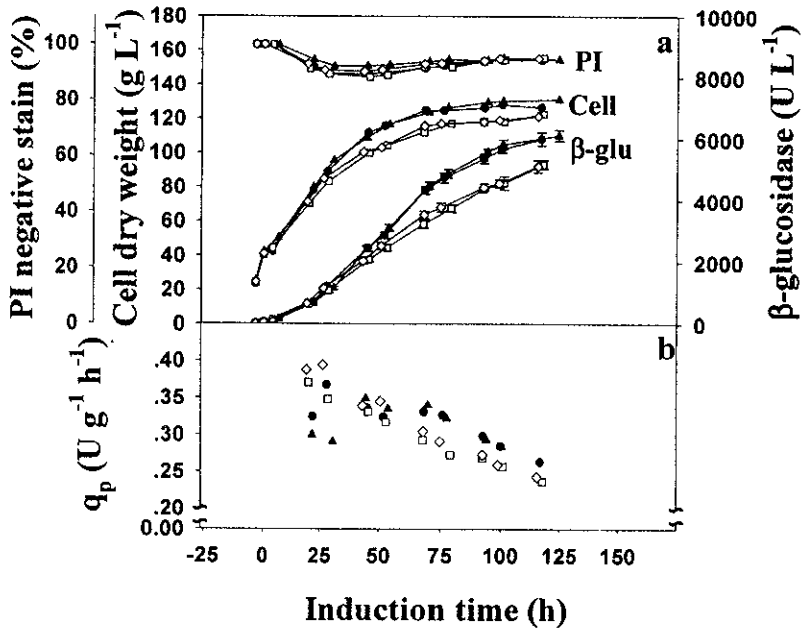
สำหรับกระบวนการแบบ OLFB ความเข้มข้นของเมธานอลจะถูกควบคุมให้คงที่ที่ 350 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยอาศัยข้อมูลความเข้มข้นของเมธานอลจากเครื่องวิเคราะห์ในการควบคุมการเติมเมธานอลแบบย้อนกลับ ระบบนี้จะเพิ่มอัตราการเติมเมธานอลเมื่อความเข้มข้นของเมธานอลที่อ่านได้มีค่าน้อยกว่า 350 มิลลิกรัมต่อลิตร และจะลดอัตราการเติมเมธานอลเมื่อความเข้มข้นของเมธานอลมีค่ามากกว่า 350 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4.2)



ภาพที่ 4.2 ระบบควบคุมการเติมเมธานอลแบบ Oxygen limited fed-batch

## 4.2 ผลการทดลองและวิจารณ์

การเติบโตของเซลล์และการสะสมผลผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส



ภาพที่ 4.3 a) รูปแบบการเติบโต, การสร้างผลิตภัณฑ์ และปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต จากกระบวนการแบบ MLFB (สัญลักษณ์เปิด) และจากกระบวนการแบบ OLFB (สัญลักษณ์ปิด) b) อัตราการผลิตเบต้ากลูโคซิเดสจำเพาะ ( $q_p$ )

สำหรับงานวิจัยในส่วนนี้ซึ่งได้ทำการออกแบบกระบวนการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดย *P. pastoris* มีความจำเป็นอย่างยิ่งที่กระบวนการที่ออกแบบจะต้องสามารถทำซ้ำโดยได้ผลการทดลองใกล้เคียงกัน (good reproducibility) ซึ่งจากภาพที่ 4.3 ทั้งกระบวนการแบบ MLFB และ OLFB แสดงความสามารถในการทำซ้ำได้ โดยรูปแบบการเพิ่มขึ้นของเซลล์ของทั้งสองกระบวนการมีความคล้ายคลึงกันถึงแม้ว่าค่าจากกระบวนการแบบ OLFB (129 กรัมต่อลิตร) จะสูงกว่าค่าที่ได้จากกระบวนการแบบ MLFB (122 กรัมต่อลิตร) ในทำนองเดียวกัน การสะสมเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสในกระบวนการแบบ OLFB (6000 หน่วยต่อลิตร) ก็แสดงค่าที่มากกว่ากระบวนการแบบ MLFB (5170 หน่วยต่อลิตร) (ภาพที่ 3.3a) สำหรับอัตราการผลิตเอนไซม์ เบต้ากลูโคซิเดสจำเพาะ ( $q_p$ ) จากทั้งสองกระบวนการจะค่อยๆ ลดลง อย่างไรก็ตามค่า  $q_p$  เมื่อสิ้นสุดการหมักยังคงมีค่าสูงถึง 52% ของค่าที่คำนวณได้เมื่อเริ่มต้นเติมเมธานอล (ภาพที่ 3.3b) นี่เป็นการแสดงให้เห็นถึง

ศักยภาพของทั้งสองกระบวนการที่จะดำเนินการหมักต่อไปถึงแม้ว่าความหนาแน่นของเซลล์จะไม่เพิ่มขึ้นแล้วก็ตาม

ผลการทดลองที่ได้นี้สนับสนุนผลการทดลองก่อนหน้านี้ซึ่งทำการผลิต fusion protein ระหว่าง cellulose binding module และไลเปส (lipase) โดยยีสต์ *P. pastoris* ซึ่งพบว่าค่า  $q_p$  มีค่าอยู่ในระดับที่สูงตลอดระยะเวลา 160 ชั่วโมง ของการหมัก (Jahic et al., 2002) ดังนั้นสถานะจำกัดออกซิเจนของกระบวนการแบบ OLFB จึงไม่ยับยั้งการผลิตเบต้ากลูโคซิเดส ซึ่งคล้ายกับผลการทดลองที่ได้จากการผลิตโปรตีนชนิดอื่นๆ ในสถานะที่จำกัดออกซิเจน (Trentmann et al., 2004; Hellwig et al., 2001)

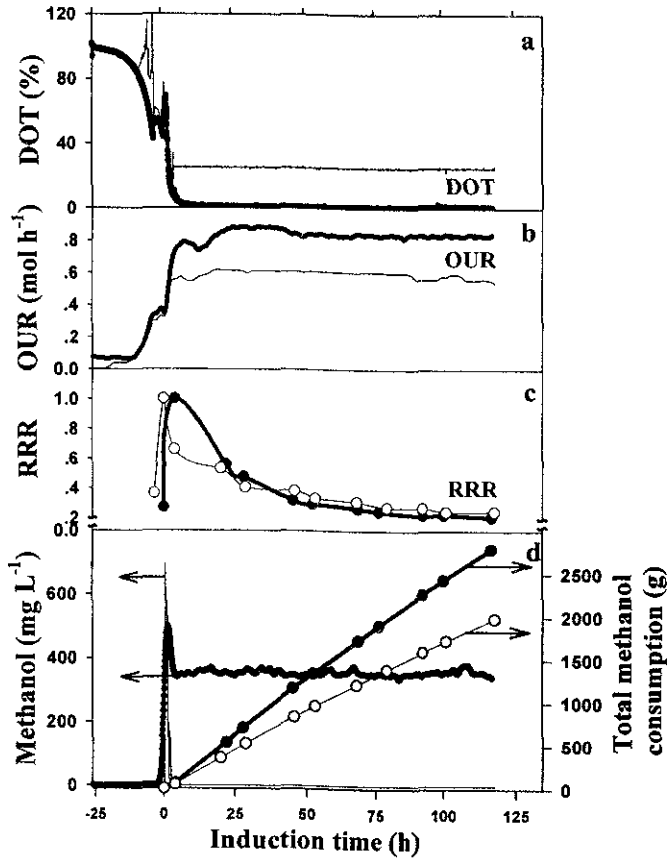
#### ผลของรูปแบบการเติมเมธานอลต่อปริมาณเมธานอลที่ใช้ไปทั้งหมด และอัตราการใช้ออกซิเจน

ในกระบวนการแบบ MLFB ค่า DOT ในช่วง production phase จะคงที่ที่ 25% (ภาพที่ 4.4a) โดยหลังจากเริ่มเติมเมธานอลจะมีการสะสมของเมธานอลในน้ำหมักจนมีความเข้มข้นสูงที่สุดที่ประมาณ 700 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นความเข้มข้นของเมธานอลจะค่อยๆ ลดลงจนมีค่าต่ำกว่าความสามารถของเครื่องมือวิเคราะห์ (ต่ำกว่า 25 มิลลิกรัมต่อลิตร) ในชั่วโมงที่ 5 ของระยะ production phase (ภาพที่ 4.4d)

สำหรับกระบวนการแบบ OLFB จะทำการควบคุมความเข้มข้นของเมธานอลที่ 350 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4.4d) ซึ่งมีผลทำให้ค่า DOT ลดลงอย่างต่อเนื่องจนมีค่าใกล้เคียงกับศูนย์ ทั้งนี้ค่าอัตราการใช้ออกซิเจน (oxygen uptake rate, OUR) จากกระบวนการแบบ OLFB มีค่าสูงกว่ากระบวนการแบบ MLFB ประมาณ 40% (ภาพที่ 4.4b) โดยที่ค่า OUR จากทั้งสองกระบวนการมีค่าค่อนข้างคงที่จนสิ้นสุดการหมัก

เมื่อพิจารณาถึงปริมาณเมธานอลที่ใช้ไปทั้งหมด ค่าที่ได้จากกระบวนการแบบ OLFB มีค่าสูงกว่ากระบวนการแบบ MLFB ประมาณ 40% (ภาพที่ 4.4d) ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของอัตราการถ่ายเทออกซิเจน (oxygen transfer rate, OTR) เนื่องจากการใช้กระบวนการแบบ OLFB ทำให้ได้ค่า OUR สูงขึ้นในอัตราส่วนที่ใกล้เคียงกับปริมาณเมธานอลที่ถูกใช้ไปทั้งหมด ผลการทดลองที่ได้นี้คล้ายกับผลการทดลองที่ได้จากกระบวนการผลิต mouse endostatin (Trinh et al., 2003) และ scFV

(Trentmann et al., 2004) โดยยีสต์ *P. pastoris* เมื่อมีการควบคุมความเข้มข้นของเมธานอลในน้ำหมักให้มียีสต์มากกว่าศูนย์



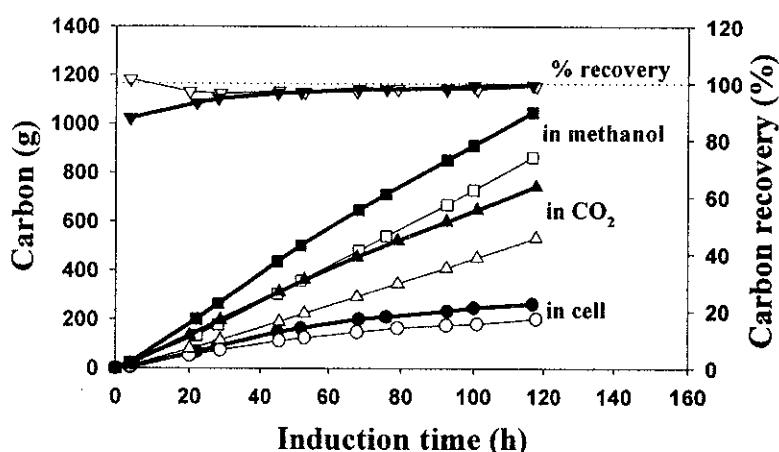
ภาพที่ 4.4 การเปรียบเทียบ a) DOT, b) OUR, c) RRR และ d) ความเข้มข้นของเมธานอล (เส้น) และปริมาณเมธานอลที่ใช้ไปทั้งหมด (สัญลักษณ์) จากกระบวนการแบบ MLFB (สัญลักษณ์เปิด, เส้นบาง) และจากกระบวนการแบบ OLFB (สัญลักษณ์ปิด, เส้นหนา)

ค่าอัตราการหายใจสัมพันธ์ (relative rate of respiration, RRR) (ภาพที่ 4.4c) สามารถคำนวณจากอัตราการหายใจที่เวลาใดๆ หาค่าด้วยอัตราการหายใจสูงสุด ซึ่งเป็นค่าที่สามารถใช้ในการอธิบายระดับของออกซิเจนที่จำกัดในกระบวนการแบบ OLFB รวมถึงเป็นการวัดระดับของเมธานอลที่จำกัดในกระบวนการแบบ MLFB นอกจากนี้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้สำหรับวัดระดับของพลังงานที่จำกัดในจุลินทรีย์ที่สามารถเติบโตได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนเท่านั้น (obligate aerobe) และไม่มีเมตาบอลิซึมแบบพิเศษในการใช้สับสเตรท จากการคำนวณหาค่า RRR นี้แสดงให้เห็นว่าหลังจากเริ่มเติมเมธานอลทั้งสองกระบวนการไม่แสดงออกถึงสภาวะจำกัดทั้งออกซิเจนและ

เมธานอล (RRR = 1) แต่หลังจากนั้นค่าพารามิเตอร์นี้จะลดลงอย่างรวดเร็วในทั้งสองกระบวนการ จนมีค่าประมาณ 0.20-0.25 โดยค่าจากกระบวนการแบบ MLFB จะสูงกว่า (พลังงานจำกัคน้อยกว่า) กระบวนการแบบ OLFB เล็กน้อย

### ความต้องการการบำรุงรักษาเซลล์และปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต

เมื่อพิจารณาถึงปริมาณเมธานอลที่ใช้ไปทั้งหมด พบว่าค่าจากกระบวนการแบบ OLFB มีค่าสูงกว่ากระบวนการแบบ MLFB ค่อนข้างมาก อย่างไรก็ตามปริมาณเซลล์จากกระบวนการแบบ OLFB มีค่าสูงกว่าปริมาณเซลล์ที่ได้จากกระบวนการแบบ MLFB เพียงเล็กน้อยเท่านั้น นี่เป็นผลมาจากผลได้ของมวลชีวภาพ (biomass yield,  $Y_x/s$ ) จากกระบวนการแบบ OLFB มีค่าต่ำกว่ากระบวนการแบบ MLFB ทั้งนี้สามารถพิสูจน์ได้โดยการวิเคราะห์สมดุลมวลของคาร์บอน (carbon mass balance)



ภาพที่ 4.5 สมดุลมวลของคาร์บอน จากกระบวนการแบบ MLFB (สัญลักษณ์เปิด, เส้นบาง) และจากกระบวนการแบบ OLFB (สัญลักษณ์ปิด, เส้นหนา), ปริมาณคาร์บอนในเซลล์ (●-), คาร์บอนใน CO<sub>2</sub> (-▲-), คาร์บอนในเมธานอล (-■-) และ carbon recovery (-▼-)

สมดุลมวลของคาร์บอนคำนวณได้จากปริมาณคาร์บอนที่เดิมเข้าไปในระบบ (คาร์บอนจากเมธานอล) ปริมาณคาร์บอนที่เปลี่ยนไปอยู่ในรูปของเมตาบอไลต์ต่างๆ (คาร์บอนในเซลล์, ในคาร์บอนไดออกไซด์ และในโปรตีนผลิตภัณฑ์) โดยในการคำนวณนี้ให้ถือว่าปริมาณเมธานอลที่ระเหยไปในอากาศที่ออกจากถังหมักมีค่าน้อยมาก และปริมาณโปรตีนที่ปลดปล่อยสู่น้ำหมักซึ่งมีค่าต่ำมาก (น้อยกว่า 0.4% ของคาร์บอนทั้งหมด) จะไม่นำมาใช้ในการคำนวณ ค่า C-recovery ที่ได้

จากทั้งสองกระบวนการมีค่ามากกว่า 98% (ภาพที่ 4.5) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไม่มีการใช้คาร์บอนไปในการสร้างเมตาบอไลต์ในรูปแบบอื่นๆ

ค่าผลได้ของเซลล์ในรูปของคาร์บอนจากเมธานอล ( $Y^c_{x/s}$ ) ค่อยๆ ลดลงจาก 0.33 โมลต่อโมล เป็น 0.24 โมลต่อโมล สำหรับกระบวนการแบบ OLFB และลดลงจาก 0.38 โมลต่อโมล เป็น 0.27 โมลต่อโมล ในกระบวนการแบบ MLFB เมื่อพิจารณาถึงค่าผลได้ของคาร์บอนไดออกไซด์ในรูปของคาร์บอนจากเมธานอล ( $Y^c_{CO_2/s}$ ) ในกระบวนการแบบ OLFB มีค่าเพิ่มขึ้นจาก 0.60 โมลต่อโมล เป็น 0.74 โมลต่อโมล และจาก 0.59 โมลต่อโมล เป็น 0.70 โมลต่อโมล ในกระบวนการแบบ MLFB ทั้งนี้ การลดลงของผลได้ของมวลชีวภาพและการเพิ่มขึ้นของผลได้ของคาร์บอนไดออกไซด์ สะท้อนให้เห็นถึงการเพิ่มขึ้นของความต้องการการบำรุงรักษาเซลล์ในระยะที่อัตราการเติบโตจำเพาะลดลง (Jahic et al., 2002) โดยค่าความต้องการการบำรุงรักษาเซลล์ในกระบวนการแบบ OLFB มีค่าสูงกว่าในกระบวนการแบบ MLFB

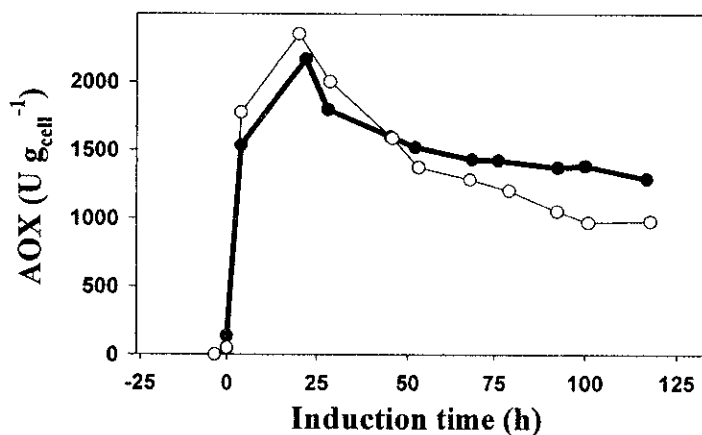
เมธานอลเป็นสารที่เข้าใจกันดีว่ามีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตในหลายสปีชีส์ อย่างไรก็ตาม *P. pastoris* ค่อนข้างทนต่อเมธานอลโดยที่ความเข้มข้นสูงถึง 10 กรัมต่อลิตร จึงจะเริ่มที่ทำให้อัตราการเติบโตและอัตราการใช้เมธานอลลดลง (Katakura et al., 1998) แต่เมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้นจนถึง 30 กรัมต่อลิตร จะเกิดการยับยั้งการเติบโตอย่างสมบูรณ์ ดังนั้นปริมาณเมธานอลในกระบวนการแบบ OLFB (350 มิลลิกรัมต่อลิตร) จึงไม่เกิดการยับยั้งการเติบโตของเซลล์ อย่างไรก็ตาม ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักของกระบวนการแบบ OLFB ซึ่งมีค่าต่ำมากอาจส่งผลกระทบต่อการสะสมเมธานอลภายในเซลล์ เนื่องจากเกิดการจำกัดของกระบวนการออกซิเดชันของเมธานอล

ความเป็นพิษของเมธานอลในกระบวนการแบบ OLFB สามารถศึกษาโดยการวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตด้วยวิธีการย้อมเซลล์ด้วย propidium iodide (PI) ทั้งนี้เฉพาะเซลล์ตายเท่านั้นที่จะติดสี โดยวิธีการวิเคราะห์นี้ได้รับการรายงานว่าให้ผลเป็นอย่างดีสำหรับ *P. pastoris* (Jahic et al., 2003) ผลการวิเคราะห์ที่ได้ไม่แสดงถึงความแตกต่างระหว่างกระบวนการแบบ OLFB และ MLFB ดังนั้น สภาวะจำกัดออกซิเจนในกระบวนการแบบ OLFB จึงไม่ส่งผลกระทบต่อปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต



### กิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดส

การสะสมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสในช่วงเริ่มต้น production phase มีความใกล้เคียงกันทั้งสองกระบวนการ แต่หลังจากนั้น 20 ชั่วโมง ระดับของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจากกระบวนการแบบ OLFB เริ่มที่จะสูงกว่าค่าจากกระบวนการแบบ MLFB (ภาพที่ 3.3a) ผลที่ได้นี้อาจจะเนื่องมาจากความแตกต่างของกิจกรรมของ *aox* promoter ซึ่งสามารถตรวจสอบได้จากกิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดส ภาพที่ 4.6 แสดงให้เห็นว่ากิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดสในช่วงเริ่มต้น production phase มีความเหมือนกันทั้งสองกระบวนการ โดยเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึงค่าสูงสุดที่ 2000-2300 หน่วยต่อกรัมเซลล์ หลังจากนั้นประมาณ 20 ชั่วโมง กิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดสในทั้งสองกระบวนการจึงค่อยๆ ลดลง โดยกิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดสจากกระบวนการแบบ OLFB จะลดลงน้อยกว่าจากกระบวนการแบบ MLFB เมื่อสิ้นสุดการหมักค่าที่ได้จากกระบวนการแบบ OLFB สูงกว่ากระบวนการแบบ MLFB ประมาณ 37%

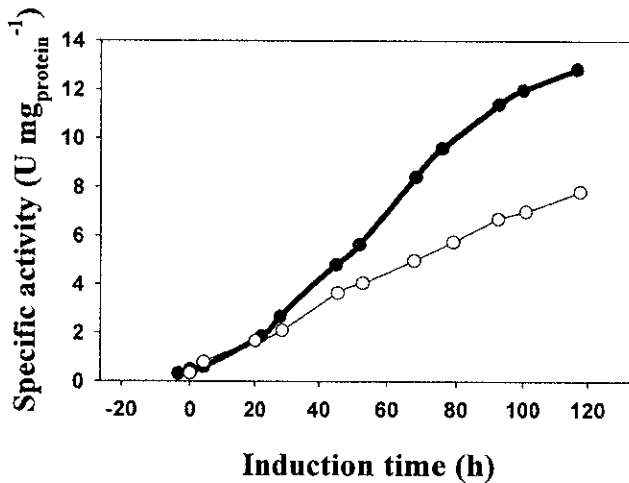


ภาพที่ 4.6 การเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดส จากกระบวนการแบบ MLFB (สัญลักษณ์เปิด, เส้นบาง) และจากกระบวนการแบบ OLFB (สัญลักษณ์ปิด, เส้นหนา)

### ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส

ข้อดีอย่างหนึ่งของระบบการแสดงออกของยีนโดย *P. pastoris* คือ สามารถเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีเฉพาะเกลือต่างๆ และผลิตโปรตีนแล้วปลดปล่อยออกสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่า *P. pastoris* จะปลดปล่อยโปรตีนของตัวเองสู่อาหารเลี้ยงเชื่อน้อยมาก ทำให้หลังจากสิ้นสุดการหมัก โปรตีนส่วนใหญ่ในน้ำหมักจึงเป็นรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่เราต้องการผลิต ใน

กระบวนการแบบ OLFB เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักจะมีกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส 6000 หน่วยต่อลิตร ซึ่งมากกว่าค่าที่ได้จากกระบวนการแบบ MLFB ซึ่งมีค่า 5170 หน่วยต่อลิตร อย่างไรก็ตาม พบว่าปริมาณโปรตีนทั้งหมดในกระบวนการแบบ OLFB (470 มิลลิกรัมต่อลิตร) ซึ่งน้อยกว่าค่าจากกระบวนการแบบ MLFB (660 มิลลิกรัมต่อลิตร) นี่เป็นเหตุให้ค่า specific activity ที่ได้จากกระบวนการแบบ OLFB มีค่าสูงกว่าค่าที่ได้จากกระบวนการแบบ MLFB (ภาพที่ 4.7)



ภาพที่ 4.7 Specific activity ของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส จากกระบวนการแบบ MLFB (สัญลักษณ์เปิด, เส้นบาง) และจากกระบวนการแบบ MLFB (สัญลักษณ์ปิด, เส้นหนา)

#### 4.3 วิเคราะห์และสรุปผลการทดลอง

ถึงแม้ว่า *P. pastoris* จะเป็นยีสต์ที่ต้องใช้ออกซิเจนในการเติบโตเมื่อใช้เมทานอลเป็นสับสเตรท อย่างไรก็ตาม แม้ในสถานะที่ออกซิเจนจำกัด *P. pastoris* ก็ยังคงไม่มีการแสดงออกโดยการใช้เมตาบอลิซึมในรูปแบบอื่น นี่เป็นเหตุผลหนึ่งที่ทำให้สามารถประยุกต์ใช้กระบวนการแบบ OLFB เพื่อเพิ่มอัตราการถ่ายเทออกซิเจนสำหรับการแสดงออกของยีนโดย *P. pastoris* ได้ ยิ่งไปกว่านั้น น้ำหมักที่ได้จากกระบวนการแบบ OLFB ยังมีโปรตีนปนเปื้อนน้อยกว่ากระบวนการแบบ MLFB ซึ่งเป็นผลดีสำหรับขั้นตอนการทำให้โปรตีนผลิตภัณฑ์บริสุทธิ์

## บทที่ 5

### บทสรุปและข้อเสนอแนะ

จากงานวิจัยในส่วนที่ 1 เกี่ยวกับการศึกษาอิทธิพลของพีเอชต่อการเติบโตและการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดย *P. pastoris* พบว่า พีเอชเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเติบโตและการสร้างผลิตภัณฑ์รีคอมบิแนนท์โปรตีน โดยพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสมีค่าในช่วง 5.0-5.25 ซึ่งหลังจากทำการเพิ่มพีเอชจนถึง 5.5 จะมีผลทำให้อัตราการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสลดลง ในทางตรงกันข้ามอัตราการเติบโตของเซลล์จะสูงขึ้น ทั้งนี้จากข้อมูลที่ได้รับ การตีพิมพ์หลายฉบับที่ทำการศึกษาอิทธิพลของพีเอชในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนชนิดอื่นๆ โดย *P. pastoris* (Jahic et al., 2002; Kobayashi et al., 2000; Brierley et al., 1994) พบว่า พีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนแต่ละชนิดอาจจะไม่เท่ากัน ดังนั้น จึงจำเป็นต้องหาพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนแต่ละชนิดเป็นขั้นต้นก่อนที่จะดำเนินการผลิตจริง เพื่อให้ได้กระบวนการผลิตที่มีประสิทธิภาพสูงสุด

สำหรับงานวิจัยในส่วนที่ 2 ซึ่งทำการพัฒนากระบวนการผลิตโดยการประยุกต์ใช้กระบวนการแบบ fed-batch อย่างง่าย พบว่าการใช้กระบวนการแบบ fed-batch อย่างง่าย สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการผลิต โดยเมื่อสิ้นสุดการหมัก ความเข้มข้นของเซลล์ และเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสเพิ่มขึ้น 1.6 และ 4 เท่า เปรียบเทียบกับกระบวนการแบบ batch ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม การใช้ระบบควบคุมการเติมสารอาหารที่ซับซ้อนขึ้นน่าจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการผลิตให้สูงขึ้นได้ จึงพัฒนากระบวนการผลิตสู่งานวิจัยในส่วนที่ 3

การดำเนินงานวิจัยในส่วนที่ 3 มี 2 วัตถุประสงค์ที่สำคัญ คือ เพิ่มกำลังการผลิตจากถังหมักขนาด 2 ลิตร เป็น 10 ลิตร และพัฒนากระบวนการผลิตสู่กระบวนการแบบ fed-batch ที่ใช้ระบบควบคุมการเติมสารอาหารแบบย้อนกลับ ซึ่งระบบควบคุมการเติมสารอาหารแบบย้อนกลับที่ใช้ในงานวิจัยนี้มี 2 ระบบ คือ Methanol limited fed-batch (MLFB) ซึ่งเป็นระบบที่ออกแบบและรายงานว่ามีประสิทธิภาพสูงสำหรับการแสดงออกของยีนโดย *P. pastoris* โดย Jahic et al. (2002) และ Oxygen limited fed-batch (OLFB) ซึ่งเป็นกระบวนการที่คณะผู้วิจัยในโครงการนี้ได้ร่วมกันออกแบบเพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับการแสดงออกของยีนโดย *P. pastoris* ทั้งนี้พบว่าทั้งกระบวนการแบบ MLFB และ OLFB มีประสิทธิภาพสูงกว่าทั้งกระบวนการแบบ batch และกระบวนการแบบ fed-batch อย่างง่าย กล่าวคือ เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก ความเข้มข้นของเซลล์

และปริมาณเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสสูงกว่ากระบวนการหมักแบบ batch ประมาณ 6-7 เท่า และ 85-95 เท่า ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของกระบวนการแบบ MLFB และ OLFB พบว่า กระบวนการแบบ OLFB เป็นกระบวนการที่สามารถประยุกต์ใช้ในการเพิ่มอัตราการถ่ายเท ออกซิเจน โดยส่งผลให้ปริมาณเมธานอลที่ใช้ไปทั้งหมด ปริมาณเซลล์และเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส ที่ผลิตได้ มีค่าสูงกว่ากระบวนการแบบ MLFB ทั้งนี้ไม่พบว่าสภาวะจำกัดออกซิเจนในกระบวนการแบบ OLFB จะทำให้ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตลดลง หรือมีการสร้าง by-product ดังนั้น กระบวนการแบบ OLFB จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน โดย *P. pastoris*

**บรรณานุกรม**

- Brierley, A.R., Davis, R.G. and Holtz, C.G. (1994). Product of insulin-like growth factor-1 in methylotrophic yeast cells. United States patent, United States of America, 5,324,639, pp.100.
- 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.
- Cino, J. 1999. High-yield protein production from *Pichia pastoris* yeast: A protocol for benchtop fermentation. Application Note. New Brunswick Scientific.
- Couderc, R. and Baratti, J. (1980). Oxidation of methanol by the yeast *Pichia pastoris*: purification and properties of alcohol oxidase. Agric. Biol. Chem. 44: 2279-2289.
- Cregg, J.M., Cereghino, L., Shi, J. and Higgins, D.R. (2000). Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. Mol. Biotech. 16: 23-52.
- Douma, A.C., Veenhuis, M., de Koning, W., Evers, M. and Harder, W. (1985). Dihydroxyacetone syntase is localized in the peroxisomal matrix of methanol-grown *Hansenula polymorpha*. Arch Microbiol. 143: 237-243.
- Hellwig, S., Emde, F., Raven, N.P.G., Henke, M., van der Logt, P., Fischer, R. (2001). Analysis of single-chain antibody production in *Pichia pastoris* using on-line methanol control in fed-batch and mixed-feed fermentations. Biotechnol. Bioeng. 74:344-352
- 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.

- 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.
- Katakura, Y., Zhang, W., Zhuang, G. and Omasa, T. (1998). Effect of methanol concentration on the production of Human  $\beta_2$ -Glycoprotein I Domain V by a recombinant *Pichia pastoris*: A simple system for the control of methanol concentration using a semiconductor gas sensor. *J. Ferm. Bioeng.* 86(5): 482-487.
- Ketudat-Cairns, J.R., Champattanachai, V., Srisomsap, C., Wittman-Liebold, B., Thiede, B. and Svasti, J. (2000). Sequence and expression of Thai Rosewood  $\beta$ -glucosidase/ $\beta$ -fucosidase, a family 1 glycosyl hydrolase glycoprotein. *J. Biochem.* 128: 999-1008.
- 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. *J. Biosci. Bioeng.*, 89, 55-61.
- Lin Cereghino, J. and Cregg, J.M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microb. Rev.* 24: 45-66.
- Lin Cereghino, G.P., Sunga, A.J., Lin Cereghino, J. and Cregg, J.M. (2001). Expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*. *Quoted in Genetic Engineering . Principles and Methods.* Kluwer Academic. London. 23: 157-169.
- Reese, E.T. (1997). Degradation of polymeric carbohydrates by microbial enzymes. *Rec. Adv. Phytochem.* 11: 311-364. *Quoted in Cicek, M. and Esen., A. (1998). Structure and expression of dhurrinase ( $\beta$ -glucosidase) from sorghum. Plant Physiol.* 166: 1469-1478.

Threntmann O, Khatri NK, Hoffmann F (2004) Reduced oxygen supply increases process stability and product yield with recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Prog.* 20:1766-1775

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*. *Biotech. Bioeng.* 82(4): 438-444.

ภาคผนวก



ภาคผนวก ก

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ Thai Journal of Biotechnology

# Recombinant $\beta$ -glucosidase Production by *Pichia pastoris*: Influence of pH

Theppanya Charoenrat<sup>1</sup>, Wirat Vanichsiratana<sup>2</sup> and Mariena Ketudat-Cairns<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand, <sup>2</sup>Department of Biotechnology, Faculty of Agro-Industry, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

*Pichia pastoris* is an excellent host for high level heterologous gene expression. The pH is one of the most important environmental factors which affects cell growth rate, product formation rate and product stability. The  $\beta$ -glucosidase enzyme is an enzyme which catalyzes the hydrolysis of alkyl- and aryl- $\beta$ -glucosides, diglucosides and oligoglucosides. Thai Rosewood  $\beta$ -glucosidase cDNA was cloned and expressed in *P. pastoris* under the control of AOX1 promoter fused to the  $\alpha$ -factor secretion signal sequence. Two phase recombinant  $\beta$ -glucosidase fermentation by *P. pastoris* at various pH values, ranging from 4.50 to 5.50, was studied. The pH between 5.00–5.25 was optimal for  $\beta$ -glucosidase production. At this pH, the specific production rate ( $q_p$ ), volumetric production rate ( $Q_p$ ) and yield of  $\beta$ -glucosidase on methanol ( $Y_{p/s}$ ) were 0.24 U/g<sub>cell</sub>.h, 4.23 U/l.h and 4.72 U/g<sub>meth</sub>, respectively. At pH 4.50 the  $q_p$  (0.14 U/g<sub>cell</sub>.h) and specific growth rate ( $\mu=1.36\times 10^{-2}$  h<sup>-1</sup>) were lower. At pH 5.50,  $\mu$  and yield of cell on methanol ( $Y_{x/s}$ ) were equal to  $6.20\times 10^{-2}$  h<sup>-1</sup> and 0.71 g<sub>cell</sub>/g<sub>meth</sub>, which are much higher values when compared to pH 5.25 ( $\mu=1.70\times 10^{-2}$  h<sup>-1</sup> and  $Y_{x/s}=0.22$  g<sub>cell</sub>/g<sub>meth</sub>). The highest productivity was obtained at pH different than the optimal ones for growth. Therefore, optimum pH for each recombinant protein needs to be evaluated prior to mass production of the proteins.

**Keywords:** *Pichia pastoris*, recombinant protein production,  $\beta$ -glucosidase, influence of pH

## Introduction

$\beta$ -Glucosidases, which in nature, catalyze the hydrolysis of  $\beta$ -glucosidic bonds, can also be used for glycoside synthesis by kinetically (transglycosylation) or equilibrium (reverse hydrolysis) controlled approaches (Makropoulou *et al.*, 1998). Both hydrolytic and synthetic functions have important applications in industrial production such as the production of sugar, brewery and food.

In the methylotrophic yeast *P. pastoris*, recombinant expression of protein can be induced by methanol by the use of the *alcohol oxidase1* (AOX1) promoter. The signal sequence of the  $\alpha$ -factor derived from *Saccharomyces cerevisiae* fused to the protein will lead to secretion of the target proteins (Cereghino and Cregg, 2000). Expression levels of foreign protein depend not only the native sequence of the cDNA, such as codon usage, but also on other factors, such as copy number,

\*Corresponding author: ketudat@ccs.sut.at.th, fax +66 44 22 4150

temperature, pH, induction duration and concentration of inducer (d'Anjou and Daugulis, 2001).

The expression of heterologous proteins can be done in shake-flask cultures. However, protein levels are typically much higher in fermenter cultures because only in fermenters, where parameters such as pH, aeration and carbon source feed rate can be controlled, is it possible to achieve ultra-high cell densities. Furthermore, the fermenter media for *P. pastoris* (containing only glycerol or methanol, biotin, salts and trace elements) are economical and well defined. This yeast is nearly ideal for large-scale production of heterologous proteins in the fermenter. However, the move from shake-flask to fermenter cultures inevitably requires considerable re-optimization of culturing conditions (Cereghino, et al., 2002).

The common approach to fermentation with *P. pastoris* is divided to two-phases based on *i*) initial growth on glycerol to produce cells (growth phase) and *ii*) induction by methanol to produce recombinant protein (induction phase). *P. pastoris* is capable of growing across a relatively broad pH range of 3.00 to 7.00. This range has little or no effect on the growth rate (Chiruvolu et al., 1998), which allows considerable freedom in adjusting the pH to one that is optimal for recombinant protein production and not optimal for proteases (Sreekrisna et al., 1997). This study investigated the influence of pH on the recombinant  $\beta$ -glucosidase production only in the induction phase.

## Objective

To study the influence of pH on recombinant  $\beta$ -glucosidase production by *P. pastoris* in the induction phase.

## Materials and methods

### Strain

The methylotrophic yeast *P. pastoris* strain Y-11430, a wild-type (Mut<sup>+</sup> and His<sup>+</sup>) strain, was a gift from Cereghino and Cregg, 2000.

The  $\beta$ -glucosidase cDNA gene from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre (Thai Rosewood) (Ketudat-Cairns et al., 2000) was cloned into the pPICz $\alpha$ B *P. pastoris* - *E. coli* shuttle vector as described previously (Loonchanta et al., 2002). This vector uses the zeocin resistant gene as a selectable marker not only in *P. pastoris* but also in *E. coli* (Invitrogen<sup>®</sup> *Pichia* fermentation process guidelines).

The pPICz $\alpha$ B with the  $\beta$ -glucosidase gene was then integrated into *P. pastoris* Y-11430 at the AOX1 promoter by digesting with SacI. Subsequently, and Mut<sup>+</sup> strains were selected.

### Starter preparation

Primary starter was prepared by picking the colony of *P. pastoris* from YPD agar which contained 100  $\mu$ g/ml zeocin 10 g/l yeast extract, 20 g/l peptone and 20 g/l dextrose) and inoculating it into 20 ml YPD broth containing 100  $\mu$ g/ml zeocin. The culture was incubated at 30 °C, 250 rpm for 24 h.

Secondary starter was prepared by transferring the entire 20 ml of primary starter into a 500 ml shake flask that contained 130 ml basal-salts medium (26.70 ml/l H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 85 %, 10.00 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.93 g/l CaSO<sub>4</sub>, 18.20 g/l K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 14.90 g/l MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 4.13 g/l KOH and 20 g/l Glycerol) pH 5.00 with 4.35 ml PTM1 trace salts (6.00 g/l CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.08 g/l KI, 3.00 g/l MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0.20 g/l Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.02 g/l H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 20.00 g/l ZnCl<sub>2</sub>, 13.70 g/l FeCl<sub>3</sub>, 0.90 g/l CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 5.00 ml/l conc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 0.20 g/l biotin) (Invitrogen<sup>®</sup> *Pichia* fermentation process guidelines). The culture was incubated for 24 hr under the same conditions as the primary starter.

### Fermentation

The fermentation process was carried out in a 2 L fermenter (Biostat B, B.Braun). In the growth phase, 150 ml starter culture was transferred into the fermenter containing 1.35 l of basal-salts medium and 4.35 ml/l of PTM1 trace salts. The fermentation conditions were controlled at 30 °C, aeration 1 vvm, 600 rpm agitation and pH 5.00. Three Molar H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> and NaOH solutions were

Figure 1 Fermentation profile of  $\beta$ -glucosidase production by *P. pastoris* at different pH.

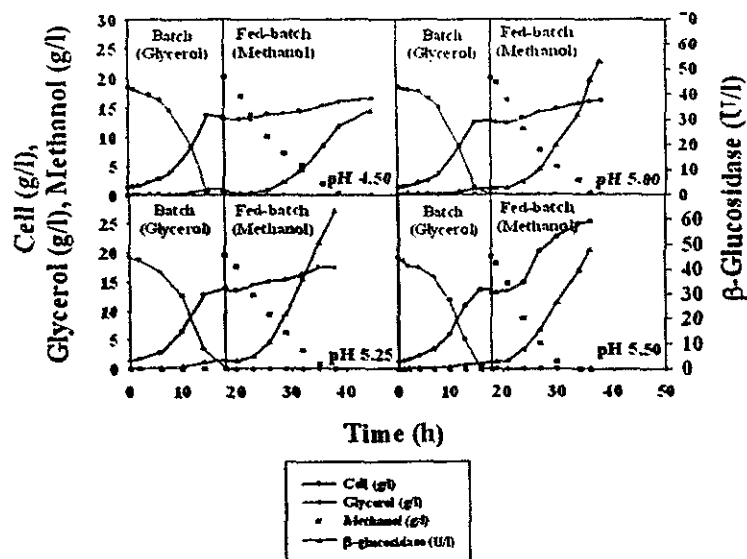
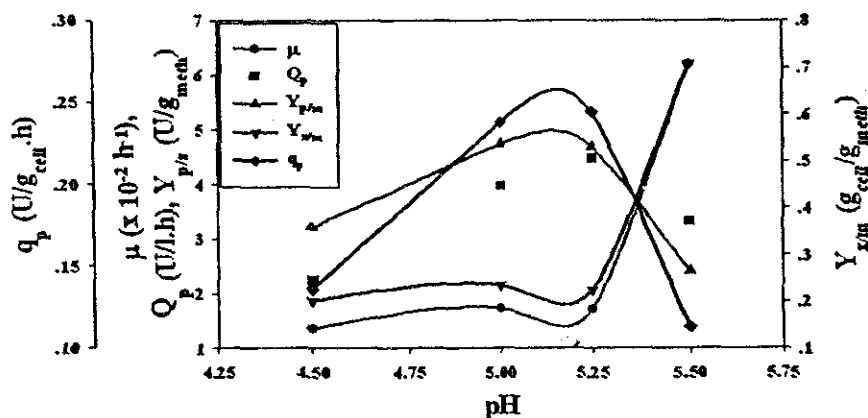


Figure 2 Kinetics of  $\beta$ -glucosidase production in Induction phase at different pH.



used as acid and alkaline to adjust the pH. After the glycerol was completely consumed (approximately 18 h), the process was then switched to induction phase. The methanol feed medium (12 ml/l PTM1 trace salts in methanol) (Invitrogen® *Pichia* fermentation process guidelines) was added to the fermenter to 20 g/l final concentration. The fermentation condition was similar to the growth phase, except the pH was varied.

The influence of pH on  $\beta$ -glucosidase production was studied at pH values of 4.50, 5.00, 5.25 and 5.50. The kinetic parameters ( $\mu_m$ ,  $q_p$ ,  $Y_{x/s}$ ,  $Y_{p/s}$  and  $Q_p$ ) were obtained from the experimental data of cell (g/l), glyce-

rol (g/l), methanol (g/l) and  $\beta$ -glucosidase (U/l).

## Results and Discussion

In this investigation, after about 18 hours of growth phase, the glycerol in the media was completely consumed. The fermentation was then shifted to induction phase by adding methanol at 20 g/l final concentration. The pH of the induction medium was varied at 4.50, 5.00, 5.25 and 5.50. The influence of pH on recombinant  $\beta$ -glucosidase activity produced in *P. pastoris* is shown in Figure 1 and 2. At all pH values observed, the methanol consumption rates were similar. At pH 4.50, 5.00 and

the cell concentration increased slowly to give rise low  $\mu$  values of  $1.36 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ ,  $1.65 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$  and  $1.90 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$  respectively. At pH 5.50, the cell grows much faster to give rise to a higher cell concentration and higher  $\mu$  value of  $6.20 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ . The  $Y_{x/s}$  was also high ( $0.71 \text{ g}_{\text{cell}}/\text{g}_{\text{meth}}$ ), a much higher value compared to pH 5.00 ( $Y_{x/s} = 0.22 \text{ g}_{\text{cell}}/\text{g}_{\text{meth}}$ ). It indicated that high pH is suitable for growth. However, this result contradicted that of Chiruvolu *et al.* (1998), which reported that pH over a range of 3.00 to 7.00 has little or no effect on the growth rate.

The methanol consumption rate was essentially equal at all pH values. However, the  $\beta$ -glucosidase activity at pH lower than 5.00 was quite low. At pH 4.50, the  $q_p$  ( $0.14 \text{ U/g}_{\text{cell}}\cdot\text{h}$ ) were lower than at higher pH. The effect of pH lower than 5.00 could have resulted from partial loss of the activity of other metabolic enzymes involved in the biosynthesis of cell components and  $\beta$ -glucosidase (low  $\mu$  and  $q_p$ ). At pH 5.00, 5.25 and 5.50, the enzyme activity was quite high. However, the high cell density at pH 5.50 gave rise to lower  $q_p$ , and  $Q_p$ . Highest levels of  $\beta$ -glucosidase were expressed at a pH between 5.00–5.25. At pH 5.25, the  $q_p$ ,  $Q_p$ ,  $Y_{p/s}$  were  $0.24 \text{ U/g}_{\text{cell}}\cdot\text{h}$ ,  $4.23 \text{ U/Lh}$  and  $4.72 \text{ U/g}_{\text{meth}}$ , respectively.

The process of protein production in *P. pastoris* is one in which the highest productivity may be obtained at a pH different from the optimal ones for growth. The optimal pH for human serum albumin production was 6.00 (Kobayashi, *et al.*, 2000). Decreasing of fermentation pH from 5.00 to 4.00 resulted in an increase of the fraction of full-length production of CBM-CALB fusion protein from 40 % to 90 % (Jahic, *et al.*, 2003). It also reduced the

proteolysis problem in xyloglucan endotransglycosylase production (Jahic, *et al.*, 2003). pH 3.00 was optimal for insulin-like growth factor-I production (Brierley, *et al.*, 1994). Therefore, optimum pH for production of each recombinant protein needs to be evaluated prior to mass production of the protein.

In the induction phase (Fig.1), the lag time after induction by methanol is very long (3–8 h) because the cell needs time to produce the AOX enzyme and start metabolizing the methanol (Cino, 1999). Furthermore, methanol at high concentration can be toxic and inhibit growth. Kobayashi *et al.* (2000) reported that methanol concentration of more than 7 g/l has an inhibitory effect to *P. pastoris*. Therefore, in the future we will try to develop the fermentation process by adding methanol at very low concentrations in the initiation of the induction phase. The methanol concentration will be increased after the cells have adapted to using methanol as substrate.

## Conclusion

Recombinant  $\beta$ -glucosidase production was affected by the pH, and controlling the pH of the medium at 5.00 to 5.25 during the induction phase was optimal for this production.

## Acknowledgement

This research was partially supported by Suranaree University of Technology Research. TC is supported by MUA scholarship (UDC) program. The authors would like to thank JRK Cairns for critically reviewing and editing the manuscript.

## Reference

- Makropoulou, M., Christakopoulos, P., Tsitsimpikou, C., Kekos, P., Kolisis, F.N. and Macris, B.J. (1998) Factors affecting the specificity of  $\beta$ -glucosidase from *Fusarium oxysporum* in enzymatic synthesis of alkyl  $\beta$ -D-glucosides. *Int. J. Biological Macromolecules*. 22, 97-101.
- Lin Cereghino, J. and Cregg, J.M. (2000). Heterologous protein expression in methylotrophic yeast *Pichia pastoris* FEMS Microb. Rev. 24, 45-66.
- d'Anjou, M.C. and Daugulis, A.J. (2001) A rational approach to improving productivity in recombinant *Pichia pastoris* fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 72, 1-11.
- Lin Cereghino, G.P., Lin Cereghino, J., Ilgen, C. and Cregg, J.M. (2002) Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology*. 13, 329-332.
- 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.
- Sreekrishna, K., Brankamp, G.R., Kropp, E.K., Blankenship, T.D., Tsay, J.T., Smith, L.P., Wierschake, D.J., Subramaniam, A. and Birkenberger, A.L. (1997) Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*. 190, 55-62.
- Ketudat-Cairns, J.R., Champattanachai, V., Srisomsap, C., Wittman-Liebold, B., Thiede, B. and Svasti, J. (2000) Sequence and expression of Thai Rosewood beta-glucosidase/beta-fucosidase, a family 1 glycosyl hydrolase glycoprotein *J. Biochem.* 128, 999-1008.
- Loonchanta, A., Chumnarnsilpa S. and Ketudat-Cairns, M. (2002) Comparison of recombinant  $\beta$ -glucosidase production by *Pichia pastoris* in stirred and air-lift bioreactor. Proceeding the 14<sup>th</sup> annual meeting of Thai Society for Biotechnology 13-15 Nov. Khonkan Thailand 37.
9. Invitrogen®. *Pichia* fermentation process guidelines.
10. 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. *J. Biosci. Bioeng.* 89, 55-61.
11. 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.
12. 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. *Microbial cell Factories*. 2, 6.
13. Brierley, A.R., Davis, R.G. and Holtz, C.G. (1994) Product of insulin-like growth factor-1 in methylotrophic yeast cells. United States patent, United State, 5.324.639, pp.100.
14. Cino, J. (1999) High-yield protein production from *Pichia pastoris* yeast : A protocol for benchtop fermentation. Application Note. New Brunswick Scientific.
15. Kobayashi, K., Kuwae, S., Ohya, T., Ohda, T., Ohyama, M. and Tomomitsu, K. (2000). High-level secretion of recombinant human serum albumin by fed-batch fermentation of methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, based on optimal methanol feeding strategy. *J. Biosci. Bioeng.* 90, 280-288.

**ภาคผนวก ข**

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ Bioprocess Biosystem Engineering

Theppanya Charoenrat · Mariena Ketudat-Cairns  
Helle Stendahl-Andersen · Mehmedalija Jahic  
Sven-Olof Enfors

## Oxygen-limited fed-batch process: an alternative control for *Pichia pastoris* recombinant protein processes

Received: 8 March 2005 / Accepted: 20 May 2005 / Published online: 4 August 2005  
© Springer-Verlag 2005

**Abstract** An oxygen-limited fed-batch technique (OLFB) was compared to traditional methanol-limited fed-batch technique (MLFB) for the production of recombinant Thai Rosewood  $\beta$ -glucosidase with *Pichia pastoris*. The degree of energy limitation, expressed as the relative rate of respiration ( $q_o/q_{o,max}$ ), was kept similar in both the types of processes. Due to the higher driving force for oxygen transfer in the OLFB, the oxygen and methanol consumption rates were about 40% higher in the OLFB. The obligate aerobe *P. pastoris* responded to the severe oxygen limitation mainly by increased maintenance demand, measured as increased carbon dioxide production per methanol, but still somewhat higher cell density (5%) and higher product concentrations (16%) were obtained. The viability was similar, about 90–95%, in both process types, but the amount of total proteins released in the medium was much less in the OLFB processes resulting in substantially higher (64%) specific enzyme purity for input to the downstream processing.

**Keywords** Oxygen-limited fed batch (OLFB) · Methanol-limited fed batch (MLFB) · *Pichia pastoris* ·  $\beta$ -glucosidase

### List of symbols

AOX	Enzyme alcohol oxidase
<i>AOX1</i>	Alcohol oxidase gene 1
CPR	Carbon dioxide production rate ( $\text{mol h}^{-1}$ )
DOT	Dissolved oxygen tension (%)

T. Charoenrat · H. Stendahl-Andersen · M. Jahic  
S.-O. Enfors (✉)  
School of Biotechnology, Royal Institute of Technology,  
AlbaNova University Centre, Roslagstullsbacken 21,  
106 91, Stockholm, Sweden  
E-mail: enfors@biotech.kth.se  
Tel.: +46-8-55378302  
Fax: +46-8-55378323

M. Ketudat-Cairns · T. Charoenrat  
School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology,  
Suranaree University of Technology,  
Nakhon Ratchasima, 30000, Thailand

MLFB	Methanol limited fed-batch
OLFB	Oxygen limited fed-batch
OUR	Oxygen uptake rate ( $\text{mol h}^{-1}$ )
PI	Propidium iodide
$q_o$	Specific oxygen uptake rate ( $\text{mol g}_{\text{cell}}^{-1} \text{h}^{-1}$ )
$q_{o,max}$	Maximum specific oxygen uptake rate ( $\text{mol g}_{\text{cell}}^{-1} \text{h}^{-1}$ )
$q_p$	Specific $\beta$ -glucosidase productivity ( $\text{U g}_{\text{cell}}^{-1} \text{h}^{-1}$ )
$Q_i$	Inlet air flow rate ( $\text{L h}^{-1}$ )
$Q_o$	Outlet air flow rate ( $\text{L h}^{-1}$ )
RRR	Relative rate of respiration
$V$	Medium volume (L)
$V_m$	Molar volume of gas ( $\text{L mol}^{-1}$ )
$X$	Biomass concentration from dry weight ( $\text{g L}^{-1}$ )
$Y_{\text{CO}_2/\text{S}}^{\text{C}}$	Carbon yield coefficient of carbon dioxide from methanol ( $\text{mol mol}^{-1}$ )
$Y_{\text{X}/\text{S}}^{\text{C}}$	Carbon yield coefficient of biomass from methanol ( $\text{mol mol}^{-1}$ )

### Introduction

*Pichia pastoris* is a methylotrophic yeast that is often genetically engineered to express proteins [1]. It is suited for foreign protein expression for three main reasons: it can be easily manipulated at the molecular genetic level; it can express and secrete proteins at high levels; and it can perform many of the 'higher eukaryotic' protein modifications such as glycosylation, disulfide-bond formation and proteolytic processing [2].

*Pichia pastoris* can be grown to very high cell densities (more than  $130 \text{ g dry cell weight L}^{-1}$ ) [3, 4]. It also contains a tightly methanol-controlled alcohol oxidase (*AOX1*) promoter that is induced by methanol and can be used to drive expression of foreign genes [5]. The strong promoter, coupled with the high cell-density fermentation, has allowed production of recombinant product at very high levels. Product concentrations can



reach  $22 \text{ g L}^{-1}$  for intracellular production [6] and  $14.8 \text{ g L}^{-1}$  of clarified supernatant for secretion protein production [7].

In recombinant protein production by *P. pastoris*, a four-stage fermentation protocol has been suggested [4]. After an initial batch phase on glycerol to produce biomass, an exponential glycerol feed with glycerol-limiting concentration is applied for a short period to derepress the *AOX1* promoter [8]. Then a low but increasing methanol feed is applied matching the increasing AOX activity caused by the induction [9]. This results in increasing oxygen uptake rate, and when DOT reaches about 25% air sat., the methanol feed rate is kept constant during the main production phase to avoid oxygen limitation. Under these conditions the concentration of methanol is very low and growth-rate-limiting.

Several papers describe the effect of methanol concentration on *P. pastoris*. At low concentration ( $< 3\text{--}5 \text{ g L}^{-1}$ ) the specific growth rate exhibits typical Monod kinetics [10], but at higher concentrations substrate inhibition is observed [10–12]. However, in spite of the methanol-inhibiting effects on growth and substrate uptake observed by Katakura et al. [12], the specific rate of production of a human  $\beta_2$ -glycoprotein I domain V fragment increased considerably. This might be due to a higher *AOX1* promoter activity at the higher methanol concentration but no AOX data were presented in this paper. However, high methanol concentration cannot be kept in high cell-density cultures without oxygen limitation or temperature limitation [9]. Facultative organisms like *Saccharomyces cerevisiae* and *E. coli* switch to anaerobic metabolism and accumulate toxic metabolites when exposed to oxygen limitation. Such responses have been suggested to play a major role in the scale-up responses of such organisms [13]. The information of *P. pastoris* response to oxygen limitation when growing on methanol is limited. Trentmann et al. [14] compared two *P. pastoris* cultivation techniques, methanol-limited and

methanol-saturated, with oxygen limitation cultures. The recombinant scFv protein quality and productivity were higher in the methanol-saturated processes. On the other hand, no significant difference was found when both techniques were applied for mouse endostatin production [15].

The methanol metabolism of *P. pastoris* has been reviewed by Lin Cereghino and Cregg [16] and the methanol and oxygen consumption has been modeled by Jahic et al. [4]. The pathways summarizing the metabolism of methanol in the methylotrophic yeast *P. pastoris* are shown in Fig. 1. Molecular oxygen is not only used for the respiration but also for the initial oxidation of methanol to formaldehyde. This reaction, catalyzed by the AOX enzyme, generates hydrogen peroxide that can also be used by AOX for methanol oxidation. Thus, two potentially toxic metabolites are generated in the cell during the initial methanol oxidation [5, 17, 18]. Of these components, formaldehyde could be expected to accumulate in the cells with detrimental effect when the cells are exposed to oxygen limitation.

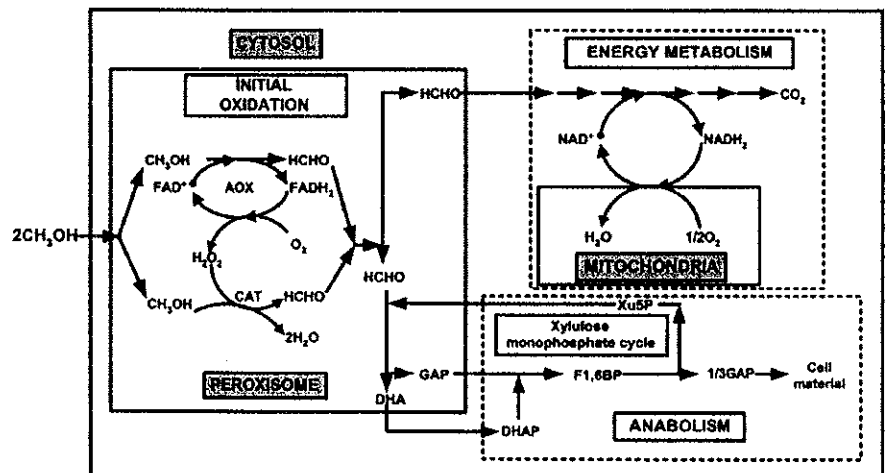
In this work we investigate the possibility to run fed-batch cultures with higher methanol concentration under oxygen limitation. Oxygen-limited fed-batch (OLFB) was compared with methanol-limited fed-batch (MLFB) for the production of the Thai Rosewood  $\beta$ -glucosidase.

## Materials and methods

### Strain and plasmid

The *P. pastoris* strain Y-11430 (wild-type strain) was a gift from J. Lin Cereghino [16].  $\beta$ -glucosidase cDNA gene from Thai Rosewood (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre) [20] was cloned into the *pPIC $\alpha$ B* vector (Invitrogen). The *pPIC $\alpha$ B* with the  $\beta$ -glucosidase gene was then integrated in to *P. pastoris* Y-11430 at the *AOX1* promoter.

Fig. 1 Methanol metabolism in *P. pastoris*: AOX alcohol oxidase; CAT catalase; GAP glyceraldehyde-3-phosphate; DHA dihydroxyacetone; DHAP dihydroxyacetone phosphate; F1,6BP fructose-1,6-bisphosphate; Xu5P xylulose-5-phosphate. Adapted from Douma et al. [19]



### Inoculum preparation

The first inoculum culture was prepared from one colony of *P. pastoris* on YPD agar (yeast extract 10 g, peptone 20 g and dextrose 20 g in 1 L of deionized water) containing 100 µg zeocin ml<sup>-1</sup> suspended in 20 ml YPD broth containing 100 µg zeocin ml<sup>-1</sup>. The culture was incubated at 30° C, in a 100-ml baffled shake-flask on rotary shaker with 200 rpm for 24 h. A second inoculum culture was prepared by transferring the entire 20 ml of first inoculum into 1,000-ml baffled shake-flask that contained 80 ml BMGY medium (yeast extract 10 g, peptone 20 g and glycerol 10 g; dissolved in 1 L of 0.1 M potassium phosphate buffer pH 6.0). The culture was then incubated under the same condition as the first inoculum culture for 24 h.

### Fed-batch fermentation

The fed-batch fermentation was carried out in a 10-L stirred tank bioreactor (Belach Bioteknik AB, Stockholm) which contained 3.0 L of glycerol basal salts (GBS) medium (containing H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 85% 26.7 ml; CaSO<sub>4</sub> 0.93 g; K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 18.2 g; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 14.9 g; KOH 4.13 g; glycerol 40.0 g; PTM1 trace salts 4.35 ml in 1 L of deionized water). The PTM1 trace salts contained: CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 6.0 g; KI 0.08 g; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 3.0 g; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.2 g; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.02 g; ZnCl<sub>2</sub> 20.0 g; FeCl<sub>3</sub> 13.7 g; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.9 g; H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5.0 ml; biotin 0.2 g in 1 L of deionized water. The fermentation was controlled under the following conditions: temperature 30° C, aeration 6 L min<sup>-1</sup>, agitation 1,000 rpm and pH 5.0. Ammonia solution 25% was used to control pH and addition of antifoam A (A-5758, Sigma) was controlled by a level electrode.

A four-stage fermentation protocol was used in this study: The first stage was a glycerol batch phase. About 24 h after inoculation when the glycerol was completely consumed as indicated by the DOT signal, the process was switched to glycerol fed batch with a glycerol feed (GF) medium (glycerol 500 g L<sup>-1</sup> and PTM1 trace salts 12 ml L<sup>-1</sup>) added to the bioreactor at an exponentially increasing rate of 0.18 h<sup>-1</sup> starting with 35.5 ml h<sup>-1</sup>. After 3–3.5 h when the cell density reached 40 g L<sup>-1</sup> (OD<sub>600</sub> = 80), the process was switched to the third phase (methanol induction phase) by replacing the GF medium with the methanol feed (MF) medium (12 ml PTM1 trace salts per liter of methanol). The initial MF medium feed rate was constant at about 10 ml h<sup>-1</sup> for 2–3 h until the production phase. The MF medium was then fed into the bioreactor with different strategies (MLFB or OLFB).

### Methanol feed control

In the MLFB, the DOT was kept at 25% air sat. by means of a feedback control of the methanol feed rate based on the DOT signal (Fig. 2a). In the OLFB, the

methanol concentration was kept at 350 mg L<sup>-1</sup> by means of feedback control of the methanol concentration from methanol analysis (Fig. 2b).

### Analyses

#### Cell concentration and viability

Cell concentration was monitored by measuring the optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>). Dry cell weight was determined by centrifugation of 5 ml of culture broth at 4,500 rpm for 10 min, and the supernatant was collected for the analysis of other compounds. The pellet was washed with distilled water once and dried at 105° C, till constant weight.

The viability was measured by staining with propidium iodide (PI; Sigma, P-4170). A Partec PAS flow cytometry (Partec GmbH, Münster, Germany) equipped with a 488-nm argon laser was used for this analysis. Samples taken from the fermentor were diluted with PBS (0.16 M NaCl, 0.003 M KCl, 0.008 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 0.001 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.3). For staining, 25 µl of a stock solution containing 200 µg ml<sup>-1</sup> of PI dissolved in water was added to 975 µl of diluted sample at room temperature. Samples were then analyzed, at a data rate of about 1,500 counts s<sup>-1</sup>. A count of 50,000 was collected in each measurement. The measurement was calibrated by using 3 µm diameter fluorescent beads (Standard 05-4008, Partec GmbH). PI-positive cells were considered as dead and the PI-negative cells were considered as viable.

#### Total protein concentration

The total protein concentration in the supernatant was analyzed according to Bradford [21]. Bovine serum albumin was used as standard protein.

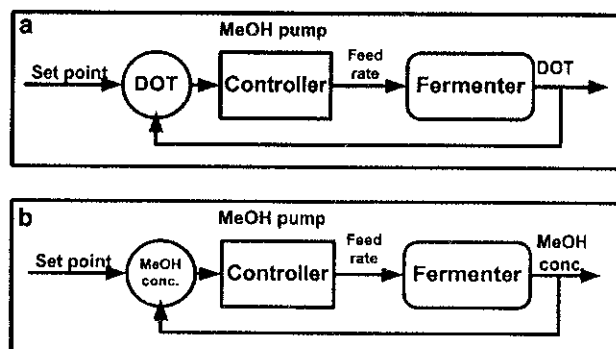


Fig. 2 Block diagram of the methanol feed control: a DOT regulation for a methanol-limited fed-batch (MLFB) process and b methanol concentration regulation for an oxygen-limited fed-batch (OLFB) process

### *$\beta$ -glucosidase activity*

$\beta$ -glucosidase activity was assayed by Evans method [22]. This method used spectrophotometric assay to measure the release of *p*-nitrophenol (pNP) from *p*-nitrophenol- $\beta$ -D glucopyranoside (pNP-Glu) by  $\beta$ -glucosidase reaction. The 3.3 mM pNP-Glu in 0.1 M sodium acetate buffer pH 5.0 was used as a substrate. One unit of enzyme was defined as the amount of enzyme releasing 1  $\mu$ mol pNP per minute at 30° C, pH 5.0.

### *Methanol feed*

Methanol feed rate was calculated from the signal of a balance on which the feed solution was placed. The integrated value of this feed rate was used as the total methanol consumption since the accumulation in the medium and the evaporation of methanol were insignificant when compared to the feed.

### *Outlet gas analysis*

The concentrations of oxygen, carbon dioxide and methanol in the outlet air were continuously analyzed using Industrial Emissions Monitor Type 1311 (Brüel & Kjær, Innova, Denmark). The methanol signal was calibrated (at the stirrer speed, 1,000 rpm; aeration rate, 6 L min<sup>-1</sup>; and temperature 30° C in liquid phase, applied in the process) by addition of aliquots of methanol to the fermentor in a 1 g L<sup>-1</sup> NaCl solution before fermentation, as described recently [9].

### *Calculation of relative respiration rate and carbon mass balances*

The oxygen uptake rate (OUR) (mol h<sup>-1</sup>) and carbon dioxide production rate (CPR) (mol h<sup>-1</sup>) were calculated from:

$$\text{CPR} = \frac{Q_o \text{CO}_{2,o} - Q_i \text{CO}_{2,i}}{100 V_m} \quad (1)$$

$$\text{OUR} = \frac{Q_i \text{O}_{2,i} - Q_o \text{O}_{2,o}}{100 V_m} \quad (2)$$

$$Q_o = \frac{Q_i (100 - \text{O}_{2,i} - \text{CO}_{2,i})}{(100 - \text{O}_{2,o} - \text{CO}_{2,o})} \quad (3)$$

where  $Q$  is air flow rate (l h<sup>-1</sup>),  $\text{O}_2$  is oxygen concentration in air (% v/v),  $\text{CO}_2$  is carbon dioxide concentration in air (% v/v), and  $V_m$  is molar volume of the gas at the analysis temperature (24.04 l mol<sup>-1</sup>). Subscripts *i* and *o* refer to inlet and outlet gas, respectively.

Relative rate of respiration (RRR) is a ratio between the observed specific oxygen uptake rate ( $q_o$ ; g g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) and the maximum specific oxygen uptake rate ( $q_{o,\text{max}}$ ; g g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>).

$$\text{RRR} = \frac{q_o}{q_{o,\text{max}}}, \quad (4)$$

where  $q_o$  was obtained from:

$$q_o = \frac{\text{OUR}}{XV}, \quad (5)$$

in which  $X$  is cell concentration (g L<sup>-1</sup>) and  $V$  is culture volume (l).  $q_{o,\text{max}}$  was obtained from the maximum  $q_o$  value before methanol or DOT became limiting.

For the carbon mass balance calculations, a previously analyzed carbon concentration in *P. pastoris* (0.396 g g<sup>-1</sup>) was used [4].

### *SDS-PAGE analysis*

The sample, containing 60  $\mu$ l of supernatant, 25  $\mu$ l of sample buffer (NuPAGE LDS 4x sample buffer, Invitrogen), 10  $\mu$ l of 0.5 M dithiothreitol and 5  $\mu$ l of 3.5% PMSF in ethanol, was incubated for 10 min at 95° C. SDS-PAGE was performed on NuPAGE Novex 4–12% Bis-Tris Gel (1.0 mm  $\times$  10 well; Invitrogen) using MOPS-running buffer. Ten  $\mu$ l of prepared sample was loaded to each well and run at 200 V for 60 min. The gel was stained with Coomassie Blue R-250 for 30 min and destained (with destain solution; 100 ml L<sup>-1</sup> methanol and 100 ml L<sup>-1</sup> glacial acetic acid in distillate water) for 1–2 h.

### *Alcohol oxidase activity*

Alcohol oxidase was assayed with the method described recently [9]. Sample from the fermentation (5 ml) were centrifuged at 4,200 rpm, 4° C for 10 min. The volume of supernatant was measured. The cell pellet was washed once with 5 ml of 0.1 M potassium-phosphate buffer pH 7.5 and finally suspended in the same buffer to the original supernatant volume. The cells were then disintegrated in a French press (SLM Aminco, USA) at 800 bars. One milliliter of 0.1 M potassium-phosphate buffer pH 7.5 with 2,000 units of catalase (from bovine liver, Sigma-Aldrich, Sweden) and 10  $\mu$ l of cells homogenate were mixed. Catalase was added to assure that the hydrogen peroxide produced was converted to molecular oxygen, making the stoichiometry of the reaction 1 mol O<sub>2</sub> per 2 mol of CH<sub>3</sub>OH. The reaction was started by adding 10  $\mu$ l of 10 M methanol. Oxygen consumption was assayed polarographically with a Clark type oxygen electrode (Medelco AB, Sweden) at 37° C in air-saturated buffer. Alcohol oxidase units were expressed as a  $\mu$ mol of methanol oxidized per minute.

## **Results and discussion**

### *Cell growth and product accumulation*

The duplication processes of OLFB and MLFB processes showed the good reproducibility. The biomass

concentration profiles were quite similar for the two control strategies, but with a higher maximum value for the OLFB ( $129 \text{ g L}^{-1}$ ) than for the MLFB ( $122 \text{ g L}^{-1}$ ; Fig. 3a). Also the  $\beta$ -glucosidase accumulation was higher in the OLFB with total  $6,000 \text{ U L}^{-1}$  supernatant fluid, compared to  $5,170 \text{ U L}^{-1}$  in the MLFB process. The specific  $\beta$ -glucosidase productivity ( $q_p$ ) declined slowly during the process, but it was still about 52% of the initial value after 120 h of induction (Fig. 3b), indicating a capacity for extending the process even if the cell density does not increase. This is in agreement with earlier results on production of a fusion protein between a cellulose binding module and a lipase with *P. pastoris*, when the specific productivity was even better preserved during 160 h [4]. Thus, the oxygen limitation did not inhibit  $\beta$ -glucosidase accumulation which is similar to other protein productions [14, 23].

#### Effect of feed strategy on total methanol consumption and OUR

The methanol feed in the MLFB was regulated with the DOT electrode keeping the DOT constant at 25% air sat. (Fig. 4a). After a transient accumulation of methanol to  $700 \text{ mg L}^{-1}$ , the concentration decreased below the detection limit (about  $25 \text{ mg L}^{-1}$ ) in 5 h (Fig. 4d). In the OLFB, the methanol concentration was automatically controlled at  $350 \text{ mg L}^{-1}$  (Fig. 4d), and it resulted in a rapid drop of DOT below the detection limit (Fig. 4a). In the OLFB, the OUR was about 40% higher than in the MLFB (Fig. 4b) and it was kept relatively constant in both processes.

Correspondingly, the total methanol consumption was about 40% higher in OLFB (Fig. 4d). Thus, the increased oxygen transfer rate obtained by the use of the

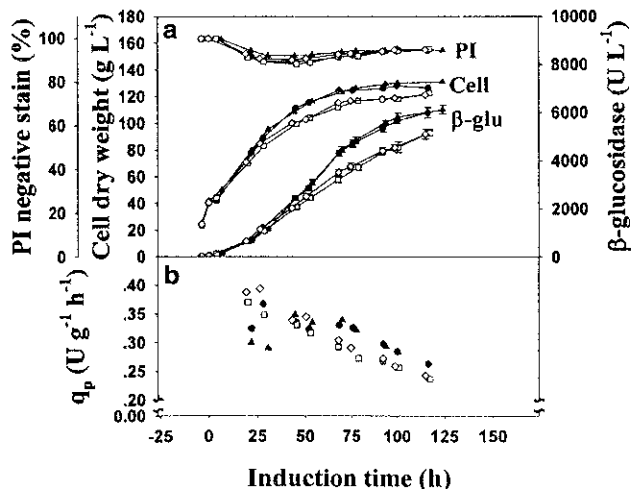


Fig. 3 a Fermentation profile of  $\beta$ -glucosidase production in MLFB (open symbols, thin lines) and OLFB (close symbols, thick lines); cell dry weight,  $\beta$ -glucosidase activity and PI-negative-stained cell b specific productivity ( $q_p$ )

OLFB technique resulted in higher OUR and correspondingly higher methanol consumption rate. This was similar to a recent work on mouse endostatin production [15] and scFv production [14] when the methanol-saturation condition was applied for *P. pastoris* expression system.

The relative respiration rate (RRR), i.e., the current respiration rate divided by the maximum respiration rate is a parameter that can be used to describe the degree of oxygen limitation. It should also be a measure of the degree of methanol limitation, provided the organism is obligately aerobic and has no alternative pathways for the methanol metabolism. This analysis showed that both processes were quite similar with respect to degree of energy limitation (Fig. 4c). Initially, after the induction, both cultures were nonlimited with respect to oxygen and methanol and RRR was 1, but then this parameter dropped rapidly in both processes and approached about 0.20–0.25 with slightly a higher value (i.e., less degree of energy limitation) for the MLFB.

#### Maintenance demand and viability

Taking into account that considerably more methanol was consumed in the OLFB process but only slightly

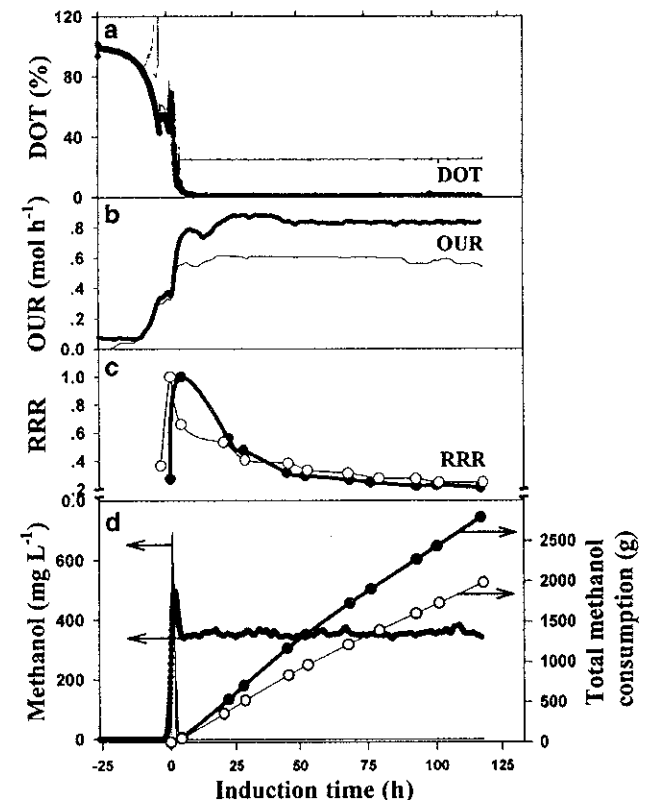


Fig. 4 Comparison of a DOT, b OUR, c RRR and d methanol concentration (lines) and total methanol uptake (symbols) in MLFB (open symbols, thin lines) and OLFB (close symbols, thick lines)

more cells were produced, the carbon yield coefficient of biomass from methanol ( $Y_{X/S}^C$ ) must have been lower in the OLFB process. This was further investigated by carbon mass balances.

Carbon mass balances based on methanol input and outputs of biomass, carbon dioxide and protein in the medium showed good agreement in both processes. The methanol loss in the outlet air is insignificant since the methanol analyzer signal from  $500 \text{ mg L}^{-1}$  in the fermentor is kept stable for at least 2 days under calibration condition (data not shown). During the main part of the process time the carbon recovery was 98–99% (Fig. 5). The extracellular protein in the medium accounted for less than 0.4 % of the total carbon (data not shown). Thus, no major by-products from the methanol metabolism were produced. The  $Y_{X/S}^C$  ( $\text{molC molC}^{-1}$ ) gradually declined from 0.33 to 0.24 for the OLFB and from 0.38 to 0.27 for the MLFB (Table 1). Corresponding carbon yield coefficients of carbon dioxide from methanol ( $Y_{\text{CO}_2/S}^C$ ) increased from 0.60 to 0.74 in the OLFB and from 0.59 to 0.72 in the MLFB. The decreasing biomass yield and the increasing carbon dioxide yield reflects the increasing total maintenance demand at declining specific growth rate [4] but it also shows that the maintenance demand is larger in the OLFB.

Methanol is known to be toxic for many species. However, *P. pastoris* is quite resistant to methanol and  $10 \text{ g L}^{-1}$  methanol exhibited only a slight reduction of the specific growth and methanol uptake rates [12]. Not until the methanol concentration reached  $30 \text{ g L}^{-1}$  was the growth almost completely inhibited. Therefore the higher methanol concentration in the OLFB process ( $350 \text{ mg L}^{-1}$ ) was not expected to be inhibitory. However, the low oxygen concentration in the OLFB might cause an accumulation of intracellular methanol if it limits the oxidation rate of methanol. This is especially intriguing since in vitro assays of the AOX kinetics showed a very high  $K_m$  (0.7 mM) for oxygen at 10 mM methanol [5].

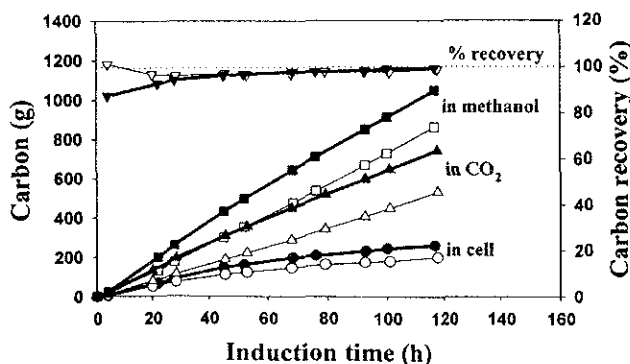


Fig. 5 Carbon mass balances of a MLFB (open symbols) and an OLFB (close symbols): carbon in cell (circle), carbon in  $\text{CO}_2$  (triangle), carbon in methanol (square) and carbon recovery (inverted triangle)

The possible toxic effect of methanol in the OLFB process was investigated by comparing the viability analyzed as frequency of dead cells according to propidium iodide (PI) staining. This method has previously been used to reveal large differences in viability of *P. pastoris* cultures under different process conditions [9]. However, no difference in viability was observed between the OLFB and the MLFB processes (Fig. 3a). In both cases the frequency of viable cells dropped to about 90% during the first 22 h of induction but then it stayed within 90–95% throughout the processes.

#### The intracellular AOX activity

The  $\beta$ -glucosidase accumulation during the transition phase after the induction was similar to both cultivation techniques, but after 20 h higher level of  $\beta$ -glucosidase accumulation was observed in OLFB process (Fig. 3a). To investigate whether there were differences in the activity of the AOX promoter, the intracellular AOX activity was compared. Figure 6 shows that the AOX activity initially showed a similar rapid increase to a maximum of about  $2,000\text{--}2,300 \text{ U g}_{\text{cell}}^{-1}$  after 20 h of induction in both techniques. Then during the main production phase a gradual decrease of the AOX activity was observed in both processes, but the decrease was less pronounced in the OLFB and at the end of the process, the OLFB exhibited 37% higher AOX activity. This might be due to the fact that the methanol concentration was higher and not growth-limiting in the OLFB. It is also plausible that the higher  $\beta$ -glucosidase production, at least partly, could be due to a higher activity of the *AOX1* promoter since the deviation between the  $q_p$  curve (Fig. 3b) and the AOX curve for the two processes follows a similar pattern after about 50 h (Fig. 6).

#### Product purity

One of the advantages of the *P. pastoris* system for the production of recombinant proteins is that it often permits secretion of the product to a defined mineral salt medium contaminated with only a few host proteins. At the end of the processes, at about  $120\text{--}130 \text{ g L}^{-1}$  cell dry weight, the  $\beta$ -glucosidase activity was higher in an OLFB process ( $6,000 \text{ U L}^{-1}$ ) than in a MLFB process ( $5,200 \text{ U L}^{-1}$ ). On the contrary, the total protein in the medium (data not shown) was lower in the OLFB (final concentration about  $470 \text{ mg L}^{-1}$ ) than MLFB (about  $660 \text{ mg L}^{-1}$ ). The combined effect of these parameters was that the specific activity of the  $\beta$ -glucosidase became much higher in the OLFB processes (Fig. 7).

#### Conclusions

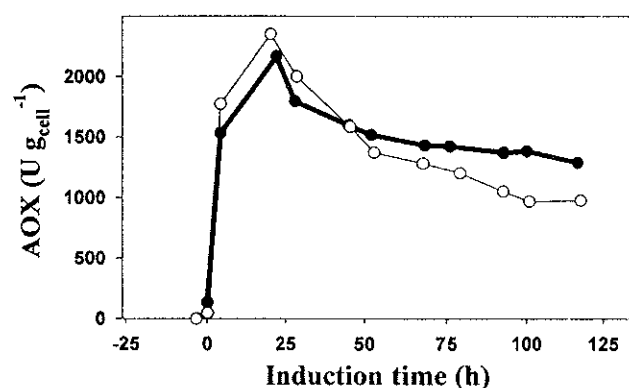
The obligately aerobic *P. pastoris* did not respond to severe oxygen limitation with major negative responses.

**Table 1** Carbon yield coefficient of biomass and carbon dioxide for MLFB and OLFB

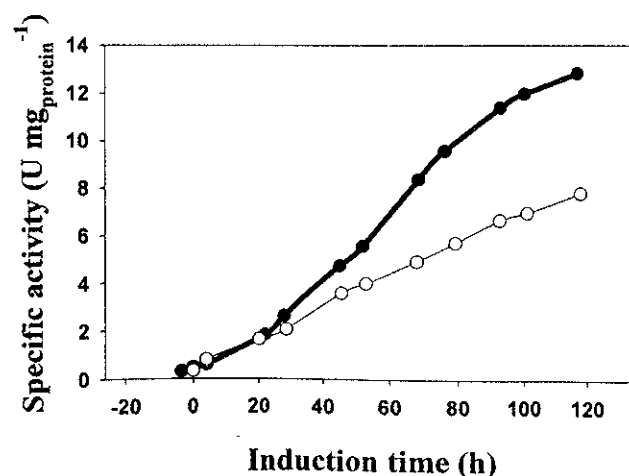
MLFB			OLFB		
Induction time (h)	$Y_{X/S}^{C^*}$ (molC molC <sup>-1</sup> )	$Y_{CO_2/S}^{C^{**}}$ (molC molC <sup>-1</sup> )	Induction time (h)	$Y_{X/S}^{C^*}$ (molC molC <sup>-1</sup> )	$Y_{CO_2/S}^{C^{**}}$ (molC molC <sup>-1</sup> )
20.1	0.38	0.59	22.0	0.33	0.60
28.6	0.38	0.59	28.0	0.34	0.60
45.6	0.36	0.61	45.1	0.33	0.63
53.0	0.34	0.62	52.0	0.32	0.64
67.9	0.33	0.65	68.4	0.3	0.67
79.1	0.32	0.66	76.0	0.29	0.68
92.4	0.29	0.68	92.6	0.27	0.71
100.9	0.28	0.70	100.0	0.26	0.72
117.7	0.27	0.72	116.7	0.24	0.74

\*\* $Y_{CO_2/S}^{C^{**}}$  Carbon yield coefficient of carbon dioxide from methanol

\* $Y_{X/S}^{C^*}$  Carbon yield coefficient of biomass from methanol



**Fig. 6** Comparison of the AOX activity in MLFB grown cells (open symbols) and OLFB grown cells (close symbols)



**Fig. 7** Specific activity of  $\beta$ -glucosidase in the culture supernatant from one MLFB (open symbols) and OLFB (close symbols) process

Therefore, an oxygen-limited fed-batch technique could be used to improve the oxygen transfer rate and productivity. An additional advantage was that less total proteins were released to the medium making the specific

product concentration in the broth much higher. On the other hand, the oxygen limitation caused an increasing maintenance demand which resulted in a lower biomass yield per methanol.

**Acknowledgements** TC is supported by the university lecturer development program from the Ministry of Education and Suranaree University, Thailand. This work is part of the BiMaC Enzyme Factory programme financed by the Södra Skogsägarnas Stiftelse för Forskning, Utveckling och Utbildning.

## References

- Higgins DR, Cregg JM (1998) Methods in molecular biology: *Pichia* protocols. In: Lin Cereghino GP, Lin Cereghino J, Ilgen C, Cregg JM (eds) Production of recombinant proteins in fermentor cultures of the yeast *Pichia pastoris*. Curr Opin Biotechnol 13:329–332
- Cregg JM, Lin Cereghino J, Shi J, Higgins DR (2000) Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. Mol Biotechnol 16:23–52
- Wegner G (1990) Emerging application of methylophilic yeast. FEMS Microbiol Rev 87:279–284
- Jahic M, Rotticci-Mulder JC, Martinelle M, Hult K, Enfors S-O (2002) Modelling of growth and energy metabolism of *Pichia pastoris* producing a fusion protein. Bioprocess Biosyst Eng 24:385–393
- Couderc R, Baratti J (1998) Oxidation of methanol by the yeast *Pichia pastoris*: purification and properties of alcohol oxidase. Agric Biol Chem 44:2279–2289
- Hasslacher M, Schall M, Hayn M, Bona R, Rumbold K, Lückl J, Griengl H, Kohlwein SD, Schwab H (1997) High-level intracellular expression of hydroxynitril lyase from the tropical rubber tree *Hevea brasiliensis* in microbial hosts. Protein Expression Purif 11:61–71
- Werten MWT, van den Bosch TJ, Wind RD, Mooibroek H, de Wolf FA (1999) High-yield secretion of recombinant gelatines by *Pichia pastoris*. Yeast 15:1087–1096
- Chiruvolu V, Eskridge K, Cregg J, Meagher M (1998) Effect of glycerol concentration and pH on growth of recombinant *Pichia pastoris* yeast. Appl Biochem Biotechnol 75:63–173
- Jahic M, Wallberg F, Bollok M, Garcia P, Enfors S-O (2003) Temperature limited fed-batch technique for control of proteolysis in *Pichia pastoris* bioreactor cultures. Microbial Cell Factories 2:1–6
- Kobayashi K, Kuwae S, Ohya T, Ohda T, Ohyama M, Ohi H, Tomomitsu K, Ohmura T (2000) High-level expression of recombinant human serum albumin from the methylotrophic

- yeast *Pichia pastoris* with minimal protease production and activation. *J Biosci Bioeng* 89:55–61
11. Zhang W, Bevisn MA, Plantz BA, Smith LA, Meagher MM (2000) Modelling *Pichia pastoris* growth on methanol and optimizing the production of a recombinant protein, the heavy-chain fragment C of botulinum, serotype A. *Biotechnol Bioeng* 70:1–8
  12. Katakura Y, Zhang W, Zhuang G, Omasa T, Kishimoto M, Goto Y, Suga K-I (1998) Effect of methanol concentration on the production of human  $\beta_2$ -glycoprotein I domain V by a recombinant *Pichia pastoris*: a simple system for the control of methanol concentration using a semiconductor gas sensor. *J Ferm Bioeng* 86(5):482–487
  13. Enfors S-O, Jahic M, Rozkov A, Xu B, Hecker M, Jürgen B, Krüger E, Schweder T, Hamer G, O'Beirne D, Noisommit-Rizzi N, Reuss M, Boone L, Hewitt C, McFarlane C, Nienow A, Kovacs T, Trägårdh C, Fuchs L, Revstedt J, Friberg PC, Hjertager B, Blomsten G, Skogman H, Hjort S, Hoeks F, Lin H-Y, Neubaer P, van der Lans R, Luyben K, Vrabel P, Manelius A (2001) Physiological responses to mixing in large scale bioreactors. *J Biotechnol* 85:175–185
  14. Trentmann O, Khatri NK, Hoffmann F (2004) Reduced oxygen supply increases process stability and product yield with recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnol Prog* 20:1766–1775
  15. Trinh LB, Phue JN, Shiloach J (2003) Effect of methanol feeding strategies on production and yield of recombinant mouse endostatin from *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioeng* 82:438–444
  16. Lin Cereghino J, Cregg JM (2000) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microb Rev* 24:45–66
  17. Sibirny AA, Ubijvovk VM, Gonchar MV, Titorenko VI, Voronovsky AY, Kapultsevich YG, Bliznik KM (1990) Reaction of direct formaldehyde oxidation to CO<sub>2</sub> are not-essential for energy supply of yeast methylotrophic growth. *Arch Microbiol* 154:566–575
  18. Sibirny AA, Titorenko VI, Gonchar MV, Ubijvovk VM, Ksheminskaya GP, Vitvitskaya OP (1988) Genetic control of methanol utilizing in yeast. *J Basic Microbiol* 28:293–319
  19. Douma AC, Veenhuis M, de Koning W, Evers M, Harder W (1985) Dihydroxyacetone syntase is localized in the peroxisomal matrix of methanol-grown *Hansenula polymorpha*. *Arch Microbiol* 143:237–243
  20. Ketudat-Cairns JR, Champattanachai V, Srisomsap C, Wittman-Liebold B, Thiede B, Svasti J (2000) Sequence and expression of Thai Rosewood  $\beta$ -glucosidase/ $\beta$ -fucosidase, a family I glycosyl hydrolase glycoprotein. *J Biochem* 128:999–1008
  21. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitative of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
  22. Evans CS (1985) Properties of the  $\beta$ -glucosidase (cellobiase) from the wood-rotting fungus *Coriolus versicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol* 22:128–131
  23. Hellwig S, Emde F, Raven NPG, Henke M, van der Logt P, Fischer R (2001) Analysis of single-chain antibody production in *Pichia pastoris* using on-line methanol control in fed-batch and mixed-feed fermentations. *Biotechnol Bioeng* 74:344–352

## ประวัตินักวิจัย

### ประวัติหัวหน้าโครงการ

- ชื่อ (ภาษาไทย)                      นาง มารีนา เกตุทัต-คาร์นส์  
(ภาษาอังกฤษ)                      Mrs. Mariena Ketudat-Cairns
- เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 1014 01120 08 7  
รหัสประจำตัวนักวิจัย    38 40 0999
- ตำแหน่งปัจจุบัน                    ผู้ช่วยศาสตราจารย์
- หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้  
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร  
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี  
เลขที่ 111 ถ. มหาวิทยาลัย ต. สุรนารี อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000  
โทรศัพท์ (044) 224355    โทรสาร (044) 224150  
e-mail: ketudat@sut.ac.th

### 5. ประวัติการศึกษา

- พ.ศ. 2531    วิทยาศาสตร์บัณฑิต (ชีววิทยา)  
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- พ.ศ. 2538    Ph.D. (Biology)  
University of California, San Diego, USA

### 6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

- Molecular Biology
- Genetic Engineering
- Recombinant Protein Production
- Bioinformatics

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ: ระบุสถานภาพในการทำวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอโครงการวิจัย เป็นต้น

7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ไม่มี,

ผู้ประสานงานชุดโครงการวิจัยโปรตีน, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : มีชื่อโครงการวิจัย ดังต่อไปนี้

- Production of Tilapia Transglutaminase
- Expression and Production of  $\beta$ -glucosidase from Thai Plants in *Pichia pastoris*



- Purification of the Enzyme Taq DNA polymerase
- Tilapia Sex Chromosome Identification Using DNA probe
- Molecular Identification of *Dendrocalamus asper* from SUT farm
- Genetic, Morphology, and Behavior Characterization in Thai Native Fowl

### 7.3 ผู้ร่วมวิจัยในโครงการวิจัย ดังต่อไปนี้

- Functional Analysis of the Maize bZIP Protein Opaque (NIH, USA) แล้วเสร็จ 2537
- Clonal Selection of Sweet Bamboo for Commercial and Industrial Uses แล้วเสร็จ 2545
- Investigation of Rice Beta-Glycosidase Gene Functions. (National Science and Technology Development Agency National Center for Genetic Engineering and Biotechnology)

### 7.4 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว :

- Functional Analysis of the Maize bZIP Protein Opaque-2 (NIH, USA), แล้วเสร็จ 2537
- Purification of the Enzyme Taq DNA polymerase, แล้วเสร็จ 2541
- Tilapia Sex Chromosome Identification Using DNA probe, แล้วเสร็จ 2543
- Clonal Selection of Sweet Bamboo for Commercial and Industrial Uses, แล้วเสร็จ 2545
- Molecular Identification of *Dendrocalamus asper* from SUT farm, แล้วเสร็จ 2546
- Genetic, Morphology, and Behavior Characterization in Thai Native Fowl, แล้วเสร็จ 2547
- Expression and Production of  $\beta$ -glucosidase from Thai Plants in *Pichia pastoris*, แล้วเสร็จ 2548
- The Study for Optimum Production Conditions of Recombinant Proteins in Bioreactor, รายงานฉบับนี้

### 7.5 งานวิจัยที่กำลังทำ :

- Search for new Glycosyl hydrolases and theirs expression in KDML Rice  
สถานภาพในการทำวิจัย :  
เริ่มโครงการในปีงบประมาณ 2548 และได้ดำเนินการไปแล้ว 20%
- Development of biological probes to assure traceability of tilapia from the North East of Thailand  
สถานภาพในการทำวิจัย :  
เริ่มโครงการในปีงบประมาณ 2548 และได้ดำเนินการไปแล้ว 5%
- Enterokinase cloning and production  
สถานภาพในการทำวิจัย :

เริ่มโครงการในปีงบประมาณ 2549 และได้ดำเนินการไปแล้ว 20%

- Production of Tilapia Transglutaminase

สถานภาพในการทำวิจัย :

เริ่มโครงการในปีงบประมาณ 2546 และได้ดำเนินการไปแล้ว 60 %

### ประวัติผู้ร่วมวิจัยที่ 1

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นาย เทพปัญญา เจริญรัตน์  
(ภาษาอังกฤษ) Mr. Theppanya Charoenrat
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 2004 00047 62 7
3. ตำแหน่งปัจจุบัน : อาจารย์
4. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี  
มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (ศูนย์รังสิต)

อ. คลองหลวง จ. ปทุมธานี 12121

โทรศัพท์ (02) 564 -4446 ต่อ 2467 โทรสาร (02) 564-4500

e-mail: thep\_4@hotmail.com

5. ประวัติการศึกษา

- พ.ศ. 2542 วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- พ.ศ. 2545 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)  
ม. เกษตรศาสตร์
- พ.ศ. 2549 วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)  
ม. เทคโนโลยีสุรนารี

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

- Bioprocess/Biochemical Engineering
- Fermentation Process
- Recombinant Protein Production and Purification

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ : ระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอโครงการวิจัย เป็นต้น

7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : -

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : -

### 7.3 ผู้ร่วมวิจัย : ในโครงการวิจัย ดังต่อไปนี้

- Modeling and Control of *Pichia* Processes for Recombinant Protein Production, Royal Institute of Technology (KTH), Stockholm, Sweden, 2003-2004
- *Pichia* Processes Technique for Production of Tree Derived Enzymes, Royal Institute of Technology (KTH), Stockholm, Sweden, 2004-2006
- Expression and Production of  $\beta$ -glucosidase from Thai Plants in *Pichia pastoris*, แล้วเสร็จ 2548
- The Study for Optimum Production Conditions of Recombinant Proteins in Bioreactor, รายงานฉบับนี้

### 7.4 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว :

- Modeling and Control of *Pichia* Processes for Recombinant Protein Production, Royal Institute of Technology (KTH), Stockholm, Sweden, แล้วเสร็จ 2547
- Expression and Production of  $\beta$ -glucosidase from Thai Plants in *Pichia pastoris*, แล้วเสร็จ 2548
- The Study for Optimum Production Conditions of Recombinant Proteins in Bioreactor, รายงานฉบับนี้

### 7.5 งานวิจัยที่กำลังทำ :

- *Pichia* Processes Technique for Production of Tree Derived Enzymes, Royal Institute of Technology (KTH), Stockholm, Sweden ,2004-2006