เทพปัญญา เจริญรัตน์ : การพัฒนากระบวนการหมักสำหรับการผลิตรีคอมบิเนนท์โปรตีนโดย *Pichia pastoris* (FERMENTATION PROCESS DEVELOPMENT FOR RECOMBINANT PROTEIN PRODUCTION BY *Pichia pastoris*)
อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มารินา เกตุทัต-คาร์นส์, 184 หน้า.
ISBN 974-533-499-5

เนื่องจากยีสต์ *Pichia pastoris* มีอัตราการสร้างผลผลิตจำเพาะ (specific productivity) ต่ำ เป็นเหตุให้กระบวนการผลิตรีคอมบิเนนท์โปรตีนโดยยีสต์ชนิดนี้โดยมากจะใช้กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเติมสารอาหาร (fed-batch culture) ซึ่งทำให้มีความหนาแน่นของเซลล์สูง การเพาะเลี้ยงภายใต้ความหนาแน่นของเซลล์สูงนั้นส่งผลให้ความต้องการออกซิเจนสูงตามไปด้วย ดังนั้นอัตราการถ่ายเทออกซิเจนจึงเป็นตัวแปรที่สำคัญมากตัวหนึ่ง ในการทดลองนี้ได้ทำการออกแบบกระบวนการที่สะดวกและประหยัดในการเพิ่มอัตราการถ่ายเทออกซิเจนสองแบบ และทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของกระบวนการทั้งสองแบบกับกระบวนการอ้างอิง คือ กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเติมเมธานอลในอัตราที่จำกัด (methanol limited fed-batch process) ภายใต้ความดันรวม 1.2 บาร์ และ DOT (dissolved oxygen tension) เท่ากับ 25 เปอร์เซ็นต์ อากาศอิ่มตัว (กระบวนการแบบ MLFB) สำหรับกระบวนการแรกที่ทำการออกแบบเพื่อเพิ่มอัตราการถ่ายเทออกซิเจน คือ กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเติมเมธานอลภายใต้สภาวะจำกัดออกซิเจน (oxygen limited fed-batch process) ภายใต้ความดันรวม 1.2 บาร์ (กระบวนการแบบ OLFB) กระบวนการนี้จะทำการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่ออกซิเจนจำกัดส่งผลให้อัตราการถ่ายเทออกซิเจนสูงขึ้นประมาณ 35 เปอร์เซ็นต์ กระบวนการที่สอง คือ กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเติมเมธานอลในอัตราที่จำกัด ภายใต้ความดันรวม 1.9 บาร์ และ DOT เท่ากับ 25 เปอร์เซ็นต์ อากาศอิ่มตัว (กระบวนการแบบ HPFB) ซึ่งการเพิ่มความดันส่งผลให้ความสามารถในการละลายของออกซิเจนในน้ำหมักสูงขึ้น ทำให้อัตราการถ่ายเทออกซิเจนสูงขึ้นประมาณ 59 เปอร์เซ็นต์

ถึงแม้ว่าปริมาณเมธานอลที่ถูกใช้ไปทั้งหมดจะเพิ่มขึ้นในอัตราส่วนที่ใกล้เคียงกับอัตราการเพิ่มขึ้นของอัตราการถ่ายเทออกซิเจน แต่การเพิ่มของชีวมวล (biomass) นั้นน้อยกว่าอัตราส่วนของอัตราการถ่ายเทออกซิเจน คือ เพิ่มขึ้นเพียง 7 และ 12 เปอร์เซ็นต์ ในกระบวนการแบบ OLFB และกระบวนการแบบ HPFB ตามลำดับ สาเหตุเกิดจากการตอบสนองของ *P. pastoris* ต่อการเพาะเลี้ยงภายใต้ความดันสูงและสภาวะที่ออกซิเจนจำกัดโดยการเพิ่มค่าสัมประสิทธิ์การบำรุงรักษาเซลล์ (maintenance coefficient) ส่งผลให้ผลได้ของชีวมวลจากเมธานอล (biomass yield) ลดลง อย่างไรก็ตาม ผลผลิตของเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสทั้งหมดในกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบ

OLFB และกระบวนการแบบ HPFB ยังคงเพิ่มขึ้นประมาณ 41 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าที่ใกล้เคียงกับอัตราส่วนการเพิ่มขึ้นของอัตราการถ่ายเทออกซิเจน

โดยการอ้างอิงถึงการวิเคราะห์สมดุลมวลของคาร์บอนในแต่ละกระบวนการ พบว่าในทุกกระบวนการยีสต์ *P. pastoris* ไม่มีการใช้เมธานอลโดยเมตาบอลิซึมรูปแบบอื่น ยิ่งไปกว่านั้น ในทุกกระบวนการยังแสดงค่าร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตใกล้เคียงกัน เป็นการแสดงให้เห็นว่าทั้งกระบวนการแบบ OLFB และกระบวนการแบบ HPFB สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตรีคอมบิเนนท์โปรตีนได้ โดยที่กระบวนการที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุด คือ กระบวนการแบบ HPFB

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2548 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

THEPPANYA CHAROENRAT : FERMENTATION PROCESS DEVELOPMENT FOR RECOMBINANT PROTEIN PRODUCTION BY *Pichia pastoris*. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. MARIENA KETUDAT-CAIRNS, Ph.D. 184 PP. ISBN 974-533-499-5

OXYGEN TRANSFER RATE/OXYGEN-LIMITATION/HIGH PRESSURE CULTIVATION/β-GLUCOSIDASE

Due to its low specific productivity, high cell density fed-batch culture is often used for recombinant protein production by *Pichia pastoris*. High cell density causes the process to have high oxygen demand which makes the oxygen transfer rate (OTR) a key limiting parameter. In this work, two economical and simple process strategies were designed to increase the OTR and were compared with the reference methanol limited fed-batch technique of 1.2 bar total air pressure and DOT = 25% air saturation (MLFB process). The oxygen limited fed-batch technique at 1.2 bar total air pressure (OLFB process) was run under oxygen limited conditions, which could increase the OTR about 35%. The methanol limited fed-batch technique at 1.9 bar total air pressure and DOT = 25% (high pressure fed-batch, HPFB process) used an elevated total air pressure to increase the oxygen solubility, which increased the OTR about 59%.

The total methanol consumption increased almost in proportion to the OTR, but the biomass increased much less. Only 7% and 12% increases in biomass were produced in the OLFB and HPFB processes, respectively. This was due to the

response of *P. pastoris* to the oxygen limitation and high pressure condition by increasing the maintenance coefficient (q_m), which resulted in the decrease of the biomass yield ($Y_{x/s}$). However, total product formation per process increased about 41% and 50% in OLFB and HPFB, respectively, which is close to proportional to the increase in OTR.

The carbon mass balance analysis of all processes indicated that *P. pastoris* did not apply any alternative metabolism during oxygen limitation. Furthermore the percent of cell viability in all processes were similar. Thus, both OLFB and HPFB can improve the *P. pastoris* process efficiency without any major negative effect. The highest efficiency was obtained in the HPFB process.

School of Biotechnology

Academic Year 2005

Student's Signature Thapanya Charoenrat

Advisor's Signature

Co-advisor's Signature

Co-advisor's Signature N. Vanichsriratana