สภาวะการหมักที่เหมาะสมสำหรับการผลิตโปรตีน Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2)
ด้วยเชื้อ *Escherichia coli* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

โดย

นางสาวณัฐธิดา ดอนพรมมะ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2565
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

สภาวะการหมักที่เหมาะสมสำหรับการผลิตโปรตีน Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) ด้วยเชื้อ *Escherichia coli* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

โดย
นางสาวณัฐธิดา ดอนพรมมะ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2565
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

OPTIMIZATION OF FERMENTATION CONDITIONS FOR BONE MORPHOGENETIC PROTEIN 2 (BMP-2) PRODUCTION BY *ESCHERICHIA COLI* IN BIOREACTOR

By

MISS Natthida DONPROMMA

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for Master of Science (BIOTECHNOLOGY)
Department of BIOTECHNOLOGY
Graduate School, Silpakorn University
Academic Year 2022

Copyright of Silpakorn University

หัวข้อ	สภาวะการหมักที่เหมาะสมสำหรับการผลิตโปรตีน Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) ด้วยเชื้อ *Escherichia coli* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ
โดย	นางสาวณัฐธิดา ดอนพรมมะ
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	ดร. ชลเทพ อุสาคู
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ดร. ภานุ พิมพ์วิริยะกุล
	รองศาสตราจารย์ ดร. พิมพ์ชนก จตุรพิรีย์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย (ผู้รักษาการแทน)

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สาธิต นิรัติศัย)

พิจารณาเห็นชอบโดย

....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วนิดา วัฒนการุณ)

....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(ดร. ชลเทพ อุสาคู)

....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ดร. ภานุ พิมพ์วิริยะกุล)

....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร. พิมพ์ชนก จตุรพิรีย์)

....ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พีรพัฒน์ ทองนึก)

620920064 : เทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
คำสำคัญ : BMP-2, การออกแบบการทดลองส่วนประสมกลาง, เอสเชอริเชีย โคไล, วิธีพื้นผิวตอบสนอง, การกระตุ้นด้วยแลคโตส, การหาสภาวะที่เหมาะสม, ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

นางสาว ณัฐธิดา ดอนพรมมะ: สภาวะการหมักที่เหมาะสมสำหรับการผลิตโปรตีน Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) ด้วยเชื้อ *Escherichia coli* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ดร. ชลเทพ อุสาคู

Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) เป็นโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญต่อการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับกระดูกซึ่งสามารถผลิตได้จากเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* BL21 (DE3) ในรูปแบบของรีคอมบิแนนท์โปรตีนก่อนนำมา refolding เพื่อให้มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลกระทบของสภาวะการเพาะเลี้ยงเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) เพื่อผลิตโปรตีน BMP-2 ในระดับฟลาสก์ ได้แก่ ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง สัดส่วนหัวเชื้อและความเข้มข้นแลคโตส และในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ได้แก่ อัตราการให้อากาศและอัตราการกวนใบพัด ต่อความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมดและหาสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมที่สุดจากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ได้ด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง โดยเริ่มต้นศึกษาผลกระทบของทั้ง 3 สภาวะการเพาะเลี้ยงในระดับฟลาสก์แบบทีละปัจจัย พบว่าที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 9 ชั่วโมง สัดส่วนหัวเชื้อ 1% และความเข้มข้นแลคโตส 2 กรัมต่อลิตรให้ความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมดที่เหมาะสม เท่ากับ 0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 84.8 มิลลิกรัมต่อกรัม และ 70 ตามลำดับ และเมื่อศึกษาความเข้มข้นสารลดฟองในถังปฏิกรณ์ชีวภาพพบว่าที่ความเข้มข้น 40 ppm สามารถลดการเกิดฟองและให้ความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 อัตราส่วนระหว่างโปรตีนต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมดสูงสุดที่เหมาะสมเท่ากับ 0.159 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 94.7 มิลลิกรัมต่อกรัมและ 65.85 ตามลำดับ จากนั้นศึกษาผลกระทบของ 3 สภาวะการเพาะเลี้ยงในระดับฟลาสก์แบบพร้อมกันเพื่อหาสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมด้วยการออกแบบการทดลองส่วนประสมกลาง โดยกำหนดช่วงของสภาวะการเพาะเลี้ยงจากผลการทดลองที่ได้เบื้องต้น ได้แก่ ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงระหว่าง 6-12 ชั่วโมง สัดส่วนหัวเชื้อระหว่าง 1-9% และความเข้มข้นแลคโตสระหว่าง 1-3 กรัมต่อลิตร จากการวิเคราะห์ทางสถิติร่วมกับแบบจำลองของผลการทดลองจากสภาวะการทดลองที่ได้จากการออกแบบการทดลอง พบว่าหนึ่งในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมที่สุดคือ ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 8.54 ชั่วโมง สัดส่วนหัวเชื้อ 7.02% และความเข้มข้นแลคโตส 2.96 กรัมต่อลิตร โดยให้ความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด เท่ากับ 0.192 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 118.39 มิลลิกรัมต่อกรัม ที่ร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 64.1 และสุดท้ายนำสภาวะที่เหมาะสมที่สุดจากในฟลาสก์มาใช้ศึกษาหาสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมที่สุดในถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยวิธีการออกแบบการทดลองส่วนประสมกลาง โดยกำหนดช่วงของสภาวะการเพาะเลี้ยงที่สนใจ ได้แก่ อัตราการให้อากาศระหว่าง 0.5-1.5 vvm และอัตราการกวนของใบพัดระหว่าง 150-350 รอบต่อนาที พบว่าการวิเคราะห์ทางสถิติร่วมกับแบบจำลองของผลการทดลองจากสภาวะการทดลองที่ได้จากการออกแบบการทดลอง บ่งชี้ถึงหนึ่งในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมที่สุด คือ ที่อัตราการให้อากาศและอัตราการกวนใบพัด เท่ากับ 0.994 vvm และ 253.5 รอบต่อนาทีจะให้ความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด เท่ากับ 0.191 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 133.28 มิลลิกรัมต่อกรัม ที่ร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมด เท่ากับ 71.8 ซึ่งผลจากสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทำนายทั้งในฟลาสก์และถังปฏิกรณ์ชีวภาพมีความสอดคล้องทางสถิติกับผลจากการทดลองที่สภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมดังกล่าว

620920064 : Major (BIOTECHNOLOGY)

Keyword : BMP-2, central composite design (CCD), Escherichia coli, response surface methodology (RSM), lactose inducible, optimization, Bioreactor

MISS NATTHIDA DONPROMMA : OPTIMIZATION OF FERMENTATION CONDITIONS FOR BONE MORPHOGENETIC PROTEIN 2 (BMP-2) PRODUCTION BY *ESCHERICHIA COLI* IN BIOREACTOR THESIS ADVISOR : CHONLATEP USAKU

Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) plays an important role in treatments of bone-associated diseases. With the recombinant technology, it can be produced from the commonly used cell host, *E. coli* BL21 (DE3), prior to final refolding to obtain biological activity. The objective of this study was to study the effects of culturing conditions for the culture of *E. coli* BL21 (DE3) expressing BMP-2 in the shake flask: culturing time, inoculum size, and lactose concentration, and in the bioreactor: aeration rate and agitation rate, on BMP-2 concentration, BMP-2 to DCW ratio, and the percentage of BMP-2 in total protein, and further determine optimal culturing conditions using mathematical models through response surface methodology. The effect of the three culture conditions in the shake flask were first evaluated through one-factor-at-a-time experiments, and was found that suitable levels of BMP-2 concentration, BMP-2 to DCW ratio, the percentage of BMP-2 in the total protein of 0.15 mg/mL, 84.8 mg/g, and 70%, respectively, were achieved using 9 h culturing time, 1% inoculum size, and 2 g/L lactose concentration. The suitable antifoam concentration was found to be 40 ppm as it showed a reduced level of foam formation while providing suitable levels of BMP-2 concentration, BMP-2 to DCW ratio, percentage of BMP-2 in the total protein of 0.159 mg/mL, 94.7 mg/g, and 65.85%, respectively. The effects of the three culturing conditions in the shake flask were simultaneously studied through central composite design (CCD) to determine their optimal levels. The range of these conditions were suggested by the herein obtained result including culturing time between 6-12 h, inoculum size between 1-9%, and lactose concentration between 1-3 g/L. Based on statistical analysis and the resulting models from the results from the designed 18 experimental conditions, at an optimum culturing condition: 8.54 h culturing time, 7.02% inoculum size, and 2.96 g/L lactose concentration, the highest BMP-2 concentration and BMP-2 to DCW ratio of 0.192 mg/mL and 118.39 mg/g were achieved with the percentage of BMP-2 in the total protein of 64.1%. With the optimum condition in the shake flask, the optimization study of the culturing conditions in the bioreactor with the range of interest: aeration rate between 0.5-1.5 vvm and agitation rate between 150-350 rpm, was performed with CCD. Statistical analysis and the resulting models from the results of the designed 12 experimental conditions showed that an optimum condition which provided the highest BMP-2 concentration and BMP-2 to DCW ratio of 0.191 mg/mL and 133.28 mg/g, with the percentage of BMP-2 in the total protein of 71.8% was at 0.994 vvm aeration rate and 253.5 rpm agitation rate. The experimental data obtained from the culture at the optimal conditions in both shake flask and bioreactor were statistically comparable to the predictions at the optimal conditions.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. ชลเทพ อุสาคู อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำเป็นอย่างดีที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย ตลอดจนช่วยในการปรับปรุงข้อบกพร่องต่าง ๆ ตลอดการทำวิจัย รวมถึงตรวจทานและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ผู้วิจัยตระหนักถึงความทุ่มเท และความเอาใจใส่อย่างดียิ่งของอาจารย์ และขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. พิมพ์ชนก จตุรพิรีย์ และอาจารย์ ดร. ภานุ พิมพ์วิริยะกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะแนว ตลอดจนช่วยปรับปรุงแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์มากขึ้น

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วนิดา วัฒนการุณ ที่ให้ความกรุณาเป็นประธานสอบวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พีรพัฒน์ ทองนึก ที่ให้ความกรุณาเป็นกรรมการสอบ ให้คำปรึกษา ข้อเสนอแนะเพิ่มเติมสำหรับการแก้ไขและปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากขึ้น

ขอขอบพระคุณอาจารย์ประจำภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากรทุกท่าน ที่ให้ความรู้แก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาการศึกษา และขอขอบพระคุณภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่อำนวยความสะดวกทั้งสถานที่ อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีต่าง ๆ ในการทำวิจัย ทำให้งานวิจัยดำเนินได้อย่างสะดวก และสำเร็จไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ คุณฑิพาภรณ์ ทรัพย์สมบูรณ์ คุณประไพ บางเชย และคุณนุชนาฏ เลี้ยงอำนวย เจ้าหน้าที่ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านการเบิกเครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีต่าง ๆ ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ คุณวิลพิไล ยอดยิ่งทวีลาภ และคุณศิลา ศรียา ที่ช่วยอำนวยความสะดวกติดต่อประสานงานในการดำเนินการยื่นคำร้องต่าง ๆ จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณ นางสาว สุบงกช เหมือนวงศ์ธรรม เพื่อนที่ดีที่สุด ที่คอยให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา ร่วมทุกข์ร่วมสุข ร่วมฝ่าฟันอุปสรรคต่าง ๆ และคอยให้กำลังข้าพเจ้าเสมอมาจนสามารถทำงานสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณ นางสาว กานดา พลจร พี่ที่คอยให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา ร่วมทุกข์ร่วมสุข ร่วมฝ่าฟันอุปสรรคต่าง ๆ และคอยให้กำลังข้าพเจ้าเสมอมาจนสามารถทำงานสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณ พี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้องในรุ่นป. โททุกคน ที่คอยเป็นกำลังใจซึ่งกันและกัน และร่วมฝ่าฟันอุปสรรคต่าง ๆ จนสามารถผ่านอุปสรรคต่าง ๆ มาได้

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัวที่ให้ความสนับสนุนการศึกษามาโดยตลอด และให้คำปรึกษา ตลอดจนคอยสร้างรอยยิ้ม เสียงหัวเราะ เป็นกำลังใจที่ดีเสนอมาเป็นแรงผลักดันที่ทำให้ผู้วิจัยมีกำลังใจศึกษาสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

นางสาว ณัฐธิดา ดอนพรมมะ

มหาวิทยาลัยศิลปากร

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย .... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .... จ
กิตติกรรมประกาศ .... ฉ
สารบัญ .... ซ
สารบัญตาราง .... ญ
สารบัญภาพ .... ฏ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 4
1.3 ขอบเขตงานวิจัย 4
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 6
2.1 ลักษณะของโปรตีน BMP-2 และการนำไปใช้ประโยชน์ในมนุษย์ 6
2.2 *Escherichia coli* 7
2.3 การแสดงออกของโปรตีนในแบคทีเรีย 8
2.4 Auto induction medium (AIM) 10
2.5 การออกแบบการทดลอง 11
2.6 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ 16
2.7 สารลดฟอง (antifoam) 17
2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 18
บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง 24

มหาวิทยาลัยศิลปากร

3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้และระบบการแสดงออกของโปรตีน BMP-2 ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ 24
3.2 ศึกษาผลกระทบของสภาวะการเพาะเลี้ยง *E. coli* BL21 (DE3) ต่อการผลิตโปรตีน BMP-2 ในระดับฟลาสก์และถังปฏิกรณ์ชีวภาพ 25
3.3 หาสภาวะที่เหมาะสมด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองร่วมกับการออกแบบการทดลองแบบส่วนประสมกลางในการเพาะเลี้ยง *E. coli* BL21 (DE3) เพื่อผลิตโปรตีน BMP-2 สูงสุดในระดับห้องปฏิบัติการ 27
3.4 หาสภาวะที่เหมาะสมด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองร่วมกับการออกแบบการทดลองแบบส่วนประสมกลาง ในการเพาะเลี้ยง *E. coli* BL21 (DE3) เพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตโปรตีน BMP-2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ........................29
3.5 วิธีการวิเคราะห์........................31
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง........................35
4.1 ผลกระทบของสภาวะการเพาะเลี้ยง *E. coli* BL21 (DE3) ต่อการผลิตโปรตีน BMP-2 ในระดับฟลาสก์และถังปฏิกรณ์ชีวภาพ 35
4.2 หาสภาวะที่เหมาะสมด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองร่วมกับการออกแบบการทดลองแบบส่วนประสมกลางในการเพาะเลี้ยง *E. coli* BL21 (DE3) เพื่อผลิตโปรตีน BMP-2 สูงสุดในระดับห้องปฏิบัติการ 41
4.3 หาสภาวะที่เหมาะสมด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองร่วมกับการออกแบบการทดลองแบบส่วนประสมกลาง ในการเพาะเลี้ยง *E. coli* BL21 (DE3) เพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตโปรตีน BMP-2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ........................54
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง 66
รายการอ้างอิง........................69
ภาคผนวก ก 75
ภาคผนวก ก........................76
ภาคผนวก ข........................79
ประวัติผู้เขียน 95

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ตัวแปรอิสระและรหัสที่ใช้ในกระบวนการหาค่าที่เหมาะสมที่สุดตามการออกแบบส่วนประสมกลาง 42

ตารางที่ 2 ผลกระทบของสภาวะการเพาะเลี้ยงเซลล์ E. coli BL21 (DE3) ที่ได้จากการออกแบบการทดลองแบบส่วนประสมกลางประกอบด้วย 3 ตัวแปรอิสระ ได้แก่ ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง สัดส่วนหัวเชื้อและความเข้มข้นแลคโตสในระดับฟลาสก์ 43

ตารางที่ 3 แสดงผลกระทบของตัวแปรอิสระ ได้แก่ ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง สัดส่วนหัวเชื้อและความเข้มข้นแลคโตสต่อความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมด 47

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของตัวแปรอิสระต่อค่าตัวแปรตอบสนองต่อความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมด 50

ตารางที่ 5 ตัวแปรอิสระและรหัสที่ใช้ในกระบวนการหาค่าที่เหมาะสมที่สุดตามการออกแบบส่วนประสมกลาง 55

ตารางที่ 6 ผลกระทบของการเพาะเลี้ยงเซลล์ E. coli BL21 (DE3) ที่ได้จากการออกแบบการทดลองแบบส่วนประสมกลางประกอบด้วยตัวแปรอิสระ ได้แก่ อัตราการให้อากาศและอัตราการกวนในระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพ 56

ตารางที่ 7 แสดงผลกระทบของตัวแปรอิสระ ได้แก่ อัตราการให้อากาศและอัตราการกวนใบพัดต่อความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมด 59

ตารางที่ 8 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของตัวแปรอิสระต่อผลตอบสนอง ต่อความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมด 62

ตารางที่ 9 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโปรตีนกับค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 595 นาโนเมตร 81

ตารางที่ 10 ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีคของ band BSA และความเข้มข้นโปรตีน BSA 85

ตารางที่ 11 ความสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นเซลล์กับน้ำหนักเซลล์แห้ง 89

มหาวิทยาลัยศิลปากร

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 โครงสร้างโปรตีน BMP-2 (bone morphogenetic protein-2) [28] 6

ภาพที่ 2 ลักษณะองค์ประกอบของโปรตีน BMP-2 ในแต่ละมอนอเมอร์ที่มีตำแหน่งพันธะไดซัลไฟต์ระหว่างภายในโมเลกุลสามตำแหน่ง คือ Cys34/Cys111 และ Cys47/Cys114 รูปร่างโครงสร้างคล้ายวงแหวน ส่วนวงแหวนที่สามเป็น Cys14/Cys79 รวมเรียกว่า cystine-knot และ BMP-2 ไดเมอร์ที่ตำแหน่งของกรดอะมิโน Cys78 ในแต่ละมอนอเมอร์ [28] 7

ภาพที่ 3 a) เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* BL21 (DE3) และ b) พลาสมิด pET-28a(+) vectors [30] 8

ภาพที่ 4 การแสดงออกของยีน [31] 9

ภาพที่ 5 การควบคุมการแสดงออกของยีนภายในเซลล์ E. coli a) ภายใต้สภาวะที่ไม่มีแลคโตส b) ภายใต้สภาวะที่มีแลคโตส [32] 9

ภาพที่ 6 a) โครงสร้าง 1,6 allolactose b) โครงสร้าง IPTG (Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside [33] 10

ภาพที่ 7 ขั้นตอนการออกแบบการทดลอง 11

ภาพที่ 8 การออกแบบส่วนประสมกลาง (CCD) [34] 13

ภาพที่ 9 รูปแบบของความแปรปรวนการออกแบบส่วนประสมกลาง 2 ปัจจัย (CCD) [34] 14

ภาพที่ 10 การออกแบบการทดลองบ็อกซ์-เบห์นเคน [36] 16

ภาพที่ 11 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน (stirred tank) รุ่น EYELA [37] 16

ภาพที่ 12 กราฟตอบสนองพื้นที่ผิวแสดงอิทธิพลของตัวแปรที่ศึกษาคืออัตราการกวนใบพัดและอัตราการให้อากาศที่มีผลต่อการผลิต 1,3-β-glucanase [43] 18

ภาพที่ 13 กราฟตอบสนองพื้นที่ผิวของการผลิตโปรตีน reteplase ที่แสดงอิทธิพลของตัวแปรที่ศึกษา 3 ตัวแปร ได้แก่ A) ผลกระทบระหว่างอุณหภูมิและความเร็วในการกวนขณะ pH 7.5 คงที่ B) ผลกระทบระหว่างอุณหภูมิและ pH ขณะความเร็วในการกวนเท่ากับ 300 rpm คงที่ C) ผลกระทบระหว่าง pH และความเร็วในการกวนขณะ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสคงที่ [25] 19

ภาพที่ 14 พื้นผิวตอบสนองแบบสามมิติของการศึกษา 3 ตัวแปรที่มีผลต่อการผลิตโปรตีนโดยใช้วิธีออกแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน โดย A) ผลกระทบระหว่างระยะเวลาในการกระตุ้นการผลิตโปรตีนและความเข้มข้นของ แรมโนส, B) ผลกระทบระหว่างระยะเวลาในการกระตุ้นการผลิตโปรตีนและความเข้มข้นของอาหาร, C) ผลกระทบระหว่างความเข้มข้นของอาหารและความเข้มข้นของแรมโนส [44] 20

ภาพที่ 15 ลักษณะเฉพาะของรีคอมบิแนนท์โปรตีน MPT64 ที่สภาวะเหมาะสมในการผลิตโปรตีนตรวจสอบโดยใช้ SDS-PAGE ช่อง C: จุดศูนย์กลาง, 1-5: ลำดับการทำการทดลองซ้ำที่สภาวะการทดลองที่เหมาะสม, m: Marker, (ลูกศร): รีคอมบิแนนท์โปรตีน MPT64 (ประมาณ 24 kDa) [44].21

ภาพที่ 16 ผลกระทบของการใช้สารลดฟองที่แตกต่างกัน (a) SLM54474, (b) S184, (c) VP1133 และ (d) SE9 ต่ออัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อแบคทีเรีย E. coli K-12 [42]....22

ภาพที่ 17 ความแตกต่างของ specific product activity (β-galactosidase fusion protein) ต่อความเข้มข้นเซลล์ E. coli K-12 ที่ใช้สารลดฟองที่แตกต่างกัน (a) SLM54474, (b) S184, (c) VP1133 และ (d) SE9 [42] 23

ภาพที่ 18 SDS-PAGE ของโปรตีน BMP-2 a) จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ b) จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ E. coli BL21 (DE3) โดยเลน M คือ แถบ protein marker เลน 1a) แถบโปรตีน BMP-2 จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลน 1b) แถบโปรตีน BMP-2 ในสภาวะที่ไม่ได้กระตุ้นด้วยแลคโตสและเลน 2b) แถบโปรตีน BMP-2 ในสภาวะที่กระตุ้นด้วยแลคโตส ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 16 ชั่วโมง สัดส่วนหัวเชื้อ 1% (v/v) และความเข้มข้นแลคโตส 2 กรัมต่อลิตร....25

ภาพที่ 19 การเจริญเติบโตของเซลล์ E. coli BL21 (DE3) ต่อเวลาในระดับฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร (◆, n = 3)....36

ภาพที่ 20 การเจริญเติบโตของเซลล์ E. coli BL21 (DE3) ต่อเวลาในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวนขนาด 3 ลิตร (▲, n = 1)....36

ภาพที่ 21 ผลกระทบของสภาวะการเพาะเลี้ยงของระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกันที่ความเข้มข้นแลคโตส 2 กรัมต่อลิตร สัดส่วนหัวเชื้อ 1% ต่อความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัมต่อกรัม) และร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมด 38

ภาพที่ 22 ผลกระทบของสภาวะการเพาะเลี้ยงสัดส่วนหัวเชื้อที่แตกต่างกันที่ความเข้มข้นแลคโตส 2 กรัมต่อลิตรและระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 12 ชั่วโมงต่อความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 (มิลลิกรัมต่อ

มิลลิลิตร) อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัมต่อกรัม) และร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมด 38

ภาพที่ 23 ผลกระทบของสภาวะการเพาะเลี้ยงของความเข้มข้นแลคโตสที่แตกต่างกันที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 12 ชั่วโมง สัดส่วนหัวเชื้อ 1% ต่อความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัมต่อกรัม) และร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมด..39

ภาพที่ 24 การเจริญเติบโตของเซลล์ E. coli BL21 (DE3) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน ขนาด 3 ลิตรที่สภาวะความเข้มข้นสารลดฟองแตกต่างกัน: 30 (●), 40 (◆) และ 50 ppm (▲) ที่อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm อัตราการกวนใบพัด 350 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส 40

ภาพที่ 25 ผลกระทบของความเข้มข้นสารลดฟองที่แตกต่างกัน ได้แก่ 30, 40 และ 50 ppm ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ E. coli BL21(DE3) ต่อความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมดในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 3 ลิตร..41

ภาพที่ 26 กราฟพื้นผิวตอบสนอง 3 มิติของ 3 สภาวะการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน คือ ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง สัดส่วนหัวเชื้อและความเข้มข้นแลคโตสต่อความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมด โดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง; A-C) ความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาการเพาะเลี้ยงและความเข้มข้นแลคโตส ขณะที่สัดส่วนหัวเชื้อเท่ากับ 5%; D-F) ความสัมพันธ์ระหว่างสัดส่วนหัวเชื้อและความเข้มข้นแลคโตส ขณะที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 9 ชั่วโมง..48

ภาพที่ 27 ภาพ 2 มิติแสดงจุดของสภาวะที่เหมาะสมที่สุดหลังการทำ optimal condition โดยที่ A) ค่า Desirability ที่ได้จากสภาวะการเพาะเลี้ยง B) ความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 C) อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และ D) ร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมดที่สภาวะการเพาะเลี้ยงที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 8.54 ชั่วโมง สัดส่วนหัวเชื้อ 7.02% และความเข้มข้นแลคโตส 2.96 กรัมต่อลิตร..51

ภาพที่ 28 เปรียบเทียบค่าตัวแปรตอบสนองที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ E. coli BL21 (DE3) ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 8.54 ชั่วโมง สัดส่วนหัวเชื้อ 7.02% และความเข้มข้นแลคโตส 2.96 กรัมต่อลิตร โดยที่ A) ความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 B) อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และ C) ร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมดในระดับฟลาสก์บ่มที่ความเร็วรอบเขย่า 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส..53

ภาพที่ 29 เปรียบเทียบค่าตัวแปรตอบสนองที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ E. coli BL21 (DE3) ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงจริง 9 ชั่วโมง สัดส่วนหัวเชื้อ 7% และความเข้มข้นแลคโตส 3 กรัมต่อลิตรในระดับฟลาสก์บ่มที่ความเร็วรอบเขย่า 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่อัตราการให้อากาศ 1 vvm และอัตราการกวนใบพัด 250 รอบต่อนาที............................54

ภาพที่ 30 กราฟพื้นผิวตอบสนอง 3 มิติของ 3 สภาวะการเพาะเลี้ยงเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) ของ 2 ตัวแปรอิสระที่แตกต่างกัน คือ อัตราการให้อากาศและอัตราการกวนใบพัดต่อตัวแปรตอบสนอง คือ A) ความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 B) อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและ C) ร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมดโดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 3 ลิตร...60

ภาพที่ 31 ภาพ 2 มิติแสดงจุดของสภาวะที่เหมาะสมที่สุดหลังการทำ optimal condition โดยที่ A) ค่า Desirability ที่ได้จากสภาวะการเพาะเลี้ยง B) ความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 C) อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และ D) ร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมดที่สภาวะการเพาะเลี้ยงที่อัตราการให้อากาศ 0.994 vvm และอัตราการกวนใบพัด 253.5 รอบต่อนาที........63

ภาพที่ 32 เปรียบเทียบค่าตัวแปรตอบสนองที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) ที่อัตราการให้อากาศ 0.994 vvm และอัตราการกวนใบพัด 253.5 รอบต่อนาที โดยที่ A) ความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 B) อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและ C) ร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมดในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส.............................65

ภาพที่ 33 กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นโปรตีน BSA กับค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 595 นาโนเมตร...81

ภาพที่ 34 กราฟมาตรฐานพื้นที่ใต้พีคของ band BSA และความเข้มข้นโปรตีน BSA.......................86

ภาพที่ 35 กราฟมาตรฐานกราฟมาตรฐานระหว่างความหนาแน่นเซลล์ (OD_{600}) กับน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อ E. coli BL21 (DE3) ที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส...........89

ภาพที่ 36 ผลการรันลำดับเบส ในโปรแกรม blastx เพื่อพิสูจน์ลำดับเบสของโปรตีน BMP-2..........90

ภาพที่ 37 ผลการทดลอง SDS-PAGE ของสภาวะการเพาะเลี้ยงเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) ที่สภาวะของการเพาะเลี้ยง 3 สภาวะการเพาะเลี้ยงคือระยะเวลาการเพาะเลี้ยง สัดส่วนหัวเชื้อและความเข้มข้นแลคโตส ทั้งหมด 2 ซ้ำ...90

ภาพที่ 38 ผลการทดลอง SDS-PAGE ของสภาวะการเพาะเลี้ยงเชื้อ E coli BL21 (DE3) ที่แตกต่างกันที่ได้จากการออกแบบการทดลองด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองแบบส่วนประสมกลางของทั้ง 3 สภาวะ

การเพาะเลี้ยงคือ ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง สัดส่วนหัวเชื้อและความเข้มข้นแลคโตสในระดับฟลาสก์ทั้งหมด 18 รัน (A-D).....91

ภาพที่ 39 ผลการทดลอง SDS-PAGE ของการทวนสอบสภาวะการเพาะเลี้ยงเชื้อ E coli BL21 (DE3) ที่เหมาะสมที่สุดทั้ง 3 ตัวแปรอิสระ คือ ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 9 ชั่วโมง สัดส่วนหัวเชื้อ 7% และความเข้มข้นแลคโตส 3 กรัมต่อลิตรในระดับฟลาสก์ (A) และถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (B).....92

ภาพที่ 40 ผลการทดลอง SDS-PAGE ของสภาวะการเพาะเลี้ยงเชื้อ E coli BL21 (DE3) ที่แตกต่างกันหลังจากการออกแบบการทดลองด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองแบบส่วนประสมกลางของทั้ง 2 ตัวแปรอิสระ คือ อัตราการให้อากาศและอัตราการกวนใบพัดในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ มีทั้งหมด 12 รัน (A-C)93

ภาพที่ 41 ผลการทดลอง SDS-PAGE ของการทวนสอบสภาวะการเพาะเลี้ยงเชื้อ E. coli BL21 (DE3) ที่เหมาะสมที่สุดของทั้ง 2 ตัวแปรอิสระ คือ อัตราการให้อากาศ 1 vvm และอัตราการกวนใบพัด 250 รอบต่อนาที.....94

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบัน สัดส่วนประชากรสูงอายุในประเทศไทยเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยในปี ค.ศ. 2022 มีจำนวนประชากรสูงวัยอายุ 60 ปีขึ้นไปเป็นจำนวน 12 ล้านคน คิดเป็นร้อยละ 18.3 ของจำนวนประชากรทั้งหมด และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง [1] หนึ่งในปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญต่อสังคมผู้สูงอายุเหล่านี้ คือ โรคกระดูกพรุน ซึ่งนำไปสู่การเกิดกระดูกเปราะหรือหักได้ง่าย ส่งผลให้เกิดความเจ็บป่วยและความพิการในผู้สูงอายุ การรักษาโรคกระดูกพรุนในปัจจุบันด้วยการใช้ยา เช่น ยากลุ่มบิสฟอสโฟเนต (bisphosphonate) เป็นต้น หรือการใช้ฮอร์โมนเอสโทรเจน (estrogen) มีจุดประสงค์เพื่อลดความเสี่ยงจากการเกิดโรคกระดูกพรุน อย่างไรก็ตาม แนวทางการรักษาดังกล่าว ทำให้เกิดผลข้างเคียงเกิดขึ้นกับร่างกายของผู้ป่วย ได้แก่ ไข้ต่ำๆ ปวดกล้ามเนื้อและข้อ และมีผลต่อไต ในผู้ป่วยวัยหมดระดูอาจช่วยเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งเต้านม ลิ่มเลือดอุดตันได้ ปัจจุบันการใช้โปรตีน bone morphogenetic protein-2 หรือ BMP-2 เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ช่วยลดการเกิดผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นจากแนวทางการรักษาทั่วไป โดยพบว่าเมื่อฉีดโปรตีนชนิดนี้บริเวณกระดูกที่เกิดความเสียหายจะกระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูกภายใน 12 สัปดาห์ทั้งในกระต่ายและในมนุษย์ [2, 3] ปัจจุบันการใช้โปรตีน BMP-2 ได้รับการอนุมัติโดยองค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (Food and Drug Administration, FDA) สำหรับการบำบัดและฟื้นฟูกระดูก [4] มีการรายงานแนวโน้มของการรักษาโรคโดยใช้โปรตีน BMP-2 ในอนาคต จะเป็นที่ต้องการในตลาดโลกเพิ่มมากขึ้น คาดว่าจะมีราคาเพิ่มสูงขึ้นจากราคาตลาดที่ 498.1 ล้านดอลลาร์สหรัฐในปี 2021 ไปเป็น 675.7 ล้านดอลลาร์สหรัฐ ภายในปี 2030 [5]

BMP-2 เป็นโปรตีนในตระกูลของ transforming growth factor beta (TGF-β) มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการพัฒนากล้ามเนื้อและกระดูก โดยกระตุ้นการพัฒนาของ osteocytes ซึ่งเป็นเซลล์กระดูกที่กำเนิดมาจากเซลล์สร้างกระดูก (osteoblasts) เพื่อนำไปสู่การสร้างกระดูกใหม่ขึ้น (osteogenesis) โดยทั่วไปโปรตีน BMP-2 จะมีฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยโครงสร้างแบบโฮโมไดเมอร์ (homodimer) ที่ประกอบขึ้นจากส่วนมอนอเมอร์ (monomer) ที่เหมือนกัน 2 โมเลกุลเชื่อมต่อกัน [6, 7] กล่าวคือโครงสร้างแบบโฮโมไดเมอร์นี้ประกอบด้วยโมเลกุลของ cysteine 7 หน่วย ซึ่งเป็น

บริเวณอนุรักษ์ (conserved region) ในโมเลกุลของโปรตีน BMP-2 ในบริเวณนี้มีการเชื่อมกันระหว่าง cysteine ในแต่ละโมเลกุลมอนอเมอร์ด้วยพันธะไดซัลไฟต์แบบโควาเลนต์ ซึ่งเรียกว่า cysteine knot ที่มีเฉพาะของโปรตีนในตระกูล TGF-beta ซึ่งทำให้โปรตีนมีความเสถียรและสามารถเกาะบนผิวเซลล์เป้าหมายและออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ ขนาดของโปรตีน BMP-2 จะขึ้นอยู่กับลำดับเบสของระบบการผลิต เวคเตอร์ที่ใช้ เป็นต้น [8] โดยทั่วไปจะมีขนาดประมาณ 26 kDa [9-11] โดยหน้าที่ของโปรตีน BMP-2 จะเป็นตัวส่งสัญญาณ (signaling) ในกลไกการเกิดกระดูก โดยการจับกับตัวรับสัญญาณ ชนิดที่ 1 และ 2 ของ serine-threonine kinase receptor หรือเรียก BMP-2 receptor บนเซลล์เป้าหมาย และส่งสัญญาณด้วยการกระตุ้น Smads (canonical) และ non-Smads (non-canonical) ซึ่งจะกระตุ้นยีน osteogenic ที่ควบคุมกระบวนการสร้างกระดูก เช่น *Runt-related transcription factor 2 (Runx2)* และ *osterix (Osx)* เป็นต้น ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพเซลล์ให้เป็นเซลล์กระดูกต่อไป [12]

การแสดงออกของโปรตีน เป็นเทคนิคที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายโดยอาศัยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเพื่อผลิตโปรตีนที่ต้องการ โดยการตัดต่อยีนที่สนใจเข้าสู่เวคเตอร์แล้วถ่ายโอนไปยังเซลล์เจ้าบ้าน โปรตีนที่ได้ คือ โปรตีนลูกผสมหรือรีคอมบิแนนท์โปรตีน (recombinant protein) การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน BMP-2 ทำได้จากเซลล์เจ้าบ้านยูคาริโอตและ/หรือโปรคาริโอต การใช้เซลล์เจ้าบ้านยูคาริโอตจะได้โปรตีน BMP-2 ที่มีคุณสมบัติทางชีวภาพคล้ายโปรตีนในธรรมชาติเนื่องจากมีกระบวนการ post-translational modification ที่ปรับแต่งโปรตีนหลังจากการแปลรหัสสารพันธุกรรม (translation) อย่างไรก็ตาม วิธีนี้มีต้นทุนในการผลิตโปรตีนค่อนข้างสูงเนื่องจากมีความยุ่งยากในการเพาะเลี้ยงเซลล์และผลผลิตของโปรตีนที่ได้มีปริมาณต่ำในระดับ 20-100 ng/mL และอาจเกิดกระบวนการผลิตมอนอเมอร์ไม่สมบูรณ์ [13-18] ในขณะที่ใช้เซลล์เจ้าบ้านโปรคาริโอต เช่น แบคทีเรีย เป็นต้น มีการเจริญเติบโตสูงและให้ผลผลิตโปรตีนสูง อีกทั้งยังมีต้นทุนในการเพาะเลี้ยงที่ต่ำกว่า จึงนิยมใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านเพื่อผลิตโปรตีน อย่างไรก็ตามเซลล์เจ้าบ้านชนิดนี้ไม่มีกระบวนการ post-translational modification ที่เหมือนกับเซลล์สัตว์หรือคน จึงอาจจะไม่เหมาะกับการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่มีความซับซ้อน เช่น โปรตีนที่มีการม้วนพับโดยมีพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide) ในโครงสร้าง เป็นต้น [19] ที่ผ่านมามีการนำเซลล์โพรคาริโอต โดยเฉพาะอย่างยิ่งเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) มาใช้ในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน [20] โปรตีนที่ได้จะอยู่ในรูป inclusion body ที่ต้องผ่านกระบวนการ solubilization และ refolding เพื่อให้โปรตีนอยู่ในรูปของโฮโมไดเมอร์จึงจะทำให้

เกิดฤทธิ์ทางชีวภาพได้ [21] โดยในงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า การ refolding โปรตีนมอนอเมอร์ของ BMP-2 ได้ผลผลิตไดเมอร์สูงถึงร้อยละ 80-96 ของมอนอเมอร์ที่ผลิตได้โดยมีปริมาณโปรตีน BMP-2 เท่ากับ 90 มิลลิกรัมโปรตีนต่อกรัมเซลล์แห้ง [16, 22] ดังนั้นปริมาณโปรตีน BMP-2 ที่ผลิตได้จึงขึ้นอยู่กับปริมาณ BMP-2 ที่สังเคราะห์จากเซลล์เจ้าบ้านก่อนการ solubilization และ refolding

ทั้งปริมาณและคุณภาพของรีคอมบิแนนท์ BMP-2 ขึ้นอยู่กับสภาวะการเพาะเลี้ยงเซลล์เจ้าบ้าน สภาวะการเพาะเลี้ยงที่สำคัญในระดับฟลาสก์ เช่น ชนิดของสารเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนรีคอมบิแนนท์ ปริมาณการเพาะเลี้ยงหัวเชื้อเริ่มต้น อุณหภูมิ ความเข้มข้นของอาหาร และหากทำการเพาะเลี้ยงในระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพ อาจต้องศึกษาสภาวะการเพาะเลี้ยงอื่นเพิ่มเติม เช่น อัตราการให้อากาศ อัตราการกวนใบพัด และความเข้มข้นของสารลดฟอง เป็นต้น ซึ่งผลของสภาวะต่อการผลิตโปรตีนมักมีปฏิสัมพันธ์ซึ่งกันและกันทำให้การหาสภาวะที่เหมาะสมด้วยการศึกษาผลกระทบของปัจจัยต่อการผลิตโปรตีนทีละปัจจัยอาจไม่ประสบความสำเร็จ และใช้ระยะเวลานานหากศึกษาหลายปัจจัย นอกจากนี้ยังต้องใช้การทดลองจำนวนมากซึ่งไม่อาจสามารถระบุปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยได้ [23, 24] ปัจจุบันมีการนำการออกแบบการทดลองโดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology, RSM) มาใช้เพื่ออธิบายความสัมพันธ์ของสภาวะการเพาะเลี้ยงหรือปัจจัย และผลกระทบต่อตัวแปรที่สนใจในรูปแบบของสมการทางคณิตศาสตร์ ซึ่งช่วยลดจำนวนของการทดลองลง ในงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการใช้การออกแบบการทดลองร่วมกับวิธีพื้นผิวตอบสนองเพื่อหาสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนในเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) พบว่าผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน reteplase หรือ endoglucanase ได้ถึง 188 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 9 กรัมต่อลิตรของมวลชีวภาพ ตามลำดับ [25, 26] นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยอีกหลายฉบับที่แสดงให้เห็นว่า วิธีการพื้นผิวตอบสนองสามารถนำไปใช้หาสภาวะที่เหมาะสมในด้านต่าง ๆ ได้ [24, 27]

อย่างไรก็ตามการผลิตโปรตีนในระดับฟลาสก์นั้นอาจยังไม่เพียงพอต่อความต้องการในอนาคต หากจะนำไปใช้ในเชิงอุตสาหกรรม จึงต้องขยายขนาดระบบการผลิต (Scale up) ในระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพเพื่อเพิ่มปริมาณของการผลิตโปรตีน ในงานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของระบบการเพาะเลี้ยง *E. coli* BL21 (DE3) ในระดับฟลาสก์และถังปฏิกรณ์ชีวภาพเพื่อเพิ่มการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน BMP-2 โดยเริ่มจากศึกษาการเจริญเติบโตและผลกระทบของสภาวะการเพาะเลี้ยงเบื้องต้นในระดับฟลาสก์และถังปฏิกรณ์ชีวภาพ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาใช้ในการออกแบบการทดลองเพื่อหาสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมของ ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง สัดส่วนหัว

เชื้อและความเข้มข้นของแลคโตสในฟลาสก์ และท้ายที่สุดนำข้อมูลที่ได้ในระดับฟลาสก์ไปใช้ในการหาสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมของ อัตราการให้อากาศ และอัตราการกวนใบพัด ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 ศึกษาการเจริญเติบโตและผลกระทบของสภาวะการเพาะเลี้ยง *E. coli* BL21 (DE3) ต่อการผลิตโปรตีน BMP-2 ในระดับฟลาสก์และถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

1.2.2 หาสภาวะที่เหมาะสมด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองร่วมกับการออกแบบการทดลองแบบส่วนประสมกลาง ในการเพาะเลี้ยง *E. coli* BL21 (DE3) เพื่อผลิตโปรตีน BMP-2 สูงสุดในระดับห้องปฏิบัติการ

1.2.3 หาสภาวะที่เหมาะสมด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองร่วมกับการออกแบบการทดลองแบบส่วนประสมกลาง ในการเพาะเลี้ยง *E. coli* BL21 (DE3) เพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตโปรตีน BMP-2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1.3.1 ศึกษาผลกระทบของปัจจัยในการเพาะเลี้ยง *E. coli* BL21 (DE3) ในระดับฟลาสก์และถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

1.3.3.1 ศึกษาการเจริญเติบโตในการเพาะเลี้ยง *E. coli* BL21 (DE3) ในระดับฟลาสก์และถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

1.3.3.2 ศึกษาผลกระทบของปัจจัยในการเพาะเลี้ยง *E. coli* BL21 (DE3) ในระดับฟลาสก์ต่อความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมด โดยสภาวะการเพาะเลี้ยงที่สนใจ ได้แก่ ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง สัดส่วนหัวเชื้อและความเข้มข้นแลคโตส เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาใช้ในการออกแบบการทดลองต่อไป

1.3.3.3 ศึกษาความเข้มข้นของสารลดฟองต่ออัตราการเจริญเติบโตและต่อความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมดในการเพาะเลี้ยงเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ โดยช่วงสภาวะที่สนใจ ได้แก่ ความเข้มข้นของสารลดฟอง 30, 40 และ 50 ppm

มหาวิทยาลัยศิลปากร

1.3.2 หาสภาวะที่เหมาะสมของการเพาะเลี้ยง *E. coli* BL21 (DE3) เพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน BMP-2 ในระดับฟลาสก์ โดยศึกษาผลกระทบของสภาวะการเพาะเลี้ยง ได้แก่ ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง สัดส่วนหัวเชื้อ และความเข้มข้นแลคโตส ต่อความเข้มข้นของโปรตีน BMP-2 อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมด ด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองร่วมกับการออกแบบการทดลองส่วนประสมกลาง ผลที่ได้จะนำมาใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

1.3.3 หาสภาวะที่เหมาะสมของการเพาะเลี้ยง *E. coli* BL21 (DE3) เพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน BMP-2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ โดยศึกษาผลกระทบของสภาวะการเพาะเลี้ยง ได้แก่ อัตราการให้อากาศและอัตราการกวนใบพัด ต่อความเข้มข้นของโปรตีน BMP-2 อัตราส่วนอัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมด ด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองร่วมกับการออกแบบการทดลองส่วนประสมกลาง

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้แนวทางของสภาวะที่เหมาะสมของการเพาะเลี้ยงเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) ที่สามารถให้ผลผลิตโปรตีน BMP-2 สูงเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้ในอนาคต

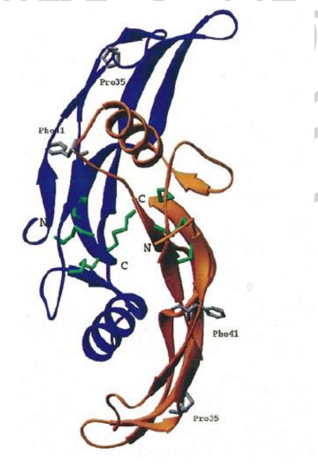
มหาวิทยาลัยศิลปากร

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะของโปรตีน BMP-2 และการนำไปใช้ประโยชน์ในมนุษย์

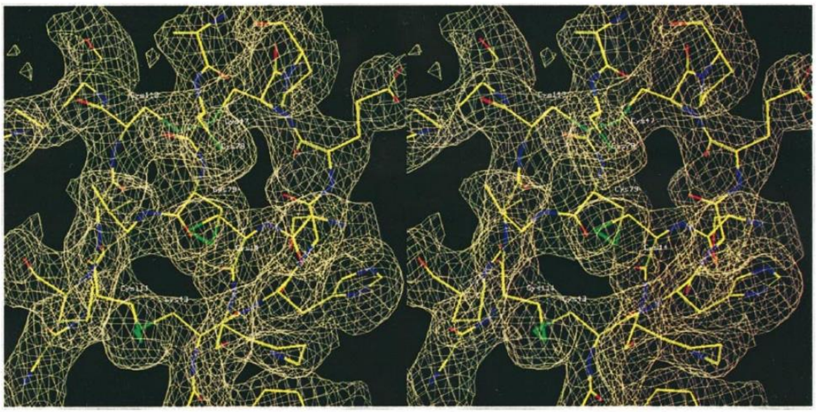
โปรตีน BMP-2 มีโครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยโมเลกุลมอนอเมอร์เหมือนกัน 2 โมเลกุลเข้าคู่กันโดยผ่านกระบวนการไดเมอร์ไรเซชั่น ซึ่งเป็นการเข้าคู่กันของโมเลกุลโปรตีน 2 โมเลกุล (Dimerization) จะได้โครงสร้างของโปรตีน BMP-2 รูปแบบไดเมอร์โดยการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ ใน**ภาพที่ 1** ระหว่างกรดอะมิโนซิลเทอีนตำแหน่งที่ 78 (Cys78) ของแต่ละโมเลกุลมอนอเมอร์ ซึ่งแต่ละโมเลกุลมอนอเมอร์มีตำแหน่งของพันธะไดซัลไฟด์ภายในโมเลกุล 3 ตำแหน่ง ได้แก่ ตำแหน่งแรกระหว่างกรดอะมิโนซิลเทอีนตำแหน่งที่ 43 และ 111 (Cys43-Cys111), ตำแหน่งที่สองระหว่างกรดซิสเทอีนตำแหน่งที่ 47 และ 113 (Cys47-Cys113) และตำแหน่งที่สามระหว่างกรดซิสเทอีนตำแหน่งที่ 14 และ 79 (Cys14-Cys79) ตามลำดับ รูปแบบทั้งสามตำแหน่งนี้จะเรียกว่า cysteine knot ซึ่งเป็นตำแหน่งอนุรักษ์ของโมเลกุลโปรตีนในตระกูลของ TGF-beta โครงสร้างของโปรตีนชนิดนี้ประกอบด้วย เบต้า ชีท (β-sheet) ซึ่งมีลักษณะเป็นแผ่นซ้อนกันไปมาในรูปแบบแอนติพาราเรล เบต้าแสตน (antiparallel β-sheets) ซึ่งเป็นเกลียวเบต้าที่เรียงติดกันแต่มีการสลับทิศทางตรงกันข้ามซึ่งตั้งฉากกับส่วนของแอลฟา เฮลิกซ์ (α-helixs) ซึ่งมีลักษณะเป็นเกลียวขดคล้ายสปริง ใน**ภาพที่ 2** [28]



ภาพที่ 1 โครงสร้างโปรตีน BMP-2 (bone morphogenetic protein-2) [28]

โปรตีน BMP-2 ได้นำมาใช้ในการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกระดูก เช่น รักษากระดูกที่เกิดแตกหักหรือเกิดความเสียหาย ด้วยการกระตุ้นให้เกิดการผลิตเซลล์กระดูกและเปลี่ยนแปลงเป็นกระดูก ปัจจุบันมีการนำโปรตีนมาใช้ในการรักษาในรูปแบบ INFUSE ® Bone Graft ในประเทศสหรัฐอเมริกา

โดยใช้รีคอมบิแนนท์ BMP-2 แต่กระบวนการผลิตโปรตีน BMP-2 นี้เกิดขึ้นในเซลล์ยูคาริโอต จึงทำให้ได้ปริมาณผลผลิตโปรตีนต่ำ ส่งผลต่อราคาผลิตภัณฑ์โปรตีน BMP-2 ให้มีราคาสูง ดังนั้น ในระบบอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ จึงเลือกใช้เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการเพิ่มปริมาณของผลผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน เนื่องจากสามารถลดต้นทุนของการผลิตและให้ผลผลิตโปรตีนที่สูง [3, 28]

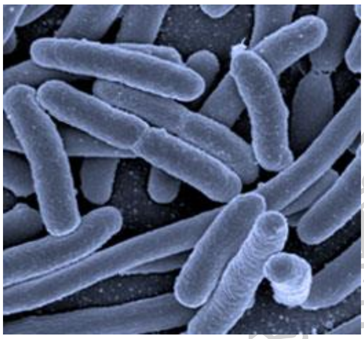


ภาพที่ 2 ลักษณะองค์ประกอบของโปรตีน BMP-2 ในแต่ละมอนอเมอร์ที่มีตำแหน่งพันธะไดซัลไฟต์ระหว่างภายในโมเลกุลสามตำแหน่ง คือ Cys34/Cys111 และ Cys47/Cys114 รูปร่างโครงสร้างคล้ายวงแหวน ส่วนวงแหวนที่สามเป็น Cys14/Cys79 รวมเรียกว่า cystine-knot และ BMP-2 ไดเมอร์ที่ตำแหน่งของกรดอะมิโน Cys78 ในแต่ละมอนอเมอร์ [28]

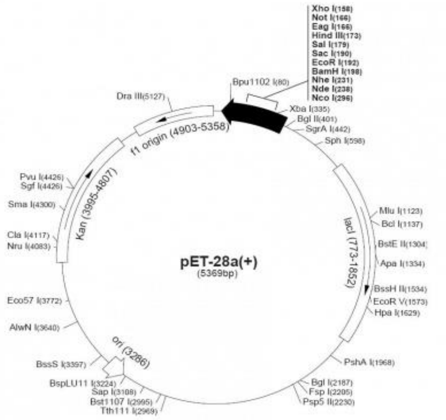
2.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli หรือ *E. coli* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative bacteria) มีรูปร่างเป็นลักษณะแท่ง (rod shape) ไม่สร้างสปอร์ ใน**ภาพที่ 3a** จัดเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม facultative anaerobe สามารถเจริญได้ทั้งที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน เป็นแบคทีเรียพบทั่วไปในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์เลือดอุ่น ในงานวิจัยส่วนใหญ่นิยมใช้เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) สำหรับการแสดงออกของโปรตีน เนื่องจากภายในเซลล์จะมีเวคเตอร์หรือพลาสมิด pET ที่ใช้ในการโคลนยีนที่มีตำแหน่งของยีนคัดเลือก (selectable marker) ซึ่งเป็นส่วนที่มียีนต้านยาปฏิชีวนะ เช่น คานามัยซิน แอมพิซิลลิน เป็นต้น ใช้ในการตรวจสอบว่าเวคเตอร์ที่เราสนใจได้เข้าไปอยู่ในเซลล์เจ้าบ้าน เช่น pET-28a(+) vectors ใน**ภาพที่ 3b** จะมีตำแหน่งยีนต้านทานยาปฏิชีวนะคานามัยซิน (Kanamycin) เพื่อใช้สำหรับคัดเลือกเซลล์ผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ต้านทานคานามัยซินได้ และเนื่องจากภายในเซลล์ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) มีการแสดงออกของโปรตีนอยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์

T7 ซึ่งเป็นโปรโมเตอร์ที่ทำให้เกิดการถอดรหัสของยีนเพื่อผลิตโปรตีนได้มากกว่าของเซลล์ดั้งเดิม (wild type) [29] จึงสามารถกระตุ้นการสร้างโปรตีนได้ในปริมาณสูงของการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน แต่อย่างไรก็ตามหากมีการแสดงออกของโปรตีนที่มากเกินไปอาจเป็นพิษต่อเซลล์ส่งผลให้ลดผลผลิตของโปรตีนลงได้



(a)

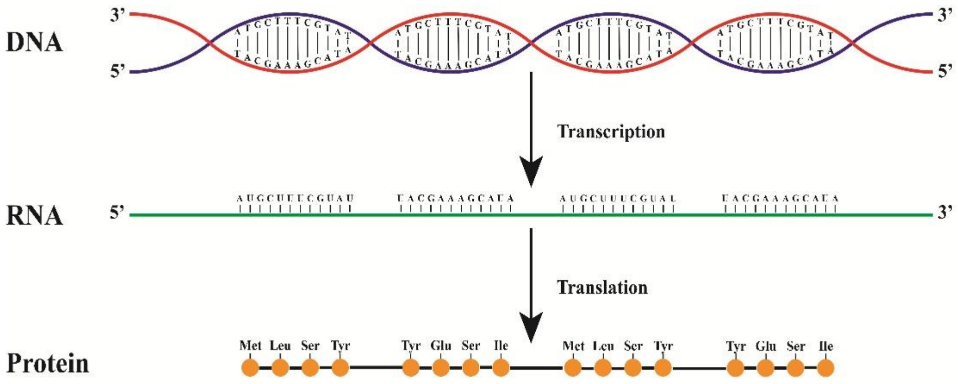


(b)

ภาพที่ 3 a) เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* BL21 (DE3) และ b) พลาสมิด pET-28a(+) vectors [30]

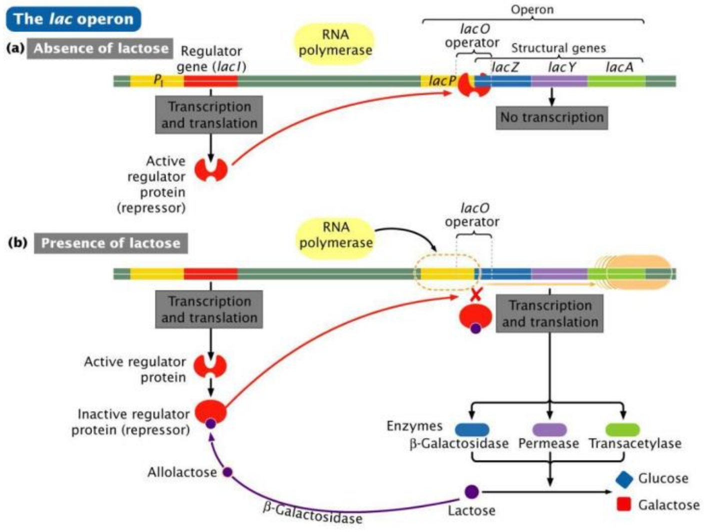
2.3 การแสดงออกของโปรตีนในแบคทีเรีย

การแสดงออกของโปรตีน (protein expression) ในแบคทีเรียเป็นเทคนิคหนึ่งที่เป็นทางเลือกให้กับนักพันธุวิศวกรรมที่ต้องการผลิตโปรตีนที่ต้องการศึกษาในเวคเตอร์ที่ต้องการ ซึ่งอาศัยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม โดยปกติแล้วในสิ่งมีชีวิตทั่วๆ ไปมีการผลิตโปรตีนในเซลล์อยู่แล้ว ซึ่งโปรตีนบางตัวผลิตขึ้นมาปริมาณที่แตกต่างกัน ดังนั้นหากจะทำการสกัดโปรตีนเหล่านั้นออกมาเพื่อศึกษาอาจจะทำได้ยากหรืออาจใช้เวลานาน ดังนั้น จึงมีเทคนิคที่ใช้การตัดต่อยีนที่สนใจเข้าเวคเตอร์และย้ายเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านที่มีทั้งเซลล์โปรคาริโอต เช่น *E. coli* หรือเซลล์ยูคาริโอต เช่น ยีสต์ เซลล์แมลง และเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม เรียกโปรตีนที่มีการแสดงโปรตีนที่เราสนใจนี้ว่าโปรตีนเชื่อมต่อหรือโปรตีนลูกผสม (recombinant protein)



ภาพที่ 4 การแสดงออกของยีน [31]

การแสดงออกของยีน (gene expression) เป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของโปรตีน เนื่องจากยีนจะถูกใช้เป็นแม่พิมพ์หรือต้นแบบให้มีผลผลิตเป็นอาร์เอ็นเอ (RNA) และโปรตีนออกมา ใน**ภาพที่ 4** ซึ่งกระบวนการนี้จะมีการควบคุมการแสดงออกของยีน ประกอบด้วยสองขั้นตอนคือ ขั้นตอนการถอดรหัส (Transcription) จากดีเอ็นเอเป็นอาร์เอ็นเอส่งข่าว (mRNA) และขั้นตอนการแปลรหัส (Translation) จากลำดับเบสของ mRNA เป็นลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน ส่วนใหญ่ในเซลล์โปรคาริโอต (Prokaryotic cell) เช่น แบคทีเรีย จะเกิดการถอดรหัสและแปลรหัสในส่วนของไซโทพลาซึม (Cytoplasm) ขณะที่ยูคาริโอตมีการถอดรหัสในนิวเคลียสและแปลรหัสในไซโทพลาซึม ซึ่งมีการควบคุมที่ซับซ้อนกว่าของเซลล์โปรคาริโอตเนื่องจากโปรตีนมีความซับซ้อน

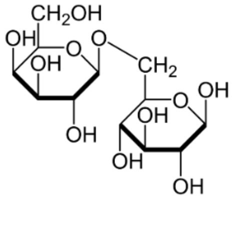


ภาพที่ 5 การควบคุมการแสดงออกของยีนภายในเซลล์ *E. coli* a) ภายใต้สภาวะที่ไม่มีแลคโตส b) ภายใต้สภาวะที่มีแลคโตส [32]

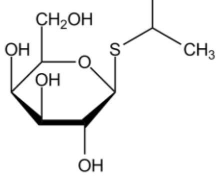
ในแบคทีเรียการแสดงออกของโปรตีนจะมีผลควบคุมมาจากยีนที่เป็นกลุ่มเรียกว่า โอเพอรอน (operon) ซึ่งประกอบด้วยยีนโครงสร้าง (structural gene) ยีนควบคุม (regulatory gene) และบริเวณบังคับการ (control site) ซึ่งแบ่งเป็นสองส่วนย่อยคือ ยีนส่งเสริม (promoter gene, *p*) และยีนดำเนินการ (operator gene, *o*) ยีนควบคุมและยีนโครงสร้างจะมีข้อมูลพันธุกรรมที่จะถูกถอดรหัสเป็น mRNA แล้วแปลเป็นลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนต่อไป ใน**ภาพที่ 5a** ในกรณีที่ไม่มีแลคโตส จะทำให้ตัวยับยั้ง (repressor) มาจับที่ตำแหน่งของ operator gene จึงทำให้ RNA polymerase เข้าจับที่ตำแหน่ง promoter ไม่ได้จึงทำให้ไม่เกิดการสังเคราะห์ของโปรตีน ใน**ภาพที่ 5b** ขณะที่ในกรณีที่มีแลคโตส เมื่อแลคโตสเข้าสู่เซลล์จะมีการเปลี่ยนไปเป็นอัลโลแลคโตสโดยเอนไซม์ **β**-galactosidase แล้วเคลื่อนไปจับกับตัวยับยั้งทำให้ตัวยับยั้งไม่สามารถจับตำแหน่งของ operator gene ทำให้เอนไซม์ RNA polymerase สามารถเข้าจับที่ promoter ได้ แล้วเคลื่อนไปยังยีนโครงสร้างเพื่อสังเคราะห์ mRNA และเกิดการสังเคราะห์โปรตีนต่อไป ซึ่งเป็นที่มาของทฤษฎีแลคโอเพอรอน ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์จึงใช้หลักการนี้ในการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ต้องการในเซลล์แบคทีเรียได้โดยใช้ตัวกระตุ้นชักนำให้เกิดการผลิตโปรตีนมากขึ้น

2.4 Auto induction medium (AIM)

Auto induction medium (AIM) ได้รับการพัฒนาขึ้นมาจากรูปแบบการเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตโปรตีนโดยใช้ IPTG (Isopropyl-**β**-D-1-thiogalactopyranoside) ซึ่งเป็นอาหารที่มีส่วนประกอบหลักคือกลูโคสและแลคโตส โดยกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการเจริญเติบโตของเซลล์เพื่อเพิ่มการเจริญเติบโตของเซลล์ให้หนาแน่นและช่วยไม่ให้เซลล์นำเอาแลคโตสไปใช้จนกว่ากลูโคสจะหมด เมื่อกลูโคสถูกใช้จนหมด แลคโตสหรือตัวกระตุ้น (inducer) จะถูกเปลี่ยนไปเป็นอัลโลแลคโตส ใน**ภาพที่ 6a** ที่มีลักษณะคล้ายกับโครงสร้างของ IPTG ใน**ภาพที่ 6b** จะไปจับกับตำแหน่งของ lac repressor (ตัวยับยั้ง) ทำให้ lac repressor ไม่สามารถไปจับกับตำแหน่งของ lac operator ได้จึงเป็นสาเหตุเกิดการสังเคราะห์โปรตีนเป้าหมาย เป็นไปตามทฤษฎีของแลคโอเพอรอน



a)

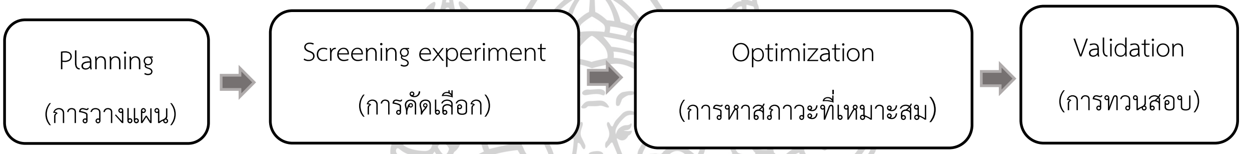


b)

ภาพที่ 6 a) โครงสร้าง 1,6 allolactose b) โครงสร้าง IPTG (Isopropyl-**β**-D-1-thiogalactopyranoside [33]

2.5 การออกแบบการทดลอง

การออกแบบการทดลอง (Design of experiment, DOE) เป็นการออกแบบเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความเหมาะสม โดยการหาค่าที่เหมาะสมที่สุด (optimization) ซึ่งอาศัยแบบจำลองหรือสมการทางคณิตศาสตร์มาอธิบายความสัมพันธ์ของปัจจัยที่มีผลต่อผลิตภัณฑ์ สามารถศึกษาผลของปัจจัยหลายปัจจัย พร้อมกันในเวลาเดียวกันด้วยวิธีจำนวนการทดลองน้อยกว่าการศึกษาทีละปัจจัยและสามารถศึกษาผลกระทบร่วมของแต่ละปัจจัย การออกแบบการทดลองจึงเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพและแม่นยำที่สามารถเปลี่ยนแปลงหรือปรับค่าของปัจจัย (factors) ที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของผลตอบสนอง (response) ที่เกิดขึ้น



ภาพที่ 7 ขั้นตอนการออกแบบการทดลอง

ในการออกแบบการทดลองส่วนใหญ่จะต้องมีขั้นตอนดังใน**ภาพที่ 7** ประกอบไปด้วยการวางแผน (planning) คือการกำหนดวัตถุประสงค์การทดลอง แล้วทำการคัดเลือก (screening experiment) เพื่อเลือกระดับของปัจจัยที่มีผลต่อความสำคัญมากที่สุดของผลิตภัณฑ์ในการออกแบบการทดลองเพื่อให้ได้โมเดลที่สามารถหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดหลังจากนั้นทำการหาสภาวะที่เหมาะสม (optimization) คือ การหาค่าที่ดีที่สุดของแต่ละปัจจัยที่มีผลต่อผลิตภัณฑ์ตามวัตถุประสงค์ของการทดลองที่ต้องการแล้วจึงทำการทวนสอบ (validation) เพื่อตรวจสอบค่าที่ดีที่สุดที่ได้มานั้นให้ผลที่ดีที่สุดต่อผลิตภัณฑ์ตามวัตถุประสงค์ของการทดลองที่ต้องการ โดยในงานวิจัยนี้จะหาสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้การออกแบบพื้นผิวผลตอบสนอง

2.5.1 การออกแบบพื้นผิวผลตอบสนอง

วิธีการพื้นผิวผลตอบสนอง (response surface methodology, RSM) เป็นการรวบรวมเอาเทคนิคทั้งทางคณิตศาสตร์และทางสถิติที่มีประโยชน์ต่อการสร้างแบบจำลองและการวิเคราะห์ปัญหาโดยผลตอบสนองที่สนใจขึ้นอยู่กับหลายตัวแปร และมีวัตถุประสงค์ที่จะหาค่าที่ดีที่สุดของผลตอบสนอง

$$y = f(x_1, x_2) + \varepsilon \qquad (1)$$

โดยกำหนดให้ปัจจัยนั้นแทนค่าด้วย x และ ε คือ ค่าความผิดพลาดของผลตอบสนอง y ที่เป็นผลมาจากการทดลองถ้ากำหนดว่า $E(y) = f(x_1,x_2) = \eta$ ดังนั้น สามารถเขียนสมการของพื้นผิวได้ คือ

$$\eta = f(x_1, x_2) \quad (2)$$

ซึ่งจะเรียกว่า “พื้นผิวผลตอบสนอง (response surface)” โดยส่วนใหญ่จะแสดงพื้นผิวตอบสนองในรูปของกราฟิก โดยที่ η จะถูกพลอตกับระดับของ x_1 และ x_2 เพื่อที่จะช่วยให้มองรูปร่างของพื้นผิวผลตอบสนองได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งอาจจะพลอตในรูปแบบของเส้นโครงร่าง (contour plot) ของพื้นผิวผลตอบสนอง โดยที่ปัญหาเกี่ยวกับพื้นที่ผิวตอบสนองส่วนมากไม่สามารถหาความสัมพันธ์ระหว่างผลตอบสนองและตัวแปรอิสระ ดังนั้นในขั้นแรกต้องหาค่าประมาณที่เหมาะสมจะใช้เป็นตัวแทนสำหรับแสดงความสัมพันธ์ที่แท้จริงระหว่างผลตอบสนอง (y) และเซตของตัวแปรอิสระ (x) โดยปกติจะใช้ฟังก์ชันพหุนามที่มีกำลังต่างๆ ภายใต้ขอบเขตบางส่วนของตัวแปรอิสระ ถ้าแบบจำลองของผลตอบสนองมีความสัมพันธ์แบบเชิงเส้นกับตัวแปรอิสระ ฟังก์ชันที่ใช้ในการประเมินความสัมพันธ์คือเป็นแบบจำลองกำลังหนึ่ง ดังสมการที่ 3

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_k x_k + \varepsilon \quad (3)$$

แต่ถ้ามีส่วนโค้งเกี่ยวของในระบบจะใช้ฟังก์ชันพหุนามที่มีกำลังสูงขึ้น เช่น พหุนามกำลังสอง ดังสมการที่ 4

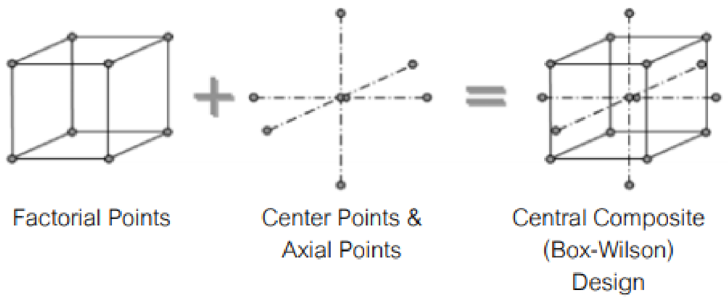
$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{k} \beta_i x_i + \sum_{i=1}^{k} \beta_{ij} x_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^{k} B_{ij} x_i x_j \quad (4)$$

เมื่อ	y	คือ ตัวแปรผลตอบสนอง
	x	คือ ปัจจัยที่ i = 1,2,..., k
	k	คือ จำนวนปัจจัยทั้งหมด
	β_0	คือ จุดตัดแกน y (y intercept)
	$\sum_{t=i}^{k} \beta_i x_i$	คือ เทอมของอิทธิพลเชิงเส้น (linear effect)
	$\sum_{i=1}^{k} \beta_{ij} x_i^2$	คือ เทอมของอิทธิพลกำลังสอง (quadratic effect)
	$\sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^{k} B_{ij} x_i x_j$	คือ เทอมของอิทธิพลร่วม (interaction effect)

ปัญหาเกี่ยวกับพื้นผิวผลตอบสนองส่วนมากจะใช้แบบจำลองกำลังหนึ่งหรือแบบจำลองกำลังสองในการหาผลตอบสนอง แต่แบบจำลองทั้งสองชนิดไม่สามารถใช้ประมาณความสัมพันธ์ตลอดพื้นผิวทั้งหมดของตัวแปรอิสระได้หากแบบจำลองมีการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรตลอดพื้นที่ผิวที่สนใจมีขนาดใหญ่ ดังนั้น การเลือกการออกแบบการทดลองเพื่อให้ครอบคลุมพื้นที่ผิวทั้งหมดเพื่อหาค่าที่ดีที่สุดของความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรจึงเป็นสิ่งที่ควรคำนึง

การออกแบบพื้นผิวผลตอบสนองมีวิธีการที่นำมาใช้ในการหาค่าที่ดีที่สุดของผลตอบสนองหลายวิธี ได้แก่ วิธีการกำลังสองน้อยสุด การปีนด้วยทางชัน การออกแบบสำหรับสร้างแบบจำลองของสมการอันดับที่หนึ่งและแบบจำลองของสมการอันดับที่สอง ซึ่งการออกแบบสำหรับสร้างแบบจำลองของสมการอันดับที่สองนี้เป็นการเน้นไปที่การสร้างแบบจำลองควอดราติกหรือแบบเส้นโค้งของผลตอบสนอง มีวิธีการที่น่าสนใจอยู่ 2 วิธีด้วยกัน คือ

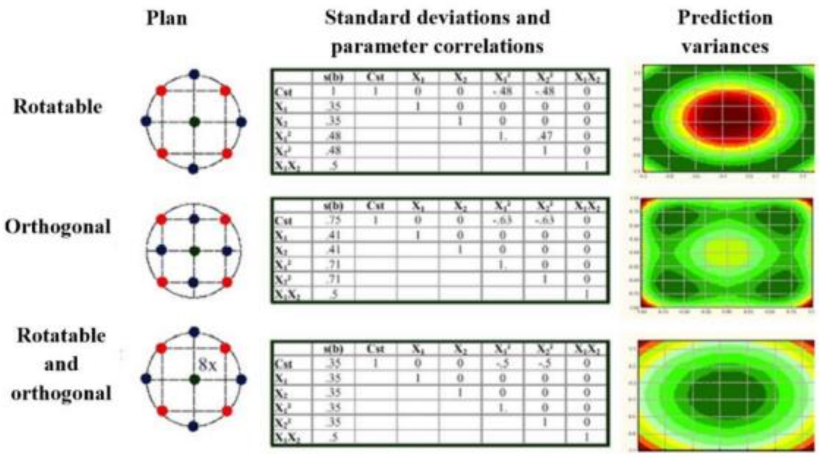
1) การออกแบบส่วนประสมกลาง (Central Composite Design; CCD) เป็นหนึ่งในวิธีการของพื้นที่ผิวตอบสนองที่นิยมใช้เพื่อหากระบวนการที่เป็นการทดลองที่ 5 ระดับ (นิยมแทนด้วยสัญลักษณ์ ($-\alpha$,-1, 0, +1, $+\alpha$) ประกอบไปด้วย 3 ส่วน คือ ส่วนที่หนึ่งเป็นการออกแบบแฟคทอเรียล (factorial point) คือการออกแบบการทดลองจุด -1, 1 เป็นการออกแบบ 2^K แฟกทอเรียล โดยที่ k คือจำนวนของปัจจัย ส่วนที่สองเป็นการทดลองที่จุดในแนวแกน (axial points) เป็นจุดของ $-\alpha$, α ซึ่งเป็นการปรับค่าตัวแปรใดตัวแปรหนึ่งในขณะที่มีการ fix ค่าตัวแปรอื่นให้เท่ากับศูนย์และส่วนที่สามเป็นการทดลองที่จุดศูนย์กลาง (center point) เป็นจุดของ 0 เป็นการปรับค่าตัวแปรทุกตัวให้เท่ากับศูนย์ [34] ใน**ภาพที่ 8**



ภาพที่ 8 การออกแบบส่วนประสมกลาง (CCD) [34]

การออกแบบส่วนประสมกลางจะมีรูปแบบความแปรปรวน 3 รูปแบบซึ่งมีผลต่อคุณภาพของการออกแบบการทดลองโดยหาจากความแปรปรวนของค่าประมาณของสัมประสิทธิ์ ความแปรปรวนของค่าประมาณผลการตอบสนอง และความแปรปรวนต่อการหมุน (iso-variance per rotation;

rotatability) ซึ่งความแปรปรวนต่อการหมุน คือ ความผิดพลาดในการคาดคะเนโดยจุดที่อยู่ในระยะห่างจากจุดศูนย์กลางของโดนเมนเดียวกันจะเท่ากันโดยการออกแบบ 2 ปัจจัย แสดงความแตกต่างของการทำนายความแปรปรวน 3 รูปแบบ ใน**ภาพที่ 9**



ภาพที่ 9 รูปแบบของความแปรปรวนการออกแบบส่วนประสมกลาง 2 ปัจจัย (CCD) [34]

การออกแบบการทดลองในรูปแบบของ Orthogonal จะมีความแม่นยำมากกว่ารูปแบบของ Rotatable เนื่องจากความสมมาตรของการออกแบบซึ่งมีส่วนจำเป็นต่อการประเมินผลกระทบเชิงเส้น ผลกระทบเชิงกำลัง และผลกระทบร่วมของตัวแปร แต่การออกแบบในรูปแบบ Rotatable จะมีความแม่นยำขึ้นเมื่อค่าตัวแปรต่างๆ สามารถประมาณได้อย่างอิสระโดยสามารถคำนวณได้ดังสมการโดยหาค่าจำนวนการทดลองของการออกแบบรูปแบบ Orthogonal (N_0)

$$N_0 = 4N_f^{0.5} - 2k + 4 \qquad (5)$$

เมื่อ N_0 คือ จำนวนของการทดลองการออกแบบแฟกทอเรียล ($N_f = 2^k$)

จำนวนการทดลองทั้งหมดของการออกแบบรูปแบบ Rotatable (N)

$$N = 2^k + 2k + N_0 \qquad (6)$$

การเพิ่มจุดศูนย์กลางหรือจุดกลาง (center point) ทำให้สามารถประเมินความผิดพลาดในการทดลองและพิจารณาความไม่พอดีของแบบจำลองให้มีความแม่นยำขึ้น แต่ก็ทำให้จำนวนการทดลองเพิ่มขึ้น โดยสามารถคำนวณจำนวนการทดลองทั้งหมดของการออกแบบในรูปแบบของ Rotatable (N) ให้มีจำนวนจุดกลางที่เหมาะสมโดยแสดงระดับของปัจจัยต่างๆ เป็นรหัสลำดับ ($-\alpha$, -1, 0, +1, $+\alpha$) แทนด้วย x_j โดยสามารถคำนวณได้ดังนี้

มหาวิทยาลัยศิลปากร

$$x_j = \frac{Z_j - Z_j^0}{\Delta Z_j} \quad (7)$$

$$\Delta Z_j = \frac{Z_j^{max} - Z_j^{min}}{2\alpha} \quad (8)$$

$$\Delta Z_j^0 = \frac{Z_j^{max} - Z_j^{min}}{2\alpha} \quad (9)$$

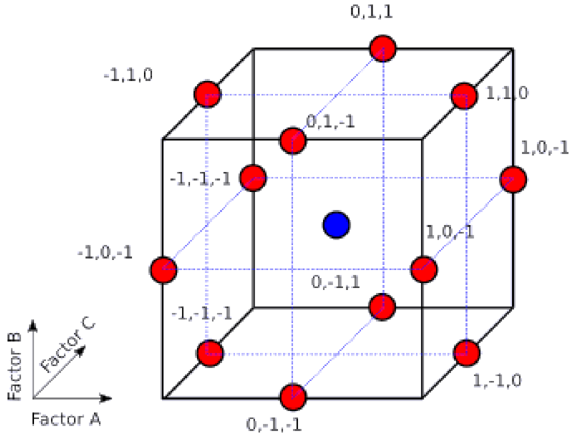
โดยที่ $\alpha = \sqrt[4]{2^k}$ และ j = 1,...,4

Z_j^{max} และ Z_j^{min} คือ ค่าสูงสุดและค่าต่ำสุดของระดับแต่ละปัจจัย

Z_j^0 คือ ค่ากลางของระดับแต่ละปัจจัย

การออกแบบการทดลองส่วนประสมกลางหรือ CCD สามารถศึกษาผลกระทบได้ทั้งปัจจัยตัวแปรที่มีความสำคัญต่อผลิตภัณฑ์หลัก (Main effect) ความสัมพันธ์ของตัวแปร (Interaction) และสมการกำลังสอง (Quadratic term) ที่สามารถแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นโค้งได้ทำให้สามารถนำค่าตัวแปรดังกล่าวไปแทนในการออกแบบการทดลองเพื่อปรับค่าตัวแปรต่างๆ ให้เหมาะสมซึ่งนำไปปรับใช้เพื่อประเมินผลกระทบของความสัมพันธ์ที่มีลักษณะเป็นเส้นโค้งได้ดีขึ้นและหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตผลิตภัณฑ์ที่ต้องการโดยใช้จำนวนการทดลองที่ไม่มาก แต่ข้อเสียของวิธีการออกแบบส่วนประสมส่วนกลางต้องมีจำนวนของระดับปัจจัยเท่ากับห้าระดับ [34]

2) การออกแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน (Box-Behnken Design) เป็นการออกแบบการทดลองในวิธีการพื้นที่ผิวตอบสนอง ซึ่งเป็นการทดลองที่ 3 ระดับในแต่ละปัจจัย (factor) หรือตัวแปรอิสระ (independent variable) นิยมแทนด้วยสัญลักษณ์ -1, 0, 1 ประกอบไปด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่เป็นจุดกึ่งกลางของแต่ละเส้นขอบ (จุดสีแดง) และตำแหน่งของจุดศูนย์กลาง (จุดสีน้ำเงิน) โดยให้ทิศทางลูกศรตามแนวแกนของแต่ละปัจจัยรูปแบบ 3 แนวแกน (แกน x; factor A, แกน y; factor B และแกน z; factor c) [35] ใน**ภาพที่ 10** แต่มีข้อจำกัดของวิธีการออกแบบบ็อกซ์-เบห์นเคนคือ จำนวนของปัจจัยมีค่าเท่ากับหรือมากกว่า 3 และมีจำนวนของการรันการทดลองที่น้อยกว่าการออกแบบการทดลอง CCD แต่มีข้อเสียต้องมีจำนวนปัจจัยเท่ากับ 3 ปัจจัยจึงจะสามารถใช้วิธีการออกแบบการทดลองนี้ได้



ภาพที่ 10 การออกแบบการทดลองบ็อกซ์-เบห์นเคน [36]

2.6 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

ภาพที่ 11 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน (stirred tank) รุ่น EYELA [37]

ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวนหรือ stirred tank เป็นชนิดที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะกระบวนการหมัก (fermentation) เนื่องจากมีต้นทุนต่ำและมีระบบการกวนและการให้อากาศซึ่งสามารถควบคุมได้ อีกทั้งยังมีประสิทธิภาพในกระบวนการหมักได้ดี [38] ซึ่งขนาดของถังหมักจะมีหลายขนาดขึ้นกับการใช้งานในห้องปฏิบัติการตั้งแต่ 1 - 30 ลิตร ใน**ภาพที่ 11** เป็นถังหมักขนาดเล็กชนิดตั้งโต๊ะ (bench top) รุ่น EYELA ประกอบด้วย ตัวถังหมักเป็นรูปทรงกระบอก (vessel) ทำจากวัสดุแก้ว ซึ่งทนความร้อนและความดันได้ (borosilicate glass) ด้านในจะมีแผ่นกั้น (baffle) เพื่อป้องกันกระแสวน (vortex) ในถังหมักและเกิดการผสมที่ดีขึ้น ฝาปิดด้านบนเป็นเหล็กปราศจากสนิมยึดติดกับตัวถัง โดยมีประเก็นหรือยางซิลิโคน (O-ring) อยู่ระหว่างฝาปิดด้านบนกับตัวถัง เพื่อให้ฝาปิดสนิทและป้องกันถังแก้วแตก เมื่อใช้งานในลักษณะจำเป็นต้องปราศจากการปนเปื้อนเชื้ออื่น

ตัวถังยังสามารถนำไปนึ่งฆ่าเชื้อได้ในหม้อนึ่งไอน้ำ (autoclave) ได้ บริเวณด้านบนจะมีช่องสำหรับใส่อิเล็กโทรดต่างๆ เช่น มีอิเล็กโทรดสำหรับวัดออกซิเจน ฟองอากาศ อุณหภูมิ และค่าความเป็นกรด-ด่าง บริเวณตรงกลางถังจะมีใบพัดกวนชนิด turbine มีลักษณะคล้ายใบพายขนาดสั้นจำนวน 6 ตัวมาติดตั้งตรงแกนกลางใบพัด ซึ่งเหมาะสำหรับอุตสาหกรรมขนาดกลาง ใช้ในการผสมผลิตภัณฑ์ที่มีความหนืดต่ำถึงปานกลางได้ดี สำหรับถังหมักที่มีขนาดใหญ่ขึ้นหรือถังหมักในระดับอุตสาหกรรมจะนิยมใช้ตัวถังเป็นเหล็กปราศจากสนิม เพื่อความแข็งแรงและคงทนต่อการใช้งาน และจะมีระบบฆ่าเชื้ออยู่ในตัว [37]

ถึงแม้ว่าการเลือกใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพจะมีผลต่อการผลิตผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ แต่ผลกระทบที่สำคัญต่อกระบวนการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ที่ต้องการในระดับอุตสาหกรรม ยังเจอปัญหาเกี่ยวกับการเกิดฟองขึ้นซึ่งอาจจะมีผลกระทบต่อกระบวนการผลิตและต้นทุนในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากทำให้เกิดการปนเปื้อนระหว่างกระบวนการผลิต และการเกิดฟองอาจจะมีผลกระทบต่อเซลล์นำไปสู่การลดลงของผลผลิตโปรตีนในการหมักรีคอมบิแนนท์โปรตีนได้ [39]

2.7 สารลดฟอง (antifoam)

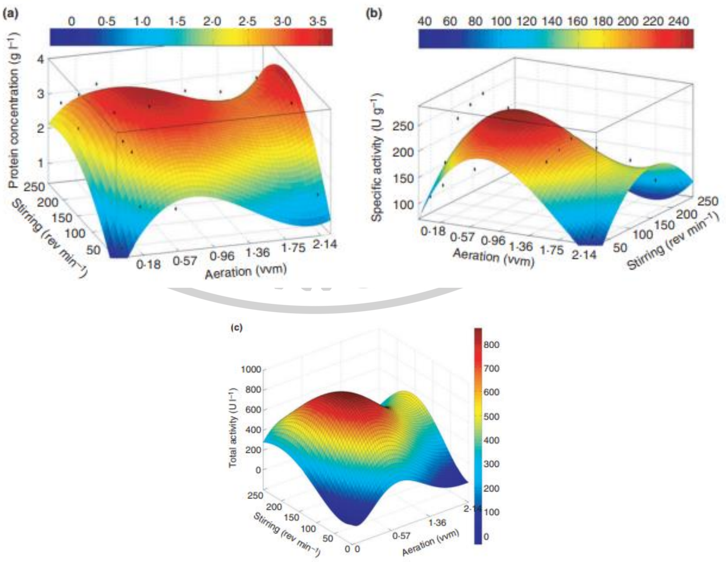
การเกิดฟองอากาศ (foam formation) ขึ้นในกระบวนการทางชีวภาพ เช่น ในกระบวนหมักเพื่อผลิตโปรตีน เกิดจากอากาศที่มีอยู่ในระบบของการเพาะเลี้ยง ซึ่งฟองอากาศเหล่านี้ส่งผลต่อกระบวนการผลิตโปรตีนต่างๆ เช่น หากมีการล้นออกมาจากระบบการเพาะเลี้ยงจะทำให้เกิดการปนเปื้อนได้หรือทำให้ผลผลิตโปรตีนที่ได้ลดลง [40] จึงจำเป็นต้องมีการกำจัดฟองอากาศ โดยวิธีการต่างๆ เช่น การระบายความร้อน (thermal method) คลื่นความถี่ (ultrasound) หรือการใช้สารเคมีโดยเติมสารลดฟอง (antifoams) ซึ่งเป็นที่นิยมใช้ในกระบวนการหมัก [41] ในงานวิจัยที่ผ่านมาได้ศึกษาเกี่ยวกับผลกระทบของการใช้สารลดฟองหรือ antifoam 4 ประเภท ได้แก่ S184 (pure silicon oil), SLM54474 (polypropylene glycol), VP1133 (silicon oil/PPG mixture) และ SE9 (aqueous emulsion with 10% silicone oil competent) ในระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์ *E. coli* K-12 ในการผลิตเอนไซม์ β-galactosidase fusion protein พบว่าสารลดฟองจำพวก VP1133 และ SE9 มีประสิทธิภาพในการลดฟองมากที่สุด เนื่องจากว่ามีผลกระทบน้อยต่อค่าความเข้มข้นของเซลล์และการผลิตโปรตีนเล็กน้อยเมื่อเทียบกับสารจำพวกอื่น อย่างไรก็ตามพบว่าการใช้สารลดฟองจำพวก SE9 อาจจะส่งผลเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์และโปรตีน แต่ก็ไม่มีผลต่อเซลล์ ในงานวิจัยนี้จึงสรุปได้ว่า

SE9 เป็นสารลดฟองที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อลดฟองจากกระบวนการหมักในระดับอุตสาหกรรมได้ [42]

จากการศึกษาชนิดของสารลดฟองในกระบวนการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนจากงานวิจัยที่ผ่านมา จะเห็นได้ว่าชนิดของสารลดฟองมีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตโปรตีนภายในเซลล์ จึงจำเป็นต้องคำนึงถึงการเลือกใช้ชนิดและความเข้มข้นของสารกำจัดฟองเพื่อให้เป็นไปตามวัตถุประสงค์ที่ต้องการได้

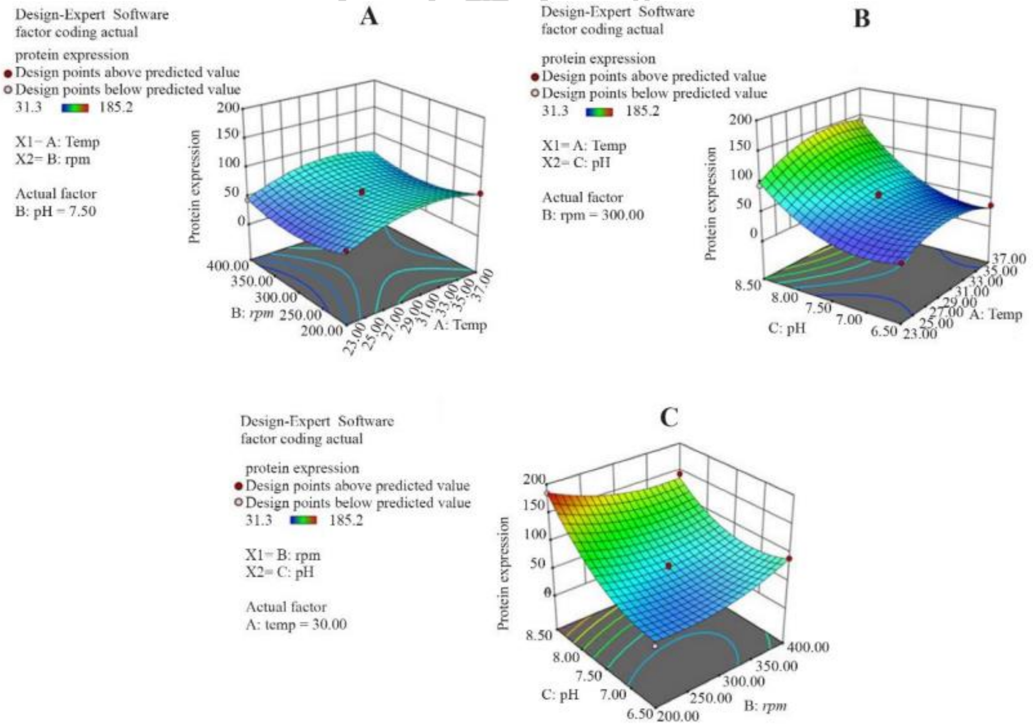
2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

งานวิจัยของ H. Zaslona และคณะ (2015) ได้ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมด้วยการออกแบบการทดลองร่วมกับวิธีพื้นผิวตอบสนองในการผลิต 1,3-β-glucanase โดยเชื้อ *E. coli* K-12 BL21 (DE3) ใช้พลาสมิด pETSD10 ผลิตเอนไซม์ใช้ย่อยพันธะไกลโคซิดิกของโพลีแซคคาไรด์อย่างจำเพาะ ในงานวิจัยนี้ศึกษาปัจจัยอัตราการให้อากาศ (0.7-0.9 vvm) อัตราการกวน (125-150 รอบต่อนาที) ที่สภาวะอัตราการให้อากาศและอัตราการกวนเท่ากับ 0.8 vvm และ 135 รอบต่อนาที ตามลำดับ ให้ความเข้มข้นโปรตีนเท่ากับ 0.074 กรัมต่อลิตรและมีค่าความจำเพาะกิจกรรมเอนไซม์ glucanase สูงสุดเท่ากับ 252 U/g [43] ใน**ภาพที่ 12**



ภาพที่ 12 กราฟตอบสนองพื้นที่ผิวแสดงอิทธิพลของตัวแปรที่ศึกษาคืออัตราการกวนใบพัดและอัตราการให้อากาศที่มีผลต่อการผลิต 1,3-β-glucanase [43]

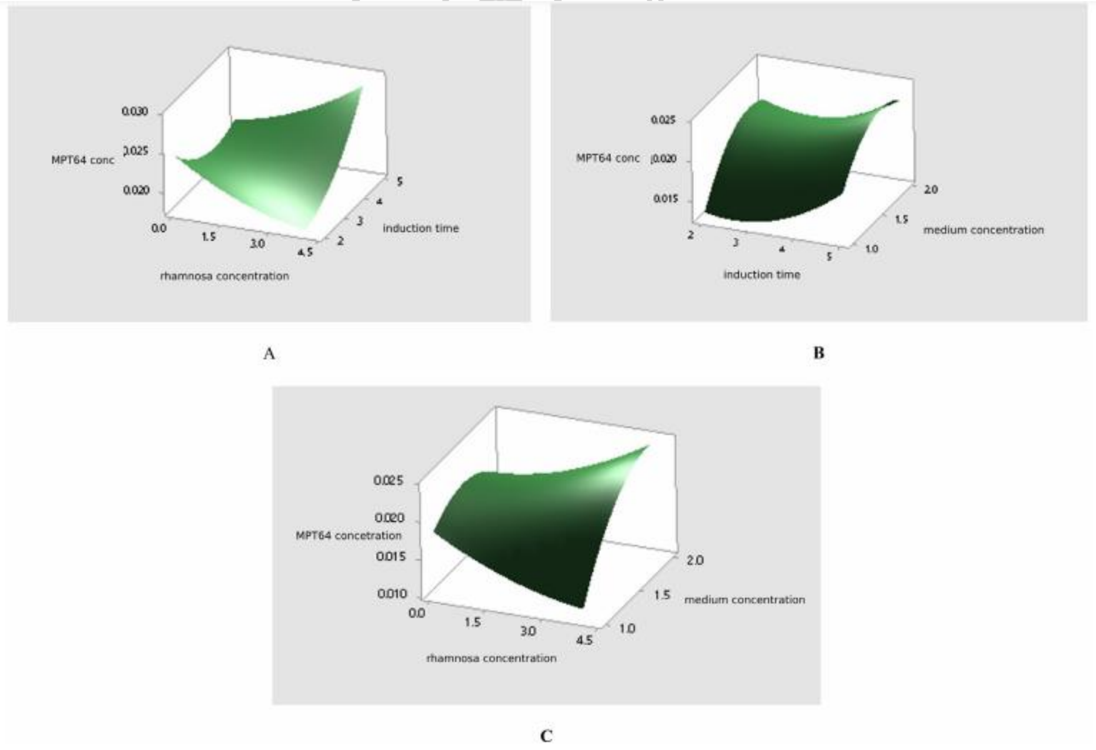
งานวิจัยของ Zare. H และคณะ (2019) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการหาสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมด้วยวิธีการออกแบบบ็อกซ์-เบห์นเคนร่วมกับวิธีพื้นผิวตอบสนองบนพื้นฐานในการผลิตโปรตีน reteplase โดยเชื้อ *E. coli* BL21 (DE3) ในระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพของการศึกษาผลกระทบของ 3 ตัวแปร ได้แก่ อุณหภูมิ (23–37 องศาเซลเซียส) อัตราการกวนใบพัด (200–400 รอบต่อนาที) และ pH (6.5 – 8.5) ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์และการผลิตโปรตีน พบว่ามีสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส อัตราการกวนใบพัด 210 รอบต่อนาทีและ pH 8.4 เมื่อนำสภาวะนี้ไปประยุกต์ใช้ในการทดลองพบว่ามีการผลิตโปรตีน reteplase ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพของผลผลิตโปรตีนสุทธิเท่ากับ 188 มิลลิกรัมต่อลิตร ใน**ภาพที่ 13** [25]



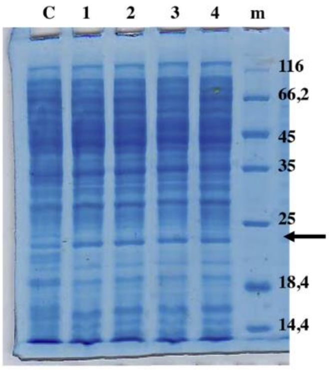
ภาพที่ 13 กราฟตอบสนองพื้นที่ผิวของการผลิตโปรตีน reteplase ที่แสดงอิทธิพลของตัวแปรที่ศึกษา 3 ตัวแปร ได้แก่ A) ผลกระทบระหว่างอุณหภูมิและความเร็วในการกวนขณะ pH 7.5 คงที่ B) ผลกระทบระหว่างอุณหภูมิและ pH ขณะความเร็วในการกวนเท่ากับ 300 rpm คงที่ C) ผลกระทบระหว่าง pH และความเร็วในการกวนขณะ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสคงที่ [25]

งานวิจัยของ Sri Agung Fitri Kusuma และคณะ (2019) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการหาสภาวะที่เหมาะสมด้วยการออกแบบการทดลองแบบบ็อกซ์-เบห์นเคนร่วมกับวิธีพื้นที่ผิวตอบสนองในการผลิตโปรตีน MPT64 ในเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) ศึกษาผลกระทบของ 3 ปัจจัย คือ ความเข้มข้นของ

อาหารเลี้ยงเชื้อ (1, 1.5, 2.0 เท่า) ระยะเวลาในการเหนี่ยวนำ (2, 3.5, 5 ชั่วโมง) และความเข้มข้นของแรมโนส (0.025, 2.0125, 4 มิลลิโมลาร์) ได้สภาวะการทดลองทั้งหมด 15 การทดลอง ใน**ภาพที่ 15** พบแถบแบนโปรตีน MPT64 ขนาดประมาณ 24 kDa และคำนวณปริมาณโปรตีนด้วยโปรแกรม Image J พบสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมที่ความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เท่า ระยะเวลาในการเหนี่ยวนำ 5 ชั่วโมงและความเข้มข้นของแรมโนส 4 มิลลิโมลาร์ ได้ความเข้มข้นโปรตีน MPT64 เท่ากับ 0.0392 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยแสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรที่ใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงมีอิทธิพลต่อระดับของการผลิตโปรตีน MPT64 ในเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) [44] **ในภาพที่ 14**



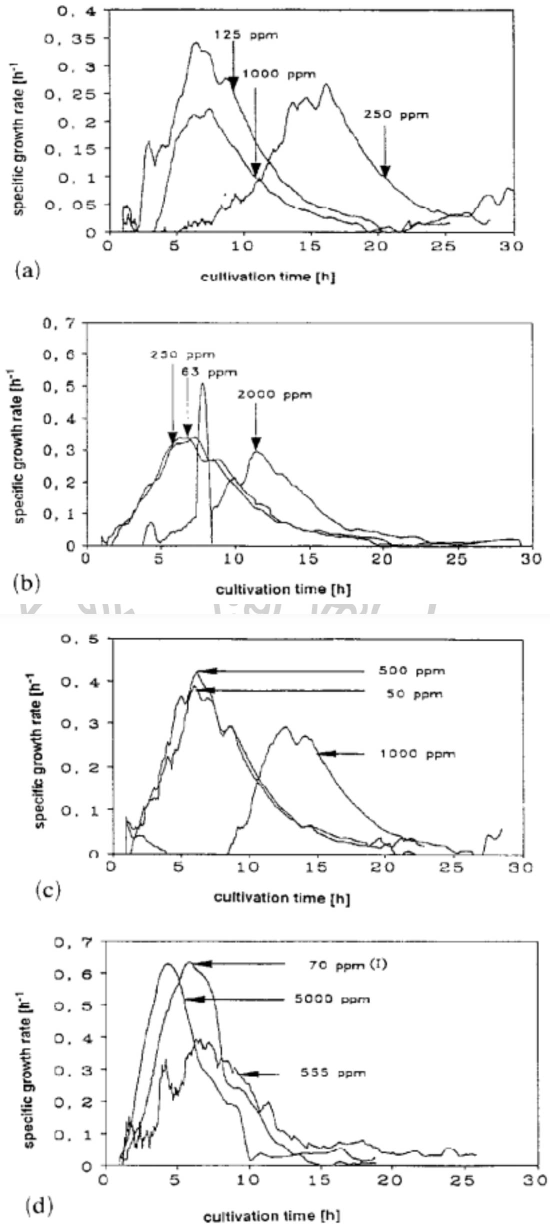
ภาพที่ 14 พื้นผิวตอบสนองแบบสามมิติของการศึกษา 3 ตัวแปรที่มีผลต่อการผลิตโปรตีนโดยใช้วิธีออกแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน โดย A) ผลกระทบระหว่างระยะเวลาในการกระตุ้นการผลิตโปรตีนและความเข้มข้นของ แรมโนส, B) ผลกระทบระหว่างระยะเวลาในการกระตุ้นการผลิตโปรตีนและความเข้มข้นของอาหาร, C) ผลกระทบระหว่างความเข้มข้นของอาหารและความเข้มข้นของแรมโนส [44]



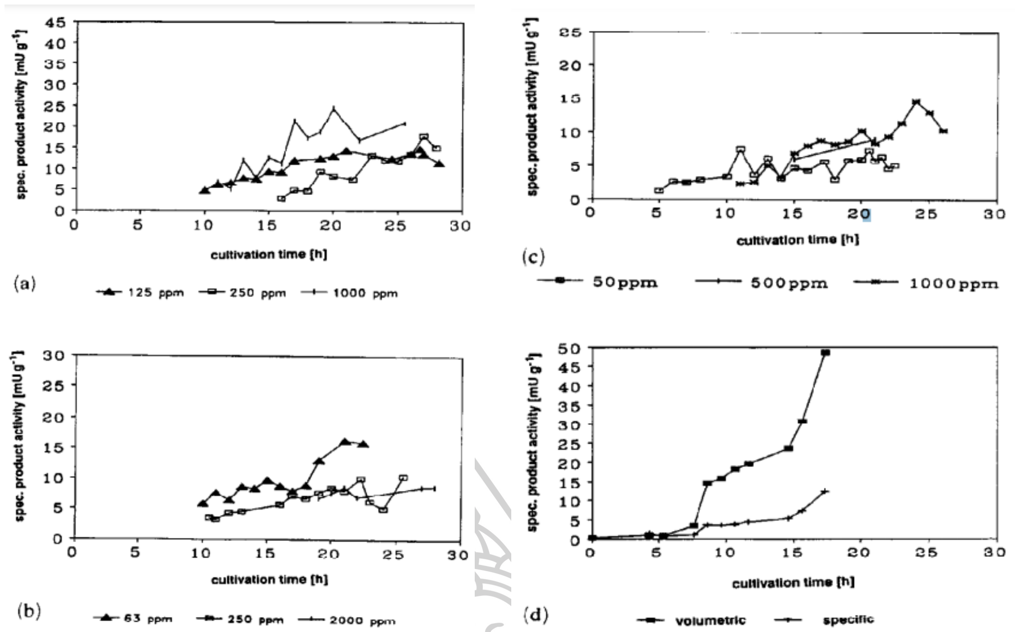
ภาพที่ 15 ลักษณะเฉพาะของรีคอมบิแนนท์โปรตีน MPT64 ที่สภาวะเหมาะสมในการผลิตโปรตีน ตรวจสอบโดยใช้ SDS-PAGE ช่อง C: จุดศูนย์กลาง, 1-5: ลำดับการทำการทดลองซ้ำที่สภาวะการทดลองที่เหมาะสม, m: Marker, (ลูกศร): รีคอมบิแนนท์โปรตีน MPT64 (ประมาณ 24 kDa) [44]

งานวิจัยของ Volker Koch และคณะ (1995) ได้ศึกษาเกี่ยวกับผลกระทบของการใช้สารลดฟองหรือ antifoam ซึ่งในการทดลองนี้มีสารลดฟอง 4 ประเภท ได้แก่ S184 (pure silicon oil), SLM54474 (polypropylene glycol), VP1133 (silicon oil/PPG mixture) และ SE9 (aqueous emulsion with 10% silicone oil competent) โดยศึกษาผลกระทบของการเกิดฟองในระหว่างการเพาะเลี้ยงของเซลล์ *E. coli* K-12 ต่อการผลิตเอนไซม์ β-galactosidase fusion protein พบว่าการใช้สารลดฟองที่ความเข้มข้น 100 ppm ของสารจำพวก VP1133, 300 ppm ของ SLM54474, 1000 และ 2000 ppm ของ S184 มีประสิทธิภาพในการลดฟองขณะทำการเพาะเลี้ยงแบบกะ (batch) ในถังปฏิกรณ์ขนาดเล็กขนาด 2.5 ลิตรและถังปฏิกรณ์ขนาด 60 ลิตร และพบว่าฟองจะเกิดในช่วงที่เซลล์อยู่ในระยะเปลี่ยนจาก growth phase ไปสู่ production phase ในการเติมสารลดฟองจำพวก SLM54474, VP1133 และ S184 ที่ความเข้มข้นสูงจะลดอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ขณะที่สารลดฟองชนิด SE9 ไม่ส่งผลต่อการลดลงของอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ใน**ภาพที่ 16** อีกทั้งยังไม่ส่งผลต่อการลดลงของค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ที่ผลิต จึงไม่นิยมใช้สารลดฟองจำพวก S184 และ SLM54474 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดใหญ่ เนื่องจากมีอัตราการกระจายตัวที่ต่ำ พบว่าสารลดฟองจำพวก VP1133 และ SE9 มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการลดฟอง เนื่องจากมีผลต่อค่าความเข้มข้นของเซลล์และการผลิตโปรตีนค่อนข้างต่ำ ใน**ภาพที่ 17** ถึงแม้ว่า SE9 อาจจะส่งผลเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์และการผลิตโปรตีนแต่ก็ไม่มีผลกระทบต่อเซลล์จากการทำ CFU ในงานวิจัยนี้

จึงสรุปได้ว่า SE9 เป็นสารลดฟองที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อลดฟองจากกระบวนการหมักในระดับอุตสาหกรรมได้ [42]



ภาพที่ 16 ผลกระทบของการใช้สารลดฟองที่แตกต่างกัน (a) SLM54474, (b) S184, (c) VP1133 และ (d) SE9 ต่ออัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* K-12 [42]



ภาพที่ 17 ความแตกต่างของ specific product activity (β-galactosidase fusion protein) ต่อความเข้มข้นเซลล์ *E. coli* K-12 ที่ใช้สารลดฟองที่แตกต่างกัน (a) SLM54474, (b) S184, (c) VP1133 และ (d) SE9 [42]

บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้และระบบการแสดงออกของโปรตีน BMP-2 ที่ใช้ในงานวิจัยนี้

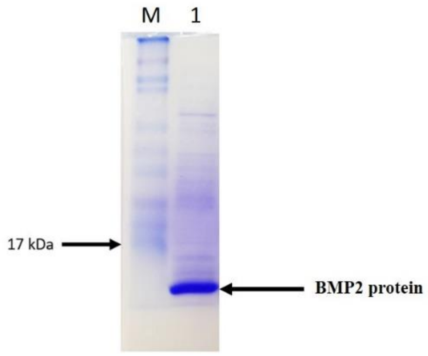
3.1.1 แหล่งที่มาของยีน BMP-2

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการดำเนินงานการวิจัยคือ แบคทีเรีย *E. coli* BL21 (DE3) ที่ได้รับการถ่ายโอนยีนสังเคราะห์โปรตีน BMP-2 โดยพลาสมิด pET-28a ดังแสดงใน**ภาพที่ 3b** โดยโคลนยีน BMP-2 ในตำแหน่งของ NcoI และ BamHI ซึ่งได้รับจากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งมีลำดับเบส (sequence) คือ

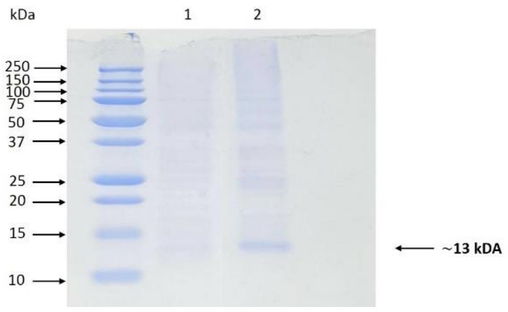
atggccaaacacaaacagcggaaacgccttaagtccagctgtaagagacaccctttgtacgtggacttcagtgacgtggggtg
gaatgactggattgtggctcccccggggtatcacgccttttactgccacggagaatgcccttttcctctggctgatcatctgaact
ccactaatcatgccattgttcagacgttggtcaactctgttaactctaagattcctaaggcatgctgtgtcccgacagaactcag
tgctatctcgatgctgtaccttgacgagaatgaaaaggttgtattaaagaactatcaggacatggttgtggagggttgtgggtgtc
gctaatga

สามารถนำลำดับ sequence ดังกล่าวรันในโปรแกรม blastx เพื่อตรวจสอบโปรตีน BMP-2 ได้ ดังแสดงใน**ภาพที่ 36** ซึ่งลำดับ sequence ดังกล่าวจะเป็นเพียงส่วน mature ของโปรตีน BMP-2 ในรูปมอนอเมอร์ โดยมีขนาดประมาณ 13 kDa [10]

3.1.2 ลักษณะของแถบโปรตีนโดยการทำ SDS-PAGE electrophoresis ของโปรตีน BMP-2



a)



b)

ภาพที่ 18 SDS-PAGE ของโปรตีน BMP-2 a) จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ b) จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) โดยเลน M คือ แถบ protein marker เลน 1a) แถบโปรตีน BMP-2 จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลน 1b) แถบโปรตีน BMP-2 ในสภาวะที่ไม่ได้กระตุ้นด้วยแลคโตสและเลน 2b) แถบโปรตีน BMP-2 ในสภาวะที่กระตุ้นด้วยแลคโตส ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 16 ชั่วโมง สัดส่วนหัวเชื้อ 1% (v/v) และความเข้มข้นแลคโตส 2 กรัมต่อลิตร

จากการทำ SDS-PAGE ใน**ภาพที่ 18a** แสดงให้เห็นลักษณะของแถบโปรตีนบริเวณแถบล่างสุดในเลนที่ 1 ซึ่งเป็นโปรตีนที่เราสนใจในรูปของมอนอเมอร์ มีขนาดประมาณ 13 kDa เมื่อเปรียบเทียบกับขนาดของแถบ protein marker ในเลน M และใน**ภาพที่ 18b** แสดงให้เห็นลักษณะของแถบโปรตีน BMP-2 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) โดยเลนที่ 1 เป็นสภาวะที่ไม่มีการกระตุ้นด้วยแลคโตสจะไม่ปรากฏแถบโปรตีน ในขณะที่เลนที่ 2 เป็นสภาวะที่มีการกระตุ้นด้วยแลคโตส เซลล์จะมีการผลิตโปรตีนโดยปรากฏแถบโปรตีนประมาณ 13 kDa ในลักษณะเดียวกันกับแถบโปรตีนที่มาจากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 ศึกษาผลกระทบของสภาวะการเพาะเลี้ยง *E. coli* BL21 (DE3) ต่อการผลิตโปรตีน BMP-2 ในระดับฟลาสก์และถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

3.2.1 ศึกษาการเจริญเติบโตในการเพาะเลี้ยง *E. coli* BL21 (DE3) ในระดับฟลาสก์

นำโคโลนีเดี่ยวของหัวเชื้อ *E. coli* BL21 (DE3) ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรในอาหาร AIM ปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่ไม่มีแลคโตสซึ่งมี kanamycin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มด้วยเครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่า รุ่น Innova® 43/43 R (New Brunswick Incubator Shaker; Eppendrof, Germany) ที่ความเร็วรอบเขย่าเท่ากับ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 6 ชั่วโมงหรือจนกระทั่ง OD_{600} มีค่าประมาณ 2.0 แล้วนำหัวเชื้อที่ได้ 1 % (v/v) ใส่ลงฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ในอาหาร AIM ปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่มีแลคโตส 2 กรัมต่อลิตรซึ่งมี kanamycin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง เพื่อนำไปวัดค่าความขุ่นของเซลล์ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 600 นาโนเมตรและนำผลที่ได้ไปพลอตกราฟระหว่างค่า OD_{600} กับเวลา

3.2.2 ศึกษาการเจริญเติบโตในการเพาะเลี้ยง *E. coli* BL21 (DE3) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

นำโคโลนีเดี่ยวของหัวเชื้อ *E. coli* BL21 (DE3) ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรในอาหาร AIM ปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่ไม่มีแลคโตสซึ่งมี kanamycin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ความเร็วรอบเขย่าเท่ากับ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 ชั่วโมงหรือจนกระทั่ง OD_{600} มีค่าประมาณ 2.0 ทำการถ่ายหัวเชื้อ 1% (v/v) ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตรในอาหาร AIM ปริมาตร 100 มิลลิลิตรที่ไม่มีแลคโตส บ่มที่สภาวะเดิมจนได้ OD_{600} มีค่าประมาณ 2.0 และนำหัวเชื้อที่ได้ 7% (v/v) ใส่ลงถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 3 ลิตร ที่มีอาหาร AIM 1 ลิตรที่มีความเข้มข้นแลคโตส 3 กรัมต่อลิตร ที่สภาวะอัตราการให้อากาศ 1.5 vvm อัตราการกวนใบพัด 350 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิประมาณ 35–37 องศาเซลเซียส โดยมีการเติม 10% silicone oil ที่ความเข้มข้น 30 ppm เก็บตัวอย่าง ทุก 2 ชั่วโมง เพื่อนำไปวัดค่าความขุ่นของเซลล์ (optical density) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 600 นาโนเมตรและนำผลที่ได้ไปพลอตกราฟระหว่างค่า OD_{600} กับเวลา

3.2.3 ศึกษาผลกระทบของสภาวะการเพาะเลี้ยง *E. coli* BL21 (DE3) ในระดับฟลาสก์

เพาะเลี้ยงเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) ตามหัวข้อ 3.2.1 จนได้ OD_{600} เท่ากับ 2.0 ทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ปริมาตร 50 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มี kanamycin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บตัวอย่างหลังจากจบการเพาะเลี้ยงปริมาตร 50 มิลลิลิตร เพื่อนำมาหาค่าความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมดดังบรรยายในภาคผนวก ข หัวข้อ 3.7 โดยศึกษาผลกระทบของสภาวะการเพาะเลี้ยง ดังต่อไปนี้

- ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)

เพาะเลี้ยงที่ความเร็วรอบเขย่า 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สัดส่วนหัวเชื้อที่ 1% ความเข้มข้นแลคโตส 2 กรัมต่อลิตร โดยใช้การเพาะเลี้ยงที่ 9, 12 และ 15 ชั่วโมง

- สัดส่วนหัวเชื้อ (% (v/v))

เพาะเลี้ยงที่ความเร็วรอบเขย่า 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง ความเข้มข้นแลคโตส 2 กรัมต่อลิตร โดยใช้สัดส่วนหัวเชื้อที่ 1, 5 และ 10 %

- ความเข้มข้นแลคโตส (กรัมต่อลิตร)

เพาะเลี้ยงที่ความเร็วรอบเขย่า 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง สัดส่วนหัวเชื้อที่ 1% โดยใช้ความเข้มข้นแลคโตสที่ 2, 4 และ 6 กรัมต่อลิตร

3.2.4 ศึกษาความเข้มข้นของสารลดฟองในการเพาะเลี้ยง *E. coli* BL21 (DE3) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

เพาะเลี้ยงเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) เหมือนกับบรรยายในหัวข้อ 3.2.2 โดยใช้ความเข้มข้นของสารลดฟองที่แตกต่างกัน ได้แก่ 30, 40 และ 50 ppm เก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง นำผลที่ได้ไปพลอตกราฟระหว่างค่าความขุ่นเซลล์ (OD_{600}) กับเวลา จนกระทั่งเซลล์เข้าสู่ระยะคงที่ หลังจากจบการเพาะเลี้ยงเก็บตัวอย่างปริมาตร 50 มิลลิลิตร เพื่อนำมาหาค่าความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมดดังบรรยายในภาคผนวก ข หัวข้อ 3.7

3.3 หาสภาวะที่เหมาะสมด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองร่วมกับการออกแบบการทดลองแบบส่วนประสมกลางในการเพาะเลี้ยง *E. coli* BL21 (DE3) เพื่อผลิตโปรตีน BMP-2 สูงสุดในระดับห้องปฏิบัติการ

3.3.1 การออกแบบการทดลอง (Design of experiment) ร่วมกับวิธีพื้นผิวตอบสนอง

ศึกษาผลกระทบของสภาวะการเพาะเลี้ยง ได้แก่ ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง สัดส่วนหัวเชื้อและความเข้มข้นแลคโตส โดยใช้การออกแบบการทดลองโดยโปรแกรม Design Expert version 11 แบบส่วนประสมกลางด้วยวิธี face centered (α = 1) โดยกำหนดค่าระดับกลางและช่วงที่ศึกษาของสภาวะการเพาะเลี้ยงหรือตัวแปรอิสระจากผลการทดลองที่ได้ในหัวข้อ 3.2.3 หลังจากนั้นโปรแกรมจะทำการออกแบบตารางการทดลอง โดยหากกำหนดการทำซ้ำที่ระดับกลางเท่ากับ 4 ซ้ำจะได้การทดลองทั้งหมด 18 รัน โดยตัวแปรตอบสนองที่สนใจ ได้แก่ ความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 (R1)

อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (R2) และร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมด (R3)

3.3.2 ทำการทดลองตามสภาวะการเพาะเลี้ยงจากการออกแบบการทดลอง

เพาะเลี้ยงเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) ดังบรรยายในหัวข้อ 3.2.1 แต่เปลี่ยนระยะเวลาการเพาะเลี้ยง สัดส่วนหัวเชื้อ และความเข้มข้นแลคโตส ตามสภาวะการออกแบบการทดลองโปรแกรม Design Expert version 11 และเก็บตัวอย่างหลังจบการเพาะเลี้ยงปริมาตร 50 มิลลิลิตร เพื่อนำมาหาค่าความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมดดังบรรยายในภาคผนวก ข หัวข้อ 3.7 นำผลที่ได้ใส่ในตารางการออกแบบการทดลองในโปรแกรม Design Expert version 11 ประมวลผลเพื่อหาแบบจำลองทางคณิตศาสตร์แสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลกระทบของตัวแปรอิสระต่อตัวแปรตอบสนอง

3.3.3 หาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของการเพาะเลี้ยงเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3)

หาสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมโดยใช้โปรแกรม Design Expert version 11 ในโมดูล optimization โดยกำหนดเป้าหมายที่ต้องการ คือ ความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 (R1) อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (R2) สูงสุด (maximizing) โปรแกรมจะทำนายสภาวะที่เป็นไปได้ทั้งหมด ให้พิจารณาค่า Desirability ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกถึงความเป็นไปได้ของสภาวะการเพาะเลี้ยงที่จะได้ค่าตัวแปรตอบสนองตามที่ทำนายไว้ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 0-1 โดยเลือกสภาวะการเพาะเลี้ยงที่ค่านี้ใกล้เคียง 1 มากที่สุด ซึ่งหมายความว่าสภาวะที่โปรแกรมทำนายมีความเป็นไปได้ว่าจะได้ค่าตัวแปรตอบสนองเป็นไปตามเป้าหมายที่ต้องการ แต่ในทางปฏิบัติตัวแปรอิสระที่ให้ค่า Desirability สูงสุด อาจจะไม่สามารถนำไปใช้ได้จริง ซึ่งอาจจำเป็นต้องพิจารณาถึงความเหมาะสมก่อน ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยอาจเลือกจุดอื่นแทนซึ่งให้ค่า Desirability ใกล้เคียงกับค่า 1

3.3.4 การทวนสอบสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของการเพาะเลี้ยงเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3)

เพาะเลี้ยงเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) โดยใช้สภาวะดังอธิบายในหัวข้อ 3.2.1 และ 3.2.2 ในระดับฟลาสก์และถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ตามลำดับ โดยมีอัตราการให้อากาศในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เท่ากับ 1 vvm และอัตราการกวนใบพัดเท่ากับ 250 รอบต่อนาที แต่เปลี่ยนระยะเวลาการเพาะเลี้ยง สัดส่วนหัวเชื้อ และความเข้มข้นแลคโตส ตามสภาวะการออกแบบการทดลองโปรแกรม Design Expert version 11 หลังทำ optimization และเก็บตัวอย่างหลังจบการเพาะเลี้ยงปริมาตร 50 มิลลิลิตร เพื่อนำมาหาค่าความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและ

ร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมดดังบรรยายในภาคผนวก ข หัวข้อ 3.7 นำผลที่ได้ใส่ในโปรแกรม Design Expert version 11 ประมวลผลเพื่อเปรียบเทียบผลการทดลองจริงที่ได้กับผลการทดลองของโปรแกรมที่ทำนายไว้ โดยพิจารณาจากค่าผลการทดลองจริงที่ได้กับค่าต่ำสุดที่ยอมรับได้ (95% PI low) และค่าสูงสุดที่ยอมรับได้ (95% PI high) ซึ่งเป็นค่าที่แสดงช่วงความเชื่อมั่น 95% ของค่าการทำนายผลค่าต่ำสุดและสูงสุดของผลตัวแปรตอบสนองที่โปรแกรมทำนาย หากค่าผลการทดลองจริงที่ได้อยู่ระหว่างค่าการทำนายผลค่าต่ำสุดและสูงสุด หมายความว่าสภาวะการเพาะเลี้ยงที่ได้สามารถให้ค่าตัวแปรตอบสนองตามเป้าหมายที่ต้องการที่มีความสอดคล้องทางสถิติกับผลจากการทดลองที่สภาวะการเพาะเลี้ยงที่ได้ และสามารถที่จะนำสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมที่สุดไปใช้ในการออกแบบการทดลองในถังปฏิกรณ์ชีวภาพต่อไป

3.4 หาสภาวะที่เหมาะสมด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองร่วมกับการออกแบบการทดลองแบบส่วนประสมกลาง ในการเพาะเลี้ยง *E. coli* BL21 (DE3) เพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตโปรตีน BMP-2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

3.4.1 การออกแบบการทดลอง (Design of experiment) ร่วมกับวิธีพื้นผิวตอบสนอง

เนื่องจากไม่มีผลการทดลองของผลกระทบของ 2 ตัวแปรที่สนใจ คือ อัตราการให้อากาศและอัตราการกวนใบพัด อย่างไรก็ตามจากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าค่าอัตราการให้อากาศที่ใช้อยู่ระหว่าง 0.2-1.0 vvm [45-47] และอัตราการกวนใบพัดอยู่ระหว่าง 100–300 รอบต่อนาที [25, 45, 48] ดังนั้น ในการทดลองนี้จึงกำหนดค่าระดับกลางของอัตราการให้อากาศและอัตราการกวนใบพัดเท่ากับ 1 vvm และ 250 รอบต่อนาที ตามลำดับ และช่วงที่ศึกษาของสภาวะการเพาะเลี้ยงหรือตัวแปรอิสระคือ อัตราการให้อากาศ (0.5-1.5 vvm) และอัตราการกวนใบพัด (150-350 รอบต่อนาที) โดยใช้การออกแบบการทดลองโดยโปรแกรม Design Expert version 11 แบบส่วนประสมกลางด้วยวิธี other (α = 1.4) หลังจากนั้นโปรแกรมจะทำการออกแบบตารางการทดลอง โดยหากกำหนดการทำซ้ำที่ระดับกลางเท่ากับ 4 จะได้การทดลองทั้งหมด 12 รัน

3.4.2 ทำการทดลองตามสภาวะการเพาะเลี้ยงจากการออกแบบการทดลอง

เพาะเลี้ยงเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) โดยใช้สภาวะดังอธิบายในหัวข้อ 3.2.2 แต่เปลี่ยนอัตราการให้อากาศและอัตราการกวนใบพัด ตามสภาวะการออกแบบการทดลองโปรแกรม Design Expert version 11 เก็บตัวอย่างหลังจบการเพาะเลี้ยงปริมาตร 50 มิลลิลิตร เพื่อนำมาหาค่าความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและร้อยละของโปรตีน BMP-2

ต่อโปรตีนทั้งหมดดังบรรยายในภาคผนวก ข หัวข้อ 3.7 นำผลที่ได้ใส่ในตารางการออกแบบการทดลองในโปรแกรม Design Expert version 11 ประมวลผลเพื่อหาแบบจำลองทางคณิตศาสตร์แสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลกระทบของตัวแปรอิสระต่อค่าตัวแปรตอบสนอง

3.4.3 หาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของการเพาะเลี้ยงเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3)

หาสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมโดยใช้โปรแกรม Design Expert version 11 ในโมดูล optimization โดยกำหนดเป้าหมายที่ต้องการ คือ ความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 (R1) อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (R2) สูงสุด (maximizing) โปรแกรมจะจำลองหาสภาวะที่เป็นไปได้ทั้งหมด ให้พิจารณาค่า Desirability ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกถึงความเป็นไปได้ของสภาวะการเพาะเลี้ยงที่จะได้ค่าตัวแปรตอบสนองตามที่ทำนายไว้ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 0-1 โดยเลือกสภาวะการเพาะเลี้ยงที่ค่านี้ใกล้เคียง 1 มากที่สุด ซึ่งหมายความว่าสภาวะที่โปรแกรมทำนายมีความเป็นไปได้ว่าจะได้ค่าตัวแปรตอบสนองเป็นไปตามเป้าหมายที่ต้องการ แต่ในทางปฏิบัติตัวแปรอิสระที่ให้ค่า Desirability สูงสุด อาจจะไม่สามารถนำไปใช้ได้จริง ซึ่งอาจจำเป็นต้องพิจารณาถึงความเหมาะสมก่อน ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยอาจเลือกจุดอื่นแทนซึ่งให้ค่า Desirability ใกล้เคียงกับค่า 1

3.4.4 การทวนสอบสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของการเพาะเลี้ยงเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3)

เพาะเลี้ยงเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) โดยใช้สภาวะดังอธิบายในหัวข้อ 3.2.2 แต่เปลี่ยนอัตราการให้อากาศและอัตราการกวนใบพัด ตามสภาวะการออกแบบการทดลองโปรแกรม Design Expert version 11 หลังทำ optimization และเก็บตัวอย่างหลังจบการเพาะเลี้ยงปริมาตร 50 มิลลิลิตร เพื่อนำมาหาค่าความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมดดังบรรยายในภาคผนวก ข หัวข้อ 3.7 นำผลที่ได้ใส่ในโปรแกรม Design Expert version 11 ประมวลผลเพื่อเปรียบเทียบผลการทดลองจริงที่ได้กับผลการทดลองของโปรแกรมที่ทำนายไว้ โดยพิจารณาจากค่าผลการทดลองจริงที่ได้กับค่าต่ำสุดที่ยอมรับได้ (95% PI low) และค่าสูงสุดที่ยอมรับได้ (95% PI high) ซึ่งเป็นค่าที่แสดงช่วงความเชื่อมั่น 95% ของค่าการทำนายผลค่าต่ำสุดและสูงสุดของผลตัวแปรตอบสนองที่โปรแกรมทำนาย หากค่าผลการทดลองจริงที่ได้อยู่ระหว่างค่าการทำนายผลค่าต่ำสุดและสูงสุด หมายความว่าสภาวะการเพาะเลี้ยงที่ได้สามารถให้ค่าตัวแปรตอบสนองตามเป้าหมายที่ต้องการที่มีความสอดคล้องทางสถิติกับผลจากการทดลองที่สภาวะการเพาะเลี้ยงที่ได้ และสามารถที่จะเป็นแนวทางนำไปใช้ในการเพิ่มปริมาณการผลิตโปรตีน BMP-2 ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

3.5 วิธีการวิเคราะห์

3.5.1 วัดความหนาแน่นของเซลล์

โดยปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในคิวเวท หลังจากนั้นนำไปวัดความหนาแน่นเซลล์โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ กำหนดค่าความยาวคลื่นแสงเท่ากับ 600 นาโนเมตร โดยให้ค่า OD_{600}

3.5.2 การทำน้ำหนักเซลล์แห้ง (Dry cell weight)

เพาะเลี้ยงเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) เหมือนในหัวข้อ 3.2.1 และเก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่ 6 นำไปตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นเจือจางตัวอย่างเป็นลำดับ (serial dilution) ด้วยน้ำกลั่นที่อัตราส่วน 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 และ 1:32 แล้วจึงนำตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตรไปวัดความหนาแน่นเซลล์ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์และนำตัวอย่างปริมาตร 2 มิลลิลิตรใส่ลงในกระทงที่มีน้ำหนักคงที่แล้วจึงนำไปอบแห้งด้วยตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงหรือจนน้ำหนักของเซลล์คงที่เพื่อวัดน้ำหนักของเซลล์ คำนวณตามสมการดังต่อไปนี้

$$\text{น้ำหนักแห้งเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักกระทงหลังอบเซลล์ (กรัม)} - \text{น้ำหนักกระทงอบก่อนใส่เซลล์ (กรัม)}}{\text{ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้อบ (ลิตร)}}$$

จากนั้นพลอตกราฟเพื่อใช้เป็นกราฟมาตรฐานในการคำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยพลอตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นของเซลล์ (OD_{600}) กับน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ใน**ภาพที่ 35** และหาน้ำหนักเซลล์แห้งในตัวอย่างดังบรรยายในภาคผนวก ข หัวข้อ 4

3.5.3 การหาความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมด

1. เก็บตัวอย่างเซลล์เพื่อตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Z 36 HK Centrifuge; HERMLE, Germany) ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. เทสารละลายส่วนใสทิ้งแล้วละลายตะกอนด้วยสารละลาย Phosphate-buffered saline, PBS buffer (ประกอบด้วย 2.7 mM KCl, 137 mM NaCl, 1.8 mM KH_2PO_4 และ 10 mM Na_2HPO_4 pH 7.4) ที่ปริมาตร 20 มิลลิลิตรต่อ 1 กรัมเซลล์

3. นำไปแตกเซลล์โดยเครื่องสลายเซลล์ด้วยคลื่นความถี่สูง (Vibra cell VCX750 Ultrasonic Cell Disrupter; Sonics & Materials Inc., U.S.A.) ที่แอมพลิจูด 25 เฮิรตซ์ เป็นเวลา 10 นาที (นาน (on) 5 วินาที, พัก (off) 10 วินาที)

4. นำสารละลายที่ผ่านการแตกเซลล์แล้วไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. เทส่วนใสทิ้งแล้วเติมสารละลาย solubilization buffer (8 M urea, 0.1 M Na_2PO_4, 0.01 Tris-HCl) ที่ปริมาตร 5 มิลลิลิตรต่อ 1 กรัมเซลล์ นำปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส [14] เพื่อกำจัดเศษซากเซลล์

6. นำสารละลายส่วนใสไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนทั้งหมดโดยวิธี Bradford และแยกโปรตีนตามน้ำหนักด้วย 12% SDS-PAGE

3.5.3.1 การวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดจากตัวอย่างโดยวิธี Bradford assay [49]

ใช้ Bovine serum albumin (BSA) เป็นสารในการทำกราฟมาตรฐานการวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมด

1. ปิเปตน้ำกลั่นปริมาตร 780 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง

2. ปิเปตตัวอย่างที่เจือจางแล้วปริมาตร 20 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลอง (ถ้าทำ blank ใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง)

3. ปิเปต Bradford dye ปริมาตร 200 ไมโครลิตรและผสมเป็นเนื้อเดียวกัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที

4. นำสารละลายที่ได้ วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (V-5100 VISIBLE spectrophotometer; METASH, China) ที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 595 นาโนเมตร

5. หาปริมาณของโปรตีนทั้งหมดในตัวอย่าง โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของตัวอย่างมาหารด้วยค่าความชันของกราฟมาตรฐานโปรตีนทั้งหมด ดังบรรยายในภาคผนวก ข หัวข้อ 1

3.5.3.2 ใช้ 12% SDS-PAGE gel เพื่อแสดงลักษณะการแสดงออกของโปรตีน BMP-2

เตรียมแผ่นเจลโดยชุดเจลกึ่งสำเร็จ 12% ของ Biorad (TGX™ FastCast™ Acrylamide Kit, 12%) โดยผสม Resolver (12%) A และ B อย่างละ 3 มิลลิลิตรต่อ 1 แผ่นเจลลงในหลอดทดลอง และเติม 5 เปอร์เซ็นต์ของแอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟตปริมาตร 30 ไมโครลิตรหลังจากนั้นเติม TEMED

ปริมาตร 3 ไมโครลิตรผสมสารเป็นเนื้อเดียวกันและโหลดลงกระจกประมาณ 3 ใน 4 ของแผ่นกระจก หลังจากนั้นผสม Stacking (4%) A และ B อย่างละ 1 มิลลิลิตรต่อ 1 แผ่นเจลและเติม 5 เปอร์เซ็นต์ของแอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟตปริมาตร 10 ไมโครลิตรหลังจากนั้นเติม TEMED ปริมาตร 2 ไมโครลิตรผสมสารเป็นเนื้อเดียวกันและโหลดลงกระจก 1 ใน 4 ของกระจกแล้วจึงนำหวีมาใส่ลงบนหน้าแผ่นเจลรอประมาณ 1 ชั่วโมงเพื่อให้เจลแข็ง หลังจากนั้นนำเจลไปใส่แชมเบอร์เติมสารละลาย running buffer เพื่อเตรียมโหลดตัวอย่างสารละลายโปรตีน โดยโหลด protein marker ในหลุมปริมาตร 7 ไมโครลิตรเพื่อใช้ในการบอกน้ำหนักโมเลกุลและติดตามการเคลื่อนที่ของโปรตีนที่สนใจ และใส่ตัวอย่างในแต่ละหลุมปริมาตรไม่เกิน 20 ไมโครลิตร ให้มีความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดเท่ากันทุกหลุมเท่ากับ 7.5 ไมโครกรัมลงในแผ่นเจลที่เตรียมไว้ โดยผสมกับสี 4x gel loading dye กับ 2-Mercaptoethanol ซึ่งเป็น detergent ในการทำลายพันธะไดซัลไฟด์ของสารละลายโปรตีนกับโปรตีนตัวอย่างเพื่อใช้สำหรับย้อมสีของตัวอย่างด้วย Coomassie brilliant blue เมื่อโหลดตัวอย่างสารละลายโปรตีนลงแผ่นเจลจนครบทำการปิดฝาเครื่องและเริ่มรันที่สภาวะความต่างศักย์เท่ากับ 105 โวลต์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือจนสีของโปรตีนตัวอย่างวิ่งจนสุดแผ่นเจล แล้วนำแผ่นเจลออกจากกระจก และย้อมแผ่นเจลด้วยสารละลายย้อมสีโปรตีน (Stain) เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง นำไปล้างออกด้วยน้ำกลั่นและแช่ลงสารละลาย Destain I เป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้วล้างออก และแช่ในสารละลาย Destain II ข้ามคืนแล้วจึงค่อยเปลี่ยนสารละลายเป็นน้ำกลั่นเพื่อใช้ในการเก็บแผ่นเจล

3.5.3.3 การหาความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 ด้วยซอฟต์แวร์ Image J

นำแผ่นเจลที่ได้มาวิเคราะห์หาความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 โดยซอฟต์แวร์ ImageJ ดังบรรยายในภาคผนวก ข หัวข้อ 3 จากนั้นนำค่าพื้นที่ใต้พีคของโปรตีน BMP-2 ที่ได้มาเทียบเป็นความเข้มข้นโดยหาได้จากกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้พีคของ band BSA และความเข้มข้นโปรตีน BSA **ในภาพที่ 34** เพื่อนำมาคำนวณหาความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมด ดังบรรยายในภาคผนวก ข หัวข้อ 3.7

หาได้จากสมการ ดังนี้

ความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) =

$$\frac{\text{ความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 ที่หาได้จากกราฟมาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)} \times \text{ปริมาตรสารละลายโปรตีนที่โหลดลงแผ่นเจล (ไมโครลิตร)} \times \text{dilution factor} \times \text{ปริมาตรสารละลาย solubilize buffer ที่ใช้ละลายโปรตีน (มิลลิลิตร)}}{\text{ปริมาตรโปรตีนที่นำมาผสมกับ dye (ไมโครลิตร)} \times \text{ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ (มิลลิลิตร)}}$$

อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัมต่อกรัม)

$$= \frac{\text{ความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)}}{\text{น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากกราฟมาตรฐาน (กรัมต่อลิตร)}}$$

ร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมด $= \frac{\text{พื้นที่ใต้พีคของโปรตีน BMP-2}}{\text{พื้นที่ใต้พีคของโปรตีนทั้งหมด}} \times 100$

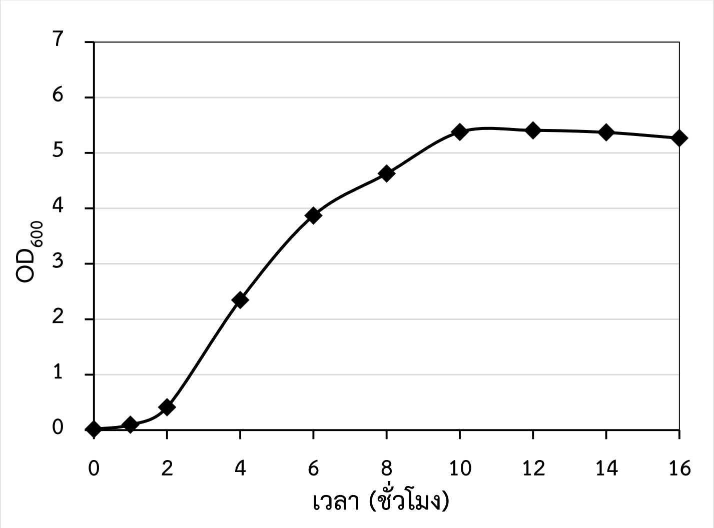
บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

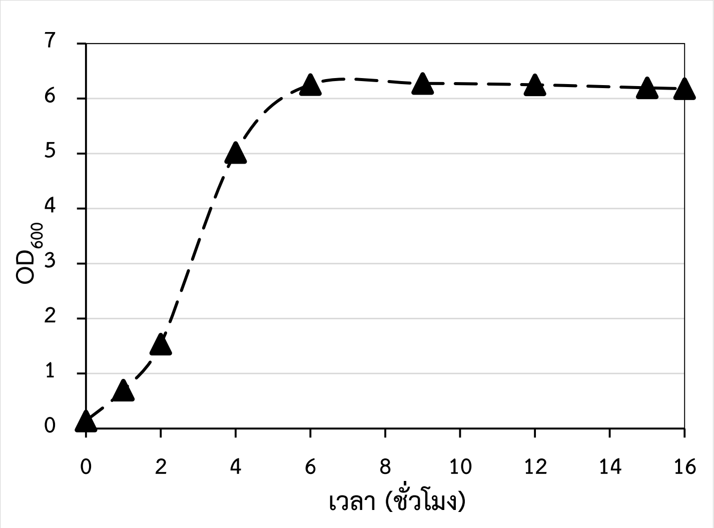
4.1 ผลกระทบของสภาวะการเพาะเลี้ยง *E. coli* BL21 (DE3) ต่อการผลิตโปรตีน BMP-2 ในระดับฟลาสก์และถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

4.1.1 การเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) ในระดับฟลาสก์และถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

การเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) สำหรับการผลิตโปรตีน BMP-2 ทำโดยการวัดค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรกับเวลา เพื่อศึกษาช่วงระยะการเจริญเติบโตของเซลล์ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการเพาะเชื้อเริ่มต้น (subculture) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตโปรตีน BMP-2 โดยในงานวิจัยนี้เลือกใช้เซลล์ในช่วงระยะ log phase หรือ OD_{600} เท่ากับ 2.0 เป็นค่าหัวเชื้อเริ่มต้นสำหรับ subculture ในทุกการทดลอง ใน**ภาพที่ 19** และ**ภาพที่ 20** เซลล์จะเติบโตโดยเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างช้า ๆ ใน 2 ชั่วโมงแรกสำหรับในฟลาสก์ ในขณะที่การเจริญเติบโตของเซลล์ในระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพเข้าสู่ระยะนี้ในเวลา 1 ชั่วโมง ซึ่งช่วงการเจริญเติบโตระยะนี้เรียกว่า lag phase ซึ่งเป็นระยะที่เซลล์เริ่มทำการปรับตัวให้เข้ากับอาหารเพาะเลี้ยงใหม่ หลังจากนั้นเซลล์เพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็วอย่างเห็นได้ชัด เมื่อเริ่มเข้าสู่ระยะ exponential phase หรือ log phase ซึ่งเป็นระยะที่เซลล์มีอัตราการแบ่งตัวมากที่สุดของทั้งสองระบบ แต่อย่างไรก็ตามจะสังเกตเห็นว่าเซลล์เข้าสู่ระยะนี้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพระยะสั้นกว่าในการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ หลังจากนั้นเซลล์จะเริ่มมีค่าคงที่หรือเป็นช่วงเซลล์มีอัตราการเกิดเท่ากับอัตราตายพบได้ในชั่วโมงที่ 10 และ 6 ในฟลาสก์และถังปฏิกรณ์ชีวภาพตามลำดับ



ภาพที่ 19 การเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) ต่อเวลาในระดับฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร (◆, n = 3)



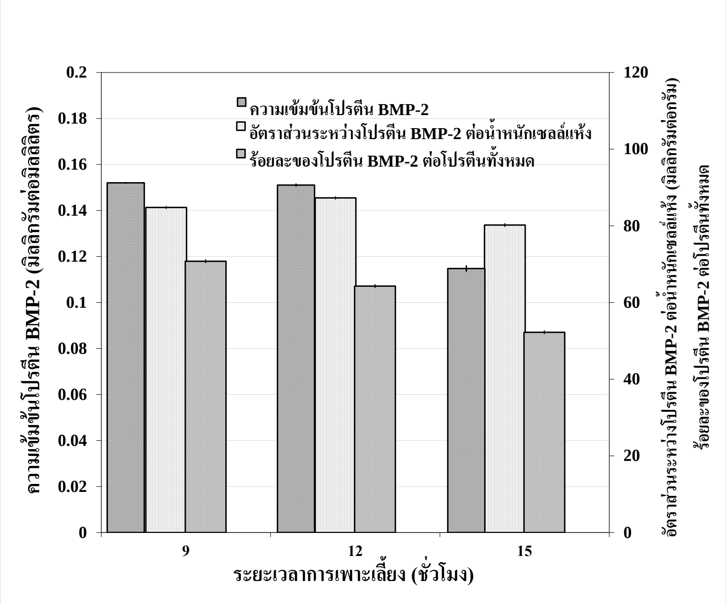
ภาพที่ 20 การเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) ต่อเวลาในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวนขนาด 3 ลิตร (▲, n = 1)

4.1.2 ผลการศึกษาผลกระทบของสภาวะการเพาะเลี้ยง *E. coli* BL21 (DE3) ในระดับฟลาสก์

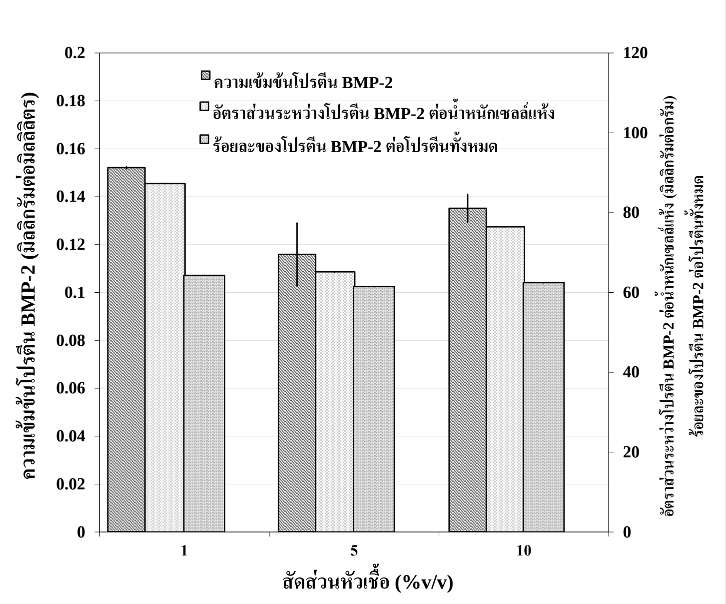
การดำเนินงานวิจัยเพื่อศึกษาผลกระทบของสภาวะการเพาะเลี้ยง ได้แก่ ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง สัดส่วนหัวเชื้อและความเข้มข้นแลคโตสต่อความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 (R1) อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (R2) และร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมด (R3) ของการเพาะเลี้ยงเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) เพื่อจะนำไปใช้ในการออกแบบการทดลอง ใน**ภาพที่ 21** พบว่าระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นจะลดความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมดลดลง เนื่องจาก

เมื่อเพิ่มระยะเวลาการเพาะเลี้ยงมากขึ้น อาจจะส่งผลให้โปรตีนเกิดการ degraded หรือ denatured หรือมีสาเหตุจาก plasmid instability จึงทำให้โปรตีนที่ได้ลดลง [50, 51] ดังนั้น การเพาะเลี้ยงที่เวลา 9 ชั่วโมงให้ความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและร้อยละของโปรตีนทั้งหมดต่อโปรตีน BMP-2 สูงสุด (p<0.05) เท่ากับ 0.152 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร , 84.8 มิลลิกรัมต่อกรัม และ 70.77 ตามลำดับ ใน**ภาพที่ 22** สัดส่วนหัวเชื้อที่ 1% เป็นสภาวะที่ให้ความเข้มข้นของโปรตีน BMP-2 สูงสุด เท่ากับ 0.151 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและมีอัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและร้อยละของโปรตีนทั้งหมดต่อโปรตีน BMP-2 สูงสุดเช่นเดียวกัน เนื่องจากสัดส่วนหัวเชื้อที่สูงขึ้น จะส่งผลให้เซลล์อยู่ในสภาวะ exhausted หรือเจริญเติบโตเร็วในขณะที่สารอาหารค่อยๆ ลดลงซึ่งนำไปสู่สภาวะการขาดแคลนอาหาร จึงทำให้เซลล์ผลิตโปรตีนลดลง นอกจากนี้ การเผาผลาญพลังงานภายในเซลล์แบคทีเรียยังเกิดของเสียซึ่งอาจจะส่งผลเสียต่อการผลิตโปรตีนอีกด้วย [51] และใน**ภาพที่ 23** ความเข้มข้นของแลคโตสที่ 2 กรัมต่อลิตรให้ความเข้มข้นของโปรตีน BMP-2 และอัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (p<0.05) เท่ากับ 0.151 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 87.3 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ เนื่องจากความเข้มข้นแลคโตสที่สูงอาจจะส่งผลต่อความแตกต่างของเข้มข้นของแลคโตสภายนอกกับภายในเซลล์ที่เพิ่มขึ้นซึ่งเป็นกระบวนการที่เรียกว่า osmotic pressure ทำให้เซลล์เกิดการ lysis นำไปสู่การลดลงของโปรตีนที่ได้ จากผลการทดลองจะเห็นว่าสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการออกแบบการทดลองต่อไป คือ ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 9 ชั่วโมง สัดส่วนหัวเชื้อ 1% และความเข้มข้นแลคโตส 2 กรัมต่อลิตร

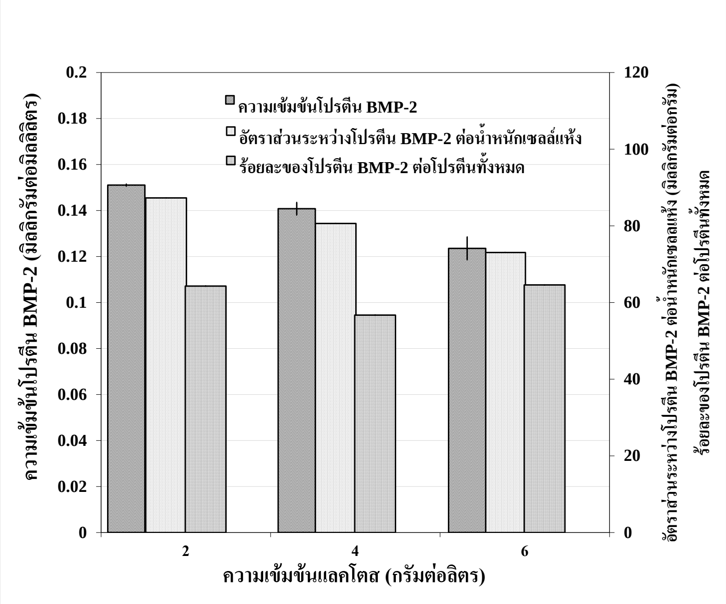
มหาวิทยาลัยศิลปากร



ภาพที่ 21 ผลกระทบของสภาวะการเพาะเลี้ยงของระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกันที่ความเข้มข้นแลคโตส 2 กรัมต่อลิตร สัดส่วนหัวเชื้อ 1% ต่อความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัมต่อกรัม) และร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมด



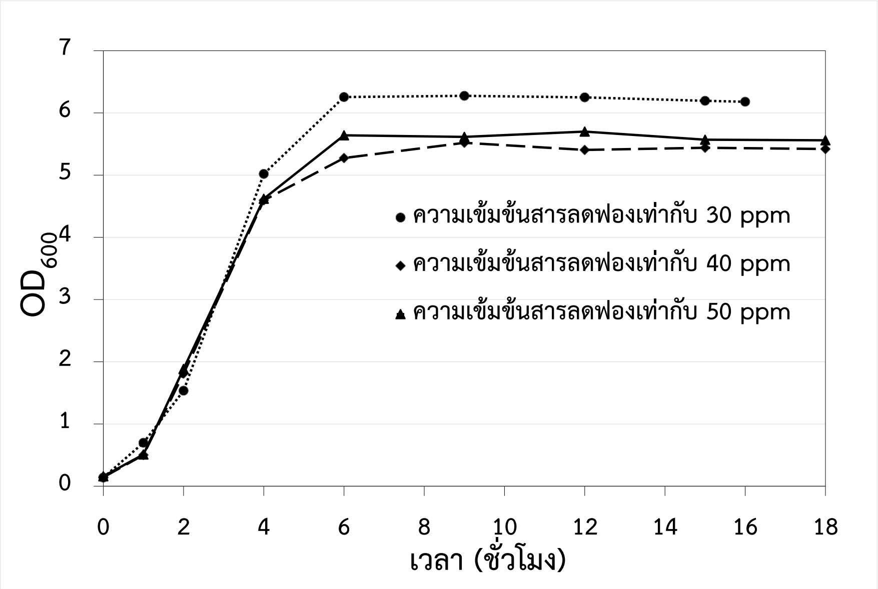
ภาพที่ 22 ผลกระทบของสภาวะการเพาะเลี้ยงสัดส่วนหัวเชื้อที่แตกต่างกันที่ความเข้มข้นแลคโตส 2 กรัมต่อลิตรและระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 12 ชั่วโมงต่อความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัมต่อกรัม) และร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมด



ภาพที่ 23 ผลกระทบของสภาวะการเพาะเลี้ยงของความเข้มข้นแลคโตสที่แตกต่างกันที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 12 ชั่วโมง สัดส่วนหัวเชื้อ 1% ต่อความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัมต่อกรัม) และร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมด

4.1.3 ผลกระทบของความเข้มข้นสารลดฟองในการเพาะเลี้ยงเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) ในระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

การศึกษาผลกระทบของความเข้มข้นสารลดฟองต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) ใน**ภาพที่ 24** ที่ความเข้มข้นสารลดฟองที่แตกต่างกัน คือ 30, 40 และ 50 ppm ที่ความเข้มข้นสารลดฟอง 30 ppm เซลล์มีการเจริญเติบโตสูงสุด มีค่า OD_{600} ประมาณ 6 ในชั่วโมงที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง แต่ในสภาวะนี้ไม่สามารถดำเนินจนจบการทดลองได้เนื่องจากเกิดฟองขึ้นจำนวนมากและหากปล่อยไปจะเกิดการล้นของฟองออกมานอกถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ซึ่งเป็นอันตรายต่อตัวเครื่องและอาจเกิดการปนเปื้อนในระหว่างการหมัก นำไปสู่การลดลงของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการได้ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารลดฟองเป็น 40 และ 50 ppm เซลล์จะมีอัตราการเจริญเติบโตที่ลดลงแต่เพาะเลี้ยงต่อไปได้จนกระทั่งจบในชั่วโมงที่ 16 โดยมีค่า OD_{600} เซลล์ที่ใกล้เคียงกันคือประมาณ 5.5 ในชั่วโมงที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่ายิ่งเพิ่มความเข้มข้นของสารลดฟอง จะส่งผลทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์ยิ่งลดลงอาจเนื่องมาจากความเข้มข้นสารลดฟองที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อ oxygen transfer rate (OTR) ระหว่างเซลล์และออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ลดลง [42, 52, 53]

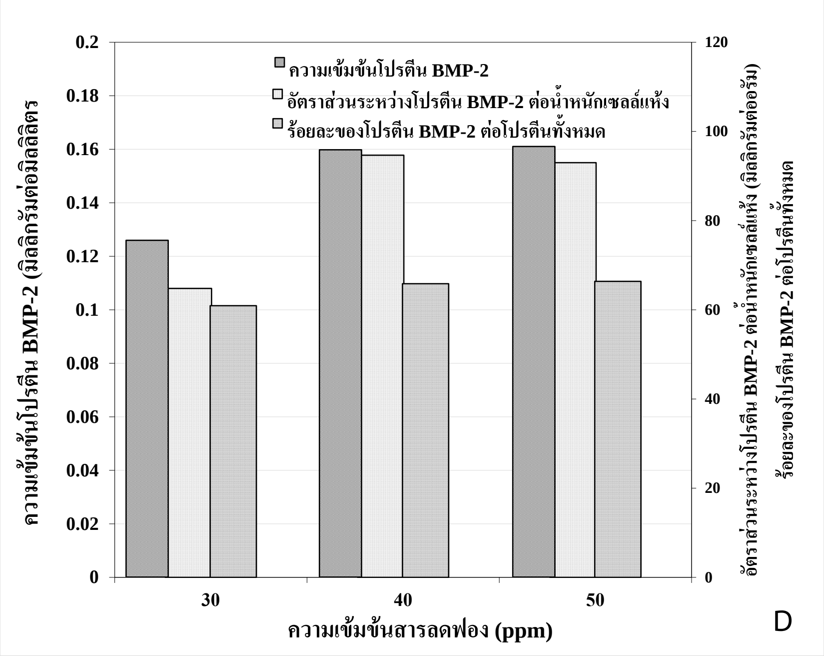


ภาพที่ 24 การเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน ขนาด 3 ลิตรที่สภาวะความเข้มข้นสารลดฟองแตกต่างกัน: 30 (●), 40 (◆) และ 50 ppm (▲) ที่อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm อัตราการกวนใบพัด 350 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส

ผลการศึกษาผลกระทบความเข้มข้นของสารลดฟองต่อการผลิตโปรตีน BMP-2 ใน**ภาพที่ 25** พบว่าการผลิตโปรตีนสูงขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารลดฟองซึ่งในการทดลองนี้ใช้สารลดฟองประเภท 10% silicone oil ที่ความเข้มข้นของสารลดฟอง 40 และ 50 ppm จะมีความเข้มข้นของโปรตีน BMP-2 และอัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุดมีค่าประมาณ 0.16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและ 95 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ขณะที่ร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมดของค่าทั้งสองมีค่าสูงกว่าที่ความเข้มข้นของสารลดฟองเท่ากับ 30 ppm จากการทดลองนี้ พบความเข้มข้นสารลดฟองที่เหมาะสมคือ 40-50 ppm ซึ่งจะนำไปใช้ในการลดฟองเพื่อเพิ่มผลผลิตโปรตีน BMP-2

จากการดำเนินงานวิจัยในขั้นตอนนี้เพื่อศึกษาความเข้มข้นของสารลดฟองต่อการเจริญเติบโตและการผลิตโปรตีน BMP-2 ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) ในระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพเพื่อนำความเข้มข้นของสารลดฟองที่เหมาะสมไปประยุกต์ใช้ในการลดการเกิดฟองขึ้นระหว่างทำการทดลองในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ โดยใช้สารลดฟองประเภท 10% silicone oil ซึ่งนิยมใช้กันในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดใหญ่ [42] จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าที่ความเข้มข้นของสารลดฟองเท่ากับ 40 และ 50 ppm สามารถเพิ่มผลผลิตโปรตีน BMP-2 และยับยั้งการเกิดฟองได้ตลอดการทดลอง ในขณะที่หากใช้ความเข้มข้นสารลดฟองที่ต่ำ จะไม่สามารถยับยั้งการเกิดฟองในระหว่างกระบวนการ

หมักได้นำไปสู่การลดลงของการผลิตโปรตีนและเกิด cell lysis [54] ดังนั้น หากเกิดปริมาณฟองที่ลดลงเมื่อใช้ความเข้มข้นของสารลดฟองที่เพิ่มขึ้น อาจจะเพิ่มการผลิตโปรตีนที่สูงขึ้นได้ โดยความเข้มข้นสารลดฟอง 40 ppm สามารถยับยั้งการเกิดฟองได้และมีผลผลิตโปรตีนที่เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นสารลดฟองที่ 30 ppm และ 50 ppm ในงานวิจัยนี้เลือกความเข้มข้นสารลดฟอง 40 ppm เป็นค่าที่เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ลดฟองระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) ในระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพเพื่อใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมของการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตโปรตีน BMP-2 ต่อไป



ภาพที่ 25 ผลกระทบของความเข้มข้นสารลดฟองที่แตกต่างกัน ได้แก่ 30, 40 และ 50 ppm ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ต่อความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมดในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 3 ลิตร

4.2 หาสภาวะที่เหมาะสมด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองร่วมกับการออกแบบการทดลองแบบส่วนประสมกลางในการเพาะเลี้ยง *E. coli* BL21 (DE3) เพื่อผลิตโปรตีน BMP-2 สูงสุดในระดับห้องปฏิบัติการ

4.2.1 ผลการออกแบบการทดลองร่วมกับวิธีพื้นผิวตอบสนองและทำการทดลองตามสภาวะการเพาะเลี้ยงจากการออกแบบการทดลอง

เมื่อทำการรันค่าของตัวแปรที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาผลกระทบของการเพาะเลี้ยงในหัวข้อที่ 4.1.2 ลงในโปรแกรม Design Expert version 11 จะแสดงใน**ตารางที่ 1**

ตารางที่ 1 ตัวแปรอิสระและรหัสที่ใช้ในกระบวนการหาค่าที่เหมาะสมที่สุดตามการออกแบบส่วนประสมกลาง

Independence variables (ตัวแปรอิสระ)	Factor (ปัจจัย)	Units (หน่วย)	Variables level (รหัสระดับของตัวแปร)		
			-1	0	1
A	**ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง**	**ชั่วโมง**	6	9	12
B	**สัดส่วนหัวเชื้อ**	**%(v/v)**	1	5	9
C	**ความเข้มข้นแลคโตส**	**กรัมต่อลิตร**	1	2	3

ในตารางที่ 2 แสดงตารางการออกแบบการทดลองหลังรันโปรแกรม กำหนดการทำซ้ำที่ระดับกลางเท่ากับ 4 จะได้ผลการทดลองทั้งหมด 18 รัน ประกอบด้วย 3 ตัวแปรอิสระ ได้แก่ ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง สัดส่วนหัวเชื้อและความเข้มข้นแลคโตส และ 3 ตัวแปรตอบสนอง ได้แก่ ความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมด โดยพบว่าในช่วงของสภาวะการเพาะเลี้ยงที่ศึกษาจะให้ผลผลิตความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมดสูงสุด คือ 0.207 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 128.14 มิลลิกรัมต่อกรัม และ 71.8 ตามลำดับ

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ตารางที่ 2 ผลกระทบของสภาวะการเพาะเลี้ยงเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) ที่ได้จากการออกแบบการทดลองแบบส่วนประสมกลางประกอบด้วย 3 ตัวแปรอิสระ ได้แก่ ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง สัดส่วนหัวเชื้อและความเข้มข้นแลคโตสในระดับฟลาสก์

Std	Run (รัน)	Independence variables (ตัวแปรอิสระ)			Response (ตัวแปรตอบสนอง)		
		A: ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)	B: สัดส่วนหัวเชื้อ (%v/v)	C: ความเข้มข้นแลคโตส) (กรัมต่อลิตร)	R1: ความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	R2: อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัมต่อกรัม)	R3: ร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมด
1	6	6(-1)	1(-1)	1(-1)	0.099	105.72	63.6
2	2	12(1)	1(-1)	1(-1)	0.175	109.40	52.3
3	7	6(-1)	9(1)	1(-1)	0.151	82.35	56.7
4	4	12(1)	9(1)	1(-1)	0.113	69.66	48.2
5	8	6(-1)	1(-1)	3(1)	0.174	106.33	61.0
6	1	12(1)	1(-1)	3(1)	0.145	58.82	59.1
7	16	6(-1)	9(1)	3(1)	0.112	121.11	61.9
8	14	12(1)	9(1)	3(1)	0.145	71.86	64.5
9	3	6(-1)	5(0)	2(0)	0.191	106.35	71.8
10	15	12(1)	5(0)	2(0)	0.136	83.44	61.1
11	10	9(0)	1(-1)	2(0)	0.165	90.44	53.4
12	11	9(0)	9(1)	2(0)	0.198	100.45	56.0
13	12	9(0)	5(0)	1(-1)	0.191	128.14	54.1
14	9	9(0)	5(0)	3(1)	0.116	123.12	61.3
15	5	9(0)	5(0)	2(0)	0.126	116.66	64.1
16	13	9(0)	5(0)	2(0)	0.192	127.08	63.8
17	17	9(0)	5(0)	2(0)	0.207	120.46	60.7
18	18	9(0)	5(0)	2(0)	0.193	110.68	65.3

มหาวิทยาลัยศิลปากร

เมื่อวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธีการทางสถิติใน**ตารางที่ 3** พบว่าตัวแปรที่สำคัญที่สุดทั้งสามผลกระทบหรือค่าตัวแปรสนอง คือ ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง ซึ่งส่งผลกระทบในเชิงลบหมายความว่าเมื่อระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นทำให้ความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 และอัตราส่วนระหว่างโปรตีนและร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมดลดลง (p<0.05) เนื่องจากระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่เพิ่มขึ้นอาจจะทำให้โปรตีนภายในเซลล์เกิดการ degraded หรือ denatured นำไปสู่การลดลงของโปรตีนเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่ใช้ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงน้อยหรือเป็นผลมาจาก plasmid instability [50, 51] อย่างไรก็ตาม เมื่อดูผลกระทบของร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมดยังพบความสัมพันธ์ในเชิงบวกต่อความเข้มข้นแลคโตส หมายความว่าเมื่อความเข้มข้นแลคโตสเพิ่มขึ้นทำให้ร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมดเพิ่มขึ้น เนื่องมาจากแลคโตสเป็นตัวกระตุ้นในการเปิดยีนเพื่อการแสดงออกของโปรตีน เมื่อเพิ่มความเข้มข้นแลคโตสส่งผลให้เซลล์มีการผลิตโปรตีนเพิ่มขึ้น แต่เมื่อพิจารณาเทอมของผลกระทบในเชิงร่วมกัน พบว่าในเทอมของระยะเวลาการเพาะเลี้ยงและความเข้มข้นแลคโตส ส่งผลกระทบเชิงลบต่อความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 และอัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งหมายความว่าเมื่อเพิ่มทั้งระยะเวลาการเพาะเลี้ยงและความเข้มข้นแลคโตส ทำให้ความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 และอัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งลดลง (p<0.05) เนื่องจากความเข้มข้นแลคโตสเพิ่มขึ้นอาจจะเป็นสาเหตุให้เกิดการผลิตโปรตีนอย่างรวดเร็วภายในเซลล์ ทำให้โปรตีนที่ผลิตได้อยู่ในรูป misfolding และระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นมีผลให้โปรตีนเหล่านั้นเกิดการ degraded ล้วนส่งผลต่อการลดลงของโปรตีน [55] ในขณะที่มีผลกระทบเชิงบวกต่อร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมด เมื่อพิจารณาในเทอมของค่าสมการกำลังสอง (quadratic factor) พบว่าระยะเวลาการเพาะเลี้ยง ส่งผลกระทบเชิงลบต่อความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งหมายความว่า ที่ระยะเวลาที่ต่ำหรือสูงเกินค่าที่เหมาะสมจะส่งผลต่อความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 และอัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งลดลง (p<0.05) เนื่องจากการเพิ่มระยะเวลาการเพาะเลี้ยงทำให้โปรตีนเกิด degrade ได้ ในขณะที่ระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงต่ำเกินไปทำให้เซลล์ไม่สามารถผลิตโปรตีนได้ในปริมาณมาก อย่างไรก็ตาม การเพิ่มระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่ยาวนานขึ้นจะส่งผลต่อการผลิตโปรตีนสูงขึ้น [56] แต่จำเป็นต้องคำนึงถึงสภาวะแวดล้อมของโปรตีนต่าง ๆ เช่น อาจเกิดการ degraded เนื่องจากอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นจากการเพาะเลี้ยงหรือ protease ที่ผลิตขึ้นภายในเซลล์ รวมทั้งปัจจัยทางสภาพแวดล้อมอื่นๆ ด้วย ซึ่งลักษณะกราฟตัวแปรตอบสนองที่

ได้จะอยู่ในรูปของระฆังคว่ำ ใน**ภาพที่ 26A-B** ซึ่งค่ากลางที่เหมาะสมคือระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 9 ชั่วโมง ในขณะที่ส่งผลกระทบเชิงบวกต่อร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมด ซึ่งกราฟตัวแปรตอบสนองที่ได้จะมีลักษณะรูประฆังหงาย ใน**ภาพที่ 26C** และในเทอมของผลกระทบเชิงร่วมกันระหว่างสัดส่วนหัวเชื้อและความเข้มข้นแลคโตสส่งผลกระทบเชิงบวกต่อทั้ง 3 ตัวแปรตอบสนอง หมายความว่าเมื่อเพิ่มสัดส่วนหัวเชื้อและความเข้มข้นแลคโตส ทำให้ความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 และอัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมดเพิ่มขึ้น (p<0.05) เนื่องจากสัดส่วนหัวเชื้อที่เพิ่มขึ้นจะเพิ่มปริมาณเซลล์อย่างรวดเร็ว ส่งผลให้มีปริมาณของเซลล์มากขึ้นเมื่อเทียบกับความเข้มข้นแลคโตสที่เพิ่มขึ้น ทำให้เซลล์สามารถผลิตโปรตีนได้โดยไม่เกิดการสะสมของแลคโตสที่ความเข้มข้นสูง ซึ่งเป็นสาเหตุต่อการผลิตโปรตีนที่ลดลง เนื่องจากการทำงานของยีน lacY ซึ่งทำหน้าที่ในการเปลี่ยนแลคโตส ให้เป็นอัลโตแลคโตส นำไปใช้ในการเปิดยีนของการแสดงออก พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของตัวกระตุ้นที่ต่ำส่งผลดีต่อการผลิตโปรตีน เนื่องจากที่ความเข้มข้นตัวกระตุ้นสูงอาจจะทำให้เกิด metabolic burden และความเป็นพิษกับเซลล์ แต่อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นของตัวกระตุ้นที่ต่ำมากเกินไปอาจจะลดการผลิตโปรตีนได้ จากยีน lacY ซึ่งส่งผลให้เกิดการกระจายของตัวเหนี่ยวนำต่อจำนวนเซลล์ที่ไม่เหมาะสม [57, 58] และในเทอมของสัดส่วนหัวเชื้อส่งผลกระทบเชิงลบต่อทั้ง 3 ตัวแปรตอบสนอง หมายความว่าที่สัดส่วนหัวเชื้อที่ต่ำหรือสูงเกินค่าที่เหมาะสมจะส่งผลต่อความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 และอัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมดลดลง (p<0.05) เนื่องจากสัดส่วนหัวเชื้อที่ต่ำเมื่อนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงมีผลให้ปริมาณการเพิ่มจำนวนเซลล์มีน้อย เนื่องจากต้องใช้เวลาในการปรับตัวช่วง lag phase นาน ในขณะที่สัดส่วนหัวเชื้อที่สูงจะส่งผลให้เซลล์เจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ทำให้เมื่อระยะเวลาผ่านไปเกิดสภาวะ exhausted หรือเซลล์เกิดการขาดสารอาหารขึ้นล้วนเป็นสาเหตุทำให้เกิดการผลิตโปรตีนที่ลดลง [51] ซึ่งลักษณะกราฟตัวแปรตอบสนองที่ได้จะอยู่ในรูปของระฆังคว่ำ ใน**ภาพที่ 26D-F** ซึ่งค่ากลางที่เหมาะสมคือสัดส่วนหัวเชื้อ 5% และในเทอมความเข้มข้นแลคโตสพบว่ามีผลกระทบเชิงบวกต่ออัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง หมายความว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นแลคโตสจะทำให้อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้น (p<0.05) เนื่องจากความเข้มข้นแลคโตสมีผลต่อการผลิตโปรตีนหากมีปริมาณที่สูงพอเมื่อเทียบกับจำนวนเซลล์ อาจจะทำให้เซลล์สามารถนำแลคโตสไปใช้ในการผลิตโปรตีนได้ในปริมาณสูง หากมีปริมาณของแลคโตสที่ต่ำจะส่งผลให้เซลล์ผลิตโปรตีนลดลงได้ [57] ซึ่ง

ลักษณะกราฟตัวแปรตอบสนองที่ได้จะอยู่ในรูปของระฆังคว่ำ ใน**ภาพที่ 26F** ซึ่งค่ากลางที่เหมาะสมคือความเข้มข้นแลคโตส 2 กรัมต่อลิตร

เมื่อวิเคราะห์ผลกระทบของตัวแปรอิสระ ใน**ตารางที่ 3** สามารถนำมาเขียนสมการที่โมเดลทำนายของตัวแปรอิสระต่อความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมด ดังสมการนี้

ความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร), R1

$= 0.1844 - 0.0116A – 0.0002B – 0.0000C – 0.0074AB - 0.0191AC + 0.0199BC – 0.0390A^2 - 0.0270B^2 + 0.0170C^2$

อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัมต่อกรัม), R2

$= 116.41 - 12.87A - 2.53B - 1.40C - 2.26AB - 10.97AC + 11.37BC - 19.21A^2 - 18.65B^2 + 11.53A^2$

ร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมด, R3

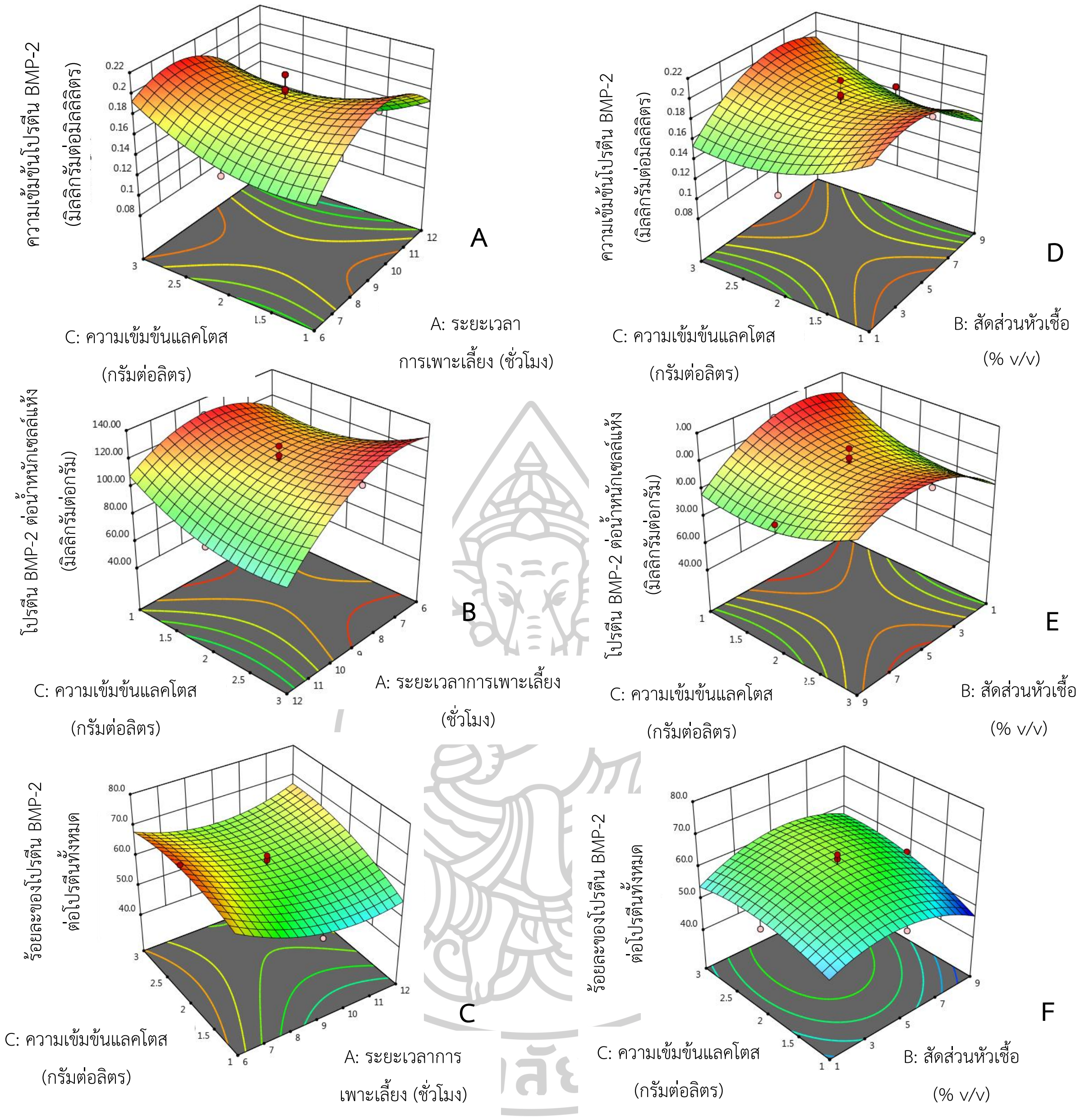
$= 62.24 - 3.00A – 0.207B + 3.29C +0.914 + 2.58AC + 2.16BC + 5.45A^2 - 6.32B^2 - 3.26C^2$

โดยที่ความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมด เป็นค่าที่ได้จากการทำนายผลการทดลอง ในเทอม A, B และ C คือ ค่าตัวแปรอิสระของผลการทดลอง ได้แก่ ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง สัดส่วนหัวเชื้อและความเข้มข้นแลคโตส ตามลำดับ ในเทอม AB, AC และ BC คือ ค่าตัวแปรอิสระของผลการทดลองของผลกระทบในเชิงร่วมกัน ได้แก่ ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงและสัดส่วนหัวเชื้อ ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงและความเข้มข้นแลคโตส และสัดส่วนหัวเชื้อและความเข้มข้นแลคโตส ตามลำดับ ในเทอม A^2, B^2 และ C^2 คือ ค่าตัวแปรอิสระของผลการทดลองในเทอมค่าสมการกำลังสอง ได้แก่ ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง สัดส่วนหัวเชื้อและความเข้มข้นแลคโตส ตามลำดับ

ตารางที่ 3 แสดงผลกระทบของตัวแปรอิสระ ได้แก่ ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง สัดส่วนหัวเชื้อและความเข้มข้นแลคโตสต่อความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมด

Independence variable (ตัวแปรอิสระ)	Effect (ผลกระทบ)			*p*-value		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Intercept	0.1844	116.41	62.24	>0.0001	>0.0001	>0.0001
A : ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง	-0.0116	-12.87	-3.00	0.0327	0.0003	0.0047
B : สัดส่วนหัวเชื้อ	-0.0002	-2.53	-0.207	0.9656	0.2761	0.7958
C : ความเข้มข้นแลคโตส	0.0000	-1.40	3.29	1.0000	0.5351	0.0028
AB	-0.0074	-2.26	0.914	1.807	0.3771	0.3216
AC	-0.0191	-10.97	2.58	0.0052	0.0019	0.0174
BC	0.0199	11.37	2.16	0.0042	0.0015	0.0369
A^2	-0.0390	-19.21	5.45	0.0020	0.0017	0.0064
B^2	-0.0270	-18.65	-6.32	0.0142	0.0020	0.0028
C^2	0.0170	11.53	-3.26	0.0845	0.0242	0.0598

มหาวิทยาลัยศิลปากร



ภาพที่ 26 กราฟพื้นผิวตอบสนอง 3 มิติของ 3 สภาวะการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน คือ ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง สัดส่วนหัวเชื้อและความเข้มข้นแลคโตสต่อความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมด โดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง; A-C) ความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาการเพาะเลี้ยงและความเข้มข้นแลคโตส ขณะที่สัดส่วนหัวเชื้อเท่ากับ 5%; D-F) ความสัมพันธ์ระหว่างสัดส่วนหัวเชื้อและความเข้มข้นแลคโตส ขณะที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 9 ชั่วโมง

จากการนำผลการทดลองมารันด้วยโปรแกรม Design expert version 11 พบว่าโมเดลที่เหมาะสมที่สุดสำหรับอธิบายผลค่าตัวแปรตอบสนองทั้ง 3 ตัว ที่โปรแกรมแนะนำให้ใช้คือแบบ Quadratic ใน**ตารางที่ 4** เมื่อพิจารณาค่า R^2 ซึ่งบ่งบอกปริมาณค่า error ระหว่างผลการทดลองที่ได้กับค่าที่โมเดลทำนายไว้ ในการทดลองนี้ค่า R^2 ความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมด เท่ากับ 0.921, 0.950 และ 0.912 ตามลำดับ ค่า Adjusted R^2 จะคำนึงถึงตัวแปรที่มีความสำคัญต่อโมเดล โดยปกติจะมีค่าต่ำกว่า R^2 และหากมีค่าต่างจาก R^2 มาก หมายความว่ามีตัวแปรที่มีผลต่อโมเดลน้อยหรือไม่มีความสำคัญต่อโมเดลส่งผลให้ค่าของ Adjusted R^2 ที่ได้ลดลง ซึ่งในการทดลองนี้ค่า Adjusted R^2 เท่ากับ 0.832, 0.895 และ 0.814 ตามลำดับ เช่นเดียวกันกับค่า Predicted R^2 หากมีค่าที่ต่างจากค่าของ R^2 และ Adjusted R^2 มาก หมายความว่ามีตัวแปรที่มีผลต่อโมเดลน้อยหรือไม่มีความสำคัญต่อโมเดล ซึ่งในการทดลองนี้ค่าเท่ากับ 0.642, 0.702 และ 0.544 ตามลำดับ พบว่าค่าที่ได้มีความต่างจาก R^2 และ Adjusted R^2 แต่ไม่ได้สูงมาก ซึ่งยังพอเป็นค่าที่ยอมรับได้ของโมเดล และค่า Adeq Precision ทำนายอัตราส่วนของค่าทำนายต่อค่าเฉลี่ยการทำนายที่ผิดพลาด ในการทดลองนี้ค่า Adeq Precision เท่ากับ 10.28, 13.94 และ 12.56 ตามลำดับ และ Model ที่ได้ควรจะมี significant ($p<0.05$) และมีค่า Lack of fit ถ้าเป็น not significant ($p>0.05$) ซึ่งในการทดลองนี้ค่าของทั้ง 3 ตัวแปรตอบสนองมีค่า Model เป็น significant และ Lack of fit เป็น not significant ซึ่งเป็นไปตามกฎของโมเดลที่มีความน่าเชื่อถือต่อการนำไปวิเคราะห์หาสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมของค่าตัวแปรตอบสนองที่ต้องการต่อได้

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของตัวแปรอิสระต่อค่าตัวแปรตอบสนองต่อความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมด

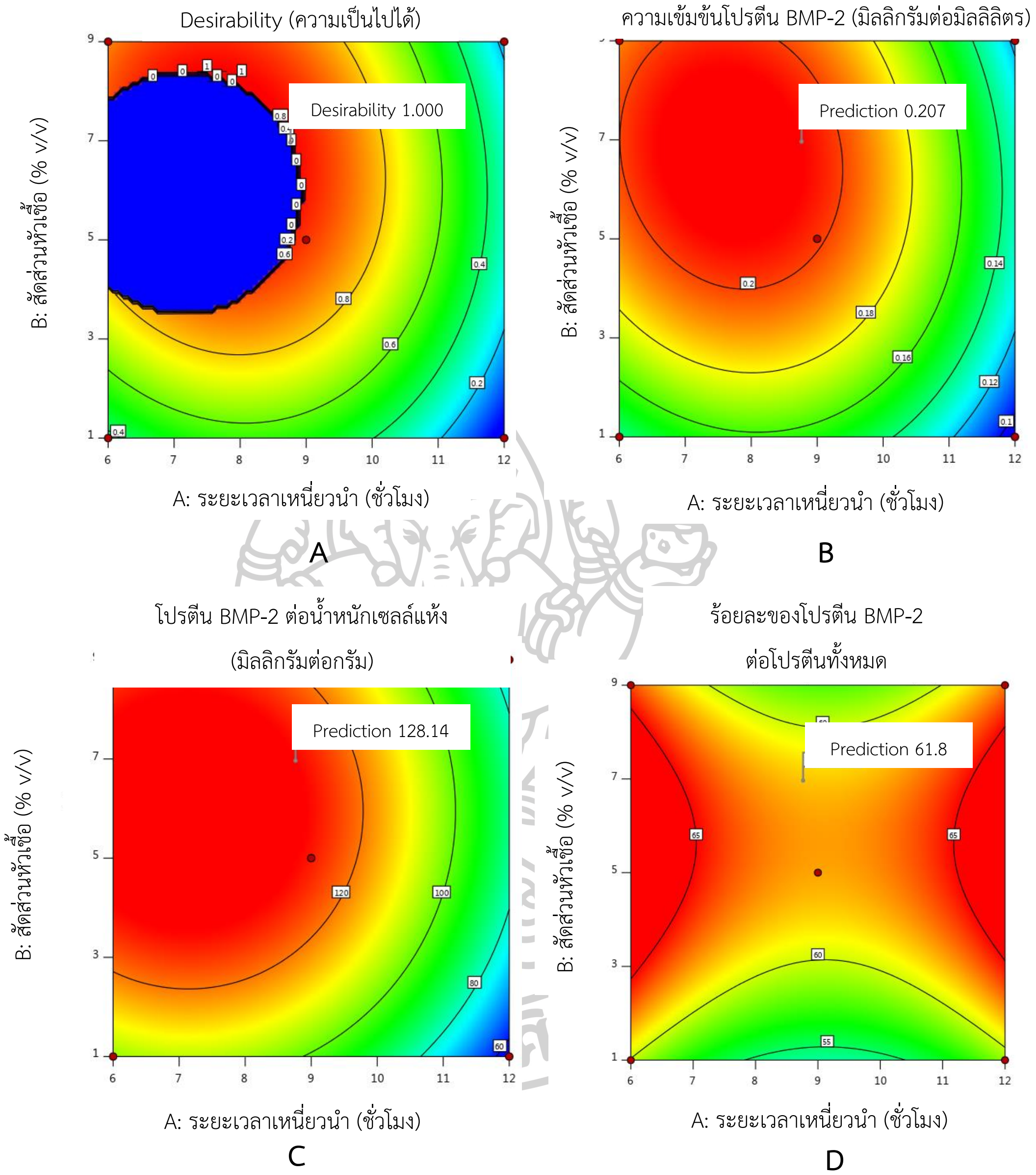
Factors	Sum of square (Degree of freedom)			Mean square			*p*-value (f-value)[a]		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Model	0.0188 (9)	7171.18 (9)	498.39 (9)	0.0021	796.8	55.4	0.0016 (10.32)	0.0003 (17.02)	0.0023 (9.26)
Residue	0.0016 (8)	374.53 (8)	47.9 (8)	0.0002	46.8	5.98			
- Lack of fit	0.0011 (5)	232.7 (5)	36.6 (5)	0.0002	46.5	7.3	0.4786 (1.17)	0.9847 (0.98)	0.3087 (1.95)
- Pure error	0.0005 (3)	141.8 (3)	11.3 (3)	0.0002	47.3	3.8			
Total	0.0204 (17)	7545.7 (17)	546.3 (17)						
R^2	0.921	0.950	0.912						
Adjusted R^2	0.832	0.895	0.814						
Predicted R^2	0.642	0.702	0.544						
Adeq Precision	10.28	13.94	12.56						

[a]Statistically significant at 95% of confidence level

4.2.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของการเพาะเลี้ยงเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3)

กำหนดเป้าหมายเพื่อให้ได้ค่าความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 และอัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุด (maximizing) หลังจากนั้นโปรแกรมจะทำนายสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เป็นไปได้ทั้งหมด โดยในการทดลองนี้พิจารณาหนึ่งในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 8.54 ชั่วโมง สัดส่วนหัวเชื้อ 7.02% และความเข้มข้นแลคโตส 2.96 กรัมต่อลิตร จะแสดงในรูปแบบภาพ 2 มิติ โดยใน**ภาพที่ 27A** จะแสดงค่า Desirability ของแบบจำลองที่ได้เท่ากับ 1 และเมื่อวิเคราะห์แบบจำลองต่อค่าตัวแปรตอบสนองที่ควรเป็นไปได้ใน**ภาพที่ 27B-D** จะทำนาย (Prediction) ค่าของสภาวะการเพาะเลี้ยงทั้ง 3 ตัวแปรอิสระต่อตัวแปรตอบสนองที่เป็นไปได้ คือ ความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและร้อยละของ

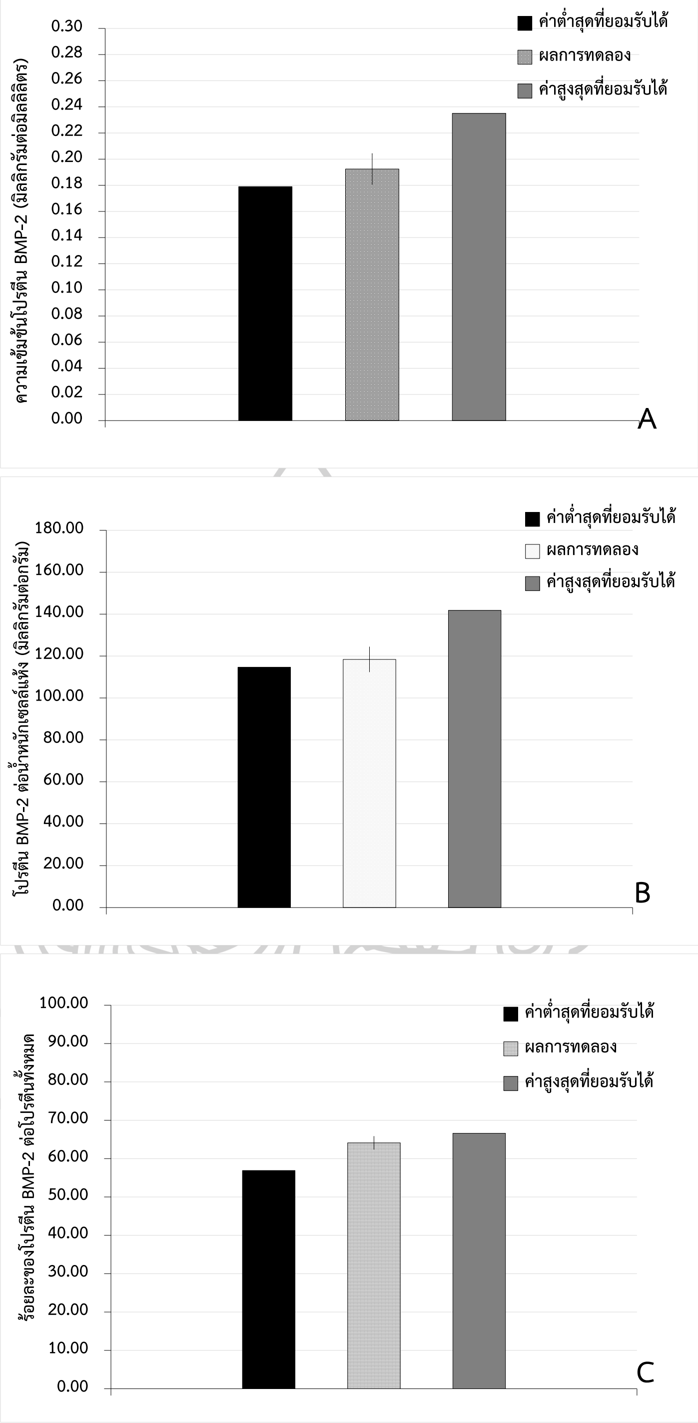
โปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมด เท่ากับ 0.207 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 128.14 มิลลิกรัมต่อกรัมและ 61.8



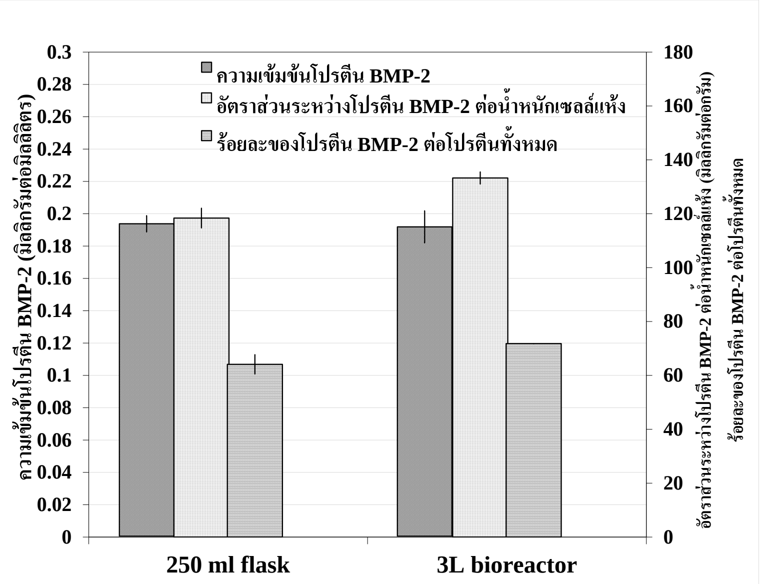
ภาพที่ 27 ภาพ 2 มิติแสดงจุดของสภาวะที่เหมาะสมที่สุดหลังการทำ optimal condition โดยที่ A) ค่า Desirability ที่ได้จากสภาวะการเพาะเลี้ยง B) ความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 C) อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และ D) ร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมดที่สภาวะการเพาะเลี้ยงที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 8.54 ชั่วโมง สัดส่วนหัวเชื้อ 7.02% และความเข้มข้นแลคโตส 2.96 กรัมต่อลิตร

4.2.3 การทวนสอบสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของการเพาะเลี้ยงเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3)

จากการหาสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมที่สุดจากหัวข้อ 4.2.2 จะได้ค่าทำนายของสภาวะการเพาะเลี้ยงคือ ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 8.54 ชั่วโมง สัดส่วนหัวเชื้อ 7.02 % และความเข้มข้นแลคโตส 2.96 กรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามในการทดลองจริงทำการเพาะเลี้ยงที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 9 ชั่วโมง สัดส่วนหัวเชื้อ 7% และความเข้มข้นแลคโตสเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร ซึ่งได้ผลการทดลองดังใน**ภาพที่ 28 A-C** พบว่าค่าตัวแปรตอบสนองที่ได้คือ ความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 0.192 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 118.39 มิลลิกรัมต่อกรัมและ 64.1 ซึ่งผลจากการทดลองสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมที่ได้พบว่าอยู่ในช่วงความเชื่อมั่น 95% ของแบบจำลองที่ทำนายไว้ หมายความว่าผลจากสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมที่สุดที่ได้จากการทำนายในระดับฟลาสก์มีความสอดคล้องทางสถิติกับผลจากการทดลองที่สภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมดังกล่าว **ในภาพที่ 29** เมื่อเปรียบเทียบสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมที่สุดทั้งในระดับฟลาสก์กับถังปฏิกรณ์ชีวภาพ พบว่ามีความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเท่ากับ 0.191 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 133.28 มิลลิกรัมต่อกรัมและ 71.8 ตามลำดับ ซึ่งมีค่ามากกว่าการเพาะเลี้ยงในระดับฟลาสก์อาจเนื่องมาจากในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ มีสภาวะอื่นๆ ที่อาจเอื้ออำนวยหรือมีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตและการผลิตโปรตีนในเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ที่ต่างจากในระดับฟลาสก์ จากการหาสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมที่สุดในระดับฟลาสก์จะเห็นได้ว่าสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมที่สุด คือ ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 8.54 ชั่วโมง สัดส่วนหัวเชื้อ 7.02% และความเข้มข้นแลคโตส 2.96 กรัมต่อลิตร ซึ่งสภาวะการเพาะเลี้ยงในการทดลองจริงคือระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 9 ชั่วโมง สัดส่วนหัวเชื้อ 7% และความเข้มข้นแลคโตส 3 กรัมต่อลิตร มีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ต่อเพื่อศึกษาหาสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อในระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ทั้งนี้จำเป็นต้องคำนึงถึงสภาวะการเพาะเลี้ยงอื่นๆ ด้วย เช่น อัตราการให้อากาศ อัตราการกวนใบพัด รวมถึงความเข้มข้นสารลดฟองที่ใช้ซึ่งจำเป็นต่อการลดการเกิดฟองขึ้นขณะเพาะเลี้ยงเซลล์ซึ่งล้วนมีผลต่อการเจริญเติบโตและผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนของเซลล์ทั้งสิ้น



ภาพที่ 28 เปรียบเทียบค่าตัวแปรตอบสนองที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 8.54 ชั่วโมง สัดส่วนหัวเชื้อ 7.02% และความเข้มข้นแลคโตส 2.96 กรัมต่อลิตร โดยที่ A) ความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 B) อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และ C) ร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมดในระดับฟลาสก์บ่มที่ความเร็วรอบเขย่า 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 29 เปรียบเทียบค่าตัวแปรตอบสนองที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงจริง 9 ชั่วโมง สัดส่วนหัวเชื้อ 7% และความเข้มข้นแลคโตส 3 กรัมต่อลิตรในระดับฟลาสก์บ่มที่ความเร็วรอบเขย่า 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่อัตราการให้อากาศ 1 vvm และอัตราการกวนใบพัด 250 รอบต่อนาที

4.3 หาสภาวะที่เหมาะสมด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองร่วมกับการออกแบบการทดลองแบบส่วนประสมกลาง ในการเพาะเลี้ยง *E. coli* BL21 (DE3) เพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตโปรตีน BMP-2 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

4.3.1 ผลการออกแบบการทดลองร่วมกับวิธีพื้นผิวตอบสนองและทำการทดลองตามสภาวะการเพาะเลี้ยงจากการออกแบบการทดลอง

นำสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมที่สุดที่ได้จากการทดลองระดับฟลาสก์ ได้แก่ ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 9 ชั่วโมง สัดส่วนหัวเชื้อ 7% และความเข้มข้นแลคโตส 3 กรัมต่อลิตรมาใช้ในการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ โดยศึกษา 2 ตัวแปร คือ อัตราการให้อากาศและอัตราการกวนใบพัด เมื่อทำการรันค่าของตัวแปรอิสระที่จะศึกษาลงในโปรแกรม Design Expert version 11 จะแสดงใน **ตารางที่ 5**

ตารางที่ 5 ตัวแปรอิสระและรหัสที่ใช้ในกระบวนการหาค่าที่เหมาะสมที่สุดตามการออกแบบส่วนประสมกลาง

Independence variables (ตัวแปรอิสระ)	Factor (ปัจจัย)	Units (หน่วย)	Variables level (รหัสระดับของตัวแปร)				
			-α	-1	0	1	α
A	อัตราการให้อากาศ	vvm	0.3	0.5	1	1.5	1.7
B	อัตราการกวน	รอบ/นาที	110	150	250	350	390

ในตารางที่ 6 แสดงตารางการออกแบบการทดลองหลังรันโปรแกรม กำหนดการทำซ้ำที่ระดับกลางเท่ากับ 4 จะได้ผลการทดลองทั้งหมด 12 รัน ประกอบด้วย 2 ตัวแปรอิสระ ได้แก่ อัตราการให้อากาศและอัตราการกวนใบพัดและ 3 ตัวแปรตอบสนอง ได้แก่ ความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมด โดยพบว่าในช่วงของสภาวะการเพาะเลี้ยงที่ศึกษาจะให้ผลผลิตโปรตีน อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมดสูงที่สุด คือ 0.203 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 151.32 มิลลิกรัมต่อกรัมและ 75.9 ตามลำดับ

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ตารางที่ 6 ผลกระทบของการเพาะเลี้ยงเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) ที่ได้จากการออกแบบการทดลองแบบส่วนประสมกลางประกอบด้วยตัวแปรอิสระ ได้แก่ อัตราการให้อากาศและอัตราการกวนในระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

Std	Run (รัน)	Independence variables (ตัวแปรอิสระ)		Response (ตัวแปรตอบสนอง)		
		A: อัตราการให้อากาศ (vvm)	B: อัตราการกวนใบพัด (รอบ/นาที)	R1: ความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	R2: อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัมต่อกรัม)	R3: ร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมด
1	5	0.5(-1)	150(-1)	0.057	85.19	73.0
2	8	1.5(1)	150(-1)	0.097	107.18	75.0
3	9	0.5(-1)	350(1)	0.129	82.83	70.0
4	4	1.5(1)	350(1)	0.126	68.78	70.1
5	1	0.3(-α)	250(0)	0.105	116.32	75.9
6	2	1.7(α)	250(0)	0.130	78.89	74.0
7	11	1(0)	110(-α)	0.059	89.59	69.0
8	7	1(0)	390(α)	0.121	69.64	66.7
9	3	1(0)	250(0)	0.194	140.12	70.9
10	6	1(0)	250(0)	0.203	151.32	72.0
11	10	1(0)	250(0)	0.202	143.83	74.4
12	12	1(0)	250(0)	0.182	143.32	74.6

เมื่อวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธีการทางสถิติใน**ตารางที่ 7** พบว่าตัวแปรอิสระทั้งสองตัวมีผลกระทบเชิงบวกต่อความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 หมายความว่าเมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศหรืออัตราการกวนใบพัดจะส่งผลให้ความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 เพิ่มขึ้น (p<0.05) เนื่องจากเมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศและอัตราการกวนใบพัดจะส่งผลต่อค่าออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้นทำให้เซลล์สามารถเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนขึ้นได้อย่างรวดเร็ว ส่งผลต่อการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่มีการให้อากาศและอัตราการกวนที่ต่ำ [45] อย่างไรก็ตาม เมื่อดูผลกระทบของอัตราส่วนระหว่างความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งยังพบความสัมพันธ์

ในเชิงลบต่ออัตราการกวนใบพัดหมายความว่าเมื่อเพิ่มอัตราการกวนใบพัดมากขึ้นส่งผลให้อัตราส่วนระหว่างความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งลดลง (p<0.05) เนื่องจากอัตราการกวนใบพัดที่สูงจะไปเพิ่มแรงเฉือนที่เกิดขึ้นระหว่างของเหลวกับเซลล์มีผลทำให้ผนังของเซลล์แตกและตายในที่สุด ซึ่งมีผู้วิจัยหลายคนได้แสดงความเห็นเกี่ยวกับผลกระทบของอัตราการกวนใบพัดทำนองเดียวกัน [59-61] ส่งผลต่ออัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งลดลง เมื่อพิจารณาเทอมของผลกระทบในเชิงร่วมกันระหว่างอัตราการให้อากาศและอัตราการกวนใบพัดส่งผลกระทบเชิงลบต่อความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 หมายความว่า เมื่อเพิ่มทั้งอัตราการให้อากาศและอัตราการกวนทำให้ความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 ลดลง (p<0.05) เนื่องจากอัตราการให้อากาศส่งผลต่อความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายในอาหารเพาะเลี้ยง ทำให้เซลล์เจริญเติบโตและผลิตโปรตีนได้ดีขึ้น ซึ่งหากมีอัตราการให้อากาศสูงอาจจะทำให้เซลล์ใช้ระยะเวลาในการเจริญเติบโตเพื่อให้เซลล์มีปริมาณสูงสุดนานขึ้น ส่งผลให้ปริมาตรอาหารถูกนำไปใช้อย่างรวดเร็วจนในที่สุดเข้าสู่สภาวะการขาดสารอาหารซึ่งทำให้เซลล์ตายและโปรตีนที่ผลิตได้ลดลง [62] และอัตราการกวนของใบพัดมีผลต่อความเข้มข้นของเซลล์ที่เกิดขึ้นภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ หากมีอัตราการกวนที่สูงเกินไปทำให้เกิดการทำลายผนังของเซลล์จากแรงเฉือนของใบพัดที่เพิ่มมากขึ้นได้ [63] เมื่อพิจารณาในเทอมของค่าสมการกำลังสองพบว่าอัตราการให้อากาศส่งผลกระทบเชิงลบต่อความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 และอัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง หมายความว่าที่อัตราการให้อากาศที่ค่าสูงหรือต่ำเกินกว่าค่าที่เหมาะสมจะส่งผลต่อความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 และอัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งลดลง (p<0.05) เนื่องจากที่อัตราการให้อากาศต่ำทำให้เซลล์มีอัตราการเจริญเติบโตลดลง ส่งผลต่อการลดลงของการผลิตโปรตีน [45] หากอัตราการให้อากาศสูงจะส่งผลต่อระยะเซลล์เติบโตยาวนานขึ้น อาหารลดลงและโปรตีนที่ผลิตได้ลดลง ซึ่งลักษณะกราฟตัวแปรตอบสนองที่ได้จะอยู่ในรูประฆังคว่ำ ใน**ภาพที่ 30A-B** ซึ่งค่ากลางที่เหมาะสมคืออัตราการให้อากาศ 1 vvm ขณะที่ในเทอมของอัตราการกวนใบพัดส่งผลกระทบเชิงลบต่อทั้ง 3 ตัวแปรตอบสนอง หมายความว่าที่อัตราการกวนใบพัดที่สูงหรือต่ำเกินกว่าค่าที่เหมาะสมจะส่งผลให้ความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมดลดลง (p<0.05) เนื่องจากที่อัตราการกวนใบพัดที่ไม่เหมาะสม มีค่าสูงหรือต่ำเกินไปส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ลดลงนำไปสู่การผลิตโปรตีนที่ลดลงได้ เนื่องจากที่อัตราการกวนใบพัดต่ำจะส่งผลต่อความเข้มข้นของสารอาหารที่ไม่เท่ากันภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ทำให้การเจริญเติบโตลดลงส่งผลต่อการ

ลดลงของการผลิตโปรตีน ในขณะที่อัตราการกวนใบพัดที่สูงจะทำให้เซลล์เกิดการ lysis จากแรงเฉือนที่เพิ่มขึ้นของใบพัดได้ [63] ซึ่งลักษณะกราฟตัวแปรตอบสนองที่ได้จะอยู่ในรูประฆังคว่ำ ดังแสดงใน **ภาพที่ 30A-C** ซึ่งค่ากลางที่เหมาะสมคืออัตราการกวนใบพัด 250 รอบต่อนาที

เมื่อวิเคราะห์ผลกระทบของตัวแปรอิสระ ใน**ตารางที่ 7** สามารถนำมาเขียนสมการที่โมเดลทำนายของตัวแปรอิสระต่อความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมด ดังสมการนี้

ความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร), R1

$= 0.195 + 0.0091A + 0.0237B – 0.0107AB – 0.0396A^2 – 0.0536B^2$

อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัมต่อกรัม), R2

$= 144.66 – 5.61A - 8.67B - 0.91AB – 24.38A^2 – 33.56B^2$

ร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมด, R3

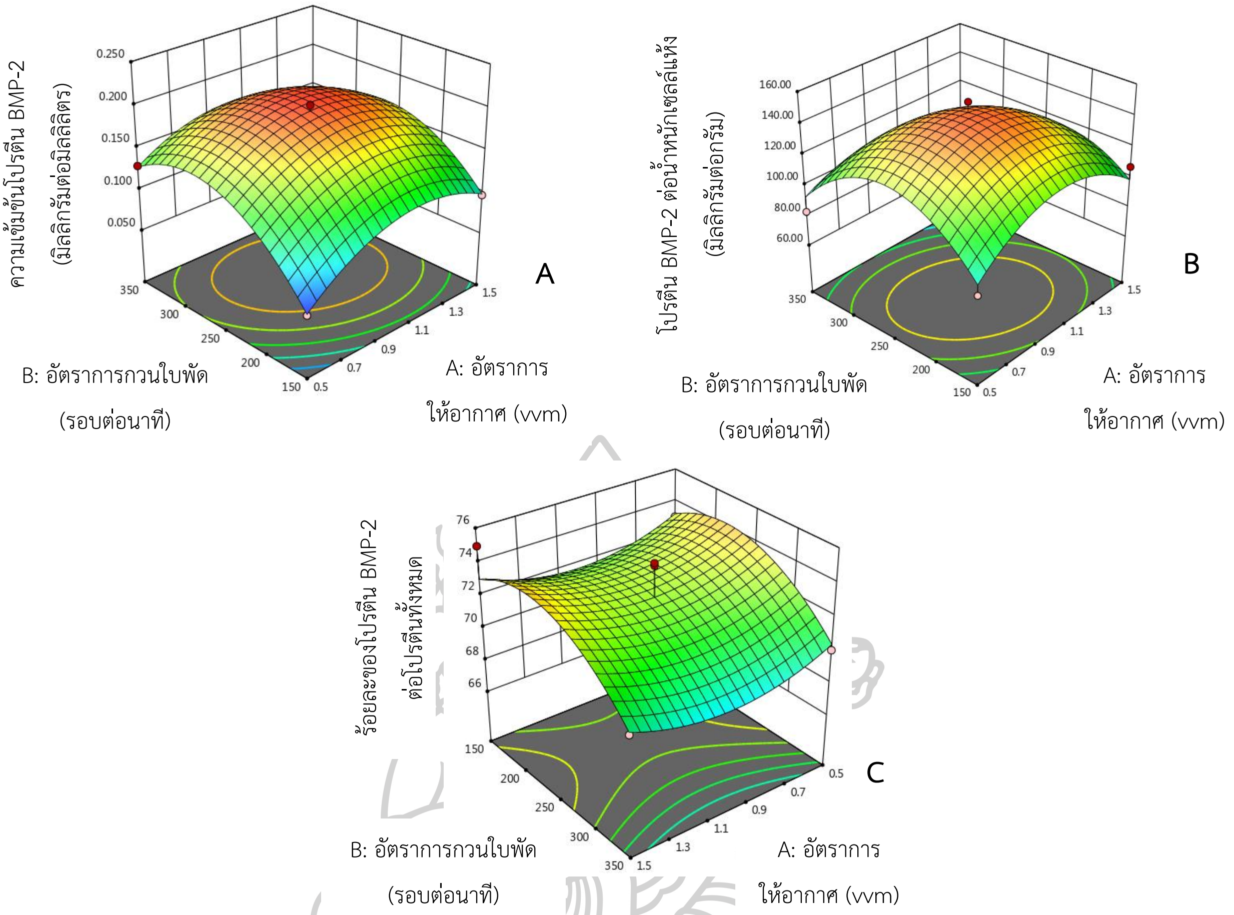
$= 72.94 – 0.089A – 1.41B - 0.476AB + 1.17A^2 – 2.42B^2$

โดยที่ความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมดเป็นค่าที่ได้จากการทำนายผลการทดลอง โดย A และ B คือค่าตัวแปรอิสระของผลการทดลอง ได้แก่ อัตราการให้อากาศและอัตราการกวนใบพัดตามลำดับ ในเทอม AB คือ ค่าตัวแปรอิสระของผลการทดลองของผลกระทบในเชิงร่วมกัน ได้แก่ อัตราการให้อากาศและอัตราการกวนใบพัด ในเทอม A^2 และ B^2 คือ ค่าตัวแปรอิสระของผลการทดลองในเทอมค่าสมการกำลังสอง ได้แก่ อัตราการให้อากาศและอัตราการกวนใบพัด ตามลำดับ ในสมการโมเดลที่ได้จากผลการทดลองสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดใหญ่เพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตโปรตีน BMP-2 แต่จำเป็นต้องคำนึงถึงปัจจัยอื่นๆ เช่น ชนิดของใบพัด ลักษณะของตัวถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ใช้ เส้นผ่านศูนย์กลางของใบพัดควรเป็นชนิดเดียวกัน เป็นต้น ซึ่งล้วนมีอิทธิพลต่อการผลิตโปรตีน

ตารางที่ 7 แสดงผลกระทบของตัวแปรอิสระ ได้แก่ อัตราการให้อากาศและอัตราการกวนใบพัดต่อความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมด

Independence variable (ตัวแปรอิสระ)	Effect (ผลกระทบ)			*p*-value		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Intercept	**0.195**	**144.66**	**72.94**	**>0.0001**	**>0.0001**	**>0.0001**
A : อัตราการให้อากาศ	**0.0091**	-5.61	-0.089	**0.0100**	0.1522	0.8837
B : อัตราการกวนใบพัด	**0.0237**	**-8.67**	-1.41	**<0.0001**	**0.0444**	0.0525
AB	**-0.0107**	-0.91	-0.476	**0.0210**	0.1106	0.5827
A^2	**-0.0396**	**-24.38**	1.17	**<0.0001**	**0.0007**	0.1255
B^2	**-0.0536**	**-33.56**	**-2.42**	**<0.0001**	**0.0001**	**0.0103**

มหาวิทยาลัยศิลปากร



ภาพที่ 30 กราฟพื้นผิวตอบสนอง 3 มิติของ 3 สภาวะการเพาะเลี้ยงเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) ของ 2 ตัวแปรอิสระที่แตกต่างกัน คือ อัตราการให้อากาศและอัตราการกวนใบพัดต่อตัวแปรตอบสนอง คือ A) ความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 B) อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและ C) ร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมดโดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 3 ลิตร

จากการนำผลการทดลองมารันด้วยโปรแกรม Design expert version 11 พบว่าโมเดลที่เหมาะสมที่สุดสำหรับอธิบายผลค่าตัวแปรตอบสนองทั้ง 3 ตัว ที่โปรแกรมแนะนำให้ใช้คือแบบ Quadratic ใน**ตารางที่ 8** เมื่อพิจารณาค่า R^2 ซึ่งบ่งบอกปริมาณค่า error ระหว่างผลการทดลองที่ได้กับค่าที่โมเดลทำนายไว้ ในการทดลองนี้ค่า R^2 ความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมด เท่ากับ 0.990, 0.949 และ 0.813 ตามลำดับ ค่า Adjusted R^2 จะคำนึงถึงตัวแปรที่มีความสำคัญต่อโมเดล โดยปกติจะมีค่าต่ำกว่า R^2 และหากมีค่าต่างจาก R^2 มาก หมายความว่ามีตัวแปรที่มีผลต่อโมเดลน้อยหรือไม่มีความสำคัญต่อโมเดลส่งผลให้ค่าของ Adjusted R^2 ที่ได้ลดลง ซึ่งในการทดลองนี้ค่า Adjusted R^2 เท่ากับ 0.982, 0.906 และ 0.658 ตามลำดับ เช่นเดียวกันกับค่า Predicted R^2 หากมีค่าที่ต่างจากค่าของ R^2 และ Adjusted R^2 มาก หมายความว่ามีตัวแปรที่มีผลต่อโมเดลน้อยหรือไม่มีความสำคัญต่อโมเดล ซึ่งในการทดลองนี้ค่าเท่ากับ 0.980, 0.667 และ 0.288 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาค่าที่ได้ของตัวแปรตอบสนอง คือ ร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมด พบว่ามีความต่างจาก R^2 และ Adjusted R^2 ที่สูง ซึ่งทำให้โมเดลของตัวแปรตอบสนองนี้มีความน่าเชื่อถือน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับโมเดลของตัวแปรตอบสนอง 2 ตัวคือ ความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และค่า Adeq Precision ทำนายอัตราส่วนของค่าทำนายต่อค่าเฉลี่ยการทำนายที่ผิดพลาด ในการทดลองนี้ค่า Adeq Precision เท่ากับ 28.46, 11.93 และ 7.88 ตามลำดับ และ Model ที่ได้ควรจะมี significant (p<0.05) และมีค่า Lack of fit ถ้าเป็น not significant (p> 0.05) ซึ่งในการทดลองนี้ค่าของทั้ง 3 ตัวแปรตอบสนองมีค่า Model เป็น significant และ Lack of fit เป็น not significant ซึ่งเป็นไปตามกฎของโมเดลที่มีความน่าเชื่อถือต่อการนำไปวิเคราะห์หาสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมของค่าตัวแปรตอบสนองที่ต้องการต่อได้ อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาการวิเคราะห์เชิงสถิติของโมเดลของทั้ง 3 ตัวแปรตอบสนอง จะเห็นว่าค่าโมเดลของตัวแปรตอบสนอง คือ ร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมด มีความน่าเชื่อถือของโมเดลที่ต่ำ เนื่องจากมีค่า R^2 Adjusted R2 และ Predicted R^2 ที่ต่ำ อาจจะทำให้โมเดลที่ได้มีความถูกต้องและแม่นยำลดน้อยลงเมื่อเปรียบเทียบกับค่าตัวแปรตอบสนองความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 และอัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง

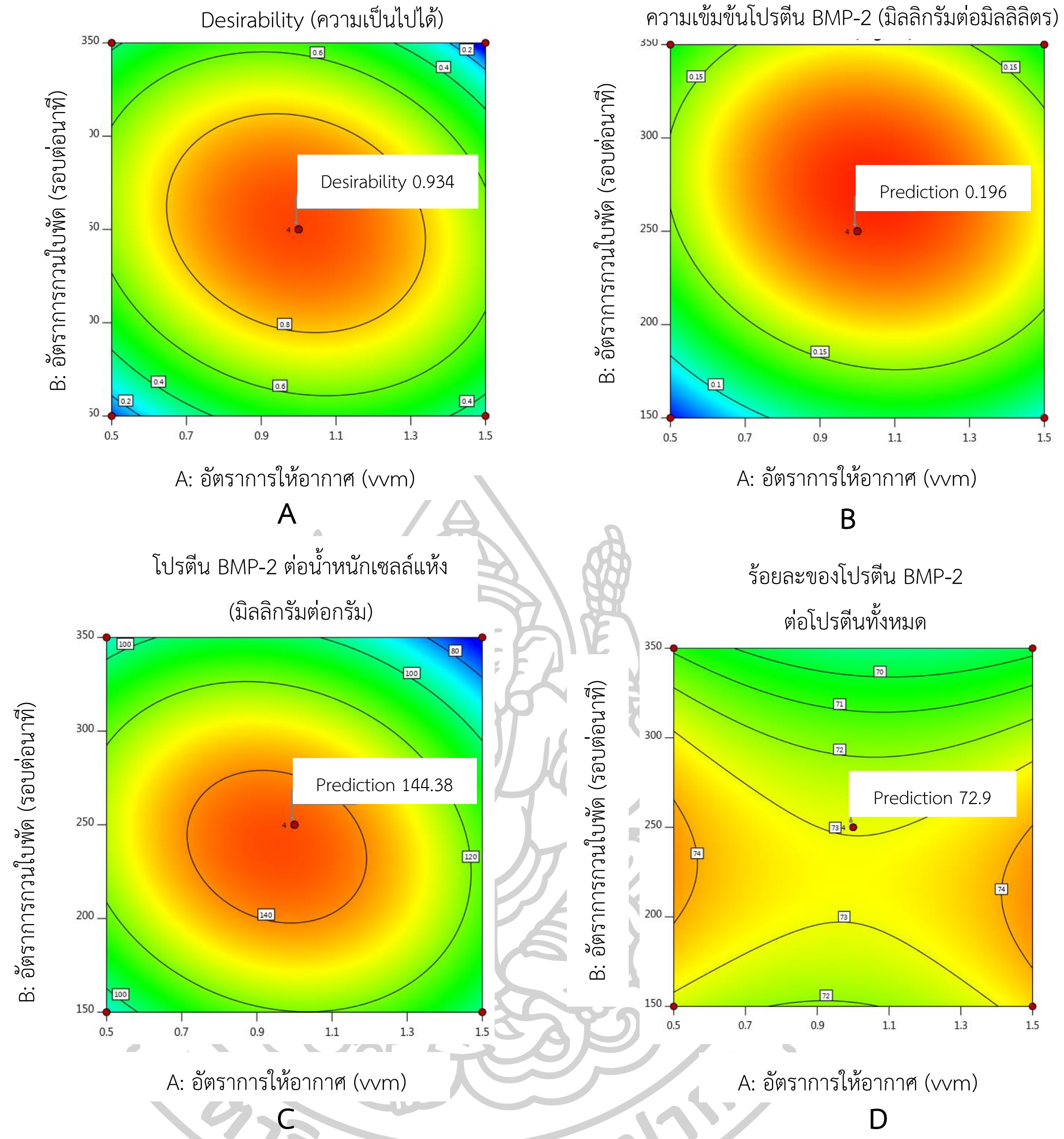
ตารางที่ 8 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของตัวแปรอิสระต่อผลตอบสนอง ต่อความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมด

Factors	Sum of square (Degree of freedom)			Mean square			*p*-value (f-value)[a]		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Model	0.0290 (5)	10272.89 (5)	70.38 (5)	0.0058	2054.58	14.03	<0.0001 (122.94)	0.0008 (22.13)	0.0341 (5.23)
Residue	0.0003 (6)	556.93 (6)	16.16 (6)	0.0000	92.82	2.69			
- Lack of fit	0.0000 (3)	489.50 (3)	6.17 (3)	5.446 E-06	163.17	2.06	0.9769 (0.0613)	0.0689 (7.26)	0.6489 (0.6181)
- Pure error	0.0003 (3)	67.43 (3)	9.99 (3)	0.0001	22.48	3.33			
Total	0.0293 (11)	10829.82 (11)	86.53 (11)						
R^2	0.990	0.949	0.813						
Adjusted R^2	0.982	0.906	0.658						
Predicted R^2	0.980	0.667	0.288						
Adeq Precision	28.46	11.93	7.88						

[a]Statistically significant at 95% of confidence level

4.3.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของของการเพาะเลี้ยงเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3)

กำหนดเป้าหมายเพื่อให้ได้ค่าความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 และอัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุด (maximizing) หลังจากนั้นโปรแกรมจะทำนายสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เป็นไปได้ทั้งหมด ในการทดลองนี้พิจารณาหนึ่งในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่อัตราการให้อากาศ 0.994 vvm และอัตราการกวนใบพัด 253.5 รอบต่อนาที จะแสดงในรูปแบบภาพ 2 มิติ โดยใน**ภาพที่ 31A** จะแสดงค่า Desirability ของแบบจำลองที่ได้เท่ากับ 0.934 และเมื่อวิเคราะห์แบบจำลองต่อค่าตัวแปรตอบสนองที่ควรเป็นไปได้ใน**ภาพที่ 31B-D** จะทำนาย (Prediction) ค่าของสภาวะการเพาะเลี้ยงทั้ง 3 ตัวแปรอิสระต่อตัวแปรตอบสนองที่ควรเป็นไป คือ ความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมด เท่ากับ 0.196 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 144.38 มิลลิกรัมต่อกรัมและ 72.9 ตามลำดับ



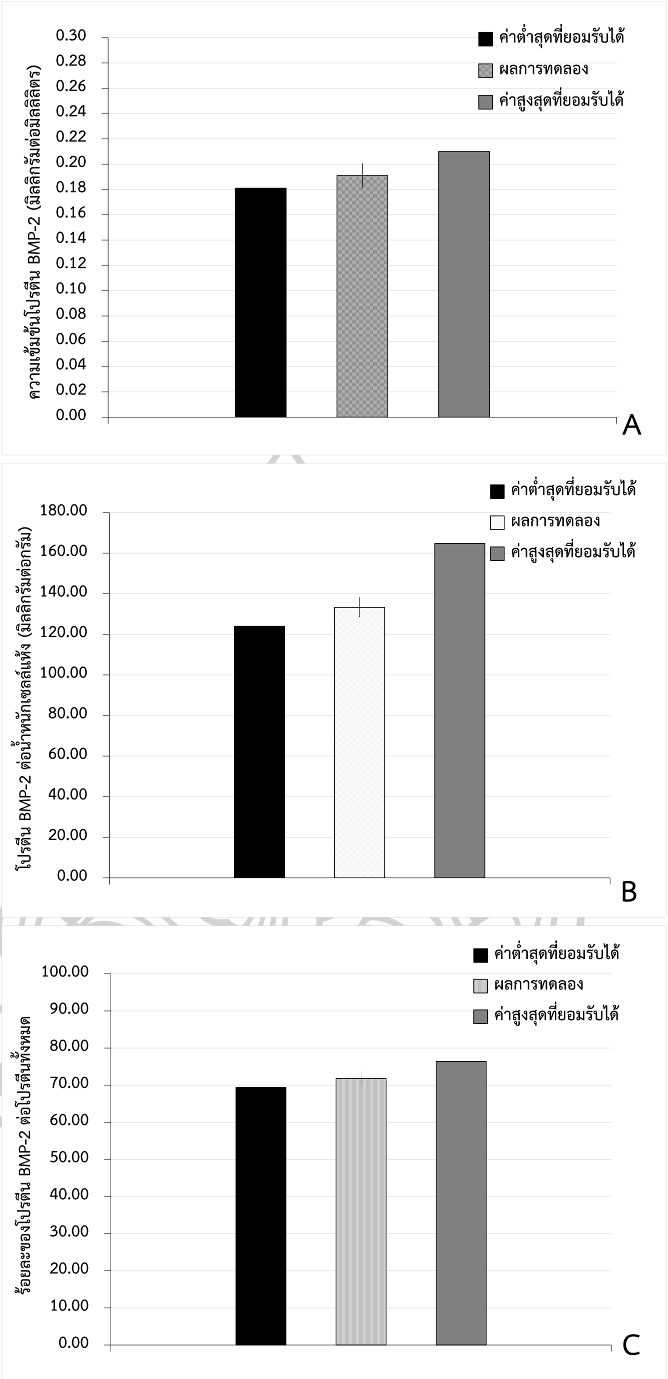
ภาพที่ 31 ภาพ 2 มิติแสดงจุดของสภาวะที่เหมาะสมที่สุดหลังการทำ optimal condition โดยที่ A) ค่า Desirability ที่ได้จากสภาวะการเพาะเลี้ยง B) ความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 C) อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และ D) ร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมดที่สภาวะการเพาะเลี้ยงที่อัตราการให้อากาศ 0.994 vvm และอัตราการกวนใบพัด 253.5 รอบต่อนาที

4.3.3 การทวนสอบสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมที่สุดของการเพาะเลี้ยงเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

จากการหาสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมที่สุดจากหัวข้อ 4.3.2 จะได้ค่าทำนายของสภาวะการเพาะเลี้ยงคืออัตราการให้อากาศ 0.994 vvm และอัตราการกวนใบพัด 253.5 รอบต่อนาที

อย่างไรก็ตามในการทดลองจริงทำการเพาะเลี้ยงที่อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1 vvm และอัตราการกวนใบพัดเท่ากับ 250 รอบต่อนาที ซึ่งได้ผลการทดลองดังใน**ภาพที่ 32A-C** พบว่าค่าตัวแปรตอบสนองที่ได้คือความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมด เท่ากับ 0.191 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 133.28 มิลลิกรัมต่อกรัมและ 71.8 ตามลำดับ ซึ่งผลจากการทดลองสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมที่ได้พบว่าอยู่ในช่วงความเชื่อมั่น 95% ของแบบจำลองที่ทำนายไว้ หมายความว่าผลจากสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมที่สุดที่ได้จากการทำนายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพมีความสอดคล้องทางสถิติกับผลจากการทดลองที่สภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมดังกล่าว ดังนั้น การหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของการเพาะเลี้ยงโดยประยุกต์ใช้วิธีพื้นผิวตอบสนองร่วมกับการออกแบบการทดลองส่วนประสมกลางเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการนำมาหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตโปรตีน BMP-2 ได้ในระดับฟลาสก์และถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ในงานวิจัยนี้พบว่าสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมที่สุดในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ คือ ที่อัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.994 vvm และอัตราการกวนใบพัด 253.5 ซึ่งสภาวะการเพาะเลี้ยงที่ใช้ในการทดลองจริงคือ ที่อัตราการให้อากาศ 1 vvm และอัตราการกวนใบพัดเท่ากับ 250 รอบต่อนาที ซึ่งสามารถที่จะใช้เป็นแนวทางของการเพาะเลี้ยงเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) ที่สามารถให้ผลผลิตโปรตีน BMP-2 สูงเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้ในอนาคต

มหาวิทยาลัยศิลปากร



ภาพที่ 32 เปรียบเทียบค่าตัวแปรตอบสนองที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) ที่อัตราการให้อากาศ 0.994 vvm และอัตราการกวนใบพัด 253.5 รอบต่อนาที โดยที่ A) ความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 B) อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและ C) ร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมดในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

- ในงานวิจัยนี้ศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) ในระดับฟลาสก์และถังปฏิกรณ์ชีวภาพ พบว่าเซลล์ที่เจริญเติบโตในถังปฏิกรณ์ชีวภาพจะมีช่วงในแต่ละระยะของการเจริญเติบโตที่เร็วและสั้นกว่าเซลล์ในระดับฟลาสก์รวมไปถึงมีความหนาแน่นเซลล์มากกว่าเนื่องจากมีสภาวะการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกันซึ่งมีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของเซลล์
- ในงานวิจัยนี้ศึกษาผลกระทบของสภาวะการเพาะเลี้ยงเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) ได้แก่ ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง สัดส่วนหัวเชื้อ และความเข้มข้นแลคโตสเพื่อหาสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมที่สุดด้วยวิธีพื้นผิวตอบร่วมกับการการออกแบบการทดลองส่วนประสมกลางในระดับห้องปฏิบัติการพบว่าหนึ่งในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมที่สุด คือ ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 9 ชั่วโมง สัดส่วนหัวเชื้อ 7% และความเข้มข้นแลคโตสเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร จะให้ค่าตัวแปรตอบสนองของต่อความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 0.192 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 118.39 มิลลิกรัมต่อกรัม ที่ร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 64.1 ตามลำดับ
- ในงานวิจัยนี้ศึกษาความเข้มข้นของสารลดฟอง (30, 40 และ 50 ppm) จำพวก 10% silicone oil พบว่าความเข้มข้นสารลดฟองเท่ากับ 40 ppm สามารถลดฟองที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักได้ดีและยังส่งผลดีต่อการผลิตโปรตีน BMP-2 จึงเลือกมาใช้ในการลดฟองขณะทำการทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ
- ในงานวิจัยนี้ศึกษาผลกระทบของสภาวะการเพาะเลี้ยงเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) ได้แก่ อัตราการให้อากาศและอัตราการกวนใบพัดเพื่อหาสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมที่สุดด้วยวิธีพื้นผิวตอบร่วมกับการการออกแบบการทดลองส่วนประสมกลางในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ พบว่าหนึ่งในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมที่สุด คือ อัตราการให้อากาศ 1 vvm และอัตราการกวนใบพัด 250 รอบต่อนาที จะให้ค่าตัวแปรตอบสนองของต่อความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 0.191 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 133.28 มิลลิกรัมต่อกรัม ที่ร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 71.8 ตามลำดับ

- จากการศึกษาในงานวิจัยพบว่าการใช้วิธีพื้นผิวตอบสนองร่วมกับการออกแบบการทดลองแบบส่วนประสมกลางนั้นสามารถที่จะนำมาใช้ในการหาสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมที่สุดจากทั้งในฟลาสก์และถังปฏิกรณ์ชีวภาพได้อย่างมีประสิทธิภาพ จะเห็นได้จากผลการทดลองที่ได้จากการทำนายมีความสอดคล้องทางสถิติกับผลจากการทดลองที่สภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมดังกล่าว ซึ่งสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมที่สุดจากทั้งในฟลาสก์และถังปฏิกรณ์ชีวภาพนั้นสามารถนำไปเป็นแนวทางในการพัฒนาเพื่อเพิ่มศักยภาพและปริมาณการผลิตของรีคอมบิแนนท์โปรตีน BMP-2 ได้ในกระบวนการอุตสาหกรรมเพื่อตอบสนองความต้องการอย่างสูงต่อปริมาณโปรตีน BMP-2 ในการรักษาโรคกระดูกพรุนได้ในอนาคต

ข้อเสนอแนะ

- ในการทดลองนี้ใช้เซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) ซึ่งเป็นที่แพร่หลายในการนำมาใช้เป็นเจ้าบ้านเพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน อย่างไรก็ตามโปรตีนที่เซลล์ผลิตได้ส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของ inclusion body มีลักษณะเป็นกลุ่มก้อนของโปรตีน (protein aggregates) ที่เกิดจากการแสดงออกโปรตีนที่สูง (overexpression) ซึ่งทำให้โปรตีนที่ได้อยู่ในรูปไม่สามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ต้องผ่านกระบวนการ refolding ซึ่งอาจจะส่งผลต่อการเพิ่มต้นทุนของการผลิต อีกทั้งยังส่งผลต่อขั้นตอนทำบริสุทธิ์โปรตีนจึงอาจจำเป็นต้องหาแนวทางในการผลิตให้โปรตีนอยู่ในรูปของ soluble protein ซึ่งง่ายต่อการนำไปทำบริสุทธิ์และลดต้นทุนของการผลิตได้ [64]
- ในงานวิจัยนี้ยังใช้การออกแบบการทดลองส่วนประสมกลางร่วมกับวิธีพื้นผิวตอบสนอง ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมนำมาใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการทางชีวภาพต่างๆ แต่อย่างไรก็ตาม วิธีการออกแบบการทดลองส่วนประสมกลางนี้มีข้อเสีย คือ จำเป็นต้องมีจำนวนของระดับปัจจัยถึง 5 ระดับ และยังมีจำนวนของการทดลองในจุดกลางหรือ center point มากกว่าเมื่อเทียบกับการทดลองของบ็อกซ์-เบห์น เคน ในสภาวะที่คล้ายคลึงกัน อีกทั้งยังต้องคำนึงถึงความสัมพันธ์ปฏิสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรที่นำมาใช้ในการออกแบบการทดลอง หากไม่มีความสัมพันธ์กันก็อาจจะทำให้เปลืองเวลาและทรัพยากรในการทดลองได้
- การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมด้วยวิธีการออกแบบการทดลองร่วมกับวิธีพื้นผิวตอบสนองจำเป็นต้องศึกษาตัวแปรซึ่งส่งผลต่อการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนก่อนนำมาใช้ในการ

ออกแบบการทดลอง และควรศึกษาวิธีการใช้งานของโปรแกรมอย่างเข้าใจเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดและเป็นไปตามวัตถุประสงค์ที่ต้องการ ซึ่งอาจจะเป็นวิธีที่สำคัญสามารถนำไปสู่การใช้งานประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมได้ในอนาคต

มหาวิทยาลัยศิลปากร

รายการอ้างอิง

1. Team, M., สถิติผู้สูงอายุไทยปี 65 จำนวนผู้สูงวัยเพิ่มต่อเนื่อง แต่อัตราการเกิดต่ำ in *Marketeer* 2022.
2. Eguchi, Y., et al., *An injectable composite material containing bone morphogenetic protein-2 shortens the period of distraction osteogenesis in vivo.* J Orthop Res, 2011. 29(3): p. 452-6.
3. Karyagina AS, B.I., Grunina TM, Demidenko A V., Poponova MS, Sergienko O V., et al, *Two variants of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) with additional protein domains: Synthesis in an Escherichia coli heterologous expression system.* Biochem, 2017.
4. Gillman, C.E. and A.C. Jayasuriya, *FDA-approved bone grafts and bone graft substitute devices in bone regeneration.* Materials Science and Engineering: C, 2021. 130: p. 112466.
5. *Bone Morphogenetic Protein (BMP) 2 Market Size, Report* 2022-2030. 2022; Available from: https://www.biospace.com/article/bone-morphogenetic-protein-bmp-2-market-size-report-2022-2030/.
6. Gieseler, G., et al., *Purification of bone morphogenetic protein-2 from refolding mixtures using mixed-mode membrane chromatography.* Appl Microbiol Biotechnol, 2017. 101(1): p. 123-130.
7. Isaacs, M.J., et al., *Bone morphogenetic protein-2 and -6 heterodimer illustrates the nature of ligand-receptor assembly.* Molecular endocrinology (Baltimore, Md.), 2010. 24(7): p. 1469-1477.
8. Fisher, D.I., L.M. Mayr, and R.G. Roth, *Expression Systems*, in *Encyclopedia of Cell Biology*. 2016. p. 54-65.
9. Long S, T.L., Bennett K, Phillips A, Wong-Staal F, Ma H, *xpression, purification, and renaturation of bone morphogenetic protein-2 from Escherichia coli.* Protein Expression Purification, 2006.
10. Sharapova NE, K.A., Galushkina ZM, Lavrova N V., Poletaeva NN, Tukhvatulin AE, et al, *Production of the recombinant human bone morphogenetic protein-2 in*

Escherichia coli and testing of its biological activity in vitro and in vivo. Molecular Biology, 2010.

11. Mesa Restrepo, A., J. Fernando Alzate, and E.B. Patiño Gonzalez, *Bone morphogenetic protein 2: heterologous expression and potential in bone regeneration.* Actualidades Biológicas, 2021. 43(114).
12. Chen G, D.C., Li YP, *TGF-β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation.* 2012.
13. Maruoka, Y., et al., *Production of functional human bone morphogenetic protein-2 using a baculovirus/Sf-9 insect cell system.* Biochem Mol Biol Int, 1995. 35(5): p. 957-63.
14. Zhang, Y., et al., *Expression, purification, and refolding of a recombinant human bone morphogenetic protein 2 in vitro.* Protein Expr Purif, 2011. 75(2): p. 155-60.
15. Zhou, A.J., C.M.L. Clokie, and S.A.F. Peel, *A novel peptide to enhance recombinant BMP-2 production in mammalian cell cultures.* BMC Proceedings, 2011. 5(8): p. P96.
16. Zhang Y, M.Y., Yang M, Min S, Yao J, Zhu L, *Expression, purification, and refolding of a recombinant human bone morphogenetic protein 2 in vitro.* 2011.
17. Wang EA, R.V., D'Alessandro JS, Bauduy M, Cordes P, Harada T, et al, *Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation.* 1990.
18. Israel DI, N.J., Kerns KM, Moutsatsos IK, Kaufman RJ, *Expression and characterization of bone morphogenetic protein-2 in chinese hamster ovary cells.* Growth Factors, 1992.
19. Jing, *Enhancing Production of Recombinant BMP-2 In Mammalian Cell Culture Systems By Inhibition of Pro-protein Cleavage Using 9DR Peptides by Jing-Jing Aileen Zhou A thesis submitted in conformity with the requirements for the degree of Master of Science Gradua.* 2008.
20. Rosano, G.L. and E.A. Ceccarelli, *Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges*. Front Microbiol, 2014. 5: p. 172.

21. Long, S., et al., *Expression, purification, and renaturation of bone morphogenetic protein-2 from Escherichia coli.* Protein Expr Purif, 2006. 46(2): p. 374-8.

22. Sharapova, N.E., et al., *Production of the recombinant human bone morphogenetic protein-2 in Escherichia coli and testing of its biological activity in vitro and in vivo.* Molecular Biology, 2010. 44(6): p. 923-930.

23. Baş, D. and İ.H. Boyacı, *Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology.* Journal of Food Engineering, 2007. 78(3): p. 836-845.

24. Bezerra, M.A., et al., *Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry.* Talanta, 2008. 76(5): p. 965-977.

25. Zare H, M.M.S.H., Akbari V, *Optimization of Fermentation Conditions for Reteplase Expression by Escherichia coli Using Response Surface Methodology.* Avicenna J Med Biotechnol, 2019.

26. Shahzadi, I., et al., *Scale-up fermentation of Escherichia coli for the production of recombinant endoglucanase from Clostridium thermocellum.* Sci Rep, 2021. 11(1): p. 7145.

27. Liu, N., et al., *Optimization of simultaneous production of volatile fatty acids and bio-hydrogen from food waste using response surface methodology.* RSC advances, 2018. 8(19): p. 10457-10464.

28. Scheufler C, S.W., Hülsmeyer M, *Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution.* 1999.

29. Du, F., et al., *Regulating the T7 RNA polymerase expression in E. coli BL21 (DE3) to provide more host options for recombinant protein production.* Microb Cell Fact, 2021. 20(1): p. 189.

30. *E. coli*. Available from: https://www.google.com/search?q=e+coli.

31. *Gene expression*. Available from: https://www.google.com/search?q=gene+expression.

32. *lac operon*. Available from: https://microbeonline.com/lac-operon-mechanism/.

33. Clark, D.P. and N.J. Pazdernik, *Chapter 2 - DNA, RNA, and Protein*, in *Biotechnology (Second Edition)*, D.P. Clark and N.J. Pazdernik, Editors. 2016, Academic Cell: Boston. p. 33-61.

34. Oughlis-Hammache F, H.-M.N., Aissani-Benissad F, Bourouina-Bacha S, *Central composite design for the modeling of the phenol adsorption process in a fixed-bed reactor.* 2010.

35. ทรัพย์เสรี, จ., *DOE ตอน Central Composite Design.* 2552. 16(145): p. 72-74.

36. *Box Behnken*. Available from: https://develve.net/Box-Behnken%20design.html.

37. จตุรพิรีย์, พ., หนังสือประกอบการเรียนวิศวกรรมกระบวนการชีวภาพ. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร. 2558.

38. มูลอามาตย์, ส., ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. วิศวกรรมสาร ม.ข., 2541. 25(1): p. 47-57.

39. Routledge, S.J. and R.M. Bill, *The effect of antifoam addition on protein production yields.* Methods Mol Biol, 2012. 866: p. 87-97.

40. Routledge, S.J., *Beyond de-foaming: the effects of antifoams on bioprocess productivity.* Comput Struct Biotechnol J, 2012. 3: p. e201210014.

41. SJ, R., *Beyond de-foaming: The effects of antifoams on bioprocess productivity.* Comput Struct Biotechnol J, 2012.

42. Koch V, R.H., Schügerl K, Innertsberger E, Menzel H, Weis J, *Effect of antifoam agents on the medium and microbial cell properties and process performance in small and large reactors.* Process Biochem, 1995.

43. Zaslona H, T.-H.A., Radosinski L, Hennig J, *Optimization and kinetic characterization of recombinant 1,3-β-glucanase production in Escherichia coli K-12 strain BL21/pETSD10 - a bioreactor scale study.* 2015.

44. Agung S, K.F., Parwati I, Rostinawati T, Yusuf M, Fadhlillah M, et al, *Heliyon Optimization of culture conditions for Mpt64 synthetic gene expression in Escherichia coli BL21 (DE3) using surface response methodology.* 2019.

45. Zaslona, H., et al., *Optimization and kinetic characterization of recombinant 1,3-beta-glucanase production in Escherichia coli K-12 strain BL21/pETSD10 - a bioreactor scale study.* Lett Appl Microbiol, 2015. 61(1): p. 36-43.

46. Castan A, N.A., Enfors SO, *Oxygen enriched air supply in Escherichia coli processes: Production of biomass and recombinant human growth hormone.* Enzyme Microb Technol, 2002.

47. Çalik P, A.M., Çalik G, *Oxygen transfer effects in β-lactamase fermentation by Bacillus licheniformis in a glucose-based defined medium.* 2005.

48. Riesenberg, D. and R. Guthke, *High-cell-density cultivation of microorganisms.* Appl Microbiol Biotechnol, 1999. 51(4): p. 422-30.

49. ; Available from: https://apps.weber.edu/wsuimages/jonclark/PDFs/CellBio/Fall2017/Lab%201-%20Introduction.pdf.

50. Choi, S.-J., et al., *Plasmid Stability in Long-Term hG-CSF Production Using $ _ {L}-Arbinose $ Promoter System of Escherichia coli.* Journal of microbiology and biotechnology, 2000. 10(3): p. 321-326.

51. Zhang, H.C., et al., *Production of recombinant protein G through high-density fermentation of engineered bacteria as well as purification.* Molecular Medicine Reports, 2015. 12(2): p. 3132-3138.

52. Palomares, L.A., S. Estrada-Moncada, and O.T. Ramírez, *Production of recombinant proteins.* Recombinant gene expression, 2004: p. 15-51.

53. Morao, A., et al., *Effect of antifoam addition on gas-liquid mass transfer in stirred fermenters.* Bioprocess Engineering, 1999. 20(2): p. 165-172.

54. Routledge, S.J. and R.M. Bill, *The effect of antifoam addition on protein production yields*, in *Recombinant Protein Production in Yeast*. 2012, Springer. p. 87-97.

55. You, Z., et al., *Enhancement of prodigiosin synthetase (PigC) production from recombinant Escherichia coli through optimization of induction strategy and media.* Preparative Biochemistry and Biotechnology, 2018. 48(3): p. 226-233.

56. Shibui, T. and K. Nagahari, *Secretion of a functional Fab fragment in Escherichia coli and the influence of culture conditions.* Appl Microbiol Biotechnol, 1992. 37(3): p. 352-7.

57. Muhlmann, M., et al., *Optimizing recombinant protein expression via automated induction profiling in microtiter plates at different temperatures.* Microb Cell Fact, 2017. 16(1): p. 220.

58. Wu, P.H., et al., *High cell density cultivation of Escherichia coli with surface anchored transglucosidase for use as whole-cell biocatalyst for alpha-arbutin synthesis.* J Ind Microbiol Biotechnol, 2008. 35(2): p. 95-101.

59. Kamble, A.L., V.S. Meena, and U.C. Banerjee, *Effect of agitation and aeration on the production of nitrile hydratase by Rhodococcus erythropolis MTCC* 1526 *in a stirred tank reactor.* Letters in Applied Microbiology, 2010. 51.

60. Kim, S.W., et al., *Effect of aeration and agitation on the production of mycelial biomass and exopolysaccharides in an enthomopathogenic fungus Paecilomyces sinclairii.* Lett Appl Microbiol, 2003. 36(5): p. 321-6.

61. Maharajh, D., R. Lalloo, and J. Görgens, *Effect of an exponential feeding regime on the production of Rhodotorula araucariae epoxide hydrolase in Yarrowia lipolytica.* Lett Appl Microbiol, 2008. 47(6): p. 520-5.

62. Pham, P.L., P. Strehaiano, and P. Taillandier, *Effect of aeration on xylanase production by Bacillus sp. I*-1018. Bioprocess Engineering, 1997. 18(1): p. 41-43.

63. Subramaniam, R., et al., *High-density cultivation in the production of microbial products.* Chemical and biochemical engineering quarterly, 2018. 32(4): p. 451-464.

64. Song, J.M., et al., *Cultivation at* 6-10°*C is an effective strategy to overcome the insolubility of recombinant proteins in Escherichia coli.* Protein Expr Purif, 2012. 82(2): p. 297-301.

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ภาคผนวก ก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์และการเตรียมสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 AIM (Auto Induction Medium)

Tryptone (Himedia)	10.0	กรัม
Yeast extract (Himedia)	5.0	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$ (QREC)	3.30	กรัม
KH_2PO_4 (KEMAUS)	6.80	กรัม
Na_2HPO_4 (Ajax Finechem)	7.10	กรัม
Glucose (Sigma)	0.50	กรัม
$MgSO_4$ (SRL)	0.15	กรัม
Lactose (Univar)	2.0	กรัม

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร แล้วนำไปปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.2 LB agar

Tryptone (Himedia)	10.0	กรัม
Yeast extract (Himedia)	5.0	กรัม
NaCl (SRL)	10.0	กรัม
Agar powder (BIO AGARS)	15.0	กรัม

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร แล้วนำไปปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

มหาวิทยาลัยศิลปากร

1.3 LB broth

Tryptone (Himedia)	10.0	กรัม
Yeast extract (Himedia)	5.0	กรัม
NaCl (SRL)	10.0	กรัม

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.4 ยาต้านปฏิชีวนะคานามัยซิน (kanamycin antibiotic) 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Kanamycin Sulphate (BIO BASIC CANADA INC.)	2	กรัม

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น 35 มิลลิลิตร จนละลายเป็นเนื้อเดียวกันหลังจากนั้นปรับปริมาตรให้ได้เท่ากับ 40 มิลลิลิตร นำไปกรองผ่านตัวกรองขนาด 0.22 ไมครอน (25 mm Syringe Filter Nylon membrane, 0.22 µm ; CNY, China) โดยแบ่งใส่หลอด (1.5 mL Centrifuge tube; Lab Medic, China) ขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่ปลอดเชื้อแล้ว ปริมาตรหลอดละ 1 มิลลิลิตร และนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เก็บเป็น stock kanamycin

2. สารละลาย

2.1 สารละลายสำหรับวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีน

2.1.1 สารละลายบัฟเฟอร์ (PBS buffer) pH 7.4 [16]

KCl	0.2	กรัม
NaCl (SRL)	8.0	กรัม
KH_2PO_4 (KEMAUS)	0.24	กรัม
Na_2HPO_4 (Ajax Finechem)	1.44	กรัม

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร แล้วนำไปปรับ pH ด้วย 0.1M HCl ให้ได้ pH ตามต้องการ แล้วจึงปรับปริมาตรน้ำให้ได้ 1000 มิลลิลิตร แล้วนำไปปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาทีหรือกรองผ่านตัวกรองขนาด 0.22 ไมครอน (25 mm Syringe Filter Nylon membrane, 0.22 µm ;CNY, China)

2.1.2 สารละลายโปรตีน (Solubilization buffer) pH 8.0 [16]

Urea (Biorad)	240.2	กรัม
Na_2HPO_4 (Ajax Finechem)	7.1	กรัม
Tris (Biorad)	0.61	กรัม
HCl		

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร แล้วนำไปปรับ pH ด้วย 0.1M HCl ให้ได้ pH ตามต้องการ แล้วจึงปรับปริมาตรน้ำให้ได้ 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที หรือกรองผ่านตัวกรองขนาด 0.22 ไมครอน (25 mm Syringe Filter Nylon membrane, 0.22 µm ;CNY, China)

2.1.3 สารละลายสำหรับหาโปรตีน

Biorad protein assay dye reagent concentrate (Biorad)

2.1.4 สารละลายสำหรับ SDS-PAGE

1x Tris/Glycine/SDS Buffer (Biorad)
4x Laemmmli Sample Buffer (Biorad)
β-mercaptoethanol (Biorad) (9:1)
Resolver A (Biorad)
Resolver B (Biorad)
Stacking A (Biorad)
Stacking B (Biorad)

ทำการรันเจลโดยเตรียมแผ่นเจลและรันตัวอย่างดังบรรยายในบทที่ 3 หัวข้อ 3.5.3.2

ภาคผนวก ข

ภาคผนวก ข

กราฟมาตรฐานและการคำนวณ

1. กราฟมาตรฐานโปรตีน

1.1. ปิเปตน้ำกลั่นปริมาตร 780 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง

1.2. ปิเปตสารละลายโปรตีน BSA ที่ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลอง

1.3. ปิเปตสารละลาย Bradford dye ปริมาตร 200 ไมโครลิตรและผสมเป็นเนื้อเดียวกัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที

1.4. นำสารละลายที่ได้ วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (V-5100 VISIBLE spectrophotometer; METASH, China) ที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 595 นาโนเมตร

1.5. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้เขียนกราฟมาตรฐานความเข้มข้นโปรตีน BSA กับค่าการดูดกลืนแสง ดังใน**ภาพที่ 33** และ**ตารางที่ 9**

1.6 การหาปริมาณโปรตีนทั้งหมด

จากกราฟมาตรฐานโปรตีน จะได้สมการ y = 1.033212121x

โดยที่ y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

X คือ ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

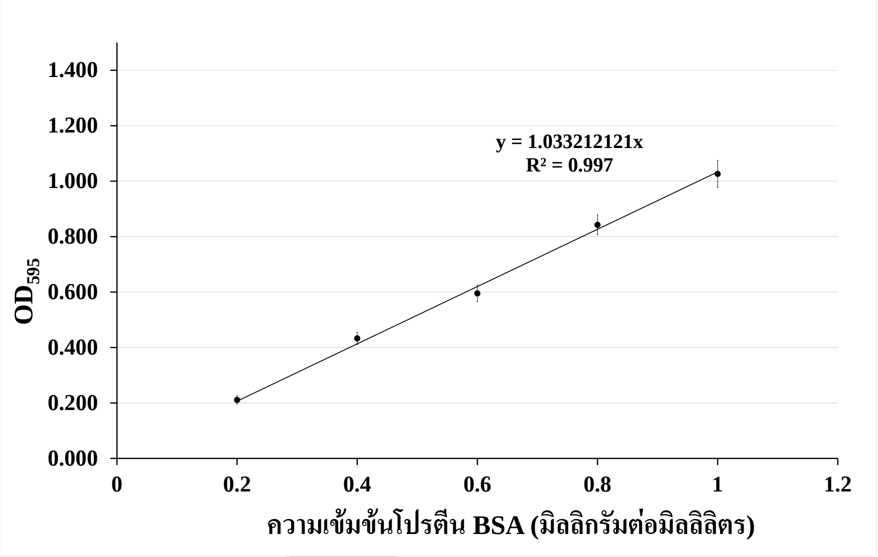
สามารถคำนวณหาปริมาณโปรตีนทั้งหมด ได้ดังนี้

$$\text{ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)} = \frac{OD_{595}}{1.033212121} \times \text{dilution factor}$$

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ตารางที่ 9 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโปรตีนกับค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 595 นาโนเมตร

BSA (mg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร (OD_{595})			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
0.2	0.227	0.211	0.195	0.211
0.4	0.453	0.409	0.433	0.432
0.6	0.622	0.563	0.601	0.595
0.8	0.881	0.837	0.810	0.843
1	1.083	1.000	0.996	1.026

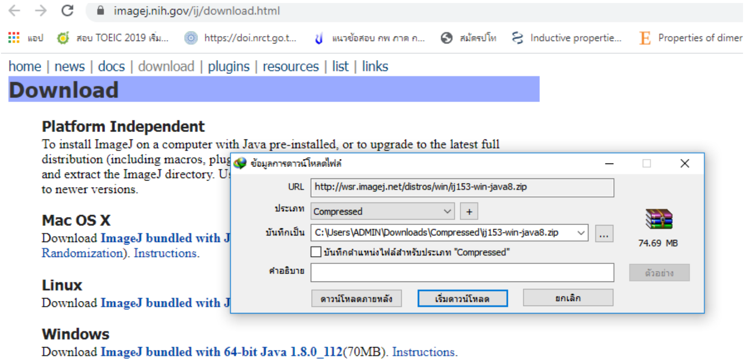


ภาพที่ 33 กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นโปรตีน BSA กับค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 595 นาโนเมตร

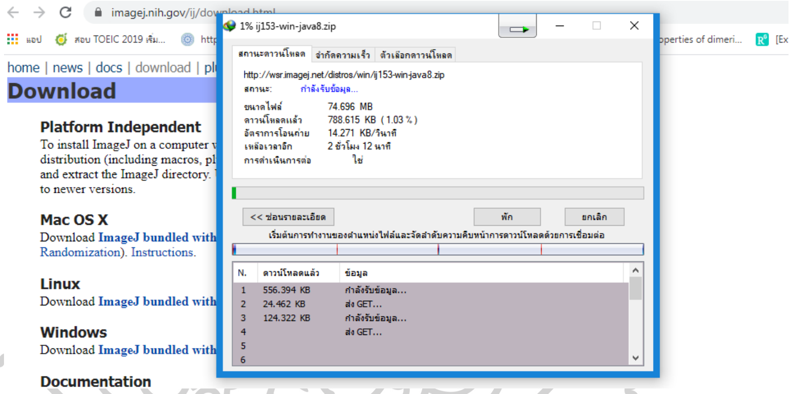
2. วิธีการติดตั้ง Image J software

2.1. เปิด Google ใส่ลิ้งค์ https://imagej.nih.gov/ij/download.html แล้วกดคลิกค้นหา

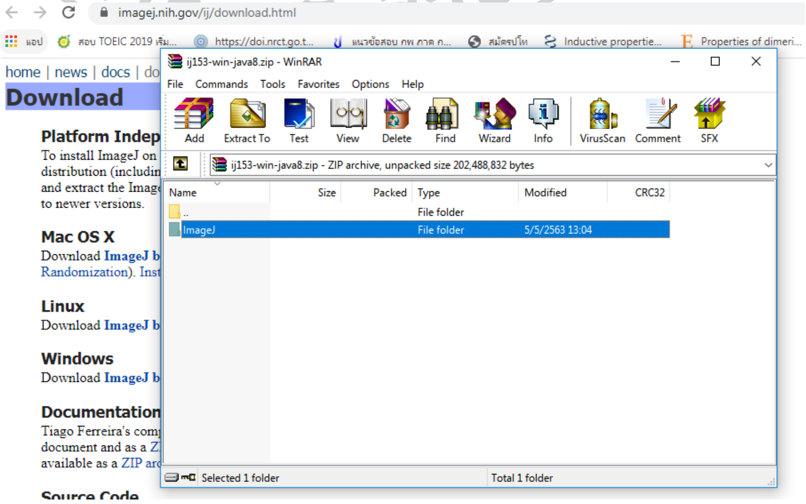
2.2 หน้าจอจะขึ้นหน้าต่างให้คลิก ‘เริ่มดาวน์โหลด’



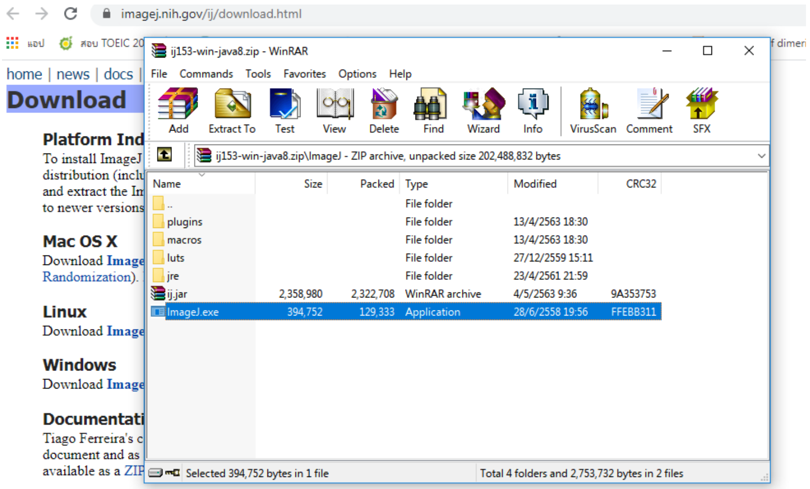
2.3. รอจนกระทั่งการดาวน์โหลดเสร็จสมบูรณ์



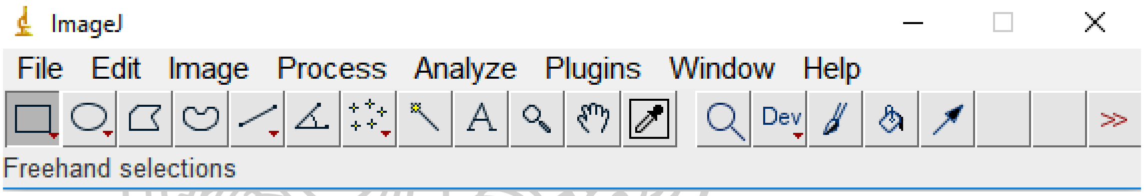
2.4. หลังทำการดาวน์โหลดโปรแกรมเสร็จขึ้นหน้าต่างดังกล่าว ให้ดับเบิ้ลคลิกคำว่า ‘ImageJ’



2.5. หลังจากนั้นจะขึ้นหน้าต่างด้านล่างนี้ ให้ดับเบิ้ลคลิกที่ไอคอน ‘ ImageJ.exe’



2.6. พอดาวน์โหลดเสร็จจะขึ้นดังภาพด้านล่าง เป็นการลงโปรแกรมเสร็จสมบูรณ์

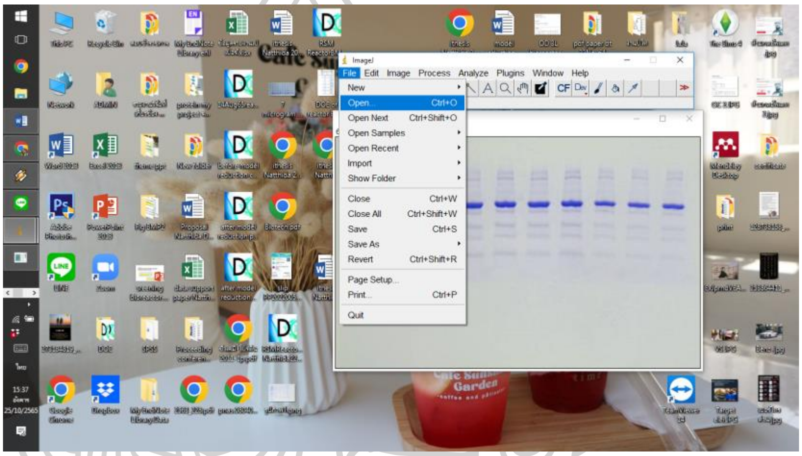


2.7. หลังจากนั้นก็นำภาพแผ่นเจลที่ได้จากการรัน SDS-PAGE หาความเข้มข้นโปรตีนโดยใช้โปรแกรมข้างต้นเพื่อใช้ในเทียบหาความเข้มข้นโปรตีนที่เราสนใจกับกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้พีคของ band BSA และความเข้มข้นโปรตีน BSA

มหาวิทยาลัยศิลปากร

3. กราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้พีคของ band BSA และความเข้มข้นของโปรตีน BSA และการคำนวณความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมด

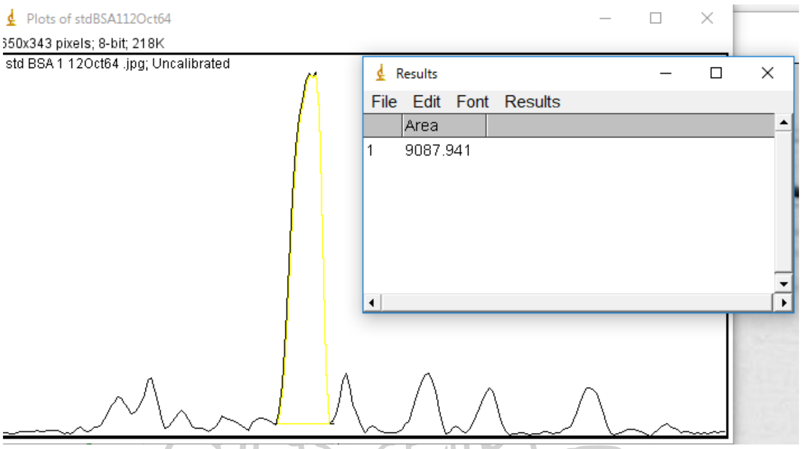
3.1. นำสารละลายโปรตีน BSA ที่มีความเข้มข้น 0.375, 0.25, 0.0625 และ 0.0375 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โหลดลงในแผ่นเจล 12% SDS-PAGE โดยใส่ปริมาตรสารละลายทั้งหมด 10 ไมโครลิตรต่อหลุมทีมีอัตราส่วนสารละลายโปรตีน BSA ในแต่ละความเข้มข้น 7.5 ไมโครลิตรต่อ Dye (4x) 2.5 ไมโครลิตร หลังจากนั้นทำการรันเจลในสภาวะดังบรรยายในบทที่ 3 หัวข้อ 3.5.3.2 หลังจากนั้นนำภาพเจลที่ได้เปิดใน Image J software โดยคลิก file จากนั้นกด open เลือกรูปที่ต้องการ



3.2. จากนั้นคลิก Image และ type ตั้งค่าภาพเป็น “32-bit” หลังจากนั้นคลิก Process เลือก Subtract background เป็น 20 pixel เพื่อลด noise ที่เกิดขึ้นในภาพ โดยคลิก light background และ preview และคลิก เพื่อลากเส้นให้ครอบคลุมเลนของโปรตีนที่เราสนใจดังบริเวณที่ปรากฏเป็นเส้นสีเหลืองในภาพด้านล่าง

มหาวิทยาลัยศิลปากร

3.3 คลิก “analyze” แล้วเลือก “gel” และ “select first lane”จากนั้นเลือก “plot lanes”หาพื้นที่ใต้กราฟของโปรตีนโดยการกด ลากเส้นใต้กราฟของแถบโปรตีน หาพื้นที่ของพีคทั้งหมด โดยการใช้ “wand (tracing) tool” ซอฟต์แวร์ ImageJ แสดงผลค่าพื้นที่ออกมา



3.4. นำค่าพื้นที่ใต้กราฟที่ได้พล็อตกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้พีคของ band BSA และความเข้มข้นโปรตีน BSA ดังใน**ภาพที่ 34** และ**ตารางที่ 10**

3.5 การหาความเข้มข้นโปรตีน BMP-2

จากกราฟมาตรฐานโปรตีน จะได้สมการ y = 23420.90371x

โดยที่ y คือ พื้นที่ใต้พีคของ band BMP-2

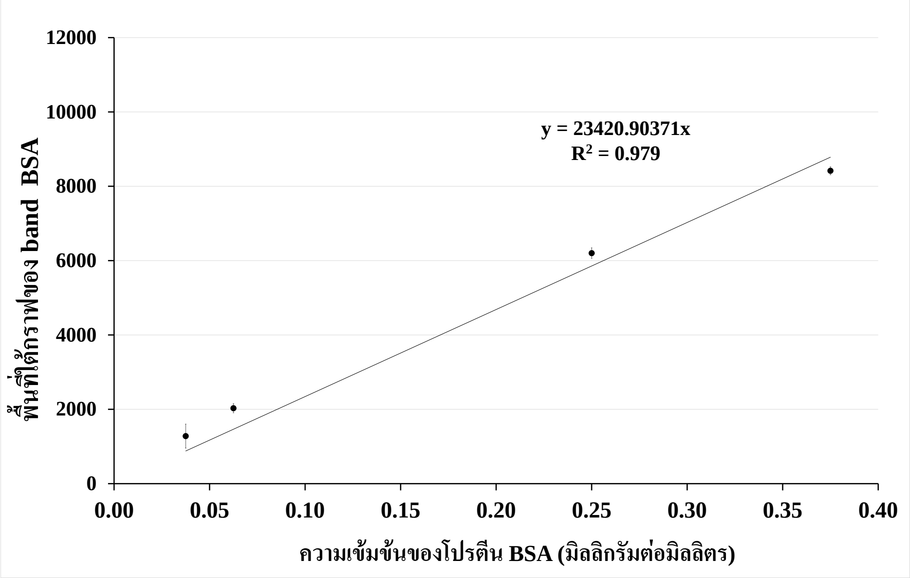
X คือ ความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

สามารถคำนวณหาความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 ได้ดังนี้

$$\text{ความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{พื้นที่ใต้พีคของ band BMP-2}}{23420.90371} \times \text{dilution factor}$$

ตารางที่ 10 ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีคของ band BSA และความเข้มข้นโปรตีน BSA

BSA (mg/ml)	พื้นที่ใต้กราฟของ band BSA			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
0.375	9428.21	9972.45	8420.74	9273.79
0.25	6068.48	6185.50	6350.38	6201.45
0.0625	2174.34	1959.04	1957.04	2030.14
0.0375	1411.04	1516.28	912.34	1279.89

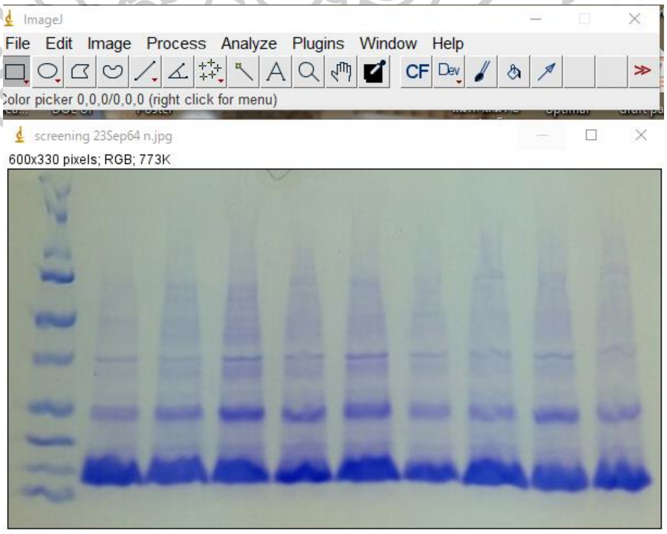


ภาพที่ 34 กราฟมาตรฐานพื้นที่ใต้พีคของ band BSA และความเข้มข้นโปรตีน BSA

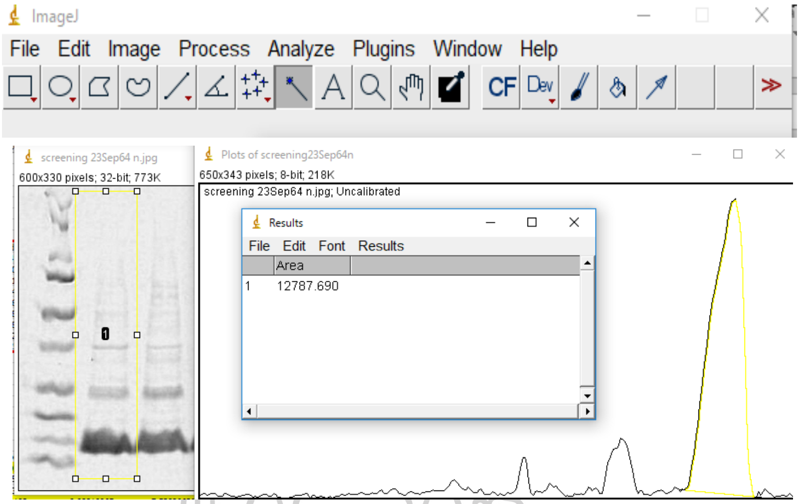
3.6 โหลดรูปภาพของเจลตัวอย่างที่ต้องการคำนวณความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 เพื่อคำนวณความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 จากกราฟมาตรฐานพื้นที่ใต้กราฟของ band BSA และความเข้มข้นโปรตีน BSA

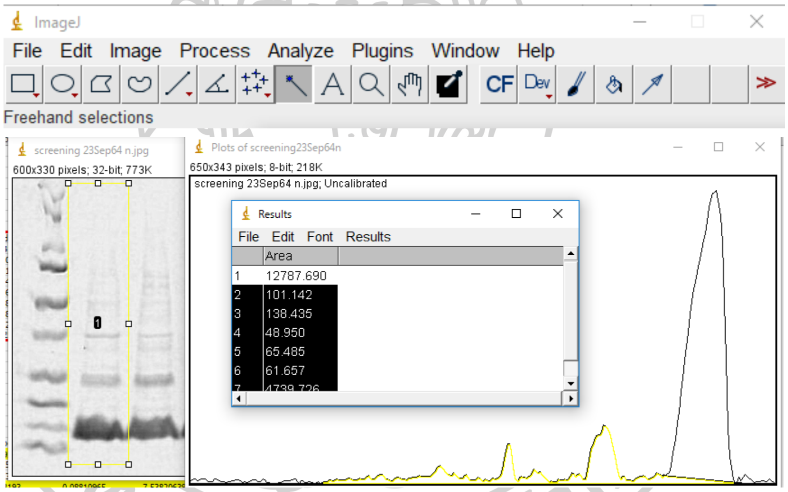
3.7 ตัวอย่างการหาความเข้มข้นของโปรตีน BMP-2 อัตราส่วนโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งและร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมด

3.7.1 โหลดภาพเจล SDS-PAGE ของโปรตีน BMP-2 ที่ต้องการตามภาคผนวก ข ในหัวข้อที่ 3



3.7.2 หาพื้นที่ใต้พีคตามภาคผนวก ข ในหัวข้อที่ 3 จะได้พื้นที่ใต้พีคของโปรตีน BMP-2 และพื้นที่ใต้พีคโปรตีนทั้งหมดเป็นส่วนที่ครอบดำรวมกับส่วนพื้นที่ใต้พีคของโปรตีน BMP-2





3.7.3 นำพื้นที่ใต้พีคที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีน BMP-2 (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัมต่อกรัม) และร้อยละของโปรตีน BMP2 ต่อโปรตีนทั้งหมด

ความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) =

$$\frac{\text{ความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 ที่หาได้จากกราฟมาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)} \times \text{ปริมาตรสารละลายโปรตีนที่โหลดลงแผ่นเจล (ไมโครลิตร)} \times \text{dilution factor} \times \text{ปริมาตรสารละลาย solubilize buffer ที่ใช้ละลายโปรตีน}}{\text{ปริมาตรโปรตีนที่นำมาผสมกับ dye(ไมโครลิตร)} \times \text{ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ (มิลลิลิตร)}}$$

$$= \frac{(\frac{12787.690}{23420.90371}\ \text{มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร}) \times 10.4\ \text{ไมโครลิตร} \times 10 \times 1.05\ \text{มิลลิลิตร}}{7.8\ \text{ไมโครลิตร} \times 50\ \text{มิลลิลิตร}}$$

= 0.152 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

อัตราส่วนระหว่างโปรตีน BMP-2 ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัมต่อกรัม)

$$= \frac{\text{ความเข้มข้นโปรตีน BMP-2 (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)}}{\text{น้ำหนักแห้งเซลล์ที่ได้จากกราฟมาตรฐาน (กรัมต่อลิตร)}}$$

$$= \frac{\text{0.152 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร}}{0.581\times10\times0.3097\text{(กรัมต่อลิตร)}}$$

= 84.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ร้อยละของโปรตีน BMP-2 ต่อโปรตีนทั้งหมด $= \frac{\text{พื้นที่ใต้พีคของโปรตีน BMP-2}}{\text{พื้นที่โปรตีนทั้งหมด}} \times 100$

$$= \frac{12787.690}{(12787.690+101.142+138.435+65.485+61.657+4739.726+154.778)}$$

= 70.8

4. การสร้างกราฟมาตรฐานน้ำหนักเซลล์แห้ง

4.1 ดำเนินการทดลองดังที่บรรยายในหัวข้อ 3.5.2 หลังจากนั้นนำค่าการดูดกลืนและน้ำหนักเซลล์แห้งที่วัดได้มาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความหนาแน่นเซลล์ (OD_{600}) กับน้ำหนักเซลล์แห้ง ดังใน**ภาพที่ 35** และ**ตารางที่ 11**

4.2 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง *E. coli* BL21 (DE3)

จากกราฟมาตรฐานระหว่างความหนาแน่นเซลล์กับน้ำหนักแห้งเซลล์แห้งจะได้สมการ y = 0.3097x

โดยที่ y คือ น้ำหนักเซลล์แห้ง

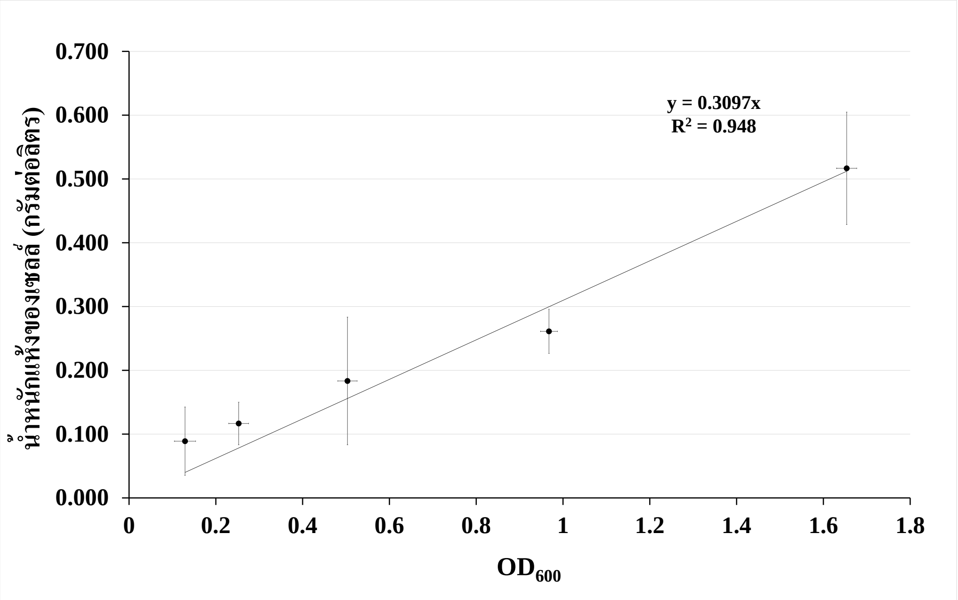
X คือ ค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร

สามารถคำนวณหาปริมาณโปรตีน ได้ดังนี้

$$\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)} = \frac{OD_{600}}{0.3097} \times \text{dilution factor}$$

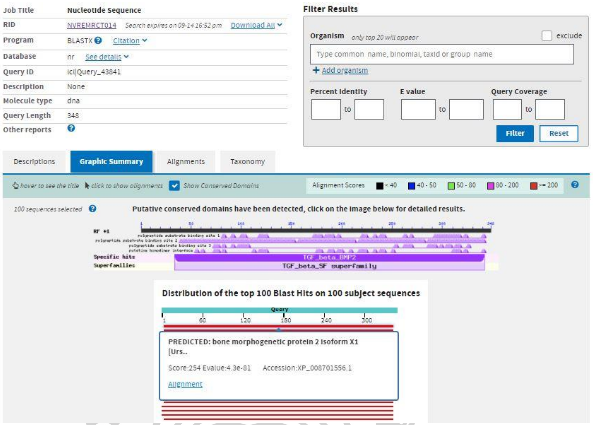
ตารางที่ 11 ความสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นเซลล์กับน้ำหนักเซลล์แห้ง

ค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร				น้ำหนักของเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)			
ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
1.633	1.679	1.649	1.654	0.485	0.450	0.615	0.517
0.946	0.984	0.973	0.968	0.300	0.235	0.250	0.261
0.488	0.529	0.493	0.503	0.285	0.185	0.0085	0.183
0.227	0.271	0.260	0.252	0.0085	0.115	0.150	0.117
0.104	0.153	0.130	0.129	0.15	0.050	0.065	0.089



ภาพที่ 35 กราฟมาตรฐานกราฟมาตรฐานระหว่างความหนาแน่นเซลล์ (OD_{600}) กับน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อ *E. coli* BL21 (DE3) ที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

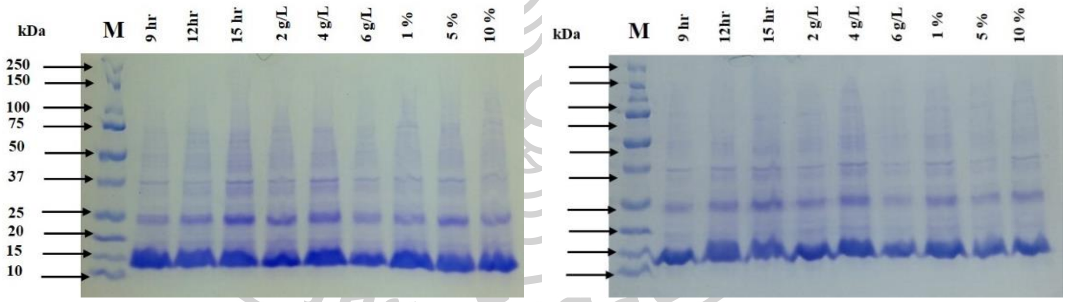
5. ข้อมูลแสดง sequence ของโปรตีน BMP-2 ที่ได้จากการรันลำดับเบสจาก จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยด้วยเว็บไซต์ https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi เพื่อตรวจสอบโปรตีน BMP-2 ใน**ภาพที่ 36**



ภาพที่ 36 ผลการรันลำดับเบส ในโปรแกรม blastx เพื่อพิสูจน์ลำดับเบสของโปรตีน BMP-2

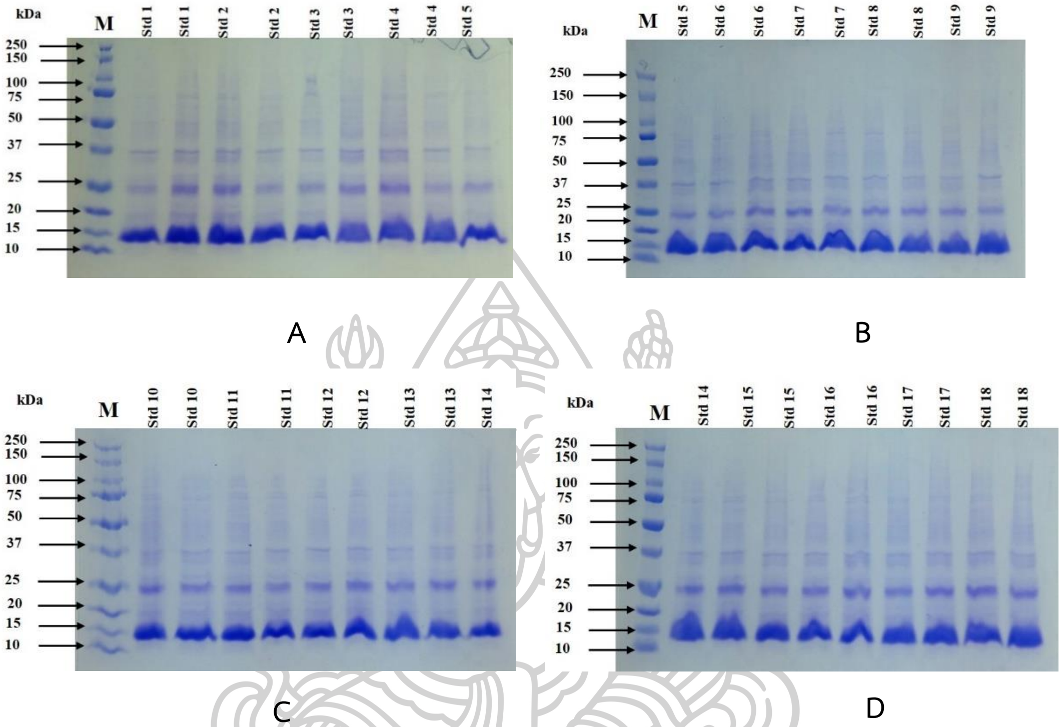
6. ภาพแสดงผลเจล SDS-PAGE ภายใต้สภาวะการการเพาะเลี้ยงของการทดลองในงานวิจัย ดังนี้

6.1 สภาวะการเพาะเลี้ยงเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) ที่แตกต่างกันของ 3 สภาวะการเพาะเลี้ยงคือระยะเวลาการเพาะเลี้ยง สัดส่วนหัวเชื้อ และความเข้มข้นแลคโตส ดัง**ภาพที่ 37**



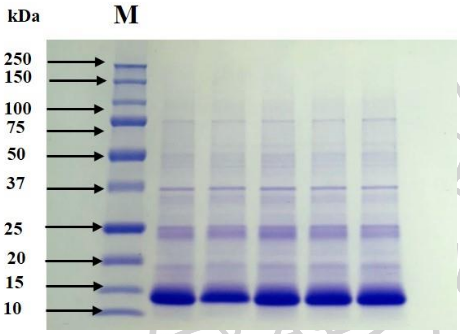
ภาพที่ 37 ผลการทดลอง SDS-PAGE ของสภาวะการเพาะเลี้ยงเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) ที่สภาวะของการเพาะเลี้ยง 3 สภาวะการเพาะเลี้ยงคือระยะเวลาการเพาะเลี้ยง สัดส่วนหัวเชื้อและความเข้มข้นแลคโตส ทั้งหมด 2 ซ้ำ

6.2 สภาวะการเพาะเลี้ยงเชื้อ *E coli* BL21 (DE3) ที่แตกต่างกันที่ได้จากการออกแบบการทดลองด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองแบบส่วนประสมกลางของทั้ง 3 ตัวแปรอิสระคือ ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง สัดส่วนหัวเชื้อและความเข้มข้นแลคโตสในระดับฟลาสก์ มีทั้งหมด 18 รัน ดัง**ภาพที่ 38**

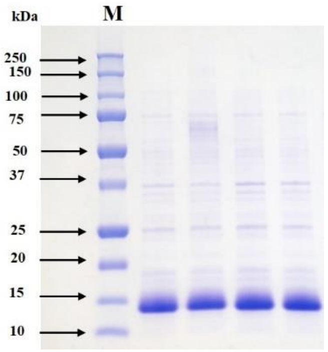


ภาพที่ 38 ผลการทดลอง SDS-PAGE ของสภาวะการเพาะเลี้ยงเชื้อ *E coli* BL21 (DE3) ที่แตกต่างกันที่ได้จากการออกแบบการทดลองด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองแบบส่วนประสมกลางของทั้ง 3 สภาวะการเพาะเลี้ยงคือ ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง สัดส่วนหัวเชื้อและความเข้มข้นแลคโตสในระดับฟลาสก์ทั้งหมด 18 รัน (A-D)

6.3 การทวนสอบสภาวะการเพาะเลี้ยงเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) ที่ได้หลังการทำ optimization จากการออกแบบการทดลองด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองแบบส่วนประสมกลางของ 3 ตัวแปรอิสระที่ได้คือ ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 8.54 ชั่วโมง สัดส่วนหัวเชื้อ 7.02% และความเข้มข้นแลคโตส 2.96 กรัมต่อลิตร ซึ่งในการทดลองจริงใช้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่ระยะเวลาการเหนี่ยวนำ 9 ชั่วโมง สัดส่วนหัวเชื้อ 7% และความเข้มข้นแลคโตส 3 กรัมต่อลิตรทั้งในระดับฟลาสก์และถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ดัง**ภาพที่ 39**



A

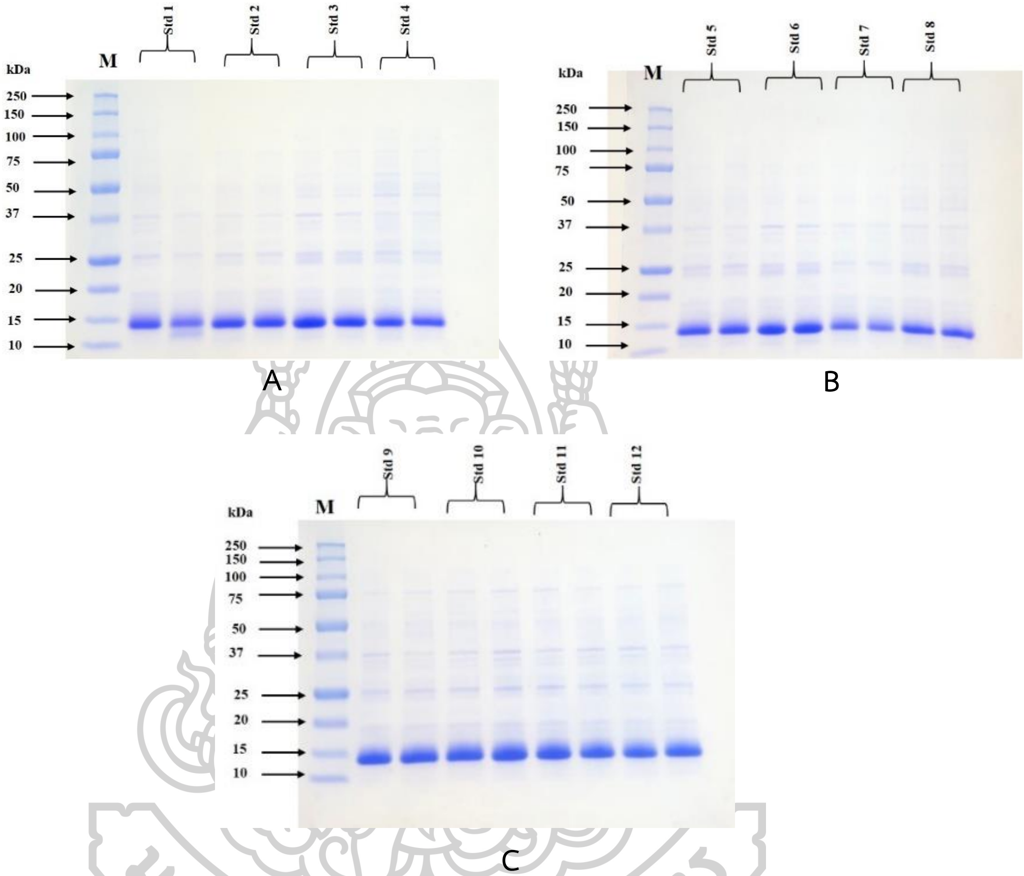


B

ภาพที่ 39 ผลการทดลอง SDS-PAGE ของการทวนสอบสภาวะการเพาะเลี้ยงเชื้อ *E coli* BL21 (DE3) ที่เหมาะสมที่สุดทั้ง 3 ตัวแปรอิสระ คือ ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 9 ชั่วโมง สัดส่วนหัวเชื้อ 7% และความเข้มข้นแลคโตส 3 กรัมต่อลิตรในระดับฟลาสก์ (A) และถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (B)

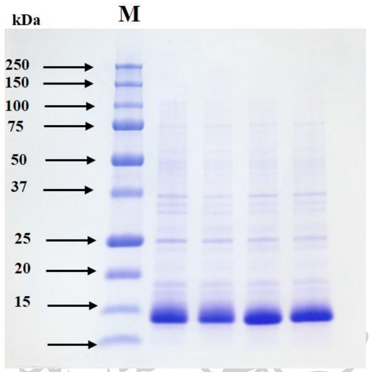
มหาวิทยาลัยศิลปากร

6.4 สภาวะการเพาะเลี้ยงเชื้อ *E coli* BL21 (DE3) ที่แตกต่างกันที่ได้จากการออกแบบการทดลองด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองแบบส่วนประสมกลางของทั้ง 2 ตัวแปรอิสระ คือ อัตราการให้อากาศและอัตราการกวนใบพัดในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ มีทั้งหมด 12 รัน ดัง**ภาพที่ 40**



ภาพที่ 40 ผลการทดลอง SDS-PAGE ของสภาวะการเพาะเลี้ยงเชื้อ *E coli* BL21 (DE3) ที่แตกต่างกันหลังจากการออกแบบการทดลองด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองแบบส่วนประสมกลางของทั้ง 2 ตัวแปรอิสระ คือ อัตราการให้อากาศและอัตราการกวนใบพัดในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ มีทั้งหมด 12 รัน (A-C)

6.5 การทวนสอบสภาวะการเพาะเลี้ยงเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) ที่ได้หลังการทำ optimization จากการออกแบบการทดลองด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองแบบส่วนประสมกลางของ 2 ตัวแปรอิสระที่ได้ คือ อัตราการให้อากาศ 0.994 vvm และอัตราการกวนใบพัด 253.5 รอบต่อนาที ซึ่งในการทดลองจริงใช้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่อัตราการให้อากาศ 1 vvm และอัตราการกวนใบพัด 250 รอบต่อนาทีในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ดัง**ภาพที่ 41**



ภาพที่ 41 ผลการทดลอง SDS-PAGE ของการทวนสอบสภาวะการเพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* BL21 (DE3) ที่เหมาะสมที่สุดของทั้ง 2 ตัวแปรอิสระ คือ อัตราการให้อากาศ 1 vvm และอัตราการกวนใบพัด 250 รอบต่อนาที

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล ณัฐธิดา ดอนพรมมะ

วัน เดือน ปี เกิด 12 July 1996

สถานที่เกิด Phate Pradit Hospital, Ratchaburi

ที่อยู่ปัจจุบัน 112/1 Moo 6 Chamrae Photharam Ratchaburi 70120

มหาวิทยาลัยศิลปากร