ภาวะเหมาะที่สุดของการผลิตรีคอมบิแนนต์อินซูลินในยีสต์ *Pichia pastoris* KM71H

นางสาวกนกพัชร์ กมลจิตไพศาล

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2559
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

OPTIMIZATION OF RECOMBINANT INSULIN PRODUCTION IN *Pichia pastoris* KM71H

Miss Kanokphat Kamonjitpaisan

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2016

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ภาวะเหมาะที่สุดของการผลิตรีคอมบิแนนต์อินซูลินในยีสต์ *Pichia pastoris* KM71H
โดย	นางสาวกนกพัชร์ กมลจิตไพศาล
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ดร.ศรินทิพ สุกใส
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.ณัฏฐา ทองจุล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.นาตยา งามโรจนวณิชย์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ดร.ศรินทิพ สุกใส)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร.ณัฏฐา ทองจุล)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.อภิชาติ กาญจนทัต)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ดร.กอบกุล เหล่าเท้ง)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

กนกพัชร์ กมลจิตไพศาล : ภาวะเหมาะที่สุดของการผลิตรีคอมบิแนนต์อินซูลินในยีสต์ *Pichia pastoris* KM71H (OPTIMIZATION OF RECOMBINANT INSULIN PRODUCTION IN *Pichia pastoris* KM71H) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ดร.ศรินทิพ สุกใส, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. ดร.ณัฏฐา ทองจุล, 141 หน้า.

ปัจจุบันมีจำนวนของผู้ป่วยโรคเบาหวานเพิ่มสูงอย่างต่อเนื่องทั้งในระดับโลกและระดับชาติ ในประเทศไทย วิกฤตนี้ได้ส่งผลให้เกิดแรงผลักดันในการผลิตอินซูลินขึ้นภายในประเทศเอง ซึ่งมีจุดประสงค์เพื่อบำบัดรักษาผู้ป่วยโรคเบาหวาน และเพื่อหลีกเลี่ยงการนำเข้าอินซูลินจากต่างประเทศด้วย อินซูลินที่ใช้ในการบำบัดรักษาผู้ป่วยนั้นสามารถผลิตได้จากหลายวิธี อาทิ การสกัดจากตับอ่อนของสัตว์ และจากกระบวนการหมักโดยใช้รีคอมบิแนนท์แบคทีเรียหรือยีสต์ ซึ่งการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินจากยีสต์ให้ผลประโยชน์ต่อการบำบัดรักษาผู้ป่วยโรคเบาหวาน เนื่องมาจาก ยีสต์จัดเป็นสิ่งมีชีวิตในกลุ่มยูคาริโอตเหมือนกับสัตว์และมนุษย์ โดยที่รีคอมบิแนนท์อินซูลินที่สังเคราะห์ได้จากยีสต์มีการดัดแปลงโมเลกุลของโปรตีนหลังการแปลรหัสที่ถูกต้อง ทั้งนี้ การทำบริสุทธิ์ของอินซูลินที่ได้จากการเลี้ยงยีสต์นั้นสามารถทำได้ง่าย เนื่องจากรีคอมบิแนนท์อินซูลินถูกหลั่งออกมาภายนอกเซลล์ของยีสต์ ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาถึง การผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินแบบมอนอเมอร์ (MIP) โดยใช้เมธิลโลโทรฟิกยีสต์ *Pichia pastoris* KM71H (TP1) ที่มีชุดของยีนรีคอมบิแนนท์อินซูลินแบบมอนอเมอร์ภายใต้การควบคุมของแอลกอฮอล์ออกซิเดสโปรโมเตอร์ (*AOX1*$_P$-*MIP*-*AOX1*$_{TT}$) โดยศึกษาถึงผลกระทบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ความเข้มข้นของกลีเซอรอล และไนโตรเจน ที่มีผลต่อการผลิตชีวมวลของเซลล์ในระหว่างระยะการเจริญเติบโต ซึ่งปริมาณชีวมวลของเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารที่เป็นสารสกัดจากยีสต์ เปปโตน และกลีเซอรอล (YPGly) ให้ปริมาณสูงกว่าเมื่อเทียบกับการเลี้ยงในอาหารยีสต์ไนโตรเจนเบสและกลีเซอรอล (YNBGly) ทั้งนี้ ปริมาณของเซลล์ที่สูงสุดได้มาจากการเลี้ยงเชื้อโดยใช้อาหาร YPGly ที่ประกอบไปด้วย 1% (w/v) กลีเซอรอล และ 1% (w/v) ของทั้งสารสกัดจากยีสต์และเปปโตน ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจน ในระยะของการเหนี่ยวนำนั้น เชื้อที่ได้จากระยะการเจริญเติบโตที่ถูกเลี้ยงให้เจริญในอาหาร YPGly ถูกนำมาใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับเลี้ยงต่อในอาหารที่ใช้ในการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลิน โดยผลกระทบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณของหัวเชื้อ และเมทานอลที่ใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินถูกนำมาศึกษา จากการศึกษาพบว่า ปริมาณของรีคอมบิแนนท์อินซูลินที่มากที่สุดเท่ากับ 23.67±0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อทั้งสิ้นเป็น 48 ชั่วโมง โดยใช้ความเข้มข้นของหัวเชื้อเป็นแบบเข้มข้นขึ้น (5X) และการใช้ความเข้มข้นของเมทานอล 1% (v/v) ในอาหารเป็นปริมาณที่เหมาะสมที่สุดต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลิน โดยทำการเติมทุก 24 ชั่วโมง

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....

ปีการศึกษา 2559 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

5771905723 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS:

KANOKPHAT KAMONJITPAISAN: OPTIMIZATION OF RECOMBINANT INSULIN PRODUCTION IN *Pichia pastoris* KM71H. ADVISOR: SARINTIP SOOKSAI, Ph.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF.NUTTHA THONGCHUL, Ph.D., 141 pp.

Nowadays, a number of diabetic patients continousuly increase at national and global levels. In Thailand, this crisis has driven the local insulin production in order for serving therapeutic purpose and avoiding import of insulin products from abroad. Therapeutic insulin can be produced in many ways, e.g., extraction from animal pancreas and fermentation using recombinant bacteria or yeast. Among these, recombinant insulin production from yeast provided beneficial outcomes for therapeutic application since yeasts were classified in Eukaryota similarly to animal and human. Recombinant insulin synthesized from yeast could therefore have a correct posttranslation. Purification of insulin by yeast fermentation was simple since the recombinant product was secreted from the yeast cells. In this research, recombinant insulin monomer production (MIP) from methylotrophic yeast *Pichia pastoris* KM71H (TP1) containing recombinant monomeric insulin precursor gene cassette under alcohol oxidase controlled promoter (*$AOX1_P$-MIP-$AOX1_{TT}$*) was investigated. The effects of culture media as well as the concentrations of glycerol and nitrogen on cell biomass production was observed during the growth phase. Higher cell biomass was obtained from the fermentation of yeast extract peptone glycerol (YPGly) medium compared with that of yeast nitrogen base glycerol (YNBGly) medium. The highest cell biomass was acquired from the culture using YPGly containing 1% (w/v) glycerol and 1% (w/v) each of yeast extract and peptone (nitrogen source). In the induction phase, the culture from the growth phase grown in YPGly medium was inoculated into the production medium. The effects of medium, inoculum size, and methanol induction on recombinant insulin production were investigated. From the study, it was found that the highest recombinant insulin production of 23.67±0.04 $mg.l^{-1}$ was achieved at 48 h fermentation when inoculating with the concentrated inoculum (5X). Methanol concentration of 1% was proper for inducing insulin production every 24 h.

Field of Study: Biotechnology
Academic Year: 2016

Student's Signature .....
Advisor's Signature .....
Co-Advisor's Signature .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาในหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต ซึ่งสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจาก ได้รับความกรุณาอย่างสูงจาก อาจารย์ ดร. ศรินทิพ สุกใส อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ รองศาสตราจารย์ ดร. ณัฏฐา ทองจุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม จากสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาเสียสละเวลาให้คำแนะนำ ให้ความรู้ ข้อคิดเห็นและชี้แนวทางในการแก้ไขปัญหาต่างๆ ตลอดระยะเวลาในการทำวิจัย รวมทั้งตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ด้วยดี ด้วยความเอาใจใส่เป็นอย่างดียิ่ง จึงขอขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. นาตยา งามโรจนวณิชย์ ประธานกรรมการ รองศาสตราจารย์ ดร. อภิชาติ กาญจนทัต กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ จากสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ ดร. กอบกุล เหล่าเท้ง กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกมหาวิทยาลัย หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพอาหาร ที่กรุณาให้คำแนะนำ ตลอดจนปรับปรุงแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้แก่ข้าพเจ้าจนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอบพระคุณเจ้าหน้าที่หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ เจ้าหน้าที่สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ เจ้าหน้าที่คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตลอดจนพี่ๆ เพื่อน และทุกท่านที่คอยให้ความช่วยเหลือด้วยดีมาโดยตลอด

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่ให้ความอุปการะเลี้ยงดู และสนับสนุนในการศึกษามาด้วยดีโดยตลอด และขอบพระคุณญาติพี่น้องในครอบครัวทุกท่านที่ให้กำลังใจและความเข้าใจที่ดีตลอดมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญรูปภาพ ..... ฐ

สารบัญตาราง ..... ฒ

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ ..... ถ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 5

1.3 วิธีดำเนินการ 5

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 5

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 6

2.1 อินซูลิน 6

2.1.1 ความหมายของอินซูลิน 6

2.1.2 การค้นพบอินซูลิน 6

2.1.3 โครงสร้างของอินซูลิน 8

2.1.4 กลไกการทำงานของอินซูลิน 10

2.1.5 ประเภทของอินซูลิน 11

2.1.5.1 ประเภทที่ให้ผลการรักษาอย่างรวดเร็ว (rapid acting insulin) 11

2.1.5.2 ประเภทที่ให้ผลการรักษาค่อนข้างเร็ว (short acting insulin) 11

2.1.5.3 ประเภทที่ให้ผลกลางๆ (intermediate acting insulin) 11

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

หน้า

2.1.5.4 ประเภทที่ออกฤทธิ์ยาวนาน (long acting insulin) 11
2.1.5.5 ประเภทที่ผสมอินซูลิน 2 ชนิดรวมกันใน 1 ขวด (combination, mixed) ... 12
2.2 โรคเบาหวาน 13
2.2.1 ความหมายของโรคเบาหวาน 13
2.2.2 ชนิดของโรคเบาหวาน 13
2.2.2.1 โรคเบาหวานชนิดที่ 1 (Type 1 diabetes) 13
2.2.2.2 โรคเบาหวานชนิดที่ 2 (Type 2 diabetes) 14
2.2.2.3 โรคเบาหวานที่มีสาเหตุจำเพาะอื่นๆ (Other specific type of diabetes) 15
2.2.2.4 โรคเบาหวานในหญิงมีครรภ์ (Gestational diabetes mellitus; GDM) 15
2.2.3 โรคแทรกซ้อนที่อาจเกิดขึ้นในผู้ป่วยเบาหวาน 15
2.2.3.1 โรคแทรกซ้อนแบบเฉียบพลัน (Acute complications) 15
2.2.3.2 โรคแทรกซ้อนแบบเรื้อรัง (Chronic complications) 16
2.2.4 แนวโน้มของโรคเบาหวานในปัจจุบัน 18
2.3 เทคโนโลยีรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ (Recombinant DNA technology) 19
2.3.1 ความหมายของเทคโนโลยีรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ 19
2.3.2 การผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลิน 19
2.4 *Pichia pastoris* 24
2.4.1 *Pichia pastoris* X-33 25
2.4.2 *Pichia pastoris* GS115 25
2.4.3 *Pichia pastoris* KM71H 25
2.4.4 ข้อดีของการใช้ *P. pastoris* KM71H เป็นเซลล์เจ้าบ้าน 27
2.5 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ 27

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

หน้า

2.5.1 สารอาหารที่ต้องการ 27
2.5.1.1 แหล่งคาร์บอน 27
2.5.1.2 แหล่งไนโตรเจน 30
2.5.1.3 แหล่งฟอสฟอรัส 31
2.5.1.4 แหล่งซัลเฟอร์ 31
2.5.1.5 แหล่งแร่ธาตุ 31
2.5.2 ปัจจัยทางกายภาพและทางเคมี 32
2.5.2.1 ความเป็นกรด-เบส 32
2.5.2.2 อุณหภูมิ 33
2.5.2.3 ปริมาณออกซิเจน 35
2.5.2.4 น้ำ 35
2.6 การวิเคราะห์ปริมาณอินซูลิน 35
2.6.1 ติดตามปริมาณของอินซูลินโดยใช้วิธี Dot-blot 36
2.6.2 วิเคราะห์ปริมาณโดยใช้เทคนิค ELISA 37
2.6.2.1 Direct enzyme-linked immunosorbent assay 37
2.6.2.2 Indirect enzyme-linked immunosorbent assay 38
2.6.2.3 Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay 39
บทที่ 3 วิธีการทดลอง 40
3.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง 40
3.1.1 เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์ 40
3.2 จุลินทรีย์ 44
3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ 45
3.3.1 อาหารที่ใช้สำหรับการเจริญเติบโต 45

3.3.2 อาหารที่ใช้สำหรับเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลิน 45

3.4 วิธีการดำเนินงานวิจัย..... 45

3.4.1 ศึกษาค้นคว้าเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 45

3.4.2 ศึกษาชนิดของอาหาร (YPGly, YNBGly) ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของยีสต์สายพันธุ์ *P. pastoris* KM71H 45

3.4.3 วิเคราะห์ปริมาณของกลีเซอรอลที่เหลือในอาหาร โดยใช้ โครมาโทกราฟีเหลวความดันสูง (High performance liquid chromatography, HPLC)..... 46

3.4.4 วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือในอาหารโดยใช้วิธีคเจลดาห์ล (Kjeldahl method)..... 46

3.4.5 ศึกษาชนิดของอาหาร (YPMet, YNBMet และ MMH) รวมถึงปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลิน..... 47

3.4.6 ศึกษาความเข้มข้นของเมทานอลและช่วงเวลาในการเติมเมทานอลที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้มีการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลิน..... 48

3.4.7 วิเคราะห์ความเข้มข้นของเมทานอลและช่วงเวลาในการเติมเมทานอลที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้มีการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินโดยใช้ โครมาโทกราฟีแบบแก๊ส (Gas chromatography, GC) 48

3.4.8 วิเคราะห์ปริมาณของรีคอมบิแนนท์อินซูลินโดยใช้เทคนิค Indirect competitive ELISA..... 51

บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 53

4.1 ศึกษาชนิดของอาหารที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ *P. pastoris* KM71H (TP1) 53

4.1.1 ติดตามการเจริญเติบโตของเซลล์เมื่อเลี้ยงในอาหาร YPGly และ YNBGly..... 53

4.1.2 ศึกษาปริมาณของกลีเซอรอลและไนโตรเจนที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ 56

4.1.2.1 การศึกษาปริมาณของกลีเซอรอลโดยใช้เทคนิค HPLC 57

4.1.2.2 การศึกษาปริมาณของไนโตรเจนโดยใช้วิธี Kjeldahl..... 57

4.2 ศึกษาผลของกลีเซอรอลที่มีต่อการเจริญของเซลล์ *P. pastoris* KM71H (TP1)..... 60

4.2.1 ติดตามการเจริญเติบโตของเซลล์เมื่อเลี้ยงในอาหาร YPGly 1% (w/v), 2% (w/v) และ 3% (w/v) 60

4.2.2 ศึกษาปริมาณของกลีเซอรอลและไนโตรเจนที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ 62

4.2.2.1 วิเคราะห์ปริมาณของกลีเซอรอลโดยใช้เทคนิค HPLC 62

4.2.2.2 วิเคราะห์ปริมาณของไนโตรเจนโดยใช้วิธี Kjeldahl 63

4.3 ศึกษาผลของไนโตรเจนที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์ *P. pastoris* KM71H (TP1) 66

4.3.1 ติดตามการเจริญเติบโตของเซลล์เมื่อเลี้ยงในอาหาร Y1P1Gly1% (w/v), Y2P2Gly2% (w/v) และ Y3P3Gly3% (w/v) 66

4.3.2 ศึกษาปริมาณของกลีเซอรอลและไนโตรเจนที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ 68

4.3.2.1 วิเคราะห์ปริมาณของกลีเซอรอลโดยใช้เทคนิค HPLC 68

4.3.2.2 วิเคราะห์ปริมาณของไนโตรเจนโดยใช้วิธี Kjeldahl 69

4.4 ศึกษาชนิดของอาหาร (YPMet, YNBMet และ MMH) รวมถึงปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลิน 72

4.4.1 ศึกษาผลของชนิดอาหาร YPMet, YNBMet และ MMH โดยใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น OD600 เท่ากับ 1 72

4.4.2 ศึกษาผลของชนิดอาหารทั้ง 3 ชนิดและปริมาณหัวเชื้อแบบ 1xHCD 74

4.4.3 ศึกษาผลของชนิดอาหารทั้ง 3 ชนิดและปริมาณหัวเชื้อแบบ 5xHCD 76

4.5 ศึกษาความเข้มข้นของเมทานอลและช่วงเวลาในการเติมเมทานอลที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้มีการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลิน 85

4.5.1 ศึกษาผลของ 1% (v/v) เมทานอลเมื่อทำการเติมทุก 12 ชั่วโมง 85

4.5.2 ศึกษาผลของ 2% (v/v) เมทานอลเมื่อทำการเติมทุก 24 ชั่วโมง 87

4.6 ศึกษาผลผลิตได้ของรีคอมบิแนนท์อินซูลิน (recombinant insulin yield) เมื่อใช้ระดับความเข้มข้นของเมทานอลต่างกัน 93

4.6.1 ศึกษาผลผลิตที่ได้ของอินซูลินเมื่อใช้การเติมเมทานอล 1% (v/v) ทุก 24 ชั่วโมง 93

4.6.2 ศึกษาผลผลิตที่ได้ของอินซูลินเมื่อใช้การเติมเมทานอล 1% (v/v) ทุก 12 ชั่วโมง..... 94

4.6.3 ศึกษาผลผลิตที่ได้ของอินซูลินเมื่อใช้การเติมเมทานอล 2% (v/v) ทุก 24 ชั่วโมง..... 95

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 99

5.1 สรุปผลการทดลอง 99

5.2 ข้อเสนอแนะ 101

รายการอ้างอิง 102

ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ 110

ภาคผนวก ข การเตรียมสารละลายเคมี 114

ภาคผนวก ค การหาปริมาณกลีเซอรอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้เทคนิค HPLC 116

ภาคผนวก ง การตรวจติดตามระดับการแสดงออกของ MIP ด้วยวิธี Dot-blot 117

ภาคผนวก จ การหาความเข้มข้นของ MIP โดยใช้เทคนิค Indirect Competitive ELISA 118

ภาคผนวก ฉ การหาปริมาณของเมทานอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้เทคนิค GC 120

ภาคผนวก ช การหาผลผลิตที่ได้ของรีคอมบิแนนท์อินซูลิน 121

ภาคผนวก ซ การวิเคราะห์ทางสถิติ 130

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 141

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 2.1 บทบาทของอินซูลินในการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด 6

รูปที่ 2.2 Frederic Grant Banting และ Charles Herbert best แพทย์ผู้ค้นพบวิธีรักษาผู้ป่วยเบาหวาน 7

รูปที่ 2.3 Frederick Sanger นักชีวเคมีผู้คนพบโครงสร้างลำดับกรดอะมิโนของอินซูลินในวัว 8

รูปที่ 2.4 โครงสร้างทางโมเลกุลของอินซูลิน 9

รูปที่ 2.5 แสดงขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงของอินซูลินจากพรีโปรอินซูลิน โปรอินซูลินและอินซูลิน 9

รูปที่ 2.6 กลไลการทำงานของอินซูลิน 10

รูปที่ 2.7 ชนิดและคุณสมบัติของอินซูลิน ที่ใช้ในผู้ป่วยเบาหวาน มหาวิทยาลัยมหิดล 12

รูปที่ 2.8 การออกฤทธิ์ของอินซูลิน 13

รูปที่ 2.9 ลักษณะการทำงานของอินซูลินในคนปกติกับผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 1 และ 2 14

รูปที่ 2.10 หลอดเลือดใหญ่ของคนปกติกับหลอดเลือดของผู้ป่วยเบาหวาน 17

รูปที่ 2.11 อัตราการเพิ่มขึ้นของผู้ป่วยเบาหวานในปี 2035 18

รูปที่ 2.12 กระบวนการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลิน 20

รูปที่ 2.13 ร้อยละของการใช้เซลล์เจ้าบ้านแต่ละชนิดเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพ 21

รูปที่ 2.14 *Pichia pastoris* 25

รูปที่ 2.15 ตรวจติดตามปริมาณของ MIP ด้วยวิธี Dot-blot 26

รูปที่ 2.16 โครงสร้างของกลีเซอรอล 28

รูปที่ 2.17 โครงสร้างของเมทานอล (ก) และ แมทาบอลิซึมของเมทานอลในยีสต์ (ข) 29

รูปที่ 2.18 การติดตามปริมาณของรีคอมบิแนนท์อินซูลินด้วยวิธี Dot-blot 37

รูปที่ 2.19 ประเภทของ ELISA 39

รูปที่ 3.1 การติดตามการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์อินซุลินด้วยวิธี Dot blot 49

รูปที่ 3.2 การวิเคราะห์ปริมาณของรีคอมบิแนนท์อินซูลินโดยใช้เทคนิค ELISA 51

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รูปที่ 4.1 การติดตามการเจริญเติบโต (growth curve) ของ *P. pastoris* KM71H (TP1) เมื่อเลี้ยงในอาหารและปริมาณกลีเซอรอลต่างกัน 56

รูปที่ 4.2 ปริมาณกลีเซอรอล (ก) และปริมาณไนโตรเจน (ข) ที่เหลือในอาหาร YPGly และ YNBGly..... 59

รูปที่ 4.3 การติดตามการเจริญเติบโต (growth curve) ของ *P. pastoris* KM71H 62

รูปที่ 4.4 ปริมาณกลีเซอรอล (ก) และไนโตรเจน (ข) ที่เหลือในอาหาร YPGly1% (w/v), 2% (w/v) และ 3% (w/v)..... 65

รูปที่ 4.5 การติดตามการเจริญเติบโต (growth curve) ของ *P. pastoris* KM71H 66

รูปที่ 4.6 ปริมาณกลีเซอรอล (ก) และไนโตรเจน (ข) ที่เหลือใน Y1P1Gly1% (w/v), Y2P2Gly2% (w/v) และ Y3P3Gly3% (w/v)..... 71

รูปที่ 4.7 ตรวจติดตามปริมาณรีคอมบิแนนท์อินซูลินโดยใช้เทคนิค dot-blot เมื่อใช้อาหาร YPMet, YNBMet และ MMH และใช้ปริมาณหัวเชื้อต่างกัน (OD600=1 1xHCD และ 5xHCD..... 80

รูปที่ 4.8 ปริมาณของรีคอมบิแนนท์อินซูลินเมื่อเลี้ยงในอาหาร YPMet, YNBMet และ MMH 81

รูปที่ 4.9 ปริมาณของเมทานอลที่เหลือเมื่อเลี้ยงในอาหาร YPMet, YNBMet และ MMH โดยใช้ปริมาณหัวเชื้อต่างกัน (OD600=1, 1xHCD และ5xHCD) 82

รูปที่ 4.10 ปริมาณของรีคอมบิแนนท์อินซูลินเมื่อเลี้ยงในอาหาร YPMet, YNBMet และ MMH โดยใช้ความเข้มข้นและระยะเวลาในการเติมเมทานอลที่แตกต่างกัน 91

รูปที่ 4.11 ปริมาณของเมทานอลที่เหลือเมื่อเลี้ยงในอาหาร YPMet YNBMet และ MMH โดยใช้ความเข้มข้นและระยะเวลาในการเติมเมทานอลที่แตกต่างกัน 92

รูปที่ 4.12 ผลผลิตที่ได้ของรีคอมบิแนนท์อินซูลินเมื่อใช้ความเข้มข้นและ 97

รูปที่ ค.1 กราฟมาตรฐานของกลีเซอรอล สำหรับหาปริมาณกลีเซอรอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ 116

รูปที่ จ.1 กราฟมาตรฐานสำหรับใช้วิเคราะห์ปริมาณรีคอมบิแนนท์อินซูลิน 119

รูปที่ ฉ.1 กราฟมาตรฐานของเมทานอล สำหรับหาปริมาณเมทานอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ.... 120

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนชุดของอินซูลินยีนและความเข้มข้นที่ผลิตได้ 21

ตารางที่ 2.2 ข้อดีและข้อด้อยในการเลือกใช้เซลล์เจ้าบ้านแต่ละชนิด 22

ตารางที่ 2.3 การผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินโดยใช้ *E. coli* 23

ตารางที่ 2.4 การผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินโดยใช้ยีสต์ 24

ตารางที่ 2.5 สายพันธุ์ของ *P. pastoris* ที่แบ่งได้ตามลักษณะการใช้เมทานอล 26

ตารางที่ 2.6 การศึกษาปริมาณของเมทานอลในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน 30

ตารางที่ 2.7 การศึกษาสภาพความเป็นกรด-ด่างในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน 33

ตารางที่ 2.8 การศึกษาอุณหภูมิในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนใน *P. pastoris* สายพันธุ์ X-33 ... 34

ตารางที่ 3.1 สภาวะการทำงานของโครมาโทกราฟีเหลวความดันสูง 46

ตารางที่ 3.2 สภาวะการทำงานของการโครมาโทกราฟีแบบแก๊ส 49

ตารางที่ 4.1 ความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยงในอาหารและปริมาณกลีเซอรอลต่างกัน 55

ตารางที่ 4.2 ปริมาณกลีเซอรอลที่เหลือในอาหาร YPGly และ YNBGly 57

ตารางที่ 4.3 ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือในอาหารเหลือในอาหาร YPGly และ YNBGly 58

ตารางที่ 4.4 ความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณกลีเซอรอลต่างกัน 61

ตารางที่ 4.5 ปริมาณของกลีเซอรอลที่เหลือในอาหาร YPGly 1% (w/v), 2% (w/v) และ 3% (w/v) 64

ตารางที่ 4.6 ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือในอาหารเหลือในอาหาร YPGly 1% (w/v), 2% (w/v) และ 3% (w/v) 64

ตารางที่ 4.7 ความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณกลีเซอรอลและไนโตรเจนต่างกัน 68

ตารางที่ 4.8 ปริมาณของกลีเซอรอลที่เหลือในอาหาร Y1P1Gly1% (w/v), Y2P2Gly2% (w/v) และ Y3P3Gly3% (w/v) 70

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 4.9 ปริมาณของไนโตรเจนที่เหลือในอาหาร Y1P1Gly1% (w/v), Y2P2Gly2% (w/v) และ Y3P3Gly3% (w/v)..... 70

ตารางที่ 4.10 ปริมาณรีคอมบิแนนท์อินซูลินเมื่อใช้ปริมาณของหัวเชื้อเป็นแบบ OD600=1 73

ตารางที่ 4.11 เมทานอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้ปริมาณของหัวเชื้อเป็นแบบ OD600=1 .. 73

ตารางที่ 4.12 ปริมาณรีคอมบิแนนท์อินซูลินของ P. pastoris KM71H (TP1) เมื่อเลี้ยงในอาหาร YPMet, YNBMet และMMH โดยใช้ปริมาณของหัวเชื้อเป็นแบบ 1xHCD..... 75

ตารางที่ 4.13 เมทานอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้ปริมาณของหัวเชื้อเป็นแบบ 1xHCD 76

ตารางที่ 4.14 ปริมาณรีคอมบิแนนท์อินซูลินของ P. pastoris KM71H (TP1) เมื่อเลี้ยงในอาหาร YPMet YNBMet และMMH โดยใช้ปริมาณของหัวเชื้อเป็นแบบ 5xHCD..... 78

ตารางที่ 4.15 เมทานอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้ปริมาณของหัวเชื้อเป็นแบบ 5xHCD 78

ตารางที่ 4.16 ปริมาณของรีคอมบิแนนท์อินซูลินเมื่อเลี้ยงในอาหาร YPMet, YNBMet และ MMH โดยใช้ปริมาณหัวเชื้อต่างกัน (OD600=1, 1xHCD และ5xHCD)..... 83

ตารางที่ 4.17 ปริมาณของเมทานอลที่เหลือเมื่อเลี้ยงในอาหาร YPMet, YNBMet และ MMH โดยใช้ปริมาณหัวเชื้อต่างกัน (OD600=1 1xHCD และ5xHCD)..... 84

ตารางที่ 4.18 ปริมาณของรีคอมบิแนนท์อินซูลินเมื่อทำการเติม 1% (v/v) เมทานอลในทุก 12 ชั่วโมง..... 86

ตารางที่ 4.19 เมทานอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเติม 1% (v/v) เมทานอลในทุก 12 ชั่วโมง..... 87

ตารางที่ 4.20 ปริมาณของรีคอมบิแนนท์อินซูลินเมื่อทำการเติม 2% (v/v) เมทานอลในทุก 24 ชั่วโมง..... 88

ตารางที่ 4.21 เมทานอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเติม 2% (v/v) เมทานอลในทุก 24 ชั่วโมง..... 90

ตารางที่ 4.22 ผลผลิตที่ได้ของรีคอมบิแนนท์อินซูลินเมื่อเติม 1% (v/v) เมทานอลทุก 24 ชั่วโมง... 94

ตารางที่ 4.23 ผลผลิตที่ได้ของรีคอมบิแนนท์อินซูลินเมื่อเติม 1% (v/v) เมทานอลทุก 12 ชั่วโมง... 94

ตารางที่ 4.24 ผลผลิตที่ได้ของรีคอมบิแนนท์อินซูลินเมื่อเติม 2% (v/v) เมทานอลทุก 24 ชั่วโมง... 95

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 4.25 ผลผลิตที่ได้ของรีคอมบิแนนท์อินซูลินเมื่อใช้ความเข้มข้นและระยะเวลาในการเติมเมทานอลที่แตกต่างกัน 96

ตารางที่ ง.1 การเตรียมสารละลายอินซูลินมาตรฐานสำหรับวิธี dot-blot 117

ตารางที่ จ.1 การเตรียมสารละลายอินซูลินมาตรฐานสำหรับวิธี Indirect Competitive ELISA .. 118

ตารางที่ ช. 1 ผลผลิตที่ได้เมื่อเลี้ยงเชื้อใน YPMet และใช้การเติม 1% (v/v) เมทานอลทุก 24 ชั่วโมง เหนี่ยวนำให้เกิดรีคอมบิแนนท์อินซูลิน 122

ตารางที่ ช.2 ผลผลิตที่ได้เมื่อเลี้ยงเชื้อใน YNBMet และใช้การเติม 1% (v/v) เมทานอลทุก 24 ชั่วโมง เหนี่ยวนำให้เกิดรีคอมบิแนนท์อินซูลิน 123

ตารางที่ ช.3 ผลผลิตที่ได้เมื่อเลี้ยงเชื้อใน MMH และใช้การเติม 1% (v/v) เมทานอลทุก 24 ชั่วโมง เหนี่ยวนำให้เกิดรีคอมบิแนนท์อินซูลิน 124

ตารางที่ ช.4 ผลผลิตที่ได้เมื่อเลี้ยงเชื้อใน YNBMet และใช้การเติม 1% (v/v) เมทานอลทุก 12 ชั่วโมง เหนี่ยวนำให้เกิดรีคอมบิแนนท์อินซูลิน 125

ตารางที่ ช.5 ผลผลิตที่ได้เมื่อเลี้ยงเชื้อใน YNBMet และใช้การเติม 1% (v/v) เมทานอลทุก 12 ชั่วโมง เหนี่ยวนำให้เกิดรีคอมบิแนนท์อินซูลิน 126

ตารางที่ ช.6 ผลิตที่ได้เมื่อเลี้ยงเชื้อใน MMH และใช้การเติม 1% (v/v) เมทานอลทุก 12 ชั่วโมง เหนี่ยวนำให้เกิดรีคอมบิแนนท์อินซูลิน 127

ตารางที่ ช.7 ผลิตที่ได้เมื่อเลี้ยงเชื้อใน YPMet และใช้การเติม 2% (v/v) เมทานอลทุก 12 ชั่วโมง เหนี่ยวนำให้เกิดรีคอมบิแนนท์อินซูลิน 128

ตารางที่ ช.8 ผลิตที่ได้เมื่อเลี้ยงเชื้อใน YNBMet และใช้การเติม 2% (v/v) เมทานอลทุก 12 ชั่วโมง เหนี่ยวนำให้เกิดรีคอมบิแนนท์อินซูลิน 129

ตารางที่ ซ.1 การเปรียบเทียบความแตกต่างของอาหารแต่ละกลุ่ม YPGly0.5%(w/v), YPGly1%(w/v), YNBGly0.5%(w/v) และ YNBGly1%(w/v) 130

ตารางที่ ซ.2 การเปรียบเทียบความแตกต่างของระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อโดยเปรียบเทียบในทุกๆ 3 ชั่วโมง ของอาหาร YPGly0.5%(w/v), YPGly1%(w/v), YNBGly0.5%(w/v) และ YNBGly1%(w/v) 132

ตารางที่ ซ.3 การเปรียบเทียบความแตกต่างของอาหารแต่ละกลุ่ม YPGly1%(w/v), YPGly2%(w/v) และ YPGly3%(w/v) 133

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ ซ.4 การเปรียบเทียบความแตกต่างของระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อโดยเปรียบเทียบในทุกๆ 3 ชั่วโมง ของอาหาร YPGly1%(w/v), YPGly2%(w/v) และ YPGly3%(w/v)..... 134

ตารางที่ ซ.5 การเปรียบเทียบความแตกต่างของอาหารแต่ละกลุ่ม Y1P1Gly1%(w/v), Y2P2Gly2%(w/v) และ Y3P3Gly3%(w/v)..... 135

ตารางที่ ซ.6 การเปรียบเทียบความแตกต่างของระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อโดยเปรียบเทียบในทุกๆ 3 ชั่วโมง ของอาหาร Y1P1Gly1%(w/v), Y2P2Gly2%(w/v) และ Y3P3Gly3%(w/v) 136

ตารางที่ ซ.7 การเปรียบเทียบความแตกต่างของอาหารแต่ละกลุ่ม YPMet, YNBMet และ MMH รวมถึงปริมาณหัวเชื้อที่ใช้และระยะเวลาในการเลี้ยงที่ได้ทำการเติมเมทานอลในทุกๆ 24 ชั่วโมง..... 137

ตารางที่ ซ.8 การเปรียบเทียบความแตกต่างของอาหารแต่ละกลุ่ม YPMet, YNBMet และ MMH รวมถึงระดับความเข้มข้นของเมทานอล ตลอดจนระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ..... 139

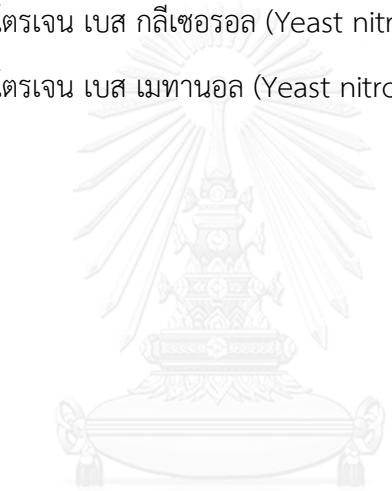
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

%	เปอร์เซ็นต์ (Percentage)
^{o}C	องศาเซลเซียส (Degree Celsius)
μg	ไมโครกรัม (Microgram)
μl	ไมโครลิตร (Microliter)
xg	แรงหมุน (Mutiply by gravitational force (x9.80665 m.s^{2}))
AOX	แอลกอฮอล์ออกซิเดส (Alcohol oxidase)
AOX1	ยีนแอลกอฮอล์ออกซิเดส 1 (Alcohol oxidase 1 gene)
AOX2	ยีนแอลกอฮอล์ออกซิเดส 2 (Alcohol oxidase 2 gene)
ELISA	การวิเคราะห์โดยใช้หลักการภูมิคุ้มกันและเอ็นไซม์ (Enzyme-linked immunosorbent assay)
h	ชั่วโมง (Hour)
HCD	สภาวะความเข้มข้นของเซลล์สูง (High cell density)
1xHCD	สภาวะความเข้มข้นของเซลล์สูงเป็น 1 เท่า (1 times high cell density)
5xHCD	สภาวะความเข้มข้นของเซลล์สูงเป็น 5 เท่า (5 times high cell density)
HPLC	เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography)
M	โมลาร์ (Molar)
mg	มิลลิกรัม (Milligram)
MIP	มอนอเมอริกอินซูลินพรีเคอเซอร์ (Monomeric insulin precursor)
ml	มิลลิลิตร (Milliliter)
MMH	เมทานอล มินิมอล ฮีสทิดีน (Methanol minimal histhdine)
Mut^{+}	สายพันธุ์ที่ใช้เมทานอลเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว (Methanol utilization plus)
Mut^{S}	สายพันธุ์ที่ใช้เมทานอลเจริญเติบโตอย่างช้า (Methanol utilization slow)
nm	นาโนเมตร (Nanometer)
OD	ค่าการดูดกลืนแสง (Optical density)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

rpm	รอบต่อนาที (Revolution per minute)
T	อุณหภูมิ (Temperature)
UV	รังสีอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet)
v	ปริมาตร (Volume)
w	น้ำหนัก (Weight)
YPD	ยีสต์ เอกซ์แทรค เปปโตน เด็กซ์โตรส (Yeast extract peptone dextrose)
YPGly	ยีสต์ เอกซ์แทรค เปปโตน กลีเซอรอล (Yeast extract peptone glycerol)
YPMet	ยีสต์ เอกซ์แทรค เปปโตน เมทานอล (Yeast extract peptone methanol)
YNBGly	ยีสต์ ไนโตรเจน เบส กลีเซอรอล (Yeast nitrogen base glycerol)
YNBMet	ยีสต์ ไนโตรเจน เบส เมทานอล (Yeast nitrogen base methanol)



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคเบาหวาน คือโรคที่มีความผิดปกติของการควบคุมการใช้น้ำตาลในร่างกายทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดสูงกว่าปกติ (มากกว่า 126 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ($mg.dl^{-1}$) ก่อนรับประทานอาหารหรือมากกว่า 200 $mg.dl^{-1}$ หลังรับประทานอาหาร) โดยปกติร่างกายจะมีระบบกรองและดูดกลับสารต่างๆ ที่ไต ซึ่งมีความแตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดสาร สำหรับกลูโคส (glucose) ซึ่งมีขนาดโมเลกุลเล็กจะสามารถกรองผ่านเยื่อหุ้มของโกลเมอรูลัส (glomerulus) ออกไปได้ แต่กลูโคสที่กรองออกจะถูกดูดกลับที่หลอดไตฝอยส่วนต้น โดยจะสามารถดูดกลับกลูโคสได้หมดถ้าระดับน้ำตาลในเลือดไม่เกิน 126 $mg.dl^{-1}$ ทำให้ในคนปกติไม่พบน้ำตาลออกมากับปัสสาวะ แต่สำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวานที่มีระดับน้ำตาลในเลือดสูงเกินความสามารถในการดูดกลับของไตจึงทำให้ตรวจพบน้ำตาลออกมากับปัสสาวะได้ (เปี่ยมงาม, 2558) ซึ่งกลไกของการเกิดโรคเบาหวานคือ ฮอร์โมนที่ควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดซึ่งมีชื่อว่า อินซูลิน (insulin) โรคเบาหวานเกิดเนื่องจากการขาดฮอร์โมนอินซูลินหรือประสิทธิภาพของอินซูลินลดลงเนื่องจากภาวะดื้อต่ออินซูลิน ทำให้ร่างกายไม่สามารถนำน้ำตาลในเลือดไปใช้ได้ตามปกติ การที่มีระดับน้ำตาลในเลือดสูงเป็นระยะเวลานานนั้น จะส่งผลให้เกิดโรคแทรกซ้อนตามอวัยวะต่างๆ เช่น สมอง, ตา, ไต, หัวใจและระบบประสาท (โฆษชุณหนันท์, 2558) การเกิดโรคเบาหวานมีปัจจัยทั้งจากพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อม สามารถจำแนกตามชนิดของโรคเบาหวานได้ดังนี้ โรคเบาหวานชนิดที่ 1 (Type 1) หรือเดิมเรียกว่า insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) เป็นภาวะที่ร่างกายมีความบกพร่องในการสร้างอินซูลินพบประมาณ 5-10 เปอร์เซ็นต์ (%) ของผู้ป่วยโรคเบาหวานทั้งหมด สาเหตุเกิดจากเบตาเซลล์ (beta cell) ของตับอ่อนถูกทำลายโดยภูมิคุ้มกันของตัวเอง (autoimmune destruction) จนทำให้การสร้างอินซูลินลดลงและนำไปสู่การขาดอินซูลินในที่สุด สำหรับโรคเบาหวานชนิดที่ 2 (Type 2) หรือที่เดิมเรียกว่า non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM) พบประมาณ 90-95% ของผู้ป่วยเบาหวานทั้งหมด ซึ่งสาเหตุมาจากภาวะดื้อต่ออินซูลินร่วมกับภาวะขาดอินซูลินที่เกิดจากการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดที่ผิดปกติ (Ta, 2014; เปี่ยมงาม, 2558) โดยผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ในระยะต้น อาจไม่มีการ

ขาดอินซูลินแต่เมื่อเป็นระยะเวลานานขึ้น ตับอ่อนที่ทำงานหนักมากเพื่อผลิตอินซูลินจะเสื่อมสมรรถภาพลง ไม่สามารถผลิตอินซูลินได้เพียงพอ ทำให้ในที่สุดผู้ป่วยนั้นก็จำเป็นต้องรับอินซูลินจากภายนอกเช่นกัน

อินซูลินเป็นฮอร์โมนที่ถูกผลิตขึ้นมาจากตับอ่อน มีหน้าที่ควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด อินซูลินในรูปแบบที่ออกฤทธิ์หรือทำงานได้ จะประกอบด้วยสายเปปไทด์ (peptide) 2 สาย คือ สาย A มีกรดอะมิโนทั้งสิ้น 21 หน่วยและสาย B มีกรดอะมิโนทั้งสิ้น 30 หน่วย โดยอินซูลินสาย A และ B จะจับกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ 2 คู่ อีกทั้งในเปปไทด์สาย A ยังมีการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ขึ้นภายในอีก 1 คู่ อีกด้วย (Joshi et al., 2007)

โดยรีคอมบิแนนท์อินซูลิน (recombinant insulin) สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มใหญ่ๆ ได้ตามระยะเวลาในการออกฤทธิ์ ได้แก่ กลุ่ม rapid-acting (faster acting) insulin เป็นรีคอมบิแนนท์อินซูลินที่ถูกดัดแปลงเพื่อให้มีการดูดซึมและทำงานได้อย่างรวดเร็วกว่าอินซูลินจากธรรมชาติ รีคอมบิแนนท์อินซูลินในกลุ่มนี้ ได้แก่ Apidra® ของบริษัท Sanofi-Aventis, NovoLog® ของบริษัท Novo Nordisk และHumalog® ของบริษัท Lilly (Daly, and Hearn, 2005; Kjeldsen et al., 2002; Wood et al., 1997) สำหรับรีคอมบิแนนท์อินซูลินอีกกลุ่มหนึ่ง คือ long-acting (slowly released) insulin เป็นรีคอมบิแนนท์อินซูลินที่ถูกดัดแปลงให้มีการทำงานในช่วง 8 ถึง 24 ชั่วโมง เพื่อควบคุมให้มีอินซูลินอยู่ในระดับคงที่ตลอดทั้งวันรีคอมบิแนนท์อินซูลินกลุ่มนี้ ได้แก่ Lantus ของบริษัท Sanofi-Aventis, Glaritus ของบริษัท Wockhardt (Bolli et al., 1999) ถึงแม้รีคอมบิแนนท์อินซูลินจะถูกพัฒนาและผลิตขึ้นมาเป็นระยะเวลานาน แต่อย่างไรก็ตาม ประเทศไทยก็ยังไม่มีการผลิตอินซูลินขึ้นภายในประเทศไทย จำเป็นต้องอาศัยการนำเข้ารีคอมบิแนนท์อินซูลินจากต่างประเทศทั้งสิ้นทั้งที่มีปริมาณผู้ป่วยโรคเบาหวานเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องทุกๆปี

ปัจจุบันรีคอมบิแนนท์อินซูลินที่ใช้สำหรับรักษาผู้ป่วยโรคเบาหวานถูกพัฒนาขึ้นอย่างต่อเนื่องเพื่อตอบสนองและบำบัดรักษาผู้ป่วยโรคเบาหวานที่มีจำนวนเพิ่มสูงขึ้น การพัฒนาโครงสร้างของอินซูลินจึงถือเป็นปัจจัยพื้นฐานสำคัญปัจจัยหนึ่งที่จะส่งผลให้รีคอมบิแนนท์อินซูลินมีประสิทธิภาพในการรักษาผู้ป่วยโรคเบาหวานแต่ละชนิด ซึ่งมอนอเมอริกอินซูลินพรีเคอเซอร์ (monomeric insulin precursor, MIP, B27 Lys DTrI) เป็นรีคอมบิแนนท์อินซูลินที่มีประสิทธิสูงในกลุ่มออกฤทธิ์เร็วตัวหนึ่งที่ถูกพัฒนาขึ้นโดย Ding และ คณะในปี 2003 ซึ่งใช้ยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevesiae* เป็นเซลล์เจ้าบ้านโดยมีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับอินซูลินของมนุษย์ แต่มีการดัดแปลง

โดยตัดกรดอะมิโนลำดับที่ B28-30 ออกและเปลี่ยนกรดอะมิโนตัวที่ B27 จากกรดอะมิโนธรีโอนีน (Threonine) เป็นกรดอะมิโนไลซีน (Lysine) ซึ่งเมื่อต้องการทำให้ MIP อยู่ในรูปแบบที่ออกฤทธิ์ได้หรือพร้อมใช้งาน เพียงตัดด้วยเอ็นไซม์ TPCK-trypsin จะเกิดปฏิกิริยา tryptic hydrolysis เปลี่ยน MIP ให้อยู่ในรูปแบบที่ออกฤทธิ์ได้ (Ding et al., 2003; Ding et al., 2005) ซึ่งจะมีประสิทธิภาพที่สูงมากกว่ามอนอเมอริกอินซูลินรุ่นแรกที่ได้ผลิตขึ้นอีกด้วย (Cui et al., 2001)

รีคอมบิแนนท์เทคโนโลยี (recombinant technology) เป็นเทคโนโลยีที่ถูกนำมาใช้มากในวงการวิทยาศาสตร์ การแพทย์และเภสัชศาสตร์ โดยการนำดีเอ็นเอ (DNA) หรือลำดับของสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่ง มาใส่เข้าไปในสิ่งมีชีวิตอื่นที่เรียกว่า เซลล์เจ้าบ้าน (host cell) เพื่อผลิตโปรตีนที่ได้จากยีนที่เราต้องการ โปรตีนที่ได้เรียกว่า “รีคอมบิแนนท์โปรตีน” ซึ่งยีสต์ถูกนิยมใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน เนื่องจากเป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวที่จัดเป็นยูคาริโอติกเซลล์ (eukaryotic cell) ที่มีกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนที่ใกล้เคียงกับสิ่งมีชีวิตชั้นสูง สามารถเพิ่มจำนวนและเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วและผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนได้ในปริมาณมากที่ความเข้มข้นของเซลล์สูง อีกทั้งยังสามารถควบคุมการแสดงออกของยีนเพื่อให้สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนในปริมาณที่สูงกว่าการใช้แบคทีเรีย (bacteria) เป็นเซลล์เจ้าบ้าน อีกทั้งในระบบของแบคทีเรียเองไม่มีกระบวนการปรับแต่งโปรตีนหลังจากกระบวนการสังเคราะห์ ซึ่งอาจมีผลต่อหน้าที่และคุณสมบัติของโปรตีนที่มีความซับซ้อนของโครงสร้างมาก ดังนั้น จึงนิยมใช้ระบบการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดยใช้ยีสต์ เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนที่มีความซับซ้อนและสามารถหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนต่อไป (Celik, and Calık, 2012) ซึ่งจากงานวิจัยก่อนหน้าพบว่า *Pichia pastoris, Hansenula polymorpha, Schizosaccharomyces pombe, Kluyveromyces lactis*, และ *Yarrowia lipolytica* เป็นยีสต์ (yeast) ที่สามารถใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านที่มีประสิทธิภาพในการผลิตและหลั่งรีคอมบิแนนท์โปรตีนออกนอกเซลล์ได้ดีกว่า *S. cerevisiae* (Gellissen Gerd et al., 2005; Gellissen G, and Melber, 1996; Müller et al., 1998)

P. pastoris และ *H. polymorpha* เป็นยีสต์ที่นิยมใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนเนื่องจากเป็นเมธิลโลโธฟิกยีสต์ (methylotrophic yeast) ที่มีความสามารถในการใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อใช้ในการสร้างเซลล์และสร้างพลังงานด้วยระบบเมทาบอลิซึมจำเพาะที่เรียกว่า methanol metabolism pathways ภายใต้การควบคุมการแสดงออกของ โปรโมเตอร์แอลกอฮอล์ออกซิเดสยีน (*AOX1* promoter) ซึ่งโปรโมเตอร์นี้มีความแรงในการแสดงออกสูง

เมื่อถูกกระตุ้นด้วยเมทานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่อย่างไรก็ตาม *P. pastoris* ถือเป็นยีสต์ที่นิยมใช้ศึกษาถึงการแสดงออกของยีนและใช้เพื่อผลิตคอมบิแนนท์โปรตีนมากกว่า *H. polymorpha* เนื่องจากระบบของ *P. pastoris* ได้รับการเอื้ออำนวยและมีจำหน่ายในเชิงพาณิชย์จากบริษัทซึ่งแตกต่างกับ *H. polymorpha* อีกทั้งสามารถควบคุม *P. pastoris* ให้ผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนแล้วปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์หรือสะสมไว้ในเซลล์ สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ความหนาแน่นของเซลล์สูง (Cereghino, and Cregg, 2000; Cregg et al., 2000; Daly, and Hearn, 2005) รวมถึงสามารถเพาะเลี้ยงได้ง่าย เจริญเติบโตได้ดีในอาหารสังเคราะห์ (synthetic medium) ใช้ต้นทุนในการผลิตต่ำและให้ผลผลิตในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนสูงเมื่อเทียบกับการใช้ยูคาริโอติกเซลล์ชนิดอื่นเป็นเซลล์เจ้าบ้าน (Inan, and Meagher, 2001) และ จากงานวิจัยในปี 2014 (Tanapati, 2014) ได้สร้างพลาสมิดที่มีชุดยีนที่ผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินพรีเคอเซอร์แบบมอนอเมอร์ (MIP, B27 Lys DTrI) และนำเข้าสู่เซลล์ยีสต์สายพันธุ์ *H. polymorpha* NRRL2214 และ *P. pastoris* 3 สายพันธุ์ ได้แก่ GS115 (Mut^+, his4), X-33 (Mut^+, WT) และ KM71H (Mut^S) จากนั้นตรวจติดตามปริมาณรีคอมบิแนนท์อินซูลินด้วย Dlot-blot analysis, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) พบว่ายีสต์สายพันธุ์ *P. pastoris* KM71H มีความสามารถในการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินพรีเคอเซอร์แบบมอนอเมอร์ได้ปริมาณมากที่สุดเมื่อเทียบกับยีสต์สายพันธุ์อื่น

ทั้งนี้การเพิ่มปริมาณผลผลิตของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผลิตได้จากยีสต์ สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การเพิ่มจำนวนชุดของยีน (Mansur et al., 2005; Zhu et al., 2009) การเลือกใช้เซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสม เซลล์เจ้าบ้านที่เป็นสิ่งมีชีวิตชั้นสูงแต่ละชนิดมีความสามารถในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนได้แตกต่างกัน เพราะเซลล์เจ้าบ้านแต่ละชนิดมีความสามารถในการแสดงออกของยีนในการสังเคราะห์กรดอะมิโนแต่ละชนิดต่างกัน (Avgerinos et al., 2001) นอกจากนี้การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ ก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่นำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน เช่น ชนิดและปริมาณของไนโตรเจนและคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการเป็นแหล่งอาหารและพลังงาน (Chen et al., 2008; Moon et al., 2002) ซึ่งปัจจัยเหล่านี้เป็นปัจจัยพื้นฐานที่ต้องศึกษาในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์และการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน รวมถึงความเข้มข้นของเมทานอล (methanol) ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งถือเป็นอีกหนึ่งปัจจัยสำคัญ เพราะ *P. pastoris* ไม่สามารถทนต่อเมทานอลที่ความเข้มข้นสูงๆได้ เนื่องจากเกิดการสะสมของ

ฟอร์มาลดีไฮด์ (formaldehyde) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) ขึ้นทำให้มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งสารทั้งสองนี้เกิดจากการออกซิเดชันของเมทานอลด้วยเอ็นไซม์แอลกอลฮอล์ออกซิเดสนั่นเอง (Couderc, and Baratti, 1980; Cregg, and Madden, 1988; Van Der Klei et al., 1990)

งานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะทำการหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินที่หลั่งออกมานอกเซลล์ยีสต์ โดยใช้ยีสต์สายพันธุ์ *P. pastoris* KM71H (TP1) ซึ่งมีพลาสมิดที่มีชุดยีนที่ผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินพรีเคอเซอร์แบบมอนอเมอร์ (MIP, B27 DTrl) เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการผลิตระดับขยายส่วนต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินที่หลั่งออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์สายพันธุ์ *P. pastoris* KM71H (TP1)

1.3 วิธีดำเนินการ

- ศึกษาค้นคว้าเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง
- ศึกษาชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของยีสต์สายพันธุ์ *P. pastoris* KM71H โดยใช้อาหาร YPGly, YNBGly
- ศึกษาชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลิน โดยใช้อาหาร YPMet, YNBMet และ MMH
- ศึกษาปริมาณของหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลิน
- ศึกษาหาความเข้มข้นของเมทานอลและช่วงเวลาในการเติมเมทานอลที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้มีการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลิน
- วิเคราะห์ สรุปผลการทดลอง เผยแพร่ผลงานวิจัยและเขียนวิทยานิพนธ์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

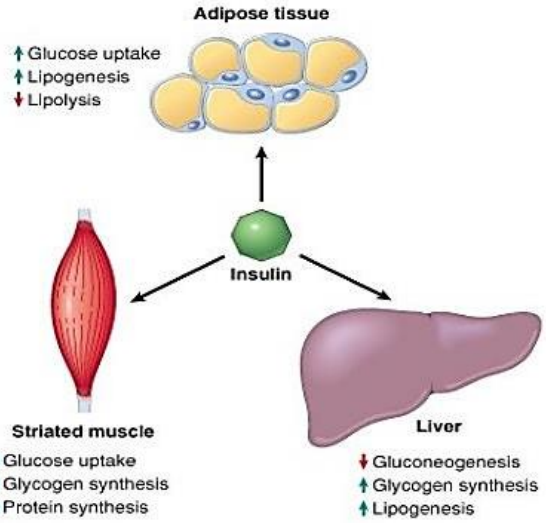
ได้ภาวะที่เหมาะสมของการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินที่หลั่งออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์สายพันธุ์ *P. pastoris* KM71H

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 อินซูลิน

2.1.1 ความหมายของอินซูลิน

อินซูลินเป็นฮอร์โมนชนิดอนาโบลิคโพลีเปปไทด์ (anabolic polypeptide) ที่ถูกผลิตขึ้นโดยเบตาเซลล์ของตับอ่อน มีหน้าที่ควบคุมระดับน้ำตาลกลูโคสในกระแสเลือด ซึ่งอินซูลินจะหลั่งออกมาเมื่อระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดเพิ่มสูงขึ้น โดยอินซูลินจะช่วยเพิ่มการขนส่งน้ำตาลในกระแสเลือดเข้าไปสู่เซลล์ของร่างกาย เช่น เซลล์ตับ เซลล์กล้ามเนื้อ และเนื้อเยื่อไขมัน เพื่อใช้เป็นพลังงาน ซึ่งอินซูลินจะช่วยกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์ของไกลโคเจน (glycogen synthesis) และไขมัน (lipogenesis) พร้อมทั้งยังช่วยยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์กลูโคส (gluconeogenesis) รวมถึงกระบวนการเผาผลาญไขมัน อีกด้วย (Wilcox, 2005) (รูปที่ 2.1)



รูปที่ 2.1 บทบาทของอินซูลินในการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด (Worldpress, 2014)

2.1.2 การค้นพบอินซูลิน

การศึกษาหาฮอร์โมนเพื่อที่จะรักษาผู้ป่วยเบาหวานเริ่มขึ้นในปี 1904 โดย Ernst Henry Starling นักสรีรวิทยา ชาวอังกฤษ ต่อมา Jean de Meyer นักวิทยาศาสตร์ประเทศเบลเยี่ยม ได้ตั้งชื่อฮอร์โมนชนิดนี้ว่า อินซูลิน ในปี 1909 นอกจากนี้ยังมีการทดลองที่ได้พยายามศึกษาและแยก

อินซูลินออกจากตับอ่อนด้วยแอลกอฮอล์เพื่อนำไปใช้รักษาอาการของผู้ป่วยหวาน โดย Georg Ludwig zuler แต่เนื่องจากไม่มีการทำบริสุทธิ์ที่มากเพียงพอ การนำอินซูลินไปใช้ในครั้งนั้นจึงส่งผลข้างเคียงในการรักษา ทำให้การทดลองนี้ถูกยกเลิกไปในช่วงสงครามโลกครั้งที่ 1 ต่อมาในปี 1920 จากความร่วมมือของ Frederic Grant Banting แพทย์ชาวแคนนาดา และ Charles Herbert best แพทย์ชาวสหรัฐอเมริกา (รูปที่ 2.2) ได้ทดสอบฤทธิ์ของอินซูลินกับสุนัข โดยมี Jame R. Colip นักวิทยาศาสตร์เคมีเป็นผู้แยกอินซูลินจากตับอ่อน ในปี 1921 จากผลการทดลอง เมื่อทำให้สุนัขตัวแรกเป็นเบาหวานจากการตัดเอาตับอ่อนออกหมด พร้อมกับทำการสกัดสารอินซูลินจากสุนัขตัวที่ 2 โดยมัดท่อที่ผลิตน้ำย่อยของตับอ่อนของสุนัข ผลปรากฏว่าตับอ่อนไม่สามารถสร้างเอนไซม์ได้อีก แต่เซลล์ไอเลตส์ออฟแลงเกอร์ฮานส์ (islets of Langerhans) ยังทำงานได้เป็นปกติ จากนั้นจึงได้ทำการแยกของเหลวที่อยู่ในไอเลตส์ออฟแลงเกอร์ฮานส์ออกมา พร้อมทั้งฉีดกลับเข้าทางเส้นเลือดดำในสุนัขตัวแรกที่เป็นเบาหวาน ซึ่งของเหลวที่ถูกฉีดเข้าไปในสุนัขนั้นจะถูกเรียกว่า ไอเลตทิน (isletin) ผลคือสุนัขมีระดับน้ำตาลในเลือดและในปัสสาวะลดต่ำลง ต่อมา Banting และคณะ ได้เริ่มการศึกษาและพัฒนาต่อยอดเพื่อใช้ในการรักษาผู้ป่วยเบาหวาน จนในท้ายที่สุดสามารถใช้รักษาผู้ป่วยได้จริง และเป็นที่แพร่หลาย จนในท้ายที่สุด Banting และคณะ ได้รับรางวัล โนเบลสาขาการแพทย์ในปี 1923 (Joshi et al., 2007)

รูปที่ 2.2 Frederic Grant Banting และ Charles Herbert best แพทย์ผู้ค้นพบวิธีรักษาผู้ป่วยเบาหวาน (DiabetesUK, 2013)

หลังจากนั้นในปี 1955 Frederick Sanger (รูปที่ 2.3) และคณะ ได้พบโครงสร้างของลำดับกรดอะมิโนของอินซูลินในวัว จนในปี 1958 Sanger ได้รับรางวัลโนเบล โดยพบว่าอินซูลินประกอบด้วย 2 สายเปปไทด์ (สาย A และสาย B) เชื่อมต่อกันด้วยสายไดซัลไฟด์ (disulfide bridge)

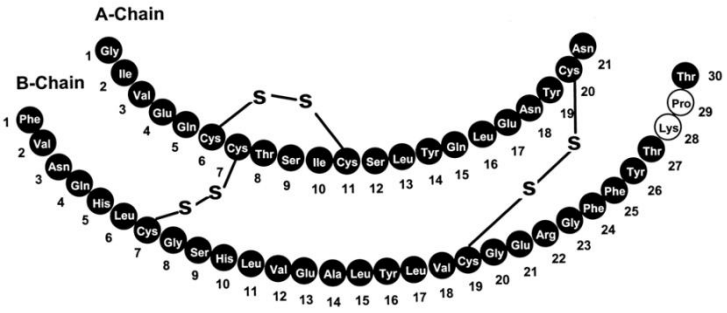
2 ที่ คือระหว่างสองสายเปปไทด์และภายในเปปไทด์สายเอเอง ต่อมา Donald Steiner และ P.E. Oyer ได้มีการค้นพบพรีโปรอินซูลิน (preproinsulin) และโปรอินซูลิน (proinsulin) ในปี 1967 ทำให้ทราบว่าในตอนแรกอินซูลินนั้นมาจากเปปไทด์สายเดียวก่อน นอกจากนี้จากการศึกษาของ Sanger ยังเป็นจุดเริ่มต้นที่นักวิจัยหลายคนสนใจ อาทิ Helmuth Zalm (1965), Katsyoannis และ Tonatsko (1966) ที่ได้ศึกษาการผลิตอินซูลินสังเคราะห์ จากการใช้แบคทีเรีย (*Escherichia coli*) เป็นเซลล์เจ้าบ้านโดยใช้กระบวนการและเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเพื่อผลิตอินซูลินให้แก่ผู้ป่วยเบาหวาน ซึ่งอินซูลินที่ได้จะถูกเรียกว่า รีคอมบิแนนท์อินซูลิน (Joshi et al., 2007)

รูปที่ 2.3 Frederick Sanger นักชีวเคมีผู้คนพบโครงสร้างลำดับกรดอะมิโนของอินซูลินในวัว (Nobelmedia, 2014)

2.1.3 โครงสร้างของอินซูลิน

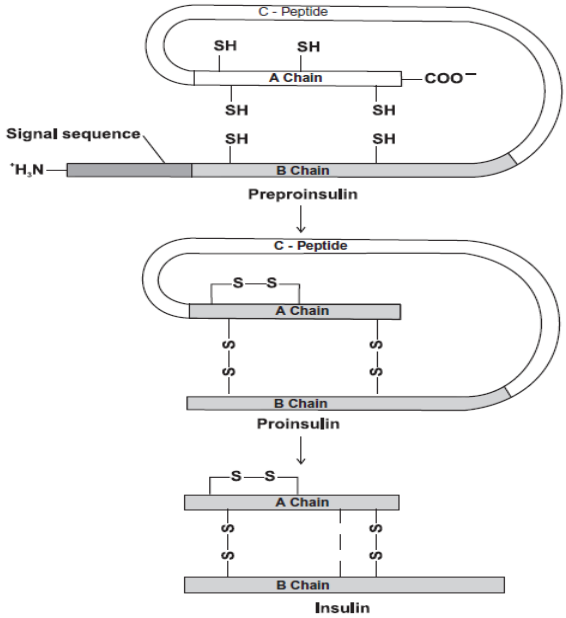
อินซูลินมีน้ำหนักโมเลกุลเท่า 5808 ดาลตัน (Da) และประกอบไปด้วยเปปไทด์ 2 สาย ได้แก่ สายเอ (A chain) และ สายบี (B chain) โดยที่ในเปปไทด์สายเอ จะมีกรดอะมิโนเป็นจำนวน 21 ตัว ในขณะที่เปปไทด์สายบี มีกรดอะมิโนทั้งสิ้น 30 ตัว รวมแล้วอินซูลินจะมีกรดอะมิทั้งสิ้น 51 ตัว ซึ่งในระหว่างสายเปปไทด์ เอ และ บี จะมีพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) เกิดขึ้น เช่นเดียวกับภายในเปปไทด์สายเอเอง (รูปที่ 2.4) สำหรับปลายทางด้าน N-terminal จะค่อนข้างต่างกันในสัตว์ต่างสปีชีย์ (species) กัน ส่วนทางด้าน C-terminal ซึ่งเป็นส่วนที่มีบทบาทในการทำหน้าที่ของอินซูลินจะค่อนข้างคล้ายคลึงกัน โดยที่อินซูลินอยู่ในร่างกายของคนจะอยู่ในรูปของ อินซูลินเฮกซาเมอร์ (insulin hexamer) ซึ่งมีลักษณะสมมาตร 3 ด้านและยึดกันอยู่โดยมีสังกะสี (zinc) เป็นอะตอมกลาง อย่างไรก็ตามอินซูลินในรูปแบบที่ออกฤทธิ์หรือทำงานได้จะอยู่ในรูปของอินซูลินมอนอเมอร์ (monomer) ซึ่ง

เมื่ออยู่ในกระแสเลือดอินซูลินจะมีค่าครึ่งชีวิตที่สั้นมากประมาณ 4-5 นาที เท่านั้น (Burtis, and Ashwood, 1999)



รูปที่ 2.4 โครงสร้างทางโมเลกุลของอินซูลิน (Phamafactz, 2015)

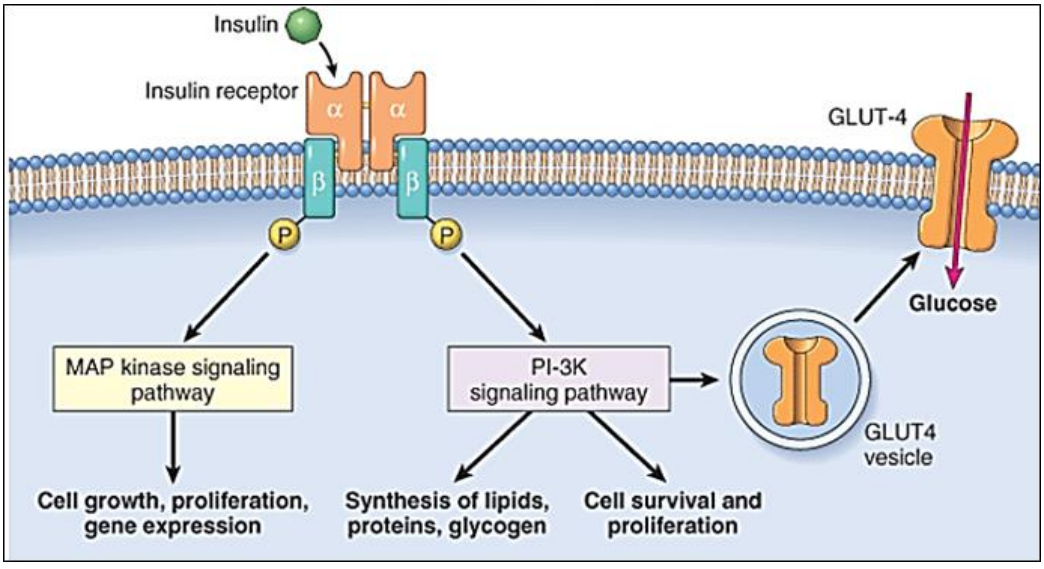
ในตอนแรกอินซูลินที่ผลิตได้จากเบตาเซลล์จะอยู่ในรูปของพรีโปรอินซูลิน จากนั้นจะถูกตัดด้วยเอนไซม์จนเป็นโปรอินซูลิน ซึ่งยังคงมีเปปไทด์สายซี (C chain) ติดอยู่ สุดท้ายเปปไทด์สายซีจะถูกตัดออกไปเพื่อให้อินซูลินออกฤทธิ์หรือทำงานได้ (Burtis, and Ashwood, 1999) ดังแสดงในรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 แสดงขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงของอินซูลินจากพรีโปรอินซูลิน โปรอินซูลินและอินซูลิน (Joshi et al., 2007)

2.1.4 กลไกการทำงานของอินซูลิน

การทำงานของอินซูลินเริ่มมาจาก อินซูลินเข้าไปจับกับตัวรับที่จำเพาะ (insulin receptor) ซึ่งเป็นเอนไซม์ไทโรซีนไคเนส (tyrosine kinase) ที่ถูกกระตุ้นได้โดยอินซูลิน โดยโครงสร้างของตัวรับที่จำเพาะนี้จะอยู่บนผิวของเซลล์ทุกชนิดในร่างกาย ได้แก่ เซลล์ที่อินซูลินออกฤทธิ์โดยตรง เช่น เซลล์ตับ เซลล์กล้ามเนื้อลายและเนื้อเยื่อไขมัน กับ เซลล์อื่นๆ ทั่วไป เช่น เซลล์เม็ดเลือด insulin receptor จะมีลักษณะเป็นเฮเทอโรเตตระเมอร์ (heterotetramer) ที่ประกอบไปด้วย หน่วยของอัลฟา (α-subunit) และหน่วยของเบตา (β-subunit) อย่างละ 2 หน่วยอยู่ด้วยกัน โดยที่ α-subunit จะอยู่ที่ผิวของเซลล์ซึ่งจะมีส่วนที่สามารถจับกับอินซูลินได้ ในขณะที่ β-subunit จะอยู่ด้านในของเซลล์ และมีส่วนของ ไทโรซีนไคเนสแอคทิวิตี (tyrosine kinase activity) อยู่ เมื่อมีอินซูลินเข้ามากระตุ้น จะเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ α-subunit จนมีฤทธิ์ในการกระตุ้นการทำงานของเอ็นไซม์ไทโรซีนไคเนส ที่อยู่ในส่วนของ β-subunit ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยาออโตฟอสโฟรีเลชัน (autophosphorylation) คือ เกิดการเติมหมู่ฟอตเฟต (phosphate group) ให้กับกรดอะมิโนเอง จากนั้นจะมีการส่งสัญญาณต่อไปเรื่อยๆ จนสุดท้ายไปกระตุ้นการทำงานของตัวขนส่งกลูโคส (glucose transporter; GLUT) ซึ่งอยู่ที่ผิวเซลล์ให้ทำงานแล้วนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ต่อไป (Nakae et al., 2001) ดังแสดงในรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 กลไลการทำงานของอินซูลิน (Chhabra, 2014)

2.1.5 ประเภทของอินซูลิน

ในปัจจุบันประเภทของอินซูลินนิยมแบ่งตามระยะเวลาการออกฤทธิ์ ได้แก่

2.1.5.1 ประเภทที่ให้ผลการรักษาอย่างรวดเร็ว (rapid acting insulin)

เป็นอินซูลินที่ออกฤทธิ์เร็วประมาณ 5-10 นาทีแรก และใช้เวลาในการทำงานประมาณ 3-5 ชั่วโมง สามารถแบ่งออกเป็นสามกลุ่มหลักๆ ได้แก่ อินซูลิน lispro ที่ได้จากการสลับลำดับของกรดอะมิโนโปรลีน (proline) ตำแหน่งที่ 28 กับกรดอะมิโนไลซีน (lysine) ตำแหน่งที่ 29 ที่อยู่บนเปปไทด์สายบี ของ human regular insulin อินซูลิน aspart เป็นอินซูลินที่ได้จากการนำแอสปาร์เตต (aspartate) มาแทนกรดอะมิโนโปรลีน ที่ตำแหน่งที่ 28 ที่อยู่บนเปปไทด์สายบี และสุดท้าย คือ อินซูลิน glulisine ได้มาจากการให้กรดกลูตามิก (glutamic acid) แทนที่ไลซีนที่ตำแหน่งที่ 29 และนำไลซีนมาแทนที่ แอสพาราจีน (asparagine) ที่ตำแหน่งที่ 3 บนเปปไทด์สายบีของ human regular insulin

2.1.5.2 ประเภทที่ให้ผลการรักษาค่อนข้างเร็ว (short acting insulin)

อินซูลินประเภทนี้จะเริ่มต้นการทำงานภายใน 30 นาทีแรก และมีระยะเวลาในการออกฤทธิ์ประมาณ 5-8 ชั่วโมง ได้แก่ อินซูลิน actrapid และ อินซูลิน regular

2.1.5.3 ประเภทที่ให้ผลกลางๆ (intermediate acting insulin)

อินซูลินประเภทนี้ออกฤทธิ์ไม่เร็วมากนัก จะเริ่มต้นทำงานภายใน 1-3 ชั่วโมง และมีระยะเวลาในการออกฤทธิ์ประมาณ 10-18 ชั่วโมง สำหรับอินซูลินประเภทนี้จะได้แก่ อินซูลิน neutral protamine hagedorn (NPH) โดยจะมีการเติมโปรตามีน (protamine) และสังกะสี (zinc) เข้าไป

2.1.5.4 ประเภทที่ออกฤทธิ์ยาวนาน (long acting insulin)

อินซูลินประเภทนี้จะเริ่มต้นทำงานภายใน 4-6 ชั่วโมง แต่จะมีระยะเวลาในการออกฤทธิ์ที่ยาวนาน คือ ประมาณ 20-24 ชั่วโมง อินซูลินประเภทนี้ ได้แก่ อินซูลิน glagine อินซูลิน detemir และ อินซูลิน ultralente เป็นต้น

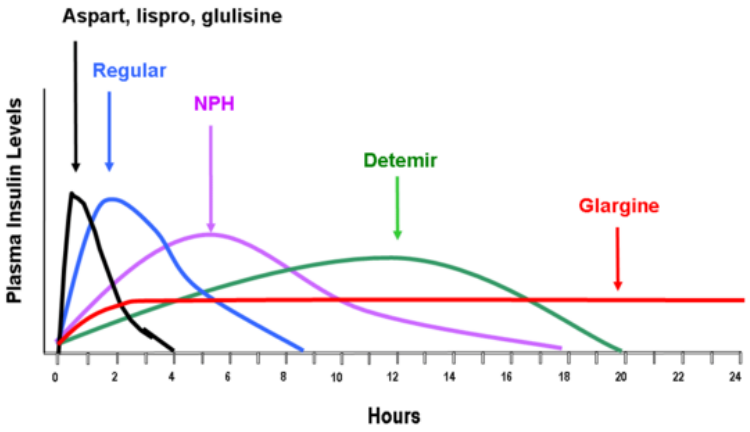
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.1.5.5 ประเภทที่ผสมอินซูลิน 2 ชนิดรวมกันใน 1 ขวด (combination, mixed)

อินซูลินประเภทนี้มักจะเริ่มทำงานภายใน 30 นาที และจะมีระยะเวลาในการออกฤทธิ์ประมาณ 10-16 ชั่วโมง มีทั้งแบบที่ผสมเสร็จแล้ว เช่น ชนิด 70/30; 70% NPH และ 30% regular (mixtrad 30, humulin 70/30) ชนิด 75% protaminated lispro และ 25% lispro (Humalog mix 25) และยังมีแบบที่สามารถนำมาผสมได้เอง อีกด้วย (Blair, 2016; Mahidol, 2015; WebMD, 2005) อย่างไรก็ตามสำหรับชนิด และคุณสมบัติของอินซูลินที่ใช้ในผู้ป่วยเบาหวาน รวมถึงการออกฤทธิ์ของอินซูลินจะแสดงในรูปที่ 2.7 และ 2.8 ตามลำดับ

Preparation	**Trade name**	**Timing of Action**		
		Onset	**Peak**	**Duration**
Rapid-acting insulin				
Lispro	Humalog	15-30 นาที	30-90 นาที	3-5 ชั่วโมง
Aspart	Novorapid			
Short acting insulin				
Regular	Humulin R	30-60 นาที	1-2 ชั่วโมง	5-8 ชั่วโมง
	Actrapid HM			
Intermediate acting insulin				
NPH (isophane)	Humulin	2-4 ชั่วโมง	6-10 ชั่วโมง	10-16 ชั่วโมง
	Insulatard			
Lente (insulin zinc suspension)	Monotard	3-4 ชั่วโมง	6-12 ชั่วโมง	12-18 ชั่วโมง
Long acting insulin				
Glargine	Lantus	1-2 ชั่วโมง	Less peak	24 ชั่วโมง
Detemir	Levemir	1-2 ชั่วโมง	Less peak	20-22 ชั่วโมง
Pre-mixed insulin				
70%NPH / 30%Regular	Humulin 70/30	30-60 นาที	Dual	10-16 ชั่วโมง
	Mixtard30			
75% protaminated Lispro / 25% Lispro	Humalog mix 25	15-30 นาที	Dual	10-16 ชั่วโมง
70% Protaminated aspart / 30% aspart	Novomix 30	15-30 นาที	Dual	10-16 ชั่วโมง

รูปที่ 2.7 ชนิดและคุณสมบัติของอินซูลิน ที่ใช้ในผู้ป่วยเบาหวาน มหาวิทยาลัยมหิดล (Mahidol, 2015)



รูปที่ 2.8 การออกฤทธิ์ของอินซูลิน (Worldpress, 2009)

2.2 โรคเบาหวาน

2.2.1 ความหมายของโรคเบาหวาน

โรคเบาหวาน เป็นกลุ่มอาการที่ผู้ป่วยมีภาวะของระดับน้ำตาลกลูโคสในกระแสเลือดที่สูงกว่าปกติ หรือเรียกว่า ไฮเปอร์ไกลซีเมีย (hyperglycemia) ซึ่งสาเหตุของการเกิดเบาหวานจะเกิดจากการขาดฮอร์โมนอินซูลินหรือประสิทธิภาพในการทำงานของอินซูลินลดต่ำลง ทำให้ผู้ป่วยเบาหวานไม่สามารถนำน้ำตาลในเลือดไปใช้เป็นพลังงานได้ตามปกติ ซึ่งหากไม่ได้รับการรักษาที่เหมาะสมและมีอาการเรื้อรังจะผลให้เกิดโรคแทรกซ้อนตามอวัยวะต่างๆที่รุนแรงขึ้นได้

2.2.2 ชนิดของโรคเบาหวาน

องค์การอนามัยโลก (World Health Organization; WHO) และองค์กรเบาหวานแห่งประเทศอเมริกา (American Diabetes Association; ADA) ได้มีการกำหนดแบ่งประเภทของโรคเบาหวานไว้ ดังนี้

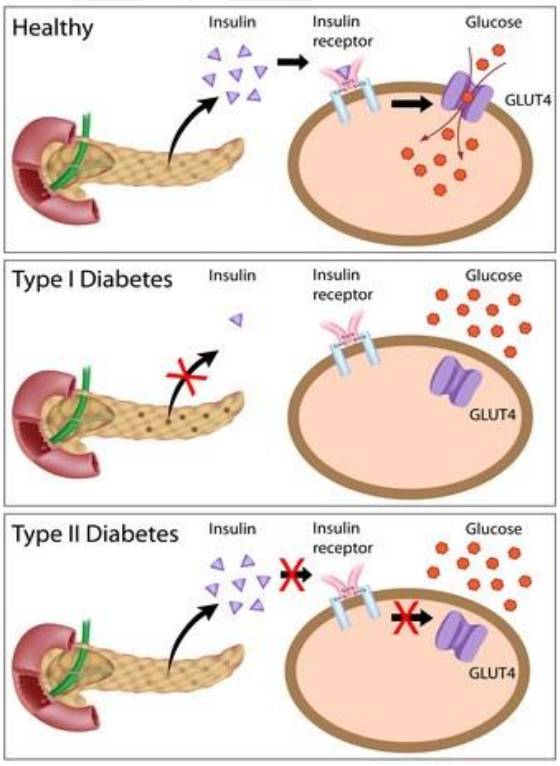
2.2.2.1 โรคเบาหวานชนิดที่ 1 (Type 1 diabetes)

โรคเบาหวานชนิดที่ 1 ส่วนมากพบในคนที่มีอายุน้อยกว่า 35 ปี รูปร่างผอม มีอาการปัสสาวะและกระหายน้ำบ่อย (polydipsia) รวมถึงหายใจถี่และเร็ว มีโอกาสที่จะหมดสติได้ในท้ายที่สุดโรคเบาหวานชนิดนี้เกิดจากการที่ร่างกายมีระดับน้ำตาลในเลือดสูงกว่าปกติอันเนื่องมาจากเบตาเซลล์ของตับอ่อนถูกทำลายโดยระบบภูมิคุ้มกันของตัวเอง ผู้ป่วยจึงไม่สามารถสร้างอินซูลินได้ ทำให้ผู้ป่วยจำเป็นต้องได้รับอินซูลินจากภายนอก อย่างไรก็ตามสาเหตุโรคเบาหวานชนิดนี้

อาจเกิดได้จากทั้ง ทางพันธุกรรม ความผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกัน หรือ จากการติดเชื้อไวรัส (virus) อีกด้วย (รูปที่ 2.9)

2.2.2.2 โรคเบาหวานชนิดที่ 2 (Type 2 diabetes)

โรคเบาหวานชนิด 2 เกิดจากการมีน้ำตาลกลูโคสในกระแสเลือดสูง เนื่องมาจาก ร่างกายมีภาวะดื้อต่ออินซูลินหรือมีการตอบสนองต่ออินซูลินที่ลดต่ำลงร่วมกับความผิดปกติของการหลั่งฮอร์โมน ผู้ป่วยส่วนใหญ่จึงมีระดับของน้ำตาลกลูโคสและอินซูลินในกระแสเลือดสูง โรคเบาหวานชนิดนี้พบได้ประมาณ 90% ของจำนวนผู้ป่วยโรคเบาหวานทั้งหมด ส่วนมากพบในผู้ที่มีอายุมากกว่า 40 ปีขึ้นไป นอกจากนี้ยังมีปัจจัยเสี่ยงที่มีผลอย่างมากต่อโอกาสในการเกิดโรคเบาหวานชนิดนี้ เช่น พันธุกรรม อายุ และความอ้วน เป็นต้น (รูปที่ 2.9)



รูปที่ 2.9 ลักษณะการทำงานของอินซูลินในคนปกติกับผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 1 และ 2 (Worldpress, 2014)

2.2.2.3 โรคเบาหวานที่มีสาเหตุจำเพาะอื่นๆ (Other specific type of diabetes)

โรคเบาหวานชนิดนี้จะมีสาเหตุมาจากความผิดปกติทางด้านอื่นๆได้แก่ ความผิดปกติทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเบตาเซลล์มีโรคที่เกี่ยวของกับตับอ่อนหรือต่อมไร้ท่อ รวมถึงการได้รับยาหรือสารเคมีบางกลุ่มที่ส่งผลให้การทำงานของตับรับจำเพาะของอินซูลิน (insulin receptor) มีประสิทธิภาพลดต่ำลง ทำให้มีระดับน้ำตาลในเลือดสูงกว่าปกติในท้ายที่สุด

2.2.2.4 โรคเบาหวานในหญิงมีครรภ์ (Gestational diabetes mellitus; GDM)

โรคเบาหวานชนิดนี้เกิดจากการเปลี่ยนของเมตาบอลิซึม (metabolism) และฮอร์โมน (hormone) ในระหว่างตั้งครรภ์ โดยผู้ป่วยจะมีอาการที่ไม่ทนต่อกลูโคสส่วนใหญ่มักพบในช่วงระยะสุดท้ายของการตั้งครรภ์ ผู้ป่วยบางรายจะสามารถหายเป็นปกติเองได้หลังจากคลอดบุตร อย่างไรก็ตามโรคเบาหวานชนิดนี้จะส่งผลให้เกิดโรคแทรกซ้อนที่อาจเกิดขึ้นก่อนคลอด รวมถึงเพิ่มโอกาสเสี่ยงในการป่วยเป็นเบาหวานให้แก่เด็กในครรภ์ เด็กที่อยู่ในครรภ์ของมารดาที่เป็นเบาหวานจะถูกกระตุ้นให้มีการผลิตอินซูลินมากขึ้น อาจส่งผลให้เกิดภาวะช็อค (shock) และเสียชีวิตได้ในขณะคลอด เนื่องจากภาวะที่ร่างกายมีกลูโคสมากเกินไปจะหยุดลงในขณะที่อินซูลินในกระแสเลือดยังคงสูงอยู่ ดังนั้น อาจเกิดภาวะที่มีกลูโคสในกระแสเลือดต่ำ (hypoglycemia) ได้ในเด็ก นอกจากนี้เด็กที่เกิดจากมารดาที่ป่วยเป็นเบาหวานนั้นจะมีโอกาสเสี่ยงในการป่วยเป็นโรคต่างๆ เช่น โรคพัฒนาการของทางเดินหายใจที่ไม่สมบูรณ์ (respiratory distress syndrome) และภาวะแคลเซียมในเลือดต่ำ (hypocalcemia) อีกด้วย (Ta, 2014)

2.2.3 โรคแทรกซ้อนที่อาจเกิดขึ้นในผู้ป่วยเบาหวาน

โรคแทรกซ้อนในผู้ป่วยเบาหวาน แบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท ดังนี้

2.2.3.1 โรคแทรกซ้อนแบบเฉียบพลัน (Acute complications)

ภาวะกลูโคสในเลือดสูง (Hyperglycemia, Hyperosmolar non ketotic syndrome; HHNK) ส่วนมากพบในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 คือ ร่างกายสามารถสร้างอินซูลินได้บ้างแต่มีปริมาณไม่เพียงพอต่อความต้องการ มักตรวจไม่พบคีโตนในเลือดหรือในปัสสาวะ โรคแทรกซ้อนชนิดนี้เกิดจากการที่ร่างกายของผู้ป่วยเบาหวานมีระดับน้ำตาลกลูโคสในกระแสเลือดสูงมากมากกว่า 600 $mg.dl^{-1}$ ส่งผลให้เกิดการดึงน้ำออกจากเซลล์และทำให้เซลล์ขาดน้ำอย่างรุนแรง ทำให้ผู้ป่วยมีอาการอ่อนเพลีย เหนื่อยง่าย และอาจหมดสติได้ (Fourtner et al., 2005)

ภาวะกลูโคสในเลือดต่ำ (hypoglycemia) พบได้บ่อยทั้งในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 1 และในผู้ป่วยหวานชนิดที่ 2 เกิดเนื่องจากผู้ป่วยเบาหวานมีระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดต่ำกว่า 50 $mg.dl^{-1}$ ซึ่งสาเหตุที่ทำให้เกิดภาวะนี้มีได้หลายสาเหตุ เช่น ผู้ป่วยรับประทานอาหารไม่ตรงต่อเวลา ออกกำลังกายหรือทำงานหนักมากเกินไปและการกินยาหรือฉีดอินซูลินเกินขนาด ส่งผลให้ผู้ป่วยมีอาการเหงื่อออกท่วมตัว ตัวเย็น ใจสั่น หน้ามืด หน้าซีด ในผู้ป่วยบางรายอาจมีอาการชักและหมดสติได้ในที่สุด

ภาวะเป็นกรดในเลือดเนื่องจากสารคีโตน (diabetic ketoacidosis; DKA) ภาวะนี้จะเกิดจากการที่ร่างกายของผู้ป่วยเบาหวานใช้พลังงานจากกลูโคสไม่ได้ จึงจำเป็นต้องใช้พลังงานจากไขมันส่งผลให้ในกระแสเลือดมีสารคีโตนเกิดขึ้น ซึ่งสารกลุ่มนี้จะประกอบไปด้วย กรดเบตา-ไฮดรอกไซบิวไทริก (beta-hydroxybutyric acid) กรดอะซิโตอะซิติค (acetoacetic acid) และ อะซิโตน (acetone) สารเหล่านี้เมื่อมีอยู่ในร่างกายจำนวนมากจะทำให้เกิดภาวะกรดที่เรียกว่า ภาวะคีโตซีส (ketoacidosis) โดยภาวะแทรกซ้อนชนิดนี้สามรถพบได้ทั้งในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 1 และผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 ซึ่งสาเหตุอาจเกิดจากความเครียด หรือการควบคุมโรคในผู้ป่วยเบาหวานที่ไม่ดีเท่าที่ควร (Newton, and Raskin, 2004)

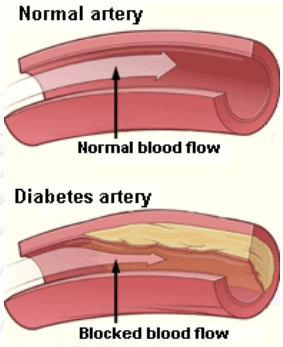
2.2.3.2 โรคแทรกซ้อนแบบเรื้อรัง (Chronic complications)

ผู้ป่วยเบาหวานทั้งชนิดที่ 1 และชนิดที่ 2 มีโอกาสเกิดโรคแทรกซ้อนตามอวัยวะต่างๆได้ ดังนี้

โรคความดันเลือดสูง (Hypertension) จะพบในผู้ป่วยเบาหวานมากกว่าในคนปกติถึง 2 เท่า ซึ่งสาเหตุของโรคนี้จะเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดขนาดเล็ก (microvascular complications) และเนื่องจาก ไตเป็นอวัยวะที่ทำหน้าที่กรองสารต่างๆในเลือดโดยตรง ไตจึงเป็นอวัยวะหลักที่จะได้รับผลกระทบโดยตรงจากการมีระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดที่สูงมากกว่าปกติของผู้ป่วยเบาหวาน ส่งผลให้ผู้ป่วยเบาหวานมักมีภาวะของโรคไตร่วมด้วย ซึ่งจะทำให้ผู้ป่วยมีความดันในกระแสเลือดสูงขึ้น เนื่องมาสาเหตุหลายประการ เช่น หน่วยไต (nephron) หรืออัตราการกรองของไตลดน้อยลง อย่าไรก็ตามสำหรับในกรณีของผู้ป่วยเบาหวานที่ไม่มีอาการแทรกซ้อนของโรคไตก็สามารถมีความดันในเลือดสูงได้ โดยมักมีสาเหตุมาจาก วิธีการดำเนินชีวิตที่ไม่เหมาะสมของผู้ป่วย รวมถึงการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเองในขณะที่มีภาวะน้ำตาลในเลือดสูง (เครสซี่, 2558)

โรคของหัวใจและหลอดเลือด เกิดจากการเปลี่ยนแปลงที่มีผลกระทบต่อหลอดเลือดขนาดใหญ่ (macrovascular) ซึ่งกรณีที่มีระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดสูงจะทำให้เกิดภาวะ อาเธอโรสเคลอโรซิส (atherosclerosis) ซึ่งเป็นภาวะที่หลอดเลือดแดงแข็งเนื่องจากมีคราบไขมันมาสะสม

(รูปที่ 2.10) ส่งผลให้หลอดเลือดตีบและมีเลือดไปเลี้ยงอวัยวะต่างๆไม่เพียงพอ ถ้าหลอดเลือดที่ไปเลี้ยงหัวใจตีบตันจะทำให้เกิดโรคกล้าเนื้อหัวใจขาดเลือด (myocardial infarction) หรือกล้ามเนื้อหัวใจตายเฉียบพลัน เป็นผลให้เกิดอาการของโรคหัวใจ เจ็บบริเวณหัวใจหรือร้าวไปที่แขนตลอดจนขากรรไกร หรืออาจเสียชีวิตโดยฉับพลันได้ ในกรณีที่เป็นบริเวณหลอดเลือดที่สมอง จะทำให้เส้นเลือดในสมองตีบตัน มีโอกาสที่จะเป็นอัมพาต หมดสติ และเสียชีวิตได้ในท้ายที่สุด อย่างไรก็ตาม โรคหลอดเลือดหัวใจเป็นสาเหตุการเสียชีวิตที่พบได้บ่อยที่สุดในผู้ป่วยเบาหวานถึงประมาณร้อยละ 75 ของผู้ป่วยเบาหวานทั้งหมด (Astrup, 2011; Xu, and Zou, 2009)



รูปที่ 2.10 หลอดเลือดใหญ่ของคนปกติกับหลอดเลือดของผู้ป่วยเบาหวาน (Healthy-ojas, 2016)

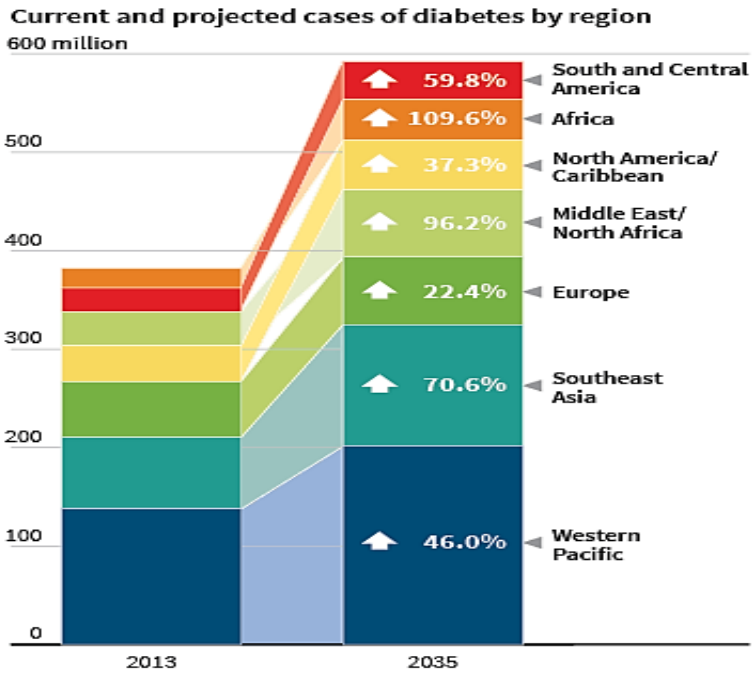
โรคของจอตา เป็นโรคที่เกิดขึ้นเนื่องจากการเกิดภาวะแทรกซ้อนที่จอตาทำให้ตาบอด โดยลักษณะความผิดปกติที่เกิดขึ้นจะเกิดจาก การมีภาวะน้ำตาลในเลือดสูงทำให้หลอดเลือดบริเวณตามีความผิดปกติ โดยการสะสมของสารฟลูออเรสซีน (fluorescein) และซอร์บิทอล (sorbital) ที่เรตินา (retina) และลูกตา (vitreous) ซึ่งสารซอบิทอลนี้เป็นสารที่ถูกเปลี่ยนมาจากน้ำตาลกลูโคส การสะสมของสารเหล่านี้จะไปกระทบต่อการมองเห็นของผู้ป่วย เนื่องจากการเกิดอาการหลุดลอกของจอตาในส่วนของการมองเห็นนำไปสู่ภาวะต้อหินหรือต้อกระจก ในผู้ป่วยเบาหวานบางรายอาจมีอาการตาบอดเฉียบพลัน อีกด้วย (Cheung et al., 2005; Robinson et al., 1990)

โรคของประสาทส่วนปลาย ประสาทสมองหรือประสาทในช่องท้อง โรคแทรกซ้อนนี้จะเกิดเนื่องจากการสะสมของสารซอร์บิทอล (sorbital) ที่มาจากการมีภาวะของน้ำตาลในเลือดสูงทำให้เซลล์ของประสาทเสื่อมลง ทำให้การนำความรู้สึกลดลง นอกจากนี้การอุดตันของหลอดเลือดที่ไปเลี้ยงสมองก็จะส่งผลให้สมองขาดออกซิเจน (oxygen) อาการของปลายประสาทนี้จะเป็นมากขึ้นเมื่อผู้ป่วยเป็นเบาหวานมานาน เริ่มต้นจะมีอาการชาบริเวณปลายเท้า กล้าเนื้อโคนขาลีบและไม่มีแรง ในผู้ป่วย

เบาหวานบางรายจะมีอาการอักเสบที่ปลายประสาทบริเวณสมองร่วมด้วย ทำให้มีอาการหนังตาตก ตาเหล่ ซึ่งอาการเหล่านี้สามารถรักษาให้หายได้ภายใน 6-8 สัปดาห์ ในกรณีมีการอักเสบที่บริเวณประสาทซี่โครง จะส่งผลให้มีอาการเจ็บหน้าอก หรือ มีอาการคล้ายงูสะหวัด (herpes zoster) เกิดขึ้นได้ (Kawai et al., 2010)

2.2.4 แนวโน้มของโรคเบาหวานในปัจจุบัน

ในปัจจุบันโลกมีประชากรที่ป่วยด้วยโรคเบาหวานเพิ่มสูงขึ้นในทุกๆ ปี โดยในปี 2035 มีการคาดการณ์ว่าผู้ป่วยโรคเบาหวานจะเพิ่มสูงขึ้นจากเดิมถึงร้อยละ 55 จากผู้ป่วยเบาหวานในปี 2013 และเมื่อพิจารณาแยกเป็นทวีป จะเห็นว่าทวีปในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ถือเป็น 1 ใน 3 ทวีปที่ถูกคาดการณ์ว่าจะมีอัตราการเพิ่มขึ้นของผู้ป่วยโรคเบาหวานมากที่สุด รองจากทวีปแอฟริกาและประเทศในแถบตะวันออกกลางรวมถึงแอฟริกาเหนือที่มีอัตราการเพิ่มขึ้นของผู้ป่วยเบาหวานสูงมากที่สุดถึงร้อยละ 109.6 และ 96.2 ตามลำดับ (รูปที่ 2.11) นอกจากนี้สมาพันธ์เบาหวานนานาชาติ (International Diabetes Federation; IDF) ยังได้มีการคาดการณ์ถึงจำนวนผู้ป่วยเบาหวานทั่วโลก พบว่า ในปี 2035 จะมีผู้ป่วยเป็นเบาหวานทั้งสิ้น 592 ล้านคน (Rizwan, 2016)



รูปที่ 2.11 อัตราการเพิ่มขึ้นของผู้ป่วยเบาหวานในปี 2035 (Rizwan, 2016)

สำหรับแนวโน้มของโรคเบาหวานในประเทศไทยนั้น ประเทศไทยได้ตระหนักถึงความสำคัญของโรคเบาหวาน และได้มีการสำรวจจำนวนของผู้ป่วยเบาหวานครั้งแรกในปี พ.ศ. 2508 พบว่า มีผู้ป่วยเบาหวานร้อยละ 2.3 ของประชากรที่นำมาศึกษาทั้งหมด ต่อมาในปี พ.ศ. 2514 สมาคมโรคเบาหวานแห่งประเทศไทยได้สำรวจประชากรทั่วประเทศอีกครั้ง พบว่ามีผู้ป่วยเบาหวานร้อยละ 2.5 ของประชากรที่นำมาศึกษาทั้งหมด นอกจากนี้พบว่าร้อยละ 75 ของผู้ป่วยเบาหวานเป็นประชากรที่มีอายุเกิน 40 ปี ขึ้นไป ในขณะที่เพศหญิงและเพศชายจะมีโอกาสป่วยเป็นโรคเบาหวานได้เท่าๆกัน หลังจากนั้นในปี 2530 พบว่า อัตราความชุกของผู้ป่วยเบาหวานที่มีอายุตั้งแต่ 20 ปี ขึ้นไปมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นถึงร้อยละ 4 เช่นเดียวกับประชากรที่มีอายุระหว่าง 30-60 ปี จะมีอัตราการเพิ่มขึ้นของผู้ป่วยเบาหวานประมาณร้อยละ 4-7 และสำหรับผู้สูงอายุที่อายุ 60 ปี ขึ้นไปจะมีอัตราการเพิ่มขึ้นของผู้ป่วยเบาหวานสูงถึงร้อยละ 10-15 อย่างไรก็ตามในปี 2552 พบว่า อัตราการป่วยเป็นเบาหวานในเพศหญิงมีมากกว่าเพศชายและส่งผลให้เกิดความสูญเสียถึงร้อยละ 8.6 และ 3.8 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามยังพบว่าในปี 2556 ประเทศไทยมีผู้เสียชีวิตด้วยโรคเบาหวาน 9,647 คน คิดเป็น 27 คนต่อวัน อีกด้วย (Federation, 2014; สำนักโรคไม่ติดต่อ., 2557)

2.3 เทคโนโลยีรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ (Recombinant DNA technology)

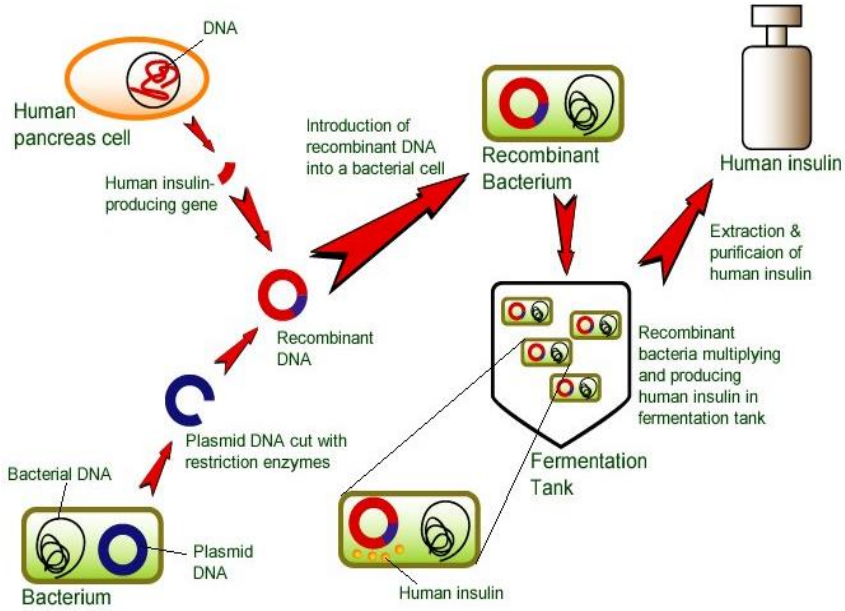
2.3.1 ความหมายของเทคโนโลยีรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ

เทคโนโลยีรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ เป็นเทคโนโลยีในการพัฒนาสิ่งมีชีวิตนั้นๆ ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงและปรับปรุงไป เช่น การกระตุ้น ยับยั้งหรือทำให้สิ่งมีชีวิตนั้นผลิตสารที่ต้องการ โดยการนำชิ้นส่วนของสารพันธุกรรม (genetic material; DNA) ที่ต้องการใส่เข้าไปในสิ่งมีชีวิตเพื่อที่จะนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆต่อไป ซึ่งสิ่งมีชีวิตที่ถูกปรับปรุงและเปลี่ยนแปลงไปจะถูกเรียกว่า ทรานสเจนิก ออแกนิซึม (transgenic organism) (แสงคำ, 2552)

2.3.2 การผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลิน

เทคโนโลยีรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ เป็นเทคโนโลยีที่ถูกนำมาใช้สำหรับกระบวนการผลิตอินซูลินโดยการนำชิ้นส่วนของยีน (gene) ที่สามารถผลิตอินซูลิน มาต่อกับพลาสมิด (plasmid) แล้วนำเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (host cell) เช่น แบคทีเรีย (bacteria) หรือยีสต์ (yeast) เพื่อผลิตอินซูลินสังเคราะห์ โดยอินซูลินที่ผลิตได้ จะถูกเรียกว่า รีคอมบิแนนท์อินซูลิน (recombinant insulin) ดังแสดงให้เห็นในรูปที่ 2.12 ซึ่งสามารถนำมาพัฒนาตลอดจนทำบริสุทธิ์เพื่อให้ใช้ทดแทนอินซูลินที่สกัด

มาจากตับอ่อนหมูหรือวัวได้ ทั้งนี้ในปัจจุบันประเทศไทยยังคงอาศัยการนำเข้ารีคอมบิแนนท์อินซูลินจากต่างประเทศด้วยทั้งสิ้น อย่างไรก็ตามสำหรับปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินนั้นสามารถแบ่งออกเป็น 2 ส่วนหลักๆ ได้แก่ การสร้างชิ้นส่วนของสารพันธุกรรม (construction) และปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลิน (production)



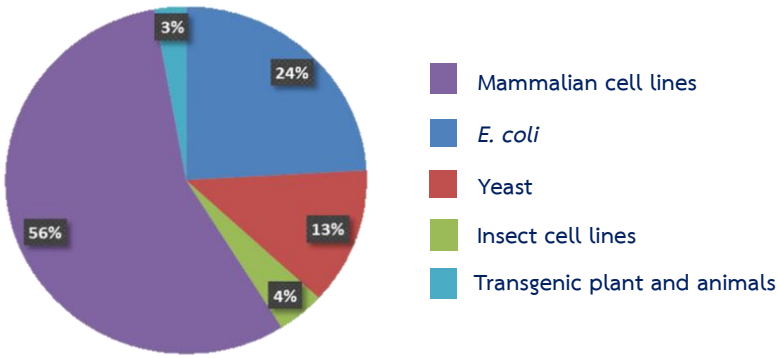
รูปที่ 2.12 กระบวนการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลิน (Swamy, 2016)

จำนวนชุดของยีน (copy number) ถือเป็นหนึ่งในปัจจัยหลักของการสร้างชิ้นส่วนทางพันธุกรรมที่จะมีผลต่อปริมาณของอินซูลินที่ผลิตได้โดยตรง ดังแสดงให้เห็นในตารางที่ 2.1 จะเห็นว่าอินซูลินแบบ mini-proinsulin และ porcine insulin precursor มีความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้นเมื่อเพิ่มจำนวนชุดของยีนนั้นๆจนกระทั่งระดับหนึ่งที่มีจำนวนชุดของยีนมากเกินไป ปริมาณอินซูลินที่ผลิตได้จะลดต่ำลง เนื่องจากข้อจำกัดในการถอดและแปลรหัสพันธุกรรมหลายประการ ทั้งนี้จากงานวิจัยในปี 2005 และ 2009 พบว่า จำนวนชุดของยีนที่เหมาะสมในการผลิตอินซูลินเพื่อให้ได้ปริมาณความเข้มข้นที่มากที่สุดจะ เท่ากับ 11 และ 12 ตามลำดับ

ตารางที่ 2.1 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนชุดของอินซูลินยีนและความเข้มข้นที่ผลิตได้

Host cell	Copy number of gene	Product	Amount of product	Research (Ref.)
Pichia pastoris GS115	1 5 11	Mini-proinsulin	18.6 mg.l^{-1} 120 mg.l^{-1} 246 mg.l^{-1}	(Mansur et al., 2005)
Pichia pastoris GS115	1 3 6 12 18 29 52	Porcine insulin precursor	15 mg.l^{-1} 67 mg.l^{-1} 133 mg.l^{-1} 181 mg.l^{-1} 127 mg.l^{-1} 95 mg.l^{-1} 75 mg.l^{-1}	(Zhu et al., 2009)

นอกจากจำนวนชุดของยีนแล้ว ยังมีการเลือกใช้เซลล์เจ้าบ้าน ในการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินนั้น ที่เป็นอีกปัจจัยหนึ่งซึ่งมีผลกระทบต่อปริมาณของรีคอมบิแนนท์อินซูลิน จากแผนภาพนี้แสดงถึง ร้อยละของเซลล์เจ้าบ้านที่ถูกนำมาใช้ผลิตผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพ จากแผนภาพจะเห็นว่าเซลล์สัตว์ (mammalian cell lines) เอสเชอริเชีย โคไล (*E. coli*) และ ยีสต์ (yeast) ถูกนำมาใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้าน ถึงร้อยละ 56 , 24 และ 13 ตามลำดับ (รูปที่ 2.13)



รูปที่ 2.13 ร้อยละของการใช้เซลล์เจ้าบ้านแต่ละชนิดเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพ (Baeshen et al., 2014)

อย่างไรก็ตามการใช้เซลล์เจ้าบ้านเป็นเซลล์สัตว์ *E. coli* และยีสต์นั้น มีข้อดีและข้อด้อยที่แตกต่างกันไป ดังตารางที่ 2.2 เนื่องจากการใช้เซลล์สัตว์เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการผลิตผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพนั้นมีต้นทุนที่ค่อยข้างสูง ดังนั้นปัจจุบันหลายงานวิจัยจึงหันมาสนใจการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินโดยใช้ *E. coli* และยีสต์เป็นเซลล์เจ้าบ้านกันมากขึ้น

ตารางที่ 2.2 ข้อดีและข้อด้อยในการเลือกใช้เซลล์เจ้าบ้านแต่ละชนิด

Host cell	Advantage	Disadvantage
เซลล์สัตว์	- มีเวคเตอร์ในการใช้สร้างโปรตีน (expression vector) ที่หลากหลาย - โปรตีนที่ผลิตมีคุณสมบัติทางชีวภาพใกล้เคียงกันกับโปรตีนที่ต้องการ	- เซลล์สัตว์เลี้ยงยาก เจริญเติบโตช้า - ให้ผลผลิตต่ำ - ราคาแพง
E. coli	- มีการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม (genetics characteristics) กันอย่างแพร่หลาย - ได้ผลผลิตสูง - ราคาถูก	- โปรตีนที่ผลิตได้จะอยู่ในเซลล์ (intracellular product) - ผลิตสารพิษ (endotoxin) - มีปัญหาในการดัดแปลงโมเลกุลของโปรตีนหลังการแปลรหัส (post-translational modification)
ยีสต์	- เลี้ยงง่าย เจริญเติบโตไว - สายพันธุ์ส่วนมากอยู่ในลิสต์ของ GRAS (generally recognized as safe) - ได้ผลผลิตสูง - ผลิตโปรตีนออกมานอกเซลล์ (extracellular product) - ง่ายต่อการทำบริสุทธิ์	- ยังไม่มีการยอมรับเท่าที่ควร - การดัดแปลงโมเลกุลของโปรตีนหลังการแปลรหัสไม่เหมือนในเซลล์สัตว์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สำหรับงานวิจัยที่ใช้ *E. coli* เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการผลิตอินซูลิน จะเห็นว่าในปี 1997 สามารถใช้ *E. coli* ในการผลิตอินซูลินซึ่งได้ปริมาณอินซูลินสูงถึง 4.34 g.l^{-1}แต่การผลิตอินซูลินใน *E. coli* จะเกิดขึ้นภายในเซลล์ (intracellular product) ทำให้มีขั้นตอนที่ยากและซับซ้อนต่อการทำบริสุทธิ์ ต่อมางานวิจัยในปี 2000 และ 2004 มีการพัฒนาให้ *E. coli* สามรถผลิตโปรตีนออกมาภายนอกเซลล์ได้ หรือที่เรียกว่า extracellular product โดยจะมีความเข้มข้นของอินซูลินอยู่ที่ 0.0092 g.l^{-1} และ 0.009 g.l^{-1}ตามลำดับ ดังแสดงใน ตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 การผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินโดยใช้ *E. coli*

Strain	Type of culture	Medium	Products	Amount of product	Research (Ref.)
BL21	Fed batch bioreactor	Luria Broth (LB), Synthetic medium	Human mini-proinsulin **(intracellular product)**	4.34 g.l^{-1}	(Shin et al., 1997)
RB791	shake flask with batch culture	LB medium 0.4 M l-arginine	Proinsulin **(extracellular product)**	9.2 mg.l^{-1}	(Winter et al., 2000)
JM109	shake flask with batch culture	LB medium, Synthetic medium	Proinsulin **(extracellular product)**	9 mg.l^{-1}	(Mergulhao et al., 2004)

อย่างไรก็ตามจากการศึกษา พบว่า มีการใช้ยีสต์หลายสายพันธุ์เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลิน โดยสายพันธุ์หลักๆ จะเป็นกลุ่มของ *S. cerevisiae* และ *P. pastoris* ซึ่งจากตารางที่ 2.4 จะเห็นว่า ปริมาณของรีคอมบิแนนท์อินซูลินที่ได้จากเซลล์เจ้าบ้านในกลุ่ม *S. cerevisiae* ค่อนข้างต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับ *P. pastoris* โดยจากงานวิจัยในปี 2010 จะเห็นว่าปริมาณ *P. pastoris* สายพันธุ์ X33 สามารถผลิต Insulin precursor ได้สูงถึง 3.075 g.l^{-1} ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินโดยใช้ยีสต์ *P. pastoris* เป็นเซลล์เจ้าบ้านต่อไป

สำหรับปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินจะขอกล่าวถึงในหัวข้อ ปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ ต่อไป

ตารางที่ 2.4 การผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินโดยใช้ยีสต์

Strain	Type of culture	Products	Amount of product	Research (Ref.)
S. cerevisiae GcP3	Fed batch bioreactor	Recombinant human insulin-like growth factor 1	8.6 $mg.l^{-1}$	(Vai et al., 2000)
S. cerevisiae CEN.PK530-1C	Fermenter	Recombinant human insulin	4.8 $mg.l^{-1}$	(Liu et al., 2013)
P. pastoris GS115	Fermenter	B27 Lys destripeptide insulin	200 $mg.l^{-1}$	(Ding et al., 2005)
P. pastoris C27 (his4, HIS4)	Fed batch bioreactor	Recombinant human miniproinsulin (rhMPI)	105.37$mg.l^{-1}$	(Gil et al., 2011)
P. pastoris X33	Fed batch bioreactor	Insulin precursor	3.075 $mg.l^{-1}$	(Gurramkonda et al., 2010)

2.4 *Pichia pastoris*

P. pastoris เป็นเมธิลโลโทรฟิกยีสต์ (รูปที่ 2.14) หรือยีสต์ที่สามารถใช้เมทานอล (methanol) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเมทานอลจะถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ แอลกอฮอล์ออกซิเดส 1 และ แอลกอฮอล์ออกซิเดส 2 (alcohol oxidase 1; AOX1 และ alcohol oxidase 2; AOX2) ซึ่งเอนไซม์นี้จะถูกสังเคราะห์ภายใต้การควบคุมการทำงานโดย โปรโมเตอร์ของยีน *AOX* (*AOX* promotor) ซึ่งยีน *AOX 1* มีคุณสมบัติในการแสดงออกสูงประมาณร้อยละ 85 ขณะที่ *AOX 2* มีการแสดงออกเพียง ร้อยละ 15 ตามลำดับ (Daly, and Hearn, 2005) ทั้งนี้สายพันธุ์ของ *P. pastoris* สามารถแบ่งได้ 3 สายพันธุ์หลักๆ (ตารางที่ 2.5) ดังนี้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รูปที่ 2.14 *Pichia pastoris* (Martin, 2009)

2.4.1 *Pichia pastoris* X-33

P. pastoris X-33 เป็นสายพันธุ์ที่มีลักษณะปกติหรือดั้งเดิม (wild type) ที่มีลักษณะของการใช้เมทานอล (methanol utilization; MUT phenotype) เป็นแบบ Mut^+ คือมียีนแอลกอฮอล์ออกซิเดส 1 (*AOX1*gene) และยีนแอลกอฮอล์ ออกซิเดส 2 (*AOX2* gene) อยู่ครบทั้งสองยีน AOX2 ซึ่งทำให้ยีสต์สายพันธุ์นี้สามารถใช้เมทานอลในการเจริญเติบโตได้เป็นอย่างดี

2.4.2 *Pichia pastoris* GS115

P. pastoris GS115 ยีสต์สายพันธุ์นี้เป็นสายพันธุ์ที่มีการทำลายยีนที่ใช้สังเคราะห์ กรดอะมิโนฮีสทิดีน (Histidine) แต่ยังคงมี MUT phenotype เป็นแบบ Mut^+ เช่นเดียวกับสายพันธุ์ X33 เนื่องจากมียีน *AOX1* และ *AOX2* อยู่ครบ ส่งผลให้ยีสต์สายพันธุ์นี้สามารถเจริญเติบโตได้ดีเมื่อเมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนได้เช่นเดียวกัน

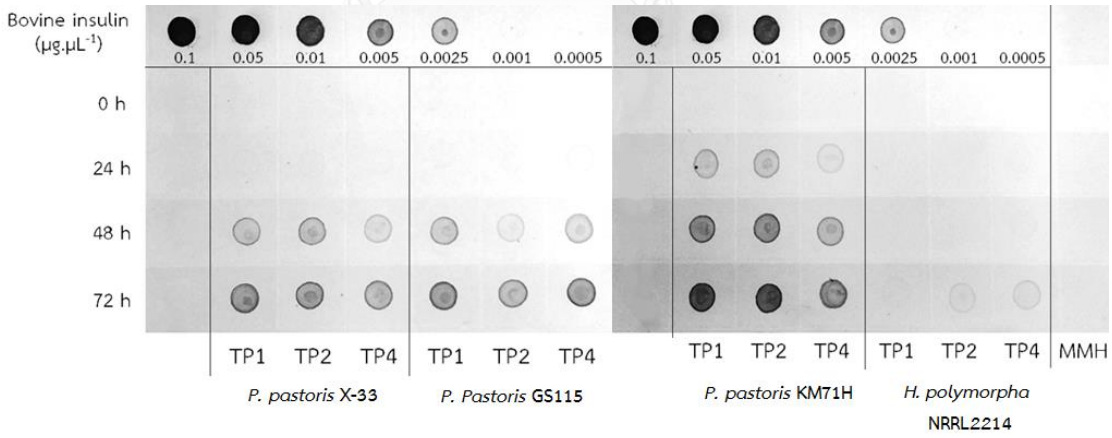
2.4.3 *Pichia pastoris* KM71H

P. pastoris KM71H เป็นสายพันธุ์ที่ถูกทำลายยีน *AOX1* ทำให้มีเพียงยีน *AOX2* ที่สามารถทำงานได้ ดังนั้นจึงมีลักษณะของการใช้เมทานอล หรือ MUT phenotype เป็นแบบ Mut^S (MUT slow) ซึ่งทำให้ยีสต์สายพันธุ์นี้ใช้เมทานอลในการเจริญเติบโตได้ในอัตราที่ไม่สูงมากนัก (Thermofisher., 2016)

ตารางที่ 2.5 สายพันธุ์ของ *P. pastoris* ที่แบ่งได้ตามลักษณะการใช้เมทานอล

Strain	Genotype	Methanol utilization (MUT)
X-33	*AOX1 AOX2*	Mut^{+}
GS115	*his4 AOX1 AOX2*	Mut^{+}
KM71H	*arg4 aox1::ARG4 AOX2*	Mut^{S}, Arg^{+}

และเนื่องจากจากงานวิจัยในปี 2014 ได้มีการศึกษาถึงการเพิ่มการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินแบบมอนอเมอร์ (monomeric insulin precursor; MIP) ใน *P. pastoris* สายพันธุ์ต่างๆ โดยการเพิ่มจำนวนชุดของยีน และจากผลการติดตามระดับการแสดงออกของ MIP ด้วยวิธี dot-blot พบว่า *P. pastoris* KM71H มีการแสดงออกของ MIP ที่เร็วและสูงกว่าในรีคอมบิแนนท์ยีสต์สายพันธุ์อื่นๆ ซึ่งพิจารณาได้จากความเข้มของจุดสีดำที่เกิดขึ้น (Tanapati, 2014) ดังแสดงให้เห็นในรูปที่ 2.15 ดังนั้นงานวิจัยนี้ จึงสนใจที่จะหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินโดยเลือกใช้ *P. pastoris* KM71H (TP1) เป็นเซลล์เจ้าบ้าน



รูปที่ 2.15 ตรวจติดตามปริมาณของ MIP ด้วยวิธี Dot-blot (Tanapati, 2014)

2.4.4 ข้อดีของการใช้ *P. pastoris* KM71H เป็นเซลล์เจ้าบ้าน

P. pastoris KM71H เป็นยีสต์สายพันธุ์ที่มีเพียงยีน *AOX2* ทำให้มีความสามารถในการใช้เมทานอลสำหรับการเจริญเติบโตในอัตราที่ไม่สูงมากนัก อีกทั้งยังสามารถนำ เมทานอลบางส่วนไปใช้สำหรับเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินขึ้นในปริมาณสูง นอกจากนี้ ยังสามารถเลี้ยงได้ที่ความเข้มข้นของเซลล์สูงๆ ตลอดจนสามารถเจริญเติบโตได้ดีทั้งในอาหารที่สมบูรณ์ (organic medium) และอาหารสังเคราะห์ (synthetic medium)

2.5 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของยีสต์

การเจริญของเซลล์ยีสต์จะเกี่ยวข้องกับปัจจัยหลายประการ เช่น การนำสารอาหารเข้าสู่เซลล์ การใช้สารอาหารที่จำเป็น เพื่อเสริมสร้างเซลล์และเพื่อเสริมสร้างการทำงานของเซลล์ ตลอดจนการควบคุมสภาวะต่างๆ ซึ่งเป็นปัจจัยทั้งทางกายและเคมีที่มีผลต่อการเจริญทั้งสิ้น

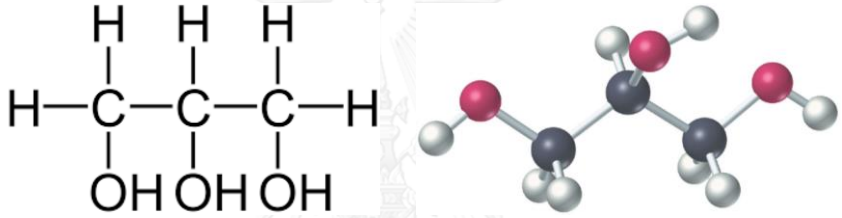
2.5.1 สารอาหารที่ต้องการ

2.5.1.1 แหล่งคาร์บอน

โดยปกติยีสต์สามารถใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโตได้เป็นอย่างดี โดยเฉพาะน้ำตาลกลูโคส (glucose) ในห้องปฏิบัติการกลูโคสถือเป็นน้ำตาลที่ถูกนำมาใช้เป็นอย่างมากเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเพาะเลี้ยงยีสต์ แต่ขณะที่ในธรรมชาติที่มียีสต์อาศัยอยู่ในบริเวณใดก็ตามนั้น ยีสต์มักจะไม่ได้รับแหล่งคาร์บอนที่มาจากกลูโคสอิสระโดยตรง แต่จะรับกลูโคสในรูปของพอลิเมอร์แทน (glucose polymer) เช่น แป้ง (starch) เซลลูโลส (cellulose) และ พอลิแซคคาไรด์ (polysaccharide) ชนิดอื่นๆ (Atlas, 2010)

ในกรณีการเพาะเลี้ยง *P. pastoris* ที่มีโปรโมเตอร์ของยีน *AOX* อยู่ (*AOX* promoter) และเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดยการใช้เมทานอลเข้ามาเหนี่ยวนำ แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงยีสต์ *P. pastoris* มักจะใช้เป็นกลีเซอรอล (glycerol) เป็นแหล่งคาร์บอนแทนการใช้น้ำตาลกลูโคส เนื่องจาก น้ำตาลกลูโคสสามารถกดการทำงานของ *AOX* promotor จนทำให้ไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนได้ (Daly, and Hearn, 2005)

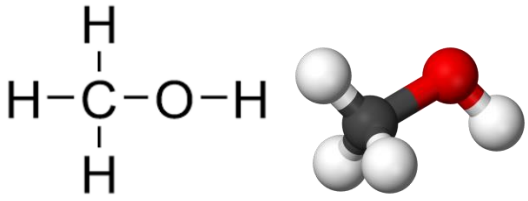
กลีเซอรอล หรือที่เรียกอีกอย่างว่า กลีเซอรีน (glycerin) ถือเป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญของ *P. pastoris* จัดเป็นสารกลุ่มไตรไฮดริกแอลลกอฮอล์ (trihydric alcohol) คือ แอลกอฮอล์ที่โมเลกุลมีหมู่ไฮดรอกซิล 3 หมู่ กลีเซอรอลมีสูตรโมเลกุลคือ CH_2OH-$CHOH$-CH_2OH ($C_3H_8O_3$) (รูปที่ 2.16) คิดเป็นน้ำหนักโมเลกุล 92.09 กรัมต่อโมล ($g.mol^{-1}$) โดยกลีเซอรอลจะมีลักษณะเป็นของเหลวหนืด ไม่มีกลิ่น ไม่มีสี และให้รสหวานต่ำกลีเซอรอลสามารถละลายได้ดีมากทั้งในน้ำ และในแอลกอฮอล์ (alcohol) แต่จะไม่ละลายในสารจำพวกอีเทอร์ (ether) จุดเดือดและจุดหลอมเหลวของกลีเซอรอลอยู่ที่ 290 องศาเซลเซียส และ 17.9 องศาเซลเซียส ตามลำดับ อย่างไรก็ตามในปัจจุบันกลีเซอรอลยังถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท อาทิ อุตสาหกรรมอาหาร ยา และเครื่องสำอาง เป็นต้น (Cruz et al., 2003; Hansen et al., 1977; Rungrojchaipon, 2014)



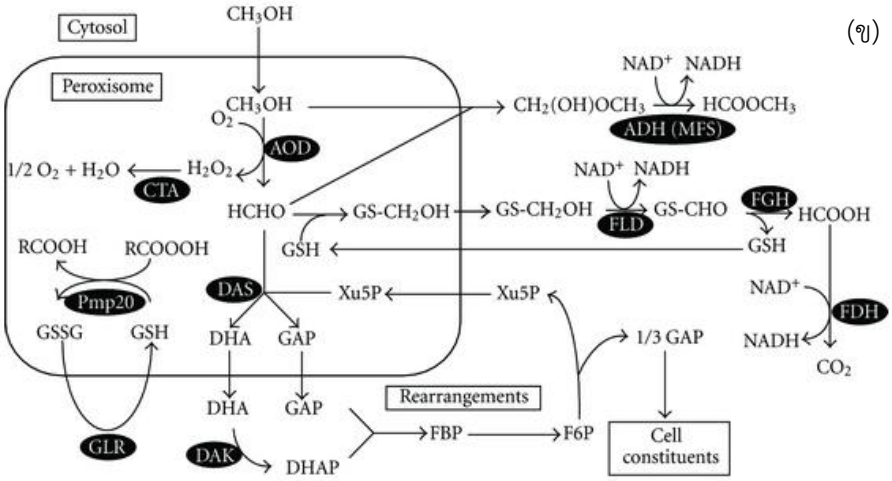
รูปที่ 2.16 โครงสร้างของกลีเซอรอล (Tiker, 2007)

อย่างไรก็ตามในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนใน *P. pastoris* จะนิยมใช้เมทานอลในการเป็นแหล่งคาร์บอนรวมถึงเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน ซึ่งเมทานอล (methanol) หรือที่เรียกอย่างว่า เมทิลแอลกอฮอล์ (methyl alcohol) มีสูตรโมเลกุลคือ CH_3OH (รูปที่ 2.17 (ก)) และมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 32.05 กรัมต่อโมล ($g.mol^{-1}$) มีลักษณะเป็นของเหลวใส ไม่มีสี มีความเป็นพิษสูง และระเหยง่าย เมทานอลมีจุดเดือดและจุดหลอมเหลวเท่ากับ 64.7 องศาเซลเซียส และ –97 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ปัจจุบันนิยมใช้เป็นตัวทำละลาย และใช้ในอุตสาหกรรมเชื้อเพลิง

(ก)



(ข)



รูปที่ 2.17 โครงสร้างของเมทานอล (ก) (Wikipedia, 2016) และ แมทาบอลิซึมของเมทานอลในยีสต์ (ข) (Koch et al., 2016)

โดยยีสต์ในกลุ่ม *P. pastoris* ที่มี *AOX* promoter อยู่ จะมีความสามารถในการใช้เมทานอลเพื่อนำใช้เป็นแหล่งพลังงานสำหรับสร้างเซลล์และเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ต้องการ ซึ่งเมื่อเซลล์ได้รับเมทานอล จะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันขึ้นภายในออร์แกเนลล์ (organelle) ขนาดเล็กที่เรียกว่าเพอรอกซิโซม (peroxisome) ด้วยการเร่งโดยเอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดส และเกิดเป็นสารฟอร์มาลดีไฮด์ (formaldehyde) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) ขึ้น ต่อมาจะผ่านเข้าสู่กระบวนการต่างๆ โดยในขั้นสุดท้ายของปฏิกิริยานี้จะมีคาร์บอนไดออกไซด์ (carbon dioxide; CO_2) และเกิดพลังเพื่อนำไปสร้างส่วนประกอบของเซลล์ได้ (รูปที่ 2.17 (ข)) แต่อย่างไรก็ตาม การเติมเมทานอลในปริมาณมากเกินไปจะส่งผลให้เกิดการสะสมของสาร ฟอร์มาลดีไฮด์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งมีความเป็นพิษต่อเซลล์ (Ogata et al., 1969) ดังนั้น จึงมีหลายงานวิจัยที่สนใจศึกษาปริมาณของเมทานอลที่ใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนอีกด้วย โดยจากตารางที่ 2.6 พบว่า *P. pastoris* ทั้ง 3 สายพันธุ์ (X-33, GS115 และ KM71H) สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนได้ปริมาณสูงที่ความเข้มข้นของเมทานอลต่ำๆ คือ 2.5%, 1% และ 1% ตามลำดับ

ตารางที่ 2.6 การศึกษาปริมาณของเมทานอลในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน

Strain	Methanol % (v/v)	Product	Amount of product	Research (Ref.)
X-33	0% 0.5% 1% 2.5% 5% 10% 20%	Recombinant human erythropoietin	2.5% เมทานอลส่งผลให้มีระดับการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนสูงสุด	(Santoso et al., 2012)
GS115::BA11	0.3% 1% 3%	Single-chain antibody fragment (scFv)	50 $mg.l^{-1}$ 150 $mg.l^{-1}$ 350 $mg.l^{-1}$	(Khatri, and Hoffmann, 2006)
KM71H	0.5% 1% 1.5% 2% 3%	Recombinant *Rhizopus oryzae* Lipase	1% เมทานอลส่งผลให้มีระดับการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์สูงสุด (0.6 $g.l^{-1}$)	(Li et al., 2013)

2.5.1.2 แหล่งไนโตรเจน

แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate) ถือเป็นแหล่งไนโตรเจน (nitrogen) และแหล่งซัลเฟอร์ (sulfur) ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย โดยการนำไปผสมเข้ากับอาหารเพื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ในห้องปฏิบัติการ สำหรับยีสต์บางชนิด เช่น *Hansenula* spp. สามารถใช้ไนเตรท (nitrate) และไนไตรท์ (nitrite) ในการเจริญเติบโตได้ แต่ในขณะที่ยีสต์บางกลุ่มไม่สามารถนำไนเตรทมาใช้ในการเจริญของเซลล์ได้ เช่น *Pichia* spp. อย่างไรก็ตาม ยีสต์สามารถใช้แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ได้ด้วย เช่น กลูตามีน (glutamine) กรดแอสปาติก (aspatic acid) ไพริมิดีน (pyrimidine) และ พิวรีน (purine) โดยที่กรดแอสปาติก และกลูตามีน จะให้ไนโตรเจนออกมาในกระบวนการดีอะมิเนชัน (deamination) นอกจากนี้ยังมี โปรตีนไฮโดรไลเซท (protein hydrolysate) ที่ได้รับความนิยมใน

การใช้เลี้ยงเซลล์ยีสต์ในห้องปฏิบัติการ ซึ่งโปรตีนไฮโดรไลเซทจะประกอบไปด้วยกรดอะมิโนชนิดต่างๆ หลายชนิดที่ยีสต์สามารถนำมาใช้ได้ (Albers et al., 1996; Cruz et al., 2003; ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์, 2558)

2.5.1.3 แหล่งฟอสฟอรัส

ฟอสฟอรัส (phosphorus) เป็นสารที่มีความจำเป็นและสำคัญสำหรับยีสต์ทุกสายพันธุ์ เนื่องจาก ฟอสฟอรัสเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของกรดนิวคลีอิก (nucleic acid) และฟอสโฟลิพิด (phospholipid) ซึ่งในเซลล์ยีสต์มักพบฟอสฟอรัสอยู่ในเซลล์ประมาณร้อยละ 3-5 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยฟอตเฟตนี้จะถูกสะสมไว้ในแวคิวโอล (vacuole) หรือในไซโทพลาซึมเอง (cytoplasm) ทั้งนี้ ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (dihydrogen phosphate) ถือเป็นสารอนินทรีย์ฟอตเฟตที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงยีสต์ เนื่องจาก สารไดไฮโดรเจนฟอสเฟตมีความสามารถที่จะช่วยการทำงานของเอนไซม์ตลอดจนเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างพลังงานได้ในยีสต์ (Yuk, 2002; ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์, 2558)

2.5.1.4 แหล่งซัลเฟอร์

ซัลเฟอร์ (sulfur) เป็นแหล่งอาหารที่มีความจำเป็นต่อเซลล์ยีสต์ เนื่องจากในกระบวนการสังเคราะห์กรดอะมิโนบางชนิด เช่น ซีสเทอีน (cysteine) มีความจำเป็นที่จะต้องใช้ซัลเฟอร์เข้ามาเป็นองค์ประกอบของกรดอะมิโนนั้นๆ ในเซลล์ยีสต์จะมีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบอยู่ร้อยละ 0.3 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ในห้องปฏิบัติการนิยมใช้ซัลเฟอร์หลากหลายชนิดที่อยู่ในรูปสารประกอบต่างๆ อาทิ ซัลเฟต (sulphate) ซัลไฟต์ (sulphite) และ เมไทโอนีน (methionine) ทั้งนี้ เมไทโอนีนจัดเป็นแหล่งของซัลเฟอร์ที่ยีสต์สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ดี เนื่องจากเป็นสารที่เกี่ยวข้องกับเมทาบอลิซึมของซัลเฟอร์โดยตรง (ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์, 2558)

2.5.1.5 แหล่งแร่ธาตุ

นอกจากสารอาหารที่กล่าวมาแล้วนั้น ยีสต์ยังมีความจำเป็นที่จะต้องใช้แร่ธาตุชนิดต่างๆ สำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์ เช่น ธาตุโพแทสเซียม (potassium; K) และแมคนีเซียม (magnesium; Mg) โพแทสเซียมจะมีอยู่ในเซลล์ยีสต์ประมาณร้อยละ 1-2 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง มีส่วนช่วยในการเป็นโคแฟคเตอร์ (cofactor) ของเอนไซม์ (enzyme) หลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับเมทาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) กระบวนการออกซิเดทีฟฟอสโฟริลเลชัน (oxidative phosphorylation) ตลอดจนกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน สำหรับแมคนีเซียมนั้น เป็นธาตุที่พบอยู่ในยีสต์ประมาณร้อย 0.3 ของน้ำหนังเซลล์แห้ง มีบทบาทในการช่วยสังเคราะห์เอทีพี (adenosine

triphosphate; ATP) ทั้งนี้ โพแทสเซียมและแมคนีเซียมจัดเป็นธาตุที่ยีสต์ต้องการในปริมาณมาก ระดับมิลลิโมลาร์ (millimolar) นอกจากนี้ยังมีธาตุอื่นๆ ที่ต้องการในระดับ ไมโครโมลาร์ (micromolar) หรือ นาโนโมลาร์ (nanomolar) ด้วย เช่น แคลเซียม (calcium; Ca) แมงกานีส (manganese; Mn) และเหล็ก (Iron; Fe) เป็นต้น (ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์, 2558)

2.5.2 ปัจจัยทางกายภาพและทางเคมี

2.5.2.1 ความเป็นกรด-เบส

โดยทั่วไปยีสต์สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีความเป็นกรด-เบส (pH) ประมาณ 5.5 หรือในช่วงพีเอชของอาหารที่มีสภาพเป็นกรดเล็กน้อย (pH 4.5-6.5) ความเป็นกรด-เบสของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงยีสต์จึงถือเป็นปัจจัยสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของเซลล์ยีสต์โดยตรง สำหรับการปรับอาหารให้เป็นกรดด้วยกรดอินทรีย์ เช่น กรดแลคติก (lactic acid) กรดอะซิติก (acetic acid) จะมีผลต่อการเจริญของเซลล์ยีสต์โดยตรง คือ จะทำให้ยีสต์มีอัตราการเจริญที่ลดต่ำลง เนื่องจาก กรดอินทรีย์มีฤทธิ์ทำให้ในเซลล์ยีสต์มีสภาพเป็นกรด ดังนั้น ในปัจจุบันจึงนิยมใช้ กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) ในการปรับสภาพความเป็นกรดของอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากมีฤทธิ์ในการทำให้เซลล์ยีสต์เป็นกรดได้น้อยกว่ากรดอินทรีย์ (Praphailong, and Fleet, 1997; Wanderley et al., 2009)

อย่างไรตาม ได้มีงานวิจัยที่ศึกษาถึงความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนของ *P. pastoris* สายพันธุ์ต่างๆ จากงานวิจัยในตารางที่ 2.7 พบว่า ยีสต์ *P. pastoris* สามารถเจริญได้ในช่วงตั้งแต่ พีเอช 3-8 แต่ในขณะที่พีเอชที่เหมาะสมมากที่สุดสำหรับการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนจะอยู่ในช่วงระหว่างพีเอช 5-6 เนื่องจาก เป็นช่วงพีเอชที่ไม่เหมาะต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส (protease activity) (Ithoi, 2010; Jafari et al., 2011; Shi et al., 2003)

ตารางที่ 2.7 การศึกษาสภาพความเป็นกรด-ด่างในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน

Strain	pH	Product	Amount of product	Research (Ref.)
KM71H	3 5 6 8	single-chain antibody (scFv)	pH 6 ส่งผลให้มีความเข้มข้นของ single-chain antibody (scFv) มากที่สุด	(Shi et al., 2003)
X33	3 4 5	Recombinant antigens (SAG2)	pH 5 ส่งผลให้มีความเข้มข้นมากที่สุดอยู่ที่ 9.5 $mg.l^{-1}$	(Ithoi, 2010)
KM71H	6 7 8	Anti-keratin 8 scFv TS1-218	pH 6 ส่งผลให้มีความเข้มข้นมากที่สุด อยู่ที่ 1.0 $mg.l^{-1}$	(Jafari et al., 2011)

2.5.2.2 อุณหภูมิ

อุณหภูมิถือเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์และการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนของยีสต์ โดยทั่วไปยีสต์จะสามารถเจริญเติบโตได้ดีในช่วงของอุณหภูมิประมาณ 20-30 องศาเซลเซียส แต่อย่างไรก็ตาม ความสามารถในการเจริญจะขึ้นอยู่กับชนิด สายพันธุ์ รวมถึงสภาวะแวดล้อมของยีสต์เองด้วย เช่น *Kluyveromyces marxianus* เป็นยีสต์ชนิดที่สามารถเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิกว้าง คือ 52 และ 20 องศาเซลเซียส จากความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างกันของยีสต์ จึงทำให้สามารถแบ่งยีสต์ออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มไซโครไฟล์ (psychrophile) มีโซไฟล์ (mesophile) และเทอร์โมไฟล์ (thermophile) โดยไซโครไฟล์ (psychrophile) จะเป็นยีสต์ที่เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ ในขณะที่ มีโซไฟล์ (mesophile) และ เทอร์โมไฟล์ (thermophile) จะเป็นกลุ่มที่เจริญได้ในภาวะที่มีอุณหูมิปานกลาง และอุณหภมิสูง (Arthur, and Watson, 1976)

จากหลายงานวิจัย เช่น งานวิจัยในปี 1999, 2000 และ 2010 ในตารางที่ 2.8 ที่ได้ศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิ ต่อการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนใน *P. pastoris* สายพันธุ์ X-33 พบว่า ที่อุณหภูมิในช่วง 23-28 องศาเซลเซียส ส่งผลให้รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้มีปริมาณมากกว่าที่อุณหภูมิสูง

ตารางที่ 2.8 การศึกษาอุณหภูมิในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนใน *P. pastoris* สายพันธุ์ X-33

Temperature	Product	Amount of product	Research (Ref.)
24 28 32	Recombinant hookworm) anticoagulant peptide (rAcAP-5)	0.248 g.l^{-1} 0.315 g.l^{-1} 0.008 g.l^{-1} (3.5 Day after cultivation)	(Inan et al., 1999)
23 30	recombinant herring antifreeze protein (WT) and a fusion protein with a C-terminal six-histidine tag (WT-6H)	42 mg.l^{-1} 5 mg.l^{-1} (4 Day after cultivation)	(Li et al., 2001)
25 30	Recombinant antigens (SAG2)	14 mg.l^{-1} 11 mg.l^{-1} (3 Day after cultivation)	(Ithoi, 2010)

2.5.2.3 ปริมาณออกซิเจน

ยีสต์โดยส่วนมากถือเป็นจุลินทรีย์ที่อาศัยอากาศ (aerobe) ในการเจริญเติบโต ซึ่งออกซิเจน (oxygen) จะมีบทบาททั้งในกระบวนการหายใจ โดยทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเลกตรอน (electron) ตำแหน่งสุดท้าย รวมถึงมีส่วนช่วยในการสังเคราะห์กรดไขมันและสเตอรอล (sterol) อย่างไรก็ตาม ยีสต์ต่างชนิดกันจะมีความต้องการปริมาณออกซิเจนต่างกัน โดยปกติออกซิเจน (oxygen) จะมีความสามารถในการละลายในของเหลวได้จำกัด (Ithoi, 2010) ดังนั้นการเพิ่มอัตราการแพร่ผ่านของออกซิเจนในอาหาร (K_L) การเพิ่มพื้นที่ผิวของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ (a) ตลอดจนการเพิ่มความเข้มข้นของออกซิเจนในอาหารเหลว (c) หรือที่เรียกโดยรวมว่า การเพิ่มค่า $K_L$ac จึงถือเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญในการเจริญเติบโตของเซลล์ยีสต์และการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนอีกด้วย

2.5.2.4 น้ำ

น้ำเป็นปัจจัยที่มีความจำเป็นต่อยีสต์เช่นกัน เนื่องจาก น้ำมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเจริญของยีสต์ รวมถึงกระบวนการเมทาบอลิซึม และการทำงานของเอนไซม์ ชนิดต่างๆ สำหรับศักยภาพในการนำน้ำเข้าสู่เซลล์ของยีสต์ หรือที่เรียกว่า ค่าพลังงานศักย์ของน้ำ (water potential; ψ_w) จะมีความสัมพันธ์แบบผกผันกับแรงดันออสโมติก (osmotic pressure) ในอาหารเหลวที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ ซึ่งโดยปกติแล้วน้ำที่มีความบริสุทธิ์สูงจะมีค่าพลังงานศักย์ของน้ำเท่ากับศูนย์ ในขณะที่เมื่อน้ำที่มีการเจือปนด้วยสารอื่นๆ จะมีค่าพลังงานศักย์ของน้ำลดลง เช่น ในน้ำที่มีส่วนประกอบของเกลือสูง จะมีค่าพลังงานศักย์ของน้ำลดต่ำลง แต่จะส่งผลเกิดแรงดันออสโมติกที่สูงขึ้นต่อเซลล์ยีสต์ เช่น *Zygosaccharomyces rouxii* จัดเป็นยีสต์ที่สามารถทนต่อแรงดัน ออสโมติกสูงได้ (osmotolerant) หรือเรียกอีกอย่างว่าสามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่มีค่าพลังงานศักย์ของน้ำต่ำประมาณ -1.0 ถึง -5.6 เมกะปาสคาล (MPa) แต่โดยปกติแล้วยีสต์โดยส่วนมากมักจะทนต่อแรงดันออสโมติกได้ปานกลางซึ่งคิดเป็นค่าพลังงานศักย์ของน้ำอยู่ที่ประมาณ -5 เท่านั้น (ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์, 2558)

2.6 การวิเคราะห์ปริมาณอินซูลิน

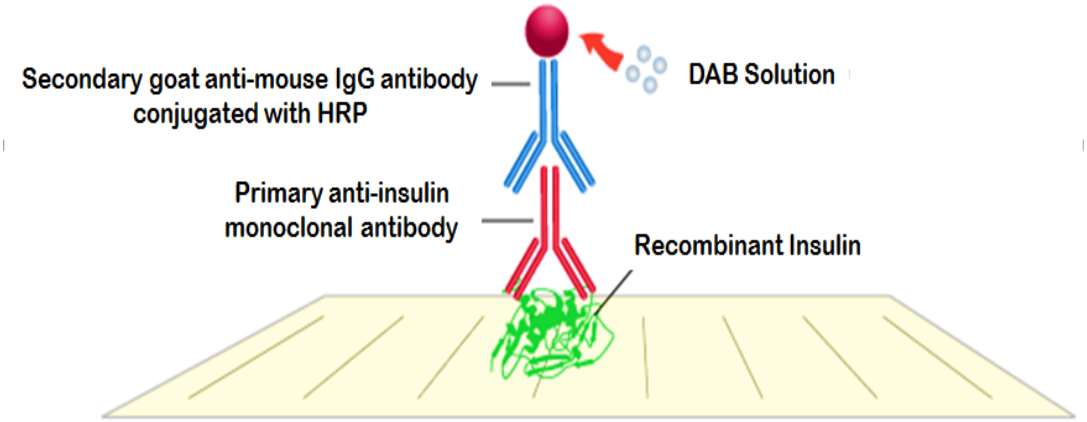
ปัจจุบันวิธีที่ใช้ตรวจวิเคราะห์รีคอมบิแนนท์อินซูลินที่ถูกผลิตออกมาภายนอกเซลล์ยีสต์สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การแยกโปรตีนอินซูลิน โดยเทคนิค non-denaturing gel หรือ native gel electrophoresis หรือตรวจวิเคราะห์เพื่อหาขนาดของโมเลกุลโดยการใช้ western blot เช่น

เทคนิค sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ตลอดจนการหาปริมาณของรีคอมบิแนนท์อินซูลินด้วยเครื่องโครมาโทกราฟฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography; HPLC) แต่อย่างไรก็ตามการใช้เทคนิค dot-blot และ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ถือเป็นอีกวิธีที่มีความสะดวก รวดเร็ว แม่นยำ ตลอดจนมีประสิทธิภาพสูงในการตรวจติดตามระดับการแสดงของรีคอมบิแนนท์อินซูลิน

2.6.1 ติดตามปริมาณของอินซูลินโดยใช้วิธี Dot-blot

การวิเคราะห์ด้วย Dot-blot ถือเป็นเทคนิคหนึ่งในทางอณูชีววิทยา (molecular biology) ที่สามารถทำได้ง่าย สะดวกและประหยัดระยะเวลาในการทดลอง ซึ่งเทคนิคนี้จะสามารถใช้ วิเคราะห์ ระบุบ่งชี้ ตลอดจนตรวจติดตามระดับการแสดงออกของโปรตีนที่สนใจ โดยตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ไม่ต้องผ่านการแยกด้วยกระบวนการอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) (Van Der Klei et al., 1990)

ทั้งนี้การวิเคราะห์และตรวจติดตามปริมาณของรีคอมบิแนนท์โปรตีนสามารถทำได้โดย หยดตัวอย่างลงบนแผ่นเมมเบรน (membrane) เช่น ไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (nitrocellulose membrane) หรือ พอลิไวนิลลิดีนฟลูออไรด์ (polyvinylidene difluoride membrane; PVDF membrane) แล้วนำแผ่นเมมเบรนที่ได้ไปบ่มด้วย 5% (w/v) ของนมผงขาดมันเนย (skim milk) ที่เจือจางในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (PSB) หลังจากนั้นบ่มในแอนติบอดี (antibody) ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนตัวนั้นๆ เช่น ในกรณีของอินซูลินจะนำมาบ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติอินซูลินแอนติบอดี (monoclonal anti-insulin antibody) จากนั้นนำแผ่นเมมเบรนไปบ่มอีกครั้งด้วยแอนติบอดีตัวที่สอง (secondary antibody) ที่มีความจำเพาะกับแอนติบอดีตัวแรก (first antibody) โดยแอนติบอดีตัวที่สองนี้จะมีเอนไซม์ฮอร์เซอราดิสเปอร์ออกซิเดสติด (horse radish peroxidase; HRP) ติดอยู่ ซึ่งมีไดอะมิโนเบนซิดีน (3,3' diaminobenzidine; DAB) ทำหน้าที่เป็นซับสเตรท (substrate) เมื่อซับสเตรทถูกย่อยจะเกิดปฏิกิริยาให้จุดสีดำบนแผ่นเมมเบรน โดยที่ระดับความเข้มของโปรตีนที่ต้องการศึกษาจะแปรผันตรงกับความเข้มของจุดสีดำที่เกิดขึ้น (Thongyoo, 2015) (รูปที่2.18)



รูปที่ 2.18 การติดตามปริมาณของรีคอมบิแนนท์อินซูลินด้วยวิธี Dot-blot (Thongyoo, 2015)

2.6.2 วิเคราะห์ปริมาณโดยใช้เทคนิค ELISA

Enzyme-linked immunosorbent assay หรือ ELISA เป็นเทคนิคที่สามารถนำมาใช้วิเคราะห์หาปริมาณของโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่ง ELISA จัดเป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะ (selectivity) และมีความไวในการตรวจวิเคราะห์ (sensitivity) ตัวอย่างได้สูง โดยเทคนิคนี้จะอาศัยความจำเพาะของแอนติเจน (antigen) และแอนติบอดี (antibody) รวมถึงใช้หลักของเอนไซม์ (enzyme) กับซับสเตรท (substrate) เพื่อทำให้เกิดปฏิกิริยาให้สีขึ้นในตัวอย่าง และสามารถนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงเพื่อวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามความสัมพันธ์ของแอนติบอดีและแอนติเจนในตัวอย่าง (Pornchaloempong, 2010) อย่างไรก็ตามเทคนิค ELISA สามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ตามความสัมพันธ์ของแอนติบอดีและแอนติเจนได้ดังนี้ (รูปที่ 2.19)

2.6.2.1 Direct enzyme-linked immunosorbent assay

วิธี Direct enzyme-linked immunosorbent assay หรือที่เรียกว่า direct ELISA เป็นวิธีที่อาศัยความจำเพาะของแอนติบอดีและแอนติเจนโดยตรง โดยจะมีการบ่มแอนติเจนเคลือบลงไปบนผิวของไมโครเวลเพลท (microwell plate) หลังจากนั้นใช้แอนติบอดีที่มีเอนไซม์ติดอยู่ เช่น เอนไซม์ฮอร์เซอราดิสเปอร์ออกซิเดส มาจับกันอย่างจำเพาะกับแอนติเจน เมื่อทำการเติมสารตั้งต้นของเอนไซม์นี้ลงไปจะเกิดปฏิกิริยาให้สีเกิดขึ้น ซึ่งสามารถวิเคราะห์ปริมาณของตัวอย่างโดยการนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงเทียบกับกราฟมาตรฐาน (standard curve) (Devergne et al., 1981; Vab.amrita.edu., 2011)

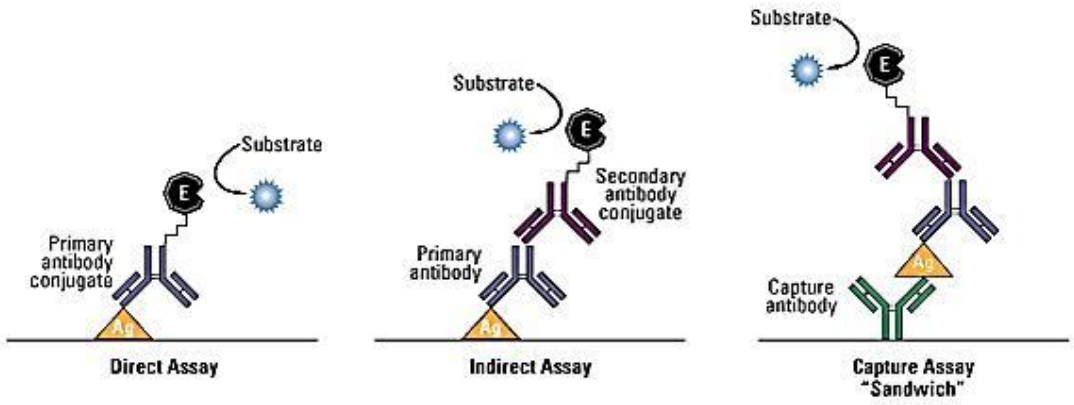
2.6.2.2 Indirect enzyme-linked immunosorbent assay

สำหรับ Indirect enzyme-linked immunosorbent assay (indirect ELISA) เป็นเทคนิคที่ช่วยเพิ่มความจำเพาะในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยวิธีนี้จะมีแอนติบอดีตัวที่สองเพิ่มเข้ามาอีกหนึ่งตัว (secondary antibody conjugate) ซึ่งแอนติบอดีที่เพิ่มเข้ามานี้จะมีเอนไซม์ติดอยู่และสามารถจับกันอย่างจำเพาะกับแอนติบอดีตัวแรก (first antibody) และเมื่อทำการเติมสารตั้งต้นจะเกิดปฏิกิริยาให้สีและสามารถวิเคราะห์ปริมาณของตัวอย่างได้เช่นเดียวกับ direct ELISA (Sino-Biological., 2004)

อย่างไรก็ตามได้มีการพัฒนาเทคนิค indirect ELISA ขึ้นอีก เพื่อให้ได้ความถูกต้องและแม่นยำในการวิเคราะห์ปริมาณอินซูลินมากขึ้น ซึ่งวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้จะเรียกว่าเทคนิค Indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (indirect competitive ELISA) เทคนิคนี้จะสามารถใช้วิเคราะห์ปริมาณของรีคอมบิแนนท์อินซูลินที่ถูกผลิตออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ โดยเริ่มจากการเคลือบแอนติเจน (bovine insulin) ลงบนไมโครเวลเพลท จากนั้นนำไปบ่มด้วย 5% (w/v) ของนมผงขาดมันเนยที่ถูกเจือจางในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน ทำการเติมตัวอย่างอินซูลินลงไปพร้อมกันนี้ทำการเติมแอนติบอดีตัวแรก (first antibody) ที่มีความสามารถในการจับอย่างจำเพาะทั้งกับตัวอย่างอินซูลินและแอนติเจน (bovine insulin) ในกรณีที่ตัวอย่างมีปริมาณอินซูลินมาก แอนติบอดีตัวแรกจะไปจับกับแอนติเจนที่เคลือบอยู่ด้านล่างไมโครเวลเพลทได้น้อยกว่าในกรณีที่ตัวอย่างมีปริมาณอินซูลินน้อย เนื่องจาก ตัวอย่างอินซูลินที่มีปริมาณมากจะไปแย่งจับกับแอนติบอดีตัวที่หนึ่งด้วย ส่งผลให้ในกรณีที่มีตัวอย่างอินซูลินมาก เมื่อบ่มด้วยแอนติบอดีตัวที่สองที่มีเอนไซม์ HRP ติดอยู่ แอนติบอดีชนิดนี้จะไปจับกับแอนติบอดีตัวแรกที่จับกับแอนติเจน (bovine insulin) อยู่อีกทีหนึ่งน้อยกว่า ดังนั้นเมื่อเติมสารตั้งต้นลงไปจะเกิดปฏิกิริยาให้สีจางกว่าในกรณีที่ตัวอย่างมีปริมาณอินซูลินต่ำ (Thongyoo, 2015)

2.6.2.3 Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay

สำหรับเทคนิค Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (sandwich ELISA) เป็นเทคนิคที่มีวิธีการคล้ายคลึงกับ indirect ELISA แต่จะมีกระบวนการที่ซับซ้อนเพิ่มมากขึ้น โดยในเทคนิคนี้จะมีการเพิ่มแอนติบอดีเข้ามา ซึ่งจะมีการบ่มแอนติบอดีให้อยู่ด้านล่างไมโครเวลเพลทก่อน แล้วจึงตามด้วยแอนติเจน แอนติบอดีตัวที่หนึ่งและสองตามลำดับ เหมือนกับในเทคนิค indirect ELISA ดังนั้นเทคนิค sandwich ELISA นี้จึงมีประสิทธิภาพและมีความแม่นยำในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนมากกว่า indirect ELISA แต่ในขณะเดียวกันก็มีขั้นตอนในการวิเคราะห์ที่ซับซ้อนขึ้นด้วย (Sino-Biological., 2004)



รูปที่ 2.19 ประเภทของ ELISA (Thermofisher., 2010)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 3
วิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์

เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์	บริษัท	ประเทศ
กระดาษกรองสำหรับไซลิงค์ขนาด 0.2 ไมโครเมตร (Syringe filter, Polytetrafluorethylene, PTFE)	Hirayama manufacturing Co., Ltd.	ญี่ปุ่น
เครื่องกวนสารแบบให้ความร้อน (Hot plate, PC-101)	Corning	สหรัฐอเมริกา
เครื่องกลั่น (Distillation unit)	Buchi Co., Ltd.	สวิตเซอร์แลนด์
เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี (Gas chromatography, 7890B, GC)	Agilent technologies	สหรัฐอเมริกา
เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography, LC10-AD, HPLC)	Shimadzu Co., Ltd.	ญี่ปุ่น
เครื่องชั่งแบบกล (Mechanical balance) (Balance Adventurer™, AR 2140)	Ohaus Co., Ltd.	สหรัฐอเมริกา
เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนความเร็วสูงแบบควบคุมอุณหภูมิ (High speed refrigerated centrifuge, 6500)	Kubota Co., Ltd.	ญี่ปุ่น
เครื่องปั่นเหวี่ยงตะกอน (High speed micro refrigerated centrifuge, MTX-150)	Tomy Seiko Co., Ltd.	ญี่ปุ่น
เครื่องผสมสารละลาย (Vortex, KMC-1300V)	Vision scientific Co., Ltd.	เกาหลีใต้
เครื่องย่อย (Digestion Unit)	Buchi Co., Ltd.	สวิตเซอร์แลนด์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์	บริษัท	ประเทศ
เครื่องวัดความเข้มข้นสารละลายด้วยคลื่นแสง (UV-Visible recording spectrophotometer, UV-160)	Shimadzu Co., Ltd.	ญี่ปุ่น
เครื่องหมุนเหวี่ยงขนาดเล็ก (Bench-top centrifuge, WiseSpin® CF-10)	Dihan scientific Co., Ltd.	เกาหลีใต้
เครื่องอ่านค่าไมโครเพลท (Microplate Reader, Mutiskan FC, Type 357)	Thermo Fisher Scientific Instruments Co., Ltd.	จีน
ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (Refrigerated incubator shaker, Innova™ 4330)	New Brunswick Scientific Co., Inc.	สหรัฐอเมริกา
ตู้บ่มเชื้อแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator, MIR 152)	Sanyo Electric Co., Ltd.	ญี่ปุ่น
ตู้ปลอดเชื้อ (Biological safety cabinet Heal force®, HFsafe-1200)	Shanghai Lishen Scientific equipment Co., Ltd	จีน
ตู้เย็น – 80 (Freezer – 80°C)	Sanyo Electric Co., Ltd.	ญี่ปุ่น
ตู้เย็น 2 – 4 องศาเซลเซียส (Refrigerator 2 -4 °C)	Panasonic Appliances Lights Action Alliance Co., Ltd.	ไทย
ตู้อบแห้ง (Oven, UL-80)	Memmert Co., Ltd.	เยอรมัน
ปิเปตอัตโนมัติ ขนาด 1-5 มิลลิลิตร (Automatic micropipette 1-5 mL)	Thermo Scientific	สหรัฐอเมริกา
ปิเปตอัตโนมัติ ขนาด 2, 20, 200 และ 1000 ไมโครลิตร (Automatic micropipette P2, P20, P200 และ P1000 HTL LABMATEPRO)	HTL LAB SOLUTION	โปแลนด์
ไนโตรเซลลูโลส เมมเบรน (Nitrocellulose membrane, NitroBind™)	Life Science Products, Co., Inc.	สหรัฐอเมริกา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์	บริษัท	ประเทศ
ปั๊ม (Pump, MPNI 125)	Thakita Electric Works	ญี่ปุ่น
ไมโครเวฟ (Microwave oven, National®)	Matsushita Electric Co. Ltd.	ญี่ปุ่น
หม้อนึ่งความดันฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (Autoclave HV-50)	Hirayama manufacturing Corp.	ญี่ปุ่น

3.1.2 สารเคมี

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
กรดซัลฟลูริค (Sulfuric acid)	Merck	เยอรมนี
กรดบอริก (Boric acid)	Merck	เยอรมนี
กรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก (Para-4-amino benzoic acid)	Sigma Aldrich	เยอรมนี
กรดโฟลิค (Folic acid)	Sigma Aldrich	สวิตเซอร์แลนด์
กลีเซอรอล (Glycerol)	ศึกษาภัณฑ์พาณิชย์	ไทย
กลูตารอลดีไฮด์ (Glutaraldehyde)	Merck	สหรัฐอเมริกา
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต (Copper(II) sulfate pentahydrate)	Merck	เยอรมันนี
แคลเซียมคลอไรด์ (Calcium chloride)	Merck	สหรัฐอเมริกา
แคลเซียมแพนโทธีเนต (Calcium pantothenate)	Sigma-Aldrich	สหรัฐอเมริกา
ซิงค์ซัลเฟต (Zinc sulfate)	Ajax Finechem Pty, Ltd.	ออสเตรเลีย
ซีโอซิน (Zeocin™)	Invitrogen	สหรัฐอเมริกา
โซเดียมคลอไรด์ (Sodium Chloride)	Ajax Finechem Pty, Ltd.	ออสเตรเลีย
โซเดียมโมลิบเดรตไดไฮเดรต (Sodium molybdate dihydrate)	Farmitalia industria chimico farmaceutica s.r.l	อิตาลี
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide)	Ajax Finechem Pty, Ltd.	ออสเตรเลีย

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
ไดอะมิโนเบนซิดีน (3,3' Diaminobenzidine, DAB)	Sigma-Aldrich	สหรัฐอเมริกา
ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide, DMSO)	Fluka Biochemika	สวิตเซอร์แลนด์
ทวีน 20 (Tween-20)	Sigma Aldrich	เยอรมนี
ทีเอ็มบี (3,3',5,5'-tetrametyhlbenzidine)	Sigma-Aldrich	สหรัฐอเมริกา
นมผงขาดมันเนย (Skim milk)	Difco	สหรัฐอเมริกา
ไทอะมีน (Thiamine)	Fluka Biochemika	สวิตเซอร์แลนด์
ไนโตรเซลลูโลส เมมเบรน (Nitrocellulose membrane) (NitroBind™)	Life Science Products, Inc.	สหรัฐอเมริกา
ไนอะซิน (Niacin)	HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.	อินเดีย
ไบโอติน (Biotin)	Fluka	เยอรมนี
โพแทสเซียมฟอสเฟตโมโนเบสิก (Potassium phosphate monobasic)	Merck	เยอรมนี
โพแทสเซียมไอโอไดด์ (Potassium iodide)	Sigma Aldrich	เยอรมนี
ไพริดอกซีน (Pyridoxine)	Sigma Aldrich	เยอรมนี
เพปโทน (Bacto™ Peptone powder)	Becton, Dickinson and Company	ฝรั่งเศส
เฟอริกคลอไรด์ (Ferric chloride)	Chem-Supply Pty Ltd.	ออสเตรเลีย
เมทานอล (Methanol)	Merck	เยอรมนี
แมงกานีสซัลเฟตมอนอไฮเดรต (Manganese sulfate monohydrate)	Mallinckrodt, Inc.	ฝรั่งเศส
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (Magnesium sulphate heptahydrate)	Merck	เยอรมนี
ไรโบฟลาวิน (Riboflavin)	Wako	ญี่ปุ่น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract powder)	Bio Springer	ฝรั่งเศส
อินโนซิทอล (Innosital)	Sigma-Aldrich	สหรัฐอเมริกา
อินซูลินจากตับอ่อนวัว (Insulin from bovine pancrese)	Lilly	สหรัฐอเมริกา
อินซูลินชนิดฉีด (Insulin lispro injection, Humalog®)	Sigma-Aldrich	สหรัฐอเมริกา
อินซูลินชนิดฉีด (Insulin injection, Mixtrad® 30 HM Penfill®)	Novo Nordisk	เดนมาร์ก
เอทานอล (Ethnol)	Merck	เยอรมนี
แอนติบอดีชนิดที่ 1 (First-antibody, Monoclonal anti-insulin antibody)	Sigma-Aldrich	สหรัฐอเมริกา
แอนติบอดีชนิดที่ 2 (Second-antibody, Goat anti-Mouse IgG, (H,L) HRP conjugate)	Jackson Immuno Research Laboratories Inc.	สหรัฐอเมริกา
แอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulfate)	Commercial grad	ไทย
ฮีสทิดีน (Histidine)	Fluka Biochemika	สวิตเซอร์แลนด์
ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide)	Merck	เยอรมนี

3.2 จุลินทรีย์

รีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris* (TP1) สายพันธุ์ KM71H ที่มีอินซูลินยีนแทรกอยู่ในพลาสมิด (pPICZαA::MIP) จากสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3.1 อาหารที่ใช้สำหรับการเจริญเติบโต

ในเบื้องต้นเพื่อคัดกรองรีคอมบิแนนท์ยีสต์อาหารแข็ง YPD (Yeast extract peptone dextrose) ที่มีส่วนผสมของ Zeocin ™ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ถูกนำมาใช้สำหรับการเลี้ยง *Pichia pastoris* KM71H (TP1) หลังจากนั้น ใช้อาหาร YPGly (Yeast extract peptone glycerol) หรือ YNBGly (Yeast nitrogen base glycerol) ที่มีกลีเซอรอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ และ 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นองค์ประกอบ เพื่อทำการเพิ่มปริมาณของเซลล์ยีสต์ให้ได้มากที่สุด ทั้งนี้องค์ประกอบของอาหารได้อธิบายไว้ใน ภาคผนวก ก

3.3.2 อาหารที่ใช้สำหรับเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลิน

สำหรับการเหนี่ยวนำให้เกิดให้เกิดการผลิตอินซูลินจะใช้อาหารที่มีเมทานอลเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ อาหาร YPMet (Yeast extract peptone methanol), YNBMet (Yeast nitrogen base methanol) หรือ MMH (Minimal methanol histidine) ทั้งนี้องค์ประกอบของอาหารได้อธิบายไว้ใน ภาคผนวก ก

3.4 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.4.1 ศึกษาค้นคว้าเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ศึกษาค้นคว้าและรวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับภาวะที่เหมาะสมในเจริญและการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดยใช้ยีสต์สายพันธุ์ *P. pastoris* KM71H เป็นเซลล์เจ้าบ้าน

3.4.2 ศึกษาชนิดของอาหาร (YPGly, YNBGly) ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของยีสต์สายพันธุ์ *P. pastoris* KM71H

นำรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris* KM71H (TP1) ที่มีพลาสมิดลูกผสม pPICZαA::MIP แทรกอยู่ในโครโมโซมที่ถูกเจริญบนอาหารแข็ง YPD Zeocin ™ เป็นเวลา 2-5 วัน มาเลี้ยงในอาหาร YPGly และYNBGly ที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าที่ 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนได้หัวเชื้อนี้ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (OD600) ประมาณ 20±0.2 นำมาเพาะเลี้ยงต่อในอาหาร YPGly, YNBGly โดยให้ความเข้มข้นของหัวเชื้อที่ใช้มีค่า OD600 ได้เท่ากับ 1±0.2 ทำการเลี้ยงที่สภาวะเดิม พร้อมทั้งติดตามการเจริญเติบโตโดยทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมง จนเชื้อเจริญเข้าสู่การเจริญในอัตราคงที่

(stationary phase) นำตัวอย่างที่เก็บแต่ละจุดมาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของเซลล์ ทำการวัดผ่านเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 1,000 รอบต่อนาที เพื่อแยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ (ส่วนใส) และนำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณกลีเซอรอลและไนโตรเจนต่อไป

3.4.3 วิเคราะห์ปริมาณของกลีเซอรอลที่เหลือในอาหาร โดยใช้ โครมาโทกราฟีเหลวความดันสูง (High performance liquid chromatography, HPLC)

นำตัวอย่างส่วนใสที่ได้มาทำการกรองผ่านกระดาษกรองเซลลูโลสอะซิเตต (cellulose acetate) ฉีดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 50 ไมโครลิตร วิเคราะห์ผ่านเครื่องโครมาโทกราฟีเหลวความดันสูง (HPLC) เพื่อหาปริมาณของกลีเซอรอลและทำการคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐาน โดยใช้สภาวะดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 สภาวะการทำงานของโครมาโทกราฟีเหลวความดันสูง

คอลัมน์	Biorad Aminex HPX-87H ion exclusion organic acid (300 มิลลิเมตร x 7.8 มิลลิเมตร)
สารละลายตัวพา	กรดซัลฟูริก (H_2SO_4) มีความเข้มข้น 5 มิลลิโมลลาร์
อุณหภูมิ	45 องศาเซลเซียส
อัตราการไหล	0.6 มิลลิลิตรต่อนาที
เครื่องตัววัด	RI detector
เวลาที่อยู่ในคอมลัมน์	25 นาที

3.4.4 วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือในอาหารโดยใช้วิธีคเจลดาห์ล (Kjeldahl method)

นำตัวอย่างส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงที่ 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาเติมลงในหลอดย่อย พร้อมกับเติม ตัวเร่งปฏิกิริยา (catalyst) ซึ่งประกอบด้วยโพแทสเซียมซัลเฟตและคอปเปอร์ซัลเฟต (95:5) ปริมาณ 7 กรัม จากนั้นเติมกรดซัลฟูริคเข้มข้น 15 มิลลิตร นำไปย่อยในเตาไฟฟ้า (digestion apparatus) 45 นาที จนได้สารละลายสีเขียวใส ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการเติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ลงในหลอดย่อย ระหว่างนั้นเตรียม 4 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ของกรดบอริก 50 มิลลิลิตร หยดมิกซ์อินดิเคเตอร์ (mixed indicator) ซึ่งประกอบด้วย เมทิลเรด (methyl red) และ เมทิลีนบลู (methylene blue) ลงใน

สารละลายกรดบอริกและต่อเข้ากับชุดกลั่น (Digestion unit) จากนั้นเติม 32 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ปริมาตร 50-60 มิลลิลิตร หรือจนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีดำ ทำการกลั่นจนได้ของเหลวปริมาตร 150 มิลลิลิตร นำของเหลวที่ได้มาไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริกที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน เพื่อทำการคำนวณหาปริมาณไนโตรเจน โดยใช้การคำนวณดังต่อไปนี้

ไนโตรเจน (g) = (ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ไทเทรตได้ (ml) – ปริมาตรของชุดควบคุม (ml)) X (ความเข้มข้นที่แน่นอนของกรดไฮโดรคลอริก (N) X 0.014007)

ไนโตรเจน % (w/v) = ไนโตรเจน (g) X 100) / ปริมาตรตัวอย่าง (ml)

3.4.5 ศึกษาชนิดของอาหาร (YPMet, YNBMet และ MMH) รวมถึงปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลิน

นำรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris* KM71H (TP1) ที่เพิ่มจำนวนเซลล์ได้จากอาหารที่เหมาะสมในข้อ 3.4.2 มาเลี้ยงต่อในอาหาร YPMet, YNBMet และ MMH (ภาคผนวก ก) ที่มีเมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอน 1 % (v/v) เพื่อเหนี่ยวนำให้มีการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลิน พร้อมทั้งทำการเติมเมทานอล 1 % (v/v) ทุกๆ 24 ชั่วโมง ซึ่งจะใช้หัวเชื้อที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน 3 ค่า ดังนี้

- หัวเชื้อที่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (OD600) ได้เป็น 1±0.2

- หัวเชื้อแบบเข้มข้นขึ้น 1 เท่า ใช้การถ่ายเซลล์ทั้งหมด 1 ขวดที่ได้จากการเลี้ยงยีสต์ *P. pastoris* KM71H (TP1) ในช่วงระยะเจริญเติบโตแล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที ลงในอาหารสำหรับผลิตรีคอมบิแนท์อินซูลินปริมาตรเท่ากัน (1xHCD; OD600 = 35±5)

- หัวเชื้อแบบเข้มข้นขึ้น 5 เท่า ใช้การถ่ายเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงยีสต์ *P. pastoris* KM71H (TP1) ในช่วงระยะเจริญเติบโต ทั้งหมด 5 ขวด ลงในอาหารสำหรับผลิตรีคอมบิแนท์อินซูลิน 1 ขวด โดยการปั่นเหวี่ยงแยกอาหารออก และถ่ายหัวเชื้อทั้งหมดลงในอาหารสำหรับผลิตรีคอมบิแนท์อินซูลิน (5xHCD; OD600 = 130±10)

จากนั้น นำไปเขย่าที่ 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณของเมทานอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ พร้อมกับวิเคราะห์ปริมาณของรีคอมบิแนนท์อินซูลินที่ถูกผลิตขึ้นต่อไป

3.4.6 ศึกษาความเข้มข้นของเมทานอลและช่วงเวลาในการเติมเมทานอลที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้มีการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลิน

นำรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris* KM71H (TP1) ที่เพิ่มจำนวนเซลล์ได้จากสูตรอาหารที่เหมาะสมในข้อ 3.4.2 มาใช้ในการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลิน โดยเลือกชนิดของอาหาร (YPMet, YNBMet หรือ MMH) และปริมาณของหัวเชื้อที่เหมาะสมที่สุดที่ได้จากข้อ 3.4.5 โดยแปรเปลี่ยนความเข้มข้นของเมทานอลเป็น 1% (v/v) และ 2% (v/v) โดยเลือกเติมเมทานอลเป็น 2 แบบ คือ เติมทุก 12 ชั่วโมง หรือ เติมทุกๆ 24 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ความเข้มข้นที่เหมาะสมของเมทานอลในการเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลิน

3.4.7 วิเคราะห์ความเข้มข้นของเมทานอลและช่วงเวลาในการเติมเมทานอลที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้มีการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินโดยใช้ โครมาโทกราฟีแบบแก๊ส (Gas chromatography, GC)

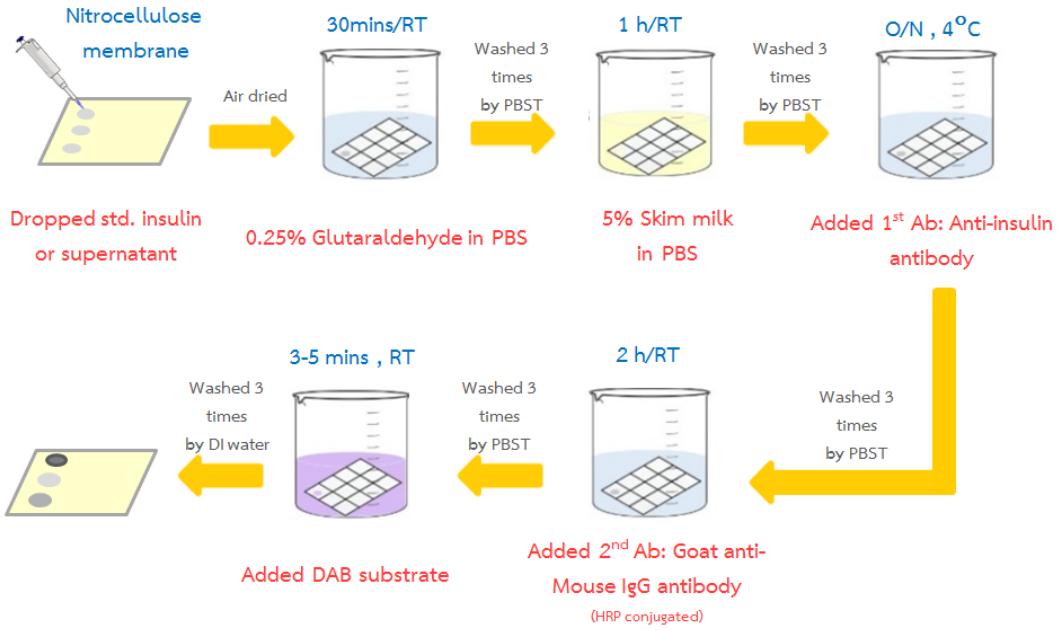
การวิเคราะห์หาความเข้มข้นของเมทานอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำได้โดยนำตัวอย่างส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อมากรองผ่านกระดาษกรองเซลลูโลสอะซิเตทที่มีรูพรุนขนาด 0.2 ไมครอน จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างวิเคราะห์ผ่านโครมาโทกราฟีแบบแก๊ส (Gas chromatography, GC) เพื่อทำการคำนวณหาปริมาณที่เหลือของเมทานอลเทียบกับกราฟมาตรฐาน โดยใช้สภาวะดังตารางที่ 3.2

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 3.2 สภาวะการทำงานของการโครมาโทกราฟีแบบแก๊ส

คอลัมน์	HP-5 (30 เมตร x 320 ไมโครเมตร x 0.25 ไมโครเมตร)
สารละลายตัวพา	ฮีเลียม
อุณหภูมิของอินเจคเตอร์	150 องศาเซลเซียส
อัตราการไหล	1.5 มิลลิลิตรต่อนาที
Split ratio	1:100
อุณหภูมิของคอลัมน์	เริ่มต้น 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที โดยเพิ่มขึ้นทุก 20 องศาเซลเซียสต่อนาที จนกระทั่งมีอุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส
เครื่องตัววัด	Flame ionization detector (FID)
เวลาที่อยู่ในคอมลัมน์	25 นาที
อุณหภูมิของเครื่องตัววัด	250 องศาเซลเซียส

3.4.7 ตรวจติดตามการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์อินซูลินที่ได้ในเชิงคุณภาพด้วยวิธี Dot blot

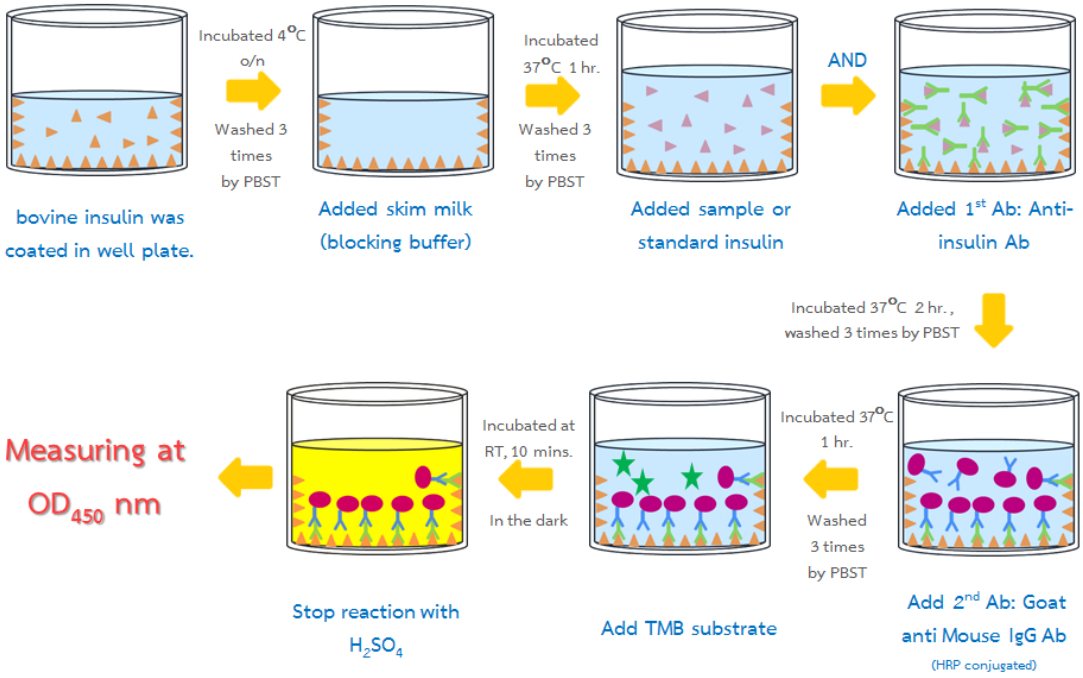


รูปที่ 3.1 การติดตามการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์อินซุลินด้วยวิธี Dot blot

การติดตามการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์อินซูลินในทุก 12 ชั่วโมง ทำได้โดยนำส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงที่ 1,000 ต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที มาหยดลงบนแผ่นกระดาษไนโตรเซลลูโลสปริมาตร 3 ไมโครลิตร พร้อมทั้งหยดตัวควบคุมเชิงลบ (negative control) ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อในช่วงการผลิตอินซูลิน (YPMet, YNBMet และ MMH) จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (30 นาที) หรืออบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (10 นาที) จนแผ่นกระดาษไนโตรเซลลูโลสแห้งสนิท จึงนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสมาตรึงด้วย 0.25 เปอร์เซ็นต์ ของกลูตารอลดีไฮด์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 3-5 ครั้ง นำไปแช่ใน 5 เปอร์เซ็นต์ ของนมผงขาดมันเนย (skim milk) ซึ่งละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบตามระยะเวลาที่กำหนด นำกระดาษไนโตรเซลลูโลสมาล้าง 3-5 ครั้ง ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีนที่มี 0.05% (v/v) ของทวีน 20 เป็นองค์ประกอบ (PBST) หลังจากนั้นบ่มในโมโนโคลนอลแอนติอินซูลินแอนติบอดี (monoclonal anti-insulin antibody) เจือจางในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน อัตราส่วน 1: 1500 เป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง หรือทิ้งไว้ข้ามคืนที่ 4 องศาเซลเซียส เสร็จแล้วนำไปล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีนที่มีทวีนอยู่ 3-5 ครั้ง นำแผ่นกระดาษไนโตรเซลลูโลสมาบ่มต่ออีก 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง หรือทิ้งไว้ข้ามคืนที่ 4 องศาเซลเซียส ในแอนติบอดีตัวที่สองที่มีเอนไซม์ฮอร์เซอราดิสเปอร์ออกซิเดสติดอยู่ (goat anti-mouse IgG, (H,L) HRP conjugate) ที่ถูกเจือจางด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีนในอัตราส่วน 1: 1500 เช่นเดียวกัน ล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลสอีก 3-5 ครั้งด้วย PBST สุดท้ายนำไปแช่ในสารละลายซับสเตรตของเอนไซม์ HRP 2-5 นาทีที่ประกอบด้วย 0.03 เปอร์เซ็นต์ ไดอะมิโนเบนซิดีน (DAB, 3,3' diaminobenzidine), 0.03 เปอร์เซ็นต์ ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) และ 0.25 เปอร์เซ็นต์ โคบอลต์คลอไรด์ (cobalt chloride) ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ทั้งนี้จะเกิดปฏิกิริยาให้สีดำบนแผ่นกระดาษไนโตรเซลลูโลส สุดท้ายทำการหยุดปฏิกิริยาโดยนำมาล้างด้วยน้ำกลั่น 3-5 ครั้ง (รูปที่ 3.1) (Tanapati, 2014)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.4.8 วิเคราะห์ปริมาณของรีคอมบิแนนท์อินซูลินโดยใช้เทคนิค Indirect competitive ELISA



รูปที่ 3.2 การวิเคราะห์ปริมาณของรีคอมบิแนนท์อินซูลินโดยใช้เทคนิค ELISA

อย่างไรก็ตาม dot blot analysis เป็นเพียงวิธีการวัดเชิงคุณภาพ ดังนั้นการใช้เทคนิค indirect competitive ELISA จึงเป็นวิธีที่ใช้สำหรับศึกษาปริมาณของรีคอมบิแนนท์อินซูลินที่ผลิตได้ โดยขั้นแรกทำการบ่มไมโครเพลท (microplate) ด้วย bovine insulin ที่มีความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน ซึ่งบ่มโดยใช้ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 คืน เสร็จแล้วนำไปล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีนที่มีทวีน (PBST) อยู่ 0.05 เปอร์เซ็นต์ 3-5 ครั้ง จากนั้นทำการเติม 5 เปอร์เซ็นต์ของนมผงขาดมันเนย (skim milk) ที่เจือจางในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน ปริมาตร 300 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จึงนำมาล้าง 3-5 ครั้ง ด้วย PBST ต่อมาเติมตัวอย่างส่วนใสปริมาตร 50 ไมโครลิตรที่ได้ทำการปรับ pH ให้เป็นกลางและผ่านการทำเจือจางด้วย PBS มาแล้วลงไป พร้อมกับทำการเติมโมโนโคลนอลแอนติอินซูลินแอนติบอดี (monoclonal anti-insulin antibody) ในปริมาตรที่เท่ากัน เจือจางด้วย PBS อัตราส่วน 1:10000 นำไป บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำมาล้าง 3-5 ครั้ง ด้วย PBST จากนั้นเติม แอนติบอดีตัวที่สองที่มีเอนไซม์ฮอร์เซอราดิสเปอร์ออกซิเดสติดอยู่ (goat anti-mouse IgG, (H,L) HRP conjugate) ที่ถูกเจือจางด้วยฟอสเฟต

บัฟเฟอร์ซาลีนในอัตราส่วน 1: 10000 เช่นกัน บ่มต่ออีก 1 ชั่วโมง ล้าง 3-5 ครั้ง ด้วย PBST หลังจากนั้นจึงเติมสารละลายซับสเตรตของเอนไซม์ HRP ที่ประกอบด้วย ทีเอ็มบี (TMB, 3,3',5,5'-tetrametyhlbenzidine) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำเจือจางในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO, dimethyl sulfoxide), 200 มิลลิโมลาร์ของโพแทสเซียมซิเตรท และ 30 เปอเซ็นต์ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ทิ้งไว้ในที่มืดประมาณ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จะเกิดปฏิกิริยาให้สีฟ้า แล้วจึงทำการหยุดปฏิกิริยาโดยการเติมกรดซัลฟลูริคเข้มข้น สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร เพื่อวิเคราะห์ปริมาณรีคอมบิแนนท์อินซูลินต่อไป (รูปที่ 3.2) (Thongyoo, 2015)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 4
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ศึกษาชนิดของอาหารที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ *P. pastoris* KM71H (TP1)

4.1.1 ติดตามการเจริญเติบโตของเซลล์เมื่อเลี้ยงในอาหาร YPGly และ YNBGly

จากการศึกษาเพื่อหาชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ *P. pastoris* KM71H (TP1) โดยใช้อาหาร YPGly และ YNBGly ที่มีกลีเซอรอล ความเข้มข้น 0.5% (w/v) และ 1% (w/v) เป็นองค์ประกอบ และมีการใช้ไนโตรเจน (yeast extract peptone) ในปริมาณ 1% (w/v) เท่ากัน จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมง เพื่อติดตามการเจริญของเซลล์จนครบ 48 ชั่วโมง ทั้งนี้สามารถติดตามการเจริญของเซลล์หรือวิเคราะห์ค่าความหนาแน่นของเซลล์ (cell density) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงผ่านเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ โดยใช้ค่าความยาวคลื่นที่ 600 นาโนเมตร และใช้อาหาร YPGly และ YNBGly เป็นตัวปรับค่าเริ่มต้น (autozero) ซึ่งเป็นการใช้หลักการของการดูดกลืนแสงที่ต่างกัน เมื่อมีจำนวนเซลล์ที่ไม่เท่ากัน แสงส่วนหนึ่งจะถูกเซลล์ดูดซับไว้ อย่างไรก็ตามปริมาณแสงที่ถูกดูดซับจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของเซลล์ เช่น ในกรณีที่สารละลายของเซลล์มีความขุ่นมาก ปริมาณแสงที่ถูกดูดซับจะมากขึ้น แสดงว่า ในสารละลายจะมีปริมาณของเซลล์มากกว่าในกรณีที่สารละลายของเซลล์มีความขุ่นน้อย (Sutton, 2006) จากผลการทดลองพบว่า การใช้ YPGly ซึ่งเป็นอาหารที่มีสารอาหารครบสมบูรณ์ ส่งผลให้ *P. pastoris* KM71H (TP1) มีการเจริญเติบและมีความขุ่นของเซลล์ (cell turbidity) สูงกว่าการใช้อาหารสังเคราะห์ (YNBGly) พร้อมกันนี้ก็ได้ทำการศึกษาหาปริมาณกลีเซอรอลที่เหมาะสมด้วย โดยพบว่า เมื่อระยะเวลาผ่านไป 36 ชั่วโมง การใช้กลีเซอรอล 0.5% (w/v) และ 1% (w/v) เป็นองค์ประกอบในอาหาร YPGly ส่งผลให้มีปริมาณความขุ่นของเซลล์สูงสุด อยู่ที่ 21.867±1.290 และ 32.633±1.012 ตามลำดับ ทั้งนี้อาหาร YNBGly ที่มีกลีเซอรอลเป็นองค์ประกอบ 0.5% (w/v) และ 1% (w/v) พบว่ามีความขุ่นของเซลล์สูงสุดอยู่ที่ 10.917±0.808 และ 17.117±0.759 ตามลำดับ ดังแสดงให้เห็นในตารางที่ 4.1

นอกจากนี้การติดตามการเจริญเติบโต (growth curve) ของ *P. pastoris* KM71H (TP1) (รูปที่ 4.1) ยังแสดงให้เห็นว่า เมื่อเวลาผ่านไป 21 ชั่วโมง *P. pastoris* ที่ถูกเลี้ยงในอาหาร YPGly 1%

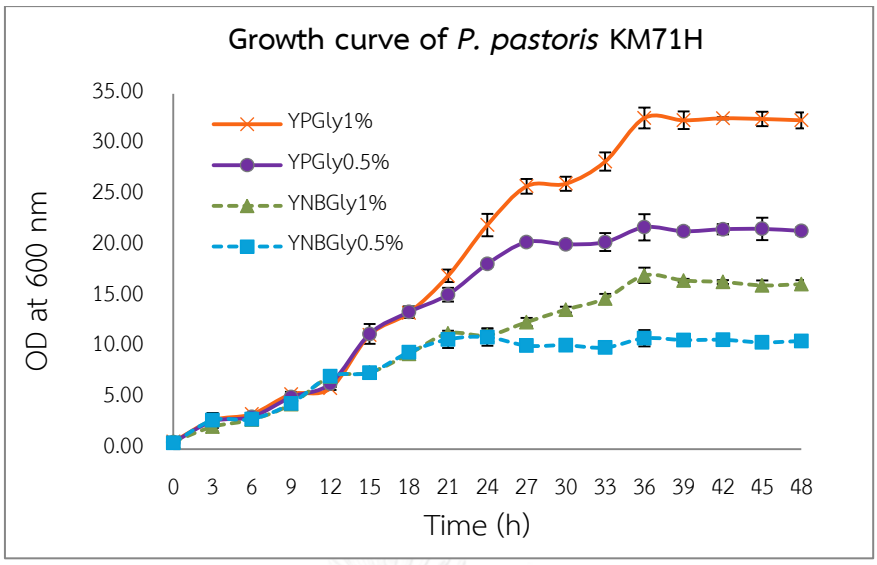
(w/v) จะส่งเสริมให้มีการเจริญเซลล์มากที่สุดอย่างเห็นได้ชัด เนื่องจาก YPGly 1% (w/v) มีสารอาหารมากเพียงพอ (enrichment medium) ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเซลล์ อย่างไรก็ตามชั่วโมงที่ 36 ของการเจริญเติบโต เซลล์จะเริ่มเข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) คือมีปริมาณเซลล์คงที่ หรือ มีอัตราการเพิ่มและอัตราการตายของเซลล์ในปริมาณที่เท่ากัน และเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยในปี 2006 ที่ได้ติดตามการเจริญของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris* สายพันธุ์ GS115 โดยเลี้ยงในอาหาร BMGY (buffered glycerol-complex medium) ซึ่งเป็นสารอาหารที่ประกอบไปด้วย 1% (w/v) ของสารสกัดจากยีสต์ 2% (w/v) ของเปปโตน และ 1% (w/v) ของกลีเซอรอล รวมไปถึงสารอาหารอื่นๆ ได้แก่ 100 mM โพแทสเซียมฟอสเฟต pH 6, 1.34% YNB รวมไปถึงไบโอติน 0.4 $mg.l^{-1}$ (He et al., 2006) พบว่า การเลี้ยงในอาหาร BMGY ส่งผลให้มีความหนาแน่นของเซลล์อยู่ที่ประมาณ 25±0.5 ซึ่งน้อยกว่าการเลี้ยงโดยใช้อาหาร YPGly 1% (w/v) นอกจากนี้ การใช้อาหาร YPGly 1% (w/v) ยังให้ปริมาณความหนาแน่นของเซลล์ที่สูงที่สุดเป็น 1.67 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยก่อนหน้าในปี 2014 ที่ได้ติดตามการเจริญของ *P. pastoris* KM71H เช่นเดียวกัน (Tanapati, 2014) อย่างไรก็ตามนอกจากแหล่งของคาร์บอนที่เป็นส่วนสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์ยีสต์แล้วนั้น ยังมีแหล่งไนโตรเจนซึ่งถือเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่สำคัญในการสร้างองค์ประกอบของเซลล์ยีสต์ โดยยีสต์สามารถใช้แหล่งของไนโตรเจนได้ในรูปของกรดอะมิโน, แอมโมเนียมไอออน, ไนเตรท และยูเรีย ทั้งนี้จากงานวิจัยในปี 2007 (Ni et al., 2007) ได้มีการศึกษาถึงชนิดของไนโตรเจนที่มีผลต่อเจริญของเซลล์ *Phaffia rhodozyme* สายพันธุ์ 7B12 รวมไปถึงผลกระทบต่อการผลิตแอสตาแซนธิน (astaxanthin) โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นคงที่ เท่ากับ 20 $g.l^{-1}$ ทั้งนี้สารสกัดจากยีสต์และเปปโตนก็เป็นแหล่งของไนโตรเจนที่ถูกนำมาศึกษาเช่นเดียวกัน จากงานวิจัยในปี 2007 พบว่า การใช้แหล่งของไนโตรเจนต่างชนิดกันในปริมาณ 1 $g.l^{-1}$ เท่ากัน ส่งผลให้มีปริมาณของเซลล์แตกต่างกัน และปริมาณแอสตาแซนธินที่ได้แตกต่างกันด้วย โดยการใช้เปปโทนและสารสกัดจากยีสต์ ให้ปริมาณของมวลชีวภาพ (biomass) เท่ากับ 4.00 $g.l^{-1}$ และ 3.14 $g.l^{-1}$ ตามลำดับ ซึ่งรองลงมาจากการใช้ สารสกัดจากเนื้อวัวที่มีราคาสูงกว่า (beef extract) ซึ่งให้ปริมาณของมวลชีวภาพ เท่ากับ 5.62 $g.l^{-1}$ ทั้งนี้ไนโตรเจนจะส่งผลต่อการสร้างเซลล์ยีสต์ โดยยีสต์สามารถใช้แหล่งไนโตรเจนที่ได้รับจากภายนอก ในการสร้างกรดอะมิโนบางชนิดเพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการสร้างกรดอะมิโนชนิดอื่นและสร้างเซลล์ เช่น การสร้างกลูทาเมต (glutamate) และ กลูทามีน (glutamine) ขึ้น โดยปกติยีสต์มักใช้กลูทามีนเกือบทั้งหมดในการสร้างอัลฟา-อะมิโนไนโตรเจน

(alpha-amino nitrogen) เพื่อใช้ในกระบวนการสร้างและการเจริญ รวมถึงการคงรูปร่างของเซลล์ยีสต์ ดังนั้นปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อจึงเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการสร้างและการเจริญของเซลล์โดยตรง

ตารางที่ 4.1 ความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยงในอาหารและปริมาณกลีเซอรอลต่างกัน

Time (h)	Cell density at OD 600 nm			
	YPGly 0.5% (w/v) [a]	YPGly 1% (w/v) [b]	YNBGly 0.5% (w/v) [c]	YNBGly 1% (w/v) [d]
0	0.670±0.023	0.724±0.139	0.616±0.013	0.717±0.078
3	2.703±0.640	2.827±0.732	2.840±0.606	2.203±0.488
6	3.317±0.010	3.440±0.026	2.957±0.070	2.897±0.070
9	5.113±0.519	5.400±0.026	4.487±0.107	4.410±0.330
12	6.457±0.345	5.990±0.149	7.530±0.589	7.533±0.310
15	11.347±0.987	11.253±0.101	7.173±0.153	7.147±0.450
18	13.507±0.564	13.427±0.479	9.540±0.314	9.367±0.310
21	15.227±0.681	17.080±0.616	10.813±0.858	11.400±0.060
24	18.250±0.278	22.083±1.109	11.033±0.850	11.200±0.701
27	20.400±0.200	25.900±0.726	10.193±0.266	12.507±0.412
30	20.183±0.058	26.150±0.705	10.233±0.325	13.747±0.277
33	20.400±0.889	28.333±0.907	10.000±0.379	14.830±0.475
36	21.867±1.290	32.633±1.012	10.917±0.808	17.117±0.759
39	21.467±0.351	32.400±0.872	10.750±0.550	16.617±0.153
42	21.667±0.493	32.600±0.100	10.767±0.597	16.467±0.189
45	21.700±1.114	32.533±0.702	10.517±0.340	16.150±0.482
48	21.500±0.361	32.400±0.781	10.650±0.132	16.250±0.397

[a], [b], [c] และ [d] คือ ความแตกต่างของแต่ละกลุ่มที่ได้จากการวิเคราะห์แบบ multiple comparison ที่ระดับนัยสำคัญเท่ากับ 0.05 ด้วยโปรแกรม IBN SPSS (ดังแสดงในภาคผนวก ซ)



รูปที่ 4.1 การติดตามการเจริญเติบโต (growth curve) ของ *P. pastoris* KM71H (TP1) เมื่อเลี้ยงในอาหารและปริมาณกลีเซอรอลต่างกัน

จากการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม IBM SPSS เวอร์ชัน 22 โดยการวิเคราะห์แบบ multiple comparison (ชนิดของอาหาร เวลาที่ใช้ในการเลี้ยง และปริมาณความหนาแน่นของเซลล์) พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 4 สูตรที่มีปริมาณของกลีเซอรอลต่างกันเป็น 0.5% (w/v) และ 1% (w/v) ตามลำดับ (YPGly 0.5% (w/v), YPGly 1% (w/v), YNBGly 0.5% (w/v) และ YNBGly 1% (w/v)) มีค่าเฉลี่ยของปริมาณความหนาแน่นของเซลล์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่การกำหนดระดับนัยสำคัญเท่ากับ 0.05 ($p < 0.05$) และ เมื่อพิจารณาถึงชนิดของอาหารที่ส่งผลต่อปริมาณของเซลล์ในระยะการเจริญเติบโต พบว่า YPGly 1% (w/v) เป็นอาหารที่ส่งผลให้มีค่าเฉลี่ยของปริมาณเซลล์มากที่สุดในทางสถิติ ทั้งนี้เมื่อพิจารณาถึงระยะเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงยีสต์ *P. pastoris* KM71H (TP1) พบว่า เมื่อเซลล์เข้าสู่ชั่วโมงที่ 36 นั้น เซลล์เริ่มเข้าสู่ระยะคงที่ โดยยีสต์มีความหนาแน่นเฉลี่ยของเซลล์ไม่แตกต่างกันตั้งแต่ชั่วโมงที่ 36 จนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 48 ดังแสดงในภาคผนวก ซ

4.1.2 ศึกษาปริมาณของกลีเซอรอลและไนโตรเจนที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง (supernatant) แยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ ถูกนำมาวิเคราะห์หาปริมาณกลีเซอรอลและไนโตรเจนที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งในอาหาร YPGly และ YNBGly ที่มีกลีเซอรอลอยู่ 0.5% (w/v) และ 1% (w/v)

4.1.2.1 การศึกษาปริมาณของกลีเซอรอลโดยใช้เทคนิค HPLC

จากผลการทดลองที่ได้นำส่วนใสมาผ่านการกรองแล้ววิเคราะห์ผ่านเครื่อง HPLC เพื่อหาปริมาณของกลีเซอรอล โดยการคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐาน (standard curve) ดังที่แสดงสมการในภาคผนวก ค และจากผลการทดลองในรูปที่ 4.2ก แสดงปริมาณของกลีเซอรอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเวลาผ่านไปทุก 12 ชั่วโมง สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลีเซอรอลเริ่มต้น 0.5% (w/v) เป็นองค์ประกอบ กลีเซอรอลจะถูกใช้หมดไปตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย กลีเซอรอลเริ่มต้น 1% (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน กลีเซอรอลจะถูกใช้จนหมดที่ชั่วโมงที่ 36 ซึ่งเป็นระยะเวลาเดียวกับที่เซลล์เข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.2 ปริมาณกลีเซอรอลที่เหลือในอาหาร YPGly และ YNBGly

Medium	Residual of glycerol concentration % (w/v)				
	0 h	12 h	24 h	36 h	48 h
YPGly0.5%	0.528±0.002	0.255±0.015	0.000	0.000	0.000
YPGly1%	1.022±0.019	0.683±0.030	0.365±0.168	0.000	0.000
YNBGly0.5%	0.526±0.009	0.254±0.011	0.000	0.000	0.000
YNBGly1%	0.987±0.038	0.767±0.015	0.396±0.006	0.000	0.000

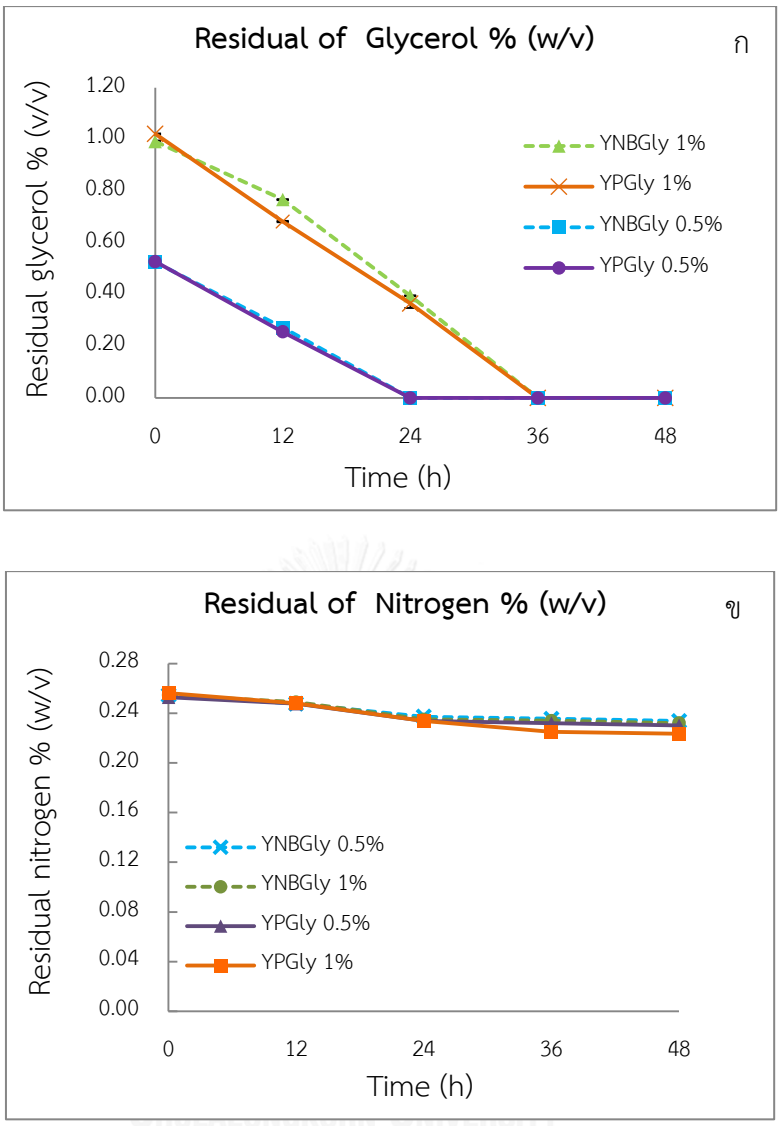
4.1.2.2 การศึกษาปริมาณของไนโตรเจนโดยใช้วิธี Kjeldahl

ส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง (supernatant) จะถูกเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง แล้วนำไปผ่านกระบวนการย่อย การกลั่น และการไทเทรตด้วยกรดไฮโดรคลอลิกที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน เพื่อทำการคำนวณหาปริมาณไนโตรเจน ผ่านสมการดังที่ได้แสดงไว้ใน 3.4.4 (ตารางที่ 4.3) จากการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ (YPGly และ YNBGly) ที่มีกลีเซอรอลเริ่มต้น 0.5% (w/v) และ 1% (w/v) (รูปที่ 4.2ข) พบว่า อาหาร YPGly 1% (w/v) มีปริมาณไนโตรเจนที่เหลือน้อยกว่าในอาหารชนิดอื่นเล็กน้อย ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของปริมาณในการใช้ไนโตรเจน ที่แปรผันตรงกับปริมาณความหนาแน่นของเซลล์เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกับ growth curve ในรูปที่ 4.1

ตารางที่ 4.3 ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือในอาหารเหลือในอาหาร YPGly และ YNBGly

Medium	Residual of nitrogen concentration % (w/v)				
	0 h	12 h	24 h	36 h	48 h
YPGly0.5%	1.580±0.031	1.548±0.015	1.461±0.031	1.450±0.015	1.439±0.015
YPGly1%	1.602±0.031	1.537±0.031	1.462±0.015	1.407±0.000	1.396±0.015
YNBGly0.5%	1.591±0.015	1.548±0.046	1.483±0.046	1.472±0.000	1.461±0.015
YNBGly1%	1.591±0.015	1.525±0.015	1.504±0.015	1.472±0.031	1.450±0.031

อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองในตอนที่ 4.1 นี้สามารถวิเคราะห์และสรุปผลการทดลองได้ว่า การใช้อาหารในการเลี้ยงยีสต์ *P. pastoris* KM71H (TP1) ที่มีแหล่งของไนโตรเจนเป็นสารสกัดจากยีสต์และเปปโตนนั้น (YPGly) มีปริมาณของไนโตรเจนที่เพียงพอที่ยีสต์จะสามารถนำมาใช้ในการเจริญของเซลล์ได้มากกว่าการใช้ยีสต์ไนโตรเจนเบสเป็นแหล่งไนโตรเจน (YNBGly) จนกระทั่งเซลล์เริ่มเข้าสู่ระยะคงที่ 36 ชั่วโมง ที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงความหนาแน่นของเซลล์ โดยปกติยีสต์จำเป็นต้องใช้ไนโตรเจนในการเจริญเติบโต แต่ปริมาณของไนโตรเจนที่ใช้จะไม่สูงมากนักเมื่อเทียบกับการใช้แหล่งคาร์บอน ทั้งนี้แหล่งของไนโตรเจนที่เหลืออยู่ใน YNB อาจไม่ได้อยู่ในรูปที่ยีสต์ *P. pastoris* KM71H (TP1) สามารถนำมาใช้งานได้ดีนัก เมื่อเทียบกับการใช้อาหาร YP เป็นแหล่งของไนโตรเจน จึงส่งผลให้มีค่าความหนาแน่นของเซลล์ เมื่อติดตามวัดได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร แตกต่างกันเมื่อใช้ชนิดของไนโตรเจนแตกต่างกัน ดังรูปที่ 4.1 ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะเลือกใช้อาหาร YPGly ในการเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน เพื่อส่งเสริมการเจริญของยีสต์ *P. pastoris* KM71H (TP1) ต่อไป



รูปที่ 4.2 ปริมาณกลีเซอรอล (ก) และปริมาณไนโตรเจน (ข) ที่เหลือในอาหาร YPGly และ YNBGly

นอกจากนี้เมื่อพิจารณาปริมาณของไนโตรเจนที่เหลือใน YPGly 1% (w/v) ซึ่งเป็นอาหารที่ส่งผลให้เซลล์มีความหนาแน่นสูงกว่าการใช้อาหารชนิดอื่น (รูปที่ 4.2ข) โดยพบว่า ตลอดระยะเวลาในการเลี้ยงยีสต์ *P. pastoris* KM71H (TP1) เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์นั้น อาหาร YPGly 1% (w/v) ยังคงมีปริมาณไนโตรเจนที่เหลืออยู่ในอาหารค่อนข้างสูง ทั้งนี้อาจเกิดจากข้อกำจัดในเรื่องปริมาณของกลีเซอรอลที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญเติบโต ทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโตได้ในระดับหนึ่งเท่านั้น ดังนั้น เพื่อเพิ่มปริมาณความหนาแน่นของเซลล์ยีสต์ *P. pastoris* KM71H การทดลองต่อมาจึงสนใจที่จะศึกษาผลของกลีเซอรอลที่เพิ่มมากขึ้น โดยใช้ความเข้มข้นของกลีเซอรอลเป็น 1% (w/v), 2% (w/v) และ 3% (w/v) ตามลำดับ

4.2 ศึกษาผลของกลีเซอรอลที่มีต่อการเจริญของเซลล์ *P. pastoris* KM71H (TP1)

4.2.1 ติดตามการเจริญเติบโตของเซลล์เมื่อเลี้ยงในอาหาร YPGly 1% (w/v), 2% (w/v) และ 3% (w/v)

จากการทดลองในตอนที่ 4.1 พบว่า อาหาร YPGly ที่มีกลีเซอรอลเริ่มต้น 1% (w/v) เป็นองค์ประกอบ เป็นอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ *P. pastoris* KM71H (TP1) ในช่วง growth phase มากที่สุด ต่อมาจึงศึกษาผลของความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่มากเกินพอ โดยใช้ความเข้มข้นของกลีเซอรอลเป็น 1% (w/v), 2% (w/v) และ 3% (w/v) เพื่อศึกษาปริมาณความหนาแน่นของเซลล์ รวมถึงปริมาณกลีเซอรอลและไนโตรเจนที่เหลือในอาหาร YPGly ต่อไป

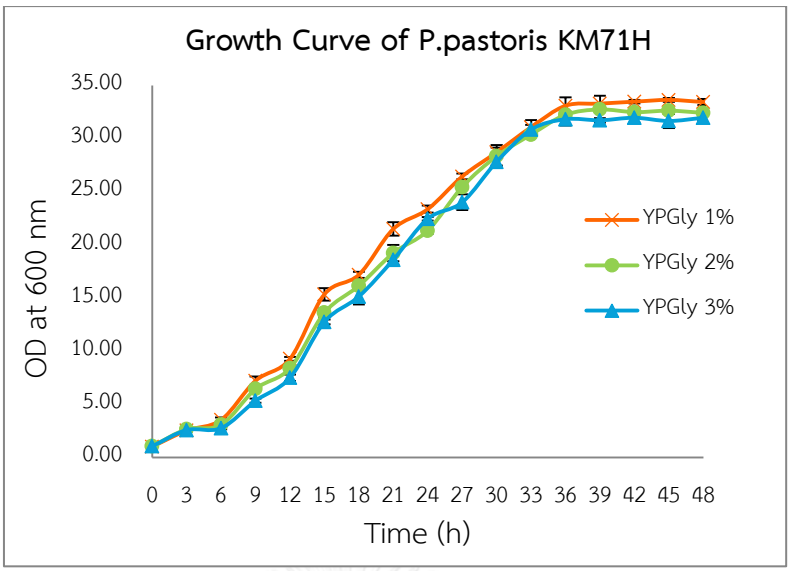
จากการติดตามการเจริญเติบโตของรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* KM71H (TP1) ในทุก 3 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.4) จะพบว่า เมื่อใช้ความเข้มข้นของกลีเซอรอลใน YPGly เป็น 1% (w/v), 2% (w/v) และ 3% (w/v) ส่งผลให้ยีสต์ *P. pastoris* KM71H (TP1) มีการเจริญเติบโตให้ความหนาแน่นของเซลล์ไม่แตกต่างกันมากนัก ซึ่งจากผลการทดลอง เมื่อใช้กลีเซอรอลเริ่มต้น 1% (w/v), 2% (w/v) และ 3% (w/v) เซลล์เริ่มเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่ ที่ชั่วโมงที่ 36 และมีค่าความหนาแน่นของเซลล์ (OD600) อยู่ที่ 33.083±0.802, 32.233±0.284 และ 31.817±0.597 ตามลำดับ (ดังที่แสดงให้เห็นในรูปที่ 4.3) ทั้งนี้แสดงให้เห็นว่า ปริมาณของกลีเซอรอลและไนโตรเจนเริ่มต้นที่ดีที่สุดเพื่อการเจริญของหัวเชื้อ *P. pastoris* KM71H (TP1) ในอาหาร YPGly คือ ปริมาณ 1% (w/v) ทั้งนี้สาเหตุที่เซลล์มีการเจริญได้ในระดับหนึ่งเท่านั้น อาจเกิดได้จากปัจจัยหลายประการ เช่น งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยในระดับขวดเขย่า จึงอาจทำให้มีการละลายของออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ค่อนข้างต่ำ ซึ่งออกซิเจนจะมีผลต่อการเจริญของเซลล์ โดยออกซิเจนจะมีผลต่อกระบวนการหายใจของยีสต์และมีความสำคัญในปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชัน (hydroxylation) ที่มีส่วนในการช่วยสร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัว ซึ่งใช้เป็นองค์ประกอบหลักของเซลล์ (Losen et al., 2004) หรืออาจเกิดจากข้อจำกัดของปริมาณสารสกัดจากยีสต์และเปปโตนที่ใช้ เนื่องจากการทดลองในหัวข้อที่ 4.2 นี้ ยังคงใช้ปริมาณของสารสกัดจากยีสต์และเปปโตนเท่ากับ 1% (w/v) ซึ่งอาจมีไนโตรเจนบางส่วนที่ยีสต์ไม่สามารถนำมาใช้ได้ จึงอาจส่งผลให้เมื่อทำการเพิ่มปริมาณของกลีเซอรอลลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ ยีสต์ *P. pastoris* KM71H (TP1) ก็ยังคงเจริญเติบโตได้ในระดับหนึ่งเท่านั้น

ตารางที่ 4.4 ความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณกลีเซอรอลต่างกัน

Time (h)	Cell density at OD 600 nm		
	YPGly 1% (w/v)[a]	YPGly 2% (w/v)[b]	YPGly 3% (w/v)[c]
0	1.009±0.016	1.045±0.028	1.045±0.029
3	2.523±0.083	2.643±0.075	2.567±0.131
6	3.520±0.225	3.063±0.081	2.747±0.123
9	7.207±0.387	6.433±0.110	5.327±0.189
12	9.267±0.192	8.387±0.323	7.493±0.300
15	15.340±0.590	13.607±0.409	12.747±0.223
18	17.183±0.284	16.142±0.399	15.133±0.742
21	21.487±0.636	19.220±0.779	18.600±0.480
24	23.353±0.325	21.340±0.248	22.453±0.167
27	26.427±0.266	25.440±0.243	24.000±0.741
30	28.707±0.442	28.337±1.060	27.813±0.361
33	31.067±0.671	30.367±0.126	30.833±0.454
36	33.083±0.802	32.233±0.284	31.817±0.597
39	33.283±0.749	32.733±0.247	31.717±0.208
42	33.467±0.176	32.483±0.275	31.953±0.463
45	33.633±0.189	32.617±0.236	31.650+0.654
48	33.433±0.275	32.417±0.153	31.95±0.0265

[a], [b] และ [c] คือ ความแตกต่างของแต่ละกลุ่มที่ได้จากการวิเคราะห์แบบ multiple comparison ที่ระดับนัยสำคัญเท่ากับ 0.05 ด้วยโปรแกรม IBN SPSS (ดังแสดงในภาคผนวก ซ)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



รูปที่ 4.3 การติดตามการเจริญเติบโต (growth curve) ของ *P. pastoris* KM71H เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณกลีเซอรอลต่างกัน

ทั้งนี้จากการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม IBM SPSS เวอร์ชัน 22 โดยการวิเคราะห์แบบ multiple comparison (ชนิดของอาหาร เวลาที่ใช้ในการเลี้ยง และปริมาณความหนาแน่นของเซลล์) พบว่า อาหาร YPGly 1% (w/v), YPGly 2% (w/v) และ YPGly 3% (w/v) มีค่าเฉลี่ยของปริมาณความหนาแน่นของเซลล์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่การกำหนดระดับนัยสำคัญเท่ากับ 0.05 ($p < 0.05$) และ เมื่อพิจารณาถึงชนิดของอาหารที่ส่งผลต่อปริมาณของเซลล์ในระยะการเจริญเติบโต พบว่า YPGly 1% เป็นอาหารที่ส่งผลให้มีค่าเฉลี่ยของปริมาณเซลล์มากที่สุดในทางสถิติ นอกจากนี้เมื่อพิจารณาถึงระยะเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงยีสต์ *P. pastoris* KM71H (TP1) พบว่า เมื่อเซลล์เข้าสู่ชั่วโมงที่ 36 นั้น ซึ่งเป็นระยะเวลาที่เซลล์เริ่มเข้าสู่ระยะคงที่ โดยยีสต์มีความหนาแน่นเฉลี่ยของเซลล์ไม่แตกต่างกันตั้งแต่ชั่วโมงที่ 36 จนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 48 ดังแสดงในภาคผนวก ซ

4.2.2 ศึกษาปริมาณของกลีเซอรอลและไนโตรเจนที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ

4.2.2.1 วิเคราะห์ปริมาณของกลีเซอรอลโดยใช้เทคนิค HPLC

สำหรับอาหาร YPGly ที่มีกลีเซอลรอลเริ่มต้น 1% (w/v) กลีเซอรอลถูกใช้เกือบหมดเมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อผ่านไป 36 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.5) เช่นเดียวกับผลของการใช้กลีเซอรอลที่ได้แสดงในตารางที่ 4.2 ในขณะที่ เมื่อเลี้ยงในอาหาร YPGly ที่มีกลีเซอรอลเริ่มต้นเป็น 2% (w/v) และ 3% (w/v) กลีเซอรอลถูกใช้ไม่หมดและยังคงมีปริมาณของกลีเซอรอลเหลืออยู่ที่ 1.075±0.005%

(w/v) และ 2.068±0.038% (w/v) ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.4ก ซึ่งจากการทดลองนี้ แสดงให้เห็นว่า การเพิ่มขึ้นของปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้นที่มากไป (เกินกว่า 1% (w/v)) ไม่ได้แปรผันตรงกับความหนาแน่นของเซลล์ที่เพิ่มขึ้น ทั้งนี้ การเพิ่มขึ้นของปริมาณเซลล์อาจเกี่ยวข้องกับปัจจัยอื่นๆ อาทิ ปริมาณไนโตรเจน ค่าการละลายออกซิเจน และค่าพลังงานศักย์ของน้ำ เป็นต้น ทั้งนี้ไนโตรเจนถือเป็นองค์ประกอบประมาณ 10% ของน้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ ดังนั้น ยีสต์จึงมีความต้องการไนโตรเจนในระดับที่เพียงพอเพื่อให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีนในการทำหน้าที่เป็นโครงสร้างของเซลล์ อย่างไรก็ตามยีสต์ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโตที่เพียงพอด้วยเช่นเดียวกัน เนื่องจากออกซิเจนมีหน้าที่ในการเป็นตัวรับอิเล็กตรอน (electron) ตัวสุดท้ายในกระบวนการหายใจเพื่อสร้างพลังงานและส่งเสริมการเจริญเติบโต นอกจากนี้ ยังมีค่าพลังงานศักย์ของน้ำที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ด้วย เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเพิ่มปริมาณของกลีเซอรอลขึ้น จะส่งผลให้มีค่าพลังงานศักย์ของน้ำลดลง หรือมีแรงดันออสโมติก (osmotic pressure) เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งจะส่งผลเสียต่อเซลล์ที่ทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญของเซลล์ รวมไปถึงอาจมีการตายของเซลล์เพิ่มขึ้น จึงทำให้ยีสต์ *P. pastoris* KM71H (TP1) มีการดูดซึมกลีเซอรอลเพื่อนำไปใช้สร้างเซลล์ได้ในระดับหนึ่งเท่านั้น (ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์, 2558)

4.2.2.2 วิเคราะห์ปริมาณของไนโตรเจนโดยใช้วิธี Kjeldahl

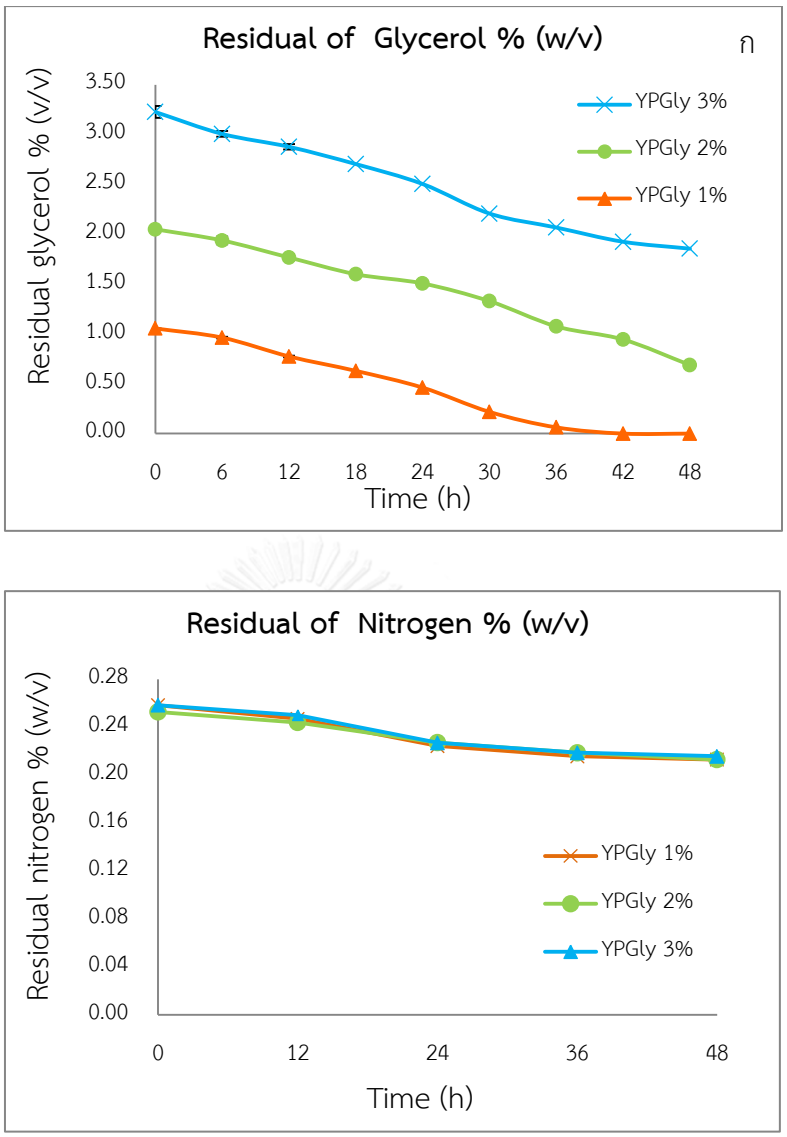
เมื่อวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือทุก 12 ชั่วโมง ในอาหาร YPGly 1% (w/v), 2% (w/v) และ 3% (w/v) จะเห็นว่า ปริมาณของการใช้ไนโตรเจนยังคงสอดคล้องกับผลที่ได้จากการติดตามการเจริญของเซลล์ในก่อนหน้านี้ โดยจะเห็นได้ว่า มีการใช้ไนโตรเจนได้ไม่แตกต่างกันมากนักในอาหารที่มีปริมาณกลีเซอรอลต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.6 นอกจากนี้จะเห็นว่าปริมาณการใช้ไนโตรเจนจะคงที่หลังจาก 36 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับระยะเวลาที่เซลล์เข้าสู่ระยะคงที่ หรือ stationary phase

ตารางที่ 4.5 ปริมาณของกลีเซอรอลที่เหลือในอาหาร YPGly 1% (w/v), 2% (w/v) และ 3% (w/v)

Time (h)	Residual of glycerol % (w/v)		
	YPGly 1% (w/v)	YPGly2% (w/v)	YPGly 3% (w/v)
0	1.055±0.001	2.050±0.000	3.227±0.059
6	0.963±0.009	1.938±0.039	3.007±0.029
12	0.774±0.008	1.767±0.029	2.877±0.026
18	0.629±0.001	1.599±0.016	2.704±0.007
24	0.461±0.002	1.507±0.025	2.504±0.062
30	0.218±0.012	1.329±0.003	2.208±0.009
36	0.063±0.000	1.075±0.005	2.068±0.038
42	0.000	0.944±0.003	1.925±0.002
48	0.000	0.688±0.001	1.855±0.004

ตารางที่ 4.6 ปริมาณไนโตรเจนที่เหลือในอาหารเหลือในอาหาร YPGly 1% (w/v), 2% (w/v) และ 3% (w/v)

Time (h)	Residual of nitrogen % (w/v)		
	YPGly 1% (w/v)	YPGly 2% (w/v)	YPGly 3% (w/v)
0	0.258±0.005	0.253±0.005	0.258±0.005
12	0.247±0.000	0.244±0.005	0.250±0.005
24	0.224±0.005	0.227±0.005	0.227±0.005
36	0.216±0.005	0.219±0.009	0.219±0.005
48	0.210±0.005	0.213±0.005	0.216±0.005



รูปที่ 4.4 ปริมาณกลีเซอรอล (ก) และไนโตรเจน (ข) ที่เหลือในอาหาร YPGly1% (w/v), 2% (w/v) และ 3% (w/v)

จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า การเจริญเติบโตของเซลล์ *P. pastoris* KM71H (TP1) ไม่ได้ขึ้นกับข้อจำกัดในเรื่องของปริมาณกลีเซอรอลเพียงอย่างเดียว ทั้งนี้อาจขึ้นกับข้อจำกัดของปริมาณไนโตรเจน เนื่องจาก รูปที่ 4.4ข ชี้ให้เห็นว่า ยีสต์ *P. pastoris* KM71H (TP1) สามารถใช้ไนโตรเจนได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น ดังนั้นการทดลองต่อมาจึงทำการศึกษาผลของไนโตรเจนที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยเพิ่มปริมาณของแหล่งไนโตรเจนขึ้นตามลำดับ ดังนี้

- 1% (w/v) สารสกัดจากยีสต์, 1% (w/v) เปปโตน และ 1% (w/v) กลีเซอรอล (Y1P1Gly1% (w/v))

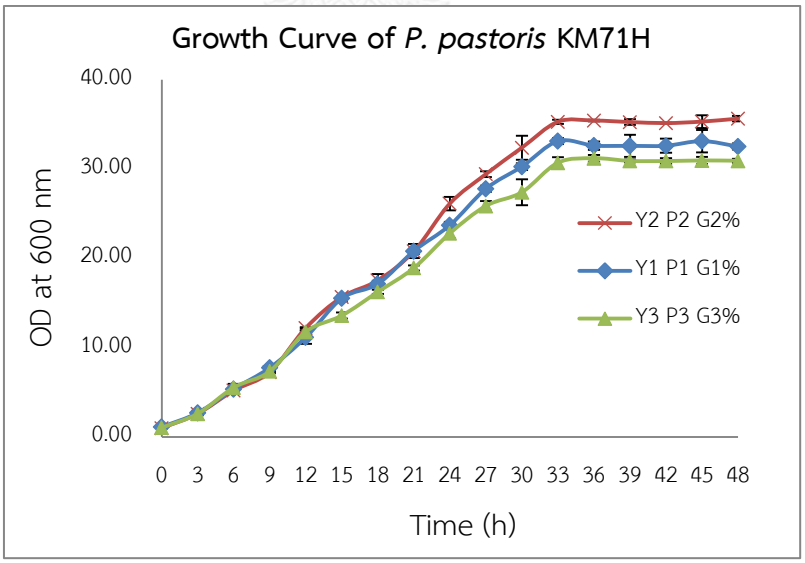
- 2% (w/v) สารสกัดจากยีสต์, 2% (w/v) เปปโตน และ 2% (w/v) กลีเซอรอล (Y2P2Gly2% (w/v))

- 3% (w/v) สารสกัดจากยีสต์, 3% (w/v) เปปโตน และ 3% (w/v) กลีเซอรอล (Y3P3Gly3% (w/v))

4.3 ศึกษาผลของไนโตรเจนที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์ *P. pastoris* KM71H (TP1)

4.3.1 ติดตามการเจริญเติบโตของเซลล์เมื่อเลี้ยงในอาหาร Y1P1Gly1% (w/v), Y2P2Gly2% (w/v) และ Y3P3Gly3% (w/v)

สำหรับการติดตามการเจริญเติบโตของเซลล์ *P. pastoris* KM71H (TP1) (รูปที่ 4.5) เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณของกลีเซอรอลและไนโตรเจนที่แตกต่างกัน จะเห็นว่ามีปริมาณความหนาแน่นของเซลล์แตกต่างกันอยู่เล็กน้อย โดยเมื่อระยะเวลาผ่านไป 33 ชั่วโมง ในอาหาร Y2P2Gly2% (w/v) จะมีความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดอยู่ที่ 35.433±0.104 ในขณะที่การใช้อาหาร Y1P1Gly1% (w/v) และ Y3P3Gly3% (w/v) ยีสต์จะมีความหนาแน่นของเซลล์อยู่ที่ 32.633±0.465 และ 31.217±0.379 ตามลำดับ ดังแสดงให้เห็นในตารางที่ 4.7



รูปที่ 4.5 การติดตามการเจริญเติบโต (growth curve) ของ *P. pastoris* KM71H เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณกลีเซอรอลและไนโตรเจนต่างกัน

ทั้งนี้เนื่องมาจากการเพิ่มปริมาณของกลีเซอรอลและไนโตรเจนที่มากเกินพอในอาหาร Y3P3Gly3% (w/v) ส่งผลให้มีแรงดันออสโมติกที่สูงขึ้น ซึ่งมีผลต่อการเจริญของเซลล์ *P. pastoris* KM71H ที่สามารถทนต่อแรงดันออสโมติกได้ในระดับหนึ่งเท่านั้น อาจทำเซลล์ยีสต์บางส่วนตายลงไป จึงเห็นว่า เมื่อเพิ่มปริมาณสารอาหารให้มีปริมาณของกลีเซอรอลและไนโตรเจนมากที่สุดแล้วนั้น ยีสต์จะมีความหนาแน่นของเซลล์ที่ลดต่ำลงกว่าการใช้สารอาหารในปริมาณที่น้อยกว่า เช่นเดียวกับงานวิจัยในปี 2011 ที่ได้ศึกษาผลของปริมาณกลีเซอรอลและชนิดของไนโตรเจนที่มีผลต่อปริมาณชีวมวลของเซลล์ยีสต์ ซึ่งจากงานวิจัยพบว่า เมื่อใช้ปริมาณของสารสกัดจากยีสต์และเปปโตนคงที่อยู่ที่ 1% และทำการเพิ่มปริมาณของกลีเซอรอลมากเกินพอในระดับหนึ่ง (มากกว่า 10% (w/v)) เซลล์จะมีการเจริญเติบโตที่ลดต่ำลงเล็กน้อย ซึ่งคิดเป็นปริมาณชีวมวลอยู่ที่ประมาณ 2 $g.l^{-1}$ และการใช้ชนิดของแหล่งไนโตรเจนเป็นสารสกัดจากยีสต์และเปปโตนจะให้ปริมาณเซลล์สูงที่สุดเช่นเดียวกัน ทั้งนี้เนื่องมาจากการใช้ปริมาณของกลีเซลรอลที่มากเกินพอจะส่งผลต่อกระบวนการยับยั้งการสังเคราะห์กรดไขมันบางชนิดยีสต์ เช่นเดียวกับชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์โครงสร้างของเซลล์ (Kitcha, and Cheirsilp, 2011)

สำหรับการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม IBM SPSS เวอร์ชัน 22 โดยการวิเคราะห์แบบ multiple comparison (ชนิดของอาหาร เวลาที่ใช้ในการเลี้ยง และปริมาณความหนาแน่นของเซลล์) พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 สูตรที่มีปริมาณของกลีเซอรอลและไนโตรเจนต่างกันเป็น 1% (w/v), 2% (w/v) และ 3% (w/v) ตามลำดับ (Y1P1Gly1% (w/v), Y2P2Gly2% (w/v)และ Y3P3Gly3% (w/v)) มีค่าเฉลี่ยของปริมาณความหนาแน่นของเซลล์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่การกำหนดระดับนัยสำคัญเท่ากับ 0.05 ($p < 0.05$) และ เมื่อพิจารณาถึงชนิดของอาหารที่ส่งผลต่อปริมาณของเซลล์ในระยะการเจริญเติบโต พบว่า Y2P2Gly2% (w/v) เป็นอาหารที่ส่งผลให้มีค่าเฉลี่ยของปริมาณเซลล์มากที่สุดในทางสถิติ ในขณะที่อาหาร Y1P1Gly1% (w/v) เป็นอาหารที่ส่งผลให้มีค่าเฉลี่ยของปริมาณเซลล์รองลงมา คิดเป็นค่าเฉลี่ยทางสถิติเท่ากับ 21.181 ทั้งนี้เมื่อพิจารณาถึงระยะเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงยีสต์ *P. pastoris* KM71H (TP1) พบว่า เมื่อเซลล์เข้าสู่ชั่วโมงที่ 33 นั้น เซลล์เริ่มเข้าสู่ระยะคงที่ โดยยีสต์มีความหนาแน่นเฉลี่ยของเซลล์ไม่แตกต่างกันตั้งแต่ชั่วโมงที่ 33 จนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 48 ดังแสดงในภาคผนวก ซ

ตารางที่ 4.7 ความหนาแน่นของเซลล์เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณกลีเซอรอลและไนโตรเจนต่างกัน

Time (h)	Cell density at OD 600 nm		
	Y1P1Gly1% (w/v)[a]	Y2P2Gly2% (w/v)[b]	Y3P3Gly3% (w/v)[c]
0	1.119±0.122	0.999±0.038	1.045±0.091
3	2.710±0.225	2.617±0.194	2.617±0.110
6	5.370±0.105	5.217±0.297	5.553±0.386
9	7.760±0.175	7.267±0.139	7.353±0.095
12	11.167±0.723	12.220±0.080	11.793±0.150
15	15.525±0.295	15.667±0.146	13.600±0.353
18	17.150±0.328	17.533±0.714	16.250±0.238
21	20.827±0.777	20.800±0.280	18.933±0.289
24	23.720±0.367	26.147±0755	22.813±0.600
27	27.800±0.349	29.440±0.327	25.880±0.541
30	30.283±0.382	32.400±1.348	27.417±1.451
33	33.133±0.333	35.300±0.229	30.717±0.603
36	32.633±0.465	35.433±0.104	31.217±0.379
39	32.600±1.226	35.267±0.325	30.917±0.176
42	32.617±0.791	35.150±0.050	30.900±0.312
45	33.133±1.255	35.317±0.711	30.967+0.407
48	32.533±0.333	35.650±0.300	31.933±0.021

[a], [b] และ [c] คือ ความแตกต่างของแต่ละกลุ่มที่ได้จากการวิเคราะห์แบบ multiple comparison ที่ระดับนัยสำคัญเท่ากับ 0.05 ด้วยโปรแกรม IBN SPSS (ดังแสดงในภาคผนวก ซ)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

4.3.2 ศึกษาปริมาณของกลีเซอรอลและไนโตรเจนที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ

4.3.2.1 วิเคราะห์ปริมาณของกลีเซอรอลโดยใช้เทคนิค HPLC

จากผลการทดลองพบว่า ปริมาณกลีเซอรอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ Y1P1Gly1% (w/v) จะถูกใช้ไปเกือบหมดที่ชั่วโมงที่ 36 คือ มีปริมาณกลีเซอลที่เหลืออยู่ในอาหารเท่ากับ 0.066±0.001

% (w/v) ในขณะที่การเพิ่มปริมาณของแหล่งไนโตรเจน (yeast extract peptone) ควบคู่กับการเพิ่มปริมาณกลีเซอรอล เป็น 2% (w/v) และ 3% (w/v) ยังคงมีปริมาณกลีเซอรอลเหลืออยู่เช่นเดิมเท่ากับ 0.750±0.044% (w/v) และ 1.973±0.052 % (w/v) ตามลำดับ (ตารางที่ 4.8, รูปที่ 4.6ก)

4.3.2.2 วิเคราะห์ปริมาณของไนโตรเจนโดยใช้วิธี Kjeldahl

จากการวิเคราะห์ปริมาณของไนโตรเจนที่เหลือในอาหารทั้ง 3 สูตร คือ Y1P1Gly1% (w/v) Y2P2Gly2% (w/v) และ Y3P3Gly3% (w/v) แสดงให้เห็นว่าเมื่อระยะเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อยังคงมีปริมาณของไนโตรเจนเหลืออยู่คิดเป็น 0.207±0.005% (w/v), 0.432±0.005% (w/v) และ 0.750±0.005% (w/v) (ตารางที่ 4.9, รูปที่ 4.6ข) ตามลำดับ ทั้งนี้สามารถคำนวณปริมาณของไนโตรเจนที่ใช้ไปในอาหาร Y1P1Gly1% (w/v), Y2P2Gly2% (w/v) และ Y3P3Gly3% (w/v) เมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อผ่านไปทั้งสิ้น 48 ชั่วโมง ได้เท่ากับ 0.063% (w/v), 0.099% (w/v) และ 0.040% (w/v) ตามลำดับ ทั้งนี้พบว่า ปริมาณของการใช้ไนโตรเจนแปรผันตรงกับปริมาณของเซลล์ในระยะเจริญ (รูปที่ 4.5) โดยเมื่อเลี้ยง *P. pastoris* KM71H (TP1) ใน Y2P2Gly2% (w/v) ส่งผลให้ยีสต์มีสามารถในการใช้ไนโตรเจนและมีความหนาแน่นของเซลล์มากกว่าการเลี้ยง *P. pastoris* KM71H (TP1) ในสูตรอาหารชนิดอื่นเล็กน้อย แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดจากยีสต์และเปปโตน ซึ่งใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนมีราคาค่อนข้างแพงคิดเป็นประมาณ 56 บาทต่อลิตร ดังนั้น จึงไม่คุ้มค่าต่อการเพิ่มปริมาณของสารสกัดจากยีสต์และเปปโตนขึ้นเพื่อให้ได้ปริมาณของเซลล์เพิ่มขึ้นเล็กน้อย ดังนั้น การใช้อาหาร Y1P1Gly1% (w/v) จึงเป็นอาหารที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเพื่อใช้เพิ่มจำนวนเซลล์ของ *P. pastoris* KM71H (TP1) มากที่สุด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

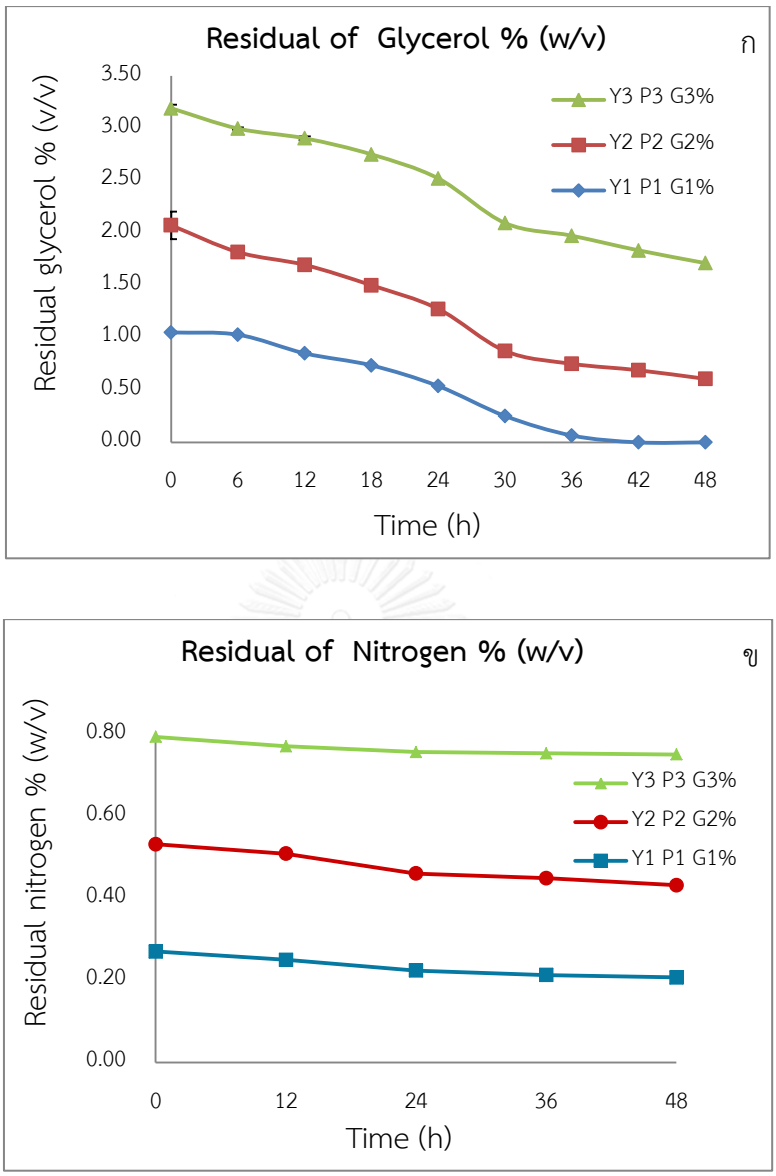
ตารางที่ 4.8 ปริมาณของกลีเซอรอลที่เหลือในอาหาร Y1P1Gly1% (w/v), Y2P2Gly2% (w/v) และ Y3P3Gly3% (w/v)

Time (h)	Residual of glycerol % (w/v)		
	Y1P1Gly1% (w/v)	Y2P2Gly2% (w/v)	Y3P3Gly3% (w/v)
0	1.050±0.008	2.073±0.132	3.191±0.035
6	1.028±0.004	1.817±0.058	2.997±0.012
12	0.850±0.011	1.69±0.050	2.904±0.019
18	0.735±0.003	1.500±0.024	2.750±0.043
24	0.538±0.020	1.274±0.041	2.520±0.04
30	0.252±0.007	0.873±0.013	2.094±0.024
36	0.066±0.001	0.750±0.044	1.973±0.052
42	0.000	0.688±0.004	1.834±0.056
48	0.000	0.607±0.005	1.712±0.011

ตารางที่ 4.9 ปริมาณของไนโตรเจนที่เหลือในอาหาร Y1P1Gly1% (w/v), Y2P2Gly2% (w/v) และ Y3P3Gly3% (w/v)

Time (h)	Residual of nitrogen % (w/v)		
	Y1P1Gly1% (w/v)	Y2P2Gly2% (w/v)	Y3P3Gly3% (w/v)
0	0.270±0.005	0.531±0.005	0.792±0.009
12	0.250±0.005	0.508±0.005	0.769±0.005
24	0.224±0.005	0.456±0.000	0.755±0.005
36	0.213±0.000	0.449±0.009	0.752±0.000
48	0.207±0.005	0.432±0.005	0.750±0.005

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 4.6 ปริมาณกลีเซอรอล (ก) และไนโตรเจน (ข) ที่เหลือใน Y1P1Gly1% (w/v), Y2P2Gly2% (w/v) และ Y3P3Gly3% (w/v)

ทั้งนี้จากการทดลองที่ผ่านมาในหัวข้อที่ 4.1, 4.2 และ 4.3 แสดงให้เห็นว่า ปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่ได้จากสารสกัดของยีสต์และเปปโตน หรือ ยีสต์ไนโตรเจนเบส รวมถึงปริมาณของกลีเซอรอล ไม่ใช่ข้อจำกัดในการเลี้ยงยีสต์ *P. pastoris* KM71H (TP1) เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์เท่านั้น ซึ่งอาจมีสาเหตุอื่นเข้ามาเกี่ยวข้องดังที่ได้กล่าวไปแล้วในข้างต้น อย่างไรก็ตามจากการทดลองนี้จึงสรุปได้ว่า YPGly ที่มีความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์, เปปโตน และกลีเซอรอลเป็น 1% (w/v) นั้นเป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเซลล์ยีสต์ *P. pastoris* KM71H (TP1) เพื่อให้เกิดความ

หนาแน่นของเซลล์สูงที่สุดและคุ้มค่าที่สุดในระยะการเจริญเติบโต โดยทำการเลี้ยงเชื้อจนกระทั่ง 24 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในระยะการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินของยีสต์ต่อไป

4.4 ศึกษาชนิดของอาหาร (YPMet, YNBMet และ MMH) รวมถึงปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลิน

4.4.1 ศึกษาผลของชนิดอาหาร YPMet, YNBMet และ MMH โดยใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น OD600 เท่ากับ 1

จากการนำรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris* KM71H (TP1) ที่เพิ่มจำนวนเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPGly1% (w/v)เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาเลี้ยงต่อในอาหาร YPMet, YNBMet และ MMH ที่มีเมทานอล 1% (v/v) เป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อเหนี่ยวนำให้มีการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลิน โดยจะทำการเติมเมทานอลทุกๆ 24 ชั่วโมง และใช้หัวเชื้อที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (OD600) ประมาณ 1±0.2 จากนั้นทำการตรวจติดตามและวิเคราะห์ปริมาณของรีคอมบิแนนท์อินซูลินที่เกิดขึ้น รวมถึงศึกษาปริมาณของเมทานอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิด จากผลการทดลองวิเคราะห์ปริมาณของรีคอมบิแนนท์อินซูลินด้วยเทคนิค dot-blot และ indirect competitive ELISA พบว่าเมื่อใช้ปริมาณของหัวเชื้อ OD600=1 ในอาหาร YPMet ส่งผลให้มีปริมาณของรีคอมบิแนนท์อินซูลินสูงสุดอยู่ที่ชั่วโมงที่ 72 คิดเป็นความเข้มข้นเท่ากับ 3.723±0.022 $mg.l^{-1}$ ในขณะที่ *P. pastoris* KM71H (TP1) ที่เจริญในอาหาร MMH และ YNBMet จะมีอินซูลินที่เกิดขึ้นในปริมาณน้อยกว่าคิดเป็นความเข้มข้นเท่ากับ 1.522±0.072 $mg.l^{-1}$ และ 1.153±0.022 $mg.l^{-1}$ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.10) ซึ่งสอดคล้องกับการติดตามปริมาณของรีคอมบิแนนท์อินซูลินด้วยวิธี dot-blot (รูปที่ 4.7) ทั้งนี้เนื่องจากการใช้หัวเชื้อที่มีปริมาณน้อย อาจไม่เหมาะสมกับการเลี้ยงใน YNBMet และ MMH ซึ่งเป็นเพียงอาหารสังเคราะห์ที่ประกอบด้วย วิตามิน กรดอะมิโน และแร่ธาตุที่จำเป็นเท่านั้น ในขณะที่ YPMet เป็นสูตรอาหารสมบูรณ์ที่ทำให้เชื้อเจริญเติบโตได้ดีกว่า ซึ่งสามารถยืนยันได้จากการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการทดลองที่ผ่านมา โดยเมื่อมีปริมาณของเซลล์เยอะ ยีสต์ *P. pastoris* KM71H (TP1) จึงสามารถผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินได้มากกว่าการใช้อาหารสังเคราะห์ ดังนั้น อาหาร YPMet จึงเหมาะกับการผลิตแบบใช้ปริมาณหัวเชื้อที่มีปริมาณน้อย (ในสภาวะปกติ) ทั้งนี้เมื่อวิเคราะห์ปริมาณของเมทานอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิด พบว่า YPMet เป็น

อาหารที่มีปริมาณเมทานอลเหลืออยู่น้อยที่สุด ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของการใช้เมทานอลกับปริมาณรีคอมบิแนนท์อินซูลินที่เกิดขึ้น ดังแสดงให้เห็นในตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.10 ปริมาณรีคอมบิแนนท์อินซูลินเมื่อใช้ปริมาณของหัวเชื้อเป็นแบบ OD600=1

Time(h)	MIP concentration ($mg.l^{-1}$)		
	OD600 =1		
	YPMet[a]	YNBMet[b]	MMH[c]
0	0.195±0.000	0.044±0.096	0.153±0.079
12	2.416±0.006	0.886±0.078	1.177±0.028
24	2.605±0.078	0.933±0.058	1.241±0.014
36	2.997±0.069	0.988±0.032	1.349±0.044
48	3.363±0.008	1.097±0.005	1.379±0.041
60	3.509±0.008	1.127±0.026	1.403±0.007
72	3.723±0.022	1.153±0.022	1.522±0.072

[a], [b] และ [c] คือ ความแตกต่างของแต่ละกลุ่มที่ได้จากการวิเคราะห์แบบ multiple comparison ที่ระดับนัยสำคัญเท่ากับ 0.05 ด้วยโปรแกรม IBN SPSS (ดังแสดงในภาคผนวก ซ)

ตารางที่ 4.11 เมทานอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้ปริมาณของหัวเชื้อเป็นแบบ OD600=1

Time(h)	Methanol concentration % (v/v)		
	OD600 =1		
	YPMet	YNBMet	MMH
0	1.048±0.063	1.068±0.013	1.032±0.086
12	0.881±0.072	0.935±0.013	0.798±0.014
24*	0.741±0.058	0.726±0.016	0.685±0.026
36	1.098±0.025	1.794±0.036	1.319±0.013
48*	0.908±0.023	1.244±0.035	1.107±0.012
60	1.593±0.032	1.846±0.076	1.821±0.016
72	1.328±0.058	1.814±0.026	1.819±0.056

* ชั่วโมงที่ทำการเติมเมทานอลให้เป็น 1% (v/v)

โดยจากการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม IBM SPSS เวอร์ชัน 22 โดยการวิเคราะห์แบบ multiple comparison (ชนิดของอาหาร และเวลาที่ใช้ในการเลี้ยง) พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิดที่มีปริมาณของเมทานอล 1% (v/v) เป็นองค์ประกอบ พร้อมทั้งทำการเติมทุก 24 ชั่วโมง (YPMet, YNBMet และ MMH) มีค่าเฉลี่ยของปริมาณรีคอมบิแนนท์อินซูลินแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่การกำหนดระดับนัยสำคัญเท่ากับ 0.05 ($p < 0.05$) และ เมื่อพิจารณาถึงชนิดของอาหารที่ส่งผลต่อการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลิน พบว่า YPMet เป็นอาหารที่ส่งผลให้มีค่าเฉลี่ยของปริมาณรีคอมบิแนนท์อินซูลินมากที่สุดในทางสถิติ ทั้งนี้เมื่อพิจารณาถึงระยะเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงยีสต์ *P. pastoris* KM71H (TP1) เพื่อให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลิน พบว่า ยีสต์สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินเฉลี่ยไม่แตกต่างกันตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 จนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 72 ดังแสดงในภาคผนวก ซ

4.4.2 ศึกษาผลของชนิดอาหารทั้ง 3 ชนิดและปริมาณหัวเชื้อแบบ 1xHCD

จากผลของการทดลองเมื่อทำการเพิ่มปริมาณของหัวเชื้อในการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินให้เป็นแบบหัวเชื้อเข้มข้น 1 เท่า คือ ถ่ายหัวเชื้ออายุ 24 ชั่วโมงจากอาหาร (YPGly1% (w/v)) ในช่วงระยะเจริญเติบโตทั้งหมด ลงในอาหารเหนี่ยวนำการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน (ทั้ง 3 ชนิด) ในปริมาตรที่เท่ากันกับปริมาตรอาหารที่ใช้เลี้ยงหัวเชื้อเริ่มต้น จะได้ค่าความขุ่นเริ่มต้น (OD600) เป็น 35±5 ทำการเลี้ยงที่สภาวะเดิม โดยในอาหารทั้ง 3 ชนิด ใช้ เมทานอล 1% (v/v) เป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลีเซอรอล และเมทานอลยังทำหน้าที่ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินอีกด้วย โดยทำการเติมเมทานอล 1% (v/v) ทุกๆ 24 ชั่วโมง จากการติดตามปริมาณของรีคอมบิแนนท์อินซูลินในทุก 12 ชั่วโมง ด้วยวิธี dot-blot (รูปที่ 4.7) ชี้ให้เห็นว่า เมื่อเพิ่มปริมาณของหัวเชื้อเป็นแบบ 1xHCD ส่งผลให้มีการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินสูงขึ้น โดยเห็นเป็นจุดสีดำที่แสดงบนแผ่นเมมเบรนที่มีสีเข้มกว่าการใช้หัวเชื้อแบบ OD600=1 และจุดสีดำที่เกิดขึ้นนี้จะเข้มขึ้นเรื่อยๆ ในทุก 12 ชั่วโมง จนกระทั่งเข้าสู่ระยะสุดท้ายของการเลี้ยงเชื้อที่ 72 ชั่วโมง นอกจากนี้ ในอาหาร MMH ยังแสดงให้เห็นถึงความเข้มของจุดสีดำที่มากที่สุดอีกด้วย ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณของรีคอมบิแนนท์อินซูลินด้วยวิธี ELISA (ตารางที่ 4.12) พบว่า ในอาหาร MMH ยีสต์ *P. pastoris* สามารถผลิต MIP ออกมาภายนอกเซลล์ได้สูงที่สุดที่ 72 ชั่วโมง โดยคิดเป็นความเข้มข้นเท่ากับ 6.340±0.018 $mg.l^{-1}$ ในขณะที่ YNBMet และ YPMet มีปริมาณของ MIP รองลงมา คิดเป็นความเข้มข้นเท่ากับ 4.470±0.003 $mg.l^{-1}$ และ 3.956±0.012 $mg.l^{-1}$ ตามลำดับ อย่างไรก็ตามจากตารางที่ 4.13

ปริมาณเมทานอลที่เหลือ พบว่า ยังคงมีปริมาณของเมทานอลที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิด อย่างไรก็ตาม ในอาหาร YPMet เมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อผ่านไปที่ 60 ถึง 72 ชั่วโมง ยีสต์ *P. pastoris* จะมีการใช้เมทานอลใน YPMet ได้น้อยลง อาจเนื่องมาจาก YPMet เป็นอาหารที่มีความสมบูรณ์กว่า YNBMet และ MMH จึงส่งเสริมการเจริญเติบโตของยีสต์ได้ดี และเร่งอัตราการตายของเซลล์ด้วย ดังนั้นปริมาณของเมทานอลจึงเหลืออยู่สูงในระยะท้ายๆ ของการเลี้ยง ซึ่งในกระบวนการย่อยสลายเซลล์ที่ตายแล้วจะมีการหลั่งเอนไซม์โปรติเอส (protease enzyme) ทำให้รีคอมบิแนนท์อินซูลินอาจถูกย่อยสลายไปในบางส่วน ดังนั้นปริมาณของ MIP จึงเหลือน้อยกว่าในอาหารชนิดอื่นที่มีเพียงแค่สารอาหารที่จำเป็นเท่านั้น นอกจากอาจเกิดจากการที่มีปริมาณของไนโตรเจนที่มากเพียงพอ ยีสต์จะใช้ไนโตรเจนไปกับการเจริญของเซลล์มากกว่าการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลิน ทำให้การเลี้ยง *P. pastoris* ในอาหารที่มีไนโตรเจนที่สมบูรณ์ส่งผลให้มีปริมาณของรีคอมบิแนนท์อินซูลินน้อยกว่าการใช้อาหารสังเคราะห์

ตารางที่ 4.12 ปริมาณรีคอมบิแนนท์อินซูลินของ *P. pastoris* KM71H (TP1) เมื่อเลี้ยงในอาหาร YPMet, YNBMet และMMH โดยใช้ปริมาณของหัวเชื้อเป็นแบบ 1xHCD

Time (h)	MIP concentration ($mg.l^{-1}$)		
	1x high cell density		
	YPMet[a]	YNBMet[b]	MMH[c]
0	0.155±0.105	0.044±0.018	0.137±0.024
12	2.561±0.002	1.386±0.017	1.580±0.089
24	2.636±0.007	1.553±0.098	2.552±0.061
36	3.297±0.039	2.529±0.053	2.977±0.006
48	3.510±0.025	3.378±0.041	4.749±0.033
60	3.638±0.114	4.222±0.017	6.284±0.085
72	3.956±0.012	4.470±0.003	6.340±0.018

[a], [b] และ [c] คือ ความแตกต่างของแต่ละกลุ่มที่ได้จากการวิเคราะห์แบบ multiple comparison ที่ระดับนัยสำคัญเท่ากับ 0.05 ด้วยโปรแกรม IBN SPSS (ดังแสดงในภาคผนวก ซ)

ตารางที่ 4.13 เมทานอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้ปริมาณของหัวเชื้อเป็นแบบ 1xHCD

Time(h)	Methanol concentration % (v/v)		
	1X high cell density		
	YPMet	YNBMet	MMH
0	1.003±0.024	1.035±0.064	1.049±0.025
12	0.784±0.034	0.699±0.013	0.668±0.023
24*	0.494±0.052	0.556±0.012	0.521±0.018
36	0.825±0.014	1.198±0.039	0.930±0.021
48*	0.741±0.046	1.003±0.083	0.997±0.042
60	1.505±0.040	1.403±0.055	1.360±0.020
72	1.306±0.019	1.154±0.019	0.935±0.030

* ชั่วโมงที่ทำการเติมเมทานอลให้เป็น 1% (v/v)

อย่างไรก็ตามจากการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม IBM SPSS เวอร์ชัน 22 โดยการวิเคราะห์แบบ multiple comparison (ชนิดของอาหาร และเวลาที่ใช้ในการเลี้ยง) พบว่า อาหาร YPMet, YNBMet และ MMH มีค่าเฉลี่ยของปริมาณรีคอมบิแนนท์อินซูลินแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่การกำหนดระดับนัยสำคัญเท่ากับ 0.05 ($p < 0.05$) และ เมื่อพิจารณาถึงชนิดของอาหารที่ส่งผลต่อการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลิน พบว่า MMH เป็นอาหารที่ส่งผลให้มีค่าเฉลี่ยของปริมาณรีคอมบิแนนท์อินซูลินมากที่สุดในทางสถิติ ซึ่งเมื่อพิจารณาถึงระยะเวลาที่ใช้ในการเลี้ยง เพื่อให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลิน พบว่า *P. pastoris* KM71H สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินเฉลี่ยไม่แตกต่างกันตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 จนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 72 ดังแสดงในภาคผนวก ซ

4.4.3 ศึกษาผลของชนิดอาหารทั้ง 3 ชนิดและปริมาณหัวเชื้อแบบ 5xHCD

สำหรับผลของการทดลองเมื่อทำการเพิ่มปริมาณของหัวเชื้อให้เข้มข้นขึ้น 5 เท่า โดยการถ่ายหัวเชื้อทั้งหมดจากอาหารในช่วงระยะเจริญเติบโต (YPGly1% (w/v)) ลงในอาหารทั้ง 3 ชนิดในปริมาตรที่ลดลง 5 เท่า และใช้ 1% (v/v) ของเมทานอลในการเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลิน จากการวิเคราะห์ปริมาณของ MIP ($mg.l^{-1}$) พบว่า ปริมาณของรีคอมบิแนนท์อินซูลินเพิ่มสูงขึ้นทุก 12 ชั่วโมง จนกระชั่วโมงที่ 48 ปริมาณ MIP ที่ผลิตได้จะค่อนข้างคงที่ไปจนถึงชั่วโมงที่ 72 และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบชนิดของอาหารจะให้เห็นว่า การใช้อาหาร MMH ส่งผลให้มีปริมาณ

รีคอมบิแนนท์อินซูลินที่ผลิตได้สูงกว่าอาหารชนิดอื่น โดยในชั่วโมงที่ 48 พบว่ามีปริมาณ MIP มากกว่า YNBMet และ YPMet อยู่ที่ 23.672±0.044 mg.l^{-1}, 17.556±0.008 mg.l^{-1} และ 9.656±0.358 mg.l^{-1} ตามลำดับ ในขณะที่ชั่วโมงสุดท้ายของการผลิต (72 ชั่วโมง) จะมีปริมาณรีคอมบิแนนท์อินซูลินอยู่ที่ 24.623±0.018 mg.l^{-1} 19.396±0.019 mg.l^{-1} และ 10.09±0.028 mg.l^{-1} ตามลำดับ ดังที่แสดงในตารางที่ 4.14 เนื่องจาก MMH เป็นอาหารสังเคราะห์ที่มีองค์ประกอบของกรดอะมิโน วิตามิน และแร่ธาตุที่มีความเข้มข้นเป็น 2 เท่าของอาหาร YNBMet และการใช้ YNBMet ยังมีผลต่อการเร่งอัตราการตายของเซลล์ (สูตรของอาหารทั้ง 3 ชนิดแสดงไว้ในภาคผนวก ก) ดังนั้นอาหาร MMH ที่ส่งผลให้ *P. pastoris* KM71H สามารถผลิต MIP ได้ในปริมาณมากที่สุด จึงเหมาะสมต่อการใช้เป็นแหล่งอาหารในระยะของการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลิน (production phase) ในส่วนของการติดตามปริมาณรีคอมบิแนนท์อินซูลินด้วยวิธี dot-blot (รูปที่ 4.7) พบว่า ที่ความเข้มข้นของหัวเชื้อเป็นแบบ 5xHCD ให้จุดสีดำเข้มมากกว่าการใช้หัวเชื้อเป็นแบบ 1xHCD และ OD600=1 แต่อย่างไรก็ตามการใช้เทคนิค dot-blot จะไม่สามารถแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของจุดสีดำที่เกิดขึ้น เมื่อมีปริมาณของ MIP ที่มากเกินไปในระดับหนึ่ง

สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณเมทานอลที่เหลือให้อาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเทคนิค GC จะเห็นว่าในอาหาร MMH จะมีปริมาณของเมทานอลที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อน้อยที่สุด โดยเมื่อพิจารณาที่ 36 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะเวลาหลังจากการเติมเมทานอลให้เป็น 1% (v/v) ที่ 24 ชั่วโมงแล้วนั้น พบว่าในอาหาร MMH ยีสต์สามารถใช้เมทานอลไปได้ทั้งหมด ในขณะที่การเลี้ยงในอาหาร YNBMet และ YPMet จะมีปริมาณของเมทานอลเหลืออยู่เท่ากับ 0.068±0.004% (v/v) และ 0.120±0.005% (v/v) ตามลำดับ ในขณะที่เมื่อเวลาผ่านไป 60 ชั่วโมง ยีสต์จะสามารถใช้เมทานอลได้น้อยลงซึ่งแปรผันตรงกับปริมาณการผลิต MIP ที่ค่อยๆลดลงด้วย โดยแนวโน้มของปริมาณเมทานอลที่เหลือในอาหาร MMH YNBMet และ YPMet หลังจากผ่านชั่วโมงที่ 60 จะมีแนวโน้มเช่นเดียวกับที่ 36 ชั่วโมง ซึ่งคิดเป็นปริมาณเมาทานอลเท่ากับ 0.009±0.003% (v/v), 0.032±0.017% (v/v) และ 0.074±0.004% (v/v) ตามลำดับ (ตารางที่ 4.15)

ตารางที่ 4.14 ปริมาณรีคอมบิแนนท์อินซูลินของ *P. pastoris* KM71H (TP1) เมื่อเลี้ยงในอาหาร YPMet YNBMet และMMH โดยใช้ปริมาณของหัวเชื้อเป็นแบบ 5xHCD

Time (h)	MIP concentration ($mg.l^{-1}$)		
	5x high cell density		
	YPMet[a]	YNBMet[b]	MMH[c]
0	0.069±0.083	0.054±0.408	0.044±0.003
12	6.440±0.138	8.886±0.005	9.925±1.276
24	8.161±0.050	11.096±1.221	15.563±0.005
36	8.712±0.430	12.743±0.077	18.788±0.031
48	9.656±0.358	17.556±0.008	23.672±0.044
60	9.982±0.265	19.002±0.020	24.238±0.023
72	10.09±0.028	19.396±0.019	24.623±0.018

[a], [b] และ [c] คือ ความแตกต่างของแต่ละกลุ่มที่ได้จากการวิเคราะห์แบบ multiple comparison ที่ระดับนัยสำคัญเท่ากับ 0.05 ด้วยโปรแกรม IBN SPSS (ดังแสดงในภาคผนวก ซ)

ตารางที่ 4.15 เมทานอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้ปริมาณของหัวเชื้อเป็นแบบ 5xHCD

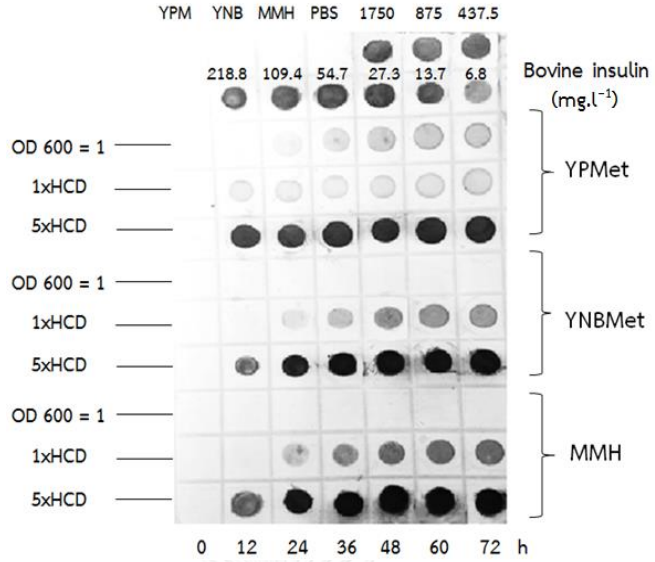
Time(h)	Methanol concentration % (v/v)		
	5x high cell density		
	YPMet	YNBMet	MMH
0	1.036±0.062	1.036±0.053	1.000±0.061
12	0.077±0.023	0.426±0.034	0.388±0.011
24*	0.201±0.015	0.195±0.037	0.138±0.031
36	0.120±0.005	0.068±0.004	0.000
48*	0.025±0.022	0.000	0.000
60	0.124±0.033	0.086±0.003	0.066±0.011
72	0.074±0.004	0.032±0.017	0.009±0.003

* ชั่วโมงที่ทำการเติมเมทานอลให้เป็น 1% (v/v)

ซึ่งจากการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม IBM SPSS โดยการวิเคราะห์แบบ multiple comparison (ชนิดของอาหาร และเวลาที่ใช้ในการเลี้ยง) พบว่า อาหารทั้ง 3 ชนิดมีค่าเฉลี่ยของปริมาณรีคอมบิแนนท์อินซูลินแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่การกำหนดระดับนัยสำคัญเท่ากับ 0.05 ($p < 0.05$) และ เมื่อพิจารณาถึงชนิดของอาหารที่ส่งผลต่อการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลิน พบว่า MMH ยังคงเป็นอาหารที่ส่งผลให้มีค่าเฉลี่ยของปริมาณรีคอมบิแนนท์อินซูลินมากที่สุดในทางสถิติ ซึ่งเมื่อพิจารณาถึงระยะเวลาที่ใช้ในการเลี้ยง เพื่อให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลิน พบว่า *P. pastoris* KM71H สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินเฉลี่ยไม่แตกต่างกันตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 จนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 72 ดังแสดงในภาคผนวก ซ

สำหรับการตรวจติดตามปริมาณของรีคอมบิแนนท์อินซูลินอีกวิธี สามารถใช้เทคนิค dot-blot ซึ่งเป็นวิธีวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (Tanapati, 2014) โดยอาศัยการแสดงผลผ่านความเข้มของจุดสีดำที่เกิดบนแผ่นกระดาษไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (รูปที่ 4.7) แล้วเปรียบเทียบกับปริมาณของรีคอมบิแนนท์อินซูลินที่ได้จากวิธี indirect competitive ELISA แต่อย่างไรก็ตามสามารถเปรียบเทียบกับช่วงความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (bovine insulin) ได้เพียงระดับหนึ่งเท่านั้น เช่น ปริมาณของรีคอมบิแนนท์อินซูลิน ที่ผลิตได้จากหัวเชื้อความเข้มข้น 1xHCD ในอาหาร MMH จะได้ 6.340±0.018 $mg.l^{-1}$ ที่เวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งเมื่อเทียบความเข้มของจุดสีดำ จะใกล้เคียงกับสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 6.8 $mg.l^{-1}$ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อมีความเข้มข้นของสารมาตรฐานรวมถึงปริมาณของ MIP เพิ่มมากขึ้นจะไม่สามารถใช้การเทียบระดับสีจากระดับความเข้มของจุดสีดำได้ เนื่องจากความเข้มของจุดสีดำที่เกิดขึ้นจะใกล้เคียงกัน ทำให้ไม่สามารถแยกความแตกต่างของปริมาณอินซูลินได้ด้วยวิธี dot-blot ได้ ดังกรณี การใช้หัวเชื้อความเข้มข้นแบบ 5xHCD เป็นต้น

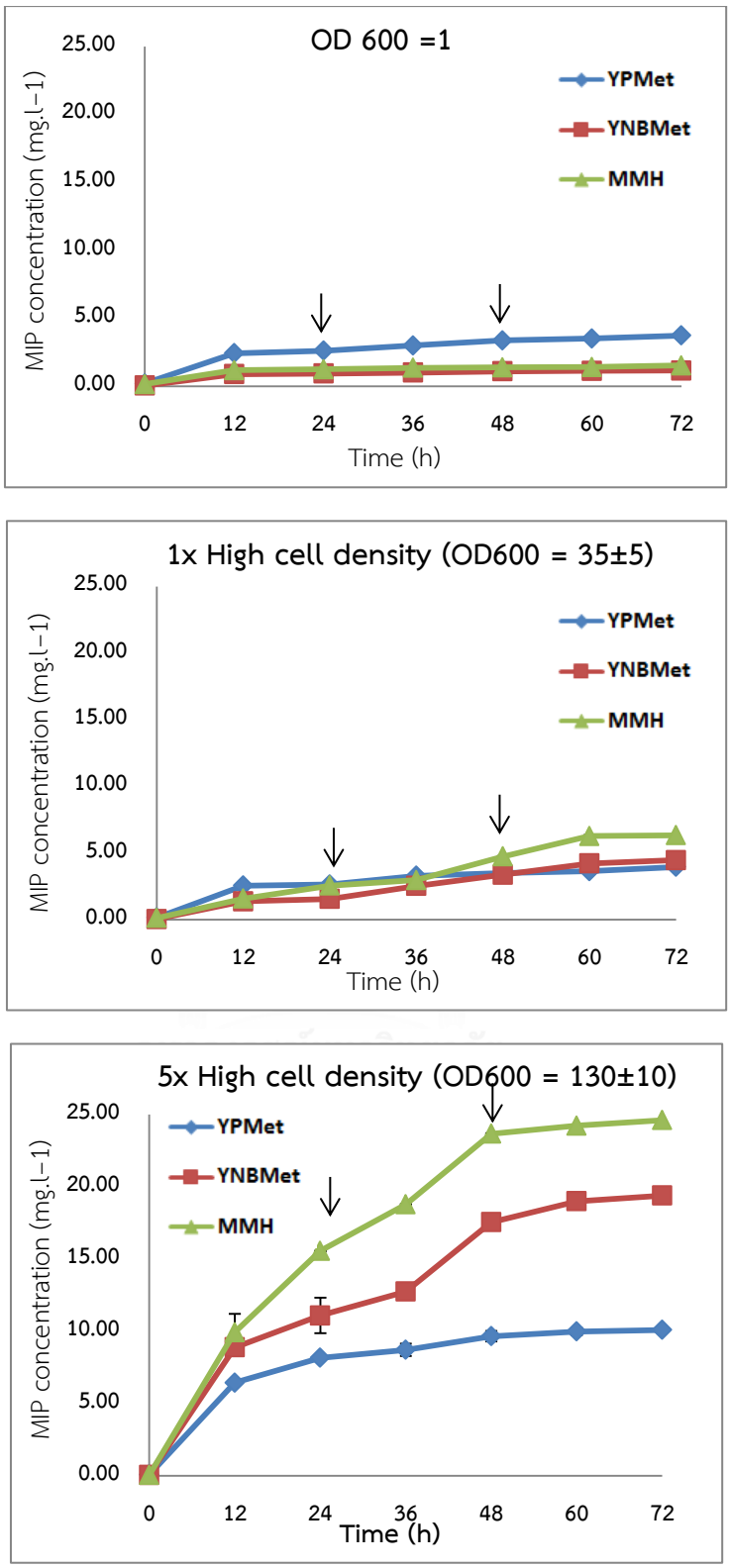
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



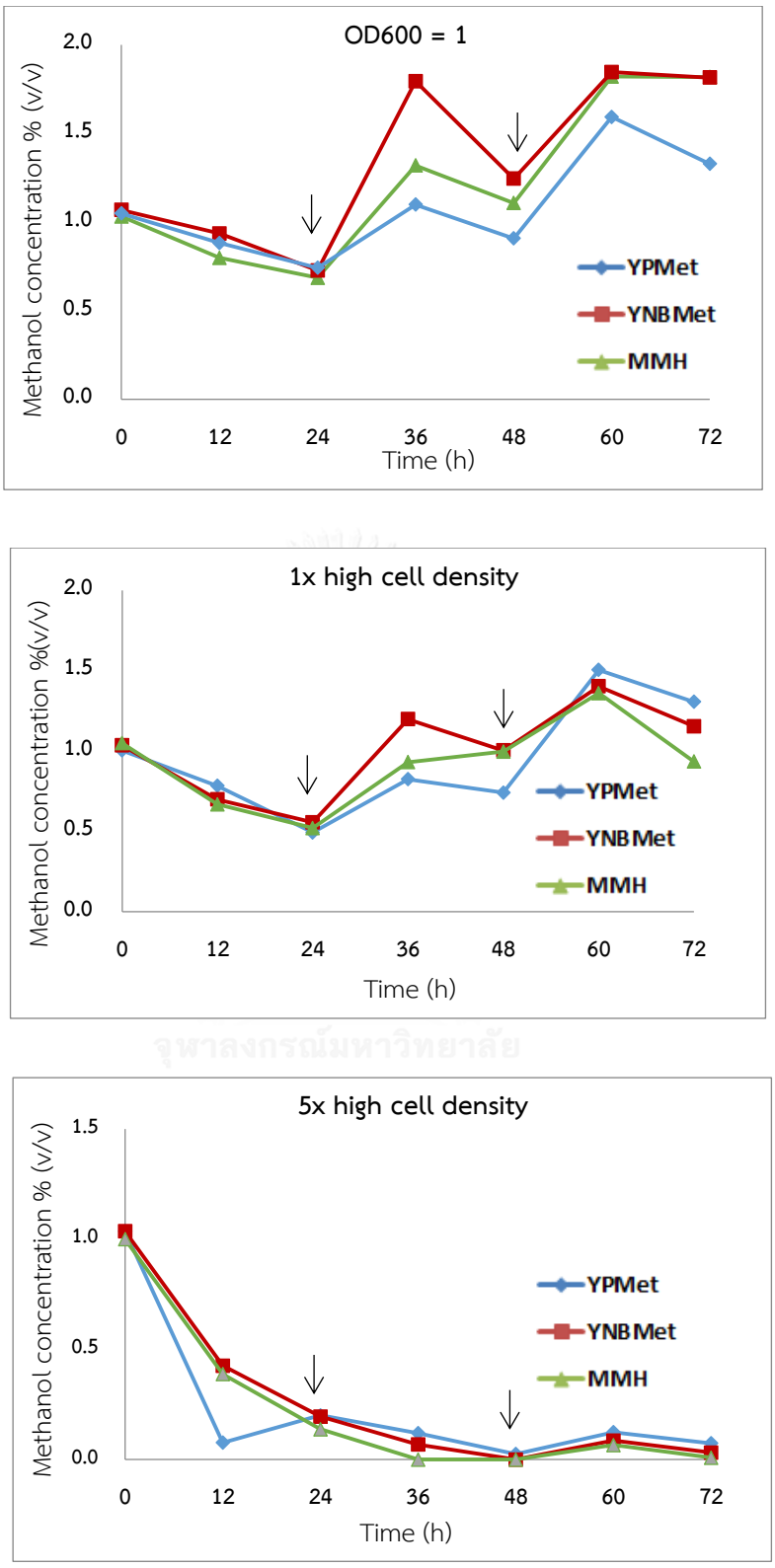
รูปที่ 4.7 ตรวจติดตามปริมาณรีคอมบิแนนท์อินซูลินโดยใช้เทคนิค dot-blot เมื่อใช้อาหาร YPMet, YNBMet และ MMH และใช้ปริมาณหัวเชื้อต่างกัน (OD600=1 1xHCD และ 5xHCD

ทั้งนี้เพื่อเปรียบเทียบความต่างของปริมาณรีคอมบิแนนท์อินซูลินในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างชนิดกันให้ชัดเจนยิ่งขึ้น จึงได้แสดงให้เห็นถึงปริมาณของรีคอมบิแนนท์อินซูลินที่ผลิตได้ในทุก 12 ชั่วโมง ในรูปแบบของกราฟเส้น ซึ่งเห็นได้ชัดว่า การใช้ความเข้มข้นของหัวเชื้อที่สูงขึ้น ทำให้สามารถผลิตอินซูลินได้มากขึ้นตามไปด้วย โดยที่ความเข้มข้นของหัวเชื้อสูง (1xHCD และ 5xHCD) อาหารเลี้ยงเชื้อ MMH สามารถผลิตอินซูลินได้มากที่สุด ในขณะที่ YPMet เป็นอาหารที่สามารถผลิตอินซูลินในภาวะที่ความเข้มข้นของหัวเชื้อน้อยที่สุด นอกจากนี้จะเห็นว่าปริมาณรีคอมบิแนนท์อินซูลินที่ผลิตได้จะค่อนข้างคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 (รูปที่ 4.8)

สำหรับการเปรียบเทียบปริมาณของเมทานอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด (แสดงให้เห็นในรูปที่ 4.9) พบว่า อาหาร MMH ที่ใช้ความเข้มข้นของเซลล์เป็นแบบ 5xHCD มีเมทานอลที่เหลืออยู่ในอาหารน้อยที่สุด ในขณะที่การใช้หัวเชื้อเป็นแบบ OD600=1 ส่งผลให้มีปริมาณของเมทานอลเหลืออยู่มากที่สุดในอาหาร YPMet, YNBMet และ MMH ทั้งนี้อาจเกิดเนื่องจาก การใช้ปริมาณของเมทานอลที่มากเกิดไปต่อความเข้มข้นของเซลล์จึงทำให้เกิดการยับยั้ง (repression) โดยเมทานอลซึ่งเป็นสารที่ใช้เหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินเอง (induction substrate) ทั้งนี้สามารถเปรียบเทียบปริมาณของ MIP และการเหลือของเมทานอลที่ต่างกันได้จากตารางที่ 4.16 และ 4.17 ตามลำดับ



รูปที่ 4.8 ปริมาณของรีคอมบิแนนท์อินซูลินเมื่อเลี้ยงในอาหาร YPMet, YNBMet และ MMH โดยใช้ปริมาณหัวเชื้อต่างกัน (OD600=1 1xHCD และ5xHCD)



รูปที่ 4.9 ปริมาณของเมทานอลที่เหลือเมื่อเลี้ยงในอาหาร YPMet, YNBMet และ MMH โดยใช้ปริมาณหัวเชื้อต่างกัน (OD600=1, 1xHCD และ5xHCD)

หมายเหตุ: ทำการเติมเมทานอลทุก 24 ชั่วโมง และ เป็นกราฟที่ได้จากการคำนวณ

ตารางที่ 4.16 ปริมาณของรีคอมบิแนนท์อินซูลินเมื่อเลี้ยงในอาหาร YPMet, YNBMet และ MMH โดยใช้ปริมาณหัวเชื้อต่างกัน (OD600=1, 1xHCD และ 5xHCD)

Time (h)	MIP concentration ($mg.l^{-1}$)								
	OD600 =1			1x high cell density			5x high cell density		
	YPMet	YNBMet	MMH	YPMet	YNBM	MMH	YPMet	YNBMet	MMH
0	0.195±0.000	0.044±0.096	0.153±0.079	0.155±0.105	0.044±0.018	0.137±0.024	0.069±0.083	0.054±0.408	0.044±0.003
12	2.416±0.006	0.886±0.078	1.177±0.028	2.561±0.002	1.386±0.017	1.580±0.089	6.440±0.138	8.886±0.005	9.925±1.276
24	2.605±0.078	0.933±0.058	1.241±0.014	2.636±0.007	1.553±0.098	2.552±0.061	8.161±0.050	11.096±1.221	15.563±0.005
36	2.997±0.069	0.988±0.032	1.349±0.044	3.297±0.039	2.529±0.053	2.977±0.006	8.712±0.430	12.743±0.077	18.788±0.031
48	3.363±0.008	1.097±0.005	1.379±0.041	3.510±0.025	3.378±0.041	4.749±0.033	9.656±0.358	17.556±0.008	23.672±0.044
60	3.509±0.008	1.127±0.026	1.403±0.007	3.638±0.114	4.222±0.017	6.284±0.085	9.982±0.265	19.002±0.020	24.238±0.023
72	3.723±0.022	1.153±0.022	1.522±0.072	3.956±0.012	4.470±0.003	6.340±0.018	10.09±0.028	19.396±0.019	24.623±0.018

ตารางที่ 4.17 ปริมาณของเมทานอลที่เหลือเมื่อเลี้ยงในอาหาร YPMet, YNBMet และ MMH โดยใช้ปริมาณหัวเชื้อต่างกัน (OD600=1 1xHCD และ 5xHCD)

Time (h)	Methanol concentration % (v/v)								
	OD600 =1			1x high cell density			5x high cell density		
	YPMet	YNBMet	MMH	YPMet	YNBMet	MMH	YPMet	YNBMet	MMH
0	1.048±0.063	1.068±0.013	1.032±0.086	1.003±0.024	1.035±0.064	1.049±0.025	1.036±0.062	1.036±0.053	1.000±0.061
12	0.881±0.072	0.935±0.013	0.798±0.014	0.784±0.034	0.699±0.013	0.668±0.023	0.077±0.023	0.426±0.034	0.388±0.011
24	0.741±0.058	0.726±0.016	0.685±0.026	0.494±0.052	0.556±0.012	0.521±0.018	0.201±0.015	0.195±0.037	0.138±0.031
36	1.098±0.025	1.794±0.036	1.319±0.013	0.825±0.014	1.198±0.039	0.930±0.021	0.120±0.005	0.068±0.004	0.000
48	0.908±0.023	1.244±0.035	1.107±0.012	0.741±0.046	1.003±0.083	0.997±0.042	0.025±0.022	0.000	0.000
60	1.593±0.032	1.846±0.076	1.821±0.016	1.505±0.040	1.403±0.055	1.360±0.020	0.124±0.033	0.086±0.003	0.066±0.011
72	1.328±0.058	1.814±0.026	1.819±0.056	1.306±0.019	1.154±0.019	0.935±0.030	0.074±0.004	0.032±0.017	0.009±0.003

สุดท้ายนี้เมื่อพิจารณาถึง ชนิดของอาหาร (YPMet, YNBMet และ MMH) และปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลิน (OD600=1, 1xHCD และ 5xHCD) รวมถึงระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิต (0-72 ชั่วโมง) ด้วยการวิเคราะห์ทางสถิติ (ภาคผนวก ซ) โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS เวอร์ชัน 22 พบว่า การใช้อาหาร MMH ที่ใช้หัวเชื้อของเซลล์เป็นแบบเข้มข้นขึ้น 5 เท่านั้น ส่งผลให้มีค่าเฉลี่ยของปริมาณอินซูลินในทางสถิติสูงที่สุด และ การใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 48 ชั่วโมงนั้นส่งผลให้มีปริมาณของค่าเฉลี่ยของรีคอมบิแนนท์อินซูลินไม่ต่างกันกับที่ 60 ชั่วโมงและ 72 ชั่วโมง ดังนั้นจึงสนใจที่จะเลือกใช้ความเข้มข้นของหัวเชื้อเป็นแบบเข้มข้นขึ้น 5 เท่า และใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อที่ 48 ชั่วโมง แต่อย่างไรก็ตามจากงานวิจัยพบว่าการเติมเมทานอล 1% (v/v) ทุก 24 ชั่วโมงนั้น ยีสต์ *P.pastoris* KM71H สามารถใช้เมทานอลไปจนหมดทั้งในอาหารทั้ง 3 ชนิด เพราะฉะนั้นการทดลองต่อมาจึงสนใจที่จะศึกษาปริมาณของเมทานอลที่เหมาะสมต่อการเหนี่ยนำให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินต่อไป

4.5 ศึกษาความเข้มข้นของเมทานอลและช่วงเวลาในการเติมเมทานอลที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้มีการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลิน

4.5.1 ศึกษาผลของ 1% (v/v) เมทานอลเมื่อทำการเติมทุก 12 ชั่วโมง

จากการนำรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris* KM71H ที่เพิ่มจำนวนเซลล์ได้จากอาหาร YPGly1% (w/v) มาใช้ในการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลิน โดยยังคงใช้อาหาร YPMet, YNBMet และ MMH แต่ใช้ความเข้มข้นของหัวเชื้อที่เหมาะสมเท่ากับ 5xHCD เพียงแบบเดียว และมีการเติมเมทานอลเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดรีคอมบิแนนท์อินซูลิน โดยเติมให้มีความเข้มข้นเป็น 1% (v/v) ทุก 12 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณของรีคอมบิแนนท์อินซูลินและความเข้มข้นที่เหมาะสมของเมทานอลในการเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลิน จากการทดลองพบว่า อาหาร MMH สามารถส่งเสริมให้มีการผลิต รีคอมบิแนนท์อินซูลินได้ดีที่สุดเช่นเดียวกับการทดลองที่ 4.4.3 และยังคงได้ปริมาณของ MIP ที่ใกล้เคียงกันตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48, 60 และ 72 ซึ่งคิดเป็นความเข้มข้นเท่ากับ 25.458±0.005 mg.l^{-1} และ 25.544±0.012 mg.l^{-1} 25.348±0.005 mg.l^{-1} ตามลำดับ ในขณะที่ YNBMet และ YPMet เป็นอาหารที่มีการเหนี่ยวนำให้เกิดรีคอมบิแนนท์อินซูลินรองลงมา โดยที่ 72 ชั่วโมงจะสามารถผลิตอินซูลินสูงสุดเท่ากับ 19.569±0.004 mg.l^{-1} และ 10.056±0.833 mg.l^{-1} ตามลำดับ (ตารางที่ 4.18)

ตารางที่ 4.18 ปริมาณของรีคอมบิแนนท์อินซูลินเมื่อทำการเติม 1% (v/v) เมทานอลในทุก 12 ชั่วโมง

Time (h)	MIP concentration (mg.l^{-1})		
	Methanol 1% (v/v) added every 12 h		
	YPMet[a]	YNBMet[b]	MMH[c]
0	0.056±0.004	0.059±0.018	0.083±0.127
12	7.377±0.845	8.468±0.012	10.102±0.130
24	8.683±1.018	11.809±2.059	16.197±0.007
36	8.731±1.743	14.034±0.001	20.412±0.018
48	9.734±0.152	19.072±0.001	25.458±0.005
60	9.880±0.270	19.278±0.003	25.544±0.012
72	10.056±0.833	19.569±0.004	25.348±0.005

[a], [b] และ [c] คือ ความแตกต่างของแต่ละกลุ่มที่ได้จากการวิเคราะห์แบบ multiple comparison ที่ระดับนัยสำคัญเท่ากับ 0.05 ด้วยโปรแกรม IBN SPSS (ดังแสดงในภาคผนวก ซ) ซึ่งจากการวิเคราะห์ทางสถิติ โดยการวิเคราะห์แบบ multiple comparison (ชนิดของอาหาร และเวลาที่ใช้ในการเลี้ยง) พบว่า อาหารทั้ง 3 ชนิดมีค่าเฉลี่ยของปริมาณรีคอมบิแนนท์อินซูลินแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับนัยสำคัญเท่ากับ 0.05 ($p < 0.05$) และ เมื่อพิจารณาถึงชนิดของอาหารที่ส่งผลต่อการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลิน พบว่า MMH เป็นอาหารที่ส่งผลให้มีค่าเฉลี่ยของปริมาณรีคอมบิแนนท์อินซูลินมากที่สุดในทางสถิติ ซึ่งเมื่อพิจารณาถึงระยะเวลาที่ใช้ในการเลี้ยง เพื่อให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลิน พบว่า *P. pastoris* KM71H สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินเฉลี่ยไม่แตกต่างกันตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 จนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 72 ดังแสดงในภาคผนวก ซ

สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณของเมทานอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิด พบว่า เมื่อทำการเติม 1% (v/v) ของเมทานอลในทุก 12 ชั่วโมง ในอาหาร YPMet, YNBMet และ MMH จะยังคงมีเมทานอลเหลืออยู่ เนื่องจาก *P. pastoris* KM71H (TP1) ใช้เมทานอลไปบางส่วนเท่านั้นในเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตอินซูลิน (ตารางที่ 4.19)

ตารางที่ 4.19 เมทานอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเติม 1% (v/v) เมทานอลในทุก 12 ชั่วโมง

Time(h)	Methanol concentration % (v/v)		
	Methanol 1% (v/v) added every 12 h		
	YPM	YNBM	MMH
0	1.069±0.021	1.078±0.006	1.089±0.010
12*	0.138±0.012	0.465±0.012	0.347±0.001
24*	0.279±0.005	0.280±0.017	0.223±0.008
36*	0.274±0.018	0.173±0.009	0.154±0.014
48*	0.233±0.028	0.268±0.002	0.263±0.015
60*	0.259±0.025	0.265±0.008	0.266±0.021
72	0.335±0.055	0.289±0.017	0.267±0.007

* ชั่วโมงที่ทำการเติมเมทานอลให้เป็น 1% (v/v)

4.5.2 ศึกษาผลของ 2% (v/v) เมทานอลเมื่อทำการเติมทุก 24 ชั่วโมง

จากการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเมทานอลเป็น 2% (v/v) และทำการเติมทุก 24 ชั่วโมง จะพบว่า รีคอมบิแนนท์อินซูลินที่ผลิตได้มีปริมาณลดน้อยลง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเมทานอลเป็น 2% (v/v) ทั้งนี้อย่างไรก็ตาม การใช้อาหาร MMH ยังคงส่งผลให้ ยีสต์สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินได้ในปริมาณมากที่สุดที่ 36 ชั่วโมงคิดเป็นความเข้มข้นเท่ากับ 11.422±1.782 $mg.l^{-1}$ เช่นเดียวกับอาหาร YNBMet ที่คิดเป็นปริมาณ 7.774±0.566 $mg.l^{-1}$ ในขณะที่การใช้อาหาร YPMet จะมีปริมาณ รีคอมบิแนนท์อินซูลินสูงสุดที่ 48 ชั่วโมง (8.709±0.493 $mg.l^{-1}$) ดังแสดงในตารางที่ 4.20

ตารางที่ 4.20 ปริมาณของรีคอมบิแนนท์อินซูลินเมื่อทำการเติม 2% (v/v) เมทานอลในทุก 24 ชั่วโมง

Time (h)	MIP concentration ($mg.l^{-1}$)		
	Methanol 2% (v/v) added every 24 h		
	YPMet[a]	YNBMet[b]	MMH[c]
0	0.037±0.018	0.045±0.011	0.067±0.102
12	6.105±0.438	8.368±0.716	9.651±0.019
24	5.345±0.340	11.610±2.346	16.080±0.026
36	6.180±0.428	7.774±0.566	11.422±1.782
48	8.709±0.493	7.615±0.275	11.199±1.556
60	6.600±0.261	6.980±0.245	11.162±1.277
72	6.048±0.411	6.935±0.411	11.069±1.471

[a], [b] และ [c] คือ ความแตกต่างของแต่ละกลุ่มที่ได้จากการวิเคราะห์แบบ multiple comparison ที่ระดับนัยสำคัญเท่ากับ 0.05 ด้วยโปรแกรม IBN SPSS (ดังแสดงในภาคผนวก ซ)

ทั้งนี้จากการวิเคราะห์ปริมาณของเมทานอลที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิด ด้วยเทคนิค GC เมื่อทำการเพิ่มปริมาณของเมทานอลเป็น 2% (v/v) (ตารางที่ 4.21) พบว่าการเพิ่มปริมาณของ เมทานอลนั้นไม่ได้แปรผันตรงกับการเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลิน เนื่องจากการใช้เมทานอลในปริมาณสูงจะส่งผลให้เกิดการสะสมของสารฟอร์มาลดีไฮด์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ซึ่งมีความเป็นพิษต่อเซลล์ (Ogata et al., 1969); (Li Xun et al., 2013) นอกจากนี้รูปที่ 4.10 ยังแสดงให้เห็นถึงปริมาณ MIP ที่ต่างกันเมื่อใช้เมทานอลในระดับที่ต่างกัน จากรูปจะเห็นว่า การใช้ปริมาณของเมทานอลเป็น 1% (v/v) โดยให้ระยะเวลาในการเติมเท่ากับ 12 ชั่วโมง สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินได้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกับการใช้ 1% (v/v) เมทานอลที่ทำการเติมทุก 24 ชั่วโมง โดย MMH จะเป็นอาหารที่ส่งผลให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินในปริมาณสูงเช่นเดียวกัน แต่อย่างไรก็ตามจากรูปที่ 4.11 ซึ่งชี้ให้เห็นถึงปริมาณของเมทานอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า การเติมเมทานอลทุก 12 ชั่วโมง ส่งผลให้มีปริมาณของเมทานอลที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิด มากกว่าการเติมเมทานอล 1% (v/v) ทุก 24 ชั่วโมง ในขณะที่การเติมเมทานอล 2% (v/v) ทุก 24 ชั่วโมง จะส่งผลให้มีปริมาณของเมทานอลเหลืออยู่มาก

ที่สุด และ มีการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินได้น้อยที่สุดอีกด้วย ทั้งนี้ *P. pastoris* เป็นยีสต์ที่ใช้เมทานอลในการเจริญและเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินได้ โดยที่สายพันธุ์ KM71H ที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นสายพันธุ์ที่นำเมทานอลไปใช้ในการเจริญเติบโตได้อย่างช้าๆ ซึ่งเมื่อพิจารณาถึงระบบการใช้เมทานอล (methanol utilization pathway) ของยีสต์จะเห็นว่า เมทานอลจะถูกเปลี่ยนไปเป็นสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และฟอร์มัลดีไฮด์ ด้วยเอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดส ซึ่ง *P. pastoris* KM71H จะมีแค่เอนไซม์แอลกฮอล์ออกซิเดส 2 ที่มีบทบาทในการทำงานประมาณ 15% เท่านั้นเมื่อเทียบกับเอนไซม์แอลกฮอล์ออกซิเดส 1 ดังนั้นเมื่อทำการเติมปริมาณของเมทานอลที่ระดับความเข้มข้นสูง (2% (v/v)) ลงไปในอาหารทั้ง 3 ชนิดแบบรวดเดียวนั้น จึงส่งผลกระทบต่อระบบการใช้เมทานอลของเซลล์ยีสต์ *P. pastoris* KM71H มากกว่าการเติมเมทานอล 1% (v/v) ในทุกๆ 12 ชั่วโมง หรือ การเติมเมทานอล 1% (v/v) ทุก 24 ชั่วโมง ทั้งนี้จากตารางที่ 4.20 ซึ่งพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิด เมื่อทำการเติมเมทานอล 2% ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมงนั้น มีปริมาณของรีคอมบิแนนท์อินซูลินที่ผลิตได้ลดต่ำลงและค่อนข้างคงมีปริมาณคงที่ในระยะเวลาต่อมา ซึ่งอาจเกิดเนื่องจากเซลล์มีการหลั่งเอนไซม์โปรติเอสออกมา เพื่อให้เซลล์สามารถเจริญอยู่ได้ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเมทานอลสูง ซึ่งรีคอมบิเนนท์อินซูลินที่ผลิตได้อาจถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรติเอสเองอีกด้วย เช่นเดียวกับ งานวิจัยในปี 2013 ที่ได้มีการศึกษาถึงระดับความเข้มข้นของเมทานอลที่เหมาะสมต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ไลเปส (lipase) ของยีสต์ *P. pastoris* KM71H โดยจากผลการทดลองพบว่า การใช้ระดับความเข้มข้นเป็น 1% (v/v) จะส่งผลให้มีระดับของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์มากที่สุด คิดเป็นความเข้มข้นเท่ากับ 0.6 $g.l^{-1}$ ในขณะที่การเพิ่มปริมาณของเมทานอลเป็น 1.5%, 2% และ 3% ส่งผลให้มีระดับความเข้มข้นของรีคอมบิแนนท์ลดต่ำลง เนื่องจากเกิดสารที่มีพิษต่อเซลล์ รวมถึงกระบวนการดูดซึมเมทานอลของยีสต์ถูกยับยั้ง จึงทำให้มีปริมาณของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ลดน้อยลงด้วยเช่นเดียวกัน (Li Xun et al., 2013)

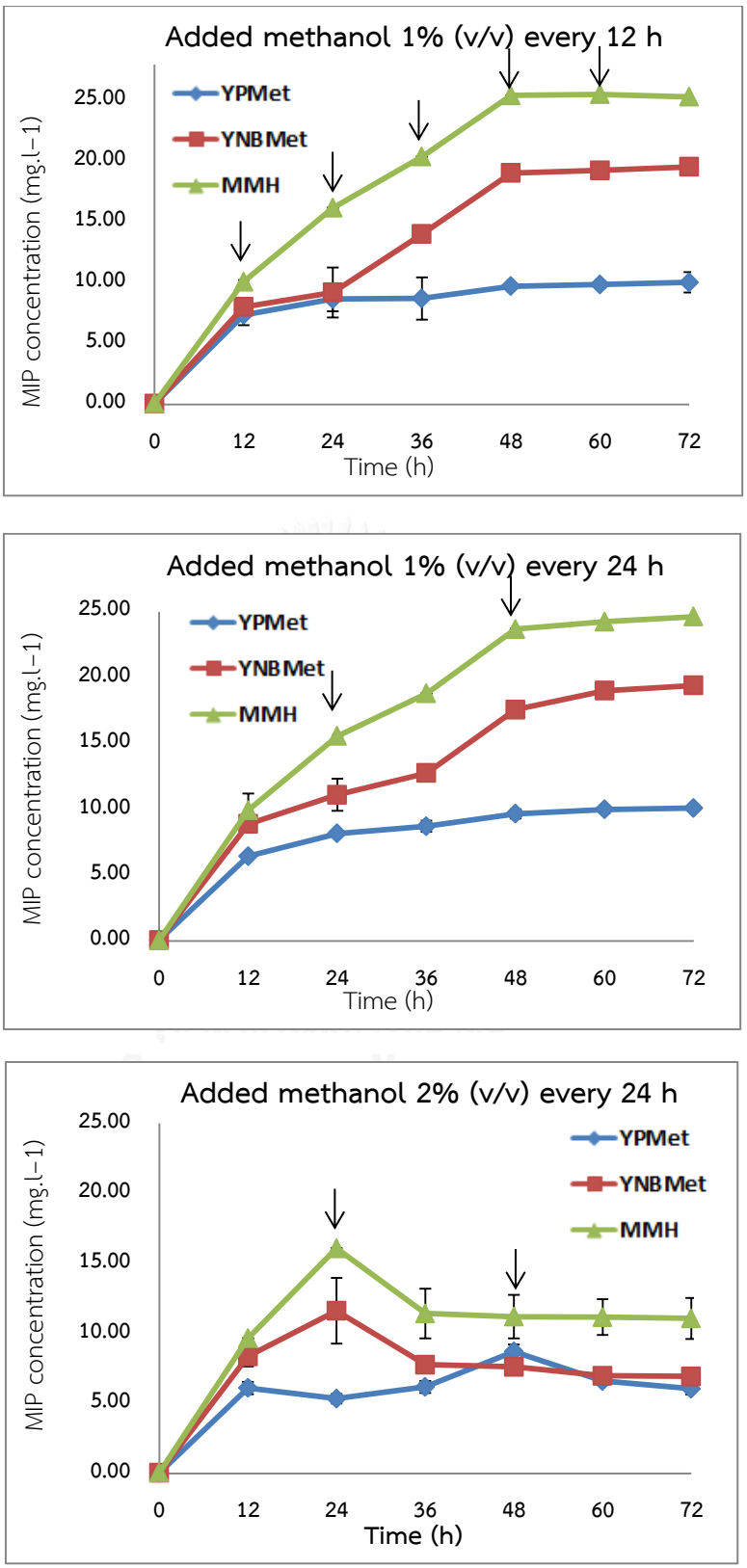
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 4.21 เมทานอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการเติม 2% (v/v) เมทานอลในทุก 24 ชั่วโมง

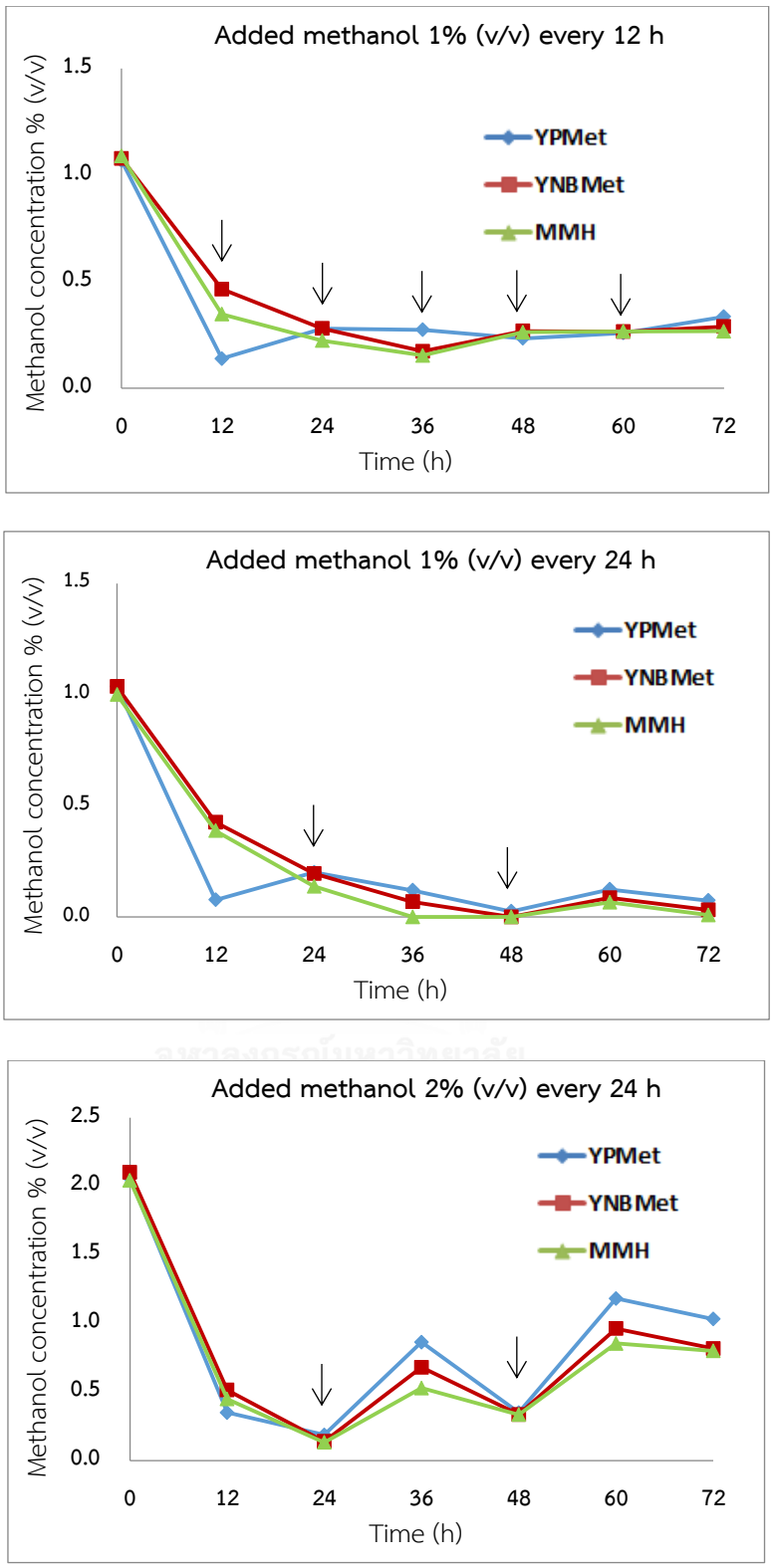
Time (h)	Methanol concentration (% v/v)		
	Methanol 2% (v/v) added every 24 h		
	YPMet	YNBMet	MMH
0	2.058±0.026	2.100±0.069	2.043±0.112
12	0.350±0.006	0.513±0.010	0.448±0.090
24*	0.187±0.025	0.140±0.008	0.132±0.005
36	0.862±0.052	0.679±0.013	0.528±0.025
48*	0.349±0.047	0.335±0.069	0.334±0.005
60	1.181±0.054	0.962±0.010	0.854±0.034
72	1.0308±0.038	0.817±0.021	0.799±0.015

* ชั่วโมงที่ทำการเติมเมทานอลให้เป็น 2% (v/v)

นอกจากนี้จากการวิเคราะห์ทางสถิติ โดยการวิเคราะห์แบบ multiple comparison (ชนิดของอาหาร และเวลาที่ใช้ในการเลี้ยง) ด้วยโปรแกรม SPSS พบว่า อาหารทั้ง 3 ชนิดมีค่าเฉลี่ยของปริมาณรีคอมบิแนนท์อินซูลินแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับนัยสำคัญเท่ากับ 0.05 ($p < 0.05$) และ เมื่อพิจารณาถึงชนิดของอาหารที่ส่งผลต่อการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินโดยใช้อาหารที่มีเมทานอล 2% (v/v) เป็นองค์ประกอบ พบว่า MMH ยังคงเป็นอาหารที่ส่งผลให้มีค่าเฉลี่ยของปริมาณรีคอมบิแนนท์อินซูลินมากที่สุดในทางสถิติเช่นเดียวกับผลการทดลองก่อนหน้า ซึ่งเมื่อพิจารณาถึงระยะเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงเพื่อให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลิน พบว่า *P. pastoris* KM71H สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินเฉลี่ยไม่แตกต่างกันตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 จนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 72 ดังแสดงในภาคผนวก ซ



รูปที่ 4.10 ปริมาณของรีคอมบิแนนท์อินซูลินเมื่อเลี้ยงในอาหาร YPMet, YNBMet และ MMH โดยใช้ความเข้มข้นและระยะเวลาในการเติมเมทานอลที่แตกต่างกัน



รูปที่ 4.11 ปริมาณของเมทานอลที่เหลือเมื่อเลี้ยงในอาหาร YPMet YNBMet และ MMH โดยใช้ความเข้มข้นและระยะเวลาในการเติมเมทานอลที่แตกต่างกัน

หมายเหตุ: ทำการเติมเมทานอลทุก 24 ชั่วโมง และ เป็นกราฟที่ได้จากการคำนวณ

ทั้งนี้เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ด้วยโปรแกรม SPSS (ภาคผนวก ซ) โดยพิจารณาถึง ชนิดของอาหาร (YPMet, YNBMet และ MMH) รวมถึงระดับความเข้มข้นของเมทานอล (เติม 1% (v/v) ทุก 24 ชั่วโมง, เติม 1% (v/v) ทุก 12 ชั่วโมง และ เติม 2% (v/v) ทุก 24 ชั่วโมง) รวมถึงระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตอินซูลิน (0-72 ชั่วโมง) พบว่า การใช้อาหาร MMH โดยทำการเติมเมทานอล 1% (v/v) ทุก 12 ชั่วโมง ส่งผลให้มีค่าเฉลี่ยของปริมาณอินซูลินในทางสถิติสูงที่สุด คิดเป็น 12.8630 แต่ยังคงใกล้เคียงกับการเติม 1% (v/v) ของเมทานอลในทุก 24 ชั่วโมง ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 12.2853 ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกการเติมเมทานอล 1% (v/v) ทุก 24 ชั่วโมงในการเป็นแหล่งคาร์บอนและเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลิน ซึ่งเป็นลดต้นทุนในการผลิตที่สุด โดยใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงทั้งสิ้น 48 ชั่วโมง เนื่องจาก ที่ชั่วโมงที่ 48 เป็นต้นไป ค่าเฉลี่ยปริมาณอินซูลินที่ผลิตได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติจนกระทั่ง 72 ชั่วโมง

4.6 ศึกษาผลผลิตได้ของรีคอมบิแนนท์อินซูลิน (recombinant insulin yield) เมื่อใช้ระดับความเข้มข้นของเมทานอลต่างกัน

4.6.1 ศึกษาผลผลิตที่ได้ของอินซูลินเมื่อใช้การเติมเมทานอล 1% (v/v) ทุก 24 ชั่วโมง

จากการศึกษาผลผลิตที่ได้ของรีคอมบิแนนท์อินซูลิน เมื่อเลี้ยงยีสต์ *P. pastoris* KM71H ในอาหาร YPMet YNBMet และ MMH แล้วทำการเก็บตัวอย่างพร้อมกับการเติมเมทานอลในทุก 24 ชั่วโมง จากผลการวิเคราะห์พบว่า ในช่วง 24 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยง *P. pastoris* KM71H อาหาร MMH จะเป็นอาหารที่เชื้อสามารถนำเมทานอลไปใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดผลผลิตที่ได้ของรีอินซูลินสูงที่สุดเท่ากับ 1.882×10^{-3} กรัมของรีคอมบิแนนท์อินซูลินต่อกรัมเมทานอลของเมทานอล ($g.g^{-1}$) ในขณะที่ YNBMet และ YPMet เป็นอาหารที่ให้ผลผลิตที่ได้ของรีคอมบิแนนท์อินซูลินรองลงมาเท่ากับ $1.416 \times 10^{-3} g.g^{-1}$ และ $1.044 \times 10^{-3} g.g^{-1}$ ตามลำดับ อย่างไรก็ตามพบว่า เมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้น จะส่งผลผลิตของอินซูลินลดต่ำลงเรื่อยๆ จนกระทั่งที่ 72 ชั่วโมงจะให้ผลผลิตที่ได้ของอินซูลินต่ำที่สุดใน อาหารทั้ง 3 ชนิด ซึ่งแสดงให้เห็นว่า *P. pastoris* KM71H ผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินได้ลดลงเมื่อเทียบกับในชั่วโมงแรกๆ (0-48 ชั่วโมง) ดังแสดงในตารางที่ 4.22

ตารางที่ 4.22 ผลผลิตที่ได้ของรีคอมบิแนนท์อินซูลินเมื่อเติม 1% (v/v) เมทานอลทุก 24 ชั่วโมง

Time (h)	Insulin yield ($x10^{-3}$ g.g^{-1})		
	YPMet	YNBMet	MMH
0	0	0	0
24	1.044	1.416	1.882
48	-0.024	0.383	0.472
72	-0.253	-0.336	0.061

4.6.2 ศึกษาผลผลิตที่ได้ของอินซูลินเมื่อใช้การเติมเมทานอล 1% (v/v) ทุก 12 ชั่วโมง

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณของรีคอมบิแนนท์อินซูลินที่ได้พบว่า การเติม 1% (v/v) เมทานอลทุก 12 ชั่วโมง ยังคงส่งผลให้ยีสต์สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินได้ในปริมาณใกล้เคียงกับการเติม 1% (v/v) เมทานอลทุก 24 ชั่วโมง ดังนั้นจากการศึกษาผลผลิตที่ได้ของรีคอมบิแนนท์อินซูลินนั้น พบว่า อาหาร MMH ยังคงเป็นอาหารที่มีปริมาณผลผลิตที่ได้ของอินซูลินสูงสุดในระยะแรกที่ชั่วโมงที่ 24 ซึ่งมีค่าเท่ากับ $1.143x10^{-3}$ g.g^{-1} ดังแสดงให้เห็นในตารางที่ 4.23 แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มระดับในการเติมเมทานอลขึ้นจะพบว่า ผลผลิตที่ได้ของอินซูลินไม่ได้แปรผันตรงตามระดับของเมทานอลที่เพิ่มขึ้น และที่ชั่วโมงที่ 48 อาหาร YNBMet จะเป็นอาหารที่ให้ผลผลิตของรีคอมบิแนนท์อินซูลินสูงกว่า ที่เลี้ยงในอาหาร MMH คิดเป็นปริมาณผลผลิตที่ได้เท่ากับ $0.358x10^{-3}$ g.g^{-1} และ $0.351x10^{-3}$ g.g^{-1} ตามลำดับ

ตารางที่ 4.23 ผลผลิตที่ได้ของรีคอมบิแนนท์อินซูลินเมื่อเติม 1% (v/v) เมทานอลทุก 12 ชั่วโมง

Time (h)	Insulin yield ($x10^{-3}$ g.g^{-1})		
	YPMet	YNBMet	MMH
0	0	0	0
24	0.536	0.840	1.143
48	-0.044	0.358	0.351
72	-0.141	-0.272	-0.405

4.6.3 ศึกษาผลผลิตที่ได้ของอินซูลินเมื่อใช้การเติมเมทานอล 2% (v/v) ทุก 24 ชั่วโมง

จากการศึกษาผลผลิตที่ได้ของรีคอมบิแนนท์อินซูลิน พบว่า เมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของเมทานอลเป็น 2% (v/v) และทำการเติมทุก 24 ชั่วโมง ส่งผลให้ปริมาณผลผลิตลดต่ำลงกว่าการใช้ปริมาณของเมทานอลเป็น 1% (v/v) แต่จะเห็นว่า MMH ยังคงเป็นอาหารที่ให้ผลผลิตได้ของรีคอมบิแนนท์อินซูลินสูงที่สุดในช่วง 24 ชั่วโมงแรก คิดเป็นปริมาณเท่ากับ 0.908×10^{-3} $g.g^{-1}$ (ตารางที่ 4.24)

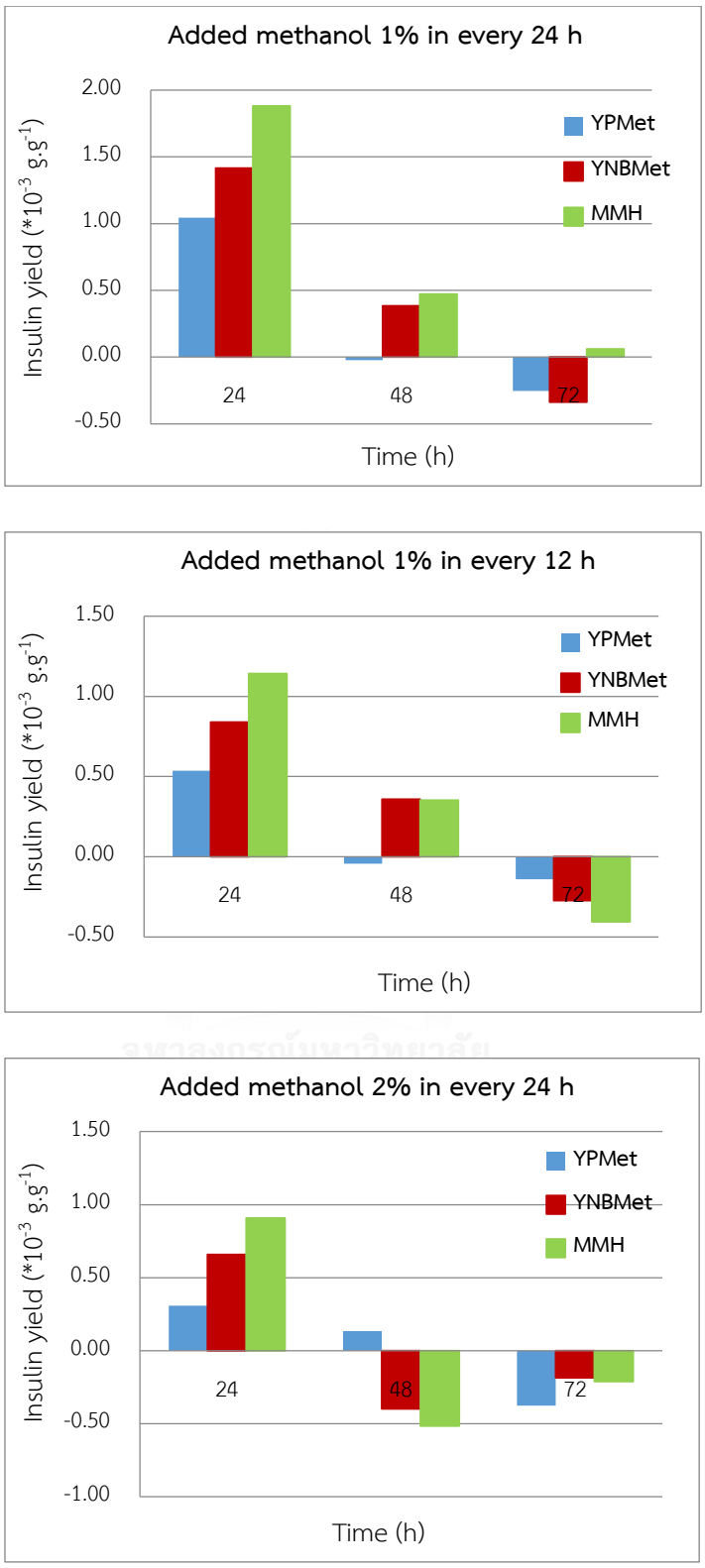
ตารางที่ 4.24 ผลผลิตที่ได้ของรีคอมบิแนนท์อินซูลินเมื่อเติม 2% (v/v) เมทานอลทุก 24 ชั่วโมง

Time (h)	Insulin yield ($x10^{-3}$ $g.g^{-1}$)		
	YPMet	YNBMet	MMH
0	0	0	0
24	0.308	0.658	0.908
48	0.134	-0.399	-0.514
72	-0.376	-0.185	-0.211

อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบผลผลิตของรีคอมบิแนนท์อินซูลินที่ใช้ความเข้มข้นและระยะเวลาในการเติมเมทานอลที่ต่างกัน (ตารางที่ 4.25 และรูปที่ 4.12) พบว่า การใช้ระดับของเมทานอลเป็น 1% (v/v) โดยทำการเติมเมทานอลในทุกๆ 24 ชั่วโมง ส่งผลให้มีผลผลิตของรีคอมบิแนนท์อินซูลินสูงที่สุดในทั้งอาหาร YPMet YNBMet และ MMH ซึ่งจากการวิเคราะห์ปริมาณผลผลิตที่ได้ของรีคอมบิแนนท์อินซูลินที่เกิดขึ้น จึงพบว่า สำหรับการใช้หัวเชื้อแบบเข้มข้นขึ้น 5 เท่า อาหาร MMH ที่มีความเข้มข้นของเมทานอลเป็น 1% (v/v) ที่ทำการเติมเมทานอลในทุกๆ 24 ชั่วโมง จะส่งผลให้ได้ผลผลิตของรีคอมบิแนนท์อินซูลินสูง

ตารางที่ 4.25 ผลผลิตที่ได้ของรีคอมบิแนนท์อินซูลินเมื่อใช้ความเข้มข้นและระยะเวลาในการเติมเมทานอลที่แตกต่างกัน

Time (h)	Insulin yield ($x10^{-3}$ $g.g^{-1}$)								
	1% (v/v) 24 h			1% (v/v) 12 h			2% (v/v) 24 h		
	YPMet	YNBMet	MMH	YPMet	YNBMet	MMH	YPMet	YNBMet	MMH
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	1.044	1.416	1.882	0.536	0.840	1.143	0.308	0.658	0.908
48	-0.024	0.383	0.472	-0.044	0.358	0.351	0.134	-0.399	-0.514
72	-0.253	-0.336	0.061	-0.141	-0.272	-0.406	-0.376	-0.185	-0.211



รูปที่ 4.12 ผลผลิตที่ได้ของรีคอมบิแนนท์อินซูลินเมื่อใช้ความเข้มข้นและระยะเวลาในการเติมเมทานอลที่แตกต่างกัน

อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ได้มีการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินในรูปของมอนอเมอร์ หรือมอนอเมอริกอินซูลินพรีเคอเซอร์ (MIP) จากยีสต์ *P. pastoris* สายพันธุ์ KM71H ซึ่งสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินได้ด้วยการใช้แหล่งอาหารที่มีเมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอน ทั้งนี้หลายงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการศึกษาการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินหลายรูปแบบตั้งแต่การผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินโดยใช้แบคทีเรียเป็นเซลล์เจ้าบ้าน ซึ่ง *E. coli* เป็นแบคทีเรียที่นิยมนำมาใช้ในการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลิน แต่จากงานวิจัยพบว่า *E. coli* จะผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินอยู่ภายในเซลล์ทำให้มีขั้นตอนในการทำบริสุทธิ์ที่ค่อนข้างยาก รวมไปถึง *E. coli* สามารถผลิตเอนโดทอกซิน (endotoxin) ซึ่งเป็นสารพิษในระหว่างการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินด้วย นอกจากนี้ใน *E. coli* ยังไม่มีกระบวนการการดัดแปลงโมเลกุลของโปรตีนหลังการแปลรหัสอีกด้วย (Goeddel et al., 1979) อย่างไรก็งานวิจัยต่อมาได้ทำการศึกษาถึงการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินที่อยู่ในรูปแบบของโปรอินซูลิน (proinsulin) โดยใช้ *E. coli* เป็นเซลล์เจ้าบ้าน โดยมีการพัฒนาให้เซลล์ของ *E. coli* สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินออกมาภายนอกเซลล์ (Mergulhao et al., 2004; Winter et al., 2000) ทั้งนี้โปรอินซูลินที่ผลิตได้จะประกอบไปด้วยสายเปปไทด์ 3 สาย คือ เปปไทด์สาย เอ, เปปไทด์สาย บี และเปปไทด์สาย ซี ซึ่งยังคงได้ผลผลิตในปริมาณต่ำ รวมถึงมีขั้นตอนในการเปลี่ยนเป็นรีคอมบิแนนท์อินซูลินให้อยู่ในรูปแบบที่ออกฤทธิ์หรือทำงานได้ที่ซับซ้อนและยุ่งยากกว่าการใช้อินซูลินในรูปแบบของมอเนอเมอร์ นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ศึกษาการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินโดยใช้ยีสต์เป็นเซลล์เจ้าบ้าน เนื่องจากยีสต์สมารถผลิตโปรตีนออกมาภายนอกเซลล์ และมีกระบวนการการดัดแปลงโมเลกุลของโปรตีนหลังการแปลรหัส อย่างไรก็ตามรีคอมบิแนนท์อินซูลินที่ผลิตได้จาก *P. pastoris* ส่วนใหญ่อยู่ในรูปของโปรอินซูลิน และมินิโปรอินซูลิน (miniproinsulin) (Gil et al., 2011; Gurramkonda et al., 2010) เช่นเดียวกันกับการผลิตใน *E. coli* ทั้งนี้มินิโปรอินซูลินยังคงมีสายเปปไทด์ทั้ง 3 สายอยู่ แต่จะมีจำนวนของกรดอะมิโนในเปปไทด์สาย ซี น้อยกว่าในโปรอินซูลิน ซึ่งจำเป็นต้องอาศัยหลายขั้นตอนในการเปลี่ยนแปลงรีคอมบิแนนท์อินซูลินให้อยู่ในรูปแบบที่ออกฤทธิ์ได้ นอกจากนี้เมื่อพิจารณาในเรื่องของการทำพันธุวิศวกรรมนั้น การผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินในรูปของมอนอเมอร์ โดยใช้มอนอเมอริกอินซูลินพรีเคอเซอร์ยีนนั้น สามารถทำได้ง่ายและสะดวก เนื่องจาก MIP อยู่ในรูปของสายเปปไทด์สายเดียวและเป็นเปปไทด์สายสั้น ทำให้ง่ายต่อการโคลนยีน และเมื่อต้องการนำมาใช้งานเพียงตัดด้วยเอนไซม์ TPCK ทริปซิน จะเกิดปฏิกิริยา Tryptic hydrolysis เปลี่ยน MIP ให้อยู่ในรวมแบบที่ออกฤทธิ์หรือทำงานได้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินในยีสต์ *P. pastoris* สายพันธุ์ KM71H (TP1) ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตมอนอเมอริกอินซูลินพรีเคอเซอร์ (MIP) สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มหลักๆ ได้แก่ ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์ในช่วงระยะเจริญ (growth phase) และ ปัจจัยที่มีผลต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดรีคอมบิแนนท์อินซูลินในระยะของการผลิต (production phase) ทั้งนี้การเจริญของเซลล์จะเกี่ยวข้องกับชนิดของอาหารที่ใช้ (YPGly และ YNBGly) จากการศึกษาติดตามการเจริญของเซลล์ในทุก 3 ชั่วโมงพบว่า *P. pastoris* KM71H (TP1) สามารถใช้ YPGly ซึ่งเป็นอาหารที่สมบูรณ์ในการเจริญได้ดีกว่าการใช้อาหารสังเคราะห์ YNBGly และการใช้ปริมาณของกลีเซอรอลเป็น 1% (w/v) ส่งผลให้มีการเจริญของเซลล์สูงสุด ซึ่งสามารถวัดความหนาแน่นของเซลล์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ได้เท่ากับ 32.633±1.012 ที่ชั่วโมงที่ 36 ของการเลี้ยง ในขณะที่การเพิ่มระดับความเข้มข้นของกลีเซอรอลเป็น 2% (w/v) และ 3% (w/v) ยีสต์ *P. pastoris* KM71H (TP1) ยังคงมีความหนาแน่นของเซลล์ใกล้เคียงกับการใช้ 1% (w/v) ของกลีเซอรอล นอกจากนี้ การวิเคราะห์ปริมาณของกลีเซอรอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเทคนิค HPLC ยังพบว่า กลีเซอรอลถูกใช้ในการเป็นแหล่งคาร์บอนได้ประมาณ 1% (w/v) เท่านั้น เช่นเดียวกับผลของการศึกษาระดับไนโตรเจน ซึ่งพบว่าอาหารที่เพิ่มปริมาณไนโตรเจนและกลีเซอรอลเป็น Y2P2Gly2% (w/v) จะส่งผลให้ยีสต์มีความหนาแน่นของเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น 35.433±0.104 และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณของไนโตรเจนที่เหลือในอาหารด้วยวิธีคเจลดาห์ล พบว่า ไนโตรเจนยังคงเหลืออยู่ในปริมาณมาก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากงานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยในระดับฟลาสก์เขย่า ค่าการละลายของออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อจึงถือเป็นข้อจำกัดอีกปัจจัยหนึ่งในการเลี้ยงเชื้อแบบใช้อากาศ ในระดับฟลาสก์เขย่า ซึ่งจะมีค่าการละลายของออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ค่อนข้างต่ำ จึงส่งผลให้ *P. pastoris* KM71H (TP1) มีการเจริญของเซลล์ได้ที่ความหนาแน่นจำกัดระดับหนึ่งเท่านั้น (Losen et al., 2004) นอกจากนี้ แหล่งไนโตรเจน (yeast extract และ peptone) มีราคาค่อนข้างแพง ดังนั้น ในระยะการเจริญของ *P. pastoris* KM71H (TP1) การใช้อาหาร YPGly 1% (w/v) จึง

เป็นอาหารที่มีความเหมาะสมที่สุดต่อการเจริญของเซลล์ในระดับฟลาสก์ เพื่อที่จะนำเซลล์ไปใช้ต่อในการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลิน

สำหรับอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์เพื่อให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินนั้น จำเป็นต้องอาศัยเมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนและเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินต่อจากระยะการเจริญของเซลล์ ดังนั้น ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาในการเติมเมทานอลจึงถือเป็นปัจจัยที่สำคัญในการเหนี่ยวนำให้ *P. pastoris* KM71H (TP1) ผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลิน อย่างไรก็ตาม ยังมีปัจจัยอื่นที่สำคัญต่อการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินเช่นเดียวกัน ได้แก่ ชนิดของอาหาร (YPMet, YNBMet และ MMH) และความเข้มข้นของหัวเชื้อที่ใช้ (OD600=1; 1xHCD; 5xHCD) โดยพบว่าการเพิ่มปริมาณของหัวเชื้อมากขึ้นจะแปรผันตรงกับปริมาณของอินซูลินที่เกิดขึ้น แต่ในขณะที่การเพิ่มระดับความเข้มข้นของเมทานอลไม่ได้ส่งผลให้มีระดับของอินซูลินเพิ่มขึ้นตามไปด้วย เนื่องจากเมื่อมีระดับของเมทานอลสูงเกินไปจะส่งผลให้เกิดสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ (Ogata et al., 1969); (Li Xun et al., 2013) และจากการศึกษาพบว่า *P. pastoris* KM71H (TP1) ที่ถูกเลี้ยงในอาหาร MMH โดยมี 1% (v/v) ของเมทานอลเป็นองค์ประกอบ (เติมทุก 12 และ 24 ชั่วโมง) และใช้ปริมาณของหัวเชื้อเป็นแบบ 5xHCD ส่งผลให้มีปริมาณของรีคอมบิแนนท์อินซูลินสูงกว่าการใช้เมทานอล 2% (v/v) และจากการวิเคราะห์ปริมาณของเมทานอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเทคนิค GC พบว่า การเติมเมทานอล 1% (v/v) ทุก 12 ชั่วโมง ส่งผลให้มีปริมาณเมทานอลเหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อมากกว่าการเติมเมทานอล 1% (v/v) ทุก 24 ชั่วโมง ในขณะที่การเติมเมทานอล 2% (v/v) จะมีปริมาณของเมทานอลที่เหลืออยู่มากที่สุด และจากการวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินจากเมทนอลของ *P. pastoris* KM71H (TP1) พบว่า การเติมเมทานอล 1% (v/v) ทุก 24 ชั่วโมง จะมีประสิทธิภาพในการเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินได้มากที่สุด โดยระดับของอินซูลินจะค่อนข้างคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 ถึง 72 ชั่วโมง ซึ่งคิดเป็นความเข้มข้นเท่ากับ 23.672±0.044 ถึง 24.623±0.018 $mg.l^{-1}$ ดังนั้น สภาวะที่เหมาะสมต่อการเหนี่ยวนำการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินในระดับฟลาสก์ คือ การใช้อาหาร MMH และใช้ปริมาณของหัวเชื้อเป็นแบบ 5xHCD พร้อมทั้งเลือกใช้การเติมเมทานอล 1% (v/v) ทุก 24 ชั่วโมง โดยทำการเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

5.2 ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยเพื่อหาข้อมูลเบื้องต้นที่ช่วยชี้ให้เห็นถึงภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินของยีสต์ *P. pastoris* KM71H (TP1) ในระดับขวดเขย่า ซึ่งการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย อาทิ ชนิดและสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ, ปริมาณของเซลล์, ระยะเวลาในการเลี้ยง ตลอดจนระดับความเข้มข้นของเมทานอล ทั้งนี้ ในงานวิจัยนี้ พบว่าในระยะเจริญเติบโตของเซลล์ เซลล์สามารถเจริญเติบโตได้ในระดับหนึ่งเท่านั้น ซึ่งอาจมีข้อจำกัดในเรื่องของปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทั้งนี้ หากต้องการปริมาณของเซลล์ที่เพิ่มมากขึ้น อาจแก้ปัญหาโดยการใช้ขวดบัฟเฟิล (baffled flask) ในการเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ในระยะเจริญเติบโต โดยคาดหวังว่า จะมีปริมาณความหนาแน่นของเซลล์ยีสต์เพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตาม ในช่วงการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลิน ที่ได้ทำการศึกษาระดับของเมทานอลที่เหมาะสมต่อการผลิตอินซูลินโดยทำการเติมเมทานอลที่ความเข้มข้นแตกต่างกันนั้น ควรเก็บตัวอย่างของอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งก่อนและหลังจากที่ได้ทำการเติมเมทานอลลงไป เพื่อเป็นการวิเคราะห์ปริมาณของเมทานอลทั้งหมดที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากที่ได้ทำการเติมเมทานอลลงไปอีกครั้ง นอกจากนี้ ยังพบว่า การเพิ่มปริมาณของหัวเชื้อยีสต์ส่งผลให้มีปริมาณของรีคอมบิแนนท์อินซูลินเพิ่มมากขึ้นในอาหาร YNBMet และ MMH ดังนั้นหากต้องการศึกษารีคอมบิแนนท์อินซูลินในปริมาณที่มากขึ้นในระดับขวดเขย่า อาจศึกษาโดยการใช้หัวเชื้อเข้มข้นมากขึ้น หรือ ทำการลดปริมาตรของอาหารในระยะนี้ลง หรือ อาจทำการศึกษาการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินโดยการขยายการผลิตเป็นในระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (bioreactor) ต่อไป อย่างไรก็ตาม รีคอมบิแนนท์อินซูลินแบบมอนอเมอร์ที่ผลิตได้นี้ ถือเป็นอินซูลินประเภทที่ออกฤทธิ์ได้ทันที (rapid acting insulin) สำหรับใช้รักษาผู้ป่วยเบาหวาน แต่ทั้งนี้จำเป็นต้องผ่านกระบวนการทำบริสุทธิ์ และการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพก่อนที่จะนำมาใช้งาน เพื่อให้เกิดประโยชน์และสามารถนำมาใช้ได้จริงต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

รายการอ้างอิง

Albers, E., Larsson, C., Lidén, G., Niklasson, C., and Gustafsson, L. (1996). Influence of the nitrogen source on *Saccharomyces cerevisiae* anaerobic growth and product formation. *Applied and Environmental Microbiology,* 62(9), 3187-3195.

Arthur, H., and Watson, K. (1976). Thermal adaptation in yeast: growth temperatures, membrane lipid, and cytochrome composition of psychrophilic, mesophilic, and thermophilic yeasts. *Journal of Bacteriology,* 128(1), 56-68.

Astrup, A.S. (2011). Cardiovascular morbidity and mortality in diabetes mellitus: prediction and prognosis. *Dan Med Bull,* 58(8), 41-52.

Atlas, R.M. (2010). *Handbook of microbiological media*. Boca Raton London Newyork Washington, D.C. : CRC press.

Avgerinos, G.C., et al. (2001). Production and clinical development of a *Hansenula polymorpha*-derived PEGylated hirudin. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis,* 27(4), 357-372.

Baeshen, N.A., et al. (2014). Cell factories for insulin production. *Microbial cell factories,* 13(1), 1-11.

Blair, E. Types of insulin for people with diabetes. 2016. Aviable from: http://www.joslin.org/info/insulin.html. [29 September 2016].

Bolli, G., Di Marchi, R., Park, G., Pramming, S., and Koivisto, V.A. (1999). Insulin analogues and their potential in the management of diabetes mellitus. *Diabetologia,* 42(10), 1151-1167.

Burtis, C., and Ashwood, E. (1999). Tietz textbook of clinical chemistry.

Celik, E., and Calık, P. (2012). Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnology Aadvances,* 30(5), 1108-1118.

Cereghino, J.L., and Cregg, J.M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews,* 24(1), 45-66.

Chen, Z., et al. (2008). Uricase production by a recombinant *Hansenula polymorpha* strain harboring Candida utilis uricase gene. *Applied Microbiology and Biotechnology,* 79(4), 545-554.

Cheung, A.K., et al. (2005). Aldose reductase deficiency prevents diabetes-induced blood-retinal barrier breakdown, apoptosis, and glial reactivation in the retina of db/db mice. *Diabetes,* 54(11), 3119-3125.

Chhabra, N. Mechanism of action of Insulin. 2014. Aviable from: http://usmle.biochemistryformedics.com/mechanism-of-action-of-insulin/. [19 September 2016].

Couderc, R., and Baratti, J. (1980). Oxidation of methanol by the yeast, *Pichia pastoris*. Purification and properties of the alcohol oxidase. *Agricultural and Biological Chemistry,* 44(10), 2279-2289.

Cregg, J.M., Cereghino, J.L., Shi, J., and Higgins, D.R. (2000). Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology,* 16(1), 23-52.

Cregg, J.M., and Madden, K.R. (1988). Development of the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, as a host system for the production of foreign proteins. *Developments in Industrial Microbiology,* 29, 33-41.

Cruz, S.H., Batistote, M., and Ernandes, J.R. (2003). Effect of sugar catabolite repression in correlation with the structural complexity of the nitrogen source on yeast growth and fermentation. *Journal of The Institute of Brewing,* 109(4), 349-355.

Cui, D.F., Li, M.Y., Zhang, Y.S., and Feng, Y.M. (2001). Monomeric destetrapeptide human insulin from a precursor expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Peptide Research,* 57(3), 188-192.

Daly, R., and Hearn, M.T.W. (2005). Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of Molecular Recognition,* 18(2), 119–138.

Devergne, J., Cardin, L., Burckard, J., and Van Regenmortel, M. (1981). Comparison of direct and indirect ELISA for detecting antigenically related cucumoviruses. *Journal of Virological Methods,* 3(4), 193-199.

DiabetesUK. Diabetes research through the years. 2013. Aviable from: http://timeline.diabetes.org.uk/. [19 September 2016].

Ding, J.G., Cui, D.F., and Zhang, Y.S. (2003). Monomeric B27 Lys destripeptide insulin: semisynthesis, characterization and biological activity. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica Chinese Edition,* 35(3), 215-218.

Ding, J.G., Fei, J., Cui, D.F., and Zhang, Y.S. (2005). Expression of monomeric insulin precursor in *Pichia pastoris* and its conversion into monomeric B27 Lys destripeptide insulin by tryptic hydrolysis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica Chinese Edition,* 37(4), 234-240.

Federation, I.D. World diabetes day. 2014. Aviable from: http://www.idf.org/worlddiabetesday/current-campaign. [22 September 2016].

Fourtner, S.H., Weinzimer, S.A., and Levitt Katz, L.E. (2005). Hyperglycemic hyperosmolar non-ketotic syndrome in children with type 2 diabetes. *Pediatric Diabetes,* 6(3), 129-135.

Gellissen, G., et al. (2005). New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adeninivorans* and *Yarrowia*

lipolytica–a comparison. *Federation of European Microbiological Societies Yeast Research,* 5(11), 1079-1096.

Gellissen, G., and Melber, K. (1996). Methylotrophic yeast *hansenula polymorpha* as production organism for recombinant pharmaceuticals. *Arzneimittel-Forschung,* 46(9), 943-948.

Gil, D.F., et al. (2011). Recombinant expression of ShPI-1A, a non-specific BPTI-Kunitz-type inhibitor, and its protection effect on proteolytic degradation of recombinant human miniproinsulin expressed in *Pichia pastoris*. *Federation of European Microbiological Societies Yeast Research,* 11(7), 575-586.

Goeddel, D.V., et al. (1979). Expression in Escherichia coli of chemically synthesized genes for human insulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 76(1), 106-110.

Gurramkonda, C., et al. (2010). Research Application of simple fed-batch technique to high-level secretory production of insulin precursor using *Pichia pastoris* with subsequent purification and conversion to human insulin. *Developments in Industrial Microbiology,* 15(2), 13-27.

Hansen, R.J., Switzer, R.L., Hinze, H., and Holzer, H. (1977). Effects of glucose and nitrogen source on the levels of proteinases, peptidases, and proteinase inhibitors in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects,* 496(1), 103-114.

He, J., Deng, J., Zheng, Y., and Gu, J. (2006). A synergistic effect on the production of S-adenosyl-l-methionine in *Pichia pastoris* by knocking in of S-adenosyl-l-methionine synthase and knocking out of cystathionine-β synthase. *Journal of Biotechnology,* 126(4), 519-527.

Healthy-ojas. Heartdisease 2016 Aviable from: http://healthy-ojas.com/diabetes/heart-disease.html. [20 September 2016].

Inan, M., et al. (1999). Optimization of temperature–glycerol–pH conditions for a fed-batch fermentation process for recombinant hookworm (*Ancylostoma caninum*) anticoagulant peptide (AcAP-5) production by *Pichia pastoris*. *Enzyme and Microbial Technology,* 24(7), 438-445.

Inan, M., and Meagher, M.M. (2001). Non-repressing carbon sources for alcohol oxidase (AOX1) promoter of *Pichia pastoris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering,* 92(6), 585-589.

Ithoi, I. (2010). Optimization for high-level expression in *Pichia pastoris* and purification of truncated and full length recombinant SAG2 of Toxoplasma gondii for diagnostic use. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health,* 41(3), 20-39.

Jafari, R., Sundström, B.E., and Holm, P. (2011). Optimization of production of the anti-keratin 8 single-chain Fv TS1-218 in *Pichia pastoris* using design of experiments. *Microbial Cell Factories,* 10(1), 1-14.

Joshi, S.R., Parikh, R.M., and Das, A. (2007). Insulin-History, Biochemistry, Physiology and Pharmacology. *Journal Association of Physicians of India,* 55(L), 19-25.

Kawai, T., et al. (2010). Effects of epalrestat, an aldose reductase inhibitor, on diabetic peripheral neuropathy in patients with type 2 diabetes, in relation to suppression of N **ε**-carboxymethyl lysine. *Journal of Diabetes and Its Complications,* 24(6), 424-432.

Khatri, N.K., and Hoffmann, F. (2006). Impact of methanol concentration on secreted protein production in oxygen-limited cultures of recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering,* 93(5), 871-879.

Kitcha, S., and Cheirsilp, B. (2011). Screening of oleaginous yeasts and optimization for lipid production using crude glycerol as a carbon source. *Energy Procedia,* 9, 274-282.

Kjeldsen, T., et al. (2002). Engineering-enhanced protein secretory expression in yeast with application to insulin. *Journal of Biological Chemistry,* 277(21), 18245-18248.

Koch, C., Neumann, P., Valerius, O., Feussner, I., and Ficner, R. (2016). Crystal Structure of Alcohol Oxidase from *Pichia pastoris*. *PloS One,* 11(2), 149-152.

Li, X., He, X., Li, Z., and Wang, F. (2013). Combined strategies for improving the production of recombinant *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*. *BioResources,* 8(2), 2867-2880.

Li, Z., et al. (2001). Low-temperature increases the yield of biologically active herring antifreeze protein in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification,* 21(3), 438-445.

Liu, Z., Hou, J., Martínez, J.L., Petranovic, D., and Nielsen, J. (2013). Correlation of cell growth and heterologous protein production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology,* 97(20), 8955-8962.

Losen, M., Frolich, B., Pohl, M., and Buchs, J. (2004). Effect of oxygen limitation and medium composition on *Escherichia coli* fermentation in shake-flask cultures. *Biotechnology Progress,* 20(4), 1062-1068.

Mahidol. Insulin. 2015. Aviable from: http://med.mahidol.ac.th/med/sites/default/files/public/pdf/medicinebook1/insulin.pdf [19 September 2016].

Mansur, M., et al. (2005). Multiple gene copy number enhances insulin precursor secretion in the yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology Letters,* 27(5), 339-345.

Martin, F. Unwrapping the genome of a protein µfactory. 2009. Aviable from: http://mycor.nancy.inra.fr/blogGenomes/?m=200908. [24 September 2016].

Mergulhao, F., Taipa, M., Cabral, J., and Monteiro, G. (2004). Evaluation of bottlenecks in proinsulin secretion by *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology,* 109(1), 31-43.

Moon, H., et al. (2002). Optimal strategy of pH control in the production of recombinant human epidermal growth factor by *Hansenula polymorpha*. *Process Biochemistry,* 38(4), 487-495.

Müller, S., Sandal, T., Kamp-Hansen, P., and Dalbøge, H. (1998). Comparison of expression systems in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Klyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe* and *Yarrowia lipolytica*. Cloning of two novel promoters from *Yarrowia lipolytica*. *Yeast,* 14(14), 1267-1283.

Nakae, J., Kido, Y., and Accili, D. (2001). Distinct and overlapping functions of insulin and IGF-I receptors. *Endocrine Reviews,* 22(6), 818-835.

Newton, C.A., and Raskin, P. (2004). Diabetic ketoacidosis in type 1 and type 2 diabetes mellitus: clinical and biochemical differences. *Archives of Internal Medicine,* 164(17), 1925-1931.

Ni, H., et al. (2007). Studies on optimization of nitrogen sources for astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma*. *Journal of Zhejiang University Science B,* 8(5), 365-370.

Nobelmedia. Frederick Sanger–biographical. 2014. Aviable from: https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1958/sanger-bio.html. [20 September 2016].

Ogata, K., Nishikawa, H., and Ohsugi, M. (1969). A yeast capable of utilizing methanol. *Agricultural and Biological Chemistry,* 33(10), 1519-1520.

Phamafactz. Pharmacology of insulin analogues. 2015. Aviable from: http://pharmafactz.com/pharmacology-of-insulin-analogues. [17 September 2016].

Pornchaloempong, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). 2010. Aviable from: http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/4118/enzyme-linked-immunosorbent-assay-elisa. [25 September 2016].

Praphailong, W., and Fleet, G. (1997). The effect of pH, sodium chloride, sucrose, sorbate and benzoate on the growth of food spoilage yeasts. *Food Microbiology,* 14(5), 459-468.

Rizwan, S.A. Diabetes: epidemiology & prevention. 2016. Aviable from: http://www.slideshare.net/RizwanSa/diabetes-mellitus-epidemiology-prevention. [22 September 2016].

Robinson, W.G., Tillis, T.N., Laver, N., and Kinoshita, J.H. (1990). Diabetes-related histopathologies of the rat retina prevented with an aldose reductase inhibitor. *Experimental Eye Research,* 50(4), 355-366.

Rungrojchaipon, P. Glycerol: Utilization for hydrogen production. 2014. Aviable from: https://www.tci-thaijo.org/index.php/science_kmitl/article/download/ 31529/27077. [25 September 2016].

Santoso, A., Herawati, N., and Rubiana, Y. (2012). Effect of methanol induction and incubation time on expression of human erythropoietin in methylotropic yeast *Pichia pastoris*. *MAKARA of Technology Series,* 16(1), 29-34.

Shi, X., et al. (2003). Optimal conditions for the expression of a single-chain antibody (scFv) gene in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification,* 28(2), 321-330.

Shin, C.S., Hong, M.S., Bae, C.S., and Lee, J. (1997). Enhanced production of human mini-proinsulin in fed-batch cultures at high cell density of *Escherichia coli* BL21 (DE3) [pET-3aT2M2]. *Biotechnology Progress,* 13(3), 249-257.

Sino-Biological. ELISA. 2004. Aviable from: http://www.elisa-antibody.com/ELISA-Introduction/ELISA-types/indirect-elisa. [27 September 2016].

Sutton, S. Measurement of cell concentration in suspension by optical density. 2006. Aviable from: http://www.microbiol.org/resources/monographswhite-papers/measurement-of-cell-concentration-in-suspension-by-optical-density/. [1 November 2016].

Swamy, S. Recombinant DNA (r-DNA) technology. 2016. Aviable from: http://www.slideshare.net/seetaram443/recombinant-dna-rdna-technology. [24 September 2016].

Ta, S. (2014). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care,* 37(1), 81-90.

Tanapati, P. (2014). *Enhancement of monomeric insulin production in Pichia pastoris strains by increasing copy number of gene.* Master's Thesis of Science Program in Biotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn university.

Thermofisher. Overview of ELISA 2010. Aviable from: https://www.thermofisher.com/th/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa.html. [25 Semptember 2016].

Thermofisher. EasySelect™ *Pichia* Expression Kit. 2016. Aviable from: https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K174001. [24 September 2016].

Thongyoo, S. (2015). *Purification and biological activity assay of recombinant monomeric insurin from Pichia pastoris KM71H.* Master's Thesis of Science Program in Biotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn university.

Tiker, N. Glycerol. 2007. Aviable from: https://en.wikipedia.org/wiki/Glycerol. [25 Semptember 2016].

Vab.amrita.edu. Direct ELISA. 2011. Aviable from: www.amrita.edu/?sub=3&brch=69&sim=696&cnt=1 [27 September 2016].

Vai, M., et al. (2000). Improved secretion of native human insulin-like growth factor 1 from gas1 mutant *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Applied and Environmental Microbiology,* 66(12), 5477-5479.

Van Der Klei, I.J., Bystrykh, L.V., and Harder, W. (1990). Alcohol oxidase from *Hansenula polymorpha* CBS 4732. *Methods in Enzymology,* 188, 420-437.

Wanderley, M.S.O., et al. (2009). Influence of pH on cellular growth of *Pichia pastoris* KM71H by fed-batch process. *Applied Microbiology and Biotechnology,* 24(3), 65-77.

WebMD. Types of insulin for diabetes treatment. 2005. Aviable from: http://www.webmd.com/diabetes/guide/diabetes-types-insulin. [29 September 2016].

Wikipedia. Methanol. 2016. Aviable from: www.en.wikipedia.org/wiki/Methanol.com. [24 Semptember 2016].

Wilcox, G. (2005). Insulin and insulin resistance. *Clin Biochem Rev,* 26(2), 19-39.

Winter, J., Neubauer, P., Glockshuber, R., and Rudolph, R. (2000). Increased production of human proinsulin in the periplasmic space of *Escherichia coli* by fusion to DsbA. *Journal of Biotechnology,* 84(2), 175-185.

Wood, A.J., Holleman, F., and Hoekstra, J.B. (1997). Insulin lispro. *New England Journal of Medicine,* 337(3), 176-183.

Worldpress. Insulin. 2009. Aviable from: www.numob.wordpress.com. [20 September 2016].

Worldpress. Diabetes. 2014. Aviable from: www.science-tuition.co.uk/diabetes.com. [20 September 2016].

Xu, J., and Zou, M.-H. (2009). Molecular insights and therapeutic targets for diabetic endothelial dysfunction. *Circulation,* 120(13), 1266-1286.

Yuk, C.L. (2002). Yeast compositions for converting bio-available phosphorus in a culture medium to intracellular phosphorus. Patent No. US 6,436,695 B431.

Zhu, T., et al. (2009). Efficient generation of multi-copy strains for optimizing secretory expression of porcine insulin precursor in yeast *Pichia pastoris*. *Journal of Applied Microbiology,* 107(3), 954-963.

เครสซี่, ร. (2558). โรคเบาหวาน. เชียงใหม่ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

โฆษชุณหนันท์, ณ. ความรู้เรื่องโรคเบาหวาน. 2558. Aviable from: http://www.med.cmu.ac.th/etc/princefund/file/17.pdf. [6 กรกฎาคม 2558].

ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์, อ. (2558). โภชนาการของยีสต์. กรุงเทพมหาคร: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เปี่ยมงาม, ก. รู้ทันเบาหวาน. 2558. Aviable from: http://allied.tu.ac.th/MedicalTechnology/Documents/Articles/Articles_mt_gen_KanyanatP_2554_06_29.pdf. [7 กรกฎาคม 2558].

สำนักโรคไม่ติดต่อ. ข้อมูลโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง. 2557. Aviable from: http://www.thaincd.com/information-statistic/non-communicable-disease-data.php. [22 กันยายน 2559].

แสงคำ, ณ. พันธุวิศวกรรม (Genetic Engineering). 2552. Aviable from: http://www.sahavicha.com/?name=knowledge&file=readknowledge&id=1049. [24 กันยายน 2559].

ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหาร Yeast Peptone Dextrose (YPD)

- Yeast extract 1% (w/v)
- Peptone 2% (w/v)
- Dextrose or Glucose 2% (w/v)
- Agar 2% (w/v)

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส โดยใช้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 20 นาที ในกรณีของอาหาร YPD ที่มี Zeocin™ เป็นองค์ประกอบ ทำการเติม Zeocin™ ลงไปหลังจากที่อาหาร YPD ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ Zeocin™ เท่ากับ 100 $mg.l^{-1}$ หลังจากนั้นนำไปเก็บที่ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้งาน

2. อาหาร Yeast extract Peptone Glycerol (YPGly)

- Yeast extract 1% (w/v)
- Peptone 1% (w/v)
- Glycerol 1% (w/v)

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส โดยใช้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 20 นาที และนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สำหรับในกรณีที่มีการเปลี่ยนแปลงระดับความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนจะใช้ความเข้มข้นของกลีเซอรอลเท่ากับ 0.5% (w/v), 1% (w/v), 2% (w/v) และ 3% (w/v) (YPGly 0.5% (w/v), YPGly 1%(w/v), YPGly 2% (w/v) และ YPGly 3% (w/v)) ในขณะที่การเปลี่ยนแปลงระดับของไนโตรเจนและกลีเซอรอลจะใช้เปอร์เซ็นต์ของสารสกัดจากยีสต์และเปปโตนรวมถึงปริมาณของกลีเซอรอลเท่ากับ 2% (w/v) และ 3% (w/v) ตามลำดับ (Y2P2Gly2% (w/v) และ Y3P3Gly3% (w/v))

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3. อาหาร Yeast Nitrogen Base Glycerol (YNBGly)

ประกอบด้วย วิตามิน

- Biotin	2	$\mu g.l^{-1}$
- Calcium pantothenate	400	$\mu g.l^{-1}$
- Folic acid	2	$\mu g.l^{-1}$
- Inositol	2000	$\mu g.l^{-1}$
- Niacin	400	$\mu g.l^{-1}$
- p-Aminobenzoic acid	200	$\mu g.l^{-1}$
- Pyridoxine hydrochloride	400	$\mu g.l^{-1}$
- Riboflavin	200	$\mu g.l^{-1}$
- Thiamine hydrochloride	400	$\mu g.l^{-1}$

แร่ธาตุ

- Boric acid	500	$\mu g.l^{-1}$
- Copper sulfate	40	$\mu g.l^{-1}$
- Potassium iodide	100	$\mu g.l^{-1}$
- Ferric chloride	200	$\mu g.l^{-1}$
- Manganese sulfate	400	$\mu g.l^{-1}$
- Sodium molybdate	200	$\mu g.l^{-1}$
- Zinc sulfate	400	$\mu g.l^{-1}$

เกลือ

- Potassium phosphate monobasic	1	$g.l^{-1}$
- Magnesium sulfate	500	$mg.l^{-1}$
- Sodium chloride	100	$mg.l^{-1}$
- Calcium chloride	100	$mg.l^{-1}$

แหล่งไนโตรเจน

- Ammonium sulfate 5 $g.l^{-1}$

แหล่งคาร์บอน

- 0.5% (w/v) หรือ 1% (w/v) กลีเซอรอล

นำส่วนที่เป็นเกลือและแหล่งคาร์บอนไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส โดยใช้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นนำมาเติมวิตามินและแร่ธาตุในตู้ปลอดเชื้อ และนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. อาหาร Yeast extract Peptone Methanol (YPMet)

- Yeast extract 1% (w/v)
- Peptone 1% (w/v)
- Methanol 1% (w/v)

ทั้งนี้สำหรับอาหาร YPMet 2% (v/v) จะเปลี่ยนระดับความเข้มข้นของเมทานอลเป็น 2% (v/v)

5. อาหาร Yeast Nitrogen Base Methanol (YNBMet)

ใช้สูตรอาหารเช่นเดียวกับ YNBGly แต่เปลี่ยนแปลงแหล่งคาร์บอนจากกลีเซอรอลให้เป็นเมทานอลเพื่อใช้เหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์อินซูลินโดยจะใช้เมทานอลเป็น 1%(v/v) และ 2% (v/v) ตามลำดับ

6. อาหาร Minimal Methanol Histidine (MMH)

- Biotin 4×10^{-5} % (w/v)
- Histidine 0.004% (w/v)
- Methanol 1% หรือ 2% (w/v)

นอกจากนี้อาหาร MMH จะประกอบด้วย วิตามิน แร่ธาตุ เกลือ และแหล่งไนโตรเจนที่มีความเข้มข้นเป็น 2 เท่าของอาหาร YNBMet ดังนี้

วิตามิน

- Biotin 4 $\mu g.l^{-1}$
- Calcium pantothenate 800 $\mu g.l^{-1}$

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

- Folic acid	4	$\mu g.l^{-1}$
- Inositol	4000	$\mu g.l^{-1}$
- Niacin	800	$\mu g.l^{-1}$
- p-Aminobenzoic acid	400	$\mu g.l^{-1}$
-Pyridoxine hydrochloride	800	$\mu g.l^{-1}$
- Riboflavin	400	$\mu g.l^{-1}$
- Thiamine hydrochloride	800	$\mu g.l^{-1}$
แร่ธาตุ		
- Boric acid	1000	$\mu g.l^{-1}$
- Copper sulfate	80	$\mu g.l^{-1}$
- Potassium iodide	200	$\mu g.l^{-1}$
- Ferric chloride	400	$\mu g.l^{-1}$
- Manganese sulfate	800	$\mu g.l^{-1}$
- Sodium molybdate	400	$\mu g.l^{-1}$
- Zinc sulfate	800	$\mu g.l^{-1}$
เกลือ		
- Potassium phosphate monobasic	2	$g.l^{-1}$
- Magnesium sulfate	1000	$mg.l^{-1}$
- Sodium chloride	1000	$mg.l^{-1}$
- Calcium chloride	1000	$mg.l^{-1}$
แหล่งไนโตรเจน		
- Ammonium sulfate	10	$g.l^{-1}$

ภาคผนวก ข
การเตรียมสารละลายเคมี

1. การเตรียม 0.01 M Phosphate Buffer Saline (PBS), ค่าพีเอช 7.4

- 200 mM phosphate buffer, pH 7.4	1	l
- Sodium chloride	175.2	g
- Double distilled water	18	l

2. การเตรียม 0.05% (v/v) **Phosphate Buffer Saline Tween (PBST)**

- Tween 20	0.5	ml
- 0.01 M Phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4	1000	ml

3. การเตรียม 0.25% (w/v) **Glutaraldehyde**

- Glutaraldehyde 50% (w/v) in water	0.5	ml
- Double distilled water	99.5	ml

4. การเตรียม สารละลาย 3,3' Diaminobenzidine (DAB)

- PBS	20	ml
- DAB	6	mg
- 30% H_2O_2	20	µl
- 1% $COCl_2$	50	µl

5. การเตรียม 200 mM Potassium citrate buffer for ELISA, ค่าพีเอช 4.0

- Citric acid monohydrate	10.5	g
- Potassium citrate	16.22	g

6. การเตรียม 5% (w/v) นมผงขาดมันเนย (skim milk)

- Skim milk powder	5	g
- 0.01 M Phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4	100	ml

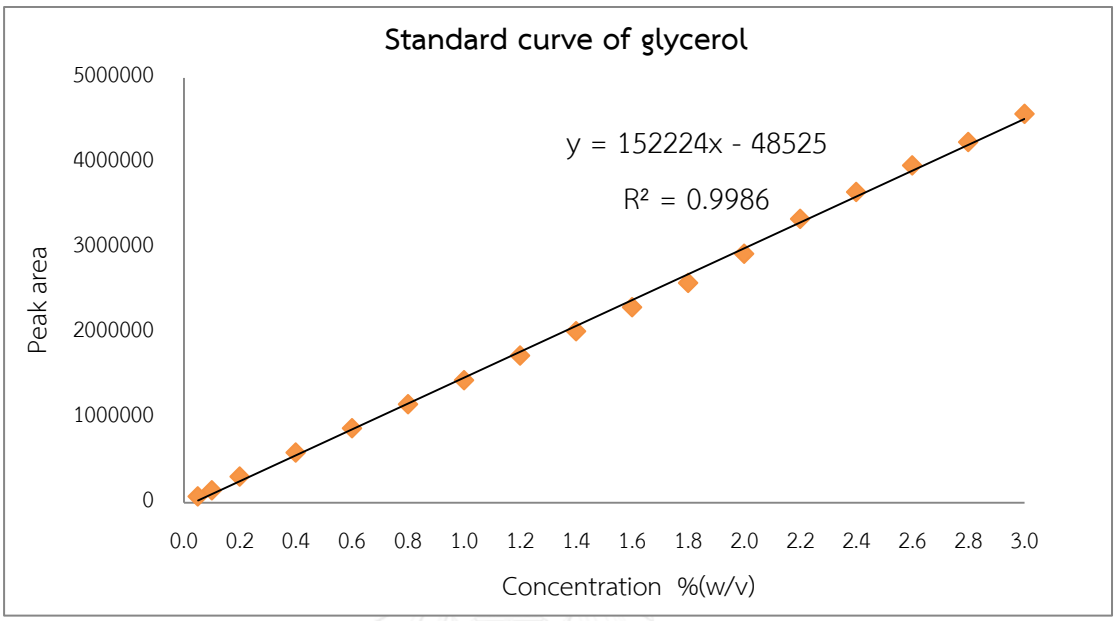
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

7. การเตรียม สารละลาย 3,3', 5,5'-tetrametyhlbenzidine (TMB)

- TMB	2.5	mg
- DMSO	250	μg
- 200 mM Potassium citrate buffer	10	ml
- 30% H_2O_2	3.5	μl

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ค
การหาปริมาณกลีเซอรอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้เทคนิค HPLC



รูปที่ ค.1 กราฟมาตรฐานของกลีเซอรอล สำหรับหาปริมาณกลีเซอรอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ทั้งนี้สามารถคำนวณปริมาณของกลีเซอรอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ โดยการคำนวณเทียบกับกราฟมารตราฐาน ดังที่แสดงในสมการด้านล่างนี้

$$y = 152224x - 48525$$

โดยกำหนดให้

Y คือ พื้นที่ใต้กราฟ

X คือ ปริมาณของกลีเซอรอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ % (w/v)

ภาคผนวก ง
การตรวจติดตามระดับการแสดงออกของ MIP ด้วยวิธี Dot-blot

การเตรียมสารละลายอินซูลินมาตรฐาน ที่จะใช้เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control) ในวิธี dot-blot สามารถทำได้โดยใช้ อินซูลินจากตับอ่อนของวัว (bovine pancreas) หรืออินซูลินแบบฉีด (injection insulin; Mixtrad® 30 HM Penfill®, 3 mg.ml^{-1}) นำมาละลายใน PBS buffer (pH 7.4) จนได้ความเข้มข้นเป็น 2 mg.ml^{-1} และ 1 mg.ml^{-1} ตามลำดับ จากนั้นทำการละลายในสารละลาย PBS อีกครั้งจนได้ความเข้มดังที่แสดงในตารางที่ 32

ตารางที่ ง.1 การเตรียมสารละลายอินซูลินมาตรฐานสำหรับวิธี dot-blot

Insulin from bovine pancreas				Injection insulin			
Final conc. mg.ml^{-1}	Stock solution mg.ml^{-1}	Volume from stock solution µl	PBS buffer (µl)	Final conc. mg.ml^{-1} *Serial dilution	Stock solution mg.ml^{-1}	Volume from stock solution µl	PBS buffer µl
2	2	500	0	1	1	500	0
1	2	500	500	1/2 X	1	500	500
0.5	1	500	500	1/4 X	1/2 X	500	500
0.1	1	100	900	1/8 X	1/4 X	500	500
0.05	0.5	100	900	1/16 X	1/8 X	500	500
0.01	0.1	100	900	1/32 X	1/16 X	500	500
0.0050	0.05	100	900	1/64 X	1/32 X	500	500
0.0025	0.05	50	950	1/128 X	1/64 X	500	500
0.0010	0.01	100	900	1/256 X	1/128 X	500	500
0.0005	0.005	100	900	1/512 X	1/256 X	500	500

ภาคผนวก จ

การหาความเข้มข้นของ MIP โดยใช้เทคนิค Indirect Competitive ELISA

1. การเตรียมสารละลายอินซูลินมาตรฐานเพื่อที่จะใช้เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control)

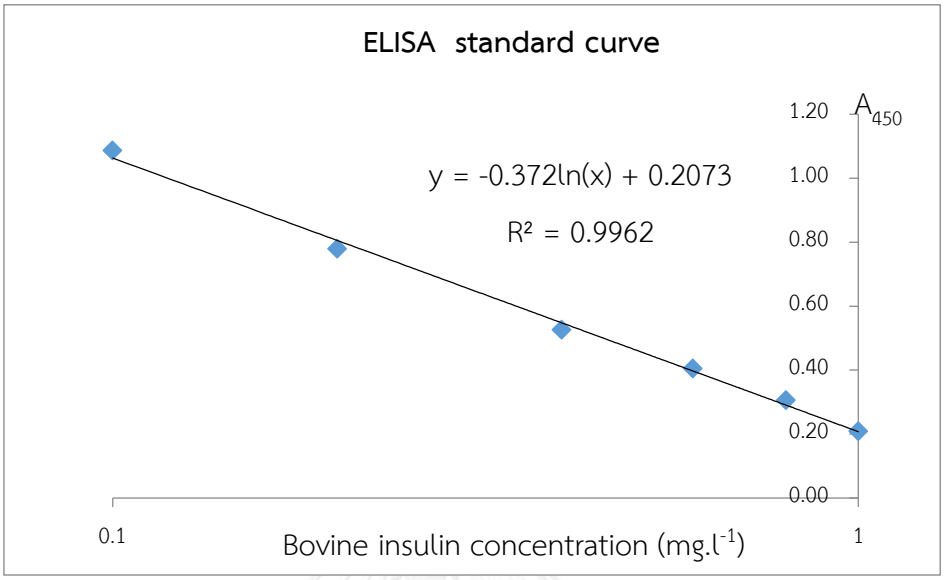
การเตรียมสารละลายอินซูลินมาตรฐานเพื่อที่จะใช้เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control) ทำได้โดย นำอินซูลินที่ได้จากตับอ่อนของวัว (bovine pancreas) ความเข้มข้น 1 $mg.ml^{-1}$ มาละลายใน PBS buffer (pH 7.4) จนได้ความเข้มข้นเป็น 0.1 $\mu g.\ \mu l^{-1}$, 0.01 $\mu g.\ \mu l^{-1}$และ 0.001 $\mu g.\ \mu l^{-1}$ ตามลำดับ จากนั้นละลายด้วย PBS อีกครั้งจนได้ความเข้มข้นที่ต้องการ (ตารางที่ 33)

ตารางที่ จ.1 การเตรียมสารละลายอินซูลินมาตรฐานสำหรับวิธี Indirect Competitive ELISA

Insulin standard concentration, $\mu g.ml^{-1}$	Stock concentration, $\mu g.\ \mu l^{-1}$	Use from stock (µl)	PBS sterile (µl)
10.00	0.1	100	900
7.50	0.1	75	925
5.00	0.1	50	950
4.00	0.1	40	960
3.00	0.1	30	970
2.00	0.1	20	980
1.00	0.1	10	990
0.80	0.01	80	920
0.60	0.01	60	940
0.40	0.01	40	960
0.20	0.01	20	980
0.10	0.01	10	990
0.075	0.001	75	925
0.050	0.001	50	950
0.025	0.001	25	975
0.000	0	0	1000

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2. กราฟมาตรฐานของสารละลายอินซูลินมาตรฐาน (bovine pancreas) สำหรับหาปริมาณรีคอมบิแนนท์อินซูลินด้วยวิธี Indirect Competitive ELISA



รูปที่ จ.1 กราฟมาตรฐานสำหรับใช้วิเคราะห์ปริมาณรีคอมบิแนนท์อินซูลิน

อย่างไรก็ตามสามารถคำนวณหาปริมาณของรีคอมบิแนนท์อินซูลินที่เกิดขึ้นโดยใช้ Microsoft Excel 2010 ตามสมการด้านล่าง ดังนี้

$$y = -0.372\ln(x) + 0.2073$$

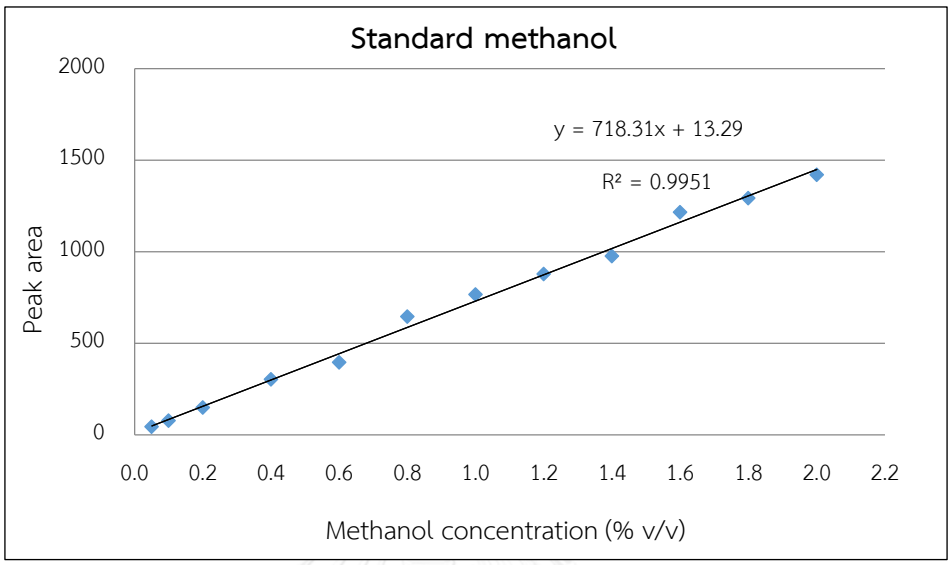
โดยกำหนดให้

y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร

x คือ ความเข้มข้นของรีคอมบิแนนท์อินซูลิน ($mg.l^{-1}$)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ฉ
การหาปริมาณของเมทานอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้เทคนิค GC



รูปที่ ฉ.1 กราฟมาตรฐานของเมทานอล สำหรับหาปริมาณเมทานอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ทั้งนี้สามารถคำนวณปริมาณของเมทานอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ โดยการคำนวณเทียบกับกราฟมารตราฐาน ดังที่แสดงในสมการด้านล่างนี้

$$y = 718.31x - 13.29$$

โดยกำหนดให้

Y คือ พื้นที่ใต้กราฟ

X คือ ปริมาณของเมทานอลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ (%v/v)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ช
การหาผลผลิตที่ได้ของรีคอมบิแนนท์อินซูลิน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ ช. 1 ผลผลิตที่ได้เมื่อเลี้ยงเชื้อใน YPMet และใช้การเติม 1% (v/v) เมทานอลทุก 24 ชั่วโมง เหนี่ยวนำให้เกิดรีคอมบิแนนท์อินซูลิน

Time (h)	YPMet (5xHCD)		Methanol				Insulin		dif. weight μg	Insulin yield $x10^{-3} g_{Ins} \cdot g_{Met}^{-1}$
	before (μl)	after (μl)	intake (μl)	residual % (v/v)	residual (μl)	use (μl)	conc. (μg/ml)	weight μg		
0	40000	37000	400	1.000	400	0	0.07	2.76	-	-
12	37000	34000	0	0.077	28.49	371.51	6.44	238.28		
24	34000	31000	310	0.201	68.34	-39.85	8.16	277.47	274.71	1.044
36	31000	28000	0	0.120	37.2	341.14	8.71	270.09		
48	28000	25000	250	0.025	7	30.2	9.66	270.37	-7.11	-0.024
60	25000	22000	0	0.124	31	226	9.98	249.56		
72	22000	19000	0	0.074	16.28	14.72	10.09	222.00	-48.37	-0.253

ตารางที่ ช.2 ผลผลิตที่ได้เมื่อเลี้ยงเชื้อใน YNBMet และใช้การเติม 1% (v/v) เมทานอลทุก 24 ชั่วโมง เหนี่ยวนำให้เกิดรีคอมบิแนนท์อินซูลิน

Time	YNBMet (5xHCD)		Methanol			Insulin			dif. weight	Insulin yield
(h)	before	after	intake	residual		use	conc.	weight	μg	$x10^{-3} g_{Ins} \cdot g_{Met}^{-1}$
	(μl)	(μl)	(μl)	% (v/v)	(μl)	(μl)	(μg/ml)	μg		
0	40000	37000	400	1.000	400	0	0.05	2.18	-	-
12	37000	34000	0	0.426	157.62	242.38	8.89	328.77		
24	34000	31000	310	0.195	66.3	91.32	11.10	377.26	375.08	1.416
36	31000	28000	0	0.068	21.08	355.22	12.74	395.05		
48	28000	25000	250	0.000	0	21.08	17.56	491.57	114.31	0.383
60	25000	22000	0	0.086	21.5	228.5	19.00	475.04		
72	22000	19000	0	0.032	7.04	14.46	19.40	426.72	-64.85	0.336

ตารางที่ ช.3 ผลผลิตที่ได้เมื่อเลี้ยงเชื้อใน MMH และใช้การเติม 1% (v/v) เมทานอลทุก 24 ชั่วโมง เหนี่ยวนำให้เกิดรีคอมบิแนนท์อินซูลิน

Time	MMH (5xHCD)		Methanol				Insulin		dif. weight	Insulin yield
(h)	before	after	intake	residual		use	conc.	weight	μg	$x10^{-3} g_{Ins}.g_{Met}^{-1}$
	(μl)	(μl)	(μl)	% (v/v)	(μl)	(μl)	(μg/ml)	μg		
0	40000	37000	400	1.00	400	0	0.04	1.75	-	-
12	37000	34000	0	0.39	143.56	256.44	9.92	367.22		
24	34000	31000	310	0.14	46.92	96.64	15.56	529.16	527.41	1.882
36	31000	28000	0	0.00	0	356.92	18.79	582.44		
48	28000	25000	250	0.00	0	0	23.67	662.81	133.65	0.472
60	25000	22000	0	0.07	16.5	233.5	24.24	605.96		
72	22000	19000	0	0.01	1.98	14.52	24.62	541.70	-121.11	0.061

ตารางที่ ช.4 ผลผลิตที่ได้เมื่อเลี้ยงเชื้อใน YNBMet และใช้การเติม 1% (v/v) เมทานอลทุก 12 ชั่วโมง เหนี่ยวนำให้เกิดรีคอมบิแนนท์อินซูลิน

Time	YPMet (5xHCD)		Methanol				Insulin		dif. weight	Insulin yield
(h)	before	after	intake	residual		use	conc.	weight	μg	$x10^{-3} g_{Ins} \cdot g_{Met}^{-1}$
	(μl)	(μl)	(μl)	% (v/v)	(μl)	(μl)	(μg/ml)	μg		
0	40000	37000	400	1.00	400.00	0	0.06	2.26	-	-
12	37000	34000	340	0.14	51.11	348.89	7.38	272.95	270.69	0.978
24	34000	31000	310	0.28	94.74	296.37	8.68	295.23	22.28	0.095
36	31000	28000	280	0.27	84.86	319.88	8.73	270.65	-24.58	-0.097
48	28000	25000	250	0.23	65.28	299.58	9.73	272.55	1.89	0.008
60	25000	22000	220	0.26	64.71	250.58	9.88	247.08	-25.46	-0.128
72	22000	19000	0	0.34	73.71	210.99	10.06	221.23	-25.86	-0.154

ตารางที่ ช.5 ผลผลิตที่ได้เมื่อเลี้ยงเชื้อใน YNBMet และใช้การเติม 1% (v/v) เมทานอลทุก 12 ชั่วโมง เหนี่ยวนำให้เกิดรีคอมบิแนนท์อินซูลิน

Time (h)	YNBMet (5xHCD)		Methanol				Insulin		dif. weight μg	Insulin yield $x10^{-3} g_{Ins} \cdot g_{Met}^{-1}$
	before (μl)	after (μl)	intake (μl)	residual		use (μl)	conc. (μg/ml)	weight μg		
				% (v/v)	(μl)					
0	40000	37000	400	1.00	400.00	0	0.06	2.26	-	-
12	37000	34000	340	0.46	171.90	228.10	8.03	297.12	294.86	1.629
24	34000	31000	310	0.28	95.07	416.84	9.23	313.90	16.78	0.051
36	31000	28000	280	0.17	53.67	351.40	14.03	435.07	121.17	0.434
48	28000	25000	250	0.27	75.00	258.67	19.07	534.01	98.94	0.482
60	25000	22000	220	0.26	66.25	258.76	19.28	481.95	-52.06	-0.253
72	22000	19000	0	0.29	63.54	222.71	19.57	430.51	-51.44	-0.291

ตารางที่ ช.6 ผลิตที่ได้เมื่อเลี้ยงเชื้อใน MMH และใช้การเติม 1% (v/v) เมทานอลทุก 12 ชั่วโมง เหนี่ยวนำให้เกิดรีคอมบิแนนท์อินซูลิน

Time	MMH (5xHCD)		Methanol				Insulin		dif. weight	Insulin yield
(h)	before	after	intake	residual		use	conc.	weight	μg	$x10^{-3} g_{Ins}.g_{Met}^{-1}$
	(μl)	(μl)	(μl)	% (v/v)	(μl)	(μl)	(μg/ml)	μg		
0	40000	37000	400	1.00	400.00	0	0.08	3.30	-	-
12	37000	34000	340	0.35	128.32	271.68	10.10	373.77	370.46	1.718
24	34000	31000	310	0.22	75.72	392.60	16.20	550.70	176.93	0.568
36	31000	28000	280	0.15	47.62	338.11	20.41	632.77	82.07	0.306
48	28000	25000	250	0.26	73.53	254.09	25.46	712.83	80.07	0.397
60	25000	22000	220	0.27	66.62	256.90	25.54	638.59	-74.24	-0.364
72	22000	19000	0	0.27	58.73	227.89	25.35	557.65	-80.94	-0.448

ตารางที่ ช.7 ผลิตที่ได้เมื่อเลี้ยงเชื้อใน YPMet และใช้การเติม 2% (v/v) เมทานอลทุก 12 ชั่วโมง เหนี่ยวนำให้เกิดรีคอมบิแนนท์อินซูลิน

Time (h)	YPMet (5xHCD)		Methanol				Insulin		dif. weight μg	Insulin yield $x10^{-3} g_{Ins}.g_{Met}^{-1}$
	before (μl)	after (μl)	intake (μl)	residual % (v/v)	residual (μl)	use (μl)	conc. (μg/ml)	weight μg		
0	40000	37000	800	2.00	800.00	0.00	0.04	1.48	-	-
12	37000	34000	0	0.35	129.41	670.59	6.10	225.88		
24	34000	31000	620	0.19	63.42	65.99	5.35	181.73	180.25	0.308
36	31000	28000	0	0.86	267.36	416.06	6.18	191.57		
48	28000	25000	500	0.35	97.74	169.62	8.71	243.85	62.12	0.134
60	25000	22000	0	1.18	295.36	302.38	6.60	165.00		
72	22000	19000	0	1.03	226.79	68.57	6.05	133.05	-110.80	-0.376

ตารางที่ ช.8 ผลิตที่ได้เมื่อเลี้ยงเชื้อใน YNBMet และใช้การเติม 2% (v/v) เมทานอลทุก 12 ชั่วโมง เหนี่ยวนำให้เกิดรีคอมบิแนนท์อินซูลิน

Time	YNBMet (5xHCD)		Methanol				Insulin		dif. weight	Insulin yield
(h)	before	after	intake	residual		use	conc.	weight	μg	$x10^{-3} g_{Ins} \cdot g_{Met}^{-1}$
	(μl)	(μl)	(μl)	% (v/v)	(μl)	(μl)	(μg/ml)	μg		
0	40000	37000	800	2.00	800.00	0.00	0.05	1.80	-	-
12	37000	34000	0	0.51	189.89	610.11	8.37	309.61		
24	34000	31000	620	0.14	47.44	142.44	11.61	394.73	392.93	0.658
36	31000	28000	0	0.68	210.46	456.99	7.77	240.99		
48	28000	25000	500	0.34	93.85	116.61	7.62	213.23	-181.50	-0.399
60	25000	22000	0	0.96	240.52	353.33	6.98	174.50		
72	22000	19000	0	0.82	179.65	60.87	6.93	152.56	-60.67	-0.185

ภาคผนวก ซ
การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ทางสถิติใช้โปรแกรม IBM SPSS เวอร์ชัน 22 ในการคำนวณเพื่อเปรียบเทียบแบบ multiple comparison ของชนิดและสูตรของอาหาร, ปริมาณของหัวเชื้อ, ระดับของความเข้มข้นของเมทานอลที่เหมาะสม ตลอดจนระยะเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อและผลิตอินซูลินในแต่ละกลุ่มที่สนใจ โดยกำหนดระดับนัยสำคัญที่ 0.05 ($p < 0.05$) ซึ่งได้ผลการวิเคราะห์ เป็นดังนี้

ตารางที่ ซ.1 การเปรียบเทียบความแตกต่างของอาหารแต่ละกลุ่ม YPGly0.5%(w/v), YPGly1%(w/v), YNBGly0.5%(w/v) และ YNBGly1%(w/v)

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: OD

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	15660.095[a]	67	233.733	761.072	.000
Intercept	35132.554	1	35132.554	114397.313	.000
Time	9869.586	16	616.849	2008.561	.000
Medium	3436.596	3	1145.532	3730.038	.000
Time * Medium	2353.914	48	49.040	159.682	.000
Error	41.767	136	.307		
Total	50834.417	204			
Corrected Total	15701.862	203			

a. R Squared = .997 (Adjusted R Squared = .996)

OD

Tukey HSD[a,b]

Medium	N	Subset			
		1	2	3	4
YNBGly 0.5%	51	8.295059			
YNBGly 1.0%	51		10.621196		
YPGly 0.5%	51			14.448647	
YPGly 1.0%	51				19.127902
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .307.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 51.000.

b. Alpha = 0.05.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ ซ.2 *การเปรียบเทียบความแตกต่างของระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อโดยเปรียบเทียบในทุกๆ 3 ชั่วโมง ของอาหาร YPGly0.5%(w/v), YPGly1%(w/v), YNBGly0.5%(w/v) และ YNBGly1%(w/v)*

OD

Tukey HSD[a,b]

Time	N	Subset										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
.00	12	.681917										
3.00	12		2.643333									
6.00	12		3.115833									
9.00	12			4.852500								
12.00	12				6.877500							
15.00	12					9.230000						
18.00	12						11.460000					
21.00	12							13.630000				
24.00	12								15.641667			
27.00	12									17.250000		
30.00	12									17.578333		
33.00	12										18.391667	
48.00	12											20.200000
45.00	12											20.225000
39.00	12											20.308333
42.00	12											20.375000
36.00	12											20.633333
Sig.		1.000	.795	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	.990	1.000	.884

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on observed means.
The error term is Mean Square(Error) = .307.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 12.000.

b. Alpha = 0.05.

ตารางที่ ซ.3 การเปรียบเทียบความแตกต่างของอาหารแต่ละกลุ่ม YPGly1%(w/v), YPGly2%(w/v) และ YPGly3%(w/v)

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: OD

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	15660.095[a]	67	233.733	761.072	.000
Intercept	35132.554	1	35132.554	114397.313	.000
Time	9869.586	16	616.849	2008.561	.000
Medium	3436.596	3	1145.532	3730.038	.000
Time * Medium	2353.914	48	49.040	159.682	.000
Error	41.767	136	.307		
Total	50834.417	204			
Corrected Total	15701.862	203			

a. R Squared = .997 (Adjusted R Squared = .996)

OD

Tukey B[a,b]

Medium	N	Subset		
		1	2	3
YPGly 3.0%	51	19.402667		
YPGly 2.0%	51		19.912137	
YPGly 1.0%	51			20.822863

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .175.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 51.000.

b. Alpha = 0.05.

ตารางที่ ซ.4 การเปรียบเทียบความแตกต่างของระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อโดยเปรียบเทียบในทุกๆ 3 ชั่วโมง ของอาหาร YPGly1%(w/v), YPGly2%(w/v) และ YPGly3%(w/v)

OD

Tukey B[a,b]

Time	N	Subset											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
.00	9	1.032889											
3.00	9		2.577778										
6.00	9		3.110000										
9.00	9			6.322222									
12.00	9				8.382222								
15.00	9					13.897778							
18.00	9						16.152778						
21.00	9							19.768889					
24.00	9								22.382222				
27.00	9									25.288889			
30.00	9										28.285556		
33.00	9											30.755556	
36.00	9												32.377778
39.00	9												32.577778
48.00	9												32.600000
45.00	9												32.633333
42.00	9												32.634444

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on observed means.
The error term is Mean Square(Error) = .175.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.

b. Alpha = 0.05.

ตารางที่ ซ.5 การเปรียบเทียบความแตกต่างของอาหารแต่ละกลุ่ม Y1P1Gly1%(w/v), Y2P2Gly2%(w/v) และ Y3P3Gly3%(w/v)

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: OD

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	21020.396[a]	50	420.408	1524.309	.000
Intercept	68790.738	1	68790.738	249420.422	.000
Medium	167.141	2	83.571	303.010	.000
Time	20747.644	16	1296.728	4701.656	.000
Medium * Time	105.610	32	3.300	11.966	.000
Error	28.132	102	.276		
Total	89839.265	153			
Corrected Total	21048.527	152			

a. R Squared = .999 (Adjusted R Squared = .998)

OD

Tukey HSD[a,b]

Medium	N	Subset		
		1	2	3
Y3P3Gly 3.0%	51	19.935569		
Y1P1Gly 1.0%	51		21.181196	
Y2P2Gly 2.0%	51			22.495451
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .276.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 51.000.

b. Alpha = 0.05.

ตารางที่ ซ.6 การเปรียบเทียบความแตกต่างของระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อโดยเปรียบเทียบในทุกๆ 3 ชั่วโมง ของอาหาร Y1P1Gly1%(w/v), Y2P2Gly2%(w/v) และ Y3P3Gly3%(w/v)

OD

Tukey HSD[a,b]

Time	N	Subset 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
.00	9	1.054222											
3.00	9		2.647778										
6.00	9			5.380000									
9.00	9				7.460000								
12.00	9					11.726667							
15.00	9						14.930556						
18.00	9							16.977778					
21.00	9								20.186667				
24.00	9									24.226667			
27.00	9										27.706667		
30.00	9											30.033333	
42.00	9												32.888889
39.00	9												32.927778
48.00	9												33.038889
33.00	9												33.050000
36.00	9												33.094444
45.00	9												33.138889
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on observed means.
The error term is Mean Square(Error) = .276.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.

b. Alpha = 0.05.

ตารางที่ ซ.7 การเปรียบเทียบความแตกต่างของอาหารแต่ละกลุ่ม YPMet, YNBMet และ MMH รวมถึงปริมาณหัวเชื้อที่ใช้และระยะเวลาในการเลี้ยงที่ได้ทำการเติมเมทานอลในทุกๆ 24 ชั่วโมง

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: MIP

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	5312.173[a]	62	85.680	136.518	.000
Intercept	3984.934	1	3984.934	6349.345	.000
Medium	152.265	2	76.132	121.305	.000
Time	930.758	6	155.126	247.169	.000
OD	2835.977	2	1417.988	2259.335	.000
Medium * Time	81.025	12	6.752	10.758	.000
Medium * OD	461.340	4	115.335	183.768	.000
Time * OD	700.058	12	58.338	92.952	.000
Medium * Time * OD	150.751	24	6.281	10.008	.000
Error	39.540	63	.628		
Total	9336.646	126			
Corrected Total	5351.713	125			

a. R Squared = .993 (Adjusted R Squared = .985)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

MIP

Tukey B[a,b]

Medium	N	Subset		
		1	2	3
YPMet	42	4.4009		
YNBMet	42		5.4039	
MMH	42			7.0665

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .628.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 42.000.

b. Alpha = 0.05.

MIP

Tukey B[a,b]

OD	N	Subset 1	Subset 2	Subset 3
OD=1	42	1.6005		
1xHCD	42		2.9854	
5xHCD	42			12.2853

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .628.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 42.000.

b. Alpha = 0.05.

MIP

	Time	N	Subset 1	2	3	4	5	6
Tukey HSD[a,b]	0	18	.1823					
	12	18		3.7722				
	24	18			5.1400			
	36	18				6.0679		
	48	18					7.6145	
	60	18					8.2233	
	72	18					8.3658	
	Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	.082	
Duncan[a,b]	0	18	.1823					
	12	18		3.7722				
	24	18			5.1400			
	36	18				6.0679		
	48	18					7.6145	
	60	18						8.2233
	72	18						8.3658
	Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	.591
Scheffe[a,b]	0	18	.1823					
	12	18		3.7722				
	24	18			5.1400			
	36	18			6.0679			
	48	18				7.6145		
	60	18				8.2233		
	72	18				8.3658		
	Sig.		1.000	1.000	.071	.249		

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .628.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 18.000.

b. Alpha = 0.05.

ตารางที่ ซ.8 การเปรียบเทียบความแตกต่างของอาหารแต่ละกลุ่ม YPMet, YNBMet และ MMH รวมถึงระดับความเข้มข้นของเมทานอล ตลอดจนระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: MIP

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	6227.645[a]	62	100.446	177.762	.000
Intercept	14996.406	1	14996.406	26539.522	.000
Medium	1278.847	2	639.424	1131.604	.000
Time	3064.044	6	510.674	903.753	.000
Methanol	705.239	2	352.619	624.039	.000
Medium * Time	367.664	12	30.639	54.222	.000
Medium * Methanol	124.199	4	31.050	54.949	.000
Time * Methanol	501.141	12	41.762	73.907	.000
Medium * Time * Methanol	186.511	24	7.771	13.753	.000
Error	35.599	63	.565		
Total	21259.650	126			
Corrected Total	6263.244	125			

a. R Squared = .994 (Adjusted R Squared = .989)

Chulalongkorn University

MIP

Tukey B[a,b]

Medium	N	Subset 1	Subset 2	Subset 3
YPMet	42	7.0044		
YNBMet	42		10.9162	
MMH	42			14.8081

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .565.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 42.000.

b. Alpha = 0.05.

MIP

Tukey B[a,b]

Methanol	N	Subset 1	Subset 2	Subset 3
Met 2% (24h)	42	7.5805		
Met 1% (24h)	42		12.2853	
Met 1% (12h)	42			12.8630

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .565.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 42.000.

b. Alpha = 0.05.

MIP

Tukey B[a,b]

Time	N	Subset 1	Subset 2	Subset 3	Subset 4
0	18	.1247			
12	18		8.2234		
24	18			11.5917	
36	18			12.1056	
48	18				14.7541
60	18				14.7633
72	18				14.8044

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .565.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 18.000.

b. Alpha = 0.05.

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวกนกพัชร์ กมลจิตไพศาล เกิดเมื่อวันที่ 26 สิงหาคม พ.ศ. 2534 ในจังหวัดกรุงเทพมหานคร และปัจจุบันอาศัยอยู่ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาในระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เมื่อปี พ.ศ. 2557 ต่อมาเข้าศึกษาต่อระดับปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2557

การเสนอผลงานวิจัย

Kanokphat Kamonjitpaisan, S.T., Tanapati Phakum, Sajee Noitang, Nantika Khongchareonporn, Nuttha Thongchul and Sarintip Sooksai. (2016, 20-23 September 2016). Optimization of recombinant insulin production in Pichia pastoris KM71H (TP1). Paper presented at the Biotechnology International Congress (BIC) 2016 “Biomass Energy and Its Refinery”, Bangkok

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University