รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การแสดงออกของเอนไซม์แลกเตทดีไฮโดรจิเนสจาก *Rhizopus oryzae* เพื่อใช้ในการผลิตกรดแลกติกใน *Escherichia coli*

EXPRESSION OF *Rhizopus oryzae* LACTATE DEHYDROGENASE FOR LACTIC ACID PRODUCTION IN *Escherichia coli*

อาจารย์ ดร.ฤทัยรัตน์ บุญสมบัติ

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล ประจำปีงบประมาณ 2554

กิตติกรรมประกาศ

รายงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความอนุเคราะห์อย่างดียิ่งจาก รศ.ดร. อมร เพชรสม อดีตผู้อำนวยการสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (ปัจจุบันดำรงตำแหน่งคณบดีบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) และรศ.ดร. พลกฤษณ์ แสงวนิช ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบคุณ อาจารย์ ดร. ณัฏฐา ทองจุล อาจารย์ประจำสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับคำปรึกษา คำแนะนำและตัวเชื้อ *R. oryzae* ที่ใช้ในโครงการวิจัยนี้

ขอขอบคุณ Dr. Kentaro Kodama สำหรับเทคนิคในการผลิตกรดแลกติกจากแบคทีเรีย

ขอขอบคุณ น.ส. ศศิธร เงินประเสริฐศิริ ผู้ช่วยวิจัยโครงการนี้ โดยศศิธรช่วยเหลืองานอย่างดีทั้งงานในโครงการวิจัยนี้และงานอื่นๆ

ขอขอบคุณบุคคลากรทุกท่านในสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับความช่วยเหลือทุกๆอย่างจนรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์นี้สำเร็จได้

และสุดท้ายนี้ ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล ประจำปีงบประมาณ 2554 สำหรับทุนวิจัยในโครงการนี้ด้วย

บทคัดย่อ

กรดแลกติกได้ถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมต่างๆ รวมถึงความเป็นไปได้ในการใช้เป็นสารตั้งต้นเพื่อผลิตพลาสติกชีวภาพ กระบวนการผลิตเพื่อให้ได้กรดแลกติกที่บริสุทธิ์ในปริมาณมากมีความสำคัญอย่างยิ่งในการสร้างพอลิเมอร์จากกรดแลกติก จากปัญหาที่เกิดจากการผลิตกรดแลกติกทางชีภาพด้วยแบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacilli* ทำให้มีความพยายามในการใช้จุลินทรีย์อื่น เช่น รา *Rhizopus oryzae* แม้ว่า *R. oryzae* จะให้กรดแลกติกไอโซเมอร์ L บริสุทธิ์ แต่ยังมีข้อจำกัดในการใช้สิ่งมีชีวิตนี้เพื่อการผลิตกรดแลกติก ดังนั้นจึงมีการใช้เทคนิคทางวิศกรรมพันธุศาสตร์เข้ามาช่วย โดย *Escherichia coli* เป็นทางเลือกที่มีความเป็นไปได้สูง โดยในโครงการวิจัยนี้ได้ทำการตัดต่อยีน *ldhA* จาก *R. oryzae* เข้าสู่พลาสมิด แล้วนำเข้าสู่ *E. coli* เมื่อยีน *ldhA* บนโครโมโซมถูกทำลาย ยีน *ldhA* ของ *R. oryzae* บนพลาสมิดสามารถแสดงออกได้ เมื่อทำการหมัก *E. coli* สายพันธุ์ที่มีพลาสมิดซึ่งมียีน *ldhA* ของ *R. oryzae* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 100 g/L พบว่ามีการแสดงออกของยีน *ldhA* บนพลาสมิดสามารถแสดงออกได้และมีการผลิตกรดแลกติกได้ดีที่สุดในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนและไม่เติม Amplicilin แต่ทั้งนี้ปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้ยังมีปริมาณน้อย (5.03±4.149 g/L) ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณมากยับยั้งการผลิตกรดแลกติก

คำสำคัญ: กรดแลกติก, *Rhizopus oryzae*, *Escherichia coli*

ABSTRACT

Lactic acid is widely used in various industrial applications including the use as a potential precursor for biodegradable plastics. To synthesize the polymers of lactic acid, the production of optically pure monomers is essential. The high cost along with several disadvantages from lactic acid biosynthesis by *Lactobacilli* leads to an attempt to use other organisms such as *Rhizopus oryzae* instead. Although it produces optically pure L-isomer lactic acid, *R. oryzae* has some limitations for using as lactic acid producer. To solve these problems, genetic modification of *Escherichia coli* will be a potential alternative to develop as a host for optically pure lactic acid production. In this research, plasmids containing *R. oryzae ldhA* were transformed into *E. coli* cells. When *E. coli ldhA* gene is knocked out, the *R. oryzae ldhA* gene onto the plasmid can be expressed. *E. coli* strain with plasmids containing *R. oryzae* was fermented by using media containing 100 g/L glucose. The result suggests that the *R. oryzae ldhA* gene on the plasmid can express and the optical condition for lactic acid fermentation is the use of fermentation media without Amplicilin in anaerobic conditions. However, the lactic acid yield obtained from this strain is still low (5.03±4.149 g/L). This may result from the high amount of remaining glucose in the culture that may inhibit the lactic acid production.

Keywords: Lactic acid, *Rhizopus oryzae*, *Escherichia coli*

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ ..... ก
บทคัดย่อ ..... ข
ABSTRACT ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... ฉ
สารบัญภาพ ..... ช
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ ..... ซ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 การทบทวนวรรณกรรม 1
1.2 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย 3
1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย 4
1.4 ขอบเขตของโครงการวิจัย 4
1.5 ทฤษฎี และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย 5
1.6 วิธีการดำเนินการวิจัยโดยสรุป 5
1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 5
บทที่ 2 อุปกรณ์ วิธีดำเนินงานวิจัย 6
2.1 อุปกรณ์ 6
2.2 จุลินทรีย์ พลาสมิด และไพรเมอร์ 8
2.2.1 พลาสมิด 8

2.2.2 จุลินทรีย์ 9
2.2.3 ไพรเมอร์ 10
2.3 การเตรียม *E. coli* สายพันธุ์ที่เหมาะสมเพื่อการแสดงออก 10
2.4 การตัดต่อยีน *ldhA* ของ *R. oryzae* ใส่ในพลาสมิดและคัดเลือกพลาสมิดถูกต้อง 11
2.5 การใส่พลาสมิดจากที่มียีน *ldhA* ของ *R. oryzae* ใน *E. coli* สายพันธุ์ใช้ในการทดลอง และการคัดเลือกโคลนที่ถูกต้อง 12
2.6 การวิเคราะห์ปริมาณผลผลิตกรดแลกติกที่สภาวะต่างๆในระดับ Shake flask 12
บทที่ 3 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง 17
3.1 การสร้างพลาสมิดที่มียีน *ldhA* ของ *R. oryzae* 17
3.2 การแสดงออกของยีน *ldhA* จาก *R. oryzae* ใส่บนพลาสมิด pRB85 17
3.3 ความเข้มข้นของกรดแลกติกที่ได้จากการหมักในสภาวะต่างๆ 18
3.3.1 การหมักในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด 19
3.3.2 การหมักในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน 19
3.3.3 การหมักในสภาวะที่เปลี่ยนจากการมีออกซิเจนเป็นไม่มีออกซิเจน 20
3.3.4 การหมักในสภาวะที่มีออกซิเจน 20
บทที่ 4 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ 30
4.1 สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผล 30
4.2 ข้อเสนอแนะ 30
ภาคผนวก 32
ประวัติผู้วิจัย 37

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 3. 1 ความเข้มข้นกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ที่ผลิตได้และความเข้มข้นกลูโคสที่เหลือจาก *E. coli* สายพันธุ์ต่างๆ เมื่อทำการหมักในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด 22

ตารางที่ 3. 2 ความเข้มข้นกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ที่ผลิตได้และความเข้มข้นกลูโคสที่เหลือจาก *E. coli* สายพันธุ์ต่างๆ เมื่อทำการหมักในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน 23

ตารางที่ 3. 3 ความเข้มข้นกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ที่ผลิตได้และความเข้มข้นกลูโคสที่เหลือจาก *E. coli* สายพันธุ์ต่างๆ เมื่อทำการหมักในสภาวะที่เปลี่ยนจากการมีออกซิเจนเป็นไม่มีออกซิเจน 24

ตารางที่ 3. 4 ความเข้มข้นกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ที่ผลิตได้และความเข้มข้นกลูโคสที่เหลือจาก *E. coli* สายพันธุ์ต่างๆ เมื่อทำการหมักในสภาวะที่มีออกซิเจน 25

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 2.1 การสร้าง *E. coli* สายพันธุ์ที่เหมาะสม เพื่อการแสดงออก..... 14

รูปที่ 2.2 ขั้นตอนการสร้างพลาสมิดที่มียีน *ldhA* ของ *R. oryzae*..... 15

รูปที่ 2.3 ขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อก่อนทำการหมักเพื่อปรับสภาพเซลล์..... 16

รูปที่ 3.1 การตรวจสอบความถูกต้องของผลิตภัณฑ์ PCR ที่มียีน *ldhA* ของ *R. oryzae* ก่อนตัดต่อเข้าสู่พลาสมิด..... 26

รูปที่ 3.2 การตรวจสอบหาพลาสมิดที่มียีน *ldhA* ของ *R. oryzae*..... 27

รูปที่ 3.3 การเจริญเติบโตและ clear zone ของ *E.coli* เมื่อได้รับพลาสมิดที่มียีน *ldhA* ของ *R. oryzae*..28

รูปที่ 3.4 ความเข้มข้นของกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ที่ผลิตได้จาก *E. coli* สายพันธุ์ต่างๆจากการหมักทั้ง 4 สภาวะ 29

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

%	เปอร์เซ็นต์
°C	องศาเซลเซียส
µg/mL	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
µl	ไมโครลิตร
µm	ไมโครเมตร
Amp	Amplicilin
Amp^R	Amplicilin Resistance
cat	ยีน chloramphenicol acetyltransferase
$CaCO_3$	แคลเซียมคาร์บอเนต
g	กรัม
g/L	กรัมต่อลิตร
kan	ยีนต้าน Kanamycin
Kan	Kanamycin
Kan^R	Kanamycin Resistance
L	ลิตร
LB	Luria-Bertani
ldhA	ยีน lactate dehydrogenase A
ldhA::cat	ยีน *pta* ที่ถูกทำลายด้วยการแทรกยีน *cat*
M	โมลาร์ หรือ โมลต่อลิตร
mL	มิลลิลิตร
mM	มิลลิเมตร

PCR	Polymerase Chain Reaction
pta	ยีน phosphate acetyltransferase
pta::kan	ยีน *pta* ที่ถูกทำลายด้วยการแทรกยีนต้าน Kanamycin
RbCl	Rubidium Chloride
rpm	round per minute (รอบต่อนาที)
v/v	volume by volume (ปริมาตรต่อปริมาตร)
w/v	weight by volume (น้ำหนักต่อปริมาตร)

บทที่ 1

บทนำ

1.1 การทบทวนวรรณกรรม

กรดแลกติกถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค .ศ.1780 โดย Carl Wilhelm Scheele นักเคมีชาวสวีเดนและใช้เพื่อเป็นสารให้รสเปรี้ยวในนม ต่อมามีการนำกรดแลกติกไปใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร และการนำไปสร้างเป็นพอลีเมอร์เช่น พอลีแลกไตด์ (polylactides) เพื่อใช้ในทางการแพทย์ และการผลิตพลาสติกที่ย่อยสลายได้ง่าย (Hester, 2000a; Kricheldorf, 2001) ซึ่งมีการคาดหมายว่ามีการผลิตกรดแลกติกทั่วโลกใน ปริมาณ 100,000 ตันต่อปี (Hester, 2000b) และมีแนวโน้มความต้องการที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว

กรดแลกติกสามารถผลิตได้ด้วยกระบวนการทางเคมี หรือกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์หลายชนิด (Narayanan *et al.*, 2004) จุลินทรีย์ที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมคือ แบคทีเรียจำพวก *Lactobacillus spp.* แต่ปัญหาที่พบคือ แบคทีเรียจำพวกนี้ต้องการสารอาหารที่ซับซ้อน และไม่สามารถผลิตกรดแลกติกในปริมาณมากที่ระดับ pH ต่ำกว่า 4 ซึ่งทำให้ประสิทธิภาพในการละลายลดลง เกิดการตกผลึกเป็นเกลือแลกเตท และทำให้ต้องเพิ่มขั้นตอนการสร้างกรดแลกติกมาจากเกลือแลกเตท (Skory, 2003) จุลินทรีย์ชนิดอื่นที่มีการนำมาใช้ผลิตกรดแลกติก ได้แก่ราจำพวก *R. oryzae* ซึ่งสามารถผลิตกรดแลกติกในรูปไอโซเมอร์ L เป็นหลักจากแป้ง (starch)เซลลูโลส , (cellulose) และเฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) โดยใช้แหล่งไนโตรเจนจากเกลือแอมโมเนีย (ammonium salts) (Woiciechowski *et al.*, 1999) ทั้งนี้กรดแลกติกไอโซเมอร์ L เป็นที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมเกือบทุกประเภท แต่ข้อจำกัดของการผลิตกรดแลกติกโดยใช้ *R. oryzae* คือ กรดแลกติกที่ได้มีปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับแบคทีเรียและปัญหาการปนเปื้อนของเอทานอลที่ถูกสร้างขึ้นระหว่างกระบวนการหมักในปริมาณสูง (Skory, 2004) นอกจากนี้สรีระวิทยาของ *R. oryzae* ก็ไม่เหมาะสมต่อกระบวนการหมัก (Narayanan *et al.*, 2004) ดังนั้นจึงมีความพยายามในการใช้ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดแลกติกไอโซเมอร์ L แสดงออกในจุลินทรีย์อื่นๆ ที่เลี้ยงง่าย และมีความเป็นไปได้ที่จะให้กรดแลกติกในปริมาณมาก

ขั้นตอนสุดท้ายของการสังเคราะห์กรดแลกติกจากกลูโคสคือ การเปลี่ยนกรดไพรูวิกให้เป็นกรดแลกติก ซึ่งปฏิกิริยานี้อาศัยเอนไซม์แลกเตทดีไฮโดรจิเนส (lactate dehydrogenase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งเอนไซม์นี้ยังเป็นตัวกำหนดไอโซเมอร์ของกรดแลกติกที่จุลินทรีย์แต่ละชนิดสร้างอีกด้วย (Ferain *et*

al., 1994) สำหรับ *R. oryzae* มีการสังเคราะห์เอนไซม์แลกเตทดีไฮโดรจิเนสสองชนิด คือ แลกเตทดีไฮโดรจิเนส A และ B ซึ่งสร้างจากยีน *ldhA* และ*ldhB* ตามลำดับ (Skory, 2000) ยีนทั้งสองนี้มีลำดับเบสคล้ายกัน 93.1% (Saito *et al.*, 2004) ซึ่งมีการสันนิษฐานว่า *ldhA* ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนกรดไพรูวิกเป็นกรดแลกติก ในขณะที่ *ldhB* เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาการเปลี่ยนกรดแลกติกเป็นกรดไพรูวิกเมื่อ *R. oryzae* เลี้ยงในกลีเซอรอ เอทานอล หรือแลกเตท (Skory, 2000) ทั้งนี้ *R. oryzae* สามารถแบ่งได้เป็นสองกลุ่ม คือ กลุ่มที่สร้างกรดแลกติก (LA group) และกลุ่มที่สร้างกรดฟอมูริกหรือกรดมาลิก (FMA group) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว โดยกลุ่มที่สร้างกรดแลกติกมีทั้งยีน *ldhA* และ*ldhB* แต่กลุ่มที่สร้างกรดฟอมูริกหรือกรดมาลิก มีเพียงยีน *ldhB* (Saito *et al.*, 2004) อย่างไรก็ตาม ทั้ง *ldhA* และ*ldhB* จาก *R. oryzae* สามารถแสดงออกและคืนความสามารถในการผลิตกรดแลกติกใน *E. coli* สายพันธุ์ที่ไม่สามารถสร้างกรดแลกติกได้

การผลิตกรดแลกติกในปัจจุบันได้ใช้วิศวกรรมพันธุศาสตร์เข้ามาเกี่ยวข้อง เช่น การตัดต่อยีน *ldhA* ของ *R. oryzae* ใส่ในพลาสมิดเพื่อนำไปแสดงออกในยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* แต่วิธีนี้ยังพบปัญหาเนื่องจากกรดแลกติกที่ได้มีปริมาณไม่มากและยังพบการปนเปื้อนของเอทานอล (Skory, 2003) การตัดต่อพันธุกรรมโดยการนำยีน L-*LDH* จากวัว *Bos taurus* จำนวน 2 ชุดใส่เข้าในยีสต์ *Candida utilis* ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ *CuPDC1* พบว่าการผลิตแลกติกได้ดี แต่การผลิตกรดแลกติกเกิดขึ้นที่อุณหภูมิจำกัดที่ 5-35°C เท่านั้น (Ikushima *et al.*, 2009) ในแบคทีเรีย *Enterobacter asburiae* เมื่อใช้เทคนิคพันธุวิศวกรรมลบยีน *pflB* และ *als* ซึ่งจำเป็นในการสร้างเอทานอล อะซิเตทและ 2,3-บิวทาเนไดออล (2,3-butanediol) พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกบริสุทธิ์ไอโซเมอร์ D ได้โดยการใช้เฮมิเซลลูโลสที่ได้จากกระบวนการไฮโดรไลซีสจากต้นไม้และผลิตผลจากการเกษตรเช่น sweet gum เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่วิธีดังกล่าวยังสามารถผลิตกรดแลกติกได้น้อยและยังประสบปัญหาที่จุลินทรีย์เจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อบางชนิดเท่านั้น (Bi *et al.*, 2009) ในการผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ D จากแบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum* สายพันธุ์ที่ถูกทำลายยีน *ldhL1* โดยใช้แป้งข้าวโพดดิบเป็นอาหาร โดยแบคทีเรียที่ใช้ได้นำพลาสมิดที่มียีน *amyA* ซึ่งสร้างเอนไซม์ α-amylase จาก *Streptococcus bovis* ทำให้แบคทีเรียดังกล่าวสามารถย่อยแป้งเป็นกลูโคสเพื่อผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ D บริสุทธิ์ได้ปริมาณค่อนข้างสูง ทั้งนี้เพื่อหลีกเลี่ยงการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาพลาสมิดไว้ในเซลล์ คณะผู้วิจัยได้นำยีน *amyA* ใส่ในโครโมโซมของ *L. plantarum* สายพันธุ์ดังกล่าว พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้น้อยกว่าการใช้พลาสมิด (Okano *et al.*, 2009a) *L. plantarum* สายพันธุ์ดังกล่าวยังได้ถูกใช้เพื่อนำพลาสมิดที่มียีน *celA* ซึ่งสร้างเอนไซม์ endoglucanase จาก *Clostridium thermocellum* เพื่อใช้ย่อย β-glucan ในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าผลิตผลที่ได้เป็นกรดอะซิติกที่เปลี่ยนมาจากกรดแลกติก ซึ่งการเลี้ยงเชื้อโดย

ไม่ให้ออกซิเจนสามารถลดการเปลี่ยนกรดแลกติกเป็นกรดอะซิติกได้บางส่วน (Okano *et al.*, 2009b) แบคทีเรียชนิด *Leuconostoc citreum* ซึ่งโดยปกติผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ D ในอาหารหมักดอง สามารถผลิตกรดแลกติกชนิดไอโซเมอร์ L โดยใช้การแสดงออกของยีน *ldhL* จาก *L. plantarum* ที่ดัดต่อใส่พลาสมิด แต่ปริมาณไพรูเวทที่ใช้เพื่อเปลี่ยนเป็นกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ไม่ได้นำมาจากไพรูเวทที่ใช้เพื่อเปลี่ยนเป็นกรดแลกติกไอโซเมอร์ D มากนัก (Jin *et al.*, 2009)

E. coli เป็นสิ่งมีชีวิตที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในการดัดต่อพันธุกรรม ข้อดีสำหรับการใช้แบคทีเรียชนิดนี้คือ เลี้ยงง่ายและโตเร็วด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ซับซ้อน และข้อมูลทางพันธุกรรมมีการศึกษาอย่างกว้างขวาง ดังนั้น *E. coli* จึงเป็นตัวเลือกในโครงการวิจัยนี้ ทั้งนี้ยีน *ldh* จากสิ่งมีชีวิตอื่นๆ เช่น *L. casei* สามารถแสดงออกได้ใน *E. coli* แต่ยีน *ldhA* ใน *E. coli* ต้องถูกทำลายก่อน (Chang *et al.*, 1999) ดังนั้นเพื่อตอบสนองต่อความต้องการกรดแลกติกที่เพิ่มขึ้นอย่างมากในทางอุตสาหกรรม การพัฒนาการผลิตกรดแลกติกโดยใช้ *E. coli* จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีความเป็นไปได้สูงสำหรับการผลิตกรดแลกติกในอนาคต

1.2 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ปัจจุบันแลกแตท (lactate) และอนุพันธุ์ของแลกเตท (lactate derivatives) ถูกใช้อย่างกว้างขวางในกระบวนการอุตสาหกรรมโดยเฉพาะอุตสาหกรรมอาหาร เช่น กรดแลกติก (lactic acid) ถูกใช้เพื่อเพิ่มรสชาติและสามารถใช้เพื่อยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์ในอาหาร นอกจากนี้แล้ว กรดแลกติกสามารถนำมาสร้างในรูปพอลิเมอร์ของกรดแลกติก (polylactic acid) ซึ่งมีคุณสมบัติคล้ายพอลิโอเลฟิน (polyolefins) จึงมีความเป็นได้สูงที่พอลิเมอร์ของกรดแลกติกจะเป็นทางเลือกใหม่ เพื่อใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตพลาสติกที่ย่อยสลายได้ง่ายโดยกระบวนการทางธรรมชาติ แทนที่การใช้พลาสติกที่มีพอลิเอทิลีน (polyethylene) เป็นส่วนผสม ซึ่งเป็นปัญหาใหญ่ด้านสิ่งแวดล้อมในปัจจุบัน ในทางอุตสาหกรรมกรดแลกติกสามารถสร้างได้โดยวิธีการทางเคมีหรือทางชีวภาพด้วยกระบวนการหมัก (fermentation) แต่ทั้งนี้กรดแลกติกที่ได้อาจมีการผสมกันระหว่างไอโซเมอร์ D และ L (D and L isomers) เนื่องจากคุณสมบัติของพอลิเมอร์ของกรดแลกติกนั้นขึ้นอยู่กับส่วนผสมระหว่างไอโซเมอร์ทั้งสองชนิดนี้ ดังนั้นการผลิตกรดแลกติกบริสุทธิ์จึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง เพื่อที่จะนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการสร้างพอลิเมอร์ต่อไป ทั้งนี้จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถสร้างกรดแลกติกได้จากกระบวนการหมักและกรดแลกติกที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นอาจเป็นไอโซเมอร์ D หรือ L ก็ได้ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตามกรดแลกติกในรูปของไอโซเมอร์ L เป็นที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมเกือบทุกประเภท

จากงานวิจัยของ Lockwood และคณะ ในปี ค .ศ.1936 พบว่าเชื้อรา *R. oryzae* สามารถเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสให้กลายเป็นกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ได้ด้วยกระบวนการเผาผลาญอาหารแบบใช้ออกซิเจน (aerobic metabolism) ดังนั้นการใช้ *R. oryzae* เพื่อผลิตกรดแลกติกจึงมีปัญหาเมื่อ *R. oryzae* ถูกเลี้ยงในสภาพแวดล้อมที่ไม่มีออกซิเจนหรือมีออกซิเจนน้อย อาทิเช่น กระบวนการหมัก ซึ่งพบว่าได้ผลผลิตกรดแลกติกที่ได้มีปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับแบคทีเรีย และมีการปนเปื้อนของเอทานอลในปริมาณสูง ดังนั้นเพื่อเป็นแก้ปัญหาดังกล่าว การผลิตกรดแลกติกโดยใช้ *E. coli* จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีความเป็นได้สูงเพราะ *E. coli* เป็นแบคทีเรียที่โตเร็วและไม่จำเป็นต้องใช้กระบวนการเลี้ยงเชื้อที่ซับซ้อน นอกจากนี้การตัดต่อยีนใน *E. coli* ก็สามารถทำได้ไม่ยุ่งยาก จากงานวิจัยของ Chang และคณะ ในปี ค .ศ.1999 พบว่าพลาสมิดที่มียีน L-LDH จาก *Lactobacillus casei* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างกรดแลกติกไอโซเมอร์ L เมื่อถูกใส่เข้าไปใน *E. coli* สายพันธุ์ที่ยีน *pta* และ *ldhA* ถูกทำลาย *E. coli* สายพันธุ์ดังกล่าวสามารถสร้างกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ได้ นอกจากนี้ใน *E. coli* สายพันธุ์ที่ไม่สามารถสร้างกรดแลกติกด้วยกระบวนการหมักได้เนื่องจากยีน *ldhA* ใน *E. coli* สายพันธุ์ดังกล่าวถูกทำลาย พบว่า *E. coli* สายพันธุ์นี้สามารถกลับมาสร้างกรดแลกติกได้อีกเมื่อได้รับพลาสมิดที่มียีน *ldhA* หรือ *ldhB* ของ *R. oryzae* (Skory, 2000) ซึ่งสามารถกล่าวได้ว่ายีน *ldh* จากสิ่งมีชีวิตอื่นสามารถแสดงออกได้ใน *E. coli* ดังนั้นการผลิตกรดแลกติกโดยใช้ *E. coli* จึงเป็นทางเลือกที่มีความเป็นไปได้สูงและควรมีการพัฒนาเพื่อให้ได้กระบวนการผลิตที่มีประสิทธิภาพสูงสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่อไป

1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

พัฒนาการผลิตกรดแลกติกบริสุทธิ์ให้มีประสิทธิภาพเพื่อให้สามารถนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในทางอุตสาหกรรมอื่นๆ

1.4 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ในโครงการวิจัยนี้จะใช้ยีน *ldhA* จาก *R. oryzae* ซึ่งสังเคราะห์เอนไซม์แลกเตทดีไฮโดรจิเนสA (Lactate Dehydrogenase A) ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวจะเปลี่ยนกรดไพรูวิก (pyruvic acid) ให้กลายเป็นกรดแลกติกไอโซเมอร์ L โดยยีน *ldhA* จาก *R. oryzae* จะถูกตัดต่อใส่พลาสมิดก่อนจะนำเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ที่ยีน *pta* และ *ldhA* ถูกทำลายทั้งนี้เพื่อให้ได้กรดแลกติกจากการแสดงออกของยีน *ldhA* จาก *R. oryzae* ที่บริสุทธิ์มากที่สุดและลดการปนเปื้อนจากสารที่สร้างขึ้นระหว่างกระบวนการหมักของ *E. coli* เพราะสำหรับ *E. coli* แล้ว แม้ว่าจะได้รับพลาสมิดที่มียีน *ldh* ของสิ่งมีชีวิตอื่น แต่จะมีสร้างเฉพาะกรดแลกติกไอโซเมอร์ D โดยใช้ยีน *ldhA* ของตัวเอง (Chang, 1999) นอกจากนี้ในกระบวนการหมัก *E. coli*

สามารถเกิดสารประกอบอื่นๆที่เป็นผลพลอยได้ เช่น เอทานอล (ethanol), ฟอร์เมท (formate), ไพรูเวท (pyruvate) เมื่อยีน *pta* ถูกทำลายไป พบว่าได้กำจัดหรือลดการสร้างสารประกอบบางอย่างที่เกิดจากกระบวนการหมักของ *E. coli* (Chang, 1999) ในโครงการวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์แลกเตทดีไฮโรจิเนสที่สภาวะต่างๆในระดับ Shake Flask และเปรียบเทียบปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้จาก *E. coli* สายพันธุ์ที่ได้รับพลาสมิดที่มียีน *ldhA* ของ *R. oryzae* เพื่อเป็นข้อมูลในการพัฒนาการผลิตกรดแลกติกต่อไป

1.5 ทฤษฎี และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

เนื่องจากการสกัดกรดแลกติกจาก *R. oryzae* ประสบปัญหาเช่น ได้กรดแลกติกในปริมาณน้อย เพราะ *R. oryzae* เป็นสิ่งมีชีวิตที่เจริญเติบโตค่อนข้างช้าเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรีย เช่น *E. coli* และกระบวนการผลิตกรดแลกติกส่วนใหญ่ได้จากกระบวนการเผาผลาญอาหารแบบใช้ออกซิเจน ซึ่งเกิดปัญหาเมื่อใช้กระบวนการหมักเพื่อผลิตกรดแลกติก รวมถึงการปนเปื้อนของเอทานอลในปริมาณสูง ดังนั้นการใช้จุลินทรีย์ที่โตง่ายและไม่มีปัญหาในกระบวนการหมัก เช่น *E. coli* จึงเป็นทางเลือกที่เป็นไปได้ในการผลิตกรดแลกติกบริสุทธิ์เพื่อเป็นสารตั้งต้นในอุตสาหกรรมต่อไป

1.6 วิธีการดำเนินการวิจัยโดยสรุป

1. เตรียม *E. coli* สายพันธุ์ที่เหมาะสมเพื่อการแสดงออก
2. ตัดต่อยีน *ldhA* ของ *R. oryzae* ใส่ในพลาสมิดและคัดเลือกพลาสมิดถูกต้อง
3. ใส่พลาสมิดจากข้อ 2 ใน *E. coli* สายพันธุ์ที่ใช้การทดลองและการคัดเลือกโคลนที่ถูกต้อง
4. วิเคราะห์ปริมาณผลผลิตกรดแลกติกที่สภาวะต่างๆในระดับ Shake Flask

1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เป็นข้อมูลเพื่อประยุกต์ใช้ในการผลิตกรดแลกติกได้อย่างมีประสิทธิภาพสำหรับเป็นสารตั้งต้นในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น การผลิตพลาสติกที่ย่อยสลายได้ง่าย

2. สามารถนำความรู้ที่ได้ไปพัฒนาและประยุกต์ใช้ *E. coli* เพื่อเป็นระบบในการผลิตสารอื่นๆต่อไป เช่น การผลิต recombinant proteins

บทที่ 2

อุปกรณ์ วิธีดำเนินงานวิจัย

2.1 อุปกรณ์

เครื่อง PCR	Applied Biosystems, Singapore
(Polymerase Chain Reaction Thermocycer)	
เครื่องเขย่าผสม รุ่น Vortex-Genie2	Scientific Industries, USA
(Vortex mixer: model Vortex-Genie2)	
เครื่องเขย่าเลี้ยงเชื้อควบคุมอุณหภูมิ	New Brunswick Scientific, USA
(Refrigerated incubator shaker : model Innova 4330)	
เครื่องชั่งแบบละเอียด รุ่น FX-180	A&D Co., Ltd., Japan
(Electronic balance : model FX-180)	
เครื่องชั่งแบบหยาบ รุ่น FX-3000	A&D Co., Ltd, Japan
(Electronic balance : model FX-3000)	
เครื่องทำให้สารแตกตัวโดยใช้คลื่นเสียง รุ่น UD-201	Tomy Seiko Co., Ltd., Japan
(Ultrasonic disruptor model : UD-201)	
เครื่องบันทึกภาพเจลภายใต้แสงยูวี	UVItec, UK
(Uvitec Platinum Gel Documentation system)	
เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิ	Kubota cooperating, Japan
(Refrigerated high speed centrifuge)	
เครื่องปั่นเหวี่ยงหลอด micro-tube ความเร็วสูง รุ่น MTX-150	Tomy Seiko Co., Ltd., Japan
(High speed micro refrigerated centrifuge : model MTX-150)	
เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง	Mettler Toledo, USA

(pH meter)	
เครื่องวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล รุ่น 2700	YSI, Inc., USA
(YSI Select Biochemistry Analyzer model : 2700)	
เครื่องวิ่งเจลอะกาโรส	ADVANCE Co., Ltd., Japan
(Agarose gel electrophoresis equipments)	
เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ	Taladlab, Thailand
(Autoclave)	
เครื่องอังน้ำ	Yamato, Japan
(Water bath)	
ชุดทำ cloning	Promega, USA
(pGEM®-T Vector Easy System)	
ชุดทำ cloning	Invitrogen, USA
(TOPO® Cloning Kits)	
ชุดทำสภาวะไม่มีออกซิเจน	MISUBISHI GAS CHEMICAL, CO., INC, Japan
(AnaeroPack® Anarero)	
ชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล	MACHEREY-NAGEL, Germany
(NucleoSpin® Extract II Kits)	
ชุดสกัดพลาสมิด	MACHEREY-NAGEL, Germany
(NucleoSpin® plasmid)	
ตู้แช่แข็ง –20°C	Sanyo, Japan
(Freezer –20°C)	
ตู้แช่แข็ง –70°C	Sanyo, Japan
(Freezer –70°C)	

ตู้ปลอดเชื้อ รุ่น HF safe-12006	Heal Force, China
(Laminar flow: model HF safe-12006)	
ตู้เพาะเชื้อ อุณหภูมิ 37°C	Sanyo, Japan
(Growth cabinet)	
ตู้อบแห้ง รุ่น UNB-400	Memmert Co.,Ltd., Germany
(Oven : model UNB-400)	
ไมโครปิเปต รุ่น Discovery Comfort	Mettler Toledo, USA
(Micro auto pipette: model Discovery Comfort)	

2.2 อุลินทรีย์ พลาสมิด และไพรเมอร์

2.2.1 พลาสมิด

pCR®2.1-TOPO®	Invitrogen, USA
pBluescriptII KS(+)	Agilent Technologies, USA
pGEM®-T Vector	Promega, USA
pKD46	(Datsenko and Wanner, 2000)
pML1	Dr. Steven Sandelr's lab, USA
pRB73	พลาสมิด pGEM®-T Vector ที่มีบางส่วนของยีน *ldhA* ของ *E.coli* โดยตรงกลางมีบริเวณตัดจำเพาะ ด้วย *BsIWI*
pRB74	พลาสมิด pGEM®-T Vector ที่มีบางส่วนของยีน *ldhA* ของ *E.coli* โดยตรงกลางแทรกยีน *cat*
pRB85	พลาสมิด pBluescriptII KS(+) ที่มียีน *ldhA* ของ *R. oryzae*

2.2.2 จุลินทรีย์

R. oryzae สายพันธุ์ NRRL395	Northern Regional Research Laboratry, USA
E. coli competent cells สายพันธุ์ Super 10^{9} HIT-DH5a	United Bioinformatica Inc., Canada
E. coli K-12 สายพันธุ์ JC13509	Dr. Steven Sandelr's lab, USA
E. coli K-12 สายพันธุ์ SS4075	เป็นสายพันธุ์ BW25113 ที่มียีน *pta::kan* ได้รับจาก Dr. Steven Sandelr's lab, USA
RB1	พลาสมิด pRB73 ใน *E. coli* DH5a
RB2	พลาสมิด pRB74 ใน *E. coli* DH5a
RB5	Linear Transformation ชิ้นส่วนดีเอ็นเอจาก pRB74 เข้าสู่ JC13509 ทำให้เกิดจีโนไทป์ *ldhA::cat*
RB6	P1 transduction SS4075→ JC13509 ทำให้เกิดจีโนไทป์ *pta::kan*
RB7	P1 transduction RB5→ RB6 ทำให้เกิดจีโนไทป์ *ldhA::cat pta::kan*
RB19	พลาสมิด pRB85 ใน *E. coli* DH5a
RB24	พลาสมิด pRB85 ใน RB7
RB29	พลาสมิด pBluescriptII KS(+) ใน RB7
RB30	พลาสมิด pRB85 ใน JC13509
RB31	พลาสมิด pBluescriptII KS(+) ใน JC13509

2.2.3 ไพรเมอร์

prRB1	5' ACAGGTGGATCCGTCCTTTG 3'
prRB2	5' ACCGGTACCGCGTACGCCTGCCG 3'
prRB3	5' CGGCAGGCGTACGCGGTACCGGT 3'
prRB4	5' GGAATACGGAATTCTGGATCACG 3'
prRB5	5' GTAGCGCGTACGATGATTCCGGGGATCCGTCG 3'
prRB6	5' CCATGCCGTACGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG 3'
prRB33	5' CTCAGTTTATAGGATCCAAGCAGTC 3'
prRB34	5' TGTGTAAGCTTTACAATTCGATTGT 3'

2.3 การเตรียม *E. coli* สายพันธุ์ที่เหมาะสมเพื่อการแสดงออก

ในขั้นตอนของการสร้างสายพันธุ์ที่เหมาะสมเพื่อการแสดงออก นี้ *E.coli* จะถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ชนิดเหลวหรืออาหารเลี้ยงเชื้อ LB ชนิดแข็ง ส่วนยาปฏิชีวนะเติมตามความเหมาะสมโดยจะมีความเข้มข้นสุดท้ายดังนี้ Amplicinlin 100 µg/mL, Chloramphenicol 25 µg/mL และ Kanamycin 100 µg/mL

เพื่อให้มีการแสดงออกของยีน *ldhA* จากสิ่งมีชีวิตอื่นเมื่อเข้าสู่ *E.coli* จะต้องมีการทำลายยีน *ldhA* บนโครโมโซมของ *E.coli* เพื่อป้องกันการแสดงออกของยีน *ldhA* บนโครโมโซมตัวเอง ซึ่งการทำลายยีน *ldhA* นี้จะใช้เทคนิค Cross-over PCR และ Linear Transformation (รูปที่ 2.1) เริ่มต้นจากการทำ PCR เพื่อให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 ชิ้น โดยชิ้นที่ 1 ใช้ไพรเมอร์ prRB1 และ prRB2 ซึ่ง prB1 จะจับที่ส่วนต้นของยีน *ldhA* ของ *E.coli* และมีการใส่บริเวณตัดจำเพาะด้วย *Bam*HI ส่วน prRB2 จะจับส่วนกลางของยีน *ldhA* และมีการเหนี่ยวนำให้เกิดบริเวณตัดจำเพาะด้วย *Bsi*WI ส่วนชิ้นที่ 2 ใช้ไพรเมอร์ prRB3 และ prRB4 โดย pRB3 จะจับส่วนกลางของยีน *ldhA* และและมีการเหนี่ยวนำให้เกิดบริเวณตัดจำเพาะด้วย *Bsi*WI ส่วน prB4 จะจับที่ส่วนปลายของยีน *ldhA* ของ *E.coli* และมีการใส่บริเวณตัดจำเพาะด้วย *Eco*RI ดังนั้นชิ้นส่วนดีเอ็นเอทั้งชิ้นจะมีส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนที่เหมือนกันจาก prRB2 และ prRB3 และสามารถทำการเชื่อมติดกันได้ด้วยวิธี Primerless PCR ซึ่งคือการทำ PCR โดยไม่ใส่ไพรเมอร์ จากนั้นทำการเพิ่มจำนวน

ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จาก Primerless PCR อีกครั้งด้วยไพรเมอร์ prRB1 และ pRB4 แล้วทำการสกัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอซึ่งเป็นชิ้นส่วนของยีน *ldhA* ของ *E. coli* โดยใช้ชุด pGEM®-T Vector Easy System (Promega, USA) ชิ้นส่วนดีเอ็นเอนี้ถูกเก็บไว้ในพลาสมิด pGEM®-T Vector โดยพลาสมิดที่ได้เมื่อโคลนยีนแล้วมีชื่อ pRB73 จากนั้นจะทำการทำลาย ยีน *ldhA* ของ *E. coli* โดยการแทรกยีนต้านยาปฏิชีวนะ Chloramphenicol (ยีน *cat*) ซึ่งตัดจากพลาสมิด pML1 ด้วยเอนไซม์ *Bsi*WI แล้วแทรกเข้าพลาสมิด pRB73 ซึ่งตัดด้วย *Bsi*WI ตรงกลางยีน *ldhA* แล้วทำการเชื่อมต่อดีเอ็นเอ (DNA ligation) เมื่อเชื่อมต่อกันชิ้นส่วนยีน *cat* จะแทรกตรงกลางยีน *ldhA* ทำให้ยีน *ldhA* ทำงานไม่ได้ แล้วคัดเลือกโคโลนีที่สามารถโตได้บนอาหารแข็ง LB ที่มี Chloramphenicol จากนั้นสกัดพลาสมิดแล้วตรวจสอบความถูกต้อง พลาสมิดที่ถูกเลือกและได้ตรวจสอบความถูกต้องแล้วมีชื่อว่า pRB74

พลาสมิด pRB74 จะถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Eco*RI แล้วสกัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *ldhA::cat* เพื่อนำไปแทนที่ยีน *ldhA* บนโครโมโซมของ *E. coli* ด้วยวิธี Linear Transformation โดย competent cells ที่ใช้จะมีพลาสมิด pKD46 (Datsenko and Wanner, 2000) แล้วคัดเลือก *E. coli* ที่ยีน *ldhA* ถูกทำลายด้วยการเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB ที่มี Chloramphenicol และตรวจสอบความถูกต้องว่ายีน *ldhA* ที่ถูกทำลายบนโครโมโซมด้วยวิธี PCR และสายพันธุ์นี้มีชื่อว่า RB6

E. coli สายพันธุ์ RB6 จะถูกนำไปทำลายยีน *pta* เพื่อลดผลพลอยได้ที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักด้วยวิธี P1 transduction (Willetts *et al.*, 1969) โดยคัดเลือกบนอาหารแข็ง LB ที่มี kanamycin และตรวจสอบความถูกต้องว่ายีน *pta* ที่ถูกทำลายบนโครโมโซมด้วยวิธี PCR ซึ่ง *E.coli* สายพันธุ์ที่ยีน *ldhA* และ *pta* ถูกทำลายนี้มีชื่อว่า RB7

2.4 การตัดต่อยีน *ldhA* ของ *R. oryzae* ใส่ในพลาสมิดและคัดเลือกพลาสมิดถูกต้อง

เนื่องจากยีน *ldhA* ใน *R. oryzae* เป็นยีนที่ไม่มี intron จึงสามารถใช้ดีเอ็นเอของ *R. oryzae* เป็น templateในการทำ PCR ได้เลย เริ่มจากการสกัดดีเอ็นเอจาก *R. oryzae* สายพันธุ์ NRRL395 วิธี PCR โดยไพรเมอร์ที่ใช้คือ prRB33 และ prRB34 ได้เหนี่ยวนำให้เกิดบริเวณตัดจำเพาะสำหรับเอนไซม์ *Bam*HI และ *Hind*III ตามลำดับ เพื่อการตัดต่อเข้าสู่พลาสมิดในลำดับต่อไป ดังขั้นตอนที่แสดงไว้ในรูปที่ 2.2 สกัดผลิตภัณฑ์ PCR ซึ่งเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 1800 คู่เบส ซึ่งประกอบด้วยยีน *ldhA*, promoter, และ ribosome binding site นำมาตรวจสอบความถูกต้องด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ *Kpn*I และ *Eco*RI เมื่อได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกต้องแล้ว (บทที่ 3 รูปที่ 3.1) ได้นำใส่เข้าสู่พลาสมิด pBlueScriptII KS(+)โดยการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอและพลาสมิดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Hind*III แล้วเชื่อมให้ติดกันด้วยเทคนิค DNA Ligation ซึ่งถูกกระตุ้นด้วยเอนไซม์ T4 Ligase โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้

จากกระบวนการ Ligation นี้นำเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิด ในลำดับต่อมาทำการคัดเลือกบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่มี Amplicilin จากนั้นทำการสกัดพลาสมิดตรวจสอบความถูกต้องโดยคัดเลือกพลาสมิดที่มียีน *ldhA* จากการตัดด้วยเอนไซม์ *Kpn*I ซึ่งพลาสมิด pBlueScriptII KS(+) ที่มียีน *ldhA* จาก *R. oryzae* จะมีรูปแบบการตัดดังที่กล่าวไว้ในบทถัดไป (บทที่ 3 รูปที่ 3.2) พลาสมิดที่ตรวจสอบแล้วได้รับการตั้งชื่อว่า pRB85

2.5 การใส่พลาสมิดจากที่มียีน *ldhA* ของ *R. oryzae* ใน *E. coli* สายพันธุ์ใช้ในการทดลอง และการคัดเลือกโคลนที่ถูกต้อง

พลาสมิด pRB85 และ pBlueScriptII KS(+) จะถูกนำเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ RB7 และสายพันธุ์อื่นๆที่ใช้ในการทดลอง โดยการทำเซลล์ *E. coli* ให้เป็น competent cells ด้วยวิธี RbCl Chemically Competent Cells และนำพลาสมิดเข้าสู่ competent cells ด้วยวิธี Chemical Transformation ตามวิธีของ Lewis' Lab (http://lewislab.wikispaces.com/Protocols#rb) คัดเลือกเซลล์ที่มีพลาสมิดที่ต้องการด้วยการเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ผสม Ampicilin จากนั้นสกัดพลาสมิดจากโคลนที่สุ่มเลือก แล้วนำมาตรวจสอบความถูกต้องด้วยการตัดด้วยเอนไซม์เช่นเดียวกับการคัดเลือกพลาสมิด pRB85 ดังที่กล่าวไว้ข้างต้น สำหรับสายพันธุ์ RB7 ที่มีพลาสมิด pRB85 มีชื่อเรียกว่า RB24 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่คาดว่าจะมีแสดงออกของยีน *ldhA* บนพลาสมิด pRB85 เพื่อผลิตกรดแลกติกซึ่งได้นำไปทดสอบในขั้นต่อไป

2.6 การวิเคราะห์ปริมาณผลผลิตกรดแลกติกที่สภาวะต่างๆในระดับ Shake flask

เนื่องจากในขั้นตอนของการหมักเพื่อให้เซลล์ *E. coli* ผลิตกรดแลกติกโดยการแสดงออกของยีน *ldhA* บนพลาสมิด pRB85 นั้นต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูง แต่ในอาหารเลี้ยงเชื้อในขั้นตอนของการสร้างพลาสมิดนั้นใช้อาหาร LB ที่ไม่ได้ใส่กลูโคสเสริม นอกจากนี้ในการหมักจำเป็นต้องใส่ $CaCO_3$ ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อลดความเป็นกรด หากมีความเป็นกรดมาก *E. coli* ก็ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ ดังนั้นการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อจาก LB มาอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการหมักที่มีปริมาณกลูโคสและ $CaCO_3$ สูงโดยทันที เซลล์อาจจะปรับตัวไม่ได้จึงจำเป็นต้องเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ค่อยๆปรับปริมาณกลูโคสและ $CaCO_3$ ตามขั้นตอนที่แสดงในรูปที่ 2.3 โดยส่วนผสมอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดได้แสดงไว้ในภาคผนวก ส่วนในรูป 2.3 ได้ระบุไว้เฉพาะปริมาณกลูโคสและ $CaCO_3$ ในขั้น Pre-culture ทำการเลี้ยงเชื้อ 50 mL เมื่อเลี้ยงครบตามเวลาของการทดลองการหมักแต่ละสภาวะ นำ Pre-culture ปริมาตร 2 mL ใส่ลงใน 50 mL Fermentation broth ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

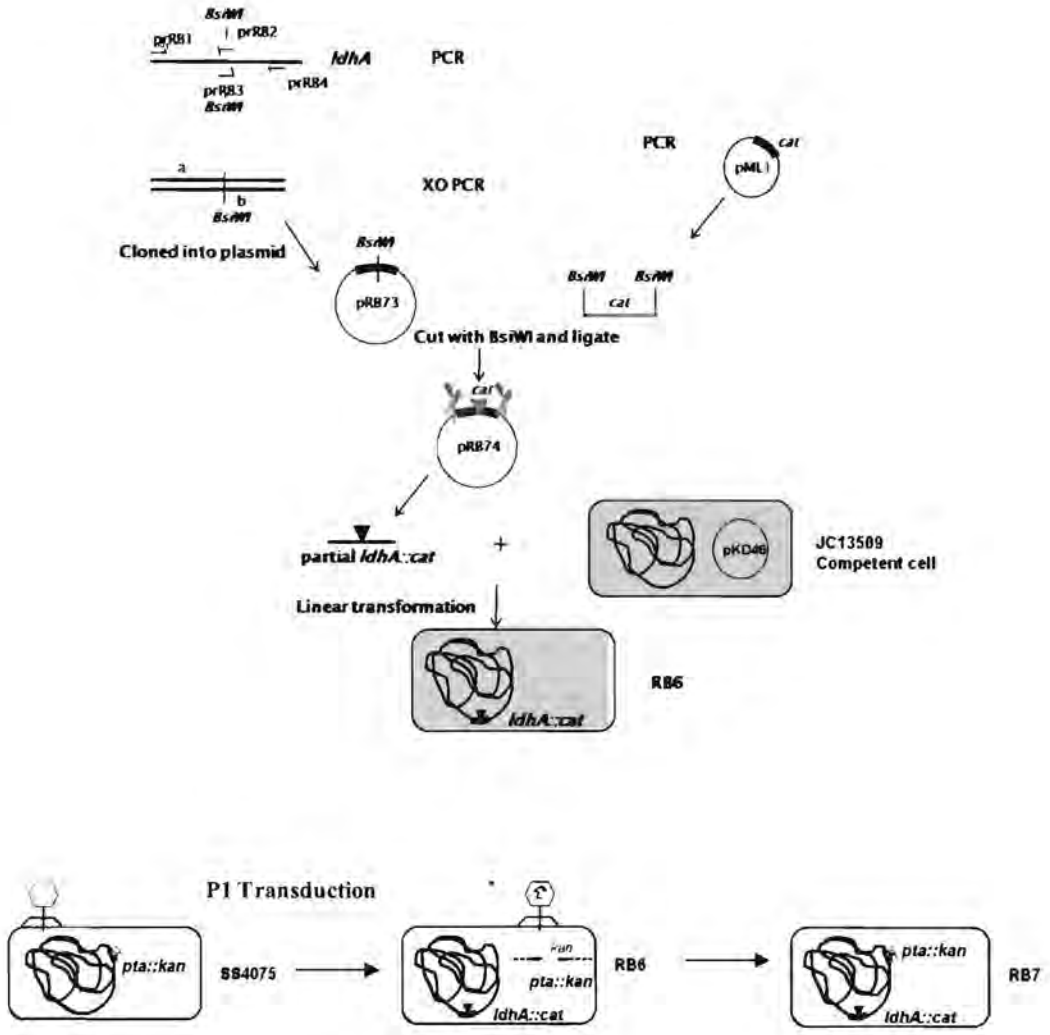
แต่ละขั้นเติม Amplicilin ความเข้มข้นสุดท้าย 100 µg/mL ในอาหารเลี้ยงเชื้อของสายพันธุ์ที่ต้องการรักษาพลาสมิด pBluescriptII KS(+) และ pRB85 ไว้ในเซลล์

ในขั้นตอนการทดสอบการผลิตกรดแลกติกด้วยการหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อ Fermentatio borthที่มีกลูโคส 100 g/L ได้ทำการแบ่งการหมักออกเป็น 4 สภาวะดังนี้

สภาวะที่	Pre-culture (กลูโคส 10g/L)	Fermentation (กลูโคส 100 g/L)
1	บ่มที่ 37°C 24 ชั่วโมง	บ่มที่ 37°C 48 ชั่วโมง
2	บ่มที่ 37°C 24 ชั่วโมง แบบไม่มีออกซิเจน	บ่มที่ 37°C 48 ชั่วโมง แบบไม่มีออกซิเจน
3	บ่มที่ 37°C เขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm. 7 ชั่วโมง	บ่มที่ 37°C 48 ชั่วโมง แบบไม่มีออกซิเจน
4	บ่มที่ 37°C เขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm. 7 ชั่วโมง	บ่มที่ 37°C 48 ชั่วโมง

หลังจากทำการหมักครบ 48 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่าง 1 mL แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 7 นาที เพื่อแยกเซลล์และ$CaCO_3$ ออก จากนั้นนำส่วนใสไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ที่ผลิตได้และน้ำตาลกลูโคสที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่องวัดปริมาณกลูโคสและแลกเตท YSI 2700 Selector

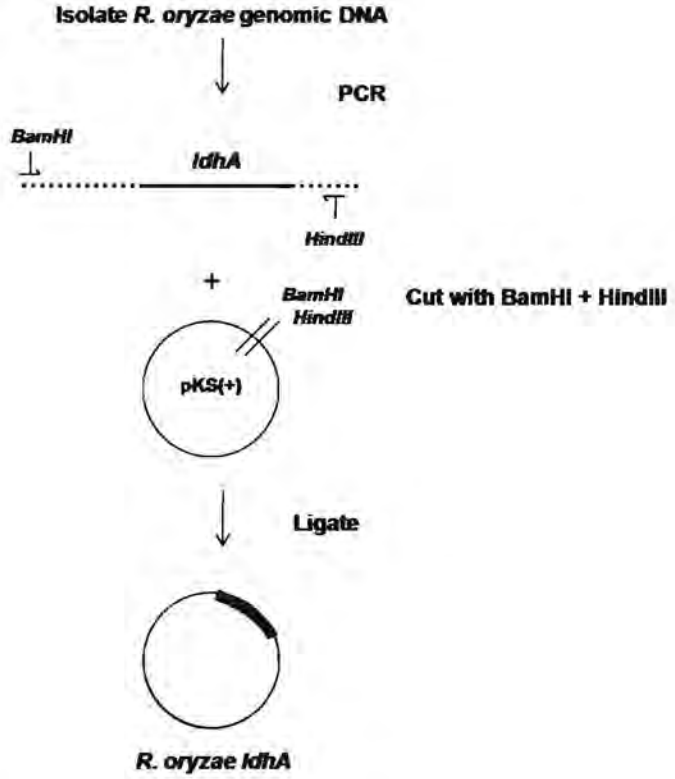
(ก.)



รูปที่ 2.1 การสร้าง *E. coli* สายพันธุ์ที่เหมาะสมเพื่อการแสดงออก

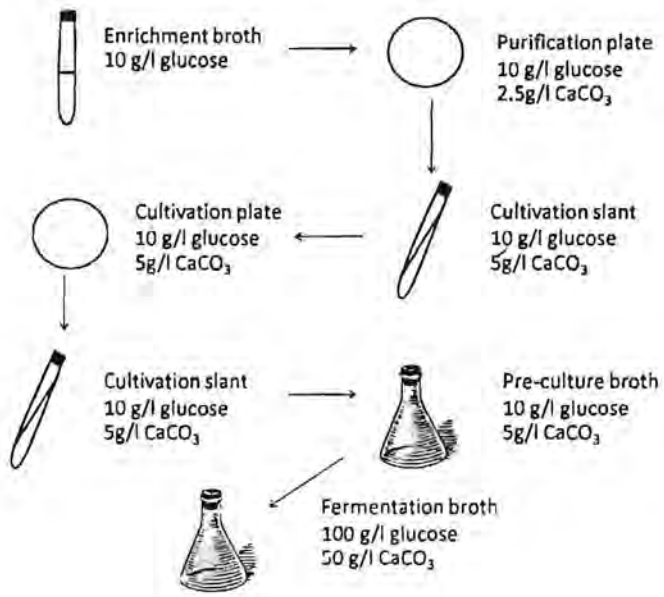
(ก.) การทำลายยีน *ldhA* บนโครโมโซมของ *E. coli* โดยการแทรกยีน *cat* ซึ่งต้านยา Chloramphinicol ลงตรงกลางของยีน *ldhA* และสายพันธุ์ที่ยีน *ldhA* บนโครโมโซมถูกทำลาย (*ldhA::cat*) บนโครโมโซมมีชื่อว่า RB6

(ข.) การนำ *pta::kan* จากสายพันธุ์ SS4075 เข้าสู่สายพันธุ์ RB6 ด้วยวิธี P1 Transduction สายพันธุ์ที่มีการทำลายยีน *pta* และ *ldhA* (*pta::kan ldhA::cat*) มีชื่อว่า RB7



รูปที่ 2.2 ขั้นตอนการสร้างพลาสมิดที่มียีน *ldhA* ของ *R. oryzae*

เริ่มจาก PCR เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มียีน *ldhA* ของ *R.orzyae* โดยไพรเมอร์ที่ใช้จะทำให้เหนี่ยวนำให้เกิดบริเวณตัดจำเพาะด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Hind*III หลังจากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR และพลาสมิด pBluescriptII KS(+) ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Hind*III แล้วเชื่อมติด กันด้วยเอนไซม์ T4 Ligase



รูปที่ 2.3 ขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อก่อนทำการหมักเพื่อปรับสภาพเซลล์

ในอาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิดจะปรับ pH ที่ 6.8 และส่วนประกอบอื่นๆเหมือนกัน ตามละเอียดในภาคผนวก ยกเว้น น้ำตาลกลูโคสและ $CaCO_3$ ที่แสดงไว้ในภาพโดยในการเลี้ยงเชื้อทุกขั้นตอนจะบ่มเซลล์ที่ 37 ^{o}C เป็นเวลา 2 วัน ยกเว้นในขั้น Pre-culture ซึ่งจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสภาวะในการหมัก

บทที่ 3

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

3.1 การสร้างพลาสมิดที่มียีน *ldhA* ของ *R. oryzae*

ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ prRB33 และ prRB34 โดยใช้ดีเอนเอของ *R. oryzae* เป็นต้นแบบมีขนาดประมาณ 1800 คู่เบส ก่อนนำผลิตภัณฑ์ PCR ไปตัดต่อเข้าสู่พลาสมิดได้ทำการตรวจสอบความถูกต้องโดยการตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI และ *Kpn*I ถ้าเป็นชิ้นส่วนที่ถูกต้องเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* จะได้ชิ้นส่วนขนาดประมาณ 600 และ 1200 คู่เบส ในขณะที่เอนไซม์ *Kpn*I จะตัดได้ชิ้นส่วนประมาณ 770 และ 1030 คู่เบส (รูปที่ 3.1)

หลังจากนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ถูกต้องใส่เข้าสู่พลาสมิด pBlueScriptII KS(+) ได้ทำการตรวจสอบความถูกต้องโดยการสกัดพลาสมิดแล้วตัดด้วยเอนไซม์ *Kpn*I ซึ่งถ้าเป็นพลาสมิดที่ถูกต้องจะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 800 และ 4000 คู่เบส (รูปที่ 3.2) ซึ่งพลาสมิดตรวจสอบความถูกต้องแล้วมีชื่อว่า pRB85 และพลาสมิดนี้นำไปใส่ใน *E coli* สายพันธุ์ต่างๆที่ใช้ในการทดลองขั้นต่อไปด้วยวิธี Chemical Transformation

3.2 การแสดงออกของยีน *ldhA* จาก *R. oryzae* ใส่บนพลาสมิด pRB85

เนื่องจาก *E. coli* จะผลิตกรดแลกติกในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน แต่สำหรับ *R. oryzae* นั้นยีน *ldhA* จะแสดงออกในสภาวะที่มีออกซิเจน ดังนั้นในขั้นต้นจึงได้ทดสอบการแสดงออกของยีน *ldhA* บนพลาสมิด pRB85 โดยการเลี้ยงในอาหาร Cultivation ชนิดแข็ง ที่มีกลูโคสเข้มข้น 10 g/L และมี $CaCO_3$ ผสมในอาหารในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน จากผลการทดลองดังรูปที่3.3 พบว่าสายพันธุ์ RB24 (มีพลาสมิด pRB85) สามารถสร้าง clear zone ได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจนเช่นเดียวกับสายพันธุ์ JC13509 (wild type) ซึ่งแสดงว่ามีการผลิตกรด ทั้งนี้การทดลองขั้นต่อไปคือการทดสอบว่ากรดที่ผลิตคือกรดแลกติกหรือไม่และมีปริมาณการผลิตเท่าไร ในขณะที่ RB7 ซึ่งไม่มียีน *ldhA* ไม่มีการสร้างกรดและเจริญเติบโตได้น้อยมากในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนแสดงถึงความสำคัญของ ยีน *ldhA* ต่อ *E.coli* เพื่อการเจริญเติบโตในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ทั้งนี้เป็นไปได้ว่าการเจริญเติบโตและการสร้างกรดของสายพันธุ์ RB24 ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนเกิดจากการแสดงออกของยีน *ldhA* บนพลาสมิด pRB85 เพื่อชดเชยการสูญเสียยีน *ldhA* บนโครโมโซม

3.3 ความเข้มข้นของกรดแลกติกที่ได้จากการหมักในสภาวะต่างๆ

การทดลองในส่วนนี้เริ่มจากการหมักเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ต่างๆในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการหมัก (Fermentation Broth) ซึ่งมีน้ำตาลกลูโคส 100 g/L ทั้งนี้สายพันธุ์ RB24 ซึ่งมีพลาสมิด pRB85 (ยีน *ldhA* จาก *R. oryzae*) โดยยีน *ldhA* และ *pta* บนโครโมโซม *E. coli* ถูกทำลาย คาดว่ามีการผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L โดยการทดสอบขั้นต้นพบการผลิตกรดและการเจริญเติบโตในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ซึ่งน่าจะเกิดจากการแสดงออกของยีน *ldhA* ของ *R. oryzae* บนพลาสมิดเพื่อทำงานทดแทนการสูญเสียยีน *ldhA* บนโครโมโซมของ *E. coli*

การทดลองในส่วนนี้จะเปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกของสายพันธุ์ RB24 กับ *E. coli* สายพันธุ์อื่นๆ ได้แก่

(1.) JC13509 ซึ่งเป็น wild type ใน wild type ซึ่งมียีน *ldhA* บนโครมโซมน่าจะพบการผลิตกรดแลกติกบ้าง ทั้งนี้ *ldhA* บนโครโมโซม *E. coli* มีการผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ D และ L ผสมกัน

(2.) RB7 ในสายพันธุ์นี้ยีน *ldhA* และ *pta* ของ *E. coli* ถูกทำลาย ในการทดสอบข้างต้นไม่พบการผลิตกรดรวมทั้งมีการเจริญเติบโตในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนน้อยมาก ดังนั้นเมื่อทำการหมักจึงไม่น่าพบการผลิตกรดแลกติก

(3.) RB29 เป็นสายพันธุ์ที่ใส่พลาสมิด pBluescriptII KS(+) เปล่าใน RB7 เพื่อทดสอบว่าการใส่พลาสมิดชนิดนี้รบกวนระบบในเซลล์หรือไม่

(4.) RB30 เป็นสายพันธุ์ที่ใส่พลาสมิด pRB85 ใน JC13509 ทั้งนี้จากงานวิจัยของ Chang *et al.*, 1999 พบว่าการแสดงออกของยีน *ldh* จากสิ่งมีชีวิตอื่นจะเกิดขึ้นได้ต้องมีการทำลายยีน *ldhA* บนโครโมโซมของ *E. coli* ก่อน ดังนั้นในสายพันธุ์นี้ ยีน *ldhA* ของ *R. oryzae* บนพลาสมิด pRB85 จึงไม่ควรมีการแสดงออกเพราะยีน *ldhA* บนโครโมโซมไม่ได้ถูกทำลาย การผลิตกรดแลกติกควรจะใกล้เคียงกับที่เกิดขึ้นในสายพันธุ์ JC3509

(5.) RB30 เป็นสายพันธุ์ที่ใส่พลาสมิด pBluescriptII KS(+) เปล่าใน JC13509 เพื่อทดสอบว่าพลาสมิดชนิดนี้รบกวนระบบในเซลล์หรือไม่

นอกจากนี้สำหรับสายพันธุ์ RB24 ได้ทดลองการหมักแบบที่ไม่ใส่ Ampicilin เนื่องจากในสภาวะปกติ หากเซลล์มีพลาสมิดอยู่ จำเป็นต้องใส่ยาปฏิชีวนะที่พลาสมิดนั้นๆมียีนต้านอยู่เพื่อรักษาพลาสมิดไว้ในเซลล์ หากไม่ใส่ยาปฏิชีวนะ เซลล์จะกำจัดพลาสมิดออกเพราะไม่มีความจำเป็นต้องเก็บไว้ สำหรับโครงการวิจัยนี้ได้เติม Amplicilin ทุกครั้งในการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ที่มีพลาสมิด

pBluescriptII KS(+) และpRB85 จากรูปที่ 3.3 การทดลองในขั้นต้นพบว่า RB7 เจริญเติบโตได้น้อยในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ดังนั้นหากใส่พลาสมิด pRB85 ซึ่งมียีน *ldhA* ของ *R. oryzae* ลงใน RB7 (ได้เป็นสายพันธุ์ RB24) พลาสมิด pRB85 น่าจะถูกรักษาไว้ในเซลล์แม้ว่าจะไม่ใส่ Ampicilin เพราะเซลล์จำเป็นต้องใช้ยีน *ldhA* บนพลาสมิดนี้เพื่อใช้ในการเจริญเติบโต ซึ่งถ้าหากเซลล์สามารถรักษาพลาสมิดไว้ได้โดยไม่ต้องใส่ยาปฏิชีวนะจะเป็นผลดีเช่นสามารถลดค่าใช้จ่ายและความยุ่งยากในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3.1 การหมักในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด

ในการหมักสภาวะนี้ *E. coli* ทุกสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองถูกเลี้ยงในอาหาร Pre-culture ที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนมาเลี้ยงใน Fermentation broth 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยที่ไม่มีการเขย่า ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3.1 และรูปที่ 3.4 พบว่า มีการผลิตความเข้มข้นของกรดกรดแลกติกเมื่อวัดด้วยเครื่องวัดปริมาณกลูโคสและแลกเตท YSI 2700 Selectorในสายพันธุ์ RB24 ซึ่งการไม่เติม Amplicilin ให้ผลผลิตกรดแลกติกที่มากกว่าการเติม Amplicilin แสดงว่าพลาสมิดยังถูกรักษาไว้ได้ในเซลล์แม้ว่าไม่มีการเติม Amplicilin เพราะเซลล์จำเป็นต้องใช้ยีน *ldhA* ของ *R. oryzae* เพื่อการเจริญเติบโตในสภาวะที่ออกซิเจนมีจำกัดอย่างไรก็ตาม กรดแลกติกที่ผลิตได้ยังน้อยและเซลล์นำกลูโคสไปใช้น้อยจึงเห็นว่ามีกลูโคสเหลืออยู่อีกมาก

3.3.2 การหมักในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน

ในสภาวะนี้ *E. coli* ทุกสายพันธุ์ในขั้น Pre-culture และ Fermentation บรรจุในถุงที่มี AnaeroPack® Anarero เพื่อให้เป็นสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน พบว่าในสภาวะนี้ การเลี้ยงสายพันธุ์ RB24 โดยไม่เติม Ampicilin ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีการแสดงออกของยีน *ldhA* บนพลาสมิด pRB85 โดยมีการผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L เกิดขึ้น (ตารางที่ 3.2) และเป็นสภาวะที่สามารถผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ได้มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบทั้ง 4 สภาวะ (รูปที่ 3.4) ดังนั้นทั้งในสภาวะที่ออกซิเจนจำกัดและในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ RB24 รักษาพลาสมิด pRB85 ไว้ได้โดยไม่ต้องมีการเติม Amplicilin เพราะต้องการใช้ยีน *ldhA* ของ *R. oryzae* บนพลาสมิดเพื่อทำงานชดเชยการสูญเสียยีน *ldhA* บนโครโมโซม นอกจากนี้ในการหมักทั้ง 2 สภาวะ (ออกซิเจนจำกัดและไม่มีออกซิเจน) การไม่เติม Ampicilin ให้ผลผลิตกรดแลกติกมากกว่าการเติม Ampicilin โดย Ampicilin อาจขัดขวางการเจริญเติบโตและ/หรือการสร้างกรดแลกติกในสภาวะดังกล่าว อย่างไรก็ตามปัญหาที่พบจากการใช้การแสดงออกของยีน ldhA บนพลาสมิด คือความเสถียรโดยเฉพาะกรณีที่ไม่ใส่ Amplicilin ซึ่งปัญหาเรื่องความเสถียรนี้จะได้กล่าวต่อไป

แม้ว่าการหมักในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน RB24 จะมีการผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ออกมามากที่ แต่ก็ยังน้อยมาก คือพบกดแลกติกที่ความเข้มข้นเพียง 5.03 g/L (ตารางที่ 3.2) และเหลือน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่มาก แสดงว่าเซลล์มีการนำแหล่งคาร์บอนนี้ไปใช้เพื่อการเจริญเติบโตและสร้างผลิตภัณฑ์ที่ต้องการในปริมาณน้อย นอกจากนี้ปริมาณกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณมากนั้นอาจไปยับยั้งการเจริญเติบโตและการสร้างกรดแลกติกอีกด้วย

3.3.3 การหมักในสภาวะที่เปลี่ยนจากการมีออกซิเจนเป็นไม่มีออกซิเจน

ในขั้น Pre-culture ทำการเลี้ยงเซลล์โดยการนำไปเขย่าเพื่อให้ออกซิเจนกระจายได้อย่างทั่วถึง จากนั้นในขั้น Fermentation นำเชื้อที่เลี้ยงใน Fermentation broth แล้วบรรจุในถุงที่มี AnaeroPack® Anarero เพื่อให้เกิดเป็นสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน วิธีการหมักเช่นนี้คาดว่าน่าจะเพิ่มปริมาณผลิตภัณฑ์จากการที่ในช่วง Pre-culture เซลล์น่าจะมีการเจริญเติบโตดี ทำให้มีเซลล์ปริมาณมากเพื่อมาผลิตผลิตภัณฑ์ที่ต้องการในขั้นตอนการหมัก จากตารางที่ 3.3 และรูปที่ 3.4 พบว่าสายพันธุ์ RB24 มีการผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L แต่ปริมาณที่ได้ยังน้อย นอกจากนี้พบว่าสายพันธุ์ RB24 หากไม่เติม Ampicilin ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ผลิตกรดแลกติกได้น้อยกว่าการเติม Amplicilin ซึ่งเป็นไปได้ว่าในสภาวะที่มีออกซิเจนนั้น เซลล์สามารถเจริญเติบโตได้โดยไม่จำเป็นต้องใช้ยีน *ldhA* บนพลาสมิดจึงกำจัดพลาสมิดนี้ออกจากเซลล์ไป อย่างไรก็ตามแม้ว่าปริมาณกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณมากแต่ยังเหลือน้อยกว่าในการหมักจาก 2 สภาวะที่ได้กล่าวไปแล้ว จะเห็นได้ว่าเซลล์ได้นำกลูโคสไปใช้ประมาณครึ่งหนึ่งของอาหารเลี้ยงเชื้อ (ตารางที่ 3.3) ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่า เมื่อเลี้ยง *E. coli* สานพันธุ์เหล่านี้ในสภาวะที่มีออกซิเจน เซลล์ได้นำกลูโคสส่วนใหญ่ไปใช้เพื่อการเจริญเติบโตโดยการนำกลูโคสไปใช้นี้ผ่านกระบวนการเมทาบอลิซึมในวิถีที่ไม่ได้สร้างกรดแลกติก

3.3.4 การหมักในสภาวะที่มีออกซิเจน

การหมักในสภาวะนี้ได้ทำการเลี้ยง *E. coli* ในขั้น Pre-culture โดยการเขย่าเพื่อการกระจายตัวออกซิเจนทำให้ออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อได้มากขึ้นแล้วจึงนำมาหมักใน Fermentation broth ที่ 37°C ในสภาวะนี้พบการผลิตกรดแลกติกในปริมาณที่น้อยจากสายพันธุ์ RB24 (ตารางที่ 3.4 และรูปที่ 3.4) แต่ในสภาวะนี้พบการผลิดกรดแลกติกไอโซเมอร์ L เมื่อเติม Amplicilin เท่านั้น ซึ่งอาจเกิดจากหากไม่มี Amplicilin พลาสมิด pRB85 ถูกกำจัดออกจากเซลล์ นอกจากนี้ผลที่ได้เหมือนกับสภาวะที่ 3.3.3 คือมีการใช้น้ำตาลกลูโคสประมาณครึ่งหนึ่งจากที่ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยน้ำตาลกลูโคสที่

เซลล์นำไปใช้น่าจะนำไปใช้เพื่อการเจริญเติบโตโดยผ่านวิถีเมทาบอลิซึมที่ไม่ได้กรดแลกติกเป็นผลิตภัณฑ์

จากการทดลองการหมักทั้ง 4 สภาวะ พบว่ามีการแสดงออกของยีน *ldhA* ของ *R. oryzae* บนพลาสมิด pRB85 ทำให้ได้กรดแลกติกไอโซเมอร์ L แต่ทั้งนี้กรดแลกติกที่ผลิตได้ยังมีปริมาณน้อย และพบน้ำตาลกลูโคสเหลือในระบบในปริมาณมาก ดังนั้นจึงต้องมีการพัฒนาการผลิตเพื่อหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสมต่อไป เพราะน้ำตาลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มากเกินไปอาจส่งผลทำให้เกิดการยับยั้งกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ

นอกจากนี้ยังพบว่าในการทดลองทั้งหมดกล่าวได้ว่ามีเพียงสายพันธุ์ RB24 เท่านั้นที่มีการสร้างกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ทั้งนี้ในสายพันธุ์ JC13509 ซึ่งเป็น wide type ในงานวิจัยนี้อาจมีการสร้างกรดแลกติกออกมาบ้างดังที่เห็นเป็น clear zone ในรูปที่ 3.3 แต่กรดที่สร้างอาจเป็นกรดแลกติกไอโซเมอร์ D และนอกจากนี้ผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ เช่น งานวิจัยของ Chang *et al.*, 1999 ที่ว่าหากไม่มีการทำลายกรดแลกติกบนโครโมโซมของ *E. coli* ยีน *ldhA* จะไม่สามารถแสดงออกได้ โดยเห็นได้จากสายพันธุ์ RB30 ซึ่งสรุปได้ว่ายีน *ldhA* บนพลาสมิด pRB85 ไม่มีการแสดงออกในสายพันธุ์ดังกล่าว

การเลือกใช้การแสดงออกของยีนบนพลาสมิดนั้นมีข้อดีคือการตัดต่อยีนเข้าพลาสมิดจะมี copy number มากกว่าการตัดต่อเข้าโครโมโซมที่จะมีเพียง 1 copy number ทำให้อาจมีการผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L มากขึ้น แต่ปัญหาที่พบจากการใช้พลาสมิดคือความเสถียร พลาสมิดมีแนวโน้มจะหลุดออกจากเซลล์ได้ง่าย ในการทดลองนี้ในการผลิตกรดแลกติกในบางชุดการทดลองพบกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ของสายพันธุ์ RB24 น้อยมากคล้ายกับไม่มีพลาสมิด pRB85 ทำให้ปริมาณกรดแลกติกที่วัดได้ในทุกชุดไม่มีความใกล้เคียงกัน ดังนั้นงานในลำดับต่อไปต้องทำการหาสภาวะที่ทำให้พลาสมิดมีความเสถียรมากขึ้นซึ่งจะได้กล่าวถึงในบทถัดไป

ตารางที่ 3. 1 ความเข้มข้นกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ที่ผลิตได้และความเข้มข้นกลูโคสที่เหลือจาก *E. coli* สายพันธุ์ต่างๆ เมื่อทำการหมักในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด

สายพันธุ์[a]	ยีน *ldhA* บนโครโมโซม *E. coli*[b]	พลาสมิด[c]	ความเข้มข้นของกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ที่ผลิต (g/L)	ความเข้มข้นของกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ (g/L)
JC13509 (WT)	+	-	0.42 ± 0.080	81.33 ± 8.031
RB7	-	-	0.43 ± 0.083	98.43 ± 0.7638
RB24 (No Amp[d])	-	pRB85	3.86 ± 4.011	91.93 ± 6.468
RB24	-	pRB85	1.80 ± 2.564	84.70 ± 1.908
RB29	-	pKS(+)	0.27 ± 0.110	81.67 ± 9.471
RB30	+	pRB85	0.35 ± 0.141	86.77 ± 13.536
RB31	+	pKS(+)	0.41 ± 0.078	86.30 ± 4.636

[a] ทุกสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองนี้ใช้สายพันธุ์ JC13509 เป็นสายพันธุ์ตั้งต้นและใช้เป็น wild type ในการทดลองนี้ โดย JC13509 มี genotype บางส่วนคือ *F' lacMS286 ϕ80dIIlacBK1 sulB103 argE4 his-4 thi-1 xyl-5 mtl-1 Sm^R T6^R* โดย JC13509 เป็นอนุพันธุ์ของสายพันธุ์ SK362

[b] + หมายถึงยีน *ldhA* บนโครโมโซม *E. coli* ไม่ถูกทำลายซึ่งก็คือ JC13509 ซึ่งเป็น wild type ส่วน RB30, RB31 ก็คือ JC13509 ที่ใส่พลาสมิดเข้าไป

- หมายถึงยีน *ldhA E. coli* บนโครโมโซมถูกทำลาย ได้แก่ RB7 ซึ่งก็มียีน *pta* ถูกทำลายเช่นกัน ส่วน RB24, RB29 ก็คือ RB7 ที่ใส่พลาสมิดเข้าไป

[c] – หมายถึง ไม่มีพลาสมิด โดย pKS(+) หมายถึงพลาสมิด pBluescriptII KS(+) เปล่า ส่วน pRB85 คือพลาสมิด pBluescriptII KS(+) ที่มียีน *ldhA* จาก *R. oryzae* ตัดต่อเข้าไป

[d] ทุกสายพันธุ์ที่มีพลาสมิดจะเติม Ampicilin ในอาหารเลี้ยงเชื้อทุกขั้นตอนเพื่อรักษาพลาสมิดไว้ ยกเว้นสายพันธุ์ที่ระบุว่า RB24 (No Amp) คือ RB24 ที่ไม่ได้เติม Ampicilin ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทั้งนี้เพื่อทดสอบว่าเซลล์สามารถรักษาพลาสมิดไว้และยีน *ldhA* บนพลาสมิด pRB85 สามารถแสดงออกได้หรือไม่

ตารางที่ 3. 2 ความเข้มข้นกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ที่ผลิตได้และความเข้มข้นกลูโคสที่เหลือจาก *E. coli* สายพันธุ์ต่างๆ เมื่อทำการหมักในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน

สายพันธุ์[a]	ยีน *ldhA* บนโครโมโซม *E. coli*[b]	พลาสมิด[c]	ความเข้มข้นของกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ที่ผลิต (g/L)	ความเข้มข้นของกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ (g/L)
JC13509 (WT)	+	-	0.34 ± 0.015	78.20 ± 8.455
RB7	-	-	ND[e]	ND[e]
RB24 (No Amp[d])	-	pRB85	5.03 ± 4.149	82.03 ± 6.062
RB24	-	pRB85	0.57 ± 0.238	85.60 ± 10.048
RB29	-	pKS(+)	0.34 ± 0.053	85.77 ± 11.075
RB30	+	pRB85	0.33 ± 0.015	82.30 ± 5.966
RB31	+	pKS(+)	0.36 ± 0.031	80.83 ± 9.963

[a] ทุกสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองนี้ใช้สายพันธุ์ JC13509 เป็นสายพันธุ์ตั้งต้นและใช้เป็น wild type ในการทดลองนี้ โดย JC13509 มี genotype บางส่วนคือ *F' lacMS286 ϕ80dIIlacBK1 sulB103 argE4 his-4 thi-1 xyl-5 mtl-1 Sm^R $T6^R$* โดย JC13509 เป็นอนุพันธุ์ของสายพันธุ์ SK362

[b] + หมายถึงยีน *ldhA* บนโครโมโซม *E. coli* ไม่ถูกทำลายซึ่งก็คือ JC13509 ซึ่งเป็น wild type ส่วน RB30, RB31 ก็คือ JC13509 ที่ใส่พลาสมิดเข้าไป

- หมายถึงยีน *ldhA E. coli* บนโครโมโซมถูกทำลาย ได้แก่ RB7 ซึ่งก็มียีน *pta* ถูกทำลายเช่นกัน ส่วน RB24, RB29 ก็คือ RB7 ที่ใส่พลาสมิดเข้าไป

[c] – หมายถึง ไม่มีพลาสมิด โดย pKS(+) หมายถึงพลาสมิด pBluescriptII KS(+) เปล่า ส่วน pRB85 คือพลาสมิด pBluescriptII KS(+) ที่มียีน *ldhA* จาก *R. oryzae* ตัดต่อเข้าไป

[d] ทุกสายพันธุ์ที่มีพลาสมิดจะเติม Ampicilin ในอาหารเลี้ยงเชื้อทุกขั้นตอนเพื่อรักษาพลาสมิดไว้ ยกเว้นสายพันธุ์ที่ระบุว่า RB24(No Amp) คือ RB24 ที่ไม่ได้เติม Ampicilin ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทั้งนี้เพื่อทดสอบว่าเซลล์สามารถรักษาพลาสมิดไว้และยีน *ldhA* บนพลาสมิด pRB85 สามารถแสดงออกได้หรือไม่

[e] ND หมายถึงไม่ได้ทดลองเนื่องจาก RB7 โตได้น้อยมากในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน

ตารางที่ 3. 3 ความเข้มข้นกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ที่ผลิตได้และความเข้มข้นกลูโคสที่เหลือจาก *E. coli* สายพันธุ์ต่างๆ เมื่อทำการหมักในสภาวะที่เปลี่ยนจากการมีออกซิเจนเป็นไม่มีออกซิเจน

สายพันธุ์[a]	ยีน *ldhA* บนโครโมโซม *E. coli*[b]	พลาสมิด[c]	ความเข้มข้นของกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ที่ผลิต (g/L)	ความเข้มข้นของกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ (g/L)
JC13509 (WT)	+	-	0.31 ± 0.038	45.00 ± 5.340
RB7	-	-	0.22 ± 0.076	50.03 ± 4.834
RB24 (No Amp[d])	-	pRB85	1.18 ± 1.341	47.27 ± 0.924
RB24	-	pRB85	1.74 ± 1.386	51.40 ± 3.538
RB29	-	pKS(+)	0.30 ± 0.042	45.53 ± 3.691
RB30	+	pRB85	0.32 ± 0.048	44.17 ± 4.990
RB31	+	pKS(+)	0.36 ± 0.072	47.80 ± 1.473

[a] ทุกสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองนี้ใช้สายพันธุ์ JC13509 เป็นสายพันธุ์ตั้งต้นและใช้เป็น wild type ในการทดลองนี้ โดย JC13509 มี genotype บางส่วนคือ *F' lacMS286 ϕ80dIIlacBK1 sulB103 argE4 his-4 thi-1 xyl-5 mtl-1 Sm^R T6^R* โดย JC13509 เป็นอนุพันธุ์ของสายพันธุ์ SK362

[b] + หมายถึงยีน *ldhA* บนโครโมโซม *E. coli* ไม่ถูกทำลายซึ่งก็คือ JC13509 ซึ่งเป็น wild type ส่วน RB30, RB31 ก็คือ JC13509 ที่ใส่พลาสมิดเข้าไป

- หมายถึงยีน *ldhA E. coli* บนโครโมโซมถูกทำลาย ได้แก่ RB7 ซึ่งก็มียีน *pta* ถูกทำลายเช่นกัน ส่วน RB24, RB29 ก็คือ RB7 ที่ใส่พลาสมิดเข้าไป

[c] – หมายถึง ไม่มีพลาสมิด โดย pKS(+) หมายถึงพลาสมิด pBluescriptII KS(+) เปล่า ส่วน pRB85 คือพลาสมิด pBluescriptII KS(+) ที่มียีน *ldhA* จาก *R. oryzae* ตัดต่อเข้าไป

[d] ทุกสายพันธุ์ที่มีพลาสมิดจะเติม Ampicilin ในอาหารเลี้ยงเชื้อทุกขั้นตอนเพื่อรักษาพลาสมิดไว้ ยกเว้นสายพันธุ์ที่ระบุว่า RB24 (No Amp) คือ RB24 ที่ไม่ได้เติม Ampicilin ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทั้งนี้เพื่อทดสอบว่าเซลล์สามารถรักษาพลาสมิดไว้และยีน *ldhA* บนพลาสมิด pRB85 สามารถแสดงออกได้หรือไม่

ตารางที่ 3. 4 ความเข้มข้นกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ที่ผลิตได้และความเข้มข้นกลูโคสที่เหลือจาก *E. coli* สายพันธุ์ต่างๆ เมื่อทำการหมักในสภาวะที่มีออกซิเจน

สายพันธุ์[a]	ยีน *ldhA* บนโครโมโซม *E. coli*[b]	พลาสมิด[c]	ความเข้มข้นของกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ที่ผลิต (g/L)	ความเข้มข้นของกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ (g/L)
JC13509 (WT)	+	-	0.27 ± 0.038	33.20 ± 18.654
RB7	-	-	0.22 ± 0.125	46.00 ± 12.601
RB24 (No Amp[d])	-	pRB85	0.25 ± 0.091	48.30 ± 3.560
RB24	-	pRB85	1.95 ± 1.517	53.83 ± 2.196
RB29	-	pKS(+)	0.20 ± 0.131	40.50 ± 18.357
RB30	+	pRB85	0.28 ± 0.049	46.87 ± 2.290
RB31	+	pKS(+)	0.34 ± 0.071	40.63 ± 8.165

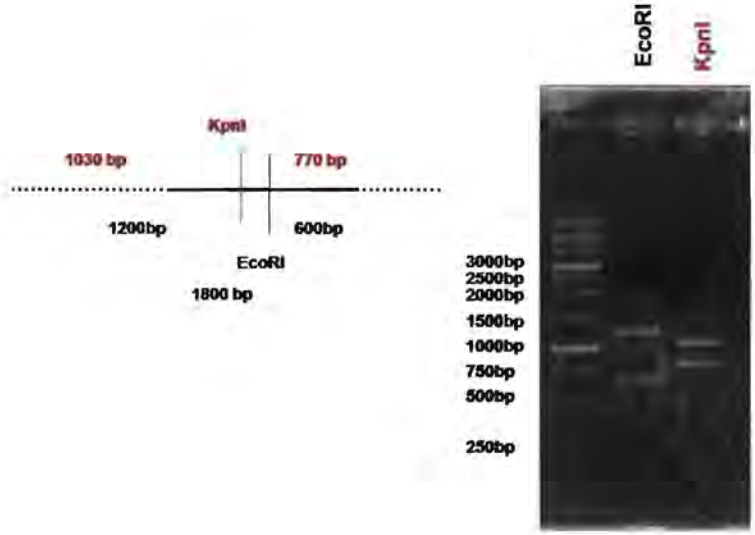
[a] ทุกสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองนี้ใช้สายพันธุ์ JC13509 เป็นสายพันธุ์ตั้งต้นและใช้เป็น wild type ในการทดลองนี้ โดย JC13509 มี genotype บางส่วนคือ *F' lacMS286 ϕ80dIIIacBK1 sulB103 argE4 his-4 thi-1 xyl-5 mtl-1 Sm^R T6^S* โดย JC13509 เป็นอนุพันธุ์ของสายพันธุ์ SK362

[b] + หมายถึงยีน *ldhA* บนโครโมโซม *E. coli* ไม่ถูกทำลายซึ่งก็คือ JC13509 ซึ่งเป็น wild type ส่วน RB30, RB31 ก็คือ JC13509 ที่ใส่พลาสมิดเข้าไป

- หมายถึงยีน *ldhA E. coli* บนโครโมโซมถูกทำลาย ได้แก่ RB7 ซึ่งก็มียีน *pta* ถูกทำลายเช่นกัน ส่วน RB24, RB29 ก็คือ RB7 ที่ใส่พลาสมิดเข้าไป

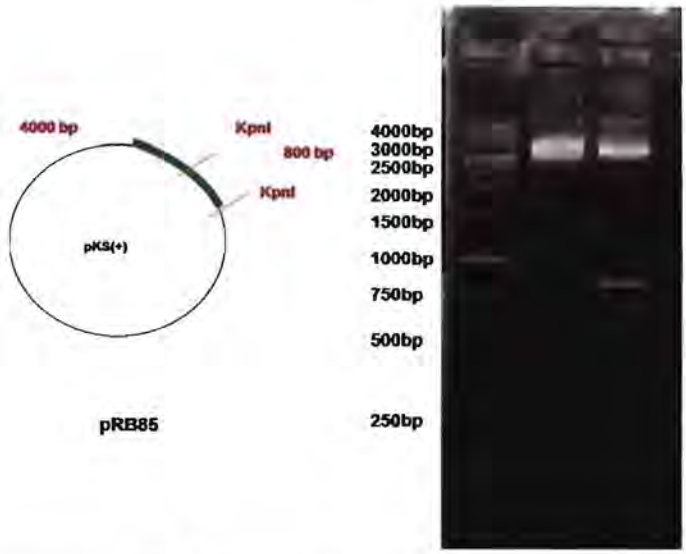
[c] – หมายถึง ไม่มีพลาสมิด โดย pKS(+) หมายถึงพลาสมิด pBluescriptII KS(+) เปล่า ส่วน pRB85 คือพลาสมิด pBluescriptII KS(+) ที่มียีน *ldhA* จาก *R. oryzae* ตัดต่อเข้าไป

[d] ทุกสายพันธุ์ที่มีพลาสมิดจะเติม Ampicilin ในอาหารเลี้ยงเชื้อทุกขั้นตอนเพื่อรักษาพลาสมิดไว้ ยกเว้นสายพันธุ์ที่ระบุว่า RB24 (No Amp) คือ RB24 ที่ไม่ได้เติม Ampicilin ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทั้งนี้เพื่อทดสอบว่าเซลล์สามารถรักษาพลาสมิดไว้และยีน *ldhA* บนพลาสมิด pRB85 สามารถแสดงออกได้หรือไม่



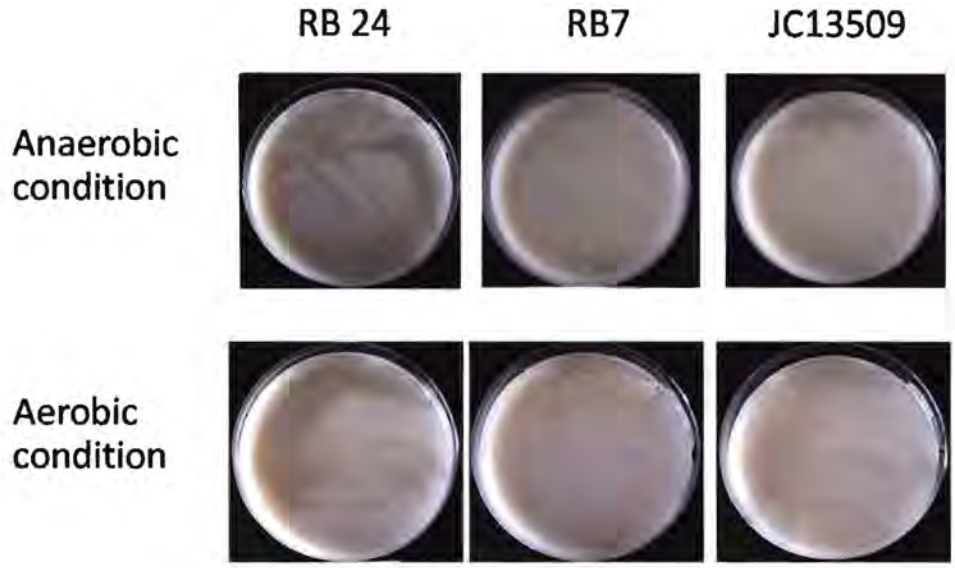
รูปที่ 3.1 การตรวจสอบความถูกต้องของผลิตภัณฑ์ PCR **ที่มียีน *ldhA* ของ *R. oryzae* ก่อนตัดต่อเข้าสู่พลาสมิด**

ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีขนาดประมาณ 1800 คู่เบส ซึ่งประกอบด้วยยีน *ldh*, promoter, และ ribosome binding site ซึ่งหากตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI จะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1200 และ 600 คู่เบส แต่หากตัดด้วยเอนไซม์ *Kpn*I จะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1030 และ 770 คู่เบส โดยในรูปเป็น Agarose Electrophoresis ที่ Agarose มีความเข้มข้น 1% w/v

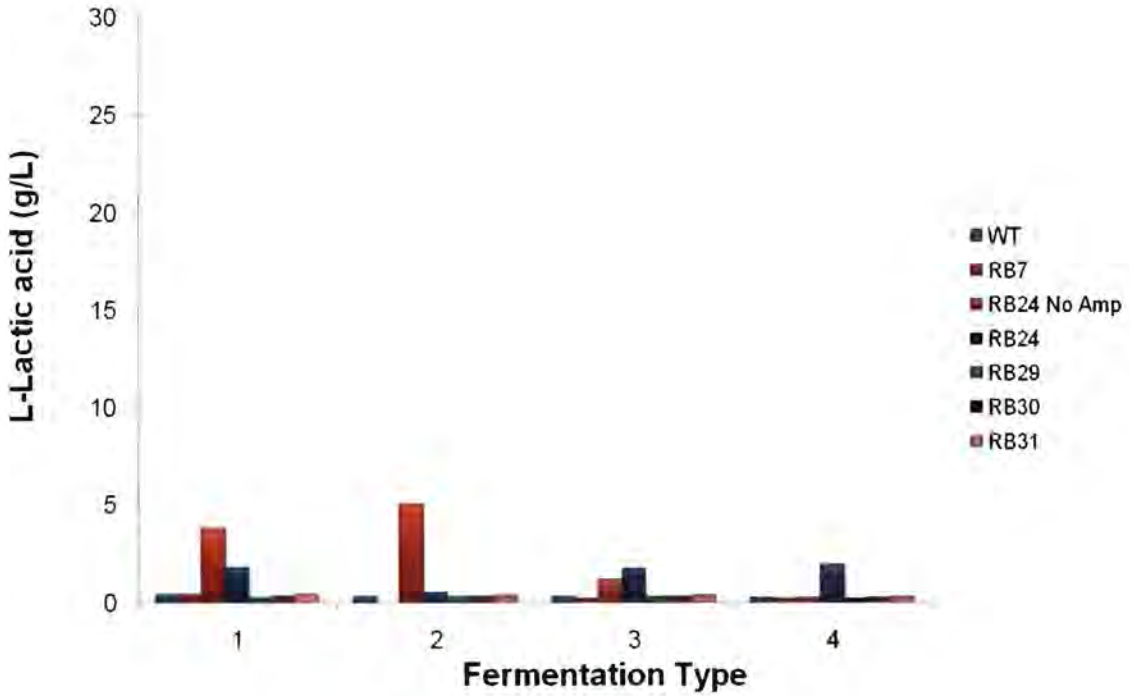


รูปที่ 3.2 การตรวจสอบหาพลาสมิดที่มียีน *ldhA* ของ *R. oryzae*

เมื่อนำผลิตภัณฑ์ **PCR** ที่ได้ซึ่งมีขนาดประมาณ 1800 คู่เบส ใส่เข้าสู่พลาสมิด pBlueScriptII KS(+) พลาสมิดที่มียีนดังกล่าวหากตัดด้วยเอนไซม์ *Kpn*I จะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 4000 และ 800 คู่เบสซึ่งสามารถตรวจสอบได้ด้วยเทคนิค Agarose Electrophoresis โดยรูปเจลที่แสดงในรูปเป็น Agarose 1% w/v โดยพลาสมิดที่พบว่ามียีน *ldhA* ของ *R. oryzae* นี้มีชื่อเรียกว่า pRB85



รูปที่ 3.3 การเจริญเติบโตและ clear zone ของ *E.coli* เมื่อได้รับพลาสมิดที่มียีน *ldhA* ของ *R. oryzae* แถวบนเป็นการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ชนิด Cultivation ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน แถวล่างเป็นการเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีออกซิเจน ทั้งการเลี้ยงในทั้งสองสภาวะนั้นบ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 วัน โดยสายพันธุ์ RB24 (RB7 ที่มี plasmid pRB85) และ JC13509 (wild type) เจริญเติบโตได้ดีทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจนและสร้าง clear zone ซึ่งแสดงว่ามีการสร้างกรด และนำไปทดสอบในขั้นต่อไปว่ามีการผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ปริมาณเท่าใด ในขณะที่ RB7 ซึ่งยีน *ldhA* บนโครโมโซมถูกทำลายสามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะที่มีออกซิเจนเท่านั้น



รูปที่ 3.4 ความเข้มข้นของกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ที่ผลิตได้จาก *E. coli* สายพันธุ์ต่างๆจากการหมักทั้ง 4 สภาวะ

สภาวะในการหมัก (Fermentation Type) ทั้ง 4 แบบได้แก่

1. สภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด
2. สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน
3. สภาวะที่เปลี่ยนจากการมีออกซิเจนเป็นไม่มีออกซิเจน
4. สภาวะที่มีออกซิเจน

บทที่ 4

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

4.1 สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผล

โครงการวิจัยนี้พบว่าเมื่อนำยีน *ldhA* ของ *R. oryzae* ตัดต่อเข้าสู่พลาสมิด pBluescriptII KS(+) พบว่ายีน *ldhA* นี้สามารถแสดงออกได้ใน *E. coli* แต่ทั้งนี้ต้องมีการทำลายยีน *ldhA* บนโครโมโซมของ *E. coli* นอกจากนี้ยังพบว่า การหมักในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนโดยการไม่เติม Amplicilin ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อพบการผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L มากที่สุดที่ความเข้มข้น 5.03 g/L ซึ่งยังน้อยมาก และการที่เซลล์สามารถรักษาพลาสมิดไว้ได้โดยไม่ต้องใส่ Ampicilin ในอาหารเลี้ยงเชื้อในสภาวะนี้แสดงว่ายีน *ldhA* มีความสำคัญต่อ *E. coli* ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน และสายพันธุ์ RB24 ต้องการใช้ยีน *ldhA* ของ *R. oryzae* บนพลาสมิดเพื่อชดเชยการสูญเสีย *ldhA* บนโครโมโซมของ *E. coli* ทั้งนี้ในการเลี้ยงเชื้อทุกสายพันธุ์ยังพบน้ำตาลกลูโคสเหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณมาก ซึ่งน้ำตาลกลูโคสในปริมาณนี้อาจยับยั้งกระบวนการผลิตกรดแลกติก ดังนั้นจึงต้องมีการพัฒนาหากระบวนการผลิตกรดแลกติกต่อไป นอกจากนี้การตัดต่อยีนบนพลาสมิดเพื่อให้มีการแสดงออกของยีนยังพบปัญหาเรื่องความไม่เสถียรของพลาสมิด ทำให้ในการผลิตกรดแลกติกที่มีประสิทธิภาพต้องหาวิธีเพิ่มความเสถียรของยีน *ldhA* ที่ตัดต่อเข้าไป

4.2 ข้อเสนอแนะ

เพื่อให้เกิดความคุ้มทุนในการผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ในการผลิตในสเกลที่ใหญ่ขึ้น การพัฒนาการการผลิตกรดแลกติกในระดับ Shake Flask เพื่อเป็นข้อมูลประยุกต์ใช้ในการผลิตในระดับใหญ่ขึ้น ทั้งนี้เมื่อใช้การแสดงออกของยีน *ldhA* จาก *R. oryzae* บนพลาสมิด pRB85 ใน *E. coli* ซึ่งการผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ยังพบในปริมาณน้อย ซึ่งการพัฒนาเพื่อให้มีการผลิตกรดแลกติกในปริมาณมากขึ้น อาจทำได้โดย

1. หาปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสม เนื่องจากการหมักในการทดลองนี้ใช้น้ำตาลกลูโคส 100 g/L และพบว่ามีปริมาณน้ำตาลเหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อมาก ซึ่งน้ำตาลที่ยังเหลือนี้อาจยับยั้งการผลิตกรดแลกติกได้

2. การปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้เทคนิควิศวกรรมพันธุศาสตร์ เช่นการทำให้ยีน *ldhA* เกิดการกลายพันธุ์ เช่น การใช้เทคนิค Error-prone PCR เพื่อให้เกิดการกลายพันธุ์แบบสุ่ม แล้วคัดเลือกหาโคลนที่มีการผลิตกรดแลกติกในปริมาณมาก

3. การวิเคราะห์หาสารปนเปื้อนอื่นๆที่เกิดขึ้นในการผลิตกรดแลกติก ทั้งนี้หากพบการปนเปื้อนของสารใดในปริมาณมาก สามารถกลับไปศึกษาว่าสารนี้เป็นผลมาจากวิถีเมทาบอลิซึมเพื่อจะหาตัวยับยั้งวิถีนั้น

นอกจากนี้การใช้พลาสมิดเพื่อการแสดงออกของยีนยังพบความไม่เสถียร การแก้ปัญหาดังกล่าวอาจทำได้โดยการตัดต่อยีน *ldhA* ของ *R. oryzae* เข้าสู่โครโมโซมของ *E. coli* แทน ทั้งนี้หากยีนอยู่บนโครโมโซมจะมีความเสถียรมากขึ้น รวมทั้งไม่ต้องใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อการรักษาพลาสมิด

หากได้ระบบการผลิตกรดแลกติกที่ได้ปริมาณกรดแลกติกที่มากพอ อาจทำการพัฒนาต่อเพื่อลดค่าใช้จ่ายโดยหาแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่มีราคาถูกลงได้

ภาคผนวก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1 อาหารเหลว LB (1 L)

10g Bacto-peptone

5g Yeast extract

10g NaCl

ละลายในน้ำปรับปริมาตรเป็น 1 L แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ

2 อาหารแข็ง LB

อาหารเหลว LB เติม 2% Bacto-agar แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ

3. อาหารเหลว Enrichment (1 L)

10 g Glucose

5 g Yeast Extract

5 g Peptone

0.25 g KH_2PO_4

0.25 g K_2HPO_4

5 mL Salt Solution

ละลายในน้ำปรับปริมาตรเป็น 1 L และปรับ pH เป็น 6.8 แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ

4. อาหารแข็ง Purification (1 L)

10 g Glucose

5 g Yeast Extract

5 g Peptone

0.25 g KH_2PO_4

0.25 g K_2HPO_4

2.5 g $CaCO_3$

10 g Agar

5 mL Salt Solution

ละลายในน้ำปรับปริมาตรเป็น 1 L และปรับ pH เป็น 6.8 แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ

5. อาหารแข็ง Culivation ทั้งชนิด plate และ slant (1 L)

10 g Glucose

5 g Yeast Extract

5 g Peptone

0.25 g KH_2PO_4

0.25 g K_2HPO_4

5 g $CaCO_3$

10 g Agar

5 mL Salt Solution

ละลายในน้ำปรับปริมาตรเป็น 1 L และปรับ pH เป็น 6.8 แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ

6. อาหารเหลว Pre-culture broth (1 L)

10 g Glucose

5 g Yeast Extract

5 g Peptone

0.25 g KH_2PO_4

0.25 g K_2HPO_4

5 g $CaCO_3$

5 mL Salt Solution

ละลายในน้ำปรับปริมาตรเป็น 1 L และปรับ pH เป็น 6.8 แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ

7. อาหารเหลว Fermentation broth (1 L)

แยกทำเป็น 2 ส่วน

ส่วนที่ 1 ละลาย Glucose 100 g แล้วเติมน้ำปรับปริมาตรเป็น 500 mL จากนั้นแบ่งใส่ Flask ขนาด 250 mL ด้วยปริมาตร Flask ละ 25 mL แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ

ส่วนที่ 2 ประกอบด้วย

5 g Yeast Extract

5 g Peptone

0.25 g KH_2PO_4

0.25 g K_2HPO_4

5 mL Salt Solution

ละลายในน้ำปรับปริมาตรเป็น 500 mL และปรับ pH เป็น 6.8 แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ เมื่อต้องการใช้นำส่วนที่ 2 ปริมาตร 25 mL ใส่ลงใน Flask จากที่เตรียมไว้แล้วในส่วนที่ 1 จากนั้นเติม $CaCO_3$ 2.5 g ต่อ Flask

8. Salt Solution (10 mL)

400 mg $MgSO_4.7H_2O$

20 mg $MnSO_4.5H_2O$

20 mg $FeSO_4.7H_2O$

ละลายในน้ำปรับปริมาตรเป็น 10 mL

บรรณานุกรม

Bi, C., Zhang, X., Rice, J.D., Ingram, L.O., and Preston, J.F. (2009) Genetic engineering of Enterobacter asburiae strain JDR-1 for efficient D: (-) lactic acid production from hemicellulose hydrolysate. *Biotechnol Lett*.

Chang, D.E., Jung, H.C., Rhee, J.S., and Pan, J.G. (1999) Homofermentative production of D- or L-lactate in metabolically engineered *Escherichia coli* RR1. *Appl Environ Microbiol* 65: 1384-1389.

Datsenko, K.A., and Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli K-12* using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 6640-6645.

Ferain, T., Garmyn, D., Bernard, N., Hols, P., and Delcour, J. (1994) *Lactobacillus plantarum ldhL* gene: overexpression and deletion. *J Bacteriol* 176: 596-601.

Hester, A. (2000a) IB market forecast. *Ind Bioprocess* 22: 3-5.

Hester, A. (2000b) IB market forecast. *Ind Bioprocess* 22: 4-5.

Ikushima, S., Fujii, T., Kobayashi, O., Yoshida, S., and Yoshida, A. (2009) Genetic engineering of *Candida utilis* yeast for efficient production of L-lactic acid. *Biosci Biotechnol Biochem* 73: 1818-1824.

Jin, Q., Jung, J.Y., Kim, Y.J., Eom, H.J., Kim, S.Y., Kim, T.J., and Han, N.S. (2009) Production of l-lactate in *Leuconostoc citreum* via heterologous expression of l-lactate dehydrogenase gene. *J Biotechnol*.

Kricheldorf, H.R. (2001) Syntheses and application of polylactides. *Chemosphere* 43: 49-54.

Narayanan, N., Roychoudhury, P.K., and Srivastava, A. (2004) L (+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Electronic Journal of Biotechnology* 7: 167-179.

Okano, K., Zhang, Q., Shinkawa, S., Yoshida, S., Tanaka, T., Fukuda, H., and Kondo, A. (2009a) Efficient production of optically pure D-lactic acid from raw corn starch by using a

genetically modified L-lactate dehydrogenase gene-deficient and alpha-amylase-secreting *Lactobacillus plantarum* strain. *Appl Environ Microbiol* 75: 462-467.

Okano, K., Zhang, Q., Yoshida, S., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H., and Kondo, A. (2009b) D: -lactic acid production from cellooligosaccharides and beta-glucan using L: -LDH gene-deficient and endoglucanase-secreting *Lactobacillus plantarum*. *Appl Microbiol Biotechnol.*

Saito, K., Saito, A., Ohnishi, M., and Oda, Y. (2004) Genetic diversity in *Rhizopus oryzae* strains as revealed by the sequence of lactate dehydrogenase genes. *Arch Microbiol* 182: 30-36.

Skory, C.D. (2000) Isolation and expression of lactate dehydrogenase genes from *Rhizopus oryzae*. *Appl Environ Microbiol* 66: 2343-2348.

Skory, C.D. (2003) Lactic acid production by *Saccharomyces cerevisiae* expressing a *Rhizopus oryzae* lactate dehydrogenase gene. *J Ind Microbiol Biotechnol* 30: 22-27.

Skory, C.D. (2004) Lactic acid production by *Rhizopus oryzae* transformants with modified lactate dehydrogenase activity. *Appl Microbiol Biotechnol* 64: 237-242.

Woiciechowski, A.L., Soccol, C.R., Ramos, L.P., and Pandey, A. (1999) Experimental design to enhance the production of L-(+)-lactic acid from steam-exploded wood hydrolysate using *Rhizopus oryzae* in a mixed-acid fermentation. *Proc Biochem* 34: 949-955.

ประวัติผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

(ภาษาไทย) อาจารย์ ดร. ฤทัยรัตน์ บุญสมบัติ

(ภาษาอังกฤษ) Dr. RUETHAIRAT BOONSOMBAT

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ A-5

ที่ทำงาน สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาคารสถาบัน 3 ถ.พญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 02-2188078 โทรสาร 02-2533543 E-mail address : Ruethairat.B@Chula.ac.th

ที่อยู่ปัจจุบัน 1550/3 ถ.ประชาราษฎร์ 1 แขวงบางซื่อ เขตบางซื่อ กรุงเทพฯ 10800

โทรศัพท์ 02-5872352

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่จบการศึกษา
มหาวิทยาลัยมหิดล	ปริญญาตรี	วทบ. (ชีววิทยา)	2544
University of Massachusetts, Amherst	ปริญญาเอก	Ph.D. (Microbiology)	2551

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ พันธุศาสตร์โมเลกุล

ผลงานทางวิชาการ

Ngenprasertsiri, S., Suksai, S., Kongchareonporn, N. and Boonsombat, R. Effect of Temperature and Nitrogen Sources on the Expression of Different Insulin Analogues from *Pichia pastoris* in Shake Flask level. *Menuscript preparation*

Moon-ai, W., Niyomploy, P., **Boonsombat, R.,** Sangvanich, P. and Karnchanatat, A. (2012) A superoxide dismutase purified from the rhizome of Curcuma aeruginosa Roxb. as

inhibitor of nitric oxide production in the macrophage-like RAW 264.7 cell line. *Appl Biochem Biotechnol* **166**: 2138-2155

Lopper, M., **Boonsombat, R.**, Sandler, S. J. and Keck, J. L. (2007) A hand-off mechanism for primosome assembly in replication restart. *Molecular Cell 26* : 781-793.

Boonsombat, R., Yeh, S.P., Milne, A., and Sandler, S.J. (2006) A novel *dnaC* mutation that suppresses *priB rep* mutant phenotypes in *Escherichia coli* K-12. *Mol Micro* 60: 973-983.

Renzette, N., Gumlaw, N., Nordman, J.T., Krieger, M., Yeh S.P., Long, E., Centore, R., **Boonsombat, R.** and Sandler, S.J. (2005) Localization of RecA in *Escherichia coli* K-12 using RecA-GFP. *Mol Micro* 57:1074-85.

ผู้ช่วยวิจัย

(ภาษาไทย) น.ส.ศศิธร เงินประเสริฐศิริ

(ภาษาอังกฤษ) Miss SASITHORN NGENPRASERTSIRI

ตำแหน่งปัจจุบัน นิสิตปริญญาโท, ผู้ช่วยวิจัยโครงการ

ที่ทำงาน สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาคารสถาบัน 3 ถ.พญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 02-2188071 โทรสาร 02-2533543 E-mail address : tukko007@hotmail.com

ที่อยู่ปัจจุบัน 1/2 หมู่ 3 ต.ท่าผา อ.บ้านโป่ง จราชบุรี

โทรศัพท์ 087-9169211

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่จบการศึกษา
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ปริญญาตรี	วท.บ. (จุลชีววิทยา)	2551

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ จุลชีววิทยา, พันธุศาสตร์โมเลกุล

ผลงานทางวิชาการ

Ngenprasertsiri, S., Suksai, S., Kongchareonpom, N. and Boonsombat, R. Effect of Temperature and Nitrogen Sources on the Expression of Different Insulin Analogues from *Pichia pastoris* in Shake Flask level. *Menuscript preparation*

การเสนอผลงานวิจัย

Ngenprasertsiri, S. and Boonsombat, R. Development of insulin production in *Pichia pastoris* GS115. Processing in the 23rd Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology on "Systems Biotechnology : Quality and Success" February 1-2, 2012, Bangkok, Thailand.