



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการตัดต่อทางพันธุกรรมของ *Escherichia coli* เพื่อ
ผลิตกรดแลกติก

โดย อาจารย์ ดร. ฤทัยรัตน์ บุญสมบัติ

มิถุนายน 2556

สัญญาเลขที่ MRG5380156

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการตัดต่อทางพันธุกรรมของ *Escherichia coli* เพื่อ
ผลิตกรดแลกติก

อาจารย์ ดร. ฤทัยรัตน์ บุญสมบัติ
สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย
สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

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

ขอขอบคุณ ผศ. ดร. ณัฐฐา ทองจุล อาจารย์ประจำสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับคำปรึกษา คำแนะนำและตัวเชื้อ *R. oryzae* ที่ใช้ในโครงการวิจัยนี้

ขอขอบคุณ Associate Prof Dr. Steven J. Sandler, University of Massachusetts, Amherst, USA สำหรับ *Escherichia coli* สายพันธุ์ตั้งต้นที่ใช้ในโครงการวิจัยนี้

ขอขอบคุณ Dr. Kentaro Kodama สำหรับเทคนิคในการผลิตกรดแลกติกจากแบคทีเรีย

ขอขอบคุณ น.ส.ชนพร วิชัย น.ส.ชนวรรณ วัฒนพร นายฐากร แยมโอบูร์ ที่ช่วยวิจัยโครงการในนี้

ขอขอบคุณบุคลากรทุกท่านในสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับความช่วยเหลือทุกอย่างจนรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์นี้สำเร็จได้

และสุดท้ายนี้ขอพระคุณขอบคุณทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ ประจำปีงบประมาณ 2553 จากสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยเป็นอย่างสูงที่สนับสนุนงานวิจัยนี้จนสำเร็จลง

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5380156

ชื่อโครงการ: การตัดต่อทางพันธุกรรมของ *Escherichia coli* เพื่อผลิตกรดแลกติก

ชื่อนักวิจัย: อาจารย์ ดร. ฤทัยรัตน์ บุญสมบัติ

E-mail Address: Ruethairat.B@chula.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 15 มิถุนายน พ.ศ. 2553 - 14 มิถุนายน พ.ศ. 2556

กรดแลกติกมีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอย่างกว้างขวางรวมถึงความเป็นไปได้ในการใช้เป็นสารตั้งต้นเพื่อผลิตพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ โดยกระบวนการผลิตกรดแลกติกบริสุทธิ์ที่มีประสิทธิภาพมีความสำคัญอย่างยิ่ง เมื่อการตัดต่อยีน *ldhA* จาก *Rhizopus oryzae* เข้าสู่พลาสมิดแล้วนำเข้าสู่ *Escherichia coli* ที่ยีน *ldhA* บนดีเอ็นเอถูกทำลายเกิดเป็น *E. coli* สายพันธุ์ RB24 พบว่ายีน *ldhA* ของ *R. oryzae* บนพลาสมิดสามารถแสดงออกได้ โดยเมื่อทำการหมักในอาหารที่มีกลูโคสเริ่มต้น 100 g/L ในภาวะที่ไม่มีออกซิเจนและไม่เติม Ampicillin พบว่า *E. coli* สายพันธุ์นี้สามารถผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ได้มากที่สุด แต่เนื่องจากปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้ยังมีปริมาณน้อยซึ่งอาจเป็นผลมาจากกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณมากทำให้ไปยับยั้งการผลิตกรดแลกติก และการสูญเสียพลาสมิดได้ง่ายเมื่อไม่เติม Ampicillin จึงได้ทำการหาภาวะที่เหมาะสมในการหมัก *E. coli* สายพันธุ์ RB24 คือในขั้น Pre-culture ใช้ภาวะที่มีออกซิเจนเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ แล้วจึงทำการหมักในภาวะที่ไม่มีออกซิเจนโดยใช้กลูโคสเริ่มต้น 20 g/L และเติม Ampicillin ทำให้ได้ปริมาณกรดแลกติกที่คงที่มากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อตัดต่อยีน *ldhA* จาก *R. oryzae* ลงบนพลาสมิด pUC19 สามารถผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ได้ดีกว่าการใช้พลาสมิด pBluescript II KS(+) ซึ่งอาจเป็นเพราะขนาดของพลาสมิดที่แตกต่างกัน เมื่อทำการศึกษาการใช้เทคนิค error-prone PCR เพื่อทำให้บริเวณยีน *ldhA* จาก *R. oryzae* บนพลาสมิดเกิดการกลายพันธุ์แบบสุ่ม พบว่าสามารถคัดเลือก *E. coli* สายพันธุ์ที่ผลิตกรดแลกติกได้ดีขึ้นกว่า *E. coli* สายพันธุ์ RB24 ประมาณ 6-8 เท่า โดยพบการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 554 จาก C เป็น T ในสายพันธุ์ TW10 และการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 524 เหนือ Start codon จาก A เป็น G ในสายพันธุ์ TW11 นอกจากนี้ยังพบว่า *E. coli* สายพันธุ์ที่ปรับปรุงด้วยด้วยเทคนิค error-prone PCR สามารถผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ได้ดีที่สุดในอาหารหมักที่มีกลูโคสเริ่มต้น 20 g/L

คำหลัก : กรดแลกติก, *Rhizopus oryzae*, error-prone PCR, *Escherichia coli*

Abstract

Project Code: MRG5380156

Project Title: Genetic modification of *Escherichia coli* for lactic acid production

Investigator: Dr. Ruethairat Boonsombat

Institute of Biotechnology and Genetic Engineering, Chulalongkorn University

E-mail Address: Ruethairat.B@chula.ac.th

Project Period: 15th June 2010 - 14th June 2013

Lactic acid is widely applied in various industries including the use as a potential precursor for biodegradable plastics. The effective process to produce optically pure monomers of lactic acid is essential. When plasmid with *ldhA* from *Rhizopus oryzae* was transformed into *E. coli* which chromosomal *ldhA* was knocked out, generating the strain called RB24, *R. oryzae ldhA* gene on the plasmid could be expressed. The RB24 produced L-lactic acid with the highest yield when fermented with fermentation broth containing 100 g/L initial glucose without Ampicillin under anaerobic condition. However, the lactic acid yield obtained from this strain was still low that may result from the inhibition of the lactic acid production by high amount of residual glucose in the culture and the easy loss of plasmid when Ampicillin was not added. To solve this problem, the suitable condition for fermenting *E. coli* strain RB24 was optimized and found that L-lactic acid production was more stable when the strain was pre-cultured under aerobic condition to increase cell density for the inoculum and further fermented with fermentation broth containing 20 g/L initial glucose with Ampicillin addition under anaerobic condition. Moreover, due to the difference in size, it was suggested that *ldhA* from *R. oryzae* on pUC19 plasmid produced more L-lactic acid than on pBluescript II KS(+). When error-prone PCR was applied to generate random mutations on *R. oryzae ldhA* gene region, which further inserted on plasmid and transformed into *E. coli*, clones that could produce L-lactic acid approximately 6-8 times more than RB24 strain were selected. DNA sequencing suggested there was a mutation for the strain TW10 at nucleotide 554 from C to T and for the strain TW11 at 524 base pair upstream the start codon from A to G. Furthermore, the modified strains by error-prone PCR could produce L-lactic acid with the highest yield by using fermentation broth with 20 g/L initial glucose.

Keywords : lactic acid , *Rhizopus oryzae*, error-prone PCR, *Escherichia coli*

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

- กำลังอยู่ระหว่างการทำ manuscript เพื่อตีพิมพ์ในวารสาร *Annals of Microbiology*

2. การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

- นำเสนอผลงาน 2 ชิ้นในหัวข้อเรื่อง Improvement of Lactic Acid Production in *Escherichia coli* harboring Plasmid with *Rhizopus oryzae* *ldhA* Gene และ Optimization of lactic acid production by *Escherichia coli* harboring *ldhA* gene from *Rhizopus oryzae* ในการประชุม TSB International Forum 2013 ณ ศูนย์ประชุมไบเทค บางนา กรุงเทพฯ ระหว่างวันที่ 28- 30 สิงหาคม พ.ศ. 2556 (เอกสารแนบ ภาคผนวก ข. หน้า 53)

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	ก
บทคัดย่อ.....	ข
Abstract.....	ค
Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.....	ง
สารบัญ.....	จ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญภาพ.....	ซ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฌ
บทนำ.....	1
1. การทบทวนวรรณกรรม	1
2. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย.....	3
3. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย.....	4
4.ขอบเขตของโครงการวิจัย.....	4
5. วิธีการดำเนินการวิจัยโดยสรุป	5
6. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
อุปกรณ์ วิธีดำเนินงานวิจัย.....	6
1. อุปกรณ์.....	6
2. จุลินทรีย์ พลาสมีด และไฟรเมอร์.....	8
2.1 พลาสมีด.....	8
2.2 จุลินทรีย์.....	9
2.3 ไฟรเมอร์.....	11
3. การเตรียม <i>E. coli</i> สายพันธุ์ที่เหมาะสมเพื่อการแสดงออก	12
4. การตัดต่อยีน <i>IdhA</i> ของ <i>R. oryzae</i> ใส่ในพลาสมีดคัดเลือกพลาสมีดถูกต้อง และการนำพลาสมีดเข้าสู่ <i>E. coli</i>	13
5. การวิเคราะห์ปริมาณผลผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ที่ผลิตได้จาก <i>E. coli</i> ที่ ได้รับพลาสมีดซึ่งมียีน <i>IdhA</i> ของ <i>R. oryzae</i> ที่ภาวะต่าง ๆ ในระดับ Shake flask.....	14
6. การศึกษาความเป็นไปได้ในการตัดต่อยีน <i>IdhA</i> ของ <i>R. oryzae</i> ลงบนดีเอ็นเอ	

ของ <i>E. coli</i>	15
7. การทำให้ยีน <i>ldhA</i> ของ <i>R. oryzae</i> บนพลาสมิด pRB85 เกิดการกลายพันธุ์แบบ สุ่มด้วยวิธี error-prone PCR และนำเข้าสู่ <i>E.coli</i>	16
8. การคัดเลือกโคลนที่กรดแลกติกในปริมาณมากและการวิเคราะห์ปริมาณผล ผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ที่ผลิตได้และปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือใน อาหารเลี้ยงเชื้อในระดับ Shake Flask.....	16
9. การศึกษาปัจจัยที่อาจมีผลต่อการผลิตกรดแลกติกจาก <i>E. coli</i> ที่ได้รับการ ปรับปรุงสายพันธุ์ เช่น ชนิดของพลาสมิด ปริมาณน้ำตาลกลูโคส.....	17
10. การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์บนบริเวณยีน <i>ldhA</i> ของ <i>R. oryzae</i>	17
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	25
1. การสร้างพลาสมิดที่มียีน <i>ldhA</i> ของ <i>R. oryzae</i>	25
2. การแสดงออกของยีน <i>ldhA</i> จาก <i>R. oryzae</i> บนพลาสมิด pRB85 ใน <i>E.coli</i>	25
3. ผลผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ที่ได้จากการหมักในภาวะต่าง ๆ ในระดับ Shake flask.....	26
4. การตัดต่อยีน <i>ldhA</i> ของ <i>R. oryzae</i> ลงบนดีเอ็นเอของ <i>E. coli</i>	28
5. การปรับปรุงสายพันธุ์ <i>E.coli</i> เพื่อผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L โดยใช้ เทคนิค error-prone PCR.....	31
6. ผลของพลาสมิดต่อการผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ใน <i>E.coli</i>	32
7. ผลของปริมาณกลูโคสเริ่มต้นในอาหารสำหรับการหมักต่อการผลิตกรด แลกติกไอโซเมอร์ L ใน <i>E.coli</i> ที่ได้รับการปรับปรุงสายพันธุ์.....	33
8. การเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>ldhA</i> ของ <i>R. oryzae</i> จาก สายพันธุ์ที่ผ่านการทำ error-prone PCR.....	34
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	45
1. สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผล.....	45
2. ข้อเสนอแนะ	47
บรรณานุกรม.....	48
ภาคผนวก.....	50
ก. อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	50
ข. เอกสารแนบ.....	53

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ภาวะการหมักหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L จาก <i>E. coli</i> สายพันธุ์ RB24.....	19
ตารางที่ 2 ความเข้มข้นของกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ที่ผลิตได้และกลูโคสที่เหลือจาก <i>E. coli</i> สายพันธุ์ต่าง ๆ.....	35
ตารางที่ 3 ความเข้มข้นของกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ที่ผลิตได้และกลูโคสที่เหลือจาก <i>E. coli</i> สายพันธุ์ที่มียีน <i>ldhA</i> จาก <i>R. oryzae</i> ซึ่งผ่านการทำ error-prone PCR และตัดต่อลงบนพลาสมิด pBluescript II KS(+).	36
ตารางที่ 4 ความเข้มข้นของกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ที่ผลิตได้และกลูโคสที่เหลือจาก เมื่อใช้พลาสมิด pBluescript II KS(+) หรือ pUC19 ใน <i>E. coli</i>	37
ตารางที่ 5 ความเข้มข้นของกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ที่ผลิตได้และกลูโคสที่เหลือจาก <i>E. coli</i> สายพันธุ์ที่มียีน <i>ldhA</i> จาก <i>R. oryzae</i> ซึ่งผ่านการทำ error-prone PCR และตัดต่อลงบนพลาสมิด pUC19.....	38
ตารางที่ 6 ความเข้มข้นของกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ที่ผลิตได้และกลูโคสที่เหลือจาก <i>E. coli</i> สายพันธุ์ต่าง ๆ เมื่อใช้ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นในการหมัก ต่างกัน.....	39

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 การสร้าง <i>E. coli</i> สายพันธุ์ที่ยีน <i>ldhA</i> บนดีเอ็นเอถูกทำลาย	20
รูปที่ 2 ขั้นตอนการสร้างพลาสมิดที่มียีน <i>ldhA</i> ของ <i>R. oryzae</i>	21
รูปที่ 3 ขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อก่อนทำการหมักเพื่อปรับสภาพเซลล์	22
รูปที่ 4 แผนงานการสร้างดีเอ็นเอสายตรงสำหรับการแทนที่ยีน <i>ldhA</i> บนดีเอ็นเอของ <i>E. coli</i> ด้วยยีน <i>ldhA</i> ของ <i>R. oryzae</i>	23
รูปที่ 5 พลาสมิด pBluescript II KS(+) และ pUC19	24
รูปที่ 6 การตรวจสอบความถูกต้องของผลิตภัณฑ์ PCR ที่มียีน <i>ldhA</i> ของ <i>R. oryzae</i> ก่อนตัดต่อเข้าสู่พลาสมิด	40
รูปที่ 7 การตรวจสอบพลาสมิดที่มียีน <i>ldhA</i> ของ <i>R. oryzae</i>	41
รูปที่ 8 การเจริญเติบโตและ clear zone ของ <i>E. coli</i> เมื่อได้รับพลาสมิดที่มียีน <i>ldhA</i> ของ <i>R. oryzae</i>	42
รูปที่ 9 การทำ XO PCR เพื่อสร้างชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มียีน <i>ldhA</i> ของ <i>R. oryzae</i> สำหรับ แทนที่ยีน <i>ldhA</i> บนดีเอ็นเอของ <i>E. coli</i>	43
รูปที่ 10 การหาภาวะที่เหมาะสมในการทำ error-Prone PCR ของยีน <i>ldhA</i> จาก <i>R. oryzae</i> โดยใช้พลาสมิด pRB85 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบโดยทำการเปลี่ยน แปลงความเข้มข้นของ $MgCl_2$ และ $MnCl_2$	44

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

%	เปอร์เซ็นต์
°C	องศาเซลเซียส
µg/mL	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
µl	ไมโครลิตร
µm	ไมโครเมตร
Amp	Ampicilin
Amp ^R	Ampicilin Resistance
<i>cat</i>	ยีน chloramphenicol acetyltransferase
CaCO ₃	แคลเซียมคาร์บอเนต
g	กรัม
g/L	กรัมต่อลิตร
<i>kan</i>	ยีนต้าน Kanamycin
Kan	Kanamycin
Kan ^R	KanamycinResistance
L	ลิตร
LB	Luria-Bertani
<i>ldhA</i>	ยีน lactate dehydrogenase A
<i>ldhA::cat</i>	ยีน <i>pta</i> ที่ถูกทำลายด้วยการแทรกยีน <i>cat</i>
M	โมลาร์หรือ โมลต่อลิตร
mL	มิลลิลิตร
mM	มิลลิเมตร
PCR	Polymerase Chain Reaction
<i>pta</i>	ยีน phosphate acetyltransferase

<i>pta::kan</i>	ยีน <i>pta</i> ที่ถูกทำลายด้วยการแทรกยีนต้าน Kanamycin
RbCl	Rubidium Chloride
rpm	round per minute (รอบต่อนาที)
v/v	volume by volume (ปริมาตรต่อปริมาตร)
w/v	weight by volume (น้ำหนักต่อปริมาตร)
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside
XO PCR	Cross-over Polymerase Chain Reaction

บทนำ

1. การทบทวนวรรณกรรม

แม้ว่าการดัดแปลงจะถูกค้นพบมาเป็นเวลานานกว่าสองศตวรรษเพื่อเป็นสารให้รสเปรี้ยวในนม และมีการนำไปใช้อย่างต่อเนื่องและกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหาร แต่ไม่นานนี้การดัดแปลงได้รับความสนใจเพื่อนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตพอลิเมอร์เช่น พอลิแลกไทด์ (polylactides) ซึ่งใช้ในการผลิตพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Hester, 2000; Kricheldorf, 2001) ปัจจุบันการดัดแปลงสามารถผลิตได้ด้วยทั้งกระบวนการทางเคมีและกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์หลายชนิด (Narayanan *et al.*, 2004) จุลินทรีย์ที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมคือ แบคทีเรียจำพวก *Lactobacillus spp.* แต่ปัญหาที่พบคือแบคทีเรียจำพวกนี้ต้องการสารอาหารที่ซับซ้อนและไม่สามารถผลิตกรดแลกติกในปริมาณมากที่ระดับ pH ต่ำกว่า 4 ซึ่งทำให้ประสิทธิภาพในการละลายลดลง เกิดการตกผลึกเป็นเกล็ดและทำให้ต้องเพิ่มขั้นตอนการสร้างกรดแลกติกมาจากเกล็ดและเตท (Skory, 2003) จุลินทรีย์ชนิดอื่นที่มีการนำมาใช้ผลิตกรดแลกติก ได้แก่ราจำพวก *R. oryzae* ซึ่งสามารถผลิตกรดแลกติกในรูปไอโซเมอร์ L เป็นหลักจากแป้ง (starch) เซลลูโลส (cellulose) และเฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) โดยใช้แหล่งไนโตรเจนจากเกลือแอมโมเนียม (ammonium salts) (Woiciechowski *et al.*, 1999) ซึ่งกรดแลกติกไอโซเมอร์ L เป็นที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมเกือบทุกประเภท ข้อดีของการผลิตกรดแลกติกด้วย *R. oryzae* คือใช้อาหารเลี้ยงเชื้อไม่ซับซ้อน นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์จากการเกษตร เช่น กากมันสำปะหลัง เมื่อนำมาผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) เพื่อให้ได้น้ำตาลกลูโคสปริมาณสูงสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ *R. oryzae* แต่การเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีดังกล่าวพบการปนเปื้อนของเอทานอลในปริมาณสูงซึ่งอาจเกิดจากปริมาณไนโตรเจนที่เพิ่มขึ้นจากการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว (Thongchul *et al.*, 2009) ข้อจำกัดอื่นๆของการผลิตกรดแลกติกโดยใช้ *R. oryzae* คือ กรดแลกติกที่ได้มีปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับแบคทีเรียและปัญหาการปนเปื้อนของเอทานอลที่ถูกสร้างขึ้นระหว่างกระบวนการหมักในปริมาณสูง (Skory, 2004) นอกจากนี้สรีรวิทยาของ *R. oryzae* ก็ไม่เหมาะสมต่อกระบวนการหมัก (Narayanan *et al.*, 2004) ดังนั้นจึงมีความพยายามในการใช้ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดแลกติกไอโซเมอร์ L แสดงออกในจุลินทรีย์อื่นๆ ที่เลี้ยงง่าย และมีความเป็นไปได้ที่จะผลิตกรดแลกติกในปริมาณมาก

ขั้นตอนสุดท้ายของการสังเคราะห์กรดแลกติกจากกลูโคสคือ การเปลี่ยนกรดไพรูวิกให้เป็นกรดแลกติก ซึ่งปฏิกิริยานี้อาศัยเอนไซม์แลกเตทดีไฮโดรจิเนส (lactate dehydrogenase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาซึ่งเอนไซม์นี้ยังเป็นตัวกำหนดไอโซเมอร์ของกรดแลกติกที่จุลินทรีย์แต่ละชนิดสร้างอีกด้วย (Ferain *et al.*, 1994) สำหรับ *R. oryzae* มีการสังเคราะห์เอนไซม์แลกเตทดีไฮโดรจิเนสสอง

ชนิด คือ แลกเตทไฮโดรจิเนส A และ B ซึ่งสร้างจากยีน *ldhA* และ *ldhB* ตามลำดับ (Skory, 2000) ยีนทั้งสองนี้มีลำดับเบสคล้ายกัน 93.1% (Saito *et al.*, 2004) ซึ่งมีการสันนิษฐานว่า *ldhA* ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนกรดไพรูวิกเป็นกรดแลกติก ในขณะที่ *ldhB* เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาการเปลี่ยนกรดแลกติกเป็นกรดไพรูวิกเมื่อเลี้ยง *R. oryzae* ในกลีเซอรอล เอทานอล หรือแลกเตท (Skory, 2000) ทั้งนี้ *R. oryzae* สามารถแบ่งได้เป็นสองกลุ่ม คือ กลุ่มที่สร้างกรดแลกติก (LA group) และกลุ่มที่สร้างกรดฟอเมอริกหรือกรดมาลิก (FMA group) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว โดยกลุ่มที่สร้างกรดแลกติกมีทั้งยีน *ldhA* และ *ldhB* แต่กลุ่มที่สร้างกรดฟอเมอริกหรือกรดมาลิก มีเพียงยีน *ldhB* (Saito *et al.*, 2004) อย่างไรก็ตาม ยีน *ldhA* และ *ldhB* จาก *R. oryzae* สามารถแสดงออกและค้นความสามารถในการผลิตกรดแลกติกใน *E. coli* สายพันธุ์ที่ไม่สามารถสร้างกรดแลกติกได้

การผลิตกรดแลกติกในปัจจุบันได้ใช้พันธุวิศวกรรมเข้ามาเกี่ยวข้อง เช่น การตัดต่อยีน *ldhA* ของ *R. oryzae* ใส่ในพลาสมิดเพื่อนำไปแสดงออกในยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* แต่วิธีนี้ยังพบปัญหาเนื่องจากกรดแลกติกที่ได้มีปริมาณไม่มากและยังพบการปนเปื้อนของเอทานอล (Skory, 2003) การตัดต่อพันธุกรรมโดยการนำยีน *L-LDH* จากวัว *Bos Taurus* จำนวน 2 ชุดใส่เข้าไปในยีสต์ *Candida utilis* ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ *CuPDC1* พบว่าการผลิตแลกติกได้ดี แต่การผลิตกรดแลกติกเกิดขึ้นที่อุณหภูมิจำกัดที่ 5-35°C เท่านั้น (Ikushima *et al.*, 2009) ในแบคทีเรีย *Enterobacter asburiae* เมื่อใช้เทคนิคพันธุกรรมลบยีน *pflB* และ *als* ซึ่งจำเป็นในการสร้างเอทานอล อะซิเตทและ 2,3-บิวทานไดออล (2,3-butanediol) พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกบริสุทธิ์ไอโซเมอร์ D ได้โดยการใช้เฮมิเซลลูโลสที่ได้จากกระบวนการไฮโดรไลซิสจากต้นไม้อและผลิตผลจากการเกษตรเช่น sweetgum เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่วิธีดังกล่าวยังสามารถผลิตกรดแลกติกได้น้อยและยังประสบปัญหาที่จุลินทรีย์เจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อบางชนิดเท่านั้น (Bi *et al.*, 2009) ในการผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ D จากแบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum* สายพันธุ์ที่ถูกทำลายยีน *ldhL1* โดยใช้แป้งข้าวโพดดิบเป็นอาหาร โดยใช้แบคทีเรียที่มีพลาสมิดที่มียีน *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* เพื่อใช้อย่าง β -glucan ในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าผลิตผลที่ได้เป็นกรดอะซิติกที่เปลี่ยนมาจากกรดแลกติก ซึ่งการเลี้ยงเชื้อโดยไม่ให้ออกซิเจนสามารถลดการเปลี่ยนกรดแลกติกเป็นกรดอะซิติกได้บางส่วน (Okano *et al.*, 2009b) แบคทีเรียชนิด *Leuconostoc citreum* ซึ่งโดยปกติผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ D ในอาหารหมักดอง

สามารถผลิตกรดแลกติกชนิดไอโซเมอร์ L โดยใช้การแสดงออกของยีน *ldhL* จาก *L. plantarum* ที่ตัดต่อใส่พลาสมิด แต่ปริมาณไพรูเวทที่ใช้เพื่อเปลี่ยนเป็นกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ไม่ได้นำมาจากไพรูเวทที่ใช้เพื่อเปลี่ยนเป็นกรดแลกติกไอโซเมอร์ D มากนัก (Jin *et al.*, 2009)

ในโครงการวิจัยนี้เลือกใช้ *E. coli* เป็นเซลล์เจ้าบ้านเพื่อให้ยีน *ldhA* จาก *R. oryzae* แสดงออก และใช้เทคนิคด้านพันธุศาสตร์โมเลกุลในการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ดังกล่าวเพื่อผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L เนื่องจาก *E. coli* เป็นแบคทีเรียชนิดนี้เจริญเติบโตเร็วเลี้ยงง่ายและมีการศึกษาด้านพันธุศาสตร์อย่างกว้างขวาง ซึ่งใน *E. coli* พบว่ายีน *ldh* จากสิ่งมีชีวิตอื่นเช่น *L. casei* สามารถแสดงออกได้ใน *E. coli* แต่ยีน *ldhA* ใน *E. coli* ต้องถูกทำลายก่อน (Chang *et al.*, 1999) หลังจากนำพลาสมิดที่มียีน *ldhA* จาก *R. oryzae* ใส่เข้าสู่เซลล์ *E. coli* แล้ว ได้นำเทคนิค error-pronePCR มาใช้ในการปรับปรุง *E. coli* สายพันธุ์นี้อีกด้วย โดยเทคนิคดังกล่าวก่อให้เกิดการกลายพันธุ์แบบสุ่มในยีน *ldhA* สำหรับเทคนิค error-pronePCR นั้นได้ถูกนำมาใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์หลายชนิด เช่น การเพิ่มคุณสมบัติการทนความร้อนในเอนไซม์ไฟเตส (phytase) App2 ใน *E. coli* (Kim and Lei, 2008) หลักการของเทคนิค error-pronePCR คือการเพิ่มอัตราการกลายพันธุ์ของสารพันธุกรรมที่สนใจโดยการรบกวนระบบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในกระบวนการ PCR เช่น การเปลี่ยนความเข้มข้นแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) การเติมแมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2$) หรือการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของนิวคลีโอไทด์ (nucleotides) แต่ละชนิดในปฏิกิริยา PCR (Pritchard *et al.*, 2005) จากนั้นทำการคัดเลือกโคลนที่สามารถผลิตกรดแลกติกได้ในปริมาณสูง และทำการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของลำดับสารพันธุกรรมในของยีน *ldhA* จาก *R. oryzae* ซึ่งเทคโนโลยีดังกล่าวสามารถช่วยปรับปรุงสายพันธุ์ของจุลินทรีย์โดยทำให้เอนไซม์ lactate dehydrogenase A ทำงานได้ดีขึ้นและส่งผลให้ผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ได้มากขึ้น ทั้งนี้กระบวนการผลิตกรดแลกติกที่มีประสิทธิภาพสามารถตอบสนองความต้องการการกรดแลกติกเพื่ออุตสาหกรรมต่างๆ โดยเฉพาะอุตสาหกรรมพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพที่ปัจจุบันการผลิตกรดแลกติกเพื่อเป็นสารตั้งต้นยังไม่เพียงพอและยังมีต้นทุนการผลิตสูง

2. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

สภาวะโลกร้อนส่งผลกระทบต่อมวลมนุษยชาติอย่างมาก สาเหตุสำคัญสาเหตุหนึ่งเนื่องจากการใช้พลาสติกที่ไม่สามารถย่อยสลายได้ตามกระบวนการทางธรรมชาติ ก่อให้เกิดการสะสมของขยะดังกล่าว นอกจากนี้ราคาน้ำมันปิโตรเลียมซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของพลาสติกที่ปรับตัวสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องและสารทางปิโตรเคมีซึ่งเป็นแหล่งพลังงานที่ใช้แล้วหมดไปนั้นมีน้อยลงทุกที ทำให้เกิดการตื่นตัวในการหาวัสดุทางเลือกใหม่เพื่อนำมาผลิตพลาสติกที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม กรดแลกติกเป็นทางเลือกหนึ่งที่ได้รับคามสนใจเป็นอย่างมากเนื่องจากกรดแลกติกสามารถนำมาสร้างในรูปพอลิเมอร์ของกรดแลกติก (polylactic acid) ซึ่งมีคุณสมบัติคล้ายพอลิโอเลฟิน (polyolefins)

ทั้งนี้ในปัจจุบันกรดแลกติกได้จากการหมักน้ำตาลกลูโคสด้วยแบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacilli* ซึ่งมีต้นทุนสูงและยังไม่บริสุทธิ์เพียงพอสำหรับการสังเคราะห์เป็นพอลิเมอร์ ดังนั้นการพัฒนากระบวนการผลิตกรดแลกติกจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง พันธุวิศวกรรมจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจเพื่อการพัฒนาการปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรีย แต่เนื่องจากการปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacilli* มักเกิดความไม่เสถียร โครงการวิจัยนี้จึงเลือก *E. coli* ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในการติดต่อพันธุกรรม ข้อดีสำหรับการใช้แบคทีเรียชนิดนี้คือ เลี้ยงง่ายและโตเร็วด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ซับซ้อน และข้อมูลทางพันธุกรรมมีการศึกษาอย่างกว้างขวาง นอกจากนี้ยังใช้เทคนิค error-prone PCR มาใช้ปรับปรุงสายพันธุ์ *E. coli* เพื่อการผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ให้มีประสิทธิภาพดีขึ้นอีกด้วยซึ่งเทคนิคดังกล่าวเป็นอีกทางเลือกหนึ่งเพื่อพัฒนาการผลิตกรดแลกติกให้มีประสิทธิภาพรองรับความต้องการของตลาดที่เพิ่มขึ้น ซึ่งความรู้ที่ได้รับนอกจากนำมาใช้พัฒนาการผลิตกรดแลกติกบริสุทธิ์โดยลงลึกไปถึงระดับโมเลกุลแล้ว ยังสามารถนำไปประยุกต์กับการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์เพื่อวัตถุประสงค์อื่นๆด้วย

3. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

3.1 ศึกษาความเป็นไปได้ในการแสดงออกของยีน *ldhA* จากเชื้อรา *R. oryzae* ใน *E. coli*

3.2 ศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้เทคนิค error-prone PCR เพื่อปรับปรุงสายพันธุ์ *E. coli* สำหรับการผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L

3.3 ศึกษาเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกจาก *E. coli* สายพันธุ์ที่ได้รับการปรับปรุงสายพันธุ์ในระดับห้องปฏิบัติการเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการผลิตกรดแลกติกระดับอุตสาหกรรม

4. ขอบเขตของโครงการวิจัย

ในโครงการวิจัยนี้ได้นำยีน *ldhA* จาก *R. oryzae* ซึ่งสังเคราะห์เอนไซม์ lactate dehydrogenase A ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวทำหน้าที่เปลี่ยนกรดไพรูวิก (pyruvic acid) ให้กลายเป็นกรดแลกติกไอโซเมอร์ L โดยยีน *ldhA* จาก *R. oryzae* ได้ถูกตัดต่อใส่พลาสมิดก่อนจะนำเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ที่ยีน *pta* และ *ldhA* ถูกทำลายทั้งนี้เพื่อลดการปนเปื้อนจากสารที่สร้างขึ้นระหว่างกระบวนการหมักและให้ยีน *ldhA* จาก *R. oryzae* บนพลาสมิดเท่านั้นที่แสดงออก ตามลำดับรวมถึงศึกษาความเป็นไปได้ในการนำยีน *ldhA* จาก *R. oryzae* ตัดต่อลงบนดีเอ็นเอของ *E. coli* จากนั้นทำการปรับปรุงสายพันธุ์ *E. coli* โดยใช้เทคนิค error-prone PCR เพื่อทำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบสุ่มของยีน *ldhA* จาก *R. oryzae* ผลลัพธ์ที่ได้จากกระบวนการดังกล่าวนำไปตัดต่อใส่พลาสมิด pBluescript I KS(+) แล้วนำเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ RB7 ที่ยีน *ldhA* และ *pta* ถูกทำลายแล้วทำการคัดเลือกโคโลนีที่ผลิตกรดแลกติกในปริมาณมาก พลาสมิดจากโคโลนีที่ผลิตกรดแลกติก

ได้ปริมาณมากได้ถูกสกัดเพื่อนำไปวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์บนบริเวณยีน *ldhA* ของ *R. oryzae* นอกจากนี้โครงการวิจัยนี้ได้ศึกษาปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L จาก *E. coli* ที่ได้รับการปรับปรุงสายพันธุ์ เช่น ภาวะการเลี้ยงเชื้อ ชนิดของพลาสติก ปริมาณ กลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ

5. วิธีการดำเนินการวิจัยโดยสรุป

5.1 เตรียม *E. coli* สายพันธุ์ที่เหมาะสมเพื่อการแสดงออก

5.2 ตัดต่อยีน *ldhA* ของ *R. oryzae* ใส่ในพลาสติก คัดเลือกพลาสติกถูกต้องและนำเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ในข้อ 5.1

5.3 วิเคราะห์ปริมาณผลผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ที่ผลิตได้จาก *E. coli* สายพันธุ์ที่คัดเลือก ในข้อ 5.2 ที่ภาวะต่างๆในระดับ Shake Flask

5.4 ศึกษาความเป็นไปได้ในการตัดต่อยีน *ldhA* ของ *R. oryzae* ลงบนดีเอ็นเอของ *E. coli*

5.5 ทำให้ยีน *ldhA* ของ *R. oryzae* บนพลาสติกจากข้อ 5.2 ให้เกิดการกลายพันธุ์แบบสุ่มด้วยวิธี error-prone PCR

5.6 นำผลิตภัณฑ์สารพันธุกรรมที่ได้จากข้อ 5.5 ใส่ในพลาสติก pBluescriptII KS(+) แล้วนำใส่ ใน *E. coli* สายพันธุ์ที่เหมาะสมในการแสดงออกจากข้อ 5.1

5.7 การคัดเลือกโคลนที่กรดแลกติกในปริมาณมาก วิเคราะห์ปริมาณผลผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ที่ผลิตได้และปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อในระดับ Shake Flask

5.8 ศึกษาปัจจัยที่อาจมีผลต่อการผลิตกรดแลกติกจาก *E. coli* ที่ได้รับการปรับปรุงสายพันธุ์ เช่น ชนิดของพลาสติก ปริมาณน้ำตาลกลูโคส

5.9 สกัดพลาสติกจากโคลนที่ได้ในข้อ 5.7 แล้วนำไปวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์บนบริเวณยีน *ldhA* ของ *R. oryzae*

6. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถสร้าง *E. coli* สายพันธุ์ที่สามารถผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L อย่างมีประสิทธิภาพ และสามารถนำความรู้ที่ได้ไปใช้เพื่อการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์อื่นๆสำหรับการผลิตสารหรือผลิตภัณฑ์อื่นๆที่สนใจ

อุปกรณ์ วิธีดำเนินงานวิจัย

1. อุปกรณ์

เครื่อง PCR (Polymerase Chain Reaction Thermocycler)	Applied Biosystems, Singapore
เครื่องเขย่าผสมรุ่น Vortex-Genie2 (Vortex mixer: model Vortex-Genie2)	Scientific Industries, USA
เครื่องเขย่าเลี้ยงเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated incubator shaker : model Innova 4330)	New Brunswick Scientific, USA
เครื่องชั่งแบบละเอียดรุ่น FX-180 (Electronic balance : model FX-180)	A&D Co., Ltd., Japan
เครื่องชั่งแบบหยาบ รุ่น FX-3000 (Electronic balance : model FX-3000)	A&D Co., Ltd, Japan
เครื่องทำให้สารแตกตัวโดยใช้คลื่นเสียง รุ่น UD-201 (Ultrasonic disruptor model : UD-201)	Tomy Seiko Co., Ltd., Japan
เครื่องบันทึกภาพเจลภายใต้แสงยูวี (Uvitec Platinum Gel Documentation system)	UVItec, UK
เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated high speed centrifuge)	Kubota cooperating, Japan
เครื่องปั่นเหวี่ยงหลอด micro-tube ความเร็วสูงรุ่น MTX-150 (High speed micro refrigerated centrifuge : model MTX-150)	Tomy Seiko Co., Ltd., Japan
เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)	Mettler Toledo, USA
เครื่องวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล รุ่น 2700 (YSI Select Biochemistry Analyzer model : 2700)	YSI, Inc., USA

เครื่องวิ่งเจลอะกาโรส (Agarose gel electrophoresis equipments)	ADVANCE Co., Ltd., Japan
เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave)	Taladlab, Thailand
เครื่องอิงน้ำ (Water bath)	Yamato, Japan
ชุดทำ cloning (pGEM [®] -T VectorEasy System)	Promega, USA
ชุดทำ cloning (TOPO [®] Cloning Kits)	Invitrogen, USA
ชุดทำสภาวะไม่มีออกซิเจน (AnaeroPack [®] Anarero)	MISUBISHI GAS CHEMICAL, CO., INC, Japan
ชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล (NucleoSpin [®] Extract II Kits)	MACHEREY-NAGEL, Germany
ชุดสกัดพลาสมิด (NucleoSpin [®] plasmid)	MACHEREY-NAGEL, Germany
ตู้แช่แข็ง -20°C (Freezer -20°C)	Sanyo, Japan
ตู้แช่แข็ง -70°C (Freezer -70°C)	Sanyo, Japan
ตู้ปลอดเชื้อรุ่น HF safe-12006 (Laminar flow: model HF safe-12006)	Heal Force, China
ตู้เพาะเชื้อ อุณหภูมิ 37°C (Growth cabinet)	Sanyo, Japan

ตู้อบแห้งรุ่น UNB-400

Memmert Co.,Ltd., Germany

(Oven : model UNB-400)

ไมโครปิเปตรุ่น Discovery Comfort

Mettler Toledo, USA

(Micro auto pipette: model Discovery Comfort)

2. จุลินทรีย์ พลาสมิด และไพรเมอร์

2.1 พลาสมิด

pCR [®] 2.1-TOPO [®]	Invitrogen, USA
pBluescriptII KS(+)	Agilent Technologies, USA
pUC19	United Bioinformatica Inc., Canada
pGEM [®] -T Vector	Promega, USA
pKD46	(Datsenko and Wanner, 2000)
pML1	Dr. Steven Sandel's lab, USA
pRB73	พลาสมิด pGEM [®] -T Vector ที่มีบางส่วนของยีน <i>ldhA</i> ของ <i>E. coli</i> โดยตรงกลางมีบริเวณตัดจำเพาะด้วยเอนไซม์ <i>BsWI</i>
pRB74	พลาสมิด pGEM [®] -T Vector ที่มีบางส่วนของยีน <i>ldhA</i> ของ <i>E. coli</i> โดยมีการแทรกยีน <i>cat</i> ตรงกลาง
pRB85	พลาสมิด pBluescript II KS(+) ที่มียีน <i>ldhA</i> ของ <i>R. oryzae</i>
pRB86	พลาสมิด pCR [®] 2.1-TOPO [®] ที่มีผลิตภัณฑ์จากการทำ XO PCR ส่วนบริเวณ 700 คู่เบสเหนือ Start codon ของยีน <i>ldhA</i> ของ <i>E. coli</i> กับยีน <i>ldhA</i> ของ <i>R. oryzae</i>
pAOY1	พลาสมิด pUC19 ที่มีผลิตภัณฑ์จากการทำ error-prone PCR ของยีน <i>ldhA</i> ของ <i>R. oryzae</i>
pAOY4	พลาสมิด pBluescript II KS(+) ที่มีผลิตภัณฑ์จากการทำ error-prone PCR ของยีน <i>ldhA</i> ของ <i>R. oryzae</i>
pAOY8	พลาสมิด pUC19 ที่มียีน <i>ldhA</i> ของ <i>R. oryzae</i>

pAOY10	พลาสมิด pBluescript II KS(+) ที่มีผลิตรากันท์จากการทำ error-prone PCR ของยีน <i>ldhA</i> ของ <i>R. oryzae</i>
pAOY11	พลาสมิด pUC19 ที่มีผลิตรากันท์จากการทำ error-prone PCR ของยีน <i>ldhA</i> ของ <i>R. oryzae</i>
pAOY14	พลาสมิด pUC19 ที่มีผลิตรากันท์จากการทำ error-prone PCR ของยีน <i>ldhA</i> ของ <i>R. oryzae</i>
pAOY15	พลาสมิด pUC19 ที่มีผลิตรากันท์จากการทำ error-prone PCR ของยีน <i>ldhA</i> ของ <i>R. oryzae</i>
pAOY16	พลาสมิด pBluescript II KS(+) ที่มีผลิตรากันท์จากการทำ error-prone PCR ของยีน <i>ldhA</i> ของ <i>R. oryzae</i>
pAOY17	พลาสมิด pBluescript II KS(+) ที่มีผลิตรากันท์จากการทำ error-prone PCR ของยีน <i>ldhA</i> ของ <i>R. oryzae</i>
pAOY18	พลาสมิด pBluescriptII KS(+) ที่มีผลิตรากันท์จากการทำ error-prone PCR ของยีน <i>ldhA</i> ของ <i>R. oryzae</i>
pAOY19	พลาสมิด pUC19 ที่มีผลิตรากันท์จากการทำ error-prone PCR ของยีน <i>ldhA</i> ของ <i>R. oryzae</i>
pAOY20	พลาสมิด pUC19 ที่มีผลิตรากันท์จากการทำ error-prone PCR ของยีน <i>ldhA</i> ของ <i>R. oryzae</i>
pTJY1	พลาสมิด pBluescript II KS(+) ที่มีผลิตรากันท์จากการทำ error-prone PCR ของยีน <i>ldhA</i> ของ <i>R. oryzae</i>

2.2 จุลินทรีย์

<i>R. oryzae</i> สายพันธุ์ NRRL395	Northern Regional Research Laboratory, USA
<i>E. coli</i> competent cells สายพันธุ์ Super 10 ⁹ HIT-DH5a	United Bioinformatica Inc., Canada
<i>E. coli</i> K-12 สายพันธุ์ JC13509	Associate Prof Dr. Steven J. Sandler's Lab, USA
<i>E. coli</i> K-12 สายพันธุ์ SS4075	เป็นสายพันธุ์ BW25113 ที่มียีน <i>pta::kan</i> ได้รับจาก Associate Prof Dr. Steven J. Sandler's lab, USA

RB1	พลาสมิด pRB73 ใน <i>E. coli</i> DH5a
RB2	พลาสมิด pRB74 ใน <i>E. coli</i> DH5a
RB5	Linear Transformation ชิ้นส่วนดีเอ็นเอจาก pRB74 เข้าสู่ JC13509 ทำให้เกิดจีโนไทป์ <i>ldhA::cat</i>
RB6	P1 transduction SS4075 → JC13509 ทำให้เกิดจี โนไทป์ <i>pta::kan</i>
RB7	P1 transduction RB5 → RB6 ทำให้เกิดจีโนไทป์ <i>ldhA::cat pta::kan</i>
RB19	พลาสมิด pRB85 ใน <i>E. coli</i> DH5a
RB24	พลาสมิด pRB85 ใน RB7
RB29	พลาสมิด pBluescriptII KS(+) ใน RB7
RB30	พลาสมิด pRB85 ใน JC13509
RB31	พลาสมิด pBluescriptII KS(+) ใน JC13509
RB32	พลาสมิด pRB86 ใน <i>E. coli</i> DH5a
TW1	พลาสมิด pAOY1 ใน RB7
TW4	พลาสมิด pAOY4 ใน RB7
TW8	พลาสมิด pAOY8 ใน RB7
TW9	พลาสมิด pUC19 ใน RB7
TW10	พลาสมิด pAOY10 ใน RB7
TW11	พลาสมิด pAOY11 ใน RB7
TW14	พลาสมิด pAOY14 ใน RB7
TW15	พลาสมิด pAOY15 ใน RB7
TW16	พลาสมิด pAOY16 ใน RB7
TW17	พลาสมิด pAOY17 ใน RB7
TW18	พลาสมิด pAOY18 ใน RB7

TW19	พลาสมิด pAOY19 ใน RB7
TW20	พลาสมิด pAOY20 ใน RB7
TY1	พลาสมิด pTJY1 ใน RB7

2.3 ไพรเมอร์

prRB1	5' ACAGGT <u>GGATCC</u> GCCTTTG 3' (บริเวณที่ขีดเส้นใต้คือบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ <i>Bam</i> HI)
prRB2	5' ACCGGTACCG <u>CGTACG</u> CCTGCCG 3' (บริเวณที่ขีดเส้นใต้คือบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ <i>Bs</i> WI)
prRB3	5' CGGCAGG <u>CGTACG</u> CGGTACCGGT 3' (บริเวณที่ขีดเส้นใต้คือบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ <i>Bs</i> WI)
prRB4	5' GGAATACGGA <u>ATTCTG</u> GATCACG 3' (บริเวณที่ขีดเส้นใต้คือบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ <i>Eco</i> RI)
prRB5	5' GTAGCG <u>CGTACG</u> ATGATTCCGGGGATCCGTCG 3' (บริเวณที่ขีดเส้นใต้คือบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ <i>Bs</i> WI)
prRB6	5' CCATGCG <u>CGTACG</u> TGTAGGCTGGAGCTGCTTCG 3' (บริเวณที่ขีดเส้นใต้คือบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ <i>Bs</i> WI)
prRB33	5' CTCAGTTTATAG <u>GATCCA</u> AAGCAGTC3' (บริเวณที่ขีดเส้นใต้คือบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ <i>Bam</i> HI)
prRB34	5' TGTGTA <u>AAGCTT</u> TACAATTCGATTGT3' (บริเวณที่ขีดเส้นใต้คือบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ <i>Hind</i> III)
prRB36	5'CTCAGTTTATAGAAATCGAAGCAGTCAATG3'
prRB37	5'TGTGT <u>CGTACG</u> TACAATTCGATTGT 3' (บริเวณที่ขีดเส้นใต้คือบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ <i>Bs</i> WI)
prRB38	5'CATTGACTGCTTCGATTCTATAAACTGAGAAGACTTTCTCCAGTGATGTTG3'

- prRB39 5' ACAATCGAATTGTACGTACGACACATCTTGCCGCTCCCCTGCATTCCAGG3'
(บริเวณที่ขีดเส้นใต้คือบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Bs*WI)
- prRB40 5'CGCCCGGATCCCGCAGTTGCTGGAT 3'
(บริเวณที่ขีดเส้นใต้คือบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Bam*HI)
- prRB41 5' GCGTCGGGATCCAGTAGTGGAG 3'
(บริเวณที่ขีดเส้นใต้คือบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Bam*HI)

3. การเตรียม *E. coli* สายพันธุ์ที่เหมาะสมเพื่อการแสดงออก

ในขั้นตอนของการสร้างสายพันธุ์ที่เหมาะสมเพื่อการแสดงออกนี้ *E.coli* ทุกสายพันธุ์ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ชนิดเหลวหรืออาหารเลี้ยงเชื้อ LB ชนิดแข็งซึ่งเติมยาปฏิชีวนะตามความเหมาะสมโดยมีความเข้มข้นสุดท้ายดังนี้ Ampicillin 100 µg/mL, Chloramphenicol 25 µg/mL และ Kanamycin 100 µg/mL

การแสดงออกของยีน *ldhA* จากสิ่งมีชีวิตอื่นเมื่อเข้าสู่ *E.coli* จะเกิดขึ้นได้เมื่อมีการทำลายยีน *ldhA* บนดีเอ็นเอของ *E.coli* เพื่อป้องกันการแสดงออกของยีน *ldhA* บนดีเอ็นเอของตัวเอง ซึ่งการทำลายยีน *ldhA* นี้ได้ใช้เทคนิค XO PCR และ Linear Transformation (รูปที่ 1) เริ่มต้นจากการทำ PCR โดยใช้ดีเอ็นเอของ *E. coli* สายพันธุ์ JC13509 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบเพื่อให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 ชิ้น โดยชิ้นที่ 1 ใช้ไพรเมอร์ prRB1 และ prRB2 ซึ่ง prRB1 จับที่ส่วนต้นของยีน *ldhA* ของ *E.coli* และมีการเหนี่ยวนำให้เกิดบริเวณตัดจำเพาะด้วย *Bam*HI ส่วน prRB2 จับส่วนกลางของยีน *ldhA* และมีการเหนี่ยวนำให้เกิดบริเวณตัดจำเพาะด้วย *Bs*WI ส่วนชิ้นที่ 2 ใช้ไพรเมอร์ prRB3 และ prRB4 โดย prRB3 จับส่วนกลางของยีน *ldhA* และมีการเหนี่ยวนำให้เกิดบริเวณตัดจำเพาะด้วย *Bs*WI ส่วน prRB4 จับที่ส่วนปลายของยีน *ldhA* ของ *E.coli* และมีการใส่บริเวณตัดจำเพาะด้วย *Eco*RI ดังนั้นชิ้นส่วนดีเอ็นเอทั้งชิ้นมีส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนที่เหมือนกันจาก prRB2 และ prRB3 และสามารถทำการเชื่อมติดกันได้ด้วยวิธี Primerless PCR ซึ่งคือการทำ PCR โดยไม่ใส่ไพรเมอร์ จากนั้นทำการเพิ่มจำนวนผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จาก Primerless PCR อีกครั้งด้วยไพรเมอร์ prRB1 และ prRB4 แล้วทำการสกัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอซึ่งเป็นชิ้นส่วนของยีน *ldhA* ของ *E. coli* โดยใช้ชุด pGEM[®]-T Vector Easy System (Promega, USA) ชิ้นส่วนดีเอ็นเอนี้ถูกเก็บไว้ในพลาสมิด pGEM[®]-T Vector โดยเมื่อโคลนยีนแล้วพลาสมิดที่ได้มีชื่อ prB73 จากนั้นทำการทำลาย ยีน *ldhA* ของ *E. coli* โดยการแทรกยีนต้านยาปฏิชีวนะ Chloramphenicol (ยีน *cat*) ซึ่งตัดจากพลาสมิด pML1 ด้วยเอนไซม์ *Bs*WI แล้วแทรกเข้าพลาสมิด prB73 ซึ่งตัดด้วย *Bs*WI ตรงกลางยีน *ldhA* แล้วทำการเชื่อมต่อดีเอ็นเอ (DNA ligation) เมื่อเชื่อมต่อกัน ชิ้นส่วนยีน *ldhA* มียีน *cat* แทรกตรง

กลางทำให้ยีน *ldhA* ทำงานไม่ได้ แล้วคัดเลือกโคโลนีที่สามารถโตได้บนอาหารแข็ง LB ที่มี Chloramphenicol จากนั้นสกัดพลาสมิดแล้วตรวจสอบความถูกต้อง พลาสมิดที่ถูกเลือกและได้ตรวจสอบความถูกต้องแล้วมีชื่อว่า pRB74

หลังจากนั้นนำพลาสมิด pRB74 ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Eco*RI แล้วสกัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *ldhA::cat* เพื่อนำไปแทนที่ยีน *ldh* บนดีเอ็นเอของ *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* ที่ถูกทำลายด้วยวิธี PCR ตั้งชื่อสายพันธุ์นี้ว่า RB5 จากนั้นนำสายพันธุ์ RB5 ไปทำ P1 lysate เพื่อให้ P1 bacteriophage นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *ldhA::cat* เข้าแทนที่ *ldhA* บนดีเอ็นเอของ *E. coli* สายพันธุ์ RB6 ตามวิธี P1 transduction (Willett et al., 1969) ซึ่ง *E. coli* สายพันธุ์ RB6 นั้นยีน *pta* ถูกทำลายเพื่อลดผลพลอยได้ที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักด้วยวิธี P1 transduction เช่นกัน โดยชิ้นส่วน *pta::kan* นั้นนำมาจาก *E. coli* สายพันธุ์ SS4075 โดย *E. coli* สายพันธุ์ที่ยีน *ldhA* และ *pta* บนดีเอ็นเอถูกทำลายสามารถคัดเลือกบนอาหารแข็ง LB ที่มี kanamycin และ Chloramphenicol จากนั้นตรวจสอบความถูกต้องด้วยวิธี PCR ซึ่ง *E. coli* สายพันธุ์ที่ยีน *ldhA* และ *pta* ถูกทำลายนี้มีชื่อว่า RB7

4. การตัดต่อยีน *ldhA* ของ *R. oryzae* ใส่ในพลาสมิดคัดเลือกพลาสมิดถูกต้องและการนำพลาสมิดเข้าสู่ *E. coli*

เนื่องจากยีน *ldhA* ใน *R. oryzae* เป็นยีนที่ไม่มี intron จึงสามารถใช้ดีเอ็นเอของ *R. oryzae* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำ PCR ได้ เมื่อสกัดดีเอ็นเอจาก *R. oryzae* สายพันธุ์ NRRL395 แล้วทำการสกัดและเพิ่มปริมาณยีน *ldhA* จากดีเอ็นเอ *R. oryzae* วิธี PCR โดยไพรเมอร์ที่ใช้คือ prRB33 และ prRB34 ซึ่งมีการเหนี่ยวนำให้เกิดบริเวณตัดจำเพาะสำหรับเอนไซม์ *Bam*HI และ *Hind*III ตามลำดับ ผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดขึ้นเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 1800 คู่เบส หลังจากนั้นนำมาตรวจสอบความถูกต้องด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ *Kpn*I และ *Eco*RI เมื่อได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกตัดแล้ว นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังกล่าวใส่เข้าสู่พลาสมิด pBlueScript II KS(+) โดยการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอและพลาสมิดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Hind*III แล้วเชื่อมให้ติดกันด้วยเทคนิค DNA Ligation ซึ่งถูกกระตุ้นด้วยเอนไซม์ T4 Ligase (รูปที่ 2) โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการ Ligation นี้เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิด ในลำดับต่อมาทำการคัดเลือกบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่มี Ampicillin และ X-gal แล้วคัดเลือกโคโลนีสีขาวซึ่งคาดว่าจะมียีน *ldhA* บนพลาสมิดตามหลัก blue/white screening (Sambrook et al., 1989)

จากนั้นทำการสกัดพลาสมิดตรวจสอบความจากการตัดด้วยเอนไซม์ *KpnI* ซึ่งพลาสมิดที่ตรวจสอบแล้วได้รับการตั้งชื่อว่า pRB85

พลาสมิดที่ใช้ในการทดลองนี้ เช่น pRB85 และ pBlueScript II KS(+) นำเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ RB7 และสายพันธุ์อื่น ๆ ที่ใช้ในการทดลองด้วยเทคนิค Chemical Transformation ตามวิธีของ Lewis' Lab (<http://lewislab.wikispaces.com/Protocols#rb>) โดยการทำให้เซลล์ *E. coli* ให้เป็น competent cells ด้วยวิธี RbCl Chemically Competent Cells และนำพลาสมิดเข้าสู่ competent cells คัดเลือกเซลล์ที่มีพลาสมิดที่ต้องการด้วยการเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ผสม Ampicillin จากนั้นสกัดพลาสมิดจากโคลนที่สุ่มเลือก โดยพลาสมิดที่มียีน *ldhA* ของ *R. oryzae* สามารถตรวจสอบความถูกต้องโดยการตัดด้วยเอนไซม์ *KpnI* สำหรับสายพันธุ์ RB7 ที่มีพลาสมิด pRB85 นั้นมีชื่อเรียกว่า RB24 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่คาดว่าจะมีแสดงออกของยีน *ldhA* บนพลาสมิด pRB85 เพื่อผลิตกรดแลกติกซึ่งได้นำไปทดสอบในขั้นต่อไป

5. การวิเคราะห์ปริมาณผลผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ที่ผลิตได้จาก *E. coli* ที่ได้รับพลาสมิดซึ่งมียีน *ldhA* ของ *R. oryzae* ที่ภาวะต่าง ๆ ในระดับ 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 เซลล์อาจจะปรับตัวไม่ได้ จึงจำเป็นต้องเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ค่อยๆ ปรับปริมาณกลูโคสและ CaCO_3 ตามขั้นตอนที่แสดงในรูปที่ 3 โดยส่วนผสมอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดได้แสดงไว้ในภาคผนวกทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว Pre-culture ปริมาตร 50 mL เมื่อเลี้ยงครบตามเวลาของการทดลองการหมักแต่ละภาวะ นำ Pre-culture ปริมาตร 2 mL ใส่ลงใน Fermentation broth ปริมาตร 50 mL โดยอาหารเลี้ยงเชื้อของสายพันธุ์ที่ต้องการรักษาพลาสมิดไว้ในเซลล์มีการเติม Ampicillin ที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 100 $\mu\text{g/mL}$

ในขั้นตอนการทดสอบการผลิตกรดแลกติกด้วยการหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อ Fermentation broth ที่มีกลูโคสเริ่มต้น 100 g/L ได้ทำการแบ่งการหมักออกเป็น 4 ภาวะดังตารางที่ 1 หลังจากทำการหมักครบ 48 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่าง 1 mL แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 7 นาทีเพื่อแยกเซลล์และ CaCO_3 ออกจากนั้นนำส่วนใสไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ที่ผลิตได้และน้ำตาลกลูโคสที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่องวัดปริมาณกลูโคสและแลกเตท YSI 2700 Selector

6. การศึกษาความเป็นไปได้ในการตัดต่อยีน *ldhA* ของ *R. oryzae* ลงบนดีเอ็นเอของ *E. coli*

เนื่องจากยีน *ldhA* ของ *R. oryzae* และ *E. coli* มีความเหมือนกันประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ซึ่งไม่เพียงพอเกิดกระบวนการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนดีเอ็นเอเพื่อให้ยีน *ldhA* ของ *R. oryzae* แทนที่ยีน *ldhA* บนดีเอ็นเอของ *E. coli* ได้ ดังนั้นก่อนการแทนที่ ยีน *ldhA* บนดีเอ็นเอของ *E. coli* ด้วยวิธี Linear transformation ต้องมีการสร้างชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค XO PCR โดยชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการนี้ประกอบด้วยยีน *ldhA* ของ *R. oryzae* และในส่วนหัวและท้ายของดีเอ็นเอเส้นนี้มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับส่วนด้านหน้าและด้านหลังของยีน *ldhA* ของ *E. coli* ประมาณข้างละ 700 คู่เบส และในส่วนท้ายยีน *ldhA* ของ *R. oryzae* มีบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อให้สามารถใส่ marker สำหรับการคัดเลือกในขั้นต่อไป ซึ่งการทดลองนี้วางแผนใช้ยีน chloramphenicol acetyltransferase (*cat*) โดยขั้นตอนการสร้างชิ้นส่วนดีเอ็นเอนี้แสดงไว้ในรูปที่ 4 ซึ่งเริ่มต้นจากการสร้าง Fragment 1 ด้วยวิธี PCR ซึ่งใช้ดีเอ็นเอของ *E. coli* สายพันธุ์ JC13509 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ และใช้ไพรเมอร์ prRB40 กับ prRB38 ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้เป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 700 คู่เบส ส่วน Fragment 2 สร้างโดยวิธี PCR ซึ่งใช้โครโมโซมของ *R. oryzae* สายพันธุ์ NRRL395 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ และใช้ไพรเมอร์ prRB36 กับ prRB37 ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้เป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1800 คู่เบส จากนั้นทำการ XO PCR ของ Fragment 1 และ 2 เริ่มจาก Primerless PCR โดยการทำให้ Fragment 1 และ 2 แต่ไม่ใส่ไพรเมอร์ลงไปในปฏิกิริยา ซึ่งบริเวณที่เหมือนกันของ Fragment 1 และ 2 สามารถจับกันได้ จากนั้นจึงเติมไพรเมอร์ prRB40 และ 37 ลงไปภายหลังเพื่อเพิ่มจำนวน โดยผลิตภัณฑ์ที่ถูกต้องเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 2500 คู่เบส ทำการสกัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอนี้เพื่อโคลนเข้าสู่พลาสมิด pCR[®] 2.1-TOPO[®] (Invitrogen, USA) และตั้งชื่อพลาสมิดนี้ว่า pRB86 จากนั้นทำการ XO PCR อีกครั้ง เริ่มจากการเพิ่มจำนวน Fragment 1+2 บนพลาสมิด pRB86 โดยวิธี PCR ด้วยไพรเมอร์ prRB40 และ 37 และสร้าง Fragment 3 โดยวิธี PCR ซึ่งใช้ดีเอ็นเอของ *E. coli* สายพันธุ์ JC13509 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบกับไพรเมอร์ prRB39 และ prRB41 ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้เป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 700 คู่เบสเมื่อทำการ XO PCR ของ Fragment 1+2 และ 3 ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ควรเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3200 คู่เบส นำเข้าสู่พลาสมิด pCR[®] 2.1-TOPO[®] จากนั้นตัดด้วยเอนไซม์ *Bs*MI เพื่อแทรกยีน *cat* ที่ตัดจากพลาสมิด pML1 แล้วจึงนำเข้าสู่ *E. coli* DH5A คัดเลือกบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่มี Chloramphenicol จากนั้นสกัดพลาสมิดแล้วตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI สกัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 4500 คู่เบส แล้วใช้วิธี Linear Transformation เพื่อนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอนี้แทนที่ยีน *ldhA* บนดีเอ็นเอของ *E. coli* สายพันธุ์ JC13509

7. การทำให้ยีน *IdhA* ของ *R. oryzae* บนพลาสมิด pRB85 เกิดการกลายพันธุ์แบบสุ่มด้วยวิธี error-prone PCR และนำเข้าสู่ *E.coli*

ในโครงการวิจัยนี้ใช้วิธี error-prone PCR โดยการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ Mg^{2+} และการเติม Mn^{2+} เริ่มต้นจากการหาภาวะที่เหมาะสมในการทำ error-prone PCR เมื่อใช้ pRB85 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบและไพรเมอร์ prRB33 และ prRB34 โดยใช้วิธีการทำเหมือน PCR ตามปกติแต่เปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ตั้งแต่ 0.25 mM ถึง 1.75 M และเติม $MnCl_2$ ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.05 mM ถึง 0.35 mM ลงในปฏิกิริยาเมื่อได้ภาวะที่เหมาะสมในการทำ error-prone PCR แล้ว ทำ error-prone PCR โดย pRB85 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบและไพรเมอร์ prRB33 และ prRB34 ด้วยภาวะนั้น หลังจากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการทำ error-prone PCR นี้ได้นำไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III เพื่อนำเข้าพลาสมิด pBluescript II KS(+) หรือ pUC19 แล้วใส่เข้าสู่ *E.coli* สายพันธุ์ RB7 ทำการคัดเลือกบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่มี Ampicillin และ X-gal แล้วคัดเลือกโคโลนีสีขาวซึ่งคาดว่าจะมียีน *IdhA* ตัดต่อบนพลาสมิดตามหลัก blue/white screening (Sambrook *et al.*, 1989)

8. การคัดเลือกโคโลนีที่กรดแลกติกในปริมาณมากและการวิเคราะห์ปริมาณผลผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ที่ผลิตได้และปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อในระดับ Shake Flask

ทำการคัดเลือกหาโคโลนีของแบคทีเรียที่มีความเป็นไปได้ว่ามีการผลิตกรดแลกติกในปริมาณมากในขั้นต้น โดยนำโคโลนีสีขาวที่คัดเลือกบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่มี Ampicillin และ X-gal มาขีดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิด Cultivation plate ซึ่งผสม $CaCO_3$ (ส่วนผสมตามภาคผนวก) บ่มที่ 37 °C ในภาวะที่ไม่มีออกซิเจนเป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกต clear zone ที่เกิดขึ้น คัดเลือกโคโลนีที่มี clear zone ขนาดใหญ่กว่าสายพันธุ์ RB24 จากนั้นนำโคโลนีดังกล่าวย้ายไปเลี้ยงลงบน Cultivation slant ที่มี Ampicillin ความเข้มข้นสุดท้าย 100 µg/mL เพื่อทำการหมักหาปริมาณกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ที่ผลิตได้ในขั้นต่อไป ทำการถ่ายโคโลนีบน Cultivation slant ลงในอาหารเหลว Pre-culture ที่มีกลูโคสเข้มข้น 10g/L $CaCO_3$ เข้มข้น 5 g/L ปริมาตร 50 mL เติม Ampicillin ที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 100 µg/mL เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C เขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 1 คืน แล้วจึงนำ Pre-culture ปริมาตร 2 mL ใส่ลงใน Fermentation broth ที่มีกลูโคสเข้มข้น 20 g/L $CaCO_3$ เข้มข้น 20 g/L ปริมาตร 50 mL และเติม Ampicillin ที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 100 µg/mL ในขั้นของการหมักใน Fermentation broth นี้ ทำการเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C ในภาวะที่ไม่มีออกซิเจนเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บตัวอย่าง 1 mL แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 7 นาทีเพื่อแยกเซลล์และ $CaCO_3$ ออก

จากนั้นนำส่วนใสไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ที่ผลิตได้และน้ำตาลกลูโคสที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่องวัดปริมาณกลูโคสและแลกเตท YSI 2700 Selector

9. การศึกษาปัจจัยที่อาจมีผลต่อการผลิตกรดแลกติกจาก *E. coli* ที่ได้รับการปรับปรุงสายพันธุ์ เช่น ชนิดของพลาสมิด ปริมาณน้ำตาลกลูโคส

ในการศึกษาผลของชนิดของพลาสมิดมีผลต่อการผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L คณะผู้วิจัยได้นำยีน *ldhA* ของ *R. oryzae* ทำการตัดต่อลงบนพลาสมิด pUC19 ซึ่งเป็นพลาสมิดที่มีการทำสำเนาสูงและมีขนาดเล็กกว่าพลาสมิด pBluescript II KS(+) (รูปที่ 5) โดยการตัดยีน *ldhA* บนพลาสมิด pRB85 ด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Hind*III จากนั้นนำมาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pUC19 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์เดียวกันด้วยเทคนิค DNA Ligation ซึ่งถูกกระตุ้นด้วยเอนไซม์ T4 Ligase และในขั้นตอนต่อไป เช่น การเพิ่มจำนวน การคัดเลือกพลาสมิดที่ต้องการ การเลี้ยงเชื้อ ทำเช่นเดียวกับการสร้างพลาสมิด pRB85 (ดังที่กล่าวไว้ในข้อ 4) พลาสมิด pUC19 ที่มียีน *ldhA* ของ *R. oryzae* มีชื่อว่า pAOY8 จากนั้นนำ pAOY8 เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ RB7 เช่นเดียวกับการสร้างสายพันธุ์ RB24 โดย *E. coli* สายพันธุ์ RB7 ที่มีพลาสมิด pAOY8 มีชื่อว่า TW8 และนำ *E. coli* สายพันธุ์ TW8 ศึกษาการผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L โดยใช้ถ่ายเชื้อจาก Cultivation slant ลงในอาหารเหลว Pre-culture และหมักในอาหารเหลว Fermentation broth ด้วยวิธี อาหารเลี้ยงเชื้อและภาวะเช่นเดียวกับที่กล่าวไว้ในข้อ 8 เปรียบเทียบกับ *E. coli* สายพันธุ์ RB24 ซึ่งมีพลาสมิด pRB85 (พลาสมิด pBluescript II KS(+) ที่มียีน *ldhA* ของ *R. oryzae*)

สำหรับการศึกษาผลกระทบของปริมาณกลูโคสต่อการผลิตกรดแลกติกนั้นได้ทำการทดลองโดยการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ต้องการทำการทดสอบเลี้ยงลงบน Cultivation slant จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว Pre-culture และหมักในอาหารเหลว Fermentation broth ด้วยวิธี อาหารเลี้ยงเชื้อและภาวะเช่นเดียวกับที่กล่าวไว้ในข้อ 8 แต่ทำการทดสอบการหมักโดยใช้ Fermentation broth ที่มีกลูโคสเข้มข้น 20 30 50 และ 70 g/L ตามลำดับ จากนั้นเก็บตัวอย่าง 1 mL แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 7 นาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ที่ผลิตได้และน้ำตาลกลูโคสที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่องวัดปริมาณกลูโคสและแลกเตท YSI 2700 Selector

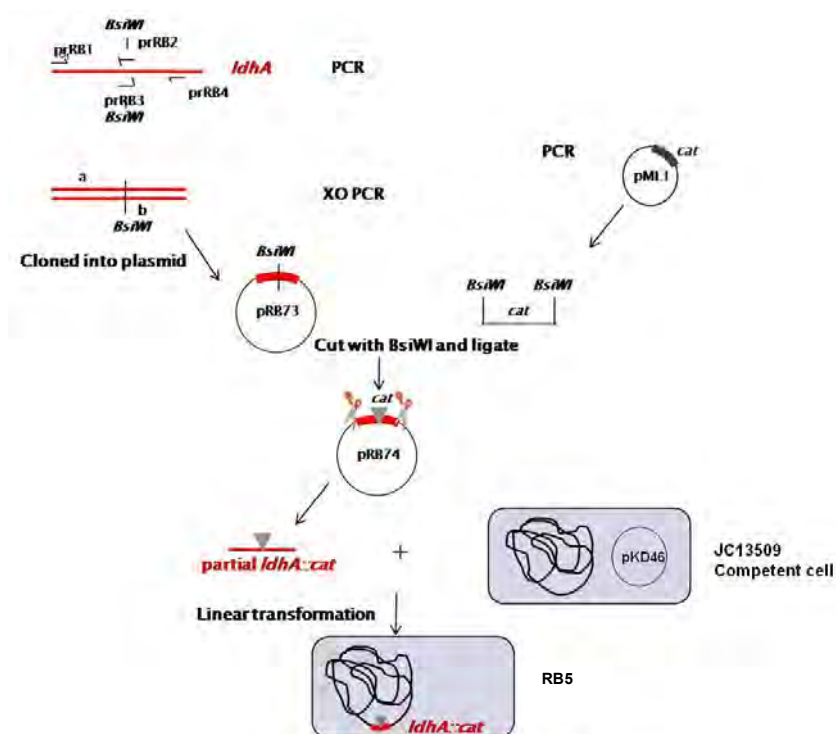
10. การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *ldhA* ของ *R. oryzae*

ทำการคัดเลือก *E. coli* สายพันธุ์ที่มีการผลิตกรดแลกติกได้ดีกว่าสายพันธุ์ RB24 จากนั้นเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 mL ที่เติม Ampicilin ความเข้มข้นสุดท้าย 100 µg/mL ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C เขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 1 คืน แล้วนำมาสกัดพลาสมิด จากนั้นนำพลาสมิดดังกล่าวส่งตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ (MacroGen, Korea) โดยใช้ไพรเมอร์

prRB33 และ prRB34 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ldhA* ที่ผ่านการทำ error-prone PCR กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ldhA* ของ *R. oryzae* บนฐานข้อมูล

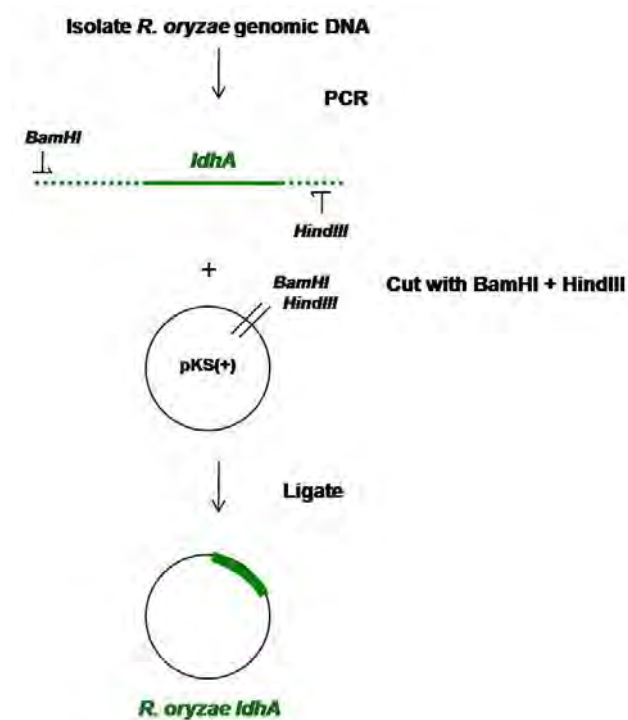
ตารางที่ 1 ภาวะการหมักหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L จาก *E. coli* สายพันธุ์ RB24

ภาวะที่	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 ชั่วโมงแบบไม่มีออกซิเจน	บ่มที่ 37°C 48 ชั่วโมงแบบไม่มีออกซิเจน
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



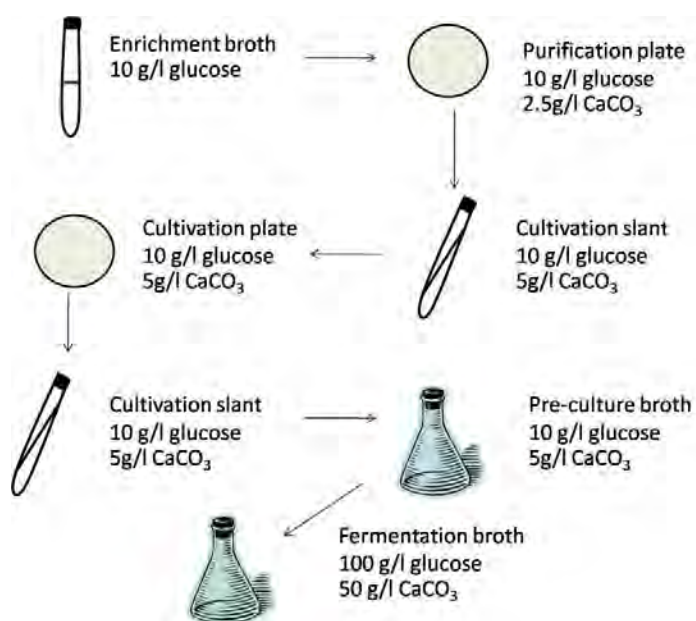
รูปที่ 1 การสร้าง *E. coli* สายพันธุ์ที่ยีน *IdhA* บนดีเอ็นเอถูกทำลาย

เริ่มต้นจากทำ XO PCR เพื่อสร้างชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ยีน *IdhA* ของ *E. coli* ถูกทำลายโดยการแทรกยีน *cat* ซึ่งต้านยา Chloramphenicol ลงตรงกลางของยีน *IdhA* จากนั้นนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังกล่าวแทนที่ยีน *IdhA* บนดีเอ็นเอของ *E. coli* ด้วยวิธี Linear Transformation โดยสายพันธุ์ที่ยีน *IdhA* บนดีเอ็นเอถูกทำลาย (*IdhA::cat*) มีชื่อว่า RB5



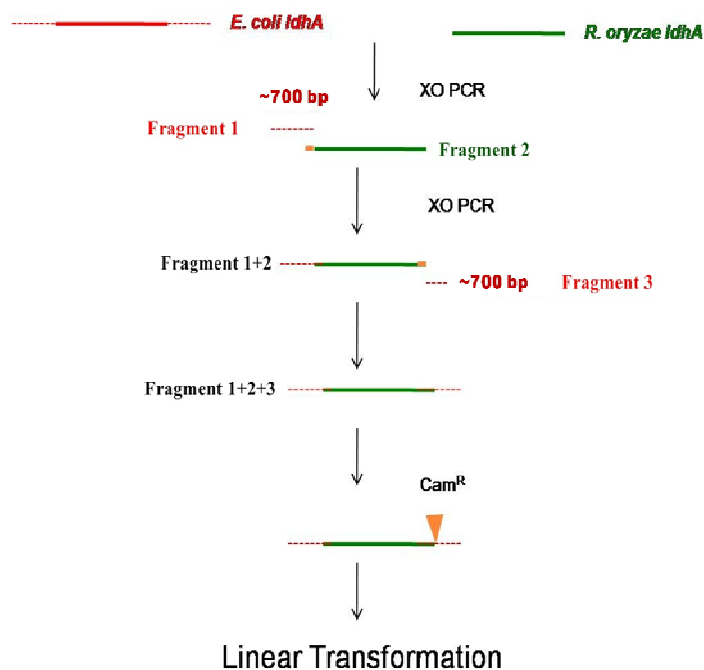
รูปที่ 2 ขั้นตอนการสร้างพลาสมิดที่มียีน *IdhA* ของ *R. oryzae*

เริ่มจากการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *IdhA* ของ *R. oryzae* โดยไพรเมอร์ที่ใช้จะทำให้เหนี่ยวนำให้เกิดบริเวณตัดจำเพาะด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Hind*III หลังจากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR และพลาสมิด pBluescript II KS(+) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Hind*III แล้วเชื่อมติดกันด้วยเอนไซม์ T4 Ligase



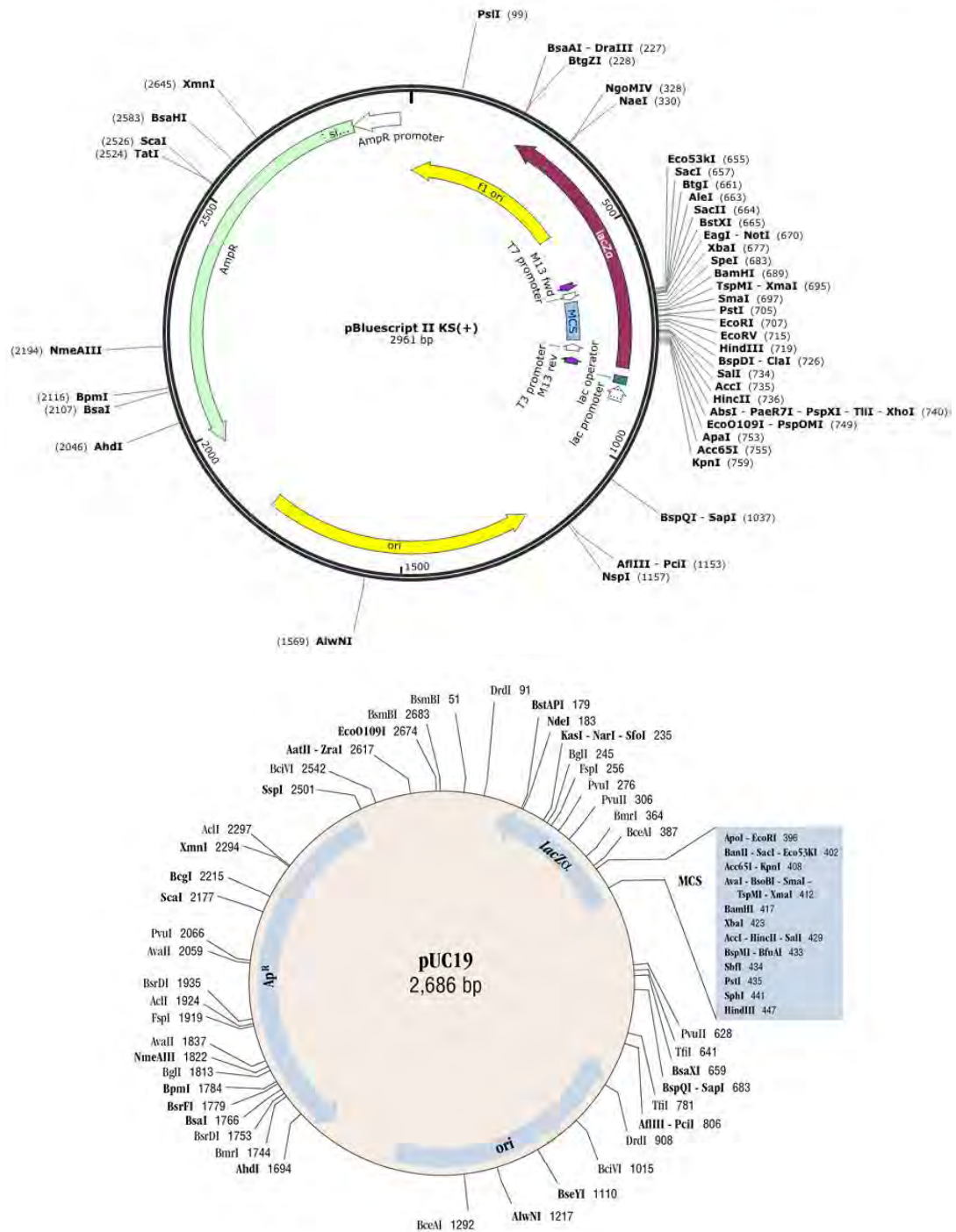
รูปที่ 3 ขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อก่อนทำการหมักเพื่อปรับสภาพเซลล์

อาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิดปรับ pH ที่ 6.8 และส่วนประกอบอื่นๆเหมือนกันตามละเอียดในภาคผนวกยกเว้นน้ำตาลกลูโคสและ CaCO_3 ซึ่งแสดงไว้ในภาพ โดยในการเลี้ยงเชื้อทุกขั้นตอนจะบ่มเซลล์ที่ 37°C เป็นเวลา 2 วัน ยกเว้นในขั้น Pre-culture ซึ่งจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับภาวะในการหมัก (ตารางที่ 1)



รูปที่ 4 แผนงานการสร้างดีเอ็นเอสายตรงสำหรับการแทนที่ยีน *ldhA* บนดีเอ็นเอของ *E. coli* ด้วยยีน *ldhA* ของ *R. oryzae*

Fragment 1 จะเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับบริเวณที่อยู่หน้ายีน *ldhA* ใน *E. coli* ซึ่งมีขนาดประมาณ 700 คู่เบส แล้วเชื่อมติดกับ Fragment 2 ซึ่งเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มียีน *ldhA* ใน *R. oryzae* ที่ส่วนหัวมีความเหมือนกับ Fragment 1 ประมาณ 30 คู่เบส ด้วยเทคนิค XO PCR หลังจากนั้นจึงใช้เทคนิค XO PCR เชื่อมติดกับ Fragment 3 อีกครั้ง โดย Fragment 3 เป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่อยู่หลังยีน *ldhA* ใน *E. coli* และมีส่วนที่เหมือนส่วนท้ายของ Fragment 2 ประมาณ 30 คู่เบส นอกจากนี้ ยังได้ออกแบบให้มีบริเวณที่สามารถตัดได้ด้วยเอนไซม์ *BsWI* ในส่วนท้ายของ Fragment 2 เพื่อนำ marker คือ chloramphenicol acetyltransferase (*cat*) มาใส่ก่อนทำ Linear Transformation



รูปที่ 5 พลาสมิด pBluescript II KS(+) และ pUC19

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การสร้างพลาสมิดที่มียีน *IdhA* ของ *R. oryzae*

ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ prRB33 และ prRB34 โดยใช้ดีเอ็นเอของ *R. oryzae* เป็นต้นแบบมีขนาดประมาณ 1800 คู่เบสซึ่งประกอบด้วยยีน *IdhA*, promoter, และ ribosome binding site ก่อนนำผลิตภัณฑ์ PCR ไปตัดต่อเข้าสู่พลาสมิดได้ทำการตรวจสอบความถูกต้องโดยการตัดด้วยเอนไซม์ *KpnI* และ *EcoRI* โดยชิ้นส่วนที่ถูกต้องเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *KpnI* เกิดขึ้นส่วนขนาดประมาณ 770 และ 1030 คู่เบส ในขณะที่การตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* ได้ชิ้นส่วนขนาดประมาณ 600 และ 1200 คู่เบส (รูปที่ 6)

หลังจากนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ถูกต้องตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* และ *HindIII* ใส่เข้าสู่พลาสมิด pBlueScript II KS(+) ที่บริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์เดียวกันเมื่อทำการตรวจสอบความถูกต้องโดยการสกัดพลาสมิดแล้วตัดด้วยเอนไซม์ *KpnI* ซึ่งพลาสมิดที่ถูกต้องเกิดขึ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 800 และ 4000 คู่เบส (รูปที่ 7) และทำการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี DNA Sequencing (MAcrogen, Korea) ในลำดับต่อมา ซึ่งพลาสมิด pBlueScript II KS(+) ที่มียีน *IdhA* ของ *R. oryzae* ซึ่งได้รับการตรวจสอบความถูกต้องแล้วมีชื่อว่า pRB85 และพลาสมิดนี้นำไปใส่ใน *E. coli* สายพันธุ์ RB7 ที่ยีน *IdhA* และ *pta* บนดีเอ็นเอถูกทำลาย โดยสายพันธุ์ดังกล่าวมีชื่อว่า RB24 ซึ่งใช้ในการทดสอบการแสดงออกของยีน *IdhA* ของ *R. oryzae* ขึ้นต่อไป

2. การแสดงออกของยีน *IdhA* จาก *R. oryzae* บนพลาสมิด pRB85 ใน *E. coli*

เนื่องจาก *E. coli* ผลิตรกรดแลกติกในภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ดังนั้นในสายพันธุ์ RB7 ซึ่งยีน *IdhA* บนดีเอ็นเอถูกทำลายจึงไม่สามารถผลิตรกรดแลกติกได้ในภาวะดังกล่าว และความสามารถในการผลิตรกรดแลกติกสามารถหาค่าได้เมื่อนำยีน *IdhA* จากแหล่งอื่นซึ่งในที่นี้คือยีน *IdhA* บนพลาสมิด pRB85 ในขั้นต้นนั้นได้ทดสอบการแสดงออกของยีน *IdhA* บนพลาสมิด pRB85 โดยการเลี้ยง *E. coli* สายพันธุ์ RB24 ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Cultivation plate ที่มีกลูโคสเข้มข้น 10 g/L และมี CaCO_3 ผสมในอาหารในภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน จากผลการทดลองดังรูปที่ 8 พบว่าสายพันธุ์ RB24 ซึ่งมีพลาสมิด pRB85 สามารถสร้าง clear zone ได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจนเช่นเดียวกับสายพันธุ์ JC13509 (wild type) ซึ่งแสดงว่ามีการผลิตรกรด ทั้งนี้การทดลองขั้นต่อไปคือการหมักที่ภาวะต่างๆ เพื่อทดสอบว่ากรดที่ผลิตคือกรดแลกติกหรือไม่และมีปริมาณการผลิตเท่าไร ในขณะที่สายพันธุ์ RB7 ซึ่งไม่มียีน *IdhA* ไม่มีการสร้างกรดและเจริญเติบโตได้น้อยมากในภาวะที่ไม่มีออกซิเจน แสดงถึงความสำคัญของยีน *IdhA* ต่อ *E. coli* เพื่อการเจริญเติบโตในภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ทั้งนี้สามารถกล่าวได้ว่าการเจริญเติบโตและ

การสร้างกรดของสายพันธุ์ RB24 ในภาวะที่ไม่มีออกซิเจนเกิดจากการแสดงออกของยีน *ldhA* บนพลาสมิด pRB85 เพื่อชดเชยการสูญเสียยีน *ldhA* บนดีเอ็นเอของ *E. coli*

3. ผลผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ที่ได้จากการหมักในภาวะต่าง ๆ ในระดับ Shake flask

การทดลองในส่วนนี้ทำการหมักเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ต่าง ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการหมัก Fermentation Broth ซึ่งมีน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 100 g/L และ CaCO_3 50 g/L ทั้งนี้สายพันธุ์ RB24 ซึ่งมีพลาสมิด pRB85 (ยีน *ldhA* จาก *R. oryzae* บนพลาสมิด pBluescript II KS(+)) และยีน *ldhA* และ *pta* บนดีเอ็นเอของ *E. coli* ถูกทำลาย มีความเป็นไปได้ว่ามีการผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L เนื่องจากในการทดสอบขั้นต้นพบการผลิตและการเจริญเติบโตในภาวะที่ไม่มีออกซิเจนซึ่งคาดว่าเกิดจากการแสดงออกของยีน *ldhA* ของ *R. oryzae* บนพลาสมิดเพื่อทำงานทดแทนการสูญเสียยีน *ldhA* บนดีเอ็นเอของ *E. coli* นอกจากนี้ยังได้ทำการเปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกของสายพันธุ์ RB24 กับ *E. coli* สายพันธุ์อื่นๆ ได้แก่

- (1.) JC13509 ซึ่งใช้เป็น *E. coli* wild type เนื่องจากใน wild type มียีน *ldhA* บนดีเอ็นเอ ดังนั้นคาดว่าอาจพบการผลิตกรดแลกติกบ้าง ทั้งนี้ *ldhA* บนดีเอ็นเอ *E. coli* มีการผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ D และ L ได้
- (2.) RB7 ในสายพันธุ์นี้ยีน *ldhA* และ *pta* ของ *E. coli* ถูกทำลาย ในการทดสอบข้างต้นไม่พบการผลิตกรดรวมทั้งมีการเจริญเติบโตน้อยมาก ในภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ดังนั้นเมื่อทำการหมักจึงไม่ควรพบการผลิตกรดแลกติก
- (3.) RB29 เป็นสายพันธุ์ที่ใส่พลาสมิด pBluescript II KS(+) เปล่าใน RB7 เพื่อทดสอบว่าการใส่พลาสมิดชนิดนี้รบกวนระบบการผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L หรือไม่
- (4.) RB30 เป็นสายพันธุ์ที่ใส่พลาสมิด pRB85 ใน JC13509 ทั้งนี้จากงานวิจัยของ Chang *et al.*, 1999 พบว่าการแสดงออกของยีน *ldh* จากสิ่งมีชีวิตอื่นจะเกิดใน *E. coli* เมื่อมีการทำลายยีน *ldhA* บนดีเอ็นเอของ *E. coli* ก่อน ดังนั้นในสายพันธุ์นี้ ยีน *ldhA* ของ *R. oryzae* บนพลาสมิด pRB85 จึงไม่ควรมีการแสดงออกเพราะยีน *ldhA* บนโครโมโซมไม่ได้ถูกทำลาย การผลิตกรดแลกติกควรใกล้เคียงกับสายพันธุ์ JC3509
- (5.) RB31 เป็นสายพันธุ์ที่ใส่พลาสมิด pBluescript II KS(+) เปล่าใน JC13509 เพื่อทดสอบว่าพลาสมิดชนิดนี้รบกวนระบบต่างๆในเซลล์หรือไม่

ในภาวะปกติหากไม่ใส่ยาปฏิชีวนะที่พลาสมิดนั้นๆมียืนต้านอยู่ เซลล์จะกำจัดพลาสมิดออก เพราะไม่มีความจำเป็นต้องเก็บไว้ ดังนั้นในการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ที่มีพลาสมิด pBluescript II KS(+) และ pRB85 จำเป็นต้องใส่ยาปฏิชีวนะ Ampicillin ทุกครั้งเพื่อรักษาพลาสมิดไว้ในเซลล์

จากรูปที่ 8 พบว่า RB7 เจริญเติบโตได้น้อยในภาวะที่ไม่มีออกซิเจน แต่การเจริญเติบโตและสร้างกรดเกิดขึ้นเมื่อได้รับพลาสมิด pRB85 ซึ่งมียีน *ldhA* ของ *R. oryzae* (สายพันธุ์ RB24) ดังนั้นเป็นไปได้ว่าพลาสมิด pRB85 ถูกรักษาไว้ในเซลล์แม้ว่าจะไม่ใส่ Ampicillin เพราะเซลล์จำเป็นต้องใช้ยีน *ldhA* บนพลาสมิดนี้เพื่อใช้ในการเจริญเติบโต ซึ่งคณะผู้วิจัยได้ทดลองการหมักแบบที่ไม่ใส่ Ampicillin ซึ่งถ้าหากเซลล์สามารถรักษาพลาสมิดไว้ได้โดยไม่ต้องใส่ยาปฏิชีวนะจะเป็นผลดีเช่นสามารถลดค่าใช้จ่ายและความยุ่งยากในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 2 แสดงผลผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ที่ได้จากการหมักในภาวะต่างๆ พบว่าในการหมักภาวะที่ 1 และ 2 ที่ออกซิเจนมีจำกัด และไม่มีออกซิเจนตามลำดับ *E. coli* สายพันธุ์ RB24 สามารถผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ได้แม้ไม่ใส่ Ampicillin และดีกว่าใส่ Ampicillin ในอาหารเลี้ยงเชื้อ แสดงว่าพลาสมิดยังถูกรักษาไว้ในเซลล์แม้ว่าไม่มีการใส่ยาปฏิชีวนะดังกล่าว ทั้งนี้เพราะเซลล์จำเป็นต้องใช้ยีน *ldhA* จาก *R. oryzae* บนพลาสมิดเพื่อการเจริญเติบโตในภาวะที่ออกซิเจนมีจำกัดหรือไม่มีออกซิเจน ส่วน Ampicillin เองอาจขัดขวางการสร้างกรดแลกติกในภาวะดังกล่าว ส่วนภาวะการหมักแบบที่ 3 และ 4 นั้นได้ให้ออกซิเจนในชั้นของ Pre-culture พบว่า *E. coli* สายพันธุ์ RB24 ผลิตกรดแลกติกได้น้อยมากหากไม่เติม Ampicillin ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเป็นไปได้ว่าในภาวะที่มีออกซิเจนนั้น เซลล์ไม่จำเป็นต้องใช้ยีน *ldhA* บนพลาสมิดจึงกำจัดพลาสมิดนี้ออกจากเซลล์ไป นอกจากนี้ยังพบว่าพลาสมิด pBluescript II KS(+) ไม่มีผลต่อระบบการผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ใน *E. coli* และการผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L จากสายพันธุ์อื่นๆเป็นตามที่คาดไว้ซึ่งได้กล่าวไว้ก่อนหน้านี้ ทั้งนี้จากการหมักทั้ง 4 รูปแบบ แสดงให้เห็นว่า *E. coli* สายพันธุ์ RB24 มีการแสดงออกของยีน *ldhA* บนพลาสมิด pRB85 โดยภาวะที่สามารถผลิตกรดแลกติกได้มากที่สุดคือการหมักในภาวะที่ 2 ที่ทั้ง Pre-culture และ Fermentation อยู่ในภาวะที่ไม่มีออกซิเจน และไม่เติม Ampicillin ในอาหารเลี้ยงเชื้อ อย่างไรก็ตาม ปริมาณกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ที่ผลิตได้ยังมีปริมาณน้อย (5.03 ± 4.149 g/L) และปริมาณไม่คงที่ในแต่ละชุดการทดลอง ดังนั้นจึงต้องมีการปรับปรุงการเลี้ยงเชื้อและสายพันธุ์ *E. coli* นี้ เพื่อให้ผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ให้ได้ปริมาณมากขึ้น โดยปัญหาที่คณะผู้วิจัยคาดว่าอาจเป็นสาเหตุให้ *E. coli* สายพันธุ์ RB24 ยังผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ได้น้อย และทางแก้ปัญหาดังกล่าวที่ใช้ในโครงการวิจัยนี้ได้แก่

(1.) การใช้พลาสมิด pRB85 ที่มียีน *ldhA* จาก *R. oryzae* เพื่อแสดงออกใน *E. coli* ยังไม่มีความเสถียร แม้ว่าการเลือกใช้การแสดงออกของยีนบนพลาสมิดนั้นมีข้อดีคือการตัดต่อยีนเข้าพลาสมิดจะมีสำเนา (copy number) มากกว่าตัดต่อยีนบนดีเอ็นเอที่มีเพียง 1 สำเนา ทำให้อาจมีการผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L มากขึ้น แต่พลาสมิดมีแนวโน้มจะหลุดออกจากเซลล์ได้ง่าย ในการทดลองนี้ในการผลิตกรดแลกติกในบางชุดการทดลองพบกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ของสายพันธุ์

RB24 น้อยมากคล้ายกับไม่มีพลาสมิด pRB85 ทำให้ปริมาณกรดแลกติกที่วัดได้ในทุกชุดการทดลองไม่มีความใกล้เคียงกัน ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าถ้ามีออกซิเจนเข้าไปในการทดลองเพียงเล็กน้อย เซลล์มีการกำจัดพลาสมิดออก ดังนั้นคณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาความเป็นไปได้ในการนำ *ldhA* ของ *R. oryzae* ตัดต่อลงบนดีเอ็นเอของ *E. coli* เพื่อเพิ่มความเสถียร

(2.) ภาวะการหมักยังไม่เหมาะสม ซึ่งปัญหานี้คณะผู้วิจัยได้ทำการหาภาวะหมักที่ดีขึ้น เพื่อใช้ภาวะการหมักนี้สำหรับการคัดเลือก *E. coli* ในขั้นตอนอื่นด้วย

(3.) ประสิทธิภาพในการแสดงออกของยีน *ldhA* จาก *R. oryzae* ใน *E. coli* ยังไม่ดีพอ ซึ่งปัญหานี้คณะผู้วิจัยได้ทำการปรับปรุงยีน *ldhA* ของ *R. oryzae* ที่อยู่บนพลาสมิดด้วยเทคนิค error-prone PCR ซึ่งเป็นเทคนิคที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบสุ่มบนยีน *ldhA* แล้วทำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ได้มากขึ้น

(4.) พลาสมิด pBluescript II KS(+) อาจไม่เหมาะสม คณะผู้วิจัยจึงได้ใช้พลาสมิด pUC19 เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L เปรียบเทียบกับการใช้พลาสมิด pBluescript II KS(+)

(5.) ปริมาณกลูโคสที่ใช้ในการหมักมากเกินไปซึ่งอาจไปขัดขวางกระบวนการสร้างกรดแลกติก จากผลการทดลองที่แสดงในตารางที่ 2 พบว่าในภาวะการหมักที่ 2 ซึ่งผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L จาก *E. coli* สายพันธุ์ RB24 ได้ดีที่สุดนั้นมีน้ำตาลกลูโคสเหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อมากกว่า 80 g/L ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการหาปริมาณกลูโคสที่เหมาะสมสำหรับการหมัก

4. การตัดต่อยีน *ldhA* ของ *R. oryzae* ลงบนดีเอ็นเอของ *E. coli*

เพื่อแก้ปัญหาความเสถียรของยีน *ldhA* จาก *R. oryzae* ซึ่งอยู่บนพลาสมิด คณะผู้วิจัยศึกษาความเป็นไปได้ในการนำยีน *ldhA* ของ *R. oryzae* ตัดต่อลงแทนที่ยีน *ldhA* บนดีเอ็นเอของ *E. coli* แต่เนื่องจาก *ldhA* ของ *R. oryzae* และ *E. coli* มีความเหมือนกันประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ซึ่งไม่เพียงพอเกิดกระบวนการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนดีเอ็นเอเพื่อให้ยีน *ldhA* ของ *R. oryzae* แทนที่ยีน *ldhA* บนดีเอ็นเอของ *E. coli* ได้ ดังนั้นจึงการใช้เทคนิค XO PCR ในการสร้างชิ้นส่วนดีเอ็นเอสำหรับใช้แทนที่ยีน *ldhA* บนโครโมโซมของ *E. coli* ซึ่งชิ้นส่วนดีเอ็นเอนี้ประกอบด้วยยีน *ldhA* ของ *R. oryzae* และในส่วนหัวและท้ายของดีเอ็นเอชิ้นนี้มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับส่วนด้านหน้าและด้านหลังของยีน *ldhA* ของ *E. coli* ข้างละประมาณ 700 คู่เบส โดยที่ตอนท้ายยีน *ldhA* ของ *R. oryzae* จะมีบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ *BsWI* เพื่อให้ใส่ marker คือยีน *chloramphenicol acetyltransferase (cat)* เพื่อให้ทำการคัดเลือกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาปฏิชีวนะ Chloramphenicol ดังแผนงานที่แสดงไว้ในรูปที่ 4 ขั้นแรกเป็นการสร้าง Fragment 1 โดยวิธี PCR ซึ่งใช้ดีเอ็นเอของ *E. coli* สายพันธุ์ JC13509 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ และใช้ไพรเมอร์

prRB40 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ 5'- CGCCCGGATCCCGCAGTTGCTGGAT- 3' (บริเวณขีดเส้นใต้แทนตำแหน่งตัดจำเพาะด้วยเอนไซม์ *Bam*HI) โดยไพรเมอร์นี้จับบริเวณ 700 คู่เบสเหนือ Start codon ของยีน *ldhA* ของ *E. coli* กับไพรเมอร์ prRB38 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์คือ 5'- CATTGACTGCTTCGATTCTATAAACTGAGAAGACTTTCTCCAGTGATGTTG-3' (บริเวณตัวเอียงเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกับบริเวณ 600 คู่เบสเหนือ Start codon ของยีน *ldhA* ของ *R. oryzae* บริเวณตัวหนาเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกับบริเวณเหนือ Start codon ของยีน *ldhA* ของ *E. coli*) ซึ่งไพรเมอร์นี้จับบริเวณเหนือ Start codon ของยีน *ldhA* ของ *E. coli* ทำให้เมื่อใช้ไพรเมอร์ prRB40 และ prRB38 ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้เป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 700 คู่เบส (รูปที่ 9 ก.) ส่วนวิธี Fragment 2 สร้างโดยวิธี PCR ซึ่งใช้ไพรเมอร์ของ *R. oryzae* สายพันธุ์ NRRL395 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ และใช้ไพรเมอร์ prRB36 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ 5'- CTCAGTTTATAGAATCGAAGCAGTCAATG - 3' (บริเวณตัวเอียงเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกับบริเวณ 600 คู่เบสเหนือ Start codon ของยีน *ldhA* ของ *R. oryzae*) โดยไพรเมอร์นี้จับบริเวณ 600 คู่เบสเหนือ Start codon ของยีน *ldhA* ของ *R. oryzae* กับไพรเมอร์ prRB37 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์คือ 5'- TGTGTCTGACGTACAATTCGATTGT -3 (บริเวณขีดเส้นใต้แทนตำแหน่งตัดจำเพาะด้วยเอนไซม์ *Bs*WI) โดยไพรเมอร์นี้จับบริเวณ 250 คู่เบสใต้ Stop codon ของยีน *ldhA* ของ *R. oryzae* ทำให้เมื่อใช้ไพรเมอร์ prRB36 และ prRB37 ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้เป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1800 คู่เบส (รูปที่ 9 ก.) ต่อจากนั้นทำการ XO PCR โดยเริ่มจาก Primerless PCR คือการทำ PCR ที่ใส่ Fragment 1 และ 2 แต่ไม่ใส่ไพรเมอร์ลงไปในการปฏิบัติ ซึ่งบริเวณที่เหมือนกันของ Fragment 1 และ 2 สามารถจับกันได้ (บริเวณตัวเอียงในไพรเมอร์ prRB38 และ 36) จากนั้นจึงเติมไพรเมอร์ prRB40 และ 37 ลงไปภายหลังเพื่อเพิ่มจำนวน โดยผลิตภัณฑ์ที่ถูกต้องเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 2500 คู่เบส (Fragment 1+2 ในรูปที่ 4, รูปที่ 9 ข.)

ปัญหาในการทดลองการทำ XO PCR เพื่อเชื่อม Fragment 1 และ 2 พบว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอทั้ง 2 ชิ้นมักไม่เชื่อมต่อกัน จึงได้มีการทดลองหาอุณหภูมิในการทำ PCR ขั้น annealing ที่เหมาะสมด้วยวิธี Gradient PCR ซึ่งได้ผลการทดลองดังรูป 9 ข. โดยได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ Fragment 1 และ 2 ซึ่งเชื่อมต่อกันขนาดประมาณ 2500 คู่เบส ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าอุณหภูมิในขั้น annealing ที่เหมาะสมอยู่ที่ 42-50°C ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 2500 คู่เบสนี้ได้ทำการสกัดออกจากเจลแล้วนำเข้าสู่พลาสมิด pCR[®] 2.1-TOPO[®] (Invitrogen, USA) ซึ่งตั้งชื่อพลาสมิดที่เกิดขึ้นว่า prRB86 เพื่อเก็บรักษาและเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังกล่าว

ต่อมาคณะผู้วิจัยได้ทำการ XO ครั้งที่ 2 เพื่อเชื่อมส่วนท้ายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนส่วนท้ายยีน *ldhA* ของ *E. coli* (Fragment 3 ในรูปที่ 4) กับ Fragment

1+2 ที่สังเคราะห์ได้เริ่มจากการเพิ่มจำนวน Fragment 1+2 บนพลาสมิด pRB86 โดยวิธี PCR ด้วยไพรเมอร์ prRB40 และ 37 และสร้าง Fragment 3 โดยวิธี PCR ซึ่งใช้โครโมโซมของ *E. coli* สายพันธุ์ JC13509 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ และใช้ไพรเมอร์ prRB39 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์คือ 5'-ACAATCGAATTGTACGTACGACACATCTTGCCGCTCCC CTGCATTCCAGG - 3' (บริเวณตัวเอียงเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกับบริเวณ 250 คู่เบสใต้ Stop codon ของยีน *ldhA* ของ *R. oryzae* บริเวณตัวหนาเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกับบริเวณใต้ Stop codon ของยีน *ldhA* ของ *E. coli* บริเวณขีดเส้นใต้แทนตำแหน่งตัดจำเพาะด้วยเอนไซม์ *Bs*WI) โดยไพรเมอร์นี้จับบริเวณใต้ Stop codon ของยีน *ldhA* ของ *E. coli* กับไพรเมอร์ prRB41 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์คือ 5'-GC GTCGGGATCCAGTAGTGGAG -3 (บริเวณขีดเส้นใต้แทนตำแหน่งตัดจำเพาะด้วยเอนไซม์ *Bam*HI) ซึ่งไพรเมอร์นี้จับบริเวณ 700 คู่เบสใต้ Stop codon ของยีน *ldhA* ของ *E. coli* ทำให้เมื่อใช้ไพรเมอร์ prRB39 และ prRB41 ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้เป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 700 คู่เบส (รูปที่ 9 ค.)

อย่างไรก็ตาม คณะผู้วิจัยไม่สามารถใช้เทคนิค XO PCR เพื่อเชื่อม Fragment 1+2 เข้ากับ Fragment 3 ได้ คณะผู้วิจัยได้พยายามแก้ไขโดยการทำ Gradient PCR เพื่อทดลองหาอุณหภูมิในการทำ PCR ขั้น annealing รวมถึงหาปรับเปลี่ยนภาวะต่างๆที่เหมาะสมในการทำ PCR ซึ่งก็ไม่สามารถแก้ไขปัญหาได้ ปัญหาที่ไม่สามารถสังเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้นี้อาจเกิดจากเครื่อง PCR ที่ทางสถาบันฯ มีอยู่เพียงเครื่องเดียวชำรุดที่ฝาเครื่องปิดไม่สนิท ทำให้ไม่สามารถทำ PCR ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดยาวได้ และความเสียหายนี้ไม่สามารถซ่อมได้ คณะผู้วิจัยได้พยายามหาทางใช้เครื่อง PCR ในหน่วยงานอื่นแต่ก็ล่าช้าและไม่สะดวก รวมทั้งการจัดหาอุปกรณ์เพื่อหาเครื่อง PCR เครื่องใหม่นั้นยุ่งยากและล่าช้า คณะผู้วิจัยจึงตัดสินใจหยุดทำการตัดต่อยีน *ldhA* ของ *R. oryzae* ลงบนดีเอ็นเอของ *E. coli* และมุ่งเน้นไปที่การใช้เทคนิคด้านพันธุศาสตร์โมเลกุลเพื่อปรับปรุงยีน *ldhA* ของ *R. oryzae* บนพลาสมิดและนำไปแสดงออกใน *E. coli* ซึ่งการใช้พลาสมิดนั้นมีข้อดีกว่าคือมีสำเนาสูง แต่ทั้งนี้เพื่อให้การแสดงออกของยีนบนพลาสมิดมีความเสถียรมากขึ้น คณะผู้วิจัยได้ทำการหาภาวะการเลี้ยงเชื้อและการหมักที่ *E. coli* สายพันธุ์ RB24 ผลิตรวดแลกติกไอโซเมอร์ L ได้และมีความใกล้เคียงกันในแต่ละชุดการทดลอง ซึ่งคณะผู้วิจัยพบว่าภาวะที่เหมาะสมที่สุดคือในขั้น Pre-culture ใช้อาหารเหลว Pre-culture ที่มีกลูโคสเข้มข้น 10g/L CaCO₃ เข้มข้น 5 g/L ปริมาตร 50 mL และเติม Ampicillin ที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 100 µg/mL เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C เขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 1 คืน ซึ่งการเลี้ยงเชื้อแบบนี้ทำให้เซลล์ตั้งต้นสำหรับการหมักมีจำนวนเพิ่มขึ้น แล้วจึงนำ Pre-culture ปริมาตร 2 mL ไปลงใน Fermentation broth ที่มีกลูโคสเข้มข้น 20 g/L CaCO₃ เข้มข้น 20 g/L ปริมาตร 50 mL และเติม Ampicillin ที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 100 µg/mL ทำการหมักโดยเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C ในภาวะที่ไม่มี

ออกซิเจนเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และภาว๋ะดังกล่าวได้ใช้เพื่อการคัดเลือกโคลนที่ผลิตกรดแลกติกได้ดีในขั้นต่อไปด้วย

5. การปรับปรุงสายพันธุ์ *E.coli* เพื่อผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L โดยใช้เทคนิค error-prone PCR

โครงการวิจัยนี้เลือกใช้เทคนิค error-prone PCR เพื่อให้ยีน *ldhA* จาก *R. oryzae* บนพลาสมิด pRB85 เกิดการกลายพันธุ์แบบสุ่ม ข้อดีของเทคนิคดังกล่าวคือการกลายพันธุ์เกิดขึ้นเฉพาะบริเวณยีน *ldhA* จาก *R. oryzae* ในขณะที่วิธีการสร้างการกลายพันธุ์แบบสุ่ม เช่น การฉายแสงยูวีหรือการใช้สารเคมีเหี่ยวนานั้น การกลายพันธุ์จะเกิดบนดีเอ็นเอส่วนใดก็ได้ไม่จำกัดเฉพาะยีน *ldhA* จาก *R. oryzae* บนพลาสมิด ซึ่งทำให้ยากต่อการติดตามหาตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์

หลักการของเทคนิค error-prone PCR คือในการทำ PCR มักเกิดการกลายพันธุ์ได้ง่ายเนื่องจากเอนไซม์ *Taq* polymerase ไม่มีกระบวนการตรวจสอบความถูกต้องที่เรียกว่า Proofreading ซึ่งต่างจากเอนไซม์ DNA polymerase ที่ใช้การสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยกระบวนการ Replication ทั้งนี้อัตราการกลายพันธุ์จะเกิดขึ้นในกระบวนการ PCR เมื่อปฏิกิริยาถูกรบกวน เช่น การเปลี่ยนความเข้มข้นของ dNTPs การเพิ่มความเข้มข้นของ divalent cations เช่น Mg^{2+} , Mn^{2+} หรือการเปลี่ยนแปลงรอบในการทำ PCR ซึ่งอัตราการเกิดการกลายพันธุ์อาจสูงถึง 2 ใน 1000 คู่เบส ในโครงการวิจัยนี้ใช้วิธี error-prone PCR โดยการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ Mg^{2+} และการเติม Mn^{2+} ซึ่ง Mg^{2+} นั้นเป็น cofactor ของเอนไซม์ *Taq* polymerase ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ Mg^{2+} หรือการเติม Mn^{2+} ทำให้ *Taq* polymerase ทำงานผิดพลาดมากขึ้นส่งผลให้เกิดอัตราการกลายพันธุ์สูงขึ้น ในขั้นต้นคณะผู้วิจัยได้หาภาว๋ะที่เหมาะสมในการทำ error-prone PCR เมื่อใช้ pRB85 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบและใช้ไพรเมอร์ prRB33 กับ prRB34 โดยใช้ $MgCl_2$ ที่ความเข้มข้นต่างๆตั้งแต่ 0.25 mM ถึง 1.75 M และ $MnCl_2$ ที่ความเข้มข้นต่างๆตั้งแต่ 0.05 mM ถึง 0.35 mM พบว่าเกิดผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้ $MgCl_2$ ความเข้มข้น 0.25 mM เป็นต้นไป และ $MnCl_2$ ความเข้มข้น 0.05 mM เป็นต้นไป โดยผลิตภัณฑ์ PCR มีปริมาณแตกต่างกันไปในปฏิกิริยาใช้ $MgCl_2$ และ $MnCl_2$ ที่ความเข้มข้นต่างกัน (รูปที่ 10) ในการทำ error-prone PCR ในเวลาต่อมาคณะผู้วิจัยเลือกใช้ $MgCl_2$ ที่ความเข้มข้น 1.25 mM และ $MnCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0.05 mM ในการทำ error-prone PCR โดยผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการทำ error-prone PCR นี้ได้นำไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III เพื่อนำเข้าพลาสมิด pBluescript II KS(+) แล้วใส่เข้า *E.coli* สายพันธุ์ RB7 เพื่อทำการคัดเลือกหาโคลนของแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติกในปริมาณมาก ในการคัดเลือกรุ่นต้นนำโคลนนี้สีขาวจากอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่มี Ampicillin และ X-gal มาขีดลงบนอาหารแข็ง Cultivation plate ที่ผสม $CaCO_3$ แล้วบ่มที่ 37 °C

ในภาวะที่ไม่มีออกซิเจน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตขนาด clear zone โดยคณะผู้วิจัยได้ทำการคัดเลือกโคโลนีบางโคโลนีที่มี clear zone ขนาดใหญ่กว่า clear zone ของ *E. coli* สายพันธุ์ RB24 ย้ายไปเลี้ยงลงบน Cultivation slant ที่มี Ampicilin ความเข้มข้นสุดท้าย 100 µg/mL จากนั้นนำโคโลนีบน Cultivation slant ถ่ายลงในอาหารเหลว Pre-culture ที่มีกลูโคสเข้มข้น 10 g/L CaCO₃ เข้มข้น 5 g/L ปริมาตร 50 mL เติม Ampicilin ที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 100 µg/mL เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C เขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 1 คืน แล้วจึงนำ Pre-culture ปริมาตร 2 mL โดยเจือจางให้มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นประมาณ 10⁶ เซลล์ ใส่ลงใน Fermentation broth ที่มีกลูโคสเข้มข้น 20 g/L CaCO₃ เข้มข้น 20 g/L ปริมาตร 50 mL และเติม Ampicilin ที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 100 µg/mL ทำการหมักที่อุณหภูมิ 37 °C ในภาวะที่ไม่มีออกซิเจนเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งผลการทดลองที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 3

ผลการทดลองที่แสดงไว้ในตารางที่ 3 พบว่า เมื่อทดสอบการหมักโดยใช้น้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 20 g/L ในภาวะที่ไม่มีออกซิเจน สายพันธุ์ที่คัดเลือกจากการทำ error-prone PCR หลายสายพันธุ์สามารถผลิตกรดแลกติกได้ในปริมาณที่สูงกว่า *E. coli* สายพันธุ์ RB24 ประมาณ 6-7 เท่า โดยเฉพาะสายพันธุ์ TW10 ที่สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด ทั้งนี้มีน้ำตาลกลูโคสเหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่มากนัก ทั้งนี้คาดว่าสายพันธุ์เหล่านี้มีการกลายพันธุ์บนบริเวณยีน *ldhA* จาก *R. oryzae* บนพลาสมิด ซึ่งต้องทำการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *ldhA* ด้วยวิธี DNA sequencing ต่อไป

6. ผลของพลาสมิดต่อการผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ใน *E. coli*

คณะผู้วิจัยทำการตัดยีน *ldhA* ของ *R. oryzae* ตัดต่อเข้าพลาสมิด pUC19 แล้วนำเข้า *E. coli* สายพันธุ์ RB7 โดยสายพันธุ์นี้มีชื่อว่า TW8 นำมาเปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L กับ *E. coli* สายพันธุ์ RB24 ที่ยีน *ldhA* ของ *R. oryzae* อยู่บนพลาสมิด pBluescript II KS(+) ในภาวะการหมักดังที่ใช้ในการทดลองก่อนหน้านี้ (ระบุไว้ในข้อ 3 และ 5 โดยมีน้ำตาลกลูโคสในการหมักเริ่มต้น 20 g/L CaCO₃ เข้มข้น 20 g/L ในภาวะที่ไม่มีออกซิเจน) พบว่า *E. coli* สายพันธุ์ TW8 ผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ได้มากกว่าสายพันธุ์ RB24 เกือบ 4 เท่า (ตารางที่ 4) ในขณะที่พลาสมิด pUC19 เปล่ามีผลต่อระบบในเซลล์ไม่ต่างจากพลาสมิด pBluescript II KS(+) เปล่า (เปรียบเทียบสายพันธุ์ TW9 กับ RB29) การที่ *E. coli* สายพันธุ์ TW8 ผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ได้ดีกว่าสายพันธุ์ RB24 อาจเกิดจากพลาสมิด pUC19 มีขนาดเล็กกว่าและมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ซับซ้อนน้อยกว่า pBluescript II KS(+) (รูปที่ 5) ทำให้พลาสมิด pAOY8 (พลาสมิด pUC19 ที่มียีน *ldhA* ของ *R. oryzae*) มีการแบ่งตัวได้เร็วกว่าพลาสมิด pRB85 (พลาสมิด pBluescript II KS(+) pUC19 ที่มียีน *ldhA* ของ *R. oryzae*) ส่งผลให้สำเนาของ ยีน *ldhA* ของ *R. oryzae* ในสาย

พันธุ์ TW8 มีมากกว่าและผลิตเอนไซม์ lactate dehydrogenase A เพื่อใช้ในการผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ได้มากกว่า

นอกจากนี้คณะผู้วิจัยได้ทำ error-prone PCR โดยใช้พลาสมิด pRB85 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ โดยไว้ทำการทดลองเหมือนที่ระบุไว้ในข้อ 5 แต่เปลี่ยนไปใช้พลาสมิด pUC19 แทน pBluescript II KS(+) สายพันธุ์ที่ได้รับการคัดเลือกเนื่องจากเกิด clear zone ใหญ่กว่า *E. coli* สายพันธุ์ RB24 ได้นำไปทำการหมักเพื่อหาปริมาณกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ที่ผลิตได้ ดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 5 โดยสายพันธุ์ที่คัดเลือกมาส่วนใหญ่สามารถผลิตกรดแลกติกได้ดีกว่า *E. coli* สายพันธุ์ RB24 แต่ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ TW8 ยกเว้นสายพันธุ์ TW11 ที่สามารถผลิตกรดแลกติกได้ดีกว่า *E. coli* สายพันธุ์ RB24 และ TW8 ประมาณ 8 และ 2 เท่า ตามลำดับ ซึ่งคณะผู้วิจัยได้ทำการสกัดพลาสมิด pAOY11 จากสายพันธุ์นี้เพื่อทำการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *ldhA* ด้วยวิธี DNA sequencing ต่อไป

7. ผลของปริมาณกลูโคสเริ่มต้นในอาหารสำหรับการหมักต่อการผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ใน *E. coli* ที่ได้รับการปรับปรุงสายพันธุ์

เพื่อทดสอบหาปริมาณกลูโคสเริ่มต้นที่เหมาะสมในการหมักสำหรับการผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ใน *E. coli* สายพันธุ์ที่ได้รับการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยเทคนิค error-prone PCR คณะผู้วิจัยได้ทำการคัดเลือกสายพันธุ์ TW10 และ TW11 มาทำการทดลองต่อ โดยทำการเลี้ยง *E. coli* สายพันธุ์ดังกล่าวและสายพันธุ์ที่ใช้เป็นตัวแปรควบคุมใน Cultivation slant จากนั้นถ่ายโคลนบน Cultivation slant ลงในอาหารเหลว Pre-culture ที่มีกลูโคสเข้มข้น 10g/L CaCO_3 เข้มข้น 5 g/L ปริมาตร 50 mL เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C เขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 1 คืน แล้วจึงนำ Pre-culture ปริมาตร 2 mL โดยเจือจางให้มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นประมาณ 10^6 เซลล์ ใส่ลงใน Fermentation broth ที่มีกลูโคสเข้มข้น 20 30 50 และ 70 g/L ตามลำดับ และมี CaCO_3 เข้มข้น 20 g/L ปริมาตร 50 mL ทำการหมักที่อุณหภูมิ 37 °C ในภาวะที่ไม่มีออกซิเจนเป็นเวลา 48 ชั่วโมง สำหรับสายพันธุ์ที่มีพลาสมิดได้เติม Ampicillin ที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 100 $\mu\text{g/mL}$ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อทุกขั้นตอน

จากผลการทดลองในตารางที่ 6 พบว่าปริมาณกลูโคสในเริ่มต้นในการหมักที่เหมาะสมที่สุดสำหรับสายพันธุ์ที่มียีน *ldhA* จาก *R. oryzae* บนพลาสมิด (RB24 และ TW8) และสายพันธุ์ที่มียีน *ldhA* จาก *R. oryzae* ที่ผ่านการทำ error-prone PCR (TW10 และ TW11) คือ 20 g/L โดยวิเคราะห์ได้จากความเข้มข้นของกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ที่ผลิตได้และค่า $Y_{P/S}$ เมื่อตรวจสอบความเข้มข้นของกลูโคสที่เหลือในอาหารพบว่าเซลล์สามารถนำกลูโคสไปใช้ได้น้อยกว่า 20 g/L ในอาหารเลี้ยงเชื้อทุกความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น ดังนั้นหากใช้ปริมาณกลูโคสเริ่มต้นในการหมัก

มากกว่า 20 g/L นอกจากสิ้นเปลืองแล้ว ปริมาณกลูโคสที่เหลือมากในอาหารเลี้ยงเชื้ออาจไปยับยั้งกระบวนการผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L โดยยีน *ldhA* ของ *R. oryzae* อีกด้วย

8. การเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ldhA* ของ *R. oryzae* จากสายพันธุ์ที่ผ่านการทำ error-prone PCR

เมื่อทำการสกัดพลาสมิด pAOY10 และ pAOY11 จาก *E. coli* สายพันธุ์ TW10 และ TW11 ตามลำดับ จากนั้นทำการส่งตรวจการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *ldhA* จาก *R. oryzae* ที่อยู่บนพลาสมิดด้วยวิธี DNA Sequencing (Macrogen, Korea) พบว่าสำหรับพลาสมิด pAOY10 มีการเปลี่ยนแปลงที่นิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง 554 จาก C เป็น T ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนจาก Alanine เป็น Valine ซึ่งบริเวณนี้เป็นบริเวณ dimer of dimer interface ของเอนไซม์ในกลุ่ม LDH-MDH-like Superfamily โดยปกติแล้วเอนไซม์ในกลุ่มนี้จะพร้อมทำงานเมื่ออยู่ในรูป tetramer โดยเอนไซม์จะอยู่ในรูป dimer ก่อน แล้ว dimer 2 ชุดจะรวมตัวกันเป็น tetramer การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นบริเวณ *ldhA* จาก *R. oryzae* ที่อยู่บนพลาสมิด pAOY10 อาจทำให้ dimer ของเอนไซม์ lactate dehydrogenase A ทั้ง 2 ชุดรวมตัวเป็น tetramer เร็วขึ้นหรืออาจทำให้ dimer ทำงานได้โดยไม่ต้องรวมตัวเป็น tetramer ซึ่งส่งผลให้เอนไซม์ lactate dehydrogenase A ทำงานได้เร็วขึ้นสำหรับบนพลาสมิด pAOY11 พบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 524 เหนือ Start codon จาก A เป็น G ซึ่งตำแหน่งนี้ไม่ได้อยู่ในส่วนยีน *ldhA*, promoter หรือ ribosome binding site คาดว่าการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งดังกล่าวแล้วทำให้มีการผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ดีขึ้น อาจเกิดจากการการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เกิดขึ้นช่วยเอนไซม์ RNA polymerase ทำงานได้ดีขึ้น เช่น อาจช่วยให้เอนไซม์ RNA polymerase จับบริเวณดังกล่าวได้ดีขึ้น หรือการช่วยเป็น enhancer ซึ่งส่งผลให้การสังเคราะห์ mRNA จากยีน *ldhA* ทำได้รวดเร็วและมีปริมาณมากขึ้น เป็นผลให้การสังเคราะห์เอนไซม์ lactate dehydrogenase A รวดเร็วและมีปริมาณมากขึ้นตามมา

ตารางที่ 2 ความเข้มข้นของกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ที่ผลิตได้และกลูโคสที่เหลือจาก *E. coli* สายพันธุ์ต่าง ๆ

สายพันธุ์ ^a	ยีน <i>ldhA</i> บนโครโมโซม <i>E. coli</i> ^b	พลาสมิด ^c	ภาวะการหมัก ^d	ความเข้มข้นกรดแลกติก ไอโซเมอร์ L ที่ผลิต(g/L)	ความเข้มข้นกลูโคสที่เหลือ (g/L)	Y _{P/L}
JC13509 (WT)	+	-	1	0.42 ± 0.080	81.33 ± 8.031	0.00
RB7	-	-	1	0.43 ± 0.083	98.43 ± 0.7638	0.00
RB24 (No Amp ^e)	-	pRB85	1	3.86 ± 4.011	91.93 ± 6.468	0.04
RB24	-	pRB85	1	1.80 ± 2.564	84.70 ± 1.908	0.02
RB29	-	pKS(+)	1	0.27 ± 0.110	81.67 ± 9.471	0.00
RB30	+	pRB85	1	0.35 ± 0.141	86.77 ± 13.536	0.00
RB31	+	pKS(+)	1	0.41 ± 0.078	86.30 ± 4.636	0.00
JC13509 (WT)	+	-	2	0.34 ± 0.015	78.20 ± 8.455	0.00
RB7	-	-	2	ND ^f	ND	ND
RB24 (No Amp ^e)	-	pRB85	2	5.03 ± 4.149	82.03 ± 6.062	0.05
RB24	-	pRB85	2	0.57 ± 0.238	85.60 ± 10.048	0.01
RB29	-	pKS(+)	2	0.34 ± 0.053	85.77 ± 11.075	0.00
RB30	+	pRB85	2	0.33 ± 0.015	82.30 ± 5.966	0.00
RB31	+	pKS(+)	2	0.36 ± 0.031	80.83 ± 9.963	0.00
JC13509 (WT)	+	-	3	0.31 ± 0.038	45.00 ± 5.340	0.00
RB7	-	-	3	0.22 ± 0.076	50.03 ± 4.834	0.00
RB24 (No Amp ^e)	-	pRB85	3	1.18 ± 1.341	47.27 ± 0.924	0.01
RB24	-	pRB85	3	1.74 ± 1.386	51.40 ± 3.538	0.02
RB29	-	pKS(+)	3	0.30 ± 0.042	45.53 ± 3.691	0.00
RB30	+	pRB85	3	0.32 ± 0.048	44.17 ± 4.990	0.00
RB31	+	pKS(+)	3	0.36 ± 0.072	47.80 ± 1.473	0.00
JC13509 (WT)	+	-	4	0.27 ± 0.038	33.20 ± 18.654	0.00
RB7	-	-	4	0.22 ± 0.125	46.00 ± 12.601	0.00
RB24 (No Amp ^e)	-	pRB85	4	0.25 ± 0.091	48.30 ± 3.560	0.00
RB24	-	pRB85	4	1.95 ± 1.517	53.83 ± 2.196	0.02
RB29	-	pKS(+)	4	0.20 ± 0.131	40.50 ± 18.357	0.00
RB30	+	pRB85	4	0.28 ± 0.049	46.87 ± 2.290	0.00
RB31	+	pKS(+)	4	0.34 ± 0.071	40.63 ± 8.165	0.00

^a ทุกสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองนี้ใช้สายพันธุ์ JC13509 เป็นสายพันธุ์ตั้งต้นและใช้เป็น wild type

^b + หมายถึงยีน *ldhA* บนโครโมโซม *E. coli* ไม่ถูกทำลายซึ่งก็คือ JC13509 ซึ่งเป็น wild type ส่วน RB30, RB31 ก็คือ JC13509 ที่มีพลาสมิด

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

^c - หมายถึง ไม่มีพลาสมิด pKS(+) หมายถึงพลาสมิด pBluescript II KS(+) pRB85 คือพลาสมิด pBluescript II KS(+) ที่มียีน *ldhA* จาก *R. oryzae*

^d ภาวะต่าง ๆ ที่ใช้ในการหมักเป็นไปตามที่แสดงในตารางที่ 1

^e ทุกสายพันธุ์ที่มีพลาสมิดเติม Ampicillin ในอาหารเลี้ยงเชื้อทุกขั้นตอนเพื่อรักษาพลาสมิดไว้ ยกเว้นสายพันธุ์ที่ระบุว่า RB24 (No Amp) คือ RB24 ที่ไม่ได้เติม Ampicillin ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

^f ND หมายถึงไม่ได้ทดลองเนื่องจาก RB7 โตได้น้อยมากในภาวะที่ไม่มีออกซิเจน

ตารางที่ 3 ความเข้มข้นของกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ที่ผลิตได้และกลูโคสที่เหลือจาก *E. coli* สายพันธุ์ที่มียีน *ldhA* จาก *R. oryzae* ซึ่งผ่านการทำ error-prone PCR และตัดต่อลงบนพลาสมิด pBluescript II KS(+)

สายพันธุ์ ^a	ความเข้มข้นของกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ที่ผลิต (g/L)	ความเข้มข้นของกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ (g/L) ^b	Y _{P/S}
JC13509 (WT)	0.10 ± 0.0404	8.47 ± 0.3907	0.00
RB7	0.26 ± 0.1498	8.84 ± 1.8382	0.01
RB24	1.39 ± 0.0300	5.36 ± 0.6040	0.07
TW4	1.61 ± 0.4216	11.13 ± 2.3617	0.08
TW10	7.65 ± 0.2517	3.02 ± 2.3210	0.38
TW16	0.21 ± 0.0500	6.19 ± 0.5283	0.01
TW17	6.10 ± 0.7905	2.57 ± 0.6590	0.30
TW18	6.02 ± 0.4356	1.69 ± 0.5302	0.30
TY1	1.87 ± 0.5100	10.13 ± 3.2498	0.09

^a ทุกสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองนี้ใช้สายพันธุ์ JC13509 เป็นสายพันธุ์ตั้งต้นและใช้เป็น wild type

^b ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นคือ 20 g/L

ตารางที่ 4 ความเข้มข้นของกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ที่ผลิตได้และกลูโคสที่เหลือ เมื่อใช้พลาสมิด pBluescript II KS(+) หรือ pUC19 ใน *E. coli*

สายพันธุ์ ^a	ยีน <i>ldhA</i> บนพลาสมิด ^b	ชนิดของพลาสมิด ^c	ความเข้มข้นของกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ที่ผลิต (g/L)	ความเข้มข้นของกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ (g/L) ^d	Y _{P/S}
JC13509 (WT)	-	-	0.10 ± 0.0404	8.47 ± 0.3907	0.00
RB7	-	-	0.26 ± 0.1498	8.84 ± 1.8382	0.01
RB24	+	pKS(+)	1.39 ± 0.0300	5.36 ± 0.6040	0.07
TW8	+	pUC19	5.04 ± 0.6920	3.08 ± 1.4566	0.25
RB29	-	pKS(+)	0.58 ± 0.2268	4.71 ± 4.3932	0.03
TW9	-	pUC19	0.22 ± 0.0751	0.05 ± 0.0416	0.01

^a ทุกสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองนี้ใช้สายพันธุ์ JC13509 เป็นสายพันธุ์ตั้งต้นและใช้เป็น wild type

^b + หมายถึงมีการตัดต่อยีน *ldhA* จาก *R. oryzae* ลงบนพลาสมิด

- หมายถึงไม่มีการตัดต่อยีน *ldhA* จาก *R. oryzae* ลงบนพลาสมิด(พลาสมิดเปล่า)

^c - หมายถึง ไม่มีพลาสมิด

pKS(+) หมายถึงพลาสมิด pBluescript II KS(+)

pUC19 หมายถึงพลาสมิด pUC19

^d ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นคือ 20 g/L

ตารางที่ 5 ความเข้มข้นของกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ที่ผลิตได้และกลูโคสที่เหลือจาก *E. coli* สายพันธุ์ที่มียีน *ldhA* จาก *R. oryzae* ซึ่งผ่านการทำ error-prone PCR และตัดต่อลงบนพลาสมิด pUC19

สายพันธุ์ ^a	ความเข้มข้นของกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ที่ผลิต (g/L)	ความเข้มข้นของกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ (g/L) ^b	Y _{P/S}
JC13509 (WT)	0.10 ± 0.0404	8.47 ± 0.3907	0.00
RB7	0.26 ± 0.1498	8.84 ± 1.8382	0.01
RB24	1.39 ± 0.0300	5.36 ± 0.6040	0.07
TW8	5.04 ± 0.6920	3.08 ± 1.4566	0.25
TW1	6.73 ± 1.1015	3.50 ± 3.1200	0.34
TW11	8.98 ± 0.2623	3.04 ± 10.563	0.45
TW14	4.93 ± 0.5977	4.00 ± 3.1305	0.25
TW15	3.01 ± 0.5774	3.58 ± 2.3343	0.15
TW19	6.07 ± 0.4706	1.23 ± 1.0729	0.30
TW20	6.09 ± 1.8031	3.83 ± 0.6366	0.30

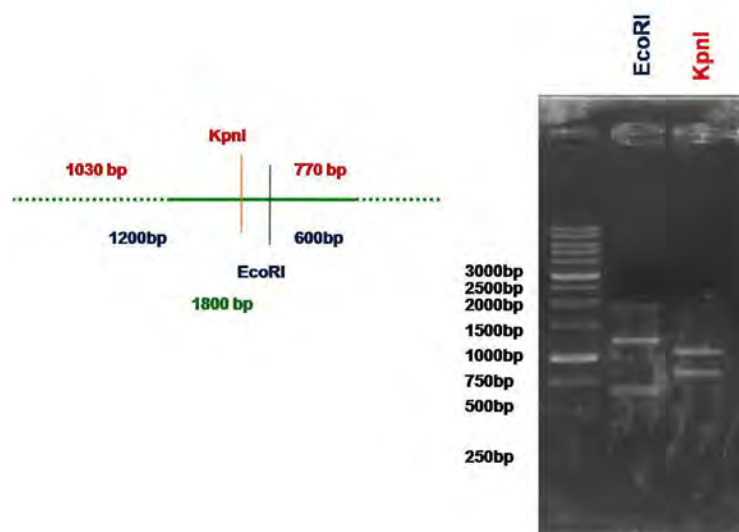
^a ทุกสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองนี้ใช้สายพันธุ์ JC13509 เป็นสายพันธุ์ตั้งต้นและใช้เป็น wild type

^b ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นคือ 20 g/L

ตารางที่ 6 ความเข้มข้นของกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ที่ผลิตได้และกลูโคสที่เหลือจาก *E. coli* สายพันธุ์ต่าง ๆ เมื่อใช้ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นในการหมักต่างกัน

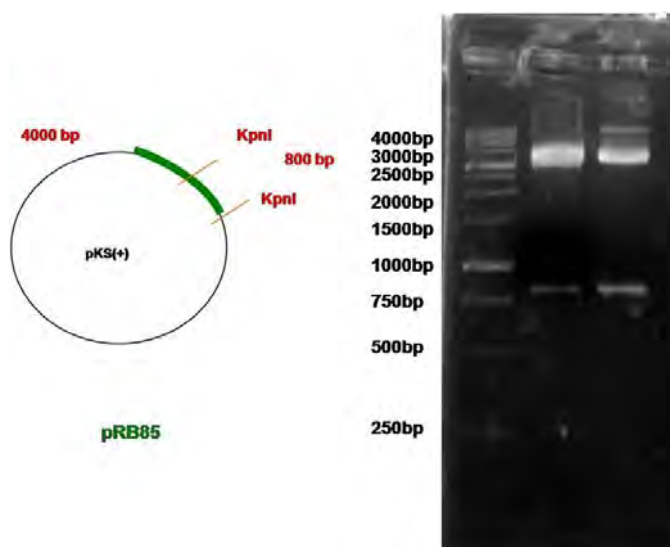
ความเข้มข้นของ กลูโคสเริ่มต้น (g/L)	สายพันธุ์ ^a	ความเข้มข้นของกรดแลกติก ไอโซเมอร์ L ที่ผลิต (g/L)	ความเข้มข้นของกลูโคสที่เหลือใน อาหารเลี้ยงเชื้อ (g/L)	Y _{PS}
20	JC13509 (WT)	0.10 ± 0.0404	8.47 ± 0.3907	0.00
	RB7	0.26 ± 0.1498	8.84 ± 1.8382	0.01
	RB24	1.39 ± 0.0300	5.36 ± 0.6040	0.07
	RB29	0.58 ± 0.2268	4.71 ± 4.3932	0.03
	TW8	5.04 ± 0.6920	3.08 ± 1.4566	0.25
	TW9	0.22 ± 0.0751	0.05 ± 0.0416	0.01
	TW10	7.65 ± 0.2517	3.02 ± 2.3210	0.38
	TW11	8.98 ± 0.2623	3.04 ± 10.563	0.45
30	JC13509 (WT)	0.12 ± 0.0071	20.40 ± 0.9899	0.00
	RB7	0.69 ± 0.8061	20.35 ± 1.0607	0.02
	RB24	2.00 ± 1.0182	13.90 ± 9.6167	0.07
	RB29	1.37 ± 0.7707	20.35 ± 1.3435	0.05
	TW8	3.52 ± 0.7539	18.87 ± 0.2517	0.12
	TW9	0.12 ± 0.0283	11.45 ± 0.3536	0.00
	TW10	6.77 ± 0.6243	11.79 ± 6.8577	0.23
	TW11	7.92 ± 0.7223	15.07 ± 0.7095	0.26
50	JC13509 (WT)	0.14 ± 0.0212	31.40 ± 0.4243	0.00
	RB7	0.66 ± 0.0141	31.85 ± 1.3435	0.01
	RB24	1.63 ± 0.5374	20.19 ± 13.3557	0.03
	RB29	0.19 ± 0.0495	37.05 ± 9.6874	0.00
	TW8	3.69 ± 0.1058	30.40 ± 7.3539	0.07
	TW9	0.20 ± 0.0778	23.90 ± 0.5657	0.00
	TW10	5.88 ± 0.6716	30.20 ± 1.3077	0.12
	TW11	7.34 ± 0.2358	21.70 ± 7.0682	0.15
70	JC13509 (WT)	0.10 ± 0.0212	33.00 ± 13.5169	0.00
	RB7	0.14 ± 0.0354	24.80 ± 15.0725	0.00
	RB24	2.98 ± 2.6729	48.70 ± 2.9698	0.04
	RB29	0.20 ± 0.1273	36.35 ± 14.7785	0.00
	TW8	2.05 ± 1.3665	38.83 ± 2.0051	0.03
	TW9	0.21 ± 0.0849	36.20 ± 7.0711	0.00
	TW10	4.57 ± 0.6596	25.55 ± 5.3033	0.07
	TW11	6.62 ± 0.2427	30.63 ± 0.8505	0.09

^a ทุกสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองนี้ใช้สายพันธุ์ JC13509 เป็นสายพันธุ์ตั้งต้นและใช้เป็น wild type



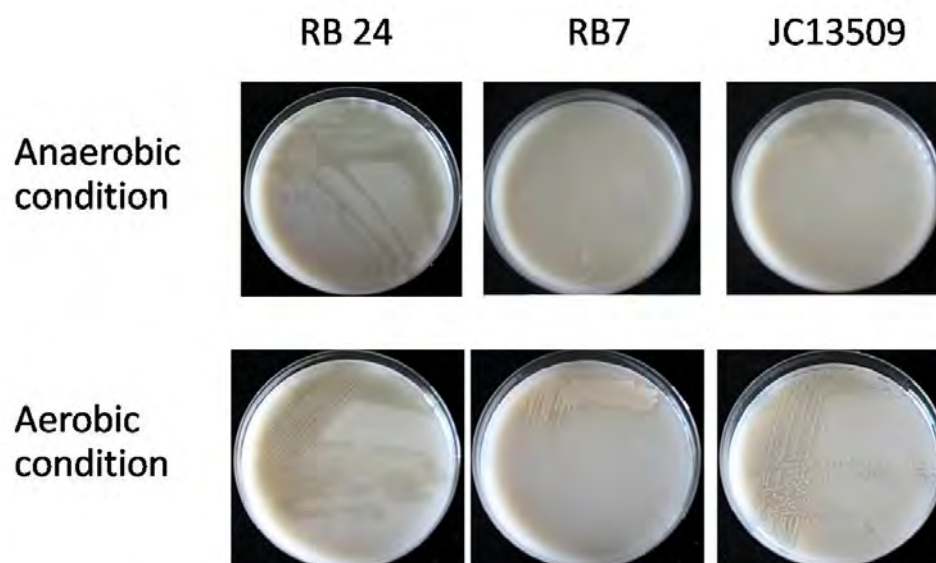
รูปที่ 6 การตรวจสอบความถูกต้องของผลิตภัณฑ์ PCR ที่มียีน *ldhA* ของ *R. oryzae* ก่อนตัดต่อเข้าสู่พลาสมิด

ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีขนาดประมาณ 1800 คู่เบส ซึ่งประกอบด้วยยีน *ldhA*, promoter และ ribosome binding site ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1200 และ 600 คู่เบส และเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *KpnI* ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1030 และ 770 คู่เบส โดยใช้ Agarose Electrophoresis ในการแยกขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ที่ Agarose มีความเข้มข้น 1% w/v



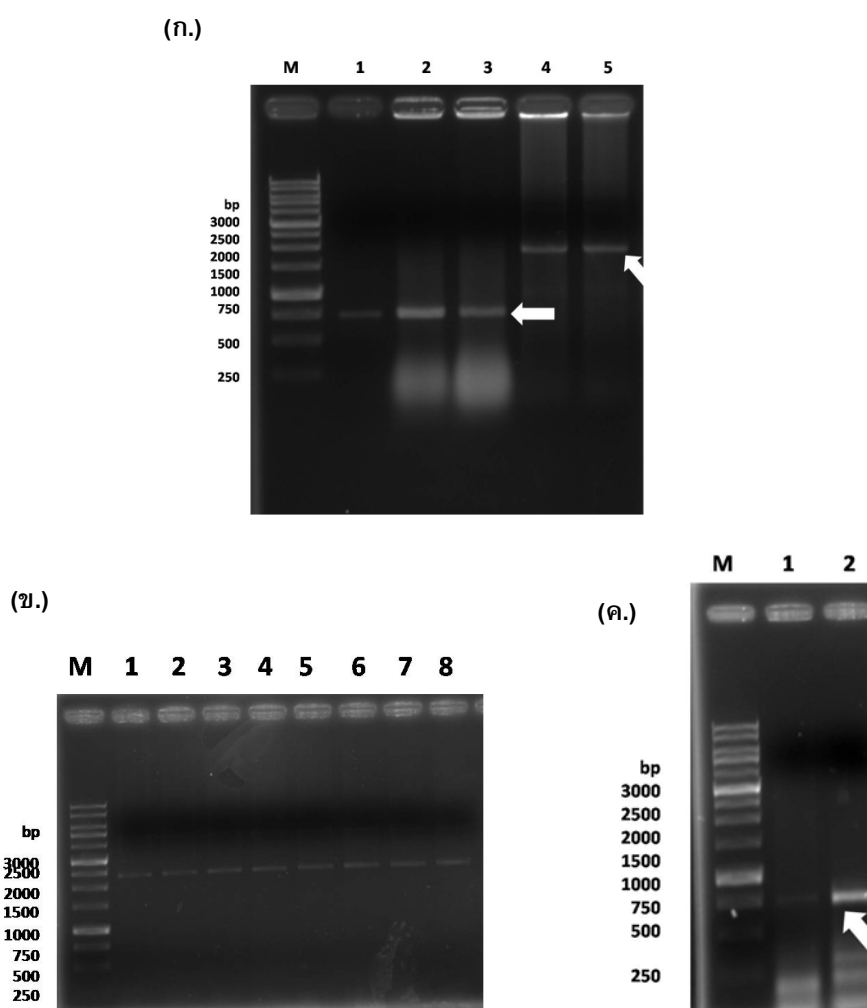
รูปที่ 7 การตรวจสอบพลาสมิดที่มียีน *IdhA* ของ *R. oryzae*

เมื่อนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ซึ่งมีขนาดประมาณ 1800 คู่เบส ใส่เข้าสู่พลาสมิด pBlueScript II KS(+) หากตัดพลาสมิดที่มียีน *IdhA* จาก *R. oryzae* ด้วยเอนไซม์ *KpnI* ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 4000 และ 800 คู่เบส ซึ่งสามารถตรวจสอบได้ด้วยเทคนิค Agarose Electrophoresis โดยรูปเจลที่แสดงในรูปเป็น Agarose 1% w/v โดยพลาสมิดที่พบว่ามียีน *IdhA* ของ *R. oryzae* นี้มีชื่อเรียกว่า pRB85



รูปที่ 8 การเจริญเติบโตและ **clear zone** ของ *E.coli* เมื่อได้รับพลาสมิดที่มียีน *ldhA* ของ *R. oryzae*

แฉกบนเป็นการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิด Cultivation ในภาวะที่ไม่มีออกซิเจน แฉกล่างเป็นการเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีออกซิเจน ทั้งการเลี้ยงในทั้งสองภาวะนี้ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 วัน โดยสายพันธุ์ RB7 ซึ่งยีน *ldhA* บนดีเอ็นเอถูกทำลาย สามารถเจริญเติบโตได้ดีในภาวะที่มีออกซิเจนเท่านั้น ในขณะที่สายพันธุ์ RB24 (RB7 ที่มี plasmid pRB85) และ JC13509 (wild type) เจริญเติบโตได้ดีทั้งในภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจนและสร้าง **clear zone** ซึ่งแสดงว่ามีการสร้างกรดและได้นำไปทดสอบในขั้นต่อไปว่ามีการผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ปริมาณเท่าใด



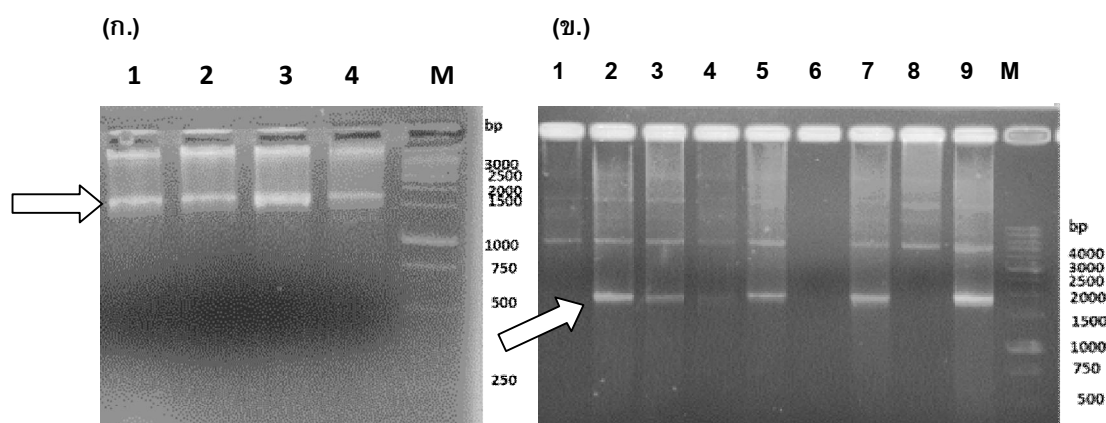
รูปที่ 9 การทำ XO PCR เพื่อสร้างชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มียีน *ldhA* ของ *R. oryzae* สำหรับแทนที่ยีน *ldhA* บนดีเอ็นเอของ *E. coli*

เมื่อใช้ Agarose Electrophoresis ที่ Agarose มีความเข้มข้น 1% w/v ในการแยกขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ และ M คือ 1 kb DNA Marker

(ก.) Fragment 1 ขนาดประมาณ 700 คู่เบส (Lane 1-3) เกิดจาก PCR โดยใช้ดีเอ็นเอของ *E. coli* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบและใช้ไพรเมอร์ prRB40 และ 38 และ Fragment 2 ขนาดประมาณ 1800 คู่เบส (Lane 4-5) เกิดจาก PCR โดยใช้โครโมโซม *R. oryzae* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบและใช้ไพรเมอร์ prRB36 และ 37

(ข.) การหาอุณหภูมิในขั้น annealing ที่เหมาะสมในการทำ XO PCR Fragment 1 และ 2 โดยใช้อุณหภูมิ 50°C (Lane 1), 54.9°C (Lane 2), 48.3°C (Lane 3), 47°C (Lane 4), 45.1°C (Lane 5), 42.5°C (Lane 6), 42.5°C (Lane 7) และ 42°C (Lane 8)

(ค.) Fragment 3 ขนาดประมาณ 700 คู่เบส (Lane 1-2) เกิดจาก PCR โดยใช้ดีเอ็นเอของ *E. coli* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบและใช้ไพรเมอร์ prRB39 และ 41



รูปที่ 10 การหาภาวะที่เหมาะสมในการทำ error-Prone PCR ของยีน *IdhA* จาก *R. oryzae* โดยใช้พลาสมิด pRB85 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบโดยทำการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ $MgCl_2$ และ $MnCl_2$ เมื่อใช้ Agarose Electrophoresis ที่ Agarose มีความเข้มข้น 1% w/v ในการแยกขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ และ M คือ 1 kb DNA Marker

- (ก.) Lane 1 ใช้ $MgCl_2$ ความเข้มข้น 1.0 mM และ $MnCl_2$ ความเข้มข้น 0.4 mM
 Lane 2 ใช้ $MgCl_2$ ความเข้มข้น 0.75 mM และ $MnCl_2$ ความเข้มข้น 0.3 mM
 Lane 3 ใช้ $MgCl_2$ ความเข้มข้น 0.5 mM และ $MnCl_2$ ความเข้มข้น 0.2 mM
 Lane 4 ใช้ $MgCl_2$ ความเข้มข้น 0.25 mM และ $MnCl_2$ ความเข้มข้น 0.1 mM
- (ข.) Lane 1 ใช้ น้ำแทนบัฟเฟอร์ในปฏิกิริยา PCR
 Lane 2 ใช้ บัฟเฟอร์สำเร็จรูปที่มี $MgCl_2$ 15 mM
 Lane 3 ใช้ $MgCl_2$ ความเข้มข้น 0.75 mM และ $MnCl_2$ ความเข้มข้น 0.1 mM
 Lane 4 ใช้ $MgCl_2$ ความเข้มข้น 0.75 mM และ $MnCl_2$ ความเข้มข้น 0.3 mM
 Lane 5 ใช้ $MgCl_2$ ความเข้มข้น 0.75 mM และ $MnCl_2$ ความเข้มข้น 0.4 mM
 Lane 6 ใช้ $MgCl_2$ ความเข้มข้น 0.75 mM และ $MnCl_2$ ความเข้มข้น 0.5 mM
 Lane 7 ใช้ $MgCl_2$ ความเข้มข้น 1.75 mM และ $MnCl_2$ ความเข้มข้น 0.05 mM
 Lane 8 ใช้ $MgCl_2$ ความเข้มข้น 1.5 mM และ $MnCl_2$ ความเข้มข้น 0.05 mM
 Lane 9 ใช้ $MgCl_2$ ความเข้มข้น 1.25 mM และ $MnCl_2$ ความเข้มข้น 0.05 mM

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

1. สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผล

จากผลการทดลองในโครงการวิจัยนี้พบว่าเมื่อนำยีน *ldhA* ของ *R. oryzae* ติดต่อเข้าสู่พลาสมิด pBluescript II KS(+) ยีน *ldhA* นี้สามารถแสดงออกได้ใน *E. coli* ที่มีการทำลายยีน *ldhA* บนดีเอ็นเอของ *E. coli* (สายพันธุ์ RB24) โดยเมื่อทำการหมักในภาวะต่างๆในระดับ Shake flask เมื่อใช้กลูโคสเริ่มต้นในการหมัก 100 g/L พบว่าการหมักในภาวะที่ไม่มีออกซิเจนโดยการไม่เติม Ampicillin ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อพบการผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L มากที่สุดที่ความเข้มข้น 5.03 ± 4.149 g/L ซึ่งการที่เซลล์สามารถรักษาพลาสมิดไว้ได้โดยไม่ต้องใส่ Ampicillin ในอาหารเลี้ยงเชื้อในภาวะนี้แสดงว่ายีน *ldhA* มีความสำคัญต่อ *E. coli* ในภาวะที่ไม่มีออกซิเจน และสายพันธุ์ RB24 ต้องการยีน *ldhA* ของ *R. oryzae* บนพลาสมิดเพื่อชดเชยการสูญเสีย *ldhA* บนดีเอ็นเอของ *E. coli* อย่างไรก็ตาม การผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ยังมีปริมาณน้อยและกลูโคสเหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณมากหลังทำการหมัก 48 ชั่วโมง ซึ่งกลูโคสในปริมาณนี้อาจยับยั้งกระบวนการผลิตกรดแลกติก นอกจากนี้ยังพบว่าการหมักในภาวะที่ไม่มีออกซิเจนโดยการไม่เติม Ampicillin ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อพบการผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ในแต่ละชุดการทดลองมีความแตกต่างกันค่อนข้างมาก ซึ่งอาจเกิดจากการสูญเสียพลาสมิดหากมีออกซิเจนเข้าสู่ระบบการทดลอง ดังนั้นคณะผู้วิจัยได้ทำการทดสอบหาภาวะการหมักที่เหมาะสมกว่าสำหรับการใช้คัดเลือก *E. coli* สายพันธุ์ที่ผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ได้ดีในขั้นต่อไป ซึ่งพบว่าภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L จาก *E. coli* สายพันธุ์ RB24 คือการใช้อาหารเหลว Pre-culture ที่มีกลูโคสเข้มข้น 10g/L CaCO_3 เข้มข้น 5 g/L และเติม Ampicillin ที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 100 $\mu\text{g/mL}$ ทำเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C เขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 1 คืน เพื่อเพิ่มเซลล์ตั้งต้นสำหรับการหมัก จากนั้นใช้ Fermentation broth ที่มีกลูโคสเข้มข้น 20 g/L CaCO_3 เข้มข้น 20 g/L และเติม Ampicillin ที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 100 $\mu\text{g/mL}$ ทำการหมักโดยเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C ในภาวะที่ไม่มีออกซิเจนเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยการหมักด้วยภาวะนี้ได้ผลผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ในการทดลองแต่ละชุดการทดลองมีความคงที่มากขึ้น

เพื่อให้ผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L จาก *E. coli* มีความเสถียรมากขึ้น คณะผู้วิจัยได้พยายามติดต่อยีน *ldhA* จาก *R. oryzae* แทนที่ยีน *ldhA* บนดีเอ็นเอของ *E. coli* แต่เนื่องจากยีน *ldhA* ของ *R. oryzae* และ *E. coli* มีความเหมือนกันประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ซึ่งไม่เพียงพอต่อกระบวนการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนดีเอ็นเอเพื่อให้ยีน *ldhA* ของ *R. oryzae* แทนที่ยีน *ldhA* บนดีเอ็นเอของ *E. coli* ได้ คณะผู้วิจัยได้ใช้เทคนิค XO-PCR ในการสร้างชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ประกอบด้วยยีน *ldhA* ของ *R. oryzae* และในส่วนหัวและท้ายของดีเอ็นเอชิ้นนี้จะมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับส่วนด้านหน้าและด้านหลังของยีน *ldhA* ของ *E. coli* โดยชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่

สังเคราะห์ได้เพื่อนำไปใช้แทนที่ยีน *ldhA* บนดีเอ็นเอของ *E. coli* ควรมีขนาดประมาณ 3200 คู่เบส อย่างไรก็ตาม จากปัญหาเครื่องมือที่ใช้ในการทดลองชำรุดและไม่สามารถซ่อมได้ ทำให้ไม่สามารถใช้สร้างชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดยาวได้ การทดลองส่วนนี้จึงไม่สามารถดำเนินต่อไปได้

สำหรับการใช้เทคนิค error-prone PCR เพื่อทำให้ยีน *ldhA* ของ *R. oryzae* เกิดการกลายพันธุ์แบบสุ่ม จากนั้นทำการตัดต่อผลิตภัณฑ์จากการทำ error-prone PCR ตัดต่อเข้าสู่พลาสมิดและนำเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ RB7 เมื่อทำการคัดเลือกพบว่าเทคนิคดังกล่าวช่วยให้การผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L สูงกว่า *E. coli* สายพันธุ์ RB24 ได้ 6-7 เท่าเมื่อใช้พลาสมิด pBluescript II KS(+) และพบสายพันธุ์ที่ผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ได้มากที่สุดซึ่งผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ได้สูงกว่า *E. coli* สายพันธุ์ RB24 ประมาณ 8 เท่าคือ สายพันธุ์ TW11 ที่ใช้พลาสมิด pUC19 เมื่อทำการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า สำหรับสายพันธุ์ TW10 ซึ่งนำผลิตภัณฑ์จากการทำ error-prone PCR ตัดต่อเข้าสู่พลาสมิด pBluescript II KS(+) พบการเปลี่ยนแปลงที่นิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง 554 จาก C เป็น T ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนจาก Alanine เป็น Valine ซึ่งบริเวณนี้เป็นบริเวณ dimer of dimer interface ของเอนไซม์ในกลุ่ม LDH-MDH-like Superfamily โดยเป็นไปได้ว่าการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นทำให้เอนไซม์ lactate dehydrogenase A ทำงานได้เร็วขึ้นจากการที่ dimer ของเอนไซม์ lactate dehydrogenase A ทั้ง 2 ชุดรวมตัวเป็น tetramer เร็วขึ้นหรือ dimer สามารถทำงานได้โดยไม่ต้องรวมตัวเป็น tetramer ส่วนสายพันธุ์ TW11 พบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 524 เหนือ Start codon จาก A เป็น G โดยคาดว่า การเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งดังกล่าวแล้วช่วยการทำงานของเอนไซม์ RNA polymerase เป็นผลดีต่อการสังเคราะห์ mRNA จากยีน *ldhA* ทำให้การสังเคราะห์เอนไซม์ lactate dehydrogenase A รวดเร็วและมีปริมาณมากขึ้น

ในการศึกษาปัจจัยที่อาจมีผลต่อการผลิตกรดแลกติกจาก *E. coli* พบว่าชนิดของพลาสมิดมีผลต่อการผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L จากสายพันธุ์ RB24 โดยพบว่าเมื่อตัดต่อยีน *ldhA* จาก *R. oryzae* เข้าสู่พลาสมิด pUC19 สามารถผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ได้มากกว่าการใช้พลาสมิด pBluescript II KS(+) ในการตัดต่อยีน *ldhA* จาก *R. oryzae* ประมาณ 4 เท่า ซึ่งผลการทดลองที่ได้ อาจเกิดจากพลาสมิด pUC19 มีขนาดเล็กกว่าและลำดับนิวคลีโอไทด์ซับซ้อนน้อยกว่า ทำให้การแบ่งตัวของพลาสมิดดีกว่า ส่งผลให้สำเนาของยีน *ldhA* จาก *R. oryzae* มีมากกว่าเมื่อใช้พลาสมิด pUC19 สำหรับปัจจัยในเรื่องความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นสำหรับการหมัก พบว่าใน *E. coli* ที่ได้รับการปรับปรุงสายพันธุ์มีการผลิตกรดแลกติกที่ดีที่สุดเมื่อใช้ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 20 g/L เนื่องจาก *E. coli* สายพันธุ์เหล่านี้นำกลูโคสไปใช้ได้น้อยกว่า 20 g/L ดังนั้นหากใช้ปริมาณกลูโคสเริ่มต้นในการหมัก ทำให้ปริมาณกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อมีมากและอาจไปยับยั้งกระบวนการผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L โดยยีน *ldhA* ของ *R. oryzae* บนพลาสมิด

แม้ว่าเทคนิค error-prone PCR สามารถช่วยให้ *E. coli* สามารถผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ได้มากขึ้น และกรดแลกติกที่ได้ยังมีปริมาณน้อย จึงจำเป็นต้องพัฒนาหากระบวนการผลิตกรดแลกติกที่มีประสิทธิภาพดีขึ้นต่อไป

2. ข้อเสนอแนะ

การพัฒนาการผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ในระดับ Shake Flask นี้เป็นข้อมูลเพื่อประยุกต์ใช้ในการผลิตในระดับใหญ่ขึ้นให้มีความคุ้มค่าในการผลิต ทั้งนี้เมื่อใช้การแสดงออกของ ยีน *ldhA* จาก *R. oryzae* บนพลาสมิด pRB85 ใน *E. coli* พบการผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L และเทคนิค error-prone PCR สามารถช่วยปรับปรุงให้ *E. coli* สามารถผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ได้ดีขึ้น แต่ปริมาณกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ที่ผลิตได้ยังพบในปริมาณน้อย ซึ่งแนวทางในการพัฒนาการผลิตกรดแลกติกในปริมาณมากขึ้น อาจทำได้โดย

- (1.) หาแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมถึงการหาแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่มีราคาถูกเพื่อลดค่าใช้จ่าย
- (2.) วิเคราะห์หาสารปนเปื้อนอื่นๆที่เกิดขึ้นในการผลิตกรดแลกติก ทั้งนี้หากพบการปนเปื้อนของสารใดในปริมาณมาก สามารถกลับไปศึกษาว่าสารนี้เป็นผลมาจากวิถีเมตาบอลิซึมเพื่อหาตัวยับยั้งวิธีนั้น
- (3.) ทำการทดลองใช้เทคนิค error-prone PCR เพื่อให้เกิดการกลายพันธุ์แบบสุ่มต่อไป โดยคัดเลือกโคลนในจำนวนมากขึ้นเพื่อหาโคลนที่สามารถผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ L ได้ดีกว่าเดิม
- (4.) ใช้เทคนิคอื่นในการตัดต่อยีน *ldhA* ของ *R. oryzae* เข้าแทนที่บนดีเอ็นเอของ *E. coli* เพื่อเพิ่มความเสถียรของยีน รวมทั้งไม่ต้องใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อการรักษาพลาสมิด

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*.
- Kim, M.S., and Lei, X.G. (2008) Enhancing thermostability of *Escherichia coli* phytase AppA2 by error-prone PCR. *Appl Microbiol Biotechnol* 79: 69-75.
- 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*.
- Pritchard, L., Corne, D., Kell, D., Rowland, J., and Winson, M. (2005) A general model of error-prone PCR. *J Theor Biol* 234: 497-509.
- 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.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning : a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York USA.
- 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.
- Thongchul, N., Navankasattusas, S., and Yang, S.T. (2009) Production of lactic acid and ethanol by *Rhizopus oryzae* integrated with cassava pulp hydrolysis. *Bioprocess Biosyst Eng*.
- 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.

ภาคผนวก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเหลว LB (1 L)

10 g Bacto-peptone

5 g Yeast extract

10 g NaCl

ละลายในน้ำปริมาตรเป็น 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

ละลายในน้ำปริมาตรเป็น 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 **Cultivation** 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 โดยส่วนที่ 1 ละลาย Glucose 20 30 50 70 หรือ 100 g แล้วเติมน้ำปรับปริมาตรเป็น 500 mL จากนั้นแบ่งใส่ Flask ขนาด 250 mL ด้วยปริมาตร Flask ละ 25 mL แล้วนำไปบ่มฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ

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 แล้วนำไปบ่มฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ

เมื่อต้องการใช้น้ำส่วนที่ 2 ปริมาตร 25 mL ใส่ลงใน Flask จากที่เตรียมไว้แล้วในส่วนที่ 1 จากนั้นเติม CaCO_3 2.5 g (สำหรับการทดลองที่ใช้ CaCO_3 ความเข้มข้น 50 g/L) หรือ 1 g (สำหรับการทดลองที่ใช้ CaCO_3 ความเข้มข้น 20 g/L) ต่อ Flask

8. Salt Solution (10 mL)

400 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

20 mg $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

20 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

ละลายในน้ำปรับปริมาตรเป็น 10 mL

เอกสารแนบ

Proceeding การประชุม TSB International Forum 2013 ณ ศูนย์ประชุมไบเทค บางนา กรุงเทพฯ ระหว่างวันที่ 28- 30 สิงหาคม พ.ศ. 2556 โดยได้นำเสนอผลงานใน 2 เรื่องคือ

1. Improvement of Lactic Acid Production in *Escherichia coli* harboring Plasmid with *Rhizopus oryzae* *ldhA* Gene
2. Optimization of lactic acid production by *Escherichia coli* harboring *ldhA* gene from *Rhizopus oryzae*