



โครงการ การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การดัดแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณตำแหน่งที่ไรโบโซมจับของ
โอเพอรอน *phaCAB* เพื่อการผลิตพอลิ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต

ชื่อนิสิต นายธเนศ ศรีโมรา รหัสประจำตัว 6032324323

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

เรื่อง

การดัดแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณตำแหน่งที่ไรโบโซมจับของโอเพอรอน *phaCAB* เพื่อ
การผลิตพอลิ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต

Modification of ribosome binding site region of the *phaCAB* operon for
poly(3-hydroxybutyrate) production

อาจารย์ที่ปรึกษา

รองศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา จันทร์ประทีป นภาร

นิสิตในโครงการ

นายธเนศ ศรีโมรา

รหัสประจำตัวนิสิต 6032324323

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ปีการศึกษา 2563ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ	การดัดแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณตำแหน่งที่ไรโบโซมจับของโอเพอรอน <i>phaCAB</i> เพื่อการผลิตพอลิ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต
นิสิตผู้เสนอโครงการ	นายธเนศ ศรีโมรา รหัสประจำตัวนิสิต 6032324323
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ	รองศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา จันทร์ประทีป นภทร
ปีการศึกษา	2563

บทคัดย่อ

การผลิตพลาสติกชีวภาพชนิดพอลิ 3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต (PHB) ในรีคอมบิแนนท์ *E. coli* โดยการใช้ยีนชีวสังเคราะห์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิต PHB โอเพอรอน *phaCAB* มีข้อดีกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม เช่น สามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็ว สามารถใช้อาหารราคาถูกได้ มีประสิทธิภาพในการผลิต PHB สูงรวมถึงไม่มีเอนไซม์ดีพอลิเมอไรเซชันด้วย โดยปกติแล้วโอเพอรอน *phaCAB* จะสามารถแสดงออกได้ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์และตำแหน่งจับกับไรโบโซม (RBS) ซึ่งโปรโมเตอร์ที่นิยมใช้กันนั้นมักเป็นโปรโมเตอร์เหนี่ยวนำที่ต้องใช้สารเคมี เช่น ไอโซพรีพิล ปีต้า ดี หนึ่ง ไทโอกาแล็คโตไพแรนโนไซด์ (IPTG) ซึ่งจะเป็นการเพิ่มมูลค่าของต้นทุนการผลิต งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาการใช้โปรโมเตอร์ที่สามารถทำงานได้แรงอย่างต่อเนื่องที่ชื่อว่า BBa_J23100 แทนการใช้โปรโมเตอร์เหนี่ยวนำและได้สร้างไลบรารีของ RBS โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์แบบสุ่มในบริเวณตำแหน่งสแตนด์บาย (standby site) และบริเวณว่าง (spacer region) ของ RBS จากนั้นคัดเลือกสายพันธุ์ *E. coli* ที่มีการดัดแปลง RBS และโอเพอรอน *phaCAB* ให้สามารถผลิต PHB ในปริมาณสูงได้โดยกระบวนการคัดเลือกล้วนจะคัดเลือกบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB และจานเพาะเชื้อแข็งขนาด 96 หลุมที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและไนล์เรดเป็นตัวตรวจวัด โดยจะคัดเลือกโคโลนีที่มีค่าฟลูออเรสเซนซ์สูง 14 โคโลนีไปทดสอบการผลิต PHB เบื้องต้นด้วยการเพาะเลี้ยงระดับขวดเขย่า จากนั้นผู้วิจัยได้คัดเลือกโคโลนีที่มีอัตราการเจริญจำเพาะและอัตราการผลิตสารผลิตภัณฑ์จำเพาะที่สูงและปานกลางไปศึกษาการเจริญของรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ผลจากการทดลองพบว่า โคโลนีที่ 20 สามารถผลิต PHB ได้สูงที่สุดเท่ากับ 60.91% ของน้ำหนักเซลล์แห้งคิดเป็นปริมาณ PHB เท่ากับ 4.02 กรัมต่อลิตร ขณะที่สายพันธุ์ที่ใช้เป็นตัวควบคุมสามารถผลิต PHB ได้เท่ากับ 26.98% ของน้ำหนักเซลล์แห้งคิดเป็นปริมาณ PHB เท่ากับ 0.054 กรัมต่อลิตร ดังนั้นในงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงการใส่โปรโมเตอร์ BBa_J23100 ร่วมกับการดัดแปลง RBS ในรีคอมบิแนนท์ *E. coli* สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิต PHB และสามารถนำไปหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิต PHB ในระดับที่สูงขึ้นในอนาคตได้

Project title	Modification of ribosome binding site region of the <i>phaCAB</i> operon for poly(3-hydroxybutyrate) production
Name of student	Mister Thanate Srimora
Advisor	Associated Professor Dr.Suchada Chanprateep Napathorn, Ph.D.
Academic year	2021
Department	Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University

Abstract

Production of biodegradable plastic poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) in *E. coli* by PHB biosynthesis genes, *phaCAB* operon, has offered advantages over the wild type strains such as high growth rate, cheap medium, high productivity including an absence of depolymerase enzyme. Typically, *phaCAB* operon could be expressed under the control of promoter and ribosome binding site region (RBS). Normally, the promoter is an inducible promoter that has to use inducing agents (i.e. Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside; IPTG) that would increase the cost of production. The objective of this study was to use strong constitutive promoter BBa_J23100 to replace inducible promoter and construct a library of RBS by degenerated primers in standby site and spacer region of RBS. Next, the recombinant *E. coli* harboring modified RBS and *phaCAB* operon were screened for high efficiency of PHB production. The screening process was performed using both LB agar plates and 96 well plates containing glucose as a carbon source and Nile red as an indicator. We selected 14 colonies with having high fluorescence unit for preliminary PHB production in flask cultivation. Then, we selected the colonies to have high and moderate specific growth rates and specific production rates to characterize the PHB time course production. As a result, the colony namely #20 showed the highest PHB production of 60.91 % (w/w) with PHB 4.02 g/L whereas the control strain showed PHB production of 26.98% (w/w) with 0.054 g/L. Therefore, in combination with BBa_J23100 and modified RBS performed in this study, we successfully obtained the recombinant *E. coli* that showed high efficiency of PHB production. The further optimization in large scale production of PHB using these recombinants is required.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเสริมประสบการณ์นี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากหลาย ๆ ท่าน ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงสำหรับ รองศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา จันทร์ประทีป นภทร อาจารย์ที่ปรึกษา ที่ได้ให้คำแนะนำ แนวทาง ข้อคิดเห็นต่าง ๆ รวมทั้งได้เสียร่างกาย แรงใจและทุนทรัพย์ ตลอดจนตรวจทานแก้ไขโครงการจนเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ คณาจารย์ประจำภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านที่ได้ประสิทธิประสาทวิชาความรู้และให้คำปรึกษาเป็นอย่างดีรวมทั้งเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่คอยให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดีทุก ๆ ด้าน

ขอขอบพระคุณ นายธนวัฒน์ บุญทิพย์ (พีโดม) นิสิตระดับปริญญาเอก ที่เป็นผู้ดูแล คอยสอนเทคนิคปฏิบัติการ แนวการคิดวิเคราะห์อย่างเป็นระบบ ให้ความช่วยเหลือผู้วิจัยเป็นอย่างดี นอกจากนี้ยังได้ช่วยออกแบบการทดลองและมอบเชื้อจุลินทรีย์ พลาสมิดและวัสดุอื่น ๆ ที่จำเป็นต่อการทดลอง หากไม่มีพีโดม โครงการอาจไม่สำเร็จลุล่วงได้

ขอขอบคุณพี่ ๆ ประจำห้องปฏิบัติการ 1904/16 ทุก ๆ ท่าน โดยเฉพาะ พี่อ้อม พี่เนซ พี่ปอ พี่อ๊อฟ พี่เซลาร์ ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ กำลังใจ และมอบความห่วงใยมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดาและครอบครัวที่ได้มอบความรัก ความห่วงใย กำลังใจและทุกสิ่งทุกอย่างแก่ผู้วิจัย รวมถึงกำลังใจที่ดีมาจากเพื่อนทุก ๆ คนที่แบ่งปันประสบการณ์ และกำลังใจในการทำงานวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ธนศ ศรีโมรา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	จ
Abstract	จ
กิตติกรรมประกาศ	จ
บทที่ 1	ฉ
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์	3
1.3 วิธีดำเนินงานวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2	5
2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับพลาสติก	5
2.2 ปัญหาสิ่งแวดล้อมจากขยะพลาสติก	5
2.3 การสลายตัวของพลาสติก	5
2.4 พลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable plastics)	8
2.5 ความรู้เกี่ยวกับพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (polyhydroxyalkanoate, PHA)	10
2.7 ภาพรวมของการผลิต PHB ใน รีคอมบิแนนท์ <i>E. coli</i>	27
2.8 Ribosome binding site (RBS) และการแปลรหัสของแบคทีเรีย	29
บทที่ 3	33
3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	33
3.2 สารเคมี	34
3.3 จุลินทรีย์ พลาสติดและไพร์เมอร์	36
3.4 การเก็บรักษาจุลินทรีย์	37

3.5 การสร้างพลาสมิดลูกผสม (recombinant plasmid) เพื่อผลิต PHB	38
3.6 การนำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน	41
3.7 การคัดเลือกเชื้อ <i>E. coli</i> ที่มีพลาสมิดลูกผสม	42
3.8 การทดสอบการผลิต PHB ของ Recombinant <i>E. coli</i> เบื้องต้น	42
3.9 การศึกษาการเจริญของเชื้อ (time course)	44
3.10 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์	44
บทที่ 4	45
4.1 การสร้างพลาสมิดลูกผสม (recombinant plasmid) เพื่อผลิต PHB 45	
4.2 ไลบริารีของรีคอมบิแนนท์ <i>E. coli</i> ที่มีพลาสมิดลูกผสม pUC19-23100CAB _{A-04}	45
4.3 การคัดเลือกรีคอมบิแนนท์ <i>E. coli</i> ที่มีพลาสมิดลูกผสม pUC19-23100CAB _{A-04}	46
4.4 การทดสอบการผลิต PHB เบื้องต้นของรีคอมบิแนนท์ <i>E. coli</i>	50
4.5 การศึกษาการเจริญของรีคอมบิแนนท์ <i>E. coli</i> ที่มีพลาสมิดลูกผสม	52
4.6 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์	66
บทที่ 5	68
รายการอ้างอิง	71
ภาคผนวก	75

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิถีสังเคราะห์ PHA ในรูปที่ 5	21
ตารางที่ 2 จุลินทรีย์ พลาสติดและไพโรเมอร์ที่ใช้ทดลอง	36
ตารางที่ 3 แสดงค่าฟลูออเรสเซนซ์ที่วัดได้ของแต่ละโคลนีย์ของ <i>E. coli</i>	48
ตารางที่ 4 การทดสอบการผลิต PHB เบื้องต้น	50
ตารางที่ 5 แสดงค่าอัตราการเจริญจำเพาะและอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์จำเพาะ ของรีคอมบิแนนท์ <i>E. coli</i> ที่มีพลาสติดลูกผสม pUC19-23100CABA-04 ที่ถูกคัดเลือก	51
ตารางที่ 6 แสดงการเปรียบเทียบค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (CDW) ปริมาณ PHB สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกลูโคสที่ใช้และ น้ำหนักเซลล์แห้งจริง (RB) ที่เวลาต่าง ๆ ของสายพันธุ์ที่ 6	53
ตารางที่ 7 แสดงการเปรียบเทียบค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (CDW) ปริมาณ PHB สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกลูโคสที่ใช้และ น้ำหนักเซลล์แห้งจริง (RB) ที่เวลาต่าง ๆ ของสายพันธุ์ที่ 39	55
ตารางที่ 8 แสดงการเปรียบเทียบค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (CDW) ปริมาณ PHB สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกลูโคสที่ใช้และ น้ำหนักเซลล์แห้งจริง (RB) ที่เวลาต่าง ๆ ของสายพันธุ์ที่ 14	56
ตารางที่ 9 แสดงการเปรียบเทียบค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (CDW) ปริมาณ PHB สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกลูโคสที่ใช้และ น้ำหนักเซลล์แห้งจริง (RB) ที่เวลาต่าง ๆ ของสายพันธุ์ที่ 20 แบบแบชต์	57
ตารางที่ 10 แสดงการเปรียบเทียบค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (CDW) ปริมาณ PHB สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกลูโคสที่ใช้และ น้ำหนักเซลล์แห้งจริง (RB) ที่เวลาต่าง ๆ ของสายพันธุ์ที่ 20 แบบเฟดแบชต์	59
ตารางที่ 11 แสดงการเปรียบเทียบค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (CDW) ปริมาณ PHB สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกลูโคสที่ใช้และ น้ำหนักเซลล์แห้งจริง (RB) ที่เวลาต่าง ๆ ของสายพันธุ์ n-RBS (ตัวต้นแบบ)	60
ตารางที่ 12 เปรียบเทียบค่าจลนศาสตร์ของรีคอมบิแนนท์ <i>E. coli</i> สายพันธุ์ต่าง ๆ	65

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 แนวทางในการย่อยสลายสลายพอลิเมอร์แบบต่าง ๆ	7
รูปที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของ Polyhydroxyalkanoate (PHA)	12
รูปที่ 3 วิธีการสังเคราะห์ PHA	20
รูปที่ 4 โครงสร้างทางเคมีของ poly(-3-hydroxybutyrate)	23
รูปที่ 5 วิธีการเผาผลาญสำหรับการสังเคราะห์และการย่อยสลาย PHB	24
รูปที่ 6 กลไกการเกิดพอลิเมอร์ไฮดรอกซีด้วย phaC	26
รูปที่ 7 กระบวนการแปลรหัส	32
รูปที่ 8 ไพรเมอร์ที่ออกแบบขึ้น	38
รูปที่ 9 แผนผังแสดงการสร้างพลาสมิดดลูกผสม pUC19-23100CABA-04	40
รูปที่ 10 รูปถ่ายจากการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโพลีซิสในสร้างในพลาสมิดดลูกผสม	45
รูปที่ 11 โลบาร์รีของเชื้อ <i>E. coli</i> ที่มีพลาสมิดดลูกผสม	46
รูปที่ 12 รีคอมบิแนนท์ <i>E. coli</i> ในไมโครเพลทขนาด 96 หลุมที่ส่องดูภายใต้แสงสีน้ำเงิน.	46
รูปที่ 13 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างโคโลนีของรีคอมบิแนนท์ <i>E. coli</i> ที่คัดเลือกและ ค่าความสว่างของฟลูออเรสเซน	47
รูปที่ 14 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญจำเพาะและ อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์จำเพาะของรีคอมบิแนนท์ <i>E. coli</i> ที่มีพลาสมิดดลูกผสม pUC19-23100CABA-04 ที่ถูกคัดเลือก	52
รูปที่ 15 กราฟการเจริญของรีคอมบิแนนท์ <i>E. coli</i> สายพันธุ์ที่ 6	53
รูปที่ 16 กราฟการเจริญของรีคอมบิแนนท์ <i>E. coli</i> สายพันธุ์ที่ 39	54
รูปที่ 17 กราฟการเจริญของรีคอมบิแนนท์ <i>E. coli</i> สายพันธุ์ที่ 14	55
รูปที่ 18 กราฟการเจริญของรีคอมบิแนนท์ <i>E. coli</i> สายพันธุ์ที่ 20 แบบแบดซ์	57
รูปที่ 19 กราฟการเจริญของรีคอมบิแนนท์ <i>E. coli</i> สายพันธุ์ที่ 20 แบบเฟดแบชต์	58
รูปที่ 20 กราฟการเจริญของรีคอมบิแนนท์ <i>E. coli</i> สายพันธุ์ n-RBS	60
รูปที่ 21 ก. DCW ข. PHB (%w/w) ค. PHB (g/L) ง. Glucose (g/L) จ. RB (g/L) ที่เวลาต่าง ๆ ของเชื้อ แต่ละสายพันธุ์	62
รูปที่ 22 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ RBS ของรีคอมบิแนนท์ <i>E. coli</i> สายพันธุ์ n-RBS No.6 No.14 No.20 No.39 และNo.93	66
รูปที่ 23 ภาพรวมของลำดับนิวคลีโอไทด์	67

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

ในปัจจุบันนี้การขยายตัวของเมืองและการเติบโตทางเศรษฐกิจในประเทศต่าง ๆ เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจึงนำไปสู่การผลิตและการอุปโภคพลาสติกเพิ่มขึ้นอย่างมากทั่วโลกและการขาดองค์ความรู้ในการพัฒนาเทคโนโลยีการรีไซเคิลทำให้การรีไซเคิลของขยะพลาสติกยังคงต่ำมากส่งผลให้พลาสติกส่วนใหญ่จะถูกชะล้างลงสู่มหาสมุทร กำจัดในหลุมฝังกลบหรือเผาในเตาเผาขยะซึ่งพลาสติกจำนวนมากเหล่านี้จะก่อให้เกิดผลร้ายตามมาเช่น มลภาวะการปนเปื้อนของพลาสติกในห่วงโซ่อาหาร การเสียสมดุลความหลากหลายทางชีวภาพและระบบนิเวศ (*Chow และคณะ, 2017*) ดังนั้นเพื่อขจัดปัญหาข้างต้นจึงมีวิธีการพัฒนาเทคโนโลยีและนวัตกรรมต่าง ๆ เพื่อจัดการกับขยะพลาสติกเหล่านี้ไม่ว่าจะเป็นการหาวิธีการย่อยสลายพลาสติกให้รวดเร็วยิ่งขึ้นหรือการลดการใช้พลาสติก แต่ปัญหาขยะพลาสติกเหล่านี้คงจะหมดไปได้ยากเนื่องจากว่า พลาสติกได้กลายเป็นวัสดุสำคัญอย่างหนึ่งที่ใช้ในการดำเนินกิจกรรมของมนุษย์ไปแล้ว ดังนั้นการแก้ไขปัญหาอย่างยั่งยืนจำเป็นที่จะต้องหาพลาสติกทดแทนที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและสามารถย่อยสลายได้เช่น พลาสติกชีวภาพ ซึ่งพลาสติกชีวภาพก็มีหลายชนิด เช่น พอลิแล็กติกแอซิด (polylactic acid, PLA) พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (polyhydroxyalkanoates, PHA) และ พอลิบิวทิลีนซัคซิเนต (polybutylenesuccinate, PBS) เป็นต้น (*Madison และ Huisman, 1999*) โดยหนึ่งในพลาสติกชีวภาพที่ย่อยสลายได้ในธรรมชาติชนิดหนึ่งที่มีความสนใจและศึกษามากอย่างต่อเนื่องนั้นคือ PHA ซึ่งเป็นพอลิเอสเทอร์ของกรดไฮดรอกซีแอลคาโนอิกที่สังเคราะห์ขึ้นและสะสมภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์จะสะสม PHA เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนหรือแหล่งพลังงานสำรองภายในเซลล์ โดยกรดไฮดรอกซีแอลคาโนอิกนี้จะสร้างพันธะเอสเทอร์ต่อกันเป็นสายซึ่งแบ่งออกเป็น 3 ชนิดตามความยาวของสายได้แก่ขนาดสั้น กลางและยาว โดยพอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต (polyhydroxybutylate, PHB) จัดเป็น PHA สายสั้นชนิดหนึ่งที่ค้นพบเป็นชนิดแรกและมีคุณสมบัติเป็นเทอร์โมพลาสติก มีคุณสมบัติเชิงกลใกล้เคียงกับพอลิเอทิลีน (polyethylene, PE) พอลิโพรพิลีน (polypropylene, PP) (*Babel และคณะ, 2001*) มีโครงสร้างแบบสเตอริโอที่จำเพาะและมีคุณสมบัติย่อยสลายได้ตามธรรมชาติดังนั้นจึงเป็นที่นิยมนำไปประยุกต์ใช้ทั้งในทางการแพทย์ เกษตรกรรม และ

อุตสาหกรรม (Singh และคณะ, 2019) แต่อย่างไรก็ตาม ปัญหาหลักอย่างหนึ่งที่ส่งผลต่อการผลิต PHB ในเชิงพาณิชย์คือ ต้นทุนในการผลิตสูงและประสิทธิภาพการผลิตต่ำ (McAdam และคณะ, 2020) โดยมีแบคทีเรียมากกว่า 250 สปีชีส์ที่สามารถผลิต PHB ได้แต่มีเพียงไม่กี่สปีชีส์เท่านั้นที่สามารถผลิต PHB เพื่อใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้เช่น ริกคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มียีนชีวสังเคราะห์ที่ผลิต PHB ได้ (Hokamura และคณะ, 2015) การใช้ *E. coli* เป็นเจ้าบ้านในการผลิต PHB นั้นมีข้อดีกว่าแบคทีเรียอื่นคือ เจริญเติบโตได้รวดเร็ว ไม่มีเอนไซม์ PHA ดีพอลิเมอร์เอส (PHA depolymerase) ที่สามารถย่อย PHB ระหว่างการหมักได้ นอกจากนี้ ยังมีผนังเซลล์ที่บางสามารถทำให้เซลล์แตกแล้วสกัด PHB ออกมาได้โดยง่าย (Hokamura และคณะ, 2015) โดยมีงานวิจัยจำนวนมากที่ได้รายงานถึง การสร้างวิถีชีวสังเคราะห์ PHB ในริกคอมบิแนนท์ *E. coli* เช่น งานวิจัยของ Napathorn และคณะ (2021) ได้เลือกใช้โอเพอรอน *phaCAB* จาก *Cupriavidus necator* สายพันธุ์ A-04 (*C. necator* A-04) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ *Cupriavidus necator* สายพันธุ์ H16 (*C. necator* H16) ถึง 99% ที่เป็นสายพันธุ์ที่ใช้ผลิตในระดับอุตสาหกรรม (Heinrich และคณะ, 2012; Kaur, 2015) โดยแสดงออกภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ *araBAD* ที่เหนี่ยวนำด้วยน้ำตาลอะราบินอสในริกคอมบิแนนท์ *E. coli* สามารถผลิต PHB ถึง 91.74% ของน้ำหนักเซลล์แห้งภายในเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโอเพอรอน *phaCAB* จาก *C. necator* A04 มีศักยภาพในการผลิต PHB นอกจากนี้ Boontip และคณะ (2020) ได้สร้างพลาสมิดลูกผสม pColdTF-*phaCAB*_{A-04} ที่มียีนที่สามารถสังเคราะห์ PHB จาก *C. necator* A-04 แสดงออกภายใต้โปรโมเตอร์ cold - shock *cspA* ที่เหนี่ยวนำด้วยสาร Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) ที่อุณหภูมิต่ำใน *E. coli* JM109 พบว่าสามารถผลิต PHB ได้ถึง 90.6% ของน้ำหนักเซลล์แห้งภายในเวลา 24 ชั่วโมงซึ่งถือได้ว่ามีประสิทธิภาพในการผลิตที่สูงเช่นกัน แต่อย่างไรก็ตาม น้ำตาลอะราบินอสและสาร IPTG ที่ใช้ในการเหนี่ยวนำโปรโมเตอร์ดังกล่าวนั้นมีราคาแพงมากส่งผลให้ต้นทุนการผลิต PHB สูงขึ้นเมื่อนำไปผลิตในระดับอุตสาหกรรม ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้โปรโมเตอร์ BBa_J23100 ซึ่งเป็นโปรโมเตอร์ที่มีความแรง (strong promoter) สามารถทำงานได้อย่างต่อเนื่อง (constitutive promoter) โดยไม่ต้องใช้ตัวเหนี่ยวนำและเป็นโปรโมเตอร์ที่ออกแบบมาเพื่อใช้กับริกคอมบิแนนท์ *E. coli* (Damalas และคณะ, 2020) นอกจากความสำคัญของโปรโมเตอร์ที่ส่งผลต่อกระบวนการถอดรหัสที่มีผลไปถึงการแสดงออกของโอเพอรอนแล้วนั้น กระบวนการแปลรหัสก็เป็นกระบวนการที่มีความสำคัญต่อการแสดงออกของโอเพอรอนด้วยเช่นกัน โดยการทำงานของกระบวนการแปลรหัสจะสามารถเริ่มต้นขึ้นได้ขึ้นอยู่กับตำแหน่งที่ไรโบโซมมาจับนั่นคือ ribosome binding site, RBS ซึ่งแบ่งย่อยออกเป็น ตำแหน่ง

สแตนด์บาย (standby site) ตำแหน่งจับกับ 16S rRNA (6S rRNA binding site) บริเวณว่าง (spacer region) และโคดอนเริ่มต้น start codon โดยตำแหน่งสแตนด์บาย (standby site) และบริเวณว่าง (spacer region) เป็นตำแหน่งที่มีความอนุรักษ์ต่ำแต่กลับมีผลต่อประสิทธิภาพในการควบคุมองค์ประกอบสำหรับการเริ่มต้นการแปลรหัส (translation initiation) ซึ่งเป็นขั้นกำหนดอัตราของกระบวนการแปลรหัสที่จะทำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนที่ใช้ในการสังเคราะห์ PHB โดยจะส่งผลกระทบต่อปฏิสัมพันธ์ของโมเลกุลหลาย ๆ โมเลกุลภายในเซลล์ เช่น การจับกันระหว่าง 16s rRNA กับ RBS tRNA^{fMET} กับโคดอนเริ่มต้น (start codon) ระยะห่างระหว่างตำแหน่งที่จับกับ 16s rRNA กับ โคดอนเริ่มต้น และโครงสร้างของ RNA ทูติยภูมิ (Salis และคณะ, 2009) ดังนั้นในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยต้องการสร้างพลาสมิดลูกผสมที่มียืนสำหรับการผลิต PHB หรือ โอเพอรอน *phaCAB* จาก *C. necator* A-04 ที่สามารถแสดงออกภายใต้โปรโมเตอร์ BBa_J23100 ซึ่งแสดงออกอย่างแรงตลอดเวลา (strong constitutive promoter) และดัดแปลงตำแหน่งสแตนด์บาย (standby site) และบริเวณว่าง (spacer region) ของ RBS ที่มีความอนุรักษ์ต่ำตามงานวิจัยของ Seo และคณะ (2013) ด้วยวิธีการสุ่มลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์แบบสุ่ม (degenerated oligonucleotides primer) ในการสร้างไลบรารีของพลาสมิดลูกผสม ศึกษาและพัฒนาประสิทธิภาพการผลิต PHB ในรีคอมบิแนนท์ *E. coli*

1.2 วัตถุประสงค์

- 1). สร้างไลบรารีพลาสมิดลูกผสมที่มียืนชีวสังเคราะห์ PHB ภายใต้การทำงานของโปรโมเตอร์ BBa_J23100 และกลายพันธุ์ตำแหน่งจับกับไรโบโซมแบบสุ่ม
- 2). เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ของรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่ผลิต PHB ในปริมาณสูง
- 3). เพื่อผลิต PHB ของสายพันธุ์ที่คัดเลือก

1.3 วิธีดำเนินงานวิจัย

- 1). การสร้างพลาสมิดลูกผสม (recombinant plasmid) เพื่อผลิต Poly[(R)-3hydroxybutyrate], PHBs
- 2). การนำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน
- 3). การคัดเลือกเชื้อ *E. coli* ที่มีพลาสมิดลูกผสม
- 4). การทดสอบการผลิต PHB ของ Recombinant *E. coli* เบื้องต้น
- 5). การศึกษาการเจริญของ Recombinant *E. coli* ที่ผลิต PHBs ในปริมาณสูง

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1). ด้านความรู้และประสบการณ์

ทำให้เข้าใจกระบวนการสร้างแบบที่เรียสายพันธุ์รีคอมบิแนนท์โดยวิธีการกลายพันธุ์ตั้งแต่กระบวนการแรกจนถึงกระบวนการสุดท้ายและเข้าใจกลไกการผลิต PHB นอกจากนี้ยังสามารถวางแผนและพัฒนาวิธีการผลิตสายพันธุ์รีคอมบิแนนท์ได้ ฝึกคิด วิเคราะห์ปัญหาโดยอาศัยกระบวนการทางวิทยาศาสตร์ และสามารถนำไปต่อยอดได้ในอนาคต

2). ความรู้ ความเข้าใจที่นำไปสู่การแก้ไขปัญหาของสังคมหรือสภาพแวดล้อม

สามารถนำความรู้ที่ได้ ไปพัฒนาสายพันธุ์แบคทีเรียในงานวิจัยด้านต่างๆ รวมไปถึงการผลิตและพัฒนาพลาสติกชีวภาพ ให้มีประสิทธิภาพดีและ สามารถแก้ไขปัญหาด้านมลภาวะจากขยะพลาสติกจากปิโตรเลียมได้

3). ได้รีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่สามารถผลิต PHB ในปริมาณสูงได้

บทที่ 2

ปรีทัศน์วรรณกรรม

2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับพลาสติก

พลาสติก หรือ พอลิเมอร์ เป็นสารประกอบที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ มวลโมเลกุลสูงและมีลักษณะเป็นสายยาวที่เกิดจากกระบวนการทางเคมีที่ชื่อว่ากระบวนการพอลิเมอร์ไรเซชัน (polymerization) ซึ่งเป็นการนำสารประกอบหน่วยย่อยหรือ โมโนเมอร์ (monomer) มาเรียงต่อกันด้วยพันธะเคมีให้เป็นสายยาวทำให้โมเลกุลมีขนาดใหญ่ขึ้นและสามารถเปลี่ยนสถานะจากของเหลวหรือแก๊สไปเป็นของแข็งที่มีคุณสมบัติที่เหมาะสมแก่การนำไปขึ้นรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ได้ (Ulf, 2015)

2.2 ปัญหาสิ่งแวดล้อมจากขยะพลาสติก

ผลิตภัณฑ์พลาสติกนิยมใช้กันอย่างแพร่หลายซึ่งผลิตภัณฑ์เหล่านี้เมื่อถูกใช้จนหมดประโยชน์หรือเสื่อมสภาพลงก็จะกลายเป็นขยะจำนวนมากมหาศาลทำให้มีขยะพลาสติกและขยะมูลฝอยในชุมชนปริมาณมากและด้วยการเติบโตทางเศรษฐกิจของสังคมประชากรมนุษย์ทำให้ความต้องการใช้พลาสติกจึงมีมากขึ้นตามไปด้วยอย่างรวดเร็วและต่อเนื่องโดยเฉพาะอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ที่มีอายุการใช้งานสั้นและมีการพัฒนาผลิตภัณฑ์อยู่ตลอดเวลาทำให้ผู้ใช้งานก็จะเปลี่ยนอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์เหล่านั้นตามการพัฒนา โดยจากการรายงานของ UNEP ในปี 2009 ระบุว่าอุปกรณ์ไฟฟ้าและอิเล็กทรอนิกส์จากการผลิตทั่วโลกอยู่ที่ประมาณ 40 ล้านตันต่อปีและคาดว่าตัวเลขนี้จะมีจำนวนมากขึ้นในอนาคต (Awasthi และคณะ, 2017) นอกจากนี้ก็ยังมีขยะมูลฝอยอื่น ๆ อีกมากมายที่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมนั้นเช่น ขวดน้ำ ถูพลาสติก หลอดดูดน้ำ เป็นต้น ซึ่งผลิตภัณฑ์เหล่านี้มักถูกทิ้งไม่เป็นที่จึงทำให้ไม่ได้รับการจัดการต่อขยะเหล่านั้นอย่างเหมาะสมส่งผลให้ขยะพลาสติกเหล่านั้นปนเปื้อนไปกับสิ่งแวดล้อมและก่อให้เกิดอันตรายต่อธรรมชาติและสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ได้

2.3 การสลายตัวของพลาสติก

การเปลี่ยนแปลงใดทางกายภาพหรือทางเคมีในพอลิเมอร์หรือพลาสติกนั้นเป็นผลมาจากปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมเช่น แสง ความร้อน ความชื้น สารเคมี หรือกิจกรรมทางชีวภาพ เป็นต้น ซึ่งเป็นกระบวนการที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของพอลิเมอร์ทำให้เกิดการเสื่อมสภาพของวัสดุซึ่งคุณสมบัติของวัสดุที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น ลักษณะทางกล ลักษณะทางแสง หรือทางไฟฟ้า

การแตก สึกกร่อน เปลี่ยนสี แยกเฟส (phase) หรือหลุดลอก เป็นต้น ซึ่งปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อการย่อยสลายของพอลิเมอร์พลาสติกมีดังนี้ (Bahl และคณะ, 2021)

2.3.1 การย่อยสลายด้วยแสง (Photodegradation)

ความไวของการย่อยสลายของพอลิเมอร์ด้วยแสงเกี่ยวข้องกับความสามารถในการดูดซับรังสีที่เป็นอันตรายจากดวงอาทิตย์รวมถึงรังสี UV-B (~ 295– 315 นาโนเมตร) และรังสี UV-A (~ 315– 400 นาโนเมตร) ที่ส่งผลต่อปฏิกิริยาการสลายตัวด้วยแสงโดยตรง (photolysis, initiated photooxidation) ส่วนคลื่นแสงที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าของแสงแดด (the visible part of sunlight) (400–760 นาโนเมตร) จะเร่งการย่อยสลายพอลิเมอร์โดยการให้ความร้อน และรังสีอินฟราเรด (Infrared) (760– 2500 นาโนเมตร) จะเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยความร้อน (thermal oxidation) ด้วยสาเหตุนี้จึงส่งผลให้เกิดการย่อยสลายของพลาสติกได้

2.3.2 การย่อยสลายด้วยความร้อน (Thermal degradation)

การย่อยสลายพอลิเมอร์ด้วยความร้อนคือ การเสื่อมสภาพของโมเลกุลซึ่งเป็นผลมาจากความร้อนที่สูงเกินไป ที่อุณหภูมิสูงส่วนประกอบของโซ่ยาวแกนกลางของพอลิเมอร์จะสามารถเริ่มแยกตัวหรือแยกโมเลกุลและทำปฏิกิริยากันเพื่อเปลี่ยนคุณสมบัติของพอลิเมอร์ ปฏิกิริยาทางเคมีที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายด้วยความร้อนจะนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางกายภาพและทางแสงที่สัมพันธ์กัน นอกจากนี้การย่อยสลายด้วยความร้อนจะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักโมเลกุล การกระจายน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์และการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทั่วไป ได้แก่ ลดความเหนียว การแตกตัว การเปลี่ยนสี การแตกร้าวและลดคุณสมบัติทางกายภาพอื่น ๆ อีก เป็นต้น

2.3.3 กระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพแบบออกโซ (Oxo-biodegradation)

กระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพแบบออกโซจะใช้สองวิธีในการเริ่มต้นการย่อยสลายทางชีวภาพ คือการย่อยสลายด้วยแสง UV และปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยการย่อยสลายด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชันจะใช้เวลาและความร้อนในการสลายพลาสติกส่วนรังสี UV จะใช้ในการย่อยสลายผลิตภัณฑ์สุดท้าย ซึ่งทั้งสองวิธีนี้จะช่วยลดน้ำหนักโมเลกุลของพลาสติกและทำให้เกิดการย่อยสลายทางชีวภาพต่อไปได้ง่ายขึ้น

2.3.4 การย่อยสลายทางชีวภาพ (Biodegradation)

การย่อยสลายทางชีวภาพเป็นกระบวนการที่สารอินทรีย์ถูกทำลายโดยจุลินทรีย์ซึ่งพลาสติกนี้สามารถถูกย่อยสลายทางชีวภาพได้โดยจุลินทรีย์ที่ใช้ออกซิเจนในธรรมชาติและจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้ออกซิเจนในตะกอนและหลุมฝังกลบ โดยการย่อยสลายทางชีวภาพแบบใช้ออกซิเจนจะมีการสร้างแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) และน้ำ (H_2O) ขึ้นเป็นผลิตภัณฑ์ในขณะที่การย่อยสลายทางชีวภาพแบบไม่ใช้ออกซิเจนจะมีการสร้าง คาร์บอนไดออกไซด์ น้ำและมีเทน (CH_4) เกิดขึ้นเป็นผลิตภัณฑ์ ซึ่งโดยทั่วไปการสลายตัวของพอลิเมอร์ที่มีขนาดใหญ่ไปจนถึงขนาดเล็ก เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ จำเป็นต้องใช้จุลินทรีย์ที่แตกต่างกันหลายชนิดโดยที่จุลินทรีย์หนึ่งจะทำลายพอลิเมอร์หนึ่งให้เป็นโมโนเมอร์ จากนั้นจุลินทรีย์อีกชนิดก็จะสามารถนำโมโนเมอร์นั้นและสารอาหารอื่น ๆ ที่จุลินทรีย์ชนิดก่อนหน้าสร้างขึ้นมาใช้สร้างพลังงานต่อไปได้

Factors (requirement/activity)	Photo-degradation	Thermo-oxidative degradation	Biodegradation
Active agent	UV-light or high-energy radiation	Heat and oxygen	Microbial agents
Requirement of heat	Not required	Higher than ambient temperature required	Not required
Rate of degradation	Initiation is slow. But propagation is fast	Fast	Moderate
Other consideration	Environment friendly if high-energy radiation is not used	Environmentally not acceptable	Environment friendly
Overall acceptance	Acceptable but costly	Not acceptable	Cheap and very much acceptable

รูปที่ 1 แนวทางในการย่อยสลายสลายพอลิเมอร์แบบต่าง ๆ

(Bahl และคณะ, 2021)

2.4 พลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable plastics)

พลาสติกที่ย่อยสลายได้มีการศึกษาอย่างมากมายในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมา และได้เข้าสู่กระบวนการผลิตเพื่อการค้าโดยผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ประเภทต่าง ๆ เช่น ถุงขยะ ถุงปุ๋ยหมัก ถุงพอลิ และฟิล์มคลุมดินทางการเกษตร พลาสติกที่ย่อยสลายได้สามารถย่อยสลายได้หลังจากปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อมโดยกิจกรรมของจุลินทรีย์แล้วให้ผลิตภัณฑ์เป็น แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ และ น้ำ ซึ่งพลาสติกย่อยสลายได้เหล่านี้สามารถผลิตได้จากน้ำมันหรือผลิตภัณฑ์จากพืช โดยกระบวนการย่อยสลายพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพนี้จะมีความไวต่อแบคทีเรีย เชื้อราหรือสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กอื่น ๆ โดยใช้เป็นอาหารเพื่อการดำรงชีวิต พลาสติกย่อยสลายได้จะต้องผ่านการทดสอบการย่อยสลายทางชีวภาพเพื่อให้แน่ใจว่าสามารถย่อยสลายได้ทั้งหมด เช่น พลาสติกชนิดพอลิเอทิลีน (polyethylene, PE) ซึ่งสามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้เมื่อโซ่สายของพอลิเมอร์มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 500 ซึ่งน้ำหนักโมเลกุลพอลิเมอร์อื่น ๆ ส่วนใหญ่มีความไวต่อการย่อยสลายทางชีวภาพ ยกเว้นพอลิเอสเตอร์ (polyester) ซึ่งย่อยสลายได้ช้าแต่ตัววัสดุบรรจุภัณฑ์ส่วนใหญ่จะผลิตขึ้นจากพอลิเอสเตอร์เป็นจำนวนมาก เมื่อผลิตภัณฑ์เหล่านี้ถูกใช้จนหมดคุณค่าแล้วจะกลายเป็นขยะที่ย่อยสลายได้ยาก ด้วยเหตุนี้จึงทำให้การกำจัดขยะไม่สามารถได้รับการแก้ไขได้อย่างแท้จริงทำให้ในปัจจุบันจึงมีผู้ผลิตพลาสติกจำนวนมากหันมาสนใจในเรื่องนี้มากขึ้นและได้ผลิตพลาสติกย่อยสลายได้หลากหลายชนิดซึ่งสามารถแบ่งออกได้คร่าว ๆ ดังนี้ (Faris และคณะ, 2014)

2.4.1 พลาสติกที่ผลิตขึ้นจากแป้ง (Starch Based Plastics)

พลาสติกที่ผลิตจากแป้งส่วนใหญ่ทำจากข้าวสาลี มันฝรั่ง ข้าวและข้าวโพด ในบรรดาแป้งทั้งสี่ชนิดนี้ข้าวโพดมีราคาถูกและถูกใช้มากที่สุด พลาสติกที่ทำจากแป้งได้ถูกนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ในการรับประทาน อาหาร ถ้วยและผลิตภัณฑ์อื่น ๆ นอกจากนี้พลาสติกย่อยสลายจากแป้งสามารถแปรรูปโดยใช้เทคโนโลยี การฉีดขึ้นรูป การเป่าฟิล์ม การอัดขึ้นรูป และการขึ้นรูปด้วยความร้อนได้ ซึ่งพลาสติกย่อยสลายจากแป้งได้แก่ พอลิแลคซิไทด์ (polylactide, PLA) หรือ พอลิไกลโคลิค (polyglycolic, PGA) ซึ่งทั้ง PLA และ PGA เป็นพอลิเมอร์ที่เป็นผลึก แต่ PLA นั้นไม่ชอบน้ำมากกว่า PGA นอกจากนี้ PLA ยังมีความเปราะแต่แข็งแรงมากจึงจำเป็นต้องใช้พลาสติกไฮเซออร์สำหรับการใช้งานส่วนใหญ่ ส่วนคุณสมบัติเด่นอื่น ๆ ของพลาสติก PLA คือมีความเงาและความใสสูงกว่าพลาสติกชนิดอื่น

2.4.2 พลาสติกที่ผลิตจากแบคทีเรีย (Bacteria Based Plastics)

แบคทีเรียเป็นหนึ่งในทางเลือกเพิ่มเติมที่ใช้ในการสร้างพลาสติกย่อยสลายได้หลากหลายประเภท เช่นการใช้สายโซ่ของพอลิเมอร์พอลิไฮดรอกซีแอลคานอเอต (polyhydroxyalkanoate, PHA) ที่ผลิตขึ้นในเซลล์แบคทีเรีย โดยแบคทีเรียจะถูกเลี้ยงให้มีการเจริญในปริมาณมาก ๆ จากนั้นก็นำมาสกัดพอลิเมอร์ PHA แล้วสร้างเป็นพลาสติกย่อยสลายได้ ซึ่งคุณสมบัติเชิงกลของพอลิเมอร์สามารถเปลี่ยนแปลงได้ขึ้นอยู่กับความต้องการของผลิตภัณฑ์ PHA สามารถสังเคราะห์ได้มากกว่า 30% ของแบคทีเรียที่พบในดิน นอกจากนี้ยังพบได้ในตะกอนในทะเลและในสภาพแวดล้อมที่รุนแรงอื่น ๆ PHA จะคุณสมบัติที่ดีหรือไม่ขึ้นอยู่กับโครงสร้างของพอลิเมอร์ นอกจากนี้ชนิดของแบคทีเรียและสภาวะการเจริญเติบโตก็จะส่งต่อการผลิตโฮโมพอลิเมอร์ (homopolymers) โคพอลิเมอร์แบบสุ่ม (random copolymers) และบล็อกโคพอลิเมอร์ (block copolymers) ของ PHA ได้ด้วย

2.4.3 พลาสติกที่ผลิตจากถั่วเหลือง (Soy Based Plastics)

พลาสติกจากถั่วเหลืองเป็นการใช้วัสดุทางเลือกอื่นที่ใช้ผลิตพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ซึ่งถั่วเหลืองจะประกอบด้วยโปรตีนที่มีไขมันและน้ำมันโดยระดับโปรตีนในถั่วเหลืองอยู่ในช่วง 40-55% โปรตีนในปริมาณสูงนี้ทำให้ถั่วเหลืองสามารถขึ้นรูปเป็นวัสดุและฟิล์มพลาสติกได้ ฟิล์มที่ผลิตมักใช้สำหรับเคลือบอาหาร นอกจากนี้ยังมีการพัฒนานำมาใช้ในการผลิตขวดพลาสติกขึ้นและยังสามารถใช้ประโยชน์จากพลาสติกโปรตีนถั่วเหลืองไปใช้กับส่วนประกอบพลาสติกในรถยนต์ได้ โดยการบีบอัดและการฉีดพลาสติก

2.4.4 พลาสติกที่ผลิตจากเซลลูโลส (Cellulose Based Plastics)

พลาสติกที่ผลิตจากเซลลูโลสจะดัดแปลงมาจากวัสดุเซลลูโลสจากพืช ตัวอย่างของแหล่งเซลลูโลสที่นิยมใช้ ได้แก่ เยื่อไม้ป่านและฝ้าย เซลลูโลสถือเป็นไบโอพอลิเมอร์ (biopolymer) ที่มีอยู่มากที่สุดในโลกและมีอยู่ในหลากหลายสายพันธุ์เช่น สัตว์ พืชและแบคทีเรีย แต่แม้ว่าวัสดุบรรจุภัณฑ์ที่ทำจากเซลลูโลสที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพบางส่วนได้ปรากฏตัวในตลาดแล้วแต่การใช้ก็มีข้อจำกัดเนื่องมาจากต้นทุนการผลิตสูงที่มาก

2.4.5 พลาสติกที่ผลิตจากลิกนิน (Lignin Based Plastic)

พลาสติกที่ทำจากลิกนินหรือวัสดุจากพืชลิกนินเซลลูโลสที่เป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมการผลิตกระดาษ ลิกนินถือเป็นสารทดแทนน้ำมันฟีนอลิก (oil phenolic) เรซินอีพ็อกซี (epoxy resins) และกาว (adhesives) การเติมลิกนินลงในเมทริกซ์พอลิเมอร์ (polyolefin) จะให้ประโยชน์

แก่พลาสติกนั้นคือ ทำให้ทนต่อรังสี UV มากขึ้นและมีความสามารถในการเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายทางชีวภาพมากขึ้น

2.4.6 พลาสติกเสริมใยธรรมชาติ (Natural Fiber Reinforced Plastics)

เส้นใยธรรมชาติเช่นไม้ไผ่ ปอ ป่านศรนารายณ์ ปอแก้ว และชานอ้อยถูกนำมาใช้เป็นวัสดุเสริมแรงเนื่องจากมีต้นทุนต่ำ มีความแข็งแรงเฉพาะ โมดูลัสและความสามารถในการย่อยสลายทางชีวภาพอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ การใช้เส้นใยธรรมชาติเป็นตัวเสริมแรงในวัสดุชีวภาพให้ประโยชน์ต่อสิ่งแวดล้อมเนื่องจากสามารถลดของเสียที่ถูกทิ้งได้ เส้นใยธรรมชาติมีคุณสมบัติที่น่าสนใจเช่น ต้นทุนต่ำ ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ความแข็งแรงและโมดูลัสสูง ความหนาแน่นต่ำ มีกระบวนการทำที่ง่าย เส้นใยธรรมชาติสามารถเพิ่มขอบเขตการใช้วัสดุเหล่านี้ในสาขาต่าง ๆ ได้ เช่น อุตสาหกรรมการยานยนต์และบรรจุภัณฑ์ ซึ่งเส้นใยธรรมชาติสามารถจำแนกได้เป็น 2 ประเภทกว้าง ๆ ได้แก่ เส้นใยที่ไม่ใช่ไม้และเส้นใยไม้ในอุตสาหกรรมยานยนต์ การใช้เส้นใยที่ไม่ใช่ไม้เช่น ป่าน ปอและป่านศรนารายณ์พบว่า ประสบความสำเร็จในการออกแบบวัสดุผสมชีวภาพของพอลิพรอพิลีน (polypropylene, PP) การเปลี่ยนสารพอลิเมอร์ที่ใช้ผลิต PP ไปเป็นสารไบโอพอลิเมอร์ได้นั้นจะเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมมากขึ้นซึ่งเข้ากับนโยบายการใช้งานชิ้นส่วนยานยนต์สีเขียวในศตวรรษที่ 21 อีกด้วย นอกจากนี้ เส้นใยหญ้า (grass fiber) ถือเป็นเส้นใยชีวภาพอีกประเภทหนึ่งที่กำลังได้รับความสนใจจากนักวิทยาศาสตร์มากขึ้นเรื่อย ๆ ในฐานะที่เป็นเส้นใยเสริมแรงสำหรับการใช้งานในยานยนต์ในอนาคต

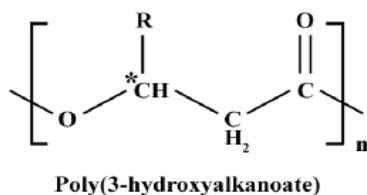
2.5 ความรู้เกี่ยวกับพอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (polyhydroxyalkanoate, PHA)

พอลิไฮดรอกซีแอลคาโนเอตเป็นพอลิเอสเทอร์ที่แบคทีเรียหลายชนิดสามารถสังเคราะห์และสะสมไว้ในไซโตพลาสซึมได้ซึ่งจะไม่ละลายน้ำ มีหน้าที่เป็นสารกักเก็บพลังงานและคาร์บอน สิ่งเหล่านี้เรียกว่าเม็ด PHA (PHA granules) (Byrom, 1991) นอกจากพอลิเอสเทอร์เหล่านี้แล้วพอลิเอสเทอร์อื่น ๆ ที่มีอยู่ในเฉพาะสิ่งมีชีวิตเท่านั้นคือ กรดพอลิมาลิก (polymalic acid) ซึ่งเป็นพอลิเอสเทอร์ที่ละลายน้ำได้สร้างขึ้นเฉพาะในสิ่งมีชีวิตที่มีวิวัฒนาการต่ำกว่ายูคาริโอต (Babel และคณะ, 2001) การสะสมของ PHAs ในเซลล์แบคทีเรียมักเกิดขึ้นเมื่อมีแหล่งคาร์บอนมากเกินไปและถ้าสารอาหารอื่น ๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตหมดลงหรืออาจบอกได้ว่า หากการเจริญเติบโตไม่สมดุล PHA ที่สังเคราะห์ขึ้นจะถูกใช้เป็นสารตัวกลาง (intermediates) ของกระบวนการเผาผลาญคาร์บอนต่อไปหรือใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญเติบโตของแบคทีเรียต่อไป ซึ่งการสังเคราะห์ PHA ในแบคทีเรียได้นั้นจะต้องถูกกำหนดขึ้นโดยยีน (gene) ที่อยู่ภายในเซลล์ ซึ่งมีการรายงานถึงการวิเคราะห์ในระดับ

โมเลกุลของกระบวนการสังเคราะห์ PHA พบว่ามีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องได้แก่ PHA synthases เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับเม็ดแกรนูลและเอนไซม์ที่กระตุ้นการสร้างไฮดรอกซีอะซิล-โคเอไทโอเอสเทอร์ (hydroxyacyl-CoA thioesters) รวมทั้งเอนไซม์สำหรับการแสดงออกของโปรตีนที่ควบคุมการสังเคราะห์ โดยความสามารถในการทำงานของเอนไซม์เหล่านี้และความรู้เกี่ยวกับชีวเคมีของเอนไซม์ตลอดจนโปรตีนโครงสร้างและโปรตีนควบคุมจะเป็นสิ่งสำคัญต่อการสร้างวิธีการสังเคราะห์ PHA (PHA biosynthesis pathways) ที่ทำงานได้ในสิ่งมีชีวิตที่ไม่สามารถสังเคราะห์ PHA ได้ นอกจากนี้ PHA ยังสามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้โดยการไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ PHA ดีพอลิเมอร์เอส (PHA depolymerases) เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานของจุลินทรีย์ (*Jendrossek, 2009*) นอกจากนี้จุลินทรีย์เหล่านี้ยังสามารถสังเคราะห์พอลิเมอร์ต่าง ๆ ที่มีคุณสมบัติที่น่าสนใจ เช่น โพลิเอสเตอร์ของพอลิ 3-ไฮดรอกซีบิวทิลเรต (homopolymer poly(3-hydroxybutyrate, poly(3HB)) โคพอลิเอสเตอร์ของ 3-ไฮดรอกซีบิวทิลเรต และ 3-ไฮดรอกซีวาเลเรต (poly(3HB-co-3HV)) และ PHAs ซึ่งประกอบด้วย 3-ไฮดรอกซีออกทานอเอต (3-hydroxyoctanoate) 3-ไฮดรอกซีเดคาโนเอต (3-hydroxydecanoate) และ 3-ไฮดรอกซีแอลคาโนเอต (3-hydroxyalkanoates) เป็นต้น

2.5.1 โครงสร้างของ PHA

PHA มีโครงสร้างเป็นพอลิเอสเตอร์สายตรง (linear polyester) ที่มีธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน เป็นองค์ประกอบ และมีสูตรโครงสร้างทั่วไปดังรูปที่ 2 โมโนเมอร์จะต่อกันแบบหัวต่อหางโดยปลายที่เป็นหมู่ฟังก์ชันไฮดรอกซีของโมเลกุลหนึ่งจะเชื่อมต่อกับหมู่ฟังก์ชันคาร์บอนิลิกของอีกโมเลกุลหนึ่งด้วยพันธะเอสเทอร์ ซึ่งตรงตำแหน่งปีต้าคาร์บอน (β carbon) จะเป็นไครัลคาร์บอน (chiral carbon) แสดงเป็น R-configuration (*Tan และคณะ, 2014*)



R group	Carbon no.	PHA polymer
methyl	C ₄	Poly(3-hydroxybutyrate)
ethyl	C ₅	Poly(3-hydroxyvalerate)
propyl	C ₆	Poly(3-hydroxyhexanoate)
butyl	C ₇	Poly(3-hydroxyheptanoate)
pentyl	C ₈	Poly(3-hydroxyoctanoate)
hexyl	C ₉	Poly(3-hydroxynonanoate)
heptyl	C ₁₀	Poly(3-hydroxydecanoate)
octyl	C ₁₁	Poly(3-hydroxyundecanoate)
nonyl	C ₁₂	Poly(3-hydroxydodecanoate)
decyl	C ₁₃	Poly(3-hydroxytridecanoate)
undecyl	C ₁₄	Poly(3-hydroxytetradecanoate)
dodecyl	C ₁₅	Poly(3-hydroxypentadecanoate)
tridecyl	C ₁₆	Poly(3-hydroxyhexadecanoate)

รูปที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของ Polyhydroxyalkanoate (PHA) :ระบบการตั้งชื่อและจำนวนคาร์บอนอะตอมของสารประกอบ PHA ของหมู่ alkyl R และเครื่องหมายดอกจันหมายถึง chiral carbon ของ PHA) (Tan และคณะ, 2014)

2.5.2 การจำแนกชนิดของ PHA

การจำแนกชนิดของ PHA สามารถจำแนกรวบรวม ๆ ได้ด้วย 2 เกณฑ์ ดังนี้

2.5.2.1 การจัดจำแนกโดยแบ่งตามชนิดของโมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบในสายพอลิเมอร์ (Babel และคณะ, 2001)

ก. โฮโมพอลิเมอร์ (homopolymer) เป็นพอลิเมอร์ที่มีโมโนเมอร์เพียงชนิดเดียวกันมาต่อกันเป็นสายยาว เช่น พอลิ 3 - ไฮดรอกซีบิวทีเรต (poly-3-hydroxybutyrate) และ พอลิ 3 - ไฮดรอกซีวาเลเรต (poly-3-hydroxyvalerate) เป็นต้น

ข. เฮเทอโรพอลิเมอร์ (heteropolymer) เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์มากกว่า 1 ชนิดมาต่อกัน โดยเรียกชื่อตามจำนวนของโมโนเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบ ตัวอย่างเช่น โคพอลิเมอร์ (copolymer) จะประกอบด้วยโมโนเมอร์ 2 ชนิดมาต่อกันเป็นสายพอลิเมอร์ เทอร์พอลิเมอร์ (terpolymer) จะประกอบด้วยโมโนเมอร์ 3 ชนิดมาต่อกัน เป็นต้น

2.5.2.2 การจัดจำแนกตามจำนวนคาร์บอนในหน่วยโมโนเมอร์ (Yee, 2012)

ก. PHA สายสั้น (short chain length, scl-PHA) เป็น PHA มีคาร์บอนจำนวน 3-5 อะตอม

ข. PHA สายกลาง (medium chain length, mcl-PHA) เป็น PHA มีคาร์บอนจำนวน 6-14 อะตอม

ค. PHA สายกลาง (long chain length, lcl-PHA) เป็น PHA มีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 14 อะตอมขึ้นไป

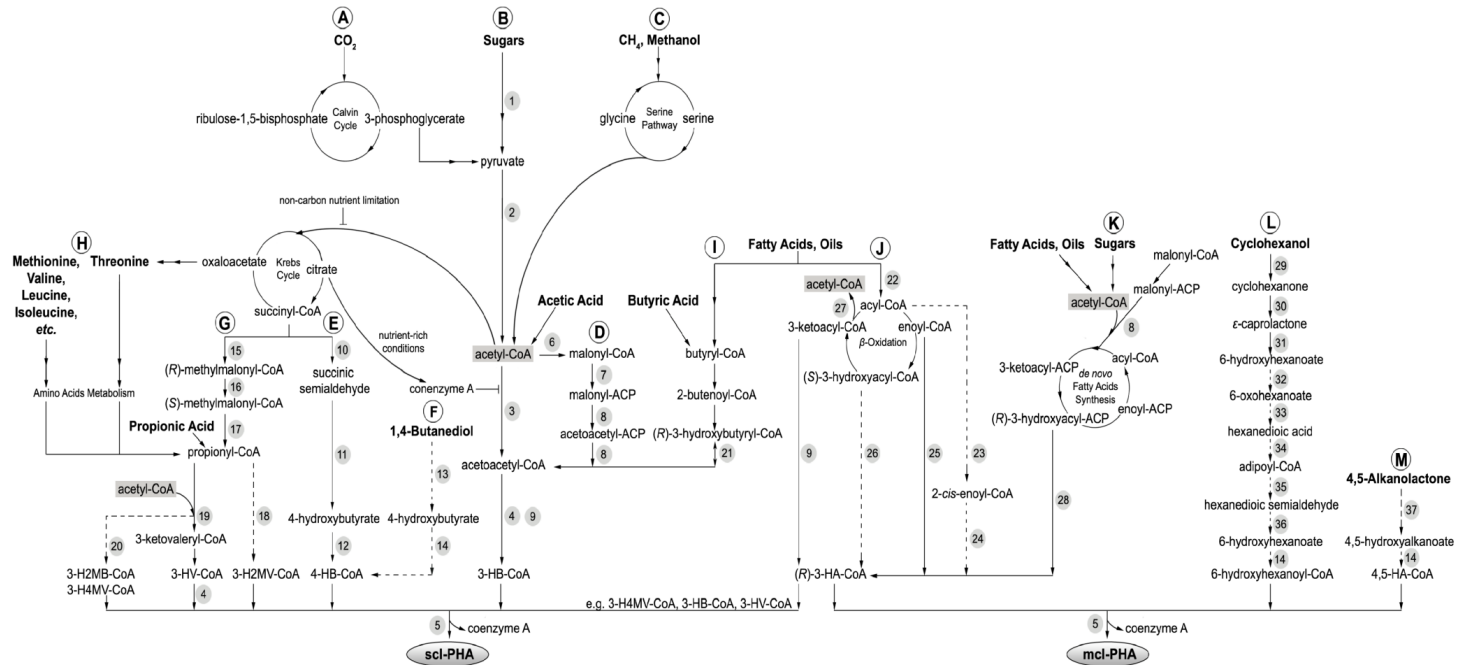
2.5.3 วิธีชีวสังเคราะห์

PHA มีบทบาทสำคัญต่อการอยู่รอดของจุลินทรีย์ในสภาวะที่มีความเครียด โดย PHA จะช่วยให้แบคทีเรียสามารถอยู่รอดได้ในระยะยาวภายใต้สภาวะที่ขาดแคลนสารอาหารโดยทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานสำรอง นอกจากนี้แบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตและสะสม PHA ได้นั้นยังแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการทนต่อความเครียดที่เพิ่มขึ้นจากการถูกทำลายจากสิ่งแวดล้อม เช่น การฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต (UV) ความร้อนและการซ็อกจากแรงดันออสโมติก (osmotic shock) (Shrivastav และคณะ, 2013) วิธีการสังเคราะห์ PHA นั้นจะเชื่อมโยงกันอย่างซับซ้อนกับวิถีการเผาผลาญส่วนกลางของแบคทีเรีย (central metabolic pathways) ไม่ว่าจะเป็นกระบวนการไกลโคไลซิส (glycolysis) วัฏจักรเครบส์ (Krebs' Cycle) กระบวนการปฏิกิริยาออกซิเดชัน (β -oxidation) การสังเคราะห์กรดไขมันผ่านวิถีเดอโนโว (*de novo* fatty acids synthesis) การสลายกรดอะมิโน วัฏจักรคัลวิน (Calvin Cycle) และวิถีสังเคราะห์ซีรีน (serine pathway) ซึ่งวิถีสังเคราะห์ PHA จะใช้สารตัวกลาง (intermediates) มากมายหลายชนิดร่วมกันกับกระบวนการต่าง ๆ เหล่านี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง สารตัวกลางอะซิetyl-CoA ซึ่งในจุลินทรีย์ที่สร้าง PHA บางชนิด เช่น *Cupriavidus necator*, *Chromatium vinosum* และ *Pseudomonas aeruginosa* ฟลักซ์ (flux) ของการเปลี่ยน acetyl-CoA ไปเป็น PHA นั้นจะขึ้นอยู่กับสภาวะของสารอาหารอย่างมีนัยสำคัญโดยภายใต้สภาวะที่อุดมด้วยสารอาหารมากมายจะส่งผลให้มีการผลิตโคเอนไซม์ เอ (coenzyme A) ในปริมาณที่สูงซึ่งจะไปขัดขวางกระบวนการสังเคราะห์ PHA โดยจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 3 - คีโตไทโอเรต (3-ketothiolase, PhaA) ส่งผลให้สารตัวกลาง acetyl-CoA เปลี่ยนวิถีไปยังวัฏจักรเครบส์ (Krebs' Cycle) เพื่อนำไปผลิตพลังงานเพื่อการเจริญเติบโตของเซลล์ แต่ในทางกลับกันในสภาวะที่ขาดอาหารไม่สมดุลเช่น เมื่อสารอาหารที่จำเป็น เช่น ไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ถูกใช้ไปจนหมดแต่แล้วยังมีคาร์บอนปริมาณที่มากเกินไปหรือกล่าวได้ว่า

มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูง จะทำให้ระดับโคเอนไซม์ เอ (coenzyme A) จะยังไม่สูงพอที่จะทำให้ acetyl-CoA เปลี่ยนวิถีไปยังวัฏจักรเครบส์ได้ ด้วยเหตุนี้ acetyl-CoA จึงยังคงมีการดำเนินวิถีไปสู่การสังเคราะห์ PHA และสะสมไว้ในเซลล์ได้ ซึ่งกลไกการควบคุมการเผาผลาญนี้จะช่วยให้จุลินทรีย์สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมได้ (Tan และคณะ, 2014)

นอกจากนี้ Tan และคณะ (2014) ยังได้ค้นคว้าข้อมูลเกี่ยวกับวิถีการเผาผลาญเพื่อการสังเคราะห์ scl-PHA และ mcl-PHA จนได้รับความรู้ความเข้าใจอย่างมากและสามารถสรุปเป็นแผนภาพได้ดังรูปที่ 3 ที่แสดงวิถีต่าง ๆ ของการสังเคราะห์ scl-PHA (เส้นทาง A ถึง J) และการสังเคราะห์ mcl-PHA (เส้นทาง J ถึง M) และตารางที่ 1 แสดงข้อมูลสรุปของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง และหน้าที่ของเอนไซม์นั้น ๆ (Sagong และคณะ, 2018) แต่อย่างไรก็ตามความรู้ในปัจจุบันเกี่ยวกับวิถีการสังเคราะห์ทางชีวภาพส่วนใหญ่ถูกจำกัดอยู่ที่ อาร์ ไฮดรอกซีแอลคิล โคเอ ((R)-hydroxyalkyl-CoA, (R) -3-HA-CoA) และยังไม่ค้นพบสารตั้งต้นและโมโนเมอร์ที่มีความหลากหลายทางเคมีที่จะสามารถนำมาสังเคราะห์ lcl-PHA ได้ แต่ Tan และคณะ (2014) คาดว่าจะมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อตรวจสอบวิถีการสังเคราะห์ตลอดจนค้นหาวิถีการสังเคราะห์ทางชีวภาพใหม่เพื่ออำนวยความสะดวกในการสร้างวัสดุ PHA ที่สามารถปรับแต่งให้เหมาะสมกับความต้องการใช้งานเฉพาะต่อไปได้

รูปที่ 3 วิธีการสังเคราะห์ PHA :เส้นประแทน putative pathways ตัวเลขแทนเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง (Tan และคณะ, 2014)



ตารางที่ 1 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิถีสังเคราะห์ PHA ในรูปที่ 5 (Tan และคณะ, 2014)

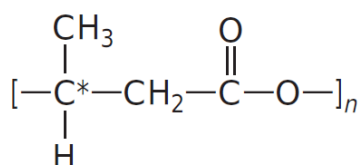
No.	Enzyme	Abbreviation	Species
1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	-	<i>Cupriavidus necator</i>
2	Pyruvate dehydrogenase complex	-	<i>Cupriavidus necator</i> and <i>Burkholderia cepacia</i>
3	3-Ketothiolase	PhaA	<i>Cupriavidus necator</i>
4	NADPH-dependent acetoacetyl-CoA reductase	PhaB	<i>Cupriavidus necator</i>
5	PHA synthase	PhaC	<i>Cupriavidus necator</i> and various
6	Acetyl-CoA carboxylase	ACC	<i>Escherichia coli</i> K-12 MG1655
7	Malonyl-CoA:ACP transacylase	FabD	<i>Escherichia coli</i> K-12 MG1656
8	3-Ketoacyl carrier protein synthase	FabH	<i>Escherichia coli</i> K-12 MG1657
9	NADPH-dependent 3-Ketoacyl reductase	FabG	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
10	Succinic semialdehyde dehydrogenase	SucD	<i>Clostridium kluyveri</i>
11	4-Hydroxybutyrate dehydrogenase	4HbD	<i>Clostridium kluyveri</i>
12	4-Hydroxybutyrate-CoA: CoA transferase	OrfZ	<i>Clostridium kluyveri</i>
13	Alcohol dehydrogenase, putative	-	<i>Aeromonas hydrophila</i> 4AK4
14	Hydroxyacyl-CoA synthase, putative	-	Mutants and recombinants of <i>Cupriavidus necator</i>
15	Methylmalonyl-CoA mutase	Sbm	<i>Escherichia coli</i> W3110
16	Methylmalonyl-CoA racemase	-	<i>Nocardia corallina</i>
17	Methylmalonyl-CoA decarboxylase	YgfG	<i>Escherichia coli</i> W3110
18	Ketothiolase, putative	-	-
19	3-Ketothiolase	BktB	<i>Cupriavidus necator</i>
20	Ketothiolase, putative	-	-

ตารางที่ 1 (ต่อ) เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิถีสังเคราะห์ PHA ในรูปที่ 5

No.	Enzyme	Abbreviation	Species
21	NADPH-dependent acetoacetyl-CoA reductase	-	<i>Rhizobium (Cicer) sp.</i> CC 1192
22	Acyl-CoA synthetase	FadD	<i>Pseudomonas putida</i> CA-3 and <i>Escherichia coli</i> MG1655
23	Acyl-CoA oxidase, putative	-	-
24	Enoyl-CoA hydratase I, putative	-	-
25	(R)-Enoyl-CoA hydratase	PhaJ	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440
26	Epidermase	-	-
27	3-Ketoacyl-CoA thiolase	FadA	<i>Pseudomonas putida</i> KT2442
28	3-Hydroxyacyl-ACP: CoA transacylase	PhaG	<i>Pseudomonas mendocina</i>
29	Cyclohexanol dehydrogenase	ChnA	<i>Acinetobacter sp.</i> SE19 and <i>Brevibacterium epidermidis</i> HCU
30	Cyclohexanone monooxygenases	ChnB	<i>Acinetobacter sp.</i> SE19 and <i>Brevibacterium epidermidis</i> HCU
31	Caprolactone hydrolase	ChnC	<i>Acinetobacter sp.</i> SE19 and <i>Brevibacterium epidermidis</i> HCU
32	6-Hydroxyhexanoate dehydrogenase	ChnD	<i>Acinetobacter sp.</i> SE19 and <i>Brevibacterium epidermidis</i> HCU
33	6-Oxohexanoate dehydrogenase	ChnE	<i>Acinetobacter sp.</i> SE19 and <i>Brevibacterium epidermidis</i> HCU
34	Semialdehyde dehydrogenase, putative	-	-
35	6-hydroxyhexanoate dehydrogenase, putative	-	-
36	Hydroxyacyl-CoA synthase, putative	-	-
37	Lactonase, putative	-	Mutants and recombinants of <i>Cupriavidus necator</i>

2.6. ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับ PHB

Poly-3-hydroxybutyrate หรือ PHB ถือเป็นตัวอย่างของการพัฒนาทางเทคโนโลยีชีวภาพในการผลิตวัสดุใหม่ เกิดจากการสังเคราะห์ทางชีวภาพ มีคุณสมบัติมากมายที่น่าสนใจเช่นสำหรับการใช้งานด้านชีวการแพทย์ เป็นพอลิไกลโคไลด์ (polyglycolide) ที่มีลักษณะคล้ายกับพอลิเอสเทอร์ (polyester) และยังสามารถย่อยสลายได้ภายในร่างกาย โครงสร้างของ PHB แสดงได้ดังรูป 4 นอกจากนี้ด้วยวิธีการสังเคราะห์ PHB เป็นการสังเคราะห์ทางชีวภาพโดยใช้จุลินทรีย์เป็นตัวผลิตจึงทำให้ไอโซเมอร์ของ PHB มีเพียงไอโซเมอร์เดียว ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ PHB มีค่าระดับความเป็นผลึก (degrees of crystallinity) มากกว่า 95% มีโครงสร้างภายในที่ยืดหยุ่นได้ มีจุดหลอมเหลวประมาณ 180 องศาเซลเซียส ซึ่งน้ำหนักโมเลกุลของ PHB จะแตกต่างกันตามชนิดของจุลินทรีย์ วิธีการสกัดช่วงการเจริญของเซลล์ที่นำมาสกัด และสภาวะที่ใช้เลี้ยงเซลล์ เช่น ค่า pH อุณหภูมิ ปริมาณสารที่จำเป็น เป็นต้น (Hill, 2005)



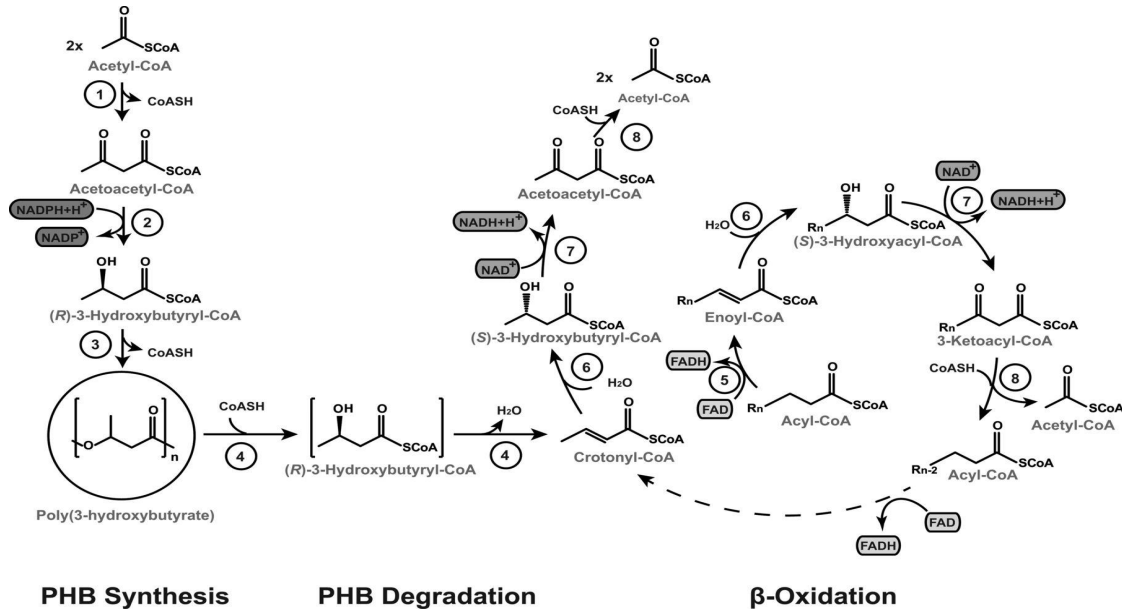
รูปที่ 4 โครงสร้างทางเคมีของ poly(-3-hydroxybutyrate)

เครื่องหมายดอกจันคือ ตำแหน่งคาร์บอน (Hill, 2005)

2.6.1 วิธีชีวสังเคราะห์ PHB

การสังเคราะห์ PHB จาก acetyl-CoA ประกอบด้วยสามขั้นตอนและเอนไซม์สามตัวที่เกี่ยวข้อง คือ (Babel และคณะ, 2001)

- การทำปฏิกิริยาเชื่อมต่อ acetyl-CoA 2 โมเลกุลเข้าด้วยกันเพื่อสร้าง acetoacetyl-CoA ในกระบวนการ Claisen-condensation โดยเอนไซม์ 3-ketothiolase (PhaA)
- การเปลี่ยน acetoacetyl-CoA เป็น D - (-) - 3-hydroxybutyryl-CoA ด้วยเอนไซม์ acetoacetyl-CoA reductase (PhaB)
- การพอลิเมอไรเซชันด้วยเอนไซม์ PHA synthase (PhaC)



รูปที่ 5 วิธีการเผาผลาญสำหรับการสังเคราะห์และการย่อยสลาย PHB. : (1) β -ketothiolase (PhaA); (2) acetoacetyl-CoA reductase (PhaB); (3) poly(3HB) synthase; (4) PHB depolymerases (PhaZ); (5) acyl-CoA dehydrogenase (FadE) (6) enoyl-CoA hydratase (multifunctional FadB); (7) 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (multifunctional enzyme FadB); (8) 3-ketoacyl-CoA thiolase (FadA) (Eggers และ Steinbuchel, 2013)

Sagong และคณะ (2018) ได้อธิบายรายละเอียดเกี่ยวกับวิถีชีวสังเคราะห์ PHB ในแต่ละขั้นตอน ดังต่อไปนี้

ก. การควบแน่นของโมเลกุล Acetyl-CoA สองโมเลกุลโดย PhaA

(Condensation of Two Acetyl-CoA Molecules by PhaA)

PhaA เร่งปฏิกิริยาในขั้นตอนแรกของการสังเคราะห์ PHB โดยการควบแน่นของ acetyl-CoA สองโมเลกุลให้เป็น acetoacetyl-CoA แต่ที่ที่น่าสนใจคือในแบคทีเรีย *Cupriavidus necator* (*C. necator*) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่รู้จักกันดีที่สุดสำหรับการสังเคราะห์ด้วย PHA มี อะซิetyl โคเอ อะซิetylทรานส - ฟอเรส (acetyl- CoA acetyltransferases) 2 ตัวคือ 3 - คีโตไทโอเอร์ส (3-ketothiolase, CnPhaA) และ บีต้า-คีโตไทโอเอร์ส (β -ketothiolase B, CnBktB) แม้ว่าเอนไซม์ทั้งสองจะเป็นสื่อกลางในการเร่งปฏิกิริยาเดียวกันในการสังเคราะห์ PHA แต่ก็มีเฉพาะของสารตั้งต้นที่แตกต่างกันกล่าวคือ CnPhaA สามารถเร่งปฏิกิริยาการควบแน่นของโมเลกุล acetyl-CoA สองโมเลกุลเท่านั้น แต่ CnBktB สามารถเร่งปฏิกิริยาการควบแน่นของ acetyl- CoA และ acyl-CoAs ที่มีความยาวคาร์บอนต่างกัน เช่น acetyl-CoA, propionyl-CoA และ butyryl-CoA เนื่องจากความจำเพาะของสารตั้งต้นของ CnBktB ที่มีความหลากหลายมากกว่าจึงถูกนำมาใช้ในการผลิต PHAs ที่มีคาร์บอนโมโนเมอร์ที่ยาวกว่ากรด 3 - ไฮดรอกซีบิวทริก (3 -hydroxybutyric) ได้เช่น กรด 3 - ไฮดรอกซีวาเลริก (3 - hydroxyvaleric acid) และกรด 3 - ไฮดรอกซีเฮกซะโนอิก (3 - hydroxyhexanoic acid)

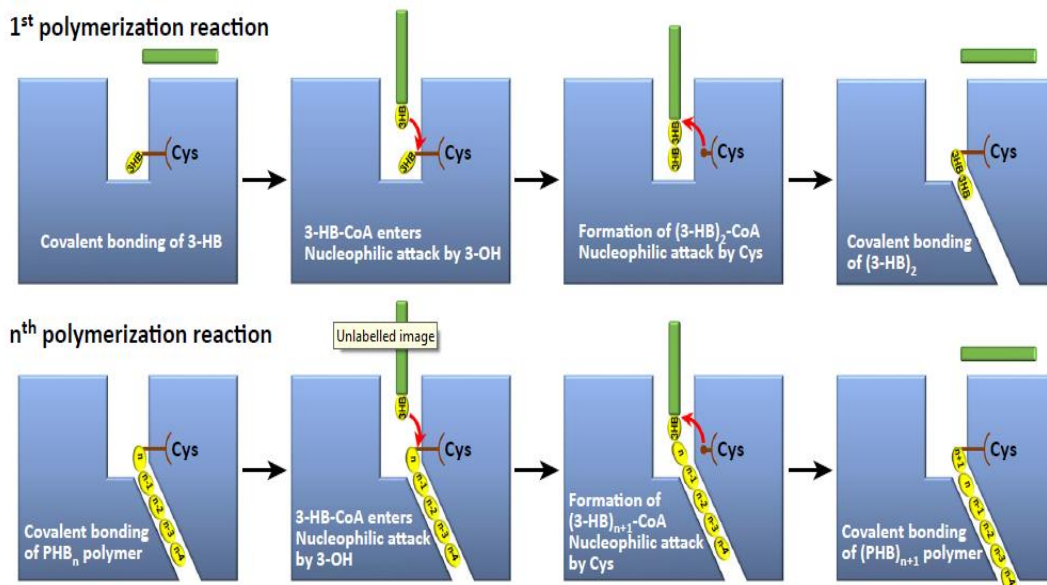
ข. ปฏิกิริยารีดักชันของ 3 - คีโตอะซิetylโคเอด้วย PhaB

(Reduction of 3 - Ketoacyl-CoA by PhaB)

ในขั้นตอนที่สองของการสังเคราะห์ PHB acetoacetyl-CoA จะถูกรีดิิวซ์ไปเป็น (R) -3-HB-CoA โดย PhaB และมี NADPH เป็นปัจจัยร่วม นอกจากนี้ยังพบว่านอกจากการเร่งปฏิกิริยาของ PhaB ในแบคทีเรีย *C. necator* (CnPhaB) ที่จะเปลี่ยน acetoacetyl-CoA ไปเป็น (R) -3-HB-CoA แล้ว acetoacetyl-CoA สามารถถูกรีดิิวซ์ไปเป็น (S) -3-HB-CoA ได้โดย *C. necator* hydroxybutyryl- CoA dehydrogenase (CnPaaHI) ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องข้องในการเกิดปฏิกิริยาย้อนกลับของ β -oxidation ถึงแม้ว่าทั้ง CnPhaB และ CnPaaHI จะใช้ acetoacetyl-CoA เป็นสารตั้งต้นในการผลิต 3-HB-CoA แต่คุณสมบัติของไอโซเมอร์หรือไครัลคาร์บอน (chirality) ของผลิตภัณฑ์ขั้นสุดท้ายของเอนไซม์ทั้งสองนี้แตกต่างกันคือ รูปแบบ R และรูปแบบ S ตามลำดับ แต่ที่สำคัญคือ จะมีเพียง (R) -3-HB-CoA ที่สามารถใช้เป็นโมโนเมอร์ของการสังเคราะห์ PHA ได้ ส่วน(S) -3-HB-CoA ไม่สามารถใช้ได้ ดังนั้น จึงต้องมีความเข้าใจสเตอริโอเคมี (stereochemistry) ของเอนไซม์ reductase เพื่อการผลิต PHA ที่เพิ่มขึ้นได้

ค. การพอลิเมอไรเซชัน PHB โดย PhaC (PHB Polymerization by PhaC)

PhaC เป็นเอนไซม์ที่สำคัญที่สุดในการสังเคราะห์ PHA และเร่งปฏิกิริยาการเกิดพอลิเมอไรเซชันของ CoA thioesters ของ HAs ต่าง ๆ เนื่องจาก PhaC มีบทบาทสำคัญในการกำหนดลักษณะทั่วไปของ PHAs ที่ผลิตขึ้นรวมถึงน้ำหนักโมเลกุล องค์ประกอบ โมโนเมอร์ ความแตกต่างและผลผลิต โดยพอลิเมอไรเซชัน PHB เริ่มต้นเมื่อสารตั้งต้นตัวแรก (R) -3-HB-CoA เข้าสู่ตำแหน่งบริเวณเร่งของเอนไซม์ ตำแหน่ง Cys319 ของเอนไซม์ซึ่งจะทำลายพันธะ thioester ของสารตั้งต้น (R) -3-HB-CoA ทำให้ coA หลุดออกไปกลายเป็น (R) -3-HB จากนั้นสารตั้งต้นโมเลกุลที่สอง (R) -3-HB-CoA เข้าสู่บริเวณเร่งของเอนไซม์ จากนั้นเชื่อมพันธะระหว่าง HB-CoA โมเลกุลแรกกับ (R) -3-HB-CoA ของโมเลกุลที่สองโดยจะเกิดปฏิกิริยาต่อกันเช่นนี้ไปเรื่อย ๆ จนกว่าเอนไซม์จะไม่สามารถทำงานต่อได้



รูปที่ 6 กลไกการเกิดพอลิเมอไรเซชันด้วย phaC (PHA Polymerization Mechanism by PhaC)

(Sagong และคณะ, 2018)

2.6.2 การตรวจสอบจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์ PHB ในธรรมชาติ

แกรนูลของ PHA ที่สะสมอยู่ในเซลล์ของจุลินทรีย์เป็นสารประเภทไขมันชนิดหนึ่ง ดังนั้นการตรวจสอบเบื้องต้นสามารถใช้วิธีการย้อมสีของสารประเภทไขมันที่อยู่ภายในเซลล์ได้ เช่น การย้อมสีด้วยซูดาน แบลค บี (zudan black B), ไนล์บูล (nile blue), ไนล์เรด (nile red) โดยที่สีเหล่านี้จะเข้าไปติดที่แกรนูล แต่อย่างไรก็ตามวิธีการย้อมสีเหล่านี้ไม่ได้มีความจำเพาะต่อแกรนูลของ PHA เพียงอย่างเดียวเท่านั้นแต่สามารถย้อมไขมันอื่น ๆ ได้ ดังนั้นการรายงานการตรวจพบ PHA จะต้องใช้วิธีการอื่น ๆ ยืนยันด้วย (Spiekermann และคณะ, 1999)

มีรายงานการศึกษาการวัดปริมาณสะสมอย่างรวดเร็ว (rapid quantitative) ของ PHA โดยการวัดความเข้มของการเรืองแสงของสีย้อมเซลล์ไนล์เรดโดยมีช่วงความยาวคลื่นที่ดีที่สุด คือ ความยาวคลื่นกระตุ้น 535 นาโนเมตรและปลดปล่อยความยาวคลื่น 605 นาโนเมตรออกมา แต่การวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยสีย้อมเช่นนี้ใช้เพียงเพื่อตรวจสอบเบื้องต้นแบบเร็ว ๆ ไม่สามารถระบุปริมาณอย่างแม่นยำได้ (Zuriani และคณะ, 2013)

2.7 ภาพรวมของการผลิต PHB ใน รีคอมบิแนนท์ *E. coli* (Overview of PHB production in recombinant *E. coli*)

Poly-3-hydroxybutyrate, PHB เป็นพอลิเอสเทอร์ประเภทเทอร์โมพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพที่ผลิตจากแหล่งคาร์บอนหมุนเวียนจากแบคทีเรียจำนวนมาก แต่อย่างไรก็ตามการผลิตด้วยวิธีนี้ ต้นทุนการผลิตยังคงสูงอยู่มาก และหนึ่งในกลยุทธ์ที่มุ่งลดต้นทุนคือการพัฒนาสายพันธุ์รีคอมบิแนนท์ที่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน นอกจากนี้แบคทีเรียที่มีการสะสม PHB ในธรรมชาติมักจะมีเวลาในการเจริญเติบโตที่ยาวนาน อุณหภูมิการเจริญเติบโตที่เหมาะสมค่อนข้างต่ำ และมักจะสลายตัวได้ง่าย ด้วยสาเหตุเหล่านี้จึงนำไปสู่การพัฒนา PHB รีคอมบิแนนท์แบคทีเรียที่มีความสามารถในการสะสม PHB สูงและ / หรือไม่มีการย่อยสลาย PHB เลย (Thirumala และ Reddy, 2012)

ในการสร้างวิถีชีวสังเคราะห์ PHB ในรีคอมบิแนนท์แบคทีเรียนั้น องค์ประกอบหลักที่มีส่วนสำคัญ ได้แก่ ยีน (gene) โปรโมเตอร์ (promoter) และ ตำแหน่งที่ไรโบโซมมาจับ (ribosome binding site) ซึ่งมีงานวิจัยจำนวนมากที่กล่าวถึงองค์ประกอบเหล่านี้และพยายามที่จะดัดแปลงหรือพัฒนาเพื่อนำไปใช้ในการผลิต ดังนี้

2.7.1 ยีน (gene)

Kaur (2015) ได้กล่าวถึงกลยุทธ์ที่ใช้ผลิต PHB ในระดับอุตสาหกรรมพบว่าชนิดของแบคทีเรียหรือยีนของแบคทีเรียนั้นจะเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อการผลิต PHB ปริมาณสูงด้วย โดยจากงานวิจัยนี้ได้กล่าวถึงการผลิต PHB จากแบคทีเรียหลากหลายสปีชีส์พบว่ามีประสิทธิภาพในการผลิต PHB ได้แตกต่างกัน หนึ่งในสปีชีส์ที่สามารถผลิต PHB ได้ในปริมาณมากนั้นคือแบคทีเรีย *Cupriavidus necator* (*C. necator*) เมื่อใช้เศษอาหารเหลือทิ้งเป็นซับสเตรตสามารถผลิต PHB ได้ถึง 87% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งแสดงให้เห็นถึงศักยภาพการผลิต PHB ของ *C. necator*

Heinrich และคณะ (2012) ได้กล่าวถึงการใส่ *Cupriavidus necator* สายพันธุ์ H16 (*C. necator* H16) ในการผลิต PHB ในถังหมักขนาด 400 ลิตรและใช้โซเดียมกลูโคเนต เป็นซับสเตรต พบว่าสามารถผลิต PHB ได้ถึง 87.03 % ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งจะเห็นได้ว่า ยีนของ *C. necator* H16 มีความสามารถในการผลิต PHB ในปริมาณสูงได้

2.7.2 โพรโมเตอร์ (promoter)

Wei และคณะ (2009) ได้สร้างพลาสมิดลูกผสม pBHR68 ที่มียีนที่สามารถผลิต PHB จาก *C. necator* H16 แสดงออกภายใต้โพรโมเตอร์ดั้งเดิม (native promoter) ของยีนนั้นใน รีคอมบิแนนท์ *E. coli* สายพันธุ์ JM109 (*E. coli* JM109) พบว่าสามารถผลิต PHB ได้เพียง 29.7% ของน้ำหนักเซลล์แห้งภายในเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งแสดงให้เห็นได้ว่า โพรโมเตอร์ดั้งเดิมนี้นี้มีประสิทธิภาพ ในการผลิต PHB ได้ต่ำ

Napathorn และคณะ (2021) ได้สร้างพลาสมิดลูกผสมที่สามารถผลิต PHB ได้โดยใช้ โอเพอรอน *phaCAB* *C. necator* A04 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ใกล้เคียงกับ *C. necator* H16 ที่เป็นสายพันธุ์ที่ใช้ผลิต PHB ในระดับอุตสาหกรรม แสดงออกภายใต้การควบคุมของโพรโมเตอร์ *araBAD* ที่เหนี่ยวนำด้วยน้ำตาลอะราบิโนสพบว่าสามารถผลิต PHB ได้ปริมาณ 91.74 % ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่เวลา 24 ชั่วโมง แต่ทว่าการใช้น้ำตาลอะราบิโนสที่มีราคาแพงมากเพื่อเหนี่ยวนำการผลิต PHB นั้น จะส่งผลต้นทุนการผลิตสูงขึ้นและยังไม่คุ้มค่ากับการผลิตในระดับอุตสาหกรรม

Boontip และคณะ (2020) ได้สร้างพลาสมิดลูกผสม pColdTF-*phaCAB*_{A-04} ที่มียีนที่สามารถสังเคราะห์ PHB จาก *C. necator* A04 แสดงออกภายใต้โพรโมเตอร์ cold - shock *cspA* ใน *E. coli* JM109 พบว่าสามารถผลิต PHB ได้ถึง 90.6% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ภายในเวลา 24 ชั่วโมงซึ่งถือได้ว่ามีประสิทธิภาพในการผลิตที่สูงแต่เนื่องจากพลาสมิดลูกผสมนี้จะผลิต PHB ได้ ต้องเหนี่ยวนำด้วยสาร IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) ที่อุณหภูมิ ต่ำ เมื่อคำนึงถึงการผลิตในระดับอุตสาหกรรมแล้วการใช้สารเหนี่ยวนำที่มีราคาแพงและใช้อุณหภูมิต่ำ ในการเหนี่ยวนำการผลิตนั้นถือเป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิตอย่างมาก

Ko และคณะ (2020) ได้สร้างพลาสมิดลูกผสมเพื่อผลิตกรดอะคริลิก (acrylic acid) ใน *E. coli* โดยยีนผลิตกรดอะคริลิกจะแสดงออกภายใต้การควบคุมของโพรโมเตอร์ BBa_J23100 ซึ่งเป็นโพรโมเตอร์ที่แสดงออกได้ตลอดเวลาพบว่าสามารถผลิตกรดอะคริลิกได้ถึง 55.7 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่ยีนผลิตกรดอะคริลิกจะแสดงออกภายใต้การควบคุมของโพรโมเตอร์ดั้งเดิมของยีนจะผลิต ได้เพียง 37.7 มิลลิกรัมต่อลิตรเท่านั้นซึ่งจากงานวิจัยนี้นั้นแสดงให้เห็นได้ว่าโพรโมเตอร์

BBa_J23100 นั้นถือเป็นโปรโมเตอร์ที่สามารถแสดงออกได้แรงตลอดเวลาไม่ต้องใช้ตัวเหนี่ยวนำการผลิตและสามารถผลิตสารผลิตภัณฑ์ได้ในปริมาณมาก ซึ่งจะสามารถลดต้นทุนการผลิตเนื่องจากการใช้ตัวเหนี่ยวนำได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้เลือกใช้โปรโมเตอร์ BBa_J23100 มาศึกษาในงานวิจัยนี้

2.7.3 ตำแหน่งจับของไรโบโซม (ribosome binding site, RBS)

Li และคณะ (2016) ได้สร้างไลบรารีของการผลิต PHB จากยีน *phbC phbA* และ *phbB* จาก *C. necator* H16 ใน *E. coli* โดยจะมีการดัดแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ RBS ของแต่ละยีนจำนวน 10 นิวคลีโอไทด์ พบว่าวิธีการนี้สามารถคัดเลือกสายพันธุ์รีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มีความสามารถผลิต PHB ในปริมาณสูงได้ โดยจากงานวิจัยพบว่าสูงได้ถึง 92% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ภายในเวลา 24 ชั่วโมง จากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นการสร้างไลบรารีของการผลิต PHB โดยมีการดัดแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ RBS สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต PHB ได้

Seo และคณะ (2013) ได้นำเสนอการดัดแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ RBS บริเวณสแตนด์บาย (standby) และบริเวณว่าง (spacer region) ซึ่งทั้งสองบริเวณนี้จะส่งผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของไรโบโซมซึ่งจะส่งผลไปถึงการแสดงออกของเอนไซม์ที่สังเคราะห์สารผลิตภัณฑ์ได้

จากงานวิจัยดังกล่าวข้างต้นทำให้ผู้วิจัยได้สร้างไลบรารีที่มีการผลิต PHB โดยมียีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิต PHB จาก *C. necator* A-04 (*phaCAB_{A-04}* operon) ที่แสดงออกภายใต้การทำงานของโปรโมเตอร์ BBa_J23100 ซึ่งเป็นโปรโมเตอร์ที่สามารถแสดงออกได้อย่างแรงตลอดเวลาเพื่อลดต้นทุนการใช้สารเหนี่ยวนำโปรโมเตอร์และผู้วิจัยได้ดัดแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ RBS ของโอเพอเรอนตามงานวิจัยของ Seo และคณะ (2013) เพื่อให้การผลิต PHB มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

2.8 Ribosome binding site (RBS) และการแปลรหัสของแบคทีเรีย (bacterial translation)

Salis (2011) และ Salis และคณะ (2009) ได้อธิบายรายละเอียดของการแปลรหัส และความสำคัญของ RBS ได้ดังนี้

2.8.1 การเริ่มต้นการแปลเป็นขั้นกำหนดอัตรา (Translation initiation as a rate-limiting step)

การแปลรหัสเป็นกระบวนการที่ไรโบโซม (ribosome) จับกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ mRNA และสร้างโปรตีนที่สอดคล้องกับรหัสพันธุกรรม กระบวนการนี้มีสามขั้นตอน ได้แก่ การเริ่มต้นการแปล (initiation) การขยายการแปล (elongation) และการสิ้นสุดการแปล (termination) โดย การเริ่มต้นการแปลรหัสจะเป็นขั้นกำหนดอัตราที่สำคัญ ซึ่งจะเป็นตัวควบคุมจำนวนไรโบโซมที่เริ่มกระบวนการขยายตัวการแปลหรือ elongation และจำนวนไรโบโซมที่สามารถแปลรหัสจนเสร็จสิ้น

เพื่อให้ได้การผลิตโปรตีนสูงที่สุด ซึ่งทั้งอัตราการเริ่มต้นการแปลและอัตราการขยายตัวควรจะต้องมีค่ามากที่สุด ซึ่งวิธีที่ใช้กันทั่วไปในการเพิ่มอัตราการยืดขยายตัวของการแปล คือการเพิ่มประสิทธิภาพโคดอน (Codon) ของโปรตีนที่ถูกแปลรหัส (coding sequence, CDS) แต่ในทางกลับกัน หากมีการลดลงของอัตราการเริ่มต้นการแปลก็จะนำไปสู่การผลิตโปรตีนลดลงได้ ดังนั้นการเพิ่มประสิทธิภาพของ codon ของโปรตีน CDS และการปรับเปลี่ยนอัตราการเริ่มต้นการแปลจะทำให้สามารถควบคุมอัตราการผลิตของโปรตีนได้อย่างสมบูรณ์ในช่วงการแปลนั้นได้

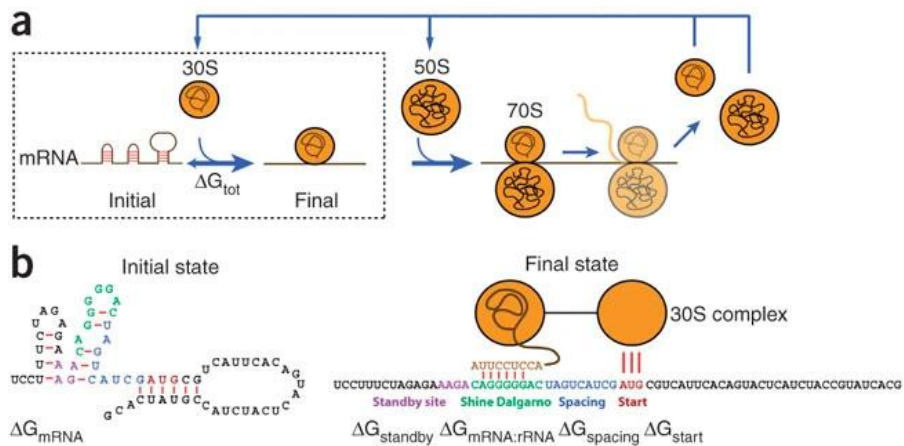
2.8.2 อัตราการเริ่มต้นการแปลถูกกำหนดโดยสองปัจจัยหลัก

การเผาผลาญของเซลล์และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ mRNA เฉพาะที่อยู่รอบ ๆ โคดอนเริ่มต้นจะเป็นสองปัจจัยหลักในการกำหนดอัตราการเริ่มต้นการแปล เมื่อแบคทีเรียเจริญเติบโตในอาหารที่อุดมด้วยสารอาหาร จำนวนไรโบโซมที่มีอยู่จะจำลองตัวเองเพิ่มขึ้นเพื่อรองรับอัตราการผลิตโปรตีนที่เร็วขึ้น ในทางกลับกันในอาหารที่มีสารอาหารไม่มากหรือเมื่อการผลิตโปรตีนเกินเกณฑ์วิกฤตแบคทีเรียจะลดอัตราการผลิตโปรตีนโดยรวมเพื่อรักษาทรัพยากรโดยการตอบสนองต่อความเครียดที่เกิดขึ้นอย่างเข้มงวดซึ่งการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้เกิดขึ้นทั่วทั้งเซลล์ ไม่ใช่เฉพาะบริเวณใดบริเวณหนึ่งในเซลล์ เพราะว่ามันจะมีผลต่อการแปลรหัส mRNA ทั้งหมดภายในเซลล์ นอกจากนี้การควบคุมการแปลรหัส mRNA ของแบคทีเรียแต่ละชนิดก็จะแตกต่างกันตามลำดับของ RBS ซึ่งเป็นชิ้นส่วนทางพันธุกรรมที่อยู่ต้นน้ำหรือต้นสายของ CDS

2.8.3 ปฏิสัมพันธ์ระหว่างโมเลกุลในขั้นกำหนดอัตราของการเริ่มต้นการแปลรหัส

การเริ่มต้นการแปลรหัสในแบคทีเรียจำเป็นต้องมีการประกอบกันของไรโบโซมคอมเพล็กซ์ 30S เข้ากับ RBS ก่อนถึงตำแหน่งของโคดอนเริ่มต้นของ CDS ซึ่งโครงสร้างนี้เรียกว่า preinitiation complex มีโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของโครงสร้างนี้ได้แก่ translation initiation factors ทั้ง 3 หน่วย คือ IF1, IF2 และ IF3 และตัวเริ่มต้น $tRNA^{fMet}$ (initiator $tRNA^{fMet}$) แต่กระบวนการนี้จะเริ่มทำงานได้ต้องใช้ GTP เป็นแหล่งพลังงาน เมื่อไรโบโซมมาจับกับ mRNA แล้วไรโบโซมจะปกป้อง mRNA บริเวณนั้นจากอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล (hydroxyl radical) ซึ่งประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ประมาณ 35 นิวคลีโอไทด์ก่อนถึงตำแหน่งโคดอนเริ่มต้นการแปลและขยายไปถึง 19–22 นิวคลีโอไทด์หลังจากโคดอนเริ่มต้น ซึ่งตำแหน่ง RBS แบ่งย่อยออกเป็น ตำแหน่งสแตนด์บาย (standby site) ตำแหน่งจับกับ 16S rRNA (6S rRNA binding site) บริเวณว่าง (spacer region) และโคดอนเริ่มต้น start codon (รูปที่ 7) ในขั้นต้นหน่วยย่อย 30S ของไรโบโซมจะจับกับตำแหน่งสแตนด์บายซึ่งเป็นบริเวณแบบเกลียวเดี่ยว (single-stranded region) ที่อยู่ห่างจากตำแหน่งของโคดอนเริ่มต้น เมื่อจับกันไว้แล้วหน่วยย่อย 30S จะเลื่อนลงด้านล่างจากตำแหน่ง RBS จากนั้นมีโปรตีนมาประกอบ

เป็นโครงสร้าง preinitiation complex และเริ่มการแปลรหัส การมีอยู่ของตำแหน่งสแตนด์บายนั้น ได้มีการตั้งสมมติฐานและการทดลองไว้ว่าเพื่อแก้ปัญหาความขัดแย้งของหน่วยย่อย 30S ของไรโบโซม ในไซโตพลาสซึมที่แพร่กระจายอย่างอิสระให้มีเวลาเพียงพอที่จะมาจับกับ RBS ที่ถูกแยกจาก โครงสร้างทุติยภูมิของ mRNA ในขณะที่โครงสร้างของ mRNA คลายออก (unfolds) แล้วม้วนพับ ใหม่ (refolds) อย่างต่อเนื่อง (dynamic) ในช่วงเวลาหน่วยไมโครวินาที ในช่วงเวลาสั้น ๆ นี้ หน่วยย่อย 30S จะต้องกระจายไปยัง mRNA และจับกับ mRNA นั้น ซึ่งจะต้องมีค่าคงที่การจับกัน มีค่าเท่ากับ $10^{10} \text{ [Ms]}^{-1}$ หรือมากกว่านั้น แต่อย่างไรก็ตามค่าคงที่การจับกันที่แท้จริงอยู่ที่ประมาณ 10^7 [Ms]^{-1} ดังนั้นการมีตำแหน่งสแตนด์บายจะช่วยขจัดปัญหานี้ได้ และการจับกันของหน่วยย่อย 30S ที่ RBS ของ mRNA ที่มีตำแหน่งสแตนด์บายแบบเกลียวเดี่ยวและตำแหน่งที่จับกับ 16S rRNA แบบแยกกันแบบนี้จะสามารถทำให้เกิดการแปลรหัสได้อย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตาม หากตำแหน่งสแตนด์บายถูกแยกออกจากโครงสร้างทุติยภูมิของ mRNA ประสิทธิภาพการเริ่มต้น การแปลรหัสของ mRNA จะลดลง และเมื่อโครงสร้างของ 30S เลื่อนข้ามตำแหน่งจับกับ mRNA ไปยังตำแหน่งก่อนเริ่มต้นการแปลรหัสพันธะที่ไม่ใช่พันธะโควาเลนต์ (noncovalent bonds) จำนวนมากจะถูกสร้างขึ้นและแตกออก จากนั้น ความเสถียรของ preinitiation complex และ อัตราการเริ่มต้นการแปลรหัสจะถูกกำหนดโดยพลังงานของพันธะเหล่านี้ที่แตกออก อัตราการประกอบโครงสร้างก็จะลดลงโดยการคลายโครงสร้าง mRNA ที่จับกับตำแหน่ง 16S rRNA binding, spacer region, หรือ start codon ซึ่งโครงสร้าง mRNA เหล่านี้ประกอบด้วย การจับคู่เบส ของนิวคลีโอไทด์ภายในโมเลกุล (intramolecular nucleotide base pairings, hydrogen bonds) ที่มีโครงสร้างเป็นเกลียว (helices) นี้อต (knots) ลูป (loops) และส่วนนูน (bulges) ซึ่งการไม่มี โครงสร้างของ mRNA เหล่านี้จะเพิ่มอัตราการเริ่มต้นการแปลรหัส ที่สำคัญทั้ง RBS และโปรตีน ของ CDS สามารถมีส่วนร่วมที่ทำให้ mRNA เกิดโครงสร้างเหล่านี้ได้ ซึ่งจะส่งผลให้ preinitiation complex อาจแยกชิ้นส่วนก่อนที่จะเริ่มการแปล เพื่อที่จะไม่ได้เกิดเหตุการณ์เหล่านี้เซลล์จะต้อง มีการตอบสนองโดย (ก) ไฮบริไดเซชันระหว่าง mRNA และนิวคลีโอไทด์เก้าตัวสุดท้ายของ 16S rRNA ของ 30S complex ซึ่งเรียกว่า the anti-Shine–Dalgarno sequence (ASD) (ข) ไฮบริไดเซชัน ระหว่างแอนติโคดอน $\text{tRNA}^{\text{fMet}}$ และโคดอนเริ่มต้น (start codon) และ (ค) ปฏิสัมพันธ์ระหว่าง mRNA และไรโบโซม ในทางกลับกัน หาก mRNA ถูกบังคับให้ยืดขยายหรือบีบอัดตัวเองเพื่อให้ RBS อยู่ในตำแหน่งที่ต้องการจะส่งผลให้ preinitiation complex ไม่เสถียรได้



รูปที่ 7 กระบวนการแปลรหัส

(Salis และคณะ, 2009)

- ไรโบโซมแปล mRNA และสร้างโปรตีนในหลายขั้นตอน: การประกอบของคอมเพล็กซ์ 30S (กล่อง) การเริ่มต้นการยึดตัว การสิ้นสุดและการหมุนเวียนของหน่วยย่อยไรโบโซม และปัจจัยอื่น ๆ
- การเปลี่ยนแปลงพลังงานอิสระทางอุณหพลศาสตร์ในระหว่างการประกอบที่ซับซ้อนของ 30S ถูกกำหนดโดยปฏิกิริยาระหว่างโมเลกุล 5 ชนิดที่เข้าร่วมในสถานะเริ่มต้นและสถานะสุดท้ายของระบบ

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการทดลอง

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. กระบอกตวง (cylinder) บริษัท PYREX, USA
2. กล้องจุลทรรศน์ใช้แสง (light microscope) รุ่น CH3ORF200 บริษัท Olympus Optical Co., Ltd., Japan
3. ขวดเก็บสารพร้อมฝาเกลียว ขนาด 500 มิลลิลิตร และ 1000 มิลลิลิตร (Duran Laboratory bottle 1000 mL) บริษัท Shcott AG, Germany
4. ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร (Erlenmeyer flask 250 mL) บริษัท PYREX, USA
5. ขวดสำหรับปั่นเหวี่ยงขนาด 250 มิลลิลิตร บริษัท Thermo Fisher Scientific, USA
6. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Shaker) รุ่น Innova 4300 บริษัท New Brunswick Scientific Co., Ltd., Edison, N.J., USA
7. เครื่องชั่งแบบละเอียด (analytical balance) รุ่น AG 204 และรุ่น AG 285 บริษัท Metter Toledo Co, Ltd., Switzerland
8. เครื่องชั่งแบบหยาบ (laboratory balance) รุ่น PG-2002-S, รุ่น ME 3200 บริษัท Metter Toledo Co, Ltd., Switzerland
9. เครื่องทำน้ำบริสุทธิ์ประเภทที่ 1 (Barnstead Type I ultra micropure system) บริษัท Thermo Fisher Scientific, USA
10. เครื่องทำปฏิกิริยาอุณหภูมิไซโคลิเมอร์ส (T100PM Thermal Cycler) รุ่น No 186-1096 บริษัท Bio-Rad Laboratories, Inc., USA
11. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วยไอน้ำ (autoclave) รุ่น SS-325 และรุ่น ES-315 บริษัท Tomy Seiko Ltd.,Japan, รุ่น MLS 3020 บริษัท Sanyo Co., Ltd., Japan
12. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) รุ่น 1920, รุ่น 5922 และ รุ่น 6500 บริษัท Kubota, Japan
13. เครื่องอ่านไมโครเพลท (microplate reader) บริษัท PerkinElmer, Inc., USA
14. เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) รุ่น G-650E บริษัท Science industries, USA
15. เครื่องผ่านกระแสไฟฟ้าส่วนสำหรับพากรดนิวคลีอิก (Horizontal electrophoresis system)

- บริษัท Blo-rad Laboratories, Inc., USA
16. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Perkin Elmer instrument Lamda 25 UV/VIS Spectrophotometer บริษัท Elmer, Inc., USA
 17. จานเพาะเชื้อ (petri dish) บริษัท PYREX, USA
 18. ช้อนตักสาร (spatula) บริษัท Ladd research industries Inc., USA
 19. ชุดหัวกรองขนาด 0.2 ไมครอน รุ่น Minisart syringe filter บริษัท Sartorius stedim ประเทศเยอรมนีและกระบอกฉีดยา ขนาด 10 มิลลิลิตร บริษัท Nipro (Thailand) Co., Ltd.,
 20. ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar flow) บริษัท Thermo Fisher Scientific, USA
 21. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส บริษัท Sanyo Electronic, Japan และอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส บริษัท Thermo Fisher Scientific, USA
 22. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น INE 500 บริษัท Memmert Co., Ltd., Germany 23. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) บริษัท Memmert Co., Ltd., Germany
 24. ภาชนะส่องแสงแอลอีดี (LED blue/white light transilluminator) รุ่น BluPAD บริษัท Bio-helix Co., Ltd., Taiwan
 25. ทิปสำหรับไมโครปิเปตขนาด 10 ไมโครลิตร ขนาด 200 ไมโครลิตร และขนาด 1000 ไมโครลิตร บริษัท Ward Medic Co. Ltd., Thailand
 26. แผงแกว่งกระจายเชื้อ (Spreader) บริษัท PYREX, USA
 27. ปีกเกอร์ (beaker) บริษัท PYREX, USA
 28. ไมโครปิเปตต์ (micropipette) รุ่น P P20 P200 P1000 บริษัท Gilson, France
 29. รูปเขี้ยวเชื้อ (Loop) บริษัท Ladd research industries Inc., USA
 30. หลอดทดลองมีฝาปิด (Screw cap tube) บริษัท PYREX, USA
 31. หลอดสำหรับทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน (PCR tube) บริษัท Ward Medic Co., Ltd., Thailand
 32. หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 1.5 มิลลิลิตร (microcentrifuge tube) บริษัท Axygen, Inc., USA

3.2 สารเคมี

1. กลีเซอรอล (glycerol) บริษัท Merck, Germany
2. กลูโคส (glucose) บริษัท Sigma Chemical Co., USA
3. แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2) บริษัท Merck, Germany

4. ชุดสารเคมีทำบริสุทธิ์ผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันและสกัดวุ้น (PCR clean-up & get extraction kit) บริษัท Bio-helix Co., Ltd., Taiwan
 5. ชุดสารเคมีสำหรับทำปฏิกิริยาเชื่อมต่อยีนดีเอ็นเอเข้าสู่เวกเตอร์ (T4 DNA ligation kit) บริษัท Thermo Fisher Scientific, USA
 6. ชุดสารเคมีสำหรับทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน (Taq DNA polymerase reaction kit) บริษัท apsagen, Thailand (Q5 High-Fidelity DNA polymerase reaction kit) บริษัท New England Biolab Inc., USA
 7. ชุดสารเคมีสำหรับสกัดพลาสมิดจากเซลล์จุลินทรีย์ (FavorPrep Plasmid Extraction Mini kit) บริษัท Favorgen Biotech Corp., Taiwan
 8. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Merck, Germany
 9. ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide, DMSO)
 10. ทริปโตเนน (tryptone) บริษัท BD, Thailand
 11. ทริสอะซิเตต (Tris-acetate) บริษัท Merck, Germany
 12. น้ำกลั่นบริสุทธิ์ (nuclease free - water) บริษัท Thermo Fisher Scientific, USA
 13. พอลิเอทิลีนไกลคอล (polyethylene glycol, PEG) บริษัท Merck, Germany
 14. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) บริษัท Merck, Germany
 15. แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) บริษัท Merck, Germany
 16. สีไนล์เรด (nile red) บริษัท Thermo Fisher Scientific, USA
 17. ยาปฏิชีวนะแอมพลิซิลิน (Amplicilin) บริษัท Thermo Fisher Scientific, USA
 18. วุ้นผง (agar) บริษัท Productora de agar S.A., Chile
 19. วุ้นอะกาโรสผง (agarose gel) บริษัท Vivantis Technologies Sdn., Malaysia
 20. สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) บริษัท Springer, France
 21. สีย้อมดีเอ็นเอ (Novel juice supplied in 6x Loading dye) บริษัท GeneDireX, Inc., USA
 22. เอทิลีนไดอะมีนเตตระอะซิติกแอซิด (ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) บริษัท Merck, Germany
 23. เอทานอล (ethanol) บริษัท Biotech and Scientific Co. Ltd., Thailand
 24. 3,5-Dinitrosalicylic acid บริษัท Merck, Germany
 25. เอนไซม์ KOD Hot Start DNA Polymerase บริษัท Merck, Germany
- หมายเหตุ สารเคมีที่ใช้ทุกชนิดเป็นเกรดเพื่อการวิเคราะห์ (analytical grade)

3.3 จุลินทรีย์ พลาสมิดและไพรเมอร์

ตารางที่ 2 จุลินทรีย์ พลาสมิดและไพรเมอร์ที่ใช้ทดลอง

จุลินทรีย์/พลาสมิด/ ไพรเมอร์	ลักษณะสมบัติ	เอกสารอ้างอิง
จุลินทรีย์ <i>E. coli</i> สายพันธุ์ JM109	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, supE44, relA1, λ-, Δ(lac-proAB), [F' traD36, proAB, lacIqZΔM15]</i>	บริษัท Promega, Madison, WI
พลาสมิด pUC19	<i>lacZ, Amp^r</i>	บริษัท Invitrogen, USA
pColdI- <i>phaCAB</i> _{A-04}	<i>colE ori, lacI, Amp^r</i> ; pColdI derivative, carrying <i>phaCAB</i> operon from <i>c. necator</i> strain A-04	(Boontip และคณะ, 2020)
ไพรเมอร์ Deg-RBS-F	5' AGGAATTCCTCCGGGTTGACGGCTAGCTCA GTCCTAGGTACAGTGCTAGCNNNNNNNNNNA AAGGAGNNNNNNNNATGGCGACCGGCAAA 3' (79.6 °C)	สร้างในการทดลองนี้
Ter- CAB-R	5' TTCTCGAGCCCGGGAACCCCGCC CTGTCAGGGGCGGGTTTTTTTTTCTAGACTG CAGGTCGAC 3' (78.8 °C)	สร้างในการทดลองนี้
CAB-F	5' ATGGCGACCGGCAAAG 3' (57.8 °C)	สร้างในการทดลองนี้
L-pUC19-F	5' GTCAACCCGGGAATTCCTGACCGTCTCC GGGA 3' (63.6 °C)	สร้างในการทดลองนี้
L-pUC19-R	5' TTTTTTCCCGGCTCGAGAACGCTCTCC GCTTC 3' (70.5°C)	สร้างในการทดลองนี้
Verify-F	5' GGTGATGACGGTGAA 3' (49 °C)	สร้างในการทดลองนี้
Verify-R	5' AGTCAGTGAGCGAG 3' (47.9 °C)	สร้างในการทดลองนี้

3.4 การเก็บรักษาจุลินทรีย์

3.4.1 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ระยะสั้น

ใช้ลูปเขี่ยเชื้อจุลินทรีย์บนอาหารแข็ง LB ที่มีแอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ใหม่และถ่ายเชื้อลงบนอาหารใหม่ทุก 1 เดือน

3.4.2 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ระยะยาว

เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB มีแอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นในตู้ปั่นเชื้อแบบเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาปั่นแยกเซลล์ออกจากอาหารด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บตะกอนเซลล์ ล้างเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% จากนั้นปั่นแยกเซลล์ แล้วกระจายเซลล์ในกลีเซอรอล 15% นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร และปรับให้อยู่ในช่วง 0.8-1.0 บรรจุลงหลอดเก็บเยือกแข็ง (cyotube) ที่ฆ่าเชื้อแล้ว เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือนหรือเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ปี

3.5 การสร้างพลาสมิดลูกผสม (recombinant plasmid) เพื่อผลิต PHB (Poly[(R)-3hydroxybutyrate])

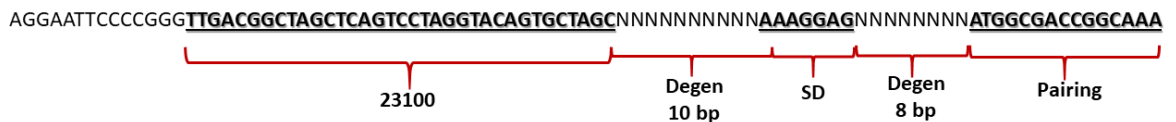
3.5.1 การออกแบบไพรเมอร์โดยใช้วิธีทางชีวสารสนเทศ (Bioinformatics design)

ออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *phaA*, *phaB*, และ *phaC* เพื่อโคลนยีนดังกล่าวใส่เข้าไปในพลาสมิด pUC19 โดยไพรเมอร์ที่ใช้ดังรูปที่ 8

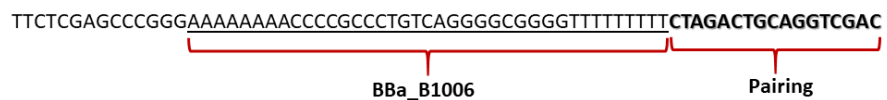
CAB-F (16 mers)



Deg-RBS-F (89 mers)



Ter-CAB-R (70 mers)



L-pUC19-F (33 mers)



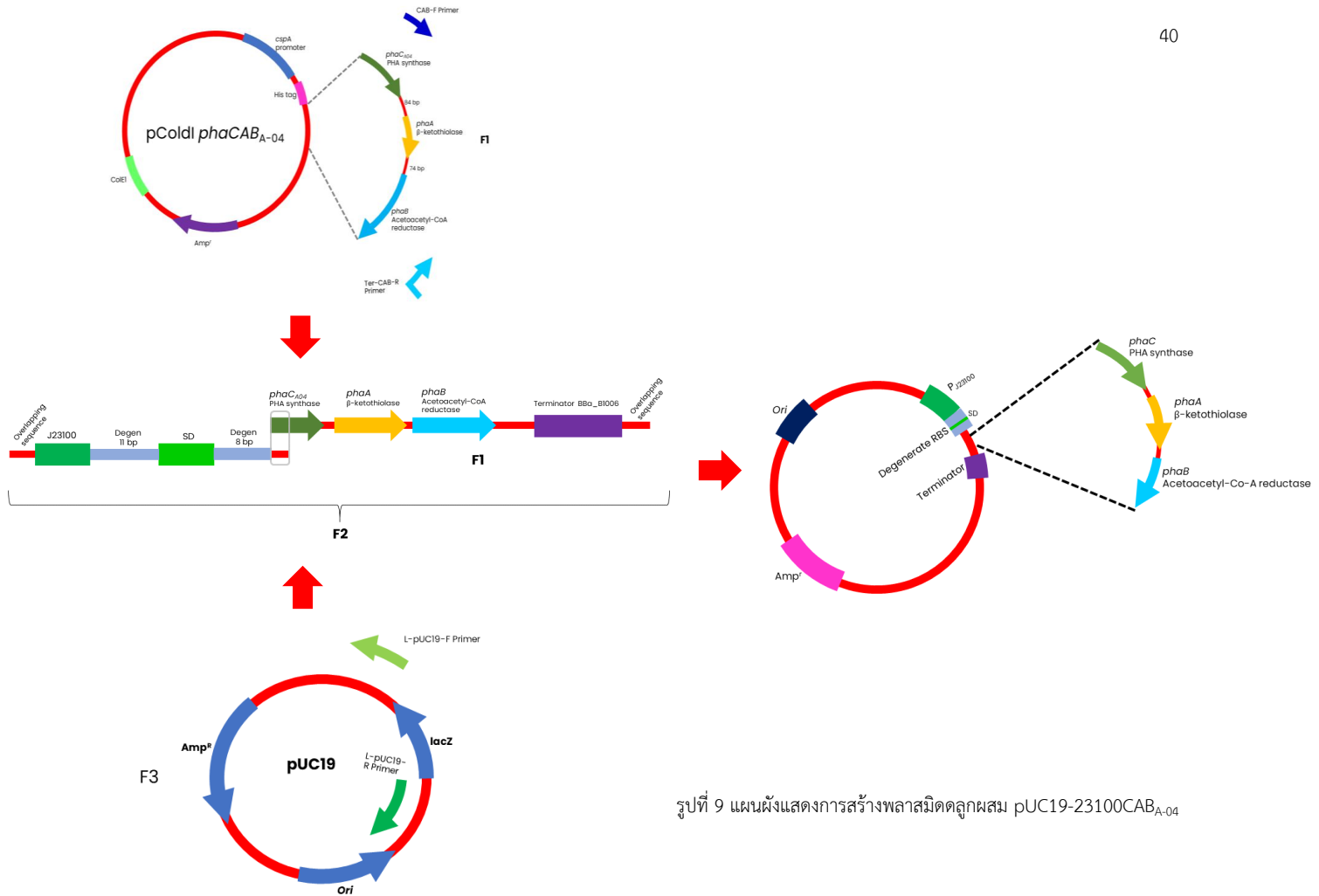
L-pUC19-R (34 mers)



รูปที่ 8 ไพรเมอร์ที่ถูกออกแบบขึ้นโดยบริเวณที่ขีดเส้นใต้คือตำแหน่งเข้าคู่กัน (complementary)

3.5.2 การสร้างไลบรารีของพลาสมิดลูกผสมเพื่อผลิต PHB

เพิ่มจำนวนชิ้นส่วน *phaCAB_{A-04}* (*phaC*, *phaA*, *phaB*) จากพลาสมิด *pColdI-phaCAB_{A-04}* โดยใช้ไพรเมอร์ CAB-F และ Ter - CAB-R ที่ออกแบบไว้ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังตารางที่ 2 โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน (polymerase chain reaction, PCR) โดยใช้ high fidelity Taq DNA polymerase KOD (Takara, Japan) จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) และสกัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอนี้ออกจากเจลอะกาโรส ซึ่งชิ้นส่วนที่ได้จากปฏิกิริยานี้ให้ชื่อว่า F1 จากนั้นนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอ F1 เชื่อมต่อเข้ากับชิ้นส่วนโอลิโกนิวคลีโอไทด์ Deg - RBS - F ที่มีโปรโมเตอร์ BBa_BJ23100 และ RBS ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์แบบสุ่มโดยชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยานี้ให้ชื่อว่า F2 จากนั้นเตรียมชิ้นส่วนดีเอ็นเอเวกเตอร์โดยใช้ไพรเมอร์ L - pUC19-F และ L - pUC19-R และใช้เวกเตอร์ pUC 19 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบให้ชื่อว่า F3 จากนั้นเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอ F2 และ F3 เข้าด้วยกันด้วยวิธี circular polymerase extension cloning (CPEC-PCR) จะได้พลาสมิดลูกผสม *pUC19-23100CAB_{A-04}* จากนั้นตรวจสอบความถูกต้องของผลิตภัณฑ์ที่สร้างขึ้นโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* แล้วตรวจสอบขนาดด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส



รูปที่ 9 แผนผังแสดงการสร้างพลาสมิดลูกผสม pUC19-23100CAB_{A-04}

3.6 การนำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน

3.6.1 จุลินทรีย์

แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ JM109 ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการโคลนและแสดงออกของยีน

3.6.2 การเตรียมเชื้อ *E. coli* ให้เป็นเซลล์ที่พร้อมรับพลาสมิดลูกผสม (competent cells)

1) การเตรียมกล้าเชื้อ *E. coli*

ใช้ลูปเขี่ยเชื้อ *E. coli* มา 1 โคลนีสไลลงในอาหาร Luria-Bertani broth (LB broth) จำนวน 3 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

2) การเพิ่มจำนวนเซลล์ *E. coli*

นำกล้าเชื้อที่ได้จากข้อ 1) มาใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani broth (LB broth) 50 มิลลิลิตร โดยใช้กล้าเชื้อ 2.5 มิลลิลิตร (5 % inoculum) แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที จนมีค่าความขุ่น (OD) เท่ากับ 0.2-0.5

3) การทำให้เชื้อ *E. coli* เป็นเซลล์ที่พร้อมรับพลาสมิดลูกผสม (competent cells)

นำเชื้อ *E. coli* จากข้อ 2) มาแช่ในน้ำแข็งประมาณ 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิต่ำ แล้วเทส่วนน้ำใสทิ้งไปเหลือตะกอนไว้ แล้วเติมสารละลายบัฟเฟอร์ TSS ไป 10 % ของอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ จากนั้นแบ่งใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรเก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส

3.6.3 การส่งถ่ายพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่ competent cells ด้วยวิธี Transformation

นำพลาสมิดที่ได้จากข้อ 3.7.2 ผสมกับน้ำกลั่น (ddH_2O) และสารละลายบัฟเฟอร์ KCM (5X) จากนั้นปิเปตใส่ลงใน หลอดเซนตริฟิวจ์ที่มี competent cells แล้วแช่ในน้ำแข็ง 30 นาที จากนั้นนำมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที เมื่อครบเวลาแล้วปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ลงไป 600 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 40 นาที

3.6.4 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* ที่มีพลาสมิดลูกผสม (Recombinant *E. coli*)

นำเชื้อ *E. coli* ที่ได้มีการส่งถ่ายพลาสมิด จากข้อ 3.2.3 มา สเปรดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่มีกลูโคส (glucose) แอมพิซิลิน (ampicillin) และ ไนล์เรด (nile red) แล้วบ่มในตู้บ่มเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

3.7 การคัดเลือกเชื้อ *E. coli* ที่มีพลาสมิดลูกผสม

การคัดเลือกกริคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่ต้องการนั้นสามารถทำได้โดยนำเพลตจากข้อ 3.6.4 มาส่องดูความเข้มของแสงภายใต้แสงสีน้ำเงิน โดยจะเลือกโคโลนีที่มีขนาดใหญ่และมีความสว่างสูง มาจำนวน 89 โคโลนี และเลือกโคลนที่มีความสว่างต่ำ 4 โคโลนี มาชิตบนอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเก็บเป็นคลังเชื้อและใส่ลงในไมโครเพลทขนาด 96 หลุมโดยใช้อาหาร LB ที่มีกลูโคส แอมพิซิลินและ ไนล์เรด แล้วบ่มในเครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่าที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้ววัดค่าฟลูออเรสเซนส์ ด้วยเครื่องไมโครเพลทรีเดอร์ (microplate reader) โดยตรวจวัดที่ความยาวคลื่นกระตุ้น (excitation wavelength) เท่ากับ 535 นาโนเมตร และความยาวคลื่นที่คายพลังงาน (emission wavelength) เท่ากับ 605 นาโนเมตรตามงานวิจัยของ Zuriani และคณะ (2013) แล้วเลือกโคโลนีที่มีค่าฟลูออเรสเซนส์สูง 14 โคโลนี และโคลนที่มีค่าฟลูออเรสเซนส์ต่ำจำนวน 2 โคโลนี รวมทั้งหมด 16 โคโลนี เพื่อนำมาทดสอบการผลิต PHB เบื้องต้น

3.8 การทดสอบการผลิต PHB ของ Recombinant *E. coli* เบื้องต้น

3.8.1 การวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง

เลี้ยงเชื้อ *E. coli* ทั้ง 16 โคโลนีจากข้อ 3.7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีแอมพิซิลินและกลูโคส 20 กรัมต่อลิตรในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง โดยเก็บใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ที่ฆ่าเชื้อแล้วขนาด 15 มิลลิลิตร เมื่อครบแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงแยกอาหารเลี้ยงเชื้อออกจากเซลล์ ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำตะกอนเซลล์ที่ได้ไปอบที่ตู้อบแห้ง อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งแบบละเอียด

3.8.2 การวิเคราะห์ปริมาณ PHB ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography, GC)

ด้วยวิธีการของ (Comeau และคณะ, 1988)

ซึ่งเซลล์ที่อบแห้งแล้วจากข้อ 3.8.1 ประมาณ 20 มิลลิกรัมด้วยเครื่องชั่งแบบละเอียดใส่ลงในหลอดฝาเกลียว จากนั้นเติมคลอโรฟอร์ม 2 มิลลิลิตรและเติมสารละลายกรดซัลฟิวริก 15 เปอร์เซ็นต์ในเมทานอลที่มีกรดเบนโซอิก 0.5 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปิดฝาเกลียวให้แน่น แล้วนำไปต้มผ่านน้ำที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง 30 นาที โดยเขย่าทุก ๆ 30 นาที เมื่อครบเวลาแล้วทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่นลงไปภายหลอด หลอดละ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายแยกชั้นดูดสารละลายส่วนใสชั้นล่างซึ่งเป็นส่วนของคลอโรฟอร์มเอาไวโนขวดฝาเกลียวขนาดเล็กปิดฝาให้สนิทแล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณ PHB ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณ PHB ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟีนั้นจะทำการคำนวณตามวิธีของสุชาติาจันทร์ประทีป (2539) ภายใต้สภาวะดังต่อไปนี้

คอลัมน์	: แคมป์ปิลลารีคอลัมน์ชนิด CP-wax ขนาด 30m × 25mm ID × 25µm Df
อุณหภูมิของอินเจคเตอร์ (injector)	: 250 องศาเซลเซียส (ไอโซเทอร์มอล)
อุณหภูมิของคอลัมน์	: 140 องศาเซลเซียส (ไอโซเทอร์มอล)
อุณหภูมิของดีเทคเตอร์ชนิด flame ionization detector	: 250 องศาเซลเซียส (ไอโซเทอร์มอล)
อัตราส่วนการสพลิต (split ratio)	: 50 ต่อ 1
ก๊าซตัวพา	: N ₂ อัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที
: O ₂ อัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที	
: H ₂ อัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที	
ปริมาตรฉีด	: 1 ไมโครลิตร
(คำนวณปริมาตรของมอนอเมอร์ที่มีสารมาตรฐานภายในเป็นกรดเบนโซอิก (benzoic acid) ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่วิเคราะห์ในภาวะเดียวกัน)	

เมื่อได้ข้อมูลจากการวิเคราะห์ในการทดลองขั้นที่ 3.8 แล้วนำไปคำนวณหาอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) และอัตราการผลิตจำเพาะ (specific production rate) แล้วสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าจลนศาสตร์ทั้งสองค่าข้างต้นแล้วคัดเลือกโคโลนีที่ให้ค่าจลนศาสตร์ทั้งสองค่าที่สูงสุดมาทดลองในขั้นต่อไป

3.9. การศึกษาการเจริญของเชื้อ (time course)

นำหัวเชื้อรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มีพลาสมิดลูกผสม pUC19-23100CAB_{A-04} ที่ได้คัดเลือกจากข้อ 3.8 ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่มีแอมพิซิลินและกลูโคส 20 กรัมต่อลิตรในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสและเก็บตัวอย่างที่เวลา 6 9 24 33 และ 48 ชั่วโมง จากนั้นวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณ PHB ที่ผลิตเช่นเดียวกันกับการทดลองที่ 3.8 และปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือตามวิธีทางชีวเคมีด้วยสาร DNSA

3.10 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์

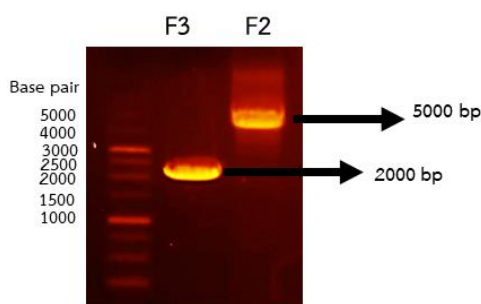
เมื่อพิจารณาผลการทดลองตอนที่ 4.3 และ 4.4 (การทดลองขั้น 3.8 และ 3.9) ผู้วิจัยได้คัดเลือกรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มีพลาสมิดลูกผสม pUC19-23100CAB_{A-04} จำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ที่ 6 14 20 39 และ 93 มาสกัดพลาสมิดโดยใช้ชุดสกัดพลาสมิดจากเซลล์จุลินทรีย์ จากนั้นส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แบบแซงเกอร์ (sanger sequencing) โดยใช้ไพรเมอร์ verify – F จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาสร้างแผนภูมิการอนุรักษ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์หรือ sequence logo โดยใช้อัลกอริทึมที่ชื่อว่า WebLogo (<https://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>) (Crooks และคณะ, 2004)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การสร้างพลาสมิดลูกผสม (recombinant plasmid) เพื่อผลิต PHB (Poly[(R)-3hydroxybutyrate])

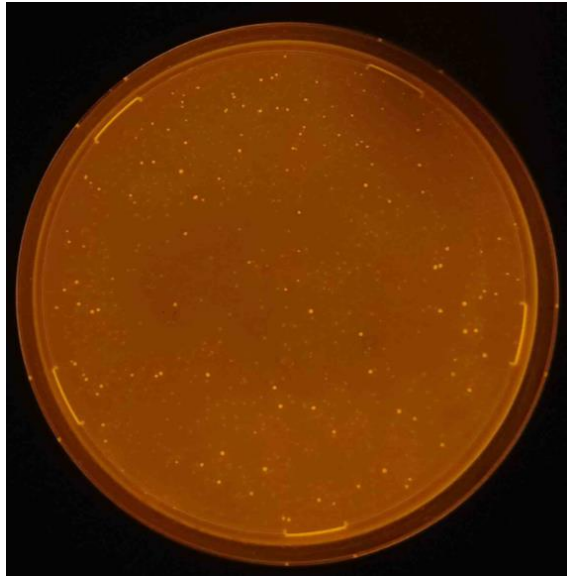
จากการทดลองการสร้างพลาสมิดลูกผสมจะได้ผลการทดลองดังรูปที่ 10 โดยที่ F3 คือ เวกเตอร์ pUC19 ที่เป็นเส้นตรง มีขนาด 2000 bp และ F2 คือ โอเพอรอน phaCAB ที่มีโปรโมเตอร์ BBa_J23100 และ RBS ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์แบบสุ่มขนาด 5000 bp จากนั้นนำ F2 และ F3 มาเชื่อมกันดังแผนผังรูปที่ 9 ได้เป็นพลาสมิดลูกผสม pUC19-23100CAB_{A-04} จากนั้นส่งพลาสมิดนี้เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ JM109 เพื่อสร้างเป็นไลบรารีของรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มีเป็นพลาสมิดลูกผสม pUC19-23100CAB_{A-04}



รูปที่ 10 รูปถ่ายจากการทำอะกาโรสเจลอเล็กโทรโพลีซิสในสร้างในพลาสมิดลูกผสม

4.2 ไลบรารีของรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มีพลาสมิดลูกผสม pUC19-23100CAB_{A-04}

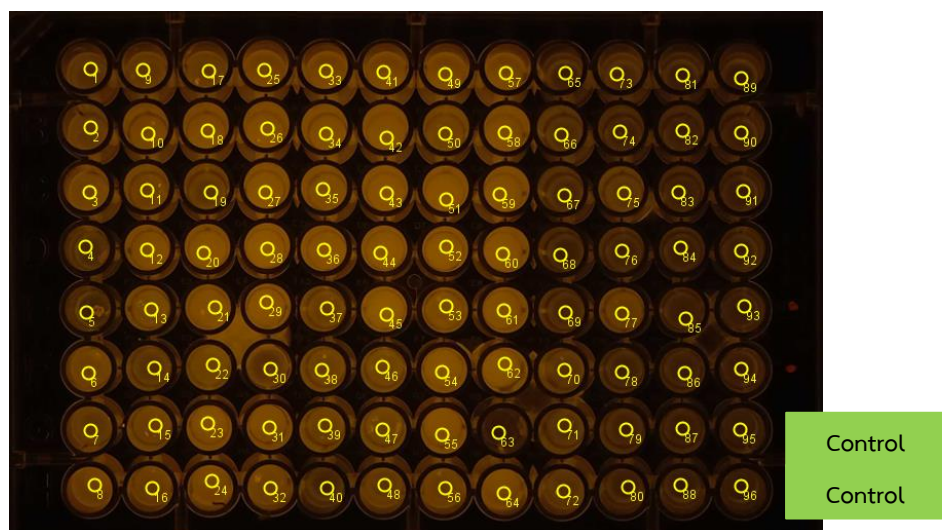
หลังจากนำส่งพลาสมิดลูกผสม pUC19-23100CAB_{A-04} เข้าสู่รีคอมบิแนนท์ *E. coli* สายพันธุ์ JM109 แล้วจะได้ไลบรารีของรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มีพลาสมิดลูกผสม pUC19-23100CAB_{A-04} ดังรูปที่ 11 ซึ่งเป็นไลบรารีของรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มีพลาสมิดลูกผสมที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่มีแอมพลิซิลิน กลูโคส 20 กรัมต่อลิตร และไนล์เรด ซึ่งป็นสีที่ผู้วิจัยนำมาใช้ย้อมดูแกรนูลของ PHB เพื่อตรวจหาและคัดเลือกโคโลนีที่มีการผลิต PHB ในเบื้องต้น โดยเมื่อนำไปส่องภายใต้แสงสีน้ำเงิน พบว่ามีโคโลนีเจริญขึ้นมากกว่า 100 โคโลนีซึ่งแต่ละโคโลนีมีความเข้มของการเรืองแสงที่แตกต่างกันดังรูปที่ 11 จากนั้นผู้วิจัยคัดเลือกโคโลนีที่มีความสว่างสูง 89 โคโลนีและโคโลนีที่มีความสว่างต่ำ 4 โคโลนีมาทดลองในขั้นต่อไป



รูปที่ 11 โลบรารีของเชื้อ *E. coli* ที่มีพลาสมิดลูกผสม

4.3 การคัดเลือกรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มีพลาสมิดลูกผสม pUC19-23100CAB_{A-04}

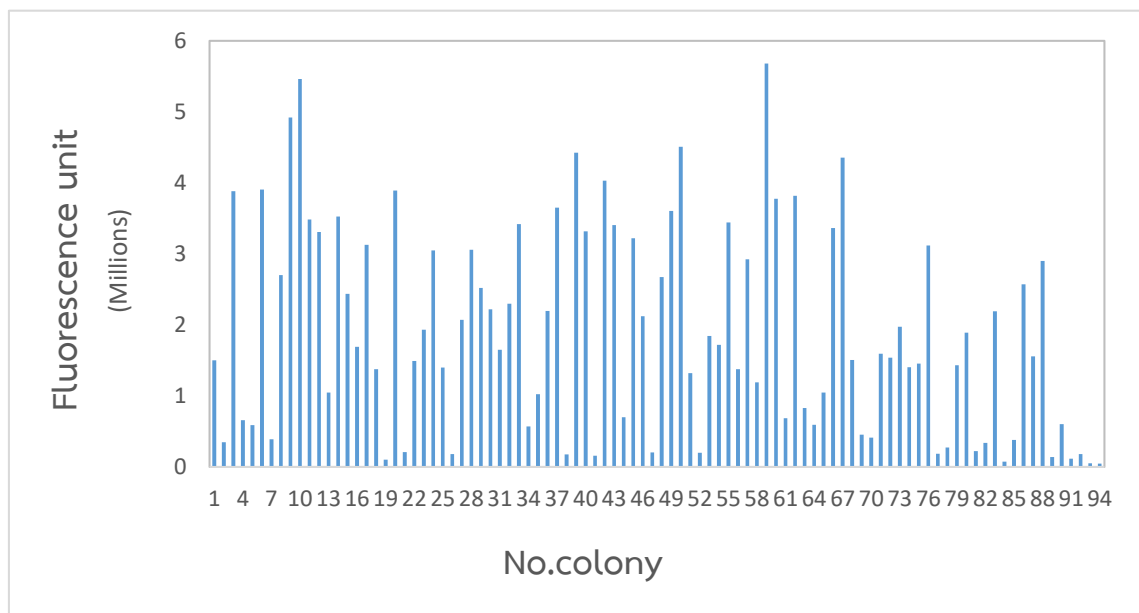
จากการทดลองการคัดเลือกรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มีพลาสมิดลูกผสมโดยเลี้ยงเชื้อในไมโครเพลทขนาด 96 หลุม ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มีแอมพิซิลิน ไนล์เรดและกลูโคส 20 กรัมต่อลิตรดังรูปที่ 16 บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นวัดค่าความสว่างของแสงฟลูออเรสเซนซ์ด้วยเครื่องไมโครเพลทรีเดอร์ ซึ่งให้ผลการทดลองดังรูปที่ 12



รูปที่ 12 รีคอมบิแนนท์ *E. coli* ในไมโครเพลทขนาด 96 หลุมที่ส่องดูภายใต้แสงสีน้ำเงิน.

จากรูปที่ 13 และตารางที่ 3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่คัดเลือก และค่าความสว่างของฟลูออเรสเซน พบว่าแต่ละโคโลนีหรือมีค่าฟลูออเรสเซนที่แตกต่างกัน โดยที่โคโลนีที่มีค่าฟลูออเรสเซนสูงสุดคือโคโลนีที่ 59 มีค่าใกล้เคียง 6×10^6 ซึ่งเป็นค่าที่มีความสว่างสูง จากนั้นผู้วิจัยได้คัดเลือกโคโลนีที่มีค่าฟลูออเรสเซนที่สูงกว่า 3.5×10^6 ซึ่งมีทั้งหมด 14 โคโลนี

รูปที่ 13 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างโคโลนีของรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่คัดเลือกและค่าความสว่างของฟลูออเรสเซน



ตารางที่ 3 แสดงค่าฟลูออเรสเซนซ์ที่วัดได้ของแต่ละโคลนของ *E. coli* ที่มีพลาสมิดลูกผสม

No. well	No.clone	FI
1A	1	1503294
1B	2	347320
1C	3	3881994
1D	4	657131
1E	5	589672
1F	6	3907935
1G	7	389820
1H	8	2700962
2A	9	4922400
2B	10	5464065
2C	11	3484982
2D	12	3310063
2E	13	1048928
2F	14	3526871
2G	15	2436830
2H	16	1692935
3A	17	3129979
3B	18	1377612
3C	19	100607
3D	20	3892285
3E	21	208980
3F	22	1494355
3G	23	1933763
3H	24	3047741

No. well	No.clone	FI
4A	25	1401645
4B	26	182529
4C	27	2073321
4D	28	3058477
4E	29	2521807
4F	30	2221818
4G	31	1651520
4H	32	2297349
5A	33	3420935
5B	34	570620
5C	35	1022908
5D	36	2195896
5E	37	3652354
5F	38	174932
5G	39	4427062
5H	40	3317827
6A	41	159297
6B	42	4030928
6C	43	3404556
6D	44	701924
6E	45	3222748
6F	46	2121348
6G	47	205382
6H	48	2672925

ตารางที่ 3 (ต่อ) แสดงค่าฟลูออเรสเซนซ์ที่วัดได้แต่ละโคลนของ *E. coli* ที่มีพลาสมิดลูกผสม

No. well	No.clone	FI
7A	49	3602773
7B	50	4508592
7C	51	1322790
7D	52	201549
7E	53	1845643
7F	54	1720917
7G	55	3442567
7H	56	1377549
8A	57	2922288
8B	58	1191315
8C	59	5681363
8D	60	3775913
8E	61	686207
8F	62	3816945
8G	63	830677
8H	64	592936
9A	65	1049306
9B	66	3361962
9C	67	4355547
9D	68	1505061
9E	69	455763
9F	70	412099
9G	71	1592302
9H	72	1539336

No. well	No.clone	FI
10A	73	1974122
10B	74	1402315
10C	75	1457300
10D	76	3119138
10E	77	183958
10F	78	272646
10G	79	1434174
10H	80	1892081
11A	81	223336
11B	82	340366
11C	83	2192640
11D	84	74475
11E	85	379122
11F	86	2573088
11G	87	1558907
11H	88	2902321
12A	89	140509
12B	90	605264
12C	91	114602
12D	92	181525
12E	93	51311
12F	94	45621
12G (blank media)	95	19846
12H (empty vector)	96	58876

4.4 การทดสอบการผลิต PHB เบื้องต้นของรีคอมบิแนนท์ *E. coli*

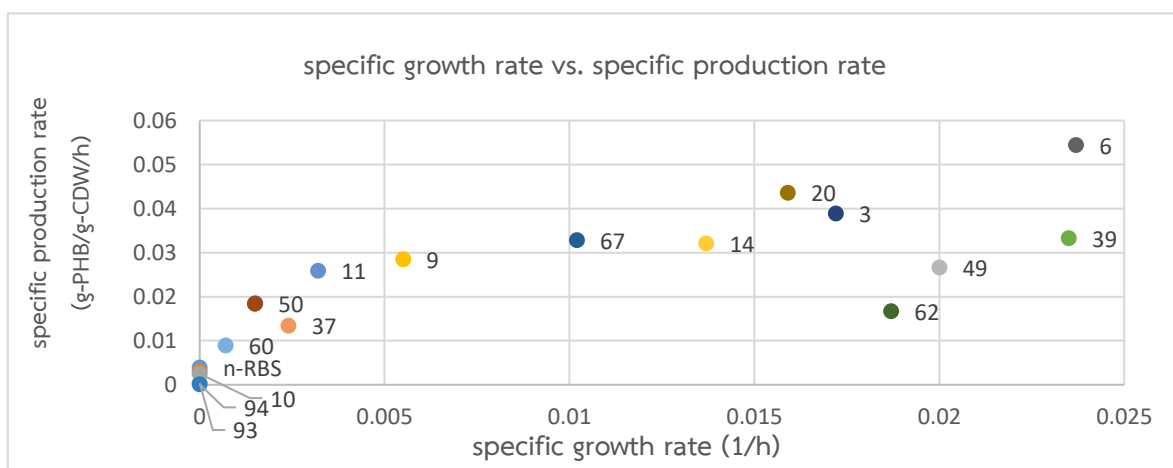
ตารางที่ 4 การทดสอบการผลิต PHB เบื้องต้น : แสดงค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (Cell Dry Weight ,CDW, (g/L)) ปริมาณ PHB (g/L) สัดส่วน PHB ต่อเซลล์แห้ง (%) และ ค่าน้ำหนักเซลล์ที่แท้จริง (residual biomass, (g/L)) เมื่อเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มีพลาสมิดลูกผสม pUC19-23100CAB_{A-04} เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

(n-RBS เป็นรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มีโอเพอรอน *phaCAB* แสดงออกภายใต้โปรโมเตอร์ BBa_J23100 และ RBS ดั้งเดิมของโอเพอรอน)

No.	CDW (g/L)		PHB (%w/w)		PHA (g/L)		R.B (g/L)	
	12 h	24 h	12 h	24 h	12 h	24 h	12 h	24 h
n-RBS	1.01	1.05	8.39	13.15	0.1	0.1	0.92	0.91
59	1.03	0.97	12.35	12.17	0.1	0.1	0.90	0.85
10	1.09	0.91	11.47	10.82	0.1	0.1	0.97	0.81
9	2.55	2.76	54.14	52.73	1.4	1.5	1.17	1.30
50	2.01	1.99	28.19	46.13	0.6	0.9	1.44	1.07
39	5.53	6.62	63.93	53.28	3.5	3.5	2.00	3.09
67	3.69	3.87	53.70	57.83	2.0	2.2	1.71	1.63
42	2.07	1.98	35.36	45.71	0.7	0.9	1.34	1.07
6	8.50	9.53	68.72	67.23	5.8	6.4	2.66	3.12
20	6.79	6.79	55.33	68.43	3.8	4.6	3.03	2.14
3	4.67	5.44	63.63	58.13	3.0	3.2	1.70	2.28
62	4.29	4.17	47.67	41.33	2.0	1.7	2.25	2.45
60	1.57	1.45	27.14	28.46	0.4	0.4	1.15	1.03
37	1.91	1.80	29.19	37.56	0.6	0.7	1.35	1.12
49	5.21	4.67	61.84	44.10	3.2	2.1	1.99	2.61
14	5.46	4.71	64.87	59.08	3.5	2.8	1.92	1.93
11	2.21	2.46	37.32	52.57	0.8	1.3	1.38	1.17
93	0.88	0.76	1.85	1.86	0.0	0.0	0.86	0.75
94	0.88	0.77	3.27	1.65	0.0	0.0	0.85	0.76

ตารางที่ 5 แสดงค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) และอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์จำเพาะ (specific production rate) ของรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มีพลาสมิดลูกผสม pUC19-23100CAB_{A-04} ที่ถูกคัดเลือก (n-RBS เป็นรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มีโอเพอรอน *phaCAB* แสดงออกภายใต้โปรโมเตอร์ BBa_J23100 และ RBS ดั้งเดิมของโอเพอรอน)

No.	specific growth rate	specific production rate
n-RBS	0.0000	0.0039
59	0.0000	0.0031
10	0.0000	0.0025
9	0.0055	0.0285
50	0.0015	0.0185
39	0.0235	0.0333
67	0.0102	0.0328
42	0.0015	0.0184
6	0.0237	0.0544
20	0.0159	0.0436
3	0.0172	0.0389
62	0.0187	0.0167
60	0.0007	0.0089
37	0.0024	0.0134
49	0.0200	0.0266
14	0.0137	0.0321
11	0.0032	0.0259
93	0.0000	0.0004
94	0.0000	0.0001

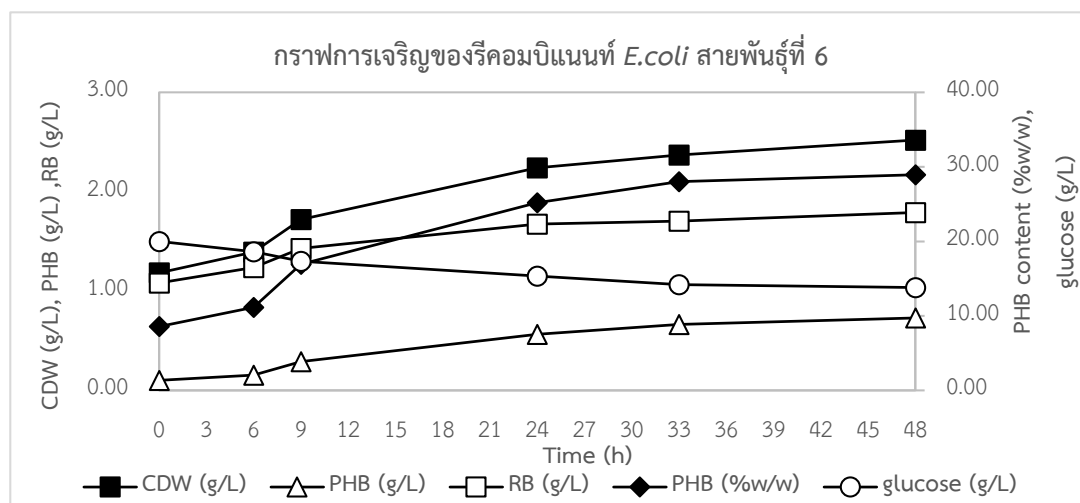


รูปที่ 14 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) และอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์จำเพาะ (specific production ration) ของรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มีพลาสมิดลูกผสม pUC19-23100CAB_{A-04} ที่ถูกคัดเลือก

จากรูปที่ 14 เป็นการทดลองการผลิต PHB เบื้องต้นโดยในกราฟจะแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญจำเพาะและอัตราการผลิตจำเพาะของรีคอมบิแนนท์ *E. coli* แต่ละสายพันธุ์ที่ถูกคัดเลือกโดยจะพบว่า สายพันธุ์ที่ 6 มีอัตราการเจริญและผลิตจำเพาะสูงที่สุด นั่นคือ 0.0237 และ 0.0544 ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาจากกราฟจะพบว่ามีโคลนอื่น ๆ ที่มีอัตราการเจริญและผลิตจำเพาะที่สูงควรที่จะนำไปศึกษาการเจริญของเชื้อต่อไป ได้แก่ สายพันธุ์ที่ 39 14 และ 20 โดยมีอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.0235 0.0137 และ 0.0159 ตามลำดับ และ มีอัตราการผลิตจำเพาะเท่ากับ 0.0333 0.0321 และ 0.0436 ตามลำดับ

4.5 การศึกษาการเจริญของรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มีพลาสมิดลูกผสม

จากรูปที่ 15 เป็นผลการทดลองการเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ *E. coli* สายพันธุ์ที่ 6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มีแอมพิซิลลินและกลูโคส 20 กรัมต่อลิตรเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า ภายในเวลา 48 ชั่วโมง รีคอมบิแนนท์ *E. coli* สายพันธุ์ที่ 6 สามารถผลิต PHB ได้ 28.94 % ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งซึ่งสามารถคิดปริมาณ PHB เท่ากับ 0.73 กรัมต่อลิตร ปริมาณเซลล์ที่แท้จริง 1.79 กรัมต่อลิตร ขณะที่ใช้ปริมาณกลูโคสไปเพียง 6.2 กรัมต่อลิตร

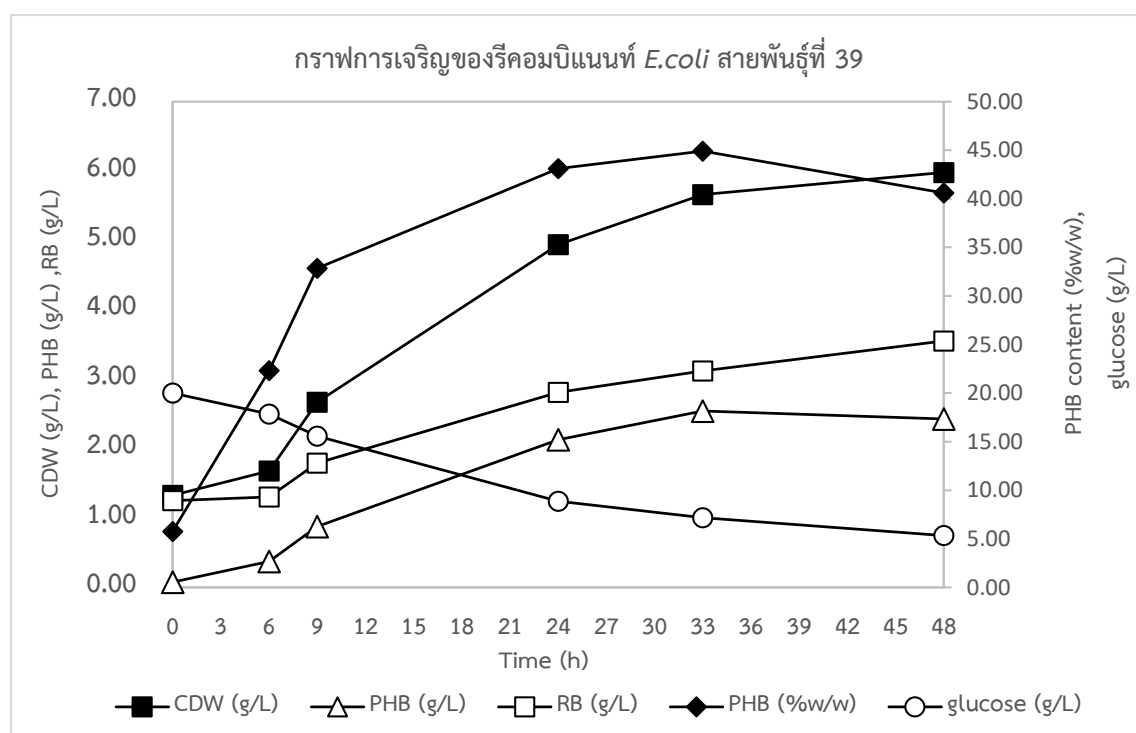


รูปที่ 15 กราฟการเจริญของรีคอมบิแนนท์ *E. coli* สายพันธุ์ที่ 6: แสดงการเปรียบเทียบค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (CDW) ปริมาณ PHB สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกลูโคสที่มีอยู่ในระบบและน้ำหนักเซลล์แห้งจริง (RB) ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ

ตารางที่ 6 แสดงการเปรียบเทียบค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (CDW) ปริมาณ PHB สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกลูโคสที่ใช้และน้ำหนักเซลล์แห้งจริง (RB) ที่เวลาต่าง ๆ ของสายพันธุ์ที่ 6

Time (hr)	CDW (g/L)	PHB (%w/w)	PHB (g/L)	glucose (g/L)	RB (g/L)
0	1.18	8.57	0.101	20.0	1.08
6	1.39	11.16	0.155	18.6	1.24
9	1.72	16.92	0.291	17.3	1.43
24	2.24	25.20	0.565	15.3	1.68
33	2.37	28.04	0.665	14.2	1.71
48	2.52	28.94	0.730	13.8	1.79

จากรูปที่ 16 ซึ่งเป็นผลการทดลองการเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ *E. coli* สายพันธุ์ที่ 39 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มีแอมพิซิลลินและกลูโคส 20 กรัมต่อลิตรเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าที่เวลา 33 ชั่วโมง สามารถผลิต PHB ได้สูงที่สุดคือ 44.91% ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง คิดเป็นปริมาณ PHB เท่ากับ 2.542 กรัมต่อลิตร และปริมาณเซลล์ที่แท้จริง 3.12 กรัมต่อลิตร ขณะที่มือน้ำตาลกลูโคสเหลืออยู่ภายในระบบเท่ากับ 7.2 กรัมต่อลิตร และเมื่อผ่านชั่วโมงที่ 33 ไปปริมาณ PHB ที่ผลิตได้จะลดลงโดยที่เมื่อเวลาผ่าน 48 ชั่วโมง จะมีผลิตเท่ากับ 40.61% ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งซึ่งคิดเป็นปริมาณ PHB เท่ากับ 2.430 กรัมต่อลิตร และปริมาณเซลล์ที่แท้จริง 3.55 กรัมต่อลิตร ขณะที่มือน้ำตาลกลูโคสเหลืออยู่ภายในระบบเท่ากับ 5.3 กรัมต่อลิตร ซึ่งหมายความว่าเชื้อสายพันธุ์ที่ 39 ใช้น้ำตาลกลูโคสไป 14.7 กรัมต่อลิตรภายในเวลา 48 ชั่วโมง

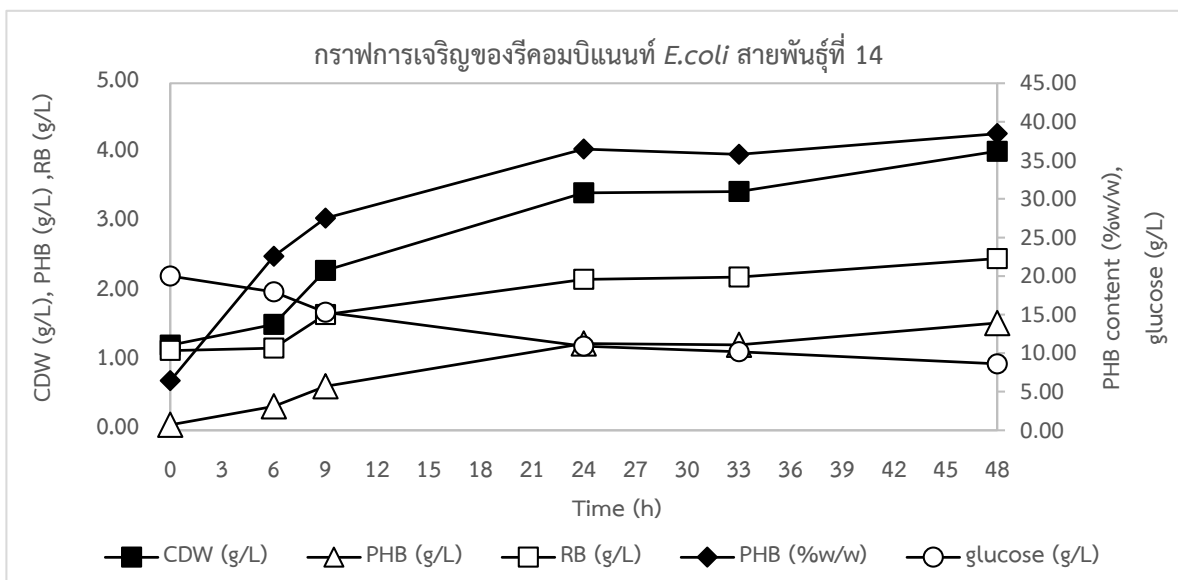


รูปที่ 16 กราฟการเจริญของรีคอมบิแนนท์ *E. coli* สายพันธุ์ที่ 39: แสดงการเปรียบเทียบค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (CDW) ปริมาณ PHB สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกลูโคสที่มีอยู่ในระบบและน้ำหนักเซลล์แห้งจริง (RB) ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ

ตารางที่ 7 แสดงการเปรียบเทียบค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (CDW) ปริมาณ PHB สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกลูโคสที่ใช้และน้ำหนักเซลล์แห้งจริง (RB) ที่เวลาต่าง ๆ ของสายพันธุ์ที่ 39

Time (hr)	CDW (g/L)	PHB (%w/w)	PHB (g/L)	glucose (g/L)	RB (g/L)
0	1.33	5.76	0.076	20.0	1.25
6	1.68	22.32	0.375	17.9	1.31
9	2.67	32.84	0.876	15.6	1.79
24	4.94	43.10	2.129	8.9	2.81
33	5.66	44.91	2.542	7.2	3.12
48	5.98	40.61	2.430	5.3	3.55

จากรูปที่ 17 ซึ่งเป็นผลการทดลองการเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ *E. coli* สายพันธุ์ที่ 14 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มีแอมพิซิลลินและกลูโคส 20 กรัมต่อลิตรเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า ภายในเวลา 48 ชั่วโมงรีคอมบิแนนท์ *E. coli* โคลนที่ 14 สามารถผลิต PHB ได้ 38.46 % ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งซึ่งสามารถคิดปริมาณ PHB เท่ากับ 1.55 กรัมต่อลิตร ปริมาณเซลล์ที่แท้จริง 2.47 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณกลูโคสเหลืออยู่ในระบบเท่ากับ 8.6 กรัมต่อลิตร ซึ่งหมายความว่าสายพันธุ์ที่ 14 ใช้กลูโคสไปทั้งหมดเท่ากับ 11.4 กรัมต่อลิตร

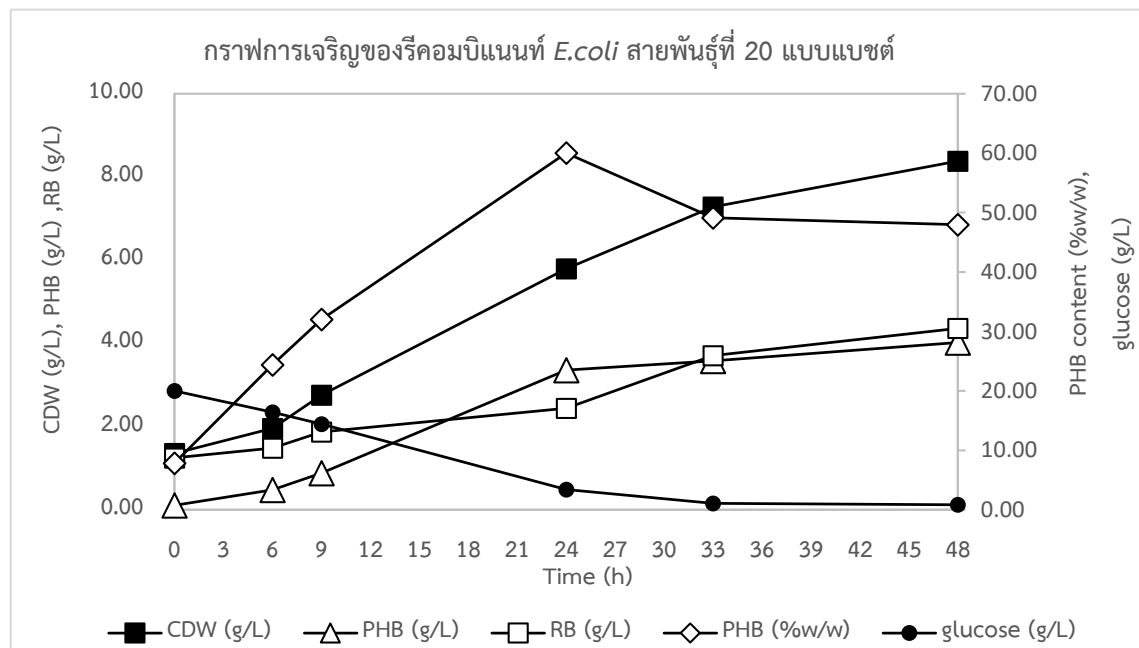


รูปที่ 17 กราฟการเจริญของรีคอมบิแนนท์ *E. coli* สายพันธุ์ที่ 14: แสดงการเปรียบเทียบค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (CDW) ปริมาณ PHB สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกลูโคสที่มีอยู่ในระบบและน้ำหนักเซลล์แห้งจริง (RB) ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ

ตารางที่ 8 แสดงการเปรียบเทียบค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (CDW) ปริมาณ PHB สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกลูโคสที่ใช้และน้ำหนักเซลล์แห้งจริง (RB) ที่เวลาต่าง ๆ ของสายพันธุ์ที่ 14

Time (hr)	CDW (g/L)	PHB (%w/w)	PHB (g/L)	Glucose (g/L)	RB (g/L)
0	1.23	6.41	0.079	20.0	1.15
6	1.53	22.55	0.344	17.9	1.18
9	2.30	27.51	0.633	15.3	1.67
24	3.42	36.48	1.248	10.9	2.17
33	3.44	35.77	1.230	10.2	2.21
48	4.02	38.46	1.550	8.6	2.47

จากรูปที่ 18 ซึ่งเป็นผลการทดลองการเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ *E. coli* สายพันธุ์ที่ 20 แบบแบชต์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มีแอมพิซิลลินและกลูโคส 20 กรัมต่อลิตรเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง สามารถผลิต PHB ได้สูงที่สุดคือ 60.01% ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง คิดเป็นปริมาณ PHB เท่ากับ 3.354 กรัมต่อลิตร และปริมาณเซลล์ที่แท้จริง 2.44 กรัมต่อลิตร ขณะที่มือน้ำตาลกลูโคสเหลืออยู่ภายในระบบเท่ากับ 3.4 กรัมต่อลิตร และเมื่อผ่านชั่วโมงที่ 24 ไปปริมาณ PHB ที่ผลิตได้จะลดลงโดยที่เมื่อเวลาผ่าน 48 ชั่วโมง จะมี PHB เท่ากับ 47.97% ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งซึ่งคิดเป็นปริมาณ PHB รวมเท่ากับ 4.020 กรัมต่อลิตร และปริมาณเซลล์ที่แท้จริง 4.36 กรัมต่อลิตร ขณะที่มือน้ำตาลกลูโคสเหลืออยู่ภายในระบบเท่ากับ 0.80 กรัมต่อลิตร ซึ่งหมายความว่าเชื้อสายพันธุ์ที่ 20 ใช้ น้ำตาลกลูโคสไป 19.2 กรัมต่อลิตรภายในเวลา 48 ชั่วโมง

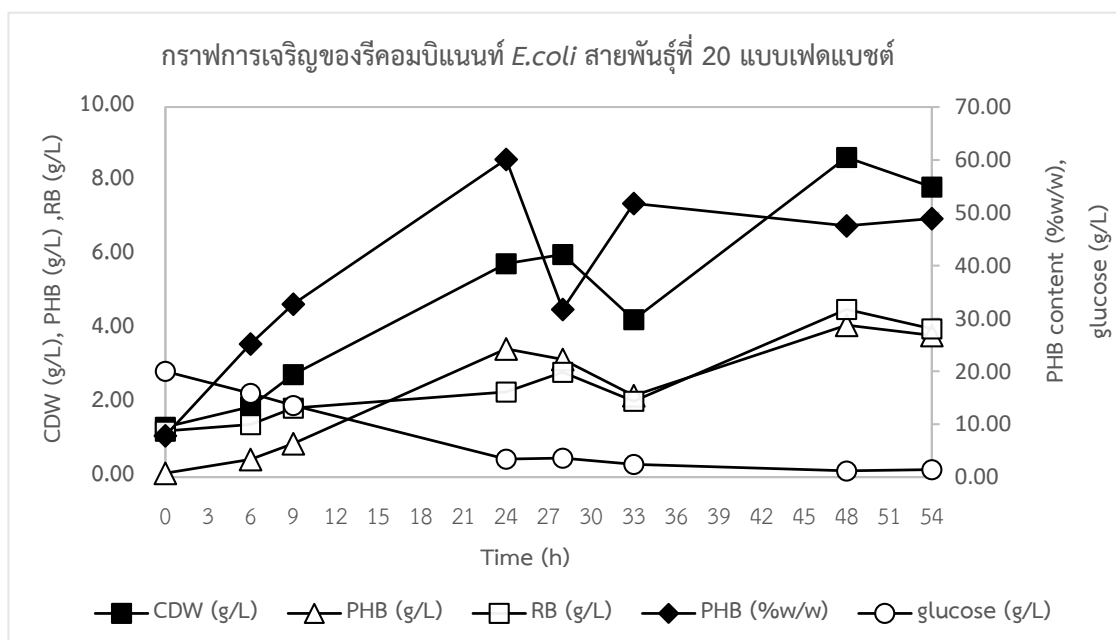


รูปที่ 18 กราฟการเจริญของรีคอมบิแนนท์ *E. coli* สายพันธุ์ที่ 20 แบบแบชต์: แสดงการเปรียบเทียบค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (CDW) ปริมาณ PHB สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกลูโคสที่มีอยู่ในระบบและน้ำหนักเซลล์แห้งจริง (RB) ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ

ตารางที่ 9 แสดงการเปรียบเทียบค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (CDW) ปริมาณ PHB สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกลูโคสที่ใช้และน้ำหนักเซลล์แห้งจริง (RB) ที่เวลาต่าง ๆ ของสายพันธุ์ที่ 20 แบบแบชต์

Time (hr)	CDW (g/L)	PHB (%w/w)	PHB (g/L)	glucose (g/L)	RB (g/L)
0	1.35	7.84	0.106	20.0	1.25
6	1.96	24.39	0.478	16.4	1.48
9	2.75	32.00	0.881	14.4	1.87
24	5.79	60.01	3.354	3.4	2.44
33	7.28	49.11	3.577	1.1	3.71
48	8.38	47.97	4.020	0.8	4.36

จากรูปที่ 19 ซึ่งเป็นผลการทดลองการเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ *E. coli* สายพันธุ์ที่ 20 แบบ เฟดแบชต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มีแอมพิซิลินและกลูโคส 20 กรัมต่อลิตรเป็นเวลา 54 ชั่วโมง และมีการเติมน้ำตาลกลูโคส 20 กรัมต่อลิตรลงไปอีกที่เวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งจากการทดลองพบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง สามารถผลิต PHB ได้สูงที่สุดคือ 60.11% ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง คิดเป็นปริมาณ PHB เท่ากับ 3.469 กรัมต่อลิตร และปริมาณเซลล์ที่แท้จริง 2.30 กรัมต่อลิตร ขณะที่มือน้ำตาลกลูโคสเหลืออยู่ภายในระบบเท่ากับ 3.4 กรัมต่อลิตร และเมื่อเติมกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง พบว่า ที่เวลา 28 ชั่วโมง เชื้อผลิต PHB ลดลงเหลือ 31.71% ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งเท่านั้น จากนั้นเมื่อถึงเวลาที่ 33 ชั่วโมง เชื้อสามารถกลับมาผลิต PHB สูงขึ้นอีกครั้ง โดยผลิตได้เท่ากับ 51.74% ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งเท่านั้น แล้วหลังจากนั้นก็ผลิตได้ลดลงตลอดการทดลองโดย ที่เวลา 54 ชั่วโมงซึ่งเป็นช่วงสุดท้ายของการเก็บตัวอย่างพบว่าเชื้อสามารถผลิต PHB ได้เท่ากับ 48.91% ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง คิดเป็นปริมาณ PHB เท่ากับ 3.830 กรัมต่อลิตร และปริมาณเซลล์ที่แท้จริง 4.01 กรัมต่อลิตร ขณะที่มือน้ำตาลกลูโคสเหลืออยู่ภายในระบบเท่ากับ 3.830 กรัมต่อลิตร ซึ่งหมายความว่าเชื้อสายพันธุ์ที่ 20 ที่เลี้ยงแบบเฟดแบชต์ ใช้น้ำตาลกลูโคสไป 36.80 กรัมต่อลิตรภายในเวลา 54 ชั่วโมง

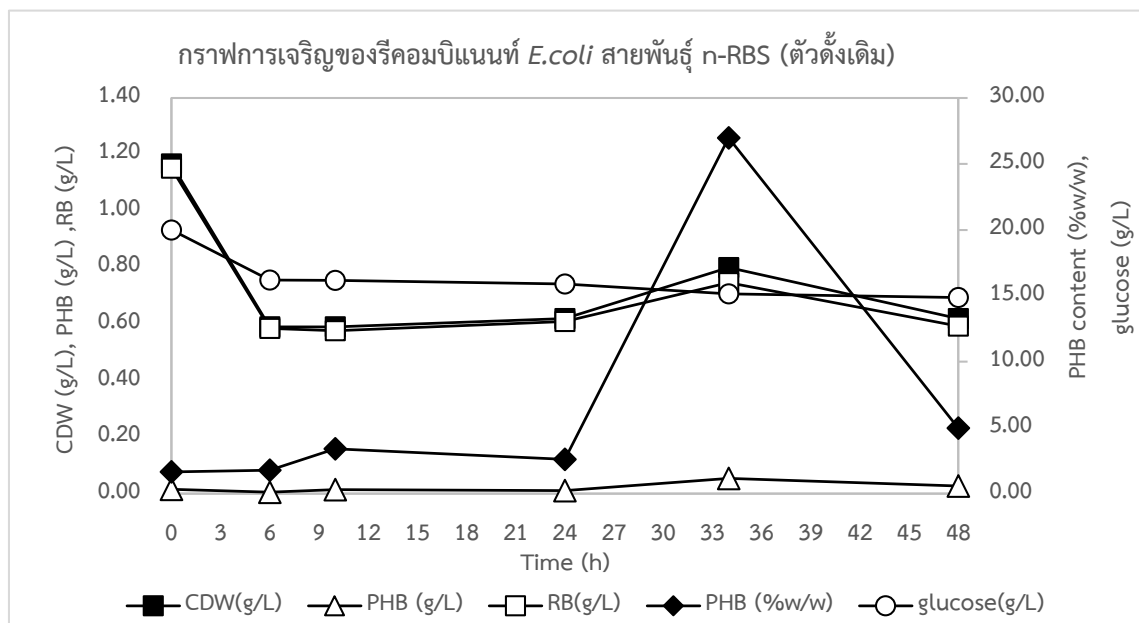


รูปที่ 19 กราฟการเจริญของรีคอมบิแนนท์ *E. coli* สายพันธุ์ที่ 20 แบบเฟดแบชต์: แสดงการเปรียบเทียบค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (CDW) ปริมาณ PHB สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกลูโคสที่มีอยู่ในระบบและน้ำหนักเซลล์แห้งจริง (RB) ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ

ตารางที่ 10 แสดงการเปรียบเทียบค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (CDW) ปริมาณ PHB สัดส่วน PHB ต่อ น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกลูโคสที่ใช้และน้ำหนักเซลล์แห้งจริง (RB) ที่เวลาต่าง ๆ ของสายพันธุ์ที่ 20 แบบเฟดแบชต์

Time (hr)	CDW (g/L)	PHB (%w/w cdw)	PHB (g/L)	glucose (g/L)	RB (g/L)
0	1.35	7.84	0.106	20.0	1.25
6	1.9	25.20	0.479	15.8	1.42
9	2.77	32.70	0.907	13.6	1.87
24 (feed)	5.77	60.11	3.469	3.4	2.30
28	6.02	31.71	3.181	3.6	2.84
33	4.26	51.74	2.204	2.4	2.06
48	8.64	47.53	4.106	1.2	4.53
54	7.84	48.91	3.830	1.4	4.01

จากรูปที่ 20 ซึ่งเป็นผลการทดลองการเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ *E. coli* สายพันธุ์ n-RBS ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มีแอมพิซิลลินและกลูโคส 20 กรัมต่อลิตรเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าที่เวลา 34 ชั่วโมงสามารถผลิต PHB ได้สูงที่สุดคือ 26.98% ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง คิดเป็นปริมาณ PHB เท่ากับ 0.054 กรัมต่อลิตร และปริมาณเซลล์ที่แท้จริง 3.71 กรัมต่อลิตร ขณะที่มือน้ำตาลกลูโคสเหลืออยู่ภายในระบบเท่ากับ 15.14 กรัมต่อลิตร และเมื่อพ้นชั่วโมงที่ 34 ไปปริมาณ PHB ที่ผลิตได้จะลดลงโดยที่เมื่อเวลาผ่าน 48 ชั่วโมง จะมี PHB เพียง 4.96% ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งซึ่งคิดเป็นปริมาณ PHB รวมเท่ากับ 2.027 กรัมต่อลิตร และปริมาณเซลล์ที่แท้จริง 4.36 กรัมต่อลิตร ขณะที่มือน้ำตาลกลูโคสเหลืออยู่ภายในระบบเท่ากับ 14.87 กรัมต่อลิตร ซึ่งหมายความว่าสายพันธุ์ที่เป็นสายพันธุ์ดั้งเดิมก่อนการดัดแปลง ใช้น้ำตาลกลูโคสไป 5.13 กรัมต่อลิตรภายในเวลา 48 ชั่วโมง

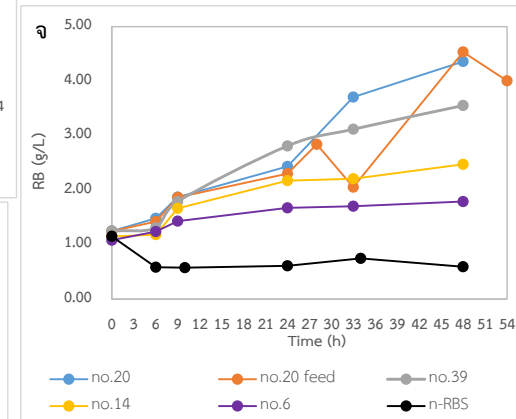
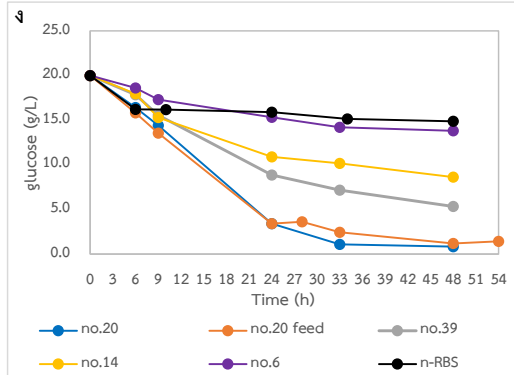
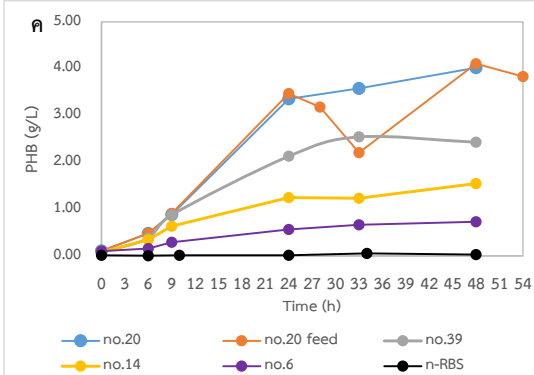
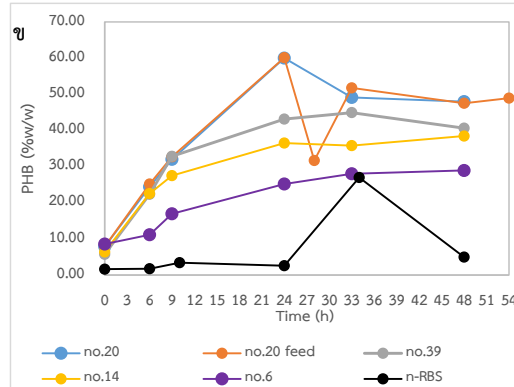
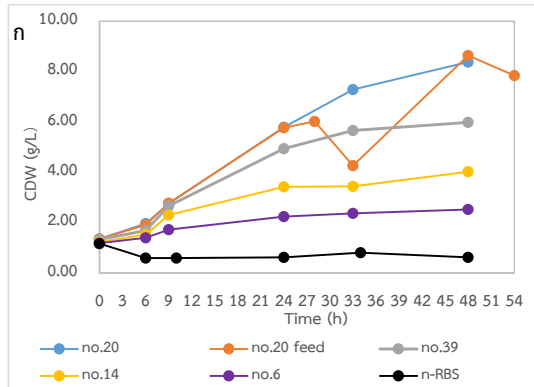


รูปที่ 20 กราฟการเจริญของรีคอมบิแนนท์ *E. coli* สายพันธุ์ n-RBS: แสดงการเปรียบเทียบค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (CDW) ปริมาณ PHB สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกลูโคสที่มีอยู่ในระบบและน้ำหนักเซลล์แห้งจริง (RB) ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ

ตารางที่ 11 แสดงการเปรียบเทียบค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (CDW) ปริมาณ PHB สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกลูโคสที่ใช้และน้ำหนักเซลล์แห้งจริง (RB) ที่เวลาต่าง ๆ ของสายพันธุ์ n-RBS (ตัวต้นแบบ)

Time (hr)	CDW (g/L)	PHB (%w/w)	PHB (g/L)	glucose (g/L)	RB (g/L)
0	1.17	1.65	0.015	20.00	1.15
6	0.59	1.77	0.005	16.20	0.58
10	0.59	3.41	0.014	16.18	0.58
24	0.62	2.61	0.010	15.89	0.61
34	0.80	26.98	0.054	15.14	0.75
48	0.62	4.96	0.027	14.87	0.59

จากรูปที่ 21 เป็นกราฟการเจริญของรีคอมบิแนนท์ *E. coli* สายพันธุ์ต่าง ๆ ซึ่งแสดงการเปรียบเทียบค่า ก. น้ำหนักเซลล์แห้ง (CDW) ข. สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ค. ปริมาณ PHB ง. ปริมาณกลูโคสที่มีอยู่ในระบบและ จ. น้ำหนักเซลล์แห้งจริง (RB) ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ เมื่อพิจารณาในกราฟ ก จะพบว่า ค่าน้ำหนักเซลล์ของทุก ๆ สายพันธุ์ จะมีค่ามากกว่าสายพันธุ์ n-RBS ที่เป็นสายพันธุ์ดั้งเดิมที่ใช้ในการดัดแปลงบริเวณ RBS ในทุก ๆ ชั่วโมงของการตรวจวัด โดยที่สายพันธุ์ที่ 20 มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงกว่าสายพันธุ์อื่น ๆ ทั้งการเลี้ยงแบบแบตช์และเฟดแบตช์ และเมื่อพิจารณาในกราฟ ข และ ค ซึ่งเป็นกราฟของ สัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ PHB ตามลำดับ ให้ผลการทดลองเช่นกับกราฟ ก คือ สายพันธุ์อื่น ๆ จะมีค่ามากกว่าสายพันธุ์ n-RBS ที่เป็นสายพันธุ์ดั้งเดิม ในทุก ๆ ชั่วโมงของการตรวจวัด และสายพันธุ์ที่ 20 มีค่าสูงกว่าสายพันธุ์อื่น ๆ ในทุกปัจจัยที่ศึกษา เมื่อพิจารณาในกราฟ ง ซึ่งเป็นการตรวจวัดปริมาณน้ำตาลที่คงเหลืออยู่ในระบบที่ชั่วโมงต่าง ๆ พบว่าสายพันธุ์ n-RBS เป็นสายพันธุ์ที่มีปริมาณกลูโคสคงเหลืออยู่ในระบบมากที่สุดในขณะที่ สายพันธุ์ที่ 20 มีปริมาณกลูโคสคงเหลืออยู่ในระบบน้อยที่สุดซึ่งหมายความว่า สายพันธุ์ n-RBS มีความสามารถในการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นซับสเตรตในการผลิตได้ต่ำที่สุด ขณะที่สายพันธุ์ที่ 20 มีความสามารถในการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นซับสเตรตสูงที่สุด และเมื่อพิจารณาในกราฟ จ ซึ่งเป็นแสดงค่าการวัดน้ำหนักเซลล์ที่แท้จริงพบว่า ที่ชั่วโมงสุดท้ายของการตรวจพบว่า สายพันธุ์ที่ 20 มีปริมาณเซลล์ที่แท้จริงมากที่สุดและขณะเดียวกันสายพันธุ์ n-RBS ก็มีปริมาณเซลล์ที่แท้จริงน้อยที่สุด ดังนั้น กล่าวโดยสรุปแล้ว สายพันธุ์ที่ 20 เป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการใช้น้ำตาลกลูโคสเพื่อผลิต PHB ได้ดีที่สุดในทุก ๆ สายพันธุ์ที่คัดเลือกมาทดลองนั้นมีความสามารถในการผลิต PHB ได้ดีกว่า สายพันธุ์ n-RBS ที่เป็นสายพันธุ์ดั้งเดิมที่ใช้เป็นต้นแบบในการดัดแปลงทั้งสิ้น



รูปที่ 21 ก. DCW ข. PHB (%w/w) ค. PHB (g/L)
ง. Glucose (g/L) จ. RB (g/L) ที่เวลาต่าง ๆ ของเชื้อ
แต่ละสายพันธุ์

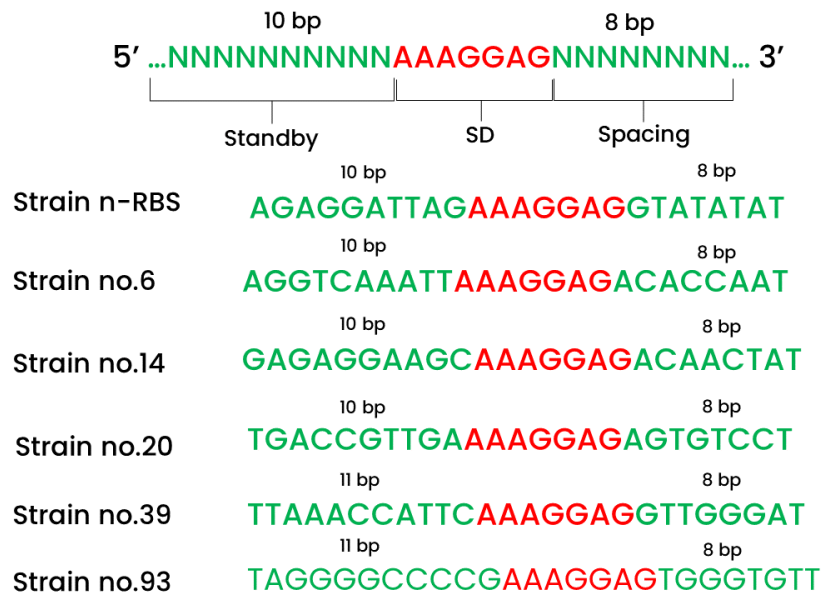
จากตารางที่ 12 เป็นตารางแสดงค่าจลนศาสตร์ของรีคอมบิแนนท์ *E. coli* สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ศึกษา โดยจะพบว่าสายพันธุ์ที่มีการผลิต PHB ที่มีความเข้มข้นสูงที่สุดคือ สายพันธุ์ที่ 20 ทั้งที่มีการเลี้ยงแบบเฟดแบตช์และแบตช์ โดยมีความเข้มข้นเท่ากับ 4.11 กรัมต่อลิตร และ 4.02 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ รองลงมาคือสายพันธุ์ 39 14 6 และสายพันธุ์ n-RBS ตามลำดับโดยจะมีความเข้มข้นเท่ากับ 2.54 1.55 0.73 และ 0.054 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่าสายพันธุ์ที่ได้คัดเลือกมาทดลองนั้นมีความสามารถในการผลิต PHB ได้ความเข้มข้นมากกว่า สายพันธุ์ n-RBS ที่เป็นสายพันธุ์ต้นแบบทั้งสิ้น เมื่อพิจารณาน้ำหนักเซลล์แห้งและสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง จะพบว่าให้ผลเช่นเดียวกับความเข้มข้นของ PHB โดย สายพันธุ์ที่ 20 มีค่ามากกว่าสายพันธุ์อื่น ๆ ทั้งในการเลี้ยงแบบเฟดแบตช์และแบตช์ โดยจะมีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 8.64 และ 8.38 กรัมต่อลิตรตามลำดับ และมีสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 60.11% และ 60.01% ตามลำดับ รองลงมา สายพันธุ์ 39 14 6 และสายพันธุ์ n-RBS โดยจะมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 5.98 4.02 2.52 และ 0.80 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีสัดส่วน PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 44.91% 38.46% 28.94% และ 26.98% ตามลำดับ เมื่อพิจารณาอัตราการเจริญจำของแต่ละสายพันธุ์จะพบว่าสายพันธุ์ที่ 20 ที่มีการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ สายพันธุ์ที่ 39 และสายพันธุ์ต้นแบบ n-RBS มีอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากันคือ 0.03 1/ชั่วโมง และสายพันธุ์ที่ 20 ที่มีการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบตช์และสายพันธุ์ที่ 14 มีอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากันคือ 0.02 1/ชั่วโมง ส่วนสายพันธุ์ที่ 6 จะมีอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.01 1/ชั่วโมง เมื่อพิจารณาอัตราการใช้ซัพสเตรตหรือกลูโคสจำเพาะนั้นจะพบว่า สายพันธุ์ที่มีอัตราการใช้ซัพสเตรตจำเพาะสูงที่สุดคือสายพันธุ์ที่ 20 โดยที่การเพาะเลี้ยงแบบแบตช์จะมีอัตราการใช้ซัพสเตรตจำเพาะที่สูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบตช์ซึ่งจะมีค่าเท่ากับ 0.42 และ 0.18 กรัมของกลูโคสต่อกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้งต่อชั่วโมงตามลำดับ และอัตราการใช้ซัพสเตรตจำเพาะรองลงมาได้แก่ สายพันธุ์ที่ 39 14 6 และ n-RBS โดยจะมีอัตราการใช้ซัพสเตรตจำเพาะเท่ากับ 0.15 0.15 0.10 และ 0.01 กรัมของกลูโคสต่อกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้งต่อชั่วโมงตามลำดับ เมื่อพิจารณาอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ PHB จำเพาะของแต่ละสายพันธุ์พบว่าให้ผลการทดลองเช่นเดียวกันกับอัตราการใช้ซัพสเตรตจำเพาะ คือสายพันธุ์ที่ 20 มีอัตราการผลิต PHB จำเพาะสูงกว่าสายพันธุ์อื่น ๆ และการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ก็จะมีอัตราการผลิต PHB จำเพาะสูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบตช์โดยจะมีค่าเท่ากับ 0.08 กรัมของ PHB ต่อกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้งต่อชั่วโมงในขณะที่การเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบตช์จะมีค่าเท่ากับ 0.03 กรัมของ PHB ต่อกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้งต่อชั่วโมงและอัตราการผลิต PHB จำเพาะรองลงมาได้แก่ สายพันธุ์ที่ 39 14 6 และ n-RBS โดยจะมีอัตราการผลิต PHB จำเพาะเท่ากับ 0.03 0.02 0.01 และ 0.0006 กรัมของ PHB ต่อกรัมของน้ำหนักเซลล์แห้งต่อชั่วโมงตามลำดับ และเมื่อพิจารณา ผลผลิตเซลล์แห้งต่อกลูโคส

ผลผลิต PHB ต่อกลูโคส และผลผลิต PHBต่อเวลาในหน่วยชั่วโมง พบว่าในสายพันธุ์ที่ 20 ที่มีการเพาะเลี้ยงแบบแบดซ์จะมีผลผลิตเซลล์แห้งต่อกลูโคสเท่ากับ 0.12 ผลผลิต PHB ต่อกลูโคสเท่ากับ 0.19 และผลผลิต PHBต่อเวลาเท่ากับ 0.10 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง ในสายพันธุ์ที่ 20 ที่มีการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบชต์จะมีผลผลิตเซลล์แห้งต่อกลูโคสเท่ากับ 0.11 ผลผลิต PHB ต่อกลูโคสเท่ากับ 0.18 และผลผลิต PHB ต่อเวลาเท่ากับ 0.08 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง ในสายพันธุ์ที่ 39 จะมีผลผลิตเซลล์แห้งต่อกลูโคสเท่ากับ 0.17 ผลผลิต PHB ต่อกลูโคสเท่ากับ 0.18 และผลผลิต PHB ต่อเวลาเท่ากับ 0.06 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง ในสายพันธุ์ที่ 14 จะมีผลผลิตเซลล์แห้งต่อกลูโคสเท่ากับ 0.11 ผลผลิต PHB ต่อกลูโคสเท่ากับ 0.12 และผลผลิต PHBต่อเวลาเท่ากับ 0.04 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง ในสายพันธุ์ที่ 6 จะมีผลผลิตเซลล์แห้งต่อกลูโคสเท่ากับ 0.12 ผลผลิต PHB ต่อกลูโคสเท่ากับ 0.12 และผลผลิต PHB ต่อเวลาเท่ากับ 0.02 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง และในสายพันธุ์ n-RBS จะมีผลผลิตเซลล์แห้งต่อกลูโคสเท่ากับ 0.38 ผลผลิต PHB ต่อกลูโคสเท่ากับ 0.02 และผลผลิต PHB ต่อเวลาเท่ากับ 0.01 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง ดังนั้นจากการพิจารณาค่าจลนศาสตร์ที่คำนวณได้ในตารางที่ 14 นี้จะพบว่าสายพันธุ์ที่ 20 มีประสิทธิภาพในการผลิต PHB ดีที่สุดในสายพันธุ์ที่คัดเลือกแต่เมื่อเปรียบเทียบกับระหว่างการเพาะเลี้ยงแบบแบดซ์และเฟดแบชต์นั้นยังไม่สามารถอธิบายได้จำเป็นต้องมีการทดลองเพิ่มเติมเนื่องจากว่าการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบชต์มีการเติมน้ำตาลกลูโคสระหว่างการเพาะเลี้ยงเพียงครั้งเดียวซึ่งไม่ใช้การเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบชต์ตามทฤษฎีจึงทำให้การทดลองคลาดเคลื่อนได้

ตารางที่ 12 เปรียบเทียบค่าจลนศาสตร์ของรีคอมบิแนนท์ *E. coli* สายพันธุ์ต่าง ๆ

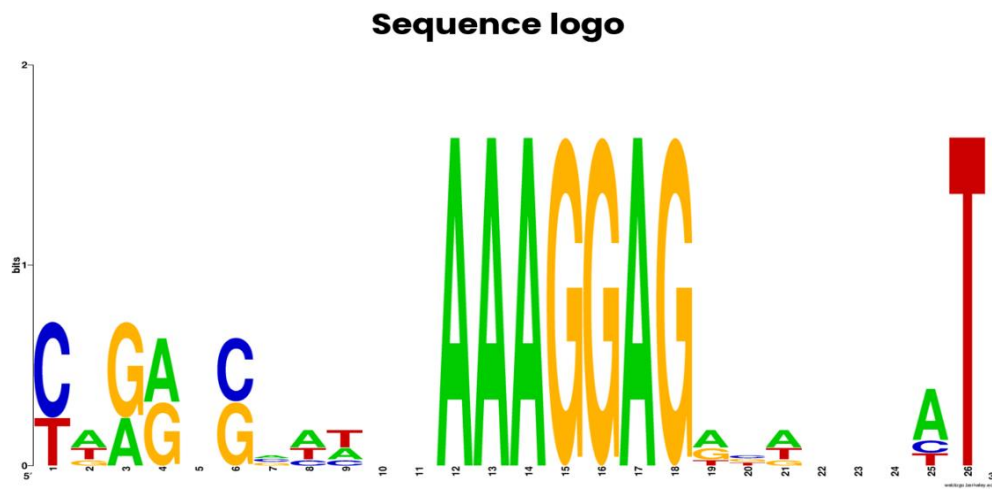
Kinetic parameter	strain					
	n-RBS	No. 20	No. 20 feed	No. 39	No. 14	No. 6
Maximum PHB concentration (g/L)	0.054	4.02	4.11	2.54	1.55	0.73
Maximum CDW (g/L)	0.80	8.38	8.64	5.98	4.02	2.52
Maximum PHB content (%wt)	26.98	60.01	60.11	44.91	38.46	28.94
Specific growth rate (1/h)	0.03	0.03	0.02	0.03	0.02	0.01
Specific consumption rate (g-glucose/g-CDW/h)	0.01	0.42	0.18	0.15	0.15	0.10
Specific production rate (g-PHB/g-CDW/h)	0.0006	0.08	0.03	0.03	0.02	0.01
$Y_{X/S}$ (g-CDW/g-glucose)	0.38	0.12	0.11	0.17	0.11	0.12
$Y_{P/S}$ (g-PHB/g-glucose)	0.02	0.19	0.18	0.18	0.12	0.12
Productivity (g/L h)	0.01	0.10	0.08	0.06	0.04	0.02
Time (h)	48	48	54	48	48	48

4.6 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์



รูปที่ 22 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ RBS ของรีคอมบิแนนท์ *E. coli* สายพันธุ์ n-RBS No.6 No.14 No.20 No.39 และ No.93

เมื่อพิจารณาผลการทดลองตอนที่ 4.3 และ 4.4 ผู้วิจัยได้คัดเลือกรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มีพลาสมิดลูกผสม pUC19-23100CAB_{A-04} นำไปส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง RBS ซึ่งให้ผลการทดลองดังรูปที่ 22 จะเห็นได้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 6 สายพันธุ์มีความแตกต่างกันในบริเวณที่ศึกษา นอกจากนี้ยังพบว่าในสายพันธุ์ที่ 39 และ 93 ที่บริเวณสแตนด์บาย (standby) มีการเติมกรดนิวคลีอิกเพิ่มมาอีก 1 ตัวด้วย จากนั้นผู้วิจัยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง RBS ไปสร้างเป็นแผนภูมิการอนุรักษ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์หรือ sequence logo โดยใช้อัลกอริทึมที่ชื่อว่า WebLogo (Crooks และคณะ, 2004) ซึ่งให้ผลดังรูปที่ 23 ซึ่งความสูงโดยรวมของสแต็ก (stack) จะบ่งบอกถึงการอนุรักษ์ลำดับที่ตำแหน่งนั้น ๆ ในขณะที่ความสูงของสัญลักษณ์ภายในสแต็กจะระบุความสัมพันธ์สัมพัทธ์ของกรดนิวคลีอิกแต่ละตัวที่ตำแหน่งนั้น แต่ในการทดลองนี้ผู้ได้ใช้ข้อมูลเพียง 6 ชุดซึ่งอาจจะน้อยเกินไปสำหรับการพิจารณาการอนุรักษ์ลำดับหรือการเปลี่ยนแปลงของกรดนิวคลีอิกในแต่ละตำแหน่งได้ แต่ก็เพียงพอที่จะเห็นภาพรวมว่ามีการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของรีคอมบิแนนท์ *E. coli* สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่พิจารณา แต่สำหรับการทดลองขั้นนี้ผู้วิจัยไม่สามารถอธิบายได้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันเหล่านี้ส่งผลต่อการแสดงออกของยีนได้อย่างไรบ้าง เนื่องจากว่ามีปัจจัยภายนอกอื่น ๆ ที่ส่งผลต่อโครงสร้างและกระบวนการแปลรหัสรวมถึงการแสดงออกของโปรตีนด้วย (Sherwood และ Henkin, 2016)



รูปที่ 23 ภาพรวมของลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละตำแหน่งของรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่พิจารณา

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการทำไลบรารีของรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มีพลาสมิดลูกผสม pUC19-23100CAB_{A-04} ซึ่งเป็นพลาสมิดที่มีการใช้เทคนิคการสุ่มลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณตำแหน่งสแตนด์บาย (standby site) และบริเวณว่าง (spacer region) ของ RBS ของโอเพอรอน *phaCAB* ซึ่งเป็นโอเพอรอนที่มีการผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ PHB พบว่า ไลบรารีนี้มีความหลากหลายของสายพันธุ์รีคอมบิแนนท์ *E. coli* โดยสังเกตได้จากเมื่อนำไลบรารีไปเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่มีกลูโคส 20 กรัมต่อลิตรเป็นซับสเตรตและไนล์เรตเป็นตัวตรวจวัดปริมาณ PHB เมื่อนำไปส่องภายใต้แสงสีน้ำเงินพบว่า มีโคโลนีของเชื้อที่เจริญขึ้นเป็นจำนวนมากและแต่ละโคโลนีมีความเข้มของการเรืองแสงที่แตกต่างกัน จากนั้นผู้วิจัยได้คัดเลือกโคโลนีจากการสังเกตโดยเลือกโคโลนีที่มีความสว่างสูง 89 โคโลนีและเลือกโคโลนีที่มีความสว่างต่ำ 4 โคโลนีมาเพาะเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อขนาด 96 หลุมที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตรเป็นซับสเตรตและไนล์เรตเป็นตัวตรวจวัดปริมาณ PHB ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมงสาเหตุที่ใช้เวลาเพียง 12 ชั่วโมงนั้นเนื่องจากความเข้มข้นเซลล์เพียงพอต่อการตรวจวัดแล้วหากเพาะเลี้ยงนานกว่านี้เซลล์ของรีคอมบิแนนท์ *E. coli* จำนวนมากจะไปบดบังการเรืองแสงของไนล์เรตและรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ก่อตัวเป็นไบโอฟิล์มบริเวณพื้นผิวของหลุมส่งผลให้ไม่มีความเป็นเนื้อเดียวกันของน้ำเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำไปวัดค่าการเรืองแสงด้วยเครื่องโมโครเพลทรีเตอร์พบว่า แต่ละโคโลนีมีค่าการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่แตกต่างกัน ซึ่งวิธีการนี้เป็นการคัดเลือกรีคอมบิแนนท์ *E. coli* เบื้องต้น (Zuriani และคณะ, 2013) ซึ่งจะช่วยให้สามารถคัดเลือกรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่อาจมีการผลิต PHB ในปริมาณที่สูงได้ จากนั้นผู้วิจัยได้คัดเลือกโคโลนีที่ให้ค่าการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์สูงซึ่งมีทั้งหมด 14 โคโลนี และเพื่อเป็นการศึกษายืนยันวิธีการทดลองการคัดเลือกเบื้องต้น ผู้วิจัยได้เลือกโคโลนีที่มีค่าการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ต่ำมาจำนวน 2 โคโลนีเพื่อนำไปทดสอบผลิต PHB เบื้องต้นต่อไป

จากการทดลองการผลิต PHB เบื้องต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่มีแอมพลีซิลินและกลูโคสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตรที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมงเมื่อนำไปวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์และปริมาณ PHB ที่ผลิตได้แล้วนำไปคำนวณหาค่าอัตราการเจริญจำเพาะและอัตราการผลิตจำเพาะจะเห็นว่ามีค่าที่แตกต่างกันดังรูปที่ 14 จากนั้นผู้วิจัยได้คัดเลือกโคโลนีเหล่านี้ศึกษาการเจริญต่อโดยคัดเลือกโคโลนีที่มีอัตราการเจริญจำเพาะและอัตราการผลิตจำเพาะสูงจำนวน 2 โคโลนีคือ โคโลนีที่ 6 และ 20 โคโลนีที่มีอัตราการเจริญจำเพาะและอัตราการผลิตจำเพาะปานกลางจำนวน 2 โคโลนีคือ โคโลนีที่ 14 และ 39 ส่วนโคโลนีที่มีอัตราการ

เจริญจำเพาะและอัตราการผลิตจำเพาะต่ำจะไม่นำมาศึกษาต่อในระดับการเจริญของเชื้อ ทั้งนี้จะเห็นได้ว่าผลการทดลองการผลิต PHB เบื้องต้นนั้นให้ผลที่แตกต่างจากผลการทดลองในขั้นการคัดเลือกโคโลนีเบื้องต้นในไมโครเพลท สาเหตุเนื่องมาจากการจัดเรียงของแกรนูล PHB ภายในเซลล์เองก็สามารถส่งผลต่อการเรืองแสงของไนล์เรดที่แตกต่างกันได้อีกด้วยซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ (Zuriani และคณะ, 2013) ที่อธิบายว่าค่าการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ของไนล์เรดนั้นขึ้นกับพื้นที่ผิวและรูปร่างของแกรนูล หากแกรนูลเกิดการรวมกันจนมีขนาดใหญ่ขึ้นจะทำให้พื้นที่ผิวโดยรวมของแกรนูลลดลงเมื่อเทียบตอนแรก ส่งผลให้ค่าการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ของไนล์เรดลดลงด้วยจึงเป็นสาเหตุให้มีการศึกษาการผลิต PHB เบื้องต้นด้วย

เมื่อนำโคโลนีที่คัดเลือกจากการผลิต PHB เบื้องต้นมาศึกษาการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่มีแอมพลิซิลิน และ กลูโคสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสพบว่า โคโลนีหรือสายพันธุ์ที่ 20 มีประสิทธิภาพในการผลิต PHB ดีที่สุดในสายพันธุ์ที่คัดเลือกกรองลงมาคือ สายพันธุ์ที่ 39 14 และ 6 ตามลำดับซึ่งทั้ง 4 สายพันธุ์นี้ให้ประสิทธิภาพในการผลิต PHB ที่ดีกว่าในสายพันธุ์ต้นแบบ (n-RBS) และสายพันธุ์ที่ใช้โปรโมเตอร์ดั้งเดิมในงานวิจัยของ Wei และคณะ (2009) ทั้งสิ้น แต่ทว่าเมื่อพิจารณาผลการทดลองของแต่ละสายพันธุ์จะพบว่ารีคอมบิแนนท์ *E. coli* จะมีความสามารถในการผลิต PHB ในปริมาณที่สูงขึ้นในช่วงระยะเวลาหนึ่งจากนั้นเมื่อน้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นแหล่งพลังงานใกล้หมดรีคอมบิแนนท์ *E. coli* เหล่านี้จะมีสัดส่วนของ PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่มีค่าลดลง โดยผู้วิจัยได้คาดการณ์ว่าสาเหตุน่าจะมาจากความเสถียรของเวกเตอร์พลาสมิดที่ใช้ซึ่งมีความเสถียรต่ำจึงส่งผลให้เกิดเหตุการณ์ดังกล่าวข้างต้นได้ ซึ่งในงานวิจัยของ Silva และคณะ (2012) ได้อธิบายถึงผลของเมตาบอลิกเบอเด้น (metabolic burden) หรือปริมาณของแหล่งพลังงานที่เซลล์ใช้ในการรักษาสภาพการทำงานของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดและการเพิ่มจำนวน โดยกล่าวว่าในสภาวะที่เซลล์มีการใช้แหล่งอาหารในปริมาณที่สูงเพื่อนำไปผลิตเป็นสารผลิตภัณฑ์และเพิ่มจำนวน พลาสมิดนั้นจะทำให้เซลล์มีสภาวะเครียดเนื่องจากการเผาผลาญพลังงานในปริมาณสูงจึงส่งผลต่อความเสถียรของพลาสมิดที่ลดลงรวมถึงพลาสมิดไม่สามารถทำงานได้ซึ่งก็จะส่งผลต่อการผลิต PHB ด้วย ดังนั้นสิ่งนี้จึงเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่อธิบายถึงสัดส่วนของ PHB ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่ลดลงในช่วงท้ายของการทดลอง นอกจากนี้ผลการทดลองในขั้นตอนการศึกษาการเจริญนั้นจะเห็นได้ว่าสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพการผลิต PHB ที่ดีที่สุดนั้นไม่ใช่สายพันธุ์ที่ 6 เช่นเดียวกับผลการทดลองการผลิต PHB เบื้องต้นซึ่งผู้วิจัยคาดการณ์ว่าเป็นผลมาจากการเก็บตัวอย่างในขั้นการผลิต PHB เบื้องต้นจำนวนน้อยเกินไปจึงทำให้ได้ข้อมูลที่คลาดเคลื่อนเมื่อเทียบกับการศึกษาการเจริญของ รีคอมบิแนนท์ *E. coli* ในแต่ละสายพันธุ์

เมื่อนำผลการทดลองจากการทดลองการผลิต PHB เบื้องต้นและการศึกษาเจริญของรีคอมบิแนนท์ *E. coli* มาพิจารณาผู้วิจัยได้คัดเลือกรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่มีพลาสมิดลูกผสม

pUC19-23100CAB_{A-04} ได้แก่สายพันธุ์ที่ 6 14 20 39 และ 93 นำไปส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง RBS ซึ่งจากการส่งวิเคราะห์พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ รีคอมบิแนนท์ *E. coli* แต่ละสายพันธุ์นั้นมีความแตกต่างกันในตำแหน่งสแตนด์บาย (standby site) และบริเวณว่าง (spacer region) ของ RBS ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีการศึกษาแสดงให้เห็นว่าทั้งสอง บริเวณที่มีการศึกษาส่งผลต่อการผลิต PHB แต่อย่างไรก็ตามผู้วิจัยไม่สามารถอธิบายความสัมพันธ์ ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันเหล่านี้กับกระบวนการผลิต PHB เนื่องจากว่ามีปัจจัยภายนอก อื่น ๆ ที่ส่งผลต่อโครงสร้าง กระบวนการแปลรหัส การแสดงออกของโปรตีนและการสังเคราะห์ PHB ด้วย (Bedard และคณะ, 2020; Sherwood และ Henkin, 2016)

จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการใช้โปรโมเตอร์ที่มีการแสดงออกตลอดเวลา ร่วมกับการทำไลบรารีของ RBS โดยใช้วิธีการกลายพันธุ์ลำดับนิวคลีโอไทด์แบบสุ่มสามารถพัฒนาประสิทธิภาพของ การผลิต PHB ในรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ได้ นอกจากนี้ RBS ที่ได้จากการทำไลบรารีนี้ยังสามารถ นำไปใช้เป็นเครื่องมือทางพันธุวิศวกรรมเพื่อการผลิตพลาสติกชีวภาพในอนาคตได้

รายการอ้างอิง

- สุชาติ จันทรประทีป. (2539). การผลิตเทอร์พอลิเมอร์ พอลิ (3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต-โค-4-ไฮดรอกซีบิวทิเรต) โดย *Alcaligenes sp. A-04*. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย/กรุงเทพฯ.
- Awasthi, A. K., Shivashankar, M., & Majumder, S. (2017). Plastic solid waste utilization technologies: A Review. *Materials Science and Engineering*, 14.
- Babel, W., Ackermann, J., & Breuer, U. (2001). Physiology, Regulation, and Limits of the Synthesis of Poly(3HB). In T. Scheper (Ed.), *Biopolyesters*.
- Bahl, S., Dolma, J., Jyot Singh, J., & Sehgal, S. (2021). Biodegradation of plastics: A state of the art review. *Materials Today: Proceedings*, 39, 31-34.
- Bedard, A. V., Hien, E. D. M., & Lafontaine, D. A. (2020). Riboswitch regulation mechanisms: RNA, metabolites and regulatory proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1863(3), 194501.
- Boontip, T., Waditee-Sirisattha, R., Honda, K., & Napathorn, S. C. (2020). *Enhanced functional expression of the polyhydroxyalkanoate synthase gene from Cupriavidus necator A-04 using a cold-shock promoter for efficient poly(3-hydroxybutylate) production in Escherichia coli*. Chulalongkorn university, Bangkok.
- Byrom, D. (1991). *Biomaterials*. (Vol. 1): Macmillan Publishers Ltd and ICI Biological Products Business.
- Chow, C., So, W., Cheung, T., & Yeung, S. (2017). Plastic Waste Problem and Education for Plastic Waste Management. In *Emerging Practices in Scholarship of Learning and Teaching in a Digital Era* (pp. 125-140).
- Comeau, Y., Hall, K. J., & Oldham, W. K. (1988). Determination of Poly-beta-Hydroxybutyrate and Poly-beta-Hydroxyvalerate in Activated Sludge by Gas-Liquid Chromatography. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(9), 2325-2327.
- Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J. M., & Brenner, S. E. (2004). WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Research*, 14(6), 1188-1190.

- Damalas, S. G., Batiannis, C., Martin-Pascual, M., de Lorenzo, V., & Martins Dos Santos, V. A. P. (2020). SEVA 3.1: enabling interoperability of DNA assembly among the SEVA, BioBricks and Type IIS restriction enzyme standards. *Microbial Biotechnology*, *13*(6), 1793-1806.
- Eggers, J., & Steinbuchel, A. (2013). Poly(3-hydroxybutyrate) degradation in *Ralstonia eutropha* H16 is mediated stereoselectively to (S)-3-hydroxybutyryl coenzyme A (CoA) via crotonyl-CoA. *Journal of Bacteriology*, *195*(14), 3213-3223.
- Faris, N. A., Noriman, N. Z., Sam, S. T., Ruzaidi, C. M., Omar, M. F., & Kahar, A. W. M. (2014). Current Research in Biodegradable Plastics. *Applied Mechanics and Materials*, *679*, 273-280.
- Heinrich, D., Madkour, M. H., Al-Ghamdi, M. A., Shabbaj, II, & Steinbuchel, A. (2012). Large scale extraction of poly(3-hydroxybutyrate) from *Ralstonia eutropha* H16 using sodium hypochlorite. *AMB Express*, *2*(1), 59.
- Hill, R. G. (2005). Biomedical polymers. In *Biomaterials, Artificial Organs and Tissue Engineering* (pp. 97-106).
- Hokamura, A., Wakida, I., Miyahara, Y., Tsuge, T., Shiratsuchi, H., Tanaka, K., & Matsusaki, H. (2015). Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoates) by recombinant *Escherichia coli* from glucose. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *120*(3), 305-310.
- Jendrossek, D. (2009). Polyhydroxyalkanoate granules are complex subcellular organelles (carbonosomes). *Journal of Bacteriology*, *191*(10), 3195-3202.
- Kaur, G. (2015). Strategies for Large-scale Production of Polyhydroxyalkanoates. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, *29*(2), 157-172.
- Ko, Y. S., Kim, J. W., Chae, T. U., Song, C. W., & Lee, S. Y. (2020). A Novel Biosynthetic Pathway for the Production of Acrylic Acid through beta-Alanine Route in *Escherichia coli*. *ACS Synth Biol*, *9*(5), 1150-1159.
- Li, T., Ye, J., Shen, R., Zong, Y., Zhao, X., Lou, C., & Chen, G. Q. (2016). Semirational Approach for Ultrahigh Poly(3-hydroxybutyrate) Accumulation in *Escherichia coli* by Combining One-Step Library Construction and High-Throughput Screening. *ACS Synthetic Biology*, *5*(11), 1308-1317.

- Madison, L. L., & Huisman, G. W. (1999). Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS* 63, 21–53.
- McAdam, B., Brennan Fournet, M., McDonald, P., & Mojicevic, M. (2020). Production of Polyhydroxybutyrate (PHB) and Factors Impacting Its Chemical and Mechanical Characteristics. *Polymers (Basel)*, 12(12).
- Napathorn, S. C., Visetkoop, S., Pinyakong, O., Okano, K., & Honda, K. (2021). Polyhydroxybutyrate (PHB) Production Using an Arabinose-Inducible Expression System in Comparison With Cold Shock Inducible Expression System in *Escherichia coli*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9.
- Sagong, H. Y., Son, H. F., Choi, S. Y., Lee, S. Y., & Kim, K. J. (2018). Structural Insights into Polyhydroxyalkanoates Biosynthesis. *Trends in Biochemical Sciences*, 43(10), 790-805.
- Salis, H. M. (2011). The ribosome binding site calculator. *Methods in Enzymology*, 498, 19-42.
- Salis, H. M., Mirsky, E. A., & Voigt, C. A. (2009). Automated design of synthetic ribosome binding sites to control protein expression. *Natural Biotechnology*, 27(10), 946-950.
- Seo, S. W., Yang, J. S., Kim, I., Yang, J., Min, B. E., Kim, S., & Jung, G. Y. (2013). Predictive design of mRNA translation initiation region to control prokaryotic translation efficiency. *Metabolic Engineering*, 15, 67-74.
- Sherwood, A. V., & Henkin, T. M. (2016). Riboswitch-Mediated Gene Regulation: Novel RNA Architectures Dictate Gene Expression Responses. *Annual Review of Microbiology*, 70, 361-374.
- Shrivastav, A., Kim, H. Y., & Kim, Y. R. (2013). Advances in the applications of polyhydroxyalkanoate nanoparticles for novel drug delivery system. *BioMed Research International*, 2013, 581684.
- Silva, F., Queiroz, J. A., & Domingues, F. C. (2012). Evaluating metabolic stress and plasmid stability in plasmid DNA production by *Escherichia coli*. *Biotechnology Advances*, 30(3), 691-708.

- Singh, M. K., Rai, P. K., Rai, A., Singh, S., & Singh, J. S. (2019). Poly-beta-Hydroxybutyrate Production by the Cyanobacterium *Scytonema geitleri* Bharadwaja under Varying Environmental Conditions. *Biomolecules*, 9(5).
- Spiekermann, P., Rehm, B. H. A., Kalscheuer, R., Baumeister, D., & Steinbüchel, A. (1999). A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. *Archives Microbiology*, 171.
- Tan, G.-Y., Chen, C.-L., Li, L., Ge, L., Wang, L., Razaad, I., . . . Wang, J.-Y. (2014). Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review. *Polymers*, 6(3), 706-754.
- Thirumala, M., & Reddy, S. V. (2012). Production of PHA by recombinant organisms. *International journal of life science and pharma research*, 1.
- Ulf, B. (2015). *User's Guide to Plastic* (S. Mark Ed.): Hanser Publications.
- Wei, X. X., Shi, Z. Y., Yuan, M. Q., & Chen, G. Q. (2009). Effect of anaerobic promoters on the microaerobic production of polyhydroxybutyrate (PHB) in recombinant *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(4), 703-712.
- Yee, L.-N. (2012). Polyhydroxyalkanoate Synthesis by Recombinant *Escherichia coli* JM109 Expressing PHA Biosynthesis Genes from *Comamonas* sp. EB172. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 04(05).
- Zuriani, R., Vigneswari, S., Azizan, M. N. M., Majid, M. I. A., & Amirul, A. A. (2013). A high throughput Nile red fluorescence method for rapid quantification of intracellular bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 18(3), 472-478.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria-Bertani (LB broth)

สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	5 กรัม
ทริปโตน (tryptone)	10 กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride)	10 กรัม

ละลายสารทั้ง 3 ชนิดในน้ำกลั่น ให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria-Bertani (LB agar)

สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	5 กรัม
ทริปโตน (tryptone)	10 กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride)	10 กรัม
วุ้นผง (agar)	15 กรัม

ละลายสารทั้ง 4 ชนิดในน้ำกลั่น ให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาทีก่อนนำมาเทลงจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่สะอาดและปลอดเชื้อ ทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัวและแห้งไม่มีไอน้ำเกาะ

ภาคผนวก ข

สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. แอมพิซิลลิน (ampicillin)

ละลายแอมพิซิลลิน 100 มิลลิกรัม ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองสารละลายผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตทที่มีรูพรุนขนาด 0.20 ไมครอน

2. บัฟเฟอร์ TE pH 8.0

Tris-HCl	10	มิลลิโมลาร์
EDTA	1	มิลลิโมลาร์

ผสมสารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 1.0 โมลาร์ pH 8.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เข้ากับสารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 8.0 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำปลอดประจุจนมีปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. บัฟเฟอร์ 25x Tris-acetate (TAE)

Tris base	121	กรัม
กรดอะซิติกเข้มข้น	28.55	กรัม
สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์	50	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำปลอดประจุปริมาตร 300 มิลลิลิตร จากน้ำเติมน้ำปลอดประจุปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. บัฟเฟอร์เคซีเอ็ม (5x KCM buffer)

แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl ₂)	150	มิลลิโมลาร์
แมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl ₂)	250	มิลลิโมลาร์
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	500	มิลลิโมลาร์

ละลายสารทั้ง 3 ชนิดในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ให้เข้ากันแล้วนำไปกรองด้วยชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตทที่มีรูพรุนกรองขนาด 0.20 ไมครอน

5. บัฟเฟอร์สำหรับเก็บเซลล์ทำทรานฟอร์เมชัน (Transformation storage buffer, TSB buffer)

Luria-Bertani (LB) broth	100	มิลลิลิตร
พอลิเอทิลีนไกลคอล (polyethylene glycol, PEG)	10	กรัม
ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide, DMSO)	5	มิลลิลิตร
1 โมลาร์แมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO ₄)	0.1	มิลลิลิตร
แมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl ₂)	0.1	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดละลายเข้าด้วยกัน จากนั้นทำให้ปลอดเชื้อโดยนำไปกรองด้วยชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตทที่มีรูพรุนกรองขนาด 0.20 ไมครอน จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6. ไนล์เรด (Nile red)

ละลายไนล์เรด 0.8 มิลลิตรกรัมใน DMSO 10 มิลลิลิตรแล้วกรัมในขวดสีชา

7. สารละลายกลูโคสสำหรับการทดลองเฟดแบชต์

เตรียมสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 700 กรัมต่อลิตรปริมาตร 10 มิลลิลิตรนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

8. สารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (DNSA)

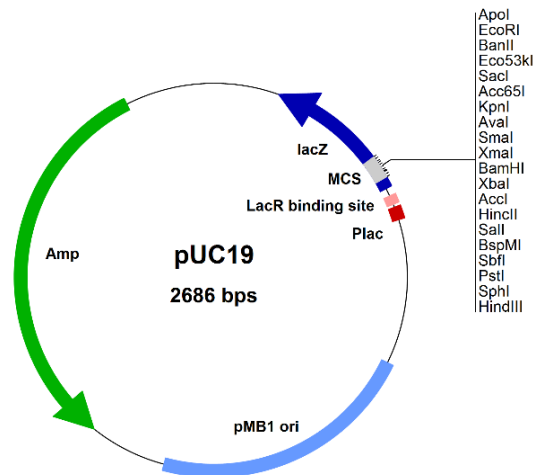
กรดไดไนโตรซาลิไซลิก	1	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น	2	โมลาร์
โพแทสเซียมทาร์เทต	30	กรัม

ละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 1 กรัมในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 โมลาร์ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ละลายบนเครื่องกวนสารแบบให้ความร้อน (hotplate stirrer) เติมโพแทสเซียมทาร์เทต 30 กรัม จากนั้นปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุเก็บไว้ในขวดสีชา

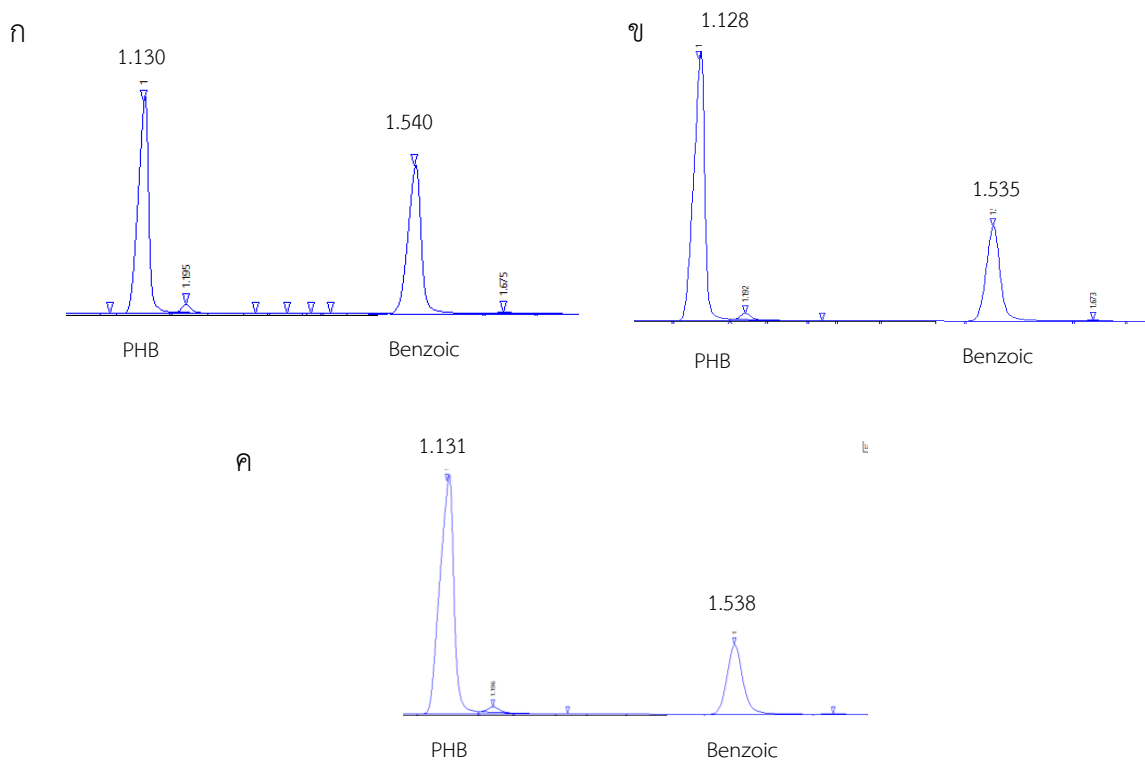
ภาคผนวก ค

เวกเตอร์และโครมาโตแกรม

1. เวกเตอร์ pUC 19



2. โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน PHB



รูปโครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐาน PHB ปริมาณ 2.45 กรัมต่อลิตร แสดงดังรูป ก ข ค ตามลำดับ