



การศึกษาผลของการเติมน้ำตาลต่อการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ใน *Escherichia coli* BL21(DE3)



โดย
นางสาวสุบงกช เหมือนวงศ์ธรรม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโทมหาบัณฑิต

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2564

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

การศึกษาผลของการเติมน้ำตาลต่อการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ใน *Escherichia coli*
BL21(DE3)



โดย
นางสาวสุนงกช เหมือนวงศ์ธรรม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2564
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

EFFECTS OF SUGAR ADDITION ON RECOMBINANT PROTEIN IN *ESCHERICHIA*
COLI BL21(DE3)



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for Master of Science (BIOTECHNOLOGY)
Department of BIOTECHNOLOGY
Graduate School, Silpakorn University
Academic Year 2021
Copyright of Silpakorn University

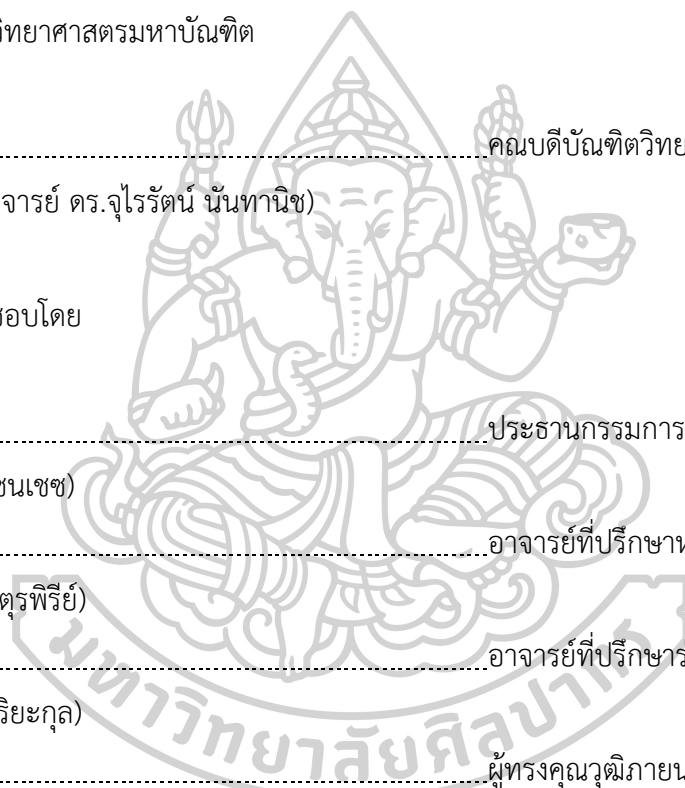
หัวข้อ	การศึกษาผลของการเติมน้ำตาลต่อการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ ใน <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)
โดย	นางสาวสুবงกช เหมือนวงศ์ธรรม
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ แผนก ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโท
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	พิมพ์ชนก จตุรพิริย์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ภาณุ พิมพ์วิริยะกุล

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.จุไรรัตน์ นันทานิช)

พิจารณาเห็นชอบโดย

..... ประธานกรรมการ
(นางฐระพี แซนเซซ)
..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(พิมพ์ชนก จตุรพิริย์)
..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ภาณุ พิมพ์วิริยะกุล)
..... ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก
(สมชาติ แม่นปิ่น)



620920067 : เทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโทบัณฑิต

คำสำคัญ : การผลิตโปรตีนลูกผสม, *Escherichia coli* BL21(DE3), น้ำตาล

นางสาว สุกงกช เหมือนวงศ์ธรรม: การศึกษาผลของการเติมน้ำตาลต่อการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ใน *Escherichia coli* BL21(DE3) อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : พิมพ์ชนก จตุรพิริย์

การแสดงออกของโปรตีนรีคอมบิแนนท์ใน *Escherichia coli* BL21(DE3) เป็นระบบที่มีประสิทธิภาพสูงและนิยมใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมการผลิตโปรตีน ซึ่งต้องการการผลิตโปรตีนได้ในปริมาณมาก งานวิจัยนี้จึงศึกษาผลของการเติมน้ำตาลชนิดต่างๆต่อการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ในเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) โดยเติมน้ำตาลกลูโคส กาแลคโตส ฟรุคโตส แมนโนส อะราบิโนส ไฮโลส แลคโตส มอลโตส และซูโครส ที่ความเข้มข้น 2 4 6 8 และ 10 กรัมต่อลิตรในอาหาร LB broth และ auto-induction media แล้วนำไปวัดค่า OD600 เพื่อติดตามการเจริญเติบโตของเซลล์ พบว่าในอาหาร LB น้ำตาลส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ 3 แบบคือน้ำตาลที่ยับยั้งการเจริญของเซลล์ น้ำตาลที่ไม่มีผลต่อการเจริญของเซลล์และน้ำตาลที่เพิ่มการเจริญของเซลล์ ในขณะที่ไม่มีน้ำตาลชนิดใดเลยที่เพิ่มการเจริญเติบโตของเซลล์ใน auto-induction media จากนั้นผู้วิจัยจึงศึกษาผลของน้ำตาลในการเพาะเลี้ยงเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีพลาสมิด pET-11a และ GFP-pET-11a น้ำตาลยังคงส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ 3 แบบในทิศทางเดียวกัน โดยน้ำตาลมอลโตสและไฮโลสเป็นน้ำตาลที่เพิ่มการเจริญเติบโตของเซลล์ทุกชนิด จากนั้นนำโปรตีนที่อยู่ในเซลล์มาวัดความเข้มข้นโปรตีนด้วย Bradford protein assay พบว่าเซลล์ที่มีการเจริญเติบโตสูงให้ความเข้มข้นโปรตีนทั้งหมดสูงเช่นกัน แล้วนำโปรตีนมาวิเคราะห์ขนาดโปรตีนด้วย sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) พบว่าโปรตีนมีขนาด 26.9 kDa จากนั้นทำการวิเคราะห์แถบโปรตีนด้วยซอฟต์แวร์ ImageJ เพื่อหาพื้นที่ใต้พีคของโปรตีน GFP พบว่าเซลล์ที่มีการเจริญเติบโตสูงไม่ได้มีความเข้มข้นโปรตีน GFP ที่สูง ดังนั้นน้ำตาลสามารถเพิ่มการเจริญของเซลล์ได้ส่งผลให้เพิ่มจำนวนโปรตีนทั้งหมดในเซลล์แต่ไม่เพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนรีคอมบิแนนท์

620920067 : Major (BIOTECHNOLOGY)

Keyword : Recombinant protein production, *Escherichia coli* BL21(DE3), Sugars

MISS SUBONGKOD MUENWONGTHAM : EFFECTS OF SUGAR ADDITION ON RECOMBINANT PROTEIN IN *ESCHERICHIA COLI* BL21(DE3) THESIS ADVISOR : PHIMCHANOK JATURAPIREE

Recombinant protein expression in *Escherichia coli* BL21(DE3) is highly effective and widely used in industrial protein production. The method to obtain higher amount of protein production need to be developed. This project investigated the effect of sugar on recombinant protein production in *E. coli* BL21(DE3). Sugars, include glucose, galactose, fructose, mannose, arabinose, xylose, lactose, maltose, and sucrose, were added into both LB medium and auto-induction medium at concentration of 2, 4, 6, 8, and 10 g/L. Growth curves of *E. coli* BL21(DE3) at various conditions were determined by measuring OD600. The results showed that LB medium sugars could be divided into three groups based on their effect on *E. coli* BL21(DE3) growth sugars that inhibits cell growth, sugars that increases cell growth. However, inhibited and no effect sugars were observed in the cell growth on auto-induction medium. Then, the cell growth on LB media was only further investigated by adding these sugars to the growth of *E. coli* BL21(DE3) containing pET-11a or GFP-pET-11a. The effect of sugar on cell growth was still observed in the same tread as in *E. coli* BL21(DE3) where maltose and xylose sinificantly increase cell growth. Then, total protein concentration measuring by Bradford protein assay revealed that higher cell growth cause the higher total protein concentration. The examine protein molecular by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) found that was 26.9 kDa in size. Band intensity of GFP at each condition was examined by ImageJ software and it was found that the amount of GFP was not depended on the cell density. So sugar can increase cell *E. coli* BL21(DE3) growth but couldn't increase recombinant protein concentration.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความสามารถของ รศ.ดร. พิมพ์ชนก จตุรพิริย์ ที่คอยสนับสนุนและให้คำปรึกษาการทำวิทยานิพนธ์นี้ อีกทั้งยังคอยให้กำลังใจและคอยกระตุ้นเมื่อดิฉันรู้สึกไม่กระตือรือร้นในบางช่วงจึงทำให้ดิฉันรู้สึกว่าจะสามารถพูดคุยและสามารถบอกปัญหาที่เกิดขึ้นได้ อาจารย์เป็นผู้รับฟังและแนะนำการแก้ไขปัญหาที่ดีทำให้บรรยากาศในการดำเนินงานวิจัยไม่มีความกดดัน และคอยให้คำแนะนำต่างๆที่เป็นประโยชน์ต่อการดำเนินงานวิจัยนี้ และขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร.ภาณุ พิมพ์วิริยะกุล ที่คอยให้คำปรึกษาและคอยแก้ไขปัญหาที่พบขณะดำเนินงานวิจัย และให้คำแนะนำต่างๆที่เป็นประโยชน์ต่อการดำเนินงานวิจัย และคอยปรับปรุงแก้ไขเพื่อให้วิทยานิพนธ์นี้สมบูรณ์ขึ้น อีกทั้งยังช่วยอธิบายในสิ่งที่ดิฉันไม่เข้าใจหรือสงสัยในงานวิจัยให้มีความกระจ่างและเข้าใจมากยิ่งขึ้น ขอขอบพระคุณอาจารย์ที่สละเวลามาให้คำแนะนำในขณะที่ดิฉันดำเนินงานวิจัยแล้วมีปัญหาเกิดขึ้น และอาจารย์คอยกระตุ้นเมื่อดิฉันไม่กระตือรือร้น อีกทั้งยังเป็นอาจารย์ที่ดิฉันสามารถพูดคุยและบอกปัญหาได้ทุกเรื่องซึ่งอาจารย์จะมีคำแนะนำที่ดีให้ทุกครั้ง

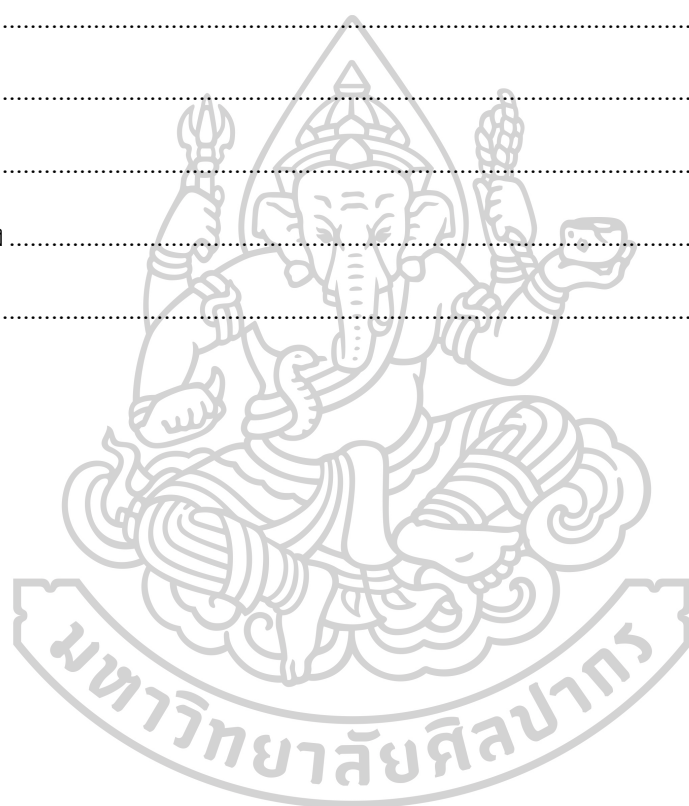
ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร. นาฏระพี แซนแซช ที่เป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และผศ.ดร. สมชาติ แม่นปิ่น ที่เป็นผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ชี้แนะแนวทางและให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์กับวิทยานิพนธ์ อีกทั้งยังช่วยปรับปรุงให้วิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ขึ้น

ขอขอบพระคุณนักวิทยาศาสตร์ของภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพที่คอยอำนวยความสะดวกต่อเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย อีกทั้งยังให้คำแนะนำในการใช้เครื่องมือและขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ของภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพที่อำนวยความสะดวกและดำเนินการเรื่องเอกสารต่างๆ และขอขอบพระคุณบิดาและมารดาที่คอยให้กำลังใจ และขอขอบคุณเพื่อนๆที่ๆ ระดับบัณฑิตศึกษาทุกคนที่คอยรับฟังปัญหาและคอยให้กำลังใจ สุดท้ายนี้หากวิทยานิพนธ์เล่มนี้มีข้อผิดพลาดประการใด ดิฉันขอน้อมรับไว้ และขออภัยมา ณ โอกาสนี้

นางสาว สุปงกช เหมือนวงศ์ธรรม

สารบัญ

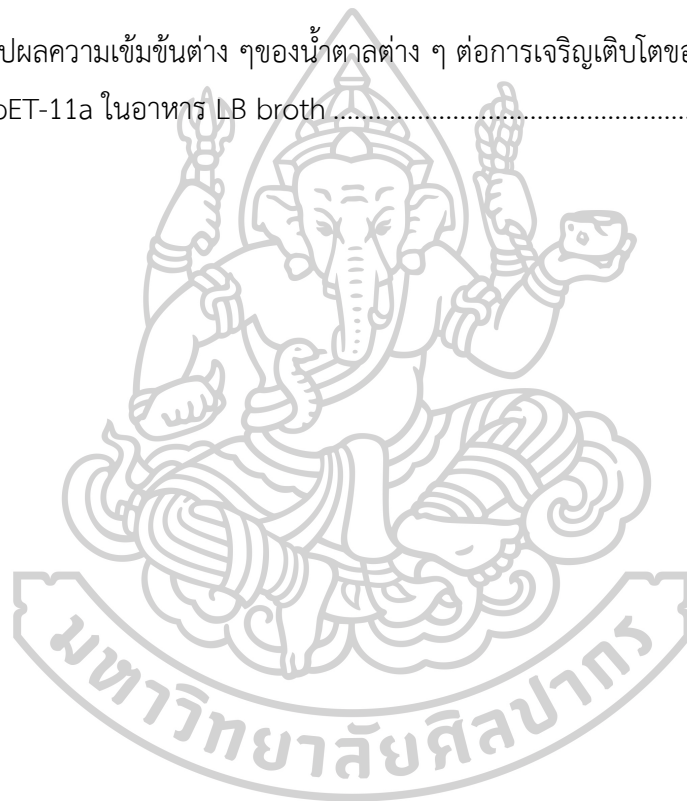
	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ซ
สารบัญภาพ.....	ฅ
รายการอ้างอิง.....	59
ประวัติผู้เขียน.....	64



สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 สรุปผลของน้ำตาลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ E. coli BL21(DE3) ในอาหาร LB broth และอาหาร auto-induction media.....	39
ตารางที่ 2 สรุปผลการเจริญเติบโตของเซลล์ E. coli BL21(DE3) ต่อความเข้มข้นต่าง ๆ น้ำตาลต่าง ๆ ในอาหาร LB broth.....	47
ตารางที่ 3 สรุปผลความเข้มข้นต่าง ๆ ของน้ำตาลต่าง ๆ ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์และความเข้มข้นโปรตีน GFP-pET-11a ในอาหาร LB broth.....	54



สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 การดัดแปลงสายพันธุ์ BL21(DE3) สำหรับการแสดงออกของ T7	4
ภาพที่ 2 แผนภาพ pET plasmid.....	6
ภาพที่ 3 การควบคุมการแสดงออกบน lac operon.....	7
ภาพที่ 4 การทำงานของระบบ auto-induction medium.....	8
ภาพที่ 5 โครงสร้างน้ำตาลกลูโคส.....	9
ภาพที่ 6 เส้นทางการใช้น้ำตาลกลูโคสในเซลล์ E.coli BL21(DE3)	10
ภาพที่ 7 โครงสร้างน้ำตาลกาแลคโตส	11
ภาพที่ 8 เส้นทางการใช้น้ำตาลกาแลคโตส ในเซลล์ E.coli BL21(DE3)	12
ภาพที่ 9 โครงสร้างน้ำตาลฟรุคโตส	13
ภาพที่ 10 เส้นทางการใช้น้ำตาลฟรุคโตสในเซลล์ E.coli BL21(DE3).....	13
ภาพที่ 11 โครงสร้างน้ำตาลแมนโนส.....	14
ภาพที่ 12 เส้นทางการใช้น้ำตาลแมนโนสในเซลล์ E. coli BL21(DE3).....	14
ภาพที่ 13 โครงสร้างน้ำตาลอะราบิโนส.....	15
ภาพที่ 14 เส้นทางการใช้น้ำตาลอะราบิโนสในเซลล์ E.coli BL21(DE3).....	16
ภาพที่ 15 โครงสร้างน้ำตาลไซโลส	17
ภาพที่ 16 เส้นทางการใช้น้ำตาล xylose ในเซลล์ E.coli BL21(DE3).....	18
ภาพที่ 17 โครงสร้างน้ำตาลแลคโตส	18
ภาพที่ 18 เส้นทางการใช้น้ำตาลแลคโตสในเซลล์ E.coli BL21(DE3).....	19
ภาพที่ 19 โครงสร้างน้ำตาลมอลโตส	20
ภาพที่ 20 เส้นทางการใช้น้ำตาล maltose ในเซลล์ E.coli BL21(DE3).....	20
ภาพที่ 21 โครงสร้างน้ำตาลซูโครส.....	21

ภาพที่ 22 เส้นทางการใช้น้ำตาลซูโครส ในเซลล์ E.coli BL21(DE3)	22
ภาพที่ 23 โครงสร้างโปรตีน GFP	23
ภาพที่ 24 การเจริญเติบโตของเซลล์ E. coli BL21(DE3) ต่อน้ำตาลที่ความเข้มข้น 2 g/L ในอาหาร LB broth.....	36
ภาพที่ 25 การเจริญเติบโตของเซลล์ E. coli BL21(DE3) ต่อน้ำตาลที่ความเข้มข้น 10 g/L ในอาหาร LB broth.....	37
ภาพที่ 26 การเจริญเติบโตของเซลล์ E. coli BL21(DE3) ต่อน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 2 g/L.....	37
ภาพที่ 27 การเจริญเติบโตของเซลล์ E. coli BL21(DE3) ต่อน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 10 g/L.....	38
ภาพที่ 28 ผลการเจริญเติบโตของเซลล์ E. coli BL21(DE3) ต่อกความเข้มข้นต่าง ๆ ของน้ำตาลต่าง ๆ	41
ภาพที่ 29 ผลการเจริญเติบโตของเซลล์ E. coli BL21(DE3) ต่อกความเข้มข้นต่าง ๆ ของน้ำตาลต่าง ๆ	42
ภาพที่ 30 การเจริญเติบโตของเซลล์เซลล์ E. coli BL21(DE3) ที่มี pET-11a plasmid ในอาหาร LB broth โดยไม่มีการเติมน้ำตาล (control).....	43
ภาพที่ 31 การเจริญเติบโตของเซลล์ E. coli BL21(DE3) ที่มี pET-11a plasmid ต่อกความเข้มข้นของน้ำตาลต่าง ๆ ที่เวลา 25 ชั่วโมงในอาหาร LB broth	44
ภาพที่ 32 การเจริญเติบโตของเซลล์เซลล์ E .coli BL21(DE3) ที่มี GFP-pET-11a plasmid ใน	45
ภาพที่ 33 ผลการเจริญเติบโตของเซลล์ E. coli BL21(DE3) ที่มี GFP-pET-11a plasmid	46
ภาพที่ 34 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ของแบนโปรตีนกับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA ด้วยวิธี Bradford.....	48
ภาพที่ 35 ผลความเข้มข้นโปรตีน GFP ต่อกความเข้มข้นต่าง ๆของน้ำตาลต่าง ๆในอาหาร LB broth	49
ภาพที่ 36 ผลเจล SDS-PAGE ของน้ำตาลกลูโคส (A), กาแลคโตส (B), ฟรุคโตส (C), แมนโนส (D), อะราบิโนส (E), ไฮโลส (F), แลคโตส (G), มอลโต (H), ซูโครส (I) ที่ความเข้มข้น 2, 4, 6, 8, 10 กรัม ต่อลิตรที่เวลา 24 ชั่วโมง	51

ภาพที่ 37 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ของแบนโปรตีนกับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA ด้วยซอฟต์แวร์ ImageJ 52

ภาพที่ 38 ผลของพื้นที่ฟิคของโปรตีน GFP ต่อความเข้มข้นของน้ำตาลต่าง ๆ ในอาหาร LB broth. 53



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

การผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ (recombinant protein) ในเซลล์ *Escherichia coli* (*E. coli*) สายพันธุ์ BL21(DE3) เป็นที่นิยมโดยเซลล์จะมีการแสดงออก T7 RNA polymerase ซึ่งสามารถใช้ในการแสดงออกของโปรตีนรีคอมบิแนนท์ที่ถูกควบคุมภายใต้ *lac operon* ซึ่งการผลิตโปรตีนจะเริ่มเมื่อมีการเติม isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวชักนำ (inducer) แต่วิธีนี้มีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูงเนื่องจาก IPTG นั้นมีราคาแพง ดังนั้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดยวิธี auto-induction จึงเป็นวิธีที่น่าสนใจเนื่องจากเป็นวิธีที่ง่ายและมีค่าใช้จ่ายต่ำและวิธีนี้ยังให้ผลผลิตของโปรตีนมากกว่าการใช้ IPTG โดยองค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยง auto-induction media ได้แก่ กลูโคส α -lactose และกลีเซอรอล โดยการเจริญเติบโตแบบขั้นบันไดของ *E. coli* (diauxic growth) โดยกลูโคสจะถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนตัวแรกหลังจากนั้นจะใช้แลคโตสทำหน้าที่เป็นตัวชักนำ (inducer) ของ *lac operon* ควบคุมการผลิตโปรตีนและกลีเซอรอลจะทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอนเสริม ซึ่ง auto-induction media จะไม่สนใจระยะเวลาในการเติมตัวชักนำโดยการชักนำให้มีการแสดงออกของโปรตีนจะเกิดขึ้นอัตโนมัติ โดย α -lactose จะถูกเปลี่ยนเป็น allolactose ภายในเซลล์ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุม *lac operator* ได้โดยตรงจึงไม่ต้องเติมตัวชักนำ ซึ่งการเจริญเติบโตของเซลล์จะนำไปสู่การผลิตโปรตีนภายใต้การควบคุมการเผาผลาญ (metabolic) ของการแสดงออกของเซลล์เจ้าบ้าน (Li, Kessler, Heuvel, & Rinas, 2011)

การเพาะเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียให้เจริญเติบโตต้องอาศัยแหล่งคาร์บอนในปัจจุบันการใช้แหล่งคาร์บอนแหล่งเดียวส่วนมากใช้เป็นน้ำตาลเช่นกลูโคสใช้ทั่วไปทั้งในห้องปฏิบัติการและในอุตสาหกรรมเนื่องจากเป็นน้ำตาลที่เซลล์นำไปใช้ได้ง่ายจึงเป็นที่นิยม (Liu, Santala, & Stephanopoulos, 2020) ซึ่งหากใช้น้ำตาลอื่นเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตโปรตีนแทนกลูโคสเช่นน้ำตาลที่พบในชีวมวล (biomass) (ไซโลส กาแลคโตส แมนโนส และอะราบิโนส) จะเป็นการนำของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้ให้เกิดประโยชน์อีกด้วย

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงศึกษาน้ำตาลที่มีผลต่อการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนในเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ในอาหารเพาะเลี้ยง LB broth ที่มีการเติม IPTG เพื่อทำหน้าที่ชักนำการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) และในอาหารเพาะเลี้ยง auto-induction media เป็นวิธีที่มีการชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนโดยอัตโนมัติ

1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาหาชนิดของน้ำตาลที่ส่งผลต่อการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนในเซลล์ *E.coli* BL21(DE3) บนอาหารเพาะเลี้ยง LB media และ auto-induction media

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

- ศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ต่อน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในอาหาร LB broth และ auto-induction media

- ศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ที่มี pET-11a plasmid ต่อน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในอาหาร LB broth

- ศึกษาผลของชนิดน้ำตาลของน้ำตาล และความเข้มข้นของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ที่มี GFP-pET11a และการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ green fluorescent protein (GFP)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

สามารถทราบได้ว่าน้ำตาลตัวใดและความเข้มข้นเท่าไรที่มีผลเพิ่มหรือยับยั้งการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ต่อไป



บทที่ 2

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

2.1 Recombinant protein

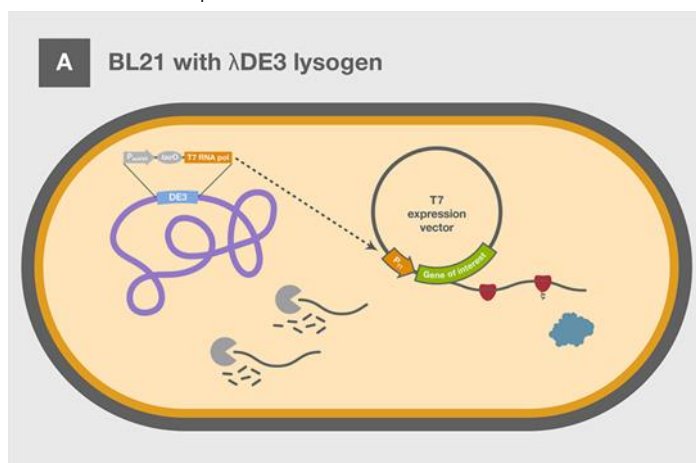
โปรตีนลูกผสม (recombinant protein) เป็นโปรตีนที่มีการดัดแปลงรหัสดีเอ็นเอโดยพื้นฐาน ดีเอ็นเอลูกผสม (recombinant DNA) ประกอบด้วยโมเลกุลดีเอ็นเอชนิดหนึ่งเชื่อมต่อกับโมเลกุลดีเอ็นเออีกชนิดหนึ่งที่แตกต่างแหล่งที่มาเข้าด้วยกันเพื่อต้องการโคลนยีนที่สนใจหรือสร้างสิ่งมีชีวิตดัดแปรพันธุกรรมให้มีลักษณะตามที่ต้องการ โดยแยกดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์จากเซลล์หรือเนื้อเยื่อ ตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตัดได้มาเชื่อมต่อกับโมเลกุลดีเอ็นเอขนาดเล็กที่ทำหน้าที่เป็นตัวนำหรือเวกเตอร์ (vector) ซึ่งอาจใช้โครโมโซมของไวรัสหรือโครโมโซมของแบคทีเรียที่เรียกว่าพลาสมิด (plasmid) จากนั้นรหัสดีเอ็นเอจะถูกแปล (translated) เป็นโปรตีนที่มีลักษณะใหม่ๆ

ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อแล้วคือโมเลกุลดีเอ็นเอลูกผสม (recombinant DNA) ซึ่งหมายถึงโมเลกุลดีเอ็นเอที่เกิดจากการเชื่อมต่อของดีเอ็นเอที่มาจากแหล่งที่ต่างต่างกัน เช่น ดีเอ็นเอของคนเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอของแบคทีเรีย โมเลกุลดีเอ็นเอลูกผสมจะถูกใส่เข้าไปในเซลล์แบคทีเรียเพื่อให้ยีนได้มีการแสดงออกในเซลล์แบคทีเรีย

2.2 *Escherichia coli* BL21(DE3) หรือ *E. coli* BL21(DE3)

Escherichia coli เป็นหนึ่งในเซลล์เจ้าบ้าน (host cell) ที่นิยมใช้มากสำหรับการแสดงออกที่มาก (overexpression) ของโปรตีนลูกผสม เนื่องจากมีการเจริญเติบโตเร็วและมีประสิทธิภาพ ส่วนใหญ่สายพันธุ์ *E. coli* ที่นิยมใช้ในการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม คือ BL21 และอนุพันธ์อื่น เพราะสายพันธุ์ BL21 ไม่มี protease Lon และ outer membrane protease (Omp) ใน cytoplasmic การกลายพันธุ์ (mutation) เหล่านี้ทำให้เกิดการสะสม (accumulation) ของ heterologous proteins (อนุพันธ์โปรตีนจากสายพันธุ์หรือชนิดของเซลล์ที่ต่างจากเซลล์เจ้าบ้าน) ภายในเซลล์ (intracellular) สูงในขณะที่การสลายตัวของโปรตีนระหว่างการทำบริสุทธิ์น้อย ภายในเซลล์เจ้าบ้านมีการแสดงออกของยีน RNA polymerase บนพลาสมิดที่มีการถ่ายโอน (transformed plasmid) ประกอบด้วย cloned gene ซึ่งอาจจะขับเคลื่อนด้วย promoter เช่น *lac* หรือ *tac* อย่างไรก็ตาม promoter เหล่านี้ให้การแสดงออกของ cloned gene ที่ค่อนข้างอ่อนแอ ดังนั้นจึงไม่เหมาะสำหรับการแสดงออกที่รุนแรงของ cloned gene ดังนั้นสายพันธุ์ BL21(DE3) อาจจะมีการดัดแปลงด้วย promoter ของ bacteriophage T7 promoter เพื่อเพิ่มการแสดงออกของ cloned recombinant proteins ในระบบการแสดงออกของ T7 สายพันธุ์ BL21 ถูกดัดแปลงด้วย λ DE3

lysogen เพื่อแสดงออก T7 RNA polymerase ภายใต้การควบคุมของ *lac* promoter ที่ถูกดัดแปลง คือ *lacUV5* promoter ซึ่ง *lacUV5* promoter ถูกควบคุมเชิงบวกด้วย IPTG ซึ่งปกติจะถูกใช้เพื่อชักนำการ transcription ภายในเซลล์โดย T7 RNA polymerase ยีนที่แสดงออกมาสามารถ cloned downstream ของ T7 RNA polymerase promoter บน vector และชักนำจาก DE3 โดยผ่าน IPTG โดยเรียกการดัดแปลงสายพันธุ์ BL21 ว่า BL21(DE3) (scientific, 2022)



ภาพที่ 1 การดัดแปลงสายพันธุ์ BL21(DE3) สำหรับการแสดงออกของ T7

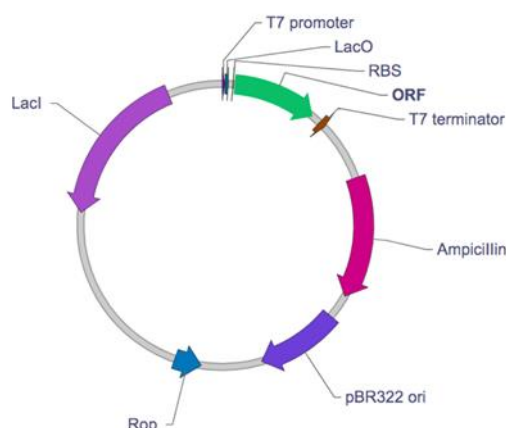
ที่มา : (scientific, 2022)

สำหรับการผลิตโปรตีน recombinant plasmid จะถูกถ่ายโอนไปสู่เจ้าบ้านสายพันธุ์ *E. coli* ที่มียีน chromosomal copy สำหรับ T7 RNA polymerase เซลล์เจ้าบ้านเหล่านี้เป็น lysogen ของ bacteriophage DE3 ซึ่งอนุพันธ์ λ นั้นมีบริเวณภูมิคุ้มกัน (immunity region) ของ phage 21 และบรรจุ DNA fragment ประกอบด้วยยีน *lacI*, *lacUV5* promoter และยีนสำหรับ T7 RNA polymerase ซึ่ง fragment นี้ถูกแทรกไปที่ *int* gene ป้องกัน DE3 จากการรวมตัวหรือตัดจาก chromosome โดยไม่มี helper phage เมื่อก่อน DE3 lysogen ถูกสร้างขึ้นมีเพียงแค่ promoter เดียวที่รู้ว่ามี การถอดรหัส (transcription) ยีน T7 RNA polymerase โดยตรงคือ *lacUV5* promoter ซึ่งชักนำด้วยการเติม IPTG ไปที่การเพาะเลี้ยงให้เจริญเติบโตของ lysogen ชักนำการผลิต T7 RNA polymerase ในทางกลับกันเกิดการถอดรหัสของ DNA เป้าหมายในพลาสมิด (Novagen, 2003)

2.3 pET system

pET system เป็นระบบที่มีประสิทธิภาพมากถูกพัฒนาสำหรับการโคลนนิ่ง (cloning) และการแสดงออก (expression) ของโปรตีนรีคอมบิแนนท์ใน *E. coli* โดยยีนเป้าหมายจะถูกโคลนใน pET plasmid ภายใต้การควบคุมของการถอดรหัสและแปลรหัสของ bacteriophage T7 การแสดงออกจะถูกชักนำโดยเซลล์เจ้าบ้าน (host cell) จะเป็นแหล่งของ T7 RNA polymerase ซึ่ง T7 RNA polymerase เป็นตัวคัดเลือกและตัวทำงานโดยแหล่งทรัพยากรเกือบทั้งหมดของเซลล์ถูกเปลี่ยนให้เกิดการแสดงออกของยีนเป้าหมาย

ระบบ T7 ประกอบด้วย T7 promoter และ phage T7 RNA polymerase เป็นหนึ่งในระบบส่วนมากที่ใช้ในระบบการแสดงออก ในเจ้าบ้านสายพันธุ์ *E. coli* เช่น BL21(DE3) ซึ่ง T7 RNA polymerase จะแสดงออกภายใต้การควบคุมของ *lacUV5* promoter และชักนำด้วย IPTG การแสดงออกของโปรตีนเป้าหมายจากการโคลนยีนจะถูกควบคุมโดย T7 promoter ซึ่ง promoter นี้มีความจำเพาะต่อ T7 RNA polymerase หลังจากจำนวนของ T7 RNA polymerase ผลิตออกมาเพียงพอจะไปจับกับ T7 promoter และถอดรหัส (transcribe) ยีนที่สนใจ โปรตีนรีคอมบิแนนท์ต่าง ๆ ที่มีการแสดงออกสูง (overexpressed) ใน *E. coli* จะใช้ระบบนี้ ซึ่งปัญหาในการแสดงออกของระบบนี้นั้นบ่อยครั้งคือมีการแสดงออกพื้นฐานของ T7 RNA polymerase จาก *lacUV5* promoter แม้ว่าจะไม่มีตัวชักนำ ถ้าโปรตีนเป้าหมายเป็นพิษต่อเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* การแสดงออกพื้นฐานของโปรตีนเป้าหมายเชื่อว่าจะส่งผลให้พลาสมิดไม่เสถียรหรือทำให้เซลล์ตาย เพื่อลดการแสดงออกพื้นฐานนั้น lac operator sequence (ตำแหน่งจับสำหรับ lac repressor) ถูกวางที่ตำแหน่ง downstream ของ T7 promoter แล้วสร้าง T7lac promoter lac repressor จับกับ lac operator และทำหน้าที่ยับยั้ง T7 RNA polymerase ชักนำให้เกิดการถอดรหัส (transcription) พื้นฐานของยีนเป้าหมายในเซลล์ BL21(DE3) นอกจากนี้การชักนำด้วย IPTG บ่อยครั้งนำไปสู่การสร้าง inclusion bodies (EL-Baky, Linjawi, & Redwan., 2015)



ภาพที่ 2 แผนภาพ pET plasmid

ที่มา : (vectorBuilder, 2022)

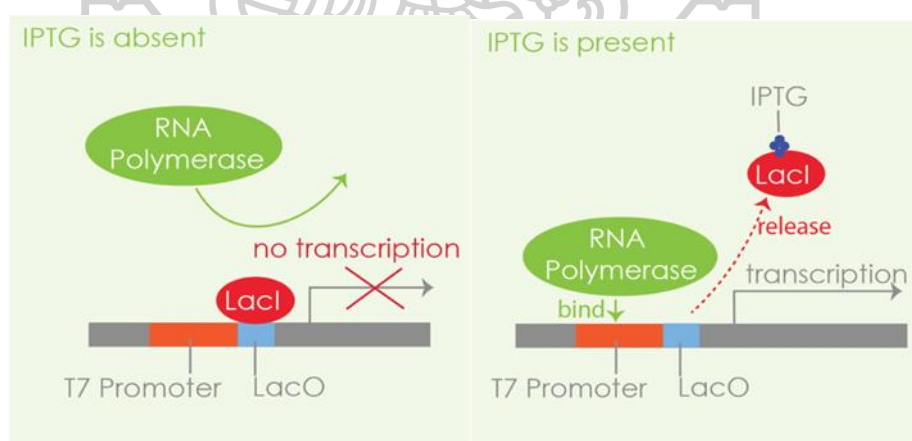
ส่วนประกอบของ pET vector ประกอบด้วย

- T7 promoter คือทำหน้าที่ขับเคลื่อนระดับการ transcription ของยีนที่สนใจให้สูงเมื่อมี T7 RNA polymerase เมื่อถูกวางทันทีที่ตำแหน่ง upstream ขององค์ประกอบ LacO Cassette นี้ เรียกว่า T7 lac promoter
- LacO คือตำแหน่งจับสำหรับ LacI องค์ประกอบนี้จะยับยั้งกิจกรรมของ T7 promoter เมื่อมีโปรตีน LacI เพื่อป้องกันการแสดงออกที่เร็วของยีนที่สนใจ
- RBS (ribosome-binding site) คือตำแหน่งจับของ ribosome และเริ่มต้นการ translation องค์ประกอบจาก T7 bacteriophage ทำให้การผลิตโปรตีนที่สนใจมีประสิทธิภาพ
- ORF (open reading frame) คือตำแหน่งการโคลนยีนที่สนใจ
- T7 terminator คือลำดับสัญญาณเพื่อหยุดการ transcript ยีนที่สนใจ
- Ampicillin คือยีนที่ดื้อต่อ Ampicillin ทำหน้าที่คัดเลือกพลาสมิด
- pBR322 ori (pBR322 origin of replication) คือเป็นจุดเริ่มต้นของการสร้างพลาสมิดจึงสามารถเพิ่มจำนวน พลาสมิดได้ด้วยตัวเอง
- Rop (repressor of primer) คือ Rop จะให้รหัสโปรตีนขนาดเล็กเพื่อควบคุมจำนวนพลาสมิด ถ้ามีโปรตีน Rop ในการรวมกลุ่ม (combination) ของ pBR322 ori บนพลาสมิดจะทำให้จำนวนพลาสมิดน้อย
- LacI คือโปรโมเตอร์ตามธรรมชาติของ *E.coli* และลำดับรหัส (coding sequence) สำหรับ lac repressor ในการชักนำที่ไม่มี IPTG โปรตีน LacI จะยับยั้งการ transcription ของยีนที่สนใจจาก

T7lac promoter เช่นเดียวกับการ transcription ของ T7 RNA polymerase จาก *LacUV5* promoter ในเจ้าบ้านสายพันธุ์ที่ใช้สำหรับการผลิตโปรตีนลูกผสม (vectorBuilder, 2022)

2.4 Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)

Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside หรือ IPTG เป็นสารเคมีเลียนแบบ allolactose ซึ่งจะกำจัดการยับยั้งจาก *lac* operon เพื่อชักนำการแสดงออกของยีน โดย allolactose เป็น isomer ของ lactose ซึ่งจะเกิดรูปแบบนี้เมื่อ lactose เข้าไปในเซลล์ IPTG ทำหน้าที่เป็นตัวเหนี่ยวนำเพื่อเริ่มการถอดรหัสของยีนใน *lac* operon การเหนี่ยวนำด้วย IPTG เป็นวิธีที่ควบคุมการสังเคราะห์โปรตีน โดยกระตุ้นการถอดรหัส ของ *lac* operon ซึ่งต้องการสององค์ประกอบสำคัญ (1) เซลล์คือในระหว่างการเหนี่ยวนำด้วย IPTG เซลล์ต้องผลิต T7 RNA polymerase เพื่อให้ยีนเกิดการถอดรหัสตัวอย่างเช่น ใช้ BL21(DE3) เป็นสายพันธุ์ของ *E. coli* ซึ่ง BL21(DE3) มียีน *lacI* ที่จะให้แสดงออกมาเป็น *lac* repressor (2) vector ในขั้นตอนการ cloning จะแทรกยีนที่สนใจไปที่เวกเตอร์จำเพาะเช่น pET vector และถ่ายโอนเวกเตอร์ไปที่เซลล์ *E. coli* ด้วย recombinant DNA ภายในเซลล์ *E. coli* ที่มีการถ่ายโอนยีนนั้นเมื่อไม่มี IPTG จะทำให้ *lac* repressor ไปจับที่ตำแหน่ง *lacO* ซึ่งการจับของ *lac* repressor ที่ตำแหน่งนี้ทำให้เกิดการบล็อก T7 RNA polymerase ที่เริ่มการถอดรหัสของยีนที่สนใจ ดังนั้นจึงไม่มีการผลิตโปรตีน เมื่อมี IPTG ในอาหารเพาะเลี้ยง IPTG จะเข้าไปในเซลล์และทำให้ *lac* repressor หลุด จากตำแหน่ง *lacO* ทำให้ T7 RNA polymerase ไปจับ T7 promoter และเริ่มการถอดรหัสยีนจะเกิดการสังเคราะห์โปรตีนที่สนใจ (Kroemer)

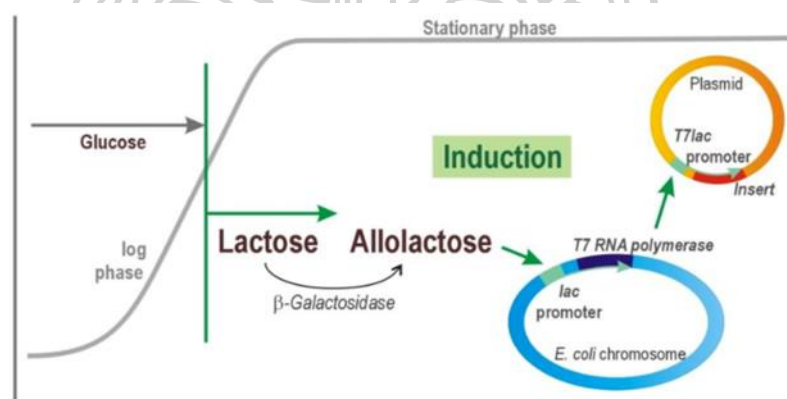


ภาพที่ 3 การควบคุมการแสดงออกบน *lac* operon

ที่มา : (Tyasning Kroemer)

2.5 อาหาร Auto-induction media

Auto-induction media จะให้ความหนาแน่นเซลล์สูงและอัตราการแสดงออกของโปรตีนสูงกว่า 2-3 เท่าของการเหนี่ยวนำด้วยวิธี IPTG โดยการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธีนี้เป็นการเกิดขึ้นอย่างเป็นธรรมชาติที่จุดหนึ่งในการพัฒนาการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียและกำจัดการตรวจสอบความหนาแน่นของการเพาะเลี้ยงหรือการเติม IPTG โดยการเติมยาปฏิชีวนะ (antibiotics) อาจเตรียมเป็นอาหารคัดเลือก หลักการของ auto-induction media ขึ้นอยู่กับแหล่งคาร์บอนในอาหารเพาะเลี้ยงที่ถูกย่อยที่แตกต่างกันทำให้เสริมความหนาแน่นการเจริญของเซลล์ให้สูงและเหนี่ยวนำการแสดงออกของโปรตีนแบบอัตโนมัติการขับเคลื่อนของ *lac* promoter ซึ่งใน auto-induction media ประกอบด้วยแลคโตสและกลูโคสที่มีความเข้มข้นจำกัดทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอน โดย กลูโคสจะถูกย่อยก่อนในระหว่างที่เซลล์เพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว (proliferation) ซึ่งป้องกันการใช้แลคโตสจนกระทั่งกลูโคสลดลงมักอยู่ในช่วงกลางถึงปลายของ log phase เมื่อกลูโคสลดลงแลคโตสจะถูกใช้และถูกเปลี่ยนเป็นตัวเหนี่ยวนำ allolactose ด้วยเอนไซม์ β -galactosidase ซึ่ง allolactose จะทำให้ *lac* repressor หลุดจากตำแหน่งจับจำเพาะใน DNA คือ *lac* operon แล้วเกิดการแสดงออกของลำดับยีนขับเคลื่อนด้วย *lac* promoter ซึ่ง genotype DE3 ใน *E. coli* จะปลดบล็อก T7lac promoter และเหนี่ยวนำการแสดงออกของ T7 RNA polymerase ด้วยการขับเคลื่อนของ *lacUV5* ส่งผลให้เกิดการแสดงออกของ T7 RNA polymerase ของโปรตีนเป้าหมาย (carlroth, 2016)

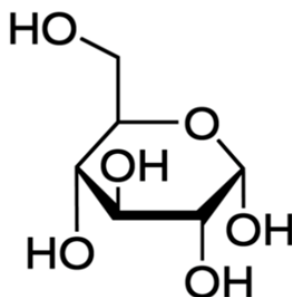


ภาพที่ 4 การทำงานของระบบ auto-induction medium

ที่มา : (carlroth, 2016)

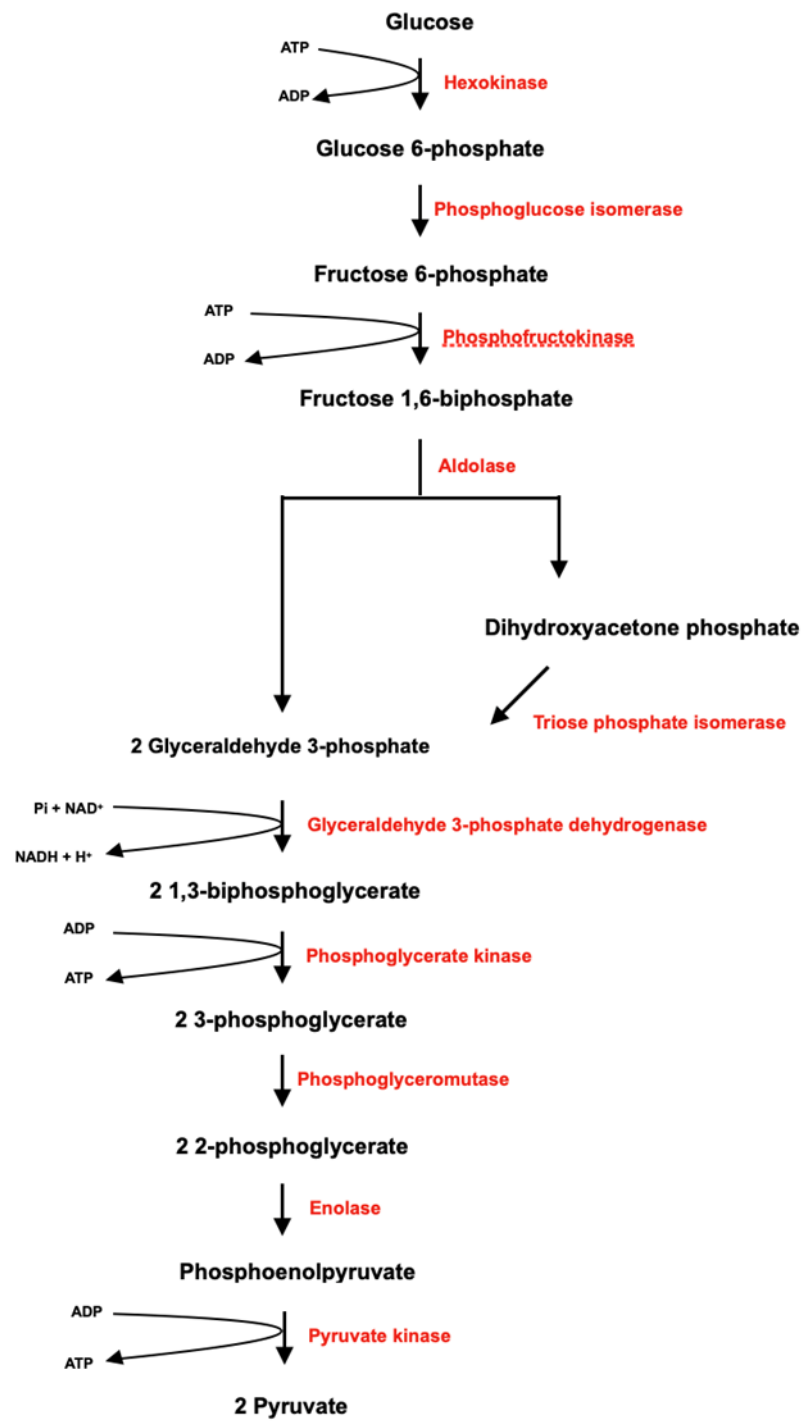
2.6 น้ำตาลกลูโคส (Glucose)

กลูโคสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) สูตรโมเลกุลคือ $C_6H_{12}O_6$ ที่มีความสำคัญ เพราะเป็นน้ำตาลพื้นฐานของคาร์โบไฮเดรตทุกตัวหรือเป็นสารตั้งต้นของการผลิตพลังงาน แหล่งอาหารธรรมชาติที่พบกลูโคส คือ ข้าว แป้ง น้ำตาล น้ำผึ้ง ผัก และผลไม้ และได้จากการย่อยแป้งย่อยน้ำตาลทุกชนิด



ภาพที่ 5 โครงสร้างน้ำตาลกลูโคส
ที่มา : (MERCK, 2022c)

Glycolysis หรือ EMP Pathway เป็น Catabolic pathway ที่ส่วนมากนิยมอย่างแพร่หลาย ซึ่งต้องผ่าน fructose-1,6-bisphosphate (FBP) โดยกลูโคสที่เข้ามาในการเผาผลาญนี้จะถูกทำให้อยู่ในรูป active โดยเกิดการ phosphorylation บน C6 ด้วย Hexokinase หรือ glucokinase และเปลี่ยนไปเป็น glucose-6-phosphate จากนั้น glucose-6-phosphate ถูกเปลี่ยนไปเป็น fructose-6-phosphate ด้วยการเกิด isomerization แล้ว fructose-6-phosphate จะเกิด phosphorylation กลายเป็น fructose-1,6-bisphosphate จากนั้น fructose-1,6-bisphosphate จะเกิดการเปลี่ยนสาร C6 ให้เป็นสาร C3 ด้วย aldolase ได้สองชนิดคือ glyceraldehydes-3-phosphate และ dihydroxyacetone phosphate (DHAP) แล้ว dihydroxyacetone phosphate จะเปลี่ยนไปเป็น glyceraldehydes-3-phosphate ด้วย isomerization จากนั้น glyceraldehydes-3-phosphate จะเกิดการ oxidation และ phosphorylation กลายเป็น 1,3-bisphosphoglycerate จากนั้น 1,3-bisphosphoglycerate จะเปลี่ยนไปเป็น 3-phosphoglycerate ด้วยการ phosphorylation แล้ว 3-phosphoglycerate จะเกิดการ isomerization กลายเป็น 2-phosphoglycerate แล้วจะเกิดการ dehydration กลายเป็น phosphoenolpyruvate จากนั้น phosphoenolpyruvate จะเกิดการ phosphorylation ได้เป็น pyruvate และ ATP (ภาพที่ 6) (Sturm, 2020) (Hatti-Kaul, Chen, Dishisha, & Enshasy, 2018) (Biocyclopedia, 2022)



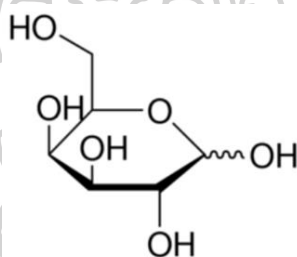
ภาพที่ 6 เส้นทางการใช้น้ำตาลกลูโคสในเซลล์ *E.coli* BL21(DE3)

ที่มา : (Sturm, 2020)

2.7 น้ำตาลกาแลคโตส (Galactose)

กาแลคโตสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) มีสูตรโมเลกุลคือ $C_6H_{12}O_6$ คล้ายกับกลูโคสซึ่งกาแลคโตสมีโครงสร้างคล้ายกับกลูโคสต่างกันเพียงแค่ตำแหน่ง 1 ตำแหน่งของ hydroxyl group ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 4 แหล่งของกาแลคโตส หลัก ๆ คือแลคโตสซึ่งเป็น disaccharide ที่ประกอบด้วยกลูโคส 1 โมเลกุลและกาแลคโตส 1 โมเลกุล

น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวนี้อาจมีรสชาติดหวานคล้ายกับกลูโคส สารประกอบนี้สามารถเรียกว่า aldohexose เพราะว่าเป็นน้ำตาล hexose ที่มีหมู่ฟังก์ชัน aldehyde เมื่อโมเลกุลกาแลคโตสรวมกับโมเลกุลกลูโคสจะกลายเป็นโมเลกุลแลคโตสนอกจากนั้นรูปแบบ polymeric ของกาแลคโตสคือ galactan สามารถพบได้ใน hemicellulose แหล่งของกาแลคโตสส่วนใหญ่พบได้ในนมของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเช่น นมสด โยเกิร์ต อะโวคาโด น้ำตาลทราย นอกจากนี้โมเลกุลกาแลคโตสสามารถสังเคราะห์ได้ในร่างกายมนุษย์ (Madhu, 2020)



ภาพที่ 7 โครงสร้างน้ำตาลกาแลคโตส

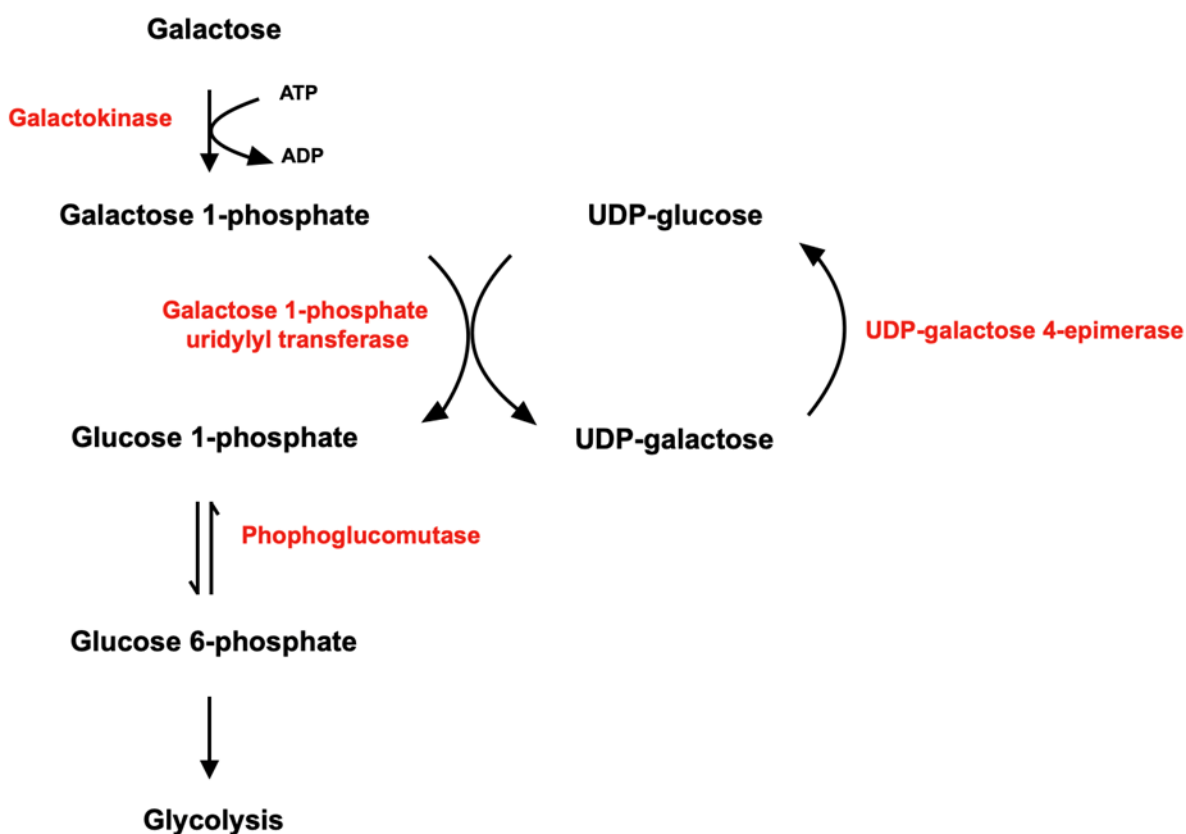
ที่มา : (MERCK, 2022d)

วิธีหลักของ Galactose metabolism คือ Leloir pathway เป็นการเปลี่ยน galactose เป็น glucose 1-phosphate ซึ่งสามารถเข้า glycolytic pathway ได้

ในสิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่แล้วการเปลี่ยน β -D-galactose ไปเป็น glucose-1-phosphate มีประโยชน์มากสำหรับการเผาผลาญโดยมี 4 เอนไซม์ที่ใช้ใน Leloir pathway ในขั้นตอนแรกของ pathway นี้ β -D-galactose ถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูป (epimerized) α -D-galactose ด้วยเอนไซม์ galactose mutarotase ขั้นตอนต่อมาเกี่ยวกับ ATP-dependent phosphorylation ของ α -D-galactose ด้วยเอนไซม์ galactokinase ทำให้ α -D-galactose ถูกเปลี่ยนไปเป็น galactose 1-phosphate และ UDP-glucose จากนั้นเอนไซม์ galactose-1-phosphate uridylyl transferase จะเร่งปฏิกิริยา (catalyzes) การถ่ายโอนของ UMP group

กลูโคสและกาแลคโตสเป็น epimer กันซึ่งโครงสร้าง (configuration) ต่างกันที่ C4 ดังนั้นกาแลคโตสจะเข้า glycolysis จึงต้องการปฏิกิริยา epimerization โดย pathway นี้จะเกิดขึ้น 4 ขั้นตอน ในขั้นตอนแรกกาแลคโตสจะถูก phosphorylated ผ่านเอนไซม์ galactokinase เกิดเป็น galactose

1-phosphate ขึ้นตอนต่อมา galactose 1-phosphate uridylyl transferase จะเร่งการถ่ายโอน uridylyl group จาก UDP-glucose ไปเป็น galactose 1-phosphate เพื่อสร้าง glucose 1-phosphate และ UDP-galactose จากนั้น UDP-galactose จะถูกเปลี่ยนกลับเป็น UDP-glucose ด้วยเอนไซม์ UDP-galactose 4-epimerase เพราะฉะนั้น UDP-glucose ทั้งหมดจะไม่ถูกใช้ในปฏิกิริยานี้ และสุดท้าย glucose 1-phosphate จะถูกเปลี่ยนไปเป็น glucose 6-phosphate ด้วยเอนไซม์ phosphoglucomutase แล้วจากนั้น glucose 6-phosphate จะเข้า glycolysis ต่อไป (รูปที่ 8.) (Holden, Rayment, & Thoden, 2003) (ExpertsMind, 2020)

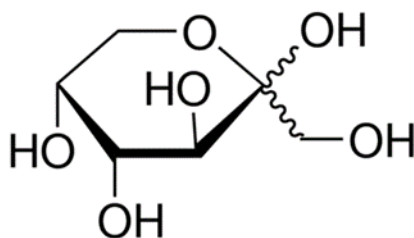


ภาพที่ 8 เส้นทางการใช้น้ำตาลกาแลคโตส ในเซลล์ *E.coli* BL21(DE3)

ที่มา : (ExpertsMind, 2020) (Wang, Xia, Yang, & Tang, 2019)

2.8 น้ำตาลฟรุคโตส (Fructose)

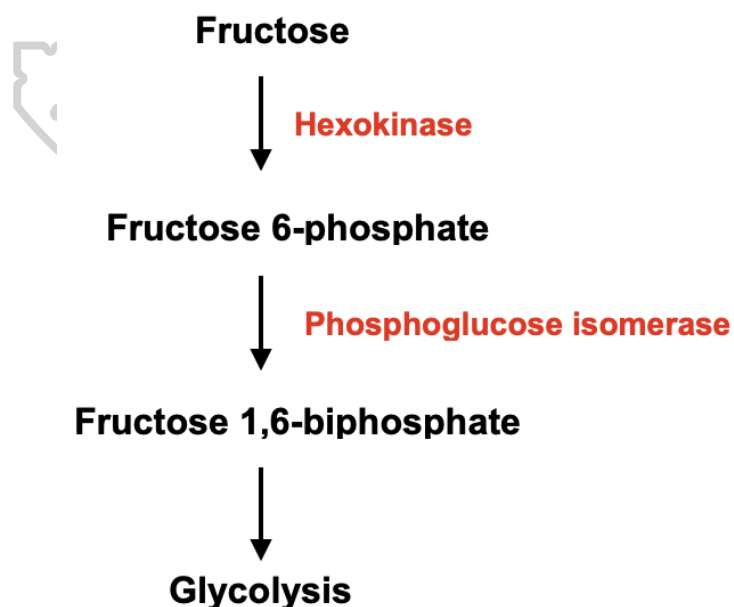
ฟรุคโตสเป็นน้ำตาลชนิดหนึ่ง ซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตประเภท monosaccharide มีคาร์บอน 6 อะตอมเป็นน้ำตาลคีโทส (ketose) และเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) มีสูตรโมเลกุลคือ $C_6H_{12}O_6$ และเป็นส่วนประกอบในธรรมชาติของอาหารต่าง ๆ เกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติสามารถพบได้ในผลไม้ (tinnakorn, 2022)



ภาพที่ 9 โครงสร้างน้ำตาลฟรุคโตส

ที่มา : (MERCK, 2022b)

Fructose จะเปลี่ยนเป็น Fructose 1,6-biphosphate เพื่อเข้าสู่วิถี glycolysis โดยเริ่มที่ fructose เปลี่ยนเป็น fructose 6-phosphate ด้วยเอนไซม์ hexokinase จากนั้นเอนไซม์ phosphoglucose isomerase จะเปลี่ยน fructose 6-phosphate เปลี่ยนเป็น fructose 1,6-biphosphate แล้วเข้าสู่วิถี glycolysis (ภาพที่ 10.) (Hatti-Kaul et al., 2018)

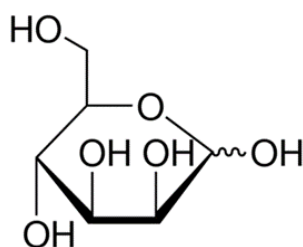


ภาพที่ 10 เส้นทางการใช้น้ำตาลฟรุคโตสในเซลล์ *E.coli* BL21(DE3)

ที่มา : (Hatti-Kaul et al., 2018)

2.9 น้ำตาลแมนโนส (Mannose)

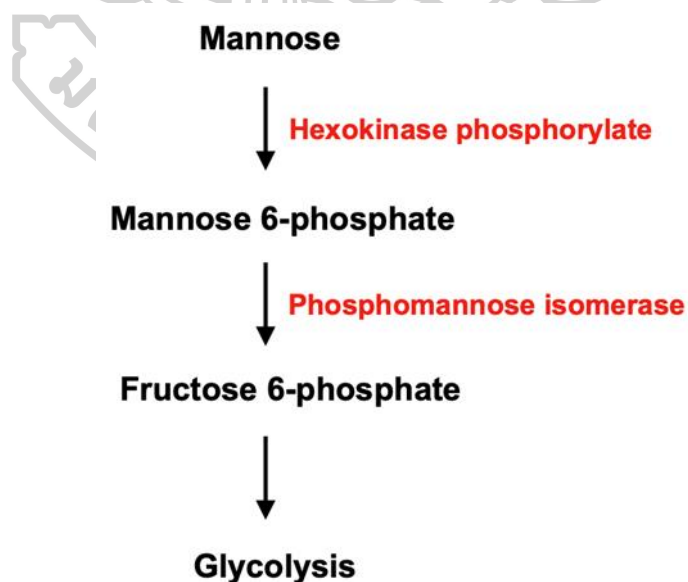
D-Mannose เป็น monosaccharide มีสูตรโมเลกุลคือ $C_6H_{12}O_6$ เป็น epimer ของกลูโคส โดยมีการสลับตำแหน่งที่คาร์บอนตำแหน่งที่สองทำให้คุณสมบัติทางชีวเคมีต่างกัน และเป็นน้ำตาลที่ไม่ค่อยพบเป็นน้ำตาลอิสระในธรรมชาติ สารประกอบนี้มีความสำคัญมากในเมตาบอลิซึมของมนุษย์ เช่น glycosylation ของโมเลกุลโปรตีนบางชนิด พบได้ในพืชบางชนิดในรูปของแป้ง เช่น แอปเปิ้ล ส้ม ถั่วเขียว ลูกพีช แครนเบอร์รี่ เป็นต้น



ภาพที่ 11 โครงสร้างน้ำตาลแมนโนส

ที่มา : (MERCK, 2022f)

เมื่อ mannose เข้ามาในเซลล์เอนไซม์ hexokinase phosphorylase จะเปลี่ยน mannose เป็น mannose 6-phosphate จากนั้นจะเปลี่ยนไปเป็น fructose 6-phosphate ด้วยเอนไซม์ phosphomannose isomerase แล้วเข้าสู่ glycolysis (ภาพที่ 12.) (Wang et al., 2019)

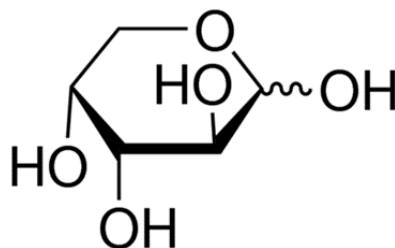


ภาพที่ 12 เส้นทางการใช้น้ำตาลแมนโนสในเซลล์ *E. coli* BL21(DE3)

ที่มา : (Wang et al., 2019)

2.10 น้ำตาลอะราบินโนส (Arabinose)

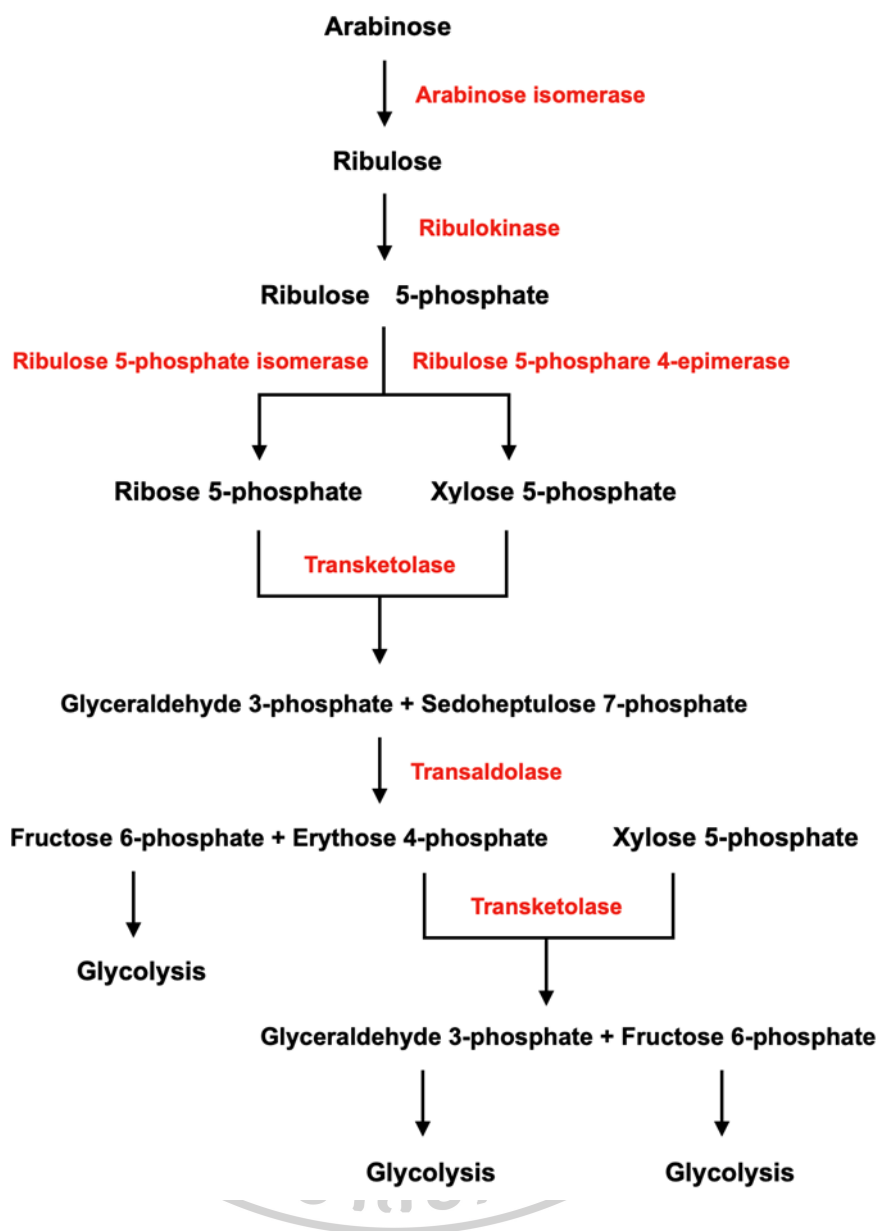
อะราบินโนสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) ประเภทน้ำตาล aldose ที่มีจำนวนคาร์บอน 5 อะตอมมีสูตรโมเลกุล $C_5H_{10}O_5$ โดยพบในธรรมชาติอยู่ในรูปของ L-arabinose ซึ่งเป็นน้ำตาลส่วนประกอบใน hemicellulose gum และ pectin ไม่ค่อยพบเป็นน้ำตาลอิสระในธรรมชาติ (นายกร, 2016)



ภาพที่ 13 โครงสร้างน้ำตาลอะราบินโนส

ที่มา : (MERCK, 2022a)

อะราบินโนสเป็นองค์ประกอบหลักของ hemicellulose และพบปริมาณมากในของเสียทางการเกษตรเช่น ฟางข้าว ชังข้าวโพด และส่วนของไม้เนื้อแข็ง ในแบคทีเรียอะราบินโนสจะเข้าสู่วิถี pentose phosphate โดยอยู่ในรูป xylulose-5-phosphate ด้วยกระบวนการของเอนไซม์สามขั้นตอนโดยขั้นตอนแรก arabinose ถูกเปลี่ยนเป็น ribulose ด้วยเอนไซม์ arabinose isomerase (AraA) ขั้นตอนที่สอง ribulose เกิดการ phosphorylate ด้วยเอนไซม์ ribulokinase (AraB) กลายเป็น ribulose-5-phosphate ขั้นตอนสุดท้ายเป็นการเปลี่ยนเป็น xylulose-5-phosphate ด้วยเอนไซม์ ribulose-5-phosphate 4-epimerase (AraD) จากนั้นเข้าสู่ pentose phosphate แล้วเข้าสู่วิถี glycolysis (ภาพที่ 14.) (Hideo Kawaguchi., 2009) (Wang et al., 2019)



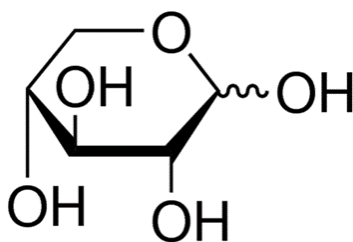
ภาพที่ 14 เส้นทางการใช้น้ำตาลอะราบินโนสในเซลล์ *E.coli* BL21(DE3)
ที่มา : (Wang et al., 2019)

2.11 Xylose

ไซโลสเป็น monosaccharide มีสูตรโมเลกุลคือ $C_5H_{10}O_5$ เป็นน้ำตาลมีจำนวนคาร์บอน 5 มี D-xylose เป็นน้ำตาลที่พบเป็นส่วนประกอบใน hemicellulose เช่น D-xyloglucans และ D-xylans แต่จะไม่พบเป็นน้ำตาลอิสระในธรรมชาติ อุตสาหกรรมการผลิตไซโลสค่อย ๆ เติบโตขึ้นซึ่งไซโลสมักถูกใช้เป็นสารให้ความหวานในอาหารและเป็นแหล่งของ xylitol การใช้ประโยชน์ของไซโลสและ hemicellulose ได้รับความสนใจอย่างมากในการพัฒนาให้มีการใช้ประโยชน์ของชีวมวล (biomass)

ให้มีมูลค่าสูง ซึ่งเป็นหน่วยน้ำตาลธรรมชาติที่มีอยู่อย่างกว้างขวางสามารถใช้ประโยชน์เป็นแหล่งคาร์บอนในอุตสาหกรรมหมักที่กลายเป็นที่นิยม

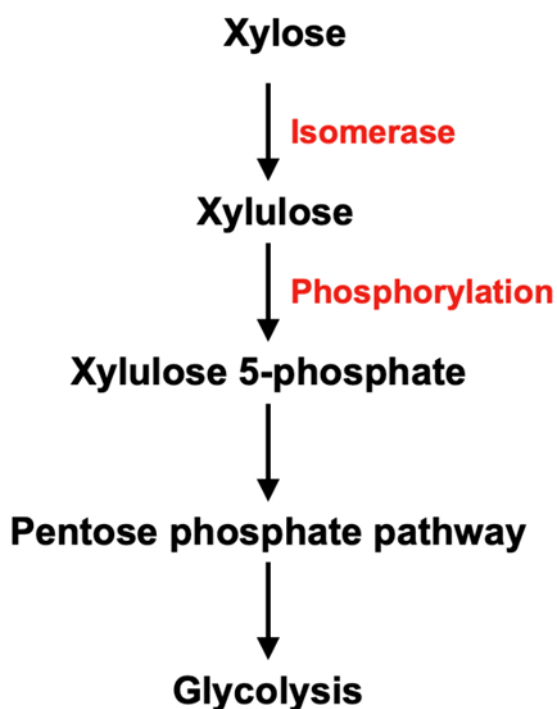
ชีวมวล (Biomass) ถือว่าเป็นสิ่งที่ใช้ไม่หมดมีปริมาณมากและเป็นแหล่งน้ำตาลที่อุดมสมบูรณ์ที่มีราคาต่ำสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนหมุนเวียนสำหรับการผลิตสารประกอบสังเคราะห์ได้ ซึ่งพืชสวนต่าง ๆ ประกอบด้วย hemicellulose ประมาณ 20–30% โดยน้ำตาลที่มีมากเป็นอันดับสองใน hydrolysates คือ D-xylose (30–40%) เป็นแหล่งทรัพยากรธรรมชาติที่สำคัญสำหรับสารเคมีที่หลากหลายและการเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์ ดังนั้นชีวมวลพืชจึงมีศักยภาพในการใช้เป็นแหล่งหมุนเวียนสำหรับเชื้อเพลิงและเคมีภัณฑ์ต่าง ๆ อย่างไรก็ตามงานวิจัยเมื่อเร็ว ๆ นี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสามารถเปลี่ยนน้ำตาลเพนโทสให้เป็นสารเคมีอื่น ๆ ที่มีมูลค่าทั้งเชื้อจุลินทรีย์พื้นเมืองและเชื้อจุลินทรีย์ที่มีการปรับแต่งพันธุกรรมมีรายงานในสิ่งพิมพ์ (literature) ของการผลิตสารเคมีที่หลากหลายจากน้ำตาลที่ได้จากชีวมวล น้ำตาลแอลกอฮอล์และกรดน้ำตาลเช่น xylitol และ xylonic acid ได้มาจากไซโลส ซึ่งได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในทศวรรษที่ผ่านมาและยังคงเป็นงานวิจัยที่เติบโต การเปลี่ยนจากน้ำตาล C6 ไปใช้น้ำตาล C5 ของชีวมวลถือเป็นจุดเปลี่ยนสำคัญในการเติบโตอย่างรวดเร็วของการใช้แหล่งคาร์บอนทางเลือก (Sundar & Nampoothiri, 2022)



ภาพที่ 15 โครงสร้างน้ำตาลไซโลส

ที่มา : (MERCK, 2022h)

ในแบคทีเรียไซโลสจะเข้าสู่วิถี pentose phosphate หลังจาก xylose เกิดการ isomerization เป็น xylulose ด้วยเอนไซม์ isomerase จากนั้นเกิดการ phosphorylation ของ xylulose เป็น xylulose-5-phosphate จากนั้นจะเข้าสู่วิถี glycolysis (ภาพที่ 16.) (Wang et al., 2019)

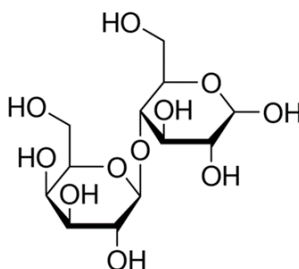


ภาพที่ 16 เส้นทางการใช้น้ำตาล xylose ในเซลล์ *E.coli* BL21(DE3)

ที่มา : (Wang et al., 2019)

2.12 น้ำตาลแลคโตส (Lactose)

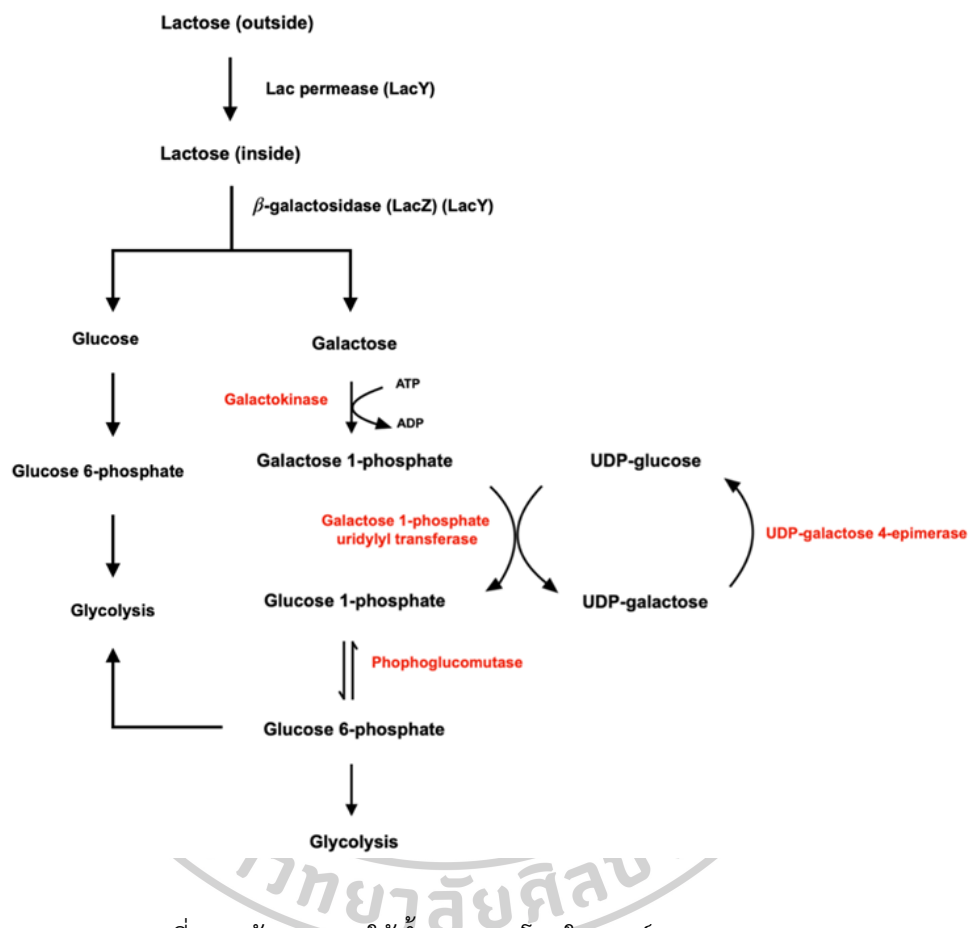
แลคโตสเป็น disaccharide มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{12}H_{22}O_{11}$ เป็นหนึ่งในส่วนประกอบหลักของมนุษย์และนมสัตว์ ซึ่งเป็น disaccharide ที่ประกอบด้วยกลูโคสและกาแลคโตสเชื่อมกันด้วยพันธะ β -(1,4) glycosidic โดยที่แลคโตสทำหน้าที่ขนส่งพลังงานในนม ทุกวันนี้แลคโตสถูกใช้เป็นจำนวนมากในอุตสาหกรรมเช่นเดียวกับในอุตสาหกรรมยา แลคโตสผลิตมาจาก whey ซึ่งเป็น byproduct ที่ได้จากการผลิต cheese และ casein



ภาพที่ 17 โครงสร้างน้ำตาลแลคโตส

ที่มา : (MERCK, 2022d)

เซลล์จะนำแลคโตสที่อยู่ในอาหารเพาะเลี้ยงเข้ามาภายในเซลล์ด้วยเอนไซม์ Lac permease (LacY) เมื่อแลคโตสเข้ามาในเซลล์แล้วจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ β -galactosidase (LacZ) ได้กลูโคสและกาแลคโตส จากนั้นกลูโคสจะถูกเปลี่ยนเป็น glucose 6-phosphate และกาแลคโตสจะเข้า Leloir pathway เพื่อเปลี่ยนกาแลคโตสเป็น glucose 6-phosphate แล้วเข้าสู่วิถี glycolysis (ภาพที่ 18.) (Wang et al., 2019)



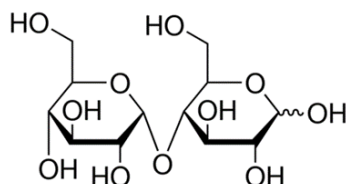
ภาพที่ 18 เส้นทางการใช้น้ำตาลแลคโตสในเซลล์ *E.coli* BL21(DE3)

ที่มา : (Wang et al., 2019)

2.13 น้ำตาลมอลโตส (Maltose)

มอลโตสเป็น disaccharide มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{12}H_{22}O_{11}$ เป็น disaccharide ที่ประกอบด้วยกลูโคส 2 โมเลกุลเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α -(1,4) glycosidic ซึ่งมอลโตสไม่ได้เป็นสารประกอบทั่วไปในอาหารแต่สามารถสร้างได้จากการย่อยแป้ง มอลโตสเป็นหนึ่งในแหล่งกลูโคสหลัก ซึ่งกลูโคสเป็นสารอาหารหลักในการเมตาบอลิซึมพลังงานโดยทั่วไปเซลล์ใช้กลูโคสในรูปแบบ monosaccharide ในการสังเคราะห์ ATP ผ่านวิธี substrate-level phosphorylation (glycolysis) หรือ oxidative

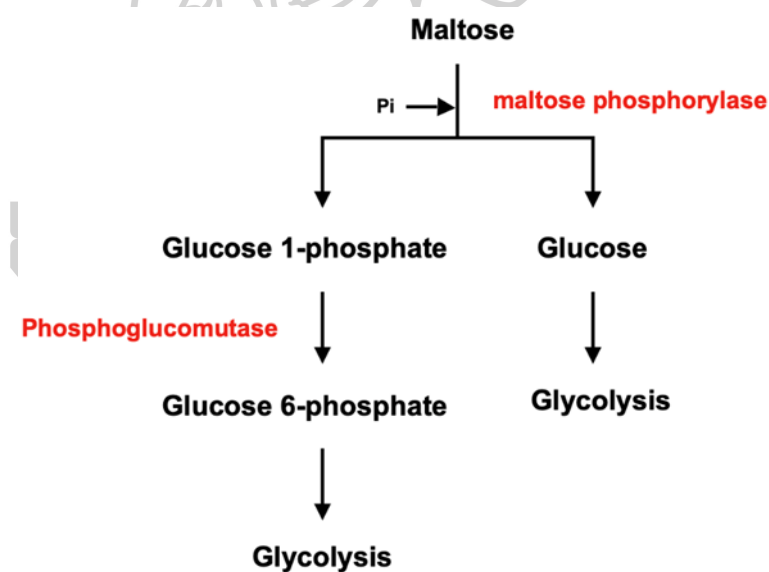
phosphorylation ในทางการค้ามีการใช้มอลโตสเป็นสารให้ความหวานและใช้เป็นอาหารเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย (Encyclopedia, 2022) (Biology Online, 2021)



ภาพที่ 19 โครงสร้างน้ำตาลมอลโตส

ที่มา : (MERCK, 2022e)

เมื่อมอลโตสเข้ามาในเซลล์เอนไซม์ inorganic phosphate (Pi) จะเข้ามาทำปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ maltose phosphorylase เกิดเป็น glucose 1-phosphate และกลูโคส จากนั้นเอนไซม์ phosphoglucomutase จะเปลี่ยน glucose 1-phosphate เป็น glucose 6-phosphate แล้วเข้าสู่วิถี glycolysis (ภาพที่ 20.) (Hatti-Kaul et al., 2018) (Wang et al., 2019)

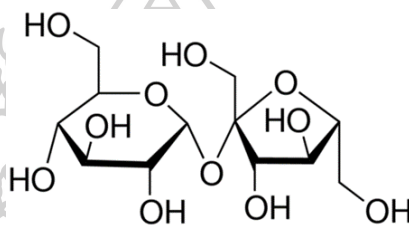


ภาพที่ 20 เส้นทางการใช้น้ำตาล maltose ในเซลล์ *E.coli* BL21(DE3)

ที่มา : (Hatti-Kaul et al., 2018; Wang et al., 2019)

2.14 น้ำตาลซูโครส (Sucrose)

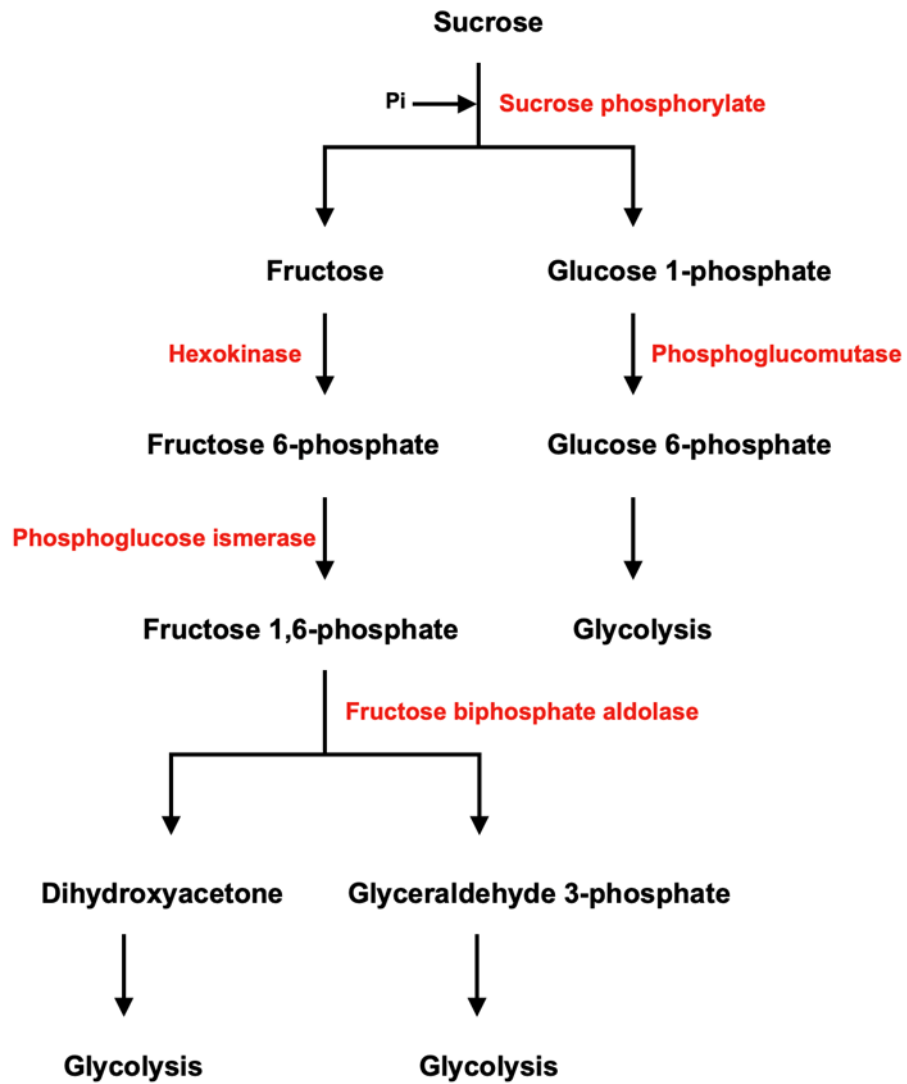
ซูโครสเป็น disaccharide มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{12}H_{22}O_{11}$ ประกอบด้วยกลูโคสและฟรุคโตส เชื่อมกันด้วยพันธะ α -(1,2) glycosidic พบในพืชต่าง ๆ ในโลกและเป็นที่ยึดกันในเรื่องน้ำตาลทราย ในสิ่งมีชีวิตที่ใช้ซูโครสเป็นส่วนประกอบสำหรับ monosaccharide โดยซูโครสจะถูกละลายเป็น กลูโคส และฟรุคโตสซึ่งกลูโคสเป็นสิ่งสำคัญสำหรับการเมตาบอลิซึมพลังงาน โดยทั่วไปเซลล์ใช้น้ำตาลในรูปแบบ monosaccharide ในการสังเคราะห์ ATP ผ่านวิธี substrate-level phosphorylation (glycolysis) หรือ oxidative phosphorylation โดย fructose ทำหน้าที่เป็นเมตาบอลิท์ทางเลือกในการให้พลังงาน โดยเฉพาะเวลากลูโคสไม่เพียงพอในขณะที่เมตาบอลิซึมต้องการพลังงานสูง (Biologu Online, 2021)



ภาพที่ 21 โครงสร้างน้ำตาลซูโครส

ที่มา : (MERCK, 2022g)

เมื่อซูโครสเข้ามาในเซลล์เอนไซม์ inorganic phosphate (Pi) จะเข้ามาทำปฏิกิริยาด้วย เอนไซม์ sucrose phosphorylase เกิดเป็น glucose 1-phosphate และฟรุคโตสเอนไซม์ phosphoglucomutase จะเปลี่ยน glucose 1-phosphate เป็น glucose 6-phosphate แล้วเข้าสู่วิถี glycolysis ส่วนฟรุคโตสจะเปลี่ยนเป็น fructose 6-phosphate ด้วยเอนไซม์ hexokinase จากนั้นเอนไซม์ phosphoglucose isomerase จะเปลี่ยน fructose 6-phosphate เปลี่ยนเป็น fructose 1,6-biphosphate แล้วเข้าสู่วิถี glycolysis (ภาพที่ 22.) (Timothy J, 2019) (Hatti-Kaul et al., 2018)

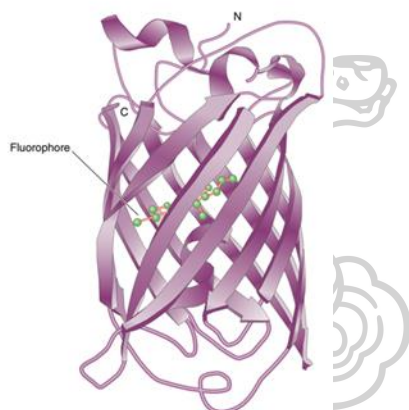


ภาพที่ 22 เส้นทางการใช้น้ำตาลซูโครส ในเซลล์ *E.coli* BL21(DE3)

ที่มา : (Hatti-Kaul et al., 2018) (Timothy J, 2019)

2.15 Green Fluorescent Protein (GFP)

Green Fluorescent Protein (GFP) เป็นโปรตีนเรืองแสงที่สามารถแสดงออกในร่างกายได้ ถ้าโปรตีน GFP โดยแสงมันจะเรืองแสงสีเขียวออกมา GFP เป็นโปรตีนที่เกิดภายในเซลล์จาก Jellyfish (Aequorin Victoria) ที่ประกอบด้วย 238 กรดอะมิโน หลักการเรืองแสงคือ chromophore 2 วงของ GFP จะดูดและปล่อยแสงเช่นแสงโฟตอนเป็นสเปกตรัมสีเขียวที่ตามองเห็น โดย chromophore ของ GFP จะอยู่ตรงกลางของโครงสร้าง β -barrel โดย chromophore 2 วงเกิดจากการ oxidation และการ cyclization ของ backbone ของ 3 กรดอะมิโนคือ threonine 65, Tyrosine 66 และ glycine 67 กระบวนการนี้จะเกิดขึ้นระหว่างการพับของโปรตีนและขึ้นกับปัจจัยที่แตกต่างเช่น pH, อุณหภูมิ และความเข้มข้น O_2 เนื่องจากโปรตีนชนิดนี้สามารถเปล่งแสงได้ด้วยตัวเองจึงนิยมนำมาใช้ในการติดตามการแสดงออกของโปรตีนต่างๆ (proteintech)



ภาพที่ 23 โครงสร้างโปรตีน GFP

ที่มา : (Goodman & R., 2021)

บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย

1. เครื่องมืออุปกรณ์และสารเคมี

1.1 เครื่องมือ

1.1.1	Autoclave รุ่น ss-325	(Tommy, Japan)
1.1.2	Autoclave รุ่น sx-700	(Tommy, Japan)
1.1.3	Centrifuge รุ่น z 206 a	(HERMLE, Germany)
1.1.4	Centrifuge รุ่น 5424	(Eppendorf, Germany)
1.1.5	Class II biosafety cabinet	(Nuair, USA)
1.1.6	Incubator	(Pol-ekoaparatura, Poland)
1.1.7	pH meter	(Mettler Toledo, Switzerland)
1.1.8	Shaker incubator รุ่น New Brunswick innova 43 incubator series	(New Brunswick, USA)
1.1.9	Shaker incubator รุ่น KS 4000 I control	(IKA, China)
1.1.10	Spectrophotometer รุ่น biowave II	(Biochrome WPA, UK)
1.1.11	Ultrasonicator	(Fisher, USA)
1.1.12	เครื่อง SDS-PAGE	(Bio-Rad, USA)

1.2 สารเคมี

1.2.1	Acetic acid	(loba chemie, India)
1.2.2	Agar	(Scharlab, Spain)
1.2.3	Ammonium chloride	(Merck, Germany)
1.2.4	Ampicillin	(Fluka, USA)
1.2.5	Arabinose	(TCI, Japan)
1.2.6	Bradford reagent	(Bio-Rad, USA)
1.2.7	Coomassie blue R250	(Fluka), USA
1.2.8	Disodium hydrogenphosphate	(Ajax finechem, USA)

1.2.9	Fructose	(Fluka, USA)
1.2.10	Galactose	(Sigma-Aldrich, USA)
1.2.11	Glucose	(kemaus, Australia)
1.2.12	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside	(Vivantis, Malaysia)
1.2.13	Lactose	(Sigma-Aldrich, USA)
1.2.14	Magnesium sulfate	(Merck, Germany)
1.2.15	Maltose	(Merck, Germany)
1.2.16	Mannose	(Sigma-Aldrich, USA)
1.2.17	2-mercaptoethanol	(Bio-Rad, USA)
1.2.18	Methanol	(RCI labscan, Thailand)
1.2.19	Peptone	(Conda Pronadisa, Spain)
1.2.20	Potassium dihydrogen phosphate	(Srichem, China)
1.2.21	Protein marker Thailand)	(Enzmart biotech,
1.2.22	Sample buffer	(Bio-Rad, USA)
1.2.23	SDS-PAGE running buffer	(Bio-Rad, USA)
1.2.24	Sodium chloride	(Srichem, China)
1.2.25	Sodium sulfate	(Merck, Germany)
1.2.26	Sucrose	(Sigma-Aldrich, USA)
1.2.27	Sodium dihydrogen phosphate	(Ajax finechem, USA)
1.2.28	Xylose	(TCI, Japan)
1.2.29	Yeast extract	(Conda Pronadisa, Spain)
1.2.30	เจล SDS-PAGE กึ่งสำเร็จรูป	(Bio-Rad, USA)

2. เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) ที่มีโปรตีนรีคอมบิแนนท์ GFP

3. วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 การเตรียม competent cells ของ *E. coli* BL21(DE3)

เชื้อเชื้อจากโคลนเดี่ยวของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) บนอาหาร LB agar ลงใน LB broth 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มในเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิ (shaker incubator) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีข้ามคืน จากนั้นเติมเชื้อที่เลี้ยง 1% ลง LB broth 125 มิลลิลิตรแล้วนำไปบ่มในเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิ (shaker incubator) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีจนกระทั่ง OD600 ประมาณ 0.3-0.4 (1.50 ชั่วโมง) แบ่งใส่หลอดแล้วนำไปแช่บนน้ำแข็ง 10 นาทีจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนใส (supernate) ออกแล้วละลายตะกอน (pellet) ด้วยสารละลาย 80 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$ 20 มิลลิโมลาร์ $CaCl_2$ 75 มิลลิลิตร (ต้องทำบนน้ำแข็ง) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาทีแยกส่วนใส (supernate) ออกแล้วละลายตะกอน (pellet) ด้วยสารละลาย 0.1 โมลาร์ $CaCl_2$ 3.1 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 60% glycerol โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ glycerol เป็น 15% แล้วแบ่งใส่ microtube ประมาณ 100 ไมโครลิตรต่อหลอดแล้วนำไปแช่ในตู้ -80 องศาเซลเซียส

3.2 การนำพลาสมิดดีเอ็นเอ (transformation) pET-11a หรือ GFP-pET-11a เข้าสู่ competent cells ของ *E. coli* BL21(DE3)

นำ competent *E. coli* BL21(DE3) cells 100 ไมโครลิตรมาวางบนน้ำแข็งแล้วเติมพลาสมิด pET-11a หรือ GFP-pET-11a 2 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปแช่บนน้ำแข็ง 45 นาที แล้วนำไปแช่อย่างช้าๆ ควบคุมอุณหภูมิตั้งที่ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 90 วินาที แล้ววางบนน้ำแข็ง 1 ถึง 2 นาที จากนั้นดูดใส่ LB broth 900 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มในเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิ (shaker incubator) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1.50 ชั่วโมง จากนั้นนำไป spread บน LB agar ที่มี Ampicillin แล้วนำไปบ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

3.3 การคัดเลือกว่าตาลที่มีผลต่อการเจริญของ *E. coli* BL21(DE3)

3.3.1 ศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ต่อน้ำตาลในอาหาร LB broth

เตรียมกล้าเชื้อโดยเชื้อโคลนเดี่ยวของ *E. coli* BL21(DE3) บนอาหาร LB agar ลงในอาหาร LB broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน และถ่ายกล้าเชื้อ 1% ลงใน LB broth ปริมาตร 160 มิลลิลิตร จำนวน 8 ฟลาสก์และ LB broth ปริมาตร 110 มิลลิลิตร จำนวน 1 ฟลาสก์ เพาะเลี้ยงที่ความเร็ว 200 รอบต่อ

นาที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2.50 ชั่วโมง และนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 ได้ค่าประมาณ 1.0 แล้วแบ่ง LB broth ใส่พลาสติกละ 50 มิลลิลิตรจำนวน 19 พลาสติก แล้วเติมน้ำตาลกลูโคส กาแลคโตส ฟรุคโตส แมนนโนส อะราบิโนส ไฮโลส แลคโตส มอลโตส และซูโครส ที่ความเข้มข้น 0 (ไม่เติมน้ำตาล), 2 และ 10 กรัมต่อลิตร นำมาเพาะเลี้ยงที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 ทุก 3 ชั่วโมง เมื่อเซลล์เจริญเติบโตเข้าสู่ stationary phase ให้เก็บเซลล์มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 ทุก 5-8 ชั่วโมง

3.3.2 ศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ต่อน้ำตาลในอาหาร auto-induction media

เตรียมกล้าเชื้อโดยแยกโคลนเดี่ยวของ *E. coli* BL21(DE3) บนอาหาร LB agar ลงในอาหาร ZYM-5052 starter ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน และถ่ายกล้าเชื้อ 1% ของอาหาร ZYM-5052 starter media ลงในอาหาร ZYP-5052 media ปริมาตร 950 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2.50 ชั่วโมง และนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 ได้ค่าประมาณ 1.0 แล้วแบ่งอาหาร ZYP-5052 media ใส่พลาสติกละ 50 มิลลิลิตร จำนวน 19 พลาสติก แล้วเติมน้ำตาลกลูโคส กาแลคโตส ฟรุคโตส แมนนโนส อะราบิโนส ไฮโลส แลคโตส มอลโตส และซูโครสที่ความเข้มข้น 0 (ไม่เติมน้ำตาล), 2 และ 10 กรัมต่อลิตร นำมาเพาะเลี้ยงที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 ทุก 3 ชั่วโมง เมื่อเซลล์เจริญเติบโตเข้าสู่ stationary phase ให้เก็บเซลล์มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 ทุก 5-8 ชั่วโมง

3.4 ศึกษาความเข้มข้นน้ำตาลที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ต่ออาหาร LB broth และอาหาร auto-induction media

3.4.1 ศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ต่อความเข้มข้นต่างๆของน้ำตาลต่าง ๆ ในอาหาร LB broth

เตรียมกล้าเชื้อโดยแยกโคลนเดี่ยวของ *E. coli* BL21(DE3) บนอาหาร LB agar ลงในอาหาร LB broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน และถ่ายกล้าเชื้อ 1% ลงใน LB broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จำนวน 3 พลาสติก เพาะเลี้ยงที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2.50 ชั่วโมง และนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 ได้ค่าประมาณ 1.0 แล้วแบ่ง LB broth ใส่หลอด

ทดลองหาค่า 1 มิลลิลิตรจำนวน 73 หลอด แล้วเติมน้ำตาลกลูโคส กาแลคโตส ฟรุคโตส แมนนโนส อะราบิโนส ไฮโลส แลคโตส มอลโตส และซูโครสที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 กรัมต่อลิตรตามลำดับ แล้วนำมาเพาะเลี้ยงที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 ในชั่วโมงที่ 27

3.4.2 ศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ต่อความเข้มข้นต่างๆของน้ำตาลต่าง ๆ ในอาหาร auto-induction media

เตรียมกล้าเชื้อโดยเขี่ยโคลนเดี่ยวของ *E. coli* BL21(DE3) บนอาหาร LB agar ลงในอาหาร ZYM-5052 starter media ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน และถ่ายกล้าเชื้อ 1% ของอาหาร ZYM-5052 starter media ลงในอาหาร ZYP-5052 media ปริมาตร 73 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2.50 ชั่วโมง และนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 ได้ค่าประมาณ 1.0 แล้วแบ่งอาหาร ZYP-5052 media ใส่หลอดทดลองหลอดละ 1 มิลลิลิตรจำนวน 73 หลอด แล้วเติมน้ำตาลกลูโคส กาแลคโตส ฟรุคโตส แมนนโนส อะราบิโนส ไฮโลส แลคโตส มอลโตส และซูโครส ที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 กรัมต่อลิตรตามลำดับ แล้วนำมาเพาะเลี้ยงที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 ในชั่วโมงที่ 27

3.5 ศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีพลาสมิด pET-11a ในอาหาร LB broth

เตรียมกล้าเชื้อโดยเขี่ยโคลนเดี่ยวของ *E. coli* BL21(DE3) บนอาหาร LB agar ลงในอาหาร LB broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน และถ่ายกล้าเชื้อ 1% ลงในอาหาร LB broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่มี Ampicillin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วเพาะเลี้ยงที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2.50 ชั่วโมง และนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 ได้ค่าประมาณ 1.0 แล้วเติม IPTG ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ แล้วเพาะเลี้ยงที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ที่เวลา 6, 9, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเก็บตะกอนเซลล์ที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่ส่วนใสและเก็บตะกอนเซลล์ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.6 ศึกษาความเข้มข้นต่าง ๆ ของน้ำตาลต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีพลาสมิด pET-11a ต่ออาหาร LB broth

เตรียมกล้าเชื้อโดยเปียโคลนนิ่งเดียวของ *E. coli* BL21(DE3) บนอาหาร LB agar ลงในอาหาร LB broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน และถ่ายกล้าเชื้อ 1% ลงในอาหาร LB broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่มี ampicillin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร แล้วเพาะเลี้ยงที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2.50 ชั่วโมง และนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 ได้ค่าประมาณ 1.0 แล้วเติม IPTG ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์และเติมน้ำตาลกลูโคส กาแลคโตส ฟรุคโตส แมนนโนส อะราบิโนส ไซโลส แลคโตส มอลโตส และซูโครสที่ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8, และ 10 กรัมต่อลิตร แล้วนำไปเพาะเลี้ยงที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 ที่เวลา 25 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเก็บตะกอนเซลล์ที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่ส่วนใสและเก็บตะกอนเซลล์ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.7 ศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีพลาสมิด GFP-pET-11a ในอาหาร LB broth

เตรียมกล้าเชื้อโดยเปียโคลนนิ่งเดียวของ *E. coli* BL21(DE3) บนอาหาร LB agar ลงในอาหาร LB broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน และถ่ายกล้าเชื้อ 1% ลงในอาหาร LB broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่มี Ampicillin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร แล้วเพาะเลี้ยงที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2.50 ชั่วโมง และนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 ได้ค่าประมาณ 1.0 แล้วเติม IPTG ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ แล้วเพาะเลี้ยงที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ที่เวลา 6, 9, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเก็บตะกอนเซลล์ที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่ส่วนใสและเก็บตะกอนเซลล์ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.8 ศึกษาความเข้มข้นต่าง ๆ ของน้ำตาลต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีพลาสมิด GFP-pET-11a ต่ออาหาร LB broth

เตรียมกล้าเชื้อโดยเปียโคลนนิ่งเดียวของ *E. coli* BL21(DE3) บนอาหาร LB agar ลงในอาหาร LB broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน และถ่ายกล้าเชื้อ 1% ลงในอาหาร LB media ปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่มี ampicillin

ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร แล้วเพาะเลี้ยงที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2.50 ชั่วโมง และนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 ได้ค่าประมาณ 1.0 แล้วเติม IPTG ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์และเติมน้ำตาลกลูโคส กาแลคโตส ฟรุคโตส แมนนโนส อะราบิโนส ไซโลส แลคโตส มอลโตส และซูโครสที่ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8, และ 10 กรัมต่อลิตร แล้วนำไปเพาะเลี้ยงที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 ที่เวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเก็บตะกอนเซลล์ที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่มีส่วนใสและเก็บตะกอนเซลล์ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.9 การแตกเซลล์ใน *E.coli* BL21(DE3) ที่มี GFP-pET11a ในอาหาร LB broth

นำตะกอนเซลล์ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสมาละลายตะกอนด้วย sodium phosphate buffer pH 7.0 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปแตกเซลล์ด้วยเครื่อง Ultrasonicators ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส แอมพลิจูด (amplitude) 20% และ pulser on 5 วินาที pulser off 10 วินาทีเป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำตัวอย่างละ 3 รอบ จากนั้นเปิดใส่หลอด microcentrifuge 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที แล้วเปิดแยกส่วนใสกับตะกอน นำส่วนใสที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.10 การหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford

3.10.1 การเตรียมกราฟมาตรฐาน Bovine Serum Albumin (BSA)

เตรียมสารมาตรฐาน BSA ที่ความเข้มข้น 2, 4, 6, 8, 10 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร โดยชั่งสารละลายมาตรฐาน BSA ปริมาณ 0.005 กรัมละลายด้วยน้ำกลั่น 5 มิลลิตรเพื่อให้ได้ stock สารละลายมาตรฐาน BSA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร จากนั้นนำ stock สารละลายมาตรฐาน BSA มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นตามต้องการ แล้วเปิดสารละลาย BSA ปริมาณ 10 ไมโครลิตร ผสม Bradford dye reagent ปริมาตร 200 ไมโครลิตรและน้ำกลั่น 790 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรด้วยเครื่อง spectrophotometer

3.10.2 การเตรียมตัวอย่างเพื่อหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford

เปิดส่วนใสที่เก็บใน -20 องศาเซลเซียสปริมาตร 10 ไมโครลิตรผสม Bradford dye reagent ปริมาตร 200 ไมโครลิตรและน้ำกลั่น 790 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรด้วยเครื่อง spectrophotometer

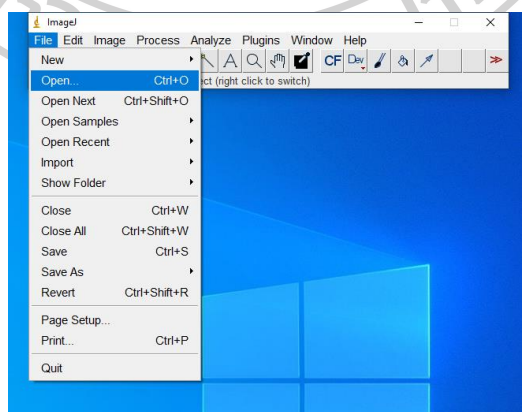
3.11 การวิเคราะห์ขนาดโปรตีนด้วยวิธี sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS PAGE)

เตรียมแผ่นเจลแบบ 15% ด้วยชุดเตรียมเจลกิ่งสำเร็จรูป โดยมี 2 ส่วนคือ resolver และ stacker จากนั้นเตรียมประกบกระจกเข้ากับตัวยึดเพื่อเปิดสารละลายเจลที่เตรียมไว้ในช่องว่างของกระจก โดยเปิดสารละลาย resolver ลงไปก่อนให้ห่างจากด้านล่างของทวิประมาณ 0.5-1 เซนติเมตร จากนั้นเปิดสารละลาย stacker ให้เต็มความสูงของกระจกแล้วใส่ทวิลงในช่องว่างของกระจก จากนั้นรอให้เจลแข็งตัวประมาณ 45 นาที หลังจากเจลแข็งแล้วถอดกระจกออกแล้วนำแผ่นเจลไปประกอบเข้ากับ chamber แล้วเท 1X SDS-PAGE running buffer ลงใน chamber ให้ท่วมแผ่นเจลด้านบน

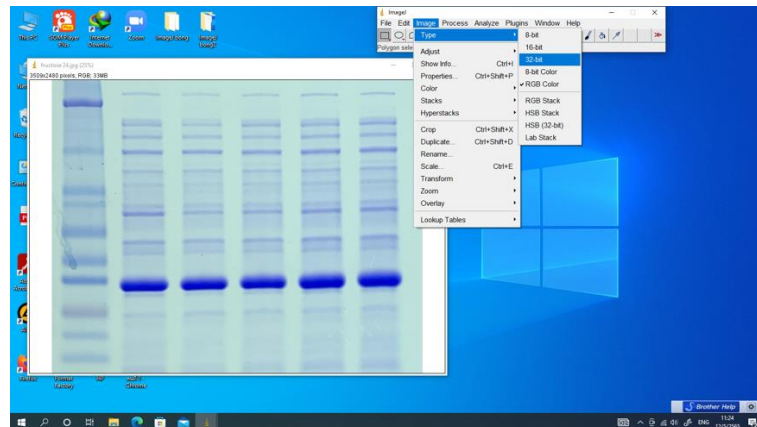
นำตัวอย่างมาคำนวณปริมาณโปรตีนให้ได้ความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรต่อหลุมเจล (ปริมาตรสารละลายต่อหลุมเจลไม่เกิน 20 ไมโครลิตร) ด้วยวิธี Bradford แล้วผสมกับ loading dye 4 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที แล้วนำตัวอย่างมาโหลดลงในหลุมเจลและโหลด protein marker 5 ไมโครลิตร จากนั้นต่อ power supply เข้ากับ chamber โดยตั้งค่าความต่างศักย์ (voltage) 120 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 90 นาที เมื่อครบเวลาให้ปิดสวิตซ์แล้วนำกระจกออกจาก chamber แล้วแกะกระจกเพื่อนำเจลออกมาแล้วนำไปย้อมด้วยสีย้อม Coomassie blue stain ข้ามคืนแล้วล้างสีย้อมด้วย Destain I 1 ชั่วโมง และล้างด้วย Destain II 1 ชั่วโมง

3.12 การวิเคราะห์ความเข้มข้นโปรตีนด้วยโปรแกรม ImageJ

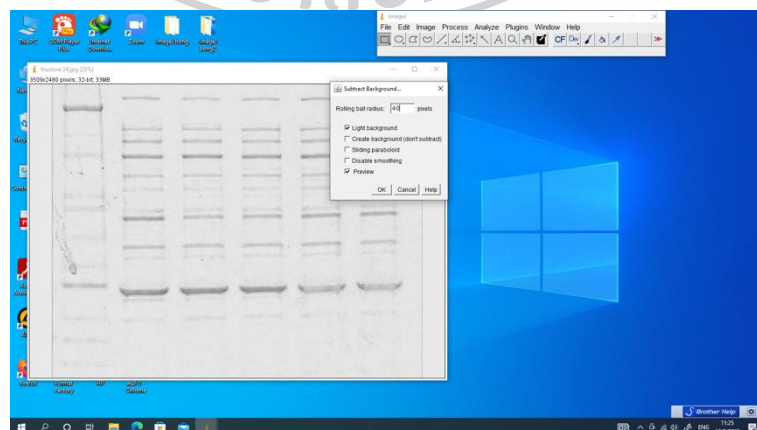
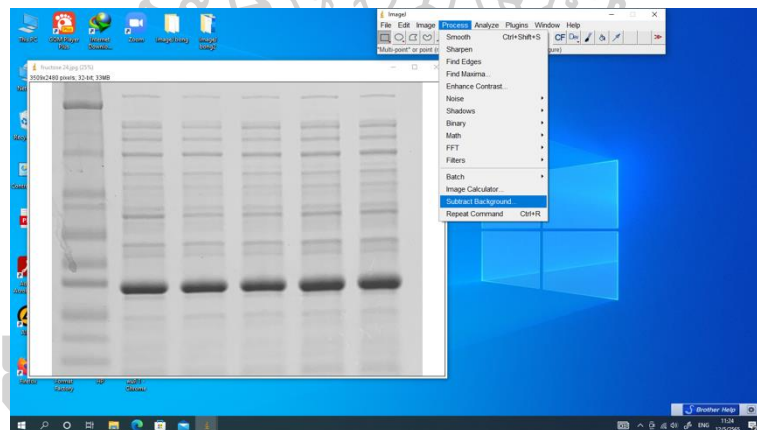
- โหลดรูปเจลที่ต้องการวิเคราะห์ลงโปรแกรม ImageJ



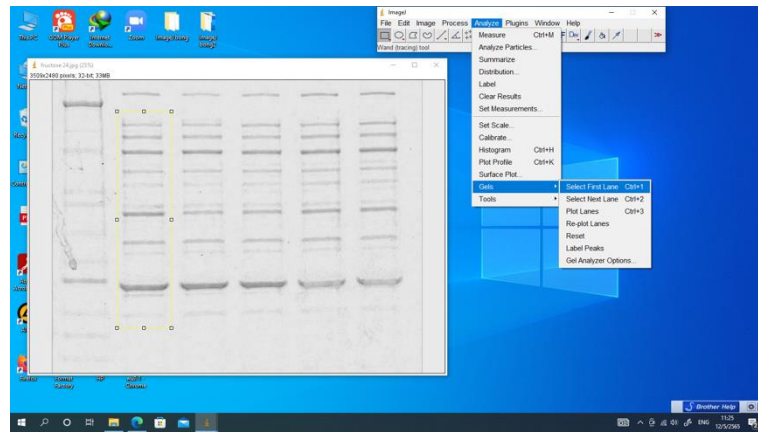
- เลือก image แล้วเลือก type 32-bit



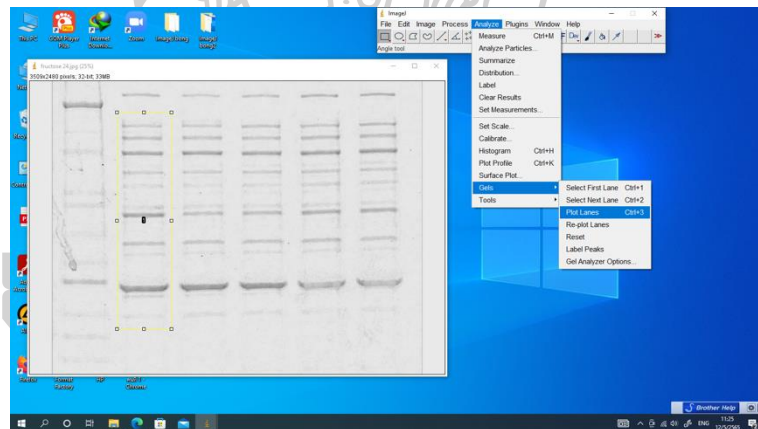
- เลือก process แล้วตั้งค่า subtract background เป็น 40 pixel แล้วเลือก Light background และ preview



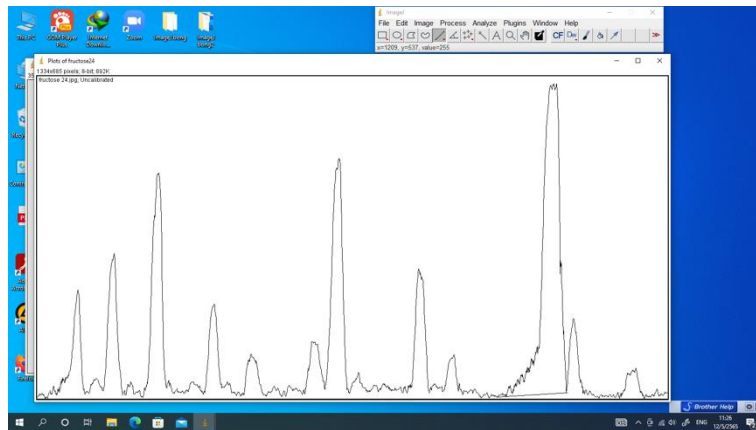
- แล้วครอบเลนเจลที่ต้องการวิเคราะห์ จากนั้นเลือก analyze เลือก gel เลือก select first lane



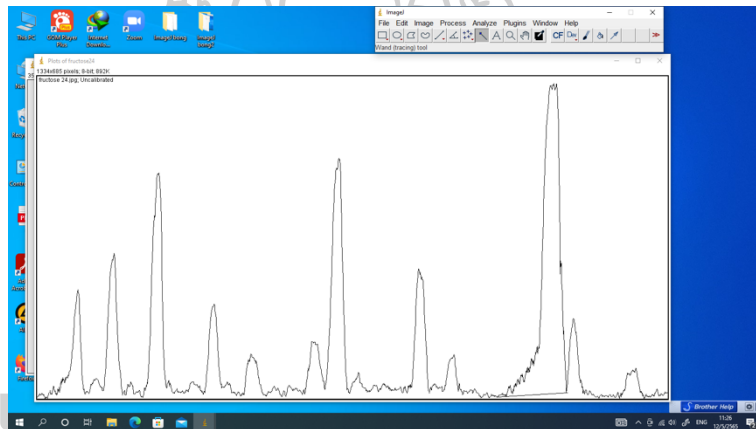
- เลือก analyze เลือก gel แล้วเลือก plot lanes



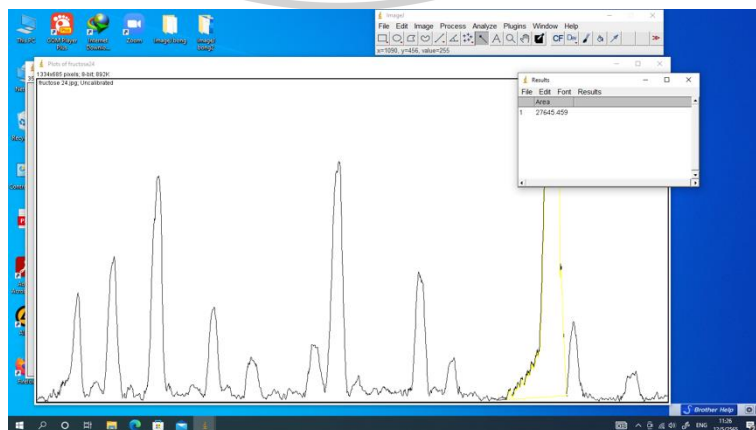
- แล้วลากเส้นใต้พีคที่ต้องการ



- แล้วเลือก  จากนั้นเลือกพื้นที่ใต้พีคที่เราต้องการ



- จะได้ค่าพื้นที่ใต้พีค



บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การคัดเลือกน้ำตาลที่มีผลต่อการเจริญของ *E. coli* BL21(DE3)

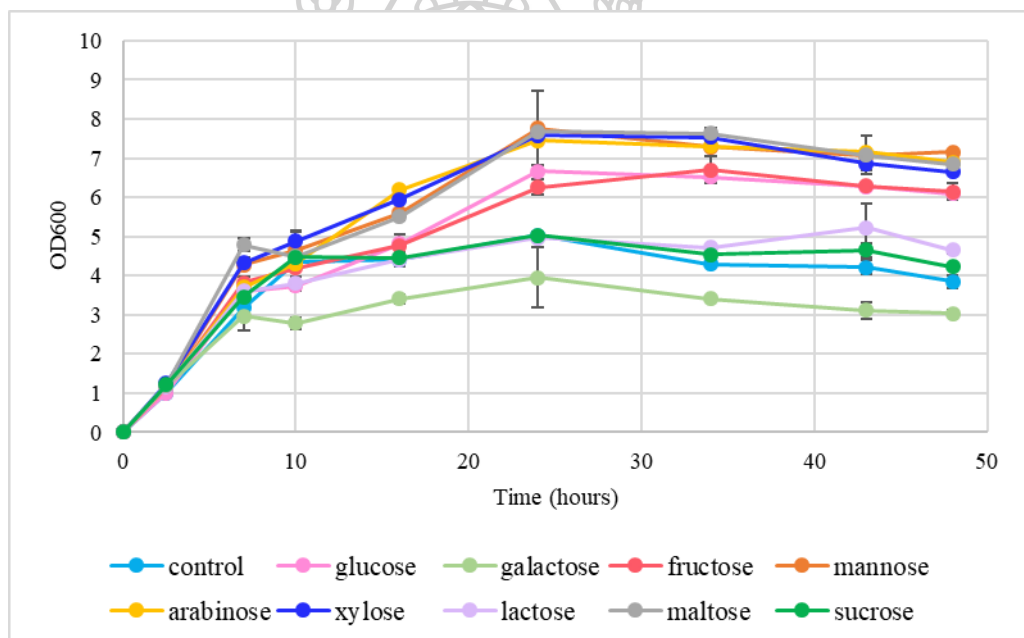
4.1.1 ผลของน้ำตาลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ในอาหาร LB broth

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ต่อน้ำตาลกลูโคส กาแลคโตส ฟรุคโตส แมนโนส อะราบิโนส ไฮโลส แลคโตส มอลโตส และซูโครสที่ความเข้มข้น 2 และ 10 กรัมต่อลิตรในอาหาร LB broth ที่มีการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมงโดยมี control คือการไม่เติมน้ำตาล พบว่าผลการเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีการเติมน้ำตาลต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 2 และ 10 กรัมต่อลิตร ที่แสดงในภาพที่ 24 และ 25 และ จะเห็นว่าผลการเจริญเติบโตของเซลล์แบ่งเป็นสามกลุ่มคือกลุ่มน้ำตาลที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ กลุ่มที่น้ำตาลไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์และกลุ่มน้ำตาลที่เพิ่มการเจริญเติบโตของเซลล์ ซึ่งที่ความเข้มข้นน้ำตาล 2 กรัมต่อลิตรมีน้ำตาลที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้แก่น้ำตาลกาแลคโตสโดยเริ่มต้นเซลล์มีการเจริญเพิ่มขึ้นตามเวลา จนกระทั่งชั่วโมงที่ 10 การเจริญเติบโตของเซลล์เริ่มคงที่ ส่วนน้ำตาลแลคโตสและซูโครสไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์จะเห็นได้ว่าเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นการเติบโตของเซลล์ไม่ได้เพิ่มตามไปด้วย และ น้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส แมนโนส อะราบิโนส ไฮโลส และมอลโตสเริ่มต้นเซลล์มีการเจริญตามเวลา จนกระทั่งชั่วโมงที่ 24 การเจริญเติบโตของเซลล์เริ่มคงที่และที่ความเข้มข้นของน้ำตาล 10 กรัมต่อลิตร มีน้ำตาลที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้แก่น้ำตาลกลูโคส กาแลคโตส ฟรุคโตส แมนโนส และอะราบิโนส โดยเริ่มต้นเซลล์มีการเจริญเพิ่มขึ้นตามเวลาจนกระทั่งชั่วโมงที่ 10 การเจริญเติบโตของเซลล์เริ่มคงที่ ส่วนน้ำตาลซูโครสไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์และน้ำตาลที่เพิ่มการเจริญเติบโตของเซลล์ได้น้ำตาลไฮโลสและมอลโตสจากภาพที่ 24 และ 25 จะเห็นได้ว่าการเจริญเติบโตของเซลล์ที่มีการเติมน้ำตาลสองชนิดนี้เซลล์เจริญเติบโตเพิ่มขึ้นตามเวลา

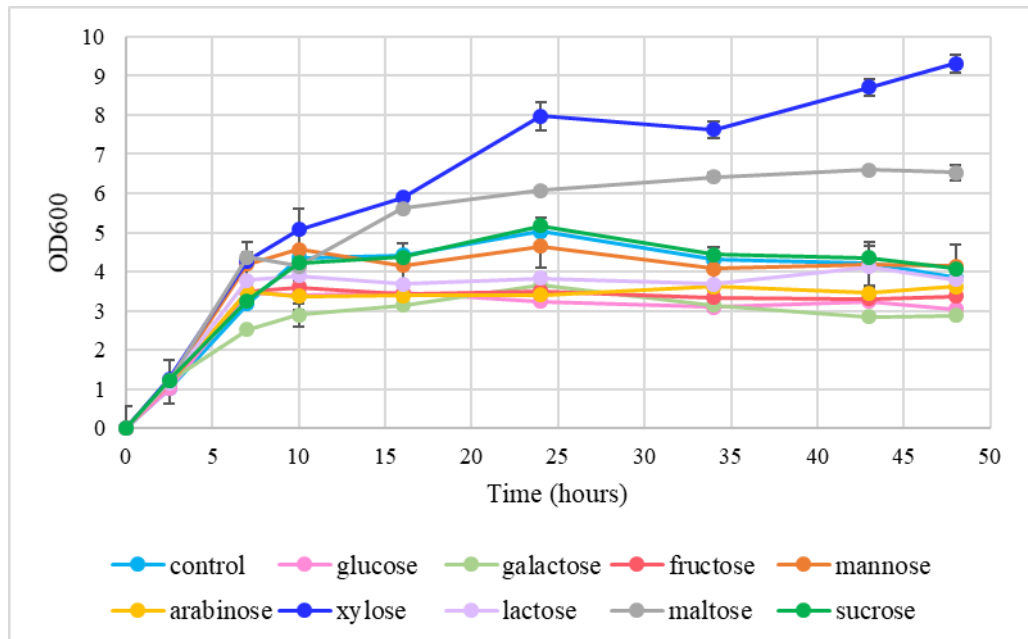
4.1.2 ผลของน้ำตาลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ในอาหาร auto-induction media

จากผลศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ต่อน้ำตาลกลูโคส กาแลคโตส ฟรุคโตส แมนโนส อะราบิโนส ไฮโลส แลคโตส มอลโตส และซูโครสที่ความเข้มข้น 2 และ 10 กรัมต่อลิตรในอาหาร auto-induction media ที่มีการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมงโดยมี control คือการไม่เติมน้ำตาล พบว่าผลการเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ที่มีการเติมน้ำตาลต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 2 และ 10 กรัมต่อลิตร ที่แสดงในภาพที่ 26 และ 27 และ จะเห็นว่าผลการเจริญเติบโตของ

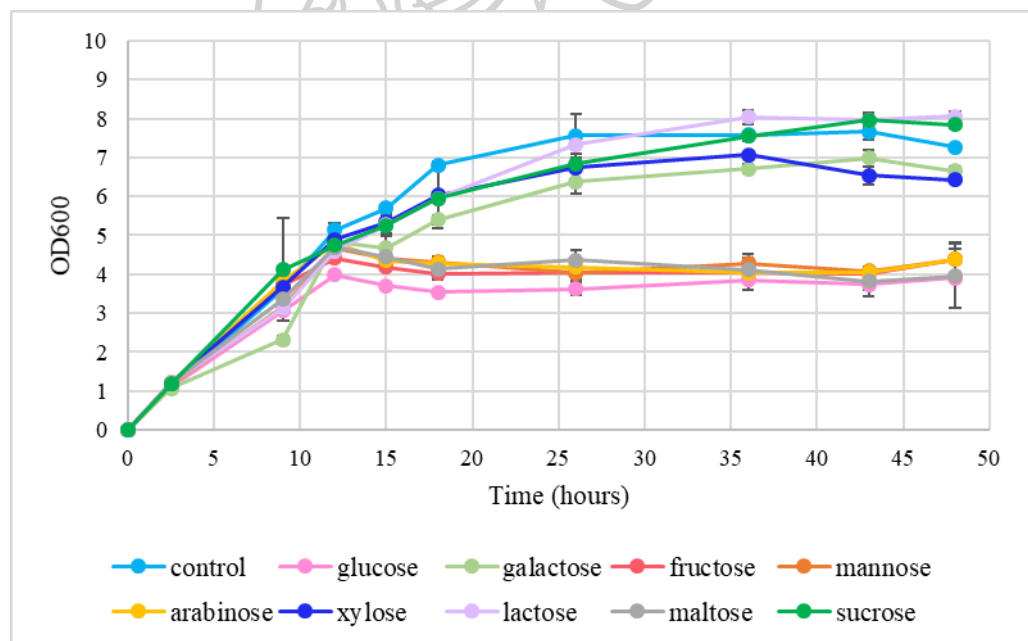
เซลล์แบ่งเป็นสองกลุ่มคือกลุ่มน้ำตาลที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์และกลุ่มน้ำตาลที่ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ ซึ่งที่ความเข้มข้นน้ำตาล 2 กรัมต่อลิตรมีน้ำตาลที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส อะราบิโนส มอลโตส และแมนโนส โดยเริ่มต้นเซลล์มีการเจริญเพิ่มขึ้นตามเวลาจนกระทั่งชั่วโมงที่ 12 การเจริญเติบโตของเซลล์เริ่มคงที่ ส่วนน้ำตาลกาแลคโตส ไซโลส แลคโตส และซูโครส ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ จะเห็นได้ว่าการเจริญเติบโตของเซลล์มีค่าไม่ต่างจากเซลล์ที่ไม่มีการเติมน้ำตาลและที่ความเข้มข้นน้ำตาล 10 กรัมต่อลิตรมีน้ำตาลที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้แก่กลูโคส ฟรุคโตส แมนโนส แลคโตส และมอลโตส โดยเริ่มต้นเซลล์มีการเจริญเพิ่มขึ้นตามเวลาจนกระทั่งชั่วโมงที่ 12 การเจริญเติบโตของเซลล์เริ่มคงที่ ส่วนน้ำตาลกาแลคโตส ไซโลส และซูโครส ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์



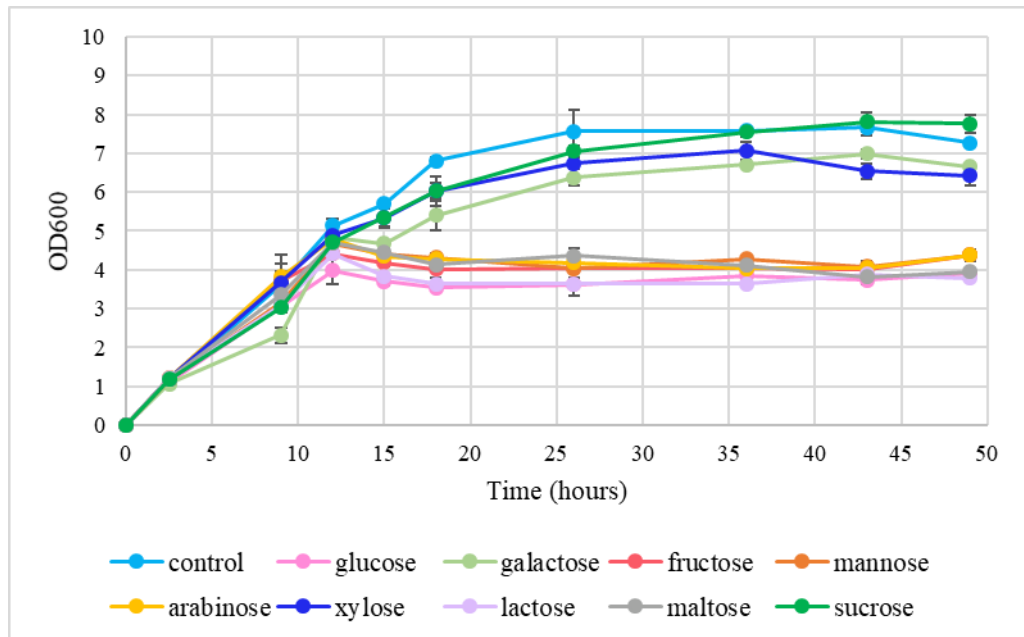
ภาพที่ 24 การเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ต่อน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 2 g/L ในอาหาร LB broth



ภาพที่ 25 การเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ต่อน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 10 g/L ในอาหาร LB broth



ภาพที่ 26 การเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ต่อน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 2 g/L ในอาหาร auto-induction media



ภาพที่ 27 การเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ต่อน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 10 g/L ในอาหาร auto-induction media

เมื่อศึกษาผลการเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ในอาหารเลี้ยง LB broth และ auto-induction media เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าน้ำตาลส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์เป็น 3 กลุ่มคือกลุ่มน้ำตาลที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ กลุ่มน้ำตาลที่ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ และกลุ่มน้ำตาลที่เพิ่มการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยสรุปได้ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สรุปผลของน้ำตาลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ในอาหาร LB broth และอาหาร auto-induction media

น้ำตาล	อาหาร LB broth		อาหาร auto-induction media	
	2 กรัมต่อลิตร	10 กรัมต่อลิตร	2 กรัมต่อลิตร	10 กรัมต่อลิตร
กลูโคส	+	-	-	-
กาแลคโตส	-	-	0	0
ฟรุคโตส	+	-	-	-
แมนโนส	+	-	-	-
อะราบิโนส	+	-	-	-
ไซโลส	+	+	0	0
แลคโตส	0	-	0	-
มอลโตส	+	+	-	-
ซูโครส	0	0	0	0

หมายเหตุสัญลักษณ์ - คือความเข้มข้นของน้ำตาลยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ สัญลักษณ์ 0 คือความเข้มข้นน้ำตาลไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ สัญลักษณ์ + คือความเข้มข้นของน้ำตาลเพิ่มการเจริญเติบโตของเซลล์



4.2 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ในอาหาร LB broth และ auto-induction media

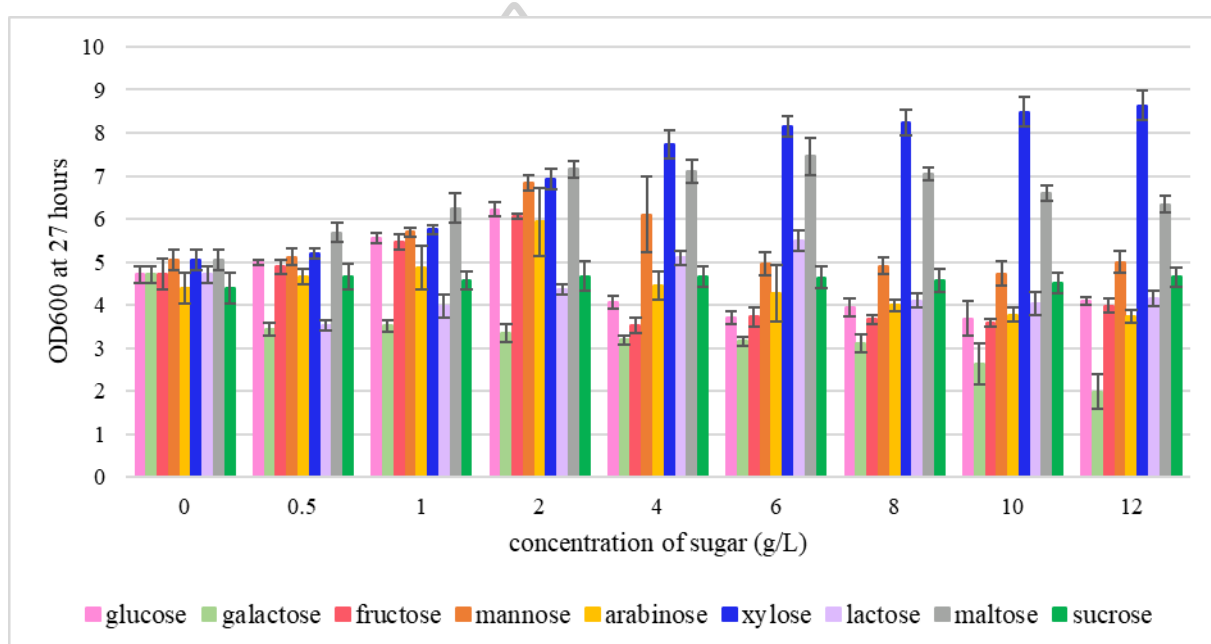
4.2.1 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ในอาหาร LB broth

หลังจากที่ศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ต่อน้ำตาลต่าง ๆ ในอาหาร LB broth จากนั้นศึกษาความเข้มข้นต่าง ๆ ของน้ำตาลต่าง ๆ ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ในอาหาร LB broth โดยมีการเติมน้ำตาลกลูโคส กาแลคโตส ฟรุคโตส แมนโนส อะราบิโนส ไฮโลส แลคโตส มอลโตส และซูโครส ที่ความเข้มข้น 0 (control), 0.5, 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 กรัมต่อลิตรและเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 27 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่เซลล์อยู่ใน stationary phase ลิตร ที่แสดงในภาพที่ 28 พบว่าผลการเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ต่อกความเข้มข้นต่าง ๆ ของน้ำตาลต่าง ๆ ในอาหาร LB broth แบ่งเป็น 3 กลุ่มคือกลุ่มน้ำตาลที่ความเข้มข้นของน้ำตาลยับยั้งการเติบโตของเซลล์คือเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลเพิ่มขึ้นส่งผลให้การเจริญเติบโตของเซลล์ลดลงได้แก่น้ำตาลกลูโคส กาแลคโตส ฟรุคโตส และอะราบิโนส โดยน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส และอะราบิโนส เมื่อเพิ่มความเข้มข้นน้ำตาลถึง 4 กรัมต่อลิตรทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์ลดลง กลุ่มที่สองคือกลุ่มน้ำตาลที่ความเข้มข้นของน้ำตาลไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์คือเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลการเจริญเติบโตของเซลล์ไม่เพิ่มขึ้นหรือมีการยับยั้งการเติบโตของเซลล์ได้แก่น้ำตาลแลคโตสและซูโครส และกลุ่มสุดท้ายคือกลุ่มที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเพิ่มการเจริญเติบโตของเซลล์ได้แก่น้ำตาลไฮโลสและมอลโตสคือเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลเพิ่มขึ้นทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์เพิ่มขึ้นด้วยเมื่อเทียบกับการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ไม่มีการเติมน้ำตาล (control) จะเห็นได้ว่าการเติบโตของเซลล์ที่มีการเติมน้ำตาลไฮโลสและมอลโตสเจริญเติบโตได้ดีกว่าเซลล์ที่ไม่มีการเติมน้ำตาล (control)

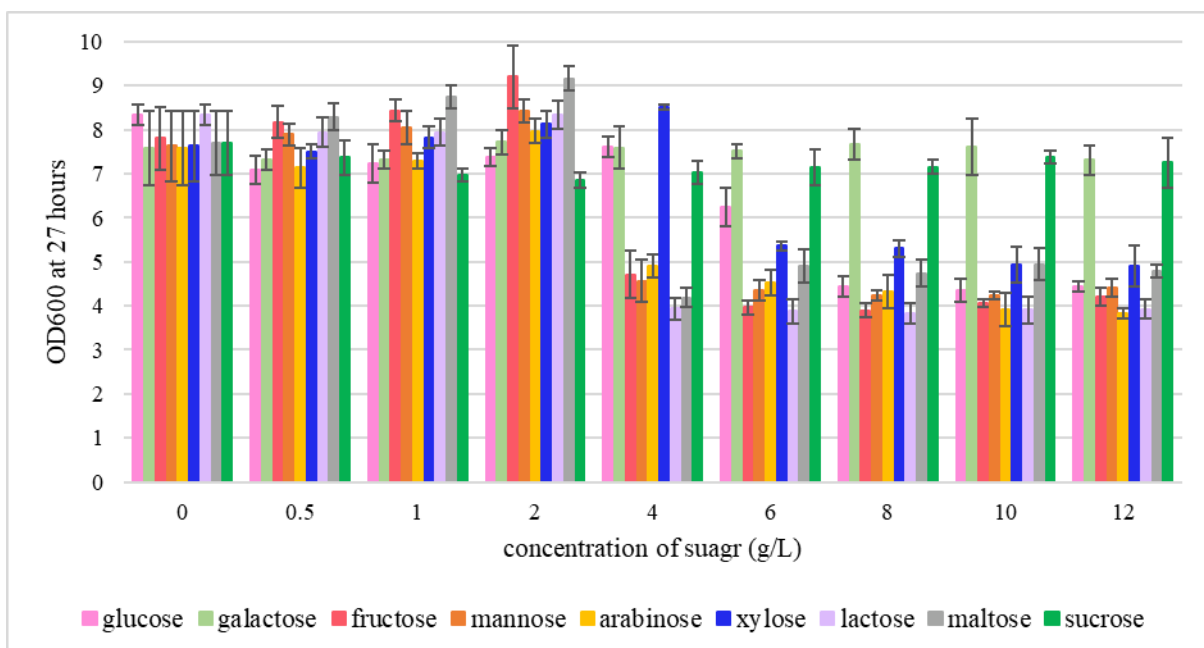
4.2.2 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ในอาหาร auto-induction media

หลังจากที่ศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ต่อน้ำตาลต่าง ๆ ในอาหาร auto-induction media จากนั้นศึกษาความเข้มข้นต่าง ๆ ของน้ำตาลต่าง ๆ ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ในอาหาร auto-induction media โดยมีการเติมน้ำตาลกลูโคส กาแลคโตส ฟรุคโตส แมนโนส อะราบิโนส ไฮโลส แลคโตส มอลโตส และซูโครสความเข้มข้น 0 (control), 0.5, 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 กรัมต่อลิตรและเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 27 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่เซลล์อยู่ใน stationary phase ลิตร ที่แสดงในภาพที่ 29 พบว่าผลการเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ต่อกความเข้มข้นต่าง ๆ ของน้ำตาลในอาหาร auto-induction media แบ่งเป็น 2 กลุ่มคือกลุ่มน้ำตาล

ความเข้มข้นของน้ำตาลยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์คือเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลเพิ่มขึ้นส่งผลให้การเจริญเติบโตของเซลล์ลดลงได้แก่ น้ำตาล กลูโคส ฟรุคโตส แมนโนส อะราบิโนส ไชโลส แลคโต และมอลโตส โดยน้ำตาลฟรุคโตส แมนโนส อะราบิโนส แลคโตส และมอลโตสเมื่อเพิ่มความเข้มข้นน้ำตาลถึง 4 กรัมต่อลิตรทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์ลดลง ส่วนน้ำตาลกลูโคสและไชโลสเมื่อเพิ่มความเข้มข้นน้ำตาลถึง 6 กรัมต่อลิตรการเจริญเติบโตของเซลล์จะลดลง กลุ่มที่สองกลุ่มน้ำตาลที่ความเข้มข้นของน้ำตาลไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ได้แก่ น้ำตาลกาแลคโตและซูโครสเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลสองชนิดนี้ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์



ภาพที่ 28 ผลการเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ต่อความเข้มข้นต่าง ๆ ของน้ำตาลต่าง ๆ ที่เวลา 27 ชั่วโมงในอาหาร LB broth



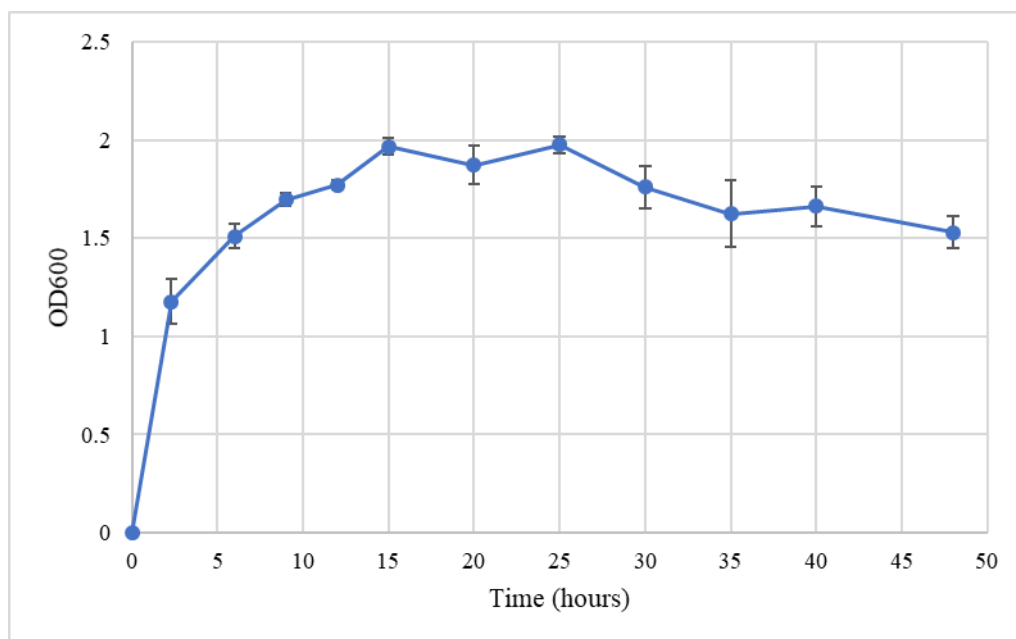
ภาพที่ 29 ผลการเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ต่อความเข้มข้นต่าง ๆ ของน้ำตาลต่าง ๆ ที่เวลา 27 ชั่วโมงในอาหาร auto-induction media

จากผลการเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ต่อความเข้มข้นต่าง ๆ ของน้ำตาลต่าง ๆ ในอาหาร auto-induction media พบว่าการเติมน้ำตาลกลูโคส กาแลคโตส ฟรุคโตส แมนโนส อะราบินอส ไซโลส แลคโตส มอลโตส และซูโครสลงไปอาหารเพาะเลี้ยงนี้ไม่ส่งผลให้การเจริญเติบโตของเซลล์เพิ่มขึ้นต่างจากอาหาร LB broth ที่การเติมน้ำตาลไซโลสและมอลโตสทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์เพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงสนใจการเจริญเติบโตของเซลล์บนอาหารเพาะเลี้ยง LB broth จึงนำมาศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ที่มี pET-11a plasmid ในอาหาร LB broth ต่อไป

4.3 ผลของน้ำตาลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ที่มี pET-11a plasmid ในอาหาร LB broth

4.3.1 ผลการเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ที่มี pET-11a plasmid ในอาหาร LB broth

จากการศึกษาผลการเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ที่มี pET11a plasmid ในอาหาร LB broth โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ที่มี pET-11a plasmid ไม่มีการเติมน้ำตาล ซึ่งติดตามการเจริญเติบโตของเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่แสดงในภาพที่ 30 พบว่าเริ่มต้นเซลล์เจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นจนกระทั่งชั่วโมงที่ 25 เซลล์เริ่มคงที่ และชั่วโมงที่ 30 เซลล์มีการเจริญเติบโตที่ลดลง



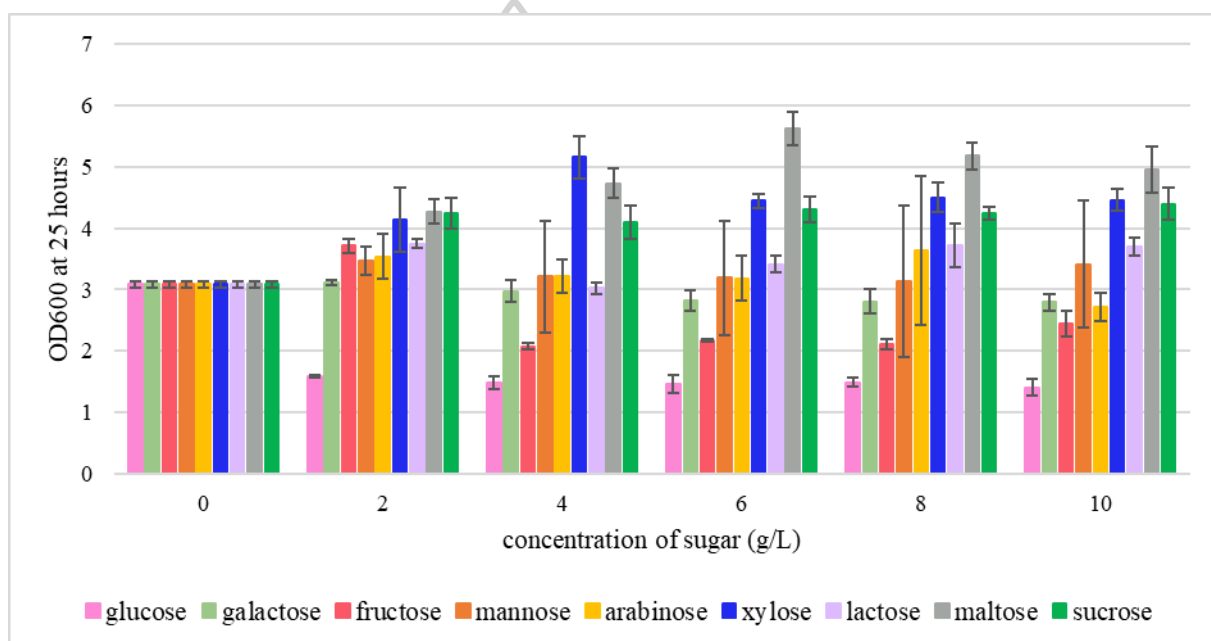
ภาพที่ 30 การเจริญเติบโตของเซลล์เซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ที่มี pET-11a plasmid ในอาหาร LB broth โดยไม่มีการเติมน้ำตาล (control)

4.4 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ที่มี pET-11a plasmid ในอาหาร LB broth

4.4.1 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ที่มี pET-11a ในอาหาร LB broth

หลังจากที่ศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ที่มี pET-11a plasmid ในอาหาร LB broth จากนั้นศึกษาความเข้มข้นต่าง ๆ ของน้ำตาลต่าง ๆ ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ที่มี pET-11a plasmid ในอาหาร LB broth โดยมีการเติมน้ำตาล กลูโคส กาแลคโตส ฟรุคโตส แมนโนส อะราบิโนส ซาโลส แลคโตส มอลโตส และซูโครส ที่ความเข้มข้น 0 (control), 0.5, 2, 4, 6, 8 และ 10 กรัมต่อลิตรและเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 25 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่เซลล์อยู่ใน stationary phase ที่แสดงในภาพ 31 พบว่าผลการเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ต่อความเข้มข้นต่าง ๆ ของน้ำตาลในอาหาร LB broth แบ่งเป็น 3 กลุ่มคือกลุ่มน้ำตาลที่ความเข้มข้นของน้ำตาลยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์คือเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลเพิ่มขึ้นส่งผลให้การเจริญเติบโตของเซลล์ลดลงได้แก่ น้ำตาลกลูโคส กาแลคโตส และฟรุคโตส เมื่อเพิ่มความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสถึง 2 กรัมต่อลิตรทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์ลดลง ส่วนน้ำตาลกาแลคโตส และฟรุคโตสเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลถึง 4 กรัมต่อลิตรทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์ลดลง กลุ่มที่สองคือกลุ่มที่ความเข้มข้นของน้ำตาลไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์เมื่อเพิ่มความเข้มข้น

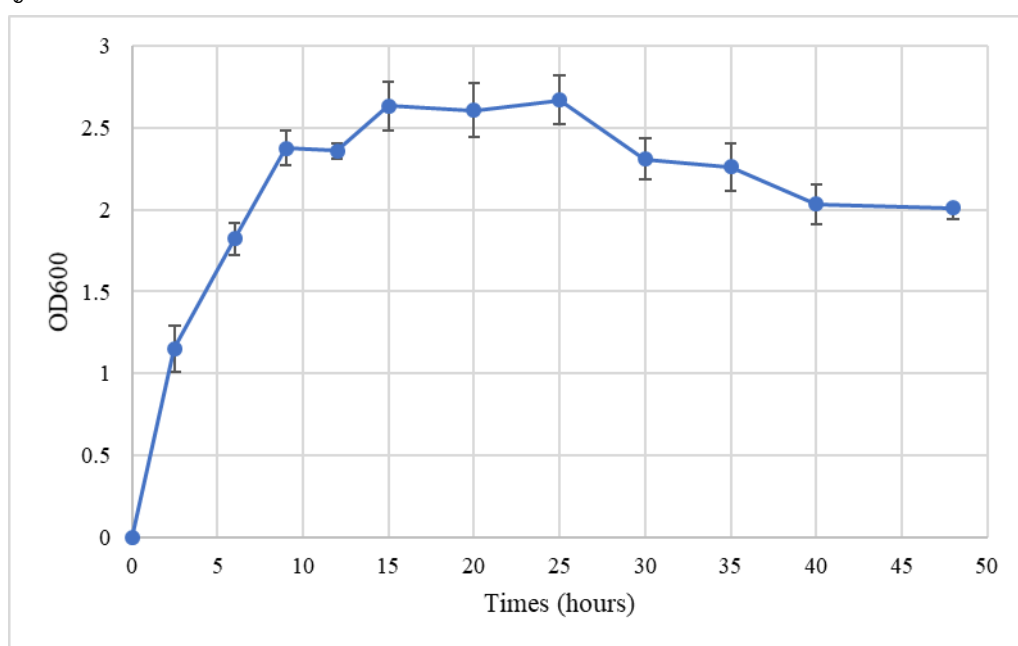
ของน้ำตาลการเจริญเติบโตของเซลล์ไม่เพิ่มขึ้นหรือมีการยับยั้งการเติบโตของเซลล์ได้แก่น้ำตาลแมนโนส และอะราบิโนส กลุ่มสุดท้ายคือกลุ่มที่ความเข้มข้นของน้ำตาลส่งผลให้การเจริญเติบโตของเซลล์เพิ่มขึ้นได้แก่น้ำตาลไซโลส แลคโตส มอลโตส และซูโครส โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลเหล่านี้ทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น จากการทดลองพบว่า การเจริญเติบโตของ *E. coli* BL2(DE3) ที่มี pET-11a ให้ค่า OD600 ลดลงเมื่อเทียบกับการเจริญเติบโตของ *E. coli* BL21(DE3) ดังภาพที่ 28 แต่ทิศทางการเจริญเติบโตของเซลล์ในน้ำตาลชนิดต่าง ๆ นั้นให้ผลไปในทิศทางเดียวกัน จึงสรุปได้ว่า pET-11a ไม่ได้ส่งผลกระทบต่อผลที่ได้จากการเติมน้ำตาลในอาหาร LB broth ซึ่งทำให้เซลล์เจริญเติบโตได้ในทางเดียวกัน



ภาพที่ 31 การเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ที่มี pET-11a plasmid ต่อความเข้มข้นของน้ำตาลต่าง ๆ ที่เวลา 25 ชั่วโมงในอาหาร LB broth

4.5 ผลการเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ที่มี GFP-pET-11a plasmid ในอาหาร LB broth

จากการศึกษาผลการเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ที่มี GFP-pET-11a plasmid ในอาหาร LB broth โดยเฉพาะเลี้ยงเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ที่มี pET-11a plasmid ไม่มีการเติมน้ำตาล ซึ่งติดตามการเจริญเติบโตของเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่แสดงในรูปที่ 32 พบว่าเริ่มต้นเซลล์เจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นจนกระทั่งชั่วโมงที่ 15 เซลล์เริ่มคงที่ และชั่วโมงที่ 30 เซลล์มีการเจริญเติบโตที่ลดลง (ภาพที่ 32.)

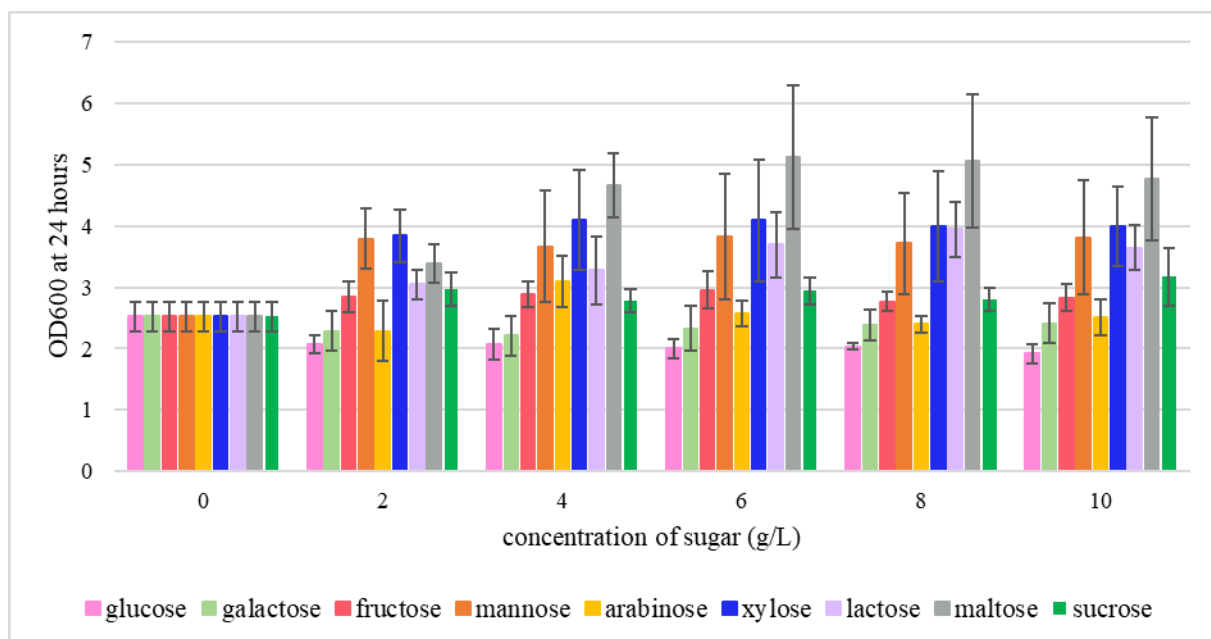


ภาพที่ 32 การเจริญเติบโตของเซลล์เซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ที่มี GFP-pET-11a plasmid ในอาหาร LB broth โดยไม่มีการเติมน้ำตาล (control)

4.6 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ที่มี GFP-pET-11a plasmid ในอาหาร LB broth

หลังจากที่ศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ที่มี GFP-pET-11a plasmid ในอาหาร LB broth จากนั้นศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ที่มี GFP-pET-11a plasmid ต่อความเข้มข้นต่าง ๆ ของน้ำตาลต่าง ๆ ในอาหาร LB broth โดยมีการเติมน้ำตาลกลูโคส กาแลคโตส ฟรุคโตส แมนโนส อะราบิโนส ซาโลส แลคโตส มอลโตส และซูโครส ที่ความเข้มข้น 0 (control), 0.5, 2, 4, 6, 8 และ 10 กรัมต่อลิตรและเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่เซลล์อยู่ใน stationary phase ที่แสดงในภาพ 33 พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้แก่น้ำตาลกลูโคส โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสถึง 2 กรัมต่อ

ลิตรทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์ลดลง ส่วนความเข้มข้นของน้ำตาลกาแลคโตสและอะราบิโนสไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์คือเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลแต่การเจริญเติบโตของเซลล์ไม่เพิ่มขึ้นหรือลดลงและความเข้มข้นของน้ำตาลที่เพิ่มการเจริญเติบโตของเซลล์ได้แก่ น้ำตาลฟรุคโตส แมนโนส ไซโลส แลคโตส มอลโตส และซูโครส เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลเหล่านี้จะทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับ การเจริญเติบโตของเซลล์ของ control



ภาพที่ 33 ผลการเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ที่มี GFP-pET-11a plasmid ต่อความเข้มข้นของน้ำตาลต่าง ๆ ที่เวลา 27 ชั่วโมงในอาหาร LB broth

จากการศึกษาผลการเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ที่มี pET-11a และ GFP-pET11a ต่อความเข้มข้นต่าง ๆ ของน้ำตาลกลูโคส กาแลคโตส ฟรุคโตส แมนโนส อะราบิโนส ไซโลส แลคโตส มอลโตส และซูโครส ในอาหาร LB broth พบว่าน้ำตาลส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ เป็น 3 กลุ่มคือกลุ่มน้ำตาลที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ กลุ่มน้ำตาลที่ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ และกลุ่มน้ำตาลที่เพิ่มการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยสรุปได้ดังตารางที่ 2 พบว่าการเติมน้ำตาลไซโลสและมอลโตส ลงในอาหาร LB broth ทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโตมากที่สุดในเซลล์ทุกชนิด

ตารางที่ 2 สรุปผลการเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ต่อความเข้มข้นต่าง ๆ น้ำตาลต่าง ๆ ในอาหาร LB broth

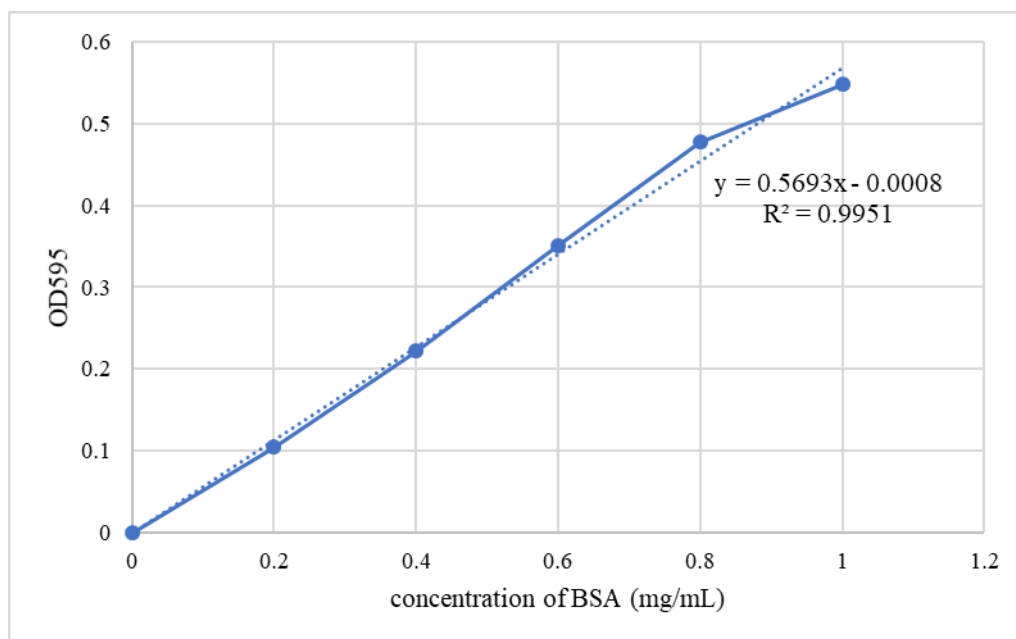
ชนิดของน้ำตาลที่เติม ลงในอาหาร LB broth	ผลการเจริญเติบโตของเซลล์		
	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>E. coli</i> BL21(DE3) + pET-11a	<i>E. coli</i> BL21(DE3) + GFP-pET-11a
กลูโคส	—	—	—
กาแลคโตส	—	—	0
ฟรุคโตส	—	—	+
แมนโนส	+	0	+
อะราบิโนส	—	0	0
ไซโลส	+	+	+
แลคโตส	0	+	+
มอลโตส	+	+	+
ซูโครส	0	+	+

หมายเหตุสัญลักษณ์ - คือความเข้มข้นของน้ำตาลยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ สัญลักษณ์ 0 คือความเข้มข้นน้ำตาลไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ สัญลักษณ์ + คือความเข้มข้นของน้ำตาลเพิ่มการเจริญเติบโตของเซลล์

4.7 การหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford

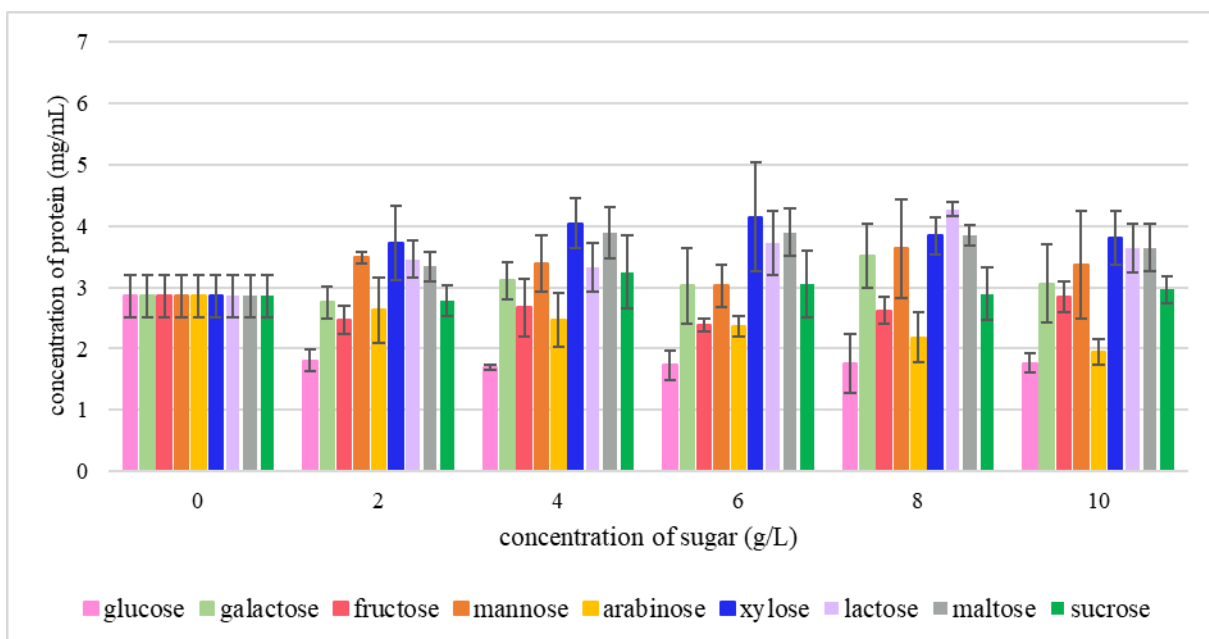
4.7.1 กราฟมาตรฐาน Bovine Serum Albumin (BSA)

ผลการศึกษามาตรฐาน BSA ที่ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี Bradford พบว่าความเข้มข้นของ BSA มากขึ้นทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตรมากขึ้นด้วย แสดงในภาพ 34 เมื่อนำสมการที่ได้จากการสร้างกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตรกับค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน BSA มาคำนวณจะได้ค่าความเข้มข้นของโปรตีน



ภาพที่ 34 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ของแบนโปรตีนกับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA ด้วยวิธี Bradford

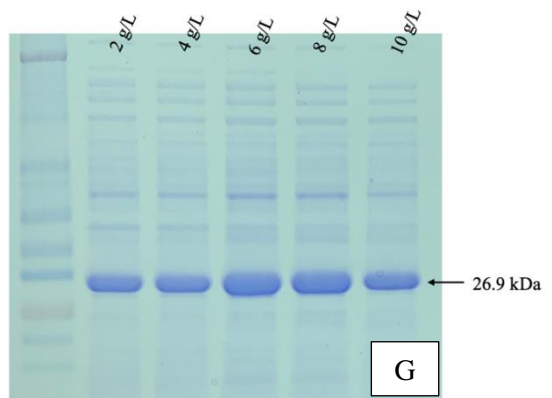
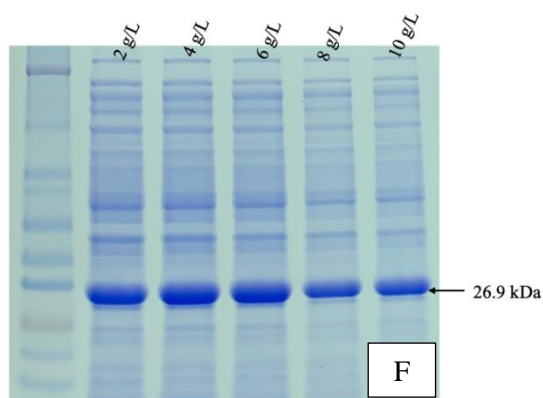
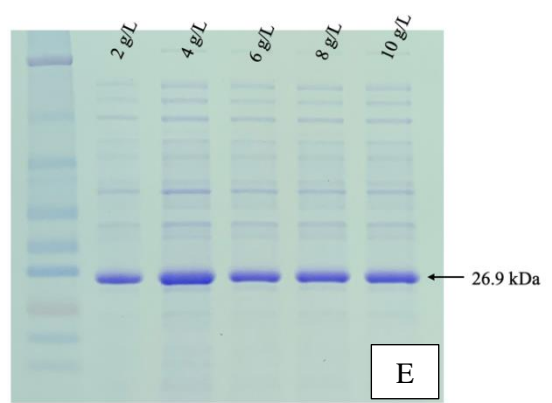
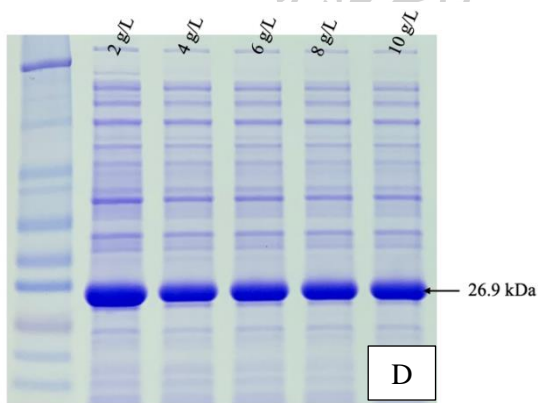
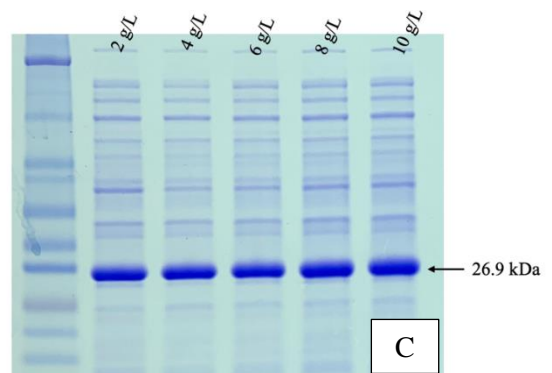
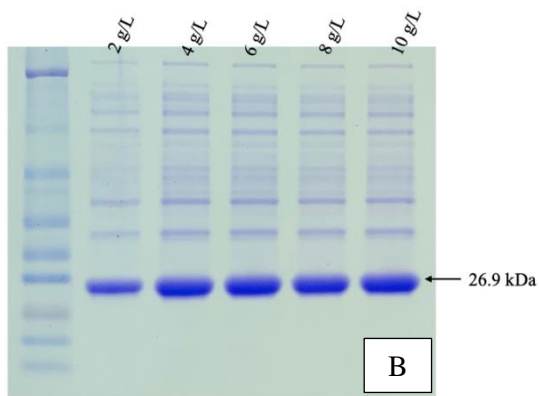
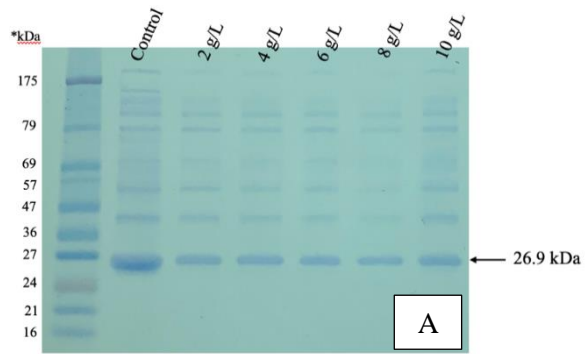
เมื่อนำสมการที่ได้จากการสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร และความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA มาคำนวณความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Bradford จากภาพที่ 35 เป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส กาแลคโตส ฟรุคโตส แมนโนส อะราบิโนส ไฮโลส แลคโตส มอลโตส และซูโครส ที่ความเข้มข้น 0 (control), 0.5, 2, 4, 6, 8 และ 10 กับความเข้มข้นของโปรตีน จะเห็นได้ว่าความเข้มข้นของโปรตีนที่มีการเติมน้ำตาลกลูโคสในการเพาะเลี้ยงเซลล์ให้ความเข้มข้นโปรตีนน้อยอยู่ที่ประมาณ 1.70-1.81 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเทียบกับตัวควบคุมโดยตัวควบคุมมีความเข้มข้นโปรตีนประมาณ 2.86 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเพิ่มขึ้นแต่ความเข้มข้นของโปรตีนก็ไม่ได้เพิ่มขึ้นด้วย และความเข้มข้นโปรตีนที่มีการเติมน้ำตาลฟรุคโตและอะราบิโนสในการเพาะเลี้ยงทำให้ความเข้มข้นโปรตีนลดน้อยลง โดยความเข้มข้นโปรตีนที่มีการเติมฟรุคโตสอยู่ที่ประมาณ 2.38-2.84 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนความเข้มข้นโปรตีนที่มีการเติมน้ำตาลอะราบิโนสอยู่ที่ประมาณ 1.95-2.63 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยความเข้มข้นโปรตีนจะลดลงเมื่อความเข้มข้นน้ำตาลอะราบิโนสเพิ่มขึ้น และน้ำตาลที่เพิ่มความเข้มข้นโปรตีนเมื่อเทียบกับตัวควบคุมได้แก่ น้ำตาลแมนโนส ไฮโลส แลคโตส และมอลโตสมีความเข้มข้นโปรตีนอยู่ที่ประมาณ 3.03-4.27 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสไม่มีผลต่อความเข้มข้นของโปรตีน

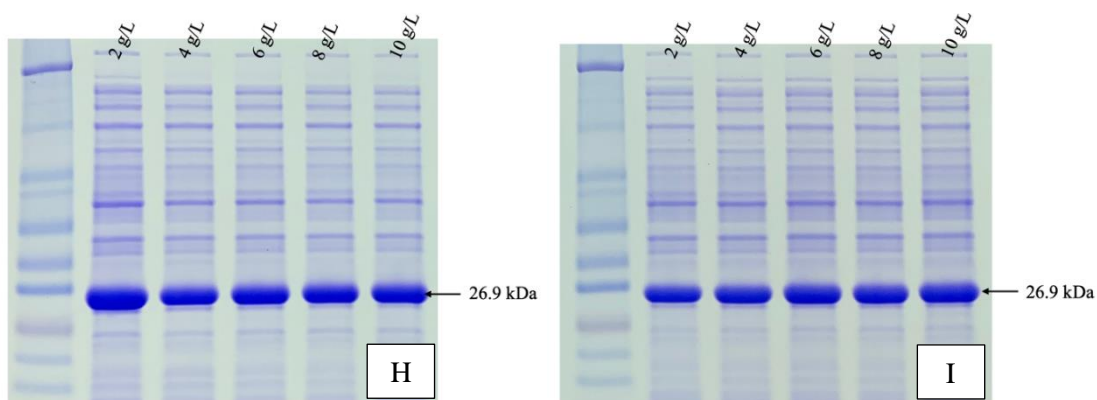


ภาพที่ 35 ผลความเข้มข้นโปรตีน GFP ต่อความเข้มข้นต่าง ๆ ของน้ำตาลต่าง ๆ ในอาหาร LB broth โดยวัดความเข้มข้นโปรตีนด้วยวิธี Bradford

4.8 ผลการวิเคราะห์ด้วย sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ของโปรตีน GFP-pET-11a plasmid

นำเซลล์ GFP-pET-11a plasmid ใน *E. coli* BL21(DE3) ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลต่าง ๆ มาแตกเซลล์ด้วย Ultrasonicater จากนั้นนำส่วนใสมารันเจล SDS-PAGE โดยแต่ละหลุมเจลโหลดโปรตีนความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรลงหลุม พบว่าแบนเจลขนาดใหญ่ที่สุดคือแบนของโปรตีน GFP เพราะมีขนาดโมเลกุล 26.9 kDa ซึ่งเทียบจาก protein marker เมื่อสังเกตความหนาของแบนที่ขนาดโมเลกุล 26.9 kDa จะพบว่าความหนาของแบนขึ้นกับความเข้มข้นของโปรตีน เมื่อโปรตีนมีความเข้มข้นมากจะส่งผลให้แบนมีความหนาเพิ่มขึ้น ดังภาพที่ 36 จะเห็นได้ว่าโปรตีนที่มีการเติม arabinose และ glucose ในการเพาะเลี้ยงส่งผลให้ความเข้มข้นโปรตีนน้อยเมื่อนำมารันเจลแบนของโปรตีนมีความหนาที่น้อย



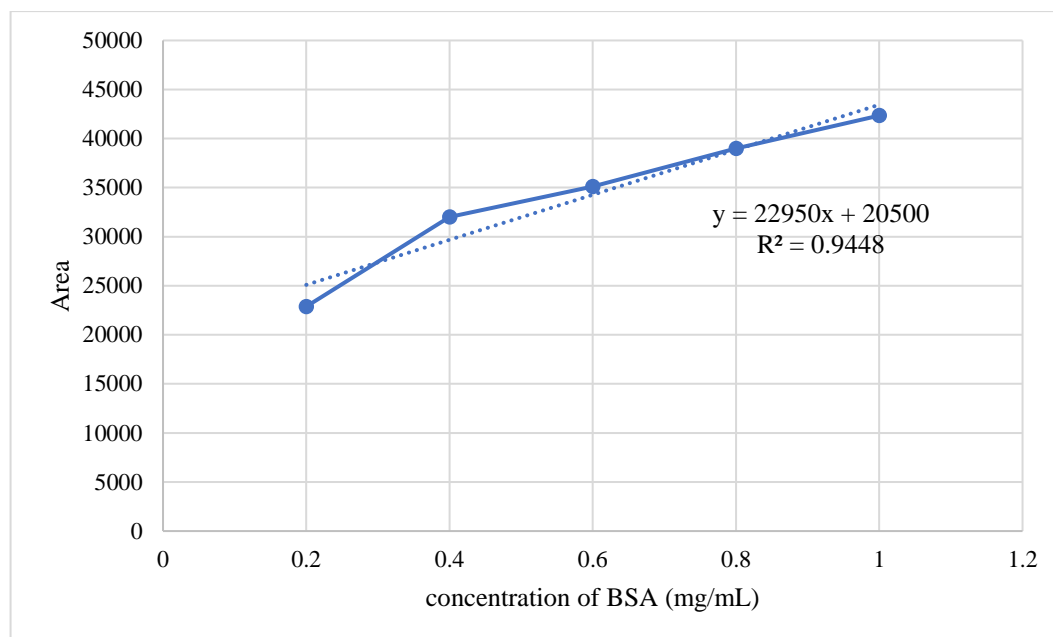


ภาพที่ 36 ผลเจล SDS-PAGE ของน้ำตาลกลูโคส (A), กาแลคโตส (B), ฟรุคโตส (C), แมนโนส (D), อะราบิโนส (E), ไซโลส (F), แลคโตส (G), มอลโต (H), ซูโครส (I) ที่ความเข้มข้น 2, 4, 6, 8, 10 กรัมต่อลิตรที่เวลา 24 ชั่วโมง

4.9 กราฟมาตรฐานของ BSA ด้วยวิธี ImageJ

จากการศึกษาสารมาตรฐาน BSA ที่ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรด้วยวิธี ImageJ โดยนำสารมาตรฐาน BSA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มารันเจล SDS-PAGE และนำผลเจลมาเข้าโปรแกรม ImageJ จะได้ค่าของพื้นที่ฟิคโปรตีน จากนั้นนำค่าพื้นที่ของฟิคโปรตีนกับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA มาสร้างกราฟดังภาพที่ 37

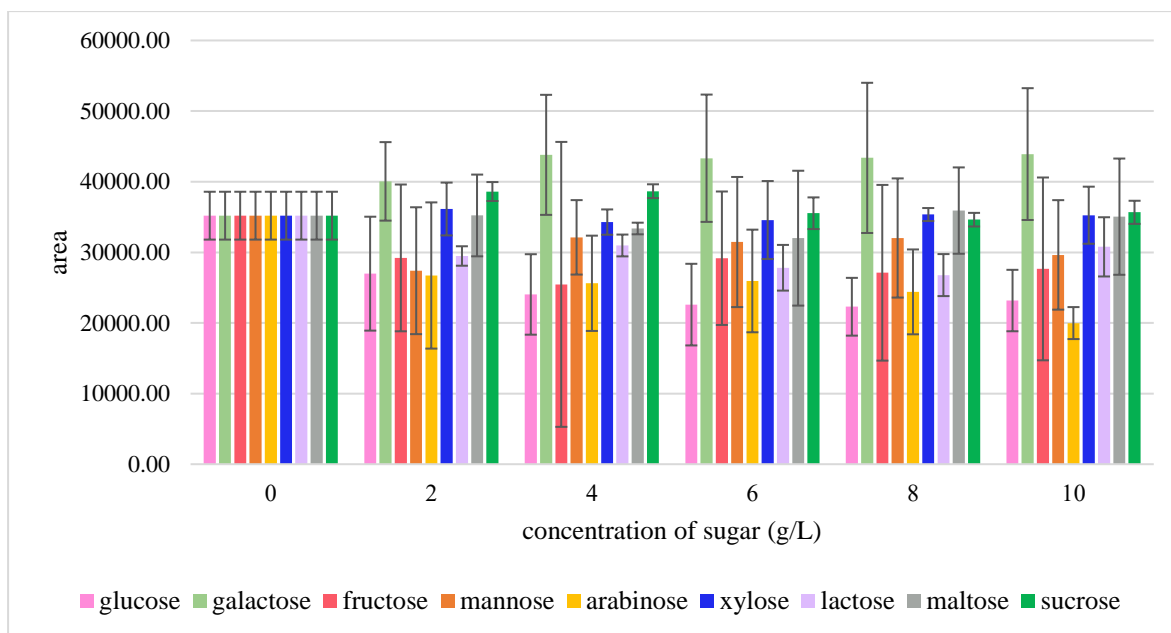




ภาพที่ 37 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ของแบนโปรตีนกับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BSA ด้วยซอฟต์แวร์ ImageJ

4.10 ผลการหาค่าพื้นที่ฟิคโปรตีนรีคอมบิแนนท์ด้วยซอฟต์แวร์ ImageJ

จากนั้นนำมาค่าความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส กาแลคโตส ฟรุคโตส แมนโนส อะราบิโนส ไฮโลส แลคโตส มอลโตส และซูโครส ที่ความเข้มข้น 0 (control), 0.5, 2, 4, 6, 8 และ 10 กับพื้นที่ของฟิคโปรตีน มาพลอตกราฟจะได้ดังภาพที่ 38 จะเห็นได้ว่าพื้นที่ฟิคของโปรตีนที่มีการเติมน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส แมนโนส อะราบิโนส และแลคโตส มีพื้นที่ฟิคน้อยของโปรตีนน้อยเมื่อเทียบกับพื้นที่ฟิคของโปรตีนที่ไม่มีการเติมน้ำตาล (control) มีพื้นที่ฟิคของโปรตีนอยู่ในช่วง 19981-32120 โดยพื้นที่ฟิคโปรตีนของ control มีค่าประมาณ 35190 ส่วนพื้นที่ฟิคโปรตีนที่มีการเติมน้ำตาลกาแลคโตส มีพื้นที่ฟิคโปรตีนมากเมื่อเทียบกับ control มีค่าประมาณ 29166-43911 และพื้นที่ฟิคโปรตีนที่มีการเติมน้ำตาลไฮโลส มอลโตส และซูโครส พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลไฮโลส มอลโตส และซูโครส ไม่มีผลต่อพื้นที่ฟิคโปรตีนโดยน้ำตาลเหล่านี้มีค่าพื้นที่ฟิคโปรตีนใกล้เคียงกับพื้นที่ฟิคของ control



ภาพที่ 38 ผลของพื้นที่ฟลักของโปรตีน GFP ต่อความเข้มข้นของน้ำตาลต่าง ๆ ในอาหาร LB broth โดยวัดพื้นที่ฟลักของโปรตีน GFP ด้วยวิธี ImageJ

จากผลการทดลองของน้ำตาลกลูโคส กาแลคโตส ฟรุคโตส แมนโนส อะราบิโนส ไซโลส แลคโตส มอลโตส และซูโครส ที่ความเข้มข้น 0 (control), 2, 4, 6, 8, 10 กรัมต่อลิตร ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ GFP-pET-11a *E. coli* BL21(DE3) ในอาหารเพาะเลี้ยง LB broth และความเข้มข้นของโปรตีน GFP ดังแสดงในตารางที่ 3 พบว่าการเจริญเติบโตของเซลล์แบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มคือ (1) กลุ่มที่ความเข้มข้นของน้ำตาลยับยั้งการเจริญเติบโตของ (2) กลุ่มที่ความเข้มข้นของน้ำตาลไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ (3) กลุ่มที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเพิ่มการเจริญเติบโตของเซลล์ ซึ่งเมื่อนำเซลล์มาวัดความเข้มข้นโปรตีนด้วยวิธี Bradford protein assay พบว่าเซลล์ที่มีการเจริญเติบโตสูงก็ให้ความเข้มข้นโปรตีนที่สูงด้วย ส่วนเซลล์ที่มีการเจริญเติบโตต่ำก็มีความเข้มข้นโปรตีนที่ต่ำด้วยเช่นกัน และเมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ImageJ เพื่อดูพื้นที่ฟลักของโปรตีนที่ต้องการพบว่าเซลล์ที่มีการเจริญเติบโตมากไม่ได้ส่งผลให้พื้นที่ฟลักโปรตีน GFP มากขึ้นด้วยโดยสรุปดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 สรุปผลความเข้มข้นต่าง ๆ ของน้ำตาลต่าง ๆ ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์และความเข้มข้นโปรตีน GFP-pET-11a ในอาหาร LB broth

Sugar	OD600	ความเข้มข้นโปรตีน ด้วย Bradford (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	พื้นที่ของแบนโปรตีน
Control	2.527	2.86	35190.61±3387.40
Glucose			
2	2.075	1.81	26977.67±8064.55
4	2.072	1.70	24036.67±5695.04
6	2.002	1.73	22596.68±5780.29
8	2.040	1.76	22295.82±4090.17
10	1.920	1.77	23173.10±4349.77
Galactose			
2	2.287	2.75	40046.67±5559.48
4	2.208	3.11	43803.84±8499.80
6	2.327	3.03	29166.20±9012.14
8	2.392	3.52	43373.96±10633.37
10	2.410	3.06	43911.97±9331.81
Fructose			
2	2.853	2.46	29211.15±10391.33
4	2.877	2.67	25463.18±20171.76
6	2.958	2.38	29166.20±9448.42
8	2.770	2.62	27104.11±12440.05
10	2.828	2.84	27653.57±12942.93
Mannose			
2	3.785	3.34	27398.49±8983.20
4	3.667	3.89	32120.52±5271.71
6	3.830	3.03	31458.55±9213.91
8	3.715	3.63	32030.85±8437.83
10	3.813	3.37	29634.57±7752.85

Arabinose			
2	3.090	2.63	26719.04±10351.66
4	2.795	2.47	25614.02±6746.59
6	2.573	2.36	25944.78±7265.31
8	2.397	2.18	24399.47±6007.90
10	2.507	1.95	19981.70±2265.75
Xylose			
2	3.838	3.73	36134.79±3738.00
4	4.098	4.04	34283.15±1793.28
6	4.092	4.15	34572.91±5521.45
8	3.993	3.84	35352.91±919.56
10	3.990	3.80	35253.71±4041.54
Lactose			
2	3.043	3.45	29481.36±1375.79
4	3.273	3.32	30971.79±1545.76
6	3.693	3.72	27816.92±3234.71
8	3.942	4.27	26776.87±2975.93
10	3.642	3.63	30775.70±4192.58
Maltose			
2	3.392	3.34	35221.17±5786.38
4	4.657	3.89	33374.19±823.76
6	5.115	3.89	32005.59±9547.78
8	5.050	3.84	35912.76±6112.91
10	4.762	3.64	35049.63±8229.90
Sucrose			
2	2.970	2.78	38608.93±1340.82
4	2.787	3.25	38655.52±976.75
6	2.945	3.04	35535.59±2241.64
8	2.800	2.89	34624.52±963.97
10	3.168	2.96	35666.87±1634.89

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการเติมน้ำตาลเพื่อผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ใน *E. coli* BL21(DE3) โดยมีการเติมน้ำตาลกลูโคส กาแลคโตส ฟรุคโตส แมนโนส อะราบิโนส ไซโลส แลคโตส มอลโตส และซูโครส เริ่มจากการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ต่อน้ำตาลต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นน้ำตาล 2 กรัมต่อลิตร และ 10 กรัมต่อลิตร ในอาหารเพาะเลี้ยง LB broth และ auto-induction media พบว่าผลการเจริญเติบโตของเซลล์ในอาหาร LB broth แบ่งเป็น 3 กลุ่มคือ (1) น้ำตาลที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ (2) น้ำตาลที่ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ (3) น้ำตาลที่เพิ่มการเจริญเติบโตของเซลล์ และผลการเจริญเติบโตของเซลล์ในอาหาร auto-induction media พบว่าเจริญเติบโตของเซลล์ในอาหาร auto-induction media แบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ (1) น้ำตาลที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ (2) น้ำตาลที่ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ จากนั้นศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ต่อกความเข้มข้นต่าง ๆ ของน้ำตาลต่าง ๆ ในอาหาร LB broth และ auto-induction media พบว่าผลการเจริญของเซลล์ในอาหาร LB broth แบ่งเป็น 3 กลุ่มคือ (1) น้ำตาลที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ (2) น้ำตาลที่ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ (3) น้ำตาลที่เพิ่มการเจริญเติบโตของเซลล์ ส่วนการเจริญเติบโตของเซลล์ในอาหาร auto-induction media พบว่าเจริญเติบโตของเซลล์ในอาหาร auto-induction media แบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ (1) น้ำตาลที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ (2) น้ำตาลที่ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ ซึ่งผลการเจริญเติบโตของเซลล์ในอาหาร auto-induction media ไม่มีน้ำตาลที่เพิ่มการเจริญเติบโตของเซลล์ ต่างจากในอาหาร LB broth ที่มีน้ำตาลที่เพิ่มการเจริญเติบโตของเซลล์คือน้ำตาลไซโลสและมอลโตส ดังนั้นจึงศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ในอาหาร LB broth

จากนั้นศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ที่มี pET-11a ต่อกความเข้มข้นต่าง ๆ ของน้ำตาลต่าง ๆ ในอาหาร LB broth พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสและมอลโตสยังคงเพิ่มการเจริญเติบโตของเซลล์และความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสก็ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ แสดงว่าการเพิ่มพลาสมิด pET-11a เข้าไปในเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ไม่ได้ส่งผลกระทบต่อ การเจริญเติบโตของเซลล์

จากนั้นศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ที่มี GFP-pET-11a ต่อความเข้มข้นต่าง ๆ ของน้ำตาลต่าง ๆ ในอาหาร LB broth พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสและมอลโตส ยังคงเพิ่มการเจริญเติบโตของเซลล์และความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสก็ยังมียับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ แสดงว่าการเพิ่มพลาสติก GFP-pET-11a เข้าไปในเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ไม่ได้ส่งผลกระทบต่อ การเจริญเติบโตของเซลล์

จากนั้นนำเซลล์มาหาความเข้มข้นโปรตีนด้วยวิธี Bradford protein assay พบว่าเซลล์ที่มีการเจริญเติบโตสูงเมื่อนำมาวัดความเข้มข้นโปรตีนก็มีค่าสูงเช่นกัน ส่วนเซลล์ที่มีการเจริญเติบโตต่ำก็มีค่าความเข้มข้นโปรตีนที่ต่ำด้วยเช่นกัน ซึ่งวิธี Bradford protein assay เป็นการหาความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดไม่สามารถบอกได้ว่าความเข้มข้นของโปรตีนที่เราต้องการมีค่าเท่าไร จึงนำสารละลายโปรตีนที่ได้จากการแตกเซลล์นำมาทดสอบด้วยวิธี Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) เพื่อตรวจสอบขนาดโมเลกุลของโปรตีนพบว่าโปรตีน GFP มีขนาดอยู่ที่ 26.9 kDa ซึ่งเซลล์ที่มีการเจริญเติบโตสูงเมื่อนำมารันเจลจะมีแบนเจลที่หนา ส่วนเซลล์ที่มีการเจริญเติบโตที่ต่ำจะมีแบนเจลที่บาง จากนั้นนำผลการทดสอบ SDS-PAGE ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ImageJ เพื่อศึกษาความเข้มข้นของโปรตีน GFP พบว่าเซลล์ที่มีการเจริญเติบโตสูงไม่ได้ส่งผลให้มีการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์สูงด้วย ดังนั้นน้ำตาลสามารถเพิ่มการเจริญเติบโตของเซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ได้ แต่ไม่ได้เพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนรีคอมบิแนนท์ ซึ่งต้องมีการศึกษาและพัฒนาต่อไปในอนาคต





รายการอ้างอิง

- Biocyclopedia. (2022). Metabolic Pathways in Microorganisms. Retrieved from https://biocyclopedia.com/index/biotechnology/microbial_biotechnology/features_of_biotechnological_importance_in_microorganisms/biotech_metabolic_paths_in_microorganisms.php
- carlroth. (2016). Autoinduction Media. Retrieved from <https://www.carlroth.com/medias/Info-Brochure-AutoinductionMedia-EN.pdf?context=bWFzdGVyfHRlY2huaWNhbERvY3VtZW50c3wxOTIzMjI8YXBwbGljYXRpb24vcGRmfHRlY2huaWNhbERvY3VtZW50cy9oMGMvaGM4Lzg5MzM1MDUzNjgwOTUucGRmfDI2NmNlNzAzMjZlNm00M2MwOGExZGVmN2UyYWY2YmU3Y2O3OTgwMjlkMjQ2ZmRiODQyOG04MDAwNTNhNjY5OGE>
- EL-Baky, N. A., Linjawi, M. H., & Redwan., E. M. (2015). Auto-induction expression of human consensus interferon-alpha in Escherichia coli. *BMC Biotechnology*, 15:14, 2-10. doi:10.1186/s12896-015-0128-x
- Encyclopedia, N. W. (2022). maltose. Retrieved from <https://www.newworldencyclopedia.org/entry/Maltose>
- ExpertsMind. (2020). Metabolism of galactose Assignment Help. Retrieved from <http://www.expertsmind.com/topic/glycolysis/metabolism-of-galactose-95879.aspx>
- Goodman, & R., S. (2021). Chapter 1 - Tools of the Cell Biologist. *Goodman's Medical Cell Biology (Fourth Edition)*, 1-24. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817927-7.00001-6>
- Hatti-Kaul, R., Chen, L., Dishisha, T., & Enshasy, H. E. (2018). Lactic acid bacteria: from starter cultures to producers of chemicals. *FEMS Microbiology Letters*, 365, No.20. doi:10.1093/femsle/fny213
- Hideo Kawaguchi., M. S., Alain A. Vert`es., Masayuki Inui., and Hideaki Yukawa. (2009). Identification and Functional Analysis of the Gene Cluster for L-Arabinose Utilization in *Corynebacterium glutamicum*. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 75, 3419-3429. doi:10.1128/AEM.02912-08

- Holden, H. M., Rayment, I., & Thoden, J. B. (2003). Structure and Function of Enzymes of the Leloir Pathway for Galactose Metabolism. *BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 278, 43885–43888. doi:10.1074/jbc.R300025200
- Kroemer, T. How Does IPTG Induction Work. Retrieved from https://www.goldbio.com/articles/article/how-does-iptg-induction-work#_Toc56514552
- Li, Z., Kessler, W., Heuvel, J. v. d., & Rinas, U. (2011). Simple defined autoinduction medium for high-level recombinant protein production using T7-based Escherichia coli expression systems. *Appl Microbiol Biotechnol*, 91, 1203–1213. doi: 10.1007/s00253-011-3407-z
- Liu, N., Santala, S., & Stephanopoulos, G. (2020). Mixed carbon substrates: a necessary nuisance or a missed opportunity. *Biotechnology*, 62, 15-21. doi:10.1016/j.copbio.2019.07.003
- Madhu. (2020). Difference Between Glucose Galactose and Mannose. Retrieved from <https://www.differencebetween.com/difference-between-glucose-galactose-and-mannose/>
- MERCK. (2022a). arabinose. Retrieved from <https://www.sigmaaldrich.com/TH/en/search/arabinose?focus=products&page=1&perpage=30&sort=relevance&term=arabinose&type=product>
- MERCK. (2022b). fructose. Retrieved from <https://www.sigmaaldrich.com/TH/en/search/fructose?focus=products&page=1&perpage=30&sort=relevance&term=fructose&type=product>
- MERCK. (2022c). glucose. Retrieved from https://www.sigmaaldrich.com/TH/en/search/glucose?focus=products&gclid=CjwKCAjw7leUBhBbEiwADhiEMRRk8a62OeZ4vEWFqAIJ4mqMPGHil-gz0N6wE_qME-mhUbFQr5dOJhoC4fUQAvD_BwE&page=1&perpage=30&sort=relevance&term=glucose&type=product_name
- MERCK. (2022d). lactose. Retrieved from <https://www.sigmaaldrich.com/TH/en/search/lactose?focus=products&page=1&perpage=30&sort=relevance&term=lactose&type=product>

- MERCK. (2022e). maltose. Retrieved from <https://www.sigmaaldrich.com/TH/en/search/maltose?focus=products&page=1&perpage=30&sort=relevance&term=maltose&type=product>
- MERCK. (2022f). mannose. Retrieved from <https://www.sigmaaldrich.com/TH/en/search/mannose?focus=products&page=1&perpage=30&sort=relevance&term=mannose&type=product>
- MERCK. (2022g). sucrose. Retrieved from <https://www.sigmaaldrich.com/TH/en/product/sigma/s0389?context=product>
- MERCK. (2022h). xylose. Retrieved from <https://www.sigmaaldrich.com/TH/en/search/xylose?focus=products&page=1&perpage=30&sort=relevance&term=xylose&type=product>
- Novagen. (2003). pET System Manual. In. Retrieved from <https://lifewp.bgu.ac.il/wp/zarivach/wp-content/uploads/2017/11/Novagen-pET-system-manual-1.pdf>
- Online, B. (2021). Maltose. Retrieved from <https://www.biologyonline.com/dictionary/maltose>
- Online, B. (2021). Sucrose. Retrieved from <https://www.biologyonline.com/dictionary/sucrose>
- proteintech. GFP (green fluorescent protein): Properties, origin, specifications, tips. Retrieved from <https://www.ptglab.com/news/blog/gfp-green-fluorescent-protein-properties-origin-specifications-tips/>
- scientific, T. F. (2022). Competent Cell Essentials—10 Molecular Cloning Strategies. Retrieved from <https://www.thermofisher.com/th/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/molecular-cloning/transformation/competent-cell-selection-applications.html>
- Sturm, N. (2020). The Glycolysis Pathway. Retrieved from http://www2.csudh.edu/nsturm/CHE452/01_Glycolysis.htm
- Sundar, M. S. L., & Nampoothiri, K. M. (2022). An overview of the metabolically engineered strains and innovative processes used for the value addition of

- biomass derived xylose to xylitol and xylonic acid. *Bioresource Technology*, 345, 126548. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126548>
- Timothy J, W., Michelle A. Allena., Yan Liaoa., Mark J. Rafteryb., Ricardo Cavicchiolia. (2019). Sucrose Metabolism in Haloarchaea: Reassessment Using Genomics, Proteomics, and Metagenomics. *ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 85(Issue 6 e02935-18). doi:10.1128/AEM.02935-18
- tinnakorn. (2022). การใช้น้ำตาลฟรุกโตส Retrieved from <https://www.tinnakorn.com/articles/fructose-benefit-application/>
- vectorBuilder. (2022). pET Bacterial Recombinant Protein Vector. Retrieved from <https://en.vectorbuilder.com/resources/vector-system/pET16b.html>
- Wang, X., Xia, K., Yang, X., & Tang, C. (2019). Growth strategy of microbes on mixed carbon sources. *NATURE COMMUNICATIONS*, 10:1279. doi:10.1038/s41467-019-09261-3
- Zhao, Z., Xian, M., Liu, M., & Zhao, G. (2020). Biochemical routes for uptake and conversion of xylose by microorganisms. *Biotechnology for Biofuels*, 2-10. doi:10.1186/s13068-020-1662-x
- นายกร. (2016). คาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate). Retrieved from http://blogcarbohydrate.blogspot.com/2016/09/blog-post_9.html





ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาวสุนงกช เหมือนวงศ์ธรรม
วัน เดือน ปี เกิด	30 พฤษภาคม 2540
สถานที่เกิด	จังหวัดพิจิตร
วุฒิการศึกษา	ระดับการศึกษาตอนปลายโรงเรียนเขาทรายทับคล้อพิทยา ระดับการศึกษาปริญญาตรีมหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ที่อยู่ปัจจุบัน	58 ม.5 ต.ท้ายทุ่ง อ.ทับคล้อ จ.พิจิตร 66150
ผลงานตีพิมพ์	Effect of supplemented sugar in lysogeny broth medium on growth of Escherichia coli BL21(DE3) and recombinant protein production

