



โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การวิเคราะห์ความทนต่อ 1-บิวทานอลของบาซิลลัส ซับทิลิส ที่ได้รับการดัดแปลงทางพันธุกรรม รวมทั้งฟอสโฟลิปิดและกลีเซอโรลิปิดที่เกี่ยวข้อง
Tolerance Analyses of Genetically-engineered Bacillus subtilis to 1-Butanol and the Related Phospholipids and Glycerolipids

ชื่อนิสิต นางสาวเพ็ญสุพัต ทองคโชค

ภาควิชา เคมี

ปีการศึกษา 2558

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การวิเคราะห์ความทนต่อ 1-บิวทานอลของบาซิลลัส ซับทิลิส ที่ได้รับการดัดแปลงทางพันธุกรรม
รวมทั้งฟอสโฟลิปิดและกลีเซอโรลิปิดที่เกี่ยวข้อง

Tolerance Analyses of Genetically-engineered *Bacillus subtilis* to 1-Butanol and the Related
Phospholipids and Glycerolipids

โดย

นางสาวเพ็ญสุพัต ทองคโชค

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2558

เรื่อง การวิเคราะห์ความทนต่อ 1-บิวทานอลของบาซิลัส ซับทิลิส ที่ได้รับการดัดแปลงทางพันธุกรรมรวมทั้ง
ฟอสโฟลิปิดและกลีเซอโรลิปิดที่เกี่ยวข้อง

โดย นางสาวเพ็ญสุพัต ทองคโชค

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิตภาควิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ



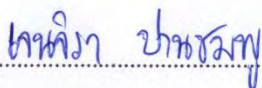
..... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชนิษฐา พุดหอม)



..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(อาจารย์ ดร. นวพร วินยเวคิน)



..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร. เจนจิรา ปานชมพู)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. วุฒิชัย พาราสุข)

หัวหน้าภาควิชาเคมี

วันที่ เดือน พ.ศ.

คุณภาพของการเขียนรายงานเล่มนี้อยู่ในระดับ ดีมาก ดี พอใช้

ชื่อโครงการ การวิเคราะห์ความทนต่อ 1-บิวทานอลของบาซิลลัส ซับทิลิส ที่ได้รับการดัดแปลงทางพันธุกรรมรวมทั้งฟอสโฟลิปิดและกลีเซอโรลิปิดที่เกี่ยวข้อง

ชื่อนิติในโครงการ นางสาวเพ็ญสุพัต ทองคโโชค เลขประจำตัว 553 31331 23

ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ ดร.นภาพร วินยเวคิน

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2558

บทคัดย่อ

บิวทานอลมีข้อได้เปรียบกว่าไบโอเอทานอลหลายประการ จึงถือว่าเป็นพลังงานทางเลือกแห่งอนาคต อย่างไรก็ตามเนื่องจากความเปราะบางของบิวทานอลไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมักบิวทานอล ทำให้ความเข้มข้นที่ผลิตได้มีค่าต่ำ งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาและเปรียบเทียบความทนต่อ 1-butanol ของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ต่างๆ ที่ได้รับการดัดแปลงทางพันธุกรรมเพื่อหยุดหรือเพิ่มการแสดงออกในยีนที่สนใจ โดยทดสอบความทนต่อ 1-butanol ที่ความเข้มข้น 1% (v/v) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Spizizen's minimal media และวัดค่า OD₆₀₀ เพื่อดูการเจริญเติบโตของ *B. subtilis* สายพันธุ์ต่างๆ เทียบกับ *B. subtilis* สายพันธุ์ 168 (wild type) และใช้น้ำเป็นตัวควบคุม พบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ LM31 และ PU31 ซึ่งมีการกลายพันธุ์ของยีน *yfnI/mprF* และ *pssA/ugtP* ตามลำดับ มีความทนต่อ 1-butanol ดีกว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ 168 สำหรับ *B. subtilis* สายพันธุ์ OPS, OUG, OPG, OPU และ LMOPU ซึ่งมีการเพิ่มการแสดงออกของยีน *pssA*, *ugtP*, *pgsA*, *pssA/ugtP* ในสายพันธุ์ 168 และ *pssA/ugtP* ใน LM31 ตามลำดับ และ *B. subtilis* สายพันธุ์ LPG31, UGT31, LTA31 ซึ่งมีการกลายพันธุ์ของยีน *mprF*, *ugtP*, *yfnI* ตามลำดับ มีความทนต่อ 1-butanol ใกล้เคียงกับ *B. subtilis* สายพันธุ์ 168 ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยยังได้ทำการสกัดไขมันจากเซลล์ *B. subtilis* เพื่อวิเคราะห์ระดับฟอสโฟลิปิดและกลีเซอโรลิปิดที่เกี่ยวข้องในสายพันธุ์ต่างๆ ด้วยเทคนิค liquid chromatography – mass spectrometry (LC-MS) ในลำดับถัดไปด้วย

คำสำคัญ : บาซิลลัส ซับทิลิส, ความทนต่อ 1-บิวทานอล

Title Tolerance Analyses of Genetically-engineered *Bacillus subtilis* to
1- Butanol and the Related Phospholipids and Glycerolipids

Student name Miss Pensuphat Thongkachok ID 5533133123

Advisorname Dr. Nawaporn Vinayavekhin

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic year 2015

Abstract

With its many advantages over bio-ethanol, butanol is considered as a future alternative energy. However, currently butanol concentration produced by fermentation using microorganism is still quite low, which is due partly to the toxicity of butanol that inhibits growth of microorganism. This research was aimed to study 1-butanol tolerance of genetically-engineered *Bacillus subtilis* in comparison to that of wild type *B. subtilis* strain 168. The growth of various *B. subtilis* in Spizizen's minimal media (SMM) with and without 1% (v/v) 1-butanol was measured by monitoring the optical density at 600 nm of each culture (OD_{600}) over 12 h. It was found that *B. subtilis* strains LM31 and PU31, which have mutations in *yfnI/mprF* and *pssA/ugtP* genes, respectively, can tolerate 1-butanol better than *B. subtilis* strain 168. However, the tolerance to 1-butanol of *B. subtilis* strains OPS, OUG, OPG, OPU and LMOPU, which have overexpression in *pssA*, *ugtP*, *pgsA*, *pssA/ugtP* genes in 168 background and *pssA/ugtP* genes in LM31 background, and LPG31, UGT31 and LTA31 which have mutations in *mprF*, *ugtP* and *yfnI* genes, respectively, was similar to that of *B. subtilis* strain 168. In this study, lipids were also extracted from various strains of *B. subtilis* cells both with and without 1-butanol treatment, ready for quantitative analysis of phospholipids and glycerolipids by liquid chromatography – mass spectrometry (LC–MS) in the near future.

Keywords: *Bacillus subtilis*, 1-Butanol tolerance

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องการวิเคราะห์ความทนต่อ 1-บิวทานอลของบาซิลลัส ซับทีลิส ที่ได้รับการดัดแปลงทางพันธุกรรม รวมทั้งฟอสโฟลิปิดและกลีเซอโรลิปิดที่เกี่ยวข้อง สำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดี จึงขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร.นวพร วินยเวคิน อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำตลอดการทำวิจัย อีกทั้งสละเวลาในการให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ และขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ขนิษฐา พุดหอม และอาจารย์ ดร. เจนจิรา ปานชมพู ที่กรุณาสละเวลาในการตรวจทานเล่มรายงานและให้เกียรติเป็นประธานและกรรมการในโครงการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. อลิสา วังใน และพี่ๆ ในห้องปฏิบัติการ ตลอดจนภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาเอื้อเฟื้อเครื่องมือในการทำงานวิจัย และได้ให้ความรู้ที่มีประโยชน์อย่างยิ่งต่อผู้ทำวิจัย รวมทั้งให้การสนับสนุนในด้านต่างๆ ในการทำงานวิจัยนี้ให้ประสบความสำเร็จเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ปีการศึกษา 2558 ที่ให้ทุนสนับสนุนการทำวิจัย

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณกำลังใจและความช่วยเหลือจากครอบครัวรวมทั้งเพื่อนๆ ในภาควิชาเคมี ผู้วิจัยขอระลึกในความกรุณาของทุกท่านที่ได้กล่าวมาข้างต้น และบุคคลที่ไม่ได้เอ่ยนามไว้ ณ ที่นี้

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
1. ที่มาและความสำคัญ	1
2. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
2.1. เมทาโบไลต์ที่พบใน <i>B. subtilis</i>	2
2.2. การสังเคราะห์ไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ใน <i>B. subtilis</i>	3
2.3. กลไกการตอบสนองของ <i>B. subtilis</i> ต่อตัวทำลายอินทรีย์	6
2.4. <i>Bacillus subtilis</i>	7
2.5. การเปลี่ยนแปลงเมทาโบไลต์ของ <i>B. subtilis</i> เมื่อได้รับ 1-butanol	8
3. วัตถุประสงค์ของโครงการ	8
4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	8
บทที่ 2 วิธีการทดลอง	9
1. วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	9
2. สายพันธุ์แบคทีเรีย อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี	10
3. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	12
4. ขั้นตอนการทดลอง	13
บทที่ 3 ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง	18
1. การดัดแปลงหรือเพิ่มปริมาณทางพันธุกรรมของ <i>B. subtilis</i>	18
2. การตรวจสอบ <i>B. subtilis</i> ที่ได้รับการดัดแปลงทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)	19
3. การทดสอบความทนต่อ 1-butanol	22
4. การวิเคราะห์ไขมันประเภทฟอสโฟลิปิดและกลีเซอโรลิปิดจาก <i>B. subtilis</i>	30

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

ภาคผนวก

ประวัติผู้ทำการวิจัย

หน้า

31

33

37

39



ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1.1 โครงสร้างของสารเมทาโบไลต์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์ไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ใน <i>B. subtilis</i>	4
2.1 ชื่อสายพันธุ์ของ <i>B. subtilis</i> และยีนที่เกี่ยวข้อง	16
3.1 ค่า OD ₆₀₀ ของ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ป่า และ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ LPG31, UGT31 และ LTA31 เปรียบเทียบระหว่างการเติม 1-butanol ความเข้มข้น 1% (v/v) และตัวควบคุม	25
3.2 ค่า OD ₆₀₀ ของ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ป่า และ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ PU31 และ LM31 เปรียบเทียบระหว่างการเติม 1-butanol ความเข้มข้น 1% (v/v) และตัวควบคุม	26
3.3 ค่า OD ₆₀₀ ของ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ป่า และ <i>B. subtilis</i> ที่ได้รับการเพิ่มปริมาณยีนที่สนใจ ได้แก่ OPS, OUG, OPG, OPU และ LMOPU เปรียบเทียบระหว่างการเติม 1-butanol ความเข้มข้น 1% (v/v) และตัวควบคุม	29

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1.1 กระบวนการสังเคราะห์ไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ใน <i>B. subtilis</i>	4
1.2 การปรับเปลี่ยน fatty acid ที่เยื่อหุ้มเซลล์เมื่อได้รับตัวทำลายอินทรีย์	6
1.3 <i>Bacillus subtilis</i> จาก Scanning Electron Microscope (SEM)	7
3.1 ภาพถ่าย agarose gel <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ LPG31 แสดงแถบ DNA ของยีน <i>mprF</i> (lane 1) โดยมีดีเอ็นเอมาตรฐาน (M) คือ 1 Kb plus DNA ladder	20
3.2 ภาพถ่าย agarose gel <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ UGT31 แสดงแถบดีเอ็นเอของยีน <i>ugtP</i> (lane 1) และแถบ genomic DNA ของ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ 168 (lane 2) โดยมีดีเอ็นเอมาตรฐาน (M) คือ 1 Kb plus DNA ladder	21
3.4 การเจริญเติบโตของ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ป่า และ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ LPG31, UGT31 และ LTA31 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Spizizen's minimal media ที่เติม 1-butanol ความเข้มข้น 1% (v/v) เปรียบเทียบกับตัวควบคุม	23
3.5 การเจริญเติบโตของ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ป่า และ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ PU31 และ LM31 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Spizizen's minimal media ที่เติม 1-butanol ความเข้มข้น 1% (v/v) เปรียบเทียบกับตัวควบคุม	24
3.6 การเจริญเติบโตของ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ป่า และ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ OPS, OUG, OPG, OPU และ LMOPU ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Spizizen's minimal media ที่เติม 1-butanol ความเข้มข้น 1% (v/v) เปรียบเทียบกับตัวควบคุม	28

บทที่ 1

บทนำ

1.) ที่มาและความสำคัญ

เนื่องจากทรัพยากรธรรมชาติที่ลดลงเรื่อยๆ ปัจจุบันพลังงานทางเลือก เช่น ไบโเอทานอล จึงได้รับความนิยมอย่างกว้างขวาง บิวทานอลเป็นพลังงานทางเลือกแห่งอนาคตที่มีข้อได้เปรียบกว่า ไบโเอทานอลตรงที่มีค่าออกเทนใกล้เคียงน้ำมันทำให้ผสมกับน้ำมันได้ดีกว่า มีค่าพลังงานและจุดเดือดที่สูงกว่า ไม่มีการกักตุนและสามารถรวมกับตัวทำละลายอินทรีย์ได้เกือบทั้งหมดอย่างสมบูรณ์ [1] นอกจากนี้ บิวทานอลยังใช้เป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรมต่างๆ และใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตสี, พอลิเมอร์และพลาสติกอีกด้วย [2]

บิวทานอลเป็นผลผลิตที่ได้จากกระบวนการหมักของแบคทีเรีย ซึ่งโดยทั่วไปใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ *Clostridium acetobutylicum* ผ่านกระบวนการ ABE fermentation [3] ซึ่งจะได้ผลผลิต คือ อะซิโตน เอทานอล และบิวทานอล ซึ่งบิวทานอลที่ได้ยังมีความเข้มข้นที่ต่ำ เนื่องจากความเป็นพิษของ บิวทานอลนั้นจะไปยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย [4] จากงานวิจัยพบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ GRSW2-B1 ที่คัดแยกได้จากน้ำทะเลในประเทศไทยสามารถทนต่อบิวทานอลที่มีความเข้มข้นสูง [5] เชื้อ *B. subtilis* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกสามารถสร้างสปอร์ได้ ซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีความทนต่อสภาวะแวดล้อมต่างๆ เช่น ความร้อน ความเป็นกรดได้ดี ทนต่อความแห้งแล้ง และสารเคมี [6] ผู้วิจัยจึงสนใจนำ *B. subtilis* มาใช้ในการวิจัย

งานวิจัยที่ผ่านมาได้ศึกษาการตอบสนองต่อ 1-butanol ของเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ 168 ซึ่งเป็นสายพันธุ์มาตรฐานที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป [7] โดยได้วิเคราะห์สารประเภทไขมันในเซลล์ของ *B. subtilis* เมื่อใส่ 1-butanol เทียบกับเมื่อไม่ใส่ 1-butanol (กลุ่มควบคุม) ผลการทดลองพบว่าการเปลี่ยนแปลงของระดับ Phospholipids และ Glycerolipids ซึ่งเป็นองค์ประกอบของไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ โดย Phosphatidylethanolamine, Diglucosyl diacylglycerol และ Phosphatidylserine มีปริมาณที่เพิ่มขึ้นเมื่อใส่ 1-butanol ในทางตรงกันข้าม Diacylglycerol และ Lysyl Phosphatidylglycerol มีปริมาณที่ลดลง (รูปที่ 1.1) งานวิจัยลำดับต่อมาจึงได้ทำการดัดแปลง

พันธุกรรมของ *B. subtilis* เพื่อเปลี่ยนแปลงระดับของ Phospholipids และ Glycerolipids ดังกล่าว แต่ยังไม่ได้ทำการตรวจสอบว่าแบคทีเรียที่ถูกดัดแปลงโครงสร้างทางพันธุกรรมนี้มีความทนต่อบิวทานอล ได้มากน้อยเพียงใด และ *B. subtilis* ที่ถูกดัดแปลงพันธุกรรมเหล่านี้มีระดับของ Phospholipids และ Glycerolipids ตามที่ตั้งสมมติฐานไว้หรือไม่

งานวิจัยนี้จึงเป็นการต่อยอดและใช้ข้อมูลจากงานวิจัยในห้องปฏิบัติการเดิม คือ ทำการวัดระดับ Phospholipids และ Glycerolipids ใน *B. subtilis* ที่ถูกดัดแปลงทางพันธุกรรม โดยการสกัดไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ของ *B. subtilis* ก่อนจะนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค liquid chromatography – mass spectrometry (LC–MS) และทดสอบความทนต่อ 1-butanol โดยวัดค่าการเจริญของแบคทีเรีย ดังกล่าวในอาหารเลี้ยงเชื้อ Spizizen’s minimal media (SMM) แบบธรรมดาเปรียบเทียบกับแบบที่ใส่ 1-butanol เพื่อนำมาวิเคราะห์ความทนต่อ 1-บิวทานอลของ *B. subtilis* สายพันธุ์ต่างๆ ที่ได้รับการดัดแปลงทางพันธุกรรมและโมเลกุลขนาดเล็กที่เกี่ยวข้องต่อไป

2.) งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1) เมทาโบไลต์ที่พบใน *B. subtilis*

สารเมทาโบไลต์ปฐมภูมิ (Primary metabolite) เป็นสารที่มีความจำเป็นต่อการเจริญของแบคทีเรีย เช่น โปรตีน กรดอะมิโน กรดนิวคลีอิก ลิพิด และคาร์โบไฮเดรต [27] ส่วนสารเมทาโบไลต์ทุติยภูมิ (Secondary metabolites) เป็นสารที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของสารตัวกลางหรือผลผลิตที่ได้จากกระบวนการผลิตสารเมทาโบไลต์ปฐมภูมิ หน้าที่ของสารเมทาโบไลต์ทุติยภูมิจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย เช่น ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บางชนิด เป็นสารช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต เป็นสารสื่อโมเลกุล และเป็นสารนำส่งโลหะที่จำเป็นเข้าเซลล์ เป็นต้น [26]

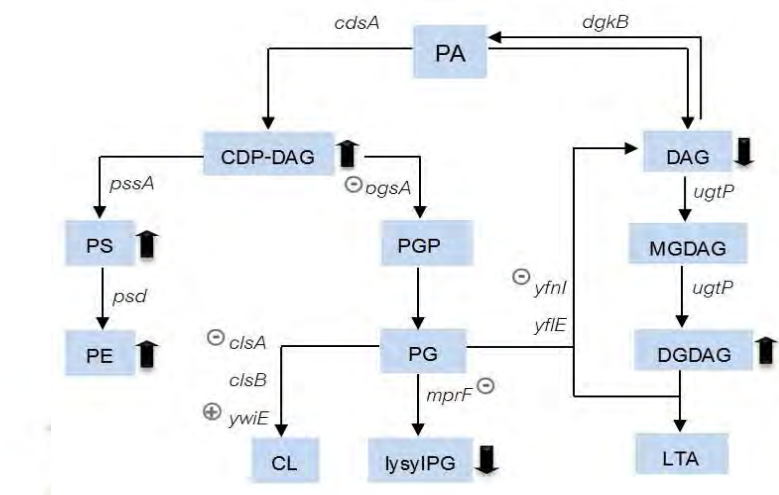
สำหรับเชื้อ *B. subtilis* สารเมทาโบไลต์ปฐมภูมิ เช่น กลุ่มกรดไขมัน และ phospholipids มีหน้าที่เป็นสารที่เกี่ยวข้องกับการเก็บพลังงานของเซลล์ เป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ และเป็นสารสื่อโมเลกุล ส่วนสารเมทาโบไลต์ทุติยภูมิ เช่น สารพวก surfactin ซึ่งเป็นสารในกลุ่มไลโปเปปไทด์ ใช้เป็นสารลดแรงตึงผิว [8] iturin มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* [9] และ fengycin มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อรา [10] เป็นต้น

2.2) การสังเคราะห์ไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ใน *B. subtilis*

เยื่อหุ้มเซลล์เป็นโครงสร้างที่เกิดจากการเรียงตัวกันของไขมันกับโปรตีน เรียกว่า phospholipid bilayer ไขมันที่เป็นองค์ประกอบมีสมบัติเป็น amphiphatic lipid ประกอบด้วย ส่วนที่ไม่ละลายน้ำ (hydrophobic) และส่วนที่ละลายน้ำ (hydrophilic) ส่วนของไขมันและโปรตีนมีการเลื่อนไหลไปมาได้ (fluidity) หน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ คือ 1) ควบคุมการซึมผ่านเข้าออกในกระบวนการขนส่งสารเมทาโบไลต์ 2) เกี่ยวข้องกับกระบวนการ oxidative phosphorylation ในการสร้างพลังงานของเซลล์ 3) สังเคราะห์ phospholipid 4) มีเอนไซม์เกี่ยวกับการสังเคราะห์ผนังเซลล์และ capsule 5) ช่วยให้ DNA ติดกับเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้กระจายไปยังเซลล์ลูกในขณะแบ่งเซลล์ [25]

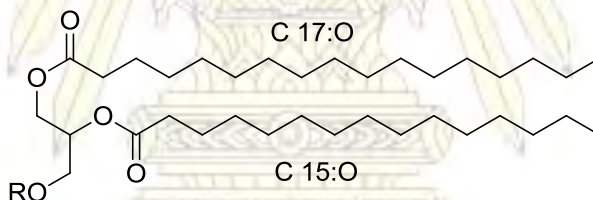
วิถีชีวสังเคราะห์ไขมัน (biosynthetic pathway) ที่เกิดขึ้นที่เยื่อหุ้มเซลล์ของ *B. subtilis* [11] ดังรูปที่ 1.1 ในวิถีนี้ phosphatidic acid (PA) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นทำปฏิกิริยากับ cytidine triphosphate (CTP) โดยมี CDP diglyceride synthase (CdsA) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ได้ cytidine diphosphate-DAG (CDP-DAG) ซึ่งเป็นสารมัธยันตร์ที่เกิดปฏิกิริยาได้ 2 รูปแบบ ในรูปแบบแรก CDP-DAG ทำปฏิกิริยากับ serin โดยมี phosphatidylserine synthase (PssA) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ได้ phosphatidylserine (PS) ซึ่งถูกเร่งปฏิกิริยาต่อไปด้วย phosphatidylserine decarboxylase (Psd) ทำให้ได้ phosphatidylethanolamine (PE) เป็นผลิตภัณฑ์ ส่วนในรูปแบบที่ 2 CDP-DAG ทำปฏิกิริยากับ glycerol phosphate โดยมี phosphatidylglycerophosphate synthase (PgsA) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ได้ phosphatidylglycerol phosphate (PGP) และ phosphatidylglycerol (PG) สำหรับ PG นั้นสามารถทำให้เกิดเป็น lysyl phosphatidylglycerol (lysylPG) โดยใช้ phosphatidylglycerol lysyltransferase (MprF) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และสามารถทำให้เกิดเป็น cardiolipins (CL) โดยมีเอนไซม์ CL synthase (ClsA, ClsB และ YwiE) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

นอกจากนี้ PA ยังเป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์ lipoteichoic acid (LTA) ซึ่งเป็นสารประกอบหลักของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก โดย PA เกิดปฏิกิริยาเป็น diacylglycerol (DAG) โดยมีเอนไซม์ UgtP เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทำให้ได้ monoglucosyl-diacylglycerol (MGDAG) และ diglucosyldiacylglycerol (DGDAG) ในขั้นตอนสุดท้าย เอนไซม์ LTA synthase เร่งการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง DGDAG และ PG ทำให้ได้ LTA โดยมี DAG เป็นผลพลอยได้

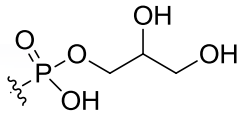
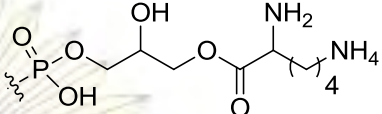
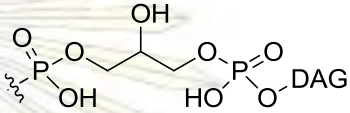
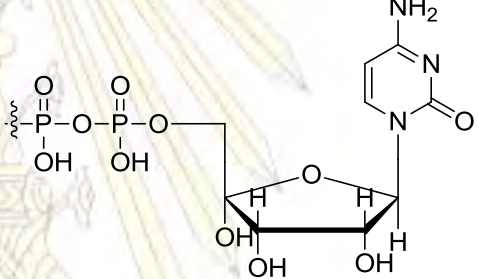
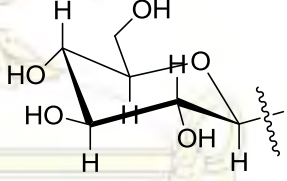
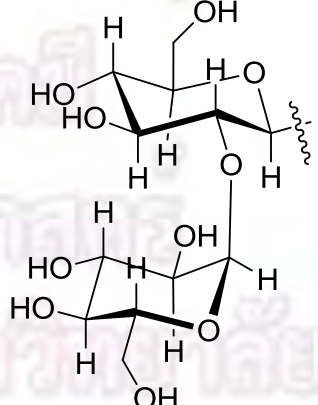


รูปที่ 1.1 กระบวนการสังเคราะห์ไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ใน *B. subtilis*

ตารางที่ 1.1 โครงสร้างของสารเมทาโบไลต์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์ไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ใน *B. subtilis*



ไขมัน	R
phosphatidic acid (PA)	
phosphatidylserine (PS)	
phosphatidylethanolamine (PE)	
phosphatidylglycerol phosphate (PGP)	

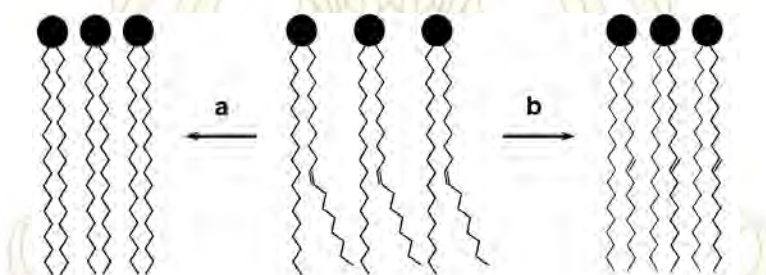
phosphatidylglycerol (PG)	
lysyl phosphatidylglycerol (lysylPG)	
cardiolipins (CL)	
diacylglycerol (DAG)	-H
cytidine diphosphate-DAG (CDP-DAG)	
monoglucosyldiacylglycerol (MGDAG)	
diglucosyldiacylglycerol (DGDAG)	

2.3) กลไกการตอบสนองของ *B. subtilis* ต่อตัวทำละลายอินทรีย์

ตัวทำละลายอินทรีย์เป็นพิษต่อแบคทีเรียเพราะตัวทำละลายอินทรีย์ส่งผลให้ 1) เยื่อหุ้มเซลล์เสีย ความสมดุลเนื่องจากตัวทำละลายอินทรีย์จะไปสะสมที่เยื่อหุ้มเซลล์ 2) พลังงานภายในเซลล์ลดลง เมื่อโปรตีนที่เป็น proton motive force ลดลง การสังเคราะห์ ATP จึงลดน้อยลงและการทำงานของ เอนไซม์ ATPase ถูกยับยั้ง [15] 3) โครงสร้าง ความเสถียรและบทบาทของเยื่อหุ้มเซลล์เปลี่ยนแปลงไป [12] 4) การสร้างสปอร์ถูกยับยั้ง ซึ่งสปอร์เป็นโครงสร้างที่มีความทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ต่อการเจริญได้ดี [13]

แบคทีเรียมีกลไกการปรับตัวต่อตัวทำละลายอินทรีย์ ดังนี้

1. มีการปรับเปลี่ยน fatty acid ที่เยื่อหุ้มเซลล์ โดยมีการเปลี่ยนโครงสร้างจาก *cis*-unsaturated fatty acid เป็น *trans*-unsaturated fatty acid [14] และมีการปรับเปลี่ยนสัดส่วนของ saturated ต่อ unsaturated fatty acid เมื่อได้รับตัวทำละลายอินทรีย์จะเปลี่ยนโครงสร้างเป็น saturated fatty acid มากขึ้น [12] ดังรูป 1.2



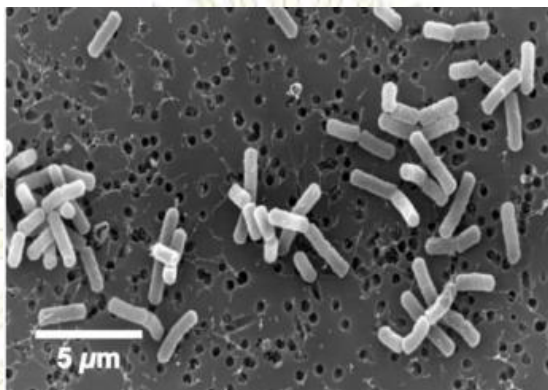
รูปที่ 1.2 การปรับเปลี่ยน fatty acid ที่เยื่อหุ้มเซลล์เมื่อได้รับตัวทำละลายอินทรีย์

a) โครงสร้าง saturation เพิ่มขึ้น b) การเปลี่ยนโครงสร้างจาก *cis* เป็น *trans*-unsaturated fatty acid

2. มีการปรับเปลี่ยนขนาดโครงสร้างของเซลล์ *B. subtilis* เซลล์จะมีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อมี ตัวทำละลายอินทรีย์ เนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของพื้นที่ผิวต่อปริมาตรของเซลล์ เมื่อได้รับ ตัวทำละลายอินทรีย์สัดส่วนของพื้นที่ผิวต่อปริมาตรจะลดลง [15]

3. มีการต่อต้านตัวทำละลายอินทรีย์โดยการขับตัวทำละลายอินทรีย์ออกจากเซลล์ (efflux pumps) เพื่อลดความเป็นพิษ [24]

2.4) *Bacillus subtilis*



รูปที่ 1.3 *Bacillus subtilis* จาก Scanning Electron Microscope (SEM) [7]

Bacillus subtilis อยู่ในวงศ์ Bacillaceae เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive bacteria) สามารถโตได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (Facultative Aerobic Bacteria) พบได้โดยทั่วไป เช่น ในดิน น้ำจืด น้ำเค็ม เป็นต้น เชื้อ *B. subtilis* เป็นเชื้อที่ไม่ทำให้เกิดโรค มีรูปร่างเป็นท่อน (rod shape) เจริญเติบโตได้ดีที่ pH 5.5-8.5 อุณหภูมิระหว่าง 28-40 องศาเซลเซียส และสามารถเจริญเติบโตได้แม้จะอยู่ในอุณหภูมิที่สูงถึง 55 องศาเซลเซียส สามารถสร้างสปอร์ (bacterial spore) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีความทนทานต่อความร้อน ทนต่อความแห้งแล้ง สารเคมีและสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญได้ดี [6]

B. subtilis เป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญและมีประโยชน์มาก สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิว ประเภทไลโปเปปไทด์ ฟอสโฟลิปิด และกรดไขมัน ซึ่งสามารถนำไปใช้อุตสาหกรรมการเกษตร อาหารและเปปเปอร์ เครื่องหนัง กระจก เครื่องสำอาง ยา และอุตสาหกรรมปิโตรเลียม [17] นอกจากนี้ *B. subtilis* ยังเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถสร้างสารปฏิชีวนะแบคเทอริโอซิน (Bacteriocin) มีชื่อว่า Subtilin และ Bacitracin ซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกด้วย [16] และในปัจจุบันแบคทีเรียชนิดนี้ถูกนำมาใช้งานทางด้านสิ่งแวดล้อมเป็นจำนวนมาก เช่น *B. subtilis* สามารถย่อยสลายน้ำมันดีเซลในดินได้ดี [23]

2.5) การเปลี่ยนแปลงเมทาโบไลต์ที่พบของ *B. subtilis* เมื่อได้รับ 1-butanol

1-butanol เป็นแอลกอฮอล์สายสั้น (C4) และเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรม 1-butanol สามารถทำให้ไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ของ *B. subtilis* มีปริมาณเปลี่ยนแปลงไป [7] เมื่อศึกษาปริมาณของไขมันประเภทต่างๆ ในเซลล์ของ *B. subtilis* เมื่อได้รับ 1-butanol โดยใช้เทคนิค liquid chromatography – mass spectrometry (LC–MS) คณะวิจัยพบว่า 1-butanol ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับของ Phospholipids และ Glycerolipids ซึ่งเป็นองค์ประกอบของไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ โดย Phosphatidylethanolamine (PE), Diglucosyl diacylglycerol (DGDAG) และ Phosphatidylserine (PS) มีปริมาณที่เพิ่มขึ้นเมื่อได้รับ 1-butanol ในทางตรงกันข้าม Diacylglycerol (DAG) และ Lysyl Phosphatidylglycerol (lysylPG) มีปริมาณที่ลดลง

สารเมทาโบไลต์ดังกล่าวเกี่ยวข้องกับผลของระดับของยีน เมื่อ *B. subtilis* ได้รับ 1-butanol ระดับของยีน *pgsA* และ *mprF* ลดลง ส่งผลทำให้ปริมาณของ lysylPG ลดลง ส่วนระดับของยีน *pssA* ไม่เปลี่ยนแปลง เมื่อได้รับ 1-butanol แต่ปริมาณของ PS และ PE เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจากปริมาณของสารตั้งต้นที่ใช้สังเคราะห์ PS นั่นก็คือ CDP-DAG เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ระดับของยีน *ugtP* ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อได้รับ 1-butanol แต่ปริมาณ DGDAG เพิ่มขึ้น และปริมาณ DAG ลดลง ซึ่งเป็นผลจากเอนไซม์ YfnI ที่ช่วยเร่งให้ DGDAG และ PG ซึ่งเป็นสารตั้งต้นผลิต LTA และ DAG ตามลำดับ ทำให้ระดับของยีน *yfnI* ที่ลดลง ส่งผลให้ปริมาณ DAG ลดลง และ ปริมาณ DGDAG เพิ่มขึ้น ดังรูปที่ 1.1

3.) วัตถุประสงค์ของโครงการ

- 3.1.) วิเคราะห์และเปรียบเทียบความทนต่อ 1-butanol ของ *B. subtilis* สายพันธุ์ต่างๆ ที่ได้รับการดัดแปลงทางพันธุกรรม
- 3.2.) วัดระดับของ phospholipids และ glycerolipids ที่เกี่ยวข้องใน *B. subtilis* สายพันธุ์ต่างๆ ที่ได้รับการดัดแปลงทางพันธุกรรม

4.) ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 4.1.) เข้าใจกลไกการตอบสนองต่อ 1-butanol ของ *B. subtilis* ได้ดีขึ้น
- 4.2.) ได้ *B. subtilis* สายพันธุ์ที่มีความทนต่อ 1-butanol ได้ดีขึ้น

บทที่ 2

วิธีการทดลอง

1.) วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1.1) วัสดุพื้นฐานภายใน

- 1.1.1) ปีกเกอร์
- 1.1.2) หลอดหยด
- 1.1.3) ขวดสารตัวอย่างขนาด 4 ml และ 22 ml พร้อมฝาปิดชนิดเทพลอน
- 1.1.4) Pipette tip
- 1.1.5) กระจกบอทวง
- 1.1.6) Micropipette
- 1.1.7) ขวดเลี้ยงเชื้อ
- 1.1.8) จานอาหารเลี้ยงเชื้อ
- 1.1.9) หลอดแก้วมีฝาปิด
- 1.1.10) Microtube
- 1.1.11) หลอดพลาสติก 50 ml
- 1.1.12) Glass pipette

1.2) เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

- 1.2.1) เครื่องชั่งน้ำหนัก
- 1.2.2) เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
- 1.2.3) เครื่องเขย่าผสม (Vortex mixer)
- 1.2.4) ตู้ดูดควัน
- 1.2.5) ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30 °C และ 37 °C

- 1.2.6) ตู้บ่มเพาะเชื้อพร้อมเขย่า (Shaking incubator)
- 1.2.7) เครื่อง UV-vis spectrophotometer
- 1.2.8) เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR machine)
- 1.2.9) เครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส
- 1.2.10) ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow clean bench)
- 1.2.11) หมอญ่ความดันไอล (Autoclave)
- 1.2.12) เครื่องถ่ายภาพและวิเคราะห์ภาพเจล (Gel documentation system)
- 1.2.13) เครื่อง Nitrogen concentrator

2.) สายพันธุ์แบคทีเรีย อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี

2.1) สายพันธุ์แบคทีเรีย

- 2.1.1) *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ 168

2.2) อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 2.2.1) 1 M potassium phosphate buffer (pH 7.0)
- 2.2.2) 1 M trisodium citrate
- 2.2.3) 1 M MgSO₄
- 2.2.4) 50% glucose
- 2.2.5) 50% potassium glutamate
- 2.2.6) 10% casein hydrolysate
- 2.2.7) 22 mg/ml ferric ammonium citrate
- 2.2.8) 20 mg/ml tryptophan
- 2.2.9) 18 mg/ml phenylalanine
- 2.2.10) K₂HPO₄
- 2.2.11) (NH₄)₂SO₄
- 2.2.12) KH₂PO₄
- 2.2.13) Na-citrate·2H₂O
- 2.2.14) yeast extract

- 2.2.15) Tryptone
- 2.2.16) Agar
- 2.2.17) 72.86 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 2.2.18) 15.29 g/l $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- 2.2.19) 10g/l $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- 2.2.20) 10 g/l ZnCl_2
- 2.2.21) 43 g/l $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 2.2.22) 10 g/l $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- 2.2.23) 10 g/l $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 2.2.24) 47 g/l Na_2SeO_4
- 2.2.25) น้ำปราศจากไอออน (deionized water)

2.3) สารเคมี

- 2.3.1) 1-butanol
- 2.3.2) 100 $\mu\text{g/ml}$ spectinomycin
- 2.3.3) 5 $\mu\text{g/ml}$ chloramphenicol
- 2.3.4) 30 $\mu\text{g/ml}$ kanamycin
- 2.3.5) Glycerol
- 2.3.6) 10 xlong PCR buffer with MgCl_2
- 2.3.7) dNTP mix (2 nm)
- 2.3.8) Forward primer (10 mM in H_2O)
- 2.3.9) Reverse primer (10 mM in H_2O)
- 2.3.10) Long PCR enzyme
- 2.3.11) Chloroform (ACS grade)
- 2.3.12) Methanol (ACS grade)
- 2.3.13) 0.1 M Isopropylthiogalactoside (IPTG)

3.) การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1.) Modified Competence (MC) media สำหรับ Transformation มีส่วนประกอบดังนี้ [18]

สารละลาย	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาณในสารละลาย 20 ml
1 M potassium phosphate buffer (pH7.0)	100 mM	2 ml
1 M trisodium citrate	3 mM	60 μ l
1 M MgSO ₄	3 mM	60 μ l
50% glucose	2%	800 μ l
50% potassium glutamate	0.2%	160 μ l
10% casein hydrolysate	0.1%	200 μ l
22 mg/ml ferric ammonium citrate	22 μ g/ml	20 μ l
20 mg/ml tryptophan	50 μ g/ml	50 μ l

3.2.) การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria Broth (LB)

สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ LB 1000 ml ซึ่ง tryptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 10 g และ agar 15 g ใส่ปิกเกอร์จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1000 ml ด้วยน้ำปราศจากไอออน (Deionized Water) ก่อนนำไปทำให้ปลอดเชื้อด้วยวิธี autoclave

3.3) การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Spizizen's minimal media (SMM) [19],[20]

สำหรับการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Spizizen's minimal media (SMM) ปริมาตร 1000 ml ซึ่ง (NH₄)₂SO₄ 2 g, K₂HPO₄ 14 g, KH₂PO₄ 6 g, Na-citrate·2H₂O 1.14 g และ 1 M MgSO₄ 1 จากนั้นใส่สารเพิ่มเติม (supplement) ดังนี้

สารละลาย	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตรในสารละลาย 1000 ml
72.86 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5.5 mg	100 μl
15.29 g/l $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	15.29 mg	1.0 ml
10g/l $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.0 mg	100 μl
10 g/l ZnCl_2	1.7 mg	170 μl
43 g/l $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.7 mg	10 μl
10 g/l $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.6 mg	10 μl
10 g/l $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.6 mg	10 μl
47 g/l Na_2SeO_4	0.47 mg	10 μl

ปรับปริมาตรเป็น 1000 ml ด้วยน้ำปราศจากไอออน (Deionized water) ก่อนนำไปทำให้ปลอดเชื้อด้วยวิธี autoclave หลังจากนั้นเติมแหล่งคาร์บอน ได้แก่ 50% glucose 10 ml, 20 mg/ml tryptophan 1 ml และ 18 mg/ml phenylalanine 1 ml ที่ทำให้ปลอดเชื้อด้วยวิธีการกรอง

4.) ขั้นตอนการทดลอง

4.1) การนำพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมที่ทำการตัดต่อในหลอดทดลองเข้าสู่เซลล์ของ *B. subtilis* โดยวิธี Transformation เพื่อตัดแปลงทางพันธุกรรม (Mutant)

นำ *B. subtilis* 168 ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาเขียนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อมาเลี้ยงในหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ LB (5 ml) บ่มบนเครื่องเขย่า ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นปิเปต 100 μl (2%) *B. subtilis* สายพันธุ์ 168 ในหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ดังกล่าว ลงในหลอดที่มี MC media (5 ml) บ่มบนเครื่องเขย่า ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (ค่า optical density ที่ความยาวคลื่น 600 nm (OD_{600}) มีค่าประมาณ 0.8-0.9) จากนั้นนำพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์ของ *B. subtilis* สายพันธุ์ 168 โดยนำเชื้อดังกล่าว 1 ml ใส่ในหลอดที่มีดีเอ็นเอสายผสมที่ได้จากการเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะ 5 μl (ที่ได้ตัดต่อไว้ในห้องปฏิบัติการ) นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำการตกตะกอนเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว $16.3 \times 1000 \text{ g}$ เป็นเวลา 1 นาที นำสารละลายออกไป 700 μl แล้วนำ pellet กับสารละลายที่เหลือมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB ที่เติมยาปฏิชีวนะ ดังนี้

พลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม

ยาปฏิชีวนะ

pBluescript II: <i>ugtP::spc</i> ^R	Spectinomycin ความเข้มข้น 100 µg/ml
pBluescript II: <i>yfnI::spc</i> ^R	Spectinomycin ความเข้มข้น 100 µg/ml
pBluescript II: <i>mprF::cat</i> ^R	Chloramphenicol ความเข้มข้น 5 µg/ml

นำไปป้อนที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นเลือกเชื้อมา 1 โคโลนี และนำไปเลี้ยงในหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ LB 5 ml บ่มบนเครื่องเขย่า ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (รุ่นที่ 1) เลี้ยงเชื้อทั้งหมด 3 รุ่น และนำ *B. subtilis* ที่ได้ไปตรวจสอบการกลายพันธุ์ (mutation) ของยีนในลำดับต่อไป

4.2) การตรวจสอบ *B. subtilis* ที่ได้รับการดัดแปลงทางพันธุกรรม ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

นำ *B. subtilis* ที่ได้รับการกลายพันธุ์ (รุ่นที่ 3) จาก 5.1 มาตรวจสอบ genomic DNA เพื่อยืนยันการดัดแปลงทางพันธุกรรม โดยนำไปป้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ก่อนจะนำไปเพิ่มปริมาณด้วยสวอนผสมปฏิกิริยา ปริมาตร 12.5 µl ซึ่งประกอบด้วย 10x long PCR buffer with MgCl₂ 1.25 µl, dNTP mix (2 mM) 0.312 µl, Forward primer (10 mM ในน้ำ) 0.375 µl, Reverse primer (10 mM ในน้ำ) 0.375 µl, gDNA หรือโคโลนีของ *B. subtilis* สายพันธุ์ที่ต้องการวิเคราะห์ (1:5000) 0.25 µl, long PCR enzyme (5 µl/ml) 0.125 µl และน้ำปราศจากไอออน 8.875 µl จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยา PCR ตามขั้นตอน ดังนี้

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)
1. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบเริ่มต้น (initial denaturing)	94	3.00
2. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing)	96	0.20
3. ดีเอ็นเอเริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing)	54.2	0.30
4. สังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากดีเอ็นเอเริ่มต้น (extension)	68	5.30
5. สังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension)	68	10.0

ทำปฏิกิริยาขั้นตอนที่ 2-4 ซึ่งเป็นปฏิกิริยาถูกไขทั้งหมด 35 รอบ และวิเคราะห์ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Gel electrophoresis นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR มาทำการตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ โดยใช้ 0.8% agarose gel ใน 0.5 x TBE buffer ย้อมด้วย ethidium bromide ใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานชนิด 1 kb เป็นตัวเปรียบเทียบ ตรวจสอบแผ่นเจลโดยนำไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต พร้อมทำการบันทึกภาพและวิเคราะห์

4.3) ทดสอบความทนต่อ 1-butanol สำหรับ *B. subtilis* ที่ถูกดัดแปลงทางพันธุกรรม (Mutant)

นำ *B. subtilis* สายพันธุ์ 168 (ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ) และ *B. subtilis* ที่ถูกดัดแปลงทางพันธุกรรมเรียบร้อยแล้ว (LPG31, UGT31, LTA31, PU31 และ LM31) ดังตารางที่ 2.1 มาเขียนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่เติมยาปฏิชีวนะ (UGT31 และ LTA31 ใช้ spectinomycin ความเข้มข้น 100 µg/ml, LPG31 ใช้ chloramphenicol ความเข้มข้น 5 µg/ml, LM31 และ PU31 ใช้ chloramphenicol ความเข้มข้น 5 µg/ml และ spectinomycin ความเข้มข้น 50 µg/ml ส่วน *B. subtilis* สายพันธุ์ 168 ไม่ต้องเติมยาปฏิชีวนะ) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อมาเลี้ยงในหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Spizizen's minimal media (5 ml) บ่มบนเครื่องเขย่า ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 17 ชั่วโมง นำเชื้อจากหลอดดังกล่าว 400 µl (2%) เลี้ยงในขวดเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Spizizen's minimal media 20 ml บ่มบนเครื่องเขย่า ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4-5 ชั่วโมง (ค่า optical density ที่ความยาวคลื่น 600 nm (OD₆₀₀) อยู่ประมาณ 0.2-0.3) การทดสอบความทนต่อ 1-butanol โดยใส่น้ำที่ปลอดเชื้อ (ตัวควบคุม) เปรียบเทียบกับแบบที่ใส่ 1-butanol ความเข้มข้น 1% (v/v) โดยทำ 3 ซ้ำ นำไปบ่มบนเครื่องเขย่า ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยวัดค่า OD₆₀₀ ทุกๆ 3 ชั่วโมง จนครบ 12 ชั่วโมง

4.4) ทดสอบความทนต่อ 1-butanol สำหรับ *B. subtilis* ที่ได้รับการเพิ่มปริมาณยีนที่สนใจ (Overexpression)

นำ *B. subtilis* สายพันธุ์ 168 (ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ) และ *B. subtilis* ได้รับการเพิ่มปริมาณยีนที่สนใจ (OPS, OUG, OPG, OPU และ LMOPU) ดังตารางที่ 2.1 มาเขียนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่เติมยาปฏิชีวนะ Kanamycin ที่มีความเข้มข้น 30 µg/ml และ 1% กลูโคส นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อมาเลี้ยงในหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Spizizen's minimal

media (5 ml), Kanamycin ที่มีความเข้มข้น 30 $\mu\text{g/ml}$, 1 % glucose และ 0.1 M IPTG (Isopropyl thio galactoside) บ่มบนเครื่องเขยา ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 17 ชั่วโมง นำเชื้อจากหลอดดังกล่าว 400 μl (2%) ใส่ลงในขวดเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Spizizen's minimal media (20 ml) บ่มบนเครื่องเขยา ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-5 ชั่วโมง (ค่า optical density ที่ความยาวคลื่น 600 nm (OD_{600}) มีค่าประมาณ 0.2-0.3) ในการทดสอบความทนต่อ 1-butanol จะใส่น้ำที่ปลอดเชื้อ (ตัวควบคุม) เปรียบเทียบกับแบบที่ใส่ 1% 1-butanol โดยทำ 3 ซ้ำ นำไปบ่มบนเครื่องเขยา ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยวัดค่า OD_{600} ทุกๆ 3 ชั่วโมง จนครบ 12 ชั่วโมง

ตารางที่ 2.1 แสดงชื่อสายพันธุ์ของ *B. subtilis* และยีนที่เกี่ยวข้อง

ชื่อสายพันธุ์	ยีนที่เกี่ยวข้อง
LPG31	กลายพันธุ์ในยีน <i>mprF</i>
UGT31	กลายพันธุ์ในยีน <i>ugtP</i>
LTA31	กลายพันธุ์ในยีน <i>yfnI</i>
PU31	กลายพันธุ์ในยีน <i>pssA</i> และ <i>ugtP</i>
LM31	กลายพันธุ์ในยีน <i>yfnI</i> และ <i>mprF</i>
OPS	การแสดงออกมากกว่าปกติในยีน <i>pssA</i>
OUG	การแสดงออกมากกว่าปกติในยีน <i>ugtP</i>
OPG	การแสดงออกมากกว่าปกติในยีน <i>pgsA</i>
OPU	การแสดงออกมากกว่าปกติในยีน <i>pssA</i> และ <i>ugtP</i>
LMOPU	การแสดงออกมากกว่าปกติในยีน <i>pssA</i> และ <i>ugtP</i> ใน LM31

4.5) การสกัดไขมันจาก *B. subtilis* ที่ได้รับการดัดแปลงทางพันธุกรรมและเพิ่มปริมาณยีนที่สนใจ เพื่อเตรียมวิเคราะห์ด้วยเทคนิค liquid chromatography – mass spectrometry

ในการเตรียมตัวอย่างก่อนการสกัด *B. subtilis* นั้น ทำการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* ในลักษณะเดียวกับการทดสอบความทนต่อ 1-butanol (ข้อ 4.3 และ 4.4) แต่จะใช้เวลาในการบ่มบนเครื่องเขยา ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง นำทุกขวดมาวัดค่า OD_{600} สำหรับทำ Normalization และนำเชื้อที่เหลือไปปั่นเหวี่ยง สำหรับ *B. subtilis* ที่ได้รับการกลายพันธุ์

(Mutant) ใช้ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ส่วน *B. subtilis* ที่ได้รับการเพิ่มปริมาณยีนที่สนใจ (Overexpression) ใช้ความเร็ว 2500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 25 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเทสารละลายส่วนบน (supernatant) ทิ้งไป จากนั้นล้าง pellet ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Spizizen's minimal media (SMM) ที่ไม่มีสารเพิ่มเติม (supplement) 20 ml แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วดังกล่าวอีกครั้ง เทสารละลายทิ้ง แล้วเก็บ pellet ไว้ เพื่อนำไปสกัดในลำดับถัดไป

ในส่วนของการสกัดไขมันนั้น นำ pellet ข้างต้น มาล้างด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Spizizen's minimal media (SMM) ที่ไม่มี supplement 1.5 ml และทำการสกัดโดยใช้ chloroform : methanol สัดส่วนเท่ากับ 2 : 1 ปริมาตร 4.5 ml จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง สำหรับ *B. subtilis* ที่ได้รับการกลายพันธุ์ (Mutant) ที่ความเร็ว 1500 g เป็นเวลา 3 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ส่วน *B. subtilis* ที่ได้รับการเพิ่มปริมาณยีนที่สนใจ (Overexpression) ใช้ความเร็ว 1500 g เป็นเวลา 3 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้เกิดการแยกชั้น โดยสารละลายชั้นบนเป็นส่วนของ methanol และน้ำ ส่วนสารละลายใสชั้นล่างเป็นส่วนของ chloroform โดยจะมีไขมันชนิดต่างๆ ละลายอยู่ในชั้นนี้ นำสารละลายที่อยู่ในชั้นของคลอโรฟอร์ม มาระเหยตัวทำละลายออกด้วยแก๊สไนโตรเจนเป็นเวลา 30 นาที หรือจนกว่าจะแห้ง จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์ด้วย LC-MS ในลำดับต่อไป

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

1) การตัดแปลงหรือเพิ่มปริมาณทางพันธุกรรมของ *B. subtilis*

ในงานวิจัยก่อนหน้าโดย Vinayavekhin และคณะ [7] พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของระดับ Phospholipids และ Glycerolipids ซึ่งเป็นองค์ประกอบของไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ เมื่อเติม 1-butanol ลงใน culture ของ *B. subtilis* โดย Phosphatidylethanolamine, Diglucosyl diacylglycerol และ Phosphatidylserine มีปริมาณที่เพิ่มขึ้นเมื่อใส่ 1-butanol ในทางตรงกันข้าม Diacylglycerol และ Lysyl Phosphatidylglycerol มีปริมาณที่ลดลง ผู้วิจัยจึงทำการตัดแปลงยีนต่างๆ ของ *B. subtilis* ดังแสดงในตารางที่ 2.1 เพื่อศึกษาผลของไขมันประเภทฟอสโฟลิปิดและกลีเซอโรลิปิด ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ (รูปที่ 1.1) ต่อความทนต่อ 1-บิวทานอลของ *B. subtilis*

วิธีการตัดแปลงพันธุกรรม (Mutant) ทำได้โดยการตัดต่อใส่ยีนที่ต้องการ ซึ่งในที่นี้ คือ *mprF*, *ugtP* และ *yfnI* พร้อมทั้ง sequence ส่วนที่ upstream หรือ downstream ของยีนนั้นๆ ประมาณ 1000 bp เข้าไปในพลาสมิด pBluescript II (-) จากนั้นทำการแทนที่ sequence ของยีนนั้นๆ ด้วยชิ้นยีนที่ใช้ได้ด้ายาปฏิชีวนะชนิด chloramphenicol หรือ spectinomycin ตามที่ระบุข้างต้น เพื่อใช้ประโยชน์ในการเลือกเซลล์ของ *B. subtilis* ที่รับพลาสมิดที่ตัดต่อนี้เข้าไปในเซลล์ ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้ทำการนำส่งพลาสมิดที่ได้ทำการตัดแปลงยีนที่สนใจแล้วเข้าไปในเซลล์ของ *B. subtilis* โดยอาศัยวิธีการ transformation ตามธรรมชาติที่ *B. subtilis* จะได้รับพลาสมิดจากสภาพแวดล้อม เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสม ซึ่งในที่นี้เลียนแบบสภาวะนั้นโดยการเลี้ยงเชื้อใน MC media เนื่องจากพลาสมิด pBluescript II (-) ไม่มีจุดเริ่มต้นของการเรพลิเคชัน (origin of replication) สำหรับทำการเพิ่มปริมาณใน *B. subtilis* เมื่อมีการแบ่งเซลล์ โคลนินของ *B. subtilis* ที่ได้ับนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาปฏิชีวนะชนิด chloramphenicol หรือ spectinomycin จึงเป็นเชื้อที่เกิด homologous recombination ระหว่าง sequence upstream และ downstream ของยีนที่สนใจบนพลาสมิดกับ sequence เดียวกันบน genomic DNA แทนชิ้นยีนที่เราสนใจจะทำการกลายพันธุ์เท่านั้น เชื้อที่ได้ับนอาหาร

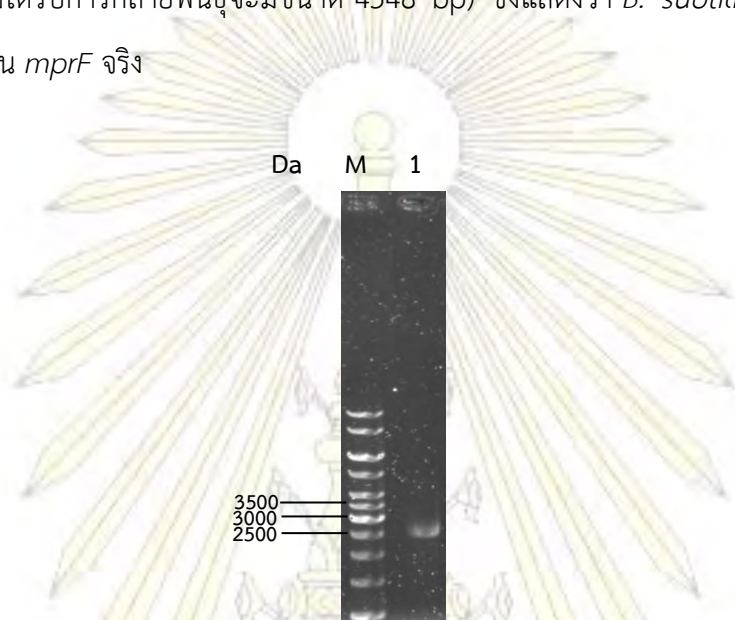
เลี้ยงเชื้อมียาปฏิชีวนะที่เหมาะสมนี้จึงมีโอกาสสูงที่จะเกิดการกลายพันธุ์ (Mutant) ที่เราต้องการ นอกจากนี้ ผู้วิจัยได้นำ *B. subtilis* สายพันธุ์ที่ได้รับการกลายพันธุ์แล้วสายพันธุ์ LPG31 และ UGTP31 มาทำการกลายพันธุ์อีกครั้งด้วยวิธีการดังกล่าว โดยทำการตัดต่อชิ้นยีน *yfnI* ในสายพันธุ์ LPG31 เพื่อให้ได้สายพันธุ์ LM31 และชิ้นยีน *pssA* ในสายพันธุ์ UGT31 เพื่อให้ได้สายพันธุ์ PU31

สำหรับการสร้างสายพันธุ์ของ *B. subtilis* เพื่อให้มีการเพิ่มปริมาณยีน (overexpression) ที่เราสนใจนั้น มีวิธีการทำได้โดยการตัดต่อชิ้นยีนที่เราสนใจ ได้แก่ ยีน *pssA*, *pgsA* และ *ugtP* เข้าไปในพลาสมิด pHK พร้อมกับตัดต่อ promoter Pspac เข้าไปในส่วนที่ upstream ของยีนนั้น ผู้วิจัยได้พยายามทำการนำส่ง พลาสมิด pHK ที่มียีนที่เราสนใจเข้าไปใน *B. subtilis* ด้วยวิธีการ transformation ตามธรรมชาติ ดังเช่นในกรณีของการกลายพันธุ์ (mutant) ข้างต้น อย่างไรก็ตามวิธีนี้ไม่ส่งผลให้เซลล์ของ *B. subtilis* โตได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียา kanamycin ซึ่งเป็นชั้นยาที่ถูกโคัดบนพลาสมิด pHK ได้เลย ซึ่งหมายความว่าผู้วิจัยไม่สามารถนำส่งพลาสมิดที่ต้องการเข้าไปใน *B. subtilis* ได้สำเร็จด้วยวิธีการ transformation ตามธรรมชาตินี้ ทั้งนี้มีวิธีการที่ใช้ในการนำส่งพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ของ *B. subtilis* ในห้องปฏิบัติการอีกวิธีหนึ่ง คือ วิธีการนำส่งถ่ายยีนโดยใช้กระแสไฟฟ้า (electroporation) เมื่อคณะวิจัยได้ทำการนำส่งพลาสมิดด้วยวิธีนี้ คณะวิจัยพบว่าได้ผลสำเร็จเป็นอย่างดี โดยสายพันธุ์ที่เพิ่มยีน (overexpression) ที่ต้องการสามารถโตได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียา kanamycin ได้ทั้งหมดตามต้องการ

2) การตรวจสอบ *B. subtilis* ที่ได้รับการดัดแปลงทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

เพื่อทำการตรวจสอบ *B. subtilis* ที่รับการดัดแปลงทางพันธุกรรมว่ายีนที่ต้องการศึกษาได้ถูกลบทิ้งหรือปรับเปลี่ยนทางพันธุกรรมที่ genomic DNA จริง ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบ *B. subtilis* สายพันธุ์ LPG31, UGT31 และ LTA31 ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ region ที่ต้องการ โดยอาศัยหลักการ DNA Replication จากนั้นทำการตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค Gel electrophoresis

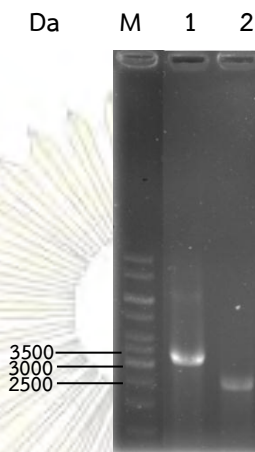
ผลการตรวจสอบ *B. subtilis* สายพันธุ์ LPG31 ซึ่งมีการกลายพันธุ์ที่ยีน *mprF* พบแถบดีเอ็นเอของยีน *mprF* (lane 1) ขนาดประมาณ 2800 bp ดังรูป 3.1 ซึ่งแถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดใกล้เคียงกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีการแทนที่ยีน *mprF* ด้วยชิ้นยาปฏิชีวนะ chloramphenicol ขนาด 2879 bp (ชิ้นส่วนของยีน *mprF* ที่ไม่ได้รับการกลายพันธุ์จะมีขนาด 4548 bp) ซึ่งแสดงว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ LPG31 มีการกลายพันธุ์ที่ยีน *mprF* จริง



รูปที่ 3.1 ภาพถ่าย agarose gel *B. subtilis* สายพันธุ์ LPG31 แสดงแถบ DNA ของยีน *mprF* (lane 1) โดยมีดีเอ็นเอมาตรฐาน (M) คือ 1 Kb plus DNA ladder

สำหรับ *B. subtilis* สายพันธุ์ UGT31 ซึ่งมีการกลายพันธุ์ที่ยีน *ugtP* พบแถบดีเอ็นเอของยีน *ugtP* (lane 1) ขนาดประมาณ 3200 bp ดังรูป 3.2 ซึ่งแถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดใกล้เคียงกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีการแทนที่ยีน *ugtP* ด้วยชิ้นยาปฏิชีวนะ spectinomycin ขนาด 3215 bp และพบแถบ genomic DNA ของ *B. subtilis* สายพันธุ์ 168 ที่ใช้เปรียบเทียบ ซึ่งก็คือชิ้นส่วนของยีน *ugtP* ที่ไม่ได้รับการกลายพันธุ์ (lane 2) ขนาดประมาณ 2500 bp ดังรูป 3.2 ซึ่งแถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดใกล้เคียงกับชิ้นส่วนของยีน *ugtP* ที่ไม่ได้รับการกลายพันธุ์ที่มีขนาด 2553 bp แสดงว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ UGT31 มีการกลายพันธุ์ที่ยีน *ugtP* จริง

คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.2 ภาพถ่าย agarose gel *B. subtilis* สายพันธุ์ UGT31 แสดงแถบดีเอ็นเอของยีน *ugtP* (lane 1) และแถบ genomic DNA ของ *B. subtilis* สายพันธุ์ 168 (lane 2) โดยมีดีเอ็นเอมาตรฐาน (M) คือ 1 Kb plus DNA ladder

สำหรับ *B. subtilis* สายพันธุ์ LTA31 ซึ่งมีการกลายพันธุ์ที่ยีน *yfnI* ไม่พบแถบดีเอ็นเอของยีน *yfnI* และไม่พบแถบ genomic DNA ของ *B. subtilis* สายพันธุ์ 168 สาเหตุอาจเกิดจากบัฟเฟอร์หรือเอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาไม่เหมาะสม และอุณหภูมิ annealing ไม่เหมาะสม ผู้วิจัยจึงปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของเชื้อแม่แบบ (template) ของ *B. subtilis* ที่คาดว่าจะเป็นสายพันธุ์ LTA31 และเปลี่ยนชนิดเอนไซม์ polymerase รวมทั้งบัฟเฟอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction เป็น kodakaraensis (KOD) ปรากฏว่ายังไม่พบแถบดีเอ็นเอของยีน *yfnI* และไม่พบแถบ genomic DNA ของ *B. subtilis* สายพันธุ์ 168 ซึ่งชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีการแทนที่ยีน *yfnI* ด้วยชิ้นยาปฏิชีวนะ spectinomycin จะต้องมีความยาว 4044 bp และชิ้นส่วนของยีน *yfnI* ที่ไม่ได้รับการกลายพันธุ์จะมีความยาว 4161 bp ซึ่งจะต้องมีการปรับเปลี่ยนสถานะให้เหมาะสมต่อไปในอนาคต

3) การทดสอบความทนต่อ 1-butanol

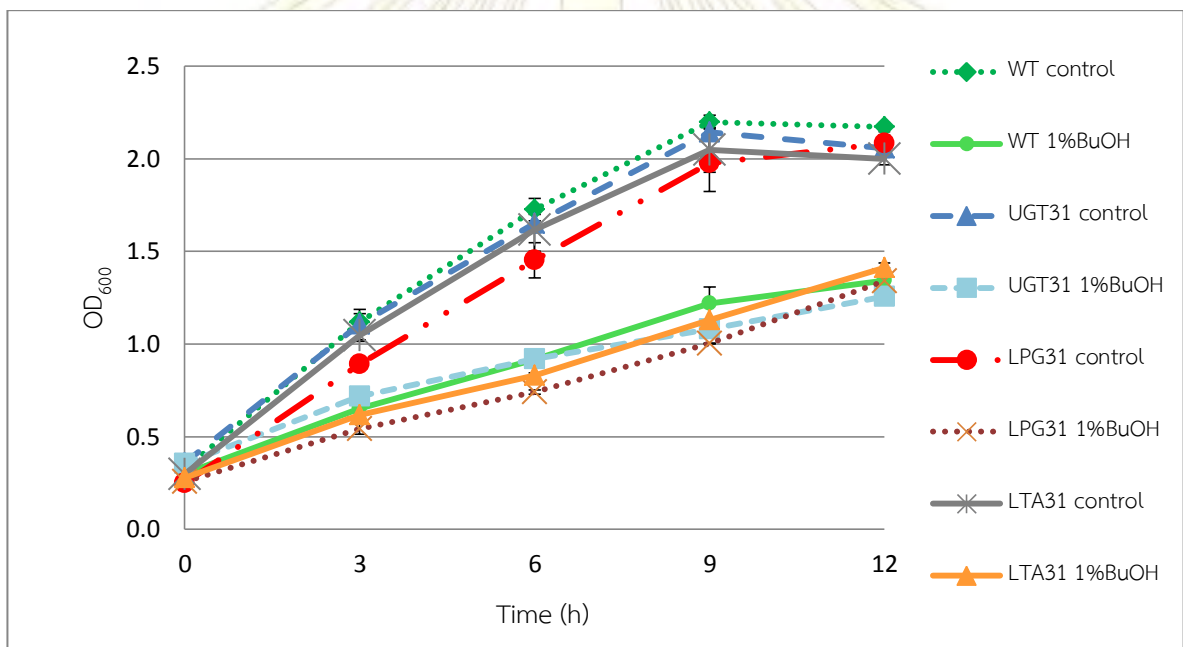
การเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ป่า (wild type; สายพันธุ์ 168) และ *B. subtilis* ที่ได้รับการดัดแปลงทางพันธุกรรมหรือได้รับการเพิ่มปริมาณยีนที่สนใจ ทำในอาหารเลี้ยงเชื้อ Spizizen's minimal media ที่ใส่ 1-butanol ความเข้มข้น 1% (v/v) เปรียบเทียบกับไม่ใส่ 1-butanol (เติมน้ำที่ปลอดเชื้อ; ตัวควบคุม) โดยผู้วิจัยได้ทำการใส่ 1-butanol เมื่อ optical density ที่ความยาวคลื่น 600 nm (OD₆₀₀) มีค่าประมาณ 0.2-0.3 เนื่องจากเป็นค่าที่การเจริญเติบโตของแบคทีเรียอยู่ในช่วงระยะพักช่วงปลาย (late lag) ซึ่งเป็นระยะแรกที่แบคทีเรียเริ่มปรับตัวกับอาหารและสิ่งแวดล้อมใหม่ได้ หรือใกล้ระยะแบ่งตัวทวีคูณ (early exponential phase) ซึ่งเป็นระยะที่แบคทีเรียจะเริ่มมีการเพิ่มจำนวนมากที่สุด ด้วยอัตราการแบ่งตัวที่คงที่ หลังจากใส่ 1-butanol ได้ติดตามการเจริญเติบโตเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จนถึงระยะคงที่ (stationary phase) ซึ่งไม่มีการเปลี่ยนแปลงของจำนวนเซลล์มากนัก ทั้งนี้ ได้ทำการทดลองในอาหารเลี้ยงเชื้อ Spizizen's minimal media เพราะเป็นอาหารที่ทราบองค์ประกอบทั้งหมด ทำให้ง่ายต่อการวิเคราะห์ปริมาณของเมทาโบไลต์ในขั้นถัดไป

3.1) *B. subtilis* ที่ได้รับการดัดแปลงทางพันธุกรรม (Mutant)

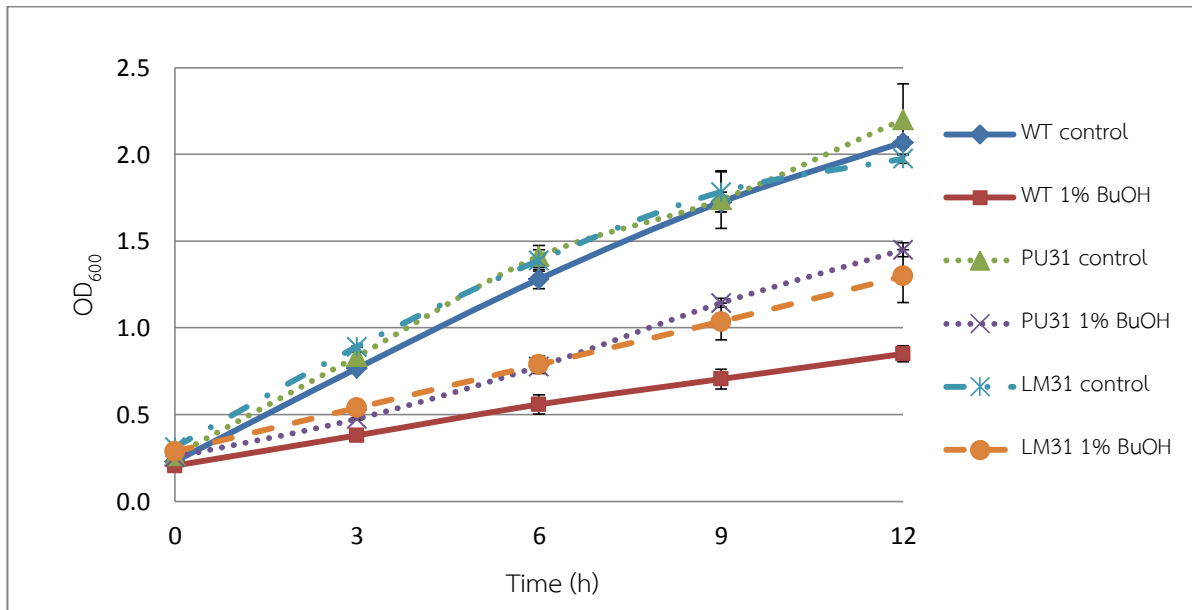
การทดสอบความทนต่อ 1-butanol มีสมมติฐานดังนี้ *B. subtilis* สายพันธุ์ LPG31, LTA31 และ LM31 ควรมีความทนต่อ 1-butanol ได้ดีขึ้น เพราะการปรับเปลี่ยนยีนเหล่านี้ควรทำให้ปริมาณของ lysylPG, DAG และทั้ง lysylPG และ DAG ลดลงตามลำดับ ซึ่งเป็นไปตามผลที่ได้จากการทดลองก่อนหน้านี้ (รูปที่ 1.1) ที่ปริมาณของเมทาโบไลต์เหล่านี้ลดลงเพื่อตอบสนองต่อ 1-butanol ส่วน *B. subtilis* สายพันธุ์ UGT31 และ PU31 ควรมีความทนต่อ 1-butanol ได้แย่ง เพราะการกลายพันธุ์ที่ยีนเหล่านี้ควรทำให้ปริมาณ DGDAG และทั้ง DGDAG, PS และ PE ลดลงตามลำดับ ซึ่งตรงกันข้ามกับผลการตอบสนองต่อ 1-butanol ตามรูปที่ 1.1

จากการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ป่า (wild type; สายพันธุ์ 168) และ *B. subtilis* ที่ได้รับการดัดแปลงทางพันธุกรรม ได้แก่ LPG31, UGT31, LTA31, PU31 และ LM31 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Spizizen's minimal media ที่ใส่ 1-butanol ความเข้มข้น 1% (v/v) เปรียบเทียบกับไม่ใส่ 1-butanol (เติมน้ำที่ปลอดเชื้อ; ตัวควบคุม) ผลที่ได้จากการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.3 และ 3.4 จะเห็นได้ว่า 1% (v/v) 1-butanol ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. subtilis* ทำให้เชื้อมีอัตราการเจริญเติบโตที่ช้ากว่าปกติ

เมื่อพิจารณาการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. subtilis* ได้แก่ สายพันธุ์ LPG31, UGT31, LTA31, PU31 และ LM31 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่ 1% (v/v) 1-butanol เปรียบเทียบกับ *B. subtilis* สายพันธุ์ป่า ที่ใส่ 1% (v/v) 1-butanol ที่เวลา 12 ชั่วโมง และใช้ t-test ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.05 พบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ LM31 และ PU31 มีอัตราการเจริญเติบโตแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับ *B. subtilis* สายพันธุ์ป่า นั่นคือ *B. subtilis* สายพันธุ์ LM31 และ PU31 มีอัตราการเจริญเติบโตดีกว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ป่า ส่วน *B. subtilis* สายพันธุ์ LPG31, UGT31 และ LTA31 มีอัตราการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับ *B. subtilis* สายพันธุ์ป่าที่ใส่ 1% (v/v) 1-butanol



รูปที่ 3.3 การเจริญเติบโตของ *B. subtilis* สายพันธุ์ป่า และ *B. subtilis* สายพันธุ์ LPG31, UGT31 และ LPG31 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Spizizen's minimal media ที่เติม 1-butanol ความเข้มข้น 1% (v/v) เปรียบเทียบกับตัวควบคุม



รูปที่ 3.4 การเจริญเติบโตของ *B. subtilis* สายพันธุ์ป่า และ *B. subtilis* สายพันธุ์ PU31 และ LM31 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Spizizen's minimal media ที่เติม 1-butanol ความเข้มข้น 1% (v/v) เปรียบเทียบกับตัวควบคุม

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.1 ค่า OD₆₀₀ ของ *B. subtilis* สายพันธุ์ป่า และ *B. subtilis* สายพันธุ์ LPG31, UGT31 และ LTA31 เปรียบเทียบระหว่างการเติม 1-butanol ความเข้มข้น 1% (v/v) และตัวควบคุม

type	time	control 1	control 2	control 3	1% BuOH 1	1% BuOH 2	1% BuOH 3	average control	sdm control	average 1%BuOH	Sdm 1%BuOH
WT	0	0.324	0.326	0.318	0.314	0.294	0.290	0.323	0.002	0.299	0.007
	3	1.206	1.048	1.100	0.662	0.672	0.621	1.118	0.046	0.652	0.016
	6	1.828	1.620	1.730	0.930	0.935	0.885	1.726	0.060	0.917	0.016
	9	2.250	2.125	2.220	1.175	1.390	1.090	2.198	0.038	1.218	0.089
	12	2.206	2.125	2.180	1.395	1.395	1.240	2.170	0.024	1.343	0.052
UGT31	0	0.368	0.358	0.344	0.374	0.348	0.346	0.357	0.007	0.356	0.009
	3	1.270	1.026	1.020	0.734	0.696	0.726	1.105	0.082	0.719	0.012
	6	1.748	1.595	1.610	0.930	0.905	0.922	1.651	0.049	0.919	0.007
	9	2.145	2.100	2.185	1.110	1.070	1.065	2.143	0.025	1.082	0.014
	12	2.030	1.990	2.150	1.300	1.215	1.255	2.057	0.048	1.257	0.025
LPG31	0	0.256	0.248	0.244	0.264	0.238	0.272	0.249	0.004	0.258	0.010
	3	0.912	0.898	0.861	0.590	0.496	0.538	0.890	0.015	0.541	0.027
	6	1.452	1.618	1.285	0.718	0.758	0.745	1.452	0.096	0.740	0.012
	9	1.985	2.240	1.705	1.000	1.010	1.000	1.977	0.154	1.003	0.003
	12	2.060	2.170	2.015	1.280	1.485	1.255	2.082	0.046	1.340	0.073
LTA31	0	0.290	0.294	0.312	0.272	0.258	0.304	0.299	0.007	0.278	0.014
	3	1.012	1.017	1.110	0.594	0.633	0.627	1.046	0.032	0.618	0.012
	6	1.450	1.562	1.838	0.820	0.812	0.858	1.617	0.115	0.830	0.014
	9	1.845	2.040	2.255	1.120	1.130	1.135	2.047	0.118	1.128	0.004
	12	2.025	1.935	2.035	1.425	1.450	1.360	1.998	0.032	1.412	0.027

ตารางที่ 3.2 ค่า OD₆₀₀ ของ *B. subtilis* สายพันธุ์ป่า และ *B. subtilis* สายพันธุ์ PU31 และ LM31
เปรียบเทียบระหว่างการเติม 1-butanol ความเข้มข้น 1% (v/v) และตัวควบคุม

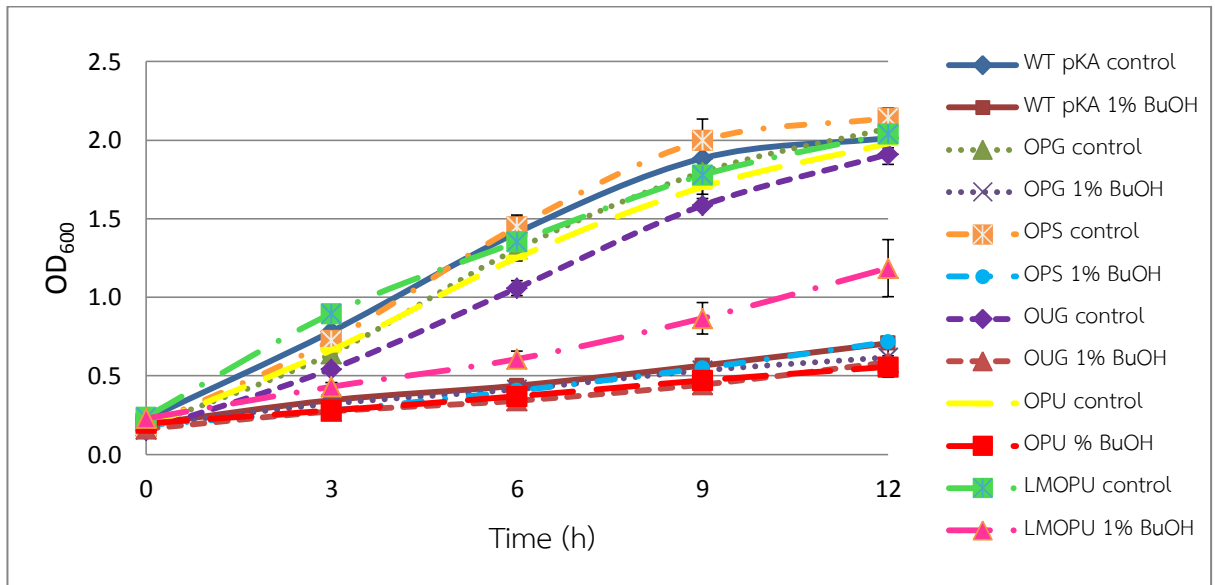
type	time	control 1	control 2	control 3	1% BuOH 1	1% BuOH 2	1% BuOH 3	average control	sdm control	average 1% BuOH	sdm 1% BuOH
WT	0	0.226	0.230	0.232	0.240	0.198	0.178	0.229	0.002	0.205	0.018
	3	0.759	0.792	0.748	0.438	0.374	0.328	0.766	0.013	0.380	0.032
	6	1.188	1.272	1.383	0.666	0.528	0.480	1.281	0.056	0.558	0.056
	9	1.615	1.755	1.805	0.816	0.666	0.633	1.725	0.057	0.705	0.056
	12	2.010	2.095	2.105	0.942	0.816	0.792	2.070	0.030	0.850	0.047
PU31	0	0.274	0.256	0.260	0.248	0.250	0.268	0.263	0.005	0.255	0.006
	3	0.826	0.798	0.880	0.480	0.464	0.482	0.835	0.024	0.475	0.006
	6	1.359	1.338	1.539	0.795	0.765	0.774	1.412	0.064	0.778	0.009
	9	1.570	1.580	2.070	1.185	1.095	1.150	1.740	0.165	1.143	0.026
	12	2.015	1.980	2.610	1.525	1.435	1.390	2.202	0.204	1.450	0.040
LM31	0	0.294	0.314	0.326	0.324	0.250	0.286	0.311	0.009	0.287	0.021
	3	0.885	0.891	0.897	0.574	0.470	0.572	0.891	0.003	0.539	0.034
	6	1.512	1.332	1.323	0.855	0.687	0.822	1.389	0.062	0.788	0.051
	9	2.010	1.635	1.705	1.210	0.844	1.055	1.783	0.115	1.036	0.106
	12	2.025	1.970	1.930	1.540	1.020	1.335	1.975	0.028	1.298	0.151

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2) *B. subtilis* ที่ได้รับการเพิ่มปริมาณยีนที่สนใจ (Overexpression)

การทดสอบความทนต่อ 1-butanol มีสมมติฐานดังนี้ *B. subtilis* สายพันธุ์ OPS, OUG, OPU และ LMOPU ควรมีความทนต่อ 1-butanol ได้ดีขึ้น เพราะการเพิ่มปริมาณยีนเหล่านี้ควรทำให้ปริมาณของ PS และ PE, DGDAG และทั้ง PS PE และ DGDAG (สำหรับสายพันธุ์ OPU และ LMOPU) เพิ่มขึ้นตามลำดับ ซึ่งเป็นไปตามผลที่ได้จากการทดลองก่อนหน้า (รูปที่ 1.1) ที่ปริมาณของเมทาโบไลต์เหล่านี้ลดลงเพื่อตอบสนองต่อ 1-butanol ส่วน *B. subtilis* สายพันธุ์ OPG ควรมีความทนต่อ 1-butanol ได้แย่ง เพราะการเพิ่มปริมาณยีนเหล่านี้ควรทำให้ปริมาณ lysylPG เพิ่มขึ้นและ PE PS ลดลง ซึ่งตรงกันข้ามกับผลการตอบสนองต่อ 1-butanol ตามรูปที่ 1.1

สำหรับ *B. subtilis* ที่ได้รับการเพิ่มปริมาณยีนที่สนใจ (Overexpression) ได้แก่ OPS, OUG, OPG, OPU และ LMOPU นั้น ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Spizizen's minimal media ที่ใช้ประกอบด้วยยาปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 30 $\mu\text{g/ml}$ เพื่อบังคับให้ *B. subtilis* เก็บพลาสมิดไว้ และใส่ 0.1 M Isopropylthiogalactoside (IPTG) เพื่อกระตุ้น P_{spac} promoter และทำให้เกิดการแสดงออกของยีน ก่อนที่ใส่ 1-butanol ความเข้มข้น 1% (v/v) เปรียบเทียบกับไม่ใส่ 1-butanol (เติมน้ำที่ปลอดเชื้อ; ตัวควบคุม) ผลที่ได้จากการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.5 จะเห็นได้ว่าเชื้อ *B. subtilis* ที่ได้รับการเพิ่มปริมาณยีนทุกสายพันธุ์มีอัตราการเจริญเติบโตไม่แตกต่างจาก *B. subtilis* สายพันธุ์ป่า และการใส่ 1% (v/v) 1-butanol ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. subtilis* โดยทุกสายพันธุ์มีอัตราการเจริญเติบโตที่ช้ากว่าปกติ เมื่อพิจารณาการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. subtilis* ได้แก่ สายพันธุ์ OPS, OUG, OPG, OPU และ LMOPU ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่ 1% (v/v) 1-butanol เปรียบเทียบกับ *B. subtilis* สายพันธุ์ป่า ที่ใส่ 1% (v/v) 1-butanol ที่เวลา 12 ชั่วโมง และใช้ t-test ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.05 พบว่า *B. subtilis* ที่ได้รับการเพิ่มปริมาณยีนที่สนใจทั้ง 5 สายพันธุ์ มีอัตราการเจริญเติบโตไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับ *B. subtilis* สายพันธุ์ป่า ที่ใส่ 1% (v/v) 1-butanol



รูปที่ 3.5 การเจริญเติบโตของ *B. subtilis* สายพันธุ์ป่า และ *B. subtilis* สายพันธุ์ OPS, OUG, OPG, OPU และ LMOPU ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Spizizen's minimal media ที่เติม 1-butanol ความเข้มข้น 1% (v/v) เปรียบเทียบกับตัวควบคุม

ตารางที่ 3.3 แสดงค่า OD₆₀₀ ของ *B. subtilis* สายพันธุ์ป่า และ *B. subtilis* สายพันธุ์ OPS, OUG, OPG, OPU และ LMOPU เปรียบเทียบระหว่างการเติม 1-butanol ความเข้มข้น 1% (v/v) และตัวควบคุม

type	time	control 1	control2	control 3	1% BuOH 1	1% BuOH 2	1% BuOH 3	average control	sdm control	average 1% BuOH	sdm 1% BuOH
WT	0	0.222	0.232	0.218	0.184	0.186	0.204	0.224	0.004	0.191	0.006
	3	0.744	0.780	0.822	0.312	0.345	0.378	0.782	0.023	0.345	0.019
	6	1.230	1.422	1.581	0.378	0.444	0.490	1.411	0.101	0.437	0.033
	9	1.660	1.761	2.232	0.528	0.576	0.592	1.884	0.176	0.565	0.019
	12	1.975	2.025	2.040	0.588	0.723	0.810	2.013	0.020	0.707	0.065
OPG	0	0.186	0.172	0.178	0.180	0.188	0.190	0.179	0.004	0.186	0.003
	3	0.664	0.626	0.632	0.342	0.302	0.323	0.641	0.012	0.322	0.012
	6	1.443	1.254	1.221	0.434	0.398	0.410	1.306	0.069	0.414	0.011
	9	2.072	1.612	1.704	0.540	0.528	0.534	1.796	0.141	0.534	0.003
	12	2.320	1.960	1.945	0.633	0.605	0.615	2.075	0.123	0.618	0.008
OPS	0	0.200	0.158	0.178	0.208	0.154	0.198	0.179	0.012	0.187	0.017
	3	0.712	0.712	0.756	0.282	0.287	0.269	0.727	0.015	0.279	0.005
	6	1.590	1.332	1.422	0.426	0.408	0.380	1.448	0.076	0.405	0.013
	9	2.268	1.880	1.844	0.554	0.558	0.536	1.997	0.136	0.549	0.007
	12	2.265	2.115	2.040	0.748	0.705	0.693	2.140	0.066	0.715	0.017
OUG	0	0.140	0.158	0.158	0.138	0.182	0.166	0.152	0.006	0.162	0.013
	3	0.536	0.524	0.570	0.312	0.269	0.239	0.543	0.014	0.273	0.021
	6	1.104	0.960	1.110	0.402	0.360	0.262	1.058	0.049	0.341	0.041
	9	1.616	1.592	1.544	0.520	0.486	0.326	1.584	0.021	0.444	0.060
	12	1.960	1.990	1.780	0.710	0.648	0.400	1.910	0.066	0.586	0.095
OPU	0	0.168	0.174	0.192	0.254	0.202	0.136	0.178	0.007	0.197	0.034
	3	0.674	0.666	0.650	0.293	0.266	0.281	0.663	0.007	0.280	0.008
	6	1.218	1.281	1.254	0.386	0.348	0.376	1.251	0.018	0.370	0.011
	9	1.604	1.840	1.660	0.510	0.426	0.476	1.701	0.071	0.471	0.024
	12	1.875	2.105	1.955	0.625	0.503	0.543	1.978	0.067	0.557	0.036
LMOPU	0	0.240	0.240	0.234	0.210	0.238	0.236	0.238	0.002	0.228	0.009
	3	0.876	0.898	0.912	0.414	0.485	0.392	0.895	0.010	0.430	0.028
	6	1.383	1.347	1.326	0.572	0.704	0.544	1.352	0.017	0.607	0.049
	9	1.808	1.776	1.748	0.794	1.062	0.742	1.777	0.017	0.866	0.099
	12	2.105	2.075	1.940	1.063	1.545	0.948	2.040	0.051	1.185	0.183

4) การวิเคราะห์ไขมันประเภทฟอสโฟลิปิดและกลีเซอโรลิปิดจาก *B. subtilis*

ทำการสกัดไขมันจากเซลล์ของ *B. subtilis* สายพันธุ์ต่างๆ ในตารางที่ 2.1 โดยการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* ในลักษณะเดียวกับการทดสอบความทนต่อ 1-butanol เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วทำการสกัดไขมันด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มและเมทานอล เพื่อให้เกิดการแยกชั้น โดยสารละลายชั้นบนเป็นส่วนของ methanol และน้ำ ส่วนสารละลายใสชั้นล่างเป็นส่วนของ chloroform โดยจะมีไขมันชนิดต่างๆ ละลายอยู่ในชั้นนี้ ในการสกัดไขมันจากเซลล์ของ *B. subtilis* นี้ เพื่อวัดระดับฟอสโฟลิปิดและกลีเซอโรลิปิดที่เกี่ยวข้องในสายพันธุ์ต่างๆ และวิเคราะห์ผลของการปรับเปลี่ยนชนิดของไขมันบนเยื่อหุ้มเซลล์ต่อความทน 1-butanol ด้วยเทคนิค liquid chromatography – mass spectrometry ในลำดับถัดไป



บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้สามารถดัดแปลงพันธุกรรมของ *B. subtilis* สายพันธุ์ 168 โดยการนำพลาสมิดดีเอ็นเอ สายผสมที่ทำการตัดต่อในหลอดทดลองเข้าสู่เซลล์ของ *B. subtilis* โดยวิธี Transformatrion ทำให้ได้สายพันธุ์ต่างๆ ที่มีการหยุดการแสดงออกของยีน *mprF*, *ugtP*, *yfnI* ในชีวิตวิธีการสังเคราะห์เยื่อหุ้มเซลล์ของ *B. subtilis* ได้แก่ สายพันธุ์ LPG31, UGT31 และ LTA31 ต่อมาสายพันธุ์เหล่านี้ได้รับการตรวจสอบการปรับเปลี่ยนทางพันธุกรรมของยีน ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) และวัดขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Gel electrophoresis จากนั้นได้ทำการปรับเปลี่ยนพันธุกรรมของ *B. subtilis* สายพันธุ์ LPG31 และ UGT31 ต่อโดยได้ทำการลบยีน *yfnI* ใน *B. subtilis* สายพันธุ์ LPG31 และยีน *pssA* ใน *B. subtilis* สายพันธุ์ UGT31

การทดสอบความทนต่อ 1-butanol ที่ความเข้มข้น 1% (v/v) ของ *B. subtilis* สายพันธุ์ 168 และ *B. subtilis* ที่ได้รับการดัดแปลงทางพันธุกรรม (Mutant) สายพันธุ์ LPG31, UGT31, LTA31, PU31 และ LM31 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Spizizen's minimal media พบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ PU31 และ LM31 ซึ่งมีการกลายพันธุ์ของยีน *yfnI/mprF* และ *pssA/ugtP* ตามลำดับ มีความทนต่อ 1-butanol ที่ความเข้มข้น 1% (v/v) ดีกว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ 168 ส่วน LPG31, UGT31 และ LTA31 ซึ่งมีการกลายพันธุ์ของยีน *mprF*, *ugtP* และ *yfnI* ตามลำดับ มีความทนต่อ 1-butanol ที่ความเข้มข้น 1% (v/v) ใกล้เคียงกับ *B. subtilis* สายพันธุ์ 168

การทดสอบความทนต่อ 1-butanol ของ *B. subtilis* สายพันธุ์ 168 และ *B. subtilis* ที่ได้รับการเพิ่มปริมาณยีนที่สนใจ (Overexpression) สายพันธุ์ OPS, OUG, OPG, OPU และ LMOPU ซึ่งมีการเพิ่มการแสดงออกของยีน *pssA*, *ugtP*, *pgsA*, *pssA/ugtP* ในสายพันธุ์ 168 และ *pssA/ugtP* ในสายพันธุ์ LM31 ตามลำดับ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Spizizen's minimal media พบว่า *B. subtilis* ที่ได้รับการเพิ่มปริมาณยีนที่สนใจทั้ง 5 สายพันธุ์ มีความทนต่อ 1-butanol ที่ความเข้มข้น 1% (v/v) ใกล้เคียงกับ *B. subtilis* สายพันธุ์ 168

ผู้วิจัยสามารถสกัดไขมันจากเซลล์ของ *B. subtilis* ได้ด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มและเมทานอล เพื่อวัดระดับฟอสโฟลิปิดและกลีเซอโรลิปิดที่เกี่ยวข้อง ด้วยเทคนิค liquid chromatography – mass spectrometry (LC–MS) ต่อไป

การศึกษาวิจัยในอนาคต

ศึกษาระดับฟอสโฟลิปิดและกลีเซอโรลิปิดที่เกี่ยวข้องในสารสกัดไขมันของ *B. subtilis* ที่ได้รับการดัดแปลงทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค liquid chromatography – mass spectrometry (LC–MS) เพื่อวิเคราะห์ผลของการปรับเปลี่ยนชนิดของไขมันบนเยื่อหุ้มเซลล์ต่อความทน 1-butanol ของ *B. subtilis* สายพันธุ์ต่างๆ ต่อไป



ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

- 1 Connor, M. R.; Liao, J. C. Microbial production of advanced transportation fuels in non-natural hosts. *Curr. Opin. Biotech.* **2009**, *20*, 307-315.
- 2 Gree, E. M. Fermentative production of butanol-the industrial perspective. *Curr. Opin. Biotech.* **2011**, *22*, 337-343.
- 3 Ni, Y.; Sun, Z. Recent progress on industrial fermentative production of acetone–butanol–ethanol by *Clostridium acetobutylicum* in China. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *83*, 415-423.
- 4 Liu, S.; Qureshi, N. How microbes tolerate ethanol and butanol. *New. Biotechnol.* **2009**, *26*, 117-121.
- 5 Kataoka, N.; Tajima, T.; Kato, J.; Rachadech, W.; Vangnai, A. S. Development of butanol-tolerant *Bacillus subtilis* strain GRSW2-B1 as a potential bioproduction host. *AMB. Express.* **2011**, Doi: 10.1186/2191-0855-1-10.
- 6 Stein, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol. Microbiol.* **2005**, *56*, 845-857.
- 7 Vinayavekhin, N.; Mahipant, G.; Vangnai, A. S.; Sangvanich, P. Untargeted metabolomics analysis revealed changes in the composition of glycerolipids and phospholipids in *Bacillus subtilis* under 1-butanol stress. *Appl Microbiol Biot.* **2015**, *99*, 5971-5983.
- 8 Besson, F.; Peypoux, F.; Michel, G.; Delcambe, L. Identification of antibiotics of iturin group in various strains of *Bacillus subtilis*. *J. Antibiot.* **1978**, *4*, 284-288.
- 9 Bechard, J.; Eastwell, K, C.; Sholberg, P. L.; Mazza, G.; Skura, B. Isolation and partial chemical characterization of an antimicrobial peptide produce by a strain of *Bacillus subtilis*. *J. Agr. Food. Chem.* **1998**, *46*, 5355-5361.

- 10 Chan, Y. K.; Savard, M. E.; Reid, L. M.; Cyr, T. D.; McCormick, W. A.; Séguin, C. Identification of lipopeptide antibiotics of a *Bacillus subtilis* isolate and their control of *Fusarium graminearum* diseases in maize and wheat. *Biocontrol*. **2009**, *54*, 567-574.
- 11 Matsuoka, S.; Hashimoto, M.; Kamiya, Y.; Miyazawa, T.; Ishikawa, K.; Hara, H.; Matsumoto, K. The *Bacillus subtilis* essential gene *dgkB* is dispensable in mutants with defective lipoteichoic acid synthesis. *Genes Genet Syst*. **2011**, *86(6)*, 365-76.
- 12 Kabelitz, N.; Santos, PM.; Heipieper, HJ. Effect of aliphatic alcohols on growth and degree of saturation of membrane lipids in *Acinetobacter calcoaceticus*. *Fems. Microbiol. Lett*. **2003**, *220(2)*, 223-7.
- 13 Boch, J.; Kempf, B.; Bremer, E. Osmoregulation in *Bacillus subtilis*: synthesis of the osmoprotectant glycinebetaine from exogenously provided choline. *Bacteriol*. **1994**, *176(17)*, 5364-5371.
- 14 Heipieper, H.; Diefenbach, R.; Keweloh, H. Conversion of *cis* unsaturated fatty acids to *trans*, a possible mechanism for the protection of phenol-degrading *Pseudomonas putida* P8 from substrate toxicity. *Appl. Environ. Microb*. **1992**, *58(6)*, 1847-1852.
- 15 Neumann, G.; Veeranagouda, Y.; Karegoudar, TB.; Sahin, O.; Mausezahl, I.,; Kabelitz, N.; Kappelmeyer, U.; Heipieper, HJ. Cells of *Pseudomonas putida* and *Enterobacter* sp. adapt to toxic organic compounds by increasing their size. *Extremophiles: life under extreme conditions*. **2005**, *9(2)*, 163-8.
- 16 Dick, J.; De Windt, W.; De Graef B.; Saveyn, H.; Van der Meeren P.; De Belie N. Bio-deposition of a calcium carbonate layer on degraded limestone by *Bacillus* species. *Biodegradation*. **2006** *17*, 357-367
- 17 Desai, JD.; Banat, IM. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. **1997**, *61(1)*, 47-64.

- 18 Kunst, F.; Ogasawara, N.; Moszer, I.; Albertini, AM.; Alloni, G.; Azevedo, V.; Bertero, MG.; Bessieres, P.; Bolotin, A.; Borchert, S.; Borriss, R.; Boursier, L.; Brans, A.; Braun, M.; Brignell, SC.; Bron, S.; Brouillet, S.; Bruschi, CV.; Caldwell, B.; Capuano, V.; Carter, NM.; Choi, SK.; Codani, JJ.; Connerton, IF.; Cummings, NJ.; Daniel, RA.; Yoshikawa, H.; Danchin, A. The complete genome sequence of the Gram-positive Bacterium. *Bacillus subtilis*. *Nature*. **1997**, *390*(6657), 249-256.
- 19 Nakano, MM.; Dailly, YP.; Zuber, P.; Clark, DP. Characterization of anaerobic fermentative growth of *Bacillus subtilis*: identification of fermentation end products and genes required for growth. *J. Bacteriol.* **1997**, *179*(21), 6749-55.
- 20 Spizizen, J. Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate. *P. Natl. Acad. Sci. Usa*. **1958**, *44*(10), 1072-1078.
- 21 Bohin, JP.; Rigomier, D.; Schaeffer, P. Ethanol sensitivity of sporulation in *Bacillus subtilis*: a new tool for the analysis of the sporulation process. *J. Bacteriol.* **1976**, *127*(2), 934- 40.
- 22 Nicolaou, SA.; Gaida, SM.; Papoutsakis, ET.; A comparative view of metabolite and substrate stress and tolerance in microbial bioprocessing: From biofuels and chemicals, to biocatalysis and bioremediation. *Metab. Eng.* **2010**, *12*(4), 307-31.
- 23 Nwaogu, L. A.; Onyeze, G. O. C.; Nwabueze, R. N. Degradation of diesel oil in a polluted soil using *Bacillus subtilis*. *Afr. J. Biotechnol.* **2008**, *7*(12), 1939-1943
- 24 Matsumoto M.; de Bont JA.; Isken S. Isolation and characterization of the solvent-tolerant *Bacillus cereus* strain R1. *J Biosci Bioeng.* 2002, *94*(1), 45-51
- 25 Salton, M R J. Structure and Function of Bacterial Cell Membranes. *Annu. Rev. Microbiol.* **1967**. *21*, 417-442.
- 26 Vining, Leo C. Functions of Secondary Metabolites. *Annu. Rev. Microbiol.* **1990**, *44*, 395-427.

27 Woods, D. D. Bacterial Metabolism. *Annu. Rev. Microbiol.* 1947, 1, 115-140



ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ก-1 ค่า t-test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ของ *B. subtilis* สายพันธุ์ OPS, OUG, OPG, OPU และ LMOPU เปรียบเทียบกับ *B. subtilis* สายพันธุ์ป่า ที่โตในอาหารเลี้ยงเชื้อ SMM ที่เติม 1-butanol ความเข้มข้น 1% (v/v) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

สายพันธุ์ (เปรียบเทียบกับWT)	F-test			T-test		
	Fcal	df	Fcritical value	Tcal	df	Tcritical value
OPG	62.1507	2	19	1.3722	2	4.3027
OPS	14.9617	2	19	0.1249	4	2.7764
OUG	2.1504	2	19	1.0556	4	2.7764
OPU	3.2350	2	19	2.0299	4	2.7764
LMOPU	8.0178	2	19	2.4664	4	2.7764

ตารางที่ ก-2 ค่า t-test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ของ *B. subtilis* สายพันธุ์ UGT31, LPG31 และ LTA31 เปรียบเทียบกับ *B. subtilis* สายพันธุ์ป่า ที่โตในอาหารเลี้ยงเชื้อ SMM ที่เติม 1-butanol ความเข้มข้น 1% (v/v) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

สายพันธุ์ (เปรียบเทียบกับWT)	F-test			T-test		
	Fcal	df	Fcritical value	Tcal	df	Tcritical value
UGT31	4.4286	2	19	1.5151	4	2.7764
LPG31	1.9886	2	19	0.0373	4	2.7764
LTA31	3.7104	2	19	1.1738	4	2.7764

ตารางที่ ก-3 ค่า t-test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ของ *B. subtilis* สายพันธุ์ PU31 และ LM31 เปรียบเทียบกับ *B. subtilis* สายพันธุ์ป่า ที่โตในอาหารเลี้ยงเชื้อ SMM ที่เติม 1-butanol ความเข้มข้น 1% (v/v) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

สายพันธุ์ (เปรียบเทียบกับWT)	F-test			T-test		
	Fcal	df	Fcritical value	Tcal	df	Tcritical value
PU31	1.3740	2	19	9.8124	4	2.7764
LM31	0.0946	2	19	2.8336	4	2.7764

ประวัติผู้ทำวิจัย

นางสาวเพ็ญสุพัต ทองคโโชค เกิดเมื่อวันที่ 23 ตุลาคม พ.ศ.2536 ที่จังหวัดยะลา สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนจุฬาภรณราชวิทยาลัย สตูล จังหวัดสตูล เมื่อปีการศึกษา 2554 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2555 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ บ้านเลขที่ 138 ถ.วิฑูรอุทิศ 1 ต.สะเตง อ.เมือง จ.ยะลา รหัสไปรษณีย์ 95000 อีเมล gly1210@gmail.com



ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย