

การผลิตแอล-ฟีนิลอะลานีนโดยระบบพลาสมิดคู่ในรีคอมบิแนนต์ *Escherichia coli*

L-Phenylalanine production using dual plasmid system in recombinant

Escherichia coli

ภคินี รัชนีลัดดาจิต (Pakinee Ratchaneeladdajit) *

กนกทิพย์ ภัคดีบำรุง (Kanoktip Packdibamrung) **

บทคัดย่อ

L-Phenylalanine (L-Phe) เป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารสำคัญในทางการแพทย์และอุตสาหกรรมอาหาร เช่น aspartame จากความต้องการในการใช้ aspartame ที่เพิ่มมากขึ้นนำไปสู่การปรับปรุงผลิต L-Phe ในจุลินทรีย์โดยเฉพาะใน *Escherichia coli* โดยกระบวนการวิศวกรรมเมแทบอลิซึม งานวิจัยนี้ได้ทำการเพิ่มการผลิต L-Phe โดยโคลนยีนที่สำคัญในวิถีการสังเคราะห์ L-Phe จำนวน 4 ยีนเข้าสู่เวกเตอร์ pRSFDuet-1 จากนั้นทรานส์ฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* BL21(DE3) ร่วมกับยีนที่เข้ารหัสโปรตีนที่นำ glycerol เข้าสู่เซลล์ และยีนที่เข้ารหัสโปรตีนที่นำกรดอะมิโนชนิดอะโรมาติกออกนอกเซลล์ที่อยู่ในเวกเตอร์ pBAD33 โคลนดังกล่าวสามารถผลิต L-Phe ได้สูงสุด คือ 608 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงในสูตรอาหารที่มี glycerol 30, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 50, KH_2PO_4 3, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3, NaCl 1, Na-citrate 1.5, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.015, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1125, thiamine-HCl 0.075, yeast extract 3 กรัมต่อลิตร และ 1.5 มิลลิลิตรของสารละลาย trace elements (ประกอบด้วย $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$ 2.0, $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.75, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 2.5, H_3BO_3 0.5, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 24, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3.0, $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2.5 และ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 15 กรัมต่อลิตร) pH 7.0 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 168 ชั่วโมง *

Abstract

L-Phenylalanine (L-Phe) is mainly used as a reactant for production of important substances in medical and food industry such as aspartame. An increase in demand for aspartame leads to the improvement of L-Phe production in microorganisms, especially *Escherichia coli* by metabolic engineering. In this research, L-Phe production was increased by cloning four important genes in L-Phe biosynthesis pathway into pRSFDuet-1 vector. After that the recombinant plasmid was co-transformed with pBAD33 vector containing a glycerol uptake gene and an aromatic amino acid exporter gene into *E. coli* BL21(DE3). The highest production

* นิสิตปริญญาโท ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กทม.10330 e-mail: yhing.bccu@gmail.com (Student of Master of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University)

** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย e-mail: kanoktip.p@chula.ac.th (Assistant Professor Doctor, Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University)

of L-Phe at 608 mg/L was obtained when the recombinant clone was cultured in minimum medium containing glycerol 30, (NH₄)₂SO₄ 50, KH₂PO₄ 3, MgSO₄•7H₂O 3, NaCl 1, Na-citrate 1.5, CaCl₂•2H₂O 0.015, FeSO₄•7H₂O 0.1125, thiamine-HCl 0.075, yeast extract 3 g/L and 1.5 ml/l of trace elements solution (contained (g/l): Al₂(SO₄)₃•18H₂O 2.0, CoSO₄•7H₂O 0.75, CuSO₄•5H₂O 2.5, H₃BO₃ 0.5, MnSO₄•7H₂O 24, Na₂MoO₄•2H₂O 3.0, NiSO₄•6H₂O 2.5 and ZnSO₄•7H₂O 15) pH 7.0 at 37 °C for 168 hours.

บทนำ

L-Phenylalanine (L-Phe) เป็นกรดอะมิโนที่จำเป็นชนิดหนึ่ง มีโครงสร้างแบบอะโรมาติก พบได้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม พืช และจุลินทรีย์ (Sprenger, 2007) ในอุตสาหกรรมนิยมนำมาใช้เป็นสารตัวกลาง (intermediate) เพื่อผลิตสารปรุงแต่งอาหาร aspartame และใช้ผลิตสารสำคัญในทางเภสัชวิทยา เป็นต้น (Baez-Viveros และ คณะ, 2004) วิธีหนึ่งในกระบวนการผลิต L-Phe ในปัจจุบัน คือ การหมักโดยใช้จุลินทรีย์ (De Boer และ Dijkhuizen, 1990)

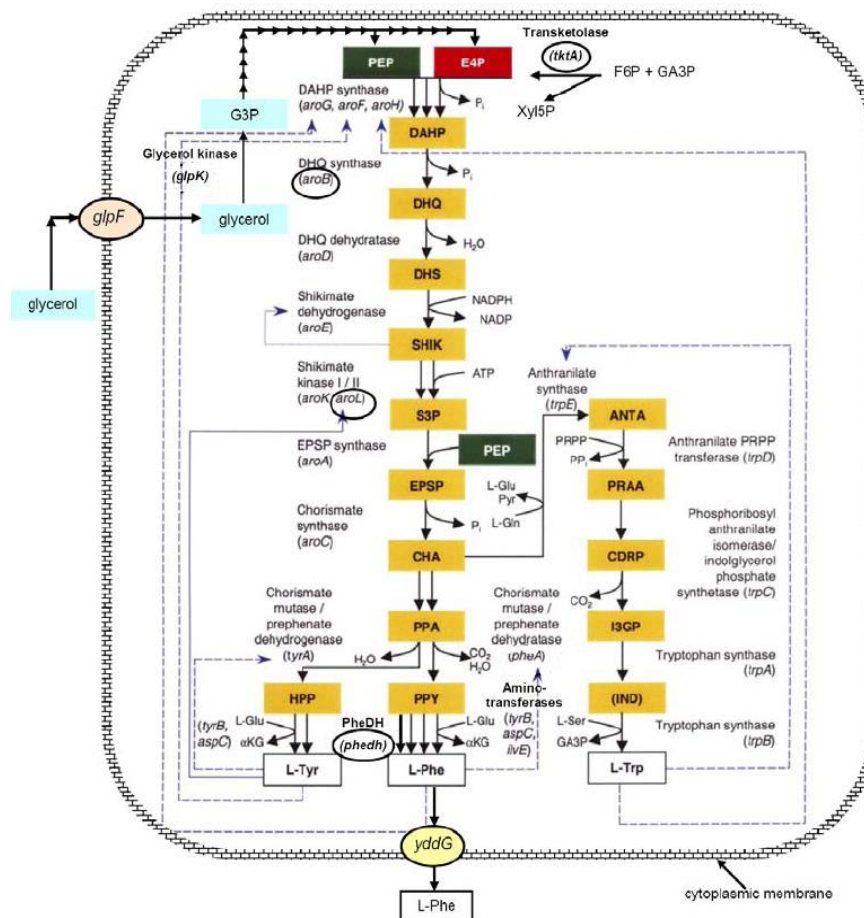
จากวิธีการสังเคราะห์กรดอะมิโนแบบอะโรมาติก ดังแสดงในรูปที่ 1 Thongchuang และคณะ (2012) ได้สร้างรีคอมบิแนนต์ *Escherichia coli* ที่มีพลาสมิด pPTFBLy ซึ่งได้จากการแทรกยีนที่สำคัญในการสังเคราะห์ L-Phe 6 ยีน เข้าสู่เวกเตอร์ pRSFDuet-1 ได้แก่ 1) ยีน *glpF* เข้ารหัสให้โปรตีน glycerol facilitator ซึ่งทำหน้าที่นำ glycerol เข้าสู่เซลล์ 2) ยีน *tktA* เข้ารหัสให้ transketolase ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ erythrose-4-phosphate (E4P) 3) ยีน *aroB* ซึ่งเข้ารหัส 3-dehydroquinate synthase (DHQ synthase) และ 4) *aroL* ซึ่งเข้ารหัส shikimate kinase II โดยทั้งสองเป็นเอนไซม์ที่กำหนดอัตราเร็วของวิถีการสังเคราะห์ L-tyrosine, L-phenylalanine และ L-tryptophan 5) ยีน *phedh* เข้ารหัส phenylalanine dehydrogenase เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน phenylpyruvate เป็น L-Phe และ 6) ยีน *yddG* ที่เข้ารหัสโปรตีนที่ทำหน้าที่นำ L-Phe ออกจากเซลล์ โดยยีนทั้งหมดได้มาจาก *E. coli* ยกเว้น *phedh* ที่มาจาก *Bacillus lentus* โดยมีวัตถุประสงค์ที่จะสร้างรีคอมบิแนนต์โคลนที่สามารถสร้าง L-Phe ในปริมาณสูงเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี glycerol เป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งมีราคาถูกเนื่องจากเป็นผลพลอยได้จากการผลิตไบโอดีเซล

Thongchuang (2011) ได้ทำการปรับสูตรอาหารและภาวะการเลี้ยงเชื้อในระดับขวดเยาะ พบว่ารีคอมบิแนนต์โคลนที่มี pPTFPLY สามารถผลิต L-Phe ได้ 429 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงใน minimum medium (glycerol 30, (NH₄)₂SO₄ 50, MgCl₂ 0.81, KH₂PO₄ 2.43, K₂HPO₄ 2.43, yeast extract 0.085, thiamine-HCl 0.0085, FeSO₄ 0.002, MnSO₄ 0.002, CaCl₂ 0.05 และ ZnSO₄ 0.01 กรัมต่อลิตร pH 7.4 ที่มี kanamycin 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยไม่ต้องเติม isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 240 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามเมื่อเลี้ยงโคลน pPTFPLY ในอาหารแข็ง พบว่าเติบโตได้ช้าและโคโลนีมีลักษณะเปลี่ยนจากนูนเป็นแบน อาจเนื่องจากความผิดปกติบนเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งเป็นผลจากการแสดงออกของ *glpF* และ *yddG* ภายใต้โปรโมเตอร์ T7 ที่เกิดขึ้นได้แม้ไม่มีการเหนี่ยวนำด้วย IPTG ทั้งนี้มีรายงานถึงการแสดงออกที่มากเกินไปของยีนภายใต้โปรโมเตอร์ T7 โดย Miroux และ John (1996) ได้โคลนยีนที่เข้ารหัสโปรตีนที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ทั้งหมด 7 ชนิดเข้าสู่ พลาสมิด pET-17b แล้วทรานส์ฟอร์มเข้า *E. coli*

BL(21)DE3 เมื่อนำรีคอมบิแนนต์โคลนที่ได้ไปเลี้ยงในอาหารแข็งที่ไม่เติม IPTG พบว่าโคลนมีขนาดเล็กมาก นอกจากนั้นรีคอมบิแนนต์โคลนไม่สามารถเติบโตได้ในอาหารที่เติม IPTG

Guzman และคณะ (1995) ได้สร้างพลาสมิดเวกเตอร์ pBAD ที่ประกอบด้วยโปรโมเตอร์ ara และยีนควบคุม *araC* โดยยีนที่อยู่ภายใต้โปรโมเตอร์ ara จะมีการแสดงออกเมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วย arabinose เท่านั้นและการแสดงออกจะลดลงเมื่อมี glucose ซึ่งเวกเตอร์นี้เหมาะกับการแสดงออกของโปรตีนที่เป็นพิษต่อเซลล์ รวมทั้งโปรตีนที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ดังนั้น ถ้าโคลนยีน *glpF* และ *yddG* ไว้ภายใต้โปรโมเตอร์ ara น่าจะทำให้เซลล์มีการเติบโตได้ปกติและมีการผลิต L-Phe ได้มากขึ้น

อย่างไรก็ตามสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการเติบโตของเชื้อและเหนี่ยวนำให้สังเคราะห์ L-Phe ได้ในปริมาณแตกต่างกัน เช่น Baez-Viveros และคณะ (2004) เปรียบเทียบการผลิต L-Phe จาก resting cell ของรีคอมบิแนนต์ *E. coli* JM101 และ *E. coli* PB12 ที่มียีน *pheA^{fbr}* และ *aroF^{fbr}* ในพลาสมิด pTrc และ pACYC184 ตามลำดับ ที่เติบโตในอาหาร pH 7.0 ที่มี glucose 10, Na₂HPO₄ 29.8, NaCl 2.5, KH₂PO₄ 15, NH₄Cl 4, MgSO₄·7H₂O 0.3 กรัมต่อลิตร, CaCl₂ 5.6, thiamine-HCl 0.09 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 1 มิลลิลิตรของสารละลาย trace element (ที่ประกอบด้วย CaCl₂·2H₂O 0.1, CuCl₂·5H₂O 0.02, CoCl₂·6H₂O 0.1, FeSO₄·7H₂O 0.2, MnSO₄·5H₂O 0.1, ZnSO₄·7H₂O 0.1 และ Na₂MoO₄·2H₂O 0.01 กรัมต่อลิตร) พบว่ารีคอมบิแนนต์ *E. coli* PB12 สามารถผลิต L-Phe ได้มากที่สุด คือ 0.45 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้น Zhou และคณะ (2011) เลี้ยงรีคอมบิแนนต์ *E. coli* BR-42 ที่มี pAP-B03 ซึ่งมียีน *pheA^{fbr}* และ *aroF* ในอาหารที่มี glucose 20, (NH₄)₂SO₄ 5, KH₂PO₄ 3, MgSO₄·7H₂O 3, NaCl 1, Na-citrate 1.5, CaCl₂·2H₂O 0.015, FeSO₄·7H₂O 0.1125, thiamine-HCl 0.075, yeast extract 3 กรัมต่อลิตร และ 1.5 มิลลิลิตรของสารละลาย trace element (ประกอบด้วย Al₂(SO₄)₃·18H₂O 2.0, CoSO₄·7H₂O 0.75, CuSO₄·5H₂O 2.5, H₃BO₃ 0.5, MnSO₄·7H₂O 24, Na₂MoO₄·2H₂O 3.0, NiSO₄·6H₂O 2.5 และ ZnSO₄·7H₂O 15 กรัมต่อลิตร) pH 7.0 ในถังหมักขนาด 3 ลิตร โดยใช้ระบบ fed batch ได้ปริมาณ L-Phe สูงสุด 57.63 กรัมต่อลิตร



วัดภูประสงค์

เพื่อปรับปรุงการผลิต L-Phe ใน *E. coli* ให้มากขึ้นโดยโคลนยีน *yddG* และ *glpF* เข้าสู่พลาสมิด pBAD33 ซึ่งเป็น tightly controlled vector เพื่อแสดงออกพร้อมกับยีน *aroB*, *aroL*, *phedh* และ *tktA* บนเวกเตอร์ pRSFDuet-1 จากนั้นทำการหาสูตรอาหารที่เหมาะสมเมื่อใช้ glycerol เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต L-Phe

วิธีการวิจัย

1. สายพันธุ์แบคทีเรีย พลาสมิด และภาวะในการเลี้ยงแบคทีเรีย

งานวิจัยนี้ใช้ *E. coli* BL21(DE3) เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับการโคลนและการแสดงออกของยีน และใช้ pAroB (pRSFDuet-1 ที่มียีน *aroB* (GenBank no. 6058405) และ pPTFBL (pRSFDuet-1 ที่มียีน *aroB*, *aroL* (GenBank no. 6059445), *phedh* (GenBank no. EU880599.1), *tktA* (GenBank no. 6059044) และ *glpF* (GenBank no. 6062231) จากงานวิจัยของ Thongchuang (2011) สำหรับการสร้าง pBLPT ส่วนการสร้าง pYF ใช้ pPTFBLY (Thongchuang, 2011) เป็น

แหล่งของยีน *yddG* (GenBank no. 6062375) และ *glpF* (GenBank no. 6062231) และใช้ pBAD33 (Creative Biogene) เป็นพลาสมิดเวกเตอร์

ทำการเลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะ chloramphenicol ความเข้มข้นสุดท้าย 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรสำหรับรีคอมบิแนนต์โคลนที่ได้จากการแทรกยีนใน pBAD33 และ kanamycin ความเข้มข้นสุดท้าย 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรสำหรับโคลนที่แทรกยีนใน pRSFDuet-1 ที่ 37 องศาเซลเซียส

2. เทคนิคทางดีเอ็นเอที่ใช้

การสกัดพลาสมิดใช้ HiYield™ Gel/PCR Fragments Extraction Kit (Real Biotech Corporation) ส่วนการย่อยดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ restriction ใช้ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต (New England BioLabs) ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) ใช้ *Pfu* DNA polymerase (Thermo Scientific) โดยไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนยีนต่างๆ แสดงดังตารางที่ 1 สำหรับการเชื่อมยีนใช้ เอนไซม์ไลเกส (New England BioLabs)

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ยีนที่ต้องการเพิ่มจำนวน	แหล่งที่มาของไพรเมอร์
XbaI yddG forward	<u>GCTCTAGA</u> ATGACACGACAAAAAGCAACGCTCATA	ยีน <i>yddG</i> จาก pPTFBLY	ออกแบบในการทดลองนี้
Sall yddG reverse	<u>ACGCGTCGAC</u> TTAACCACGACGTGTCGCCAG		
XbaI glpF forward	<u>GCTCTAGA</u> ATGAGTCAAACATCAACCTTGAAAGG	ยีน <i>glpF</i> จาก pPTFBLY	
Sall glpF reverse	<u>ACGCGTCGAC</u> TTACAGCGAAGCTTTTTGTCTGAAGGA		
Sall Ara promoter	<u>ACGCGTCGAC</u> CTGACGCTTTTTATCGCAACTCTCTACTG	โปรโมเตอร์ ara และยีน <i>glpF</i> จาก pGlpF	
PstI glpF gene	<u>AACTGCAG</u> TTACAGCGAAGCTTTTTGTCTGAAGGA		

* เส้นใต้แสดงตำแหน่งจดจำของเอนไซม์

ตารางที่ 2 สูตรอาหารในการผลิต L-Phe

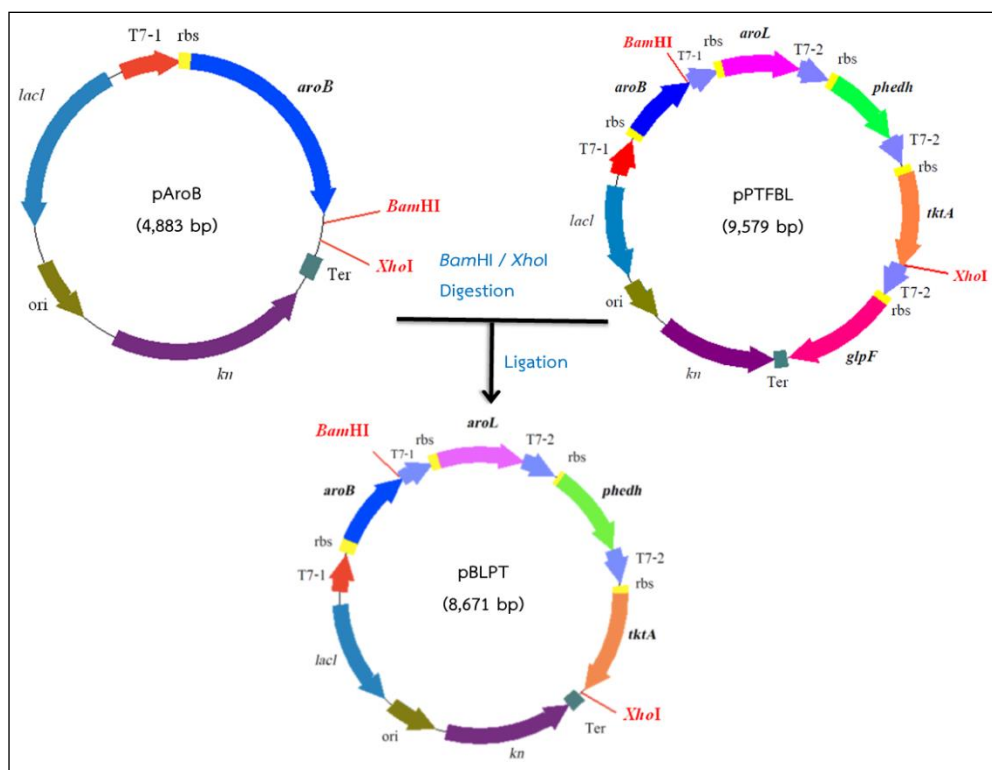
ส่วนประกอบในอาหารเหลว	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		
	สูตรที่ 1*	สูตรที่ 2**	สูตรที่ 3***
pH	7.4	7.0	7.0
glycerol	30.0	40.0	20.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	50.0	5.0	
NH ₄ Cl			4.0
K ₂ HPO ₄	2.4		
KH ₂ PO ₄	2.4	3.0	15.0
MgCl ₂	0.8		
MgSO ₄ ·7H ₂ O		3.0	0.5
Na ₂ HPO ₄			30.0
Na-citrate		1.5	
NaCl		1.0	2.5
thiamine-HCl	8.5×10^{-3}	7.5×10^{-2}	9.0×10^{-5}
yeast extract	8.5×10^{-2}	3.0	
Al ₂ (SO ₄) ₃ ·18H ₂ O		3.0×10^{-6}	
CaCl ₂	5.0×10^{-2}	1.5×10^{-2}	5.5×10^{-4}
CoCl ₂ ·6H ₂ O			1.0×10^{-7}
CoSO ₄ ·7H ₂ O		1.1×10^{-6}	
CuCl ₂ ·5H ₂ O			2.0×10^{-8}
CuSO ₄ ·5H ₂ O		3.8×10^{-6}	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	2.0×10^{-3}	1.1×10^{-1}	2.0×10^{-7}
H ₃ BO ₃		7.5×10^{-7}	
MnSO ₄ ·7H ₂ O	3.3×10^{-3}	3.6×10^{-5}	1.1×10^{-7}
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O		4.5×10^{-6}	1.0×10^{-8}
NiSO ₄ ·6H ₂ O		3.8×10^{-6}	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.8×10^{-2}	2.3×10^{-5}	1.0×10^{-7}

* จาก Thongchuang และคณะ, 2012, ** ดัดแปลงจาก Zhou และคณะ, 2011, *** ดัดแปลงจาก Baez-Viveros และคณะ, 2004

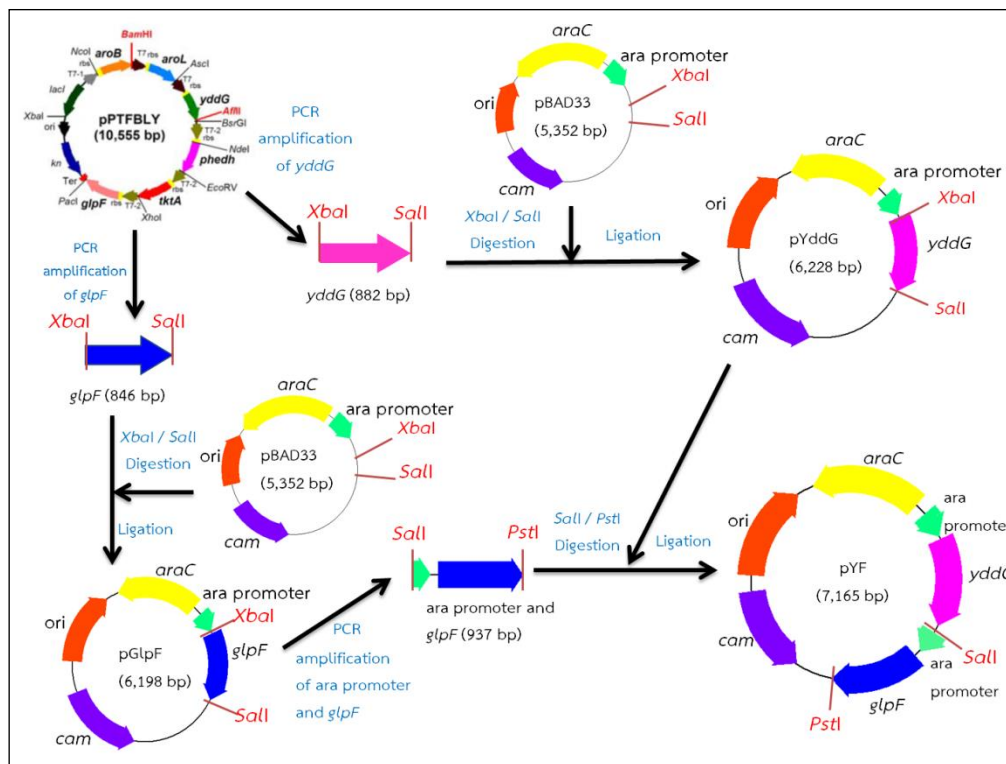
3. การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิต L-Phe

3.1 ศึกษาการเติบโตของเซลล์โดยเลี้ยงรีคอมบิแนนต์โคลนที่มี pBLPT และ pYF (pBLPT & pYF) เปรียบเทียบกับโคลนที่มีพลาสมิด pPTFBLY โดยเลี้ยงใน LB broth ที่ 37 องศาเซลเซียส จนถึงระยะ mid-log phase (OD600 ประมาณ 0.6) นำเชื้อที่ได้ไปเลี้ยงต่อใน minimum medium ที่ดัดแปลงจากงานวิจัยที่ใช้ *E. coli* ในการผลิต L-Phe ให้ใช้ glycerol เป็นแหล่งของคาร์บอนแทน glucose โดยคำนวณให้โมลของคาร์บอนเท่าเดิม จำนวน 3 สูตร ดังแสดงในตารางที่ 2 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่มี chloramphenicol หรือ kanamycin ความเข้มข้นสุดท้าย 10 และ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในกรณีที่รีคอมบิแนนต์โคลนมีพลาสมิด pYF เมื่อค่า OD600 ประมาณ 0.6 ทำการเติม arabinose ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.2 % w/v เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีน *glpF* และ *yddG* ติดตามวัดการเติบโตโดยวัดค่า OD600 ทุก 12 ชั่วโมงในช่วง 100 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นติดตามทุก 24 ชั่วโมง นำสารแขวนลอยเชื้อที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000xg เป็นเวลา 15 นาที และเก็บส่วนใสสำหรับตรวจวัดปริมาณของ L-Phe

3.2 ตรวจวัดปริมาณของ L-Phe โดยนำตัวอย่างที่ได้จากข้อ 3.1 มากรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร จากนั้นนำไปตรวจวัดปริมาณของ L-Phe ด้วย High performance liquid chromatography (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ Chirex 3126 (D)-penicillamine LC ขนาดความยาว 150 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร ใช้ copper sulfate เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์และ methanol อัตราส่วน 70:30 เป็น mobile phase อัตราเร็ว 1 มิลลิลิตรต่อนาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 254 นาโนเมตรด้วย UV detector



รูปที่ 2 แผนผังขั้นตอนการสร้าง pBLPT



รูปที่ 3 แผนผังขั้นตอนการสร้าง pYF

ผลการทดลองและอภิปรายผล

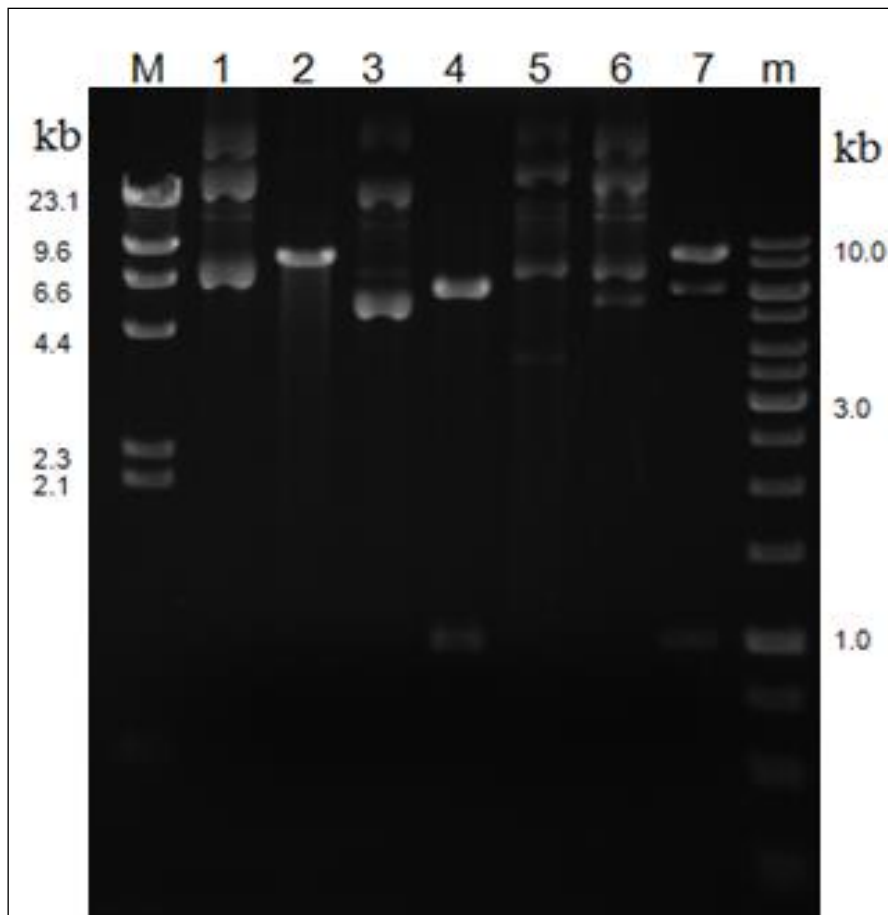
การสร้างรีคอมบิแนนต์โคลน

การซับโคลน (subclone) ยีน *aroL*, *phedh* และ *tktA* เข้าสู่พลาสมิด pAroB โดยการย่อย pAroB และ pPTFBL ด้วย *Bam*HI และ *Xho*I จากนั้นเชื่อมชิ้นยีนด้วยไลเกส ตามรูปที่ 2 เมื่อนำ pBLPT ซึ่งอยู่ใน supercoiled และ relaxed form ที่ได้ (รูป 4 ช่อง 1) มาย่อยด้วย *Bam*HI จะได้เป็น linear form มีขนาด 8,671 bp ดังรูป 4 ช่อง 2

การซับโคลนยีน *yddG* และ *glpF* จากพลาสมิด pPTFBLy โดยเพิ่มจำนวนชิ้นยีน *yddG* และ *glpF* จากนั้นโคลนเข้าเวกเตอร์ pBAD33 ดังรูปที่ 3 เมื่อนำ pYddG และ pGlpF ไปวิเคราะห์หาลำดับ นิวคลีโอไทด์ของยีน *yddG* และ *glpF* และนำไปเทียบกับฐานข้อมูล GenBank พบว่าชิ้นยีนมีความเหมือนกับ GenBank no. 6062375 และ no. 6062231 ซึ่งเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *yddG* และ *glpF* จาก *E. coli* DH10B 100 และ 100 % ตามลำดับ จากนั้นซับโคลนชิ้นยีนซึ่งมีโปรโมเตอร์ *ara* และยีน *glpF* จาก pGlpF เข้าสู่ pYddG ได้ pYF ดังรูป 4 ช่อง 3 ซึ่ง pYF ที่ได้อยู่ใน 2 form คือ supercoiled และ relaxed จากนั้นตรวจสอบความถูกต้องของชิ้นยีนพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้อง 100% และเมื่อย่อยด้วย *Bam*HI ได้ดีเอ็นเอ 2 ชิ้นซึ่งมีขนาด 6,195 และ 970 bp ดังรูป 4 ช่อง 4

เมื่อทรานส์ฟอร์ม pBLPT ร่วมกับ pYF เข้าสู่ *E. coli* BL21(DE3) รีคอมบิแนนต์โคลนที่ได้มีลักษณะของโคโลนีที่หนาปกติ พลาสมิดที่สกัดได้มีรูปแบบดังรูป 4 ช่อง 6 และเมื่อย่อยพลาสมิดด้วย *Bam*HI ได้ชิ้นดีเอ็นเอ

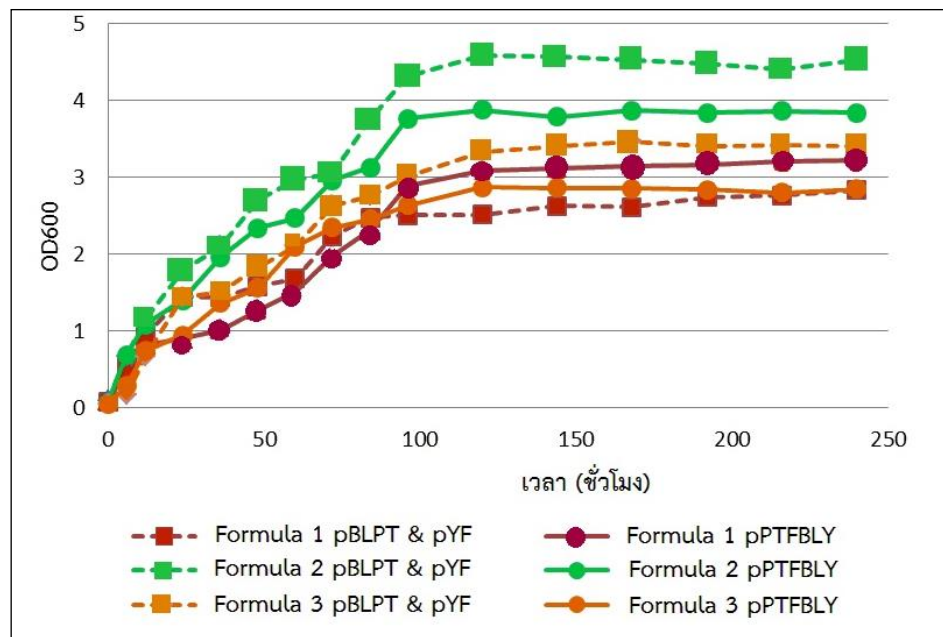
เอที่มีขนาด 8,671, 6,195 และ 970 bp (รูป 4 ช่อง 7) สรุปได้ว่าสามารถสร้างรีคอมบิแนนต์โคลนที่มียีน *glpF* และ *yddG* อยู่ภายใต้โปรโมเตอร์ *ara* ของพลาสมิด pBAD33 และมียีน *aroB*, *aroL*, *phedh* และ *tktA* ภายใต้โปรโมเตอร์ T7 ของพลาสมิด pRSFDuet-1



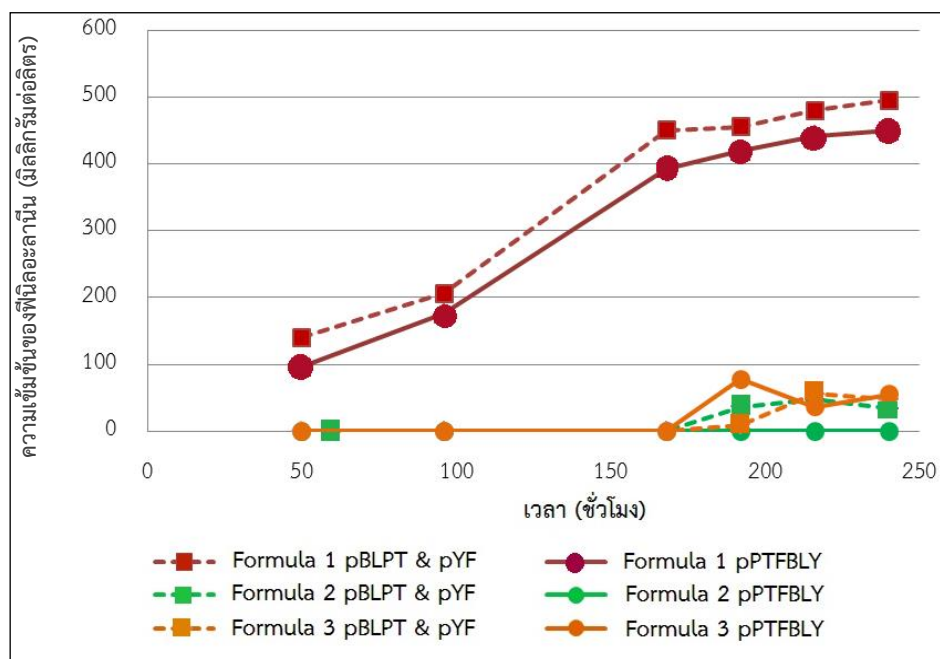
รูปที่ 4 รูปแบบของ pBLPT และ pYF เมื่อย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์: ช่อง M ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ /HindIII, ช่อง 1 pBLPT, ช่อง 2 pBLPT ที่ย่อยด้วย *Bam*HI, ช่อง 3 pYF, ช่อง 4 pYF ที่ย่อยด้วย *Bam*HI, ช่อง 5 pBAD33, ช่อง 6 pBLPT และ pYF, ช่อง 7 pBLPT และ pYF ที่ย่อยด้วย *Bam*HI และช่อง m ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder

การเติบโตและการผลิต L-Phe ของรีคอมบิแนนต์โคลนในอาหารสูตรต่าง ๆ

จากการเลี้ยงรีคอมบิแนนต์โคลนที่มีพลาสมิด pBLPT และ pYF (pBLPT & pYF) เปรียบเทียบกับโคลนที่มีพลาสมิด pPTFBLY ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 สูตร (ตารางที่ 2) ได้ผลการทดลองดังรูป 5 และ 6



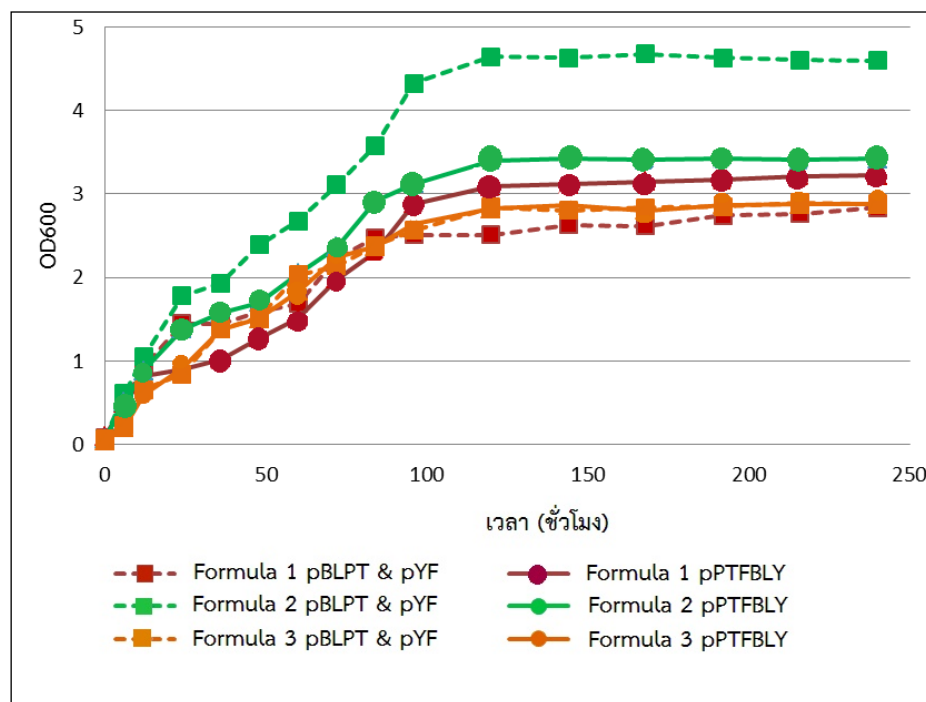
รูปที่ 5 การเติบโตของริคอมบีแนนต์โคลนในอาหารสูตรต่าง ๆ แสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ



รูปที่ 6 การผลิต L-Phe โดยริคอมบีแนนต์โคลนในสูตรอาหารต่าง ๆ แสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ

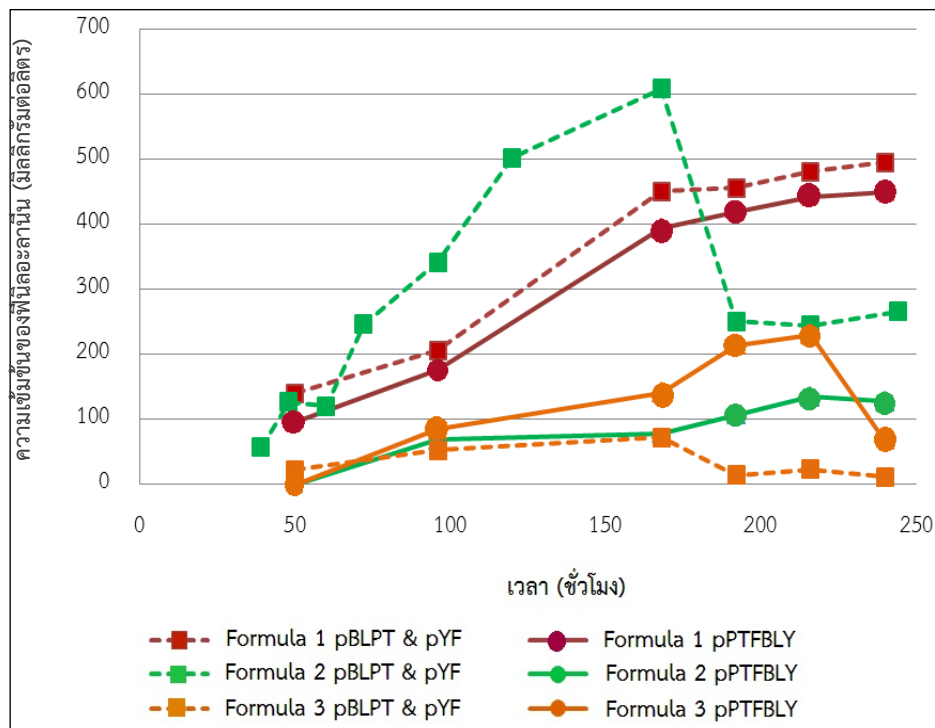
ริคอมบีแนนต์โคลนทั้งสองชนิดเติบโตได้ดีในอาหารสูตรที่ 2 รองลงมาเป็นสูตรที่ 3 สำหรับ pBLPT & pYF และสูตรที่ 1 สำหรับ pPTFBLY โดยมี log phase อยู่ระหว่าง 0 - 100 ชั่วโมง และหลังจาก 100 ชั่วโมงจะเข้าสู่ stationary phase (รูปที่ 5) ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับ Thongchuang (2011) ที่ทำการเลี้ยงโคลน pPTFBLY ได้ช่วงของ log phase อยู่ที่ 100 ชั่วโมงแรกเช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตาม ปริมาณ L-Phe ในอาหาร

สูตรที่ 2 และ 3 ที่ผลิตโดยทั้งสองโคลนน้อยมาก (ต่ำกว่า 100 มิลลิกรัมต่อลิตร) และตรวจพบหลังชั่วโมงที่ 150 สำหรับในอาหารสูตรที่ 2 ได้ผลสอดคล้องกับ Thongchuang (2011) และพบว่า pBLPT & pYF ผลิต L-Phe ได้ 495 มิลลิกรัมต่อลิตรที่ 240 ชั่วโมงซึ่งสูงกว่าการผลิตของ pPTFBLY (449 มิลลิกรัมต่อลิตรที่ 240 ชั่วโมง) เล็กน้อย (รูปที่ 6) การเติบโตและรูปแบบการผลิต L-Phe ที่แตกต่างกันอาหารทั้ง 3 สูตรอาจเนื่องมาจาก ปริมาณ glycerol รวมทั้งแหล่งไนโตรเจนและปริมาณไนโตรเจนที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงทำการปรับสูตรที่ 2 และ 3 ให้มีความเข้มข้นของ glycerol เป็น 30 กรัมต่อลิตรและใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 50 กรัมต่อลิตรเหมือนกับสูตรที่ 1 ซึ่ง ได้การเติบโตและการผลิต L-Phe ของรีคอมบิแนนต์โคลนดังรูป 7 และ 8



รูปที่ 7 การเติบโตของรีคอมบิแนนต์โคลนในอาหารสูตรต่าง ๆ ที่มีความเข้มข้นของ glycerol และ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เท่ากัน แสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ครั้ง

การปรับแหล่งของคาร์บอนและไนโตรเจนให้มีปริมาณเท่ากันในทุกสูตรให้รูปแบบของการเติบโตแทบจะไม่แตกต่างจากสูตรอาหารเดิม ยกเว้น pPTFBLY ในอาหารสูตรที่ 2 และ pBLPT & pYF ในอาหารสูตรที่ 3 มีการเติบโตลดลงเล็กน้อย (รูปที่ 7) แต่พบว่าเมื่อมี glycerol และ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็น 30 และ 50 กรัมต่อลิตรทำให้ pBLPT & pYF ผลิต L-Phe ได้สูงถึง 608 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ 168 ชั่วโมงเมื่อเลี้ยงในสูตรที่ 2 ซึ่งมากกว่าในสูตรที่ 1 ที่ผลิตได้ 495 มิลลิกรัมต่อลิตรที่ 240 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม L-Phe ในอาหารสูตรที่ 3 มีปริมาณไม่ต่างจากสูตรอาหารเดิมที่ยังไม่ได้ปรับปริมาณคาร์บอนและไนโตรเจนถึงแม้ว่าจะตรวจพบการผลิตได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 100 สำหรับ pPTFBLY อาหารสูตรที่ให้การผลิต L-Phe มากที่สุดคือ สูตรที่ 1 รองมาคือ สูตร 3 และ 2 ตามลำดับ โดย L-Phe ที่ผลิตได้จากสูตรที่ 2 และ 3 ที่ปรับปริมาณคาร์บอนและไนโตรเจนแล้วมีความเข้มข้นสูงกว่าที่ใช้สูตรเดิม และการสร้าง L-Phe ก็เร็วขึ้น พบได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 100



รูปที่ 8 การผลิต L-Phe โดยรีคอมบิแนนต์โคลนในสูตรอาหารต่าง ๆ ที่มีความเข้มข้นของ glycerol และ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เท่ากัน แสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ครั้ง

งานวิจัยนี้สามารถสร้างรีคอมบิแนนต์โคลน pBLPT & pYF ที่ผลิต L-Phe ได้สูงขึ้นเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน โดยการทรานส์ฟอร์มยีนที่เข้ารหัสให้โปรตีนที่อยู่บนเยื่อเซลล์ ได้แก่ glycerol facilitator และโปรตีนที่ทำหน้าที่นำ L-Phe ออกจากเซลล์ที่อยู่ภายใต้โปรโมเตอร์ ara ของ pBAD33 ร่วมกับยีนที่สำคัญในวิถีการผลิต L-Phe อีก 4 ยีนที่อยู่ภายใต้โปรโมเตอร์ T7 ภายใต้ของ pRSFDuet-1 และเมื่อทำการปรับเปลี่ยนสูตรอาหารแล้วพบว่า pBLPT & pYF ที่เจริญในอาหารสูตรที่ 2 ที่มี glycerol 30 และ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 50 กรัมต่อลิตรสามารถผลิต L-Phe ได้สูงกว่ารีคอมบิแนนต์โคลน pPTFBLY (Thongchuang, 2011) ที่เติบโตในอาหารสูตรที่ 1 ถึง 1.5 เท่าเมื่อเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 168 ชั่วโมง รีคอมบิแนนต์โคลน pBLPT & pYF และสูตรอาหารที่ได้จะถูกนำไปพัฒนาสำหรับการผลิต L-Phe ในระดับถัดมาต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- Baez-Viveros, J., Osuna, J., Hernandez-Chavez, G., Soberon, X., Bolivar, F. and Gossetl, G. (2004) "Metabolic engineering and protein directed evolution increase the yield of L-phenylalanine synthesized from glucose in *Escherichia coli*." **Biotechnology and Bioengineering**, no. 87: 516-524.
- De Boer, L., and Dijkhuizen, L. (1990) "Microbial and enzymatic processes for L-phenylalanine production." **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, no. 41: 1-27.
- Guzman, L.M., Belin, D., Carson M.J. and Beckwith, J. (1995) "Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose P_{BAD} promoter." **Journal of Bacteriology**, no. 14: 4121-4130.
- Miroux, B., and John E.W. (1996) "Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels." **Journal of Molecular Biology**, no. 260: 289-298.
- Sprenger, G.A. (2007) "From scratch to value: engineering *Escherichia coli* wild type cells to the production of L-phenylalanine and other fine chemicals derived from chorismate." **Applied Microbiology and Biotechnology**, no. 75: 739 - 749.
- Thongchuang, M. (2011). "Improvement of L-phenylalanine production in *Escherichia coli* by metabolic engineering process." Ph.D. thesis, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Thailand.
- Thongchuang, M., Pongsawasdi, P., Chisti, Y., and Packdibamrung, K. (2012) "Design of a recombinant *Escherichia coli* for producing L-phenylalanine from glycerol." **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, no. 28: 2937-2943
- Zhou, H., Liao, X., Liu, L., Wang, T., Du, G., and Chen, J. (2011) "Enhanced L-phenylalanine production by recombinant *Escherichia coli* BR-42 (pAP-B03) resistant to bacteriophage BP-1 via a two-stage feeding approach." **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, no. 38: 1219-1227.