

# รายงานการวิจัย

การศึกษาเอนไซม์ PLP synthase ในเชื้อชอบร้อน เพื่อใช้ประโยชน์ในการ  
ผลิตวิตามินบีหกทางเทคโนโลยีชีวภาพ

Study on PLP synthase in thermophilic bacterium for vitamin  
B6 production by biotechnology

คณะผู้วิจัย

รศ. ดร. ยานี ครอบพาณิชย์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์

ดร.ชไมพร จำปาศรี ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์

ทุนวิจัย ประเภททุนอุดหนุนทั่วไป

ประจำปีงบประมาณ 2556

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ได้สนับสนุน ทุนอุดหนุนโครงการวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ 2556 – 2557

ขอบคุณ ผู้ช่วยวิจัยและเหล่านักศึกษา ได้แก่ นางสาวชิตชนก อนุตระกูลชัย และ นายอดุลย์วิทย์ สีนุศิริ ที่ทำงานอย่างตั้งใจ มานะพากเพียร และอดทน ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่าน ของคณะวิทยาศาสตร์ และสำนักงานบริหารงานวิจัย ที่อำนวยความสะดวกต่าง ๆ เกี่ยวกับเรื่องทุนวิจัย และ ขอขอบคุณ อาจารย์เจ้าหน้าที่ และนักศึกษาของภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ทำงาน อุปกรณ์เครื่องแก้ว เครื่องมือ และสารเคมีต่าง ๆ ในการทำวิจัย

ส่วนหนึ่งในงานวิจัยนี้ได้ถูกนำไปเผยแพร่ในงานประชุมวิชาการ Innovative biotechnology for a green world and beyond ในหัวข้อเรื่อง “Cloning and expression of genes in vitamin B-6 biosynthesis pathways from *Geobacillus* sp. H6a” ณ EXCO เมือง Daegu ประเทศเกาหลีใต้ วันที่ 16-21 กันยายน 2555 และงานประชุม International conference on microbial taxonomy, basic and applied microbiology ในหัวข้อเรื่อง “Cloning and Expression of *pdxS* and *pdxT* genes from *Geobacillus* sp. H6a” ณ โรงแรมโมชะ จังหวัดขอนแก่น วันที่ 4-6 ตุลาคม 2555

รศ.ดร.ยานี ตรองพาณิชย์

ดร.ชไมพร จำปาศรี

พฤศจิกายน 2556

## บทคัดย่อ

Pyridoxal 5'-phosphate (PLP) เป็นรูปหนึ่งของวิตามินบีหก เป็นโคเอนไซม์ที่สำคัญ ในเมตาบอลิซึม ของโปรตีน, คาร์โบไฮเดรต และลิพิด ทั้งยังสำคัญต่อระบบประสาท การทำงานของฮอร์โมน และการสังเคราะห์ฮีโมโกลบิน อีกด้วย การสังเคราะห์วิตามินบีหก ใน (DXP)-independent *de novo* pathway พบว่ามียีน *pdxS* และ *pdxT* มาเกี่ยวข้อง เมื่อมีการแสดงออกของยีนแล้ว จะให้โปรตีน PDXS และ PDXT ซึ่งเมื่อรวมเป็นสารประกอบเชิงซ้อนแล้วจะให้เอนไซม์ pyridoxal 5'-phosphate synthase (PLP synthase) โดยที่ PDXT จะเร่งให้เกิดการเปลี่ยน glutamine เป็น ammonia จากนั้น PDXS จะเร่งให้เกิดการรวมตัวกันของ ribulose 5-phosphate (หรือ ribose 5-phosphate), glyceraldehyde-3-phosphate และ ammonia ได้วิตามินบีหก ในรูปของ PLP ในงานวิจัยครั้งนี้ ทำการโคลนและแสดงออกของ DNA ที่แปลรหัสเป็นเอนไซม์ PLP synthase จากเชื้อ *Geobacillus* sp. H6a (*Gh*) จากน้ำพุร้อนทางภาคเหนือของประเทศไทย ด้วยเทคนิค touchdown PCR PLP synthase ประกอบด้วย สองโปรตีน คือ โปรตีน PDXS และ PDXT จากยีน *GhpdxS* และ *GhpdxT* ตามลำดับ *GhpdxS* มีขนาด 885 base pairs แปลรหัสเป็นโปรตีนขนาด 294 amino acids ส่วน *GhpdxT* มีขนาด 591 base pairs แปลรหัสเป็นโปรตีนขนาด 196 amino acids ทำการแทรกยีน *GhpdxS* และ *GhpdxT* สู่วีลัสพลาสมิด pET28a(+) ที่ตำแหน่งการตัดจำเพาะของ *Nhe* I และ *Bam*H I แล้วย้ายเข้าสู่ *E.coli* BL21(DE3) จากนั้นตรวจสอบโคลนที่มียีนทั้งสองโดยวิธี digestion และ colony PCR ได้จำนวน 8 *GhpdxS* transformants และจำนวน 15 *GhpdxT* transformants จึงนำ transformant ที่ 1 ของยีนทั้งสอง มาทำการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วย 1 mM IPTG ที่อุณหภูมิ 37°C ในเวลา 0, 1, 3 และ 6 ชั่วโมง วิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าโปรตีน PDXS และ PDXT เป็นโปรตีนหลอมรวมกับ His-tag และ thrombin cleavage site และเป็นโปรตีนที่ละลายในส่วน of cytoplasm มีขนาดเท่ากับ 32 kDa และ 21 kDa ตามลำดับ

**คำสำคัญ:** วิธีการสังเคราะห์วิตามินบีหก, เอนไซม์ pyridoxal 5'-phosphate synthase, การแสดงออกโปรตีน, โคลนนิ่ง, Pdx1, Pdx2

## ABSTRACT

Pyridoxal 5'-phosphate (PLP) is the biologically active form of vitamin B6 and is an important coenzyme for metabolism of protein, carbohydrate, lipid, nervous system, hormone and heme synthesis. The vitamin B6 biosynthesis in (DXP)-independent *de novo* pathway, *pdxS* and *pdxT* genes are involved, that gene encoded for PDXS and PDXT protein. The two proteins are form complex as a pyridoxal 5'-phosphate synthase (PLP synthase): PDXT catalyzes the production of ammonia from glutamine and PDXS catalyzes the condensation of ribulose 5-phosphate (or ribose 5-phosphate), glyceraldehyde-3-phosphate and ammonia, PLP was produced from this process. In this study we cloned and expressed DNA coding for enzyme PLP synthase from *Geobacillus* sp. H6a (*Gh*) from hot springs in the North of Thailand by touchdown PCR. The PLP synthase consists of two proteins PDXS and PDXT that encoded by *GhpdxS* and *GhpdxT* genes, respectively. The *GhpdxS* had a length of 885 base pairs (bp) encoding a protein of 294 amino acids (aa) and the *GhpdxT* had a length of 591 bp encoding a protein of 196 aa. We inserted *GhpdxS* and *GhpdxT* genes in pET28a(+) plasmids at restriction site of *NheI* and *BamHI*, transformed into *E.coli* BL21(DE3). Digestion and colony PCR methods were used for check recombinants. The results showed that it has 8 and 15 transformants of *GhpdxS* and *GhpdxT*, respectively. Both of No.1 transformants were selected for 1 mM IPTG induction at 37°C in 0, 1, 3 and 6 hours. The results of SDS-PAGE showed that the fusion PDXS and PDXT proteins, with His-tag and a thrombin cleavage site, were soluble proteins in soluble cytoplasmic fraction with a molecular mass of 32 kDa and 21 kDa respectively.

**Keyword:** *De novo* vitamin B6 biosynthesis pathway, Pyridoxal synthase, Pdx1, Pdx2, thermophilic bacteria, Protein expression, Cloning

## สารบัญ

|                                          | หน้า |
|------------------------------------------|------|
| กิตติกรรมประกาศ                          | I    |
| บทคัดย่อ (ภาษาไทย)                       | II   |
| บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)                    | III  |
| สารบัญ                                   | IV   |
| บทที่ 1 บทนำ                             | 1    |
| บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง | 4    |
| บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย               | 19   |
| บทที่ 4 ผลการวิจัย                       | 23   |
| บทที่ 5 วิจัยรณัผลการทดลอง               | 35   |
| บรรณานุกรม                               | 36   |
| ภาคผนวก                                  | 41   |

## บทที่ 1

### บทนำ

#### ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

วิตามินบีหกเป็นวิตามินที่ละลายน้ำ ที่จำเป็นต่อร่างกายของคนและสัตว์ เนื่องจากไม่สามารถสังเคราะห์ได้เอง ประกอบด้วย 6 รูป ได้แก่ Pyridoxine (PN), Pyridoxal (PL), Pyridoxamine (PM) และอีก 3 รูปที่รวมอยู่กับฟอสเฟตในรูปของฟอสเฟตเอสเทอร์ ได้แก่ Pyridoxine 5'-phosphate (PNP), Pyridoxal 5'-phosphate (PLP), Pyridoxamine 5'-phosphate (PMP)

วิตามินบีหกในรูปของ PLP เป็นโคแฟกเตอร์ที่จำเป็นในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด และเกี่ยวข้องกับการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์มากกว่า 140 ปฏิกิริยา ซึ่งเอนไซม์ที่ใช้ PLP เป็นโคแฟกเตอร์ มีจำนวน 5 กลุ่ม จากเอนไซม์ทั้งหมด 6 กลุ่ม ตามการแบ่งกลุ่มของเอนไซม์ (enzyme class) ได้แก่ EC 1 oxidoreductase, EC 2 transferase, EC 3 hydrolase, EC 4 lyase และ EC 5 isomerase จากการเป็นโคแฟกเตอร์ที่จำเป็นของเอนไซม์หลายกลุ่ม แสดงให้เห็นถึงหน้าที่ความสำคัญของ PLP ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ยกตัวอย่างเช่น ปฏิกิริยาในการเปลี่ยนรูปของกรดอะมิโนจาก L-form เป็น D-form หรือ การสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาว (polyunsaturated fatty acid) รวมถึงการสังเคราะห์ DNA และการสังเคราะห์สารสื่อประสาทและยาปฏิชีวนะหลายชนิด (Mooney et al., 2009; Wallner et al., 2009)

การผลิตวิตามินบีหกทางอุตสาหกรรมในปัจจุบัน ใช้วิธีการสังเคราะห์ทางเคมี (Chemical synthesis) (Lin, 2003) ซึ่งมีการใช้สารเคมีและสูญเสียพลังงานมากขึ้น ส่งผลเสียต่อสภาวะแวดล้อม เพื่อลดผลเหล่านี้ จึงมีการพัฒนาโดยใช้ทรัพยากรทางชีวภาพ เช่น การผลิตวิตามินบีหกโดยใช้แบคทีเรีย (Hoshino et al., 2008) มาแทนที่เช่นเดียวกับการผลิตวิตามินบีสองและบีสิบสอง รวมถึงการผลิตวิตามินบีหกโดยการเปลี่ยนรูปของวิตามินบีหกให้อยู่ในรูปที่มีมูลค่าสูง โดยการใช้เอนไซม์ (Schell et al., 2009) การพัฒนาทั้งหมดนี้ ช่วยลดต้นทุนการผลิต ลดการใช้สารเคมีและพลังงานลง และทำให้สิ่งแวดล้อมดีขึ้นอีกด้วย

ในประเทศไทย ไม่สามารถผลิตวิตามินบีหกได้เอง จำเป็นต้องนำเข้าจากต่างประเทศ จากสถิติการนำเข้าที่ผ่านมาในปี 2549 มีการนำเข้าวิตามินบีหกเป็นมูลค่า 120,474,343 บาท (กรมศุลกากร, 2553) การใช้วิตามินบีหกในปัจจุบัน นำมาใช้เป็นยา อาหารเสริมสุขภาพและเป็นส่วนประกอบในอาหารสัตว์ และเครื่องสำอาง รวมถึงในผลิตภัณฑ์อาหาร เช่นเครื่องดื่มต่าง ๆ ที่ปรากฏในท้องตลาด และมีสถิติการส่งออกไปยังประเทศเพื่อนบ้าน ได้แก่ พม่า มาเลเซีย และลาว ซึ่งปริมาณการส่งออกคาดว่าจะขึ้นกับปริมาณที่เหลือใช้ภายในประเทศ

จากงานวิจัยที่ได้ทำก่อนหน้านี้ พบเชื้อแบคทีเรียชอบริออน *Geobacillus* sp. H6a ซึ่งคัดแยกจากบ่อน้ำพุร้อน สามารถผลิตวิตามินบีหกออกภายนอกเซลล์ ได้สูงสุด 419.2  $\mu\text{g/L}$  เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน ในรูปของ PMP และ PM (Anutrakunchai et al., 2010a) และพบยีนที่แปลรหัสเป็นเอนไซม์ PLP synthase

ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่สังเคราะห์ PLP ในเชื้อ *Geobacillus* sp. H6a (Anutrakunchai *et al.*, 2010b) เอนไซม์ที่ได้จากแบคทีเรียชอบร้อน มีคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ในอุตสาหกรรม เนื่องจากมีความทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดี ทำให้ลดค่าใช้จ่ายในการควบคุมอุณหภูมิ (McMullan *et al.*, 2004)

การศึกษาเอนไซม์ PLP synthase ที่ทำหน้าที่สังเคราะห์วิตามินบีหกขึ้นมาใหม่ในแบคทีเรียชนิดนี้เป็นสิ่งจำเป็น เพราะนอกจากจะทำให้เข้าใจเกี่ยวกับวิธีการผลิตวิตามินบีหกในแบคทีเรียชนิดนี้แล้ว ความรู้ที่ได้รับ อาจสามารถนำเอนไซม์ในวิธีการผลิตวิตามินบีหกมาใช้ให้เกิดประโยชน์ในอุตสาหกรรม เช่น การผลิตวิตามินบีหกในรูปของ PLP จากเอนไซม์โดยตรง หรือดัดแปลงแบคทีเรียชนิดนี้ ให้มีการผลิตวิตามินบีหกได้สูงขึ้น ซึ่งเหมาะต่อการนำไปใช้ในอุตสาหกรรม นอกจากนั้น ข้อมูลที่ได้รับยังสามารถใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงให้กับเชื้อชอบร้อนอื่น ๆ ในกลุ่มเดียวกันได้

### วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ PLP synthase ที่ทำหน้าที่สังเคราะห์วิตามินบีหกขึ้นมาใหม่ ในเชื้อชอบร้อน *Geobacillus* sp. H6a

### ขอบเขตของโครงการวิจัย

งานวิจัยนี้ เป็นการศึกษาเอนไซม์ PLP synthase ที่ทำหน้าที่สังเคราะห์วิตามินบีหกขึ้นมาใหม่ ในเชื้อชอบร้อน *Geobacillus* sp. H6a

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ข้อมูลเอนไซม์ PLP synthase จากเชื้อชอบร้อน *Geobacillus* sp. H6a เพื่อเป็น แนวทางนำไปสู่การพัฒนาเพื่อการใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์
2. ได้ข้อมูลเกี่ยวกับการสังเคราะห์วิตามินบีหกโดยเชื้อแบคทีเรีย เพื่อตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติได้

### หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

มหาวิทยาลัยขอนแก่น องค์การเภสัชกรรม เกษตรกร

ระยะเวลาที่ทำการวิจัยและสถานที่ทำการทดลองหรือเก็บข้อมูล

ระยะเวลาทำการวิจัย 2 ปี (2556-2557) เริ่มต้นการทดลองเดือนตุลาคม 2555 สิ้นสุดการทดลองเดือนกันยายน 2557 โดยสถานที่ทำการทดลองจะดำเนินการที่ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

### แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

ผลการวิจัย จะถูกนำไปเผยแพร่ โดยการนำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการที่เกี่ยวข้อง และจะนำไปใช้เป็นข้อมูลในการทำวิจัยเพื่อขยายผลในเชิงพาณิชย์

### ทฤษฎี สมมุติฐาน หรือกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

เนื่องจากวิตามินบีหกในรูปของ PLP ทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ที่สำคัญในการทำงานร่วมกับเอนไซม์หลายชนิด เช่น transaminase, oxidoreductase ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้ สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมยา หรือการผลิตสารตั้งต้น (precursor) เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอื่น ๆ (Weiner et al., 2011; Martin et al., 2007) นอกจากนั้น มูลค่าของ PLP ยังมีราคาสูง (25 g/927.30 \$SGD) (Sigma catalog, 2010)

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยเฉพาะทางด้านจุลินทรีย์ แต่การนำประโยชน์จากจุลินทรีย์มาใช้ในเชิงอุตสาหกรรมเพิ่งจะเริ่มต้น และยังไม่มียารายงานการศึกษาการสังเคราะห์วิตามินบีหกจากแบคทีเรีย รวมถึงการนำมาพัฒนาใช้ในเชิงอุตสาหกรรม โดยเฉพาะจากเชื้อชอบร้อน

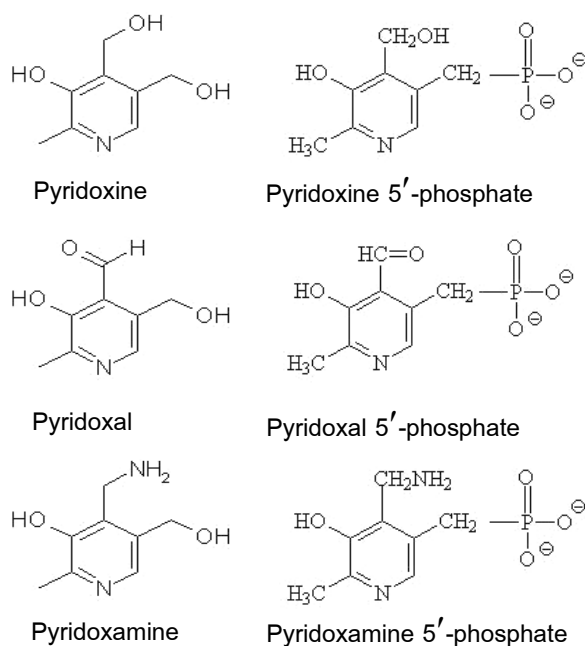
การศึกษาเอนไซม์ PLP synthase ในวิธีการผลิตวิตามินบีหก จากเชื้อแบคทีเรียชอบร้อน *Geobacillus* sp. H6a ทำให้สามารถนำเอนไซม์ในวิธีการผลิตวิตามินบีหกมาใช้ให้เกิดประโยชน์ จากข้อมูลที่ได้จะช่วยให้มีการพัฒนาความรู้เกี่ยวกับการสังเคราะห์วิตามินบีหกโดยแบคทีเรีย ยังอาจนำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตวิตามินบีหกในเชิงอุตสาหกรรมอีกด้วย

## บทที่ 2

### วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 1. วิตามินบีหก

วิตามินบีหกเป็นวิตามินที่ละลายได้ในน้ำ ถูกค้นพบครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ.1934 โดยกียอร์กี มีโครสสร้างที่พบทั่วไปในธรรมชาติจำนวน 6 รูป คือ ไพริดอกซาล (pyridoxal; PL), ไพริดอกซีน (pyridoxine; PN), ไพริดอกซามีน (pyridoxamine; PM), และอนุพันธ์ที่มีหมู่ฟอสเฟตในรูปฟอสเฟตเอสเทอร์ ได้แก่ ไพริดอกซาลฟอสเฟต (pyridoxal 5'-phosphate; PLP), ไพริดอกซีนฟอสเฟต (pyridoxine 5'-phosphate; PNP) และไพริดอกซามีนฟอสเฟต (pyridoxamine 5'-phosphate; PMP) (ดังรูปที่ 2.1) ซึ่งทุกรูปมีคุณสมบัติในการเป็นวิตามินบีหกเท่ากัน ผลักวิตามินบีหกเป็นสีขาว ไม่มีกลิ่น ละลายในน้ำได้ดีและละลายในสารละลายที่เป็นกรดและด่างได้ปานกลาง วิตามินบีหกสลายตัวได้ง่ายเมื่อถูกแสงแดด และสามารถทนความร้อนได้สูงเมื่ออยู่ในสภาวะกรด โดย PLP และ PMP เป็นรูปที่ทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ที่ช่วยในปฏิกิริยาเมตาบอลิซึมที่สำคัญต่างๆ ในร่างกาย



รูปที่ 2.1 แสดงสูตรโครงสร้างของวิตามินบีหกในแต่ละรูปที่พบในธรรมชาติ

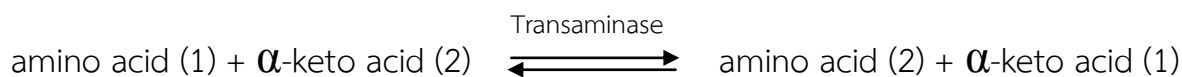
เนื่องจากร่างกายมนุษย์ไม่สามารถสังเคราะห์วิตามินบีหกได้เองจึงต้องได้รับจากแหล่งอาหารเท่านั้น แหล่งอาหารที่พบวิตามินบีหก ได้แก่ พวกเมล็ดพืช เช่น เมล็ดทานตะวัน ข้าว ถั่ว ถั่วลิสง และพวกเนื้อต่างๆ เช่น ปลา ไก่ ไข่ ตับ (Higdon, 2002)

นอกจากนี้ยังพบว่าวิตามินบีหกที่ได้จากพวกผลไม้จะอยู่ในรูป PN ส่วนวิตามินบีหกที่ได้จากเนื้อสัตว์จะอยู่ในรูปของ PL และ PM ปริมาณวิตามินบีหกที่ร่างกายต้องการจาก U.S.RDA ในเด็กอ่อน คือ 0.3 mg/วัน และ 2 mg/วัน สำหรับผู้ใหญ่ วิตามินบีหกมีสารหรืออาหารเสริมฤทธิ์ ได้แก่ วิตามินบีรวม (B Complex) วิตามินบีหนึ่ง บีสอง บีห้า วิตามินซี วิตามินเอฟ (Linoleic acid) แมกนีเซียม และโปตัสเซียม ส่วนสารหรืออาหารต้านฤทธิ์ ได้แก่ ยาพวกคอร์ติโซน (Cortisone) ฮอร์โมนเอสโตรเจน (Estrogen) ยาคุมกำเนิดชนิดรับประทาน

## 2. บทบาทของวิตามินบีหก

บทบาทที่สำคัญของวิตามินบีหกคือทำหน้าที่เป็น “โคเอนไซม์” ในระบบต่างๆ โดยมีรูปที่สำคัญ คือ PLP ซึ่งทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ของเอนไซม์กว่า 100 ชนิด ในปฏิกิริยาชีวเคมีในร่างกาย และระบบต่างๆ ของสิ่งมีชีวิตที่ใช้ PLP เป็นโคเอนไซม์ ได้แก่

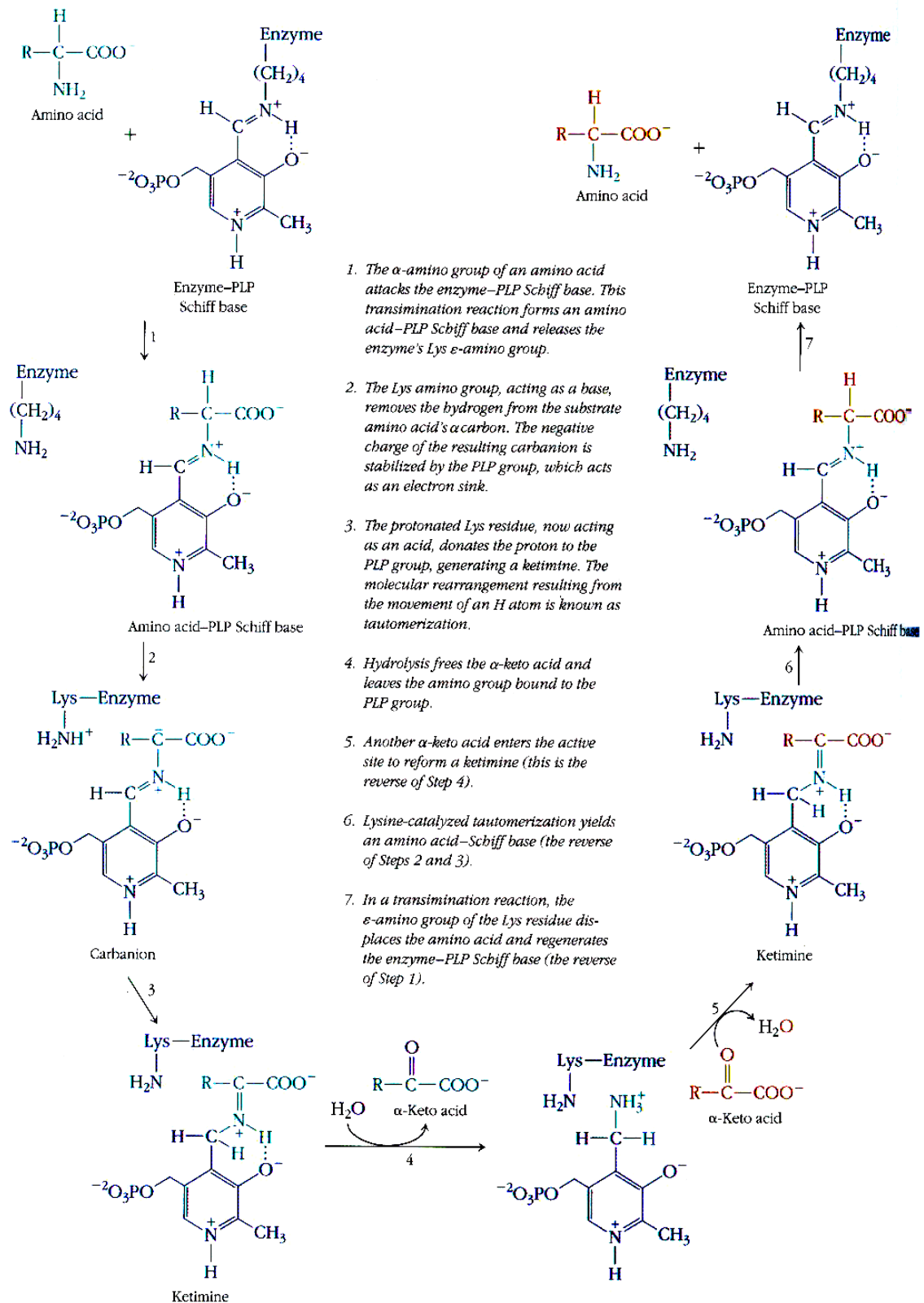
**เมตาบอลิซึมต่างๆ :** PLP ทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ของเอนไซม์หลายชนิดในเมตาบอลิซึมของกรดอะมิโน PLP จะสร้าง Schiff base ร่วมกับเอนไซม์ aminotransferases. โดย PLP จะสร้างพันธะโควาเลนต์ที่กรดอะมิโนไลซีน เพื่อเกิดเป็น Schiff base linkage (aldimine) ในรูปที่เกิด Schiff base linkage นี้ จะสามารถเกิดปฏิกิริยากับกรดอะมิโนอิสระหลายชนิด (สารตั้งต้น) เพื่อเปลี่ยนเป็นกรดอะมิโนอีกชนิด (ผลิตภัณฑ์) ดังแสดงในรูปที่ 2.2 ปฏิกิริยารวมแสดงดังสมการด้านล่าง



**ระบบประสาท :** การสังเคราะห์สารสื่อประสาท เช่น เซโรโทนิน (serotonin) ซึ่งเป็นฮอร์โมน ช่วยในการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ จากกรดอะมิโนทริปโทเฟน (tryptophan) ถูกเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ที่ต้องการ PLP ในการทำงาน ส่วนสารสื่อประสาทอื่นๆ เช่น โดปามีน (dopamine) นอร์อิพิเนฟริน (norepinephrine) และกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริก (gamma-aminobutyric acid, GABA) ก็ถูกสร้างจากเอนไซม์ที่ต้องการ PLP เป็นโคเอนไซม์เช่นกัน

**การสร้างเม็ดเลือดแดง :** PLP ทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ของ delta-aminolevulinic acid (ALA) synthetase ในการสังเคราะห์ “ฮีม” (heme) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของฮีโมโกลบิน ซึ่งพบได้ในเซลล์เม็ดเลือดแดง โดยทำหน้าที่ขนส่งออกซิเจนไปทั่วร่างกาย ทั้ง PL และ PLP ต่างสามารถจับกับโมเลกุลของฮีโมโกลบิน และเพิ่มประสิทธิภาพในการจับและปล่อยออกซิเจนได้

**การสร้างไนอะซิน และไบโอติน :** วิตามินอื่นๆ ที่ร่างกายต้องการ เช่น ไนอะซิน สามารถสังเคราะห์ได้จากทริปโทเฟน ปฏิกิริยานี้ต้องการ PLP เป็นโคเอนไซม์ ซึ่งหากได้รับไนอะซินจากอาหารเพียงพอแล้ว ก็จะไม่ต้องการวิตามินบีหกลดลง นอกจากนี้ PLP ยังเป็นโคเอนไซม์ของเอนไซม์ diaminopelargonic acid synthase ซึ่งเร่งปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอติน



รูปที่ 2.2 การเร่งปฏิกิริยา transamination โดย PLP (Pratt & Cornely, 2003)

**ระบบฮอร์โมน :** สเตียรอยด์ฮอร์โมน เช่น เอสโตรเจนและเทสโทสเตอโรน ออกฤทธิ์โดยจับกับตัวรับ (steroid hormone receptors) ในเซลล์นิวเคลียสและกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับยีน ในกรณีที่มีการหลั่ง สเตียรอยด์ฮอร์โมนมากเกินไป PLP จะจับกับตัวรับเพื่อยับยั้งไม่ให้จับฮอร์โมน การจับกันของ PLP กับตัวรับฮอร์โมนเอสโตรเจน โปรเจสเตอโรน เทสโทสเตอโรน และสเตียรอยด์ฮอร์โมนอื่นๆ จะช่วยลดการเกิดมะเร็งเต้านมและมะเร็งต่อมลูกหมากได้

**การสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก :** PLP ทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ในเมตาบอลิซึมของ single-carbon functional groups (one-carbon metabolism) เช่น ปฏิกิริยาการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก หากขาดวิตามินบีหกในระบบภูมิคุ้มกันก็อาจส่งผลต่อการทำงานของ PLP ใน one-carbon metabolism ได้

จากประโยชน์ของวิตามินบีหกที่มีมากมายทำให้วิตามินบีหกเป็นสารอาหารอีกชนิดหนึ่งที่มีความสนใจในการนำมาบริโภคเป็นอาหารเสริม และใช้เป็นส่วนผสมในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องสำอาง เพื่อเพิ่มมูลค่าให้กับสินค้า นอกจากนี้ ยังถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์เพื่อเพิ่มผลผลิตอีกด้วย

### 3. การผลิตวิตามินบีหกโดยแบคทีเรีย

การศึกษาเกี่ยวกับการสังเคราะห์วิตามินบีหกในแบคทีเรีย เริ่มต้นศึกษามานานหลายทศวรรษ แต่ก็ยังคงไม่ทราบอย่างชัดเจนทั้ง ๆ ที่โครงสร้างของวิตามินบีหกไม่ซับซ้อน จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าแบคทีเรียบางชนิดสามารถผลิตวิตามินบีหกได้ เช่น *Acromobacter cycloclastes* A.M.S. 6201 สามารถผลิตวิตามินบีหกได้ 3-4 mg/L ในรูป PMP และ PL เป็นหลัก (Ishida and Shimura, 1970) และกลุ่มแบคทีเรียจากทะเล เช่น *Vibrio* strain M-31 ผลิตได้ 5 mg/L ในรูป PN และ PM เป็นหลัก และ *Flavobacterium* strain 238-7 ผลิตได้ 18 mg/L ในรูป PN เป็นหลัก (Tani *et al.*, 1972) เชื้อกลายพันธุ์ เช่น *Bacillus subtilis* กลายพันธุ์ โดยผลิตได้ 2-5 mg/L ในรูป PLP (Tazoe *et al.*, 1999, Belitsky, 2004) เชื้อแบคทีเรีย *Sinorhizobium meliloti* IFO 14782 ซึ่งสามารถผลิตวิตามินบีหกได้ถึง 84 mg/L ในรูป PN เป็นหลัก (Tazoe *et al.*, 1999) และเชื้อ *Rhizobium* sp. 6-1C1 โดยผลิตได้ 4.31 mg/L ในรูป PM และ PMP (Trongpanich *et al.*, 2007) นอกจากนี้ยังมีเชื้อชอบร้อน *Geobacillus* sp. H6a โดยผลิตได้ 0.419 mg/L ในรูป PM และ PMP (Anutrakunchai *et al.*, 2010a)

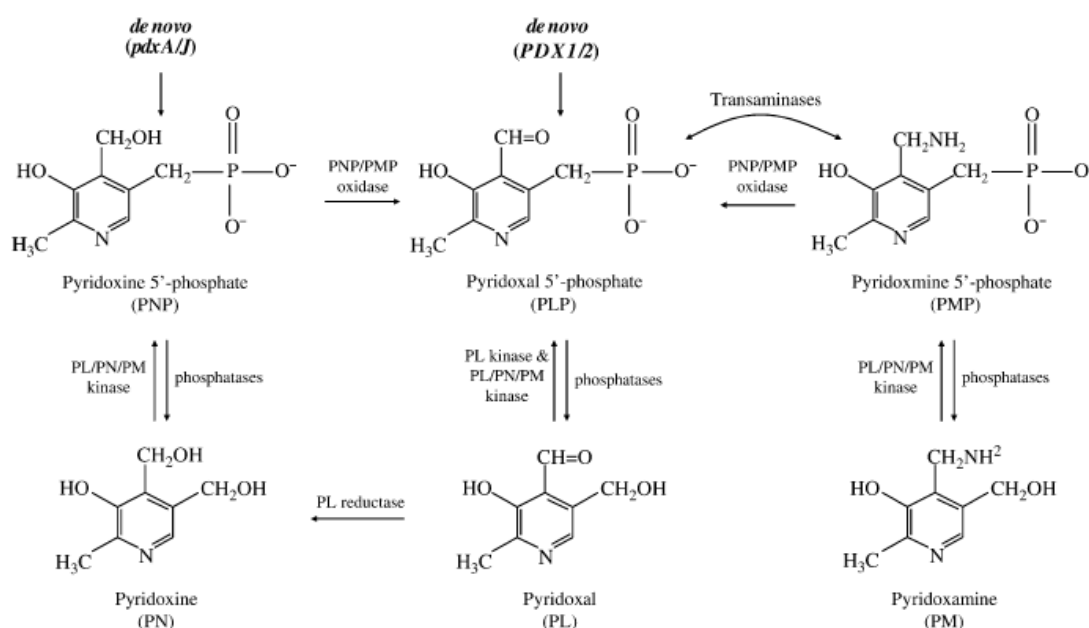
นอกจากแบคทีเรียแล้วยีสต์ก็สามารถผลิตวิตามินบีหกได้ เช่น *Saccharomyces microporus* กลายพันธุ์ ที่ผลิตวิตามินบีหกได้ 3 mg/L ในรูป PN (Scherr and Rafelson, 1962) และ *Pichia guilliermondii* ผลิตได้ 25 mg/L ในรูป PL (Nishio *et al.*, 1973)

การผลิตวิตามินบีหกสามารถแบ่งได้เป็น 2 วิธี วิธีแรกคือวิถีกู้คืน (salvage pathway) ซึ่งเป็นการสังเคราะห์วิตามินบีหกโดยการเปลี่ยนรูปแบบของวิตามินบีหกภายใน 6 รูป โดยการใช้เอนไซม์ (ยานี ตรง พานิชย์, 2546) พบได้ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด และวิธีที่สอง เป็นการสังเคราะห์แบบ *de novo* (*de novo* biosynthesis pathway) พบในสิ่งมีชีวิตบางชนิด เช่น แบคทีเรีย, ยีสต์, รา และพืช วิธีการสังเคราะห์แบบ

*de novo* นี้ เป็นการสังเคราะห์วิตามินบีหกโดยใช้สารตัวกลางจากเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต และกรดอะมิโน

### 3.1 วิถีวัฏจักร

วิถีวัฏจักรสามารถสังเคราะห์วิตามินบีหกโดยการเปลี่ยนแปลงรูปของวิตามินบีหก ที่มีทั้งหมด 6 รูป (รูปที่ 2.3) โดยเอนไซม์ Pyridoxal kinase (pyridoxal phosphokinase; PDXK) (EC 2.7.1.35) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา phosphorylation ของ วิตามินบีหกในรูปอิสระ (PL/PM/PN) ให้ได้วิตามินบีหกในรูปฟอสเฟต (PLP/PMP/PNP) โดยทำงานร่วมกับ ATP (Newman et al., 2006; Park et al., 2004) ส่วน PMP และ PNP ถูกออกซิไดซ์เป็น PLP โดย PNP/PMP oxidase (PdxH) (Zhao and Winkler, 1996) นอกจากนี้ PMP ยังสามารถถูกเปลี่ยนให้เป็น PLP โดยเอนไซม์ transaminase (Yoshikane et al., 2006) มีรายงานเพิ่มเติมเกี่ยวกับเอนไซม์ PL reductase ที่ทำหน้าที่เปลี่ยนรูปของ PL ให้เป็น PN ซึ่งพบในยีสต์ *Schizosaccharomyces pombe* ที่คาดว่าน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องในวิถีวัฏจักรอีกด้วย (Morita et al., 2004)



รูปที่ 2.3 แสดงการสังเคราะห์วิตามินบีหกแบบวิถีวัฏจักร โดยใช้พื้นฐานข้อมูลจาก *E. coli*, ยีสต์, *B. subtilis* และมนุษย์ (González et al., 2007)

### 3.2 วิถี *de novo*

การสังเคราะห์วิตามินบีหกแบบ *de novo* (*de novo* biosynthesis of vitamin B<sub>6</sub>) ซึ่งเป็นการสังเคราะห์วิตามินบีหกขึ้นมาใหม่ ดังรูปที่ 2.4 สามารถแบ่งย่อยออกได้เป็นสองประเภท (Sakai et al., 2004) ประเภทแรกเรียกว่า deoxyxylulose 5'-phosphate (DXP)-dependent พบได้ในกลุ่ม eubacteria โดย

ถูกศึกษามากที่สุดในแบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli* ซึ่งพบว่ามีกลุ่มยีน *Pdx* ได้แก่ *PdxA/J/H* ที่ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์วิตามินบีหก โดยใช้สารตั้งต้นมาจากเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด ส่วนประเภทที่สองเรียกว่า DXP-independent ถูกศึกษาในแบคทีเรียแกรมบวก *Bacillus subtilis* ยีสต์ และพืช ซึ่งพบว่ามียีน *yaaD* และ *yaaE* ซึ่งอยู่ในกลุ่ม *SNZ/SNO* ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์วิตามินบีหก โดยใช้สารตั้งต้นมาจากเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตและกลูตามีน (Burns *et al.*, 2005)

### 3.2.1 วิธี *de novo* ประเภท DXP-dependent

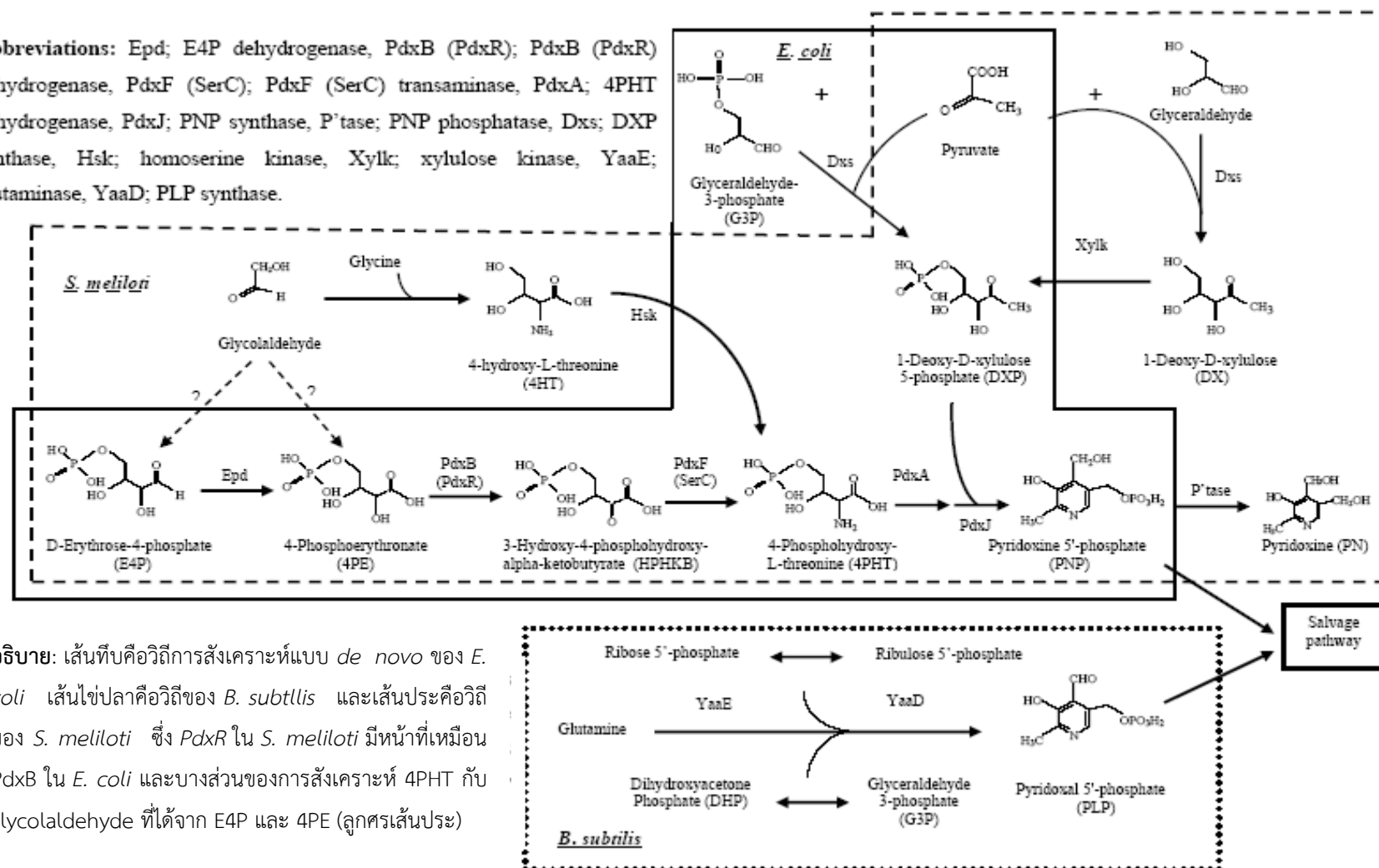
ในวิธีการสังเคราะห์แบบ *de novo* ประเภท DXP-dependent ประกอบไปด้วยสองวิถีย่อย วิถีย่อยที่หนึ่งมีลำดับของปฏิกิริยาที่คล้ายคลึงกับการสังเคราะห์กรดอะมิโนเซอรีน โดยเริ่มจาก D-Erythrose-4-phosphate (E4P) สารตัวกลางในวิถีเพนโทสฟอสเฟต (pentose phosphate pathway) ซึ่ง E4P นั้นนอกจากเป็นสารตั้งต้นสำหรับการสร้างวิตามินบีหกแล้ว ยังเป็นสารตั้งต้นในการสร้างกรดอะมิโนที่มีโครงสร้างแบบวง (aromatic amino acid) เช่น L-tryptophan, L-phenylalanine, L-tyrosine และวิตามินที่มีโครงสร้างแบบวง (aromatic vitamins) เช่น *p*-aminobenzoate, *p*-hydroxybenzoate, 2,3-dihydroxybenzoate อีกด้วย E4P ถูกออกซิไดซ์เป็น 4-Phosphoerythronate (4PE) โดย E4P dehydrogenase (Epd) และ 4PE จะถูกออกซิไดซ์ต่อโดย PdxB dehydrogenase (PdxB) ได้เป็น 3-Hydroxy-4-phosphohydroxy alpha-ketobutyrate (HPHKB) เอนไซม์ PdxB ถูกถอดรหัสมาจากยีน *PdxB* ที่อยู่บนโครโมโซมของ *E. coli* ทั้ง Epd และ PdxB ใช้  $\text{NAD}^+$  เป็นตัวรับอิเล็กตรอน จากนั้น HPHKB จะถูกเปลี่ยนเป็น 4-Phosphohydroxy-L-threonine (4PHT) โดย PdxF (SerC) transaminase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มี PLP เป็นโคเอนไซม์ และมีกรดอะมิโน กลูตาเมตเป็นตัวให้หมู่อะมิโน ซึ่งยีน *serC* นี้จะถอดรหัสเป็นเอนไซม์ที่ใช้สังเคราะห์ 4PHT ซึ่งเป็นหนึ่งในสองของสารตั้งต้นของ PNP (Wetzel *et al.*, 2004)

วิถีย่อยที่สองเริ่มจาก D-Glyceraldehyde-3-phosphate (G3P) และไพรูเวท ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่ได้รับมาจากวิถีไกลโคลิซิส และวิถีเพนโทสฟอสเฟต โดยทั้งสองตัวจะถูกเปลี่ยนให้เป็น 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate (DXP) โดยเอนไซม์ DXP synthase (Dxs) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ thiamine diphosphate เป็นโคแฟกเตอร์ DXP นั้น นอกจากจะเป็นสารตั้งต้นในการสร้างวิตามินบีหกแล้ว ยังเป็นสารตั้งต้นในการสร้าง isoprenoid และ thiamine (วิตามินบี1) ซึ่งเป็นสารที่จำเป็นในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด จากนั้น DXP จากวิถีย่อยที่สองและ 4PHT ที่ได้รับมาจากวิถีย่อยที่หนึ่ง จะถูกนำมารวมกันและเปลี่ยนให้เป็น PNP ซึ่งเป็นวิตามินบีหกประเภทแรกที่ถูกสร้างขึ้นโดยเอนไซม์ 4PHT dehydrogenase (*PdxA*) และ PNP synthase (*PdxJ*) ซึ่งคาร์บอนที่เป็นแกนหลักในการสร้างวงแหวนของวิตามินบีหกได้มาจาก DXP และ PNP ถูกออกซิไดซ์เป็น PLP โดย PdxH oxidase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่พบในวิถีนี้ (Mittenhuber, 2001)

สำหรับ *S. meliloti* นั้นพบว่ามีวิธีการสังเคราะห์วิตามินบีหกที่ใกล้เคียงกับใน *E. coli* โดยใช้สารตั้งต้น 2 ตัว คือ 1-deoxy-D-xylulose (DX) ที่สังเคราะห์ได้จาก pyruvate/glyceraldehyde และ 4-hydroxy-L-threonine (4HT) ที่ได้จาก glycolaldehyde/glycine ทั้ง DX และ 4HT นี้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ PN ในวิธีการสังเคราะห์วิตามินบีหก (Tazoe *et al.*, 2002) โดยเริ่มจาก DX และ 4HT

เปลี่ยนเป็น DXP และ 4PHT โดยเอนไซม์ xylulose kinase (Wungsintawee et al., 2001) และเอนไซม์ homoserine kinase (Shames et al., 1984; Farrington et al., 1993) ซึ่ง 4PHT นี้จะถูกออกซิไดซ์โดย PdxA จากนั้นจึงเข้าร่วมกับ DXP โดยการทำงานของเอนไซม์ PdxJ เป็น PNP ซึ่งพบได้ใน *E. coli* เช่นกัน เอนไซม์ PdxA และ PdxJ เป็นเอนไซม์ในขั้นสุดท้ายในการสร้าง PNP แล้วจึงเข้าสู่วิถีกักเก็บ และอาจนำไปสู่การเปลี่ยน PNP เป็น PN โดยเอนไซม์ PNP phosphatase นอกจากนี้การสังเคราะห์ 4PHT ของ *S. meliloti* สามารถสร้างได้จาก glycolaldehyde แล้วเปลี่ยนเป็น 4PE เพื่อสร้าง 4PHT ก็ได้ ซึ่งวิธีการสังเคราะห์วิตามินบีหกของ *S. meliloti* พบว่ามีบางส่วนคล้ายกับ *E. coli* โดยยีน *PdxR* ใน *S. meliloti* นั้นมีหน้าที่เหมือนกับ *PdxB* ใน *E. coli* โดยทำหน้าที่เปลี่ยน 4PE เป็น HPHKB (Tazoe et al., 2006)

**Abbreviations:** Epd; E4P dehydrogenase, PdxB (PdxR); PdxB (PdxR) dehydrogenase, PdxF (SerC); PdxF (SerC) transaminase, PdxA; 4PHT dehydrogenase, PdxJ; PNP synthase, P'tase; PNP phosphatase, Dxs; DXP synthase, Hsk; homoserine kinase, Xylk; xylulose kinase, YaaE; glutaminase, YaaD; PLP synthase.



อธิบาย: เส้นทึบคือวิถีการสังเคราะห์แบบ *de novo* ของ *E. coli* เส้นไข่ปลาคือวิถีของ *B. subtilis* และเส้นประคือวิถีของ *S. meliloti* ซึ่ง PdxR ใน *S. meliloti* มีหน้าที่เหมือน PdxB ใน *E. coli* และบางส่วนของ การสังเคราะห์ 4PHT กับ glycolaldehyde ที่ได้จาก E4P และ 4PE (ลูกศรเส้นประ)

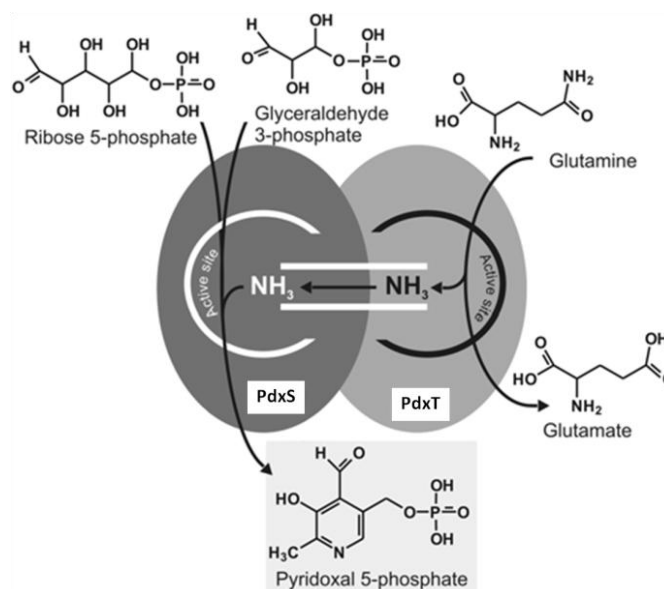
รูปที่ 2.4 แสดงวิถีการสังเคราะห์วิตามินบีหกแบบ *de novo* ของเชื้อ *E. coli*, *S. meliloti* และ *B. subtilis* (Phimwapi, 2007)

### 3.2.2 วิถี *de novo* ประเภท DXP-independent

ในวิถีการสังเคราะห์แบบ *de novo* ประเภท DXP-independent พบได้ในแบคทีเรียบางชนิด archaea และยูคาริโอต ในวิถีนี้ถูกศึกษามากในแบคทีเรียแกรมบวก *B. subtilis* มีการใช้น้ำตาล C5 (ribose 5-phosphate หรือ ribulose 5-phosphate) และน้ำตาล C3 (glyceraldehyde 3-phosphate หรือ dihydroxyacetone phosphate) ดังรูปที่ 2.4 ซึ่งพบว่า *B. subtilis* ใช้ กลูตามีน และกลุ่มยีน *YaaD/YaaE* ซึ่งไม่พบใน *E. coli* (Raschle *et al.*, 2005)

## 4. เอนไซม์ pyridoxal 5' phosphate synthase (PLP synthase)

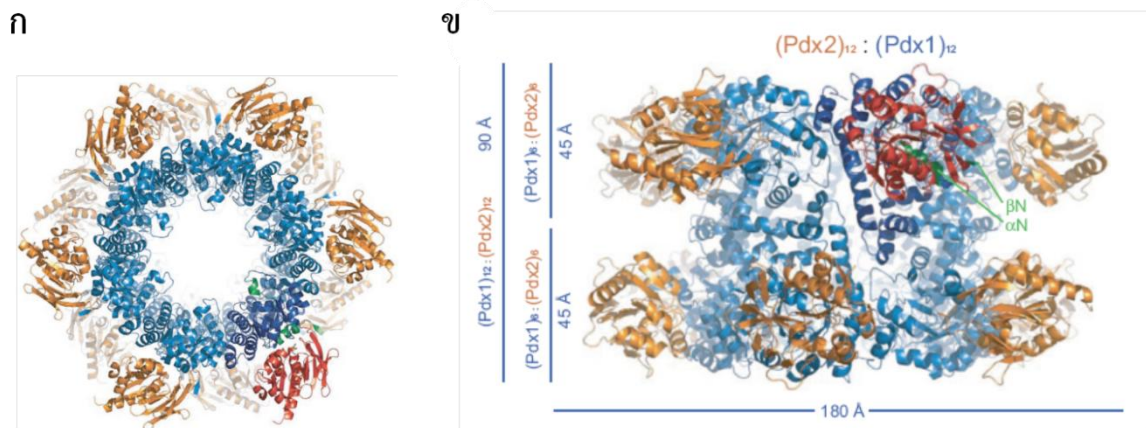
เอนไซม์ pyridoxal 5'-phosphate synthase (PLP synthase) อยู่ในวิถี *de novo* ประเภท DXP-independent ประกอบด้วยโปรตีน PDXS (หรือเรียกในชื่ออื่นว่า PDX1 หรือ YaaD) และ PDXT (หรือเรียกในชื่ออื่นว่า PDX2 หรือ YaaE) รวมเป็นเอนไซม์ PLP synthase ทั้ง PDXS และ PDXT ร่วมกันสังเคราะห์ PLP โดยใช้ ribose 5'-phosphate หรือ ribulose 5'-phosphate รวมกับ glyceraldehyde 3'-phosphate หรือ dihydroxyacetone phosphate และ glutamine เป็น substrate (Itagaki *et al.*, 2013) โดยที่ PDXT ทำหน้าที่เป็น glutamine amidotransferase จะเร่งให้เกิดการเปลี่ยน glutamine เป็น glutamate ดังรูปที่ 2.5 ให้ได้ ammonia เพื่อใช้เป็นแหล่งของ ไนโตรเจน และส่งผ่าน hydrophobic channel เข้าสู่ active site ของ PDXS และเร่งให้เกิดการรวมตัวกัน ได้วิตามินบีหก ในรูปของ PLP (Muller *et al.*, 2008)



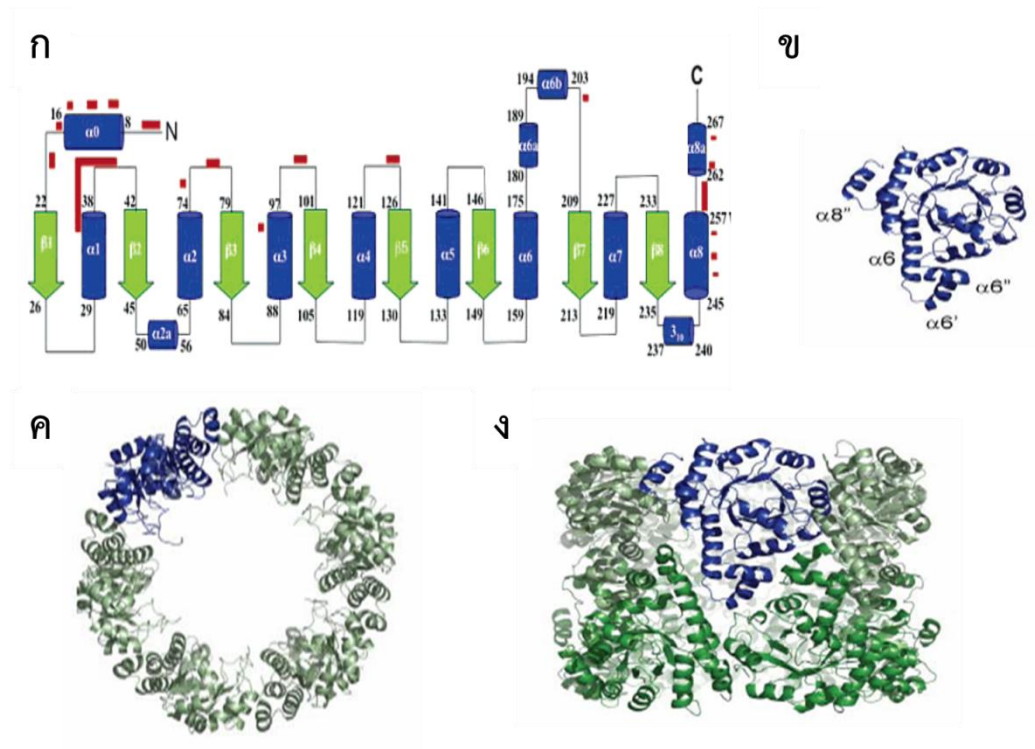
รูปที่ 2.5 แสดงแผนภูมิการทำงานของโปรตีน PDXS และ PDXT ในการสังเคราะห์ PLP (ดัดแปลงจาก Muller *et al.*, 2008)

โครงสร้างของเอนไซม์ PLP synthase ประกอบด้วย 12 monomer ของโปรตีน PDXS และ 12 monomer ของโปรตีน PDXT โดย โปรตีน PDXS ทั้ง 12 หน่วย จะรวมกันเป็นโครงสร้างแบบ double hexameric ring (วงแหวนสองวงซ้อนกัน โดยที่แต่ละวงประกอบด้วย PDXS 6 หน่วย) โปรตีน PDXT แต่ละหน่วยจะไม่จับกันเอง แต่จะจับกับโปรตีน PDXS ในอัตราส่วน 1:1 ทำให้เกิดรูปทรงแบบฟันเฟือง (cogwheel) (Strohmeier et al., 2006) ดังรูปที่ 2.6

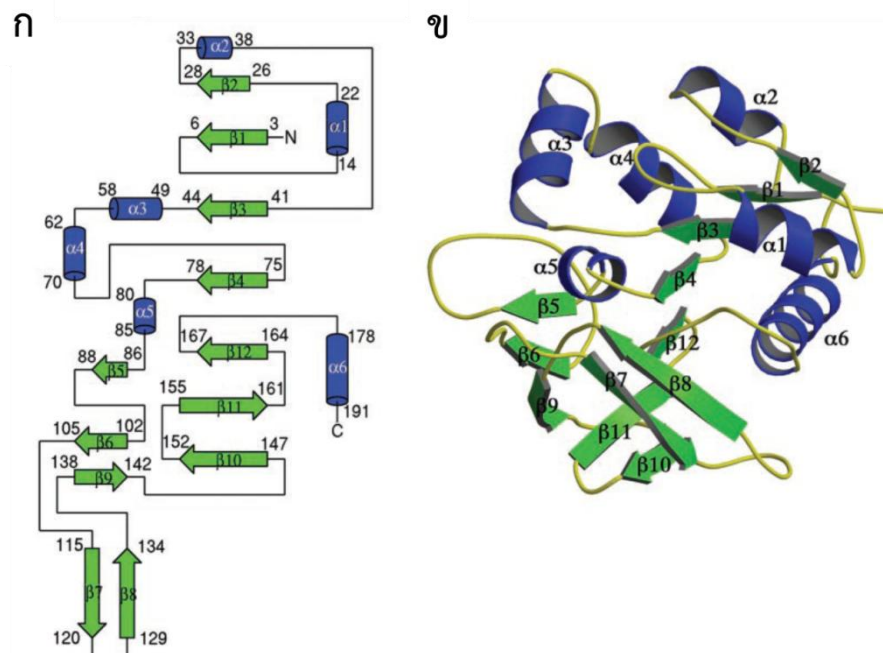
แต่ละ monomer ของโปรตีน PDXS มีรูปทรงแบบ  $(\alpha\beta)_8$  - barrel ดังรูปที่ 2.7 ส่วน monomer ของโปรตีน pdxT มีรูปทรงแบบ  $\alpha/\beta$  three layer sandwich ที่ประกอบด้วย 12  $\beta$  strands, 6  $\alpha$ -helices และ 3  $3_{10}$  - helices ดังรูปที่ 2.8 (Strohmeier et al., 2006; Bauer et al., 2004 และ Zein et al., 2006)



รูปที่ 2.6 โครงสร้างในระดับ quaternary (cogwheel) ของ PLP synthase ก: Top view, ข: Lateral view อัตราส่วนระหว่าง PDXS (หรือ PDX1) และ PDXT (หรือ PDX2) เป็น 1:1 ในการเกิดเป็นคอมเพล็กซ์ (ดัดแปลงจาก Strohmeier et al., 2006)



รูปที่ 2.7 โครงสร้างโปรตีน PDXS ก: Topology diagram ของ PDXS monomer ข: โครงสร้าง 3 มิติของ PDXS monomer ค: hexameric ring ประกอบด้วย PDXS 6 หน่วย (Top view) ง: double hexameric ring ประกอบด้วย PDXS 12 หน่วย (lateral view) (ดัดแปลงจาก Zein et al., 2006; Bauer et al., 2004 และ Strohmeier et al., 2006)

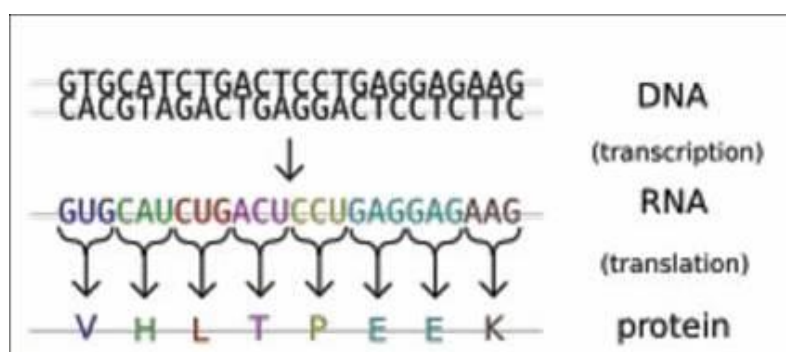


รูปที่ 2.8 โครงสร้างโปรตีน PDXT ก: Topology diagram ของ PDXT monomer ข: โครงสร้าง 3 มิติของ PDXT (Bauer et al., 2004)

## 5. การแสดงออกของโปรตีน (protein expression) ในแบคทีเรีย

การทำ protein expression เป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่เป็นทางเลือกให้กับนักพันธุวิศวกรรม ที่ต้องการจะผลิตโปรตีนที่ต้องการศึกษาในเวกเตอร์ที่ต้องการ โดยอาศัยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม โดยปกติแล้วในสิ่งมีชีวิตต่างๆ ไปมีการผลิตโปรตีนในเซลล์อยู่แล้ว ซึ่งโปรตีนบางตัวถูกผลิตมากบ้าง น้อยบ้าง ดังนั้นหากจะทำการสกัดโปรตีนเหล่านั้นออกมาเพื่อศึกษา อาจจะเป็นการยากหรือต้องใช้เวลานาน ดังนั้นจึงมีเทคนิคที่เรียกว่าการตัดต่อยีนเข้าเวกเตอร์และทำการย้ายเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านที่มีให้เลือกทั้งโปรคาริโอต เช่น *E.coli* หรือยูคาริโอต เช่น yeast, insect cell, mammalian cell เรียกโปรตีนที่ได้ว่าโปรตีนเชื่อมต่อหรือโปรตีนลูกผสม (recombinant protein)

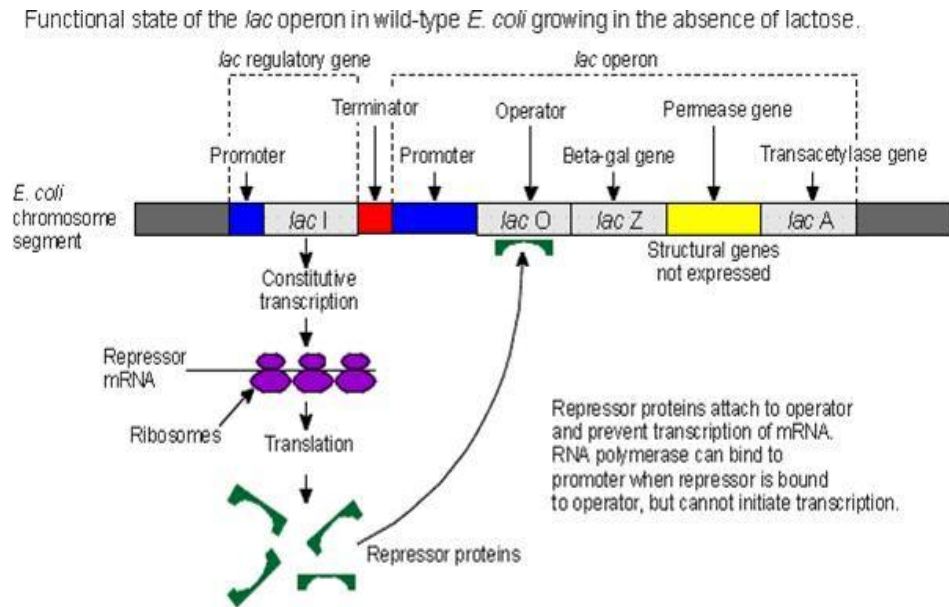
การแสดงออกของยีน (gene expression) เป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับ protein expression เพราะยีนเป็นแม่พิมพ์หรือต้นแบบให้มีการสร้างอาร์เอ็นเอและโปรตีนออกมา (ดังรูปที่ 2.9) ดังนั้นการแสดงออกของยีนจึงมีผลผลิตเป็นโปรตีน ซึ่งการควบคุมการแสดงออกของยีนประกอบด้วยขั้นตอนสองขั้นตอนคือ ขั้นตอนการถอดรหัสจากดีเอ็นเอเป็นอาร์เอ็นเอส่งขาว (mRNA) และขั้นตอนการแปลรหัสจากลำดับเบสของ mRNA เป็นลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน ส่วนใหญ่ในแบคทีเรียจะเกิดการควบคุมการแสดงออกของยีนในขั้นตอนการแปลรหัส



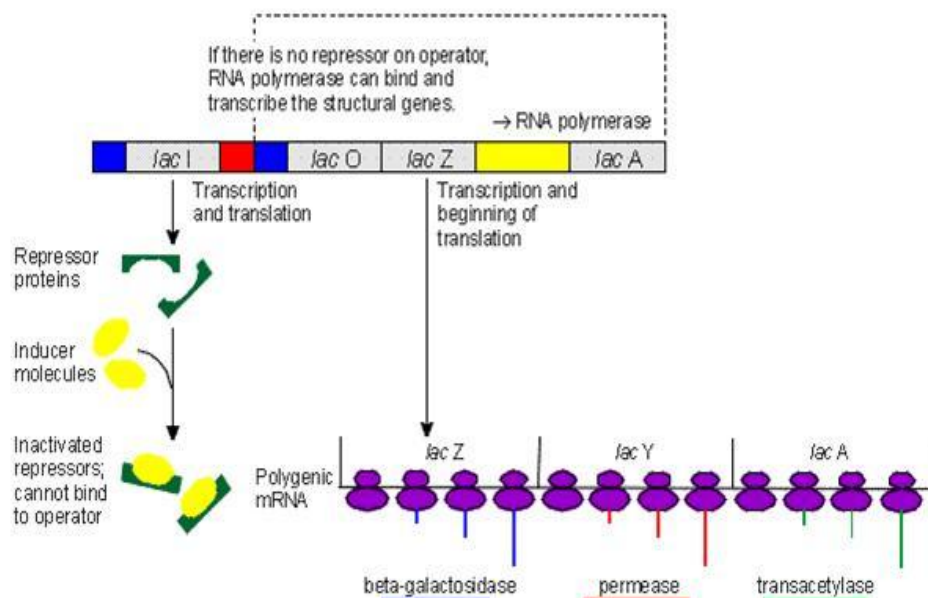
รูปที่ 2.9 แสดงการถอดรหัสและแปลรหัสของดีเอ็นเอ (Gibthai, 2008)

ในแบคทีเรียการแสดงออกของโปรตีนจะมีการแสดงออกที่มีผลควบคุมมาจากยีนที่เป็นลักษณะเป็นกลุ่มเรียกว่า โอเพอรอน (operon) ซึ่งประกอบด้วยยีนโครงสร้าง (structural gene) ยีนควบคุม (regulatory gene) และบริเวณบังคับการ (control site) ซึ่งแบ่งเป็นสองส่วนย่อยคือ ยีนส่งเสริม (promoter gene, p) และยีนดำเนินการ (operator gene, o) ยีนควบคุมและยีนโครงสร้างจะมีข้อมูลพันธุกรรมที่จะถูกถอดรหัสเป็น mRNA แล้วแปลเป็นลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนต่อไป ในกระบวนการแสดงออก (expression) ของยีนโครงสร้างหรือการสร้างโปรตีนจากยีนโครงสร้าง เอนไซม์ RNA polymerase จะเข้าจับที่ promoter แล้วเคลื่อนไปยังยีนโครงสร้างเพื่อสังเคราะห์ mRNA แต่ถ้ามีตัว

กีดกันมาจับที่ operator gene จะทำให้ RNA polymerase เข้าจับที่ promoter ไม่ได้ การสร้างโปรตีนก็จะถูกยับยั้ง (ดังรูปที่ 2.10) ซึ่งเป็นที่มาของทฤษฎีโอเพอรอน ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์จึงใช้หลักการนี้ในการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ต้องการในเซลล์แบคทีเรียได้ โดยใช้ตัว inducer ชักนำให้มีการผลิตโปรตีนให้มากๆ



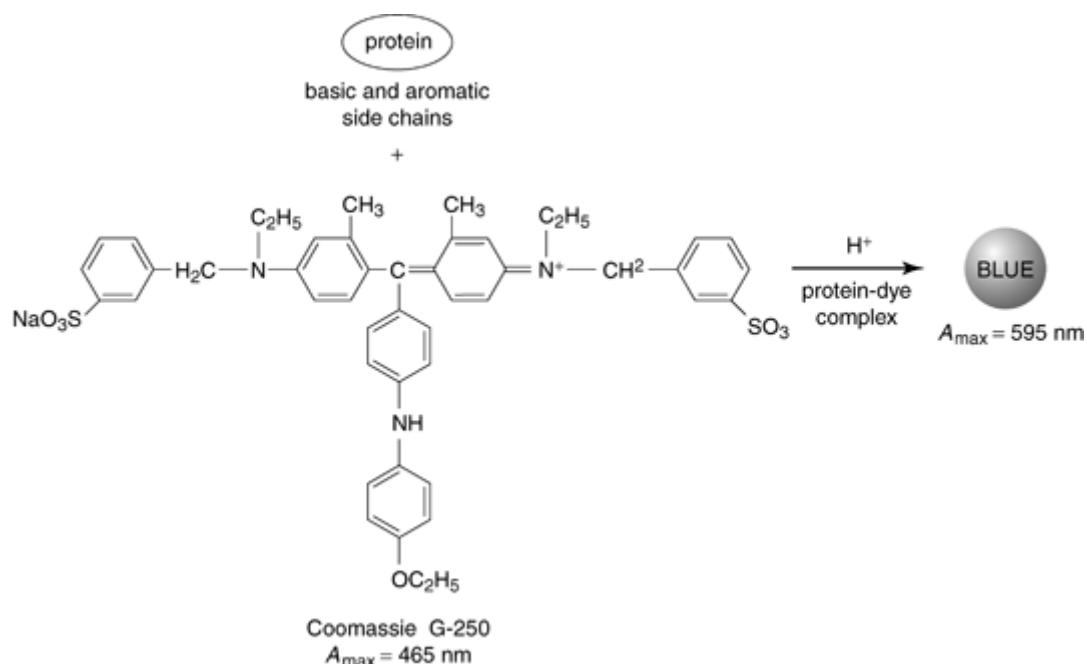
Functional state of the *lac* operon in wild-type *E. coli* growing in the presence of lactose as the sole carbon source.



**รูปที่ 2.10** การสร้างโปรตีนจากยีนโครงสร้าง เอนไซม์ RNA polymerase จะเข้าจับที่ promoter แล้วเคลื่อนไปยังยีนโครงสร้างเพื่อสังเคราะห์ mRNA แต่ถ้ามีตัวกีดกันมาจับที่ operator gene จะทำให้ RNA polymerase เข้าจับที่ promoter ไม่ได้ การสร้างโปรตีนก็จะถูกยับยั้ง (Gibthai, 2008)

## 6. การวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Dye binding assay (Bradford assay)

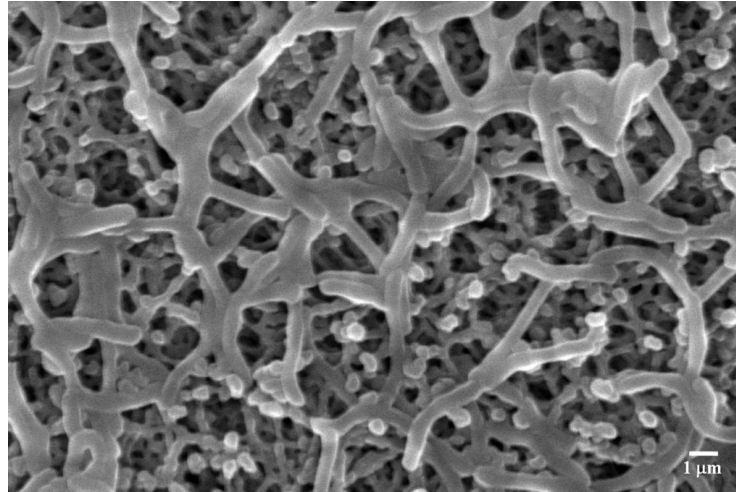
ในปี ค.ศ.1976 Bradford ได้พัฒนาวิธีนี้ขึ้น เพื่อหลีกเลี่ยงข้อจำกัดของวิธี Biuret และ Lowry โดยใช้สารละลาย Coomassie Brilliant Blue G-250 dye (รูปที่ 2.11) ในสารละลายกรด ซึ่งปกติจะมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 465 nm แต่เมื่อ dye จับกับโปรตีนโดยเฉพาะ arginine หรือกรดอะมิโนกลุ่ม aromatic ภายใต้สภาวะที่เป็นกรด ได้ผลิตภัณฑ์ที่สามารถดูดกลืนแสงที่ 595 nm ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่มีความไวสูง (0.2-20  $\mu\text{g}$ ) อีกทั้งยังเป็นวิธีที่มีความสะดวกและรวดเร็ว จึงเป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย โดยสีจะเกิดขึ้นหลังการผสมเพียง 2 นาที ตัวแทรกซ้อนที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm ได้แก่ detergent เช่น Triton X และ sodium dodecyl sulphate



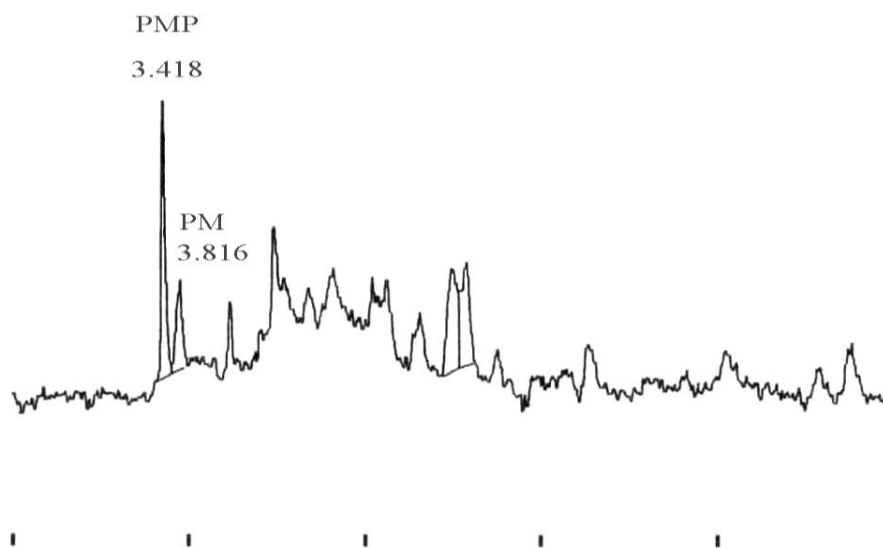
รูปที่ 2.11 แสดงปฏิกิริยาของ Bradford protein assay (Wiley *et al.*, 2011)

## 7. ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับเชื้อ *Geobacillus* sp. H6a

เชื้อ *Geobacillus* sp. H6a ถูกคัดแยกจาก บ่อน้ำพุร้อน ในภาคเหนือของประเทศไทย เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่าง (rod shape) และมี capsule อยู่ในกลุ่ม thermophilic bacteria สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ  $65^\circ\text{C}$  และใช้ออกซิเจนในการเจริญ (รูปที่ 2.12) เชื้อชนิดนี้สามารถผลิตวิตามินบีหกได้สูงที่สุดที่  $60^\circ\text{C}$ , pH 7 เมื่อตรวจสอบรูปของวิตามินบีหกที่ผลิตขึ้นโดยวิธี reverse phase HPLC พบว่าผลิตในรูป PM และ PMP เป็นหลัก ดังรูปที่ 2.13 (Anutrakulchai *et al.*, 2010a)



รูปที่ 2.12 Scanning electron microscope ของเชื้อ *Geobacillus* sp. H6a



รูปที่ 2.13 โครมาโตแกรมของ HPLC ของอาหาร SM ที่เลี้ยงเชื้อ *Geobacillus* sp. H6a เป็นเวลา 40 ชั่วโมง ที่ 60°C

### บทที่ 3

#### วิธีดำเนินงานวิจัย

#### วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี

##### อุปกรณ์

เครื่อง autoclave (APL Co., Japan), อุปกรณ์ automatic pipette ขนาด 10 $\mu$ l, 100 $\mu$ l, 1000 $\mu$ l (BIO-RAD, USA), อุปกรณ์ automatic pipette ขนาด 5ml (JENCONS, UK), (GILSON, France), เครื่อง centrifuge 1000 series (LABQUIP, UK), cuvette 1ml และ 1.5ml, Digital camera, ตู้ incubator 30°C และ 37°C (Sheldon Manufacturing, Inc., USA), เครื่อง laminar Flow (PMV, Netherland), เครื่อง Microplate reader Benchmark (BIO-RAD, USA), ตู้ OVEN (STUART SCIENTIFIC, UK), ตู้ OVEN 50°C (GALLENKAMP, UK), เครื่อง pH meter (HACH, USA), pH strip (MERCK, Germany), Plastic plate (Greiner bio-one, Austria), เครื่อง Shaker Incubator (GALLENKAMP, UK), เครื่อง Shaker Incubator (Bio-Shaker BR-300LF: TEITEC, Japan), Spectrophotometer (UV-1201V: SHIMASU, Japan), UV-Visible Spectrophotometer (UV-160A: SHIMADSU, Japan), Vortex mixture (EYELA Mixer MA-1, Japan), Water Bath-shaker (Heto, Denmark), เครื่องชั่ง 2 และ 4 ตำแหน่ง (METTLER TOLEDO, Switzerland), นาฬิกาจับเวลา (Canon, China), Freezer -20°C (MIRAGE), Freezer -70°C (NEW BRUBSWICK SCIENTIFIC), Gel Document (BIO- RAD), Centrifuge HITACHI HIMAC CR22GII

##### สารเคมี

1 Kb DNA ladder (Sibenzyme), 100 bp DNA ladder (BIO-RAD), 10x Reaction buffer + 20mM MgCl<sub>2</sub> (RBC), 10x buffer M (ROCHE), 2-mercaptoethanol (ACROS), Absolute ethanol (Carlo Erba), Acrylamide (GE healthcare), Agar for bacteriological (Scharlau), Agarose (VIVANTIS), Ammonium persulfate (Carlo Erba), Bacto tryptone (DIFCO), *Bam*H I (ROCHE), Bromophenol blue (FLUKA), Calcium chloride (RANKEM), Coomassie brilliant blue G250 (ACROS), Coomassie brilliant blue R250 (PANREAC), Deoxynucleotidetriphosphate (dNTP) (BIO-RAD), Ethanol (Italmar), Ethidium bromide (ACROS), Gel/PCR DNA Fragments Extraction kit (Geneaid), Glacial acetic acid (QROC), Glucose (Carlo Erba), Glycerol (DIFCO), Glycine (UNIVAR), High-Speed Plasmid

Mini Kit (Geneaid), Hydrochloric acid (Carlo Erba), Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (Fermentas), Kanamycin, Magnesium chloride (FLUKA), N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED) (Fluka), N,N'-methylenebisacrylamide (GE healthcare), *Nde* I (Fermentas), Phosphoric acid (Carlo Erba), Potassium acetate, Primers (Bio basic), Sodium chloride (RANKEM), Sodium dodecyl sulphate (APS Ajax Finechem), Sodium hydroxide (Carlo Erba), T4 DNA ligase (NEB), *Taq* DNA polymerase (RBC), Tris base (VIVANTIS), Yeast extract (HIMEDIA)

### จุลินทรีย์

- เชื้อแบคทีเรีย *Geobacillus* sp. H6a
- เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* BL21 (DE3)

### วิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 1. การเพิ่มปริมาณยีน *pdxS* และ *pdxT* ของเอนไซม์ PLP synthase

เตรียมส่วนผสม PCR reaction ปริมาตรรวม 25  $\mu$ l โดยใช้ primers ดังแสดงในตารางที่ 3.1 ที่จำเพาะต่อการเพิ่มจำนวนยีน *pdxS* และ *pdxT* (ตำแหน่งที่ขีดเส้นใต้แสดง restriction site *Nhe* I และ *Bam* H I ตามชื่อ primer) โดยใช้ genomic DNA ที่สกัดได้จากเชื้อ *Geobacillus* sp.H6a เป็น template

ทำ Touchdown PCR ตามขั้นตอน Denature ใช้อุณหภูมิ 95°C 1 นาที ขั้นตอน Annealing ใช้ อุณหภูมิ 62°C 1 นาที 3 รอบ, 60°C 1 นาที 4 รอบ, 58°C 1 นาที 23 รอบ และขั้นตอน Extension ใช้ อุณหภูมิ 72°C 2 นาที ต่อด้วย 72°C อีก 10 นาที เพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดได้สมบูรณ์ ตรวจสอบด้วย 1.2% agarose gel electrophoresis โดยเทียบกับ 100 bp DNA ladder จากนั้นทำบริสุทธิ์ชิ้นยีน *pdxK* โดยใช้ Gel / PCR DNA Fragments Extraction kit

ตารางที่ 3.1 Primers และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้เพิ่มปริมาณยีน *pdxS* และ *pdxT*

| Gene        | Primer's name    | Nucleotide sequences (5'→3')                |
|-------------|------------------|---------------------------------------------|
| <i>pdxS</i> | FpdxS <u>Nhe</u> | ATT <u>GCTAGC</u> ATGGCATTGACAGGTACGGACC    |
|             | RYaaD <u>Bam</u> | TTTT <u>GATCCT</u> TACCAGCCGCGTTCTTGCATC    |
| <i>pdxT</i> | 5YaaE <u>Nhe</u> | AAAG <u>CTAGC</u> ATGAAAATAGGTGTACTTGGACTGC |
|             | 3YaaE <u>Bam</u> | TTGGGATCCTTACTTGAGGCTTGACGCC                |

## 2. การเตรียม recombinant plasmid ที่มีชิ้นยีน *pdxS* และ *pdxT*

นำพลาสมิด pET-28a(+) และยีน *pdxK* ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้ว มาตัดด้วย restriction site *Nhe* I และ *Bam*H I ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง และนำพลาสมิด pET-28a(+) และยีน *pdxK* ที่ผ่านการตัดด้วย *Nhe* I และ *Bam*H I ไปทำบริสุทธิ์อีกครั้ง ก่อนนำไปเชื่อมด้วย T4 DNA ligase ที่ 16°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

## 3. การ transformation recombinant plasmid ที่มีชิ้นยีน *pdxS* และ *pdxT* เข้าสู่ *E.coli* BL21(DE3)

เติม recombinant plasmid ลงใน *E.coli* BL21(DE3) competent cell ปริมาตร 100  $\mu$ l แขนในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 3 นาที แล้วขนในน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นจึงเติม LB broth ลงไป ปริมาตร 900  $\mu$ l จึงย้ายไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C เขย่า 180 rpm เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำมา centrifuge ที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที แล้วจึง pipette medium 500  $\mu$ l ทิ้งไป ละลาย cell pellet ให้เข้ากัน แล้วนำไป spread ลงบน LB agar plates ที่มี Kanamycin 50  $\mu$ g/ml ปริมาตร 50  $\mu$ l/plate แล้วจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ตรวจสอบโคโลนีที่มี recombinant plasmid ที่มีชิ้นยีน *pdxS* และ *pdxT* โดยวิธี colony PCR

## 4. การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการแสดงออกของโปรตีน recombinant His<sub>6</sub>-tagged PDXS และ PDXT

นำ single colony เลี้ยงในอาหาร LB broth 3 ml ที่มี Kanamycin 50  $\mu$ g/ml เขย่าที่ 180 rpm อุณหภูมิ 37°C จนได้ค่า OD<sub>600</sub> = 0.5 จากนั้นย้ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth 100 ml ในอัตราส่วน เชื้อต่ออาหาร 1:100 ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าที่ 180 rpm จนได้ค่า OD<sub>600</sub> = 0.5 จากนั้นแบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนแรกเติม 1 mM IPTG เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน recombinant His<sub>6</sub>-tagged PDXS หรือ PDXT ส่วนที่ 2 ไม่เติม IPTG (ส่วน control) นำทั้ง 2 ส่วนไปเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 37°C เขย่าที่ 180 rpm เก็บเซลล์ที่เวลา 0, 1, 3 และ 6 ชั่วโมง โดยการ centrifuge ที่ 10,000 rpm ที่ 4°C เป็นเวลา 10 นาที เติมน้ำบัฟเฟอร์ Phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 ปริมาตร 5 ml ที่มีส่วนผสมของ 1 mM PMSF ลงใน cell pellet จากนั้นนำไป sonication เพื่อให้เซลล์แตก ด้วย duty cycle 20%, output 3 เวลา 30 วินาที พัก 1 นาที 5 ครั้ง เก็บส่วน supernatant โดยการ centrifuge ที่ 10,000 g อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วน pellet มาล้างด้วยบัฟเฟอร์ PBS 1 ml 2 ครั้ง จากนั้นจึงเติม 1%SDS 1.5 ml ละลายให้เข้ากันดี แล้วนำไปอุ่นในน้ำร้อน เป็นเวลา 2 นาที นำแต่ละส่วนไปหาปริมาณโปรตีน โดยวิธีของ Bradford เทียบกับโปรตีน BSA

มาตรฐาน (BSA protein standard) ปริมาณการแสดงออกของโปรตีนวิเคราะห์โดยการทำ SDS-PAGE และวัดความเข้มข้นของแถบโปรตีนด้วยโปรแกรม Quantity One (BIO-RAD)

## บทที่ 4

### ผลการวิจัย

จากการดำเนินการวิจัย เพื่อศึกษาเอนไซม์ PLP synthase ในวิธีการผลิตวิตามินบีหกแบบ *de novo* ในเชื้อชอบร็อน *Geobacillus* sp. H6a โดยเริ่มต้นจากการค้นหายีน *pdxS* และ *pdxT* ของเอนไซม์ PLP synthase ในเชื้อ *Geobacillus* sp. H6a และศึกษาโครงสร้างระดับต่าง ๆ จากลำดับกรดอะมิโนของยีน *GhpdxS* และ *GhpdxT* ในขณะเดียวกัน ได้ทำการเพิ่มจำนวนและเชื่อมเข้าสู่ expression vector pET-28a(+) และนำเข้าสู่เชื้อ *E. coli* จากนั้นกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน recombinant His<sub>6</sub>-tagged PDXS และ PDXT

#### 1. การจำแนกและการเพิ่มปริมาณยีน *pdxS* และ *pdxT* ของเอนไซม์ PLP synthase

Primers ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนยีนของเอนไซม์ PLP synthase จากเชื้อชอบร็อน *Geobacillus* sp. H6a ถูกออกแบบโดยใช้ข้อมูลจาก GenBank database และ Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) database

จากการเพิ่มจำนวนยีนของ *GhpdxS* และ *GhpdxT* ได้ PCR product ขนาด 885 bp และ 591 bp ตามลำดับ ตรวจสอบความถูกต้องของ PCR product โดยหาลำดับดีเอ็นเอโดยวิธี DNA sequencing ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.1 และ 4.2

```
1  TTGGCATTGACAGGTACGGACCGCGTCAAACGCGGCATGGCGGAAATGCAAAAAGGCGGCGTCATCATGGACGTCGTGAA
1  M A L T G T D R V K R G M A E M Q K G G V I M D V V N
81  CGCAGAACAGGGCGAAAATCGCTGAAGCGGCAGGGGCTGTGCGGTTATGGCGCTCGAGCGCGTCCCGCGGACATTCGCG
28  A E Q A K I A E A G A V A V M A L E R V P A D I R
161 CCGCTGGCGGGTGTGCGCGCATGGCCGACCCGACGGTGATCGAAGAAGTGATGAACGCCGTTTCGATCCCAGTCATGGCG
54  A A G G V A R M A D P T V I E E V M N A V S I P V M A
241 AAAGTGC GGATCGGTCATGTTGAGGCGCGTGTCTTAGAGGCGCTTGGTGTGCGACTACATTGACGAAAGCGAAGTATT
81  K V R I G H Y V E A R V L E A L G V D Y I D E S E V L
321 AACGCCGGCTGATGAGGAGTTCATATTGACAAACGGCAGTTTACCGTTCCATTGTGTGCGGTTGCCGCGATTTAGGGG
108 T P A D E E F H I D K R Q F T V P F V C G C R D L G
401 AAGCGGCGCGCCGATTGCAGAGGGGCATCGATGTTGCGGACGAAAGGAGAGCCGGGGACAGGCAACATCGTTGAGGCC
134 E A A R R I A E G A S M L R T K G E P G T G N I V E A
481 GTGCGCATATGCGCAAAGTGAACGCGCAAATTCGCAAAGTCGTCAACATGAGCGAAGATGAGCTTGTGCTGAGGCGAA
161 V R H M R K V N A Q I R K V V N M S E D E L V A E A K
561 ACAGCTCGGGGCTCCGGTTGAGGTGCTGCGCGAGATCAAGCGGCTTGGCCGCTGCCGCTCGTCAACTTTGCCGCCGGCG
188 Q L G A P V E V L R E I K R L G R L P V V N F A A G
641 GTGTCGCGACACCGGCTGACGCTGCCCTTGATGATGCACTTGGGTGCGGACGGTGTCTTTGTTGGGCTGGCATTTCAAA
214 G V A T P A D A A L M M H L G A D G V F V G S G I F K
721 TCGGAATAACCGGAAAAATACGCGCGCGCATCGTAGAGGCGACGACTCATTACGAAGACTATGAATTGATCGCACACTT
241 S E N P E K Y A R A I V E A T T H Y E D Y E L I A H L
801 GTGAAAGGATTGGGCGGCGCGATGCGTGGCATCGATATCGCGACATTGTTGCCGGAGCACCGGATGCAAGAACGCGGCT
268 S K G L G G A M R G I D I A T L L P E H R M Q E R G
881 GGTAA
294 W *
```

รูปที่ 4.1 แสดงลำดับดีเอ็นเอจากยีน *pdxS* (885 bp) จากเชื้อชอบร็อน *Geobacillus* sp. H6a ซึ่งถอดรหัสได้ 294 กรดอะมิโน ในรูปแสดง start และ stop codon ; บริเวณที่ขีดเส้นใต้แสดงตำแหน่ง primers ที่ใช้ในการทำ PCR และการหาลำดับ DNA

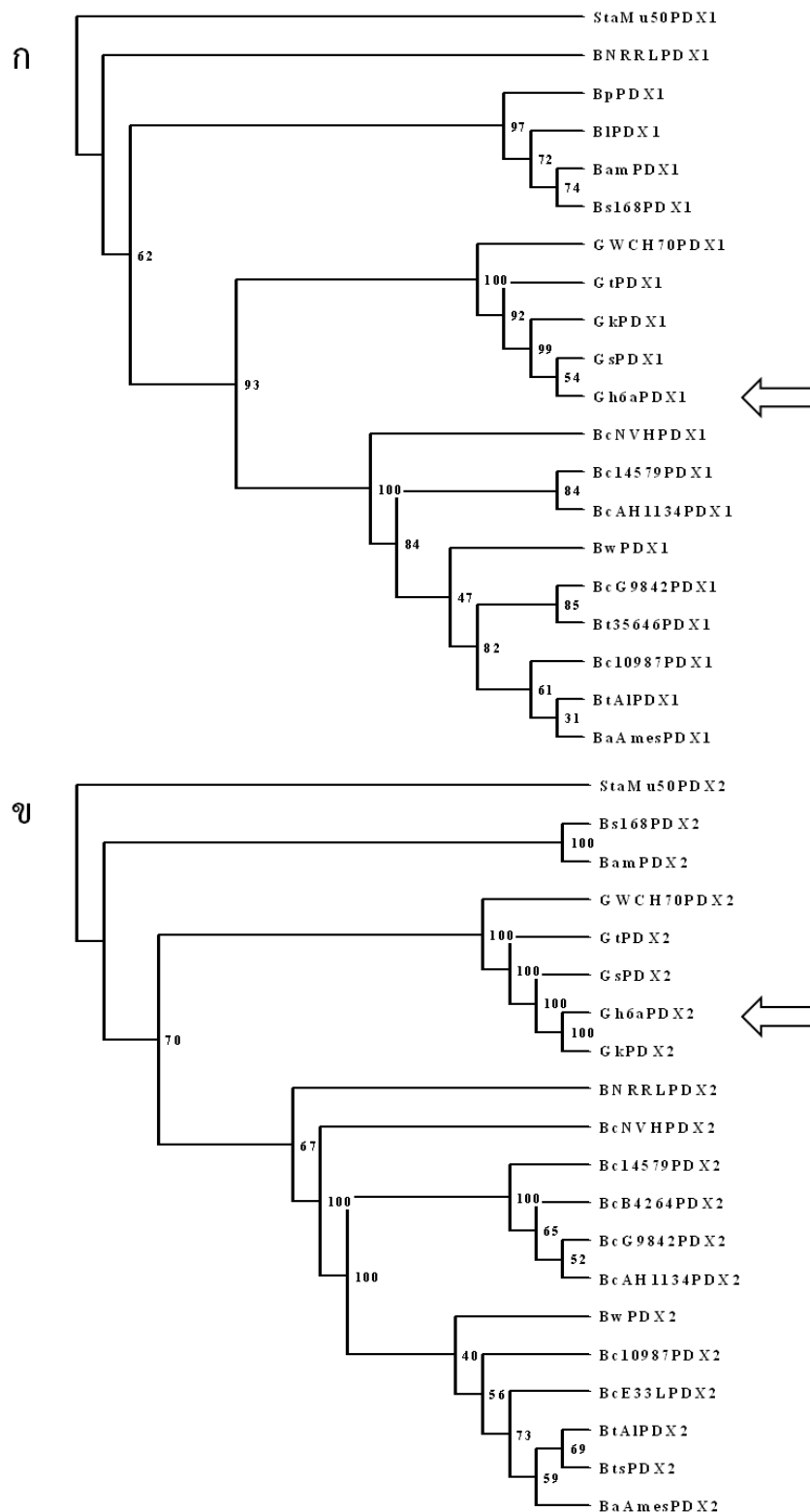
```

1  ATGAAAATAGGTGTACTTGGACTGCAAGGAGCTGTGCGGGAGCATGTTGCGCCATTGAGGCGTGCGGCGCCGAGGCGGT
1  M K I G V L G L Q G A V R E H V R A I E A C G A E A V
81  CATCGTGAAAAAGCCGGAGCAGCTTGAAGGGTTGGACGGTCTTGTGCTGCCGGGCGGCGAAAGCACGACGATGCGGCGGC
28  I V K K P E Q L E G L D G L V L P G G E S T T M R R
161  TCATCGACCGCTATGGGCTGATGGAGCCGCTCAAGCAATTTGCCGCTGCCGGCAAGCCGATGTTCCGTACGTGCGCCGGG
54  L I D R Y G L M E P L K Q F A A A G K P M F G T C A G
241  CTGATTTTACTGGCGAAACGAATCGTCGGTTACGACGAGCCGCACTTAGGTTTGATGGACATTACGGTGGAGCGGAACTC
81  L I L L A K R I V G Y D E P H L G L M D I T V E R N S
321  GTTCGGTCGGCAGCGGGAAAGCTTTGAGGCGGAGCTGTGCGATTAAAGGCGTCGGCGATGGCTTTGTCGGCGTCTTCATCC
108  F G R Q R E S F E A E L S I K G V G D G F V G V F I
401  GCGCTCCGCATATCGTGGAGGCGGGGACGGGGTCGATGTCTTGGCGACATACAATGACCGCATTGTGCGCGCTCGACAA
134  R A P H I V E A G D G V D V L A T Y N D R I V A A R Q
481  GGACAGTTTCTTGGCTGCTCGTTCCACCCAGAGCTGACCGACGATCATCGATTGATGCAATACTTCCTCAACATGGTCAA
161  G Q F L G C S F H P E L T D D H R L M Q Y F L N M V K
561  AGAAGCGAAAATGGCGTCAAGCCTCAAGTAA
188  E A K M A S S L K *

```

รูปที่ 4.2 แสดงลำดับดีเอ็นเอจากยีน *pdxT* (591 bp) จากเชื้อขอบรื้อน *Geobacillus* sp. H6a ซึ่งถอดรหัสได้ 196 กรดอะมิโน ในรูปแสดง start และ stop codon ; บริเวณที่ขีดเส้นใต้แสดงตำแหน่ง primers ที่ใช้ในการทำ PCR และการหาลำดับ DNA

ข้อมูลจากลำดับดีเอ็นเอจากยีน *GhpdxS* และ *GhpdxT* ที่ถอดรหัสได้ 294 และ 196 กรดอะมิโน ตามลำดับ ถูกนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีอยู่ใน GenBank database และวิเคราะห์ความสัมพันธ์โดย bioinformatic analysis ผลการวิเคราะห์แสดงดังรูปที่ 4.3 ซึ่งแสดงให้เห็นความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกันระหว่าง Gh6aPDXS และ Gh6aPDXT และโปรตีน PDXS และ PDXT จากเชื้อขอบรื้อน *Geobacillus* sp. อื่น ๆ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ยีนที่ได้จากการเพิ่มจำนวนโดยวิธี PCR น่าจะเป็นยีนที่ถอดรหัสให้โปรตีน PDXS และ PDXT ซึ่งรวมกันเป็น คอมเพล็กซ์ของเอนไซม์ PLP synthase จริง ลำดับดีเอ็นเอที่ได้รับ ได้ส่งไปเก็บในข้อมูลของ GenBank database โดยได้รับรหัสเป็น FJ497249 (ยีน *pdxS*) และ FJ497250 (ยีน *pdxT*)



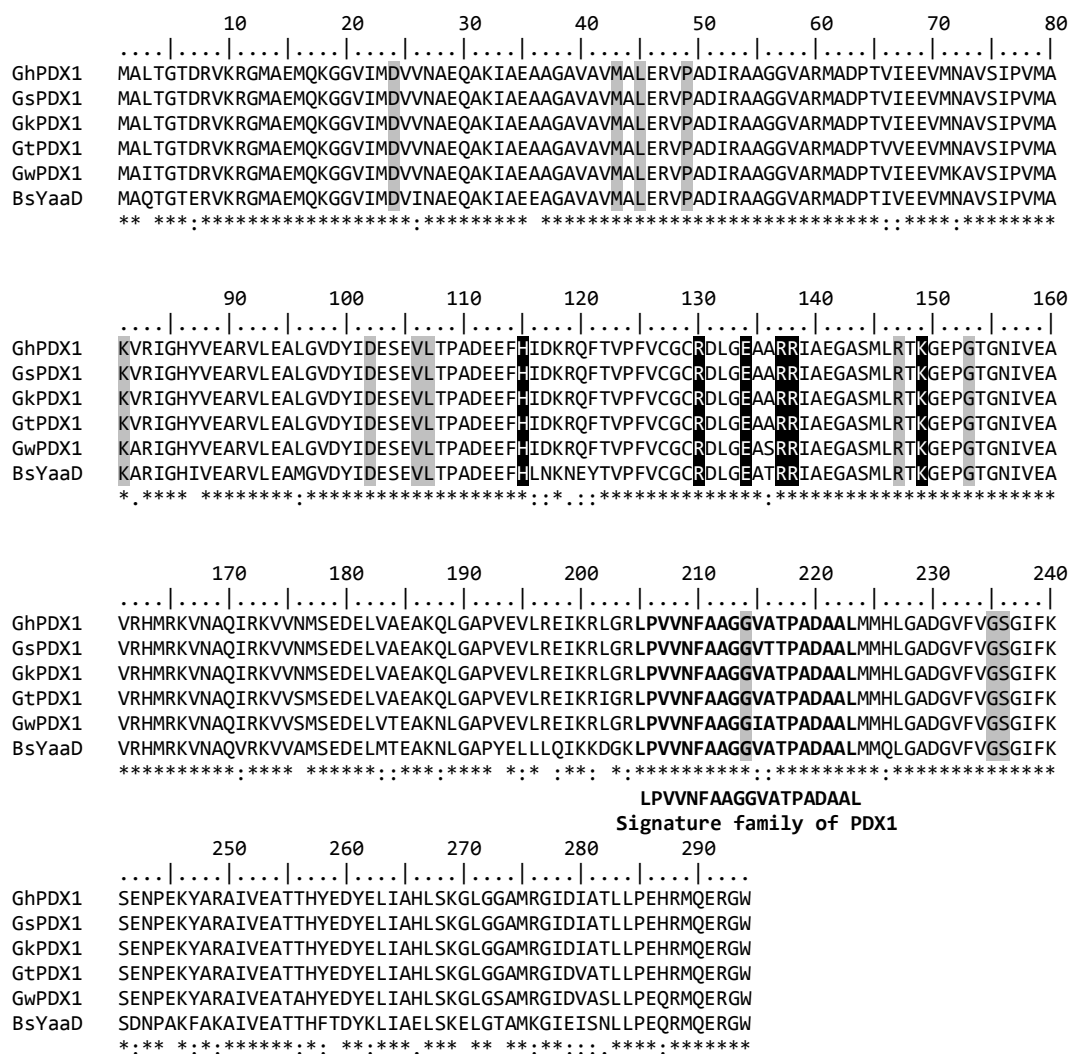
รูปที่ 4.3 แสดง Phylogenetic tree ของลำดับกรดอะมิโนจากโปรตีน PDXS (หรือ PDX1) (ก) และ โปรตีน PDXT (หรือ PDX2) (ข) จาก *Geobacillus* sp. H6a. และโปรตีน PDX จากเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ (Gs = *Geobacillus stearothermophilus* strain 10; Gk = *Geobacillus kaustophilus*; Gt = *Geobacillus thermoleovorans* ; GWCH70 = *Geobacillus* sp. CH70 ; B = *Bacillus*; Sta = *Staptococcus*)

## 2. การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนและโครงสร้างของโปรตีน GhPDXS และ GhPDXT

การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน PDXS และ PDXT จากเชื้อ *Geobacillus* sp และ *Bacillus subtilis* sub sp. 168 ใช้โปรแกรม Clustal W ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน พบว่าโปรตีน GhPDXS มีความเหมือน (identity) ถึง 100% เมื่อเทียบกับโปรตีน PDX1 จากเชื้อ *G. kaustophilus* HTA426 นอกจากนั้นยังพบลำดับกรดอะมิโนที่แสดง motif ของโปรตีนในกลุ่ม PDX1 (LPVVNFAA GGVATPADAAL) และพบตำแหน่งการจับของ substrate ได้แก่ ribulose 5-phosphate (RBP) และ dihydroxyacetone phosphate (DHAP) ดังแสดงในรูปที่ 4.4

ผลจากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน GhPDXT และกลุ่มโปรตีน PDX2 จากเชื้อ *Geobacillus* sp และ *Bacillus subtilis* sub sp. 168 พบว่าโปรตีน GhPDXT มีความเหมือน (identity) ถึง 100% เมื่อเทียบกับโปรตีน PDX2 จากเชื้อ *G. kaustophilus* HTA426 และพบลำดับกรดอะมิโนที่แสดง motif ของโปรตีนในกลุ่ม PDX2 (GLILPGGESTT) นอกจากนั้นยังพบ active site ของ glutaminase ในลำดับกรดอะมิโนของ GhPDXT อีกด้วย (รูปที่ 4.5)

การคาดเดาโครงสร้างระดับทุติยภูมิ (putative secondary structure) ของโปรตีน GhPDXS และ GhPDXT ถูกวิเคราะห์โดย Porter และการเปรียบเทียบโครงสร้างระดับตติยภูมิ (comparative tertiary structure) ถูกวิเคราะห์โดย SWISS-MODEL ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)) โครงสร้างระดับทุติยภูมิของโปรตีน GhPDXS ประกอบด้วย 15 alpha-helices และ 9 beta-sheets โครงสร้างระดับตติยภูมิของโปรตีน GhPDXS มีความเหมือนกับ โปรตีน PDX1 จากเชื้อ *G. stearothermophilus* (PDB ID: 1znn) (รูปที่ 4.6) โครงสร้างระดับทุติยภูมิของโปรตีน GhPDXT ประกอบด้วย 12 alpha-helices และ 8 beta-sheets โครงสร้างระดับตติยภูมิของโปรตีน GhPDXT ซึ่งมีความเหมือนกับ โปรตีน PDX2 จากเชื้อ *G. stearothermophilus* (PDB ID: 1q7r) (รูปที่ 4.7)



**รูปที่ 4.4** แสดง Multiple alignment ของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน GhPDXS (หรือ GhPDXS) เปรียบเทียบกับ โปรตีน PDX1 จาก เชื้อ *Geobacillus* sp และ *Bacillus subtilis* sub sp. 168 อักษรย่อ Gs: *G. strearophilus* strain 10 (97% identities), Gk: *G. kaustophilus* HTA426 (100% identities), Gt: *G. thermodenitrificans* NG80-2 (99% identities), Gw: *Geobacillus* sp. CH70 (96% identities), และ BsYaaD: โปรตีน YaaD ของเชื้อ *B. subtilis* sub sp. 168 (85% identities) สัญลักษณ์ (\*) แสดงกรดอะมิโนที่ conserved (conserved residues) สัญลักษณ์ (:) แสดงกรดอะมิโนที่มีความเหมือนกันมาก (strongly similar residues) และ สัญลักษณ์ (.) แสดงกรดอะมิโนที่มีความเหมือนกันน้อย (weakly similar residues) สีเทาแสดงตำแหน่ง RBP binding site สีดำแสดงตำแหน่ง DHAP binding site ลำดับกรดอะมิโน LPVVNFAA GGVATPADAAL แสดงตำแหน่ง motif ของ โปรตีนกลุ่ม PDX1

```

          10      20      30      40      50      60      70      80
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GhPDX2 -MKIGVLGLQGAVREHVRAIEACGA EAVVKKPEQLEGLDGLVLPGGESTTMRRLLIDRYGLMEPLKQFAAAGKPMFGTCA
GkPDX2 -MKIGVLGLQGAVREHVRAIEACGA EAVVKKPEQLEGLDGLVLPGGESTTMRRLLIDRYGLMEPLKQFAAAGKPMFGTCA
GsPDX2 -MKIGVLGLQGAVREHVRAIEACGA EAVVKKPEQLEGLDGLVLPGGESTTMRRLLIDRYGLMEPLKQFAAAGKPMFGTCA
GtPDX2 -MKIGVLGLQGAVREHVRAIEACGA EAVVKKPEQLEGLDGLVLPGGESTTMRRLLIDRYGLMEPLKQFAAAGKPMFGTCA
GwPDX2 MMKIGVLGLQGAVREHVRSIEACGA EAVVKKIEQLEEDGLILPGGESTTMRRLLMDKYGFIEPLKQFAAAGKPMFGTCA
BsYaaE MLTIGVLGLQGAVREHIIHAIEACGAAGLVVKKRPEQLNEVDGLILPGGESTTMRRLLIDTYQFMEPLREFAAQKPMFGTCA
      :.*****.***::***** :.***: *** :***:***** ***: * : ***:*** ** *
                                     GLILPGGESTT
                                     Signature family of PDX2
          90      100     110     120     130     140     150     160
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GhPDX2 GLILLAKRIVGYDEPHLGLMDITVERNSFGRQRESFEAELSIKGVGDGFVGVFIRAPHIVEAGDGVVLDLATYNDRIVAAR
GkPDX2 GLILLAKRIVGYDEPHLGLMDITVERNSFGRQRESFEAELSIKGVGDGFVGVFIRAPHIVEAGDGVVLDLATYNDRIVAAR
GsPDX2 GLILLAKRIVGYDEPHLGLMDITVERNSFGRQRESFEAELSIKGVGDGFVGVFIRAPHIVEAGDGVVLDLATYNDRIVAAR
GtPDX2 GLILLAKRIVGYDEPHLGLMDITVERNSFGRQRESFEAELSIKGVGDGFVGVFIRAPHIVEAGDGVVLDLATYNDRIVAAR
GwPDX2 GLILLAKRIVGYDEPHLGLMDITVERNSFGRQRESFEAELSIAGVADDFIGVFIRAPHIVEAGDGVVLDLATYNDRIVAAR
BsYaaE GLIILAKEIAGSDNPHLGLNIVVVERNSFGRQVDSFEADLTIKGLDEPFTGVFIRAPHILEAGENVEVLSEHNGRIVAAR
***.***.*.*.*.***** :.***** :****.*.* * : * *****.*.*.*.*: :.*****

```

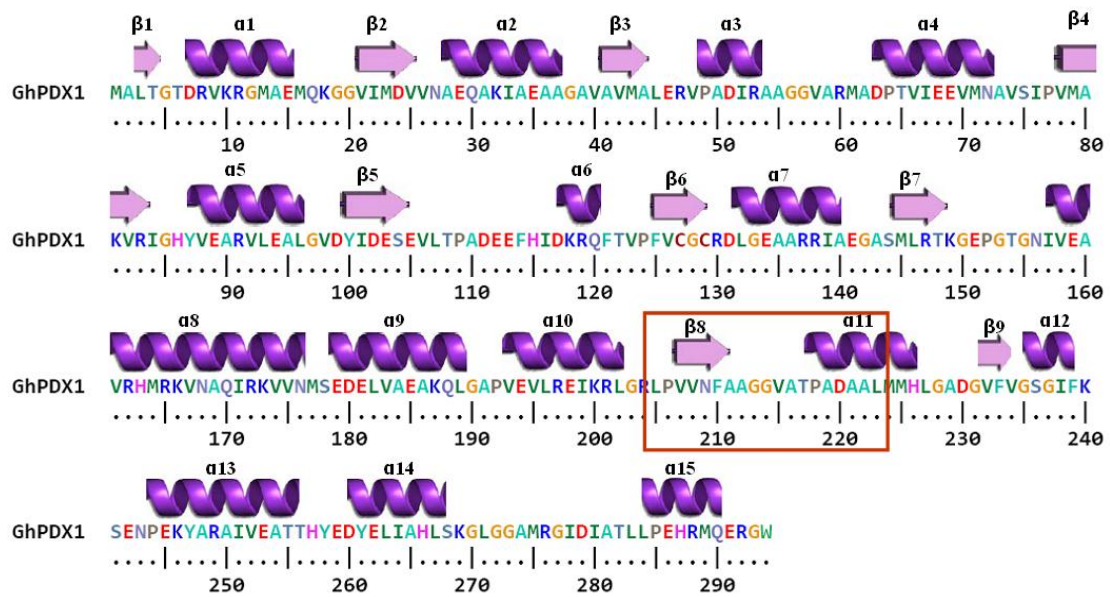
```

          170      180      190
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|..
GhPDX2 QGQFLGCSFHPELTDHRLMQYFLNMVKEAKMASSLK
GkPDX2 QGQFLGCSFHPELTDHRLMQYFLNMVKEAKMASSLK
GsPDX2 QGQFLGCSFHPELTDHRLXQYFLNXVKEAKXASSLK
GtPDX2 QGQFLGCSFHPELTDHRLMRYFLNMVKEAKTVSSI-
GwPDX2 QGQFLGCSFHPELTDYRMTQYFLNMVKEAKA-----
BsYaaE QGQFLGCSFHPELTEDHRVTQLFVEMVEEYKQKALV-
*****.*.*.*.*: : *.*: *.* *

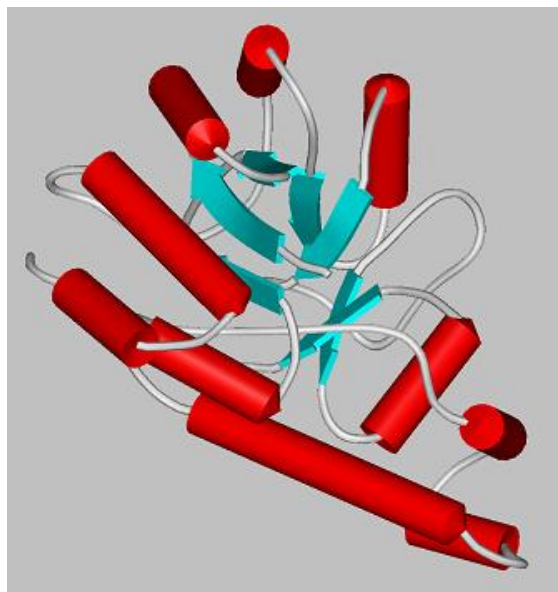
```

รูปที่ 4.5 แสดง Multiple alignment ของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน GhPDX2 (หรือ GhPDX2) เปรียบเทียบกับโปรตีน PDX2 จากเชื้อ *Geobacillus* sp และ *Bacillus subtilis* sub sp. 168 อักษรย่อ Gs: *G. stearothermophilus* strain 10 (96% identities), Gk: *G. kaustophilus* HTA426 (100% identities), Gt: *G. thermodenitrificans* NG80-2 (93% identities), Gw: *Geobacillus* sp. CH70 (84% identities), และ BsYaaE: โปรตีน YaaE ของเชื้อ *B. subtilis* sub sp. 168 (69% identities) สัญลักษณ์ (\*) แสดงกรดอะมิโนที่ conserved (conserved residues) สัญลักษณ์ (:) แสดงกรดอะมิโนที่มีความเหมือนกันมาก (strongly similar residues) และสัญลักษณ์ (.) แสดงกรดอะมิโนที่มีความเหมือนกันน้อย (weakly similar residues) สีเทาแสดงตำแหน่ง active site ของ glutaminase ลำดับกรดอะมิโน GLILPGGESTT แสดงตำแหน่ง motif ของโปรตีนกลุ่ม PDX2

ก)

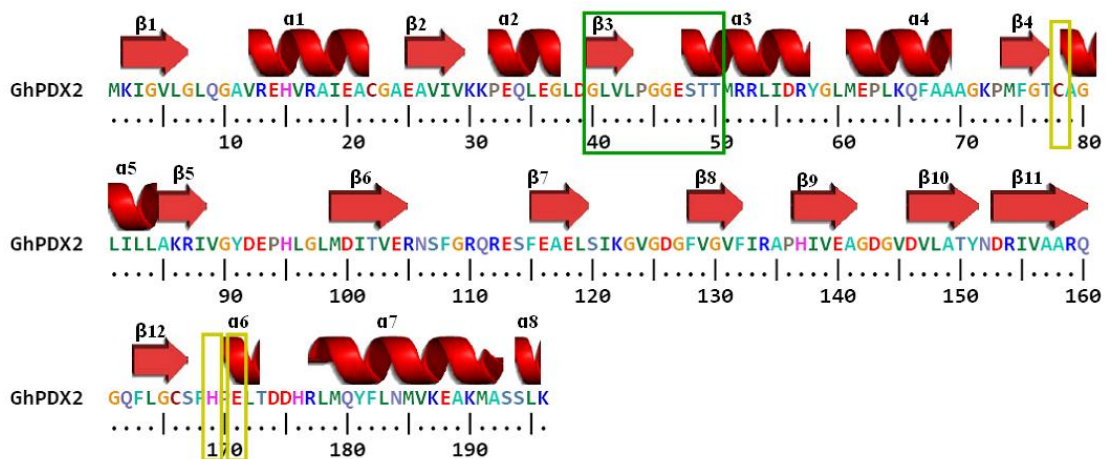


ข)

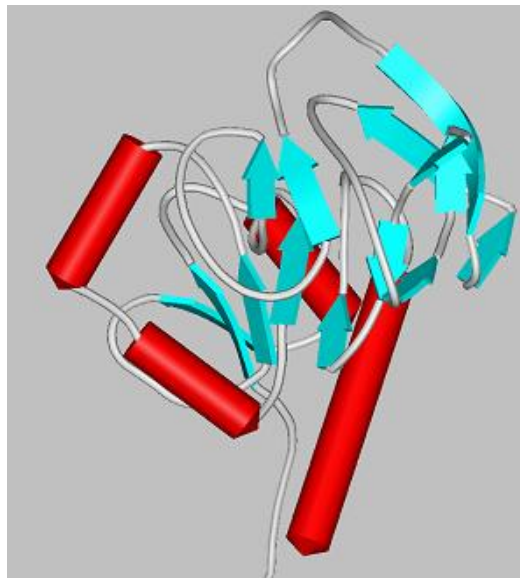


รูปที่ 4.6 แสดงโครงสร้างที่คาดเดา (putative structure) ของโปรตีน GhPDXS (หรือ GhPDX1) (ก) โครงสร้างระดับทุติยภูมิของโปรตีน GhPDXS ประกอบด้วย 15 alpha-helices และ 9 beta-sheets ตำแหน่ง motif ของกลุ่มโปรตีน PdxS/SNZ แสดงในกรอบสีแดง (ข) โครงสร้างระดับตติยภูมิของโปรตีน GhPDXS ซึ่งมีความเหมือนกับ โปรตีน PDX1 จากเชื้อ *G. stearotherophilus* (PDB ID: 1znn)

ก)



ข)

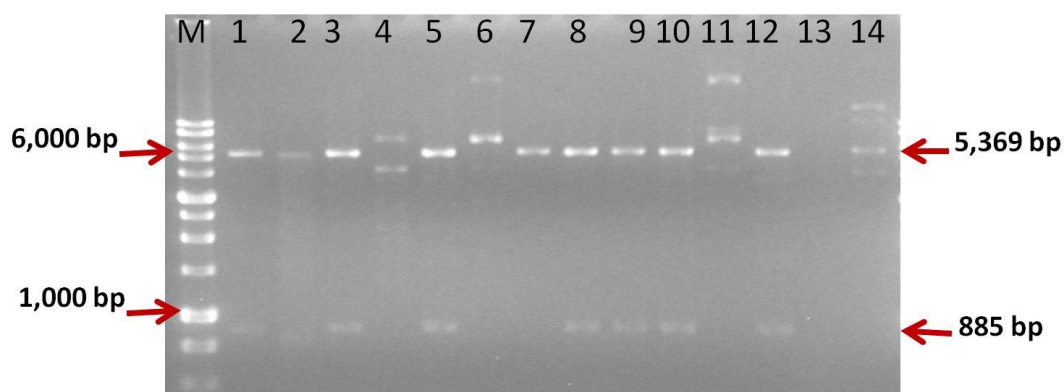


รูปที่ 4.7 แสดงโครงสร้างที่คาดเดา (putative structure) ของโปรตีน GhPDXT (หรือ GhPDX2) (ก) โครงสร้างระดับทุติยภูมิของโปรตีน GhPDXT ประกอบด้วย 12 alpha-helices และ 8 beta-sheets ตำแหน่ง motif ของกลุ่มโปรตีน PdxT/SNO แสดงในกรอบสีเขียว และตำแหน่ง active site (Cys78-His169-Glu171) แสดงในกรอบสีเหลือง (ข) โครงสร้างระดับตติยภูมิของโปรตีน GhPDXT ซึ่งมีความเหมือนกับ โปรตีน PDX2 จากเชื้อ *G. stearothermophilus* (PDB ID: 1q7r)

### 3. การตรวจสอบการ transformation recombinant plasmid ที่มีชิ้นยีน *GhpdxS* และ *GhpdxT* เข้าสู่ *E.coli* BL21(DE3)

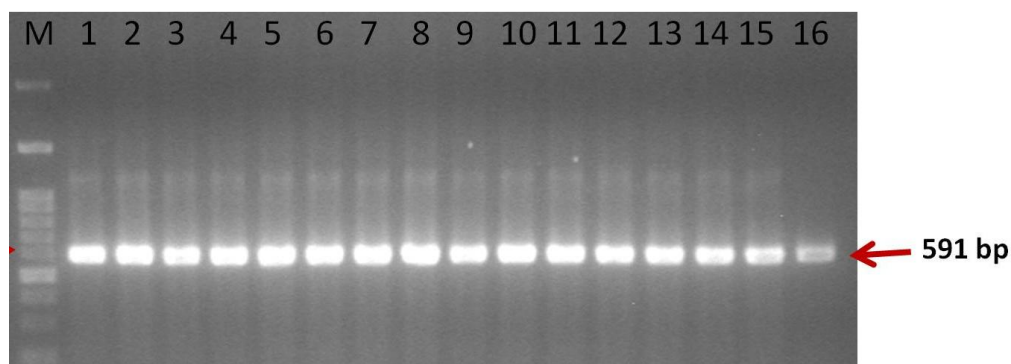
จากการเชื่อมยีน *GhpdxS* และ *GhpdxT* ใน expression vector pET-28a และ clone เข้าสู่ *E.coli* BL21 (DE3)

ตรวจสอบ recombinant clones ของยีน *GhpdxS* โดยการสกัด recombinant plasmid โดยใช้ High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid) และนำไปตัดด้วย restriction enzyme *Bam*HI และ *Nhe*I เทียบกับ intact plasmid pET28a(+) และ PCR product ของยีน *GhpdxS* ได้จำนวน 8 clones แสดงดังรูปที่ 4.8



รูปที่ 4.8 แสดงผล Screen transformed colonies *GhpdxS* โดยวิธี digestion พบว่ามีจำนวน 8 โคลน (หมายเลข 1, 2, 3, 5, 8, 9, 10 และ 12) โดยที่ lane 7: pET28a วิเคราะห์ด้วย 0.8% agarose gel ย้อมด้วย ethidium bromide load 5  $\mu$ l / well เทียบกับ 1 Kb ladder (Lane M)

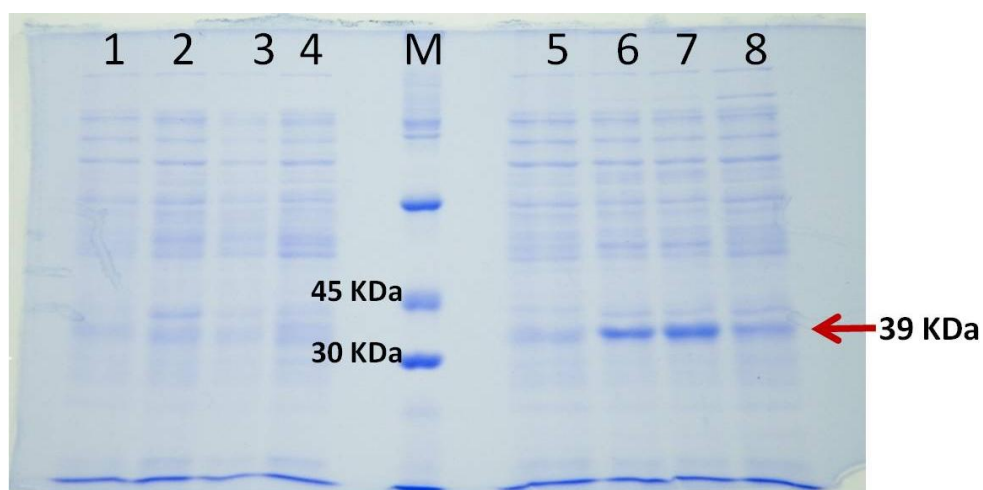
ตรวจสอบ recombinant clones ของยีน *GhpdxT* โดยวิธี colony PCR ได้จำนวน 15 clones แสดงดังรูปที่ 4.9



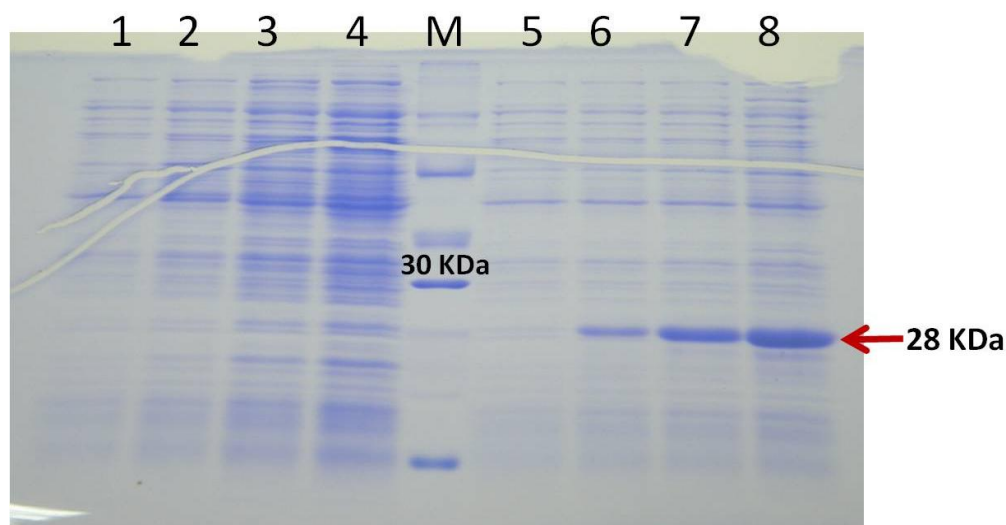
รูปที่ 4.9 แสดงผลการ screen transformed colonies โดยวิธี colony PCR ของ *GhpdxT* gene พบว่ามีจำนวน 15 โคลน วิเคราะห์ด้วย 1.5% agarose gel ย้อมด้วย ethidium bromide load 10  $\mu$ l / well เทียบกับ 100 bp ladder (Lane M) Lane 16: PCR product *GhpdxT*

#### 4. การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน recombinant His<sub>6</sub>-tagged GhPDXS และ GhPDXT ภายหลังการเหนี่ยวนำด้วย IPTG

จากขนาดของ PCR product ของ recombinant His<sub>6</sub>-tagged GhPDXS และ GhPDXT (885 และ 591 bp) ซึ่งรวมกับโปรตีนในส่วน His<sub>6</sub>-tagged และ thrombin cleavage site ที่มีขนาด 7 kD (21 aa) สามารถคำนวณขนาดของโปรตีน ได้ 39 และ 28 kD ตามลำดับ เมื่อนำ transformant ที่ 1 ของยีน *GhpdxS* และ *GhpdxT* มาทำการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออก ด้วย 1 mM IPTG ในช่วงเวลา 0, 1, 3, และ 6 ชั่วโมง พบว่าได้ขนาดซึ่งตรงกับขนาดโปรตีนที่คำนวณได้ ในการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE (ดังรูปที่ 4.10 และ 4.11) และพบว่าทั้งโปรตีน His<sub>6</sub>-tagged GhPDXS และ GhPDXT มีการเพิ่มปริมาณขึ้นตามเวลาของการเหนี่ยวนำ



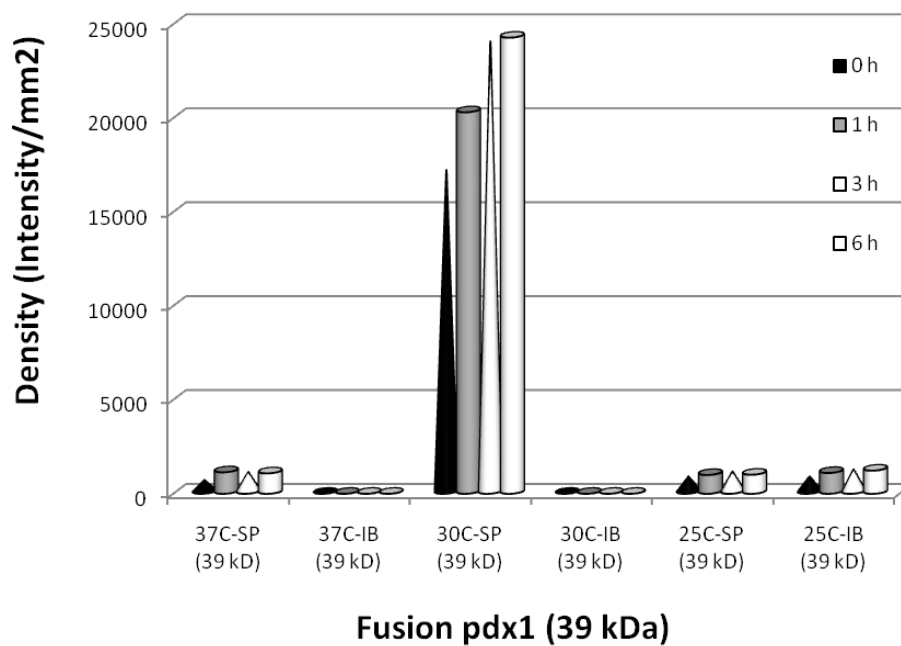
รูปที่ 4.10 แสดงผลการวิเคราะห์โปรตีน recombinant His<sub>6</sub>-tagged GhPDXS ในส่วน supernatant ด้วย 12% Acrylamide gel Lane 1-4: เป็นเซลล์ที่ไม่ได้เหนี่ยวนำด้วย IPTG ที่เวลา 0, 1, 3 และ 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°C Lane 5-8: เป็นเซลล์ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วย IPTG ที่เวลา 0, 1, 3 และ 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°C



**รูปที่ 4.11** แสดงผลการวิเคราะห์โปรตีน recombinant His<sub>6</sub>-tagged GhPDXT ในส่วน supernatant ด้วย 12% Acrylamide gel Lane 1-4: เป็นเซลล์ที่ไม่ได้เหนี่ยวนำด้วย IPTG ที่เวลา 0, 1, 3 และ 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°C Lane 5-8: เป็นเซลล์ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกด้วย IPTG ที่เวลา 0, 1, 3 และ 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°C

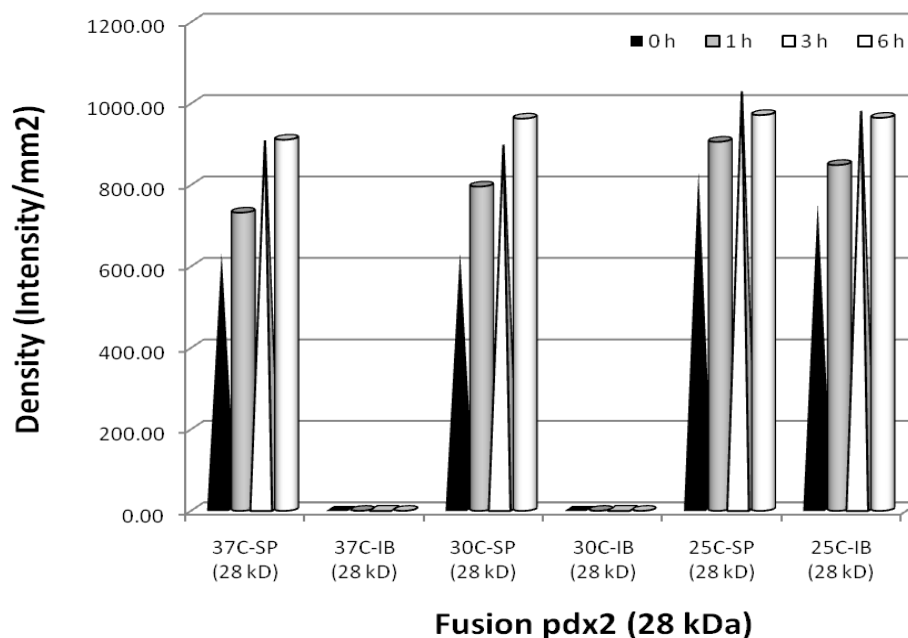
เมื่อศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการแสดงออกของโปรตีน ได้แก่ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการแสดงออกของโปรตีน ให้ได้ปริมาณมากที่สุดและเป็น soluble protein (SP) โดยอุณหภูมิที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ 25-30-37°C ส่วนความเข้มข้นของ IPTG ที่เหมาะสมต่อการแสดงออกของโปรตีนนั้น ไม่ได้ศึกษาเนื่องจาก ความเข้มข้นนี้ (1 mM IPTG) เป็นความเข้มข้นที่แนะนำตามคู่มือให้ใช้กับ expression vector ชนิดนี้ ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการแสดงออกของโปรตีน แสดงดังรูปที่ 4.12 และ 4.13 เมื่อตรวจวัดความเข้มข้นของแถบโปรตีนที่ 39 และ 28 kDa ทั้งในส่วน supernatant และ pellet พบว่า ที่ 30 และ 37°C พบโปรตีน recombinant His<sub>6</sub>-tagged GhPDXS และ GhPDXT ในส่วน supernatant แต่ไม่พบในส่วน pellet แสดงถึงโปรตีนอยู่ในรูป soluble แต่ที่ 25°C พบโปรตีน recombinant His<sub>6</sub>-tagged GhPDXS และ GhPDXT ในส่วน supernatant และ pellet แสดงถึงโปรตีนที่แสดงออก อยู่ทั้งในรูป soluble และรูป inclusion body (IB)

จากผลการทดลองนี้ เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการแสดงออกของ recombinant His<sub>6</sub>-tagged GhPDXS และ GhPDXT ได้แก่ 30°C เนื่องจากเป็นอุณหภูมิที่ได้โปรตีนอยู่ในรูป soluble ที่มีการแสดงออกมากที่สุด เพื่อนำมาศึกษา activity ของเอนไซม์ต่อไป



รูปที่ 4.12 กราฟแสดงความเข้มของแถบโปรตีน recombinant His<sub>6</sub>-tagged GhPDXS (39 kDa) จากการเหนี่ยวนำด้วย 1 mM IPTG ที่ อุณหภูมิ 25, 30 และ 37°C ที่ 0, 1, 3 และ 6 ชั่วโมง ตามลำดับ IB: Inclusion body, SP: Soluble protein

1.



รูปที่ 4.13 กราฟแสดงความเข้มของแถบโปรตีน recombinant His<sub>6</sub>-tagged GhPDXT (28 kDa) จากการเหนี่ยวนำด้วย 1 mM IPTG ที่ อุณหภูมิ 25, 30 และ 37°C ที่ 0, 1, 3 และ 6 ชั่วโมง ตามลำดับ IB: Inclusion body, SP: Soluble protein

## บทที่ 5

### วิจารณ์ผลการทดลอง

เอนไซม์ PLP synthase ทำหน้าที่สังเคราะห์วิตามินบีหกขึ้นมาใหม่ โดยใช้วิถี *de novo* ประเภท DXP-independent โครงสร้างของเอนไซม์ประกอบด้วยโปรตีน PDXS และ PDXT ทำงานร่วมกันสังเคราะห์วิตามินบีหกในรูป PLP

การศึกษาเอนไซม์ PLP synthase ในแบคทีเรีย *Geobacillus* sp. H6a ซึ่งเป็นแบคทีเรียชอบร้อน (thermophilic bacterium) เพื่อให้เข้าใจการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งอาจนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์ในอุตสาหกรรม นอกจากนั้น ข้อมูลที่ได้รับยังสามารถใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงให้กับเชื้อชอบร้อนอื่น ๆ ในกลุ่มเดียวกันได้

ในการวิจัยนี้ได้ทำการค้นหายีน *pdxS* และ *pdxT* ของเอนไซม์ PLP synthase ในเชื้อ *Geobacillus* sp. H6a แล้วนำมาเพิ่มปริมาณโปรตีน โดยใช้พลาสมิด pET-28a(+) ซึ่งเป็น expression vector ในเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* BL21(DE3) ให้ได้เป็นโปรตีน recombinant His<sub>6</sub>-tagged GhPDXS และ GhPDXT จากนั้นนำไปศึกษาคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการแสดงออก ในงานวิจัยครั้งนี้ ไม่ได้ศึกษาความเข้มข้นของ IPTG ที่เหมาะสมต่อการแสดงออก เนื่องจาก ความเข้มข้นที่ใช้ (1 mM IPTG) เป็นความเข้มข้นที่แนะนำตามคู่มือให้ใช้กับ expression vector ชนิดนี้

จากการวิจัย พบว่ายีน *GhpdxS* และ *GhpdxT* มีขนาด 885 bp และ 591 bp ตามลำดับ ถอดรหัสได้ 294 และ 196 กรดอะมิโน ตามลำดับ ผลจากการทำ phylogenetic tree แสดงให้เห็นว่า deduced Gh6aPDXS และ Gh6aPDXT มีความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกับโปรตีน PDXS และ PDXT จากเชื้อชอบร้อน *Geobacillus* sp. อื่น ๆ และผลจากการทำ multiple alignment และการคาดเดาโครงสร้างระดับทุติยภูมิและตติยภูมิ แสดงให้เห็นถึงความใกล้เคียงทางโครงสร้างและตำแหน่งที่จับกับ substrate เช่นเดียวกับเอนไซม์ PLP synthase ที่พบในกลุ่มของ *Geobacillus* sp. ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ยีนที่ได้จากการเพิ่มจำนวนโดยวิธี PCR น่าจะเป็นยีนที่ถอดรหัสให้เอนไซม์ PLP synthase จริง

การแสดงออกของโปรตีน recombinant His<sub>6</sub>-tagged GhPDXS และ GhPDXT โดยการเหนี่ยวนำด้วย 1 mM IPTG นั้น สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนที่มีขนาด 39 และ 28 kDa ตามลำดับ โดยโปรตีนที่ได้รับ พบอยู่ในลักษณะ soluble เมื่อตรวจสอบคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการแสดงออกของโปรตีน พบว่า ที่ 25°C พบโปรตีน recombinant His<sub>6</sub>-tagged GhPDXS และ GhPDXT ในส่วน supernatant และ pellet แสดงถึงโปรตีนที่แสดงออก อยู่ทั้งในรูป soluble และรูป inclusion body (IB) ในขณะที่อุณหภูมิ ที่ 30°C ให้ปริมาณโปรตีนมากที่สุดในส่วน soluble ดังนั้นจึงเป็น อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการแสดงออกของ recombinant His<sub>6</sub>-tagged GhPDXS และ GhPDXT

ดังนั้นงานที่จะทำในปัจุบันประมาณ 2557 ได้แก่ การทำบริสุทธิ์โปรตีน recombinant His<sub>6</sub>-tagged GhPDXS และ GhPDXT และศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนนี้ เพื่อการนำมาใช้ประโยชน์ในอนาคต

## บรรณานุกรม

- กรมศุลกากร. สถิติการนำเข้า-ส่งออก. ค้นข้อมูลวันที่ 11 กันยายน 2553 จาก <http://www.customs.go.th/Statistic/StatisticIndex.jsp>
- ยานี ครอบพาณิชย์ (2546) การสังเคราะห์วิตามินบีหกโดยเชื้อจุลินทรีย์ วารสารวิทยาศาสตร์ ฉบับเดือน มกราคม – กุมภาพันธ์ หน้า 49-53.
- Anutrakunchai C, Niamsanit S, Wangsomnuk P, Preeya and Trongpanich Y. (2010a) Isolation and characterization of vitamin B6-producing thermophilic bacterium, *Geobacillus* sp. H6a. J Gen Appl Micro 56, 273-279.
- Anutrakunchai C, Niamsanit S, Trongpanich Y. (2010b) Expression profiling and functional analysis of a *Pdx1* and *Pdx2* gene encoding PLP synthase from *Geobacillus* sp. H6a. KKU Sci. J. 38:2, 208-220.
- Bauer JA, Bennett EM, Begley TP, Ealick SE (2004) Three-dimensional structure of yaaE from *Bacillus subtilis*, a glutaminase implicated in pyridoxal 5'-phosphate biosynthesis. JBC. 279 :4, 2704-2711.
- Belitsky BR (2004). Physical and Enzymological Interaction of *Bacillus subtilis* Proteins Required for De Novo Pyridoxal 5'-Phosphate Biosynthesis. *J. Bacteriol.* 186: 1191-1196
- Burns KE, Xiang Y, Kinsland CL, McLafferty FW, and Begley TP. (2005) Reconstitution and biochemical characterization of a new pyridoxal 5'-phosphate biosynthetic pathway. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 3682-3683.
- Farrington GK, Kumar A, Shames SL, Ewaskiewicz JI, Ash DE, Wedler FC. (1993) Threonine synthase of *Escherichia coli*: inhibition by classical and slow-binding analogues of homoserine phosphate. *Arch Biochem Biophys.* 307(1):165-174.
- Gibthai (2011) การแสดงออกของโปรตีน (protein expression) ในแบคทีเรีย ค้นข้อมูลวันที่ 10 ตุลาคม 2554 จาก [http://www.gibthai.com/services/technical\\_detail.php?ID=16](http://www.gibthai.com/services/technical_detail.php?ID=16)
- González E, Danehower D, Daub ME. (2007) Vitamin levels, stress response, enzyme activity, and gene regulation of *Arabidopsis* lines mutant in the pyridoxine/pyridoxamine 5'-phosphate oxidase (PDX3) and the pyridoxal kinase (SOS4) genes involved in the vitamin B6 salvage pathway. *Plant Physiol.* 145(3):985-96.
- Higdon J (2002) Vitamin B-6. Retrived February 28,2006 from <http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/vitamins/vitaminB6.html>

- Hoshino T, Nagatani Y, Ichikawa K, Tazoe M. Process for producing vitamin B<sub>6</sub>. Patent number: US 7,371,547 B2, Publication date: May 13, 2008.
- Ishida M, and Shimura K (1970) Vitamin B<sub>6</sub> production with a cell-suspension of *Achromobacter cycloclastes*. *Agr Biol Chem* 34:327-334
- Itagaki S, Haga M, Oikawa Y, Sakoda A, Ohke Y, Sawada H, Eguchi T, Tamegai H (2013) Differences in the roles of a glutamine amidotransferase subunit of pyridoxal 5'-phosphate synthase between *Bacillus circulans* and *Bacillus subtilis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77, 1481-1485.
- Lin H (2003) *Continuing a successful partnership*. Retrieved March 28, 2005 from <http://www.sea.siemens.com/chemphar/case/cbchina.html>
- Martin AR, DiSanto R, Plotnikov I, Kamat S, Shonnard D, Pannuri S. (2007) Improved activity and thermostability of (S)-aminotransferase by error-prone polymerase chain reaction for the production of a chiral amine. *Biochemical Engineering Journal* 37, 246–255.
- McMullan G, Christie JM, Rahman TJ, Banat IM, Ternan NG, Marchant R (2004) Habitat, applications and genomics of the aerobic, thermophilic genus *Geobacillus*. *Biochem Soc Trans.* 32, 214-217.
- Mittenhuber G. (2001) Phylogenetic analyses and comparative genomics of vitamin B<sub>6</sub> (pyridoxine) and pyridoxal phosphate biosynthesis pathways. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3, 1-20.
- Mooney S, Leuendorf JE, Hendrickson C, Hellmann H (2009) Vitamin B<sub>6</sub>: A long known compound of surprising complexity. *Molecules* 14, 329-351.
- Morita T, Takegawa K, Yagi T. (2004) Disruption of the *plr1+* gene encoding pyridoxal reductase of *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biochem.* 135(2):225-30.
- Muller I.B., Knockel J., Groves M.R., Jordanova R., Ealick S.E., Walter R.D., Wrenger C. (2008). The Assembly of the Plasmodial PLP Synthase Complex Follows a Defined Course. **PLoS ONE** 3(3): e1815. doi:10.1371/journal.pone.0001815.
- Newman JA, Das SK, Sedelnikova SE, Rice DW (2006) Cloning, purification and preliminary crystallographic analysis of a putative pyridoxal kinase from *Bacillus subtilis*. *Acta Cryst Commun.* F62, 1006-1009.

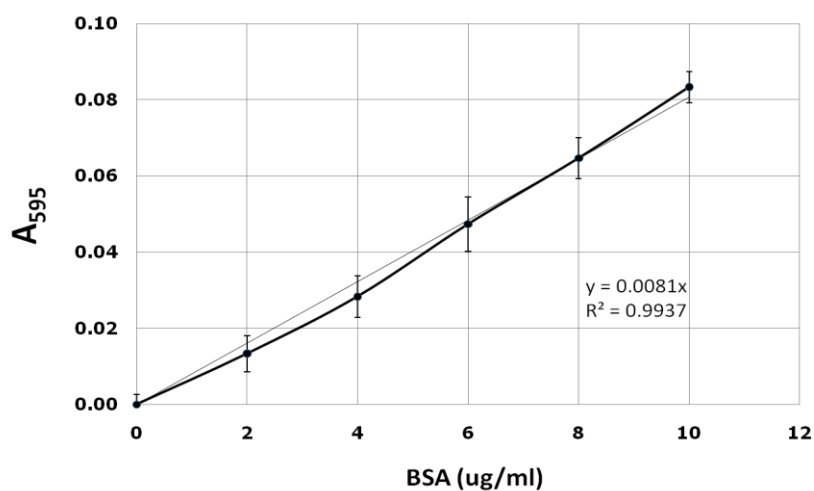
- Nishio N, Sakai K, Fujii K, Kamikubo T (1973) Utilization of *n*-paraffins and vitamin B<sub>6</sub> production by *Pechia gulliermondii* wickerham. *Agr Biol Chem* 37: 553-559
- Park JH, Burns K, Kinsland C, Begley TP (2004) Characterization of two kinases involved in thiamine pyrophosphate and pyridoxal phosphate biosynthesis in *Bacillus subtilis*: 4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine kinase and pyridoxal kinase. *J Bact* 186, 1571-1573.
- Phimwapi S (2005) Study on the biosynthesis of vitamin B-6 by bacterial isolates from soils. A thesis for the degree of master of science. Khon Kaen university.
- Pratt CW and Cornely K (2003) Essential biochemistry. 4<sup>th</sup> ed. Weinheim, Wiley.
- Raschle, T., Amrhein, N., Fitzpatrick, T. B. (2005). On the Two Components of Pyridoxal 5'-Phosphate Synthase from *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 280: 32291-32300
- Sakai A, Kita M, and Tani Y (2004) Recent progress of vitamin B<sub>6</sub> biosynthesis. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 50, 69-77.
- Schell U, Wohlgemuth R, Ward JM (2009) Synthesis of pyridoxamine 5'-phosphate using an MBA : pyruvate transaminase as biocatalyst. *J Mol Catal B; Enzymatic* 59: 279-285.
- Scherr GH and Rafelson (Jr.) ME (1962) The directed isolation of mutants producing increased amounts of metabolites. *Journal of Applied Microbiology* 25 (2) , 187–194
- Shames SL, Ash DE, Wedler FC, Villafranca JJ. (1984) Interaction of aspartate and aspartate-derived antimetabolites with the enzymes of the threonine biosynthetic pathway of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 259(24):15331–15339.
- Sigma catalog. Retrieved September 11, 2010 from [www.sigmaaldrich.com/](http://www.sigmaaldrich.com/)
- Strohmeier M., Raschle T., Mazurkiewicz J., Rippe K., Sinning I., Fitzpatrick T.B., Tews I., (2006). Structure of a bacterial pyridoxal 5-phosphate synthase complex. **PNAS.** 103(51): 19284-19289.
- Tani Y, Nakamatsu T, Izumi Y, Ogata K (1972) Extracellular formation of vitamin B<sub>6</sub> by marine and terrestrial microorganisms and its control. *Arg Biol Chem* 36:189-197
- Tazoe M, Ichikawa K, Hoshino T (1999) Production of vitamin B<sub>6</sub> in *Rhizobium*. *Biosci Biotechnol Biochem* 63: 1378-1382

- Tazoe M, Ichikawa K, and Hoshino T (2002) Biosynthesis of vitamin B<sub>6</sub> in *Rhizobium*: in vitro synthesis of pyridoxine from 1-deoxy-D-xylulose and 4-hydroxy-L-threonine. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66, 934-936.
- Tazoe M, Ichikawa K, and Hoshino T (2006) Flavin Adenine Dinucleotide-Dependent 4-Phospho-D-Erythronate Dehydrogenase Is Responsible for the 4-Phosphohydroxy-L-Threonine Pathway in Vitamin B<sub>6</sub> Biosynthesis in *Sinorhizobium meliloti* *Journal of Bacteriology*, 188: 4635-4645.
- Trongpanich, Y., Phimwapi, S., Niamsanit, S., Wangsomnuk, P.P., Boonmee, M. and Siri, S. 2007. Isolation and characterization of bacteria capable of producing pyridoxamine (PM) and pyridoxamine 5'-phosphate (PMP), vitamin B<sub>6</sub> compounds. *J Gen Appl Micro.* 53:295-299.
- Wallner S, Neuwirth M, Flicker K, Tews I, Macheroux P (2009) Dissection of contributions from invariant amino acids to complex formation and catalysis in the heteromeric pyridoxal 5-phosphate synthase complex from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* 48, 1928-1935.
- Weiner DP, Luginbuhl P, Bueno A, Cuenca JM, Marasco E. Transferase and oxidoreductase, nucleic acids encoding them and methods for making and using them. Patent number: US 2011/0033391 A1, Publication date: Feb. 10, 2011.
- Wetzel DK, Ehrenschaft M, Denslow SA, Daub ME.(2004) Functional complementation between the PDX1 vitamin B6 biosynthetic gene of *Cercospora nicotianae* and pdxJ of *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 23;564(1-2):143-6.
- Willey (2011) Bradford protein assay. ค้นข้อมูลวันที่ 11 ตุลาคม 2554 จาก <http://media.wiley.com/CurrentProtocols/CB/cba03h/cba03h-fig-0007-1-full.gif>.
- Wungsintaweeikul J, Herz S, Hecht S, Eisenreich W, Feicht R, Rohdich F, Bacher A, Zenk MH (2001) Phosphorylation of 1-deoxy-D-xylulose by D-xylulokinase of *Escherichia coli*. *Eur J Biochem*, 268: 310-316.
- Yoshikane Y, Yokochi N, Ohnishi K, Hayashi H, Yagi T (2006) Molecular cloning, expression and characterization of pyridoxamine-pyruvate aminotransferase. *Biochem J* 396, 499-507.

- Zein, F. Zhang, Y. Kang, Y. Burns, K. Begley, T. and Ealick, S. (2006). Structural Insights into the Mechanism of the PLP Synthase Holoenzyme from *Thermotoga maritime*. *Biochemistry* (45): 14609-14620.
- Zhao G and Winkler ME (1996) 4-Phospho-hydroxy-L-threonine is an obligatory intermediate in pyridoxal 5'-phosphate coenzyme biosynthesis in *Escherichia coli* K-12. *FEMS Microbiol Lett.* 135 (2-3):275–280.

## ภาคผนวก

### 1. กราฟมาตรฐาน bovine serum albumin สำหรับการวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Dye-binding assay (Bradford)



### 2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและบัฟเฟอร์

#### 2.1 Luria-Bertani broth

|                |    |   |
|----------------|----|---|
| Bacto-tryptone | 10 | g |
| Yeast extract  | 5  | g |
| NaCl           | 10 | g |

ละลายส่วนผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปรับค่า pH เท่ากับ 7 ด้วย NaOH จากนั้นปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 1 ลิตร

#### 2.2 1X phosphate buffer saline (pH 7.4)

|                                  |      |   |
|----------------------------------|------|---|
| NaCl                             | 8    | g |
| KCl                              | 0.2  | g |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 1.44 | g |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 0.24 | g |

ละลายส่วนผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปรับค่า pH เท่ากับ 7.4 ด้วย HCl จากนั้นปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 1 ลิตร