

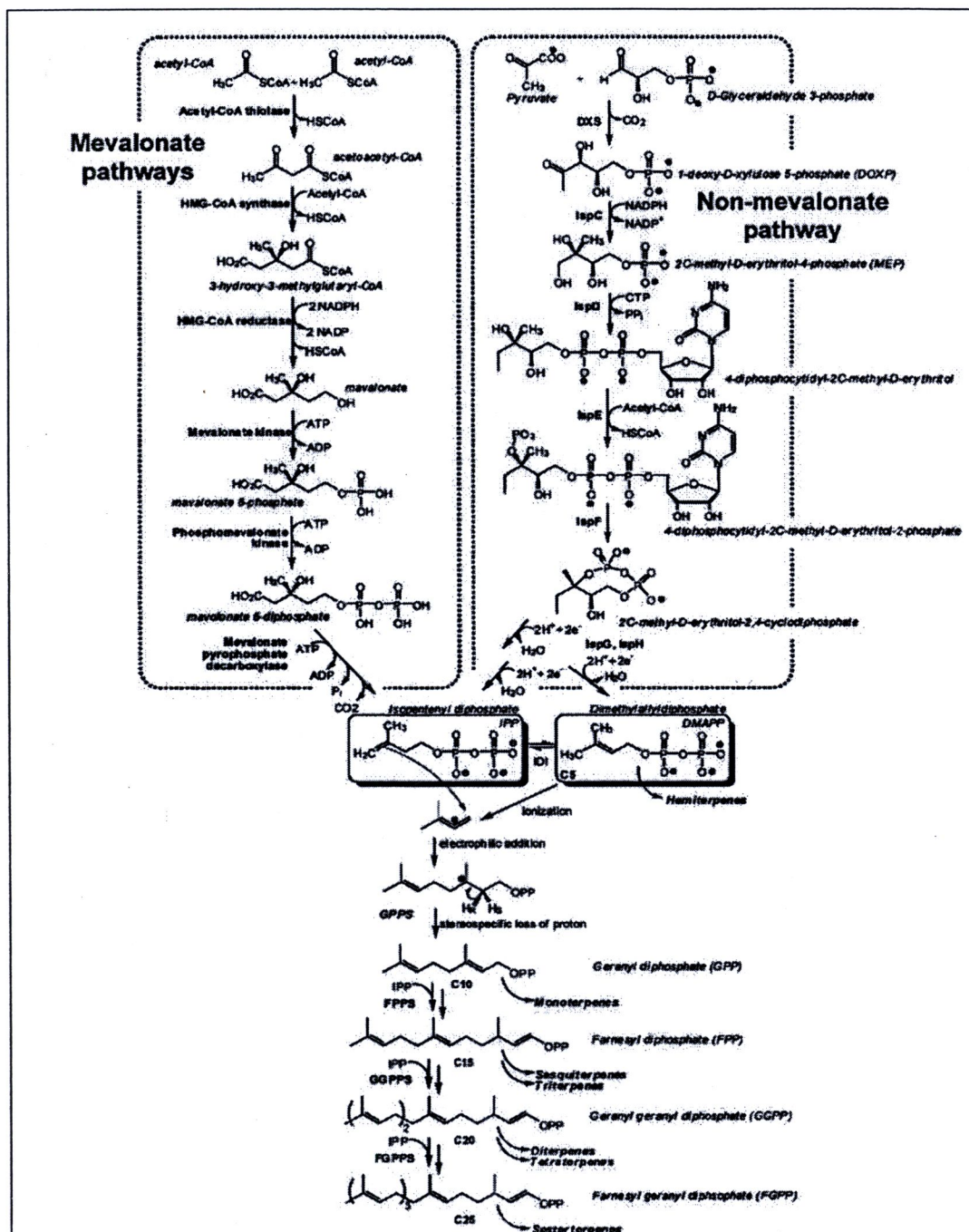
บทที่ 2

วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. วิถีชีวสังเคราะห์ของสารประกอบเทอร์ปีน

วิถีชีวสังเคราะห์ของสารประกอบเทอร์ปีน (Terpene) สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 แบบ คือวิถีชีวสังเคราะห์แบบ mevalonate (MVA pathway) และ deoxyxylulose-5 phosphate (DXP pathway) โดยที่วิถีชีวสังเคราะห์แบบ MVA พบได้ในสิ่งมีชีวิตในกลุ่มยูคาริโอต (eukaryote) เช่น พืช สัตว์ และพบในแบคทีเรียบางชนิด ปฏิกริยาเริ่มจากการรวมตัวของ acetyl-CoA สองโมเลกุลได้เป็น acetoacetyl-CoA โดยการทำงานของเอนไซม์ acetyl-CoA thiolase จากนั้นจะถูกเปลี่ยนให้เป็น 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA ด้วยเอนไซม์ HMG-CoA synthase และถูกรีดิวซ์เป็น mevalonate โดยเอนไซม์ HMG-CoA reductase (HMGR) ซึ่งทำหน้าที่เป็น rate limiting step จากนั้น mevalonate จะถูกเปลี่ยนเป็น isopentenyl diphosphate (IPP) ผ่านการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ mevalonate kinase, phosphomevalonate kinase และ mevalonate pyrophosphate decarboxylase ตามลำดับ ในขณะที่วิถีชีวสังเคราะห์แบบ DXP พบมากในสิ่งมีชีวิตในกลุ่มโปรคาริโอต (prokaryote) เริ่มจากการรวมตัวของ glyceraldehyde-3 phosphate (G3P) และ pyruvate ได้เป็น deoxyxylulose 5-phosphate (DXP) ผ่านการทำงานของเอนไซม์ deoxyxylulose 5-phosphate synthase (DXS) และถูกรีดิวซ์เป็น 2C-methyl-D-erythriol-4-phosphate (MEP) โดยเอนไซม์ deoxyxylulose 5-phosphate reductoisomerase (DXR) และถูกเปลี่ยนเป็น IPP ผ่านการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ 4-diphosphocytidyl 2C-methyl-D-erythritol synthase (IspD), 4-diphosphocytidyl 2C-methyl-D-erythritol kinase (IspE), 2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase (IspF), 4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate synthase (IspG) และ 4-Hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate synthase reductase (IspH) ตามลำดับ (รูปที่ 2.1)

การสังเคราะห์เทอร์ปีนในพืชสามารถเกิดขึ้นได้ 2 รูปแบบ โดยที่วิถีสังเคราะห์แบบ MVA พบในส่วนของไซโทพลาสซึมและใช้ในการสังเคราะห์สารกลุ่ม sesquiterpenoid, triterpenoid และ sterols ในขณะที่วิถีชีวสังเคราะห์แบบ DXP พบในคลอโรพลาสต์มีบทบาทในการสังเคราะห์สาร monoterpene, diterpene และ carotenoids ตามลำดับ การทำวิศวกรรมเมตาบอลิกโดยเพิ่มการแสดงออกของยีน *dxs* และ *dxr* สามารถเพิ่มการผลิตสารในกลุ่มเทอร์ปีนอยด์ (Ajikumar et al., 2008)

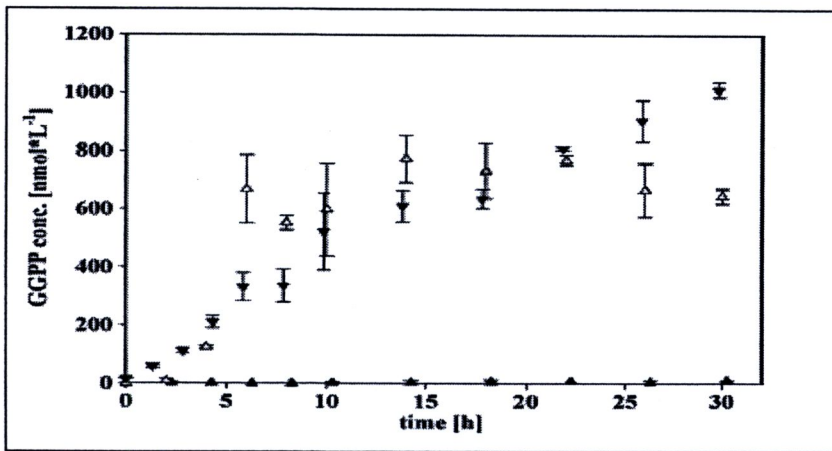


รูปที่ 2.1 แสดงวิถีชีวสังเคราะห์สารในกลุ่มเทอร์ปีนแบบ MVA และ DXP (Ajikumar et al., 2008)

2. วิถีชีวสังเคราะห์ของสารประกอบเทอร์ปีนใน *Escherichia coli*

วิถีชีวสังเคราะห์ของสารประกอบเทอร์ปีนใน *E. coli* เกิดขึ้นในแบบ DXP โดยที่ isopentenyl diphosphate (IPP) จะเกิดปฏิกิริยา isomerization ได้เป็น dimethylallyl pyrophosphate (DMAPP) โดยการทำงานของเอนไซม์ isopentenyl diphosphate isomerase (IDI) จากนั้นเกิดปฏิกิริยา chain

elongation ในแบบ head to tail condensation โดยเอนไซม์ในกลุ่ม prenyl transferase ได้แก่ geranyl diphosphate synthase (GPPS), farnesyl diphosphate synthase (FPPS) และ geranylgeranyl diphosphate synthase (GGPPS) ได้เป็น geranyl diphosphate (GPP), farnesyl diphosphate (FPP) และ geranylgeranyl diphosphate (GGPP) ตามลำดับ ซึ่งสารเหล่านี้จะถูกนำไปใช้ในปฏิกิริยาเติมหมู่พรีนิล (prenylation) ให้แก่สารชีวโมเลกุลชนิดต่างๆ โดยที่ IPP และ DMAPP ถูกนำมาใช้ในการเติมหมู่พรีนิลให้กับ tRNA (Motorin et al., 1997) ส่วน FPP เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์ ubiquinone, bactroprenol และ heme ในขณะที่ GGPP ถูกนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์ octaprenyl diphosphate synthase (IspB) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ bactroprenol โดยมีหน้าที่ในการขนส่งเปปทิโดไกลแคนออกสู่เยื่อหุ้มเซลล์ จากการศึกษาของ Vallon และคณะแสดงให้เห็นว่าการวิวัฒนาการเมทาบอลิกโดยเพิ่มการแสดงออกของยีน *GGPPS* ใน *E. coli* ส่งผลให้มีการผลิต GGPP สูงขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีน *GGPPS* (รูปที่ 2.2) (Vallon et al., 2008)



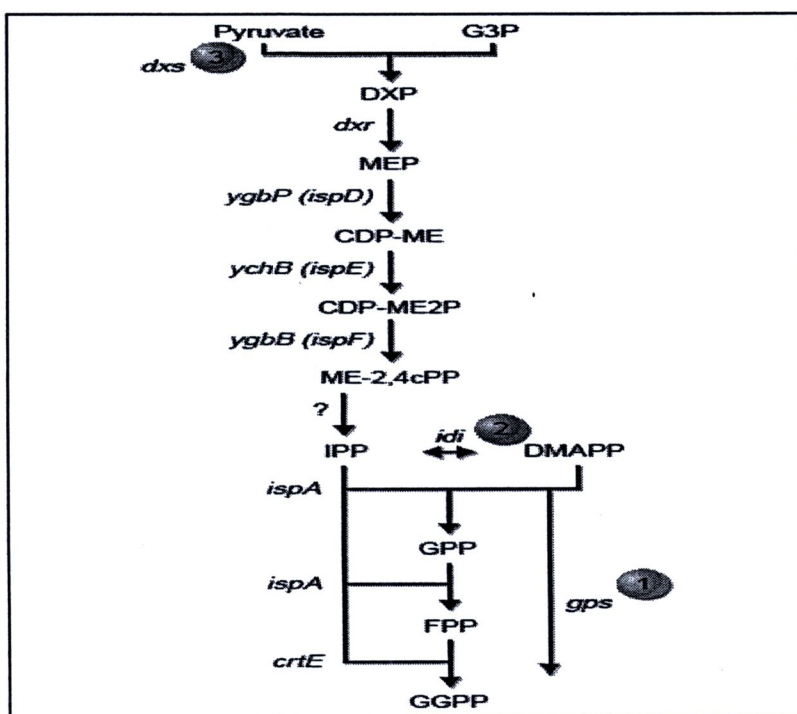
รูปที่ 2.2 แสดงปริมาณ GGPP ที่ตรวจวัดได้จากริคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่ผ่านการทำวิวัฒนาการเมทาบอลิกโดยเพิ่มการแสดงออกของยีน *GGPPS* โดยที่ ▼ และ △ คือ *E. coli* ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *GGPPS*; ▲ คือ *E. coli* ที่ได้รับการถ่ายโอน empty vector (Vallon et al., 2008)

3. แนวทางการทำวิวัฒนาการเมทาบอลิกเพื่อเพิ่มระดับการสร้างสารเทอร์ปีนอยด์

เนื่องจาก *E. coli* ที่อยู่รูปแบบสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type strain) มีการผลิต GGPP ในปริมาณต่ำมาก ดังนั้นการเพิ่มระดับการสร้าง GGPP จึงถือว่าเป็นขั้นตอนสำคัญในการทำวิวัฒนาการเมทาบอลิก

ลิกของสารกลุ่มเทอร์ปีนใน *E. coli* และ *Saccharomyces cerevisiae* นอกจาก GGPP จะเป็นสารตั้งต้นในการผลิต GGOH แล้วยังเป็นสารตัวกลางสำคัญในวิถีชีวสังเคราะห์ของสารกลุ่ม diterpenoids และ tetraterpenoids อีกด้วย ดังนั้นการเพิ่มระดับการสร้าง GGPP ส่งผลเพิ่มวิถีชีวสังเคราะห์ของสารเหล่านี้ได้

ในปัจจุบันแนวทางการทำวิศวกรรมเมตาบอลิกเพื่อเพิ่มระดับการสร้าง GGPP ได้แก่ การเพิ่มการแสดงออกของยีน *GGPPS* ในแบบ heterologous expression (Vallon et al., 2008) การเปลี่ยนเอนไซม์ FPP synthase เป็น GGPP synthase โดยการทำให้ site directed mutagenesis และเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกในรีคอมบิแนนท์ *E. coli* (Lee et al., 2005) การเพิ่มการแสดงออกของยีน octaprenyl diphosphate synthase (*IspB*) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ ubiquinone ใน *E. coli* และการแสดงออกร่วมของยีน *GGPPS* ร่วมกับยีนที่อยู่ในวิถี DXP เช่น DXP synthase หรือ DXP reductoisomerase เป็นต้น (รูปที่ 2.3) (Rohlin et al., 2001)



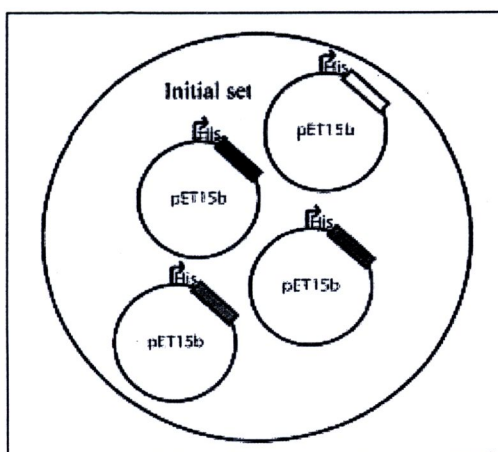
รูปที่ 2.3 การทำวิศวกรรมเมตาบอลิกเพื่อเพิ่มระดับการสร้าง GGPP ใน *E. coli* โดยอาศัยการแสดงออกร่วมยีนที่เป็น rate limiting step ในวิถี DXP (Rohlin et al., 2001)

3.1 การแสดงออกร่วมของยีนใน *E. coli*

ปัจจุบันแนวทางการทำวิศวกรรมเมทาบอลิกเพื่อเพิ่มระดับการสร้างสารกลุ่มเทอร์ปีนใน *E. coli* อาศัยการแสดงออกร่วม (coexpression) ของยีนเป้าหมายมากกว่า 1 ชนิด โดยอาศัยเทคโนโลยีการสร้างดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA technology) จากนั้นจึงถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านและตรวจสอบลักษณะทางฟีโนไทป์ที่ต้องการ ซึ่งการแสดงออกร่วมของยีนใน *E. coli* จะต้องทำการแสดงออกร่วมของยีนมากกว่า 1 ชนิดใน expression system ที่เหมาะสมเพื่อให้ได้สารทุติยภูมิซึ่งอาจเป็นสารใหม่ หรือเป็นการเพิ่มการผลิตสารทุติยภูมิให้มีปริมาณมากขึ้น เทคนิคที่ใช้ในการแสดงออกร่วมของยีนได้แก่

3.1.1 การใช้เทคนิคโคทรานส์ฟอร์มเมชัน (Co-transformation)

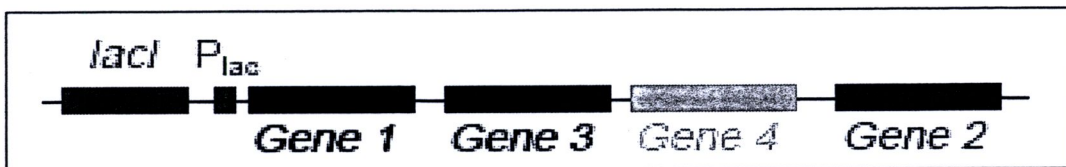
การโคทรานส์ฟอร์มเมชันเป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยมมากในปัจจุบันและมีขั้นตอนที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อน สามารถทำได้โดยได้ถ่ายโอนพลาสมิดเวกเตอร์มากกว่า 1 ชนิดเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านที่สนใจ (รูปที่ 2.4) และเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงของยีนเป้าหมาย แล้วตรวจวัดปริมาณสารทุติยภูมิที่เซลล์สร้างขึ้น อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้ยังมีข้อจำกัดคือ หากทำการถ่ายโอนพลาสมิดมากกว่า 1 ชนิด เข้าสู่ *E. coli* โดยที่พลาสมิดเหล่านั้นมีจุดเริ่มต้นของการจำลองตัว (origin of replication) และยีนต้านยาปฏิชีวนะ (antibiotic resistance gene) ที่เหมือนกัน *E. coli* จะคัดเลือกพลาสมิดเวกเตอร์ตัวใดตัวหนึ่งเอาไว้ในเซลล์ และเนื่องจากการถ่ายโอนพลาสมิดเวกเตอร์มากกว่า 1 ชนิด อัตราการเจริญเติบโตของริคอมบิแนนท์ *E. coli* จะลดลงเนื่องจากเซลล์จะต้องนำพลังงานบางส่วนมาใช้ในการผลิตยีนต้านยาปฏิชีวนะ และการแสดงออกของยีนเป้าหมาย (Johnston et al., 2000)



รูปที่ 2.4 การทำโคทรานส์ฟอร์มเมชันของยีน 4 ชนิดใน *E. coli* (Romier et al., 2006)

3.1.2 การใช้เทคนิค Single vector, single RNA transcript หรือ co-transcription

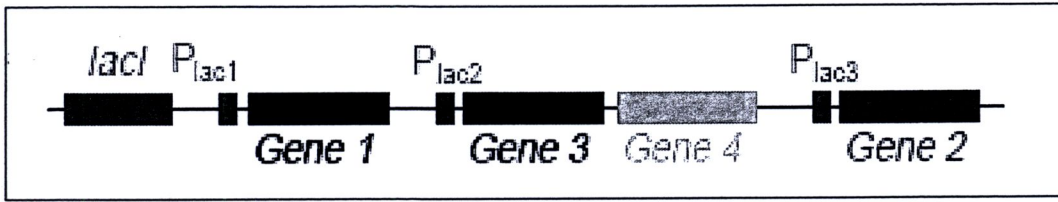
สามารถทำได้โดยการตัดต่อยีนเป้าหมายมากกว่า 1 ชนิด เข้าสู่พลาสมิดเวกเตอร์เดียวกันโดยให้ยีนแต่ละชนิดมีส่วน ribosome binding site เป็นของตัวเอง ดังนั้นการแสดงออกของยีนทั้งหมดจะอยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์เดียวกัน (Keasling, 1997) (รูปที่ 2.5) เทคนิคนี้มีข้อจำกัดคือระดับของการแสดงออกของยีนในตำแหน่งถัดไปมักจะลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับยีนในตำแหน่งที่อยู่ใกล้กับโปรโมเตอร์มากที่สุด เนื่องจากการเกิดโครงสร้างทุติยภูมิของเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA secondary formation) ส่งผลให้ความสามารถของไรโบโซมในการเข้าจับกับ mRNA เป้าหมายลดลง (Rucker et al., 1997)



รูปที่ 2.5 การแสดงออกร่วมของยีนแบบ Single vector, single RNA transcript ใน *E. coli* (Keasling, 1997)

3.1.3 การใช้เทคนิค Single vector, multi RNA transcript

สามารถทำได้โดยตัดต่อยีนเป้าหมายมากกว่า 1 ชนิดเข้าสู่พลาสมิดดีเอ็นเอชนิดเดียวกัน โดยที่ยีนแต่ละชนิดจะให้มีส่วนของโปรโมเตอร์และ ribosome binding site เป็นของตัวเอง (Keasling, 1997) (รูปที่ 2.6) ซึ่งเทคนิคนี้ได้รับความนิยมเป็นอย่างมากเนื่องจากการแสดงออกของยีนแต่ละชนิดเป็นอิสระต่อกัน อีกทั้งเป็นการตัดปัญหาความไม่เข้ากันของพลาสมิดเวกเตอร์ (plasmid incompatibility) และการแสดงออกของยีนที่ลดลงเนื่องจากเซลล์จะต้องนำพลังงานบางส่วนไปใช้ในการสังเคราะห์ยีนต้านยาปฏิชีวนะ (antibiotic resistance genes) และยังช่วยลดปัญหาการเกิดโครงสร้างทุติยภูมิของ mRNA ซึ่งปัญหาเหล่านี้พบได้ในเทคนิค cotransformation และ co-transcription ตามลำดับ



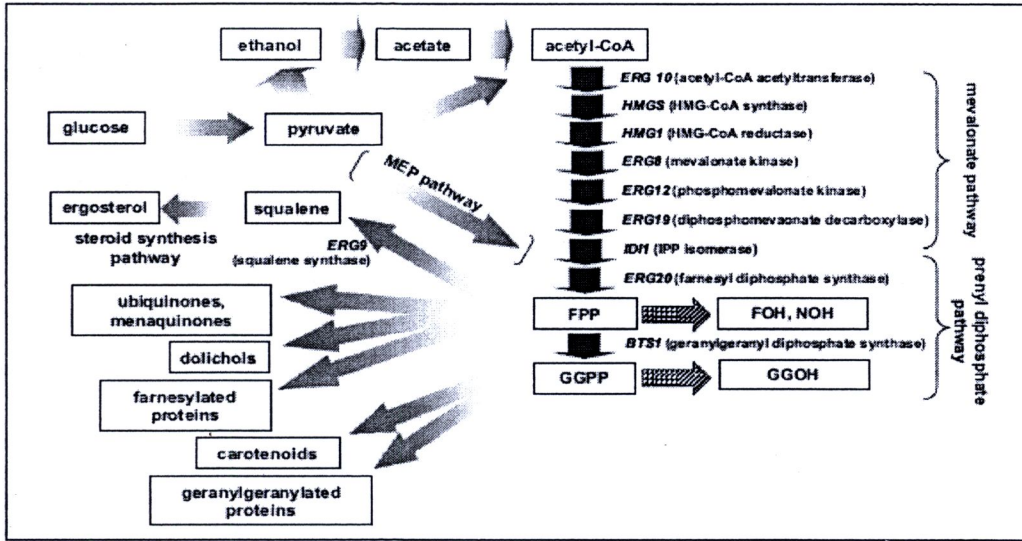
รูปที่ 2.6 การแสดงออกพร้อมของยีนแบบ Single vector, multi RNA transcript ใน *E. coli*
(Keasling, 1997)

3.2 การทำวิศวกรรมเมทาบอลิกเพื่อเพิ่มระดับการสร้างสารกลุ่มพรีนิลแอลกอฮอล์

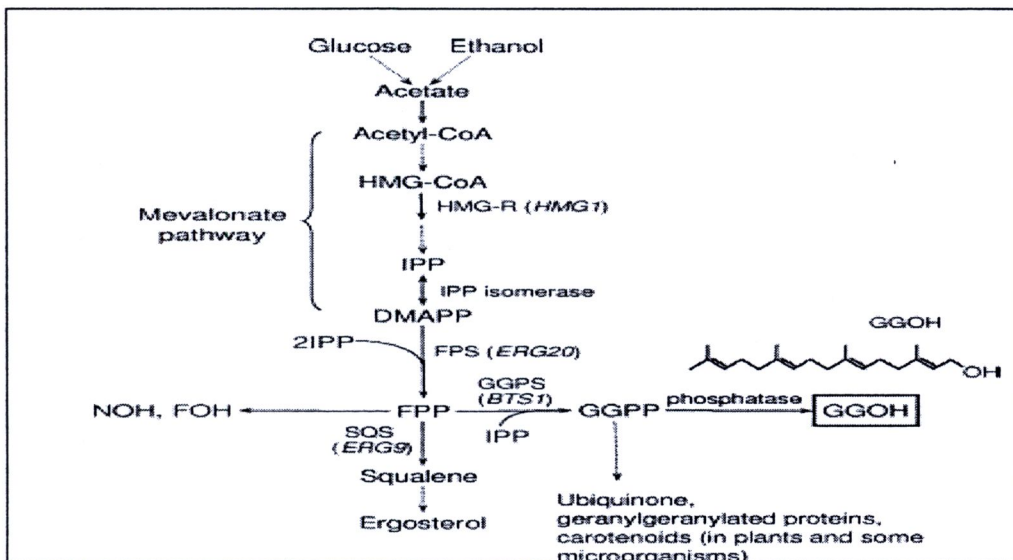
สารในกลุ่มพรีนิลแอลกอฮอล์ที่มีการผลิตโดยใช้วิศวกรรมเมทาบอลิกได้แก่ farnesol (FOH) และ geranylgeraniol (GGOH) โดยอาศัยแนวทางดังนี้

3.2.1 การแสดงออกพร้อมของยีนที่ทำหน้าที่เป็น rate limiting step

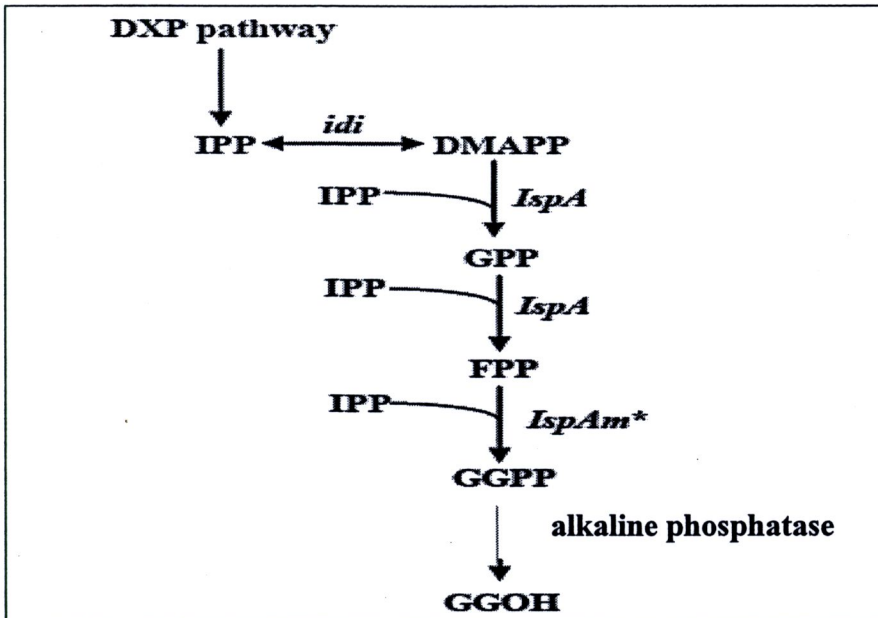
เนื่องจากเซลล์เจ้าบ้านที่อยู่ในรูปแบบดั้งเดิม (wild type strain) มีการผลิต FPP และ GGPP ในปริมาณต่ำ ดังนั้นการแสดงออกพร้อมของยีนที่ทำหน้าที่เป็น rate limiting step ในวิถี DXP หรือ MVA เพื่อเพิ่มการสะสมของ FPP และ GGPP ผ่านการแสดงออกของยีน *FPPS* และ *GGPPS* ในรูปแบบ heterologous expression ส่งผลให้มีการผลิต FOH และ GGOH สูงขึ้น โดยที่ Ohto และคณะได้ทำวิศวกรรมเมทาบอลิกของ GGOH ใน *S. cerevisiae* โดยใช้การแสดงออกพร้อมของยีน HMG-CoA reductase (*HMG1*) และ geranylgeranyl diphosphate synthase (*BTS1*) และอาศัยการทำงานของเอนไซม์ endogenous phosphatase ที่มีอยู่ในเซลล์เจ้าบ้านส่งผลให้มีการผลิต GGOH สูงขึ้นที่ระดับความเข้มข้น 2.46 mg/L (Ohto et al., 2008) (รูปที่ 2.7) การแสดงออกพร้อมของยีน *HMGR*, *FPPS*, *GGPPS* (*BTS1*) และ diacylglycerol diphosphate phosphatase (*DPPI*) ใน *S. cerevisiae* ส่งผลให้มีการผลิต GGOH ที่ระดับความเข้มข้น 3.3 g/L ในขณะที่กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีน *GGPPS* ไม่พบการผลิตสารดังกล่าว (รูปที่ 2.8) (Tokuhiro et al., 2009) และการผลิต GGOH ใน *E. coli* JM101 โดยใช้การแสดงออกพร้อมของยีน *idi* และ mutant ของยีน FPP synthase (*IspAm*) และอาศัยการทำงานของเอนไซม์ alkaline phosphatase ส่งผลให้มีการผลิต GGOH สูงขึ้น ในขณะกลุ่มควบคุมที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *FPPS* ในแบบดั้งเดิม (wild type) ไม่พบการผลิต GGOH (Ohto et al., 2009) (รูปที่ 2.9)



รูปที่ 2.7 การทำวิศวกรรมเมทาบอลิกของฟีนิลแอลกอฮอล์ใน *S. cerevisiae* (Ohto et al., 2008)



ภาพที่ 2.8 แสดงแนวทางการทำวิศวกรรมเมทาบอลิกของ GGOH ใน *S. cerevisiae* (Tokuhiro et al., 2009)



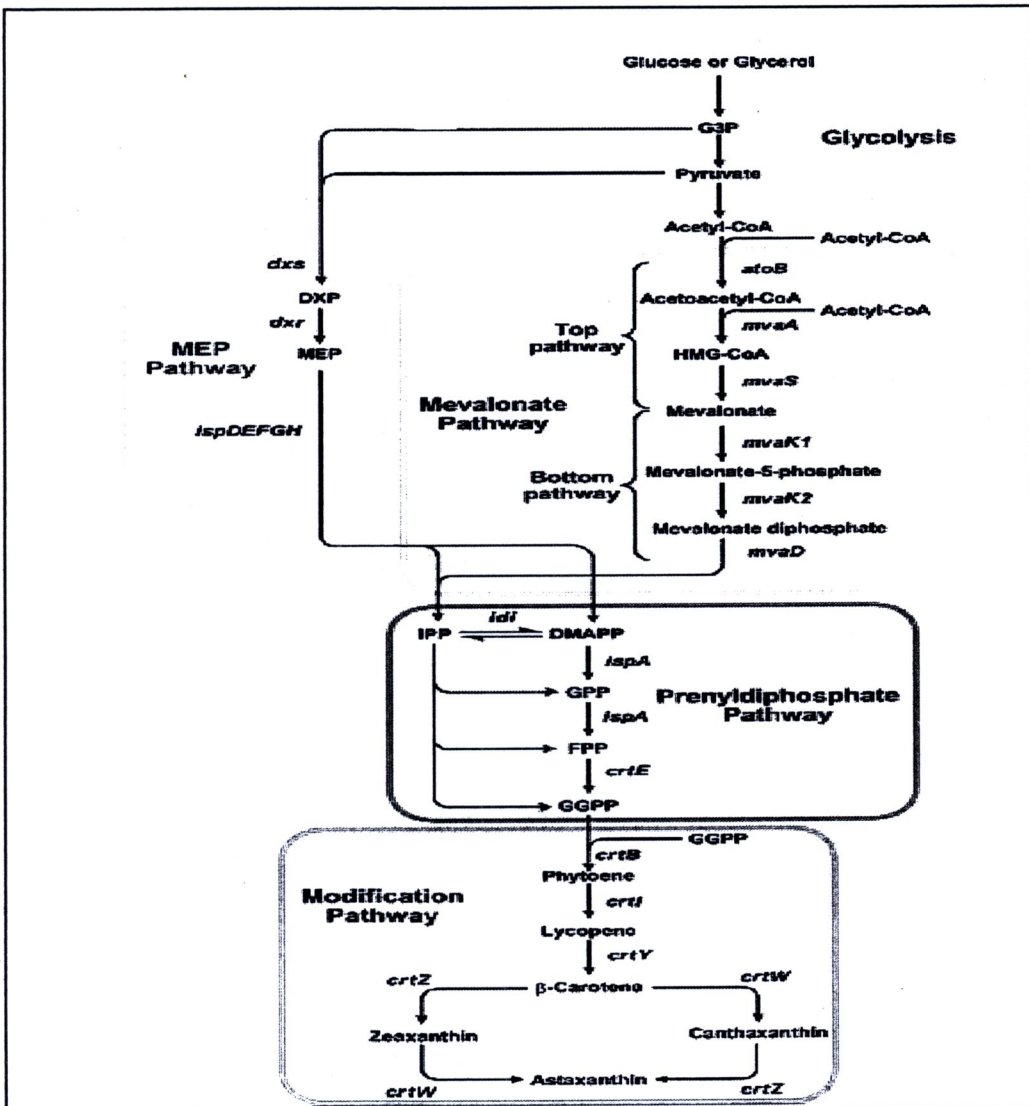
รูปที่ 2.9 การผลิต GGOH ใน *E. coli* โดยการใช้การแสดงออกพร้อมของยีน *idi* และ *GGPPS* (*IspAm**) และเอนไซม์ Alkaline phosphatase (Ohto et al., 2009)

3.2.2 แนวทางการผลิตสารกลุ่มฟรินิลแอลกอฮอล์โดยใช้ตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

การใช้ตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในวิถีชีวสังเคราะห์ของสารกลุ่มเทอร์ปีนเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถเพิ่มระดับการสร้างสารในกลุ่มฟรินิลแอลกอฮอล์ เช่น การใช้ diphenylamine (DPA) เป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ phytoene synthase ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน GGPP ให้เป็น phytoene ส่งผลให้มีการผลิต GGOH สูงขึ้น และการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ent-kaurene synthase โดยการเติม cycocel ในอาหารเลี้ยงเชื้อรา *Gibberella fujikuroi* ส่งผลให้การผลิต GGOH สูงขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Muramatsu et al., 2008) (รูปที่ 2.10)

การทำวิศวกรรมเมตาบอลิซึมของสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ใน *E. coli* มุ่งเน้นการเพิ่มการแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่เป็น rate limiting step ในวิถีชีวสังเคราะห์แบบ DXP ได้แก่ *dxs*, *dxr*, *idi* และ *GGPPS* ร่วมกับยีนในวิถีชีวสังเคราะห์ของแคโรทีนอยด์ (carotenogenic genes cluster) โดยการทำวิศวกรรมเมตาบอลิซึมของสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์แบ่งออกได้เป็น 4 ขั้นตอน ดังนี้ 1) การเพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ในวิถีไกลโคไลติก (glycolytic pathway) เพื่อเพิ่มการสร้างสารตัวกลางต่างๆ ที่เกี่ยวข้องในวิถี DXP และ MVA เช่น G 3-P, pyruvate และ acetyl CoA เป็นต้น 2) การเพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ในวิถี DXP และ MVA เพื่อเพิ่มระดับการสร้าง IPP ซึ่งเป็นสารตัวกลางสำคัญในวิถีชีวสังเคราะห์ของเทอร์ปีนอยด์ 3) การแสดงออกร่วมของยีน *idi*,

dxs, *dxr*, *FPPS* และ *GGPS* เพื่อเพิ่มการสร้าง GGPP ซึ่งเป็นสารตัวกลางสำคัญในวิถีชีวสังเคราะห์ของแคโรทีนอยด์ และทำการถ่ายโอนกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องในวิถีชีวสังเคราะห์ของแคโรทีนอยด์ (carotenogenic genes cluster) เพื่อเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน GGPP เป็นแคโรทีนอยด์ (Das et al., 2007) (รูปที่ 2.11) โดยที่ตัวอย่างของการทำวิศวกรรมเมทาบอลิกของแคโรทีนอยด์ซึ่งประกอบด้วยเพิ่มการสร้าง GGPP ได้สรุปไว้ในตารางที่ 2.1 และ 2.2



รูปที่ 2.11 แสดงแนวทางการทำวิศวกรรมเมทาบอลิกของแคโรทีนอยด์ในจุลินทรีย์ (Das et al., 2007)

ตารางที่ 2.1 การทำวิศวกรรมเมตาบอลิกของแคโรทีนอยด์ใน *E. coli* ผ่านการเพิ่มการสร้าง GGPP

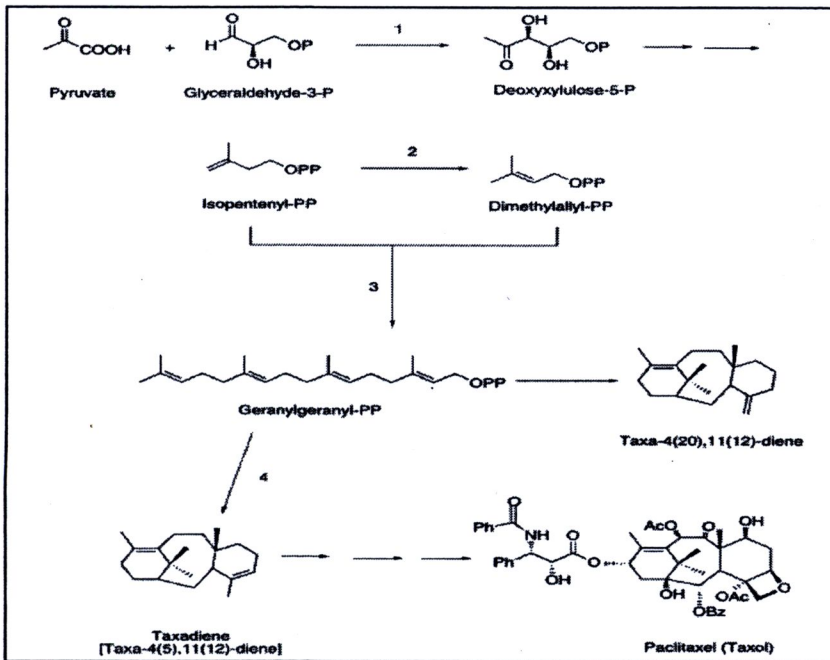
แนวทางการผลิต	แคโรทีนอยด์	เอกสารอ้างอิง
เพิ่มการแสดงออกของยีน GGPPS ใน <i>E. coli</i> ที่ได้รับการถ่ายโอนยีนที่เกี่ยวข้องในชีวสังเคราะห์ของ zeaxanthin	zeaxanthin	Ruther et al., 1997
อาศัยการแสดงออกร่วมของยีน GGPPS, <i>idi</i> , และกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องในวิถีชีวสังเคราะห์ของ β -carotene	β -carotene	Kajiwarra et al., 1997
ใช้การแสดงออกร่วมของยีน GGPPS ร่วมกับยีนที่เกี่ยวข้องในวิถีชีวสังเคราะห์ของ astaxanthin	astaxanthin	Wang et al., 1998
เพิ่มการแสดงออกของยีน GGPPS ร่วมกับยีนที่เป็น rate limiting step ในวิถี DXP ได้แก่, <i>dxs</i> , <i>dxr</i> , <i>idi</i> และยีนในวิถีชีวสังเคราะห์ของ carotenoids	β -carotene และ zeaxanthin	Albrecht et al., 1999
เพิ่มการแสดงออก (overexpression) ของยีน GGPPS, <i>dxs</i> และกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องในวิถีชีวสังเคราะห์ของ lycopene และ zeaxanthin	lycopene และ zeaxanthin	Matthews et al., 2000
เพิ่มการแสดงออกของยีน GGPPS และ <i>dxs</i> ใน <i>E. coli</i> ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน <i>crtE</i> , <i>crtB</i> และ <i>crtI</i>	lycopene	Kim et al., 2001
เพิ่มระดับการสร้าง GGPP ใน <i>E. coli</i> ที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในวิถีชีวสังเคราะห์ของ lycopene ร่วมกับการแสดงออกร่วมของยีน phosphoenolpyruvate (PEP) synthase และ PEP carboxykinase (<i>Pck</i>) ร่วมกับยับยั้งการทำงานของยีน pyruvate kinase	lycopene	Farmer et al., 2001
การเปลี่ยนยีน <i>FPPS</i> เป็น <i>GGPPS</i> ด้วยเทคนิค site directed mutagenesis และเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกใน <i>E. coli</i> ที่ได้รับการถ่ายโอนยีนที่อยู่ในวิถีชีวสังเคราะห์ของ carotenoids	lycopene และ tetrahydrolycopene	Lee et al., 2005
เพิ่มการแสดงออกของยีน <i>ispB</i> ในเข้าสู่โครโมโซมของ <i>E. coli</i> ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน <i>dxs</i> , <i>idi</i> , <i>ispDF</i> และยีนที่เกี่ยวข้องในวิถีชีวสังเคราะห์ของ β -carotene (<i>crtE</i> , <i>crtB</i> , <i>crtI</i> และ <i>crtY</i>)	β -carotene	Yuan et al., 2006
การแสดงออกร่วมของยีน GGPPS ร่วมกับยีนที่ทำหน้าที่เป็น rate limiting ในวิถีชีวสังเคราะห์ MVA และกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องในวิถีชีวสังเคราะห์ของ lycopene	lycopene	Yoon et al., 2006
เพิ่มการแสดงออกของยีน GGPPS และกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องในวิถีชีวสังเคราะห์ของ zeaxanthin	zeaxanthin	Nishisaki et al., 2007

ตารางที่ 2.2 การทำวิศวกรรมเมทาบอลิกของแคโรทีนอยด์ในยีสต์ผ่านการเพิ่มการสร้าง GGPP

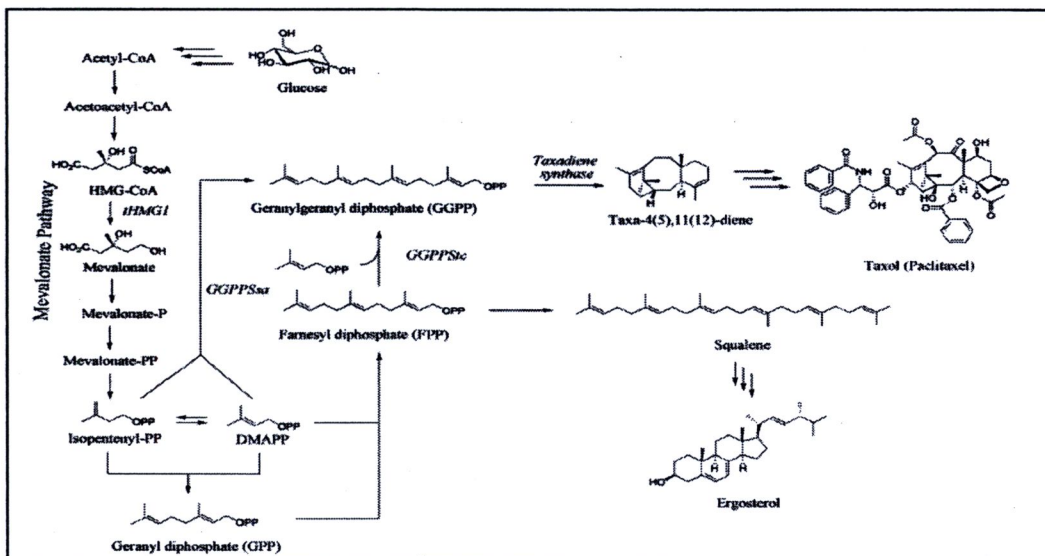
แนวทางการผลิต	แคโรทีนอยด์	เอกสารอ้างอิง
เพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ <i>GGPPS</i> ร่วมกับการยับยั้งการแสดงออกของยีน <i>squalene synthase</i> ใน <i>Candida utilis</i> ที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในวิธีสังเคราะห์ของ lycopene	lycopene	Miura et al., 1998
เพิ่มระดับการสร้าง GGPP โดยการแทรกสอดยีน <i>GGPPS</i> เข้าสู่โครโมโซมของ <i>S. cerevisiae</i> ที่ได้รับการถ่ายโอนยีนที่เกี่ยวข้องในวิถีชีวสังเคราะห์ของ β -carotene และ HMG-CoA reductase (<i>HMGR</i>)	β -carotene	Verwaal et al., 2007
การทำวิศวกรรมเมทาบอลิกใน <i>P. pastoris</i> โดยการเพิ่มการแสดงออกของยีน <i>GGPPS</i> ร่วมกับยีนที่เกี่ยวข้องในวิถีชีวสังเคราะห์ของ lycopene ส่งผลให้มีการสร้าง lycopene สูงขึ้นเมื่อเทียบกับ control ที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีน <i>GGPPS</i>	lycopene	Lee et al., 2009

3.3.2 การเพิ่มการสร้าง GGPP เพื่อการผลิตสาร taxadiene

Taxol เป็นสารในกลุ่มไดเทอร์ปีน (diterpenoid) ที่ได้จากเปลือกของ *Taxus brevifolia* ซึ่งมีประสิทธิภาพในการรักษาโรคมะเร็งรังไข่ (ovarian cancer) และมะเร็งทรวงอก (breast cancer) ซึ่งมี taxadiene เป็นสารตัวกลางสำคัญในวิถีชีวสังเคราะห์ของ taxol โดย Huang และคณะได้ทำวิศวกรรมเมทาบอลิกของสาร taxadiene ใน *E. coli* BL21(DE3)RIL โดยการใช้การแสดงออกร่วมของยีน *dxs*, *idi*, *GGPPS* และ taxadiene synthase (*TDS*) ที่ได้จาก *T. brevifolia* ส่งผลให้มีการผลิต taxadiene สูงขึ้นที่ระดับความเข้มข้น 1.3 mg/L ในขณะที่กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีน *GGPPS* ไม่พบการผลิตสาร taxadiene (รูปที่ 2.12) (Huang et al., 2001) และการทำวิศวกรรมเมทาบอลิกในยีสต์ *S. cerevisiae* ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน HMG-CoA reductase (*HMGR*), *GGPPS*, และ *TDS* ส่งผลให้มีการผลิต taxadiene ที่ระดับความเข้มข้น 8.7 mg/L โดยที่กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีน *GGPPS* ไม่พบการผลิต taxadiene (รูปที่ 2.13) (Engels et al., 2008)



รูปที่ 2.12 แสดงการทำวิศวกรรมเมตาบอลิซึมของ taxadiene ใน *E. coli* โดยใช้การแสดงออกร่วมของยีน *dxs* (1), *idi* (2), *GGPPS* (3) และ *TDS* (4) (Huang et al., 2001)

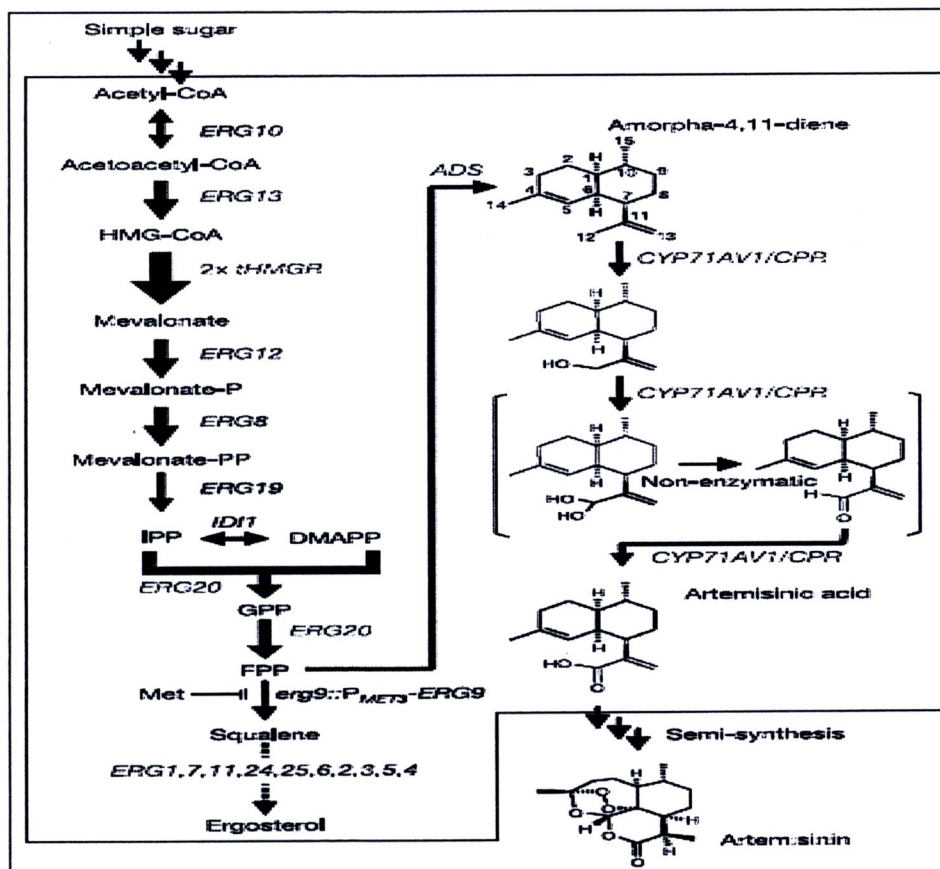


รูปที่ 2.13 แสดงการทำวิศวกรรมเมตาบอลิซึมของ taxadiene ใน *S. cerevisiae* โดยอาศัยการแสดงออก ร่วมของยีน *hMG1* (HMG-CoA reductase), *GGPPS* และ *TDS* (Engels et al., 2008)



3.4 การทำวิศวกรรมเมทาบอลิกเพื่อเพิ่มระดับการสร้างสารตัวกลางในวิถีชีวสังเคราะห์ของ artemisinin

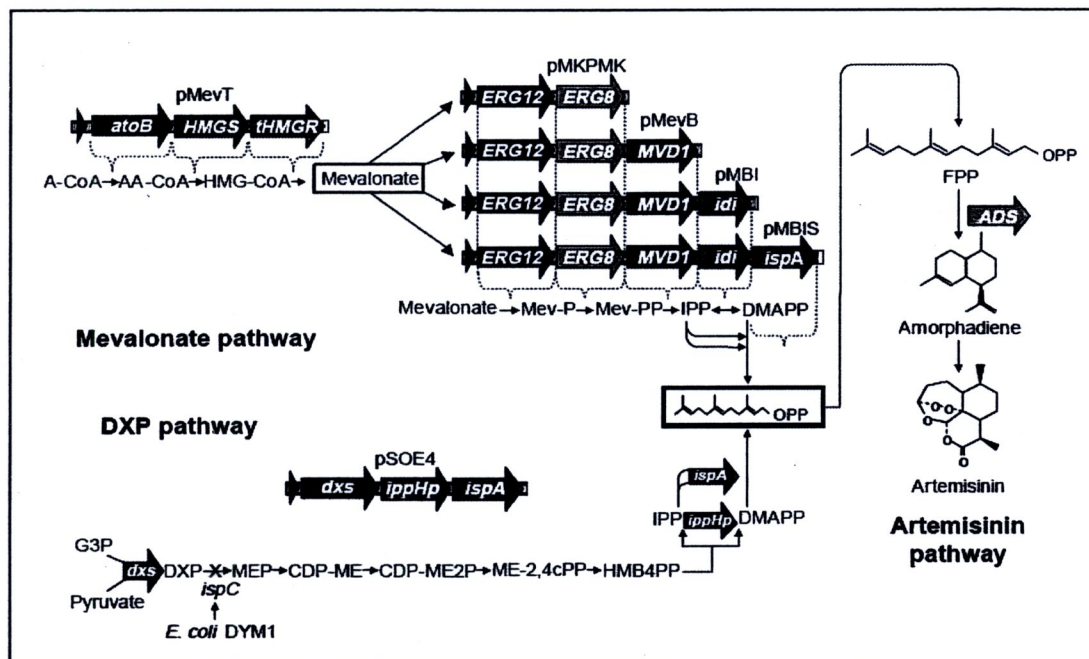
artemisinin เป็นสารในกลุ่ม sesquiterpene ได้จากต้นชิงหา (Artemisia annua) ใช้เป็นยารักษาโรคมาลาเรียที่เกิดจากปรสิตสายพันธุ์ *Plasmodium falciparum* การทำวิศวกรรมเมทาบอลิกของ artemisinin มีวัตถุประสงค์ในการผลิตสารตัวกลางในวิถีชีวสังเคราะห์ของ artemisinin เพื่อนำสารเหล่านี้ไปสังเคราะห์ให้เป็น artemisinin ผ่านการขบวนการ biotransformation หรือการสังเคราะห์ด้วยวิธีการทางเคมี ในปี 2006 Lindahl และคณะได้ทำวิศวกรรมเมทาบอลิกเพื่อเพิ่มระดับการสร้าง amorphaadiene ใน *S. cerevisiae* โดยการใช้การแสดงออกของยีน *FPPS* และ amorphaadiene synthase (*ADS*) ส่งผลให้มีการผลิต amorphaadiene สูงขึ้นที่ระดับความเข้มข้น 600 $\mu\text{g/L}$ (Lindahl et al., 2006) การทำวิศวกรรมเมทาบอลิกของ amorphaadiene ใน *E. coli* ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *FPP synthase (IspA)*, *idi*, *ADS* และ *HMGR* ส่งผลให้มีการผลิต amorphaadiene ที่ระดับความเข้มข้น 27.4 g/L (Tsuruta et al., 2009) และการทำวิศวกรรมเมทาบอลิกของ artemisinic acid ในยีสต์ *S. cerevisiae* โดยเพิ่มการแสดงออกของยีน *HMGR*, *FPPS*, *ADS* และเอนไซม์ในกลุ่มไซโตโครม P450 (cytochrome P450) ร่วมกับยับยั้งการแสดงออกของยีน squalene synthase (*ERG9*) ส่งผลให้มีการผลิต artemisinic acid เพิ่มขึ้นที่ได้ระดับความเข้มข้น 100 mg/L (รูปที่ 2.14) (Ro et al., 2006)



รูปที่ 2.14 แสดงการทำวิศวกรรมเมทาบอลิกของ artemisinic acid ใน *S. cerevisiae*

(Ro et al., 2006)

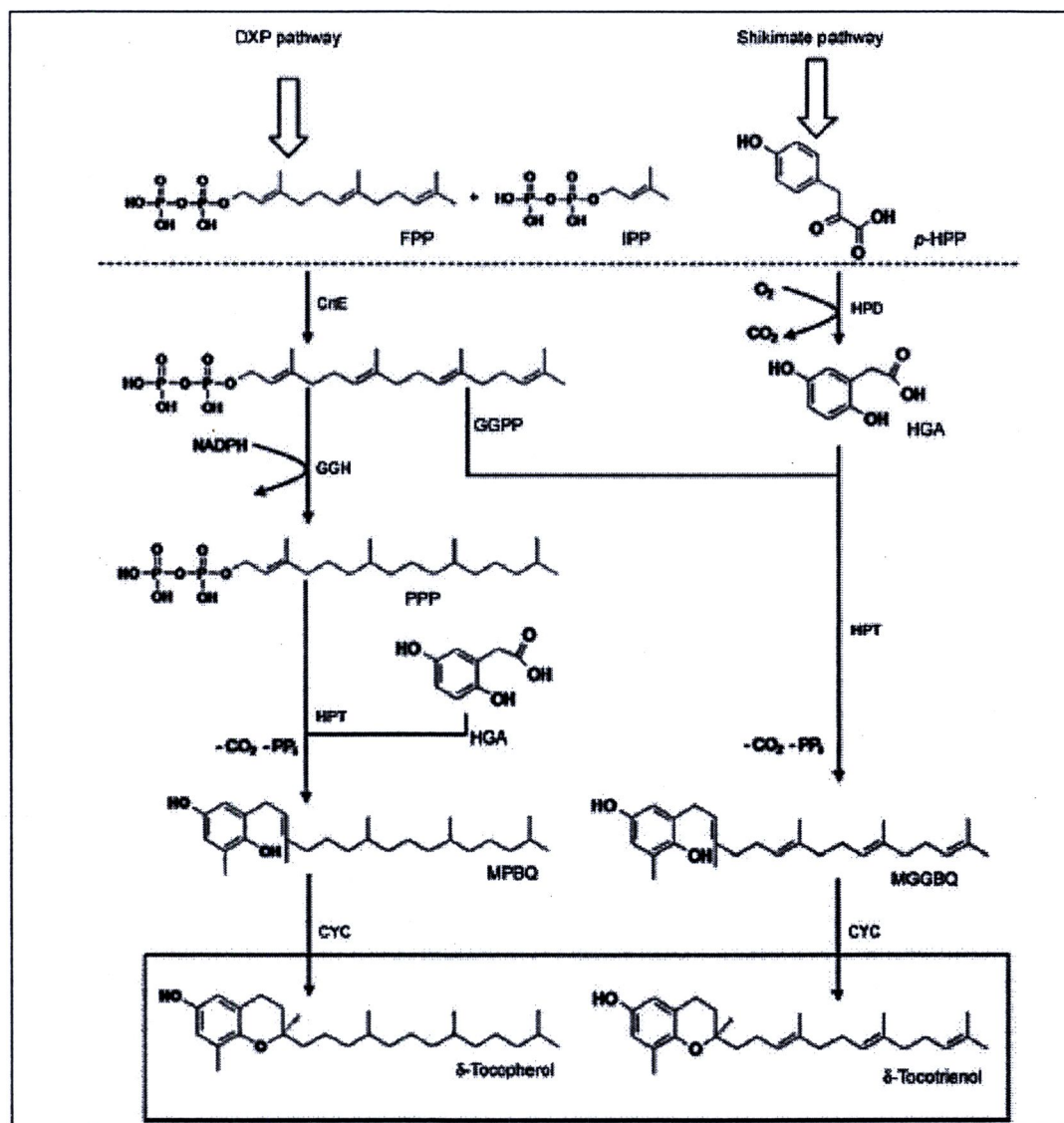
Martin และคณะได้ทำวิศวกรรมเมทาบอลิกของ amorphaadiene ใน *E. coli* DH10B โดยทำการถ่ายโอนยีนทั้งหมดในวิถีชีวสังเคราะห์แบบ mevalonate pathway ร่วมกับการแสดงออก ร่วมของยีน *idi*, *IspA* และ *ADS* ที่ได้จาก *A. annua* ส่งผลให้มีการผลิต amorphaadiene ที่ระดับความเข้มข้น 240 µg/L (Martin et al., 2006) (รูปที่ 2.15)



รูปที่ 2.15 แสดงการทำวิศวกรรมเมทาบอลิกของ amorphaadiene ใน *E. coli* (Martin et al., 2006)

3.5 การทำวิศวกรรมเมทาบอลิกของสารตัวกลางอื่นๆในวิถีชีวสังเคราะห์ของเทอร์ปีนอยด์

การทำวิศวกรรมเมทาบอลิกของโคเอนไซม์คิวเทน (CoQ10) ใน *E. coli* BL21(DE3) โดยการใช้การแสดงออกร่วมของยีน *dxs* และ decaprenyl diphosphate synthase (*ddsA*) ส่งผลให้มีการผลิต CoQ10 เพิ่มขึ้นที่ระดับความเข้มข้น 46 mg/L (Kim et al., 2006) การทำวิศวกรรมเมทาบอลิกของ CoQ10 โดยการใช้การแสดงออกร่วมของยีนที่เป็น rate limiting step ในวิถี MVA ร่วมกับ decaprenyl diphosphate synthase (*ddsA*) ที่ได้จาก *Agrobacterium tumefaciens* ส่งผลให้มีการผลิต CoQ10 ที่ระดับความเข้มข้น $2,428 \pm 75$ $\mu\text{g/L}$ (Zahiri et al., 2006) และการผลิต δ -tocotrienol ใน *E. coli* DH5 α โดยการใช้การแสดงออกร่วมของยีน hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (*hpd*), geranylgeranyl pyrophosphate synthase (*crtE*), geranylgeranyl pyrophosphate reductase (*ggh*), homogentisate phytyltransferase (*hpt*), และ tocopherol-cyclase (*cyc*) ส่งผลให้มีการผลิต tocotrienol ที่ระดับความเข้มข้น 15 $\mu\text{g/L}$ (รูปที่ 2.15) (Albermann et al., 2008)



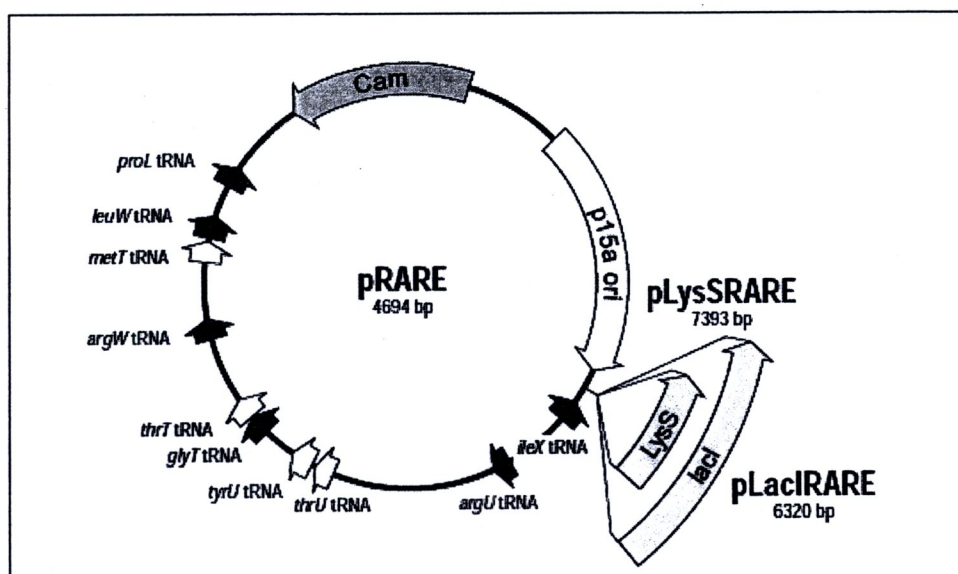
รูปที่ 2.16 แสดงการทำวิศวกรรมเมตาบอลิกของ tocotrienol ในริคอมบิแนนท์ *E. coli* โดยใช้การแสดงออกร่วมของยีน *GGPPS* และยีนที่เกี่ยวข้องในวิถีชีวสังเคราะห์ของ tocotrienol (Albermann et al., 2008)

4. ปัจจัยที่มีผลต่อการแสดงออกของยีนในระบบ *E. coli*

4.1 ผลของการใช้โคดอน (Codon usage)

ปัญหาที่พบได้ในการแสดงออกของยีนในระบบ heterologous expression คือรูปแบบการใช้โคดอนของสิ่งมีชีวิตที่แตกต่างกัน ดังนั้นการเปลี่ยนการใช้โคดอนให้เหมาะสมจึงมีส่วนสำคัญต่อการแสดงออกของยีนเป้าหมาย และการทำวิศวกรรมเมตาบอลิกเพื่อการผลิตสารทุติยภูมิ

ใน *E. coli* และ *S. cerevisiae* โดยแนวทางการปรับเปลี่ยนรหัสโคดอนมี 3 แนวทางได้แก่ การสังเคราะห์ยีนขึ้นใหม่ (synthetic gene) การทำโคทรานส์ฟอร์มชัน (co-transformation) ขึ้นเป้าหมายร่วมกับพลาสมิด pRARE ซึ่งผ่านการตัดต่อให้มีการแสดงออกของ rare codon ที่พบมากใน *E. coli* ได้แก่ *argU* (AGA/AGG), *argW* (AGG), *argX* (CGG), *ileX* (AUA), *leuW* (CUA), *glyT* (GGA) และ *proL* (CCC) (ดังที่แสดงในรูป 16) และการถ่ายโอนริคอมบิแนนท์ยีนเข้าสู่ *E. coli* BL21(DE3)RIPL ที่ผ่านการดัดแปลงพันธุกรรมให้มีการแสดงออกของ rare codon มากเกินไป (overexpression)



รูปที่ 2.17 แสดงแผนที่ของพลาสมิด pRARE ที่มีการแสดงออกของ rare codon (Redwan, 2006)

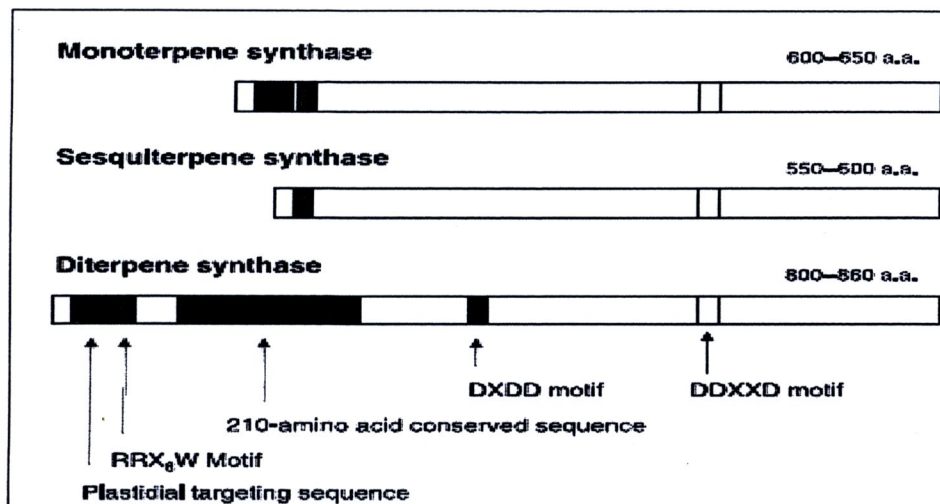
Martin และคณะได้ทำวิศวกรรมเมทาบอลิกเพื่อเพิ่มระดับการสร้าง amorphaadiene ใน *E. coli* โดยใช้ยีน *ADS* ที่ผ่านการสังเคราะห์ให้มีการใช้โคดอนใกล้เคียงกับ *E. coli* ส่งผลให้มีการผลิต amorphaadiene สูงขึ้นเมื่อเทียบกับยีน *ADS* ที่ได้จาก *A. annua* (Martin et al., 2006) และการทำวิศวกรรมเมทาบอลิกของ taxadiene ใน *S. cerevisiae* โดยใช้ยีน *TDS* ที่ผ่านการสังเคราะห์รหัสโคดอนใกล้เคียงกับ *S. cerevisiae* ส่งผลให้มีระดับการสร้าง taxadiene สูงขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *TDS* ที่ได้จาก *T. brevifolia* (Engels et al., 2008) การทำวิศวกรรมเมทาบอลิกของแคโรทีนอยด์โดยการถ่ายโอนยีนในวิถีชีวสังเคราะห์ของ Carotenoid ที่ผ่านการสังเคราะห์รหัสโคดอนใกล้เคียงกับ *C. utilis* ส่งผลให้มีระดับการสร้าง carotenoid สูงขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Miura et al., 1998)

การถ่ายโอนยีน *TDS* เข้าสู่ *E. coli* BL21(DE3)RIL เพื่อแก้ปัญหการใช้โคดอนที่แตกต่างกันระหว่างพืชกับ *E. coli* ส่งผลให้มีการผลิตสาร taxadiene สูงขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Huang et al., 2001) และการทำวิศวกรรมเมทาบอลิกของสารในกลุ่ม monoterpene โอนยีน *GGPS* และ limonene synthase เข้าสู่ *E. coli* BL21(DE3)RIL ส่งผลให้มีระดับการสร้าง limonene สูงขึ้น (Carter et al., 2003)

การทำวิศวกรรมเมทาบอลิกโดยอาศัยเทคนิคโคทรานส์ฟอร์มชันโดยการถ่ายโอนยีนเป้าหมายร่วมกับพลาสมิด pRARE ส่งผลให้มีการผลิตสารทุติยภูมิสูงขึ้นโดยที่ Martin และคณะได้ทำการถ่ายโอนยีนที่เกี่ยวข้องในวิถีชีวสังเคราะห์ sesquiterpene ร่วมกับพลาสมิด pRARE เข้าสู่ *E. coli* DH5 α ส่งผลให้มีระดับการสร้าง cadiene, 5-epi-aristolochene และ vetispiradiene สูงขึ้น (Martin et al., 2001)

4.2 ผลของเปปไทด์สัญญาณต่อการแสดงของยีนในระบบ heterologous expression

ปัญหาสำคัญที่พบได้อีกอย่างหนึ่งจากการแสดงออกของยีนที่มาจากพืชในระบบ heterologous expression คือริคอมบินেন্টโปรตีนที่ได้มีสภาพการละลายต่ำหรือเรียกว่า “inclusion body” โดยเฉพาะอย่างยิ่งการแสดงออกของยีน monoterpene synthase และ diterpene synthase ซึ่งมีส่วนของเปปไทด์สัญญาณ (signal peptide) อยู่ที่ปลายด้านอะมิโน (NH₂ terminal) ทำหน้าที่ขนส่งโปรตีนเป้าหมายไปสู่คลอโรพลาสต์ (รูปที่ 2.18) ดังนั้นการแสดงออกของยีนดังกล่าวจำเป็นต้องทำการตัดส่วนของเปปไทด์สัญญาณออก เพื่อเพิ่มระดับการแสดงออก และลดการเกิด inclusion body (Keeling et al., 2006) โดยที่ Huang และคณะได้ทำวิศวกรรมเมทาบอลิกของ taxadiene ใน *E. coli* โดยใช้การแสดงออกร่วมของเอนไซม์ *GGPS* และ taxadiene synthase ที่ผ่านการตัดเปปไทด์สัญญาณจากปลายด้านอะมิโน (NH₂-terminal deletion) ส่งผลให้มีระดับการสร้าง taxadiene สูงขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับการถ่ายโอนยีนดังกล่าวในแบบ wild type (Huang et al., 2001) และการทำวิศวกรรมเมทาบอลิกของ limonene ของยีนจาก *Mentha spicata* โดยอาศัยการแสดงออกร่วมของยีน geranyl diphosphate synthase (*GGPS*) และ limonene synthase ในรูปแบบ truncated version ส่งผลให้มีการผลิต limonene สูงขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับการถ่ายโอนยีนดังกล่าวในรูปแบบ premature gene (Carter et al., 2003)



รูปที่ 2.18 แสดงโครงสร้างพื้นฐานของยีน monoterpene และ diterpene synthase ประกอบด้วย เปปไทด์สัญญาณทำหน้าที่ในการขนส่งโปรตีนเป้าหมายเข้าสู่คลอโรพลาสต์ โดยที่ยีน sesquiterpene synthase ไม่พบบริเวณดังกล่าวเนื่องการสังเคราะห์เกิดขึ้นในไซโทพลาสซึม (Keeling et al., 2006)

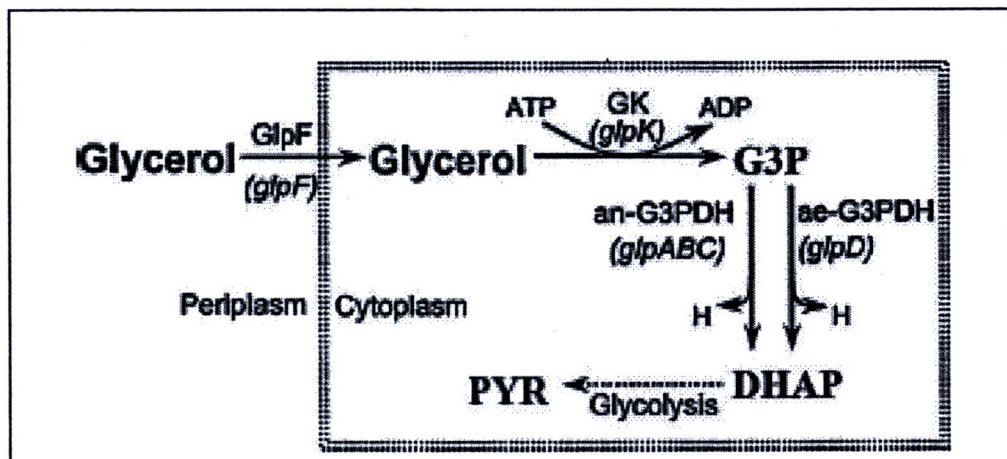
4.3 ผลของอุณหภูมิต่อการแสดงออกของยีนในระบบ *E. coli*

การปรับเปลี่ยนอุณหภูมิให้เหมาะสมยังเป็นตัวกำหนดสภาพการละลายของโปรตีนที่ได้และการเกิด inclusion body โดยที่การปรับเปลี่ยนอุณหภูมิให้ต่ำลงมีผลให้โปรตีนที่ได้มีสภาพการละลายสูงขึ้นเนื่องจากขั้นตอนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์โปรตีนเช่น transcription, translation และ folding จะเกิดขึ้นอย่างช้าๆ (Georgiou and Valax 1996; Baneyx 1999) ตัวอย่างเช่น *E. coli* ที่ได้รับการถ่ายโอนยีนที่อยู่ในวิถีชีวสังเคราะห์ของ lycopene การปรับเปลี่ยนอุณหภูมิที่ใช้จาก 37 °C เป็น 25 °C ส่งผลให้มีระดับการสร้าง lycopene สูงขึ้น เนื่องการลดการเกิด inclusion body ของริคอมบิแนนท์โปรตีน (Kim et al., 2009) การทำวิศวกรรมเมทาบอลิกของ limonene โดยอาศัยการแสดงออกร่วมของยีน *GPPS* และ limonene synthase ที่อุณหภูมิ 18 °C ส่งผลให้มีระดับการสร้าง limonene สูงขึ้น (Carter et al., 2003) การทำวิศวกรรมเมทาบอลิกของ torulene ใน *E. coli* โดยลดอุณหภูมิที่ใช้จาก 37 °C เป็น 28 °C ส่งผลให้มีการผลิต torulene สูงขึ้น (Lee et al., 2004) การทำวิศวกรรมเมทาบอลิกของสาร sesquiterpene ใน *E. coli* โดยทำการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิที่ใช้จาก 37 °C เป็น 30 °C ส่งผลให้มีการผลิต 5-epi-aristolochene สูงขึ้น (Martin et al., 2001) การผลิต β -carotene ใน *E. coli* ที่ผ่านการทำวิศวกรรมเมทาบอลิกโดยปรับเปลี่ยนอุณหภูมิที่ใช้จาก 37 °C เป็น 25 °C ส่งผลให้มีการผลิต β -carotene สูงขึ้น (Kim et al., 2006)

5. การเพิ่มระดับการสร้างสารทุติยภูมิโดยใช้กลีเซอรอล (glycerol) เป็นแหล่งของคาร์บอน

แนวทางหนึ่งที่มีการใช้เพิ่มระดับการสร้างสารทุติยภูมิในจุลินทรีย์คือ การใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งของคาร์บอน โดยที่ขบวนการสลายกลีเซอรอลใน *E. coli* เริ่มจากการขนส่งกลีเซอรอลเข้าสู่ไซโตพลาสซึมโดยการทำงานของเอนไซม์ GlpF จากนั้นเอนไซม์ glycerol kinase (glpK) เร่งปฏิกิริยาฟอสโฟรีเลชัน (phosphorylation) ได้เป็น G 3-P และเข้าสู่วิถี glycolytic ในที่สุด (รูปที่ 2.18) (Murarka et al., 2008)

ตัวอย่างของการใช้กลีเซอรอลได้แก่ Kim และคณะได้ทำวิศวกรรมเมตาบอลิกของ β -carotene ใน *E. coli* โดยใช้การแสดงออกพร้อมของยีนที่เกี่ยวข้องในวิถีสังเคราะห์ของ β -carotene ร่วมกับการเติมกลีเซอรอลในอาหารเหลว 2YT medium ส่งผลให้มีการผลิต β -carotene เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการเติมกลีเซอรอล (Kim et al., 2006) การทำวิศวกรรมเมตาบอลิกของสารในกลุ่ม sesquiterpene ใน *E. coli* DH5 α โดยใช้อาหารเหลวสูตร M9 medium ที่มีการเติมกลีเซอรอลร่วมกับการเพิ่มการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในวิถีสังเคราะห์ของ sesquiterpene (Martin et al., 2001) การเพิ่มการผลิต lycopene ใน *E. coli* โดยใช้การแสดงออกพร้อมของยีนที่เกี่ยวข้องในวิถีสังเคราะห์ของ lycopene ร่วมกับการเติมกลีเซอรอลในอาหารเหลว 2YT medium ส่งผลให้มีการผลิต lycopene เพิ่มขึ้น (Yoon et al., 2006)



รูปที่ 2.19 แสดงวิธีการสลายกลีเซอรอลใน *E. coli* โดยที่ G3P คือ glyceraldehydes 3 phosphate, DHAP คือ dihydroxy acetone phosphate, PYR คือ pyruvate, glpK คือ ATP-dependent glycerol kinase และ *glpD* คือ glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase (Murarka et al., 2008)