

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

1. การสร้างพลาสมิด pETDuet-1 vector ที่มีการแทรกสอดของยีนที่เกี่ยวข้องในวิถีชีวสังเคราะห์ของ GGOH

ขั้นตอนสำคัญในการวิศวกรรมเมทาบอลิกเพื่อเพิ่มการสร้าง GGOH ใน *E. coli* คือการเพิ่มระดับการสร้าง GGPP เนื่องจากเป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์ *PDPase* ซึ่งเริ่มจากการเตรียม full-length ของยีน *GGPPS* จากไบโพลิเมอร์ ซึ่งผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *GGPPS* ที่แทรกสอดอยู่ในพลาสมิด pTZ57R/T vector ด้วยโปรแกรม Bioedit โดยการนำยีน *GGPPS* ที่ได้มา pair wise alignment เทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *GGPPS* ที่มีรายงานอยู่ในฐานข้อมูล NCBI (Sittithaworn et al., 2001) พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *GGPPS* ที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้ทั้งหมด 7 ตำแหน่ง หลังจากนำลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ *GGPPS* ที่ได้จากการเปลี่ยนทั้ง 2 แห่ง มาเปรียบเทียบกับกันด้วยการทำ pair wise alignment พบว่าไม่มีการเปลี่ยนลำดับกรดอะมิโนของยีน *GGPPS* ซึ่งเรียกการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ในลักษณะนี้ว่า silent mutation ดังนั้นจึงนำพลาสมิด pTZ57R/*GGPPS* มาใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ truncate ของยีน *GGPPS* เนื่องจากยีนที่อยู่ในวิถีชีวสังเคราะห์ของ monoterpene synthase และ diterpene synthase จะมีส่วนของเปปไทด์สัญญาณ (signal peptide) ซึ่งมีหน้าที่ในการนำยีนเข้าสู่คลอโรพลาสต์ โดยการแสดงออกของยีนในระบบ heterologous expression จะต้องตัดส่วนของเปปไทด์สัญญาณออกเพื่อที่จะได้ matured protein ที่มีความสามารถในการทำงานและมีการแสดงออกสูงขึ้น ดังตัวอย่างของการทำวิศวกรรมเมทาบอลิกของสารของ limonene และ taxadiene ใน *E. coli* การสร้าง truncate ของยีน limonene synthase (*LS*) และ taxadiene synthase (*TDS*) ทำให้เกิด mature protein ที่ได้มีความสามารถทำงานได้ และมีระดับการแสดงออกสูงขึ้น (Williams et al., 1998; Huang et al., 2001)

จากการตรวจสอบลำดับเบสของ truncate ของยีน *GGPPS* ที่แทรกสอดอยู่ในพลาสมิด pETDuet-1 vector พบการแทรกสอดเข้าไปในตำแหน่ง *Bam*HI และ *Sal*I บริเวณ MCS1 และมีการเชื่อมต่อกับ Histidine-tag ที่ปลาย 5' โดยการแสดงออกของยีนถูกควบคุมโดยการทำงานของ T7lac promoter และมีจุดสิ้นสุดของการถอดรหัสเป็น termination base sequence ซึ่งจุดนี้จะเกิดการจับคู่กันของเบสคู่สม (self complementary) เกิดเป็นโครงสร้างคล้ายปิ่นปักผม (hairpin loop) เพื่อให้เอนไซม์ T7 RNA polymerase หยุดการทำงานและหลุดจากสาย DNA ต้นแบบ



ในส่วนของ truncate ยีน *PDPase* ที่แทรกสอดอยู่บน pETDuet-1vector จากการวิเคราะห์ลำดับเบสโดยใช้ไพรเมอร์ DuetUP2 primer และ T7 terminator พบการแทรกสอดของยีน *PDPase* ในตำแหน่ง *NdeI* และ *EcoRV* บริเวณ MCS2 และเกิดการเชื่อมต่อกับ S-tag ที่ปลายด้าน 3' เพื่อใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *PDPase* ด้วยแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ S-protein โดยการแสดงออกของยีน *PDPase* ถูกควบคุมโดย T7lac promoter-2 และมี T7 terminator เป็นจุดสิ้นสุดของการถอดรหัสของเอนไซม์ T7 RNA polymerase

ในการวิจัยครั้งนี้ได้นำเทคนิค Single vector, multi RNA transcript มาใช้ในการแสดงออกร่วมของยีน *GGPPS* และ *PDPase* ใน pETDuet-1 vector เนื่องจากมีรายงานว่า การแสดงออกร่วมของยีนด้วยวิธีนี้ช่วยลดการเกิดโครงสร้างทุติยภูมิของเอ็มอาร์เอ็นเอ (secondary structure mRNA) เพราะเพิ่มความสามารถในการจับระหว่าง mRNA กับไรโบโซมส่งผลให้มีการแสดงออกของยีนเป้าหมายสูงขึ้น และยังตัดปัญหาการใช้ยาปฏิชีวนะหลายชนิดเป็นผลให้รีคอมบิแนนท์ *E. coli* มีอัตราการเจริญเติบโต และการแสดงออกของยีนเป้าหมายลดลงซึ่งเป็นปัญหาที่พบได้ในการแสดงออกร่วมของยีนแบบ Single vector, single RNA transcript และการทำโคทรานส์ฟอร์มชัน (co-transformation) ตามลำดับ (Romier et al., 2006) และจากการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *GGPPS* และ *PDPase* ที่แทรกสอดอยู่ใน pETDuet-1 vector พบการแทรกสอดของยีนทั้งสองในตำแหน่งและทิศทางของการแปลรหัสพอลิเปปไทด์ที่ถูกต้อง (in-frame)

2. การแสดงออกของยีน *GGPPS* และ *PDPase* ใน *E. coli* BL21(DE3)RIPL

E. coli BL21(DE3)RIPL ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pETDuet/*GGPPS* และ pETDuet/*GGPPS/PDPase* สามารถผลิตเอนไซม์ *GGPPS* ที่มีขนาด 33 kDa แต่ไม่สามารถตรวจหาแถบโปรตีน *PDPase* ได้ซึ่งอาจเป็นเพราะยีน *PDPase* มีระดับการแสดงออกต่ำมาก อาจเป็นผลจากการใช้โคดอน (codon usage) ของยีน *PDPase* ซึ่งโคลนมาจากไบโพลีเมอร์มีความแตกต่างจากยีนใน *E. coli* BL21(DE3)RIPL มาก ทำให้เกิดปัญหาการแสดงออกของยีน *PDPase* ใน *E. coli* ซึ่งโปรแกรม ACUA (automated codon usage analysis) (Vetrivel et al., 2007) ถูกออกแบบขึ้นมาเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ความแตกต่างในการใช้โคดอนของยีนในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ACUA พบว่ายีน *PDPase* ที่ได้จากไบโพลีเมอร์มีความแตกต่างในการใช้โคดอนเมื่อเทียบกับ *E. coli* K12 อยู่ที่ 8.20% (ตารางที่ 1) โดยพิจารณาจากโคดอนที่ถอดรหัสเป็นกรดอะมิโน Arginine (R), Isoleucine (I), Proline (P), Leucine (L) และ Glycine (G) (Gustafsson et al., 2004) ในขณะที่ยีน *GGPPS* มีความแตกต่างของการใช้โคดอนกับระบบ *E. coli* K12 เพียง 4.16% (ตารางที่ 2) ซึ่งอาจเป็นผลให้ไม่สามารถตรวจหาแถบโปรตีน *PDPase* ได้รูปแบบการใช้โคดอนที่

แตกต่างกันนี้ ส่งผลรบกวนการแสดงออกของยีนในแบบต่างๆ เช่น อัตราการแปลรหัสที่ช้าลง (translation stalling), การแปลรหัสเร็วก่อนกำหนด (premature translation), การเกิดการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโน (amino acid misincorporation) และเกิดการแปลรหัสผิดเฟรม (frame shift translation) เป็นต้น ปัญหาการใช้โคดอนสามารถแก้ไขได้หลายวิธีเช่น การทำให้เกิดการกลายพันธุ์เฉพาะที่ (site directed mutagenesis) หรือการสังเคราะห์ยีนใหม่ (synthetic gene) (Redwan, 2006) ดังตัวอย่างการวิศวกรรมเมทาบอลิกของ amorphadiene โดยใช้ยีน amorphadiene synthase (*ADS*) ที่สังเคราะห์ยีนใหม่ให้มีการใช้โคดอนเหมือนกับเซลล์เจ้าบ้านทำให้เกิดการแสดงออกของยีน *ADS* สูงขึ้น (Martin et al., 2003; Qiang et al., 2009) และการทำวิศวกรรมเมทาบอลิกของ taxadiene ใน *S. cerevisiae* โดยการสังเคราะห์ยีน *TDS* ขึ้นใหม่ส่งผลให้มีการแสดงออกยีน *TDS* สูงขึ้น (Engels et al., 2008)

ตารางที่ 5.1 ผลการวิเคราะห์การใช้โคดอนของยีน *PDPase* ด้วยโปรแกรม ACUA

โคดอน (Codon)	กรดอะมิโน	Fraction*	จำนวนที่พบ	%
GGC	G	0.136	3	8.20
CTG	L	0.129	4	
CTT		0.129	4	
TTA		0.129	4	
CCC	P	0.063	1	
CGA	R	0.133	2	
CGG	R	0.133	2	

หมายเหตุ **Fraction*** คือปริมาณของรหัสโคดอนที่พบน้อย (Rare codon) ของยีน *PDPase* จากเป็ล้าน้อย เทียบกับจำนวนยีน4290 ยีนของ *E. coli* K12 ซึ่งถูกบรรจุอยู่ในฐานข้อมูล ACUA โดยเกณฑ์การคัดเลือกค่า fraction จาก rare codon ที่มีค่าตั้งแต่ 0.063 ถึง 0.136

ตารางที่ 5.2 ผลการตรวจสอบการใช้โคดอนของยีน *GGPPS* ด้วยโปรแกรม ACUA

โคดอน (Codon)	กรดอะมิโน	Fraction*	จำนวนที่พบ	%
GGC	G	0.125	3	4.16
ATA	I	0.118	2	
ATC		0.059	1	
CTC	L	0.029	1	
CTG		0.029	1	
CCA	P	0.111	1	
AGA	R	0.083	1	
CGA		0.083	1	
CGC		0.083	1	

หมายเหตุ **Fraction*** คือปริมาณของรหัสโคดอนที่พบได้น้อย (Rare codon) ของยีน *GGPPS* จากเป็ล้าน้อย เทียบกับจำนวนยีน4290 ยีนของ *E. coli* K12 ที่ถูกบรรจุอยู่ในฐานข้อมูล ACUA ซึ่งมีอยู่เพียง 4.16%

3. การเกิดโครงสร้างทุติยภูมิของยีน *PDPase*

การเกิด โครงสร้างทุติยภูมิของ mRNA (secondary structure mRNA) คือการจับตัวกันเองของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในโมเลกุลของ mRNA (self complementary base) ส่งผลให้เกิดโครงสร้างคล้ายปิ่นปักผม (hairpin loop) ซึ่ง loop ที่เกิดขึ้นจะเข้าไปยับยั้งการจับตัวกันระหว่าง rRNA และ mRNA ในบริเวณจุดเริ่มต้นของการถอดรหัส (translation initiation region: TIR) เป็นผลให้ขั้นตอนการแปลรหัสสายพอลิเปปไทด์สิ้นสุดลง (Ringquist et al., 1992) โปรแกรม RNA secondary structure prediction ซึ่งถูกออกแบบขึ้นมาเพื่อทำนายโอกาสในการเกิดโครงสร้างทุติยภูมิของ mRNA โดยพิจารณาจากค่าพลังงานอิสระของกิบส์ (Gibb’s free energy; ΔG) ของ loop ที่เกิดขึ้นภายในโครงสร้างของ mRNA ซึ่งค่า ΔG จะเป็นตัวกำหนดว่าโครงสร้างทุติยภูมิมิมีโอกาสเกิดขึ้นได้จริงมากน้อยเพียงใด โดยที่ ค่า ΔG เป็นลบ (-) แสดงว่าการเกิดโครงสร้างทุติยภูมินั้นมีความเป็นไปได้สูงมาก ในขณะที่ค่า ΔG เป็นบวก (+) แสดงว่าการเกิดโครงสร้างทุติยภูมิมีความเป็นไปได้้น้อยมาก ทั้งนี้ควรจะพิจารณาค่า ΔG ที่เกิดขึ้นใน loop แต่ละตำแหน่งด้วย (Redwan, 2006)

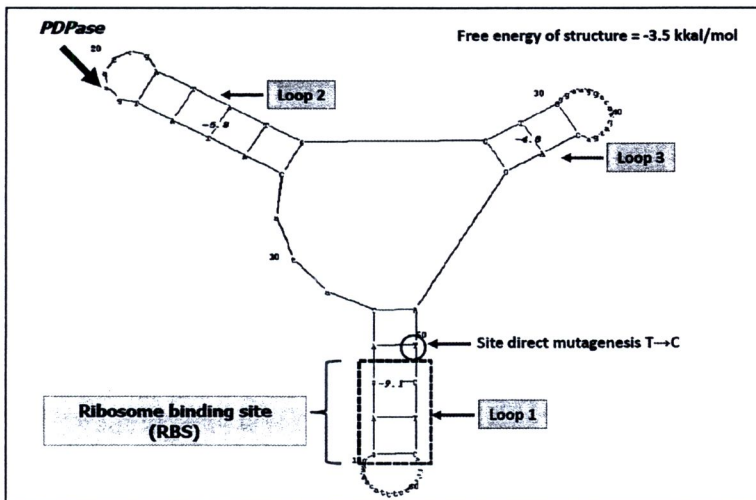
จากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PDPase* ที่เชื่อมต่อกับบริเวณ ribosome binding site (RBS) ของ pETDuet-1 vector ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของการแปลรหัส (TIR) มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม

Genebee (รูปที่ 6.1) พบว่าพลังงานรวมของ ΔG มีค่าเท่ากับ -3.5 kkal/mol และพบการเกิด loop ภายในโครงสร้างของ mRNA ทั้งหมด 3 ตำแหน่ง โดยเฉพาะ loop ตำแหน่งที่ 1 ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของการแปลรหัสมีค่า ΔG เท่ากับ -9.1 kkal ซึ่งเป็น loop ที่เกิดขึ้นภายในบริเวณ ribosome binding site และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PDPase* ที่ตำแหน่ง 49 ถึง 53 (รูปที่ 6.2)

RBS *NdeI* *PDPase* (50 nucleotide)

5' AAGGAGAATATACATATGAAACGATATGCTGGGAAGGACATGACAGATCTCAGATACCCTT
TACAA3'

รูปที่ 5.1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่ใช้ทำนายการเกิดโครงสร้างทุติยภูมิของ mRNA โดยตำแหน่งที่ขีดเส้นใต้คือ ribosome binding site (RBS); ตัวอักษรสีแดงคือบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และตัวอักษรเอนคือลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PDPase* ที่มีการเชื่อมต่อกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pETDuet-1 vector ที่ปลาย 5'



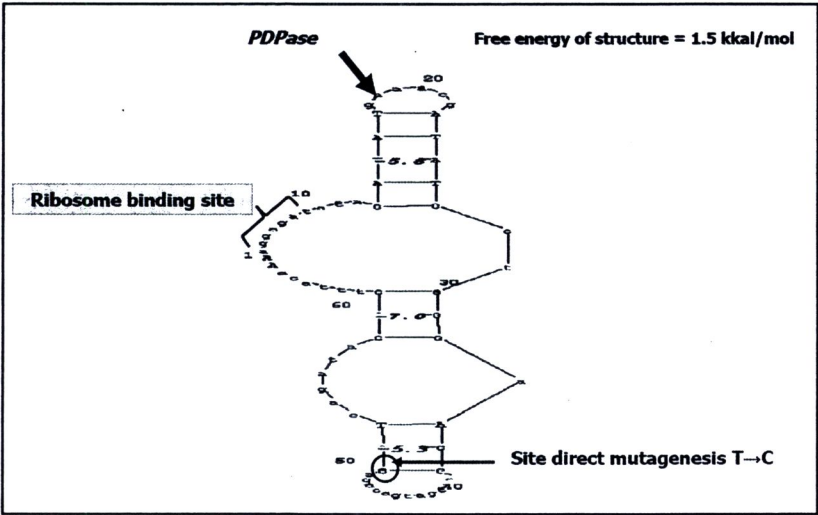
รูปที่ 5.2 แสดงโครงสร้างทุติยภูมิของยีน *PDPase* ที่เกิดจากการจับของ ribosome binding site กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PDPase* ในตำแหน่ง 49 ถึง 53 ซึ่งมีค่า ΔG -9.1 kkal/mol ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีโอกาสเกิดโครงสร้างทุติยภูมิของ mRNA สูงมาก โดยที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 50 เป็นจุดที่ถูกเลือกมาทำ site directed mutagenesis

การทำ Site directed mutagenesis อาจแก้ไขการเกิดโครงสร้างทุติยภูมิของยีน *PDPase* ได้โดยเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 50 ของยีน *PDPase* จาก thymine (T) เป็น cytosine (C) (T50C) เป็นผลให้ loop ที่เกิดขึ้นในตำแหน่งที่ 1 หายไป และค่าพลังงานรวมของกิบส์เพิ่มขึ้นจาก -3.5 kkal/mol เป็น 1.5 kkal/mol ซึ่งโอกาสเกิดโครงสร้างทุติยภูมิของ mRNA มีความเป็นไปได้้น้อยมาก (รูปที่ 6.4)

RBS
NdeI
PDPase (50 nucleotide)

5'AAGGAGAAATATACATATGAAACGATATGCTGGGAAGGACATGACAGACCTCAGATACCCTT
TACAA-3'

รูปที่ 5.3 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ที่ใช้ทำนายการเกิดโครงสร้างทุติยภูมิของ mRNA ที่ผ่านการทำ mutation โดยตำแหน่งที่ขีดเส้นใต้คือ ribosome binding site (RBS); ตัวอักษรสีแดงคือบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และตัวอักษรเอนคือลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PDPase* ที่เชื่อมต่อกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pETDuet-1 vector ที่ปลาย 5' โดยที่ตัวอักษรสีเขียวคือบริเวณที่ถูกเลือกมาทำ site directed mutagenesis โดยเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์จาก T เป็น C



รูปที่ 5.4 แสดงโครงสร้างทุติยภูมิของยีน *PDPase* ที่ผ่านการทำ site directed mutagenesis โดยเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PDPase* ในตำแหน่งที่ 50 จาก T เป็น C เป็นผลให้ค่า ΔG สูงขึ้นจาก 3.5 kkal/mol เป็น 1.5 kkal/mol

4. การผลิต GGOH ในรีคอมบิแนนท์ *E. coli*

การทำวิศวกรรมเมตาบอลิกเพื่อเพิ่มการผลิต GGOH โดยอาศัยการแสดงออกร่วมของยีน *GGPPS* และ *PDPase* สามารถเพิ่มการผลิต GGOH ได้สูงสุดเมื่อเทียบกับโคลนที่มีการแสดงออกของยีน *GGPPS* เพียงอย่างเดียวในขณะที่การแสดงออกของยีน *PDPase* เพียงอย่างเดียวไม่พบการสร้าง GGOH ซึ่งสอดคล้องกับการแสดงออกร่วมของยีน *GGPPS* และ diacylglycerol pyrophosphate phosphatase (*DPPI*) ใน *S. cerevisiae* พบการสะสมของ GGOH ในความเข้มข้นสูงกว่าโคลนที่มีการแสดงออกของ *GGPPS* เพียงอย่างเดียว (Tokuhito et al., 2009) และการเพิ่มการแสดงออกของยีน *PDPase* เพียงอย่างเดียวไม่สามารถเพิ่มระดับการสร้าง GGOH ได้ อาจเป็นเพราะปริมาณ GGPP ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์ *PDPase* มีการเก็บสะสมใน *E. coli* ในปริมาณต่ำมาก (Albermann et al., 2008; Ohto et al., 2009) ดังนั้นการเพิ่มปริมาณเอนไซม์ *PDPase* จึงไม่ส่งผลต่อการเพิ่มปริมาณ GGOH ในจุลินทรีย์

การแสดงออกของยีน *GGPPS* เพียงอย่างเดียว จะเกิดการสะสม GGPP ในปริมาณมากเกินไปกติกจะกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ allyl phosphatase ซึ่งเป็น endogenous phosphatase เพื่อเปลี่ยน GGPP เป็น GGOH เพื่อหลีกเลี่ยงความเป็นพิษต่อเซลล์ (Muramatsu et al., 2008; Ohto et al., 2008) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้โดยพบการสะสมของ GGOH จาก *E. coli* BL21(DE3)RIPL ที่มีการแสดงออกของยีน *GGPPS* เพียงอย่างเดียว จึงสรุปได้ว่าขั้นตอนสำคัญในการทำวิศวกรรมเมตาบอลิกของ GGOH คือการเพิ่มการแสดงออกของยีน *GGPPS* ในแบบ heterologous expression ซึ่งในปัจจุบันการผลิต GGPP ในจุลินทรีย์สามารถทำได้หลายแนวทางเช่น เพิ่มการแสดงออกของยีน *GGPPS* ในรูปแบบ heterologous expression หรือ homologous expression (Rohlin et al., 2001), การเปลี่ยนเอนไซม์ *FPPS* ให้เป็นเอนไซม์ *GGPPS* โดยใช้เทคนิค site directed mutagenesis ส่งผลให้มีการผลิต GGPP สูงขึ้น (Lee et al., 2005), การเพิ่มการแสดงออกของยีน octaprenyl diphosphate synthase (*IspB*) (Lee et al., 2005) และการใช้ตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในวิถีชีวสังเคราะห์ของเทอร์ปีนอยด์ เช่นการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ phytoene synthase และ ent-kaurene synthase เป็นผลให้มีการผลิต GGPP สูงขึ้น (Muramatsu et al., 2008)

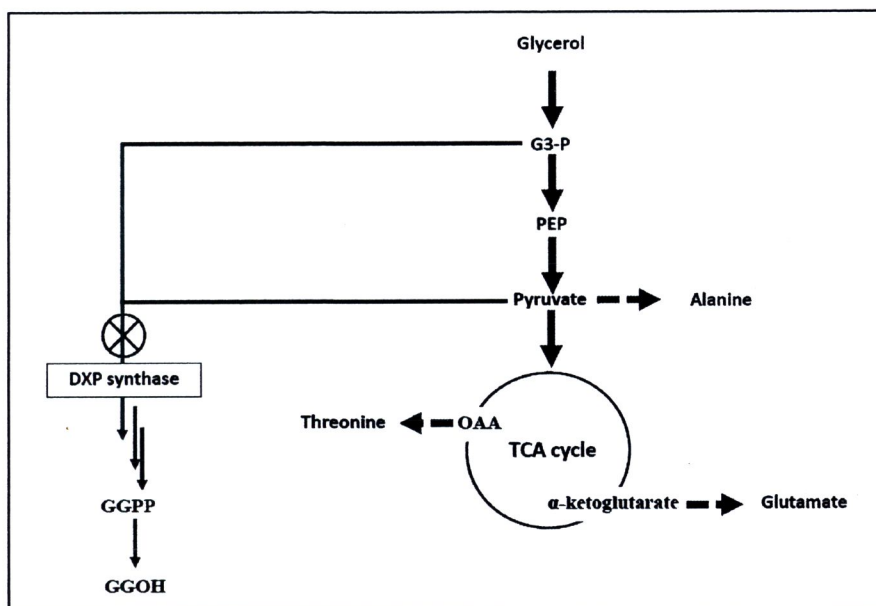
โดยทั่วไป *E. coli* มีการผลิต FPP ในปริมาณที่มากเกินไปอยู่แล้วแต่จะเก็บสะสมในรูปของ farnesol (FOH) โดยการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่ม allyl phosphatase ซึ่งเป็น endogenous phosphatase เพื่อเป็นกลไกหลีกเลี่ยงความเป็นพิษต่อเซลล์ ที่เกิดจากการผลิต FPP ในปริมาณมาก และในสถานะที่เซลล์มีความต้องการใช้ FPP ในปริมาณสูงขึ้น FOH จะถูกเปลี่ยนเป็น FPP โดยการ

งานของเอนไซม์ FPP kinase (Muramatsu et al., 2008) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้โดยพบการสะสม FOH ในริคอมบิแนนท์ *E. coli* ทั้ง 4 construct

5. ผลของกลีเซอรอลต่อการสร้าง GGOH ในริคอมบิแนนท์ *E. coli*

การเติมกลีเซอรอลลงในเซลล์เพาะเลี้ยงไม่สามารถเพิ่มการสร้าง GGOH ได้อาจเป็นเพราะการเพิ่มปริมาณกลีเซอรอลอาจส่งผลให้ Glyceraldehyde-3-phosphate และ pyruvate เปลี่ยนทิศทางการฟลักซ์ไปยังวิถี glycolytic pathway และ Krebs cycle ซึ่งมีส่วนต่อการสร้างกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเพิ่มค่าชีวมวล (biomass) เช่น threonine, alanine และ glutamic acid แทนที่จะเข้าสู่วิถี DXP เพื่อสร้าง IPP และ DMAPP (Carlson et al., 2004) ดังจะเห็นได้จากค่าชีวมวลของริคอมบิแนนท์ *E. coli* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกลีเซอรอลมีค่าชีวมวลของริคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่ไม่ได้เติมกลีเซอรอล (รูปที่ 6.5)

การเติมกลีเซอรอลไม่สามารถเพิ่มการผลิตสารเทอร์ปีนนั้นสอดคล้องกับการทำวิศวกรรมเมแทบอลิซึมของ lycopene โดยการเติมกลีเซอรอลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่าง พบว่าไม่สามารถเพิ่มระดับการสร้าง lycopene ได้เนื่องจากการแสดงออกของยีน *dxs* ที่ทำหน้าที่เป็น rate limiting step ไม่เปลี่ยนแปลงไปตาม G-3-P และ pyruvate ที่เพิ่มขึ้น (Farmer and Liao, 2001) ดังนั้นการทำวิศวกรรมเมแทบอลิซึมของ GGOH โดยอาศัยการแสดงออกร่วมของยีนที่เป็น rate limiting step ในวิถี DXP เช่น *dxs* ร่วมกับการเติมกลีเซอรอลน่าจะเป็นทางเลือกหนึ่งที่เป็นไปได้ในการเพิ่มระดับการสร้าง GGOH เนื่องจากปริมาณเอนไซม์ DXS ที่เพิ่มขึ้นจะเข้าไปเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน G-3-P และ pyruvate เป็น DXP ทำให้มีอัตราการฟลักซ์ของสารตัวกลางในวิถี DXP สูงขึ้น และทำให้ GGOH ที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาต่อมาเพิ่มสูงขึ้นตามลำดับ



รูปที่ 5.5 แผนภูมิแสดงสมมติฐานของวิธีการสลายกลีเซอรอลในริคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่ได้รับการถ่ายโอนยีนที่เกี่ยวข้องในวิถีชีวสังเคราะห์ของ GGOH ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปริมาณ G-3-P และ pyruvate ที่ได้จากการสลายกลีเซอรอลเปลี่ยนทิศทางการฟลักซ์ไปยัง glycolytic pathway และ Krebs cycle เป็นผลให้ค่าชีวมวลเพิ่มสูงขึ้น โดยไม่มีผลเปลี่ยนแปลงระดับการสร้างสรรค์ในวิถีชีวสังเคราะห์ของเทอร์ปีโนอยด์

6. การศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของริคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่ได้รับการถ่ายโอนยีนที่เกี่ยวข้องในวิถีชีวสังเคราะห์ของ GGOH

จากการศึกษาพบว่าขนาด (Size) ของพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้ถ่ายโอนเข้าสู่ *E. coli* BL21(DE3)RIPL มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตเป็นอย่างมากโดยเฉพาะโคลนที่ได้รับพลาสมิด pETDuet/GGPPS/PDPase ซึ่งมีขนาดประมาณ 7127 bp มีอัตราการเจริญเติบโตที่ช้ากว่าริคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่ได้รับเวกเตอร์เปล่า หรือเวกเตอร์ที่มียีนเดียว อาจเป็นเพราะเซลล์จะต้องนำพลังงานจำนวนมากมาใช้ในการแบ่งตัวของพลาสมิดดีเอ็นเอ (DNA replication) และการแสดงออกของยีนเป้าหมาย (Ricci and Hernandez, 2000; Kay et al., 2003)

อย่างไรก็ตาม การยับยั้งอัตราการเจริญเติบโต (Cell growth inhibition) ของ *E. coli* BL21(DE3)RIPL ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pETDuet/GGPPS/PDPase ไม่ส่งผลลดการผลิต GGOH เมื่อเทียบกับโคลนที่มีการแสดงออกของยีน GGPPS เพียงอย่างเดียวที่มีอัตราการเจริญเติบโตแต่กลับมีการผลิต GGOH ในปริมาณที่ลดลง โดยเปรียบเทียบอัตราส่วนของน้ำหนักของเซลล์เปียก (fresh weight) ที่คำนวณได้