บทที่ 6
สรุปผลการทดลอง

จากการทำวิศวกรรมเมทาบอลิคของ GGOH โดยการถ่ายโอนยีนที่เกี่ยวข้องในวิถีชีวสังเคราะห์ของ GGOH พบว่า *E. coli* BL21(DE3)RIPL ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pETDuet/*GGPPS*/*PDPase* และ pETDuet/*GGPPS* มีการแสดงออกของยีน *GGPPS* ที่สร้างเอนไซม์ที่มีขนาดที่มีขนาด 33 kDa ในขณะที่ไม่พบการแสดงออกของยีน *PDPase* ที่สร้างเอนไซม์ที่มีขนาดที่มีขนาด 30 kDa ซึ่งอาจเกิดจากการใช้โคดอนของยีน *PDPase* มีความแตกต่างกับการใช้โคดอนของ *E. coli* ถึง 8.2 % ในขณะที่ยีน *GGPPS* มีความแตกต่างของการใช้โคดอนเมื่อเทียบกับ *E. coli* เพียง 4.16% และปัจจัยหนึ่งที่ไม่พบการแสดงออกของยีน *PDPase* อาจมีสาเหตุมาจากการเกิดโครงสร้างทุติยภูมิของ mRNA ที่มีค่าพลังงานอิสระของกิบส์ (Gibbs free energy) เท่ากับ -3.5 kkal/mol และพบ loop ภายในโครงสร้างของยีน *PDPase* ทั้งหมด 3 ตำแหน่งด้วยกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณที่เป็นจุดเริ่มต้นของการถอดรหัส (translation initiation region) ที่มีค่า ΔG สูงถึง -9.1 kkal/mol ซึ่ง loop ที่เกิดขึ้นในตำแหน่งนี้อาจจะเข้าไปขัดขวางการรวมตัวระหว่าง ribosome กับ mRNA เป็นผลให้การแปลรหัสของพอลิเปปไทด์สิ้นสุดลง และจากการทำ site directed mutagenesis โดยเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ของยีน *PDPase* ในตำแหน่งที่ 50 จาก T เป็น C โดยไม่เปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโน ทำผลให้ loop ที่เกิดขึ้นบริเวณจุดเริ่มต้นของการแปลรหัสหายไป และทำให้ค่าพลังงานรวมของกิบส์เปลี่ยนจาก -3.5 kkal/mol เป็น 1.5 kkal/mol ซึ่งการทำ site directed mutagenesis อาจเป็นทางเลือกหนึ่งในการเพิ่มระดับการแสดงของยีน *PDPase* ในอนาคต

การตรวจสอบการผลิต GGOH จากริคอมบิแนนท์ *E. coli* ทั้ง 4 สายพันธุ์ที่ได้รับการถ่ายโอนยีนที่เกี่ยวข้องในวิถีชีวสังเคราะห์ของ GGOH พบว่า *E.coli* BL21(DE3)RIPL ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pETDuet/*GGPPS*/*PDPase* และ pETDuet/*GGPPS* มีการผลิต GGOH ที่ระดับความเข้มข้น 252 และ 205 ng/L ตามลำดับ ในขณะที่ *E. coli* BL21(DE3)RIPL ที่ได้รับพลาสมิด pETDuet/*PDPase* และ pETDuet-1, empty vector ไม่พบการสะสม GGOH เนื่องจาก GGPP ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์ PDPase มีการสะสมในปริมาณต่ำมาก ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าขั้นตอนสำคัญของการวิศวกรรมเมทาบอลิคของ GGOH คือการเพิ่มการแสดงออกของยีน *GGPPS* ในแบบ heterologous expression

การเติมกลีเซอรอลลงในเซลล์เพาะเลี้ยงไม่สามารถเพิ่มการสร้าง GGOH ได้เนื่องจากวิถีชีวสังเคราะห์แบบ DXP ใน *E. coli* มีการควบคุมอัตราการฟลักซ์ของสารตัวกลางต่างๆ ผ่านการ

แสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่เป็น rate limiting step ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงส่งผลให้ G-3P และ pyruvate ที่ได้จากการสลายกลีเซอรอลเปลี่ยนทิศทางการฟลักซ์จากวิถี DXP ไปยังวิถี glycolytic และ TCA cycle เป็นผลให้ค่าชีวมวลของริคอมบิแนนท์ *E. coli* ทั้ง 4 construct เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเทียบกับริคอมบิแนนท์ *E. coli* ที่เลี้ยงในอาหาร LB ที่ไม่มีส่วนผสมของกลีเซอรอล ดังนั้นการทำวิศวกรรมเมทาบอลิคของ GGOH โดยอาศัยการแสดงออกร่วมกับยีนที่เป็น rate limiting step ในวิถี DXP ร่วมกับการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งของคาร์บอนน่าจะเป็นทางเลือกหนึ่งเพื่อเพิ่มระดับการสร้าง GGOH ให้สูงขึ้นในอนาคต

จากการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ของริคอมบิแนนท์ *E. coli* ทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของโคลนที่มีการแสดงออกร่วมกับโคลนที่มีการแสดงออกของยีนเดียวพบว่า *E. coli* BL21(DE3)RIPL ที่ได้รับพลาสมิด pETDuet/*GGPPS*/*PDPase* มีอัตราการเจริญช้าที่สุด เนื่องจากเซลล์จะต้องนำพลังงานมาใช้ในการแบ่งตัวของพลาสมิดดีเอ็นเอ (DNA replication) และการแสดงออกของยีนเป้าหมาย อย่างไรก็ตามกระบวนการดังกล่าวไม่ส่งผลรบกวนต่อการผลิต GGOH ในริคอมบิแนนท์ *E. coli*