# รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองสิ้นสุด ปีงบประมาณ 2563

**ชื่อแผนงานวิจัย** การอนุรักษ์และใช้ประโยชน์จากความหลากหลายทางชีวภาพของพืชและจุลินทรีย์ เพื่อเพิ่มมูลค่าและพัฒนานวัตกรรม

**ชื่อโครงการวิจัย** การผลิตสารทุติยภูมิออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

**กิจกรรมที่ 1** การพัฒนาการผลิตสารทุติยภูมิออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์โดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

**ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** การผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิก โดยรีคอมบิแนนท์ *E. coli*

**(ภาษาอังกฤษ)** Production of 5-aminolevulinic acid (ALA) by recombinant *E. coli*

**คณะผู้ดำเนินงาน**

| | | |
|---|---|---|
| หัวหน้าการทดลอง | นางสาวภรณี สว่างศรี | สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ |
| ผู้ร่วมงาน | นางนัยเนตร เจริญสันติ ทานากะ | สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ |
| | นางสาวศุภลักษ์ สัตยสมิทสถิต | ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก |

กองบริการการศึกษา

## บทคัดย่อ

การผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกจากรีคอมบิแนนท์ *E. coli* สามารถนำมาใช้ประโยชน์ด้านการเกษตรเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช โดยการใช้เทคโนโลยีในการสร้างรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอของยีน *hem* A ซึ่งเกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์ 5-aminolevulinic acid synthase (ALAS) โดยสังเคราะห์ได้จาก genomic DNA ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *Rhodobacter* sp. ซึ่งมีขนาด 1,224 คู่เบส ทำการเชื่อมต่อเข้าสู่เวคเตอร์พาหะ (Protein Expression Vector) เมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์แล้วแปรรหัสเป็นลำดับเปปไทด์ แล้วเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank พบว่า มีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของ 5-aminolevulinate synthase ของ *R. sphaeroides* (Accession No. WP_011337894.1 ที่ identity 100 เปอร์เซ็นต์ โดยมีลำดับของกรดอะมิโนเท่ากับ 407 อะมิโน แอซิด เมื่อทำการถ่ายฝากพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) พบว่าสามารถชักนำการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนซึ่งมีขนาดประมาณ 45 กิโลดาลตัน และสามารถสังเคราะห์กรด 5-อะมิโนลีวูลินิกได้ในปริมาณสูง เมื่อเติมสารตั้งต้นไกลซีน ความเข้มข้น 30 mM และกรดซัคซินิค ความเข้มข้น 10 mM นอกจากนี้ยังพบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรด5-อะมิโนลีวูลินิคได้ดี เมื่ออุณหภูมิอยู่ในช่วง 30-37 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) 6-7 การผลิตกรดอะมิโนลีวูลินิคในระบบถังหมักสามารถเพิ่มปริมาณการผลิตได้ในปริมาณสูงถึง 615.928 uM อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ยังได้พัฒนากรด 5-อะมิโนลีวูลินิค รูปแบบผงแห้ง โดยใช้เทคนิคการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze drying) และการทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray dry) ซึ่งจะเป็นแนวทางในการพัฒนาศักยภาพการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิค ในเชิงพาณิชย์ต่อไป

**คำสำคัญ** กรด 5-อะมิโนลีวูลินิค รีคอมบิแนนท์ *E. coli* สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

รหัสการทดลอง 03-55-62-01-01-00-01-62
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร รังสิต ธัญบุรี ปทุมธานี 12110 ประเทศไทย
Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, Rangsit, Thanyaburi, Patumthani, 12110, Thailand

## Abstract

The production of 5-aminolevulinic acid (ALA) from recombinant *E. coli* can be used for agricultural purposes as a plant growth promoter. The recombinant DNA technology of *hem*A gene encoding 5-aminolevulinic acid synthase (ALAS) was cloned from *Rhodobacter* sp. In this study, *hem*A gene of *Rhodobacter* sp. was obtained by PCR gene cloning technique and the full-length nucleotide approximately 1,224 bp. *Hem* A gene could be overexpressed within the protein expression vector pLATE52. The sequenced result was exhibited as *R. sphaeroides* with 100% similarity when compared to peptide sequences (407 amino acids) of *hem*A gene (accession no. WP_011337894.1) in the GenBank database. The recombinant was then transformed into *E. coli* BL21 (DE3). The size of recombinant ALAS was molecular weight approximately 45 kDa and recombinant enzyme efficient activity could produce ALA in 12-16 hours when adding the precursor 30 mM glycine + 10 mM succinic acid as a substrate for ALA biosynthesis. The optimum conditions for the production of 5-aminolevulinic acid were good in the temperature range of 30 - 37°C and the pH 6-7. The production of the 5-aminolevulinic acid in the fermentation system can increase the production by up to 615.928 uM. This study has developed 5-aminolevulinic producing by freeze-drying and spray drying techniques used for commercial purposes.

**Key word:** 5-aminolevulinic acid, recombinant *E. coli,* plant growth promoter

กรมวิชาการเกษตร

## คำนำ

กรด 5-อะมิโนลีวูลินิค (5-aminolevulinic acid; ALA) เป็นกรดอะมิโนที่มี 5 คาร์บอน ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์เตตราไพโรล เช่น คลอโรฟิลล์ ไฟโคบิริน ฮีม และวิตามินบี 12 ในสิ่งมีชีวิต และมีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของพืช สัตว์ สาหร่าย และแบคทีเรีย แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสามารถสร้าง ALA ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์พอร์ไฟริน เช่น คลอโรฟิลล์ ไฟโคบิลลิน ฮีม และวิตามินบี12 (Sasikala *et al.,* 1994) ปัจจุบันกรด 5-อะมิโนลีวูลินิค เป็นสารชีวภาพที่กำลังได้รับความสนใจจากนักวิจัยในหลายประเทศทั่วโลก เนื่องจาก

สามารถนำมาใช้ประโยชน์ด้านการเกษตรได้หลากหลาย เช่น เป็นสารกระตุ้นการเจริญเติบโต (Growth stimulator) เพื่อทดแทนการใช้สารกลุ่มฮอร์โมนพืช โดยสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสและสร้างรงควัตถุ นอกจากนี้หากใช้ในปริมาณความเข้มข้นสูงยังสามารถใช้ทดแทนสารกำจัดวัชพืช และสารกำจัดแมลงได้ โดยไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ ในธรรมชาติมีแบคทีเรียที่สังเคราะห์ ALA ได้หลายชนิด เช่น *Clostridium thermoaceticum, Escherichia coli, Pseudomonas riboflavin, Rhodobacter sphaeroides, Rhodopseudomonas* sp. เป็นต้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *Rhodobacter* sp. สามารถผลิต ALA ได้ในปริมาณที่สูงกว่าแบคทีเรียในกลุ่มอื่นๆ แต่มีข้อจำกัดในด้านการเพาะเลี้ยงที่ยุ่งยากซับซ้อน เนื่องจากเป็นจุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตช้า อาศัยแสงในการเจริญเติบโต แต่ไม่อาศัยออกซิเจน

มีรายงานการศึกษา ALA ที่ความเข้มข้น 0.06-0.6 mM มาใช้แช่เมล็ด หรือฉีดพ่นทางรากและใบ โดยมีบทบาทส่งเสริมการเจริญของ พริก ถั่ว แตงกวา ผักโขม กระเทียม มันฝรั่ง ข้าว ข้าวโพด ข้าวบาร์เลย์ ข้าวสาลี หัวไชเท้า อินทผาลัม เนื้อเยื่ออินทผาลัมที่เพาะเลี้ยง และแปะก๊วย (Hotta *et al.,* 1997) ALA ยังช่วยเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทส (Nishihara *et al.,* 2003) เพิ่มการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ในที่มีแสงและยับยั้งการปลดปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ในที่มืด (Richter *et al.,* 2010) ทั้งยังช่วยเพิ่มอัตราการเกิดกระบวนการไนโตรเจนแอสซิมิเลชั่น, ซัลเฟอร์ แอสซิมิเลชั่น (Maruyama, 2012) และเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ไนไตรท์ รีดักเทส ในพืช (Mishra and Srivastava, 1983) นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้ ALA เพื่อให้พืชหลายชนิดสามารถทนความกดดันจากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น สภาพดินเค็มจัดในการปลูกทานตะวัน และอินทผาลัม โดยจะไปส่งเสริมการเพิ่มแรงดันออสโมซิส และยับยั้งการดูดซึม $Na^+$ เข้าสู่ปลายราก (Akram and Ashraf, 2011 ; Youssef, 2008) ความสามารถทนต่ออากาศเย็นจัดของพริกแดง และถั่วเหลือง (Korkmaz and Korkmaz, 2009 ; Balestrasse *et al.,* 2010) ทนต่อสภาพดินที่ปนเปื้อนด้วยยาฆ่าแมลง (Kumar *et al.,* 1999) ในด้านการกำจัดวัชพืช (Herbicides) การใช้ ALA ที่ความเข้มข้นสูงๆ (2-5 mM) สามารถใช้เป็นสารกาจัดวัชพืชที่มีความปลอดภัยต่อมนุษย์ โดยกลไกการเข้าไปทำลายชั้นเมมเบรนของพืช ทำให้ใบและลำต้นเหี่ยวเฉาเกิดการสูญเสียน้ำและตายในที่สุด (Sasaki *et al.,* 1987) การพ่นสาร ALA บนในวัชพืชภายใต้สภาวะไร้แสง สาร ALA เปลี่ยนรูปเป็น protochlorophyllide เมื่อมีแสงอาทิตย์ จะทำหน้าที่เป็นตัว photosynthesizers (เปลี่ยนเป็น triplet oxygen ที่มีศักยภาพในการออกซิไดซ์ singlet oxygen) ออกซิเจนในรูป singlet oxygen จะออกซิไดซ์อย่างรุนแรง (superoxidizes) ต่อฟอสโฟลิปิดของผนังเซลล์ของใบพืช ผนังเซลล์ถูกทำลาย วัชพืชตาย สาร ALA สามารถกำจัดวัชพืชชนิดใบเลี้ยงคู่มากกว่าพืชใบเลี้ยงเดี่ยว Sasaki และคณะ (1990) ทำการทดสอบประสิทธิภาพในการกำจัดวัชพืช *Trifolium repens* ของน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยง *Rhodobacter sphaeroides* 4 วัน (มีสาร ALA 4 มิลลิโมล) โดยพ่น 10 มิลลิลิตรต่อ 150 ตารางเซนติเมตร พบว่า หลังจากพ่นในวันที่ 1, 2 และ 3 ให้ค่า herbicide activity (พื้นที่ของใบพืชที่ถูกทำลายต่อพื้นที่ของใบพืชที่ดีคูณร้อย) 83, 90 และ 95% ตามลำดับ และเมื่อเติมสาร $\alpha,\alpha$ – dipilidyl (5 มิลลิโมล) ซึ่งเป็นสารส่งเสริมการออกฤทธิ์ของสารกำจัดวัชพืช ลงในน้ำหมัก มีผลเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดวัชพืชได้ถึงร้อยละ 100 (หลังการพ่น 1, 2 และ 3 วัน) การค้นพบสารกำจัดแมลง (Insecticides) เกิดขึ้นเช่นเดียวกับการค้นพบสารกำจัดวัชพืช เนื่องจากทั้งพืช และเซลล์สัตว์ มีวิถีการสังเคราะห์สารเตตราไพโรลจาก

กรด 5-อะมิโนลีวูลินิกไปเป็น protoporphyrin lX (Proto) เช่นเดียวกัน ดังนั้นจึงมีการพัฒนากระบวนการ photodynamic เพื่อใช้ในการควบคุมแมลง ซึ่งได้มีการทดลองในหนอนคืบกะหล่ำ *Trichoplusia ni* โดยพ่นสาร ALA ที่ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ +2,2- dipyridyl (Dpy) 30 มิลลิโมลาร์ ทิ้งไว้ 1 คืนที่ไม่มีแสง อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เพื่อให้เกิดการสะสมของสารเตตราไพโรล โดยเฉพาะ protoporphyrin lX (Proto) เมื่อหนอนได้รับแสงเพียงไม่กี่ชั่วโมงพบว่าหนอนมีลักษณะเฉื่อยชา และอ่อนปวกเปียกเนื่องจากมีการสูญเสียน้ำในร่างกาย และตายในที่สุด (Rebeiz *et al*., 1988) ดังนั้น ALA จึงเป็นสารชีวภาพที่มีความปลอดภัยและมีศักยภาพสูงในกระบวนการผลิตทางการเกษตร (Wang *et al.,* 2003)

เทคโนโลยีชีวภาพสามารถเข้ามาช่วยในการพัฒนากรรมวิธีการผลิตสาร ALA ให้ง่ายและรวดเร็วยิ่งขึ้น โดยวิธีการโคลนยีนที่เกี่ยวข้องในการผลิตเอนไซม์ ALA synthase (ALAS) จากเชื้อแบคทีเรีย และให้มีการ over expression เพื่อการผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ ซึ่งจะช่วยร่นระยะเวลาให้กระบวนการสังเคราะห์ ALA จาก succinyl CoA และ glycine ใน Shemin pathway ($C_4$ pathway) เกิดได้เร็วยิ่งขึ้น (Jordan, 1991) ซึ่งผลผลิตที่ได้ คือ ALA ยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ ALAS ของเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* มี 2 ยีน คือ *hemA* และ *hemT* โดยมีรายงานการศึกษาการโคลนยีนและการแสดงออกของยีน *hemA* และ *hemT* เพื่อการผลิต ALA (Neidle and Kaplan, 1993)

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิค (5-aminolevulinic acid; ALA) จากรีคอมบิแนนท์ *E. coli* และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสาร ALA เพื่อเป็นแนวทางในการใช้ประโยชน์และการพัฒนาสารชีวภาพ ALA ในเชิงพาณิชย์ต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

## วิธีดำเนินการ

### อุปกรณ์

1. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
2. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง (Thermal Cycle 9700)
3. เครื่องวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรม ABI Prism 310 Genetic Analyzer
4. เครื่องหมุนเหวี่ยงตกตะกอนความเร็วสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิต่ำได้ (Refrigerated Centrifuge)
5. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
6. ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (incubator shaker)
7. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และ -80 องศาเซลเซียส
8. ชุดถ่ายภาพเจล Gel Documentation (BIORAD)
9. อุปกรณ์ในการสกัดดีเอ็นเอ ได้แก่ โกร่ง หลอดใส่ตัวอย่างขนาดต่างๆ ไมโครปิเปต ขนาด P1,000 P200 P20 และ P2 ไมโครลิตร
10. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

11. สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR)
12. สารเคมีที่ใช้ในการทำ Electrophoresis และ Molecular Weight Marker
13. สารเคมีที่ใช้ในการโคลนยีน T&A Cloninng Kit ® (RBC Bioscience)
14. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากเจล QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)
15. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas)
16. เชื้อแบคทีเรียเซลล์เจ้าบ้าน (Competent Cells) *Escherichia coli* สายพันธุ์ BL21(DE3)
17. Expression Vector : aLICator LIC Cloning and Expression system (Thermo Scientific)
18. สารเคมีสำหรับใช้กับเครื่องวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรม ABI Prism 310
19. ไพรเมอร์สำหรับใช้ในปฏิกิริยา PCR ได้แก่
    - ไพรเมอร์ยีน *hem* A (synthase) : Ex_HemA-F, Ex_HemA-R
    - ไพรเมอร์ aLICator LIC Cloning and Expression system : LIC Forward, LIC Reverse
21. การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปและโปรแกรมบนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต
    - โปรแกรม BLAST จาก http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Blast/
    - โปรแกรม DNAStar software analysis (DNASTAR, Inc, USA)
    - โปรแกรม CromasPro version 1.33 จาก http://www.technelysium.com.au/ChromasPro.html
    - โปรแกรม NEBcutter2 จาก http://tools.neb.com/NEBcutter2/
22. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่างๆ ได้แก่ Nutrient agar (NA), Luria-Bertani (LB), LB-Ampicillin/IPTG/X-Gal

**วิธีการ**

**1. การสร้างรีคอมบิแนนท์ *E. coli* เพื่อการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิก**

**1.1 การสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย *Rhodobacter* sp.**

ทำการสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรีย โดยการเลี้ยงเพิ่มปริมาณเซลล์ของแบคทีเรียในอาหารเหลว Luria-Bertani (LB broth) (เตรียม 1 ลิตร : NaCl 10 กรัม, Tryptone 10 กรัม, Yeast extract 5 กรัม, ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ด้วย dd$H_2O$) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว160 รอบ/นาที นาน 16 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนเซลล์แบคทีเรียใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร ที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เทส่วนใสทิ้ง เก็บส่วนที่เป็นตะกอนเซลล์แบคทีเรีย ล้างตะกอนเซลล์ด้วย TE Buffer 2 ครั้ง เติม SDS ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 40 ไมโครลิตร เติม Proteinase K (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 8 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง ผสมให้เข้ากันทุก 15 นาที เติม 2 เท่า CTAB (บ่ม 65 องศาเซลเซียสก่อนใช้) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ บ่ม 65 องศาเซลเซียสนาน 20 นาที ผสมทุก 5 นาที เติม chloroform : isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ ปั่นหวี่ยง 14,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ที่ 0 องศาเซลเซียส ดูดน้ำใสใส่หลอดใหม่ (ประมาณ 700 ไมโครลิตร) เติม 0.6 เท่า ของ isoproponol และ 0.1 volume ของ 3 M NaOAC ผสมเบาๆ เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปั่น

กรมวิชาการเกษตร

เหวี่ยง 14,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที ทิ้งน้ำใส ล้างตะกอนด้วยเอทานอลร้อยละ 70 ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ 5 นาที ปั่นเหวี่ยง 14,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที ทิ้งน้ำใส ระเหยแอลกอฮอล์ที่ตกค้างในหลอดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ปั่นเหวี่ยงนาน 1 นาที เติม TE + RNase 15 ไมโครลิตร บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ตรวจวัดปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่ได้ โดยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ $OD_{260/280}$ และตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโดยแยกบน 1 เปอร์เซ็นต์ Agarose gel ใน 1XTBE buffer ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 250 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที แช่แผ่นเจลในเอธิเดียมโบรไมด์ (ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) นาน 5 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเครื่อง Gel Documentation บันทึกภาพแถบดีเอ็นเอ และเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

**1.2 การสังเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์ 5-aminolevulinic acid synthase (ALAS)**

ทำการสังเคราะห์ยีน *hem* A ซึ่งเกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์ 5-aminolevulinic acid synthase (ALAS) ในปฏิกิริยาการสังเคราะห์กรดอะมิโนลีวูลินิก โดยอาศัยปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยคู่ไพรเมอร์ Ex_HemA-F และ Ex_HemA-R

Ex_HemA-F 5’ GGT TGG GAA TTG CAA GAC TAC AAT CTG GCA CTC GAT ACC 3’

Ex_HemA-R 5’ GGA GAT GGG AAG TCA TTA GGC AAC GAC CTC GGC GCG ATT C 3’

เตรียมส่วนผสมปฏิกิริยา PCR ต่อ 1 หลอด ดังนี้

| | | |
|---|---|---|
| ดีเอ็นเอ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) | 2 | ไมโครลิตร |
| 10x PCR buffer | 2 | ไมโครลิตร |
| 4mM dNTP | 2 | ไมโครลิตร |
| 50 mM $MgCl_2$ | 0.6 | ไมโครลิตร |
| ไพร์เมอร์ Ex_HemA-F (5 ไมโครโมล) | 1 | ไมโครลิตร |
| ไพร์เมอร์ Ex_HemA-R (5 ไมโครโมล) | 1 | ไมโครลิตร |
| *Taq* DNA polymerase (0.5 ยูนิต/ไมโครลิตร, Immulase) | 0.15 | ไมโครลิตร |
| $dH_2O$ | 11.25 | ไมโครลิตร |
| รวมปฏิกิริยาทั้งหมด | 20 | ไมโครลิตร |

นำส่วนผสมทั้งหมด ผสมตามสัดส่วนข้างบนลงในหลอด PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร จากนั้นนำหลอดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ thermal cycle (Gene Amp 9700) โดยมีอุณหภูมิ เวลา จำนวนรอบ ของการทำ PCR ดังนี้

| | | |
|---|---|---|
| 95 องศาเซลเซียส | 7 นาที | จำนวน 1 รอบ |
| 94 องศาเซลเซียส | 30 วินาที | จำนวน 40 รอบ |
| 60 องศาเซลเซียส | 30 วินาที | |
| 72 องศาเซลเซียส | 2 นาที | |
| 72 องศาเซลเซียส | 5 นาที | |
| 4 องศาเซลเซียส infinity (∞) | | |

ตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR ปริมาตร 3 ไมโครลิตร และ loading dye 1 ไมโครลิตร โดยการแยกบน 1.5 เปอร์เซ็นต์ Agarose gel electrophoresis และเตรียมดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุด QIAquick Gel Extraction Kit

รบิชาการเกษตร

(QIAGEN) โดยนำผลผลิต PCR ที่เหลือ มาแยกใน 1.2 เปอร์เซ็นต์ low melting gel ด้วยวิธี gel electrophoresis แล้วย้อมด้วย Gel Star (Cambrex) หลังจากนั้นตัดแถบดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการประมาณ 2 กิโลเบส บนเครื่อง Dark Reader Transilluminators ใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ชั่งน้ำหนักเจลที่ได้ เติมสารละลาย QG Buffer ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักเจล นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เขย่าแรงๆ ทุก 15 นาที จนเจลละลายหมด (สีของสารละลายควรมีสีเหลือง ถ้ามีสีม่วงให้เติม 3M NaOAC 10 ไมโครลิตร) เติม Isopropanol (แช่เย็น) ปริมาตร 1 เท่าของน้ำหนักเจล ผสมให้เข้ากัน จากนั้นย้ายสารละลายทั้งหมดใส่ใน Binding Column บ่มทิ้งไว้ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทน้ำใสส่วนล่างทิ้ง เติม PE Buffer 750 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทน้ำใสส่วนล่างทิ้ง ย้าย Binding Column วางลงบนหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม EB Buffer (บ่มที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส) 15 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ 15–30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพด้วย 1.5 เปอร์เซ็นต์ Agarose gel electrophoresis จะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 2 กิโลเบส และเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

**1.3 การเชื่อมต่อชิ้นยีนเข้าสู่ protein expression vector และถ่ายฝากเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน**

นำชิ้นส่วนของยีน *hem* A เชื่อมต่อเข้ากับเวคเตอร์พาหะ (aLICator LIC Cloning and Expression system) (ขนาดประมาณ 4,500 คู่เบส) ซึ่งมีตำแหน่งของ T7 promoter ทำหน้าที่ถอดรหัสพันธุกรรมและแปลรหัสของยีนให้เป็นโปรตีน ทำการเชื่อมต่อชิ้นยีนเข้ากับ Expression vector เพื่อให้เกิดการสังเคราะห์ recombinant protein โดยเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาดังนี้

| | | |
|---|---|---|
| ชิ้นดีเอ็นเอของยีน *hem* A (100 นาโนกรัม) | 1 | ไมโครลิตร |
| 5X LIC Buffer | 2 | ไมโครลิตร |
| T4 DNA Polymerase, 1U/ul | 1 | ไมโครลิตร |
| $ddH_2O$ | 6 | ไมโครลิตร |
| ปฏิกิริยาทั้งหมด | 10 | ไมโครลิตร |

ผสมปฏิกิริยาให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยง 3-5 วินาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 0.5 M EDTA ปริมาตร 0.6 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติม LIC Vector (60 นาโนกรัม, 0.02 pmol DNA) ผสมปฏิกิริยาให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยง 3-5 วินาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เตรียมถ่ายฝากเข้าสู่เซลล์ *E. coli* ทันที

**1.4 การถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3)**

ทำการถ่ายฝากพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม (Ligation) จากข้อ 1.3 ที่ได้สู่เซลล์แบคทีเรียเพื่อเพิ่มปริมาณใน competent cell (*E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3)) โดยวิธี heat shock และเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB - Ampicillin/IPTG/X-Gal (อาหาร LB 1 ลิตร : NaCl 10 กรัม, Tryptone 10 กรัม, Yeast extract 5 กรัม,

กรมวิชาการเกษตร

Bacto-Agar 15 กรัม และ dd$H_2O$) ที่มีสารปฏิชีวนะ Ampicillin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เทอาหารลงจานเลี้ยงเชื้อประมาณ 10 - 15 มิลลิลิตร หลังจากอาหารแข็งแล้วเติม 100 mM IPTG 100 ไมโครลิตร และ X-Gal (50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) 20 ไมโครลิตร ลงบนอาหาร แล้วเกลี่ยจนผิวหน้าอาหารแห้ง จากนั้นทำการถ่ายฝากยีนเข้าสู่เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) โดยนำปฏิกิริยา ligation ที่เตรียมไว้ 5 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดคอมพิเทนต์เซลล์ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และแช่บนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที นำไป Heat - shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที นำไปแช่บนน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 15 นาที เติม S.O.C. medium 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้รับการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียแล้วไปเกลี่ยบนอาหาร LB - Ampicillin/IPTG/X-Gal ที่เตรียมไว้ข้างต้น นำบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 14-16 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีสีขาวของเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* ที่มีชิ้น insert ของยีน *hem* A ไปเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติม Ampicillin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที นาน 14 - 16 ชั่วโมง เพื่อนำไปใช้สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอในขั้นตอนต่อไป

**1.5 การตรวจสอบการปรากฏของยีน *hem* A ใน aLICator LIC Cloning and Expression system**

ทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมจากเซลล์รีคอมบิแนนท์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) เก็บตะกอนเซลล์ที่ได้จากข้อ 1.4 โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เพื่อนำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัด GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) ทำการละลายตะกอนเซลล์ด้วย Resuspension Solution 250 ไมโครลิตร เติม Lysis Solution 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลง 4 – 6 ครั้ง เติม Neutralization Solution 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยกลับหลอดขึ้นลง 4 – 6 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นย้ายสารละลายเซลล์ลงใน GeneJET™ spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม Wash Solution 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) ย้าย GeneJET™ spin column วางบนหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Elution Buffer 25 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้นาน 15 – 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพด้วย 1.5 เปอร์เซ็นต์ Agarose gel electrophoresis เก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ทำการตรวจสอบการปรากฏของยีนในเซลล์แบคทีเรียที่ได้รับการถ่ายฝากพลาสมิดสายผสม โดยอาศัยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ LIC Forward 5’ TAATACGACTCACTATAGGG 3’ และ LIC Reverse 5’ GAGCGGATAACAATTTCACACAGG 3’ เตรียมส่วนผสมปฏิกิริยา PCR ดังนี้

| | | |
|---|---|---|
| พลาสมิดดีเอ็นเอ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) | 2 | ไมโครลิตร |
| 10x PCR buffer | 2 | ไมโครลิตร |
| 4mM dNTP | 2 | ไมโครลิตร |
| 50 mM $MgCl_2$ | 0.6 | ไมโครลิตร |
| ไพรเมอร์ LIC Forward (5 ไมโครโมลาร์) | 1 | ไมโครลิตร |

ศูนย์วิทยทรัพยากร

| | | |
|---|---|---|
| ไพรเมอร์ LIC Reverse (5 ไมโครโมลาร์) | 1 | ไมโครลิตร |
| *Taq* DNA polymerase(0.5 ยูนิต/ไมโครลิตร, Immulase) | 0.15 | ไมโครลิตร |
| $ddH_2O$ | 11.25 | ไมโครลิตร |
| รวมปฏิกิริยาทั้งหมด | 20 | ไมโครลิตร |

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำหลอดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ thermal cycle โดยรอบของการทำปฏิกิริยา PCR มีดังนี้

| | | |
|---|---|---|
| 95 องศาเซลเซียส | 7 นาที | จำนวน 1 รอบ |
| 94 องศาเซลเซียส | 30 วินาที | จำนวน 25 รอบ |
| 58 องศาเซลเซียส | 30 วินาที | |
| 72 องศาเซลเซียส | 3 นาที | |
| 72 องศาเซลเซียส | 5 นาที | |
| 4 องศาเซลเซียส infinity (∞) | | |

ตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR ที่ได้ด้วยวิธี Electrophoresis ใน 1.5 เปอร์เซ็นต์ agarose gel นาน 30 นาที ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า 250 โวลต์ นำไปย้อมเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide (ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) จากนั้นนำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation เทียบขนาดของดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker (Fermentas) พร้อมบันทึกภาพ และเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

**1.6 การตรวจสอบความถูกต้องของยีน *hem* A โดยวิธีวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์**

จากการตรวจพบการปรากฏของชิ้นยีน *hem* A (ขนาด~ 1,200 bp) ในพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม แล้วจึงนำมาตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

- การทำปฏิกิริยา cycle sequencing

เตรียมปฏิกิริยา cycle sequencing ในหลอด 0.2 มิลลิลิตร ดังนี้

| | | |
|---|---|---|
| ผลผลิต PCR (ประมาณ 100 นาโนกรัม) | 1 | ไมโครลิตร |
| BigDye™ Terminator Cycle Sequencing V3.1 | 2 | ไมโครลิตร |
| Ready Reaction buffer | 1 | ไมโครลิตร |
| Primer ไพร์เมอร์ M13-F (5 ไมโครโมล) | 1.6 | ไมโครลิตร |
| $dH_2O$ | 4.4 | ไมโครลิตร |
| รวมปริมาตร | 10 | ไมโครลิตร |

นำส่วนผสมทั้งหมด ผสมตามสัดส่วนข้างบนลงในหลอด PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำหลอดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ thermal cycle (Gene Amp 9700) โดยมีรอบการทำ PCR ดังนี้

| | | |
|---|---|---|
| 96 องศาเซลเซียส | 1 นาที | จำนวน 1 รอบ |

ศูนย์วิทยทรัพยากร

| | | |
|---|---|---|
| 96 องศาเซลเซียส | 10 วินาที | จำนวน 25 รอบ |
| 50 องศาเซลเซียส | 5 วินาที | |
| 60 องศาเซลเซียส | 4 นาที | |
| 4 องศาเซลเซียส | infinity (∞) | |

- การล้างสีฟลูออเรสเซนต์ส่วนเกิน

นำปฏิกิริยา cycle sequencing จากข้างต้นมาล้างสีฟลูออเรสเซนต์ส่วนเกิน โดยนำปฏิกิริยาดังกล่าวใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร เติม stock solution A ($dH_2O$ 16 ไมโครลิตร : 95 เปอร์เซ็นต์ Ethanol 64 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที (ผสมโดยกลับหลอดขึ้นลงทุก 5 นาที) นำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เทน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ Ethanol 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลงนาน 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทน้ำใสทิ้งปล่อยตะกอนให้แห้งในที่มืด

- การเตรียมตัวอย่างเข้าเครื่อง ABI PRISM 310® DNA Sequencer

ละลายตะกอนที่ได้ด้วย Hidi formamide จำนวน 10 ไมโครลิตร จากนั้นปั่นให้อยู่ที่ก้นหลอด ดูดสารละลายทั้งหมดใส่หลอด septa นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที แล้วย้ายลงบนน้ำแข็งทันที ตัวอย่างที่ได้นี้ก็พร้อมที่จะเข้าเครื่อง ABI PRISM 310® DNA Sequencer เพื่อวิเคราะห์ลำดับเบสต่อไป

**1.7 การศึกษาการแสดงออกในระดับโปรตีนของรีคอมบิแนนท์ *E. coli***

การกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีน (fusion protein) ในเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ทำโดยเตรียมเชื้อตั้งต้นของเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มี recombinant plasmid ของยีน *hem* A นำมาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว LB-Ampicillin (ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง จากนั้นดูดเซลล์ตั้งต้น 3 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเหลว LB–Ampicillin ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที วัดความขุ่นของอาหาร จนกระทั่ง $OD_{600}$ เท่ากับ 0.5 จากนั้นเปรียบเทียบการชักนำการแสดงออกของยีนด้วย isopropyl-**β**-D-thiogalactopyranoside (IPTG) โดยปรับให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 mM IPTG และเลี้ยงต่อเป็นเวลา 6 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างเซลล์ทุก 1 ชั่วโมง จนครบ 6 ชั่วโมง นำตัวอย่างแต่ละช่วงเวลาไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เพื่อเก็บตะกอนเซลล์ แล้วนำมาละลายด้วย 2x sample buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปมาต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที วิเคราะห์ขนาดของ recombinant protein ด้วย 8 เปอร์เซ็นต์ SDS–PAGE ใน Tris-glycine buffer (0.025 M Tris pH 8.3, 0.192 M Glycine, 0.1 เปอร์เซ็นต์ SDS) โดยให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 120 โวลต์ เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง จากนั้นย้อมสีแผ่นเจลด้วยสารละลาย PageBlue™ Protein Staining Solution (Fermentas) และล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น 4-5 ครั้ง จนมองเห็นแถบโปรตีนชัดเจน บันทึกผลการการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ fusion protein ในแต่ละชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร

**2. การผลิตกรดอะมิโนลีวูลินิค 5-Aminolevulinic acid (ALA)**

**2.1 การศึกษาชนิดของสารตั้งต้นที่มีผลต่อการชักนำการผลิตกรดอะมิโนลีวูลินิค**

เตรียมเชื้อตั้งต้นของเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มี recombinant plasmid ของยีน *hem* A มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว LB-Ampicillin (ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบ/นาที เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง จากนั้นตรวจวัดความขุ่นของเซลล์แขวนลอย ปรับความค่าความขุ่นของเซลล์แขวนลอย $OD_{600}$ เท่ากับ ≤1.0 ใน อาหารเหลว LB–Ampicillin ปริมาตร 250 มิลลิลิตร จากนั้นชักนำการแสดงออกของยีนด้วย isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) โดยปรับให้มีความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 3 mM IPTG และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบ/นาที และเลี้ยงต่อเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพการชักนำการผลิตสาร ALA โดยการเติมสารตั้งต้น ได้แก่ ไกลซีน กรดซัคซินิค และกลูตาเมท ดังนี้ 60 mM Glycine, 30mM Glycine + 10mM Succinic Acid, 10mM L-Glutamic Acid, 30mM L-Glutamic Acid, 10mM Levulenic Acid และ 30mM Levulenic Acid ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบ/นาที และเลี้ยงเซลล์ต่อจนครบ 48 ชั่วโมง

ตรวจวัดปริมาณสาร ALA ที่ผลิตได้จากการชักนำโดยใช้สารตั้งต้นต่ละชนิด โดยการตรวจวัดปริมาณสาร ALA ดังนี้ ปั่นแยกตะกอนเซลล์ ดูดสารละลายส่วนใสปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองใหม่ เติมสารละลาย Sodium acetate buffer ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (pH 4.6) และสารละลาย Acetone ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาที และทำให้เย็นทันทีในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นเติมสารละลาย Ehrlich's reagent ปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที ตรวจวิเคราะห์ปริมาณ ALA ที่ผลิตได้ โดยนำสารละลายดังกล่าวไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 553 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสาร ALA ที่ความเข้มข้น 0-100 uM

**2.2 การศึกษาสภาวะปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดอะมิโนลีวูลินิค (ALA)**

2.2.1 ศึกษาสภาวะอุณหภูมิที่มีผลต่อการสังเคราะห์กรดอะมิโนลีวูลินิค

เตรียมอาหารเหลว LB–Ampicillin ปริมาตร 200 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที รอจนอาหารเย็น เติมเชื้อตั้งต้นของเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มี recombinant plasmid DNA ของยีน *hem* A วัดความขุ่นของเซลล์แขวนลอย ปรับค่าความขุ่นของเซลล์แขวนลอย $OD_{600}$ อยู่ในช่วง 0.7-1.0 ในอาหารเหลว LB–Ampicillin ปริมาตร 200 มิลลิลิตร จากนั้นกระตุ้นการแสดงออกของยีน *hem* A ด้วยสาร isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) ปรับให้มีความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 1 mM IPTG บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 160 รอบ/นาที เลี้ยงต่อจนครบ 6 ชั่วโมง แล้วจึงเติมสารตั้งต้นในการทำปฏิกิริยาด้วย 30mM Glycine และ 10 mM Succinic Acid ทำการทดสอบการผลิตสาร ALA ที่อุณหภูมิ 30 37 และ 45 องศาเซลเซียส อุณหภูมิละ 3 ซ้ำ บ่มต่อจนครบ 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำสารละลาย ALA ที่ผลิตได้ ไปตรวจวิเคราะห์ปริมาณสาร ALA ที่ผลิตได้ ด้วยเครื่อง spectrophotometer

กรมวิทยาศาสตร์

2.2.2 ศึกษาสภาวะความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหารที่มีผลต่อการสังเคราะห์กรดอะมิโนลีวูลินิค

เตรียมอาหารเหลว LB–Ampicillin ปริมาตรขวดละ 200 มิลลิลิตร แล้วจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที รอจนอาหารเย็น เติมเชื้อตั้งต้นของเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มี recombinant plasmid DNAของยีน *hem* A วัดความขุ่นของเซลล์แขวนลอย ปรับค่าความขุ่นของเซลล์แขวนลอย $OD_{600}$ อยู่ในช่วง 0.7-1.0 ในอาหารเหลว LB–Ampicillin ที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เท่ากับ 5 6 และ 7 ฟลาส์กละ 200 มิลลิลิตร ทำ 4 ซ้ำ จากนั้นกระตุ้นการแสดงออกของยีน *hem* A ด้วยสาร isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) ปรับให้มีความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 1 mM IPTG บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 160 รอบ/นาที เลี้ยงต่อจนครบ 6 ชั่วโมง แล้วจึงเติมสารตั้งต้นในการทำปฏิกิริยาด้วย 30mM Glycine และ 10 mM Succinic Acid บ่มต่อจนครบ 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำสารละลาย ALA ที่ผลิตได้ ไปตรวจวิเคราะห์ปริมาณสาร ALA ที่ผลิตได้ ด้วยเครื่อง spectrophotometer ต่อไป

**2.3 การศึกษากระบวนการผลิตกรดอะมิโนลีวูลินิค (ALA) ในระบบถังหมัก**

2.3.1 การทดสอบการผลิตกรดอะมิโนลีวูลินิค (ALA) ในระบบถังหมักขนาดเล็ก (BIOFLO 2000 Fermenter)

ทำการเตรียมเชื้อตั้งต้น (starter) ของเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มี recombinant plasmid ของยีน *hem* A มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว LB-Ampicillin (ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ที่ผ่านการนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบ/นาที เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อตั้งต้น (starter) จากนั้นเตรียมอาหารเหลว LB–Ampicillin ปริมาตร 3,000 มิลลิลิตร ในโถแก้ว (chamber) สำหรับใช้ในการเลี้ยงเซลล์ ปิดระบบทั้งหมด แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที รอจนอาหารเย็น เติมเชื้อตั้งต้น (starter) ของเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มี recombinant plasmid ของยีน *hem* A วัดความขุ่นของเซลล์แขวนลอย ปรับค่าความขุ่นของเซลล์แขวนลอย $OD_{600}$ อยู่ในช่วง 0.7-1.0 ในอาหารเหลว LB–Ampicillin ปริมาตร 3,000 มิลลิลิตร จากนั้นกระตุ้นการแสดงออกของยีน *hem* A ด้วยสาร isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) โดยปรับให้มีความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 1 mM IPTG ตั้งค่าอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวนด้วยความเร็ว 130 รอบ/นาที เลี้ยงต่อจนครบ 6 ชั่วโมง แล้วจึงทำการชักนำการผลิตสาร ALA โดยการเติมสารตั้งต้นปฏิกิริยาด้วย 30mM Glycine และ 10 mM Succinic Acid และเลี้ยงเซลล์ต่อจนครบ 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำสารละลาย ALA ที่ผลิตได้ ไปกรองผ่าน filter membrane ขนาด 0.2 ไมโครเมตร เพื่อแยกเอาตะกอนเซลล์ และโปรตีนของเซลล์แบคทีเรียออก โดยวิธีการกรองด้วยระบบสุญญากาศ ตรวจวิเคราะห์ปริมาณสาร ALA ที่ผลิตได้ ด้วยเครื่อง spectrophotometer ดังนี้ ปั่นแยกตะกอนเซลล์ ดูดสารละลายส่วนใสปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองใหม่ เติมสารละลาย Sodium acetate buffer ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (pH 4.6) และสารละลาย Acetone ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาที และทำให้เย็นทันทีในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นเติมสารละลาย Ehrlich’s reagent ปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที

ศรีปทุมกรุงเทพ

ตรวจวิเคราะห์ปริมาณ ALA ที่ผลิตได้ โดยนำสารละลายดังกล่าวไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 553 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสาร ALA ที่ความเข้มข้น 0-100 uM

2.3.2 การพัฒนากระบวนการผลิตกรดอะมิโนลีวูลินิค (ALA) ในระบบถังหมักขนาด 50 ลิตร

เตรียมอาหารเหลว LB–Ampicillin ปริมาตร 2,000 มิลลิลิตร ในโถแก้ว (chamber) สำหรับใช้ในการเลี้ยงเซลล์ ปิดระบบทั้งหมด แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที รอจนอาหารเย็น เติมเชื้อตั้งต้น (starter) ของเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มี recombinant plasmid ของยีน *hem* A วัดความขุ่นของเซลล์แขวนลอย ปรับค่าความขุ่นของเซลล์แขวนลอย $OD_{600}$ = 0.7-1.0 ในอาหารเหลว LB–Ampicillin ปริมาตร 20 ลิตร จากนั้นกระตุ้นการแสดงออกของยีน *hem* A ด้วยสาร isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) โดยปรับให้มีความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 1 mM IPTG ตั้งค่าอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีอัตราการกวนด้วยความเร็ว 130 รอบ/นาที เลี้ยงต่อจนครบ 6 ชั่วโมง แล้วจึงทำการชักนำการผลิตสาร ALA โดยการเติมสารตั้งต้นปฏิกิริยาด้วย 30mM Glycine และ 10 mM Succinic Acid และเลี้ยงเซลล์ต่อโดยมีการอัดอากาศเป็นระยะ จนครบ 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำสารละลาย ALA ที่ผลิตได้ ไปกรองผ่าน filter membrane ขนาด 0.2 ไมโครเมตร เพื่อแยกเอาตะกอนเซลล์ และโปรตีนของเซลล์แบคทีเรียออก โดยวิธีการกรองด้วยระบบสุญญากาศ ตรวจวิเคราะห์ปริมาณสาร ALA ที่ผลิตได้ ด้วยเครื่อง spectrophotometer

**เวลาและสถานที่**

**ระยะเวลา เริ่มต้น** ตุลาคม 2561 **สิ้นสุด** กันยายน 2563 **รวม 2 ปี**

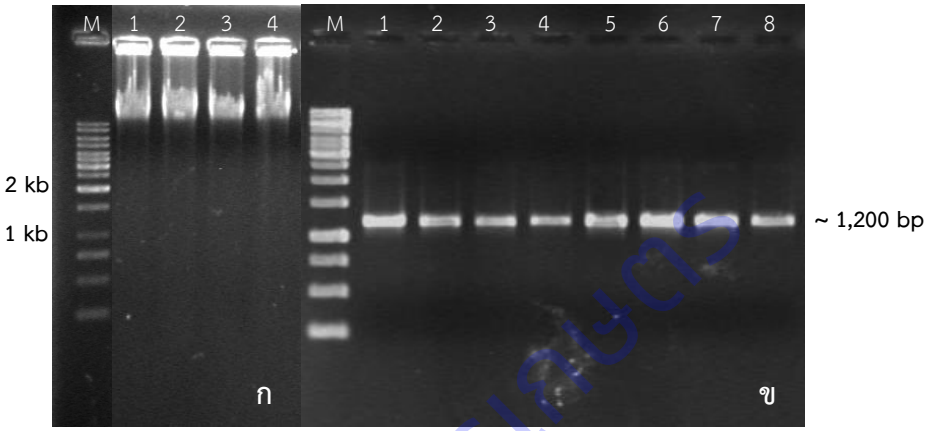
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

กรมวิทยาศาสตร์

## ผลการทดลองและวิจารณ์

### 1. การสร้างรีคอมบิแนนท์ *E. coli* เพื่อการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิก

การสังเคราะห์ยีน *hem* A ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการผลิตเอนไซม์ ALA synthase จาก genomic DNA ของเชื้อ *Rhodobacter* sp. ด้วยวิธี PCR Amplification โดยนำไพรเมอร์ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะกับยีน *hem* A มาทดสอบกับกรดนิวคลีอิกของเชื้อแบคทีเรียโดยใช้เทคนิค PCR ได้ชิ้นส่วนของยีน *hem* A ที่มีขนาดประมาณ 1,200 bp ดังภาพที่ 1




**ภาพที่ 1** แสดง genomic DNA ของเชื้อแบคทีเรีย *Rhodobacter* sp. (ก) และ ผลผลิต PCR ของยีน *hem* A ซึ่งมีขนาดประมาณ 1,200 bp (ข)

จากนั้นทำการโคลนชิ้นยีน *hem* A และเชื่อมต่อเข้าสู่เวคเตอร์พาหะ Protein Expression Vector (aLICator LIC Cloning and Expression system) ซึ่งมีแผนที่แสดงตำแหน่งของยีน *hem* A ดังภาพที่ 2 โดยออกแบบไพรเมอร์ที่มีตำแหน่งของปลาย 5’ ที่สามารถเชื่อมต่อกับส่วนของเวคเตอร์ ดังนี้

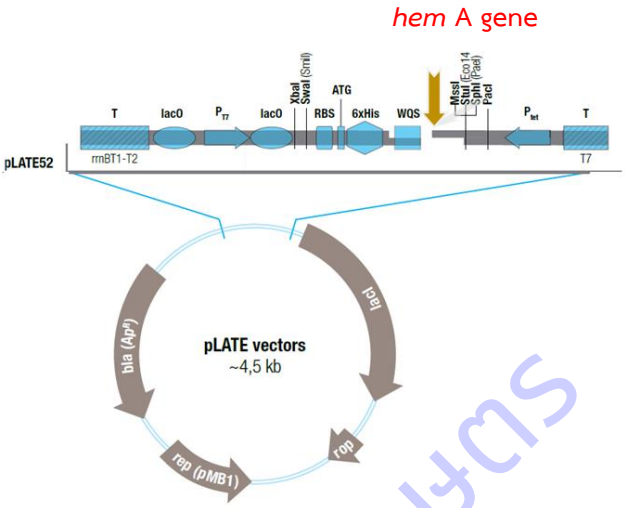
Ex_HemA-F 5’ GGT TGG GAA TTG CAA GAC TAC AAT CTG GCA CTC GAT ACC 3’

Ex_HemA-R 5’ GGA GAT GGG AAG TCA TTA GGC AAC GAC CTC GGC GCG ATT C 3’

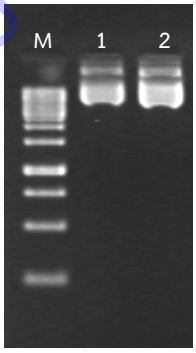
แล้วจึงถ่ายฝากพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมของยีน *hem* A เข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) เพื่อการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน ได้พลาสมิดดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 5.7 กิโลเบส และถ่ายชิ้นส่วนของยีนเข้าสู่เซลล์ *E. coli* (DH5$\alpha$) คัดเลือกโคลนที่มีชิ้นยีน และเลี้ยงเพิ่มปริมาณเซลล์ในอาหารเหลว LB ที่มีสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 ug/ml เพื่อทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอได้ ดังภาพที่ 3 ตรวจสอบการปรากฏของชิ้นยีนด้วยเทคนิค PCR พบว่าเมื่อนำผลผลิต PCR มาแยกบน 1.5 เปอร์เซ็นต์ agarose gel electrophoresis ย้อมเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide (ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จากนั้นนำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV Transiluminators เปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker (Fermentas) สามารถตรวจพบชิ้นยีนที่มีขนาดประมาณ 1,200 bp ดังภาพที่ 4 และเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์ของยีน *hem* A ที่โคลนได้ ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบว่า มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ ส่วนของ 5-aminolevulic acid synthase isozyme (*hem*A) gene ของเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* (Accession

ศูนย์วิทยทรัพยากร

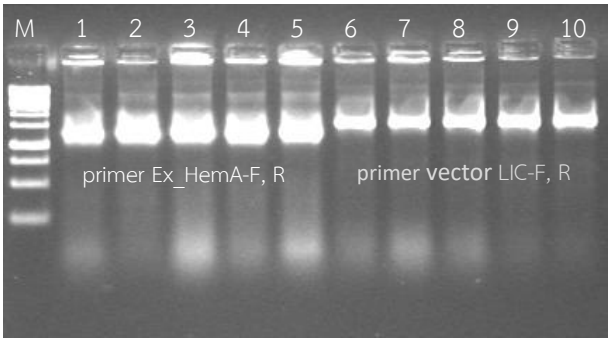
no. L07490.1) ที่ identity 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีขนาด 1,224 bp ดังภาพที่ 5 และเมื่อแปรรหัสเป็นลำดับของกรดอะมิโน พบว่า มีความคล้ายคลึงกับ 5-aminolevulinate synthase ของ *R. sphaeroides* (Accession no. WP_011337894.1 ที่ identity 100 เปอร์เซ็นต์ ดังภาพที่ 6




**ภาพที่ 2** แผนที่ตำแหน่งของยีน *hem* A ที่สอดแทรกอยู่ภายใน Expression Vector (aLICator LIC Cloning and Expression system)




**ภาพที่ 3** แสดงพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมของ expression vector ที่มียีน *hem* A Lane M; DNA Marker 1 kb, Lane 1-2; พลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมที่มียีน *hem* A ซึ่งได้รับการถ่ายฝากเข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3)




กรมวิชาการเกษตร

**ภาพที่ 4** การตรวจสอบการปรากฏของยีน *hem* A ในพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม โดยใช้เทคนิค PCR Lane M; DNA Marker 1 kb, Lane 1-5; ผลผลิต PCR จากไพรเมอร์ยีน Ex_HemA-F, Ex_HemA-R, Lane 6-10; ผลผลิต PCR จากไพรเมอร์เวคเตอร์ (LIC Forward, LIC Revers

Rhodobacter sphaeroides 5-aminolevulic acid synthase isozyme (hemA) gene, complete cds, and ORFA
Sequence ID: L07490.1Length: 3681Number of Matches: 1
Range 1: 1947 to 3170GenBankGraphics Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|---|---|---|---|---|
| 2261 bits(1224) | 0.0 | 1224/1224(100%) | 0/1224(0%) | Plus/Plus |

```
Query  1     ATGGACTACAATCTGGCACTCGATACCGCTCTGAACCGGCTCCATACCGAGGGCCGGTAC  60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1947  ATGGACTACAATCTGGCACTCGATACCGCTCTGAACCGGCTCCATACCGAGGGCCGGTAC  2006

Query  61    CGGACCTTCATCGACATCGAGCGGCGCAAGGGTGCCTTCCCGAAAGCCATGTGGCGCAAG  120
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2007  CGGACCTTCATCGACATCGAGCGGCGCAAGGGTGCCTTCCCGAAAGCCATGTGGCGCAAG  2066

Query  121   CCCGACGGGAGCGAGAAGGAAATCACCGTCTGGTGCGGCAACGACTATCTCGGCATGGGC  180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2067  CCCGACGGGAGCGAGAAGGAAATCACCGTCTGGTGCGGCAACGACTATCTCGGCATGGGC  2126

Query  181   CAGCATCCGGTGGTGCTGGGGGCCATGCACGAGGCGCTGGATTCGACCGGCGCCGGGTCG  240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2127  CAGCATCCGGTGGTGCTGGGGGCCATGCACGAGGCGCTGGATTCGACCGGCGCCGGGTCG  2186

Query  241   GGCGGCACGCGCAACATCTCGGGCACCACGCTCTATCACAAGCGCCTCGAGGCCGAGCTC  300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2187  GGCGGCACGCGCAACATCTCGGGCACCACGCTCTATCACAAGCGCCTCGAGGCCGAGCTC  2246

Query  301   GCCGACCTGCACGGCAAGGAAGCGGCGCTGGTCTTCTCGTCGGCCTATATCGCCAACGAC  360
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2247  GCCGACCTGCACGGCAAGGAAGCGGCGCTGGTCTTCTCGTCGGCCTATATCGCCAACGAC  2306

Query  361   GCGACCCTCTCGACGCTGCCGCAGCTGATCCCGGGCCTCGTCATCGTCTCGGACAAGTTG  420
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2307  GCGACCCTCTCGACGCTGCCGCAGCTGATCCCGGGCCTCGTCATCGTCTCGGACAAGTTG  2366

Query  421   AACCACGCTTCGATGATCGAGGGCATCCGCCGCTCGGGCACCGAGAAGCACATCTTCAAG  480
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2367  AACCACGCTTCGATGATCGAGGGCATCCGCCGCTCGGGCACCGAGAAGCACATCTTCAAG  2426

Query  481   CACAATGACCTCGACGACCTGCGCCGGATCCTGACCTCGATCGGCAAGGACCGTCCGATC  540
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2427  CACAATGACCTCGACGACCTGCGCCGGATCCTGACCTCGATCGGCAAGGACCGTCCGATC  2486

Query  541   CTCGTGGCCTTCGAATCCGTCTATTCGATGGATGGCGACTTCGGCCGCATCGAGGAGATC  600
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2487  CTCGTGGCCTTCGAATCCGTCTATTCGATGGATGGCGACTTCGGCCGCATCGAGGAGATC  2546

Query  601   TGCGACATCGCCGACGAGTTCGGCGCGCTGAAATACATCGACGAGGTCCATGCCGTCGGC  660
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2547  TGCGACATCGCCGACGAGTTCGGCGCGCTGAAATACATCGACGAGGTCCATGCCGTCGGC  2606

Query  661   ATGTACGGCCCCCGCGGCGGCGGCGTGGCCGAGCGGGACGGGCTGATGGACCGGATCGAC  720
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2607  ATGTACGGCCCCCGCGGCGGCGGCGTGGCCGAGCGGGACGGGCTGATGGACCGGATCGAC  2666

Query  721   ATCATCAACGGGACGCTGGGCAAGGCCTATGGCGTGTTCGGCGGCTATATCGCGGCCTCG  780
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2667  ATCATCAACGGGACGCTGGGCAAGGCCTATGGCGTGTTCGGCGGCTATATCGCGGCCTCG  2726

Query  781   TCAAAGATGTGCGACGCGGTGCGCTCCTACGCGCCGGGCTTCATCTTCTCGACCTCGCTG  840
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2727  TCAAAGATGTGCGACGCGGTGCGCTCCTACGCGCCGGGCTTCATCTTCTCGACCTCGCTG  2786

Query  841   CCGCCCGTCGTGGCGGCCGGTGCGGCGGCCTCGGTGCGCCACCTCAAGGGCGATGTGGAG  900
```

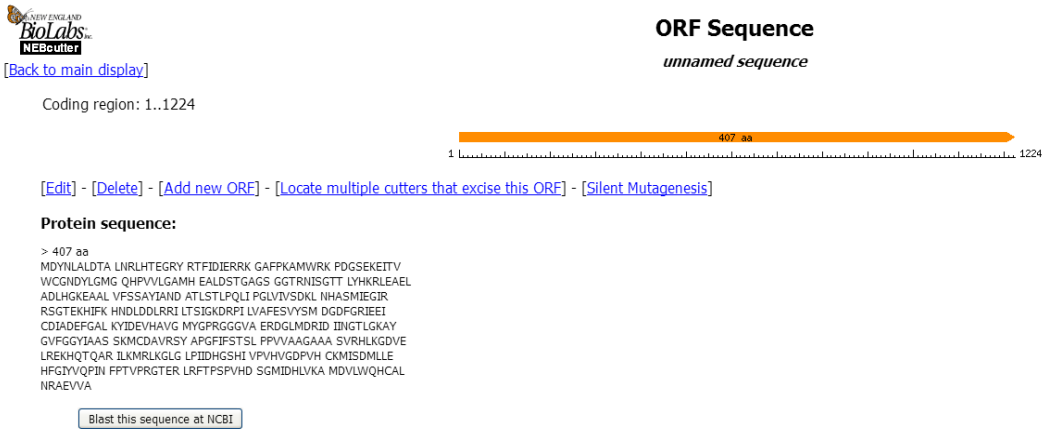
```
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2787  CCGCCCGTCGTGGCGGCCGGTGCGGCGGCCTCGGTGCGCCACCTCAAGGGCGATGTGGAG  2846
```

**ภาพที่ 5** ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบว่ามีความคล้ายคลึงกับส่วนของ 5-aminolevulic acid synthase isozyme (*hem*A) gene ของเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* (Accession no. L07490.1) ที่ identity 100 เปอร์เซ็นต์

```
Query  901   CTGCGCGAGAAGCACCAGACCCAGGCCCGCATCCTGAAGATGCGCCTCAAGGGGCTCGGC  960
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2847  CTGCGCGAGAAGCACCAGACCCAGGCCCGCATCCTGAAGATGCGCCTCAAGGGGCTCGGC  2906

Query  961   CTGCCGATCATCGACCACGGCTCGCACATCGTGCCGGTCCATGTGGGCGACCCCGTGCAC  1020
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2907  CTGCCGATCATCGACCACGGCTCGCACATCGTGCCGGTCCATGTGGGCGACCCCGTGCAC  2966

Query  1021  TGCAAGATGATCTCGGACATGCTGCTCGAGCATTTCGGCATCTATGTCCAGCCGATCAAC  1080
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2967  TGCAAGATGATCTCGGACATGCTGCTCGAGCATTTCGGCATCTATGTCCAGCCGATCAAC  3026

Query  1081  TTCCCGACCGTGCCGCGCGGGACCGAGCGGCTGCGCTTCACCCCGTCGCCCGTGCATGAT  1140
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  3027  TTCCCGACCGTGCCGCGCGGGACCGAGCGGCTGCGCTTCACCCCGTCGCCCGTGCATGAT  3086

Query  1141  TCCGGCATGATCGATCACCTCGTGAAGGCCATGGACGTGCTCTGGCAGCACTGTGCGCTG  1200
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  3087  TCCGGCATGATCGATCACCTCGTGAAGGCCATGGACGTGCTCTGGCAGCACTGTGCGCTG  3146

Query  1201  AATCGCGCCGAGGTCGTTGCCTGA  1224
              ||||||||||||||||||||||||
Sbjct  3147  AATCGCGCCGAGGTCGTTGCCTGA  3170
```

**ภาพที่ 5 (ต่อ)** ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบว่ามีความคล้ายคลึงกับส่วนของ 5-aminolevulic acid synthase isozyme (*hem*A) gene ของเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* (Accession no. L07490.1) ที่ identity 100 เปอร์เซ็นต์

กรมวิชาการเกษตร



[Back to main display]

## ORF Sequence

*unnamed sequence*

Coding region: 1..1224

407 aa

1 1224

[Edit] - [Delete] - [Add new ORF] - [Locate multiple cutters that excise this ORF] - [Silent Mutagenesis]

**Protein sequence:**

> 407 aa
MDYNLALDTA LNRLHTEGRY RTFIDIERRK GAFPKAMWRK PDGSEKEITV
WCGNDYLGMG QHPVVLGAMH EALDSTGAGS GGTRNISGTT LYHKRLEAEL
ADLHGKEAAL VFSSAYIAND ATLSTLPQLI PGLVIVSDKL NHASMIEGIR
RSGTEKHIFK HNDLDDLRRI LTSIGKDRPI LVAFESVYSM DGDFGRIEEI
CDIADEFGAL KYIDEVHAVG MYGPRGGGVA ERDGLMDRID IINGTLGKAY
GVFGGYIAAS SKMCDAVRSY APGFIFSTSL PPVVAAGAAA SVRHLKGDVE
LREKHQTQAR ILKMRLKGLG LPIIDHGSHI VPVHVGDPVH CKMISDMLLE
HFGIYVQPIN FPTVPRGTER LRFTPSPVHD SGMIDHLVKA MDVLWQHCAL
NRAEVVA

Blast this sequence at NCBI

5-aminolevulinate synthase [Rhodobacter sphaeroides]
Sequence ID: WP_011337894.1Length: 407Number of Matches: 1
Related Information
Gene-associated gene details
Identical Proteins-Identical proteins to WP_011337894.1
Range 1: 1 to 407GenPeptGraphics Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

| Score | Expect | Identities | Positives | Gaps |
|---|---|---|---|---|
| 805 bits(2078) | 0.0 | 407/407(100%) | 407/407(100%) | 0/407(0%) |

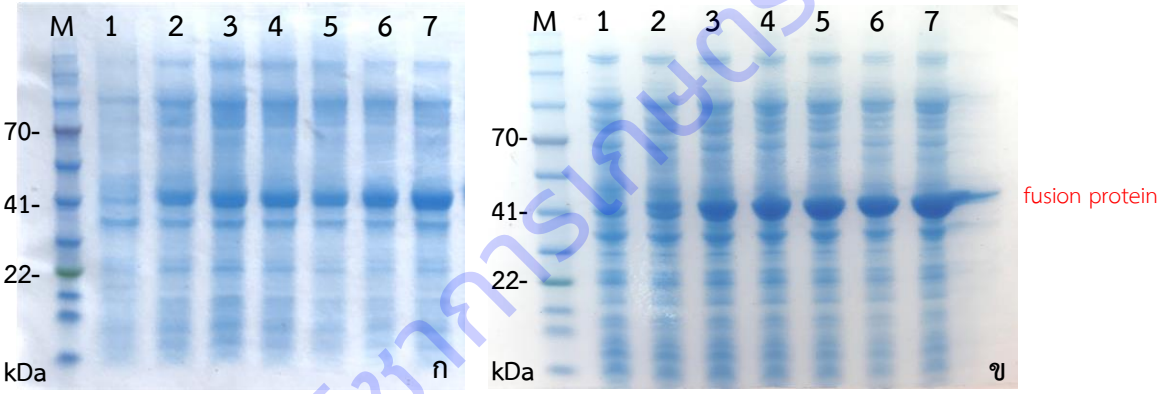
```
Query  1    MDYNLALDTALNRLHTEGRYRTFIDIERRKGAFPKAMWRKPDGSEKEITVWCGNDYLGMG  60
            MDYNLALDTALNRLHTEGRYRTFIDIERRKGAFPKAMWRKPDGSEKEITVWCGNDYLGMG
Sbjct  1    MDYNLALDTALNRLHTEGRYRTFIDIERRKGAFPKAMWRKPDGSEKEITVWCGNDYLGMG  60

Query  61   QHPVVLGAMHEALDSTGAGSGGTRNISGTTLYHKRLEAELADLHGKEAALVFSSAYIAND  120
            QHPVVLGAMHEALDSTGAGSGGTRNISGTTLYHKRLEAELADLHGKEAALVFSSAYIAND
Sbjct  61   QHPVVLGAMHEALDSTGAGSGGTRNISGTTLYHKRLEAELADLHGKEAALVFSSAYIAND  120

Query  121  ATLSTLPQLIPGLVIVSDKLNHASMIEGIRRSGTEKHIFKHNDLDDLRRILTSIGKDRPI  180
            ATLSTLPQLIPGLVIVSDKLNHASMIEGIRRSGTEKHIFKHNDLDDLRRILTSIGKDRPI
Sbjct  121  ATLSTLPQLIPGLVIVSDKLNHASMIEGIRRSGTEKHIFKHNDLDDLRRILTSIGKDRPI  180

Query  181  LVAFESVYSMDGDFGRIEEICDIADEFGALKYIDEVHAVGMYGPRGGGVAERDGLMDRID  240
            LVAFESVYSMDGDFGRIEEICDIADEFGALKYIDEVHAVGMYGPRGGGVAERDGLMDRID
Sbjct  181  LVAFESVYSMDGDFGRIEEICDIADEFGALKYIDEVHAVGMYGPRGGGVAERDGLMDRID  240

Query  241  IINGTLGKAYGVFGGYIAASSKMCDAVRSYAPGFIFSTSLPPvvaagaaasvRHLKGDVE  300
            IINGTLGKAYGVFGGYIAASSKMCDAVRSYAPGFIFSTSLPPVVAAGAAASVRHLKGDVE
Sbjct  241  IINGTLGKAYGVFGGYIAASSKMCDAVRSYAPGFIFSTSLPPVVAAGAAASVRHLKGDVE  300

Query  301  LREKHQTQARILKMRLKGLGLPIIDHGSHIVPVHVGDPVHCKMISDMLLEHFGIYVQPIN  360
            LREKHQTQARILKMRLKGLGLPIIDHGSHIVPVHVGDPVHCKMISDMLLEHFGIYVQPIN
Sbjct  301  LREKHQTQARILKMRLKGLGLPIIDHGSHIVPVHVGDPVHCKMISDMLLEHFGIYVQPIN  360

Query  361  FPTVPRGTERLRFTPSPVHDSGMIDHLVKAMDVLWQHCALNRAEVVA  407
            FPTVPRGTERLRFTPSPVHDSGMIDHLVKAMDVLWQHCALNRAEVVA
Sbjct  361  FPTVPRGTERLRFTPSPVHDSGMIDHLVKAMDVLWQHCALNRAEVVA  407
```

Submitted

**ภาพที่ 6** การเปรียบเทียบลำดับของอะมิโนแอซิดของยีน *hem*A ที่ได้จากการโคลนเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีน NCBI ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับ 5-aminolevulinate synthase ของ *Rhodobacter sphaeroides* (Accession No. WP_011337894.1) ที่ identity 100 เปอร์เซ็นต์

**การศึกษาการแสดงออกในระดับโปรตีนของรีคอมบิแนนท์ *E. coli***

การถ่ายฝากพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมของยีน *hem* A เข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) เพื่อการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน เปรียบเทียบการชักนำการแสดงออกของยีนด้วยสาร IPTG ที่ความเข้มข้น 1 mM และ 3 mM เป็นเวลานาน 6 ชั่วโมง เก็บเซลล์ทุก 1 ชั่วโมง เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE พบการแสดงออกของโปรตีนสูงสุดในชั่วโมงที่ 6 โดยรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ ALA synthase ที่ได้มีขนาดประมาณ 45 กิโลดาลตัน ดังภาพที่ 7




**ภาพที่ 7** การแสดงออกของโปรตีน fusion protein (ลูกศรชี้) ที่ได้รับการชักนำการแสดงออกของยีน *hem* A โดย 3mM IPTG (ก) และ 1 mM IPTG (ข) Lane M; protein marker Lane 1-8; recombinant *E. coli* BL21 (DE3) ที่ได้รับการกระตุ้นนาน 0, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 ชั่วโมง ตามลำดับ

กรมวิชาการเกษตร

**2. การผลิตกรดอะมิโนลีวูลินิค 5-Aminolevulinic acid (ALA)**

**2.1 การศึกษาชนิดของสารตั้งต้นที่มีผลต่อการชักนำการผลิตกรดอะมิโนลีวูลินิค**

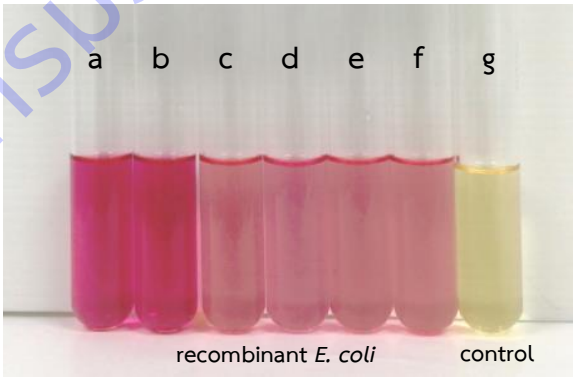
การทดสอบการชักนำการผลิตสาร ALA จากการชักนำการทำงานของยีน *hem* A ด้วย 1 mM IPTG ทำให้มีกิจกรรมของเอนไซม์ ALA synthase โดยใช้เซลล์ตั้งต้น $OD_{600}$ = 0.5 เมื่อเวลาผ่านไปนาน 6 ชั่วโมง เติมสารตั้งต้นชนิดต่างๆ ได้แก่ 60mM Glycine, 30mM Glycine +10mM Succinic Acid, 10 mM L-Glutamic Acid, 10 mM Levulenic Acid, 30 mM Levulenic Acid ทำการชักนำการผลิตสาร ALA โดยการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบ/นาที และเลี้ยงเซลล์ต่อจนครบ 24 ชั่วโมง ทำการตรวจวัดปริมาณสาร ALA ที่ผลิตได้ โดยการทำปฏิกิริยากับสารละลาย Ehrlich's reagent เมื่อนำสารละลายดังกล่าวไปวัดค่าการ

ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 553 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสาร ALA ที่ความเข้มข้น 0-100 uM พบว่า 30mM Glycine + 10 mM Succinic Acid สามารถจากการชักนำการผลิตสาร ALA ได้ดีที่สุด โดยวัดปริมาณสาร ALA ได้เท่ากับ 249.970 uM รองลงมา ได้แก่ การเติมสาร 60mM Glycine, 30 mM Levulenic Acid, 10 mM L-Glutamic Acid และ 10 mM Levulenic Acid โดยวัดปริมาณสาร ALA ได้ 204.937, 75.519, 47.996 และ 46.016 uM ตามลำดับ ดังตารางที่ 1 ภาพที่ 8

**ตารางที่ 1** แสดงผลการเปรียบเทียบปริมาณการสังเคราะห์กรดอะมิโนลีวูลินิค (ALA) ที่ผลิตได้โดยสารตั้งต้นชนิดต่างๆ ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง

| **สารตั้งต้น** | **ปริมาณสาร ALA (uM)** |
|---|---|
| LB+Amp+3 mM IPTG + 60 mM Glycine | 204.937 |
| LB+Amp+3 mM IPTG + 30 mM Glycine + 10 mM Succinic Acid | 249.970 |
| LB+Amp+3 mM IPTG + 10 mM L-Glutamic Acid | 47.996 |
| LB+Amp+3 mM IPTG + 10 mM Levulenic Acid | 46.016 |
| LB+Amp+3 mM IPTG + 30 mM Levulenic Acid | 75.519 |
| LB+Amp+3 mM IPTG | 44.994 |

กรมวิชาการเกษตร




**ภาพที่ 8** การผลิตสาร aminolevulinic acid (ALA) จาก recombinant *E. coli* ที่ได้เลี้ยงในอาหาร LB + ampicillin 100 mg/L +3mM IPTG และเติมสารตั้งต้นแต่ละชนิด ดังนี้ 30mM Glycine + 10 mM Succinic Acid (a), 60mM Glycine (b), 30 mM Levulenic Acid (c), 10 mM L-Glutamic Acid (d), 10 mM Levulenic Acid (e), LB+ ampicillin 100 mg/L +3mM IPTG (f), และ LB+ ampicillin 100 mg/L (g)

**2.2 การศึกษาสภาวะปัจจัยที่มีผลต่อการสังเคราะห์กรดอะมิโนลีวูลินิค**

2.2.1 การศึกษาผลของสภาวะอุณหภูมิที่มีผลต่อการสังเคราะห์กรดอะมิโนลีวูลินิค

จากการศึกษาอุณหภูมิที่มีผลต่อการผลิตสาร ALA ของ recombinant *E. coli* โดยการเปรียบเทียบอุณหภูมิ 3 ช่วง ได้แก่ 30 37 และ 45 องศาเซลเซียส พบว่า อุณหภูมิที่มีผลให้สามารถผลิตสาร ALA ได้ในปริมาณสูงที่สุด คือ 30 รองลงมาคือ 37 และ 45 องศาเซลเซียส โดยให้ค่าเฉลี่ยการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนลีวูลินิค เท่ากับ 354.254 351.288 และ 217.175 uM ตามลำดับ ดังตารางที่ 2

2.2.2 การศึกษาผลของสภาวะค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหารที่มีผลต่อการสังเคราะห์กรดอะมิโนลีวูลินิค

จากการศึกษาผลค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหารที่มีผลต่อการผลิตสาร ALA ของ recombinant *E. coli* โดยการเปรียบเทียบระดับความเป็นกรด-ด่าง ของอาหาร LB ในช่วง 5 6 และ 7 พบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่าง ของอาหาร LB มีผลต่อปริมาณการผลิตกรดอะมิโนลีวูลินิค โดยพบว่า ที่ระดับความเป็นกรด-ด่างของอาหาร LB เท่ากับ 7 จะให้ค่าเฉลี่ยปริมาณกรดอะมิโนลีวูลินิค สูงที่สุด เท่ากับ 364.29 uM รองลงมา คือ pH 6 และ 5 โดยให้ค่าการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนลีวูลินิค เท่ากับ 331.34 และ 231.85 uM ตามลำดับ ดังตารางที่ 2

**ตารางที่ 2** แสดงผลของสภาวะอุณหภูมิและความเป้นกรด-ด่าง (pH) ที่มีผลต่อการสังเคราะห์กรดอะมิโนลีวูลินิค (ALA)

| สภาวะปัจจัย / ปริมาณสาร ALA (uM) | อุณหภูมิ (°C) | | | pH | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 30 | 37 | 45 | 5 | 6 | 7 |
| รีคอมบิแนนท์ *E. coli* | 354.254 | 351.288 | 217.175 | 231.85 | 331.34 | 364.29 |

กรมวิชาการเกษตร

**2.3 การศึกษากระบวนการผลิตกรดอะมิโนลีวูลินิคในระบบถังหมัก**

2.3.1 การทดสอบการผลิตกรดอะมิโนลีวูลินิค (ALA) ในระบบถังหมักขนาดเล็ก

จากการทดสอบการขยายขนาดการผลิตสาร ALA โดยการนำเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่ได้รับการถ่ายฝากพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมของยีน *hem* A มาทำการเพาะเลี้ยงในระบบถังหมักขนาดเล็ก (BIOFLO 2000 Fermenter) ดังภาพที่ 9 โดยใช้อาหารเหลว LB -Ampicillin (ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 3,000 มิลลิลิตร เมื่อกระตุ้นการทำงานของยีนด้วยสาร 1 mM IPTG และมีการอัดอากาศเป็นระยะ นาน 6 ชั่วโมง จึงทำการชักนำการผลิตสาร ALA ด้วยสารตั้งต้นปฏิกิริยา 30mM Glycine และ 10 mM Succinic Acid นำไปเลี้ยงเพิ่มปริมาณเซลล์ในสภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยมีอัตราการกวนด้วยความเร็ว 130 รอบ/นาที จนครบเวลานาน 24 ชั่วโมง (ตั้งแต่เติมสาร IPTG) แล้วจึงนำสารละลาย ALA ที่ผลิตได้ไปกรองผ่าน filter membrane ขนาด 0.2 ไมโครเมตร ดังภาพที่ 10 เมื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณสาร ALA พบว่า

การผลิตในระบบถังหมักขนาดเล็กข้างต้น สามารถเพิ่มปริมาณการผลิตสาร ALA ได้ในปริมาณที่มากขึ้นเท่ากับ 489.073 µM ซึ่งจะเป็นแนวทางในพัฒนาและศึกษาสภาวะปัจจัยที่เหมาะสมในการผลิตสาร ALA ต่อไป

**ภาพที่ 9** การผลิตกรดอะมิโนลีวูลินิค (ALA) ในระบบถังหมักขนาดเล็ก (BIOFLO 2000 Fermenter)

**ภาพที่ 10** การแยกตะกอนเซลล์และโปรตีนของเซลล์แบคทีเรียออกโดยวิธีการกรองด้วยระบบสุญญากาศผ่าน filter membrane ขนาด 0.2 ไมโครเมตร

2.3.2 การทดสอบการผลิตกรดอะมิโนลีวูลินิคในระบบถังหมักขนาด 50 ลิตร

การพัฒนากระบวนการผลิตกรดอะมิโนลีวูลินิค (ALA) จากการทดสอบเลี้ยงเพิ่มปริมาณเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มี recombinant plasmid ของยีน *hem* A ในอาหารเหลว LB -Ampicillin (ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 20 ลิตร และกระตุ้นการแสดงออกของยีน *hem* A ด้วยสาร 1 mM IPTG และมีอัตราการกวนด้วยความเร็วประมาณ 80 รอบ/นาที เมื่อครบ 6 ชั่วโมง จึงทำการเติมสารตั้งต้น

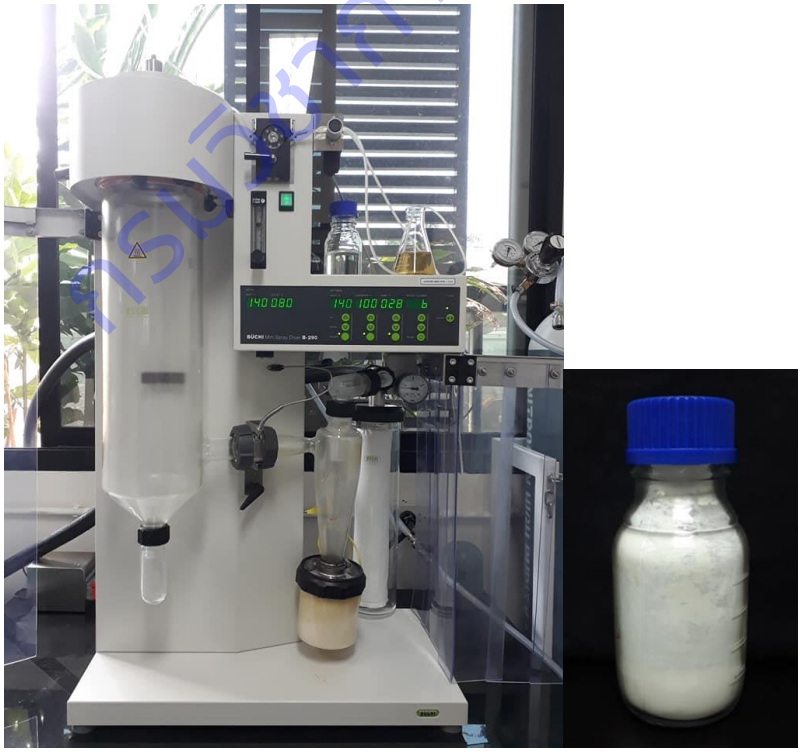
กรมวิทยาศาสตร์

ปฏิกิริยาการผลิตสาร ALA โดยการเติมสาร 30mM Glycine และ 10 mM Succinic Acid และเลี้ยงเซลล์ต่อจนครบ 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำสารละลาย ALA ที่ผลิตได้ ไปกรองผ่าน filter membrane ขนาด 0.2 ไมโครเมตร เพื่อแยกเอาตะกอนเซลล์ และโปรตีนของเซลล์แบคทีเรียออก โดยวิธีการกรองด้วยระบบสุญญากาศ เมื่อตรวจวิเคราะห์ปริมาณสาร ALA ด้วยเครื่อง spectrophotometer พบว่า สามารถผลิต ALA ได้ในปริมาณสูงถึง 615.928 uM อย่างไรก็ตามเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาและเพื่อให้สารที่ผลิตได้มีความเข้มข้นมากยิ่งขึ้น งานวิจัยนี้จึงได้เตรียมกรดอะมิโนลีวูลินิคให้อยู่ในรูปแบบผงแห้ง โดยใช้เทคนิคการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze drying) และ spray dry ดังภาพที่ 12 และ 13

**ภาพที่ 11** การผลิตกรดอะมิโนลีวูลินิค (ALA) ในระบบถังหมักขนาด 50 ลิตร

กรมวิชาการเกษตร

**ภาพที่ 12** กรดอะมิโนลีวูลินิค (ALA) ที่ผ่านการทำให้อยู่ในสภาพผงแห้ง โดยใช้เทคนิคการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze drying)



**ภาพที่ 13** กรดอะมิโนลีวูลินิค (ALA) ที่ผ่านการทำให้อยู่ในสภาพผงแห้ง โดยใช้เทคนิค spray dry

สำนักวิทยบริการเกษตร

## สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกจากรีคอมบิแนนท์ *E. coli* โดยการสร้างรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอซึ่งมียีน *hem* A ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการผลิตเอนไซม์ 5-aminolevulinic acid synthase (ALAS) ซึ่งสังเคราะห์ได้จาก genomic DNA ของเชื้อ *Rhodobacter* sp. แล้วเชื่อมต่อเข้าสู่เวคเตอร์พาหะ Protein Expression Vector (aLICator LIC Cloning and Expression system) ซึ่งมีตำแหน่งจดจำที่มีความจำเพาะกับยีน แล้วถ่ายฝากพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) เพื่อใช้ในขั้นตอนการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน ซึ่งมีขนาดประมาณ 40 กิโลดาลตัน และการสังเคราะห์กรด 5-อะมิโนลีวูลินิก

การพัฒนาการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิก (ALA) จากการทดสอบชักนำการทำงานของยีน *hem* A ด้วย IPTG ที่ความเข้มข้น 1 mM และ 3 mM ทำให้สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ALA synthase และเมื่อเติมสารตั้งต้น 30 mM Glycine + 10 mM Succinic Acid และเลี้ยงเซลล์ต่อจนครบ 24 ชั่วโมง พบว่า สามารถชักนำการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิก ได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับการเติมสาร 60mM Glycine, 30 mM Levulenic Acid, 10 mM L-Glutamic Acid และ 10 mM Levulenic Acid

การศึกษาสภาวะปัจจัยที่มีผลต่อการสังเคราะห์กรด 5-อะมิโนลีวูลินิก พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมในการการผลิตสาร ALA ของ recombinant *E. coli* ได้ดีที่สุดในช่วงระหว่าง 30-37 องศาเซลเซียส และสภาวะค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหารที่เหมาะสมที่สุด คือ pH 6-7 มีผลต่อการสังเคราะห์กรดอะมิโนลีวูลินิค

การผลิตกรดอะมิโนลีวูลินิค (ALA) ในระบบถังหมัก (BIOFLO 2000 Fermenter) และถังหมักขนาด 50 ลิตร เมื่อกระตุ้นการทำงานของยีนด้วยสาร 1 mM IPTG นาน 6 ชั่วโมง แล้วจึงทำการชักนำการผลิตสาร ALA ด้วยสารตั้งต้นปฏิกิริยา 30mM Glycine และ 10 mM Succinic Acid เลี้ยงเพิ่มปริมาณเซลล์ โดยมีอัตราการกวนด้วยความเร็ว 130 รอบ/นาที และมีการอัดอากาศเป็นระยะ จนครบเวลานาน 24 ชั่วโมง (ตั้งแต่เติมสาร IPTG) แล้วจึงนำสารละลาย ALA ที่ผลิตได้ไปกรองผ่าน filter membrane ขนาด 0.2 ไมโครเมตร เมื่อวิเคราะห์ปริมาณสาร ALA พบว่า การผลิตในระบบถังหมัก สามารถเพิ่มปริมาณการผลิตสาร ALA ได้ในปริมาณสูงถึง 615.928 uM อย่างไรก็ตามเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาและเพื่อให้สารที่ผลิตได้มีความเข้มข้นมากยิ่งขึ้น งานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาการเตรียมกรดอะมิโนลีวูลินิคให้อยู่ในรูปแบบผงแห้ง โดยใช้เทคนิคการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze drying) และ spray dry ซึ่งจะเป็นแนวทางพัฒนาการผลิตสาร ALA ในเชิงพาณิชย์เพื่อการประยุกต์ใช้ในด้านการเกษตรต่อไป

## การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. การผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิก (ALA) ซึ่งได้จากกระบวนการพัฒนาการผลิตสารชีวภาพโดยการตัดต่อสารพันธุกรรมจากแบคทีเรียสังเคราะห์แสง เพื่อการผลิตในระบบของเชื้อ *E. coli* สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดการผลิตสารชีวภาพ ALA ให้มีประสิทธิภาพสูงยิ่งขึ้นในเชิงพาณิชย์

ศรีปทุมการพิมพ์

2. กรด 5-อะมิโนลีวูลินิกที่ผลิตได้ เป็นสารชีวภาพที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านการเกษตร เป็นทางเลือกในการทดแทนการใช้สารเคมีสังเคราะห์ที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ได้แก่ ฮอร์โมน สารกำจัดวัชพืช และแมลงศัตรูพืช เป็นต้น

## เอกสารอ้างอิง


Jordan, P.M. 1991. Biosynthesis of 5-aminolevulinic acid andits transformation into uroporphyrinogen Ill in animals and bacteria. In *Biosynthesis of Tetrapyrroles* (Jordan, P.M., Ed.), pp. 1-66. Elsevier, Amsterdam.

Neidle, E. L. and S. Kaplan. 1993. Expression of the *Rhodobacter sphaeroides hemA* and *hemT* genes, encoding two 5-aminolevulinic acid synthase isozymes. J. Bacteriol. 175:2292–2303.

Sasikala, Ch., Ch.V. Ramana and P.R. Rao. 1994. 5-Aminolevulinic acid: A potential herbicide/insecticide from microorganisms. Biotechnol. Prog. 10: 451-459.

Akram, N.A. and M. Ashraf. 2011. Pattern of accumulation of inorganic elements in sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants subjected to salt stress and exogenous application of 5-aminolevulinic acid. Pak. J. Bot. 43(1): 521-530.

Balestrasse, K.B., M.L. Tomaro, A. Batlle and G.O. Noriega. 2010. The role of 5-aminolevulinic acid in the response to cold stress in soybean plants. Phytochemistry. 71: 2038-2045.

Hotta, Y., T. Tanaka, H. Takaoka, Y. Takeuchi and M. Konnai. 1997. Promotive effects of 5-aminolevulinic acid on the yield of several crops. Plant Growth Regul. 22: 109-114.

Korkmaz, A. and Y. and Korkmaz. 2009. Promotion by 5-aminolevulinic acid pepper seed Germination and seedling emergence under low-temperature stress. Sci. Hort. 119: 98-102.

Kumar, A.M., S. Chaturvedi, and D. SÖll. 1999. Selective inhibition of HEMA gene expression by photooxidation in Arabidopsis thaliama. Phytochem. 51: 847-851.

Maruyama-Nakashita, A. 2012. Sulfate uptake, cysteine and GSH contents are increased by 5-aminolevulinic acid in *Arabidopsis thaliana*. Sulfur metabolism in plants proceedings of the international plant sulfur workshop. 1: 85-89.

Mishra, S.N. and H.S. Srivastava. 1983. Stimulation of nitrate reductase activity by delta aminolevulinic acid in excised maize leaves. Experientia. 39: 1118-1120.

Nishihara, E., K. Kondo, M.M. Parvez, K. Takahashi, K. Watanabe and K. Tanaka. 2003. Role


กรมวิทยาศาสตร

of 5-aminolevulinic acid (ALA) on active oxygen-scavenging system in NaCl-treated spinach (*Spinacia oleracea*). J. Plant. Physiol. 160: 1085-1091.

Rebeiz, C. A., A. Montazer-Zouhoor, J. M. Mayasich, B. C. Tripathy, S. M. Wu and C. C. Rebeiz. 1988. Photodynamic Herbicides. Recent development and molecular basis of selectivity. *Crit. Rev. Plant Sci.* 6: 385-434.

Richter, A., E. Peter, Y. PÖrs, S. Lorenzen and B. Grimm. 2010. Rapid dark repression of 5-aminolevulinic acid synthesis in green barley leaves. Plant. Cell. Physiol. 51(5): 670-681.

Sasaki, K., S. Ikeda, Y. Nishizawa and M. Hayashi. 1987. Production of 5-aminolevulinic acid by photosynthetic bacteria. J. Ferment. Technol. 65: 511-515.

Sasaki, K., N. Noparatnaraporn and S. Nagai. 1990. Production of 5-aminolevulinic acid as a herbicide from swine waste by *Rhodobacter sphaeroides.* Ann. Rep. 1C Biotech. 13: 277-281.

Wang, J.J., W.B. Jiang, Z. Zhang, Q.H. Yao, H. Matsui and H. Ohara. 2003. 5-Aminolevulinic acid and its application in agriculture. Plant. Physiol. Commune. 39: 185-192.

Youssef, T. and M.A. Awad. 2008. Mechanisms of enhancing photosynthetic gas exchange in date palm Seedling (*Phoenix dactylifera* L.) under salinity stress by 5-aminolevulinic acid based fertilizer. J. Plant. Growth Regul. 27: 1-9.

Zhang, L., J. Chen, N. Chen, J. Sun, P. Zheng and Y. Ma. 2013. Cloning of two 5-aminolevulinic acid synthase isozymes HemA and HemO from *Rhodopseudomonas palustris* with favorable characteristics for 5-aminolevulinic acid production. Biotechnol Lett 2013 May 22;35(5):763-8. Epub 2013 Jan 22.

ศูนย์วิทยทรัพยากร