การปรับปรุงการผลิตแอล-ฟีนิลอะลานีนใน *Escherichia coli*
โดยกระบวนการวิศวกรรมเมแทบอลิซึม

นางสาวมยุรา ทองช่วง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2554

IMPROVEMENT OF L-PHENYLALANINE PRODUCTION IN *Escherichia coli* BY METABOLIC ENGINEERING PROCESS

Miss Mayura Thongchuang

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Biotechnology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2011

Thesis Title	IMPROVEMENT OF L-PHENYLALANINE PRODUCTION IN *Escherichia coli* BY METABOLIC ENGINEERING PROCESS
By	Miss Mayura Thongchuang
Field of Study	Biotechnology
Thesis Advisor	Assistant Professor Kanoktip Packdibamrung, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Professor Piamsook Pongsawasdi, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Professor Yusuf Chisti, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Doctoral Degree

.....Dean of the Faculty of Science
(Professor Supot Hannongbua, Dr.rer.nat.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman
(Professor Anchalee Tassanakajon, Ph.D.)

.....Thesis Advisor
(Assistant Professor Kanoktip Packdibamrung, Ph.D.)

.....Thesis Co-advisor
(Professor Piamsook Pongsawasdi, Ph.D.)

.....Examiner
(Associate Professor Chanpen Chanchao, Ph.D.)

.....Examiner
(Associate Professor Siriporn Sittipraneed, Ph.D.)

.....External Examiner
(Associate Professor Penjit Srinophakun, Ph.D.)

มยุรา ทองช่วง : การปรับปรุงการผลิตแอล-ฟีนิลอะลานีนใน *Escherichia coli* โดยกระบวนการวิศวกรรมเมแทบอลิซึม. (IMPROVEMENT OF L-PHENYLALANINE PRODUCTION IN *Escherichia coli* BY METABOLIC ENGINEERING PROCESS) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ. ดร. กนกทิพย์ ภักดีบำรุง, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ศ. ดร. เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์, Prof. Yusuf Chisti, Ph.D., 220 หน้า.

แอล-ฟีนิลอะลานีน (L-Phe) เป็นกรดอะมิโนจำเป็นชนิดหนึ่ง ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารสำคัญในทางการแพทย์ และอุตสาหกรรมอาหาร เช่น แอสปาร์แตม ความต้องการใช้แอสปาร์แตมที่เพิ่มมากขึ้นนำไปสู่การเพิ่มการผลิต L-Phe ในจุลชีพโดยเฉพาะอย่างยิ่งใน *E. coli* งานวิจัยนี้มีเป้าหมายในการใช้กระบวนการวิศวกรรมเมแทบอลิซึมในการปรับปรุงการผลิต L-Phe จากกลีเซอรอล ได้ทำการโคลนยีนฟีนิลอะลานีนดีไฮโดรจิเนส (*phedh*) จาก *Bacillus lentus* เข้าสู่ *E. coli* BL21(DE3) โดยใช้ expression vector pRSFDuet-1 (pPheDH) เพื่อเพิ่มการสร้าง L-Phe จากฟีนิลไพรูเวทในขั้นตอนสุดท้ายของการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ พบว่าการผลิต L-Phe โดยโคลน pPheDH ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลีเซอรอลซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการผลิตไบโอดีเซลมีข้อจำกัด ซึ่งอาจเกิดในขั้นตอนการขนส่งกลีเซอรอลเข้าสู่เซลล์ การส่ง L-Phe ออกนอกเซลล์ หรือการควบคุมในขั้นตอนต่างๆ ของการสังเคราะห์ L-Phe ดังนั้น จึงทำการโคลนยีนต่างๆ ที่เข้ารหัสให้โปรตีนที่สำคัญในวิถีการสังเคราะห์ L-Phe การนำกลีเซอรอลเข้าเซลล์และการนำ L-Phe ออกจากเซลล์ร่วมกับยีน *phedh* ได้แก่ *aroB, aroL, glpF, glpK, pheA, tktA* และ *yddG* ซึ่งเข้ารหัสให้ 3-dehydroquinate synthase, shikimate kinase II, glycerol facilitator, glycerol kinase, chorismate mutase/prephenate dehydratase, transketolase และ aromatic amino acid exporter ตามลำดับ โดยโคลน pPTFBLY ซึ่งประกอบด้วยยีน *phedh, tktA*, *glpF*, *aroB*, *aroL* และ *yddG* มีอัตราการผลิต L-Phe สูงที่สุดคือ 3.36 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงซึ่งสูงกว่าที่ได้จากโคลน pPheDH ถึง 2.1 เท่าโดยความเข้มข้นของ L-Phe ที่ 240 ชั่วโมงหลังจากวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรได้ 0.6 เท่ากับ 429 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อทำการเลี้ยงโคลน pPYF ในถังหมักขนาด 5 ลิตร (อุณหภูมิ 37 °ซ อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ความเร็วในการกวน 400 รอบ ต่อนาที) พบว่าในการหมักแบบกะผลิต L-Phe สูงสุดที่ 56 ชั่วโมงเท่ากับ 366 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนในการหมักแบบกึ่งกะที่มีการเติมกลีเซอรอลสองครั้ง ที่ 40 และ 60 ชั่วโมง ตามลำดับ พบว่าปริมาณ L-Phe สูงสุดเท่ากับ 445 มิลลิกรัมต่อลิตร การหมักแบบกึ่งกะโดยเติมกลีเซอรอลครั้งเดียวที่ 40 ชั่วโมงได้ปริมาณ L-Phe สูงสุดเท่ากับ 545 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนั้นโคลน pPYF ให้ปริมาณ L-Phe เมื่อทำการผลิตในระดับถังหมักสูงกว่าการผลิตในระดับขวดเขย่าประมาณ 2.0 เท่า

สาขาวิชา : ...เทคโนโลยีชีวภาพ... ลายมือชื่อนิสิต .....มยุรา ทองช่วง.....

ปีการศึกษา: .....2554..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5073861423 : MAJOR BIOTHECNOLOGY
KEYWORDS : PHENYLALANINE DEHYDROGENASE / L-PHENYLALANINE / METABOLIC ENGINEERING / *Bacillus lentus* / *Escherichia coli* BL21(DE3)

MAYURA THONGCHUANG : IMPROVEMENT OF L-PHENYLALANINE PRODUCTION IN *Escherichia coli* BY METABOLIC ENGINEERING PROCESS. ADVISOR : ASST. PROF. KANOKTIP PACKDIBAMRUNG, Ph.D., CO-ADVISOR: PROF. PIAMSOOK PONGSAWADSI, Ph.D., PROF. YUSUF CHISTI, Ph.D., 220 pp.

L-Phenylalanine (L-Phe), an essential amino acid, is mainly used as a reactant for production of important substances in medicine and food industry such as aspartame. An increase in demand for aspartame leads to the improvement of L-Phe production in well-known microorganisms, especially *Escherichia coli*. This work aims to improve L-Phe production from glycerol by metabolic engineering process. Phenylalanine dehydrogenase gene (*phedh*) from *Bacillus lentus* was cloned into pRSFDuet-1 (pPheDH) and expressed in *E. coli* BL21(DE3) to increase the conversion of phenylpyruvate to L-Phe in the last step of L-Phe biosynthesis pathway. The recombinant pPheDH clone had limited ability to produce L-Phe when the cells were grown in the minimal medium containing glycerol, a by-product from biodiesel production, as carbon source, possibly due to poor glycerol uptake, low ability to excrete L-Phe, or tightly regulated steps in L-Phe biosynthesis. Accordingly, various genes encoding pivotal proteins involving in L-Phe biosynthesis pathway, glycerol uptake and L-Phe excretion were co-expressed with *phedh* gene. These genes were *aroB, aroL, glpF, glpK, pheA, tktA* and *yddG* which encode 3-dehydroquinate synthase, shikimate kinase II, glycerol facilitator, glycerol kinase, chorismate mutase/prephenate dehydratase, transketolase and aromatic amino acid exporter, respectively. The recombinant pPTFBLY clone containing *phedh*, *tktA*, *glpF*, *aroB*, *aroL* and *yddG* genes had the highest L-Phe production rate of 3.36 mg/L/h which was 2.1-fold higher than that of pPheDH clone and the L-Phe concentration of 429 mg/L was attained at 240 h after the optical density at 600 nm reached 0.6. In a 5 L stirred-tank fermenter (37 °C, an aeration rate of 1 vvm, an agitation speed of 400 rpm), the L-Phe production was carried out using pPYF clone. For batch fermentation, the maximum concentration of L-Phe (366 mg/L) was achieved at 56 h. In fed-batch fermentation with addition of new glycerol medium at 40 h and 60 h, the highest yield of L-Phe production of 445 mg/L was obtained. Moreover, one time feeding of glycerol at 40 h resulted in the maximum L-Phe titer of 545 mg/L. The maximum L-Phe production of pPYF clone in the fermenter was nearly 2.0-fold higher than that in shake flask.

Field of Study: ...Biotechnology.... Student's Signature....Mayura Thongchuang.....
Academic Year: ....2011..... Advisor's Signature.....
Co-advisor's Signature....P. Pongsawadsi.....

ACKNOWLEDGMENTS

This dissertation could not be successfully completed without the great carefulness of my advisor Assistant Professor Dr. Kanoktip Packdibamrung for her excellent advice, skillful guidance, warmful encouragement, and fruitful discussion throughout the period of my study. Also, I am cordially delighted to thank my co-advisor, Professor Dr. Piamsook Pongsawasdi, for her great suggestions, terrific discussions and excellent proofreading. For my second co-advisor, Prof. Dr. Yusuf Chisti, I am impressed with his generous suggestions overall my experiments with bioreactor and the preparation of draft manuscript.

In addition, I would like to thank Professor Anchalee Tassanakajon, Associate Professor Chanpen Chanchao, Associate Professor Siriporn Sittipraneed and Associate Professor Penjit Srinophakun for serving as thesis committee members and for contributing all of helpful suggestions and valuable comments.

For all friends and colleagues at Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, especially in room numbers 707, 708 and 709, I am pleased to express my thankful for their assistances and friendships.

The big gratitude is expressed to my family members and Mr. Aumnart Chinpongpanich for their understanding, helping, supporting in spite of the fact that I have spent a lot of time with this thesis rather than with them.

This research was supported by a grant in the program "Strategic Scholarships for Frontier Research Network for the Joint Ph.D. Program, Thai Doctoral Degree" from the Office of the Higher Education Commission, Thailand, the Chulalongkorn University Graduate Scholarship to commemorate the 72nd anniversary of His Majesty King Bhumibol Adulyadej.

CONTENTS

Page

Page

Page

Page

Page

Page

Page

Page

LIST OF TABLES

LIST OF FIGURES

Figure **Page**

Figure **Page**

Figure **Page**

Figure **Page**

Figure **Page**

Figure **Page**

Figure **Page**

LIST OF ABBREVIATIONS

A	absorbance, 2′-deoxyadenosine (in a DNA sequence)
AroB	3-dehydroquinate synthase
aroB	3-dehydroquinate synthase gene
AroL	shikimate kinase II
aroL	shikimate kinase II gene
AroF	L-tyrosine-feedback inhibited DAHP synthase
aroF	L-tyrosine-feedback inhibited DAHP synthase gene
$aroF^{fbr}$	L-tryptophan-feedback resistant DAHP synthase gene
AroG	L-phenylalanine-feedback inhibited DAHP synthase
aroG	L-phenylalanine-feedback inhibited DAHP synthase gene
$aroG^{fbr}$	L-phenylalanine-feedback resistant DAHP synthase gene
AroH	L-tryptophan-feedback inhibited DAHP synthase
aroH	L-tryptophan-feedback inhibited DAHP synthase gene
bp	base pairs
BSA	bovine serum albumin
C	2′-deoxycytidine (in a DNA sequence)
^{o} C	degree Celsius
Da	Dalton
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	2′-deoxynucleoside 5′-triphosphate
EC	Enzyme Commission
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
G	2′-deoxyguanosine (in a DNA sequence)
GlpF	glycerol facilitator
glpF	glycerol facilitator gene
GlpFK	glycerol facilitator and glycerol kinase
glpFK	glycerol facilitator and glycerol kinase genes
GlpK	glycerol kinase
glpK	glycerol kinase gene

HPLC	high-performance liquid chromatography
IPTG	isopropyl-β-D-thiogalactoside
kb	kilobase pairs in duplex nucleic acid, kilobases in single-stranded nucleic acid
kDa	kiloDalton
K_m	Michaelis constant
KOH	potassium hydroxide
L	liter
L-phenylalanine	L-Phe
L-tryptophan	L-Trp
L-tyrosine	L-Tyr
LB	Luria-Bertani
µg	microgram
µL	microliter
µM	micromolar
M	mole per liter (molar)
mg	milligram
min	minute
mL	milliliter
mM	millimolar
MW	molecular weight
N	normal
NAD^+	nicotinamide adenine dinucleotide (oxidized)
NADH	nicotinamide adenine dinucleotide (reduced)
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced)
ng	nanogram
nm	nanometer
OD	optical density
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	polymerase chain reaction
PheA	chorismate mutase/ prephenate dehydratase
pheA	chorismate mutase/ prephenate dehydratase gene

pheA^{fbr}	feedback resistant chorismate mutase/ prephenate dehydratase
PheDH	phenylalanine dehydrogenase
phedh	phenylalanine dehydrogenase gene
PMSF	phenyl methyl sulfonyl fluoride
RNase	ribonuclease
SDS	sodium dodecyl sulfate
T	2′-deoxythymidine (in a DNA sequence)
TE	Tris-EDTA buffer
TEMED	*N, N, N′, N′*-tetramethyl ethylene diamine
TktA	transketolase
tktA	transketolase gene
T_m	melting temperature, melting point
UV	ultraviolet
v/v	volume by volume
vvm	volumes of air per volume of liquid per minute
w/w	weight by weight
YddG	aromatic amino acid exporter
yddG	aromatic amino acid exporter gene