



9 AUG 1996

**MOLECULAR CLONING AND EXPRESSION OF
CATALASE GENE
OF LACTOBACILLUS SAKE 911 IN ESCHERICHIA COLI UM2**

KRISANA PHUCHAROEN

~

With compliments
of

ศาสตราจารย์ ดร. วิเชียร น. นิลรัตน์

**A THESIS SUBMITTED BY PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
(BIOCHEMISTRY)**

**IN
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY**

1996

TH
k92m
1996

35877 02

ชื่อวิทยานิพนธ์	การขยายตัดต่อยีนและการแสดงออกจากยีนคะตะเลสของ LACTOBACILLUS SAKE 911 ในเชื้อแบคทีเรีย ESCHERICHIA COLI UM2
ผู้วิจัย	กฤษณา ภูเจริญ
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์	วิไล หนูนภักดิ์ Ph.D. สกล พันธุ์ยิ้ม Ph.D. รุจ วัลยะเสวี Ph.D.
วันที่สำเร็จการศึกษา	28 มีนาคม พ.ศ.2539

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์โดยทั่วไปของโครงการวิจัยคือการศึกษาและจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างกรดแลคติกในอาหารหมักดองของไทยว่ามีความสามารถในการทำงานของเอนไซม์คะตะเลสอย่างน้อยเพียงใด และทำการตัดต่อให้มีการแสดงออกของยีนคะตะเลสใน *E. coli* UM2 ซึ่งในอนาคตจะสามารถนำไปปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างกรดแลคติก แต่ไม่มีความสามารถในการทำงานของเอนไซม์คะตะเลสได้ ซึ่งการทำงานของคะตะเลสเป็นคุณสมบัติที่จะนำไปใช้ป้องกันการเหม็นหืน และปรับปรุงรสชาติของผลิตภัณฑ์ของอาหารหมักดองของไทยต่อไป

สายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียจำนวน 33 สายพันธุ์ที่แยกได้จากอาหารหมักดองของไทยถูกนำมาศึกษาการทำงานของเอนไซม์คะตะเลส โดยวิธีการสังเกตดูฟองออกซิเจนที่เกิดขึ้นจากการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของเอนไซม์ และวิธีการวัดสีที่เกิดขึ้นจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เหลืออยู่ในปฏิกิริยา พบว่า 4 สายพันธุ์ อันได้แก่ *Lactobacillus sake* 911 *Lactobacillus plantarum* P30-1 *Lactobacillus pentosus* A27-2 และ *Lactobacillus species* F3-2 มีความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ ในช่วง 50-80 ไมโครโมลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ถูก

ทำลายไปต่อหน้าที่ ต่อ 3×10^8 โคโลนี ในสภาวะที่มีฮีม และความสามารถนี้ไม่แปรตามค่าความเป็นกรดต่างในช่วง pH 3.0-9.0

ยีนคะตะเลสของ *Lactobacillus sake* 911 ถูกเลือกเพื่อนำมาทำการตัดและต่อเข้า *E. coli* UM2 โดยที่ยีนคะตะเลสขนาด 1.4 กิโลเบส ของ *Lactobacillus sake* 911 ถูกนำมาเพิ่มจำนวนในหลอดทดลองด้วยเทคนิคพีซีอาร์ซึ่งใช้ Primers ที่ออกแบบจากยีนคะตะเลสของ *Lactobacillus sake* LTH677 วิธี Southern blot ถูกนำมาเพื่อใช้ดูความคล้ายกันของ ยีนคะตะเลสนี้ กับ ยีนคะตะเลสของ *Lactobacillus sake* LTH677 ก่อนที่จะทำการตัดและต่อเข้ากับดีเอ็นเอพาหะ pMEx8 *E. coli* UM2 ที่มียีนคะตะเลสนี้ สามารถผลิตฟองออกซิเจนหลังจากหยดด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์จาก *E. coli* UM2 ที่มียีนคะตะเลสนี้อยู่ในช่วง 1-60 ไมโครโมลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ถูกทำลายไปต่อหน้าที่ ต่อ 3×10^8 โคโลนี การวิเคราะห์รูปแบบของโปรตีน พบว่ามีโปรตีนขนาดประมาณ 65 กิโลดาลตัน ใน *E. coli* UM2 ที่มียีนคะตะเลสซึ่งเป็นขนาดเดียวกับขนาดของหน่วยย่อยของเอนไซม์คะตะเลสที่พบใน *Lactobacillus sake* LTH677 จากผลของการหาลำดับเบสของยีนคะตะเลสของ *Lactobacillus sake* 911 พบว่ามี 1,451 ลำดับเบส ที่ประกอบด้วย ยีนโครงสร้างจำนวน 1,436 ลำดับเบส และ ตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (*Eco* RI และ *Kpn* I) ซึ่งยีนโครงสร้างนี้มีความคล้ายกับยีนคะตะเลสของ *Lactobacillus sake* LTH677 ถึง 93.75% แต่เมื่อถอดรหัสของกรดอะมิโนพบว่า ยีน 1,436 ลำดับเบสนี้ ไม่หยุดตรงรหัสหยุดของยีน เนื่องจากมีลำดับเบสบางตัวหายไป ทำให้การถอดรหัสไปหยุดตรงรหัสหยุดของดีเอ็นเอพาหะแทน ซึ่งทำให้มีจำนวนของกรดอะมิโนเกินมา 17 ตัว แต่อย่างไรก็ตามลำดับของกรดอะมิโนนี้ ยังมีความคล้ายกับลำดับอะมิโนของเอนไซม์คะตะเลสถึง 93.10%

Thesis Title	MOLECULAR CLONING AND EXPRESSION OF CATALASE GENE OF <u>LACTOBACILLUS SAKE</u> 911 IN <u>ESCHERICHIA COLI</u> UM2
Name	Krisana Phucharoen
Degree	Master of Science (Biochemistry)
Thesis supervisory committee	Wilai Noonpakdee, Ph.D. Sakol Panyim, Ph.D. Ruud Valyasevi, Ph.D.
Date of Graduation	28 March B.E. 2539 (1996)

ABSTRACT

The overall goal of this thesis project was to study and identify strain(s) of lactic acid bacteria that are commonly found in Thai fermented meat and vegetable products that have catalase activity. The catalase gene from a desired strain of lactic acid bacteria was selected, cloned and expressed in *E. coli* UM2. This genetic modification produced a strain of lactic acid bacteria which has a desired property of catalase activity and hence if use in food fermentation prevent rancidity and improve flavor of the fermented products.

A total of 33 strains of lactobacilli isolated from Thai fermented meat and vegetable products were screened for catalase activity by oxygen bubble method and colorimetric determination of hydrogen peroxide method. Four strains of lactobacilli, *Lactobacillus sake* 911, *Lactobacillus plantarum* P30-1, *Lactobacillus pentosus* A27-2, and *Lactobacillus species* F3-2 were shown to have high catalase activity ranging from 50-80 μ moles of hydrogen peroxide decomposed per minute per 3×10^8 colony-forming units (CFU) as compared to catalase activity of the reference strain,

Lactobacillus sake LTH677 in the presence of heme. The activity was pH independent in the range of 3.0-9.0. Catalase gene of *Lactobacillus sake* 911 was selected for cloning in *E.coli* UM2 by PCR method. The 1.4 kb fragment of catalase gene was obtained by using primers designed from the published catalase sequence of *Lactobacillus sake* LTH677. The Southern blot analysis confirmed the homology of this 1.4 kb fragment with catalase gene of *Lactobacillus sake* LTH677, before cloning into *E.coli* UM2 by using plasmid pMEx8 as expression vector. Transformants detected on LB ampicillin agar plates were found to produce oxygen bubbles when flooded with 0.87 M hydrogen peroxide solution. Catalase activities of 30 colonies of transformants harboring catalase gene were in the range of 1- 60 μ moles of hydrogen peroxide decomposed per minute per 3×10^8 CFU. Total soluble proteins analysis of transformed *E.coli* UM2 showed approximately 65-kDa protein which was the same size as the subunits of catalase found in *Lactobacillus sake* LTH677. The DNA sequencing of catalase gene of *Lactobacillus sake* 911 results in 1,451 bp containing cloning restriction sites, *Eco* RI at 5' end and *Kpn* I at 3' end, and some deletions in 1,436 bp coding sequence. These deletions result in the gene that was stopped in the TGA sequence of the plasmid, which produced the extra 17 amino acid at 3' end of the gene. These DNA and amino acid sequences had 93.75% and 93.10% homology to the published sequence of *Lactobacillus sake* LTH677.