บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

วัลยา (2534) ได้รายงานลักษณะการเจริญ และการสังเคราะห์ CDs ของ *Bacillus* A_{11} ไว้ว่า *Bacillus* A_{11} จะเจริญเข้าสู่ระยะการเจริญสูงสุด และมีแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase สูงที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร medium II, pH 9 ซึ่งประกอบด้วย corn steep liquor 5 เปอร์เซนต์, soluble starch 1 เปอร์เซนต์ , K_2HPO_4 0.1 เปอร์เซนต์ และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.02 เปอร์เซนต์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ได้ค่า dilution limit จากการทำ CD-TCE assay เท่ากับ 2^6 แต่เมื่อทำการ subculture ของ *Bacillus* A_{11} ไปเรื่อยๆ พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงเรื่อยๆ จนกระทั่งในที่สุดไม่แสดงแอคติวิตีเลย ภายหลังจากเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น Horikoshi's medium II, pH 10 พบว่ามีแอคติวิตีของเอนไซม์กลับคืนมาโดยมีแอคติวิตีสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ได้ค่า dilution limit จากการทำ CD-TCE assay เท่ากับ 2^4 เป็นไปได้ว่า *Bacillus* A_{11}ได้สูญเสียความสามารถในการสร้างเอนไซม์ CGTase ในอาหาร medium II ซึ่งอาจจะเป็นการกลายพันธุ์ไปอย่างสมบูรณ์ในระดับการควบคุมการสร้าง CGTase อย่างไรก็ตาม *Bacillus* A_{11} ยังสามารถสร้าง CDs ได้ เมื่อเปลี่ยนชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น Horikoshi's medium II แม้ว่าจะมีระดับการสร้างต่ำลง

เมื่อทดลองสกัดดีเอ็นเอพลาสมิดจาก *Bacillus* A_{11} ไม่พบว่ามีดีเอ็นเอพลาสมิด แสดงให้เห็นว่า CGTase gene ของ *Bacillus* A_{11} น่าจะอยู่บนโครโมโซม และสอดคล้องกับการศึกษา CGTase gene จากบาซิลลัสสายพันธุ์อื่นซึ่งมี CGTase gene อยู่บนโครโมโซม และได้ใช้โครโมโซมของแบคทีเรียเหล่านั้นมาทำ molecular cloning(Binder และคณะ, 1986 ; Takano และคณะ, 1986; Kato และ Horikoshi, 1986; Schmid, 1986 ; Nitschke และคณะ,1990) ในงานนี้จึงนำเอาโครโมโซมของ *Bacillus* A_{11} มาใช้ในการทำ molecular cloning ของ CGTase gene ซึ่งอาจจะนำไปปรับปรุงให้มีศักยภาพในการนำไปใช้ผลิต CDs ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

ในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้พลาสมิด pBR322 ซึ่งเป็นพลาสมิดมาตรฐานที่ใช้กันอยู่เป็นดีเอ็นเอพาหะ ในการโคลนสามารถ inactivate marker ตัวใดตัวหนึ่งบนดีเอ็นเอพาหะ คือ Ap^r และ Tet^r marker จึงสามารถจำแนกและคัดเลือก recombinant clone ได้ และจากการศึกษารายงานการโคลน CGTase gene จากบาซิลลัสสายพันธุ์ต่างๆ พบว่าประสบผลสำเร็จด้วยการใช้เรสติกชั่นเอนไซม์ Sau3AI มาย่อยดีเอ็นเอของโครโมโซมแบบ partial digestion (Takano และคณะ, 1986; Kato และ Horikoshi, 1986; Kimura และคณะ, 1987 ; Kaneko และคณะ, 1988) จึงเลือกใช้เรสติกชั่นเอนไซม์ Sau3AI มาย่อยดีเอ็นเอของโครโมโซมของ *Bacillus* A_{11} แบบ partial digestion ซึ่งจะได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีปลายเหนียวเป็นเบสคู่สมซึ่งกันและกัน(compatible cohesive end) กับชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกย่อยด้วย BamHI ที่อยู่บนพลาสมิด pBR322 ในบริเวณ tetracycline resistance gene ดังนั้นการโคลนยีนเข้าไปในตำแหน่ง BamHI จึงใช้หลักการของ insertion inactivation และสามารถคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้รับ inserted DNA fragment โดยการทำ replica plating ซึ่งทรานสฟอร์แมนท์จะมีคุณสมบัติต้านยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน แต่ไม่ต้านยาปฏิชีวนะเตตร้าซัยคลิน (Ap^r Tet^s)

ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอของ Sau3AI-digested chromosome ที่ใช้ในการทำ molecular cloning มีขนาดตั้งแต่ 2-23 kb แม้ว่าจากรายงานการโคลน CGTase gene จากบาซิลลัสสายพันธุ์ต่างๆ (ตารางที่ 9) พบว่าชิ้นดีเอ็นเอของ CGTase gene มีขนาดประมาณ 2-3 kb ก็ตาม แต่ที่ไม่เลือกชิ้นดีเอ็นเอของโครโมโซมที่มีขนาด 2-3 kb มาใช้โคลนยีน เพราะว่าต้องการเพิ่มโอกาสในความสำเร็จของการโคลน CGTase gene ให้ได้ครบทั้งยีน ซึ่งอาจจะมีอยู่ในชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดอื่นๆภายในช่วง 2-23 kb (รูปที่ 12)

การทดลองครั้งนี้เกิดรีคอมบิเนชั่นให้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดเพียง 25 เปอร์เซนต์ ทั้งนี้คงเนื่องมาจากขั้นตอนการกำจัดหมู่ฟอสเฟตที่ปลาย 5′ ของดีเอ็นเอพาหะด้วยเอนไซม์ CIP (ข้อ 2.10.3) เกิดขึ้นน้อย จึงทำให้ดีเอ็นเอพาหะส่วนใหญ่เกิดการเชื่อมต่อกันเองได้ (self ligation)

จากผลการทดลองการแสดงแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase ของทรานสฟอร์แมนท์ด้วยการทดสอบ amylolytic activity, PICT, CD-TCE assay และ การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ CDs ด้วย HPLC พบทรานสฟอร์แมนท์เพียงหนึ่งโคโลนีที่ได้รับ CGTase gene คือ SV1 จากทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด 3,127 โคโลนี ที่นำมาเลือกเฟ้นหา CGTase gene

เมื่อทำการตรวจสอบขนาดของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV1 ซึ่งเป็นพลาสมิดที่สกัดได้จากทรานสฟอร์แมนท์ SV1 โดยประมาณในรูปที่ไม่ถูกย่อยด้วยเรสติกชั่นเอนไซม์ด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส พบว่าได้แถบของดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวที่มีขนาดใหญ่กว่า 23 kb เล็กน้อยซึ่งหมายถึง inserted DNA fragment มีขนาดประมาณ 20-23 kb และเมื่อ subculture ของทรานสฟอร์แมนท์ SV1 ไปเรื่อยๆ พบว่าไม่มีความเสถียรคือแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase จะลดต่ำลงไปเรื่อยๆ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV1 มีขนาดใหญ่มากจนทำให้จำนวนชุดของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดต่ำลง (low copy number) และง่ายต่อการสูญหายไปจากทรานสฟอร์แมนท์ SV1

จากขนาดของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV1 ที่มีขนาดใหญ่เกินไป ไม่เหมาะที่จะนำมาศึกษา restriction map และหาตำแหน่งของ CGTase gene ที่อยู่บน inserted DNA fragment อีกทั้งทรานสฟอร์แมนท์ SV1 ไม่มีความเสถียร จึงได้ทำการโคลนยีนต่อเนื่อง (subcloning) อีกครั้ง โดยใช้วิธีการและใช้เรสติกชั่นเอนไซม์ในการโคลนเหมือนเดิม รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV1 ถูกนำมาย่อยด้วย Sau3AI แบบ partial digestion แล้วนำ digestion mixture มาตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส เลือกและแยกชิ้นดีเอ็นเอขนาด 2-6 kb ออกจากอะกาโรสเจล ซึ่งคาดว่าจะมี CGTase gene อยู่เพื่อใช้ในการโคลนยีนต่อเนื่องต่อไป

ในการโคลนยีนต่อเนื่องได้เปลี่ยนดีเอ็นเอพาหะเป็นชนิดที่มีจำนวนต่อเซลล์สูง(high copy number plasmid) ซึ่งจะมีประโยชน์ในการเพิ่มจำนวนชุดของ CGTase gene และง่ายต่อการตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase จึงเลือกใช้พลาสมิด pUC18 เป็นดีเอ็นเอพาหะ และใช้ *E. coli* strain JM101 เป็นเซลเจ้าเรือน ทั้งนี้เพราะพลาสมิด pUC18 และ *E. coli* strain JM101 มี *lac* Z′ และ Δ (*lac*Z) M15 gene ที่ถอดรหัสให้ส่วนทางปลาย N-terminal และ C-terminal ของเอนไซม์ β-galactosidase ตามลำดับ แล้วสายเปปไทด์จากทั้งสองส่วน จะมารวมกันเป็น active β-galactosidase ภายในเซลล์เจ้าเรือน ดังนั้นจึงใช้หลักการของ insertion inactivation ของเอนไซม์ β-galactosidase ในการคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด และเติม X-gal ซึ่งเป็น substrate analogue ของ galactose ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อช่วยในการคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่ต้องการ โดยไม่มีความจำเป็นที่จะต้องทำ replica plating เช่นที่ใช้กับพลาสมิด pBR322

จากผลการทดลองพบทรานสฟอร์แมนท์ 3 โคโลนี คือ SV2 , SV3 และ SV4 ที่แสดง amylolytic activity จากทรานสฟอร์แมนท์สีขาว 739 โคโลนี ที่นำมาเลือกเฟ้นหา CGTase gene สำหรับทรานสฟอร์แมนท์ SV4 แสดงแอคติวิตีเฉพาะ amylolytic activity เท่านั้น คาดว่าน่าจะเกิดจากพลาสมิด pSV4 ซึ่งอยู่ในทรานสฟอร์แมนท์ SV4 มี

inserted DNA fragment ที่มีเฉพาะส่วนของยีน CGTase gene ที่ทำหน้าที่ย่อยแป้งเท่านั้น และน่าจะเป็นส่วนปลาย 5′ ของ CGTase gene ที่ถอดรหัสให้ปลาย N-terminal ของเอนไซม์ CGTase เพราะว่าจากการศึกษาของ Kimura และคณะ (1989) พบว่าส่วนปลาย N-terminal ของเอนไซม์ CGTase จะทำหน้าที่คล้ายเอนไซม์ α-amylase นอกจากนี้ Hofmann และคณะ (1989) ได้ศึกษารูปร่างของเอนไซม์ CGTase จาก *B. circulans* โดย X-ray crystallography พบว่าเอนไซม์ประกอบด้วยโดเมน(domain) 5 โดเมน และ 3 โดเมนทางด้าน N-terminal มีรูปร่างและลำดับของกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับเอนไซม์ α-amylase Klein และคณะ (1991) ได้ศึกษาต่อพบว่ามีตำแหน่งที่คาดว่าจะเป็น active site ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยแป้งใน 3 โดเมนดังกล่าวด้วย ส่วน 2 โดเมนที่เหลือยังไม่ทราบหน้าที่ที่ชัดเจน แต่ Schmid และคณะ (1989) เสนอว่าโดเมนที่ 5 น่าจะทำหน้าที่ในการจับกับสับสเตรตเพราะลำดับของกรดอะมิโนในโดเมนนี้คล้ายคลึงกับบริเวณที่ทำหน้าที่นี้ในเอนไซม์ glucoamylase Kimura และคณะ (1989) พบว่า ส่วนปลาย C-terminal ของเอนไซม์ทำหน้าที่ในปฏิกิริยา cyclization ส่วนทรานสฟอร์แมนท์ SV2 และ SV3 ให้ผลบวกต่อการทดสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase โดย PICT และ CD-TCE assay

เมื่อนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV2 และ pSV3 มาศึกษาขนาดของ inserted DNA fragment โดยย่อยด้วยเรสติกชั่นเอนไซม์ PstI และ KpnI แล้วนำ digestion mixture มาตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส พบว่ารีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV2 และ pSV3 มีขนาดประมาณ 9.5 และ 7.5 kb ตามลำดับ และยังพบว่าเรสติกชั่นเอนไซม์ไม่สามารถย่อยรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV3 ที่เลือกศึกษาได้อย่างสมบูรณ์

จากความพยายามศึกษา restriction map ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV3 โดยการย่อยด้วยเรสติกชั่นเอนไซม์ชนิดต่างๆ ที่มี restriction site บนดีเอ็นเอพาหะ pUC18 แล้วนำ digestion mixture มาตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส

พบว่าเรสติกชั่นเอนไซม์ชนิดต่างๆที่ใช้ ไม่สามารถย่อยรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV3 ได้ยกเว้น PstI, KpnI,และ PvuII ที่สามารถย่อยชิ้นดีเอ็นเอของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV3 ได้บ้าง ซึ่งไม่น่าจะเป็นไปได้และไม่ทราบสาเหตุอย่างชัดเจนว่าเกิดจากอะไร เพราะปรากฏการณ์นี้ไม่เกิดขึ้นเมื่อสับโคลนย้าย inserted DNA fragment ไปไว้ในพลาสมิด pSE411 ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของพลาสมิด pUC18 และมีลำดับของกรดนิวคลีโอไทด์ส่วนใหญ่ยังคงเป็นของพลาสมิด pUC18

จากลักษณะการโคลน CGTase gene มาไว้ในพลาสมิด pUC18 ที่ multiple cloning site ซึ่งอยู่ downstream จาก *lac* promotor จึงน่าสนใจว่า CGTase gene จะอยู่ภายใต้การควบคุมของ *lac* promotor หรือไม่ จากผลการศึกษาถึงอิทธิพลของ IPTG ต่อการแสดงออกของ CGTase gene ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV3 พบว่า IPTG ซึ่งเป็นตัวกระตุ้น (inducer) ต่อ *lac* promotor บนพลาสมิด pUC18 มีผลช่วยทำให้การแสดงออกของ CGTase gene เพิ่มมากขึ้น(รูปที่ 20) แสดงว่า CGTase gene อยู่ภายใต้การควบคุมของ *lac* promotor จริง นอกจากนี้ยังรู้ว่า CGTase gene มีทิศทางของการถอดรหัสอยู่ในทิศทางเดียวกันกับ *lac* promotor

จากการที่ไม่สามารถศึกษา restriction map ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV3 ได้ จึงทำการย้าย inserted DNA fragment มาไว้ในพลาสมิด pSE411 ซึ่งเป็นพลาสมิดที่สร้างขึ้นจากพลาสมิด pUC18 โดยทำการตัดต่อเติม *M13 ori* เข้าไปในตำแหน่ง NarI (Dente และคณะ, 1983) และนำ *tac* promotor มาแทน *lac* promotor โดย *tac* promotor ในพลาสมิด pSE411 มีทิศทางการถอดรหัสในทางเดียวกันกับ *lac* promotor ในพลาสมิด pUC18 (Elledge และ Davis, 1989) ดังนั้นในการโคลนยีนต่อเนื่องครั้งนี้จึงสามารถเลือกใช้เรสติกชั่นเอนไซม์ได้หลายชนิดใน multiple cloning site และสามารถกำหนดทิศทางของการโคลนชิ้น CGTase gene ได้ เพราะพลาสมิด pSE411 มี multiple cloning site ที่เกือบจะเหมือนกับพลาสมิด pUC18 ดังนั้น CGTase gene จึงถูกย้ายให้มาอยู่ภายใต้การควบคุมของ *tac* promotor ได้ จากลักษณะการสร้างพลาสมิด

pSE411 ซึ่ง *lac* repressor binding site ถูกตัดออกจึงมีการสร้างเอนไซม์ CGTase ตลอดเวลา โดยไม่ต้องกระตุ้นด้วย IPTG

เมื่อนำทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้มาทดสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase โดยทดสอบ amylolytic activity , PICT , CD-TCE assay และการวิเคราะห์ CDs ด้วย HPLC ตามลำดับ สรุปได้ว่า CGTase gene จากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV3 ได้ถูกสับโคลนมาอยู่ในพลาสมิด pSE411 และให้ชื่อทรานสฟอร์แมนท์ และรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สร้างขึ้นใหม่ว่า SV5 และ pSV5 ตามลำดับ

จากผลการศึกษาขนาดและ restriction map โดยย่อยด้วยเรสติกชั่นเอนไซม์ชนิดต่างๆ แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซิส ดังแสดงในรูปที่ 27-32 พบว่ารีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 มีขนาดประมาณ 9.2 kb มีขนาดของ inserted DNA fragment ประมาณ 5.2 kb ซึ่งสอดคล้องกับขนาดของชิ้นดีเอ็นเอจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV3 ซึ่งนำมาโคลนยีนต่อเนื่อง จากขนาดของ inserted DNA fragment เมื่อเทียบกับขนาดของ CGTase gene ซึ่งคาดว่ามีขนาดประมาณ 2 kb ดังนั้นจึงคาดว่าจะมีส่วนของชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ใช่ส่วนของ CGTase gene อยู่มากถึงครึ่งหนึ่ง และมี restriction map ดังแสดงในรูปที่ 33 จากการเปรียบเทียบกับ restriction map ของ CGTase gene จากบาซิลลัสสายพันธุ์ต่างๆ (รูปที่ 3-10) พบว่ามีความแตกต่างกันใน restriction site เกือบทุกตำแหน่งที่มีบน inserted DNA fragment ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 ยกเว้น restriction site AccI ที่พบบน β-CGTase gene จาก *Bacillus circulans* strain No.8 2 ตำแหน่ง (รูปที่ 9) และพบบน inserted DNA fragment ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 3 ตำแหน่ง โดยที่ AccI 2 ตำแหน่งอาจจะตรงกับของ *B. cirrculans*

สำหรับการทดสอบ PICT เมื่อบ่มเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่ามีการเปลี่ยนสีของ PM medium, pH 7.4 จากสีแดงเป็นสีเหลือง โดยที่ pH ของน้ำเลี้ยงเชื้อ

ขณะนั้นมีค่าประมาณ 7.0-7.5 (ไม่ได้แสดงผลการทดลอง) ซึ่ง pH ในช่วงนี้ PM medium น่าจะมีสีแดงเหมือนเดิม แต่กลับมีสีเหลืองทั้งนี้เพราะเกิดจากแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase ที่เปลี่ยนแป้งไปเป็น CDs แล้ว CDs จะจับกับ phenol red กลายเป็น CD-phenol red complex ซึ่งไม่มีสี สีเหลืองที่เห็นจึงเป็นสีของอินดิเคเตอร์อีกชนิดที่อยู่ใน PM medium คือ methyl orange ซึ่งจะให้สีเหลืองเมื่อ pH มีค่ามากกว่า 4.4

จากผลการทดสอบ PICT ของ *Bacillus* A_{11} และทรานสฟอร์แมนท์ SV1 ดังแสดงในรูปที่ 14 พบว่าทรานสฟอร์แมนท์ SV1 เปลี่ยนสีของ PM medium ได้น้อยกว่า *Bacillus* A_{11} แสดงว่าทรานสฟอร์แมนท์ SV1 มีแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase น้อยกว่า ซึ่งสอดคล้องกับผลของ CD-TCE assay จริงๆแล้วทรานสฟอร์แมนท์ SV1 น่าจะมีจำนวนชุดของ CGTase gene มากกว่า เพราะ CGTase gene ถูกโคลนในพลาสมิด pBR322 ซึ่งมีอยู่ในเซลล์ได้หลายชุด สาเหตุอาจเป็นเพราะประการแรกกระบวนการควบคุมการสร้างเอนไซม์ CGTase และโปรโมเตอร์ (promotor) ของ CGTase gene ซึ่งตามสภาพความเป็นจริงอยู่ในแบคทีเรียสายพันธุ์บาซิลลัส อาจจะทำงานได้ไม่ดีใน *E. coli* ประการที่สอง กระบวนการ posttranslation modification ของเอนไซม์ CGTase ใน *Bacillus* A_{11} และ *E. coli* strain HB101 อาจแตกต่างกัน ทำให้มีผลต่อแอคติวิตีของเอไซม์ CGTase ที่ถอดรหัสออกมา ซึ่งเห็นได้จากแผ่นเอสดีเอส-โพลีอะไคร์ลาไมด์เจล (รูปที่ 26) ว่าทรานสฟอร์แมนท์ SV5 ซึ่งใช้ *E. coli* strain HB101 เป็นเซลเจ้าเรือนเช่นเดียวกับทรานสฟอร์แมนท์ SV1 จะสร้างโปรตีนที่มีขนาดเท่ากับเอนไซม์ CGTase ในขณะเดียวกันก็สร้างโปรตีนที่มีขนาดใหญ่กว่าเอนไซม์ CGTase เล็กน้อย ประการที่สามจากการวิเคราะห์ CDs ด้วย HPLC พบว่าสารละลายตัวอย่างที่เตรียมจาก reaction mixture ของทรานสฟอร์แมนท์ SV5 มีสัดส่วนของ ช-CD มากที่สุด ซึ่งแย้งกับ Pongsawasdi และ Yagisawa (1987) และ อุไรวรรณ (2536) ที่รายงานว่า *Bacillus* A_{11} ให้ผลิตภัณฑ์ β-CD มากที่สุด คาดว่าทรานสฟอร์แมนท์ SV1 จะให้ผลเช่นเดียวกัน ผลการทดลองนี้ชี้ให้

เห็นว่าเอนไซม์ CGTase ที่สร้างจาก *E. coli* มีความแตกต่างจากที่สร้างจาก *Bacillus* A_{11} ในด้านการทำงานของเอนไซม์ และในขณะเดียวกัน ช-CD ก็จับกับ phenol red ไม่ได้ เพราะขนาดของโพรงของ ช-CD มีขนาดใหญ่เกินไปไม่เหมาะกับขนาดของ phenol red (Kanako และคณะ ,1987) จึงส่งผลให้ทรานสฟอร์แมนท์ SV1 เปลี่ยนสีของ PM medium ได้น้อย และประการสุดท้ายอาจเกิดจากความไม่เสถียรของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV1เนื่องจากมีขนาดใหญ่เกินไป

สำหรับทรานสฟอร์แมนท์ SV2, SV3 และ SV5 สามารถเปลี่ยนสีของ PM medium จากสีแดงเป็นสีเหลืองได้ดีกว่า *Bacillus* A_{11} ทั้งนี้เนื่องจากทรานสฟอร์แมนท์ทั้งสามมีความเสถียรของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดสูงขึ้นเพราะมีขนาดเล็กลงมาก และมีจำนวนพลาสมิดภายในเซลล์เจ้าเรือนสูงกว่ารีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV1 ซึ่งสร้างจากพลาสมิด pBR322 มาก ดังนั้นจึงทำให้ทรานสฟอร์แมนท์ทั้งสามมีจำนวนชุดของ CGTase gene มากกว่าทรานสฟอร์แมนท์ SV1 มาก นอกจากนี้ CGTase gene ยังอยู่ภายใต้การควบคุมของ *lac* หรือ *tac* promotor จึงมีการสร้างเอนไซม์ CGTase ออกมามากตามมาด้วย คาดว่าแม้ทรานสฟอร์แมนท์ SV5 จะมีการสร้าง β-CD ในสัดส่วนที่น้อยลง แต่ก็ยังให้ β-CD ในปริมาณที่มากกว่าที่สร้างจาก *Bacillus* A_{11} จึงทำให้เกิดการเปลี่ยนสีของ PM medium จากสีแดงเป็นสีเหลืองที่ชัดเจนกว่า

Georganta และคณะ (1991) ได้ศึกษาถึงปริมาณของเอนไซม์ CGTase ในบริเวณต่างๆของเซลเจ้าเรือน โดยศึกษาใน *E. coli* strain HB101 ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มี CGTase gene จาก Alkalophilic *Bacillus* No. 38-2 พบว่าปริมาณของเอนไซม์ CGTase ของทรานสฟอร์แมนท์จะอยู่ภายในเซลล์ (intracellular) , periplasmic space และ หลั่งออกมานอกเซลล์ (extracellular) เท่ากับ 35, 59 และ 6 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ จึงคาดว่าทรานสฟอร์แมนท์ SV5 ซึ่งก็คือ *E. coli* strain HB101 ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 มีปริมาณเอนไซม์ CGTase ส่วนใหญ่อยู่ที่ periplasmic space และ ภายในเซลล์เช่นกัน จากการทำ CD-TCE assay ของ

ทรานสฟอร์แมนท์ SV5 โดยใช้สารละลายเอนไซม์จากส่วนต่างๆของทรานสฟอร์แมนท์ เพื่อหาการกระจาย (distribution) ของเอนไซม์ CGTase ในส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อ (S1 หรือ extracellular), ส่วน periplasmic space (S2) และ ส่วนทั้งเซลล์ (PC) พบว่าให้ค่า dilution limit เท่ากับ 2^1, 2^1 และ 0 ตามลำดับ จะเห็นว่าค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase ในส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อของทรานสฟอร์แมนท์ SV1 มีค่า dilution limit ต่ำ สอดคล้องกับรายงานของ Georganta และคณะ (1991) และต่ำกว่าของ *Bacillus* A_{11} มาก เพราะ *Bacillus* sp. จะสร้างโปรตีน และหลั่งออกนอกเซลล์ได้เกือบทั้งหมด (Sibakov, 1986) ในกรณีของสารละลายเอนไซม์จากส่วน periplasmic space (S2) ซึ่งเป็นการเตรียมสารละลายเอนไซม์ โดยการใช้lysozyme ย่อยผนังเซลแล้วนำไปปั่นเพื่อเอา supernate ซึ่งคาดว่าเอนไซม์ CGTase ในบริเวณ periplasm จะหลั่งออกมา พบว่าให้ค่า dilution limit ที่ต่ำมาก คือมีค่าเท่ากับ 2^1 ซึ่งมีค่าเท่ากับสารละลายเอนไซม์จากส่วน S1 ทั้งนี้อาจเกิดจากการย่อยผนังเซลล์ด้วย lysozyme เกิดไม่สมบูรณ์ เนื่องจากเซลล์ที่นำมาใช้ศึกษาจะต้องบ่มเลี้ยงเชื้อเป็นเวลานานถึง 72 ชั่วโมง และมีการสร้างเมือกทำให้เซลล์รวมตัวกันเป็นก้อนทำให้การทำงานของ lysozyme ไม่ได้ผลดีเท่าที่ควร นอกจากนี้ยังอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ไม่พบตะกอน CD-TCE complex อยู่ในส่วนของทั้งเซลล์ (PC) เพราะว่าเมือกเป็นตัวกั้นไม่ให้สับสเตรตสัมผัสกับเอนไซม์ CGTase ในส่วน periplasmic space ที่หลงเหลืออยู่ แม้ว่าในระหว่างการทำปฏิกิริยาจะมีการเขย่าตลอดเวลา แต่ก็พบว่าเซลล์ยังจับกลุ่มกันเป็นก้อนเหมือนเดิม ในการทดลองครั้งนี้ไม่ได้ทำให้เซลล์แตกก่อนนำมาวัดแอคติวิตี จึงไม่ได้ตรวจสอบเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์ นอกจากนี้จากการวิเคราะห์ CDs ด้วย HPLC ของสารละลายตัวอย่างที่เตรียมจาก reaction mixture ของสารละลายเอนไซม์ในส่วน S1 และ S2 พบว่ามี maltose และ maltotetraose ซึ่งเป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขันสำหรับปฏิกิริยา cyclization ในปริมาณที่มากพอสมควร จึงอาจมีผลทำให้ยับยั้งเอนไซม์ CGTase ได้บางส่วน maltose และ maltotetraose ที่ตรวจพบนั้นเกิดจากปฏิกิริยา shortening(disproportionation) ของเอนไซม์ CGTase ซึ่งมีปฏิกิริยาคล้าย

กับเอนไซม์ amylase และขณะเดียวกัน glucose ที่อยู่ใน solution I (ข้อ 2.13) ที่ใช้ในการเตรียม S2 ก็จะทำหน้าที่เป็น acceptor ในปฏิกิริยา disproportionation ด้วย (Bender, 1985)

เนื่องจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pSV5 มี CGTase gene ที่โคลนได้อยู่บน high copy number plasmid และอยู่ภายใต้การควบคุมของ strong promotor (*tac* promotor) จึงน่าจะตรวจพบเอนไซม์ CGTase ด้วยเอสดีเอส-โพลีอะไคร์ลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซิส จึงน่าโปรตีนทั้งหมดจากเซลเจ้าเรือน (*E. coli* strain HB101) และทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้รับพลาสมิด pSE411 และ pSV5 มาทดสอบด้วยเอสดีเอส-โพลีอะไคร์ลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซิส (ข้อ 2.15) พบว่าทรานสฟอร์แมนท์ SV5 สร้างโปรตีนที่มีขนาดเท่ากับเอนไซม์ CGTase จาก *Bacillus* A_{11} ในขณะที่เซลเจ้าเรือนและทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้รับพลาสมิด pSE411 ไม่ปรากฏแถบโปรตีนดังกล่าวบนแผ่นเอสดีเอส-โพลีอะไคร์ลาไมด์เจล (รูปที่ 26) นอกจากนี้ยังพบแถบโปรตีนที่มีขนาดใหญ่กว่าเอนไซม์ CGTase เล็กน้อย ซึ่งอาจจะเป็นผลของกระบวนการ post-translational modification ของเอนไซม์ CGTase ใน *E. coli* ที่อาจจะต่างไปจาก *Bacillus* sp.

จากผลการวิเคราะห์ CDs ด้วย HPLC ของสารละลายตัวอย่างที่เตรียมจากตะกอน CD-TCE complex และ reaction mixture ของทรานสฟอร์แมนท์ (รูปที่ 25) พบว่าสารละลายที่เตรียมจากตะกอน CD-TCE complex จะให้ peak ของ β-CD เพียง peak เดียว แต่มี retention time ที่แตกต่างจาก standard β-CD เล็กน้อย จึงต้องมีการพิสูจน์ว่าใช่ β-CD จริงหรือไม่ ด้วยการเติม internal standard ซึ่งให้ผลการทดลองที่ยืนยันได้ว่าเป็น β-CD จริง

Pongsawasdi และ Yagisawa (1987) ได้รายงานว่า *Bacillus* A_{11} จะให้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็น β-CD และได้ α-CD ในปริมาณน้อย ต่อมาอุไรวรรณ (2536)ได้ทำการวิเคราะห์ CDs ด้วย HPLC โดยเตรียมสารละลายตัวอย่างจาก reaction mixture ของ *Bacillus* A_{11} พบว่าให้ผลิตภัณฑ์ α-, β- และ ช-CD ในอัตราส่วน 1:5.7:1.3

จึงเป็นที่น่าสนใจว่าทรานสฟอร์แมนท์ SV5 จะให้ผลิตภัณฑ์ CDs เป็นอย่างไรบ้าง นอกจากนี้จากผลการทดสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase จากทรานสฟอร์แมนท์ SV5 ด้วย CD-TCE assay ทั้งจากส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อ (S1) และ ส่วน supernate (S2) ให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ต่ำมาก ซึ่งขัดแย้งกับผลของ PICT จึงคาดว่า *E. coli* และ *Bacillus* A_{11} อาจให้ได้ผลิตภัณฑ์ CDs ในสัดส่วนที่ต่างกัน ดังนั้นจึงเตรียมสารละลายตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ CDs ด้วย HPLC จาก reaction mixture พบว่าสารละลายเอนไซม์จากส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อ (S1) และส่วน supernate (S2) ให้ peak ของ α-, β- และ γ-CD ในอัตราส่วน 1:1.9:6 และ 1:1.4:3.5 ตามลำดับ ซึ่งแสดงว่าทรานสฟอร์แมนท์ SV5 ให้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็น γ-CD

สรุปผลการทดลอง

1. สามารถโคลน CGTase gene ที่อยู่บนชิ้นดีเอ็นเอของโครโมโซม ของ *Bacillus* A_{11} ต่อเข้ากับดีเอ็นเอพาหะ pSE411 ได้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดชนิดใหม่ให้ชื่อว่า pSV5 มีขนาดประมาณ 9.2 kb โดยมีขนาดของ inserted DNA ประมาณ 5.2 kb

2. restriction map ของ CGTase gene จาก *Bacillus* A_{11} แตกต่างจาก *Klebseilla pneumoniae* M5a1, *B. macerans*, Alkalophilic *Bacillus* 1-1, Alkalophilic *Bacillus* sp. strain No.38-2, *Bacillus* sp. #1011, Alkalophilic *Bacillus* sp. strain 17-1, *B. circulans* strain No.8 และ *B. subtilis* No. 313

3. Phenol red inclusion complex test (PICT) สามารถทดสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase ได้

4. CGTase gene ที่โคลนได้ใน *E. coli* สร้าง γ-CD ในสัดส่วนที่มากที่สุด ตามด้วย β- และ α-CD

5. สามารถตรวจพบแถบโปรตีนที่คาดว่าเป็นเอนไซม์CGTase จากทรานสฟอร์แมนท์ SV5 ด้วยเอสดีเอส-โพลีอะไคร์ลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซิส