บทที่ 4

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

4.1 สมบัติของ E. coli ATCC 11105

แม้ว่า E. coli ATCC 11105 ไม่สามารถเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำ (MM) แต่สายพันธุ์นี้ก็สามารถใช้ PAA เป็นแหล่งคาร์บอนได้ ทั้งนี้เพราะพบว่า เมื่อเสริม PAA ลงในอาหารอุดม ความขุ่นของเซลล์จะเพิ่มขึ้นถ้าเทียบกับที่มิได้เสริม ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Wojskowiez (1981) และในอาหารอุดมที่เสริม PAA 0.1 เปอร์เซนต์ จะพบแอคติวิตีของ PA ด้วย แสดงว่า PAA ทำหน้าที่เป็น inducer ได้ Levitor และคณะ (1967) Szentirmai (1964), Marancenbaum และ Park (1979) รายงานว่า ปริมาณ PAA ที่เหมาะสมในการชักนำการสร้างเอนไซม์ PA คือ 0.1-0.2 เปอร์เซนต์ แต่ถ้าปริมาณ PAA สูงกว่า 0.2 เปอร์เซนต์ นั้น ผลการทดลอง แสดงว่าการสังเคราะห์ PA จะลดลงด้วย จึงเชื่อว่า ปริมาณ PAA ที่สูงเกินไปจะทำให้เกิด self-catabolite repression นอกจากนั้นนักวิจัยกลุ่มนี้ยังได้แสดงว่าสารประกอบที่มีโครงสร้างคล้าย PAA สามารถชักนำการสร้าง PA ได้ด้วย

สมบัติที่เด่นอีกอย่างหนึ่งของ E. coli ATCC 11105 ก็คือ การที่กลูโคสสามารถลดอัตราการเจริญของสายพันธุ์นี้ลง นอกเหนือจากการแสดงสมบัติ catabolite repression หรือกดดันการถอดระหัสของยีน PA Levitor และคณะ (1967), Szentirmai (1964), Vojtisch และ Slczak (1975) ก็เคยรายงานว่าพบการกดดันการสร้างเอนไซม์ PA โดยคาร์โบไฮเดรท เช่น กลูโคส, มอลโตส และโพลีแอลกอฮอล์ - กลีเซอรอล เนื่องจากการวิจัยนี้มิได้มีความมุ่งหมายที่จะศึกษาถึงผลของกลูโคสต่อการเจริญของเชื้อ จึงมิอาจอธิบายปรากฏการณ์เกี่ยวกับความสามารถของกลูโคส ในการลดการเจริญของ E. coli ATCC 11105 เนื่องจากกลูโคสเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนราคาถูกกว่าส่วนประกอบอื่นในอาหารอุดม LB พินิจโดยนัยยะนี้จะเห็นขีดจำกัดของการนำ E. coli ATCC 11105 มาใช้ในระดับอุตสาหกรรม

Vandamme (1980) รายงานว่า E. coli ATCC 11105 มีแอคติวิตีของเอนไซม์ปีตา-แลคตาเมสอยู่ปริมาณเล็กน้อย แต่การทดลองนี้ไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์นี้เลย อาจเนื่องจากความไว (sensitivity) ของวิธีวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ดังกล่าวของการทดลองนี้ต่ำเกิน

ไป อย่างไรก็ตาม E. coli ATCC 11105 ก็เป็นสายพันธุ์หนึ่งที่นิยมใช้เป็นต้นแบบในการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ PA และใช้ผลิต 6-APA จากเพนนิซิลินจี (Kutzbach และ Rauenbusch, 1974) Takasawa และคณะ (1972) รายงานว่า แม้จะมีเอนไซม์บีตา-แลคตาเมสอยู่บ้างก็สามารถทำให้เอนไซม์ดังกล่าวเสียสภาพ (inactivate) ไปได้โดยขบวนการเติมสารเคมีและปรับสภาวะบางอย่าง การที่ไม่พบแอคติวิตีของบีตา-แลคตาเมสหรือมีเอนไซม์นี้ปริมาณน้อยก็ตาม ใน E. coli ATCC 11105 นับว่าเป็นข้อดีของสายพันธุ์นี้ที่จะนำไปใช้ผลิต 6-APA จาก penicillin G

เมื่อพิจารณาในแง่ของการปรับปรุงพันธุ์ E. coli ATCC 11105 จากการที่พบว่า E. coli ATCC 11105 ต้านทานการบุกรุกของ bacteriophage λ , Tn 5, Tn 10 และ P_1 (ไม่ได้แสดงผลการทดลอง) รวมทั้ง Vandamme (1980) ได้เคยรายงานว่า E. coli ATCC 11105 (E. coli NCIB 8_{878}) มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ E. coli NCIB 8_{743}A ซึ่งเป็นอนุพันธุ์ของ E. coli ATCC 9637 และเป็น E. coli W ดังนั้นจึงอนุมานได้ว่า E. coli ATCC 11105 ไม่ใช่อนุพันธ์ของ E. coli K 12 การจะปรับปรุงพันธุ์ของ E. coli ATCC 11105 โดยการทำ in vivo genetic engineering จึงเป็นไปได้ยาก เนื่องจากยังหาพาหะ (vector) ที่เหมาะสมไม่พบ

mitomycin C เป็น antibiotic ที่ให้ผลยับยั้ง การแบ่งตัวของพลาสมิดดีเอนเอได้สูงกว่าโครโมโซมใหญ่ (Suit, 1983) ดังนั้นถ้าเสริม mitomycin C ลงในอาหาร พลาสมิดดีเอนเอในเซลล์แบคทีเรียจะมีจำนวนลดลง เรียกว่า ถูก curing ด้วย mitomycin C สำหรับการทดลองนี้ยังคงพบแอคติวิตีของ PA ในเซลล์ที่เจริญเมื่อมี mitomycin C ใกล้เคียงกับเซลล์ที่เจริญเมื่อไม่มี mitomycin C. ปรากฏการณ์นี้น่าจะหมายความว่ายีน PA ของ E. coli ATCC 11105 อยู่บนโครโมโซมใหญ่ และการที่ตรวจไม่พบพลาสมิดหลังสกัด ก็ยังเป็นเครื่องช่วยเสริมว่า ยีน PA น่าจะอยู่บนโครโมโซมแน่นอน จึงเป็นข้อแนะนำที่ดีว่าควรจะใช้ โครโมโซมของ E. coli ATCC 11105 มาทำ molecular cloning เพื่อให้ได้สายพันธุ์ใหม่ที่มีศักยภาพในการนำไปใช้ผลิต 6-APA ในระดับอุตสาหกรรมสูงกว่าเดิม

4.2 ขั้นตอนต่าง ๆ ในการทำ Molecular cloning

ปัจจัยสำคัญในการทำ molecular cloning คือการเลือกพลาสมิดพาหะที่เหมาะสม และ restriction site ที่ใช้งานได้ดี คือสามารถตัดยีนที่ต้องการออกมาได้โดยไม่เสียสภาพ

ในการทดลองนี้ได้เลือก pSY 343 เป็นพลาสมิดพาหะ ก็เนื่องจากว่าเป็นอนุพันธุ์ของ run away replication plasmid ที่ Yasuda และคณะ (1983) ได้สร้างเอาไว้ โดยที่เปลี่ยนยีนต้านยาจากพลาสมิดเดิมคือ Ampicillin เป็น Kanamycin การสร้างพลาสมิดพาหะของ Yasuda ทำให้ทราบแผนผัง restriction site ของพลาสมิดพาหะ ว่า Hind III, BamH I และ EcoR I จะเรียงอยู่ที่บริเวณปลายและใกล้เคียงกับยีน Km โดยมีตำแหน่งของ Hind III อยู่ใกล้กับ ori ด้วย ในการทำ molecular cloning นี้ถ้าต้องการใช้เอนไซม์ตัวเดียว ก็อาจเลือกใช้ EcoR I, BamH I หรือ Hind III ถ้าต้องการใช้เอนไซม์สองตัวก็จะต้องเป็น EcoR I กับ Hind III หรือ BamH I กับ Hind III

เนื่องจากพลาสมิดพาหะ pSY 343 มีขนาดใหญ่มาก ประมาณ 9.5 kb. ดังนั้นจึงเลือกใช้เอนไซม์ครั้งละ 2 ตัว เพื่อหวังต้องการลดขนาดของ recombinant plasmid DNA หลังจากการทดลองหลาย ๆ ครั้ง จึงพบว่า การใช้ EcoR I กับ Hind III ได้ผลการทดลองดีที่สุด สอดคล้องกับปลาย EcoR I Hind III ของชิ้น DNA จากโครโมโซมของ E. coli ATCC 11105 ซึ่งเลือกใช้จากการพิจารณาแผนผัง Restriction ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดดีเอนเอที่มียีน PA ของ E. coli ATCC 11105 ที่ Mayer และคณะ (1980); Chang และคณะ (1983) ได้เคยรายงานไว้

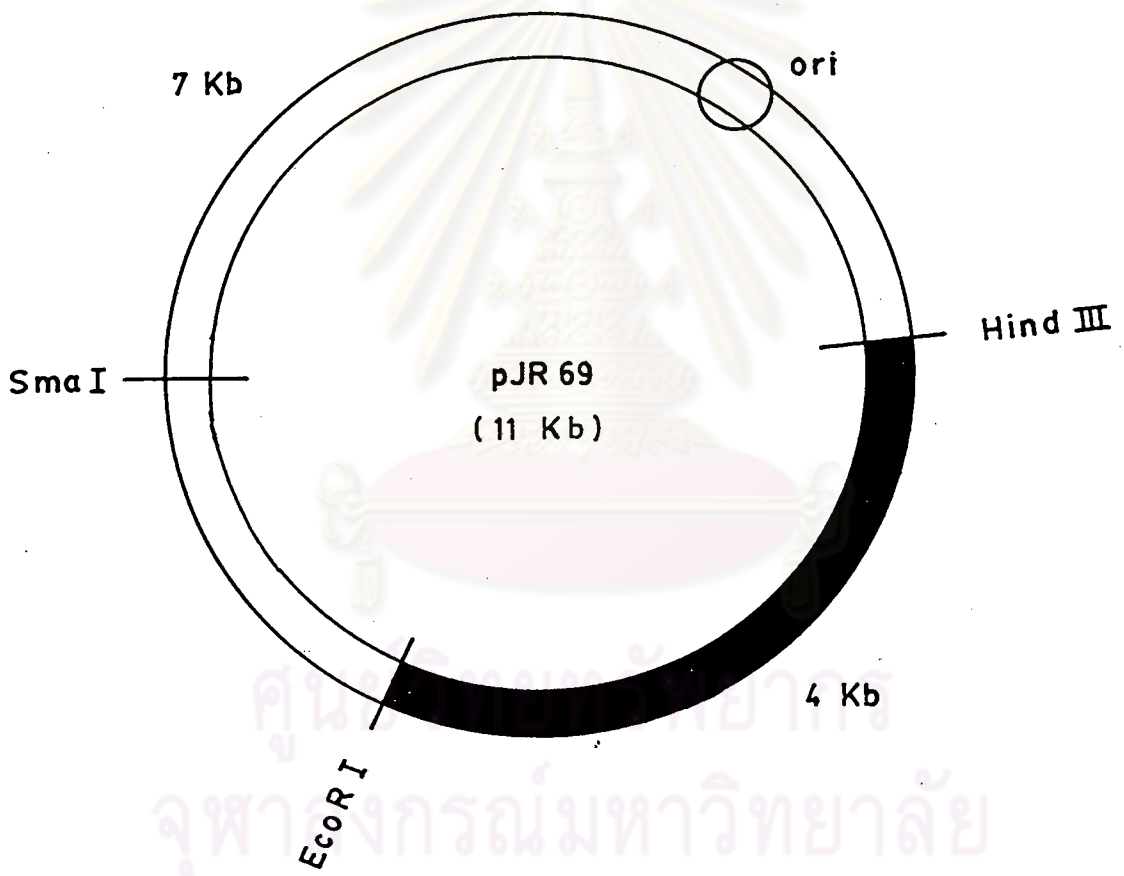
เนื่องจากยีนที่อยู่บนโครโมโซมโดยเฉพาะที่ถอดระหัสเป็นเอนไซม์มักจะมีเพียงชุดเดียว ดังนั้นเมื่อตัดโครโมโซมออกเป็นชิ้นเล็กชิ้นน้อย จึงต้องเลือกเฟ้นยีนที่ต้องการให้พบอีกด้วย เพราะว่าการต่อยีนเข้ากับพลาสมิดพาหะ โดยการใช้ restriction enzyme ชนิดเดียวกันตัดนั้น โอกาสที่ยีนจะต่อเข้ากับพลาสมิดพาหะเป็นสมบัติทางกายภาพ คล้ายเป็นปฏิกิริยาเคมีปฏิกิริยาหนึ่งเท่านั้น โดยเหตุนี้เมื่อรวมพลาสมิดพาหะเข้ากับโครโมโซมที่ตัดแล้ว จึงมีโอกาสได้ดีเอนเอรูปแบบต่าง ๆ กันมากมาย ส่วนที่เป็นความต้องการคือ พลาสมิดพาหะต่อเข้ากับดีเอนเอจากโครโมโซม เมื่อเป็นดังนี้จึงเกิดขีดจำกัดในการทำ Molecular Cloning ขึ้นว่า ถ้าหากไม่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของการทำ ligation และ transformation ให้สูงกว่าการทดลองโดยทั่วไปแล้ว ความสำเร็จที่คาดว่าจะได้ก็จะลดลงมาก ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงทำให้ต้องทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำ molecular cloning เสียก่อน

ผลการวิจัยพบว่า สภาวะของการบ่มชิ้น DNA ที่ 65^{o}ซ. 5 นาที แล้วจึง ligation จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของ transformation ขึ้นประมาณ 3 เท่า เปรียบเทียบกับไม่บ่มชิ้น

DNA ก่อน อีกทั้งการเตรียม competent cell โดยวิธี DMSO-treated สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของ transformation ขึ้นประมาณ 4 เท่า เปรียบเทียบกับวิธี $CaCl_2$-treated ซึ่งจากการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมของการทำ Molecular cloning จะเห็นผลในขั้นสุดท้าย คือประสิทธิภาพของ transformation สูงถึง 1.5×10^4 โคโลนีต่อพลาสมิดดีเอนเอ 9.5 kb 1 ไมโครกรัม การวิจัยนี้ใช้ดีเอนเอจากโครโมโซม E. coli ATCC 11105 ซึ่งเตรียมโดย Enrichment ให้มีโอกาสพบยีน PA โดยปรับปรุงวิธีการย่อยด้วย restriction enzyme เลือกดีเอนเอขนาด 3-4.3 kb จำนวน 3 ไมโครกรัม (จากดีเอนเอเริ่มต้น 20 ไมโครกรัม) กับพลาสมิดดีเอนเอ pSY 343 ขนาดประมาณ 7 kb จำนวน 6 ไมโครกรัม ปริมาณดีเอนเอที่ใช้ transform ทั้งหมด 9 ไมโครกรัม คาดว่ามีโอกาสพบ transformant ทั้งสิ้นอย่างมาก 1.4×10^5 โคโลนี (เนื่องจาก recombinant plasmid DNA มีขนาดประมาณ 10-12 kb ประสิทธิภาพของ transformation ย่อมต่ำกว่า pSY 343 ที่มีขนาดประมาณ 9.5 kb) ซึ่งถ้าคิดว่าแบคทีเรีย 1 เซลล์ มีโครโมโซมดีเอนเอประมาณ 2×10^6 bp (1 d = 1.66×10^{-24} g, 1 b = 310 d, 2×10^6 bp = 2.06×10^{-15} g) จะมียีน PA 1 ยีน การที่ใช้ดีเอนเอเริ่มต้น 20 ไมโครกรัม จึงควรจะมียีน PA 9.7×10^9 ยีน หากคาดมีการสูญเสียยีนดีเอนเอที่มียีน PA ประมาณ 20 % ดังนั้น ดีเอนเอที่ใช้ transformation ทั้งหมด 3 ไมโครกรัมจึงควรมียีน PA ประมาณ 8×10^9 ยีน ในดีเอนเอรวมที่มีขนาด 4 kb (4.1×10^{-12} ไมโครกรัม) ประมาณทั้งสิ้น 7×10^{11} ยีน โอกาสการพบ transformant ที่มียีน PA จึงเป็น 1 ใน 88 เมื่อคาดว่าจะมีโอกาสพบ transformant ทั้งสิ้นน้อยกว่า 1.4×10^5 ตัว จึงมีโอกาสที่จะพบ transformant ที่มียีน PA อย่างมากที่สุด 1590 ตัวซึ่งจากผลการทดลอง พบ transformant 1 ตัวที่มียีน PA คือ Q_{69} ซึ่งมีรีคอมบิแนนท์ พลาสมิด ดีเอนเอ pJR 69 ขนาดประมาณ 11 kb (รูปที่ 29) จากโอกาสที่คำนวณได้จะเห็นว่าถ้าไม่ปรับปรุงขั้นตอนต่าง ๆ เพื่อหาสภาวะเหมาะสมในการทำ Molecular cloning จะมีโอกาสพบ transformant ลดลงกว่านี้อีกมาก

การเลือก E. coli HB 101 เป็นเซลล์เจ้าเรือน เนื่องจากมันเป็น recA$^-$ สามารถป้องกันการเกิด recombination ของพลาสมิดดีเอนเอที่ได้รับ เข้าสู่โครโมโซมดีเอนเอ และจากการพบว่า E. coli HB 101 มีประสิทธิภาพของ transformation สูงกว่า E. coli C 600 อีกทั้งยังเป็นเซลล์เจ้าเรือนที่ถูกแนะนำให้ใช้เพราะว่ามีความปลอดภัยสำหรับทำเทคนิคทางรีคอมบิแนนท์ ดีเอนเอ อีกด้วย

รูปที่ 29 Restriction mapping คร่าว ๆ ของ pJR 69 (ในการวิจัยนี้)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3 สมบัติของ transformant Q_{69}

Q_{69} เป็น E. coli HB 101 ที่มี pJR 69 ซึ่งได้จากการ clone ยีน PA จาก E. coli ATCC 11105 ต่อเข้ากับพลาสมิดดีเอนเอพาหะ pSY 343

Q_{69} ไม่สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 37°ซ. เนื่องจากมันมีพลาสมิดดีเอนเอ pJR 69 ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของพลาสมิดดีเอนเอ pSY 343 มีคุณสมบัติ runaway replication คือ ที่อุณหภูมิสูงกว่า 35°ซ. (ซึ่งในกรณีของพลาสมิด pSY 343 ใช้อุณหภูมิ 37°ซ.) พลาสมิดดีเอนเอจะสูญเสียการควบคุม replication ของพลาสมิดดีเอนเอ (Yasuda และคณะ, 1983; Uhlin และคณะ, 1979) เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการบ่มเชื้อ พบว่า การเจริญสูงสุด, ปริมาณพลาสมิดดีเอนเอ และแอคติวิตีของ PA จะเปลี่ยนแปลงไป โดยถ้าตอนย้ายอุณหภูมิไปเจริญที่ 37°ซ. นั้น ยิ่งใช้เวลานานมากขึ้น จะทำให้ปริมาณพลาสมิดดีเอนเอสูงขึ้น แต่กลับทำให้การเจริญสูงสุดของเชื้อลดลง สอดคล้องกับที่ Uhlin และคณะ (1979) ได้รายงานว่า การย้ายเซลล์ไปเจริญที่ 37°ซ. เป็นระยะเวลาที่พอเหมาะ แล้วนำกลับมาเจริญต่อที่ 30°ซ. จะช่วยให้จำนวนพลาสมิดดีเอนเอไม่สูงเกินไป และอยู่ใน steady state ซึ่งจะไม่ส่งผลกระทบให้เซลล์มีการเจริญลดลง สำหรับการทดลองนี้รูปแบบของการเจริญเชื้อ Q_{69} ที่พบแอคติวิตีของ PA สูงที่สุดคือ การเจริญที่ 30°ซ. จนกระทั่ง $O.D._{660}$ = 0.1 หน่วย จึงย้ายไปเจริญที่ 37 °ซ. เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำกลับมาเจริญต่อที่ 30°ซ.

อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบปริมาณพลาสมิดดีเอนเอ pJR 69 กับแอคติวิตีสูงสุดของ PA ในสภาวะที่เจริญในอุณหภูมิ 30°ซ. ตลอดกับเมื่อมีการย้ายมาเจริญที่ 37°ซ. 2 ชั่วโมง พบว่า ในขณะที่ปริมาณพลาสมิด pJR 69 เพิ่มขึ้น 6 เท่า แอคติวิตีสูงสุดกลับเพิ่มขึ้นเพียง 4 เท่า แสดงว่ารูปแบบของอุณหภูมิและเวลาในการบ่มเชื้ออาจมีผลต่อการถอดระหัสของยีน PA ด้วย และเมื่อลองคิดจำนวนพลาสมิดต่อเซลล์อย่างคร่าว ๆ พบว่า เซลล์ซึ่งเจริญที่ 30°ซ. ตลอด ควรจะมีจำนวนพลาสมิดประมาณ 50 copy น่าจะมี PA operon 50 ชุด แต่เมื่อเปรียบเทียบแอคติวิตีของ PA ของ Q_{69} กับ E. coli ATCC 11105 กลับพบว่าสูงกว่า E. coli ATCC 11105 เพียง 2.2 เท่า ซึ่งสอดคล้องกับที่ Chang และคณะ (1983) รายงานว่า เมื่อ recombinant plasmid DNA ที่มียีน PA ของ E. coli ATCC 11105 มีประมาณ 70 copy กลับพบแอคติวิตีของ PA สูงกว่า E. coli ATCC 11105 ประมาณ 20 เท่า ซึ่งอธิบายในแง่ของการที่ยีน PA ทุก ๆ ชุด อาจไม่สามารถถอดระหัสหรืออาจถอดระหัส แต่ได้ผลิตภัณฑ์ที่

ไม่มีแอคติวิตีก็ได้

การที่ Q_{69} สามารถให้แอคติวิตีของ PA ได้ อาจอนุมานได้ว่า RNA polymerase ของ E. coli HB 101 ซึ่งเป็น E. coli K-12 สามารถ recognized บริเวณ promotor ของ PA operon ของ E. coli ATCC 11105 ได้ อีกทั้งการที่ Q_{69} สามารถสร้าง PA โดยไม่ต้องอาศัยการชักนำด้วย PAA อาจสรุปได้เช่นเดียวกับ Mayer และคณะ (1980) ว่า Regulatory gene ไม่ได้ติดมากับ PA operon ที่ clone ได้จากการทดลอง

จากสมบัติต่าง ๆ ของ Q_{69} จะเห็นได้ว่า Q_{69} มีข้อดีกว่า E. coli ATCC 11105 ในแง่ของการให้แอคติวิตีสูงสุดของ PA สูงกว่า E. coli ATCC 11105 ประมาณ 9.3 เท่า โดยไม่จำเป็นต้องอาศัย PAA เป็นตัวชักนำ แต่ถึงกระนั้น Q_{69} ก็ยังคงความสามารถถูกกดดันการสร้าง PA ได้โดย glucose catabolite repression และการเจริญสูงสุดของ Q_{69} ในสภาวะที่มีแอคติวิตีของ PA สูงสุดนั้นยังต่ำ

4.4 สมบัติของ Catabolite derepressed mutant R_9 และ S_5

R_9 เป็นมิวแตนท์ที่แยกได้จากการกลายพันธุ์ E. coli C 600 ที่มี pJR 69 ด้วยรังสีอุลตราไวโอเลต ซึ่งการที่ต้องย้ายพลาสมิดดีเอนเอ pJR 69 จาก Q_{69} ซึ่งเป็น E. coli HB 101 ที่มี pJR 69 มาสู่ E. coli C 600 ก่อนการกลายพันธุ์ด้วยรังสี UV เนื่องจาก E. coli HB 101 เป็น recA$^-$ mutant จึงมีความไว (sensitive) ต่อรังสี UV มาก ดังนั้นการกลายพันธุ์ Q_{69} ด้วยรังสี UV จะทำไม่ได้ ข้อดีของ R_9 คือหลังจากการกลายพันธุ์แล้ว สามารถสร้าง PA ได้โดยปลอดจาก glucose catabolite repression และมีแอคติวิตีของ PA สูงกว่า Q_{69} (wild type) ซึ่งความผิดปกติของ R_9 นี้ พบว่าเกิดที่โครโมโซมของเซลล์เจ้าเรือน ส่วนข้อเสียของการกลายพันธุ์โดยวิธีนี้คือ Stability ของ R_9 จะต่ำกว่า Q_{69} เนื่องจาก R_9 มีเซลล์เจ้าเรือนเป็น E. coli C 600 ซึ่งไม่มีคุณสมบัติของ recA$^-$ mutant เมื่อ subculture เชื้อบ่อย ๆ จึงพบว่าแอคติวิตีของ PA จะหายไป และไม่พบพลาสมิดดีเอนเอ

S_5 เป็นมิวแตนท์ที่แยกได้จากการกลายพันธุ์ Q_{69} (E. coli HB 101 ที่มี pJR 69) ด้วยสาร NTG ซึ่งหลังจากการกลายพันธุ์แล้ว พบว่า S_5 สามารถสร้าง PA ได้โดยปลอดจาก glucose catabolite repression และมีแอคติวิตีของ PA สูงกว่า Q_{69} (wild type)

ซึ่งความผิดปกติของ S_5 นี้ พบว่าเกิดทั้งบนโครโมโซมของเซลล์เจ้าเรือน และที่พลาสมิดดีเอนเอด้วย ส่วน stability ของ S_5 นั้น ก็พบว่าสูงกว่า R_9 ด้วย เนื่องจากเซลล์เจ้าเรือนของ S_5 เป็น E. coli HB 101 ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น recA⁻ mutant

เมื่อพิจารณาผลเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างค่าแอคติวิตีของ PA เมื่อใช้สับสเตรทต่างกัน วิธีของ Szewezuk นั้น ใช้ PAAB เป็นสับสเตรท เมื่อถูก เอนไซม์ PA ย่อยจะเกิด product เป็น p-aminobenzoic acid (PABA) วิธีนี้มีข้อดีที่ sensitivity สูง ไม่จำเป็นต้องใช้เซลล์มากในการวัดแอคติวิตี สามารถวัดแอคติวิตีได้ในระดับ นาโนโมลของ PABA อีกทั้งสับสเตรทจะไม่ถูกรบกวนกรณีที่มีเอนไซม์ปีตา-แลคตาเมสปะปนอยู่อีก ด้วย Szewczuk และคณะ (1980) รายงานว่า Km ของเอนไซม์ PA ต่อ PAAB เป็น 0.18 mM และ Km ต่อ Penicillin G เป็น 0.20 mM Relative activity ของการวัดเมื่อใช้ PAAB เป็นสับสเตรทจะต่ำกว่าเมื่อใช้เพนนิซิลิน จี เป็นสับสเตรทประมาณ 5 เท่า ซึ่งในการทดลองนี้ พบว่าต่ำกว่าประมาณ 2.3 เท่า ทั้งนี้อาจเกิดเนื่องจากสับสเตรท PAAB ในการทดลองนี้กับการทดลองของ Szewczuk มีความแตกต่างกันเพราะต้องสังเคราะห์เอง ส่วนการวัดโดยใช้วิธีของ Balasingham ใช้เพนนิซิลินเป็นสับสเตรทเมื่อถูกเอนไซม์ PA ย่อยจะเกิด product เป็น 6-APA วิธีนี้มี sensitivity ต่ำกว่า จำเป็นต้องใช้เซลล์จำนวนมากกว่าในการวัดแอคติวิตี ซึ่งสามารถวัดได้ในระดับไมโครโมลของ 6-APA และสับสเตรทจะถูกรบกวนในกรณีที่มีเอนไซม์ปีตา-แลคตาเมสปะปนอยู่ด้วย ถึงแม้ Km ของเอนไซม์ PA ต่อเพนนิซิลิน จี จะต่ำกว่าเอนไซม์ปีตา-แลคตาเมสก็ตาม (Km ของ PA = 20 μM, Km ของปีตา-แลคตาเมส = 22-48 μM (Vandamme , 1980) อาจอนุมานได้ว่า ความจำเพาะของเอนไซม์ต่อสับสเตรท PAAB และเพนนิซิลิน จี ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์ E. coli ATCC 11105 (wild type), Q_{69} (transformant), R_9 และ S_5 (mutant) เพราะ relative activity ของการวัดเมื่อใช้ PAAB เป็นสับสเตรทจะต่ำกว่าเมื่อใช้เพนนิซิลิน จี ประมาณ 2.0-2.3 เท่า อย่างไรก็ตาม การที่เอนไซม์ PA จากทั้งสี่สายพันธุ์สามารถไฮโดรไลซ์ เพนนิซิลิน จี เกิดเป็น 6-APA ได้ ก็แสดงถึงศักยภาพสำคัญที่จะนำไปใช้เพื่อการผลิต 6-APA ต่อไป

R_9 และ S_5 มีคุณสมบัติใกล้เคียงกัน จึงอาจสรุปและวิจารณ์ร่วมกันดังนี้คือ R_9 และ S_5 ไม่สามารถเจริญที่ 37°ซ. อีกทั้งยังมีผลของการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของอุณหภูมิและเวลาที่

ใช้บ่มเชื้อที่มีต่อการเจริญสูงสุด, ปริมาณพลาสมิดดีเอนเอ และแอคติวิตีของ PA คล้ายคลึงกันกับ Q_{69} ด้วย สำหรับรูปแบบของอุณหภูมิและเวลาที่ใช้บ่มเชื้อที่ให้แอคติวิตีของ PA สูงที่สุดใน R_9 เหมือนกับ Q_{69} และใน S_5 คล้ายกับ Q_{69} เพียงแต่ย้ายมาเจริญที่ 37°ซ. 1 ชั่วโมง จึงนำกลับไปเจริญต่อที่ 30°ซ.

ข้อดีของการกลายพันธุ์ที่พบใน R_9 และ S_5 อีกอย่างหนึ่งก็คือ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณพลาสมิดดีเอนเอ pJR 69 กับแอคติวิตีสูงสุดของ PA ในสภาวะที่เจริญที่อุณหภูมิ 30°ซ. ตลอดกับเมื่อมีการย้ายมาเจริญที่ 37°ซ. 2 ชั่วโมง พบว่าในขณะที่ปริมาณพลาสมิดดีเอนเอเพิ่มขึ้น 4 เท่า แอคติวิตีสูงสุดของ PA กลับเพิ่มขึ้นถึง 7 เท่า ซึ่งดีกว่า Q_{69} แต่อย่างไรก็ตาม แอคติวิตีของ PA ที่สูงขึ้นก็ยังคงมีจำนวนเท่าน้อยกว่าปริมาณ copy ของพลาสมิดดีเอนเอ เช่นเดียวกับ R_{69}

จากสมบัติต่าง ๆ ของ R_9 และ S_5 จะเห็นได้ว่า R_9 และ S_5 มีข้อดีกว่า Q_{69} และ E. coli ATCC 11105 ในแง่ของการให้แอคติวิตีของ PA ได้โดยไม่จำเป็นต้องอาศัย PAA เป็นตัวชักนำ อีกทั้งยังปลอดจาก glucose catabolite repression อีกด้วย ซึ่งหมายความว่า ในการเลี้ยง R_9 และ S_5 จะทำให้ R_9 และ S_5 สามารถเพิ่มทั้งจำนวนเซลล์และแอคติวิตีของ PA ได้เพียงโดยการเติมกลูโคส

เมื่อได้นำ R_9 ไปทำ subculture หลาย ๆ ครั้ง ปรากฏว่า activity ของ PA จะสูญหายไป และนำเซลล์ที่ทดลองหาแอคติวิตีไม่พบนั้นไปสกัดพลาสมิด พบว่า พลาสมิดก็หายไปด้วย การรักษาสภาพของพลาสมิดใน R_9 จึงอาจต้องใช้ใส่เพนนิซิลินลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย เป็นการเพิ่มราคาของอาหาร แต่ถ้าใช้ S_5 นั้น ไม่พบเหตุการณ์ดังกล่าว S_5 จึงให้คุณสมบัติในด้านนี้ดีกว่า R_9 ส่วนสมบัติอื่น ๆ ของ S_5 และ R_9 ก็จะคล้ายคลึงกัน

สมมุติฐานของความผิดปกติที่ก่อให้เกิด Catabolite derepressed mutant ในการทดลองนี้คือ

ก. ความผิดปกติที่โครโมโซมของเซลล์เจ้าเรือนที่พบใน R_9 และ S_5 ส่งผลให้

i) CAP protein ของเซลล์เจ้าเรือนที่สร้างออกมา มีความสามารถไปจับที่ CAP site บริเวณ promotor site ของโอเปอรอน PA ของ pJR 69 ช่วย RNA polymerase ถอดรหัสยีน PA ได้โดยไม่ต้องอาศัยการ form complex ระหว่าง CAP protein กับ c-AMP

ii) การสร้าง c-AMP ของเซลล์เจ้าเรือนเกิดมากกว่าปกติ แม้ในสภาวะ

ที่มีกลูโคส (Vogtisek และ Slezak, 1975)

iii) RNA polymerase ของเซลล์เจ้าเรือนที่สร้างออกมา มีความสามารถไปจับกับ promotor site ของ pJR 69 แล้วถอดระหัสยีน PA ได้โดยไม่ต้องอาศัย complex ของ CAP protein กับ c-AMP

ข) ความผิดปกติที่พลาสมิดดีเอนเอ pJR 69 ที่พบใน S_5 ส่งผลให้

i) CAP site บริเวณ promotor site บนพลาสมิดดีเอนเอ เกิดผิดปกติ ทำให้ CAP protein ปกติของเซลล์เจ้าเรือนสามารถไปจับได้ ช่วย RNA polymerase ถอดรหัส ของยีน PA ได้ โดยไม่ต้องอาศัยการ form complex ระหว่าง CAP protein กับ c-AMP ก่อน

ii) promotor site บนพลาสมิดดีเอนเอ เกิดผิดปกติ ทำให้ RNA polymerase ปกติของเซลล์เจ้าเรือนสามารถไปจับ แล้วถอด รหัสของยีน PA ได้โดยไม่ต้องอาศัย complex ของ CAP protein กับ c-AMP (Wojskowiez, 1981)

4.5 เปรียบเทียบการเจริญสูงสุดและแอคติวิตีสูงสุดของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสระหว่าง E. coli ATCC 11105 กับ Q_{69}, R_9 และ S_5

ในตารางที่ 20 จากการสังเกตการเจริญสูงสุดในอาหารอุดม LB พบว่า E. coli ATCC 11105 เจริญได้ดีกว่า Q_{69}, R_9 และ S_5 ประมาณ 1.5 เท่า แต่แอคติวิตีสูงสุดของ PA ของมันกลับต่ำกว่าสายพันธุ์ทั้งสาม ประมาณ 85-86 เท่า

เมื่อเสริม PAA ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า PAA สามารถเพิ่มการเจริญสูงสุดของ E. coli ATCC 11105 ประมาณ 1.1 เท่า ในขณะที่เพิ่มแอคติวิตีสูงสุดของ PA ถึง 9 เท่า ส่วนในสายพันธุ์ทั้งสาม พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงการเจริญสูงสุด และแอคติวิตีสูงสุดของ PA ต่ำลงเล็กน้อย แต่ก็สูงกว่าที่พบในเซลล์ E. coli ATCC 11105 ประมาณ 8-9 เท่า เป็นที่น่าสังเกตว่า Q_{69}, R_9 และ S_5 ไม่จำเป็นต้องอาศัย PAA เป็นสารชักนำการสร้างเอนไซม์ PA

กลูโคสที่เสริมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลให้การเจริญของ E. coli ATCC 11105 ลดลงถึง 2.5 เท่า ทั้งยังกดดันการสร้างเอนไซม์ PA อีกด้วย ในสายพันธุ์ Q_{69} พบว่าแม้มีการเจริญเพิ่มขึ้น 1.4 เท่า แต่การสร้างเอนไซม์ก็ยังคงถูกกดดันเช่นเดียวกับ E. coli ATCC

11105 ปรากฏการณ์ที่น่าสนใจคือ R_9 และ S_5 มีการเจริญเพิ่มขึ้นประมาณ 1.4 เท่า และมีแอคติวิตีสูงสุดของ PA เพิ่มขึ้นประมาณ 1.8 เท่า ซึ่งสูงกว่าที่พบในเซลล์ E. coli ATCC 11105 ถึง 186-189 เท่า และสูงกว่า Q_{69} ประมาณ 93-95 เท่า แสดงว่า R_9 และ S_5 หลอดจากสภาพ Catabolite repression โดยกลูโคสแล้ว

การเปรียบเทียบ S_5 กับ R_9 เมื่อเสริมกลูโคสเพิ่มจาก 0.2 เป็น 1 เปอร์เซนต์ พบว่า การเจริญสูงสุดและแอคติวิตีสูงสุดของ PA ของ R_9 ไม่เปลี่ยนแปลง แต่ในขณะที่แอคติวิตีสูงสุดของ PA ของ S_5 ไม่เปลี่ยนแปลง กลับพบว่าการเจริญสูงสุดเพิ่มขึ้น 1.1 เท่า ซึ่งจะส่งผลให้มี cell mass มากขึ้น ดังนั้นแอคติวิตีรวม (total activity) ของ S_5 ในสภาวะนี้จะสูงกว่าสายพันธุ์ R_9

การที่พบว่า แอคติวิตีสูงสุดของ PA ต่อมิลลิกรัมโปรตีนของ Q_{69}, R_9, S_5 สูงกว่า E. coli ATCC 11105 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ wild type นั้นเนื่องจาก Q_{69}, R_9, S_5 มีจำนวนชุดของ PA operon มากกว่า E. coli ATCC 11105

ส่วนการที่พบว่า แอคติวิตีสูงสุดของ PA ต่อมิลลิกรัมโปรตีนของ Catabolite derepressed mutant R_9 และ S_5 ในสภาวะไม่เสริมกลูโคส สูงขึ้นกว่าในสภาวะที่เสริมกลูโคส แสดงว่าการกลายพันธุ์นอกจากจะทำให้มีคุณสมบัติ Catabolite derepressed ยังอาจไปเปิดกลไกบางอย่างที่ทำให้ PA operon ถอด รหัสของ PA ได้สูงขึ้นเมื่อมีกลูโคสอีกด้วย

เมื่อเปรียบเทียบค่าแอคติวิตีที่สูงที่สุดของ PA ใน Q_{69}, R_9, S_5 กับ E. coli ATCC 11105 แล้ว พบว่ามีแอคติวิตีสูงขึ้น 9.3, 17.3 และ 17.0 เท่า ตามลำดับ ซึ่งจากรายงานของ Mayer และคณะ, 1980 กับ Chang และคณะ, 1983 สามารถแยกสายพันธุ์ที่มี recombinant plasmid DNA คล้าย pJR 69 และพบแอคติวิตีสูงที่สุดของ PA สูงกว่า E. coli ATCC 11105 7.5 กับ 20 เท่า ตามลำดับ

ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่า สายพันธุ์ที่สร้างใหม่มีศักยภาพสูงกว่า E. coli ATCC 11105 ในการที่จะนำไปใช้ผลิต 6-APA ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

ตารางที่ 20 เปรียบเทียบการเจริญสูงสุด และแอคติวิตีสูงสุดของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ระหว่าง E. coli ATCC 11105 กับ Q_{69}, R_9 และ S_5 เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่าง ๆ โดยใช้สภาวะของอุณหภูมิที่ให้แอคติวิตีของ PA สูงที่สุดในแต่ละสายพันธุ์ ดังที่ระบุในผลการทดลองข้างต้น

อาหารเลี้ยงเชื้อ	ชื่อสายพันธุ์	เวลาบ่มที่พบแอคติวิตีสูงสุด (ชั่วโมง)	การเจริญสูงสุด (Klett unit)	แอคติวิตีสูงสุดของ PA (nmole PABA/min/mg protein)	ความสัมพันธ์ของแอคติวิตีสูงสุด (เท่า)	
LB	E. coli ATCC 11105	10	383	4.2	1	-
	Q_{69}	15	250	355.0	85	9.3
	R_9	15	255	362.1	86	-
	S_5	15	260	360.0	86	-
LB + PAA 0.1 %	E. coli ATCC 11105	10	405	38.3	1	1
	Q_{69}	15	254	322.0	8	-
	R_9	15	256	360.0	9	-
	S_5	15	260	358.4	9	-
LB + Glucose 0.2 %	E. coli ATCC 11105	10	150	3.5	1	-
	Q_{69}	15	360	5.8	2	-
	R_9	15	360	661.8	189	17.3
	S_5	15	378	650.1	186	-
LB + Glucose 1 %	R_9	15	365	662.1	189	-
	S_5	15	410	651.2	186	17.0

4.6 สรุปผลการวิจัย

1. พบว่า E. coli ATCC 11105 สามารถใช้ PAA เป็นแหล่งคาร์บอน และเป็นตัวชักนำให้มีการสร้างเอนไซม์ PA ได้ แต่การเจริญและการสร้างเอนไซม์ PA ของ E. coli ATCC 11105 จะถูกกดดันด้วยกลูโคสในขบวนการ catabolite repression

2. สามารถ clone ยีน PA ซึ่งอยู่บนยีน DNA จากโครโมโซมของ E. coli ATCC 11105 ระหว่าง site ของ Hind III และ EcoR I ขนาดประมาณ 4 kb ต่อเข้ากับยีนพลาสมิดตีเอนเอ pSY 343 ได้ recombinant plasmid DNA ชนิดใหม่ ให้ชื่อว่า pJR 69 มีขนาดประมาณ 11 kb

3. พลาสมิดตีเอนเอ pJR 69 ที่อยู่ในเซลล์เจ้าเรือนที่เป็น E. coli K 12 เช่น E. coli HB 101, E. coli C 600 สามารถถอด รหัสของ PA operon ได้โดยไม่ต้องมี PAA เป็นตัวชักนำ

4. Q_{69} คือ E. coli HB 101 ที่มี pJR 69 ซึ่งการเจริญสูงสุดและแอคติวิตีของ PA สูงสุดขึ้นกับรูปแบบของอุณหภูมิและเวลาที่ใช้บ่มเชื้อเพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิดตีเอนเอ ค่าแอคติวิตีสูงสุดของ PA ของ Q_{69} สูงกว่า E. coli ATCC 11105 ประมาณ 9.3 เท่า อีกทั้งการสร้าง PA ของ Q_{69} ไม่จำเป็นต้องใช้ PAA เป็นตัวชักนำ แต่ยังคงถูกควบคุมโดย glucose catabolite repression

5. R_9 และ S_5 เป็น catabolite derepressed mutant สามารถสร้าง PA โดยไม่ต้องใช้ PAA เป็นตัวชักนำ และปลอดจากการถูกควบคุมโดยกลูโคส การเจริญสูงสุด และแอคติวิตีของ PA สูงสุดขึ้นกับรูปแบบของอุณหภูมิ และเวลาที่ใช้บ่มเชื้อเพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิด ค่าแอคติวิตีสูงสุดของ R_9 และ S_5 สูงกว่า E. coli ATCC 11105 ประมาณ 17.3 และ 17.0 เท่า ตามลำดับ และสูงกว่า Q_{69} ประมาณ 1.9 และ 1.8 เท่า ตามลำดับ

6. การถอด รหัสของ PA operon บนพลาสมิด pJR 69 ไม่เพิ่มตามจำนวนเท่าของ copy ของพลาสมิด ซึ่งพบทั้งใน Q_{69}, R_9 และ S_5

7. Stability ของสายพันธุ์ R_9 ต่ำกว่า S_5 และ Q_{69}

8. ไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์บีตา-แลคตาเมส ทั้งใน E. coli ATCC 11105, Q_{69}, R_9 และ S_5

9. elative activity ของการวัดแอคติวิตีของ PA ด้วยการใช้สับสเตรท PAAB ต่ำกว่าการใช้สับสเตรท เพนนิซิลิน สี ประมาณ 2.0-2.3 เท่า ซึ่งไม่มีความแตกต่างกัน ทั้งใน E. coli ATCC 11105, Q_{69}, R_9 และ S_5

4.7 ข้อแนะนำ

สายพันธุ์ Q_{69}, R_9 และ S_5 ที่สร้างขึ้นใหม่ มีประโยชน์ในระดับอุตสาหกรรมสูงกว่า E. coli ATCC 11105

สายพันธุ์ทั้งสามมีประโยชน์แตกต่างกันขึ้นกับวัตถุประสงค์ที่จะนำไปใช้ เช่น Q_{69} อาจเป็นต้นแบบนำไปปรับปรุงพันธุ์ให้มีคุณสมบัติ catabolite derepressed ที่เสถียรกว่า R_9 และ S_5 โดยการทำการตัดต่อ operon เสียใหม่ เช่น ตัดส่วนที่ไม่จำเป็นในการถอดระหัสของ PA ของ operon ออก หรืออาจต่อ strong promotor เพื่อให้ถอดระหัสของ PA operon ดีขึ้น หรือทำ site directed mutagenesis หรือหารูปแบบใหม่ของสภาวะเหมาะสมที่ทำให้ PA operon ที่ไม่สามารถถอดระหัส สามารถถอดระหัสให้แอคติวิตีของ PA สูงขึ้น

และสำหรับ R_9 และ S_5 นั้นถ้าต้องการนำไปทดลองใช้ในระดับอุตสาหกรรมเพื่อผลิต 6-APA นั้น อาจทำได้โดยการปรับปรุงส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้ต้นทุนการผลิตลดลง เช่น การทดลองใช้ กากน้ำตาล เป็นสารตั้นตอการับอนแทนกลูโคสบริสุทธิ์, การใช้อาหารอุตมอื่นซึ่งราคาถูกกว่าทดแทน Yeast extract เป็นต้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย