บทที่ 4

วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย

การสร้างและการรีเจนเนอเรทโปรโตพลาสต์ของ *Streptomyces* sp.190-1

จากผลการทดลองพบว่า การสร้างโปรโตพลาสต์ของ *Streptomyces* sp.190-1 จะมีประสิทธิภาพสูงเมื่อใช้ไมซีเลียมที่มีอายุอยู่ในระยะ middle ถึง late-log phase คือจะได้จำนวนโปรโตพลาสต์อยู่ในช่วง 10^{8} ต่อมล. หรือ 10^{11} ต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง แต่การรีเจนเนอเรทโปรโตพลาสต์จะมีประสิทธิภาพสูงสุด เมื่อเชื้อมีอายุระยะ late-log phase ซึ่งจากรายงานที่กล่าวในบทนำข้างต้น ก็จะพบว่าการสร้างและการรีเจนเนอเรทโปรโตพลาสต์ จะเป็นไปได้ดีเมื่อเชื้อมีอายุอยู่ในระยะ log phase และส่วนใหญ่จะเติมไกลซีนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการเกิดโปรโตพลาสต์ด้วย

Sagara และคณะ (34) เลี้ยงเชื้อ *S. griseoflavus* เพื่อเตรียมโปรโตพลาสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว modified Sabouraud's liquid medium (0.5% ยีสต์เอกซ์แทรค , 4% กลูโคส , 1% โพลีเปปโทน) โดยเติมไกลซีน 5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) พบว่าไมซีเลียมจะถูกยับยั้งการเจริญ แต่ผนังเซลล์จะถูกย่อยสลายด้วยไลโซไซม์ได้ดีกว่าไม่เติมไกลซีน Okanishi และคณะ (31) เตรียมโปรโตพลาสต์จาก *S. griseus* และ *S. venezuelae* โดยเติมไกลซีน 0.8% และ 2.0% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ตามลำดับ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว S (1% กลูโคส , 0.4% เปปโทน , 0.4% ยีสต์เอกซ์แทรค , 0.05% $Mgso_4.7H_2O$, 0.2% KH_2PO_4 , 0.4% K_2HPO_4) พบว่าการย่อยผนังเซลล์ด้วยไลโซไซม์และเอนไซม์ไลติก No.2 ง่ายยิ่งขึ้น และให้ผลการรีเจนเนอเรทโปรโตพลาสต์ดีเมื่อใช้เชื้อในช่วงอายุ mid-log phase แต่เมื่อใช้เชื้อในระยะ stationary phase พบว่าการย่อยผนังเซลล์เป็นไปได้ยากมาก แม้ว่าจะเติมไกลซีนในอาหารเลี้ยงเชื้อก็ตาม Hopwood และคณะ (10,35) ก็แสดงผลการทดลองยืนยันว่า ไกลซีนมีผลทำให้เกิดโปรโตพลาสต์ได้ดีกว่าไม่เติมไกลซีน

โดยศึกษากับ *Streptomyces* 5 ชนิด ได้แก่ *S. lividans* 66 , *S. coelicolor* A3(2) , *S. pavulus* , *S. griseus* และ *S. acrimycini* แต่พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของไกลซีนจะแตกต่างกันไปตามชนิดของ *Streptomyces* โดยอยู่ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 1-4%

อย่างไรก็ตาม ในรายงานวิจัยนี้ ซึ่งศึกษากับ *Streptomyces* sp.190-1 พบว่าไกลซีนไม่มีผลต่อการสร้างโปรโตพลาสต์ (รูปที่ 6) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Mirdamadi และคณะ (37) ที่พบว่าการเติมหรือไม่เติมไกลซีนไม่มีผลต่อการสร้างโปรโตพลาสต์ของ *S. canescens* และ *S. limosus*

Pigac และคณะ (36) พบว่าการเติมไกลซีน 1-3% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว S ตามสูตรของ Okanishi และคณะ (31) สำหรับเลี้ยง *S. rimosus* มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา (morphology) หลังจากที่โปรโตพลาสต์รีเจนเนอเรทแล้ว ดังนั้นเขาจึงเปลี่ยนมาเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ precultivated medium ซึ่งประกอบด้วย 3% tryptic soy broth, 1% ยีสต์เอกซ์แทรค, 10.3% ซูโครส, 1.012% $MgCl_2.6H_2O$, 3.68% $CaCl_2.2H_2O$ พบว่าการรีเจนเนอเรทของโปรโตพลาสต์เป็นไปตามปกติ และยังสังเกตพบว่าการเกิดโปรโตพลาสต์ให้ผลดีโดยไม่ต้องเติมไกลซีน ซึ่งผู้วิจัยคาดว่าอาจเป็นไปได้ว่า สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างจากอาหารเลี้ยงเชื้อ S อาจมีไกลซีนปนอยู่ในสารประกอบอื่น ๆ อยู่บ้างซึ่งเพียงพอที่จะไปมีผลต่อการสร้างเปปติโดไกลแคน ทำให้การย่อยผนังเซลด้วยไลโซไซม์เป็นไปโดยง่าย

ทรานสฟอร์เมชันใน *Streptomyces* sp.190-1

Bibb และคณะ (39) รายงานว่าการทรานสฟอร์มพลาสมิดดีเอนเอในรูปวงแหวนปิด (covalently closed circular,ccc) เข้าสู่โปรโตพลาสต์ของ *Streptomyces* จะให้ประสิทธิภาพสูงโดยใช้โพลีเอธิลีนไกลคอลเป็นสารชักนำ

จากผลการทดลองทำทรานสฟอร์เมชันของพลาสมิดพาหะ pIJ702 และ pIJ699 เข้าสู่ *S. lividans* TK64 และ *Streptomyces* sp.190-1 โดยใช้ PEG ความเข้มข้น 25% (ตารางแสดงผลการทดลองที่ 3) พบว่า *Streptomyces*

sp.190-1 ให้ประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มพลาสมิดทั้งสองต่ำกว่า S. *lividans* TK64 200-400 เท่า โดยให้ทรานสฟอร์แมนท์ประมาณ 10^2 ต่อไมโครกรัมพลาสมิดดีเอนเอเท่านั้น และเมื่อทดลองแปรผันความเข้มข้นของ PEG พบว่าประสิทธิภาพการทรานสฟอร์มพลาสมิด pIJ702 ก็ไม่แตกต่างกันมากนัก (ตารางที่ 4) คาดว่าการที่ *Streptomyces* sp.190-1 มีประสิทธิภาพในการทรานสฟอร์มต่ำอาจเนื่องมาจากมี restriction system ในเซลเจ้าบ้าน ซึ่งมีรายงานของ Bailey และ Winstanley (43) ศึกษาการยับยั้ง restriction system ใน S. *clavuligesus* โดยวิธีการบ่มโปรโตพลาสต์ก่อนนำมาทำทรานสฟอร์เมชันที่อุณหภูมิสูงชั่วขณะ ซึ่ง Engel (44) ก็ได้นำวิธีการบ่มด้วยความร้อนมาใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพการทรานสฟอร์มใน S. *tendae* เช่นกัน สำหรับ *Streptomyces* sp.190-1 พบว่าการบ่มโปรโตพลาสต์ก่อนนำไปทำทรานสฟอร์เมชันที่ 40°ซ 10 นาที ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทรานสฟอร์มได้เพียง 5 เท่าเท่านั้น และถ้าเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้น พบว่าจะได้ทรานสฟอร์แมนท์ลดลง ทั้งนี้ อาจเป็นเพราะโปรโตพลาสต์ไม่เสถียรในอุณหภูมิสูงขึ้น ซึ่งโดยทั่วไปแล้วพบว่าโปรโตพลาสต์จะไม่เสถียรที่อุณหภูมิสูง (30)

ทรานสฟอร์เมชันใน S. *lividans* TK64

เมื่อทรานสฟอร์มพลาสมิดเข้า *Streptomyces* sp.190-1 แล้ว ได้ผลต่ำ จึงนำพลาสมิดพาหะ pIJ699 และ pIJ702 มาทรานสฟอร์มเข้าสู่ S. *lividans* TK64 ซึ่งเป็นเชื้อมาตรฐาน

Hopwood และคณะ (13) รายงานว่า S. *lividans* และ S. *coelicolor* A3(2) เมื่อทรานสฟอร์มด้วยพลาสมิดที่อยู่ในรูปวงแหวนปิด (ccc DNA) จะได้ทรานสฟอร์แมนท์ 10^6-10^7 ต่อไมโครกรัมของพลาสมิด

จากผลการทดลองในตารางที่ 6 พบว่าเมื่อทรานสฟอร์ม S. *lividans* TK64 ด้วยพลาสมิด pIJ702 และ pIJ699 ที่ยังไม่ได้ตัด ได้จำนวนทรานสฟอร์แมนท์อยู่ในช่วง 10^5 ต่อไมโครกรัมพลาสมิด ซึ่งต่ำกว่าการรายงานของ Hopwood ข้างต้น 10-100 เท่า Bibb และคณะ (42) รายงานว่าถ้าทรานสฟอร์มพลาสมิดที่อยู่ในรูปวงแหวนเปิด (open circular) หรือในรูปเส้น (linearised plasmid) ที่มีปลาย

ดีเอนเอเป็นปลายเหนียว (sticky ends) พบว่าประสิทธิภาพของทรานสฟอร์เมชัน ใน S. *lividans* และ S. *coelicolor* A3(2) จะลดลงประมาณ 10-100 เท่า จากเมื่อทรานสฟอร์มด้วยพลาสมิดในรูปวงแหวนปิด

ผลการทดลองสกัดพลาสมิดในรูปที่ 10 และ 11 ในช่องที่ 1 พบว่าพลาสมิด pIJ702 และ pIJ699 ที่สกัดได้นั้นไม่ได้อยู่ในรูปวงแหวนปิดทั้งหมด แต่มีส่วนของพลาสมิดในรูปวงแหวนเปิดปนมาด้วย โดยแถบสว่างล่างสุดคือแถบของพลาสมิดในรูปวงแหวนปิด ซึ่งมีความเข้มข้นสูงกว่าแถบสว่างแถบบนซึ่งอยู่ในรูปวงแหวนเปิด โดยเทียบผลจากรายงานของ Kieser (52) จึงเป็นไปได้ว่าการทรานสฟอร์ม pIJ702 และ pIJ699 เข้าสู่ S. *lividans* TK64 นั้นมีประสิทธิภาพลดลงเพราะมีพลาสมิดในรูปวงแหวนเปิดปนอยู่ด้วย

เมื่อทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีส่วนของ pIJ702 และ pIJ699 เข้าสู่ S. *lividans* TK64 นั้นพบว่าประสิทธิภาพของทรานสฟอร์เมชันจะลดลงประมาณ 100-200 เท่า ซึ่งการทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดใน *Streptomyces* ส่วนใหญ่พบว่าประสิทธิภาพของทรานสฟอร์เมชันจะลดลงกว่าเดิมประมาณ 100 เท่า (9)

การแสดงออกของไซแลเนสยีนในโคลนของ S. *lividans* TK64

จากผลการทดลองโคลนไซแลเนสยีน จากโครโมโซมอลดีเอนเอ ของ *Streptomyces* sp.42-9 เข้าสู่ S. *lividans* TK64 โดยใช้ pIJ699 เป็นพลาสมิดพาหะพบว่าได้โคลนที่ให้วงใสรอบโคโลนี 3 โคลน เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ (รูปที่ 12) ซึ่งสกัดได้รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPT6C , pPT6E และ pPT6G และเมื่อใช้ pIJ702 เป็นพลาสมิดพาหะ ได้โคลนที่ให้วงใสรอบโคโลนี 5 โคลน (รูปที่ 15) ซึ่งสกัดได้รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPT7-1 , pPT7-2 , pPT7-3 , pPT7-4 และ pPT7-5

เมื่อนำโคลนเหล่านี้ไปเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ พบว่าโคลนที่มีพลาสมิด pPT6C และ pPT6E ให้แอคติวิตีของไซแลเนสสูงกว่าใน *Streptomyces* sp.42-9 เล็กน้อย ขณะที่ pPT6G ให้แอคติวิตีต่ำกว่า (ตารางที่ 7) ซึ่งไซแลเนสแอคติวิตีที่ได้จากทั้ง 3 โคลนนี้ จัดว่าใกล้เคียงกับของ *Streptomyces*

sp.42-9 pIJ699 เป็นพลาสมิดที่เพิ่มจำนวนได้หลายชุด แต่การที่ปริมาณเอนไซม์ไม่เพิ่มสูงขึ้นนั้น อาจเนื่องมาจากการแสดงออกของไซแลเนสยีนในโคลนทั้งสาม ยังอยู่ภายใต้การควบคุมของยีนควบคุม และโปรโมเตอร์ยีน บนชิ้นส่วนดีเอนเอที่โคลนได้ (inserted DNA) โดยไม่ได้รับอิทธิพลจากโปรโมเตอร์บน pIJ699 ทั้งนี้เพราะสมบัติของพลาสมิดนี้ มีส่วนของยีน ter อยู่ทั้งสองปลายของพาหะ ซึ่งจะเป็นผลให้การอ่านรหัสของพาหะจะถูกหยุดก่อนที่จะอ่านเข้าไปในดีเอนเอที่ถูกโคลน (23) เนื่องจากพลาสมิด pIJ699 เป็นพลาสมิดที่ถูกสร้างขึ้นใหม่ จึงยังไม่พบรายงานผู้ศึกษาการโคลนยีนด้วยพลาสมิดนี้ ดังนั้นจึงไม่มีผลการทดลองจากรายงานอื่น ๆ มาเปรียบเทียบกับผลการทดลองนี้

แม้ว่าจะมีรายงานหลายฉบับ กล่าวถึงการนำ pIJ702 มาใช้ในการโคลนยีนและสามารถเพิ่มผลิตภัณฑ์ของยีนที่โคลนได้นั้นหลายเท่า เช่น Kendal และ Cullum (5) สามารถเพิ่มการสร้างอะกาเรส ได้ถึง 500 เท่า โดยการโคลนอะกาเรสยีนจาก *S. coelicolor* A3(2) เข้าสู่ *S. lividans* 66 และยังพบว่าการสร้างเอนไซม์ถูกเปลี่ยนจากลักษณะ inducible เป็นแบบ constitutive Mondou และคณะ (6) นำมาใช้ในการโคลนไซแลเนสยีน ใน *S. lividans* สามารถเพิ่มไซแลเนสแอคติวิตีได้กว่า 60 เท่า แต่การสร้างเอนไซม์ยังคงเป็นลักษณะชักนำ Iwasaki และคณะ (7) นำมาใช้ในการโคลนไซแลเนสยีนจาก *Streptomyces* sp. No.36a เข้าสู่ *S. lividans* TK21 และ *S. kasugaensis* ได้แอคติวิตีเพิ่มขึ้น 10-70 เท่า และการสร้างเอนไซม์ยังคงเป็นลักษณะชักนำ

สำหรับการทดลองนี้ ซึ่งใช้ pIJ702 เป็นพลาสมิดพาหะในการโคลนไซแลเนสยีนจาก *Streptomyces* sp.42-9 เข้าสู่ *S. lividans* TK64 และได้ 5 โคลนที่มีวงใสรอบโคโลนี เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งที่มีไซแลน คือ pPT7-1 , pPT7-2 , pPT7-3 , pPT7-4 และ pPT7-5 แต่เมื่อนำมาตรวจหาแอคติวิตีของไซแลเนสพบว่าค่อนข้างต่ำกว่าของ *Streptomyces* sp.42-9 (ตารางที่ 8) นอกจากนั้นวงใสรอบโคโลนีของโคลนที่ได้ เป็นลักษณะโปร่งทึบ (opaque) ขณะที่วงใสรอบโคโลนีของ *Streptomyces* sp.42-9 เป็นลักษณะโปร่งแสง (transparent) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการโคลนไซแลเนสยีนจาก *Streptomyces* sp.42-9 ยังได้ยีนมาไม่ครบสมบูรณ์ เพราะไซแลเนสเป็นเอนไซม์เชิงซ้อน ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์หลักอย่างน้อย 2 กลุ่ม

กลุ่มแรกได้แก่ endo-1,4-β-xylanase ซึ่งย่อยสลายไซแลนได้ผลิตภัณฑ์คือ ไซโลส และไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ (xylooligosaccharide) โดยย่อยแบบสุ่มภายใน และกลุ่มที่ 2 คือ β-xylosidase ซึ่งย่อยไซแลนทีละหนึ่งหน่วยจากปลาย ได้ไซโลสเป็นผลิตภัณฑ์ (49) ดังนั้น ถ้าโคลนทั้ง 5 ของการทดลองนี้ ได้ยีนสำหรับการแสดงออกของไซแลเนสจาก *Streptomyces* sp.42-9 มาไม่ครบสมบูรณ์ จึงอาจเป็นไปได้ว่าการย่อยสลายไซแลนจึงไม่ได้ไซโลสปริมาณมากในขั้นสุดท้าย แต่ยังคงมีไซแลนที่ถูกย่อยอยู่ในรูปของไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ เช่น ไซโลเพนโตส (xylopentose) , ไซโลเฮกโซส (xylohexose) จึงทำให้เห็นเป็นวงใส ลักษณะโปร่งทึบรอบโคโลนี

นอกจากนั้น การผลิตไซแลเนสสำหรับจุลินทรีย์ส่วนใหญ่อาจสามารถผลิตได้มากกว่า 1 ชนิด (multiple xylanases) (62,65) Marui และคณะ (63) พบว่า *Streptomyces* sp. strain 3137 ผลิตเอนไซม์ไซแลเนสได้ 3 ชนิด นอกจากนี้การผลิตไซแลเนสยังแบ่งได้เป็นไซแลเนสกลุ่มหลัก (major xylanase) ซึ่งนิยมศึกษาการทำไซแลเนสให้บริสุทธิ์ (purification) โดยไซแลเนสกลุ่มหลักนี้จะผลิตออกมาปริมาณมาก อีกกลุ่มหนึ่งคือ ไซแลเนสกลุ่มย่อย (minor xylanase) ซึ่งจะผลิตออกมาในปริมาณน้อย เมื่อเทียบกับไซแลเนสกลุ่มหลักในช่วงการเจริญเดียวกัน (62) จากการศึกษาการผลิตไซแลเนสใน *Trichoderma viride* (65) พบว่ามีการผลิตไซแลเนสกลุ่มหลัก 3 ชนิด และไซแลเนสกลุ่มย่อยอีก 10 ชนิด ดังนั้น อาจเป็นไปได้ว่า ไซแลเนสยีนของ *Streptomyces* sp. 42-9 ที่โคลนเข้ามาในพลาสมิดทั้ง 5 ชนิด ได้รับส่วนของยีนที่แสดงออกของไซแลเนสกลุ่มย่อย จากการที่เลี้ยงในอาหารที่มีไซแลน แล้ววัดแอคติวิตีของไซแลเนสได้ต่ำมาก อาจเพราะการหลั่งไซแลเนสกลุ่มย่อยมีปริมาณน้อย และยังอาจดูดซับ (adsorption) อยู่กับไซแลนที่ไม่ละลายน้ำได้ด้วย (62) เนื่องจากการทำไซแลเนสให้บริสุทธิ์ของ *Streptomyces* sp.42-9 กำลังอยู่ในระหว่างการวิจัย (โดยนางสาวกมลวรรณ มั่นภักดี นิสิตปริญญาโท ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) จึงยังสรุปไม่ได้ว่า *Streptomyces* sp. 42-9 สร้างไซแลเนสกี่ชนิด

เมื่อนำโคลนที่มีพลาสมิด pPT6C , pPT6E และ pPT6G มาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีกากรำข้าวโดยใช้สูตรที่ปรับปรุงเหมาะสมแล้วสำหรับ *Streptomyces* sp.42-9

พบว่า โคลนที่มีพลาสมิด pPT6C , pPT6E และ pPT6G ยังคงให้แอคติวิตีของไซแลเนสใกล้เคียงกับ *Streptomyces* sp.42-9 (ตารางที่ 7) สำหรับโคลนที่มีพลาสมิด pPT7-1 , pPT7-2 , pPT7-3 , pPT7-4 และ pPT7-5 ไม่สามารถวัดแอคติวิตีของไซแลเนสได้ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีกากรำข้าวอาจเนื่องจากปริมาณเอนไซม์ไซแลเนสต่ำ และไม่เพียงพอในการย่อยสลายกากรำข้าวให้เป็นไซโลส

การแสดงออกของไซแลเนสยีนจากโคลนทั้งแปดใน *Streptomyces* sp.190-1

เมื่อนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPT6C , pPT6E และ pPT6G ทรานสฟอร์มเข้าสู่ *Streptomyces* sp.190-1 พบว่าการผลิตไซแลเนสลดลงจากเมื่อทรานสฟอร์มเข้า *S.lividens* TK64 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซแลน (ตารางที่ 9) และเมื่อนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pPT7-1 , pPT7-2 , pPT7-3 , pPT7-4 และ pPT7-5 ทรานสฟอร์มเข้าสู่ *Streptomyces* sp.190-1 กลับให้ปริมาณไซแลเนสสูงขึ้นกว่าเมื่อให้ *S. lividens* TK64 เป็นเซลเจ้าบ้าน ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าพลาสมิดที่ทรานสฟอร์มเข้าสู่ *Streptomyces* sp. 190-1 เกิดการเปลี่ยนแปลงของยีน (modification) เนื่องจาก restriction system ในตัวเอง มีรายงานการโคลนไซแลเนสยีนจาก *Aeromonas* sp. strain 212 เข้า *E. coli* (66) ปรากฏว่าโคลนใหม่ที่ได้ผลิตไซแลเนสที่มีน้ำหนักโมเลกุลลดลงกว่าเดิม ทั้ง ๆ ที่ผลิตจากยีนเดียวกันและทดสอบแล้วว่ามีคุณสมบัติทางกายภาพ (physiochemical) เหมือนกัน ดังนั้นจึงควรจะต้องมีการศึกษาต่อไปในแง่ของการเปรียบเทียบถึงน้ำหนักโมเลกุลของไซแลเนส ที่ผลิตโดย *Streptomyces* sp.42-9 และโคลนของ *Streptomyces* sp.190-1 ว่ามีขนาดเท่ากันหรือไม่ การผลิตไซแลเนสที่แตกต่างกันในจุลินทรีย์ อาจเนื่องมาจาก postranslational modification (64,67) เช่นการเกิดการเปลี่ยนแปลงของ mRNA processing, glycosylation, amidation หรือ partial proteolysis ซึ่งอาจเกิดอย่างใดอย่างหนึ่งหรือเกิดพร้อมกันหลายอย่างก็ได้

นอกจากนั้นการเปลี่ยนเซลล์เจ้าบ้านในการทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดทั้ง 8 จาก *S. lividens* TK64 เป็น *Streptomyces* sp.190-1 พบว่าเอนไซม์ที่ผลิตได้มีระดับแตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากอิทธิพลของเซลล์เจ้าบ้านต่อการแสดงออก

ของยีน และการส่งผ่านเอนไซม์ออกนอกเซลล์ รวมทั้งองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ อาจยังไม่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ในแต่ละโคลน

จากผลการวัดแอคติวิตีของไซแลเนสใน *Streptomyces* sp.190-1 ซึ่งเป็นเซลเจ้าบ้าน ก็พบว่ามีแอคติวิตีบ้างแม้จะไม่สูงนัก *Streptomyces* sp.190-1 จึงน่าจะมียีนที่แสดงไซแลเนสแอคติวิตี ดังนั้น พลาสมิดที่ทรานสฟอร์มเข้าไป อาจสร้างโปรตีนอื่น ๆ ไปกระตุ้นการสร้าง หรือยับยั้งการสร้างไซแลเนสของเซลเจ้าบ้านเองก็ได้

ขนาดชิ้นส่วนของดีเอนเอจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่แสดงแอคติวิตีของไซแลเนส

จากรายงานการโคลนไซแลเนสยีนใน *Streptomyces* Mondou และคณะ (30) พบว่าได้ขนาดของไซแลเนสยีน 2 กิโลเบสเมื่อทำการโคลนย่อย (subcloning) Iwasaki และคณะ (31) พบว่าขนาดเล็กที่สุดของไซแลเนสยีนที่ยังแสดงออกแอคติวิตีของไซแลเนส คือ 1.04 กิโลเบส Ghangas และคณะ (47) พบว่าไซแลเนสยีนของ *Thermomonospora fusca* ที่โคลนเข้า *S. lividans* มีขนาด 2.1 กิโลเบส

สำหรับการทดลองนี้ซึ่งโคลนไซแลเนสยีนจาก *Streptomyces* sp.42-9 เข้าไปในเซลเจ้าบ้าน คือ *S. lividans* TK64 และ *Streptomyces* sp.190-1 โดยใช้ pIJ699 และ pIJ702 เป็นพลาสมิดพาหะ พบว่า ชิ้นส่วนของดีเอนเอที่มีไซแลเนสยีน มีขนาดตั้งแต่ 0.5-14.2 กิโลเบส การที่ได้ชิ้นส่วนดีเอนเอขนาดเล็กถึง 0.5 กิโลเบส อาจเป็นไปได้ว่า ปลายของชิ้นส่วนขนาดเล็กนี้ไปจับเบสคู่สมกับชิ้นส่วนดีเอนเอขนาดใหญ่ที่แยกออกมาคือช่วง 3-8 กิโลเบส ซึ่งมีรายงานจาก Bethesda Research Laboratories (BRL), U.S.A. พบว่าชิ้นส่วนของแลมดาดีเอนเอ (λ) ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ HindIII ขนาด 4.36 กิโลเบสนั้น สามารถจับกับชิ้นส่วนขนาด 23.13 กิโลเบส ได้ด้วยปลายเหนียวที่เหมือนกันของชิ้นส่วนทั้งสอง ซึ่งสามารถแยกออกจากกันได้โดยการบ่ม λ HindIII ที่ 65°ซ เป็นเวลา 10 นาที

สำหรับชิ้นส่วนดีเอนเอขนาดใหญ่ที่มีไซแลเนสยีนถึง 14.2 กิโลเบส อาจเกิดจากการเชื่อมกันเองของชิ้นส่วนโครโมโซมอลดีเอนเอของ *Streptomyces* sp. 42-9 ที่คัดเลือกไว้ขนาด 3-8 กิโลเบส มากกว่า 1 ชิ้น (multiple inserts) ในระหว่างขั้นตอนการเชื่อมกับพลาสมิดพาหะ

อย่างไรก็ตาม ในการทดลองนี้ยังไม่สามารถระบุชิ้นส่วนขนาดเล็กที่สุดของดีเอนเอที่จำเป็นต่อการแสดงออกของไซแลเนสยีนจาก *Streptomyces* sp.42-9 ได้ ซึ่งจะต้องมีการศึกษาโดยการโคลนย่อยต่อไป

การแสดงออกของกลูโคสไอโซเมอเรสภายหลังโคลนไซแลเนสยีนเข้าสู่ *Streptomyces* sp.190-1

จากการหาแอคติวิตีของกลูโคสเอโซเมอเรส พบว่าโคลนทั้งแปดให้แอคติวิตีต่ำกว่า *Streptomyces* sp.190-1 ประมาณ 20-30% แสดงว่ารีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ทรานสฟอร์มเข้าไปอาจสร้างโปรตีนบางชนิด ที่ไปมีผลต่อการแสดงออกของเอนไซม์ เนื่องจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเหล่านี้ มีส่วนของ tsr ยีน ซึ่งเป็นยีนที่สร้าง RNA methylase จึงอาจมีผลต่อการสร้างโปรตีนใน *Streptomyces* sp.190-1 ทำให้การสร้างเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสลดลง

จากผลการวิจัยครั้งนี้ พบว่าเทคโนโลยีของการโคลนยีน สามารถนำมาปรับปรุงสายพันธุ์ *Streptomyces* sp.190-1 ให้เพิ่มคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์ไซแลเนสเพิ่มขึ้น และยังคงคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสด้วย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย