



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษายีนที่เกี่ยวข้องและสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลาย
อะซีแนพธิลีนโดย *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1

โดย ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มิถุนายน 2547

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษายีนที่เกี่ยวข้องและสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลาย
อะซีแนพธิลีนโดย *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1

โดย ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Abstract (บทคัดย่อ)

Project Code : TRG4580088

(รหัสโครงการ)

Project Title : การศึกษายีนที่เกี่ยวข้องและสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลาย

(ชื่อโครงการ) อะซีแนพรีลินโดย *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1

Investigator : Kobchai Pattaragulwanit, Dr. rer. nat.

Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University

(ชื่อนักวิจัย) : ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

E-mail Address : kobchai@sc.chula.ac.th

Project Period : 2 years

(ระยะเวลาโครงการ)

บทคัดย่อ : *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 เป็นแบคทีเรียที่มีศักยภาพสูงในการย่อยสลายอะซีแนพทิลีนซึ่งแยกได้จากดินที่ปนเปื้อนปิโตรเลียมในประเทศไทย เพื่อศึกษายีนที่เกี่ยวข้องและสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนพทิลีน ได้กลายพันธุ์ด้วยทรานสโปซอน Tn5 เพื่อที่จะได้สายพันธุ์กลายที่ไม่สามารถย่อยสลายอะซีแนพทิลีนได้ เพื่อพิสูจน์ลักษณะสารมัธยันต์ที่สะสมได้เพาะเลี้ยงสายพันธุ์กลาย A53 B1 และ B5 ในอาหารสูตรต่ำที่มีอะซีแนพทิลีน สกัดสารมัธยันต์จากน้ำเลี้ยงโดยใช้เอธิลอะซีเตทและทำให้บริสุทธิ์โดยโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (TLC) และซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟี พิสูจน์ลักษณะสารมัธยันต์ที่บริสุทธิ์ด้วยแมสสเปกโตรเมตรี (MS) และ/หรือนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (NMR) พบว่าสารมัธยันต์ที่สะสมจากสายพันธุ์กลาย A53 B1 และ B5 คือกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก อะซีแนพทริโนนและกรดแนพทาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก นอกจากนี้ได้แยกและศึกษาลักษณะยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพทิลีนโดยเขาเธอร์นาไฮบริไดเซชันดีเอ็นเอของสายพันธุ์ E11 และสายพันธุ์ดั้งเดิม CU-A1 กับตัวติดตาม Tn5 และ AE ตามลำดับ จากนั้นโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วน 4.5 kb *Bam*HI-*Hind*III พบกรอบอ่านรหัสเปิด 5 แห่งซึ่งคล้ายคลึงกับเป็นยีนที่ประมวลรหัสของโปรตีนตามลำดับจาก 5'→3' ดังต่อไปนี้ เฟอร์รีดอกซินรีดักเทส (33%) ไฮดราเทส-อัลโดเลส (38%) 2-คาร์บอกซีเบนซัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (46%) โปรตีนที่คล้ายแอตดูซิน (38%) และดีไฮโดรจีเนส (46%) งานวิจัยนี้ยังเป็นงานวิจัยแรกที่ได้เสนอวิถีการย่อยสลายอะซีแนพทิลีนในแบคทีเรียตระกูล *Rhizobium* โดยอาศัยข้อมูลจากสารมัธยันต์ที่ได้แยกและพิสูจน์ลักษณะ รวมทั้งยีนที่เกี่ยวข้องพบว่าอะซีแนพทิลีนจะถูกย่อยสลายผ่านอะซีแนพทริโนน และกรดแนพทาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก ซึ่งสารประกอบชนิดหลังจะถูกย่อยสลายต่อไปได้เป็นกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก

Keywords: *Rhizobium*, acenaphthylene degradation, intermediates, gene, 2,5-dihydroxybenzoic acid

Abstract : *Rhizobium* sp. strain CU-A1 is a potential acenaphthylene (ACN) degrading bacterium isolated from petroleum contaminated soil in Thailand. In order to study genes involving and intermediates from ACN degradation, transposon Tn5 mutagenesis was performed to obtain ACN degrading defective mutants. To identify accumulated intermediates, the mutant strains A53, B1 and B5 were cultured in minimal medium containing ACN. The intermediates were extracted from culture broth using ethyl acetate and purified by thin layer chromatography and silica gel column chromatography. The purified intermediates were identified by mass spectrometry (MS) and nuclear magnetic resonance to be 2,5-dihydroxybenzoic acid, acenaphthenequinone and naphthalene-1,8-dicarboxylic acid. In addition, genes involving ACN degradation were isolated and characterized by Southern hybridization DNA of the strain E11 and CU-A1 with Tn5- and AE-probe, respectively. The 4.5 kb *Bam*HI-*Hind*III-fragment was then cloned and sequenced. Five open reading frames (ORFs) were identified which showed homology to gene encoding for protein as following: ferredoxin reductase (33%), hydratase-aldolase (38%), 2-carboxybenzaldehyde dehydrogenase (46%), adducin like protein (38%), and dehydrogenase (46%). The ACN degradation pathway was also proposed.

Methodology: *Rhizobium* sp. CU-A1 was mutagenized by Transposon Tn5. Three mutants incapable of growing with ACN were used for isolation of intermediates and genes involving ACN degradation. Mutants were cultivated in carbon free medium containing ACN followed by extraction with ethyl acetate. Isolate intermediates was purified preparative TLC and silica gel column chromatography before subjected to identify by MS and NMR. Genes involving ACN degradation were isolated and characterized by Southern hybridization DNA of strain E11 and CU-A1 with Tn5- and AE-probe, respectively. The 4.5 kb *Bam*HI-*Hind*III-fragment was cloned and nucleotide sequences were determined.

Results and Discussion: Three intermediates were isolated and characterised as 2,5-dihydroxybenzoic acid, acenaphthenequinone and naphthalene-1,8-dicarboxylic acid. Five open reading frames (ORFs) were identified which showed homology to gene encoding for ferredoxin reductase, hydratase-aldolase, 2-carboxybenzaldehyde dehydrogenase, adducin like protein, and dehydrogenase. Base on this results, ACN may be degraded by strain CU-A1 via acenaphthenequinone, naphthalene-1,8-dicarboxylic acid and 2,5-dihydroxybenzoic acid, respectively.

Future direction: The functional analysis of the isolated genes should be performed and some intermediates should be characterized in order to ensure the proposed ACN degradation pathways.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ที่ได้ให้โอกาสและทุนเพื่อทำวิจัยในครั้งนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ ที่ให้ความรู้ ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะตลอดการทำวิจัย รองศาสตราจารย์ ดร.อมร เพชรสม ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ คำแนะนำ และการแปรผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัธยันต์ด้วย MS และ NMR ขอขอบคุณโครงการเงินกู้ธนาคารเพื่อการพัฒนาแห่งเอเชีย (ADB) และโครงการ Thailand-Japan Technology Transfer Project (TJTTP) ที่ได้อนุเคราะห์เครื่อง HPLC เพื่อใช้วิเคราะห์สารมัธยันต์และเครื่องมือในการทำวิจัยอื่นๆ และขอขอบคุณคณาจารย์และนักวิจัยของหน่วยวิจัย Bioremediation ทุกท่านที่ได้ให้ข้อคิดเห็น การสนับสนุนและความช่วยเหลือต่างๆตลอดงานวิจัย และขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่และอำนวยความสะดวกในการทำวิจัยครั้งนี้

บทนำ

ภาวะสิ่งแวดล้อมเป็นพิษจากการแพร่กระจายของสารพิษปนเปื้อนลงสู่สิ่งแวดล้อมในปัจจุบันเกิดจากการขยายตัวของการผลิตในภาคอุตสาหกรรมเพื่อตอบสนองต่อความต้องการของประชากร โดยสารเคมีบางชนิดที่นำมาใช้ในกระบวนการผลิตจัดเป็นสารมีพิษที่มีอันตรายสูง ซึ่งสามารถที่จะแพร่กระจายปนเปื้อนลงสู่สิ่งแวดล้อมได้จากการขาดความรู้และการควบคุมดูแลเอาใจใส่อย่างเคร่งครัดในการเก็บรักษา การนำไปใช้ในกระบวนการผลิต และการกำจัดกากของเสีย ทำให้สารพิษนั้นกระจายสู่สิ่งแวดล้อม

จากการศึกษาปริมาณของเสียอันตรายที่มีผลต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อมที่เกิดขึ้นจากอุตสาหกรรม และทุกกิจกรรมทั่วทั้งประเทศ ในปี พ.ศ. 2535 พบว่ามีของเสียอันตรายเกิดขึ้นประมาณ 1 ล้านตัน และคาดว่าในปี พ.ศ. 2544 จะมีของเสียอันตรายเกิดขึ้นประมาณ 2,813,980 ตันโดยเป็นของเสียอันตรายประเภทน้ำมัน (oil) ประมาณ 589,508 ตัน (สำนักเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อมโรงงาน, 2542) และเป็นของเสียอันตรายที่เกิดจากอุตสาหกรรมปิโตรเลียม 11,813 ตัน (บุญยงค์ โล่ห์วงศ์วัฒน์, 2540) โดยของเสียอันตรายประเภทน้ำมันและปิโตรเลียมจะประกอบด้วยสารอินทรีย์หลายชนิด และที่มีความสำคัญคือ สารในกลุ่มพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (polycyclic aromatic hydrocarbon, PAHs)

พอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) เป็นสารประกอบอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีโครงสร้างของวงอะโรมาติกเบนซีนมาเชื่อมต่อกันเป็นเส้นตรง (linear) เป็นมุมงอ (angular) หรือเป็นกลุ่ม (cluster) โดยมีวงอะโรมาติกเบนซีนตั้งแต่ 2 วงขึ้นไป โดยสาร PAHs มีแหล่งกำเนิดมาจากกระบวนการผลิตในภาคอุตสาหกรรมหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับน้ำมันดิบ ถ่านหิน น้ำมันดำ จากถ่านหิน (coal tar) ครีโอโซท (creosote) ผลิตภัณฑ์จากน้ำมันปิโตรเลียม และเกิดจากกระบวนการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของเชื้อเพลิงฟอสซิล (Volkering *et al.*, 1992) นอกจากนี้สาร PAHs ยังสามารถเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติจากการรั่วซึมของแหล่งน้ำมันตามธรรมชาติ ไฟไหม้ป่า และภูเขาไฟระเบิด เป็นต้น (Cerniglia, 1992) สารประกอบ PAHs สามารถปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อมทั้งอากาศ ดิน แหล่งน้ำบนดิน และใต้ดินในปริมาณสูง (Fernandez *et al.*, 1992)

สารประกอบ PAHs จัดเป็นสารที่ก่อให้เกิดอันตรายร้ายแรงต่อสิ่งมีชีวิตเนื่องจากความเป็นพิษของสาร เป็นสารซึ่งก่อให้เกิดมะเร็ง (carcinogen) เป็นสารที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของยีน (mutagen) และเป็นสารที่ทำให้ทารกในครรภ์มีรูปร่างผิดปกติ (teratogen) (Wilson & Jones, 1993) หน่วยงานคุ้มครองสิ่งแวดล้อมของสหรัฐอเมริกา (The U.S. Environmental Protection Agency, EPA) จึงได้กำหนดให้สารประกอบ PAHs 16 ชนิดดังแสดงในรูปที่ 1 ได้แก่ แนพทาลีน (naphthalene) อะซีแนพทีน (acenaphthene) อะซีแนพทิลีน (acenaphthylene) ฟลูออรีน (fluorene) ฟีนแอนทรีน (phenanthrene) แอนทราซีน (anthracene) ฟลูออแรนทีน (fluoranthene), เบนซ์[เอ]แอนทราซีน (benz[a]anthracene), ไครซีน (chrysene), ไพรีน (pyrene) เบนโซ[บี]ฟลูออแรนทีน (benzo[b]fluoranthene) เบนโซ[เค]ฟลูออ

แรนธรีน (benzo[k]fluoranthene) เบนโซ[เอ]ไพรีน (benzo[a]pyrene) ไดเบนซ์[เอ,เอช]แอนทราซีน (dibenz[ah]anthracene) เบนโซ[จี,เอช,ไอ]เพอร์ลิซีน (benzo[ghi]perylene) และอินดิโน-[1,2,3,ซีดี]ไพรีน (indeno[1,2,3cd]pyrene) เป็นสารพิษที่มีความสำคัญในลำดับต้นๆ ที่จะต้องป้องกันการปนเปื้อนของสารพิษดังกล่าวสู่สิ่งแวดล้อม (Wilson & Jones, 1993) ในประเทศไทย ได้มีการออกพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2535 ซึ่งกำหนดให้สารประกอบ PAHs มีสมบัติจัดอยู่ในประเภทวัตถุอันตรายประเภทที่ 7 คือ วัตถุที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม (พระราชบัญญัติวัตถุอันตราย, 2535)

อะซีแนพทิลีน (acenaphthylene)

อะซีแนพทิลีนเป็นสารประกอบชนิดหนึ่งในกลุ่มพอลิไซคลิกอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน ที่มีโครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยวงเบนซีน 2 วงและวงไซโคลเพนทีน 1 วงเชื่อมต่อกันเป็นกลุ่ม อะซีแนพทิลีนเป็นส่วนประกอบของน้ำมันดิบ น้ำมันดำจากถ่านหิน คันนูทรี (Neurath, 1972) ผลิตภัณฑ์ปิโตรเคมี ผลิตภัณฑ์จากถ่านหินและเกิดจากการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของเชื้อเพลิงฟอสซิล (Alexander *et al.*, 1985; Radke, 1987) และยังพบได้ในอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์สารทนอมและรักษาเนื้อไม้ (Wilson & Jones, 1993) อะซีแนพทิลีนสามารถกระจายสู่สิ่งแวดล้อมทั้งอากาศ พื้นดิน แหล่งน้ำใต้ดิน และแหล่งน้ำบนดินเนื่องจากการรั่วไหลของผลิตภัณฑ์ดังกล่าวจากการนำไปใช้ในกระบวนการอุตสาหกรรม รวมทั้งการขนส่ง การดูแลเก็บรักษา ตลอดจนการกำจัดกากของเสียจากอุตสาหกรรมดังกล่าว (Mattox & Humenick, 1980)

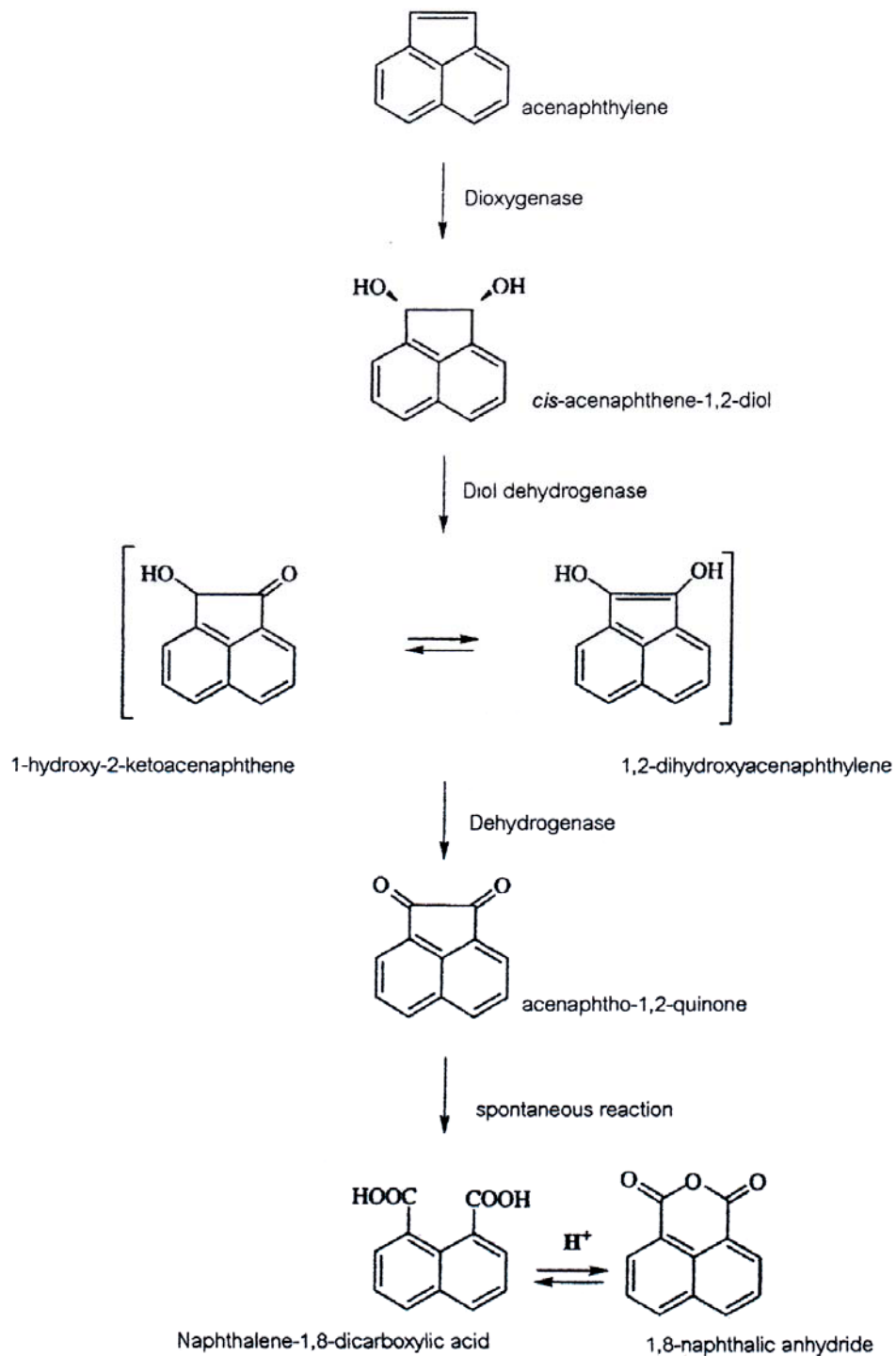
อะซีแนพทิลีนและสาร PAHs ชนิดอื่น เป็นสารที่มีความคงทนในสิ่งแวดล้อมเนื่องจากมีโครงสร้างโมเลกุลที่เสถียร ละลายน้ำได้น้อยมาก จึงทำให้เกิดการตกค้างสะสมอยู่ในสิ่งแวดล้อม และสามารถเข้าสู่ห่วงโซ่อาหารได้ด้วยการสะสมอยู่ในพืชที่ขึ้นบนดินหรือน้ำที่ปนเปื้อน จากนั้นเข้าสู่สัตว์ผ่านทางห่วงโซ่อาหารและเข้าสู่มนุษย์ได้ในที่สุด แม้ว่าอะซีแนพทิลีนมีความเป็นพิษไม่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับสารประกอบ PAHs อื่นที่มีมวลโมเลกุลใหญ่ แต่ได้มีรายงานว่าอะซีแนพทิลีนมีความเป็นพิษ (toxicity) ต่อสัตว์น้ำจืดและน้ำเค็ม ทำให้เกิดพิษเฉียบพลัน (Lederer, 1985) แม้ยังไม่มีรายงานความเป็นพิษร้ายแรงในมนุษย์ แต่อะซีแนพทิลีนอาจทำให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนังและระบบหายใจได้ (Lederer, 1985) สารอนุพันธ์บางตัวของอะซีแนพทิลีนยังสามารถก่อให้เกิดมะเร็งและการกลายพันธุ์ได้ (LaVoie & Rice, 1988) เนื่องจากอะซีแนพทิลีนจัดเป็นสารอันตรายที่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม จึงทำให้มีความสนใจที่จะบำบัดสิ่งแวดล้อมที่ถูกปนเปื้อนด้วยอะซีแนพทิลีน การบำบัดสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนด้วยอะซีแนพทิลีนสามารถกระทำได้หลายวิธี เช่น การบำบัดด้วยวิธีทางกายภาพ อาทิการกรอง การทำให้แห้ง การสกัดด้วยตัวทำละลาย การใช้ผงถ่านกัมมันต์ในการดูดซับ (Manahan, 1993) การบำบัดด้วยวิธีทางเคมี (Cockson, 1995) การเผาที่อุณหภูมิสูงมาก (incineration) การฝังกลบ (landfill) และแนวทางหนึ่งที่มีประสิทธิภาพเป็นที่ยอมรับและใช้กันอย่างแพร่หลาย คือ กระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพ (bioremediation) โดยการใช้ประโยชน์จากความสามารถของจุลินทรีย์ เพื่อย่อยสลายสารพิษให้มีความเป็นพิษลดลงหรือหมดไป

(Mueller *et al.*, 1989) ซึ่งเป็นวิธีที่ได้เปรียบกว่าการบำบัดด้วยวิธีอื่น เนื่องจากมีความปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม ค่าใช้จ่ายต่ำ (Lee & Cutright, 1996) และไม่ก่อให้เกิดสารพิษชนิดใหม่ที่มีอันตรายมากกว่าเดิมเนื่องจากจุลินทรีย์ใช้สารพิษเป็นแหล่งพลังงานและคาร์บอน จึงสลายสารพิษบางชนิดได้อย่างสมบูรณ์ (mineralization) และได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำและคาร์บอนไดออกไซด์ (Wilson & Jones, 1993) หรือจุลินทรีย์สามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างบางส่วน of สาร PAHs ทำให้ความเป็นพิษลดลงหรือหมดไป กระบวนการบำบัดโดยวิธีการย่อยสลายทางชีวภาพยังอาจทำได้โดยกระตุ้นจุลินทรีย์ในแหล่งที่มีการปนเปื้อนของสารพิษ ให้มีความสามารถในการย่อยสลายสาร PAHs ได้ (biostimulation) หรือเติมจุลินทรีย์จากภายนอกที่มีสามารถย่อยสลายสาร PAHs ลงไปในแหล่งที่มีการปนเปื้อนของสาร PAHs (bioaugmentation) ซึ่งมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ของจุลินทรีย์นั้นเพื่อเป็นข้อมูลในการศึกษาติดตาม เพื่อให้การบำบัดสาร PAHs นั้นเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ

การย่อยสลายอะซีแนพริลีนโดยแบคทีเรีย

วิธีการย่อยสลายอะซีแนพริลีนได้มีการศึกษาใน *Beijerinckia* sp. ที่ย่อยสลายไบฟีนิล (Schocken & Gibson, 1984) พบว่าสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถย่อยอะซีแนพริลีนร่วมกับอะซีแนพริลีนแบบโคออกซิเดชัน ได้ศึกษาการออกซิไดซ์ของอะซีแนพริลีนจากการวิเคราะห์สารมัธยันต์ที่สะสม พบว่าวิธีการย่อยสลายเริ่มจากปฏิกิริยาไดออกซิเจเนชันด้วยการเติมออกซิเจนเข้ายังส่วนวงไฮโดรเพนทีนของอะซีแนพริลีนได้เป็น ซิส-1,2-อะซีแนพริลีนไดออล 1,2-ไดไฮดรอกซีอะซีแนพริลีน หรือ 1,2-อะซีแนพริลีนไดโอน และมีผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นอะซีแนพริลีนควิโนน ตามลำดับ จากผลวิจัยดังกล่าวยังไม่พบว่ามีกระบวนการแตกวงไฮโดรเพนทีนของอะซีแนพริลีน

Komatsu *et al.* (1993) ได้รายงานว่า *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ A4 สามารถย่อยสลาย อะซีแนพริลีนเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ และเมื่อศึกษาสารมัธยันต์ที่สะสมในน้ำเลี้ยงเชื้อพบการสะสมของกรด 1,8-แนพธาไลน์ไดคาร์บอกซิลิก แสดงว่าสายพันธุ์นี้สามารถแตกวงไฮโดรเพนทีนในโครงสร้างของอะซีแนพริลีนได้ Selifonov *et al.* (1996) ได้ทำการวิเคราะห์สารมัธยันต์ที่สะสมในน้ำเลี้ยงเชื้อของสายพันธุ์ลูกผสมของ *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ PAO1 (pRE695) ที่ได้รับยีนประมวลรหัสเอนไซม์ไดออกซิจีเนสจากพลาสมิด NAH7 เพื่อทำนายวิธีการย่อยสลายอะซีแนพริลีน พบว่าขั้นแรกของปฏิกิริยาอะซีแนพริลีนจะถูกออกซิไดซ์ด้วยเอนไซม์ไดออกซิจีเนส คล้ายกับกระบวนการที่เกิดขึ้นในการย่อยสลายสารประกอบ PAHs ชนิดอื่นในแบคทีเรีย ได้เป็น ซิส-อะซีแนพริลีน-1,2-ไดออล ซึ่งจะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็น 1,2-ไดไฮดรอกซีอะซีแนพริลีน และ 1-ไฮดรอกซี-2-คีโตอะซีแนพริลีน สารมัธยันต์ทั้งสองชนิดจะถูกออกซิไดซ์ต่อไปเป็นอะซีแนพริลีน-1,2-ควิโนน และ กรด 1,8-แนพธาไลน์ไดคาร์บอกซิลิก ตามลำดับ



รูปที่ 1.1 วิธีการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดย *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์รีคอมบิแนนท์ PAO1 (pRE695) (Selifonov *et al.*, 1996)

ดังแสดงในรูปที่ 1.1 จนถึงปัจจุบัน ยังไม่มีรายงานการย่อยสลายกรด 1,8-แนพธาลีนไดคาร์บอกซิลิก ต่อไปอีก ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายังไม่มีคาร์บอนอะตอมใดที่ถูกนำไปใช้เพื่อไปเป็นแหล่งคาร์บอนของเซลล์ ดังนั้นจึงยังไม่มี การเสนอวิธีการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดยแบคทีเรียที่สมบูรณ์

Rhizobium sp. สายพันธุ์ CU-A1 (Phaengthai *et al.*, 2000)

Rhizobium sp. สายพันธุ์ CU-A1 เป็นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันเครื่องในประเทศไทย สายพันธุ์ CU-A1 เป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถสูงในการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีน กล่าวคือสามารถย่อยสลายอะซีแนฟธิลีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ carbon free mineral medium ความเข้มข้น 0.6 กรัม/ลิตรจนหมดได้ในระยะเวลาเพียง 3 วัน นอกจากนี้ สายพันธุ์ CU-A1 ยังสามารถย่อยสลายแนฟธาลิน ซึ่งเป็นสารประกอบ PAHs ได้ด้วย และสามารถย่อยสลายพีแนนทรีน ฟลูออรีนและอะซีแนฟธินแบบโคเมแทบอลิซึมร่วมกับอะซีแนฟธิลีนอีกด้วย แบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวจึงเป็นแบคทีเรียที่มีศักยภาพที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดดินที่มีการปนเปื้อนด้วยอะซีแนฟธิลีนโดยวิธีทางชีวภาพ

แต่เนื่องจากได้เคยมีรายงานว่าแบคทีเรียบางชนิดแม้สามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs ได้ แต่อาจเกิดการสะสมของสารมัธยันต์ซึ่งคงทนต่อการถูกย่อยสลายไปเป็นสารอื่น (dead end metabolite) (Weissenfels *et al.*, 1990; Tongpim & Pickard, 1996) หรือเกิดสารมัธยันต์ที่เป็นพิษมากกว่าขึ้น (Calder & Lader, 1976; Rao, 1996) ยิ่งไปกว่านั้น จนถึงปัจจุบันนี้ยังไม่มีเคยมีรายงานการย่อยสลายสารประกอบ PAHs หรืออื่นที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีนโดยแบคทีเรียในกลุ่ม *Rhizobium* จึงไม่สามารถทราบได้ว่าเมื่อใช้เชื้อดังกล่าว ในการบำบัดสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนอะซีแนฟธิลีน จะก่อให้เกิดสารมัธยันต์หรือผลิตภัณฑ์ที่เป็นพิษกว่าหรือไม่

ดังนั้น ในงานวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งศึกษาสารมัธยันต์และ/หรือผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีนโดยเชื้อ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 เพื่อประเมินความเป็นพิษของสารมัธยันต์ก่อนที่จะนำจุลินทรีย์ดังกล่าวมาใช้ในการบำบัดพื้นที่จริง นอกจากนี้ การวิจัยยังจะได้ศึกษายินที่เกี่ยวข้องกับวิธีการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีน ซึ่งในปัจจุบันยังไม่มีรายงานวิธีการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีนที่สมบูรณ์ ผลจากการวิจัยจะสามารถบอกถึงยีนที่เกี่ยวข้องกับวิธีการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีนใน *Rhizobium* sp. CU-A1 และจะช่วยทำนายสารมัธยันต์ที่จะเกิดขึ้นได้ อีกทั้งยังสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการปรับปรุงสายพันธุ์ต่อไปได้ในอนาคต

วิธีดำเนินการทดลอง

3.1 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในงานด้านชีววิทยาโมเลกุลเป็นชนิด molecular biology grade สารเคมีหรือตัวทำละลายที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ด้วย HPLC หรือ MS หรือ NMR เป็นระดับ HPLC grade หรือดีกว่า สารเคมีอื่นเป็นชนิด analytical grade หรือดีกว่า สารเคมีซื้อจากบริษัท Sigma, USA; Kanto Chemical, Japan; Merck, Germany; J.T.Baker, USA

3.2 แบคทีเรียและการเก็บรักษา

แบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย ได้แสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย

แบคทีเรีย	จีโนมไทป์/ ฟิโนไทป์	เอกสารอ้างอิง
<i>Escherichia coli</i> สายพันธุ์ JM109	<i>EndA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17, relA1, supE44, Δ(lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacI^qZΔM15]</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
<i>E. coli</i> สายพันธุ์ DH5α	<i>φ80dlacZΔM15, endA1, recA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, relA1, supE44, deoR, Δ(lacZYA-argF)U169</i>	Hanahan, 1983
<i>E. coli</i> สายพันธุ์ S17-1	<i>RecA, Tra (IncP), (RP4-2-Tc::Mu::Km^r::Tn7), Sm^r</i>	Simon <i>et al.</i> , 1983
<i>Rhizobium</i> sp. สายพันธุ์ CU-A1	สามารถย่อยสลายอะซีแนพรีลีน	Phaengthai <i>et al.</i> , 2000
<i>Rhizobium</i> sp. สายพันธุ์ A18 A35 A49 A53 A8 B1 B5 D1 D2 E11 E32 G101 G12 G39 G531 G62 H1 J1	สายพันธุ์ถูกกลายจากสายพันธุ์ CU-A1 ที่มีทรานสโปซอน Tn5 ซึ่งมีความผิดปกติในการย่อยสลายอะซีแนพรีลีน	สร้างในงานวิจัยนี้

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียต่างๆ ดังนี้

3.1.1 *Escherichia coli* ทุกสายพันธุ์ เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB หรือ 2YT (Sambrook & Russell, 2001) ในกรณีที่ต้องเติมสารปฏิชีวนะใช้ความเข้มข้นดังต่อไปนี้ กานามัยซิน (Km) 50 ไมโครกรัมต่อมล. และแอมพิซิลลิน (Am) 100 ไมโครกรัมต่อมล. เมื่อทำเป็นอาหารแข็งเติมวุ้น 1.5% บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 °C

3.1.2 *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 เมื่อเลี้ยงในอาหารแข็ง carbon free mineral medium (CFMM) (Kasuga *et al.* 1997) วางผลึกอะซีแนพรีลินบนฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อผึ่งด้วยเทปกาวให้สนิท บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 3-4 วัน เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเติมสารละลายอะซีแนพรีลินในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 0.6 กรัมต่อลิตรหรือแหล่งคาร์บอนอื่นตามที่ระบุในวิธีการทดลอง และเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3-4 วัน สำหรับสายพันธุ์กลายเลี้ยงเช่นเดียวกันแต่เติมกานามัยซิน 50 ไมโครกรัมต่อ มล.

3.1.3 *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ให้บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C ทั้งอาหารแข็งและอาหารเหลว เป็นเวลา 3 วัน และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที สำหรับสายพันธุ์กลายของ *Rhizobium* sp. เลี้ยงเช่นเดียวกันแต่เติมกานามัยซิน 50 ไมโครกรัมต่อมล.

3.1.4 เก็บรักษาแบคทีเรียโดยเลี้ยง *E. coli* ทุกสายพันธุ์ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 และสายพันธุ์กลายต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวตามข้อ 3.1.1 และ 3.1.2 ตามลำดับ นำมาผสมกับกลีเซอรอลในอัตราส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อต่อกลิเซอรอลเป็น 3 : 7 บรรจุลงในหลอดเก็บเชื้อแช่แข็งปลอดเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C เป็นเวลา 6 เดือน หรือที่อุณหภูมิ -70 °C เป็นเวลา 1 ปี

3.2 พลาสมิด

พลาสมิดที่ใช้ได้แสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 พลาสมิดที่ใช้ในงานวิจัยนี้

พลาสมิด	จีโนม	เอกสารอ้างอิง
pSUP2021	Tn5(Km ^r), Cm ^r , Tra ⁻ , Mob ⁺ , pBR325 replicon	Simon <i>et al.</i> , 1983
pBluescript KS(+/-)	Ap ^r , α lac/MCS	บริษัท Stratagene, USA
pGEM-7Zf(+/-)	Ap ^r , α lac/MCS	บริษัท Promega, USA
pGEM-3Zf(+/-)	Ap ^r , α lac/MCS	บริษัท Promega, USA
pTEM	Ap ^r , Km ^r มีชิ้นส่วน <i>EcoRI</i> จากดีเอ็นเอของสายพันธุ์ กลาย E11 ขนาดประมาณ 9.2 kb ในพลาสมิด pBluescript KS(+/-)	สร้างในงานวิจัยนี้
pTEB	Ap ^r มีชิ้นส่วน <i>BamHI-EcoRI</i> จาก pTEM ขนาด ประมาณ 3.9 kb ในพลาสมิด pGEM-7Zf(+/-)	สร้างในงานวิจัยนี้
pWT	Ap ^r มีชิ้นส่วน <i>BamHI-HindIII</i> จากดีเอ็นเอของ <i>Rhizobium</i> sp. สายพันธุ์ CU-A1 ขนาด 4.5 kb ในพลาสมิด pGEM-3Zf(+/-)	สร้างในงานวิจัยนี้
pES	Ap ^r มีชิ้นส่วน <i>EcoRI-SalI</i> จาก pWT ขนาดประมาณ 1.8 kb ในพลาสมิด pGEM-3Zf(+/-)	สร้างในงานวิจัยนี้
pWR	Ap ^r มีชิ้นส่วน <i>EcoRI-HindIII</i> จาก pWT ขนาด ประมาณ 0.7 kb ในพลาสมิด pGEM-3Zf(+/-)	สร้างในงานวิจัยนี้
pSW	Ap ^r มีชิ้นส่วน <i>SalI-EcoRI</i> จาก pWT ขนาดประมาณ 1.5 kb ในพลาสมิด pGEM-3Zf(+/-)	สร้างในงานวิจัยนี้

3.3 เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล

ในกรณีที่ไม่มีกระบวนการเป็นอย่างอื่น เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลที่ใช้ทุกขั้นตอนได้ดำเนินการตามวิธีมาตรฐานที่ระบุไว้ใน Sambrook & Russel (2001) หรือ Ausubel *et al.* (1999) ในกรณีที่ใช้ชุดทดสอบสำเร็จ (Kits) จะดำเนินการตามวิธีของบริษัทผู้ผลิตที่ได้ระบุไว้ตามขั้นตอนต่างๆ

3.4 การกลายพันธุ์ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ด้วยทรานสโปซอน Tn5 โดยวิธีคอนจูเกชัน

เลี้ยง *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 และ *Escherichia coli* สายพันธุ์ S17-1 ที่มีพลาสมิด pSUP2021 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่ 30°C และ 37°C ตามลำดับ เขย่าบนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมงเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ เติมหหัวเชื้อที่ไดลงในอาหารเหลว 2YT จนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (OD_{600}) เท่ากับ 0.1 สำหรับ *E. coli* จะเติมกานามัยซิน บ่มเชื้อดังกล่าวทั้งสองชนิดจนการเจริญเข้าสู่ช่วงต้นของระยะเอกซโปเนนเชียล โดยค่า OD_{600} จะอยู่ที่ประมาณ 0.4-0.6 ปั่นแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที ล้างเซลล์สองครั้งด้วย 0.85% NaCl และแขวนลอยเซลล์ให้ได้ค่า OD_{600} เท่ากับ 1.0 จากนั้นนำเซลล์ของ *E. coli* ซึ่งเป็นเซลล์ผู้ให้และ *Rhizobium* ซึ่งเป็นเซลล์ผู้รับมาผสมให้เข้ากัน ในอัตราส่วน 1:1 ปั่นเก็บเซลล์แบคทีเรียด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที ดูดส่วนน้ำใสออกด้วยไมโครปิเปตให้เหลือส่วนน้ำใสประมาณ 20 ไมโครลิตรเพื่อแขวนลอยเซลล์

ทำคอนจูเกชันตามวิธีของ Sevaraj และ Iyer (1983) เริ่มจากเตรียมแผ่นกรอง Nitrocellulose ขนาด 0.45 μ m โดยฆ่าเชื้อด้วยวิธี autoclave และอบแห้งที่ 50°C ก่อนใช้ วางแผ่นกรองบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ปิเปิดส่วนผสมของเซลล์ลงบนแผ่นกรองและบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ปากคีบปลดเชื้อคิบบนแผ่นกรองมาบรรจุลงในหลอดไมโครพิวจ์ ล้างเซลล์ออกด้วย 0.85% NaCl 1 มล. นำเซลล์ที่แขวนลอยมาเจือจางครั้งละ 10 เท่าด้วย 0.85% NaCl จากนั้นนำมาเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง carbon free mineral medium (CFMM) ที่ทำให้แข็งด้วย 1.5% Nobel agar เติมกรดโปรโตคาที่คูอิความเข้มข้นสุดท้าย 1.0 กรัม/ลิตร และกานามัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัม/มล. บ่มที่ 30°C เป็นเวลา 4 วัน

คำนวณค่าประสิทธิภาพของทรานสโพซิชันจากอัตราส่วนจำนวน *Rhizobium* ทรานสคอนจูเกนต์ต่อจำนวน *Rhizobium* ทั้งหมดที่ใช้ในการคอนจูเกชัน

3.5 ตรวจยืนยันการแทรกสอดของทรานสโปซอน Tn5 แบบสุ่มโดยใช้เทคนิคไฮบริดเซชัน

3.5.1 การเตรียม TN5-DNA probe

สกัดพลาสมิด pSUP2021 จาก *E. coli* S17-1 โดยใช้ QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) ตัดพลาสมิดที่ได้ด้วย *Hind*III ตามวิธีที่ระบุโดยผู้ผลิต (Promega, USA.) แยกดีเอ็นเอโดย agarose gel electrophoresis ตัดเจลที่มีขั้วดีเอ็นเอขนาด 3.4 kb ซึ่งมีส่วนของ ทรานสโปซอน Tn5 อยู่

แยกดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลด้วย GeneClean II Kit (Bio101, USA) ติดตามดีเอ็นเอติดตามทรานสโพซอน Tn5 ด้วย DIG high prime DNA labeling and detection starter kit I (Roche, Germany)

3.5.2 Southern Hybridisation

สกัดดีเอ็นเอของทรานสคอนจูแกนที่ได้ในข้อ 3.4 ตัดด้วยเอนไซม์ EcoRI (Promega, USA.) แยกดีเอ็นเอโดย agarose gel electrophoresis พร้อมกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb ถ่ายดีเอ็นเอไปยังไนลอนเมมเบรน (Hybond-N+, Amersham, USA) ตรึงดีเอ็นเอบนแผ่นเมมเบรนด้วยแสงอัลตราไวโอเลต ไฮบริไดเซชันกับ TN5-DNA probe ล้างแผ่นเมมเบรนและตรวจหาสัญญาณไฮบริไดเซชันโดยวิธีทำให้เกิดสี (colorimetric method) ตามที่วิธีที่ระบุในชุด DIG high prime DNA labeling and detection starter kit I (Roche, Germany)

3.6 คัดแยก *Rhizobium* สายพันธุ์กลายที่มีความบกพร่องในการย่อยสลายอะซีแนพรีลิน

เก็บโคโลนีเดี่ยวของทรานสคอนจูแกนที่ขึ้นบนอาหารแข็งในข้อ 3.4 มาขีดบนอาหารดังนี้

ก. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ซึ่งเติมกานามัยซิน (50 ไมโครกรัม/มล.) และกรดโปรโตคาที่คูอิก (1.0 กรัม/ลิตร) เพื่อเป็น master plate

ข. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ซึ่งเติมกานามัยซิน (50 ไมโครกรัม/มล.) และวางผลึกอะซีแนพรีลินบนผาจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ฝักจานอาหารให้สนิทด้วยเทปขาว

บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 4 วัน สังเกตการเจริญของเชื้อบนจานอาหารข้อ ข. โคโลนีที่ไม่เจริญหรือมีลักษณะการเจริญต่างไปจากสายพันธุ์เดิม ถือเป็นสายพันธุ์กลายที่มีความบกพร่องในการย่อยสลายอะซีแนพรีลิน นำโคโลนีของสายพันธุ์กลายที่ต้องการจาก master plate (ข้อ ก.) มายืนยันสายพันธุ์กลายโดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพรีลิน 0.6 กรัม/ลิตร พร้อมเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ที่ 30 °C เป็นเวลา 4 วัน สังเกตการเจริญเทียบกับสายพันธุ์ CU-A1

3.7 ค้นหาชิ้นส่วนของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพรีลินบนโครโมโซมของสายพันธุ์กลายที่มีขึ้นทรานสโพซอนสอดแทรกอยู่

ค้นหาชิ้นส่วนของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพรีลินบนโครโมโซมของสายพันธุ์กลายด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชัน ตามวิธีในข้อ 3.5.2 โดยสกัดดีเอ็นเอของสายพันธุ์กลายที่ได้ในข้อ 3.6 ตัดด้วยเอนไซม์ EcoRI แยกดีเอ็นเอโดย agarose gel electrophoresis ถ่ายดีเอ็นเอไปยังไนลอนเมม

เบรอน ไฮบริโดเซชันกับ TN5-DNA probe ล้างแผ่นเมมเบรนและตรวจหาสัญญาณไฮบริโดเซชันโดยวิธีทำให้เกิดสี (colorimetric method)

3.8 สกัดชิ้นดีเอ็นเอที่ให้สัญญาณกับ DNA-probe และโคลนชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวเข้าในพลาสมิดเวกเตอร์

เลือกสายพันธุ์กลายที่ให้ผลบวกกับ TN5-DNA probe จากนั้นสกัดดีเอ็นเอสายพันธุ์กลายดังกล่าวตัดด้วยเอนไซม์ EcoRI แยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า ตัดเจลให้ครอบคลุมบริเวณที่มีดีเอ็นเอของสายพันธุ์กลายที่เลือกที่ให้ผลบวกจากการไฮบริโดเซชันในข้อ 3.7 สกัดชิ้นดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลด้วย GeneClean II Kit (Bio101, USA) หรือใช้วิธี electroelution ละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อในปริมาณที่เหมาะสม ใช้ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้นี้เพื่อเป็น insert สำหรับ ligation

เตรียม pBLUESCRIPT KS (+/-) (Stratagene, USA) โดยตัดด้วยเอนไซม์ EcoRI สกัดด้วยฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ตกตะกอนส่วนน้ำใสที่มีพลาสมิดด้วยเอทานอล ละลายพลาสมิดที่ได้ใน Tris-HCl pH 8.0 ก็จัดหมู่ฟอสเฟส (dephosphorylation) ตรงปลายสายพลาสมิดเวกเตอร์ โดยใช้ Alkaline phosphatase (Promega, USA) ละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อในปริมาณที่เหมาะสม ใช้ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้นี้เพื่อเป็นเวกเตอร์สำหรับ ligation

ไลเกชันชิ้นดีเอ็นเอที่เตรียมได้เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ pBluescript KS(+/-) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ EcoRI โดยใช้เอนไซม์ไลเกส (ligase) (Promega, USA) ทำไลเกชันที่อุณหภูมิ 16 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

3.9 ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากข้อ 3.8 เข้าสู่ *Escherichia coli* และคัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์ที่มีทรานสโปซอนสอดแทรกอยู่ในดีเอ็นเอ

ทำ *Escherichia coli* DH5 α ให้เป็นคอมพีเทนท์เซลล์ด้วยวิธี Calcium chloride จากนั้นทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้จากไลเกชันที่ได้เข้าคอมพีเทนท์เซลล์ด้วยวิธี Heat shock คัดเลือกโคลนหรือโคโลนีของ *E. coli* DH5 α ซึ่งมีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีทรานสโปซอน Tn5 สอดแทรกอยู่โดยเกลี่ยเชื้ออาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ซึ่งมีกานามัยซิน 50 ไมโครกรัม/มล. (เพื่อคัดเลือกยีนเครื่องหมายบน Tn5) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ข้ามคืน นำโคโลนีที่ได้มาสกัดพลาสมิดและตรวจหาพลาสมิดที่มีชิ้นทรานสโปซอนแทรกสอดอยู่โดยวิธี Dot blot hybridization กับ TN5-DNA probe

3.10 หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพริลลินจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิดและเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับที่มีอยู่ใน GenBank

หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพริลลินจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ หรือการสับโคลนและใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดเวกเตอร์เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดีเอ็นเอสอดแทรก สังเคราะห์โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน โดยหน่วยบริการชีวภาพ (BIOSERVICE UNIT, BSU) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)

เมื่อได้ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดีเอ็นเอสอดแทรกแล้ว นำไปวิเคราะห์หาแผนการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์โดยละเอียด รวมทั้งหากรอบอ่านรหัสเปิด (Open Reading Frame, ORF) ในการถอดรหัสของยีนเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพริลลินโดยวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม DNASIS และรวมไปถึงการหาความเหมือนและบริเวณที่คาดว่าจะเป็กรอบอ่านรหัสเปิดโดยเทียบกับข้อมูลใน GenBank ด้วยโปรแกรม BlastX version 2.2.1

3.11 หาตำแหน่งของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพริลลินในโครโมโซมของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1

3.11.1 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่อยู่ติดกับทรานสโปซอน Tn5 โดย PCR

จากข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอที่อยู่ติดกับทรานสโปซอน Tn5 ที่หาได้จากข้อ 3.10 ออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ทั้ง forward primer และ reverse primer เพื่อใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) ส่วนผสมปฏิกิริยา PCR เป็นดังนี้ 1.5 mM MgCl₂, 1X Taq DNA polymerase buffer, 1 μM forward primer & reverse primer, 0.2 mM dNTP, 2.5 U Taq DNA polymerase (Promega, USA), DNA Template 10 pg, H₂O จนถึง 50 μl โปรแกรมในการทำปฏิกิริยา PCR เป็นดังนี้ hot start 95 °C 3 นาที, denaturation 95 °C 1 นาที, annealing 53 °C 1 นาที, extension 72 °C 1 นาที ทำปฏิกิริยา 30 รอบ final extension 72 °C เป็นเวลา 10 นาที

ทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer, USA) ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

3.11.2 ตัดคลากดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้

ตัดคลากดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 3.11.1 โดยใช้วิธีในข้อ 3.5.1 และให้ชื่อว่า AE-Probe

3.11.3 หาตำแหน่งของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีนในโครโมโซมของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1

หาชิ้นส่วนของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีนบนโครโมโซมของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ด้วยเทคนิคไฮบริดเซชัน เช่นเดียวกับวิธีที่แสดงในข้อ 3.5.2 โดยสกัดดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆ แยกดีเอ็นเอโดย agarose gel electrophoresis ถ่ายดีเอ็นเอไปยังไนลอนเมมเบรน ไฮบริดเซชันกับ AE-probe ล้างแผ่นเมมเบรนและตรวจหาสัญญาณไฮบริดเซชันโดยวิธีทำให้เกิดสี (colorimetric method)

เลือกชิ้นดีเอ็นเอที่ให้ผลบวกกับ AE-probe จากนั้นสกัดดีเอ็นเอสายพันธุ์ CU-A1 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ที่เหมาะสม แยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า ตัดเจลให้ครอบคลุมบริเวณที่มีดีเอ็นเอที่ให้ผลบวกจากการไฮบริดเซชัน สกัดชิ้นดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลด้วย GeneClean II Kit (Bio101, USA) หรือใช้วิธี electroelution ละลายดีเอ็นเอดำเนินการปฏิกิริยา PCR ในปริมาตรที่เหมาะสม ใช้ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้นี้เป็น insert สำหรับ ligation

เตรียมพลาสมิดเวกเตอร์ที่เหมาะสม (pBLUESCRIPT KS (+/-) (Stratagene, USA) หรือ pGEM-series (Promega, USA)) โดยตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดเดียวกับที่ตัดโครโมโซมดีเอ็นเอ สกัดด้วยฟีนอล/คลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ตกตะกอนส่วนน้ำใสที่มีพลาสมิดด้วยเอทานอล ละลายพลาสมิดที่ได้ใน Tris-HCl pH 8.0 ในกรณีที่ตัดด้วยเอนไซม์เพียงชนิดเดียว กำจัดหมู่ฟอสเฟส (dephosphorylation) ตรงปลายสายพลาสมิดเวกเตอร์ โดยใช้ Alkaline phosphatase (Promega, USA) ละลายพลาสมิดเวกเตอร์ด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อในปริมาตรที่เหมาะสม ใช้ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้เป็นเวกเตอร์สำหรับ ligation ไกลเกชันชิ้นดีเอ็นเอที่เตรียมได้เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์โดยใช้เอนไซม์ไลเกส (ligase) (Promega, USA) ทำไลเกชันที่อุณหภูมิ 16 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

ทำ *Escherichia coli* DH5 α ให้เป็นคอมพีเทนท์เซลล์ด้วยวิธี Calcium chloride จากนั้นทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้จากไลเกชันที่ได้เข้าคอมพีเทนท์เซลล์ด้วยวิธี Heat shock คัดเลือกทรานสฟอร์มแมนต์ด้วยวิธี Blue/White selection บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ข้ามคืน นำโคโลนีที่ได้มาสกัดพลาสมิดและตรวจหาพลาสมิดที่มีชิ้นทรานสโพซอนแทรกสอดอยู่โดยวิธี Dot blot hybridization กับ AE-probe หากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีนจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิดและเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับที่มีอยู่ใน GenBank ตามวิธีในข้อ 3.10

3.12 การศึกษาการเจริญและวิเคราะห์สารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพรีลีนโดยสายพันธุ์กลายของ *Rhizobium* sp. CU-A1

3.12.1 เตรียมหัวเชื้อของแบคทีเรีย

เลี้ยงสายพันธุ์กลายในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 100 มล. ที่มีกรดโปรโตคาที่คูอิก (1 กรัมต่อลิตร) และกานามัยซิน (50 มิลลิกรัมต่อลิตร) เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C พร้อมเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นปั่นตกตะกอนที่ 8,000 รอบต่อนาที 4 °C 10 นาที ล้างเซลล์ในสารละลาย 0.85% NaCl 3 ครั้ง แว่นลอยเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ถ่ายหัวเชื้อที่ได้ลงในอาหารเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพรีลีน (0.6 กรัมต่อลิตร) ปริมาตร 5 มล. และเติมกานามัยซิน (50 มิลลิกรัมต่อลิตร) ให้ความขุ่น (turbidity) ที่ความยาวคลื่น 600 nm เท่ากับ 1.0 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C พร้อมเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกวัน เป็นเวลา 14 วันเพื่อศึกษาการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียและวิเคราะห์สารมัธยันต์ที่สะสม เปรียบเทียบกับสายพันธุ์เดิม

3.12.2 วัดการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี *viable plate count*

เจือจางน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้ด้วยสารละลาย 0.85% NaCl นำมาเกลี่ยบนอาหารแข็ง CFMM ที่มีกรดโปรโตคาที่คูอิก (1 กรัมต่อลิตร) และกานามัยซิน (50 มก.ต่อลิตร) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 3 วัน นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น

3.12.3 การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณอะซีแนพรีลีนที่เหลือและวิเคราะห์สารมัธยันต์ที่เกิดขึ้น

ปรับ pH ของน้ำเลี้ยงเชื้อจากข้อ 3.12.1 ด้วย conc. HCl ให้เท่ากับ 2.0-3.0 จากนั้นเติมเอธิลอะซีเตทปริมาตร 1 เท่าของน้ำเลี้ยงเชื้อลงในอาหารเหลว ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น จากนั้นแยกส่วนเอธิลอะซีเตทเก็บไว้ สกัดน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยเอธิลอะซีเตทปริมาตร 1 เท่าของน้ำเลี้ยงเชื้อซ้ำอีกครั้งหนึ่ง รวมส่วนเอธิลอะซีเตททั้งหมดเข้าด้วยกัน กำจัดน้ำที่ปนอยู่ด้วยการเติม Na_2SO_4 anhydrous จากนั้นนำส่วนเอธิลอะซีเตทไประเหยแห้งด้วย evaporator จนได้ตะกอนของสารมัธยันต์ ละลายตะกอนด้วยเมทานอล 0.5 มล. กรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาด 0.2 μm ใส่ลงในหลอดแก้วขนาดเล็ก เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะนำไปใช้ในขั้นต่อไป

3.12.4 การวิเคราะห์ปริมาณอะซีแนพริลีนที่เหลือและวิเคราะห์สารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

เตรียมสารมาตรฐานของอะซีแนพริลีน โดยละลายอะซีแนพริลีนในอาหารเหลว CFMM ให้ได้ความเข้มข้น 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 และ 1000 มก.ต่อลิตร จากนั้นทำการสกัดด้วยเอธิลอะซีเตตตามขั้นตอนในข้อ 3.12.3 นำชุดสารมาตรฐานและชุดทดลองมาวิเคราะห์ปริมาณอะซีแนพริลีนโดยวิธี HPLC ด้วยเครื่องเครื่องลิควิดโครมาโตกราฟีรุ่น LC-3A ใช้คอลัมน์ Senshu Pak Pegasil ODS ขนาด 4.6×150 มม. ตั้งอุณหภูมิของคอลัมน์ที่ 40°C ตรวจสอบการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 nm โดยใช้สารละลายตัวพา คือ เมธานอล 80% ในน้ำ และอัตราการไหลเท่ากับ 1 มล.ต่อนาที ฉีดสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ทำกราฟมาตรฐานความเข้มข้นอะซีแนพริลีนจากพื้นที่ใต้กราฟ วิเคราะห์ความเข้มข้นของตัวอย่างโดยใช้กราฟมาตรฐานนี้

3.12.5 การวิเคราะห์สารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายอะซีแนพริลีนโดยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC)

นำตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์จากข้อ 3.12.3 ปริมาตร 5-10 ไมโครลิตรมาจุดลงบนแผ่น TLC ขนาดกว้าง 8×8 ซม. (Merck, Germany) โดยใช้ตัวทำละลายเป็นโทลูอีน : 1,4-ไดออกเซน : กรดอะซิติกเข้มข้น ในอัตราส่วน 90:25:4 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) ตรวจหาสารมัธยันต์ภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตช่วงความยาวคลื่น 215-250 nm

3.13 การแยกสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพริลีนโดยสายพันธุ์กลายต่างๆ และให้บริสุทธิ์โดยวิธี preparative TLC และ ซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟี

3.13.1 เตรียมหัวเชื้อของแบคทีเรีย

ดำเนินการเช่นเดียวกับขั้นตอนในข้อ 3.12.1 ถ่ายหัวเชื้อลงในอาหารเหลว CFMM ปริมาตร 1000 มล. ที่มีอะซีแนพริลีน (0.6 กรัมต่อลิตร) และกานามัยซิน (50 มก.ต่อลิตร) ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm เท่ากับ 1.0 เลี้ยงเชื้อตามวิธีในข้อ 3.12.1 เมื่อครบตามกำหนดเวลาที่เหมาะสม นำน้ำเลี้ยงเชื้อมาทำการสกัดด้วยเอธิลอะซีเตตเช่นเดียวกับขั้นตอนในข้อ 3.12.3 จากนั้นนำส่วนที่สกัดได้มาทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

3.13.2 การแยกสารมัธยันต์ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี preparative TLC

นำสารละลายตัวอย่างในเมทานอลที่ต้องการทำให้บริสุทธิ์มาจุดเป็นแนวลงบนแผ่น PLC ที่เคลือบด้วยซิลิกาเจล 60 หน้า 1 มม. (Merck, Germany) โดยใช้ตัวทำละลายเป็น เฮกเซน : เอธิลอะซีเตท : กรดอะซีติกเข้มข้น ในอัตราส่วน 10:10:1 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) ตรวจหาสารมัธยันต์ภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตช่วงความยาวคลื่น 215-250 nm จากนั้นขีดแถบของซิลิกาเจลที่มีตัวอย่างที่ต้องการออก สกัดด้วยเอธิลอะซีเตทปริมาตร 250 มล. แยกส่วนเอธิลอะซีเตทเก็บไว้ สกัดผงซิลิกาเจลด้วยเอธิลอะซีเตท 250 มล.อีกครั้ง รวมส่วนเอธิลอะซีเตททั้งหมดเข้าด้วยกัน จากนั้นกำจัดน้ำที่ปนอยู่ด้วยการเติม Na_2SO_4 anhydrous นำส่วนเอธิลอะซีเตทไประเหยแห้งด้วย evaporator จนได้ตะกอนของสารมัธยันต์ ละลายตะกอนด้วยเมทานอล 5 มล. กรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาด 0.2 μm ใส่ลงในหลอดแก้วขนาดเล็ก นำไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารมัธยันต์ด้วยวิธี TLC ดังวิธีการในข้อ 3.12.5 และวิธี HPLC ดังวิธีการในข้อ 3.12.4 หรือเก็บที่อุณหภูมิ -20°C

3.13.3 การแยกสารมัธยันต์ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟี

เตรียมคอลัมน์ โดยแขวนลอยซิลิกาเจล 60 ขนาด 0.063-0.2 มม. (Merck, USA) ปริมาณ 10 กรัม ลงในเฮกเซน บรรจุลงในคอลัมน์แก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 ซม. ยาว 30 ซม. หลังจากบรรจุ ล้างคอลัมน์ด้วยเฮกเซน 100 มล.

เตรียมตัวอย่าง โดยนำส่วนสกัดที่ต้องการทำให้บริสุทธิ์มาผสมกับซิลิกาเจล 3 กรัม จากนั้นระเหยแห้งด้วย evaporator เติมเฮกเซนปริมาตรเล็กน้อยลงไปละลาย แล้วนำมาบรรจุลงในคอลัมน์ที่เตรียมไว้ ชะคอลัมน์เป็นลำดับส่วนด้วย 0 ถึง 100% เอธิลอะซีเตทในเฮกเซน โดยเพิ่มความเข้มข้นของเอธิลอะซีเตทลำดับส่วนละ 10% ใช้ตัวชะลำดับส่วนละ 100 มล. เก็บแต่ละลำดับส่วนที่ชะได้เพื่อนำไประเหยแห้งด้วย evaporator ละลายตะกอนด้วยเมทานอล 0.5 มล. กรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ขนาด 0.2 μm ใส่ลงในหลอดแก้วขนาดเล็ก นำไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารมัธยันต์ด้วยวิธี TLC ดังวิธีการในข้อ 3.12.5 และวิธี HPLC ดังวิธีการในข้อ 3.12.4 หรือเก็บที่อุณหภูมิ -20°C

3.14 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัธยันต์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยแมสสเปกโตรเมทรี (MS) และ นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (NMR)

3.14.1 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัธยันต์ด้วยแมสสเปกโตรเมทรี (MS)

นำสารมัธยันต์ที่บริสุทธิ์มาพิสูจน์เอกลักษณ์โดย MS ด้วยเทคนิค Electron Impact (EI) ที่ 70 eV เปรียบเทียบมวลโมเลกุลและรูปแบบการแตกตัวของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพริลีนโดยเชื้อสายพันธุ์กลายเทียบกับสารมัธยันต์มาตรฐานต่างๆ

3.14.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัธยันต์ด้วยนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (NMR)

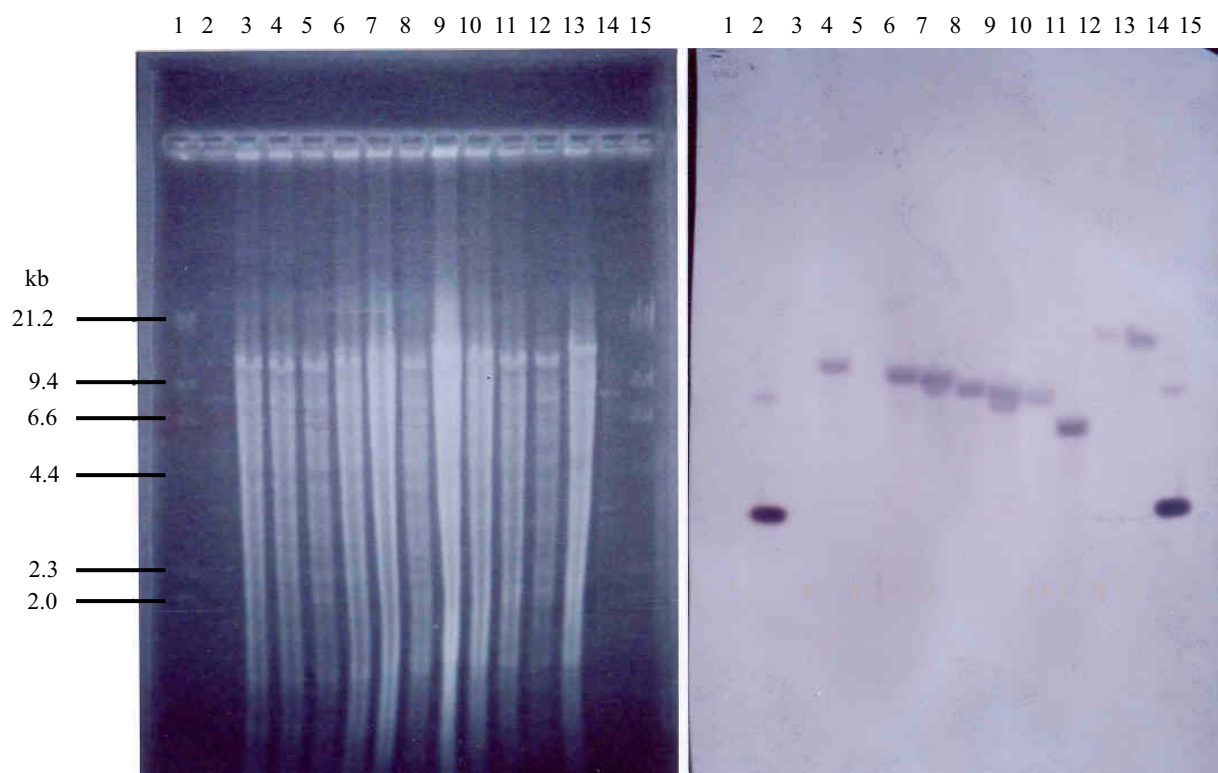
นำสารมัธยันต์ที่บริสุทธิ์มาพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย NMR โดยใช้ CDCl_3 เป็นตัวทำละลาย วิเคราะห์ $^1\text{H-NMR}$ ที่ 200 MHz และ $^{13}\text{C-NMR}$ ที่ 50 MHz โดยใช้สัญญาณจากตัวทำละลายเป็นพีคอ้างอิง และรายงานผลเป็นค่าเคมีคัล ชิฟต์ในหน่วย พีพีเอ็ม (ppm)

การวิเคราะห์ทั้งสองส่วนนี้ทำโดยภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ภายใต้ความอนุเคราะห์และคำแนะนำของ รศ.ดร.อมร เพชรสม

ผลการทดลอง

3.1 การกลายพันธุ์ *Rhizobium* sp. CU-A1 โดยเทคนิค Transposon mutagenesis

การกลายพันธุ์ *Rhizobium* sp. CU-A1 โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมในการกลายพันธุ์ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 โดยใช้ทรานสโปซอน Tn5 ด้วยวิธีคอนจูเกชัน โดยใช้ *Escherichia coli* S17-1 ที่มี พลาสมิด pSUP2021 ซึ่งเป็น suicide plasmid ที่มีทรานสโปซอน Tn5 เป็นผู้ให้ (donor cell) และ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 เป็นผู้รับ (recipient cell) พบว่าประสิทธิภาพของการทรานสโพลีชันเมื่อใช้ภาวะดังกล่าวคือ 4.75×10^{-5} เซลล์ต่อเซลล์ผู้รับ จากนั้นได้กลายพันธุ์สายพันธุ์ CU-A1 จนได้ทรานสคอนจูแกนท์จำนวนทั้งสิ้น 15,730 โคลน ตรวจยืนยันการแทรกสอดของทรานสโปซอน Tn5 แบบสุ่มโดยใช้เทคนิคไฮบริโดเซชัน โดยใช้ทรานสโปซอน Tn5 เป็นตัวติดตาม พบว่าทรานสโปซอน Tn5 มีการแทรกสอดแบบสุ่มเข้าไปในโครโมโซมของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ดังแสดงในรูปที่ 3.1



ก.

ข.

รูปที่ 3.1 ก.) ภาพอะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอของ *Rhizobium* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* ข.) สัญญาณจากเซาท์เธอร์นไฮบริโดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตามทรานสโปซอน Tn5

ช่องวิ่งที่ 1 และ 15 Lambda DNA/*HindIII* marker

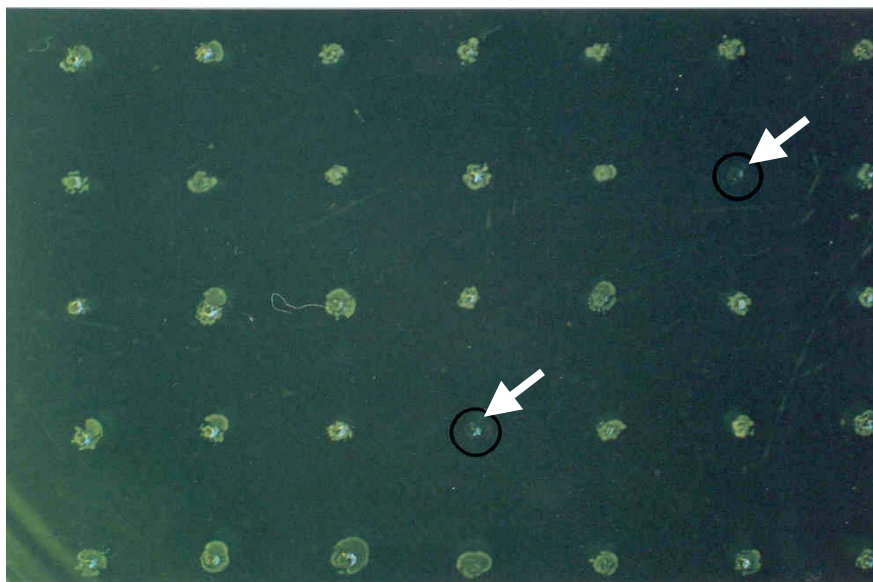
ช่องวิ่งที่ 2 และ 14 พลาสมิด pSUP2021 ตัดด้วยเอนไซม์ *HindIII* (ตัวควบคุมผลบวก)

ช่องวิ่งที่ 3 และ 5 ดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* (ตัวควบคุมผลลบ)

ช่องวิ่งที่ 4 และ 6-13 ดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. ทรานสคอนจูแกนท์ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI*

3.2 คัดเลือกสายพันธุ์กลายของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่ไม่สามารถใช้อะซีแนพธิดีนเป็นแหล่งคาร์บอน

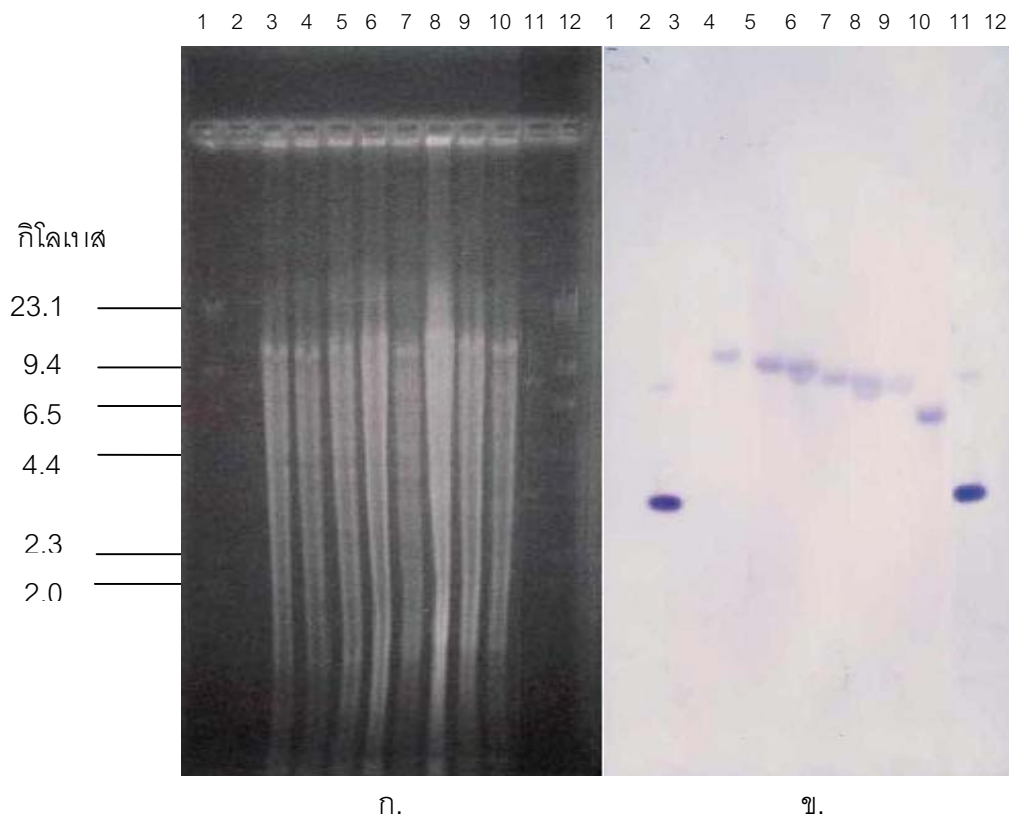
คัดเลือกสายพันธุ์กลาย *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 ที่ไม่สามารถใช้อะซีแนพธิดีนเป็นแหล่งคาร์บอนได้โดยการขีดทรวงศ์คอนจูแกนตที่ได้จากข้อ 3.1 เลือกสายพันธุ์กลายที่ไม่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งหรือเจริญช้ากว่าสายพันธุ์ CU-A1 (รูปที่ 3.2) จากนั้น นำมายืนยันสายพันธุ์กลายโดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพธิดีน 600 มก./ลิตร ที่ 30°C เป็นเวลา 4 วัน พบว่ามีสายพันธุ์กลาย 18 สายพันธุ์ที่มีความบกพร่องในการใช้อะซีแนพธิดีนเป็นแหล่งคาร์บอนหรือมีรูปแบบการเจริญต่างไปจาก *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 คือสายพันธุ์กลาย A8, A18, A35, A49, A53, B1, B5, D1, D2, E11, E32, G12, G39, G62, G101, G531, H1 และ J1



รูปที่ 3.2 ลักษณะการเจริญของ *Rhizobium* สายพันธุ์กลายไม่สามารถใช้อะซีแนพธิดีนเป็นแหล่งคาร์บอน (ในวงกลมครี) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CFMM ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซินและให้อะซีแนพธิดีนในรูปไอระเหิด

3.3 ค้นหาชิ้นส่วนของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิดีนบนโครโมโซมของสายพันธุ์กลายซึ่งมีชิ้นทรานสโปซอนสอดแทรกอยู่ ด้วยเทคนิคไฮบริดเซชัน (hybridization)

ค้นหาชิ้นส่วนของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิดีนบนโครโมโซมของสายพันธุ์กลายซึ่งมีชิ้นทรานสโปซอนสอดแทรกอยู่ โดยใช้ไฮบริดเซชันดีเอ็นเอของสายพันธุ์กลายที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* กับ TN5-DNA probe ผลการทดลองเป็นดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3.3 ก.) ภาพอะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอของ *Rhizobium* สายพันธุ์กลายต่างๆ ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI*

ข.) สัญญาณจากเซาท์เธอร์นไฮบริดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตามทรานสโพซอน Tn5

ช่องวิ่งที่ 1 และ 12 Lambda DNA/*HindIII* marker

ช่องวิ่งที่ 2 และ 11 พลาสมิด pSUP2021 ตัดด้วยเอนไซม์ *HindIII* (ตัวควบคุมผลบวก)

ช่องวิ่งที่ 3 ดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. CU-A1 ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* (ตัวควบคุมผลลบ)

ช่องวิ่งที่ 4-10 ดีเอ็นเอของสายพันธุ์กลายชนิดต่างๆ ของ *Rhizobium* sp. CU-A1 ได้แก่ สายพันธุ์ A53, D1, E11, G12, G531, H1 และ J1 ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* ตามลำดับ

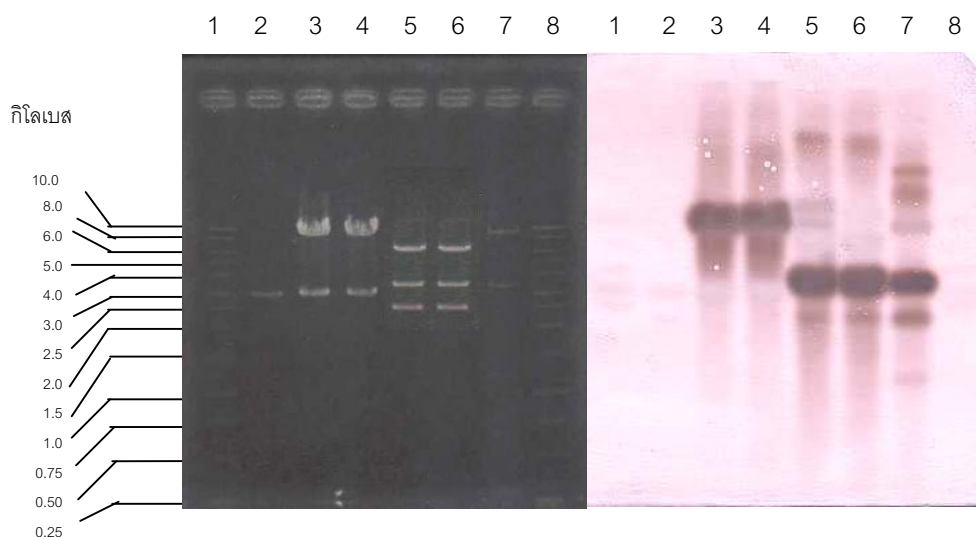
3.4 สกัดชิ้นดีเอ็นเอที่ให้สัญญาณกับดีเอ็นเอติดตามและโคลนชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวเข้าใน พลาสมิดเวกเตอร์

ตัดดีเอ็นเอของสายพันธุ์กลาย E11 ด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และนำดีเอ็นเอไปแยกขนาดในอะกาโรสด้วยกระแสไฟฟ้าเช่นเดียวกับวิธีในข้อ 3.3 ตัดอะกาโรสเจลให้ครอบคลุมบริเวณประมาณ 9.0 – 10.0 kb ซึ่งเป็นบริเวณที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ให้ผลบวกกับดีเอ็นเอติดตาม สกัดชิ้นดีเอ็นเอออกจากอะกาโรส นำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ไปใส่ในพลาสมิด pBLUESCRIPT KS (+/-) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI*

3.5 ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดจากข้อ 3.4 เข้าสู่ *Escherichia coli* และคัดเลือก ทรานสฟอร์มแมนท์ที่มีทรานสโปซอนสอดแทรกอยู่ในดีเอ็นเอ

นำของผสมปฏิกิริยาไลเกชันที่ได้จากข้อ 3.4 ไปทรานสฟอร์มเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ *Escherichia coli* DH5 α คัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยการกระจายเชื้อบนอาหาร LB ที่มี กานามัยซิน (50 μ g/ml) เพื่อคัดเลือกยีนเครื่องหมายบน Tn5 นำโคโลนีที่ได้มาสกัดพลาสมิดโดยใช้ QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany) และตรวจหาพลาสมิดที่มีขึ้นทรานสโปซอนแทรกสอด อยู่โดยวิธี Dot blot hybridization กับตัวติดตามทรานสโปซอน Tn5

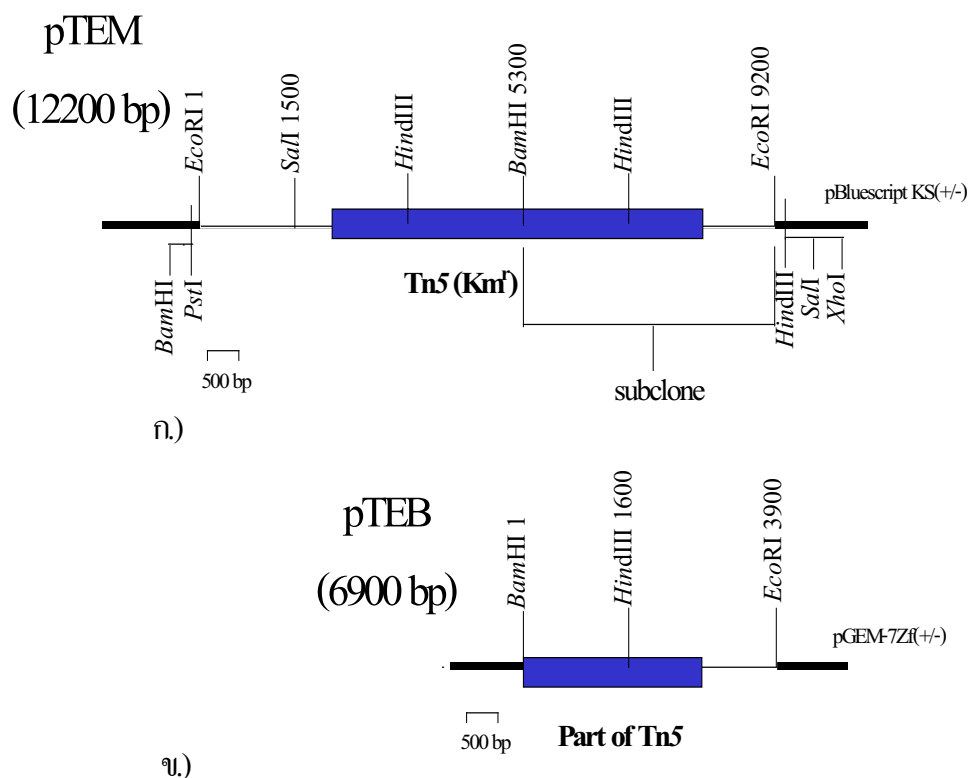
พลาสมิดที่ให้ผลบวก Dot blot hybridization เป็นพลาสมิดที่มีขึ้นทรานสโปซอนแทรกสอดอยู่ ตั้ง ชื่อพลาสมิดว่า pTEM ตรวจสอบยืนยันพลาสมิดดังกล่าวโดยการตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *HindIII* และ ไฮบริไดเซชันกับตัวติดตามทรานสโปซอน Tn5 อีกครั้ง ดังแสดงในรูปที่ 3.4



รูปที่ 3.4 ก.) ภาพอะกาโรสเจลที่มีพลาสมิด pTEM ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *EcoRI* หรือ *HindIII*
ข.) สัญญาณจากเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันด้วยดีเอ็นเอติดตามทรานสโปซอน Tn5

ช่องวิ่งที่ 1 และ 8	1 kb DNA Ladder
ช่องวิ่งที่ 2	pBluescript KS(+/-) ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ <i>EcoRI</i> (ตัวควบคุมผลลบ)
ช่องวิ่งที่ 3 และ 4	pTEM ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ <i>EcoRI</i>
ช่องวิ่งที่ 5 และ 6	pTEM ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ <i>HindIII</i>
ช่องวิ่งที่ 7	pSUP2021 ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ <i>HindIII</i> (ตัวควบคุมผลบวก)

จากรูปแสดงให้เห็นว่า pTEM (รูปที่ 3.4 ก) มีชิ้นทรานสโปซอน Tn5 เมื่อตัดด้วย *Hind*III จะให้ผลบวกขนาดประมาณ 3.4 kb เช่นเดียวกับ pSUP2021 และเมื่อตัดด้วย *Eco*RI จะให้ผลบวกขนาดประมาณ 9.2 kb pTEM ที่ได้นั้นยังไม่สามารถนำไปหาลำดับเบสของดีเอ็นเอข้างเคียงทรานสโปซอน Tn5 ได้เนื่องจากไพรเมอร์ TN5-OE ที่ออกแบบไว้มีความจำเพาะต่อทั้งปลาย 5' และ 3' ของทรานสโปซอน Tn5 ดังนั้นจึงได้ทำการสับโคลน (subcloning) pTEM เพื่อตัดแบ่งครึ่งทรานสโปซอน Tn5 ภายในชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก โดยตัดพลาสมิด pTEM ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Eco*RI/*Bam*HI นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3.9 กิโลเบส สับโคลนเข้า pGEM-7Zf(+/-) ให้ชื่อพลาสมิดที่เกิดขึ้นใหม่นี้ว่า pTEB (รูปที่ 3.5 ข)



รูปที่ 3.5 แผนที่เรสทริกชันของ (ก) พลาสมิด pTEM และ (ข) pTEB

3.6 หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพรีลินจากริคอมบิแนนท์พลาสมิดและเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับที่มีอยู่ใน GenBank

หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ติดกับทรานสโปซอน โดยใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อปลายของทรานสโปซอน Tn5 (TN5-OE: 5'-GGTTCGTTTCAGGACGCTAC-3') ซึ่งมีทิศทางออกจากทรานสโปซอน ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้คือบริเวณของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพรีลิน ซึ่งเมื่อทรานสโปซอนเข้าไปแทรกอยู่ จะทำให้การย่อยสลายอะซีแนพรีลินบกพร่องไป ได้แสดงลำดับนิว

คลิโอไทด์ที่ได้แสดงในรูปที่ 3.6 เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเทียบความเหมือนโดยใช้โปรแกรม BlastX version 2.2.1 (Altschul et al., 1997) ซึ่งจะแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวเป็นลำดับกรดอะมิโนc]ไปเทียบความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของยีนใน GenBank ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าลำดับกรดอะมิโนที่ถอดรหัสมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าว มีความเหมือนกับกรดอะมิโนของเอนไซม์ไฮดรอะเลส-อัลโดเลส (hydratase-aldolase) ที่ถอดรหัสมาจากยีน *phnE* ของ *Burkholderia* sp. RP007 (Laurie และ Lloyd-Jones, 1999)

	10	20	30	40	50
5'	TTGTGTATAA	GAGTCAG	GAA TAGGCTCGTT	CGCCAGCCG	ATGGCCGCCG
	60	70	80	90	100
	TCAGCGTATG	GATGGCGTCC	TGGTTCGCGG	CTTCGATCGC	TCTCATCAGG
	PHNF primer →				
	110	120	130	140	150
	GCGATTGCAG	GCGCAGGGTT	CATGCCGGAG	GCCGTTGCCC	AGCAGGCCCGT
	160	170	180	190	200
	CGTCGTATTG	GGCGCGATGG	CGAAGAAGTC	CTGCACGACC	ATTTTCGTTTCG
	210	220	230	240	250
	GCATGAAATT	GATCCGCCCG	CCCGTCGCCG	CGATCAGTTC	CTTCAGTCCC
	260	270	280	290	300
	TGCGTACGGG	AATACTTCGC	CGAAGTCACG	GTGGGAGCCG	CCTGCGCCAC
	310	320	330	340	350
	TGCCGACCAG	AACTCAAGCG	GAAAGGAGAA	GCGGAAGGCG	CGCGCATTAN
	360	370	380	390	400
	CGTAAGCCAT	GATCGCAAGA	TCGGGGGAACA	GTTCTGAAAT	TCCCCGCGTAA
	410	420	430	440	450
	TAATCGACGG	CCATCCGTGT	CGTCACCGGC	TGCCACATCG	GCAACCCAC
	460	470	480	490	500
	AGCGTCGCGT	CTGCGCCCTG	TTCACGAATA	AACGTCAGTC	GGCGCACGAC
	← PHNR primer				
	510	520			
	CTCATGGCCG	CCTGGCGGTC	GCACCCAC	3'	

รูปที่ 3.6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณที่ติดกับทรานสโปซอน Tn5 ส่วนที่เป็นตัวอักษรหนาแสดงถึงส่วนที่เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของทรานสโปซอน Tn5 ตัวอักษรปกติแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ข้างเคียงทรานสโปซอน Tn5 ตัวอักษรที่ขีดเส้นใต้คือบริเวณที่ออกแบบเป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเพื่อการทำดีเอ็นเอติดตาม AE และลูกศรแสดงถึงทิศทาง 5' → 3' ของไพรเมอร์

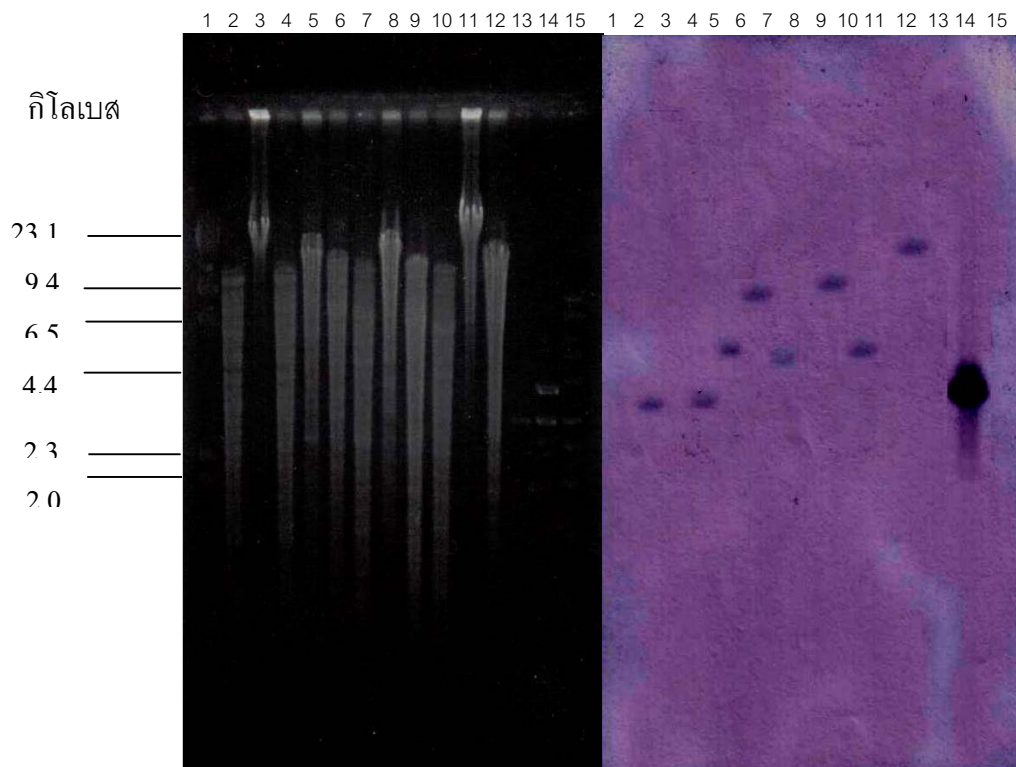
3.7 การเตรียมดีเอ็นเอติดตาม

จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอข้างเคียงทรานสโปซอน Tn5 ในข้อ 3.6 แสดงให้เห็นว่าลำดับดีเอ็นเอที่อยู่ติดกับ Tn5 น่าจะเป็นส่วนของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพรีลินจริง จึงจะทำ DNA-probe จากบริเวณนี้ โดยออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับดีเอ็นเอบริเวณดังกล่าวสองสายได้แก่ forward primer ตั้งชื่อว่า PHNF (5'-TGATGGCGTCCTGGTTC-3') และ reverse primer ตั้งชื่อว่า PHNR (5'-CTGACGTTTATTCGTGAAC-3') เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ลิเมอเรสโดยใช้พลาสมิด pTEB เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ ผลิตภัณฑ์ PCR (PCR product) ที่ได้จะมีขนาด 430 bp ติดตามผลิตภัณฑ์ PCR ดังกล่าวด้วย Digoxigenin-dUTP (Roche, Germany) โดยวิธี Random labelling เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอติดตามยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพรีลินในโครโมโซมของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 และตั้งชื่อดีเอ็นเอติดตามนี้ว่า AE-probe

3.8 หาคำแหน่งของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพรีลินในโครโมโซมของ *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1

แยกดีเอ็นเอของสายพันธุ์ CU-A1 ตัดด้วยเอนไซม์ restriction ต่างๆ ถ่ายดีเอ็นเอไปยังแผ่นไนลอน เมมเบรนด้วยวิธี Southern transfer และไฮบริไดซ์กับ AE-probe ในสภาพความเข้มงวดสูง (high stringency) ผลการไฮบริไดซ์เป็นดังที่ได้แสดงในรูปที่ 3.7



รูปที่ 3.7 ก.) ภาพอะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอของ *Rhizobium* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ restriction ต่างๆ

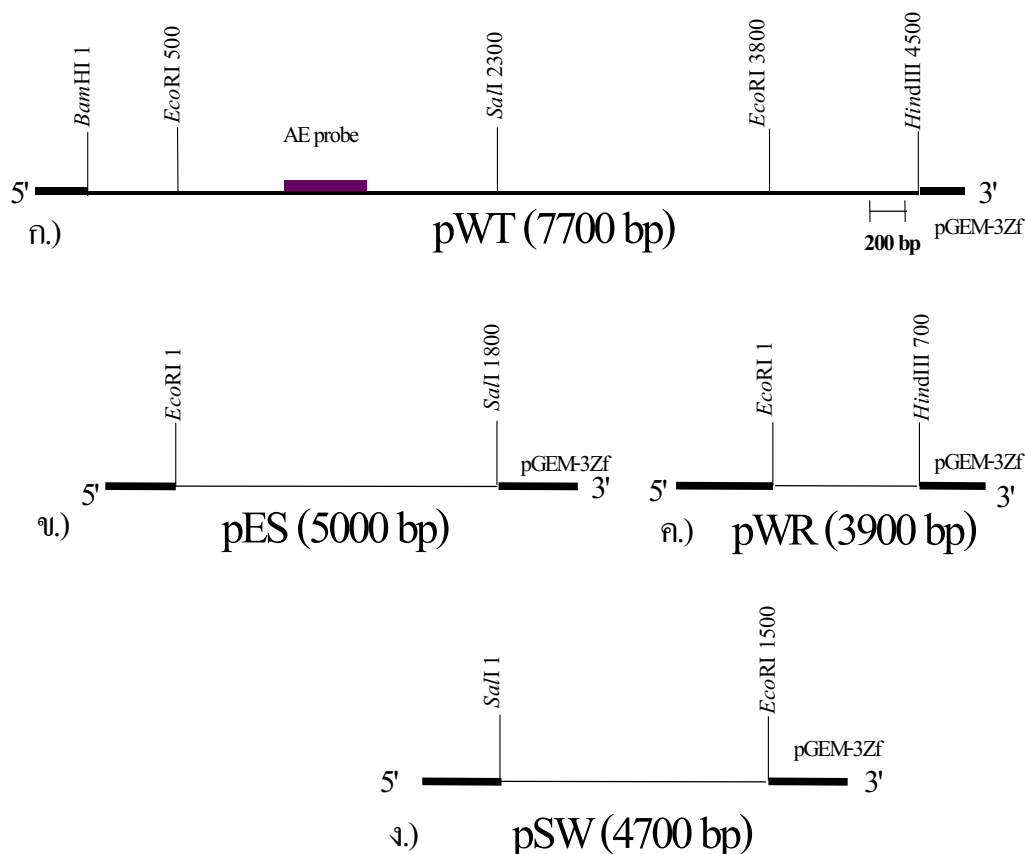
ข.) สัญญาณจากเซาท์เธอร์นไฮบริไดเซชันด้วย AE-Probe

- | | |
|----------------------|--|
| ช่องวิ่งที่ 1 และ 15 | Lambda DNA/ <i>Hind</i> III marker และ 1 kb DNA ladder ตามลำดับ |
| ช่องวิ่งที่ 2-12 | ดีเอ็นเอของ <i>Rhizobium</i> sp. CU-A1 ตัดด้วยเอนไซม์ restriction ต่างๆ คือ <i>Eco</i> RI, <i>Pst</i> II, <i>Eco</i> RI/ <i>Pst</i> II, <i>Bam</i> HI, <i>Hind</i> III, <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III, <i>Bgl</i> II, <i>Sal</i> I, <i>Bgl</i> II/ <i>Sal</i> I, <i>Xba</i> I และ <i>Xho</i> I ตามลำดับ |
| ช่องวิ่งที่ 13 | pGEM-7Zf(+/-) ตัดด้วยเอนไซม์ restriction <i>Eco</i> RI/ <i>Bam</i> HI (ตัวควบคุมผลลบ) |
| ช่องวิ่งที่ 14 | pTEB ตัดด้วยเอนไซม์ restriction <i>Eco</i> RI/ <i>Bam</i> HI (ตัวควบคุมผลบวก) |

พบว่าดีเอ็นเอของสายพันธุ์ CU-A1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ restriction ต่างๆ ให้สัญญาณจากการไฮบริดกับ AE-Probe ในขณะที่พลาสมิด pGEM-7Zf(+/-) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI/BamHI* (ตัวควบคุมผลลบ) ไม่ให้สัญญาณการไฮบริดและพลาสมิด pTEB ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI/BamHI* (ตัวควบคุมผลบวก) ให้สัญญาณขนาดประมาณ 3.9 กิโลเบส

3.9 โคลนชิ้นดีเอ็นเอของสายพันธุ์ CU-A1 ที่มียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพรีลิน

ผลไฮบริดเซชันในข้อ 3.8 ทำให้ทราบตำแหน่งของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพรีลินบนโครโมโซมของสายพันธุ์ CU-A1 จึงได้คัดเลือกชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *BamHI/HindIII* (ช่องวิ่งที่ 7) และให้สัญญาณกับดีเอ็นเอติดตาม AE ซึ่งมีขนาดประมาณ 4.5 กิโลเบสเพื่อการโคลนเข้าพลาสมิด pGEM-3Zf(+/-) และทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* JM109 คัดเลือก *E. coli* JM109 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยวิธี Blue/White selection, Dot blot hybridization และ Southern hybridization ด้วย AE-Probe ตามลำดับ ตั้งชื่อรีคอมบิแนนท์พลาสมิดนี้ว่า pWT (รูปที่ 3.8 ก) จากนั้นสืบโคลน pWT เพื่อให้ได้พลาสมิดต่างๆ คือ pES pWR และ pSW ดังแสดงในรูปที่ 3.8 ข ค และ ง ตามลำดับ



รูปที่ 3.8 ก.) ภาพแสดงแผนที่เอนไซม์ restriction ของพลาสมิด pWT และตำแหน่งของดีเอ็นเอติดตาม AE ในบริเวณขึ้นดีเอ็นเอสอดแทรก ข.)-ง.) แสดงรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้มาจากการสืบโคลนชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกของพลาสมิด pWT เพื่อนำไปใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้แก่ พลาสมิด pES (ข.) pWR (ค.) และ pSW (ง.)

3.10 หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพติลินจากพลาสมิด pWT

เริ่มหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยวิธี primer walking ซึ่งเป็นการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากส่วนที่ทราบแล้ว (รูปที่ 5) หรือใช้ universal forward/reverse primer ที่จำเพาะกับปลายด้านใดด้านหนึ่งของเวกเตอร์ การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ดำเนินการโดยหน่วยบริการชีวภาพ (BSU) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)

สามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดีเอ็นเอสอดแทรกใน pWT ดังที่แสดงในรูปที่ 3.9

ORF1 →

```

1  5' GGATCCTGCCATTTTTCGGCGGGCGACTGCACACGATTTCCGGGTCCGACAGGTCCGGT
1  D P A I A S A G D C T R A P G P T G P V

61  GCGGCTGGAAACTGGATGCACGCACTCGACCACGGCACAGTGGCCGGGGCAAATGCAGC
21  R L E N W M H A L D H G T V A G A N A A
                                flavin binding fold
121  CGGTGGAGACATTGCCTACGAAGCAAAACCTCCTTCTGGTCTGAACAATACGATCTTTA
41  G G D I A Y E A K P S F W S E Q Y D L Y

181  CATTACAGGTATCGGCTGGCCGGACCCGGACGCTAGCCGGGTGACACGCCCGCTGGACGG
61  I Q G I G W P D P D A S R V T R P L D G

241  CAACCGGGCACTGGTGGTCGAGATGAAGAACGGACTGATCCAGAGCGCGCTCGGCATCAA
81  N R A L V V E M K N G L I Q S A L G I N

301  TGTGTGCGGTGATATTGCGGCGATACGACGGCTGATCGACCGGCGGATCGAGGTGATCC
101  V S R D I A A I R R L I D R R I E V D P

361  CGTGGCTGTGCGAGACCCCTGAACGCCCTTTCGCGGATATGCTGAAGCAGAAAGTCTGAGA
121  V A V A D P E R P F A D M L K Q K V *

421  CAGGACCAACCCTATGCACGGACAGCCCTGCGCTGGGCGGACTGGATAACACGGCAATAG

481  AATTCAGTTTTACAGAATTCATTTCTTTATTACAGAATTTATTTGCCACATACATCGATG

541  CCGCCTATAGTGATCACGCGGTGCGAGTGCTGGAGGGGAAGAACAGGCATCCGTCATCTC

601  GACACGGCCTTGCGGGCATTGACGATTGTACAAGGCGGGGAGTGAAAAGCGCTTCGCTTG

661  CAGCCGGAACCTGGAGGAGACACCTGGCACTTCCTTGATGACGCAACCGCAGACACACCAT

721  TCCCGGCAATGATCACCCCTTAAAGGGCGGAGCCGAAAGCTCGATTGACGTTCTTGACGT

                                RBS
781  CCATTGCAAGCGCTCCGGACGACCTGTTGTCGTGGGCGCTTTTTATTTTCGAAGAAAGGTT

                                ORF2 (acnE) →
841  GAAGACCATGCTCACTGCTGCCGACATCCATGGGATGTACGCCATCATCGCGACCCCGGC
1  M L T A A D I H G M Y A I I A T P A

901  GAAACCCCATGCCGGAAGACTGGACGCCAAGGACACCGTTGATCTTGCCGAAACCGAGCG
19  K P H A G R L D A K D T V D L A E T E R

961  GTTGATCAACAAGCTGATCCTTGACGGTTGCGACGGCCTGATCATTACCGGTACGACGGG
39  L I N K L I L D G C D G L I I T G T T G
    
```

(มีต่อหน้าถัดไป)

1021 CGAGTGC GCAACGCTGTCCGAGAGCGACTACCGGGCATTTCGTGGACTGCGCACTTTCCAC
59 E C A T L S E S D Y R A F V D C A L S T

1081 CGTCAACCGGCGCATTCCCACCATCGTGGGTGCGACCGCCATGGGCGGCCATGAGGTCGT
79 V N R R I P T I V G A T A M G G H E V V

1141 GCGCCGACTGACGTTTATTTCGTGAACAGGGCGCAGACGCGACGCTGCTGGGGTTGCCGAT
99 R R L T A I R E Q G A D A T L L G L P M

1201 GTGGCAGCCGGTGACGACACGGATGGCCGTCGATTATTACGCGGGAATTTCAGAACTGTT
119 W Q P V T T R M A V D Y Y A G I S E L F

1261 CCCC GATCTTGCGATCATGGCTTACGCTAATGCGCGCGCCTTCCGCTTCTCCTTTCCGCT
139 P D L A I M A Y A N A R A F R F S A P L

1321 TGAGTTCTGGTCGGCAGTGGCGCAGGCGGCTCCCACCGTGACTTCGGCGAAGTATTCCCG
159 E F W S A V A Q A A P T V T S A K Y S R

1381 TACGCAGGGACTGAAGGAACTGATCGCGGCGACGGGCGGGCGGATCAATTTTCATGCCGAA
179 T Q G L K E L I A A T G G R I N F M P N

1441 CGAAATGGTCGTGCAGGACTTCTTCGCCATCGCGCCCAATACGACGACGGCCTGCTGGGC
199 E M V V Q D F F A I A P N T T T A C W A

1501 AACGGCCTCCGGCATGAACCCTGCGCCTGCAATCGCCCTGATGAGAGCGATCGAAGCCCC
219 T A S G M N P A P A I A L M R A I E A R

1561 GAACCAGGACGCCATCCATACGCTGACGGCGGCCATCGGCTGGGCGAACGAGCCTATTCA
239 N Q D A I H T L T A A I G W A N E P I Q

1621 GCCCATGCTGGCCGATGCCGATCTGTTTGCGCAATACAATATCCAGATGGAAAAGACGCG
259 P M L A D A D L A A Q Y N I Q M E K T R

1681 GATCAATGCCGCCGGTTACAGCCAGTGC GGCCCCGTGAGACCCCCCTATCAGGACTTCCC
279 I N A A G Y S Q C G P V R P P Y Q D F P

1741 GGAAGATTATGCCGCGCAGGCCCGTGAATGCGGCCAGCGCTGGCACCGCATCTGCGATGC
299 E D Y A A Q A R E C G Q R W H R I C D A

1801 CTATGCGGGGAATTTCAAGTTCAAGGACCACCCCTGGGAGACAGCGGGCGAACGGACGGC
319 Y A G N F K F K D H P W E T A G E R T A

1861 CTGAAACGGCAGCCGCGCCACTGCGCGCGGCGCCTTTATGCACAGCCAACTATCTGGAG
339 * **ORF3 (acnK) →**

1921 TAGGTCGATGGGATACATCACGACAGCAGACCGCATGCTGATTGGCGGCGAGCTGGTGA
1 M G Y I T T A D R M L I G G E L V E

1981 AAGCACGAGCGGCGCCTGGGAAGAAACATTCAATCCAGCCGATGAAACCGCAATCGGGCG
19 S T S G A W E E T F N P A D E T A I G R

2041 CGTTTCTGCCGGGACAAGGGAGGATGTGGACCGCGCCGTTGCCGAGCCAGGCGGCATG
39 V P A G T R E D V D R A V A A A Q A A W

2101 GCCCGCATGGGCGAGCAAAACACCGAAGGAACGCGGCGAAACCATGCGCGCCTTCCGTGA
59 P A W A S K T P K E R G E T M R A F G E

2161 GAAAATCCGCGCCCGCGCCACGGAATCCTTCATGTCGAGGTTGCCGACACCGGCAACAC
79 K I R A R A T E I L H V E V A D T G N T

2221 CATCACGCCGATGCGCGGAGATGTGCGCCATGCCGTCGACAGTCTCAATTACTATGCCG
99 I T P M R G D V G H A V D S L N Y Y A G

(มีต่อหน้าถัดไป)

2281 CATAGCCACGAATTGAAGGGAGAAACGATACCGGCAACCCCGGATCATCTTCACCTGAC
 119 I A H E L K G E T I P A T P D H L H L T

 2341 CATTGCGAGCCCTACGGCGTCGTGGCGCGGATCGTGCCGTTCAACCACCCCTTGATGTT
 139 I R E P Y G V V A R I V P F N H P L M A

 2401 TGCAGTGGCCAGAACAGCCGCCGCCCTTGCCGCCGGCAACGCCGTCATCGTGAAGCCGCC
 159 A V A R T A A A L A A G N A V I V K P P

 2461 GGAAACCAGCCCGCTATCGGCGATGGTGCTGGCGGAAATCGCCCGGAGGCGCTGCCGCC
 179 E T S P L S A M V L A E I A R E A L P P

 2521 CGGGGTGTTCAACATCGTGACCGGAACAGGCCCTTCGGTTGGTGAAGCCATCGTGCGGCA
 199 G V F N I V T G T G P S V G E A I V R H

 2581 CCCGAAATCAAGCGCATCGCGTTTCATTGGATCGGCAGCCACCGGCCGCGCCATCCAGAG
 219 P E I K R I A **F I G S A A T G** R A I Q R
 NAD⁺ binding fold

 2641 GACTGCGGCAGAGGTGAGCGTCAAGCATGTGACACTGGAGCTTGGCGGCAAGAACCCGAT
 239 T A A E V S V K H V T **L E L G G K N P** M
 Active site of aldehyde dehydrogenase

 2701 GATCGTTTTTCCCACAAATGATCCGGACGAGATTGCGCAAGCCGCGGTCAAGGGAATGAA
 259 I V A P D N D P D E I A Q A A V K G M N

 2761 TTTACCTGGCAGGGCCAGTCCTGCGGCTCGACAAGCCGGTTGATGGTCCACGAAGACCT
 279 F T W Q G Q S C G S T S R L M V H E D L

 2821 TTACGATGCCGTGCTTGAGCGTGTGGCAAACATCGTTGCCAGCCTGCGTGTCGGCGACCC
 299 Y D A V L E R V A N I V A S L R V G D P

 2881 GATGCGGACGACAGCGACATGGGACCGATCAACTCCGCCGGGCAGTATCGCAAGGTCAT
 319 M R D D S D M G P I N S A G Q Y R K V M

 2941 GGGCTATATCGAAAGCGGCAACGCCGAAGGCGCCCGGCTTGTGACAGGCGGCAACCGGCC
 339 G Y I E S G N A E G A R L V T G G N R P

 3001 GGATGGTCAAGCCTTCGCCAAGGGTTACTGGGTGAGACCCACCGTCTTTGCCGATGTCGA
 359 D G Q A F A K G Y W V R P T V A A D V D

 3061 TCCACATATGCGCATCTGGCGGGAAGAGATTTTGGACCGGTTCTCTCCGTCAGCAAATG
 379 P H M R I W R E E I A G P V L S V S K W

 3121 GCACTCCGTCGATGAGGCGATCCGGCTTGCGAACGGTGTCGAATATGGCCTGACGGCGTC
 399 H S V D E A I R L A N G V E Y G L T A S

 3181 GATCTGGACAAAGGATATCAAGAACGCGCTCAACACGGCACGTGCGATCGACGCTGGCCA
 419 I W T K D I K N A L N T A R R I D A G H

 3241 TATCTGGATCAACGGTGTGGCCCCGATTACCTCGGCGTGCCCTATGGCGGCATGAAGAA
 439 I W I N G V G P H Y L G V P Y G G M K N

 3301 CAGCGGCGTCGGGCGCGAAGAGGGCATCGAGGAGATGCTGAGCTACACCGAAACCAAGGT
 459 S G V G R E E G I E E M L S Y T E T K V

 3361 TCTCAATATCGTCCTG**TGA**CACCTAAAGCAGTTCATCAAAATTGGAAACCGGTTTTGCT
 479 L N I V L *****

 3421 GGAATTTTGTA AAAACAAAGAGATGGAGCATATCCGCAAGCGGGAGGCGCACCGGAAAT

(มีต่อหน้าถัดไป)

ORF4 →

1 RBS M P D H I K Q T I S E A
 3481 GCTCCGGAATGCAGGGAGTTCATACCATGCTGACCACATCAAACAGACCATCAGCGAGG

13 D L R A A G A S E P L P D P A L I A D L
 3541 CGGATCTGAGGGCTGCGGGCTTTTCCGAACCGCTTCCCGACCCGGCCCTGATCGCTGATC

33 V A A N H I L F D Q G V V D A F G H V S
 3601 TCGTCGCGGCCAATCATATCCTGTTTCGATCAGGGCGTGGTCGATGCGTTCGGGCATGTCA

53 V R H D K Q Q D R Y L L A R N M A P G Q
 3661 GCGTCCGTCACGACAAACAGCAGGACCGCTACCTTCTGGCGCGCAACATGGCACCGGGTC

73 V S A D D I I E F T F D G E A V N G R E
 3721 AGGTGAGCGCCGACGACATCATCGAATTCACCTTCGATGGCGAGGCGGTGAATGGCCGGG

93 R R V Y L E R F I H A E L Y R A R P D V
 3781 AGCGGCGCGTCTATCTCGAACGGTTCATCCATGCGGAACTCTACCGCGCAAGGCCGGATG

113 I A V V H S H S H S I L P L T I S K S V
 3841 TGATCGCTGTCGTTACAGCCATTTCGATTCCATTCTGCCGCTGACCATCTCCAAATCGG

133 R L R S V A H M A G F I G Q D A P L F E
 3901 TGCGCCTGCGCTCCGTTTTTCATATGGCCGGTTTCATCGGTGAGGACGCACCGCTTTTCG

153 I R D H G G P A T D L L I S N S E L G H
 3961 AGATTGCGGATCATGGCGGACCGGCAACCGACCTGCTGATCAGCAACAGCGAACTGGGCC

173 A L A A C C G E R N I V L M R G H G S T
 4021 ACGCGCTGGCCGCTGCTGCGGAGAGCGGAACATCGTGCTGATGCGCGGACATGGTTCGA

193 V V A D S L P R A V Y R A V Y A E L N A
 4081 CCGTCGTCGCCGATTCCCTGCCAAGAGCCGTTTACCGTGCCGCTCTACGCGGAACTGAATG

213 R Y Q C D A I G L G D V E Y L T E A E C
 4141 CACGCTACCAGTGTGACGCCATCGGGCTGGGCGATGTGCAATATCTGACCGAAGCCGAAT

233 E T S V R N V E A Q W H R P W A L W K E
 4201 GCGAAACCAGCGTCAGAAACGTGGAGGCGCAGTGGCACCGTCCTTGGGCGCTGTGGAAGG

253 Q A A E R R A G *
 4261 AGCAGGCAGCCGAACGCCGTGCCGGAATGATGGCAGCCATCATCGTGCCGCGCGCAGGCG

RBS ORF5 →

4321 CGCGATAACAATTCAAGCAACATGAGAGGACATCATGGTAATCGTCTGGATGAAAAAGT
 1 M G N R L D E K V

4381 GTGCGTCATACCGGCGCGGCGCAAGGGATAGGACAGGGCTGCGCACTCGAAATGGCGGT
 10 C V I T G A A Q G I G Q G C A L E M A V

4441 TCAGGGCGGCAGGATCGTTGTCAAGTACCGCAATGTCGCTGGCGGCGAGGAAACCGTTTCG
 30 Q G G R I V V S D R N V A G G E E T V R

4501 GCAAAATCGTCGAGCTGGGCGGTGAGGCAATCTTCGTTGCCTGTGACGTGCGGAACCGCGA
 50 Q I V E L G G E A I F V A C D V R N R D

4561 TGATCTCGAAGCTT 3'
 70 D L E A

รูปที่ 3.9 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่ถอดรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด pWT ขนาด 4574 bp ลูกศรแสดงทิศทางการถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนของยีน ตัวอักษร M แสดงกรดอะมิโนเมธิโอนีนซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นการถอดรหัส (start codon) เครื่องหมาย * แสดงรหัสสิ้นสุดการถอดรหัส (stop codon) ของบริเวณที่เป็นกรอบอ่านรหัสเปิด ลำดับนิวคลีโอไทด์ตัวหนาแสดงบริเวณที่เป็น putative ribosome binding site (RBS) กรดอะมิโนที่อยู่ในกรอบอ่านรหัสเปิดเดียวกันแสดงด้วยอักษรสีน้ำเงินและกรดอะมิโนที่อยู่ต่างกรอบอ่านรหัสเปิดแสดงด้วยอักษรสีแดง กรดอะมิโนในบริเวณอนุรักษ์ของโปรตีนแสดงไว้ในกรอบสี่เหลี่ยม

จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sense และ antisense strands) ของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกทั้งชิ้นในพลาสมิด pWT ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 4574 bp ตามที่แสดงไว้ในรูปที่ 3.9 จากรูปพบว่าเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดังกล่าวไปวิเคราะห์โดยโปรแกรม BlastX ที่แปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ให้เป็นลำดับกรดอะมิโน จากนั้นนำไปเทียบความคล้ายคลึงกับกรดอะมิโนของยีนต่างๆใน GenBank ได้พบกรอบอ่านรหัสเปิด (Open Reading Frame, ORF) จำนวน 5 กรอบ ซึ่งมีทิศทางการถอดรหัสไปทางเดียวกัน เรียงตามลำดับดังต่อไปนี้

1. กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 1 (ORF1) มีลำดับกรดอะมิโนตั้งแต่ตำแหน่งที่ 1 ถึง 138 ของ ORF1 ซึ่งพบว่ามีลักษณะเหมือนกับ putative ferredoxin reductase ที่ประมวลรหัสโดยยีน *mocF* ของ *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (Bahar และคณะ, 1998) เท่ากับ 33% ORF1 เป็นกรอบอ่านรหัสเปิดที่ไม่สมบูรณ์ กล่าวคือยังไม่สามารถพบกรดอะมิโนเมธิโอนีนที่กรดอะมิโนตัวแรกของ ORF

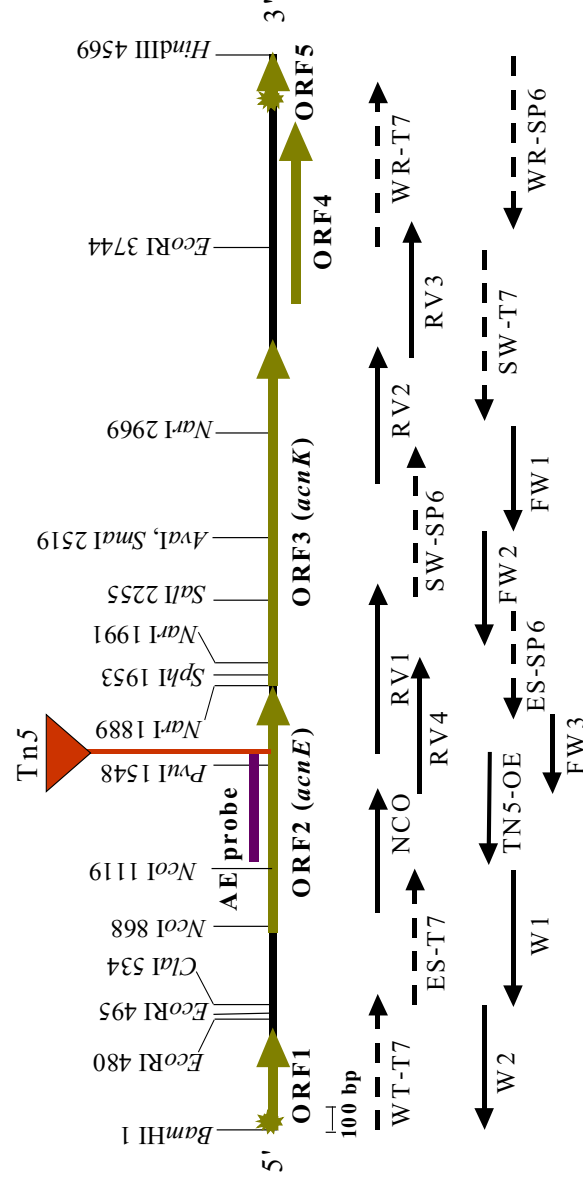
2. กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 2 (ORF2) มีลำดับกรดอะมิโนตั้งแต่ตำแหน่งที่ 1 ถึง 338 ของ ORF2 ซึ่งพบว่ามีลักษณะเหมือนกับไฮเดรราเทส-อัลโดเลส (hydratase-aldolase) ที่ประมวลรหัสโดยยีน *phnE* ของ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 (Laurie และ Lloyd-Jones, 1999) เท่ากับ 38% ให้ชื่อ ORF2 ว่า *acnE*

3. กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 3 (ORF3) มีลำดับกรดอะมิโนตั้งแต่ตำแหน่งที่ 1 ถึง 483 ของ ORF3 ซึ่งพบว่ามีลักษณะเหมือนกับ 2-คาร์บอกซีเบนซิลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส ที่ประมวลรหัสโดยยีน *phdK* ของ *Nocardioideis* sp. สายพันธุ์ KP7 (Iwabuchi และ Harayama, 1997) เท่ากับ 46% ให้ชื่อ ORF3 ว่า *acnK*

4. กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 4 (ORF4) มีลำดับกรดอะมิโนตั้งแต่ตำแหน่งที่ 1 ถึง 260 ของ ORF4 ซึ่งพบว่ามีลักษณะเหมือนกับโปรตีนที่คล้ายแอดดิวซิน (similar to adducin) ที่ประมวลรหัสโดยยีนในจีโนมของ *MesoRhizobium loti* (Kaneko และคณะ, 2000) เท่ากับ 38% ORF4 อยู่ในกรอบอ่านรหัสเปิดที่ต่างจาก ORF1-3 และ 5

5. กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 5 (ORF5) มีลำดับกรดอะมิโนตั้งแต่ตำแหน่งที่ 1 ถึง 73 ของ ORF5 ซึ่งพบว่ามีลักษณะเหมือนกับ short-chain dehydrogenase ที่ประมวลรหัสโดยยีน *yigI* ของ *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ PA01 (Stover และคณะ, 2000) เท่ากับ 43% ORF5 เป็นกรอบอ่านรหัสเปิดที่ไม่สมบูรณ์ กล่าวคือยังไม่สามารถพบรหัสหยุดการแปลรหัสที่ตำแหน่ง สุดท้ายของ ORF

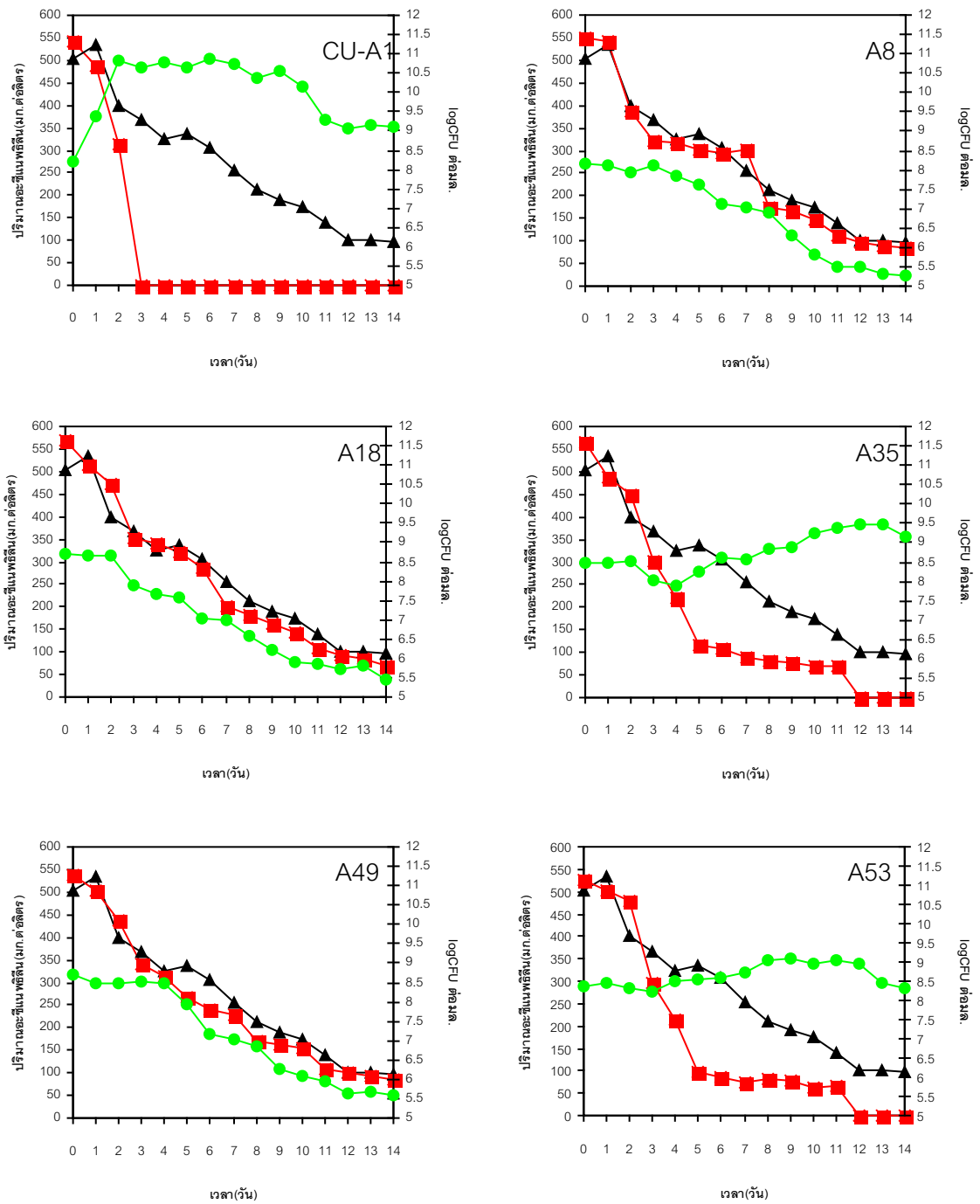
นอกจากนี้ยังพบบริเวณที่คาดว่าจะเป็ตำแหน่งจับเกาะของไรโบโซม (putative ribosome binding site) ก่อนหน้ากรอบอ่านรหัสเปิดทุกกรอบ จากข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์สามารถนำไปสร้างแผนที่เรสทริกชันโดยละเอียดดังแสดงในรูปที่ 3.10 จากรูปนอกจากจะแสดงบริเวณจดจำของเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดต่างๆในชั้นดีเอ็นเอสอดแทรกของพลาสมิด pWT โดยสมบูรณ์แล้วยังได้แสดงให้เห็นถึงบริเวณที่เป็น ORF ตามที่กล่าวมาแล้วข้างต้นและแสดงตำแหน่งที่ทรานสโพซอน Tn5 แทรกสอดในสายพันธุ์กลาย E11 ด้วย



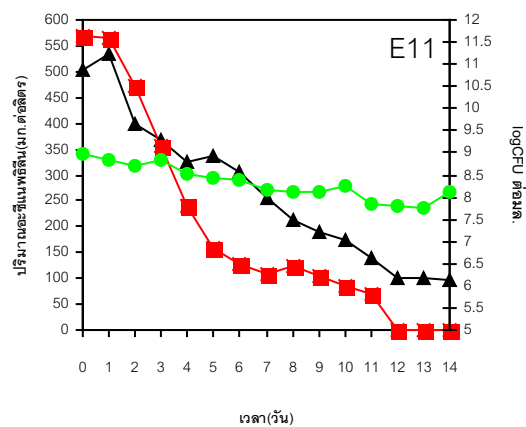
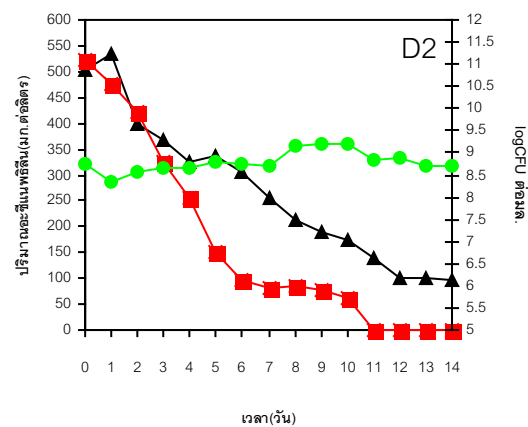
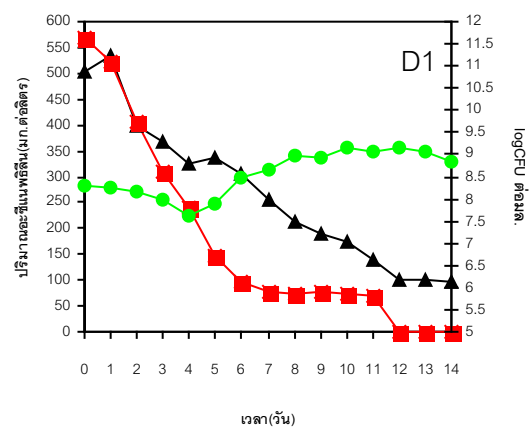
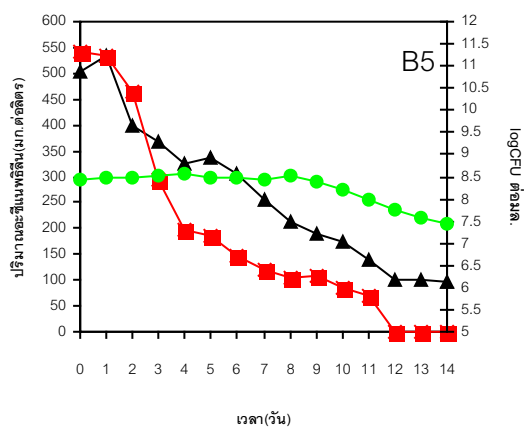
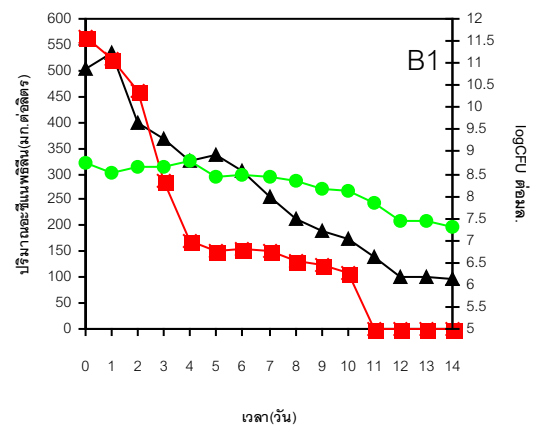
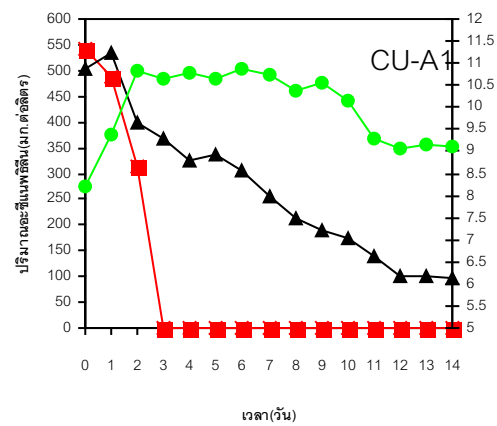
รูปที่ 3.10 แผนที่เรสทริกชันของยีนดีเอ็นเอสอดแทรกจากพลาสมิด pWT ขนาด 4574 bp แสดงตำแหน่งที่เป็นกรอบอ่านรหัสเปิด (ORF) ดีเอ็นเอติดตาม AE ตำแหน่งสอดแทรกของทรานสโปซอนในสายพันธุ์กลาย E11 และทิศทางการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยไพรเมอร์ต่างๆของยีนดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด pWT ลูกศรใหญ่แสดงทิศทางการถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนของกรอบอ่านรหัสเปิดตามชื่อที่ระบุชื่อไว้ด้านล่าง ลูกศรเล็กแสดงทิศทางการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ตัวต่างๆตามชื่อที่ระบุชื่อไว้ด้านล่างลูกศร โดย ➡ เป็นการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบเอง (designed primer) และ ➡ เป็นการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ universal primer เครื่องหมาย 🌟 แสดง ORF ที่ยังไม่สมบูรณ์

3.11 วิเคราะห์สารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพริลีนโดยสายพันธุ์กลายของ *Rhizobium* sp. CU-A1 โดยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC) และ High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

เพื่อศึกษารูปแบบการเจริญและความสามารถในการย่อยสลายอะซีแนพริลีน เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานในการเจริญเทียบกับสายพันธุ์ CU-A1 นำสายพันธุ์กลายทั้งหมด 18 สายพันธุ์มาเลี้ยงในอาหารเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพริลีน ความเข้มข้น 600 มก./ลิตร เป็นเวลา 14 วัน หาปริมาณอะซีแนพริลีนที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยการสกัดด้วยเอธิลอะซีเตทและวิเคราะห์ปริมาณอะซีแนพริลีนด้วย HPLC วัดการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี viable plate count พบว่าสายพันธุ์ CU-A1 สามารถย่อยสลายอะซีแนพริลีนจนถึงระดับที่ไม่สามารถวิเคราะห์ปริมาณอะซีแนพริลีนที่เหลืออยู่ได้ด้วย HPLC ภายในระยะเวลา 3 วัน ของการเลี้ยงเชื้อและเชื้อมีการเจริญที่สัมพันธ์กับปริมาณอะซีแนพริลีนที่ลดลง ในขณะที่สายพันธุ์กลายแต่ละชนิดมีรูปแบบในการเจริญและความสามารถในการย่อยสลายอะซีแนพริลีนแตกต่างกันไปจากสายพันธุ์ CU-A1 ดังแสดงผลการทดลองในรูปที่ 3.11ก ถึง 3.11ง

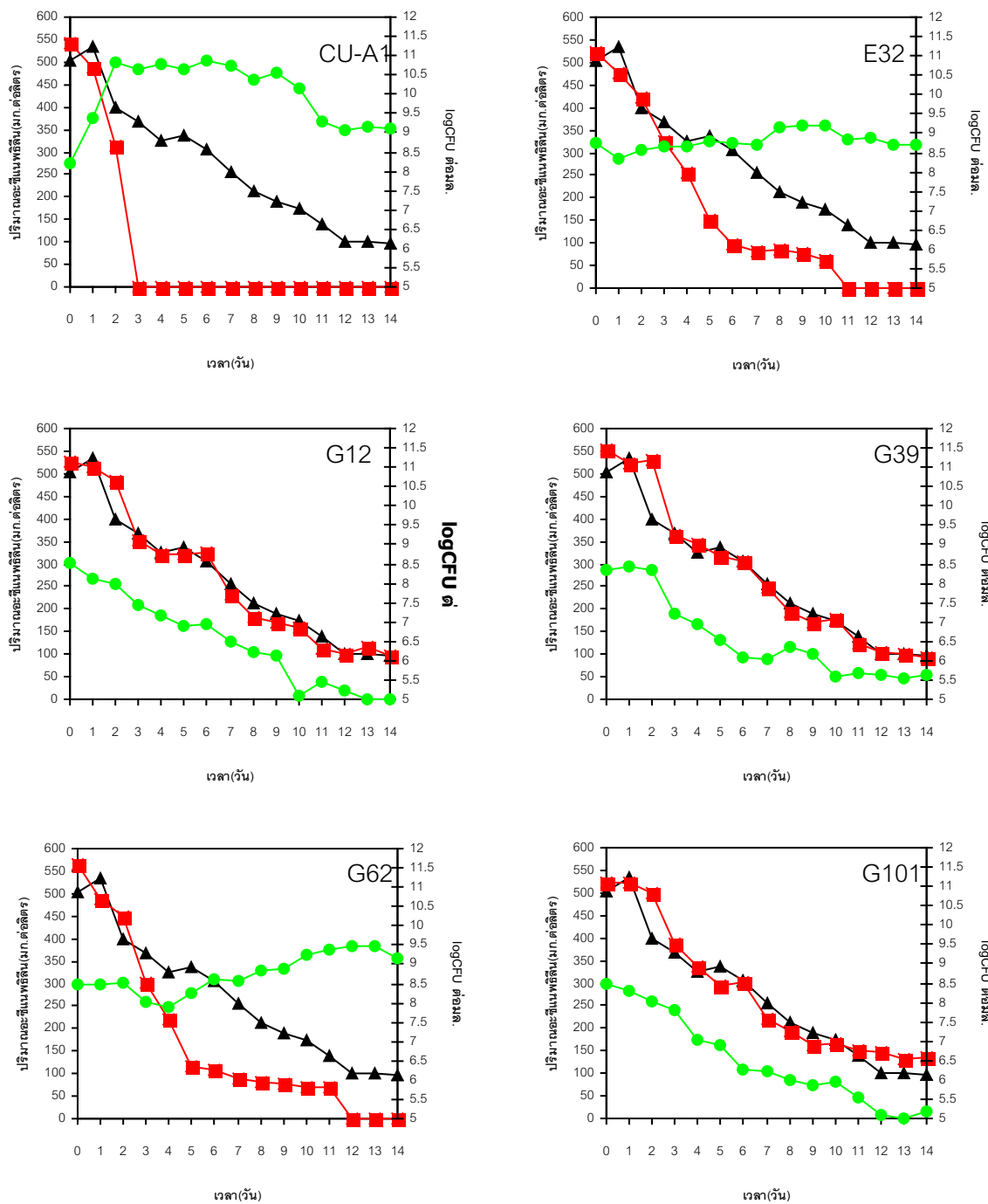


รูปที่ 3.11 ก. การเจริญของสายพันธุ์กลาย A8, A18, A35, A49 และ A53 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพรีลินเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร เปรียบเทียบกับ *Rhizobium* sp. CU-A1



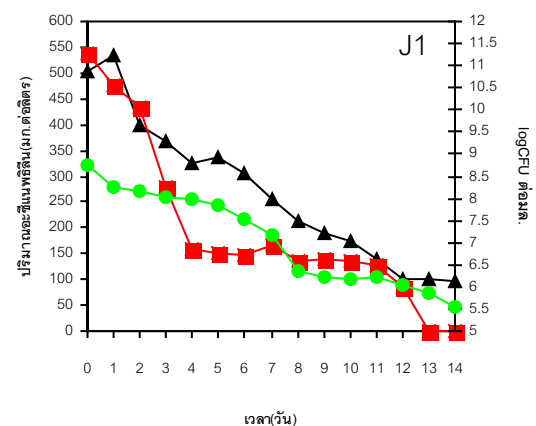
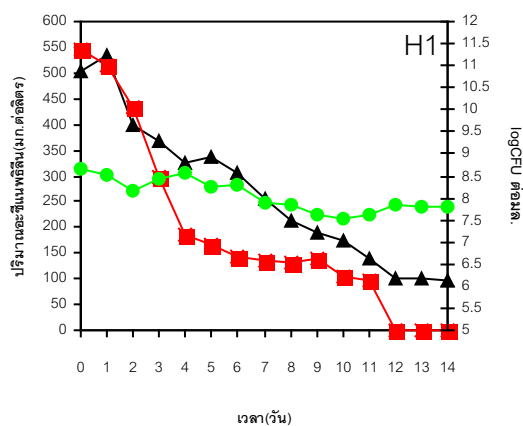
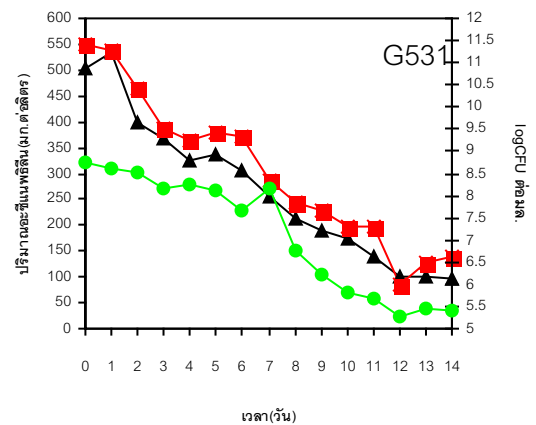
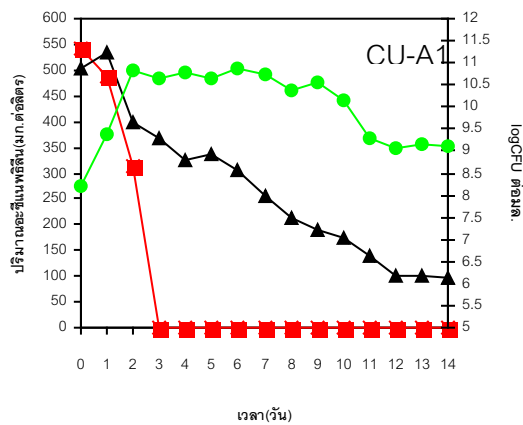
- ▲ ปริมาณอะซิแนพริลินในชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อ
- ปริมาณอะซิแนพริลินในชุดทดลองที่เติมเชื้อ
- จำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองที่เติมเชื้อ

รูปที่ 3.11 ข. การเจริญของสายพันธุ์กลาย B1, B5, D1, D2 และ E11 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีอะซิแนพริลินเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร เปรียบเทียบกับ *Rhizobium* sp. CU-A1



- ▲ ปริมาณอะซิแนฟิไลน์ในชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมเชื้อ
- ปริมาณอะซิแนฟิไลน์ในชุดทดลองที่ได้เติมเชื้อ
- จำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองที่ได้เติมเชื้อ

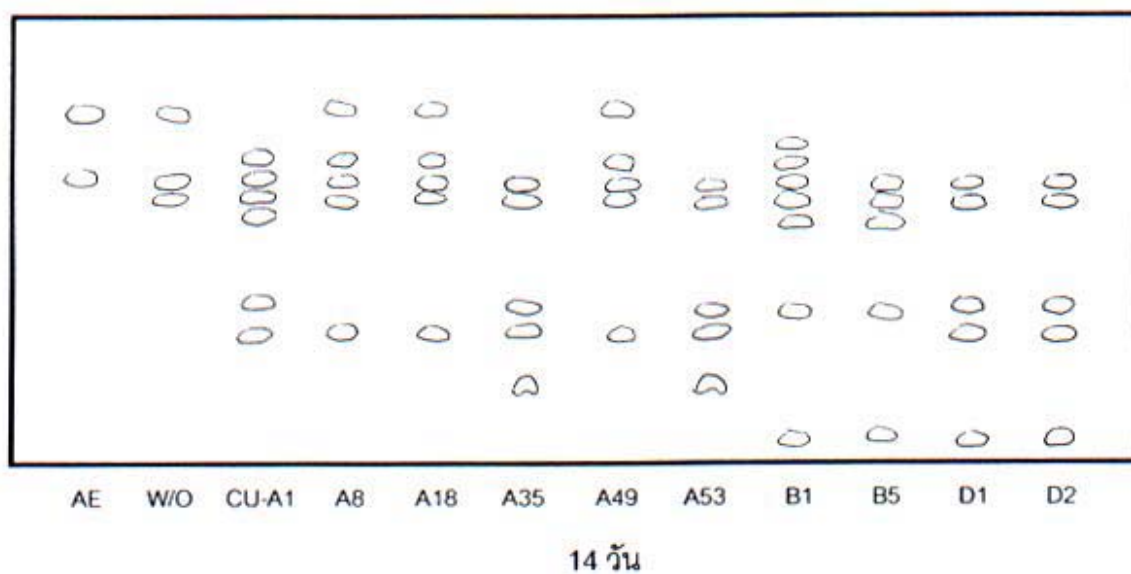
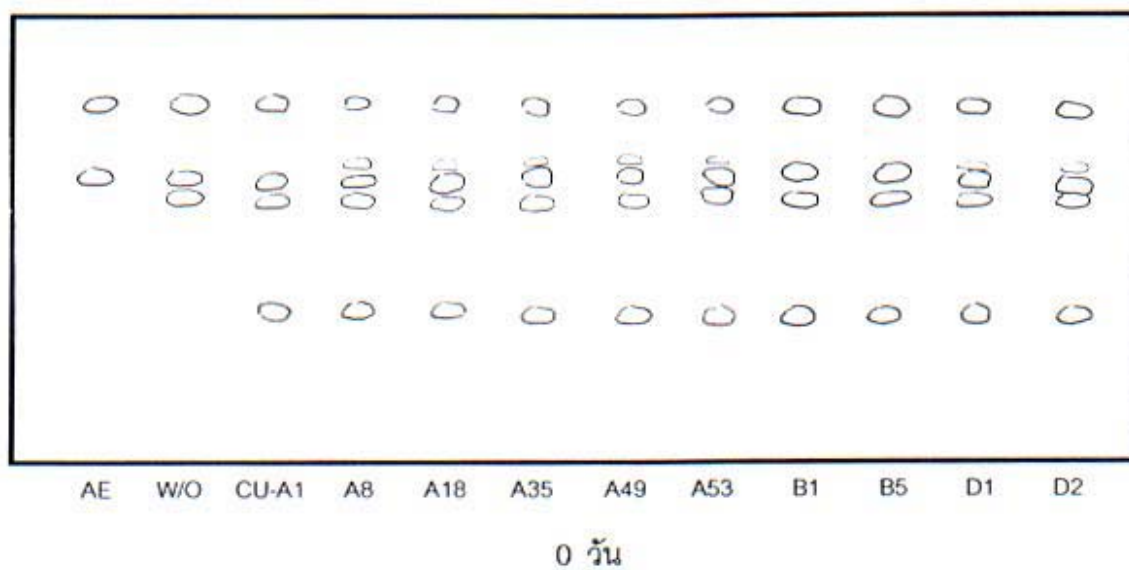
รูปที่ 3.11 ค. การเจริญของสายพันธุ์กล้วย E32, G12, G39, G62 และ G101 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีอะซิแนฟิไลน์เข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร เปรียบเทียบกับ *Rhizobium* sp. CU-A1



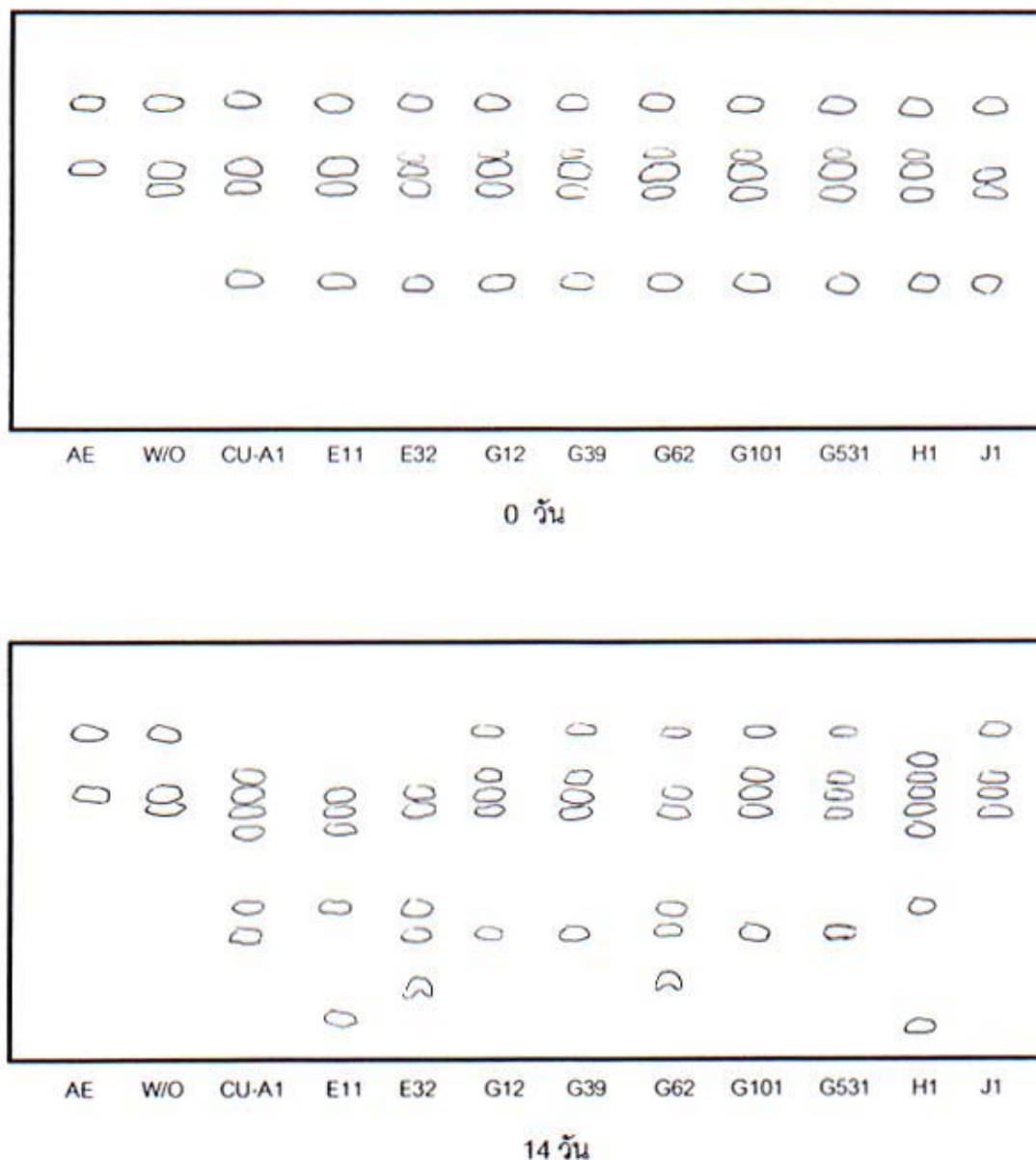
- ▲ ปริมาณอะซีแนพริลลินในชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อ
- ปริมาณอะซีแนพริลลินในชุดทดลองที่เติมเชื้อ
- จำนวนแบคทีเรียในชุดทดลองที่เติมเชื้อ

รูปที่ 3.11 ง. การเจริญของสายพันธุ์กล้วย G531, H1 และ J1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพริลลินเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร เปรียบเทียบกับ *Rhizobium* sp. CU-A1

นำส่วนสกัดเอธิลอะซีเตทที่ได้ข้างต้น มาวิเคราะห์สารมัธยันต์ที่สะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยวิธี TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลายคือ โทลูอีน:1,4-ไดออกเซน:กรดอะซีติกเข้มข้น ในอัตราส่วน 90:25:4 ตรวจหาสารมัธยันต์ภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตช่วงความยาวคลื่น 215-250 นาโนเมตร เมื่อเปรียบเทียบ TLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมโดยสายพันธุ์ CU-A1 กับสายพันธุ์กล้วยแต่ละชนิด หลังเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน ดังแสดงในรูปที่ 3.12 ก. และ ข. พบว่าแต่ละสายพันธุ์กล้วยมีการสะสมสารมัธยันต์ที่ค่อนข้างแตกต่างกัน และพบว่ามีสารมัธยันต์หลายชนิดที่แตกต่างจากชนิดที่สะสมโดย *Rhizobium* sp. CU-A1



รูปที่ 3.12 ก. TLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพธินในวันที่ 0 และวันที่ 14 โดย *Rhizobium* sp. A8, A18, A35, A49, A53, B1, B5, D1 และ D2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพธิน ความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร เปรียบเทียบกับ *Rhizobium* sp. CU-A1 (AE คืออะซีแนพธิน, W/O คืออาหารเหลวที่ไม่มีการเติมเชื้อ)

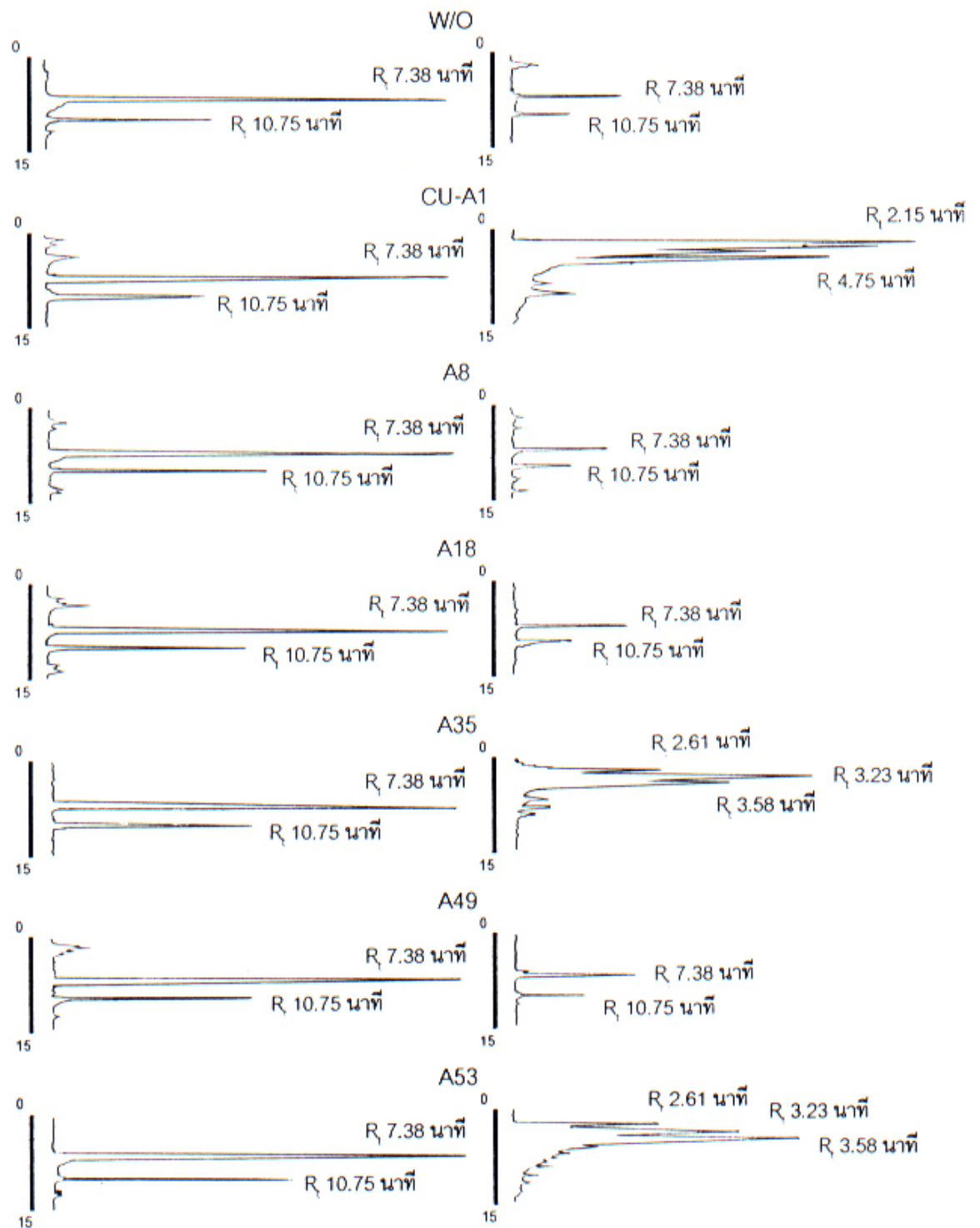


รูปที่ 3.12 ข. TLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีนในวันที่ 0 และวันที่ 14 โดย *Rhizobium* sp. E11, E32, H1, J1, G12, G39, G62, G101 และ G531 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีอะซีแนฟธิลีนความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร เปรียบเทียบกับ *Rhizobium* sp. CU-A1 (AE คืออะซีแนฟธิลีน, W/O คืออาหารเหลวที่ไม่มีการเติมเชื้อ)

นอกจากนี้ยังได้วิเคราะห์สารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีนโดยสายพันธุ์กลาย ที่เวลา 0 ถึง 14 วัน (ไม่แสดงข้อมูล) เปรียบเทียบ HPLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีนโดยสายพันธุ์กลายและสายพันธุ์ CU-A1 ในวันที่ 14 ดังแสดงในรูปที่ 3.13 ก. ถึง 3.13 ค. พบว่าสายพันธุ์ CU-A1 ย่อยอะซีแนฟธิลีนแล้วปรากฏ peak ของสารมัธยันต์หลายชนิด ขณะที่สายพันธุ์กลายหลายสายพันธุ์ได้แก่สายพันธุ์ A35, A53, B1, B5, D1, D2, E11, E32, H1, J1 และ G62 สะสมสารมัธยันต์ที่ปรากฏยอดที่ค่า retention time ต่างจากที่พบในสายพันธุ์เดิม

วันที่ 0

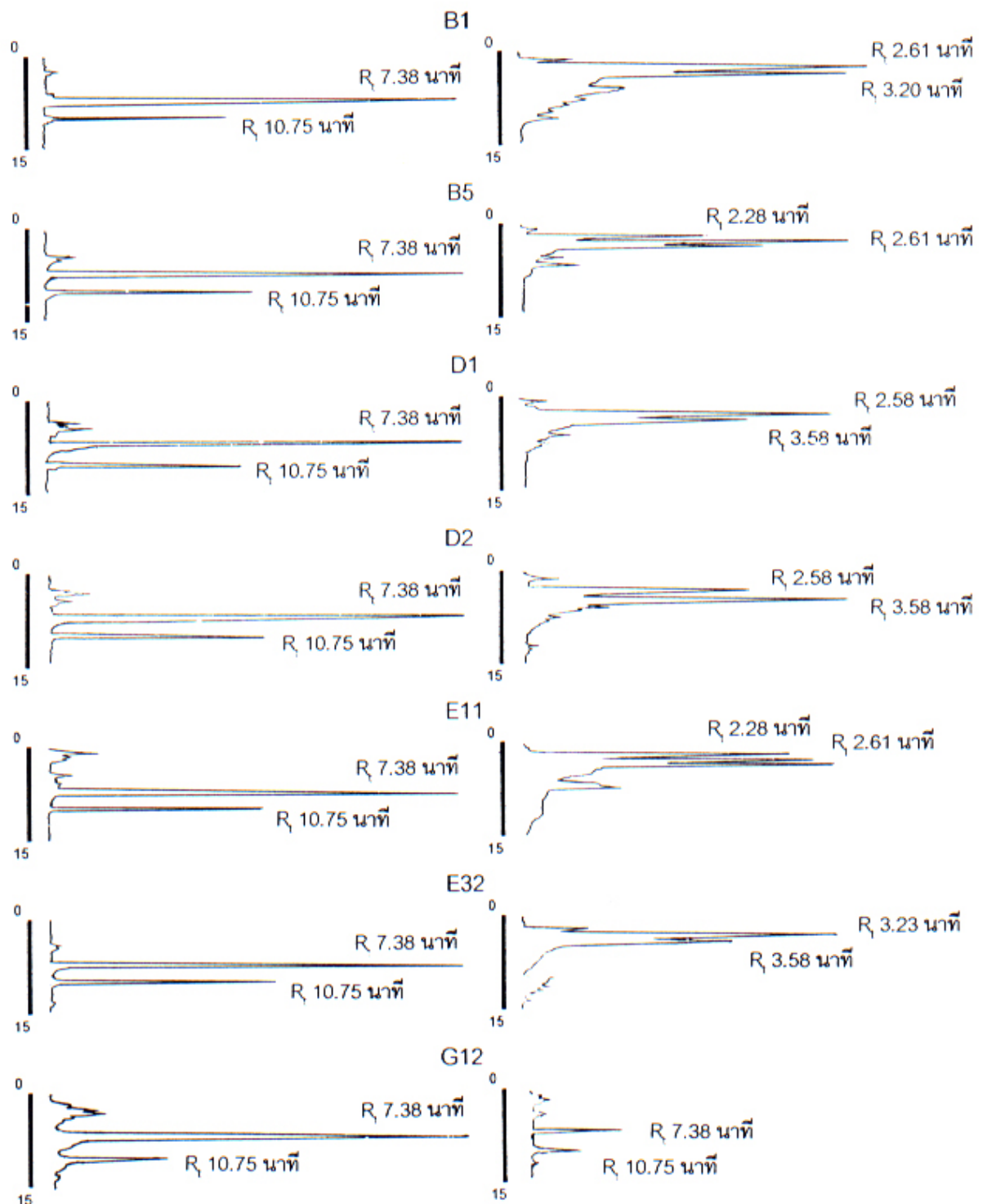
วันที่ 14



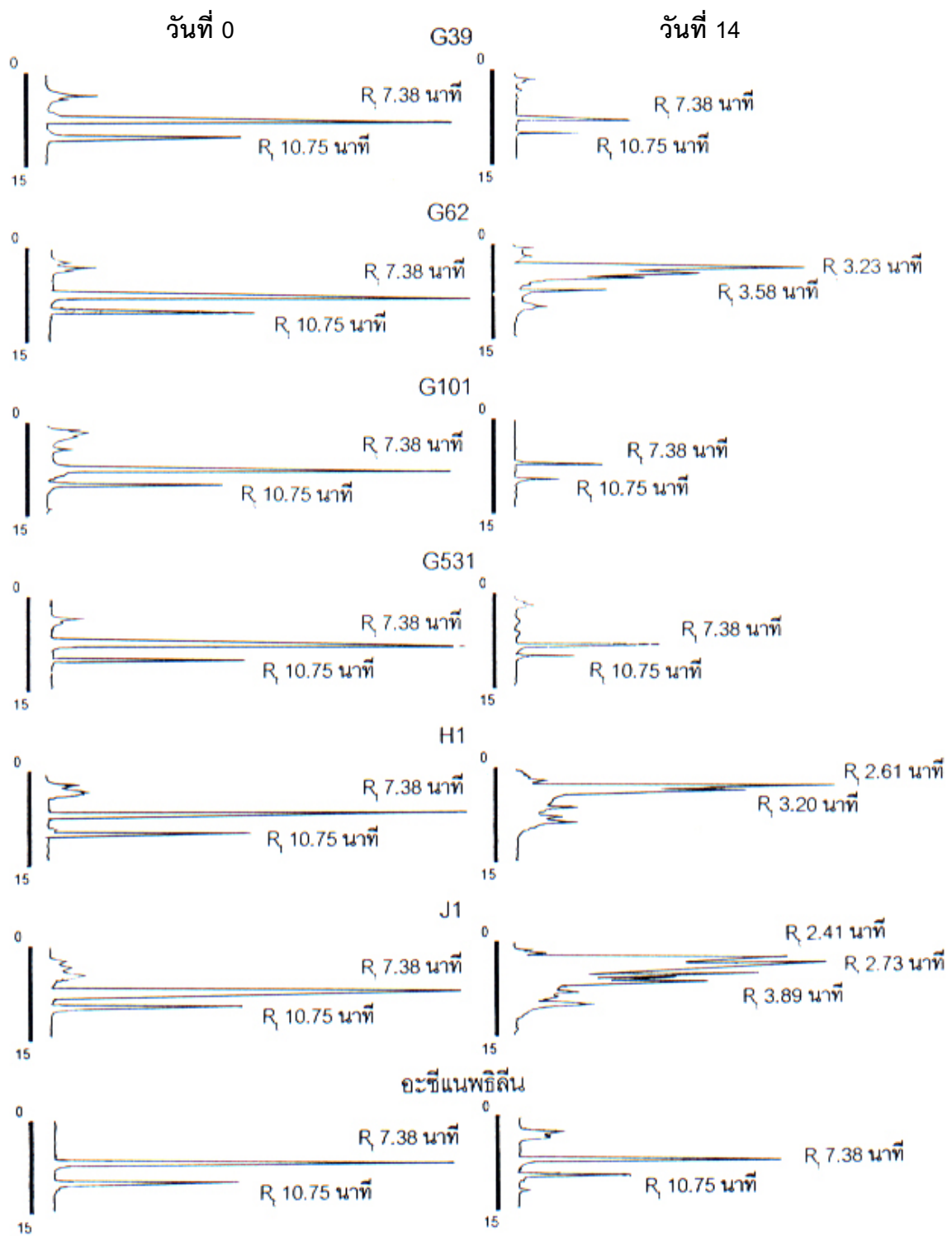
รูปที่ 3.13 ก. HPLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพทาลีนในวันที่ 0 และวันที่ 14 โดย *Rhizobium* sp. A8, A18, A35, A49 และ A53 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีอะซีแนพทาลีนความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร เปรียบเทียบกับ *Rhizobium* sp. CU-A1 (W/O คืออาหารเหลวที่ไม่มีการเติมเชื้อ, R_t 7.38 นาทีคืออะซีแนพทาลีน)

วันที่ 0

วันที่ 14

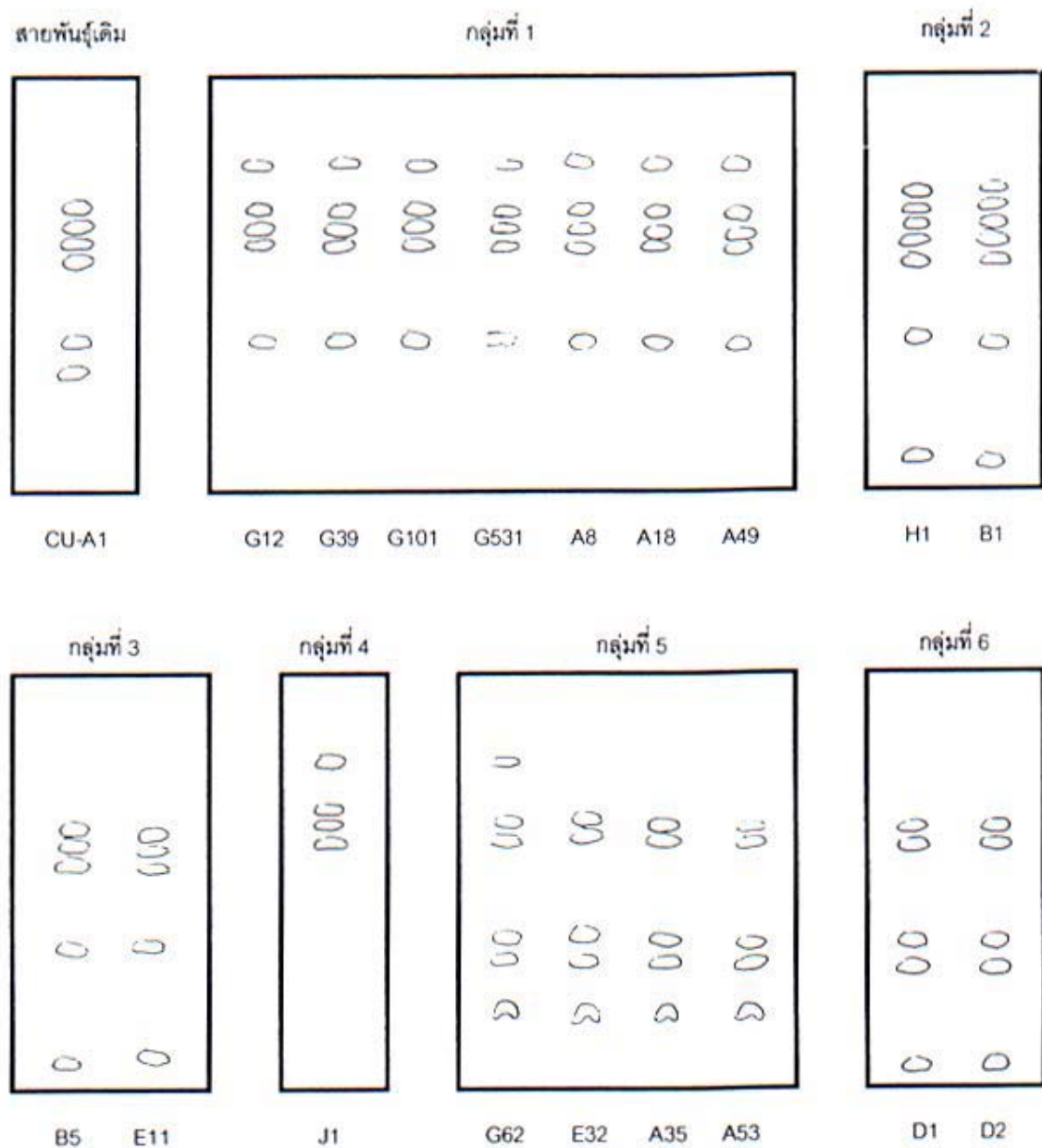


รูปที่ 3.13 ข. HPLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพทาลีนในวันที่ 0 และวันที่ 14 โดย *Rhizobium* sp. B1, B5, D1, D5, E11, E32 และ G12 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีอะซีแนพทาลีนความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร เปรียบเทียบกับ *Rhizobium* sp. CU-A1 (W/O คืออาหารเหลวที่ไม่มีการเติมเชื้อ, R_t 7.38 นาทีคืออะซีแนพทาลีน)



รูปที่ 3.13 ค. HPLC โครมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนในวันที่ 0 และวันที่ 14 โดย *Rhizobium* sp. G39, G62, G101, G531, H1 และ J1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีอะซีแนพธิลีนความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร เปรียบเทียบกับ *Rhizobium* sp. CU-A1 (W/O คืออาหารเหลวที่ไม่มีการเติมเชื้อ, R_t 7.38 นาทีคืออะซีแนพธิลีน)

จากรูปแบบการเจริญและความสามารถของสายพันธุ์กลายทั้ง 18 สายพันธุ์ในการออกซิไดซ์อะซีแนพทิลีนไปเป็นสารมัธยันต์ชนิดต่างๆ เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM สามารถจำแนกสายพันธุ์กลายทั้งหมดออกได้เป็น 6 กลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 1 ตามรูปแบบของการเจริญและผลการวิเคราะห์สารมัธยันต์ที่สะสมโดยวิธี TLC และวิธี HPLC ดังแสดงในรูปที่ 3.14



รูปที่ 3.14 การจัดกลุ่มสายพันธุ์กลาย 18 สายพันธุ์ ตามรูปแบบ TLC โคโรมาโตแกรมของสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพทิลีนในวันที่ 14 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีอะซีแนพทิลีนความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร เปรียบเทียบกับ *Rhizobium* sp. CU-A1

ตารางที่ 1 การจัดกลุ่มสายพันธุ์กลายของ *Rhizobium* sp. ตามรูปแบบการเจริญและการสะสมสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนพติลิน

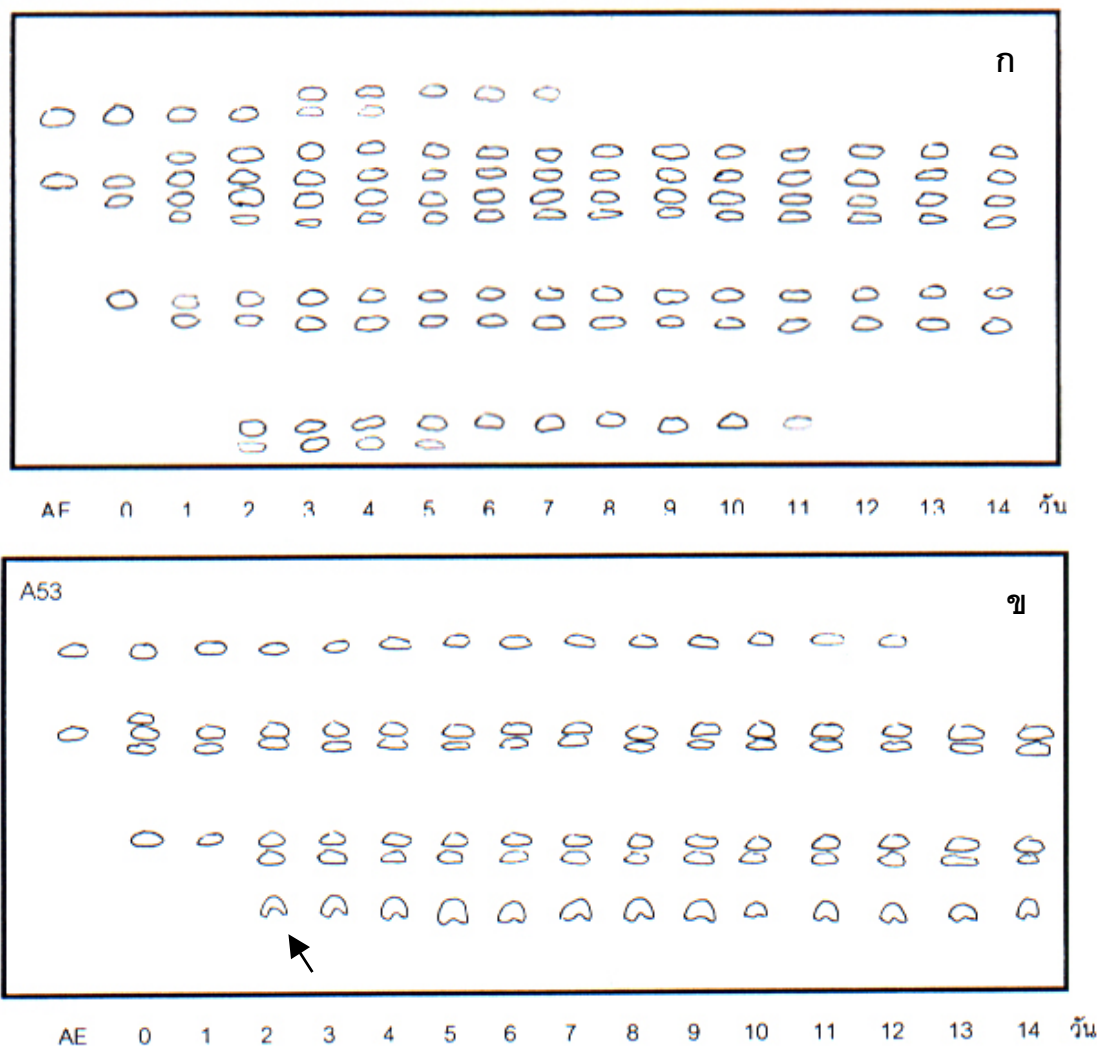
กลุ่มที่	สายพันธุ์กลายของ <i>Rhizobium</i> sp.	ความสามารถในการเจริญในอาหารที่มีอะซีแนพติลินเป็นแหล่งคาร์บอน ในเวลา 14 วัน
1	G12, G39, G101, G531, A8, A18, A49	เจริญไม่ได้
2	H1, B1	เจริญไม่ได้
3	B5, E11	เจริญไม่ได้
4	J1	เจริญไม่ได้
5	G62, E32, A35, A53	เจริญได้ช้า
6	D1, D2	เจริญได้ช้า

3.12 แยกสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพติลินโดยสายพันธุ์กลายของ *Rhizobium* sp. CU-A1 ให้บริสุทธิ์โดยวิธี Preparative Thin Layer Chromatography (TLC) และ High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

ในขั้นตอนนี้ จะทำการแยกและพิสูจน์เอกลักษณ์สารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพติลินโดยสายพันธุ์กลายของ *Rhizobium* sp CU-A1 โดยได้เลือกสายพันธุ์กลาย A53, B1 และ B5 ซึ่งอยู่ในกลุ่มที่ 5, 2 และ 3 ดังแสดงในตารางที่ 1 ตามลำดับซึ่งสายพันธุ์กลายทั้ง 3 ชนิดนี้ สะสมสารมัธยันต์ที่แตกต่างจากสายพันธุ์ CU-A1 ในปริมาณค่อนข้างสูง การแยกสารมัธยันต์ทำได้โดยเลี้ยงสายพันธุ์กลายดังกล่าวในอาหารเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพติลินความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมงเป็นเวลา 14 วัน สกัดและวิเคราะห์สารมัธยันต์ตามวิธีในข้อ 3.11 จากนั้นทำสารมัธยันต์ที่ได้ให้บริสุทธิ์ด้วย preparative TLC และ ซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟี พิสูจน์เอกลักษณ์และชนิดของสารมัธยันต์ที่บริสุทธิ์ด้วยแมสสเปคโตรเมทรี (MS) และนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (NMR)

3.12.1 การแยกสารมัธยันต์ A53

จากการสกัดและวิเคราะห์สารมัธยันต์เมื่อเพาะเลี้ยงสายพันธุ์กลาย A53 ในอะซีแนพติลินเป็นเวลา 14 วัน พบว่าสารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นแตกต่างไปจากเมื่อเลี้ยงสายพันธุ์ CU-A1 ด้วยอะซีแนพติลินดังแสดงในรูปที่ 3.15

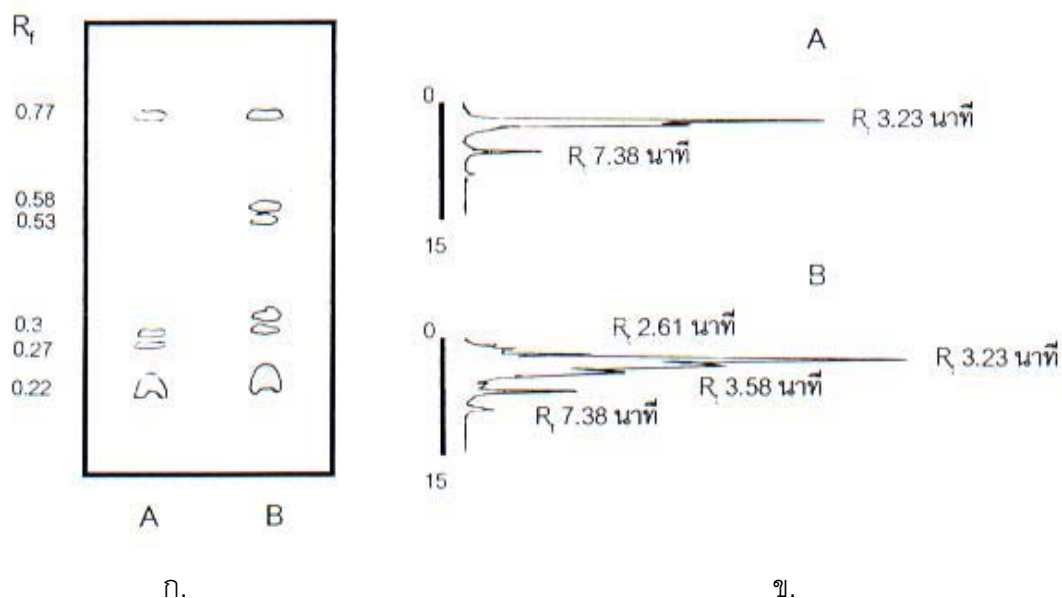


รูปที่ 3.15 TLC โครโตแกรมของสารมัธยันต์ที่จากการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดยสายพันธุ์ CU-A1 (ก) และ A53 (ข) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีอะซีแนพธิลีนความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร ที่ระยะเวลา 0 ถึง 14 วัน (AE คืออะซีแนพธิลีน) ลูกศรแสดงสารมัธยันต์สะสมที่แตกต่างจากสายพันธุ์ CU-A1

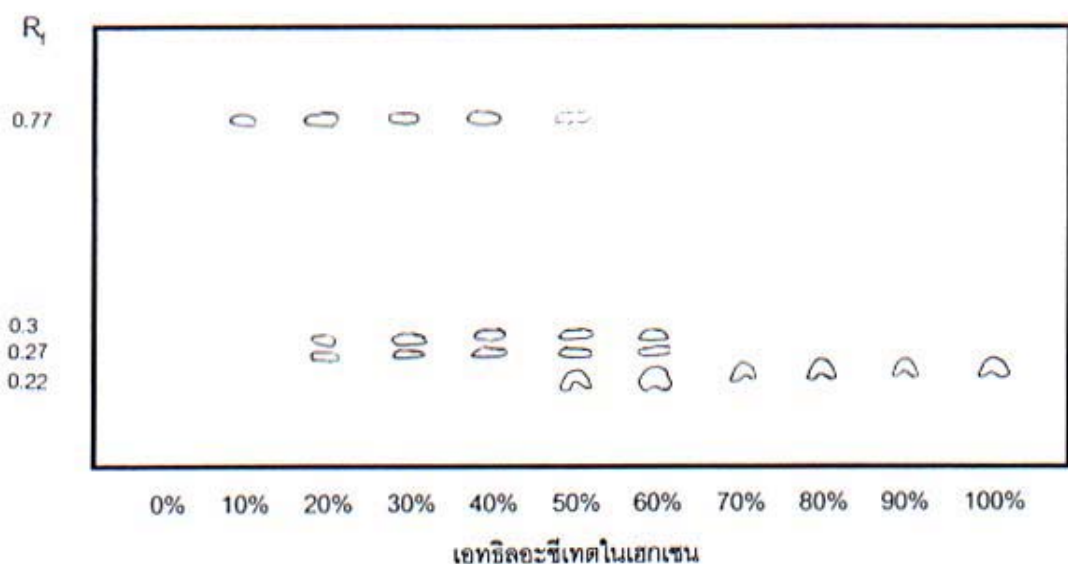
จากการวิเคราะห์สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อโดยวิธี TLC พบว่าตั้งแต่วันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง ได้พบสารมัธยันต์ชนิดหนึ่งซึ่งมีค่า R_f เท่ากับ 0.22 ดังแสดงโดยลูกศรในรูปที่ 3.15 ข และไม่พบว่ามีสารสะสมเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ CU-A1 โดยสารมัธยันต์นี้เรืองแสงสีฟ้าภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ช่วงความยาวคลื่น 215-250 นาโนเมตรและมีความเข้มของการเรืองแสงมากกว่าสารมัธยันต์ชนิดอื่นๆ แสดงว่าสายพันธุ์ A53 สะสมสารมัธยันต์นี้ในปริมาณสูง จึงได้เลี้ยงสายพันธุ์กลาย A53 ในอาหารเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพธิลีนความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตรเป็นเวลา 5 วัน จากนั้นสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อไปทำการแยกสารมัธยันต์ชนิดนี้ให้บริสุทธิ์โดยวิธี preparative TLC

เมื่อนำสารมัธยันต์นี้ไปวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ด้วยวิธี TLC และวิธี HPLC ดังแสดงผลในรูปที่ 3.16 ก). และ ข). ตามลำดับ พบว่าสารมัธยันต์ที่แยกได้ยังไม่บริสุทธิ์จึงได้นำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไปโดยวิธีซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยซิลิกาเจลเป็นลำดับส่วนด้วย 0 ถึง 100% เฮกซะอีเตทในเฮกเซน เพิ่มความเข้มข้นของเฮกซะอีเตทลำดับส่วนละ 10% จากนั้นวิเคราะห์แต่ละลำดับส่วนด้วยวิธี TLC และ

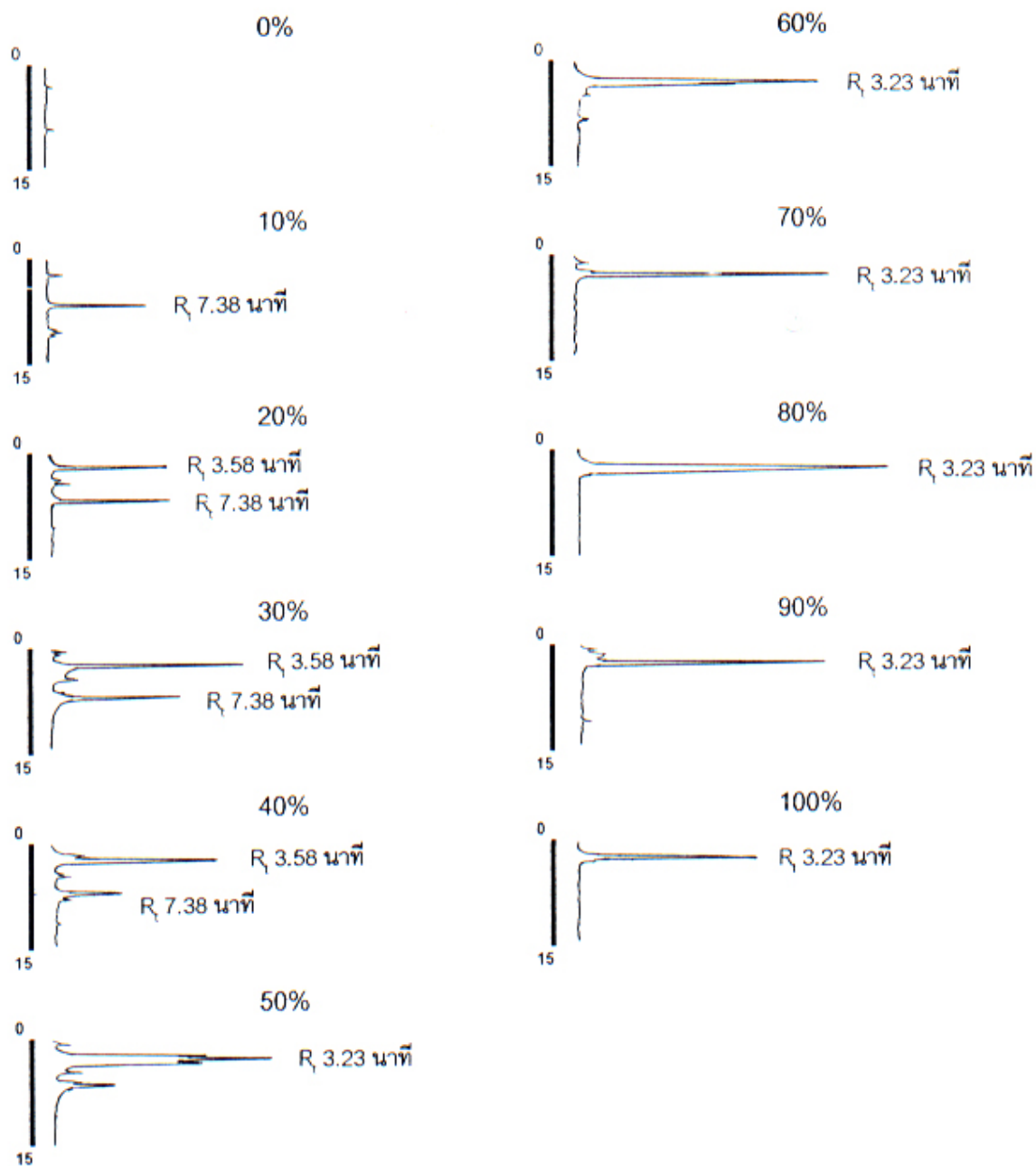
HPLC ดังแสดงผลในรูปที่ 3.17 และ 3.18 ตามลำดับ พบว่าเมื่อวิเคราะห์ลำดับส่วนที่ชะด้วย 80 – 100% เอธิลอะซีเตทด้วย TLC จะแสดงเพียงจุดเดียวที่ R_f 0.22 และจากผลการวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่าลำดับส่วนที่ชะด้วย 80% เอธิลอะซีเตทมีความบริสุทธิ์สูงสุดและมีปริมาณมากที่สุดโดยมียอดเดียวที่ R_t 3.23 นาที ดังนั้นจึงเลือกลำดับส่วนที่ชะด้วย 80% เอธิลอะซีเตทเพื่อมาใช้พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารต่อไป และให้ชื่อส่วนนี้ว่า สารมัธยันต์ A53



รูปที่ 3.16 ก.) TLC โครมาโตแกรม ข.) HPLC โครมาโตแกรมแสดงความบริสุทธิ์ของสารมัธยันต์ A53 ที่แยกได้โดยวิธี preparative TLC จากสายพันธุ์ A53 (A) เปรียบเทียบกับสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ (B) (R_t 7.38 นาทีคืออะซีแนพริน)



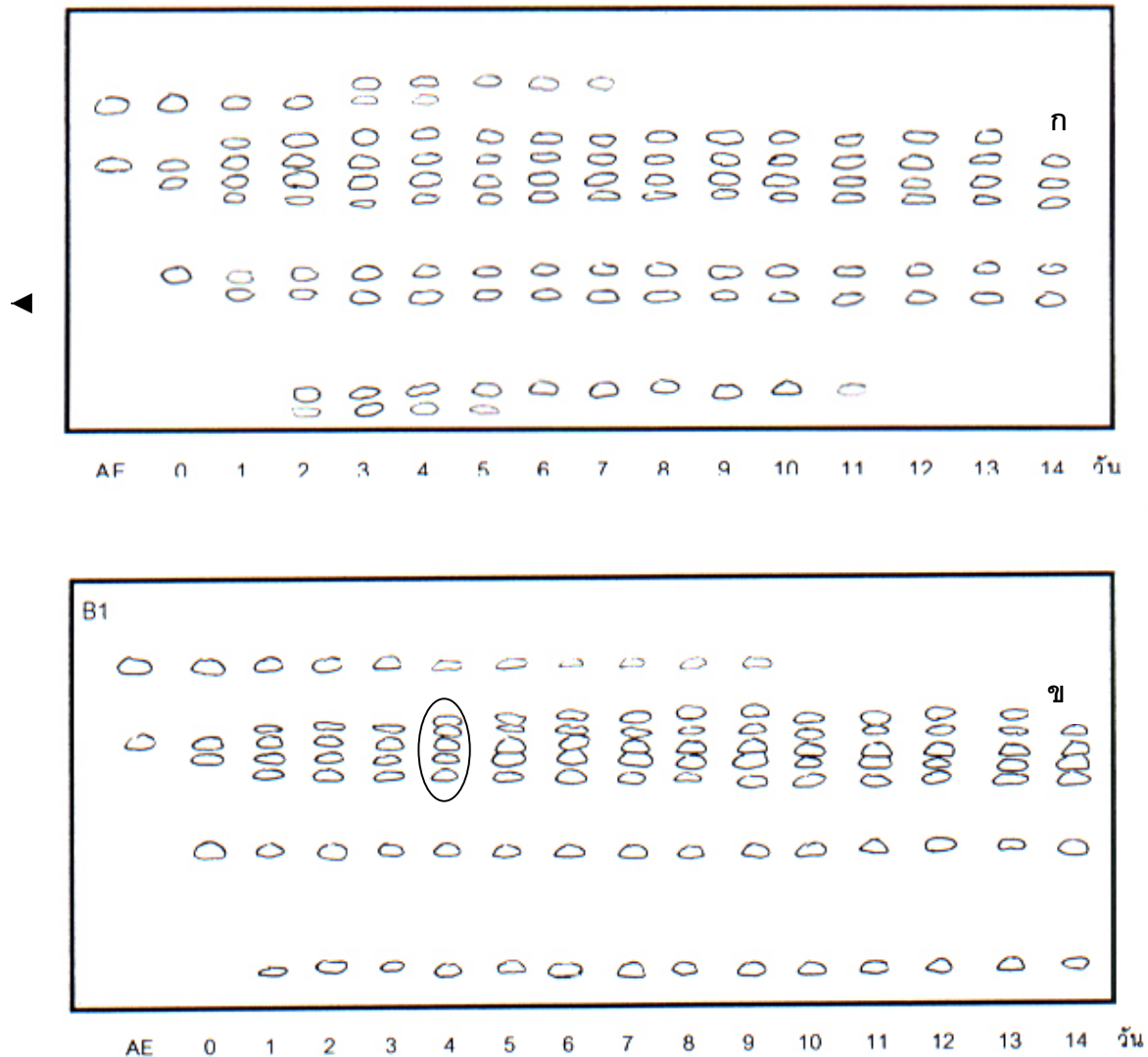
รูปที่ 3.17 TLC โครมาโตแกรมของแต่ละลำดับส่วนหลังจากนำสารมัธยันต์ A53 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟีชะด้วย 0 – 100% เอธิลอะซีเตทในเฮกเซน



รูปที่ 3.18 HPLC โครมาโตแกรมของแต่ละลำดับส่วนหลังจากนำสารมัธยันต์ A53 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟีชะด้วย 0 – 100% เอธิลอะซีเตตในเฮกเซน (R_t 7.38 นาทีคืออะซีแนพธอลีน)

3.12.2 การแยกสารมัธยันต์ B1

จากการสกัดและวิเคราะห์สารมัธยันต์เมื่อเพาะเลี้ยงสายพันธุ์กลาย B1 ในอะซีแนพริลีนเป็นเวลา 14 วัน พบว่าสารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นแตกต่างไปจากเมื่อเลี้ยงสายพันธุ์ CU-A1 ด้วยอะซีแนพริลีนดังแสดงในรูปที่ 3.19

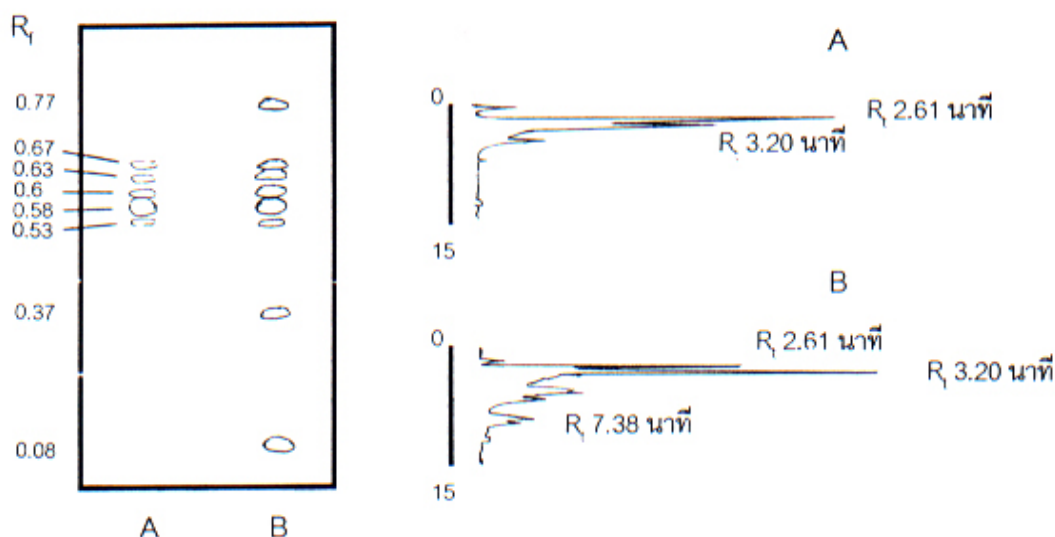


รูปที่ 3.19 TLC โครโตแกรมของสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนพริลีนโดยสายพันธุ์ CU-A1 (ก) และ B1 (ข) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีอะซีแนพริลีนความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร ที่ระยะเวลา 0 ถึง 14 วัน (AE คืออะซีแนพริลีน) วงรีแสดงกลุ่มของสารมัธยันต์สะสมที่แตกต่างจากสายพันธุ์ CU-A1

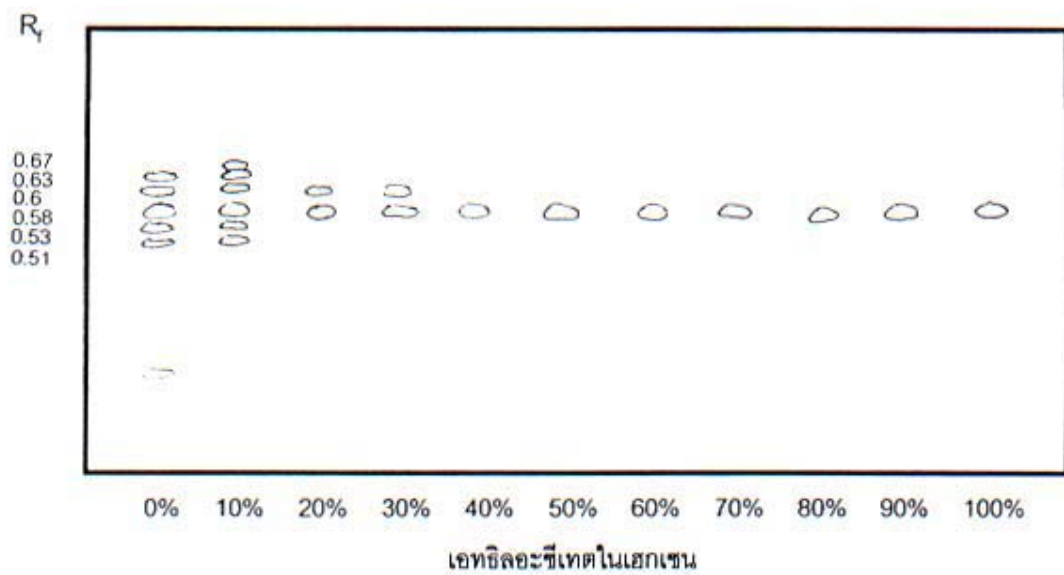
จากการวิเคราะห์สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อโดยวิธี TLC พบว่าตั้งแต่วันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง ได้พบสารมัธยันต์ชนิดหนึ่งที่มีการสะสมที่แตกต่างไปจากสายพันธุ์ CU-A1 ดังแสดงในวงรี โดยสารมัธยันต์นี้เรืองแสงสีม่วงภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ช่วงความยาวคลื่น 215-250 นาโนเมตรและมีความเข้มของการเรืองแสงมากกว่าสารมัธยันต์ชนิดอื่นๆ แสดงว่าสายพันธุ์ B1 สะสมสารมัธยันต์นี้ในปริมาณสูง จึงได้เลี้ยง

สายพันธุ์กล้วย A53 ในอาหารเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพริลีนความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตรเป็นเวลา 5 วัน จากนั้นสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อไปทำการแยกสารมัธยันต์ชนิดนี้ให้บริสุทธิ์โดยวิธี preparative TLC

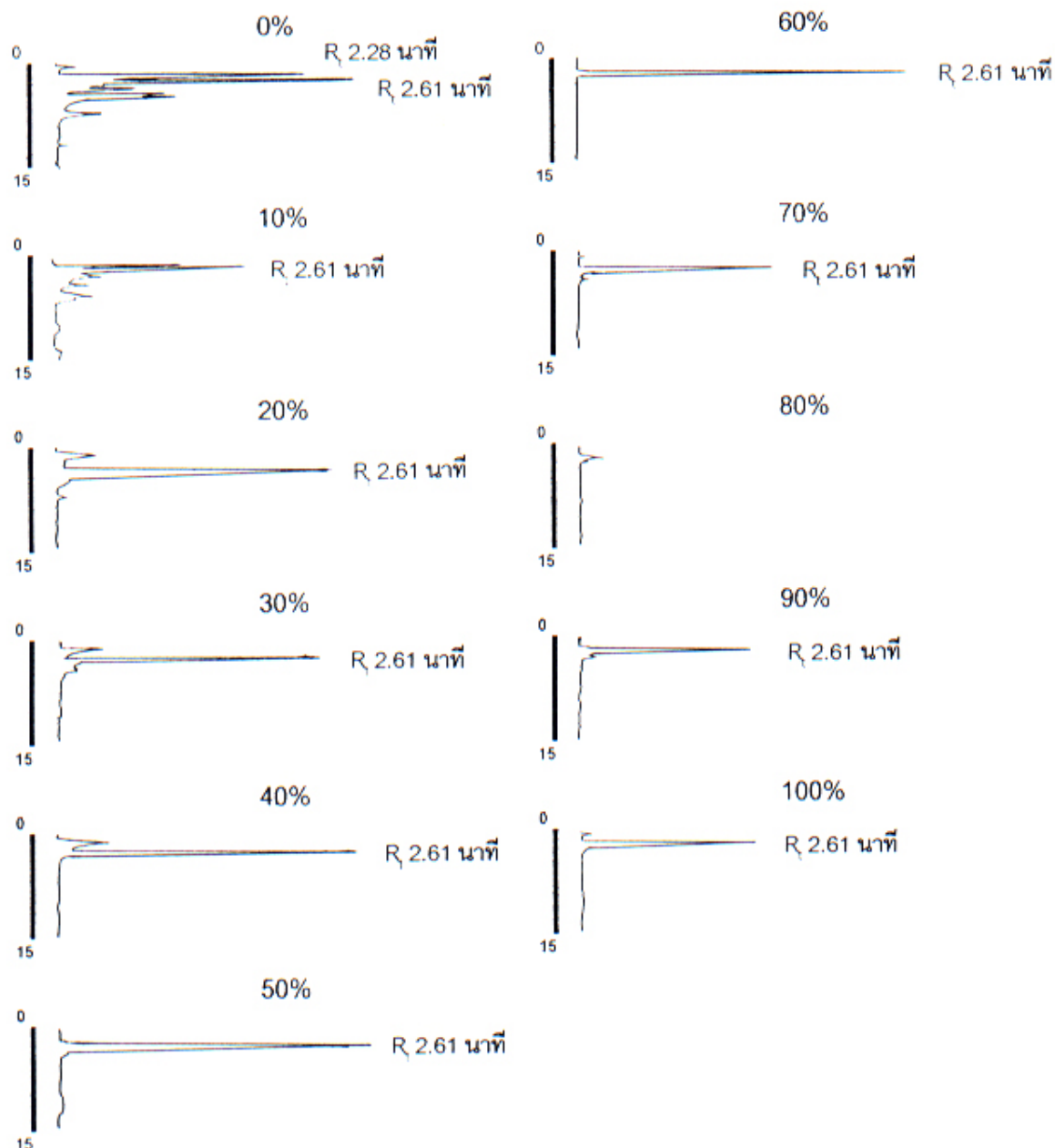
เมื่อนำสารมัธยันต์นี้ไปวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ด้วยวิธี TLC และวิธี HPLC ดังแสดงผลในรูปที่ 3.20 ก). และ ข). ตามลำดับ พบว่าสารมัธยันต์ที่แยกได้ยังไม่บริสุทธิ์จึงได้นำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไปโดยวิธีซิลิกา เจลคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยชะคอลัมน์เป็นลำดับส่วนด้วย 0 ถึง 100% เอธิลอะซีเตทในเฮกเซน เพิ่มความเข้มข้นของเอธิลอะซีเตทลำดับส่วนละ 10% จากนั้นวิเคราะห์แต่ละลำดับส่วนด้วยวิธี TLC และ HPLC ดังแสดงผลในรูปที่ 3.21 และ 3.22 ตามลำดับ พบว่าเมื่อวิเคราะห์ลำดับส่วนที่ชะด้วย 40 – 100% เอธิลอะซีเตทด้วย TLC จะแสดงเพียงจุดเดียวที่ R_f 0.58 และจากผลการวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่าลำดับส่วนที่ชะด้วย 60% เอธิลอะซีเตทมีความบริสุทธิ์สูงสุดและมีปริมาณมากที่สุดโดยมียอดเดียวที่ R_t 2.61 นาที ดังนั้นจึงเลือกลำดับส่วนที่ชะด้วย 60% เอธิลอะซีเตทเพื่อมาใช้พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารต่อไป และให้ชื่อส่วนนี้ว่า สารมัธยันต์ B1



รูปที่ 3.20 ก.) TLC โครมาโตแกรม ข.) HPLC โครมาโตแกรมแสดงความบริสุทธิ์ของสารมัธยันต์ B1 จากสายพันธุ์ B1 ที่แยกได้โดยวิธี preparative TLC (A) เปรียบเทียบกับสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ (B) (R_t 7.38 นาทีคืออะซีแนพริลีน)



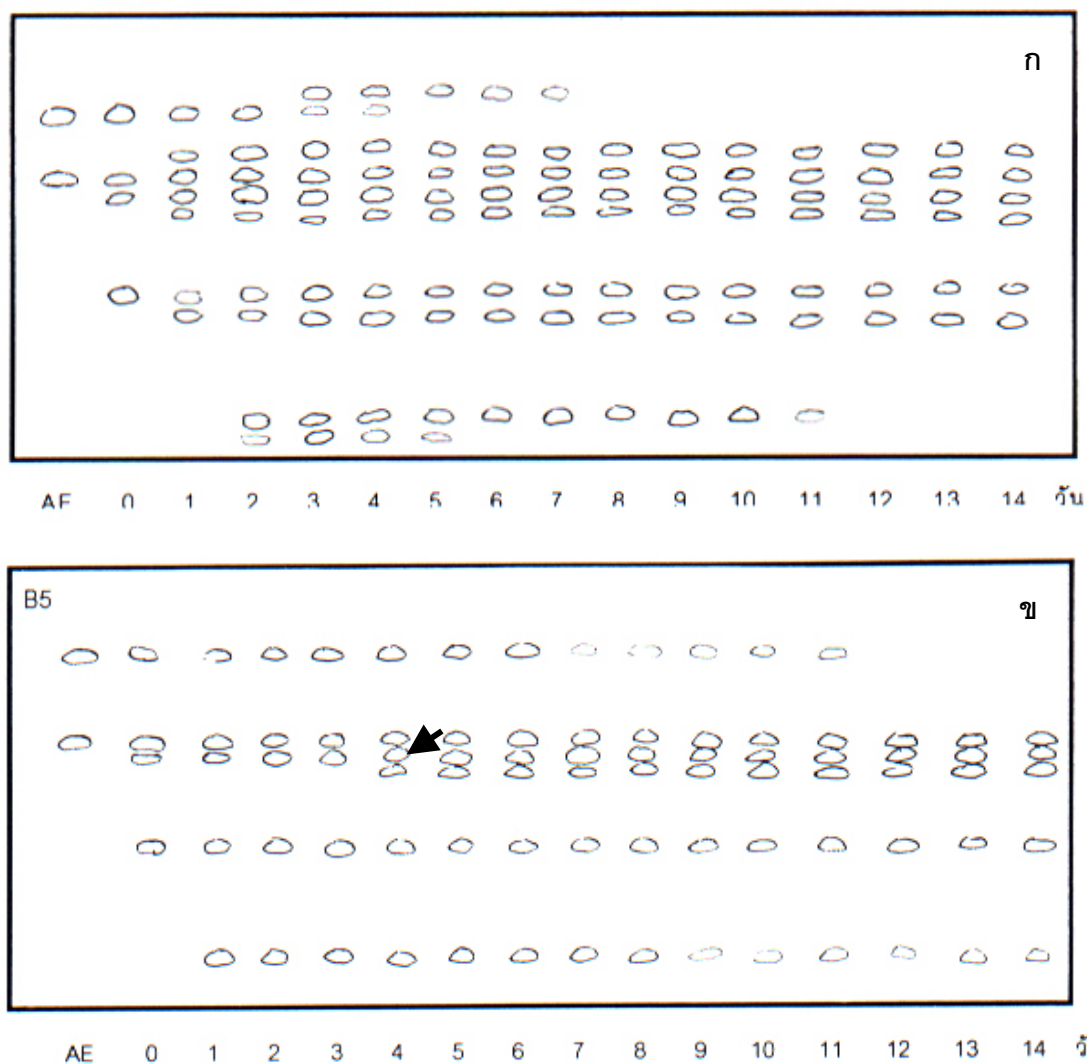
รูปที่ 3.21 TLC โครมาโตแกรมของแต่ละลำดับส่วนหลังจากนำสารมัธยันต์ B1 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยซิลิกาเจล คอลัมน์โครมาโตกราฟีชะด้วย 0 – 100% เอธิลอะซีเตตในเฮกเซน



รูปที่ 3.22 HPLC โครมาโตแกรมของแต่ละลำดับส่วนหลังจากนำสารมัยันต์ B1 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟีอะด้วย 0 – 100% เอทิลอะซีเตตในเฮกเซน (R_t 7.38 นาทีคืออะซีแนพอลิน)

3.12.3 การแยกสารมัยันต์ B5

จากการสกัดและวิเคราะห์สารมัยันต์เมื่อเพาะเลี้ยงสายพันธุ์กล้วย B5 ในอะซีแนพอลินเป็นเวลา 14 วัน พบว่าสารมัยันต์ที่เกิดขึ้นแตกต่างไปจากเมื่อเลี้ยงสายพันธุ์ CU-A1 ด้วยอะซีแนพอลินดังแสดงในรูปที่ 3.23

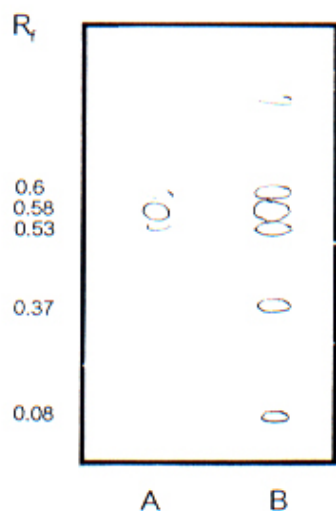


รูปที่ 3.23 TLC โครโตแกรมของสารมัธยันต์ที่จากการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนโดยสายพันธุ์ CU-A1 (ก) และ B5 (ข) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CFMM ที่มีอะซีแนพธิลีนความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตร ที่ระยะเวลา 0 ถึง 14 วัน (AE คืออะซีแนพธิลีน) ลูกศรแสดงสารมัธยันต์สะสมที่แตกต่างจากสายพันธุ์ CU-A1

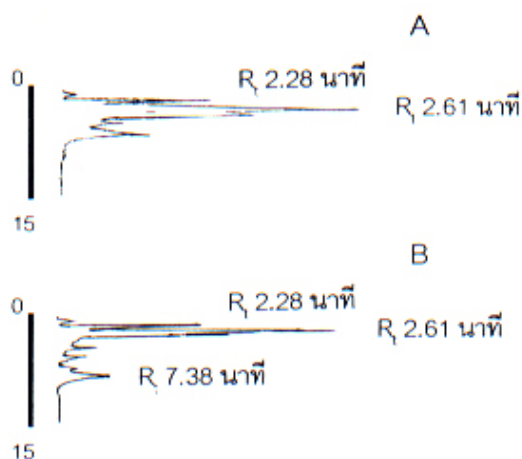
จากการวิเคราะห์สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อโดยวิธี TLC พบว่าตั้งแต่วันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง ได้พบสารมัธยันต์ชนิดหนึ่งซึ่งมีค่า R_f ประมาณ 0.58 ดังแสดงโดยลูกศรในรูปที่ 3.23 ข โดยสารมัธยันต์นี้เรืองแสงสีม่วงภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ช่วงความยาวคลื่น 215-250 นาโนเมตรและมีความเข้มของการเรืองแสงมากกว่าสารมัธยันต์ชนิดอื่นๆ แสดงว่าสายพันธุ์ B5 สะสมสารมัธยันต์นี้ในปริมาณสูง จึงได้เลี้ยงสายพันธุ์กลาย A53 ในอาหารเหลว CFMM ที่มีอะซีแนพธิลีนความเข้มข้น 600 มก.ต่อลิตรเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อไปทำการแยกสารมัธยันต์ชนิดนี้ให้บริสุทธิ์โดยวิธี preparative TLC

เมื่อนำสารมัธยันต์นี้ไปวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ด้วยวิธี TLC และวิธี HPLC ดังแสดงผลในรูปที่ 3.24 ก). และ ข). ตามลำดับ พบว่าสารมัธยันต์ที่แยกได้ยังไม่บริสุทธิ์จึงได้นำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไปโดยวิธีซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยชะคอลัมน์เป็นลำดับส่วนด้วย 0 ถึง 100% เอธิลอะซีเตทในเฮกเซน เพิ่ม

ความเข้มข้นของเอธิลอะซีเตทลำดับส่วนละ 10% จากนั้นวิเคราะห์แต่ละลำดับส่วนด้วยวิธี TLC และ HPLC ดังแสดงผลในรูปที่ 3.25 และ 3.26 ตามลำดับ พบว่าเมื่อวิเคราะห์ลำดับส่วนที่ชะด้วย 30 – 100% เอธิลอะซีเตทด้วย TLC จะแสดงเพียงจุดเดียวที่ R_f 0.58 และจากผลการวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่าลำดับส่วนที่ชะด้วย 80% เอธิลอะซีเตทมีความบริสุทธิ์สูงสุดและมีปริมาณมากที่สุดโดยมียอดเดียวที่ R_t 2.61 นาที ดังนั้นจึงเลือกลำดับส่วนที่ชะด้วย 80% เอธิลอะซีเตทเพื่อมาใช้พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารต่อไป และให้ชื่อส่วนนี้ว่า สารมัธยันต์ B5

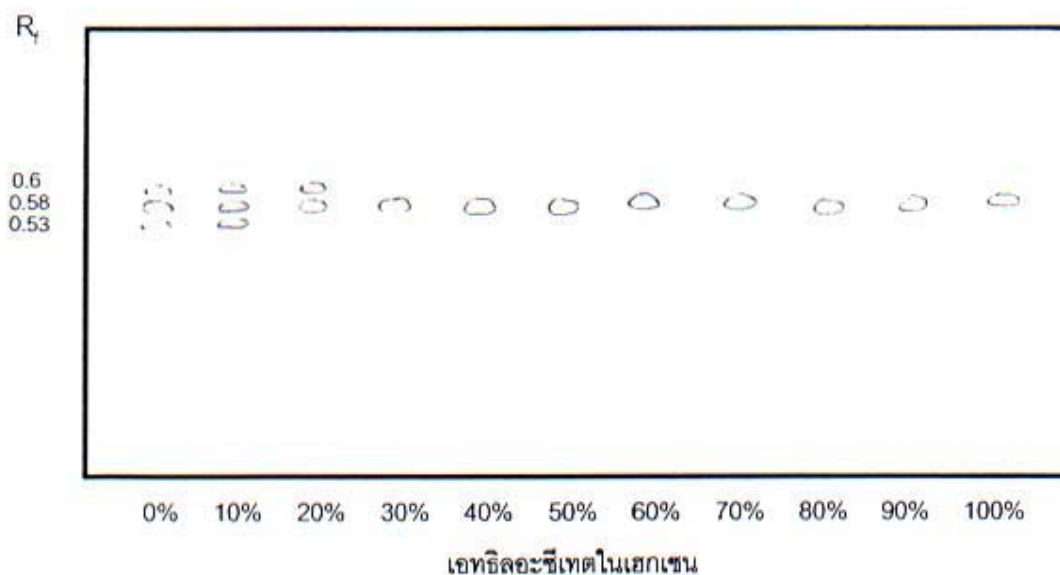


ก.

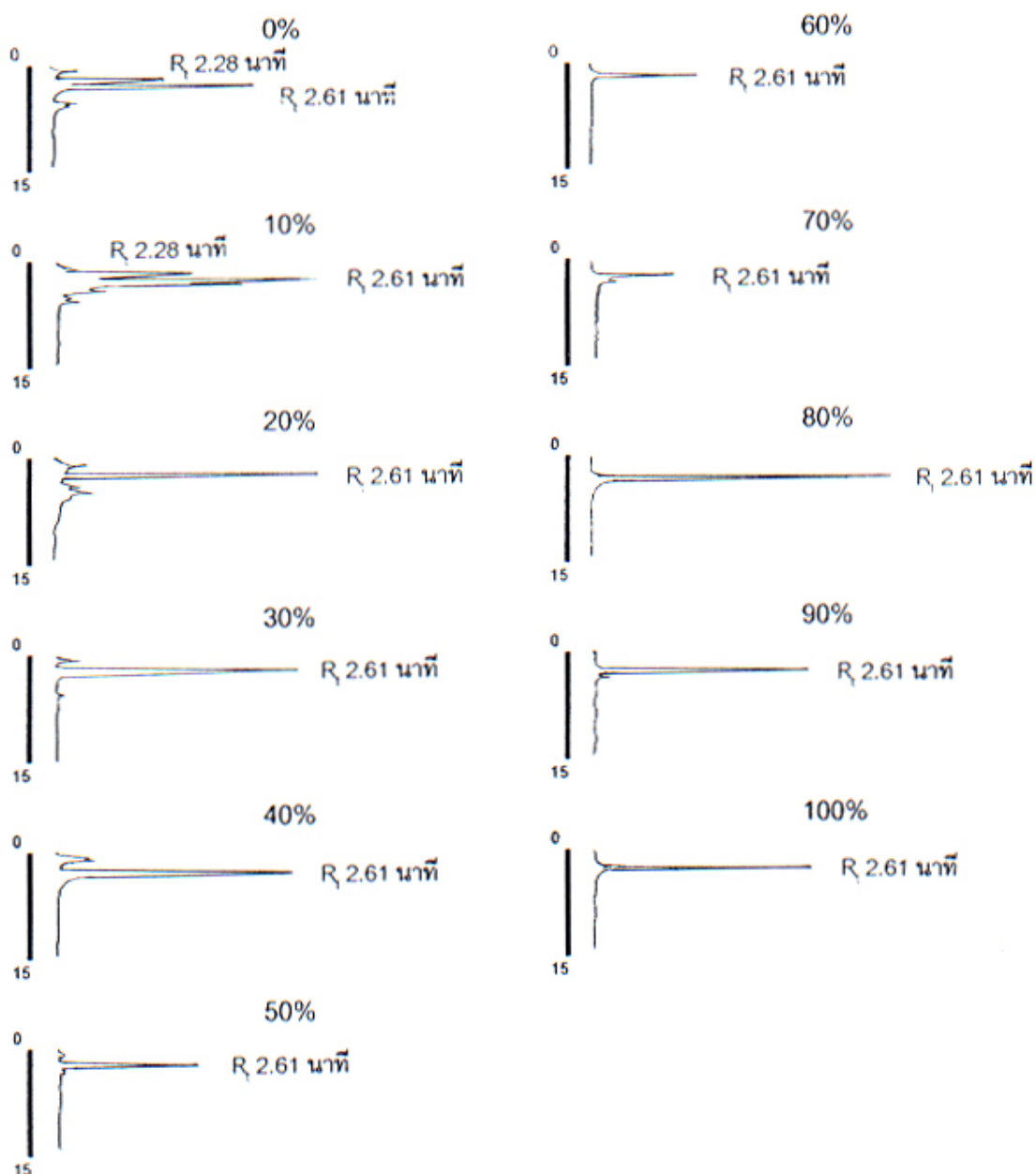


ข.

รูปที่ 3.24 ก.) TLC โครมาโตแกรม ข.) HPLC โครมาโตแกรมแสดงความบริสุทธิ์ของสารมัธยันต์ B5 ที่แยกได้โดยวิธี preparative TLC จากสายพันธุ์ B5 (A) เปรียบเทียบกับสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อ (B) (R_t 7.38 นาทีคืออะซีแนพรีลิน)



รูปที่ 3.25 TLC โครมาโตแกรมของแต่ละลำดับส่วนหลังจากนำสารมัธยันต์ B5 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยซิลิกาเจล คอลัมน์โครมาโตกราฟีชะด้วย 0 – 100% เอธิลอะซีเตทในเฮกเซน

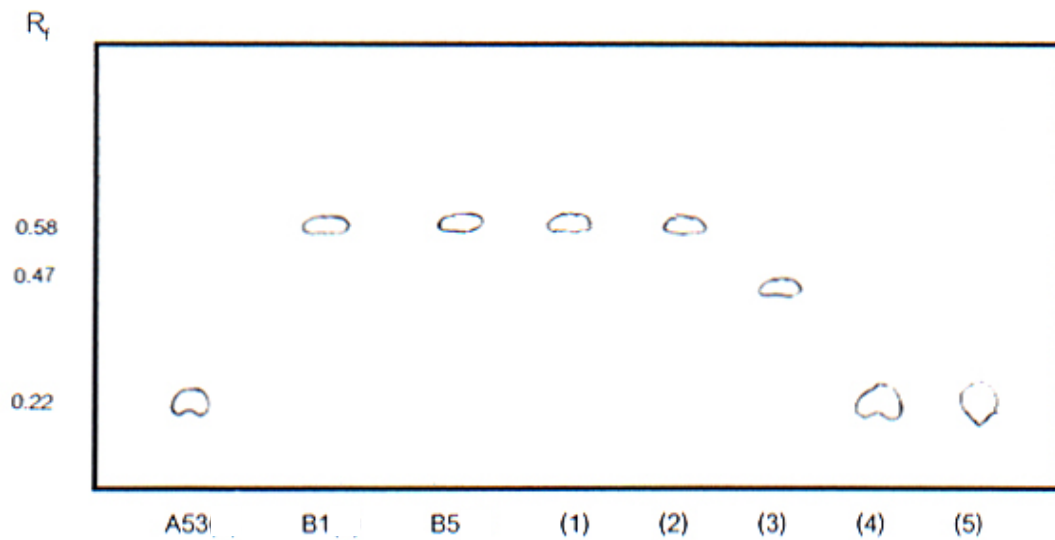


รูปที่ 3.26 HPLC โครมาโตแกรมของแต่ละลำดับส่วนหลังจากนำสารมัยยันต์ B5 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟีชะด้วย 0 – 100% เอทิลอะซีเตตในเฮกเซน (R_f 7.38 นาทีคืออะซีแนพธิลีน)

3.12.4 การตรวจสอบชนิดของสารเบื้องต้นโดยวิธี TLC

TLC เป็นวิธีตรวจสอบชนิดของสารเบื้องต้นวิธีหนึ่งโดยดูจากค่า R_f ซึ่งเป็นค่าเฉพาะของสารแต่ละชนิดเปรียบเทียบกับค่า R_f ของสารมาตรฐาน งานวิจัยนี้จึงได้ทำการเปรียบเทียบค่า R_f บน TLC ของสารมัยยันต์ A53 B1 และ B5 กับสารอะโรมาติกที่มีรายงานว่า เป็นสารมัยยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนและสารพอลิไซคลิกอะโรมาติกชนิดอื่นๆ ได้แก่ อะซีแนพธีนควิโนน กรดแนพธาลีน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิก

กรดซาลิไซลิก กรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก และ กรดโปรโตคาตีกูอิก ผลการทดลองได้แสดงในรูปที่ 3.27 และตารางที่ 3.2 พบว่าสารมาตรฐาน A53 ซึ่งเรืองแสงสีฟ้าภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต มีค่า R_f เท่ากับ 0.22 เช่นเดียวกับกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก ในขณะที่สารมาตรฐาน B1 และสารมาตรฐาน B5 เรืองแสงสีม่วงภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต และมีค่า R_f เท่ากับ 0.58 ซึ่งใกล้เคียงกับสารมาตรฐานอะซีแนพธีนควิโนน และกรดแนพธาลีน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิกที่เรืองแสงสีม่วงภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต และมีค่า R_f เท่ากับ 0.58 เช่นกัน



รูปที่ 3.27 TLC โคโรมาโตแกรมของสารมาตรฐาน A53 B1 และ B5 เปรียบเทียบกับ (1) อะซีแนพธีนควิโนน (2) กรดแนพธาลีน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิก (3) กรดซาลิไซลิก (4) กรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก (5) กรดโปรโตคาตีกูอิก

ตารางที่ 3.2 ค่า R_f จากการวิเคราะห์ TLC และลักษณะการเรืองแสงของสารมัยันต์ A53 B1 และ B5 ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตช่วงความยาวคลื่น 215 –250 นาโนเมตรเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานชนิดต่างๆ

สาร	การเรืองแสง	ค่า R_f
สารมัยันต์ A53	ฟ้า	0.22
สารมัยันต์ B1	ม่วง	0.58
สารมัยันต์ B5	ม่วง	0.58
อะซีแนพทีนควิโนน	ม่วง	0.58
กรดแนพธาซีน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิก	ม่วง	0.58
กรดซาลิไซลิก	ม่วง	0.47
กรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก	ฟ้า	0.22
กรดโปรโตคาพิคูอิก	ม่วงน้ำตาล	0.20

3.13 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัยันต์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยแมสสเปกโตรเมทรี (MS) และ นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (NMR)

3.13.1 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัยันต์ A53

พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัยันต์ A53 ด้วยวิธี MS และวิธี NMR จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยวิธี MS ได้แมสสเปกตรัมของสารมัยันต์ A53 ดังแสดงในภาคผนวก ก รูปที่ ก1(ก) โดยมีค่า M^+ เท่ากับ 154 แสดงว่าสารนี้มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 154 และเมื่อเปรียบเทียบแมสสเปกตรัมของสารมัยันต์ A53 กับแมสสเปกตรัมของสารมาตรฐานกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก (กรดเจนทิลิก) ดังแสดงในรูปที่ ก1(ข.) พบว่ามีรูปแบบของแมสสเปกตรัมเหมือนกัน

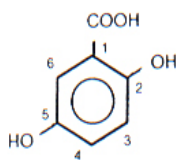
จากการพิสูจน์เอกลักษณ์สารมัยันต์ A53 โดย NMR พบสัญญาณของ $^1\text{H-NMR}$ ที่

δ 7.15 (1 H, d, $J = 4$ Hz, H-6)

δ 6.95 (1 H, dd, $J = 4, 9$ Hz, H-4)

δ 6.76 (1 H, d, $J = 9$ Hz, H-3)

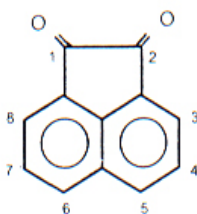
และ $^{13}\text{C-NMR}$, δ 112.5, 114.5, 117.8, 123.7, 149.3, 154.1, 171.7 ซึ่งสอดคล้องกับโครงสร้างของกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก (กรดเจนทิลิก) ที่มีโครงสร้างโมเลกุลดังแสดงในรูปที่ 3.28



รูปที่ 3.28 โครงสร้างโมเลกุลของกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก (กรดเจนิลิก)

3.13.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัยยันต์ B1

ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัยยันต์ B1(1) ด้วยวิธี MS พบว่าจากแมสสเปกตรัมของสารมัยยันต์ B1 ดังแสดงในภาคผนวก ก รูปที่ ก4 (ก) ได้ค่า M^+ เท่ากับ 182 แสดงว่าสารนี้มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 182 และเมื่อเปรียบเทียบแมสสเปกตรัมของสารมัยยันต์ B1 กับแมสสเปกตรัมของสารมาตรฐานอะซีแนพีนควิโนน ดังแสดงในรูปที่ ก4 (ข.) พบว่ามีรูปแบบของแมสสเปกตรัมเหมือนกัน แสดงว่าสารมัยยันต์ B1(1) คือ อะซีแนพีนควิโนน ที่มีโครงสร้างโมเลกุลดังแสดงในรูปที่ 3.29



รูปที่ 3.29 โครงสร้างโมเลกุลของอะซีแนพีนควิโนน

3.13.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัยยันต์ B5

ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัยยันต์ B5 ด้วยวิธี MS และวิธี NMR จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยวิธี MS ได้แมสสเปกตรัมของสารมัยยันต์ B5 ดังแสดงในภาคผนวก ก รูปที่ ก5(ก) โดยมีค่า M^+ เท่ากับ 198 แสดงว่าสารนี้มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 198 และเมื่อเปรียบเทียบแมสสเปกตรัมของสารมัยยันต์ B5 กับแมสสเปกตรัมของสารมาตรฐานของ 1,8-แนพทาลิกแอนไฮไดรด์ ดังแสดงในรูปที่ ก5(ข.) พบว่ามีรูปแบบของแมสสเปกตรัมเหมือนกัน

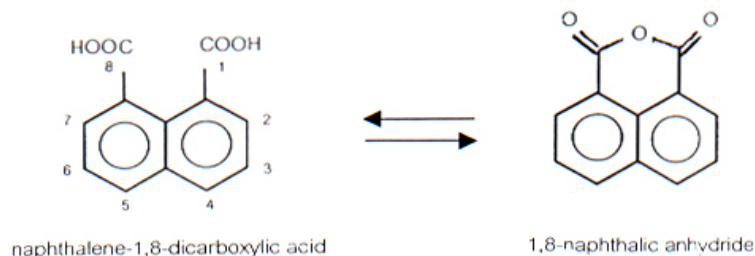
$^1\text{H-NMR}$ ของสารมัยยันต์ B5 ให้สัญญาณดังนี้

δ 7.62 (2 H, dd, $J = 7.3, 8.8$ Hz, H-3, H-6)

δ 8.31 (2 H, d, $J = 8.8$ Hz, H-4, H-5)

δ 8.62 (2 H, d, $J = 7.3$ Hz, H-2, H-7)

ข้อมูลจากการวิเคราะห์สอดคล้องกับโครงสร้างของ 1,8-แนพทาลิกแอนไฮไดรด์ ซึ่งเป็นรูปที่สกัดได้ในสถานะที่เป็นกรดของสารมัยยันต์ กรดแนพทาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก ที่มีโครงสร้างโมเลกุลดังแสดงในรูปที่ 3.30



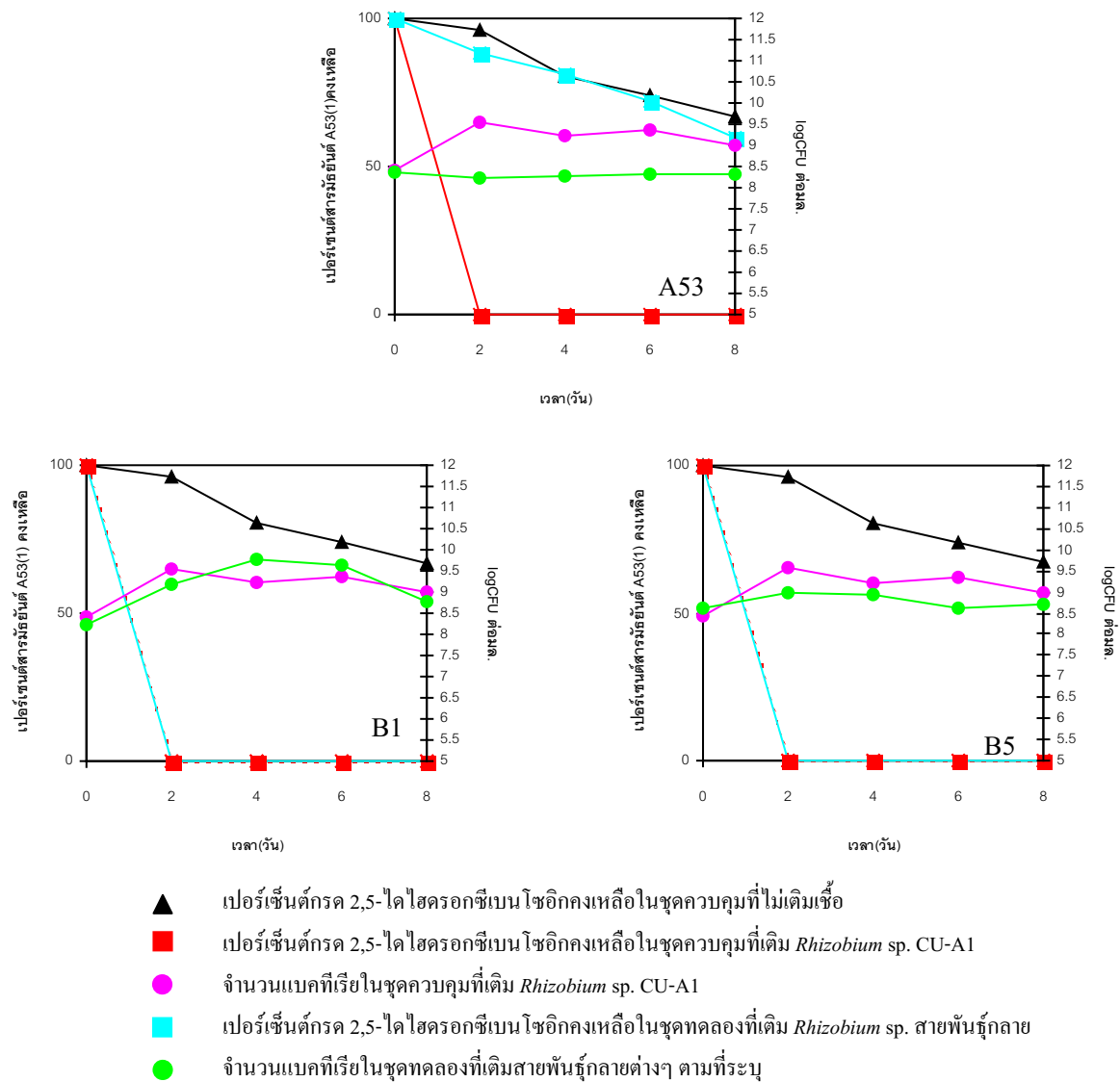
รูปที่ 3.30 โครงสร้างโมเลกุลของ 1,8-แนพทาลิกแอนไฮไดรด์ และ กรดแนพทาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก

3.14 ผลของสารมัยยันต์ A53 B1 และ B5 ต่อการเจริญของสายพันธุ์กลายสายพันธุ์ต่างๆ ของ *Rhizobium* sp. CU-A1

งานวิจัยในขั้นตอนนี้จะทดสอบยืนยันว่า สายพันธุ์กลาย A53, B1 และ B5 ไม่สามารถใช้สารมัยยันต์แต่ละเชื้อสะสมคือ A53 B1 และ B5 ตามลำดับเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญได้ โดยทำการวิเคราะห์การเพิ่มจำนวนของเชื้อและการลดลงของปริมาณแหล่งคาร์บอนที่ให้ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ CU-A1

3.14.1 สารมัยยันต์ A53 หรือกรด 2,5-ไดคาร์บอกซิลิก (กรดเจนทิลิก) เป็นแหล่งคาร์บอน

เลี้ยง *Rhizobium* sp. CU-A1 และสายพันธุ์กลาย A53, B1 และ B5 ในอาหารเหลว CFMM ที่มีสารมัยยันต์ A53 คือกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิกความเข้มข้น 300 มก.ต่อลิตร จากการเปรียบเทียบรูปแบบการเจริญและความสามารถในการย่อยสลายสารมัยยันต์ A53 พบว่า *Rhizobium* sp. CU-A1 และสายพันธุ์กลาย B1 และ B5 สามารถย่อยสลายกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิกจนไม่สามารถวิเคราะห์ปริมาณกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิกที่เหลืออยู่ได้ภายในระยะเวลา 2 วัน ได้พร้อมกับมีการเพิ่มจำนวนเซลล์ ในขณะที่สายพันธุ์กลาย A53 ไม่สามารถย่อยสลายกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิกและไม่มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ดังแสดงผลการทดลองในรูปที่ 3.31 จึงยืนยันได้ว่ากรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก เป็นสารมัยยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายของอะซีแนพรีลินของสายพันธุ์กลายนี้จริง

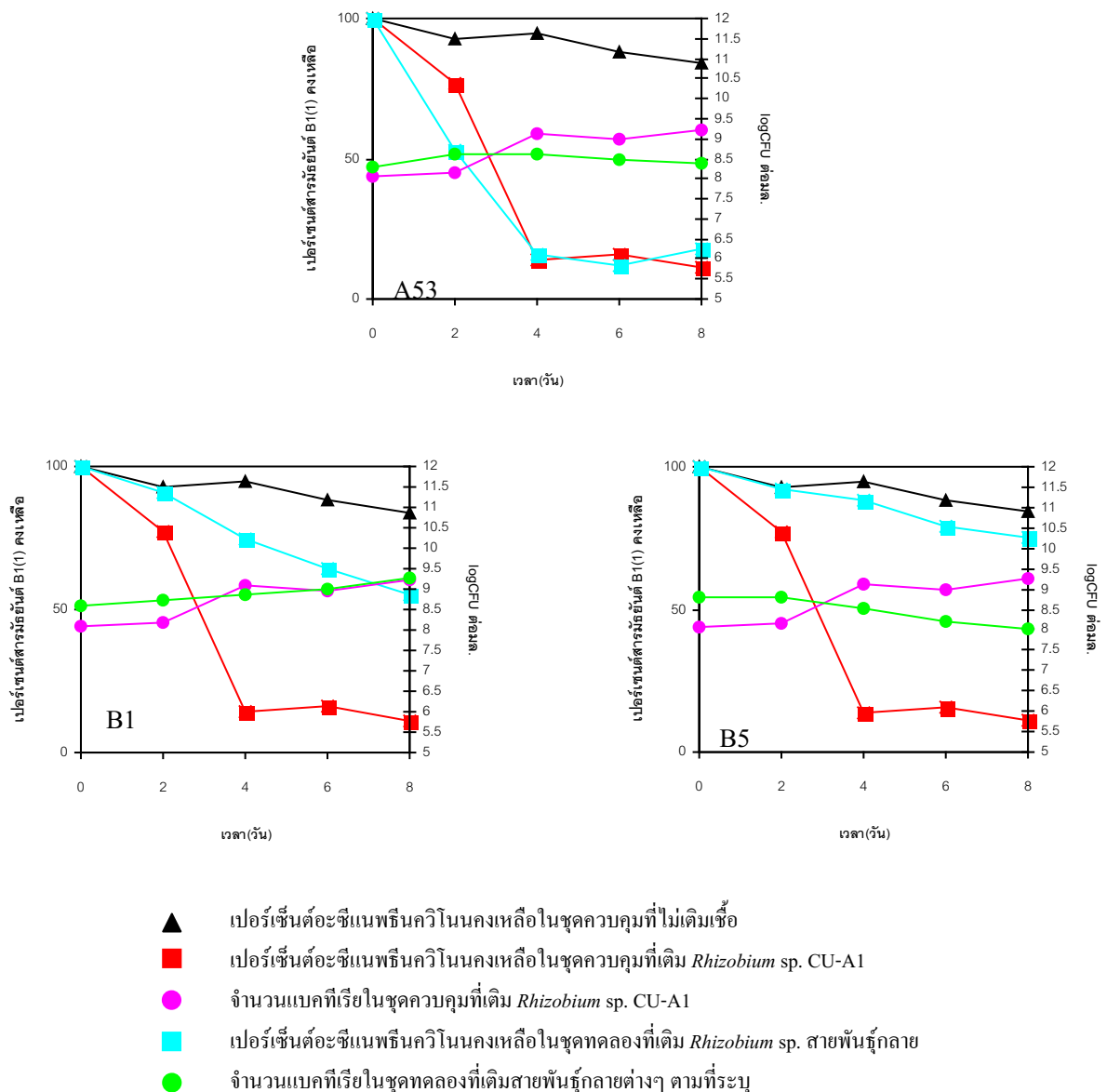


รูปที่ 3.31 การเจริญของเชื้อสายพันธุ์กลาย A53 B1 และ B5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีสารมัยยันต์ A53 หรือกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิกความเข้มข้น 300 มก.ต่อลิตร เปรียบเทียบกับ *Rhizobium* sp. CU-A1

3.14.2 สารมัยันต์ B1 หรืออะซีแนพธินควิโนนเป็นแหล่งคาร์บอน

เลี้ยง *Rhizobium* sp. CU-A1 และสายพันธุ์กลาย A53, B1 และ B5 ในอาหารเหลว CFMM ที่มี สารมัยันต์ B1 คืออะซีแนพธินควิโนนความเข้มข้น 300 มก.ต่อลิตร พบว่าแต่ละสายพันธุ์กลายมีรูปแบบ การเจริญและความสามารถในการออกซิไดซ์อะซีแนพธินควิโนนไปเป็นสารมัยันต์อื่นๆ แตกต่างกันไปเมื่อ เทียบกับ *Rhizobium* sp. CU-A1 ดังผลการทดลองในรูปที่ 3.32 โดย *Rhizobium* sp. CU-A1 โดย สามารถสลายอะซีแนพธินควิโนนจนเหลือปริมาณต่ำกว่า 30% ของปริมาณเริ่มต้นภายในวันที่ 4 ของการ เลี้ยงเชื้อ และมีการเจริญของเชื้อเพิ่มขึ้นตามปริมาณสารที่ลดลง ในขณะที่สายพันธุ์กลาย A53 ก็สามารถ ออกซิไดซ์อะซีแนพธินควิโนนจนเหลือปริมาณต่ำกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณเริ่มต้นภายในวันที่ 4 เช่น เดียวกัน แต่มีการเจริญเพียงเล็กน้อย สายพันธุ์กลาย B5 พบปริมาณอะซีแนพธินควิโนนคงเหลือมากกว่า 75 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณเริ่มต้นหลังการบ่มจนถึงวันที่ 8 อาจอธิบายได้ว่าปริมาณอะซีแนพธินควิโนนคง เหลือที่วิเคราะห์ได้ อาจไม่ใช่อะซีแนพธินควิโนน แต่เป็นแนพธาลีน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิกที่เกิดขึ้นทั้งนี้ เพราะ ค่า R_f ของแนพธาลีน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิกจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC คือ 2.61 ซึ่งเท่ากับอะซี แนพธินควิโนน

สายพันธุ์กลาย B1 เป็นสายพันธุ์กลายที่สะสมอะซีแนพธินควิโนนจากการย่อยสลายอะซีแนพธิน เมื่อวิเคราะห์รูปแบบการเจริญพบว่าสามารถออกซิไดซ์อะซีแนพธินควิโนนได้ปริมาณเล็กน้อย โดยคงเหลือ อะซีแนพธินควิโนนปริมาณ 55 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณเริ่มต้นภายในวันที่ 8 และมีการเจริญเล็กน้อยเมื่อ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์กลายอื่นๆ ซึ่งอาจอธิบายได้ว่าอะซีแนพธินควิโนนสามารถเกิดการแตกตัวไป เป็นกรดแนพธาลีน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิกได้เองโดยปัจจัยทางกายภาพไม่ต้องอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์ (Selifonov และคณะ 1996) ดังนั้นในสายพันธุ์กลาย B1 อาจเกิดกรดแนพธาลีน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิกที่ ถูกเปลี่ยนจากอะซีแนพธินควิโนนบางส่วนด้วยวิธีทางกายภาพ ทำให้ปริมาณอะซีแนพธินควิโนนลดลง และกรดแนพธาลีน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิกที่เกิดขึ้นนี้ เชื้อยังสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญได้ จึง สามารถเห็นการเจริญของสายพันธุ์ B1 นอกจากนี้ การเจริญของสายพันธุ์ B1 ยังน้อยกว่าสายพันธุ์ CU-A1 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการเปลี่ยนอะซีแนพธินควิโนนไปเป็นกรดแนพธาลีน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิกโดยวิธี ทางกายภาพเกิดได้น้อยกว่าเมื่อมีการเร่งของเอนไซม์ (Selifonov และคณะ 1996)



รูปที่ 3.32 การเจริญของเชื้อสายพันธุ์กลาย A53 B1 และ B5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีสารมัยยันต์ B1 หรืออะซีแนพรีนควิโนนความเข้มข้น 300 มก.ต่อลิตร เปรียบเทียบกับ *Rhizobium* sp. CU-A1

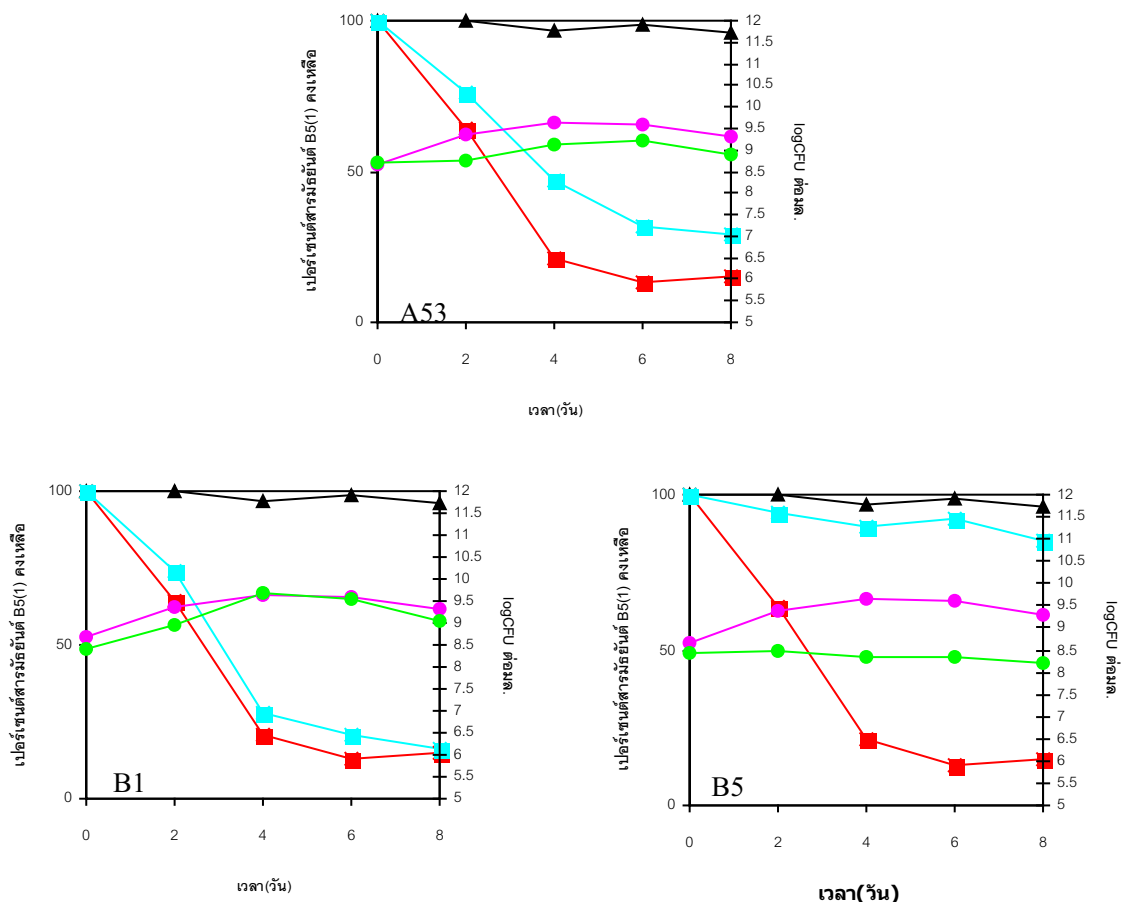
3.14.2 สารมัยยันต์ B5 หรือกรดแนพธาไลน์-1,8-ไดคาร์บอกซิลิกเป็นแหล่งคาร์บอน

เลี้ยง *Rhizobium* sp. CU-A1 และสายพันธุ์กลาย A53, B1 และ B5 ในอาหารเหลว CFMM ที่มีสารมัยยันต์ B5 คือกรดแนพธาไลน์-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก ความเข้มข้น 300 มก.ต่อลิตร พบว่าแต่ละสายพันธุ์กลายมีรูปแบบการเจริญและความสามารถในการออกซิไดซ์อะซีแนพรีนควิโนนไปเป็นสารมัยยันต์อื่นๆ แตกต่างกันไปเมื่อเทียบกับ *Rhizobium* sp. CU-A1 ดังแสดงในรูปที่ 3.33

พบว่าสายพันธุ์กลาย B1 มีรูปแบบในการลดปริมาณของสารมัยยันต์นี้คล้ายคลึงกับ *Rhizobium* sp. CU-A1 โดยสามารถใช้กรดแนพธาไลน์-1,8-ไดคาร์บอกซิลิกจนเหลือปริมาณต่ำกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ของ

ปริมาณเริ่มต้นภายในวันที่ 4 ของการเลี้ยงเชื้อ และมีการเจริญของเชื้อเพิ่มขึ้นตามปริมาณสารที่ลดลง สายพันธุ์กลาย A53 สามารถออกซิไดซ์กรดเนพธาลีน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิกจนเหลือปริมาณต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณเริ่มต้นภายในวันที่ 8 แต่มีการเจริญเพิ่มจำนวนเพียงเล็กน้อย

สำหรับสายพันธุ์กลาย B5 ไม่สามารถย่อยสลายกรดเนพธาลีน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิกได้เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ CU-A1 และไม่สามารถกรดเนพธาลีน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิกเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญ แสดงว่าสายพันธุ์กลาย B5 มีความบกพร่องในการย่อยสลายกรดเนพธาลีน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิก ซึ่งยืนยันว่าเป็นสารมัธยันต์ที่สะสมจากการย่อยสลายของอะซีแนพธิดีนโดยสายพันธุ์กลายนี้จริง



รูปที่ 3.33 การเจริญของเชื้อสายพันธุ์กลาย A53 B1 และ B5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว CFMM ที่มีสารมัธยันต์ B5 หรือกรดเนพธาลีน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิกความเข้มข้น 300 มก.ต่อลิตร เปรียบเทียบกับ *Rhizobium* sp. CU-A1

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การกลายพันธุ์โดยใช้ทรานสโปซอน Tn5

งานวิจัยครั้งนี้มุ่งที่จะศึกษาสารมัธยันต์จากการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน และยีนที่เกี่ยวข้องใน *Rhizobium* sp. CU-A1 โดยเริ่มจากการกลายพันธุ์สายพันธุ์ CU-A1 โดยใช้ Transposon Tn5 ด้วยวิธีคอนจูเกชัน ซึ่งทำให้ได้ทรานสคอนจูแกนจ์จำนวน 15730 โคลน จากการตรวจสอบการแทรกสอดของ Tn5 พบว่า Tn5 สามารถแทรกสอดเข้าสู่ดีเอ็นเอของ *Rhizobium* sp. CU-A1 แบบสุ่ม นำทรานสคอนจูแกนจ์ทั้งหมดไปตรวจสอบหาสายพันธุ์กลายที่บกพร่องในการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน ได้สายพันธุ์กลายรวมทั้งสิ้น 18 สายพันธุ์

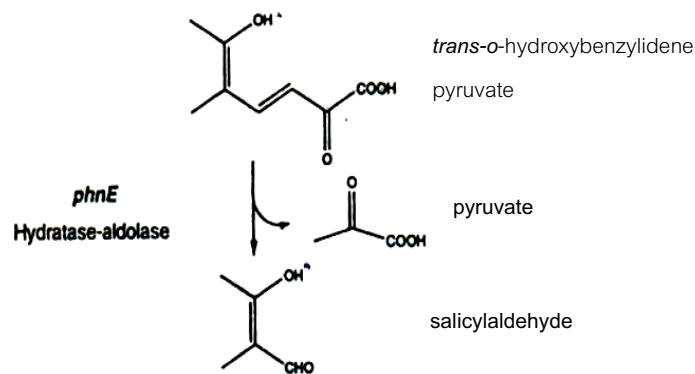
ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน

เมื่อนำสายพันธุ์กลายมาไฮบริดด้วย Tn5-probe พบว่าสายพันธุ์กลายที่ทดสอบมีขึ้นดีเอ็นเอที่ให้สัญญาณมีขนาดแตกต่างกัน จึงได้สุ่มเลือกสายพันธุ์กลาย E11 ที่ให้สัญญาณประมาณ 9.4 kb เพื่อโคลนเข้าในเวกเตอร์และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของขึ้นดีเอ็นเอแทรกสอด โดยใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่มีลำดับจำเพาะกับ Tn5 และทิศทาง 5'→3' ออกจาก Tn5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ติดกับ Tn5 คล้ายคลึงกับดีเอ็นเอที่ประมวลรหัสเอนไซม์ไฮดรอกซี-อัลโดเลสใน *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 (ความเหมือนเท่ากับ 38%) ซึ่งเอนไซม์นี้ทำหน้าที่ในการตัดกิ่งคาร์บอนของ *trans*-o-hydroxybenzylidene-pyruvic acid (tHBP) ได้เป็น salicylaldehyde ในวิธีการย่อยสลายแนพธาลีน (Laurie และ Lloyd-Jones, 1999) ดังนั้น จึงทำ AE-Probe จากขึ้นดีเอ็นเอที่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์นี้ เพื่อใช้หาดีเอ็นเอที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนในสายพันธุ์ CU-A1 ต่อไป ได้โคลนขึ้น 4.5 kb *Bam*HI-*Hind*III เข้าในเวกเตอร์ได้เป็นพลาสมิด pWT หาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของขึ้นแทรกสอดนี้ พบว่าขึ้นแทรกสอดมีขนาด 4574 bp นำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดดังกล่าวไปเทียบความเหมือนของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ใน GenBank ด้วยโปรแกรม BlastX version 2.2.1 จากข้อมูลความเหมือนในระดับกรดอะมิโนที่ได้จากโปรแกรม BlastX และการหาตำแหน่งจุดเริ่มต้นและสิ้นสุดการถอดรหัสเป็นโปรตีน รวมถึงตำแหน่งเกาะของไรโบโซม (ribosome binding site, RBS) อาจสามารถระบุกรอบอ่านรหัสเปิด (Open Reading Frame, ORF) ได้จำนวน 5 กรอบ ซึ่งมีทิศทางการถอดรหัสไปทางเดียวกัน (รูปที่ 4.1) ดังนี้

กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 1 (ORF1) เป็นกรอบอ่านรหัสเปิดที่ไม่สมบูรณ์กล่าวคือยังไม่สามารถพบกรดอะมิโนเมธิโอนีนที่ตำแหน่งที่ 1 ของ ORF (start codon) พบว่าลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกับ putative ferredoxin reductase ที่ประมวลรหัสโดยยีน *mocF* ของ *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (Bahar *et al.*, 1998) เท่ากับ 33% พบบริเวณอนุรักษ์ (conserved motif) ในการจับกับฟลาวิน (flavin) ภายในโมเลกุลของ FAD ที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 33-43 ของ ORF1 โดยบริเวณดังกล่าวประกอบด้วยกรดอะมิโน TVAGANAAGGD คล้ายกับรายงานที่เสนอโดย Eggink *et al.* (1990) ซึ่งลำดับกรดอะมิโน

โนเป็น TX₆AXGD (X หมายถึง กรดอะมิโนตัวใดๆ) putative ferredoxin reductase ของ *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* เป็นองค์ประกอบหนึ่งของระบบเอนไซม์ออกซิจีเนส (oxygenase system) เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมของสารไรโซพีน (rhizopines) ซึ่งไรโซพีนเป็นสารประกอบประเภท inositol ที่สร้างโดย bacteroid ในรากพืช (Bahar *et al.*, 1998) โดยเอนไซม์ออกซิจีเนสใน *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* ไม่มีความเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสาร PAHs

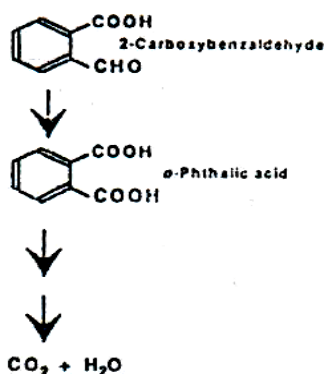
กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 2 (ORF2) หรือยีน *acnE* ลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกับไฮดราเทส-อัลโดเลส ที่ประมวลผลโดยยีน *phnE* ของ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 (Laurie และ Lloyd-Jones, 1999) เท่ากับ 38% เอนไซม์ไฮดราเทส-อัลโดเลสของ *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 ทำหน้าที่ในการตัดกิ่งคาร์บอนของ *trans*-o-hydroxybenzylidene-pyruvic acid (tHBPA) ได้เป็น salicylaldehyde ในวิธีการย่อยสลายเนพทาไลน์ และทำงานในลักษณะเดียวกันในวิธีการย่อยสลายพีแนนทรีน (Laurie และ Lloyd-Jones, 1999) ดังแสดงในรูปที่ 5.1



รูปที่ 4.2 การเร่งปฏิกิริยาของไฮดราเทส-อัลโดเลสใน *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 (Laurie และ Lloyd-Jones, 1999)

กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 3 (ORF3) หรือยีน *acnK* ลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกับ 2-คาร์บอกซีเบนซัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส ที่ประมวลผลโดยยีน *phdK* ของ *Nocardioide* sp. สายพันธุ์ KP7 (Iwabuchi และ Harayama, 1997) เท่ากับ 46% พบบริเวณอนุรักษ์ (conserved motif) ในการจับกับ NAD⁺ ของ aldehyde dehydrogenase superfamily (F/Y)(I/T)G(S/E)(T/P)XX(G/F) (Horn *et al.*, 1991) ในลำดับกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 226-233 ของ ORF3 ซึ่งประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโนดังนี้ FIGSAATG และยังพบว่าตำแหน่งของบริเวณอนุรักษ์นี้มีความใกล้เคียงกับบริเวณอนุรักษ์ของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 227-234 (FIGSTDTG) ของ *Nocardioide* sp. สายพันธุ์ KP7 (Iwabuchi และ Harayama, 1997) นอกจากนี้ยังพบบริเวณอนุรักษ์ของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 250-257 ของ ORF3 โดยประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโนดังนี้ LELGGKNP ซึ่งคล้ายกับบริเวณเร่ง (active site) ของอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสใน *Pseudomonas stutzeri* สายพันธุ์ AN10 (Bosch *et al.*, 1999) ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนในบริเวณดังกล่าวเป็น LELGGKSP 2-คาร์

บอกซีเบนซัลดีไฮด์ไฮโดรจีเนสของ *Nocardioides* sp. สายพันธุ์ KP7 ทำหน้าที่ในการเปลี่ยน 2-คาร์บอกซีเบนซัลดีไฮด์ให้เป็น กรด *o*-phthalic ในวิธีการย่อยสลายพีแนนทริน (Iwabuchi และ Harayama, 1997) ดังแสดงในรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.3 การเร่งปฏิกิริยาของ 2-คาร์บอกซีเบนซัลดีไฮด์ไฮโดรจีเนสในวิธีการย่อยสลายพีแนนทรินของ *Nocardioides* sp. สายพันธุ์ KP7 (Iwabuchi และ Harayama, 1997)

กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 4 (ORF4) อยู่ในกรอบอ่านรหัสเปิดที่ต่างจาก ORF1-3 และ 5 ลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกับโปรตีนที่คล้ายกับ adducin ที่ประมวลรหัสโดยยีนในจีโนมของ *Mesorhizobium loti* (Kaneko *et al.*, 2000) เท่ากับ 38% ปัจจุบันยังไม่ทราบหน้าที่การทำงานของโปรตีนที่คล้ายกับ adducin ที่แน่นอน

กรอบอ่านรหัสเปิดที่ 5 (ORF5) เป็นกรอบอ่านรหัสเปิดที่ไม่สมบูรณ์ กล่าวคือยังไม่สามารถพบรหัสหยุดการแปลรหัส (stop codon) ที่ตำแหน่งสุดท้ายของ ORF ลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกับ short-chain dehydrogenase ที่ประมวลรหัสโดยยีน *yigI* ของ *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ PA01 (Stover *et al.*, 2000) เท่ากับ 43% short-chain dehydrogenase ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ร่วมในกระบวนการ β -oxidation ในสายพันธุ์ PA01 ซึ่งกระบวนการ β -oxidation นี้ไม่มีความเกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs

เมื่อพิจารณาความเกี่ยวข้องของ ORF กับการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีนพบว่า ORF1 ซึ่งถอดรหัสเป็นโปรตีนที่คาดว่าจะเป็นเฟอร์รีดอกซินรีดักเทส (putative ferredoxin reductase) เนื่องจากพบบริเวณอนุรักษ์ในการจับกับฟลาวินายในโมเลกุลของ FAD ของเฟอร์รีดอกซินรีดักเทส โดยลำดับกรดอะมิโนของ ORF1 มีความเหมือนกับ putative ferredoxin reductase ของ *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* ที่เป็นองค์ประกอบหนึ่งของระบบเอนไซม์ออกซิจีเนส เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมของสารไรโซพีน (rhizopines) ซึ่งไม่มีความเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนฟธิลีน แต่ ORF1 นั้นเป็นกรอบอ่านรหัสเปิดที่ไม่สมบูรณ์การเปรียบเทียบความเหมือนกับกรดอะมิโนของโปรตีนใน GenBank อาจเป็นการเปรียบเทียบเพียงบางส่วนกับฐานข้อมูล สำหรับการย่อยสลาย PAHs ทั่วไวนั้นต้องการไดออกซิจีเนสเป็นเอนไซม์เริ่มต้นในปฏิกิริยาการย่อยสลาย (Ensley *et al.*, 1982; Ensley & Gibson, 1983) ไดออกซิจีเนส

ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อย ได้แก่ เฟอร์รีดอกซินรีดักเทส เฟอร์รีดอกซิน ISP large subunit (α_2) และ small subunit (β_2) (Ensley *et al.*, 1982) ซึ่งเฟอร์รีดอกซินรีดักเทสเป็นหน่วยหนึ่งที่สำคัญต่อการทำงานของไดออกซิจีเนส แต่พบรายงานได้กล่าวว่าเชื้อบางสายพันธุ์ที่ย่อยสลาย PAHs ขาดส่วนที่เป็นเฟอร์รีดอกซินรีดักเทสไปแต่การทำงานของไดออกซิจีเนสยังคงปกติเนื่องจากการทดแทนการทำงานของเฟอร์รีดอกซินรีดักเทสที่ไม่จำเพาะต่อปฏิกิริยาในเซลล์เจ้าบ้าน (Simon *et al.*, 1993) ดังนั้นในกรณี ORF1 อาจเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพทิลีน แต่การสรุปชัดเจนขึ้นเมื่อมีข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ครบถ้วน หรือศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการทำงานของอะซีแนพทิลีนและการแสดงออกหรือการทำหน้าที่ของยีน

ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพทิลีนต่อไปคือ ORF2 และ ORF3 หรือยีน *acnE* และ *acnK* ซึ่งถอดรหัสเป็น hydratase-aldolase และ aldehyde dehydrogenase ตามลำดับ ซึ่งเอนไซม์ทั้งสองชนิดยังพบว่าเกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs อื่นๆ ดังที่ได้แสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ยีนประมวลรหัสเอนไซม์ hydratase-aldolase และ aldehyde dehydrogenase

จุลชีพ	hydratase-aldolase	aldehyde dehydrogenase	ย่อยสลาย	เอกสารอ้างอิง
<i>Rhizobium</i> sp. CU-A1	<i>acnE</i>	<i>acnK</i>	อะซีแนพทิลีน	งานวิจัยนี้
<i>Pseudomonas putida</i> G7	<i>nahE</i>	<i>nahF</i>	แนพทาลีน	Simon <i>et al.</i> , 1993
<i>Burkholderia</i> sp. RP007	<i>phnE</i>	<i>phnF</i>	ฟีแนนทรีน	Laurie และ Lloyd-Jones, 1999
<i>Nocardioides</i> sp. KP7	<i>phdJ</i>	<i>phdK</i>	ฟีแนนทรีน	Iwabuchi และ Harayama, 1997

เมื่อพิจารณาการจัดเรียงตัวของ *acnEK* พบว่ายีนทั้งสองมีการจัดเรียงตัวแตกต่างจากยีนในกลุ่ม *nah* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพทาลีน (Simon *et al.*, 1993) ซึ่งเป็นยีนกลุ่มที่ค่อนข้างมีการอนุรักษ์อย่างสูง ยีนกลุ่มคล้าย *nah* จัดเรียงตัวเป็นโอเปอรอน *nahAaAbAcAdBFCQED* โดย *nahF* ถอดรหัสเป็น aldehyde dehydrogenase และ *nahE* ถอดรหัสเป็น hydratase-aldolase ซึ่งระหว่าง 2 ยีนดังกล่าวมียีนอื่นคั่นและลำดับของยีนสลับที่กัน

เมื่อเทียบการจัดเรียงตัวกับยีนใน *Burkholderia* sp. สายพันธุ์ RP007 (Laurie และ Lloyd-Jones, 1999) ซึ่งมีความคล้ายกรดอะมิโนของ ORF2 หรือยีน *acnE* มากที่สุด พบว่าการจัดเรียงตัวของยีน *acnEK* มีความแตกต่างจากสายพันธุ์ RP007 ซึ่งยีน *phnF* ที่ถอดรหัสเป็นอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนสของสายพันธุ์ RP007 อยู่ติดกับยีน *phnE* ที่ถอดรหัสเป็นเอนไซม์ไฮเดรตาส-อัลโดเลส (*phnFE*) ภายในโอเปอรอนเดียวกัน

การจัดเรียงตัวของยีนของ *Nocardioides* sp. สายพันธุ์ KP7 (Iwabuchi และ Harayama, 1997) ซึ่งประมวลรหัสเป็นกรดอะมิโนที่คล้ายกับกรดอะมิโนจาก ORF3 หรือยีน *acnK* มากที่สุด พบว่าการจัดเรียงตัวของยีน *acnEK* ยังคงมีความแตกต่างจากสายพันธุ์ KP7 โดยยีน *phdK* ที่ถอดรหัสเป็น 2-คาร์บอกซีเบนซัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส อยู่ใกล้ยีน *phdJ* ที่ถอดรหัสเป็น ทรานส-คาร์บอกซีเบนซอลไพริเวตอัลโดเลส มากที่สุดแต่มี ORF อื่นคั่น (*phdJ*, ORF1, *phdK*)

ดังนั้น จึงเป็นไปได้ว่าการจัดเรียงตัวของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนฟธอลีนใน *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 นี้ อาจจะไม่อยู่รวมเป็น cluster เหมือนยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ส่วนใหญ่ (Simon *et al.*, 1993; Denome *et al.*, 1993; Takizawa *et al.*, 1994) โดยมี ORF4 ซึ่งลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกับโปรตีนที่คล้ายกับ adducin ที่ไม่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs แทรกอยู่ระหว่าง ORF2 และ ORF3 และ ORF5 ที่ลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกับ short-chain dehydrogenase ซึ่งเป็นเอนไซม์หนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs ดังที่ได้เคยมีรายงานมา โดยรายงานไม่ได้กล่าวถึงหน้าที่การทำงานในปฏิกิริยาการย่อยสลาย PAHs ที่แน่ชัด (Denome *et al.*, 1993) ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs อาจไม่อยู่รวมเป็น cluster ได้ เช่นยีนประมวลรหัส 2-คาร์บอกซีเบนซัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส จาก *Nocardioideis* sp. สายพันธุ์ KP7 ที่มีความสามารถในการย่อยสลาย ฟิแนนทรีน มีดีเอ็นเอแทรกอยู่ ซึ่งมีขนาด 1,455 bp ประกอบด้วย 7 Open Reading Frames (ORFs) มีส่วนที่เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีการย่อยสลายฟิแนนทรีนทั้งหมด 3 ยีน และ อีก 4 ORFs ที่ไม่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายฟิแนนทรีน (Iwabuchi และ Harayama, 1997)

นอกจากนี้ Romine *et al.* (1999) พบยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารอะโรมาติกหลายชนิด จาก *Sphingomonas aromaticivorans* สายพันธุ์ F199 ได้แก่ ไบฟินิล แนพทาซีน เมตา-ไซลีน พารา-ครีซอล และพบว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพทาซีนที่พบในเชื้อสายพันธุ์นี้ ได้แก่ ยีน *nahE nahD* และ *nahF* มีการกระจายตัวอยู่ห่างๆกันและถูกค้นด้วยยีนจากวิถีการย่อยสลายสารอื่น

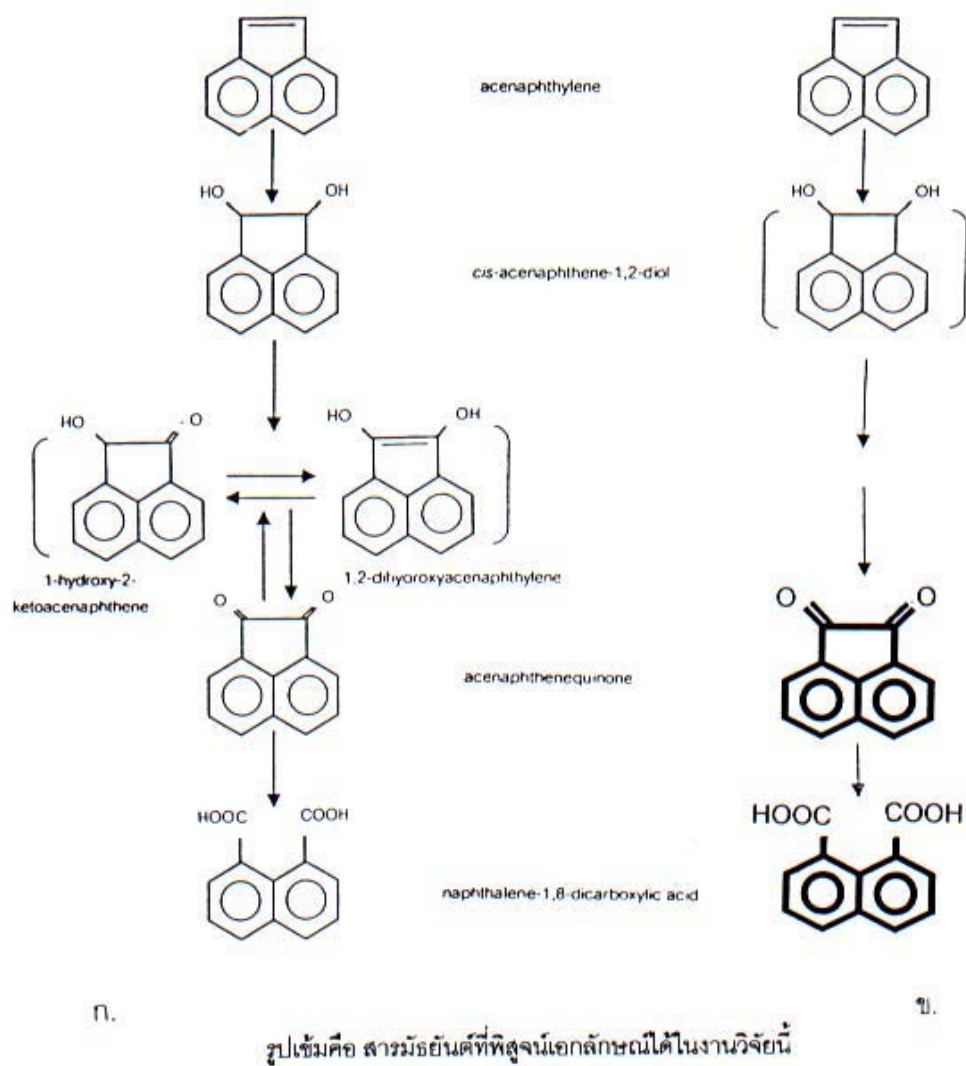
งานวิจัยนี้จึงเป็นงานแรกที่ได้กล่าวถึงยีน *acnE* และ *acnK* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนฟธอลีนใน *Rhizobium* โดยแสดงให้เห็นว่า *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 มียีน ดังกล่าวแตกต่างจากยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs อื่นตามที่ได้เคยมีรายงานมาแล้ว ทั้งลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับกรดอะมิโน และการจัดเรียงตัวของยีน โดยยีนอาจจะกระจายตัวอยู่ไม่อยู่รวมกับเป็น cluster แต่การสรุปจะชัดเจนยิ่งขึ้นถ้าทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประมวลรหัสเป็นเอนไซม์อื่นที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนฟธอลีน ต่อจากซันดีเอ็นเอในพลาสมิด pWT ทั้งในส่วนต้นและปลายเพิ่มเติมเพื่อตรวจหายีนอื่นที่เหลือเพื่อการระบุตำแหน่ง การจัดเรียงตัวของยีนที่ชัดเจนขึ้น นอกจากนี้ศึกษาการทำหน้าที่ของยีนที่แยกได้นี้ จะเป็นการยืนยันที่ชัดเจนยิ่งขึ้นว่ายีนเหล่านี้เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนฟธอลีนจริง

สารมัธยันต์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนฟธอลีน

ผลการทำสารมัธยันต์ให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมี พบว่าสายพันธุ์กลาย A53 สะสมกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก (กรดเจนทิลิก), สายพันธุ์กลาย B1 สะสมอะซีแนฟธอลีนควิโนน และสายพันธุ์กลาย B5 สะสมกรดแนพทาซีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก จากผลการวิเคราะห์สารมัธยันต์สามารถอธิบายถึงความสัมพันธ์ของการเจริญของเชื้อ A53, B1 และ B5 กับการสะสมสารมัธยันต์ที่วิเคราะห์ได้ในแต่ละเชื้อ โดย A53 เจริญได้ในอาหารที่มีอะซีแนฟธอลีนเป็นแหล่งคาร์บอน (รูปที่ 3.11 ก.) เนื่องจากสลายวงเบนซีนของอะซีแนฟธอลีนจนถึงกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก ในขณะที่ B1 และ B5 เจริญไม่ได้ (รูปที่ 3.11 ข.) เนื่อง

จากเปลี่ยนอะซีแนพทิลีนไปถึงเพียงอะซีแนพทิลควิโนน และ กรดแนพทาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก เท่านั้น ไม่มีการแตกของวงเบนซีนจึงไม่สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้

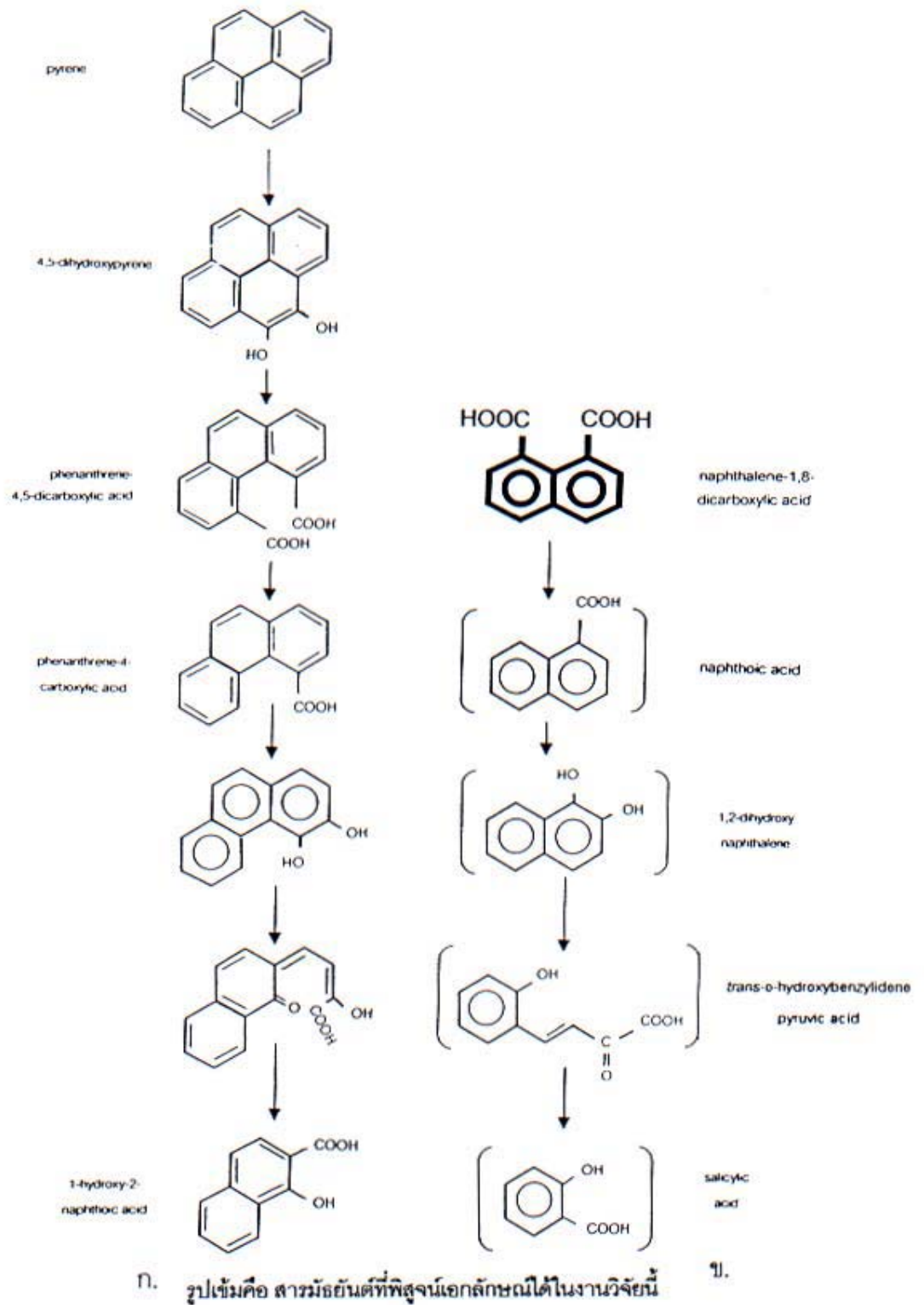
จากรายงานการย่อยสลายอะซีแนพทิลีนโดย *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Selifenov *et al.*, 1996) พบว่าอะซีแนพทิลีนจะถูกออกซิไดซ์ไปเป็น ซีส-1,2-อะซีแนพทิลไดออล, อะซีแนพทิลควิโนน และ กรดแนพทาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก ตามลำดับ ในงานวิจัยนี้พบอะซีแนพทิลควิโนน และกรดแนพทาลีน 1,8-ไดคาร์บอกซิลิกเป็นสารมัธยันต์ที่พบสะสมจากสายพันธุ์กลายของ *Rhizobium* sp. CU-A1 แสดงว่า *Rhizobium* sp. CU-A1 น่าจะมีวิธีการย่อยสลายอะซีแนพทิลีนมาเป็นกรดแนพทาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก เช่นเดียวกันกับใน *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 ดังแสดงในรูปที่ 4.4



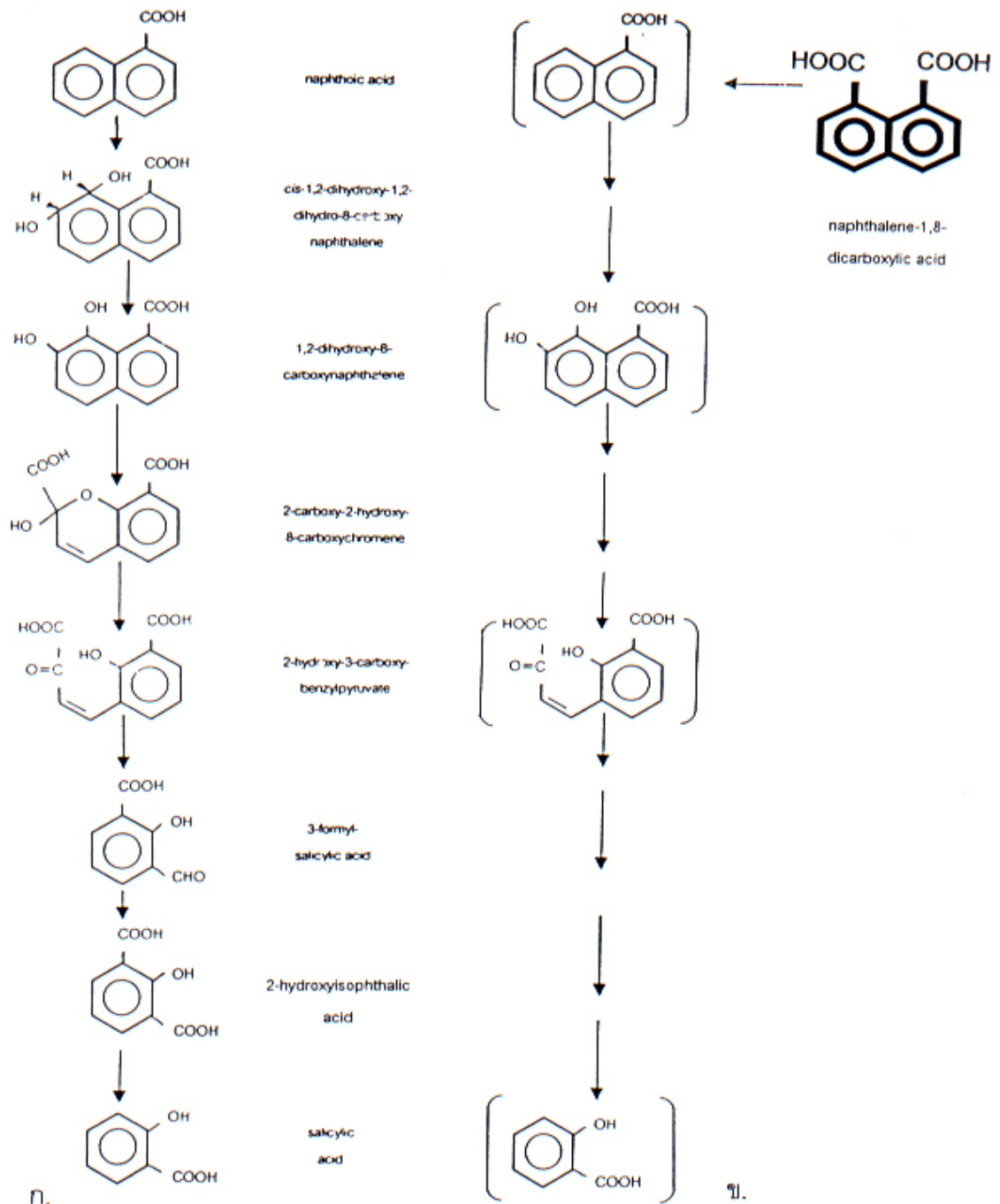
รูปที่ 4.4 วิธีการย่อยสลายอะซีแนพทิลีนเป็นกรดแนพทาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิกโดย *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Selifenov *et al.*, 1996) (ก.) และวิธีการย่อยสลายอะซีแนพทิลีนโดย *Rhizobium* sp. CU-A1 ที่เสนอในงานวิจัยนี้

ปัจจุบันยังไม่มีรายงานถึงจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก ในงานวิจัยนี้ตรวจพบสายพันธุ์กลายที่สะสม กรด-2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก หรือกรดเจนทิลิก ซึ่งพบว่าเป็นสารมัธยันต์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายสาร PAHs หลายชนิด (Starovoitov, 1975 และ Grifoll *et al.*, 1995) ซึ่งแสดงว่า *Rhizobium* sp. CU-A1 สามารถย่อยสลายกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิกมาเป็นกรดเจนทิลิกได้ ซึ่งน่าจะเกิดขึ้นโดยวิธีที่เสนอดังนี้

กรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิกอาจถูกย่อยสลายคล้ายกันกรดพีแนนทรีน-4,5-ไดคาร์บอกซิลิก ซึ่งเป็นสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายไพรีนโดย *Mycobacterium* sp. AP1 (Vila *et al.*, 2001) และ *Mycobacterium* sp. PYR-1 (Young *et al.*, 1995) ซึ่งมีสารประกอบดังกล่าวมีโครงสร้างที่มีหมู่คาร์บอกซิลบนวงอะโรมาติกเบนซีน 2 หมู่ คล้ายคลึงกับกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก จุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดจะออกซิไดซ์กรดพีแนนทรีน-4,5-ไดคาร์บอกซิลิกไปเป็นกรดพีแนนทรีน-4-คาร์บอกซิลิกโดยดึงหมู่คาร์บอกซิลบนวงเบนซีนออก 1 หมู่ และหลังจากนั้นจะเกิดการเติมออกซิเจนบนวงเบนซีนที่มีหมู่คาร์บอกซิลอยู่เพื่อแตกวงต่อไป ในทำนองเดียวกันกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิกอาจจะถูกตัดหมู่คาร์บอกซิลบนวงเบนซีนออก 1 หมู่ ทำให้เกิดเป็นกรดแนพโทอิก และเกิดการเติมออกซิเจน 2 อะตอมบนวงเบนซีนที่มีหมู่คาร์บอกซิลของกรดแนพโทอิกเพื่อแตกวงต่อไป เช่นเดียวกับวิถีการย่อยสลายไพรีน ดังแสดงในรูปที่ 4.5 หรือกรดแนพโทอิกจะถูกเติมออกซิเจน 2 อะตอมบนวงเบนซีนที่ไม่มีหมู่คาร์บอกซิลเกิดเป็น 1,2-ไดไฮดรอกซี-8-คาร์บอกซีแนพธาลีน เหมือนเช่นวิถีการย่อยสลายกรดแนพโทอิกของ *Pseudomonas maltophilia* CSV89 (Phale *et al.*, 1995) ดังแสดงในรูปที่ 4.6 ซึ่งทั้ง 2 วิถีจะเปลี่ยนกรดแนพโทอิกไปเป็นกรดซาลิไซลิกเช่นเดียวกัน



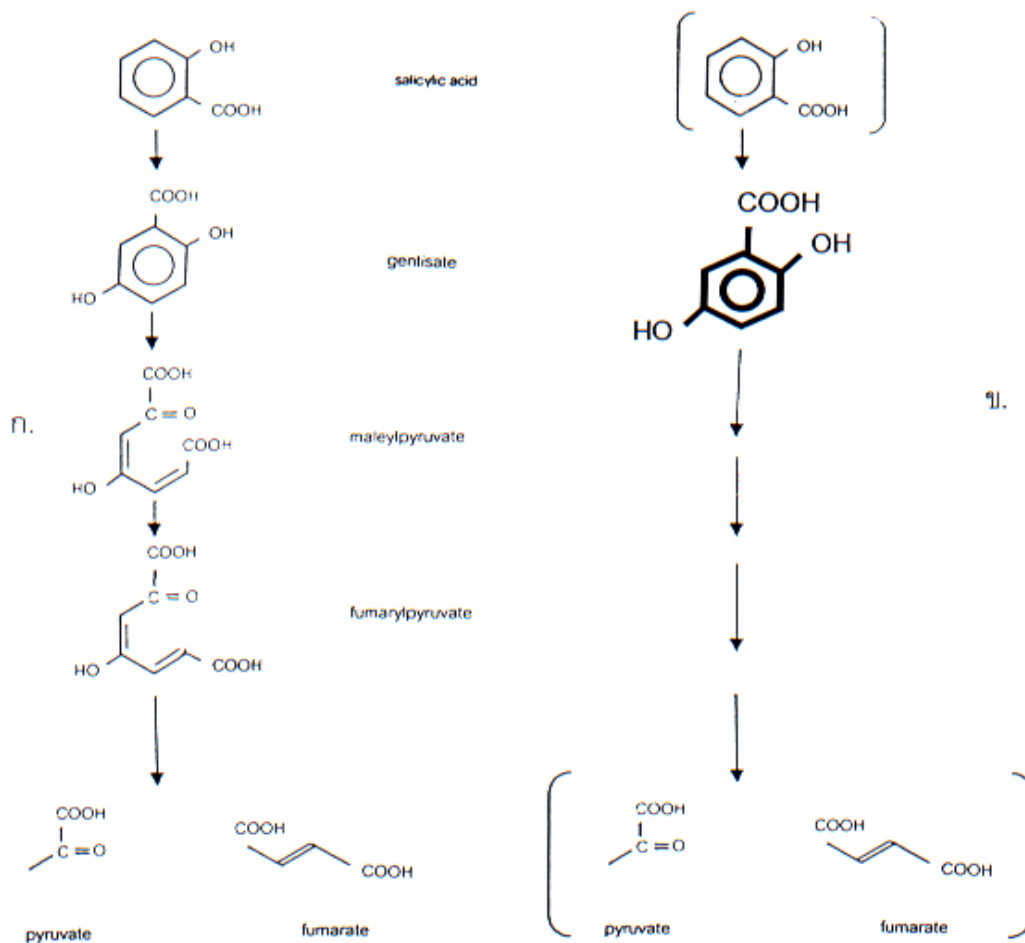
รูปที่ 4.5 วิธีการย่อยสลายไพรีนโดย *Mycobacterium* sp. AP1 (Vila *et al.*, 2001) (ก.) และไดอะแกรมเสนอวิธีการย่อยสลายกรดแนพทาลิน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิกโดย *Rhizobium* sp. CU-A1 (ข.)



รูปที่ 4.6 คือ สารมัธยันต์ที่พิสูจน์เอกลักษณ์ได้ในงานวิจัยนี้

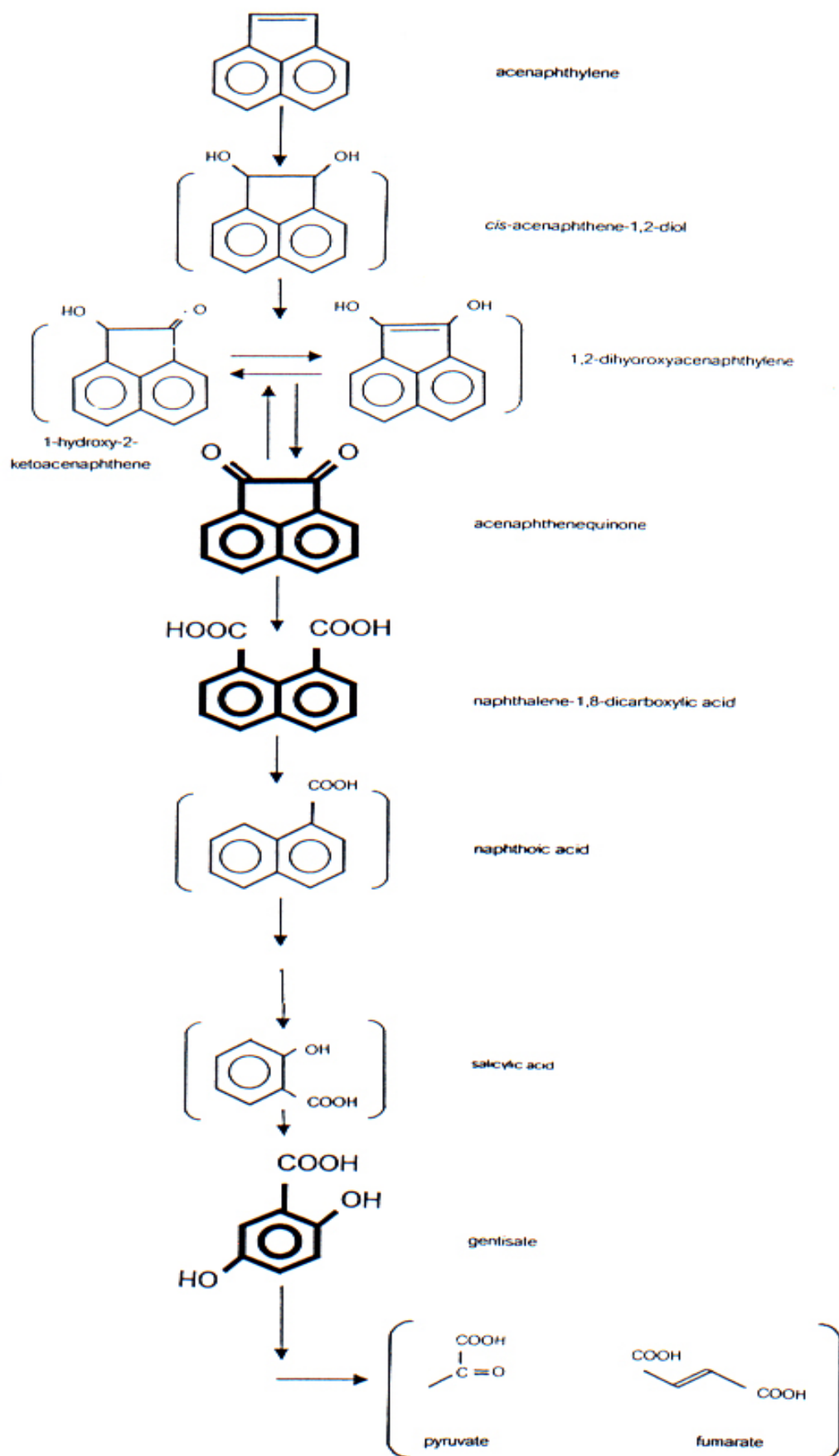
รูปที่ 4.6 วิธีการย่อยสลายกรดแนฟโธอิกโดย *Pseudomonas maltophilia* CSV89 (Phale *et al.*, 1995) (ก.) และ ไดอะแกรมเสนอวิธีการย่อยสลายกรดแนฟธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิกโดย *Rhizobium* sp. สายพันธุ์ CU-A1 (ข.)

หลังจากนั้นกรดซาลิไซลิกจะเปลี่ยนเป็นกรดเจนทิสิก (Fuenmayor *et al.*, 1998) และเปลี่ยนเป็น มาริลไพรูเวท, ฟูมาริลไพรูเวท และไพรูเวทกับฟูมาเรท ตามลำดับ (Ning *et al.*, 2001) ดังแสดงในรูปที่ 5.4 เพื่อเข้าสู่วัฏจักรเครบส์ต่อไป



รูปที่ 4.7 วิธีการย่อยสลายกรดซาลิไซลิก (Fuenmayor *et al.*, 1998) และกรดเจนทิสิก (Ning *et al.*, 2001) (ก.) และไดอะแกรมเสนอวิธีการย่อยสลายกรดซาลิไซลิกโดย *Rhizobium* sp. CU-A1 (ข.)

โดยสรุปแล้ว ผลจากการพบสารมัธยันต์ที่เกิดจากการย่อยสลายอะซีแนพริลีน 3 ชนิดคือ อะซีแนพริลีนควิโนน, กรดแนพธาไลน์-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก และกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก สามารถทำนายวิถีเมตาบอลิซึมเบื้องต้นของอะซีแนพริลีนใน *Rhizobium* sp. CU-A1 ได้ ดังนี้คือ อะซีแนพริลีนจะถูกเมตาบอลิไทต์ไปเป็น อะซีแนพริลีนควิโนน, กรดแนพธาไลน์-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก และกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.8 ซึ่งสารมัธยันต์ในวงเล็บเป็นสารมัธยันต์ที่ยังไม่สามารถสกัดแยกและทำให้บริสุทธิ์เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์และโครงสร้างทางเคมีที่แน่นอนได้ในงานวิจัยนี้ ซึ่งจะต้องหาสายพันธุ์กลายที่สะสมสารมัธยันต์ต่างๆ เพิ่มขึ้น



รูปที่ 4.8 ไดอะแกรมเสนอวิถีการย่อยสลายอะซีแนฟทีนโดย *Rhizobium* sp. CU-A1

เอกสารอ้างอิง

บุญยงค์ โหล่วงศ์วัฒน์. 2540. ขยายถึงขยั้งอันตราย. วารสารโรงงาน. ปีที่ 15. ฉบับที่ 1. ตุลาคม 2539-มกราคม 2540.

พระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2535.

สำนักเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อมโรงงาน. 2542. การกำจัดสารพิษอันตรายจากโรงงานอุตสาหกรรม. เอกสารประกอบการศึกษา
เผยแพร่โดยสำนักเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อมโรงงาน กรมโรงงานอุตสาหกรรม.

Alexander, R., Kagi, R. I., Rowland, S. J. Sheppard, P. N., and Chirila, T. V. 1985. The effects of thermal maturity on distribution of dimethylnaphthalenes and trimethylnaphthalenes in some ancient sediments and petroleums. Geochem. Cosmochim. 49: 385-395.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Ausubel, F. A., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. 1999. Current Protocols in Molecular Biology. 4th ed. New York: John Wiley & Sons.

Bahar, M., de Majnik, J., Wexler, M., Fry, J., Poole, P. S., and Murphy, P. J. 1998. A model for the catabolism of rhizopine in *Rhizobium leguminosarum* involves a ferredoxin oxygenase complex and the inositol degradation pathway. Mol. Plant Microbe Interact. 11(11): 1057-1068.

Bosch, R., Garcia-Valdes, E., and Moore, E. R. B. 1999. Genetic characterization and evolutionary implications of a chromosomally encoded naphthalene-degradation upper pathway from *Pseudomonas stutzeri* AN10. Gene. 236: 149-157.

Calder, J.A. and Lader, J.H. 1996. Effect of dissolved aromatic hydrocarbons on the growth of marine bacteria in batch culture. Appl. Environ. Microbiol. 32(1):95-101.

Cerniglia, C. E. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Biodegradation. 3: 351-368.

Cockson, J. T. 1995. Application of biological processes. In Bioremediation engineering design and application. p. 9., Cockson, J. T. (ed.). McGraw-Hill, Inc. USA.

Denome, S. A., Stanley, D. C., Olson, E. S., and Young, K. D. 1993. Metabolism of dibenzothiophene and naphthalene in *Pseudomonas* strains: complete DNA sequence of an upper naphthalene catabolic pathway. J. Bacteriol. 175: 6890-6901.

Eggink, G., Engel, H., Vriend, G., Terpstra, P., and Witholt, B. 1990. Rubredoxin reductase of *Pseudomonas oleovorans*: structural relationship to other flavoprotein oxidoreductases based on one NAD and two FAD fingerprints. J. Mol. Biol. 212: 135-142.

Ensley, B. D., and Gibson, D. T. 1983. Naphthalene dioxygenase: Purification and properties of a terminal oxygenase component. J. Bacteriol. 155: 505-511.

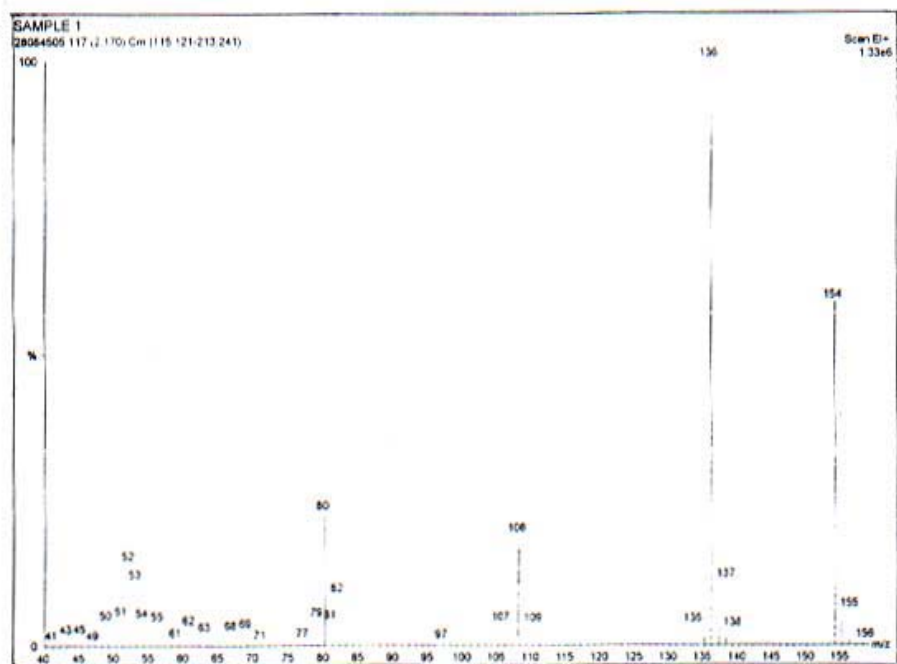
Ensley, B. D., Gibson, D. T. and Laborde, A. L. 1982. Oxidation of naphthalene by a multicomponent enzyme system from *Pseudomonas* sp. strain NCIB 9816. J. Bacteriol. 149: 948-954.

- Ensley, B. D., Ratzkin, B. J., Osslund, T. D., Simon, M. J., Wackett, L. P., and Gibson, D. T. 1983. Expression of naphthalene oxidation genes in *Escherichia coli* results in the biosynthesis of indigo. Science. 222: 167-169.
- Fernandez, P. M., Grifoll, A. M., Solanas, J. M., Bayona, and J., AlBaiges. 1992. Bioassay-directed chemical analysis of genotoxic components in coastal sediments. Environ. Sci. Technol. 26: 817-829.
- Fuenmayor, S. L., Wild, M., Boyes, A. L., and Williams, P. A. 1998. A gene cluster encoding steps in conversion of naphthalene to gentisate in *Pseudomonas* sp. strain U2. J. Bacteriol. 180: 2522-2530.
- Grifoll, M., Selifenov, S. A., Galtin, C. V., and Chapman, P. J. 1995. Actions of a versatile fluorene-degrading bacterial isolate on polycyclic aromatic compounds. Appl. Environ. Microbiol. 61: 3711-3723.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166: 557-580.
- Horn, J. M., Harayama, S., and Timmis, K. N. 1991. DNA sequence determination of the TOL plasmid (pWWO) *xylGFJ* genes of *Pseudomonas putida*: implications for the evolution of aromatic catabolism. Mol. Microbiol. 5: 2459-2474.
- Iwabuchi, T., and Harayama, S. 1997. Biochemical and genetic characterization of 2-carboxybenzaldehyde dehydrogenase, an enzyme involved in phenanthrene degradation by *Nocardioides* sp. strain KP7. J. Bacteriol. 179(20): 6488-6494.
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Asamizu, E., Kato, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Ishikawa, A., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kiyokawa, C., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Mochizuki, Y., Nakayama, S., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takeuchi, C., Yamada, M., and Tabata, S. 2000. Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. DNA Res. 7(6): 331-8.
- Kasuga, K., Nojiri, H., Yamane, H., Kodama, T., and Omori, T. 1997. Cloning and characterization of the genes involved in the degradation of dibenzofuran by *Terrabacter* sp. strain DBF63. J. Ferment. Bioeng. 84(5): 387-399.
- Komatsu, T., Omori, T., and Kodama, T. 1993. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons acenaphthene and acenaphthylene by a pure bacterial culture. Biosci. Biotech. Biochem. 57(5): 864-865.
- Laurie, A. D., and Lloyd-Jones, G. 1999. The *phn* genes of *Burkholderia* sp. strain RP007 constitute a divergent gene cluster for polycyclic aromatic hydrocarbon catabolism. J. Bacteriol. 181(2): 531-540.
- LaVoie, E. J. and Rice, J. E. 1988. Structure-activity relationships among tricyclic polynuclear aromatic hydrocarbons. In: Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Carcinogenesis: Structure-Activity Relationships. pp. 151-156. vol. 1. Yang, S. K., and Silverman, B. D. (eds.). (n.p.): CRC Press.
- Lederer, W. H. 1985. Acenaphthylene. In: Regulatory Chemicals of Health and Environmental Concern. p.1. Lederer, W. H. (ed.). (n.p.): Van Nostrand Reinhold Company.
- Lee, S., and Cutright, T. J. 1996. Nutrient medium for the bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soils. Environ. Sci. Technol. 14: 1524-1528.

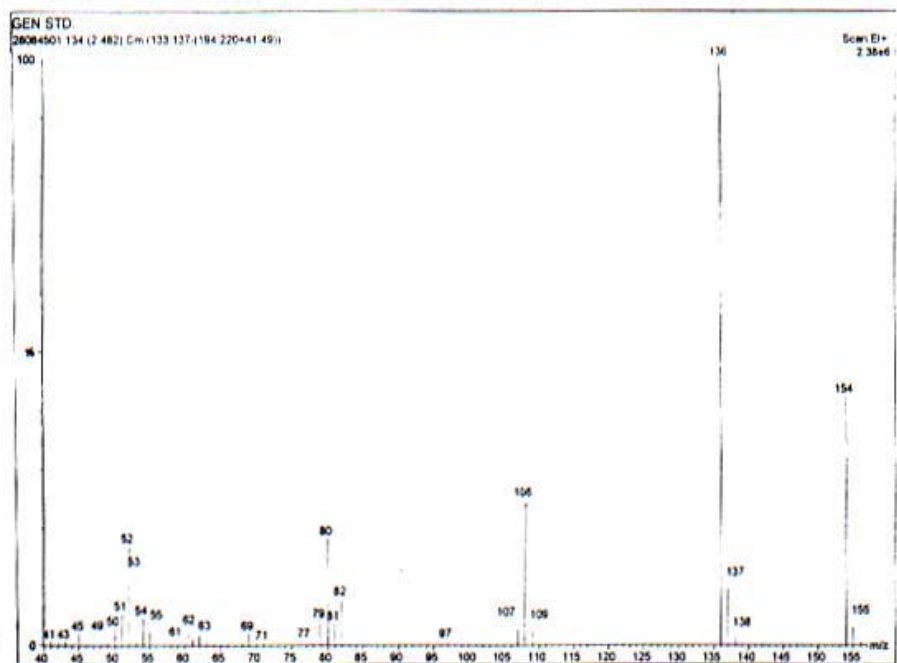
- Manahan, S. E. 1993. Reduction, Treatment, and Disposal of Hazardous waste. In Fundamentals of Environmental Chemistry. pp. 687-720., Manahan, S. E. (ed.). Lewis Publishers.
- Mattox, C. F., and Humanick, M. J. 1980. Organic groundwater contaminants from UCG. *In situ*. 4: 129-151.
- Mueller, J. G., Chapman, P. J., and Pritchard, P. H. 1989. Action of fluorene-utilizing bacterial community on polycyclic aromatic hydrocarbon components of creosote. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 3085-3090.
- Neurath, G. B. 1972. Recent advances in knowledge of the chemical composition of tobacco smoke. In The Chemistry of Tobacco and Tobacco smoke. pp. 77-97., Schmeltz, I. (ed.). Plenum Publishing Corp., New York.
- Ning, Y. Z., Fuenmayor, S. L., and Williams, P. A. 2001. *nag* Genes of *Ralstonia* (Formerly *Pseudomonas*) sp. strain U2 encoding enzymes for gentisate catabolism. *J. Bacteriol.* 183:700-708.
- Phaengthai, S., Pattaragulwanit, K., Pinphanichakarn, P., Juntongjin, K., Omori, T. and Thaniyavarn, S. (2000) Novel acenaphthylene degrading bacterium, *Rhizobium* sp. CU-A1. Proceedings of The 1st Conference on Science & Technology University-Industry Linkages under TJTTP, p242-247.
- Phale, P. S., Mahajan, M. C. and Vaidyyanathan, C. S. 1995. A pathway for biodegradation of 1-naphthoic acid by *Pseudomonas maltophilia* CSV89. *Arch. Microbiol.* 163: 42-47
- Radke, M. 1987. Organic geochemistry of aromatic hydrocarbons. In Advanced in petroleum geochemistry, vol 2. pp. 141-202., J. Brooks and D. Welte. (ed.). Academic Press, London.
- Rao, G.S. 1996 Glutathionyl hydroquinone : a potent pro-oxidant and a possible toxic of benzene. *Toxicology*. 106:49-54.
- Romine, M. F., Still Well, L. C., Wong, K.-K., Thurston, S. J., Sisk, E. C., Sensen, C., Gaasterland, T., Fredrickson, J. K., and Saffer, J. D. 1999. Complete sequence of a 184-kilobase catabolic plasmid form *Sphingomonas aromaticivorans* F199. *J. Bacteriol.* 181(5): 1585-1602.
- Sambrook, J., and Russell, D. W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schocken, M. J., and Gibson, D. T. 1984. Bacterial oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons acenaphthene and acenaphthylene. *Appl. Environ. Microbiol.* 48(1): 10-16.
- Selifenov, S. A., Grifoll, M., Eaton, R. W., and Chapman, P. J. 1996. Oxidation of naphthoaromatic and methyl-substituted aromatic compounds by naphthalene 1,2-dioxygenase. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 507-514.
- Sevaraj, G. and Iyer, V.N. 1983. Suicide plasmid vehicles for insertion mutagenesis in *Rhizobium meliloti* and related bacteria. *J. Bacteriol.* 156:1292-1300.
- Simon, M. J., Osslund, T. D., Saunders, R., Ensley, B. D., Suggs, S., Harcourt, A., Suen, W., Cruden, D. L., Gibson, D. T., and Zylstra, G. J. 1993. Sequences of genes encoding naphthalene dioxygenase in *Pseudomonas putida* strains G7 and NCIB 9816-4. *Gene*. 127: 31-37.
- Simon, R., Prier, U., and Puehler, A. 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio/Technol.* 1: 784-791.

- Starovoitov, K. 1975. Properties of salicylate-5-hydroxylase from *Moraxella osloensis*. J. Bacteriol. 121: 86-91
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S. L., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., and Garber, R. L. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. Nature. 406: 959-964.
- Takizawa, N., Kaida, N., Torigoe, S., Moritani, T., Sawada, T., Satoh, S., and Kiyohara, H. 1994. Identification and characterization of genes encoding polycyclic aromatic hydrocarbon dioxygenase and polycyclic aromatic hydrocarbon dihydrodiol dehydrogenase in *Pseudomonas putida* OUS82. J. Bacteriol. 176: 2444-2449.
- Tongpim, S. and Pickard M.A. 1999. Cometabolic oxidation of phenanthrene to phenanthrene *trans*-9,10-dihydrodiol by *Mycobacterium* strain S1 growing on anthracene in the presence of phenanthrene. Can. J. Microbiol. 45:369-376.
- Vila, J., Lopez, Z., Sabate, L., Minguillon, C., Solanas, A. M., and Grifoll, M. 2001. Identification of a novel metabolite in the degradation of pyrene by *Mycobacterium* sp. strain AP1 : Action of the isolate on two- and three-rings polycyclic aromatic hydrocarbons. Appl. Environ. Microbiol. 67: 5497-5505.
- Volkerling, F. A., Breure, A. M., Sterkenberg, A., and Van Andel, J. G. 1992. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons; effect of substrate availability on bacterial growth kinetics. Appl. Microbiol Biotechnol. 36: 548-552.
- Wilson, S. C., and Jones, K.C. 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. Environ. Pollut. 81: 229-249.
- Weissenfels, W.D., Beyer, M. and Klein, J. 1990. Degradation of phenanthrene, fluorene and fluoranthrene by pure bacterial cultures. Appl. Microbiol. Biotechnol. 32:479-484.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene. 33: 103-119.
- Young, L. Y. and Cerniglia, C. R. 1995. Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals. pp. 286-296. Wiley-Liss, Inc. New York.

ภาคผนวก ก

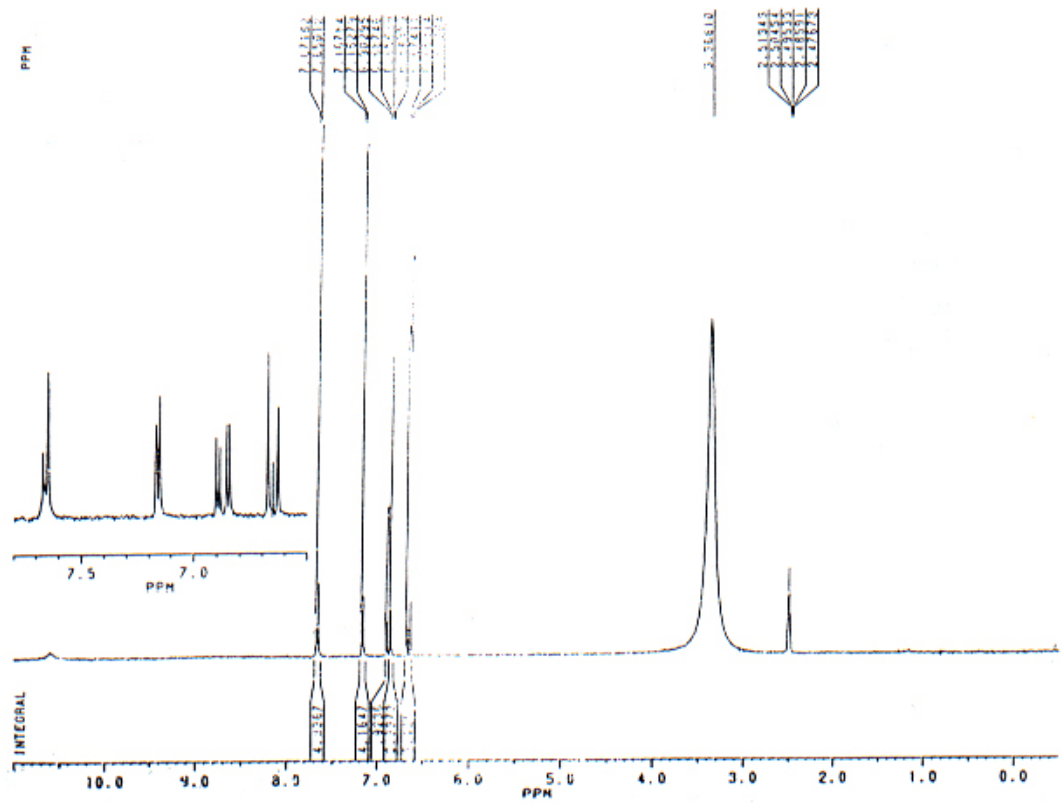


ก.

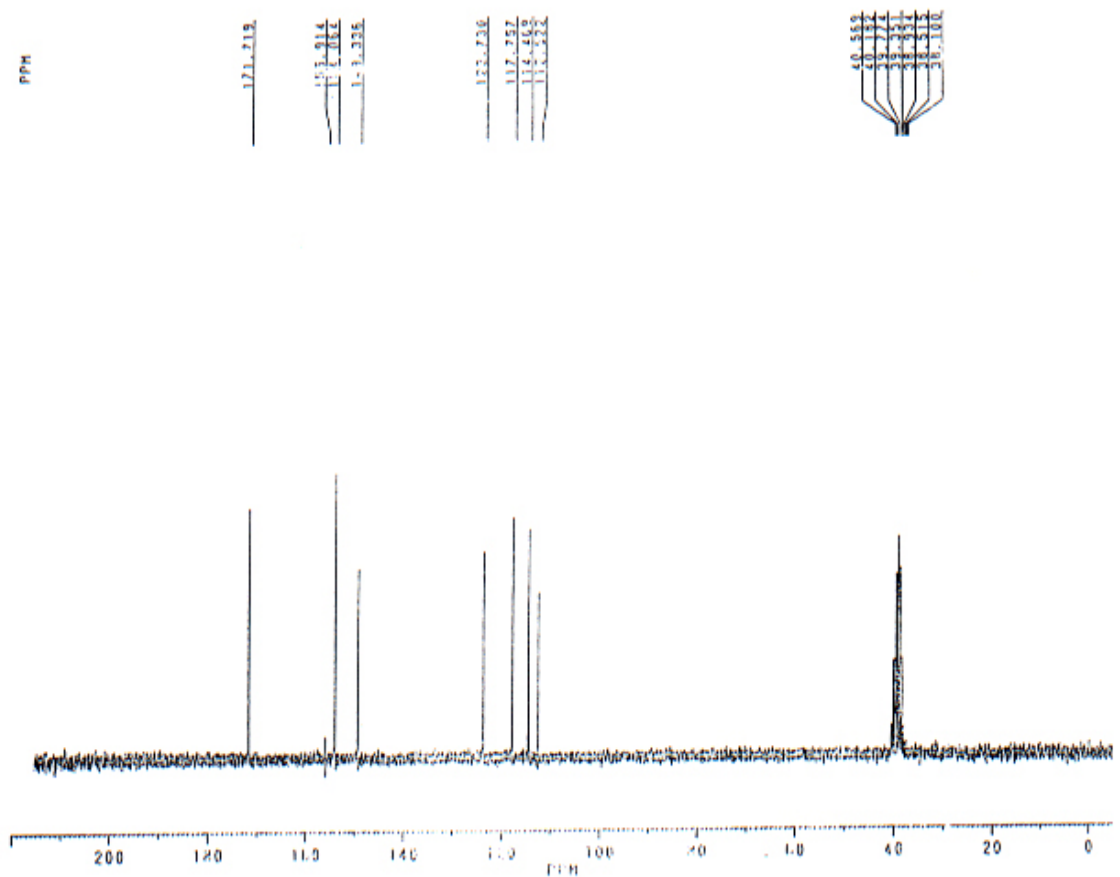


ข.

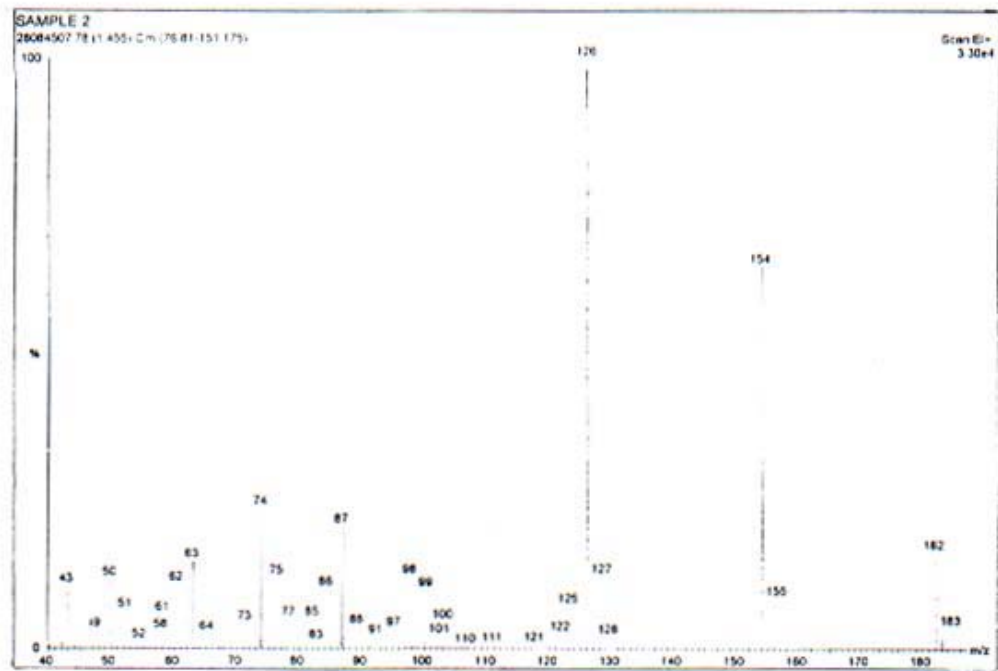
รูปที่ ก1 แมสสเปกตรัมของสารมัยันต์ A53 ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนฟทิลีนโดยสายพันธุ์กลาย A53 (ก.)
เปรียบเทียบกับแมสสเปกตรัมของสารมาตรฐานกรด 2,5-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก (ข.)



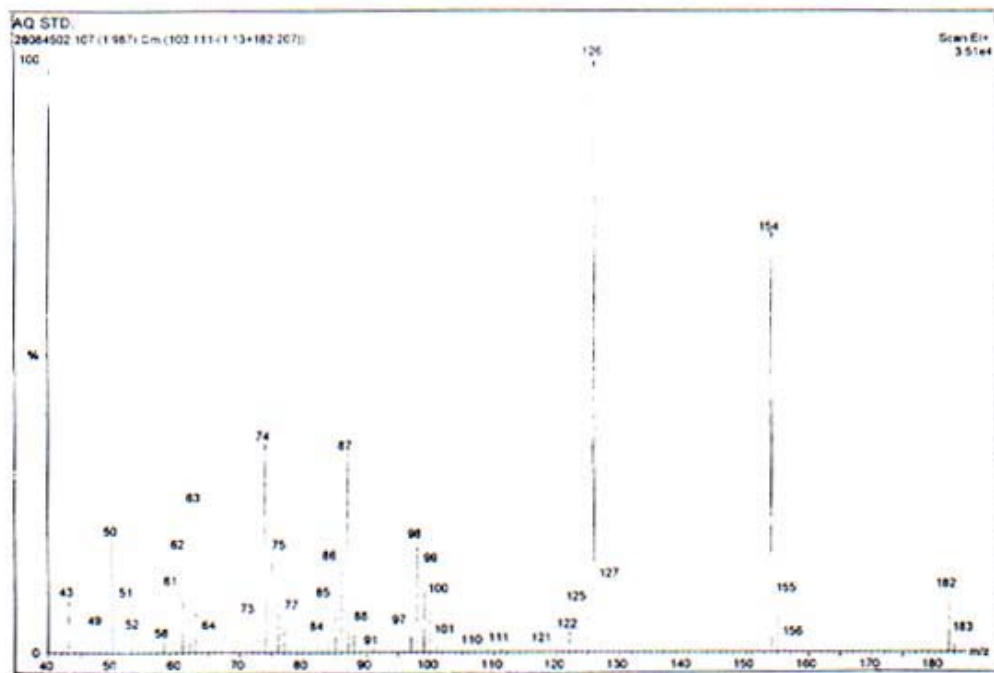
รูปที่ ก2 ¹H NMR สเปกตรัม ของสารมัธยันต์ A53 ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพริลีนโดยสายพันธุ์กลาย A53



รูปที่ ก3 ¹³C NMR สเปกตรัม ของสารมัธยันต์ A53 ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนพริลีนโดยสายพันธุ์กลาย A53

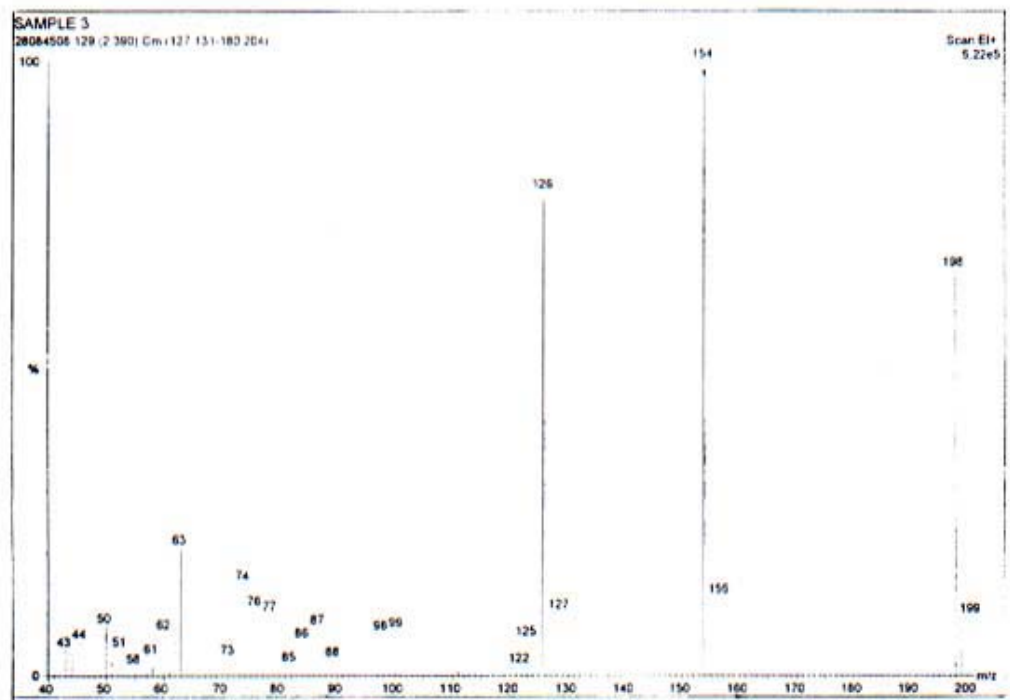


ก.

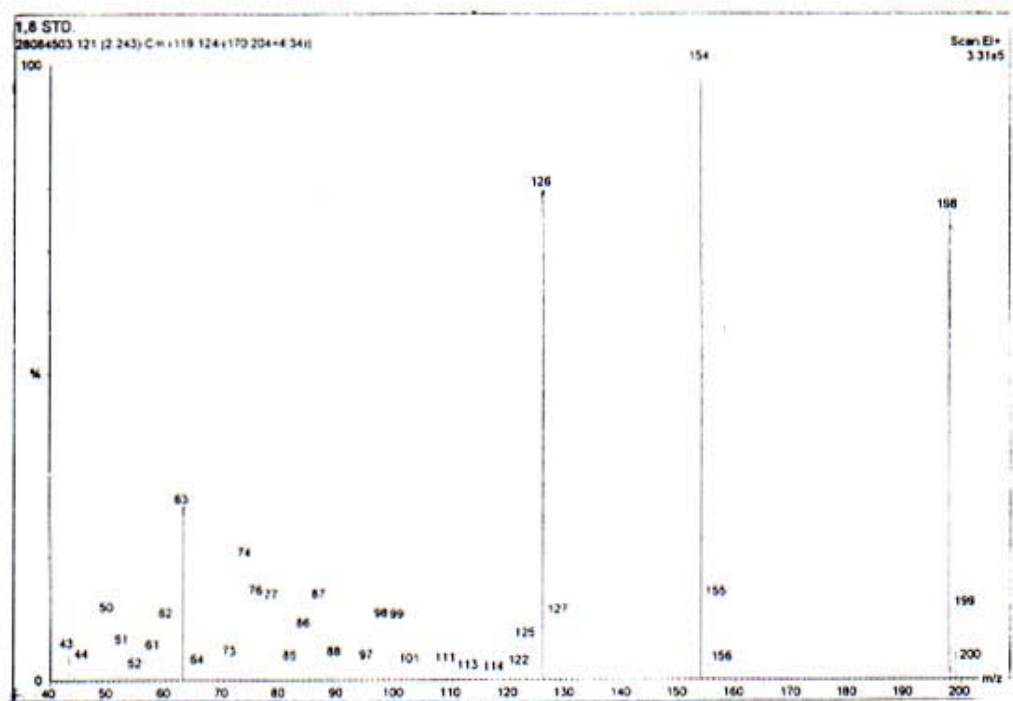


ข.

รูปที่ ก4 แมสสเปกตรัมของสารมัยันต์ B1 ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนฟทิลีนโดยสายพันธุ์กลาย B1 (ก.) เปรียบเทียบกับแมสสเปกตรัมของสารมาตรฐานอะซีแนฟทิลีนควิโนน (ข.)

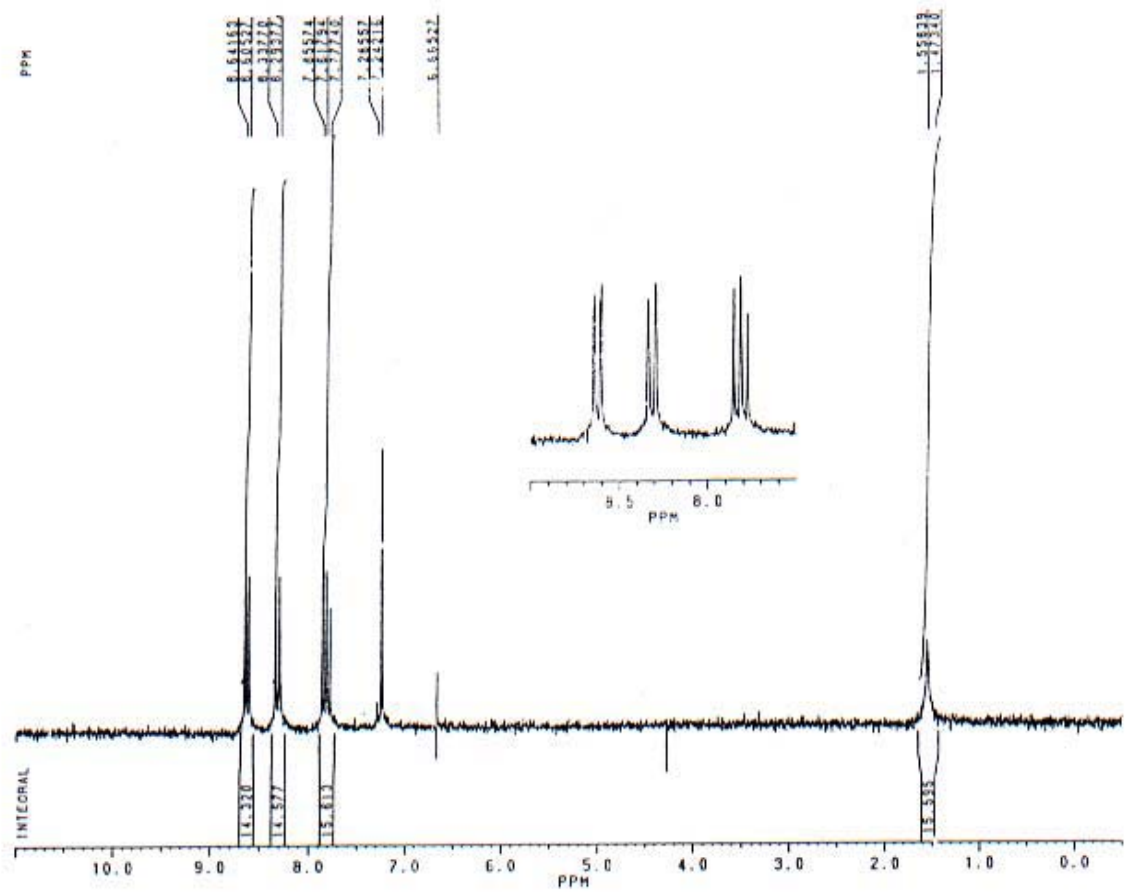


ก.



ข.

รูปที่ ก5 แมสสเปกตรัมของสารมัญยันต์ B5 ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนฟทาลีนโดยสายพันธุ์กลาย B5 (ก.) เปรียบเทียบกับแมสสเปกตรัมของสารมาตรฐาน 1,8-แนพทาลิกแอนไฮไดรด์ (ข.)



รูปที่ ก6 32 ^1H NMR สเปกตรัม ของสารมัธยันต์ B5 ที่สะสมจากการย่อยสลายอะซีแนฟลิโนโดยสายพันธุ์กลาย B5

ภาคผนวก ข

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. manuscript

Pattaragulwanit, K., Poonthrigpun, S., Kriangkripipat, T., Juntongjin, K., Thaniyavarn, S., Petsom, A., and Pinphanichakarn, P. (2004) Novel intermediates of acenaphthylene degradation by *Rhizobium* sp. CU-A1, an evidence for naphthalene-1,8-dicarboxylic acid metabolism.

2. การเผยแพร่ผลงาน

โปสเตอร์งานจุฬาริชาการ ประจำปี 2545 ร่วมกับหน่วยวิจัย Bioremediation

Nintanawongsa, T., Lorratanachaiyong, T., Pinphanichakarn, P., Juntongjin, K., Thaniyavarn, S. and Pattaragulwanit, K. (2003) Isolation and characterization of genes involved in acenaphthylene degradation in *Rhizobium* sp. CU-A1. Abstract, BioThailand 2003, Technology for life. P241 (poster).

Poonthrigpan, S., Petsom, A., Pattaragulwanit, K., Thaniyavarn, S. Juntongjin, K. and Pinphanichakarn, P. (2003) Identification of accumulated intermediates from the degradation of acenaphthylene by *Rhizobium* sp. CU-A1 transposon mutants Abstract, BioThailand 2003, Technology for life. P303 (poster).

Pattaragulwanit, K., Poonthrigpun, S., Lorrattanachaiyong, T., Kriangkripipat, T., Petsom, A., and Pinphanichakarn, P. (2004) Gene involving and intermediate from acenaphthylene degradation by *Rhizobium* sp. CU-A1 Abstract “การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว.” P155 (poster)

**Novel intermediates of acenaphthylene degradation by
Rhizobium sp. CU-A1, an evidence for
naphthalene-1,8-dicarboxylic acid metabolism.**

**Kobchai Pattaragulwanit^{a*}, Siriwat Poonthrigpun^a, Thanyanuch Kriangkripipat^a,
Kanchana Juntongjin^a, Suthep Thaniyavarn^a, Amorn Petsom^b, Pairoh Pinpanichakarn^a**

^aDepartment of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand

^bDepartment of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand

***Corresponding author. Mailing address : Department of Microbiology, Faculty of
Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand
Phone : 66-2218-5070 Fax : 66-2252-7576
E-mail : Kobchai@sc.chula.ac.th**

Introduction

Acenaphthylene is a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) found as constituents of coal tar and tobacco smoke (Neurath, 1972) and organic contaminants of groundwater (Mattox and Humenick, 1980). Acenaphthylene is one of the 16 PAHs listed in priority toxic pollutants compiled by the US Environmental Protection Agency. This compound is well known for causing adverse effects to humans as well as aquatic organisms (Lederer, 1985).

The metabolism of acenaphthylene by mammals and the isolated metabolites have been reported in detail (Hopkins *et al.*, 1962) whereas the metabolic pathways of acenaphthylene by microorganism have been rarely investigated and remain unclear. Schocken and Gibson (1984) reported the ability of *Beijerinckia* sp. to cometabolize acenaphthylene by dioxygenation acenaphthylene to form *cis*-1,2-acenaphthenedihydrodiol, 1,2-dihydroxyacenaphthylene and finally to acenaphthenequinone which cannot further be oxidized. Komatsu *et al.*, (1993) found that the pure culture strain *Pseudomonas* sp. A4 can transform acenaphthylene to 1,8-naphthalenedicarboxylic acid. Although this strain can utilized acenaphthylene and 1,8-naphthalenedicarboxylic acid as a sole carbon and energy source, no metabolite from the oxidation of 1,8-naphthalenedicarboxylic acid was reported in present. Transformation of acenaphthylene to *cis*-acenaphthene-1,2-diol can also be performed by *Pseudomonas aeruginosa* PA01 (pRE695) carrying naphthalene dioxygenase gene cloned from plasmid NAH7. Then, the nonspecific dehydrogenase activities presented in the host strain further oxidized *cis*-acenaphthene-1,2-diol to 1,2-acenaphthenequinone prior to spontaneously ring fission to form naphthalene-1,8-dicarboxylic acid (Selifonov *et al.*, 1996). No further oxidation of naphthalene-1,8-dicarboxylic acid was found. It is also interesting how the microorganism gains the c-atom from naphthalene-1,8-dicarboxylic acid.

In order to accumulate intermediates of acenaphthylene degradation, we mutagenized the strain CU-A1 using transposon Tn5. The accumulated intermediates was purified by TLC and HPLC before subjected to be identified by MS and NMR. In this paper, we describe an novel metabolic intermediate of acenaphthylene degradation lower than naphthalene-1,8-dicarboxylic acid. These results confirmed that the strain CU-A1 can use acenaphthylene as substrate for growth. Moreover, the acenaphthylene degradation pathways were also proposed.

Materials and methods

Bacterial strains and plasmids

Rhizobium sp. CU-A1 was isolated from petroleum contaminated soil in Thailand on the basis of the ability to grow on acenaphthylene as the sole carbon and energy source. (Phaengthai *et al.*, 2000) *Escherichia coli* S17-1 containing the suicide vector pSUP2021 (Simon *et al.* 1983) was used as conjugable transposon Tn5 donor.

Media and growth conditions

Carbon-free mineral medium (CFMM) employed for routinely cultivation of the strain CU-A1 and the mutants thereof was prepared after Kasuga *et al.* (1997). Acenaphthylene and other polyaromatic compounds were solubilized in dimethyl sulfoxide whereas protocatechuic acid in absolute ethanol. All PAHs solution were filter sterilized through a PTFE membrane cartridge (0.2 µm in pore size; Advantec Toyo, Tokyo) and added to CFMM following autoclaving and adjusting pH to 7.5 at a final concentration of acenaphthylene 0.6 g/l, protocatechuic acid 1 g/l and other PAHs 0.1 g/l. *Rhizobium* sp. CU-A1 and mutants thereof were routinely grown at 30 °C: with agitation at 200 rpm . *Rhizobium* sp. CU-A1 and *E. coli* S17-1 were also cultured at 37 °C in LB or 2YT medium (Sambrook and Russel, 1999) Agar plate were prepared by addition of Nobel or Bacto agar 1.5% (w/v). Kanamycin was added at 50 µg/ml. *Rhizobium* sp. CU-A1 and mutants were kept at –70 °C in CFMM supplemented with acenaphthylene or protocatechuic acid, respectively, in 50% glycerin culture.

Transposon mutagenesis

Transposon Tn5 on the suicide vector pSUP2021 was conjugally transferred from *E. coli* S17-1 to *Rhizobium* sp. CU-A1 by filter mating technique. Exponential phase cells of *E. coli* S17-1 as donor and *Rhizobium* sp. CU-A1 as recipient in LB medium were mixed at the donor-to-recipient ratios of 1:1 in a microfuge tube and centrifuged. The pellet was resuspended in 50 µl of the supernatant and transferred to a nitrocellulose membrane (pore size 0.45 µm; Sartorius, Germany) placed on LB agar. After mating 30°C for 18-24 hours, the cell mixture was resuspended in 1 ml 0.85% NaCl and 100-µl portion of an appropriately diluted solution was spreaded onto CFMM agar supplemented with protocatechuic acid and kanamycin. Following incubation at 30°C for 4 days, transconjugants were spotted onto master plates of the same composition.

Selection of acenaphthylene degrading defective mutants

To select acenaphthylene degrading defective mutants, transconjugants were transferred from master plate onto CFMM agar supplemented with kanamycin and acenaphthylene was applied as crystal on the lid. The selection plates were sealed with parafilm and incubated at 30°C up to one week. Mutants can be screened by growth or production of coloured metabolites on selection plated and confirmed by their inability to grow in liquid CFMM with acenaphthalene as sole carbon and energy source within 3 days.

Extraction and purification of acenaphthylene degradation intermediates

For isolation of intermediates, acenaphthylene degrading defective mutants were enriched in CFMM supplemented with protocatechuic acid and kanamycin at 30°C for 24 hours following by centrifugation and washing three times with 0.85% NaCl. The pellet was resuspended in CFMM before transferred to CFMM containing 0.6 g/l acenaphthylene. The culture was cultivated at 30°C with agitation 200 rpm for 5 days before subjected to extract intermediates

After incubation, the culture was acidified to pH 2-3 with 1N HCl and then extracted twice with equal volume of ethyl acetate. The ethyl acetate extracts were pooled together and dried over anhydrous Na₂SO₄ and evaporated to dryness in vacuo at 25 °C. The residue was redissolved in methanol for further purification. Accumulated intermediates were purified by preparative thin-layer chromatography (TLC) (TLC plate silica gel 60 F₂₅₄, Merck, Germany) with hexane:ethyl acetate:acetic acid (10:10:1) as the developing solvent. The major spot was scraped off, eluted with ethyl acetate and submitted to silica gel column chromatography. The column was stepwise-eluted with 0-100% ethyl acetate in hexane with 10% increment for each step. Each fraction was dried over anhydrous Na₂SO₄, evaporated to dryness in vacuo at 25 °C and redissolved in methanol. The resulting intermediates were analysed for their purity by TLC and reversed phase HPLC with ODS column (Shimadzu Scientific, Japan) as described in Nuttapun *et al.* (2000).

Identification of intermediates

The purified intermediates were identified by mass spectrometry using a Trio 2000 mass spectrometry (Fisons Instruments, England). The mass spectrometer was operated at 70 eV of electron ionization energy. Intermediates were identified by comparison of their electron impact (EI) MS spectra with those obtained from authentic samples.

For ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance (NMR) analyses, the metabolite was dissolved in 10% (v/v) deuterated methanol (CD_3OD) in deuterated chloroform (CDCl_3) and analyzed at 500 MHz (JNM-A500 spectrometer, Jeol, Ltd., Tokyo, Japan)

Chemicals

All chemicals used in this study were obtained from Kanto Chemical, Tokyo, Japan or Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany. Bacteriological media were purchased from Difco Laboratories, Detroit, Michigan. Solvents were obtained from Merck, Darmstadt, Germany. All chemicals and solvents were of the highest purity commercially available.

Results and discussion

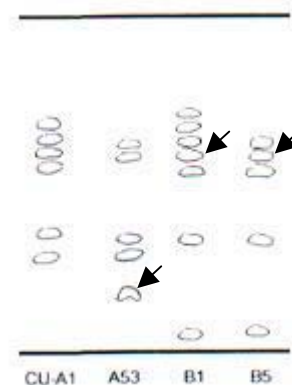
Tn5 transposon mutagenesis and isolation of acenaphthylene degrading defective mutants

In order to study the intermediate of ACN degradation by the strain CU-A1, the transposon mutagenesis experiments were performed so as to block the gene involving ACN degradation pathway. After conjugation using recipient strain CU-A1, the transfer frequency of Tn5 from the donor *E. coli* S17-1 was observed at approximately 4.7×10^{-5} per recipient. No spontaneous kanamycin-resistant mutants derived from *Rhizobium* sp. CU-A1 was found under the same condition. Southern hybridization analysis revealed that Tn5 was randomly inserted at only one site in the chromosomal DNA of each transconjugants (data not shown). From about 15,000 transconjugants obtained, three mutants defective in utilizing acenaphthylene as their sole carbon source were isolated and designated as A53, B1 and B5, respectively.

Isolation and purification of accumulated intermediates

Preliminary determination by analytical TLC of the crude extracts from 14 days-acenaphthylene degradation by the mutant strain A53, B1 and B5 showed the occurrence of spot patterns different from those of wild type strain CU-A1 (Fig 1). Major spots at R_f 0.22, R_f 0.58, R_f 0.58 from strain A53, B1 and B5, named as intermediate I, II and III, respectively were isolated from preparative thin layer chromatography and purified by silica gel column chromatography and eluted with 0-100% ethyl acetate in hexane. HPLC analysis confirmed the purity of intermediates as shown by single peak at retention times (R_t) of 3.23, 2.61 and 2.61 min for intermediate I, II and III respectively.

Fig. 1 Analytical TLC showed accumulated intermediates after 14 days incubation CFMM supplemented with acenaphthylene. Arrows indicated spots of intermediates at R_f 0.22, R_f 0.58, R_f 0.58 from strain A53, B1 and B5, respectively.



Identification of purified intermediates

MS analysis of intermediate I revealed a molecular ion (M^+) at m/z of 154 which was the base peak and fragment ions at m/z 136, 108, 80 and 52 as shown in figure 3. This mass spectral fragmentation pattern and a mass spectral library search suggested that intermediate I was 2,5-dihydroxybenzoic acid (gentisic acid). Its identity was further confirmed by comparing the mass spectra with those of an authentic standard (data not shown). The 1H and ^{13}C NMR spectrum of the metabolite I was also identical to that of 2,5-dihydroxybenzoic acid.

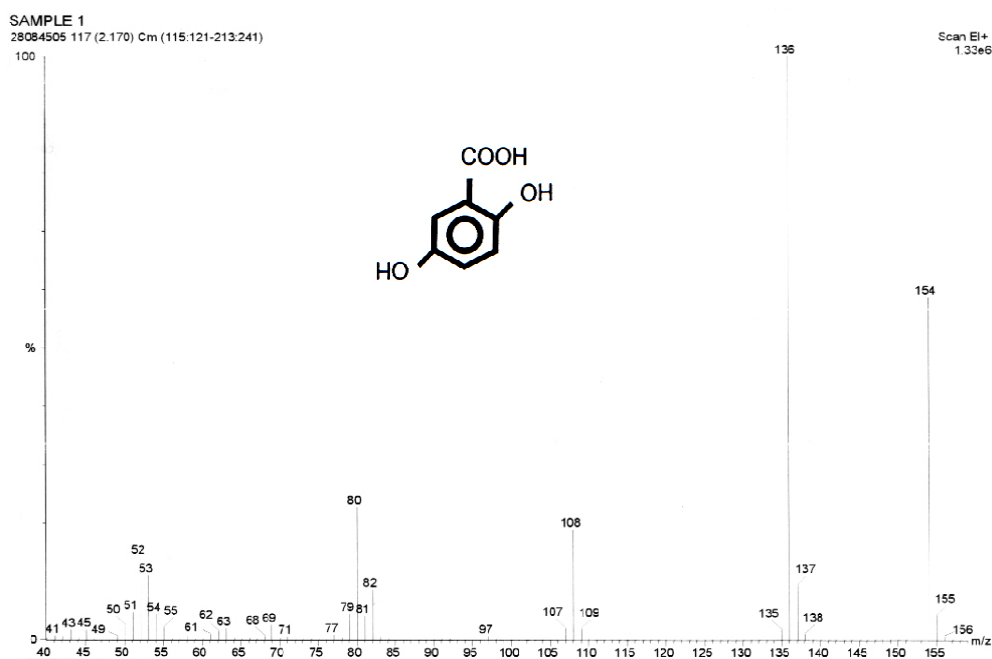


Fig. 2 Mass spectrum of intermediate I isolated from acenaphthylene degradation by *Rhizobium* sp. A53. Mass spectral characteristic of this intermediate is shown in Table 1.

Following a similar approach, intermediate II with R_t of 2.61 min was analysed by MS. The results revealed that the mass spectrum of intermediate II consisted of a molecular ion at m/z of 182 and characteristic fragment ions at m/z values of 154, 126, 98, 87, 74, 63 and 50 and a base peak at an m/z of 182 (Fig. 4). It was identified by comparing the mass spectra with those of an authentic sample as acenaphthenequinone.

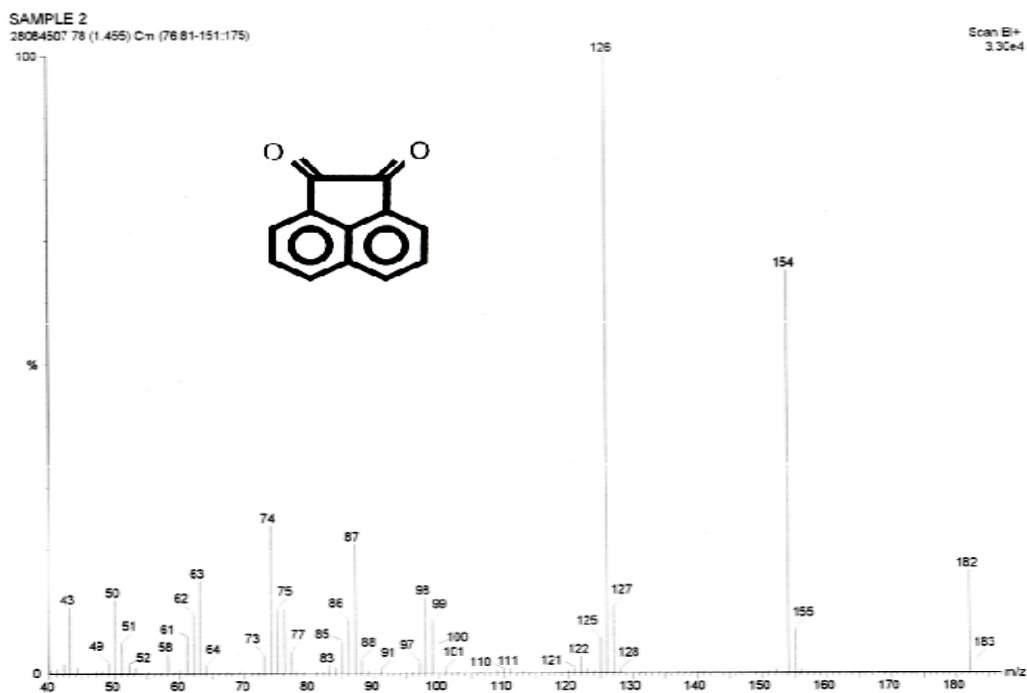


Fig. 3 Mass spectrum of intermediate II isolated from acenaphthylene degradation by *Rhizobium* sp. B1. Mass spectral characteristic of this intermediate is shown in Table 1.

The mass spectrum of intermediate III (R_t 2.61 min) showed an apparent molecular ion at an m/z of 198, fragment ions at m/z of 154, 126, 98, 87, 74, 63 and 50 (Fig. 5). The base peak was at an m/z of 198. Its mass spectra were also similar when compared with those of an authentic standard. Moreover, the ^1H NMR of the metabolite III showed the same spectrum as of 1,8-naphthalic anhydride. Consequently, on the basis of the molecular weight and fragmentation patterns, the intermediate III could be identified as 1,8-naphthalic anhydride which is an acid form of naphthalene-1,8-dicarboxylic acid.

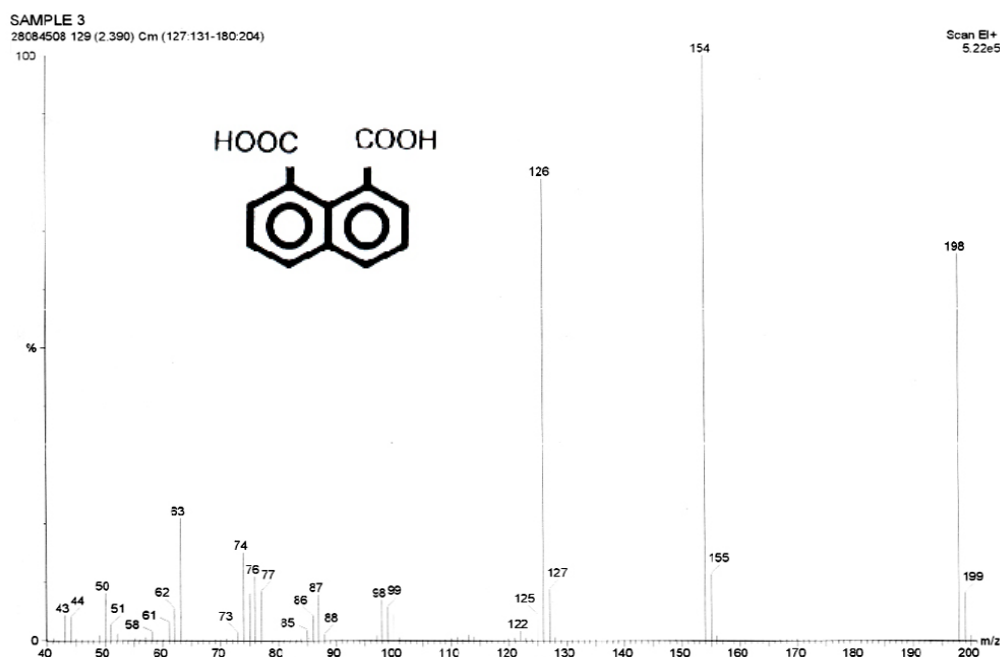


Fig. 4 Mass spectrum of intermediate III isolated from acenaphthylene degradation by *Rhizobium* sp. B5. Mass spectral characteristic of this intermediate is shown in Table 1.

Growth of *Rhizobium* mutant strains on intermediate I, II and III

In order to ensure that these three identified intermediates I, II and III are the accumulated metabolites of acenaphthylene degrading pathway which cannot be used as carbon sources for growth of the mutant comparing with the wild type strain CU-A1, all mutants and wild type strains were culture in CFMM supplemented with each intermediate at the concentration of 300 mg/l for 8 days.

Table 2 Growth of *Rhizobium* sp. CU-A1 and their Tn5 mutants on various substrates.

Growth on	Strains			
	CU-A1	A53	B1	B5
Acenaphthylene	+ ^a	- ^b	-	-
Intermediate I (2,5-dihydroxybenzoic acid)	+	-	+	+
Intermediate II (Acenaphthenequinone)	+	+	+	-
Intermediate III (Naphthalene-1,8-dicarboxylic acid)	+	+	+	-

^a and ^b indicated that the strains can grow or not grow with selected substrates with in 8 days, respectively

Discussion and conclusion

The objective of this study is to identify metabolites from acenaphthylene degradation in *Rhizobium* sp. CU-A1. We therefore induced mutagenesis of this strain using transposon Tn5 as described in previous works (Laurie and Lloyd-Jones, 1999; Simon *et al.*, 1983). Transposon Tn5 can transpose randomly into chromosomal DNA of *Rhizobium* sp. CU-A1 with the efficiency of approximately 4.7×10^{-5} per recipient cells which was comparable to the efficiency obtained from Tn5 mutagenesis of *Rhizobium meliloti* (Simon *et al.*, 1983). Three mutant strains incapable of growing with acenaphthylene as carbon source were selected from about 15,000 transconjugants. After incubation of these mutant strains in CFMM supplemented with acenaphthylene for 14 days, the acidic extract was preliminary analysed by TLC. The result showed that the mutants A53, B1 and B5 had a different TLC pattern from each other and from wild type strain CU-A1 as shown in figure 2. The accumulated intermediates with R_f 0.22, R_f 0.58, R_f 0.58 from strain A53, B1 and B5, named as intermediate I, II and III, respectively, as shown by a major spot with high intensity, were subjected to purify by preparative TLC and HPLC and silica gel column chromatography.

Identification using MS and NMR compared with authentic standard revealed that intermediates I, II and III were 2,5-dihydroxybenzoic acid (gentisic acid), acenaphthenequinone and naphthalene-1,8-dicarboxylic acid, respectively. Acenaphthenequinone and naphthylene-1,8-dicarboxylic acid have been identified as intermediates of acenaphthylene degradation by *Pseudomonas aeruginosa* recombinant strain PA01 (Selifonov *et al.*, 1996) and *Beijerinckia* sp. (Schocken and Gibson, 1984). This compound was reported as a dead-end product of acenaphthene and acenaphthylene oxidation by *Pseudomonas cepacia* F297 (Grifoll *et al.*, 1995) and *Ps. aeruginosa* PA01 and PA01 (pRE695) (Selifonov *et al.*, 1996). On the contrary, *Alcaligenase eutrophus* and *A. paradoxus* could oxidized naphthylene-1,8-dicarboxylic acid which was an intermediate of acenaphthene degradation, to 3-hydroxybenzene-1,2-dicarboxylic acid. However, there was no published data available on the further bacterial metabolism of naphthylene-1,8-dicarboxylic acid.

2,5-dihydroxybenzoic acid (gentisic acid) was newly identified as accumulated intermediate of acenaphthylene metabolism. Gentisic acid was found to be the product of various kinds of PAHs metabolism such as naphthalene via salicylic acid (Fuenmayor *et al.*, 1998.), fluorene (Grifoll *et al.*, 1995). Gentisic acid could be further oxidized by the strain CU-A1 to maleylpyruvate and fumarylpyruvate which are the same as *Raltonia* sp. strain U2 (Ning *et al.*, 2001)

In order to confirm that these compound were actually intermediates of acenaphthylene degradation pathways, the purified intermediates were used as substrate for

growth of wildtype strain CU-A1 and mutant strain A53, B5 and B1. The strain CU-A1 could utilize all substrate and exhibit growth whereas all the mutants could not use acenaphthylene as substrate for growth. The mutant strain A53 could not use 2,5-dihydroxybenzoic acid because this strain lacked of the enzyme involving 2,5-dihydroxybenzoic acid oxidation due to the insertion of transposon in that gene. Therefore A53 could not grow on this substrate. The mutant strain B1 was incapable to utilize acenaphthenequinone which was its accumulated intermediate but it showed the growth on acenaphthenequinone as sole carbon sources. This can be explained by spontaneous chemical transformation of acenaphthenequinone to naphthalene-1,8-dicarboxylic acid (Selifonov *et al.*, 1996) which can be further used as substrate for growth. The mutant strain B5 accumulated naphthalene-1,8-dicarboxylic acid and could not use that substrate for growth as well as acenaphthenequinone whereas 2,5-dihydroxybenzoic acid could be used as growth substrate.

According to the identification of acenaphthenequinone and naphthylene-1,8-dicarboxylic acid, it might be proposed as shown in figure 5 that the early step of acenaphthylene degradation in *Rhizobium* sp. CU-A1 could occur in the same manner as proposed in *P. aeruginosa* PA01 (pRE695) (Selifonov *et al.*, 1996). Acenaphthylene could be dioxygenated to be *cis*-acenaphthene-1,2-diol. After dehydrogenation of *cis*-acenaphthene-1,2-diol, acenaphthenequinone was formed and would be spontaneously oxidized to naphthylene-1,8-dicarboxylic acid.

Naphthylene-1,8-dicarboxylic acid may be decarboxylated one of the carboxyl group on pentene ring of acenaphthylene and hereby was converted to 1-naphthoic acid. This reaction may occur in the same manner as the oxidation of phenanthrene-4,5-dicarboxylic acid, an intermediate of pyrene degradation by *Mycobacterium* sp. AP-1 (Vila *et al.*, 2001) and *Mycobacterium* sp. PYR-1 (Young *et al.*, 1995), in which one carboxyl group was decarboxylated from the substrate and resulted in the formation of phenanthrene-4-carboxylic acid. 1-naphthoic acid might be dioxygenated at position 1,2 resulting in 1,2-dihydroxynaphthalene which would be further oxidized to trans-o-hydroxybenzilidene pyruvic acid and salicylic acid, respectively.

The other possible pathway of 1-naphthoic acid oxidation would be dioxygenation at the position 7,8 of benzene ring of 1-naphthoic acid which contains no carboxyl group. The resulting 1,2-dihydroxy-8-carboxynaphthalene might be oxidized to salicylic acid using the same pathway as described for naphthoic acid degradation by *Pseudomonas maltophilia* CSV89. (Phale *et al.*, 1995) Then, salicylic acid would be metabolised to gentisic acid, maleyl pyruvate and fumaryl pyruvate (Fuenmayor *et al.*, 1998; Ning *et al.*, 2001).

In conclusion, we suggested that *Rhizobium* sp. CU-A1 has ability to cleave the fused five-membered ring of acenaphthylene to form naphthalene-1,8-dicarboxylic acid via acenaphthenequinone. One of the benzene ring of naphthalene-1,8-dicarboxylic acid could further be cleaved to form 2,5-dihydroxybenzoic acid. This ability is consistent with our earlier observation that *Rhizobium* sp. CU-A1 was able to use acenaphthylene as its sole source of carbon and energy. (Phaengthai *et al.*, 2000)

References

- Fuenmayor, S. L., Wild, M., Boyes, A. L., and Williams, P. A. 1998. A gene cluster encoding steps in conversion of naphthalene to gentisate in *Pseudomonas* sp. strain U2. J. Bacteriol. 180: 2522-2530.
- Grifoll, M., Selifenov, S. A., Galtin, C. V., and Chapman, P. J. 1995. Actions of a versatile fluorene-degrading bacterial isolate on polycyclic aromatic compounds. Appl. Environ. Microbiol. 61: 3711-3723.
- Hopkins, R. P., Brooks, C. J. W., and Young, L. 1962. Biochemical studies of toxic agents. 13. The metabolism of acenaphthylene. Biochem. J. 82: 457-466.
- Kasuga, K., Nojiri, H., Yamane, H., Kodama, T., and Omori, T. 1997. Cloning and characterization of the genes involved in the degradation of dibenzofuran by *Terrabacter* sp. strain DBF63. J. Ferment. Bioeng. 84(5): 387-399.
- Komatsu, T., Omori, T., and Kodama, T. 1993. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons acenaphthene and acenaphthylene by a pure bacterial culture. Biosci. Biotech. Biochem. 57(5): 864-865.
- Laurie, A. D., and Lloyd-Jones, G. 1999. The *phn* genes of *Burkholderia* sp. strain RP007 constitute a divergent gene cluster for polycyclic aromatic hydrocarbon catabolism. J. Bacteriol. 181(2): 531-540.
- Lederer, W. H. 1985. Acenaphthylene. In: Regulatory Chemicals of Health and Environmental Concern. p.1. Lederer, W. H. (ed.). (n.p.): Van Nostrand Reinhold Company.
- Mattox, C. F., and Humanick, M. J. 1980. Organic groundwater contaminants from UCG. In situ. 4: 129-151.
- Neurath, G. B. 1972. Recent advances in knowledge of the chemical composition of tobacco smoke. In The Chemistry of Tobacco and Tobacco smoke. pp. 77-97., Schmeltz, I. (ed.). Plenum Publishing Corp., New York.
- Ning, Y. Z., Fuenmayor, S. L., and Williams, P. A. 2001. *nag* Genes of *Ralstonia* (Formerly *Pseudomonas*) sp. strain U2 encoding enzymes for gentisate catabolism. J. Bacteriol. 183:700-708.
- Phaengthai, S., Pattaragulwanit, K., Pinphanichakarn, P., Juntongjin, K., Omori, T. and Thaniyavarn, S. (2000) Novel acenaphthylene degrading bacterium, *Rhizobium* sp. CU-A1. Proceedings of The 1st Conference on Science & Technology University-Industry Linkages under TJTTP, p242-247.
- Phale, P. S., Mahajan, M. C. and Vaidyyanathan, C. S. 1995. A pathway for biodegradation of 1-naphthoic acid by *Pseudomonas maltophilia* CSV89. Arch. Microbiol. 163: 42-47

- Sambrook, J., and Russell, D. W. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schocken, M. J., and Gibson, D. T. 1984. Bacterial oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons acenaphthene and acenaphthylene. Appl. Environ. Microbiol. 48(1): 10-16.
- Selifenov, S. A., Grifoll, M., Eaton, R. W., and Chapman, P. J. 1996. Oxidation of naphthenoaromatic and methyl-substituted aromatic compounds by naphthalene 1,2-dioxygenase. Appl. Environ. Microbiol. 62: 507-514.
- Simon, R., Priefer, U., and Puehler, A. 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. Bio/Technol. 1: 784-791.
- Supaka, N., Pinpanichakarn, P., Pattaragulwanit, K., Thaniyavarn, S., Omori, T. and Junthongjin, K. 2001 Isolation and characterization of a phenanthrene-degrading *Sphingomonas* sp. strain P2 and its ability to degrade fluoranthrene and pyrene via cometabolism. Science Asia 27:21-28.
- Vila, J., Lopez, Z., Sabate, L., Minguillon, C., Solanas, A. M., and Grifoll, M. 2001. Identification of a novel metabolite in the degradation of pyrene by *Mycobacterium* sp. strain AP1 : Action of the isolate on two-and three-rings polycyclic aromatic hydrocarbons. Appl. Environ. Microbiol. 67: 5497-5505.
- Young, L. Y. and Cerniglia, C. R. 1995. Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals. pp. 286-296. Wiley—Liss, Inc. New York.

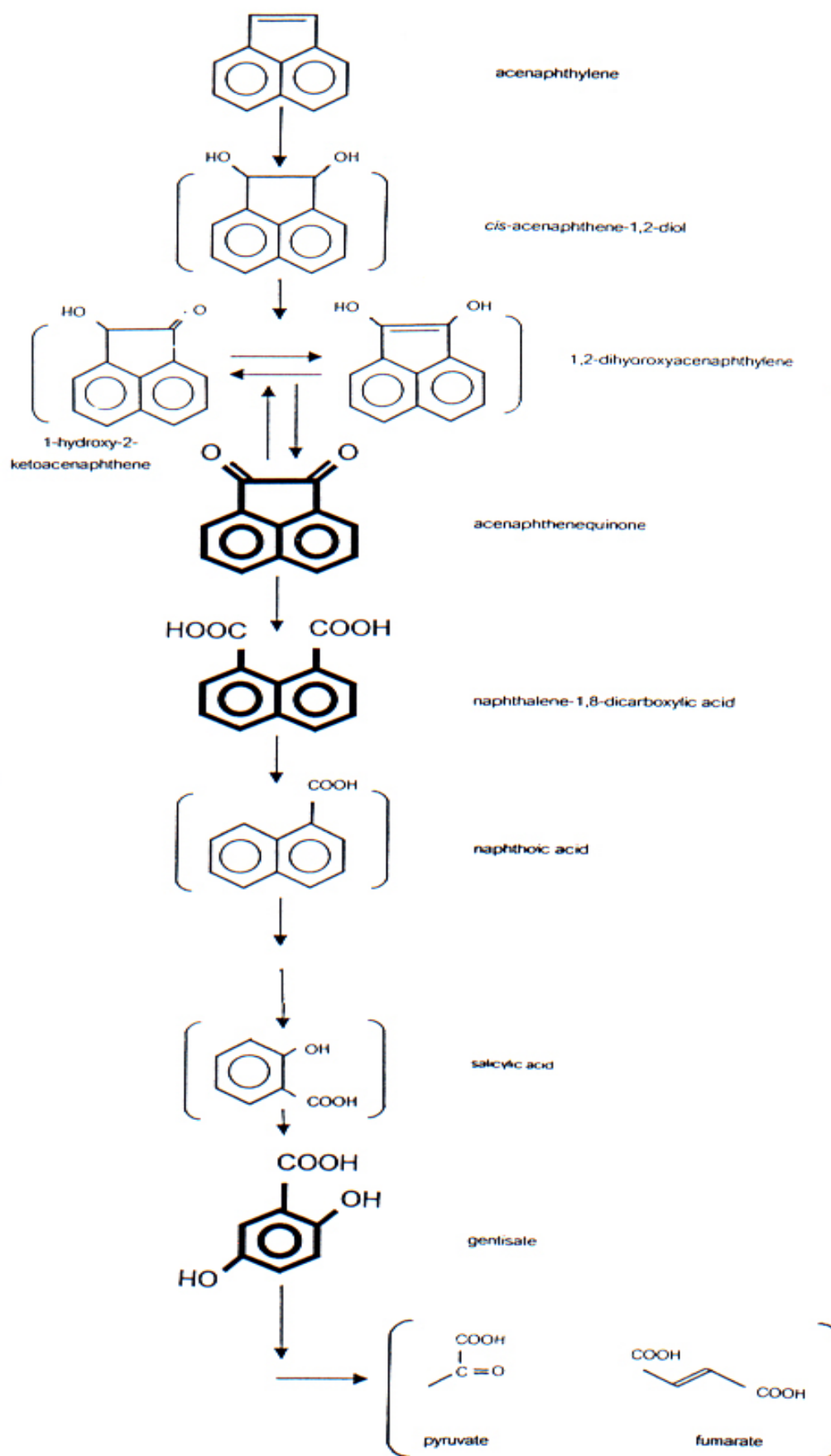


Figure 5 Propose pathway of acenaphthylene degradation by *Rhizobium* sp. strain CU-A1. Pictures printed in bold represent the identified metabolites from this study