SUT3-304-56-12-28

รายงานการวิจัย

การเพิ่มประสิทธิภาพกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ในเชื้อไรโซเบียม โดยใช้เทคนิค metabolic evolution
(Enhancing the efficiency of rhizobial ACC deaminase activity by using metabolic evolution technique)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

SUT3-304-56-12-28

รายงานการวิจัย

การเพิ่มประสิทธิภาพกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ในเชื้อไรโซเบียม โดยใช้เทคนิค metabolic evolution

(Enhancing the efficiency of rhizobial ACC deaminase activity by using metabolic evolution technique)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ศาสตราจารย์ ดร. หนึ่ง เตียอำรุง

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พรรณลดา ติตตะบุตร

นางสาวอาภากร หล่องทองหลาง

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2556

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

พฤษภาคม 2559

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2556 และดำเนินการภายใต้การสนับสนุนทางด้านสถานที่ทดลอง และเครื่องมือวิเคราะห์โดยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี คณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้เกี่ยวข้องทุกท่านที่ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัย

พฤษภาคม 2559

บทคัดย่อ

หัวเชื้อไรโซเบียมถูกนำมาใช้กับการปลูกพืชตระกูลถั่วเพื่อทำหน้าที่ในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศมาเปลี่ยนให้อยู่ในรูปที่พืชใช้ได้ ทั้งนี้นอกจากความสามารถในการตรึงไนโตรเจนแล้ว เชื้อไรโซเบียมบางสายพันธุ์ยังมีกิจกรรมของเอนไซม์ 1-minocyclopropane-1-carboxylate (ACC)-deaminase เพื่อช่วยในการส่งเสริมการเจริญให้กับพืชภายใต้สภาวะเครียดแบบต่าง ๆ แต่อย่างไรก็ตามระดับกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ในเชื้อกลุ่มไรโซเบียมมีไม่สูงมากนักเมื่อเทียบกับเชื้อในกลุ่ม Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) ดังนั้นการใช้เทคนิค metabolic evolution ซึ่งเป็นการปรับปรุงเชื้อให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นโดยอาศัยการปรับตัว และการคัดเลือกทางธรรมชาติเพื่อให้ได้เชื้อที่มีลักษณะหรือคุณสมบัติตามต้องการโดยไม่อาศัยการตัดต่อพันธุกรรม โดยในโครงการวิจัยนี้ได้นำเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ซึ่งเป็นเชื้อที่เข้าสร้างปมและตรึงไนโตรเจนได้ดีกับถั่วเศรษฐกิจหลายชนิด โดยได้พัฒนาให้เชื้อเกิดการปรับตัวเพื่อให้ทนต่อ ACC และยังสามารถใช้ ACC เป็นแหล่งของไนโตรเจนได้ โดยเมื่อตรวจสอบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ของเชื้อ SUTN9-2 ดั้งเดิม พบว่ามีค่ากิจกรรมของเอนไซม์อยู่ที่ 2.92 ± 0.16 μmole of alpa-ketobutyrate/h/mg of protein และเมื่อเชื้อดังกล่าวผ่านกระบวนการเพิ่มระดับกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase พบว่ามีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเป็น 3.20 ± 0.78 และ 3.98 ± 0.04 μmole of alpa-ketobutyrate/h/mg of protein ในสายพันธุ์ SUTN9-2_2.5 และ SUTN9-2_3.0 ตามลำดับ ทั้งนี้ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *acdS* ซึ่งเป็นยีนที่ใช้ในการสังเคราะห์เอนไซม์ ACC deaminase ในแบคทีเรียชนิดนี้ที่เปลี่ยนแปลงไปในเชื้อที่ผ่านการพัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evoluation ทั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงไป 2 ตำแหน่ง คือ G (ลำดับเบสที่ 419) และ C (ลำดับเบสที่ 843) เปลี่ยนไปเป็น A และ T เมื่อเทียบกับเชื้อดั้งเดิม และผลจากการเปลี่ยนไปของลำดับนิวคลีโอไทด์ ณ ตำแหน่งที่ 419 ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนไปจาก S หรือ serine (Ser/S) ใน SUTN9-2 ดั้งเดิม ไปเป็น N หรือ Asparagine (Asn/N) ในเชื้อที่ผ่านการพัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ทั้งสองสายพันธุ์ และเมื่อทดสอบความเสถียรของกิจกรรมเอนไซม์นี้ พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ที่วัดจากเชื้อ SUTN9-2_2.5 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่คงที่ เมื่อเลี้ยงติดต่อกัน 3 รุ่น ในขณะที่ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ใน SUTN9-2_3.0 ไม่มีความเสถียร โดยพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Abstract

Rhizobium inoculant was applied with legumes in order to fix nitrogen from the air and turn to be fertilizer for the plant. Some strains of rhizobium not only contain nitrogen fixation ability but also having the activity of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase enzyme to promote plant growth under stress conditions. However, the level of ACC deaminase activity in rhizobia is usually lower than that of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). To improve the activity of this enzyme in rhizobium, the metabolic evolution technique which is the technique that can improve the ability of strain through the natural adaptation under the selected pressure was interested to be used to improve the ACC deaminase activity of rhizobial strain without genetic engineering method. *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 was used as a model in this study since this strain could symbiosis well with several economic legumes. The results showed that the metabolic evoluted strains could adapt itself tolerate to high concentration of ACC and used it as N-source. The ACC deaminase activity of SUTN9-2 wild-type was 2.92 ± 0.16 μmole of alpa-ketobutyrate/h/mg of protein, while the enzyme activity of metabolic evoluted strains, SUTN9-2_2.5 and SUTN9-2_3.0 increased into 3.20 ± 0.78 and 3.98 ± 0.04 μmole of alpa-ketobutyrate/h/mg of protein, respectively. The nucleotide sequence of *acdS* which involved in biosynthesis of ACC deaminase enzyme in these bradyrhizobia was determined. The result showed that both metabolic evoluted strains had 2 positions of nucleotide change, at position 419 changed from G to A, and at position 843 changed from C to T. Base changes resulted in changing amino acid in one position from serine (S) to asparagene (N) in both metabolic evoluted strains. The stability of enzyme activity was also investigated and it was found that the enzyme activity of metabolic evoluted strain SUTN9-2_2.5 was stable after 3 consecutive generations of growth, while the enzyme activity significantly decreased in strain SUTN9-2_3.0.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	จ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	1
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	1
1.4 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	2
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	3
2.1 การเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase โดยเทคนิค metabolic evolution	3
2.2 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase	3
2.3 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของยีน และความเสถียรของเอนไซม์ ACC deaminase ในเชื้อไรโซเบียมที่ผ่านการพัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution	3
2.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ	4
บทที่ 3 ผลการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูล	5
3.1 การเพิ่มระดับกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase โดยใช้เทคนิค metabolic evolution	5
3.2 กิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ในเชื้อไรโซเบียมที่ผ่านการพัฒนาโดยใช้เทคนิค metabolic evolution	7
3.3 ข้อมูลทางพันธุกรรม และความเสถียร (genetic stability) ของการสร้างเอนไซม์ ACC- deaminase	8
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง	11
เอกสารอ้างอิง	12

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase เปรียบเทียบกันระหว่างเชื้อดั้งเดิมกับสายพันธุ์ที่ผ่านกระบวนการเพิ่มระดับกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase โดยใช้เทคนิค metabolic evolution (SUTN9-2_2.5 และ SUTN9-2_3.0)..... 8

ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *acdS* ใน SUTN9-2 ดั้งเดิม และที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution..... 9

ตารางที่ 3 ลำดับกรดอะมิโนของยีน *acdS* ในเชื้อ SUTN9-2 ดั้งเดิม และที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution..... 10

ตารางที่ 4 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ของเชื้อที่ผ่านกระบวนการเพิ่มระดับกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase หลังเลี้ยงเชื้อดังกล่าวต่อเนื่องกัน 3 รุ่น 10

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 แสดงผลของความเข้มข้นของ ACC (2.5, 3.0, 3.5 มิลลิโมลาร์) ที่มีต่อการเจริญของแบคทีเรียเปรียบเทียบกันระหว่าง SUTN9-2 ดั้งเดิม และ SUTN9-2 ที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution (SUTN9-2_2.5 และ SUTN9-2_3.0)..... 6

รูปที่ 2 แสดงผลของจำนวนเซลล์แบคทีเรีย SUTN9-2 ดั้งเดิม และ SUTN9-2 ที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution (SUTN9-2_2.5 และ SUTN9-2_3.0) ก่อนเลี้ยงในอาหารที่มี ACC ความเข้มข้น 2.5, 3.0 และ 3.5 มิลลิโมลาร์ เปรียบเทียบกับหลังการเลี้ยงในอาหารที่มี ACC ที่ระยะเวลา 10 วัน..... 7

รูปที่ 3 แสดงผล Alignment ของกรดอะมิโน ของเอมไซม์ ACC deaminase ของเชื้อ SUTN9-2 ดั้งเดิม และ SUTN9-2 ที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution (SUTN9-2_2.5 และ SUTN9-2_3.0), *Pseudomonas putida* UW4 และ *Hansenula saturnus*.. 10

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

เชื้อไรโซเบียมบางสายพันธุ์ยังมีกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase เพื่อช่วยในการลดความเครียดให้แก่พืชเมื่อต้องเจริญภายใต้สภาวะเครียดจากสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ เช่น การปลูกถั่วในสภาวะดินเปรี้ยว ดินเค็ม ขาดน้ำ หรือสภาวะน้ำท่วมขัง เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามระดับกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ในเชื้อกลุ่มไรโซเบียมมีไม่สูงมากนักเมื่อเทียบกับเชื้อในกลุ่ม Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) ดังนั้นหากสามารถเพิ่มระดับกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ในเชื้อไรโซเบียมได้ก็จะทำให้มีประโยชน์และมีประสิทธิภาพมากขึ้น การเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ในเชื้อไรโซเบียมสามารถทำได้โดยเทคนิคทางด้าน genetic engineering ซึ่งในขณะนี้ยังไม่เป็นที่ยอมรับในการนำ genetically modified organism (GMO) ไปใช้ในระบบการเกษตร ดังนั้นแนวทางที่จะหลีกเลี่ยงการใช้ GMO ได้คือ การใช้เทคนิค metabolic evolution ซึ่งเป็นการปรับปรุงเชื้อให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นโดยอาศัยการปรับตัว และการคัดเลือกทางธรรมชาติเพื่อให้ได้เชื้อที่มีลักษณะหรือคุณสมบัติตามต้องการโดยไม่อาศัยการตัดต่อพันธุกรรม ดังนั้นจึงสามารถนำเชื้อที่ผ่านการพัฒนาหรือปรับปรุงคุณสมบัติโดยใช้เทคนิคนี้ไปใช้ในสภาพไร่ได้จริง อันจะเป็นแนวทางการพัฒนาหัวเชื้อไรโซเบียมให้มีคุณสมบัติที่ดีขึ้นและนำไปใช้ได้จริงต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อให้ได้เชื้อไรโซเบียมที่มีระดับกิจกรรมของเอนไซม์ ACC- deaminase เพิ่มขึ้นโดยใช้เทคนิค metabolic evolution
2. เพื่อให้ทราบระดับกิจกรรมของเอนไซม์ ACC- deaminase ในเชื้อไรโซเบียมที่ผ่านการพัฒนาโดยใช้เทคนิค metabolic evolution
3. เพื่อให้ทราบข้อมูลทางพันธุกรรม และความเสถียร (genetic stability) ของยีนที่ใช้ในการสร้างเอนไซม์ ACC deaminase ที่เปลี่ยนแปลงไปของเชื้อไรโซเบียมที่ผ่านการปรับปรุงโดยใช้เทคนิค metabolic evolution

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ดำเนินการปรับปรุงเชื้อไรโซเบียมต้นแบบให้มีระดับกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase เพิ่มขึ้นโดยใช้เทคนิค metabolic evolution แล้วตรวจสอบระดับกิจกรรมของเอนไซม์ที่เปลี่ยนไปเปรียบเทียบกับเชื้อดั้งเดิม จากนั้นทำการคัดแยกยีนที่ใช้ในการสร้างเอนไซม์ ACC deaminase จากเชื้อที่ผ่านการปรับปรุงโดยใช้เทคนิค metabolic evolution แล้วตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงในระดับพันธุกรรมของยีนเปรียบเทียบกับเชื้อดั้งเดิม

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้เชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ที่มีระดับกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase เพิ่มมากขึ้นโดยใช้เทคนิค metabolic evolution
2. ได้ทราบข้อมูลการเปลี่ยนแปลงของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ ACC deaminase ในเชื้อไรโซเบียมที่ผ่านการปรับปรุงโดยใช้เทคนิค metabolic evolution
3. เกษตรกร สามารถนำเชื้อที่พัฒนาได้แล้วไปใช้ได้ต่อไปในสภาพไร่

บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase โดยเทคนิค metabolic evolution

1. นำเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 มาตรวจสอบความสามารถในการเจริญในอาหารเหลว (minimal medium + 10% HM ที่มีสาร ACC เป็นองค์ประกอบในปริมาณต่าง ๆ (1, 2, 3, 4, 5 มิลลิโมลาร์) เพื่อตรวจสอบปริมาณของสาร ACC ที่มากที่สุดที่เชื้อไรโซเบียมชนิดนี้สามารถเจริญได้โดยไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ แล้วตรวจสอบอัตราการเจริญของเชื้อ (growth rate)

2. ทำการเพิ่มระดับกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase โดยใช้เทคนิค metabolic evolution โดยเลี้ยงเซลล์ในอาหาร minimal medium + 10% HM ที่มีสาร ACC เป็นองค์ประกอบในระดับความเข้มข้นที่เชื้อยังคงเจริญได้ จากนั้นเมื่อเชื้อเจริญเข้าสู่ระยะ mid log phase ให้นำเชื้อที่ได้มาเป็น starter เพื่อทำการปลูกเชื้อต่อไปในอาหาร minimal medium ที่มีการลดปริมาณส่วนผสมของอาหาร YEM ลงตามลำดับ จนกระทั่งได้เชื้อที่สามารถเจริญได้ใน minimal medium ที่มี ACC ในระดับความเข้มข้นเท่าเดิมเป็นองค์ประกอบโดยมีการเติม 10% HM ที่ใช้ Yeast Extract เป็นมีส่วนประกอบเพียง 50% จากนั้นทำการเพิ่มระดับความเข้มข้นของสาร ACC ในอาหารเลี้ยงเชื้อตามลำดับ จนได้เชื้อที่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีปริมาณ ACC สูงได้ต่อไป ทั้งนี้จะทำการเก็บเชื้อไรโซเบียมในแต่ละระดับของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ ACC ไว้ใน -80°C เพื่อนำเชื้อในแต่ละระดับมาตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ที่เปลี่ยนแปลงไปโดยเปรียบเทียบกับเชื้อดั้งเดิม (wild-type) (Jantama et al., 2008) ในขั้นตอนต่อไป

2.2 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase

นำเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 ที่ได้ผ่านการพัฒนาโดยใช้เทคนิค metabolic evolution ในแต่ละระดับของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ ACC มาตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase โดยเปรียบเทียบกับเชื้อ *Sinorhizobium* sp. BL3 ตามวิธีการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase โดยใช้ spectrophotometer ตามวิธีการของ Tittabutr et al. (2008)

2.3 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของยีน และความเสถียรของเอนไซม์ ACC deaminase ในเชื้อไรโซเบียมที่ผ่านการพัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution

1. ทำการคัดแยกยีนที่ใช้ในการสร้างเอนไซม์ ACC deaminase หรือ ยีน *acdRS* ออกจากเชื้อไรโซเบียมที่มีระดับกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase เพิ่มขึ้นจากการปรับปรุงโดยใช้เทคนิค

metabolic evolution ทั้งนี้คัดแยกยีนออกมาด้วยเทคนิค PCR-cloning โดยใช้ primers ที่จำเพาะกับยีน *acdRS* ของเชื้อ *Bradyrhizobium* sp. SUTN9-2 แล้วเชื่อมต่อเข้ากับ pGT19-T vector

2. ตรวจสอบลำดับเบส (DNA sequencing) ของยีนที่คัดแยกได้เปรียบเทียบกับยีนของเชื้อดั้งเดิมเพื่อให้ทราบข้อมูลทางพันธุกรรมของยีนที่ใช้ในการสร้างเอนไซม์ ACC deaminase ที่เปลี่ยนแปลงไปของเชื้อไรโซเบียมที่ผ่านการปรับปรุงโดยใช้เทคนิค metabolic evolution

3. ตรวจสอบความเสถียรทางพันธุกรรม (genetic stability) ของเชื้อไรโซเบียมที่ผ่านการปรับปรุงโดยใช้เทคนิค metabolic evolution โดยทำการเลี้ยงเชื้อไรโซเบียมนี้ในอาหาร HM ที่ไม่มีการเติมสาร ACC โดยทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 180 rpm ทำเช่นนี้ต่อเนื่องกัน 3 generation แล้วตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ของเชื้อที่เปลี่ยนแปลงไปในแต่ละ generation

2.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

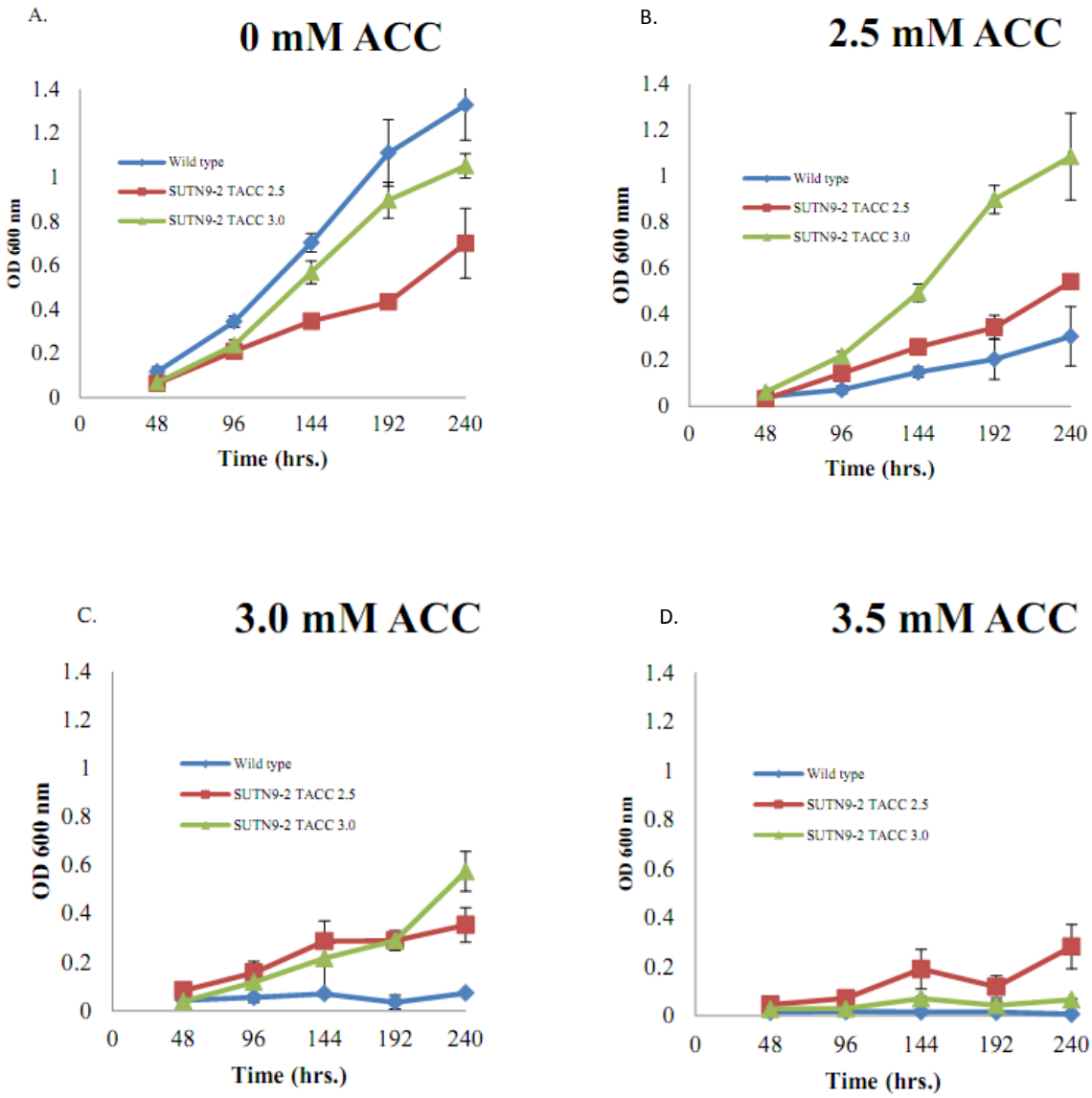
ผลการทดลองจำนวน 5 ซ้ำ ที่ได้จากแต่ละการทดลอง ได้นำมาวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม SPSS version 17 Windows (SPSS Inc., Chicago, IL) โดยวิเคราะห์ Anova และ Duncan’s multiple range test (Duncan 1955)

บทที่ 3
ผลการวิเคราะห์และอภิปรายผลการทดลอง

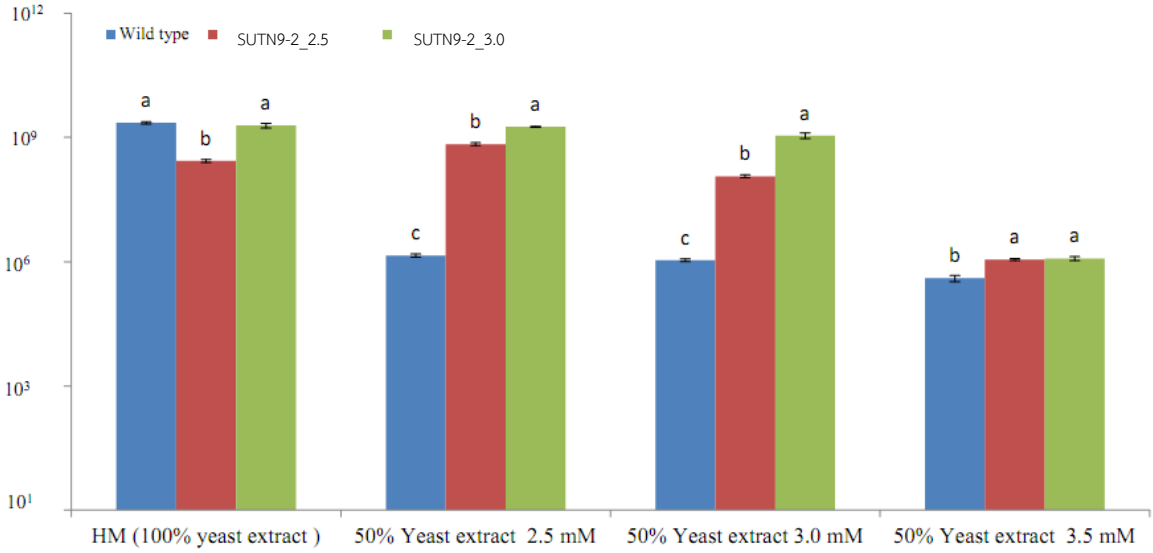
3.1 การเพิ่มระดับกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase โดยใช้เทคนิค metabolic evolution

เมื่อนำเชื้อไรโซเบียมที่ผ่านการเพิ่มระดับกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase มาเลี้ยงในอาหารที่มี ACC ที่มีความเข้มข้นต่างๆ กัน พบว่าไรโซเบียมที่ผ่านการเพิ่มระดับกิจกรรมของเอนไซม์โดยใช้เทคนิค metabolic evolution สามารถเจริญได้ในอาหารที่มี ACC และเจริญได้ดีกว่า SUTN9-2 ดั้งเดิม (รูปที่ 1) อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของ ACC ที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อการเจริญของเชื้อเมื่อเทียบกับอาหารที่ไม่มี ACC ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ACC มีผลต่อการเจริญของเชื้อในด้านของความเป็นพิษต่อเซลล์ ดังนั้นการที่เชื้อจะสามารถเจริญได้เชื้อดังกล่าวจำเป็นต้องมีระบบการกำจัด คือมีความสามารถในการย่อยสลายสารดังกล่าวให้อยู่ในรูปที่ไม่เป็นพิษ หรือเชื้อดังกล่าวอาจมีระบบป้องกันสารพิษที่เชื้อพัฒนาขึ้นเพื่อให้เซลล์ทนต่อสารดังกล่าวได้ ดังนั้นรูปที่ 2 ได้แสดงให้เห็นว่าเชื้อที่ผ่านกระบวนการเพิ่มระดับกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase โดยใช้เทคนิค metabolic evolution มีการปรับตัวโดยการพัฒนากลไกบางอย่างที่จะทำให้เซลล์ทนต่อความเป็นพิษของ ACC ได้ ในรูปที่ 2 นี้จะเห็นว่า SUTN9-2 สายพันธุ์ดั้งเดิม มีจำนวนของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างอาหาร HM (100% Yeast Extract) ซึ่งเป็นจำนวนเซลล์ก่อนเลี้ยงในอาหารที่มี ACC กับ HM (50% Yeast extract) ที่ปรับความเข้มข้นของสาร ACC ให้เป็น 2.5, 3.0 และ 3.5 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 10 วัน กราฟดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า สายพันธุ์ไรโซเบียมที่ผ่านกระบวนการเพิ่มระดับกิจกรรมของเอนไซม์มีจำนวนเซลล์ไม่แตกต่างกันทั้งที่เลี้ยงในอาหาร HM (50% Yeast extract) ที่เติม ACC 2.5 และ 3.0 มิลลิโมลาร์ กับอาหาร HM (100% Yeast Extract) อย่างไรก็ตามอาหาร HM (50% Yeast extract) ที่เติม ACC 3.5 มิลลิโมลาร์ มีผลทำให้จำนวนของเซลล์ลดลงจากเดิมที่มีจำนวนเซลล์อยู่ที่ประมาณ 10^8 ถึง 10^9 ทั้งในเชื้อดั้งเดิม และเชื้อที่ผ่านกระบวนการเพิ่มระดับกิจกรรมของเอนไซม์ เหลืออยู่ที่ประมาณ 10^6 CFU/ml หลังเลี้ยงในอาหารที่มี ACC เป็นเวลา 10 วัน ดังนั้นจะเห็นว่า เทคนิค metabolic evolution มีผลทำให้เชื้อเกิดการปรับตัวเพื่อให้ทนต่อ ACC และยังสามารถใช้ ACC เป็นแหล่งของไนโตรเจนได้ เพราะมีการเจริญของเชื้อที่ความเข้มข้นของ ACC ต่ำ ๆ ในอาหารที่ลดปริมาณของ yeast extract ลง 50% เมื่อเทียบกับเชื้อดั้งเดิม ดังนั้นมีความเป็นไปได้ที่เทคนิค metabolic evolution นอกจากจะมีผลทำให้เชื้อเกิดการปรับตัวเพื่อให้ทนต่อ ACC แล้วยังอาจปรับปรุงกิจกรรมของเอนไซม์

ACC deaminase ให้เพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าวในเชื้อที่พัฒนาแล้วนี้ต่อไปเปรียบเทียบกับเชื้อดั้งเดิม



รูปที่ 1 แสดงผลของความเข้มข้นของ ACC (2.5, 3.0, 3.5 มิลลิโมลาร์) ที่มีต่อการเจริญของแบคทีเรียเปรียบเทียบกันระหว่าง SUTN9-2 ดั้งเดิม และ SUTN9-2 ที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution (SUTN9-2_2.5 และ SUTN9-2_3.0)



รูปที่ 2 แสดงผลของจำนวนเซลล์แบคทีเรีย SUTN9-2 ดั้งเดิม และ SUTN9-2 ที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution (SUTN9-2_2.5 และ SUTN9-2_3.0) ก่อนเลี้ยงในอาหารที่มี ACC ความเข้มข้น 2.5, 3.0 และ 3.5 มิลลิโมลาร์ เปรียบเทียบกับหลังการเลี้ยงในอาหารที่มี ACC ที่ระยะเวลา 10 วัน

3.2 กิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ในเชื้อไรโซเบียมที่ผ่านการพัฒนาโดยใช้เทคนิค metabolic evolution

เทคนิค metabolic evolution นอกจากจะมีผลทำให้เชื้อเกิดการปรับตัวเพื่อให้ทนต่อ ACC แล้วยังมีผลในการปรับปรุงกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ให้เพิ่มขึ้น ตารางที่ 1 ได้แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ที่เปรียบเทียบกันระหว่างเชื้อดั้งเดิม (SUTN9-2 wild type) และ สายพันธุ์ที่ผ่านกระบวนการเพิ่มระดับกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase พบว่าสายพันธุ์ SUTN9-2_2.5 และ SUTN9-2_3.0 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase เพิ่มขึ้น โดยจากเดิมอยู่ที่ประมาณ 2.92 ± 0.16 µmole of alpa-ketobutyrate/h/mg of protein เพิ่มขึ้นเป็น 3.20 ± 0.78 และ 3.98 ± 0.04 µmole of alpa-ketobutyrate/h/mg of protein ตามลำดับ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นในเชื้อ SUTN9-2_2.5 และ SUTN9-2_3.0 มีความเป็นไปได้ที่อาจเกิดการเปลี่ยนของลำดับเบสซึ่งส่งผลต่อการสร้างโปรตีนในส่วนที่อาจจะเป็น active site ของเอนไซม์ซึ่งอาจส่งผลทำให้เอนไซม์สามารถเข้าจับกับสารตั้งต้นได้ดีขึ้น และส่งผลต่อการทำปฏิกิริยากันระหว่างเอนไซม์และสาร

ตั้งต้นที่ดีขึ้น ดังนั้นการตรวจสอบลำดับเบสของยีนที่เกี่ยวข้องต่อการแสดงออกของเอนไซม์ ACC deaminase จึงเป็นสิ่งที่สำคัญและดำเนินการต่อดังที่ได้แสดงผลในการทดลองต่อจากนี้

ตารางที่ 1 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase เปรียบเทียบกันระหว่างเชื้อดั้งเดิมกับสายพันธุ์ที่ผ่านกระบวนการเพิ่มระดับกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase โดยใช้เทคนิค metabolic evolution (SUTN9-2_2.5 และ SUTN9-2_3.0)

Sample codes	ACC –deaminase activity (μmole of alpa-ketobutyrate/h/mg of protein)
SUTN9-2 wild type	2.92 ± 0.16c
SUTN9-2_2.5	3.20 ± 0.78bc
SUTN9-2_3.0	3.98 ± 0.04ba
Sinorhizobium sp. BL3	4.77 ± 0.48a

There is a significant difference at a *P* value of 0.05

3.3 ข้อมูลทางพันธุกรรม และความเสถียร (genetic stability) ของการสร้างเอนไซม์ ACC-deaminase

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *acdS* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอนไซม์ ACC deaminase ในเชื้อที่ผ่านการพัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution ทั้งสองสายพันธุ์ (SUTN9-2_2.5 และ SUTN9-2_3.0) ถูกวิเคราะห์และเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนนี้ในเชื้อ SUTN9-2 ดั้งเดิม (ตารางที่ 2) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์มีการเปลี่ยนแปลงไป 2 ตำแหน่ง คือ G (ลำดับเบสที่ 419) และ C (ลำดับเบสที่ 843) เปลี่ยนไปเป็น A และ T ทั้งในเชื้อ SUTN9-2_2.5 และ SUTN9-2_3.0 อย่างไรก็ตาม ผลจากการเปลี่ยนไปของลำดับนิวคลีโอไทด์ G ที่ตำแหน่ง 419 ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนไป ซึ่งใน SUTN9-2 ดั้งเดิม จะเป็นกรดอะมิโน serine (Ser/S) ไปเป็น asparagine (Asn/N) ทั้งใน SUTN9-2_2.5 และ SUTN9-2_3.0 (ตารางที่ 3)

ทั้งนี้ผลจากการทำ Alignment ลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ SUTN9-2 ดั้งเดิม กับ SUTN9-2_2.5 และ SUTN9-2_3.0 เปรียบเทียบกับเชื้อ *Salmonella saturnus* (yACCD) และ *Pseudomonas putida* UW4 (bACCD) แสดงให้เห็นว่าตำแหน่งกรดอะมิโนที่เปลี่ยนไปนั้นอยู่ในส่วนที่เป็น conserve region ในกลุ่มเชื้อและยีนดังกล่าว (ภาพที่ 3) โดย Min Yao และคณะได้รายงานในปี

2000 ไว้ว่า ตำแหน่งของกรดอะมิโนที่เปลี่ยนไปอยู่ในส่วนที่เป็น small domain (residues 58-169) ของเอนไซม์ ACC deaminase ซึ่งเป็นเหตุผลที่ทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase เพิ่มขึ้นจากเชื้อดั้งเดิม แต่อย่างไรก็ตามส่วนที่เป็น *acdR* ไม่พบการเปลี่ยนของลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนั้นการเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ด้วยเทคนิค metabolic evolution ทำให้เชื้อทนต่อสาร ACC และอาจเพิ่มประสิทธิภาพในการทำปฏิกิริยากับสาร ACC ให้ดีขึ้น ด้วยการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์บางตำแหน่งที่มีผลทำให้ลำดับกรดอะมิโนเปลี่ยนไป ผลจากการเปลี่ยนไปของกรดอะมิโนมีผลต่อ conformation ของเอนไซม์ ACC deaminase รวมทั้งอาจส่งผลกระทบต่อ active site ของเอนไซม์ด้วยเช่นกัน

นอกจากนี้เพื่อทดสอบความเสถียร (genetic stability) ของการสร้างเอนไซม์ ACC deaminase ในเชื้อ SUTN9-2 ที่ผ่านการพัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution (SUTN9-2_2.5 และ SUTN9-2_3.0) จึงนำเชื้อทั้งสองสายพันธุ์นี้มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อปกติที่ไม่มีสาร ACC เป็นองค์ประกอบ โดยทำการเลี้ยงเชื้อต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 3 รุ่น (generation) แล้วนำมาตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ ผลที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 4 จากผลการทดลองพบว่าค่าของกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ที่วัดจากเชื้อ SUTN9-2_2.5 มีความคงที่ของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ เมื่อเลี้ยงติดต่อกัน 3 รุ่น เห็นได้จากค่าของกิจกรรมที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ 2.99 ± 0.18 μmole of alpa-ketobutyrate/h/mg of protein ในเชื้อ SUTN9-2_2.5 และ 2.83 ± 0.22 μmole of alpa-ketobutyrate/h/mg of protein ในรุ่นที่ 3 แต่อย่างไรก็ตาม ค่าของกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ใน SUTN9-2_3.0 ไม่คงที่ โดยพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจาก 4.28 ± 0.33 μmole of alpa-ketobutyrate/h/mg of protein เป็น 3.43 ± 0.22 μmole of alpa-ketobutyrate/h/mg of protein ใน SUTN9-2_3.0 รุ่นที่ 3 ดังนั้นเชื้อ SUTN9-2_2.5 มีความเสถียรของยีนที่ใช้ในการสร้างเอนไซม์ ACC deaminase มากกว่า เชื้อ SUTN9-2_3.0

ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *acdS* ใน SUTN9-2 ดั้งเดิม และที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution

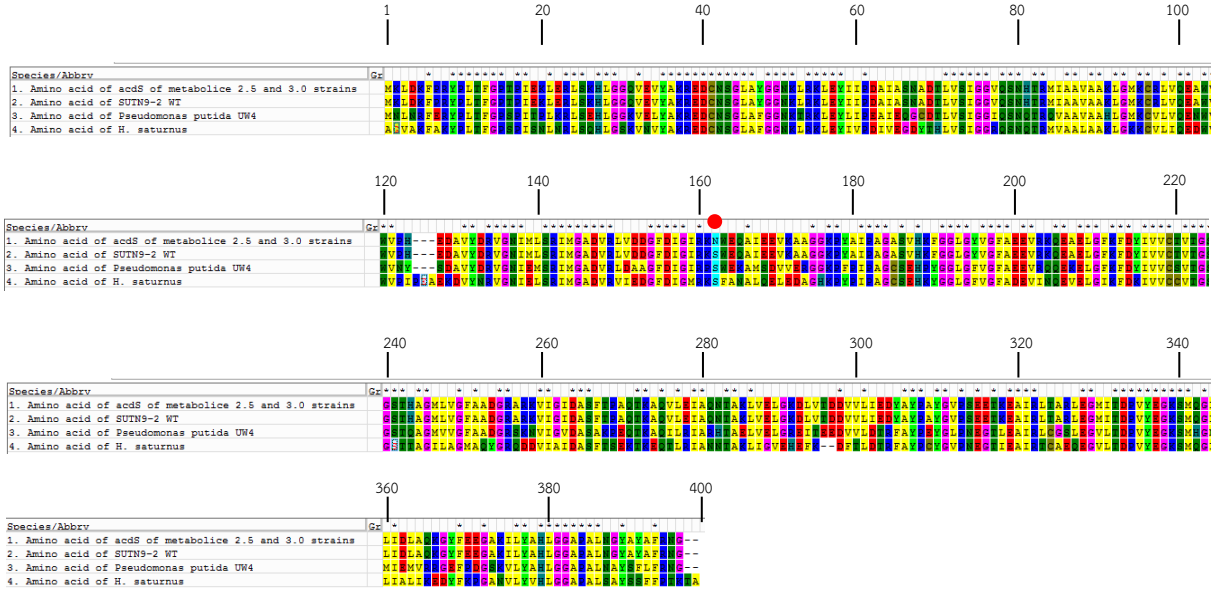
SUTN9-2 wild-type	SUTN9-2 metabolic evoluted strains (SUTN9-2_2.5 และ SUTN9-2_3.0)
5’ CTAAAATTCCAGTGGCGCGTTGTCGACGACTTCCTTCATCACGAAGAAGGTCCGGGTCTGGCGCACG CCGGGGAGCGCGATCAGCTGCTCGCCGTGGATGCGATTGAAATCCTCCATGTCGCCGACGCGGATCT TGAGGAAGTAATCGAAATCGCCGGCGACGAGGTGGCAGTCGAGCACGAATTTCAGCTTTGCAACGGC CTGCTCGAAGGTGGCAAAGCTTTCCGGCGTCGAGCGGTCGAGCACGACCCCGACCATCACCAGCGTG CCCTTTGCCACCTTCTTCGGCGCGACCATGGCGCGGACATTGGCGATGAAGCCGTCCTCGAACAGGC GCTGGGTGCGACGATGGCAGGTGGCGGGGCTGATCGCGACCGTTTCGGCCAGCTCGGCGTTGCTGAG CCGACCGTTATTCTGAAGCAATCTCAATATCTTGAGGTCGGTGCGGTCGAGCCGGGCAGCCATGAAA GAAACTTCCGTAAGAAAATGCTGTTCTGGAAGGAATATTAGCTATCGCCGCAACTTTCGCAAGAAATT GCGCAACATGGCCGCAATATTCGAGAGCACATTTTCCCGACGCGATGCTAGGGAGCCGCCAACACCA ACGCCAATCGGGATTGACCCATGAAGCTGGACAAATTTCCGCGCTATCCTTTGACCTTCGGCCCGAC GCCCATCGAGAAGCTGGAGCGCTTGTCGAAACATCTCGGCGGCCAAGTCGAGGTCTATGCCAAGCGC GAGGACTGCAATTCCGGCCTCGCCTATGGCGGCAACAAGCTGCGCAAGCTCGAATACATTATCCCCG ATGCGATCGCCTCCAATGCCGATACGCTGGTCTCAATCGGCGGCGTGCAATCGAACCACACCCGCAT GATCGCGGCGGTCGCGGCCAAGCTCGGCATGAAATGCCGCCTGGTGCAGGAAGCCTGGGTGCCGCAC GAGGACGCGGTGTATGACCGCGTCGGCAACATCATGCTCTCGCGCATCATGGGCGCCGACGTGCGCC TGGTCGACGACGGCTTCGATATCGGCATCCGCAAGAGCTGGGAGCAGGCGATCGAGGAAGTGAAGGC GGCGGGCGGCAAGCCTTACGCCATTCCCGCCGGTGCCTCCGTGCATAAGTTCGGCGGCCTCGGCTAT GTCGGCTTTGCCGAGGAGGTGCGCAAGCAGGAAGCCGAGCTCGGCTTCAAGTTCGACTACATCGTCG TCTGCACCGTCACCGGCTCCACCCATGCCGGCATGCTGGTCGGGTTTGCGGCGGACGGCCGTGCGCG AAAGGTGATCGGCATCGATGCCTCCTTCACGCCCGCCCAGACCAAGGCCCAGGTGCTCGAAATCGCG CAGAACACGGCAAAGCTCGTCGAGCTCGGCAAGGACCTCGTCACTGACGACGTCGTGCTGATCGAGG ACTACGCCTATCCCGCCTATGGTGTGCCATCGGAGGAGACCAAGGAGGCGATCCGCCTCACCGCGCG CCTCGAAGGCATGATCACCGACCCCGTCTATGAGGGCAAGTCGATGCAGGGCCTGATCGATCTCGCC CAGAAGGGCTATTTCGAGGAGGGCGCGAAGATCCTCTACGCCCATCTCGGCGGCGCGCCGGCGCTGA ACGGATATGCGTATGCGTTCAGGAATGGGTGAGTGAGAGCGTAGCGCTCGCGCGTCATACACTGCTG TCGTCCCGGGGCGCGACGAAGTCGCGAGCCCGGGACCCATACGCCGCAGCAATCGTTTTGCGAGGAC 3’	5’ CTAAAATTCCAGTGGCGCGTTGTCGACGACTTCCTTCATCACGAAGAAGGTCCGGGTCTGGCGCACG CCGGGGAGCGCGATCAGCTGCTCGCCGTGGATGCGATTGAAATCCTCCATGTCGCCGACGCGGATCT TGAGGAAGTAATCGAAATCGCCGGCGACGAGGTGGCAGTCGAGCACGAATTTCAGCTTTGCAACGGC CTGCTCGAAGGTGGCAAAGCTTTCCGGCGTCGAGCGGTCGAGCACGACCCCGACCATCACCAGCGTG CCCTTTGCCACCTTCTTCGGCGCGACCATGGCGCGGACATTGGCGATGAAGCCGTCCTCGAACAGGC GCTGGGTGCGACGATGGCAGGTGGCGGGGCTGATCGCGACCGTTTCGGCCAGCTCGGCGTTGCTGAG CCGACCGTTATTCTGAAGCAATCTCAATATCTTGAGGTCGGTGCGGTCGAGCCGGGCAGCCATGAAA GAAACTTCCGTAAGAAAATGCTGTTCTGGAAGGAATATTAGCTATCGCCGCAACTTTCGCAAGAAATT GCGCAACATGGCCGCAATATTCGAGAGCACATTTTCCCGACGCGATGCTAGGGAGCCGCCAACACCA ACGCCAATCGGGATTGACCCATGAAGCTGGACAAATTTCCGCGCTATCCTTTGACCTTCGGCCCGAC GCCCATCGAGAAGCTGGAGCGCTTGTCGAAACATCTCGGCGGCCAAGTCGAGGTCTATGCCAAGCGC GAGGACTGCAATTCCGGCCTCGCCTATGGCGGCAACAAGCTGCGCAAGCTCGAATACATTATCCCCG ATGCGATCGCCTCCAATGCCGATACGCTGGTCTCAATCGGCGGCGTGCAATCGAACCACACCCGCAT GATCGCGGCGGTCGCGGCCAAGCTCGGCATGAAATGCCGCCTGGTGCAGGAAGCCTGGGTGCCGCAC GAGGACGCGGTGTATGACCGCGTCGGCAACATCATGCTCTCGCGCATCATGGGCGCCGACGTGCGCC TGGTCGACGACGGCTTCGATATCGGCATCCGCAAGAACTGGGAGCAGGCGATCGAGGAAGTGAAGGC GGCGGGCGGCAAGCCTTACGCCATTCCCGCCGGTGCCTCCGTGCATAAGTTCGGCGGCCTCGGCTAT GTCGGCTTTGCCGAGGAGGTGCGCAAGCAGGAAGCCGAGCTCGGCTTCAAGTTCGACTACATCGTCG TCTGCACCGTCACCGGCTCCACCCATGCCGGCATGCTGGTCGGGTTTGCGGCGGACGGCCGTGCGCG AAAGGTGATCGGCATCGATGCCTCCTTCACGCCCGCCCAGACCAAGGCCCAGGTGCTCGAAATCGCG CAGAACACGGCAAAGCTCGTCGAGCTCGGCAAGGACCTCGTCACTGACGACGTCGTGCTGATCGAGG ACTACGCCTATCCCGCCTATGGTGTGCCATCGGAGGAGACCAAGGAGGCGATCCGCCTTACCGCGCG CCTCGAAGGCATGATCACCGACCCCGTCTATGAGGGCAAGTCGATGCAGGGCCTGATCGATCTCGCC CAGAAGGGCTATTTCGAGGAGGGCGCGAAGATCCTCTACGCCCATCTCGGCGGCGCGCCGGCGCTGA ACGGATATGCGTATGCGTTCAGGAATGGGTGAGTGAGAGCGTAGCGCTCGCGCGTCATACACTGCTG TCGTCCCGGGGCGCGACGAAGTCGCGAGCCCGGGACCCATACGCCGCAGCAATCGTTTTGCGAGGAC 3’

หมายเหตุ ส่วนที่มีพื้นหลังเป็นสีฟ้า คือ *acdR*; ส่วนที่เป็นสีเทา คือ *acdS* และอักษรที่เป็นสีแดงและขีดเส้นใต้ คือ นิวคลีโอไทด์ที่พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงไปจากยีน *acdS* ของเชื้อดั้งเดิม (wild-type) คือ ตำแหน่งที่ 419 และ 843

ตารางที่ 3 ลำดับกรดอะมิโนของยีน *acdS* ในเชื้อ SUTN9-2 ดั้งเดิม และที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution

SUTN9-2 wild type	SUTN9-2 metabolic evoluted strains (SUTN9-2_2.5 และ SUTN9-2_3.0)
MKLDKFPRYPLTFGPTPIEKLERLSKHLGGQVEVYAKREDCNSGLAYGGNKLRKLEYII	MKLDKFPRYPLTFGPTPIEKLERLSKHLGGQVEVYAKREDCNSGLAYGGNKLRKLEY
PDAIASNADTLVSIGGVQSNHTRMIAAVAAKLGMKCRLVQEAWVPHEDAVYDRVGN	IIPDAIASNADTLVSIGGVQSNHTRMIAAVAAKLGMKCRLVQEAWVPHEDAVYDRVG
IMLSRIMGADVRLVDDGFDIGIRKSWEQAIEEVKAAGGKPYAIPAGASVHKFGGLGYV	NIMLSRIMGADVRLVDDGFDIGIRKNWEQAIEEVKAAGGKPYAIPAGASVHKFGGLG
GFAEEVRKQEAELGFKFDYIVVCTVTGSTHAGMLVGFAADGRARKVIGIDASFTPAQT	YVGFAEEVRKQEAELGFKFDYIVVCTVTGSTHAGMLVGFAADGRARKVIGIDASFTP
KAQVLEIAQNTAKLVELGKDLVTDDVVLIEDYAYPAYGVPSEETKEAIRLTARLEGMIT	AQTKAQVLEIAQNTAKLVELGKDLVTDDVVLIEDYAYPAYGVPSEETKEAIRLTARLE
DPVYEGKSMQGLIDLAQKGYFEEGAKILYAHLGGAPALNGYAYAFRNG	GMITDPVYEGKSMQGLIDLAQKGYFEEGAKILYAHLGGAPALNGYAYAFRNG

S คือ serine (Ser/S), N คือ Asparagine (Asn/N)



หมายเหตุ สัญลักษณ์วงกลมสีแดงแสดงตำแหน่งของกรดอะมิโนที่เปลี่ยนไปของ SUTN9-2_2.5 และ SUTN9-2_3.0

รูปที่ 3 แสดงผล Alignment ของกรดอะมิโน ของเอมไซม์ ACC deaminase ของเชื้อ SUTN9-2 ดั้งเดิม และ SUTN9-2 ที่พัฒนาด้วยเทคนิค metabolic evolution (SUTN9-2_2.5 และ SUTN9-2_3.0), *Pseudomonas putida* UW4 และ *Hansenula saturnus*

ตารางที่ 4 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ของเชื้อที่ผ่านกระบวนการเพิ่มระดับกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase หลังเลี้ยงเชื้อดังกล่าวต่อเนื่องกัน 3 รุ่น

Sample codes	ACC –deaminase activity (µmole of alpa-ketobutyrate/h/mg of protein)
SUTN9-2 wild type	3.30 ± 0.22b
SUTN9-2_2.5	2.99 ± 0.18c
SUTN9-2_2.5 generation 3rd	2.83 ± 0.22c
SUTN9-2_3.0	4.28 ± 0.33a
SUTN9-2_3.0 generation 3rd	3.43 ± 0.22b
Sinorhizobium sp. BL3	4.65 ± 0.078a

There is a significant difference at a *P* value of 0.05

บทที่ 4
สรุปผลการทดลอง

กระบวนการเพิ่มระดับกิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase โดยใช้เทคนิค metabolic evolution มีผลต่อการปรับตัวและช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ โดยการพัฒนากลไกบางอย่างที่จะทำให้เซลล์ทนต่อความเป็นพิษของ ACC รวมทั้งทำให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน acdS ที่ใช้ในการสังเคราะห์เอนไซม์ ACC deaminase เปลี่ยนแปลงไป 2 ตำแหน่ง คือ G (ลำดับเบสที่ 419) และ C (ลำดับเบสที่ 843) ไปเป็น A และ T ในเชื้อ SUTN9-2 ที่ได้จาการพัฒนาด้วยเทคนิคนี้ ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์ ACC deaminase และส่งผลต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ACC deaminase ไปในทางที่ดีขึ้น อย่างไรก็ตามความเสถียรของกิจกรรมของเอนไซม์ขึ้นกับเชื้อแต่ละชนิด โดยในการทดลองนี้พบว่าเชื้อ SUTN9-2_2.5 มีความเสถียรของกิจกรรมของเอนไซม์มากกว่า SUTN9-2_3.0 ดังนั้นการเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ในเชื้อไรโซเบียมสามารถทำได้โดยการใช้เทคนิค metabolic evolution ซึ่งเป็นการปรับปรุงเชื้อให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นโดยอาศัยการปรับตัวและการคัดเลือกทางธรรมชาติเพื่อให้ได้เชื้อที่มีลักษณะหรือคุณสมบัติตามต้องการโดยไม่อาศัยการตัดต่อพันธุกรรม ดังนั้นจึงสามารถนำเชื้อที่ผ่านการพัฒนาหรือปรับปรุงคุณสมบัติดังกล่าวไปใช้ในสภาพไร่ได้จริง อันจะเป็นแนวทางการพัฒนาหัวเชื้อไรโซเบียมให้มีคุณสมบัติที่ดีขึ้นและนำไปใช้ได้จริงต่อไป

บรรณานุกรม

Chatterjee R, Cynthia SM, Kathleen C, David PC, Donnelly MI. (2001) Mutation of theptsGgene results in increased production of succinate in fermentation of glucose byEscherichia coli. Appl Environ Microbiol 67:148–154.

Conforte VP, Echeverria M, Sanchez C, Ugalde RA, Me-nendez AB, Lepek VC (2010) Engineered ACC deaminase-expressing free-living cells of *Mesorhizobium loti* show increased nodulation efficiency and competitiveness on *Lotus* spp. J Gen Appl Microbiol 56: 331–338.

Duncan, D. B. (1955). Multiple range and multiple F tests. *Biometrics* 11, 1-42.

Jantama K, Haupt MJ, Svoronos SA, Zhang X, Moore JC, Shanmugam KT, Ingram LO (2008) Combining metabolic engineering and metabolic evolution to develop nonrecombinant strains ofEscherichia coliC that produce succinate and malate. Biotechnol Bioeng 99:1140–1153.

Ma WB, Charles TC, Glick BR (2004) Expression of an exogenous 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase gene in *Sinorhizobium meliloti* increases its ability to nodulate alfalfa. Appl Environ Microb 70: 5891–5897.

Millard CS, Chao YP, Liao JC, Donnelly MI (1996) Enhanced production of succinic acid by overexpression of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol 62:1808–1810.

Nascimento F, Brı́gido C, Alho L, Glick BR, Oliveira S (2012) Enhanced chickpea growth promotion ability of a Mesorhizobium strain expressing an exogenous ACC deaminase gene. Plant Soil 353: 221–230.

Stols L, Donnelly MI (1997) Production of succinic acid through over-expression of NAD dependent malic enzyme in an *Escherichia coli* mutant. Appl Environ Microbiol 63: 2695–2701.

Tittabutr P, Awaya JD, Li QX, Borthakur D (2008) The cloned 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase gene from *Sinorhizobium* sp. strain BL3 in *Rhizobium* sp. strain TAL1145 promotes nodulation and growth of *Leucaena leucocephala*. *Syst Appl Microbiol* 31: 141-150.

Yao M, Ose T, Sugimoto H, Horiuchi A., Nakagawa A, Wakatsuki S, Yokoi D, Murakami T, Honma M, Tanaka I (2000) Crystal structure of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from *Hansenula saturnus*. J Bio Chem 275: 34557–34565.

Zhang X, Jantama K, Moorej JC, Jarboe LR, Shanmugam KT, Ingram LO (2009) Metabolic evolution of energy-conserving pathways for succinate production in *Escherichia coli*. PNAS. 106: 20180-20185.