บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

sphingomonad เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถย่อยสารสลายยาก (xenobiotics) หลายชนิดและมีรายงานมากมายเกี่ยวกับการย่อยสลายสารประกอบ PAHs มวลโมเลกุลต่ำ เช่น *Sphingomonas chungbulensis* DJ77 ที่สามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนและไบฟีนิล (Hwang และคณะ, 1999) *Sphingomonas* sp. P2 สามารถย่อยสลาย ฟีแนนทรีน แนพธาลีน และไบฟีนิล (Supaka และคณะ, 2001) และ *Sphingomonas paucimobilis* ZX4 สามารถย่อยสลายแนพธาลีน ฟลูออรีน รวมถึงโมโนอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน (Xia และคณะ, 2005) *Sphingomonas* sp. ยังสามารถย่อยสลาย PAHs มวลโมเลกุลสูงได้ เช่น *Sphingomonas* sp. CHY-1 ซึ่งสามารถย่อยสลายไครซีน (Demaneche และคณะ, 2004) นอกจากนี้ยังย่อยสลายสารอื่น เช่น ไดเบนโซฟูแรน (Fukuda และคณะ, 2002) และเททราลิน (Hernaez และคณะ, 1999) ในปัจจุบันรายงานเกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายอะซีแนพธีนน้อยมาก และส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม sphingomonad เช่น *Pseudomonas* sp. A4 (Komatsu และคณะ, 1993) (ในภายหลังเปลี่ยนชื่อเป็น *Sphingomonas* sp. A4 (Pinyakong และคณะ, 2004)) และ *Sphingomonas aromaticivoran* B0695 (Shi และคณะ, 2001) และ *Sphingomonas* sp. SP2 (Saiphet และคณะ, 2006) แต่มีเพียงสายพันธุ์ A4 เท่านั้นที่มีการศึกษาในระดับยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธีน

การศึกษาในระดับพันธุศาสตร์ของจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารประกอบ PAHs เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายโดยปรับปรุงสมบัติในระดับยีนของจุลินทรีย์หรือใช้เป็นองค์ความรู้ในการควบคุมการย่อยสลายของจุลินทรีย์อย่างมีประสิทธิภาพ การทดลองนี้แยกยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย PAHs โดยการคัดเลือกโคลนด้วยการติดตามการเปลี่ยนสีของอินโดล (Ensley และคณะ, 1983) จากห้องสมุดดีเอ็นเอบางส่วนของ *Sphingomonas* sp. SP2 ที่แสดงออกร่วมกับ pSA3A4 ซึ่งบรรจุยีนประมวลรหัสเฟอร์รีดอกซิน (*ahdA3*) และเฟอร์รีดอกซินรีดักเทส (*ahdA4*) ของ *Sphingomonas* sp. P2 (Pinyakong และคณะ, 2003b) พบโคลนที่ให้ผลบวก (pPC1) ซึ่งบรรจุยีนเทอร์มินัลออกซิจีเนสของสายพันธุ์ SP2 และจากการที่พบโคลนที่ให้ผลบวกแสดงว่าเทอร์มินัลออกซิจีเนสที่ประมวลรหัสจากยีนที่แยกได้สามารถทำงานรวมกับเฟอร์รีดอกซิน และเฟอร์รีดอกซินรีดักเทสของสายพันธุ์ P2 ซึ่งส่วนหนึ่งในงานวิจัยของ Demaneche และคณะ

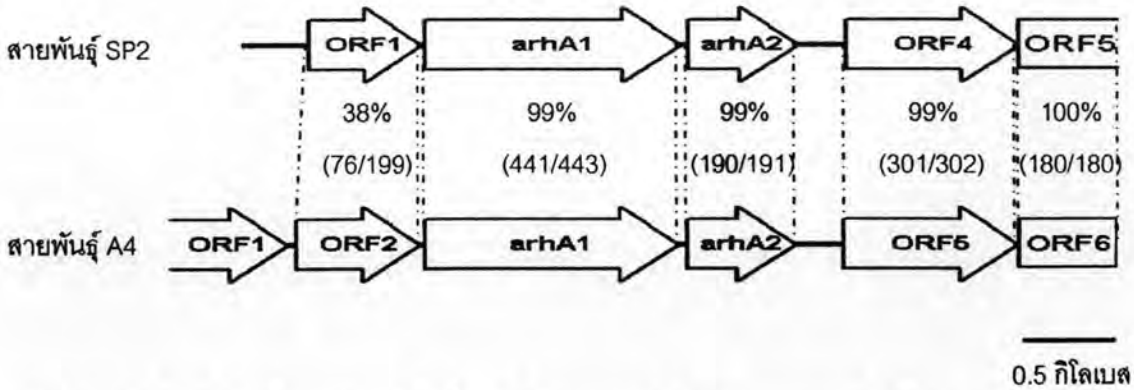
(2004) พบว่าการทำงานของเฟอร์รีดอกซินและเฟอร์รีดอกซินรีดักเทสช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเทอร์มินัลออกซิจีเนส

จากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอแทรกสอดใน pPC1 ขนาด 4,624 bp พบ 4 ORFs ที่สมบูรณ์และ 1 ORF ที่ขาดบริเวณหยุดการถอดรหัส ซึ่ง *orf2* (*arhA1*) และ *orf3* (*arhA1*) ประมวลรหัสโปรตีนคล้ายกับหน่วยย่อยแอลฟาและบีตาของเทอร์มินัลออกซิจีเนสของ *Sphingomonas* สายพันธุ์ A4 ถึง 99%

ORF1 คล้ายกับส่วนหนึ่งของไอโซเมอเรสจาก *Burkholderia* sp. DBT1 50% (99/195) และเหมือน ORF2 ของสายพันธุ์ A4 100% (76/76) เมื่อเทียบทั้ง ORF พบความเหมือน 38% (76/199) ซึ่งมีรายงานของ Pinyakong และคณะ (2004) เทียบกับฐานข้อมูลว่า ORF2 แยกเป็น 2 ส่วน ซึ่งคล้ายกับไฮดราเทส/แอลโดรเลส (PhnE) ของ *Burkholderia* sp. RP007 65% (91/140) และไอโซเมอเรสจาก *Burkholderia* sp. DBT1 58% (35/60) จึงสรุปได้ว่า *orf1* ของสายพันธุ์ SP2 ประมวลรหัสโปรตีนแตกต่างกับ ORF2 ของสายพันธุ์ A4 ซึ่งเมื่อเทียบกับฐานข้อมูลสามารถพบความคล้ายกับไอโซเมอเรสจากสายพันธุ์ DBT1 ได้อย่างต่อเนื่อง

orf4 ประมวลรหัสโปรตีนที่มีความคล้ายกับ ORF5 ของสายพันธุ์ A4 99% ซึ่งยังไม่มีรายงานระบุหน้าที่ของโปรตีนดังกล่าว และคล้ายกับไอโซเมอเรส (HbzF) ของ *P. alcaligenes* NCIMB 9867 52% จากวิถีบนของการย่อยสลายแนพธาลีนโดยแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. พบว่าหลังจากการแตกวงด้วยกิจกรรมของเอกซ์ตราไดออลไดออกซิจีเนส จะเกิดการออกซิไดซ์ผลิตภัณฑ์ด้วยแอคติวิตีของไอโซเมอเรส (Davies และ Evans, 1964; Yen และ Gunsalus, 1982) ทำนายได้ว่า ORF1 และ ORF4 อาจจะเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธีนหลังจากเกิดการแตกวงอะโรมาติก เนื่องจากมีความเหมือนกับไอโซเมอเรสจากฐานข้อมูลเพียงปานกลางเท่านั้น และที่เคยมีรายงานของสายพันธุ์ A4 ยังไม่มีการศึกษาหน้าที่ของยีนไอโซเมอเรสทั้ง 2 ที่อยู่ใกล้กันจึงต้องศึกษาหน้าที่ของยีนต่อไป

ORF5 เป็นช่วงการแสดงออกของยีนที่ไม่สมบูรณ์ คือ ไม่พบบริเวณหยุดถอดรหัส เมื่อเทียบกับฐานข้อมูลพบว่าคล้ายกับเฟอร์รีดอกซินรีดักเทส (NahAa) ของ *Ralstonia* sp. U2 เพียง 29 % (39/131) และคล้ายกับ ORF6 ของสายพันธุ์ A4 ถึง 100% ซึ่งยังไม่มีรายงานระบุหน้าที่ของโปรตีนดังกล่าว จากรายงานของ Kouzuma และคณะ (2006) พบ ORF6 ของสายพันธุ์ A4 ที่สมบูรณ์และคล้ายกับเฟอร์รีดอกซินรีดักเทส (NahAa) ของ *P.putida* NCIB9816-4 เพียง 18% และทางด้านปลายคาร์บอกซีไม่คล้ายกับ NahAa ซึ่งเป็นบริเวณ NAD-binding domain ทำให้ทำนายได้ว่า ORF นี้ไม่น่ามีหน้าที่เป็นเฟอร์รีดอกซินรีดักเทส



รูปที่ 5.1 เปรียบเทียบตำแหน่งของยีนที่แยกได้จากสายพันธุ์ SP2 และสายพันธุ์ A4

จากผลการเปรียบเทียบ ORFs กับฐานข้อมูล ไม่พบเฟอร์รีดอกซินและเฟอร์รีดอกซินรีดักเทสของสายพันธุ์ SP2 จึงยังไม่สามารถจำแนกกลุ่มของออกซิจีเนสได้ตามวิธีของ Batie และคณะที่จำแนกไดออกซิจีเนสตามความแตกต่างของจำนวนและขนาดของหน่วยย่อยในส่วนเทอร์มินัลออกซิจีเนสและรีดักเทส จนกว่าจะมีการแยกและศึกษาเฟอร์รีดอกซินและเฟอร์รีดอกซินรีดักเทสของสายพันธุ์ SP2 ต่อไป

เปรียบเทียบการเรียงตัวของยีนที่แยกได้จากสายพันธุ์ SP2 และสายพันธุ์ A4 สามารถสรุปได้ว่าการเรียงตัวของยีนทั้ง 2 สายพันธุ์เหมือนกัน และยังมีความเหมือนของลำดับอะมิโนในแต่ละยีนใกล้เคียงกันมาก เมื่อจัดกลุ่มหน่วยย่อยแอลฟาของเทอร์มินัลออกซิจีเนสของสายพันธุ์ SP2 (ArhA1) (รูปที่ 4.9) พบว่าอยู่ในสาขาเดียวกับ *Sphingomonas* sp. A4 และมีความใกล้เคียงกันมาก แต่ทั้ง 2 มีการแตกสาขาจากกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบกลุ่มอื่น เช่น ยีนกลุ่ม *nah* และยีนกลุ่มคล้าย *nah* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพธาลีน และยีนกลุ่ม *phn* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายฟีแนนทรีน จากรายงานว่าส่วนใหญ่แบคทีเรียที่มีความใกล้เคียงกันทางสายพันธุ์จะสามารถย่อยสลาย PAHs ที่คล้ายกัน และมีลักษณะยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายคล้ายกัน เช่น การจัดเรียงตัวของยีนหรือลำดับนิวคลีโอไทด์ของหน่วยย่อยแอลฟาที่ประมวลรหัสจากยีนดังกล่าว เช่น

แบคทีเรียในกลุ่ม pseudomonad ได้แก่ *nbo* ของ *P. putida* NCIB9816 (Kurkela และคณะ, 1988), *nah* ของ *P. putida* G7 และสายพันธุ์ NCIB9816-4 (Simon และคณะ, 1993), *dox* ของ *Pseudomonas* sp. C18 (Denome และคณะ, 1993) และ *pah* ของ *P. aeruginosa* OUS82 และสายพันธุ์ Pak1 (Takizawa และคณะ, 1999) เป็นต้น ซึ่งแบคทีเรียดังกล่าวสามารถย่อยสลายแนพธาลีน และมียีนในกลุ่ม *nah* และกลุ่มคล้าย *nah* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย

แนพธาลีน ซึ่งการจัดเรียงตัวของยีนที่คล้ายกัน (Habe และ Omori, 2003) ทำให้สามารถจัดว่าเป็นตัวแทนของกลุ่มแบคทีเรียที่ย่อยสลายแนพธาลีน

Mycobacterium sp. ได้แก่ *nid* ของ *M. vabaalenii* PYR-1 (Khan และคณะ, 2001), *pdo* ของ *Mycobacterium* sp. 6PY1 (Krivobok และคณะ, 2003) และ *nid* ของ *Mycobacterium* sp. S65 (Sho และคณะ, 2004) ทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถย่อยสลายไพรีน และมียีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไพรีนที่คล้ายกัน

กลุ่ม sphingomonad ได้แก่ *bph* ของ *Sphingobium yanoikuyae* B1 (Kim และ Zylstra, 1999) และ *Novosphingobium aromaticivorans* F199 (Romine และคณะ, 1999) และ *ahd* ของ *Sphingobium* sp. P2 (Pinyakong และคณะ, 2003b) ซึ่งสามารถย่อยสลายไบฟีนิลและฟีแนนทรีน และมีการจัดเรียงตัวของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไบฟีนิลและฟีแนนทรีนที่คล้ายกัน (Pinyakong และคณะ, 2003a)

รายงานของ Pinyakong และคณะในปี 2004 แยกยีนประมวลรหัสเอนไซม์ตัวแรกในวิถีการย่อยสลายอะซีแนพธีน (*arhA1A2*) จาก *Sphingomonas* sp. A4 ซึ่งจัดอยู่ในแบคทีเรียกลุ่ม sphingomonad แต่ยีนที่แยกได้ประมวลรหัสเอนไซม์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างจากเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไบฟีนิลและฟีแนนทรีนดังรายงานข้างต้น ทำให้สรุปได้ว่ายีน *arh* ของสายพันธุ์ A4 น่าจะเป็นตัวแทนของกลุ่มยีนใหม่ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธีน ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าสายพันธุ์ SP2 ที่สามารถย่อยสลายอะซีแนพธีนได้มียีน *arhA1A2* ประมวลรหัสหน่วยย่อยแอลฟาและบีตาที่คล้ายกับของสายพันธุ์ A4 มาก และมีการเรียงตัวของยีนที่คล้ายกัน (รูปที่ 5.1) จึงเป็นการสนับสนุนข้อสรุปว่า *arh* น่าจะเป็นตัวแทนของกลุ่มยีนใหม่ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายอะซีแนพธีน

จากการจัดกลุ่มสายพันธุ์ของ *Sphingomonas* sp. SP2 ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ขนาด 1,416 bp (รูปที่ 4.10) พบว่าสายพันธุ์ SP2 มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียในจีนัส *Novosphingobium* และสายพันธุ์ A4 มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียในจีนัส *Sphingobium* จึงเชื่อได้ว่าสายพันธุ์ SP2 ไม่ใช่สายพันธุ์กลายจากสายพันธุ์ A4 เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่อยู่ในจีนัสแตกต่างกัน ซึ่งการที่ทั้ง 2 สายพันธุ์มีลำดับกรดอะมิโนของหน่วยย่อยแอลฟาเทอร์มินัลออกซิจีเนสที่คล้ายกันมาก อาจเกิดจากการถ่ายโอนยีนเนื่องจากมีบรรพบุรุษใกล้กันทำให้สามารถถ่ายโอนยีนกันได้ หรืออาจเกิดจากการที่มีบรรพบุรุษที่มียีนในวิถีการย่อยสลาย PAHs คล้ายกันแต่เกิดการวิวัฒนาการแตกต่างกันทำให้เกิดการขาดหายหรือกลายพันธุ์บางตำแหน่งของยีน เช่น ในรายงานของ Kulakov และคณะ (2005) วิเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแนพธาลีนจาก

5 สายพันธุ์ คือ *Rhodococcus* sp สายพันธุ์ NCIMB12038, P200, P400, I24 และ CIR2 โดยตั้งสมมติฐานว่าทั้ง 5 สายพันธุ์มีบรรพบุรุษร่วมกัน และเมื่อเกิดการสูญหายของยีนในวิถีการย่อยสลายแนพธาลีนบางส่วนแตกต่างกันทำให้แยกเป็น 2 กลุ่มบรรพบุรุษ ได้แก่ กลุ่ม 1 สายพันธุ์ P400 และ I24 และกลุ่ม 2 สายพันธุ์ NCIMB12038 และ CIR2 เมื่อเกิดการถ่ายโอนยีนกันระหว่างกลุ่มบรรพบุรุษทำให้เกิดสายพันธุ์ P200

เมื่อเทียบลำดับกรดอะมิโนหน่วยย่อยแอลฟาของเทอร์มินัลออกซิจีเนสจากสายพันธุ์ SP2 (ArhA1) กับหน่วยย่อยแอลฟาของแนพธาลีนไดออกซิจีเนสของ *Pseudomonas* sp. NCIB986-4 เพื่อหาบริเวณอนุรักษ์ของหน่วยย่อยแอลฟาของเทอร์มินัลออกซิจีเนส พบบริเวณอนุรักษ์ 2 บริเวณ คือ บริเวณอนุรักษ์ของกรดอะมิโนที่จับกับ Fe^{2+} ใน Rieske center ([2Fe-2S]) ของหน่วยย่อยแอลฟามีลำดับกรดอะมิโน ดังนี้ $CXHX_{17}CX_2H$ ซึ่งตรงกับตำแหน่ง Cys50 Cys67 His52 และ His70 และบริเวณที่ 2 คือบริเวณอนุรักษ์ของกรดอะมิโนที่จับกับ Fe^{2+} ที่บริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ซึ่งตรงกับตำแหน่ง His204, His209 และ Asp358 โดยรายงานบริเวณอนุรักษ์ของแนพธาลีนไดออกซิจีเนสของ *Pseudomonas* sp. NCIB986-4 มีบริเวณอนุรักษ์ของกรดอะมิโนที่จับกับ Fe^{2+} ใน Rieske center ([2Fe-2S]) ของหน่วยย่อยแอลฟาตรงกับตำแหน่ง Cys81 Cys101 His83 และ His104 ซึ่งมีการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนรอบบริเวณเร่งปฏิกิริยาครอบคลุมกรดอะมิโนลำดับที่ 159-378 โดยเรียกบริเวณดังกล่าวว่า "helix-grip fold" (Carredano และคณะ, 2000) และบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ซึ่งตรงกับตำแหน่ง His208, His213 และ Asp 362 (Hegg และ Que 1997) รายงานการศึกษาโครงสร้างสร้าง 3 มิติของหน่วยย่อยแอลฟาของเทอร์มินัลออกซิจีเนสเพื่อยืนยันบริเวณเร่งปฏิกิริยา เช่น แนพธาลีนไดออกซิจีเนสของ *Pseudomonas* sp. NCIB9816-4 (Kauppi และคณะ, 1998), PCB ไดออกซิจีเนส *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 (Suenaga และคณะ, 2002) และไดออกซิจีเนสของ *Sphingomonas* sp. CHY-1 (Jakocic และคณะ, 2007)

เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ ArhA1 กับฐานข้อมูล พบว่ามีความเหมือน ArhA1 ของสายพันธุ์ A4 ถึง 99% โดยต่างกัน 2 กรดอะมิโน ที่ตำแหน่ง Met261 และ Ser347 ซึ่ง ArhA1 ของสายพันธุ์ A4 คือ Thr261 และ Gly347 ซึ่งทั้ง 2 ตำแหน่งอยู่ในบริเวณ helix-grip fold ทำให้ความแตกต่างของกรดอะมิโนดังกล่าวใน 2 สายพันธุ์ น่าจะมีความสำคัญต่อการทำงานของเทอร์มินัลออกซิจีเนสซึ่งทำให้สายพันธุ์ SP2 สามารถย่อยสลายอะซีแนพธีนแต่ไม่สามารถย่อยสลายอะซีแนพธิลีนได้ ส่วนสายพันธุ์ A4 สามารถย่อยสลายสารทั้ง 2 ชนิดได้ (Pinyakong และคณะ, 2004)

การตรวจสอบความสามารถในการย่อยสารประกอบ PAHs ชนิดต่างๆ ของเทอร์มินัลออกซิจีเนสของสายพันธุ์ SP2 ใน *Escherichia coli* JM109 โดยยีน *arhA1* และ *arhA2* ของสายพันธุ์ SP2 (pPPA1A2) สามารถแสดงออกได้บนเวกเตอร์ pUC18 ใน *E.coli* JM109 โดยสามารถแสดงออกร่วมกับ pSA3A4 ซึ่งบรรจุยีนที่ประมวลรหัสเฟอร์รีดอกซิน (*ahdA3*) และเฟอร์รีดอกซินรีดักเทส (*ahdA4*) ของสายพันธุ์ P2 ได้ (Pinyakong และคณะ, 2003b) และพบว่าเทอร์มินัลออกซิจีเนสของสายพันธุ์ SP2 สามารถใช้อะซีแนพธีนเป็นซับสเตรตได้ แต่ไม่สามารถใช้อะซีแนพธิลีน แนพธาลีน ฟีแนนทรีน แอนทราซีน ฟลูออแรนธีน และไพรีนเป็นซับสเตรต ซึ่งรายงานของ Pinyakong และคณะ (2004) พบว่าสายพันธุ์ A4 สามารถใช้อะซีแนพธีน อะซีแนพธิลีน แนพธาลีน ฟีแนนทรีน แอนทราซีนและฟลูออแรนธีนเป็นซับสเตรตได้ แสดงว่าเทอร์มินัลออกซิจีเนสของ 2 สายพันธุ์มีความจำเพาะต่อซับสเตรตต่างกัน โดยมีรายงานการแทนที่กรดอะมิโนบริเวณเร่งเพื่อศึกษาความจำเพาะของบริเวณเร่งต่อซับสเตรตในการเกิดผลิตภัณฑ์ (substrate specificity) รวมถึงตำแหน่งในการเร่งปฏิกิริยาบนซับสเตรต (stereochemistry) เช่น ตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซิลบนสารผลิตภัณฑ์ (regiospecificity) และทิศทางการหมุนของโมเลกุลสารผลิตภัณฑ์ (enantiomer) เช่น

Parales และคณะ (2000) ศึกษาสายพันธุ์กลาย Asn201Gln, Asn201Ser, Phe202Val, Val260Ala, Val260Leu, Trp316Ala, Thr351Arg, Thr351Ser, Thr351Asn, Phe352Val, Phe352Leu และ Met366Trp ของหน่วยย่อยแอลฟาของแนพธาลีนไดออกซิจีเนส (Ndo) จาก *Pseudomonas* sp. NCIB986-4 ในการย่อยสลายไบฟีนิล แนพธาลีนและฟีแนนทรีน เมื่อแทนที่ตำแหน่ง 201, 202, 260, 316, 351 และ 366 พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของผลิตภัณฑ์หลักเพียงเล็กน้อยหรือไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อใช้ไบฟีนิลและแนพธาลีนเป็นซับสเตรต และสายพันธุ์กลาย Thr351Arg ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์รอง (1,2-ไดไฮโดรไดออล) มากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อใช้ฟีแนนทรีนเป็นซับสเตรต การแทนที่ตำแหน่งที่ Phe352 พบว่าผลิตภัณฑ์หลักที่เกิดจากสายพันธุ์กลาย Phe352Val และ Phe352Leu มี regiospecificity เปลี่ยนแปลงไปจากสายพันธุ์ดั้งเดิม ซึ่งผลิตภัณฑ์หลักคือ ไบฟีนิล-2,3-ไดไฮโดรไดออล แต่สายพันธุ์กลายมีผลิตภัณฑ์หลักเป็นไบฟีนิล-3,4-ไดไฮโดรไดออล และสายพันธุ์ดั้งเดิมสามารถย่อยสลายฟีแนนทรีนได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็น 3,4-ไดไฮโดรไดออล แต่สายพันธุ์กลาย Phe352Val มีผลิตภัณฑ์หลักเป็น 1,2-ไดไฮโดรไดออล ส่วนสายพันธุ์กลาย Phe352Leu ยังมีผลิตภัณฑ์หลักเป็น 3,4-ไดไฮโดรไดออล แต่อัตราส่วนลดลงและพบผลิตภัณฑ์ใหม่ คือ 9,10-ไดไฮโดรไดออล ทำให้ทราบว่าตำแหน่ง 352 มีความสำคัญต่อตำแหน่งในการเร่งปฏิกิริยาบนซับสเตรต

Pollmann และคณะ (2003) ศึกษาการแทนที่ Leu366 และ Leu272 ของหน่วยย่อยแอลฟาของเททราคลอโรเบนซีนไดออกซิจีเนส (TecA) จาก *Ralstonia* sp. PS12 โดยสร้างสายพันธุ์กลาย Phe366Tyr, Phe366Trp, Phe366Leu, Leu272Trp และ Leu272Phe พบว่าตำแหน่ง 366 เมื่อแทนที่ด้วยกรดอะมิโนขนาดใหญ่ไม่พบการทำงานของเอนไซม์ เนื่องจากขนาดของหมู่ข้างไปบดบังบริเวณเข้าจับของซับสเตรต และเมื่อแทนที่ด้วยกรดอะมิโนขนาดเล็ก พบว่ามีการเปลี่ยนแปลง regiospecificity ของผลิตภัณฑ์หลักเมื่อใช้ 2,5-ไดคลอโรโทลูอินเป็นซับสเตรต คือ TecAB ของสายพันธุ์ PS12 มีผลิตภัณฑ์หลักเป็น 3,6-ไดคลอโร-4-เมธิลแคทิคอล (81%) แต่สายพันธุ์กลาย Phe366Leu ได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็น 2,5-ไดคลอโรด์เบนซิลแอลกอฮอล์ (54%) เนื่องจากขนาดของบริเวณ binding pocket เปลี่ยนแปลงทำให้การหมุนของซับสเตรตใน pocket ไม่แน่นอน จึงได้ผลิตภัณฑ์หลักแตกต่างกัน จากการแทนที่ตำแหน่ง 272 ด้วยกรดอะมิโนขนาดใหญ่ ไม่พบความแตกต่างจากสายพันธุ์ดั้งเดิม กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 272 จึงไม่มีผลต่อบริเวณที่ซับสเตรตเข้าทำปฏิกิริยา

Keenan และคณะ (2004) ศึกษาการแทนที่ Val350 ด้วย Phe ในหน่วยย่อยแอลฟาของ 2,4-ไดไนโตรโทลูอีนไดออกซิจีเนสจาก *Burkholderia cepacia* R34 พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของผลิตภัณฑ์เมื่อใช้ *ออโธ*-ไนโตรฟีนอล *เมตา*-ไนโตรฟีนอล และ*ออโธ*-เมธอกซีฟีนอล เป็นซับสเตรต และสามารถใช้ซับสเตรตได้หลายชนิดขึ้น ได้แก่ *เมตา*-เมทธอกซีฟีนอล *ออโธ*-ครีซอล และ*เมตา*-ครีซอล (สายพันธุ์ดั้งเดิมไม่สามารถใช้ได้) เนื่องจากหมู่ข้างของตำแหน่ง 350 ในสายพันธุ์ดั้งเดิมจะเกิดพันธะกับ ion-binding active site (Asp360, His206 และ His211) แต่ในสายพันธุ์กลายพบว่าหมู่ข้างของ Phe ทำให้ระยะของ His206 และ His211 ในการเกิดพันธะสั้นลง แต่ความยาวของพันธะมีผลต่อ active-side ไม่มากเท่าขนาดของหมู่ข้าง Phe ที่ยื่นเข้าสู่บริเวณเข้าจับของซับสเตรต ทำให้สามารถใช้ซับสเตรตขนาดเล็กได้เพิ่มขึ้น

Suenaga และคณะ (2002) สร้างสายพันธุ์กลาย Ile335Phe และ Thr376Asn ของหน่วยย่อยแอลฟาของไบฟีนิลไดออกซิจีเนสจาก (BphA1) *P. pseudoalcaligenes* KF707 ให้เหมือนกับ BphA1 ของสายพันธุ์ LB400 พบว่าผลิตภัณฑ์หลักที่เกิดจากสายพันธุ์กลายทั้ง 2 มี regiospecificity เปลี่ยนแปลงไป ได้แก่ สายพันธุ์ KF707 สามารถเติมหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 5 และ 6 บนซับสเตรต 2,2'-ไดคลอโรด์ไบฟีนิล แต่สายพันธุ์กลายทั้ง 2 เติมหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 2 และ 3 เหมือนสายพันธุ์ LB400 และในปี 2005 ศึกษาการแทนที่ Thr376 ด้วย Gln, Tyr, Gly, Ser, Asp, Lys, Asn, Val และ Phe ซึ่งแทนโครงสร้างในแบบต่างๆ เช่น ขนาดใหญ่ขึ้น (Gln และ Tyr) ขนาดเล็กลงขึ้น (Gly และ Ser) หมู่ข้างเป็นกรด (Asp) หมู่ข้างเป็นเบส (Lys) และกรดอะมิโน

ที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic; Val และ Phe) เมื่อใช้ไบฟีนิล 4-เมทธิวไบฟีนิล และไดฟีนิลเมทเธน เป็นซับสเตรต พบว่าเมื่อแทนที่ด้วย Gln, Tyr, Gly และ Ser การทำงานของเอนไซม์ลดลง เนื่องจากขนาดของกรดอะมิโนตำแหน่ง 376 มีผลต่อ binding-pocket ซึ่งเป็นบริเวณเข้าจับของซับสเตรตคือ เมื่อกรดอะมิโนมีขนาดใหญ่ขึ้นจะบดบังบริเวณเข้าจับ แต่ถ้ากรดอะมิโนมีขนาดเล็กลงจะทำให้ซับสเตรตหลุดจากบริเวณจับได้ง่ายขึ้น เมื่อแทนที่ด้วย Asp หรือ Lys พบการทำงานของเอนไซม์ลดลง เนื่องจากความเป็นกรดเบส อาจมีผลต่อรูปร่างของ binding-pocket และเมื่อแทนที่ด้วย Val และ Phe พบว่าการทำงานของเอนไซม์เพิ่มขึ้น เนื่องจากบริเวณเข้าจับของซับสเตรตมักประกอบด้วยกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำทำให้ binding-pocket มี hydrophobicity สูง จึงมีความเสถียรภาพกว่ามากขึ้นเมื่อแทนที่ด้วยกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ จากการวิเคราะห์ลักษณะโครง สร้างของกรดอะมิโนแทนที่ในเชิง 3 มิติ ของสายพันธุ์กลาย Thr376Phe และ Ile335Phe ร่วมกับ Thr376Asn ด้วยโปรแกรม MOE software พบว่าตำแหน่ง 376 นั้นอยู่ใกล้กับ His233 และ His239 มากกว่า Ile335 แต่ไม่ปฏิสัมพันธ์โดยตรงกับซับสเตรต และในสายพันธุ์ดั้งเดิมเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Asn373 กับ Thr376 แต่ในสายพันธุ์กลายทั้ง 2 ไม่เกิดพันธะไฮโดรเจน ซึ่งมีผลต่อการเข้าจับของซับสเตรตและเสถียรภาพของเอนไซม์

จากรายงานข้างต้นสามารถทำนายได้ว่าการที่เทอร์มินัลออกซิจีเนสของสายพันธุ์ SP2 และ A4 มีลำดับกรดอะมิโนแตกต่างกัน 2 ตำแหน่ง ซึ่งอยู่ในบริเวณ helix-grip fold ทั้ง 2 ตำแหน่งหรือตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่ง น่าจะที่มีผลต่อความจำเพาะของซับสเตรต ทำให้ ArhA1A2 ของสายพันธุ์ SP2 สามารถใช้อะซีแนพธีนเป็นซับสเตรตเพียงชนิดเดียว แต่สายพันธุ์ A4 สามารถใช้อะซีแนพธีน อะซีแนพธิลีน แนพธาลีน ฟีแนนทรีน แอนทราซีนและฟลูออแรนธีนเป็นซับสเตรตได้ และเนื่องจากตำแหน่ง Met261 ซึ่งในสายพันธุ์ A4 เป็น Thr261 มีโครงสร้างหมู่ข้างที่แตกต่างกันโดย Met ขนาดใหญ่กว่าและมีอะตอมซัลเฟอร์ในโมเลกุล อาจทำให้เกิดการบดบังบริเวณเข้าจับของซับสเตรต และตำแหน่ง Ser347 ซึ่งในสายพันธุ์ A4 เป็น Gly347 โดยทั้ง 2 ชนิดมีหมู่ข้างขนาดเล็กคล้ายกัน ต่างกันที่ Ser มีหมู่ไฮดรอกซิลทำให้ความมีขั้วมากกว่า Gly แต่ไม่สามารถระบุผลของทั้ง 2 ตำแหน่งได้ เพราะควรมีการศึกษาการแทนที่ลำดับอะมิโนทั้ง 2 ตำแหน่งหรือตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งด้วย Thr261 และ Gly347 ให้เหมือนกับหน่วยย่อยแอลฟาของเทอร์มินัลออกซิจีเนสของสายพันธุ์ A4 เพื่อศึกษาความจำเพาะต่อซับสเตรตว่ามีการเปลี่ยนแปลงหรือไม่เพื่อยืนยันคำทำนายดังกล่าวข้างต้น และเป็นข้อมูลสำหรับปรับปรุงเอนไซม์ให้มีประสิทธิ ภาพในการทำงานมากขึ้นตามวัตถุประสงค์ที่ต้องการ และควรศึกษาโครงสร้าง 3 มิติของอะซีแนพธีนออกซิจีเนส เพื่อทำนายบริเวณเข้าจับของซับสเตรตได้อย่างถูกต้องต่อไป