บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลองและสรุปผลการวิจัย

1. <u>การจำแนกฟีโนไทพ์ของเมไธโอนีนออกโซโทรพ</u>

โดยหลักการการกลายพันธุ์ควรเกิดได้ทั่วไปบนเส้นโครโมโซม จากการแยกกรดอะมิโนออกโซโทรพได้ <u>met</u> มากกว่า <u>thr</u> 4 เท่าโดยใช้กระบวนการแยกแบบเดียวกัน การที่พบเมไธโอนีนออกโซโทรพมากกว่าธรีโอนีนออกโซโทรพ นั้นอาจเนื่องมาจากจำนวนยีนของเอ็นไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์เมไธโอนีนจากโฮโมเซอรีนและซีรีนมากกว่ายีนของเอ็นไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ธรีโอนีนจากโฮโมเซอรีน 3 เท่า

การที่ <u>met</u> ที่แยกได้มีการเจริญในเมตาบอไลท์ระหว่างทาง (intermediate metabolite) ต่างกัน แสดงว่าฟีโนไทพ์ของมันแตกต่างกันด้วย <u>met</u> สายพันธุ์ที่สามารถเจริญในโฮโมซีสเตอีนและเมไธโอนีน เป็น <u>met</u> ที่มีความผิดปกติที่ยีนของเอ็นไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์โฮโมซีสเตอีนจากโฮโมเซอรีน <u>met</u> สายพันธุ์ที่สามารถเจริญในวิตามินบี 12 และเมไธโอนีนเป็น <u>met</u> ที่มีความผิดปกติที่ยีนของเอ็นไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์วิตามินบี 12 <u>met</u> สายพันธุ์ที่สามารถเจริญในเมไธโอนีนเท่านั้น คาดว่าเป็น <u>met</u> ที่มีความผิดปกติที่ยีนของเอ็นไซม์เอ็น 5, เอ็น 10-เมธิลีนเตตราไฮโดรโฟเลท รีดัคเตส ทั้งนี้เพราะว่าฟีโนทพ์ดังกล่าวนี้เป็นสายพันธุ์ที่ไม่สามารถรีดิวซ์เมธิลีนเตตราไฮโดรโฟเลทให้กลายเป็นเมธิลเตตราไฮโดรโฟเลท (ดูรูปที่ 1 ประกอบ) ซึ่งเป็นตัวให้หมู่เมธิลแก่โฮโมซีสเตอีนในการสังเคราะห์เมไธโอนีน

การที่ <u>met</u> สายพันธุ์ที่บกพร่องที่เอ็นไซม์ เอ็น 5 เอ็น 10–เมธิลีนเตตราไฮโดรโฟเลท รีดัคเตส เจริญได้สัดส่วนโดยตรงกับเมไธโอนีนในช่วง 0–10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรนั้นนับว่าเป็นสายพันธุ์ที่เหมาะสมในการตรวจสอบปริมาณเมไธโอนีนเพราะว่า

1. เป็นสายพันธุ์ที่มีความจำเพาะต่อเมไธโอนีนและมีความไวสูงกว่าการตรวจสอบโดยวิธีไตเตรท กล่าวคือ วิธีแรกจะวัดได้ในช่วงความไว 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่วิธีหลังจะวัดได้ในช่วง 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2. ประหยัดค่าใช้จ่ายกว่าการใช้ Leuconostoc mesenteriod P_{60} ตรวจสอบเพราะว่าไม่ต้องเสริมด้วยกรดอะมิโนอื่นอีก 15 ตัว เพียวรีน-พิริมิดีน เบส (purine pyrimidine base) และวิตามินดังเช่นการใช้ Leuconostoc mesenteriod P_{60} ตรวจสอบ

3. เป็นวิธีที่สะดวกและสามารถทำได้ง่าย เพราะสามารถตรวจสอบเมไธโอนีนในอาหารเชื้อได้โดยตรง โดยที่ไม่ต้องขจัดอนุมูลของอนินทรียสารที่ใช้เป็นอาหารเชื้อออกก่อนดังเช่นการตรวจสอบด้วยเครื่องวิเคราะห์กรดอะมิโนแบบอัตโนมัติ (automatic amino acid analyzer)

2. อัตราการเจริญของธรีโอนีนออกโซโทรพ

การที่พบว่าการเจริญของ thr ในอาหารที่เสริมด้วยธรีโอนีนปริมาณต่าง ๆ กันมีลักษณะรูปแบบของการเจริญเหมือนกัน หมายความว่าอัตราการเจริญของมันเท่ากันนั่นเอง ซึ่งอาจอุปมานได้ว่าปริมาณธรีโอนีนไม่ว่าที่ความเข้มข้นระหว่าง 10-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรจะถูกลำเลียงเข้าสู่เซลได้เร็วเท่า ๆ กัน (Piperno, J.R., and Oxender, D.L., 1968)

จากผลทดลองที่พบว่า การเจริญสูงสุดจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณธรีโอนีนไม่เกิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรนั้น แสดงว่า ปริมาณธรีโอนีนมากไปกว่านี้ไม่มีประโยชน์ต่อการเจริญของเซลอีกต่อไป ด้วยเหตุนี้จึงเลือกใช้ปริมาณนี้สำหรับเสริมในอาหารเลี้ยงเชื้อครั้งต่อไป ที่น่าสังเกตก็คือปริมาณความต้องการธรีโอนีนของเซลที่ให้ค่าการเจริญ 1 หน่วย OD. คือ 40 ไมโครกรัม ในขณะที่ความต้องการเมไธโอนีนของเซลที่ให้ค่าการเจริญ 1 หน่วย OD.คือ 5 ไมโครกรัม การที่ความต้องการธรีโอนีนมากกว่าเมไธโอนีนถึง 8 เท่าตัวเพื่อใช้เสริมเป็นอาหารสำหรับเพิ่มจำนวนเซล

ที่เท่า ๆ กันนั้นน่าจะหมายความว่าอัตราการใช้ธรีโอนีนนำไปเร็วกว่าเมไธโอนีน หรือปริมาณความต้องการธรีโอนีนเพื่อสังเคราะห์สารต่าง ๆ สูงกว่าเมไธโอนีน

3. การเลือกสายพันธุ์ที่ขับเมไธโอนีน

เนื่องจากเมไธโอนีน–ดีแอล–ซัลฟอกซิมีนมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและการยับยั้งการเจริญนี้อาจถูกผันกลับได้โดยเมไธโอนีน ดังนั้นเมไธโอนีน–ดีแอล–ซัลฟอกซิมีนเป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขันของเมไธโอนีน อีกประการหนึ่งการละลายน้ำของสารตัวนี้สูง และอำนาจการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียค่อนข้างสูง คือที่ความเข้มข้นประมาณ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถจะยับยั้งได้เกือบ 100 เปอร์เซนต์ ด้วยเหตุนี้จึงเหมาะมากที่จะใช้สารตัวนี้เป็นแอนาล็อกของเมไธโอนีนเพื่อค้นหาสายพันธุ์ที่ขับเมไธโอนีนออกมา

เนื่องจากการยับยั้งการซึมผ่านของแอนาล็อกของกรดอะมิโนเข้าสู่เซลอาจเกิดขึ้นได้สองกลไก คือ หนึ่งโดยการเปลี่ยนแปลงที่ผนังเซล และ สองโดยการเพิ่มปริมาณการสังเคราะห์กรดอะมิโนภายในเซลให้สูงขึ้น การที่พบว่าสายพันธุ์ที่ต้านเมไธโอนีน–ดีแอล–ซัลฟอกซิมีนมีสองลักษณะ คือ มี และ ไม่มี โคไลนีดาวล้อมเดือนล้อมรอบ รวมทั้งปรากฏว่าสายพันธุ์ที่ต้านแอนาล็อกแล้วไม่มีโคไลนีดาวล้อมเดือนล้อมรอบไม่ขับเมไธโอนีนออกนอกเซล เชื่อว่าลักษณะของฟีโนไทพ์ดังกล่าวนี้เกิดการต้านเมไธโอนีน–ดีแอล–ซัลฟอกซิมีน เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงที่ผนังเซล ยอมให้เมไธโอนีน–ดีแอล–ซัลฟอกซิมีนผ่านเข้าสู่เซลได้น้อยลง หรือไม่ยอมให้ผ่านเข้าสู่เซล ส่วนสายพันธุ์ที่ต้านแอนาล็อกแล้วมีโคไลนีดาวล้อมเดือนล้อมรอบนั้น พบว่า จะขับเมไธโอนีนออกภายนอกเซล เชื่อว่าสายพันธุ์ลักษณะดังกล่าวนี้เกิดการต้านเมไธโอนีน–ดีแอล–ซัลฟอกซิมีนเนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงที่ขบวนการสังเคราะห์เมไธโอนีน

เนื่องจาก พบว่า ขนาดของโคไลนีของสายพันธุ์ที่ต้านเมไธโอนีน–ดีแอล–ซัลฟอกซิมีนทั้งสองฟีโนไทพ์ดังกล่าวยังคงเป็นปฏิภาคผกผันกับความเข้มข้นของแอนาล็อก และที่ความเข้มข้นของแอนาล็อกขนาดเดียวกัน สายพันธุ์ที่ต้านแอนาล็อกแล้วมีโคไลนีดาวล้อมเดือนล้อมรอบขนาดโต

กว่า ($\underline{thr}_4$ $\underline{MSO}^r_2$) จะขับเมไธโอนีนออกได้มากกว่าสายพันธุ์ที่มีโคโลนีดาวล้อมเดือนล้อมรอบขนาดเล็กกว่า ($\underline{thr}_4$ $\underline{MSO}^r_1$) ที่เป็นดังนี้ อาจหมายความว่ากลไกการต้านต่อเมไธโอนีน-ดีแอล-ซัลฟอกซิมีน โดยการเปลี่ยนแปลงที่ผนังเซล หรือโดยการเพิ่มการสังเคราะห์เมไธโอนีนให้สูงขึ้น นั้นไม่อาจยับยั้งการซึมผ่านของเมไธโอนีน-ดีแอล-ซัลฟอกซิมีนเข้าสู่เซลได้อย่างสมบูรณ์

Umberger 1978 ได้เสนอว่าการเพิ่มปริมาณการสังเคราะห์เมไธโอนีนให้สูงขึ้นนั้นอาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงที่ยีนของขบวนการสังเคราะห์เมไธโอนีน 3 แห่ง

1. เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ยีนของเอ็นไซม์โฮโมเซอรีน ซัคซินิลทรานสเฟอเรส (homoserine succinyl transferase) ($\underline{met}$ I) ต้านต่อการยับยั้งโดยเมไธโอนีน หรือเอส-อะเดโนซิลเมไธโอนีน (S-adenosylmethionine) ทำให้สามารถสังเคราะห์เมไธโอนีนจากโฮโมเซอรีนได้มากขึ้น

2. เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ยีนควบคุม ($\underline{met}$ J) ทำให้การสังเคราะห์เอ็นไซม์ของขบวนการสังเคราะห์เมไธโอนีนไม่ถูกกดดันโดยปริมาณเมไธโอนีนหรือเอส-อะเดโนซิลเมไธโอนีน

3. เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ยีนของเอ็นไซม์ เอส-อะเดโนซิลเมไธโอนีนธินิเทส (S-adenosylmethionine synthetase)($\underline{metK}$)ทำให้มีการสังเคราะห์เอส-อะเดโนซิลเมไธโอนีน (เชื่อว่าตัวร่วมกดดันมากกว่าเมไธโอนีน) ได้น้อยลง

การที่พบว่า $\underline{thr}_4$ $\underline{MSO}^r_1$ และ $\underline{thr}_4$ $\underline{MSO}^r_2$ ขับเมไธโอนีนออกได้ต่างกันคาดว่าฟีโนไทพ์ทั้งสองเกิดการเปลี่ยนแปลงที่ยีนของขบวนการสังเคราะห์ต่างกันดังได้กล่าวมาแล้ว (Umberger, 1978) ส่วนการที่พบว่า $\underline{thr}_4$ $\underline{MSO}^r$ สามารถขับเมไธโอนีนได้มากกว่า $\underline{WT}$ $\underline{MSO}^r$ นั้นคาดว่าอาจเนื่องมาจากการสร้างเอ็นไซม์ แอสปาร์โตไคเนส-วัน-โฮโมเซอรีนดีไฮโดรจีเนส-วัน ของ $\underline{thr}$ไม่ถูกกดดันเมื่อเสริมปริมาณธรีโอนีนลงไปในอาหารเป็นจำนวนจำกัด และคาดว่า $\underline{thr}_4$ เป็น $\underline{thr}$ ที่มีความบกพร่องที่เอ็นไซม์โฮโมเซอรีนไคเนส (เอ็นไซม์เร่งปฏิกริยาการสังเคราะห์โฮโมเซอรีนฟอสเฟตจากโฮโมเซอรีน) ซึ่งมีการสะสมโฮโมเซอรีน (โฮโมเซอรีนเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์เมไธโอนีนและธรีโอนีน) และนำไปใช้สังเคราะห์เมไธโอนีนเพียงอย่างเดียว

ส่วนการที่ thr MSO^r บางสายพันธุ์ขับเมไธโอนีนได้น้อยกว่า WI MSO^r (สังเกตจากขนาดของ met ที่ล้อมรอบจากการทำ cross feeding) เชื่อว่าสายพันธุ์เหล่านี้เป็น thr ที่มีความบกพร่องที่เอ็นไซม์ธรีโอนีนซินทิเทส (threonine synthetase) เพราะว่า thr สายพันธุ์ที่บกพร่องที่เอ็นไซม์นี้ทำให้การทำงานของเอ็นไซม์โฮโมเซอรินไคเนส (homoserinekinase) ไม่ถูกยับยั้งโดยปริมาณธรีโอนีนภายในเซล (ดูรูปที่ 1 ประกอบ) ทำให้โฮโมเซอรีนถูกนำไปใช้ในการสังเคราะห์โฮโมเซอรีนฟอสเฟต (ซึ่งเกิดขึ้นในอัตราที่เร็วกว่าการนำไปใช้สังเคราะห์ออโท-ซัคซินิลโฮโมเซอรีน ราว 40 เท่า) ได้มากกว่า

จะเห็นได้ว่าการสร้างสายพันธุ์ที่ขับเมไธโอนีนออกโดยใช้แบคทีเรียกรัมลบจะขับเมไธโอนีนออกได้น้อยมากเมื่อเทียบกับการสร้างสายพันธุ์โดยกระบวนการอย่างเดียวกัน แต่เปลี่ยนเป็นใช้สายพันธุ์ของแบคทีเรียกรัมบวก เช่น สายพันธุ์ที่ต้านเอทไธโอนีน (Ethionine) ของ Brevibacterium flavum จะขับเมไธโอนีนได้ 0.4 กรัมต่อลิตรในสารอาหารที่มีน้ำตาล 10 เปอร์เซนต์ (Kase, H., and Nakayama, K., 1974) ที่เป็นดังนี้คาดว่าแบคทีเรียกรัมลบคงสามารถนำเมไธโอนีนไปใช้ในการสังเคราะห์ชิ้วโมเลกุลชนิดอื่นเร็วกว่าจุลินทรีย์กรัมบวกนั่นเอง

4. คุณสมบัติทั่วไปและศักยภาพในการเป็นอาหารของแบคทีเรียของกากน้ำตาล

4.1 คุณสมบัติทั่วไปของกากน้ำตาล โดยทั่วไปแล้วกากน้ำตาลจะมีองค์ประกอบที่คล้ายคลึงกัน แต่จะแตกต่างกันเฉพาะในด้านอัตราส่วนขององค์ประกอบ จากการศึกษาจะเห็นได้ว่า กากน้ำตาลถึงแม้มีสีก่อนฟอกเหมือนกัน แต่สีหลังฟอกจะแตกต่างกัน และจะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณฟอสเฟตอนินทรีย์ และไนโตรเจนทั้งหมดแตกต่างกันด้วย โดยเฉพาะปริมาณฟอสเฟตอนินทรีย์ และไนโตรเจนทั้งหมดในกากน้ำตาลที่มาจากต่างท้องถิ่นกันจะแตกต่างกันอย่างชัดเจน ความแปรปรวนในด้านปริมาณองค์ประกอบนี้อาจเนื่องจากสาเหตุต่าง ๆ ดังนี้ คือ กรรมวิธีในการผลิตน้ำตาล ชนิดและพันธุ์ของพืชที่นำมาสกัดน้ำตาล ตลอดถึงแหล่งที่ปลูกและสิ่งแวดล้อมอื่น ๆ

4.2 <u>ศักยภาพในการเป็นอาหารของแบคทีเรียของกากน้ำตาล</u> ศักยภาพในการเป็นอาหารของแบคทีเรียของกากน้ำตาลในลักษณะการเป็นต้นตอคาร์บอน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ซึ่งเป็นธาตุที่แบคทีเรียทุกชนิดต้องการสูงกว่าธาตุชนิดอื่นนอกเหนือธาตุไฮโดรเจนและออกซิเจน ซึ่งอาจได้เพียงพอจากน้ำ

ศักยภาพการเป็นอาหารแบคทีเรียในแง่ต้นตอคาร์บอน จะเห็นได้ว่า เอสเคอริเคีย โคไล เค12 (3110) เป็นแบคทีเรียที่ใช้ซูโครสเป็นสารต้นตอคาร์บอนไม่ได้ ดังนั้นกากน้ำตาลที่ไฮโดรไลซ์แล้วเท่านั้นจึงเป็นสารอาหารของมันได้อย่างเต็มที่ ส่วนประสิทธิภาพในการเป็นต้นตอคาร์บอนของกากน้ำตาลสูงเกือบเท่ากับกลูโคส คือ น้ำตาลรีดิวซ์ก่อนและหลังไฮโดรไลซ์มีประสิทธิภาพในการเป็นต้นตอคาร์บอนประมาณ 90 เปอร์เซนต์

ปริมาณฟอสเฟตและโปรตีนที่วิเคราะห์ได้จะแปรโดยตรงกับประสิทธิภาพการเป็นอาหารแบคทีเรียของกากน้ำตาล

กากน้ำตาลบางท้องถิ่นจะมีปริมาณฟอสเฟตสูงเพียงพอที่แบคทีเรียจะนำไปใช้จนได้การเจริญสูงสุด เมื่อใช้กากน้ำตาลเพียง 3–4 เปอร์เซนต์เป็นอาหารแบคทีเรีย และปริมาณฟอสเฟตที่เติมลงไปซึ่งทำให้แบคทีเรียเจริญสูงสุดเท่ากับ 70 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

แม้ว่าการเจริญของแบคทีเรียจะแปรโดยตรงกับปริมาณของสารที่วิเคราะห์ได้จากกากน้ำตาล แต่มีสิ่งซ่อนเร้นอยู่ คือ การหน่วงเหนี่ยวการเจริญของมัน การทดลองนี้บ่งชี้ว่าสารบางอย่างจากกากน้ำตาลมีอิทธิพลต่อการปรับตัวของแบคทีเรีย แม้ในขั้นนี้ไม่ทราบธรรมชาติที่แน่นอนของมัน แต่ก็อาจกล่าวได้เลา ๆ ว่า สารที่หน่วงเหนี่ยวการเจริญไม่ใช่ซูโครส

กากน้ำตาลเหมาะสมที่จะนำมาเป็นอาหารแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ขับเมไธโอนีน (thr MSO^r, WT MSO^r)เพราะว่าสายพันธ์ดังกล่าวนี้มีลักษณะการเจริญเป็นแบบเดียวกันกับไวลดไทพ์ (wild type) การแก้ไขปัญหาการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของมันสามารถทำได้โดยเลี้ยงแบคทีเรียเริ่มต้น (Starter innocculum) ในอาหารที่มีกากน้ำตาลเป็นส่วนผสม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อเสนอแนะ

ในการที่จะปรับเอสเคอริเคีย โคไล เค12 ให้เป็นสายพันธุ์ที่ขับเมไธโอนีนได้มากขึ้น ควรมีหลักการสร้างและแยกสายพันธุ์ดังข้อเสนอแนะต่อไปนี้

1. สร้างสายพันธุ์ที่ต้านแอนาล็อกของเมไธโอนีนมากกว่าหนึ่งตัว

2. แยกสายพันธุ์ thr, lys เพื่อให้แอสปาร์เตทถูกนำไปใช้ในการสังเคราะห์เมไธโอนีนเพียงอย่างเดียว

3. อาจนำมาต้านไตรอะโซล (Triazole) เพื่อเลือกสายพันธุ์ที่สามารถสังเคราะห์ซีสเตอีน (cysteine) ได้สูงขึ้น (ซีสเตอีนเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เมไธโอนีน ดูรูปที่ 1 ประกอบ) ผลลัพธ์ก็คือ ทำให้สังเคราะห์เมไธโอนีนได้มากขึ้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประโยชน์ของงานวิจัยนี้

1. ได้นำความรู้พันธุกรรมระดับโมเลกุลมาสร้างสายพันธุ์ที่สามารถใช้ตรวจสอบปริมาณกรดอะมิโนโดยวิธีชีวภาพ

2. ได้นำความรู้พันธุกรรมระดับโมเลกุลมาใช้แยกสายพันธุ์ที่ขับกรดอะมิโนออกภายนอกเซล

3. ได้ทราบเหตุผลที่แฝงอยู่ภายใต้การสร้างสายพันธุ์ที่ขับกรดอะมิโนในระดับอุตสาหกรรม นอกจากขึ้นอยู่กับความเร็วในการสังเคราะห์กรดอะมิโนแล้วยังขึ้นอยู่กับอัตราเร็วในการใช้กรดอะมิโนชนิดนั้นในการสังเคราะห์ชีวโมเลกุลชนิดอื่นอีกด้วย การเลือกจุลินทรีย์มาสร้างเป็นสายพันธุ์ที่ขับกรดอะมิโนต้องพิจารณาถึงปริมาณกรดอะมิโนอิสระชนิดนั้นภายในเซลเป็นส่วนประกอบด้วย

4. ได้ทราบว่า การนำกากน้ำตาลไปเป็นอาหารเชื้อได้ดีนั้นต้องขจัดเวลาการหน่วงเหนี่ยวการเจริญเติบโตของเชื้อก่อน โดยเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นในสารอาหารที่มีกากน้ำตาลเป็นส่วนผสม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย