บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. การแยกเมไธโอนีนออกโซโทรพ (met)

การแยกเมไธโอนีนออกโซโทรพ โดยการกลายพันธุ์ด้วย NTG และฆ่าเซลที่ไม่ต้องการทิ้งด้วยเพนนิซิลินจีและคีโซโคลเซอรีน ตามที่ได้กล่าวแล้วในบทที่ 2 (8) ผลการทดลองพบว่าความถี่ที่สามารถแยกเมไธโอนีนออกโซโทรพ (met) ตามกระบวนการทดลองนี้เท่ากับ 2 เปอร์เซนต์ คือได้ met 72 ตัว จากจำนวนที่เลือกทั้งหมด 3,600 ตัว หรือได้ met เท่ากับ 0.2 เปอร์เซนต์ของเซลที่นำมากลายพันธุ์

2. การแยกและจำแนกฟีโนไทพ์ของเมไธโอนีนออกโซโทรพ (met)

เนื่องจากขบวนการสร้างเมไธโอนีนประกอบด้วยเอ็นไซม์ทำงานต่อเนื่องกันหลายตัว และ met ที่นำมาตรวจสอบเมไธโอนีนในสารอาหารได้ต้องเป็น met สายพันธุ์ที่มีความผิดปกติที่เอ็นไซม์เอ็น 5 เอ็น 10–เมธิลีนเตตราไฮโดรโฟเลท รีดัคเตส met ที่มีฟีโนไทพ์ดังกล่าวนี้อาจเจริญได้โดยเสริมเมไธโอนีนในอาหารสูตรปรับต่ำเพียงอย่างเดียว แต่ไม่สามารถเจริญได้ถ้าใช้อาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยเมตาบอไลท์ระหว่างทางของขบวนการ เช่นโฮโมซีสเตอีน วิตามินบี 12 ซีรีน ด้วยเหตุนี้จึงนำ met ที่แยกได้มาจำแนกฟีโนไทพ์ โดยการทดสอบการเจริญเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยอาหารเสริมต่างกันแสดงในตารางที่ 1 พบว่า met ที่เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยเมไธโอนีนเพียงอย่างเดียว ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยเมตาบอไลท์ชนิดอื่น มีอยู่รวมกันทั้งหมด 6 ตัว เชื่อว่าฟีโนไทพ์ของ met ดังกล่าวนี้ผิดปกติที่เอ็นไซม์ เอ็น 5 เอ็น 10–เมธิลีนเตตราไฮโดรโฟเลท รีดัคเตส นอกจากนี้ยังพบว่าmet ที่เจริญได้เมื่อเสริมด้วยเมตาบอไลท์อื่น คือ โฮโมซีสเตอีน มีอยู่รวมกัน

ทั้งหมด 23 ตัว เชื่อว่าฟีโนไทพ์ที่สองนี้ควรผิดปกติที่เอ็นไซม์ใช้ในการสังเคราะห์โฮโมซีสเตอีนจากโฮโมเซอรีน และ met ฟีโนไทพ์ที่สาม พบว่า คือสายพันธุ์ที่เจริญได้เมื่อเสริมด้วยวิตามินบี 12 ซึ่งพบทั้งหมด 43 ตัว ฟีโนไทพ์หลังสุดนี้ควรเป็นสายพันธุ์ที่มีความผิดปกติที่เอ็นไซม์ใช้ในการสังเคราะห์วิตามินบี 12

ตารางที่ 1 การจำแนกฟีโนไทพ์ของเมไธโอนีนออกโซโทรพ

อาหารเสริม	จำนวนแบคทีเรียที่ตรวจพบ	เอ็นไซม์ที่อาจเกิดการบกพร่อง
เมไธโอนีน	6	เอ็น 5 เอ็น 10 เมธิลีนเตตราไฮโดร-โฟเลท รีดักเตส
โฮโมซีสเตอีน หรือเมไธโอนีน	23	เอ็นไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์โฮโมซีล-เตอีนจากโฮโมเซอรีน
วิตามินบี 12 หรือเมไธโอนีน	43	เอ็นไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์วิตามินบี-12

นำเมไธโอนีนออกโซโทรพ (met) มากริด (grid) บนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยเมไธโอนีน พิมพ์ลงบนเพลทที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำอย่างเดียว และที่เสริมด้วยโฮโมซีสเตอีน วิตามินบี 12 โฮโมซีสเตอีนกับวิตามินบี 12 และซีรีนกับเตตราไฮโดรโฟเลท

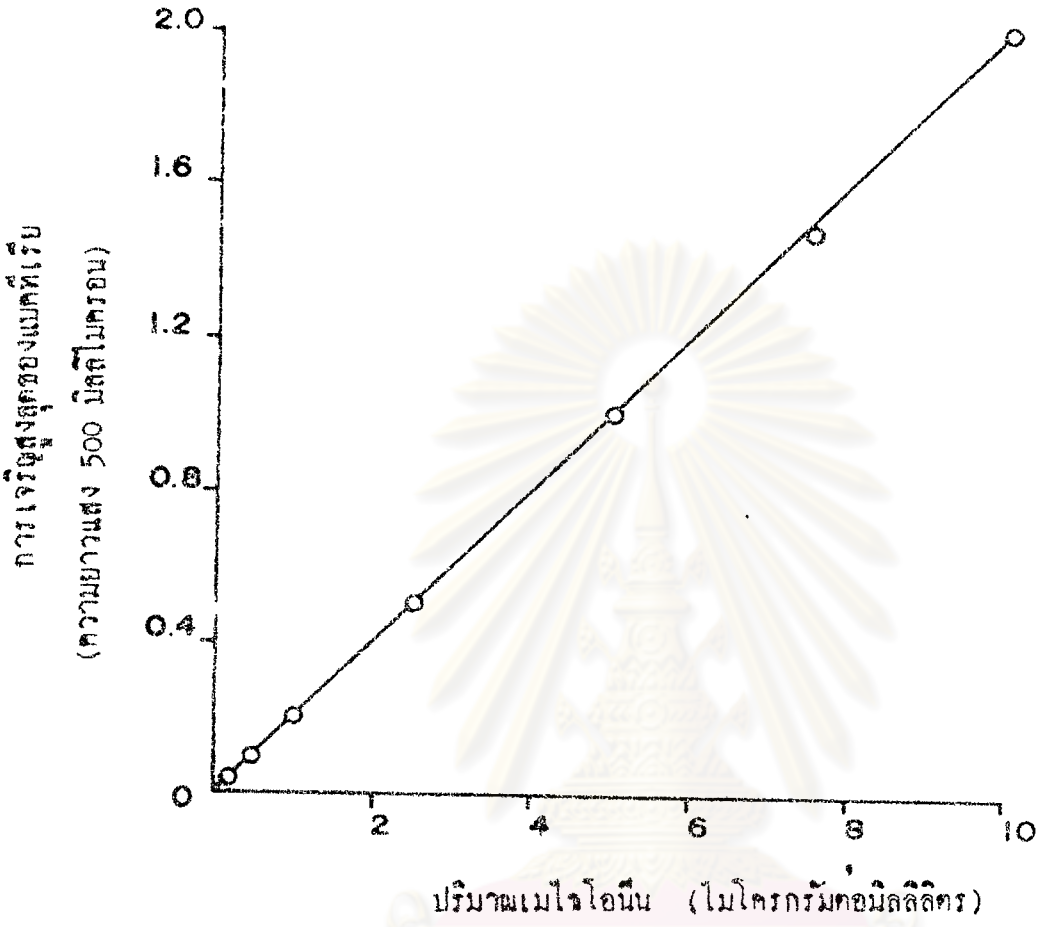
met ที่คาดว่ามีความผิดปกติที่เอ็นไซม์เอ็น 5 เอ็น 10-เมธิลีนเตตราไฮโดรโฟเลท รีดัคเตสในจำนวน 6 ตัวนี้พบว่าเป็นตัวเสถียร เพียง 5 ตัว ทั้งนี้ตัดสินจากความถี่ในการผันกลับ (reversion frequency) ของสายพันธุ์ทั้ง 5 คือ 10^{-7} ส่วนตัวที่หกความถี่ในการผันกลับสูงมาก

เมื่อนำเมไธโอนีนออกโซโทรพที่คัดเลือกแล้วว่าอาจมีความผิดปกติที่เอ็นไซม์ เอ็น 5 เอ็น 10–เมธิลีนเตตราไฮโดรโฟเลท รีดัคเตส เพาะเลี้ยงที่ 37°ซ ความเร็ว 120 รอบต่อนาที วัดการเจริญของแบคทีเรียที่ความยาวแสง 5.0 มิลลิไมครอน ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 2 พบว่า ที่เวลา 10–16 ชั่วโมง แบคทีเรียมีการเจริญเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณเมไธโอนีน 0–10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเพิ่มปริมาณเมไธโอนีนสูงกว่านี้เส้นตรงจะเบี่ยงเบนไปจากเดิม

3. <u>การแยกธรีโอนีนออกโซโทรพ (thr)</u>

การแยกธรีโอนีนออกโซโทรพ การทดลองเช่นเดียวกับการแยกเมไธโอนีนออกโซโทรพตามที่ได้กล่าวในบทที่ 2 (8) แต่ที่ใดเสริมด้วยเมไธโอนีนเปลี่ยนเป็นเสริมด้วยธรีโอนีน ผลการทดลองพบว่า ความถี่ที่สามารถแยกธรีโอนีนออกโซโทรพ (thr) ตามกระบวนการทดลองนี้เท่ากับ 0.5 เปอร์เซนต์ คือ ได้ thr 10 ตัวจากจำนวนที่เลือกทั้งหมด 2,000 ตัว หรือได้เท่ากับ 0.05 เปอร์เซนต์ของเซลที่นำมากลายพันธุ์

ในจำนวนธรีโอนีนออกโซโทรพ (thr) ที่ได้ 10 ตัว พบว่าเป็นฟีโนไทพ์ที่เสถียร เพียง 6 ตัว และทั้ง 6 ตัวมีความถี่ในการผันกลับเท่ากับ 10^{-7} จึงคาดว่าการกลายพันธุ์ของมันเป็นแบบ point mutation สายพันธุ์ที่แยกได้นี้ให้ชื่อว่า thr_1, thr_2.....thr_6 ตามลำดับ



รูปที่ 2 การเจริญสูงสุดของ met สายพันธุ์ที่มีความบกพร่องที่เอ็นไซม์ เอ็น 5 เอ็น 10-เมธิลีน เทตราไฮโดรโฟเลท รีดัคเตส (รายละเอียดของการทดลองระบุไว้ในวิธีการทดลอง ข้อ 8.4)

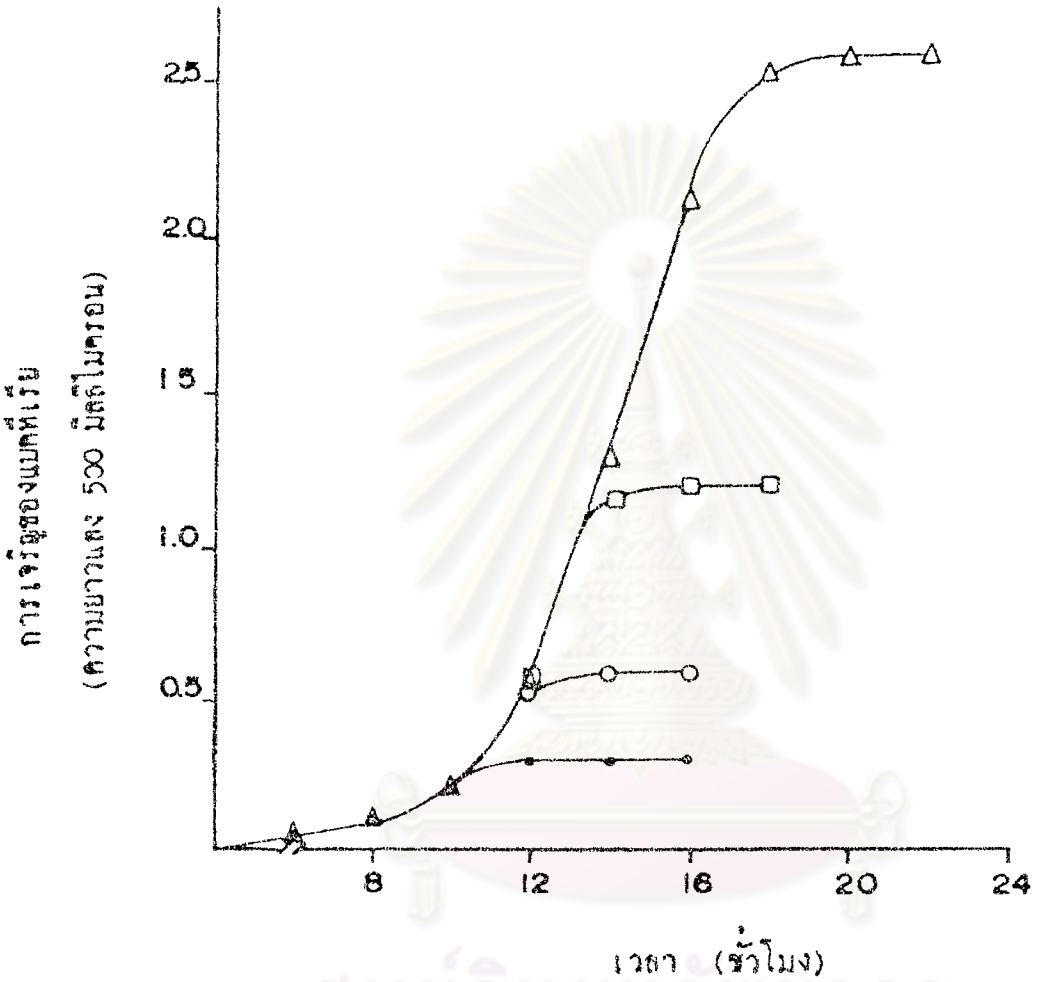
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. ลักษณะการเจริญของธรีโอนีนออกโซโทรพต่อปริมาณธรีโอนีน

เพื่อทดสอบการเจริญของธรีโอนีนออกโซโทรพที่ 37°ซ 120 รอบต่อนาที ในอาหารที่เสริมด้วยธรีโอนีนปริมาณต่างกัน ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 3 ซึ่งปรากฏว่า รูปแบบของการเจริญ (growth profile) ของ $\underline{thr}_4$ เหมือนกัน ไม่ว่าจะเสริมด้วยธรีโอนีนปริมาณ 10, 20, 40 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และปรากฏว่า thr ทุกตัวมีลักษณะเช่นเดียวกันนี้ ยกเว้นแต่ว่าการเจริญสูงสุดแปรปรวนบ้างเล็กน้อยระหว่างสายพันธุ์ทั้ง 6 แสดงในรูปที่ 4 เป็นที่น่าสังเกตว่าการเสริมด้วยธรีโอนีนตั้งแต่ 0–100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในอาหารสูตรปรับต่ำจะทำให้การเจริญสูงสุดของเชื้อเพิ่มขึ้นเป็นปฏิภาคโดยตรง และความเบี่ยงเบนจะเกิดในช่วง 100–200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ถ้าหากเพิ่มปริมาณธรีโอนีนสูงกว่านี้การเจริญสูงสุดที่ได้ไม่เพิ่มขึ้นจากเดิมแต่อย่างไร

5. การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยเมไธโอนีน–ดีแอล–ซัลฟอกซิมีน

นำเอสเคอริเดีย โคไล เค12 (3110)WT มาเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำที่ 37°ซ จนถึง mid log phase เติมเมไธโอนีน–ดีแอล–ซัลฟอกซิมีน ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 10–1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรลงไปในอินนอคคิวลัม ผลการยับยั้งการเจริญแสดงในรูปที่ 5 พบว่าเมไธโอนีน–ดีแอล–ซัลฟอกซิมีนที่ความเข้มข้น 10–50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรจะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้แตกต่างกัน แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นให้สูงกว่านี้ คือ ความเข้มข้น 50–1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญไม่แตกต่างกันมาก แต่เมื่อเติมเมไธโอนีนร่วมกับเมไธโอนีน–ดีแอล–ซัลฟอกซิมีน กล่าวคือ เติมเมไธโอนีนและเมไธโอนีน–ดีแอล–ซัลฟอกซิมีน อย่างละ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรพร้อม ๆ กัน ผลการทดลองพบว่าการยับยั้งการเจริญโดยเมไธโอนีน–ดีแอล–ซัลฟอกซิมีนจะช้ากว่าเดิมเล็กน้อย แต่เมื่อลองเพิ่มปริมาณเมไธโอนีนช่วงความเข้มข้นสูงกว่านี้ (10–200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) พบว่า ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเมไธโอนีน–ดีแอล–ซัลฟอกซิมีนก็มิได้ลดน้อยลงจากเดิม



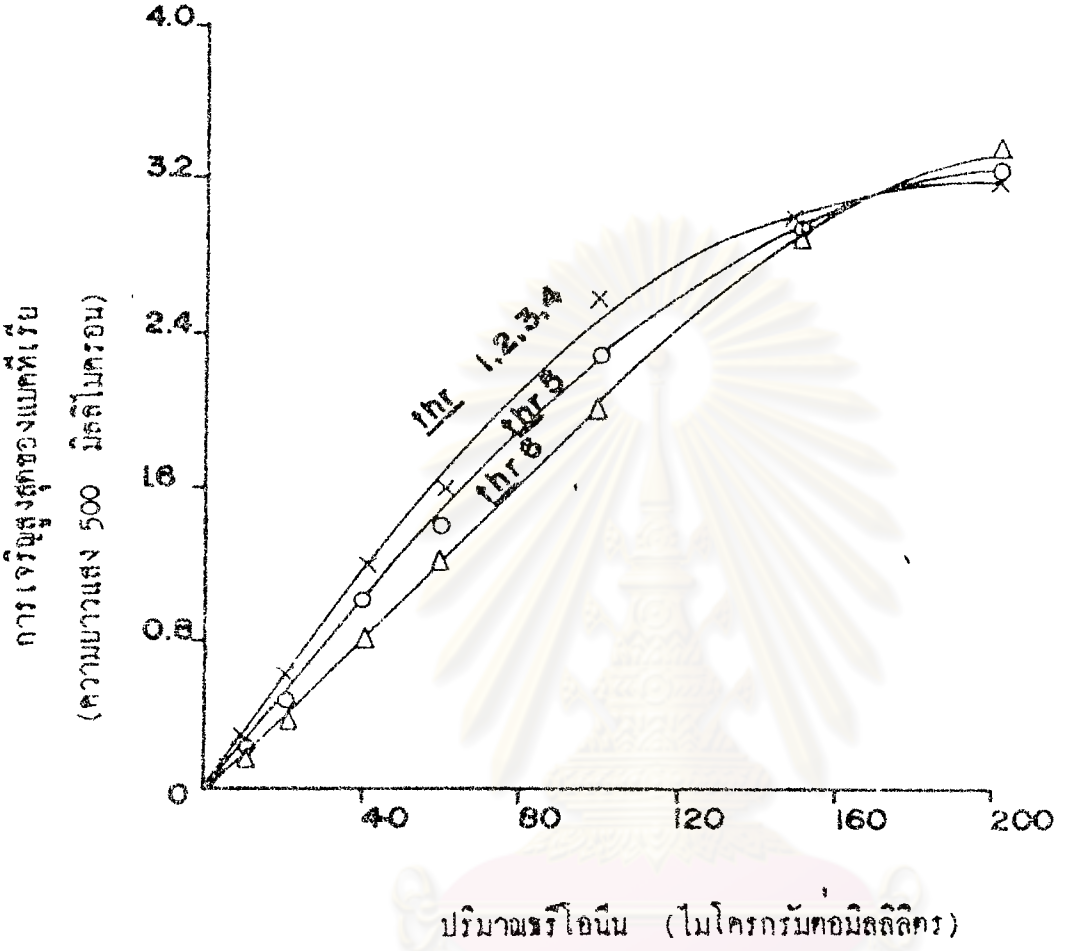
รูปที่ 3 การเจริญของ thr_4 ในธรีโอนีนปริมาณต่างกัน
(รายละเอียดของการทดลองระบุไว้ในวิธีการทดลองข้อ 8.4)

●—●—● คือ การเจริญของ thr_4 ที่เสริมด้วยธรีโอนีน 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

○—○—○ คือ การเจริญของ thr_4 ที่เสริมด้วยธรีโอนีน 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

□—□—□ คือ การเจริญของ thr_4 ที่เสริมด้วยธรีโอนีน 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

△—△—△ คือ การเจริญของ thr_4 ที่เสริมด้วยธรีโอนีน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

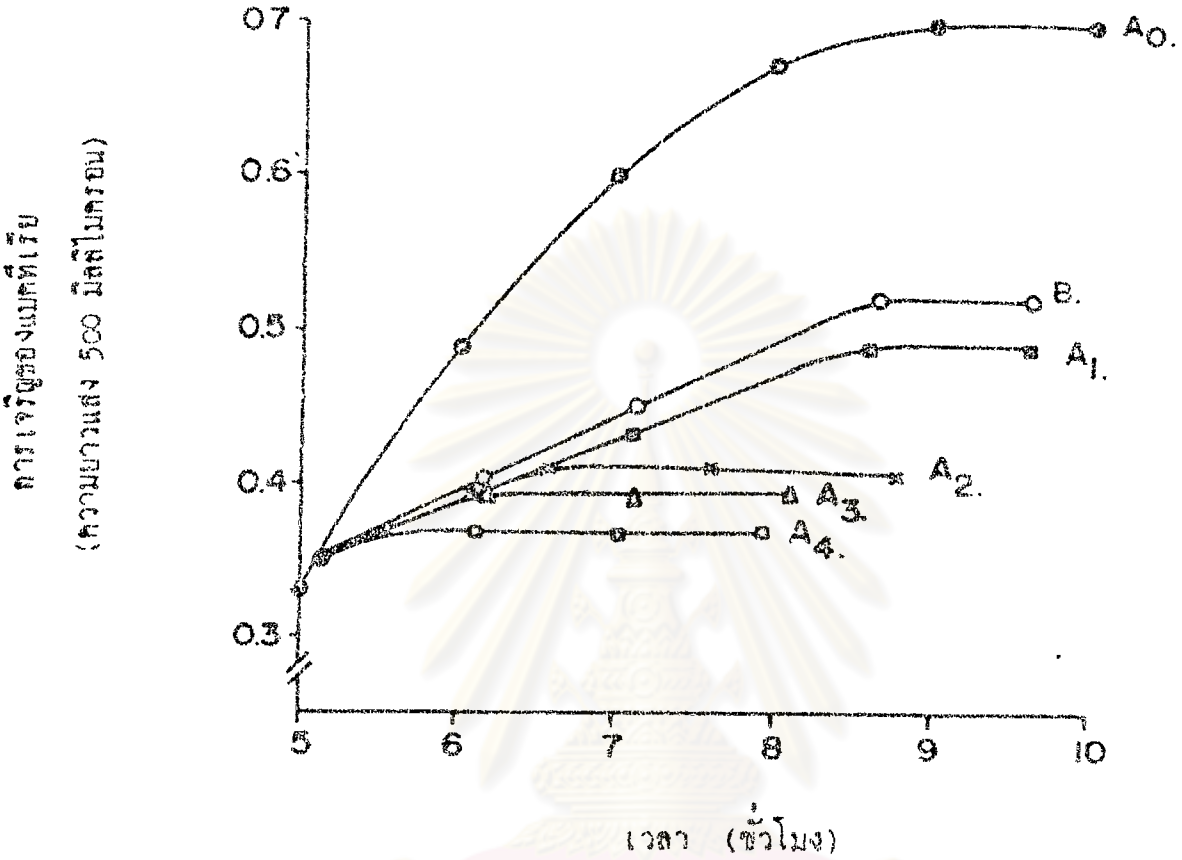


รูปที่ 4 การเจริญสูงสุดของ thr ในธรีโอนีนปริมาณต่างกัน
(รายละเอียดของการทดลองได้ระบุไว้ในวิธีการทดลองข้อ 8.4)

×—×—× คือ การเจริญสูงสุดของ thr_1, thr_2, thr_3, thr_4 ที่ปริมาณธรีโอนีน 10, 20, 40, 60, 100, 150 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

○—○—○ คือ การเจริญสูงสุดของ thr_5 ที่ปริมาณธรีโอนีน 10, 20, 40, 60, 100, 150 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

△—△—△ คือ การเจริญสูงสุดของ thr_6 ที่ปริมาณธรีโอนีน 10, 20, 40, 60, 100, 150 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 5 การเจริญของเอสเคยริเคีย โคไล เค12 ในเมไชโอนีน-คีแอล-ซัลฟอกซิมีน ปริมาณต่างกัน (แบคทีเรียถูกเลี้ยงไว้ในหลอดทดลองที่สามารถใช้อ่านค่าจากเครื่องวัดความเข้มของการดูดแสงโดยตรงติดตามการเจริญของเชื้อที่อยู่ในอาหารเต็มหลอดทดลองที่เวลาต่าง ๆ กัน)

A_0 คือ การเจริญของ WT ในอาหารสูตรปรับต่ำ.

A_1 คือ การเจริญของ WT ในเมไชโอนีน-คีแอล-ซัลฟอกซิมีน 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

A_2 คือ การเจริญของ WT ในเมไชโอนีน-คีแอล-ซัลฟอกซิมีน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

A_3 คือ การเจริญของ WT ในเมไชโอนีน-คีแอล-ซัลฟอกซิมีน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

A_4 คือ การเจริญของ WT ในเมไชโอนีน-คีแอล-ซัลฟอกซิมีน 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

B คือ การเจริญของ WT ในเมไชโอนีน-คีแอล-ซัลฟอกซิมีน 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเมไชโอนีน 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

6. <u>การเลือกสายพันธุ์ที่ขับเมไธโอนีน</u>

เมื่อนำแบคทีเรียที่ต้องการแยก (อีโคไล เค12 (3110) <u>thr</u>, <u>WT</u>) มาต้านยาที่เป็นแอนาล็อกของเมไธโอนีน (methionine analog) ชื่อว่า เมไธโอนีน–ดีแอล–ซัลฟอกซิมีน ที่ความเข้มข้นลดหลั่นกันตั้งแต่ 1,000 ถึง 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในระยะเวลาหนึ่ง พบว่ามีแบคทีเรียจำนวนหนึ่งต้าน เมไธโอนีน–ดีแอล–ซัลฟอกซิมีนได้ ลักษณะการต้านต่อเมไธโอนีน–ดีแอล–ซัลฟอกซิมีนถูกรวบรวมไว้ในตารางที่ 2 พบว่า การเจริญของแบคทีเรียที่ต้านต่อเมไธโอนีน–ดีแอล–ซัลฟอกซิมีน มีสองลักษณะ คือ เกิดโคโลนีสีน้ำตาลนูนขนาดเล็กและขนาดใหญ่ พบว่า ขนาดของโคโลนีเป็นปฏิภาคผกผันกับความเข้มข้นของ เมไธโอนีน–ดีแอล–ซัลฟอกซิมีน และยังพบว่าโคโลนีทั้งสองขนาดจะมีและไม่มีโคโลนีขนาดเล็กกว่าซึ่งเรียกว่า โคโลนีดาวล้อมเดือน (satellite colonies) ล้อมรอบ นอกจากนี้ยังได้สังเกตเห็นว่าที่ความเข้มข้นของเมไธโอนีน–ดีแอล–ซัลฟอกซิมีนสูงมักไม่พบสายพันธุ์ที่ต้านต่อเมไธโอนีน–ดีแอล–ซัลฟอกซิมีนแล้วมีโคโลนีดาวล้อมเดือนล้อมรอบ และที่ความเข้มข้นเมไธโอนีน–ดีแอล–ซัลฟอกซิมีนเดียวกัน ขนาดของสายพันธุ์ที่ต้านต่อเมไธโอนีน–ดีแอล–ซัลฟอกซิมีน ซึ่งมีโคโลนีดาวล้อมเดือนล้อมรอบและขนาดของโคโลนีดาวล้อมเดือนยังไม่เท่ากับอีกด้วย แต่ขนาดของโคโลนีทั้งสองชนิดนี้จะสอดคล้องกัน

ความถี่ที่พบ <u>thr</u> <u>MSO</u>^{r} และ <u>WT</u> <u>MSO</u>^{r} คืออัตราระหว่างโคโลนีสีน้ำตาลนูนขนาดเล็กและขนาดใหญ่ ที่มีและไม่มีโคโลนีดาวล้อมเดือนล้อมรอบต่อจำนวนเชื้อที่ต้านแอนาล็อกทั้งหมดเท่ากับ 2×10^{-5} ในจำนวนนี้พบว่าจำนวนที่มีโคโลนีดาวล้อมเดือนล้อมรอบลดลง 10 เท่าจะอยู่ในช่วง $2\text{–}3 \times (10^{-6})$ คือความถี่ที่พบสายพันธุ์ที่ขับเมไธโอนีน ซึ่งยืนยันด้วยผลการ cross fedding

ตารางที่ 2 ลักษณะของสายพันธุ์ที่ต้าน เมไธโอนีน-ดีแอล-ซัลฟอกซีมีน ($\underline{MSO}^r$) ในเพลทที่มีความเข้มข้นของแอนาล็อกลดหลั่นกัน

หมายเลขแบคทีเรีย	ลักษณะของเชื้อบนเพลท	(1) ความถี่ที่พบ $\underline{MSO}^r$ โดยโดยประมาณ	(2) ความถี่ที่พบสายพันธุ์ที่ขับเมไธโอนีนโดยประมาณ	(3) จำนวนที่แยกมาศึกษา
$\underline{WT}$	สีน้ำตาลนั้นขนาดเล็กและขนาดใหญ่เป็นปฏิภาคผกผันกับความเข้มข้นของเมไธโอนีน-ดีแอล-ซัลฟอกซิมีน โคโลนีทั้งสองขนาดจะมีและไม่มีโคโลนีดาวล้อมเดือนล้อมรอบ	2×10^{-5}	2×10^{-6}	6
$\underline{thr}_1$		2×10^{-5}	3×10^{-6}	6
$\underline{thr}_2$		2×10^{-5}	2×10^{-6}	6
$\underline{thr}_3$		2×10^{-5}	2×10^{-6}	6
$\underline{thr}_4$		2×10^{-5}	3×10^{-6}	6
$\underline{thr}_5$		2×10^{-5}	2×10^{-6}	4
$\underline{thr}_6$		2×10^{-5}	2×10^{-6}	6

(1) ความถี่ที่พบ $\underline{MSO}^r$ โดยประมาณคือ อัตราส่วนระหว่างโคโลนีสีน้ำตาลนูนขนาดเล็ก และขนาดใหญ่ที่มีและไม่มีโคโลนีดาวล้อมเดือนล้อมรอบต่อจำนวนที่เพลททั้งหมด

(2) ความถี่ที่พบสายพันธุ์ที่ขับเมไธโอนีนโดยประมาณคืออัตราส่วนระหว่างโคโลนีสีน้ำตาลนูนขนาดเล็กและขนาดใหญ่ที่มีโคโลนีดาวล้อมเดือนล้อมรอบต่อจำนวนที่เพลททั้งหมด

(3) จำนวนที่แยกมาศึกษาคือ โคโลนีที่ต้านแอนาล็อกของเมไธโอนีน ($\underline{MSO}^r$) ที่มีและไม่มีโคโลนีดาวล้อมเดือนล้อมรอบมาทำ cross feeding กับ $\underline{met}$ เทียบขนาดของ $\underline{met}$ ที่ขึ้นล้อมรอบภายใน 3 วัน

รูปที่ 6 เป็นการแสดง cross feeding ระหว่าง thr กับ met (cross feeding คือการเลือกสายพันธุ์ที่ขับเมตาบอไลท์ โดยใช้สายพันธุ์ที่ต้องการเมตาบอไลท์ชนิดนั้นเป็นตรรชนีบ่งชี้ภายในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่ปราศจากเมตาบอไลท์ชนิดนั้น) โดยกระจาย met 10^3 เซลลงไปในอาหารสูตรปรับต่ำแล้วเขี่ยแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบการขับเมไธโอนีน (thr) ลงไป พบว่า met ไม่สามารถขึ้นล้อมรอบ thr ได้

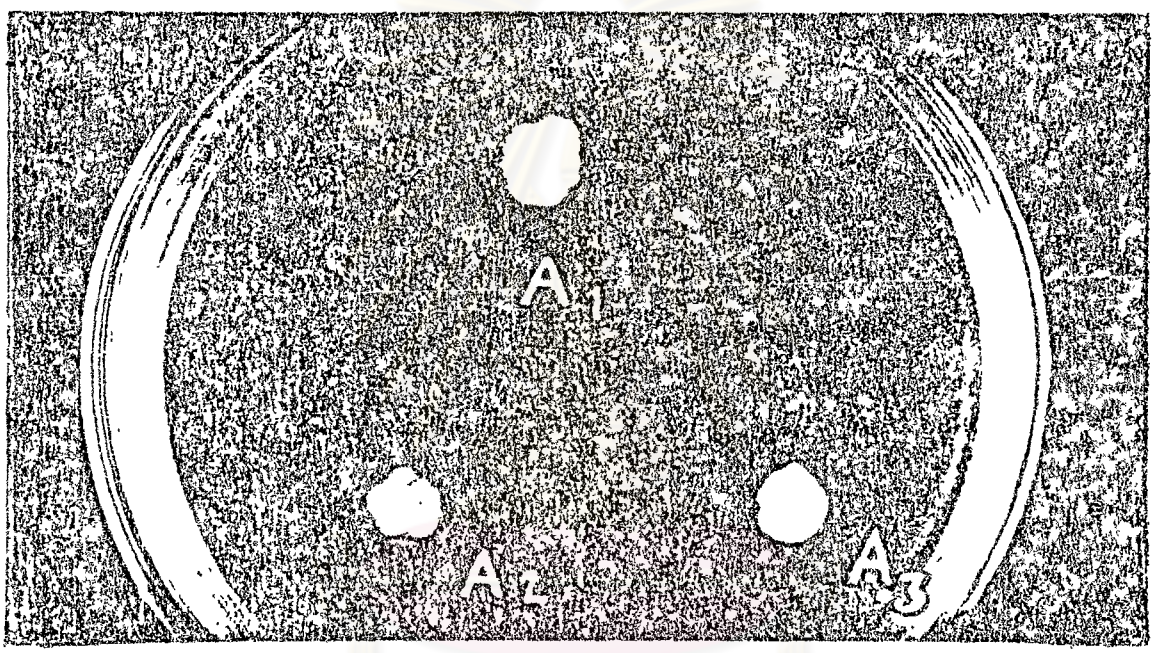
รูปที่ 7 เป็นการแสดง cross feeding ระหว่าง thr MSO^r กับ met ซึ่งผลการทดลองพบว่า thr MSO^r ที่ไม่มีโคโลนีดาวล้อมเดือนล้อมรอบ (สองโคโลนีขวามือ) เมื่อ cross feeding กับ met จะไม่มี met ล้อมรอบ ส่วน thr_4 MSO^r ที่มีโคโลนีดาวล้อมเดือนล้อมรอบ (สองโคโลนีซ้ายมือ) เมื่อ cross feedingกับ met มี met ล้อมรอบเช่นเดียวกัน และยังพบว่าขนาดของ met ที่ล้อมรอบจะมีขนาดแตกต่างกัน เช่นเดียวกับขนาดของ met ที่ล้อมรอบ thr MSO^r ในรูปที่ 8

7. การหาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลกับปริมาณเมไธโอนีนที่ถูกขับออก

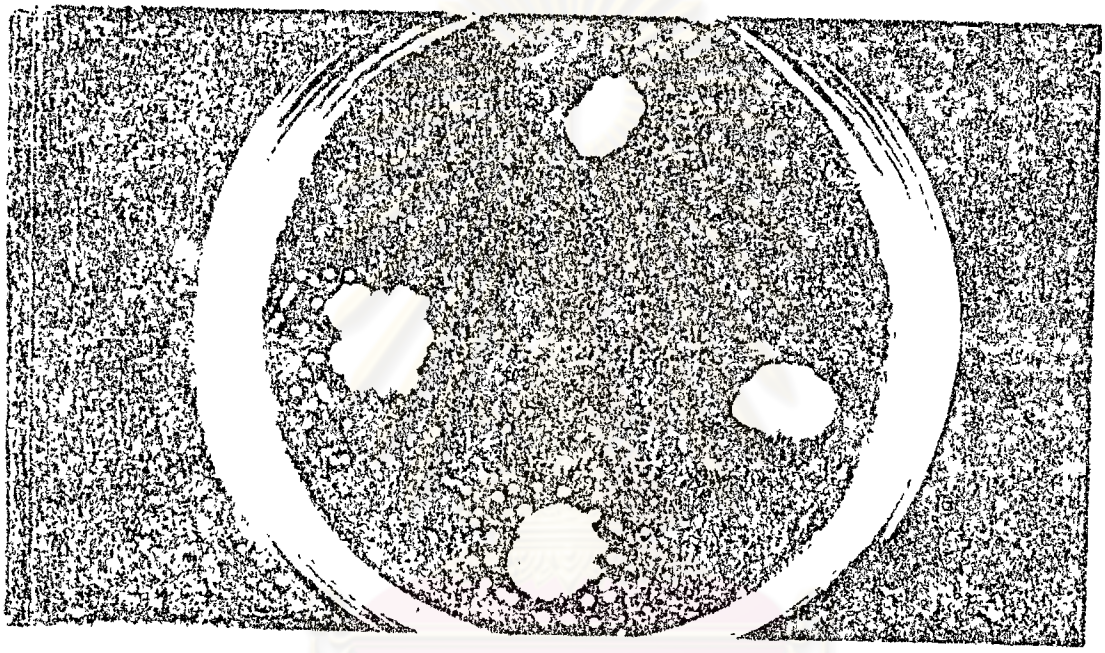
โดยปกติการขับเมตาบอไลท์ออกภายนอกเซลจะเกิดขึ้นเมื่อเซลอยู่ในระยะเจริญเต็มที่ (stationary phase)

จากการนำแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ (thr MSO^r, thr_4, WT MSO^r, WT) มาเลี้ยงในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมและได้เสริมด้วยธรีโอนีน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วัดความขุ่นที่ความยาวแสง 500 มิลลิไมครอน ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 9 พบว่า การเจริญของแบคทีเรียทั้งหมด (thr_4 MSO^r, thr_4, WT MSO^r, WT) มีรูปแบบของการเจริญ (growth profile) และระยะเวลาแบ่งตัวเป็นแบบเดียวกัน และเมื่อใช้ met ตรวจสอบปริมาณเมไธโอนีนในอาหารเชื้อ ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 10 และรูปที่ 11

รูปที่ 10 เป็นการแสดงถึงประมาณเมไธโอนีนที่ขับออกโดย thr_4 MSO^r และ thr_4 ที่เวลาต่าง ๆ กัน พบว่า ปริมาณเมไธโอนีนที่ขับออกโดยแบคทีเรียจะเป็นสัดส่วน

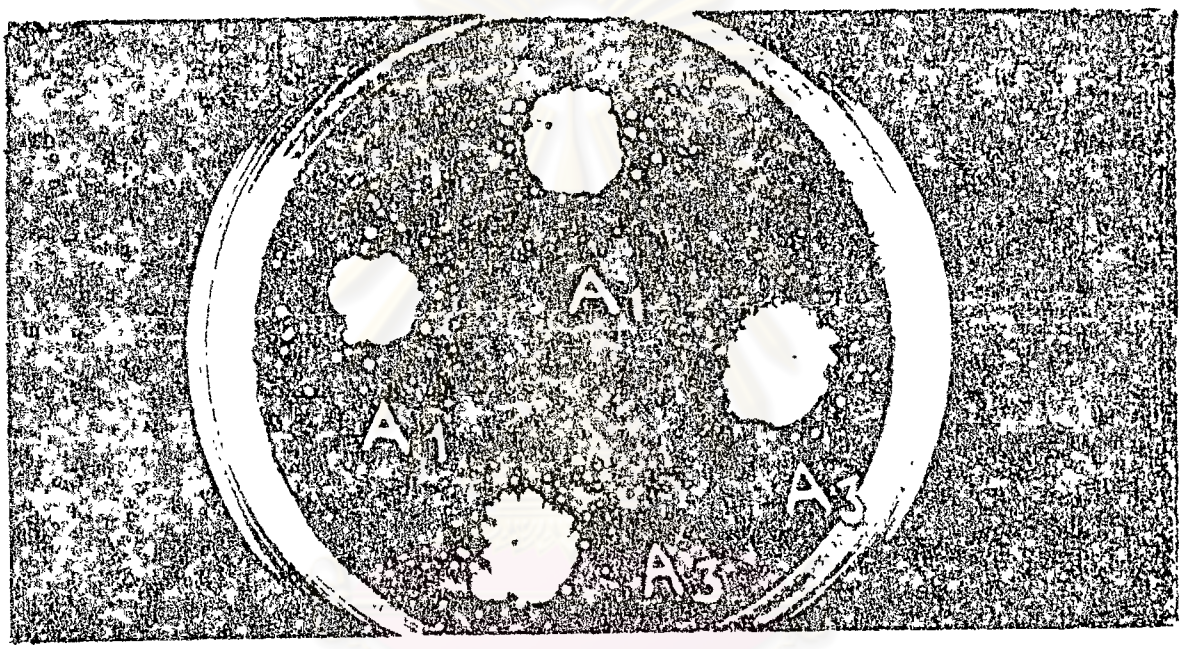


รูปที่ 6 Cross feeding ระหว่างเชื้อเซลเคอริเคีย โคไล เค12 (3110) met กับ thr A_1, A_2, A_3 คือเชื้อ thr_1, thr_2, thr_3 ตามลำดับ (Cross feeding คือการนำ met 10^3 เซลมากระจายบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำที่มีธรีโอนีน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรแล้วกริด (grid) thr ลงไปนำไปอบที่ 37° ซ 3 วัน)



รูปที่ 7 Cross feeding ระหว่างเอสเคอริเคีย โคไล เค12 (311) met กับ thr ซึ่งต้านเมไธโอนีน-ดีแอล-ซัลฟอกซิมีน
(รายละเอียดของการทดลองได้ระบุไว้ในวิธีการทดลองข้อ 9.2)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 8 Cross feeding ระหว่างเอสเคอริเคีย โคไล เค12 (3110) met กับ thr ซึ่งต้านเมไธโอนีน-ดีแอล-อัลฟอกซีนีน

A_1, A_3 คือ thr_1, thr_3 ตามลำดับ

(รายละเอียดของการทดลองระบุไว้ในวิธีการทดลองข้อ 9.2)

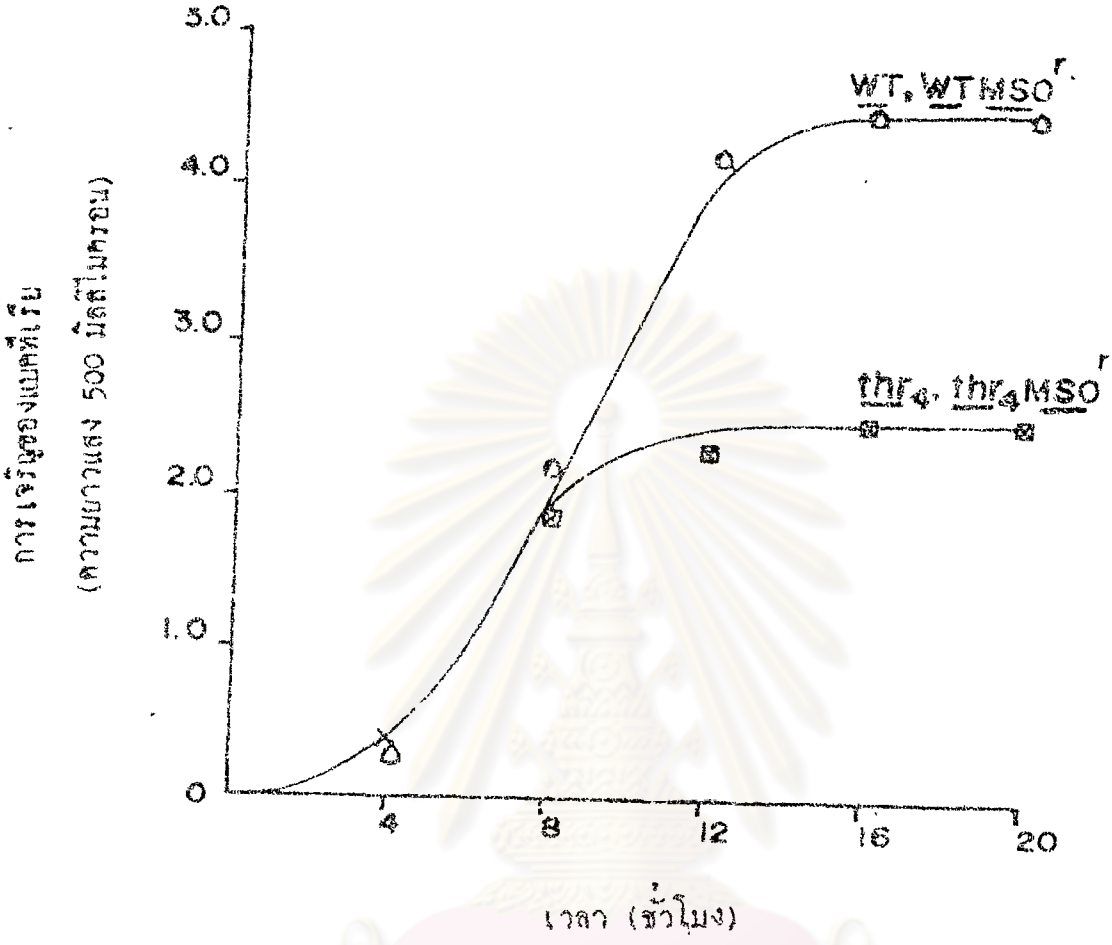
โดยตรงกับการเจริญของมัน และยังพบว่า $\underline{thr}_4$ $\underline{MSO}^r_2$ ให้ขนาดของ met โตกว่าในการทำ cross feeding จะขับเมไธโอนีนออกได้มากกว่า $\underline{thr}_4$ $\underline{MSO}^r_1$ และสายพันธุ์ทั้งสองข้างต้นจะขับเมไธโอนีนออกได้มากกว่า $\underline{thr}_4$ ตลอดระยะเวลาของการเจริญ และพบว่าที่เวลา 16 ชั่วโมง ความขุ่นของเชื้อที่ความยาวแสง 500 มิลลิไมครอนเท่ากับ 2.5 (รูปที่ 10) ในอาหารเลี้ยง $\underline{thr}_4$ มีเมไธโอนีน 0.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร $\underline{thr}_4$ $\underline{MSO}^r_1$ มีเมไธโอนีนอยู่ 0.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ $\underline{thr}_4$ $\underline{MSO}^r_2$ มีเมไธโอนีนอยู่ 1.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

รูปที่ 11 เป็นการแสดงปริมาณเมไธโอนีนที่ขับออกโดย $\underline{WT}$ $\underline{MSO}^r$ และ $\underline{WT}$ ที่เวลาต่าง ๆ กัน พบว่า ปริมาณเมไธโอนีนที่ขับออกจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับการเจริญของแบคทีเรียที่เวลาต่าง ๆ กัน และยังพบว่า $\underline{WT}$ $\underline{MSO}^r$ (เป็นสายพันธุ์ที่ cross feeding กับ met ให้ขนาดของ met ล้อมรอบโตที่สุด) จะขับเมไธโอนีนได้มากกว่า $\underline{WT}$ ตลอดระยะเวลาของการเจริญ และที่เวลา 20 ชั่วโมง ซึ่งการเจริญของมันจะปรากฏเป็นความขุ่นที่ความยาวแสง 500 มิลลิไมครอนเท่ากับ 4.5 (รูปที่ 10) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ $\underline{WT}$ มีเมไธโอนีนอยู่ 0.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ $\underline{WT}$ $\underline{MSO}^r$ มีเมไธโอนีนอยู่ 0.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เมื่อเทียบปริมาณเมไธโอนีนที่ขับออกโดยแบคทีเรียในรูปที่ 10 และ 11 โดยคิดปริมาณเมไธโอนีนที่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความขุ่นของเซลเท่ากัน (จากรูปที่ 10) พบว่า $\underline{thr}_4$ $\underline{MSO}^r$ จะขับเมไธโอนีนออกได้มากกว่า $\underline{WT}$ $\underline{MSO}^r$ ตลอดระยะเวลาของการเจริญ $\underline{thr}_4$ $\underline{MSO}^r_1$ และ $\underline{thr}_4$ $\underline{MSO}^r_2$ จะขับเมไธโอนีนออกได้มากกว่า $\underline{WT}$ $\underline{MSO}^r$ ประมาณ 2 และ 4 เท่าตามลำดับ และจะขับเมไธโอนีนได้มากกว่า $\underline{WT}$ 5 และ 10 เท่าตามลำดับ

8. <u>คุณสมบัติทั่วไปของกากน้ำตาล</u>

กากน้ำตาลที่นำมาจากโรงงานน้ำตาลทั้งสามแหล่ง มีสีเหมือนกัน คือ สีน้ำตาลไหม้ ภายหลังการฟอกสีให้สีแตกต่างกัน โดยกากน้ำตาลจากกาญจนบุรีภายหลังการฟอกสีได้สีเหลืองแก่



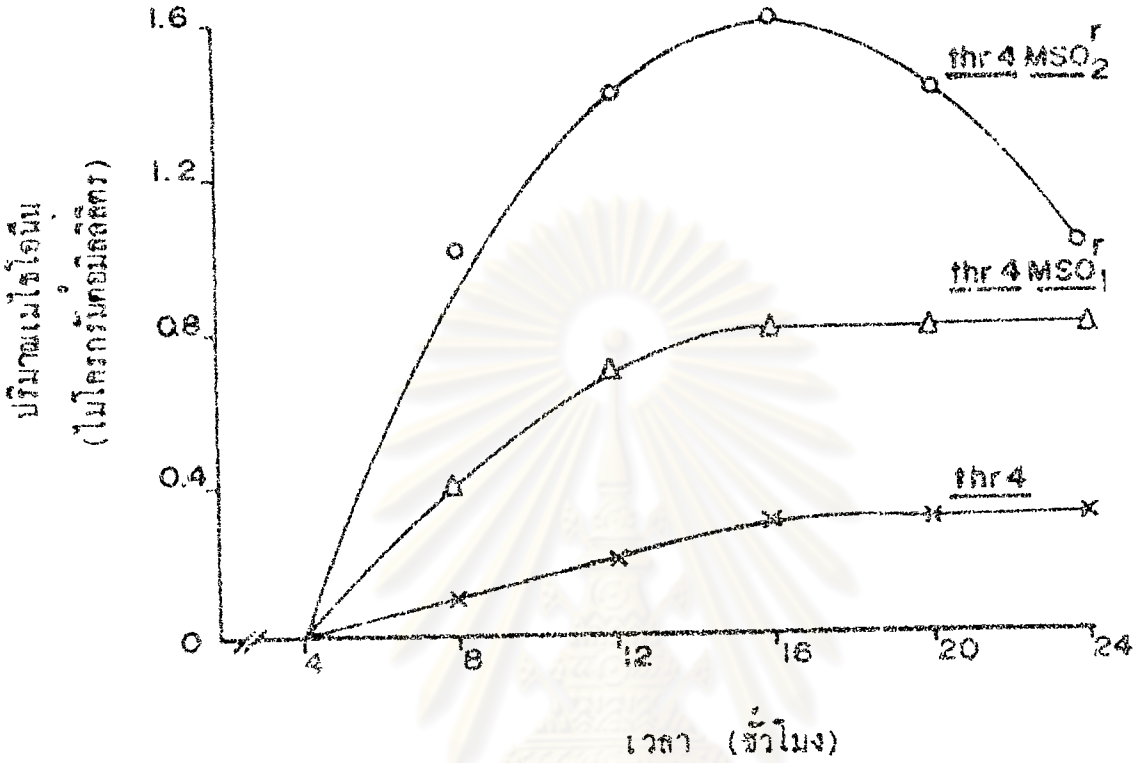
รูปที่ 9 การเจริญของ thr_4, thr_4 MSO^r และ WT, WT MSO^r
(รายละเอียดของการทดลองระบุไว้ในวิธีการทดลองข้อ 10)

×—×—× thr_4 คือการเจริญของ thr_4 ที่เสริมด้วยธรีโอนีน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

□—□—□ thr_4 MSO^r คือการเจริญของ thr_4 MSO^r ที่เสริมด้วยธรีโอนีน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

○—○—○ WT คือการเจริญของ WT ในอาหารสูตรปรับต่ำ

△—△—△ WT MSO^r คือการเจริญของ WT MSO^r ในอาหารสูตรปรับต่ำ

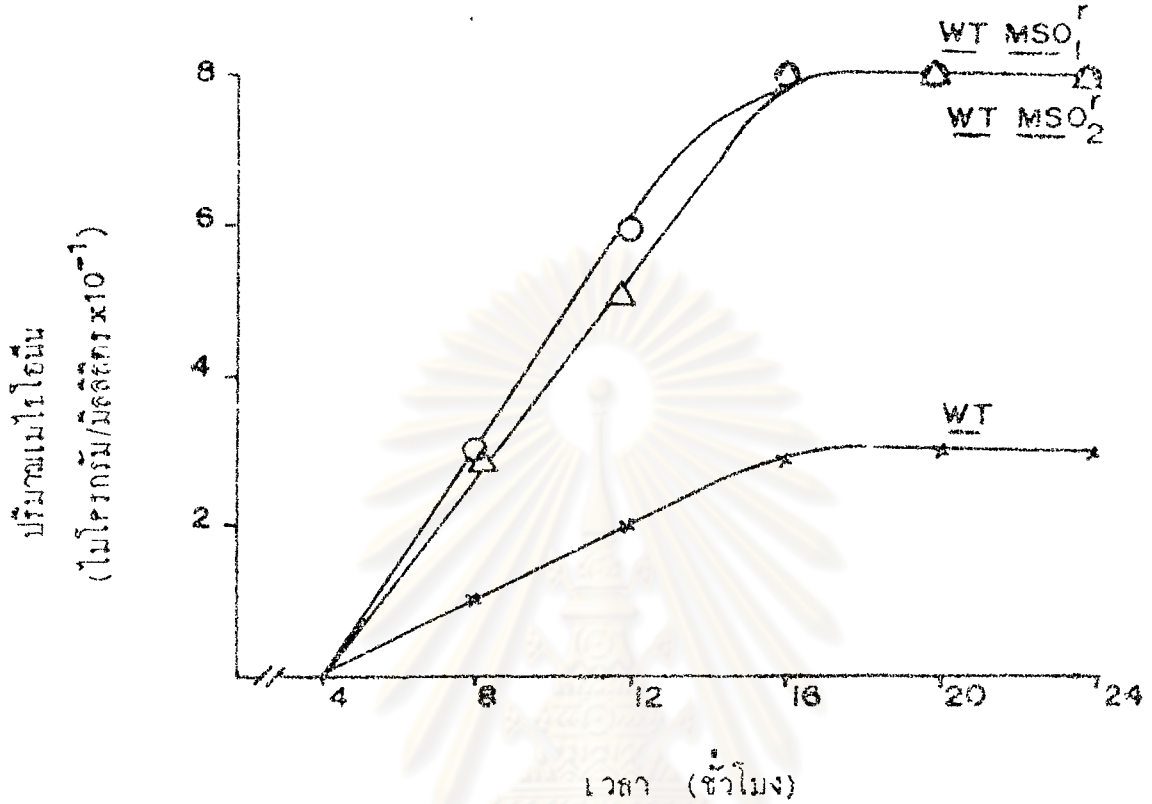


รูปที่ 10 ปริมาณเมไธโอนีนที่ขับออกจาก $\underline{thr}_4$, $\underline{thr}_4$ $\underline{MSO}^r$ ที่เวลาต่าง ๆ (รายละเอียดของการทดลองระบุไว้ในวิธีการทดลองข้อ 10)

×—×—× $\underline{thr}_4$ คือปริมาณเมไธโอนีนที่ขับออกโดย $\underline{thr}_4$ ที่เวลา 4, 8, 12, 16, 20, 24 ชั่วโมง

△—△—△ $\underline{thr}_4$ $\underline{MSO}_1^r$ คือปริมาณเมไธโอนีนที่ขับออกโดย $\underline{thr}_4$ $\underline{MSO}_1^r$ ที่เวลา 4, 8, 12, 16, 20, 24 ชั่วโมง

○—○—○ $\underline{thr}_4$ $\underline{MSO}_2^r$ คือปริมาณเมไธโอนีนที่ขับออกโดย $\underline{thr}_4$ $\underline{MSO}_2^r$ ที่เวลา 4, 8, 12, 16, 20, 24 ชั่วโมง



รูปที่ 11 ปริมาณเมไธโอนีนที่ขับออกจาก WT WT MSO^r ที่เวลาต่าง ๆ (รายละเอียดของการทดลองระบุไว้ในวิธีการทดลองข้อ 10)

×—×—× WT คือปริมาณเมไธโอนีนที่ขับออกโดย WT ที่เวลา 4, 8, 12, 16, 20 และ 24 ชั่วโมง

○—○—○ WT MSO$_1^r$ คือปริมาณเมไธโอนีนที่ขับออกโดย WT MSO$_1^r$ ที่เวลา 4, 8, 12, 16, 20 และ 24 ชั่วโมง

△—△—△ WT MSO$_2^r$ คือปริมาณเมไธโอนีนที่ขับออกโดย WT MSO$_2^r$ ที่เวลา 4, 8, 12, 16, 20 และ 24 ชั่วโมง

จากจังหวัดชลบุรีได้สีเหลืองอ่อน จากลำปางไม่มีสี นำกากน้ำตาลที่ฟอกสีแล้วไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ฟอสเฟตอนินทรีย์และไนโตรเจนทั้งหมด และไฮโดรไลซ์ด้วยกรด กากน้ำตาลที่ไฮโดรไลซ์แล้วนำกลับมาหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ซ้ำ ผลได้แสดงไว้ในตารางที่ 3 จากการวิเคราะห์พบว่า กากน้ำตาลจากกาญจนบุรีมีฟอสเฟตสูงกว่าอีกสองแหล่งถึงหนึ่งเท่าตัว อีกทั้งปริมาณไนโตรเจนสูงกว่าอีกราวครึ่งเท่าตัว ส่วนน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลซูโครสมีความแตกต่างอยู่ในพิสัย 12–22 และ 41–54 เปอร์เซนต์ตามลำดับ

ตารางที่ 3 สมบัติทั่วไปของกากน้ำตาล

แหล่งของกากน้ำตาล	สีของกากน้ำตาลฟอก	ผลวิเคราะห์เป็นเปอร์เซนต์เทียบกับกลูโคส			เปอร์เซนต์	
		(1) น้ำตาลรีดิวซ์	(2) น้ำตาลทั้งหมด	(3) ซูโครส	(4) ฟอสเฟต	(5) โปรตีน
กาญจนบุรี (M_1)	เหลืองแก่	12	53	41	10.25	0.8
ชลบุรี (M_2)	เหลืองอ่อน	22	63	41	0.13	0.6
ลำปาง (M_3)	ไม่มีสี	14	67	53	0.10	0.5

(1) ใช้กากน้ำตาลฟอกสีทดสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี เนลสันและโซโมจิ

(2) คือผลต่างของน้ำตาลรีดิวซ์หลังและก่อนไฮโดรไลซ์คูณ 0.95

(3) ความแตกต่างระหว่างเปอร์เซนต์น้ำตาลที่ได้จาก (2) กับ (1)

(4) ใช้น้ำตาลฟอกสีมาหาปริมาณฟอสเฟตโดยวิธีฟิสเคและซับเบโร

(5) ใช้กากน้ำตาลฟอกสีมาหาปริมาณของไนโตรเจนทั้งหมดโดยวิธีเคลดาล์แล้วคูณด้วย 6.25

9. ศักยภาพในการเป็นอาหารของแบคทีเรียของกากน้ำตาล

9.1 ศักยภาพในการเป็นต้นตอคาร์บอน

เมื่อนำเอสคอริเคีย โคไล เค12 (3110) มาเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำของเดวิดโดยใช้กลูโคสและกากน้ำตาลปริมาณต่าง ๆ กันเป็นสารต้นตอคาร์บอน ลักษณะการเจริญของแบคทีเรียแสดงไว้ในรูปที่ 12 และ 13 จากรูปจะเห็นได้ว่าค่าระยะบ่มตัว (lag period) เมื่อใช้กากน้ำตาลเป็นสารอาหารจะยาวกว่าเมื่อใช้กลูโคสเป็นสารอาหารอย่างเห็นได้เด่นชัด ในขณะที่การแบ่งตัวระยะทวีคูณ (log phase) กลับไม่ต่างกัน คือให้ค่าการเพิ่มตัวเป็นสองเท่าเท่ากันคือ 45, 42, 40, 40 นาทีตามลำดับ

ตารางที่ 4 แสดงการเปรียบเทียบระยะเวลาบ่มตัวของเอสเคอริเคีย โคไล เค12 (3110) ในอาหารที่มีกลูโคสและกากน้ำตาลเป็นสารต้นตอคาร์บอน จะเห็นได้ว่าการหน่วงเหนี่ยวการเจริญในกากน้ำตาลจากกาญจนบุรี และชลบุรีให้ค่าบเวลาบ่มตัวแปรปรวนอยู่ระหว่าง 7–13 ชั่วโมง เทียบกับกลูโคส 6–10 ชั่วโมง เมื่อใช้กากน้ำตาล 0.018–0.108 เปอร์เซนต์น้ำตาลริดิวซ์ ในขณะที่ค่าบเวลาของการบ่มตัวของกากน้ำตาลจากลำปางมีความแปรปรวนอยู่ระหว่าง 11–21 ชั่วโมง ในสภาวะเดียวกันทุกอย่าง โปรดสังเกตด้วยว่าระยะบ่มตัวที่ปรากฏ เมื่อใช้กากน้ำตาล M_1 และ M_2 ที่ไฮโดรไลซ์แล้วเป็นสารต้นตอคาร์บอนก็มิได้แตกต่างไปจากเมื่อยังมิได้ไฮโดรไลซ์

เมื่อเทียบประสิทธิภาพของการเป็นสารต้นตอคาร์บอนของกากน้ำตาลทั้งสามเทียบกับกลูโคส ได้นำเอสเคอริเคีย โคไล เค12 (3110) มาเจริญเติบโตในสารอาหารที่มีต้นตอคาร์บอนจำกัดคือ 0.018, 0.036, 0.072 และ 0.108 เปอร์เซนต์ตามลำดับ นำค่าความขุ่นสูงสุดที่ได้มาเทียบกันแสดงใน

ตารางที่ 5 ปรากฏว่า ประสิทธิภาพในการเป็นต้นตอคาร์บอนของกากน้ำตาลต่างกับกลูโคส กล่าวคือ ก่อนไฮโดรไลซ์เอสเตอริเคีย โคไล เค12 (3110) จะใช้กากน้ำตาลได้ด้วยประสิทธิภาพ 18–29 เปอร์เซนต์ และหลังไฮโดรไลซ์ใช้ได้ด้วยประสิทธิภาพ 18–29 เปอร์เซนต์ และหลังไฮโดรไลซ์ ใช้ได้ด้วยประสิทธิภาพ 87–93 เปอร์เซนต์

การเจริญสูงสุดนี้เมื่อพลอทควบคู่กับเปอร์เซนต์ความเข้มข้นของน้ำตาล ไม่ว่าจากกลูโคสหรือกากน้ำตาลจะแปรตรงตัวกับการเจริญของแบคทีเรีย ข้อที่ควรสังเกตก็คือกากน้ำตาลจากชลบุรีซึ่งให้ผลการวิเคราะห์เกี่ยวกับน้ำตาลรีดิวซ์เป็นค่าสูงสุด (ตารางที่ 3) ก็ให้ค่าการเจริญสูงสุดกว่ากากน้ำตาลอีกสองจังหวัดด้วย ความแตกต่างนี้จะหายไปเมื่อใช้กากน้ำตาลที่ไฮโดรไลซ์แล้วเป็นสารต้นตอคาร์บอน

9.2 ศักยภาพในการเป็นสารต้นตอฟอสเฟต

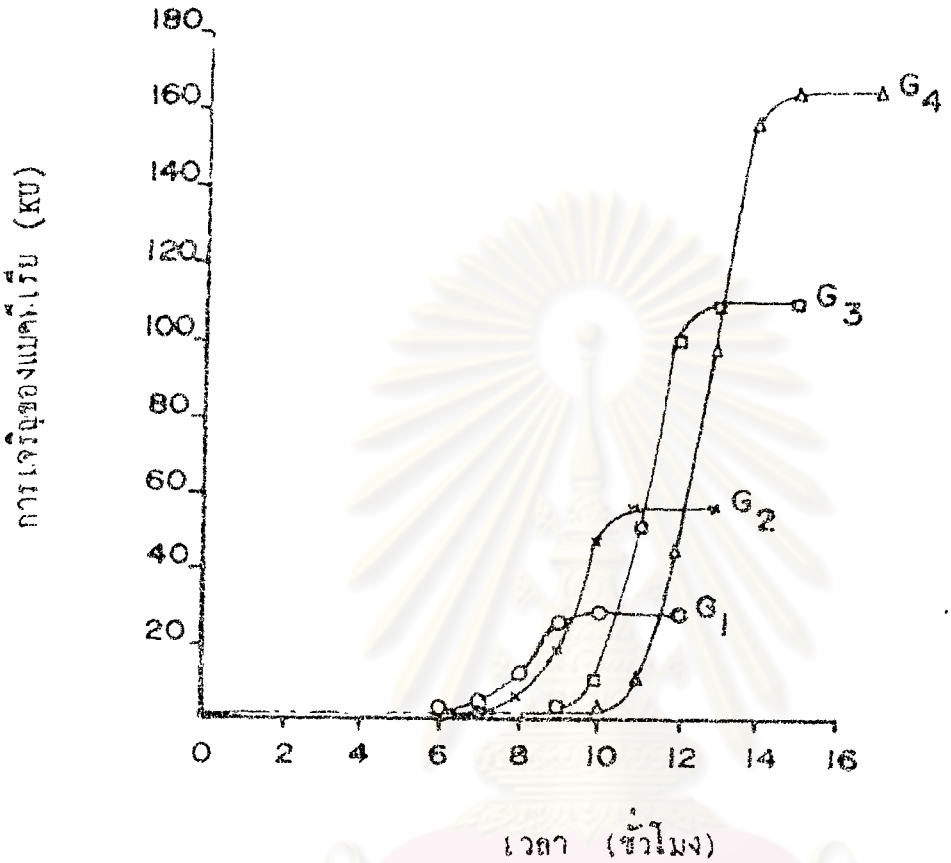
เพื่อทดสอบการเป็นต้นตอฟอสเฟตของกากน้ำตาล ได้ปรับสูตรอาหารโดยใช้ 50 mM Tris - HCL pH7.0 แทนฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และใช้กากน้ำตาลอิ่มตัว 0.4 เปอร์เซนต์น้ำตาลรีดิวซ์เป็นต้นตอคาร์บอน วัดการเจริญสูงสุดเมื่อเติมและไม่ได้เติมโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตปริมาณต่าง ๆ ผลแสดงในรูปที่ 15 พบว่า กากน้ำตาลจากกาญจนบุรีจะให้ค่าการเจริญสูงสุด 280 KU (Klettunit) โดยปริมาณฟอสเฟตที่เติมลงไปมิทำให้ค่าการเจริญเพิ่มขึ้นแต่อย่างใด ตรงกันข้ามกับกากน้ำตาลอีกสองแหล่งต่างก็แสดงว่าปริมาณฟอสเฟตที่เติมลงไปจะต้องมากกว่า 70 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จึงให้ค่าการเจริญสูงสุด

9.3 ศักยภาพในการเป็นต้นตอไนโตรเจน

การทดลองนี้ได้ปรับปรุงสูตรอาหารโดยใช้แบคทีเรียเจริญในที่มีและไม่มี

อนุพันธ์แอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้นต่างกันคือ 0, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วัดการเจริญสูงสุดของแบคทีเรียเมื่อใช้กลูโคสและกาก-น้ำตาลก่อนไฮโดรไลซ์ 0.4 เปอร์เซนต์ น้ำตาลรีดิวซ์เป็นต้นตอคาร์บอน ผลได้แสดงไว้ในรูปที่ 16 พบว่า กากน้ำตาลจากกาญจนบุรี ซึ่งให้ค่าวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดสูงกว่ากากน้ำตาลอีกสองแหล่งจะให้ค่าการเจริญสูงสุดสูงกว่ากากน้ำตาลอีกสองแหล่งแม้จะไม่เติมอนุพันธ์แอมโมเนียมในอาหารเลย และพบว่าการเจริญสูงสุดของแบคทีเรียเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในกากน้ำตาล และการเจริญจะเพิ่มขึ้นเมื่อเติมอนุพันธ์แอมโมเนียมลงไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



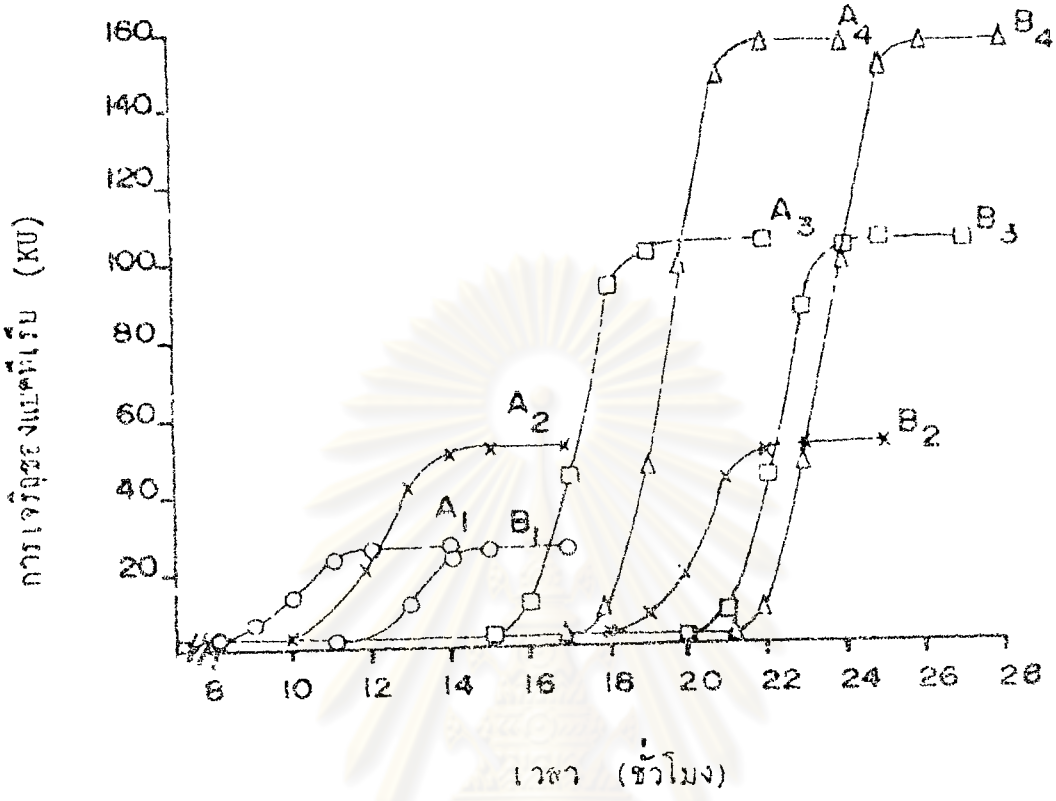
รูปที่ 12 การเจริญของเอสเคอริเคีย โคไล เค12 (3110) เมื่อใช้กลูโคสเป็นคาร์บอน (รายละเอียดของการทดลองระบุไว้ในวิธีการทดลองข้อ 7)

o—o—o G_1 คือการเจริญของแบคทีเรีย 0.018 เปอร์เซนต์กลูโคส

×—×—× G_2 คือการเจริญของแบคทีเรียที่ 0.036 เปอร์เซนต์กลูโคส

□—□—□ G_3 คือการเจริญของแบคทีเรียที่ 0.072 เปอร์เซนต์กลูโคส

△—△—△ G_4 คือการเจริญของแบคทีเรียที่ 0.108 เปอร์เซนต์กลูโคส



รูปที่ 13 การเจริญของเอสเคอริเคีย โคไล เค12 (3110) เมื่อใช้กากน้ำตาลเป็นต้นคอคาร์บอน (รายละเอียดของการทดลองระบุไว้ในวิธีการทดลองข้อ 7)

○—○—○ B_1, A_1 คือการเจริญของแบคทีเรียเมื่อใช้กากน้ำตาลก่อนและหลังการไฮโดรไลซ์ 0.18 เปอร์เซนต์น้ำตาลรีดิวซ์

×—×—× B_2, A_2 คือการเจริญของแบคทีเรียเมื่อใช้กากน้ำตาลก่อนและหลังการไฮโดรไลซ์ 0.036 เปอร์เซนต์น้ำตาลรีดิวซ์

□—□—□ B_3, A_3 คือการเจริญของแบคทีเรียเมื่อใช้กากน้ำตาลก่อนและหลังการไฮโดรไลซ์ 0.072 เปอร์เซนต์น้ำตาลรีดิวซ์

△—△—△ B_4, A_4 คือการเจริญของแบคทีเรียเมื่อใช้กากน้ำตาลก่อนและหลังการไฮโดรไลซ์ 0.108 เปอร์เซนต์น้ำตาลรีดิวซ์

ตารางที่ 4 ระยะบ่มตัวของเอสเคอริเคีย โคไล เค12 (3110) เมื่อใช้กากน้ำตาลเป็นสารต้นตอคาร์บอนเทียบกับกลูโคส

ธรรมชาติของกากน้ำตาล	ระยะบ่มตัว* (เป็นชั่วโมง) ที่ปรากฏจากการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่เข้มข้นต่างกันเป็นเปอร์เซนต์			
	0.018	0.036	0.072	0.108
ก่อนย่อย (MB_1)	8	9	12	13
หลังย่อย (MA_1)	8	9	12	13
ก่อนย่อย (MB_2)	7	8	10	12
หลังย่อย (MA_2)	7	8	10	12
ก่อนย่อย (MB_3)	11	18	20	21
หลังย่อย (MA_3)	8	10	15	17
กลูโคส	6	7	9	10

*ระยะบ่มตัว คือคาบเวลานับตั้งแต่การฟักตัวจนถึงช่วงที่ตรวจสอบความขุ่นได้ด้วย Klett Colorimeter ในสภาวะเดียวกัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 การเจริญสูงสุดของเอสเคอริเคีย โคไล เค12 (3110) เมื่อใช้กากน้ำตาลเป็นสารต้นตอคาร์บอนเทียบกับกลูโคส

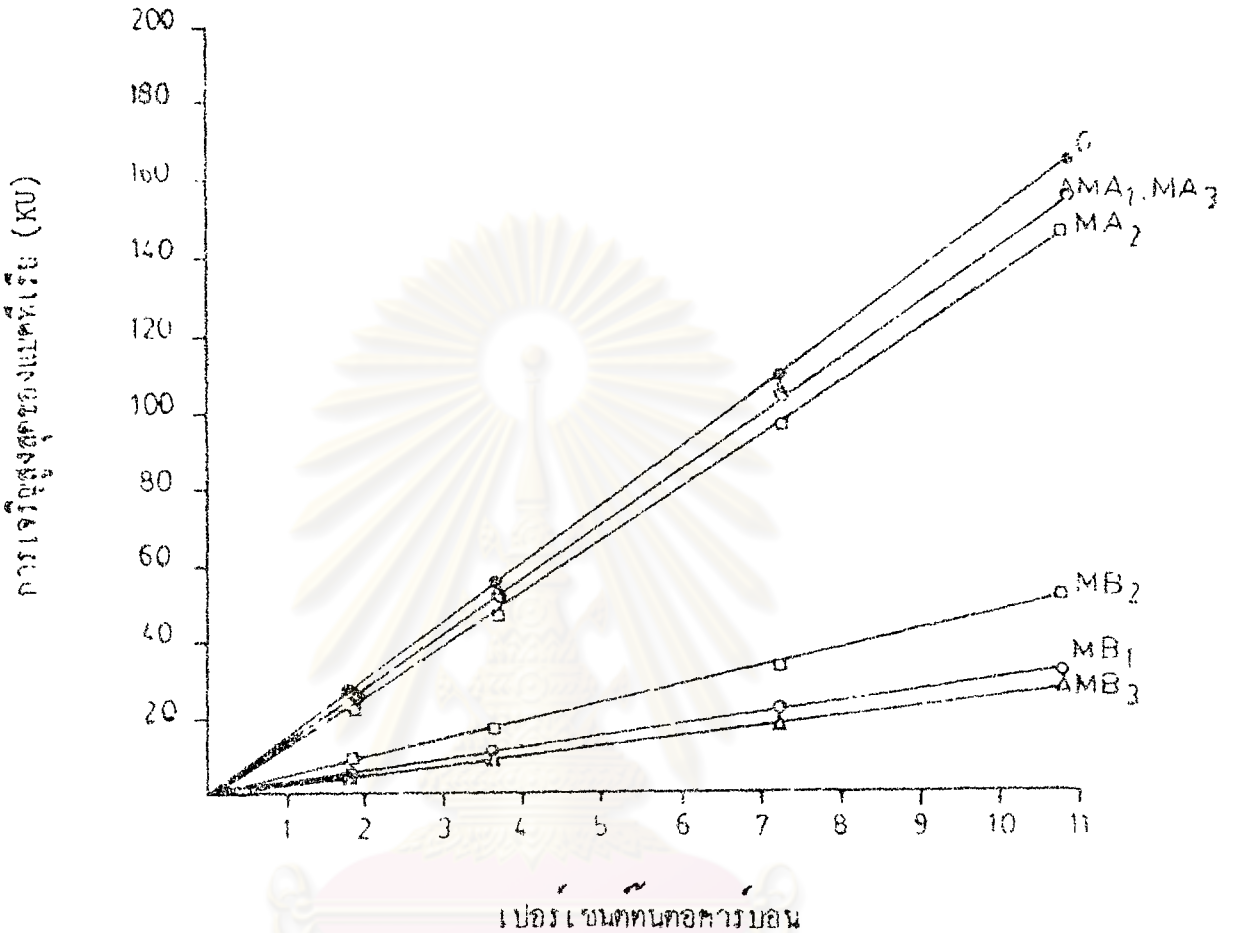
สารต้นตอคาร์บอน	ความขุ่นสูงสุด (KU) จากการใช้สารต้นตอคาร์บอนคิดเป็นเปอร์เซนต์				ประสิทธิภาพของการเป็นอาหารแบคทีเรีย (เปอร์เซนต์)*
	0.018	0.036	0.072	0.108	
กลูโคส	28	56	110	165	100
MB_1	6	11	22	33	20
MA_1	26	52	104	156	93
MB_2	8	16	32	52	29
MA_2	24	48	96	147	87
MB_3	5	10	20	30	18
MA_3	26	52	104	156	93

* เป็นค่าถัวเฉลี่ยที่ได้จากความขุ่นสูงสุด (KU) จากกากน้ำตาลก่อนหรือหลังการไฮโดรไลซ์คิดเทียบเป็นเปอร์เซนต์กับความขุ่นสูงสุด (KU) เมื่อใช้กลูโคสเป็นสารต้นตอคาร์บอน

MB_1, MA_1 คือกากน้ำตาลจากจังหวัดกาญจนบุรีก่อนและหลังการไฮโดรไลซ์

MB_2, MA_2 คือกากน้ำตาลจากจังหวัดชลบุรีก่อนและหลังการไฮโดรไลซ์

MB_3, MA_3 คือกากน้ำตาลจากจังหวัดลำปางก่อนและหลังการไฮโดรไลซ์



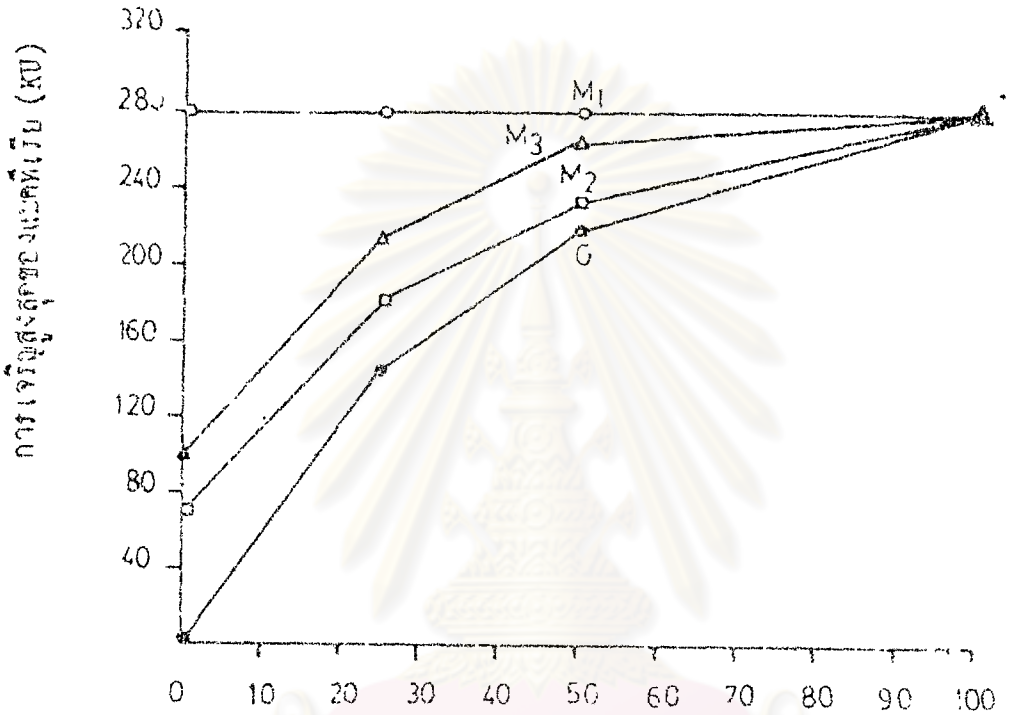
รูปที่ 14 การเจริญสูงสุดของเอสเคยริเคีย โคไล เค12 (3110) เมื่อใช้กากน้ำตาลก่อนและหลังการไฮโดรไลซ์ที่มีความเข้มข้นต่างกันเป็นต้นคอคาร์บอน

●—○—● G คือการเจริญสูงสุดของแบคทีเรียในกลูโคล

○—○—○ MB_1 MA_1 คือการเจริญสูงสุดของแบคทีเรียในกากน้ำตาล ชนิดที่ 1 ก่อนและหลังการไฮโดรไลซ์

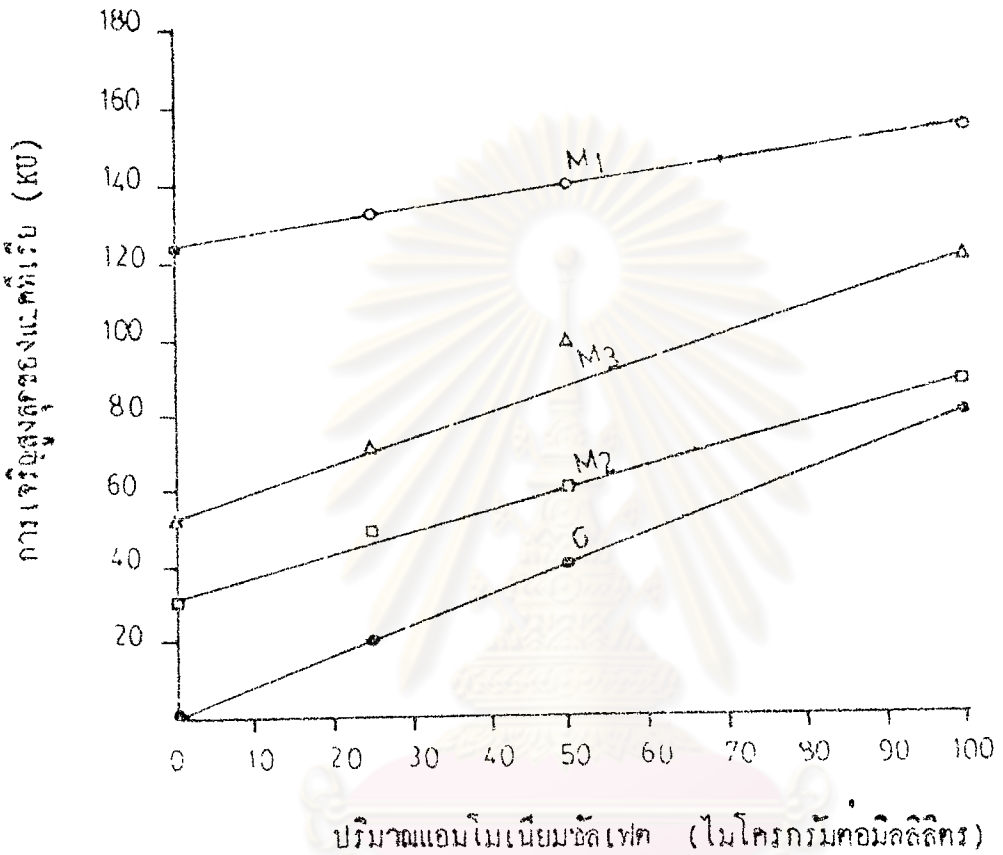
□—□—□ MB_2 MA_2 คือการเจริญสูงสุดของแบคทีเรียในกากน้ำตาล ชนิดที่ 2 ก่อนและหลังการไฮโดรไลซ์

△—△—△ MB_3 MA_3 คือการเจริญสูงสุดของแบคทีเรียในกากน้ำตาล ชนิดที่ 3 ก่อนและหลังการไฮโดรไลซ์



รูปที่ 15 การเจริญสูงสุดของเอสเคอริเคีย โคไล เค12 (5110)
(รายละเอียดของการทดลองระบุไว้ในวิธีการทดลองข้อ 7)

- G กลูโคสเป็นสารต้นทอคาร์บอน
- M_1 กากน้ำตาลชนิดที่ 1
- M_2 กากน้ำตาลชนิดที่ 2
- M_3 กากน้ำตาลชนิดที่ 3



รูปที่ 16 การเจริญสูงสุดของเอสเคอริเคีย โคไล เค12 (5110)
(รายละเอียดของการทดลองระบุไว้ในวิธีการทดลองข้อ 7)

●-●-●	G	กลูโคสเป็นสารต้นตอคาร์บอน
o-o-o	M_1	กากน้ำตาลชนิดที่ 1
□-□-□	M_2	กากน้ำตาลชนิดที่ 2
△-△-△	M_3	กากน้ำตาลชนิดที่ 3