หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

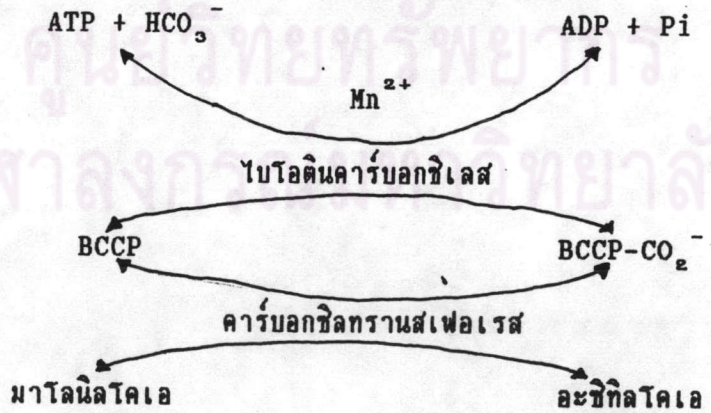
บทที่ 1

บทนำ

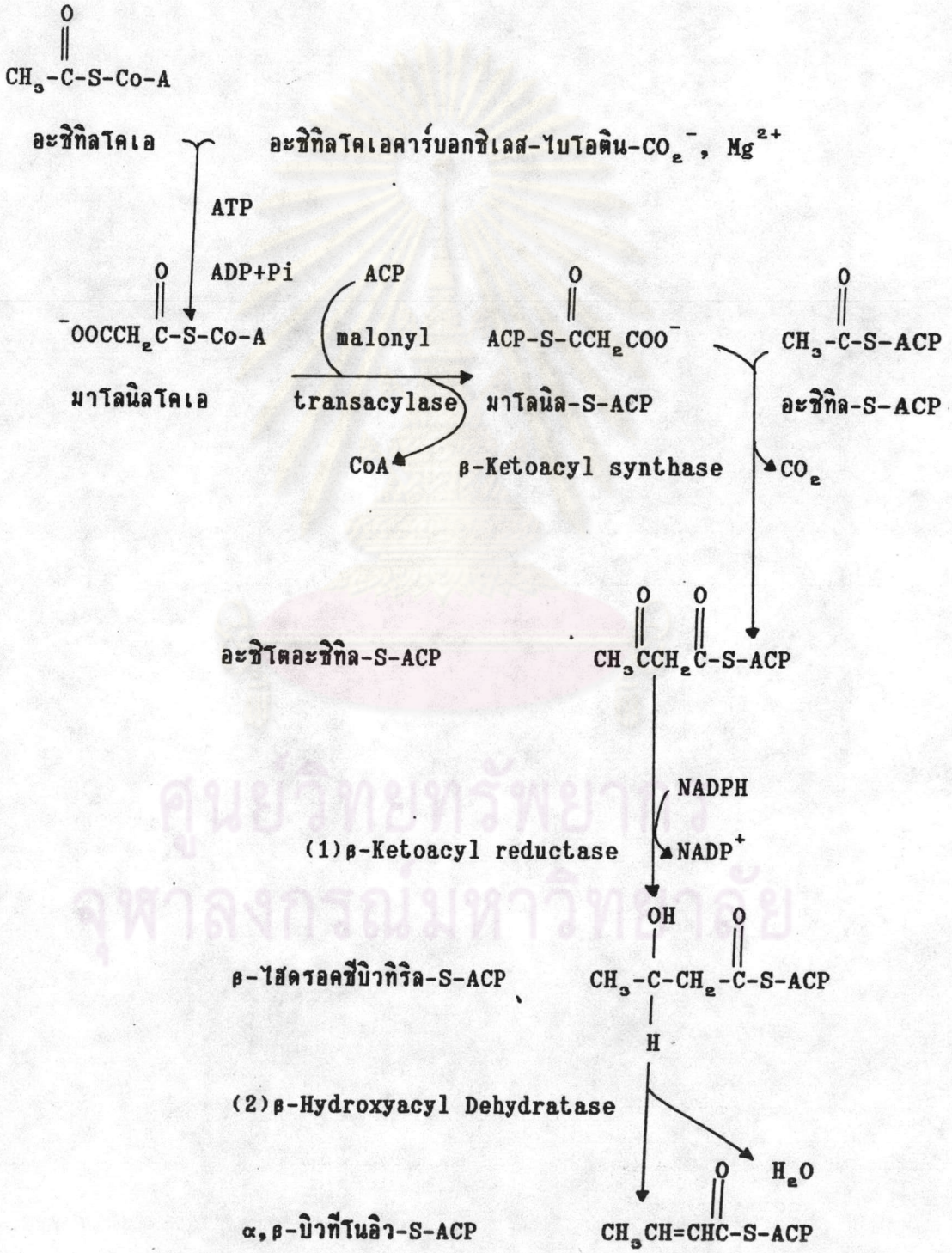
จุลินทรีย์หลายชนิด เช่น แบคทีเรีย รา และยีสต์สังเคราะห์ไบโอตินหรือไวตามินเอช(H) ในขณะที่จุลินทรีย์บางชนิดไม่สังเคราะห์ไบโอติน หรือสังเคราะห์ไบโอตินในปริมาณไม่เพียงพอต่อการใช้งาน จึงต้องเติมไบโอตินในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์(Lee et al., 1988; Winter et al., 1989) ทั้งนี้เพราะไบโอตินเป็นโคเอ็นไซม์ที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์กรดไขมันสายยาว การย่อยสลายกรดอะมิโน(ลิวซีนและไอโซลิวซีน) และในปฏิกิริยาอื่นๆซึ่งเร่งปฏิกิริยาโดยกลุ่มเอ็นไซม์ คาร์บอกซิเลส ดีคาร์บอกซิเลส และ เอ็นไซม์ทรานส์คาร์บอกซิเลส (Conn et al., 1987) ตัวอย่างเช่นเอ็นไซม์อะซิทิลโคเอคาร์บอกซิเลส เป็นเอ็นไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาคาร์บอกซิเลชั่นของอะซิทิลโคเอให้กลายเป็นมาโลนิลโคเอ ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่หนึ่งในวิถีการสังเคราะห์กรดไขมันสายยาว เอ็นไซม์อะซิทิลโคเอคาร์บอกซิเลสในแบคทีเรีย *E. coli* มีองค์ประกอบ 3 ส่วน ได้แก่ไบโอตินคาร์บอกซิเลส คาร์บอกซิลทรานสเฟอเรสและโปรตีนบีซีซีพี ซึ่งมีไบโอตินเป็นโคแฟกเตอร์ทำหน้าที่รับกลุ่มคาร์บอกซิล (biotinylated carboxyl carrier protein) บีซีซีพีมีบทบาทเป็นตัวกลางในการเร่งปฏิกิริยาโดยอะซิทิลโคเอคาร์บอกซิเลสใน *E. coli* บีซีซีพีมีไบโอตินเชื่อมด้วยพันธะโคเวาเลนต์กับไลซีนตำแหน่งที่ 48 (Sutton et al.,1977) บทบาทของบีซีซีพีในการเป็นตัวกลางการเร่งปฏิกิริยาของอะซิทิลโคเอคาร์บอกซิเลสมีดังแสดงในรูปที่ 1 กล่าวคือ การเร่งปฏิกิริยาขององค์ประกอบอะซิทิลโคเอทรานสเฟอเรส แบ่งเป็นปฏิกิริยาย่อยได้ 2 ปฏิกิริยา ปฏิกิริยาย่อยที่หนึ่งเป็นการเติมกลุ่มคาร์บอกซิลให้แก่ไบโอตินซึ่งอยู่บนบีซีซีพี มีการเร่งปฏิกิริยาโดยองค์ประกอบไบโอตินคาร์บอกซิเลส ปฏิกิริยาย่อยที่สองเป็นการย้ายกลุ่มคาร์บอกซิลจากบีซีซีพีไปยังอะซิทิลโคเอให้กลายเป็นมาโลนิลโคเอ โดยมีองค์ประกอบเอ็นไซม์คาร์บอกซิลทรานส์เฟอเรสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จะเห็นได้ว่าในระหว่าง

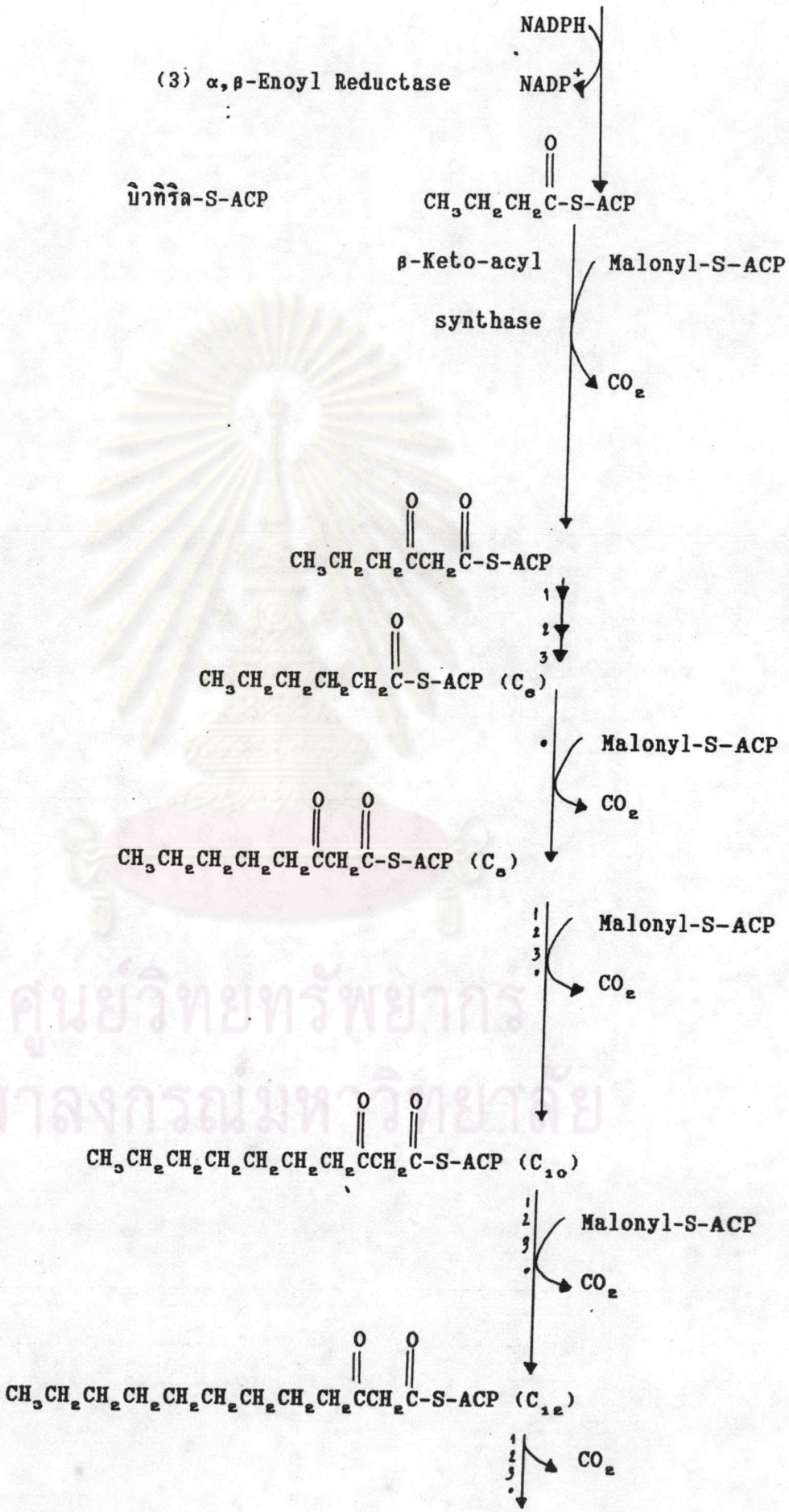
การทำปฏิกิริยาทั้งหมดที่เร่งโดยเอ็นไซม์อะซิทิลโคเอคาร์บอกซิเลส องค์ประกอบที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาของเอ็นไซม์อะซิทิลโคเอคาร์บอกซิเลส อันได้แก่ไบโอตินคาร์บอกซิเลสและคาร์บอกซิลทรานสเฟอเรสนอกจากจะมี binding sites สำหรับซับสเตรทของแต่ละองค์ประกอบแล้ว ยังมี binding site ที่เฉพาะเจาะจงต่อส่วนโปรตีนของบีซีซีพีที่มีไบโอตินเชื่อมอยู่ ดังนั้นในการที่อะซิทิลโคเอคาร์บอกซิเลสจะเร่งปฏิกิริยาทั้งหมด จะต้องมีการย้ายส่วนไบโอตินซึ่งรับกลุ่มคาร์บอกซิลแล้วจาก carboxylation site บนไบโอตินคาร์บอกซิเลสมายัง transfer site บนคาร์บอกซิลทรานสเฟอเรส (Guchhait et al., 1974) รูปที่ 1 สรุปการเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนอะซิทิลโคเอเป็นมาโลนิลโคเอ โดยระบบเอ็นไซม์อะซิทิลโคเอคาร์บอกซิเลส รูปที่ 2 แสดงให้เห็นว่าอะซิทิลโคเอคาร์บอกซิเลสซึ่งมีไบโอตินเป็นโคแฟกเตอร์ เป็นปฏิกิริยาที่หนึ่งในวิถีการสังเคราะห์กรดไขมันสายยาว

รูปที่ 1 การเร่งปฏิกิริยาโดยอะซิทิลโคเอคาร์บอกซิเลสใน *E.coli* ประกอบด้วยการทำงานของโปรตีนทั้งสามส่วน ดังแสดงในปฏิกิริยาต่อไปนี้ (Sutton et al.,1977)



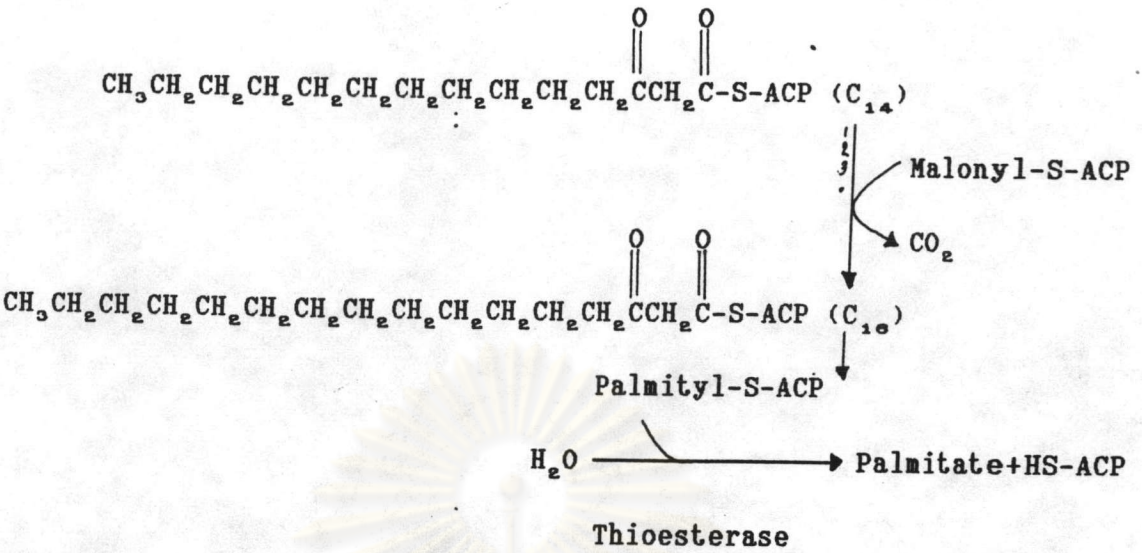
รูปที่ 2 การสังเคราะห์กรดไขมันสายยาว มีเอ็นไซม์อะซิทิลโคเอคาร์บอกซิเลส เร่งปฏิกิริยาที่หนึ่งในกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันสายยาวเช่น C_{16} (palmitate) (Bohinski, 1987)





ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



หมายเหตุ 1,2,3 แทนเอ็นไซม์สามชนิดดังแสดงในรูปข้างต้น และ แทนเอ็นไซม์ β-Keto-acyl-Synthase

ตามปกติแบคทีเรียในลำไส้ผลิตไบโอตินเพียงพอแก่ความต้องการของร่างกาย จึงไม่พบภาวะทุโภชนาการอันเกิดจากการขาดไบโอตินในมนุษย์และสัตว์เลี้ยง ในไข่ขาวดิบมีโปรตีนอวิดิน(avidin) ซึ่งรวมกับไบโอตินขัดขวางไม่ให้ไบโอตินถูกดูดซึมเข้าไปในผนังลำไส้ อวิดินถูกทำลายโดยความร้อนชื้น สารประกอบอวิดิน-ไบโอตินถูกทำลายโดยนึ่ง 30-60 นาที ดังนั้นสัตว์ที่เลี้ยงด้วยโปรตีนจากไข่ต้มสุกจึงไม่มีอาการอันเกิดจากการขาดไบโอติน(Church & Pond, 1988) สัตว์ปีกเช่น ไก่ ที่ขาดไบโอตินจะเป็นแผลที่อุ้งเท้าและน้ำหนักลด นอกจากนี้ยังเกิดการพอก(encrustation)และการแตกตามมุมของจงอยปากเปลือกตา หงอนไก่ และเล็บเท้า และในหมูจะเป็นโรคผิวหนัง เบื่ออาหาร(Roche,1976)ทุโภชนาการเหล่านี้แก้ไขได้โดยบริโภคหรือให้สารอาหารที่มีไบโอตินเป็นองค์ประกอบ ไบโอตินที่มีอยู่ตามธรรมชาติมีทั้งที่อยู่ในรูปไบโอตินอิสระพบในผักและผลไม้ชนิดต่างๆ น้ำนม และรำข้าว และไบโอตินในรูปของไบโอตินเชื่อมกับโปรตีนในเนื้อเยื่อของสัตว์ เมล็ดพืช และยีสต์(Roche,1976)

ในการวิจัยใช้ยีสต์ผลิตผลิตภัณฑ์มักมีการเติมไบโอตินลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 1 ในปัจจุบันไบโอติน(Sigma)ราคา 1,023 บาทต่อกรัม จึงควรมีการวิจัยคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ที่ผลิตผลิตภัณฑ์ที่ต้องการโดยไม่มีการเติมไบโอตินลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจาก

ตารางที่ 1 ตัวอย่างการวิจัยใช้ยีสต์ผลิตผลิตภัณฑ์ในระดับห้องปฏิบัติการที่มีการเติมไบโอตินลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

สายพันธุ์ยีสต์	ผลิตภัณฑ์ที่ผลิต	ไบโอตินที่ต้องการ (mg/l)	เอกสารอ้างอิง
Candida brassicae	cell	0.1	Amano et al.,1975
Candida rugosa	lipase	0.008	Ferrer & Sola, 1992
Candida shehatae	ethanol	0.1	Du Preez et al.,1989
Candida utilis	methionine	0.3	Dunyak & Cook,1985
Hansenula polymorpha	phenylalanine	0.002	Denenu & Demain,1981
Hansenula polymorpha	tryptophan	0.002	Denenu & Demain,1981
Hansenula polymorpha	tyrosine	0.002	Denenu & Demain,1981
Pichia stipitis	ethanol	0.1	Du Preez et al.,1989
Pichia pastoris	cell	$2x10^6$	Jara et al.,1983
Saccharomyces carlsbogensis	beer	2.0	Rainbow,1970
Saccharomyces cerevisiae	beer	2.0	Rainbow,1970
Saccharomyces cerevisiae	Baker's yeast	0.00025	Burrows,1970
Saccharomyces cerevisiae	ethanol	0.1	Giudici et al.,1989
Saccharomyces cerevisiae (recombinant strain)	hepatitis B surface antigen	0.0002	Gu et al.,1991
Saccharomyces cerevisiae (recombinant strain)	human tissue plasminogen activator	0.004	Martegani et al.,1992
Torulopsis candida mutant	sebacic acid	0.1	Kaneyuki et al.,1980

ใช้ไบโอตินในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว ในการวิจัยทางชีววิทยาระดับโมเลกุล (Molecular Biology) ยังมีการใช้ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ที่ติดฉลากด้วยไบโอตินเช่น biotinylated dATP หรือ biotinylated dCTP ในการสังเคราะห์โพรบ เพื่อใช้ติดตามแถบดีเอ็นเอเป้าหมายโดยใช้วิธีการปลอดรังสี (Medeiros, et al.,1988) และมีการใช้ biotinylated dideoxy dNTP ในวิธีการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยวิธี Sanger dideoxy ซึ่งวิธีนี้ประกอบด้วยขั้นตอน 3 ขั้นตอน คือ 1.การใช้เอ็นไซม์ DNA polymerase ต่อออกมาจาก specific primerโดยสิ้นสุดการสร้างสายเมื่อมีการใส่ dideoxynucleoside triphosphate (ddNTPs)เข้าไปใน DNA สายใหม่ 2.การสร้างลำดับbase-specific chain termination 3.การใช้ polyacrylamide gel ในการจัดจำแนกตามความยาวสาย DNA สายเดี่ยว การหาลำดับเบสโดยวิธีนี้จะมีการใส่ radioactive label ในสาย DNA ที่สร้างใหม่ โดยกระบวนการปลอดรังสี(Creasey et al.,1991)จะเห็นได้ว่าไบโอตินมีประโยชน์ทั้งในด้านการเป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้ในการเป็นโคเอ็นไซม์และในการวิจัยทางชีววิทยาระดับโมเลกุล

<u>วัตถุประสงค์ของการวิจัย</u>

เพื่อแยกยีสต์จากผลไม้และตรวจปริมาณการสังเคราะห์ไบโอตินในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมไบโอติน จำแนกชนิดเบื้องต้นทางอนุกรมวิธาน และศึกษาผลของกรดนิมีลิคต่อการผลิตไบโอตินโดยยีสต์ทั้งในระดับขวดเขย่าและในถังหมักขนาด 10 ลิตร