หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

การเจริญและการสังเคราะห์พลังงานของแบคทีเรีย

แบคทีเรียเป็นโพรคาริโอทที่คาดว่าเป็นต้นกำเนิดของสิ่งมีชีวิตในโลกนี้ (Lehninger, 1975) คุณสมบัติสำคัญของแบคทีเรียซึ่งทำให้มันเหมาะสมในการเป็นต้นแบบของการศึกษากระบวนการชีวภาพระดับโมเลกุลคือ ความสามารถในการใช้อาหารสังเคราะห์ ซึ่งประกอบด้วยเกลือแร่และสารต้นตอคาร์บอนสูตรโครงสร้างง่าย ๆ

ทราบกันดีแล้วว่า การที่แบคทีเรียสามารถเจริญในอาหารสังเคราะห์สูตรใดสูตรหนึ่งได้นั้น กระบวนการเมตาบอลิสมของแบคทีเรียจะแปรเปลี่ยนไปตามสูตรอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งกระบวนการที่เกี่ยวกับการใช้และการทำลายสารต้นตอคาร์บอนและไนโตรเจน

โดยหลักการ แบคทีเรียจะเจริญในสารต้นตอคาร์บอนหรือสารต้นตอไนโตรเจนชนิดใดนั้น จะต้องอาศัยปัจจัยดังต่อไปนี้

1. มีพันธุกรรมที่สามารถถอดรหัสให้เป็นเอนไซม์ซึ่งเกี่ยวกับกระบวนการเมตาบอลิสมในการใช้สารนั้น ๆ ได้

2. สภาวะที่เหมาะสมที่จะปลดปล่อยการถอดรหัสของเอนไซม์นั้น ๆ

3. สารอาหารรวมกันอยู่ในอัตราที่เหมาะสม เอื้ออำนวยให้เอนไซม์ที่ถอดรหัสออกมานั้น สามารถทำหน้าที่ได้

โดยทั่วไปแบคทีเรียซึ่งเป็นเฮทเทอโรโทรพ (heterotroph) สามารถใช้น้ำตาลเป็นสารต้นตอคาร์บอน และสามารถใช้กรดอะมิโนรวมทั้งอนุมูลอนินทรีย์ที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบเป็นสารต้นตอไนโตรเจนได้

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า ในแฟคคัลเททีฟแบคทีเรีย เช่น Escherichia coli จะใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารต้นตอคาร์บอนได้ดีกว่าน้ำตาลชนิดอื่น ๆ น้ำตาลกลูโคสนี้เมื่อผ่านเข้าเซลล์ของ Escherichia coli แล้ว จะถูกเปลี่ยนเป็นกลูโคส –6– ฟอสเฟต และถูกเมตาบอไลส์ต่อไปเป็นไพรูเวตในกระบวนการไกลโคโลซิส

ในกรณีที่มีน้ำตาลชนิดอื่น ๆ เป็นสารต้นตอคาร์บอน น้ำตาลนั้นจะถูกเมตาบอไลส์ให้เป็นอนุพันธ์ของกลูโคสหรือฟรุคโตส แล้วจึงเข้าสู่กระบวนการไกลโคไลซิสต่อไป (Lehninger, 1975)

อินทรีย์สารบางชนิด เช่น อาซีเตต ฟูมาเรต หรือ ซักซีเนต สามารถใช้เป็นสารต้นตอคาร์บอนของ Escherichia coli ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าหากเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจน

ในกรณีของ Escherichia coli จะเจริญโดยสามารถย่อยสลายอินทรีย์สารเหล่านั้นในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจน เมื่อมีตัวให้อิเล็กตรอนเสริมในอาหารเท่านั้น เช่น ในกรณีที่ใช้ฟูมาเรตเป็นสารต้นตอคาร์บอน Escherichia coli จะเจริญไม่ได้ ยกเว้นแต่จะเลี้ยงภายใต้บรรยากาศของไฮโดรเจน หรือเสริมฟอร์เมตลงในอาหาร (Macy และคณะ, 1976)

ส่วนวิถีในการนำสารต้นตอไนโตรเจนไปสร้างเป็นโครงร่างของเซลล์นั้นจะขึ้นกับชนิดของสารต้นตอไนโตรเจน ในกรณีที่อาหารเป็นอาหารสูตรอุดม เช่น ในสูตรอาหารที่ประกอบด้วยผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) หรือทริพโตน (tryptone) หรือเพบโตน (peptone) เป็นต้น สารที่กล่าวมานี้ ประกอบด้วยกรดอะมิโนเกือบครบทุกชนิด ผสมรวมกันด้วยอัตราส่วนต่าง ๆ กัน แบคทีเรียเพียงแต่นำกรดอะมิโนเหล่านี้เข้าเซลล์ และนำไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนได้โดยตรง

ในกรณีที่อาหารประกอบด้วยสารต้นตอไนโตรเจนซึ่งเป็นกรดอะมิโนชนิดใดชนิดหนึ่งนั้น แบคทีเรียจะต้องเปลี่ยนกรดอะมิโนที่เติมลงไปนั้นเป็นกรดอะมิโนชนิดอื่น ๆ หลักการทั่วไปคือ ดีอะมิเนตกรดอะมิโนที่เสริมนั้น และใช้อนุมูลแอมโมเนียมที่ได้จากการดีอะมิเนต เป็นสารต้นตอไนโตรเจนต่อไป

ส่วนการเมตาบอไลส์สารต้นตอไนโตรเจนที่เป็นอนินทรียสารนั้นเชื่อว่าอนุมูลใด ๆ ก็ตามที่มีไอ่อนุมูลแอมโมเนียม เช่น ไนเตรต ไนไตร์ต จะถูกเปลี่ยนเป็นอนุมูลแอมโมเนียมก่อน จากนั้นอนุมูลแอมโมเนียมจึงจะถูกนำไปใช้เป็นสารต้นตอไนโตรเจนอีกทอดหนึ่ง

โดยทั่วไป ประสิทธิภาพในการใช้สารอาหารเพื่อการเจริญของแบคทีเรียขึ้นกับกระบวนการผลิตพลังงานของแบคทีเรียเอง ดัชนีหนึ่งที่อาจใช้ชี้ประสิทธิภาพในการใช้สารอาหารเพื่อการเจริญของแบคทีเรีย คือ การวัดความเจริญสูงสุด เมื่อแบคทีเรียเจริญในอาหารที่มีสารต้นตอการ์บอนจำกัด

วิถีการผลิตพลังงานซึ่งจะทำให้เกิดความแตกต่างของการเจริญสูงสุดใน Escherichia coli แบ่งได้เป็น 3 วิถี คือ

1. ในสภาวะที่เจริญภายใต้บรรยากาศออกซิเจน แบคทีเรียจะเจริญในอาหารที่มีสารต้นตอการ์บอนจำกัด ได้สูงกว่าในภาวะที่ปราศจากออกซิเจน กระบวนการผลิตพลังงานของเซลล์ในภาวะนี้ได้รับการศึกษาค่อนข้างดีแล้ว กล่าวคือ สารต้นตอการ์บอนจะถูกเมตาบอไลส์ผ่านกระบวนการไกลโคไลซิสโดยมีไพรูเวตเป็นผลิตภัณฑ์ เซลล์จะได้พลังงานในรูปของ ATP 2 โมล และอำนาจรีดิวส์ในรูปของ NADH 2 โมล ต่อ 1 โมล กลูโคสที่ถูกเมตาบอไลส์โดยกระบวนการนี้ ไพรูเวตที่เกิดขึ้นจะถูกเปลี่ยนแปลงเป็นอาเซตทิลโคเอ โดยเอนไซม์ไพรูเวตดีไฮโดรจีเนสคอมเพล็กซ์ซึ่งมี NAD เป็นโคเอนไซม์ และโคเอนไซม์เอเป็นตัวร่วมทำปฏิกิริยา อาเซตทิลโคเอที่เกิดขึ้นจะถูกเมตาบอไลส์ผ่านวัฏจักรเครบ เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำจากวัฏจักรเครบนี้ เซลล์จะได้อำนาจรีดิวส์ในรูปของ NADH 4 โมล และ FADH 1 โมลต่อไพรูเวต 1 โมล ในสภาวะที่มีออกซิเจน กระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนที่มีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายจะถูกชักนำขึ้น เรียกกระบวนการนี้ว่ากระบวนการลูกโซ่ของการหายใจ (respiratory chain) อำนาจรีดิวส์ที่เกิดขึ้นจะถูกออกซิไดซ์โดยกระบวนการลูกโซ่ของการหายใจ พลังงานที่เกิดจากการขนส่งอิเล็กตรอนไปยังตัวรับอิเล็กตรอนต่าง ๆ จะถูกนำไปควบคู่ (coupling) กับการสร้างพลังงานในรูป ATP กระบวนการสร้างพลังงานนี้เรียกว่า oxidative phosphorylation ประมาณ

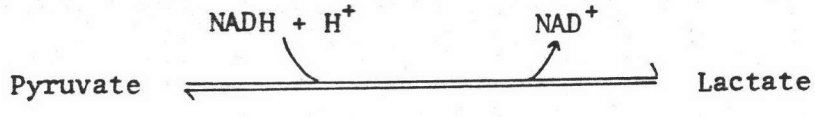
ว่าได้พลังงาน 3 โมลของ ATP ต่อ 1 โมลของ NADH และ 2 โมลของ ATP ต่อ 1 โมลของ FADH ดังนั้น เมื่อแบคทีเรียเติบโตในสภาวะที่มีออกซิเจนจะได้พลังงานประมาณ 36 โมลของ ATP ต่อ 1 โมลของกลูโคส

2.ก ในภาวะที่ปราศจากออกซิเจน พบว่า กระบวนการลูกโซ่หายใจหรือแม้แต่เอนไซม์ในวัฏจักรเครบบางตัวจะไม่ถูกชักนำ (Gray และคณะ, 1966) และในภาวะนี้ Escherichia coli จะเจริญสูงสุดได้เท่าใดนั้น ขึ้นกับชนิดของตัวรับอิเล็กตรอน หากไม่มีตัวรับอิเล็กตรอนอื่นใดเสริมในอาหารจะใช้โปรตอนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน และลดอำนาจรีดิวส์ลงเป็นก๊าซ กระบวนการนี้เรียกว่า anaerobic growth

2.ข หากมีตัวรับอิเล็กตรอนชนิดอื่น ๆ ในอาหาร เช่น ไนเตรต ในกรณีนี้ Escherichia coli จะลดอำนาจรีดิวส์ผ่านตัวรับอิเล็กตรอนดังกล่าว กระบวนการนี้เรียกว่า anaerobic respiration (หรือกระบวนการหายใจโดยใช้ไนเตรต) กระบวนการหายใจแบบหลังนี้แม้มีความสำคัญต่อนิเวศน์วิทยาของโลก แต่ได้รับการศึกษาน้อยกว่ากระบวนการผลิตพลังงานแบบที่ใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน

<u>บทบาทของฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสต่อวิถีการผลิตพลังงาน เมื่อปราศจากออกซิเจน</u>

ดังได้กล่าวมาแล้วว่า เมื่อปราศจากออกซิเจนแฟคคัลเททีฟ แบคทีเรียจะผลิตพลังงานด้วยวิถีที่แตกต่างจากกระบวนการที่เกิดขึ้น เมื่อมีออกซิเจน กล่าวคือ น้ำตาลซึ่งเป็นสารต้นตอคาร์บอนจะถูกเมตาบอไลส์ผ่านกระบวนการไกลโคไลซิส เป็นไพรูเวต ได้พลังงานในรูปของ ATP 2 โมล และอำนาจรีดิวส์ในรูปของ NADH 2 โมล ต่อจากนี้ แฟคคัลเททีฟแบคทีเรียจะเมตาบอไลส์ไพรูเวต และการกำจัดอำนาจรีดิวส์แตกต่างกันไป กล่าวคือ Streptococcus sp, Pediococcus sp รวมทั้ง Lactobacillus บางชนิดจะขจัด NADH ด้วยเอนไซม์แลคเทตดีไฮโดรจีเนส โดยการเปลี่ยนไพรูเวตเป็นแลคเทต (Garvie, 1980)



ส่วนแบคทีเรียพวกสแตฟฟิลโลคอคคัส เอนเทอโรแบคทีเรีย เช่น Escherichia coli จะเปลี่ยนไพรูเวตบางส่วนเป็นแลคเทต โดยเอนไซม์แลคเทต-ดีไฮโดรจีเนสเช่นเดียวกัน ไพรูเวตบางส่วนจะถูกเปลี่ยนแปลงเป็นอาเซตทิลโคเอและฟอร์เมต ในปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์ไพรูเวตฟอร์เมตไลเยสซึ่งมีโคเอนไซม์เอเป็นตัวร่วมปฏิกิริยา อาเซตทิลโคเอบางส่วนจะถูกเปลี่ยนแปลงเป็นเอธานอลโดยเอนไซม์อัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส และแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสซึ่งทั้งสองมี NADH เป็นโคเอนไซม์ อาเซตทิลโคเอบางส่วนจะถูกเปลี่ยนแปลงเป็นอาเซตทิลฟอสเฟตและในที่สุดจะเปลี่ยนแปลงเป็นอาซีเตต และพลังงานในรูป ATP 1 โมล โดยเอนไซม์ฟอสโฟทรานส์อะเซททิลเลสและอาซีเตตไคเนส (Garvie, 1980 ; Pascal และคณะ, 1981) (**รูปที่ 1**)

ฟอร์เมตซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์อีกตัวหนึ่งของปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์ไพรูเวตฟอร์เมตไลเยส จะถูกเปลี่ยนแปลงเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ โปรตอน และอิเล็กตรอน โดยปฏิกิริยาที่เร่งด้วยเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสในกรณีที่ไม่มีตัวรับอิเล็กตรอนอื่นใดในอาหารเลี้ยงเชื้อ อิเล็กตรอนที่เกิดขึ้นนี้จะถูกส่งไปยังกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนที่ยังไม่ทราบองค์ประกอบที่แน่ชัด โปรตอนจะเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย เกิดเป็นไฮโดรเจนโดยมีเอนไซม์ไฮโดรจีเนสเร่งปฏิกิริยานี้ กระบวนการนี้เรียกว่าฟอร์เมตไฮโดรเจนไลเยส (formate - hydrogenlyase) เอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสที่เกี่ยวข้องในกระบวนการนี้ เป็นเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสฟอร์ม H

หากมีตัวรับอิเล็กตรอนอื่นในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น ไนเตรต กระบวนการหายใจโดยใช้ไนเตรต (nitrate respiration) จะถูกชักนำขึ้น อิเล็กตรอนที่เกิดจากดีไฮโดรจีเนชันของฟอร์เมต จะถูกส่งไปยังกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนซึ่งมีไซโตโครม บี และยูบิควิโนนเป็นองค์ประกอบ ไนเตรตจะทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย และถูกรีดิวส์เป็นไนไตรต์ ปฏิกิริยานี้เร่งโดยเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส ในกรณีนี้เซลล์จะได้รับพลังงาน 2–3 โมลของ ATP ต่อ 1 โมลของไนเตรตที่ถูกรีดิวส์ (Hadjipetrou และ Stouthamer, 1965) เอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสที่เกี่ยวข้องในกระบวนการนี้ เป็นเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสฟอร์ม N (**รูปที่ 1**)

รูปที่ 1 กลูโคสเมตาบอลิสมในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจนของ Escherichia coli (Pascal และคณะ, 1981)

LDH = แลคเตทดีไฮโดรจีเนส (Lactate dehydrogenase)

PFL = ไพรูเวทฟอร์เมทไลเยส (Pyruvate formate lyase)

FDH_H = ฟอร์มิกดีไฮโดรจีเนสฟอร์ม H (Formic dehydrogenase form H)

FDH_N = ฟอร์มิกดีไฮโดรจีเนสฟอร์ม N (Formic dehydreoenase form N)

HYD = ไฮโดรจีเนส (Hydrogenase)

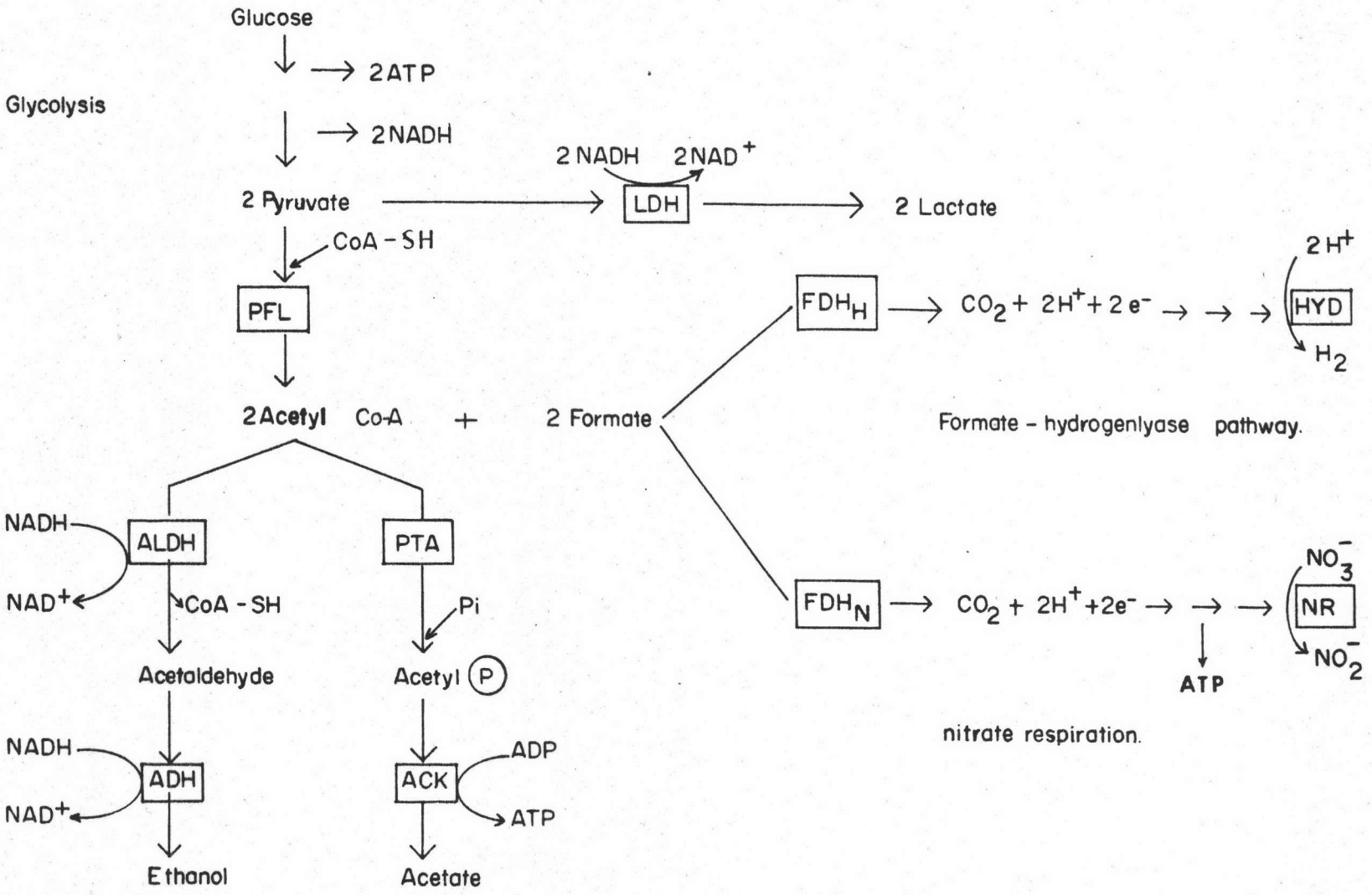
NR = ไนเตรทรีดักเทส (Nitrate reductase)

ALDH = อัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (Aldehyde dehydrogenase)

ADH = แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (Alcohol dehydrogenase)

PTA = ฟอสโฟทรานสอะเซททิลเลส (Phosphotransacetylase)

ACK = อะซิเตทไคเนส (Acetate kinase)


Glucose
2ATP
Glycolysis
2NADH
2 NADH 2NAD+
2 Pyruvate
LDH
2 Lactate
CoA - SH
PFL
2 H+
FDH_H
CO2 + 2H+ + 2e-
HYD
H2
2 Acetyl Co-A
+
2 Formate
Formate - hydrogenlyase pathway.
NADH
ALDH
PTA
NAD+
CoA - SH
Pi
NO3-
FDH_N
CO2 + 2H+ + 2e-
NR
NO2-
ATP
Acetaldehyde
Acetyl (P)
nitrate respiration.
NADH
ADH
ACK
ADP
NAD+
ATP
Ethanol
Acetate

สมบัติของเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนส

เอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนส เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนฟอร์เมตเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ โปรตอน และอิเล็กตรอน

$$H-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-O-H \xrightarrow{FDH} CO_2 + 2H^+ + 2e^- \qquad \mathcal{E}^{\circ\prime} = -420 \text{ มิลลิโวลต์}$$

เอนไซม์นี้มี 2 ฟอร์ม ขึ้นอยู่กับภาวะที่เซลล์เจริญเติบโต คือ

1. <u>เอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสฟอร์ม N</u> เป็นเอนไซม์ในกระบวนการหายใจโดยใช้ไนเตรต อยู่ที่เยื่อเซลล์ของแบคทีเรีย มีความจำเพาะต่อตัวรับอิเล็กตรอนสังเคราะห์พีนาซีนเมโธซัลเฟต (Lester และ DeMoss,1971;Ruiz-Herrera และคณะ 1972 ; Cox และคณะ, 1981) เอนไซม์นี้ถูกกดด้วยออกซิเจน และถูกชักนำด้วยไนเตรต (Ruiz - Herrera และ DeMoss,1969;Ruiz-Herrera และ Alvarez;1972)

Enoch และ Lester, 1975 ได้แยกและทำให้เอนไซม์นี้บริสุทธิ์ พบว่ามีคุณสมบัติดังต่อไปนี้

ก. มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 600 000 ดาลตัน

ข. ประกอบด้วยโพลีเพปไทด์ 3 ชนิด คือ α, β และ γ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 110 000, 32 000 และ 20 000 ตามลำดับ และมี molar ratio ของ $\alpha : \beta : \gamma$ = 1:1.2:0.55

ค. ประกอบด้วย ฮีม โมลิบดินัม ซีลีเนียม non-heme iron และ acid labile sulfide

ง. α subunit เป็น subunit ที่มีซีลีเนียมเป็นองค์ประกอบ

2. <u>เอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสฟอร์ม H</u> เป็นเอนไซม์ในกระบวนการฟอร์เมต – ไฮโดรเจนไลเยส มีความจำเพาะต่อตัวรับอิเล็กตรอนสังเคราะห์เบนซิลไวโอโลเจน (Peck และ Gest 1957; Lester และ DeMoss, 1971 ;

Ruiz - Herrera และคณะ, 1972 ; Cox และคณะ, 1981) ตำแหน่งของเอนไซม์นี้ยังไม่แน่นอน มีทั้งผู้ที่รายงานว่าตรวจพบแอคติวิตีของเอนไซม์นี้ในเยื่อเซลล์และไซโตพลาสสม เอนไซม์นี้ถูกกดกันด้วยออกซิเจนและไนเตรต ถูกชักนำด้วยฟอร์เมต (Gray และคณะ, 1966; Wimpenny และ Cole,1967; Ruiz-Herrera และ Alvarez, 1972)

Lester และ DeMoss 1971 รายงานว่าสามารถวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสฟอร์ม H นี้ได้สูงขึ้น เช่นเดียวกับฟอร์ม N ถ้าเติมโซเดียมโมลิบเดตและโซเดียมซิลีไนต์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Cox และคณะ, 1981 พบว่า ซีลีโนเพปไทด์นี้มีน้ำหนักโมเลกุล 80 000 ดาลตัน ถูกชักนำและถูกกดกันในสภาวะเดียวกันกับเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสฟอร์ม H และมีการกระจายตัว (distribution) ใน sucrose gradient เช่นเดียวกับเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสฟอร์ม H ข้อมูลทั้ง 2 ชี้แนะว่า เอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสฟอร์ม H นี้ มีโมลิบดินัม และซีลีเนียมเป็นองค์ประกอบเช่นเดียวกับเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสฟอร์ม N แต่อาจมีความแตกต่างกันที่น้ำหนักโมเลกุลของซีลีโนเพปไทด์ ส่วนคุณสมบัติอื่น ๆ ของเอนไซม์ฟอร์มนี้ไม่มีผู้รายงานไว้ เนื่องจากยังไม่สามารถทำให้เอนไซม์ฟอร์มนี้บริสุทธิ์ได้

พันธุศาสตร์ของ Escherichia coli

ในปัจจุบันทราบดีแล้วว่า Escherichia coli มีโครโมโซมเป็นวงสายเกลียวคู่ (circular double helix) ซึ่งมีหน้าที่ 4 อย่างคือ

1. replication
2. repair
3. recombination
4. transcription

ทรานสคริบชัน เป็นหน้าที่หนึ่งของโครโมโซมที่ช่วยให้เกิดความเข้าใจเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างยีนและเอนไซม์ และจากความสัมพันธ์ระหว่างยีน–เอนไซม์นี้

จึงทำให้เกิดความเข้าใจเกี่ยวกับพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล

จากความรู้ในปัจจุบัน ทราบว่ายีนเป็นหน่วยย่อยที่สุดของโครโมโซมที่สามารถถอดและแปลรหัสออกเป็นโปรตีน หน่วยย่อยของโปรตีนนี้รวมกับปัจจัยอื่น ๆ ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาเฉพาะ ปฏิกิริยาที่ต่อเนื่องกันเรียกว่าวิถี โดยทั่วไปยีนชนิดต่าง ๆ ที่ถอดรหัสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาในวิถีเดียวกันรวมกันจะเรียกว่า โอเปอรอน ในปัจจุบันทราบดีแล้วว่าโอเปอรอนบางชนิดสามารถถอดรหัสได้ตลอดเวลา โดยไม่ขึ้นกับภาวะการเจริญหรือชนิดของสารอาหาร เรียกโอเปอรอนประเภทนี้ว่า constitutive operon โอเปอรอนอีกประเภทหนึ่งเป็นโอเปอรอนที่ต้องถูกชักนำหรือได้รับการปลดปล่อยจากการกดดันซึ่งจะถอดรหัสได้ เรียกโอเปอรอนสองประเภทหลังนี้ว่า inducible และ derepressed operon ตามลำดับ

สำหรับโอเปอรอนประเภทที่ถูกชักนำได้นั้น จะเอื้ออำนวยในการศึกษาพันธุศาสตร์เป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากสามารถควบคุมการเปิดปิดโอเปอรอนได้โดยการแปรเปลี่ยนชนิดของสารอาหาร ดังนั้นจึงเป็นต้นบทให้มีการศึกษาอย่างกว้างขวางและก่อให้เกิดความเข้าใจการเรียงตัวของยีนบนโครโมโซมของโอเปอรอนชักนำเหล่านี้ เช่น ทราบว่าในโอเปอรอนหนึ่งจะประกอบด้วย regulatory gene, promotor gene, operator gene และ structural gene

วิธีการหนึ่งที่สามารถศึกษาการเรียงตัวของยีนในโอเปอรอนเหล่านี้ได้ คือ การแยกมิวแตนท์ที่มีความผิดปกติที่ตำแหน่งต่าง ๆ ของยีนของโอเปอรอน คุณสมบัติของมิวแตนท์ที่มีความผิดปกติที่โอเปอรอนเหล่านี้ อาจจำแนกออกตามความสัมพันธ์เกี่ยวกับการถอดรหัสเป็นเอนไซม์ได้ 2 แบบ คือ

1. regulatory mutant เป็นมิวแตนท์ที่มีความผิดปกติที่ยีนซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการถอดรหัสคือ i,p,o. ยีน ดังนั้นมิวแตนท์ในกลุ่มนี้จึงแสดงคุณสมบัติที่สัมพันธ์กับปริมาณของเอนไซม์

2. structural mutant เป็นมิวแตนท์ที่มีความผิดปกติที่ยีนซึ่งถอดรหัสเป็นโปรตีนโครงสร้างของเอนไซม์ ดังนั้นมิวแตนท์ในกลุ่มนี้ จะแสดงคุณสมบัติที่

สัมพันธ์กับคุณภาพและ/หรือปริมาณของ เอนไซม์

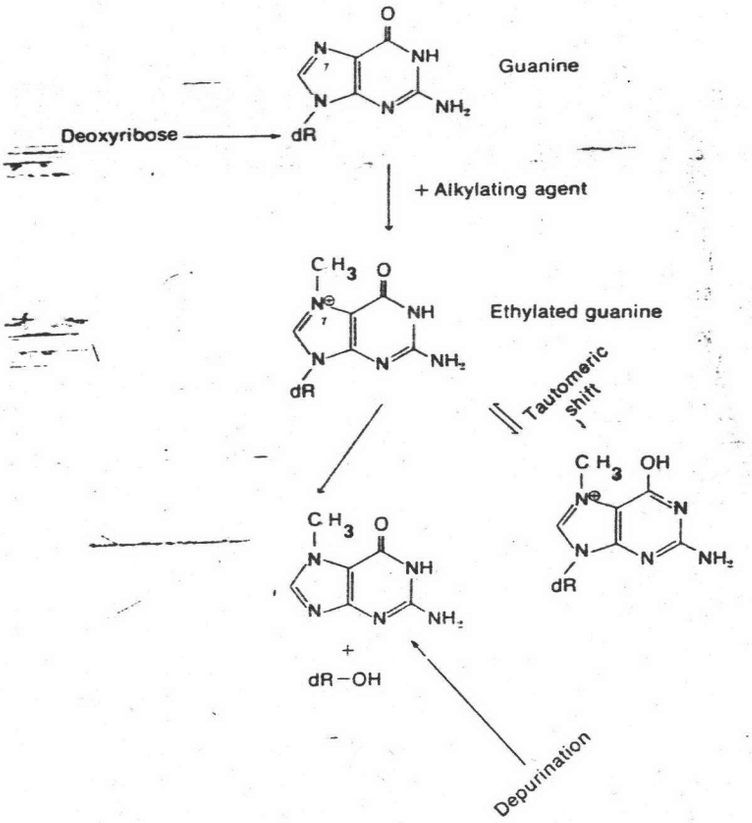
การแยกมิวแตนท์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตพลังงาน

โครโมโซมของ Escherichia coli ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ 4.5×10^6 คู่ ในกระบวนการ replication แบคทีเรียจะต้องสร้างนิว-คลีโอไทด์ตั้งแต่เริ่มต้นจนครบรอบโครโมโซมติดต่อกัน 2×10^6 นิวคลีโอไทด์ (ถ้าถือว่ากจร เพิ่มตัวของโครโมโซมเป็นแบบ bidirectional semiconservative) ด้วยเหตุนี้ ทุกครั้งที่มีการ เพิ่มตัวของโครโมโซมในการแบ่งตัวของแบคทีเรีย จึงมีโอกาส เกิดความผิดพลาดในการ เติมนิวคลีโอไทด์แต่ละหน่วยให้สอดคล้องกับแม่แบบ (template) เช่น ถ้าแบคทีเรียเจริญในอาหารสูตรอุดม มันจะต้อง เติมนิวคลีโอ-ไทด์เหล่านี้ให้เสร็จภายในเวลา 30 นาที ความผิดพลาดในลักษณะนี้ก่อให้เกิด spontaneous mutation ประมาณว่าอัตราการ เกิดความผิดปกติที่ยีนใดยีนหนึ่งโดย กระบวนการ spontaneous mutation มีค่าเท่ากับ 10^{-5} – 10^{-7} ต่อเซลล์ (Luria และ Delbriick, 1943;Cavalli-Sfora และ Lederberg, 1956)

ในห้องปฏิบัติการ การแยกมิวแตนท์ที่มีความผิดปกติที่ยีนที่สนใจของแบคที-เรียนั้น จะใช้ spontaneous mutation เพียงอย่างเดียวมิได้ จำเป็นต้อง เพิ่มโอกาสที่จะพบมิวแตนท์ที่สนใจนั้น โดยการกลายพันธุ์โครโมโซมของแบคทีเรีย

ในปัจจุบัน สารกลายพันธุ์โครโมโซมของแบคทีเรียที่มีอานุภาพสูง ได้แก่ พวก alkylating agent เช่น diethyl sulfate, ethylethanesulfonate (EES), ethylmethanesulfonate (EMS), methylmethanesulfonate (MMS), N-methyl - N' - nitro - N - nitrosoguanidine (NTG)

NTG เป็นมิวตาเจนที่นิยมใช้มากที่สุด NTG จะถูกเปลี่ยนเป็นไดอะโซมีเธน (diazomethane) ซึ่งเป็นสารกลายพันธุ์ที่แท้จริง ไดอะโซมีเธนจะทำปฏิกิริยากับเบส เพียวรีน ดังปฏิกิริยาต่อไปนี้



เป็นที่ยอมรับกันว่า การกลายพันธุ์ด้วย NTG จะเอื้ออำนวยให้ได้มิวแตนท์ที่มีความผิดปกติทุกยีน ปัญหาที่สำคัญคือ การแยกมิวแตนท์ที่สนใจออกจากกลุ่มมิวแตนท์ที่ถูกกลายพันธุ์นั้นได้อย่างไร

สำหรับมิวแตนท์ที่มีความผิดปกติที่ยีนที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิสมของเมตาบอไลท์ต่าง ๆ เช่น น้ำตาล กรดอะมิโน ไวตามินนั้น สามารถแยกออกจากกลุ่มอื่น ๆ ได้โดยง่าย โดยกระบวนการทดสอบความเป็นออกโซโทรฟของมัน กล่าวอีกนัยหนึ่งเพียงการสังเกตความแตกต่างระหว่าง **master plate** และ **replicating plate** ที่เสริมและไม่เสริมด้วยเมตาบอไลท์ที่สนใจนั้น จะสามารถแยกออกโซโทรฟที่ต้องการได้ กระบวนการแยกออกโซโทรฟนี้เป็นกระบวนการที่ไม่ยุ่งยาก ทั้งยังสามารถเพิ่มความถี่ของการแยกออกโซโทรฟด้วยกระบวนการ **enrichment** ได้อีกด้วย

การ **enrichment** ที่นิยมใช้ในการแยกออกโซโทรฟคือ สร้างภาวะที่ออกโซโทรฟที่สนใจหยุดแบ่งตัว ในขณะที่มิวแตนท์ตัวอื่น ๆ แบ่งตัวได้ตามปกติ เมื่อเติมยาปฏิชีวนะที่ทำลายเยื่อเซลล์ของแบคทีเรียลงในภาวะนั้น มิวแตนท์ฟีโนไทพ์อื่น ๆ ที่ไม่ต้องการจึงถูกทำลายเกือบหมด ยาปฏิชีวนะที่นิยมใช้ในการ

enrichment ของ Escherichia coli ได้แก่ เพนนิซิลิน-จี และ ดี-ไซโคล-ซีรีน (Gorini และ Kaufman, 1960)

สำหรับมิวแตนท์ที่มีความผิดปกติที่กระบวนการผลิตพลังงานนั้น ไม่อาจแยกได้โดยกระบวนการแบบเดียวกับการแยกออกโซโทรพ แต่จะต้องใช้ความรู้ทางชีวเคมีของกระบวนการเหล่านั้น เป็นหลักในการสร้างเงื่อนไขสำหรับการแยกมิวแตนท์ที่ต้องการ ดังนั้น การแยกมิวแตนท์จึงจัดเป็นความคิดสร้างสรรค์ชนิดหนึ่ง และไม่มีกล่าวไว้เป็นเงื่อนไขที่แน่นอนแต่อย่างใด ณ ที่นี้ จะกล่าวถึงหลักการคิดวิธีแยกมิวแตนท์ที่มีความผิดปกติที่กระบวนการผลิตพลังงาน ดังต่อไปนี้

1. ใช้ความแตกต่างของวาเลนซีของธาตุที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีนหรือเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสร้างพลังงาน

ทราบกันดีแล้วว่า โปรตีนหรือเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตพลังงาน มักมีธาตุทรานซิชัน (transition element) เป็นองค์ประกอบ ธาตุที่สำคัญและพบมากที่สุดได้แก่ Fe^{+2} / Fe^{+3}; Cu^{+}/Cu^{+2} ธาตุทรานซิชันเหล่านี้เมื่อรวมกับโปรตีนหรือเอนไซม์แล้ว จะสามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่าง ๆ กัน ทำให้เกิดสีที่แตกต่างกัน ดังนั้น จึงสามารถแยกมิวแตนท์ได้โดยการสังเกตสีของโคโลนีที่เปลี่ยนแปลงไป ในอาหารที่เอื้ออำนวยให้วาเลนซ์อิเล็กตรอนของธาตุทรานซิชันเปลี่ยนแปลง วิธีนี้นิยมใช้เป็นหลักแยกมิวแตนท์ที่มีความผิดปกติที่ไซโตโครมชนิดต่าง ๆ

2. ใช้ตัวรับอิเล็กตรอนที่มีค่ารีดักชันโพเทนเชียลที่เหมาะสมเป็นตัวจำแนก

ทราบกันดีแล้วว่า อินทรีย์สารสังเคราะห์หลายตัว สามารถเปลี่ยนแปลงสีได้เมื่อมีการเปลี่ยนแปลง pH และอินทรีย์สารเหล่านี้มีค่ารีดักชันโพเทนเชียลที่สภาวะมาตรฐาน (Standard reduction potential) แตกต่างกัน ด้วยเหตุนี้อินทรียสารเหล่านั้นจึงเหมาะที่จะใช้เป็นรีดอกซ์อินดิเคเตอร์ในการเลือกมิวแตนท์ที่มีความผิดปกติที่รีดอกซ์เอนไซม์ ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างพลังงาน เช่น เบนซิลไวโอโลเจน ซึ่งมีค่ารีดักชันโพเทนเชียลที่สภาวะมาตรฐานเท่ากับ − 359 มิลลิโวลต์ จะสามารถรับอิเล็กตรอนจากตัวให้อิเล็กตรอนที่มีค่ารีดักชันโพเทนเชียลต่ำกว่าได้

3. ใช้ตัวร่วมเร่งหรือตัวยับยั้งปฏิกิริยาเป็นตัวจำแนก

ทราบกันดีแล้วว่า กระบวนการสร้างพลังงานมักประกอบด้วยรีดอกซ์เอนไซม์ที่ทำงานร่วมกับไซโตโครมชนิดต่าง ๆ ตัวอย่างเช่น กระบวนการลูกโซ่หายใจได้รับการศึกษาทางชีวเคมีอย่างดี แม้ว่ากลไกที่แท้จริงของกระบวนการนี้จะศึกษาได้ยากและยังไม่มีการเปิดเผยก็ตาม แต่ก็สามารถใช้ความรู้เกี่ยวกับตัวร่วมเร่งหรือตัวยับยั้งปฏิกิริยาซึ่งทราบดีแล้วนี้เป็นหลักในการแยกมิวแตนท์ที่ต้องการได้ ยกตัวอย่างเช่น การที่ทราบว่าไซโตโครมออกซิเดส ถูกยับยั้งได้โดยซัยยาไนด์ ดังนั้นการแยกมิวแตนท์ที่มีความผิดปกติที่ไซโตโครมออกซิเดสจึงทำได้ง่าย โดยการเลือกสายพันธุ์ที่สามารถต้านซัยยาไนด์ (cyanide resistant strain)

นอกจากหลักการโดยทั่วไปดังกล่าวแล้ว ยังอาจอาศัยความจริงทางสรีรวิทยาหรือพันธุศาสตร์เข้าช่วยในการแยก ในกรณีนี้จะต้องพินิจจากความจริงของแต่ละราย และนำความจริงที่ได้มาใช้เป็นประโยชน์ในการแยกอีกทอดหนึ่ง ตัวอย่างที่จะกล่าว ณ ที่นี้คือ การแยกมิวแตนท์ที่มีความผิดปกติที่เอนไซม์เอทีพี ซินเทเทส (ATP synthetase) ซึ่งทำหน้าที่สร้างเอทีพีโดยควบคู่ (coupling) พลังงานจากกระบวนการลูกโซ่การหายใจ มิวแตนท์ที่มีความผิดปกติที่โอเปอรอนของเอนไซม์ตัวนี้ถูกแยกมาจากความสามารถในการใช้ซักซีเนต เป็นสารต้นทางคาร์บอน กล่าวคือ ถาเอนไซม์เอทีพี – ซินเทเทส ผิดปกติแล้ว มิวแตนท์ดังกล่าวจะใช้ซักซีเนตเป็นสารต้นทางคาร์บอนไม่ได้ และนอกจากนี้ยังพบว่า สรีรวิทยาที่เด่นอีกประการหนึ่งของมิวแตนท์ที่โอเปอรอนนี้คือ ไม่สามารถเจริญในอาหารที่ปราศจากตัวรับอิเล็กตรอนได้

ภายหลังจากที่แยกมิวแตนท์ที่มีความผิดปกติทางสรีรวิทยาได้แล้ว ก็ได้มีการตรึงความผิดปกติของมิวแตนท์ที่แยกได้ พบว่า ความผิดปกติถูกตรึงได้ที่นาทีที่ 83 ของโครโมโซมของ Escherichia coli เรียกว่า unc (uncouple mutant) จากความรู้เกี่ยวกับตำแหน่งที่ผิดปกติบนยีนนี้เอง จึงเอื้ออำนวยให้สร้างมิวแตนท์ฟีโนไทพ์ใหม่ ๆ ขึ้นโดยอาศัยกระบวนการ localized mutagenesis กล่าวคือ ถาสามารถสร้างออกโซโทรพที่มีความผิดปกติที่ตำแหน่งยีนบนโครโมโซมนาทีเดียวกันได้ (ในที่นี้คือไอโซลิวซีน – วาลีนออกโซโทรพ ซึ่งตรึงความผิดปกติได้ที่นาทีที่ 83 เช่นเดียวกัน) จะสามารถใช้เป็นตัวรับ (recipient) ในการทรานสดักชัน โดยมี

ตัวให้ (donor) คือ P_1 lysate ที่ถูกกลายพันธุ์แล้ว การทำทรานสดักชันโดยอาศัย lysate ที่ถูกกลายพันธุ์ ผ่านตัวรับที่เหมาะสมนี้ จะทำให้ได้ทรานสดักแตนท์ ที่มีความผิดปกติที่เอนไซม์ที่ต้องการ ในกรณีนี้ความถี่ที่จะพบมิวแตนท์จะสูงมาก และโอกาสที่จะได้มิวแตนท์ที่มีจีโนไทพ์และฟีโนไทพ์ต่าง ๆ กันมีมากที่สุด (Hong และ Ames, 1971)

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ในขั้นต้น การวิจัยนี้ตั้งขึ้นโดยมีวัตถุประสงค์ว่า ต้องการแยกมิวแตนท์ของ Klebsiella pneumoniae M5al ที่มีความผิดปกติที่รีดอกซ์เอนไซม์ในกระบวนการสร้างพลังงานในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจน เพื่อนำไปศึกษากลไกของการตรึงไนโตรเจนต่อไป รีดอกซ์เอนไซม์ดังกล่าวได้แก่ เอนไซม์ไพรูเวตฟอร์เมตไลเยส และเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนส

ภายหลังจากที่ได้ศึกษาไประยะหนึ่งแล้วจึงพบว่า มิวแตนท์ที่แยกได้ มีความผิดปกติที่เอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนส ดังนั้น วัตถุประสงค์หลักของการวิจัยจึงจำกัดตัวได้ว่า เป็นการแยกและจำแนกมิวแตนท์ที่มีความผิดปกติที่เอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนส

กระบวนการวิจัยประกอบด้วย

1. การแยกมิวแตนท์ที่มีความผิดปกติในการสังเคราะห์พลังงาน
2. การจำแนกมิวแตนท์ออกเป็นกลุ่ม
3. การศึกษาสรีรสมบัติของมิวแตนท์กลุ่มที่น่าสนใจ
4. การพิสูจน์ว่ามิวแตนท์กลุ่มที่ศึกษามีความผิดปกติที่เอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนส โดยการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์และตรึงตำแหน่งความผิดปกติของยีน