การเลือกมิวแตนท์ของ *เอสเชอริเชีย โคไล* ที่ขับแอล-เมไทโอนีน

นายคงพัฒน์ พงศ์ไพบูลย์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาชีวเคมี
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ.2524

011724

SELECTION of L-METHIONINE SECRETORY MUTANT of *Escherichia coli*

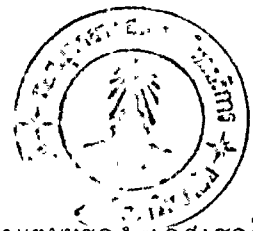
Mr.Kongpat Pongpaiboon

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of The Requirements
for the Degree of Master of Sciences

Department of Biochemistry
Graduate School
Chulalongkorn University

1981



หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเลือกมิวแตนท์ของ *เอสเชอริเชีย โคไล* ที่ขับแอล–เมไทโอนีน
โดย	นายคงพัฒน์ พงศ์ไพบูลย์
ภาควิชา	ชีวเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ทิพยทัศน์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุประดิษฐ์ บุนนาค)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สรรเสริญ ทรัพย์โตษก)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ทิพยทัศน์)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.นลิน นิลอุบล)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อมเรศ ภูมิรัตน)

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การเลือกมิวแตนท์ของเอสเชอริเชีย โคไล ที่ขับแอล–เมไทโอนีน
ชื่อนิสิต นายคงพันธ์ พงศ์ไพบูลย์
อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ทิพยทัศน์
ภาควิชา ชีวเคมี
ปีการศึกษา 2523

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อเลือกมิวแตนท์ของเอสเคอริเคีย โคไล ที่ขับแอล–เมไทโอนีน รวมทั้งศึกษาศักยภาพของการใช้กากน้ำตาลเป็นอาหารของแบคทีเรียตัวนี้อีกด้วย

จากการทดลองพบว่าธรีโอนีนออกโซโทรพของเอสเคอริเคีย โคไล เค12 บางตัวสามารถเจริญได้ในอาหารเชื้อที่เติมเมไทโอนีน–ดีแอล–ซัลฟอกซิมีนที่มีความเข้มข้นลดหลั่นกัน ประมาณสิบเปอร์เซนต์ของโคโลนีที่เจริญได้นี้ พบว่า เป็นมิวแตนท์ที่ขับแอล–เมไทโอนีน ปริมาณของแอล–เมไทโอนีนในอาหารเลี้ยงเชื้อหาได้โดยใช้เมไทโอนีนออกโซโทรพที่มีความผิดปกติที่เอ็นไซม์เอ็น 5 เอ็น 10–เมธิลีนเตตราไฮโดรโฟเลท รีดักเตส ความไวของวิธีการนี้อยู่ระหว่าง 0–10 ไมโครกรัมของแอล–เมไทโอนีนต่อมิลลิลิตรของอาหารเชื้อ จากการทดลองพบว่า มิวแตนท์ของเอสเคอริเคีย โคไล เค12 ที่ขับแอล–เมไทโอนีนสายพันธุ์หนึ่งขับแอล–เมไทโอนีนได้ 1,600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณแอล–เมไทโอนีนจำนวนนี้ถึงแม้ว่าค่อนข้างน้อยแต่ยังสูงกว่าจำนวนที่ถูกขับออกโดยไวลด์ไทพ์เดิมราวสิบเท่า

กากน้ำตาลประกอบด้วยสารมีคุณค่าเหมาะแก่การนำมาเป็นอาหารแบคทีเรีย ผลการวิเคราะห์สมบัติทั่วไปของกากน้ำตาลจากจังหวัดกาญจนบุรี ชลบุรี และลำปางเปิดเผยว่า กากน้ำตาลทุกชนิดใช้

เป็นต้นตอคาร์บอน ไนโตรเจน และฟอสฟอรัสสำหรับใช้เอสเคอริเคีย โคไล เค12 เจริญได้ ปริมาณ น้ำตาล โปรตีน และฟอสเฟตอนินทรีย์ของกากน้ำตาลจะต่างกัน แต่ปริมาณจำนวนนี้ จะแปรเป็นสัดส่วนโดยตรงกับการเจริญสูงสุดของเอสเคอริเคีย โคไล เค12 นอกจากนี้ยังพบว่า มีสารบางอย่างในกากน้ำตาลสามารถหน่วงเหนี่ยวการเจริญของแบคทีเรีย ระยะบ่มตัวที่ได้จากเส้นโค้ง ของการเจริญของเอสเคอริเคีย โคไล เค12 เมื่อใช้กากน้ำตาลเป็นต้นตอคาร์บอน จะแตกต่างกับ เมื่อใช้กลูโคสเป็นต้นตอคาร์บอนอย่างมีนัยสำคัญ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis Title	Selection of L-Methionine Secretory Mutant of *Escherichia coli*
Name	Mr.Kongpat Pongpaiboon
Thesis Advisor	Associate Professor Dr.Pairor Thipayathasana
Department	Biochemistry
Academic Year	1980

ABSTRACT

The purpose of this study is to select L-methionine secretory mutants of *Escherichia coli* including the study of the potential of using molasses as its nutrient.

It was found that some of *thr* auxotroph of *Escherichia coli* K_{12} can outgrow in minimal medium supplemented with linear gradient concentration of methionine-DL-sulfoximine. Approximately ten percents of these outgrowth colonies were detected as L-methionine secretory mutants. The concentration of L-methionine in the growth medium was determined by using *met* auxotroph which has a genetic defection on the N^5N^{10}-methylenetetrahydrofolate reductase enzyme. The sensivity of this adjusted procedure ranged between 0-10 micrograms of L-methionine per mililitre of the medium. It was found that one strain from the stock of L-methionine secretory mutants secretes 1,600 micrograms of L-methionine per litre of the medium. This amount of L-methionine, even though it appears rather low, is still ten times higher that that secreted by the wild type.

Molasses is composed of various precious substances and can be used as a source of bacterial nutrient. The analysis of molasses from Kanchanaburi, Chonburi and Lumpang provinces revealed that molasses from each of these areas can serve as a source of carbon, nitrogen and phosphorus for Escherichia coli K_{12}. The total amount of sugar, protein and inorganic phosphate from these different sources are different. The quantity of these substances was shown to be directly proportionate to the maximum growth yield of Escherichia coli K_{12}. It was also found that some substances in the molasses suppress its growth. The latent period from the growth curve of Escherichia coli K_{12}, when used molasses as a carbon source, is significantly different from that when used glucose as a carbon source.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนใคร่ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ทิพยทัศน์ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและให้แนวความคิดอย่างดียิ่ง ในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สรรเสริญ ทรัพย์โสภก รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัมเรศ ภูมิรัตน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและให้แนวความคิดในด้านการเขียนอย่างดียิ่งในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สภาวิจัยแห่งชาติ ที่ให้ความช่วยเหลือด้านทุนการวิจัย และขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย และทุกท่านซึ่งมิได้เอ่ยนามในนี้ สำหรับกำลังใจ ความช่วยเหลือ จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ค

กิตติกรรมประกาศ ..... จ

สารบัญ ..... ฉ

รายการตารางประกอบ ..... ช

รายการรูปประกอบ ..... ฌ

คำย่อ ..... ฏ

บทที่ 1 บทนำ 1

บทที่ 2 วิธีการทดลอง 10

1. วัสดุและเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง 10
2. แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง 11
3. อาหารเลี้ยงแบคทีเรีย 11
4. การเตรียมสารละลาย 12
5. วิธีศึกษาสมบัติทั่วไปของกากน้ำตาล 14
6. การเก็บรักษาแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง 17
7. การศึกษาศักยภาพในการเป็นอาหารของแบคทีเรียของกากน้ำตาล 17
8. การเตรียมกรดอะมิโนออกโซโทรฟ 17
9. การเลือกสายพันธุ์ที่ขับเมไธโอนีนของเอสเคอริเคีย โคไล เค12 (3110) 20
10. การตรวจสอบปริมาณเมไธโอนีนที่ขับออก 21

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 ผลการวิจัย 22

1. การแยกเมไธโอนีนออกโซโทรฟ (met) 22
2. การแยกและจำแนกฟีโนไทพ์ของเมไธโอนีนออกโซโทรฟ (met) 22
3. การแยกธรีโอนีนออกโซโทรฟ (thr) 24
4. ลักษณะการเจริญของธรีโอนีนออกโซโทรฟต่อปริมาณธรีโอนีน 26
5. การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยเมไธโอนีน–ดีแอล–ซัลฟอกซิมีน 26
6. การเลือกสายพันธุ์ที่ขับเมไธโอนีน 30
7. การหาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลกับปริมาณเมไธโอนีนที่ถูกขับออก 32
8. คุณสมบัติทั่วไปของกากน้ำตาล 36
9. ศักยภาพในการเป็นอาหารของแบคทีเรียของกากน้ำตาล 41

บทที่ 4 วิจารณ์ผลการทดลองและสรุปผลการวิจัย 51

เอกสารอ้างอิง 60

ประวัติผู้เขียน 65

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการตารางประกอบ

หน้า

ตารางที่ 1 การจำแนกฟีโนไทพ์ของเมไธโอนีนออกโซโทรพ 23
ตารางที่ 2 ลักษณะสายพันธ์ที่ต้านเมไธโอนีน–ดีแอล–ซัลฟอกซิมีน ในเพลทที่ความเข้มข้นของแอนาล็อกลดหลั่นกัน 31
ตารางที่ 3 สมบัติทั่วไปของกากน้ำตาล 40
ตารางที่ 4 ระยะบ่มตัวของเอสเคอริเดีย โคไล เค12 (3110) เมื่อใช้กากน้ำตาลเป็นสารต้นตอคาร์บอนเทียบกับกลูโคส 46
ตารางที่ 5 การเจริญสูงสุดของเอสเคอริเดีย โคไล เค12 (3110) เมื่อใช้กากน้ำตาลเป็นสารต้นตอคาร์บอนเทียบกับกลูโคส 47

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการรูปประกอบ

หน้า

รูปที่ 1 เมตาบอลิสมและการควบคุมการสังเคราะห์เมไธโอนีนของ เอสเคอริเคีย โคไล เค12 โดยขบวนการควบคุมแบบป้อนกลับ 7

รูปที่ 2 การเจริญสูงสุดของ met ในสูตรอาหารปรับต่ำเมื่อเสริมด้วยเมไธโอนีนปริมาณต่างกัน 25

รูปที่ 3 การเจริญของ thr_4 ในธรีโอนีนปริมาณต่างกัน 27

รูปที่ 4 การเจริญสูงสุดของ thr ในธรีโอนีนปริมาณต่างกัน 28

รูปที่ 5 การเจริญของเอสเคอริเคีย โคไล เค12 ในเมไธโอนีน-ดีแอล ซัลฟอกซิมีน ปริมาณต่างกัน 29

รูปที่ 6 Cross feeding ระหว่างเอสเคอริเคีย โคไล เค12 (3110) met กับ thr 33

รูปที่ 7 Cross feeding ระหว่างเอสเคอริเคีย โคไล เค12 (3110) met กับ thr_4 ซึ่งต้านเมไธโอนีน-ดีแอล-ซัลฟอกซิมีน 34

รูปที่ 8 Cross feeding ระหว่างเอสเคอริเคีย โคไล เค12 (3110) met กับ thr ซึ่งต้านเมไธโอนีน-ดีแอล-ซัลฟอกซิมีน 35

รูปที่ 9 การเจริญของ thr_4, thr_4 MSO^r และ WT, WT MSO^r ในอาหารสูตรปรับต่ำเมื่อเสริมและไม่เสริมด้วยธรีโอนีน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 37

รูปที่ 10 ปริมาณเมไธโอนีนที่ขับออกจาก thr_4, thr_4 MSO^r ที่เวลาต่าง ๆ 38

รูปที่ 11 ปริมาณเมไธโอนีนที่ขับออกจาก WT, WT MSO^r ที่เวลาต่าง ๆ 39

รายการรูปประกอบ (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 12 การเจริญของเอสเคอริเคีย โคไล เค12 (3110) เมื่อใช้กลูโคสเป็นต้นตอคาร์บอน 44

รูปที่ 13 การเจริญของเอสเคอริเคีย โคไล เค12 (3110) เมื่อใช้กากน้ำตาลเป็นต้นตอคาร์บอน 45

รูปที่ 14 การเจริญสูงสุดของเอสเคอริเคีย โคไล เค12 (3110) เมื่อใช้กากน้ำตาลก่อนและหลังการไฮโดรไลซ์ที่มีความเข้มข้นต่างกันเป็นต้นตอคาร์บอน 48

รูปที่ 15 การเจริญสูงสุดของเอสเคอริเคีย โคไล เค12 (3110) เมื่อเสริมด้วยฟอสเฟตปริมาณต่างกัน 49

รูปที่ 16 การเจริญสูงสุดของเอสเคอริเคีย โคไล เค12 (3110) เมื่อเสริมด้วยอนุมูลแอมโมเนียมที่ความเข้มข้นต่างกัน 50

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ

M	=	กากน้ำตาล
MA	=	กากน้ำตาลหลังย่อย
MB	=	กากน้ำตาลก่อนย่อย
Cys	=	cysteine
F	=	feedback inhibition
Lys	=	lysine
lys	=	lysine auxotroph
Met	=	methionine
met	=	methionine auxotroph
MSO^r	=	methionine-DL-sulfoximine resistant
MSO^s	=	methionine-DL-sulfoximine sensitive
NTG	=	N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
OD.	=	optical density
R	=	respression
Ser	=	serine
Thr	=	threonine
thr	=	threonine auxotroph
FH_4	=	tetrahydrofolate
B_{12}	=	vitamin B_{12}
WT	=	wild type

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย