บทที่ 1

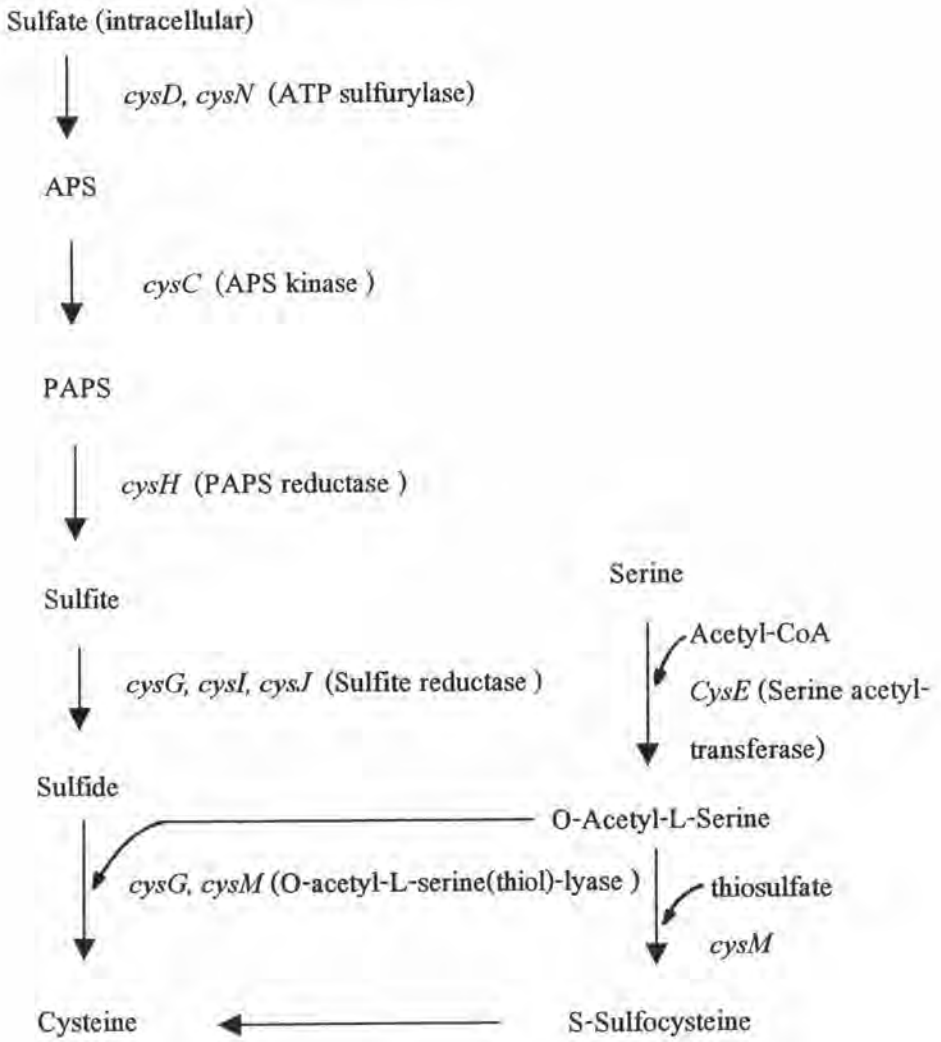
บทนำ

กำมะถันเป็นองค์ประกอบของสารอินทรีย์หลายชนิดในเซลล์ของพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ สารอินทรีย์เหล่านี้สัตว์สังเคราะห์จากกรดอะมิโนที่มีกำมะถันเป็นองค์ประกอบ ซึ่งได้มาจากสารอาหารที่รับประทานเข้าไป พืชสังเคราะห์จากกำมะถันซัลเฟตที่ดูดซับได้จากภายนอกเซลล์ จุลินทรีย์สังเคราะห์ได้จากทั้งกำมะถันซัลเฟตและกรดอะมิโนที่มีกำมะถันเป็นองค์ประกอบที่ดูดซับได้จากภายนอกเซลล์ ทั้งพืชและจุลินทรีย์ต่างก็นำกำมะถันซัลเฟตจากภายนอกเซลล์ที่ได้มาสังเคราะห์เป็นกรดอะมิโนซิสเตอีน จากนั้นกรดอะมิโนซิสเตอีนจึงจะถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดอะมิโนชนิดอื่นที่มีกำมะถันเป็นองค์ประกอบ สารเมทาโบไลต์ทั้งชนิดปฐมภูมิและทุติยภูมิ (primary and secondary metabolite) ที่มีกำมะถันเป็นองค์ประกอบต่อไป กำมะถันซัลเฟตที่จุลินทรีย์ทั้งรา ยีสต์ และแบคทีเรีย ดูดซึมเข้ามาภายในเซลล์จะถูกรีดิวซ์ไปเป็นอะดีโนซิน 5-ฟอสโฟซัลเฟต (adenosine 5′ phosphosulfate, APS) โดยเอทีพีซัลฟูรีเลส (ATP sulfurylase) ต่อจากนั้น เอพีเอสจะถูกเปลี่ยนไปเป็นพีเอพีเอส (PAPS; 3-phosphoadenosine-5-phosphosulfate) ซัลไฟต์ (sulfite) ซัลไฟด์ (sulfide) และซิสเตอีน โดยเอพีเอสไคเนส (APS kinase) พีเอพีเอสรีดักเตส (PAPS reductase) ซัลไฟต์รีดักเตส (sulfite reductase) และโอ-อะซิติล-แอล-ซีรีน (ไธออล)-ไลเอส (O-acetyl-L-serine(thiol)-lyase) หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่าซิสเตอีนซินเธส (cysteine synthase) ตามลำดับ (Schmidt และ Jager 1992) ภาพที่ 1.1 แสดงวิถีการสังเคราะห์กรดอะมิโนซิสเตอีนและยีนประมวลรหัสของเอนไซม์ต่างๆในวิถีนี้

พืชนำกำมะถันซัลเฟตที่ดูดซับได้จากภายนอกเซลล์มาสังเคราะห์เป็น เอพีเอสโดยเอทีพีซัลฟูรีเลสเช่นเดียวกับจุลินทรีย์ ต่อจากนั้นเอพีเอสจะถูกนำมาสังเคราะห์เป็นกรดอะมิโนซิสเตอีนได้โดย 2 วิถี (Schmidt และ Jager 1992) ได้แก่

1. เปลี่ยนเอพีเอสไปเป็นสารประกอบซึ่งมีซัลไฟต์มาจับเกาะ (bound sulfite) สารประกอบซึ่งมีซัลไฟด์มาจับเกาะ (bound sulfide) และซิสเตอีน โดยเอพีเอสซัลโฟทรานสเฟอเรส (APS sulfotransferase) ไธโอซัลโฟเนทรีดักเตส (thiosulfonate reductase) และซิสเตอีสซินเธส ตามลำดับ เรียกวิถีนี้ว่า bound intermediate pathway ดังแสดงในสมการที่ 1

$$\text{APS} \xrightarrow{\text{APS sulfotransferase}} \text{R-S-SO}_3^- \xrightarrow{\text{thiosulfonate reductase}} \text{R-S-S}^- \xrightarrow{\text{cysteine synthase}} \text{cysteine} \quad \text{.....(1)}$$



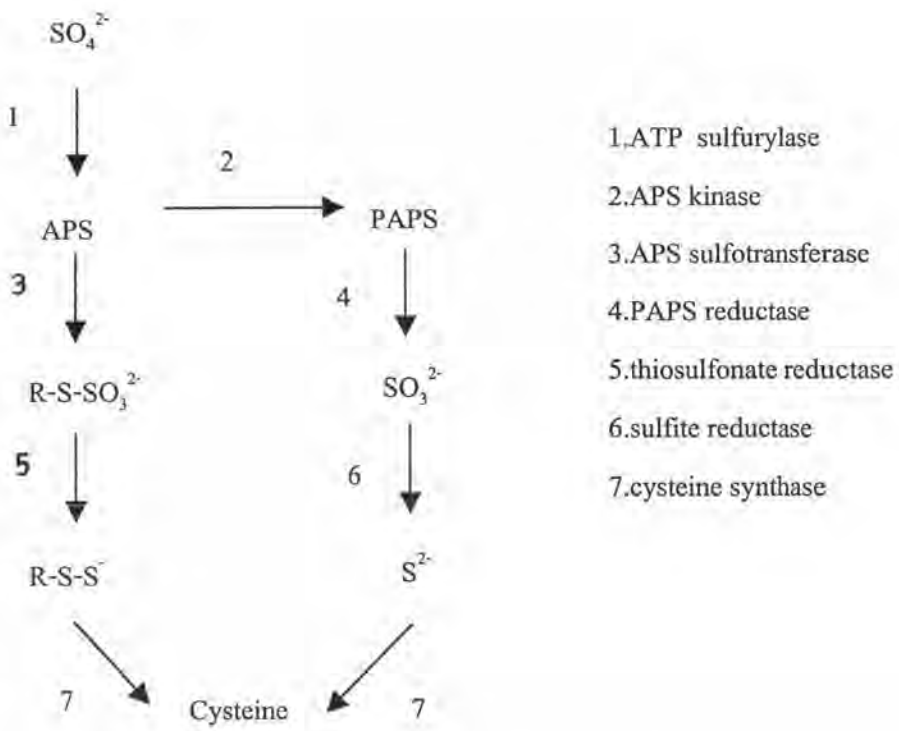
ภาพที่ 1.1 วิถีการสังเคราะห์กรดอะมิโนซิสเตอีนจากกำมะถันซัลเฟต และยีนซึ่งประมวลรหัสเอนไซม์แต่ละชนิดในวิถีนี้ของ *Escherichia coli* (Schmidt และ Jager 1992)

2. เปลี่ยนเอพีเอสไปเป็นพีเอพีเอส ซัลไฟต์ (sulfite) ซัลไฟด์(sulfide) และซิสเตอีน โดยเอพีเอสไคเนส (APS kinase) พีเอพีเอสรีดักเตส (PAPS reductase) ซัลไฟต์รีดักเตส (sulfite reductase) และซิสเตอีสซินเธส ตามลำดับเรียกวิถีนี้ว่า free intermediate pathway ดังสมการที่ 2

APS kinase PAPS reductase sulfite reductase cysteine synthase

APS ⟶ PAPS ⟶ SO_3^{2-} ⟶ S^{2-} ⟶ cysteine .....(2)

Schmidt (1972) รายงานว่าสาหร่าย *Chlorella pyrenoidosa* ที่ยีนประมวลรหัสเอพีเอสซัลโฟทรานสฟอเรสผ่าเหล่า ไม่สามารถสังเคราะห์กรดอะมิโนซิสเตอีน Brunold และ Suter (1990) รายงานว่าพบกิจกรรมของเอพีเอสซัลโฟทรานสเฟอเรสที่คลอโรพลาสต์ซึ่งเป็นออกาเนล (organelle) ที่มีการสังเคราะห์กรดอะมิโนซิสเตอีน Schiffman และ Schwenn (1994) รายงานว่าพบกิจกรรมของพีเอพีเอสรีดักเตส ซึ่งต้องการไธโอรีดอกซิน (thioredoxin, Trx) เป็นตัวให้อิเลคตรอนในผักขม (spinach) ภาพที่ 1.2 แสดงวิถีการสังเคราะห์กรดอะมิโนซิสเตอีนจากกำมะถันซัลเฟตและเอนไซม์ซึ่งทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาในแต่ละขั้นตอนของพืช (Schmidt และ Jager 1992)



ภาพที่ 1.2 วิถีการสังเคราะห์กรดอะมิโนซิสเตอีนจากกำมะถันซัลเฟตและเอนไซม์ซึ่งทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาในแต่ละขั้นตอนของพืช (Schmidt และ Jager 1992)

Goldschmidt และคณะ (1975) รายงานว่าน้ำสกัดจากคลอโรพลาสต์ของพืชสามารถเปลี่ยนเอพีเอสไปเป็นซัลไฟต์ได้โดยตรง ไม่จำเป็นต้องถูกเปลี่ยนไปเป็นพีเอพีเอสก่อน Setya และคณะ (1996) และ Gutierrez-Marcos และคณะ (1996) รายงานว่าพบวิถีการสังเคราะห์กรดอะมิโนซิสเตอีนจากกำมะถันซัลเฟตของพืชวิถีที่ 3 คือการเปลี่ยนเอพีเอสไปเป็นซัลไฟต์ ซัลไฟด์ และซีสเตอีน โดยเอพีเอสรีดักเตส (APS reductase) ซัลไฟต์รีดักเตส และซิสเตอีนซินเธส ตามลำดับ ดังแสดงในสมการที่ 3

ATP sulfurylase APS reductase sulfite reductase cysteine synthase

$$SO_4^{2-} \longrightarrow APS \longrightarrow SO_3^{2-} \longrightarrow S^{2-} \longrightarrow \text{cysteine} \quad ...(3)$$

โดยตรวจพบว่า *Arabidopsis thaliana* มียีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตสซึ่งสามารถเปลี่ยนเอพีเอสไปเป็นซัลไฟต์ได้โดยตรง

Setya และคณะ (1996) โคลนยีนประมวลรหัสพีเอพีเอสรีดักเตสของ *A.thaliana* ด้วยวิธีตรวจหาความสามารถของยีนที่โคลนเข้าไป ในการทำให้เซลล์แบคทีเรียที่ยีนบางชนิดผ่าเหล่าเจริญได้ในภาวะที่ทดสอบ (functional complementation test) โดยโคลนคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอของ *A. thaliana* สายพันธุ์ Columbia เข้าสู่ *E. coli* JM96 สายพันธุ์ที่ยีนประมวลรหัสพีเอพีเอสรีดักเตส (ยีน *cysH*) ผ่าเหล่า แล้วเพาะเลี้ยงทรานสฟอร์แมนต์บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากกรดอะมิโนซิสเตอีน ผลการโคลนได้ยีน 3 ยีน คือ ยีน *APR1, APR2* และ *APR3* สามารถทำให้ทรานสฟอร์แมนต์เจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากกรดอะมิโนซิสเตอีนที่ทดสอบ แสดงว่ายีน *APR* ทั้งสามนี้เป็นรหัสของเอนไซม์ซึ่งสามารถทำหน้าที่แทนพีเอพีเอสรีดักเตสได้ ยีน *APR* ทั้งสามนี้พบว่าเป็นยีนที่มีความใกล้ชิดกัน (gene family) เพราะสามารถให้สัญญาณไฮบริดซึ่งกันและกันได้ ผลการหาลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสจากยีนทั้งสามนี้พบว่ามีบริเวณอนุรักษ์ (conserved domain) เหมือนกับของพีเอพีเอสรีดักเตสและโปรตีนไธโอรีดอกซิน (thioredoxin, Trx) ของแบคทีเรีย รา และยีสต์ ผลการทรานสฟอร์มยีน *APR1* เข้าสู่ *E. coli* JM81A, *E. coli* A522 และ *E. coli* JM240 สายพันธุ์ที่ยีนประมวลรหัสเอพีเอสไคเนส โปรตีนไธโอรีดอกซินและเอทีพีซัลฟูรีเลสผ่าเหล่าตามลำดับ เพาะเลี้ยงทรานสฟอร์แมนต์บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากกรดอะมิโนซิสเตอีน พบว่ายีน *APR1* สามารถทำให้เซลล์ทรานสฟอร์แมนต์ของ *E. coli* JM81A และ *E. coli* A522 ซึ่งเดิมเป็นสายพันธุ์ที่ไม่สามารถสังเคราะห์เอพีเอสไคเนส และไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีนไธโอรีดอกซินตามลำดับเจริญได้ แต่ไม่สามารถทำให้เซลล์ทรานสฟอร์แมนต์ของ *E. coli* JM240 ซึ่งเดิมเป็นสายพันธุ์ที่ไม่สามารถสังเคราะห์เอทีพีซัลฟูรีเลสเจริญได้ ผลการ

ทดลองที่ได้ แสดงว่าเอนไซม์ที่แปลรหัสมาจากยีน *APR1* นี้ไม่ต้องการพีเอพีเอส สามารถใช้เอพีเอสเป็นสับสเตรตได้ เพราะ *E.coli* JM81A เป็นสายพันธุ์ที่ไม่สามารถสังเคราะห์เอพีเอสไคเนสจึงไม่สามารถเปลี่ยนเอพีเอสไปเป็นพีเอพีเอส การทำงานของเอนไซม์นี้ไม่ต้องการไธโอรีดอกซินเพราะ *E. coli* A522 เป็นสายพันธุ์ที่ไม่มีโปรตีนไธโอรีดอกซิน แสดงว่าเอนไซม์นี้ไม่ใช่พีเอพีเอสรีดักเตสเพราะการทำงานของพีเอพีเอสรีดักเตส ต้องการไธโอรีดอกซินเป็นตัวให้อิเลคตรอน และกิจกรรมของเอนไซม์ต้องการเอพีเอสเพราะ *E. coli* JM240 เป็นสายพันธุ์ที่ไม่สามารถสังเคราะห์เอทีพีซัลฟูรีเลส จึงไม่สามารถสังเคราะห์เอพีเอสจากกำมะถันซัลเฟตได้ ผลการทดสอบความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์กึ่งบริสุทธิ์ ที่แปลรหัสจากยีน *APR1* พบว่ามีความจำเพาะต่อเอพีเอสสูงกว่าพีเอพีเอส 50 เท่า ผลการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากการที่เอนไซม์กึ่งบริสุทธิ์ที่แปลรหัสจากยีน *APR1* ย่อยสลายเอพีเอสหรือพีเอพีเอสคือซัลไฟต์ ผลการทรานสฟอร์มยีน *APR1* เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ที่มีซัลไฟต์รีดักเตสแต่ไม่มีเอนไซม์ย่อยสลายไธโอซัลเฟต พบว่าทรานสฟอร์แมนต์สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากกรดอะมิโนซิสเตอีน แสดงว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกิจกรรมของเอนไซม์ที่แปลรหัสมาจากยีน *APR1* คือซัลไฟต์ไม่ใช้ไธโอซัลเฟต ผลการทดลองนี้สนับสนุนว่าเอนไซม์นี้ไม่ใช้เอพีเอสซัลโฟทรานส-เฟอเรสเพราะผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกิจกรรมของเอพีเอสซัลโฟทรานสเฟอเรสคือไธโอซัลเฟต ซึ่งต้องการเอนไซม์ย่อยสลายไธโอซัลเฟตในวิถีการสังเคราะห์กรดอะมิโนซิสเตอีน ผลการหาลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสมาจากยีน *APR1*, *APR2* และ *APR3* พบว่ามีบริเวณสายเปปไทด์ขนส่งไปสู่คลอโรพลาสต์ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีการสังเคราะห์กรดอะมิโนซิสเตอีนภายในเซลล์

Gutierrez-Marcos และคณะ (1996) โคลนยีนประมวลรหัสพีเอพีเอสรีดักเตสของ *A. thaliana* สายพันธุ์ Columbia ด้วยวิธีเดียวกันกับ Setya และคณะ (1996) คือโคลนคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอของ *A. thaliana* เข้าสู่ *E. coli* JM96 สายพันธุ์ที่ยีนประมวลรหัสพีเอพีเอสรีดักเตสผ่าเหล่า ผลการโคลนได้ยีน 3 ยีน คือ ยีน *prh19*, *prh26* และ *prh43* สามารถทำให้เซลล์ทรานสฟอร์แมนต์ของ *E. coli* JM96 ซึ่งเดิมเป็นสายพันธุ์ที่ไม่สามารถสังเคราะห์พีเอพีเอสรีดักเตสเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากกรดอะมิโนซิสเตอีน แสดงว่ายีน *prh* ทั้งสามนี้เป็นรหัสของเอนไซม์ซึ่งสามารถทำหน้าที่แทนพีเอพีเอสรีดักเตสได้ ผลการหาลำดับเบสของยีนทั้งสามนี้พบว่าบริเวณแปลรหัสเป็นโปรตีน (open reading frame) ไม่มีส่วนอินตรอน (intron) ประมวลรหัสสายโปลีเปปไทด์ขนาด 465, 458 และ 453 กรดอะมิโน น้ำหนักโมเลกุลจากการคำนวณเท่ากับ 51.2, 50.5 และ 50.4 กิโลดาลตันตามลำดับ โปรตีนที่แปลรหัสจากยีน *prh* (โปรตีนพีอาร์เอช, PRH) ต่างจากพีเอพีเอสรีดักเตส เพราะปลายเอ็น (N-terminus) มีสายเปปไทด์ขนส่งไปยังคลอโรพลาสต์ และปลายซี (C-terminus) มีลำดับกรดอะมิโนและรูปร่างสามมิติที่คำนวนได้

เหมือนโปรตีนไธโอรีดอกซิน โปรตีนพีอาร์เอช สามารถใช้เอพีเอสเป็นสับสเตรทได้ดีกว่าพีเอพีเอสในการสังเคราะห์ซัลไฟต์ นั่นคือสามารถใช้เอพีเอสเป็นสับสเตรทได้โดยตรง ไม่จำเป็นต้องเปลี่ยนเอพีเอสเป็นพีเอพีเอสโดยเอพีเอสไคเนสก่อน ผลการหากิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตสในน้ำสกัดจากเซลล์ทรานสฟอร์แมนต์ที่ได้จากการทรานสฟอร์มยีน *prh19*, ยีน *prh26* หรือยีน *prh43* เข้าสู่ *E. coli* JM96 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไม่สามารถสังเคราะห์พีเอพีเอสรีดักเตส เปรียบเทียบกับในน้ำสกัดจากสายพันธุ์ดั้งเดิม(wild type) ของ *E. coli* JM96 พบว่ากิจกรรมของพีเอพีเอสรีดักเตสของเซลล์ทรานสฟอร์แมนต์ต่ำกว่าของสายพันธุ์ดั้งเดิมมาก กิจกรรมของเอนไซม์ไม่ต้องการไธโอรีดอกซิน การเพิ่มความเข้มข้นของไธโอรีดอกซินไม่มีผลทำให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงขึ้น การทดสอบโดยใช้โปรตีนพีอาร์เอชบริสุทธิ์ซึ่งเป็นรหัสจากยีน *prh* ทั้งสามชนิดให้ผลเช่นเดียวกัน แสดงว่าไม่มีไธโอรีดอกซินปนเปื้อนอยู่ในน้ำสกัดจากเซลล์หรือโปรตีนไธโอรีดอกซินไม่จำเป็นต่อกิจกรรมของเอนไซม์จริง แต่ผลการหากิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตสของน้ำสกัดจากเซลล์ทรานสฟอร์แมนต์ทั้ง 3 ชนิดเปรียบเทียบกับจากสายพันธุ์ดั้งเดิม ในภาวะที่เติมและไม่เติมไธโอรีดอกซิน พบว่าน้ำสกัดจากเซลล์ทรานสฟอร์แมนต์มีกิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตสสูงกว่าของสายพันธุ์ดั้งเดิมมาก ไธโอรีดอกซินไม่จำเป็นต่อกิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตสทั้งในน้ำสกัดจากเซลล์และโปรตีนพีอาร์เอชบริสุทธิ์ แต่จากการที่พบปลายซีของโปรตีนพีอาร์เอชมีลำดับกรดอะมิโนบริเวณอนุรักษ์เหมือนโปรตีนไธโอรีดอกซิน ทำให้สันนิษฐานว่าโปรตีนพีอาร์เอชอาจมีบริเวณเร่งปฏิกิริยา (catalytic site) ของโปรตีนไธโอรีดอกซิน จึงไม่ต้องการไธโอรีดอกซินจากภายนอกเหมือนพีเอพีเอสรีดักเตส โปรตีนพีอาร์เอชซึ่งเป็นรหัสจากยีน *prh43* ซึ่งสายเปปไทด์ที่ปลายเอ็นบางส่วนถูกตัดออกยังคงมีกิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตส แสดงว่าโปรตีนพีอาร์เอชนี้ประกอบด้วย 2 ส่วนคือสายเปปไทด์ขนส่งและส่วนของเอพีเอสรีดักเตส ผลการทำไฮบริไดเซชันโดยใช้ลำดับเบสบริเวณปลายด้านเอ็นของยีน *prh* แต่ละชนิดพบว่าในจีโนม (genome) ของ *A. thaliana* สายพันธุ์ Columbia นี้มียีน *prh19* และ *prh43* อย่างละ 1 ชุด แต่มียีน *prh26* หลายชุด ผลการหาลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนพีอาร์เอชยืนยันได้ว่าไม่ใช้เอพีเอสไคเนสและเอพีเอสซัลโฟทรานสเฟอเรสอย่างแน่นอน

เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ที่เป็นรหัสจากยีน *APR1* และยีน *prh19* ด้วยโปรแกรม Blast ของ NCBI (National Center for Biotechnology Information) พบว่าเหมือนกัน 99% จากการที่พบว่ากลุ่มยีน *APR* มีส่วนที่เป็นอินตรอน แต่กลุ่มยีน *prh* ไม่มีส่วนที่เป็นอินตรอน และจำนวนอินตรอนที่พบในยีน *APR* แต่ละชนิดไม่เหมือนกัน Bick และ Leustek (1998) ได้สันนิษฐานว่าน่าจะเป็นผลมาจากวิวัฒนาการของยีน เอพีเอสรีดักเตสที่พบในพืชไม่มีความสัมพันธ์ใดๆ กับเอพีเอสรีดักเตสที่พบในแบคทีเรียที่สามารถรีดิวซ์กำมะถันซัลเฟตเพื่อนำไป

ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์สารอินทรีย์ที่มีกำมะถันเป็นองค์ประกอบ(sulfate reducing bacteria) เช่น *Desulfovibrio vulgalis* และ *Archaeoglobus fulgidus* (Hipp และคณะ 1997) วิถีการรีดิวซ์ซัลเฟตของแบคทีเรียกลุ่มนี้ดังแสดงในสมการที่ 4

$$SO_4^{2-} \xrightarrow{\text{ATP sulfurylase}} APS \xrightarrow{\text{APS reductase}} SO_3^{2-} \xrightarrow{\text{sulfite reductase}} H_2S \quad \text{.....(4)}$$

เนื่องจากพืชสามารถดูดซับกำมะถันซัลเฟตจากสิ่งแวดล้อมที่เจริญอยู่นำมาสังเคราะห์เป็นสารอินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่มีกำมะถันเป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ Ernst (1998) จึงได้เสนอแนวคิดในการใช้พืชขจัดกำมะถันซัลเฟตที่มากเกินไปซึ่งจัดเป็นมลพิษออกจากสิ่งแวดล้อม (Phytoremediation) ประเทศไทยมีเหมืองถ่านหินลิกไนต์ที่ อ.แม่เมาะ จ.ลำปาง ซึ่งจัดเป็นเหมืองถ่านลิกไนต์ที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ น้ำที่เกิดจากกระบวนการทำเหมืองหรือที่เรียกว่าน้ำล้างเหมืองมีกำมะถันซัลเฟตปนเปื้อนในปริมาณสูงถึง 800-2,000 มก./ล. ทั้งนี้เพราะถ่านลิกไนต์ที่เหมืองแม่เมาะนี้มีเหล็กซัลไฟด์ (FeS_2) หรือไพไรต์ปนเปื้อนอยู่สูงถึง 3-6% โดยเฉลี่ย (ศิรพรรณ สุคนธสิงห์ 2539) ในภาวะที่มีออกซิเจน และค่าความเป็นกรดด่างที่เป็นกลาง เหล็กซัลไฟด์เหล่านี้จะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันทางเคมี (chemical oxidation) ดังสมการที่ 5

$$2FeS_2 + 7O_2 + 2H_2O \longrightarrow 2Fe^{2+} + 4SO_4^{2-} + 4H^+ \quad \text{.....(5)}$$

เฟอรัสไอออน (Fe^{2+}) ซึ่งอยู่ในรูปของเฟอรัสซัลเฟตจะถูกออกซิไดซ์โดยแบคทีเรียกลุ่มคีโมลิโธโทรฟ (chemolithotrophs) ได้แก่ *Thiobacillus ferroxidans* (Rossi 1992) ซึ่งสามารถออกซิไดซ์เฟอรัสไอออน ไปเป็นเฟอริกไอออน (Fe^{3+}) ดังแสดงในสมการที่ 6

$$2Fe^{2+} + 0.5O_2 + 2H^+ \longrightarrow 2Fe^{3+} + H_2O \quad \text{.....(6)}$$

เฟอริกไอออนจากสมการที่ 6 จะออกซิไดซ์ไพไรต์ทางเคมีได้ต่อไปดังแสดงในสมการที่ 7

$$FeS_2 + 14Fe^{3+} + 8H_2O \longrightarrow 15\,Fe^{2+} + 2SO_4^{2-} + 16H^+ \quad \text{.....(7)}$$

จะเห็นว่า ผลผลิตหลักจากการที่ไพไรต์ถูกออกซิไดซ์ทั้งโดยออกซิเจนในอากาศและโดย

จุลินทรีย์คือกำมะถันซัลเฟต การไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทยได้ทำการขจัดหรือลดปริมาณกำมะถันซัลเฟตออกจากน้ำล้างเหมืองให้มีปริมาณกำมะถันซัลเฟตไม่สูงกว่า 100 มก./ล. เพื่อให้สามารถปล่อยน้ำล้างเหมืองเหล่านี้ออกสู่แหล่งน้ำตามธรรมชาติได้ โดยทำการสูบน้ำล้างเหมืองมายังบ่อพัก ซึ่งได้สร้างให้ภาวะในแต่ละบ่อที่น้ำล้างเหมืองไหลผ่านนี้เป็นภาวะไร้อากาศโดยการปลูกพืชที่เจริญเติบโตรวดเร็วอย่างหนาแน่นปกคลุมเพื่อป้องกันการแพร่ของออกซิเจนในอากาศเข้าทางผิวน้ำ และเพื่อให้พืชดูดซับกำมะถันซัลเฟตบางส่วน และใส่สารอินทรีย์ปริมาณมากลงไปในบ่อ ผลการเจริญของจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์จะทำให้ออกซิเจนที่ละลายในบ่อหมดไปเกิดเป็นภาวะไร้อากาศ ในภาวะไร้อากาศจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการออกซิเจนเพื่อการเจริญ เช่นแบคทีเรียกลุ่ม *Desulfotomaculum* ได้แก่ *D. nitrificans*, *D.ruminis* และ *D.orientis* (Holt และคณะ 1994) ซึ่งใช้กำมะถันซัลเฟตเป็นตัวรับอิเลคตรอนตัวสุดท้ายในกระบวนการสังเคราะห์พลังงานจะเจริญ มีผลให้กำมะถันซัลเฟตถูกรีดิวซ์ไปเป็นกาซไฮโดรเจนซัลไฟด์ กาซไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่เกิดขึ้นนี้จะก่อให้เกิดกลิ่นเหม็นรบกวนบริเวณใกล้เคียง เรียกวิธีการขจัดหรือลดกำมะถันซัลเฟตโดยวิธีนี้ว่า wet land พบว่า wet land สามารถลดปริมาณกำมะถันซัลเฟตลงไปประมาณ 30% เท่านั้น น้ำล้างเหมืองที่ผ่านกระบวนการนี้ จึงยังไม่สามารถปล่อยออกสู่แหล่งน้ำตามธรรมชาติได้ น้ำล้างเหมืองเหล่านี้จึงถูกนำมากักเก็บไว้ในบ่อพักเรียก Biological pond และเมื่อมีฝนตกลงมาปริมาณน้ำฝนจะทำให้ความเข้มข้นของกำมะถันซัลเฟตใน Biological pond ลดต่ำลง และอาจลดลงถึง 100 มก./ล. ได้ ใน Biological pond นี้พบว่ามีผักบุ้งเจริญอยู่ ผักบุ้งเป็นพืชที่เจริญเติบโตเร็ว การเจริญมีการนำกำมะถันซัลเฟตในน้ำที่เจริญอยู่มาสังเคราะห์เป็นสารอินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ หรือมีกระบวนการนำกำมะถันซัลเฟตมาสร้างเป็นกรดอะมิโนซิสเตอีนดังได้กล่าวแล้วข้างต้น ในธรรมชาติประสิทธิภาพการนำกำมะถันซัลเฟตมาสังเคราะห์เป็นกรดอะมิโนซิสเตอีนไม่สูงมาก ดังนั้นหากต้องการใช้ผักบุ้งเพื่อการขจัดหรือลดปริมาณกำมะถันซัลเฟตใน Biological pond ต้องทำการปรับปรุงสายพันธุ์ให้มีประสิทธิภาพสูง ในการนำกำมะถันซัลเฟตมาสังเคราะห์เป็นกรดอะมิโนซิสเตอีน ซึ่งอาจทำโดยการถ่ายโอนยีนประมวลรหัสเอนไซม์ในวิถีการสังเคราะห์กรดอะมิโนซิสเตอีนจากกำมะถันซัลเฟตให้แก่ผักบุ้ง

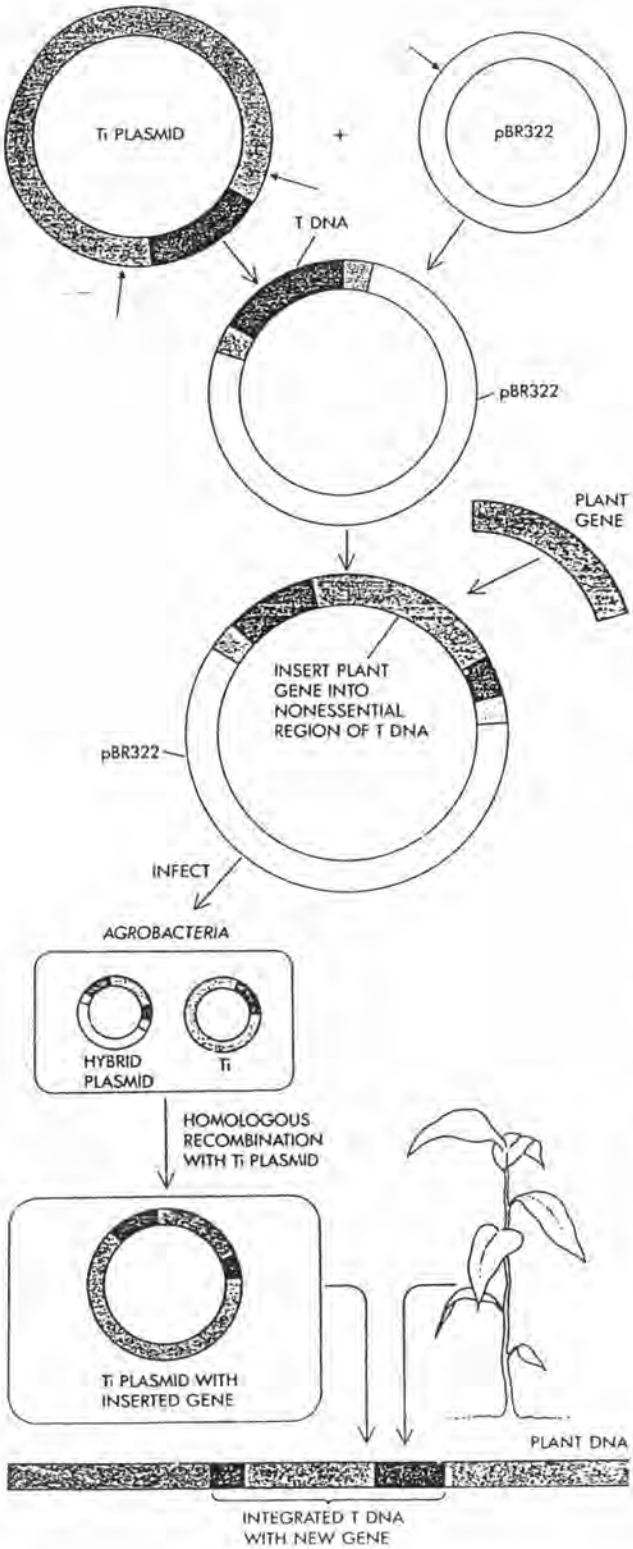
การปรับปรุงสายพันธุ์พืชโดยวิธีทางพันธุวิศวกรรมอาจทำโดยการถ่ายโอนยีนโดยตรง เช่น โดยวิธีอิเลคโตพอเรชัน (electroporation) วิธีการใช้เข็มฉีด (microinjection) หรือวิธีการใช้เครื่องยิง (microprojectile bombardment) และโดยการถ่ายโอนยีนโดยการใช้ *Agrobacterium* ซึ่งวิธีนี้ใช้ได้เฉพาะกับพืชใบเลี้ยงคู่ (Dicotyledons) แต่เป็นวิธีที่นิยมใช้มากที่สุด (Walden และคณะ 1997) *Agrobacterium tumefaciens* เป็นแบคทีเรียกรัมลบอาศัยอยู่ในดิน สามารถบุกรุกเข้าสู่เซลล์พืชได้ทางบาดแผล ทำให้พืชมีลักษณะเป็นปุ่มปม เรียก Crown gall disease ทั้งนี้เพราะ

A. tumefaciens สามารถถ่ายโอนยีนส่วน T-DNA จากพลาสมิด Ti เข้าสู่โครโมโซมพืช ยีนส่วน T-DNA มียีนระบุรหัสฮอร์โมนพืชพวกออกซิน (auxins) และไซโตไคนิน (cytokinins) จึงทำให้เซลล์พืชแบ่งตัวอย่างรวดเร็วและไม่จำกัด เกิดเป็นปุ่มปมหรือก้อนเนื้องอก หลักการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์พืชโดยอาศัย *Agrobacterium* ทำโดยขจัดยีนระบุรหัสฮอร์โมนพืชออกจากยีนส่วน T-DNA แล้วนำยีนที่ต้องการถ่ายโอนเข้ามาสอดแทรกแทน เมื่อยีนส่วน T-DNA สอดแทรกเข้าไปในโครโมโซมของพืชยีนที่ต้องการถ่ายโอนก็จะถูกนำเข้าไปด้วย

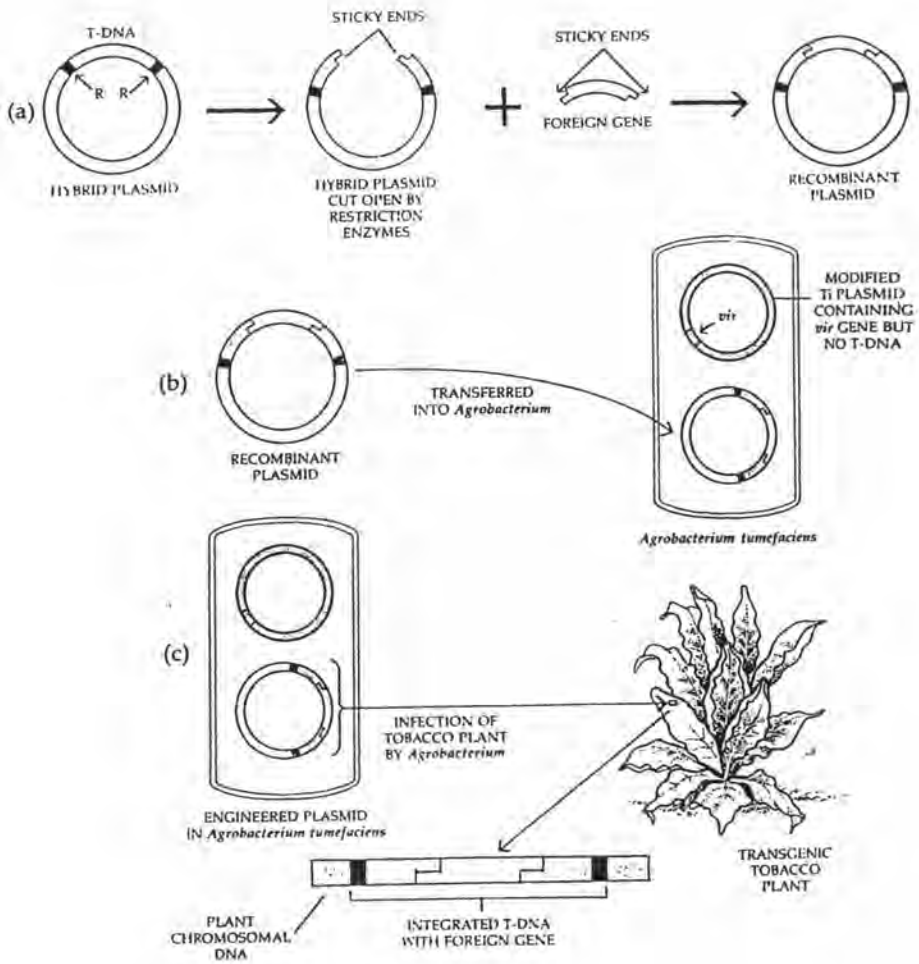
พลาสมิดพาหะ Ti สำหรับการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์พืชโดย *Agrobacterium* แบ่งออกเป็น 2 ชนิดคือ

1. ชนิดโคอินทิเกรต (Cointegrate vector) (สุรินทร์ ปียะโชคคณานุกูล 2539, Watson และคณะ 1975) พลาสมิดพาหะชนิดนี้เกิดจากการนำยีนส่วน T-DNA ของพลาสมิด Ti มาเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะที่สามารถเพิ่มจำนวนได้ใน *E.coli* และภายในยีนส่วน T-DNA มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์เรสทริกชันซึ่งสามารถตัด และสอดแทรกยีนที่ต้องการถ่ายโอนเข้าไปได้ รีคอมบิแนนต์พลาสมิดที่สร้างจากพลาสมิดพาหะชนิดนี้ เมื่อทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ *A. tumefaciens* ที่มีพลาสมิด Ti ยีนส่วน T-DNA ของรีคอมบิแนนต์พลาสมิดและของพลาสมิด Ti จะเกิดกระบวนการโฮโมโลกัสรีคอมบิเนชัน (homologous recombination) ของยีนส่วนที่เหมือนกันในบริเวณ T-DNA เกิดเป็นพลาสมิด Ti ซึ่งมียีนส่วน T-DNA ที่มาจากรีคอมบิแนนต์พลาสมิด หรือมียีนที่ต้องการถ่ายโอนอยู่ในส่วน T-DNA นั่นเอง ดังนั้น *A. tumefaciens* ที่มีพลาสมิด Ti นี้ เมื่อบุกรุกเข้าสู่เซลล์พืชจึงสามารถถ่ายโอนยีนที่ต้องการเข้าสู่โครโมโซมของพืชได้ (ภาพที่ 1.3)

2. ชนิดไบนารี (Binary vector) (สุรินทร์ ปียะโชคคณานุกูล 2539, Raven และคณะ 1992) พลาสมิดพาหะชนิดนี้เกิดจากการนำยีนส่วน T-DNA ของพลาสมิด Ti มาเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะชนิดที่สามารถเพิ่มจำนวนได้ทั้งใน *E.coli* และใน *A. tumefaciens* ภายในยีนส่วน T-DNA มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์เรสทริกชันซึ่งสามารถตัดและสอดแทรกยีนที่ต้องการถ่ายโอนเข้าไปได้ รีคอมบิแนนต์พลาสมิดที่สร้างจากพลาสมิดพาหะชนิดนี้เมื่อทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ *A. tumefaciens* ที่มีพลาสมิดดัดแปลง Ti คือมีกลุ่มยีน *vir* ซึ่งระบุรหัสเอนไซม์ตัดยีนส่วน T-DNA ออกจากพลาสมิด Ti และทำให้ยีนส่วน T-DNA สามารถสอดแทรกเข้าไปในโครโมโซมของพืชได้ แต่ไม่มียีนส่วน T-DNA รีคอมบิแนนต์พลาสมิดจะสามารถอยู่ร่วมกับพลาสมิดดัดแปลง Ti นี้ได้ *A. tumefaciens* ซึ่งมีพลาสมิดทั้งสองนี้อยู่ร่วมกันเมื่อบุกรุกเข้าสู่เซลล์พืช จะสามารถถ่ายโอนยีนส่วน T-DNA จากรีคอมบิแนนต์พลาสมิดซึ่งมียีนที่ต้องการถ่ายโอนสอดแทรกอยู่เข้าไปในโครโมโซมของพืชได้ (ภาพที่ 1.4)



ภาพที่ 1.3
แสดงการสร้างพลาสมิดพาหะ Ti ชนิดโคอินทิเกรต (Cointegrate vector) โดยตัดยีนส่วน T-DNA จากพลาสมิด Ti นำไปเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะ pBR322 โคลนยีนที่ต้องการถ่ายโอนลงไปในบริเวณ T-DNA ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนต์พลาสมิดเข้าสู่ *A. tumefaciens* ที่มีพลาสมิด Ti จะเกิดโฮโมโลกัสรีคอมบิเนชันของยีนส่วนที่เหมือนกันของT-DNA ทำให้ได้พลาสมิด Ti ใหม่ซึ่งมียีนที่ต้องการถ่ายโอนสอดแทรกอยู่
(Watson และคณะ 1975)



ภาพที่ 1.4 แสดงการสร้างพลาสมิดพาหะ Ti ชนิดไบนารี (Binary vector) โดยตัดยีนส่วน T-DNA จากพลาสมิด Ti มาไว้ในพลาสมิดขนาดเล็กซึ่งสามารถเพิ่มจำนวนได้ใน *A. tumefaciens* สร้างเป็นรีคอมบิแนนต์พลาสมิด โดยสอดแทรกยีนที่ต้องการถ่ายโอนเข้าไปในบริเวณ T-DNA ทรานสฟอร์มเข้าสู่ *A. tumefaciens* ซึ่งมีพลาสมิดดัดแปลง Ti ซึ่งมีกลุ่มยีน *vir* แต่ไม่มียีนส่วน T-DNA พลาสมิดทั้งสองชนิดสามารถอยู่ร่วมกันได้ (Raven และคณะ 1992)

Hood และคณะ (1986) ได้สร้างพลาสมิดพาหะ Ti ชนิดไบนารี พลาสมิดชนิดที่ 1 สำหรับสร้างเป็นรีคอมบิแนนต์พลาสมิด มียีนส่วน T-DNA ในบริเวณ T-DNA มียีนต้านต่อสารปฏิชีวนะ พลาสมิดชนิดที่ 2 เป็นพลาสมิดดัดแปลง Ti ซึ่งมีกลุ่มยีน *vir* ให้ชื่อว่าพลาสมิด pEHA101 เรียก *A. tumefaciens* ที่มีพลาสมิด pEHA101 นี้ว่า *A. tumefaciens* EHA101 ต่อมา Kimura และคณะ (1993) ได้สร้างพลาสมิด pBIH1-IG ซึ่งเป็นพลาสมิดพาหะ Ti ชนิดไบนารี ซึ่งมียีนส่วน T-DNA และมียีนต้านต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินและกานามัยซินอยู่ในบริเวณ T-DNA พลาสมิด pBIH1-IG นี้เมื่อนำมาสร้างเป็นรีคอมบิแนนต์พลาสมิด และทรานสฟอร์มเข้าสู่ *A. tumefaciens* EHA101 พบว่าทรานสฟอร์แมนต์ *A. tumefaciens* EHA101 ที่ได้มีประสิทธิภาพสูงในการถ่ายโอนยีนสอดแทรกในรีคอมบิแนนต์พลาสมิดเข้าสู่โครโมโซมของ *A. thaliana* และข้าว (Hiei และคณะ,1994)

Hatzfeld และคณะ (1998) รายงานว่าการถ่ายโอนยีนประมวลรหัสเอทีพีซัลฟูรีเลสของ *A.thaliana* เข้าสู่ต้นยาสูบ ทำให้ต้นยาสูบที่ได้มีกิจกรรมของเอทีพีซัลฟูรีเลสสูงขึ้นกว่าสายพันธุ์เดิม (wild type) แต่ไม่ทำให้มีประสิทธิภาพการดูดซับกำมะถันซัลเฟตมาใช้ในกระบวนการสังเคราะห์กรดอะมิโนซิสเตอีนเพิ่มขึ้น Heiss และคณะ (1999) รายงานว่าการถ่ายโอนยีนประมวลรหัสซัลเฟตทรานสปอร์เตอร์ (sulfate transporter; *LAST*) เอทีพีซัลฟูรีเลส (*ATPS*) และเอพีเอสรีดักเตส (*APRS*) ของ *A. thaliana* เข้าสู่พืช *Brassica juncea* ทำให้รากของ *B. juncea* ที่ได้มีปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนสูงกว่ารากของสายพันธุ์เดิมถึง 81 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากกิจกรรมของซัลเฟตทรานสปอร์เตอร์ ถูกยับยั้งได้โดยปริมาณของกำมะถันซัลเฟตในไซโตพลาสซึม (Hatzfeld และคณะ 1998) ดังนั้นเอพีเอสรีดักเตสน่าจะเป็นเอนไซม์ในขั้นตอนสำคัญ (key step enzyme) ของกระบวนการนำกำมะถันซัลเฟตมาใช้ในกระบวนการสังเคราะห์กรดอะมิโนซิสเตอีนของพืช ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลซึ่งเป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปว่าพืชที่เจริญในภาวะขาดแคลนกำมะถัน (sulfur-stravation condition) นั้น กิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตส และซัลเฟตทรานสปอร์เตอร์จะเพิ่มสูงขึ้น (Saito, 2000)

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะแยกยีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตส ของ *A. thaliana* โดยสังเคราะห์ดีเอ็นเอไพร์เมอร์จากข้อมูลลำดับเบสของเอพีเอสรีดักเตสของ *A. thaliana* แล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยกระบวนการ Polymerase Chain Reaction ใช้คอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอของ *A. thaliana* เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ นำดีเอ็นเอที่ได้มาทดสอบว่าสามารถแสดงออก นำไปเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะ Ti แล้วทรานสฟอร์มเข้าสู่ *A. tumefaciens* เพื่อใช้ในการถ่ายโอนยีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตสของ *A. thaliana* เข้าสู่ผักบุ้งต่อไป