เอกสารนี้เป็นสิทธิ์ของ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 1

## บทนำ

### ความสำคัญของกรดอะมิโน

ทราบกันแล้วว่า บรรดาชีวโมเลกุลที่มีอยู่ในเซลแบคทีเรียและยีสต์ โปรตีนเป็นสารที่มีมากที่สุดทั้งชนิดและปริมาณ โดยทั่วไป โมเลกุลของโปรตีนจะมีกรดอะมิโน 20 ชนิดเป็นองค์ประกอบ ทุกชนิดเป็นแบบแอล-อัลฟา มีหมู่อะมิโนและหมู่ทำปฏิกริยาอยู่ที่อัลฟาคาร์บอน ($R-\overset{NH_2}{\overset{|}{C}}H-COOH$) ซึ่งเป็นคาร์บอนที่อยู่ถัดจากหมู่คาร์บอกซิล ชนิดของกรดอะมิโนที่พบในโปรตีนจะต่างกันเนื่องจากหมู่ปฏิกริยาซึ่งเป็นตัวกำหนดสมบัติต่าง ๆ ของโปรตีน โดยเฉพาะอย่างยิ่งโครงสร้างสามมิติของโมเลกุล

นอกจากกรดอะมิโนเป็นส่วนโครงสร้างของโมเลกุลโปรตีนแล้วกรดอะมิโนยังถูกสลายเพื่อใช้ในกระบวนสร้างพลังงานและสารอื่นอีกบางตัว

### การผลิตกรดอะมิโนในเชิงอุตสาหกรรม

ในเชิงอุตสาหกรรม กรดอะมิโนอาจถูกสังเคราะห์ขึ้นได้โดยวิธีเคมีและวิธีชีวภาพ ซึ่งวิธีหลังนิยมใช้กระบวนการหมักด้วยแบคทีเรียหรือเอ็นไซม์จากแบคทีเรีย

ในปัจจุบัน ในระดับอุตสาหกรรมนิยมใช้การสังเคราะห์กรดอะมิโนโดยการหมัก วิธีนี้สามารถแข่งขันกับวิธีทางเคมีได้ ทั้งนี้เพราะความได้เปรียบในเชิงเศรษฐศาสตร์ดังต่อไปนี้

ก. ใช้วัตถุดิบซึ่งเป็นอาหารเชื้อที่สามารถขับกรดอะมิโนออก หรือใช้ผลผลิตทางการเกษตรหรือของเหลือจากอุตสาหกรรมการเกษตร ซึ่งต่างจากการสังเคราะห์โดยวิธีทางเคมีที่ต้องอาศัยสารสังเคราะห์โดยตรง

ข. อาจใช้โรงงานอุตสาหกรรมเดียวกัน เพื่อผลิตกรดอะมิโนหรือผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ที่อยู่ในข่ายอุตสาหกรรมการเกษตรได้ ทั้งนี้เพราะกระบวนการผลิตกรดอะมิโนหรือสารเหล่านี้คล้ายกัน

ค. ใช้อุณหภูมิต่ำ จึงเป็นการประหยัดพลังงานไปในตัว ซึ่งผิดกับการสังเคราะห์ทางเคมี คือ การเกิดปฏิกริยาเคมีส่วนใหญ่ต้องใช้พลังงานสูงในการกระตุ้นปฏิกริยา

ง. ได้กรดอะมิโนแบบแอล (L-amino acid) อย่างเดียว ส่วนกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีได้กรดอะมิโนทั้งแบบดีและแบบแอลเท่า ๆ กัน เราทราบกันดีแล้วว่า กรดอะมิโนเฉพาะรูปที่เป็นแอลเท่านั้นที่สิ่งมีชีวิตต้องการ

<u>หลักการแยกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ผลิตกรดอะมิโนโดยการหมัก</u>

เอสเคอริเคีย โคไล เป็นแบคทีเรียตัวแทนที่นิยมใช้ศึกษาพันธุกรรมระดับโมเลกุล แบคทีเรียชนิดนี้สามารถสังเคราะห์กรดอะมิโนขึ้นใช้ได้เองทุกชนิด การควบคุมการสังเคราะห์กรดอะมิโนในเอสเคอริเคีย โคไล จะเป็นแบบป้อนกลับ (feedback regulation)คล้าย ๆ กับที่พบในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ กล่าวคือ ในสภาวะอันหนึ่งกรดอะมิโนซึ่งเป็นผลผลิตสุดท้ายของกระบวนการจะสามารถยับยั้งเอ็นไซม์ตัวต้น ๆ ของวิถี (pathway) ได้ ผลลัพธ์คือ กระบวนการสังเคราะห์กรดอะมิโนตัวนั้นจะถูกยับยั้ง กลไกการยับยั้งที่กล่าวมานี้ เรียกว่า การยับยั้งแบบป้อนกลับ (feedback inhibition) นอกจากนี้ การสังเคราะห์กรดอะมิโนยังถูกควบคุมในระดับยีน (gene) ได้อีกด้วย กล่าวคือ กรดอะมิโนที่เป็นผลปั้นปลาย (end product) อาจไปกดดันยีนควบคุมที่ทำหน้าที่ถอดยีนที่เป็นเอ็นไซม์ตัวต้น ๆ หรือตัวถัดมาก็ตาม ทำให้กระบวนการผลิตกรดอะมิโนนั้นลดลงด้วย กลไกยับยั้งแบบหลังนี้เรียกว่าการยับยั้งแบบกดดัน (repression inhibition) จะเห็นได้ว่าการควบคุมแบบแรกจะอยู่ที่ระดับหลังการแปลแบบ (posttranslation) และแบบหลังเป็นระดับถอดแบบ (transcription) ความแตกต่างของการผิดปกติที่กระบวนการควบคุมทั้งสองแบบนี้มีดังต่อไปนี้

ก. ด้านหลังการแปลแบบ(posttranslation) มิวแตนท์จะมีความผิดปกติที่ยีนโครงสร้าง(structural gene)ของเอ็นไซม์ซึ่งทำให้การทำงานของเอ็นไซม์สูญเสียไป ผลก็คือทำให้ตัวกลางของกระบวนการเกิดการสะสมตัวขึ้น ด้วยเหตุนี้จึงนับได้ว่ามิวแตนท์ชนิดนี้มีการเปลี่ยนแปลงเชิงคุณภาพ คุณสมบัติในข้อนี้มีประโยชน์ในการนำมาใช้สร้างสายพันธุ์ที่ขับกรดอะมิโนบางอย่างในอุตสาหกรรม เช่น ฮิสติดีนออกโซโทรพของบริวิแบคทีเรียม ฟลาวัม (Brevibacterium flavum) ที่มีความผิดปกติที่เอ็นไซม์ในการสังเคราะห์ฮิสติดีนจากฮีสติดินนอลจะสะสมฮีสติดีนอลและขับออกภายนอกเซล 6 กรัมต่อลิตรในสารอาหารที่มีน้ำตาล 10 เปอร์เซนต์ (Kubota, K., Shiro, T; and Okumura, S., 1971)

ข. ด้านการถอดแบบ (transcription) ตามทฤษฎี มิวแตนท์ที่ผิดปกติที่ยีนควบคุม (regulatory gene) จะเป็นมิวแตนท์ที่มีการเปลี่ยนแปลงการผลิตกรดอะมิโนตัวเดิม กล่าวคือ อาจยับยั้งกระบวนการผลิตทั้งกระบวนการหรืออาจเพิ่มการผลิตจนสูงขึ้น และถ้าหากสามารถแยกมิวแตนท์ที่มีความผิดปกติที่โปรตีนกดดัน (repressor protein) ทำให้ไม่สามารถจับกับกรดอะมิโนบั้นปลายซึ่งเป็นตัวร่วมกดดัน (co-represser) ได้ จะทำให้เกิดการถอดแบบของเอ็นไซม์ที่ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์กรดอะมิโนตัวนั้นสูงขึ้น

การแยกมิวแตนท์ของขบวนการสังเคราะห์กรดอะมิโน

มิวแตนท์อาจสร้างได้โดยการเหนี่ยวนำการกลายพันธุ์ ซึ่งตามทฤษฎีมีอยู่หลายวิธี แต่ในทางปฏิบัติวิธีที่นิยมใช้มากคือการใช้ N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) เหนี่ยวนำการกลายพันธุ์ เพราะ NTG สามารถเหนี่ยวนำทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในอัตราที่สูง การแยกมิวแตนท์ อาจทำโดยตรงหลังการกลายพันธุ์ หรือผ่านวิธีการเพิ่มโอกาสการพบมิวแตนท์ด้วยการฆ่าเซลที่ไม่ต้องการทิ้งด้วยเพนนิซิลินจี (penicillingG) หรือ ดี–ไซโคลเซอรีน (D-cycloserine) จากนั้นเลือกมิวแตนท์ที่ได้โดยเปรียบเทียบความแตกต่างของการเจริญเติบโต เมื่อมีและไม่มีสารอาหารหรือเมตาบอไลท์ที่ต้องการโดยการปั๊มแบบ (replica plating)

สำหรับการแยกสายพันธุ์ที่ขับกรดอะมิโนนั้น นิยมแยกโดยใช้แอนาล็อกของกรดอะมิโน เพราะเป็นดรรชนีบ่งชี้สายพันธุ์ที่สามารถขับกรดอะมิโนได้ ทั้งนี้เพราะว่าแอนาล็อกบางชนิดของกรด–

อะมิโนมีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ตัวต้นและกดดันการสังเคราะห์เอ็นไซม์เช่นเดียวกัน แอนาล็อกของกรดอะมิโนบางตัวอาจทำให้เซลของจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ตายเมื่อเจริญในอาหารที่เสริมด้วยตัวมันแทนกรดอะมิโนนั้น ๆ ส่วนสายพันธุ์ที่สามารถเจริญได้อาจเป็นผลเนื่องมาจากมีการเปลี่ยนแปลงที่ผนังเซล โดยที่แอนาล็อกของกรดอะมิโนไม่สามารถผ่านเข้าสู่เซลได้ หรืออาจเป็นสายพันธุ์ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ยีนควบคุม (regulatory gene) ซึ่งต้านต่อการยับยั้งแบบกดดันโดยแอนาล็อกของกรดอะมิโน หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงที่ยีนโครงสร้าง (structural gene) ของเอ็นไซม์ที่ต้านทานต่อการยับยั้งโดยแอนาล็อกของกรดอะมิโน มิวแตนท์ที่มีฟีโนไทพ์แบบสองชนิดหลังนี้สังเคราะห์กรดอะมิโนได้สูงขึ้น และเมื่อมันเจริญในแอนาล็อกของกรดอะมิโนจะให้กรดอะมิโนแก่สายพันธุ์ที่ถูกยับยั้งและกดดันโดยแอนาล็อกของกรดอะมิโน (amino acid analog sensitive strain)รอบ ๆ ตัวมัน และจะมีลักษณะเป็นโคโลนีเล็ก ๆ แบบดาวล้อมเดือน ซึ่งเรียกว่าโคโลนีดาวล้อมเดือน (satellite colonies) จะเห็นว่า**การแยกสายพันธุ์ที่ขับกรดอะมิโน**โดยแอนาล็อกของกรดอะมิโนจะแยกได้ง่าย โดยอาศัยโคโลนีดาวล้อมเดือนเป็นครรชนีบ่งชี้สายพันธุ์ที่แยกได้นำไปทดสอบให้แน่ใจ โดยอาศัย cross feeding กับออกโซโทรพของกรดอะมิโนที่ต้องการขับออกมานั่นเอง

<u>ความสำคัญของเมไธโอนีน</u>

เมไธโอนีน เป็นกรดอะมิโนที่จำเป็นที่สัตว์ชั้นสูงไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นมาใช้เองได้ ต้องอาศัยจากแหล่งอาหารภายนอก เช่น พืช ส่วนใหญ่แล้วโปรตีนพืช เช่น ข้าวโพด ถั่ว ถั่วเหลือง มักมีปริมาณเมไธโอนีนต่ำเมื่อเทียบกับโปรตีนสัตว์ (Mitchell, H.H., and Block, R.J., 1946) ในอุตสาหกรรมผลิตอาหารสัตว์ ซึ่งใช้พืชเป็นส่วนประกอบหลัก มักจะเติมเมไธโอนีนและไลซีนลงไปเป็นอาหารเสริม เพื่อขจัดปัญหาการขาดแคลนอาหารโปรตีนในสัตว์เลี้ยง (Brette A. et. al.,1963)

ปัจจุบันในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารสัตว์ทั่วโลกใช้เมไธโอนีนเป็นอาหารเสริม เพื่อเพิ่มผลผลิตของปศุสัตว์เป็นจำนวนมากปีละเป็นแสนตัน ซึ่งเมไธโอนีนจำนวนนี้ได้มาจากการสังเคราะห์ทางเคมี (Yamamoto, A., 1980)

การสังเคราะห์เมไธโอนีนในระดับอุตสาหกรรม

ปัจจุบันการสังเคราะห์เมไธโอนีนในทางอุตสาหกรรมได้จากปฏิกริยาการสังเคราะห์ทางเคมีโดยวิธีของเพรียสันและคณะ (Prierson, et al ,1948) หลักการคือใช้ acrolein (I) ทำปฏิกริยากับ methylmercaptan (II) จะเกิด β-methylemecaptopropionaldehyde (III) เมื่อทำปฏิกริยากับไซยาไนด์ในสารละลายเกลือคาร์บอนเนตจะเกิด hydantoin derivative (IV) เมื่อไฮโดรไลซ์ด้วยด่างจะได้ดีแอล-เมไธโอนีนดังแผนภาพต่อไปนี้

$CH_2 = CH - CHO$ + $CH_3SH$

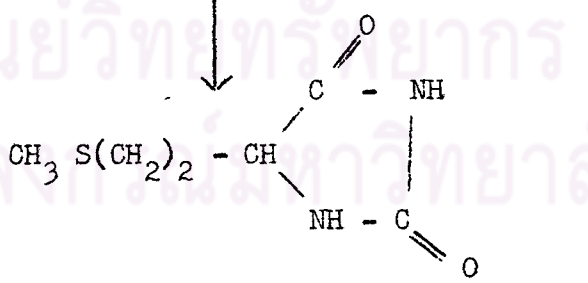
acrolein (I) methylmercaptan (II)

↓

$CH_3S(CH_2)_2 - CHO$

β - methylmercaptopropionaldehyde (III)

↓ $HCN, (NH_4)_2 CO_3$



hydantoin derivative (IV)

↓ $O\bar{H}$

$CH_3S\ (CH_2)_2\ CH(NH_2)\ CO_2H$

DL - methionine

เมตาบอลิสมของเมไธโอนีน

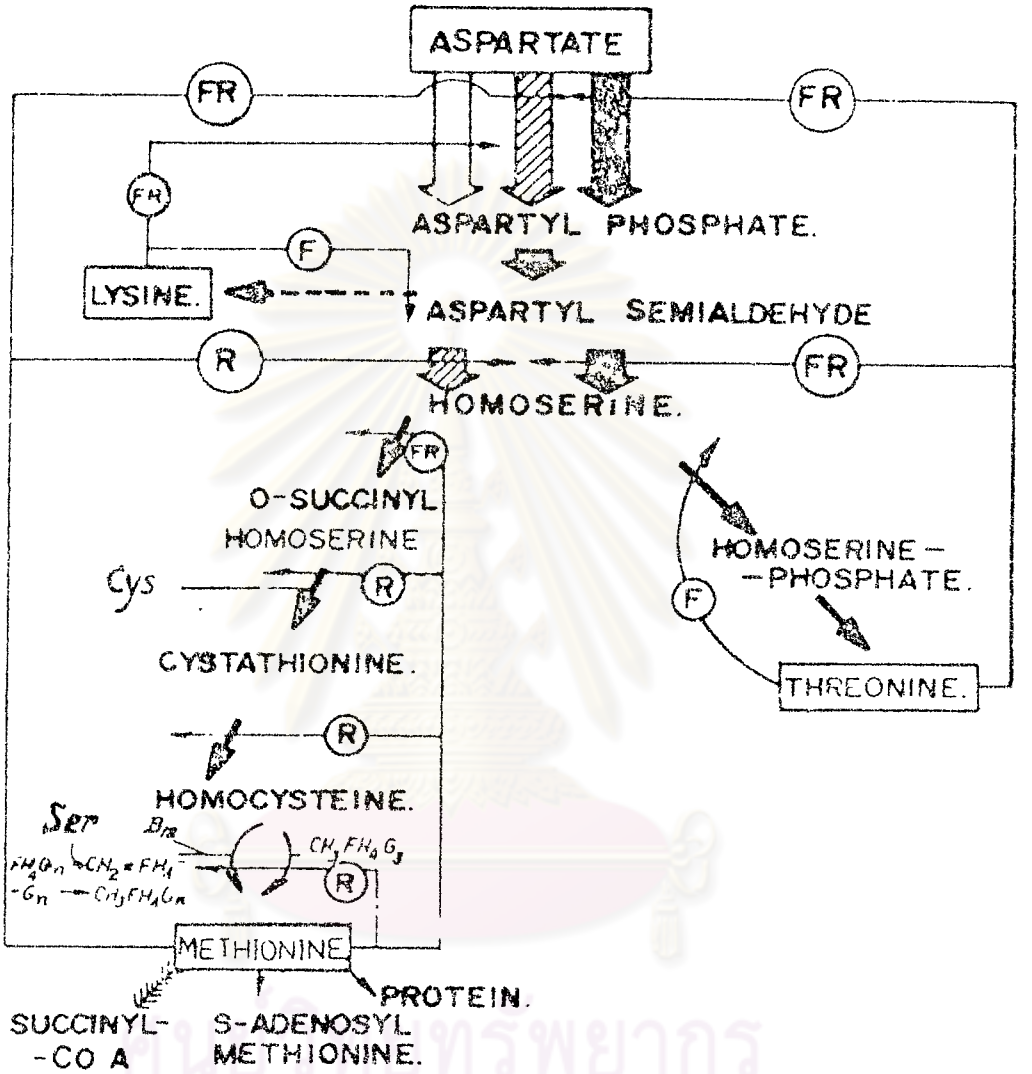
แอสปาร์เตท และซีรีนจะเป็นสารเริ่มต้นในการสังเคราะห์ของเมไธโอนีนในเอสเคอริเคีย โคไล เมไธโอนีนที่ถูกสร้างขึ้นจะถูกนำไปใช้ในการสังเคราะห์โปรตีนและเอส-อะดีโนซิลเมไธโอนีน (S-adenosyl methionine) การสลายเมไธโอนีนในเอสเคอริเคีย โคไล จะให้สารพลังงานสูงคือ ซัคซินิลโคเอ (Succinyl Co A) แผนภาพแสดงเมตาบอลิสมของเมไธโอนีนแสดงในรูปที่ 1 ที่น่าสังเกตจากรูปคือ การควบคุมการสังเคราะห์เมไธโอนีน ธรีโอนีน และไลซีน จะเกี่ยวพันกันโดยการควบคุมการสังเคราะห์แบบป้อนกลับ (feedback regulation)ดังได้กล่าวในหลักการแยกสายพันธุ์ที่ผลิตกรดอะมิโนโดยการหมัก และการสังเคราะห์เมไธโอนีนยังเกี่ยวพันกับการสังเคราะห์เมธิลเตตราไฮโดรโฟเลทโมโนกลูตาเมท และไตรกลูตาเมท (methyltetrahydrofolate monoglutamate and triglutamate) จากซีรีนอีกด้วย กล่าวคือ หมู่เมธิล (methyl group) ที่ใช้ในการสังเคราะห์เมไธโอนีนจากโฮโมซีสเตอีน(homocysteine)ทั้งหมดได้จากการสลายตัวของซีรีน

การตรวจสอบปริมาณเมไธโอนีน

การตรวจสอบปริมาณเมไธโอนีนอาจทำได้หลายวิธี

ก. วิธีการไตเตรท (titration method)

โดยอาศัยปฏิกริยารีดักทีพดีเมธิลเลชั่น (reductive demethylation) เมไธโอนีนด้วยกรดไฮดริโอดิค (hydriodic acid) ภายใต้การต้มกลั่น (reflux) แล้ววัดปริมาณเมธิลไอโอไดด์ที่เกิดขึ้น โดยให้ทำปฏิกริยากับสารละลายซิลเวอร์ไนเตรทมาตรฐานที่มากเกินพอ จะเกิดตะกอนซิลเวอร์ไอโอไดด์ขึ้น หาปริมาณซิลเวอร์ไนเตรทที่ทำปฏิกริยาสมบูรณ์พอดีกับเมธิลไอโอไดด์ โดยไตเตรทหาซิลเวอร์ไนเตรทที่เหลือด้วยสารละลายไธโอไซยาเนทมาตรฐาน (Baerstein, H.O., 1932)




รูปที่ 1 เมตาบอลิสมและการควบคุมการสังเคราะห์เมไธโอนีนของเอสเคอริเคีย โคไล เค12 โดยขบวนการควบคุมแบบป้อนกลับ

F คือ การยับยั้งแบบป้อนกลับ

R คือ การกดดันแบบป้อนกลับ

$B_{12}$ คือ วิตามินบี 12

Cys คือ ซีสเตอีน

$CH_3FH_4G_n$ คือ เมธิลเตตราไฮโดรโฟเลทโมโนกลูตาเมทและไดกลูตาเมท

Ser คือ ซีรีน

โดยอาศัยปฏิกริยาระหว่างเมไธโอนีนกับไอโอดีนที่มากเกินพอที่พีเอช 7.0 แล้วหาปริมาณไอโอดีนที่ทำปฏิกริยาสมมูลย์พอดีกับเมไธโอนีน โดยไตเตรทหาไอโอดีนที่เหลือด้วยสารละลายไธโอซัลเฟต

ข. <u>การตรวจสอบโดยวิธีโครมาโตกราฟฟี</u> (chromatographic method)

โดยอาศัยปฏิกริยาระหว่างนินไฮดรินกับกรดอะมิโนที่อุณหภูมิสูงเกิดสารระเหยแอลดีไฮด์ (volatile aldehyde) ทำปฏิกริยากับสารละลายกรด 2, 4-ไดโนโตรเฟนิลไฮตราซีน (2, 4-dinitrophenylhydrazine) เกิดเฟนิลไฮดราโซน (phenylhydrazone) แยกเมไธโอนีนเฟนิลไฮดราโซน (methionine phenylhydrazone) โดยผ่านคอลัมน์แมกเนเซียมซัลเฟต แล้วนำไปวัดความเข้มของสี

โดยอาศัยการแยกกรดอะมิโนออกจากกันโดยวิธีโครมาโตกราฟฟี พร้อมกับหาปริมาณด้วยปฏิกริยาการเกิดสีกับนินไฮดรีน โดยใช้เครื่องมือวิเคราะห์กรดอะมิโนแบบอัตโนมัติ (Spackmann, D.H. ; Stein, W.H., Moore, S., 1958)

โดยอาศัยการเปลี่ยนกรดอะมิโนให้อยู่ในรูปสารระเหยเอสเตอร์ แล้วหาปริมาณโดยใช้เครื่องมือก๊าซลิควิดโครมาโตกราฟฟี (Gehrke, C.W., and Stalling, D.L., 1967)

ค. <u>การตรวจสอบเชิงชีวภาพ</u> (bioassay)

อาศัยจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ต้องการเมไธโอนีนเป็นอาหารเสริมเพื่อการเจริญ เช่น ลูโคนอสตอก มีเซนเทอรอยด์ พี 60 (<u>Leuconostoc mesenteriod</u> $P_{60}$)

อาศัยเมไธโอนีนออกโซโทรพสายพันธุ์ที่บกพร่องที่เอ็นไซม์ เอ็น 5 เอ็น 10-เมธิลีนเตตราไฮโดรโฟเลท รีดัคเตส ($N^5N^{10}$-methylenetetrahydrofolate reductase) ของเอสเคอริเคีย โคไล (Dawes, J., and Foster, M.A., 1971)

ศักยภาพในการเป็นอาหารของแบคทีเรียของกากน้ำตาล

กากน้ำตาล (molasses) เป็นของเหลือจากอุตสาหกรรมผลิตน้ำตาลทรายที่อุดมไปด้วยสารที่ทรงคุณค่าทางอาหาร มีองค์ประกอบหลักคือ น้ำตาลทราย หรือซูโครส สารอื่น ๆ ที่มีปนอยู่เป็นส่วนน้อย ได้แก่ น้ำตาลรีดิวซ์ โปรตีน วิตามิน และอินทรีย์สารอื่น ๆ อีกหลายชนิด ปริมาณขององค์ประกอบเหล่านี้จะมีจำนวนต่าง ๆ กัน ขึ้นกับชนิดของพืชที่นำมาสะกัด รวมทั้งแหล่งที่ปลูก และสิ่งแวดล้อมอื่น ๆ อีก

โดยทั่วไป กากน้ำตาลถูกนำไปใช้ประโยชน์หลายอย่าง เช่น ใช้ประโยชน์ทางตรงในทางเกษตรกรรม และใช้ประโยชน์ทางอ้อมในการสังเคราะห์สารเคมี และอุตสาหกรรมการหมัก แต่การใช้กากน้ำตาลภายในประเทศมีน้อยคือราวร้อยละ 30–35 เปอร์เซนต์ ส่วนใหญ่ใช้ในอุตสาหกรรมหมัก (ภัทรา มณีธวัช 2520)

โดยธรรมชาติแบคทีเรีย ต่างชนิดกันใช้สูตรอาหารต่างกันด้วย ตามทฤษฎีแบคทีเรียทุกชนิดต้องการธาตุคาร์บอน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ออกซิเจน และไฮโดรเจนและธาตุอื่นแต่ปริมาณความต้องการธาตุที่กล่าวมานั้นจะสูงกว่าชนิดอื่น ๆ ธาตุสามชนิดแรกได้จากอนุพันธ์ของอินทรีย์สาร และอนินทรีย์สารต่าง ๆ ธาตุสองชนิดหลังอาจได้จากน้ำ การวิเคราะห์ต้นตอสามธาตุแรก และศักยภาพในการเป็นอาหารของแบคทีเรียของกากน้ำตาล มีความจำเป็นอย่างยิ่งในการนำกากน้ำตาลไปเป็นอาหารแบคทีเรีย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อแยกสายพันธุ์ของเอสเคอริเคีย โคไล ที่ขับแอล–เมไธโอนีนโดยวิธีการกลายพันธุ์และต้านแอนาล็อกของเมไธโอนีนและศึกษาสรีรสมบัติบางประการของสายพันธุ์ที่แยกได้ รวมทั้งศึกษาศักยภาพในการเป็นอาหารของแบคทีเรียของกากน้ำตาล