บทที่ 4

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

1. <u>การแยกมิวแตนท์ที่มีความผิดปกติที่รีดอกซ์เอนไซม์</u>

โดยหลักการ NTG จะเป็น alkylating agent ที่อาจก่อให้เกิดปฏิกิริยาการตัดหมู่เพียวรีน (purine) ออกจากสายโพลีนิวคลีโอไทด์ได้ ดังนั้นเมื่อแบคทีเรียที่ถูกดีเพียวรีเนตมีโอกาสแบ่งตัว โครโมโซมของมันจึงมีโอกาสเกิดความผิดปกติที่เป็นผลจากทั้ง transition (GC——→AT) และ transversion (AG—→CT) ได้ เนื่องด้วยเหตุนี้ NTG จึงเป็นมิวตาเจนที่มีอานุภาพสูง สามารถจะสร้างโอกาสการเกิดมิวแตนท์ทุก ๆ ฟีโนไทพ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อประยุกต์ใช้กับแบคทีเรีย เนื่องด้วยเหตุนี้ การแยกมิวแตนท์ที่มีความผิดปกติที่รีดอกซ์เอนไซม์จึงไม่น่ามีปัญหาที่การกลายพันธุ์ ปัญหาหลักจะตกอยู่ที่สภาวะที่เหมาะสม เพื่อแยกมิวแตนท์ที่ต้องการออกมาเท่านั้น

เนื่องจากเอนไซม์ที่อยู่ในข่ายความสนใจได้แก่ เอนไซม์ไพรูเวตฟอร์เมต-ไลเยส และเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนส การทดลองนี้จึงได้เลือกใช้เบนซิลไวโอโลเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน ทั้งนี้เพราะค่ารีดักชันโพเทนเชียล มีค่าเท่ากับ −359 มิลลิโวลต์ จึงน่าจะเป็นดัชนีที่ดีที่บ่งชี้ถึงความผิดปกติที่เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้ได้

หลังจากตัดสินใจแยกมิวแตนท์โดยใช้การสังเกตสีของโคโลนีในอาหารสังเคราะห์ที่เสริมด้วยเคสอะมิโนแอซิด 1 เปอร์เซนต์ รวมกับเบนซิลไวโอโลเจน 12.5 มิลลิกรัมเปอร์เซนต์ พบว่า การกลายพันธุ์ <u>Klebsiella pneumoniae</u> ด้วย NTG โดยได้ killing curve 90 เปอร์เซนต์นั้น สามารถที่จะให้มิวแตนท์เป็นจำนวนมาก ในการสังเกตขั้นต้นสุดนั้น พบว่ามีโคโลนีสีขาวกระจายอยู่ค่อนข้างมาก (ร้อยละ 1) แต่ครั้นเมื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์แล้ว กลับเหลือมิวแตนท์ที่มีการเปลี่ยนแปลงสีของเบนซิลไวโอโลเจนอย่างชัดเจนเพียง 27 ตัว ปรากฏการณ์ที่มีมิวแตนท์หายไปจากการแยกขั้นต้น (first screen) อาจสันนิษฐานได้ว่า สภาวะที่

กำหนดนั้นคง เอื้ออำนวยให้รีดอกซ์เอนไซม์หลาย ๆ ตัว อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมที่จะ ป้อนอิเล็กตรอนแก่เบนซิลไวโอโลเจนได้ แต่ครั้นเมื่อนำมิวแตนท์มาทำให้บริสุทธิ์ ความสามารถในการ เปลี่ยนแปลงสี เปลี่ยนแปลงไป แต่ ณ ที่นี้ ได้ตั้งสมมุติฐานว่า มิวแตนท์ที่ให้สีของ เบนซิลไวโอโลเจนในอาหารที่เสริมและไม่เสริมด้วยฟอร์เมต น่า จะมีโอกาสผิดปกติที่เอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนส หรือไพรูเวตฟอร์เมตไลเยสมากที่สุด

2. <u>การจำแนกกลุ่มของมิวแตนท์</u>

หลังจากที่ได้ตัดสินใจ เลือกมิวแตนท์กลุ่มที่มีการ เปลี่ยนสีของ เบนซิลไวโอ-โลเจนในอาหารที่เสริมและไม่เสริมด้วยโซเดียมฟอร์เมตอย่างถาวรแล้ว จึงได้นำ มิวแตนท์จำนวน 27 ตัวมาจำแนก เป็นกลุ่ม

ในการจำแนกกลุ่มนี้ ได้ตัดสินใจ เลือกตัวแปรดังต่อไปนี้

ก. การ เปลี่ยนแปลงสีของ เบนซิลไวโอโลเจนในอาหารที่มีและไม่มีฟอร์เมต

ข. การสัง เกตฟองก๊าซ

ค. ความสามารถในการตรึงไนโตรเจน

เหตุผลที่เลือกตัวแปร เหล่านี้ คือ

ฟอร์เมตควรจะ เป็นตัวแปรที่ดีที่แสดงถึงความผิดปกติที่เอนไซม์ฟอร์มิคดี-ไฮโดรจีเนส หรือไพรูเวตฟอร์เมตไลเยส เพราะฟอร์เมต เป็นผลผลิตจากปฏิกิริยา ของไพรูเวตฟอร์เมตไลเยส และ เป็นสับสเตรตของ เอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนส

และเพราะว่าฟอร์เมต เป็นตัวชักนำการถอดรหัสของ เอนไซม์ฟอร์มิคดี-ไฮโดรจีเนส การ เสริมฟอร์เมตลงไปจะทำให้ เกิดการถอดรหัสของ เอนไซม์ดังกล่าว ข้างต้น ดังนั้นถ้า เกิดความผิดปกติที่เอนไซม์ไพรูเวตฟอร์เมตไลเยส จะสัง เกตก๊าซ ได้ แต่ถ้าผิดปกติที่เอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนส ก็ไม่น่าจะ เกิดก๊าซ (ดูรูปที่ 1 ประกอบ)

ส่วนการตรึงไนโตรเจนนั้น คือตัวแปรซึ่ง เป็นจุดประสงค์หลักของการวิจัย นี้ กล่าวคือ ต้องการ เตรียมมิวแตนท์ที่ผิดปกติที่รีดอกซ์เอนไซม์ เพื่อนำมาศึกษากลไก การตรึงไนโตรเจน

ผลจากการสังเกตสีของโคโลนีในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมและไม่เสริมด้วยฟอร์เมต รวมกับการตรึงไนโตรเจน ทำให้แยกมิวแตนท์ออกได้เป็น 4 กลุ่ม (รายงานไว้ในบทที่ 3 ข้อ 2.1)

นำมิวแตนท์มาสังเกตฟองก๊าซที่เกิดขึ้น ในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมและไม่ได้เสริมด้วยฟอร์เมตโดยปรับให้มี pH เท่ากับ 7.6, 7.0 และ 6.6 ตามลำดับ การทดลองนี้หวังจะให้มีการเกิดก๊าซอย่างชัดเจนในการจำแนกเบื้องต้น เพื่อเป็นแนวทางว่า แต่ละกลุ่มที่จำแนกมานั้น จะเป็นกลุ่มที่มีโอกาสผิดปกติที่เอนไซม์โพรูเวตฟอร์-เมตไลเยสหรือเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนส

เมื่อมีฟอร์เมตในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะสังเกตก๊าซได้ เพราะไวลโทพ์จะกำจัดฟอร์เมตโดยกระบวนการฟอร์เมตไฮโดรเจนไลเยส เกิดคาร์บอนไดออกไซด์และไฮโดรเจนสูงกว่าเมื่อไม่มีฟอร์เมต ยิ่งเมื่อลด pH ลง จะเห็นก๊าซได้เร็วขึ้นและนานขึ้นทั้งนี้เพราะเมื่อลด pH ลง การละลายของก๊าซจะลดลงด้วย

มิวแตนท์ที่นำมาทดสอบ ส่วนมากจะเป็นมิวแตนท์ที่ไม่มีก๊าซเกิดขึ้น ไม่ว่าจะมีฟอร์เมตในอาหารหรือไม่ และลด pH ลงจาก 7.6 เป็น 7.0 และ 6.6 ก็ตาม ยกเว้น 27A 18E และ 35A ซึ่งจะให้ก๊าซเกิดขึ้นถ้าปล่อยให้เจริญไปนาน ๆ

เป็นที่น่าสังเกตว่า มิวแตนท์สายพันธุ์อื่น ๆ ที่ให้โคโลนีเป็นสีม่วง เมื่อมีฟอร์เมตในอาหารเลี้ยงเชื้อ ควรจะสังเกตก๊าซได้ด้วย แต่ก็พบว่าไม่สามารถสังเกตก๊าซจากสายพันธุ์เหล่านี้ได้เลย แม้ว่าจะเติบโตในอาหารที่มี pH ลดลงจาก 7.6 เป็น 7.0 และ 6.6 ก็ตาม

จะเห็นได้ว่ามีมิวแตนท์เพียง 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ 27A 18E และ 35A ซึ่งจะสังเกตก๊าซได้ในสภาวะเดียวกับที่มีสีของโคโลนีเป็นสีม่วง จะสันนิษฐานในขั้นนี้ว่าน่าจะเป็นมิวแตนท์ที่มีความผิดปกติที่เอนไซม์โพรูเวตฟอร์เมตไลเยส

3. สรีรสมบัติของมิวแตนท์กลุ่มที่ 1

เมื่อตัดสินใจเลือกมิวแตนท์กลุ่มที่ 1 มาศึกษาต่อ ขั้นแรกสุดคือการศึกษาสรีรสมบัติทั่ว ๆ ไป

3.1 การเจริญเติบโตในสภาวะที่มีออกซิเจน

การที่พบว่ามิวแตนท์ทั้ง 3 สามารถเจริญได้ในอาหารสูตรปรับต่ำในสภาวะที่มีออกซิเจนได้ดีเท่า ๆ กับไวล์ไทพ์ แสดงว่า มิวแตนท์เหล่านี้มิใช่ออกโซโทรพ (auxotroph) รวมทั้งมิได้มีความผิดปกติในกระบวนการต่าง ๆ เมื่อมีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนด้วย

3.2 การเจริญและ growth yield ในอาหารสูตรปรับต่ำในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจน

มิวแตนท์ทั้ง 3 สามารถเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำในสภาวะแอนแอโรบิคได้ดีเท่า ๆ กับไวล์ไทพ์ กล่าวคือมีระยะแบ่งตัว 2 เท่า และ growth yield ไม่แตกต่างจากไวล์ไทพ์ทุกความเข้มข้นของกลูโคสที่ใช้ทดสอบ แสดงว่ามิวแตนท์ทั้ง 3 มิได้มีความผิดปกติในกระบวนการไกลโคโลซิส เนื่องจากเมื่อแบคทีเรียเติบโตในสภาพแอนแอโรบิค จะได้พลังงานและอำนาจรีดิวส์จากกระบวนการนี้ หากมีความผิดปกติที่เอนไซม์ตัวใดตัวหนึ่งในกระบวนการดังกล่าว จะทำให้การเจริญแตกต่างไปจากไวล์ไทพ์ได้

นอกจากนี้ การที่มิวแตนท์ทั้ง 3 สามารถเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำได้ดีเท่ากับไวล์ไทพ์ ยังแสดงว่ามิวแตนท์ทั้ง 3 มิได้มีความผิดปกติที่เอนไซม์ไพรูเวทฟอร์เมทไลเยส เนื่องจากปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์นี้ เป็นปฏิกิริยาหลักที่สร้างอาเซตทิลโคเอ (acetyl CoA) เมื่อแบคทีเรียกลุ่ม Enterobactericiae เติบโตในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจน (Thauer และคณะ, 1977) หากมีความผิดปกติที่เอนไซม์นี้ จะทำให้มิวแตนท์ไม่สามารถเติบโตในอาหารสูตรปรับต่ำได้ เพราะขาดอาเซตทิลโคเอ ซึ่งเป็นสารสำคัญในการสังเคราะห์ชีวโมเลกุลต่าง ๆ การเจริญเติบโตจะเกิดขึ้นได้ เมื่อเติมอาซีเตตซึ่งจะเปลี่ยนเป็นอาเซตทิลโคเอได้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่านั้น (Pascal และคณะ, 1981)

3.3 การเจริญและ growth yield ในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยอาซีเตต ในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจน

แม้ว่าการทดสอบการเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำ ได้ชี้ว่ามิวแตนท์ทั้ง 3 มิได้มีความผิดปกติที่เอนไซม์ไพรูเวตฟอร์เมตไลเยสก็ตาม เพื่อให้แน่ใจได้ทดสอบการเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยโซเดียมอาซีเตต พบว่า อาซีเตตมิได้มีผลต่อการเจริญของมิวแตนท์ทั้ง 3 กล่าวคือ มีระยะแบ่งตัว 2 เท่าและ growth yield ไม่แตกต่างจากไวลไทพ์ ทุกความเข้มข้นของกลูโคสที่ทดสอบ แสดงว่ามิวแตนท์ทั้ง 3 มิได้มีความผิดปกติที่เอนไซม์ไพรูเวตฟอร์เมตไลเยส

3.4 การเจริญและ growth yeild ในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยไนเตรตในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจน

การทดสอบการเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยไนเตรตพบว่าไวลไทพ์เจริญได้ดีกว่าเมื่อเติบโตในอาหารสูตรปรับต่ำ และอาหารที่เสริมด้วยอาซีเตต กล่าวคือ มีระยะแบ่งตัว 2 เท่าลดลงเป็น 45 นาที และมี growth yield สูงขึ้นกว่าเมื่อเติบโตในอาหาร 2 ชนิดแรก ทุกความเข้มข้นของกลูโคสที่ทดสอบ เนื่องจากเมื่อมีไนเตรตในอาหาร กระบวนการหายใจโดยใช้ไนเตรต (nitrate respiration) จะถูกชักนำขึ้น กระบวนการนี้ประกอบด้วย เอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนส กระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนซึ่งมีไซโตโครมบี และยูนิควิโนน (ubiquinone) เป็นองค์ประกอบ และเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส (Enoch และ Lester,, 1974) อิเล็กตรอนจากปฏิกิริยาดีไฮโดรจิเนชันของฟอร์เมต จะถูกส่งผ่านกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนมารีดิวส์ไนเตรตโดยเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส เซลล์จะได้รับพลังงานเพิ่มขึ้นอีก 2 – 3 โมลต่อ 1 โมลของไนเตรตที่ถูกรีดิวส์ ดังนั้น ไวลไทพ์จึงเจริญได้ดีกว่าในอาหารที่ไม่ได้เสริมด้วยไนเตรต

ส่วนมิวแตนท์ทั้ง 3 เมื่อเติบโตในอาหารที่เสริมด้วยไนเตรตพบว่า ยังคงมีระยะแบ่งตัว 2 เท่า และ growth yield ไม่แตกต่างจากเมื่อเติบโตในอาหาร 2 ชนิดแรก แสดงว่า แม้ว่ามิวแตนท์จะเจริญในสภาวะที่กระบวนการหายใจโดยใช้ไนเตรตถูกชักนำขึ้น เซลล์ไม่ได้พลังงานเพิ่มขึ้นจากขบวนการนี้ ซึ่งอาจเกิดจากสาเหตุ 4 ประการ คือ

ก. มีความผิดปกติที่เอนไซม์ไพรูเวทฟอร์เมตไลเยส มีผลทำให้ไม่มีฟอร์เมตซึ่งเป็นสับสเตรตของเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนส จึงไม่มีอิเล็กตรอนที่จะรีดิวส์ในเตรต

ข. มีความผิดปกติที่เอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนส มีผลทำให้ไม่มีอิเล็กตรอนที่จะรีดิวส์ในเตรต

ค. มีความผิดปกติที่เอนไซม์ในเตรตรีดักเทส ทำให้ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาการรีดิวส์ในเตรตได้ แม้จะมีอิเล็กตรอนก็ตาม

ง. มีความผิดปกติที่กระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนมายัง เอนไซม์ในเตรต-รีดักเทส

จากการทดสอบการเจริญเติบโตในอาหารสูตรปรับต่ำและอาหารชนิดเดียวกัน แต่เสริมด้วยโซเดียมอาซีเตต ได้แสดงว่ามิวแตนท์ทั้ง 3 มิได้มีความผิดปกติที่เอนไซม์ไพรูเวทฟอร์เมตไลเยส ดังนั้น มิวแตนท์ที่แยกได้จึงอาจมีความผิดปกติที่เอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนส หรือเอนไซม์ในเตรตรีดักเทส หรือตัวรับอิเล็กตรอนต่าง ๆ ในกระบวนการหายใจโดยใช้ในเตรต

3.5 การต้านคลอเรต

เมื่อเติมโปตัสเซียมคลอเรตลงในอินนอคคิวลัมของไวล์ไทพ์ขณะเติบโตในอาหารที่เสริมด้วยโปตัสเซียมไนเตรต จนถึงระยะ mid log พบว่าการเจริญของไวล์ไทพ์ถูกยับยั้ง แสดงว่าไวล์ไทพ์สามารถรีดิวส์คลอเรตให้เป็นคลอไรต์ได้

จากการทดลองผลของคลอเรต โดยมิได้ให้กระบวนการหายใจโดยใช้ในเตรตถูกชักนำ ได้ผลเช่นเดียวกับการทดลองข้างต้น กล่าวคือ เมื่อเติมคลอเรตลงในอินนอคคิวลัมของไวล์ไทพ์ที่เติบโตในอาหารสูตรปรับต่ำจนถึงระยะ mid log และการเติมคลอเรตลงในอาหารสูตรปรับต่ำและอาหารที่เสริมด้วยโปตัสเซียมไนเตรตตั้งแต่เริ่มต้นทำการทดลอง พบว่าให้ผลการทดลองเช่นเดียวกัน กล่าวคือ คลอเรตสามารถยับยั้งการเจริญของไวล์ไทพ์ได้ แสดงว่า แม้กระบวนการหายใจโดยใช้ในเตรตจะมิได้ถูกชักนำเซลล์ยังคงสามารถรีดิวส์คลอเรตให้เป็นคลอไรต์ได้ นั่นคือ แม้ไม่มีในเตรตในอาหารเลี้ยงเชื้อ ไวล์ไทพ์มีเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนส

และเอนไซม์ในเตรตรีดักเทสอยู่แล้ว ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับที่เคยมีรายงานมาแล้ว กล่าวคือ

Ruiz-Herrera และคณะ, 1972 ; Ruiz - Herrera และ Alvarez, 1972 รายงานว่า แม้ไม่มีไนเตรตในอาหารเลี้ยงเชื้อ สามารถวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสฟอร์ม N ของ Escherichia Coli ได้ แต่ถ้ามีไนเตรตในอาหารจะสามารถวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ตัวนี้ได้เพิ่มขึ้น 6 เท่า และ 10 เท่าตามลำดับ

Cole และ Wimpenny, 1968;Showe และ De Moss 1968, รายงานว่า แม้ไม่มีไนเตรตในอาหาร ยังคงสามารถวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสได้ แต่ถ้ามีไนเตรตในอาหารจะสามารถวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสได้สูงขึ้น 28 เท่า และ 23 เท่าตามลำดับ

ผลการทดลอง ผลของคลอเรตต่อการเจริญของมิวแตนท์ทั้ง 3 โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับไวล์ไทพ์ พบว่าคลอเรตไม่สามารถยับยั้งการเจริญของมิวแตนท์ทั้ง 3 ได้ แสดงว่ามิวแตนท์ทั้ง 3 ไม่สามารถรีดิวส์คลอเรตให้เป็นคลอไรด์ได้ กล่าวคือมีความผิดปกติที่กระบวนการหายใจโดยใช้ไนเตรตนั่นเอง

3.6 ปริมาณอนุมูลไนเตรต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากการตรวจสอบปริมาณไนไตรต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อของไวล์ไทพ์ที่เติบโตในสภาวะแอนแนโรบิคในอาหารที่เสริมด้วยโปตัสเซียมไนเตรต 10 มิลลิโมลาร์ พบว่าสามารถวัดไนไตรต์ได้ในอาหารขณะที่ไวล์ไทพ์เจริญเติบโต และวัดไนไตรต์ได้สูงสุดเท่ากับ 3.8 มิลลิโมลาร์ เมื่อไวล์ไทพ์เจริญถึงระยะ late log แสดงว่า Klebsiella pneumoniae M5al สามารถใช้ไนเตรตเป็นตัวรับอิเล็กตรอนในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนได้ หลังจากเมื่อไวล์ไทพ์เจริญเข้าสู่ stationary phase แล้ว พบว่าปริมาณไนไตรต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลง แสดงว่า Klebsiella pneumoniae สามารถรีดิวส์ไนไตรต์ได้ Sherman และคณะ, 1980 รายงานว่า Klebsiella pneumoniae M5al สามารถใช้ไนเตรตและไนไตรต์เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายได้เช่นเดียวกับ Escherichia coli กล่าวอีกนัยหนึ่งคือ Klebsiella pneumoniae

M5a1 มีเอนไซม์ ไนเตรตรีดักเทส และไนไตร์ต รีดักเทส เช่นเดียวกับ Escherichia coli นั่นเอง

อนึ่ง จากการศึกษาเอนไซม์ไนไตร์ตรีดักเทสของ Escherichia coli พบว่า นอกจากจะสามารถรับอิเล็กตรอนจากฟอร์เมตแล้ว เอนไซม์นี้ยังสามารถรับอิเล็กตรอนจาก NADH ได้อีกด้วย (Kemp และ Atkinson,1966) ดังนั้น ปริมาณไนไตร์ตที่ลดลงเมื่อไวล์ไทพ์เจริญอยู่ในระยะ stationary phase คาดว่าเนื่องจากไนไตร์ตถูกรีดิวส์ด้วย NADH

เมื่อมิวแตนท์ทั้ง 3 เจริญในสภาวะเดียวกับไวล์ไทพ์ จะไม่มีไนไตร์ตสะสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ แสดงว่ามิวแตนท์ทั้ง 3 มีความผิดปกติของกระบวนการหายใจโดยใช้ไนเตรต จึงไม่สามารถรีดิวส์ไนเตรตเป็นไนไตร์ตได้

เมื่อมิวแตนท์ทั้ง 3 แบ่งตัวเข้าสู่ stationary phase แล้วประมาณ 2 ชั่วโมง จะสามารถตรวจสอบไนไตร์ตในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ คาดว่าไนไตร์ตนี้เกิดจากรีดักชันของไนเตรตด้วย NADH เพราะเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสนอกจากจะรับอิเล็กตรอนจากฟอร์เมตได้แล้ว ยังสามารถรับอิเล็กตรอนจาก NADH ได้ (Cole และ Wimpenny, 1968 ; Abou-Jaoude' และคณะ 1977)

Ruiz-Herrera และ De Moss, 1969 รายงานว่า มิวแตนท์ที่ไม่สามารถรีดิวส์ไนเตรตได้ เนื่องจากมีความผิดปกติที่เอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนส แต่ยังมีเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส ขณะกำลังเติบโตในอาหารที่มีไนเตรตจะไม่มีไนไตร์ตในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่เมื่อเซลเจริญเข้าสู่ stationary phase จะสามารถตรวจสอบไนไตร์ตในอาหารได้ เช่นเดียวกับมิวแตนท์ทั้ง 3 ที่แยกได้

จากผลการทดลอง ศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ของมิวแตนท์ที่ผ่านมาชี้บ่งว่ามิวแตนท์ทั้ง 3 สายพันธุ์มีความผิดปกติที่กระบวนการหายใจโดยใช้ไนเตรต อาจมีความผิดปกติที่เอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนส หรือมีความผิดปกติที่ตัวรับอิเล็กตรอนในกระบวนการนี้

3.7 การวัดก๊าซที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟ

ดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้นว่า ถ้าเป็นมิวแตนท์ที่ผิดปกติที่เอนไซม์

ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนส ควรจะไม่มีก๊าซเกิดขึ้น แต่ในการทดลองเบื้องต้น สังเกตฟองก๊าซได้ ดังนั้นจึงได้ตรวจสอบชนิดและปริมาณของก๊าซอย่างละเอียดในอาหารที่มีกลูโคส 27 มิลลิโมลาร์ เป็นสารต้นตอคาร์บอน และเสริมด้วยโซเดียมฟอร์เมต 27 มิลลิโมลาร์ พบว่า ขณะที่ไวลไทพ์กำลังเติบโตนั้น สามารถตรวจสอบก๊าซได้ 2 ชนิด คือ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และก๊าซไฮโดรเจน เนื่องจากเมื่อไวลไทพ์เติบโตในสภาวะดังกล่าว ฟอร์เมตในอาหารจะชักนำกระบวนการฟอร์เมตไฮโดรเจนไลเยส (formatehydrogenlyase) ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสฟอร์ม H กระบวนการขนส่งอิเล็กตรอน ซึ่งยังไม่ทราบตัวรับอิเล็กตรอนที่แน่ชัด และเอนไซม์ไฮโดรจีเนสฟอร์เมตจะถูกรีดิวส์เป็นคาร์บอนไดออกไซด์ โปรตอน และอิเล็กตรอน โดยปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนส อิเล็กตรอนที่เกิดขึ้นจะถูกส่งไปยังตัวรับอิเล็กตรอนต่าง ๆ เนื่องจากในกระบวนการนี้มิได้มีตัวรับอิเล็กตรอนอื่นใดเกี่ยวข้อง สุดท้ายโปรตรอนจึงรับอิเล็กตรอน เกิดเป็นก๊าซไฮโดรเจน ดังนั้นจึงตรวจสอบก๊าซได้ 2 ชนิด คือ คาร์บอนไดออกไซด์ และไฮโดรเจน

จะเห็นได้ว่าก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นเมื่อไวลไทพ์เติบโตในสภาวะดังกล่าวมีปริมาณสูงกว่าก๊าซไฮโดรเจน แสดงว่าเมื่อไวลไทพ์เติบโตในสภาวะนี้ มีกระบวนการหรือปฏิกิริยาอื่น ที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลิตภัณฑ์ เช่น กระบวนการ เพนโทสฟอสเฟต (pentose phosphate pathway) ซึ่งเป็นกระบวนการที่ใช้ NADP เป็นโคเอนไซม์ จะเกิด NADPH ซึ่งเป็นโคเอนไซม์ที่ใช้ในขบวนการสังเคราะห์ชีวโมเลกุลต่าง ๆ

อนึ่ง ในขณะนี้ยังไม่สามารถชี้สาเหตุ ที่ทำให้ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และก๊าซไฮโดรเจนลดลง เมื่อไวลไทพ์แบ่งตัวเข้าสู่ระยะ stationary phase และหลังจากนั้น 3 ชั่วโมง ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนจะเพิ่มขึ้น ในขณะที่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มีปริมาณคงที่

เมื่อมิวแตนท์เจริญในสภาพแอนแอโรบิคในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีกลูโคส 27 มิลลิโมลาร์ เป็นสารต้นตอคาร์บอน และเสริมด้วยโซเดียมฟอร์เมต 27 มิลลิโมลาร์ เช่นเดียวกับไวลไทพ์ จะเห็นได้ว่ามิวแตนท์เจริญต่ำกว่าไวลไทพ์มาก กล่าวคือไวลไทพ์มีความขุ่นสูงสุด 0.77 หน่วย $OD_{500\ nm}$ ส่วนมิวแตนท์สายพันธุ์ 27A, 18E และ

35A มีความชุ่นสูงสุดเพียง 0.26 – 0.31 หน่วย OD 500 nm เท่านั้น จากที่ได้ทำการทดสอบแล้วว่า มิวแตนท์ทั้ง 3 สามารถเจริญได้ดีเท่าไวลไทพ์ เมื่อเติบโตในอาหารสูตรปรับต่ำ แสดงว่า การที่มิวแตนท์เจริญได้น้อยกว่าไวลไทพ์ในอาหารที่เสริมด้วยโซเดียมฟอร์เมตนั้น เป็นผลมาจากฟอร์เมตนั่นเอง

การที่ฟอร์เมตมีผลต่อการเจริญในสภาวะแอนแนโรบิคของมิวแตนท์ทั้ง 3 ชี้ว่า มิวแตนท์ทั้ง 3 มีความผิดปกติของกระบวนการฟอร์เมตไฮโดรเจนไลเยส จึงทำให้ไม่สามารถกำจัดสภาวะรีดิวส์ในรูปของฟอร์เมตให้เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และก๊าซไฮโดรเจนได้ ด้วยเหตุนี้จึงคาดว่าก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นขณะที่มิวแตนท์ทั้ง 3 เจริญอยู่ในสภาวะดังกล่าว **เกิดจากกระบวนการอื่น** มิใช่กระบวนการฟอร์เมต-ไฮโดรเจนไลเยส

3.8 การเจริญในอาหารที่มีฟูมาเรตเป็นสารต้นตอคาร์บอน

จากผลการทดสอบการเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีฟูมาเรตเป็นสารต้นตอคาร์บอน จะเห็นได้ว่า ทั้งไวลไทพ์และมิวแตนท์ไม่สามารถเจริญได้ถ้าไม่มีก๊าซไฮโดรเจน ทั้งนี้เพราะเมื่อใช้ฟูมาเรตเป็นสารต้นตอคาร์บอน จำเป็นต้องมีรีดิวเซอร์มารีดิวส์ฟูมาเรตให้เป็นซักซิเนต เมื่อมีไฮโดรเจนเป็นรีดิวเซอร์จึงจะสามารถเติบโตได้ (Macy และคณะ, 1976)

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า มิวแตนท์ทั้ง 3 สามารถเติบโตได้ตามปกติเช่นเดียวกับไวลไทพ์เมื่อมีฟูมาเรตเป็นสารต้นตอคาร์บอน ภายใต้บรรยากาศของไฮโดร-เจน แสดงว่ามิวแตนท์ทั้ง 3 มิได้มีความผิดปกติที่เอนไซม์ฟูมาเรตรีดักเทสและเอนไซม์ไฮโดรจีเนส

อนึ่ง แม้ว่าค่าความชุ่นสูงสุดของเชื้อเมื่อใช้ฟูมาเรตเป็นสารต้นตอคาร์บอนจะต่ำกว่าค่าความชุ่นสูงสุดของเชื้อ เมื่อใช้กลูโคสเป็นสารต้นตอคาร์บอนก็ตาม ค่าความชุ่นสูงสุดที่ทำการทดลองได้ ใกล้เคียงกับค่าความชุ่นสูงสุดเมื่อ Escherichia coli เติบโตในสภาวะเดียวกัน (Macy และคณะ, 1976)

แม้ว่าการทดสอบนี้จะเป็นการทดสอบเอนไซม์ไฮโดรจีเนส ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนไฮโดรเจนเป็นโปรตอน และอิเล็กตรอน (hydrogen uptake) แต่ก็สามารถบ่งชี้ได้ว่า เอนไซม์ไฮโดรจีเนสซึ่งเร่งปฏิกิริยาการรีดิวส์โปรตอน เป็นไฮโดรเจน (hydrogen evolution) ของมิวแตนท์ทั้ง 3 มิได้ผิดปกติ ทั้งนี้โดยอาศัยข้อมูลจากเอนไซม์ไฮโดรจีเนสของ Escherichia coli ซึ่ง Tait และคณะ, 1981 ได้รายงานไว้ว่าเอนไซม์ไฮโดรจีเนสที่เร่งปฏิกิริยา hydrogen uptake และ hydrogen evolution เป็นเอนไซม์ตัวเดียวกันที่เร่งปฏิกิริยาที่ผันกลับได้

จากการทดสอบคุณสมบัติของมิวแตนท์ทั้ง 3 ชี้ว่า มิวแตนท์ทั้ง 3 น่าจะมีความผิดปกติที่เอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนส ซึ่งมีผลกระทบต่อกระบวนการหายใจโดยใช้ไนเตรตและกระบวนการฟอร์เมตไฮโดรเจนไลเยส

4. ความผิดปกติที่เอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนส

จากสรีรสมบัติที่ผ่านมา มีเหตุผลที่ทำให้น่าสงสัยว่า มิวแตนท์ทั้ง 3 น่าจะผิดปกติที่เอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนส ดังนั้นจึงต้องพิสูจน์โดยการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนส และตรึงตำแหน่งความผิดปกตินี้

เนื่องจากสรีรสมบัติที่ศึกษามา ชี้ว่ามิวแตนท์ที่นำมาศึกษานี้ น่าจะแสดง pleiotropic effect ในกระบวนการหายใจโดยใช้ไนเตรต และกระบวนการฟอร์เมตไฮโดรเจนไลเยส (ดูรูปที่ 1 ประกอบ) จึงได้ตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสทั้ง 2 ฟอร์ม

การเตรียมเยื่อเซลล์ เพื่อวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ทั้ง 2 ฟอร์ม พบอุปสรรคอยู่บ้าง เพราะกระบวนการทำลายเซลล์โดยวิธี sonication ไม่สามารถนำมาใช้ได้เลย ครั้นเมื่อเปลี่ยนแปลงเป็นการใช้ไลโซไซม์ และ EDTA รวมกับ freezing and thawing ตามด้วย osmotic lysis รวมเป็น 3 ขั้นตอน ปรากฏว่าการทำลายเซลล์ให้ผลดีขึ้น แม้กระนั้นก็ตาม ค่าความเร็วเริ่มต้น (initial velocity) ซึ่งเป็นเส้นตรงก็ยังมีค่าสั้นมาก ที่เป็นเช่นนี้ เพราะว่าการทำลายเซลล์ต้องเสียเวลามาก และกระบวนการมีหลายขั้นตอน แต่ละขั้นตอนย่อมเปิดโอกาส

ให้ออกซิเจนจากอากาศลงไปทำลายแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ง่าย ถึงแม้กระนั้นโดยการศึกษาเปรียบเทียบในสภาพเดียวกัน ก็สามารถบอกความแตกต่างของแอคติวิตีของเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสทั้ง 2 ฟอร์ม ระหว่างไวล์ไทพ์และมิวแตนท์ทั้ง 3 อย่างมีนัยสำคัญด้วยเหตุผลดังนี้

ก. จากการตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสฟอร์ม H จากเยื่อเซลล์ของมิวแตนท์ทั้ง 3 จะเห็นว่า เยื่อเซลล์ของมิวแตนท์ทั้ง 3 ที่มีปริมาณโปรตีนอยู่ในพิสัยของปริมาณโปรตีนของเยื่อเซลล์ของไวล์ไทพ์ ไม่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสฟอร์ม H แม้ว่าจะเตรียมจากเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารที่เสริมด้วยโซเดียมฟอร์เมต 73 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นสภาวะที่เอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสฟอร์ม H ถูกชักนำก็ตาม

ข. จากการตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสฟอร์ม N จากเยื่อเซลล์ของมิวแตนท์ทั้ง 3 จะเห็นว่า เยื่อเซลล์ของมิวแตนท์ทั้ง 3 ที่มีปริมาณโปรตีนอยู่ในพิสัยของปริมาณโปรตีนของเยื่อเซลล์ของไวล์ไทพ์ ไม่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสฟอร์ม N แม้ว่าจะเตรียมจากเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารที่เสริมด้วยโปตัสเซียมไนเตรต 0.1 โมลาร์ ซึ่งเป็นสภาวะที่เอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสฟอร์ม N ถูกชักนำก็ตาม

การที่พบว่าค่าเปอร์เซนต์โคทรานสดักชันของมิวแตนท์ทั้ง 3 เมื่อเทียบกับ **mtl** ตัวเดียวกัน ให้ค่าแตกต่างกัน คือ มิวแตนท์สายพันธุ์ 27A มีเปอร์เซนต์-โคทรานสดักชันกับ **mtl** เท่ากับ 45 ส่วนมิวแตนท์สายพันธุ์ 18E และ 35A มีค่าเปอร์เซนต์โคทรานสดักชันเท่ากับ 24 และ 15 ตามลำดับนั้น แสดงอย่างชัดเจนว่า จีโนไทพ์ของมิวแตนท์ตัวแรก (สายพันธุ์ 27A) แตกต่างจากมิวแตนท์ 2 ตัวหลัง (สายพันธุ์ 18E และ 35A) และดังนั้นอาจสันนิษฐานได้ว่า มิวแตนท์ทั้ง 3 สายพันธุ์นี้ มีความผิดปกติที่ **structural gene** คนละตัว

สรุปผลการวิจัย

จากการทดลองที่ผ่านมา สรุปได้ว่า มิวแตนท์ทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสมิวแตนท์ ซึ่งมีคุณสมบัติดังต่อไปนี้

1. สามารถเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำในสภาวะที่มีออกซิเจนได้ดีเท่ากับไวล์ไทพ์

2. สามารถเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำ และอาหารที่เสริมด้วยอาซีเตตในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจนได้ดีเท่ากับไวล์ไทพ์

3. ในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจน เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เสริมด้วยไนเตรตจะเจริญได้ต่ำกว่าไวล์ไทพ์ คือ สามารถใช้กลูโคสปริมาณเดียวกัน แต่มีความขุ่นสูงสุดของเซลล์แตกต่างกัน 0.6 เท่า

4. ไม่มีไนไตรต์สะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ ขณะกำลังเจริญในอาหารที่เสริมด้วยไนเตรตในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจน แต่จะมีไนไตรต์สะสมอยู่เมื่อเจริญถึง **stationary phase** แล้ว

5. มีคุณสมบัติต้านคลอเรต

6. สามารถใช้ฟูมาเรตเป็นสารต้นตอคาร์บอนได้เช่นเดียวกับไวล์ไทพ์ เมื่อเติบโตภายใต้บรรยากาศของไฮโดรเจน

7. เมื่อเติบโตในอาหารที่เสริมด้วยฟอร์เมตในสภาวะที่ปราศจากออกซิเจน จะเติบโตได้ต่ำกว่าไวล์ไทพ์ และไม่มีก๊าซไฮโดรเจนเกิดขึ้น

8. ไม่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนส ทั้งฟอร์ม **H** และฟอร์ม **N**

9. มีความผิดปกติที่ยีนซึ่งแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่มีโคทรานสดักชัน-ฟรีเควนซีกับ **mtl** เท่ากับ 45 เปอร์เซนต์ และ 24 – 15 เปอร์เซนต์

ข้อเสนอแนะและประโยชน์ที่ได้จากการวิจัยนี้

สำหรับมิวแตนท์กลุ่มที่ได้ศึกษาจนทราบว่ามีความผิดปกติที่เอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนส อาจนำไปศึกษาต่อได้หลายประการคือ

1. เป็นต้นแบบในการศึกษาถึงกลไกของการตรึงไนโตรเจน โดยเฉพาะอย่างยิ่งเพื่อศึกษาผลกระทบของไนเตรต

2. อาจเป็นต้นแบบในการศึกษาหน้าที่ของหน่วยย่อยของเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนสได้ เนื่องจากมีแนวโน้มว่า มิวแตนท์กลุ่มที่ศึกษาไว้นี้มีความผิดปกติที่ structural gene คนละตัว

สำหรับมิวแตนท์กลุ่มที่ยังไม่ได้ศึกษาคุณสมบัติอย่างละเอียด จะสามารถใช้วิธีการศึกษาเช่นเดียวกันนี้ เป็นแนวทางได้

ผลจากการศึกษามิวแตนท์ทั้งหมดนี้ อาจช่วยให้ความกระจ่างทั้งในด้านสรีรสมบัติและชีวสมบัติของเอนไซม์ฟอร์มิคดีไฮโดรจีเนส หรือในด้านที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหายใจโดยไม่ใช้ออกซิเจน รวมทั้งกลไกการตรึงไนโตรเจน