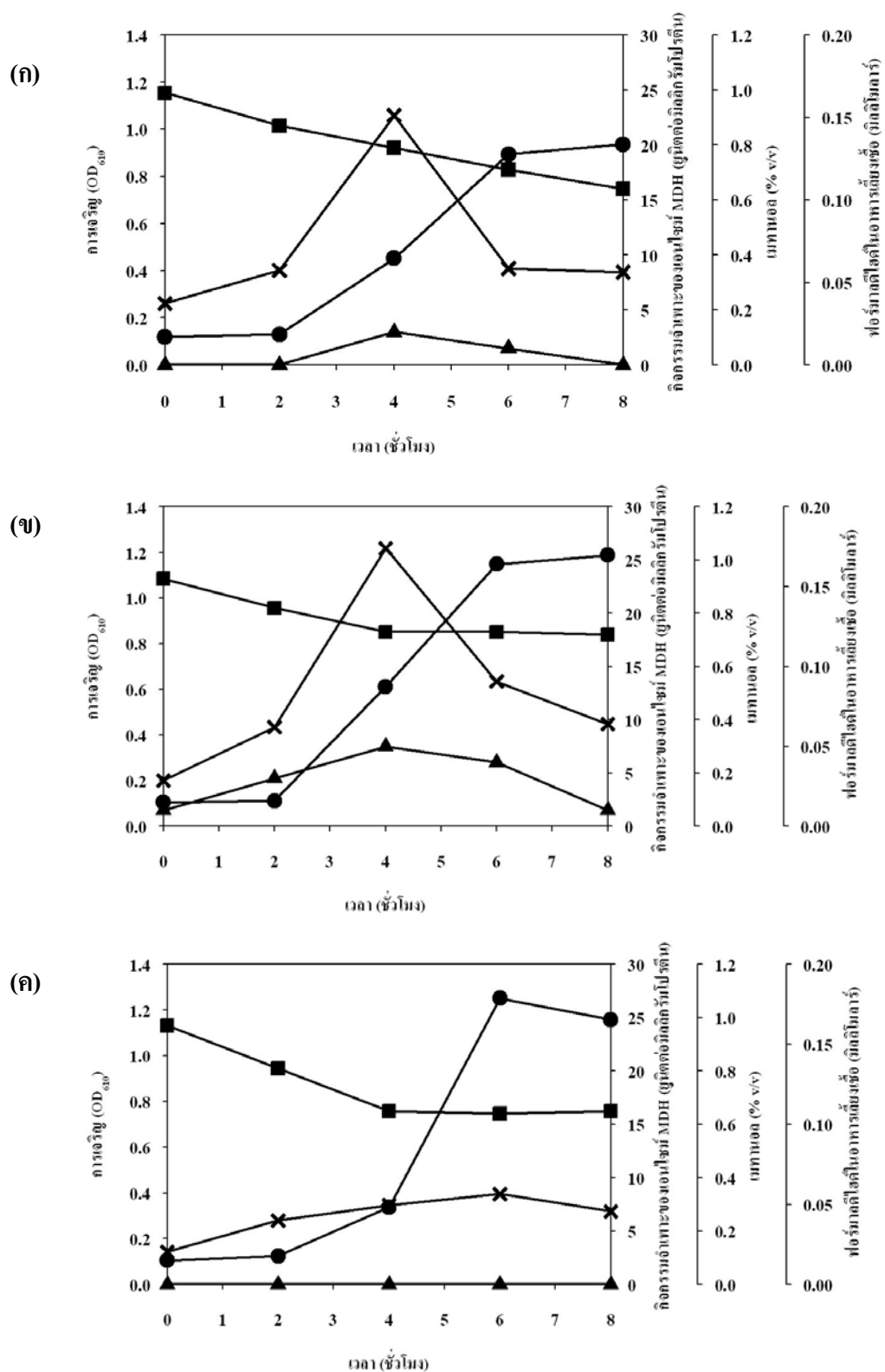




การศึกษารูปแบบการเจริญและการใช้เมทานอล รวมถึงปริมาณฟอर्मัลดีไฮด์ในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ของเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียรหัส SB4 จากภาพที่ 27 (ก) พบว่าแบคทีเรียมีการเจริญสูงสุดในชั่วโมงที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง โดยมีค่า OD_{610} เท่ากับ 0.936 หน่วย ในขณะที่เมทานอลลดลงจาก 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เหลือ 0.64 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร คิดเป็นเมทานอลที่ใช้ไปเท่ากับ 36 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณเริ่มต้น เมื่อพิจารณากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ MDH ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของเมทานอลเป็นฟอर्मัลดีไฮด์ พบว่าแบคทีเรียมีกิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นจากชั่วโมงแรกและมีกิจกรรมจำเพาะสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง โดยมีค่าเท่ากับ 22.7 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีนแล้วลดลง หลังจากนั้น ซึ่งเป็นการเจริญของแบคทีเรียเข้าสู่ระยะ stationary phase และเมื่อวิเคราะห์ฟอर्मัลดีไฮด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าค่าสูงสุดเท่ากับ 0.02 มิลลิโมลาร์ที่เวลา 4 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง แล้วลดต่ำลงหลังจากนั้น เมื่อแบคทีเรียมีการเจริญเข้าสู่ระยะ stationary phase เช่นกัน

สำหรับเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียรหัส TE1 พบว่ามีการเจริญ (OD_{610}) สูงสุดเท่ากับ 1.188 หน่วย ในชั่วโมงที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง จากการเจริญที่เพิ่มขึ้นนั้น เมื่อพิจารณาปริมาณเมทานอลพบว่าลดลงจาก 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เหลือ 0.72 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร คิดเป็นเมทานอลที่ใช้ไป 28 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณเริ่มต้น แบคทีเรียมีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ MDH เพิ่มขึ้นเมื่อเริ่มเพาะเลี้ยง และมีกิจกรรมสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งมีค่าเท่ากับ 26.1 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน แล้วลดลงหลังจากนั้น เมื่อการเจริญของแบคทีเรียเริ่มเข้าสู่ระยะ stationary phase การวิเคราะห์ฟอर्मัลดีไฮด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อพบค่าสูงสุดที่ 4 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง แล้วลดลง หลังจากนั้น เช่นเดียวกับที่ตรวจพบในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียรหัส SB4 แต่สำหรับแบคทีเรียรหัส TE1 พบว่ามีฟอर्मัลดีไฮด์มากกว่าเป็นสองเท่า คือ 0.05 มิลลิโมลาร์ อย่างไรก็ตามยังพบว่าฟอर्मัลดีไฮด์ที่ตรวจพบในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงตามการเจริญที่ลดลง เช่นเดียวกับรูปแบบที่พบในแบคทีเรียรหัส SB4

ส่วนเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียรหัส TB2 มีการเจริญ (OD_{610}) สูงสุดเท่ากับ 1.251 ในชั่วโมงที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง และเมื่อพิจารณาปริมาณจำเพาะของเอนไซม์ MDH พบว่ามีการเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ โดยพบค่าสูงสุดเพียง 8.47 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีนในชั่วโมงที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งเป็นเวลาที่แบคทีเรียมีการเจริญสูงสุด และเมื่อพิจารณาการใช้เมทานอลพบว่า เมทานอลลดลงจาก 1 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 0.64 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ซึ่งคิดเป็นเมทานอลที่ใช้ไปเท่ากับ 34.02 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณเริ่มต้น เมื่อวิเคราะห์ฟอर्मัลดีไฮด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่ามีค่าต่ำมากตลอดการ

เพาะเลี้ยง ซึ่งอาจเป็นผลจากการที่แบคทีเรียรหัส TB2 สร้างเอนไซม์ MDH ได้น้อยเมื่อเทียบกับไอโซเลทอื่นที่ศึกษา แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าถึงแม้จะพบกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ MDH ต่ำ แต่เมทานอลที่แบคทีเรียรหัส TB2 ใช้ไป กลับมีค่าสูงกว่าแบคทีเรียรหัส TE1 ซึ่งพบการสร้างเอนไซม์ MDH และฟอร์มัลดีไฮด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อมากกว่า

เนื่องจากการทดลองส่วนนี้ทำการตรวจวิเคราะห์เฉพาะฟอร์มัลดีไฮด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งคาดว่าเกิดขึ้นจากการที่เมทิลโลโทรฟิคแบคทีเรียออกซิไดส์เมทานอลที่ได้รับเข้าไปภายในเซลล์ แล้วเกิดฟอร์มัลดีไฮด์ซึ่งเป็นสารมัธยันตร์ของกระบวนการการใช้เมทานอล ฟอร์มัลดีไฮด์ที่เกิดขึ้นอาจถูกตรึงได้หลายวิธีขึ้นกับชนิดของแบคทีเรีย ซึ่งการตรวจพบฟอร์มัลดีไฮด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ อาจแสดงถึงความสามารถในการตรึงฟอร์มัลดีไฮด์ที่ต่างกัน จึงได้นำเมทิลโลโทรฟิคแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลทไปศึกษาการตรึงฟอร์มัลดีไฮด์ที่ 45 องศาเซลเซียสต่อไป

7. การตรึงฟอสฟอรัสที่ 45 องศาเซลเซียส โดยเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูง

เมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียอาจใช้ฟอสฟอรัสเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน โดยการออกซิไดส์ฟอสฟอรัสเพื่อสร้างพลังงานหรือสร้างองค์ประกอบของเซลล์ได้ การศึกษา กิจกรรมการตรึงฟอสฟอรัสที่ 45 องศาเซลเซียส โดยเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท ควรทำการทดลองในสภาวะที่แบคทีเรียเจริญใช้ฟอสฟอรัส เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียว เพื่อพิจารณาความสามารถของแบคทีเรียในการตรึงฟอสฟอรัสโดยปราศจากอิทธิพลของแหล่ง คาร์บอนชนิดอื่น เช่น เมทานอล ดังนั้นจึงทำการทดลองเพื่อหาค่า MIC ของฟอสฟอรัสต่อการ เจริญของเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมฟอสฟอรัสความเข้มข้นต่าง ๆ เป็น แหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียว แล้วเปรียบเทียบกับค่า MIC ของฟอสฟอรัสต่อการเจริญของเมทิล โลโทรฟิแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารที่มีเมทานอล (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ค่า MIC ของฟอสฟอรัสต่อการเจริญของเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียรหัส SB4 TE1 และ TB2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีและไม่มีเมทานอล เมื่อเลี้ยงที่ 45 องศาเซลเซียส

รหัสเชื้อ	ค่า MIC ของฟอสฟอรัส (มิลลิโมลาร์)	
	อาหารที่มีเมทานอล	อาหารที่ไม่มีเมทานอล
SB4	2.5	0.8
TE1	2.4	0.7
TB2	1.9	0.5

ผลการทดลองในตารางที่ 5 แสดงว่า เมื่อเจริญในสภาวะที่มีเมทานอลร่วมอยู่ด้วยนั้น เมทิล โลโทรฟิแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท มีค่า MIC ของฟอสฟอรัสสูงกว่าเมื่อเจริญในสภาวะที่ไม่มี เมทานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อ

Mitsui *et al.*, 2005 รายงานว่า *Methylobacterium* sp. MF1 สามารถเจริญในสภาวะที่มี ฟอสฟอรัสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียว ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (1.2 กรัมต่อลิตร) เมื่อเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ ที่ 28 องศาเซลเซียส ซึ่ง Wood *et al.* (1998) เคยรายงานไว้ว่า *M. thiocyanatum* สามารถเจริญในสภาวะที่มีฟอสฟอรัสความเข้มข้นสูงสุด 1.25 มิลลิโมลาร์เป็น แหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียว Chongcharoen *et al.* (2005) พบว่าการปรับสภาพ *Methylobacterium*

สายพันธุ์ใกล้เคียงกันนี้ให้คุ้นเคยกับฟอร์มาลดีไฮด์ความเข้มข้นสูง ๆ ทำให้แบคทีเรียทนต่อความเป็นพิษของฟอร์มาลดีไฮด์และใช้ฟอร์มาลดีไฮด์เพื่อการเจริญได้เพิ่มขึ้นมาก โดยมีค่าความเข้มข้นของฟอร์มาลดีไฮด์ที่สูงถึง 58-100 มิลลิโมลาร์ ที่ 30 องศาเซลเซียส

แม้ว่าเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียรหัส SB4 TE1 และ TB2 มีค่า MIC ของฟอร์มาลดีไฮด์ค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับที่มีรายงานในแบคทีเรีย *Methylobacterium* ซึ่งเป็นเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียที่ใช้วิถี Serine ในการกำจัดฟอร์มาลดีไฮด์ แต่เป็นการเพาะเลี้ยงที่ 28-30 องศาเซลเซียส (Wood *et al.*, 1998; Mitsui *et al.*, 2005; Chongcharoen *et al.* 2005) ส่วนกรณีของเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียรหัส SB4 TE1 และ TB2 นั้นเป็นการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิสูงถึง 45 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นข้อได้เปรียบสำหรับการนำแบคทีเรียดังกล่าวไปประยุกต์ใช้ในสิ่งแวดล้อมจริง เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศเขตร้อน มีอุณหภูมิเฉลี่ยตลอดทั้งปีค่อนข้างสูง

Yurimoto *et al.* (2002) พบว่า เมทานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อเหนียวทำให้เมทิลโลโทรฟิแบคทีเรีย *Bacillus brevis* S1 สร้างเอนไซม์ hexulose phosphate synthase (HPS) และเอนไซม์ phosphohexulose isomerase (PHI) ได้ ซึ่งเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้เป็นเอนไซม์หลัก ของวิถี ribulose monophosphate pathway (RuMP) ซึ่งเป็นวิถีการตรึงฟอร์มาลดีไฮด์วิธีหนึ่งที่อาจพบได้ในเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรีย โดยเอนไซม์ HPS จะช่วยเร่งปฏิกิริยาการตรึงฟอร์มาลดีไฮด์เข้ารวมกับ ribulose-5-phosphate ได้เป็น hexulose-6-phosphate ซึ่งจะถูกไอโซเมอไรซ์ต่อไปเป็น fructose-6-phosphate โดยกิจกรรมของเอนไซม์ PHI (ภาพที่ 5) การที่แบคทีเรียสร้างเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ จึงคาดว่าจะมีส่วนช่วยให้แบคทีเรียเปลี่ยนฟอร์มาลดีไฮด์ไปเป็นสารอื่น แล้วทำให้แบคทีเรียทนต่อความเป็นพิษของฟอร์มาลดีไฮด์ได้ดีขึ้น

ดังนั้นจึงทำการศึกษาเกี่ยวกับวิถีเมแทบอลิซึมที่เมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียที่คัดเลือกไว้ทั้ง 3 ไอโซเลท ใช้ในการตรึงฟอร์มาลดีไฮด์ที่ผ่านเข้าสู่เซลล์ โดยเริ่มต้นจากการทดสอบการสร้างเอนไซม์ HPS และ PHI ซึ่งเป็นเอนไซม์หลักของวิถี RuMP ซึ่งเป็นวิถีการตรึงฟอร์มาลดีไฮด์ที่มีรายงานว่า พบในเมทิลโลโทรฟิแบคทีเรียที่เจริญได้ที่อุณหภูมิสูง เช่น แบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* spp. (Yurimoto *et al.*, 2002)

ตารางที่ 6 กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ HPS และ PHI ของเมทิลโลโทรฟิเคแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเหลวที่มีเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุน 170 รอบต่อนาที ที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

รหัสเชื้อ	กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน)	
	HPS	PHI
SB4	11.3	0.9
TE1	56.5	7.1
TB2	20.5	2.4

ผลการทดลองในตารางที่ 6 แสดงให้เห็นว่าเมทิลโลโทรฟิเคแบคทีเรียที่คัดเลือกไว้ทั้ง 3 ไอโซเลท ใช้วิถี RuMP ในการตรึงฟอร์มัลดีไฮด์ที่เกิดขึ้นจากการแอสซิมิเลชันของเมทานอล ไปเป็นส่วนประกอบของเซลล์ เนื่องจากพบกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ HPS และ PHI ในปริมาณที่ตรวจวัดได้ชัดเจน

Orita *et al.* (2005) รายงานว่าเมทิลโลโทรฟิเคแบคทีเรีย *Pyrococcus horikoshii* ที่เลี้ยงในอาหาร LB ที่มีฟอร์มัลดีไฮด์ 0.5 มิลลิโมลาร์ ที่ 37 องศาเซลเซียส พบกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ HPS และเอนไซม์ PHI 56.7 และ 45.5 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ

Yurimoto *et al.* (2002) ได้แสดงให้เห็นว่า เมื่อเลี้ยง *Bacillus brevis* S1 ซึ่งเป็นเมทิลโลโทรฟิเคแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูง ในสภาวะที่มีเมทานอลหรือเอทานอลหรือกลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า เมื่อเซลล์เจริญในสภาวะที่มีเมทานอล 0.06 เปอร์เซ็นต์ พบกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ HPS และ PHI เท่ากับ 7.4 และ 11 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ตามลำดับ เมื่อเซลล์เจริญในสภาวะที่มีเอทานอลเป็นแหล่งคาร์บอน พบกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ HPS และ PHI 3.7 และ 3.9 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน แต่พบกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองต่ำมาก เมื่อเซลล์เจริญในสภาวะที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน คือ 0.67 และ 0.92 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ

ปัจจุบันเป็นที่ยอมรับแล้วว่าวิถี RuMP เป็นวิถีเมแทบอลิซึมสำหรับการตรึงและกำจัดความเป็นพิษของฟอร์มัลดีไฮด์ภายในเซลล์ของโปรคาริโอต (Dijkhuizen *et al.*, 1992; Quayle and Ferenci, 1978) ซึ่งอาจพบวิถี RuMP ได้ในแบคทีเรียหลายชนิด โดยเฉพาะเมทิลโลโทรฟิเค

แบคทีเรียที่ใช้สารประกอบคาร์บอนหนึ่งอะตอมเพื่อการเจริญได้ ทั้งกลุ่มที่เป็น facultative methylotroph เช่น *Mycobacterium gastri* (Mitsui *et al.*, 2000) และกลุ่มที่เป็น obligate methylotroph เช่น *Methylobacterium aminofaciens* (Sakai *et al.*, 1999) นอกจากนี้ยังพบในแบคทีเรียที่เป็นกลุ่ม Archaea เช่น *Thermococcus kodakaraensis* และ *Pyrococcus horikoshii* (Orita *et al.*, 2005; Orita *et al.*, 2006) และยังพบวิถี RuMP ได้ในแบคทีเรียกลุ่มที่ไม่เป็น methylotroph ด้วย เช่น *Burkholderia fungorum* (Marx *et al.*, 2004) และ *B. cepacia* (Mitsui *et al.*, 2003) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีการดำรงชีวิตอย่างอิสระ รวมทั้ง *Bacillus subtilis* ซึ่งพบว่าการทำงานของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ HPS และ PHI ถูกควบคุมในลักษณะของโอเปอรอนและถูกเหนี่ยวนำได้โดยฟอร์มาลดีไฮด์ (Yurimoto *et al.*, 2002) การตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ HPS และ PHI ซึ่งเป็นเอนไซม์หลักของวิถี RuMP ในสิ่งมีชีวิตแสดงว่าสิ่งมีชีวิตนั้นมีกระบวนการตรึงและกำจัดฟอร์มาลดีไฮด์ได้โดยวิถี RuMP (Orita *et al.*, 2005) สำหรับ *Thermococcus kodakaraensis* ซึ่งเป็น Archaea พบว่าใช้ปฏิกิริยาย้อนกลับของการตรึงฟอร์มาลดีไฮด์เพื่อการสังเคราะห์ ribose 5-phosphate จาก fructose 6-phosphate ในกรณีที่เกิดความบกพร่องของวิถี pentose phosphate ได้ด้วย (Orita *et al.*, 2006)

มีรายงานว่าเอนไซม์ HPS และ PHI ถูกเหนี่ยวนำได้โดยเมทานอล เอทานอล และฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Mitsui *et al.*, 2000; Sakai *et al.*, 1999; Yasueda *et al.*, 1999; Yurimoto *et al.*, 2002) แต่ในกรณีของ *Pyrococcus horikoshii* พบว่ายีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ทั้งสองมีการแสดงออกอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากมีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ HPS เท่ากับ 0.250 และ 0.210 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีนทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีฟอร์มาลดีไฮด์ 0.5 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ (Orita *et al.*, 2005) ซึ่งแตกต่างเพียงเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ HPS เท่ากับ 0.310 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีนภายหลังจากที่ทำการเหนี่ยวนำ *Bacillus subtilis* โดยฟอร์มาลดีไฮด์ปริมาณเท่ากัน เพื่อให้เกิดการสร้างเอนไซม์ดังกล่าว (Yurimoto *et al.*, 2002)

การศึกษาการตรึงฟอร์มาลดีไฮด์ของเมทิลโอโทรฟิกแบคทีเรียในสภาวะที่มีฟอร์มาลดีไฮด์เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียว ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมฟอร์มาลดีไฮด์ความเข้มข้นต่าง ๆ ตามค่า MIC ของฟอร์มาลดีไฮด์จากตารางที่ 5 โดยพิจารณาการเจริญ (OD_{610}) ฟอร์มาลดีไฮด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ฟอร์มาลดีไฮด์ภายในเซลล์ กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ HPS และ PHI โดยเก็บตัวอย่างทุก ๆ 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ได้ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 28