บทที่ 4

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

4.1 สภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ *P rettgeri* ATCC 9250

เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส (EC 3.5.1.11) ของ *Proteus rettgeri* และ *E. coli* จะมีสมบัติที่แตกต่างกันเช่น โครงสร้าง น้ำหนักโมเลกุล และ isoelectric พีเอช (Daumy และคณะ, 1982 และ 1985) นอกจากนี้การผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ *E. coli* นั้นจะถูกควบคุมโดยอุณหภูมิ (Kaufman, 1964; Mayer, 1979)และถูกเหนี่ยวนำการถอดระหัสด้วยกรด ฟีนิลอะซีติก (Szentirmai, 1964) กลูโคสก็สามารถยับยั้งการถอดระหัสของเอนไซม์แบบ catabolite repression ได้ ในขณะที่มีรายงานว่า เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ *P rettgeri* ไม่ถูกเหนี่ยวนำการถอดระหัสด้วยกรด ฟีนิลอะซีติก จึงมีสมบัติเป็น constitutive enzyme และจะถูกยับยั้งการถอดระหัสแบบกดดัดด้วยสารประกอบ ซึ่งเป็นสารตัวกลางในวัฏจักรของเครบส์ที่มีคาร์บอน 4 อะตอม คือ ซักซิเนท ฟูมาเรท และ มาเลท (Daumy และคณะ, 1982)

เมื่อทำการปลูกเชื้อ *P. retteri* ATTC 9250 ในอาหารสูตรอุดมและสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยกลูโคส จะพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้สามารถเจริญได้ดีในอาหารสูตรอุดม แต่ไม่สามารถเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีกลูโคสซึ่งเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนเดี่ยวได้ ถึงแม้ *P rettgeri* ATCC 9250 จะเจริญในอาหารสูตรอุดมได้แต่แอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส อยู่ในระดับต่ำ (รูปที่ 6) Daumy และคณะ (1982) รายงานว่า *P. rettgeri* ATCC 31052 ไม่สามารถเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีกลูโคสเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนเช่นกัน ในการวิจัยนี้จึงเลือกใช้อาหารสูตรปรับต่ำเป็นอาหารเลี้ยงแบคทีเรียแล้วแปรชนิดของสารต้นตอคาร์บอน วัดการเจริญสูงสุดและแอคติวิตีสูงสุดของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส การทดลองปลูก *P. rettgeri* ATCC 9250 ในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยสารต้นตอคาร์บอนเดี่ยวชนิดต่าง ๆ คือ ซักซิเนท ซิเตรท แอสปาร์เตท กลูตาเมท และ กลีเซอรอล พบว่าเมื่อเสริมด้วยสารต้นตอคาร์บอนเดี่ยวเหล่านี้ในปริมาณ 0.2 เปอร์เซนต์ จะให้ค่าการเจริญอยู่ในระดับต่ำ ยกเว้นเมื่อเสริมด้วยกลีเซอรอล ส่วนแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส นั้น เมื่อเสริมด้วยแอสปาร์เตท 0.2 เปอร์เซนต์ จะให้ค่าสูงที่สุดถึง

126 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนสุทธิของเซลล์ (ตารางที่ 5) จะเห็นได้ว่า *P rettgeri* ATCC 9250 สามารถใช้แหล่งต้นตอคาร์บอนเดี่ยวในการเจริญและผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ได้ต่างกัน เนื่องจากสารต้นตอคาร์บอนเดี่ยวดังกล่าวมีวิถี (pathway) ในการสลายและให้พลังงานที่แตกต่างกัน โดยซักซิเนทและซิเตรท ซึ่งเป็นสารตัวกลางในวัฏจักรเครบส์ จะมีผลในการกดดันการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ได้ ในขณะที่ทั้งแอสปาร์เตท กลูตาเมท และกลีเซอรอลนั้นจำเป็นต้องเกิดเมตาบอลิสมในเซลล์แบคทีเรียเสียก่อน ซึ่งแบคทีเรียสายพันธุ์นี้อาจจะมีวิถีของการใช้สารต้นตอคาร์บอน เหล่านี้แตกต่างไปจากการใช้เป็นตัวกลางในวัฏจักรของเครบส์แต่เพียงอย่างเดียวก็ได้จึงมี ผลในการกดดันการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ต่ำกว่าจะเห็นได้จากผลการทดลองเมื่อใช้สารต้นตอคาร์บอนเดี่ยวทั้ง 3 นี้ในการเจริญของ *P. rettgeri* ATCC 9250 นั้นจะต้องใช้ช่วงเวลาของการเจริญสูงสุดยาวกว่าเมื่อใช้ซิเตรทและซักซิเนทเป็นสารต้นตอคาร์บอน โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อใช้แอสปาร์เตทต้องใช้เวลานานถึง 45 ชั่วโมง จึงสามารถเจริญและผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด อย่างไรก็ตามเนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่เสริมด้วยแอสปาร์เตท ให้แอคติวิตี้ของเอนไซม์สูงสุด จึงได้ทำการทดลองแปรเปลี่ยนความเข้มข้นของแอสปาร์เตทในอาหารสูตรปรับต่ำ พบว่าเมื่อปลูก *P. rettgeri* ATCC 9250 ในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยแอสปาร์เตท 0.8 เปอร์เซนต์ ได้ค่าการเจริญสูงสุด 4.5 หน่วย และแอคติวิตีสูงสุดของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ประมาณ 172 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนรวมของเซลล์ (รูปที่ 7) ในระหว่างทำการทดลองได้วัด พี เอช ของอาหารเลี้ยงแบคทีเรียพบว่าอัตราการเพิ่มของ พี เอช ของอาหารเลี้ยงแบคทีเรียจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนกระทั่งการเจริญมีค่าสูงสุดหลังจากนั้น อัตราการเพิ่ม พี เอช จึงช้าลงในขณะที่แอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส และจำนวนเซลล์มีชีวิตก็จะลดลงอย่างรวดเร็วตามไปด้วย จึงได้ตั้งสมมติฐานว่าการลดแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสพร้อมกับการตายของเซลล์อย่างรวดเร็วนั้น อาจจะมีผลมาจากการเปลี่ยนแปลง พี เอช ของอาหารเลี้ยงเชื้อ จากรายงานของ Son และคณะ (1982) พบว่า *Bacillus megaterium* RFCC 10029 สามารถที่จะสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ได้สูงขึ้นเมื่อมีการควบคุม พี เอช ของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ผลการทดลองควบคุม พี เอช ของอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยแอสปาร์เตท 0.8 เปอร์เซนต์ในการเจริญของ *P. rettgeri* ATCC 9250 ให้อยู่ในช่วง พี เอช 7.0-7.5 พบว่ารูปแบบของการเจริญและผลิตเอนไซม์จะไม่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิมมากนัก จึงสรุปได้ว่าในการ

เจริญของ *P. retteri* ATCC 9250 ในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยแอสปาร์เตท 0.8 เปอร์เซนต์นั้น พี เอช ของอาหารเลี้ยงแบคทีเรียจะไม่มีผลต่อการสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส และการอยู่รอดของเซลล์แต่อย่างใด

จากการติดตามการเจริญ และแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ *P. rettgeri* ATCC 9250 เมื่อปลูกในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยซิเตรทและซักซิเนทที่เป็นสารต้นตอคาร์บอนเดียวนั้นจะเห็นได้ว่าซิเตรท และซักซิเนทเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนที่ถูกนำไปใช้ในการเจริญ และผลิตเอนไซม์ได้อย่างรวดเร็ว (ช่วงเวลาของการเจริญ และผลิตเอนไซม์สูงสุด 9 และ 12 ชั่วโมง) และจากรายงานของ Son (1982) พบว่าในการใช้กลูโคสเป็นสารต้นตอคาร์บอนจะทำให้ *Bacillus megaterium* ATCC 14945 สามารถผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ได้สูง จึงได้พยายามเพิ่มค่าการเจริญ และผลิตเอนไซม์ของแบคทีเรีย โดยการเติมกลูโคสลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสารต้นตอคาร์บอนคู่ ผลการทดลอง (ข้อ 3.1.6) พบว่าเมื่อปลูก *P. rettgeri* ATCC 9250 ในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยสารต้นตอคาร์บอนคู่มือซิเตรท 0.2 เปอร์เซนต์ และ กลูโคส 1.0 เปอร์เซนต์ จะให้ค่าการเจริญและผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส สูงกว่าในการเจริญเมื่อเสริมด้วยซิเตรท (0.2 เปอร์เซนต์) เดี่ยว ๆ เกือบ 3 เท่าจึงน่าจะกล่าวได้ว่ากลูโคสมีอิทธิพลต่อการเจริญ และผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของเชื้อ *P. rettgeri* ATCC 9250 โดยถ้าการมีซิเตรทเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนควบคู่ไปด้วยจะช่วยในการสนับสนุน (facilitated) การใช้กลูโคสเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนของแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ได้ดีขึ้น

ผลการศึกษารูปแบบการเจริญ การผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส และวัดปริมาณกลูโคสในอาหารเลี้ยงแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด (ผลการทดลอง ข้อ 3.1.6) พบว่ารูปแบบการเจริญ (รูปที่ 10 ก) เมื่อปลูกในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยซิเตรท 0.2 เปอร์เซนต์ จะมีลักษณะของการเจริญแบ่งออกเป็น 2 ช่วง คือ ช่วงต้นระยะเวลา 9 ชั่วโมงแรกของการเจริญ *P. rettgeri* ATCC 9250 มีอัตราการเจริญอย่างรวดเร็ว หลังจากนั้นจึงเข้าสู่ช่วงที่ 2 ซึ่งอัตราการเจริญจะช้าอย่างเห็นได้ชัด ผลการทดลองวัดปริมาณของกลูโคสจะเห็นได้ว่าในช่วงเวลา 9 ชั่วโมงแรกของการเจริญ ระดับของกลูโคสจะมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก หรือเกือบจะไม่เปลี่ยนแปลงหลังจากนั้นระดับของกลูโคสจะลดลงอย่างรวดเร็ว และแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ก็จะผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน

เอชิเลส ออกมามากขึ้นจนเข้าสู่ระยะการเจริญคงที่ และแอคติวิตีของเอนไซม์ที่วัดได้ก็จะคงที่ในขณะที่อัตราการลดระดับของกลูโคสก็จะช้าลง การที่ *P. rettgeri* ATCC 9250 สามารถผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอชิเลส ได้สูงมากกว่าเมื่อเจริญในชิเตรทเดี่ยว ๆ เนื่องจากการที่ชิเตรท สามารถที่จะช่วยให้แบคทีเรียสายพันธุ์นี้สามารถที่จะนำกลูโคสไปใช้ได้ Daumy และคณะ (1982) ได้รายงานว่า *P. rettgeri* ATCC 31052 ไม่สามารถเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยกลูโคส เป็นสารต้นตอคาร์บอนเดี่ยวได้ ในงานวิจัยเมื่อปริมาณ ชิเตรท 0.2 เปอร์เซนต์ นั้น *P. rettgeri* ATCC 9250 ถูกใช้หมดไปภายในเวลาอันสั้นเพียง 9-12 ชั่วโมง แล้วแบคทีเรียสามารถใช้กลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสารต้นตอคาร์บอนแทนได้ในช่วงระยะเวลาหนึ่ง (12-24 ชั่วโมง) จึงสามารถเพิ่มเพิ่มค่าการเจริญและผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอชิเลส ได้ ผลการทดลองในรูปที่แสดงในภาคผนวกที่ 7 เป็นการสนับสนุนสมมติฐานนี้ อีกอันหนึ่งคือ เมื่อปลูก *P. rettgeri* ATCC 9250 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยกลูโคส 0.2 เปอร์เซนต์ เป็นระยะเวลานานมากกว่า 72 ชั่วโมง พบว่า *P. rettgeri* ATCC 9250 สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอชิเลส ได้ โดยมีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอชิเลส สูงสุดประมาณ 80 หน่วย ต่อมิลลิกรัมโปรตีนรวมของเซลล์ และการเจริญสูงสุดประมาณ 1.8 หน่วย

เมื่อทำการแปรเปลี่ยนค่าความเข้มข้นของกลูโคส และชิเตรท เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมกับการเจริญและผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอชิเลส (รูปที่ 11 ก, 11 ข, และ รูปที่ 12) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอชิเลส ของ *P. rettgeri* ATCC 9250 เมื่อปลูกในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยชิเตรท 0.2 เปอร์เซนต์ และกลูโคส 1.0 เปอร์เซนต์ จะให้ค่าการเจริญและผลิตเอนไซม์ได้สูงที่สุดการเพิ่มความเข้มข้นของชิเตรทไม่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียมากนัก กลับจะไปยับยั้งการผลิตเอนไซม์อีกด้วย (รูปที่ 14)

ในการทดลองปลูก *P. rettgeri* ATCC 9250 ในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยกลีเซอรอล 0.2 เปอร์เซนต์ และ กลูโคส 1.0 เปอร์เซนต์ นั้นจะให้ผลตรงกันข้ามกับในกรณีของชิเตรท โดยแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอชิเลส จะลดลงประมาณ 2 เท่า ทั้งนี้อาจเป็นเพราะกลีเซอรอลไม่ใช่สารประกอบที่จะสนับสนุนการใช้กลูโคสในการเจริญและผลิตเอนไซม์ ทั้งนี้เพราะประสิทธิภาพและวิธีการใช้กลีเซลรอลเป็นสารต้นตอคาร์บอนที่แตกต่างกันดังจะเห็นได้จากการต้องใช้ช่วงเวลาในการเจริญจนได้ค่าการเจริญสูงสุดนานถึง 21 ชั่วโมง ซึ่งต่างไปจากการใช้

ซิเตรทเป็นสารต้นตอคาร์บอนเดี่ยว (9 ชั่วโมง) ดังนั้นเมื่อเพิ่มกลูโคสลงไปในสูตรอาหารที่เสริมด้วย กลีเซลรอล จะไม่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส แต่กับมีอิทธิพลต่อการกดดันการผลิตเอนไซม์ด้วย

นอกจากการทดลองใช้สารต้นตอคาร์บอนดี่ยวและคู่แล้ว ในงานวิจัยนี้ยังได้ทดลองใช้สารต้นตอคาร์บอนเชิงซ้อนในการเลี้ยง *P. rettgeri* ATCC 9250 เพื่อเพิ่มการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ให้สูงขึ้นโดยทำการทดลองปลูก *P. rettgeri* ATCC 9250 ในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วย เคซีน ไฮโดรไลเซท ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน พบว่าเมื่อใช้ปริมาณของ เคซีน สูงมากขึ้น แบคทีเรียจะมีการเจริญได้ดีขึ้น และการเจริญจะแปรผัน ตามปริมาณเคซีน แสดงว่าแบคทีเรียสามารถใช้เคซีน เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนเพื่อการเจริญได้ดี แต่ในทางตรงกันข้ามการเพิ่มความเข้มข้นของเคซีนในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีผลทำให้แอคติวิตีสูงสุด เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ลดลง ถึงแม้ว่าจะมีการเติมแลคเตท ซึ่งเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนเพิ่มลงไปอีกชนิดหนึ่งก็ตาม Hamsher และคณะ (1975) ได้ทำการทดลองพบว่า *P. rettgeri* ATCC 9250 สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ได้สูงเมื่อปลูกในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วย แลคติก-เคซีน เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน

จากผลการทดลองนี้ทำให้เราสามารถอธิบายผลการทดลองในหัวข้อ 3.1.1 ที่ว่า *P. rettgeri* ATCC 9250 เมื่อเจริญในอาหารสูตรอุดมถึงแม้ว่าจะมีการเจริญได้ดี ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส จะมีค่าต่ำมาก ทั้งนี้เนื่องจากในอาหารสูตรอุดมมี ทริพโตน เป็นส่วนประกอบอยู่ด้วย องค์ประกอบของทริพโตน จะคล้ายคลึงกับ เคซีน ไฮโดรไลเซท คือประกอบด้วยกรดอะมิโนหลาย ๆ ชนิด จึงเป็นไปได้ที่ว่ามีกรดอะมิโนบางตัวในสารประกอบเคซีน หรือ ทริพโตน ไปกดดันการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ได้

4.2 <u>การแยกสายพันธุ์ของ *P. rettgeri* ATCC 9250 ที่มีประสิทธิภาพการสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสเพิ่มขึ้น</u>

Son และคณะ (1982) พบว่าสามารถกลายพันธุ์ *Bacillus megaterium* ATCC 14945 ซึ่งปกติสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ด้วยการเหนี่ยวนำของกรดพีนิลอะซีติก (Szentrimai, 1964; Self และคณะ, 1969) โดยใช้รังสีอุลตราไวโอเลต ได้มิวแตนท์

ที่ซึ่งสามารถสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ได้สูงกว่าสายพันธุ์เดิมประมาณ 7-8 เท่า และกลไกการสังเคราะห์เอนไซม์นี้จะเปลี่ยนไปเป็นแบบต่อเนื่องบางส่วน (partially constitutive mutant) Morita และคณะ (1984) ทำการกลายพันธุ์ *E. coli* IFO 13500 ด้วย NTG ได้มิวแตนท์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ เพนนิซิลิน เอซิเลส ได้สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 6 เท่า และสายพันธุ์ที่ได้ใหม่นี้จะยอมให้เพนนิซิลิน จี ผ่านผนังเซลล์ด้านนอกเข้าไปได้ง่ายกว่าสายพันธุ์ *E. coli* IFO 13500 เดิม เป็นผลให้ค่า Km ระหว่างเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส กับ เพนนิซิลิน จี ของ มิวแตนท์ต่ำกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นเกือบ 3 เท่า

จากผลการทดลองใช้สารต้นตอคาร์บอนคู่คือ ซิเตรท และ กลูโคส ในการเจริญ *P. rettgeri* ATCC 9250 พบว่าซิเตรทสามารถช่วยสนับสนุนให้เซลล์นำกลูโคสไปใช้และเพิ่มการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ได้สูงขึ้น จะเห็นได้ว่าถ้าเซลล์สามารถนำกลูโคสไปใช้เป็นสารต้นตอคาร์บอนเดียวได้ก็น่าจะทำให้แบคทีเรียสกุมารถผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ได้สูงขึ้นตามไปด้วย

เมื่อทำการทดลองกลายพันธุ์ *P. rettgeri* ATCC 9250 ด้วยรังสีอุลตราไวโอเลต ตามผลการทดลองข้อ 3.2.1 ได้มิวแตนท์ 2 ตัวให้ชื่อว่า No. 89 และ No. 139 ซึ่งมิวแตนท์ทั้ง 2 ตัวนี้ในระยะแรกสามารถผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ได้สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม (*P. rettgeri* ATCC 9250) ซึ่งทดสอบโดยวัดความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *S. marcescens* ATCC 27117 บนอาหารชนิดแข็ง แต่เมื่อนำมิวแตนท์ทั้ง 2 มาปลูกในอาหารชนิดเหลวสูตรต่าง ๆ พบว่า มิวแตนท์ที่ได้ไม่มีการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส เลย จากปรากฏการณ์นี้ แสดงให้เห็นว่าการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอุลตราไวโอเลตของ *P. rettgeri* ATCC 9250 จะได้มิวแตนท์ที่ไม่เสถียร (Leaky mutant) ทั้งนี้อาจจะเป็นไปได้เพราะรังสีอุลตราไวโอเลตจะเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ที่เบสเดี่ยว (point mutation) ซึ่งมีความสัมพันธ์โดยตรงกับกรด ดีออกซีไร โบนิวคลิอิก (DNA) ของจุลชีพแต่เนื่องจากจุลชีพส่วนใหญ่มีการซ่อมแซมชิ้นของ DNA ตลอดเวลา จึงทำให้การกลายพันธุ์นี้สามารถเกิดปรากฏการณ์ที่เรียกว่าย้อนกลับ (revertant) ได้ จึงเปลี่ยนวิธีการกลายพันธุ์ของ *P. rettgeri* ATCC 9250 มาเป็น NTG เนื่องจาก NTG เป็นสารที่ใช้ในการกลายพันธุ์ (mutagent) ที่นิยมใช้กันมากที่สุดโดย NTG จะถูกเปลี่ยนไปเป็น ไดอะโซมีเธน (diazomethane) ซึ่งเป็นสารกลายพันธุ์ที่แท้จริง จากนั้น ไดอะโซมีเธน

จะทำปฏิกิริยา กับ เบสเพียวรีน ซึ่งเป็นเบสในสายของ DNA ทำให้ได้สารประกอบตัวใหม่จึงมีผลทำให้การเกิดกระบวนการ duplication และ replication ผิดปรกติไป ทำให้ได้สายพันธุ์ของแบคทีเรียชนิดใหม่เกิดขึ้น เป็นที่ยอมรับกันว่าการกลายพันธุ์ด้วย NTG จะเอื้ออำนวยให้ได้มิวแตนท์ที่มีความผิดปกติได้ทุกยีน แต่ปัญหาที่สำคัญคือการแยกมิวแตนท์ที่สนใจออกมาจากกลุ่มมิวแตนท์ที่ถูกกลายพันธุ์นั้นได้อย่างไร สำหรับมิวแตนท์ที่มีความผิดปกติที่ยีนที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอไลท์ต่าง ๆ เช่น น้ำตาล กรดอะมิโน วิตามิน นั้นสามารถแยกออกจากกลุ่มอื่น ๆ ได้โดยง่ายด้วยกระบวนการทดสอบความเป็น auxotroph ของมัน กล่าวอีกนัยหนึ่งว่าเพียงการสังเกตความแตกต่างระหว่าง master plate และ replicating plate ที่เสริมและไม่ได้เสริมด้วยเมตาบอไลท์ ที่สนใจนั้นก็จะสามารถแยก auxotroph ที่ต้องการได้กระบวนการแยก auxotroph นี้เป็นกระบวนการที่ไม่ยุ่งยาก ทั้งยังสามารถเพิ่มความถี่ของการแยก auxotroph ด้วยการเพิ่มประสิทธิภาพของการแยกมิวแตนท์ (enrichment) ได้อีกด้วย การ enrichment ที่นิยมใช้ในการแยก auxotroph คือการสร้างสภาวะที่ auxotroph ที่สนใจหยุดการแบ่งตัวในขณะที่มิวแตนท์ตัวอื่น ๆ แบ่งตัวได้ตามปกติ เมื่อเติมยาปฏิชีวนะที่ทำลายผนังเซลล์ ของแบคทีเรียลงในภาวะนั้น มิวแตนท์ตัวอื่น ๆ ที่ไม่ต้องการจึงถูกทำลายเกือบหมด ยาปฏิชีวนะที่ใช้คือ เพนนิซิลิน จี (Gorini และ Kaufman, 1960)

ผลการวิจัยกลายพันธุ์ *P. rettgeri* ATCC 9250 ด้วย NTG และทำการคัดเลือกมิวแตนท์ตามวิธีข้อ 2.14.2 โดยใช้อาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยกลูโคส 0.2 เปอร์เซนต์ ปรากฏว่า ได้มิวแตนท์ 9 ตัว ให้ชื่อว่า SPS (1-9) โดยมิวแตนท์ทั้ง 9 ตัวนี้ มีการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ในระดับสูง และยังสามารถเจริญได้ ในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยกลูโคสเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนเดี่ยวได้

ในการวิจัยได้คัดเอามิวแตนท์ SPS-6 ซึ่งผลการศึกษาการเจริญและผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส พบว่ามีการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ได้สูงที่สุดมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส พบว่า เมื่อปลูกมิวแตนท์ SPS-6 ในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยกลูโคส 0.4 เปอร์เซนต์ จะให้ค่าการเจริญสูงสุด 4.6 หน่วย และ แอคติวิตีสูงสุดของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ประมาณ 397.2 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนสุทธิของเซลล์ จะเห็นได้ว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นกลูโคสเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนเดี่ยวที่เกินกว่า 0.4 เปอร์เซนต์

จะมีการกดดันการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ด้วยกลูโคสได้ แสดงว่ามิวแตนท์ที่ได้ยังไม่ปลอดจากการกดดันการผลิตเอนไซม์อย่างสมบูรณ์ ทั้งนี้อาจจะเป็นผลเนื่องมาจากวิธีการคัดเลือกมิวแตนท์ ใช้กลูโคสเข้มข้นเพียง 0.2 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งต้นคาร์บอนเดียว ดังนั้นถ้าใช้กลูโคสในการคัดเลือกมิวแตนท์สูงกว่า 0.2 เปอร์เซนต์ อาจจะได้มิวแตนท์ที่ปลอดจากการกดดันการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ด้วยกลูโคสที่มีความเข้มข้นสูงกว่านี้ได้

ในการวัดปริมาณของเอนไซม์เบต้า-แลคแตมเมส ของเซลล์มิวแตนท์ SPS-6 และเซลล์ *P. rettgeri* ATCC 9250 WT ในขณะที่มีการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ผลปรากฏว่าไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์เบต้า-แลคแตมเมส เลย เมื่อเทียบกับเซลล์ของ *K. pneumoniae* M5a1 ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Bicknel (1983) โดยพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ *Proteus rettgeri* สามารถผลิตเอนไซม์เบต้า-แลคแตมเมสได้ แต่เอนไซม์นี้จะมีความจำเพาะกับ สับสเตรทคือ เซฟอโลสปอริน (cephalosporin) (Yotsuji และคณะ, 1982; Matsuura และคณะ, 1980) ซึ่งต่างไปจากเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส โดยมีความจำเพาะต่อ เพนนิซิลิน จี (Robak และคณะ, 1981 Daumy และคณะ, 1982 และ 1985)

4.3 <u>เปรียบเทียบสมบัติของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของเซลล์มิวแตนท์ SPS-6 และ *P. rettgeri* ATCC 9250 WT</u>

จากการวิจัยหาช่วงของ พี เอช และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส (optimum pH, temperature) จะเห็นได้ว่าเอนไซม์ของเซลล์มิวแตนท์ SPS-6 และ *P. rettgeri* ATCC 9250 WTจะมีช่วง พี เอช ที่เหมาะสมใกล้เคียงกันคือประมาณช่วง พี เอช 7.0-8.5 Balasingham และ คณะ (1972) พบว่า พี เอช ที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของเซลล์ *E. coli* NCIB 8743A คือ 8.0 ในสายพันธุ์ *E. coli* ATCC 11104 นั้นซึ่งจากรายงานของ Kutzbach และ คณะ (1974) พบว่า พี เอช ที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส คือ 8.1

อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส นั้นจะเห็นได้ว่า

เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของเซลล์มิวแตนท์ SPS-6 สามารถเร่งปฏิกิริยาการไฮโดร เพนนิซิลิน จี ได้ดีที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ซึ่งสูงกว่าเอนไซม์ของเซลล์ *Proteus rettgeri* ATCC 9250 WT ประมาณ 10 องศา โดยอาจเป็นผลเนื่องมาจากการที่ *P. rettgeri* ATCC 9250 WT ถูกกลายพันธุ์ไปนั้น ทำให้คุณสมบัติ DNA ของ *P. rettgeri* ATCC 9250 WT ผิดไปจากเดิม จึงทำให้มีการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ที่มีโครงสร้างต่าง จากเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ *P. rettgeri* ATCC 9250 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ดั้งต้น

ในการศึกษาความเสถียรของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ในช่วง พี เอช ต่าง ๆ ของเซลล์มิวแตนท์ SPS-6 และ *P. rettgeri* ATCC 9250 WT พบว่าเอนไซม์นี้จะมีความเสถียรอยู่ในช่วง พี เอช 7.0-8.0 (เมื่อแช่เซลล์นาน 12 ชั่วโมง) คล้ายคลึงกัน และการวิจัยหาผลกระทบของอุณหภูมิ ต่อความเสถียรของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส พบว่าไม่มีการสูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์นี้เลย ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานถึง 5 ชั่วโมง ด้วยเหตุนี้จึงทำให้แน่ใจได้ว่าในการวัดปริมาณของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส โดยวิธีทดลองข้อ 2.10.2 ซึ่งใช้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จะให้ผลที่ถูกต้องเชื่อถือได้

เมื่อเปรียบเทียบค่าคงที่ทางจลน์ศาสตร์ของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของเซลล์มิวแตนท์ SPS-6 และ *P. rettgeri* ATCC 9250 WT จะเห็นได้ว่าเอนไซม์ของเซลล์มิวแตนท์ SPS-6 จะให้ค่า Km ต่ำกว่าประมาณ 2 เท่า เมื่อเทียบกับค่า Km ของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ เซลล์ *P. rettgeri* ATCC 9250 WT ทั้งนี้อาจจะเป็นไปได้ว่าเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ เซลล์มิวแตนท์ SPS-6 นั้นมีโครงสร้างที่ต่างจากเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ เซลล์ *P. rettgeri* ATCC 9250 WT จึงมีผลทำให้มีการเพิ่มประสิทธิภาพของการจับกันระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรท ได้ดียิ่งขึ้นหรืออาจจะเป็นเพราะว่ามิวแตนท์ SPS-6 สามารถยอมให้เพนนิซิลิน จี ผ่านเข้าไปในเซลล์ได้ง่ายกว่า *P. rettgeri* ATCC 9250 WT ซึ่งจากรายงานของ Morita และ คณะ (1984) พบว่าเมื่อทำการกลายพันธุ์ *E. coli* IFO 13500 ด้วย NTG ได้สายพันธุ์ใหม่ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ได้สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมประมาณ 6 เท่า และพบว่ามิวแตนท์ที่ได้นั้นสามารถยอมให้เพนนิซิลิน จี ผ่านเข้าไปในเซลล์ได้ง่ายกว่า ซึ่งมีผลจากการที่ค่า Km ของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ที่ได้จากเซลล์มิวแตนท์นั้นมีค่าต่ำกว่าเกือบ 4 เท่า

ค่า Ki ของกรดฟีนิลอะซีติก และกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก ของเอนไซม์เพนนิซิลิน

เอซิเลส ในเซลล์มิวแตนท์ SPS-6 จะมีค่าสูงกว่าเอนไซม์ของเซลล์ *P. rettgeri* ATCC 9250 ประมาณ 2 เท่า แสดงให้เห็นว่าการกลายพันธุ์จะช่วยให้ผลกระทบของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ เพนนิซิลิน จี ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ลดลงไปได้ จึงเป็นข้อดีอีกประการหนึ่งที่ประสิทธิภาพของการไฮโรไลซ์เพนนิซิลิน จี ด้วย เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของเซลล์มิวแตนท์ SPS-6 สูงกว่าสายพันธุ์เดิม (*P. rettgeri* ATCC 9250)

จากการศึกษาความเสถียรของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของเซลล์มิวแตนท์ SPS-6 และ *P. rettgeri* ATCC 9250 WT พบว่าทั้ง 2 สายพันธุ์จะมีความเสถียรสูง สามารถเก็บเซลล์ไว้ในสารละลายนอร์มอลซาลีน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส จะลดลงไปเพียง 20 เปอร์เซนต์ เมื่อเก็บเซลล์ไว้นาน 45 วัน

ความสามารถในการคำรงคุณสมบัติของมิวแตนท์ SPS-6 จากผลการวิจัยจะเห็นได้ว่ามิวแตนท์ SPS-6 สามารถที่จะรักษาสภาพของความเป็นมิวแตนท์อยู่ได้ ไม่ว่าจะเก็บเซลล์มิวแตนท์ SPS-6 ไว้ที่อุณหภูมิ-20 องศาเซลเซียส ในสารละลายกลีเซอรอล 50 เปอร์เซนต์ หรือผ่านการถ่ายเชื้อ (subculture) มาหลายครั้งแล้วก็ตาม ย่อมแสดงให้เห็นว่ามิวแตนท์ SPS-6 มีความเสถียรสูง และในขณะเดียวกันยังสามารถผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ได้ในระดับสูงอีกด้วย

<u>สรุปผลการทดลอง</u>

1. สารต้นตอคาร์บอนที่ *P. rettgeri* ATCC 9250 ใช้เจริญเติบโตและสังเคราะห์ เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ได้สูงสุดคือ แอสปาร์เตท ณ ความเข้มข้น 0.8% ที่ 45 ชั่วโมง จะให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส 173 หน่วย ต่อ มิลลิกรัมโปรตีนรวมของเซลล์ โดยให้ค่าการเจริญสูงสุดเท่ากับ 4.5 หน่วย OD_{540}

2. ซิเตรทที่ 0.2% รวมกับกลูโคส 1% เป็นสารต้นตอคาร์บอนคู่ที่ *P. rettgeri* ATCC 9250 ใช้เจริญได้สูงถึง 3.6 หน่วย OD_{540} และให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส สูง 98 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนรวมของเซลล์

3. มิวแตนท์ SPS-6 เป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถใช้กลูโคสเป็นสารต้นตอคาร์บอน ซึ่งแตกต่างจาก *P. rettgeri* ATCC 9250 WT และยังให้การเจริญสูงสุด 4.5 หน่วย OD_{540} ในขณะที่แอคติวิตีของเพนนิซิลน เอซิเลส สูงถึง 397 หน่วยต่อ มิลลิกรัมโปรตีนรวมของเซลล์

4. มิวแตนท์ SPS-6 ที่แยกได้นี้ น่าจะมี double mutation เพราะให้ค่าจลน์ศาสตร์ การทำงานของเอนไซม์ เพนนิซิลิน เอซิเลส ต่างจาก *P. rettgeri* ATCC 9250 WT อีกทั้งยังสามารถใช้กลูโคสเพื่อการเจริญได้อีกด้วย สมมุติฐานดังกล่าวได้รับการสนับสนุนทางอ้อมจากความเสถียรของเอนไซม์ที่ศึกษาได้จากมิวแตนท์ตัวนี้