บทที่ 1

บทนำ

แบคทีเรียดำรงชีพอยู่ในภาวะแวดล้อมหลากหลายชนิดได้ เพราะแบคทีเรียมีผนังเซลล์ ซึ่งเป็นโครงสร้างของเซลล์ที่อยู่นอกสุด ทำหน้าที่ให้ความแข็งแรงและป้องกันเซลล์จากภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ผนังเซลล์ประกอบด้วยโพลิเมอร์ชนิดต่างๆ แต่องค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ของแบคทีเรียทุกชนิด คือ เปปทิโดไกลแคน (Roger, Perkin and Ward, 1980) ซึ่งเป็นเฮเทอโรโพลิเมอร์ (heteropolymer) ระหว่างสายไกลแคนและสายเปปไทด์โดย

สายไกลแคน เกิดจากน้ำตาลอะซิทิเลท 2 ชนิด คือ เอ็น-อะซิทิลกลูโคซามิน (*N*-acetylglucosamine ; Glc*N*AC) และ เอ็น-อะซิทิลมิวรามิค แอซิด (*N*-acetylmuramic acid ; Mur*N*AC) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β 1-4 เรียงสลับกันตลอดสาย ที่หมู่คาร์บอกซิลของ Mur*N*AC บางโมเลกุลบนสายไกลแคน มีสายเปปไทด์เชื่อมต่ออยู่

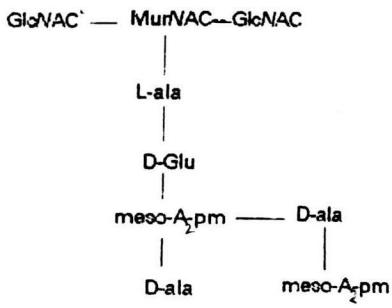
สายเปปไทด์เหล่านี้ ประกอบด้วยกรดอะมิโนอย่างน้อย 4 ชนิด เรียงต่อกัน สายเปปไทด์ที่เชื่อมต่อจากสายไกลแคนต่างสายกันอาจจะเชื่อมต่อกันโดยตรง หรือเชื่อมต่อกันโดยสายโพลิเมอร์ของน้ำตาล หรือสายเปปไทด์อื่น (bridge) (Roger *et.al.*, 1980)

จากการเชื่อมต่อกันของสายเปปไทด์ดังกล่าวนี้ ทำให้เปปทิโดไกลแคนมีลักษณะเป็นร่างแหครอบคลุมพื้นที่ผิวทั้งหมดของเซลล์ และโดยอาศัยลักษณะความแตกต่างของสายเปปไทด์ ตลอดจนการเชื่อมต่อกันระหว่างสายเปปไทด์เหล่านี้ Schleifer และ Kandle (1972) ได้ จัดแบ่งลักษณะของเปปทิโดไกลแคนออกเป็น 2 ลักษณะใหญ่ ๆ ดังตารางต่อไปนี้

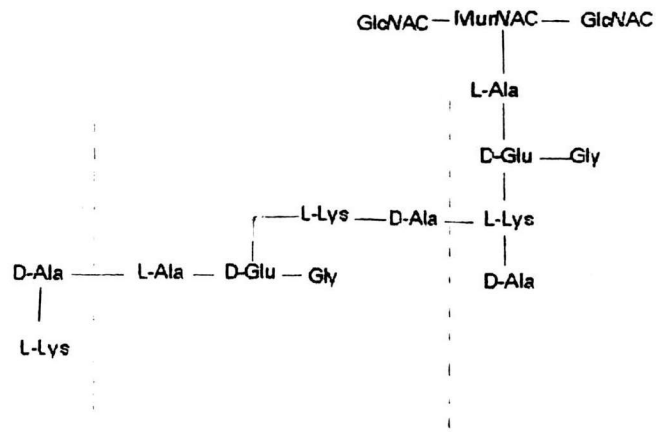
ตารางที่ 1 แสดงการแบ่งลักษณะของเปปทิโดไกลแคน ตามวิธีของ Schleifer และ Kandle (1972)

ตำแหน่งที่เกิดการเชื่อมต่อ (Anchorage point of the cross-linkage)	ชนิดของโพลีเมอร์ที่เชื่อมต่อระหว่างสายเปปไทด์ (Type of intervening bridge)	ชนิดของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 3 (Amino acid at position 3)	ตัวอย่างของแบคทีเรีย
A) กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 3 ของสายเปปไทด์สายที่ 1 และกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 4 ของสายเปปไทด์สายที่ 2	1. ไม่มี bridge	α L-Lysine β L-ornithine γ meso-diaminopimilic acid	*Gaffkya homari* *Spirochaeta stemostrepta* *Escherichia coli , Bacillus megaterium , Bacillus subtilis*
	2. สายเปปไทด์	α L-lysine	*Micrococcus luteus* *Sarcina flava*
	3. ไกลซีนหรือสายโพลิเมอร์ของไกลซีน	α L-lysine β L-ornithine γ L , L-diaminopimilic acid	*S. aureus , Leuconostoc mesenteroid* *Micrococcus radiodurans* *Propionibacterium petersoni* *Streptomyces albus*
	4. กรดอะมิโนชนิดที่มีหมู่คาร์บอกซิล 2 หมู่ เช่น กรดแอสพาติก	α L-lysine β L-ornithine γ meso-diaminopimilic acid δ L-diaminobutyric acid	*Streptococcus faecium , Sporosarcina ureae* *Lactobacillus cellobiosus* *Arthrobacter duodecadis* *Arthrobacter sp. Ar22*
B.) กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 2 ของสายเปปไทด์สายที่ 1 และกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 4 ของสายเปปไทด์สายที่ 2	1. กรดอะมิโนชนิดแอล (L-amino acid)	α L-lysine β L-homoserine γ L-glutamic acid δ L-alanine	*Microbacterium lacticum* *Brevibacterium imperiale* *Arthrobacter J39* *Erysipelothrix rhusiopathiae*
	2. กรดดี-ไดอะมิโน (D-diamino acid)	α L-lysine β L-homoserine γ L-diaminobutyric acid	*Butyribacterium rettgeri* *Corynebacterium poinsettiae* *Corynebacterium insidiosum*

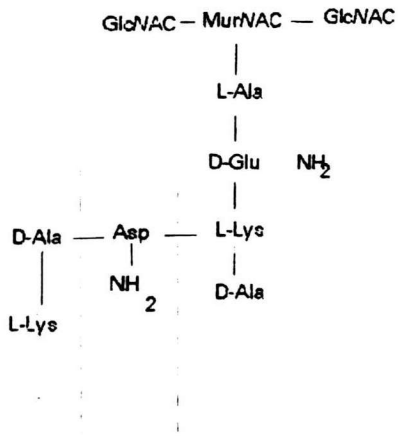
1. *Bacillus subtilis* และ *Escherichia coli*



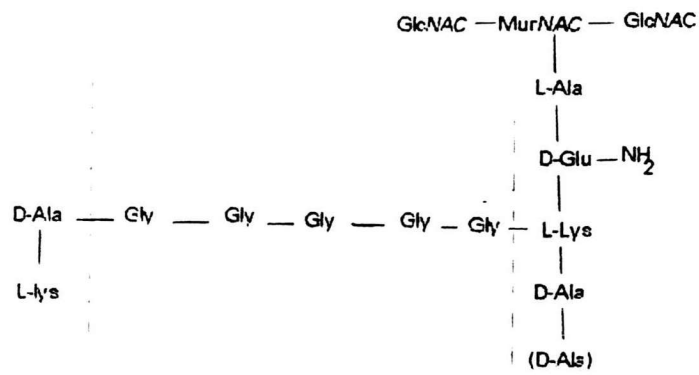
2. *Micrococcus luteus*



3. *Streptococcus faecium*



4. *Staphylococcus aureus*



รูปที่ 1 - 4 แสดงลักษณะโครงสร้างของเปปทิโดไกลแคนที่แตกต่างกันของแบคทีเรียชนิดต่างๆ (Schleifer and Kandle, 1972) สัญลักษณ์ที่ใช้เป็นดังนี้ เอ็น-อะซิทิลกลูโคซามิน (GlcNAC) เอ็น-อะซิทิลมิวรามิค แอซิก (MurNAC) แอล-อะลานิน(L-Ala) ดี-กลูตามิก แอซิด(D-Glu) มีโซ-ไดอะมิโนพิมิลิก แอซิด(meso-A_2 pm) ดี-อะลานิน(D-Ala) ไกลซีน (Gly) แอสปาติก แอซิด(Asp)

ผนังเซลล์ของแบคทีเรียกรัมบวกแตกต่างจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียกรัมลบ กล่าวคือ ชั้นเปปทิโดไกลแคนซึ่งอยู่ถัดออกมาจากเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียกรัมบวกจะหนา ประกอบด้วยร่างแหเปปทิโดไกลแคนหลายชั้นซ้อนกันโดยมีกรดไตโคอิด (teichoic acid) ยึดให้โครงสร้างดังกล่าวคงสภาพอยู่ได้ (Knox and Wicken , 1973) แต่ชั้นเปปทิโดไกลแคนของแบคทีเรียกรัมลบจะบางประกอบด้วยร่างแหเปปทิโดไกลแคนเพียงชั้นเดียว โดยมีเยื่อหุ้มชั้นนอก (outer membrane) ประกอบด้วยสารประกอบลิโปโพลีแซคคาไรด์ และลิโปโปรตีนปกคลุมอยู่ เยื่อหุ้มชั้นนอกนี้มีไขมันเป็นองค์ประกอบสูงถึง 20% ทำหน้าที่ป้องกันเซลล์จากการถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ออโตไลซิน (autolysin) (Moat , 1979)

การสลายตัวของผนังเซลล์โดยเฉพาะอย่างยิ่งการสลายตัวของเปปทิโดไกลแคนเป็นปรากฏการณ์ที่บ่งชี้ถึงการแตกของเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งจะพบได้ในการเจริญของเซลล์ระยะสุดท้ายของวงชีวิต(death phase) ทั้งนี้เป็นผลมาจากการทำงานของเอนไซม์ออโตไลซิน เอนไซม์ออโตไลซิน เป็นกลุ่มของเอนไซม์ประกอบด้วยเอนไซม์ 4 ชนิด

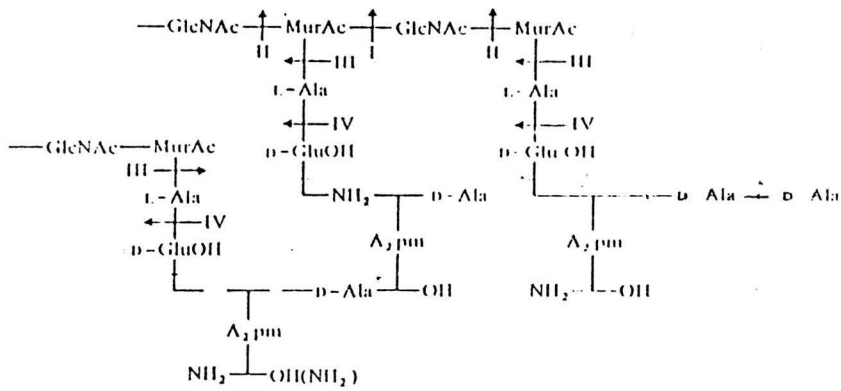
1. Peptidoglycan *N*-acetylmuramoyl-hydrolase (EC.3.2.1.17 ไลโซไซม์ (lysozyme) หรือ muramidase) ย่อยสลายสายไกลแคนที่ตำแหน่งหลังโมเลกุล Mur*N*AC ตรงพันธะ β 1-4 ก่อให้เกิดน้ำตาลรีดิวซ์อิสระของ *N*-acetylmuramic acid ในผลิตภัณฑ์สุดท้าย

2. Endo-β-*N*-acetylglucosaminidase (EC.3.2.1.30) ย่อยสลายสายไกลแคนที่ตำแหน่งหลังโมเลกุล Glc*N*AC ตรงพันธะ β 1-4 ก่อให้เกิดน้ำตาลรีดิวซ์อิสระของ *N*-acetylglucosamine ในผลิตภัณฑ์สุดท้าย

3. *N*-acetylmuramoyl-L-alanine amidase (EC.3.5.1.28) ซึ่งต่อไปจะเรียกว่า NA-L-alanine amidase ย่อยสลายพันธะระหว่างสายไกลแคน และ แอล-อะลานิน ซึ่งเป็นกรดอะมิโนตัวแรกของสายเปปไทด์ที่เชื่อมอยู่

4. เปปทิเดส ย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของสายเปปไทด์

ตำแหน่งการย่อยสลายเปปทิโดไกลแคนโดนเอนไซม์ในกลุ่มออโตไลซินดังแสดงในรูป ที่ 5 แบคทีเรียต่างชนิดกันเอนไซม์ออโตไลซินที่พบจะต่างกัน เช่น *Bacillus subtilis* 168 มี NA-L-alanine amidase และ endo-β-*N*-acetylglucosaminidase โดยมี NA-L-alanine amidase เป็นเอนไซม์ชนิดหลัก (Roger *et.al.*, 1984) *Streptococcus faecium* มี มิวรามิเดส (Carvalho, Goncalves and Silva, 1987) *Streptococcus pneumoniae* มี NA-L-alanine amidase



รูปที่ 5 แสดงตำแหน่งการย่อยสลายเปปทิโดไกลแคนโดยเอนไซม์กลุ่มออโตไลซิน ลูกศรแสดงตำแหน่งการย่อยสลายของเอนไซม์ : (I) ไลโซไซม์ (II) Endo-β-*N*-acetyl-glucosaminidase (III) NA-L-alanine amidase (IV) เปปทิเดส

(Tomasz and Westphal, 1971) *Escherichia coli* มีเอนไซม์ Endo-β-*N*-acetylglucosaminidase (Pelzer, 1963) และสมบัติของเอนไซม์ชนิดเดียวกันของแบคทีเรียต่างชนิดกันจะต่างกัน นอกจากนี้แบคทีเรียชนิดเดียวกันเอนไซม์ออโตไลซินที่พบในช่วงการเจริญต่างกัน ก็แตกต่าง เช่น เซลล์ *Bacillus cereus* ขณะสร้างสปอร์เอนไซม์ออโตไลซินที่พบเป็นชนิด endo-β-*N*-acetylglucosaminidase ซึ่งเอนไซม์ที่พบนี้ไม่สามารถย่อยสลายผนังเซลล์ของเซลล์ปกติได้ เอนไซม์ออโตไลซินส่วนใหญ่พบเกาะอยู่ที่ผนังเซลล์ (Young, 1966; Forsberg and Roger,1971) สามารถสกัดออกมาจากผนังเซลล์ได้ด้วยลิเทียมคลอไรด์เข้มข้น 3 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Brown and Young , 1970) สำหรับเซลล์ที่ปราศจากผนังเซลล์มีรายงานว่าพบเอนไซม์ ออโตไลซินเกาะอยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ (Forsberg and Ward , 1972) สามารถสกัดออกมาจากเยื่อหุ้มเซลล์ได้ด้วยสารซักฟอกไร้ประจุ (nonionic detergent) Forsberg and Ward (1972) จึงได้ตั้งข้อสันนิษฐานว่าเอนไซม์ออโตไลซิน น่าจะเกาะอยู่ที่ผนังเซลล์ด้วยพันธะประจุ (ionic bonding) แต่เกาะที่เยื่อหุ้มเซลล์ด้วยพันธะไร้ประจุ (nonionic bonding) นอกจากการทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกแล้ว สมบัติการย่อยสลายผนังเซลล์ได้ของเอนไซม์ออโตไลซิน ทำให้เอนไซม์ออโตไลซินมีความสำคัญและจำเป็นต่อกระบวนการดำรงชีพของแบคทีเรียหลายกระบวนการ เช่น

1. กระบวนการเจริญเติบโต เอนไซม์ออโตไลซินทำหน้าที่ย่อยสลายเปปทิโด-ไกลแคนเพียงบางช่วง เพื่อทำให้เซลล์สามารถนำเอาองค์ประกอบของเปปทิโดไกลแคนมาแทรกเพิ่มลงไป ทำให้พื้นที่ผิวของผนังเซลล์เพิ่มขยายใหญ่ขึ้นได้ตามการเจริญ (Roger, 1984)มีผลงานวิจัยที่สนับสนุนความคิดข้างต้น กล่าวคืออัตราการเจริญของแบคทีเรีย-สายพันธุ์ที่มีปริมาณเอนไซม์ออโตไลซินลดน้อยลงกว่าของสายพันธุ์ดั้งเดิม (parental strain) เช่น *Streptococcus faecalis* (Cornett and Shockmam , 1978) *Streptococcus pneumoniae* (Lacks , 1976) *Staphylococcus aureus* (Koyama, Yamada and Matsuhashi , 1976) *Bacillus licheniformis* (Forsberg and Rogers, 1974) และ *Bacillus subtlis* (Fein and Roger, 1976) จะลดลงอย่างเห็นได้ชัด เมื่อเทียบกับอัตราการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ดั้งเดิม โดย Fein และ Roger (1976) รายงานว่าอัตราการเจริญของ *Bacillus subtlis* สายพันธุ์กลายพันธุ์ข้างต้นจะสูงขึ้น เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมไลโซไซม์ หรือ เอนไซม์ออโตไลซินที่สกัดได้จากสายพันธุ์ดั้งเดิมลงไป

2.กระบวนการแยกเซลล์ออกจากกันหลังกระบวนการแบ่งเซลล์มีรายงานว่า *Streptococcus* (Pooley *et al.*, 1972) *Staphylococcus* (Koyama , Yamada and Matsuhashi , 1977) และ *Bacillus subtlis* (Tilby, 1978) สายพันธุ์ที่มีเอนไซม์ออโตไลซิน ลดน้อยลงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมเมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการแบ่งเซลล์ เซลล์จะไม่สามารถแยกออกจากกันได้ จึงปรากฏให้เห็นเป็นลักษณะโซ่ของเซลล์ หรือกลุ่มของเซลล์ขนาดใหญ่

3. การเคลื่อนที่ของเซลล์ มีรายงานว่า *Bacillus subtilis* (Fein and Rogers, 1976) และ *Bacillus licheniformis* (Fein , 1979) สายพันธุ์กลายพันธุ์ชนิดที่มีปริมาณเอนไซม์ออโตไลซินลดน้อยลงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม เคลื่อนที่ไม่ได้เพราะไม่สามารถสร้างแฟลกเจลลา (flagella) แต่การทำให้แบคทีเรียสายพันธุ์กลายพันธุ์เหล่านี้กลับมามีเอนไซม์ออโตไลซินในปริมาณเท่ากับสายพันธุ์ดั้งเดิม (reverse mutant) พบว่าเซลล์จะสามารถสร้างแฟลกเจลลาและเคลื่อนที่ได้เช่นเดียวกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (Forberg *et al.*, 1973)

4. สมดุลระหว่างการสังเคราะห์และการย่อยสลายเปปทิโดไกลแคน (cell wall turnover) ผลการตรวจสอบเปปทิโดไกลแคนที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี (Mauck, Chan and Glaser , 1971 ; Boothby *et al.*, 1973 ; Chatterjee , 1976 ; Pooley, 1976a ; Pooley , 1976b) พบว่ามีกระบวนการย่อยสลายและกระบวนการสังเคราะห์เปปทิโดไกลแคนเกิดขึ้นพร้อม ๆ กันตลอดเวลา โดยเซลล์จะนำเอาองค์ประกอบของเปปทิโดไกลแคนที่ถูกย่อยสลายออกไปหมุนเวียนกลับมาใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ *Staphylococcus aureus* (Chatterjee *et al.*, 1976) *Bacillus subtilis* (Pooky , 1976) สายพันธุ์กลายพันธุ์ชนิดที่มีปริมาณเอนไซม์ออโตไลซินลดน้อยลงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม อัตราการเกิดกระบวนการย่อยสลายเปปทิโด-ไกลแคนแล้วนำองค์ประกอบกลับมาสังเคราะห์เปปทิโดไกลแคนขึ้นใหม่แทนที่จะช้ามาก

5. กระบวนการทรานสฟอร์มเมชั่น (transformation) ในบางสภาวะของการเจริญเซลล์จะสามารถนำเอาดีเอ็นเออิสระจากภายนอกเข้าสู่เซลล์ได้ เรียกเซลล์สภาวะนี้ว่าเซลล์คอมพลีแทนซ์ (completent cell) Young และ Spizizen (1963) พบว่าอัตราการเกิดเป็นเซลล์คอมพลีแทนซ์ของ *Bacillus subtilis* สัมพันธ์โดยตรงกับอัตราเร็วของการแตกของเซลล์ (rate of cell autolysis) และสิ่งสกัดจากเซลล์คอมพลีแทนซ์ของ *Bacillus subtilis* ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ออโตไลซินสูงขึ้น(Akrigg and Ayard, 1970) นอกจากนั้นยังไม่พบกระบวนการ ทรานสฟอร์มเมชั่นในแบคทีเรียกรัมบวกที่ปราศจากผนังเซลล์

6. กระบวนการแยกตัวของสปอร์ออกจากเซลล์แม่ (sporulation) และกระบวนการงอกของสปอร์ (spore germination) จากสมมติฐานที่พบว่าสปอร์จะแยกตัวออกจากเซลล์แม่ได้ เปปทิโดไกลแคนของเซลล์แม่ต้องถูกย่อยสลาย และสปอร์จะงอกได้ชั้นคอร์เทก (cortex) ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายเปปทิโดไกลแคน ก็จะต้องถูกย่อยสลายออกไปก่อนเช่นเดียวกัน ทำให้คิดว่าเอนไซม์ออโตไลซินน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการทั้งสองนี้ มีรายงานผลการวิจัยซึ่งสนับสนุนความคิดข้างต้นดังนี้ Warth (1972) รายงานว่าพบเอนไซม์ Endo-β-*N*-acetylglucosaminidase และเอนไซม์ NA-L-alanine amidase ที่เปลือกของสปอร์ (spore intergument) ของ *Bacillus subtilis* Kingan and Ensign (1968) และ Guinand *et al.* (1979) พบเอนไซม์เอนโดเปปทิเดส(endopeptidase) และเอนไซม์ NA-L-alanine amidase ใน *Bacillus thuringiensis* และ *Bacillus sphaericus* ขณะเซลล์สร้างสปอร์ตามลำดับ การใช้สารนิ๊ทรอปซิน (netropsin) ยับยั้งการสร้างสปอร์มีผลทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ออโตไลซินที่พบเหล่านี้ถูกยับยั้งด้วย (Guinand, Vacheton and Michel, 1978) Brow *et al.* (1978) รายงานว่าเอนไซม์ endo-β-*N*-acetylglucosaminidase ที่สกัดได้จากสปอร์ของ *Bacillus cereus* ไม่สามารถย่อยสลายเปปทิโดไกลแคนของเซลล์ปกติ (vegetative cell) ได้ แสดงว่าเอนไซม์ endo-β-*N*-acetylglucosaminidase ที่สกัดจากสปอร์และที่เกาะอยู่ที่ผนังเซลล์ทั่วๆไปมีความแตกต่างกัน การค้นพบนี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Fein และ Roger (1976) กล่าวคือ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลายพันธุ์ชนิดที่มีปริมาณเอนไซม์ออโตไลซินทั้งหมดที่ผนังเซลล์เหลืออยู่เพียงร้อยละ 5 ของเซลล์ดั้งเดิม ยังคงมีกระบวนการหลุดของสปอร์จากเซลล์แม่ และกระบวนการงอกของสปอร์ได้อย่างปกติ

7. กระบวนการแตกของเซลล์ ซึ่งแบ่งออกได้เป็น

7.1 กระบวนการแตกของเซลล์ในระยะสุดท้ายของวงชีวิต (death phase)

7.2 กระบวนการแตกของเซลล์ในระยะการเจริญแบบอัตราก้าวหน้า (exponential phase) ซึ่งจะเกิดขึ้นเมื่อการสังเคราะห์ผนังเซลล์ถูกยับยั้งหรือเมื่อให้เซลล์สัมผัสกับสารลดแรงตึงผิว(surfactant) เซลล์ *Bacillus licheniformis* และ เซลล์ *Bacillus subtilis* จะแตกเมื่อยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ด้วยแวนโคมัยซิน (vancomycin) หรือ ดี-ไซโคล-เซอริน (D-cycloserine) (Roger and Forsberg , 1971) เซลล์ *Escherichia coli* (Jaretz *et al.*, 1951 ; Guinand *et al.*, 1979) เซลล์ *Bacillus subtilis* (Roger and Forberg , 1971) และเซลล์ *Streptococcus faecalis* (Shockman, Pooky and Thompson, 1967) จะแตกเมื่อยับยั้ง

การสังเคราะห์ผนังเซลล์ด้วยเพนนิซิลิน (pennicillin) เซลล์ *Streptococcus pneumoniae* จะแตกเมื่อสัมผัสกับ ดีออกซีโคเลต (deoxycholate) (Dubos, 1937) เซลล์ *Streptococcus faecalis* จะแตกเมื่อสัมผัสกับโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate) หรือ ไตรตอน เอกซ์ 100 (triton x-100) (Cornett and Shockman , 1978) เซลล์ *Bacillus subtilis* 168 จะแตกเมื่อสัมผัสกับเพามิทิลไตรเมธิลแอมโมเนียม ไอโอไดด์ (palmityltrimethylammonium iodide) หรือ ไตรตอน เอกซ์ 100 (Tsuchido *et al.*, 1990) ซึ่งกระบวนการแตกของเซลล์โดยวิธีเหล่านี้อาจยับยั้งได้ด้วยการเติมสารยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน เช่น คลอแรมเฟนิคอล (chloramphenical) (Roger and Forsberg , 1971 ; Cornett and Shockman 1978 ; Tsuchido *et. al.*, 1990) หรือโดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ออโตไลซินโดยการใช้ความร้อนหรือด้วยการบ่มเซลล์ไว้ที่ภาวะที่มีค่า pH ไม่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ออโตไลซิน (Dubos,1973) ก่อนทำการยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ หรือก่อนที่จะให้เซลล์สัมผัสกับสารลดแรงตึงผิว จากผลการทดสอบกับแบคทีเรียสายพันธุ์กลายพันธุ์ชนิดที่ปราศจากเอนไซม์ออโตไลซิน ดังต่อไปนี้คือ *Bacillus licheniformis* ซึ่งพบว่าเซลล์ไม่แตกเมื่อยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ด้วย แวนโคมัยซิน หรือ ดี-ไซโคลเซอริน (Browder *et.al.*, 1965) *Diplococcus pneumoniae* เซลล์ไม่แตกเมื่อยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ด้วย เพนนิซิลิน (Tomasz and Waks , 1975) *Bacillus subtilis* เซลล์ไม่แตกเมื่อสัมผัสกับเพามิทิลไตรเมธิล-แอมโมเนียม ไอโอไดด์ หรือ ไตรตอน เอกซ์ 100 (Tsuchido *et al.*, 1990) แต่การยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ของ *Diplococcus pneumoniae* สายพันธุ์กลายพันธุ์ชนิดที่ปราศจากเอนไซม์ออโตไลซิน ด้วยเพนนิซิลิน ร่วมกับการเติมเอนไซม์ออโตไลซินซึ่งสกัดจากสายพันธุ์ดั้งเดิมมีผลสามารถทำให้เซลล์แตก (Tamasz and Waks , 1975) จึงสันนิษฐานว่าการที่สารมีฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์และสารลดแรงตึงผิวสามารถทำให้เซลล์แตกได้นั้น เกิดจากการมีผลกระตุ้นให้เอนไซม์ออโตไลซินเริ่มกระบวนการย่อยสลายผนังเซลล์

Tomasz และ Westphal (1971) รายงานว่า *Streptococcus pneumoniae* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมเอธานอลเอมีน (ethanolamine) แทนโคลิน (choline) นั้น เซลล์จะสร้างเอนไซม์ NA-L-alanine amidase ขนาดน้ำหนักโมเลกุล 36 กิโลดาลตัน ซึ่งไม่สามารถย่อยสลายผนังเซลล์ แต่เมื่อนำเอนไซม์นี้มาบ่มกับผนังเซลล์ซึ่งมีโคลินเป็นองค์ประกอบ หรือนำมาบ่มกับโคลินที่ความเข้มข้นสูงๆ จะมีผลทำให้ขนาดน้ำหนักโมเลกุล

ของเอนไซม์ NA-L-alanine amidase เพิ่มขึ้นจาก 36 กิโลดาลตัน กลายเป็น 500 กิโลดาลตัน ซึ่งเอนไซม์ที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุล 500 กิโลดาลตันนี้สามารถย่อยสลายผนังเซลล์ได้

Sayare และคณะ (1972) ศึกษาสารหลายชนิดซึ่งยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอและโปรตีน พบว่าเฉพาะสารยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนเท่านั้น ที่สามารถป้องกันไม่ให้เซลล์ *Streptococcus faecalis* ที่เขวนลอยอยู่ในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตแตก และเนื่องด้วยกระบวนการยับยั้งการแตกของเซลล์โดยสารยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนเกิดขึ้นรวดเร็วมาก Sayare และคณะ (1972) จึงสรุปว่าสารยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนน่าจะมีผลทำให้เอนไซม์ออโตไลซิน ซึ่งมีอยู่แล้วภายในเซลล์ในสภาพที่ไม่สามารถย่อยสลายผนังเซลล์ (inactive form) กลายสภาพมาเป็นสภาพที่สามารถย่อยสลายผนังเซลล์ได้ (active form) มิใช่มีผลต่อการยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ออโตไลซินโดยตรง ซึ่งข้อสรุปนี้สนับสนุนผลการทดลองของ Tomasz และ Westphal (1971) เกี่ยวกับการมีเอนไซม์ออโตไลซินในเซลล์ 2 รูปแบบ คือ รูปแบบที่สามารถย่อยสลายผนังเซลล์ และรูปแบบที่ไม่สามารถย่อยสลายผนังเซลล์

จากการที่เอนไซม์ออโตไลซิน สามารถย่อยสลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียแล้วทำให้เซลล์แตก แต่ในขณะเดียวกันสมบัติของเอนไซม์ออโตไลซิน ที่สามารถย่อยสลายผนังเซลล์ได้นี้ก็ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในกระบวนการหลายชนิดที่สำคัญของแบคทีเรียดังได้กล่าวมาแล้วข้างต้น ฉะนั้นการควบคุมให้กิจกรรมของเอนไซม์ออโตไลซินให้เกิดขึ้นในระดับที่พอเหมาะจึงเป็นสิ่งที่สำคัญและจำเป็นอย่างยิ่ง Svarachorn และคณะ (1989) รายงานว่ากระบวนการกระตุ้นให้เอนไซม์ NA-L-alanine amidase ของ *Bacillus subtilis* 168 ในระยะการเจริญแบบอัตราก้าวหน้าทำงานได้นั้นต้องประกอบด้วย 2 กระบวนการ กระบวนการแรก คือ การยับยั้งการสังเคราะห์พลังงาน (energy metabolism) หรือการรบกวนโครงสร้างของผิวเซลล์ กระบวนการที่สองคือ โมโนวาเลนท์ แคตอิออน (monovalent cation) ที่ความเข้มข้นสูงทำหน้าที่กระตุ้นให้เอนไซม์ NA-L-alanine amidase สภาพที่ไม่สามารถทำงานได้กลายมาเป็นสภาพที่สามารถทำงานได้ แต่เนื่องด้วยเซลล์ *Bacillus subtilis* 168 สามารถเจริญและเซลล์ไม่แตกในอาหารเลี้ยงเชื้อ spizizen salt ทั้ง ๆ ที่ในอาหารเลี้ยงเชื้อนี้มี โมโนวาเลนซ์ แคตอิออน คือ โปแตสเซียม อิออน ในปริมาณความเข้มข้นสูงกว่า 100 มิลลิโมลาร์ Svarachorn และคณะ (1989) จึงได้ทำการศึกษาการเกิดกระบวนการ

แตกของเซลล์ภายใต้สภาวะที่มีสารอาหารจำกัด และสรุปผลว่าเซลล์จะแตกหากกระบวนการสังเคราะห์ผนังเซลล์ถูกยับยั้งในขณะที่เซลล์ยังคงมีกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน

ไลโซไซม์เป็นเอนไซม์ในกลุ่มออโตไลซิน ที่พบได้ทั่วๆไปในของเหลวในร่างกายมนุษย์ เช่น น้ำตา น้ำลาย น้ำนม ของเหลวในสายรก (Mosky , 1982 ; Muzaki *et al.*, 1983;) พบปริมาณมากในไข่ขาวของไก่ (Jolles and Jolles, 1984) และนอกจากนี้ยังพบในจุลินทรีย์บางชนิดเช่น *Chalaropsis* sp.(Fouche and Hash, 1978) *Streptomyces erythraeus* (Morita, Hara and Matsuchima, 1978) เนื่องจากไลโซไซม์ย่อยสลายสายไกลแคน ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่พบในเปปทิโดไกลแคนของแบคทีเรียทุกชนิด Nakazawa และคณะ (1965) ได้ทดลองนำไลโซไซม์ซึ่งสกัดจากไข่ขาวของไก่ มาทดสอบศักยภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย โดยการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของไลโซไซม์ที่เชื้อแบคทีเรียทดสอบไม่สามารถเจริญได้ (minimum inhibitory concentration) ผลการศึกษาพบว่าไลโซไซม์สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียกรัมบวกได้ดีกว่ากรัมลบ โดยใช้ได้ผลดีที่สุดกับ *Bacillus subtilis* pH ที่เหมาะสมที่สุดในการฆ่าเชื้อ *Bacillus subtilis* คือ 6.0 ผลการศึกษาค่าความต้านทานต่อไลโซไซม์ของ *Bacillus subtilis* ซึ่งเพาะเลี้ยงไว้เป็นระยะเวลาต่อเนื่องกัน 15 วงชีวิต พบว่าค่าความต้านทานจะค่อย ๆ สูงขึ้นในช่วง 3 วงชีวิตแรก หลังจากนั้นจะคงที่ ผลการศึกษาประสิทธิภาพของการใช้ไลโซไซม์เมื่อใช้ร่วมกับสารปฏิชีวนะต่อการฆ่าเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดทั้งแบคทีเรียกรัมบวก และแบคทีเรียกรัมลบ พบว่าการฆ่าเชื้อ *Staphylococcus aureus* มีการเสริมฤทธิ์กันระหว่างไลโซไซม์ และสารปฏิชีวนะดังต่อไปนี้ เพนนิซิลิน จี เตตราซัยคลิน คลอแรมเฟนิคอล สเตพโตมัยซิน Wagabayashi และคณะ (1970) รายงานว่าการใช้ไลโซไซม์ ร่วมกับการรักษาหลังการผ่าตัดมีผลทำให้อัตราการติดเชื้อของผู้ป่วยลดลง และในปีเดียวกัน Miyao และ Ozaki ก็รายงานว่าทารกที่ดื่มน้ำนมที่ผสมไลโซไซม์มีอัตราการติดเชื้อลดลง

Jolles และ Jolles (1984) ได้รายงานถึงการนำไลโซไซม์จากไข่ขาวของไก่มาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ โดยใช้ไลโซไซม์เพียงอย่างเดียวหรือใช้ร่วมกับสารปฏิชีวนะ เช่น เตตราซัยคลิน เบซิตราซิน (bacitracin) ในการรักษาการอักเสบเนื่องจากการติดเชื้อแบคทีเรีย หรือไวรัส

จากสมบัติของไลโซไซม์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียกอรปกับเมื่อ Palmiter (1972) ได้รายงานว่ารังไข่ของไก่จะผลิตไข่ชนิดที่มีไลโซไซม์อยู่ในไข่ขาวมากหรือน้อยนั้น อยู่ภายใต้

การควบคุมของฮอร์โมนสเตียร์รอยด์ ความพยายามในการนำเทคนิคพันธุวิศวกรรมมาใช้เพื่อการผลิตไลโซไซม์ในปริมาณมากจึงเริ่มขึ้น Sippel และคณะ (1978) สกัด mRNA ของไลโซไซม์จากท่อรังไข่ของไก่ นำมาเป็นแม่แบบในการสังเคราะห์คอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอ (cDNA) โคลนคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้เข้าสู่พลาสมิดพาหะ pBR 322 ทรานสฟอร์มเข้าสู่ *Escherichia coli* K12 คัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์โดยใช้คอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอที่เป็นรหัสของไลโซไซม์เป็นตัวติดตาม ได้ชิ้นดีเอนเอ 555 เบส ลำดับกรดอะมิโนจากลำดับเบสที่วิเคราะห์ได้ พบว่าลำดับกรดอะมิโนที่ทำนายได้เป็นส่วนหนึ่งของลำดับกรดอะมิโนของไลโซไซม์ของไข่ขาวของไก่ตามที่ Canfield (1963) ได้รายงานไว้ Baldacci และคณะ (1979) นำดีเอ็นเอของเม็ดเลือดแดง (erythorocyte) ของไก่มาตัดบางส่วนด้วยเอนไซม์ เรสทริกชัน *Hae* III และ *Alu* I โคลนเข้าสู่เฟสพาหะ λ Charon XA โดยใช้ชิ้นดีเอ็นเอเชื่อม (linker) ชนิด *EcoR* I เพิ่มปริมาณรีคอมบิแนนท์เฟสใน *Escherichia coli* ตรวจหารีคอมบิแนนท์เฟสที่ต้องการโดยใช้คอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอของไลโซไซม์ของไข่ขาวของไก่ขนาด 470 เบส เป็นตัวติดตาม สามารถโคลนยีนที่เป็นรหัสของไลโซไซม์ของไข่ขาวของไก่ที่ครบสมบูรณ์ขนาดยาว 3.9 กิโลเบส Oberto และ Davison (1985) ประสบความสำเร็จในการทำให้ยีนที่เป็นรหัสของไลโซไซม์ของไข่ขาวของไก่ แสดงออกใน *Saccharomyces cerevisiae* ภายใต้ยีนบงการ (promoter) ของเอนไซม์ เบทา-กาแลคโตซิเดส (β-galatosidase) ของยีสต์ ปริมาณไลโซไซม์ที่ผลิตได้คิดเป็นร้อยละ 1.5 ของปริมาณโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ที่ขับออกจากเซลล์ ตรวจพบไลโซไซม์ได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ แสดงว่ากระบวนการควบคุมการหลั่งของโปรตีนออกสู่ภายนอกเซลล์ของยีสต์สามารถแปลรหัสยีนส่วนต้น (signal sequence) ของยีนที่เป็นรหัสของไลโซไซม์ของไข่ขาวของไก่ จึงทำให้ไลโซไซม์สามารถผ่านผนังเซลล์ของยีสต์ออกสู่ภายนอกได้

เมื่อเปรียบเทียบไลโซไซม์ที่สกัดได้จากน้ำนมและน้ำในสายรกของคนกับไลโซไซม์ที่สกัดได้จากไข่ขาวของไก่ ในการนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านการแพทย์ พบว่าไลโซไซม์ที่สกัดได้จากของเหลวในร่างกายคนดีกว่า ทั้งนี้เพราะปฏิกริยาต้านทานของร่างกายคนต่อไลโซไซม์ของคนจะต่ำกว่า จึงมีศักยภาพในการนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์มากกว่าไลโซไซม์จากไข่ขาวของไก่ จึงได้มีความพยายามที่จะนำเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมศาสตร์มาใช้ผลิตไลโซไซม์ของคนในปริมาณมาก ๆ Muraki และคณะ (1985) โคลนยีนที่เป็นรหัสของไลโซไซม์ของคนที่สังเคราะห์ขึ้น เข้าสู่พลามิดพาหะ pMY 12-6 ที่

ตำแหน่งเรสทริกชัน *BamH* I เรียกพลามิดที่ได้ว่า pPLHLY-1 ทรานสฟอร์มเข้าสู่ *Escherichia coli* เลี้ยงทรานสฟอร์มแมนท์ที่ได้ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นำมาทำให้เซลล์แตก ตรวจพบโปรตีนขนาด 14.7 กิโลดาลตันที่กากเซลล์ (cell debris) แต่ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ไลโซไซม์ การตรวจพิสูจน์ทางอิมมิวโนวิทยาและโดยการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนด้านเอ็นของไลโซไซม์บริสุทธิ์ของคนกับของโปรตีนขนาด 14.7 กิโลดาลตันนี้ ยืนยันได้ว่าโปรตีนนี้คือไลโซไซม์ของคนจริง แสดงว่าไลโซไซม์ของคนที่ผลิตได้โดยวิธีนี้ไม่สามารถทำงานได้ Yoshimura และคณะ (1987) เชื่อมยีนสังเคราะห์ที่เป็นรหัสไลโซไซม์ของคน เข้ากับยีนที่ทำหน้าที่นำเอนไซม์อะมายเลสของ *Bacillus* ออกสู่ภายนอกเซลล์ แล้วเชื่อมต่อกับพลาสมิดที่มียีนบงการชนิดแลมด้า ผลการทำ Western blot ตรวจพบไลโซไซม์ของคนในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์และเฉพาะ Western blot ในสภาพรีดิวซ์เท่านั้น ไลโซไซม์ของคนที่พบในอาหารเลี้ยงเชื้อจะอยู่ที่ตำแหน่งเดียวกันกับไลโซไซม์เปรียบเทียบ ทำให้สันนิษฐานได้ว่าการที่ไลโซไซม์ของคนไม่สามารถแสดงกิจกรรมของเอนไซม์น่าจะเนื่องมาจากความผิดปกติของการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide) ในโมเลกุล Jigami และคณะ (1986) จึงนำยีนสังเคราะห์ที่เป็นรหัสของไลโซไซม์ของคน มาเชื่อมกับยีนสังเคราะห์ที่นำไลโซไซม์ของไข่ขาวของไก่ออกจากเซลล์ *Saccharomyces cerevisiae* โดยอาศัยรหัสกรดอะมิโนที่ยีสต์มักจะใช้เป็นส่วนใหญ่ (codon bias) แล้วเชื่อมเข้ากับพลาสมิดพาหะ YEp-HLYSIG ทรานสฟอร์มเข้าสู่ *Saccharomyces cerevisiae* ทรานสฟอร์มแมนท์ที่ได้สามารถสังเคราะห์ไลโซไซม์ของคนขนาด 14.7 กิโลดาลตัน ขับออกจากเซลล์สู่ช่องว่างเพอริพลาสมิด (periplasmid space) และออกสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อนำไลโซไซม์ของคนในอาหารเลี้ยงเชื้อมาทำให้บริสุทธิ์ด้วย HPLC สามารถเก็บเกี่ยวผลได้ร้อยละ 69 โปรตีนที่ได้มีค่ากิจกรรมจำเพาะ (specific activity) เท่ากับ 8,000 หน่วยเอนไซม์ต่อมิลลิกรัมโปรตีน ผลการหาลำดับกรดอะมิโนปลายด้านเอ็น ไม่พบส่วนของโปรตีนที่ทำหน้าที่นำไลโซไซม์ออกสู่อาหารเลี้ยงเชื้อติดอยู่ แสดงว่า *Saccharomyces cerevisiae* มีกระบวนการในการกำจัดโปรตีนดังกล่าวออก ต่อมา Castanon และคณะ (1988) ก็ประสบความสำเร็จในการโคลนยีนที่เป็นรหัสของไลโซไซม์ของคนจากเซลล์ลิมโฟมา (Lymphoma) และสายรก โดยการสร้างธนาการยีนชนิดคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอ แล้วใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์สังเคราะห์ขนาด 17 เบสเป็นตัวติดตาม เชื่อมต่อชิ้นยีนที่ติดตามได้เข้ากับ α-factor leader ทรานสฟอร์มเข้าสู่

Saccharomyces cerevisiae ทรานสฟอร์มแมนท์ที่ได้ขับไลโซไซม์ของคนที่สามารถแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ออกสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ

ผนังเซลล์ของแบคทีเรียโดยทั่วไป กรดอะมิโนตัวแรกของสายเปปไทด์ ซึ่งเชื่อมต่ออยู่กับหมู่คาร์บอกซิลของ MurNAC บนสายไกลแคนคือ แอล-อะลานิน ดังนั้นเอนไซม์ NA-L-alanine amidase จึงน่าจะมีศักยภาพในการใช้เป็นสารฆ่าเชื้อแบคทีเรียโดยการทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกได้เช่นเดียวกับไลโซไซม์ และจากการที่เอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียตรงตำแหน่งที่ต่างจากไลโซไซม์ การใช้เอนไซม์ NA-L-alanine amidase และไลโซไซม์ร่วมกันอาจจะมีการเสริมฤทธิ์กัน เอนไซม์ NA-L-alanine amidase นี้สามารถพบได้ในแบคทีเรียหลายชนิดเช่น *Staphylococcus aureus* (Gilpin, Chatterjee and Young ,1972 ; Singer, Wisc and Park, 1972) , *Streptococcus pneumoniae* (Tomaz and Wake, 1972) , *Escherichia coli* และ *Bacillus* sp. (Roger *et. al.*, 1980) และ *Bacillus subtilis* 168 (Spizizen, 1958) เอนไซม์ NA-L-alanine amidase เป็นเอนไซม์ออโตไลซินชนิดหลักของ *Bacillus subtilis* 168 Herbold และ Glaser (1975) รายงานกรรมวิธีการทำให้เอนไซม์ NA-L-alanine amidase ของ *Bacillus subtilis* 168 บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตรกราฟฟีชนิด ไฮดรอกซีอะปาไทท์ (Hydroxyapatite) ชะด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต pH 7.5 เข้มข้น 0.1-0.5 โมลาร์ที่มีโปแตสเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.2 โมลาร์ และคอลัมน์ชนิด Bio-GelA ชะด้วยสารละลายลิเทียมคลอไรด์เข้มข้น 3 โมลาร์ในสารละลายบัฟเฟอร์ทริส ไฮโดรคลอไรด์ pH 8.0 เข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่มีแมกนีเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.01 โมลาร์และเอธทิลีนไดอะมีน เตตราอะซิติกแอซิด (EDTA) เข้มข้น 0.01 โมลาร์ (สารละลาย เอ) แล้วทำการไดอะไลซิส (dialysis) ในสารละลายลิเทียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ในสารละลายบัฟเฟอร์ เอ เอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุล 51 กิโลดาลตัน และพบโปรตีนน้ำหนักโมเลกุล 80 กิโลดาลตัน ซึ่งหากอยู่ร่วมกับเอนไซม์ NA-L-alanine amidase ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 โดยโมลแล้วจะทำให้กิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้น 3 เท่า เรียกโปรตีนนี้ว่าโปรตีนโมดิฟายเออร์ (modifier protein) pH ที่เหมาะสมที่สุดต่อกิจกรรมของเอนไซม์คือ 9.5

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์ NA-L-alanine amidase ของ *Bacillus subtilis* 168 ต่อการฆ่าเชื้อแบคทีเรียทั้งกรัมบวกและกรัมลบ ซึ่งมีลักษณะโครงสร้างของผนังเซลล์แตกต่างกัน และทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของเอนไซม์นี้เมื่อใช้ร่วมกับไลโซไซม์จากไข่ขาวของไก่

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัยนี้

ทราบถึงศักยภาพการนำเอนไซม์ NA-L-alanine amidase ของ *Bacillus subtilis* 168 มาใช้เพื่อการฆ่าเชื้อแบคทีเรียเช่นเดียวกับไลโซไซม์ได้หรือไม่ ตลอดจนทราบผลของการนำเอนไซม์ทั้งสองนี้มาใช้ร่วมกันในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย

ขั้นตอนการดำเนินงาน

1. เตรียมเอนไซม์ NA-L-alanine amidase จาก *Bacillus subtilis* 168 ที่บริสุทธิ์
2. ทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่เตรียมได้จากข้อ 1. ประสิทธิภาพของไลโซไซม์ และของเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้เมื่อใช้ร่วมกันในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียทั้งกรัมบวกและกรัมลบ ซึ่งมีโครงสร้างของผนังเซลล์แตกต่างกัน