หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญของกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก

ในปัจจุบันพบว่าประสิทธิภาพของการรักษาโรคโดยใช้ยาปฏิชีวนะจำพวก เพนนิซิลิน (เพนนิซิลิน จี, เพนนิซิลิน วี) เริ่มลดลง เพราะปัญหาการต้านยาของจุลชีพ ดังนั้นความต้องการยาปฏิชีวนะชนิดใหม่ซึ่งมีประสิทธิภาพในการรักษาสูงกว่าเพนนิซิลิน จี และ เพนนิซิลิน วี จึงสูงขึ้นตลอดเวลา ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่มีการนำเข้าของยาปฏิชีวนะในมูลค่าสูงขึ้นทุกปี เช่นในปี ค.ศ. 1983 มีการนำเข้าของยาปฏิชีวนะมูลค่าสูงถึง 1,042 ล้านบาท ในจำนวนนี้เป็นยาเพนนิซิลิน และ อนุพันธ์ประมาณ 135 ล้านบาท (Annual Report on Foreign Trade Statistics of Thiland, 1981)

กระบวนการผลิตยาเพนนิซิลินในอุตสาหกรรมสามารถทำได้ 2 วิธี ได้แก่วิธีสังเคราะห์ทางเคมี (Chemical synthesis) และวิธีกึ่งสังเคราะห์ (semisynthesis) ซึ่งในการผลิตทั้ง 2 กระบวนการนี้จะต้องผ่านขั้นตอนที่สำคัญร่วมกันคือ การสังเคราะห์กรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก (Carrington, 1971; Carleysmith และ คณะ, 1980; Vandamme, 1983) จากสารเริ่มต้นเพนนิซิลิน จี หรือ เพนนิซิลิน วี เสียก่อน

สูตรโครงสร้างของยากลุ่มเพนนิซิลิน ประกอบด้วยส่วนที่สำคัญ 2 ส่วนคือ ส่วนที่เป็นนิวเคลียสเรียกว่า กรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก (6-Aminopenicilanic Acid, 6-APA) และส่วนที่เป็นกลุ่มข้างเคียง (side chain group)และหมู่ข้างเคียงนี้เองที่ทำให้ยาปฏิชีวนะกลุ่มเพนนิซิลินแสดงฤทธิ์ต่อต้านจุลชีพได้แตกต่างกันออกไป (Vandamme, 1983) ดังนั้นหากต้องการสังเคราะห์อนุพันธ์ของเพนนิซิลินขึ้นมาใหม่ เพื่อวัตถุประสงค์ในการเพิ่มประสิทธิภาพการรักษาของตัวยาในกลุ่มนี้ แล้วอาจทำได้ง่าย ๆ โดยการแปรเปลี่ยนโครงสร้างของหมู่ข้างเคียงแต่ยังคงใช้ 6-APA เป็นนิวเคลียสตั้งต้น (Self และ Lilly, 1969; Carrington, 1971; Vandamme, 1980; Daumy และ คณะ,1985) อาจเรียกกลุ่มของยาชนิดใหม่นี้ว่า อนุพันธ์เพนนิซิลิน เช่น Aminobenzylpenicillin (Ampicillin), α-phenoxyethyl penicillin (Phenethicillin), 5-methyl-3-phenyl-4-isoxazollyl penicillin (Oxacillin),

Dimethoxyphenyl penicillin (Methicillin) (Vandamme และ Voets, 1974; Vandamme, 1980) เป็นต้น (รูปที่ 1)

1.2 การผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลิน

ในระยะเริ่มแรกของการผลิตยากลุ่มอนุพันธ์เพนนิซิลิน พบว่าแหล่งของกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก ได้จากวิธีการหมักโดยตรงจากเชื้อราหลายชนิด เช่น *Penicillium chrysogenum* Q_{176} (Kato, 1953; Ballia และคณะ, 1959; Batchelor และคณะ , 1959) และวิธีทางเคมี ซึ่งทั้ง 2 วิธีนี้มีข้อเสียคือ ผลผลิตต่ำ และวิธีในการแยกกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกยุ่งยากซับซ้อน (Carrington, 1971)

ปัจจุบันอุตสาหกรรมการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก สามารถทำได้ 2 วิธี (Poulson, 1984)

1.2.1 วิธีทางเคมี (Chemical method)

กระบวนการนี้ใช้เพนนิซิลิน จี หรือ วี เป็นวัตถุดิบตั้งต้น (รูปที่ 2) ประกอบด้วยปฏิกิริยาหลายขั้นตอน วิธีการควบคุมปฏิกิริยายุ่งยากและซับซ้อน เช่น ต้องใช้สารละลายอินทรีย์ช่วยให้เกิดปฏิกิริยา อุณหภูมิที่ใช้ต้องควบคุมให้อยู่ในระดับต่ำมาก (-40 องศาเซลเซียส) และปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นได้ต้องปราศจากน้ำโดยเด็ดขาด จึงจำเป็นต้องใช้พลังงานและต้นทุนการผลิตสูง

1.2.2 วิธีทางชีวภาพ (Biological method)

โดยอาศัยความสามารถของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ในการไฮโดรไลซ์เพนนิซิลิน จี หรือ วี ไปเป็นกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก ดังแสดงในรูปที่ 3 จะเห็นได้ว่ากระบวนการผลิต และขั้นตอนจะลดลงเหลือเพียงขั้นตอนเดียวจึงทำให้การผลิตวิธีนี้ง่ายและถูกกว่ากระบวนการผลิตทางเคมี รวมทั้งผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความบริสุทธิ์มากกว่าอีกด้วย (Aharonowitze, 1981)

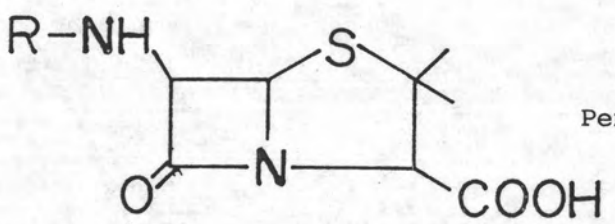
ดังนั้นแนวโน้มของอุตสาหกรรมการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก ในปัจจุบันจึงหันความนิยมมาสู่วิธีทางชีวภาพเป็นต้น

1.3 เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส (Penicillin Acylase , EC 3.5.1.11)

1.3.1 การค้นพบและการเรียกชื่อ

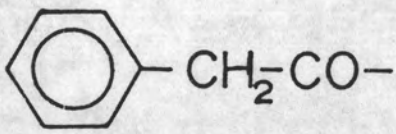
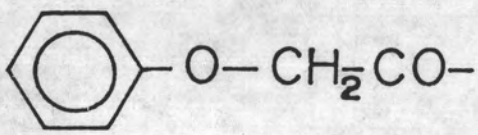
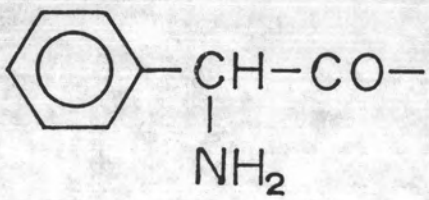
ในปี ค.ศ. 1953 Sakaguchi และ Murao พบว่า *Penicillium*

<u>รูปที่ 1</u> สูตรโครงสร้างของเพนนิซิลินและตัวอย่างหมู่ข้างเคียงชนิดต่าง ๆ (Vandamme, 1980)



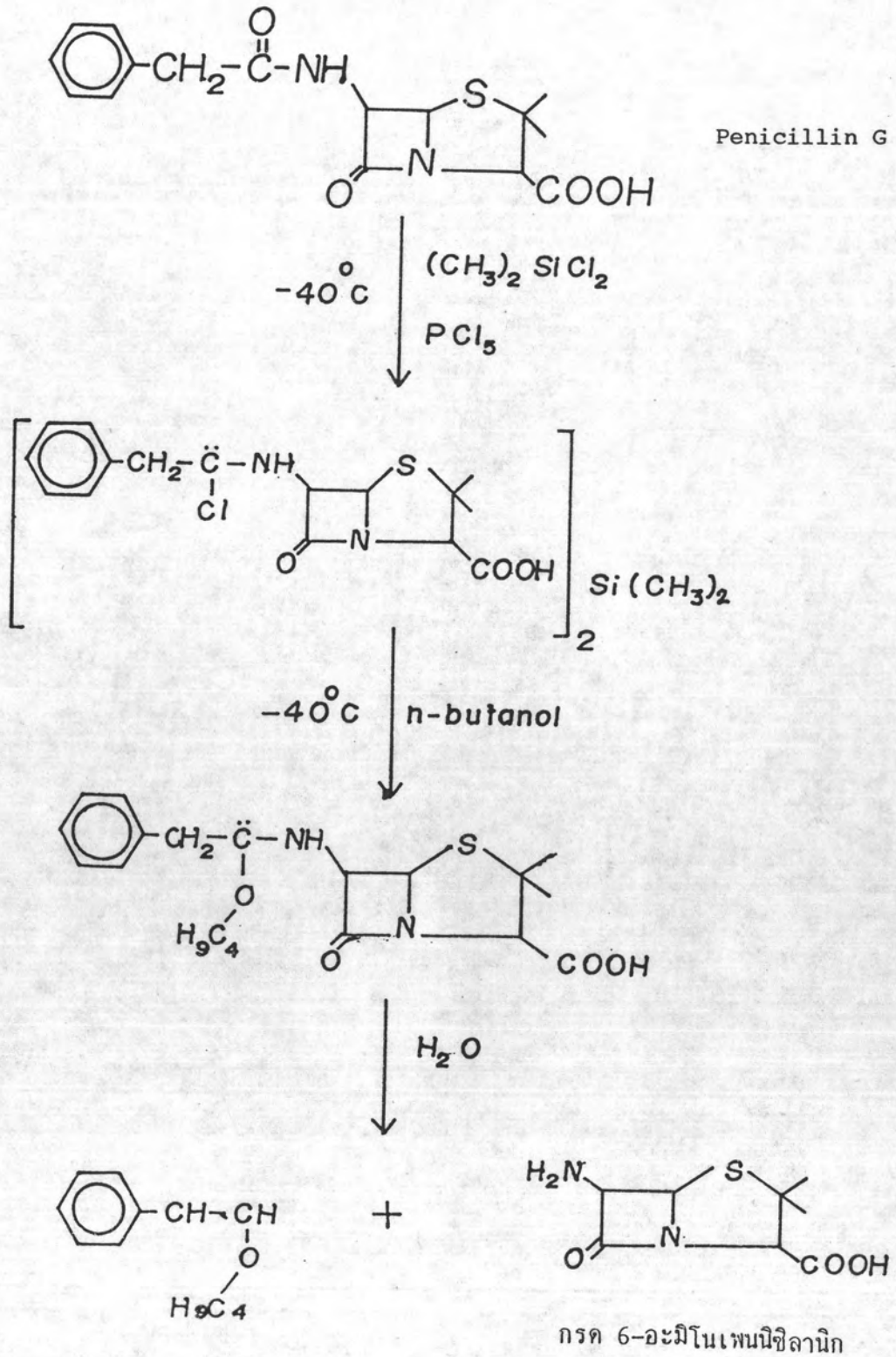
Penicillin

หมู่ข้างเคียง (side chain) กรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก (6-aminopenicillanic acid)

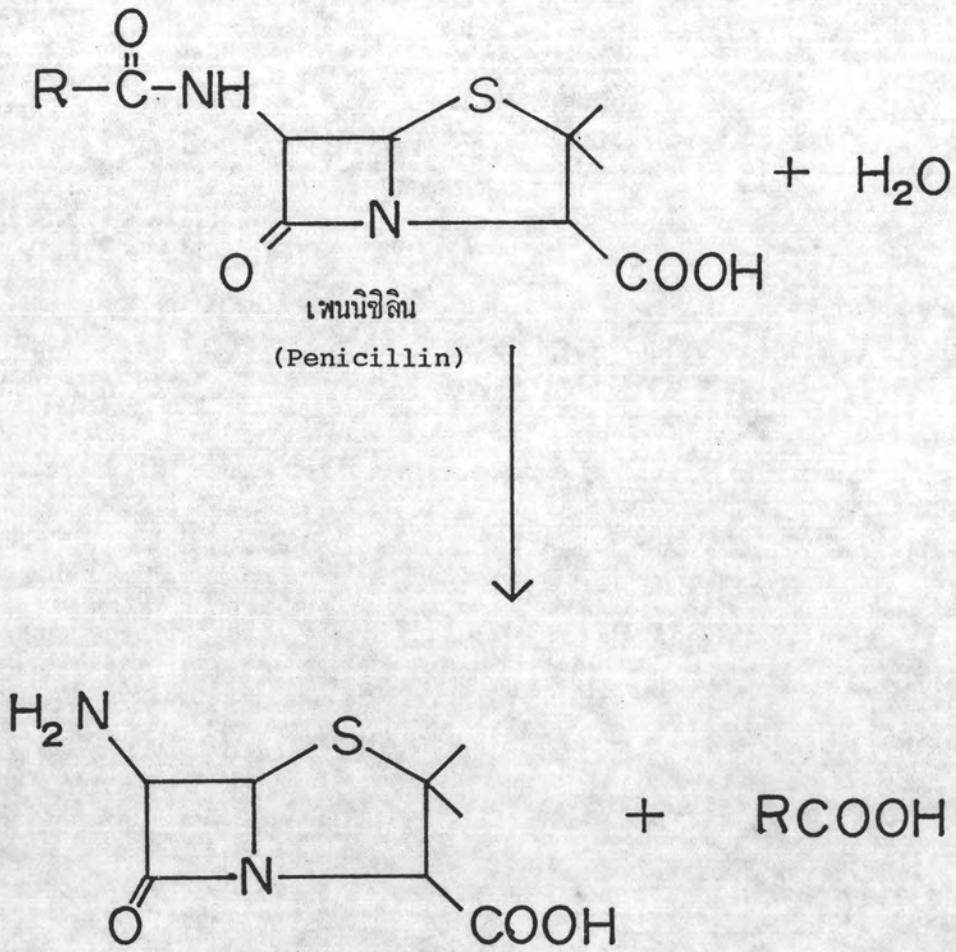
หมู่ข้างเคียง	ชื่อเพนนิซิลิน
R = H	กรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก (6-aminopenicillanic acid)
R = 	เพนนิซิลิน จี (Benzylpenicillin G)
R = 	เพนนิซิลิน วี (Phenoxymethyl penicillin V)
R = 	แอมพิซิลิน (Ampicillin)

<u>รูปที่ 2</u> ขั้นตอนการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก ด้วยวิธีทางเคมี

(Paulson, 1984)



<u>รูปที่ 3</u> ปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์เพนนิซิลินเป็นกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก ด้วยเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส (Vandamme, 1980)



เพนนิซิลิน (Penicillin)

กรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก (6-aminopenicillanic acid)

กรด คาร์บอกซิลิก (Carboxylic acid)

chrysogenum Q_{176} และ *Aspergillus oryzae* สามารถผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน อะมิเดส ซึ่งไฮโดรไลซ์ เพนนิซิลิน จี เป็นกรดฟีนิลอะซีติก และ สารชนิดหนึ่งเรียกว่า penicin จนกระทั่งปี ค.ศ. 1959 Batchelor และคณะ รายงานว่า penicin ก็คือ กรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกและสามารถตกผลึกของกรดนี้สำเร็จ กรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกสามารถทำปฏิกิริยากับสาร phenylacetylchloride ได้เป็นเพนนิซิลิน จี หรือทำปฏิกิริยากับสารประกอบที่มีสูตรโครงสร้างแตกต่างกับรูปแบบอื่น ๆ เกิดเป็นอนุพันธ์ของเพนนิซิลินชนิดอื่น ๆ ได้ (Claridge, 1960; Huang และคณะ, 1960; Kaufman และ Bauer, 1960; Rolinson, 1960) หลังจากนั้นจึงเริ่มประยุกต์เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส เข้าไปในอุตสาหกรรม (Chain, 1971)

เอนไซม์ชนิดนี้มีชื่อเรียกแตกต่างกันหลายชื่อ เช่น Penicillin amidase (Sakaguchi และ Murao, 1953) Penicillin amidohydrolase (Vojtisck, 1975a, b, c) แต่ชื่อที่ได้รับความนิยมเรียกมากที่สุดคือ เพนนิซิลิน เอซิเลส (Huang และคณะ, 1962; Szentirmai, 1964; Levitov และคณะ, 1967; Gang และ Shaikh, 1976; Meyer และคณะ, 1979; Daumy และคณะ, 1985)

1.3.2 ประเภทของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส

ในปี ค.ศ. 1974 Vandamme และ Voets ได้แบ่งประเภทของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ตามโครงสร้างของสับสเตรทซึ่งเป็นเพนนิซิลินชนิดต่าง ๆ ที่เอนไซม์สามารถไฮโดรไลซ์ได้เป็น 3 ชนิดคือ

1.3.2.1 เพนนิซิลิน จี เอซิเลส (Benzylpenicillin acylase)

เอนไซม์นี้พบในจุลชีพชนิดต่าง ๆ ซึ่งสามารถไฮโดรไลซ์เพนนิซิลิน จี ได้ดีกว่า เพนนิซิลิน วี (ตารางที่ 1) (Vandamme, 1980) ส่วนใหญ่พบในแบคทีเรีย โดยเฉพาะสายพันธุ์ เอสเชอริเชีย (Escherichia) นอกจากนี้ยังพบในเชื้อราบางชนิด

1.3.2.2 เพนนิซิลิน วี เอซิเลส (Phenoxymethyl penicillin)

เป็นเอนไซม์ซึ่งไฮโดรไลซ์เพนนิซิลิน วี ได้ดีกว่า เพนนิซิลิน จี ส่วนใหญ่พบในรา, ยีสต์, แอคติโนไมซีส (Actinomyces) และแบคทีเรียบางชนิด ตัวอย่างจุลชีพที่ผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน วี เอซิเลส แสดงในตารางที่ 2 (Vandamme, 1980)

ตารางที่ 1 ตัวอย่างจุลชีพที่ผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน จี เอซิเลส (Vandamme, 1980)

Micro-organism	Reference
BACTERIA	
Rhodopseudomonas spheroides K.Y. 4112	Nara et al. (1971a)
Pseudomonas aeruginosa K.Y. 3591, K.Y. 8501	
Pseudomonas cruciviae K.Y. 3960	
Pseudomonas desmolytica K.Y. 3981	Okachi et al. (1973a, b)
Pseudomonas sp.	Huang et al. (1960)
Xanthomonas sp.	Huang et al. (1963)
Alcaligenes faecalis A-9424	Claridge et al (1963)
Alcaligenes faecalis B.R.L. 1237, 1238	Cole and Sutherland (1966)
Bacterium faecalis alcaligenes 415	Gotovtseva et al. (1965)
Bordetella sp.	Huang et al. (1960)
Escherichia sp.	Rolinson et al. (1960)
	Gang and Shaikh (1976)
Escherichia coli A.T.C.C. 9637 (N.C.I.B. 8666)	Kaufmann and Bauer (1960)
	Vojtisek and Slezak (1975a, b, c), Sato et al. (1976)
Escherichia coli N_y1/3-67	Szentirmai (1964), Nyiri (1967)
Escherichia coli N.C.I.B. 9465	Holt and Stewart (1964a)
Escherichia coli B.M.N., K.Y. 8219, K.Y. 8268, K.Y. 8275, K.Y. 8289	Okachi et al. (1973a, b)
Escherichia coli I 187	Cole and Sutherland (1966)
Escherichia coli B.R.L. 351, B.R.L. 1360	Sjoberg et al. (1967)

Micro-organism	Reference
Escherichia coli N.C.I.B. 8743 (B.R.L. 1040) 8743A	Cole (1969s), Plaskie et al. (1978)
Escherichia coli A.T.C.C. 11105 (N.C.I.B. 8878)	Bauer et al. (1971), Kutzbach and Rauenbusch (1974)
Escherichia coli XG3A9455	Claridge et al. (1963)
Escherichia coli $0111.B_4$	Dulong de Rosney et al. (1970)
Escherichai coli N.C.I.B. 8741, 8878, 8879, 8949	Cole (1967)
Escherichia coli N.C.I.B. 8741, 8742 8744	Cole and Sutherland (1966)
Kluyvefa citrophila K.Y. 3641, PL-10 PL-21	Nara et al. (1971a), Okachi et al. (1973a,b)
Kluyvera noncitrophila K.Y. 3642 K.Y. 8991	
Aerobacter cloacae	Claridge et al. (1960)
Erwinia sp.	Huang et al. (1963)
Serratia sp.	
Proteus morganii K.Y. 4035, K.Y. 4051	Okachi et al. (1973a, b)
Proteus rettgeri F.D. 13524, A.T.C.C. 9919, 9250	Huang et al. (1963), Cole (1967)
Flavobacterium sp. K.Y. 4082	Huang et al. (1963), Shimizu et al (1975a,b)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Micro-organism	Reference
Micrococcus lysodeikticus	Claridge et al. (1960), Huang et al. (1960)
Micrococcus roseus A.T.C.C. 515	Pruess and Johnson (1965)
Micrococcus luteus K.Y. 3781	Nara et al. (1971a), Shimizu et al. (1975a, b)
Sarcina sp.	Huang et al. (1963)
Bacillus subtilis var. nigar	Claridge et al. (1960)
Bacillus megaterium A.T.C.C. 14945	Chiang and Benneti (1967)
Bacillus circulans	Abbott (1976)
Corynebacterium sp.	Huang et al. (1963)
Cellulomonas sp.	
Arthrobacter sp.	Cole (1976)
Mycobacterium phlei	Claridge et al. (1960)
Norcardia F.D. 46973, A.T.C. 13635	Huang et al. (1960)
Streptomyces ambofaciens S.P.S.L. 15	Nara et al. (1971a)
FUNGI	
Neurospora crassa F.S.C. 987, D.G.C. 757, R.F. 424, R.W.B. 622, F.G. S.C. 262, 3a6A	Rossi et al. (1973)

ตารางที่ 2 ตัวอย่างจุลชีพที่ผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน วี เอซิเลส

(Vandamme, 1982)

Micro-organism	Reference
BACTERIA	
Erwinia aroideae N.R.R.L.B-138	Voets and Vandamme (1972)
Achromobacter sp. B.R.L. 1755 (N.C.I.B. 9424)	Cole (1964)
Pseudomonas acidovorans	
Micrococcus ureae K.Y. 3767	Nara et al. (1971a)
Nocardia globerula K.Y. 3901	Nara et al. (1971a)
Streptomyces lavandulae B.R.L. 198	Batchelor et al. (1961b)
Streptomyces netropsis 2814	Haupt and Thrum (1967)
Streptomyces erythrues J.A. 4143	
Streptomyces ambofaciens S.P.S.L.-15	Nara et al. (1971a)
Actinoplanes utahensis	Dennen et al. (1971)
FUNGI	
Penicillium chrysogenum Q176	Sakaguchi and Murao (1950)
Penicillium chrysogenum A-9342	Claridge et al. (1963)
Penicillium chrysogenum W5120, W501247 W48701, W39133	Batchelor et al (1959, 1961a,b)
Penicillium chrysogenum Wis 49-408	Erickson and Bennett (1965)
Penicillium chrysogenum SC3576	Erickson and DEan (1966)
Penicillium chrysogenum 51-20F3	Spencer and Muang (1970)
Penicillium B.R.L. 807, B.R.L. 733 736, 737	Cole (1966)

Micro-organism	Reference
Penicillium chrysogenum 50935, 1951 47-638, 49-2166	Gatenbeck and Brunsberg (1968), Pruess and Johnson (1967)
Penicillium chrysogenum SC-6041	Fawcett et al. (1975)
Emericellopsis minima (Stolk) I.M.I. 69015, *Cephalosporium salmosynnematum* M.D.H. 3590A	Cole and Rolinson (1961)
Cephalosporium C.M.I. 49137	Claridge et al. (1963)
Cephalosporium arremontum A.T.C.C. 11550	
Aspergillus niger	Vandamme et al. (1971a)
Aspergillus ochraceas B.R.L. 731	Cole (1966)
Epidermophyton interdigitale, Epider *mophyton floccosum* B.R.L. 722, 623	Uri et al. (1963, 1964), Cole (1966)
Trichophyton gypseum, Trichophyton mentagrophytes B.R.L.569, B.R.L. 579	Uri et al. (1963, 1964), Cole (1966)
Trichophyton interdigitale	
Alternaria, Epicoccum, Mucor, Phoma, Trichoderma spp.	Batchelor et al. (1961a)
Malbranchea pulchella	Rode et al. (1947), Kitano et al. (1974, 1975)
Thermoascus, Gymmoascus and *Polypaecilum spp.*	Kitano et al. (1975)
Botrytis cinerea	Batchelor et al. (1961b)
Fusarium sp. 75-5	Thadhani et al. (1972)
Fusarium avenaceaum	Vanderhaeghe et al. (1968)

Micro-organism	Reference
Fusarium semitectum	Waldschemidt-Leitz and Bretzel (1964)
Fusarium semitectum B.C. 805	Baumann et al. (1971)
Giberella fujikuroi	Vasilescu et al. (1969)
Fusarium conglutinans A.Y. F254 *conidia*	Singh et al. (1969)
Fusarium moniliforme A.Y.E. 255, C.B.S. 24064, C.B.S. 44064, C.B.S. 26654 *conidia*	Vandamme et al (1971a)
Pleurotus ostreatus	Brandl (1965)
Bovista plumbea	Schneider and Rohr (1976)
Phialomyces macrosporus, Leptosphareulina australis, Robillarda sp.	Kondo and Mitsugi (1975)
YEASTS	
Torulopsis, Zygosaccharomyces, Debaryomyces, and *Turula spp.* B.R.L. 809	Cole (1966, 1967)
Crytococcus, Saccharomyces and *Inchosporon spp.*	Batchelor et al. (1961b)
Rhodotorula gluttinis var. glutinis	Vandamme and Voets (1973)

1.3.2.3 แอมพิซิลิน เอซิเลส (Ampicillin acylase)

ปัจจุบันพบเอนไซม์ชนิดนี้ใน Pseudomonas melanogenum K.Y. 3987, K.Y. 4030, K.Y. 4031 (Nara และคณะ, 1972; Okachi และคณะ, 1973a, b, Okachi และ Nara, 1973; Shimizu และคณะ, 1975a, b) เท่านั้น

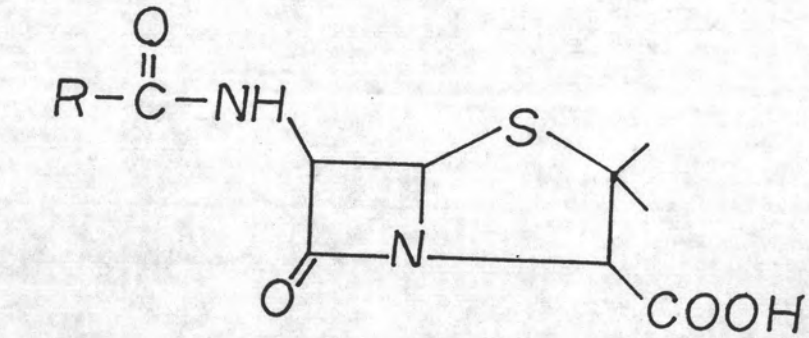
1.4 บทบาทและการทำงานของเอนไซม์เพนนิซิลิน จี เอซิเลส

เอนไซม์ที่มีการศึกษาค้นคว้ากันมากที่สุดคือ เอนไซม์เพนนิซิลิน จี เอซิเลส ทั้งนี้ด้วยเหตุผลที่ว่าเป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อสับสเตรทสูง (Huang และคณะ, 1962; Marconi และคณะ, 1973; Rossi และคณะ , 1977; Margolin และคณะ, 1980; Daumy และคณะ, 1985) และ เพนนิซิลิน จี เป็น สับสเตรทที่หาได้ง่าย และยังมีราคาถูกอีกด้วย แม้ว่าการค้นพบจุลชีพมากมายหลายชนิดที่สามารถผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน จี เอซิเลส ได้ แต่รายละเอียดเกี่ยวกับบทบาทและการทำงานของเอนไซม์นี้ยังไม่มีรายงานมากนัก (Vandamme, 1980; Daumy และคณะ, 1985)

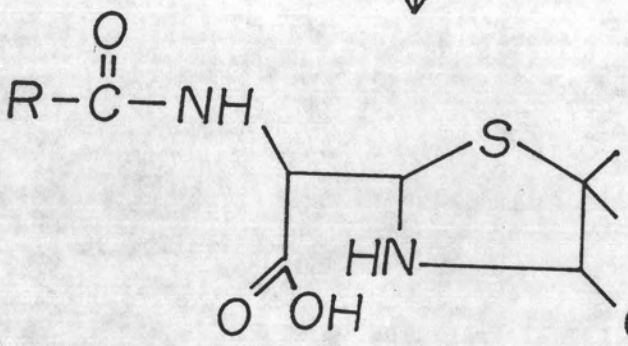
มีรายงานว่าจุลชีพที่ผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส มักจะสังเคราะห์เอนไซม์ เบต้า-แลคแตมเมส ซึ่งสามารถจะแย่งไฮโดรไลซ์ส่วนของเบต้า แลคแตม (β-lactam) ในโมเลกุลเพนนิซิลินเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ของกรดเพนนิซิโลอิก (Penicilloic acid) (Hamilton และ Miller, 1966; Vandamme, 1980) (รูปที่ 4) ควบคู่ไปด้วย

บทบาทที่สำคัญของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส อีกอย่างหนึ่งคือ พบว่าจุลชีพหลายชนิดสามารถผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ชนิดที่สามารถเร่งปฏิกิริยารีเอซิเลชั่น (reacylation) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาย้อนกลับของการไฮโดรไลซ์ ทำให้เกิดการรวมตัวของ กรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกกับอนุพันธ์ของกรดคาร์บอกซิลิกชนิดต่าง ๆ ได้ เป็นสารประกอบอนุพันธ์เพนนิซิลินชนิดใหม่ ๆ ในสภาวะที่เหมาะสม เช่น เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส จาก *E. coli* ATCC 9637 จะเกิดปฏิกิริยา รีเอซิเลชั่น ที่ พี เอช 4.5-5.5 (Bodareva และคณะ, 1969) เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส จาก *E. coli* N.C.I.B. 8743 สามารถเกิดปฏิกิริยารีเอซิเลชั่นได้ที่ พี เอช 5.0 (Cole, 1969c, d) เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส จาก *Kluyvera citrophila* K.Y. 3641 สามารถเร่งปฏิกิริยา เอซิเลชั่น ของกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกกับอนุพันธุ์ของฟีนิลไกลซีน ได้เป็นแอมพิซิลิน ดังแสดงในรูปที่ 5 (Nara และคณะ, 1971a, b, 1972)

<u>รูปที่ 4</u> ปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์เพนนิซิลินเป็นกรด เพนนิซิโลอิก ด้วยเอนไซม์เบต้า-แลคแตมเมส (β-lactamase)
(Vandamme, 1980)



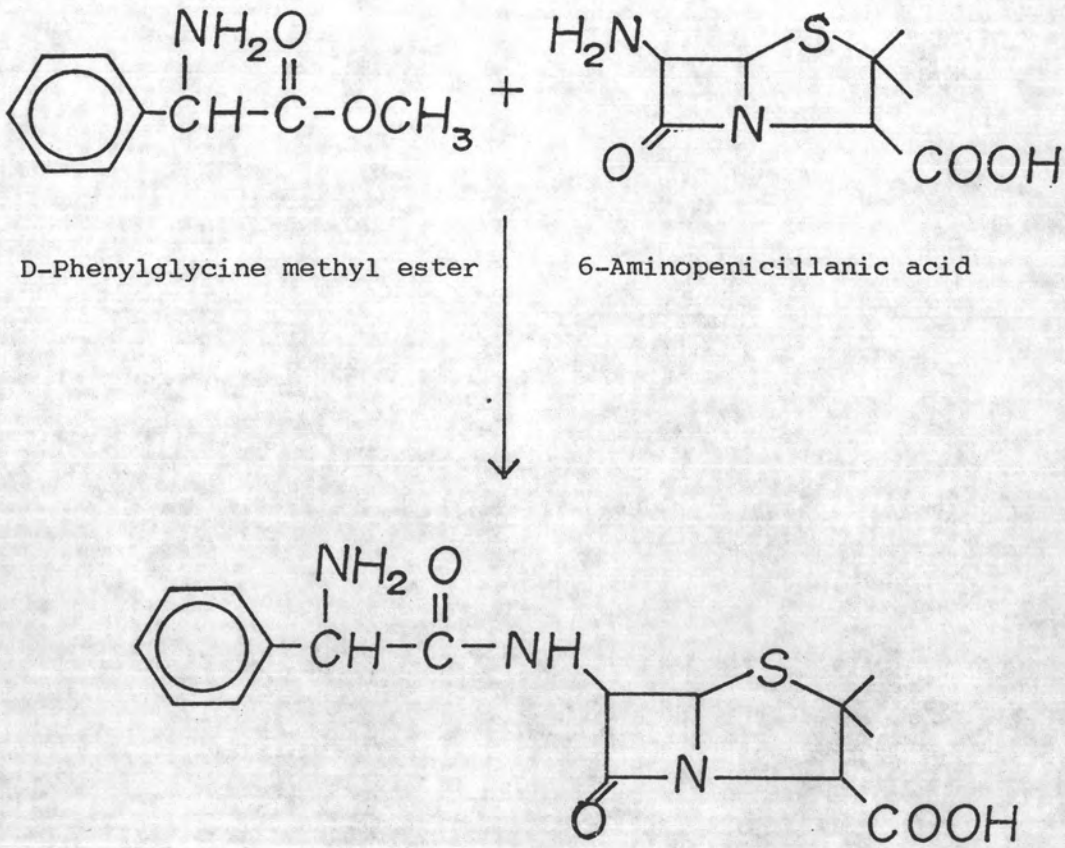
เพนนิซิลิน
(Penicillin)



กรด เพนนิซิโลอิก
(Penicilloic acid)

<u>รูปที่ 5</u> ปฏิกิริยา รีเอซิเลชั่น ของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส

(Vandamme, 1980)



Ampicillin

012459

i10299671

1.5 คุณสมบัติทั่วไปของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส

ด้วยเหตุผลของการแข่งขันทางการค้าและอุตสาหกรรม (U.S. Patent 3,239,427 U.S. Patent 3,905,868, U.S. Patent 3,953,291, Vandamme, 1983) พบว่าข้อมูลที่สำคัญบางอย่างของเอนไซม์และเซลล์ที่เป็นแหล่งของเอนไซม์จะถูกปกปิดเป็นความลับ คุณสมบัติของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ทั้ง 2 ชนิด เท่าที่รวบรวมได้แสดงในตารางที่ 3 และ 4 โดยเฉพาะของเพนนิซิลิน จี เอซิเลส ของแบคทีเรียซึ่งทราบกันอยู่ทั่วไป (Kaufman และ Bauer, 1960; Chaing และ Bannet, 1967; Cole, 1969a, b, c, d; Balasingham และคณะ 1972; Kutzbach และ Ravenbusch, 1974; Gang และ Shaikh, 1976; Wojskowicz, 1981; Daumy, 1985) พอสรุปได้คร่าว ๆ คือ

1. เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ที่ได้รับการสังเคราะห์และทำงานภายในเซลล์ (intracellular enzyme) ยกเว้นในสายพันธุ์ Bacillus เป็นสายพันธุ์เดียวที่ภายหลังการสังเคราะห์เอนไซม์จะถูกขับออกนอกเซลล์ (extracellular enzyme) (Murao และคณะ, 1964)

2. เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ที่แยกจากสายพันธุ์ Escherichia และ Bacillus เป็นเอนไซม์ชนิดที่ต้องการ การเหนี่ยวนำ (induce) ตัวเหนี่ยวนำคือ กรดฟีนิลอะซีติก (phenylacetic acid) แต่ถ้าเป็นเอนไซม์ที่แยกจากสายพันธุ์ *Proteus rettgeri* จะเป็นเอนไซม์ชนิดที่ถูกสังเคราะห์ตลอดเวลา (constitutive enzyme) (Daumy และคณะ, 1982)

3. ในแบคทีเรียการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส จะเกิดได้ดีเมื่อเจริญที่อุณหภูมิต่ำกว่า 31 องศาเซลเซียส โดยเฉพาะอย่างยิ่งใน *Proteus rettgeri* จะต้องการอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่า (Daumy และคณะ, 1982)

4. การผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส จะถูก catabolite repression ด้วยกลูโคส และคาร์โบไฮเดรต ในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ *Proteus rettgeri* ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นสารต้นตอคาร์บอน (Daumy และคณะ, 1982)

5. การทำงานของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส จะผกผันกลับ เมื่อใช้สับสเตรทความเข้มข้นสูง ๆ

ตารางที่ 3 สมบัติของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส (Vandamme, 1980)

	Optimum pH value		Optimum temperature (^{o}C)	K_m Value (mM)	Molecular weight	Reference
	Hydrolysis	Synthesis				
BACTERIA						
Alcaligenes sp.	8	-	40	-	-	Claridge et al. (1960)
Alcaligenes faecalis	7.5	-	37	-	-	Claridge et al. (1963)
Escherichia coli A.T.C.C. 9637						
(intact cells)	7.5	4.5-5.5	30	-	-	Kaufmann and Bauer (1960)
(enzyme)	7.8-8	-	50-52	-	-	Bondareva et al. (1969a,b)
(immobilized enzyme)	7.5	5	37	7.7	-	Self et al. (1969)
Escherichia coli N.C.I.B 8734A						
(intact cells	8.2	5	50	30	-	Cole (1969a,b,c,d)
(enzyme)	8.2	-	37	0.67		Balasingham et al. (1972)
(immobilized enzyme	7.65	-	-	0.63	-	Warburton et al. (1972, 1973) Lilly et al (1972)
Escherichia coli	7	-	30-35	1.35-1.59	-	Brandl (1965)
Escherichia coli	7.5	-	-	17-5	-	Badr-Eldin and Attia (1973)

	Optimum pH value		Optimum temperature (°C)	K_m Value (mM)	Molecular weight	Reference
	Hydrolysis	Synthesis				
Escherichia coli C15 (N.C.I.B. 9465)	5.5	-	-	4.00	-	Hoh and Stweart (1964a)
Escherichia coli A.T.C.C. 11105 (enzyme)	8.1	-	-	0.02	70,000	Kutzbach and Rauenbusch (1974
Kluyvera citrophila K.Y. 3641, K.Y. 7844	7.5	6.5	35	-	63,000	Nara et al. (1971a), Okachi et al (1973b), Shimizu et al. (L975a,b)
Proteus rettgeri F.D 13424	8.0	-	-	-	-	Huang et al. (1963)
Micrococcus roseus A.T.C.C. 516	9.0	-	35	-	-	Pruessand Johnson (1965)
Bacterium faecalis alcaligenes 415	7.8	-	42	-	-	Gotovtseva et al. (1965)
Bacillus megaterium A.T.C.C. 14945 (enzyme)	8.5	-	-	4.5	1200,000	Chiang and Bennett (1967) Acevedo and Cooney (1963)
(immobilized enzyme)	-	-	-	6.0	-	Ryu et al. (1973a, b)

	Optimum pH value		Optimum temperature (°C)	K_m Value (mM)	Molecular weight	Reference
	Hydrolysis	Synthesis				
FUNGI						
Neurospora crassa	7.0	-	37	-	-	Rossi et al. (1973)

ตารางที่ 4 คุณสมบัติของเอนไซม์เพนนิซิลิน วี เอซิเลส (Vandamme, 1980)

	Optimum pH value		Optimum temperature (^{o}C)	K_m Value (mM)	Molecular weight	Reference
	Hydrolysis	Synthesis				
MOULDS						
Penicillium chrysogenum Wis.49408	8.5	6.8	30	-	-	Erickson and Bennett (1965)
Penicillium chrysogenum P5009						
Penicillium chrysogenum 51-20F3						
Enzyme)	8	7.4	28	16.7	-	Spencer and Maung (1970)
Penicillium chrysogenum	8	-	20	-	-	Cole and Rolinson (1961)
Cephalosporium sp.	8	-	-	-	-	Cole (1966)
Emericellopsis minima (Stolk)	8	-	-	-	-	
I.M.I. 69015						
Trichophyton mentagrophytes	8	-	-	-	-	Uri et al. (1963)
Epidermophyton interdigitale						
Fusarium avenaceum	7.5	-	37	-	-	Vanderhaeghe et al (1968)

	Optimum pH Value		Optimum temperature (°C)	K_m Value (mM)	Molecular weight	Reference
	Hydrolysis	Synthesis				
Fusarium conglutinans A.Y.F. 254	8	-	28	-	-	Singh et al. (1969)
Fusarium moniliforme A.Y.E. 255	8	-	28	5.75	-	Vandamme et al. (1971a)
Fusarium semiteclum	7.5	-	-	2.50-2.75	-	Brandl (1965, 1972)
(intact cells)						
(enzyme)	8	-	50	-	65,000	Waldschmidt-Leitz and Bretzel (1964
Fusarium semitectum B.C. 805						
(enzyme)	7.5	-	37	4.75	67,000	Baumann et al. (1971)
Pleurotus ostreatus	8	-	50	-	-	Brandl (1965)
Bovista plumbea (enzyme)	7.5	-	52	1.67	80,000	Schneider and Rohr (1976)
YEAST						
Rhodotorula glutinis	6.5	-	28	5.1	-	Vandamme and Voets (1973)

	Optimum pH value		Optimum temperature (°C)	K_m Value (mM)	Molecular weight	Reference
	Hydrolysis	Synthesis				
BACTERIA						
Achromobacter B.R.L. 1755	-	-	-	-	-	Cole (1964)
Erwina arvideae (enzyme)	5.5	-	28	35	62,000	Vandamme (1972), Voets and Vandamme (1972), Vandamme and Voets (1975a)
Micrococcus ureae K.Y. 3767	7.4	-	35	-	-	Nara et al. (1971a)
Streptomyces lavendulae B.R.I. 198	9	-	28	10.3	-	Batchelor et al. (1961b)
Streptomyces erythreus J.A. 4143						
Streptomyces netropsis 2814	7.5	-	28	-	-	Haupt and Thrum (1967)

6. กรด ฟีนิลอะซีติก และกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก สามารถยับยั้งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์ เพนนิซิลิน จี แบบแข่งขัน (competitive inhibitor) และไม่แข่งขัน (non-competitive inhibitor) ตามลำดับ

1.6 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส

ทำได้หลายวิธี เฉพาะวิธีในงานวิจัยนี้คือ

1.6.1 Microbiological test (Oostendrop, 1972)

ในปี ค.ศ. 1972 Oostendrip ได้อธิบายวิธี Microbiological plate assay ในการหาปริมาณของกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก หลักการก็คือ ใช้สายพันธุ์ของ *S. marcescens* ATCC 27117 ที่ไวต่อกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก เป็นเครื่องหมายวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส โดยสังเกตขนาดของ วงใส ซึ่งเป็นบริเวณถูกยับยั้งการเจริญบนอาหารแข็ง

1.6.2 วิธีทางเคมี

Balasingham และคณะ (1972) ได้รายงานวิธีการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส โดยอาศัยหลักการเดียวกับ Svatex (1965) คือเมื่อใช้ เพนนิซิลิน จี เป็นสับสเตรท ผลผลิตที่เกิดขึ้นคือ กรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก ซึ่งถ้าให้ทำปฏิกิริยากับ PDAB (p-dimethyl-aminobenzaldehyde) ก่อให้เกิด Schiff's base เป็นสารประกอบสีเขียวอ่อน สามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร

Szewczuk และคณะ (1980) ได้รายงานว่าสารประกอบ phenylacetyl-4-aminobenzoic acid (PAAB) สามารถใช้เป็นสับสเตรท ในการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส โดยพบว่าเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส สามารถไฮโดรไลซ์ PAAB ได้เป็น p-aminobenzoic acid (PABA) ซึ่งนำไปทำปฏิกิริยา diazotization กับ โซเดียมไนไตรท์ เกิดเป็นสารประกอบที่ทำปฏิกิริยา coupling กับ 1-amino-8-hydroxy-naphthalene-e, 6-disulfonic acid ได้สารประกอบเชิงซ้อนสีแดงซึ่งสามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร

1.7 <u>การแยกสายพันธุ์ที่เพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส</u>

ในปี ค.ศ. 1982 Son และคณะ ได้ทำการทดลองกลายพันธุ์ *Bacillus megaterium* ATCC 14945 ซึ่งผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ได้ดีต่อเมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยกรด ฟีนิลอะซีติก ด้วยรังสีอุลตราไวโอเลต และ EMS (ethyl methane sulfonate) ผลปรากฏว่าแยกได้มิวแตนท์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส โดยไม่ต้องการมีการเหนี่ยวนำด้วยกรด ฟีนิลอะซีติก โดยใช้ชื่อว่า *Bacillus megaterium* KFCC 10029 ซึ่งสายพันธุ์ที่ได้ใหม่นี้ จะมีการเปลี่ยนแปลงทั้งทางด้านสรีระ และทางด้านพันธุกรรม โดยทางด้านสรีระนั้นจะเห็นได้ว่าเซลล์ของ *Bacillus megaterium* KFCC 10029 จะมีลักษณะใหญ่กว่าเซลล์ของ *Bacillus megaterium* ATCC 14945 ส่วนทางด้านพันธุกรรมนั้น พบว่ามิวแตนท์จะมีการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ได้สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมประมาณ 3-4 เท่า Meevootisom และคณะ (1983) ได้ทำการทดลองกลายพันธุ์ *E. coli* ATCC 9637 ด้วยรังสีอุลตราไวโอเลต สามารถคัดเลือกและแยกมิวแตนท์ที่มีการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ได้สูงกว่า *E. coli* ATCC 9637 Morita และคณะ (1984) ได้ทำการทดลองกลายพันธุ์ *E. coli* IFO 13500 ด้วย NTG ได้สายพันธุ์ใหม่ที่สามารถผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นประมาณ 6 เท่า

<u>วัตถุประสงค์ของการวิจัยมีดังต่อไปนี้</u>

1. ศึกษาสภาวะของการเจริญและการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ *Proteus rettgeri* ATCC 9250 ในอาหารสูตรอุดมและสูตรปรับต่ำ

2. ศึกษาชนิดและองค์ประกอบของการ์บอน ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส เพื่อนำไปสู่แนวทางการปรับประสิทธิภาพของการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส โดยวิธีการกลายพันธุ์

3. แยก *P. rettgeri* ATCC 9250 สายพันธุ์ที่สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ได้สูง จากแหล่งต้นตอคาร์บอนที่เหมาะสม

4. ศึกษาเปรียบเทียบจลน์ศาสตร์การผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ระหว่าง *P. rettgeri* สายพันธุ์ที่แยกได้กับสายพันธุ์เดิม