

บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส ของ *Proteus rettgeri* ATCC 9250

3.1.1 ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ

เมื่อเลี้ยง *P. rettgeri* ATCC 9250 ในอาหารเหลวสูตรอุดมที่ไม่ได้เสริมกลูโคส เปรียบเทียบกับเมื่อเสริมกลูโคส 0.2 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 6 พบว่า *P. rettgeri* ATCC 9250 จะมีการเจริญสูงสุดประมาณชั่วโมงที่ 18 และ 24 วัดค่าแอกติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส เมื่อใช้กรดฟีนิลอะซีทิล-4อะมิโนเบนโซอิก เป็นสับสเตรท ตามวิธีทดลอง ข้อ 2.10.1 ได้ค่าสูงสุดประมาณ 15 และ 22 หน่วยต่อมิลลิกรัม โปรตีนรวมของเซลล์ ตามลำดับ แต่ถ้าเป็นอาหารเหลวสูตรปรับค่าทั้งชนิดเสริมและไม่ได้เสริมด้วยกลูโคส 0.2 เปอร์เซ็นต์ *P. rettgeri* ATCC 9250 ไม่สามารถเจริญได้

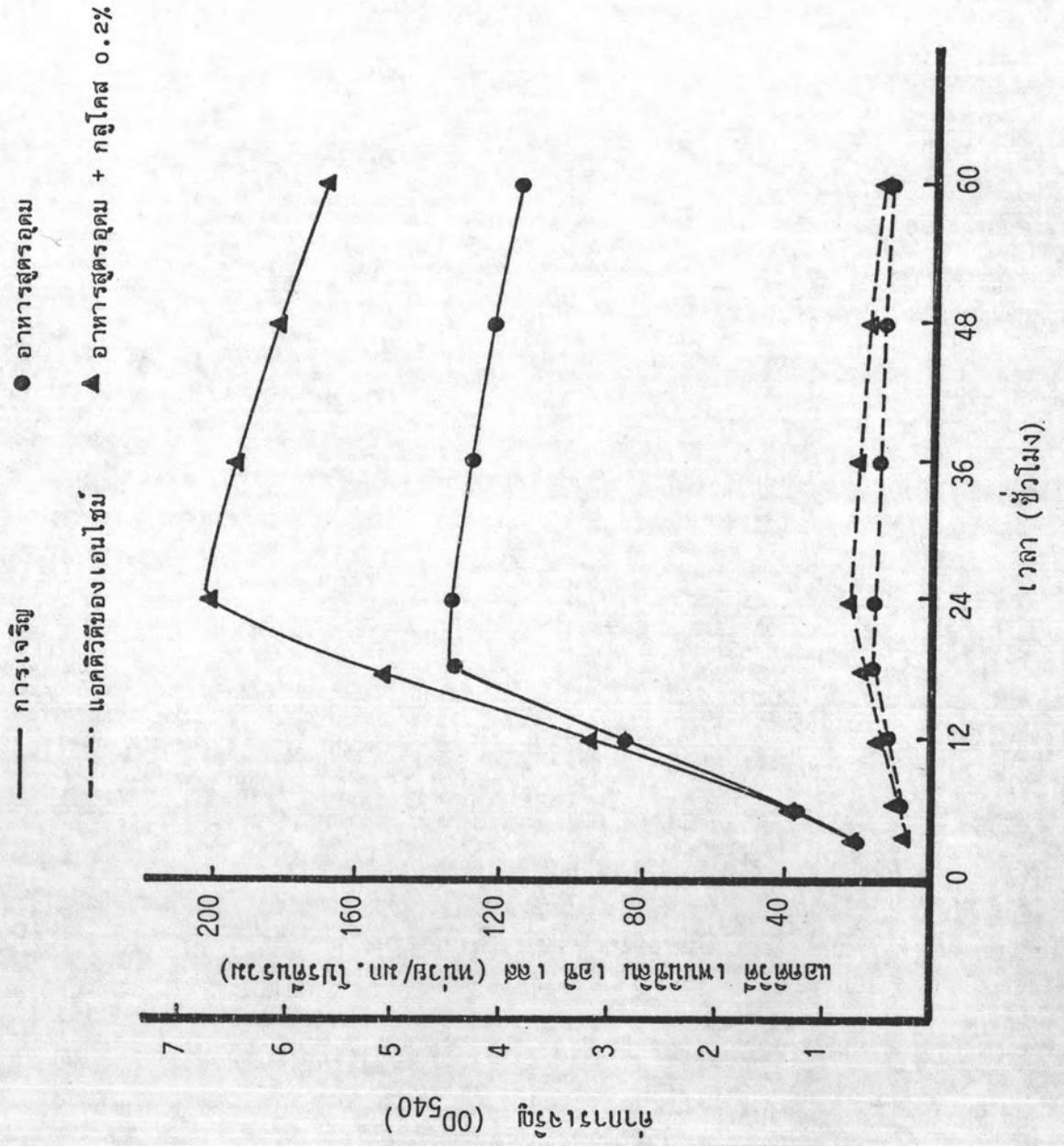
3.1.2 ชนิดสารต้นตอคาร์บอนเดี่ยว

ผลการทดลองเลี้ยง *P. rettgeri* ATCC 9250 ในอาหารเหลวสูตรปรับค่าที่เสริมด้วย 0.2 เปอร์เซ็นต์ ของสารต้นตอคาร์บอนเดี่ยวชนิดต่าง ๆ คือ ซักซิเนท ซิเตรท แอสปาร์เตท กลูตาเมท และกลีเซอรอล (ตารางที่ 5) จะเห็นได้ว่าค่าการเจริญสูงสุด (OD_{540}) ที่วัดได้อยู่ในระดับค่าประมาณ 0.8, 1.2, 1.3 และ 1.5 หน่วย ตามลำดับ ในขณะที่ค่าการเจริญสูงสุด เมื่อเสริมด้วยกลีเซอรอลจะสูงถึง 3.1 หน่วย

แอกติวิตีสูงสุดของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส เมื่อเจริญ *P. rettgeri* ATCC 9250 ในอาหารสูตรปรับค่าที่เสริมด้วย ซักซิเนท และ ซิเตรท จะมีค่าประมาณ 25 และ 38 หน่วย ต่อมิลลิกรัม โปรตีนรวมของเซลล์ ในขณะที่กลูตาเมทให้ค่าแอกติวิตีสูงสุดของเอนไซม์สูงกว่าประมาณ 2 เท่า และมีค่าใกล้เคียงกับเมื่อเสริมด้วยกลีเซอรอล โดยเฉพาะอย่างยิ่งแอสปาร์เตท จะให้ค่าแอกติวิตีสูงสุดของเอนไซม์มากที่สุดคือ ประมาณ 126 หน่วย ต่อมิลลิกรัม โปรตีนรวมของเซลล์

รูปที่ 6 รูปแบบการเจริญ (—) และการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเอส
(-----) ของ *P. rettgeri* ATCC 9250 เมื่อเลี้ยงในอาหาร
สูตรอุดม (●) กับสูตรอุดมเจริบด้วยกลูโคส 0.2% (▲) อุณหภูมิ 28⁰ซ

รูปที่ 6



ตารางที่ 5 ความสัมพันธ์ของการเจริญและการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส ของ *P. rettgeri* ATCC 9250 เมื่อปลูกเซลล์ ในอาหารสูตรปรับค่าที่เสริมด้วยสารต้นตอคาร์บอนชนิดต่าง ๆ อย่างละ 0.2 เปอร์เซ็นต์

| ชนิด สารต้นตอคาร์บอน | ค่าการเจริญสูงสุด (OD ₅₄₀) | เวลาที่ใช้ ในการเจริญ สูงสุด (ช.ม.) | แอกติวิตีของ เอนไซม์เพน นิซิลิน เอซีเลส (หน่วย* /มก. โปรตีนรวมของเซลล์) |
|-------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| ซึกซิเนท | 0.8 | 12 | 25 |
| ซีเตรท | 1.2 | 9 | 38 |
| แอสปาร์เตท | 1.3 | 45 | 126 |
| กลูตาเมท | 1.5 | 21 | 55 |
| กลีเซอรอล | 3.1 | 21 | 65 |

* 1 หน่วย (Unit) -ปริมาณเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส ที่ใช้ในการไฮโดรไลซ์
1 นาโนโมล ของ PAAB ค่อนาทิ หรือการเกิด PABA
1 นาโนโมล ค่อนาทิ ภายใต้สภาวะที่ทดลอง



อย่างไรก็ตาม เป็นที่น่าสังเกตว่าช่วงเวลาที่ใช้ในการเจริญสูงสุด เมื่อใช้แอสปาร์เตท เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนจะยาวนานที่สุด เมื่อเทียบกับแหล่งต้นตอคาร์บอนชนิดอื่น ๆ

3.1.3 การแปรความเข้มข้นของแอสปาร์เตทในอาหารเหลวสูตรปรับค่า

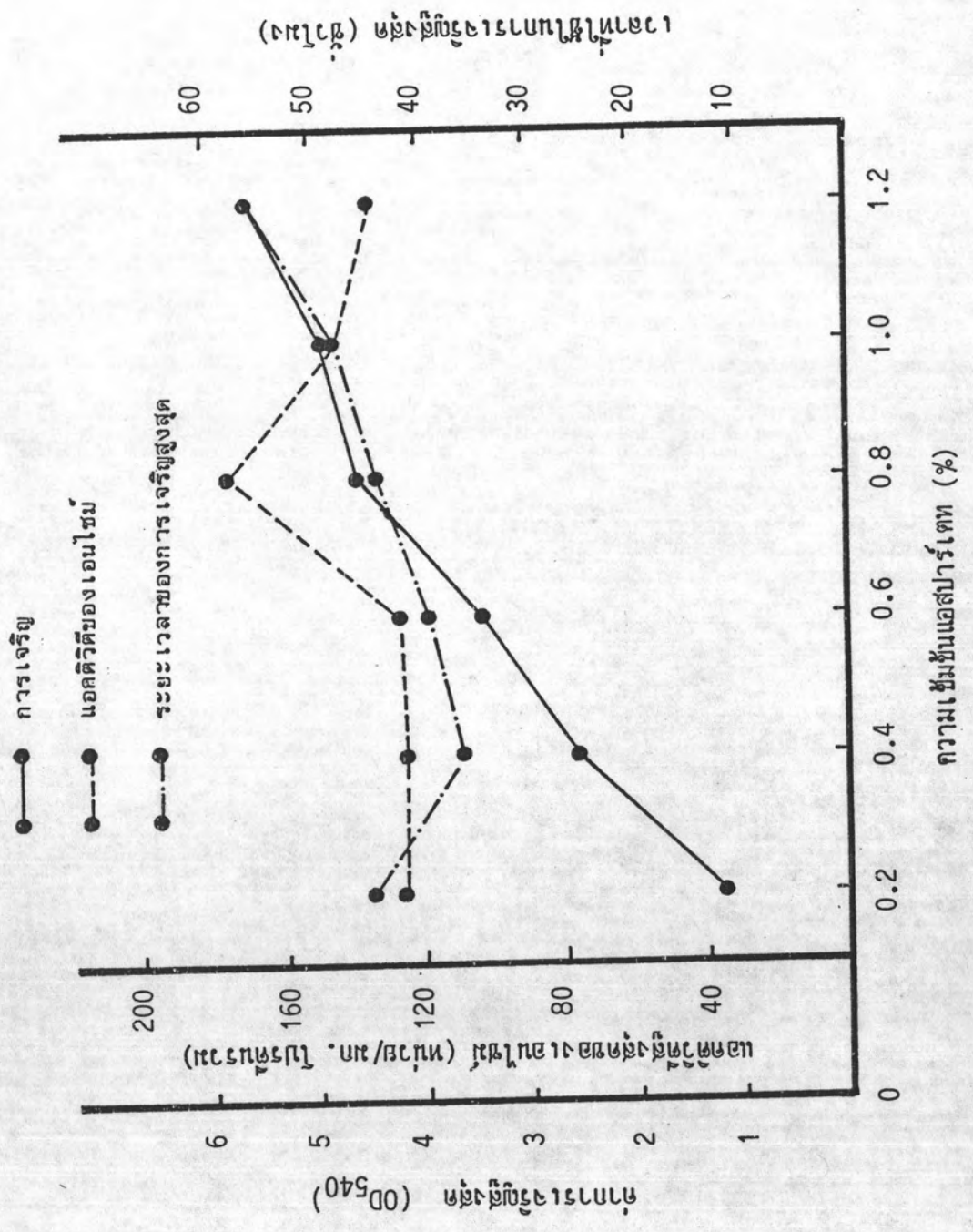
เมื่อเจริญ *P. rettgeri* ATCC 9250 ในอาหารเหลวสูตรปรับค่าที่เสริมด้วย แอสปาร์เตท ความเข้มข้นต่าง ๆ กันตั้งแต่ 0.4-1.2 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 7 พบว่าค่าการเจริญและการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส สูงสุดของ *P. rettgeri* ATCC 9250 จะแปรผันตามความเข้มข้นของแอสปาร์เตท เมื่อใช้ความเข้มข้นของแอสปาร์เตท 0.8 เปอร์เซ็นต์ จะให้ค่าแอกติวิตีสูงสุดของเอนไซม์มากที่สุดประมาณ 173 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนรวมของเซลล์ ความเข้มข้นของแอสปาร์เตทสูงกว่านี้จะเริ่มมีผลยับยั้งการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส เป็นที่น่าสังเกตว่าช่วงเวลาของการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส สูงสุด จะยาวนานตามความเข้มข้นของแอสปาร์เตทที่ใช้เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนด้วย

3.1.4 การเปลี่ยนแปลง พี เอช ในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการเจริญของ *P. rettgeri* ATCC 9250

เมื่อเจริญ *P. rettgeri* ATCC 9250 ในอาหารเหลวสูตรปรับค่าเสริมด้วย แอสปาร์เตท 0.8 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พบว่าค่า พี เอช ของอาหารเลี้ยงเชื้อจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจาก 7.0 ไปเป็น 8.4 หลังจากเจริญเชื้อเป็นเวลา 44 ชั่วโมง (รูปที่ 8) ซึ่งเป็นระยะการเจริญและผลิตเอนไซม์สูงสุด หลังจากนั้นการเจริญและผลิตเอนไซม์จะลดลงในขณะที่อัตราการเพิ่มของ พี เอช ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลงด้วย จะเห็นได้ว่าระยะเวลาของการเจริญ 60 ชั่วโมง พี เอช มีค่าถึง 8.8 ในขณะที่ค่าการเจริญเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยมาก แต่ค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ลดลงกว่าครึ่งจากประมาณ 180 ที่ช่วงการเจริญสูงสุดเหลือเพียง 88 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนรวมของเซลล์ เมื่อทำการทดลองนำเซลล์ที่มีชีวิต (viable cell count) ตามวิธีทดลองข้อ 2.5.2.ข พบว่าที่จุดพีเอชเซลล์มีชีวิตจะลดลงมากกว่าครึ่งเช่นกัน (1.6×10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตร เหลือเพียง 7.0×10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

รูปที่ 7 แสดงค่าการเจริญสูงสุด (●—●) แอคติวิตีสูงสุดของเอนไซม์เพนิซิลิน เอชเลส (●-----●) และเวลาที่ใช้ในการเจริญสูงสุด (●—·—●) ของ *P. rettgeri* ATCC 9250 เมื่อปลูกในอาหารสูตรปรับค่าเสริมด้วยแอสปาร์เตท ความเข้มข้น ตั้งแต่ 0.4-1.2% อุณหภูมิ 28^oซ

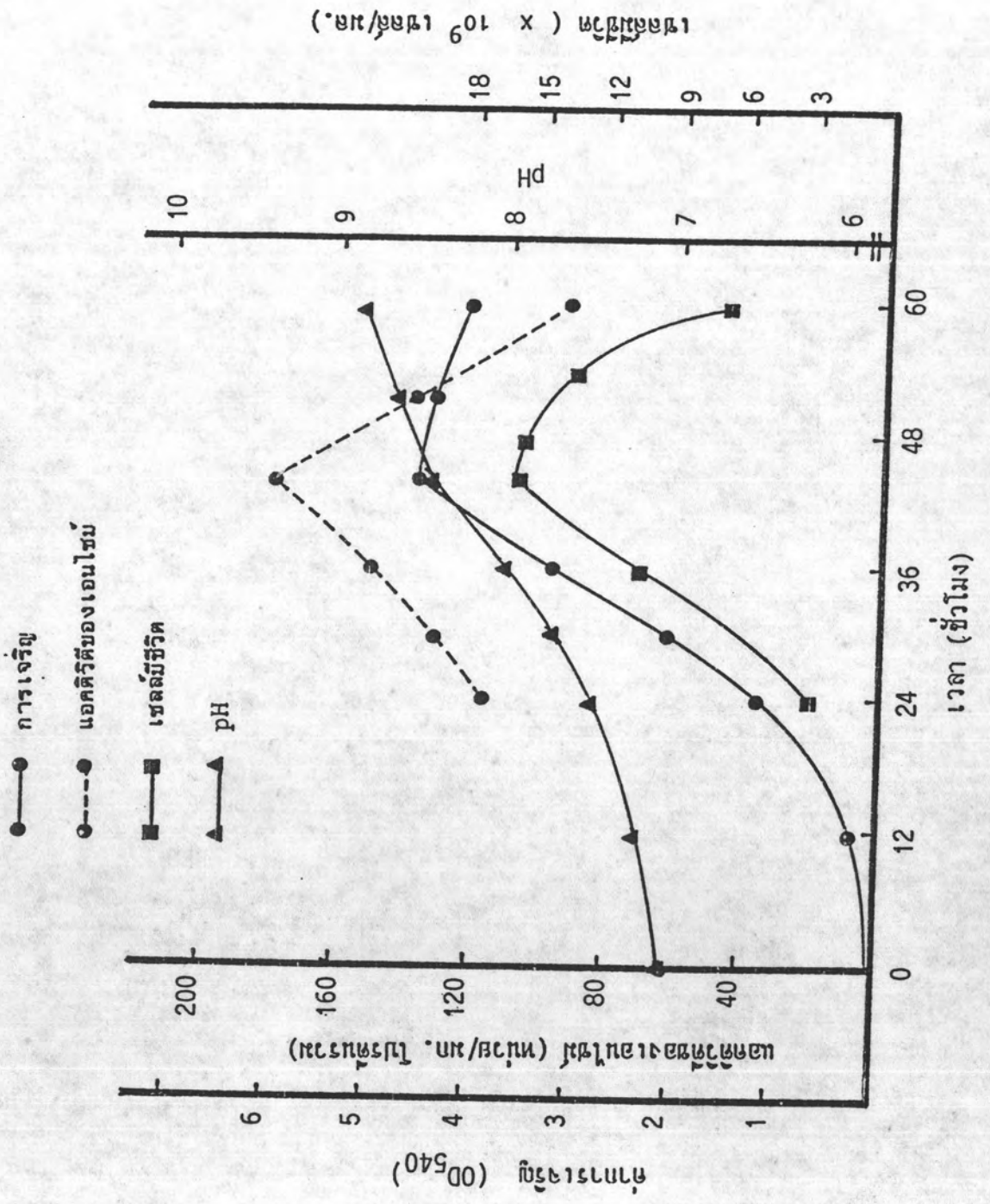
รูปที่ 7



รูปที่ 8

รูปแบบการเจริญ (●—●), การผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส (●----●), pH (▲—▲) และปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ (■—■) ของ *P. rettgeri* ATCC 9250 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรปรับค่าที่เสริมด้วยนอสปาร์เตท 0.8% ที่อุณหภูมิ 28⁰ซ

รูปที่ 8



3.1.5 การทดลองปรับ พี เอช ของอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการเจริญของ *Proteus rettgeri* ATCC 9250 ในอาหารเหลวสูตรปรับค่าที่เสริมด้วยแอสปาร์เตท 0.8 เปอร์เซ็นต์

จากการทดลองเจริญ *P. rettgeri* ATCC 9250 ในอาหารเหลวสูตรปรับค่าเสริมด้วยแอสปาร์เตท 0.8 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยปรับ พี เอช ให้คงที่อยู่ในช่วง 7.0-7.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ละลายตลอดระยะเวลาของการเจริญ (รูปที่ 9) พบว่าการเจริญและการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส จะไม่แตกต่างกันไปจากเดิมมากนัก ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการปรับ พี เอช ให้อยู่ในช่วง 7.0-7.5 ไม่สามารถเพิ่มการเจริญและการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส ได้

3.1.6 สารคั่นต่อคาร์บอนคู่

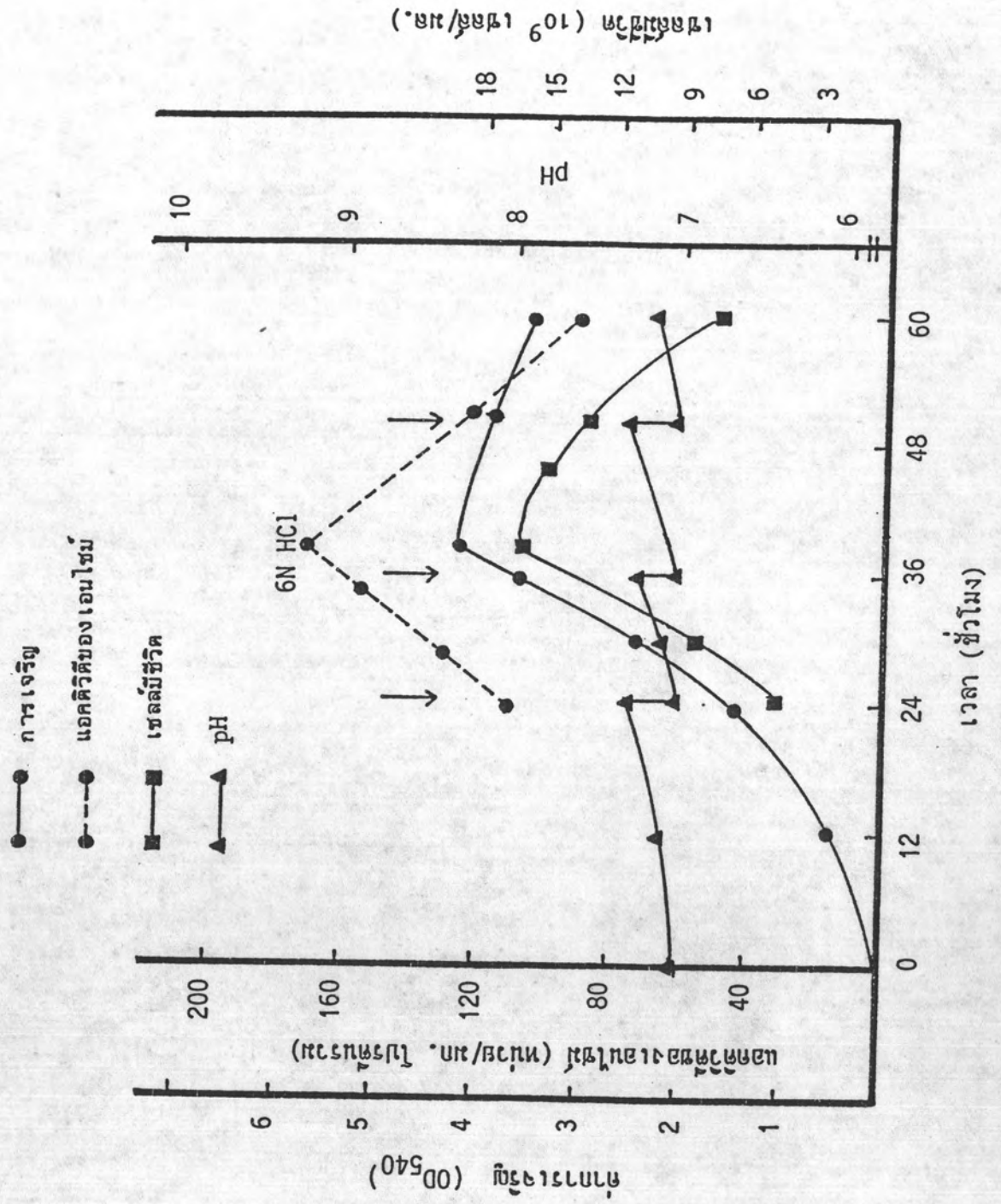
ในอาหารเหลวสูตรปรับค่าที่เสริมด้วยสารคั่นต่อคาร์บอน 2 ชนิดพร้อมกันคือ ซีเครท 0.2 เปอร์เซ็นต์ และกลูโคส 1.0 เปอร์เซ็นต์ *P. rettgeri* ATCC 9250 จะให้ค่าการเจริญสูงสุด สูงกว่าเมื่อใช้สารคั่นต่อคาร์บอนเดี่ยว ($OD_{540} \sim 3.65$) และแอกติวิตีของเพนนิซิลิน เอซีเลส สูงสุดมีค่ามากกว่าประมาณ 3 เท่า (98 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนรวมของเซลล์) (รูปที่ 10 ก) เมื่อทำการทดลองวัดระดับของกลูโคส ในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส และ กลูโคสออกซิเดส ตามวิธีทดลองข้อ 2.7.2 พบว่าในช่วง 9 ชั่วโมงแรกของการเจริญจะมีการเปลี่ยนแปลงระดับของกลูโคสน้อยมากหรือเกือบไม่มีเลย หลังจากนั้นระดับของกลูโคสจะลดลงอย่างรวดเร็ว และอัตราการเปลี่ยนแปลงระดับของกลูโคสจะเริ่มช้าลงเมื่อการเจริญของแบคทีเรียเข้าสู่ระยะการเจริญคงที่จนเหลือประมาณ 1.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่เวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง

เมื่อทำการทดลองเลี้ยง *P. rettgeri* ATCC 9250 ในสภาวะเดียวกัน แต่เสริมด้วยกลีเซอรอล 0.2 เปอร์เซ็นต์ แทนซีเครท พบว่าจะได้ค่าการเจริญสูงสุดใกล้เคียงกัน ($OD_{540} \sim 3.67$). ในขณะที่แอกติวิตีสูงสุดของเอนไซม์มีค่าลดลงกว่า 3 เท่า (30 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนรวมของเซลล์) ส่วนรูปแบบของการใช้สารคั่นต่อคาร์บอนที่เป็นกลูโคส จะมีลักษณะคล้ายคลึงกัน (รูปที่ 10 ข)

รูปที่ ๑

รูปแบบการเจริญ (●—●), การผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส (●-----●), pH (▲—▲) และปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (■—■) ของ *P. rettgeri* ATCC 9250 เมื่อเจริญในอาหารสูตรปรับค่าที่เสริมด้วย แอสปาร์เตท 0.8% ที่อุณหภูมิ 28⁰ซ ครึ่งค่าpH อยู่ใน ช่วง 7.0-7.5 ด้วย กรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 6 นอร์มอล

รูปที่ ๑



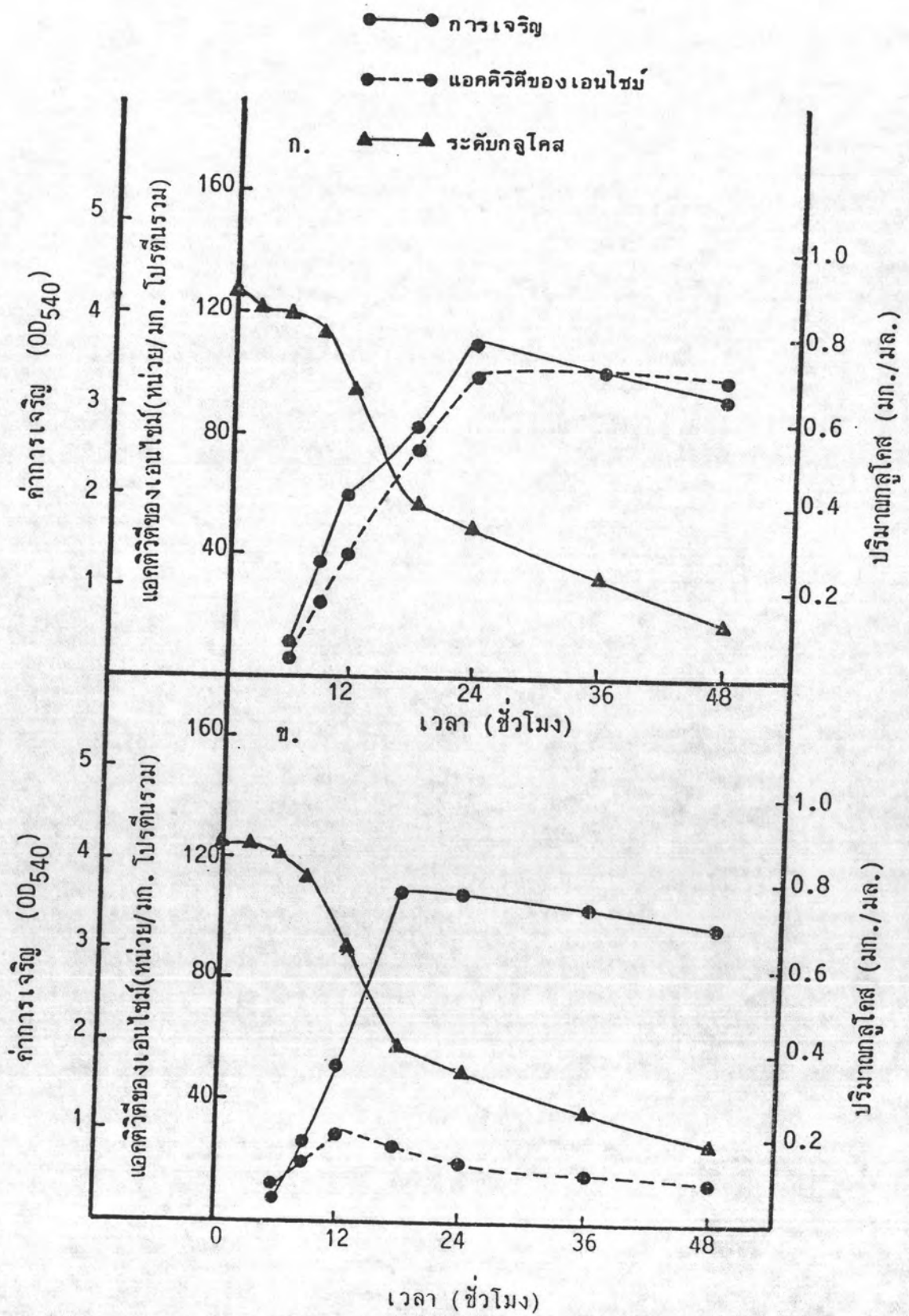
รูปที่ 10 รูปแบบการเจริญ (●—●) และการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส (●-----●) ของ *P. rettgeri* ATCC 9250 เมื่อเลี้ยงในอาหาร
สูตรปรับค่าที่เสริมด้วย

ก. ซีเครท 0.2% และ กลูโคส 1.0%

ข. กัสเซอร์อล 0.2% และ กลูโคส 1.0%

ที่อุณหภูมิ 28⁰ซ และติดตามวัฏระดับของกลูโคสที่เหลืออยู่ (▲—▲)
โดยใช้เอนไซม์ กลูโคสออกซิเดส ตามวิธีในข้อ 2.7.2

รูปที่ 10



3.1.7 การแปรความเข้มข้นของกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารตั้งต้นคาร์บอนคู่

ผลการศึกษาอิทธิพลของกลูโคสต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส โดยเลี้ยง *P. pettgeri* ATCC 9250 ในอาหารเหลวสูตรปรับค่าที่เสริมด้วยซิเตรท 0.2 เปอร์เซ็นต์ และกลูโคสในปริมาณความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ดังแสดงในรูปที่ 11ก และ 11ข พบว่าการเจริญสูงสุดจะแปรผันตามความเข้มข้นของกลูโคส คือ มีค่าเพิ่มขึ้นจาก 2.60 เป็น 3.07 และ 3.45 หน่วยที่ความเข้มข้นระดับต่ำ ๆ และค่าการเจริญสูงสุด เริ่มคงที่เมื่อเพิ่มระดับกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อให้สูงขึ้น (0.5-1.0 เปอร์เซ็นต์) ค่าแอกติวิตีสูงสุดของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส มีค่าเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของกลูโคสที่ใช้ตลอดช่วงของการทดลอง (0.2-1.0 เปอร์เซ็นต์)

3.1.8 การแปรความเข้มข้นของซิเตรทในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารตั้งต้นคาร์บอนคู่

ในอาหารเหลวสูตรปรับค่าที่เสริมด้วยกลูโคสความเข้มข้นคงที่ 1.0 เปอร์เซ็นต์ และแปรเปลี่ยนความเข้มข้นของซิเตรทเป็น 0.4 และ 0.8 เปอร์เซ็นต์ พบว่าค่าการเจริญสูงสุดของ *P. rettgeri* ATCC 9250 ที่วัดได้ใกล้เคียงกัน ($OD_{540} \sim 3.67$ และ 3.77) และไม่แตกต่างกันกับเมื่อเลี้ยง *P. pettgeri* ATCC 9250 ในอาหารเหลวที่เสริมด้วยซิเตรท 0.2 เปอร์เซ็นต์ และกลูโคส 1.0 เปอร์เซ็นต์ ตามผลการทดลองข้อ 3.1.6 แต่ค่าแอกติวิตีสูงสุดของ เอนไซม์ที่วัดได้กลับลดลงจาก 98 เป็น 67 และ 22 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนรวมของเซลล์ตามลำดับ (รูปที่ 12) จะเห็นได้ว่าซิเตรทที่มีความเข้มข้นสูง ๆ จะไปยับยั้งการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส ได้

3.1.9 การแปรความเข้มข้นของเคซีน ไฮโดรไลเซตในอาหารเหลวสูตรปรับค่า

เมื่อเจริญ *P. rettgeri* ATCC 9250 ในอาหารเหลวสูตรปรับค่าที่เสริมด้วยเคซีน ไฮโดรไลเซตความเข้มข้นต่าง ๆ กันตั้งแต่ 0.5-3.0 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พบว่าเคซีนจะเพิ่มการเจริญของแบคทีเรียได้ดีกว่าแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นที่ได้ทำการทดลองมาทั้งหมดและค่าการเจริญสูงสุดจะแปรผันตามความเข้มข้นของเคซีน และมีค่าการเจริญสูงสุด ($OD_{540} \sim 7.0$) เมื่อเสริมด้วยเคซีน 3.0 เปอร์เซ็นต์ แต่ทว่าค่าแอกติวิตีสูงสุดของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส ที่วัดได้กลับมีค่าลดลงอย่างเห็นได้ชัด คือค่าแอกติวิตีสูงสุดลดลงเหลือเพียง 12

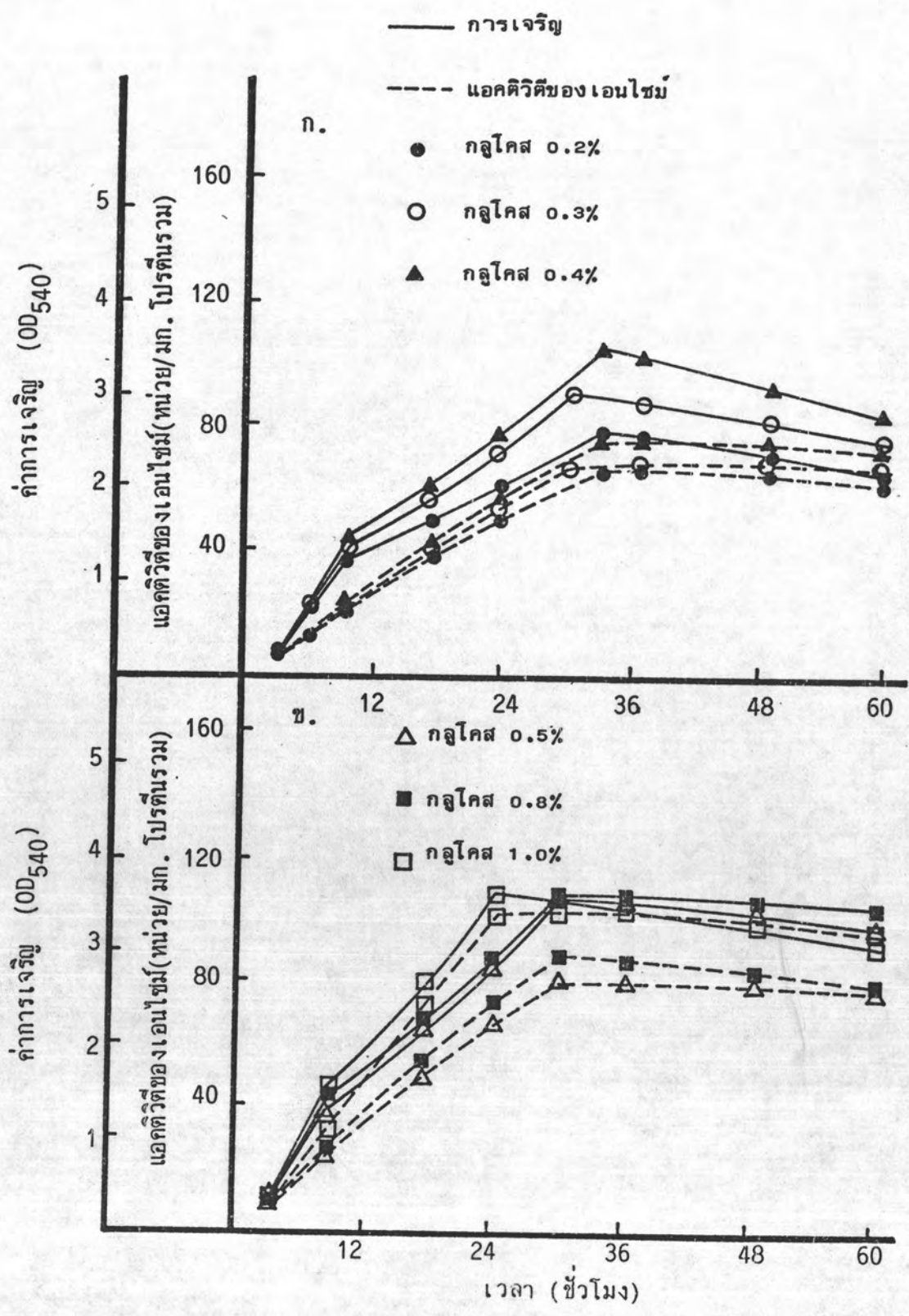
รูปที่ 11 รูปแบบการเจริญ (———) และการสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลิน
เอซิลเลส (-----) ของ *P. rettgeri* ATCC 9250 เมื่อ
ปลูกในอาหารสูตรปรับค่าที่เสริมด้วย ซีเครท 0.2 เปอร์เซ็นต์
(นน./ปริมาตร) และแปรเปลี่ยนความเข้มข้นของกลูโคส

ก. ความเข้มข้นของกลูโคสระหว่าง 0.2-0.4%

ข. ความเข้มข้นของกลูโคสระหว่าง 0.5-1.0%

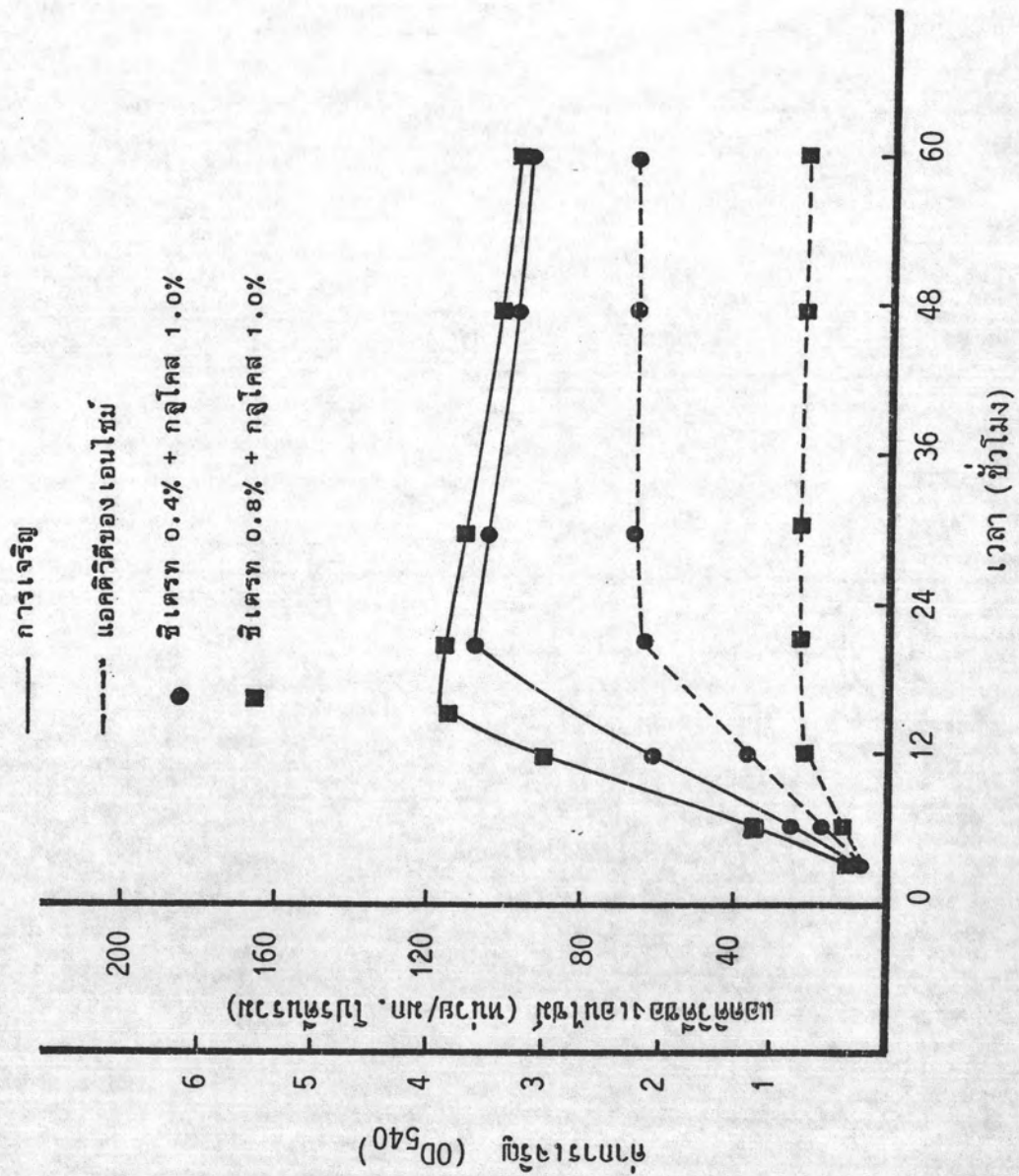
ที่อุณหภูมิตั้งที่ 28 องศาเซลเซียส

รูปที่ 11



รูปที่ 12 รูปแบบการเจริญ (——) และการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส (-----) ของ
P. rettgeri ATCC 9250 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรปรับค่าที่เสริมด้วย ซีเตรท 0.4%,
กลูโคส 1.0% (●) และ ซีเตรท 0.8%, กลูโคส 1.0% (■) ที่อุณหภูมิ 28^oซ

รูปที่ 12



หน่วยค่อมิลลิกรัม โปรตีนรวมของเซลล์เท่านั้น (รูปที่ 13) เป็นที่น่าสังเกตว่าช่วงเวลาของการเจริญสูงสุดของแบคทีเรียจะยาวนานอย่างมากจาก 10 ชั่วโมงที่เคซินเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ไปเป็น 5 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นเคซิน 3.0 เปอร์เซ็นต์

3.1.10 การแปรความเข้มข้นของแลคเตทในอาหารเหลวสูตรปรับค่าที่เสริมด้วยเคซิน

ผลการทดลองปลูก *P. rettgeri* ATCC 9250 ในอาหารเหลวสูตรปรับค่าที่เสริมด้วยเคซิน 2.0 เปอร์เซ็นต์ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส วัดการเจริญและผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส เทียบกับการเลี้ยง *P. rettgeri* ATCC 9250 ในอาหารสูตรปรับค่าที่เสริมด้วยเคซิน 2.0 เปอร์เซ็นต์ และแลคเตทความเข้มข้นแตกต่างกันตั้งแต่ 0.2-0.8 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 14) พบว่าค่าการเจริญและเอนไซม์แอกติวิตีที่วัดได้ไม่แปรผันตามความเข้มข้นของแลคเตทที่ใช้มากนัก ($OD_{540} \sim 6.0$ หน่วย เอนไซม์ แอกติวิตีสูงสุด 20 หน่วยค่อมิลลิกรัม โปรตีนรวมของเซลล์) แสดงว่าแลคเตทไม่สามารถเหนี่ยวนำการเจริญ และการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส ของ *P. rettgeri* ATCC 9250 ตรงกันข้ามอาจไปยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์และยังมีส่วนทำให้ช่วงเวลาของการผลิตเอนไซม์สูงสุดยาวนานออกไป เมื่อความเข้มข้นของแลคเตทที่ใช้สูงขึ้น

3.2 การกลายพันธุ์ *P. rettgeri* ATCC 9250 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเพนนิซิลิน เอซีเลส

3.2.1 การกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต

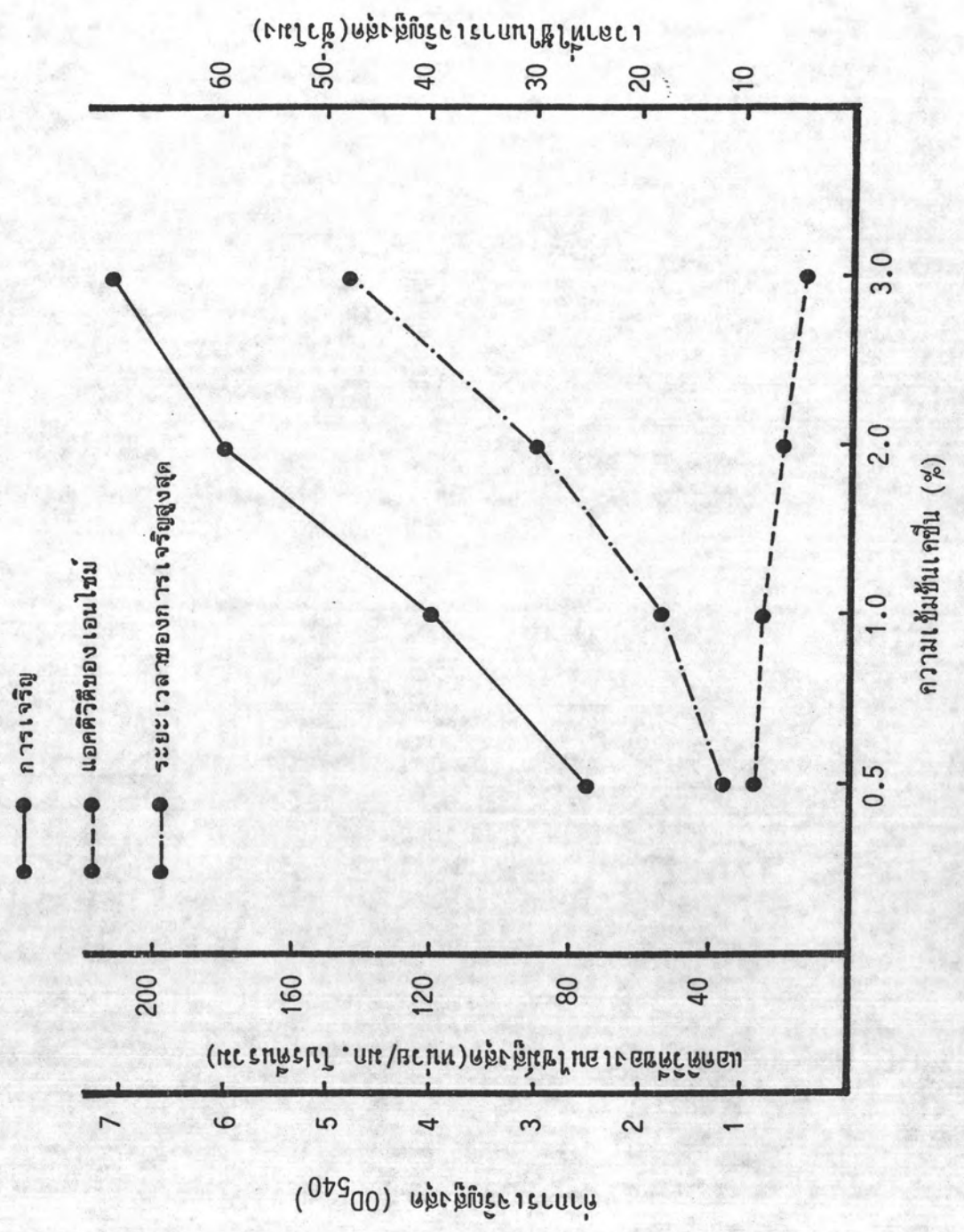
เมื่อทดลองกลายพันธุ์ *P. rettgeri* ATCC 9250 โดยใช้รังสีอัลตราไวโอเล็ต ตามวิธีทดลองข้อ 2.14.1 ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Son และคณะ (1982) ให้ผลการทดลองดังนี้

3.2.1.1 กราฟความอยู่รอด (Survival curve)

การศึกษาความอยู่รอดของ *P. rettgeri* ATCC 9250 เมื่อฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่มีขนาดกำลังส่องสว่าง 15 วัตต์ ในระยะห่าง 30 เซนติเมตร บนอาหารแข็งสูตรอุดมที่เสริมด้วยกลูโคส 0.2 เปอร์เซ็นต์ และเพนนิซิลิน จี 200 ไมโครกรัม ค่อมิลลิตรตามวิธีการทดลองที่ 2.14.1 (รูปที่ 15) พบว่าเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของ *P. rettgeri* ATCC 9250 เมื่อถูกฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตในช่วงเวลา 10 วินาที แรก จะลดลงอย่างรวดเร็วเหลือเพียง 5.7×10^{-4} เปอร์เซ็นต์ แต่ในช่วงเวลา 10-60 วินาที

รูปที่ 13 แสดงค่าการเจริญ (●—●) แอคติวิตีสูงสุดของ เอนไซม์พหุนิวคลีเอส เอซีเอส (●-----●)
และเวลาที่ใช้ในการเจริญสูงสุดของ *P. rettgeri* ATCC 9250 เมื่อปลูกในอาหารสูตร
ปรับค่าที่เสริมด้วยเคซีน ความเข้มข้นแตกต่างกันตั้งแต่ 0.5-0.3 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 28⁰ซ

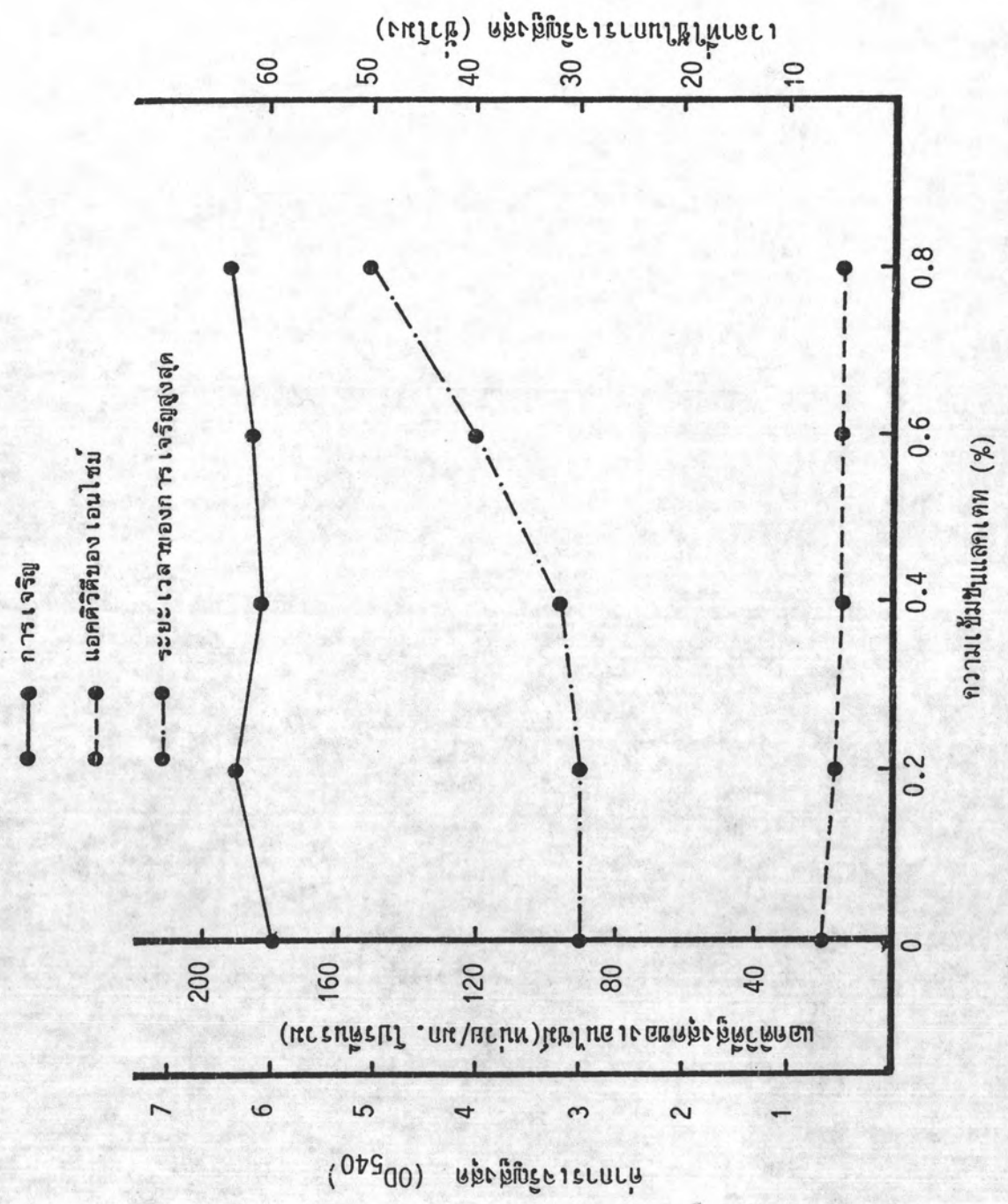
รูปที่ 13



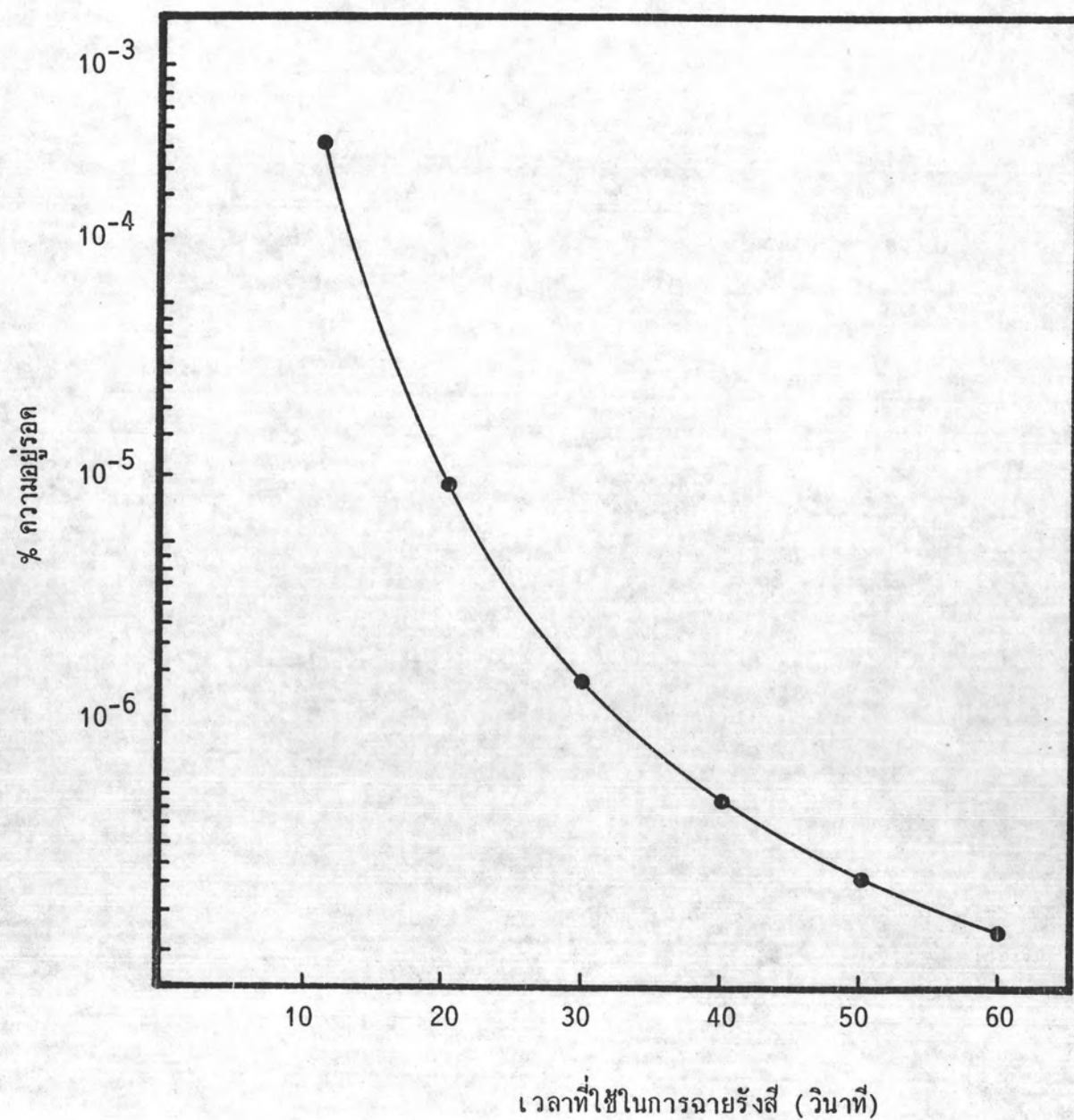
รูปที่ 14

แสดงค่าการเจริญสูงสุด (●—●) แอคติวิตีสูงสุดของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส (●-----●)
และ เวลาที่ใช้ในการเจริญสูงสุด (●-.-.-●) ของ *P. rettgeri* ATCC 9250
เมื่อปลูกในอาหารสูตรปรับค่าที่เสริมด้วยเคซีน 0.2% และ แปรเปลี่ยนตามเข้มข้นของแลคเตทจาก
0-0.8% ที่อุณหภูมิ 28^oซ

รูปที่ 14



รูปที่ 15. Survival curve ของ *P. rettgeri* ATCC 9250 เมื่อถูกฉายรังสีด้วยรังสีอุลตราไวโอเลต ที่มีขนาดกำลังส่องสว่าง 15 วัตต์ ในระยะห่าง 30 ซม. บนอาหารชนิดแข็งสูตรอุดมที่เสริมด้วย กลูโคส 0.2% และ เพนนิซิลิน จี 200 ไมโครกรัมต่อ มล. ที่อุณหภูมิ 28°C



พบว่าเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดจะลดลงอย่างช้า ๆ

3.2.1.2 การแยกสายพันธุ์ *P. rettgeri* ATCC 9250

เมื่อทำการทดลองกลายพันธุ์ *P. rettgeri* ATCC 9250 โดยใช้รังสีอุลตราไวโอเลต ที่มีขนาดกำลังส่องสว่าง 15 วัตต์ ในระยะห่าง 30 เซนติเมตร นาน 15 วินาที เริ่มต้นจาก 2.65×10^8 เซลล์บนอาหารแข็งสูตรอุดมที่เสริมด้วยกลูโคส 0.2 เปอร์เซ็นต์ และเพนนิซิลิน จี 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสามารถแยกเซลล์ ที่เหลืออยู่รอดได้ 5,219 โคโลนี เมื่อนำไปทดสอบการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส โดยวิธี Microbiological test ตามวิธีทดลองข้อ 2.9 จากจำนวน 216 โคโลนี พบมีวแคนท์ 2 ตัว ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. marcescens* ATCC 27117 ได้สูงสุด ซึ่งสูงกว่า *P. rettgeri* ATCC 9250 ให้ชื่อว่า No. 89 และ no. 139 (รูปที่ 16) เมื่อนำมีวแคนท์ทั้ง 2 มาเจริญในอาหารเหลวพบว่าไม่สามารถเจริญในอาหารสูตรปรับค่าที่เสริมด้วยกลูโคส 0.2 เปอร์เซ็นต์ได้ สามารถเจริญในอาหารสูตรปรับค่าที่เสริมด้วยซีเตรท 0.2 เปอร์เซ็นต์ กับกลูโคส 1.0 เปอร์เซ็นต์ และในอาหารสูตรอุดมได้ดี แต่ไม่มีการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส เลย (ตารางที่ 6)

3.2.2 การกลายพันธุ์ *P. rettgeri* ATCC 9250 ด้วย NTG (N-methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine)

จากการกลายพันธุ์ *P. rettgeri* ATCC 9250 ด้วย NTG ตามวิธีทดลองข้อ 2.14.2 ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Mandel และ Chen พบว่าจากเซลล์ *P. rettgeri* ATCC 9250 เริ่มต้น 1.7×10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร หลังจากทำปฏิกิริยากับ NTG จะมีเซลล์ที่เหลือรอดชีวิตประมาณ 1.1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และเมื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการคัดเลือก (enrichment) ด้วยเพนนิซิลิน จี 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 3 ชั่วโมงจะแยกมีวแคนท์ที่สามารถเจริญบนอาหารแข็งสูตรปรับค่าที่เสริมด้วยกลูโคส 0.2 เปอร์เซ็นต์ ได้ทั้งสิ้น 249 ตัว ซึ่งเมื่อนำไปทดสอบโดยการเลี้ยงมีวแคนท์ในอาหารเหลวสูตรปรับค่าที่เสริมด้วยกลูโคส 0.2 เปอร์เซ็นต์ เทียบกับสายพันธุ์เดิมคือ *P. rettgeri* ATCC 9250 พบว่ามีมีวแคนท์ 9 ตัวที่สามารถเจริญ และผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส ได้สูงกว่าสายพันธุ์ *P. rettgeri* ATCC 9250 WT ซึ่งต่อไปจะให้ชื่อว่า SPS (1-9) รายละเอียดผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 7

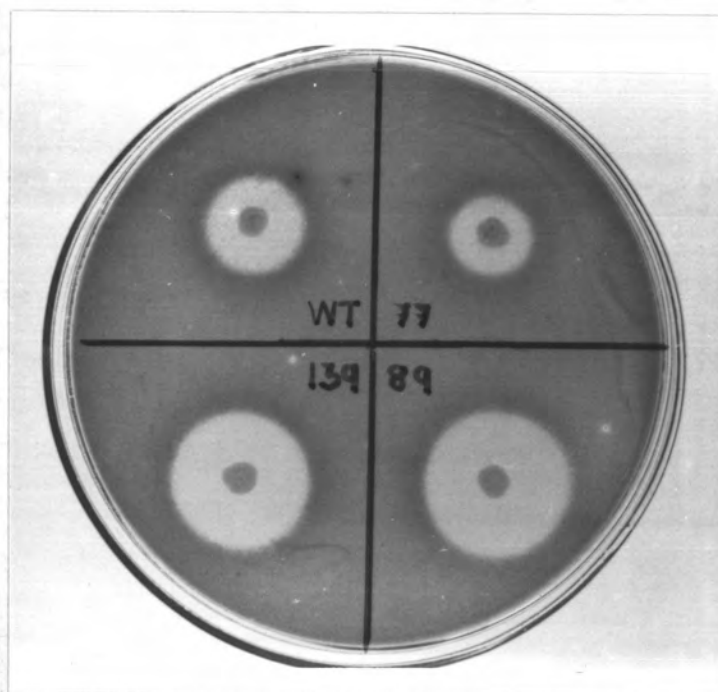
รูปที่ 16 แสดงผลการทดสอบการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส ของมิวแตนท์ No. 89 และ No. 139 โดยสังเกตการยับยั้งการเจริญของ *S. marcescens* ATCC 27117 ตามวิธีทดลองข้อ 2.9 เทียบกับ *P. rettgeri* ATCC 9250 WT

WT คือ *P. rettgeri* ATCC 9250

77 คือ มิวแตนท์ No. 77

89 คือ มิวแตนท์ No. 89

139 คือ มิวแตนท์ No. 139



ตารางที่ 6 แสดงค่าการเจริญและแอกติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส ใน
 มิวแตนท์ No. 89 และ No. 139 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ
 ชนิดต่าง ๆ

| ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ | ค่าการเจริญสูงสุด (OD ₅₄₀) | | เวลาที่ใช้ในการเจริญสูงสุด ช.ม. | | แอกติวิตีเอนไซม์เพนนิ ซิลิน เอซีเลส สูงสุด (หน่วย/มก, โปรตีนรวมของเซลล์) | |
|--------------------------------------------|-------------------------------------------|--------|------------------------------------|--------|--------------------------------------------------------------------------------|---------|
| | No.89 | No.139 | No.89 | No.139 | No.89 | No. 139 |
| 1. สูตรอุดม | 4.6 | 4.4 | 18 | 20 | - | - |
| 2. สูตรอุดม, กลูโคส 0.2% | 5.5 | 4.8 | 24 | 24 | - | - |
| 3. สูตรปรับค่า, กลูโคส 0.2% | - | - | - | - | - | - |
| 4. สูตรปรับค่า, แอสปาร์ เตท 0.8% | 4.6 | 4.5 | 44 | 40 | - | - |
| 5. สูตรปรับค่า, ซิเตรท 0.2% กลูโคส 1.0% | 5.4 | 5.6 | 24 | 20 | - | - |

- ไม่มีแอกติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบการเจริญและผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส ของมีวแคนท์ SPS (1-9) กับ *P. rettgeri* ATCC 9250 WT เมื่อเจริญในอาหารสูตรปรับค่าที่เสริมด้วยกลูโคส 0.2% นาน 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

| สายพันธุ์ | ค่าการเจริญ (OD ₅₄₀) | แอกติวิตีเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส (หน่วย/มก. โปรตีนรวมของเซลล์) |
|------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| <i>P. rettgeri</i> ATCC 9250 WT | (1) - | (1) - |
| SPS-1 | 1.60 | 59 |
| SPS-2 | 2.80 | 90 |
| SPS-3 | 2.08 | 88 |
| SPS-4 | 1.88 | 58 |
| SPS-5 | 0.52 | 35 |
| SPS-6 | 2.46 | 127 |
| SPS-7 | 2.80 | 90 |
| SPS-8 | 2,80 | 120 |
| SPS-9 | 1.04 | 35 |

1 หน่วย (1 Unit) - ปริมาณเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส ที่ใช้ในการไฮโดรไลซ์
1 นาโนโมลของ PAAB ต่อนาที หรือการเกิด PABA
1 นาโนโมล ต่อนาที ที่สภาวะที่ทดลอง

(1) - ไม่มีการเจริญและแอกติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส

3.3 การผลิตเอนไซม์เบต้า-แลคแตมเมส ใน *P. rettgeri* ATCC 9250 และมิวแตนท์ SPS-6, SPS-7 และ SPS-8

3.3.1 การตรวจสอบเอนไซม์เบต้า-แลคแตมเมส ในจานเพาะเชื้อ

โดยการเปรียบเทียบการเจริญและฟอกจางสีน้ำเงินของสารละลายน้ำแบ็ง-ไอโอดีน ระหว่าง *P. rettgeri* ATCC 9250 WT มิวแตนท์ SPS-6, SPS-7, SPS-8 และ *K. pneumoniae* M5a1 เมื่อบ่มแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็งสูตรอุดมและสูตรปรับค่าเจริญด้วยกลูโคส 0.2 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถเจริญได้ดีในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็งสูตรอุดม และสูตรปรับค่าเสริมด้วยกลูโคส 0.2 เปอร์เซ็นต์ยกเว้น *P. rettgeri* ATCC 9250 ซึ่งเจริญได้ในเฉพาะอาหารแข็งสูตรอุดมเท่านั้น เมื่อศึกษาเปรียบเทียบน้ำแบ็ง-ไอโอดีนตามวิธีทดลองข้อ 2.11.1 พบว่า *K. pneumoniae* M5a1 เท่านั้นที่สามารถฟอกจางสีน้ำเงินของสารละลายน้ำแบ็ง-ไอโอดีนได้ทั้งในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็งสูตรอุดม และสูตรปรับค่าที่เสริมด้วยกลูโคส 0.2 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 17) ในขณะที่ *P. rettgeri* ATCC 9250 WT และมิวแตนท์ SPS-6, SPS-7 และ SPS-8 สามารถเจริญได้ดีในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็งสูตรอุดม แต่ไม่สามารถฟอกจางสีน้ำเงินของสารละลายน้ำแบ็ง-ไอโอดีนได้ สำหรับมิวแตนท์ SPS-6, SPS-7 และ SPS-8 เมื่อเจริญในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็งสูตรปรับค่าที่เสริมด้วยกลูโคส 0.2 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีการเจริญได้ดี แต่ไม่สามารถฟอกจางสีน้ำเงินของสารละลายน้ำแบ็ง-ไอโอดีน ได้เช่นเดียวกัน

3.3.2 การผลิตเอนไซม์เบต้า-แลคแตมเมสในอาหารเหลว

ผลการทดลองเลี้ยง *P. rettgeri* ATCC 9250 WT มิวแตนท์ SPS-6 และ *K. pneumoniae* M 5a1 ในอาหารเหลวสูตรอุดม และสูตรปรับค่าที่เสริมด้วยกลูโคส 0.2 เปอร์เซ็นต์ พบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถเจริญได้ดีในอาหารเหลวสูตรอุดม และ *K. pneumoniae* M 5a1 จะได้ค่าแอกติวิตีของเอนไซม์เบต้า-แลคแตมเมส ซึ่งวัดตามวิธีทดลองข้อ 2.11.2 เท่ากับ 0.5 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนสุทธิของเซลล์ ในขณะที่ทั้ง *P. rettgeri* ATCC 9250 และมิวแตนท์ SPS-6 ไม่สามารถตรวจพบแอกติวิตีของเอนไซม์เบต้า-แลคแตมเมส (ตารางที่ 8) แล้วไม่สามารถตรวจพบแอกติวิตีของเอนไซม์เบต้า-แลคแตมเมส เมื่อเจริญมิวแตนท์ SPS-6 ในอาหารเหลวสูตรปรับค่าที่เจริญด้วยกลูโคส 0.2 เปอร์เซ็นต์เช่น

รูปที่ 17 แสดงการเจริญและการฟอกจางสีน้ำเงินของสารละลายน้ำแข็งขโไอโอดีน
(ทดสอบแอกติวิตีของเอนไซม์ เบคต้า แลคแตม เมส ตามวิธีทดลองข้อ
2.11.2) ของ *P. rettgeri* ATCC 9250, มีวแทนท์ SBS-6,
SPS-7, SPS-8 และ *K. pneumoniae* M 5a1 ในจานเพาะเชื้อ

ก. อาหารชนิดแข็งสูตรอุดม

ข. อาหารชนิดแข็งสูตรปรับค่าที่เสริมด้วยกลูโคส 0.2%

WT คือ *P. rettgeri* ATCC 9205

K คือ *K. pneumoniae* M5a1

E คือ *E. coli* ATCC 9637

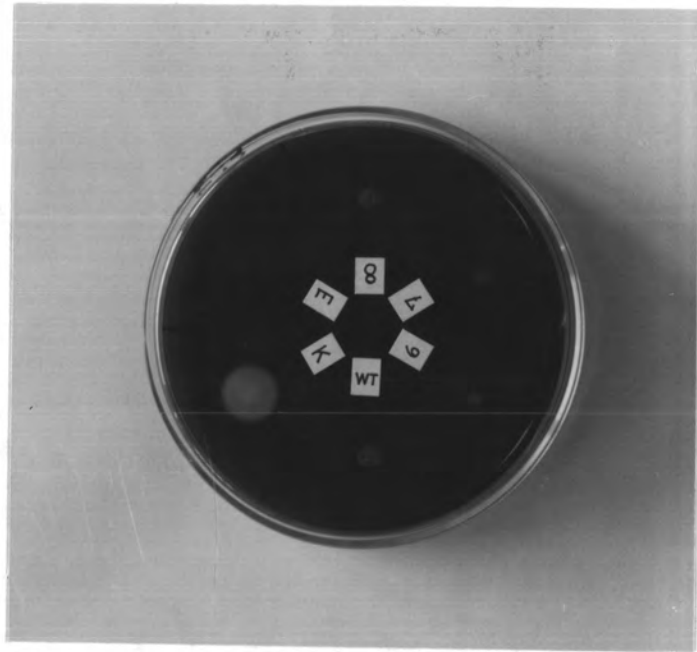
6 คือ มีวแทนท์ SPS-6

7 คือ มีวแทนท์ SPS07

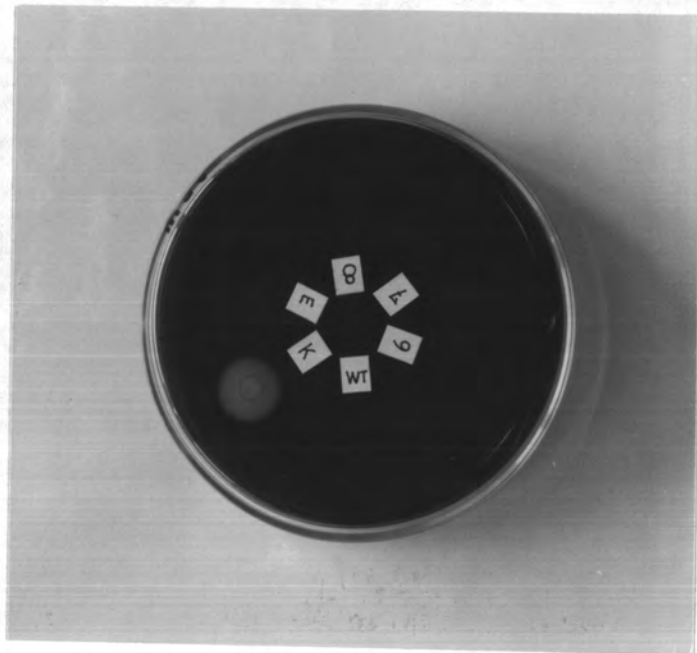
8 คือ มีวแทนท์ SPS-8

รูปที่ 17

ก.



ข.



ตารางที่ 8 แสดงแอกติวิตีของเอนไซม์เบต้า-แลคแตมเมส ใน *P. rettgeri* ATCC 9250 WT
 มิวแคนท์ (SPS-6) และ *K. pneumoniae* M 5a1 เมื่อเลี้ยงในสูตร
 อาหารชนิดต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 28⁰ซ และ วัดแอกติวิตี ของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ
 37⁰ซ ตามวิธีข้อ 2.11.2

| ชนิดของแบคทีเรีย | ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ | แอกติวิตีเอนไซม์เบต้า-แลคแตมเมส (หน่วย* /มก. โปรตีนรวมของเซลล์) |
|---------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| <i>P. rettgeri</i> ATCC 9250 WT | สูตรอุดม | 0 |
| มิวแคนท์ (SPS-6) | สูตรอุดม | 0 |
| | สูตรปรับต่ำ, กลูโคส 0.2% | 0 |
| <i>K. pneumoniae</i> M5a1 | สูตรอุดม | 0.5 |

*1 หน่วย (unit) - ปริมาณเอนไซม์เบต้า-แลคแตมเมส ที่ใช้เร่งปฏิกิริยา
 การเกิด กรดเพนนิซิลอิก 1 ไมโครโมล ต่อนาที
 ภายใต้สภาวะที่ทดลอง

เดียวกัน

3.4 การศึกษาเปรียบเทียบการเจริญและการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส ของมิวแคนท์ SPS-6 กับ *P. rettgeri* ATCC 9250 WT

เมื่อเลี้ยงมิวแคนท์ SPS-6 และ *P. rettgeri* ATCC 9250 WT ในอาหารเหลวสูตรอุดมพบว่ค่าการเจริญสูงสุดของทั้งมิวแคนท์ SPS-6 และ *P. rettgeri* ATCC 9250 มีค่าใกล้เคียงกันประมาณ 4.2 และ 4.4 หน่วย ในขณะที่ค่าแอกติวิตีสูงสุดของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส ที่วัดได้มีค่าต่ำเพียง 18.0 และ 15.2 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนรวมของเซลล์ (รูปที่ 18) แต่ถ้าหากเลี้ยงมิวแคนท์ SPS-6 และ *P. rettgeri* ATCC 9250 WT ในอาหารเหลวสูตรปรับค่าที่เสริมด้วยกลูโคส 0.2 เปอร์เซ็นต์ พบว่มิวแคนท์ SPS-6 สามารถเจริญได้ดีโดยวัดค่าการเจริญสูงสุดใกล้เคียงกับที่เลี้ยงในอาหารสูตรอุดมเมื่อใช้เวลาในการเจริญ 33 ชั่วโมง และผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส ได้สูงถึง 194 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนรวมของเซลล์ ส่วน *P. rettgeri* ATCC 9250 WT ไม่สามารถเจริญในอาหารเหลวสูตรปรับค่าที่เสริมด้วยกลูโคส 0.2 เปอร์เซ็นต์

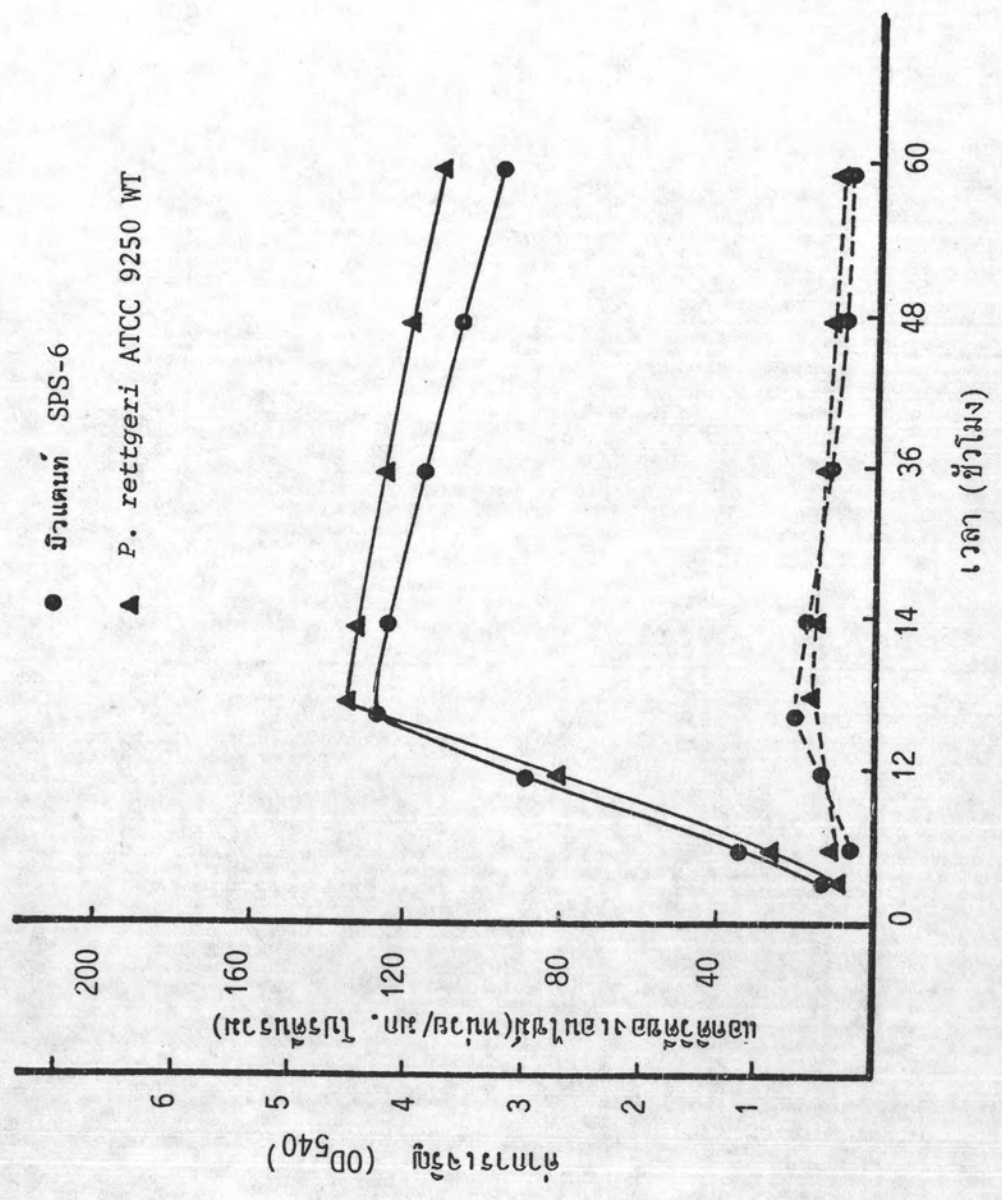
3.5 ผลกระทบของความเข้มข้นของกลูโคสที่มีต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส ในมิวแคนท์ SPS-6

เมื่อทดลองเจริญมิวแคนท์ SPS-6 ในอาหารเหลวสูตรปรับค่าที่เสริมด้วยกลูโคส ความเข้มข้นแตกต่างกันตั้งแต่ 0.2-2.0 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 19) พบว่ค่าการเจริญสูงสุดของแบคทีเรีย จะมีค่าใกล้เคียงกัน ($OD_{540} \sim 4.16-4.85$ หน่วย) ส่วนแอกติวิตีสูงสุดของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส มีค่าเพิ่มขึ้นจาก 198 เป็น 397 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนรวมของเซลล์ เมื่อความเข้มข้นของกลูโคสเพิ่มจาก 0.2 เป็น 0.4 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเหลวสูตรปรับค่าที่เสริมด้วยกลูโคส ความเข้มข้นสูงกว่นี้ ค่าแอกติวิตีสูงสุดของเอนไซม์ที่วัดได้จะมีค่าลดลง และจะลดลง กว่ 10 เท่า เมื่อเลี้ยงมิวแคนท์ SPS-6 ในอาหารเหลวสูตรปรับค่าที่เสริมด้วยกลูโคส 2.0 เปอร์เซ็นต์ (31 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนสุทธิของเซลล์) แสดงให้เห็นว่กลูโคสที่ความเข้มข้นสูง จะมีความสามารถไปก่กั้นการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส

รูปที่ 18 เปรียบเทียบการเจริญ (——) และการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส (-----)
ระหว่างมีวแคนท์ SPS-6 (●) กับ *P. rettgeri* ATCC 9250 WT (▲) เมื่อ
เลี้ยงในอาหารสูตรอุดมที่อุณหภูมิ 28^oซ

รูปที่ 18

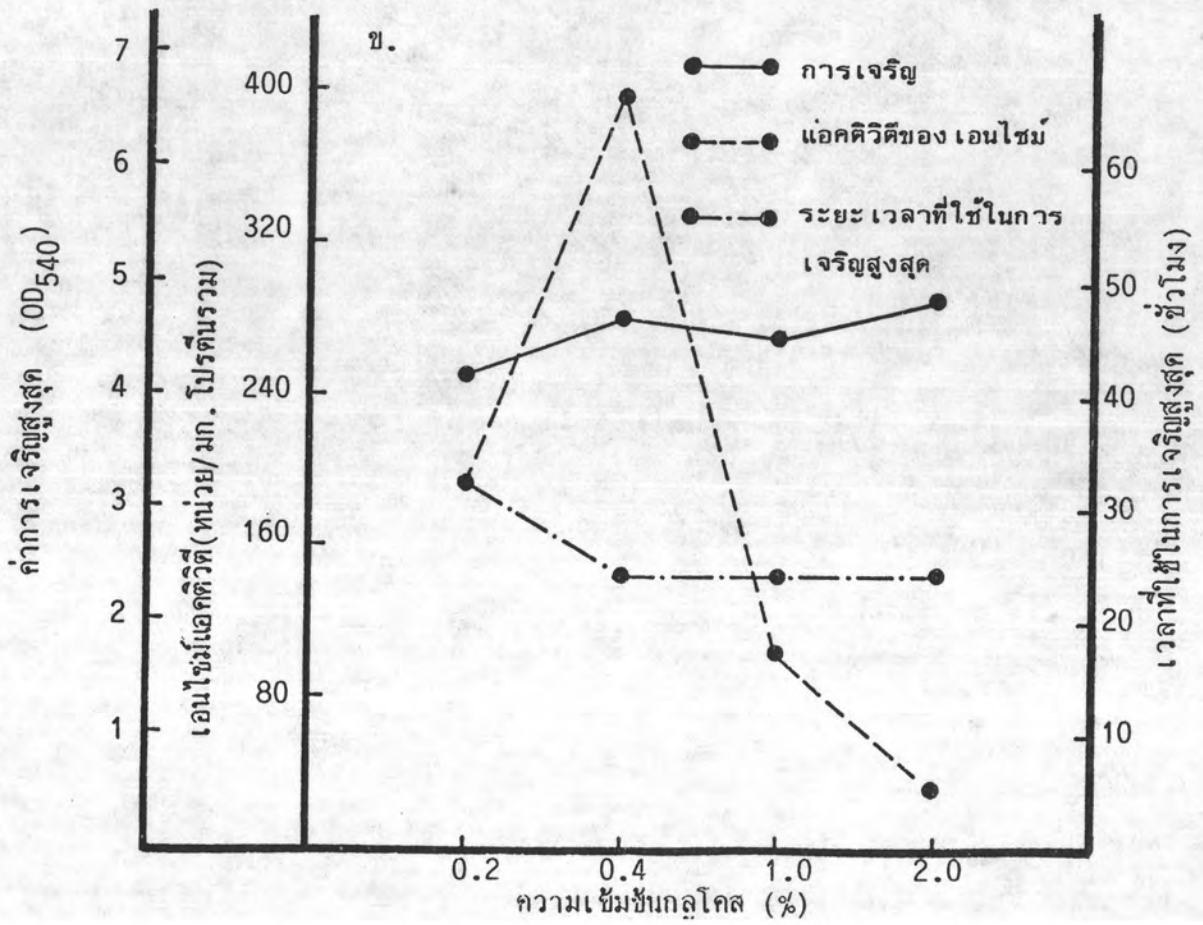
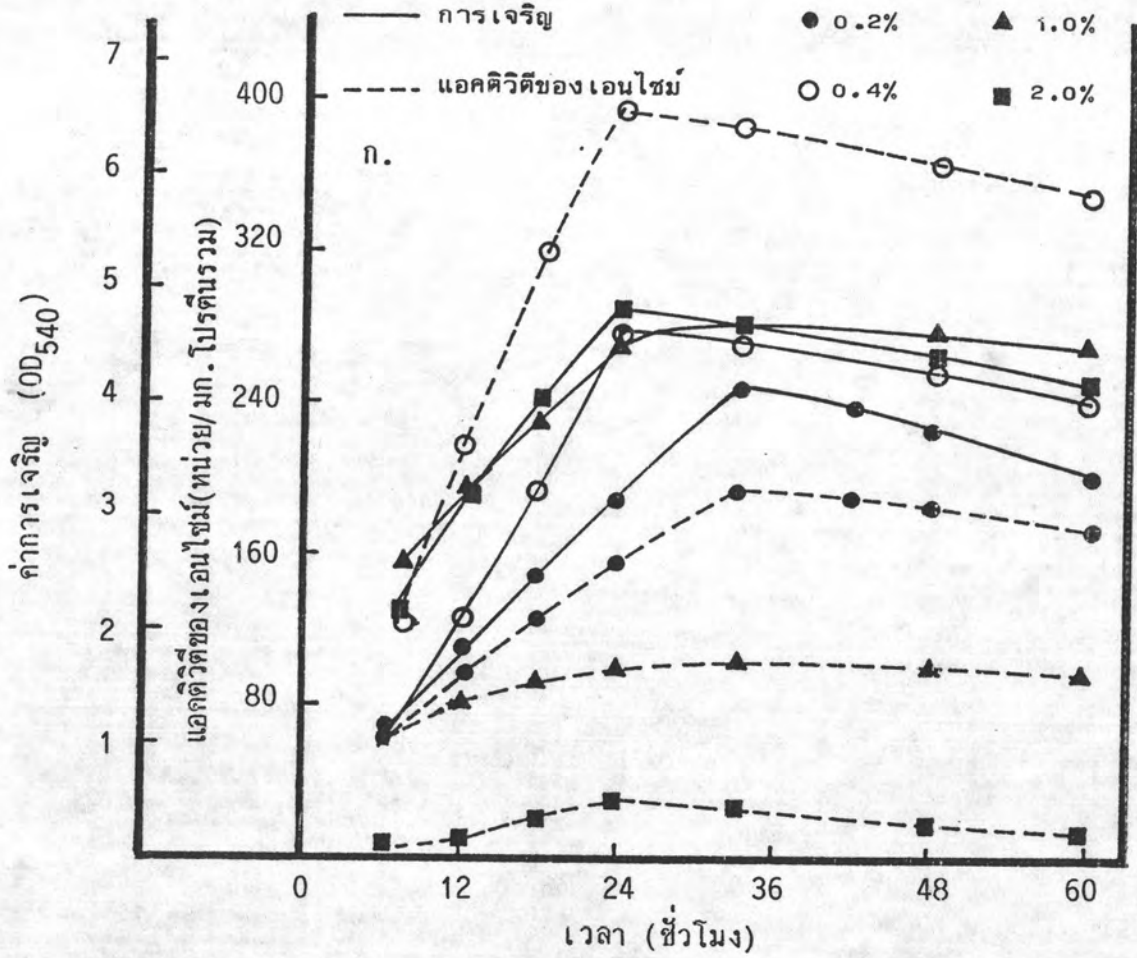
— การเจริญ
 ---- แอคติวิตีของเอนไซม์
 ● มีวแทนท์ SPS-6
 ▲ *P. rettgeri* ATCC 9250 WT



รูปที่ 19

ก. รูปแบบการเจริญ (———) และการสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส (-----) ของมิวแคนท์ SPS-6 เมื่อปลูกในอาหารสูตรปรับค่าที่เสริมด้วยกลูโคส 0.2% (◡), 0.4 (○), 1.0% (▲) และ 2.0% (■) ความล้าคืบ อุณหภูมิ 28⁰ซ

ข. แสดงความเข้มข้นด้วยการเจริญสูงสุด (●——●), แอคติวิตีสูงสุดของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส (●-----●) และเวลาที่ใช้ในการเจริญสูงสุดของมิวแคนท์ SPS-6 เมื่อปลูกในอาหารสูตรปรับค่าที่เสริมด้วยกลูโคส ความเข้มข้นแตกต่างกันตั้งแต่ 0.2-2.0% อุณหภูมิ 28⁰ซ



3.6 การศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส ของมิวแทนท์ SPS-6 กับ *P. rettgeri* ATCC 9250 WT

3.6.1 พี เอช ที่เหมาะสม

(optimum pH)

เมื่อวัดแอกติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส ของมิวแทนท์ SPS-6 เปรียบเทียบกับ *P. rettgeri* ATCC 9250 WT โดยใช้เพนนิซิลิน จี เป็นสับสเตรท ตามวิธีทดลองข้อ 2.10.2 ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่า พี เอช ต่าง ๆ กันในช่วงระหว่าง 4.0-9.5 (พี เอช 4.0-6.5 ใช้สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์, พี เอช 6.0-8.5 ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และ พี เอช 8.0-9.5 ใช้สารละลายทริส กรดไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส ของเซลล์มิวแทนท์ SPS-6 และ *P. rettgeri* ATCC 9250 WT สามารถเร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์เพนนิซิลิน จี ได้ดีในช่วง พี เอช ใกล้เคียงกันประมาณ 7.0-8.5 (รูปที่ 20)

3.6.2 อุณหภูมิที่เหมาะสม

(optimum temperature)

เมื่อทำการทดลองวัดแอกติวิตีของ เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลสของเซลล์มิวแทนท์ SPS-6 เปรียบเทียบกับ *P. rettgeri* ATCC 9250 WT โดยใช้เพนนิซิลิน จี เป็นสับสเตรทที่อุณหภูมิของการทำปฏิกิริยาต่าง ๆ กันตั้งแต่ 30-60 องศาเซลเซียส ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 21 พบว่าเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส ที่ได้จากเซลล์มิวแทนท์ SPS-6 สามารถเร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์เพนนิซิลิน จี ได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ในขณะที่เอนไซม์จากเซลล์ของ *P. rettgeri* ATCC 9250 WT สามารถเร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์เพนนิซิลิน จี ได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิต่ำกว่าคือ 45 องศาเซลเซียส

3.6.3 ผลกระทบของ พี เอช ต่อความเสถียรของ เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส

เมื่อนำเซลล์มิวแทนท์ SPS-6 และ *P. rettgeri* ATCC 9250 WT ไปแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่า พี เอช แตกต่างกันตั้งแต่ 4.0-9.5 (พี เอช 4.0-6.5 ใช้สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์, พี เอช 6.0-8.5 ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และ พี เอช 8.0-9.5

รูปที่ 20

เปรียบเทียบผลของ pH ต่อปฏิกริยาการไฮโดรไลซ์ เพนนิซิลิน จี ของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส ซึ่งวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีข้อ 2.10.2 ที่ 37⁰ซ ในสารละลายบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH ต่าง ๆ คือ pH 4.0-6.5 (อะซีเตทบัฟเฟอร์, ●), pH 6.0-8.5 (ฟอสเฟตบัฟเฟอร์, ▲), pH 8.0-9.5 (ทริส-กรดไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์, ■)

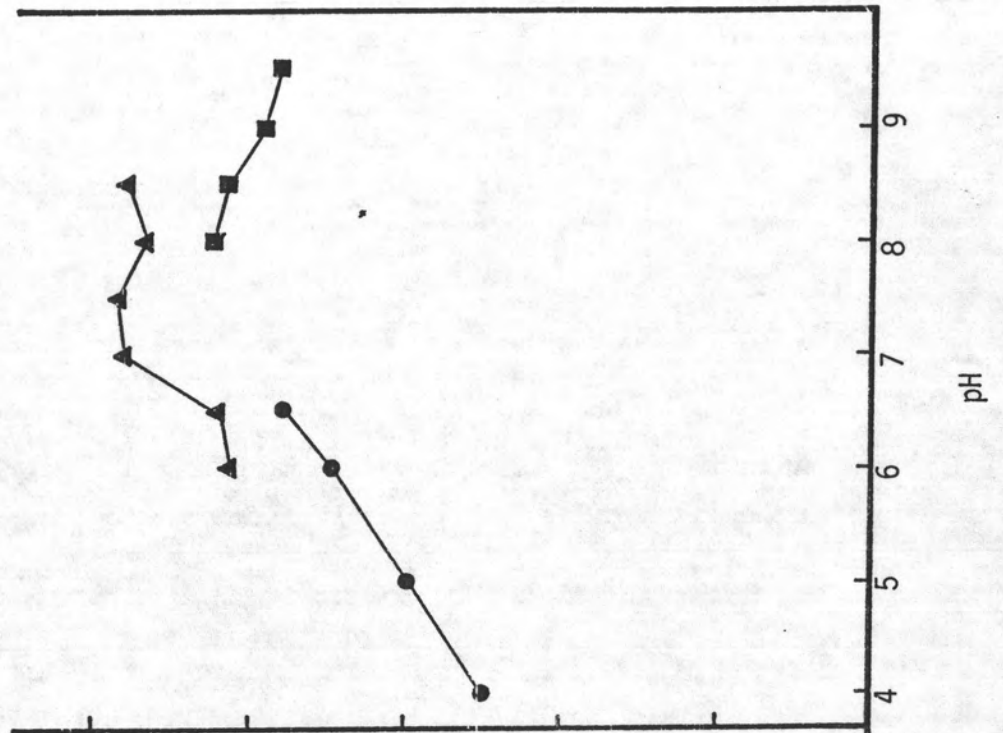
ก. เซลล์มีวแทนท์ SPS-6

ข. เซลล์ *P. rettgeri* ATCC 9250 WT

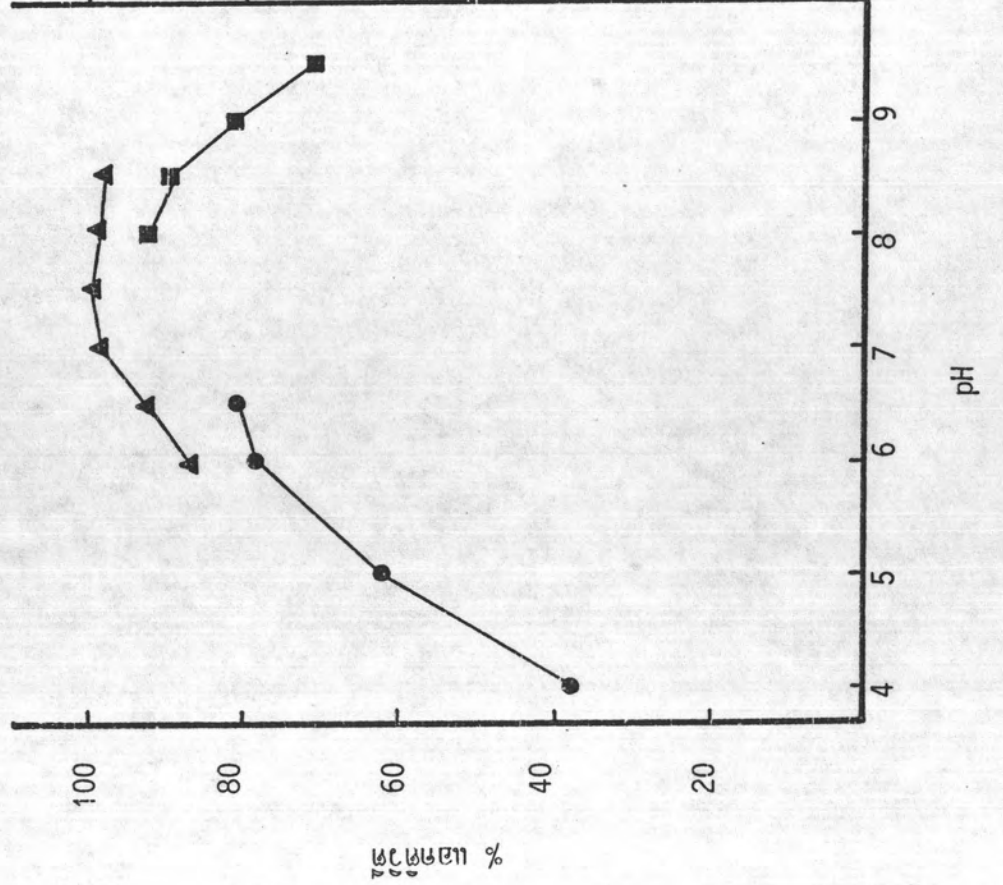


วันที่ 20

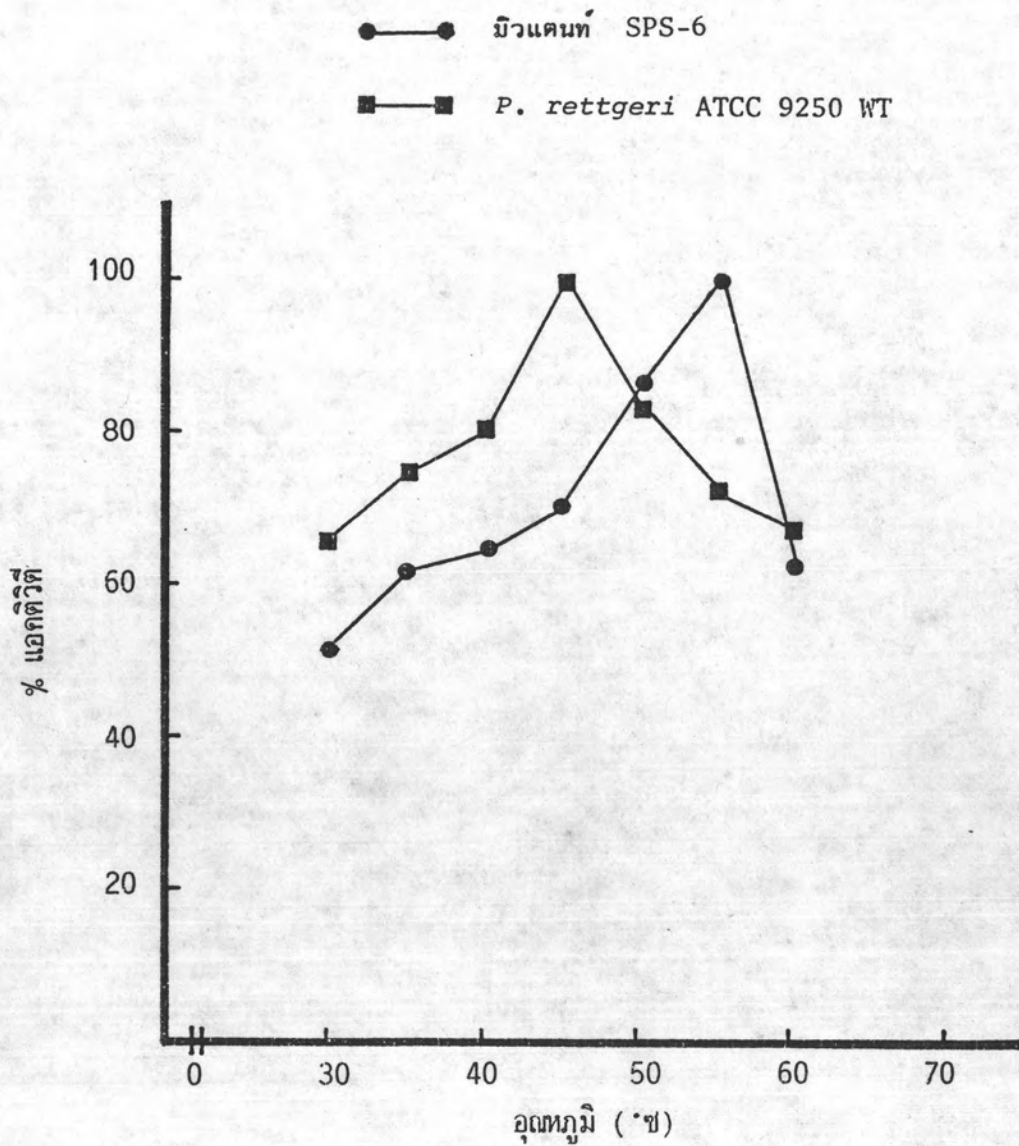
บ. P. rettgeri ATCC 9250 WT



บ. สิวคันทน์ SPS-6



รูปที่ 21 เปรียบเทียบผลกระทบบของอุณหภูมิที่มีต่อปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์เพนนิซิลิน จี ด้วยเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเอส เมื่อใช้เซลล์มิวแตนต์ SPS-6 (●) และเซลล์ *P. rettgeri* ATCC 9250 WT (■)



ใช้สารละลายทริส กรดไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง แล้วเปรียบเทียบแอกติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส ในแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ตามวิธีทดลองข้อ 2.10.2 พบว่าเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส ที่ได้จากเซลล์ มิวแคนท์ SPS-6 จะมีความเสถียรต่อ พี เอช เมื่ออินคิวเบตในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่มีค่า พี เอช อยู่ในช่วงระหว่าง 7.0-8.0 ส่วน เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส ที่ได้จากเซลล์ *P. rettgeri* ATCC 9250 WT จะมีค่าความเสถียรต่อ พี เอช ในช่วงกว้างกว่าคือประมาณ 7.0-8.5 ผลการทดลองดังแสดง ในรูปที่ 22

3.6.4 ผลกระทบของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส

จากผลการทดลองวัดแอกติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส ของเซลล์มิวแคนท์ SPS-6 เปรียบเทียบกับ *P. rettgeri* ATCC 9250 WT โดยใช้เพนนิซิลิน จี เป็นสับสเตรท เมื่อแช่เซลล์ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พี เอช 7.0 ในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน พบว่าแอกติวิตีของเอนไซม์จะคงที่ตลอดช่วงเวลาที่ถูกอินคิวเบต ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง (รูปที่ 23)

3.6.5 ผลกระทบของความเข้มข้นของสับสเตรทต่อแอกติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส

จากการทดลองเปรียบเทียบแอกติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส ของเซลล์มิวแคนท์ SPS-6 และ *P. rettgeri* ATCC 9250 WT โดยใช้เพนนิซิลิน จี เป็นสับสเตรทที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันตั้งแต่ 7.0-56.0 มิลลิโมลาร์ พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างส่วนกลับของความเข้มข้นของเพนนิซิลิน จี ต่อส่วนกลับของแอกติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส จากเซลล์ทั้งในมิวแคนท์ SPS-6 และ *P. rettgeri* ATCC 9250 WT โดย Line weaver Burk Plot มีลักษณะดังแสดงในรูปที่ 24 ซึ่งเมื่อคำนวณค่า Km ของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส ที่ได้จากเซลล์มิวแคนท์ SPS-6 และ *P. rettgeri* ATCC 9250 WT เท่ากับ 5.6 และ 9.0 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

3.6.6 ค่าคงที่ของการยับยั้ง (Ki) ของกรดฟีนอลอะซีติกต่อเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส

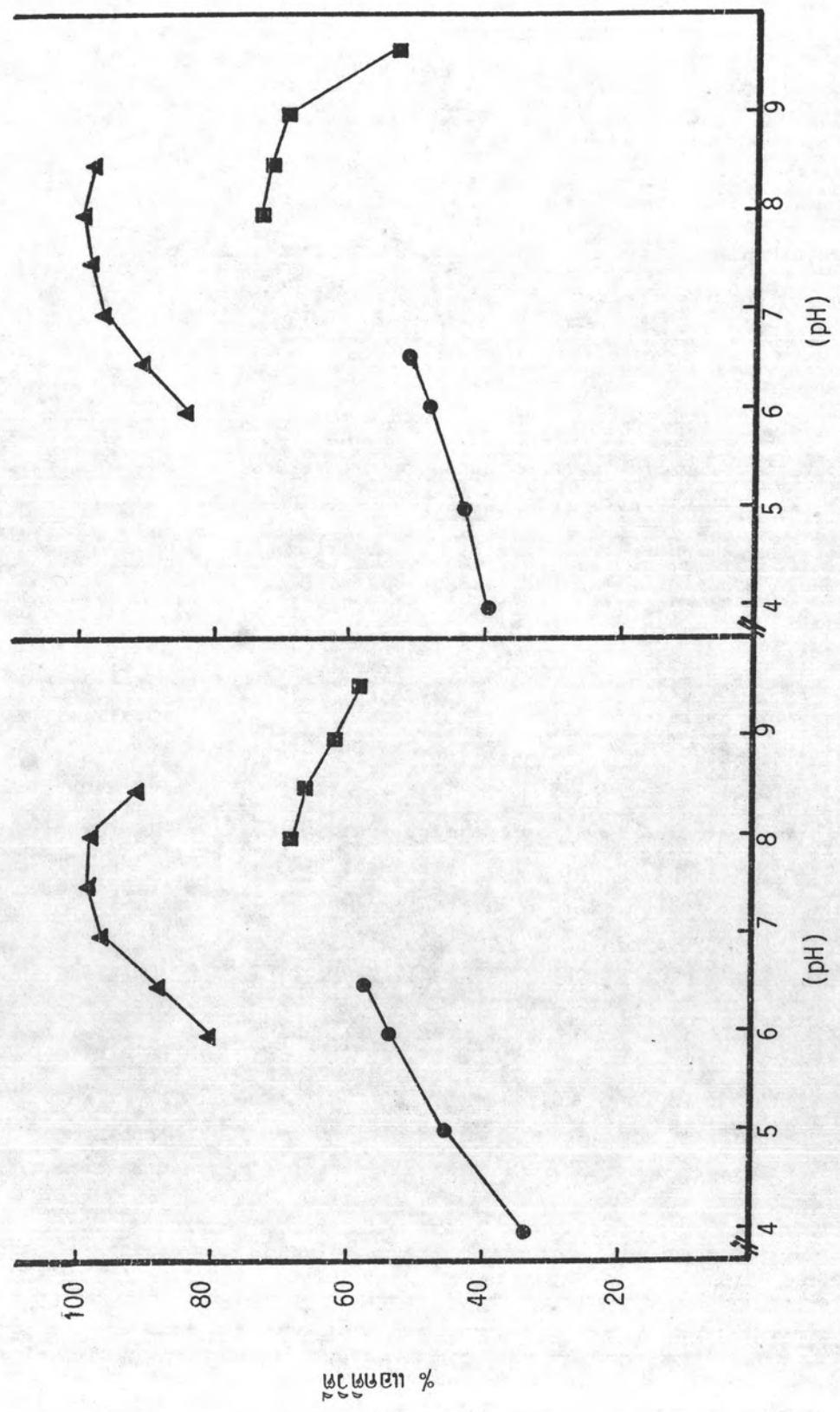
ผลการทดลองวัดแอกติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส ของมิวแคนท์ SPS-6 และ *P. rettgeri* ATCC 9250 WT โดยใช้ความเข้มข้นของสับสเตรท เพนนิซิลิน จี คงที่ ที่ 7, 14 และ 21 มิลลิโมลาร์ และแปรเปลี่ยนความเข้มข้นของกรดฟีนอลอะซีติกตั้งแต่ 0-40 มิลลิโมลาร์

รูปที่ 22 ผลกระทบของ pH ต่อความเสถียรของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส เมื่อใช้เซลล์ยิวต์เคนท์ SPS-6 (ก) และเซลล์ *P. rettgeri* ATCC 9250 WT (ข) ซึ่งแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH ต่าง ๆ คือ pH 4.0-6.5 (อะซีเตทบัฟเฟอร์, ●), pH 6.0-8.5 (ฟอสเฟตบัฟเฟอร์; ▲), pH 8.0-9.5 (ทริสฮกธาไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์, ■) เป็นเวลานาน 12 ชั่วโมง แล้ววัดแอกติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีข้อ 2.10.2

รูปที่ 22

บ. *P. rettgeri* ATCC 9250 WT

ก. ปิวแทนท์ SPS-6

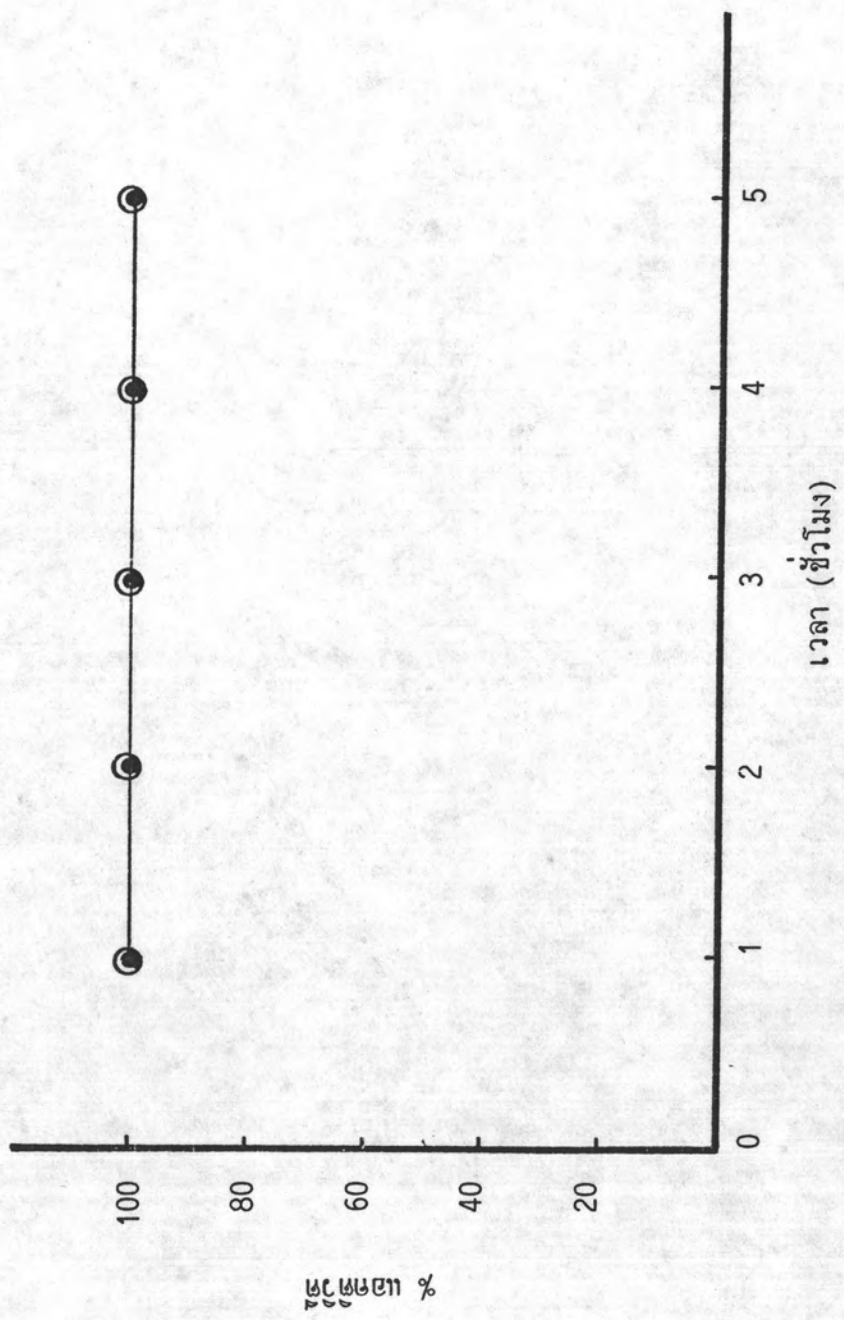


รูปที่ 23 เปรียบเทียบผลกระทบบของอุณหภูมิ 37⁰ซ ต่อความเสถียรของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส
ของเซลล์มิวแทนท์ (SPS-6) (●) และเซลล์ *P. rettgeri* ATCC 9250 (○)
เมื่ออินคิวเบตในการละลายฟอสฟาเตอ์ 0.1 โมลาร์ pH 7.5 ที่ 37⁰ซ นาน
4 ชั่วโมง โดยสกัดแอกติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส ที่อุณหภูมิ 37⁰ซ ตามวิธีข้อ
2.10.2

รูปที่ 23

● มีนเคนท์ SPS-6

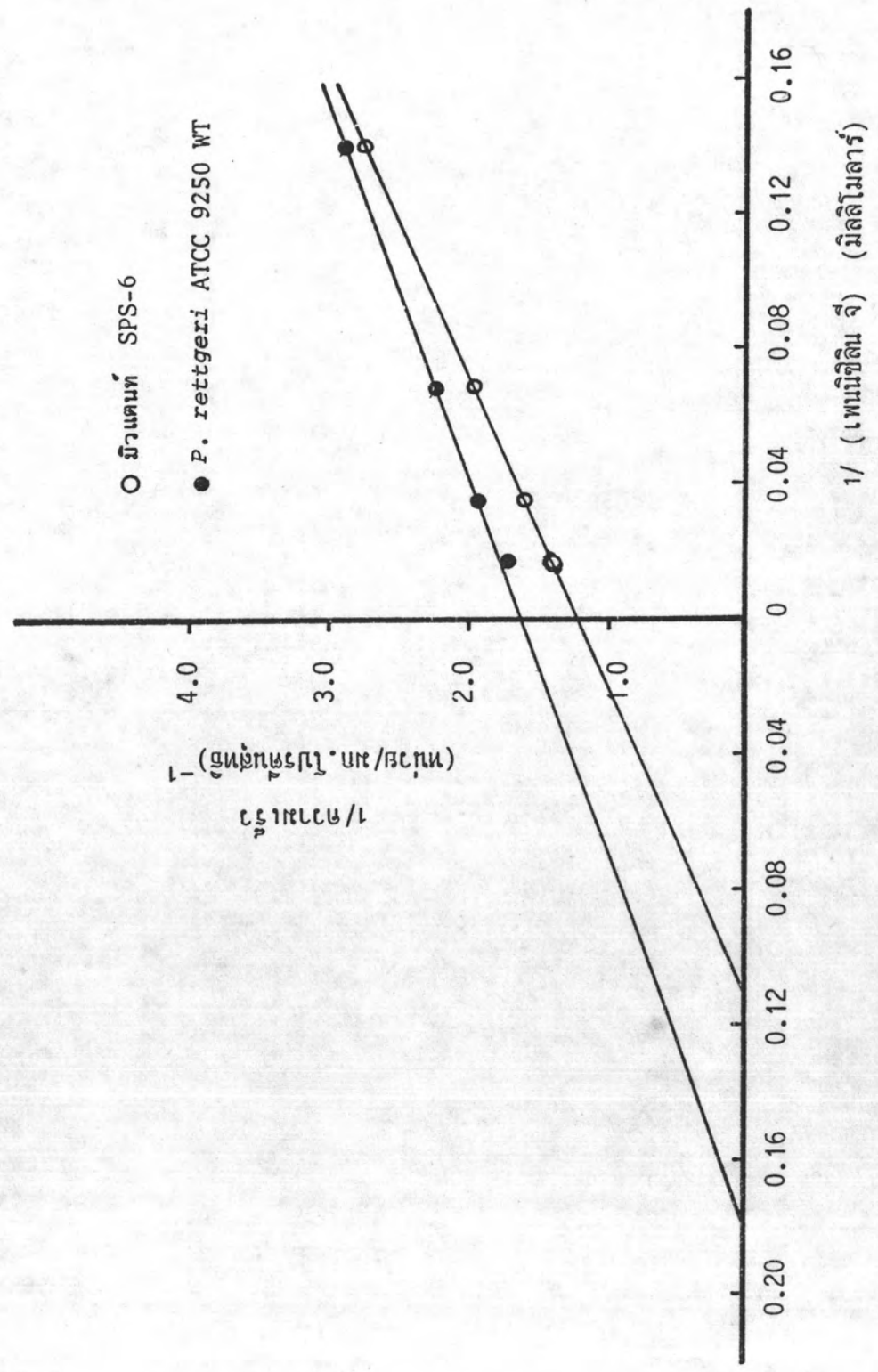
○ *P. rettgeri* ATCC 9250 WT



รูปที่ 24

Lineweaver Burk Plot ของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส ของเซลล์มิวแทนท์ SPS-6 (○) และเซลล์ *P. rettgeri* ATCC 9250 WT (●) โดยวัดแอกติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส ตามวิธีข้อ 2.10.2 ซึ่งใช้เพนนิซิลิน จี เป็นสับสเตรทที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันตั้งแต่ 7.0-56.0 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 37^oซ

รูปที่ 24



ที่แต่ละค่าคงที่ของสับสเตรท ๗ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกรดฟีนอลอะซีติกต่อส่วนกลับของแอกติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส ที่ได้จากเซลล์ทั้ง 2 ชนิด โดย Dixon Plot มีลักษณะดังแสดงในรูปที่ 25 และ 26 เมื่อคำนวณค่า K_i ซึ่งเป็นค่าคงที่ของการยับยั้งปฏิกิริยาไฮโดรไลซ์เพนนิซิลิน จี ของ เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส ด้วยกรดฟีนอลอะซีติก จะมีค่าเท่ากับ 7.0 และ 5.0 มิลลิโมลาร์ สำหรับเซลล์ SPS-6 และ *P. rettgeri* ATCC 9250 WT ตามลำดับ ลักษณะของการยับยั้งปฏิกิริยาไฮโดรไลซ์เพนนิซิลิน จี ของ เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส ที่ได้จากเซลล์ทั้งของมิวแตนท์ SPS-6 และ *P. rettgeri* ATCC 9250 ด้วยกรดฟีนอลอะซีติกจะเป็นแบบการแข่งขัน (competitive inhibition)

3.6.7 ผลการศึกษาค่าคงที่ของการยับยั้ง (K_i) ของกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลามิก ที่มีต่อเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส

จากการทดลองวัดแอกติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส ของเซลล์ทั้งมิวแตนท์ SPS-6 เปรียบเทียบกับ *P. rettgeri* ATCC 9250 WT โดยใช้เพนนิซิลิน จี เป็นสับสเตรทที่มีความเข้มข้นสองที่ที่ต่างกันคือ 3.5, 7.0 และ 14 มิลลิโมลาร์ แล้วแปรเปลี่ยนความเข้มข้นของกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลามิก ที่มีความเข้มข้นของเพนนิซิลิน จี คงที่ตั้งแต่ 0-10 มิลลิโมลาร์ ๗ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่ากราฟพล็อตความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลามิก ต่อส่วนกลับของแอกติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส ที่ได้จากเซลล์มิวแตนท์ SPS-6 และ *P. rettgeri* ATCC 9250 WT โดยวิธีของ Dixon Plot มีลักษณะดังแสดงในรูปที่ 27 และ 28 ซึ่งคำนวณค่า K_i ได้ใกล้เคียงกันประมาณ 8.8 และ 7.6 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ลักษณะของการยับยั้งปฏิกิริยาไฮโดรไลซ์เพนนิซิลิน จี ของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส ด้วยกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลามิก ของเซลล์ทั้ง 2 ชนิด จะเป็นแบบไม่แข่งขัน (non-competitive inhibition)

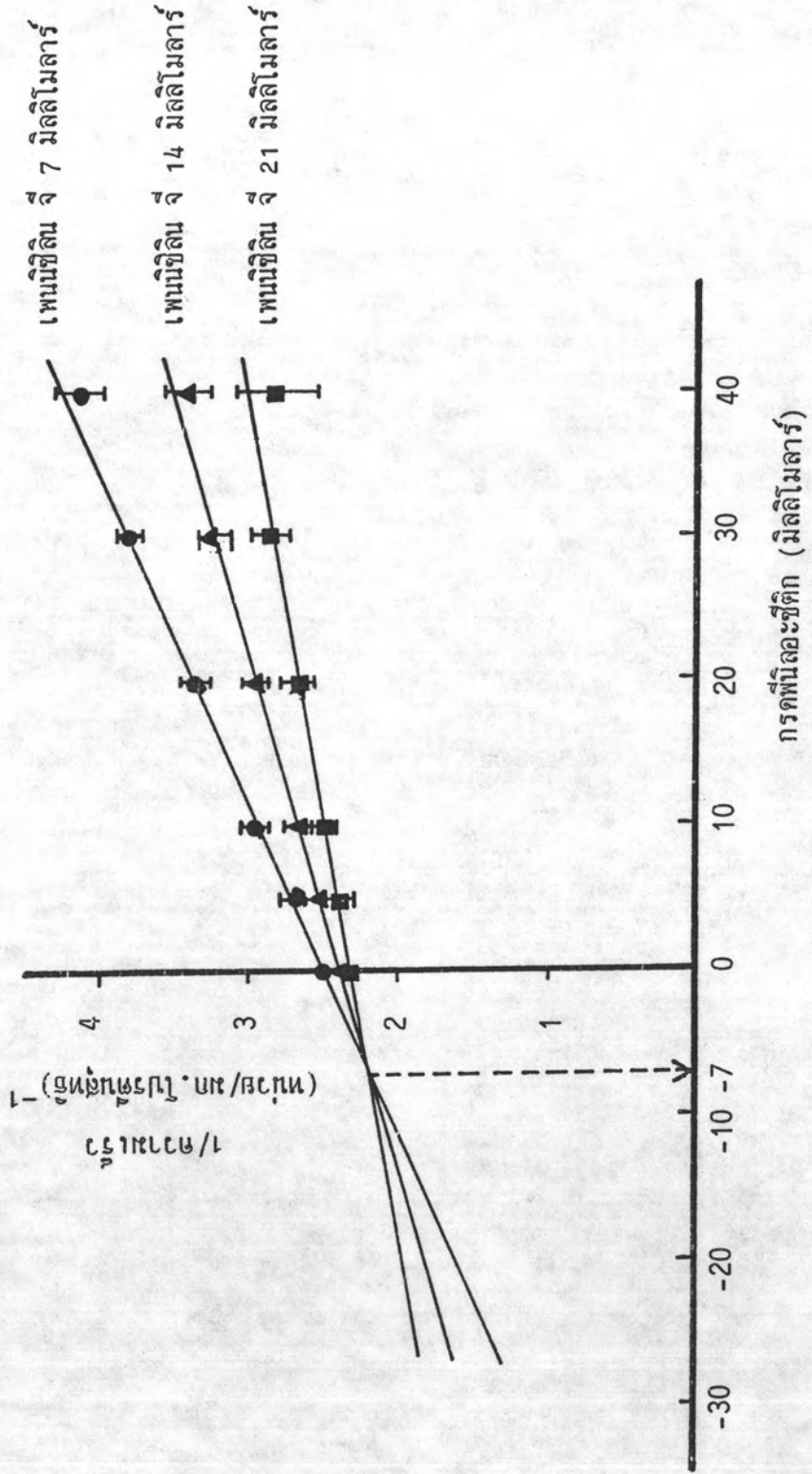
3.7 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเซลล์มิวแตนท์ SPS-6 และ *P. rettgeri* ATCC 9250 WT

จากการทดลองเก็บรักษาเซลล์มิวแตนท์ SPS-6 และ *P. rettgeri* ATCC 9250 ในสาร

รูปที่ 25 Dixon plot ของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส จากเซลล์ยิวแดนท์ (SPS-6)
เมื่อแปรเปลี่ยนความเข้มข้นของสารยับยั้งปฏิกิริยา คือ กรดฟีนิลอะซีติก
(0-40 มิลลิโมลาร์) วัดแอกติวิตีของเอนไซม์ ตามวิธีข้อ 2.10.2 ซึ่ง
ใช้เพนนิซิลิน จี เป็นสับสเตรท ที่มีความเข้มข้นที่ 7, 14 และ 21
มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ที่ 37⁰ซ

รูปที่ 25

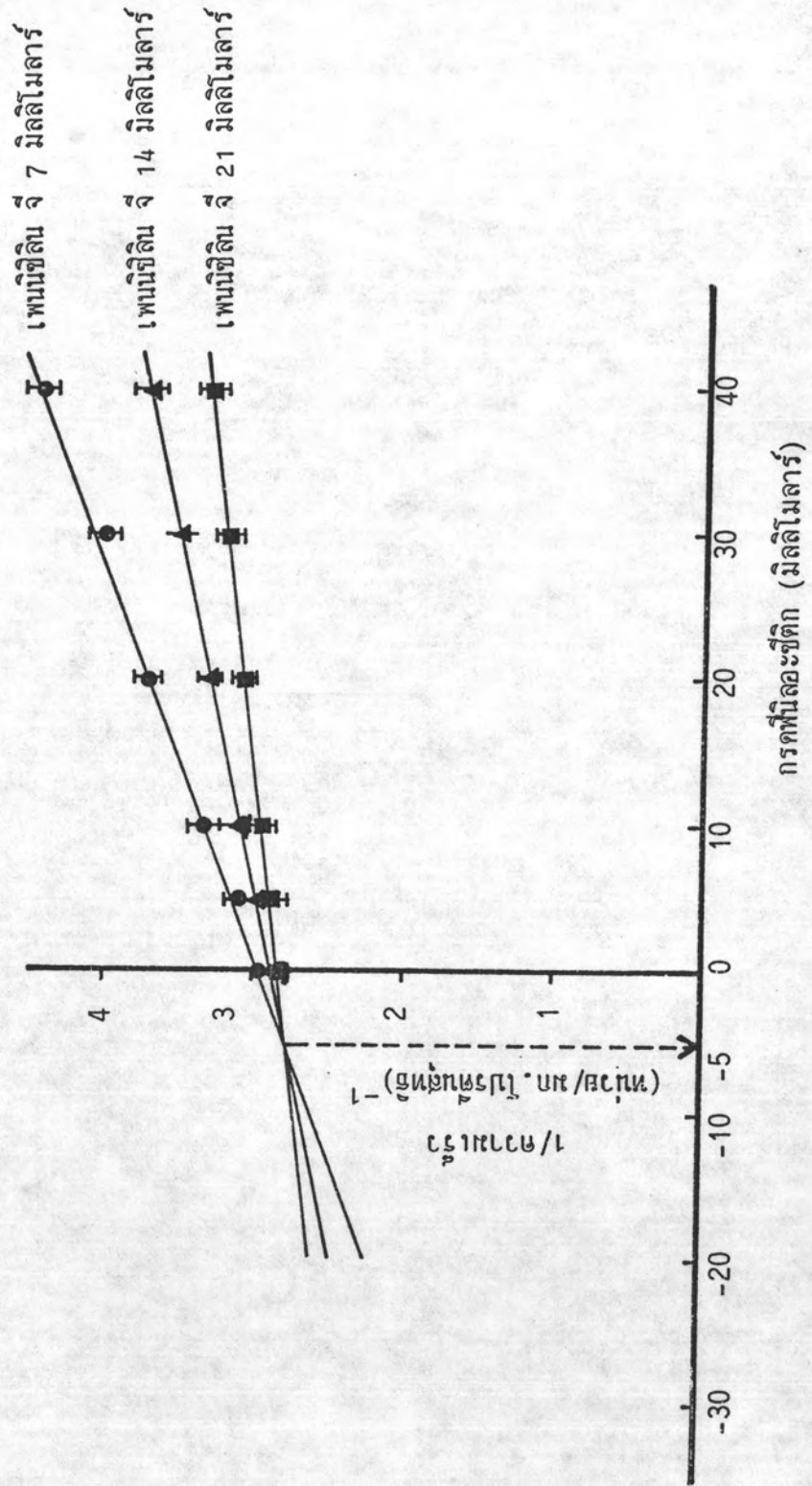
ฉิวแคนท์ SPS-6



รูปที่ 26 Dixon plot ของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส จากเซลล์ *P. rettgeri* ATCC 9250 เมื่อแปรเปลี่ยนความเข้มข้นของสารยับยั้งปฏิภิกิริยา คือ กรด ฟีนิลอะซิติก (0-40 มิลลิโมลาร์) โดยวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีข้อ 2.10.2 ที่ใช้เพนนิซิลิน จี เป็นสับสเตรทความเข้มข้นคงที่ ที่ 7, 14 และ 21 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

รูปที่ 26

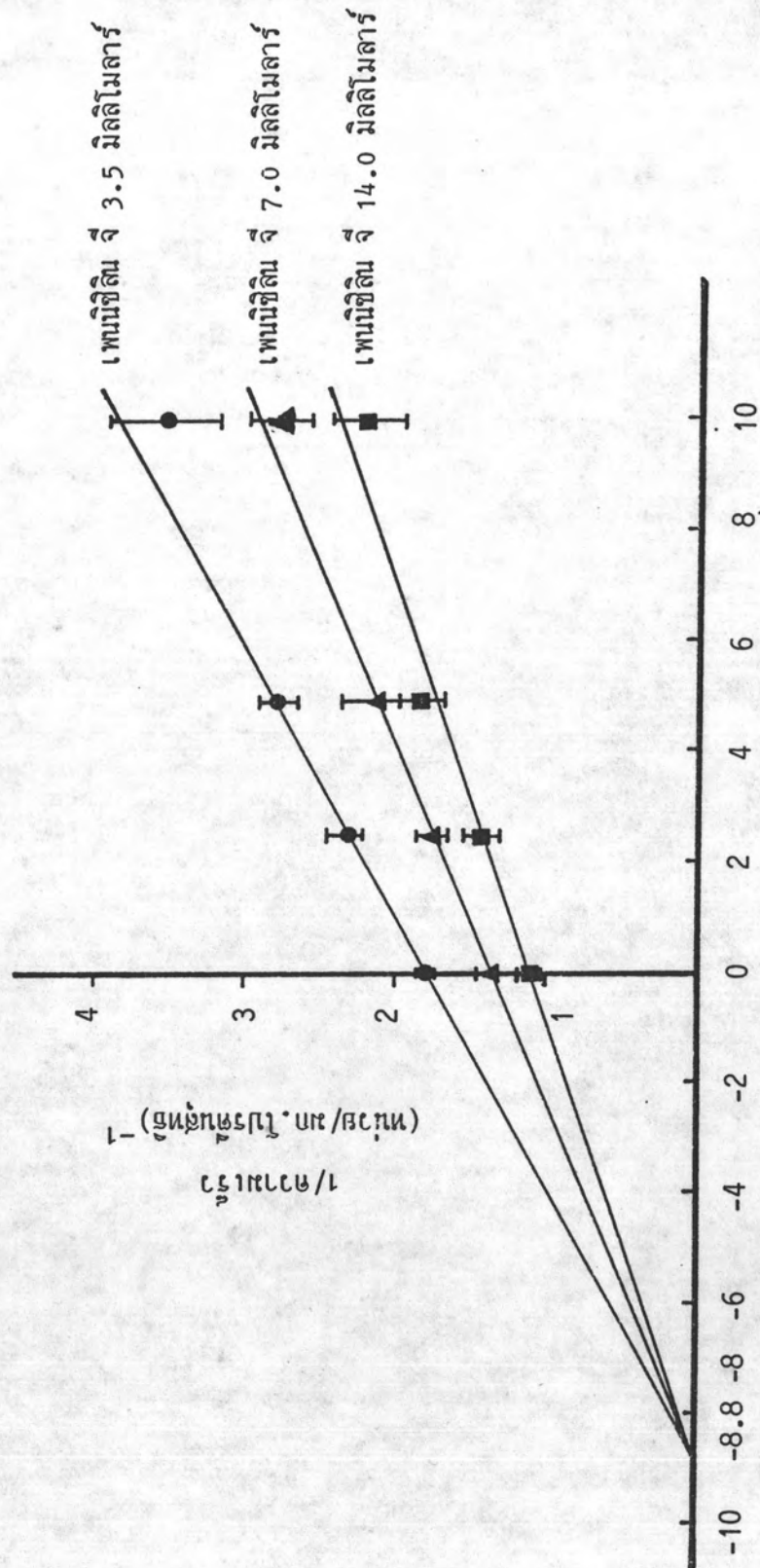
P. rettgeri ATCC 9250 WT



รูปที่ 27 Dixon plot ของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเอส จากเซลล์มิวแตนต์ SPS-6 เมื่อ
แปรเปลี่ยนความเข้มข้นของสารยับยั้งปฏิกริยา คือ กรด 6-อะมิโนเพนนิซิลีนิก
(0-10 มิลลิโมลาร์) วัดแอกทิวิตีของเอนไซม์ตามวิธีข้อ 2.10.2 ซึ่งใช้เพนนิซิลิน
จี เป็น สับสเตรทที่ความเข้มข้นคงที่ ที่ 3.5, 7.0 และ 14.0 มิลลิโมลาร์

รูปที่ 27

มิวแทนต์ SPS-6

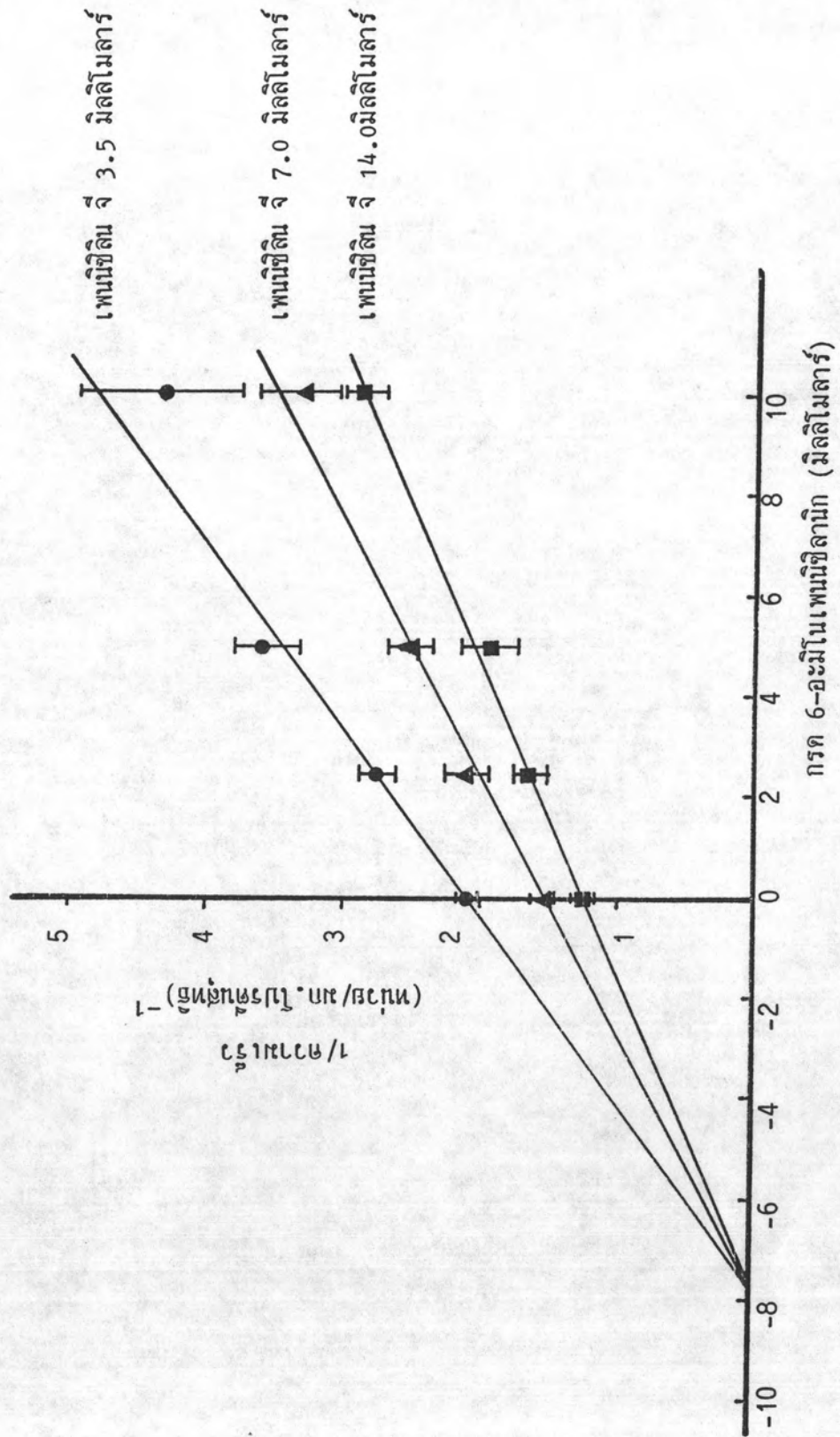


กราฟ 6-อะมิโนเพนซิลานิก (มิลลิโมลาร์)

รูปที่ 28 Dixon plot ของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส ของเซลล์ *P. rettgeri* ATCC 9250 WT เมื่อแปรเปลี่ยนความเข้มข้นของสารยับยั้งปฏิกิริยาคือกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก (0-10 มิลลิโมลาร์) วัดแอกติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีข้อ 2.10.2 ซึ่งใช้เพนนิซิลิน จี เป็นสับสเตรท ความเข้มข้นคงที่ ที่ 3.5, 7.0 และ 14.0 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

รูปที่ 28

P. rettgeri ATCC 9250 WT



ละลายนอร์มอลซาลิน ที่อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียส แล้วติดตามวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ เพนนิซิลิน เอซีเลส โดยใช้เพนนิซิลิน จี เป็นสับสเตรท ในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ กัน พบว่า แอกติวิตีของเอนไซม์ เพนนิซิลิน เอซีเลส ของเซลล์มิวแคนท์ SPS-6 ที่เก็บในสารละลาย นอร์มอลซาลิน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสในช่วง 21 วันจะค่อย ๆ ลดลงจนเหลือประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นจะคงที่ตลอดระยะเวลา 45 วัน แต่ถ้าเก็บเซลล์ไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แอกติวิตีของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็ว (เหลือเพียง 50 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 21 วัน) จนกระทั่งเหลือเพียง 12 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บเซลล์นาน 45 วัน

แอกติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส ของเซลล์ *P. rettgeri* ATCC 9250 WT ที่เก็บไว้ในสารละลายนอร์มอลซาลินที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในช่วง 21 วันแรกจะลดลงเร็วกว่า SPS-6 เล็กน้อย (เหลือเพียง 70 เปอร์เซ็นต์) หลังจากนั้นจะคงที่ตลอดเวลา 45 วัน เช่นกัน และเมื่อเก็บเซลล์ไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แอกติวิตีของเอนไซม์ จะลดลงเหลือเพียง 42 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 21 และ 45 วัน ตามลำดับ (รูปที่ 29)

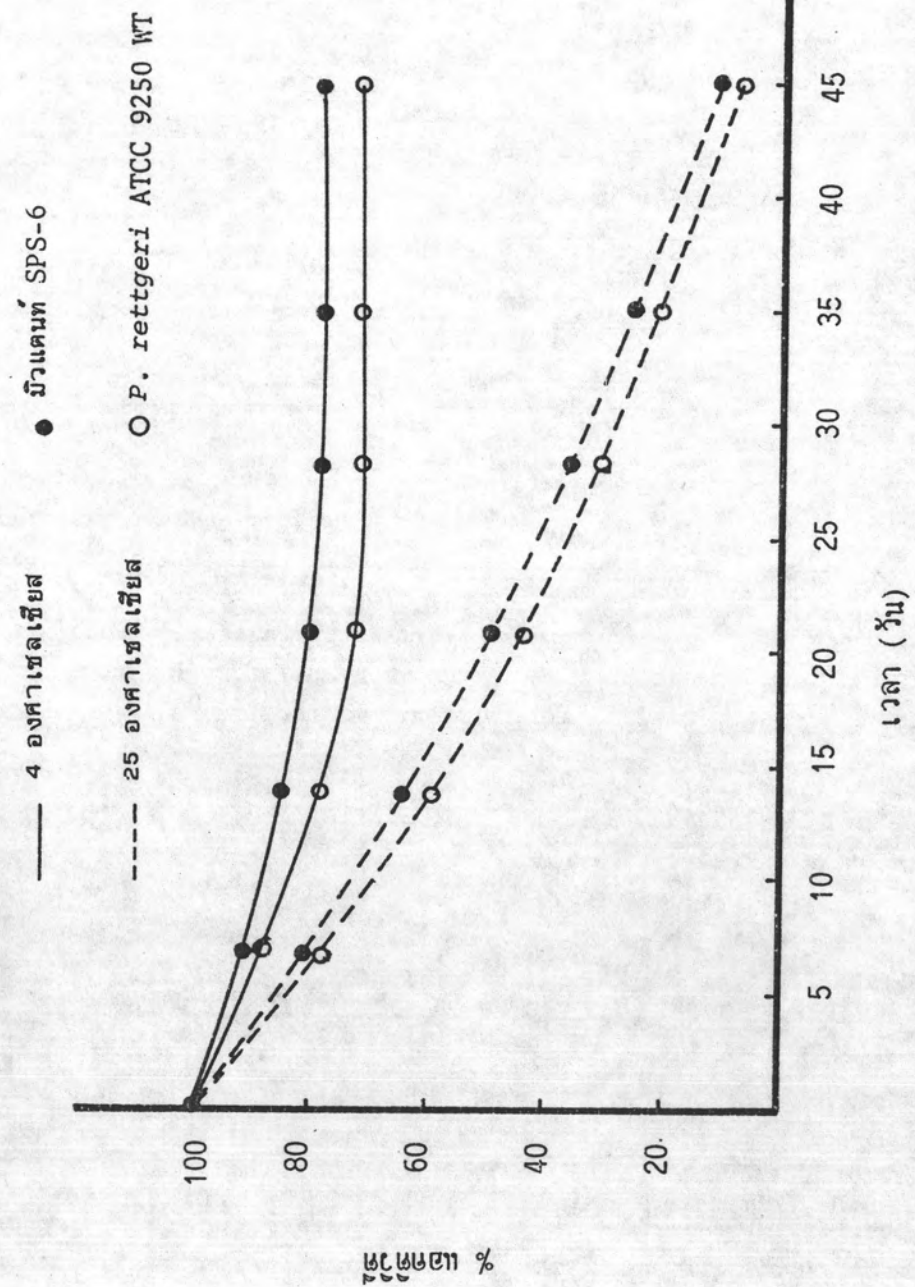
3.8 ความสามารถในการดำรงคุณสมบัติของมิวแคนท์ SPS-6


เมื่อเก็บเซลล์มิวแคนท์ SPS-6 ในกลีเซอรอล 50 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ช่วงระยะเวลา 5 เดือน โดยทำการทดสอบการเจริญและผลิตเอนไซม์ในอาหารเหลวสูตรปรับค่าที่เสริมด้วยกลูโคส 0.4 เปอร์เซ็นต์ทุกเดือน พบว่าการเจริญและสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส ของมิวแคนท์ SPS-6 เกือบไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมเลย (รูปที่ 30)


ผลการทดลองซึ่งสนับสนุนความสามารถในการดำรงคุณสมบัติของมิวแคนท์ SPS-6 อีกข้อหนึ่งคือเมื่อเก็บมิวแคนท์ SPS-6 บนอาหารชนิดแข็งสูตรปรับค่าที่เสริมด้วยกลูโคส 0.4 เปอร์เซ็นต์ ในจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 4-10 องศาเซลเซียส ทำการถ่ายเชื้อและวัดแอกติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส ทุกเดือนนาน 7 เดือน พบว่ามิวแคนท์ SPS-6 ยังสามารถเจริญและสังเคราะห์เอนไซม์ได้ในระดับสูงใกล้เคียงกับค่าเริ่มต้น ถึงแม้ว่าจะทำการถ่ายเชื้อถึง 7 ครั้ง (passages) แล้วก็ตาม ผลการทดลองวัดแอกติวิตีของเอนไซม์และลักษณะของโคไโลนี ดังแสดงในรูปที่ 31 และ

รูปที่ 29 เปรียบเทียบแอกติวิตีของ เอนไซม์ เพนนิซิลิน เอซีเอส จาก เซลล์มีวแคนท์
SPS-6 (●) และ เซลล์ *P. retteri* ATCC 9250 (○)
เมื่อเก็บเซลล์ไว้ในสารละลายนอร์มอลซาลิน ที่อุณหภูมิ 4⁰ซ (——)
25⁰ซ (-----) ในช่วงระยะเวลา 45 วัน

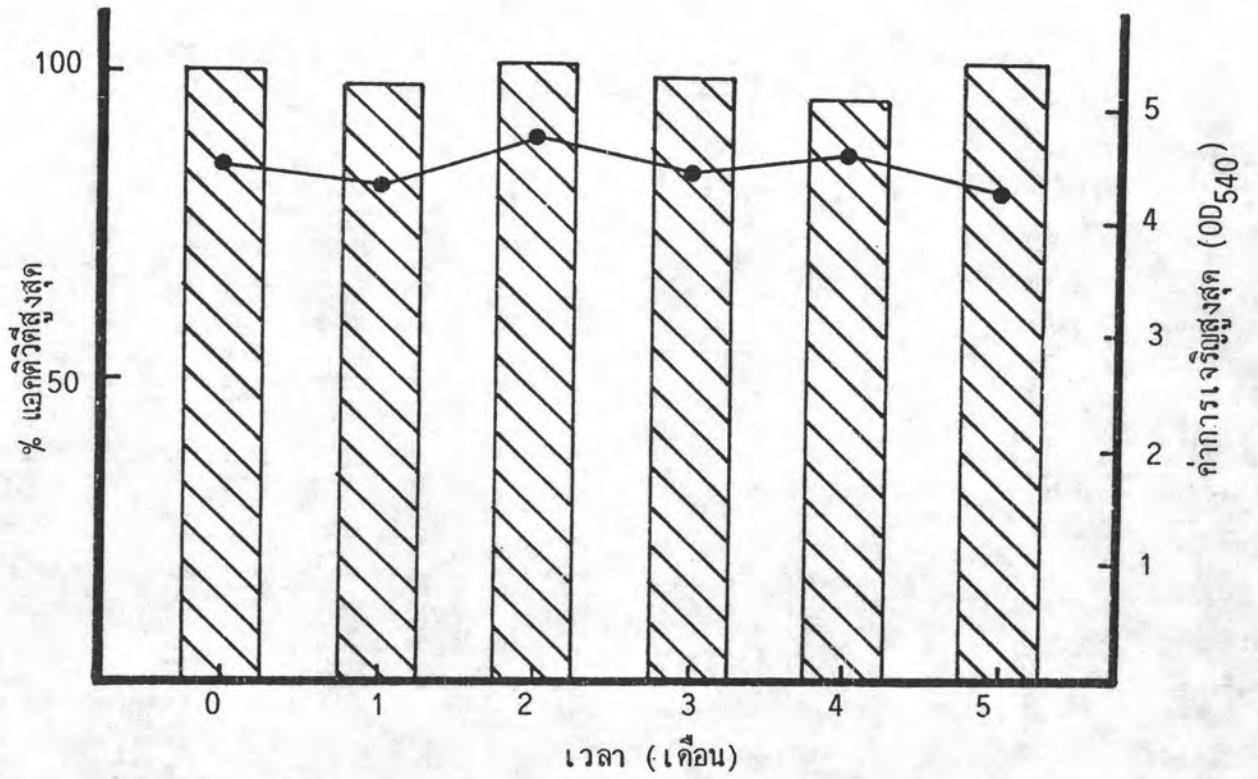
รูปที่ 29



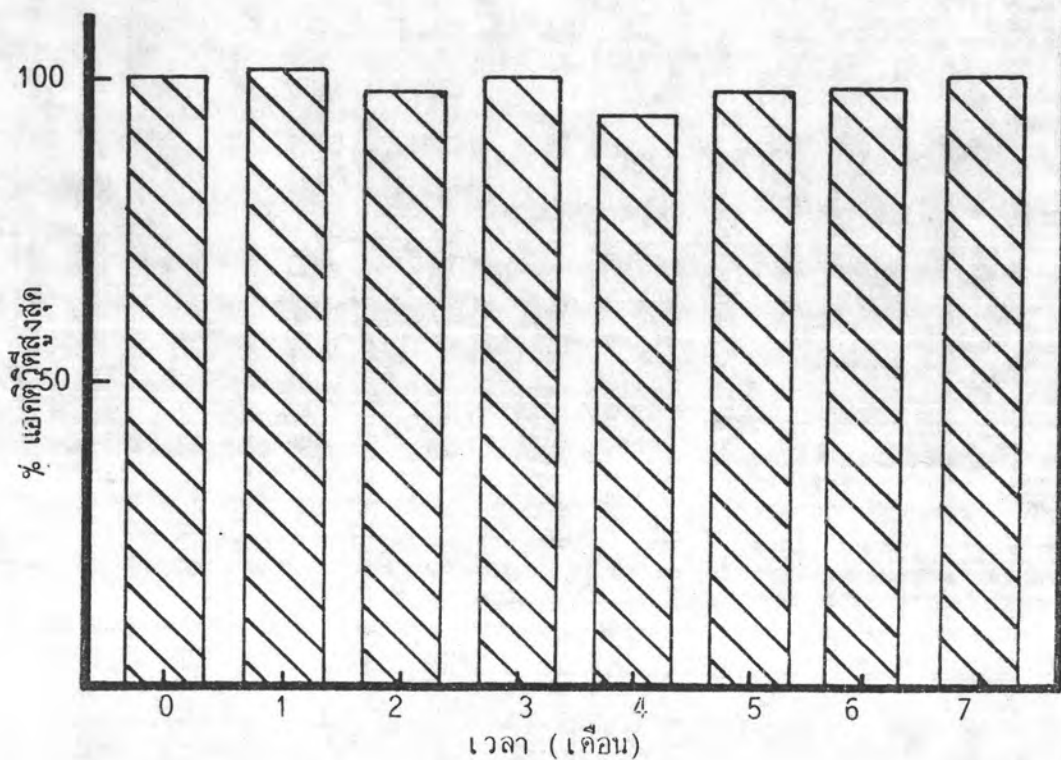
รูปที่ 30 แสดงดัชนี การเจริญสูงสุด (●—●) และแอกติวิตีสูงสุด
ของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส () ในมิวแคนท์ SPS-6
หลังจากผ่านการเก็บเซลล์ใน กลีเซอรอล 50% ที่อุณหภูมิ -20 องศา
เซลเซียส นาน 5 เดือน

รูปที่ 31 แสดงแอกติวิตีสูงสุดของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซีเลส () ใน
เซลล์มิวแคนท์ SPS-6 หลังจากทำการถ่ายเชื้อ (streak)
เดือนละครั้งนาน 7 เดือน

รูปที่ 30



รูปที่ 31



รูปที่ 32 แสดงความสามารถในการเจริญของมิวแคนท์ SPS (6-8)
ในอาหารชนิดแข็งสูตรปรับค่าที่เสริมด้วยกลูโคส 0.4% เทียบกับ
P. rettgeri ATCC 9250 WT หลังจากการถ่ายเชื้อผ่านมา 7
ครั้ง

ก. ครั้งที่ 1

ข. ครั้งที่ 7

WT คือ *P. rettgeri* ATCC 9250 WT

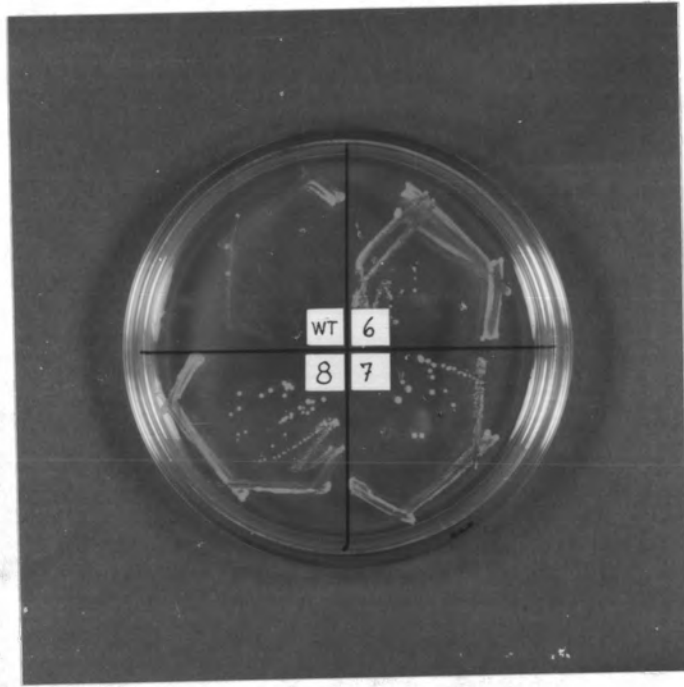
6 คือ มิวแคนท์ SPS-6

7 คือ มิวแคนท์ SPS-7

8 คือ มิวแคนท์ SPS-8

รูปที่ 32

ก.



ข.

