บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ *Bacillus subtilis* 168 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Spizizen salt medium ที่เติม แอล-ทริปโตเฟนเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร โซเดียมกลูตาเมตเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตร และแมงกานีสคลอไรด์เข้มข้น 0.2 กรัมต่อลิตร จำนวน 10 ลิตร สามารถสกัด NA-L-alanine amidase จากผนังเซลล์ ได้จำนวนกิจกรรมทั้งสิ้น 160.5 หน่วยเอนไซม์ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 21.4 หน่วยเอนไซม์ต่อมิลลิลิตร กิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 45.5 หน่วยเอนไซม์ต่อมิลลิกรัมโปรตีน ผลการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากการย่อยสลายผนังเซลล์ของ *Bacillus subtilis* 168 โดยเอนไซม์ที่เตรียมได้ในภาวะที่มีเฟนิลเมธิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์ เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เปปทิเดส พบการเพิ่มขึ้นของกรดอะมิโนอิสระและไม่พบการเพิ่มขึ้นของน้ำตาลรีดิวซ์ แสดงว่าเอนไซม์ที่เตรียมได้เป็น NA-L-alanine amidase (รูปที่ 7 - 8) ทั้งนี้เนื่องจากในปฏิกริยาการย่อยสลายผนังเซลล์ได้ทำการยับยั้งการทำงานเอนไซม์เปปทิเดส ดังนั้นกรดอะมิโนที่เกิดขึ้นจึงไม่ใช่กรดอะมิโนที่เกิดขึ้นจากการขาดของพันธะเปปไทด์ แต่น่าจะเป็นกรดอะมิโนที่เกิดจากการตัดพันธะที่เชื่อมระหว่างแอล-อะลานิน ซึ่งเป็นกรดอะมิโนตัวแรกของสายเปปไทด์ซึ่งต่ออยู่กับหมู่คาร์บอกซิลของ MurNAC ของสายไกลแคน ผลการวิเคราะห์ลักษณะและความบริสุทธิ์ของ NA-L-alanine amidase ที่เตรียมได้โดยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจล อิเลคโตรโฟริซิส ชนิดแผ่น พบแถบโปรตีน 4 แถบ เป็นแถบโปรตีนหลัก 2 แถบ ขนาดน้ำหนักโมเลกุล 82 กิโลดาลตัน และ 50 กิโลดาลตัน (รูปที่ 9) ซึ่งใกล้เคียงกับที่ Herbold และ Glaser (1975) ได้รายงานว่า NA-L-alanine amidase บริสุทธิ์ของ *Bacillus subtilis* 168 มีขนาดน้ำหนักโมเลกุล 51 กิโลดาลตัน และรายงานว่าในขั้นตอนการทำ NA-L-alanine amidase ให้บริสุทธิ์นั้นจะมีโปรตีนขนาดน้ำหนักโมเลกุล 80 กิโลดาลตันอยู่ร่วมด้วยเสมอ เรียกโปรตีนนี้ว่าโมดิฟายเออร์โปรตีน โมดิฟายเออร์โปรตีนนี้ไม่สามารถย่อยสลายผนังเซลล์ของ *Bacillus subtilis* 168 แต่เมื่อนำมา

ผสมกับ NA-L-alanine amidase ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 แล้วจะทำให้กิจกรรมของ NA-L-alanine amidase เพิ่มสูงขึ้น

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของ NA-L-alanine amidase กึ่งบริสุทธิ์ที่เตรียมได้ในการทำให้เซลล์แบคทีเรียชนิดต่างๆในระยะการเจริญแบบอัตราก้าวหน้าที่มีโครงสร้างของเปปทิโดไกลแคนแตกต่างกันแตก โดยการติดตามวัดค่าการเปลี่ยนแปลงของความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร นำมาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์กับระยะเวลาแล้วคำนวณหาอัตราเร็วของการแตกของเซลล์จากสูตร อัตราเร็วของการแตกของเซลล์ = ln(ความขุ่นเริ่มต้น/ความขุ่นสุดท้าย) / เวลา(นาที) เลือกใช้ NA-L-alanine amidase ที่ความเข้มข้น 10 หน่วยเอนไซม์ต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้เพราะ NA-L-alanine amidase ละลายอยู่ใน 0.5 โมลาร์ลิเทียมคลอไรด์ ซึ่งที่ความเข้มข้นที่เลือกใช้มีลิเทียมคลอไรด์ 40 มิลลิโมลาร์ ซึ่งไม่ทำให้เซลล์แบคทีเรียที่ทดสอบแตกโดยผลของโมโนวาเลนท์ แคตอิออน (Svarachorn *et al.*, 1989) ส่วนไลโซไซม์ใช้ที่ความเข้มข้น 10 และ 100 หน่วยเอนไซม์ต่อมิลลิลิตร ผลการทดสอบกับแบคทีเรียกรัมบวก พบว่า *Bacillus subtilis* 168 เท่านั้นที่แตกในสารละลาย NA-L-alanine amidase เข้มข้น 10 หน่วยเอนไซม์ต่อมิลลิลิตร และในไลโซไซม์ทั้งสองความเข้มข้นที่ใช้ โดยอัตราการแตกของเซลล์ในสารละลาย NA-L-alanine amidase มีค่าใกล้เคียงกับอัตราการแตกของเซลล์ในสารละลายไลโซไซม์เข้มข้น 100 หน่วยเอนไซม์ต่อมิลลิลิตร แสดงว่า NA-L-alanine amidase มีประสิทธิภาพสูงกว่าไลโซไซม์ในการทำให้เซลล์ *Bacillus subtilis* 168 แตก (รูปที่ 10) เซลล์ *Micrococcus luteus* TISTR 745 แตกเฉพาะในสารละลายไลโซไซม์เข้มข้น 100 หน่วยเอนไซม์ต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 11) พบการเสริมฤทธิ์กันระหว่าง NA-L-alanine amidase และไลโซไซม์ เมื่อทดสอบกับ *Bacillus subtilis* 168 ทั้งที่เมื่อใช้ไลโซไซม์เข้มข้น 10 หรือ 100 หน่วยเอนไซม์ต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 10 ตารางที่ 2) และเมื่อทดสอบกับ *Micrococcus luteus* TISTR 745 พบการเสริมฤทธิ์เมื่อใช้ไลโซไซม์เข้มข้น 100 หน่วยเอนไซม์ต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 11 ตารางที่ 3) เซลล์ *Streptococcus faecium* IFO 3128 แตกเฉพาะในสารละลายไลโซไซม์เข้มข้น 100 หน่วยเอนไซม์ต่อมิลลิลิตรเท่านั้นเช่นเดียวกับ *Micrococcus luteus* TISTR 745 แต่ไม่พบการเสริมฤทธิ์กันระหว่างเอนไซม์ทั้งสองชนิดเหมือนที่พบใน *Micrococcus luteus* TISTR 745 (รูปที่ 12 ตารางที่ 4) ส่วนอัตราการแตกของเซลล์ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 ในสารละลาย

บัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 8.0 มีค่าสูงกว่าอัตราการแตกของเซลล์แบคทีเรียกรัมบวกชนิดอื่นๆที่ทดสอบมาก นอกจากนั้นยังพบว่าค่าความขุ่นของเซลล์ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 ในสารละลาย NA-L-alanine amidase และในสารละลายไลโซไซม์กลับเพิ่มมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับค่าความขุ่นของเซลล์ในสารละลายบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 8.0 ทั้งนี้เนื่องจากเซลล์ในสารละลาย NA-L-alanine amidase และเซลล์ในสารละลายไลโซไซม์จะเกาะกลุ่มกัน เกิดเป็นตะกอนเบาทำให้ค่าความขุ่นที่วัดได้เพิ่มสูงขึ้น ตะกอนเบาดังกล่าวนี้พบว่าเกิดขึ้นในสารละลาย NA-L-alanine amidase เข้มข้น 10 หน่วยเอนไซม์ต่อมิลลิลิตรมากกว่าในสารละลายไลโซไซม์เข้มข้น 100 หน่วยเอนไซม์ต่อมิลลิลิตร เนื่องจากค่ากิจกรรมจำเพาะของไลโซไซม์สูงกว่าของ NA-L-alanine amidase มาก ในขณะที่ NA-L-alanine amidase เข้มข้น 10 หน่วยเอนไซม์ต่อมิลลิลิตร จำนวน 10 มิลลิลิตร มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.137 มิลลิกรัม ไลโซไซม์เข้มข้น 100 หน่วยเอนไซม์ต่อมิลลิลิตร จำนวน 10 มิลลิลิตร จะมีปริมาณโปรตีนเพียง 0.0019 มิลลิกรัม จึงทำให้สันนิษฐานว่าการเกาะกลุ่มของเซลล์ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 เกิดจากโปรตีนในสารละลาย และปริมาณการเกาะกลุ่มของเซลล์ซึ่งทำให้เห็นเป็นตะกอนเบานี้ แปรผันโดยตรงกับปริมาณโปรตีนในสารละลาย ผลการทดลองแขวนลอยเซลล์ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 ในสารละลายโบวีน-ซีรั่มอัลบูมินที่มีปริมาณโปรตีน 0.137 , 0.0019 มิลลิกรัม ซึ่งเท่ากับปริมาณโปรตีนที่พบในสารละลาย NA-L-alanine amidase เข้มข้น 10 หน่วยเอนไซม์ต่อมิลลิลิตร จำนวน 10 มิลลิลิตร และสารละลายไลโซไซม์เข้มข้น 100 หน่วยเอนไซม์ต่อมิลลิลิตร จำนวน 10 มิลลิลิตร ตามลำดับ พบว่าเซลล์เกาะกลุ่มกันเป็นตะกอนเบาในสารละลายโบวีนซีรั่ม-อัลบูมินที่มีปริมาณโปรตีน 0.137 มิลลิกรัม มากกว่าในสารละลายโบวีนซีรั่มอัลบูมินที่มีปริมาณโปรตีนเพียง 0.0019 มิลลิกรัม จริง ซึ่งสนับสนุนข้อสันนิษฐานข้างต้น (รูปที่ 14 ตารางที่6) การเกาะกลุ่มของเซลล์ *Staphylococcus aureus* แล้วทำให้ค่าความขุ่นของเซลล์เพิ่มมากขึ้นนี้ Dawson, Lominski และ Stern (1953) รายงานว่าได้พบปรากฏการณ์นี้เช่นเดียวกัน เมื่อแขวนลอยเซลล์ในสารละลายซิทริล ไตรเมทิล แอมโมเนียมโบรไมด์ ซึ่งเป็นสารซักฟอกที่มีประจุเป็นบวก (cationic detergent)

ผลการทดสอบกับแบคทีเรียกรัมลบคือ *Escherichia coli* TISTR 780 และ *Klebsiella pneumoniae* IFO 3317 พบการแตกของเซลล์ทั้งสองชนิดในสารละลาย

บัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 8.0 การเติม NA-L-alanine amidase หรือ/ และ ไลโซไซม์ลงไป ไม่มีผลทำให้อัตราการแตกของเซลล์เพิ่มมากขึ้นกว่าอัตราการแตกของเซลล์ที่ปรากฏในสารละลายบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอไรด์ (รูปที่ 15 ตารางที่ 7 และ รูปที่ 16 ตารางที่ 8) การแตกของเซลล์ในสารละลายบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอไรด์ น่าจะเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ออโตไลซินภายในเซลล์ NA-L-alanine amidase หรือ/ และไลโซไซม์ที่เติมลงไปในปริมาณที่ทดสอบไม่สามารถชักนำให้เซลล์แตกได้ Maniatis, Fritsch และ Sanbrook (1982) รายงานการใช้ไลโซไซม์เข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือในงานทดลองนี้คือ 10^6 หน่วยเอนไซม์ต่อมิลลิลิตร ในการชักนำให้ *Escherichia coli* แตก ผลการทดลองเพิ่มความเข้มข้นของไลโซไซม โดยแปรผันขึ้นไปเป็น 10^6 และ 2×10^6 หน่วยเอนไซม์ต่อมิลลิลิตร แล้วศึกษาความสามารถในการชักนำให้เซลล์ *Escherichia coli* TISTR 780 และ *Klebsiella pneumoniae* IFO 3317 แตก พบว่าไม่-สามารถชักนำให้เซลล์ทั้งสองชนิดแตกได้ (รูปที่ 17ก. และ รูปที่ 17ข.) จากการศึกษารายงานการใช้ไลโซไซม์ชักนำให้เซลล์ *Escherichia coli* แตกมีข้อน่าสังเกตุว่า Repaske(1958) ใช้ไลโซไซม์ร่วมกับ EDTA เข้มข้น 500 ไมโครโมล Maniatis , Fritsch และ Sanbrook (1982) ใช้ไลโซไซม์ร่วมกับโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต 1 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) หรือ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากมีรายงานว่าโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวสามารถชักนำให้เซลล์ *Escherichia coli* *Streptococcus faecalis* และ *Bacillus subtilis* 168 แตก (Godson and Sinsheimer, 1967 ; Cornett and Shockman, 1978 ; Tsuchido *et. al.*, 1990) ซึ่งทั้งนี้การแตกของเซลล์ไม่ได้เกิดจากความสามารถของโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตในการละลายไขมันที่เยื่อหุ้มชั้นนอกหรือ การล ะลายไขมันที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ของแบคทีเรียกรัมลบทำให้เซลล์สูญเสีย permeability มีผลทำให้เซลล์แตก เพราะการบ่มเซลล์ไว้ในสารยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน เช่น คลอแรมเฟนิคอลก่อนแล้วจึงให้เซลล์สัมผัสกับโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตภายหลังพบว่าเซลล์จะไม่เกิดการแตก จึงสรุปว่าโซเดียม-โดเดซิลซัลเฟต น่าจะมีผลรบกวนต่อกระบวนการต่างๆที่เกิดอยู่ที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ แล้วมีผลสืบเนื่องไปยังการกระตุ้นให้เอนไซม์ออโตไลซินเริ่มทำการย่อยสลายผนังเซลล์ เซลล์จึงเกิดการแตก (Svarachorn *et. al.*, 1989; Tsuchido *et.al.*, 1990)

Schnaitman (1971) อธิบายถึงผลของ EDTA เมื่อนำมาใช้ร่วมกับไลโซไซม์ในการทำให้เซลล์ *Escherichia coli* แตกว่าเกิดจากการที่ EDTA สามารถกำจัด divalent cation ซึ่ง

ทำหน้าที่เป็นประจุเชื่อม (ionic bridge) ระหว่างหมู่ฟอสเฟตของลิโปโพลีแซคคาไรด์ของเยื่อหุ้มชั้นนอก กับหมู่ประจุ(charge group) ของโปรตีนหรือฟอสโฟลิปิดของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้อ่อนแอหรือง่ายต่อการที่ไลโซไซม์จะทำการย่อยสลายเปปทิโดไกลแคน

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาความสามารถของโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตในการชักนำให้เซลล์ *Escherichia coli* TISTR 780 แตก โดยการแปรผันความเข้มข้นของโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต ที่ 10 100 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าอัตราเร็วของการแตกของเซลล์แปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต อัตราเร็วของการแตกของเซลล์ที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เท่ากับ 6.2 X 10^{-2}/ นาที (รูปที่ 18 ตารางที่ 9) เนื่องจาก Maniatis , Fritsch และ Sanbrook (1982) รายงานการใช้โซเดียมโดเดซิลซัลเฟตที่ความ-เข้มข้น 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การทดลองต่อมาจึงเลือกใช้โซเดียมโดเดซิลซัลเฟตที่ความเข้มข้นใกล้เคียงกันคือ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การศึกษาผลของการใช้ไลโซไซม์ร่วมกับโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโดยการแปรผันเวลาการบ่มเซลล์ *Escherichia coli* TISTR 780 ไว้ในไลโซไซม์เข้มข้น 100 หน่วยเอนไซม์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 0, 15, 30 และ 60 นาทีตามลำดับก่อนการเติมโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต ทั้งนี้เพราะโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตมีฤทธิ์ทำลายโปรตีน จึงไม่สามารถใช้ร่วมกันได้โดยตรง พบว่าอัตราเร็วของการแตกของเซลล์ *Escherichia coli* TISTR 780 แปรผันโดยตรงกับระยะเวลาการบ่มเซลล์ไว้ในไลโซไซม์ ที่เวลา 75 นาที เปอร์เซนต์การลดลงของค่าความขุ่นของเซลล์เท่ากับ 81.15 ในขณะที่เปอร์เซนต์การลดลงของค่าความขุ่นของเซลล์ในสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเพียงอย่างเดียวเท่ากับ 71 (รูปที่ 19 ตารางที่ 10) เนื่องด้วยผนังเซลล์ของ *Escherichia coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียกรัมลบประกอบด้วยร่างแหของเปปทิโดไกลแคนเพียงชั้นเดียว แต่ปกคลุมไว้ด้วยเยื่อหุ้มชั้นนอก ซึ่งประกอบด้วยสารประกอบลิโปโพลีแซคคาไรด์และลิโปโปรตีน (Moat, 1979) Gilby และ Few (1961) ; Shafa และ Salton (1960) ; Godson และ Sinscheiman (1967) จึงสันนิษฐานว่าการที่ไลโซไซม์เมื่อย่อยเปปทิโดไกลแคนแล้วไม่ทำให้เซลล์แบคทีเรียกรัมลบแตกได้นั้น เป็นเพราะยังมีเยื่อหุ้มชั้นนอกห่อหุ้มอยู่ แต่เมื่อเติมโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต ซึ่งสามารถทำลายเยื่อหุ้มชั้นนอกโดยการละลายเอาไขมันออก เซลล์จึงเกิดการแตก จากผลการทดลองข้างต้นจึงเลือกใช้ระยะเวลาการบ่มเซลล์ 60 นาทีใน

การทดลองต่อไป ทั้งนี้เนื่องจากการบ่มเซลล์ไว้นานกว่านี้อาจมีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียอื่น ทำให้ไม่สามารถใช้ค่าความขุ่นของเซลล์เป็นดัชนีบ่งชี้การแตกของเซลล์ การทดสอบในทำนองเดียวกันกับ *Klebsiella pneumoniae* IFO 3317 ได้ผลเช่นเดียวกับ *Escherichia coli* TISTR 780 แต่เปอร์เซนต์การลดลงของค่าความขุ่นของเซลล์ที่เวลาเดียวกันในสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเพียงอย่างเดียว และการเติมโซเดียม-โดเดซิลซัลเฟตภายหลังการบ่มเซลล์ไว้ในไลโซไซม์ไม่แตกต่างกันจนเห็นได้อย่างชัดเจน เช่นใน *Escherichia coli* TISTR 780 (รูปที่ 22 ตารางที่ 12) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะองค์ประกอบของเยื่อหุ้มชั้นนอกของ *Klebsiella pneumoniae* มีไขมันน้อย องค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นโพลีแซคคาไรด์ พบไขมันเป็นองค์ประกอบเฉพาะในเยื่อหุ้มเซลล์ การบ่มเซลล์ *Escherichia coli* TISTR 780 หรือ *Klebsiella pneumoniae* IFO 3317 ไว้ใน NA-L-alanine amidase หรือไลโซไซม์เข้มข้น 100 หน่วยเอนไซม์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 60 นาที ก่อนการเติมโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต พบว่าเปอร์เซนต์การลดลงของค่าความขุ่นของเซลล์ทั้งสองชนิดที่เวลาเดียวกันไม่แตกต่างกันคือ 80, 83 และ 64.6, 56.8 ตามลำดับ (รูปที่ 24 ตารางที่ 13 และรูปที่ 25 ตารางที่ 14) แสดงว่าสามารถใช้ NA-L-alanine amidase แทนไลโซไซม์ในการย่อยสลายเปปทิโดไกลแคน ก่อนการทำลายเยื่อหุ้มชั้นนอกและเยื่อหุ้มเซลล์โดยโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต การใช้NA-L-alanine amidase ร่วมกับไลโซไซม์ในการทดลองนี้ไม่พบการเสริมฤทธิ์กันระหว่างเอนไซม์ทั้งสองชนิดที่ใช้ (รูปที่ 24 ตารางที่ 13 และรูปที่ 25 ตารางที่ 14)