บทที่ 4
บทสรุป และวิจารณ์

สืบเนื่องมาจากงานวิจัยของ สมศักดิ์ สรั่งบิน (2530) ที่ได้ทำการกลายพันธุ์ *Proteus rettgeri* ขึ้นมาใหม่ได้ประมาณ 5 สายพันธุ์ ในจำนวนนี้ มีสายพันธุ์ SPS-6 ที่สามารถสร้างเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสในระดับสูง 397 หน่วย ต่อ มก.โปรตีนรวมของเซลล์ และสามารถเจริญได้ในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีกลูโคสเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนเดี่ยวได้ งานวิจัยนี้จึงนำสายพันธุ์ดังกล่าวมาศึกษาหาแหล่งต้นตอคาร์บอน และไนโตรเจนที่มีราคาถูก และเหมาะสมที่สุดในการเจริญ และการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส รวมทั้งสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์นี้ ในถังหมักด้วย

เมื่อเริ่มแรกของงานวิจัยได้นำเชื้อ *Proteus rettgeri* SPS-6 นี้ออกมาทดลองเลี้ยงในสภาวะเลียนแบบกับที่เคยใช้ในงานวิจัยของ สมศักดิ์ สรั่งบิน (2530) ปรากฏว่า ค่าการเจริญสูงสุดที่ได้ต่ำกว่าเล็กน้อย แต่ด้านความสามารถในการสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสนั้น ลดระดับลงเหลือ 180 หน่วย ต่อ มก. โปรตีนรวมของเซลล์ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก *Proteus rettgeri* SPS-6 นี้เป็นเชื้อที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์มาจากการกลายพันธุ์ เมื่อถูกเก็บไว้นานๆ และผ่านการถ่ายเชื้อ (subculture) มาหลายครั้ง อาจทำให้เชื้อสามารถซ่อมแซมส่วนที่ผิดปกติ หรือเกิดการกลายพันธุ์ต่อไปได้ แม้ว่าความสามารถของการสังเคราะห์เอนไซม์นั้นจะลดลงไปบ้าง แต่ก็ยังอยู่ในระดับสูง และเมื่อนำมาทดลองเลี้ยง และทำการถ่ายเชื้ออยู่นาน พบว่า เชื้อยังสามารถที่จะเจริญได้ดี และผลิตเอนไซม์ได้ในระดับค่อนข้างคงที่ จึงคงเลือกใช้เชื้อนี้เพื่อการวิจัยต่อไป

ผลการศึกษาชนิดของแหล่งต้นตอคาร์บอน ที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ *Proteus rettgeri* นั้น เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนในอาหารสูตรปรับต่ำที่อุณหภูมิ 28° ซ. ในระดับขวดเขย่า (รูปที่ 3.1) พบว่า ที่กลูโคสความเข้มข้น 0.2 % เชื้อได้รับปริมาณสารอาหารจำกัด จึงทำให้การเจริญเป็นไปได้ต่ำเพียงครึ่งหนึ่งของ ที่ความเข้มข้น 0.4 - 0.8 % ซึ่งให้ค่าการเจริญสูงสุดที่ใกล้เคียงกัน แสดงว่า ความต้องการปริมาณคาร์บอนเพื่อการเจริญสูงสุดของโปรเตียสต้องการคาร์บอนเพียง 0.4 % กลูโคส และปริมาณ

กลูโคสยังมีผลต่อความสามารถในการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของโปรเตียส อีกด้วย โดยที่ ถ้าความเข้มข้นของกลูโคสในอาหารมีสูงเกินกว่า 0.4 % จะไปกดดันการสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ให้ต่ำลง ทั้งนี้ เนื่องมาจากการเกิดคะตาโบไลท์ รีเพรสชั่น (catabolite repression) กดดันการสังเคราะห์เอนไซม์ เช่นที่พบใน *E. coli* โดย Kaufmann และ Bauer (1960) รายงานว่า การสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ *E. coli* ATCC 9637 จะถูกกดดันโดยปฏิกิริยาคะตาโบไลท์ รีเพรสชั่น อย่างสมบูรณ์ด้วยกลูโคส และมีบางส่วนที่ถูกกดดันด้วยอะซิเตท(acetate) โดยสารทั้งสองจะไปกดดันให้มี cAMP ในเซลล์ต่ำลง ต่อมา Gang และ Shaikh (1976) ได้พิสูจน์ ยืนยันข้อสันนิษฐานนี้ โดยทำการทดลองเติม cAMP ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า สามารถคืนสภาพการสังเคราะห์เอนไซม์ให้กับ *E. coli* ได้ จนถึงระดับ non-repressed และเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสที่สังเคราะห์จาก *Kluyvera citrophila* K.Y.3641 และK.Y.7844 ก็ถูกจำกัดด้วยกลูโคสผ่านปฏิกิริยาคะตาโบไลท์ รีเพรสชั่น เช่นกัน (Takasawa และคณะ,1972; Skimizu และคณะ,1975 a,b)

ส่วนแบคทีเรียสายพันธุ์ *Proteus rettgeri* นั้น Daumy และคณะ(1982) เคยรายงานว่า การสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสจาก *Proteus rettgeri* ATCC 31052 จะไม่ถูกกดดันด้วยกลูโคส แต่จะถูกยับยั้งการผลิตเอนไซม์ได้ด้วยสารที่เป็นองค์ประกอบของวัฏจักรเครบ (Kreb's cycle) หลายชนิด เช่น ซักซิเนท (succinate),ฟูมาเรท(fumarate) และมาเลท(malate) และไม่สามารถใช้กลูโคสเป็นสารต้นตอคาร์บอนเดี่ยวได้ แต่จากรายงานของ Daumy ใช้ความเข้มข้นของกลูโคสเพียง 0.2 %เท่านั้น ซึ่งจากงานวิจัยนี้ ก็พบว่า การใช้กลูโคสถึง 0.4 % ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะไม่ทำให้เกิดคะตาโบไลท์ รีเพรสชั่นต่อการผลิตเพนนิซิลิน เอซิเลส เช่นกัน แต่จะเกิดเมื่อความเข้มข้นของกลูโคสที่ใช้สูงเกิน 0.4 %

สารละลายแป้งไฮโดรไลซ์ (Hydrolysate of starch) เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนชนิดหนึ่งที่น่าสนใจ เนื่องจาก เราสามารถผลิตขึ้นเองได้จากแป้งมันสำปะหลังที่มีราคาถูก นำมาผ่านกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์ ซึ่งจะสามารถย่อยโมเลกุลของแป้งลงจนกลายเป็นสารละลายของน้ำตาลกลูโคส และมี oligosaccharide อยู่บ้างเป็นบางส่วน โดยสารละลายแป้งไฮโดรไลซ์ที่เตรียมได้นี้จะมีกลูโคสอยู่ประมาณ 40 %

เมื่อนำสารละลายแป้งไฮโดรไลซ์มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคส โดยแปรผันความเข้มข้นของแป้งไฮโดรไลซ์เพื่อหาปริมาณที่เหมาะสม ในการเจริญ และการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส (รูปที่ 3.2) ปรากฏว่า แป้งไฮโดรไลซ์ที่ความเข้มข้น 0.5 %ถึง 2.0 % สามารถให้ค่าการเจริญเติบโตสูงสุดของแบคทีเรียที่ใกล้เคียงกับเมื่อใช้กลูโคสความเข้มข้น 0.2 %ถึง 0.8 % ตามลำดับ และลักษณะการใช้กลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แป้งไฮโดรไลซ์ หรือกลูโคส(รูปที่ 3.1)เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับ *Proteus rettgeri* SPS-6 จะมีรูปแบบที่คล้ายคลึงกัน คือ ปริมาณกลูโคสในอาหารจะถูกใช้ไปจนเกือบหมด เมื่อการเจริญเติบโตของเชื้อเริ่มเข้าสู่ระยะ stationary phase และเมื่อพิจารณาทางด้านความสามารถในการสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลินเอซิเลส ของโปรเตียสเมื่อใช้แป้งไฮโดรไลซ์เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน จะเห็นว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ ต่อ ปริมาณโปรตีนรวมของเซลล์จะลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแป้งไฮโดรไลซ์ขึ้น เช่นเดียวกับเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน และเซลล์โปรเตียสที่เจริญในอาหารที่ใช้แป้งไฮโดรไลซ์ที่ความเข้มข้น 1.0 % ก็จะให้ค่าการเจริญ(OD_{540}) และแอคติวิตีสูงสุดของเอนไซม์ ต่ำกว่าเมื่อใช้กลูโคส 0.4 % เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงเล็กน้อย

สำหรับ แบะแซ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์น้ำตาลอีกชนิดหนึ่งในสภาวะของกลูโคเดกซ์ตริน (glucodextrin) ที่มีขายทั่วไปตามท้องตลาด เมื่อถูกนำมาใช้เป็นแหล่งต้นตอคาร์-บอนแทนกลูโคส ผลการทดลองในรูปที่ 3.3 จะเห็นว่า รูปแบบการเจริญ และความสามารถในการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสของ *Proteus rettgeri* SPS-6 จะคล้ายกับเมื่อใช้กลูโคส หรือแป้งไฮโดรไลซ์เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน คือ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนให้สูงขึ้น ค่าการเจริญ(OD_{540})สูงสุดก็จะสูงขึ้น แต่ความสามารถในการสังเคราะห์เอนไซม์ของโปรเตียสจะต่ำลง เมื่อวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณกลูโคส ที่มีอยู่ในแบะแซที่ใช้ พบว่า มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ตรวจวัดได้ด้วยวิธี Dinitrosalicylate (DNSA) อยู่ประมาณ 44% ในจำนวนนี้เป็นกลูโคสที่ตรวจวัดได้ด้วยวิธี Glucose oxydase ประมาณ 3.1% ดังนั้น ที่ความเข้มข้นของแบะแซ 13% จะให้กลูโคสในปริมาณที่ไม่มีผลไปกดดันการสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลินเอซิเลส ของ *Proteus rettgeri* โดยที่เซลล์โปรเตียสจะให้ค่าแอคติวิตีสูงสุดของเอนไซม์อยู่ในระดับสูงใกล้เคียงกับ เมื่อเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำที่ใช้กลูโคส 0.4 % เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน แต่จะให้ค่าการเจริญสูงสุดเพียง 3.2 หน่วย

ในขณะที่ เมื่อเลี้ยงในกลูโคส 0.4% จะให้การเจริญสูงสุดถึง 4.0 หน่วย ซึ่งอาจเนื่องมาจากมีกลูโคสบางส่วนอยู่ในรูปแบบที่เชื้อไม่สามารถนำมาใช้ได้ จากรูปที่ 3.1 จะเห็นว่า เมื่อเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตเต็มที่ในอาหารที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน กลูโคสจะถูกใช้ไปจนเกือบหมด แต่สำหรับในอาหารที่ใช้แบะแซนั้น(รูปที่ 3.3) พบว่า จะมีกลูโคสส่วนหนึ่งเหลืออยู่ ซึ่งน่าจะเป็นเพราะเหตุนี้ ที่ทำให้ค่าการเจริญสูงสุดที่ได้จึงต่ำกว่า เมื่อใช้กลูโคสบริสุทธิ์

กากน้ำตาลก็เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนอีกแหล่งหนึ่งที่น่าสนใจ เพราะเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตน้ำตาลซึ่งถือว่าเป็น วัตถุดิบที่มีราคาถูกมาก และถูกนำมาใช้ในการเลี้ยงเชื้อต่างๆ มาแล้วหลายชนิด (Phillips, 1973; Worgan, 1973; Spicer, 1974; vandehra, 1977) ซึ่งจากการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วย DNSA พบว่า ในกากน้ำตาลจะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เป็นองค์ประกอบอยู่ประมาณ 20% เป็นกลูโคสประมาณ 1.3% โดยเมื่อทดลองใช้กากน้ำตาลความเข้มข้น 10% เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนเดี่ยวในอาหารสูตรปรับต่ำ ปรากฏว่า เชื้อไม่สามารถเจริญเติบโตได้ (รูปที่ 3.4) ทั้งนี้อาจเนื่องจาก ปริมาณน้ำตาลกลูโคสในกากน้ำตาลที่ใช้มีต่ำ และอาจจะประกอบกับว่า ในกากน้ำตาลมีสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโปรเตียสอยู่ เช่น พวกอิออนของโลหะบางชนิด ซึ่ง D.V.Vandehra และคณะ(1977) เคยรายงานว่า สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (low molecular weight dialyzable substances) และพวกอิออนของโลหะที่มีในกากน้ำตาลสามารถจะไปยับยั้งการผลิตกรดซิตริก โดยเชื้อ *Aspergillus niger* ได้

สรุปผลการทดลอง แปรเปลี่ยนชนิด และปริมาณของแหล่งต้นตอคาร์บอนที่ *Proteus rettgeri* SPS-6 สามารถใช้ได้มี 3 ชนิด คือ กลูโคส,แป้งไฮโดรไลซ์ และแบะแซ ซึ่งแหล่งต้นตอคาร์บอนทั้ง 3 ชนิด ให้ลักษณะการเจริญ และการสังเคราะห์เอนไซม์ที่คล้ายคลึงกัน คือ โปรเตียสที่เจริญในอาหารที่ใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลต่ำ ๆ จะให้แอคติวิตีของเอนไซม์ดีกว่าที่ความเข้มข้นสูง แต่ในระดับน้ำตาลที่ต่ำมากเกินไปก็จะทำให้ค่าการเจริญ(OD_{540})สูงสุดที่ต่ำไปด้วย ซึ่งปรากฏว่า ที่ความเข้มข้นของกลูโคส 0.4 % นั้น เหมาะสมที่สุดที่จะใช้ในการเจริญ และผลิตเอนไซม์เพนนิซิลินเอซิเลส ของ *Proteus rettgeri* SPS-6 นี้

ในงานวิจัยขั้นต่อไปจึงใช้กลูโคส 0.4 % เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนในอาหารสูตรปรับต่ำ เพื่อการศึกษาแหล่งต้นตอไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ *Proteus rettgeri* โดยเมื่อใช้แอมโมเนียม-ซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน จะเห็นว่า ปริมาณไนโตรเจนที่เพิ่มขึ้นสามารถจะเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ได้ แต่สัดส่วนของการเพิ่มปริมาณไนโตรเจน กับการเพิ่มค่าการเจริญเติบโตของแบคทีเรียนั้นจะต่ำลงในช่วงความเข้มข้นที่สูงขึ้น คือ เมื่อเพิ่มปริมาณแหล่งต้นตอไนโตรเจน 0.05 % ในช่วงความเข้มข้น 0.05 - 0.1 % จะให้ค่าการเจริญ (OD_{540})สูงสุดเพิ่มขึ้นถึง 2 หน่วย แต่ที่ช่วงความเข้มข้น 0.1 - 0.15 % ค่าการเจริญจะเพิ่มขึ้นเพียง 0.3 หน่วยเท่านั้น ในขณะที่ แบคทีเรียจะมีความสามารถในการสังเคราะห์เอนไซม์ได้เท่ากัน (ที่ความเข้มข้น 0.1 % กับ 0.15 %)

เมื่อทดลองใช้ยูเรียเป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอีกชนิดหนึ่งมาแทนแอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งจากการคำนวณปริมาณไนโตรเจนจากสูตรโครงสร้างและน้ำหนักโมเลกุลของแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) และยูเรีย (NH_2CONH_2) ที่ใช้ พบว่า ยูเรียที่ความเข้มข้น 0.045% จะให้ปริมาณไนโตรเจน (0.021%)เท่ากับแอมโมเนียมซัลเฟต 0.1% จากกราฟรูปที่ 3.5 และ 3.6 จะเห็นว่า โปรเตียสสามารถใช้ยูเรียเป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจนได้ดี โดยจะให้ลักษณะการเจริญ และความสามารถในการสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส อยู่ในระดับสูง ใกล้เคียงกันกับเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต ตามลำดับความเข้มข้นของไนโตรเจน ทั้งนี้เพราะแบคทีเรียในกลุ่ม(genus) *Proteus* สามารถผลิตเอนไซม์ยูรีเอส(urease)ได้ (Freeman, 1985)

เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม ดังนั้นจึงมีกากที่เหลือของผลิตผลทางการเกษตรหลายชนิดที่สามารถนำมาใช้เป็นแหล่งของวัตถุดิบสำหรับจุลชีพได้ เช่น กากถั่วเหลืองที่เหลือจากการสกัดน้ำมันออกแล้ว โดยปกติจะใช้เป็นแหล่งโปรตีนในอาหารสัตว์ซึ่งถ้านำมาผ่านกระบวนการไฮโดรไลซ์ด้วยกรดกำมะถัน(ศิริลักษณ์ ธีระดากร, 2529) แล้วจะสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจนสำหรับจุลชีพต่างๆ ได้ โดยที่สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองที่ใช้นี้ มีปริมาณไนโตรเจนอยู่ค่อนข้างสูง ประมาณ 3.88 กรัมไนโตรเจน ต่อ ลิตร ถึงแม้ว่า กากถั่วเหลืองไฮโดรไลซ์จะช่วยให้แบคทีเรียมีอัตราการเจริญได้อย่างรวดเร็วก็จริง แต่ในทาง

ตรงข้าม จะทำให้การสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของโปรตีียสนี้ต่ำลง (รูปที่ 3.7) ทั้งนี้อาจเนื่องจาก สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลือง นั้นเป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่ประกอบด้วย กรดอะมิโนต่าง ๆ หลายชนิด ซึ่งอาจมีกรดอะมิโนบางตัวที่เป็นองค์ประกอบอยู่ไปกดดันการสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสได้ ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลงานของ สมศักดิ์ สรั่งบิน (2530) ที่พบว่า สารประกอบเคซีน ไฮโดรไลเซท หรือทริปโตนสามารถกระตุ้นการเจริญของ *Proteus rettgeri* ให้สูงขึ้นได้ แต่จะมีผลทำให้การผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ต่ำลง

ในการศึกษาวิจัยขั้นตอนต่อไปถึงปัจจัยทางกายภาพที่มีผลกระทบต่อ การเจริญและการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของโปรเตียสต่อไปนั้นจะใช้สูตรอาหารปรับต่ำที่มีกลูโคส 0.4 % เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน และใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 % เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน จากผลการทดลองในรูปที่ 3.8 จะเห็นว่า มีการเปลี่ยนแปลงของ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างชัดเจนในระหว่างการเจริญของ *Proteus rettgeri* ดังนั้น จึงอาจเป็นได้ว่าค่าความเป็นกรด-ด่าง ของอาหารเลี้ยงเชื้อนี้อาจมีผลกระทบต่อการเจริญ และการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสได้ เมื่อทำการศึกษาผลกระทบของ pH เริ่มต้นนี้ ปรากฏว่า ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส อย่างเห็นได้ชัด โดยพบว่าการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส จะดีขึ้น เมื่อใช้ค่า pH เริ่มต้นที่ค่อนข้างเป็นด่าง (สูงกว่า 7) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก โดยปกติเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส จะแสดงความสามารถในการไฮโดรไลซ์ได้ดี ในสภาวะที่ค่อนข้างเป็นด่าง แต่เมื่ออยู่ในสภาวะที่ค่อนข้างเป็นกรด(pH ต่ำกว่า 7) เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสนี้ กลับจะแสดงคุณสมบัติในทางตรงข้าม (reacylation) ดังนั้น โปรเตียสที่เจริญในอาหารที่มีสภาวะความเป็นกรด-ด่างที่แตกต่างกัน อาจจะสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสออกมาในรูปแบบที่แตกต่างกัน ซึ่งการเลี้ยงในสภาวะที่ค่อนข้างเป็นด่างเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ที่ถูกผลิตขึ้นมาอาจอยู่ในรูปแบบที่มี active site ของการไฮโดรไลซ์ที่ดีกว่าการเลี้ยงในสภาวะที่ค่อนข้างเป็นกรด

เมื่อพิจราณาถึงผลการทดลองในรูปที่ 3.9 จะเห็นว่า อุณหภูมิมีผลกระทบต่อการเจริญ และการสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ *Proteus rettgeri* SPS-6 อย่างมาก โดยที่อุณหภูมิสูงอัตราการเจริญเติบโตจะเป็นไปได้อย่างรวดเร็วกว่าที่อุณหภูมิต่ำ แต่ในทางตรงข้ามการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสในการเลี้ยง

เชื้อที่อุณหภูมิต่ำจะเป็นไปได้ดีกว่า โดยเซลล์โปรเตียสจะให้แอคติวิตีสูงสุดของเอนไซม์สูงกว่า เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิสูงอย่างมาก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก เมตาโบลิสม และปฏิกิริยาต่างๆ ภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตโดยทั่วไป จะเกิดขึ้นได้ดี และอย่างรวดเร็วในที่ๆ มีอุณหภูมิสูง การมีเมตาโบลิสมในเซลล์สูงก็จะมีการใช้สารอาหาร และการสร้างพลังงานอย่างรวดเร็ว พลังงานที่สร้างขึ้นนี้ก็คือ ATP โดยเมื่อในเซลล์มี ATP สูง ในทางตรงข้าม ก็จะทำให้มี cAMP ในเซลล์ต่ำซึ่งจะเข้าสู่ลักษณะเดียวกับการเกิดคะตาโบไลท์ รีเพสชั่น โดยกลูโคสนั่นเอง ที่จะมีผลไปยับยั้งการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลินเอซิเลสได้ Szentirmai(1964) ศึกษาการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ *E.coli* N.Y.1/3-67 กล่าวว่า specific activity ของเอนไซม์เพนนิซิลินเอซิเลสนี้ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิต่ำจะทำให้การผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสสูงขึ้นได้ เช่นเดียวกับที่ Dammy และคณะ (1982) รายงานว่า การผลิตเพนนิซิลินเอซิเลส ของ *E. coli* ก็จะเกิดขึ้นได้ดี เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิต่ำกว่า 31° ซ.

ผลกระทบของค่าเป็นกรด-ด่าง (pH) ต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลินเอซิเลส ควบคู่ไปพร้อมๆ กับอุณหภูมินั้น พบว่า ทั้ง 2 ปัจจัยมีผลต่อความสามารถในการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสของ *Proetus rettgeri* SPS-6 เป็นอย่างมาก แต่ทั้ง 2 ปัจจัยจะไม่มีผลเสริมกัน หรือกดดันกัน คือ จากการศึกษา(รูปที่ 3.8)เรื่องความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 28° ซ. เมื่อปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 7.8 โปรเตียส จะให้ค่าแอคติวิตีสูงสุดของเอนไซม์ ต่อปริมาณโปรตีนรวมของเซลล์เพิ่มขึ้นจาก เดิมที่ pH 7.1 ประมาณ 15 % ส่วนทางด้านอุณหภูมินั้น(รูปที่ 3.9) พบว่า การลดอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรียนี้ลงเป็น 25° ซ. จะช่วยให้ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสของ *Proteus rettgeri* เพิ่มขึ้นจาก เดิมที่อุณหภูมิ 28° ซ.ถึง 30 % และเมื่อเจริญโปรเตียสในอาหารสูตรปรับต่ำที่ปรับ pHเริ่มต้น เป็น 7.8 และเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25° ซ.(รูปที่ 3.10) จะทำให้ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของโปรเตียสสูงขึ้นกว่าเดิม ได้ถึงประมาณ 45 %

การสังเคราะห์เพนนิซิลินในเชื้อรา *Penicillium chrysogenum* นั้นจะมีเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในช่วงการเปลี่ยน Isopenicillin N ให้เป็น Benzylpenicillin ดังนั้น กรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในการสังเคราะห์เพนนิซิลินนั้น อาจมีผลกระทบต่อการสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสก็เป็นได้

กรดอะมิโนสำคัญที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการนี้ คือ L-cysteine, L-valine นอกจากนี้ จากผลการทดลองของ สมศักดิ์ สรั่งบิน (2530) พบว่า Aspartate สามารถถูกใช้เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน สำหรับ *Proteus rettgeri* ATCC 9250 ที่ให้การสังเคราะห์เพนนิซิลิน เอซิเลสสูงเมื่อเทียบกับ ซักซิเนท, ซิเตรท, กลูตาเมท และกลีเซอรอล ที่ความเข้มข้นเท่าๆ กัน ในการวิจัยจึงได้ทดลองเติมกรดอะมิโนทั้ง 3 ชนิด โดยใช้หลักว่า กรดอะมิโนแต่ละชนิดที่เติมลงไปจะถูกคำนวนให้มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบอยู่เท่ากัน ผลปรากฏว่า กรดอะมิโนทั้ง 3 ชนิด ไม่สามารถช่วยกระตุ้นการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสให้ดีขึ้นเลย ถึงแม้ว่า กรดแอสปาร์ติคจะช่วยให้อัตราการเจริญ-เติบโตของโปรเตียสเป็นไปอย่างรวดเร็ว และให้ค่าการเจริญ(OD_{540})สูงสุด สูงกว่าปกติถึง 1.4 เท่าก็ตาม แต่จะให้แอคติวิตีสูงสุดของเอนไซม์ ต่อปริมาณโปรตีนรวมลดลงเหลือเพียง 60 % ของสภาวะที่เลี้ยงใน 0.4 % กลูโคส เท่านั้น

สำหรับการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการเจริญ และการสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ *Proteus rettgeri* ในถังหมักนั้น โดยทั่วไปปัจจัยที่มีการศึกษากันในระดับถังหมักก็ คือ ความเร็วในการกวน อัตราการให้อากาศ การควบคุม pH ในระหว่างการเจริญเติบโต, อุณหภูมิ และการทำ fed batch ซึ่งสามารถทำได้สะดวก และควบคุมได้ดีกว่าในขวดเขย่า ซึ่งผลการศึกษาอัตราเร็วในการกวน และอัตราการป้อนอากาศ(รูปที่ 3.12 และ 3.13) พบว่า การสังเคราะห์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ *Proteus rettgeri* SPS-6 จะเป็นไปได้ดี ที่อัตราเร็วในการกวนต่ำ และอัตราการป้อนอากาศน้อยๆ ทั้งนี้เนื่องมาจากที่อัตราเร็วในการกวนและอัตราการป้อนอากาศมากเกินไปจะทำให้มีความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักมีปริมาณมากเกินไป ซึ่งจะมีผลทำให้ความสามารถในการสังเคราะห์เอนไซม์ต่ำลง Kleiner และ Lopatnev (1972) ; Vojtisek และ Slezak (1975) รายงานว่า การสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส จากเชื้อ *E. coli* ATCC 9637, NCIB 8743 และ ATCC 11105 นั้น จะสังเคราะห์เอนไซม์ได้มากที่สุดเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ ระหว่าง 24 - 30° ซ. โดยมี อัตราการป้อนอากาศต่ำ และการสังเคราะห์เพนนิซิลิน เอซิเลส นี้ จะถูกกดดัน อย่างเต็มที่ ด้วยการเพิ่มความเข้มข้นของอัตราการละลายของออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก ในการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส จาก *E. coli* เพื่อเป็นการค้าที่ทำกันในอุตสาหกรรมนั้น พบว่าเอนไซม์นี้ จะสามารถผลิตได้ดีที่สุด ภายใต้สภาวะการให้อากาศอ่อนๆ (mildly

aerobic conditions) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่มี fermentable carbohydrates และควบคุมอุณหภูมิที่ 24° ซ. ซึ่งการผลิตเอนไซม์นี้จะถูกยับยั้งลงถ้ามีการให้อากาศแรงเกินไป หรือการเพิ่มอัตราเร็วในการกวนให้สูงขึ้น อาจทำให้แบคทีเรียเกิดความเครียดเนื่องจากความแรงในการกวนของใบพัด ทำให้ความสามารถในการสังเคราะห์เอนไซม์ต่ำลง

ผลการทดลองในรูปที่ 3.12 เมื่อใช้อัตราเร็วในการกวน 300 รอบ ต่อ นาที ที่อัตราการป้อนอากาศ 2 ปริมาตรอากาศ ต่อ ปริมาตรน้ำหมัก ต่อ นาที นั้น จะให้แอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสสูงที่สุด มีค่าประมาณ 300 หน่วย ต่อ มก. โปรตีนรวมของเซลล์ และสูงกว่าเมื่อเลี้ยงในขวดเขย่าเล็กน้อย (ประมาณ 20 หน่วย ต่อ มก.โปรตีนรวมของเซลล์) และเมื่อเปลี่ยนมาใช้อัตราการให้อากาศที่ 0.5 ปริมาตรอากาศ ต่อ ปริมาตรน้ำหมัก ต่อ นาที (รูปที่ 3.13) จะให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงขึ้นอีกเป็น 320 หน่วย ต่อ มก.โปรตีนรวมของเซลล์

การควบคุม pH ของน้ำหมักให้มีค่าคงที่ตลอดการเพาะเลี้ยง ในระหว่างการเจริญของเชื้อนั้น ผลการทดลองรูปที่ 3.14 พบว่า การควบคุม pH ไว้ที่ 7.8 *Proteus rettgeri* จะให้แอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสสูงกว่า ที่ pH 7.1 ประมาณ 15 % ทั้งนี้อาจเนื่องจากเหตุผลที่สันนิษฐานไว้แล้ว ตอนการหา pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม แต่เมื่อพิจราณาถึงความสามารถในการสังเคราะห์เอนไซม์ของโปรเตียสที่มีการควบคุม pH กับพวกที่ไม่มีการควบคุม pH ที่สภาวะเดียวกัน (กราฟรูปที่ 3.13 และ 3.14) คือ ที่อุณหภูมิ 25° ซ.,pH เริ่มต้น 7.8 และอัตราเร็วในการกวน 300 รอบ ต่อ นาที พบว่าแบคทีเรียที่ไม่มีการควบคุม pH ในระหว่างการเจริญ จะให้แอคติวิตีสูงสุดของเอนไซม์ สูงกว่าในสภาวะที่มีการควบคุม pH ประมาณ 30 หน่วย ต่อ มก.โปรตีนรวมของเซลล์ สมศักดิ์ สรั่งบิน (2530) เคยทดลองปรับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการเจริญของ *Proteus rettgeri* ATCC 9250 ให้คงที่อยู่ในช่วง 7.0-7.5 ก็พบว่า การตริง pH ให้อยู่ในช่วง 7.0-7.5 นั้น ไม่สามารถช่วยเพิ่มการเจริญ และการสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ได้

การเติมกลูโคสอย่างต่อเนื่อง เป็นการเติมแหล่งต้นตอคาร์บอนให้เชื้อสามารถนำไปใช้ได้ตลอดเวลา โดยที่ความเข้มข้นไม่สูงเกินไป จากรูปที่ 3.1 แสดงรูปแบบการใช้น้ำตาลกลูโคสของ *Proteus rettgeri* ในระหว่างการเจริญเติบโต จะเห็น

ว่า เมื่อเริ่มเข้าสู่ระยะการเจริญคงที่ (stationary phase) ปริมาณน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อแทบจะหมด ดังนั้นถ้ามีการเติมแหล่งคาร์บอนลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อกันเป็นช่วง ๆ อาจช่วยให้การเจริญเติบโตของเชื้อเป็นไปได้ดี แต่ผลการทดลองตามรูปที่ 3.15 ปรากฏว่า การเติมกลูโคสอย่างต่อเนื่องนี้ไม่ได้ช่วยให้การเจริญของเชื้อดีขึ้น แต่จะให้แอคติวิตีสูงสุดของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสค่อนข้างคงที่ อยู่ในระดับต่ำกว่าเมื่อไม่มีการควบคุมความเข้มข้นของแหล่งต้นตอคาร์บอนเล็กน้อย พัชรากร ทิพรังกร (2530) รายงานว่า แอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส จาก *E. coli* จะสูงขึ้นถึง 2 เท่า เมื่อทำให้เซลล์อยู่ในสภาวะขาดอาหาร ดังนั้น ที่สภาวะของการใช้แหล่งต้นตอคาร์บอนไปจนเกือบหมดนี้ จะมีผลทำให้ cAMP ในเซลล์เพิ่มมากขึ้น ซึ่งจะไปลดสภาวะของ คะตาโบไลท์ รีเพรสชั่นในการสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ *Proteus rettgeri* ลงได้ ทำให้ระดับในการสังเคราะห์เอนไซม์สูงขึ้น

สรุปผลการทดลอง

1. การสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสของ *Proteus rettgeri* SPS-6 จะมีระดับสูงสุดเมื่อการเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะ stationary phase
2. ปริมาณกลูโคสที่สูงกว่า 0.4% ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้เกิดปฏิกิริยาคะตาโบไลท์รีเพรสชั่น ในการสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสของ *Proteus rettgeri* SPS-6 ได้
3. สารละลายแป้งไฮโดรไลซ์ และแบะแซ(กลูโคเดกตริน) สามารถนำมาใช้เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน เพื่อการเจริญ และการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสของ *Proteus rettgeri* SPS-6 ได้ แต่ไม่สามารถใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนได้
4. ยูเรียและแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจนที่ดี แต่สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองไม่เหมาะสมที่จะใช้เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจนสำหรับการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ *Proteus rettgeri* SPS-6
5. *Proteus rettgeri* SPS-6 ที่เจริญในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยกลูโคส 0.4 % เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน และใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 % เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน โดยปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 7.8 ,ที่อุณหภูมิ 25° ซ. จะให้ค่าการเจริญสูงสุด 3.8 หน่วย OD_{540} และให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์สูงถึง 280 หน่วย ต่อปริมาณโปรตีนรวมของเซลล์
6. การเจริญ *Proteus rettgeri* SPS-6 ในถังหมัก ที่ใช้อัตราเร็วในการกวน 300 รอบ ต่อนาที และอัตราการป้อนอากาศ 0.5 vvm โดยไม่ต้องมีการควบคุม pH ระหว่างการเจริญเติบโต จะได้ค่าการเจริญสูงสุด 3.8 หน่วย OD_{540} และมีแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส สูงสุดถึง 320 หน่วย ต่อปริมาณโปรตีนรวมของเซลล์

ข้อเสนอแนะ

1. ในงานวิจัยต่อไปอาจทดลองใช้แหล่งพลังงานชนิดอื่นที่ปลดปล่อยพลังงานได้ช้ากว่ากลูโคสมาใช้เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน เช่น sorbital, disaccharide หรือ สารที่เป็น intermediate บางชนิดใน วัฏจักรเครบ ฯลฯ
2. หากเป็นไปได้ควรศึกษาผลของการขาดแคลนอาหาร และการเพิ่มความเครียดต่อการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ *Proteus rettgeri* SPS-6 เช่นเดียวกับ รายงานของ พัชรากร ทิพรังกร (2530)ที่ทำกับเซลล์ *E. coli*
3. และสำหรับการเจริญ *Proteus rettgeri* SPS-6 ในถังหมักนั้น น่าจะมีการศึกษาค่าการละลายของออกซิเจนในน้ำหมัก ในระหว่างการเจริญเติบโตของเชื้อ และอาจลดอัตราเร็วในการกวนลงได้อีกเล็กน้อย