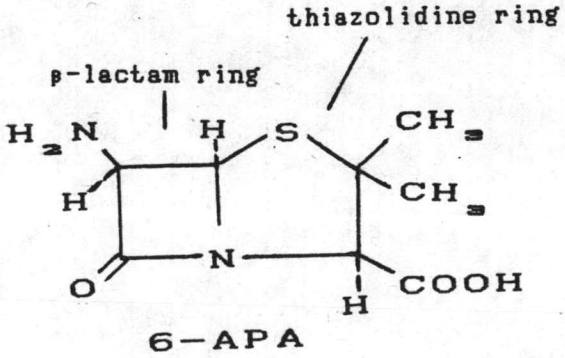
บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญของเพนนิซิลิน

ยาปฏิชีวนะเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีโครงสร้างซับซ้อนส่วนใหญ่สังเคราะห์ขึ้นได้ด้วยเชื้อจุลินทรีย์ เพนนิซิลินนับเป็นยาปฏิชีวนะชนิดหนึ่งที่รู้จักกันทั่วไป เพราะหาซื้อง่าย และราคาถูก นิยมใช้ในการรักษาโรคทั้งในมนุษย์ สัตว์ และพืชกันอย่างแพร่หลาย เป็นที่น่าเสียดายว่า ปัจจุบันประสิทธิภาพของการรักษาด้วยเพนนิซิลิน คือ เพนนิซิลิน จี และ เพนนิซิลิน วี (penicillin G and penicillin V) ลดลงอย่างมาก เนื่องจากจุลชีพหลายชนิดสามารถพัฒนาการต้านยาได้ แนวโน้มของการวิจัยและพัฒนาเกี่ยวกับเพนนิซิลินจึงมุ่งเข้าสู่การผลิตยาปฏิชีวนะเพนนิซิลินชนิดใหม่ ๆ เพื่อเพิ่มผลการรักษาให้สูงขึ้น (สัณห์ พณิชยกุล, 2529) ซึ่งกระบวนการผลิตยาเพนนิซิลินในอุตสาหกรรมสามารถทำได้ 2 วิธี คือ วิธีสังเคราะห์ทางเคมี(chemical synthesis) และวิธีกึ่งสังเคราะห์(semisynthesis) โดยทั้ง 2 กระบวนการจะต้องใช้ กรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก (6-aminopenicillanic acid ;6-APA) เป็นสารเริ่มต้นในกระบวนการผลิตทั้ง 2 กระบวนการ (Carrington, 1971; Carleysmith, Dunnill และ Lilly, 1980; Vandamme, 1983) กรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกนี้ ถูกเรียกว่าเป็น นิวเคลียสของเพนนิซิลิน (penicillin nucleus) ซึ่งประกอบขึ้นด้วย วงแหวนของไธอะโซลิดิน (thiazolidine ring) กับวงแหวนของ เบต้า-เลคแตม (β-lactam ring) (รูปที่ 1.1)



รูปที่ 1.1 สูตรโครงสร้างของ กรด 6-อะมิโนเพนนิซิลินิก

เมื่อถูกต่อเข้ากับกลุ่มข้างเคียง (side chain group) จะได้เป็นอนุพันธ์ของยาเพนนิซิลินชนิดต่างๆ (รูปที่ 1.2) ซึ่งกลุ่มข้างเคียงนี้เองที่ทำให้ยาปฏิชีวนะกลุ่มเพนนิซิลินแสดงฤทธิ์ต่อต้านจุลชีพได้ต่างกัน (Self และ Lilly, 1969; Carrington, 1971; Vandamme, 1980; Daumy, Dancly, McColl, Apostolakos และ Vinick, 1985)

1.2 อุตสาหกรรมการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก (6-APA)

ในระยะแรก กรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก ถูกผลิตขึ้นโดยตรงจากการหมักของเชื้อราหลายชนิด เช่น *Penicillium chrysogenum* Q_{176} (Kato,1953; Ballia, Chain, Dentice, Rolinson และ Batchelor, 1959; Batchelor, Doyle, Nayler และ Rolinson, 1959) แต่ผลผลิตที่ได้ต่ำ และวิธีในการแยกกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกออกนั้น ยุ่งยากซับซ้อน ในไม่ช้ากระบวนการนี้ก็เลิกใช้ไป (Carrington,1971)

ปัจจุบันอุตสาหกรรมการผลิต กรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก สามารถผลิตได้ 2 วิธี (Poulson,1984) คือ

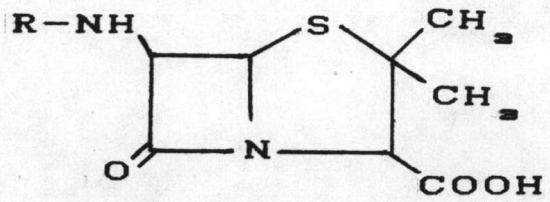
1. วิธีทางเคมี (Chemical method)

กระบวนการนี้ใช้เพนนิซิลิน จี หรือ วี เป็นวัตถุดิบตั้งต้น (รูปที่ 1.3) ประกอบด้วยปฏิกิริยาหลายขั้นตอน วิธีการควบคุมปฏิกิริยายุ่งยากและซับซ้อน เช่น ต้องใช้สารละลายอินทรีย์ช่วยให้เกิดปฏิกิริยา อุณหภูมิที่ใช้ต้องควบคุมให้อยู่ในระดับต่ำมาก(-40 องศาเซลเซียส) และปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นได้ต้องปราศจากน้ำโดยเด็ดขาด จึงจำเป็นต้องใช้พลังงาน และต้นทุนการผลิตสูง

2. วิธีทางชีวภาพ (Biological method)

โดยวิธีนี้จะใช้เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ในการไฮโดรไลซ์เพนนิซิลิน จี หรือ วี ให้เป็น กรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก (รูปที่1.4) ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย และเป็นที่นิยมในปัจจุบัน เพราะใช้ปฏิกิริยาเพียงขั้นตอนเดียว

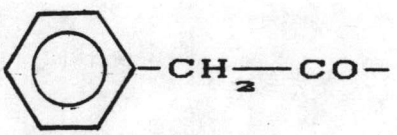
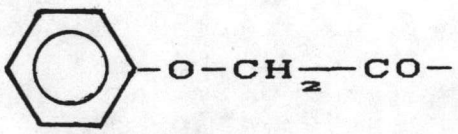
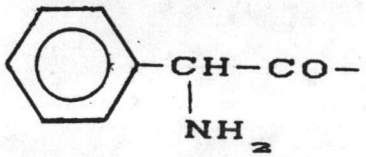
รูปที่ 1.2 สูตรโครงสร้างของเพนนิซิลิน และตัวอย่างหมู่ข้างเคียงชนิดต่างๆ (Vandamme, 1980)



Penicillin

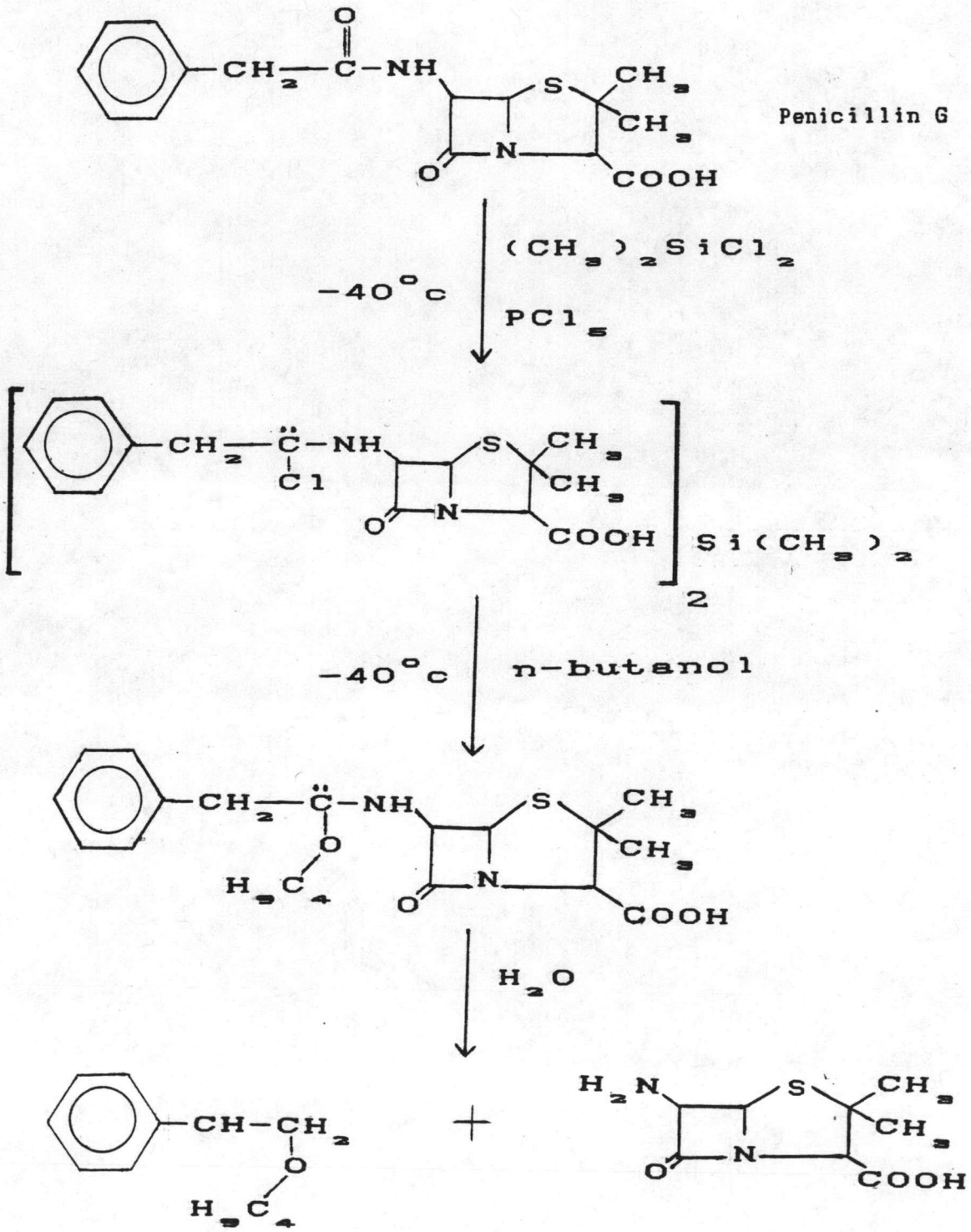
หมู่ข้างเคียง (side chain)

กรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก (6-aminopenicillanic acid)

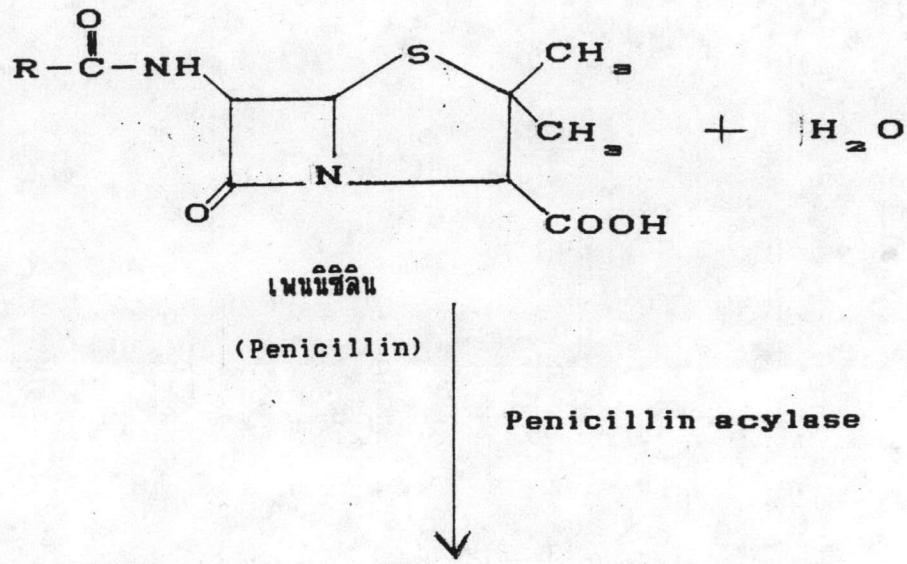
หมู่ข้างเคียง	ชื่อเพนนิซิลิน
R = H	กรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก (6-aminopenicillanic acid)
R = 	เพนนิซิลิน จี (Benzylpenicillin G)
R = 	เพนนิซิลิน วี (Phenoxymethyl penicillin V)
R = 	แอมพิซิลิน (Ampicillin)

รูปที่ 1.3 กระบวนการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก ด้วยวิธีทางเคมี

(Paulson, 1984)



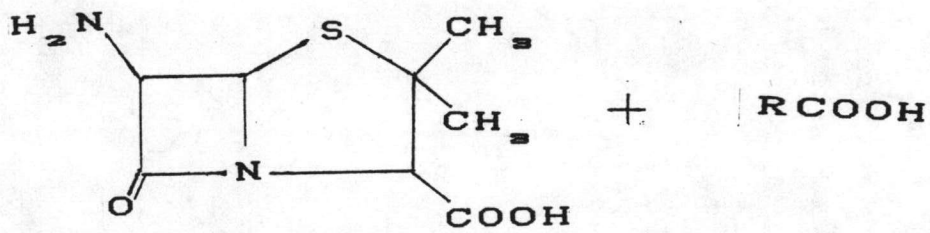
รูปที่ 1.4 กระบวนการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก ด้วยวิธีทางชีวภาพ (Vandamme, 1980)



เพนนิซิลิน

(Penicillin)

Penicillin acylase



กรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก

(6-aminopenicillanic acid)

กรดคาร์บอกซิลิก

(carboxylic acid)

1.3 <u>การค้นพบเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส</u>

Sakaguchi และ Murao (1950) พบว่า *Penicillium chrysogenum* Q176 และ *Aspergillus oryzae* สามารถผลิตเอนไซม์ซึ่งสามารถไฮโดรไลซ์เพนนิซิลิน ให้เป็นกรดฟีนิลอะซิติก และสารชนิดหนึ่งที่เรียกว่า penicin และเรียกเอนไซม์นั้นว่า เพนนิซิลิน อะมิเดส (penicillin amidase)

จนกระทั่งปี ค.ศ. 1959 Batchelor และคณะ (1959) ได้รายงานยืนยันว่า penicin ที่ Sakaguchi และ Murao ผลิตขึ้นได้จาก *Penicillium chrysogenum* ก็คือ กรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก นั่นเอง และนักวิจัยกลุ่มเดียวกันนี้สามารถตกผลึก กรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกนี้ ออกมาได้ในปี 1961 (Batchelor และคณะ, 1961)

นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่า เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส สามารถถูกผลิตได้ในจุลชีพที่ไม่มีการสร้างสารในกลุ่มเพนนิซิลินเลยก็ได้ เช่น ยีสต์, แอคติโนไมซิส และแบคทีเรีย (Cole, 1967; Vandamme และ Voets, 1974b; Vandamme, 1977)

1.4 <u>การเรียกชื่อ</u>

เอนไซม์นี้มีชื่อเรียกกันหลายชื่อ เช่น เพนนิซิลิน อะมิเดส (penicillin amidase)(Sakaguchi และ Murao, 1950; Kaufmann และ Bauer, 1964), เพนนิซิลิน อะมิโดไฮโดรเลส (penicillin amidohydrolase)(Vojtisck และ Slezak, 1975a,b,c), เพนนิซิลิน เอซิเลส (penicillin acylase)(Huang, Seto และ Shell, 1963; Szentirmai, 1964; Cole, 1964; Levitor, Klapovskaya และ Kleine, 1967; Gang และ Shaikh, 1976; Meyer, Collins และ Wagner, 1979; Dammy และคณะ; 1985) แต่ชื่อที่ได้รับความนิยมมากที่สุด คือ เพนนิซิลิน เอซิเลส(penicillin acylase)

1.5 <u>ประเภทของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส</u>

เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ถูกแบ่งออกตาม ชนิดของสับสเตรทเพนนิซิลินที่เอนไซม์สามารถไฮโดรไลซ์ได้ เป็น 3 ประเภท (Vandamme และ Voets, 1974) คือ 1. เพนนิซิลิน จี เอซิเลส (Benzylpenicillin acylase)

สามารถไฮโดรไลซ์เพนนิซิลิน จี ได้ดีกว่า เพนนิซิลิน วี ส่วนใหญ่พบใน

แบคทีเรีย โดยเฉพาะในพวก แกรมลบ นอกจากนี้ยังพบในเชื้อราบางชนิด ตัวอย่างจุลชีพที่สามารถผลิต และ คุณสมบัติของเอนไซม์กลุ่มนี้ แสดงในตารางที่ 1.1 และ 1.2 ตามลำดับ

2. เพนนิซิลิน วี เอซิเลส (Phenoxymethylpenicillin acylase)

สามารถไฮโดรไลซ์เพนนิซิลิน วี ได้ดีกว่า เพนนิซิลิน จี ส่วนมากพบในเชื้อรา ยีสต์ แอคติโนไมซีส และแบคทีเรียบางชนิด ตัวอย่างของจุลชีพที่สามารถผลิต และ คุณสมบัติของเอนไซม์กลุ่มนี้ แสดงในตารางที่ 1.3 และ 1.4 ตามลำดับ

3. แอมพิซิลิน เอซิเลส (D-α-Aminobenzylpenicillin acylase)

เป็นเอนไซม์ที่ไฮโดรไลซ์เฉพาะสับสเตรทแอมพิซิลิน และปัจจุบันพบเฉพาะในจุลชีพเพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้น ตัวอย่างของจุลชีพที่ผลิตเอนไซม์นี้ แสดงในตารางที่ 1.5

เนื่องจากเพนนิซิลิน เอซิเลส เป็นเอนไซม์สำคัญที่สามารถช่วยเร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์ เพนนิซิลิน ให้แตกออกได้เป็น กรดคาร์บอกซิลิกอิสระ และ กรด 6-อะมิโน-เพนนิซิลานิก (6-APA)(รูปที่ 1.4) ซึ่ง 6-APA นี้จะถูกใช้เป็นสารต้นตอในกระบวนการสังเคราะห์ยาอนุพันธ์เพนนิซิลินตัวอื่นๆ ต่อไป ดังที่ได้กล่าวไปแล้ว เพื่อความเป็นไปได้ในทางเศรษฐกิจที่จะนำเอนไซม์นี้เข้าไปใช้ในระดับอุตสาหกรรม มีปัจจัยสำคัญหลายประการที่ต้องคำนึงถึง อาทิ เช่น สายพันธุ์จุลชีพที่ใช้ควรมีศักยภาพในการผลิตเพนนิซิลิน เอซิเลสได้สูง และไม่ควรผลิตเอนไซม์บีตาแลคตาเมส (เอนไซม์ที่สามารถใช้เพนนิซิลิน จี เป็นสับสเตรทเช่นเดียวกัน) นอกจากนี้ สภาวะที่ใช้ผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส จะต้องไม่ยุ่งยาก มีราคาต้นทุนต่ำ เช่น จุลชีพที่มีการเจริญได้รวดเร็ว องค์ประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ ควรเป็นสารหาง่าย และราคาถูก เหล่านี้เป็นต้น

Mayer และคณะ (1979) ได้สร้างสายพันธุ์ *Escherichia coli* ที่สามารถผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส โดยวิธีทางพันธุวิศวกรรมได้สำเร็จ โดยหลังจากการ subclone แล้ว สามารถแยกได้สายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส สูงขึ้น โดยไม่ต้องเหนี่ยวนำด้วยกรดฟินิลอะซิติก เมื่อนำสายพันธุ์นี้ไปทำการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยแสง UV แล้วจะได้สายพันธุ์ของ *E. coli* ที่มีคุณสมบัติปลอดจาก catabolite repression ด้วย ; Son และคณะ (1982) ได้ทำการกลายพันธุ์ *Bacillus megaterium* ATCC 14945 ซึ่งสามารถผลิตเพนนิซิลิน เอซิเลส และ

ตารางที่ 1.1 ตัวอย่างจุลชีพที่ผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส (Vandamme, 1980)

Micro-organism	Reference
BACTERIA	
Rhodoseudomonas spheroides K.Y.4112	Nara et al. (1971a)
Pseudomonas aeruginosa K.Y.3591,K.Y.8501, *Psedomonas 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 (1975 a,b,c), Sato et al. (1976)
Escherichia coli N 1/3-67	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)
Escherichia coli N.C.I.B.8743 (B.R.L.1040) 8743A	Cole (1969a),Plaskie et al. (1978)

ตารางที่ 1.1 ตัวอย่างจุลชีพที่ผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส (Vandamme, 1980) (ต่อ)

Micro-organism	Reference
Escherichia coli A.T.C.C.11105 (N.C.I.B. 8878)	Bauer et al. (1971), Kutzbach and Rauenbusch (1974)
Escherichia coli XG3A 9455	Claridge et al. (1963)
Escherichia coli 0111.B_4	Dulong de Rosney et al. (1970)
Escherichia coli N.C.I.B.8741,8878, 8879,8949	Cole (1967)
Escherichia coli N.C.I.B.8741,8742, 8744	Cole and Sutherland (1966)
Kluyvera 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.13424, 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)
Micrococcus lysodeikticus	Claridge et al. (1960), Huang et al. (1960)
Micrococcus roseus A.T.C.C.515	Pruess and Johnson (1965)

ตารางที่ 1.1 ตัวอย่างจุลชีพที่ผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส (Vandamme, 1980) (ต่อ)

Micro-organism	Reference
Micrococcus luteus K.Y.3781	Nara et al. (1971a), Shimizu et al. (1975a,b)
Sarcina sp.	Huang et al. (1963)
Bacillus subtilis var. *niger*	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.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 1.2 สมบัติของเอนไซม์เพนนิซิลิน จี เอซิเลส (Vandamme, 1980)

	Optimum pH value		Optimum	K_m Value	Molecular	References
	Hydrolysis	Synthesis	Temperature (C)	(mM)	weight	
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)
Escherichia coli C15 (N.C.I.B.9465)	5.5	-	-	4.00	-	Holt and Stewart(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.(1975a,b)

ตารางที่ 1.2 สมบัติของเอนไซม์เพนนิซิลิน จี เอซิเลส (Vandamme, 1980) (ต่อ)

	Optimum pH value		Optimum	K_m Value	Molecular	References
	Hydrolysis	Synthesis	Temperature (C)	(mM)	weight	
Proreus rettgeri						
F.D.13424	8	-	-	-	-	Huang et al.(1963)
Micrococcus roseus						
A.T.C.C.516	9	-	35	-	-	Pruess and 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	120,000	Chiang and Bennett(1967), Acevedo and Cooney(1973)
(immobilized enzyme)		-	-	6.0	-	Ryu et al. (1972a,b)
Nocardia sp. F.D.46973	8	-	28	-	-	Huang et al.(1960)
Streptomyces ambofaciens						
S.P.S.L.-15	7.4	-	28	-	-	Nara et al.(1971a)
FUNGI						
Neurospora crassa	7.0	-	37	-	-	Rossi et al.(1973)

ตารางที่ 1.3 ตัวอย่างของจุลชีพที่ผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน วี เอซิเลส (Vandamme,1980)

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	Batchlor 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)
Actinophanes 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 51-20F8	Spencer and Muang (1970)
Penicillium B.R.L. 807,733,736,737	Cole (1966)
Penicillium chrysogenum 50935,1951 47-638, 49-2166	Gatenbeck and Brunsberg(1968) Pruess and Johnson (1967)

ตารางที่ 1.3 ตัวอย่างของจุลชีพที่ผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน วี เอซิเลส (Vandamme, 1980) (ต่

Micro-organism	Reference
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 gyseum, *Trichophyton mentagrophytes* B.R.L.569,579	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, *Gymnoascus* 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)
Fusarium semitectum	Waldschemidt-Leitz and Bretzel (1964)
Fusarium semitectum B.C.805	Baumann et al. (1971)

ตารางที่ 1.3 ตัวอย่างของจุลชีพที่ผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน วี เอซิเลส (Vandamme, 1980) (ต่อ

Micro-organism	Reference
Giberella fujikuroi	Vasilescun 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 *Torula 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)

ตารางที่ 1.4 สมบัติของเอนไซม์เพนิซิลิน วี เอซิเลส (Vandamme, 1980)

	Optimum pH value		Optimum	K_m Value	Molecular	References
	Hydrolysis	Synthesis	Temperature (C)	(mM)	weight	
MOULDS						
Penicillium chrysogenum						
Wis.49408,P5009	8.5	6.8	30	-	-	Erickson and Bennett(1965)
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)I.M.I.69015	8	-		-	-	
Trichophyton mentagro-						
phytes, Epidermophyton						
interdigitale	8	-	-	-	-	Uri et al.(1963)
Fusarium avenaceum	7.5	-	37	-	-	Vanderhaeghe et al.(1968)
Fusarium conglutinans						
A.Y.F.254	8	-	28	-	-	Singh et al.(1969)
Fusarium moniliforme						
A.Y.F.255	8	-	28	5.75	-	Vandamme et al.(1971a)
Fusarium semitectum						
(intact cells)	7.5	-	-	2.50-2.75		Brandl(1965,1972)
(enzyme)	8	-	50		65,000	Waldschmidt-Leitz and Bretzel(1964)
Fusarium semitectum						
B.C.805(enzyme)	7.5	-	37	4.50	67,000	Baumann et al.(1971)
Pleurotus ostreatus	8	-	50	-	-	Brandl(1965)

ตารางที่ 1.4 สมบัติของเอนไซม์เพนิซิลิน วี เอซิเลส (Vandamme, 1980) (ต่อ)

	Optimum pH value		Optimum	K_m Value	Molecular	References
	Hydrolysis	Synthesis	Temperature (C)	(mM)	weight	
Bovista plumbea(enzyme)	7.5	-	52	1.67	80,000	Schneider and Rohr(1976)
YEASTS						
Rhodotorula glutinis	6.5	-	28	5.1	-	Vandamme and Voets(1973)
BACTERIA						
Achromobacter B.R.L.1755	-	-	-	-	-	Cole(1964)
Erwinia aroideae (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.L.	9	-	28	10.3	-	Batchelor et al.(1961b)
Streptomyces erytheus J.A.4143, *Streptimyces netropsis* 2814	7.5	-	28	-	-	Haupt and Thrum(1967)
Streptomyces ambofaciens S.P.S.L.-15	7.4	-	35	-	-	Nara et al.(1971a)
Nocardia globerula K.Y.3901	7.4	-	35	-	-	

ตารางที่ 1.5 ตัวอย่างจุลชีพที่ผลิตเอนไซม์แอมพิซิลิน เอซิเลส (Vandamme, 1980)

Micro-organism	Reference
Pseudomonas melanogenum K.Y.3987, K.Y.4030,K.Y.4031	Nara et al. (1972),Okachi et al. (1973b)
Pseudomonas ovlis K.Y.3962	Okachi et al. (1973b),Okachi and Nara (1973),Shimizu et al. (1975a,b)

ปล่อยออกมานอกเซลล์ เมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วย กรดพีนิลอะซิติก โดยการใช้แสง UV และ EMS(Ethyl methane sulfonate) เป็นสารก่อการกลายพันธุ์ ผลปรากฏว่าแยกได้มิวแทนท์ที่สามารถผลิตเพนนิซิลิน เอซิเลสได้ โดยไม่ต้องการการเหนี่ยวนำ ซึ่งสายพันธุ์ใหม่นี้มีการเปลี่ยนแปลงทั้งด้านสรีระ และพันธุกรรม คือ เซลล์มีลักษณะที่ใหญ่ขึ้น และสามารถผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสได้สูงกว่าเดิมประมาณ 3-4 เท่า; Morita และ Iwata (1984) ได้ทำการทดลองกลายพันธุ์ *E. coli* IFO 13500 ด้วยสารก่อการกลายพันธุ์ NTG (N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine) ได้ *E. coli* สายพันธุ์ใหม่ที่สามารถผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสได้สูงกว่าเดิมประมาณ 6 เท่า; ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้เริ่มให้ความสนใจ ศึกษาศักยภาพของการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส เพื่อใช้เร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์เพนนิซิลินในกระบวนการผลิต 6-APA มาเป็นเวลาเกือบ 10 ปี เริ่มจาก จรัญญา เงินประเสริฐศิริ (2528) สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของจุลินทรีย์ได้ ด้วยวิธีทางพันธุวิศวกรรม โดยการตัดต่อยีนของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส จาก *E. coli* ATCC 11105 โคลนใส่ลงในเซลล์ *E. coli* HB101 ซึ่งใช้เป็นเซลล์เจ้าเรือน *E. coli* สายพันธุ์ใหม่ที่ได้สามารถสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ได้สูงขึ้นถึง 9.3 เท่า เมื่อนำสายพันธุ์ใหม่มากลายพันธุ์ซ้ำด้วย NTG จะได้มิวแทนท์ที่สังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส สูงขึ้นอีก 1.9 เท่า และ ปลอดจากการกดดันด้วยปฏิกิริยาคะตาโบไลท์ อีกด้วย;

จันทร์เพ็ญ เดชะอำไพ (2529) ทำการทดลองคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรีย 3 ชนิด ที่สามารถสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ได้ คือ *E. coli* ATCC 9637, *E. coli* ATCC 11105 และ *Serratia rubidaca* ATCC 181 โดยอาศัยคุณสมบัติในการต้านยาเพนนิซิลิน จี , รูปแบบการเจริญ และ ความสามารถในการสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของแบคทีเรียเป็นดัชนี พบว่า *E. coli* ATCC 9637 ให้แอคติวิตีของเอนไซม์ ต่อ มก.โปรตีนรวมของเซลล์ สูงที่สุด เมื่อเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำ ที่อุณหภูมิ 30° ซ.; สมศักดิ์ สรั่งบิน (2530) ทำการกลายพันธุ์ *Proteus rettgeri* ATCC 9250 โดยใช้ NTG เป็นสารก่อการกลายพันธุ์ ได้ *Proteus rettgeri* สายพันธุ์ใหม่ที่สามารถเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนเดี่ยวได้ และมีการสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส สูงขึ้นอีก 2 เท่า

1.6 <u>การผลิต 6-APA โดยเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส</u>

เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสได้ถูกนำมาใช้ในกระบวนการผลิต 6-APA ตั้งแต่ ปี ค.ศ. 1960 (Vandamme, 1980) โดยการนำเอนไซม์ในรูปของเซลล์อิสระ หรือเอนไซม์อิสระมาใช้โดยตรง ซึ่งพบว่ามีข้อเสียหลายประการ (จันทร์เพ็ญ เดชะอำไพ, 2529) เช่น 1. ไม่สามารถนำเอนไซม์ หรือ เซลล์มาใช้ได้อีก

2. เอนไซม์อิสระมีความเสถียรต่ำ ต้องทำในสภาวะที่เหมาะสมจริงๆ

3. การแยกผลิตภัณฑ์ 6-APA ออกจากเซลล์หรือเอนไซม์ที่ใช้ทำได้ยาก

อย่างไรก็ตาม เมื่อเทคนิคของการตรึงเอนไซม์และเซลล์(immobilized enzymes or cells) เพื่อใช้ในอุตสาหกรรม ได้รับการพัฒนาและถูกนำมาใช้ในกระบวนการผลิต 6-APA ผลทำให้ได้เอนไซม์ที่มีความเสถียรสูง และสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้หลาย ๆ ครั้ง จึงเป็นการเพิ่มศักยภาพของการใช้เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสตรึงขึ้นจนถึงขั้นใช้ในอุตสาหกรรมได้

จันทร์เพ็ญ เดชะอำไพ, 2529; นิวัฒน์ คุปต์วิวัฒน์, 2531 และ ประเสริฐ ผลประสิทธิโต, 2533 ได้ศึกษาวิธีการตรึงเซลล์ *E. coli* และ *Proteus rettgeri* (ที่ได้จากการกลายพันธุ์ โดย สมศักดิ์ สรั่งบิน, 2530) โดยการกักขังเซลล์แบคทีเรียที่มีแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลสในอะกาโรสเจล, แคบปาคาร์ราจีแนน หรือส่วนผสมของแคบปาคาร์ราจีแนนกับอะกาโรสเจลแล้ว เสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์กับ

เอกซาเมทธิลีนไดเอมีน ผลที่ได้จะทำให้ได้เซลล์ตริงที่มีความเสถียรสูงสามารถเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 10-25° ซ. ได้นาน 1 ปี โดยไม่สูญเสียแอคติวิตีไปเลย และในสภาวะของการผลิต 6-APA โดยใช้เครื่องปฏิกรณ์แบบฟลูอิไดซ์เบด (fluidized bed reactor) พบว่า สามารถผลิต 6-APA ได้อย่างต่อเนื่องนาน 3 เดือน โดยสูญเสียแอคติวิตีไปประมาณ 10-20 % เท่านั้น ขณะนี้ กระบวนการดังกล่าวจึงได้รับการพัฒนาเข้าสู่อุตสาหกรรมต่อไป

กระบวนการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสเพื่อนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมนั้นจำเป็น ต้องผลิตให้ได้ปริมาณมาก โดยให้มีต้นทุนในการผลิตต่ำในสภาวะคุ้มทุน ในงานวิจัยนี้ จึงได้พยายามศึกษาค้นคว้า แหล่งสารอาหารที่มีราคาถูก และสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสในระดับขยายส่วน โดยใช้ เชื้อ *Proteus rettgeri* SPS-6 (สมศักดิ์ สรั่งบิน, 2530) เป็นแม่แบบ ซึ่งเชื้อนี้มีคุณสมบัติเด่นที่ สามารถเจริญ และผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสได้สูงในอาหารสูตรปรับต่ำที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนเดี่ยว โดยไม่ต้องมีการเหนี่ยวนำการสังเคราะห์เอนไซม์ด้วยกรดฟีนิลอะซิติก

วัตถุประสงค์ของการทำวิจัยในครั้งนี้

1. ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ และการสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ *Proteus rettgeri* ที่ได้จากการกลายพันธุ์ ในระดับขวดเขย่า
2. ศึกษาชนิด และลักษณะวิธีการใช้วัสดุราคาถูก หรือ วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน และไนโตรเจน
3. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ และการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ *Proteus rettgeri* ในถังหมักขนาด 5 ลิตร