การเพิ่มประสิทธิภาพของการสังเคราะห์ เพนนิซิลิน เอซิเลส ใน โปรเตียส เรทเกอไร

นายสมศักดิ์ สรั่งยิน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาชีวเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2530

ISBN 974-568-078-8

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

012459

i 10299671

ENHANCEMENT OF PENICILLIN ACYLASE BIOSYNTHESIS IN *Proteus rettgeri*

Mr. Somsak Sarangbin

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Biochemistry Programme

Graduate School

Chulalongkorn University

1986

ISBN 974-568-078-8

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเพิ่มประสิทธิภาพของการสังเคราะห์ เพนนิซิลิน เอซิเลส ใน โปรเตียส เรทเกอไร
โดย	นายสมศักดิ์ สรั่งบิน
ภาควิชา	ชีวเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. สัณห์ พณิชยกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ทิพยทัศน์

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดี บัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร. ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. จริยา บุญญวัฒน์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สัณห์ พณิชยกุล)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ทิพยทัศน์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร สิทธิประณีต)

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเพิ่มประสิทธิภาพของการสังเคราะห์เพนนิซิลิน เอซิเลส ใน <u>โปรเตียส เรทเกอไร</u>
ชื่อนิสิต	นายสมศักดิ์ สรั้งปิน
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. สัณห์ พณิชยกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ทิพยทัศน์
ภาควิชา	ชีวเคมี
ปีการศึกษา	2529

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

เพนนิซิลิน เอซิเลส (E.C. 3.5.1.11) เป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์ เพนนิซิลิน จี ให้กรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก ซึ่งนิยมใช้เป็นสารต้นตอในการกระบวนการสังเคราะห์อนุสันธ์ เพนนิซิลิน จุดประสงค์ของการวิจัยนี้เพื่อศึกษาธรรมชาติของแหล่งต้นตอคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิต เอนไซม์เพนนิซิลน เอซิเลส ใน *P. rettgeri* ATCC 9250 ตลอดจนเปรียบเทียบคุณสมบัติ เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ *P. rettgeri* ATCC 9250 WT และมิวแทนท์ SPS-6 ซึ่งสามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นสารต้นตอคาร์บอนเดียวได้

เมื่อเจริญ *P. rettgeri* ATCC 9250 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วย แอสปาร์เตท 0.8 เปอร์เซนต์ ให้ค่าการเจริญ (OD_{540}) สูงสุด 4.5 หน่วย แอคติวิตี สูงสุดของเอนไซม์ เพนนิซิลิน เอซิเลส ประมาณ 173 หน่วย ต่อ มิลลิกรัมโปรตีนรวมของเซลล์ สารต้นตอคาร์บอนคู่ที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์คือ ซิเตรต 0.2% ร่วมกับ กลูโคส 1.0% ให้ค่าการเจริญ และผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส สูงสุด 3.6 หน่วย และ 98 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนรวมของเซลล์ ตามลำดับ *P. rettgeri* สายพันธุ์นี้ไม่สามารถใช้กลูโคสเป็นสารต้นตอคาร์บอนเดียว ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจที่จะแยกมิวแทนท์ ซึ่งสามารถใช้กลูโคสเป็นแหล่งต้นตอของคาร์บอนได้

การกลายพันธุ์ *P. rettgeri* ATCC 9250 ด้วย NTG สามารถแยกมิวแทนท์ซึ่งใช้กลูโคสเป็นสารต้นตอของคาร์บอนเดียวได้ 9 ตัว มิวแทนท์ SPS-6 สามารถเจริญและ

ผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ได้สูงในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยกลูโคส 0.4% ค่าแอคติวิตีสูงสุดของเอนไซม์ ประมาณ 397 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนรวมของเซลล์ และค่าการเจริญสูงสุด 4.6 หน่วย

เมื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของสายพันธุ์ *P. rettg* ATCC 9250 WT กับ มิวแทนท์ SPS-6 พบว่า พี เอช ที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยา การไฮโดรไลซ์ เพนนิซิลิน จี ของเอนไซม์ เพนนิซิลิน เอซิเลส เซลล์ *P. rettgeri* ATCC 9250 WT และ มิวแทนท์ SPS-6 มีค่าอยู่ในช่วงใกล้เคียงกันประมาณ 7.0-8.5 อย่างไรก็ตาม ค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์จากสายพันธุ์ทั้ง 2 จะแตกต่างกัน อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์มีค่าคือ 45°ซ สำหรับเซลล์ *P. rettgeri* ATCC 9250 WT และ 55°ซ สำหรับเซลล์มิวแทนท์ SPS-6 เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ เซลล์ *P. rettgeri* ATCC 9250 WT และ มิวแทนท์ SPS-6 มีความทนทานต่อสภาวะที่เป็นกรดและด่างมากได้ต่ำ สามารถเก็บเอนไซม์ไว้ที่ 37°ซ นาน 5 ชั่วโมง โดยไม่มีการสูญเสียแอคติวิตี ค่า Km ต่อเพนนิซิลิน จี ของ เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ในเซลล์ *P. rettgeri* ATCC 9250 WTและมิวแทนท์ SPS-6 มีค่า 9.0 และ 5.6 มิลลิโมลาร์ กรดฟีนิลอะซีติก สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แบบแข่งขัน (competitive inhibition) ให้ค่า Ki สำหรับเซลล์ *P. retteri* ATCC 9250 WT และมิวแทนท์ SPS-6 เท่ากับ 5.0 และ 7.0 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ การยังยั้งการทำงานของเอนไซม์ด้วยกรด 6อะมิโนเพนนิซิลานิก เป็นแบบไม่แข่งขัน (non-competitive inhibition) มีค่า Ki 7.6 มิลลิโมลาร์ สำหรับเซลล์ *P. rettgeri* ATCC 9250 WT และ 8.8 มิลลิโมลาร์ สำหรับเซลล์ มิวแทนท์ SPS-6

สายพันธุ์ *P. rettgeri* ATCC 9250 WT และ มิวแทนท์ SPS-6 สามารถเก็บรักษาไว้ในสารละลายนอร์มอลซาลีน ที่อุณหภูมิ 4°ซ ได้นาน 45 วัน พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส จะยังคงเหลืออยู่ถึง 80 เปอร์เซนต์ ของ แอคติวิตีเริ่มต้น ยิ่งไปกว่านั้นที่สภาวะเดียวกันนี้ มิวแทนท์ SPS-6 สามารถคำรงคุณสมบัติของการเจริญและผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ได้สูง นานมากกว่า 7 เดือน

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis Title	Enchancement of Penicillin Acylase Biosynthesis in *Proteus rettgeri*
Name	Mr. Somsak Sarangbin
Programme	Biochemistry
Thesis Advisor	Associate Professor Sanha Panichajakul, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Associate Professor Pairor Thipayathasana, Ph.D.
Academic Year	1986

Abstract

Penicillin acylase (E.C. 3.5.1.11) catalyzes the hydrolysis of Penicillin G yielding a widely used 6-aminopenicillanic acid (6-APA) as the starting material for further synthesis of penicillin derivatives. The aim of this project was to study the nature of carbon source suitable for the maximum activity of penicillin acylase (PAase) biosynthesis in *Proteus rettgeri* ATCC 9250, plus a comparative studies of the properties of PAase between WT and a mutant strain that showed a different ability in using glucose as the sole carbon source.

It was found that aspartate functioned as the best sole carbon source providing the maximal PAase activity as high as 173 unit per mg total cell protein at the highest growth of 4.5 unit at OD_{540}. Viewed as the best combination of dual carbon sources, it was found that 0.2% citrate plus 1% glucose rendered the maximum activity of PAase was 98 unit per mg total cell protein at its highest growth of 3.6 unit OD_{540}. Noted that, this strain of *Proteus rettgeri* could not use glucose as the sole carbon source. Therefore, it was interesting to isolate strains where glucose utilizable ability was regained.

Mutation of *P. rettgeri* ATCC 9250 with NTG resulted in 9 mutants with the ability to utilize glucose as a sole carbon source. One of them, nameed SPS-6, was able to synthesize penicillin acylase with the maximal activity of 397 units per mg of total cell protein in minimal medium with 0.4 to glucose at its highest cell turbidity of 4.6 units. Comparative studies on the properties of penicillin acylase produced by the WT strain and SPS-6 mutant were carried out. The optimal pH for the hydrolysis of Pen G for the enzyme from both sources was in the same range of pH 7.0-8.5. However, a difference in the optimal reaction temperature was observed. The optimal temperatures for penicillin acylase from the WT and SPS-6 were 45^{o}C and 55^{o}C, respectively. Both enzymes were less stable to extreme acidic and basic conditions. Cells storaged at 37^{o}C for 5 hours did not affect the loss of the enzyme activity.

The Km values of the enzyme from the WT and SPS-6 for the hydrolysis of Pen G were 9.0 and 5.6 mM, respectively. When phenylacetic acid was used as a competitive inhibiter, the Ki values of the enzyme from the WT and SPS-6 were 5.0 and 7.0 mM, respectively. With 6-APA as a non-competitive inhibitor, the Ki values for the enzyme from the WT and SPS-6 were 7.6 and 8.8 mM, respectively. Both strains could be maintained in normal saline solution at 4^{o}C for longer than 45 days with 80% of the intial activity still remained. Furthermore, under this storage conditions, SPS-6 could maintain high ability of cell growth and penicillin acylase production for at least 7 months.

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนใคร่ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สัณห์ พณิชยกุล และรองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ทิพยทัศน์ ที่ได้ให้ความกรุณาเป็นที่ปรึกษา ให้ความช่วยเหลือ กำลังใจ และความเข้าใจ อันมีค่ายิ่งต่อผู้เขียน ตลอดระยะเวลาในการทำวิทยานิพนธ์นี้

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร สิทธิประณีต ที่ได้กรุณารับเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาชีวเคมี ที่ได้ให้ความกรุณาและคำชี้แนะต่าง ๆ ตลอดระยะเวลาการทำวิจัย

ขอบคุณ คุณยุวดี วัฒนโภคาสิน เป็นอย่างยิ่งที่ให้ความช่วยเหลือ ความเข้าใจและกำลังใจต่อผู้เขียน ขอบคุณมิวัฒน์ คุปต์วิวัฒน์ สำหรับความช่วยเหลือด้านการถ่ายภาพ ตลอดจนขอขอบคุณสมาชิกทุกคนในกลุ่มวิจัย เพนนิซิลิน เอซิเลส นิสิตปริญญาโทชีวเคมี และเทคโนโลยีชีวภาพ สำหรับความช่วยเหลือต่าง ๆ และกำลังใจต่อผู้เขียน

ขอขอบคุณหน่วยปฏิบัติการพันธุวิศวกรรม ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือด้านอุปกรณ์เครื่องใช้ และสารเคมี ตลอดระยะเวลาการทำวิจัย

ขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาชีวเคมีทุกคน ในความช่วยเหลือเรื่องทั่ว ๆ ไประหว่างการทำวิจัย

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย สำหรับความอนุเคราะห์ด้านทุนวิจัย

ท้ายสุดนี้ ผู้เขียนใคร่ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ-คุณแม่ และ พี่-น้อง ของผู้เขียนที่ให้ความช่วยเหลือ กำลังใจ ความเข้าใจ ตลอดจนความรัก ความอบอุ่น อันมีค่ายิ่งต่อผู้เขียนตลอดระยะเวลาในการศึกษา

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ช

สารบัญ ..... ฌ

สารบัญตาราง ..... ฏ

สารบัญรูป ..... ฐ

บทที่

1. บทนำ 1

2. วัสดุภัณฑ์ เคมีภัณฑ์ และ เครื่องมือ 25

2.1 เครื่องมือและเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง 25

2.2 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง 27

2.3 อาหารเลี้ยงแบคทีเรีย 28

2.4 การเก็บรักษาแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง 29

2.5 การศึกษาการเจริญของแบคทีเรีย 29

2.6 การเตรียมสับสเตรท กรดพีนิลอะซีทิล-4-อะมิโนเพนโซอิก 30

2.7 การเตรียมสารละลาย 30

2.8 การเตรียมเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส 32

2.9 การทดสอบแอคติวิตีเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส 33

2.10 การวัดแอคติวิตีเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส 33

2.11 การตรวจสอบและวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เบต้า-แอคแตมเมส 34

2.12 การวัดปริมาณโปรตีน 36

2.13 การวัดปริมาณกลูโคส 36

2.14 การแยกมิวแตนท์ที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน 36

3. ผลการทดลอง

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
	3.1 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ *P. rettgeri* ATCC 9250.....	38
	3.2 ผลการกลายพันธุ์ *P. rettgeri* ATCC 9250 เพื่อเติมประสิทธิภาพการสังเคราะห์เพนนิซิลิน เอซิเลส	50
	3.3 การผลิตเอนไซม์เบต้า แลคแตมเมส ใน *P. rettgeri* ATCC 9250 และมิวแตนท์ SPS-6, SPS-7 และ SPS-8.....	58
	3.4 การศึกษาเปรียบเทียบการเจริญและการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของมิวแตนท์ SPS-6 กับ *P. rettgeri* ATCC 9250	61
	3.5 ผลกระทบของความเข้มข้นของกลูโคสที่มีต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ในมิวแตนท์ SPS-6	61
	3.6 การศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติ เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสของมิวแตนท์ SPS-6 กับ *P. rettgeri* ATCC 9250	64
	3.7 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเซลล์มิวแตนท์ SPS-6 และ *P. rettgeri* ATCC 9250	71
	3.8 ความสามารถในการดำรงคุณสมบัติของมิวแตนท์ SPS-6	76
4.	บทสรุปและวิจารณ์	80
เอกสารอ้างอิง		91
ภาคผนวก		
	1. กราฟมาตรฐานสำหรับการหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี ลอรี	104
	2. กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณกรด พารา-อะมิโนเบนโซอิก โดยวิธีของ Szewczuk	105
	3. กราฟมาตรฐานสำหรับการหาปริมาณกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก โดยวิธีของ Balasingham	106

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ หน้า

4. กราฟมาตรฐานสำหรับการหาปริมาณกลูโคสโดยวิธีของ Bergmeyer..... 107

5. แอคติวิตีของเอนไซม์เบต้า-แลมแตมเมสของ *K. pneumoniae* M5a1 เมื่อปลูกในอาหารสูตรอุดมที่ 37 องศาเซลเซียส 108

6. เปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ในมิวแตนท์ SPS-6 เมื่อวัดโดยใช้สับสเตรทเป็น PAAB (วิธีของ Szewczuk) กับ เพนนิซิลิน จี (วิธีของ Balasingham) โดยปลูกมิวแตนท์ SPS-6 ในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยกลูโคส 0.4 เปอร์เซนต์ อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส 109

7. รูปอบบการเจริญ (●——●) และการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอเซเลส (●- - - -●) ของ *P. rettgeri* ATCC 9250 WT เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยกลูโคส 0.2% ที่อุณหภูมิ 28°ซ 110

ประวัติผู้เขียน 111

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ตัวอย่างจุลชีพที่ผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน จี เอซิเลส	7
2	ตัวอย่างจุลชีพที่ผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน วี เอซิเลส	10
3	สมบัติของเอนไซม์เพนนิซิลิน จี เอซิเลส	17
4	สมบัติของเอนไซม์เพนนิซิลิน วี เอซิเลส	20
5	ค่าการเจริญและแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ *P. rettgeri* ATCC 9250 เมื่อเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยสารต้นตอคาร์บอนเดียวชนิดต่าง ๆ	40
6	ค่าการเจริญและแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของมิวแตนท์ No. 89 และ No. 139 เมื่อเจริญในอาหารชนิดต่าง ๆ	56
7	ค่าการเจริญและแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของมิวแตนท์ SPS (1-9) เมื่อเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยกลูโคส 0.2 เปอร์เซนต์	57
8	การผลิตเอนไซม์เบต้า-แลคแตมเมส ของ *P. rettgeri* ATCC 9250 มิวแตนท์ SPS-6 และ *K. pneumoniae* M5a1 เมื่อปลูกในอาหารเหลวสูตรต่าง ๆ	60

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	สูตรโครงสร้างของเพนนิซิลิน และตัวอย่างหมู่ข้างเคียงชนิดต่าง ๆ	3
2	ขั้นตอนการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก ด้วยวิธีทางเคมี	4
3	ปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์เพนนิซิลินเป็นกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก ด้วยเอนไซม์ เพนนิซิลิน เอซิเลส	5
4	ปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์เพนนิซิลิน เป็นกรด เพนนิซิโลอิก ด้วย เอนไซม์เบต้า-แลคแตมเมส	14
5	ปฏิกิริยารีเอซิเลชั่น ของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส	15
6	การเจริญและการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ *P. rettgeri* ATCC 9250 เมื่อปลูกในอาหารสูตรอุดมที่ไม่ได้เสริมและเสริมด้วยกลูโคส 0.2 เปอร์เซนต์	39
7	การเจริญและการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ *P. rettgeri* ATCC 9250 เมื่อปลูกในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยแอสปาร์เตท ความเข้มข้นแตกต่างกันตั้งแต่ 0.2 - 1.2 เปอร์เซนต์	42
8	การเจริญการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส และ พี เอช ของอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการเจริญของ *P. rettgeri* ATCC 9250 เมื่อเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วย แอสปาร์เตท 0.8 เปอร์เซนต์	43
9	การเจริญและการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส เมื่อตรึง พี เอช ให้อยู่ในช่วง 7.0-7.5 ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้อยู่ในช่วง 7.0-7.5 ของ *P. rettgeri* ATCC 9250 เมื่อปลูกในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยแอสปาร์เตท 0.8 เปอร์เซนต์	45
10	การเจริญและการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ *P. rettgeri* ATCC 9250 เมื่อปลูกในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยสารต้นตอคาร์บอนคู่ ก. ซิเตรท 0.2 เปอร์เซนต์ และกลูโคส 1.0 เปอร์เซนต์ ข. กลีเซอรอล 0.2 เปอร์เซนต์ และกลูโคส 1.0 เปอร์เซนต์ ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส	46

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
11	การเจริญและการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ *P. rettgeri* ATCC 9250 เมื่อเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยซิเตรท 0.2 เปอร์เซนต์ และแปรความเข้มข้นของกลูโคสตั้งแต่ 0.2-1.0 เปอร์เซนต์	48
12	การเจริญและการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ *P. rettgeri* ATCC 9250 เมื่อเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยกลูโคส 1.0 เปอร์เซนต์ และแปรความเข้มข้นของซิเตรทเป็น 0.4 และ 0.8 เปอรเซนต์ ตามลำดับ	49
13	การเจริญและการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ *P. rettgeri* ATCC 9250 เมื่อปลูกในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยเคซีน ไฮโดรไลเซต ความเข้มข้นต่าง ๆ กันตั้งแต่ 0.5-3.0 เปอร์เซนต์	51
14	ค่าการเจริญสูงสุด และแอคติวิตีสูงสุดของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเอส ของ *P. rettgeri* ATCC 9250 เมื่อปลูกในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยเคซีน 0.2 เปอร์เซนต์ และแปรความเข้มข้นของแลคแตท จาก 0-0.8 เปอร์เซนต์..	52
15	Survival curve ของ *P. rettgeri* ATCC 9250 เมื่อฉูกกลายพันธุ์ด้วยรังสีอุลตราไวโอเลต	53
16	การทดสอบการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของมิวแตนท์ No. 89 และ No. 139 โดยสังเกตการยับยั้งการเจริญของ *S. marcescens* ATCC 27117	55
17	การทดสอบแอคติวิตีของเอนไซม์เบต้า แอคแตมเมส ของ *P. rettgeri* ATCC 9250 มิวแตนท์ SPS (6-8) และ *K. pneumoniae* M5a1 ในจานเพาะเชื้อ	59
18	การเจริญและการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของมิวแตนท์ SPS-6 และ *P. rettgeri* ATCC 9250 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรอุดม	62
19	การเจริญและการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของมิวแตน์ SPS-6 เมื่อปลูกในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยกลูโคสความเข้มข้นแตกต่างกันตั้งแต่ 0.2-2.0 เปอร์เซนต์	63

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
20	ผลของ พี เอช ต่อปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์เพนนิซิลิน จี ของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสของเซลล์มิวแตนท์ SPS-6 และ *P. rettgeri* ATCC 9250	65
21	ผลกระทบของอุณหภูมิที่มีต่อปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์เพนนิซิลิน จี ด้วยเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของเซลล์มิวแตนท์ SPS-6 และ *P. rettgeri* ATCC 9250	66
22	ผลกระทบของ พี เอช ต่อความเสถียรของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส เมื่อใช้เซลล์มิวแตนท์ SPS-6 และ *P. rettgeri* ATCC 9250 9250	68
23	ผลกระทบของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของมิวแตนท์ SPS-6 และ *P. rettgeri* ATCC 9250 ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พี เอช 7.5	69
24	Linewever Burk plot ของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของเซลล์มิวแตนท์ SPS-6 และ *P. rettgeri* ATCC 9250	70
25	Dixon plot ของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของเซลล์มิวแตนท์ SPS-6 เมื่อแปรความเข้มข้นของกรดฟีนิลอะซีติก ตั้งแต่ 0-40 มิลลิโมลาร์	72
26	Dixon plot ของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของเซลล์ *P. rettgeri* ATCC 9250 เมื่อแปรความเข้มข้นของกรดฟีนิลอะซีติก ตั้งแต่ 0-40 มิลลิโมลาร์	73
27	Dixon plot ของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของเซลล์มิวแตนท์ SPS-6 เมื่อแปรความเข้มข้นของกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก ตั้งแต่ 0-10 มิลลิโมลาร์..	74
28	Dixon plot ของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของเซลล์ *P. rettgeri* ATCC 9250 เมื่อแปรความเข้มข้นของกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก ตั้งแต่ 0-10 มิลลิโมลาร์	75

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

29 เปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของเซลลมิวแตนท์ SPS-6 และ *P. rettgeri* ATCC 9250 เมื่อเก็บเซลล์ไว้ในสารละลายนอร์มอลซาลีนที่อุณหภูมิ 4^{o}ซ และ 25^{o}ซ ระยะเวลา 45 วัน 77

30. ดัชนีการเจริญสูงสุด และแอคติวิตีสูงสุดของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของมิวแตนท์ SPS-6 หลังจากผ่านการเก็บเซลล์ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสในสารละลายกลีเซอรอล 50% นาน 5 เดือน 78

31 แสดงแอคติวิตีสูงสุดของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของเซลล์มิวแตนท์ SPS-6 หลังจากทำการถ่ายเชื้อเดือนละครั้งนาน 7 ครั้ง 78

32 ความสามารถในการเจริญของมิวแตนท์ SPS-6 ในอาหารชนิดแข็งสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยกลูโคส 0.4 เปอร์เซนต์ เทียบกับ *P. rettgeri* ATCC 9250 79

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ

6-APA	= 6-Aminopenicillanic acid
ATCC	= American Type Culture Collection
BSA	= Bovine serum albumin
^{o}C	= Degree celcious
DNA	= Deoxyribonucleic acid
g	= gram
hr	= hour
M	= molar
mM	= millimolar (10^{-3} molar)
NTG	= N-methyl-N'-nitro-N-nitrosguanidine
O.D.	= optical density
PA	= penicillin acylase
PAA	= phenylacetic acid
PAAB	= Phenyl acetyl-4-aminobenzoic acid
PABA	= p-Amerinobenzoic acid
PDAB	= p-Dimethyl amino benzaldehyde
Pen G	= Penicillin G
UV	= Ultraviolet
WT	= Wild-type