บทที่ 4

บทวิจารณ์และสรุป

4.1 การคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ผลิตเพนนิซิลิน เอซิเลสสูง

จากการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากเอกสารทางวิทยาศาสตร์ ตารางที่ 1 และ 3 จะเห็นได้ว่าเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ถูกสังเคราะห์ได้โดยจุลชีพมากมายหลายชนิด (Bachelor และคณะ, 1961 b; Huang และคณะ, 1963; Hauptและ Thrum, 1967; Vandamme และ Voets, 1973) ปัจจุบันสามารถซื้อหรือขอสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์นี้จากแหล่งที่เหมาะสมได้ ในการวิจัยนี้ได้รับแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์คือ E.coli ATCC 9637, ATCC 11105 และ S.rubidaea ATCC 181 ซึ่งได้รับการรับรองจากสถาบัน American Type Culture Collection ว่าเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสในระดับสูง จึงได้เริ่มทำการวิจัยโดยเริ่มจากการคัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะที่สุดที่จะใช้เป็นแม่แบบในการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาขบวนการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกในอุตสาหกรรมต่อไป

Holt และ Stewart (1964, a;b) ได้รายงานว่ามีความสัมพันธุ์ระหว่างแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส กับความสามารถในการต้านยาเพนนิซิลิน ผลการศึกษาเปรียบเทียบความสามารถต้านยาของ E.coli ATCC 9637, ATCC 11105 และ S.rubidaea ATCC 181 ตามตารางที่ 8 และรูปที่ 9, 10 และ 11 รวมทั้งผลสรุปในตารางที่ 9 แสดงให้เห็นว่า S rubidaea ATCC 181 เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิดที่ใช้ทำการทดลองยกเว้นอาหารสูตรอุดมที่เสริม 0.2 เปอร์เซนต์ กรดฟีนิลอะซีติกและ 0.5 เปอร์เซนต์กลูโคส แต่การสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลินที่พบจะมีระดับต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับแบคทีเรียอีก 2 สายพันธุ์คือ E.coli ATCC 9637 ซึ่งเจริญและผลิตเอนไซม์ได้ดีในอาหารสูตรปรับต่ำได้สูงที่สุด ส่วน E.coli ATCC 11105 ไม่เจริญในอาหารสูตรปรับต่ำ แต่สามารถเจริญได้ดีในอาหารสูตรอุดมเสริม 0.2 เปอร์เซนต์กรดฟีนิลอะซีติกและผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสได้ค่อนข้างสูง แต่ต่ำกว่าสายพันธุ์ E.coli ATCC 9637 ในขณะที่ความสามารถในการต้านเพนนิซิลิน จี ของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ไม่ต่างกันมากนักเมื่อเจริญในอาหารสูตรอุดม ทั้งที่เสริมด้วยกรดฟีนิลอะซีติกและเสริมด้วยกลูโคส

จึงทำให้พอสรุปได้ว่า ความสามารถในการต้านยาเพนนิซิลิน จี ไม่น่าจะเป็นตัวดัชนีที่มีความสัมพันธุ์โดยตรงกับการสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ไม่ว่าจะมีหรือไม่มีสารเหนี่ยวนำ ในที่นี้คือกรดฟีนิลอะซีติกก็ตาม ผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานของ Vandamme และ Voets (1974b)ที่ว่า ความสามารถในการต้านเพนนิซิลิน ของจุลินทรีย์นอกจากเป็นผลจากเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสแล้ว จะต้องคำนึงถึงโปรตีนชนิดอื่น ซึ่งสามารถจับกับเพนนิซิลิน ทำให้ขยายความสามารถในการต้านเพนนิซิลินได้มากขึ้น ด้วยเหตุผลที่ว่า E.coli ATCC 9637 สามารถผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสได้ระดับสูงสุดและมีการเจริญได้ดีใกล้เคียงกับ S.rabideae ATCC 181 ซึ่งเจริญในอาหารอุดม ดังนั้น การวิจัยนี้จึงเลือก E.coli ATCC 9637 เป็นสายพันธุ์ที่จะใช้เป็นแม่แบบในการศึกษาวิจัยขั้นต่อไป

4.2 สภาวะเหมาะสมในการเจริญและการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ E.coli ATCC 9637

ถึงแม้ว่า จะมีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสมากว่า 3 ทศวรรษ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสายพันธุ์ E.coli แต่ข้อมูลต่าง ๆ เกี่ยวกับคุณสมบัติทั่วไป รวมทั้งสภาวะของการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมแก่การผลิตเอนไซม์ของแบคทีเรียเท่าที่พบมีน้อยมาก เนื่องจากเป็นความลับทางอุตสาหกรรม (Rolinson และคณะ , 1960; Claridge และคณะ, 1963 ; Szentirmai, 1964; Sikyta และSlezak, 1964; Self และคณะ, 1969 และ Vandamme, 1983)

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตเอนไซม์ เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ E.coli ATCC 9637 ที่ 30 องศาเซลเซียสในอาหารสูตรปรับต่ำจะเห็นได้ว่า เซลเข้าสู่การเจริญคงที่ที่ชั่วโมง 28 ในขณะที่การผลิตเอนไซม์สูงสุดอยู่ที่ใกล้กึ่งกลางของระยะทวีคูณคือประมาณชั่วโมงที่ 18 โดยทั่วไปการสังเคราะห์เพนนิซิลิน เอซิเลสจะอยู่ภายใต้ภาวะการควบคุมด้วยสารจำพวกเมตาบอไลท์ภายในเซล (Daumy และคณะ, 1982) สำหรับ E.coli ATCC 9637 และ auxothrophic mutant คือ E.coli ATCC 11105 จะมีการสร้างเอนไซม์ลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Vojtisek และ Slezak, 1975 b) หรือเพิ่มอุณหภูมิของการเจริญให้สูงกว่า 30 องศาเซลเซียส (Kaufmann และ Bauer, 1964;

Levitov และคณะ, 1967; Lo และ Bewick, 1978) ระดับของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส เมื่อวัดในเซลเจริญที่ 37 องศาเซลเซียส หรือสูงกว่าจะมีค่าต่ำมาก

ผลจากการวิจัยเมื่อเลี้ยง E.coli ATCC 9637 ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดสูตรปรับต่ำ (Self และคณะ, 1969) แต่เพิ่มปริมาณเฟอริกคลอไรด์ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อลงไปด้วยที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส เซล E.coli ATCC 9637 สามารถผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ได้สูงกว่าที่ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 5 เท่า ในขณะที่ปริมาณโปรตีนสุทธิที่สังเคราะห์ในเซล E.coli ATCC 9637 ที่ 37 องศาเซลเซียสต่ำกว่าที่ 30 องศาเซลเซียส แต่เพียงเล็กน้อย Vandamme (1980) ได้ตั้งข้อสังเกตว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสของ E.coli ควรอยู่ในช่วงระหว่าง 24-30 องศาเซลเซียส เมื่อทำการศึกษาผลกระทบของแหล่งต้นตอคาร์บอนต่อการเจริญผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ E.coli ATCC 9637 จะเห็นได้ว่า E.coli ไม่สามารถใช้โซเดียมกลูตาเมต (0.5 เปอร์เซนต์) เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนได้ นอกจากมีการเสริมด้วยกรดฟีนิลอะซีติก ในทางกลับกัน กรดฟีนิลอะซีติกเดี่ยว ๆ (0.2 เปอร์เซนต์) สามารถใช้เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนของการเจริญและผลิตเอนไซม์ได้สูง และมีค่าใกล้เคียงกับเมื่อเพาะเลี้ยง E.coli ATCC 9637 ในอาหารสูตรปรับต่ำที่ 30 องศาเซลเซียส โดยมีกรดฟีนิลอะซีติก (0.2 เปอร์เซนต์) และโซเดียมกลูตาเมต (0.5 เปอร์เซนต์) แต่การเพิ่มความเข้มข้นของกลูตาเมตขึ้นเป็น 1 เปอร์เซนต์ จะมีผลให้ได้ค่าการเจริญเพิ่มขึ้นบ้างเล็กน้อย แต่เกือบไม่มีการเพิ่มผลผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสเลย

การแปรค่าความเข้มข้นของกรดฟีนิลอะซีติกที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสังเคราะห์เอนไซม์ จะเห็นได้ว่าถ้าค่าความเข้มข้นของกรดฟีนิลอะซีติกสูงขึ้น จะได้การเจริญและการผลิตเอนไซม์สูงขึ้นโดยที่การเพิ่มเอนไซม์จะเห็นเด่นชัด ในช่วงการเจริญแบบทวีคูณ หลังจากนั้นจะคงที่และลดลงเล็กน้อย การเหนี่ยวนำการสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ในแบคทีเรีย E.coli ด้วยกรดฟีนิลอะซีติก ได้รับการรายงานไว้มากมาย (Kaufmann และ Bauer, 1964; Levitov และคณะ, 1967; Szentirmai, 1964; Vojtisek และ Slezek, 1975a,b) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดฟีนิลอะซีติกสูงกว่า 0.2 เปอร์เซนต์ คือที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซนต์(รูปที่ 15) ค่าการเจริญเพิ่มขึ้นบ้างแต่การเจริญจะช้าลงคือ ระยะการเข้าสู่ช่วงการเจริญคงที่

จะทอดยาวออกไปจากเดิมประมาณเท่าตัว โดยเฉพาะอย่างยิ่งช่วงเวลาการสังเคราะห์เอนไซม์จะถูกกดไว้ระยะหนึ่ง (30 ชั่วโมง) แล้วจึงเริ่มมีการสังเคราะห์เอนไซม์ โดยที่ระดับเอนไซม์สังเคราะห์สูงสุดมีค่าใกล้เคียงกับค่าเอนไซม์ที่วัดได้เมื่อใช้กรดฟีนิลอะซีติก 0.2 เปอร์เซนต์ ลักษณะของการกดการสร้างเอนไซม์เมื่อมีกรดฟีนิลอะซีติกสูงกว่า 0.2 เปอร์เซนต์ มีลักษณะ "Self-catabolite repression" โดยที่สารเหนี่ยวนำเมื่อมีปริมาณมากเกินพอสามารถกดหรือต้านการสังเคราะห์เอนไซม์ที่เหนี่ยวนำในช่วงแรก ปรากฏการณ์ดังกล่าวนี้พบในเอนไซม์ชนิดอื่นบ้างเช่น การเหนี่ยวนำเอนไซม์ pectate lyase (Tsuyumu, 1979) ซึ่งอธิบายได้ว่าเมื่อกรดฟีนิลอะซีติกถูกใช้เป็นแหล่งของคาร์บอน จนกระทั่งปฏิกิริยาคะตะบอลิสมเกิดมาเต็มที่แล้ว ความสามารถในการสังเคราะห์เอนไซม์ก็จะถูกกดดันด้วยกรดฟีนิลอะซีติกที่มากเกินพอนั้น Vojtisek และ Slezak, (1975a)ได้ตั้งข้อสังเกตว่า กรดฟีนิลอะซีติกอาจมีความเป็นพิษต่อเซลเมื่อใช้ความเข้มข้นสูงก็ได้ นอกจากนี้เมื่อทดลองเลี้ยง E.coli ATCC 9637 ในอาหารสูตรอุดมเสริมกรดฟีนิลอะซีติก 0.2 เปอร์เซนต์ จะได้การเจริญของแบคทีเรียอย่างรวดเร็ว และสูง แต่ไม่มีการสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสเลส เชื่อว่าอาจเป็นผลของ Catabolite repression เนื่องจากแหล่งของคาร์บอนชนิดอื่นที่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ซับซ้อนเหล่านั้น การเลี้ยง E.coli ATCC 9637 ในอาหารสุตรอุดมให้ได้เซลจำนวนมาก ๆ ก่อน แล้วจึงเปลี่ยนไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำที่มีกรดฟีนิลอะซีติกและมีกรดฟีนิลอะซีติกกับโซเดียมกลูตาเมตก็ยังคงให้รูปแบบของการเหนี่ยวนำเอนไซม์เหมือนกับการเลี้ยงเซลในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีกรดฟีนิลอะซีติกเติมลงไปตั้งแต่เริ่มต้น และที่มีโซเดียมกลูตาเมตกับกรดฟีนิลอะซีติกตั้งแต่เริ่มต้นเลี้ยง ยิ่งไปกว่านั้นดูเหมือนว่าระดับของเอนไซม์ที่ถูกสังเคราะห์จะมีแนวโน้มต่ำกว่าที่วัดได้เมื่อเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำแต่เพียงอย่างเดียว ผลการศึกษาช่วงการเจริญที่เหมาะสมต่อการเติมกรดฟีนิล-อะซีติกเพื่อเหนี่ยวนำการสังเคราะห์เพนนิซิลิน เอซิเลส ไม่พบว่ามีความแตกต่างของรูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์ ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Vandamme (1980) และ Wojskowicz (1981) ที่ว่า E.coli จะมีการสร้างเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส สูงสุดเมื่อเติมกรดฟีนิลอะซีติกตั้งแต่เริ่มต้นเพาะเลี้ยงเซล มีรายงานว่า โมเลกุลของน้ำตาลหลายชนิด เช่น กลูโคส มอลโตส ฟรุกโตส และกลีเซอรอล สามารถให้ผล catabolite repression ต่อการสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ E.coli ได้ และการกดการสังเคราะห์

เอนไซม์หากมีกลูโคสอยู่ด้วยจะเป็นปฏิภาคโดยตรงกับความเข้มข้นกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ (Szentirmai, 1964) ผลการวิจัยนี้จะเห็นได้ว่า การสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส จะถูกกดด้วยกลูโคสอย่างชัดเจนคือ ที่ความเข้มข้นกลูโคส 0.1 เปอร์เซนต์ ในอาหารสูตรปรับต่ำ จะลดแอคติวิตีของเอนไซม์ลงประมาณครึ่งหนึ่งของเมื่อไม่มีกลูโคส และจะไม่สามารถตรวจพบแอคติวิตีของเอนไซม์ เพนนิซิลิน เอซิเลสเลย เมื่อเลี้ยง E.coli ATCC 9637 ในอาหารสูตรปรับต่ำซึ่งมีกลูโคสเข้มข้น 0.2 เปอร์เซนต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส Golub (1977)ได้เสนอแนะว่า ผลกระทบของกลูโคสต่อการสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส อาจเกิดจากภลูโคสป้องกันการเข้าสู่เซลของกรดฟีนิลอะซีติก ทำให้ไม่สามารถเหนี่ยวนำการสังเคราะห์เอนไซม์ได้ นอกจากสารจำพวกน้ำตาลซึ่งเป็นโพลีแอลกอฮอล์แล้ว กรดอินทรีย์บางชนิดก็สามารถกดการสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสได้ (Gotovtzeya, และคณะ, 1965a,b)

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการเลี้ยง E.coli ATCC 9637 ที่น่าสนใจอีกประการหนึ่งคือ การเปลี่ยนแปลง pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรปรับต่ำที่มี 0.5 เปอร์เซนต์โซเดียมกลูตาเมตและ 0.2 เปอร์เซนต์กรดฟีนิลอะซีติก จะมีค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนแปลงไปอย่างรวดเร็ว เมื่อแบคทีเรียเริ่มต้นสร้างเอนไซม์ และค่า pH จะสูงขึ้นถึง 8.9 เมื่อเลี้ยงนาน 60 ชั่วโมง ในขณะที่การเจริญของ E.coli ATCC 9637 เมื่อมี 0.2 เปอร์เซนต์กรดฟีนิลอะซีติกเป็นแหล่งของคาร์บอนเดี่ยว จะพบว่าค่า pH ของอาหารจะคงที่ประมาณ 7.0 ตลอดเวลาเพาะเลี้ยงเชื้อ 70 ชั่วโมง จากการศึกษารูปแบบของการสังเคราะห์เพนนิซิลิน เอซิเลสพบว่า จะมีการลดลงของแอคติวิตีต่อมิลลิกรัมโปรตีนของเซลเล็กน้อยมาก ตลอดเวลาการเพาะเลี้ยง ในขณะที่ค่าเอนไซม์แอคติวิตีเมื่อมี 0.5 เปอร์เซนต์โซเดียมกลูตาเมตด้วยจะลดลงอย่างมาก (รูปที่ 14) ยิ่งไปกว่านั้นเมื่อทำการศึกษาจำนวนเซลที่มีชีวิตอยู่ (viable cells) ตามรายละเอียดในภาคผนวกที่ 5 จะเห็นได้ว่า เซลมีชีวิตของ E.coli ATCC 9637 ที่เจริญในอาหารสูตรปรับต่ำที่ไม่มี 0.5 เปอร์เซนต์โซเดียมกลูตาเมต จะมีเซลสูงสุดที่ระยะเริ่มต้นการเจริญคงที่ แล้วจะลดต่ำลงเหลือประมาณ 75 เปอร์เซนต์ เมื่อผ่านระยะการเจริญคงที่แล้ว 15 ชั่วโมง แล้วคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 70 ถึงแม้ E.coli ATCC 9637 ซึ่งเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำ

ที่มีโซเดียมกลูตาเมต จะได้เซลสูงสุดที่ระยะเริ่มต้นการเจริญคงที่เหมือนกัน แต่เมื่อผ่านระยะการเจริญคงที่ไป 15 ชั่วโมงแล้ว จำนวนเซลที่มีชีวิตเหลือเพียงประมาณ 40 เปอร์เซนต์ ซึ่งอาจเป็นได้ว่าการเปลี่ยนแปลง pH ของอาหารเลี้ยงเชื้ออาจจะเกิดขึ้นเพราะ การเจริญของ E.coli ATCC 9637 ในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีโซเดียมกลูตาเมตอยู่ด้วย ทำให้มีการสร้างสารเมตาบอไลท์บางตัว ซึ่งเป็นพิษต่อเซลโดยตรงหรืออาจมีผลทำให้เกิดการเพิ่ม pH ของอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างรวดเร็ว ทำให้เซลตายก็เป็นได้

มีรายงานว่า E.coli ATCC 9637 สามารถสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส หรือเบตา-แลคแตมเมสได้บ้างเล็กน้อย (Sato และคณะ,1976) จึงได้ติดตามวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เบตา-แลคแตมเมสในสภาวะของการสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลินสูงสุด คือในสูตรอาหารปรับต่ำที่มี 0.5 เปอร์เซนต์โซเดียมกลูตาเมต และ 0.2 เปอร์เซนต์ กรดฟีนิลอะซีติก ที่ 30 องศาเซลเซียส ปรากฏว่าไม่สามารถวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เบตา-แลคแตมเมสได้เลย ทั้งที่ใช้ความเข้มข้นของสารละลาย crude enzyme สูงมากกว่าค่าความเข้มข้นของโปรตีนที่ได้จาก K.pneumoniae M 5a1(แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ 0.89 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน) ถึง 5 เท่า จึงเชื่อว่าหากจะมีแอคติวิตีของเบตา-แลคแตมเมสในเซล E.coli ATCC 9637 อยู่บ้างก็คงจะมีค่าต่ำมากจนไม่น่าจะมีผลต่อการใช้เซลชนิดนี้เป็นแหล่งของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3 สภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเซล E.coli aTCC 9637 ด้วยวุ้นและแคปปา-คาร์ราจีแนน

ในการวิจัยนี้ได้ศึกษาวิจัยถึงการตรึงเซล E.coli ATCC 9637 โดยวิธีกักขัง (entrapment) ในวุ้นและแคปปา-คาร์ราจีแนน และติดตามด้วยการทำปฏิกิริยาเซลที่ตรึงแล้วกับสารเสริม strength ของเจล ในที่นี้ใช้กลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน เพื่อให้เกิด cross-linking ระหว่างเซลกับเซลหรือเซลกับเจล Sun et al (1980) ได้ทำการตรึงเซล E.coli ซึ่งผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส สายพันธุ์ที่แยกได้เองด้วยวุ้นและเสริม strength ด้วยกลูตารัลดีไฮด์ แล้วรายงานว่าสามารถใช้ผลิต กรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกได้แต่ไม่มีรายละเอียด Sato และคณะ (1976) ทำการตรึงเซล E.coli ATCC 9637 โดยใช้โพลีอะไครลาไมด์เจล โดยมีครึ่งชีวิต (half life)ประมาณ 42 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส Klein และ Wagner (1980) ได้ตรึงเซล E.coli ใน polyurethane และเจล และรายงานว่า วิธีนี้สามารถตรึงเซลได้มาก และให้เจลที่มีความคงทนสูง

ปัจจุบันการตรึงเซลโดยวิธีกักขังเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการศึกษาวิจัยกันมาก ทั้งนี้เพราะมีข้อได้เปรียบดังนี้ (Nilsson และคณะ, 1983)

ก. เป็นวิธีที่ทำได้ง่ายในการกักขังเซลไว้ให้อยู่ภายในร่างแหโพลีเมอร์

ข. เป็นวิธีที่ไม่ต้องใช้สภาวะการตรึงเซลรุนแรง ในบางกรณีสามารถใช้ตรึงเซลมีชีวิตได้

ค. เป็นวิธีที่เก็บเซลไว้ได้ดีโดยมีการรั่วไหลออกภายนอกได้น้อย

ง. เป็นวิธีที่ตรึงเซลได้ครั้งละมาก ๆ

แคปปา-คาร์ราจีแนนได้ถูกใช้เป็นวัสดุตรึงเซลในการผลิตกรดมาลิก (L-Malic acid) ทางการค้ามาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1977 (Chibata, 1980) และในปีค.ศ. 1978 นักวิทยาศาสตร์กลุ่มเดียวกันนี้ได้ใช้คาร์ราจีแนนเป็นวัสดุตรึงเพื่อการผลิตกรดแอสพาร์ติก (L-Aspartic acid) ในอุตสาหกรรมเช่นกัน

ในการวิจัยนี้ได้เลือกใช้วุ้น และคาร์ราจีแนนเป็นวัสดุตรึงเอนไซม์ เพราะสารทั้งสองเป็นสารอาหารที่ได้จากธรรมชาติ เมื่อใช้ตรึงแล้วผลผลิตที่ได้จะสามารถนำไปใช้ประโยชน์สำหรับมนุษย์หรือสัตว์ได้โดยไม่มีผลกระทบข้างเคียง นอกจากนี้ยังเป็นวิธีการตรึงเซลแบบ two phase system ซึ่งมีข้อได้เปรียบกว่าวิธีตรึงเซลแบบอื่น ๆ ที่ได้เม็ดเจลลักษณะสัณฐานกลมเป็นส่วนใหญ่ จึงมีประโยชน์ต่อการประยุกต์ใช้ในการผลิตแบบต่อเนื่องในคอลัมน์ได้ดี (Nilsson และคณะ,1983)

ผลการทดลองพอสรุปได้ว่า ขนาด และรูปร่างลักษณะ และ strength ของเม็ดเจลเซลตรึงที่เตรียมได้จะขึ้นอยู่กับองค์ประกอบหลายอย่าง อาทิเช่น ความเร็วในการกวนด้วยแท่งกวนแม่เหล็กบนเครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก, ชนิดของวัสดุตรึงเซล, ความเข้มข้นของวัสดุตรึงเซล, ความเข้มข้นของเซลที่ตรึง ฯลฯ

Klein และ Wagner (1980) ได้ตรึงเซล E.coli โดยการโพลิเมอไรซ์สารประกอบอีพอกไซด์ (epoxide) ได้เจลที่มีเซลบรรจุไว้ได้มาก ความทนทานและแอคติวิตีสูง พบว่าขนาดของเม็ดเจลมีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ได้บ้าง ในการวิจัยนี้พบว่า ขนาดของเม็ดเจลเซล E.coli ตรึงวุ้นในช่วงเส้นผ่าศูนย์กลางไม่เกิน 3 มิลลิเมตร ไม่มีผลกระทบต่อแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส ในขณะที่ขนาดของเม็ดเจลเซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางระหว่าง 1-3 มิลลิเมตร จะให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ต่ำกว่าเม็ดเจลขนาดเล็ก (เส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 1 มิลลิเมตร) ประมาณ 10 เปอร์เซนต์ จึงอาจสรุปได้ว่าอิทธิพลของขนาดเม็ดเจลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์นั้นจะขึ้นกับชนิดของวัสดุตรึงเอนไซม์ที่ใช้ อย่างไรก็ตาม ในการวิจัยนี้ได้คัดเฉพาะเม็ดเจลขนาดโตกว่า 1 มิลลิเมตรเท่านั้น มาใช้เพื่อให้ได้ขนาดเม็ดเจลมีขนาดสม่ำเสมอและสะดวกต่อการใช้ในขบวนการผลิตโดยใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพต่อไป เมื่อศึกษาผลกระทบของความเข้มข้นของวัสดุตรึงและความเข้มข้นของเซลต่อแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส และ strength ของเม็ดเจล ซึ่งเป็นคุณสมบัติทางกายภาพที่สำคัญต่อการใช้ผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ โดยพิจารณาองค์ประกอบหลายประการช่วยในการตัดสิน เช่น เปอร์เซนต์ผลผลิต (% yield) เปอร์เซนต์แอคติวิตีที่วัดได้ในเซลตรึงเทียบกับแอคติวิตีของเซลอิสระ (% activity recovery) ตลอดจนการวัด strength ของเม็ดเจลโดยใช้วิธีมือจับและประดิษฐ์เครื่องวัด strength ขึ้นใหม่ให้วัดค่าได้ละเอียดและถูกต้องมากขึ้น

ผลการศึกษาเปรียบเทียบชี้ให้เห็นว่า ค่า strength ของเม็ดเจลเซลตรึงวุ้น จะต่ำกว่าเม็ดเจลเซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน ที่ทุกความเข้มข้นของการทดลอง (3.0-6.0 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ของวุ้น และ 2.0-3.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ของแคปปา-คาร์ราจีแนน ความเข้มข้นของเซล E.coli ATCC 9637 ที่เหมาะสม ต่อการตรึงจะมีค่าอยู่ในช่วง 27-30 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) เมื่อใช้แคปปา-คาร์ราจีแนนเข้มข้น 2.5 เปอร์เซนต์ และ 5 เปอร์เซนต์วุ้น (น้ำหนักต่อปริมาตร) การใช้เซลที่มี ความเข้มข้นสูงจะทำให้ได้เจลที่มี strength ต่ำ ยิ่งไปกว่านั้น รูปร่างและลักษณะตลอดจนขนาดของเซลตรึง

เจลที่ได้ทั้ง 2 ชนิด จะควบคุมให้คงที่ได้ยาก การใช้เซลความเข้มข้นสูงจะมีผลให้สารละลายเจลที่ใช้ตรึงเซลหนืดมากเกินไป การเกิดเม็ดเจลทำได้ยาก ขนาดเม็ดเจลโตมากขึ้น และผลผลิตของเม็ดเจลจะลดลงเพราะส่วนหนึ่งของเจลและเซลจะสูญเสียไปเพราะไม่เกิดเม็ดเจล ความเข้มข้นของแคปปา-คาร์ราจีแนนที่สูงและต่ำกว่า 2.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) จะมีผลกระทบต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ที่วัดได้ในเซลตรึงโดยเทียบกับค่าที่วัดได้ในเซลอิสระ ซึ่งอาจเป็นผลเนื่องมาจากการรั่วไหลของเซล ถ้าใช้ความเข้มข้นของวัสดุตรึงต่ำ หรือการลดลงของขนาดรูพรุนเม็ดเจลเซลตรึงเมื่อเปอร์เซนต์วัสดุตรึงสูงขึ้น ปรากฏการณ์เช่นนี้พบในเม็ดเจลเซลตรึงวุ้นที่ความเข้มข้นต่ำกว่าและสูงกว่า 5.0 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ของวุ้นเช่นกัน Cheetham และคณะ(1979) ได้เสนอแนะว่าการลดการรั่วไหลของเซลตรึง จากเม็ดเซลตรึงทำได้โดยเพิ่มความเข้มข้นของวัสดุตรึงให้สูงขึ้น ความเข้มข้นของเซลที่ใช้ในช่วงเกินกว่า 25 และ 30 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) สำหรับเซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนและวุ้น จะทำให้แอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลสที่วัดได้ต่ำลง ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องจากการรั่วของเซลเมื่อมีปริมาณมากเกินกว่าที่เนื้อเจลจะกักขังไว้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ข้อที่น่าสังเกตคือ การเพิ่มความเข้มข้นวุ้นสูงขึ้นจะมีผลกระทบต่อ activity recovery ของเอนไซม์ในเซลตรึงมากกว่าเมื่อใช้แคปปา-คาร์ราจีแนน ซึ่งอาจเป็นได้ว่าแคปปา-คาร์ราจีแนนโดยปกติจะมี strength สูงกว่าวุ้น จึงสามารถกักขังเซลไว้ได้ดีกว่าเซลตรึงวุ้น จากข้อมูลของ Genu (tecnical data) (1985) รายงานว่าแคปปา-คาร์ราจีแนนที่ใช้เมื่อแช่ใน 0.3 เปอร์เซนต์โพแตสเซียมคลอไรด์ จะให้ค่าstrengthสูงกว่าวุ้นเกือบ 2 เท่าที่ความเข้มข้นและอุณหภูมิเดียวกัน จึงทำให้สามารถกักขังเซลไว้ได้ดีกว่า

ในการวิจัยนี้ได้พิจารณาเลือกความเข้มข้นของเซล E.coli ATCC 9637 ที่ใช้ในช่วง 10-15 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) โดยใช้ความเข้มข้นของวุ้น 5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และความเข้มข้นแคปปา-คาร์ราจีแนน 2.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ซึ่งมีผลทำให้ได้เม็ดเจลเซลตรึงของ E.coli ATCC 9637 ที่มีคุณสมบัติดังนี้ คือ

ก. Activity recovery 75-80 เปอร์เซนต์ สำหรับเม็ดเจลเซลตรึงวุ้น และ 85 เปอร์เซนต์ สำหรับเม็ดเจลเซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน

ข. ผลผลิตของเม็ดเจลเซลตรึงทั้ง 2 ชนิดสูงกว่า 90 เปอร์เซนต์

ค. strength ของเม็ดเจลเซลตรึงวุ้นมีค่า +3 และ +5 สำหรับเม็ดเจลเซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน

Tosa และคณะ (1979) พบว่ามีอิออนของโลหะหลายชนิด เช่น โพแตสเซียม, รูบิ-เดียม และซีเซียม รวมทั้ง aliphatic diamine หลายชนิด เช่น methylenediamine, hexamethylenediamine, octamethylenediamine สามารถเพิ่ม strength ของเม็ดเจลแคปปา-คาร์ราจีแนนได้ ผลจากการวิจัยในที่นี้แสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้นของโพแตสเซียมคลอ-ไรด์ จะมีผลกระทบต่อ strength ของเม็ดเจลเซล E.coli ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์-ราจีแนนมาก โดยที่ strength จะเพิ่มขึ้น 2-3 เท่า เมื่อเทียบกับค่าที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยากับโพแตสเซียมคลอไรด์ อย่างไรก็ตามโพแตสเซียมคลอไรด์มีผลกระทบต่อเอนไซม์ เพนนิซิลิน เอ-ซิเลส ของ E.coli ATCC 9637 ด้วยค่าโพแตสเซียมคลอไรด์ 0.3 โมลาร์ เป็นค่าความเข้มข้นที่ให้แอคติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์สูงที่สุด

เป็นที่ทราบกันดีว่า การตรึงเซลโดยวิธีกักขังนั้น สามารถเสริม strength ให้เพิ่มได้ด้วยการใช้สารพวก polyfunctional reagents (Klein และ Wagner, 1983) เซล E.coli ซึ่งมีแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส ได้รับการตรึงในวัสดุตรึงเจลาติน แล้ว crosslinked ด้วยกลูตารัลดีไฮด์ พบว่าสามารถใช้ผลิต กรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกได้(Park และคณะ, 1982) Nishida และคณะ (1979) พบว่าเซล E.coli ที่ผลิตเอนไซม์แอสพาเตส (aspartase) เมื่อตรึงในแคปปา-คาร์ราจีแนนกับกลูตารัลดีไฮด์หรือกลูตารัลดีไฮด์ร่วมกับเฮก-ซาเมทธิลลีนไดอามีน จะช่วยทำให้เซลตรึงที่ได้มีความเสถียรมากขึ้น Tosa และคณะ (1979) ได้แสดงให้เห็นว่า เฮกซาเมทธิลลีนไดอามีนสามารถช่วยทำให้ strength ของเซลตรึงแคป-ปา-คาร์ราจีแนนเพิ่มได้เช่นกัน ในการวิจัยนี้พยายามเพิ่ม strength ของเม็ดเจลที่ใช้ตรึง E.coli ATCC 9637 ทั้งชนิดวุ้นและแคปปา-คาร์ราจีแนน ผลปรากฏว่า กลูตารัลดีไฮด์เพียงอย่างเดียวจะไม่มีส่วนช่วยในการเพิ่ม strength ของเม็ดเจลวุ้นหรือคาร์ราจีแนนเลย ในเวลาเดียวกันกลับไปมีผลลดแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสลงบางส่วนด้วย อีกเช่นกันจะเห็นว่า ผลกระทบของกลูตารัลดีไฮด์ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ใน E.coli ATCC 9637 ที่ตรึงด้วยวุ้นจะรุนแรงกว่าเซลที่ตรึงด้วยแคปปา-คาร์ราจีแนน ในทำนองกลับกันเซลที่เสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์แล้ว นำมาทำปฏิกิริยากับเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน จะได้ค่า strength ของเจลสูงขึ้นกว่าเดิมประมาณเท่าตัว สำหรับเซล E.coli ATCC 9637 ตรึงด้วยคาร์ราจีแนน แต่จะเพิ่ม strength ขึ้นเล็กน้อยสำหรับเซลตรึงด้วยวุ้น ในขณะที่ผลกระทบของเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีนต่อแอคติวิตีของเพนนิซิลิน เอซิเลส ในเซลตรึงคาร์ราจีแนน จะเห็นชัด

มากว่า เซลตรึงวุ้น Tosa และคณะ (1979) รายงานว่า เฮกซาเมทธิลลีนไดอามีนจะมีผลในการเพิ่ม strength ของเม็ดเจลเซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนได้โดยตรง ในขณะที่ไม่มีผลต่อ strength ของเม็ดเจลเซลตรึงวุ้น ดังนั้น อาจเป็นไปได้ว่า ผลกระทบของเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน อาจมีผลต่อการ cross-linking ทั้งระหว่างเซลต่อเซลและเซลต่อวัสดุตรึงคือ คาร์ราจีแนนด้วย ในขณะที่ผลกระทบของเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีนต่อวุ้นในการตรึงระหว่างเซลกับวัสดุตรึง (วุ้น) จะมีผลน้อยมาก โดยมากแล้วน่าจะเป็นผลจากการ cross-linking ระหว่างเซลต่อเซลโดยมีกลูตารัลดีไฮด์เป็นตัวเชื่อม เท่านั้น

4.4 เปรียบเทียบคุณสมบัติของเอนไซม์เพนนิซิลินเอซิเลสใน E.coli ATCC 9637 อิสระ, เซล E.coli ATCC 9637 ตรึงวุ้น และเซล E.coli ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน

ในการวิจัยนี้ได้ทำการตรึงเซล E.coli ATCC 9637 ด้วยวิธีกักขังในวัสดุตรึงเซล 2 ชนิดคือ วุ้นและแคปปาคาร์ราจีแนน โดยใช้เซล E.coli ATCC 9637 เข้มข้น 10-15 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) เมื่อตรึงด้วยวุ้นใช้ความเข้มข้น 5.0 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และแคปปา-คาร์ราจีแนนความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยใช้อุณหภูมิการตรึงเซล 45-50 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเสริมด้วย 0.1 โมลาร์กลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีนเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เซลตรึง E.coli ATCC 9637 วุ้นและแคปป-คาร์ราจีแนนที่ได้นำมาศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส กับเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ใน E.coli ATCC 9637 อิสระ

ในการศึกษาผลกระทบของ pH ต่ออัตราเร่งของการเปลี่ยนเพนนิซิลิน จี ไปเป็นกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก จะเห็นได้ว่ารูปแบบของกราฟระหว่าง pH กับแอคติวิตีเพนนิซิลิน เอซิเลสจะเปลี่ยนไปคือ เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ในเซลอิสระจะไฮโดรไลซ์เพนนิซิลิน จี ได้ดีในช่วง pH ค่อนข้างสูง ค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาอยู่ระหว่าง 7.5-8.5 ซึ่งใกล้เคียงกับค่าที่รายงานไว้โดย Vandamme (1980) ในขณะที่ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเซล E.coli ตรึงวุ้นและตรึงคาร์ราจีแนน ในการไฮโดรไลซ์เพนนิซิลิน จี จะเกิดได้ดีในช่วง pH ที่ต่ำกว่า คือมีค่าเพียง 6.5 และประมาณ 7-7.5 สำหรับเซลตรึงวุ้นและเซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนตามลำดับ การลดลงของ pH ที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส นี้เป็นข้อได้เปรียบของการใช้เซลตรึงในการผลิต กรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก

เพราะปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์เพนนิซิลิน จี จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดฟีนิลอะซีติกและกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก ซึ่งมีผลให้ pH ของสารละลายปฏิกริยาลดลง ในทำนองเดียวกันความเสถียรต่อ pH ของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสของเซลตรึงวุ้นและตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน สูงกว่าเอนไซม์ในเซลอิสระอย่างเห็นได้ชัด คือที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 ชั่วโมง ความเสถียรของเอนไซม์อิสระอยู่ในช่วง pH 6.5-7.0 ในขณะที่เซลตรึงวุ้นจะมีช่วงความเสถียรกว้างขึ้นเป็น 5.0-8.0 และ 5.0-9.0 ตามลำดับ นับเป็นการสนับสนุนความเหมาะสมของการใช้เซล E.coli ตรึงในการผลิต กรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกมากกว่าเซลอิสระ

- เมื่อเปรียบเทียบอุณหภูมิที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซ์เพนนิซิลิน จี ของเซล E.coli ATCC 9637 อิสระกับเซลตรึงวุ้นและตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน ก็จะเห็นได้ว่า เมื่อเซลถูกตรึงจะให้ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานกว้างขึ้น เมื่อเทียบกับการทำงานของเอนไซม์ในเซล E.coli อิสระ (50 องศาเซลเซียสในเซลอิสระ และ 50-55 องศาเซียสเซสในเซลตรึง) นอกจากนี้รูปแบบของความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีของเอนไซม์กับอุณหภูมิยังบ่งถึงประสิทธิภาพของการทำงานที่ช่วงของอุณหภูมิต่าง ๆ สูงกว่าทุกค่า การศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์ ไม่ได้แสดงความแตกต่างของความเสถียรที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมงเลย แต่ผลการทดลองเปรียบเทียบการเก็บรักษาเซล E.coli ATCC 9637 ไว้ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียสนาน 10 วัน จะสูญเสียแอคติวิตีเอนไซม์ไปประมาณ 30 เปอร์เซนต์ ในขณะที่เซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนเก็บไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส จะสูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์ประมาณ 25 เปอร์เซนต์ ในขณะที่เซลตรึงวุ้นจะไม่มีการสูญเสียแอคติวิตีเลย เมื่อเก็บที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 วัน

Yamamoto (1974) รายงานว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ arginine deiminase ในเซลตรึง Pseudomonas putida จะมีค่าเพิ่มขึ้น Sato และคณะ (1976) พบว่าค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมของการไฮโดรไลซ์เพนนิซิลิน จี ของเอนไซม์จาก E.coli จะไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อตรึงเซลในโพลีอะไครลาไมด์เจล การเพิ่มความเสถียรต่อ pH และการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมต่อการไฮโดรไลซ์สับเสตรตเพนนิซิลิน จี แสดงให้เห็นว่าวุ้นและคาร์ราจีแนนน่าจะมีส่วนช่วยปกป้องการรวมจับกลุ่ม หรือการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ภายในเซลของ E.coli ซึ่งจะเกิดขึ้นที่ pH เป็นกรดมาก ๆ

และอุณหภูมิสูง ได้ (Klibanov; 1983) นอกจากนี้การกักขังเซลไว้ในวุ้นและแคปปา-คาร์รา-จีแนนจะเป็นการทำให้เอนไซม์ต้องอยู่ในรูปแบบของโครงสร้างที่ค่อนข้างแน่นอน จึงมีความเสถียรต่อ pH และอุณหภูมิมากขึ้น

เมื่อเปรียบเทียบค่าคงที่จลน์ศาสตร์ของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ในเซล E.coli ATCC 9637 อิสระ กับเอนไซม์ในเซลตรึงวุ้นและแคปปา-คาร์ราจีแนนจะเห็นได้ว่า เพนนิซิลิน เอซิเลสของเซล E.coli อิสระ จะให้ค่า K_m สูงที่สุด ติดตามด้วยเอนไซม์ของเซลตรึงวุ้นและเซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน ในขณะที่ค่า V_{max} ของเอนไซม์ในเซลอิสระจะมีค่าสูงกว่าในเซลตรึงเกือบ 3 เท่า ซึ่งอาจจะอธิบายได้ว่า การตรึงเซลอาจมีผลทำให้สับสเตรตเพนนิซิลิน จี ที่ถูกนำเข้าไปในเซลถูกบังคับให้รวมกันอยู่ใกล้บริเวณ active site จึงเพิ่มประสิทธิภาพของการจับระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรตได้ดีขึ้น หรืออาจอธิบายได้อีกอย่างหนึ่งคือ การตรึงเซลมีผลทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส เปลี่ยนไป ทำให้การจับของเอนไซม์กับสับสเตรตมีประสิทธิภาพดีขึ้น การลดลงของค่า V_{max} ในเอนไซม์ตรึงวุ้นและคาร์ราจีแนนแสดงให้เห็นชัดถึงความจำกัดของการนำสับสเตรตเข้า และผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาออกจากเจลที่ตรึงเซล นับเป็นข้อเสียของการตรึงเซลแบบการกักขังโดยทั่วไป (Klein และ Wagner, 1980)

ค่า K_i ของกรดฟีนิลอะซีติก และกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก ของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ในเซล E.coli ATCC 9637 ตรึงวุ้นและแคปปา-คาร์ราจีแนนจะมีค่าสูงกว่าเอนไซม์ในเซล E.coli อิสระ ประมาณ 2-3 เท่า แสดงให้เห็นว่าการตรึงเซลจะช่วยให้ผลกระทบของผลิตภัณฑ์ของการไฮโดรไลซ์เพนนิซิลิน จี ในการยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ลดลงไปได้ จึงเป็นข้อดีของการตรึงเซลอีกประการหนึ่ง

แอคติวิตีของเอนไซม์ เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ E.coli ATCC 9637 ค่อนข้างเสถียร จะสามารถเก็บ เซล E.coli อิสระไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในนอร์มอลซาลีน ได้นานถึง 80 วัน โดยที่สูญเสียแอคติวิตีไปเพียง 20 เปอร์เซนต์เท่านั้น เอนไซม์ในเซลตรึงวุ้นและคาร์ราจีแนน มีแนวโน้มที่จะเสถียรกว่าเอนไซม์ในเซลอิสระ เพราะสามารถเก็บไว้ที่ 4 องศา-เซลเซียส นาน 30 วัน ได้โดยไม่มีการสูญเสียแอคติวิตีไปเลย

เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ตรึงวุ้นหรือแคปปา-คาร์ราจีแนน จะมีความเสถียรน้อยกว่าเอนไซม์ในเซลตรึงวุ้นหรือคาร์ราจีแนนเสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์ แต่เอนไซม์ในเซลตรึงวุ้นหรือคาร์ราจีแนนที่เสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน จะมีความเสถียรสูงที่สุด และสามารถนำกลับมาใช้ไฮโดรไลซ์เพนนิซิลิน จี ได้นานที่สุด

สรุปผลการทดลอง

1. ในสภาวะที่เหมาะสม E.coli ATCC 9637 เป็นสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ได้สูงสุดในจำนวน 3 สายพันธุ์ที่นำมาคัดเลือกคือ E.coli ATCC 9637, ATCC 11105 และ S.rubidaea ATCC 181

2. สภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวคือ การเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีแอมโมเนียมซัล-เฟต (0.1 เปอร์เซนต์) เป็นแหล่งของไนโตรเจน กรดฟีนิลอะซีติก (0.2 เปอร์เซนต์) เป็นแหล่งของคาร์บอน และโซเดียมกลูตาเมต (0.5 เปอร์เซนต์) เป็นทั้งแหล่งของไนโตรเจนและคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุดเป็น 54.2 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนสุทธิของเซลที่เวลา 20 ชั่วโมง

3. ในสภาวะที่ E.coli ATCC 9637 เจริญดีและผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสได้สูง จะไม่พบแอคติวิตีของเบตา-แลคแตมเมสเลย

4. เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ที่ผลิตโดย E.coli ATCC 9637 จะถูก catabolite repression ด้วยกลูโคสและกรดฟีนิลอะซีติกเอง

5. สภาวะเหมาะสมในการตรึงเซล E.coli ATCC 9637ด้วยแคปปา-คาร์ราจีแนน คือ ใช้สารละลายแคปปา-คาร์ราจีแนน ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตรึงเซล E.coli ATCC 9637 ความเข้มข้น 10-15 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ใช้อุณหภูมิในการตรึง 45-40 องศาเซลเซียส ทำให้เกิดเม็ดเจลโดยการเติมนอร์มอล-บิวทิลอะซีเตต ล้างเม็ดเจลด้วย 0.3 โมลาร์ โพแตสเซียมคลอไรด์ เม็ดเจลเซลตรึงที่ได้มีแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส 85 เปอร์เซนต์ ของเซล E.coli ATCC 9637 อิสระ

6. สภาวะเหมาะสมในการตรึงเซล E.coli ATCC 9637 ด้วยวุ้น คือ ใช้สารละลายวุ้น ความเข้มข้น 5.0 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตรึง E.coli ATCC 9637 ความเข้มข้น 10-15 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ใช้อุณหภูมิในการตรึง 45-50 องศาเซลเซียส ทำให้เกิดเม็ดเจลโดยการเติมนอร์มอล-บิวทิลอะซีเตต ล้างเม็ดเจลด้วยน้ำกลั่น เม็ดเจลเซลตรึงที่ได้มีแอคติวิตี 75-80 เปอร์เซนต์ของเซล

7. เม็ดเจลเซล E.coli ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนที่มีเส้นผ่าศูนย์-กลางระหว่าง 1-3 มิลลิเมตร จะให้แอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสต่ำกว่าเม็ดเจล

เซลตรึงที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 1 มิลลิเมตร อย่างเห็นได้ชัด (10 เปอร์เซนต์) ขณะที่เม็ดเจลเซล E.coli ATCC 9637 ตรึงวุ้น จะไม่มีความแตกต่างนี้อย่างมีนัยสำคัญ

8. กลูตารัลดีไฮด์ไม่มีผลในการเพิ่ม strength ของเม็ดเจลเซลตรึงวุ้นทั้ง 2 ชนิด แต่มีผลในการทำให้เอนไซม์เสถียรมากขึ้น

9. เฮกซาเมทธิลลีนไดอามีนช่วยทำให้ strength ของเม็ดเจลเซลตรึงเพิ่มขึ้น โดย 0.1 โมลาร์เฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน เมื่อทำปฏิกิริยากับเม็ดเจลเซลตรึง ซึ่งเสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์ 0.1 โมลาร์ (20 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง 30 นาที) แล้ว ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จะเพิ่ม strength ของเม็ดเจลเซลตรึงวุ้นเพียง 0.7 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร ในขณะที่สามารถเพิ่ม strength ของเม็ดเจลเซลตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนถึง 2.2 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร

10. การเก็บรักษาเซล E.coli ATCC 9637 ในนอร์มอลซาลีนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจะดีที่สุด เมื่อเก็บนาน 30 วัน แอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสลดลงเพียง 20 เปอร์เซนต์ แล้วคงที่ตลอดจนถึงวันที่เก็บนาน 80 วัน

11. การเก็บรักษาเซล E.coli ATCC 9637 ตรึงวุ้น และเซล E.coli ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนน ไว้ในนอร์มอลซาลีนและ 0.3 โมลาร์ โพแตสเซียมคลอไรด์ ตามลำดับที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถเก็บได้นาน 30 วัน โดยไม่มีการสูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสเลย

12. เซล E.coli ATCC 9637 ตรึงวุ้น และเซล E.coli ATCC 9637 ตรึงแคปปา-คาร์ราจีแนนเสริมด้วยกลูตารัลดีไฮด์ และเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน สามารถนำมาใช้ซ้ำได้ 6 ครั้ง (5 วันต่อครั้ง 30 วัน) โดยไม่มีการสูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส เลย

ผลการวิจัยทั้งหมดบรรลุถึงวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ และสามารถใช้เป็นแนวทางในการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก ด้วยวิธีตรึงให้อยู่ในรูปแบบที่เหมาะสม เพื่อนำไปสู่การผลิตแบบต่อเนื่อง อันเป็นแม่แบบของการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป