หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

นับตั้งแต่ปีคศ. 1929 ที่ Alexander Flaming ได้ค้นพบยาปฏิชีวนะชนิดแรกคือ เพนนิซิลิน จี จาก Penicillium chrysogenum การใช้ยาจำพวกเพนนิซิลิน และยาปฏิชีวนะชนิดอื่น ซึ่งค้นพบต่อมาภายหลัง เพื่อรักษาโรคของมนุษย์ สัตว์และพืช ก็ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย จนกระทั่งราว ๆ ปีคศ. 1960 ประสิทธิภาพของการรักษาโดยใช้ยาจำพวกเพนนิซิลิน (เพนนิซิลิน จี และเพนนิซิลิน วี) เริ่มลดลง เพราะปัญหาการต้านยาของจุลชีพ ดังนั้นความต้องการตัวยาชนิดใหม่ ซึ่งจะต้องมีประสิทธิภาพในการรักษาสูงกว่าเพนนิซิลิน จี และ วี จึงมีความจำเป็นต่อวงการแพทย์อย่างยิ่ง

ปัจจุบันนี้ อุตสาหกรรมการผลิตยาเพนนิซิลินชนิดใหม่ ๆ สามารถทำได้ 2 วิธี (รูปที่ 1) คือ วิธีสังเคราะห์ทางเคมี (chemical synthesis) กับวิธีกึ่งสังเคราะห์ (semisynthetic) ทั้ง 2 วิธีนี้ประกอบด้วยขบวนการสำคัญอันดับแรกคือ การผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก (Carrington, 1971; Carleysmith และคณะ , 1980; Vandamme, 1983;)

1.1 ความสำคัญของกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก

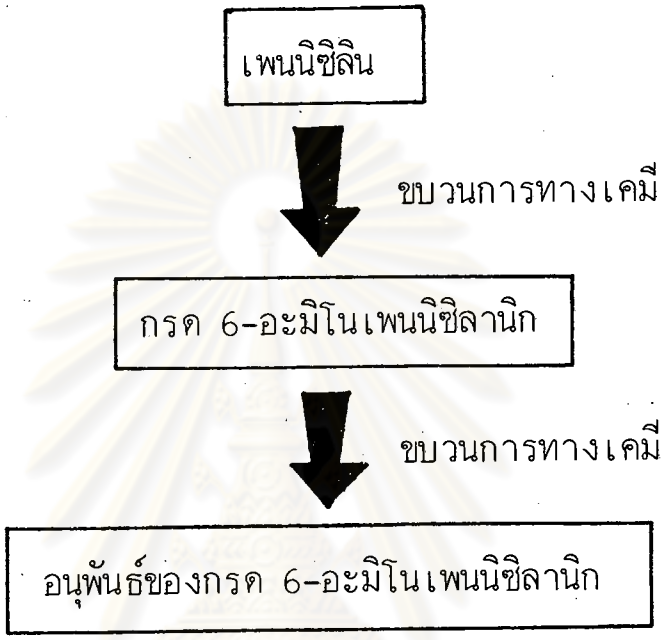
โครงสร้างโมเลกุลของเพนนิซิลินประกอบด้วย 2 ส่วนที่สำคัญ คือ ส่วนนิวเคลียสได้แก่ โมเลกุลของกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก กับส่วนของหมู่ข้างเคียง (side chain group) (รูปที่ 2)

ฤทธิ์ของยาเพนนิซิลินขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของหมู่ข้างเคียง ดังนั้น การผลิตยาเพนนิซิลินชนิดใหม่ ๆ สามารถทำได้โดยการแปรเปลี่ยนส่วนของหมู่ข้างเคียงนี้ โดยใช้กรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกเป็นนิวเคลียสตั้งต้น (Self และ Lilly, 1969; Carrington, 1971; Vandamme, 1980; Daumy และคณะ, 1985) จึงอาจเรียกยาชนิดนี้ว่า อนุพันธ์ของกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก

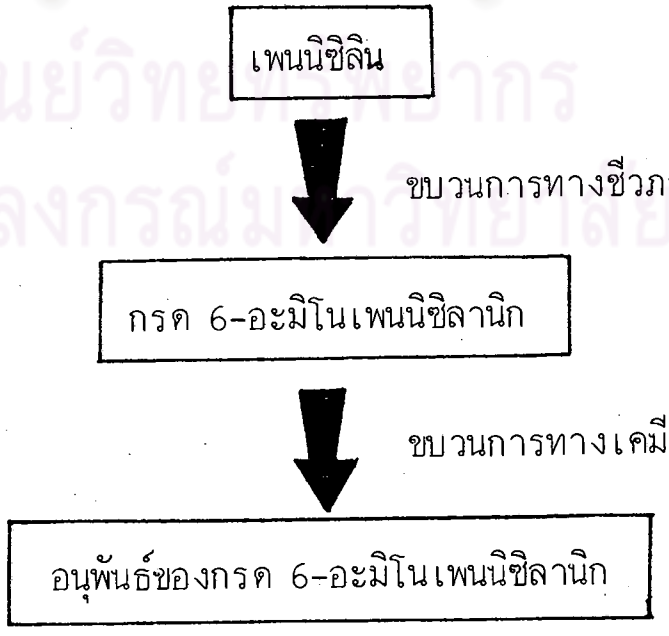
การศึกษาเพื่อสังเคราะห์ตัวยาเพนนิซิลินชนิดใหม่ ๆ ได้รับความสนใจตลอดมา จนกระทั่งในปีคศ. 1980 มีรายงานว่า สามารถผลิตอนุพันธ์ของกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกได้จำนวนมากถึง

รูปที่ 1 แผนผังขบวนการผลิตยาเพนนิซิลินใหม่

ก. วิธีสังเคราะห์ทางเคมี (Chemical synthetic method)

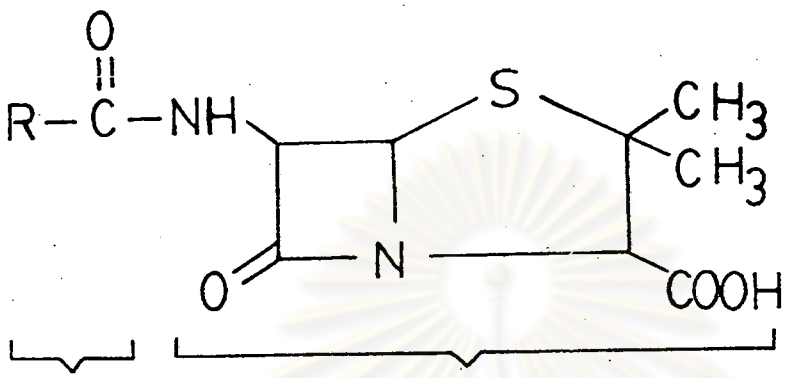


ข. วิธีกึ่งสังเคราะห์ (Semi-synthetic method)



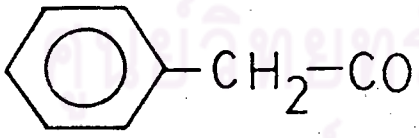
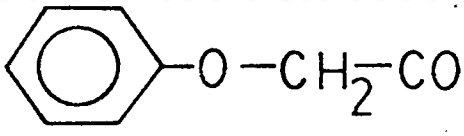
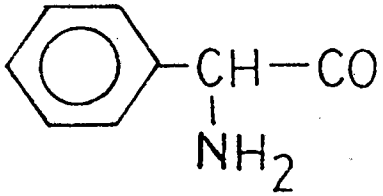
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 2 โครงสร้างของเพนนิซิลิน



หมู่ข้างเคียง (side chain)

กรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก (6-aminopenicillanic acid)

หมู่ข้างเคียง	ชื่อเพนนิซิลิน
R = 	เพนนิซิลิน จี (benzylpenicillin)
R = 	เพนนิซิลิน วี (phenoxymethypenicillin)
R = 	แอมพิซิลิน (D-α-aminobenzylpenicillin)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

25,000-30,000 ชนิด แต่ชนิดที่สามารถนำไปใช้เป็นยาในการรักษาได้มีเพียง 30-35 ชนิดเท่านั้น (Berdy, 1980) ซึ่งพัฒนาการของการค้นพบยาเพนนิซิลินและอนุพันธ์ของกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกได้แสดงไว้ในรูปที่ 3

1.2 การผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก

ในระยะแรกของอุตสาหกรรมการผลิตยาเพนนิซิลินชนิดใหม่ แหล่งของกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกได้จากวิธีหมักโดยตรง (Kato, 1953; Ballio และคณะ, 1959; Bachelor และคณะ; 1959) และวิธีทางเคมี(Johnson และคณะ, 1966) แต่ผลผลิตที่ได้ต่ำมาก

ในปีคศ. 1950 Sakaguchi กับ Murao (1950) ได้เสนอว่า Penicillium chrysogenum Q176 และ Aspergillus oryzae สามารถผลิตเอนไซม์ที่ไฮโดรไลซ์เพนนิซิลินเป็นสารชนิดหนึ่ง แต่ไม่มีการยืนยันว่าเป็นกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก จนกระทั่ง Ballio และคณะ (1959) ได้ทำการทดลองสนับสนุนว่า สารที่ได้จากการไฮโดรไลซ์เพนนิซิลินคือ กรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก และยังสามารถตกผลึกของกรดนี้ได้สำเร็จ (Claridge และคณะ, 1960; Huang และคณะ, 1960; Kaufmann และ Bauer, 1960; Rolinson และคณะ, 1960)

ปัจจุบันการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก สามารถทำได้ 2 ขบวนการ (Poulsen, 1984) คือ

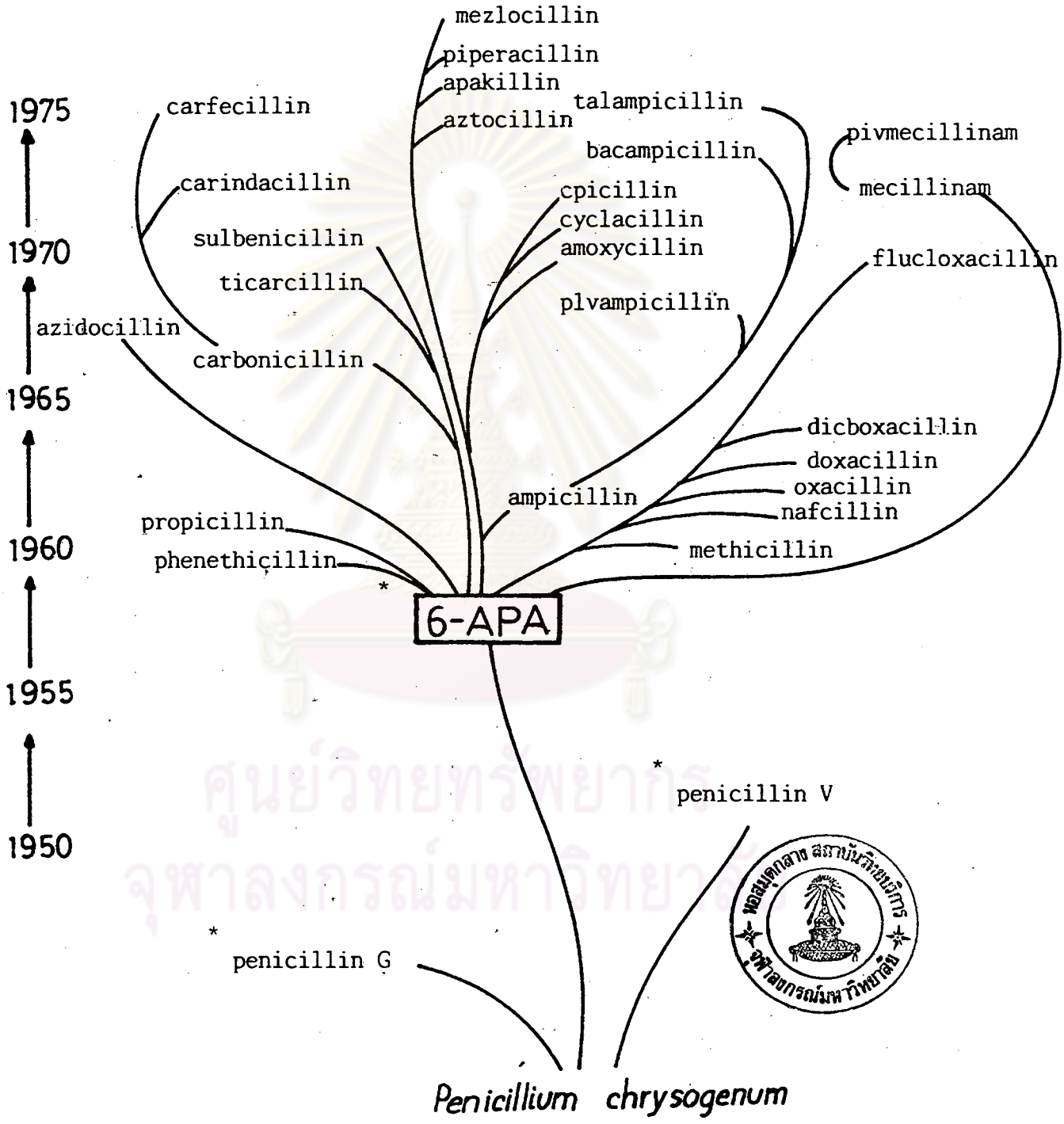
1.2.1 ขบวนการทางเคมี (chemical process)

โดยใช้เพนนิซิลิน จี หรือ วี เป็นวัตถุดิบ ขบวนการนี้ประกอบด้วยปฏิกิริยาหลายขั้นตอน (รูปที่ 4) ต้องมีการใช้สารละลายอินทรีย์ช่วยให้เกิดปฏิกิริยา ต้องควบคุมอุณหภูมิระดับต่ำมากที่ -40 องศาเซลเซียส และปฏิกิริยาจะเกิดได้ต้องปราศจากน้ำโดยเด็ดขาด ด้วยเหตุผลดังกล่าวนี้ ทำให้การผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกโดยขบวนการทางเคมีค่อนข้างยุ่งยาก ต้องการพลังงานและต้นทุนการผลิตสูง

1.2.2 ขบวนการทางชีวภาพ (biological process)

โดยใช้เพนนิซิลิน จี หรือ วี เป็นวัตถุดิบเช่นกัน แต่ว่าขบวนการนี้ประกอบด้วยปฏิกิริยาเพียงขั้นตอนเดียว (รูปที่ 5) โดยใช้เอนไซม์ซึ่งสามารถไฮโดรไลซ์เพนนิซิลิน เป็นกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก เรียกเอนไซม์นี้ว่า เพนนิซิลิน เอซิเลส

รูปที่ 3 วิวัฒนาการของสารประกอบเพนนิซิลินและอนุพันธ์ของกรด 6-อะมิโน-เพนนิซิลานิก ที่ผลิตและใช้ในการรักษา (Demand, 1981)



หมายเหตุ * ที่ตีกรอบเป็นสารประกอบที่ได้จากธรรมชาติ นอกนั้นเป็นสารประกอบที่เตรียมได้โดยวิธีสังเคราะห์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4 ขบวนการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก ทางเคมี(Poulsen, 1984)

Chemical process	pen $\xrightarrow{SiMe_2Cl_2}$ $(pen\text{-}COO)_2SiMe_2$ $\xrightarrow[base]{PCl_5}$ imidochloride $\xrightarrow[-40^oC]{n\text{-}BuOH}$ iminoether $\xrightarrow{hydrolysis}$ 6-APA

รูปที่ 5 ขบวนการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกทางชีวภาพ (Poulsen, 1984)

Enzymatic process	pen $\xrightarrow[\sim pH\ 7, 35^oC,\ 4\text{-}15\%\ w/v\ pen]{enzyme}$ 6-APA+side chain

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.3 เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส (penicillin acylase E.C. 3.5.1.11)

เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ไฮโดรไลซ์โมเลกุลของเพนนิซิลินที่ตำแหน่งพันธะเอไมด์ ซึ่งเชื่อมหมู่ข้างเคียงเอซิล (acyl side chain group) กับส่วนของโมเลกุลกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก ได้เป็น กรดคาร์บอกซีลิก กับกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก (รูปที่ 6)

เอนไซม์นี้มีชื่อเรียกหลายชื่อ เช่น เพนนิซิลิน อะมิเดส (Kaufmann และ Bauer, 1964) เพนนิซิลิน อะมิโดไฮโดรเลส (Vojtisck และ Slezak, 1975 a,b,c) แต่ชื่อที่นิยมเรียกกันมากที่สุดคือ เพนนิซิลิน เอซิเลส (Szentirmai, 1964; Levitov และคณะ 1967); Gang และ Shaikh, 1976; Mayer และคณะ, 1979; Daumy และคณะ, 1985)

1.3.1 ชนิดของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส

Vandamme และ Voets (1974 a;b และ 1975 a) ได้แบ่งประเภทของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสตามชนิดของเพนนิซิลินที่ถูกไฮโดรไลซ์ แบ่งเป็น 3 กลุ่มคือ

1.3.1.1 เพนนิซิลิน จี เอซิเลส (Benzylpenicillin acylase)

เป็นเอนไซม์ซึ่งไฮโดรไลซ์เพนนิซิลิน จี ได้ดีกว่าเพนนิซิลิน วี ส่วนใหญ่พบในแบคทีเรีย โดยเฉพาะสายพันธุ์เอสเคอริเคีย (Escherichia) และอัลคาลิจีนส์ (Alcaligenes) (Self และคณะ, 1969) นอกจากนี้ยังพบในราบางชนิด ตัวอย่างจุลชีพและคุณสมบัติของเอนไซม์เพนนิซิลิน จี เอซิเลส แสดงในตารางที่ 1 และ 2 (Vandamme, 1980)

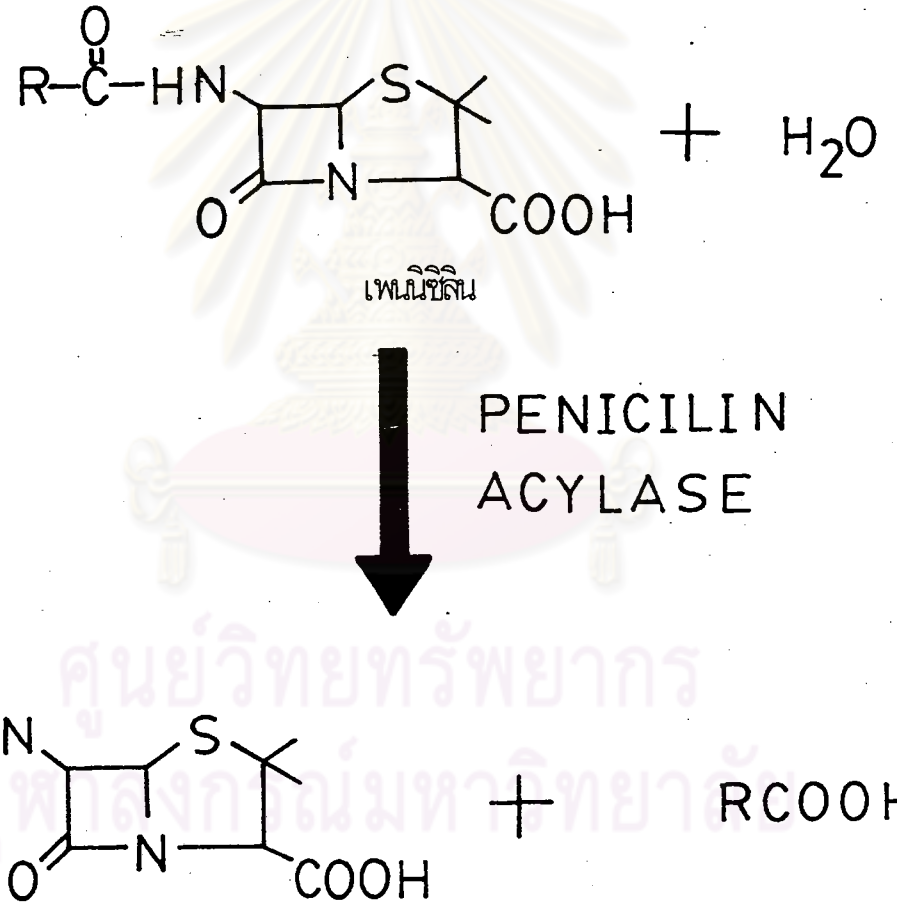
1.3.1.2 เพนนิซิลิน วี เอซิเลส (Phenoxymethylpenicillin acylase)

เป็นเอนไซม์ซึ่งไฮโดรไลซ์เพนนิซิลิน วี ได้ดีกว่าเพนนิซิลิน จี ส่วนใหญ่พบใน รา ยีสต์ แอคติโนไมซีส (Actinomyces) และแบคทีเรียบางชนิด ตัวอย่างจุลชีพและคุณสมบัติของเอนไซม์เพนนิซิลิน วี เอซิเลส แสดงในตารางที่ 3 และ 4 (Vandamme,1980)

1.3.1.3 แอมพิซิลิน เอซิเลส (Ampicillin acylase)

เป็นเอนไซม์ซึ่งไฮโดรไลซ์แอมพิซิลินได้ดี ปัจจุบันพบใน Pseudomonas melanogenum K.Y. 3987, K.Y. 4030, K.Y. 4031 (Nara และคณะ, 1972; Okachi และคณะ, 1973a,b) และ Pseudomonas ovalis K.Y. 3962 (Okachi และคณะ, 1973a,b; Okachi และ Nara, 1973; Shimizu และคณะ, 1975a,b) เท่านั้น

รูปที่ 6 ปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์เพนนิซิลินเป็นกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก ด้วยเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส (Vandamme, 1980)



เพนนิซิลิน

กรด 6-อะมิโนเพนนิซลานิก

กรดคาร์บอกซิลิก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 ตัวอย่างจุลชีพที่ผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน จี เอซิเลส (Vandamme, 1980)

Micro-organism	Reference
BACTERIA	
Rhodoseudomonas spheroides K.Y.4112	Nara et al, (1971a)
Pseudomonas aeruginosa K.Y.3591,K.Y. 8501	
Pseudomonas 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, (1965b)
Bordetella sp.	Huang et al, (1960)
Escherichia sp.	Rolinson et al, (1960), Gang and Shaikh (1976)
Escherichia coli A.T.C.C.9637	Kaufmann and Bauer (1960), Vojtisek and Slezak (1975a, b,c), Sato et al, (1976)
Escherichia coli N_y1/3-67	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	Sjöberg et al, (1967)
Escherichia coli N.C.I.B. 8743 (B.R.L. 1040) 8743A	Cole (1969a), Plaskie et al, (1978)
Escherichia coli A.T.C.C.11105 (N.C.I.B. 8878)	Bauer et al, (1971),Kutzbach and Rauenbusch (1974)
Escherichia coli XG3A9455	Claridge et al, (1963)
Escherichia coli OIII, B_4	Dulong de Rosnay et al,(1970)

Micro-organism	Reference
Escherichia coli N.C.I.B.8134,8878,8879, 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)
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 Bennett(1967)
Bacillus circulans	Abbott (1976)
Corynebacterium sp.,	Huang et al, (1963)
Cellulomonas sp.	
Arthrobacter sp.	Cole (1967)
Mycobacterium phlei	Claridge et al,(1960)
Nocardia 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.C.C.757 R.F.424,R.W.B.622,F.C.S.C.262,3a6A	Rossi et al, (1973)

ตารางที่ 2 คุณสมบัติของเอนไซม์เพนนิซิลิน จี เอซิเลส (Vandamme, 1980)

	Optimum pH value		Optimum temperature (^{o}C)	K_m Value (mM)	Molecular weight	Reference
	Hydrolysis	Synthesis				
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	7.7	-	Bondareva et al,(1969a,b)
(immobilized enzyme)	7.5	5	37	2.1	-	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)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

	Optimum pH value		Optimum temperature (^{o}C)	K_m Value (mM)	Molecular weight	Reference
	Hydrolysis	Synthesis				
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)
Proteus 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,(1965b)
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)
Sterptomyces ambofaciens						
S.P.S.L.-15	7.4	-	28	-	-	Nara et al,(1971a)
FUNGI						
Neurospora crassa	7.0	-	37	-	-	Rossi et al, (1973)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 ตัวอย่างจุลชีพที่ผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน วี เอซิเลส (Vandamme, 1980)

Micro-organism	Reference
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 51-20F3	Spencer and Maung (1970)
Penicillium B.R.L.807,B.R.L.733,736,737	Cole (1966)
Penicillium chrysogenum 50935,1951, 47-638,49-2166	Gatenbeck and Brunsberg(1968) Pruess and Johnson (1967)
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)
Cephalosporum C.M.I.49137	Claridge et al,(1963)
Cephalosporium acremontum A.T.C.C. 11550	Dennen et al,(1971)
Aspergillus niger	Vandamme et al,(1971a)
Aspergillus ochraceus B.R.L. 731	Cole (1966)
Epidermophyton interdigitale,Epider- mophyton floccosum B.R.L. 722 ,623	Uri et al,(1963,1964),Cole(1966)
Trichophyton gypseum, Trichophyton mentagrophytes B.R.L. 569,B.R.L.579	Uri et al,(1963,1964),Cole(1966)
Trichophyton interdigitale	
Alternaria,Epicoccum,Mucor,Phoma, Trichoderma spp.	Batchelor et al,(1961b)
Malbranchea pulchella	Rode et al,(1947),Kitano et al, (1974,1975)
Thermoascus,Gymmoascus and Polypaecilum spp.	Kitano et al,(1975)

Micro-organism	Reference
Botrytis cinerea	Batchelor et al, (1961b)
Fusarium sp. 75-5	Thadhani et al, (1972)
Fusarium avenaceum	Vanderhaeghe et al,(1968)
Fusarium semitectum	Waldschmidt-Leitz and Bretzel(1964)
Fusarium semitectum B.C.805	Baumann et al, (1971)
Giberella fujikuroi	Vasilescu et al, (1969)
Fusarium conglutinans A.Y.F.254 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,Zygosaccharomyes,Debaryomyces and Torula spp.,B.R.L.809	Cole (1966,1967)
Crytococcus,Saccharomyes and Inchosporon spp.	Batchelor et al, (1961b)
Rhodotorula gluttinis var. glutinis	Vandamme and Voets (1973)
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)
Streptomyes lavendulae B.R.L.198	Batchelor et al,(1961b)
Streptomyces netropsis 2814,Streptomyces erythreus J.A.4143	Haupt and Thrum (1967)
Streptomyces ambofaciens S.P.S.L.-15	Nara et al, (1971a)
Actinoplanes utahensis	Dennen et al, (1971)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 คุณสมบัติของเอนไซม์เพนนิซิลิน วี เอซิเลส (Vandamme, 1980)

	Optimum pH value		Optimum temperature (^{o}C)	K_m Value (mM)	Molecular weight	Reference
	Hydrolysis	Synthesis				
MOULDS						
Penicillium chrysogenum Wis. 49408	8.5	6.8	30	-	-	Erickson and Bennett(1965)
Penicillium chrysogenum P5009						
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 mentagrophytes 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.E.255	8	-	28	5.75	-	Vandamme et al,(1971a)
Fusarium semiteclum						
(intact cells)	7.5	-	-	2.50-2.75		Brandl (1965,1972)
(enzyme)	8	-	50		65,000	Waldschmidt-Leiz and Bretzel (1964)

013467

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

	Optimum pH value		Optimum temperature (°C)	K_m Value (mM)	Molecular weight	Reference
	Hydrolysis	Synthesis				
Fusarium semitectum						
B.C.805(enzyme)	7.5	-	37	4.75	67,000	Baumann et al,(1971)
Pleurotus ostreatus	8	-	50	-	-	Brandl (1965)
Bovista plumbea (enzyme)	7.5	-	52	1.67	80,000	Schneider and Röhr(1976)
YEASTS						
Rhodotorula glutinis	6.5	-	28	5.1	-	Vandamme and Voets(1973)
BACTERIA						
Achromobacter B.R.L.1755	-	-	-	-	-	Cole (1964)
Erwina arvideae (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.I.,198	9	-	28	10.3	-	Batchelor et al,(1961b)
Streptomyces erythreus J.A.4143						
Streptomyuces 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	-	-	

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในจำนวนเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดนี้ เอนไซม์ที่มีการศึกษาค้นคว้ากันมากที่สุดคือ เอนไซม์เพนนิซิลิน จี เอซิเลส ทั้งนี้ด้วยเหตุผลว่า เป็นเอนไซม์ซึ่งมีความจำเพาะต่อสับสเตรทกว้าง (Kaufmann และ Bauer, 1960; Sikyta และ Slezak, 1964; Levitov และคณะ 1967; Cole, 1969 a; b; Marconi และคณะ, 1973; Rossi และคณะ,1977; Margolin และคณะ, 1980; Daumy และคณะ, 1985) และเพนนิซิลิน จี เป็นสารซึ่งหาได้ง่ายในท้องตลาดอีกทั้งยังมีราคาถูกอีกด้วย

ในจุลชีพบางชนิด เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสสามารถเร่งปฏิกิริยาย้อนกลับ โดยการรีเอซิเลชั่น ทำให้เกิดการรวมตัวของกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก กับอนุพันธ์ของกรดคาร์บอกซิลิกชนิดต่าง ๆ ได้เป็นเพนนิซิลินชนิดใหม่ ๆ ในสภาวะที่เหมาะสม เช่น เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสจาก E.coli ATCC 9637 จะเกิดปฏิกิริยารีเอซิเลชั่นที่ pH 4.5 -5.5 (Bondareva และคณะ, 1969 b) เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส จาก E.coli N.C.I.B. 8743A สามารถเกิดปฏิกิริยารีเอซิเลชั่นได้ที่pH 5.0 (Cole, 1969 c; d) เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส จาก K.luyvera citrophila K.Y. 3641 และ K.Y. 7844 สามารถเร่งปฏิกิริยารีเอซิเลชั่นของกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกกับอนุพันธ์ของฟีนิลไกลซีน (รูปที่ 7) (Nara และคณะ, 1971 a;b และ 1972)

1.3.2 คุณสมบัติทั่วไปของเอนไซม์เพนนิซิลิน จี เอซิเลส

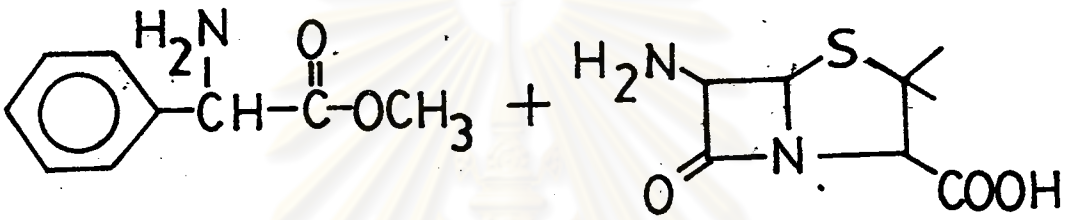
ถึงแม้จะมีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสตลอดมาเป็นเวลาเกือบ 3 ทศวรรษแล้วก็ตาม แต่ข้อมูลเบื้องต้นที่สำคัญบางอย่างของเอนไซม์และเซลที่เป็นแหล่งของเอนไซม์ก็ถูกปิดเป็นความลับ ทั้งนี้ด้วยเหตุผลการแข่งขันทางการค้าและอุตสาหกรรม (Balasingham และคณะ 1972; Vandamme, 1983) ข้อมูลเกี่ยวกับเอนไซม์เพนนิซิลิน จี เอซิเลส ที่ได้จากเซลแบคทีเรีย ซึ่งทราบกันทั่วไปอาจรวบรวมได้บ้าง ดังนี้ (Kaufmann และ Bauer, 1960; Szentirmai, 1964; Chiang และ Bannett, 1967; Cole, 1969 a, b, c, d; Bonderava และคณะ, 1969 a, b; Balasingham และคณะ, 1972; Kutzbach และ Rauenbusch, 1974; Gang และ Shaikh, 1976; Wojskowicz, 1981)

1. เอนไซม์ส่วนใหญ่เป็นชนิด intracellular เอนไซม์ยกเว้นในสายพันธุ์ Bacillus เป็น extracellular เอนไซม์

2. เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ที่ได้จากสายพันธุ์ Escherichia และ

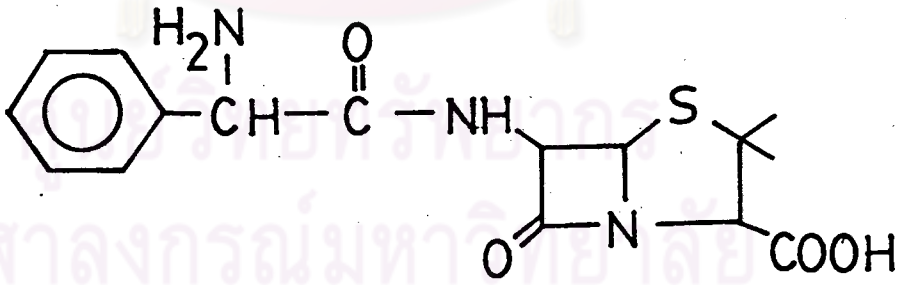
หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 7 ปฏิกิริยารีเอซิเลชันของเพนนิซิลิน เอซิเลส



D-Phenylglycinemathylester 6-Aminopenicillanic acid

PENICILLIN ACYLASE



Ampicillin

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Bacillus เป็นเอนไซม์ประเภทที่ต้องเหนี่ยวนำ (inducible enzyme) โดยใช้กรดฟีนิลอะซีติก เป็นสารเหนี่ยวนำ

3. การสร้างเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ในเชื้อแบคทีเรียจะเกิดได้ดี เมื่อเจริญเชื้อแบคทีเรียที่อุณหภูมิต่ำกว่า 31 องศาเซลเซียส

4. การสร้างเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส จะถูก catabolite repression ด้วยกลูโคสและคาร์โบไฮเดรตในอาหารเลี้ยงเชื้อ

5. การทำงานของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส จะถูกยับยั้งได้เมื่อใช้สับ-สเตรทความเข้มข้นสูง ๆ

6. กรดฟีนิลอะซีติก ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์เพนนิซิลิน จี สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส

7. กรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาการไฮโดร-ไลซ์เพนนิซิลิน จี สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส

1.4 <u>พัฒนาการของการใช้เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส เพื่อการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก</u>

การศึกษาความเป็นไปได้ของการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก โดยใช้เอนไซม์เพน-นิซิลิน เอซิเลส เริ่มต้นเมื่อปีคศ. 1960 โดยใช้เอนไซม์ในรูปของเซลอิสระ และเอนไซม์อิสระ (ตารางที่ 5)ในระยะเริ่มแรกนั้นได้ผลผลิตของกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกต่ำมาก (0.5-1 กิโลกรัมต่อน้ำหนักเปียกเซล 1 กิโลกรัม) นอกจากนี้การนำเซลหรือเอนไซม์อิสระไปใช้ในการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกในระดับอุตสาหกรรม ก็มีข้อเสียอื่น ๆ อีกหลายประการ เช่น

1. เอนไซม์หรือเซล จะใช้ได้เพียงครั้งเดียว ไม่สามารถนำกลับมาใช้ได้อีก

2. เอนไซม์ซึ่งสกัดแยกออกจากเซลแล้ว จะมีเสถียรภาพต่ำมาก ทำให้ต้องควบคุมสภาวะอย่างดี

3. เซลที่ใช้อาจมีเอนไซม์ชนิดอื่น หรือสารอื่นซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยาข้างเคียง เช่น มีเอนไซม์เบต้า-แลคแตมเมส ซึ่งสามารถไฮโดรไลซ์เพนนิซิลินได้ ทำให้ผลผลิตของกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกต่ำลง

ตารางที่ 5 ตัวอย่างการใช้เอนไซม์เพนนิซิลินเอซิเลสในรูปของเซลอิสระหรือเอนไซม์อิสระเพื่อผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก (Vandamme, 1980)

รูปแบบของเซล	คณะผู้วิจัย	ปี
Intact cell or mycelium	Rolinson และคณะ	1960
	Kaufmann และ Bauer	1960
	Cole และ Rolinson	1961
	Batchelor และคณะ	1961a
	Claridge และคณะ	1963
	Uri และคณะ	1963
	Erickson และ Bennett	1965
	Cole	1966
	Cole	1969a
	Nara และคณะ	1971a
Acetone-dried cell	Pruess และ Johnson	1965
	Haupt และ Thrum	1967
Lyophilized cell suspension in toluene-saturated buffer	Huang และคณะ	1963
Fungal spore suspension	Singh และคณะ	1969
	Vandamme และคณะ	1971a
Crude cell extracts	Claridge และคณะ	1963
	Vander haeghe และคณะ	1968
Extracted purified enzyme	Waldschmidt-Leitz และ Bretzel	1964
	Bondareva และคณะ	1969a,b
	Baumann และคณะ	1971
	Kutzbach และ Rauenbusch	1974
	Vandamme และ Voets	1974a,b
	Vandamme และ Voets	1975
	Shimizu	1975a,b
	Schneider และ Röhr	1976

4. ขั้นตอนการแยกผลิตภัณฑ์กรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก เป็นขั้นตอนที่ยุ่งยาก และสิ้นเปลืองมาก เพราะต้องแยกเซลหรือเอนไซม์ออกโดยการปั่นที่ความเร็วสูง และในกรณีที่ใช้เซลซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิด ทำให้กรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกที่ได้ไม่บริสุทธิ์

จากข้อเสียดังกล่าวนี้ แนวทางที่จะนำมาใช้เพื่อแก้ไขอาจทำได้โดยการแปรรูปของเอนไซม์หรือเซล ให้อยู่ในรูปแบบที่เหมาะสมกับการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกได้เปอร์เซนต์ผลผลิตสูงขึ้น ทั้งยังเป็นการเพิ่มความเสถียรของเอนไซม์อีกด้วย ทำได้โดยการตรึงเอนไซม์หรือการตรึงเซล (Chibata และคณะ, 197 ; Tosa และคณะ, 1974; Yamamoto และคณะ, 1976, 1977; Jack และ Zajic, 1977; Poulsen, 1984)

1.5 การตรึงเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส

เป็นการตรึงเอนไซม์ทั้งชนิด extracellular และ intracellular ในรูปของเอนไซม์อิสระโดยไม่มีเซล ที่ผลิตเอนไซม์รวมอยู่ด้วย การตรึงเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส อิสระทำได้มากมายหลายแบบ ซึ่งพอจะจำแนกตามวิธีการตรึงเอนไซม์ได้ดังต่อไปนี้

1.5.1 การตรึงเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ด้วยพันธะอิออนิก

วัสดุที่ใช้ตรึง (matrix) เอนไซม์มีหลายชนิด เช่น

- อนุพันธ์ของโพลีแซคคาไรด์ เช่น DEAE-เซลลูโลส (Lilly, และคณะ, 1972; Warburton และคณะ, 1972)

-สารโพลีเมอร์สังเคราะห์ เช่น เรซินแอมเบอร์ไรท์-XAD (Carleysmith และคณะ, 1980)

พันธะอิออนิกอาจเกิดระหว่างเอนไซม์กับวัสดุที่ตรึงโดยตรง หรือโดยมีอิออนของโลหะบางชนิดรวมอยู่ด้วยเช่น Cu (II), Co (II) และ Ni (II) เรียกว่าพันธะโค-ออดิเนชั่นอิออนิก

ในบางครั้งก่อนจะนำเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสมาตรึง จำเป็นต้องเปลี่ยนโครงสร้างเอนไซม์บางส่วนเสียก่อน เช่น เติมกลุ่มเอซิล โดยทำปฏิกิริยาด้วยซัคซินิก แอนไฮไดรด์ (Kamogashino และคณะ, 1972) เป็นต้น

1.5.2 การตรึงเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ด้วยพันธะโควาเลนท์

สามารถเชื่อมเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส กับวัสดุตรึงโดยใช้สารพวก bi หรือ multifunctional reagentเช่น กลูตารัลดีไฮด์, ไซยานูริก คลอไรด์ ฯลฯ ได้อีกด้วย (Boemer และคณะ,1973)

สภาวะที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีนี้ ค่อนข้างรุนแรง ถึงแม้พันธะโควาเลนท์จะทำให้การยึดระหว่างเอนไซม์กับวัสดุตรึงแข็งกว่าพันธะอิออนิกก็ตาม แต่จะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง และบริเวณเร่งของเอนไซม์ ทำให้มีโอกาสสูญเสีย แอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสได้สูง (Chibata, 1978)

1.5.3 การตรึงเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส โดยวิธี Crosslinking (Amotz, 1974)

เป็นการเชื่อมโมเลกุลของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส เข้าด้วยกันเป็นกลุ่มก้อน โดยใช้สารพวก bi หรือmultifunctional reagent เป็นตัวเชื่อมโดยตรง เช่น กลูตารัลดีไฮด์, เฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน ฯลฯ วิธีนี้ไม่ค่อยเหมาะสมกับการตรึงเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส มากนัก

1.5.4 การตรึงเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส โดยวิธีกักขัง (entrapping method)

โดยขังเอนไซม์ไว้ในเยื่อบาง ๆ หรือร่างแหที่มีพื้นที่จำกัด ซึ่งวิธีนี้จะไม่มีพันธะใด ๆ เกิดขึ้นเลย แบ่งได้เป็น 2 แบบ คือ

1.5.4.1 แบบ Lattice (Marconi และคณะ, 1975; Brandl Knauseder, 1975)

เป็นการขังเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสไว้ในร่างแหของวัสดุตรึงที่ไม่ละลายน้ำ เช่น โพลีอะคริลลาไมด์เจล, (Ekström และคณะ, 1974) หรืออนุพันธ์เซลลูโลสที่ใช้อยู่มี 3 ชนิดคือ เซลลูโลสไตรอะซีเตต, เซลลูโลสอะซีเตต และไนโตรเซลลูโลส

1.5.4.2 แบบ Microcapsule (Hammer และ Lozonov, 1978)

เป็นการหุ้มเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ไว้ใน Semipermeable

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

polymer membrane วิธีนี้ทำยากและต้องควบคุมสภาวะในการเกิดปฏิกิริยาอย่างดี ใช้ตรึงเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสไม่ได้ผลดีนัก

ตัวอย่างการตรึงเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ด้วยวิธีต่าง ๆ แสดงในตารางที่ 6

1.6 การตรึงเซลที่ผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส

ในราวปีคศ. 1970 เทคนิคการตรึงเซลได้รับความสนใจอย่างกว้างขวาง เนื่องจากสามารถตัดขั้นตอนการสกัดแยกและทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ออกได้ และยังสามารถใช้ได้ดีกับเอนไซม์พวก multienzyme และเอนไซม์ที่ต้องการ cofactor ในการเร่งปฏิกิริยา (Abbott, 1976; Vandamme, 1976; Jack และ Zajic, 1977, Chibata กับ Tosa, 1977; Brodelius, 1978; Cheetham และคณะ, 1979; Zurkova และคณะ, 1983)

วิธีตรึงเซลที่ผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ซึ่งนิยมใช้กันมี 3 วิธีคือ

1.6.1 วิธีตรึงเซลแบบ Carrier binding

เซลซึ่งผลิตเพนนิซิลิน เอซิเลส จะถูกตรึงบนวัสดุตรึงโดยใช้สารพวก bifunctional reagent เช่น กลูตารัลดีไฮด์ เป็นตัวเชื่อม

วัสดุตรึงที่ใช้เป็นสารจำพวก เจลาติน, โคโพลีเมอร์ ของเมทธาคริลเลต (Zurkova และคณะ, 1983), อนุพันธ์ของโพลีเอทธิลลีนอิมมีน, แอมเบอร์ไรท์ XAD-2 หรือ XAD-7 เป็นต้น ซึ่งสามารถตรึงเซลที่ผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส แอคติวิตีสูง และใช้ในเครื่องชีวปฏิกรณ์ (bioreactor) ระดับอุตสาหกรรมได้ดี (Vojtisek, และคณะ, 1983)

1.6.2 วิธีตรึงเซลแบบ Cross linking (Vojtisek และคณะ, 1979)

โดยการเชื่อมเซลซึ่งผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส เข้าด้วยกันโดยตรง โดยใช้สารจำพวก bifunctional reagent เช่น กลูตารัลดีไฮด์เป็นตัวเชื่อม ทำให้ได้กลุ่มก้อนของเซล ซึ่งมีความคงตัวสูงขึ้น

ในบางกรณีหากมีผนังเซลของจุลชีพชนิดอื่น เช่น ผนังเซลของ B.megaterium อยู่ด้วย กลูตารัลดีไฮด์จะช่วยทำให้เซล E.coli เกิดการจับกันเองได้ดีขึ้น

และบางครั้งอาจเพิ่มความแข็งของเซลที่ตรึงได้ โดยใช้สารพวก mutti-functional reagent มากกว่า 2 ชนิด ในการจับกันของเซล

ตารางที่ 6 ตัวอย่างการใช้เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสในรูปแบบของเอนไซม์ตรึง (immobilized enzyme) เพื่อผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก

แหล่งของเอนไซม์	วิธีตรึงเอนไซม์	คณะผู้วิจัย	ปี
E.coli	Chemical link to derivative of cellulose	Self และคณะ	1969
E.coli	Entrapment in cellulose triacetate fibres	Marconi และคณะ	1973
E.coli	Coupled to polysaccharide (cyanogen bromide-activated SephadexG100/ polyacrylamide	Ekstrom และคณะ	1974
E.coli	Coupled to a poly-methacrylate resin (XAD-7) with glutaraldehyde and hexamethylenediamine	Carleysmith และคณะ	1980
-	Copolymers containing acrylamide and maleic acid anhydride	H. per	1973
-	Coupled to a resin with glutaraldehyde	Savidge และคณะ	1974
Bacillus circulaus	enzyme acylated with succinic anhydride (Succinoylated) and adsorb to DEAE-Sephadex	Otzuka Seiyaku Company	1972

1.6.3 วิธีตรึงเซลแบบกักขังเซล (entrapping)

โดยใช้ร่างแหของสารจำพวกโพลีเมอร์ ที่นิยมใช้กันอยู่มี 3 จำพวก คือ

1.6.3.1 โพลีเมอร์ที่เป็นเจล

วัสดุตรึงเซลที่ใช้ เช่น โพลีอะคริลลาไมด์ และวุ้น สามารถเพิ่ม Strength และเสถียรภาพของเซลที่ถูกตรึง โดยใช้สารพวก bi หรือ multifunctional reagent ซึ่งจะทำให้เกิดการเชื่อมกันระหว่างเซลกับเซล หรือเซลกับเจลอีกส่วนหนึ่งด้วย

ปัจจุบันวิธีการตรึงเซลที่ผลิตเพนนิซิลิน เอซิเลส ด้วยสารโพลี-เมอร์ที่เป็นเจลกำลังได้รับความนิยมอย่างสูง

1.6.3.2 โพลีเมอร์พวกเรซินอีพอกซี

วัสดุตรึงเซลที่ใช้เช่น Epikote DX225 (Klein กับ Eng, 1979)เม็ดเจลเซลตรึงที่ผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส โดยสารพวกนี้จะมีรูปร่างไม่สม่ำเสมอ แต่จะมี porosity ต่อสับสเตรทเพนนิซิลินสูงกว่าโพลีเมอร์แบบเจล และทำได้ง่ายแต่มีข้อจำกัดที่วัสดุตรึงเซลพวกอีพอกซีหาซื้อได้ยากและราคาแพง

1.6.3.3 โพลีเมอร์ที่เป็นสารสังเคราะห์ชนิดอื่น ๆ

วัสดุที่ใช้ตรึงเซล เช่น เซลลูโลสอะซีเตต (Dinelli 1972) โพลียูรีเทนโฟม โมโนเมอร์ของไวนิลและไดไวนิล ฯลฯ (Klein และคณะ, 1981; Chiang และ Wang; 1982)

การตรึงเซลที่ผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส โดยวิธีนี้ต้องใช้สภาวะที่ค่อนข้างรุนแรง จึงต้องมีการปรับเปลี่ยนลักษณะของผนังเซลของจุลชีพก่อนตรึง ทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ต้องสูญเสียไปมาก

ตัวอย่างเทคนิคการตรึงเซลที่ผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ด้วยวิธีการต่าง ๆ ได้แสดงไว้ในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ตัวอย่างการใช้เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ในรูปแบบของเซลตรึง (immobilized cells) เพื่อผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก

ชนิดของเซล	วิธีตรึงเซล	คณะผู้วิจัย	ปี
E.coli	entrapment in wet spun cellulose triacetate fibre	Dinelli	1972
E.coli	entrapment in polyacrylamide	Sato และคณะ	1976
E.coli	Suspension polymerization (vinylpolymer); entrapment in porous epoxy resins	Klein และคณะ	1978
E.coli	entrapment in alginate	Klien และคณะ	1980
E.coli	entrapment in agar	Sun และคณะ	1980
E.coli	entrapment in crosslinked gelatin by glutaraldehyde	Park และคณะ	1982
E.coli	covalent bond on modified polymeric carriers	Zurkova และคณะ	1983
Proteus rettgeri	treated with glutaraldehyde and bound to glycidylmethacrylate polymer.	Nelson	1976

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โครงงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาขบวนการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก ด้วยเซลที่ถูกตรึง โดยการคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส สูงที่สุดในจำนวน 3 สายพันธุ์คือ E.coli ATCC 9637, ATCC 11105 และ S.rubidaea ATCC 181 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสได้ดี แล้วนำสายพันธุ์ที่คัดเลือกนี้ไปตรึงด้วยแคปปา-คาร์-ราจีแนน และวุ้น จากนั้นศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติทางกายภาพ เคมี และจลนศาสตร์ของเซลที่ถูกตรึง กับเซลอิสระ เพื่อจักได้สภาวะเหมาะสมในการเตรียมเซลให้อยู่ในรูปแบบที่เหมาะกับการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกแบบต่อเนื่องอันจะเป็นแม่แบบของการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

ขั้นตอนของการวิจัยมีดังต่อไปนี้

1. คัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสสูงที่สุดในจำนวน 3 สายพันธุ์คือ E.coli ATCC 9637, ATCC 11105, และ S.rubidaea ATCC 181

2. ศึกษาสภาวะเหมาะสมของการเจริญและการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกแล้ว

3. ศึกษารูปแบบและสภาวะของการตรึงเซลแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือกแล้ว โดยใช้แคปปา-คาร์ราจีแนนและวุ้น เพื่อให้ได้สภาวะการทำงานของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ในการผลิตกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิกที่เหมาะสม

4. ศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติทางกายภาพ เคมี และจลนศาสตร์ของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ในเซลที่ถูกตรึงกับเซลอิสระ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย