บทที่ 2

ทบทวนเอกสาร

Zymomonas และการผลิตแอลกอฮอล์

Zymomonas เป็นแบคทีเรียซึ่งจัดจำแนกตาม Bergey's Manual of Determinative Bacteriology เป็นพวกกรัมลบ รูปร่างเป็นแท่งปลายมน ขนาดกว้าง 1-1.4 ไมโครเมตร ยาว 2.6 ไมโครเมตร อยู่เดี่ยว ๆ หรือเป็นคู่ ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่โดยอาศัย lophotrichous flagella ไม่เจริญใน nutrient agar หรือ nutrient broth ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ แต่สามารถเจริญได้ในที่มีออกซิเจน สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสและฟรุ๊คโตสแล้วได้เอทธานอล Zymomonas ประกอบด้วย 2 สปีชีส์ คือ Z. mobilis และ Z. anaerobia โดยอาศัยความสามารถในการหมักน้ำตาล Z. mobilis จะได้ทั้งน้ำตาลกลูโคส ฟรุ๊คโตส และซูโครส ส่วน Z. anaerobia จะหมักได้เฉพาะน้ำตาลกลูโคส และฟรุ๊คโตส แต่ไม่สามารถหมักน้ำตาลซูโครส (Buchanan et al, 1974)

Zymomonas เป็นจุลินทรีย์ที่สำคัญชนิดหนึ่งสำหรับใช้ในการผลิตแอลกอฮอล์ในประเทศต่าง ๆ แบคทีเรียชนิดนี้สามารถแยกได้จากการหมักของน้ำหวาน agave sap ในประเทศเม็กซิโก หรือแยกได้จากการหมักของน้ำหวานจากพืชตระกูลปาล์มเช่น มะพร้าว ตาล ดังที่ได้ศึกษาค้นคว้าในประเทศไนจีเรีย และอินโดนีเซีย หรืออาจแยกได้จากน้ำอ้อย จะเห็นว่าเครื่องดื่มประเภทแอลกอฮอล์ของประเทศเขตร้อน เช่น ประเทศในอเมริกาใต้ อัฟริกา และเอเชีย จะได้จากการหมักโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์จากธรรมชาติซึ่งมีทั้งยีสต์ และแบคทีเรีย Zymomonas อยู่ด้วย สำหรับในประเทศยุโรป การหมักแอลกอฮอล์ประเภทเครื่องดื่มนั้นจะหมักโดยใช้ยีสต์และชนิดที่ใช้มากคือ Saccharomyces แต่ Zymomonas นั้นพบว่าเป็นแบคทีเรียที่ทำให้เบียร์และน้ำแอปเปิลเสียโดยการทำให้เกิดกลิ่นผิดปกติ ดังนั้นจึงได้มีการแยก Zymomonas จากเบียร์ที่เสียมาศึกษา

Zymomonas ผลิตแอลกอฮอล์ได้เช่นเดียวกับยีสต์ แต่การผลิตแอลกอฮอล์โดย Zymomonas sp. นั้นจะผ่าน Entner-Doudoroff Pathway ส่วนยีสต์นั้นจะได้จาก Embden-Meyerhof-Parnas Pathway Zymomonas ผลิตแอลกอฮอล์ได้ 1.8-1.9 โมลต่อน้ำตาลกลูโคส 1 โมล ในสภาพที่ปราศจากออกซิเจนถ้าปริมาณของออกซิเจนที่เพิ่มขึ้นการเกิดเอทธานอลจะลดลง (Swings and DeLey, 1977)

จากการวิจัยการผลิตแอลกอฮอล์โดยใช้ Z. mobilis เปรียบเทียบกับ S. carlsbergensis พบว่า Z. mobilis เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส 10-25 % แบบหมักครั้งคราวสามารถเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอทธานอลได้อย่างรวดเร็ว และมีอัตราการใช้น้ำตาลกลูโคสพร้อมกับการผลิตแอลกอฮอล์ได้สูงกว่ายีสต์ แต่ชีวมวล (biomass) ที่เกิดขึ้นต่ำกว่ายีสต์ นอกจากนี้ยังพบว่าการหมักแอลกอฮอล์แบบต่อเนื่องโดย Z. mobilis นั้นมีประสิทธิภาพในการผลิตแอลกอฮอล์ได้สูงถึง 120 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง ซึ่งสูงกว่ายีสต์ นอกจากนี้ในการใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบเพื่อผลิตแอลกอฮอล์โดย Z. mobilis ZM4 พบว่าการใช้กากน้ำตาลจะมีการยับยั้งการเจริญและการผลิตแอลกอฮอล์ เนื่องจากในกากน้ำตาลมีความเข้มข้นของ K^+, Mg^{++} และ Cl^- อิออนสูง แก้ปัญหานี้โดยทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของ Z. mobilis ZM4 หลาย ๆ ครั้งด้วย nitrosoguanidine และเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกากน้ำตาลในปริมาณที่สามารถยับยั้งการเจริญของสายพันธุ์เดิม พบว่ามีมิวแตนท์ (mutant) ที่สามารถเจริญได้ในอาหารชนิดเดียวกันนี้ และมีมิวแตนท์ 1 สายพันธุ์ คือ Z. mobilis ZM 482 สามารถเจริญและผลิตแอลกอฮอล์ในกากน้ำตาลได้เร็วเท่า ๆ กับสายพันธุ์เดิม (Roger et al, 1984)

การใช้น้ำตาลซูโครสของ Z. mobilis จะมีการผลิตลีแวน (levan) ขึ้นทำให้อาหารขุ่น และผลิตเอทธานอลได้น้อยลงกว่าการใช้น้ำตาลกลูโคส แต่ก็เป็นที่น่าสนใจเพราะวัตถุดิบที่มีน้ำตาลซูโครสเช่น น้ำอ้อย กากน้ำตาล มีราคาถูก (Skotnicki et al, 1981)

Z. mobilis ATCC 10988 ทำให้กลายพันธุ์ด้วย nitrosoguanidine และ ethyl methanesulfonate (EMS) ได้มิวแตนท์ที่ทนและเจริญที่อุณหภูมิ 38 °ซ มิวแตนท์สามารถหมักเอทธานอลได้มากพอ ๆ กับสายพันธุ์เดิม แม้จะผลิตได้ช้ากว่าสายพันธุ์เดิมที่หมักได้ดีที่อุณหภูมิ 30 °ซ (Berthelin et al., 1985)

การทำให้ Z. mobilis ATCC 39676 กลายพันธุ์ด้วย EMS จะได้มิวแตนท์ที่ไม่สามารถใช้น้ำตาลฟรุ๊คโตส (Fru$^-$) ได้ จึงนำมิวแตนท์นี้ไปใช้ในการผลิตน้ำเชื่อมฟรุคโตส (Fructose syrup) โดยมิวแตนท์จะสลายซูโครสได้ฟรุ๊คโตสกับกลูโคส แล้วถูกหมักเฉพาะกลูโคส ส่วนฟรุ๊คโตสก็ถูกสะสมแล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป (Suntinanalert et al, 1986)

Z. mobilis CM 141 ที่แยกได้จากน้ำอ้อย สามารถผลิตเอทธานอลได้ 15.6 % (V/V) ซึ่งมากกว่า Z. mobilis IFO 13756 และ Saccharomyces sake ซึ่งผลิตได้ 14.7 และ 12 % (V/V) ตามลำดับ และพบว่าการใช้ไฮดรอกซิลลามีน (hydroxylamine) ชักนำให้ Z. mobilis CM 141 กลายพันธุ์ จะได้มิวแตนท์ที่สามารถสร้างรงควัตถุสีแดงได้ และเจริญได้ในสภาพที่มีออกซิเจน (นงนุช, 2529)

ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย

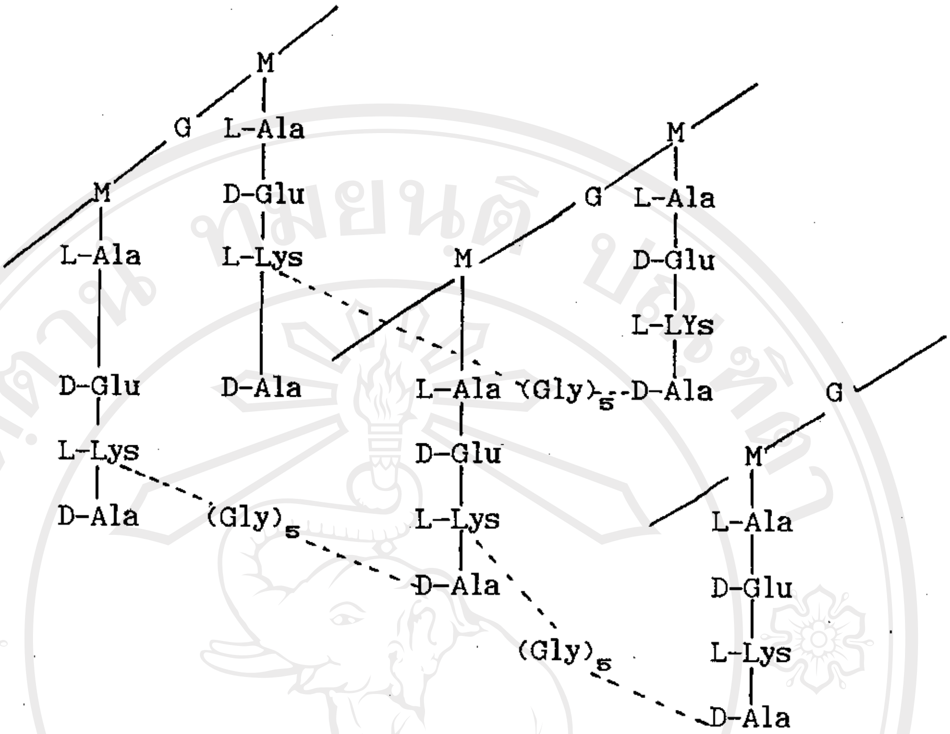
ภายในเซลล์ของแบคทีเรียจะมีความเข้มข้นของประจุต่าง ๆ และกระบวนการเมตาโบลิซึมสูงกว่าสิ่งแวดล้อมภายนอกเช่น สร้างพลังงานเพื่อสังเคราะห์สารโมเลกุลใหญ่ รวมทั้งใช้ในการเจริญและการแบ่งเซลล์ และเนื่องจากความเข้มข้นสูงภายในเซลล์นี้เอง ทำให้แรงดันออสโมติคภายในสูง ซึ่งเยื่อหุ้มเซลล์ไม่สามารถป้องกันได้ แต่เซลล์ก็ยังคงรักษารูปเดิม และทนต่อแรงดันออสโมติคสูง ๆ ภายในเซลล์ได้ เนื่องจากผนังเซลล์ที่แข็งแรงของแบคทีเรียนั่นเอง ผนังเซลล์ของแบคทีเรียมีส่วนประกอบโครงสร้าง และคุณสมบัติต่างจาก eucaryotic cell คือ มีความเหนียว ทนทานต่อแรงดันออสโมติค

มากกว่าเซลล์พืชและสัตว์ แรงดันออสโมติคภายในเซลล์แบคทีเรียมีประมาณ 5-25 เท่าของบรรยากาศ ทั้งนี้เพราะผนังเซลล์ประกอบด้วยโครงสร้างที่แข็งของ peptidoglycan (murein หรือ mucopeptide) ซึ่งเป็นสารประกอบโมเลกุลใหญ่เชิงซ้อน ที่มี N-acetylglucosamine กับ N-acetylamuramic acid เป็นแกนสำคัญ และ tetrapeptide side chains กับ peptide crossbridge เป็นส่วนประกอบ ส่วนที่เป็นแกนสำคัญนั้น พบในผนังเซลล์ของแบคทีเรียทุกชนิด (สายสมร, 2524) สำหรับเปปไทด์นั้นแตกต่างกันไปในแบคทีเรียแต่ละชนิด นอกจากส่วนสำคัญที่เป็นสาร peptidoglycan แล้วยังพบว่าผนังเซลล์ของแบคทีเรียทั่วไป มีส่วน ประกอบบางอย่างแตกต่างกัน และโดยวิธีย้อมสีแบบกรัม แบคทีเรียจะติดสีต่างกันเป็นสองพวกคือ (โสภณ และคณะ, 2524)

ก. ผนังเซลล์แบคทีเรียพวกกรัมบวก (gram positive cell wall) เช่น *Staphylococcus aureus* พวกนี้ผนังเซลล์หนาประมาณ 0.015-0.08 ไมโครเมตร ผนังเซลล์มีน้ำหนักประมาณร้อยละ 10-25 ของเซลล์ นอกจากส่วนสำคัญ peptidoglycan แล้วก็มี teichoic acid เป็นส่วนประกอบเพิ่มเติมในส่วนของ peptidoglycan ด้วย ชั้นนอกสุดของผนังเซลล์ก็เป็นชั้นโปรตีน หรือคาร์โบไฮเดรต

ข. ผนังเซลล์แบคทีเรียพวกกรัมลบ (gram negative cell wall) เช่น *Escherichia coli* พวกนี้ผนังเซลล์บางกว่าแบคทีเรียกรัมบวก ประกอบด้วย peptidoglycan ติดกับเยื่อหุ้มเซลล์ ถัดออกมาเป็นชั้นไลโปโปรตีน (lipoprotein) และชั้นไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) ส่วนนอกสุดเป็นชั้นโปรตีน หรือคาร์โบไฮเดรต

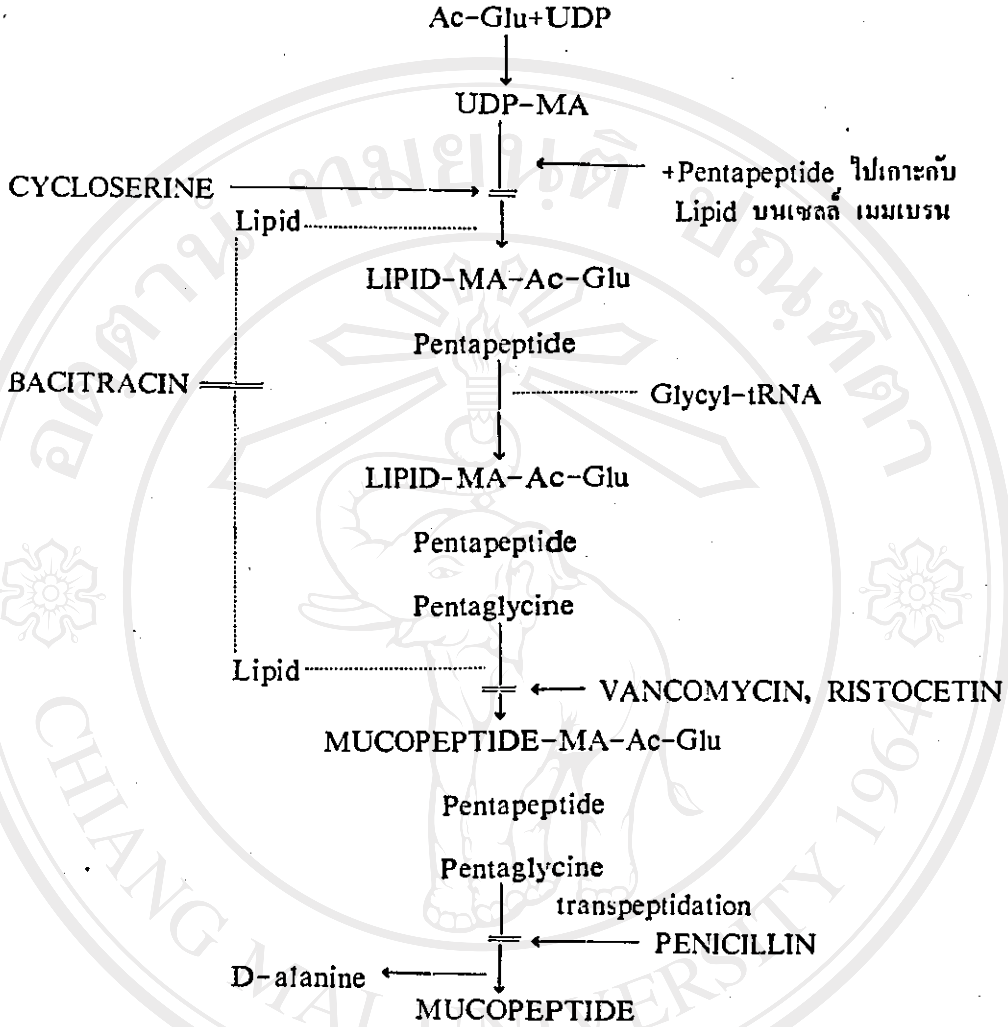
มีเอนไซม์ที่สามารถย่อยผนังเซลล์แบคทีเรียได้ คือ lysozyme (muramidase) เอนไซม์นี้ย่อยผนังเซลล์แบคทีเรียกรัมบวกได้ง่ายกว่า แบคทีเรียกรัมลบ ในภาวะปกติแบคทีเรียกรัมลบทนต่อ lysozyme นอกจากจะมีสารเคมีบางอย่างร่วมด้วย เช่น ด่าง และ chelating agent


M
G
L-Ala
D-Glu
L-Lys
D-Ala
M
L-Ala
D-Glu
L-Lys
D-Ala
(Gly)$_5$
M
G
L-Ala
D-Glu
L-LYs
D-Ala
M
L-Ala
D-Glu
L-Lys
D-Ala
(Gly)$_5$
(Gly)$_5$
G
M
L-Ala
D-Glu
L-Lys
D-Ala

แสดงโครงสร้างของ peptidoglycan ในผนังเซลล์ของแบคทีเรีย *S. aureus* สายของ glycan ประกอบด้วย N-acetylglucosamine (G) และ N-acetylmuramic acid (M) สายเปปไทด์ทั้ง 4 ที่ต่อกับ M แต่ละอันมี cross link ด้วยสะพานที่มี 5 glycine หมู่กรดอะมิโนทั้งสี่มีดังนี้ L-alanine (Ala), D-glutamine (Glu), L-Lysine (Lys), D-alanine (Ala) และ glycine (Gly) (สายสมร, 2524)

การสังเคราะห์ผนังเซลล์ (โสภณ และคณะ, 2524)

เมื่อแบคทีเรียเจริญเต็มที่แล้วจะเพิ่มจำนวนโดยการแบ่งตัว โดยที่ทุกส่วนของเซลล์จะต้องเปลี่ยนแปลงตามขบวนการที่เกิดขึ้นพร้อมกันไป ที่ผนังเซลล์มีการสังเคราะห์ peptidoglycan หรือ mucopeptide ซึ่งเริ่มต้นในไซโตพลาสซึมโดยเริ่มจาก Acetyl-glucosamine (Ac-Glu) ไปจับกับ uridine diphosphate (UDP) อาศัย p-enopyruvate และ reduction เกิดเป็นสาร UDP-muramic acid ต่อไปจะมีกรดอะมิโนต่าง ๆ เช่น L-alanine, D-isoglutamine, L-lysine, D-alanine ฯลฯ เข้ามารวมด้วยจนได้ 5 ชนิดเป็น UDP-MA-pentapeptide จากนั้น สารนี้จะไปเกาะกับไลปิด (lipid) ที่อยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ และได้รับโมเลกุล Ac-Glu และ pentaglycine จาก glycyl-tRNA จากหน่วยนี้จะถูกนำไปต่อกับ mucopeptide ของผนังเซลล์ซึ่งมีอยู่เดิม ระยะนี้ไลปิดจะถูกนำออกไปและไปใช้ใหม่ที่จุดเดิม และเมื่อเกิด cross-link ระหว่าง mucopeptide chain โดยกรดอะมิโนของ pentaglycine จะไปแทนที่กรดอะมิโนชนิดหนึ่งของ pentapeptide สารปฏิชีวนะที่ยังยั้ง การสังเคราะห์ผนังเซลล์ที่ใช้บ่อยคือ เพนิซิลลิน และอนุพันธ์อื่น ๆ รวมทั้ง cephalosporins จะไปยับยั้งปฏิกิริยา transpeptidation ทำให้เซลแบคทีเรียอยู่ใสภาวะที่มีผนังเซลล์ไม่สมบูรณ์


Ac-Glu+UDP
UDP-MA
CYCLOSERINE
+Pentapeptide ไปเกาะกับ
Lipid บนเซลล์ เมมเบรน
Lipid
LIPID-MA-Ac-Glu
Pentapeptide
BACITRACIN
Glycyl-tRNA
LIPID-MA-Ac-Glu
Pentapeptide
Pentaglycine
Lipid
VANCOMYCIN, RISTOCETIN
MUCOPEPTIDE-MA-Ac-Glu
Pentapeptide
Pentaglycine
transpeptidation
PENICILLIN
D-alanine
MUCOPEPTIDE

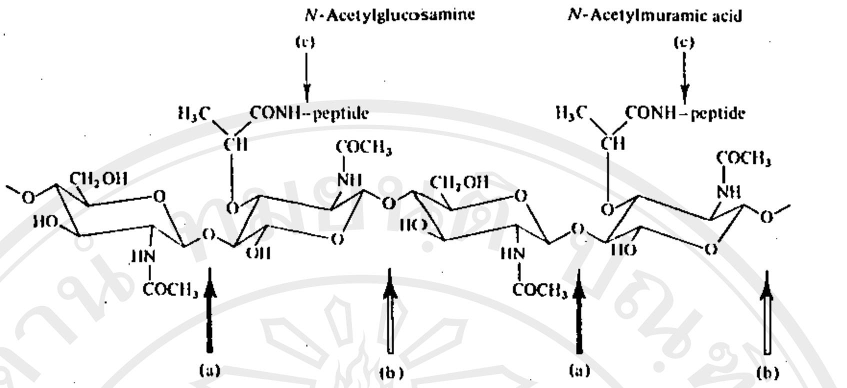
แผนภาพแสดงกระบวนการสังเคราะห์ผนังเซลล์ (โสภณ และคณะ, 2524)

Tsugita (1971) ได้รวบรวมรายงานเกี่ยวกับการค้นพบ lysozyme ว่าในช่วงแรกของปี ค.ศ.1915 มีการพบว่ามีสาร "lytic agent" ทำให้เซลล์ของ Staphylococci แตกสลายได้ โดยสารนี้ปล่อยออกมาจาก phage ที่เข้าไปอาศัยในเซลล์แบคทีเรีย เมื่อมีการเพิ่มจำนวน phage จะปล่อยสารนี้ออกมาย่อยสลายผนังเซลล์แบคทีเรียทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกสลาย และในปี ค.ศ.1922 Fleming ได้พบว่ามีสารชนิดนี้ในน้ำตาของคน และสามารถสลายเซลล์แบคทีเรียได้เช่นกัน จึงได้ตั้งชื่อว่า lysozyme หรือ lytic enzyme และในปี ค.ศ.1936 ก็มีการค้นพบ lysozyme จากไข่ขาวของไข่ไก่ (hen's egg white) ต่อมาก็มีผู้พบว่า phage หลายชนิดผลิตเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติเช่นเดียวกับ lysozyme ดังตารางที่ 1 และมีการเรียกชื่อต่าง ๆ เช่น lysin, muralysin, endolysin และ virolysin T_2 และ T_4 phage ผลิต lysozyme ชนิด endo-N-Acetylmuramidase ย่อยสลายผนังเซลล์ของ *E. coli* ได้ ในหอย (shellfish) ก็ผลิต lysozyme ได้ทำให้หอยป้องกันการติดเชื้อจากแบคทีเรียได้ในหอยชนิด *Mytilus edutis* จะมี lysozyme อยู่ในส่วนของต่อมสร้างน้ำย่อย (digestive gland) ได้มีการศึกษา lysozyme ในไข่ขาวของไข่ไก่อย่างละเอียด เพราะง่ายต่อการทำให้บริสุทธิ์ และพบว่าในไข่ขาว 1 มิลลิลิตร จะมี lysozyme อยู่ประมาณ 4 มิลลิกรัม

ตารางที่ 1 แสดง **lytic enzyme** ที่สร้างจาก **phage (Tsugita, 1971)**

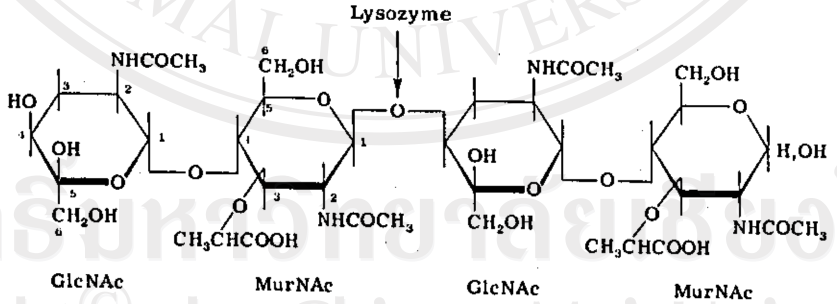
Host	phage	name	substrate specificity
E. coli	T_2	lysozyme	endo-N-Acetylmuramidase
E. coli	T_4	lysozyme	endo-N-Acetylmuramidase
group C streptococci	C_1	Muralysin	endo-N-Acetylglucosaminidase
	B_{56}	Muralysin	endo-N-Acetylglucosaminidase
S. aureus	P_1, P_{14}	Virolysin	Polysaccharide depolymerase

ตำแหน่งที่เอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยาต่อผนังเซลล์ เช่น endoacetylmuramidase ของ T_4 และ T_2 จะตัดพันธะ (bond) ระหว่าง N-acetylmuramyl-N-acetylglucosamine ส่วน endoacetylglucosaminidase จะตัดพันธะระหว่าง N-acetylglucosaminyl-N-acetylmuramic acid ส่วน Acetylmuramyl-L-alanine amidase จะตัดพันธะ acetylmuramyl-L-alanine แต่ถ้าเป็น lysozyme (muramidase) ของไข่ขาวจะตัด β-(1-4) glycosidic bond ระหว่าง N-acetylmuramic acid กับ N-acetyl glucosamine (Imoto et al., 1972)


N-Acetylglucosamine
N-Acetylmuramic acid
(c)
(c)
H3C
CONH–peptide
CH
COCH3
NH
CH2OH
O
HO
HN
COCH3
OH
(a)
(b)
(a)
(b)

A portion of peptidoglycan strand: (a) *endo-N*-acetylglucosaminidase, (b) *endo-N*-acetylmuramidase, and (c) *N*-acetylmuramyl-L-alanine amidase.

แสดงตำแหน่งที่เอนไซม์ย่อยสลาย peptidoglycan (Tsugita, 1971)


Lysozyme
NHCOCH3
CH2OH
HO
OH
CH2OH
O
CH3CHCOOH
NHCOCH3
H,OH
GlcNAc
MurNAc
GlcNAc
MurNAc

แสดงตำแหน่ง lysozyme ย่อยสลาย peptidoglycan (Imoto et al., 1972)

นอกจากในไข่ขาวไก่แล้ว lysozyme ยังพบในส่วนต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิตอื่นเช่น ไข่ขาวของเป็ด (duck egg-white lysozyme) ไข่ขาวของไก่งวง (turkey egg-white lysozyme) ไข่ขาวของนกกระทาญี่ปุ่น (japanese quail egg-white lysozyme) ไข่ขาวของห่าน (goose egg-white lysozyme) lysozyme จากคนเราเช่น จากต่อมน้ำนม (human milk) น้ำตา (tears) น้ำลาย (saliva) รก (placenta) เซรัมจากม้าม (spleen serum) และเม็ดเลือดขาวชนิด leukocytes ในกรณีคนป่วยเป็นมะเร็งในเม็ดเลือดขาว (leukemia) จะมีปริมาณ lysozyme ในเลือดมากรวมทั้งในน้ำปัสสาวะด้วย นอกจากนี้ยังพบว่ามีในม้ามหมู (rabbit spleen) และม้ามกระต่าย (dog spleen)

lysozyme ที่มาจากส่วนต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะเป็นสายของเปปไทด์ (peptide) ที่ประกอบด้วยชนิด ปริมาณ และลำดับ กรดอะมิโนแตกต่างกัน และในไข่ขาวของไก่จะมีชนิดและจำนวนกรดอะมิโน ดังนี้คือ (Imoto et al., 1972)

กรดอะมิโน	**จำนวนกรดอะมิโน**
Alanine (Ala)	12
Arginine (Arg)	11
Aspartic acid (Asp)	7
Asparagine (Asn)	14
Cysteine (Cys)	8
Glutamic acid (Glu)	2
Glutamine (Gln)	3
Glycine (Gly)	12
Histidine (His)	1

กรดอะมิโน	จำนวนกรดอะมิโน
Isoleucine (Ile)	6
Leucine (Lue)	8
Lysine (Lys)	6
Methionine (Met)	2
Phenylalanine (Phe)	3
Proline (Pro)	2
Serine (Ser)	10
Threonine (Thr)	7
Tryptophan (Trp)	6
Tyrosine (Tyr)	3
Valine (Val)	6
Total	129

เรียงลำดับกรดอะมิโนของ **lysozyme** ในไข่ขาวของไก่ (Imoto et al., 1972)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Lys	Val	Phe	Gly	Arg	Cys	Glu	Leu	Ala	Ala
11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Ala	Met	Lys	Arg	His	Gly	Leu	Asp	Asn	Tyr
21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Arg	Gly	Thr	Ser	Leu	Gly	Asn	Trp	Val	Cys

31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Ala	Ala	Lys	Phe	Glu	Ser	Asn	Phe	Asn	Thr
41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
Gln	Ala	Thr	Asn	Arg	Asn	Thr	Asp	Gly	Ser
51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
Thr	Asp	Tyr	Gly	Ile	Leu	Gln	Ile	Asn	Ser
61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
Arg	Trp	Trp	Cys	Asn	Asp	Gly	Arg	Thr	Pro
71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
Gly	Ser	Arg	Asn	Leu	Cys	Asn	Ile	Pro	Cys
81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
Ser	Ala	Leu	Leu	Ser	Ser	Asp	Ile	Thr	Ala
91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
Ser	Val	Asn	Cys	Ala	Lys	Lys	Ile	Val	Ser
101	102	103	104	105	106	107	108	109	110
Asp	Gly	Asn	Gly	Met	Asn	Ala	Trp	Val	Ala
111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
Trp	Arg	Asn	Arg	Cys	Lys	Gly	Thr	Asp	Val
121	122	123	124	125	126	127	128	129	
Gln	Ala	Trp	Ile	Arg	Gly	Cys	Arg	Leu	

Metcalf และ Deibel, 1969 พบว่าความเข้มข้นของ suspension มีผลต่อปฏิกิริยาของ lysozyme ที่มีต่อเชื้อ Streptococcus faecium โดยใช้ phosphate buffer และ NaCl เมื่อวัดค่า optical density (O.D.) ของ suspension ได้ผลดังตารางที่ 2 คือใน 0.06 M phosphate buffer ที่มี 0.09, 0.15 M NaCl ค่า O.D. ลดลง ส่วน 0.01 M phosphate buffer ที่มี 0.15 M NaCl ค่า O.D. ไม่เปลี่ยนแปลง และใน suspension อื่นที่นอกเหนือจากนี้ค่า O.D. จะเพิ่มขึ้น

ตารางที่ 2 ผลของสารละลายต่อปฏิกิริยาไลโซไซม์ที่มีต่อเชื้อ *Streptococcus faecium* (Metcalf และ Deibel., 1969)

suspending solution	NaCl (M)	optical density[a]
water[b]	–	increase
water	0.09	increase
water	0.15	increase
0.01 Mp buffer[c]	–	increase
0.01 Mp buffer	0.09	increase
0.06 Mp buffer	–	increase
0.01 Mp buffer	0.15	no change
0.06 Mp buffer	0.09	decrease
0.06 Mp buffer	0.15	decrease

a : วัดค่า O.D. หลังจากบ่มเชื้อเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

b : ค่า pH ของ suspension ในน้ำประมาณ 5.9

c : Serenson's phosphate buffer pH 7.0

การเติม NaCl ลงใน suspension ของ S. faecium ก่อนแล้วเติม lysozyme ทำให้ค่า O.D. ลดลงอย่างช้า ๆ และทำให้เชื้อในระยะ log phase เกิดการสลายเซลล์ได้มากกว่าเชื้อในระยะ stationary phase ในทางปฏิบัติตรงกันข้าม เมื่อเติม lysozyme ก่อนแล้วบ่มด้วยเวลาสั้น ๆ จึงเติม NaCl ภายหลัง ปรากฏว่าค่า O.D. ลดลงอย่างรวดเร็ว และระยะการเจริญของเชื้อไม่มีผลต่อการสลายเซลล์ การใช้ sodium lauryl sufate (SLS) แทน NaCl ก็จะได้ผลที่ไม่ค่อยแตกต่างกันเลย ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลของลำดับในการเติม lysozyme, NaCl หรือ sodium lauryl sulfate ต่อความขุ่นของ suspension ของ Streptococcus faecium (Metcalf และ Deibel., 1969)

variable and order of addition[a]		optical density at			
1	2	0 min	5 min	5.5 min	10 min
SLS[b]	H_2O	0.70	0.69	0.69	0.66
NaCl[c]	H_2O	0.70	0.68	0.66	0.64
LYS[d]	H_2O	0.70	1.18	1.15	1.15
NaCl	LYS	0.70	0.68	0.66	0.59
LYS	NaCl	0.70	1.16	0.04	0.02
H_2O	NaCl	0.70	0.70	0.70	0.64
H_2O	LYS	0.70	0.68	0.95	1.12
H_2O	SLS	0.70	0.70	0.68	0.67
SLS	LYS	0.72	0.70	0.68	0.64
LYS	SLS	0.72	1.18	0.03	0.02
H_2O	H_2O	0.72	0.70	0.68	0.60

a : ใน suspension 8 มิลลิลิตร เติมสารใน Column 1 แล้วบ่มเชื้อที่ 37 °ซ นาน 5 นาที แล้วจึงเติมสารใน Column 2 รีบวัดค่า O.D. เมื่อเวลาผ่านไป 5.5 นาที และ 10 นาที

b : เติมสารละลาย SLS 0.08 M ลงไป 1 มิลลิลิตร

c : เติมสารละลาย NaCl 4 M ลงไป 1 มิลลิลิตร

d : เติมสารละลาย lysozyme 0.2 % ลงไป 1 มิลลิลิตร

ผลของความเข้มข้นของ lysozyme ต่อความขุ่นของ suspension เชื้อ S. faecium พบว่าค่า O.D. จะลดลงเมื่อความเข้มข้น lysozyme เป็น 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า O.D. คงที่เมื่อความเข้มข้น lysozyme เท่ากับ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า O.D. จะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้น lysozyme มากกว่า 40 ไมโครกรัมต่อลิตร ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ความเข้มข้นของ lysozyme ต่อความขุ่นของ suspension ของ **Streptococcus faecium** (Metcalf และ Deibel., (1969)

Lysozyme concn µg/ml	Optical density at 0 min	 60 min	 120 min
0	0.55	0.58	0.54
10	0.56	0.38	0.24
20	0.57	0.38	0.28
40	0.64	0.54	0.53
60	0.60	0.85	0.90
100	0.62	1.02	1.04
120	0.60	1.00	1.00

ค่า O.D. ของ lysozyme-S. faecium ในน้ำจะลดลงเมื่อเติมเกลือ โดยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเกลือ และระยะเวลาในการบ่มเชื้อ พบว่าการใช้ 0.8 M NaCl จะทำให้ค่า O.D. ลดลงต่ำสุดในเวลา 14 นาที และในเวลา 20 นาที การใช้ 0.4 M NaCl ก็จะมีผลเช่นเดียวกัน ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 **ผลของความเข้มข้นของ NaCl ต่อการเปลี่ยนค่า O.D. ของ lysozyme-*S. faecium* ในน้ำที่เวลาต่าง ๆ (Metcalf และ Deibel., 1969)**

Time at 30°C	Optical density of cell-lysozyme mixture diluted in an equal volume of		
	0.8 M NaCl	0.4 M NaCl	Water
0[a]	0.33	0.30	0.28
0[b]	0.31	0.25	0.30
2	0.15	0.23	0.35
4	0.11	0.18	0.42
6	0.07	0.15	0.43
8	0.04	0.11	0.46
10	0.02	0.07	0.48
12	0.02	0.05	0.48
14	0.01	0.04	0.48
16	0.01	0.03	0.48
20	0.01	0.01	0.48

a : ก่อนเติม lysozyme ทันที

b : หลังจากเติม lysozyme ทันที

ผลของอุณหภูมิต่อการสลายเซลล์ของ *S. faecium* ที่ 0, 20, 30, 37 และ 50 °ซ พบว่าบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 และ 37 °ซ ทำให้เกิดการสลายเซลล์ได้สูงสุด

กรดเอธิลีนไดอะมีนเตตระอะซิติค (ethylenediamine tetraacetic acid)

มีชื่อย่อคือ EDTA มีสูตรเป็น $(CH_2COOH)_2-N-CH_2-CH_2-N-(CH_2COOH)_2$ เป็นสารประกอบอินทรีย์ ประเภทกรดอะมิโนโพลีคาร์บอกซิลิคที่มีคุณสมบัติเป็นกรดอ่อนและเป็น chelating agent สามารถเกิดอิออนเชิงซ้อนที่เสถียรกับอิออนโลหะหลายตัวที่เป็นสาเหตุของความกระด้างของน้ำ EDTA เตรียมได้จากการนำสารอะลิฟาติคไดอะมีนที่มีโครงสร้างง่ายที่สุดคือ เอธิลีนไดอะมีน (ethylenediamine) ทำปฏิกิริยากับกรดคลอโรอะซิติค (chloroacetic acid) จะได้สาร ethylenediaminetetraacetic acid โดยปกติ EDTA ละลายน้ำได้ยากเมื่ออยู่ในรูปเกลือไดโซเดียมของ EDTA หรือไดโปตัสเซียมของ EDTA จะละลายน้ำได้ง่ายขึ้น และเก็บสารละลายไว้ได้นานเป็นเดือน (ชัยวัฒน์, 2524)

$[CH_2.N(CH_2.COOH).CH_2.COOK]_2$ EDTA dipotassium salt

EDTA ถูกนำไปใช้ในการวิเคราะห์เคมีเกี่ยวกับการติเตรดโลหะ หรือดึงอิออนโลหะจากสารละลาย และจากดิน อิออนโลหะเชิงซ้อนเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า chelates chelates ในทางชีววิทยาเช่น Fe เชื่อมกับหมู่ porphyrin ของฮีโมโกลบิน Mg เชื่อมกับคลอโรฟิลของพืช ในทางการแพทย์ chelates ใช้ยับยั้งแบคทีเรียบางชนิด เชื้อรา และไวรัส Mg^{+2} ใน outermembrane ของแบคทีเรียกรัมลบสามารถดึงออกด้วย EDTA และ outermembrane layer สามารถสลายได้ใน Tris-HCl buffer ที่มี EDTA

การเตรียมโปรโตพลาสต์

คือ การเปลี่ยนเซลล์เป็นโปรโตพลาสต์โดยการลอกหรือทำลายผนังเซลล์ ทำให้เซลล์เหลือเพียงเยื่อหุ้มเซลล์ล้อมรอบไซโตพลาสต์ซึมอยู่ ถ้าการลอกหรือทำลายผนัง

เซลล์นั้นสมบูรณ์ผลที่ได้คือ โปรโตพลาสต์ แต่ถ้าการลอกหรือทำลายผนังเซลล์ไม่สมบูรณ์ผลที่ได้คือ สฟีโรพลาสต์ (spheroplast) วิธีเตรียมโปรโตพลาสต์ที่ดีที่สุดคือ การใช้ lytic enzyme ย่อยผนังเซลล์ lytic enzyme ที่ใช้ได้กับยีสต์มีหลายชนิดเช่น helicase, sulfatase, glusulase, zymolase และ mutanase ขึ้นอยู่กับยีสต์แต่ละชนิดว่าจะใช้เอนไซม์ชนิดใดจึงจะเหมาะสม ในแบคทีเรียจะใช้เอนไซม์ lysozyme ในการเตรียมโปรโตพลาสต์ของยีสต์ โปรโตพลาสต์เกิดได้ทันทีที่เซลล์ยีสต์สัมผัสกับเอนไซม์ ในฟันไจพวกเส้นสายมีผนังกั้นก็สามารถเกิดโปรโตพลาสต์เดี่ยว ๆ โดยใช้เอนไซม์ chitinase และ ß-glucanase เพราะผนังเซลล์ของพวกฟันไจส่วนใหญ่แล้วจะประกอบด้วยสารประกอบ พวก chitin และ glucan เป็นส่วนมาก แบคทีเรียพวกกรัมบวกการใช้ lysozyme อย่างเดียวก็สามารถสลายผนังเซลล์ได้โดยง่าย แต่ในแบคทีเรียพวกกรัมลบจะใช้ lysozyme ร่วมกับ EDTA จึงจะได้โปรโตพลาสต์หรือสฟีโรพลาสต์ ปัจจัยที่ทำให้เกิดโปรโตพลาสต์ในแบคทีเรียขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ lysozyme สภาพประจุ (ion condition) ภายนอกและภายในผนังเซลล์รวมทั้งอิทธิพลของ EDTA โปรโตพลาสต์จะถูกทำลายเมื่อมีการเปลี่ยนแรงดันออสโมติค และมีรูปร่างกลมเมื่ออยู่ใน hypertonic solution สารละลายดังกล่าวเรียกว่า protoplast buffer หรือ osmotic stabilizer ได้แก่ สารละลายน้ำตาล เช่น ซูโครส แลคโตส แรมโนส หรือน้ำตาลแอลกอฮอล์ เช่น แมนนิทอล ซอร์บิทอล กลีเซอรอล หรือสารละลายของเกลืออนินทรีย์ที่มีความเข้มข้นเหมาะสม เช่น โซเดียมคลอไรด์ ที่สำคัญ คือ เมื่อเติมลงไปแล้วจะต้องไม่ไปลดกิจกรรมของเอนไซม์ และไม่เป็นพิษต่อโปรโตพลาสต์ ปัจจัยหลายอย่างที่มีผลต่อการเปลี่ยนจากเซลล์ไปเป็นโปรโตพลาสต์ เช่น อายุของเชื้อโดยพบว่าทั้งเชื้อยีสต์และแบคทีเรีย ส่วนใหญ่อายุของเชื้อที่จะนำมาเตรียมโปรโตพลาสต์ได้ง่ายที่สุด เมื่ออยู่ใน exponential phase หรือ log phase องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อก็มีความสำคัญเนื่องจากทำให้องค์ประกอบของผนังเซลล์แตกต่างกันไป มีผู้พบว่าการเติมกรด

อะมิโนที่มีกำมะถันเป็นองค์ประกอบเช่น glycine ระหว่างการเลี้ยงเชื้อจะช่วยให้ผนังเซลล์ถูกทำลายโดย lytic enzyme ง่ายขึ้น ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ต่ำในอาหารเลี้ยงเชื้อก็จะเป็นผลดีต่อการเตรียมโปรโตพลาสต์

การรวมโปรโตพลาสต์

คือ การนำโปรโตพลาสต์ของเชื้อ 2 ชนิดมาทำให้หลอมรวมกันปกติจะทำโดยมี polyethyelene glycol (PEG) เป็นตัวช่วย PEG เป็นสารที่ช่วยกระตุ้นให้เกิดการหลอมรวมของโปรโตพลาสต์ พืช สัตว์ แบคทีเรีย เชื้อรารวมทั้งยีสต์ หน้าที่ของ PEG เชื่อว่าช่วยกระตุ้นให้เกิดการรวมกลุ่มของโปรโตพลาสต์ และหลอมรวมกันของเยื่อเซลล์ โดยเฉพาะในที่มีอนุมูลแคลเซียม นอกจากสาร PEG แล้ว ขณะนี้มีผู้พยายามให้กระแสไฟฟ้าเพื่อช่วยกระตุ้นให้เกิดการหลอมรวมกัน

การเปลี่ยนโปรโตพลาสต์กลับไปเป็นเซลล์

เมื่อโปรโตพลาสต์ของเชื้อ 2 ชนิดหลอมรวมกันแล้ว โปรโตพลาสต์ที่ได้จะถูกเปลี่ยนกลับไปเป็นเซลล์เพื่อให้มีการเพิ่มจำนวน และสร้างโคโลนีในที่สุด การเปลี่ยนกลับไปเป็นเซลล์เกิดได้โดยโปรโตพลาสต์นั้นสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ โดยปกติเมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสมโปรโตพลาสต์จะสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาอีกครั้งหนึ่ง ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมกับเชื้อแต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป โดยทั่วไปการเปลี่ยนจากโปรโตพลาสต์กลับไปเป็นเซลล์จะเกิดเมื่อเลี้ยงในอาหารแข็งที่มีเจลาติน (gelatin) หรือวุ้น อัตราการเปลี่ยนจากโปรโตพลาสต์กลับไปเป็นเซลล์ของเซลล์แต่ละชนิดก็จะแตกต่างกันไป (สาวิตรี, 2529)

Birdsell และ Cota-Robles (1967) พบว่าการเตรียมสฟีโรพลาสต์ของ *E. coli* B โดยการเติม lysozyme จะได้ plasmolized spheroplast ที่มีลักษณะเป็นแท่ง (rods) แต่เมื่อเติม EDTA ตามหลัง จะได้ spheroplast รูปร่างกลม เรียกว่า EDTA-lysozyme spheroplast เชื่อว่า EDTA ไปสลายส่วนผนังชั้นนอก

ที่มี lipopolysaccharide และ lipoprotein เป็นส่วนประกอบ การทำ Thin sections แสดงให้เห็นว่า ผนังชั้นนอกถูกทำลายและเปิดเป็นช่องโหว่บริเวณกว้าง ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์สัมผัสสิ่งแวดล้อม สฟีโรพลาสต์ของแบคทีเรียกรัมลบนำมาใช้ในการศึกษาการปล่อยเอนไซม์ การสะสมสารจากเมตาโบลิซึม การแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ สฟีโรพลาสต์ไวต่อแรงดันออสโมติค จึงป้องกันการแตกโดยให้อยู่ใน hypertomic solution การเติม EDTA อย่างเดียวทำให้ผนังถูกทำลายได้บางส่วน แต่เซลล์ยังคงรูปร่างเดิม เรียกเซลล์นี้ว่า "ghosts" การเจือจาง lysozyme-sphero-plast ลงเป็น 1:1 ด้วยน้ำกลั่น ทำให้ความเข้มข้นของ hypertonic solution ลดลงแล้วมีผลทำให้เกิด EDTA-lysozyme spheroplast ได้มากขึ้น

การที่จะยืนยันว่าโปรโตพลาสต์ที่ได้ เซลล์ถูกลอกผนังเซลล์ออกหมดหรือไม่ สามารถศึกษาได้โดยการทำ Thin-section นำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน Weiss (1976) สามารถเตรียมโปรโตพลาสต์ของ *E. coli* ML.30 ได้โดยใช้ Tris-HCl buffer ที่มีซูโครส 20 % (TBS) pH 8.0 ทำ suspension ของเชื้อ เติม lysozyme แล้วคนด้วย magnetic stirrer จากนั้นเติม dipotassium ethylenediamine tetraacetic acid (K_2 EDTA) pH 7.0 ค่อย ๆ เติมอย่างช้า ๆ จะได้เซลล์โปรโตพลาสต์ถึง 90 % มีเหตุผลที่น่าสนับสนุนในการเกิดโปรโตพลาสต์ของ *E. coli* ML.30 ซึ่งเป็นแบคทีเรียกรัมลบก็คือ อัตราส่วนระหว่างเอนไซม์กับเชื้ออาจมีความเหมาะสมที่จะลอกผนังเซลล์ออก และสภาพอุณหภูมิที่คงที่ รวมทั้งการเปลี่ยนแรงดันออสโมติคอย่างช้า ๆ ในขณะที่เติม EDTA ก็อาจจะเป็น กลไกที่ทำให้ผนังเซลล์หลุดออก

Okamoto et al (1983) พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อของ *Streptococcus lactis* MJ.708 เมื่อเติมกรดอะมิโน DL-threonine ลงไปด้วย จะทำให้เซลล์ถูกย่อยผนังเซลล์ได้ง่ายกว่าการเติม glycine และความเข้มข้นสุดท้ายของ lysozyme 30

ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้ค่า O.D. ของ suspension ลดลงมากที่สุด และถ้าใช้ lysozyme 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ร่วมกับ α-amylase 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าค่า O.D. ของ suspension ลดลงอย่างรวดเร็ว จึงนำปัจจัยที่เหมาะสมนี้ไปใช้ในการเตรียมโปรโตพลาสต์ของเชื้อ *S. lactis* ใน TBS ส่วนการเปลี่ยนโปรโตพลาสต์กลับไปเป็นเซลล์ ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารประกอบด้วย tryptone 10 กรัม yeast extract 5 กรัม, glucose 10 กรัม, gelatin 25 กรัม, sucrose 200 กรัม, $CaCl_2$ 2.5 mM, $MgCl_2$ 2.5 mM และ agar 25 กรัม ละลายใน TB 1000 มิลลิลิตร pH 6.8 สามารถเปลี่ยนโปรโตพลาสต์กลับไปเป็นเซลล์ 3 ถึง 10 %

Ogata et al (1984) พบว่าการเตรียมโปรโตพลาสต์ของเชื้อ *Streptomyces azureus*, *S. endus* และ *S. coerulescens* โดยใช้สปอร์เพาะเชื้อตั้งต้นจะได้เส้นใย นำไปทำ suspension ใน TBS แล้วเติม lysozyme 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะได้โปรโตพลาสต์ใน 1 ชั่วโมง เมื่อเปลี่ยนโปรโตพลาสต์กลับไปเป็นเซลล์ในเชื้อ *S. azureus* และ *S. endus* เกิด 40 % ในขณะที่ *S. coerulescens* เกิด 1 % เท่านั้น

Lee-Wickner และ Chassy (1984) ได้ทำการเตรียมโปรโตพลาสต์ใน *Lactobacillus casei* ATCC 383, ATCC 4646, ATCC 11578 พบว่าสามารถเตรียมโปรโตพลาสต์ของทุกสายพันธุ์เมื่อใช้ lysozyme ร่วมกับ mutanolysin ความเข้มข้นสุดท้าย 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และใช้ 0.3 M raffinose หรือ 0.5 M lactose เป็นสารรักษาสภาพแรงดันออสโมติค (osmotic stabilizer) การเติมเฉพาะ lysozyme จะไม่ทำให้เกิดโปรโตพลาสต์ในทุกสายพันธุ์ แต่เฉพาะ mutanolysin สามารถทำให้เกิดโปรโตพลาสต์ในสายพันธุ์ ATCC 4646 และ ATCC 11578 ส่วนการเปลี่ยนโปรโตพลาสต์กลับไปเป็นเซลล์นั้น การใช้ raffinose เป็น osmotic stabilizer กับการเติม bovine serum albumin ใน regeneration medium มีความสำคัญทำให้โปรโตพลาสต์เปลี่ยนกลับไปเป็นเซลล์ 10 ถึง 40 % และยังพบอีกว่าในขั้นการเตรียมโปรโตพลาสต์เวลาในการบ่มเชื้อ 2 กับ 4 ชั่วโมง แม้จะทำให้ได้โปรโตพลาสต์ถึง 90 % แต่เมื่อนำไปเปลี่ยนกลับไปเป็นเซลล์แล้ว บ่มเชื้อ 2 และ 4 ชั่วโมง ทำให้เปลี่ยนกลับไปเป็นเซลล์ได้ 30 และ 10 % ตามลำดับ นอกจากนี้ Lee-wickner ยังได้วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ L. casei คือ หาปริมาณ glycerol, rhamnose, α-D-galactose, β-D-galactose, α-D-glucose และ β-D-glucose เปรียบเทียบกันระหว่างผนังเซลล์ที่ใส่กับไม่ได้ใส่ lysozyme กับ mutanolysin พบว่า rhamnose, manose, glucose และ galactose เหลือประมาณ 3 % ส่วน glycerol เหลือ 30 % จากเดิมที่มีอยู่

Chen et al (1986) พบว่าการเตรียมโปรโตพลาสต์ของเชื้อ Fusobacterium varium และ Enterococcus faecium นั้น ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีการเติม Penicillin G. ลงไปเมื่อเชื้ออยู่ในช่วง early log phase แล้วใช้ 0.05 M phosphate buffer pH 7.0 กับ 0.2 M glycerol เตรียม suspension ในเชื้อ F. varium เมื่อเติม lysozyme ความเข้มข้นสุดท้าย 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จะเกิดโปรโตพลาสต์ถึง 80 % ในขณะที่ E. faecium เมื่อเติม lysozyme 1 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วสักครู่จึงเติม 0.08 M NaCl จึงจะเกิดโปรโตพลาสต์ถึง 80 % การเปลี่ยนโปรโตพลาสต์กลับไปเป็นเซลล์ทำได้โดยเจือจางโปรโตพลาสต์ใน 0.2 M glycerol แล้ว spread ลงบน yeast extract-agar medium ที่มี glycerol ปรากฏว่าภายใน 5-7 วัน เชื้อทั้งสองชนิดเปลี่ยนกลับไปเป็นเซลล์ได้ 20 ถึง 30 %