# บทที่ 3

## ผลการทดลอง

1. การคัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์ *Penicillium chrysogenum* สำหรับการผลิตเพนิซิลลิน จี

คัดเลือกสายพันธุ์โดยการเลี้ยงเชื้อ *Penicillium chrysogenum* จำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่สายพันธุ์ตั้งต้น A-88 ที่มีการศึกษาโดยวนิดา เรืองศรี (85) สายพันธุ์ UNN-151 ที่ได้จากการทำให้สายพันธุ์ A-88 กลายพันธุ์ด้วยแสง UV และสารก่อการกลายพันธุ์ NTG ซ้ำ 2 ครั้ง ผ่านการคัดเลือกโดยโชตนา ประมวลวัลลิกุล (86) และอีก 3 สายพันธุ์ได้จากการทำให้สายพันธุ์ UNN-151 กลายพันธุ์ด้วยแสง UV และสารก่อการกลายพันธุ์ NTG ซ้ำ 3 ครั้ง ผ่านการคัดเลือกโดยบัณฑูร พลอยสุวรรณ (87) ได้แก่สายพันธุ์ UNNN-9 UNNN-17 และ UNNN-28 ในอาหารใช้คัดเลือกเชื้อ (ภาคผนวกที่ 1.3) ตามวิธีการทดลองที่กล่าวไว้ในข้อ 2.3.3 เมื่อระยะเวลาในการหมักครบ 4 5 6 และ 7 วัน วัดการเจริญตามวิธีการทดลองที่ 3.6 วัดปริมาณเพนิซิลลิน จี โดยอาศัยประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (หน่วย/มล.) ตามวิธีการทดลองที่ 3.1 และหาปริมาณเพนิซิลลิน จี ด้วยวิธี HPLC (กรัม/ลิตร) ตามวิธีการทดลองที่ 3.2 การหาปริมาณเพนิซิลลิน จี ด้วย HPLC จะทำเฉพาะตัวอย่างที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสูงเท่านั้น แสดงผลที่ได้ในตารางที่ 4

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตเพนิซิลลิน จี ของสายพันธุ์ *Penicillium chrysogenum* 5 สายพันธุ์

| ชื่อสายพันธุ์ | ลักษณะของโคโลนี | ระยะเวลาการหมัก (วัน) | น้ำหนักเซลแห้ง (กรัม/ลิตร) | ปริมาณเพนิซิลลิน จี (หน่วย/มล.)*(กรัม/ลิตร)** | |
|---|---|---|---|---|---|
| A88 | ขอบหยักเป็นรอยพับนูน | 4 | 24.74 | 1845 | |
| | ริมขาว สปอร์สีเขียว | 5 | 23.50 | 2108 | 0.82 |
| | เข้ม สม่ำเสมอ | 6 | 18.44 | 1237 | |
| | | 7 | 17.25 | 1033 | |
| UNN-151 | ขอบหยัก เป็นรอยพับ | 4 | 23.20 | 948 | |
| | นูนไม่สม่ำเสมอ บาง | 5 | 21.01 | 1237 | 0.58 |
| | ช่วงเป็นสีแดง สีเขียว | 6 | 18.52 | 786 | |
| | และสีขาว | 7 | 16.83 | 486 | |
| UNNN-9 | ขอบหยัก เป็นรอยพับ | 4 | 21.78 | 1930 | |
| | นูน สปอร์เขียวเข้ม | 5 | 25.22 | 2404 | |
| | สม่ำเสมอ สามารถ | 6 | 19.23 | 2698 | 1.00 |
| | ย่อยแป้งได้ | 7 | 14.24 | 2108 | |
| UNNN-17 | ขอบหยัก เป็นรอยพับ | 4 | 19.55 | 644 | |
| | นูน สปอร์น้อย | 5 | 23.18 | 1550 | |
| | สปอร์สีเขียวอ่อน | 6 | 27.41 | 1930 | 0.89 |
| | ย่อยแป้งได้ | 7 | 23.98 | 1237 | |

หมายเหตุ * วัดปริมาณโดยวิธีทางชีววิทยา ดังการคำนวณในภาคผนวกที่ 5.2

** วัดปริมาณโดย HPLC ดังการคำนวณในภาคผนวกที่ 4.2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 (ต่อ)

| ชื่อสายพันธุ์ | ลักษณะของโคโลนี | ระยะเวลาการหมัก (วัน) | น้ำหนักเซลแห้ง (กรัม/ลิตร) | ปริมาณเพนิซิลลิน จี (หน่วย/มล.)* | (กรัม/ลิตร)** |
|---|---|---|---|---|---|
| UNNN-28 | ขอบหยัก เป็นรอยพับ | 4 | 18.37 | 415 | |
| | นูน สปอร์สีขาวปน | 5 | 22.78 | 1930 | |
| | เขียว ปริมาณน้อย | 6 | 27.29 | 2993 | 1.01 |
| | ย่อยแป้งได้ | 7 | 27.39 | 1615 | |

หมายเหตุ * วัดปริมาณโดยวิธีทางชีววิทยา ดังการคำนวณในภาคผนวกที่ 5.2

** วัดปริมาณโดย HPLC ดังการคำนวณในภาคผนวกที่ 4.2

จากผลการคัดเลือกดังแสดงในตารางที่ 4 สายพันธุ์ UNNN-9 และ UNNN-28 มีความสามารถในการผลิตเพนิซิลลิน จี ใกล้เคียงกัน แต่สายพันธุ์ UNNN-28 มีจุดด้อยคือ เป็นสายพันธุ์ที่สร้างสปอร์ได้น้อย ไม่สะดวกต่อการเตรียมหัวเชื้อ ดังนั้นในการศึกษาต่อไปจึงเลือกสายพันธุ์ UNNN-9 ซึ่งมีข้อได้เปรียบในการสร้างสปอร์ได้ดีกว่า

2. การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเพนิซิลลิน จี โดย *Penicillium chrysogenum* UNNN-9 ในขวดรูปชมพู่

2.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเพนิซิลลิน จี

Owen และ Johnson ได้รายงานเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเพนิซิลลิน จี เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Penicillium chrysogenum* W49-433 ที่อุณหภูมิคงที่คือ 20 25 และ30 °ซ. ตลอดการเลี้ยง กับการเลี้ยงโดยปรับอุณหภูมิจาก 30 °ซ.เป็น 25 °ซ. หลังจากที่เชื้อเจริญแล้ว พบว่าการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิดังกล่าวทำให้เชื้อสามารถผลิตเพนิซิลลิน จี ได้สูงขึ้น (71) ต่อมา Kluge และคณะ ได้รายงานว่าการเปลี่ยนอุณหภูมิจาก 25 °ซ.เป็น 30 °ซ. ภายหลังจากเชื้ออายุ 42 ชม. ทำให้เชื้อผลิตเพนิซิลลิน ในอัตราที่สูงขึ้นแต่ปริมาณคงที่ (58) ดังนั้นในงานวิจัย

นี้จึงทดลองเลี้ยงเชื้อ *Penicillium chrysogenum* UNNN-9 ในขวดรูปชมพู่ โดยใช้อาหารหมักสูตรคัดเลือกสายพันธุ์ (ภาคผนวกที่ 1.3) ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.3 ใช้อุณหภูมิในการหมัก 2 แบบคือ คงไว้ที่ 25 28 และ 30 °ซ.ตลอดการเลี้ยง และปรับเปลี่ยนอุณหภูมิหลังจากที่เชื้ออายุ 48 ชม.จาก 25 °ซ.เป็น 30 °ซ. และจาก 30 °ซ.เป็น 25 °ซ. เมื่อระยะเวลาในการหมักครบ 4 5 6 และ 7 วัน วัดการเจริญและปริมาณเพนิซิลลิน จี ตามวิธีการทดลองในข้อ 3.1 3.2 และ 3.6 แสดงผลในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงผลของอุณหภูมิที่มีต่อการผลิตเพนิซิลลิน จี โดยเชื้อ *Penicillium chrysogenum* UNNN-9

| อุณหภูมิ (°ซ.) | ระยะเวลาการหมัก (วัน) | น.น. เซลแห้ง (กรัม/ลิตร) | ปริมาณเพนิซิลลิน จี หน่วย/มล.* | กรัม/ลิตร** |
|---|---|---|---|---|
| 25 | 4 | 18.39 | 2949 | |
| | 5 | 22.37 | 3593 | 1.12 |
| | 6 | 23.32 | 3593 | 1.13 |
| | 7 | 16.16 | 2949 | |
| 28 | 4 | 20.51 | 4142 | 1.33 |
| | 5 | 24.36 | 4106 | 1.29 |
| | 6 | 17.54 | 3145 | |
| | 7 | 12.06 | 2108 | |

หมายเหตุ * วัดปริมาณโดยวิธีทางชีววิทยา ดังการคำนวณในภาคผนวกที่ 5.2

** วัดปริมาณโดย HPLC ดังการคำนวณในภาคผนวกที่ 4.2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 (ต่อ)

| อุณหภูมิ (°ซ.) | ระยะเวลาการหมัก (วัน) | น.น. เซลแห้ง (กรัม/ลิตร) | ปริมาณเพนิซิลลิน จี หน่วย/มล.* | กรัม/ลิตร** |
|---|---|---|---|---|
| 30 | 4 | 17.44 | 2850 | |
| | 5 | 25.93 | 3625 | 1.21 |
| | 6 | 23.74 | 4106 | 1.17 |
| | 7 | 16.63 | 2430 | |
| 25-->30 | 4 | 15.51 | 1325 | |
| | 5 | 18.95 | 3593 | 1.17 |
| | 6 | 23.06 | 2949 | 1.05 |
| | 7 | 16.31 | 2753 | |
| 30-->25 | 4 | 15.95 | 1325 | |
| | 5 | 24.47 | 4142 | 1.17 |
| | 6 | 22.85 | 2719 | 0.99 |
| | 7 | 21.18 | 3849 | |

หมายเหตุ * วัดปริมาณโดยวิธีทางชีววิทยา ดังการคำนวณในภาคผนวกที่ 5.2

** วัดปริมาณโดย HPLC ดังการคำนวณในภาคผนวกที่ 4.2

จากตารางที่ 5 พบว่าการคงอุณหภูมิไว้ที่ 28 °ซ. ตลอดการหมัก ทำให้สายพันธุ์ UNNN-9 ผลิตเพนิซิลลิน จี ได้สูงสุดคือ 4142 หน่วย/มล.หรือ 1.33 กรัม/ลิตร ในวันที่ 4 ของการหมัก ซึ่งนอกจากจะได้ปริมาณเพนิซิลลิน จี สูงสุดแล้ว ยังใช้ระยะเวลาในการหมักสั้นกว่าคือ 4 วัน ดังนั้นการทดลองลำดับต่อไปจะคงอุณหภูมิการหมักไว้ที่ 28 °ซ.

2.2 การเจริญของเชื้อ *Penicillium chrysogenum* UNNN-9 ในอาหารสำหรับการเตรียมหัวเชื้อ

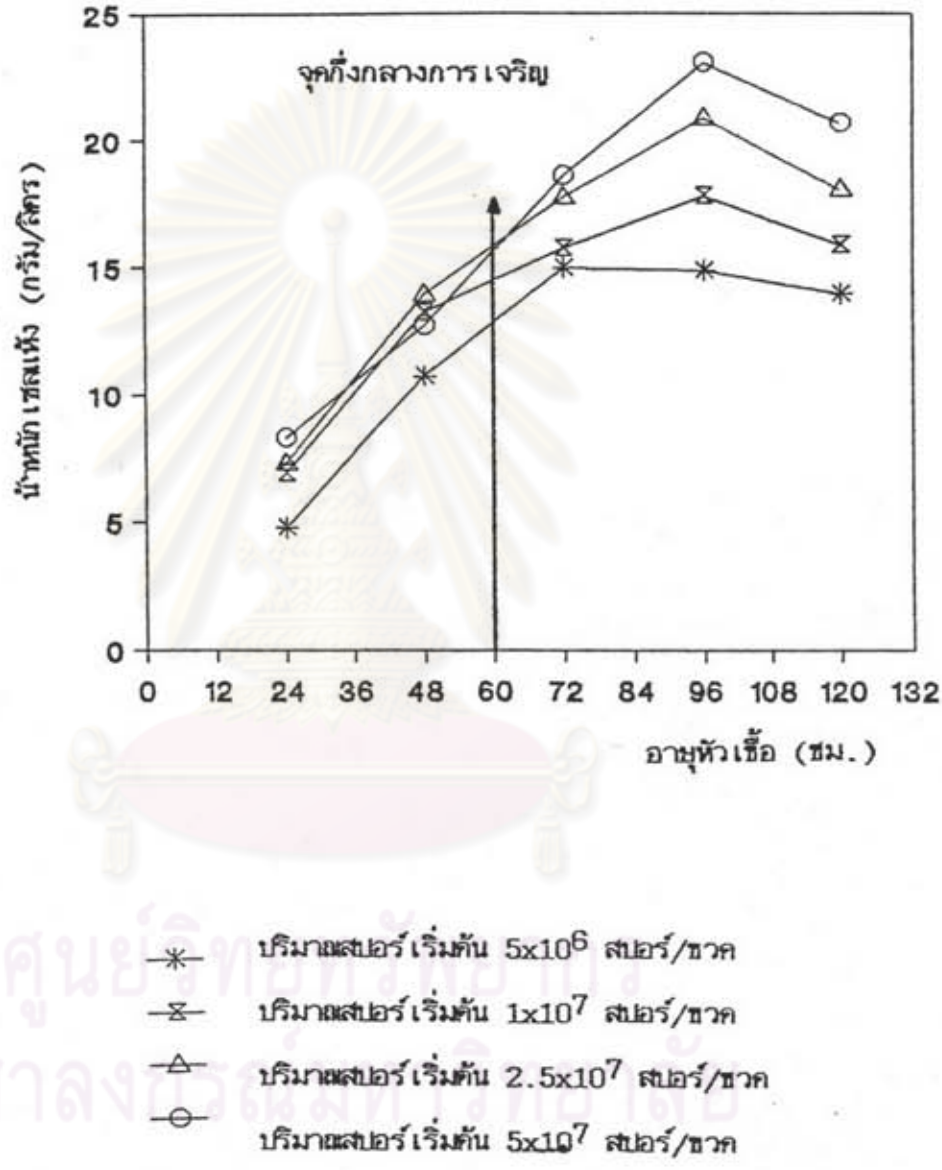
2.2.1 ผลของจำนวนสปอร์เริ่มต้นต่อลักษณะของหัวเชื้อ

ลักษณะของหัวเชื้อ มีความสำคัญต่อประสิทธิภาพการผลิตเพนิซิลลิน จี Whitaker และ Long รายงานว่าจำนวนสปอร์มีผลต่อลักษณะของหัวเชื้อ ถ้าใช้สปอร์จำนวนน้อยเกินไป ทำให้หัวเชื้อมีลักษณะเป็นกระจุก (pellet) การผลิตเพนิซิลลิน จี จะช้าและได้ปริมาณน้อย (73) วนิดาพบว่าในการเตรียมหัวเชื้อของ *Penicillium chrysogenum* A-88 จำนวนสปอร์ที่เหมาะสมคือ $2.5 \times 10^7$ สปอร์ต่ออาหารเตรียมหัวเชื้อ 50 มล. (85) Vardar และ Lilly พบว่าการใช้ปริมาณหัวเชื้อคิดเป็น 10 % ของอาหารที่ใช้ผลิตเพนิซิลลิน จี จะทำให้การผลิตเพนิซิลลิน จี ได้สูงที่สุด (70) ในการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมหัวเชื้อนั้น ได้แปรผันจำนวนสปอร์ที่ใช้เป็น $5 \times 10^6$ $1 \times 10^7$ $2.5 \times 10^7$ และ $5 \times 10^7$ สปอร์/ขวด ซึ่งบรรจุอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ 50 มล. (ภาคผนวกที่ 1.4) และทำการทดลองตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.4 วัดการเจริญตามวิธีการทดลองในข้อ 3.6 ผลการทดลองแสดงอยู่ในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงน้ำหนักเซลแห้งที่ได้จากการแปรผันปริมาณสปอร์เริ่มต้นของ *Penicillium chrysogenum* UNNN-9 ในอาหารเตรียมหัวเชื้อ

| อายุของหัวเชื้อ (ชม.) | น้ำหนักเซลแห้งที่วัดได้ (กรัม/ลิตร) เมื่อใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้น | | | |
|---|---|---|---|---|
| | $5 \times 10^6$ | $1 \times 10^7$ | $2.5 \times 10^7$ | $5 \times 10^7$ |
| 24 | 4.80 | 6.93 | 7.32 | 8.30 |
| 48 | 10.76 | 13.26 | 13.96 | 12.74 |
| 72 | 15.02 | 15.76 | 17.77 | 18.60 |
| 96 | 14.90 | 17.84 | 20.90 | 23.06 |
| 120 | 13.98 | 15.92 | 18.07 | 20.68 |

จากตารางที่ 6 นำมาเขียนเป็นกราฟดังรูปที่ 3 เพื่อให้เห็นรูปแบบการเจริญของหัวเชื้อชัดเจนยิ่งขึ้น




รูปที่ 3 แสดงรูปแบบการเจริญของหัวเชื้อ *Penicillium chrysogenum* UNNN-9 ที่ได้จากการแปรผันปริมาณสปอร์เริ่มต้น

มีรายงานว่าหัวเชื้อที่ดีควรมีอายุอยู่ที่จุดกึ่งกลางของช่วงการเจริญ (7) จากรูปที่ 3 พบว่าจุดกึ่งกลางการเจริญของเชื้อสายพันธุ์ UNNN-9 อยู่ที่ประมาณ 60 ชม. จึงใช้จุดนี้เปรียบเทียบการเจริญโดยใช้น้ำหนักเซลแห้งเป็นเกณฑ์ นั่นคือน้ำหนักเซลมากแสดงถึงเชื้อมีการเจริญมาก ได้สายใยที่พร้อมจะผลิตเพนิซิลลิน จี จำนวนมาก จากรูปที่ 3 ที่อายุหัวเชื้อ 60 ชม. พบว่าน้ำหนักเซลแห้งที่ได้จากการใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้น $5x10^6$ และ $1x10^7$ สปอร์/ขวด จะให้น้ำหนักเซลแห้งน้อยกว่าเมื่อใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้น $2.5x10^7$ และ $5x10^7$ สปอร์/ขวด ซึ่งให้ค่าน้ำหนักเซลแห้งที่ใกล้เคียงกัน ส่วนลักษณะของหัวเชื้อที่ได้จากเมื่อใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้น $5x10^6$ สปอร์/ขวด จะเป็นสายใยปนอยู่กับกระจุกเซล (pellet)ซึ่งเป็นลักษณะของหัวเชื้อที่ไม่ดี ต่างจากลักษณะที่ได้จากเมื่อใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้น $1x10^7$ $2.5x10^7$ และ $5x10^7$ สปอร์/ขวด ซึ่งเป็นสายใยยาว กระจายกันอยู่อย่างหลวม ๆ

เนื่องจากปริมาณสปอร์เริ่มต้นที่ $2.5x10^7$ และ $5x10^7$ สปอร์/ขวด ให้ปริมาณสายใยที่ใกล้เคียงกัน จึงสามารถใช้ค่าใดค่าหนึ่งเป็นสปอร์เริ่มต้นได้ แต่เพื่อเป็นการลดปัจจัยที่ทำให้เกิดความแตกต่างในการหมัก จึงเลือก $2.5x10^7$ สปอร์/ขวด เพียงค่าเดียวเพื่อเตรียมหัวเชื้อในขั้นตอนต่อไป

2.2.2 ผลของปริมาณกลูโคสและซูโครส ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ ในอาหารเพื่อเตรียมหัวเชื้อ

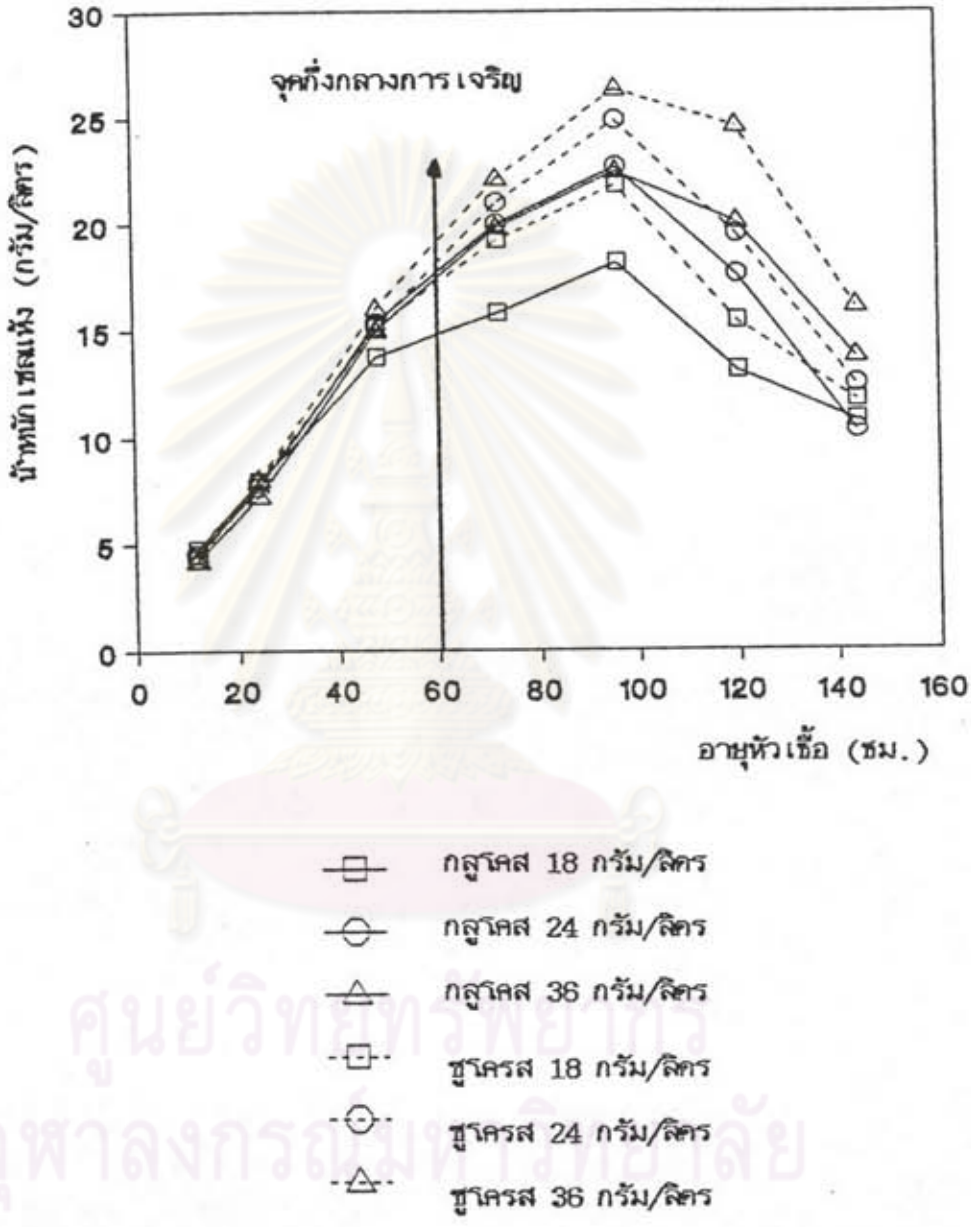
อาหารเตรียมหัวเชื้อส่วนใหญ่จะคล้ายกับอาหารสูตรผลิตเพนิซิลลิน ต่างกันที่ใช้กลูโคสหรือซูโครส 2 % แทนแลคโตส (6,8) จากผลการทดลองในข้อ 2.2.1 ได้จำนวนสปอร์ที่เหมาะสมคือ $2.5x10^7$ สปอร์/ขวด เพื่อให้หัวเชื้อเจริญได้เต็มที่โดยไม่มีปริมาณน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นข้อจำกัด จึงนำสปอร์มาเลี้ยงในอาหารเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวกที่ 1.4) ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.4 โดยแปรผันปริมาณกลูโคส หรือซูโครสเป็น 18 24 36 กรัม/ลิตร ตามลำดับ วัดการเจริญตามวิธีการทดลองในข้อ 3.6 ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงน้ำหนักเชลแห้งที่ได้จากการแปรผันปริมาณกลูโคส หรือ ซูโครส ในอาหารเตรียมหัวเชื้อ

| อายุหัวเชื้อ (ชม.) | น้ำหนักเชลแห้งที่วัดได้ (กรัม/ลิตร) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | ปริมาณกลูโคส (กรัม/ลิตร) | | | ปริมาณซูโครส (กรัม/ลิตร) | | |
| | 18 | 24 | 36 | 18 | 24 | 36 |
| 12 | 4.74 | 4.50 | 4.20 | 4.54 | 4.36 | 4.27 |
| 24 | 7.93 | 7.68 | 7.22 | 7.96 | 7.84 | 8.06 |
| 48 | 13.74 | 15.37 | 14.97 | 15.15 | 15.19 | 16.04 |
| 72 | 16.82 | 19.98 | 19.81 | 19.23 | 20.98 | 22.12 |
| 96 | 18.19 | 22.65 | 22.46 | 21.82 | 24.87 | 26.34 |
| 120 | 13.14 | 17.62 | 20.12 | 15.42 | 19.52 | 24.61 |
| 144 | 10.78 | 10.33 | 13.74 | 11.76 | 12.47 | 16.13 |

จากตารางที่ 7 นำไปเขียนเป็นกราฟในรูปที่ 4 เพื่อให้ง่ายต่อการดูอิทธิพลของชนิดและปริมาณน้ำตาลที่มีต่อการเจริญของหัวเชื้อ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย




รูปที่ 4 แสดงรูปแบบการเจริญของหัวเชื้อ *Penicillium chrysogenum* UNNN-9 เมื่อมีการแปรผันปริมาณกลูโคส หรือซูโครส ในอาหารเตรียมหัวเชื้อ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากรูปที่ 4 พบว่าน้ำหนักเซลแห้งเพิ่มขึ้นตามปริมาณน้ำตาลที่เพิ่มขึ้น และเมื่อใช้ซูโครสจะให้น้ำหนักเซลแห้งสูงกว่าเมื่อใช้กลูโคสเล็กน้อย อีกทั้งยังมีราคาที่ถูกกว่า จึงเลือกซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนในการเตรียมหัวเชื้อ เมื่อสังเกตที่จุดกึ่งกลางของการเจริญของเชื้อ คือที่ 60 ชม.พบว่าน้ำหนักเซลแห้งที่ได้เมื่อใช้ซูโครสปริมาณ 18 24 และ 36 กรัม/ลิตร มีค่าใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงควรเลือกใช้ปริมาณ 18 กรัม/ลิตร

2.3 ผลของอายุหัวเชื้อ และเวลาที่เติมกรดฟีนิลอะซิติก ต่อการผลิตเพนิซิลลิน จี

จากผลการทดลองในข้อ 2.2.1 พบว่าจุดกึ่งกลางในช่วงการเจริญอยู่ที่ประมาณ 60 ชม. เพื่อดูอิทธิพลของอายุหัวเชื้อต่อการผลิตเพนิซิลลิน จี จึงทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารสำหรับผลิตเพนิซิลลิน จี (ภาคผนวกที่ 1.3) ตามวิธีการทดลองที่ 2.3.5 โดยทดลองใช้หัวเชื้ออายุ 48 60 และ 72 ชม. เนื่องจากกรดฟีนิลอะซิติกซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการผลิตเพนิซิลลิน จี มีความเป็นพิษมาก ถ้าใช้ในความเข้มข้นสูง หรือเติมขณะเชื้อมีอายุน้อย มีรายงานว่าอายุของเชื้อที่เหมาะในการเติมกรดฟีนิลอะซิติกจะอยู่ในช่วงที่เชื้อมีการเจริญเต็มที่แล้ว เพราะในจุดนั้นเชื้อรามีการสร้างสารตัวกลางไว้พร้อมสำหรับผลิตเพนิซิลลิน จี การเติมเร็วเกินไปทำให้การเจริญถูกยับยั้ง และถ้าเติมช้าเกินไป สารตัวกลางที่เชื้อผลิตขึ้นอาจถูกนำไปใช้เพื่อการเจริญหรือสลายไป (4,5, 61,62) ดังนั้นเพื่อดูอิทธิพลของช่วงเวลาในการเติมกรดฟีนิลอะซิติกต่อการผลิตเพนิซิลลิน จี จึงทำการเติมกรดฟีนิลอะซิติกเมื่อระยะเวลาในการหมักเท่ากับ 48 60 และ 72 ชม. โดยใช้ 2 ระดับความเข้มข้นคือ 0.5 และ 1.0 กรัม/ลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วจึงทำการวิเคราะห์หาปริมาณเพนิซิลลิน จี ตามวิธีการทดลองในข้อ 3.1-3.5 แสดงผลที่ได้ในตารางที่ 8

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 แสดงปริมาณเพนิซิลลิน จี ที่ได้จากการหมัก โดยแปรผันอายุหัวเชื้อ ปริมาณและช่วงเวลาที่เติมกรดฟีนิลอะซิติก

ใช้หัวเชื้ออายุ 48 ชม. ถ่ายลงในอาหารสูตรผลิตเพนิซิลลิน จี และเติม PAA เมื่อระยะเวลาในการหมักเท่ากับ 48 ชม.

1. ปริมาณ PAA 0.5 กรัม/ลิตร

| ระยะเวลาในการหมัก (ชม.) | pH | เซลแห้ง (กรัม/ลิตร) | น้ำตาลรีดิวส์ (กรัม/ลิตร) | ไนโตรเจนรวม (กรัม/ลิตร) | PAA (กรัม/ลิตร) | ปริมาณเพนิซิลลิน จี รวม (หน่วย/มล.) | (กรัม/ลิตร) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 72 | 5.83 | 23.84 | 3.54 | 7.54 | 1.20 | 0.19 | 3661 | |
| 96 | 6.60 | 22.45 | 0.86 | 2.90 | 0.77 | 0.03 | 3861 | 0.89 |
| 120 | 7.39 | 15.26 | 0.62 | 1.66 | 0.92 | 0.02 | 1959 | |
| 144 | 8.06 | 7.88 | 0.45 | 0.75 | 1.00 | 0.02 | 1280 | |
| 168 | 8.26 | 5.68 | 0.39 | 0.63 | 1.39 | 0.02 | 88 | |

2. ปริมาณ PAA 1.0 กรัม/ลิตร

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 72 | 5.87 | 20.27 | 2.0 | 4.84 | 0.92 | 0.56 | 2859 | |
| 96 | 6.70 | 20.44 | 0.51 | 2.77 | 0.54 | 0.48 | 3865 | 0.88 |
| 120 | 7.44 | 19.54 | 0.49 | 0.55 | 0.88 | 0.39 | 3175 | |
| 144 | 7.87 | 12.19 | 0.37 | 0.56 | 1.00 | 0.24 | 1540 | |
| 168 | 8.23 | 5.82 | 0.23 | 0.39 | 1.15 | 0.26 | 1023 | |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 (ต่อ)

ใช้หัวเชื้ออายุ 48 ชม. ถ่ายลงในอาหารสูตรผลิตเพนิซิลลิน จี และเติม PAA เมื่อระยะเวลาในการหมักเท่ากับ 60 ชม.

1. ปริมาณ PAA 0.5 กรัม/ลิตร

| ระยะเวลาในการหมัก (ชม.) | pH | เซลแห้ง (กรัม/ลิตร) | น้ำตาลรีดิวส์ (กรัม/ลิตร) | ไนโตรเจนรวม (กรัม/ลิตร) | PAA (กรัม/ลิตร) | ปริมาณเพนิซิลลิน จี (หน่วย/มล.) | (กรัม/ลิตร) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 72 | 5.83 | 24.34 | 2.15 | 5.85 | 1.10 | 0.29 | 2930 |
| 96 | 6.96 | 19.52 | 0.59 | 3.27 | 0.65 | 0.02 | 2859 |
| 120 | 7.60 | 14.79 | 0.75 | 1.53 | 0.81 | 0.02 | 3136 |
| 144 | 8.08 | 8.45 | 0.55 | 1.05 | 0.92 | 0.02 | 1855 |
| 168 | 8.23 | 6.80 | 0.53 | 0.90 | 1.39 | 0.02 | 1350 |

2. ปริมาณ PAA 1.0 กรัม/ลิตร

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 72 | 5.92 | 23.25 | 1.23 | 4.53 | 0.90 | 0.89 | 2772 |
| 96 | 6.96 | 19.52 | 0.91 | 3.23 | 0.84 | 0.54 | 2650 |
| 120 | 7.66 | 19.85 | 0.81 | 1.60 | 0.77 | 0.32 | 3030 |
| 144 | 7.98 | 9.00 | 0.72 | 0.95 | 1.19 | 0.03 | 1448 |
| 168 | 8.10 | 6.97 | 0.43 | 0.74 | 1.35 | 0.02 | 1241 |

ตารางที่ 8 (ต่อ)

ใช้หัวเชื้ออายุ 48 ชม. ถ่ายลงในอาหารสูตรผลิตเพนิซิลลิน จี และเติม PAA เมื่อระยะเวลาในการหมักเท่ากับ 72 ชม.

1. ปริมาณ PAA 0.5 กรัม/ลิตร

| ระยะเวลาในการหมัก (ชม.) | pH | เซลแห้ง (กรัม/ลิตร) | น้ำตาลรีดิวส์ (กรัม/ลิตร) | ไนโตรเจนรวม (กรัม/ลิตร) | PAA (กรัม/ลิตร) | ปริมาณเพนิซิลลิน จี (หน่วย/มล.) | ปริมาณเพนิซิลลิน จี (กรัม/ลิตร) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 72 | 5.76 | 25.85 | 0.89 | 3.61 | 0.80 | 0.39 | 1203 |
| 96 | 7.09 | 20.48 | 0.85 | 3.27 | 0.92 | 0.28 | 1973 |
| 120 | 7.72 | 13.54 | 0.81 | 3.17 | 1.00 | 0.23 | 1819 |
| 144 | 7.95 | 9.05 | 0.77 | 2.43 | 1.07 | 0.10 | 1448 |
| 168 | 8.13 | 7.59 | 0.71 | 2.05 | 1.39 | 0.12 | 780 |

2. ปริมาณ PAA 1.0 กรัม/ลิตร

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 72 | 5.58 | 25.02 | 1.20 | 3.70 | 0.80 | 0.96 | 940 |
| 96 | 7.30 | 17.94 | 0.88 | 3.58 | 1.00 | 0.88 | 1973 |
| 120 | 7.72 | 15.30 | 0.85 | 3.15 | 1.00 | 0.65 | 2099 |
| 144 | 8.02 | 13.88 | 0.71 | 2.76 | 1.19 | 0.55 | 1203 |
| 168 | 8.04 | 9.54 | 0.70 | 2.62 | 1.23 | 0.55 | 650 |

ตารางที่ 8 (ต่อ)

ใช้หัวเชื้ออายุ 60 ชม. ถ่ายลงในอาหารสูตรผลิตเพนิซิลลิน จี และเติม PAA เมื่อระยะเวลาในการหมักเท่ากับ 48 ชม.

1. ปริมาณ PAA 0.5 กรัม/ลิตร

| ระยะเวลาในการหมัก (ชม.) | pH | เซลแห้ง (กรัม/ลิตร) | น้ำตาลรีดิวส์ (กรัม/ลิตร) | ไนโตรเจนรวม (กรัม/ลิตร) | PAA (กรัม/ลิตร) | ปริมาณเพนิซิลลิน (หน่วย/มล.) | จี (กรัม/ลิตร) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 72 | 5.83 | 22.54 | 2.00 | 4.96 | 1.00 | 0.22 | 2930 | |
| 96 | 6.87 | 20.78 | 0.86 | 3.63 | 0.85 | 0.09 | 4406 | 1.20 |
| 120 | 7.65 | 15.22 | 0.65 | 3.05 | 1.23 | 0.06 | 3894 | |
| 144 | 7.83 | 8.78 | 0.62 | 2.81 | 1.39 | 0.01 | 1203 | |
| 168 | 7.86 | 7.86 | 0.46 | 2.12 | 1.54 | 0.01 | 105 | |

2. ปริมาณ PAA 1.0 กรัม/ลิตร

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 72 | 5.98 | 21.39 | 2.96 | 3.40 | 1.00 | 0.54 | 2711 | |
| 96 | 6.79 | 21.43 | 0.98 | 3.06 | 0.69 | 0.29 | 4406 | 1.19 |
| 120 | 7.63 | 13.32 | 0.49 | 2.89 | 0.92 | 0.15 | 3861 | |
| 144 | 7.89 | 11.07 | 0.46 | 2.22 | 1.10 | 0.11 | 2605 | |
| 168 | 7.97 | 11.23 | 0.40 | 2.01 | 1.38 | 0.05 | 101 | |

ตารางที่ 8 (ต่อ)

ใช้หัวเชื้ออายุ 60 ชม. ถ่ายลงในอาหารสูตรผลิตเพนิซิลลิน จี และเติม PAA เมื่อระยะเวลาในการหมักเท่ากับ 60 ชม.

1. ปริมาณ PAA 0.5 กรัม/ลิตร

| ระยะเวลาในการหมัก (ชม.) | pH | เซลแห้ง (กรัม/ลิตร) | น้ำตาลรีดิวส์ (กรัม/ลิตร) | ไนโตรเจนรวม (กรัม/ลิตร) | PAA (กรัม/ลิตร) | ปริมาณเพนิซิลลิน จี (หน่วย/มล.) | (กรัม/ลิตร) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 72 | 6.02 | 24.70 | 1.11 | 5.77 | 1.10 | 0.22 | 1743 |
| 96 | 6.99 | 20.61 | 0.80 | 3.96 | 1.07 | 0.18 | 1541 |
| 120 | 7.74 | 13.49 | 0.62 | 3.74 | 1.15 | 0.14 | 883 |
| 144 | 7.89 | 9.31 | 0.56 | 3.65 | 1.26 | 0.14 | 539 |
| 168 | 8.04 | 8.24 | 0.40 | 2.93 | 1.46 | 0.12 | 220 |

2. ปริมาณ PAA 1.0 กรัม/ลิตร

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 72 | 6.17 | 22.22 | 3.58 | 5.85 | 0.80 | 0.77 | 1743 |
| 96 | 6.36 | 18.28 | 2.15 | 5.16 | 0.90 | 0.59 | 1573 |
| 120 | 7.68 | 14.35 | 0.59 | 3.12 | 1.11 | 0.57 | 1280 |
| 144 | 7.91 | 14.02 | 0.51 | 2.58 | 1.30 | 0.36 | 690 |
| 168 | 8.01 | 13.22 | 0.38 | 2.66 | 1.36 | 0.32 | 250 |

ตารางที่ 8 (ต่อ)

ใช้หัวเชื้ออายุ 60 ชม. ถ่ายลงในอาหารสูตรผลิตเพนิซิลลิน จี และเติม PAA เมื่อระยะเวลาในการหมักเท่ากับ 72 ชม.

1. ปริมาณ PAA 0.5 กรัม/ลิตร

| ระยะเวลาในการหมัก (ชม.) | pH | เซลแห้ง (กรัม/ลิตร) | น้ำตาลรีดิวส์ (กรัม/ลิตร) | ไนโตรเจนรวม (กรัม/ลิตร) | PAA (กรัม/ลิตร) | ปริมาณเพนิซิลลิน จี (หน่วย/มล.) | (กรัม/ลิตร) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 72 | 5.75 | 26.64 | 2.15 | 3.35 | 1.10 | 0.37 | 1362 |
| 96 | 7.10 | 18.55 | 0.99 | 2.87 | 1.07 | 0.28 | 1180 |
| 120 | 7.75 | 13.61 | 0.66 | 2.35 | 1.07 | 0.20 | 1157 |
| 144 | 7.98 | 8.82 | 0.60 | 2.35 | 1.15 | 0.14 | 506 |
| 168 | 8.00 | 7.97 | 0.49 | 2.27 | 1.20 | 0.09 | 344 |

2. ปริมาณ PAA 1.0 กรัม/ลิตร

| ระยะเวลาในการหมัก (ชม.) | pH | เซลแห้ง (กรัม/ลิตร) | น้ำตาลรีดิวส์ (กรัม/ลิตร) | ไนโตรเจนรวม (กรัม/ลิตร) | PAA (กรัม/ลิตร) | ปริมาณเพนิซิลลิน จี (หน่วย/มล.) | (กรัม/ลิตร) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 72 | 5.43 | 25.98 | 1.01 | 3.66 | 0.90 | 0.96 | 1000 |
| 96 | 7.18 | 18.25 | 0.64 | 3.28 | 0.85 | 0.74 | 1541 |
| 120 | 7.48 | 17.78 | 0.56 | 2.91 | 0.96 | 0.55 | 1448 |
| 144 | 7.75 | 15.49 | 0.47 | 2.62 | 1.10 | 0.44 | 1100 |
| 168 | 7.87 | 9.32 | 0.40 | 2.60 | 1.15 | 0.20 | 245 |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 (ต่อ)

ใช้หัวเชื้ออายุ 72 ชม. ถ่ายลงในอาหารสูตรผลิตเพนิซิลลิน จี และเติม PAA เมื่อระยะเวลาในการหมักเท่ากับ 48 ชม.

1. ปริมาณ PAA 0.5 กรัม/ลิตร

| ระยะเวลาในการหมัก (ชม.) | pH | เซลแห้ง (กรัม/ลิตร) | น้ำตาลรีดิวส์ (กรัม/ลิตร) | ไนโตรเจนรวม (กรัม/ลิตร) | PAA (กรัม/ลิตร) | ปริมาณเพนิซิลลิน จี (หน่วย/มล.) | (กรัม/ลิตร) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 72 | 7.05 | 22.80 | 0.90 | 3.81 | 0.50 | 0.46 | 3235 | |
| 96 | 7.78 | 13.59 | 0.85 | 3.58 | 0.80 | 0.29 | 2687 | 0.43 |
| 120 | 7.98 | 12.49 | 0.50 | 3.43 | 1.00 | 0.18 | 1497 | |
| 144 | 7.97 | 11.23 | 0.28 | 3.23 | 1.11 | 0.10 | 819 | |
| 168 | 8.07 | 10.84 | 0.14 | 2.66 | 1.14 | 0.07 | 469 | |

2. ปริมาณ PAA 1.0 กรัม/ลิตร

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 72 | 6.72 | 22.01 | 5.05 | 6.28 | 0.81 | 0.52 | 3450 | 0.62 |
| 96 | 7.53 | 20.17 | 0.98 | 3.66 | 0.92 | 0.37 | 2203 | |
| 120 | 7.76 | 16.13 | 0.89 | 3.58 | 1.00 | 0.28 | 1771 | |
| 144 | 7.93 | 12.90 | 0.78 | 3.54 | 1.23 | 0.19 | 1731 | |
| 168 | 8.02 | 10.97 | 0.75 | 3.52 | 1.39 | 0.12 | 1343 | |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 (ต่อ)

ใช้หัวเชื้ออายุ 72 ชม. ถ่ายลงในอาหารสูตรผลิตเพนิซิลลิน จี และเติม PAA เมื่อระยะเวลาในการหมักเท่ากับ 60 ชม.

1. ปริมาณ PAA 0.5 กรัม/ลิตร

| ระยะเวลาในการหมัก (ชม.) | pH | เซลแห้ง (กรัม/ลิตร) | น้ำตาลรีดิวส์ (กรัม/ลิตร) | ไนโตรเจนรวม (กรัม/ลิตร) | PAA (กรัม/ลิตร) | ปริมาณเพนิซิลลิน จี (หน่วย/มล.) | (กรัม/ลิตร) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 72 | 6.28 | 24.75 | 5.35 | 7.35 | 0.45 | 0.40 | 2850 |
| 96 | 7.39 | 22.39 | 0.90 | 3.97 | 0.78 | 0.27 | 3016 |
| 120 | 7.71 | 15.28 | 0.86 | 3.58 | 1.00 | 0.19 | 2323 |
| 144 | 7.88 | 14.57 | 0.76 | 3.23 | 1.11 | 0.04 | 819 |
| 168 | 7.95 | 13.62 | 0.66 | 2.72 | 1.30 | 0.02 | 749 |

2. ปริมาณ PAA 1.0 กรัม/ลิตร

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 72 | 6.49 | 24.71 | 3.97 | 6.35 | 0.85 | 0.78 | 1541 |
| 96 | 7.35 | 21.09 | 0.91 | 4.85 | 0.94 | 0.54 | 2526 |
| 120 | 7.72 | 14.58 | 0.67 | 3.97 | 1.10 | 0.35 | 926 |
| 144 | 8.05 | 13.79 | 0.65 | 3.58 | 1.23 | 0.28 | 756 |
| 168 | 8.12 | 10.56 | 0.66 | 3.54 | 1.34 | 0.16 | 694 |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 (ต่อ)

ใช้หัวเชื้ออายุ 72 ชม. ถ่ายลงในอาหารสูตรผลิตเพนิซิลลิน จี และเติม PAA เมื่อระยะเวลาในการหมักเท่ากับ 72 ชม.

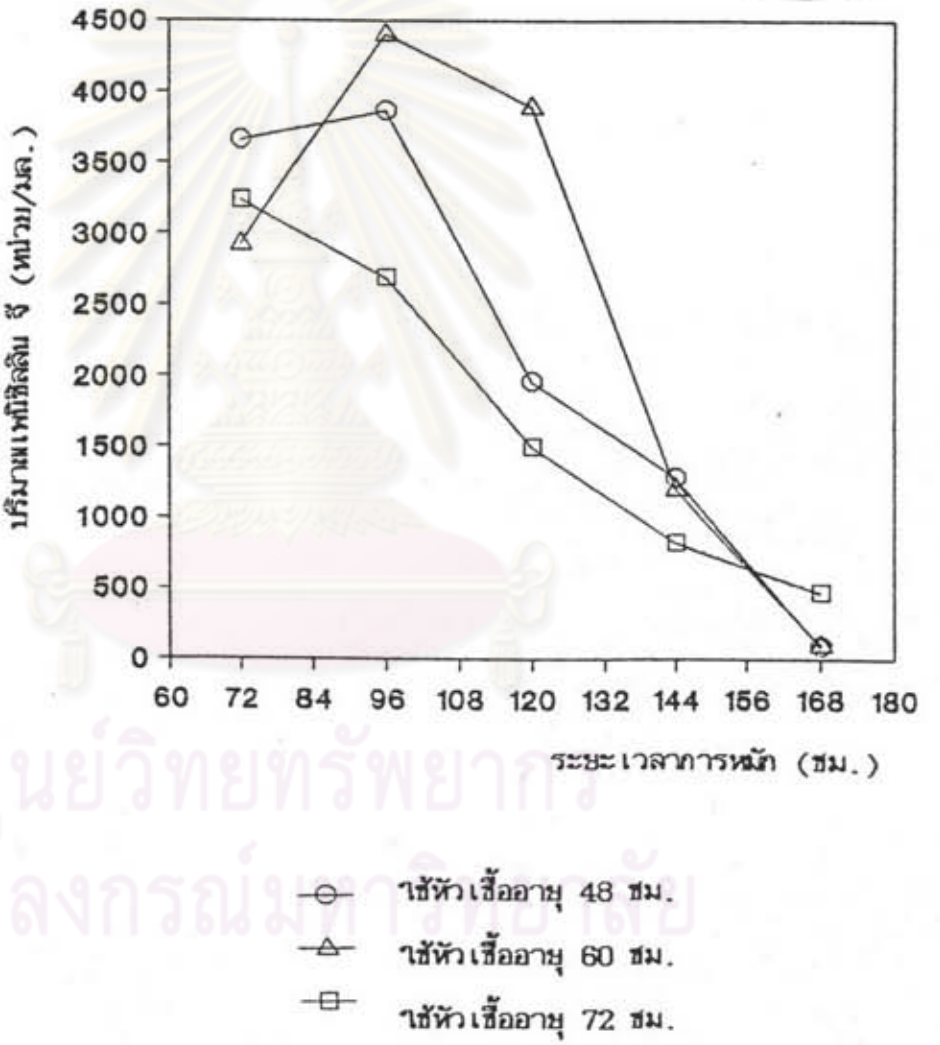
1. ปริมาณ PAA 0.5 กรัม/ลิตร

| ระยะเวลาในการหมัก (ชม.) | pH | เซลแห้ง (กรัม/ลิตร) | น้ำตาลรีดิวส์ (กรัม/ลิตร) | ไนโตรเจนรวม (กรัม/ลิตร) | PAA (กรัม/ลิตร) | ปริมาณเพนิซิลลิน จี (หน่วย/มล.) | (กรัม/ลิตร) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 72 | 5.92 | 29.84 | 2.12 | 3.89 | 1.07 | 0.37 | 1203 |
| 96 | 7.44 | 19.07 | 1.08 | 3.53 | 1.11 | 0.29 | 1203 |
| 120 | 7.81 | 14.02 | 1.05 | 3.46 | 1.20 | 0.22 | 1177 |
| 144 | 7.97 | 12.22 | 0.75 | 3.35 | 1.23 | 0.20 | 1048 |
| 168 | 8.05 | 10.60 | 0.72 | 3.30 | 1.37 | 0.20 | 415 |

2. ปริมาณ PAA 1.0 กรัม/ลิตร

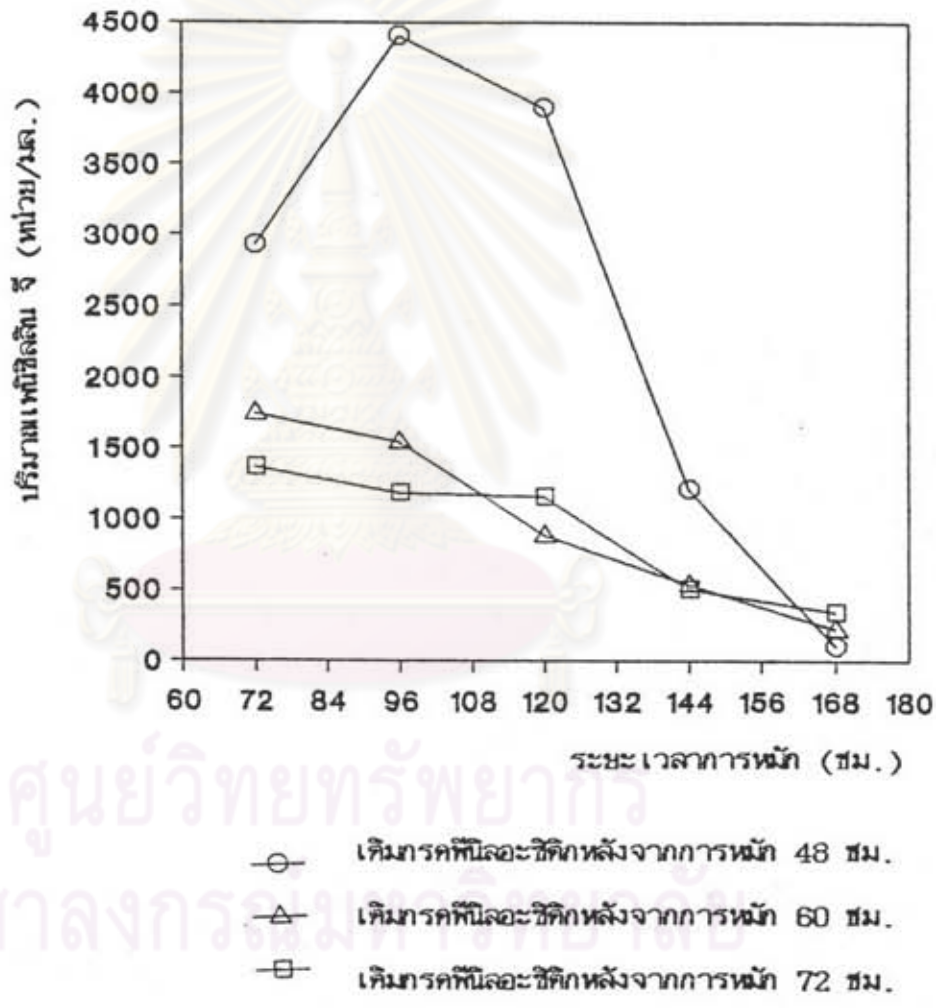
| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 72 | 5.63 | 27.76 | 1.05 | 3.97 | 0.87 | 1.05 | 1541 |
| 96 | 7.44 | 21.70 | 0.92 | 3.30 | 0.98 | 0.86 | 1855 |
| 120 | 7.89 | 14.35 | 0.79 | 3.23 | 1.00 | 0.51 | 1452 |
| 144 | 8.04 | 13.80 | 0.56 | 3.14 | 1.12 | 0.37 | 1345 |
| 168 | 8.12 | 13.28 | 0.45 | 3.12 | 1.35 | 0.25 | 153 |

จากตารางที่ 8 นำปริมาณเพนิซิลลิน จี ที่เชื้อผลิตได้จากการแปรผันอายุหัวเชื้อ มาเขียนเป็นกราฟดังรูปที่ 5 โดยเปรียบเทียบเฉพาะที่มีการเติมกรดฟีนิลอะซิติกเข้มข้น 0.5 กรัม/ลิตร เมื่อระยะเวลาในการหมักเท่ากับ 48 ชม. เพื่อดูอิทธิพลของอายุหัวเชื้อที่มีต่อการผลิตเพนิซิลลิน จี




รูปที่ 5 แสดงปริมาณเพนิซิลลิน จี ที่ได้จากการหมักที่มีการแปรผันอายุหัวเชื้อ โดยเติมกรดฟีนิลอะซิติกเข้มข้น 0.5 กรัม/ลิตร เมื่อระยะเวลาในการหมักเท่ากับ 48 ชม.

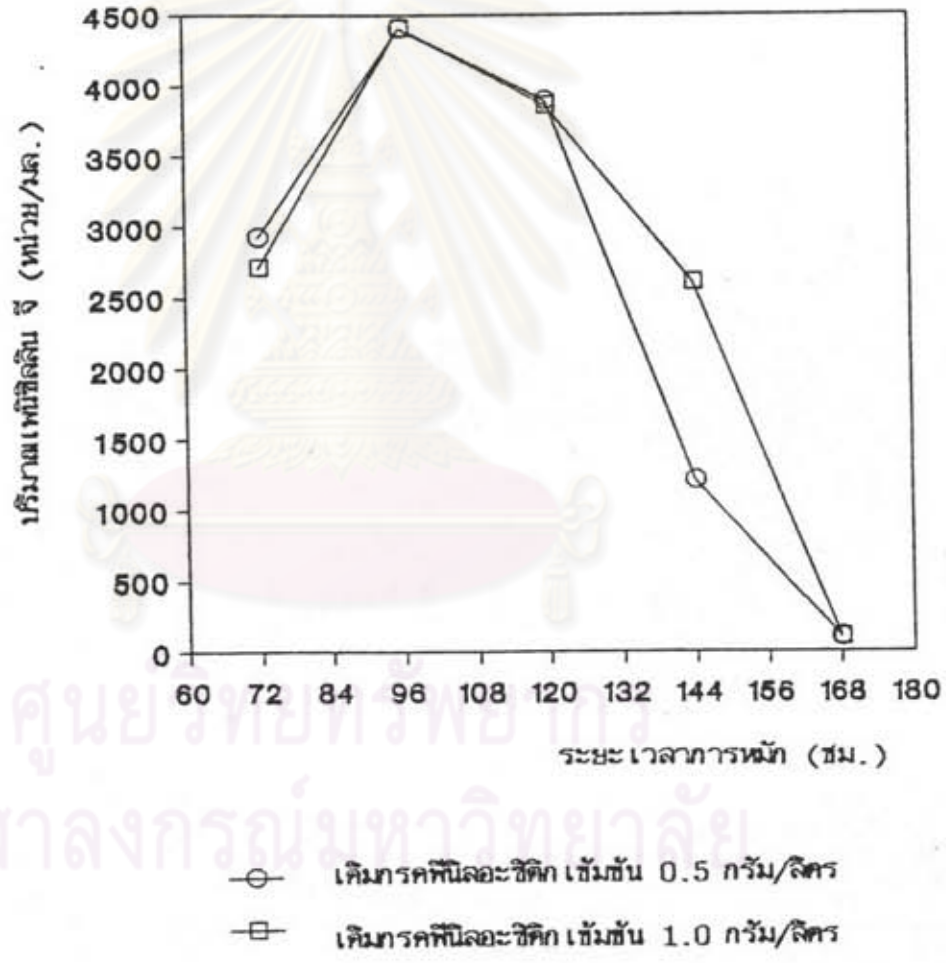
จากรูปที่ 5 พบว่าอายุหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเพนิซิลลิน จี อยู่ที่ 60 ชม. เพื่อหาเวลาที่เหมาะสมในการเติมกรดฟีนิลอะซิติก จึงทำการเปรียบเทียบโดยใช้หัวเชื้อที่มีอายุ 60 ชม. แล้วแปรผันเวลาในการเติมกรดฟีนิลอะซิติกเข้มข้น 0.5 กรัม/ลิตร แสดงผลในกราฟรูปที่ 6




รูปที่ 6 แสดงปริมาณเพนิซิลลิน จี ที่ได้จากการหมักหัวเชื้ออายุ 60 ชม. แปรผันเวลาในการเติมกรดฟีนิลอะซิติกเข้มข้น 0.5 กรัม/ลิตร เมื่อระยะเวลาในการหมักเท่ากับ 48 60 และ 72 ชม. ตามลำดับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากรูปที่ 5 และ 6 พบว่าอายุหัวเชื้อที่เหมาะสมคือ 60 ชม. เวลาที่เหมาะสำหรับการเติมกรดฟีนิลอะซิติกคือ 48 ชม. เพื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นกรดฟีนิลอะซิติกระหว่าง 0.5 และ 1.0 กรัม/ลิตร ที่มีต่อการผลิตเพนิซิลลิน จี จึงนำปริมาณเพนิซิลลิน จี ที่ได้จากการใช้หัวเชื้ออายุ 60 ชม. เลี้ยงในอาหารสูตรผลิตเพนิซิลลิน จี แล้วเติมกรดฟีนิลอะซิติกเข้มข้น 0.5 และ 1.0 กรัม/ลิตร เมื่อระยะเวลาในการหมักเท่ากับ 48 ชม. มาแสดงในกราฟรูปที่ 7




รูปที่ 7 แสดงปริมาณเพนิซิลลิน จี ที่ได้จากการหมักโดยใช้หัวเชื้ออายุ 60 ชม. เติมกรดฟีนิลอะซิติกเข้มข้น 0.5 และ 1.0 กรัม/ลิตร เมื่อระยะเวลาในการหมักเท่ากับ 48 ชม.

จากรูปที่ 7 พบว่ากรดฟีนิลอะซิติกเข้มข้น 1.0 กรัม/ลิตร ไม่ได้ทำให้เชื้อผลิตเพนิซิลลิน จี เพิ่มมากกว่าที่ใช้ความเข้มข้น 0.5 กรัม/ลิตร คือได้ปริมาณ 4406 หน่วย/มล.หรือ 1.19 และ 1.20 กรัม/ลิตร ในชม.ที่ 96 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก 2 ปัจจัย คือ สายพันธุ์นี้มีข้อจำกัดในสร้างสารตัวกลางในการผลิตเพนิซิลลิน จี การเติมกรดฟีนิลอะซิติกเพิ่มขึ้นจึงไม่ได้ทำให้ปริมาณเพนิซิลลิน จี เพิ่มขึ้นตามไปด้วย หรืออาจเป็นเพราะปัจจัยสำหรับการสร้างเพนิซิลลิน จี โดยเฉพาะอย่างยิ่งปริมาณน้ำตาลที่ให้อาจไม่เหมาะสมกับปริมาณกรดฟีนิลอะซิติก ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงแปรผันปริมาณกรดฟีนิลอะซิติกและแลคโตสไปพร้อมกัน

2.4 ผลของปริมาณแลคโตสและกรดฟีนิลอะซิติกที่มีต่อการผลิตเพนิซิลลิน จี

เลี้ยงเชื้อ *Penicillium chrysogenum* UNNN-9 ในอาหารเพื่อผลิตเพนิซิลลิน จี (ภาคผนวกที่ 1.3) ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.5 โดยแปรผันความเข้มข้นของแลคโตสเป็น 30 40 และ 50 กรัม/ลิตร และแปรผันความเข้มข้นของกรดฟีนิลอะซิติกเป็น 0.5 0.8 และ 1.0 กรัม/ลิตรของอาหารผลิตเพนิซิลลิน จี วิเคราะห์หาปริมาณเพนิซิลลิน จี เมื่อระยะเวลาในการหมักเท่ากับ 72 96 120 144 และ 168 ชม. ตามวิธีการทดลองที่ 3.1-3.6 แสดงผลการทดลองในตารางที่ 9

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 9 แสดงปริมาณเพนิซิลลิน จี ที่ได้เมื่อมีการแปรผันปริมาณแลคโตส เป็น 30 40 และ 50 กรัม/ลิตร โดยเติมกรดฟีนิลอะซิติกเข้มข้น 0.5 0.8 และ 1.0 กรัม/ลิตร เมื่อระยะเวลาในการหมักเท่ากับ 48 ชม.
ใช้น้ำตาลแลคโตส 30 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตเพนิซิลลิน จี

| ระยะเวลาในการหมัก (ชม.) | pH | น.นเซลแห้ง (กรัม/ลิตร) | น้ำตาลรีดิวส์ (กรัม/ลิตร) | ไนโตรเจนรวม (กรัม/ลิตร) | PAA (กรัม/ลิตร) | ปริมาณเพนิซิลลิน จี (หน่วย/มล.) (กรัม/ลิตร) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1. เติม PAA 0.5 กรัม/ลิตร | | | | | | |
| 72 | 6.00 | 23.88 | 6.07 | 8.31 | 0.85 | 0.10 | 2859 | |
| 96 | 7.40 | 21.99 | 0.77 | 3.54 | 0.96 | 0.08 | 4406 | |
| 120 | 7.80 | 16.60 | 0.71 | 2.22 | 1.04 | 0.03 | 4006 | 0.80 |
| 144 | 8.19 | 15.11 | 0.65 | 1.86 | 1.27 | 0.02 | 817 | |
| 168 | 8.08 | 11.88 | 0.55 | 1.54 | 1.30 | 0.02 | 683 | |
| | 2. เติม PAA 0.8 กรัม/ลิตร | | | | | | |
| 72 | 6.23 | 21.59 | 5.31 | 8.15 | 0.81 | 0.30 | 3041 | |
| 96 | 7.45 | 20.92 | 0.87 | 3.61 | 0.81 | 0.21 | 3494 | |
| 120 | 7.65 | 17.64 | 0.84 | 2.75 | 1.01 | 0.19 | 4187 | 0.81 |
| 144 | 8.16 | 14.87 | 0.72 | 1.92 | 1.15 | 0.12 | 638 | |
| 168 | 8.01 | 10.37 | 0.54 | 1.41 | 1.31 | 0.09 | 638 | |
| | 3. เติม PAA 1.0 กรัม/ลิตร | | | | | | |
| 72 | 6.57 | 20.68 | 5.08 | 8.92 | 0.92 | 0.59 | 2687 | |
| 96 | 6.65 | 20.09 | 0.73 | 3.07 | 0.77 | 0.32 | 3894 | |
| 120 | 7.33 | 19.07 | 0.66 | 2.72 | 0.88 | 0.21 | 5143 | 0.97 |
| 144 | 8.04 | 13.75 | 0.65 | 2.14 | 1.07 | 0.13 | 1340 | |
| 168 | 7.97 | 12.91 | 0.54 | 1.37 | 1.15 | 0.04 | 925 | |

ตารางที่ 9 (ต่อ)

ใช้น้ำตาลแลคโตส 40 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตเพนิซิลลิน จี

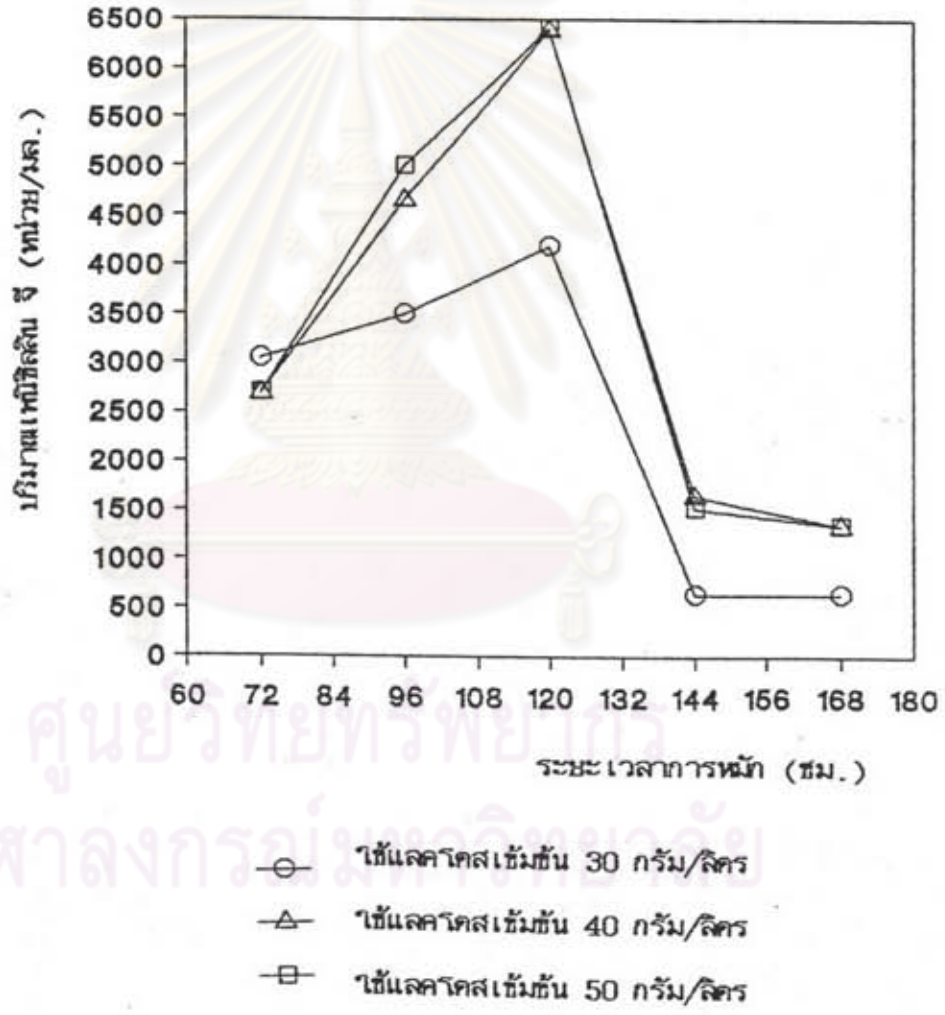
| ระยะเวลาในการหมัก (ชม.) | pH | น.น.เซลแห้ง (กรัม/ลิตร) | น้ำตาลรีดิวส์ (กรัม/ลิตร) | ไนโตรเจนรวม (กรัม/ลิตร) | PAA (กรัม/ลิตร) | ปริมาณเพนิซิลลิน จี (หน่วย/มล.) | (กรัม/ลิตร) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1. เติม PAA 0.5 กรัม/ลิตร | | | | | | |
| 72 | 5.98 | 22.58 | 9.69 | 13.54 | 0.69 | 0.14 | 2375 | |
| 96 | 6.81 | 28.25 | 1.72 | 5.06 | 0.62 | 0.03 | 5006 | |
| 120 | 7.51 | 21.87 | 0.72 | 3.56 | 0.77 | 0.02 | 5143 | 1.08 |
| 144 | 8.00 | 17.72 | 0.71 | 3.51 | 0.96 | 0.01 | 1946 | |
| 168 | 7.96 | 12.34 | 0.64 | 3.01 | 1.15 | 0.01 | 1184 | |
| | 2. เติม PAA 0.8 กรัม/ลิตร | | | | | | |
| 72 | 6.20 | 20.84 | 12.77 | 19.07 | 0.85 | 0.31 | 2687 | |
| 96 | 5.87 | 25.37 | 0.86 | 4.17 | 0.77 | 0.23 | 4661 | |
| 120 | 7.01 | 22.72 | 0.80 | 3.83 | 0.58 | 0.04 | 6384 | 1.65 |
| 144 | 7.96 | 16.42 | 0.54 | 3.25 | 0.88 | 0.03 | 1638 | |
| 168 | 7.93 | 13.68 | 0.41 | 3.06 | 1.01 | 0.01 | 1340 | |
| | 3. เติม PAA 1.0 กรัม/ลิตร | | | | | | |
| 72 | 5.95 | 14.08 | 14.38 | 21.69 | 1.15 | 0.52 | 1973 | |
| 96 | 6.08 | 24.20 | 3.94 | 7.12 | 0.73 | 0.34 | 3561 | |
| 120 | 6.74 | 26.95 | 0.62 | 4.15 | 0.62 | 0.31 | 4687 | 0.87 |
| 144 | 7.72 | 18.19 | 0.58 | 3.35 | 0.77 | 0.19 | 1184 | |
| 168 | 7.91 | 15.02 | 0.57 | 3.14 | 1.01 | 0.08 | 1184 | |

ตารางที่ 9 (ต่อ)

ใช้น้ำตาลแลคโตส 50 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตเพนิซิลลิน จี

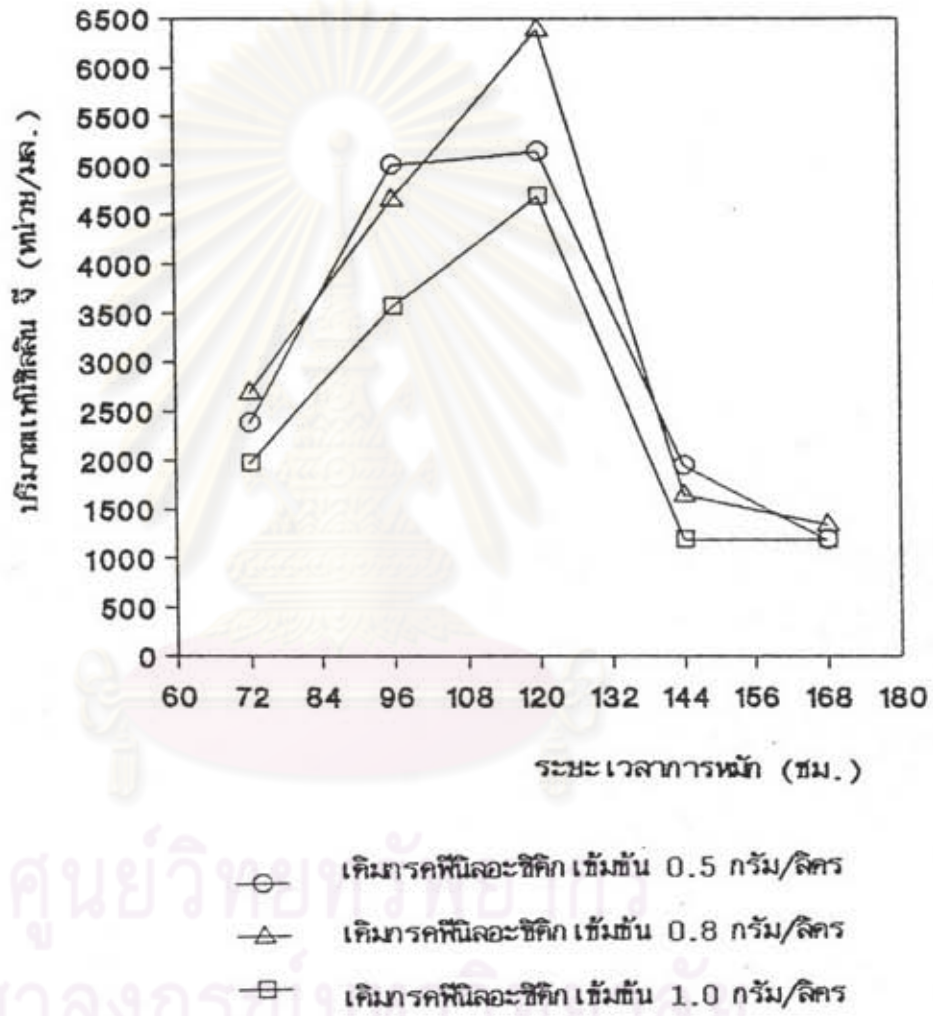
| ระยะเวลาในการหมัก (ชม.) | pH | น.น.เซลแห้ง (กรัม/ลิตร) | น้ำตาลรีดิวส์ (กรัม/ลิตร) | ไนโตรเจนรวม (กรัม/ลิตร) | PAA (กรัม/ลิตร) | ปริมาณเพนิซิลลิน จี (หน่วย/มล.) | (กรัม/ลิตร) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1. เติม PAA 0.5 กรัม/ลิตร | | | | | | |
| 72 | 6.01 | 24.58 | 19.31 | 22.01 | 0.84 | 0.08 | 3041 | |
| 96 | 5.81 | 33.57 | 2.71 | 6.74 | 0.73 | 0.03 | 5406 | |
| 120 | 6.54 | 32.21 | 0.83 | 3.67 | 0.54 | 0.01 | 5404 | 1.14 |
| 144 | 7.77 | 20.77 | 0.52 | 3.34 | 0.88 | 0.01 | 1716 | |
| 168 | 7.95 | 15.36 | 0.46 | 3.15 | 1.07 | 0.01 | 1184 | |
| | 2. เติม PAA 0.8 กรัม/ลิตร | | | | | | |
| 72 | 6.67 | 21.07 | 21.38 | 26.77 | 0.92 | 0.33 | 2687 | |
| 96 | 5.78 | 27.45 | 5.16 | 9.20 | 0.77 | 0.20 | 5006 | |
| 120 | 6.65 | 28.71 | 0.75 | 3.61 | 0.62 | 0.01 | 6404 | 1.77 |
| 144 | 7.90 | 17.62 | 0.71 | 3.35 | 0.88 | 0.01 | 1516 | |
| 168 | 7.93 | 15.04 | 0.67 | 3.21 | 1.07 | 0.01 | 1340 | |
| | 3. เติม PAA 1.0 กรัม/ลิตร | | | | | | |
| 72 | 6.42 | 21.15 | 19.85 | 28.31 | 1.01 | 0.42 | 2606 | |
| 96 | 5.83 | 26.69 | 8.25 | 11.35 | 0.85 | 0.34 | 4894 | |
| 120 | 6.49 | 27.42 | 0.92 | 4.13 | 0.69 | 0.14 | 5986 | 1.54 |
| 144 | 7.86 | 19.17 | 0.91 | 3.50 | 1.19 | 0.01 | 1716 | |
| 168 | 7.88 | 16.92 | 0.87 | 3.28 | 1.19 | 0.01 | 1184 | |

จากตารางที่ 9 พบว่าเชื้อจะผลิตเพนิซิลลิน จี เพิ่มขึ้นเมื่อใช้แลคโตสปริมาณมากขึ้น โดยพบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณแลคโตสจาก 30 กรัม/ลิตรเป็น 40 กรัม/ลิตร เชื้อผลิตเพนิซิลลิน จี ได้มากขึ้น 103.7 % คือเพิ่มจาก 0.81 กรัม/ลิตร เป็น 1.65 กรัม/ลิตร แต่เมื่อเพิ่มจาก 40 กรัม/ลิตร เป็น 50 กรัม/ลิตร ซึ่งใช้ปริมาณน้ำตาลเพิ่มขึ้น 10 กรัม/ลิตรเท่ากัน ได้ปริมาณเพนิซิลลิน จีมากขึ้นเพียง 7.27 % ใช้กราฟรูปที่ 8 แสดงผลของปริมาณแลคโตสที่มีต่อการผลิตเพนิซิลลิน จี โดยเปรียบเทียบเฉพาะการเติมกรดฟีนิลอะซิติกเข้มข้น 0.8 กรัม/ลิตร เมื่อระยะเวลาในการหมักเท่ากับ 48 ชม.




รูปที่ 8 แสดงปริมาณเพนิซิลลิน จี ที่ได้จากการแปรผันปริมาณแลคโตส โดยเติมกรดฟีนิลอะซิติกเข้มข้น 0.8 กรัม/ลิตร เมื่อระยะเวลาในการหมักเท่ากับ 48 ชม.

จากรูปที่ 8 พบว่าปริมาณแลคโตสที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเพนิซิลลิน จี ที่สุด คือ 40 กรัม/ลิตร เปรียบเทียบความเข้มข้นของกรดฟีนิลอะซิติกที่เหมาะสมในการผลิตเมื่อใช้แลคโตส 40 กรัม/ลิตร ได้ดังกราฟรูปที่ 9




รูปที่ 9 แสดงปริมาณเพนิซิลลิน จี ที่ได้จากการแปรผันปริมาณกรดฟีนิลอะซิติกเป็น 0.5 0.8 และ 1.0 กรัม/ลิตร โดยเติมเมื่อระยะเวลาในการหมักเท่ากับ 48 ชม. ในอาหารที่ใช้แลคโตส 40 กรัม/ลิตร

จากรูปที่ 9 สรุปได้ว่าความเข้มข้นของกรดฟีนิลอะซิติก ที่เหมาะสมต่อการผลิตเพนิซิลลิน จี คือ 0.8 กรัม/ลิตร

จากผลการทดลองที่เสนอ สรุปได้ว่าสภาวะที่เหมาะสมในระดับขวดเขย่าคือ การใช้ปริมาณสปอร์เริ่มต้น $2.5 \times 10^7$ สปอร์/ขวด ซึ่งบรรจุอาหารเตรียมหัวเชื้อ 50 มล. มิซูโครส 18 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงจนมีอายุครบ 60 ชม. จึงถ่าย 10 % (v/v)ของหัวเชื้อนี้ลงในอาหารสูตรผลิตเพนิซิลลิน จี ที่มีแลคโตส 40 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อใช้ในการผลิตเพนิซิลลิน จี โดยเติมกรดฟีนิลอะซิติกเข้มข้น 0.8 กรัม/ลิตร เมื่อระยะเวลาในการหมักเท่ากับ 48 ชม. การหมักในสภาวะดังกล่าวผลิตเพนิซิลลิน จี ได้สูงสุด 6384 หน่วย/มล.หรือ 1.65 กรัม/ลิตร ในชม.ที่ 120 ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะใช้สภาวะนี้ เป็นข้อมูลพื้นฐานในการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการหมักในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร เพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตเพนิซิลลิน จี ต่อไป

3. <u>การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเพนิซิลลิน จี โดย *Penicillium chrysogenum* UNNN-9 ในถังหมัก</u>

3.1 อัตราความเร็วรอบที่เหมาะสมในการกวนที่ 400 และ 500 รอบ/นาที

ถ่ายหัวเชื้อซึ่งเตรียมตามวิธีการทดลองที่ 2.3.4 ปริมาตร 350 มล. ลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวกที่ 1.5 ) ปริมาตร 3150 มล. เลี้ยงเชื้อตามวิธีการทดลองที่ 2.3.6 โดยใช้ความเร็วรอบ 400 และ 500 รอบ/นาที ตามลำดับ เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ทุก 12 ชม. ตลอดการหมัก โดยเก็บครั้งละ 25 มล. ผลที่ได้จากการใช้ความเร็ว 400 รอบ/นาที แสดงในตารางที่ 10 และรูปที่ 10 ส่วนผลที่ได้จากการใช้ความเร็ว 500 รอบ/นาที แสดงในตารางที่ 11 และรูปที่ 11

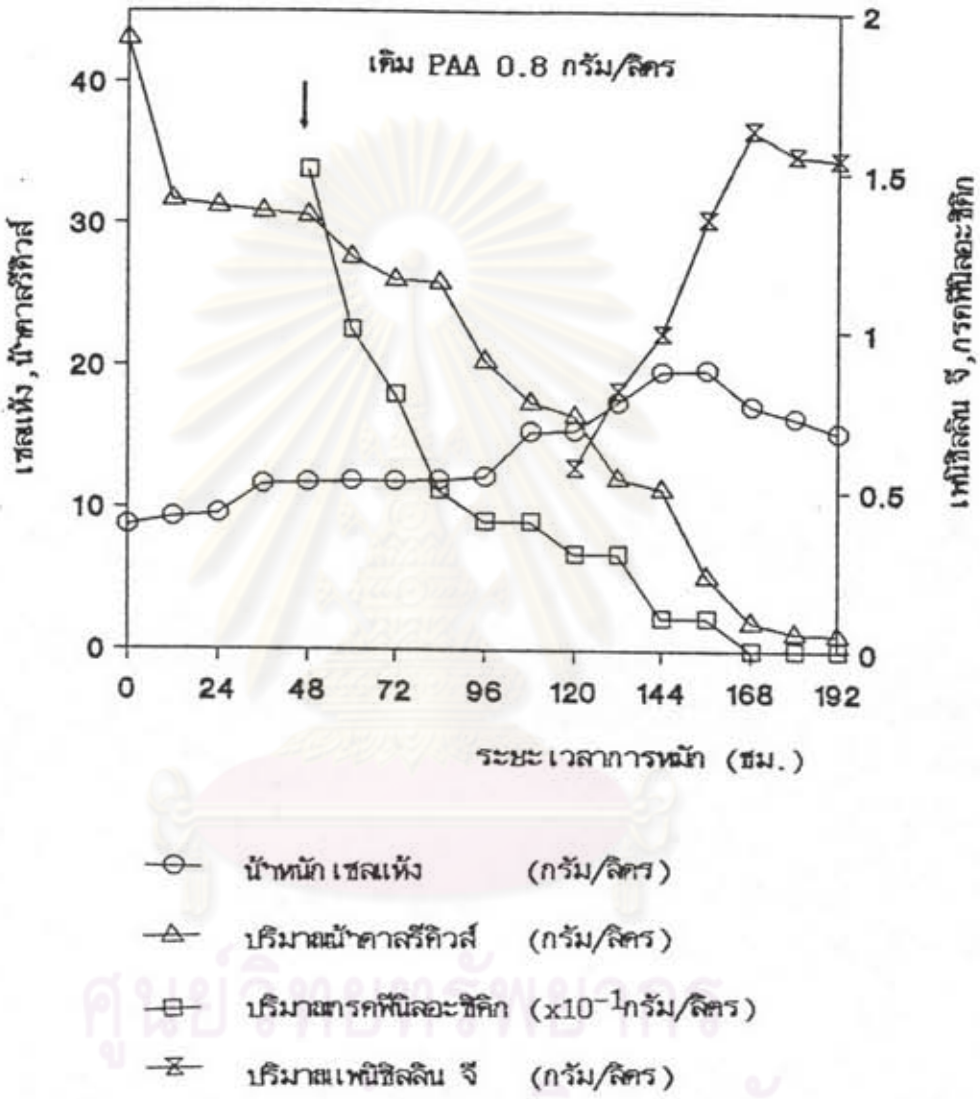
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 10 แสดงผลที่ได้จากการหมัก *Penicillium chrysogenum* UNNN-9 ในถังหมัก ขนาด 5 ลิตร โดยใช้ความเร็วในการกวน 400 รอบ/นาที

| ระยะเวลาในการหมัก (ชม.) | pH | น้ำหนักเซลแห้ง (กรัม/ลิตร) | น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร) | ไนโตรเจนรวม (กรัม/ลิตร) | PAA (กรัม/ลิตร) | ปริมาณเพนิซิลลิน จี (หน่วย/มล.) (กรัม/ลิตร) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 6.38 | 8.74 | 43.07 | 56.92 | 1.74 | | |
| 12 | 5.88 | 9.31 | 31.69 | 41.53 | 1.46 | | |
| 24 | 5.96 | 9.52 | 31.23 | 40.00 | 1.43 | | |
| 36 | 6.43 | 11.62 | 30.84 | 34.61 | 1.38 | | |
| 48 | 6.18 | 11.77 | 30.61 | 33.85 | 1.38 | 0.15 | 103 |
| 60 | 7.11 | 11.86 | 27.69 | 32.69 | 1.23 | 0.10 | 879 |
| 72 | 7.21 | 11.89 | 26.15 | 31.15 | 1.23 | 0.08 | 1356 |
| 84 | 7.07 | 11.90 | 25.96 | 30.38 | 1.23 | 0.05 | 2089 |
| 96 | 7.02 | 12.20 | 20.38 | 27.50 | 1.15 | 0.04 | 2584 |
| 108 | 6.59 | 15.38 | 17.50 | 23.26 | 1.11 | 0.04 | 2965 |
| 120 | 6.49 | 15.46 | 16.53 | 22.19 | 1.01 | 0.03 | 3495 0.57 |
| 132 | 6.41 | 17.50 | 12.11 | 16.53 | 0.98 | 0.03 | 4167 0.81 |
| 144 | 6.52 | 19.60 | 11.38 | 15.19 | 0.87 | 0.01 | 5249 0.99 |
| 156 | 6.56 | 19.74 | 5.23 | 10.30 | 0.85 | 0.01 | 5756 1.35 |
| 168 | 6.62 | 17.26 | 2.06 | 7.62 | 0.79 | NC | 6378 1.63 |
| 180 | 6.72 | 16.43 | 1.26 | 5.32 | 1.01 | NC | 6154 1.55 |
| 192 | 6.90 | 15.39 | 1.12 | 3.25 | 1.15 | NC | 6125 1.54 |

หมายเหตุ NC หมายถึง ปริมาณน้อยมากไม่สามารถคำนวณได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย




รูปที่ 10 แสดงผลที่ได้จากการหมัก *Penicillium chrysogenum* UNNN-9 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ความเร็วในการกวน 400 รอบ/นาที

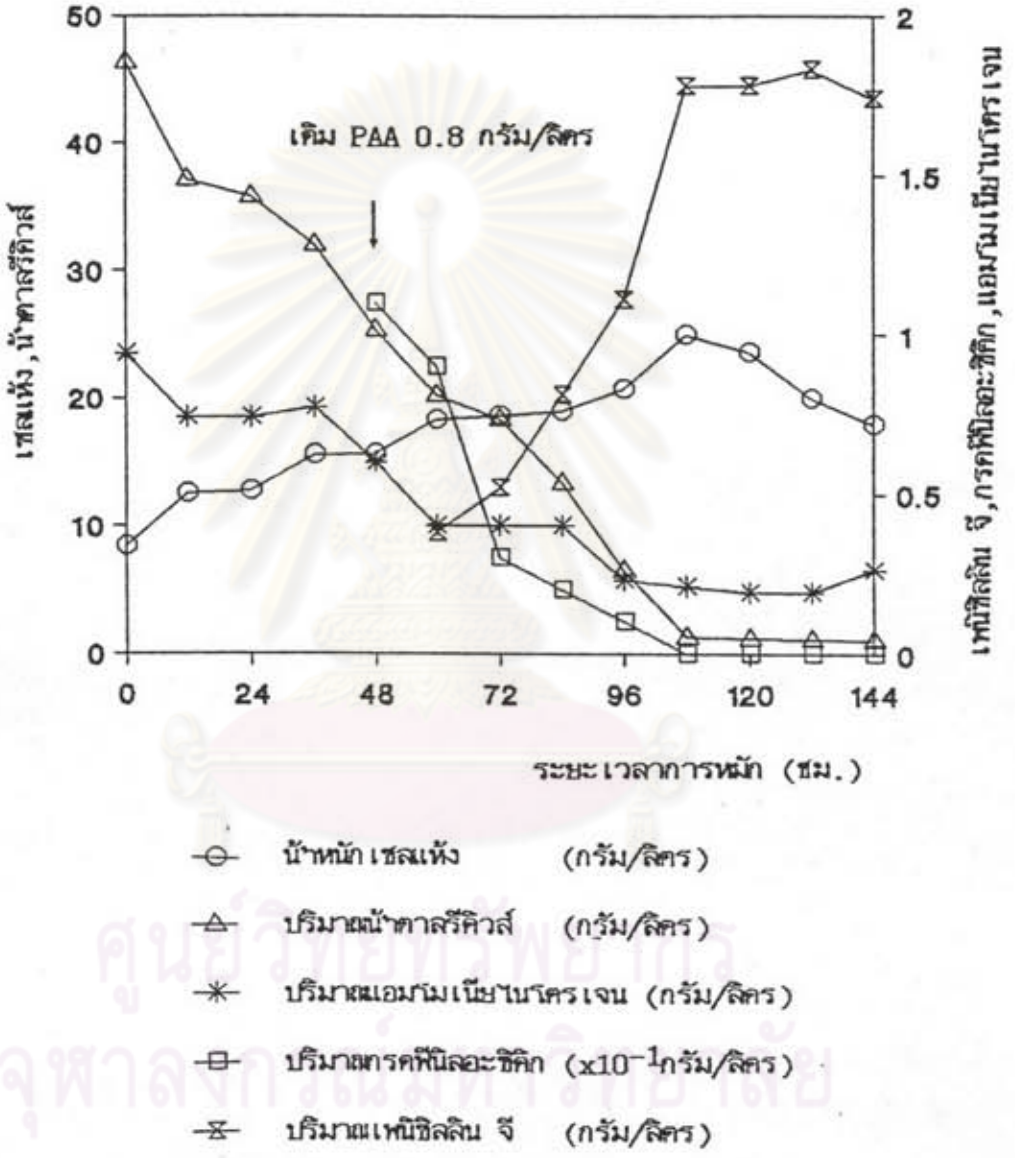
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 แสดงผลที่ได้จากการหมัก *Penicillium chrysogenum* UNNN-9 ในถังหมัก ขนาด 5 ลิตร โดยใช้ความเร็วในการกวน 500 รอบ/นาที

| ระยะเวลาในการหมัก (ชม.) | pH | น้ำหนักเซลแห้ง (กรัม/ลิตร) | น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร) | ไนโตรเจนรวม (กรัม/ลิตร) | ไนโตรเจนแอมโมเนีย (กรัม/ลิตร) | PAA รวม (กรัม/ลิตร) | ปริมาณเพนิซิลลิน จี (หน่วย/มล.) | (กรัม/ลิตร) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 6.20 | 8.45 | 46.41 | 59.05 | 0.94 | 1.77 | | |
| 12 | 6.11 | 12.59 | 37.13 | 48.86 | 0.74 | 1.54 | | |
| 24 | 6.12 | 12.79 | 35.84 | 47.17 | 0.74 | 1.46 | | |
| 36 | 6.95 | 15.54 | 32.07 | 43.50 | 0.77 | 1.31 | | |
| 48 | 6.22 | 15.65 | 25.41 | 33.77 | 0.60 | 1.31 | 0.11 | 151 | |
| 60 | 6.15 | 18.32 | 20.28 | 27.28 | 0.40 | 1.15 | 0.09 | 920 | 0.38 |
| 72 | 6.15 | 18.68 | 18.39 | 24.53 | 0.40 | 1.07 | 0.03 | 3041 | 0.52 |
| 84 | 6.10 | 19.01 | 13.39 | 17.74 | 0.40 | 0.84 | 0.02 | 3968 | 0.81 |
| 96 | 5.98 | 20.79 | 6.51 | 7.83 | 0.23 | 0.73 | 0.01 | 4406 | 1.11 |
| 108 | 5.79 | 25.01 | 1.31 | 5.36 | 0.21 | 0.73 | NC | 7685 | 1.78 |
| 120 | 6.51 | 23.60 | 1.22 | 4.91 | 0.19 | 0.61 | NC | 8175 | 1.78 |
| 132 | 7.43 | 19.96 | 1.13 | 4.50 | 0.19 | 0.61 | NC | 8175 | 1.83 |
| 144 | 7.54 | 17.94 | 1.09 | 4.29 | 0.26 | 0.84 | NC | 6384 | 1.74 |

หมายเหตุ NC หมายถึง ปริมาณน้อยมากไม่สามารถคำนวณได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย




รูปที่ 11 แสดงผลที่ได้จากการหมัก *Penicillium chrysogenum* UNNN-9 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ความเร็วในการกวน 500 รอบ/นาที

จากตารางที่ 10 และรูปที่ 10 พบว่าเชื้อผลิตเพนิซิลลิน จี เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ภายหลังจากที่มีการเติมกรดฟีนิลอะซิติกเข้มข้น 0.8 กรัม/ลิตรเมื่อระยะเวลาในการหมักเท่ากับ 48 ชม. โดยผลิตได้สูงสุด คือ 6378 หน่วย/มล.หรือ 1.63 กรัม/ลิตร ในชม.ที่ 168 และ น้ำหนักเซลแห้งขึ้นสูงสุด 19.74 กรัม/ลิตรในชม.ที่ 156 เมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตเพนิซิลลิน จี ในระดับขวดเขย่าแล้ว พบว่าการกวนที่ 400 รอบ/นาที ให้ปริมาณเพนิซิลลิน จี ใกล้เคียงกัน แต่ใช้เวลายาวกว่า คือในระดับขวดเขย่าเชื้อผลิตเพนิซิลลิน จี สูงสุด 6384 หน่วย/มล. หรือ 1.65 กรัม/ลิตร ในชม.ที่ 120 แสดงว่าการกวนที่ 400 รอบ/นาที อาจไม่เพียงพอให้เชื้อสัมผัสกับอาหาร อากาศ และสารตั้งต้น ทำให้เชื้อมีการเจริญและการผลิตที่ช้าออกไป จึงทดลองเพิ่มความเร็วในการกวนเป็น 500 รอบ/นาที

จากตารางที่ 11 และรูปที่ 11 เมื่อเพิ่มการกวนเป็น 500 รอบ/นาที พบว่ารูปแบบการเจริญจะไวขึ้นกว่าการกวนที่ 400 รอบ/นาที คือให้น้ำหนักเซลแห้งสูงสุด 25.01 กรัม/ลิตร ในชม.ที่ 108 ซึ่งเร็วกว่าถึง 48 ชม. อีกทั้งการใช้น้ำตาลและไนโตรเจนก็เร็วกว่าด้วย ทำให้ปริมาณเพนิซิลลิน จี ขึ้นสูงสุดในชม.ที่ใกล้เคียงกับที่ได้ในระดับขวดเขย่า คือ ที่ชม.ที่ 132 เชื้อผลิตเพนิซิลลิน จี ได้สูงสุด 8175 หน่วย/มล.หรือ 1.83 กรัม/ลิตร มากกว่าที่ได้จากการใช้ความเร็วรอบ 400 รอบ/นาที 9.20 % และมากกว่าการหมักในระดับขวดเขย่า 7.87 %

ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะใช้ความเร็วในการกวนเป็น 500 รอบ/นาที แปรผันความเข้มข้นของสารที่เติมต่อเนื่อง และอัตราการเติม จะไม่เพิ่มความเร็วรอบในการกวนสูงกว่า 500 รอบ/นาที เพราะวนิดาได้รายงานว่าในการหมักโดยสายพันธุ์ A-88 ที่ความเร็วรอบ 550 รอบ/นาที ทำให้สายใยเชื้อราขาด การผลิตเพนิซิลลิน จี ลดลง (85)

3.2 การเติมสารอย่างต่อเนื่อง

3.2.1 การเติมสารละลายกรดฟีนิลอะซิติกอย่างต่อเนื่อง

จากตารางที่ 11 และรูปที่ 11 พบว่าปริมาณเพนิซิลลิน จี ขึ้นสูงสุดในชม.ที่ 132 แต่กรดฟีนิลอะซิติกในน้ำหมักมีปริมาณน้อยจนไม่สามารถวัดได้ ตั้งแต่ระยะเวลาในการหมักเท่ากับ 108 ชม. อาจเป็นข้อจำกัดในการผลิตเพนิซิลลิน จี ดังนั้นจึงควรเติมกรดฟีนิลอะซิติกอย่างต่อเนื่อง โดยเริ่มเติมในชม.ที่ 72 ซึ่งเป็นจุดที่ปริมาณกรดฟีนิลอะซิติกลดลงมากกว่า 50 %

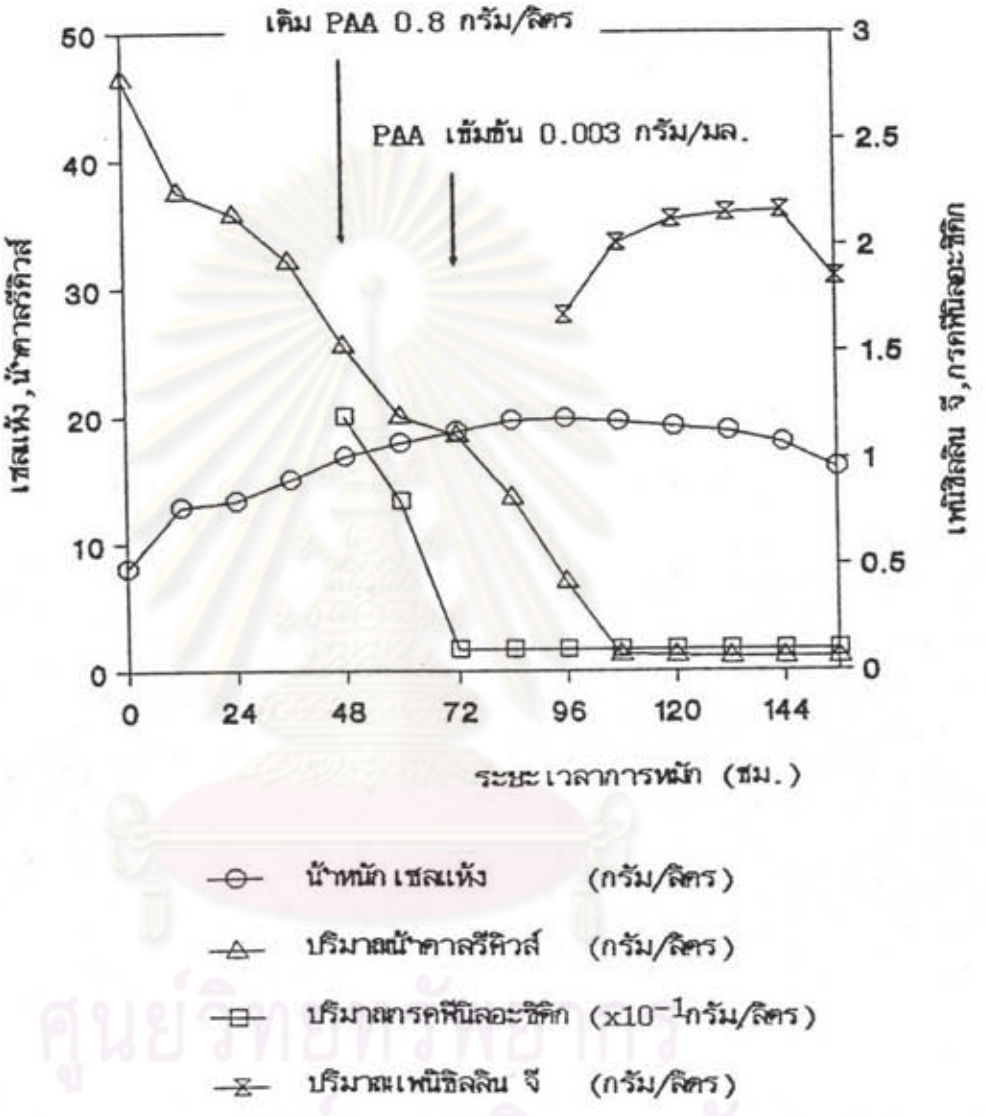
Tilly และคณะ รายงานว่าในการผลิตเพนิซิลลิน จี แบบต่อเนื่อง ในขณะที่เชื้ออยู่ในช่วงการผลิต มีอัตราการเจริญเท่ากับ 0.015 ชม.$^{-1}$ จะมีอัตราการรับกรดฟีนิลอะซิติก

เข้าเซลเพื่อรวมเป็นเพนิซิลลิน จี (Specific uptake rate )เป็น 1.8 มก./กรัมเซล/ชม. (54) เนื่องจากปริมาณเซลแห้งเมื่อเวลาการหมักเท่ากับ 72 ชม. ในตารางที่ 11 เท่ากับ 18.68 กรัม/ลิตร นำมาคำนวณโดยใช้อัตราการรับกรดฟีนิลอะซิติกตามรายงานข้างต้น เชื้อราจะต้องการปริมาณกรดฟีนิลอะซิติกประมาณ 0.03 กรัม/ชม. ดังนั้นการทดลองนี้จะทำการเลี้ยงเชื้อ *Penicillium chrysogenum* UNNN-9 ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.6 โดยใช้ความเร็วรอบ 500 รอบ/นาที เมื่อระยะเวลาในการหมักเท่ากับ 48 ชม. เติมกรดฟีนิลอะซิติกให้มีความเข้มข้นในน้ำหมักเป็น 0.8 กรัม/ลิตร และเมื่อระยะเวลาในการหมักเท่ากับ 72 ชม. จึงเริ่มเติมกรดฟีนิลอะซิติก เข้มข้น 0.003 กรัม/มล.ปริมาตร 18 มล.ทุก ๆ 2 ชม. จนสิ้นสุดการหมัก คิดเป็นปริมาณกรดฟีนิลอะซิติกที่เติมเท่ากับ 0.027 กรัม/ชม. เก็บตัวอย่างปริมาตร 25 มล. ทุก ๆ 12 ชม. มาวิเคราะห์ตามวิธีการทดลองในข้อ 3.1-3.6 ได้ผลแสดงในตารางที่ 12 และกราฟที่ 12

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 12 แสดงผลที่ได้จากการหมักในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ความเร็วในการกวนเป็น 500 รอบ/นาที และเมื่อระยะเวลาในการหมักเท่ากับ 72 ชม. เริ่มเติมกรดฟีนิลอะซิติกเข้มข้น 0.003 กรัม/มล. ปริมาตร 18 มล.ทุก ๆ 2 ชม. คิดเป็นปริมาณ 0.027 กรัม/ชม.

| ระยะเวลาในการหมัก (ชม.) | pH | น้ำหนักเซลแห้ง (กรัม/ลิตร) | น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร) | ไนโตรเจนรวม (กรัม/ลิตร) | PAA (กรัม/ลิตร) | ปริมาณเพนิซิลลิน จี (หน่วย/มล.) (กรัม/ลิตร) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 6.27 | 8.09 | 46.37 | 59.37 | 1.75 | | |
| 12 | 5.78 | 12.87 | 37.53 | 48.01 | 1.42 | | |
| 24 | 6.34 | 13.31 | 35.75 | 46.65 | 1.38 | | |
| 36 | 6.12 | 15.01 | 32.10 | 43.30 | 1.31 | | |
| 48 | 6.01 | 16.85 | 25.54 | 33.85 | 1.23 | 0.12 | 151 |
| 60 | 6.14 | 17.86 | 19.97 | 27.58 | 1.15 | 0.08 | 869 |
| 72 | 6.00 | 18.82 | 18.53 | 24.46 | 1.11 | 0.01 | 3184 |
| 84 | 5.98 | 19.62 | 13.60 | 17.53 | 1.07 | 0.01 | 4280 |
| 96 | 5.88 | 19.75 | 7.03 | 13.46 | 1.01 | 0.01 | 6384 1.67 |
| 108 | 5.88 | 19.58 | 1.25 | 5.51 | 0.88 | 0.01 | 9867 2.01 |
| 120 | 6.11 | 19.12 | 1.18 | 4.87 | 0.85 | 0.01 | 10496 2.12 |
| 132 | 6.98 | 18.78 | 1.07 | 4.52 | 0.69 | 0.01 | 10496 2.15 |
| 144 | 7.43 | 17.87 | 1.05 | 4.50 | 1.15 | 0.01 | 10496 2.16 |
| 156 | 8.00 | 15.95 | 1.05 | 4.20 | 1.23 | 0.01 | 8197 1.85 |




รูปที่ 12 แสดงผลที่ได้จากการหมักในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ความเร็วในการกวนเป็น 500 รอบ/นาที เมื่อระยะเวลาการหมักเท่ากับ 72 ชม. จึงเริ่มเติมกรดฟีนิลอะซิติกเข้มข้น 0.003 กรัม/มล. ปริมาตร 18 มล.ทุก ๆ 2 ชม. คิดเป็นปริมาณ 0.027 กรัม/ชม.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากตารางที่ 12 และรูปที่ 12 พบว่าน้ำหนักเซลแห้งขึ้นสูงสุดในชม.ที่ 96 เพียง 19.75 กรัม/ลิตรและวัดปริมาณกรดฟีนิลอะซิติกได้เพียง 0.01 กรัม/ลิตร ตั้งแต่ชม.ที่ 72 ซึ่งต่ำกว่าที่ควรเป็นเมื่อเทียบกับผลการทดลองที่ผ่านมา คาดว่าเกิดจากการเจือจางของน้ำหมัก เพราะในแต่ละวันเติมกรดฟีนิลอะซิติกปริมาตร 216 มล. หรือเติมไปทั้งหมดคิดจนถึงชม.ที่ 120 คือ 1.35 กรัม เมื่อรวมกับปริมาณกรดฟีนิลอะซิติกที่เติมเมื่อระยะการหมัก 48 ชม. เป็น 4.15 กรัม หรือ 1.18 กรัม/ลิตร

แม้ว่าจะเกิดการเจือจางขึ้น แต่ปริมาณเพนิซิลลิน จี ที่ได้กลับมีค่าเพิ่มขึ้นคือ ในชม.ที่ 120 เป็นจุดที่เชื้อเริ่มผลิตได้สูงคิดเป็น 10496 หน่วย/มล.หรือ 2.12 กรัม/ลิตร และค่อนข้างคงที่เป็น 2.15 และ 2.16 กรัม/ลิตร ในชม.ที่ 132 และ 144 ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าผลการทดลองในตารางที่ 11 ซึ่งไม่มีการเติมกรดฟีนิลอะซิติกอย่างต่อเนื่อง แสดงให้เห็นว่าการเติมกรดฟีนิลอะซิติกต่อเนื่องทำให้การผลิตเพนิซิลลิน จี เพิ่มขึ้น เนื่องจากการทดลองครั้งนี้ความเข้มข้นของกรดฟีนิลอะซิติกที่เติมต่ำไป ทำให้ต้องใช้ปริมาตรที่เติมสูง ซึ่งมีผลทำให้น้ำหมักเพิ่มปริมาณ ดังนั้นค่าความเข้มข้นของเซล ผลิตภัณฑ์ ตลอดจนสารอาหารต่าง ๆ ที่ได้จึงเจือจางลง ไม่ตรงกับความจริง ดังนั้นการทดลองต่อไป จึงเพิ่มความเข้มข้นของกรดฟีนิลอะซิติกที่เติม แต่ใช้อัตราการเติมช้าลง เพื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองครั้งนี้ และใช้เป็นข้อมูลในการปรับสภาวะในการทดลองต่อไป

3.2.2 การเติมสารละลายกรดฟีนิลอะซิติกและแอมโมเนียมอะซิเตตอย่างต่อเนื่อง

3.2.2.1 เติมกรดฟีนิลอะซิติกเข้มข้น 0.025 กรัม/มล. ไปพร้อมกับแอมโมเนียมอะซิเตตเข้มข้น 0.1 กรัม/มล.

จากการทดลองในข้อ 3.2.1 พบว่าเกิดการเจือจาง ทำให้ผลการทดลองที่วิเคราะห์ได้คลาดเคลื่อน การทดลองนี้จึงเพิ่มความเข้มข้นของกรดฟีนิลอะซิติกที่เติม แต่เปลี่ยนอัตราการเติมให้ช้าลง เพื่อให้มีปริมาณใกล้เคียงกับผลการทดลองในข้อ 3.2.1 ซึ่งเท่ากับ 0.027 กรัม/ชม. จากการคำนวณพบว่าด้วยอัตราการเติม 12 มล. ทุก ๆ 12 ชม. โดยใช้กรดฟีนิลอะซิติกเข้มข้น 0.025 กรัม/มล. ให้ปริมาณใกล้เคียงที่สุดคือ 0.025 กรัม/ชม. จึงเลือกใช้ที่ความเข้มข้นและอัตราการเติมดังกล่าวนี้

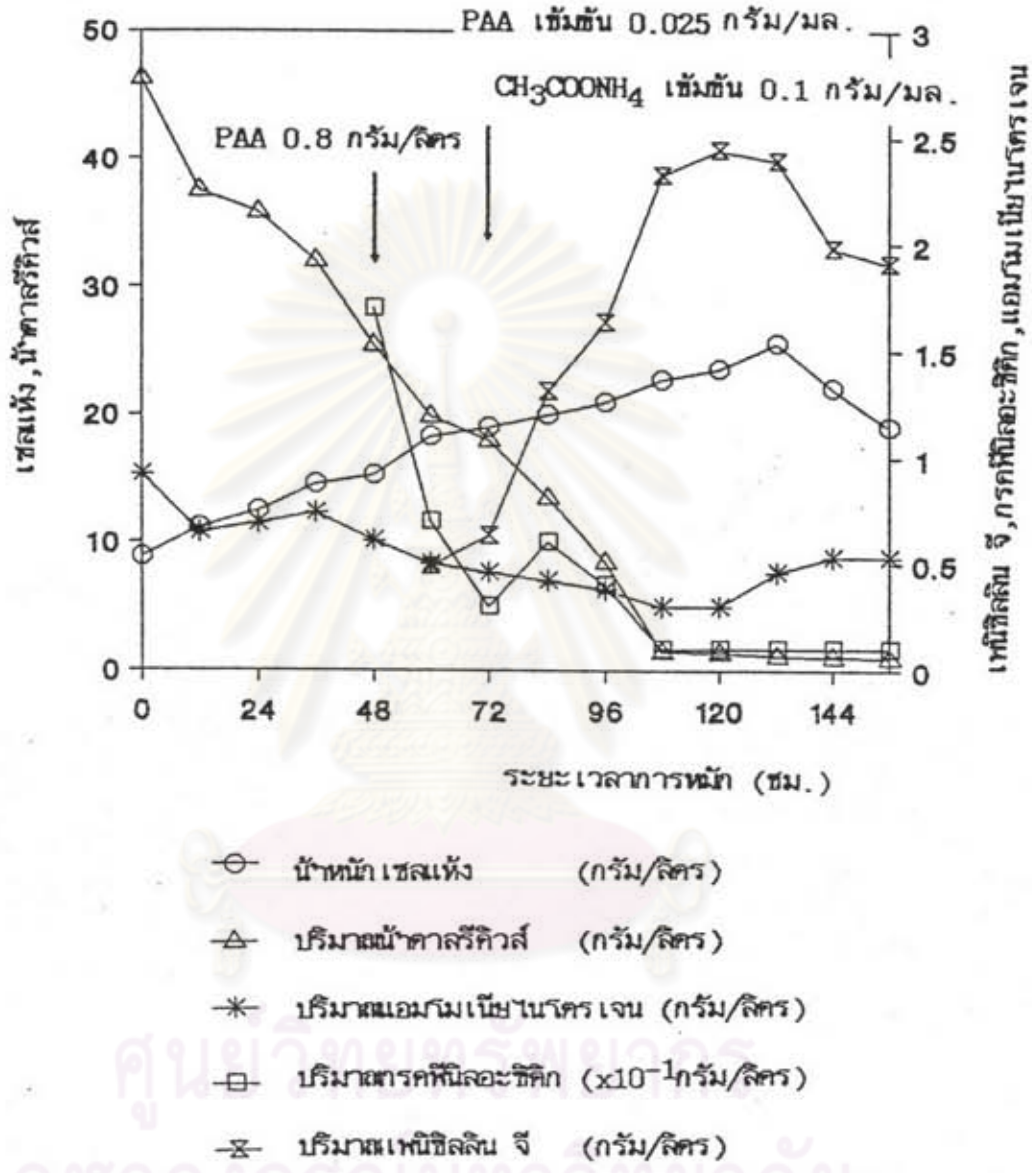
เนื่องจากมีรายงานว่าในการหมักเพนิซิลลิน จี ไม่ควรให้ระดับแอมโมเนียไนโตรเจนต่ำกว่า 0.2-0.3 กรัม/ลิตร (25,32) เพราะจะทำให้เซลเกิดการสลาย

เร็ว จากผลการทดลองที่แสดงในตารางที่ 11 และรูปที่ 11 ซึ่งไม่มีการเติมสารต่อเนื่อง พบว่าระดับของแอมโมเนียไนโตรเจนลดลงเหลือ 0.23 กรัม/ลิตร ตั้งแต่ชม.ที่ 96 ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเติมสารละลายผสมระหว่างแอมโมเนียมอะซิเตตเข้มข้น 0.1 กรัม/มล. และกรดฟีนิลอะซีติกเข้มข้น 0.025 กรัม/มล. เติมปริมาตร 12 มล. ทุก ๆ 12 ชม. เริ่มเติมเมื่อระยะเวลาในการหมักเท่ากับ 72 ชม. แสดงผลที่ได้ในตารางที่ 13 และกราฟรูปที่ 13

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 13 แสดงผลที่ได้จากการหมักในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ความเร็วในการกวนเป็น 500 รอบ/นาที เมื่อระยะเวลาในการหมักเท่ากับ 72 เริ่มเติมสารละลายผสมของกรดฟีนิลอะซีติกเข้มข้น 0.025 กรัม/มล. และแอมโมเนียมอะซิเตตเข้มข้น 0.1 กรัม/มล. ปริมาตร 12 มล. ทุก ๆ 12 ชม.

| ระยะเวลาในการหมัก (ชม.) | pH | น้ำหนักเซลแห้ง (กรัม/ลิตร) | น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร) | ไนโตรเจนรวม (กรัม/ลิตร) | แอมโมเนีย (กรัม/ลิตร) | PAA รวม (กรัม/ลิตร) | ปริมาณเพนิซิลลิน จี (หน่วย/มล.) | (กรัม/ลิตร) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 6.22 | 8.84 | 46.25 | 58.11 | 0.92 | 1.70 | | |
| 12 | 5.76 | 11.18 | 37.53 | 47.13 | 0.65 | 1.50 | | |
| 24 | 6.11 | 12.52 | 35.85 | 46.69 | 0.69 | 1.42 | | |
| 36 | 6.95 | 14.56 | 32.04 | 43.77 | 0.74 | 1.30 | | |
| 48 | 5.99 | 15.32 | 25.45 | 33.11 | 0.61 | 1.30 | 0.17 | 172 |
| 60 | 5.99 | 18.31 | 19.93 | 27.36 | 0.50 | 1.11 | 0.07 | 1638 | 0.49 |
| 72 | 6.18 | 18.97 | 18.02 | 23.77 | 0.46 | 1.07 | 0.03 | 3099 | 0.63 |
| 84 | 6.40 | 19.97 | 13.56 | 19.81 | 0.42 | 1.03 | 0.06 | 5235 | 1.31 |
| 96 | 6.15 | 20.98 | 8.47 | 13.39 | 0.38 | 1.03 | 0.04 | 6402 | 1.63 |
| 108 | 5.75 | 22.70 | 1.50 | 6.37 | 0.30 | 0.92 | 0.01 | 11877 | 2.32 |
| 120 | 6.00 | 23.59 | 1.45 | 5.88 | 0.30 | 0.96 | 0.01 | 13439 | 2.44 |
| 132 | 7.12 | 25.58 | 1.15 | 4.88 | 0.46 | 1.15 | 0.01 | 12634 | 2.39 |
| 144 | 7.23 | 22.10 | 1.05 | 4.51 | 0.53 | 1.23 | 0.01 | 9657 | 1.98 |
| 156 | 7.75 | 19.10 | 1.02 | 4.38 | 0.53 | 1.30 | 0.01 | 9657 | 1.91 |




รูปที่ 13 แสดงผลที่ได้จากการหมักในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ความเร็วในการกวนเป็น 500 รอบ/นาที เมื่อระยะเวลาในการหมักเท่ากับ 72 เริ่มเติมสารละลายผสมของกรดฟีนิลอะซิติกเข้มข้น 0.025 กรัม/มล. และแอมโมเนียมอะซิเตตเข้มข้น 0.1 กรัม/มล. ปริมาตร 12 มล.ทุก ๆ 12 ชม.

จากตารางที่ 13 และรูปที่ 13 พบว่าการเติมกรดฟีนิลอะซิติกเข้มข้น 0.025 กรัม/มล. ปริมาตร 12 มล. ทุก ๆ 12 ชม. คิดเป็นปริมาณ 0.025 กรัม/ชม. หรือคิดเป็นปริมาณรวมจนถึงชม.ที่ 120 เท่ากับ 4.3 กรัม หรือ 1.22 กรัม/ลิตร และการเติมแอมโมเนียมอะซิเตตปริมาณทั้งหมด 6 กรัม คิดเป็นปริมาณแอมโมเนีย 1.32 กรัม หรือ 0.37 กรัม/ลิตร ที่เวลาเดียวกัน ทำให้เชื้อผลิตเพนิซิลลิน จี ได้ 13439 หน่วย/มล.หรือ 2.44 กรัม/ลิตร ในชม.ที่ 120 มากกว่าปริมาณที่ได้ในการทดลองที่ไม่เติมสารต่อเนื่อง 37.07 % เมื่อคิดเป็นปริมาณเพนิซิลลิน จี รวมได้เท่ากับ 6.27 กรัม ใกล้เคียงกับปริมาณเพนิซิลลิน จี รวมที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.2.1 ซึ่งได้ 6.25 กรัม

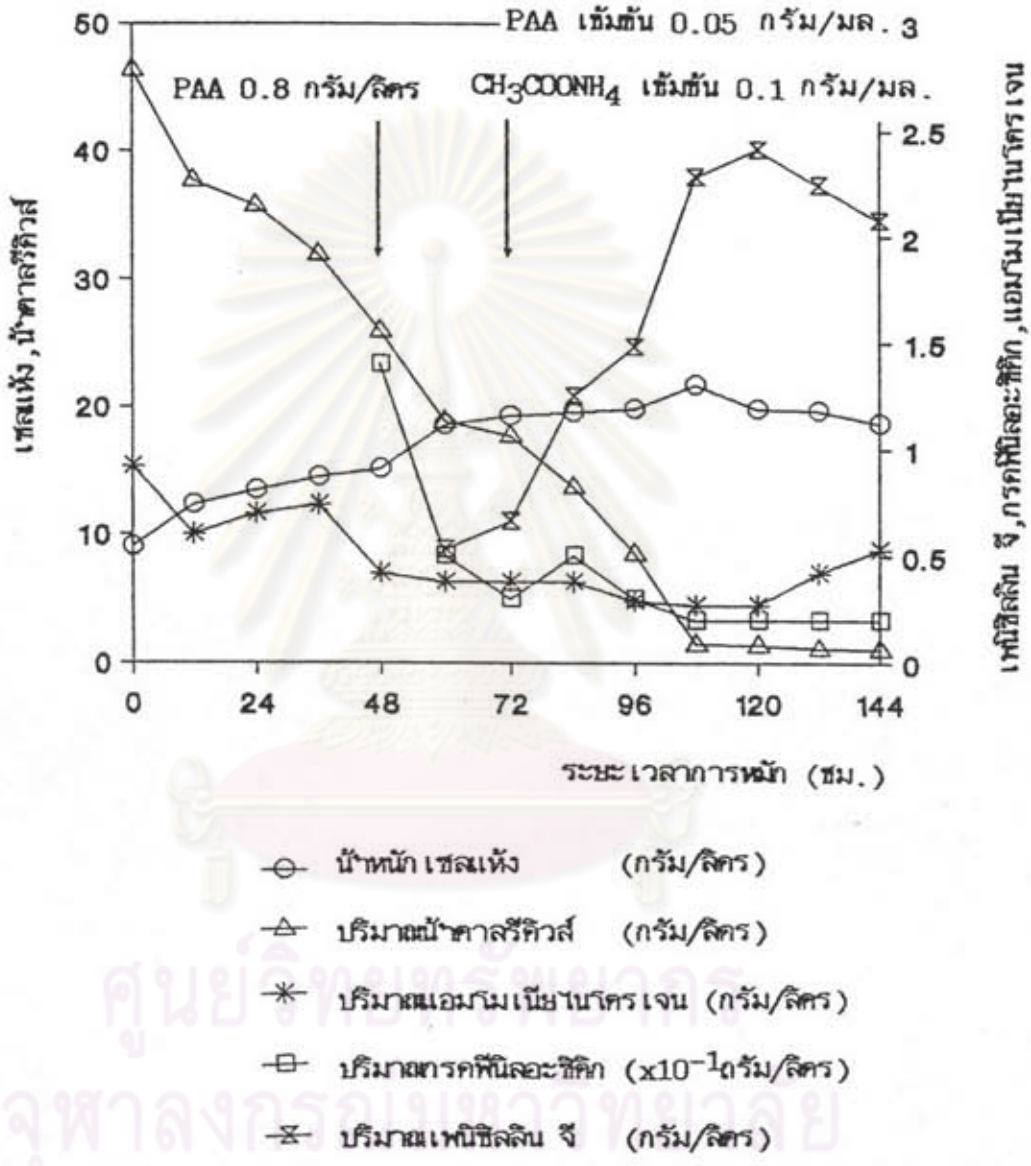
เมื่อสังเกตปริมาณกรดฟีนิลอะซิติกพบว่าตั้งแต่ชม.ที่ 108 เหลือเพียง 0.01 กรัม/ลิตร อาจจะไม่พอสำหรับการสร้างเพนิซิลลิน จี ซึ่งได้สูงสุดในชม.ที่ 120 ดังนั้นการทดลองต่อไปจะเพิ่มความเข้มข้นของกรดฟีนิลอะซิติก แต่คงอัตราการเติมไว้ที่ 12 มล. ทุก ๆ 12 ชม.

3.2.2.2 เติมกรดฟีนิลอะซิติกเข้มข้น 0.05 กรัม/มล. ไปพร้อมกับแอมโมเนียมอะซิเตตเข้มข้น 0.1 กรัม/มล.

จากผลการทดลองในข้อ 3.2.2.1 พบว่าปริมาณกรดฟีนิลอะซิติก เหลือเพียง 0.01 กรัม/ลิตร ตั้งแต่ระยะเวลาในการหมักเท่ากับ 108 ชม. คาดว่าอาจจะไม่เพียงพอสำหรับการผลิตเพนิซิลลิน จี ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเพิ่มความเข้มข้นของกรดฟีนิลอะซิติกเป็น 0.05 กรัม/มล. โดยคงอัตราการเติม 12 มล. ทุก ๆ 12 ชม. หรือคิดเป็นปริมาณ 0.05 กรัม/ชม. เติมไปพร้อมกับแอมโมเนียมอะซิเตตเข้มข้น 0.1 กรัม/มล.เริ่มเติมตั้งแต่ระยะเวลาในการหมักเท่ากับ 72 ชม. แสดงผลในตารางที่ 14 และกราฟรูปที่ 14

ตารางที่ 14 แสดงผลที่ได้จากการหมักในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ความเร็วในการกวนเป็น 500 รอบ/นาที เมื่อระยะเวลาในการหมักเท่ากับ 72 เริ่มเติมสารละลายผสมกรดฟีนิลอะซิติกเข้มข้น 0.05 กรัม/มล. และแอมโมเนียมอะซิเตตเข้มข้น 0.1 กรัม/มล. ปริมาตร 12 มล. ทุก ๆ 12 ชม.

| ระยะเวลาในการหมัก (ชม.) | pH | น้ำหนักเซลแห้ง (กรัม/ลิตร) | น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร) | ไนโตรเจนรวม (กรัม/ลิตร) | แอมโมเนียรวม (กรัม/ลิตร) | PAA (กรัม/ลิตร) | ปริมาณเพนิซิลลิน จี (หน่วย/มล.) | (กรัม/ลิตร) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 6.22 | 9.06 | 46.41 | 58.69 | 0.92 | 1.73 | | |
| 12 | 5.74 | 12.35 | 37.73 | 47.13 | 0.60 | 1.45 | | |
| 24 | 6.15 | 13.45 | 35.74 | 46.69 | 0.70 | 1.42 | | |
| 36 | 6.95 | 14.54 | 31.95 | 43.57 | 0.74 | 1.35 | | |
| 48 | 5.54 | 15.16 | 25.94 | 33.15 | 0.42 | 1.27 | 0.14 | 171 | |
| 60 | 5.83 | 18.59 | 18.86 | 27.30 | 0.38 | 1.15 | 0.05 | 1284 | 0.53 |
| 72 | 5.88 | 19.27 | 17.73 | 23.54 | 0.38 | 1.07 | 0.03 | 3145 | 0.66 |
| 84 | 6.46 | 19.54 | 13.77 | 19.95 | 0.38 | 1.07 | 0.05 | 3856 | 1.25 |
| 96 | 6.36 | 19.83 | 8.55 | 13.48 | 0.29 | 0.98 | 0.03 | 4516 | 1.48 |
| 108 | 6.54 | 21.75 | 1.48 | 6.52 | 0.27 | 0.95 | 0.02 | 11525 | 2.28 |
| 120 | 6.78 | 19.85 | 1.45 | 5.74 | 0.27 | 0.95 | 0.02 | 13156 | 2.41 |
| 132 | 7.56 | 19.71 | 1.11 | 4.91 | 0.42 | 1.15 | 0.02 | 11782 | 2.24 |
| 144 | 7.85 | 18.75 | 1.05 | 4.65 | 0.53 | 1.31 | 0.02 | 9956 | 2.08 |




รูปที่ 14 แสดงผลที่ได้จากการหมักในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ความเร็วในการกวนเป็น 500 รอบ/นาที เมื่อระยะเวลาในการหมักเท่ากับ 72 เริ่มเติมสารละลายผสมกรดฟีนิลอะซิติกเข้มข้น 0.05 กรัม/มล. และแอมโมเนียมอะซิเตตเข้มข้น 0.1 กรัม/มล. ปริมาตร 12 มล. ทุก ๆ 12 ชม.

จากตารางที่ 14 และรูปที่ 14 พบว่าการเติมกรดฟีนิลอะซิติกเข้มข้น 0.05 กรัม/มล. ปริมาตร 12 มล. ทุก ๆ 12 ชม. คิดเป็นปริมาณ 0.05 กรัม/ชม. หรือคิดเป็นปริมาณรวมจนถึงชม.ที่ 120 เท่ากับ 3 กรัม เมื่อรวมกับที่เติมเมื่อระยะเวลาการหมักเท่ากับ 48 ชม.เป็น 5.8 กรัม หรือ 1.65 กรัม/ลิตร ทำให้เชื้อผลิตเพนิซิลลิน จี สูงสุดเพียง 13156 หน่วย/มล. หรือ 2.41 กรัม/ลิตร เมื่อคำนวณเป็นปริมาณเพนิซิลลิน จี รวมที่ชม.ที่ 120 ได้เพียง 5.80 กรัม เท่านั้น อีกทั้งปริมาณเซลแห้งที่วัดได้ก็น้อยกว่าที่ได้จากการเติมกรดฟีนิล-อะซิติกเข้มข้น 0.025 กรัม/มล. คือในชม.ที่ 120 ได้น้ำหนักเซลแห้ง 23.59 กรัม/ลิตร แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 0.05 กรัม/มล. ได้น้ำหนักเซลแห้งเพียง 19.85 กรัม/ลิตร แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของกรดฟีนิลอะซิติกเท่ากับ 0.05 กรัม/มล.ไม่เหมาะกับการผลิตเพนิซิลลิน จี ดังนั้นการทดลองต่อไปควรลดความเข้มข้นของกรดฟีนิลอะซิติกลง

นอกจากความเข้มข้นของกรดฟีนิลอะซิติก จะเป็นปัจจัยในการจำกัดการผลิตเพนิซิลลิน จี แล้ว คาดว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวส์น่าจะเป็นปัจจัยจำกัดด้วย เนื่องจากพบว่าตั้งแต่ผลการทดลองในตารางที่ 11 จนถึงตารางที่ 14 ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ตั้งแต่ชม.ที่ 108 จะลดลงต่ำกว่า 2 กรัม/ลิตร ทั้ง ๆ ที่ เวลาที่เชื้อสร้างเพนิซิลลิน จี สูงสุดอยู่ที่ 120 ชม. และเนื่องจากมีรายงานว่าควรรักษาระดับน้ำตาลรีดิวส์ให้อยู่ที่ประมาณ 2-3 กรัม/ลิตร (54) ดังนั้นการทดลองต่อไปนอกจากจะลดความเข้มข้นของกรดฟีนิลอะซิติกแล้ว ยังจะเติมกลูโคสเพื่อรักษาระดับน้ำตาลรีดิวส์ให้อยู่ที่ประมาณ 2-3 กรัม/ลิตร โดยเริ่มเติมในชม.ที่ 96 ของการหมักเพราะเป็นจุดที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์เริ่มลดลงน้อยกว่า 2 กรัม/ลิตร

3.2.3 การเติมสารละลายกรดฟีนิลอะซิติก แอมโมเนียมอะซิเตต และกลูโคสอย่างต่อเนื่อง

3.2.3.1 เติมกรดฟีนิลอะซิติกเข้มข้น 0.0375 กรัม/มล. ไปพร้อมกับแอมโมเนียมอะซิเตตเข้มข้น 0.1 กรัม/มล. และเติมกลูโคสเข้มข้น 0.175 กรัม/มล.

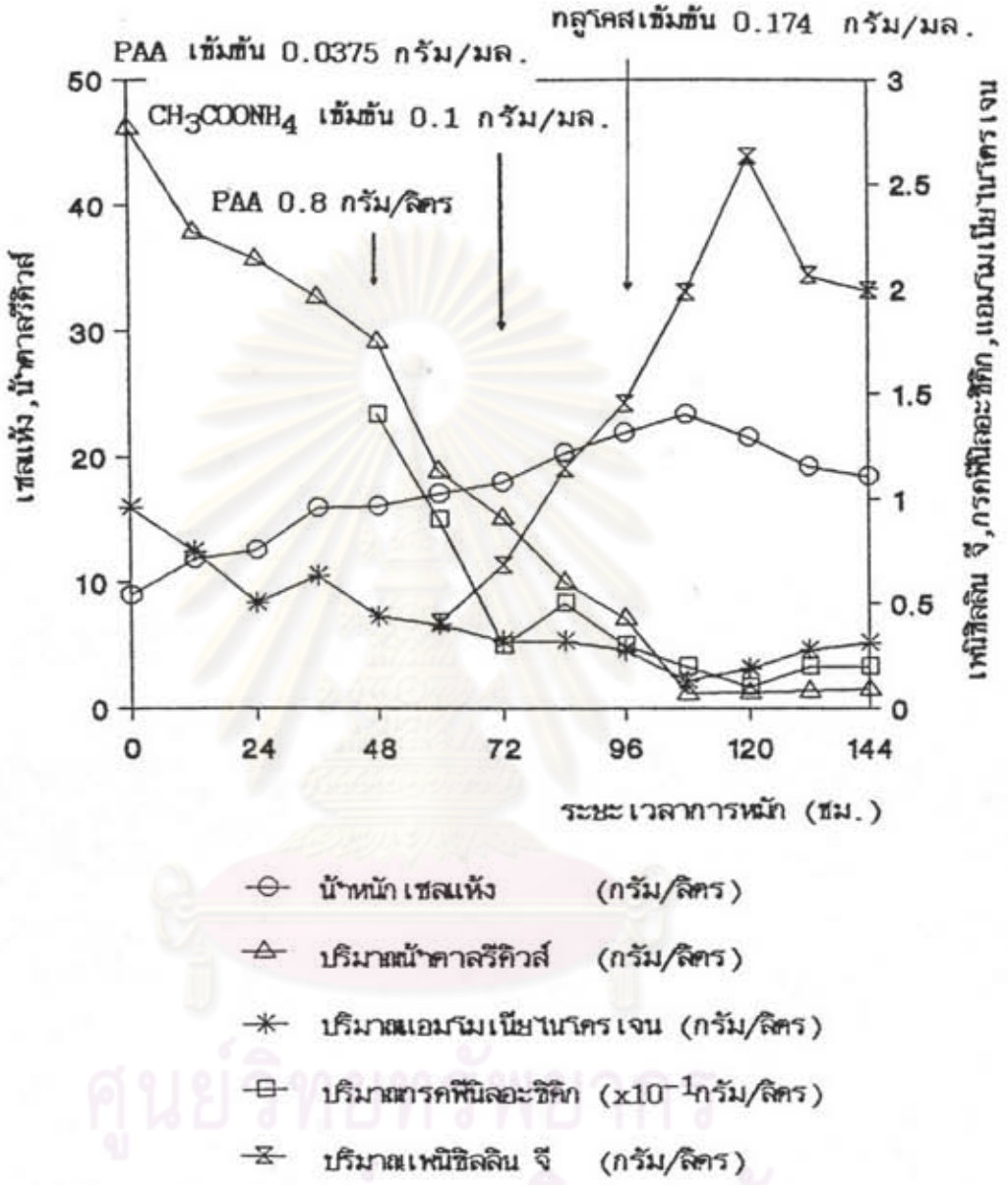
จากการทดลองในข้อ 3.2.2.1 การใช้ความเข้มข้นของกรดฟีนิลอะซิติกเป็น 0.025 กรัม/มล. คาดว่าน้อยเกินไปไม่เพียงพอต่อการผลิตเพนิซิลลิน จี และจากการทดลองในข้อ 3.2.2.2 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 0.05 กรัม/มล. พบว่าทำให้การผลิตเพนิซิลลิน จี ลดลง ดังนั้นการทดลองนี้จะใช้ค่าความเข้มข้นกลางระหว่าง 0.025 กรัม/มล.และ

0.05 กรัม/มล. คือ 0.0375 กรัม/มล. เริ่มเติมในชม.ที่ 72 ของการหมัก โดยเติมไปพร้อมกับแอมโมเนียมอะซิเตตเข้มข้น 0.1 กรัม/มล.ในอัตรา 12 มล. ทุก ๆ 12 ชม. และเมื่อระยะเวลาในการหมักเท่ากับ 96 ชม.จึงเริ่มเติมกลูโคสเข้มข้น 0.175 กรัม/มล.(เตรียมจากกลูโคส 20 กรัม ละลายน้ำ 100 มล.) ปริมาตร 12 มล. ทุก ๆ 12 ชม. แสดงผลการทดลองในตารางที่ 15 และกราฟรูปที่ 15

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 15 แสดงผลที่ได้จากการหมักในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ความเร็วในการกวนเป็น 500 รอบ/นาที ในชม.ที่ 72 ของการหมัก เริ่มเติมสารละลายผสมของกรดฟีนิล-อะซิติกเข้มข้น 0.0375 กรัม/มล. และแอมโมเนียมอะซิเตตเข้มข้น 0.1 กรัม/มล. ในอัตรา 12 มล. ทุก ๆ 12 ชม. และเมื่อระยะเวลาในการหมักเท่ากับ 96 ชม. จึงเริ่มเติมกลูโคสเข้มข้น 0.174 กรัม/มล. ปริมาตร 12 มล. ทุก ๆ 12 ชม.

| ระยะเวลาในการหมัก (ชม.) | pH | น้ำหนักเซลแห้ง (กรัม/ลิตร) | น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร) | ไนโตรเจนรวม (กรัม/ลิตร) | ไนโตรเจนแอมโมเนีย (กรัม/ลิตร) | PAA รวม (กรัม/ลิตร) | ปริมาณเพนิซิลลิน (หน่วย/มล.) | จี (กรัม/ลิตร) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 6.33 | 8.97 | 46.22 | 59.05 | 0.96 | 1.69 | | |
| 12 | 5.86 | 11.84 | 37.83 | 50.94 | 0.75 | 1.41 | | |
| 24 | 5.98 | 12.55 | 35.67 | 46.03 | 0.50 | 1.33 | | |
| 36 | 6.40 | 15.89 | 32.64 | 45.75 | 0.63 | 1.42 | | |
| 48 | 5.55 | 16.08 | 29.15 | 39.62 | 0.44 | 1.07 | 0.14 | 171 | |
| 60 | 5.86 | 17.04 | 18.86 | 28.39 | 0.40 | 1.03 | 0.09 | 1046 | 0.41 |
| 72 | 5.75 | 17.96 | 15.18 | 25.70 | 0.32 | 0.88 | 0.03 | 3041 | 0.68 |
| 84 | 6.56 | 20.30 | 10.04 | 19.81 | 0.32 | 0.88 | 0.05 | 3894 | 1.14 |
| 96 | 5.84 | 21.90 | 7.16 | 14.05 | 0.28 | 0.78 | 0.03 | 4418 | 1.45 |
| 108 | 6.18 | 23.33 | 1.20 | 4.72 | 0.13 | 0.60 | 0.02 | 9275 | 1.98 |
| 120 | 6.85 | 21.52 | 1.30 | 4.72 | 0.19 | 0.56 | 0.01 | 13439 | 2.63 |
| 132 | 7.60 | 19.23 | 1.43 | 5.72 | 0.28 | 0.60 | 0.02 | 10496 | 2.06 |
| 144 | 7.85 | 18.42 | 1.56 | 6.17 | 0.31 | 0.84 | 0.02 | 9487 | 1.99 |




รูปที่ 15 แสดงผลที่ได้จากการหมักในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ความเร็วในการกวนเป็น 500 รอบ/นาที ในชม.ที่ 72 ของการหมัก เริ่มเติมสารละลายผสมของกรดฟีนิล-อะซิติกเข้มข้น 0.0375 กรัม/มล. และแอมโมเนียมอะซิเตตเข้มข้น 0.1 กรัม/มล. ในอัตรา 12 มล. ทุก ๆ 12 ชม. และเมื่อระยะเวลาในการหมักเท่ากับ 96 ชม. จึงเริ่มเติมกลูโคสเข้มข้น 0.174 กรัม/มล. ปริมาตร 12 มล. ทุก ๆ 12 ชม.

จากตารางที่ 15 และรูปที่ 15 พบว่าการเติมกลูโคสเข้มข้น 0.174 กรัม/มล.ไม่สามารถรักษาระดับของน้ำตาลรีดิวส์ให้อยู่ที่ประมาณ 2-3 กรัม/ลิตร เนื่องจากเป็นค่าที่ต่ำเกินไป ดังนั้นการทดลองต่อไปต้องเพิ่มปริมาณของกลูโคสที่ใช้เติมให้สามารถรักษาระดับน้ำตาลรีดิวส์ให้อยู่ที่ประมาณ 2-3 กรัม/ลิตร ส่วนปริมาณเพนิซิลลิน จี พบว่าได้สูงสุดในชม. 132 คิดเป็น 13439 หน่วย/มล. หรือ 2.63 กรัม/ลิตร หรือคิดเป็นปริมาณเพนิซิลลิน จี รวมในชม.ที่ 120 เท่ากับ 6.21 กรัม ซึ่งได้มาจากการเติมกรดฟีนิลอะซิติกรวมจนถึงชม.ที่ 120 เท่ากับ 2.25 กรัม หรือรวมกับที่เติมเมื่อชม.ที่ 48 ของการหมักเป็น 5.05 กรัม หรือ 1.44 กรัม/ลิตร พบว่าปริมาณเพนิซิลลิน จี รวมที่ได้ ใกล้เคียงกับการทดลองที่เติมกรดฟีนิลอะซิติกเข้มข้น 0.025 กรัม/มล. ซึ่งได้ 6.27 กรัม ในชม.ที่ 120 เหมือนกัน แสดงว่าปริมาณกรดฟีนิลอะซิติก 0.025 กรัม/มล. ก็เพียงพอสำหรับการผลิตเพนิซิลลิน จี โดยสายพันธุ์ UNNN-9 นี้

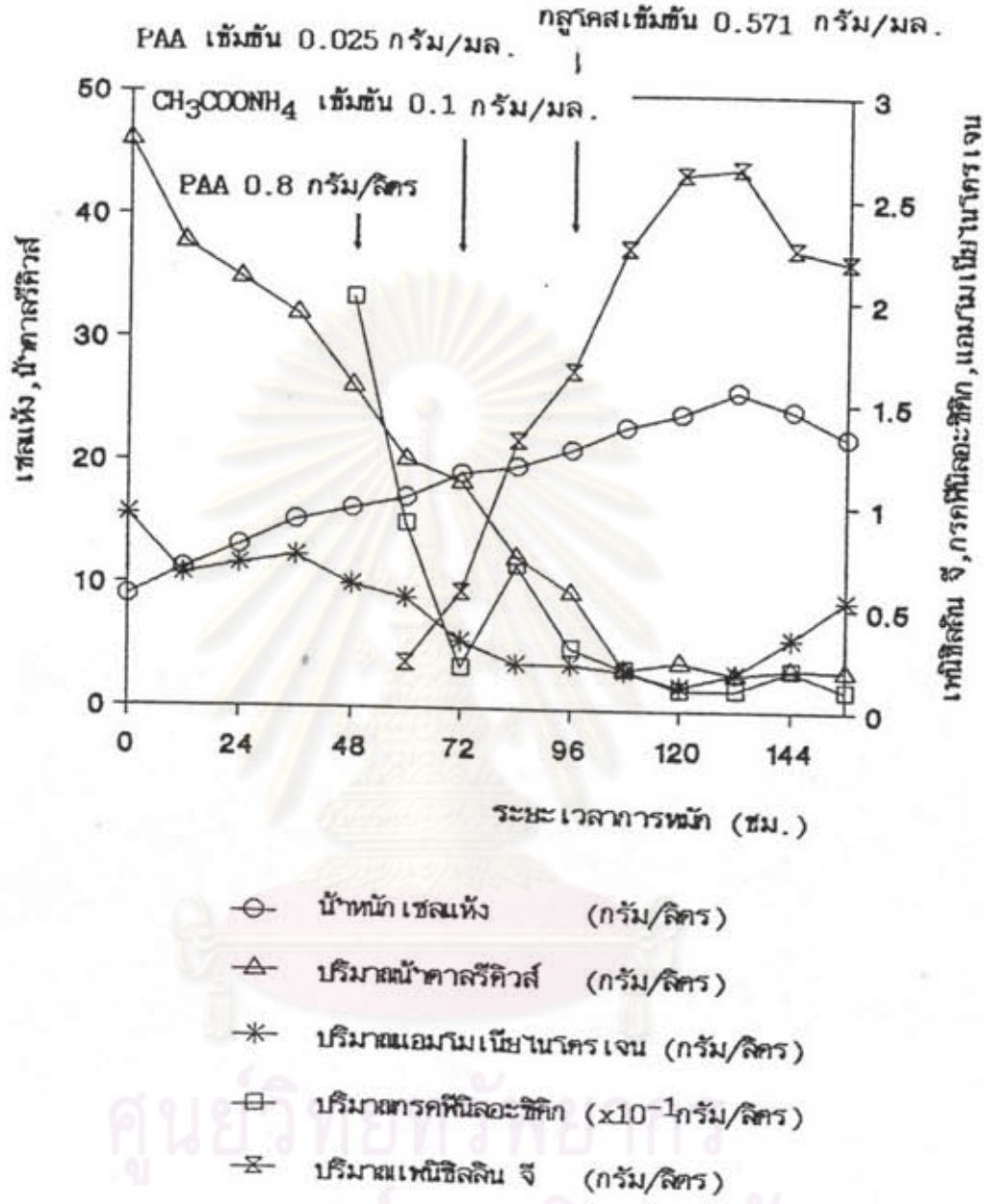
ดังนั้นการทดลองต่อไป จึงเติมกรดฟีนิลอะซิติกเข้มข้น 0.025 กรัม/มล. ไปพร้อมกับแอมโมเนียมอะซิเตตเข้มข้น 0.1 กรัม/ลิตร เริ่มเติมตั้งแต่ชม.ที่ 72 ของการหมัก ในอัตรา 12 มล. ทุก ๆ 12 ชม. และเมื่อระยะเวลาในการหมักเท่ากับ 96 ชม.เริ่มเติมกลูโคส ในความเข้มข้นที่สามารถรักษาระดับน้ำตาลรีดิวส์ให้อยู่ที่ประมาณ 2-3 กรัม/ลิตร โดยเติมอัตรา 12 มล. ทุก ๆ 12 ชม.

3.2.3.2 เติมกรดฟีนิลอะซิติกเข้มข้น 0.025 กรัม/มล. ไปพร้อมกับแอมโมเนียมอะซิเตตเข้มข้น 0.1 กรัม/มล. และเติมกลูโคสเข้มข้น 0.571 กรัม/มล.

จากการทดลองในข้อ 3.2.3.1 พบว่าการเติมกรดฟีนิลอะซิติกเข้มข้น 0.0375 กรัม/มล. ให้ปริมาณเพนิซิลลิน จี ใกล้เคียงกับเมื่อเติมกรดฟีนิลอะซิติกเข้มข้น 0.025 กรัม/มล. ดังนั้นการเติมกรดฟีนิลอะซิติกเข้มข้น 0.025 กรัม/มล.จึงเพียงพอสำหรับการผลิตเพนิซิลลิน จี และเพื่อรักษาระดับปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ให้อยู่ที่ประมาณ 2-3 กรัม/ลิตร จึงเติมกลูโคสเข้มข้น 0.571 กรัม/มล. (เตรียมจากกลูโคส 100 กรัม ละลายน้ำปริมาตร 100 มล.) โดยเริ่มเติมตั้งแต่ชม.ที่ 96 ของการหมัก แสดงผลการทดลองในตารางที่ 16 และกราฟรูปที่ 16

ตารางที่ 16 แสดงผลที่ได้จากการหมักในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ความเร็วในการกวนเป็น 500 รอบ/นาที ในชม.ที่ 72 ของการหมัก เริ่มเติมสารละลายผสมของกรดฟีนิล-อะซิติกเข้มข้น 0.025 กรัม/มล.และแอมโมเนียมอะซิเตตเข้มข้น 0.1 กรัม/มล. ในอัตรา 12 มล.ทุก ๆ 12 ชม. และเมื่อระยะเวลาในการหมักเท่ากับ 96 ชม. เริ่มเติมกลูโคสเข้มข้น 0.571 กรัม/มล.ปริมาตร 12 มล. ทุก ๆ 12 ชม.

| ระยะเวลาในการหมัก (ชม.) | pH | น้ำหนักเซลแห้ง (กรัม/ลิตร) | น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร) | ไนโตรเจนรวม (กรัม/ลิตร) | แอมโมเนียรวม (กรัม/ลิตร) | PAA (กรัม/ลิตร) | ปริมาณเพนิซิลลิน จี (หน่วย/มล.) | (กรัม/ลิตร) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 6.19 | 8.95 | 46.02 | 58.49 | 0.94 | 1.65 | | |
| 12 | 5.67 | 11.22 | 37.81 | 47.16 | 0.65 | 1.50 | | |
| 24 | 6.10 | 13.12 | 34.91 | 45.28 | 0.70 | 1.50 | | |
| 36 | 6.43 | 15.25 | 32.07 | 39.62 | 0.74 | 1.35 | | |
| 48 | 5.56 | 16.22 | 26.24 | 34.81 | 0.60 | 1.24 | 0.20 | 171 | |
| 60 | 5.80 | 17.11 | 20.28 | 27.58 | 0.54 | 1.11 | 0.09 | 1319 | 0.22 |
| 72 | 5.79 | 19.07 | 18.43 | 23.89 | 0.33 | 0.94 | 0.02 | 3099 | 0.57 |
| 84 | 6.28 | 19.70 | 12.32 | 19.03 | 0.22 | 0.88 | 0.07 | 5450 | 1.31 |
| 96 | 5.75 | 21.14 | 9.53 | 14.07 | 0.22 | 0.88 | 0.03 | 6687 | 1.65 |
| 108 | 6.02 | 23.00 | 3.32 | 9.72 | 0.19 | 0.74 | 0.02 | 11797 | 2.25 |
| 120 | 6.21 | 24.09 | 3.92 | 7.55 | 0.12 | 0.70 | 0.01 | 13439 | 2.61 |
| 132 | 7.23 | 25.93 | 2.97 | 6.03 | 0.18 | 0.94 | 0.01 | 13912 | 2.64 |
| 144 | 7.33 | 24.45 | 3.39 | 6.42 | 0.35 | 1.15 | 0.02 | 11587 | 2.25 |
| 156 | 7.89 | 22.27 | 3.32 | 6.50 | 0.54 | 1.20 | 0.01 | 10244 | 2.19 |




รูปที่ 16 แสดงผลที่ได้จากการหมักในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ความเร็วในการกวนเป็น 500 รอบ/นาที ในชม.ที่ 72 ของการหมัก เริ่มเติมสารละลายผสมของกรดฟีนิลอะซิติกเข้มข้น 0.025 กรัม/มล.และแอมโมเนียมอะซิเตดเข้มข้น 0.1 กรัม/มล.ในอัตรา 12 มล.ทุก ๆ 12 ชม. และเมื่อระยะเวลาในการหมักเท่ากับ 96 ชม. จึงเริ่มเติมกลูโคสเข้มข้น 0.571 กรัม/มล. ปริมาตร 12 มล. ทุก ๆ 12 ชม.

จากตารางที่ 16 และรูปที่ 16 พบว่าการเติมกลูโคสเข้มข้น 0.571 กรัม/มล. ในอัตรา 12 มล. ทุก ๆ 12 ชม. สามารถรักษาระดับน้ำตาลรีดิวส์ให้อยู่ที่ประมาณ 3 กรัม/ลิตร เมื่อคิดรวมจนถึงชม.ที่ 120 พบว่าเติมกลูโคสไปทั้งหมด 120 กรัม กรดฟีนิลอะซิติก 4.3 กรัมและแอมโมเนียมอะซิเตต 6 กรัม ได้เพนิซิลลิน จี คิดเป็น 13439 หน่วย/มล. หรือ 2.61 กรัม/ลิตร หรือคิดเป็นปริมาณเพนิซิลลิน จี รวมเท่ากับ 6.36 กรัม แต่ปริมาณเพนิซิลลิน จี จะสูงสุดในชม.ที่ 132 เท่ากับ 13912 หน่วย/มล.หรือ 2.64 กรัม/ลิตร โดยจะพบว่าสายใยเริ่มสลายตั้งแต่ชม.ที่ 144 ของการหมัก ทั้ง ๆ ที่ รักษาระดับแอมโมเนียไนโตรเจนและน้ำตาลรีดิวส์ ไว้ตามรายงานแล้ว คาดว่าระดับของเพนิซิลลิน จี เป็นปัจจัยที่ทำให้เส้นใยเกิดการสลาย

มีรายงานของ Casida ว่า 3-5 % ของคาร์โบไฮเดรตจะถูกเปลี่ยนเป็นเพนิซิลลิน จี (8) จึงคำนวณโดยใช้สภาวะสุดท้ายนี้ ซึ่งได้จากการหมัก 3.5 ลิตร ใช้แลคโตส 140 กรัม กลูโคส 35 กรัม แอมโมเนียมอะซิเตตที่เติมอย่างต่อเนื่อง 6 กรัม คิดเป็นปริมาณกรดอะซิติก 4.6 กรัม และกลูโคสที่ใช้เติมต่อเนื่องเท่ากับ 20.5 กรัม ได้เพนิซิลลิน จี รวม เท่ากับ 6.36 กรัม คิดเป็น % Conversion เท่ากับ 3.17 % เป็นไปตามรายงานแต่อยู่ในช่วงที่ค่อนมาทางต่ำ คาดว่าการที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณการผลิตเพนิซิลลิน จี ได้มากกว่านี้ เนื่องมาจากสายพันธุ์ UNNN-9 มีขีดจำกัดเพียงนี้ อาจจะเป็นเพราะความทนต่อระดับเพนิซิลลิน จี ในน้ำหมักเป็นขีดจำกัด เพราะถึงแม้จะพยายามรักษาระดับไนโตรเจนและคาร์บอน เชื้อก็จะสลายหลังชม.ที่ 144

การปรับสภาวะให้เหมาะสมสำหรับการผลิตเพนิซิลลิน จี ในแต่ละขั้นตอน จะสรุปเป็นเปอร์เซนต์ที่สามารถผลิตเพนิซิลลิน จี ได้เพิ่มขึ้น ตามตารางที่ 17

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 17 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณเพนิซิลลิน จี ที่ผลิตได้ เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงสภาวะตามความเหมาะสม

| สภาวะที่ใช้ในการหมัก โดยสายพันธุ์ UNNN-9 | ชม.ที่ได้ผลิตภัณฑ์สูงสุด | ปริมาณเพนิซิลลิน จี (กรัม/ลิตร) | % เมื่อเทียบกับสภาวะที่ 1 | % เมื่อเทียบกับสภาวะที่ 4 | % เมื่อเทียบกับสภาวะที่ 6 |
|---|---|---|---|---|---|
| 1. ในการคัดเลือกสายพันธุ์ | 144 | 1.00 | - | - | - |
| 2. เปลี่ยนอุณหภูมิมาเป็น 28°ซ. | 96 | 1.33 | 33 | - | - |
| 3. หัวเชื้อ 60 ชม./PAA 0.5 g/l | 96 | 1.20 | 20 | - | - |
| 4. ใช้แลคโตส 40 g/l/PAA 0.8 g/l | 120 | 1.65 | 65 | - | - |
| 5. หมักในถังหมักใช้ความเร็ว 400 rpm | 168 | 1.63 | 63 | -1.21 | - |
| 6. หมักในถังหมักใช้ความเร็ว 500 rpm | 132 | 1.83 | 83 | 10.90 | - |
| 7. เติม PAA 1.99 g | 144 | 2.16 | 116 | 30.90 | 18.03 |
| 8. เติม PAA 1.5 g + $CH_3COONH_4$ 6 g | 120 | 2.44 | 144 | 47.87 | 33.33 |
| 9. เติม PAA 3 g + $CH_3COONH_4$ 6 g | 120 | 2.41 | 141 | 46.06 | 31.69 |
| 10. เติม PAA 2.25 g + $CH_3COONH_4$ 6 g + กลูโคส 6.26 g | 120 | 2.63 | 163 | 59.39 | 43.71 |
| 11. เติม PAA 1.5 g + $CH_3COONH_4$ 6 g + กลูโคส 27.40 g | 132 | 2.64 | 164 | 60.00 | 44.26 |

หมายเหตุ
- สภาวะที่ใช้ในการหมักที่ 5-11 เติม PAA เข้มข้น 0.8 กรัม/ลิตรอาหารหมัก เมื่อระยะเวลาในการหมักเท่ากับ 48 ชม.
- สภาวะที่ 7-11 เริ่มเติม PAA หรือ สารละลายผสมระหว่าง PAA และ $CH_3COONH_4$ ตั้งแต่ระยะเวลาในการหมักเท่ากับ 72 ชม.
- สภาวะที่ 10-11 เริ่มเติมกลูโคส ตั้งแต่ระยะเวลาในการหมักเท่ากับ 96 ชม.
- ปริมาณของสารที่ใช้เติม (กรัม) คิดรวมจนถึงชม.ที่ได้ผลิตภัณฑ์สูงสุด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ดังนั้นจากการทดลองทั้งหมด สามารถสรุปปริมาณเพนิซิลลิน จี ที่ได้จากการหาสภาวะที่เหมาะสม ในตารางที่ 18

ตารางที่ 18 แสดงปริมาณเพนิซิลลิน จี ที่เชื้อ *Penicillium chrysogenum* UNNN-9 ผลิตได้

| สภาวะที่ใช้ในการหมักโดยสายพันธุ์ UNNN-9 | ชม.ที่ผลิตสูงสุด | ปริมาณเพนิซิลลิน จี (กรัม/ลิตร) |
|---|---|---|
| สภาวะที่ใช้ในการคัดเลือก | 144 | 1.00 |
| สภาวะที่เหมาะสมในระดับขวดเขย่า | 120 | 1.65 |
| สภาวะที่เหมาะสมในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร | 132 | 2.64 |

เนื่องจากสายพันธุ์ UNNN-9 เป็นสายพันธุ์ที่กลายพันธุ์มาจากสายพันธุ์ UNN-151 และสายพันธุ์ UNN-151 ได้มาจากการทำให้สายพันธุ์ตั้งต้น A-88 กลายพันธุ์ เปรียบเทียบความสามารถของสายพันธุ์ UNNN-9 ในการผลิตเพนิซิลลิน จี ในแต่ละสภาวะ กับสายพันธุ์ A-88 และสายพันธุ์ UNN-151 ที่เลี้ยงในสภาวะคัดเลือก ในตารางที่ 19

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 19 แสดงการเปรียบเทียบเปอร์เซนต์ความสามารถในการผลิตเพนิซิลลิน จี ของเชื้อสายพันธุ์ที่ได้รับการกลายพันธุ์ UNNN-9 กับสายพันธุ์ UNN-151 และสายพันธุ์A-88

| สภาวะในการหมัก | เปอร์เซนต์ความสามารถของสายพันธุ์ UNNN-9 ในการผลิตเพนิซิลลิน จี ที่เพิ่มขึ้น โดยเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ | |
|---|---|---|
| | A-88 (85) | UNN-151(86) |
| 1. ในการคัดเลือกสายพันธุ์ | 21.95 | 72.41 |
| 2. สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตในระดับขวดเขย่า | 101.21 | 184.48 |
| 3. สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตในระดับถังหมัก 5 ลิตร | 221.95 | 355.17 |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย