บทที่ 1

บทนำ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. ประวัติความเป็นมา

เพนิซิลลิน เป็นยาปฏิชีวนะตัวแรกของโลก ถูกค้นพบโดยบังเอิญ ในระหว่างปี ค.ศ. 1928-1929 เมื่อ Alexander Fleming สังเกตเห็นบริเวณใส (clear zone) รอบๆโคโลนีเชื้อรา *Penicillium notatum* ที่ปนเปื้อน บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ *Staphylococcus sp.* (1-8) เมื่อนำของเหลวภายใต้โคโลนีของเชื้อรานี้มาศึกษา พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ทำให้เกิดโรคได้ จึงตั้งชื่อว่า " เพนิซิลลิน " (1-6) ภายหลังจึงทราบว่าเป็น เพนิซิลลิน เอฟ (Penicillin F) (1,7,8)

Clutterbuck เป็นคนแรกที่พยายามสกัดแยกเพนิซิลลิน ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่เนื่องจากความรู้ด้านชีวเคมี และโครงสร้างของโมเลกุลเพนิซิลลินยังไม่ชัดเจน การสกัดด้วยอีเธอร์ ที่อุณหภูมิห้องจึงไม่ประสบผลสำเร็จ เพราะสารที่สกัดได้สูญเสียความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ทำให้เกิดโรค (1,5)

ในปี ค.ศ. 1940 Chain ได้ร่วมมือกับ Florey สกัดแยกเพนิซิลลินได้เป็นผลสำเร็จ แต่ได้ปริมาณน้อยและยังไม่บริสุทธิ์ (1,3) ในปีต่อมาจึงมีการปรับปรุงจนสามารถผลิตในระดับอุตสาหกรรม โดยใช้เชื้อรา *Penicillium notatum* หมักบนอาหารแข็งผลิตเพนิซิลลิน เรียกการผลิตแบบนี้ว่า surface culture พบว่าได้เพนิซิลลินเพียง 10-20 ออกซ์ฟอร์ดยูนิต/มล. (เทียบได้กับ 0.006-0.0012 มก.เพนิซิลลินจิโซเดียมบริสุทธิ์) (4) สามารถนำไปใช้ในการรักษาโรคได้ ทั้งในสัตว์ทดลองและในผู้ป่วยที่เป็นโรคติดเชื้อ (1,3,5) จากความสำเร็จนี้เองทำให้ Fleming , Chain และ Florey ได้รับรางวัลโนเบลสาขา Medicine and Physiology ในปี ค.ศ. 1945 (6,8)

ในปี ค.ศ. 1948 ห้องปฏิบัติการค้นคว้า USDA Northern Regional Research ได้เสนอวิธีการหมักแบบใช้อาหารเหลว เรียกการหมักแบบนี้ว่า submerged culture โดยใช้เชื้อรา *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951 ที่แยกได้จากแตงแคนตาลูป (7,8) พบว่า

ให้ปริมาณเพนิซิลลิน เพิ่มขึ้นกว่าเดิมประมาณ 100-200 เท่า และเมื่อมีการเติมคอร์นสตีปลิเคอร์ (corn-steep liquor) ลงในอาหารหมัก พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้ส่วนใหญ่เป็นเพนิซิลลิน จี ทราบภายหลังว่าประกอบด้วยสารตั้งต้นสำหรับการสร้างผลิตภัณฑ์ (precursor) คือ กรดฟีนิลอะซิติก (phenylacetic acid) (4,7) เพนิซิลลินได้รับความนิยมใช้ในปริมาณมากมาจนถึงปัจจุบัน เนื่องจากมีราคาถูก และใช้เปลี่ยนเป็นอนุพันธ์ได้มากกว่าพันชนิด (3,6)

2. สมบัติและโครงสร้างทางเคมีของเพนิซิลลิน

2.1 สมบัติในทางชีววิทยา

จากคำนิยามของ Waksman สารปฏิชีวนะ หมายถึงสารอินทรีย์ที่ได้จากจุลชีพชนิดใดชนิดหนึ่ง โดยที่สารนั้นมีประสิทธิภาพในด้านการยับยั้งการเจริญ หรือฆ่าจุลชีพชนิดอื่นได้ แม้ว่าจะใช้ในความเข้มข้นต่ำ (8)

เมื่อกล่าวถึงเพนิซิลลิน มักจะสนใจเฉพาะชนิดที่มีประสิทธิภาพในการรักษาโรค ที่นิยมใช้ได้แก่เพนิซิลลิน จี (Benzylpenicillin) เพนิซิลลิน วี (Phenoxymethylpenicillin) และส่วนน้อยเป็น เพนิซิลลิน โอ (Allmercaptomethylpenicillin) (3,4) ซึ่งสร้างโดยเชื้อราในตระกูล *Penicillium sp.* ได้แก่ *Penicillium notatum* , *Penicillium chrysogenum* และยังพบในเชื้อราตระกูลอื่นอีก ได้แก่ *Aspergillus sp.*, *Trichophyton sp.* และ *Epidermophyton sp.* (1,3,7)

เพนิซิลลิน มีกลไกการออกฤทธิ์เป็นแบบยับยั้งการสร้างผนังเซล (cell wall) ของจุลชีพที่ทำให้เกิดโรค ซึ่งเป็น เปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) มีโพลีแซคคาไรด์ ได้แก่ เอ็น-อะเซททิลกลูโคซามีน (N-acetylglucosamine) และ เอ็น-อะเซททิลมิวราเมต (N-acetylmuramate) เป็นองค์ประกอบ โดยไปมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ทรานเปปทิเดส (transpeptidase) และดี-อะลานีน คาร์บอกซีเปปติเดส (D-alanine carboxypeptidase) ถ้าใช้ในปริมาณมาก จะทำให้เปปติโดไกลแคนไม่รวมตัวเป็นผนังเซล เซลของจุลชีพนั้นจะแตกออก เนื่องจากไม่สามารถทนต่อแรงดันภายในเซลได้ ถ้าใช้ในปริมาณน้อยการสังเคราะห์ผนังเซลใหม่จะถูกยับยั้ง จำนวนจุลชีพจึงคงที่ (1-6)

ในปี ค.ศ. 1950 Rowley พบว่า เพนิซิลลินมีผลยับยั้งเฉพาะจุลชีพที่ไว หรือยอมให้เพนิซิลลินผ่านผนังเซลไปได้ และจะต้องอยู่ในช่วงที่มีการเจริญเท่านั้น (3,9,10) โดยไปมีผลยับยั้งการเคลื่อนย้ายกรดอะมิโนเข้าสู่เซลโดยอาศัยพลังงาน (active transport) (9)

เพนิซิลลินที่ได้จากธรรมชาติ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ทำให้เกิดโรคแคบกว่าเพนิซิลลินที่ได้จากวิธีกึ่งสังเคราะห์ (semisynthesis) เช่น เพนิซิลลิน จี มีผลยับยั้งเฉพาะ แบคทีเรียแกรมบวกชนิดกลม (ยกเว้น enterococci) แกรมลบชนิดกลม สไปโรชีต (Spirochetes) และแอคทิโนมัยสิท (Actinomycetes) บางชนิดเท่านั้น(2,6,8)

ตัวอย่างของโรคที่ใช้เพนิซิลลิน จี ในการรักษาได้แก่ โรคปอดบวม (Pneumonia) เกิดจากเชื้อ *Diplococcus pneumoniae* โรคเกี่ยวกับอวัยวะสืบพันธุ์(Venereal disease) ที่เกิดจากเชื้อ *Treponema pallidum* และโรคคอตีบ (Diphtheria) ที่เกิดจากเชื้อ *Corynebacterium diphtheriae* (1,3,4,7)

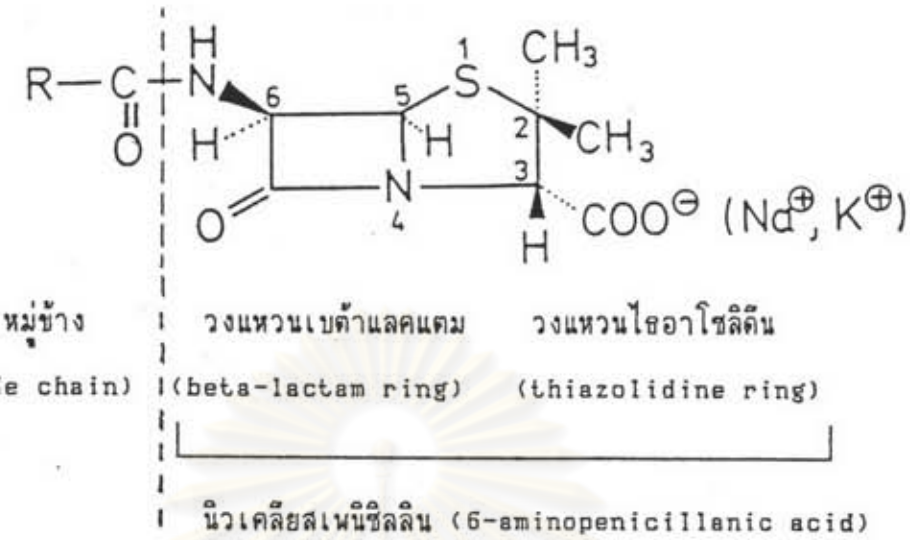
2.2 <u>สมบัติทางเคมี</u>

เพนิซิลลิน มักถูกเตรียมให้อยู่ในรูปของเกลือโซเดียม หรือโปตัสเซียม โดยเรียกชื่อทางเคมีเมื่อเป็นเพนิซิลลิน จี ว่า Sodium or Potassium(6R)-6-(2-phenylacetamido) penicillanate และถ้าเป็นเพนิซิลลิน วี เรียกว่า Sodium or Potassium (6R)-6-(2-phenoxymethylacetamido)penicillanate

เพนิซิลลิน จี ละลายน้ำได้ดี ให้สมบัติเป็นกรด มี pKa ในช่วง 2.5-3.1 มีน้ำหนักโมเลกุล 356.38 ถ้าอยู่ในรูปเกลือโซเดียม และมีน้ำหนักโมเลกุล 372.47 เมื่ออยู่ในรูปของเกลือโปตัสเซียม ส่วนเพนิซิลลิน วี มีน้ำหนักโมเลกุล 372.38 และ 388.47 เมื่ออยู่ในรูปของเกลือโซเดียมและโปตัสเซียม ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าละลายได้ดีในตัวทำละลายชนิดอื่น เช่นอะซีโตน (acetone) เอมิลอะซิเตต (amylacetate) ไซโคลเฮกเซน (cyclohexane) ไดออกเซน (dioxane) เอธิลแอกอฮอล์ (ethylalcohol) และอีเธอร์ (ether) แต่พบว่าละลายได้น้อยใน เบนซีน (benzene) คลอโรฟอร์ม (chloroform) และ คาร์บอนเตตระ-คลอไรด์ (carbontetrachloride)

เพนิซิลลิน ไม่ทนต่อสภาวะที่เป็นกรดด่างมากเกินไป คือเสถียรในช่วง pH ประมาณ 5.5-7.5 ที่อุณหภูมิต่ำ ไม่ทนต่อสารออกซิไดส์ (oxidizing agent) สารประกอบซัลไฟดริล (sulfhydryl compound) เมทธิลแอลกอฮอล์ (methylalcohol) โลหะหนัก เช่น เงิน ตะกั่ว และ ปรอท ไม่ทนต่อความร้อน และการแช่แข็งแล้วหลอมละลายซ้ำหลาย ๆ ครั้ง อีกทั้งไม่ทนต่อเอนไซม์ที่ทำให้โครงสร้างของเพนิซิลลินเปลี่ยนไป (4,6,8)

2.3 โครงสร้างทางเคมี



รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างหลักของยาปฏิชีวนะในกลุ่มเพนิซิลลิน (3)

โครงสร้างทางเคมีของโมเลกุลเพนิซิลลิน ได้ถูกเสนอขึ้นในปี ค.ศ. 1943 โดย Abraham ภายหลัง Hodgkin และ Low ได้ใช้เทคนิคทาง X-ray crystallography ยืนยันซ้ำว่าประกอบด้วย ส่วนของนิวเคลียส ซึ่งมีวงแหวนเบตาแลคแตม รวมอยู่กับวงแหวนไธอาโซลิดีน และมีส่วนของหมู่ข้าง ซึ่งทำให้เพนิซิลลินที่ได้มีความแตกต่างกัน (3,5,6-8) แสดงในรูปที่ 1

บริเวณ C_6 ของนิวเคลียสเพนิซิลลิน (6-APA) จะไวต่อเอนไซม์เพนิซิลลิเนส (penicillinase) หรือ เบตาแลคแตมเมส (β-lactamase) ซึ่งมักพบในแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ ได้แก่ *Bacillus sp.*, *Staphylococcus sp.* หลังจากการย่อยด้วยเอนไซม์ดังกล่าวได้เป็น กรดเพนิซิลโลอิก (penicilloic acid) ซึ่งไม่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ทำให้เกิดโรค ทำให้เพนิซิลลินเสื่อมสภาพ (6,8)

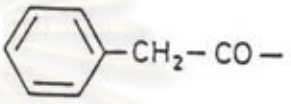
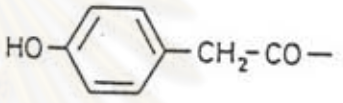
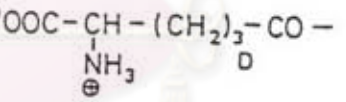
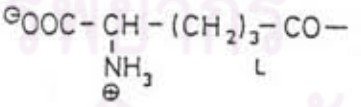
บริเวณ C_6 ของนิวเคลียสเพนิซิลลิน เป็นบริเวณที่สามารถเชื่อมกับหมู่ข้างได้เป็นเพนิซิลลินที่แตกต่างกัน ในกรณีที่ไม่มีการเติมสารที่เป็นหมู่ข้างลงในการหมัก ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะเป็นเพนิซิลลินธรรมชาติ(3) ดังตารางที่ 1 โดยจะเป็นชนิดใดขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ เช่น *Penicillium notatum* จะให้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็นเพนิซิลลิน เอฟ (1,7,8) แต่ถ้าเป็น *Penicillium chrysogenum* Q-176 โดยไม่มีการเติมสารตั้งต้นจะได้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็นเพนิซิลลิน เค และส่วนน้อยเป็น ไดไฮโดรเอฟ (4,8) นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับสูตรอาหาร เช่นถ้าใช้คอร์นสตีปลิเคอร์

ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่จะเป็นเพนิซิลลิน จี (4,7,8) จากความรู้นี้เองที่นำไปสู่การเติมหมู่ข้างที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี ให้เข้ารวมกับนิวเคลียสของเพนิซิลลิน (6-APA) โดยอาศัยปฏิกิริยาเคมีหรือเอนไซม์ได้แก่ อะมิเดส (amidase) หรือเพนิซิลลิน เอซิลเลส (penicillin acylase) ทั้งนี้เพื่อให้ได้เพนิซิลลินตัวใหม่ ที่มีผลในการรักษาโรคเพิ่มขึ้น ทนต่อความเป็นกรดด่าง และทนต่อเอนไซม์เพนิซิลลิเนสได้มากขึ้น (3,4,6,8) ตัวอย่างโครงสร้างของหมู่ข้างที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี แสดงอยู่ในตารางที่ 2

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

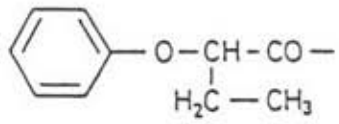
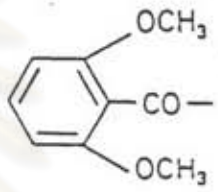
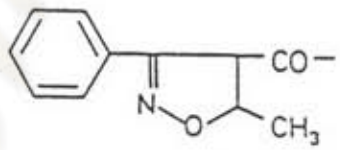
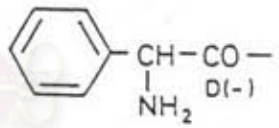
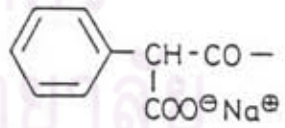
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 แสดงโครงสร้างของหมู่ข้างของเพนิซิลลินธรรมชาติ ที่ได้จากการหมักแบบไม่มีการเติมสารที่เป็นหมู่ข้าง (3)

ชนิดของเพนิซิลลินธรรมชาติ	โครงสร้างของหมู่ข้าง
Penicillin F (2-Pentenylpenicillin)	$CH_3-CH_2-CH=CH-CH_2-CO-$
Penicillin G (Benzylpenicillin)	
Penicillin X (p-Hydroxybenzylpenicillin)	
Penicillin K (n-Heptylpenicillin)	$CH_3(CH_2)_6-CO-$
Penicillin-Dihydro F (n-Amylpenicillin)	$CH_3(CH_2)_4-CO-$
Penicillin N (Synnematin B) (D-4-Amino-4-carboxy-n-butylpenicillin)	
Isopenicillin N (L-4-Amino-4-carboxy-n-butylpenicillin)	
Methylpenicillin (Methylpenicillin)	CH_3-CO-

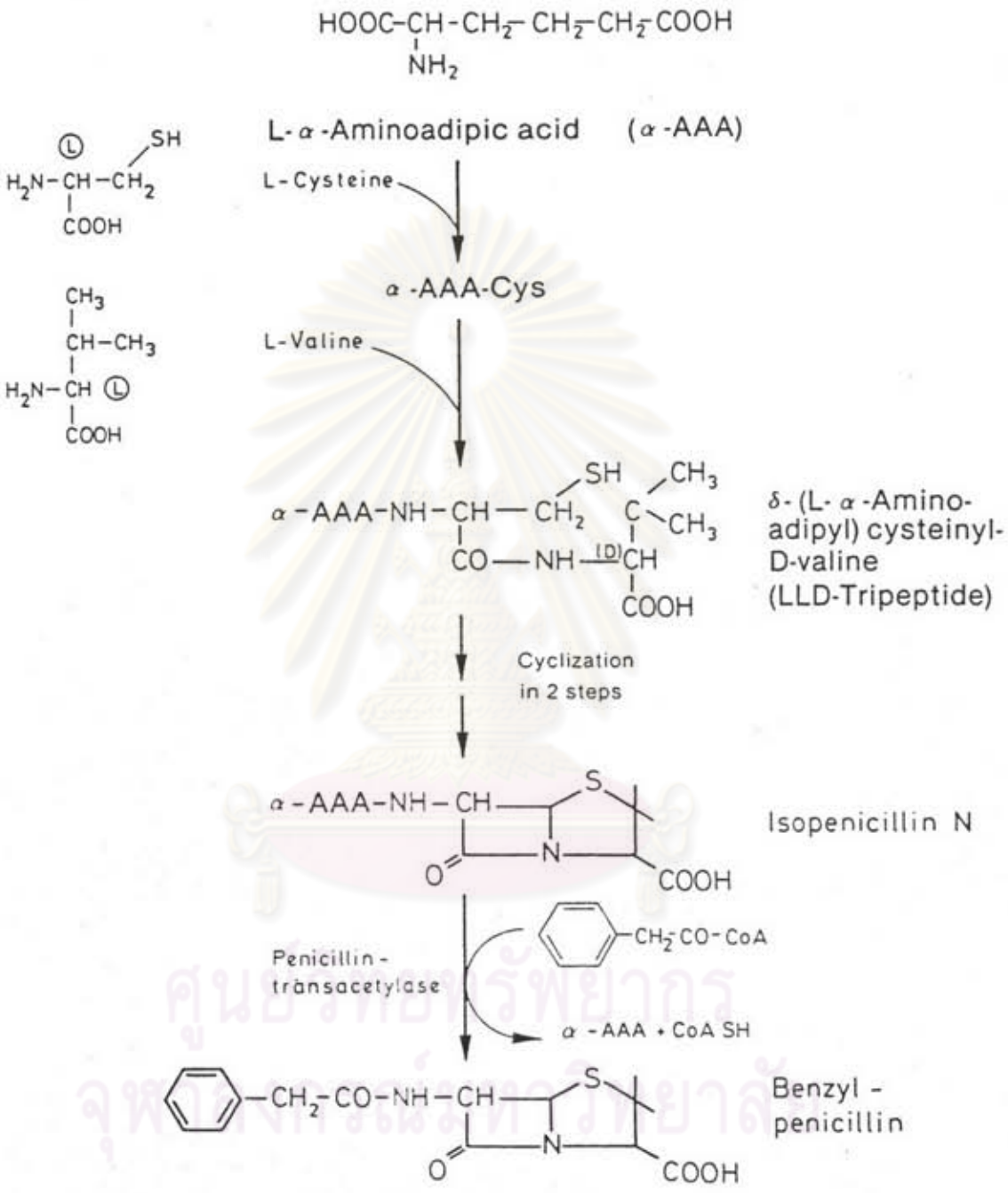
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 แสดงโครงสร้างของสารที่เป็นหมู่ข้างของเพนิซิลลิน ที่ได้จากการสังเคราะห์ (3)

ชนิดของเพนิซิลลินที่ได้จากการสังเคราะห์	โครงสร้างของหมู่ข้าง
Propicillin (ทนต่อกรดในกระเพาะ แต่ไม่ทนต่อเอนไซม์ β-lactamase)	
Methicillin (ทนต่อกรดในกระเพาะ และทนต่อเอนไซม์ β-lactamase)	
Oxacillin (ทนต่อกรดในกระเพาะ และทนต่อเอนไซม์ β-lactamase)	
Ampicillin (มีผลต่อแบคทีเรียรูปแท่งแกรมลบ แต่ให้ผลต่อแกรมบวกรูปกลมน้อยกว่าเพนิซิลลิน จึทนต่อกรดในกระเพาะ ง่ายต่อการดูดซึมที่ลำไส้ แต่ไม่ทนต่อเอนไซม์ β-lactamase)	
Carbenicillin (มีผลต่อ Pseudomonas , Proteus ที่ระบบทางเดินปัสสาวะ ทนกรด แต่มักไม่ใช้โดยการกิน มักให้ร่วมกับยาอื่น เช่น gentamicin และไม่ทนต่อเอนไซม์ β-lactamase)	

3. การสังเคราะห์เพนิซิลลิน (Biosynthesis)

มีรายงานมากมายที่ศึกษาเกี่ยวกับขั้นตอนการสังเคราะห์เพนิซิลลิน จี (3,5,7,8,11-21) โดยเริ่มจากเชื้อราจะสังเคราะห์กรดอะมิโน แอล-ซีสเตอีน (L-cysteine) , กรดแอล-แอลฟา-อะมิโนอะดิพิก (L-α-aminoadipic acid) และแอล-วาลีน (L-valine) ซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของเพนิซิลลิน จี เตรียมไว้ในไซโตพลาสซึม (cytoplasm)ของสายใย เมื่อมีสภาวะเหมาะสมต่อการสังเคราะห์เพนิซิลลิน เช่น เชื้อราขาดแหล่งอาหาร มีอัตราการเจริญต่ำ (22,23) ยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์เพนิซิลลิน จี จะเริ่มถูกกระตุ้นให้ทำงาน (3, 4,12,24) โดยสร้างเอนไซม์ L-α-aminoadipyl-L-cysteine synthetase มากระตุ้นให้กรดแอล-แอลฟา-อะมิโนอะดิพิก เข้ารวมกับแอล-ซีสเตอีน ได้เป็นไดเปปไทด์ (dipeptide) เรียกว่า L-α-aminoadipyl-L-cysteine ส่วนแอล-วาลีน จะต้องถูกเปลี่ยนเป็น ดี-วาลีน (D-valine) ก่อนการเข้ารวมกับไดเปปไทด์ เชื้อราสร้างเอนไซม์ L-α-aminoadipyl-L-cysteine-D-valine synthetase มากระตุ้นให้รวมเป็นไตรเปปไทด์ (tripeptide) เรียกว่า L-α-amino-adipyl-L-cysteinyl-D-valine (LLD-ACV) ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจนถึงขั้นตอนนี้ยังอยู่ในไซโตพลาสซึมของสายใยเชื้อรา หลังจากนี้ไตรเปปไทด์ดังกล่าวจะซึมเข้าสู่ลูเมน (lumen) ของถุงกอลจิ (golgi vesicle) ซึ่งบริเวณผนังของถุงกอลจิมีเอนไซม์ไอโซเพนิซิลลิน เอน ซินทีเตส (isopenicillin N synthetase) ทำหน้าที่ออกซิไดส์ (oxidize) ให้เกิดเป็นวงแหวน โดยออกซิไดส์ตรงบริเวณไนโตรเจนตำแหน่งที่ 4ได้เป็น พันธะ 4-5 ของวงแหวนเบตาแลคแตม ส่วนวงแหวนไธอาโซลิดีนเกิดจากการออกซิไดส์บริเวณซัลเฟอร์วงแหวน 2 วงที่เกิดขึ้นนี้ ถูกเรียกรวมว่า ไอโซเพนิซิลลิน เอน (isopenicillin N) ซึ่งจะถูกส่งต่อไปยังพลาสมาเมมเบรน (plasma membrane) เอนไซม์ เอซิล-โค-เอ ทรานเฟอเรส (acyl-Co-A transferase) ที่อยู่บริเวณนี้จะนำสารตั้งต้นในการผลิต เช่น กรดฟีนิลอะซิติก (phenylacetic acid) มาแทนที่กรดแอล-แอลฟา-อะมิโนอะดิพิก ได้เป็นเพนิซิลลิน จี ปล่อยออกนอกเซล ส่วนกรด แอล-แอลฟา-อะมิโนอะดิพิกอิสระจะถูกนำกลับไปใช้ใหม่ ในกรณีที่ไม่มีการเติมสารหมู่ข้าง นอกจากจะได้เพนิซิลลินธรรมชาติ ที่แสดงในรูปที่ 1 แล้ว เอนไซม์เอซิล-โค-เอ ทรานเฟอเรส จะนำไฮโดรเจน อิออน มาแทนที่กรด แอล-แอลฟา-อะมิโนอะดิพิก ได้เป็นนิวเคลียสของเพนิซิลลิน คือ 6-aminopenicillanic acid แทน ลำดับขั้นตอนการสังเคราะห์เพนิซิลลิน จี แสดงอยู่ในรูปที่ 2



รูปที่ 2 แสดงขั้นตอนการสังเคราะห์เพนิซิลลิน จี ที่เกิดขึ้นภายในสายใยของเชื้อรา (3)

4. การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี และกลไกควบคุมการผลิตเพนิซิลลิน จี

4.1 การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี

เพนิซิลลิน จี เป็นสารเมตาบอไลต์ชนิดทุติยภูมิ การผลิตต้องอาศัยเอนไซม์หลายตัว เอนไซม์แต่ละตัวก็มาจากการควบคุมโดยยีน (gene) ชนิดนั้น ๆ การผลิตจึงค่อนข้างซับซ้อน การควบคุมการผลิตต้องอาศัยการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีเป็นหลัก เพื่อปรับในส่วนที่เป็นจุดจำกัดการผลิต (bottleneck) ในสูตรอาหารที่ใช้กลูโคสและแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกัน สามารถแบ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวออกเป็น 3 ช่วง โดยใช้การเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดด่าง (pH) อัตราการหายใจ และน้ำหนักเซลแห้ง เป็นหลัก (25) ดังนี้

ช่วงแรก เป็นช่วงของการเจริญ (growth phase) มีระยะเวลาประมาณ 40 ชม. แรกของการหมัก พบว่าเชื้อมีอัตราการเจริญ และอัตราการหายใจที่สูงมาก เชื้อราจะใช้กลูโคสแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนได้แก่ คอร์นสตีปลิเคอร์ กากถั่วเหลือง กากเมล็ดฝ้าย แหล่งอนินทรีย์ซัลเฟอร์ เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต และออกซิเจน เพื่อให้เกิดการเจริญอย่างเต็มที่ ได้สายใยที่หนา หนัก และพร้อมที่จะผลิตเพนิซิลลิน (activated mycelium) (1,4,8,25) ขณะที่เชื้อใช้กลูโคสจะพบว่าค่า pH ลดลงอย่างเห็นได้ชัด เนื่องมาจากการสะสมของกรดอินทรีย์ ได้แก่ กรดกลูโคนิก (gluconic acid) (26) และกรดแลคติก (lactic acid) ในสูตรอาหารที่ใช้คอร์นสตีปลิเคอร์ (25) ในช่วงปลายของการเจริญกลูโคสหมดลง เชื้อราจะสร้างเอนไซม์เบตา-กาแลคโตซิเดส (β-galactosidase) เพื่อย่อยแลคโตสอย่างช้า ๆ ทำให้อัตราการเจริญ และอัตราการหายใจของเชื้อเริ่มลดลง เป็นการกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์เพนิซิลลิน และเมื่อเชื้อเปลี่ยนมาใช้แลคโตส พบว่าการรับเอาแอมโมเนีย(ที่เกิดจากการใช้อินทรีย์ไนโตรเจน) เข้าเซลลดลง ทำให้เกิดการสะสมของแอมโมเนียในน้ำหมัก ค่า pH จึงเพิ่มขึ้น (4,7,25)

ในช่วงที่สอง เป็นช่วงการผลิต (production phase) พบว่าอัตราการเจริญของเชื้อ และอัตราการหายใจจะคงระดับตามอัตราการใช้แลคโตสไปจนสิ้นสุดช่วงนี้ (25) แต่สำหรับน้ำหนักเซลแห้งยังคงพบว่าเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ เนื่องจากการแยกของช่วงการเจริญและช่วงการผลิตของเชื้อที่เป็นสายใยจะไม่เด่นชัด อีกทั้งน้ำหนักเซลแห้งก็ไม่ใช่ค่าที่ใช้บอกถึงการเจริญตามความเป็นจริง ส่วนค่าที่ใช้บอกถึงการเจริญที่ถูกต้องคือปริมาณของ DNA และ RNA (24) ในช่วงนี้เชื้อจะสังเคราะห์เพนิซิลลินเป็นขั้นตอนตามรูปที่ 2 สะสมเพิ่มปริมาณสูงสุด ตามความสามารถของสายพันธุ์ การเก็บเกี่ยวเพนิซิลลิน จี จะทำที่จุดที่เพนิซิลลิน จี ขึ้นสูงสุด ส่วนค่า pH ในช่วงนี้ค่อนข้างคงที่ (7,18,23,24,27)

ในช่วงสุดท้าย เป็นช่วงที่แหล่งอาหารหมดลง การเปลี่ยนแปลงที่พบคือน้ำหนักเซลแห้ง อัตราการหายใจ ปริมาณ DNA RNA ลดลง (1,7,8) สายใยเกิดการสลาย (autolysis) และกว่า 60 % ถูกเปลี่ยนเป็นกาซคาร์บอนไดออกไซด์ (27) ค่า pH ในช่วงนี้จึงเพิ่มขึ้นเนื่องจากการสลาย (degradation) ของโปรตีน จึงพบว่าปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนในน้ำหมักเพิ่มสูงขึ้น (7,25,27)

4.2 กลไกที่เกิดขึ้นในการควบคุมการผลิต

4.2.1 การควบคุมการผลิต เนื่องจากปริมาณอาหาร

4.2.1.1 การควบคุมโดยแหล่งคาร์บอน (Carbon catabolite regulation)

ในช่วงการเจริญเชื้อผลิตเอนไซม์กลูโคส ออกซิเดส ออกมาเปลี่ยนกลูโคส ให้เป็นกรดกลูโคนิก เป็นกรดไพรูวิก เข้าสู่วัฏจักรเอมเดนไมออบ (EM cycle) และเป็นกาซคาร์บอนไดออกไซด์ ตามลำดับ (26,28) โดยเชื้อใช้กลูโคสเพื่อการสร้างสายใย การอยู่รอด และเตรียมในการผลิตเพนิซิลลิน

ในช่วงการผลิตเพนิซิลลิน จี พบว่า ปริมาณกลูโคสที่สูงจะไปรบกวนการสังเคราะห์เพนิซิลลิน มีรายงานว่า ถ้าช่วงการผลิตมีปริมาณกลูโคส เกินกว่า 140 มิลลิโมล จะยับยั้งไม่ให้วาลีน เข้ารวมเป็นโมเลกุลของเพนิซิลลิน (5,18,24,29) โดยมีผลต่อเอนไซม์ไตรเปปไทด์ ซินทิเตส และไอโซเพนิซิลลิน เอน ซินทิเตส (22,30) เมื่อปริมาณกลูโคสลดลงจนเหมาะสมเอนไซม์ทั้งสองก็จะทำงานได้ตามปกติ (24,30) นอกจากนี้ยังมีผลยับยั้งการนำเอากรดแอล-แอลฟา อะมิโนอะดิพิก มาใช้ใหม่ โดยมีผลต่อเอนไซม์เอซิลทรานเฟอเรส ทำให้มีสารตั้งต้นไม่เพียงพอในการสังเคราะห์เพนิซิลลิน (22) ทั้งยังไปกระตุ้นให้เอนไซม์ โฮโมซิเตรต ซินเตส (homocitrate synthase) และ แซคคาโรพาย ดีไฮโดรจิเนส (saccharopine dehydrogenase) เพิ่มระดับ การสังเคราะห์ไลซีนของเชื้อเพิ่มขึ้น เกิดการย้อนกลับไปในช่วงการเจริญ (22)

การควบคุมแบบนี้มีผลต่อน้ำตาลที่เชื้อใช้ได้เร็วชนิดอื่นอีก เช่น กาแลคโตส ซูโครส ฟรุกโตส แต่จะพบน้อยกว่าถ้าใช้ แป้ง หรือ เดกซ์ตริน และจะไม่พบปรากฏการณ์นี้ ถ้าใช้แลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเพนิซิลลิน หรือเติมกลูโคสในความเข้มข้นและ ปริมาณที่เหมาะสม อย่างต่อเนื่องแทน (18,22,24)

4.2.1.2 การควบคุมโดยแหล่งไนโตรเจน (Nitrogen regulation)

เชื้อ *Penicillium chrysogenum* ใช้แหล่งไนโตรเจนได้ในรูปของแอมโมเนียม อิออน และกรดอะมิโน มีรายงานว่าปริมาณไนโตรเจนมีผลต่อการเจริญของเชื้อมากกว่าการผลิตเพนิซิลลิน กลไกควบคุมการผลิตเพนิซิลลินเนื่องมาจากปริมาณไนโตรเจนโดยตรงยังไม่แน่ชัดนัก (22)

ปริมาณแอมโมเนียม อิออนที่สูง จะไปมีผลต่อการแสดงออกของยีน (gene expression) ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการใช้ไนโตรเจนรูปแบบอื่น เช่น ยับยั้งการการทำงานของเอนไซม์ กลูตามีน ซินทิเตส (glutamine synthetase) (22) ทำให้การเปลี่ยนรูปจากกลูตาเมตไปเป็นกลูตามีนลดลง เนื่องจากกลูตามีนเป็นตัวให้หมู่อะมิโนสำหรับการสังเคราะห์เพนิซิลลินได้ดีกว่ากลูตาเมต การสังเคราะห์เพนิซิลลินจึงลดลงไปด้วย (5,24) อีกทั้งยังมีผลต่อเอนไซม์ที่ทำให้กลูตาเมต ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยา transamination เป็น วาลีน และซีสเตอีน ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการผลิตเพนิซิลลิน จี ทำให้ปริมาณการผลิตลดลง (6,18) มีรายงานว่าปริมาณแอมโมเนียม อิออน กลูตาเมต และกลูตามีน ที่สูง จะไปรบกวนการทำงานของเอนไซม์ ไดเปปไทด์ ซินทิเตส (dipeptide synthetase) ทำให้การผลิตเพนิซิลลินลดลง (19) แต่สามารถแก้ไขโดยเติมกลูโคสปริมาณเหมาะสมอย่างต่อเนื่อง เพื่อกระตุ้นให้เซลรับเอาแอมโมเนียม อิออนไปใช้มากขึ้น เมื่อแอมโมเนียม อิออน มีปริมาณลดลงจนเหมาะสมแล้ว การสังเคราะห์เพนิซิลลินก็จะดำเนินต่อไป (25,31) มีรายงานว่าปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเพนิซิลลิน อยู่ที่ประมาณ 0.2-0.3 กรัม/ลิตร ควรรักษาระดับไม่ให้ต่ำกว่าค่านี้ (25,32)

4.2.1.3 การควบคุมโดยปริมาณของฟอสเฟต

ถ้ามีปริมาณฟอสเฟตสูงๆ ฟอสโฟกลีเซอรอลดีไฮด์ (phosphoglyceraldehyde) และ กรดฟอสโฟกลีเซอริก (phosphoglyceric acid) จะเปลี่ยนรูปไปเป็น ไพรูเวต (pyruvate) ซึ่งเป็นสารตัวกลางในการผลิต วาลีน มากขึ้น ทำให้เกิดการรวมตัวของน้ำตาลฟอสเฟต (polymerization of phosphorelated sugar) เพิ่มมากขึ้น เกิดการสร้างสารพลังงานสูง คือ ATP ใช้ในขบวนการไกลโคลิติก (glycolytic pathway) รับเอาน้ำตาลไปใช้ในการเจริญมากกว่าการผลิตเพนิซิลลิน จี (18,24) ดังนั้นในการหมักควรให้มีปริมาณฟอสเฟตเพียง 0.3-300 มิลลิโมล (24) และที่มีรายงานว่า 140 มิลลิโมลของกลูโคสที่

เติมในครั้งแรกมีผลยับยั้งการผลิตเพนิซิลลิน จี นั้น จะมีผลยับยั้งน้อยลง ถ้าปริมาณฟอสเฟตที่ใช้ในการหมักมีจำกัด ประมาณ 100 มิลลิโมล (22)

4.2.2 การควบคุมเนื่องจากเกิดปฏิกิริยายับยั้งแบบย้อนกลับ

ในการผลิตเพนิซิลลิน จี พบว่าปริมาณไลซีน ที่สูง มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ โฮโมซิเตรต ซินเตส (14,19) ทำให้มีกรดแอลฟา อะมิโนอะดิพิก ไม่เพียงพอในการสังเคราะห์เพนิซิลลิน (7,18,24) มีรายงานว่าเพนิซิลลิน 10 โมเลกุล ได้มาจากกรดแอลฟา อะมิโนอะดิพิก 1 โมเลกุล (13)

ส่วนการยับยั้งอันเนื่องมาจาก วาลีน และ ซีสเตอีน จะพบน้อย แต่ถ้าพบการควบคุมยับยั้งแบบย้อนกลับแล้ว จะมีผลที่เอนไซม์อะซีโตไฮดรอกซี แอซิด ซินทิเตส (aceto-hydroxy acid synthetase) ของวาลีน (5,7) และ ซัลเฟต เพอมิเอส (sulphate permease) สำหรับซีสเตอีน (7,14)

5. การพัฒนาการผลิตเพนิซิลลิน จี

การพัฒนาการผลิตเพนิซิลลิน จี มีจุดประสงค์เพื่อเพิ่มปริมาณผลผลิต และลดค่าใช้จ่ายในกรรมวิธีการผลิต ทั้งนี้จะต้องอาศัยการทำงานหลาย ๆ ด้าน ได้แก่ การปรับปรุงสายพันธุ์ การปรับปรุงสูตรอาหาร และการใช้เทคนิคตัดต่อยีน (33) ประกอบกัน ดังนี้

5.1 การปรับปรุงสายพันธุ์ (Strain improvement)

ก่อนที่จะมีการปรับปรุงสายพันธุ์ ต้องมีการคัดเลือกสายพันธุ์ (selection) ก่อนเพื่อกำจัดสายพันธุ์ที่มีข้อจำกัดในการผลิตเพนิซิลลิน จี ออกไป จุดประสงค์ของการปรับปรุงพันธุ์นอกจากต้องการสายพันธุ์ที่มีการผลิตเพิ่มมากขึ้นแล้ว (2,5) ยังต้องการสายพันธุ์ที่มีลักษณะดีอื่น ๆ อีก เช่น ทนต่อการยับยั้งย้อนกลับของไลซีน (5,14) สามารถสะสมซัลเฟตปริมาณมากในเซลได้ (intracellular sulfate) (5) ทนต่อความเข้มข้นของเพนิซิลลิน จี ที่ผลิตขึ้น ทนต่อความเข้มข้นของกรดฟีนิลอะซิติกที่เติมเข้าไป ทนต่อปริมาณของกลูโคส ไนโตรเจน ที่สูงได้ (22,30) สร้างสารตัวกลาง และเอนไซม์ในการสังเคราะห์เพนิซิลลิน จี ได้มาก อีกทั้งให้สายใยที่มีความหนืดน้อยในการหมักอาหารเหลว (2,5)

การปรับปรุงสายพันธุ์ โดยการเปลี่ยนแปลงในระดับยีนของจุลชีพ มีการศึกษามากมาย แบ่งได้เป็น 3 วิธี ดังนี้

5.1.1 การทำให้กลายพันธุ์

โดยปกติจะพบการกลายพันธุ์ในธรรมชาติ (Sponteneous mutation) อยู่แล้วเช่น พบสายพันธุ์กลายพันธุ์ *Penicillium notatum* NRRL 832 ผลิตเพนิซิลลิน 40-80 หน่วย/มล. จากสายพันธุ์เดิมที่ Fleming ค้นพบ ให้เพนิซิลลิน 2-20 หน่วย/มล. ใช้เวลากว่า 10 ปี ในปี 1960 เริ่มมีการนำเอาสารก่อการกลายพันธุ์ ดังตารางที่3 มาใช้ โดยเริ่มใช้กับ *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951 ด้วยการนำมาฉายแสงอุลตร้าไวโอเลต พบว่าให้สายพันธุ์ที่มีการผลิตเพิ่มขึ้นจากเดิมประมาณ 8-10 เท่าในเวลาเพียง 2 ปี ได้แก่ สายพันธุ์ *Penicillium chrysogenum* Wis Q-176 ซึ่งเป็นสายพันธุ์เริ่มต้นที่นำมาใช้ในการกลายพันธุ์เพื่อผลิตเป็นอุตสาหกรรม (2-5,8) มีรายงานว่าการใช้ UV ในการกลายพันธุ์ มักทำให้เชื้อที่ได้สร้างสปอร์สีขาว หรือเขียวปนขาวเป็นแฉก ซึ่งลักษณะเหล่านี้แสดงถึงการผลิตเพนิซิลลินที่ต่ำ และยังมีโอกาสน้อยที่จะพบสายพันธุ์ที่สร้างสปอร์สีเขียวเข้มจำนวนมาก ซึ่งเป็นลักษณะของสายพันธุ์ที่ผลิตเพนิซิลลินสูง (34,35) ปัจจุบันนิยมใช้ NTG ในการกลายพันธุ์ เพราะถ้าใช้ในปริมาณและเวลาที่เหมาะสมแล้ว โอกาสที่พบสายพันธุ์ที่ผลิตสูงขึ้นมีมากกว่าวิธีอื่น อีกทั้งอัตราการตายเนื่องจากการรับเอาสารก่อการกลายพันธุ์เข้าไป ก็ต่ำกว่าวิธีอื่นด้วย (4)

ตารางที่ 3 แสดงถึงชนิดของสารก่อการกลายพันธุ์ที่มักใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์ *Penicillium chrysogenum* (4)

สารก่อการกลายพันธุ์ที่ใช้เพื่อปรับปรุงสายพันธุ์ *Penicillium chrysogenum*	
Methylbis(2-chloroethyl)amine	Ethyl methanesulfonate
Ultraviolet light irradiation(275 and 253 nm)	X-rays
N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG)	gamma-rays
Nitrous acid	Ethylenimine
Diepoxybutane	

5.1.2 การทำให้เกิดเป็น เฮตเทอโรคาริออน (Heterokaryons)

เฮตเทอโรคาริออน เกิดจากการรวมของ 2 สายพันธุ์ ได้เป็น ดิปพลอย สปอร์ (diploid spore) ที่มีคุณสมบัติตามต้องการ วิธีที่ทำให้เกิดเฮตเทอโรคาริออน มี 2 วิธี คือการหลอมโปรโตพลาส (Protoplast fusion) เป็นการนำเอาโปรโตพลาสของสายพันธุ์ที่มีการเจริญช้าแต่ผลิตเพนิซิลลิน จี มาก มารวมกับสายพันธุ์ที่มีการเจริญเร็วแต่ผลิตเพนิซิลลิน จี ต่ำ โดยเอาผนังเซลของทั้ง 2 สายพันธุ์ออก เหนี่ยวนำให้เกิดการแลกเปลี่ยนนิวคลีอาย (nuclei) เกิดการแบ่งตัวแบบไมโตซิส จนได้เป็น ดิบพลอย สปอร์ (2,3) อีกวิธีหนึ่งคือ เหนี่ยวนำให้เกิด parasexual cycle (2,5,7) คล้ายกับวิธีแรก ต่างกันที่ไม่มีการนำเอาผนังเซลออกก่อน แต่จะนำ 2 สายพันธุ์ มาเลี้ยงรวมกัน การแตะกันของไมซีเลี่ยมนำมาสู่การแลกเปลี่ยนนิวคลีอาย มีการแบ่งตัวจนได้ดิปพลอย สปอร์ การทำให้เกิดเป็นเฮตเทอโรคาริออนนั้น ไม่ค่อยนิยมทำเพราะเห็นผลช้า และมีโอกาสน้อยที่จะเกิดลักษณะตามต้องการเช่น การทำไลซีน ออกโซโทรป(lysine auxotroph) (5) หรือทำให้เกิดสายพันธุ์ที่ทนต่อโลหะหนัก (11)

5.1.3 การทำ รีคอมบิแนนซ์ ดีเอนเอ (recombinant DNA)

การกลายพันธุ์วิธีนี้ นิยมใช้กับการผลิตผลิตภัณฑ์ที่เป็นเมตาบอไลต์ชนิดปฐมภูมิ (primary metabolite) เช่น การผลิตโปรตีน แต่ในการผลิตยาปฏิชีวนะซึ่งเป็นเมตาบอไลต์ชนิดทุติยภูมิ (secondary metabolite) สร้างภายหลังจากที่มีการเจริญสูงสุดแล้ว ต้องอาศัยเอนไซม์หลายตัวในการผลิต ยีนที่ใช้ในการควบคุมค่อนข้างซับซ้อน กลไกการควบคุมยังไม่แน่ชัดนัก จึงยังไม่มีการทำรีคอมบิแนนซ์ ดีเอนเอ ในการผลิตเพนิซิลลินอย่างแพร่หลาย ส่วนวิธีที่ใช้คือโคลนยีนโครงสร้าง ที่แสดงออกเป็นเอนไซม์ไตรเปปไทด์ ซินทีเตส และไอโซเพนิซิลลิน เอน ซินทีเตส เข้าสู่เวคเตอร์ของ E. coli (11)

การศึกษาเกี่ยวกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเพนิซิลลิน มีมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1970 โดยพบว่า ยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเพนิซิลลิน จี จะอยู่ทั้งบนโครโมโซม และ บนพลาสมิด เรียกชื่อว่า npe ซึ่งมีอยู่ 5 loci คือ V,W,X,Y,Z ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับ เอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ ไตรเปปไทด์ โดยจะเริ่มทำงานเมื่ออัตราการเจริญที่ต่ำเท่านั้น (3,4,12,24)

5.2 การปรับสภาวะให้เหมาะสมสำหรับการผลิต (Optimal condition)

การผลิตแบบเดิม จะเป็นการหมักบนผิวหน้าอาหารแข็ง (surface culture) ใช้

019767

อาหารชนิด Czapex and Dox ซึ่งมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็น ซูโครส โซเดียมไนเตรต และเกลือแร่ (33) ต่อมามีการปรับปรุงโดยเติมสารอินทรีย์ไนโตรเจน เช่น เคซีน สารสกัดจากยีสต์ สารสกัดจากเนื้อ (1,2,5,33) การผลิตแบบนี้มีข้อจำกัดมาก ได้แก่ พื้นที่ในการเจริญมีจำกัดเฉพาะผิวหน้า การกระจายของออกซิเจน อาหาร ไม่ทั่วถึง การควบคุมให้ปริมาณคาร์บอน ไนโตรเจน ฟอสเฟต ให้พอเหมาะทำได้ยาก อีกทั้งการเก็บเกี่ยวเพนิซิลลินทำได้ยาก เสี่ยงต่อการปนเปื้อนโดยเชื้อที่ผลิตเอนไซม์เพนิซิลลิเนส (8) การหมักแบบนี้จึงไม่เป็นที่นิยมในปัจจุบัน แต่มักจะใช้ในการศึกษา ลักษณะของโคโลนี การงอกของสปอร์ ลักษณะและรูปแบบการเจริญของสายใย สีของสปอร์ เป็นต้น (33)

การหมักในอาหารเหลว (submerged culture) เป็นวิธีที่พัฒนาขึ้น เพื่อให้ตัวเชื้อมีโอกาสสัมผัสกับอากาศ และอาหาร ได้อย่างทั่วถึง สามารถควบคุมให้มีปริมาณอาหารเหมาะสมได้ง่าย สามารถอาศัยค่าของความเป็นกรดด่าง ดูความเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักได้ มีการพัฒนาหาสูตรอาหารที่เหมาะสม ลักษณะของถังหมัก อัตราการให้อากาศ อัตราการกวน ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมกับแต่ละสายพันธุ์ขึ้นอย่างมากมาย (36-44) มีการเติมสารอาหาร สารตั้งต้นการสร้างผลิตภัณฑ์ ในอัตราที่เหมาะสมกับสายพันธุ์ เรียกการผลิตแบบที่มีการเติมนี้ว่า fed-batch culture

ในปัจจุบันมีการพัฒนาการผลิตเป็นแบบต่อเนื่อง (continuous culture) มักใช้ร่วมกับการตรึงเซลของเชื้อราด้วยวัสดุที่มีลักษณะเป็นรูพรุน เช่น ซีไลต์ (celite)(36,37,38) แคปปา-คาราจีแนน (K-carragenan) (39,40) โพลีอะคิราไมน์ เจล (polyacrylamide gel)(41) และแคลเซียมแอลจิเนต (calcium alginate) (42,43) แต่ไม่นิยมใช้ในระดับอุตสาหกรรม เพราะไม่คุ้มทุน เนื่องจากปริมาณเพนิซิลลินที่ได้ไม่สูงกว่าการใช้เซลอิสระมากนัก

6. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต เพนิซิลลิน จี

6.1 วัตถุดิบ

6.1.1 สารแหล่งคาร์บอน

ในการผลิตเพนิซิลลิน จี มักใช้แหล่งคาร์บอน 2 ชนิดร่วมกัน (45,46) คือ ใช้กลูโคส เพื่อการเจริญ และใช้แลคโตส ในช่วงการผลิตเพนิซิลลิน เนื่องจากมีการแตกตัวอย่างช้า ๆ ไม่ทำให้เกิดการสะสมของน้ำตาล 6 คาร์บอน อันจะนำมาสู่การยับยั้งการผลิตเพนิซิลลิน

(catabolic regulation)ดังกลไกในข้อ 4.2.1.1 อีกทั้งการควบคุม pH ก็ทำได้ง่าย (5,6 47) มีรายงานว่าอัตราส่วนของกลูโคสต่อแลคโตสที่เหมาะสม คือ 1 ต่อ 3 (47,48)

นอกจากน้ำตาลแล้ว ยังมีการใช้แหล่งคาร์บอนอื่น ๆ อีก เช่น กรดอะซิติก (Acetic acid) กรดซิตริก (Citric acid) Alkali-treated gum (48) เอธานอล (32) ก็เป็นที่นิยม เนื่องจากเตรียมง่าย มีความบริสุทธิ์สูง มีความหนืดน้อย ยังพบการใช้น้ำมันที่มีอัตราส่วนของกรดโอลิอิก (oleic) และลิโนลิอิก (linoleic) สูง ได้แก่น้ำมันจากถั่วเหลือง ข้าวโพด (49) ปาล์ม (50) ควรเติมขณะที่เชื้ออยู่ในช่วงการเจริญ และสายพันธุ์นั้นต้องมีเอมไซม์ไลเปสในการย่อยด้วย (50,51) น้ำมันที่เติมนั้นนอกจากจะเป็นแหล่งคาร์บอนแล้ว ยังเป็นสารต้านการเกิดฟอง และช่วยให้การผลิตเพนิซิลลิน จี มีระยะเวลานานยิ่งขึ้น (49,52) แต่สำหรับแลคโตส พบว่าการเติมตั้งแต่แรก จะให้ปริมาณการผลิตที่มากกว่าการค่อย ๆ เติม (53) เนื่องจากจะต้องมีการกระตุ้นของเอนไซม์ เบตากาแลคโตซิเดส ก่อน ทั้งนี้เพราะเชื้อราไม่สามารถนำแลคโตสไปใช้ได้ทันทีเหมือนกลูโคส (4)

นอกจากนี้พบว่าการเติมกลูโคส หรือซูโครสโดยให้มีความเข้มข้น และอัตราการเติมที่เหมาะสม ที่ทำให้เกิดการเจริญอย่างช้า ๆ หรือมี specific growth rate อยู่ที่ 0.014-0.086 ชม.$^{-1}$จะสามารถใช้แทนแลคโตสในการผลิตเพนิซิลลิน จี ได้ (23,33,46,54, 55) โดยอัตราการเติมนั้นต้องไม่เร็วเกินไป เพราะจะทำให้เกิดความเป็นกรดไม่เหมาะกับการผลิตเพนิซิลลิน และต้องไม่ช้าเกินไป เพราะจะทำให้เส้นใยขาดอาหารสลายไปได้ง่าย

6.1.2 <u>สารแหล่งไนโตรเจน</u>

สารแหล่งไนโตรเจน จำเป็นสำหรับการเจริญ ทำให้เกิดการสร้าง DNA และ RNA ในเซล(29) เชื้อราใช้ไนโตรเจนได้ในรูปของกรดอะมิโน โพลิเปปไทด์สายสั้นๆ และแอมโมเนียม อิออน เพราะมีเอนไซม์ในการย่อยน้อยชนิด (31,33,56) ปริมาณไนโตรเจนที่ให้ต้องไม่มากจนเกิดการเจริญที่มากเกินไป (overgrowth) เพราะจะทำให้การใช้คาร์โบไฮเดรตผิดปกติ การถ่ายเทอากาศ มวลสาร ความร้อน ทำได้ยาก และทำให้การผลิตเพนิซิลลินช้า (45)

การผลิตเพนิซิลลินในระดับอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ มักใช้คอร์นสตีปลิเคอร์ (corn-steep liquor) ซึ่งเป็นผลพลอยได้ในการผลิตแป้งข้าวโพด เนื่องจากประกอบไปด้วยคาร์บอน คือกรดแลคติก ไนโตรเจน คือกรดอะมิโน วิตะมิน และเกลือแร่ ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเพนิซิลลิน โดยเฉพาะอย่างยิ่งประกอบด้วย ฟินิลอะลานีน (phenylalanine)

เมื่อเกิดปฏิกิริยาดีคาร์บอคซิเลชั่น (decarboxylation)จะเปลี่ยนเป็น ฟีนิลเอธิลเอมีน และกรดฟีนิลอะซิติก ซึ่งกรดฟีนิลอะซิติกนี้เป็นสารตั้งต้นการผลิตเพนิซิลลิน จี ทำให้ได้ปริมาณเพนิซิลลินเพิ่มขึ้น และผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่ที่ได้เป็น เพนิซิลลิน จี (1,2,7,16,57,58)

ในปัจจุบันมีการใช้กากถั่วเหลือง กากเมล็ดฝ้าย (4,6,33,59) หรือแม้แต่สายใยของเชื้อราที่ผ่านการหมัก (60) เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนแทนคอร์นสตีปลิเคอร์ ส่วนแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนที่นิยมใช้เพื่อให้เกิดการเจริญที่รวดเร็ว คือแอมโมเนียมซัลเฟต โดยไม่ควรน้อยกว่า 2.5 กรัม/ลิตร(39) เพื่อให้อัตราการหายใจเป็นปกติ การสลายของสายใยช้าลง และไม่สร้าง conidia (48)

6.1.3 <u>สารตั้งต้นการผลิตเพนิซิลลิน จี</u>

ความรู้เรื่องการใช้สารตั้งต้นในการผลิตเพนิซิลลิน จี ได้แพร่หลายภายหลังจากการใช้คอร์นสตีปลิเคอร์แล้ว ทำให้การผลิตเพนิซิลลิน จี เพิ่มขึ้น และยังเหนี่ยวนำให้เกิดเป็นเพนิซิลลิน จี มากขึ้น ดังนั้นในการหมักเพื่อผลิตเพนิซิลลิน จี จึงต้องมีการเติมกรดฟีนิลอะซิติก พบว่าปริมาณกรดฟีนิลอะซิติกเป็นข้อจำกัดในการผลิตเพนิซิลลิน จี (61)

ข้อจำกัดของกรดฟีนิลอะซิติก ได้แก่ ความเป็นกรดอย่างอ่อน และมีความเป็นพิษ เนื่องมาจากโมเลกุลที่ไม่แตกตัวสามารถซึมผ่านผนังเซลได้ (5,61) เป็นผลให้การเจริญและการสังเคราะห์เพนิซิลลิน จี ถูกยับยั้ง ดังนั้นปริมาณ ความเข้มข้น รวมทั้งเวลาการเติมต้องเหมาะสม มีรายงานว่าควรเติมกรดฟีนิลอะซิติก เมื่อเชื้อเจริญอยู่ในช่วงปลาย log phase เพราะในระยะนี้เซลทนต่อความเป็นพิษของกรดฟีนิลอะซิติกได้ดี (4,5,61,62) และยังมีรายงานว่าสายพันธุ์ที่ผลิตเพนิซิลลินต่ำ จะมีกลไกการออกซิไดส์กรดฟีนิลอะซิติกภายนอกเซล ทำให้ไม่เกิดการรวมตัวกับไตรเปปไทด์ จึงได้ปริมาณเพนิซิลลิน จี น้อย (54) แต่สำหรับสายพันธุ์ที่ผลิตเพนิซิลลิน จี สูง จะพบปฏิกิริยานี้น้อยกว่า มีรายงานว่ามากกว่า 90 % ของกรดฟีนิลอะซิติกจะเปลี่ยนไปเป็นเพนิซิลลิน จี แต่อย่างไรก็ดีสายพันธุ์ที่ผลิตเพนิซิลลิน จี สูง จะต้องการกรดฟีนิลอะซิติกปริมาณมากกว่าสายพันธุ์ที่ผลิตเพนิซิลลิน จี ต่ำ (63)

นอกจากกรดฟีนิลอะซิติกแล้ว ยังพบว่ามีการใช้อนุพันธ์ของกรดฟีนิลอะซิติกเพื่อเป็นสารตั้งต้นในการผลิต ทั้งนี้เพื่อลดความเป็นพิษ โดยทำให้อยู่ในรูปเอไมด์ เช่น ฟีนิลอะเซทตาไมด์(phenylacetamide) หรืออยู่ในรูปที่ถูกแทนที่เช่น ฟีนิลอะเซทธิลไกลซีน(phenylacetylglycine)(62) และเบตาฟีนิลเอทธิลเอมีน (β-phenylethylamine) (52) แต่ไม่

พบว่าอนุพันธ์เหล่านี้ให้ปริมาณการผลิตเพนิซิลลิน จี สูงขึ้นกว่าการใช้กรดฟีนิลอะซิติกมากนัก ในปัจจุบันจึงยังใช้กรดฟีนิลอะซิติกเป็นสารตั้งต้นการผลิตเพนิซิลลิน จี (63,64,65)

6.1.4 แหล่งเกลือแร่

ฟอสฟอรัส มักให้ในรูปของ โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ถ้าสูตรอาหารใช้คอร์นสตีปลิเคอร์ จะได้ฟอสฟอรัสในรูปของกรดไฟติก (phytic acid) พบว่าปริมาณที่เหมาะสมควรอยู่ในช่วง 250-500 ไมโครกรัม/มล. ถ้าในการหมักมีปริมาณฟอสฟอรัสไม่เพียงพอจะเห็นสายใยมีลิซมพู (66) หน้าที่ของฟอสฟอรัสนอกจากจะเป็นบัฟเฟอร์ ให้เอนไซม์ทำงานเป็นปกติแล้ว (8) ยังช่วยให้เพนิซิลลินที่ผลิตขึ้นมีความเสถียร (4 , 47,48) แต่ถ้าให้ปริมาณมากเกินไป ฟอสฟอรัสจะไปยับยั้งการผลิตเพนิซิลลิน (39) ดังการควบคุมที่กล่าวไว้ในข้อ 4.2.1.3

ซัลเฟอร์ มักให้ในรูปของ แอมโมเนียมซัลเฟต และมักมีอยู่ในสารแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน เช่นในกากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยกรด โดยอยู่ในรูปกรดอะมิโนซีสเตอีน และเมทไทโอนีน (4,48) มีความสำคัญคือ เป็นส่วนที่จะถูกนำไปใช้ในการสังเคราะห์ ถ้าขาดจะทำให้ปริมาณการผลิตเพนิซิลลิน จี ต่ำลง อัตราการหายใจลดลง การสลายของสายใยเร็วกว่าปกติ (7)

แคลเซียม มักจะให้ในรูปของ แคลเซียมคาร์บอเนต ทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ไม่ให้เกิดความเป็นกรดมากเกินไป ปริมาณที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 0.5-1.0 % (4,8,31,45,52 57) การเติมปริมาณที่มากเกินไป จะทำให้สายใยมาจับแล้วเกิดเป็นกระจุกเซล (pellet) การผลิตเพนิซิลลินจึงลดลง (45) ต่างจากในการหมักแบบผิวหน้า การเติมแคลเซียมคาร์บอเนตทำให้การผลิตเพนิซิลลินถูกยับยั้ง (56)

นอกจากนี้ ถ้าใช้สูตรอาหารที่เป็นสารเคมีทั้งหมด (chemical define media) ต้องเติมของผสมของเกลือแร่ชนิดอื่นที่จำเป็น เช่น โปแตสเซียม แมกนีเซียม โคบอลต์ แมงกานีส คอปเปอร์ บอริก สังกะสี เหล็ก (25,48,66) แต่ถ้าใช้สารอินทรีย์ไนโตรเจน เช่น คอร์นสตีปลิเคอร์ สารสกัดจากยีสต์ กากถั่วเหลืองย่อยด้วยกรด ก็ไม่ต้องเติมของผสมของเกลือแร่เหล่านี้ เพราะสารเกลือแร่เหล่านี้มักจะพบในสารอินทรีย์ไนโตรเจนอยู่แล้ว อีกทั้งเซลยังต้องการในปริมาณน้อย และถ้าให้ในปริมาณที่สูงเกินไปจะยับยั้งการผลิตได้เช่น มีรายงานว่าการหมักในถังหมักที่เป็น carbon steel ปริมาณเพนิซิลลิน จี ที่ได้จะต่ำกว่าการใช้ถังหมักที่เป็น stainless

steel เนื่องมาจากการรบกวนของเหล็กที่ออกมาจากถังหมักพบว่าปริมาณ 300 ไมโครกรัม/มล. ทำให้การผลิตถูกยับยั้งเกือบทั้งหมด (67)

6.1.5 สารต้านการเกิดฟอง (antifoam)

ปริมาณไนโตรเจนที่สูง มักเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดฟอง การเกิดฟองนอกจากทำให้เกิดการปนเปื้อนได้ง่ายแล้ว ยังทำให้การใช้ถังหมักไม่เต็มประสิทธิภาพ เพราะต้องเผื่อที่ไว้สำหรับการเกิดฟอง (31)

สารต้านการเกิดฟองที่ใช้ได้แก่ ไตรเอทาโนลามีน สเตียเรต (triethanolamine stearate) พาราฟินเหลว (paraffin wax) ออกตะดีคานอล (octadecanol) น้ำมันข้าวโพด (maize oil) ซิลิโคน (silicone) โปรปิลีนไกลคอล(propylene glycol) มีรายงานว่า 3 % อะดีคานอลในน้ำมันหมู (lard oil) เป็นสารต้านการเกิดฟองที่ดีที่สุดในการผลิตเพนิซิลลิน จี (68) นอกจากสารเคมีแล้ว ยังนิยมใช้ใบพัดตี และคลื่นเสียง ในการทำลายฟองที่เกิดขึ้น (33)

การเติมสารต้านการเกิดฟองที่มากเกินไป มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงแรงตึงผิวของอาหาร การส่งออกซิเจน การสัมผัสของอาหารกับตัวเซลเป็นไปได้ยาก การใช้สารอาหารของเซลเปลี่ยนไป และทำให้ค่าความเป็นกรดด่างลดลง แต่ถ้ามีการเติมที่พอเหมาะจะทำให้ความหนืด และแรงตึงผิวที่บริเวณสัมผัสกับอากาศมีค่าลดลง ช่วยให้การถ่ายเทของออกซิเจน และคาร์บอนไดออกไซด์ ดียิ่งขึ้น (68,69,70)

6.2 สภาวะในการหมักที่เหมาะสม

6.2.1 อุณหภูมิ

อุณหภูมิในการผลิตเพนิซิลลินที่เหมาะสมค่อนข้างกว้าง คือ อยู่ในช่วง 23 - 32 °ซ. โดยที่อุณหภูมิสูงทำให้เชื้อจะมีการใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนได้ดี เกิดการเจริญและการผลิตเพนิซิลลิน จี ได้เร็ว แต่ถ้าอุณหภูมิสูงกว่า 32 °ซ. จะทำให้การผลิตถูกยับยั้ง และทำให้เพนิซิลลิน จี ที่ผลิตขึ้นสลายไปได้ง่าย (31,47,68,71)

มีรายงานว่าการปรับอุณหภูมิการเลี้ยงจาก 25 °ซ. เป็น 30°ซ. ภายหลังจากที่เชื้อเจริญเต็มที่ ทำให้อัตราการผลิตเพนิซิลลิน จี เพิ่มขึ้น 30 % แต่ปริมาณคงที่ (58) และยังมีรายงานการปรับอุณหภูมิจาก 30 °ซ.เป็น 25 °ซ.ภายหลังจากเชื้ออายุ 42 ชม. ทำให้เชื้อ

ผลิตเพนิซิลลินได้มากกว่าที่เลี้ยงที่ 20 25 และ30 °ซ.ตลอดการหมัก เพราะที่อุณหภูมิ 30 °ซ. เชื้อมีการเจริญมากกว่าที่อุณหภูมิต่ำ ได้เส้นใยที่พร้อมจะผลิตเพนิซิลลิน จึ จำนวนมากกว่า แต่ที่อุณหภูมินี้เพนิซิลลินที่ผลิตได้ไม่เสถียรเท่าที่อุณหภูมิ 25 °ซ. (71)

6.2.2 ความเป็นกรดด่าง

ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ขึ้นกับปริมาณและชนิดของสารคาร์โบไฮเดรตที่ใช้ การใช้กลูโคสจะทำให้เกิดกรดอินทรีย์ ค่า pH จึงลดลงอย่างรวดเร็ว ค่า pH นี้มีผลต่อการเจริญ การผลิตเพนิซิลลิน และความคงทนของเพนิซิลลินที่ผลิตได้

มีรายงานหลายฉบับที่กล่าวถึงความเหมาะสมของ pH ต่อการผลิตเพนิซิลลิน โดยทั่วไปรายงานว่า pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญควรอยู่ในช่วง 5.8-6.8 ส่วนในการผลิตอยู่ในช่วง 7.1-7.5 ขึ้นกับชนิดของสายพันธุ์ และองค์ประกอบของสารอาหารที่ใช้ (32,47,72,73)

ความเป็นกรดด่าง เป็นปัจจัยสำคัญต่อลักษณะของเส้นใยของเชื้อรา โดยที่ pH 6.0 จะเห็นเป็นเส้นใยยาว และบาง แต่ที่pH 7.4 มักพบเป็นสายใยสั้นๆ รวมกันเป็นกระจุก (pellet)(29,72,73) ทั้งนี้เป็นการปรับตัวของเชื้อเพื่อให้ผนังเซลทนต่อแรงดันออสโมติก (5)

6.2.3 อัตราการให้อากาศและอัตราการกวน

อัตราการให้อากาศและอัตราการกวน มีผลต่อการใช้แหล่งคาร์บอน โดยเฉพาะน้ำตาล (44,51) แต่ไม่มีผลต่อการใช้แหล่งไนโตรเจน (51) การให้อากาศและการกวนที่เหมาะสม จะทำให้มีปริมาณออกซิเจน คาร์บอนไดออกไซด์ ที่เหมาะสมต่อการผลิต ทำให้เกิดการถ่ายเทมวลสาร และความร้อน ได้อย่างสมบูรณ์ ทำให้สายใยมีโอกาสสัมผัสกับอาหารได้ดีขึ้น เซลไม่จับตัวกันเป็นก้อน (74,75) มีการแปรผันจำนวนรอบของอัตราการกวน และรูปแบบใบพัด พบว่าในถังหมักขนาด 7 ลิตร การใช้ใบพัดแบบ turbine ให้ผลที่ดีกว่าแบบ propeller และจำนวนรอบของการกวนที่ 520 รอบ/นาที ทำให้มีการถ่ายเทออกซิเจนได้ดีกว่าที่ 440 รอบ/นาที และเกิดแรงเฉือนต่อเซลน้อยกว่าที่ 700 รอบ/นาที (44) อัตราการกวนที่สูงเกินไปจะทำให้สายใยสลายเร็ว (73) การผลิตลดลงเนื่องจากเซลหันไปซ่อมแซมผนังเซลแทนการผลิตเพนิซิลลิน (5,44,74) อัตราการกวนที่เหมาะสม คือจำนวนรอบที่น้อยที่สุด ที่ทำให้เกิดการเคลื่อนย้ายของมวล และความร้อนได้ดี (74) อัตราการให้อากาศที่มากเกินไปก็เช่นกัน นอกจากจะเป็นการสิ้นเปลืองพลังงานแล้ว ยังทำให้เชื้อรามีการเจริญที่มากเกินไป ผลิตเพนิซิลลินได้น้อย และยังมี

ปัญหาฟองอีกด้วย

ออกซิเจน เกี่ยวข้องโดยตรงกับอัตราการเจริญและการผลิตเพนิซิลลิน คือ เชื้อราต้องการออกซิเจนปริมาณมากโดยเฉพาะในช่วงการเจริญ การให้ออกซิเจนที่มากเกินไปทำให้มีการเจริญที่มาก น้ำหมักมีความหนืดสูง การผลิตเพนิซิลลินต่ำ แต่ถ้าให้ในปริมาณที่ต่ำเกินไปจะมีผลยับยั้งต่อการรับเอาออกซิเจนเข้าเซลอย่างถาวร ปริมาณออกซิเจนนิยมวัดเป็นค่า DOT (Dissolved Oxygen Tension) พบว่าถ้า DOT น้อยกว่า 10 % จะไม่พบการผลิตเพนิซิลลิน และปริมาณออกซิเจนที่เหมาะสมคือ 30 % (44,70)

คาร์บอนไดออกไซด์ ได้จากการออกซิไดส์แหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญ ในช่วงการเจริญจึงพบคาร์บอนไดออกไซด์ปริมาณมาก (26,28) ถ้าในการหมักมีอัตราการให้อากาศและการกวนไม่เหมาะสม เกิดการสะสมของคาร์บอนไดออกไซด์มาก จะพบว่าน้ำหมักมีแรงดันเพิ่มขึ้น อัตราการหายใจของเซลลดต่ำลง และปริมาณเพนิซิลลินก็ต่ำลงด้วย (68) มีรายงานว่าถ้าในน้ำหมักมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์เกินกว่า 8 % จะทำให้เซลมีลักษณะสั้นคล้ายยีสต์ เนื่องมาจากเชื้อราเปลี่ยนไปสร้างไคติน (chitin) เพื่อให้ผนังเซลทนต่อคาร์บอนไดออกไซด์ แทนการผลิตเพนิซิลลิน ดังนั้นอัตราการผลิตเพนิซิลลินจึงลดต่ำลง (25,76,77) และยังพบว่าถ้าในการหมักมีการดึงเอาคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นออกไปไม่ให้สะสมในน้ำหมักเลยจะทำให้ช่วงฟื้นตัว (lag phase) ยาวกว่าการหมักแบบปกติถึง 2 เท่า นอกจากนั้นยังพบว่าทำให้การงอกของสปอร์น้อยและช้ากว่าปกติ (54)

6.2.4 <u>ลักษณะและปริมาณของหัวเชื้อเริ่มต้น</u>

หัวเชื้อที่ดีควรมีอายุอยู่ในช่วงกึ่งกลางการเจริญ (mid-log phase) (7) และควรใช้สปอร์เริ่มต้นประมาณ 10^6-10^7 สปอร์/ขวด ปริมาณ 10 % ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ผลิตเพนิซิลลินจะดีที่สุด คือให้การเจริญที่ไว ผลิตเพนิซิลลินได้สูง ใช้เวลาสั้น (25,52,70,78) โดยมากอาหารที่ใช้ในการหมักหัวเชื้อจะคล้ายกับอาหารที่ใช้ในการผลิต ต่างกันตรงที่ไม่มีแลคโตสและสารตั้งต้นการผลิตผลิตภัณฑ์ และใช้ กลูโคส หรือ ซูโครส 2 % แทน (6,8) นอกจากนี้มีรายงานว่าสามารถใช้สปอร์เริ่มต้นแทนการใช้หัวเชื้อในการหมักระดับขวดเขย่าได้ โดยมีข้อดีคือย่นเวลาในการผลิตหัวเชื้อ โดยที่ปริมาณเพนิซิลลิน จี ที่ได้ไม่ต่างจากการใช้หัวเชื้อ แต่สำหรับการผลิตในถังหมักควรใช้หัวเชื้อ เพื่อป้องกันปัญหาฟองล้นเนื่องจากต้องใช้ความเร็วรอบสูงในการกวนเพื่อให้สปอร์งอก (79)

7. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณเพนิซิลลิน จี

วิธีทางชีววิทยา (bioassay method) เป็นวิธีที่เก่าแก่ที่สุดในการหาปริมาณของเพนิซิลลิน อาศัยคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ไวต่อเพนิซิลลิน กับคุณสมบัติในการแพร่ผ่านวุ้นทดสอบ วัดบริเวณยับยั้ง (clear zone) ที่เกิดขึ้นเทียบกับสารมาตรฐาน วิธีนี้ใช้บอกปริมาณอย่างคร่าว ๆ (5,59,80) โดยมีหน่วยเป็นหน่วยสากล (International Unit) คือ 1 หน่วย เท่ากับปริมาณเพนิซิลลิน จี โซเดียม บริสุทธิ์ 98 % 0.6 ไมโครกรัม หรือ 1 มก. ของเพนิซิลลินจี โซเดียม เท่ากับปริมาณที่วัดได้ตามวิธีชีววิทยา 1665 หน่วย (8)

วิธีทางเคมี อาศัยคุณสมบัติของการเข้าทำปฏิกิริยาของโมเลกุลเพนิซิลลิน กับสารที่ใช้ทดสอบ ทำการวัดโดยอาศัยเทคนิคการดูดกลืนแสง หรือติเตรต เทียบกับสารมาตรฐาน พบว่าวิธีนี้ ค่าที่ได้มักสูงกว่า วิธีทางชีววิทยา เนื่องจากปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นทั้งกับส่วนที่มีและไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย เช่น พันธะในโมเลกุลที่ไม่อิ่มตัว หมู่คาร์บอกซีอิสระ และนิวเคลียสเพนิซิลลิน ตัวอย่างวิธีทางเคมี ได้แก่ การเกิดสารประกอบไอโอดีน (iodometric method) สารประกอบเฟอริค ไฮดรอกซิลาเมต (ferric hydroxylamate method) และสารประกอบเมอคิวรี อิมิดาซอล (mercury imidazole) (5,81,82) เป็นต้น

วิธีทางโครมาโตกราฟฟี ในปัจจุบันเป็นวิธีที่นิยม โดยเฉพาะวิธี high-pressure liquid chromatography (HPLC) เพราะมีความแม่นยำ ถูกต้อง สะดวกและรวดเร็ว (5 , 81,83,84)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

8. เหตุจูงใจในการทำวิจัย

ในปัจจุบันยาปฏิชีวนะมีความสำคัญมาก ทั้งในด้านการรักษาโรค การเกษตรกรรม ปศุสัตว์ และในการศึกษาวิจัยค้นคว้า เนื่องมาจากประชากรโลกเพิ่มขึ้นทุกขณะ ประกอบกับเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค มีการปรับตัวและดื้อยาเพิ่มขึ้น เป็นผลให้ความต้องการยาปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพ เพิ่มปริมาณสูงขึ้น ดังจะเห็นได้จากการแข่งขันกันผลิตยาปฏิชีวนะกันอย่างมากมายในต่างประเทศ เพื่อให้ได้ยาที่มีประสิทธิภาพในการรักษาสูงขึ้น กระบวนการผลิตง่ายขึ้น ได้ผลผลิตมากขึ้น ต้นทุนต่ำ ส่งออกไปจำหน่าย ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่ต้องสูญเสียเงินงบประมาณเป็นจำนวนมากในการซื้อยาเหล่านี้

ประเทศไทยสามารถผลิตยาปฏิชีวนะ ได้เพียงชนิดเดียวโดยบริษัทญี่ปุ่น คือ กานามัยซิน (Kanamycin) ส่วนยาปฏิชีวนะชนิดอื่น ได้แก่ แอมพิซิลลิน (Ampicillin) อะมอกซีซิลลิน (Amoxycillin) โคลซามัยซิน (Cloxamycin) จะต้องนำเข้า โดยมาเติมสารเคมี แร่ธาตุ บรรจุขายภายในประเทศ เป็นที่น่าเสียดายว่า เพนิซิลลิน จี ซึ่งใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตยาแบบกึ่งสังเคราะห์กลับไม่มีการผลิต ทั้งๆที่มีความรู้เกี่ยวกับกระบวนการสังเคราะห์อย่างละเอียด อีกทั้งยังมีวัตถุดิบอย่างมากมายในประเทศ

จุดประสงค์ของการทำวิจัยนี้ เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมกับการผลิตเพนิซิลลิน จี โดยสายพันธุ์กลายพันธุ์ แล้วเปรียบเทียบกับสายพันธุ์เดิมที่มีผู้รายงานไว้ ทั้งนี้เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนาการผลิตเพนิซิลลิน จี ต่อไปในอนาคต

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

9. ขั้นตอนการวิจัย

9.1 คัดเลือกเชื้อ *Penicillium chrysogenum* จากสายพันธุ์ที่ได้รับการกลายพันธุ์ด้วย แสงอุลตราไวโอเลต และ สารก่อการกลายพันธุ์ NTG ผ่านการคัดเลือกขั้นต้น (primary screening) และขั้นที่สอง (secondary screening) แล้ว เพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่มีความเหมาะสมในการศึกษาการผลิตเพนิซิลลิน จี ต่อไป

9.2 หาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเพนิซิลลิน จี ในระดับขวดเขย่า โดยเชื้อรา *Penicillium chrysogenum* สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

9.3 หาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเพนซิลลิน จี ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยเชื้อรา *Penicillium chrysogenum* สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

9.4 วิเคราะห์เปรียบเทียบข้อเหมือนและแตกต่าง ทั้งในด้านของตัวเชื้อ ความต้องการปัจจัยต่าง ๆ ในการผลิต ตลอดจนสภาวะที่เหมาะสม ระหว่างสายพันธุ์ที่ทำการศึกษา กับสายพันธุ์ดั้งต้นก่อนการกลายพันธุ์ที่มีผู้รายงานไว้

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย