สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเพนิซิลลิน จี โดย *Penicillium chrysogenum* ที่กลายพันธุ์

นางสาว นตพร ศุภณัฐเศรษฐกุล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2536

ISBN 974-583-383-5

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

019767

OPTIMAL CONDITIONS FOR PRODUCTION OF PENICILLIN G BY *Penicillium chrysogenum* MUTANT

Miss Nataporn Supanutsetkul

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Programme of Biotechnology

Graduate school

Chulalongkorn University

1993

ISBN 974-583-383-5

หัวข้อวิทยานิพนธ์	สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเพนิซิลลิน จี โดย *Penicillium chrysogenum* ที่กลายพันธุ์
โดย	นางสาว นตพร ศุภณัฐเศรษฐกุล
ภาควิชา	หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.นลิน นิลอุบล
	รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ
	นาง วาสนา โตเลี้ยง

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.นลิน นิลอุบล)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

..... กรรมการ

(นาง วาสนา โตเลี้ยง)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุรีนา ชวนิชย์)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

นตพร ศุภณัฐเศรษฐกุล : สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเพนิซิลลิน จี โดย Penicillium chrysogenum ที่กลายพันธุ์ (OPTIMAL CONDITIONS FOR PRODUCTION OF PENICILLIN G BY Penicillium chrysogenum MUTANT) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.นลิน นิลอุบล รศ.ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ และนางวาสนา โตเลี้ยง. 114 หน้า. ISBN 974-583-383-5

Penicillium chrysogenum UNNN-9 เป็นสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ได้จากการกลายพันธุ์สายพันธุ์ UNN-151 งานวิจัยนี้ได้นำสายพันธุ์ UNNN-9 มาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับผลิตเพนิซิลลิน จี ในระดับขวดเขย่า พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งประกอบด้วยแลคโตส 40 กรัม/ลิตร ร่วมกับกลูโคส 10 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน สารละลายกากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยกรดกำมะถัน มีปริมาณไนโตรเจนรวม 1.5 กรัม/ลิตร ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 5 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน ใช้หัวเชื้ออายุ 60 ชม. เลี้ยงที่อุณหภูมิ 28°ซ. ตลอดการหมัก ความเร็วรอบ 300 รอบ/นาที เติมกรดฟีนิลอะซิติกให้มีระดับความเข้มข้นในน้ำหมักเท่ากับ 0.8 กรัม/ลิตร ในชม.ที่ 48 ของการเพาะเลี้ยง เชื้อสามารถผลิตเพนิซิลลิน จี ได้สูงสุด 1.65 กรัม/ลิตร ในชม.ที่ 120 เมื่อนำสายพันธุ์ UNNN-9 นี้ มาเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้สูตรอาหารเช่นเดียวกับการเลี้ยงในระดับขวดเขย่า ใช้อัตราการกวน 500 รอบ/นาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm. ไม่ควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง ในชม.ที่ 48 ของการหมัก เติมกรดฟีนิลอะซิติกให้มีความเข้มข้นในน้ำหมักเท่ากับ 0.8 กรัม/ลิตร จนเชื้ออายุครบ 72 ชม. เริ่มเติมสารละลายผสมกรดฟีนิลอะซิติกเข้มข้น 0.025 กรัม/มล. และแอมโมเนียมอะซิเตดเข้มข้น 0.1 กรัม/มล. ปริมาตร 12 มล.ทุก ๆ 12 ชม. จนสิ้นสุดการหมัก และเมื่อเชื้ออายุ 96 ชม. เริ่มเติมกลูโคสเข้มข้น 0.571 กรัม/มล. ปริมาตร 12 มล.ทุก ๆ 12 ชม.จนสิ้นสุดการหมัก จากสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าว ทำให้เชื้อสายพันธุ์นี้ผลิตเพนิซิลลิน จี ได้สูงสุด 2.64 กรัม/ลิตร ในชม.ที่ 132

ผลจากการวิจัยการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับผลิตเพนิซิลลิน จี โดยเชื้อ Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ UNNN-9 ทำให้เชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถผลิตเพนิซิลลิน จี ในถังหมักได้ 2.64 กรัม/ลิตร หรือเพิ่มขึ้นถึง 164 % เมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงในขวดเขย่าด้วยสภาวะที่ใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์ หรือก่อนการวิจัยหาสภาวะที่เหมาะสม ซึ่งสายพันธุ์นี้ผลิตเพนิซิลลิน จี ได้เพียง 1 กรัม/ลิตร

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา ....เทคโนโลยีชีวภาพ.... ลายมือชื่อนิสิต ....นตพร ศุภณัฐเศรษฐกุล....

สาขาวิชา ....เทคโนโลยีชีวภาพ.... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ....

ปีการศึกษา ....2536.... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ....

วาสนา โตเลี้ยง

C326424 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD: FERMENTATION/PENICILLIN G PRODUCTION/ Penicillium chrysogenum
NATAPORN SUPANUTSETKUL : OPTIMAL CONDITIONS FOR PRODUCTION OF PENICILLIN G BY Penicillium chrysogenum MUTANT. THESIS ADVISOR : ASSO.PROF.NALINE NILUBOL,Ph.D.,ASSO.PROF.PIROH PINPANICHAKARN,Ph.D. AND MRS.VASANA TOLLIENG,M.Sc. 114 pp. ISBN 974-583-383-5

Conditions for penicillin G production by Penicillium chrysogenum UNNN-9, a mutant of UNN-151, were optimized in shaken flask. Suitable carbon and nitrogen sources consisted of 40 g/l of lactose and 10 g/l glucose, H_2SO_4- hydrolyzed soy bean meal with total nitrogen content of 1.5 g/l and 5 g/l of $(NH_4)_2SO_4$. Suitable inoculum was 60 hrs and cultivation was at 28°C with agitation speed at 300 rpm. Phenylacetic acid was added at 48 hrs after cultivation to a final concentration of 0.8 g/l. Under these conditions, 1.65 g of penicillin G/l was obtained at 120 hrs of cultivation.

Production of penicillin G by UNNN-9 in a 5-l fermentor was investigated. Medium composition used was similar to that of shaken flask level. Agitation speed was at 500 rpm with aeration rate of 1 vvm under uncontrolled pH. Phenylacetic acid was added at 48 hrs to a final concentration of 0.8 g/l and then 12 ml of a mixture of 0.025 g/ml of phenylacetic acid and 0.1 g/ml of ammonium acetate was added at 72 hrs and at every 12 hr-interval. At 96 hrs and then at every 12 hr-interval, 12 ml of 0.571 g/l of glucose was added. Under these conditions, 2.64 g of penicillin G/l was obtained at 132 hrs of cultivation. This maximum production obtained was 164 % increased from that by shaken flask under selection condition which was 1 g/l.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2536 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.นลิน นิลอุบล รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ คุณวาสนา โตเลี้ยง ที่ได้กรุณาเป็นที่ปรึกษา ให้ความช่วยเหลือ ให้แนวความคิด กำลังใจ และความเข้าใจ ตลอดการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สุรีนา ชวนิชย์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ที่ได้กรุณารับเป็นกรรมการสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์นี้ ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ท่านผู้อำนวยการสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์และสารเคมี จนงานวิจัยนี้ได้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอขอบคุณนักวิจัย เจ้าหน้าที่ของสถาบัน และทุกท่านที่ช่วยอำนวยความสะดวกระหว่างการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณท่านคณาจารย์หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ และชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และขอขอบคุณ พี่ เพื่อน และน้อง ทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้กำลังใจ ความคิดเห็น แก่ข้าพเจ้ามาตลอดการทำวิจัยนี้

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการพัฒนาวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี (กพวท.หรือ STDB) ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนการศึกษาและการวิจัยในครั้งนี้

ท้ายที่สุดขอกราบขอบพระคุณ คุณยาย คุณพ่อ คุณแม่ พิสิษฐ์ และน้อง ของข้าพเจ้าที่ให้ความช่วยเหลือ ความเข้าใจ กำลังกาย กำลังใจ และกำลังทรัพย์ ในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ นับตั้งแต่เริ่มจนสำเร็จสมบูรณ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฌ

สารบัญรูป..... ฌ

คำย่อ..... ต

บทที่

1 บทนำ..... 1

1. ประวัติความเป็นมา..... 1

2. สมบัติและโครงสร้างทางเคมีของเพนิซิลลิน..... 2

2.1 สมบัติในทางชีววิทยา..... 2

2.2 สมบัติทางเคมี..... 3

2.3 โครงสร้างทางเคมี..... 4

3. การสังเคราะห์เพนิซิลลิน จี..... 8

4. การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีและกลไกควบคุมการผลิตเพนิซิลลิน จี..... 10

4.1 การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี..... 10

4.2 กลไกที่เกิดขึ้นในการควบคุมการผลิต..... 11

4.2.1 การควบคุมการผลิตเนื่องจากปริมาณอาหาร..... 11

4.2.1.1 การควบคุมโดยแหล่งคาร์บอน..... 11

4.2.1.2 การควบคุมโดยแหล่งไนโตรเจน..... 12

4.2.1.3 การควบคุมโดยปริมาณของฟอสเฟต..... 12

4.2.2 การควบคุมเนื่องจากเกิดปฏิกิริยาแบบย้อนกลับ..... 13

หน้า

บทที่

5. การพัฒนาการผลิตเพนิซิลลิน จี..... 13
5.1 การปรับปรุงสายพันธุ์..... 13
5.1.1 การทำให้กลายพันธุ์..... 14
5.1.2 การทำให้เกิดเฮตเทอโรคาริออน..... 15
5.1.3 การทำรีคอมบิแนนซ์ ดีเอนเอ..... 15
5.2 การปรับสภาวะให้เหมาะสมสำหรับการผลิต..... 15
6. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเพนิซิลลิน จี..... 16
6.1 วัตถุดิบ..... 16
6.1.1 สารแหล่งคาร์บอน..... 16
6.1.2 สารแหล่งไนโตรเจน..... 17
6.1.3 สารตั้งต้นการผลิตเพนิซิลลิน จี..... 18
6.1.4 แหล่งเกลือแร่..... 19
6.1.5 สารต้านการเกิดฟอง..... 20
6.2 สภาวะในการหมักที่เหมาะสม..... 20
6.2.1 อุณหภูมิ..... 20
6.2.2 ความเป็นกรดด่าง..... 21
6.2.3 อัตราการให้อากาศและอัตราการกวน..... 21
6.2.4 ลักษณะและปริมาณของหัวเชื้อเริ่มต้น..... 22
7. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณเพนิซิลลิน จี..... 23
8. เหตุจูงใจในการทำวิจัย..... 24
9. ขั้นตอนการวิจัย..... 25
2. วิธีการทดลอง
1. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง..... 26
1.1 อุปกรณ์..... 26
1.2 สารเคมี..... 27

หน้า

บทที่

2. เชื้อจุลินทรีย์ การเก็บ และการเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง..... 28
2.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง..... 28
2.2 การเก็บจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง..... 28
2.2.1 การเก็บรักษาเชื้อ *Penicillium chrysogenum*..... 28
2.2.2 การเก็บรักษาเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p..... 28
2.3 การเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง..... 28
2.3.1 การเตรียมสปอร์..... 28
2.3.2 การเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ..... 29
2.3.3 การเลี้ยงเชื้อ *Penicillium chrysogenum* เพื่อใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตเพนิซิลลิน จี สูง ในขวดรูปชมพู่ 29
2.3.4 การเลี้ยงเชื้อ *Penicillium chrysogenum* เพื่อเป็นหัวเชื้อสำหรับผลิตเพนิซิลลิน จี..... 29
2.3.5 การเลี้ยงเชื้อ *Penicillium chrysogenum* เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเพนิซิลลิน จี ในขวดรูปชมพู่..... 30
2.3.6 การเลี้ยงเชื้อ *Penicillium chrysogenum* เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเพนิซิลลิน จี ในถังหมักขนาด 5 ลิตร..... 30
3. วิธีการวิเคราะห์..... 30
3.1 การวิเคราะห์ปริมาณเพนิซิลลิน จี โดยวิธีทางชีววิทยา..... 30
3.2 การวิเคราะห์ปริมาณเพนิซิลลิน จี โดยวิธี HPLC..... 31
3.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล..... 32
3.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์..... 32
3.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรวม..... 32

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หน้า

บทที่

3.4 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน..... 32
3.4.1 การวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจน..... 32
3.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนรวม..... 33
3.5 การวิเคราะห์ปริมาณกรดฟีนิลอะซิติก..... 33
3.6 การวัดการเจริญของเชื้อรา โดยวิธีหาน้ำหนักเซลแห้ง..... 34
3. ผลการทดลอง..... 35
1. การคัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์ *Penicillium chrysogenum* สำหรับการผลิตเพนิซิลลิน จี 35
2. การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเพนิซิลลิน จี โดย *Penicillium chrysogenum* UNNN-9 ในขวดรูปชมพู่..... 37
2.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเพนิซิลลิน จี..... 37
2.2 การเจริญของเชื้อ *Penicillium chrysogenum* UNNN-9 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ..... 40
2.2.1 ผลของจำนวนสปอร์เริ่มต้นต่อลักษณะของหัวเชื้อ..... 40
2.2.2 ผลของปริมาณกลูโคสและซูโครส ที่มีต่อการเจริญของเชื้อในอาหารเพื่อเตรียมหัวเชื้อ..... 42
2.3 ผลของอายุหัวเชื้อ และเวลาที่เติมกรดฟีนิลอะซิติก ต่อการผลิตเพนิซิลลิน จี..... 45
2.4 ผลของปริมาณแลคโตสและกรดฟีนิลอะซิติกที่มีต่อการผลิตเพนิซิลลิน จี. 58
3. การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเพนิซิลลิน จี โดย *Penicillium chrysogenum* UNNN-9 ในถังหมัก..... 64
3.1 อัตราความเร็วรอบที่เหมาะสมในการกวนที่400 และ 500 รอบ/นาที 64
3.2 การเติมสารอย่างต่อเนื่อง..... 69
3.2.1 การเติมสารละลายกรดฟีนิลอะซิติกอย่างต่อเนื่อง..... 69

หน้า

บทที่

3.2.2 การเติมสารละลายกรดฟีนิลอะซิติกและแอมโมเนียมอะซิเตต อย่างต่อเนื่อง..... 73

3.2.3 การเติมสารละลายกรดฟีนิลอะซิติก แอมโมเนียมอะซิเตต และกลูโคสอย่างต่อเนื่อง..... 80

4. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 91

เอกสารอ้างอิง..... 94

ภาคผนวก..... 105

1 สูตรอาหารที่ใช้ในการวิจัย..... 105

1.1 สูตรอาหารที่ใช้สำหรับเก็บรักษาเชื้อราและเตรียมสปอร์..... 105

1.2 สูตรอาหารสำหรับเก็บรักษาเชื้อทดสอบและหาปริมาณเพนิซิลลิน จี โดยวิธีทางชีววิทยา..... 105

1.3 สูตรอาหารที่ใช้ในการคัดเลือกเชื้อ *Penicillium chrysogenum* ที่กลายพันธุ์..... 105

1.4 สูตรอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อในการผลิตเพนิซิลลิน จี..... 106

1.5 สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการผลิตเพนิซิลลิน จี..... 106

2 การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย..... 107

2.1 การเตรียมสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลือง..... 107

2.2 การเตรียมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิกไซลิก..... 107

2.3 การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการหาปริมาณไนโตรเจน..... 108

2.3.1 เกลือผสม..... 108

2.3.2 อินดิเคเตอร์ผสม..... 108

2.4 การเตรียมสารละลาย Propanolic-HCL..... 108

3 ลักษณะโครมาโตแกรมของเพนิซิลลิน จี ที่วิเคราะห์โดยวิธี HPLC ใช้เพนิซิลลิน วี เป็นสารเปรียบเทียบ..... 109

หน้า

บทที่

4 การคำนวณหาปริมาณเพนิซิลลิน จี โดยใช้เครื่อง HPLC..... 110

4.1 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณเพนิซิลลิน จี..... 110

4.2 การคำนวณปริมาณเพนิซิลลิน จี..... 110

5 การคำนวณหาปริมาณเพนิซิลลิน จี โดยวิธีทางชีววิทยา..... 111

5.1 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณเพนิซิลลิน จี..... 111

5.2 การคำนวณปริมาณเพนิซิลลิน จี..... 111

6 ลักษณะโครมาโตแกรมของกรดฟีนิลอะซิติก วิเคราะห์โดยใช้เครื่องแกสโครมาโต กราฟฟี ใช้เอกซาดีเคนเป็นสารเปรียบเทียบ..... 112

7 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณกรดฟีนิลอะซิติก วิเคราะห์โดยใช้เครื่องแกส โครมาโตกราฟฟี..... 113

ประวัติผู้เขียน..... 114

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่

1 แสดงโครงสร้างของหมู่ข้างของเพนิซิลลินธรรมชาติ ที่ได้จากการหมักแบบไม่มีการเติมสารที่เป็นหมู่ข้าง..... 6

2 แสดงโครงสร้างของสารที่เป็นหมู่ข้างของเพนิซิลลิน ที่ได้จากการสังเคราะห์..... 7

3 แสดงถึงชนิดของสารก่อการกลายพันธุ์ ที่มักใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์ *Penicillium chrysogenum*..... 14

4 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตเพนิซิลลิน จี ของสายพันธุ์ *Penicillium chrysogenum* 5 สายพันธุ์..... 36

5 แสดงผลของอุณหภูมิที่มีต่อการผลิตเพนิซิลลิน จี โดยเชื้อ *Penicillium chrysogenum* UNNN-9..... 38

6 แสดงน้ำหนักเซลแห้งที่ได้จากการแปรผันปริมาณสปอร์เริ่มต้นของ *Penicillium chrysogenum* UNNN-9 ในอาหารเตรียมหัวเชื้อ..... 40

7 แสดงน้ำหนักเซลแห้งที่ได้จากการแปรผันปริมาณกลูโคส หรือซูโครส ในอาหารเตรียมหัวเชื้อ 43

8 แสดงปริมาณเพนิซิลลิน จี ที่ได้จากการหมัก โดยแปรผันอายุหัวเชื้อ ปริมาณและช่วงเวลาที่เติมกรดฟีนิลอะซิติก..... 46

9 แสดงปริมาณเพนิซิลลิน จี ที่ได้ เมื่อมีการแปรผันปริมาณแลคโตสเป็น 30 40 และ 50 กรัม/ลิตร โดยเติมกรดฟีนิลอะซิติกเข้มข้น 0.5 0.8 และ 1.0 กรัม/ลิตร เมื่อระยะเวลาในการหมักเท่ากับ 48 ชม..... 59

10 แสดงผลที่ได้จากการหมัก *Penicillium chrysogenum* UNNN-9 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ความเร็วในการกวน 400 รอบ/นาที..... 65

หน้า

ตารางที่

11 แสดงผลที่ได้จากการหมัก *Penicillium chrysogenum* UNNN-9 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ความเร็วในการกวน 500 รอบ/นาที..... 67

12 แสดงผลที่ได้จากการหมักในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ความเร็วในการกวนเป็น 500 รอบ/นาที เมื่อระยะเวลาในการหมักเท่ากับ 72 ชม.เริ่มเติมกรดฟีนิลอะซิติกเข้มข้น 0.003 กรัม/มล. ปริมาตร 18 มล.ทุก ๆ 2 ชม. คิดเป็นปริมาณ 0.027 กรัม/ชม..... 71

13 แสดงผลที่ได้จากการหมักในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ความเร็วในการกวนเป็น 500 รอบ/นาที เมื่อระยะเวลาในการหมักเท่ากับ 72 ชม.เริ่มเติมสารละลายผสมของกรดฟีนิลอะซิติกเข้มข้น 0.025 กรัม/มล.และแอมโมเนียมอะซิเตตเข้มข้น 0.1 กรัม/มล. ปริมาตร 12 มล.ทุก ๆ 12 ชม..... 75

14 แสดงผลที่ได้จากการหมักในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ความเร็วในการกวนเป็น 500 รอบ/นาที เมื่อระยะเวลาในการหมักเท่ากับ 72 ชม.เริ่มเติมสารละลายผสมของกรดฟีนิลอะซิติกเข้มข้น 0.05 กรัม/มล. และแอมโมเนียมอะซิเตตเข้มข้น 0.1 กรัม/มล. ปริมาตร 12 มล.ทุก ๆ 12 ชม..... 78

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.... 82

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..... 85

หน้า

ตารางที่

17 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณเพนิซิลลิน จี ที่ผลิตได้ เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงสภาวะตามความเหมาะสม..... 88

18 แสดงปริมาณเพนิซิลลิน จี ที่เชื้อ *Penicillium chrysogenum* UNNN-9 ผลิตได้ 89

19 แสดงการเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเพนิซิลลิน จี ของเชื้อสายพันธุ์ที่ได้รับการกลายพันธุ์ UNNN-9 กับสายพันธุ์ UNN-151 และสายพันธุ์ A-88..... 90

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หน้า

สารบัญรูป

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่

1 แสดงโครงสร้างหลักของยาปฏิชีวนะในกลุ่มเพนิซิลลิน..... 4

2 แสดงขั้นตอนการสังเคราะห์เพนิซิลลิน จี ที่เกิดขึ้นภายในสายใยของเชื้อรา..... 9

3 แสดงรูปแบบการเจริญของหัวเชื้อ *Penicillium chrysogenum* UNNN-9 ที่ได้จากการแปรผันปริมาณสปอร์เริ่มต้น..... 41

4 แสดงรูปแบบการเจริญของหัวเชื้อ *Penicillium chrysogenum* UNNN-9 เมื่อมีการแปรผันปริมาณกลูโคส หรือ ซูโครส ในอาหารเตรียมหัวเชื้อ..... 44

5 แสดงปริมาณเพนิซิลลิน จี ที่ได้จากการหมักที่มีการแปรผันอายุหัวเชื้อ โดยเติมกรดฟีนิลอะซิติกเข้มข้น 0.5 กรัม/ลิตร เมื่อระยะเวลาในการหมักเท่ากับ 48 ชม.... 55

6 แสดงปริมาณเพนิซิลลิน จี ที่ได้จากการหมักหัวเชื้ออายุ 60 ชม.แปรผันเวลาในการเติมกรดฟีนิลอะซิติกเข้มข้น 0.5 กรัม/ลิตร เมื่อระยะเวลาในการหมักเท่ากับ 48 60 และ 72 ชม. ตามลำดับ..... 56

7 แสดงปริมาณเพนิซิลลิน จี ที่ได้จากการหมักโดยใช้หัวเชื้ออายุ 60 ชม.เติมกรดฟีนิลอะซิติกเข้มข้น 0.5 และ 1.0 กรัม/ลิตร เมื่อระยะเวลาในการหมักเท่ากับ 48 ชม..... 57

8 แสดงปริมาณเพนิซิลลิน จี ที่ได้จากการแปรผันปริมาณแลคโตส โดยเติมกรดฟีนิลอะซิติกเข้มข้น 0.8 กรัม/ลิตร เมื่อระยะเวลาในการหมักเท่ากับ 48 ชม..... 62

9 แสดงปริมาณเพนิซิลลิน จี ที่ได้จากการแปรผันปริมาณกรดฟีนิลอะซิติก เป็น 0.5 0.8 และ 1.0 กรัม/ลิตร โดยเติมเมื่อระยะเวลาในการหมักเท่ากับ 48 ชม. ในอาหารที่ใช้แลคโตส 40 กรัม/ลิตร 63

10 แสดงผลที่ได้จากการหมัก *Penicillium chrysogenum* UNNN-9ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ความเร็วในการกวน 400 รอบ/นาที..... 66

หน้า

รูปที่

11 แสดงผลที่ได้จากการหมัก *Penicillium chrysogenum* UNNN-9ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ความเร็วในการกวน 500 รอบ/นาที..... 68

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..... 72

13 แสดงผลที่ได้จากการหมักในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ความเร็วในการกวนเป็น 500 รอบ/นาที เมื่อระยะเวลาในการหมักเท่ากับ 72 ชม.เริ่มเติมสารละลายผสมของกรดฟีนิลอะซิติกเข้มข้น 0.025 กรัม/มล.และแอมโมเนียมอะซิเตตเข้มข้น 0.1 กรัม/มล. ปริมาตร 12 มล.ทุก ๆ 12 ชม..... 76

14 แสดงผลที่ได้จากการหมักในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ความเร็วในการกวนเป็น 500 รอบ/นาที เมื่อระยะเวลาในการหมักเท่ากับ 72 ชม.เริ่มเติมสารละลายผสมของกรดฟีนิลอะซิติกเข้มข้น 0.05 กรัม/มล. และแอมโมเนียมอะซิเตตเข้มข้น 0.1 กรัม/มล. ปริมาตร 12 มล.ทุก ๆ 12 ชม..... 79

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.... 83

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. จึงเริ่มเติมกลูโคสเข้มข้น 0.571 กรัม/มล. ปริมาตร 12 มล.ทุก ๆ 12 ชม.... 86

คำย่อ

°ซ.	=	องศาเซลเซียส
มล.	=	มิลลิลิตร
มม.	=	มิลลิเมตร
ซม.	=	เซนติเมตร
ม.	=	เมตร
กก.	=	กิโลกรัม
ชม.	=	ชั่วโมง
นน.	=	น้ำหนัก
%	=	เปอร์เซนต์
PAA	=	กรดฟีนิลอะซีติก
UV	=	แสงอุลตราไวโอเลต
NTG	=	N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
pH	=	ค่าความเป็นกรดด่าง
vvm	=	ปริมาตรอากาศ/ปริมาตรอาหาร/นาที
v/v	=	ปริมาตร/ปริมาตร
g	=	กรัม
g/l	=	กรัม/ลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย