# การปรับปรุงสายพันธุ์ Penicillium chrysogenum N-151 เพื่อเพิ่มผลผลิตเพนนิซิลลิน จี โดยวิธีการกลายพันธุ์

นาย บัณฑูร พลอยสุวรรณ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2536

ISBN 974-582-302-3

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I17045654

# Strain Improvement of *Penicillium chrysogenum* N-151 to Increase Penicillin G Production via Mutation.

Mr. Bantoon Ploysuwan

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 974-582-302-3

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การปรับปรุงสายพันธุ์ Penicillium chrysogenum N-151 เพื่อเพิ่มผลผลิตเพนนิซิลลิน จี โดยวิธีการกลายพันธุ์

โดย นาย บัณฑูร พลอยสุวรรณ

ภาควิชา หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร. นลิน นิลอุบล

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รศ.ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ

---

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

Thanon Vajrabhaya

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

( ศาสตราจารย์ ดร. ถาวร วัชราภัย )

ประธานกรรมการ

( ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพินิพนธ์ )

กรรมการ

( รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล )

กรรมการ

( รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

กรรมการ

( รองศาสตราจารย์ ดร. สุรีนา ชวนิชย์ )

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

บัณฑูร พลอยสุวรรณ : การปรับปรุงสายพันธุ์ Penicillium chrysogenum N-151 เพื่อเพิ่มผลผลิตเพนนิซิลลิน จี โดยวิธีการกลายพันธุ์ (Strain Improvement of Penicillium chrysogenum N-151 to Increase Penicillin G Production via Mutation) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร. นลิน นิลอุบล และ รศ.ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ, 156 หน้า. ISBN 974-582-302-3

งานวิจัยนี้ได้ปรับปรุงสายพันธุ์ P. chrysogenum N-151 ซึ่งมีความสามารถในการสร้างเพนนิซิลลิน จี ได้ 0.448 กรัม/ลิตร โดยการทำกลายพันธุ์อย่างต่อเนื่องด้วย UV 1 รอบ และตามด้วย NTG 4 รอบ จากการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในแต่ละรอบ ได้สายพันธุ์ U-59 UN-696 UNN-645 UNNN-354 และ UNNNN-485 ซึ่งผลิตเพนนิซิลลิน จี ได้ 0.983 1.321 1.612 2.372 และ 3.132 กรัม/ลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ในงานวิจัยยังได้มีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการผลิตเพนนิซิลลิน จี และลักษณะสัณฐานวิทยา (morphology) ที่เปลี่ยนไป ซึ่งสรุปได้ว่า สายพันธุ์ที่มีลักษณะเปลี่ยนไปจากสายพันธุ์ดั้งต้นจะเป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนนิซิลลิน จี ลดลงอย่างเด่นชัด

เมื่อได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างความกว้างบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) บนอาหารวุ้นทดสอบ ค่าโพเทนซี อินเดกซ์ (potency index) (ความกว้างบริเวณยับยั้งหารด้วยความกว้างโคโลนี) และปริมาณเพนนิซิลลิน จี ที่สร้างได้ในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า พบว่าค่าความกว้างบริเวณยับยั้งจะแปรผันตามปริมาณเพนนิซิลลิน จี ที่สร้างได้ แต่ค่าโพเทนซี อินเดกซ์ ไม่แปรผันตาม ดังนั้นการใช้วิธีการคัดเลือกสายพันธุ์ขั้นปฐมภูมิตามวิธีที่ใช้ในงานวิจัยนี้ (อาหารวุ้นหลุม) ต้องใช้ค่าความกว้างบริเวณยับยั้งในการคัดเลือกสายพันธุ์ แต่ไม่ใช้ค่าโพเทนซี อินเดกซ์

วิธีคัดเลือกสายพันธุ์ขั้นปฐมภูมิที่ใช้ในงานวิจัยนี้ เป็นวิธีการคัดเลือกที่มีประสิทธิภาพ เพราะนอกจากจะคัดเลือกได้ครั้งละมากๆ และรวดเร็วขึ้นแล้ว ยังพบว่าสายพันธุ์ที่คัดเลือกด้วยวิธีการนี้ ส่วนใหญ่คือประมาณ 58% เป็นสายพันธุ์ที่ผลิตเพนนิซิลลิน จี สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งต้น ซึ่งนับว่าเป็นค่าที่สูงกว่าที่มีผู้รายงานไว้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต บัณฑูร พลอยสุวรรณ

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2535 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

## C326356 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD: STRAIN IMPROVEMENT/MUTATION/PENICILLIN G/Penicillium chrysogenum
Bantoon Ploysuwan : Strain Improvement of Penicillium chrysogenum N-151 to Increase Penicillin G Production via Mutation. Thesis advisor : Asso. Prof. Naline Nilubol, Ph.D. and Asso. Prof. Piroh Pinpanichakarn, Ph.D., 156 pp. ISBN 974-582-302-3

Strain improvement of Penicillium chrysogenum N-151, a strain capable to produce 0.448 g of penicillin G per liter, was performed by mutating with UV for the first step and then with NTG for four consecutive steps. U-59, UN-696, UNN-645, UNNN-354 and UNNNN-485 were mutants selected from each step of the treatment showing highest ability to produce penicillin G of 0.983, 1.321, 1.612, 2.372 and 3.132 gram/liter, respectively. Correlation between penicillin G producing ability of the mutants and their morphology change was also studied. It was observed that most of the mutants with morphology change from that of the original strain had lower ability to produce penicillin G.

Furthermore, correlation between inhibition zone or potency index (inhibition zone divided by colony size) and the amount of penicillin G produced in shake flask were compared. It showed that the amount of penicillin G lineraly related to inhibition zone but not to potency index. Therefore, inhibition zone was employed for primary screening of penicillin G producing mutants in this study.

The present work also showed an effective and rapid method for primary screening of penicillin G producing strains from a large number of mutants. By using this method, about 58% of the selected mutants had higher ability to produce penicillin G when compared to that of the original strain. This value was higher than those reported by others.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2535 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

# กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.นลิน นิลอุบล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำช่วยเหลือการทำวิจัยเป็นอย่างดีมาโดยตลอด

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สุรีนา ชวนิชย์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ที่ได้กรุณารับเป็นกรรมการสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณท่านผู้อำนวยการสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์และสารเคมี จนงานนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี และขอขอบพระคุณนักวิจัย เจ้าหน้าที่สถาบัน ฯ ทุกท่านที่อำนวยความสะดวกระหว่างการทำวิจัย ตลอดจนเพื่อน ๆ พี่ น้อง ที่คอยช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดมา

ขอขอบพระคุณ คุณดารณี คุณดารารัตน์แห่งบริษัท เอ็ม แอนด์ เอ็ช แมนูแฟคเจอริ่งจำกัด และหัวหน้าห้องปฏิบัติการแห่งองค์การเภสัชกรรม ที่ให้คำปรึกษาเกี่ยวกับวิธีการวิเคราะห์ทางเคมี

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัยที่ให้ความอนุเคราะห์ด้านทุนวิจัยบางส่วน

ท้ายที่สุดขอกราบขอบพระคุณ พ่อ และ แม่ ของข้าพเจ้าที่ให้ความช่วยเหลือ ความเข้าใจ กำลังใจ และกำลังทรัพย์ ในการทำวิทยานิพนธ์ตั้งแต่เริ่มต้นจนสำเร็จสมบูรณ์

# สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ
กิตติกรรมประกาศ..... ฉ
สารบัญ..... ช
สารบัญตาราง..... ฑ
สารบัญรูป..... ฌ
บทที่

1 บทนำ..... 1
เพนนิซิลลิน ( penicillins )
1 ประวัติและการค้นพบ ..... 1
2 กลุ่มเพนนิซิลลินและความเป็นมา..... 2
เพนนิซิลลิน จี (เบนซิลเพนนิซิลลิน )..... 5
3 เพนนิซิลลินและการสังเคราะห์..... 7
4 ปัจจัยที่มีผลต่อการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะ
4.1 อาหาร ..... 8
4.2 อุณหภูมิ..... 9
4.3 ผลของความเป็นกรด-ด่าง ..... 10
4.4 สารตั้งต้นการเกิดผลิตภัณฑ์ ( precursor )..... 10
5 เพนนิซิลลินและผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย..... 12
การคัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์เพื่อใช้ในระดับอุตสาหกรรม ..... 12
การกลายพันธุ์ ( mutation )
1 การกลายพันธุ์ในระดับยีน ..... 20
2 การกลายพันธุ์ในระดับโครโมโซม ..... 21

หน้า

สิ่งก่อการกลายพันธุ์

1 radiation ( physical) mutagen..... 22

2 chemical mutagen..... 22

3 biological mutagen ..... 25

การเลือกใช้ชนิดสิ่งก่อการกลายพันธุ์และปริมาณที่เหมาะสมในการทำกลายพันธุ์จุลินทรีย์..... 32

การเปลี่ยนแปลงจีโนม ( genome )ของจุลินทรีย์หลังการทำกลายพันธุ์ทำให้การแสดงออกของ phenotype เปลี่ยนไป

1 สัณฐานวิทยา และ ผลผลิต..... 36

2 ออกโซโทรป และ ผลผลิต ..... 37

3 สภาวะในการหมักเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์เปลี่ยนแปลงจากสายพันธุ์เดิม..... 42

4 ปฏิกิริยาเคมีเพื่อเกิดเป็นโครงสร้างโมเลกุลสารปฏิชีวนะเปลี่ยนไปจากเดิม.. 43

การคัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์..... 45

การวิเคราะห์ปริมาณเพนนิซิลลิน จี

1 วิธีทางชีววิทยา ( microbiological method , bioassay )..... 49

2 วิธีทางโครมาโตกราฟฟี ( chromatography )..... 50

2 วิธีการทดลอง

1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1.1 อุปกรณ์..... 53

1.2 สารเคมี ..... 54

2 เชื้อจุลินทรีย์ การเก็บรักษา การเตรียม และ การเพาะเลี้ยง

2.1 เชื้อจุลินทรีย์..... 55

2.2 การเก็บรักษา..... 55

2.3 การเตรียมและการเพาะเลี้ยง..... 55

3 การเตรียมเพื่อใช้ศึกษาประสิทธิภาพการสร้างเพนนิซิลลิน จี บนอาหารวุ้น

3.1 การเตรียมหลุมอะลูมิเนียมสำหรับอาหารวุ้นหลุม..... 56

หน้า

3.2 การเตรียมอาหารวุ้นหลุม ..... 58
3.3 การเตรียมอาหารวุ้นทดสอบ ..... 58
3.4 วิธีการศึกษาประสิทธิภาพการสร้างเพนนิซิลลิน จี ของ P. chrysogenum
4 วิธีการศึกษาประสิทธิภาพการสร้างเพนนิซิลลิน จี ของ P. chrysogenum
4.1 วิธีการตรวจสอบการสร้างเพนนิซิลลิน จี บนอาหารวุ้น..... 59
4.2 วิธีการตรวจสอบประสิทธิภาพการสร้างเพนนิซิลลิน จี ในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า..... 62
4.2.1 วิเคราะห์ด้วยวิธีทางชีววิทยา ( bioassay )..... 62
4.2.2 วิเคราะห์ปริมาณด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอแม็นซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (HPLC)..... 62
5 การทำกลายพันธุ์
5.1 การชักนำให้กลายพันธุ์ด้วย NTG ..... 63
5.2 การชักนำให้กลายพันธุ์ด้วย แสงอุลตราไวโอเลต ( UV ) ..... 64
6 การคัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่สร้างเพนนิซิลลิน จี ปริมาณสูงขึ้น
6.1 การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ ..... 64
6.2 การคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ ..... 65

3 ผลการทดลอง
1 การศึกษาประสิทธิภาพในการสร้างเพนนิซิลลิน จี ของ Penicillium chrysogenum N-151
1.1 การผลิตเพนนิซิลลิน จี บนอาหารวุ้น..... 66
1.2 การสร้างเพนนิซิลลิน จี ในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า..... 67
2 การปรับปรุงสายพันธุ์ P. chrysogenum N-151
2.1 การทำ P. chrysogenum N-151ให้กลายพันธุ์ด้วย NTG และการคัดเลือกสายพันธุ์
2.1.1 ผลการศึกษาสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่มีลักษณะเปลี่ยนไป..... 70
2.1.2 การศึกษาสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาคงเดิม..... 82

หน้า

2.2 การทำ P. chrysogenum N-151 ให้กลายพันธุ์ด้วย UV และการคัดเลือกสายพันธุ์

2.2.1 การทำกลายพันธุ์ P. chrysogenum N-151 ด้วย UV..... 87

2.2.2 การคัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์ขั้นปฐมภูมิ ..... 88

2.2.3 การคัดเลือกสายพันธุ์ขั้นทุติยภูมิ..... 91

2.2.4 การตรวจสอบปริมาณเพนนิซิลลิน จี ที่สร้างได้ ( กรัม/ลิตร ) จากสายพันธุ์ U-59 ด้วย HPLC ..... 94

3 การปรับปรุงสายพันธุ์ U-59

3.1 การทำ P. chrysogenum U-59 ให้กลายพันธุ์ด้วย NTG ..... 94

3.2 การคัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์ขั้นปฐมภูมิ ..... 95

3.3 การคัดเลือกสายพันธุ์ขั้นทุติยภูมิ ..... 98

3.4 การตรวจสอบปริมาณเพนนิซิลลิน จี ที่สร้างได้(กรัม/ลิตร) ด้วย HPLC... 100

4 การปรับปรุงสายพันธุ์ UN-696

4.1 การทำ P. chrysogenum UN-696 ให้กลายพันธุ์ด้วย NTG ..... 101

4.2 การคัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์ขั้นปฐมภูมิ ..... 102

4.3 การคัดเลือกสายพันธุ์ขั้นทุติยภูมิ ..... 105

4.4 การตรวจสอบปริมาณเพนนิซิลลิน จี ที่สร้างได้ (กรัม/ลิตร) ด้วย HPLC.. 107

5 การปรับปรุงสายพันธุ์ UNN-645

5.1 การทำ P. chrysogenum UNN-645 ให้กลายพันธุ์ด้วย NTG ..... 108

5.2 การคัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์ขั้นปฐมภูมิ ..... 109

5.3 การคัดเลือกสายพันธุ์ขั้นทุติยภูมิ ..... 111

5.4 การตรวจสอบปริมาณเพนนิซิลลิน จี ที่สร้างได้ (กรัม/ลิตร) ด้วย HPLC.. 115

6 การปรับปรุงสายพันธุ์ UNNN-354

6.1 การทำ P. chrysogenum UNNN-354 ให้กลายพันธุ์ด้วย NTG ..... 116

6.2 การคัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์ขั้นปฐมภูมิ ..... 117

6.3 การคัดเลือกสายพันธุ์ขั้นทุติยภูมิ ..... 119

6.4 การตรวจสอบปริมาณเพนนิซิลลิน จี ที่สร้างได้ (กรัม/ลิตร) ด้วย HPLC.. 122

หน้า

7 การเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของความกว้างบริเวณยับยั้ง(inhibition zone) หรือ โพเทนซี อินเดกซ์ (potency index ) บนอาหารวุ้นทดสอบ กับปริมาณเพนนิซิลลิน จี ที่สร้างได้จากสายพันธุ์กลายพันธุ์ต่าง ๆ ในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า..... 124

**4 บทสรุปและวิจารณ์**..... 127

**เอกสารอ้างอิง**..... 133

**ภาคผนวกที่**

1 สูตรอาหารที่ใช้ในการวิจัย

1.1 สูตรอาหารสำหรับเก็บรักษาเชื้อ*Penicillium chrysogenum* และใช้เลี้ยงเชื้อสำหรับเพิ่มปริมาณสปอร์..... 146

1.2 สูตรอาหารสำหรับเก็บรักษาเชื้อ , เลี้ยงเชื้อ *Staphylococcus aureus* และใช้ทดสอบหาปริมาณเพนนิซิลลิน จี โดยวิธี bioassay..... 146

1.3 สูตรอาหารเหลวที่ใช้ในงานหมักเพื่อผลิตเพนนิซิลลิน จี.....147

2 สารละลายและบัฟเฟอร์

2.1 บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทำกลายพันธุ์ด้วย NTG ..... 148

2.2 บัฟเฟอร์ที่ใช้ละลายเพนนิซิลลิน จี เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐานและวิเคราะห์เพนนิซิลลิน จี โดยวิธีชีววิทยา..... 148

2.3 สารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้เป็นตัวเคลื่อนที่ ( mobile phase)ในการวิเคราะห์เพนนิซิลลิน จี ด้วย HPLC..... 148

3 กราฟมาตรฐาน

3.1 กราฟมาตรฐานของเพนนิซิลลิน จี โดยวิธีชีววิทยา ..... 149

3.2 กราฟมาตรฐานของเพนนิซิลลิน จี วิเคราะห์โดยวิธี HPLC ซึ่งใช้สารมาตรฐานเปรียบเทียบคือ เพนนิซิลลิน วี..... 150

4 ค่าเฉลี่ยความกว้างบริเวณยับยั้งและค่าโพเทนซี อินเดกซ์..... 153

**ประวัติผู้เขียน**..... 156

หน้า

## สารบัญตาราง

ตารางที่

1 ความก้าวหน้าในการเพิ่มผลผลิตของเพนนิซิลลินโดยการทำกลายพันธุ์และคัดเลือกสายพันธุ์..... 16

2 จำนวนและความถี่ ( %)ของสายพันธุ์ P. chrysogenum N-151 จำนวน 89 ซ้ำที่ให้ความกว้างบริเวณยับยั้งที่มีความแปรผันขนาดต่าง ๆ ..... 66

3 ผลของ NTG ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อเปอร์เซนต์รอดตายของสปอร์ P. chrysogenum N-151..... 68

4 ลักษณะ morphology ของสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาเปลี่ยนไปจากสายพันธุ์ตั้งต้นเมื่อเลี้ยงบนอาหารวุ้น พี ดี เอ และอาหารวุ้นผลิตเพนนิซิลลิน จี เป็นเวลา 7 วัน..... 70

5 การจัดแบ่งกลุ่มของสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาเปลี่ยนไปจากสายพันธุ์ตั้งต้นตามการจัดเรียงตัวของสปอร์..... 75

6 ความกว้างบริเวณยับยั้ง(มิลลิเมตร) ความกว้างโคโลนี (มิลลิเมตร) potency index (ความกว้างบริเวณยับยั้ง/ความกว้างโคโลนี ) กลุ่มของสายพันธุ์กลายพันธุ์ โดยแยกตามลักษณะของสัณฐานวิทยาที่แตกต่างไปจากสายพันธุ์ตั้งต้นและชื่อของสายพันธุ์กลายพันธุ์ในแต่ละกลุ่ม ..... 78

7 ความสามารถในการสร้างเพนนิซิลลิน จี ของสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาเปลี่ยนไปเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น..... 81

8 จำนวนและความถี่ของสายพันธุ์กลายพันธุ์ 443 สายพันธุ์ ที่ให้ความกว้างบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) ขนาดต่าง ๆ เทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น..... 83

9 ปริมาณเพนนิซิลลิน จี ( ยูนิต/มิลลิลิตร )ในอาหารเหลวระดับขวดเขย่าของสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ขั้นปฐมภูมิ (18 สายพันธุ์ ) เปรียบเทียบกับความกว้างบริเวณยับยั้งของสายพันธุ์ดังกล่าวบนอาหารวุ้นทดสอบขั้นปฐมภูมิ..... 85

10 ผลการฉายแสงอุลตราไวโอเลตที่เวลาต่าง ๆ ต่อเปอร์เซนต์รอดตายของสปอร์ P. chrysogenum N-151 ..... 87

หน้า

11 จำนวนและความถี่ของสายพันธุ์กลายพันธุ์ 747 สายพันธุ์ ที่ให้ความกว้าง
บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) ขนาดต่างๆ เทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น..... 89

12 ปริมาณเพนนิซิลลิน จี ( ยูนิต/มิลลิลิตร )ในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า
ของสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ขั้นปฐมภูมิ เปรียบเทียบกับความกว้างบริเวณยับยั้งของ
สายพันธุ์ดังกล่าวบนอาหารวุ้นทดสอบขั้นปฐมภูมิ ..... 91

13 ผลของ NTG ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อเปอร์เซนต์รอดตายของสปอร์ P.
chrysogenum U-59..... 94

14 จำนวนและความถี่ของสายพันธุ์กลายพันธุ์ 820 สายพันธุ์ ที่ให้ความกว้าง
บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) ขนาดต่างๆ เทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น ..... 96

15 ปริมาณเพนนิซิลลิน จี ( ยูนิต/มิลลิลิตร )ในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า
ของสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ขั้นปฐมภูมิ (34 สายพันธุ์ ) เปรียบเทียบกับความกว้าง
บริเวณยับยั้งของสายพันธุ์ดังกล่าวบนอาหารวุ้นทดสอบ..... 98

16 ผลของ NTG ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อเปอร์เซนต์รอดตายของสปอร์ P.
chrysogenum UN-696..... 101

17 จำนวนและความถี่ของสายพันธุ์กลายพันธุ์ 1201 สายพันธุ์ ที่ให้ความกว้าง
บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) ขนาดต่างๆ เทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น ..... 103

18 ปริมาณเพนนิซิลลิน จี ( ยูนิต/มิลลิลิตร )ในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า
ของสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ขั้นปฐมภูมิ (35 สายพันธุ์ ) เปรียบเทียบกับความกว้าง
บริเวณยับยั้งของสายพันธุ์ดังกล่าวบนอาหารวุ้นทดสอบขั้นปฐมภูมิ ..... 105

19 ผลของ NTG ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อเปอร์เซนต์รอดตายของสปอร์ P.
chrysogenum UNN-645 ..... 108

20 จำนวนและความถี่ของสายพันธุ์กลายพันธุ์ 862 สายพันธุ์ ที่ให้ความกว้าง
บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) ขนาดต่างๆ เทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น ..... 110

21 ปริมาณเพนนิซิลลิน จี ( ยูนิต/มิลลิลิตร )ในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า
ของสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ขั้นปฐมภูมิ (59 สายพันธุ์ ) เปรียบเทียบกับความกว้าง
บริเวณยับยั้งของสายพันธุ์ดังกล่าวบนอาหารวุ้นทดสอบขั้นปฐมภูมิ ..... 111

22 ผลของ NTG ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อเปอร์เซนต์รอดตายของสปอร์ P.

หน้า

chrysogenum UNNN-354..... 116

23 จำนวนและความถี่ของสายพันธุ์กลายพันธุ์ 772 สายพันธุ์ ที่ให้ความกว้างบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) ขนาดต่างๆ เทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น ..... 118

24 ปริมาณเพนนิซิลลิน จี ( ยูนิต/มิลลิลิตร )ในอาหารเหลวระดับขวดเขย่าของสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ขั้นปฐมภูมิ (34 สายพันธุ์ )เปรียบเทียบกับความกว้างบริเวณยับยั้งของสายพันธุ์ดังกล่าวบนอาหารวุ้นทดสอบขั้นปฐมภูมิ ..... 120

25 สรุปความสามารถในการสร้างเพนนิซิลลิน จี ของสายพันธุ์เริ่มต้นและสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ได้ในแต่ละขั้นของการทำกลายพันธุ์..... 123

26 เปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างความกว้างบริเวณยับยั้ง ความกว้างบริเวณยับยั้งหารด้วยความกว้างโคโลนี (potency index ) และความสามารถในการสร้างเพนนิซิลลิน จี ..... 128

27 กราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์ปริมาณเพนนิซิลลิน จี โดยวิธีทางชีววิทยา..... 149

28 กราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์ปริมาณเพนนิซิลลิน จี โดยวิธี HPLC..... 151

29 ค่าความกว้างบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)และค่าเฉลี่ย ของสายพันธุ์ตั้งต้นในการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิของการทำกลายพันธุ์แต่ละขั้น..... 153

30 ค่าโพเทนซี อินเดกซ์(ความกว้างบริเวณยับยั้งหารด้วยความกว้างโคโลนี) และค่าเฉลี่ย ของสายพันธุ์ตั้งต้นในการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิของการทำกลายพันธุ์แต่ละขั้น.. 155

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หน้า

## สารบัญรูป

รูปที่

1 โครงสร้างส่วน β-lactam nucleus ( ในกรอบสี่เหลี่ยม) และส่วนที่ทำให้เพนนิซิลลินมีความแตกต่างกันคือหมู่ข้างเคียง ( R-side group )..... 6

2 วิถีการสังเคราะห์เพนนิซิลลิน จี..... 8

3 การปรับปรุงสายพันธุ์โดยการทำกลายพันธุ์อย่างต่อเนื่อง..... 15

4 สูตรโมเลกุลสารก่อการกลายพันธุ์เคมีในกลุ่มอัลคิเลชัน(Alkylation )..... 23

5 การเกิด cytosine hydrate เนื่องจากการฉายแสงอุลตราไวโอเลตกับสารแขวนลอยของ ดี เอ็น เอ ในน้ำ..... 27

6 การเกิด Thymine dimer ภายในสายของ ดี เอ็น เอ..... 27

7 หมู่อัลคิลของอัลคิเลติ้ง เอเจนต์เข้าไปยังตำแหน่งต่างๆ ของเบสในดี เอ็น เอ Phosphodiester bond และ Ribose..... 30

8 การจับคู่ระหว่างอัลคิเลเทดกัวนีนกับ ไซโตซีน ( A ) และการจับคู่ระหว่างอัลคิเลเทดกัวนีน กับไทมีน ( B)..... 33

9 ความเป็นไปได้เนื่องจากผลของออกโซโทรปต่อการเกิดผลิตภัณฑ์ทุติยภูมิ วงกลม = ขัดขวางการเกิดสารตัวกลาง(Intermediate) ในวิถีของการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ทุติยภูมิและผลิตภัณฑ์ปฐมภูมิ จุดไข่ปลา = กระตุ้นหรือยับยั้งการเกิดสารตัวกลางในวิถีของการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ทุติยภูมิและผลิตภัณฑ์ปฐมภูมิ..... 38

10 วิถีของการเกิดไลซีนและเพนนิซิลลิน จี ใน P. chrysogenum (1) Homocitrate synthase (2) α-amino adipic acid reductase (activated) (3) α-amino adipic acid reductase (reduction) (4) Saccharopine reductase (5) Saccharopine dehydrogenase สายพันธุ์ 45 ( 45 ) ถูกขัดขวางการเกิดเนื่องจากผลของการเกิดออกโซโทรป ณ.ตำแหน่ง (2) และ สายพันธุ์ H และ 13 a ถูกขัดขวาง ณ.ตำแหน่ง ( 5 ) เส้นไข่ปลาแสดงถึงความเป็นไปได้ในการเกิด Aminoadipic acid-L-cysteine ..... 41

หน้า

11 การเตรียมหลุมอะลูมิเนียมบนแผ่นกระจก..... 57
12 การวางกระจกในถาดแสตนเลสมีฝาปิด..... 57
13 การเทอาหารวุ้นทดสอบบนแผ่นกระจกที่ปรับระดับ..... 58
14 การเจริญของเชื้อราบนอาหารวุ้นหลุม..... 60
15 การย้ายอาหารวุ้นหลุมมาวางบนอาหารวุ้นทดสอบ..... 60
16 การวางเรียงแผ่นกระจกของอาหารวุ้นหลุมในกล่องแสตนเลสมีฝาปิด..... 61
17 ความกว้างบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น..... 61
18 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น NTG และเปอร์เซนต์รอดตายของ
สปอร์ P. chrysogenum N-151..... 69
19 ลักษณะโคโลนีของสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาเปลี่ยนไปจากสายพันธุ์
ตั้งต้นกลุ่มที่ 1 เมื่อเลี้ยงบนอาหารวุ้น พี ดี เอ (ขวา) และบนอาหารวุ้นผลิต
เพนนิซิลลิน จี (ซ้าย) เป็นเวลา 7 วัน..... 71
20 ลักษณะโคโลนีของสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาเปลี่ยนไปจากสายพันธุ์
ตั้งต้นกลุ่มที่ 2 เมื่อเลี้ยงบนอาหารวุ้น พี ดี เอ (ขวา) และบนอาหารวุ้นผลิต
เพนนิซิลลิน จี (ซ้าย) เป็นเวลา 7 วัน..... 72
21 ลักษณะโคโลนีของสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาเปลี่ยนไปจากสายพันธุ์
ตั้งต้นกลุ่มที่ 3 เมื่อเลี้ยงบนอาหารวุ้น พี ดี เอ (ขวา) และบนอาหารวุ้นผลิต
เพนนิซิลลิน จี (ซ้าย) เป็นเวลา 7 วัน..... 72
22 ลักษณะโคโลนีของสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาเปลี่ยนไปจากสายพันธุ์
ตั้งต้นกลุ่มที่ 4 เมื่อเลี้ยงบนอาหารวุ้น พี ดี เอ (ขวา) และบนอาหารวุ้นผลิต
เพนนิซิลลิน จี (ซ้าย) เป็นเวลา 7 วัน..... 73
23 ลักษณะโคโลนีของสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาเปลี่ยนไปจากสายพันธุ์
ตั้งต้นกลุ่มที่ 5 เมื่อเลี้ยงบนอาหารวุ้น พี ดี เอ (ขวา) และบนอาหารวุ้นผลิต
เพนนิซิลลิน จี (ซ้าย) เป็นเวลา 7 วัน..... 73
24 ลักษณะโคโลนีของสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาเปลี่ยนไปจากสายพันธุ์
ตั้งต้นกลุ่มที่ 6 เมื่อเลี้ยงบนอาหารวุ้น พี ดี เอ (ขวา) และบนอาหารวุ้นผลิต
เพนนิซิลลิน จี (ซ้าย) เป็นเวลา 7 วัน..... 74

หน้า

25 ลักษณะโคโลนีของของ P. chrysogenum N-151 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ตั้งต้นเมื่อเลี้ยงบนอาหารวุ้น พี ดี เอ (ขวา) และบนอาหารวุ้นผลิตเพนนิซิลลิน จี (ซ้าย) เป็นเวลา 7 วัน..... 74

26 ลักษณะการจัดเรียงตัวของสปอร์สายพันธุ์กลายพันธุ์ที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาเปลี่ยนไปจากสายพันธุ์ตั้งต้นแบบที่ 1 ..... 76

27 ลักษณะการจัดเรียงตัวของสปอร์สายพันธุ์กลายพันธุ์ที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาเปลี่ยนไปจากสายพันธุ์ตั้งต้นแบบที่ 2 ..... 77

28 ลักษณะการจัดเรียงตัวของสปอร์สายพันธุ์ตั้งต้น (P. chrysogenum N-151).. 77

29 ความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการฉาย UV และเปอร์เซนต์รอดตายของสปอร์ P. chrysogenum N-151..... 88

30 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น NTG และเปอร์เซนต์รอดตายของสปอร์ P. chrysogenum U-59 ..... 95

31 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น NTG และเปอร์เซนต์รอดตายของสปอร์ P. chrysogenum UN-696 ..... 102

32 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น NTG และเปอร์เซนต์รอดตายของสปอร์ P. chrysogenum UNN-645..... 109

33 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น NTG และเปอร์เซนต์รอดตายของสปอร์ P. chrysogenum UNNN-354..... 117

34 กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณเพนนิซิลลิน จี โดยวิธีชีววิทยา..... 150

35 กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณเพนนิซิลลิน จี โดย HPLC..... 151

36 รูปตัวอย่างจากการวิเคราะห์ปริมาณเพนนิซิลลิน จี โดยวิธี HPLC ซึ่งใช้เพนนิซิลลิน วี เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ..... 152