บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเพนนิซิลิน จี โดย P. chrysogenum A 88 ในขวดรูปชมพู่

1.1 องค์ประกอบของอาหาร

1.1.1 ชนิดของสารแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน

เลี้ยงเชื้อ P. chrysogenum A 88 ในขวดรูปชมพู่ ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 2.3.3 โดยใช้น้ำตาลแลคโตสปริมาณ 30 กรัม/ลิตร ร่วมกับน้ำตาลกลูโคสปริมาณ 16 กรัม/ลิตร เป็นสารแหล่งคาร์บอน และใช้สารแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen) 1.2 กรัม/ลิตร ตามรายงานของ Perlman (21) ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต ปริมาณ 5 กรัม/ลิตร เป็นสารแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน โดยใช้สารแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ กัน 6 ชนิด ดังนี้

1. คอร์นสตีปลิเคอร์ (corn steep liquor) ปริมาณ 46 กรัม/ลิตร

2. สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันแล้ว (hydrolysate of soybean meal) จากประเทศญี่ปุ่น ปริมาณ 284 มล./ลิตร

3. สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันแล้ว จาก บริษัท ธนากรผลิตภัณฑ์น้ำมันพืช จำกัด ปริมาณ 278 มล./ลิตร

4. สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของรำข้าวที่สกัดไขมันแล้ว (hydrolysate of rice bran) จากบริษัท ธนากรผลิตภัณฑ์น้ำมันพืช จำกัด ปริมาณ 736 มล./ลิตร

5. กากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันแล้วจากประเทศญี่ปุ่นปริมาณ 15 กรัม/ลิตร

6. กาก ถั่วเหลืองที่สกัดไขมันแล้วจาก บริษัท ธนากรผลิตภัณฑ์น้ำมันพืช จำกัด ปริมาณ 16.5 กรัม/ลิตร

ทำการวิเคราะห์ปริมาณเพนนิซิลิน จี ตามวิธีการวิจัยข้อ 3.1 พบว่าเมื่อใช้คอร์นสตีปลิเคอร์ สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันแล้วจากประเทศญี่ปุ่น สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันแล้วจากบริษัท ธนากรผลิตภัณฑ์น้ำมันพืช จำกัด เป็นสารแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน ปริมาณเพนนิซิลิน จี ที่ได้จะสูงใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 2) และเมื่อพิจารณาถึงความเหมาะสมและความเป็นไปได้ในการใช้สารแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน เพื่อการผลิตเพนนิซิลิน จี ในประเทศไทย สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองที่ได้จากโรงงานผลิตน้ำมันพืชภายในประเทศจะเป็นสารแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดเพราะกากถั่วเหลืองเป็นผลพลอยได้จากการสกัดน้ำมัน

ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไป จึงเลือกใช้สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันแล้ว จาก บริษัท ธนากรผลิตภัณฑ์น้ำมันพืช จำกัด

ตารางที่ 2 ผลการใช้สารแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ต่อการสร้างเพนนิซิลิน จี โดย P. chrysogenum A 88

* ได้จากการคำนวณตามที่แสดงไว้ในภาคผนวกที่ 7

ชนิดของสารแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน	ปริมาณเพนนิซิลินจี (หน่วย/มล.)* ในระยะเวลา ต่าง ๆ ของการหมัก			
	ชม.ที่ 72	ชม.ที่ 96	ชม.ที่ 120	ชม.ที่ 144
คอร์นสตีปลิเคอร์	2,254	2,412	3,570	3,172
สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันแล้ว จากประเทศญี่ปุ่น	969	2,676	3,492	2,779
สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันแล้ว จากบริษัท ธนากรผลิตภัณฑ์น้ำมันพืช จำกัด	579	1,520	3,590	3,060
สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของรำข้าวที่สกัดไขมันแล้ว จาก บริษัท ธนากรผลิตภัณฑ์น้ำมันพืช จำกัด	139	201	1,242	1,853
กากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันแล้ว จากประเทศญี่ปุ่น	1,726	3,126	3,270	1,995
กากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันแล้ว จากบริษัท ธนากรผลิตภัณฑ์น้ำมันพืช จำกัด	1,090	1,476	2,872	2,772

1.1.2 ปริมาณที่เหมาะสมของสารแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน

เลี้ยงเชื้อ P. chrysogenum A 88 ในขวดรูปชมพู่ ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 2.3.3 โดยใช้น้ำตาลแลคโตสปริมาณ 30 กรัม/ลิตร ร่วมกับน้ำตาลกลูโคสปริมาณ 16 กรัม/ลิตร เป็นสารแหล่งคาร์บอน ใช้สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันแล้ว จาก บริษัท ธนากรผลิตภัณฑ์น้ำมันพืช จำกัด ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 5 กรัม/ลิตร เป็นสารแหล่งไนโตรเจน ผันแปรปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen) ในสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันแล้ว ทำการวิเคราะห์ปริมาณเพนนิซิลิน จี ตามวิธีการวิจัยข้อ 3.1 พบว่า เมื่อใช้สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันแล้วที่มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 1.5 กรัม/ลิตร จะให้ปริมาณเพนนิซิลิน จี เฉลี่ยสูงกว่าเมื่อใช้ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 1.0, 1.2 และ 1.7 กรัม/ลิตร (ตารางที่ 3) ซึ่งผลการทดสอบทางสถิติมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ภาคผนวกที่ 4.1)

ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกใช้สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันแล้ว ที่มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 1.5 กรัม/ลิตร เป็นสารแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 5.0 กรัม/ลิตร

ตารางที่ 3 ผลการผันแปรปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันแล้ว ต่อการสร้างเพนนิซิลิน จี โดย P. chrysogenum A 88 โดยทดสอบทางสถิติมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ภาคผนวกที่ 4.1)

ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen) ในสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันแล้ว (กรัม/ลิตร)	ปริมาณเพนนิซิลิน จี (หน่วย/มล.) ในระยะเวลาต่างๆของการหมัก		
	ชม.ที่ 96	ชม.ที่ 120	ชม.ที่ 144
1.0	2,915	3,345	2,856
1.2	3,105	3,940	2,508
1.5	2,559	4,340	2,816
1.7	1,860	3,570	3,156

1.1.3 ปริมาณที่เหมาะสมของแอมโมเนียมซัลเฟตซึ่งเป็นสารแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน

เลี้ยงเชื้อ P. chrysogenum A 88 ในขวดรูปชมพู่ ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 2.3.3 โดยใช้น้ำตาลแลคโตสปริมาณ 30 กรัม/ลิตร ร่วมกับน้ำตาลกลูโคสปริมาณ 16 กรัม/ลิตร เป็นสารแหล่งคาร์บอน ใช้สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันแล้ว ที่มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 1.5 กรัม/ลิตร เป็นสารแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน และใช้แอมโมเนียมซังเฟตเป็นสารแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน โดยผันแปรปริมาณแอมโนเนียมซัลเฟต ทำการวิเคราะห์ปริมาณเพนนิซิลิน จี ตามวิธีการวิจัยข้อ 3.1 พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 5 กรัม/ลิตร ให้ปริมาณเพนนิซิลิน จี สูงกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต ปริมาณ 2, 3, 4 และ 6 กรัม/ลิตร (ตารางที่ 4) ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกใช้แอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 5 กรัม/ลิตร

ตารางที่ 4 ผลการผันแปรปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต ต่อการสร้างเพนนิซิลิน จี โดย P. chrysogenum A 88

ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (กรัม/ลิตร)	ปริมาณเพนนิซิลิน จี (หน่วย/มล.) ในระยะเวลาต่างๆของการหมัก		
	ชม.ที่ 96	ชม.ที่ 120	ชม.ที่ 144
2.0	1,090	2,070	1,944
3.0	1,792	2,364	2,070
4.0	1,476	2,868	2,688
5.0	1,912	3,690	3,270
6.0	1,476	2,520	2,364

1.1.4 ปริมาณที่เหมาะสมของน้ำตาลกลูโคส ซึ่งเป็นสารแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญของเชื้อ

เลี้ยงเชื้อ P. chrysogenum A 88 ในขวดรูปชมพู่ ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 2.3.3 โดยใช้น้ำตาลแลคโตส ปริมาณ 30 กรัม/ลิตร ร่วมกับน้ำตาลกลูโคสเป็นสารแหล่งคาร์บอน ใช้สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันแล้วที่มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 1.5 กรัม/ลิตร ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต ปริมาณ 5 กรัม/ลิตร เป็นสารแหล่งไนโตรเจนผันแปรปริมาณน้ำตาลกลูโคส ทำการวิเคราะห์ปริมาณเพนนิซิลิน จี ตามวิธีการวิจัยข้อ 3.1 พบว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคส ปริมาณ 10 กรัม/ลิตร ให้ปริมาณเพนนิซิลิน จี เฉลี่ยสูงกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคสปริมาณ 5, 15 และ 20 กรัม/ลิตร (ตารางที่ 5) ซึ่งผลการทดสอบทางสถิติมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ภาคผนวกที่ 4.2) ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไป จึงเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคสปริมาณ 10 กรัม/ลิตร

ตารางที่ 5 ผลการผันแปรปริมาณน้ำตาลกลูโคส ต่อการสร้างเพนนิซิลิน จี โดย P. chrysogenum A 88 โดยทดสอบทางสถิติมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ภาคผนวกที่ 4.2)

ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (กรัม/ลิตร)	ปริมาณเพนนิซิลิน จี (หน่วย/มล.) ในระยะเวลาต่างๆของการหมัก		
	ชม.ที่ 96	ชม.ที่ 120	ชม.ที่ 144
5.0	3,112	3,690	3,450
10.0	3,222	4,493	3,815
15.0	2,725	3,815	3,465
20.0	2,412	3,450	3,240

1.1.5 ชนิดของสารแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตเพนนิซิลิน จี

เลี้ยงเชื้อ P. chrysogenum A 88 ในขวดรูปชมพู่ ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 2.3.3 โดยใช้สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันแล้วที่มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 1.50 กรัม/ลิตร ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 5 กรัม/ลิตร เป็นสารแหล่งไนโตรเจน และใช้น้ำตาลกลูโคสปริมาณ 10 กรัม/ลิตร ร่วมกับสารแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ กัน 8 ชนิด ดังนี้

1. แป้งมันสำปะหลัง (casava starch) ปริมาณ 30 กรัม/ลิตร
2. แป้งละลายน้ำ (soluble starch) ปริมาณ 30 กรัม/ลิตร
3. น้ำตาลซูโครส (sucrose) ปริมาณ 30 กรัม/ลิตร
4. เดกซ์ตริน (dextrin) ปริมาณ 30 กรัม/ลิตร
5. กลีเซอรอล (glycerol) ปริมาณ 30 กรัม/ลิตร
6. น้ำตาลแลคโตส (lactose) ปริมาณ 30 กรัม/ลิตร
7. สารละลายแป้งที่ย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟา อะไมเลส 1 ขั้นตอน โดยใช้ปริมาณแป้งเริ่มต้น 30 กรัม/ลิตร ปริมาตร 72 มล./ลิตร

8. น้ำมันถั่วเหลืองเบสท์ฟูด ปริมาตร 12 มล./ลิตร

ทำการวิเคราะห์ปริมาณเพนนิซิลิน จี ตามวิธีการวิจัยข้อ 3.1 พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำตาลแลคโตส จะให้ปริมาณเพนนิซิลิน จี สูงสุด 4,147 หน่วย/มล. รองลงมาคือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แป้งมันสำปะหลังโดยให้ปริมาณเพนนิซิลิน จี สูงสุด 2,958 หน่วย/มล. (ตารางที่ 6) ถึงแม้ว่าปริมาณเพนนิซิลิน จี ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แป้งมันสำปะหลังจะต่ำกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำตาลแลคโตสถึง 1,189 หน่วย/มล. แต่ก็เป็นสารแหล่งคาร์บอนที่น่าสนใจ เพราะแป้งมันสำปะหลังมีราคาถูกกว่าน้ำตาลแลคโตสถึง 6 เท่า และเป็นวัตถุดิบที่มีอยู่ภายในประเทศ ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงผันแปรปริมาณแป้งมันสำปะหลัง โดยเปรียบเทียบกับน้ำตาลแลคโตส โดยคาดหวังว่าเมื่อปรับปริมาณแป้งมันสำปะหลังให้เหมาะสมแล้ว อาจจะทำให้เชื้อราสร้างเพนนิซิลิน จี ได้ในปริมาณที่สูงขึ้น

ตารางที่ 6 ผลการใช้สารแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ กัน ต่อการสร้างเพนนิซิลิน จี *P. chrysogenum* A 88

ชนิดของสารแหล่งคาร์บอน	ปริมาณเพนนิซิลิน จี (หน่วย/มล.) ในระยะเวลาต่างๆของการหมัก		
	ชม.ที่ 96	ชม.ที่ 120	ชม.ที่ 144
แป้งมันสำปะหลัง	2,116	2,958	2,355
แป้งละลายน้ำ	1,540	2,079	1,896
น้ำตาลซูโครส	1,244	1,722	1,446
เดกซ์ตริน	1,746	2,542	2,271
สารละลายแป้งที่ย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 1 ขั้นตอน	1,755	2,290	1,015
กลีเซอรอล	749	2,000	1,840
น้ำมันถั่วเหลือง	1,580	2,184	1,684
น้ำตาลแลคโตส	3,184	4,147	3,473

1.1.6 ปริมาณที่เหมาะสมของแป้งมันสำปะหลัง และน้ำตาลแลคโตส สำหรับการผลิตเพนนิซิลิน จี

เลี้ยงเชื้อ P. chrysogenum A 88 ในขวดรูปชมพู่ ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 2.3.3 โดยใช้สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันแล้วที่มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 1.5 กรัม/ลิตร ร่วมกับแอมโนเนียมซัลเฟตปริมาณ 5 กรัม/ลิตร เป็นสารแหล่งไนโตรเจน ใช้น้ำตาลกลูโคสปริมาณ 10 กรัม/ลิตร ร่วมกับน้ำตาลแลคโตส หรือ แป้งมันสำปะหลัง เป็นสารแหล่งคาร์บอน ผันแปรปริมาณน้ำตาลแลคโตส แป้งมันสำปะหลัง ตามลำดับ ทำการวิเคราะห์ปริมาณเพนนิซิลิน จี ตามวิธีการวิจัยข้อ 3.1 พบว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำตาลแลคโตสปริมาณ 30 กรัม/ลิตร ให้ปริมาณ เพนนิซิลิน จี สูงสุด 4,200 หน่วย/มล. ในชั่วโมงที่ 120 ในขณะที่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แป้งมันสำปะหลังปริมาณ30 กรัม/ลิตร เชื้อสร้างเพนนิซิลิน จี สูงสุด 2,520 หน่วย/มล. ในชั่วโมงที่ 120 (ตารางที่ 7) จะเห็นได้ว่าปริมาณเพนนิซิลิน จี ที่ได้จากการใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นสารแหล่งคาร์บอน ต่ำกว่าปริมาณเพนนิซิลิน จีที่ได้จากการใช้น้ำตาลแลคโตสถึง 66.67% ถึงแม้ว่าแป้งมันสำปะหลังจะมีราคาถูกกว่าน้ำตาลแลคโตส แต่ถ้ามีผลให้ปริมาณเพนนิซิลิน จี ลดลงถึง 66.67% ก็อาจจะไม่คุ้มค่ากับราคาที่ต่างกัน ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะใช้น้ำตาลแลคโตสเป็นสารแหล่งคาร์บอน

I19243959

ตารางที่ 7 ผลการผันแปรปริมาณสารแหล่งคาร์บอน ต่อการสร้างเพนนิซิลิน จี โดย P. chrysogenum A 88

ชนิดของสารแหล่งคาร์บอน	ปริมาณของสารแหล่งคาร์บอน (กรัม/ลิตร)	ปริมาณเพนนิซิลิน จี (หน่วย/มล.) ในระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก			
		ชม.ที่ 72	ชม.ที่ 96	ชม.ที่ 120	ชม.ที่ 144
น้ำตาลแลคโตส	20	1,474	2,212	2,506	2,361
	30	1,683	2,541	4,200	3,367
	40	1,477	1,958	3,154	3,154
	50	1,474	2,212	3,154	2,955
แป้งมันสำปะหลัง	20	494	957	1,524	1,384
	30	896	2,309	2,520	1,477
	40	816	1,474	2,142	1,441

1.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ และการสร้างเพนนิซิลิน จี โดย P. chrysogenum A 88

เลี้ยงเชื้อ P. chrysogenum A 88 ในขวดรูปชมพู่โดยใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อตามภาคผนวกที่ 1.6 ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 2.3.3 โดยใช้ อุณหภูมิ 25 °ซ. และ 30 °ซ.ตลอดการเลี้ยงเชื้อ ทำการวิเคราะห์ปริมาณเพนนิซิลิน จี ตามวิธีการวิจัยข้อ 3.1 และติดตามการเจริญของเชื้อตามวิธีการวิจัยข้อ 3.7 พบว่าที่อุณหภูมิ 25 °ซ. เชื้อสร้างเพนนิซิลิน จี สูงกว่าที่อุณหภูมิ 30 ° ซ. ส่วนการเจริญของเชื้อใกล้เคียงกันเมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25 °ซ. และ 30 °ซ. (ตารางที่ 8) ดังนั้นจึงเลือกใช้อุณหภูมิ 25°ซ สำหรับการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเพนนิซิลิน จี ในถังหมักขนาด 5 ลิตรต่อไป

ตารางที่ 8 ผลของอุณหภูมิต่อการสร้างเพนนิซิลิน จี และการเจริญของเชื้อ P. chrysogenum A 88

เวลาในการเลี้ยงเชื้อ (ชม.)	อุณหภูมิ 25°ซ น.น. เซลแห้ง (กรัม/ลิตร)	อุณหภูมิ 25°ซ ปริมาณเพนนิซิลิน จี (หน่วย/มล.)	อุณหภูมิ 30°ซ น.น. เซลแห้ง (กรัม/ลิตร)	อุณหภูมิ 30°ซ ปริมานเพนนิซิลิน จี (หน่วย/มล.)
72	16.13	2,520	14.09	1,381
96	17.07	3,935	16.53	3,272
120	16.51	4,200	16.48	3,686
144	12.57	3,148	15.32	2,952

1.3 **การเจริญของเชื้อ P. chrysogenum A 88 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อสำหรับการทดลองในถังหมัก**

1.3.1 ผลของจำนวนสปอร์เริ่มต้นต่อลักษณะของหัวเชื้อ

เลี้ยงเชื้อ P. chrysogenum A 88 ในขวดรูปชมพู่โดยใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อตามภาคผนวกที่ 1.3 ตามวิธีการที่กล่าวไว้ในข้อ 2.3.4 โดยใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้น $5x10^4$, $1x10^5$, $5x10^6$ และ $2.5x10^7$ สปอร์/ขวด ตามลำดับ ในอาหารเตรียมหัวเชื้อที่มีสารแหล่งไนโตรเจนต่างกัน 2 ชนิดคือ คอร์นสตีปลิเคอร์และสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันแล้ว พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อราเป็นเวลา 48 ชม. เชื้อราจะมีลักษณะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับจำนวนสปอร์เริ่มต้น และสารแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ กล่าวคือเมื่อใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้น $5x10^4$ และ $1x10^5$ สปอร์/ขวด เชื้อราที่เจริญแล้วจะมีลักษณะเป็นกลุ่มสายใย(pellet) ขนาดใหญ่ แต่ถ้าใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้น $5x10^6$ สปอร์/ขวด เชื้อราเจริญเป็นกลุ่มสายใย (pellet)ที่มีขนาดเล็กมาก(รูปที่ 6.1 และ 6.2)และถ้าใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้น $2.5x10^7$ สปอร์/ขวด เชื้อราจะเจริญในลักษณะที่เป็นสายใย (filamentous) กระจาย ไม่

เกาะกลุ่ม (รูปที่ 6.3) ชนิดของสารแหล่งไนโตรเจนก็มีอิทธิพลต่อลักษณะของเชื้อราเช่นกัน กล่าวคือเมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่ใช้คอร์นสตีปลิเคอร์ กลุ่มสายใยจะมีขนาดโตกว่า เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันแล้วโดยเปรียบเทียบ เมื่อใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้นเท่ากัน (รูปที่ 6.1,6.2)

เนื่องจากลักษณะของเชื้อราที่เจริญเมื่อใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้น $5x10^6$ สปอร์/ขวด มีลักษณะเป็นกลุ่มสายใยที่มีขนาดเล็กมาก และจำนวนสปอร์เริ่มต้น $2.5x10^7$ สปอร์/ขวด มีลักษณะเป็นเส้นใยกระจาย ลักษณะดังกล่าวเป็นลักษณะที่เหมาะสมเนื่องจากเส้นใยกระจายทำให้แต่ละเส้นใยได้รับอาหารทั่วถึง ดังนั้นจึงได้เลือกใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้น $5x10^6$ และ $2.5x10^7$ สปอร์/ขวด ในการศึกษาติดตามการเจริญของเชื้อราเพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการเตรียมหัวเชื้อ (inoculum) ที่จะใช้สำหรับการศึกษาการผลิตเพนิซิลิน จีในถังหมักขนาด 5 ลิตรต่อไป

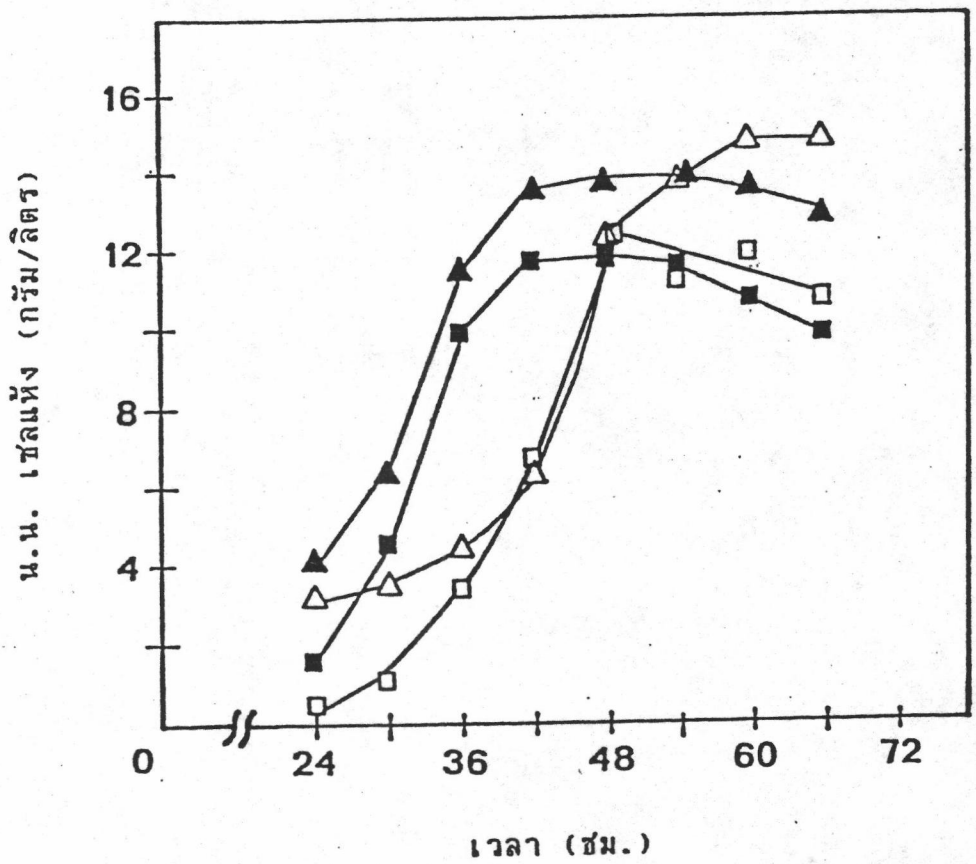
1.3.2 รูปแบบการเจริญของเชื้อ P.chrysogenum A 88 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ

เลี้ยงเชื้อ P. chrysogenum A 88ในขวดรูปชมพู่ โดยใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อตามภาคผนวกที่ 1.3 ตามวิธีการที่กล่าวไว้ในข้อ 2.3.4 ใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้น $5x10^6$, $2.5x10^7$สปอร์/ขวด ตามลำดับ ในอาหารเตรียมหัวเชื้อที่มีสารแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนต่างกัน 2 ชนิดคือ คอร์นสตีปลิเคอร์ และสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันแล้ว ติดตามการเจริญของเชื้อตามวิธีการวิจัยข้อ 3.7 ทุก 6 ชม. พบว่าเมื่อใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้น $2.5x10^7$สปอร์/ขวด อัตราเร็วในการเจริญของเชื้อดีพอ ๆ กับเมื่อใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้น $5x10^6$ สปอร์/ขวด แต่ระยะฟักตัว (lag phase) ของเชื้อที่ใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้น $5x10^6$ สปอร์/ขวด ยาวกว่า (รูปที่ 7) เมื่อเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อในอาหารเตรียมหัวเชื้อที่มีสารแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนต่างกัน โดยใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้น $2.5x10^7$ สปอร์/ขวด ในช.ม.ที่ 36 พบว่าในอาหารเตรียมหัวเชื้อที่มีคอร์นสตีปลิเคอร์ มี นน. เซลแห้งสูงกว่าในอาหารเตรียมหัวเชื้อที่มีสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันแล้ว 12% (รูปที่ 7) แต่เนื่องจากคอร์นสตีปลิเคอร์ต้องสั่งซื้อมาจากต่างประเทศ ฉะนั้นเพื่อเป็นการลดต้นทุนการผลิตจึงเลือกสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันแล้วเป็นสารแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนสำหรับเตรียมหัวเชื้อ

รูปที่ 6.1 ลักษณะของหัวเชื้อ เมื่อใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้น $5X10^6$, $1X10^5$ และ $5X10^4$ สปอร์/ขวด ตามลำดับ ในอาหารเตรียมหัวเชื้อที่มีคอร์นสตีปลิเคอร์เป็นสารแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน

รูปที่ 6.2 ลักษณะของหัวเชื้อ เมื่อใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้น $5X10^6$, $1X10^5$ และ $5X10^4$ สปอร์/ขวด ตามลำดับ ในอาหารเตรียมหัวเชื้อที่มีสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันแล้ว เป็นสารแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน

รูปที่ 6.3 ลักษณะของหัวเชื้อ เมื่อใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้น $2.5X10^7$ สปอร์/ขวด ตามลำดับ ในอาหารเตรียมหัวเชื้อที่มีสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันแล้ว และคอร์นสตีปลิเคอร์ เป็นสารแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน ตามลำดับ



รูปที่ 7 รูปแบบการเจริญของเชื้อ P. chrysogenum A 88 ในอาหารเตรียมหัวเชื้อที่มีจำนวนสปอร์เริ่มต้น และสารแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน ต่างกัน

△—△ จำนวนสปอร์เริ่มต้น 5×10^6 สปอร์/ขวด , คอร์นสตีปลิเคอร์เป็นสารแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน

▲—▲ จำนวนสปอร์เริ่มต้น 2.5×10^7 สปอร์/ขวด , คอร์นสตีปลิเคอร์เป็นสารแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน

□—□ จำนวนสปอร์เริ่มต้น 5×10^6 สปอร์/ขวด , สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันแล้วเป็นสารแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน

■—■ จำนวนสปอร์เริ่มต้น 2.5×10^7 สปอร์/ขวด , สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันแล้วเป็นสารแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน

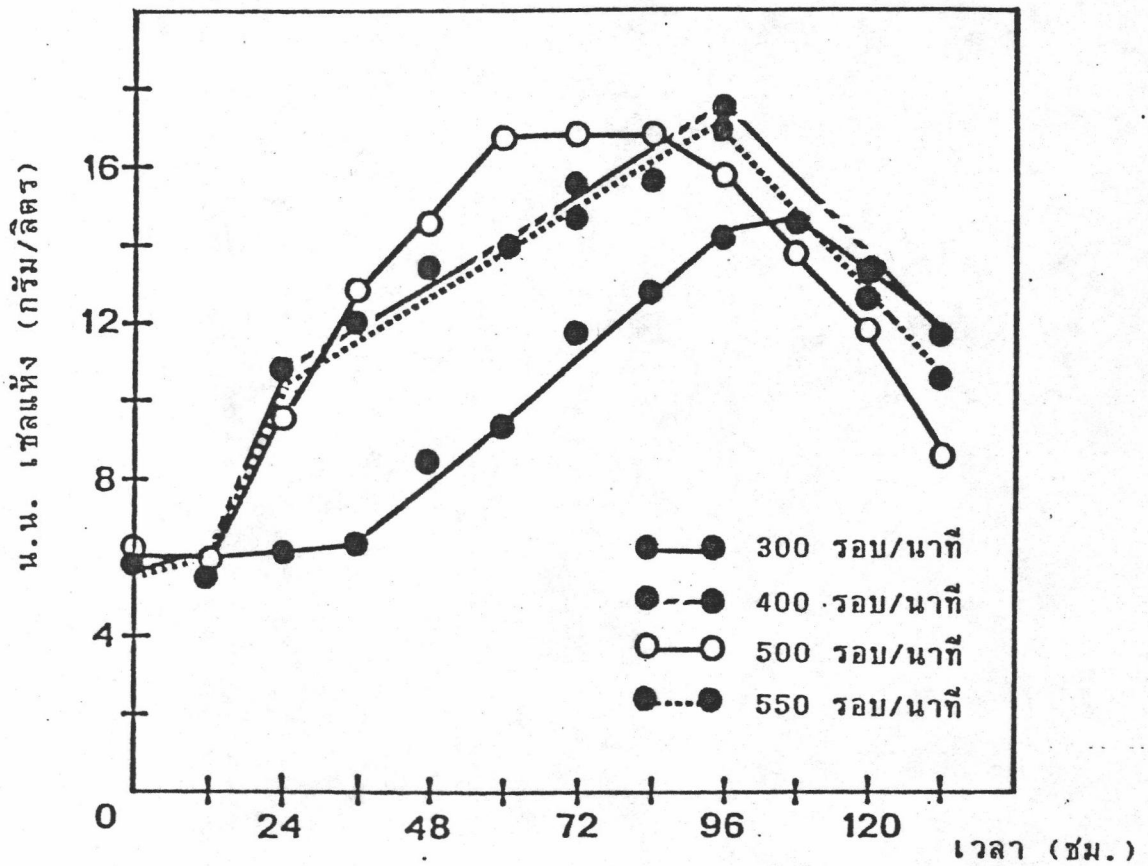
ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้ จำนวนสปอร์เริ่มต้น 2.5×10^7 สปอร์/ขวด ในอาหารเตรียมหัวเชื้อที่มีสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันแล้วเป็นสารแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน โดยใช้ระยะเวลาการเลี้ยง 36 ชม. ซึ่งเป็นเวลาที่เป็นจุดกึ่งกลางของการเจริญแบบทวีคูณ (mid log phase) สำหรับเป็นหัวเชื้อของการผลิตเพนนิซิลิน จี ในถังหมักขนาด 5 ลิตรต่อไป

2. <u>การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเพนนิซิลิน จี โดย P. chrysogenum A 88 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร</u>

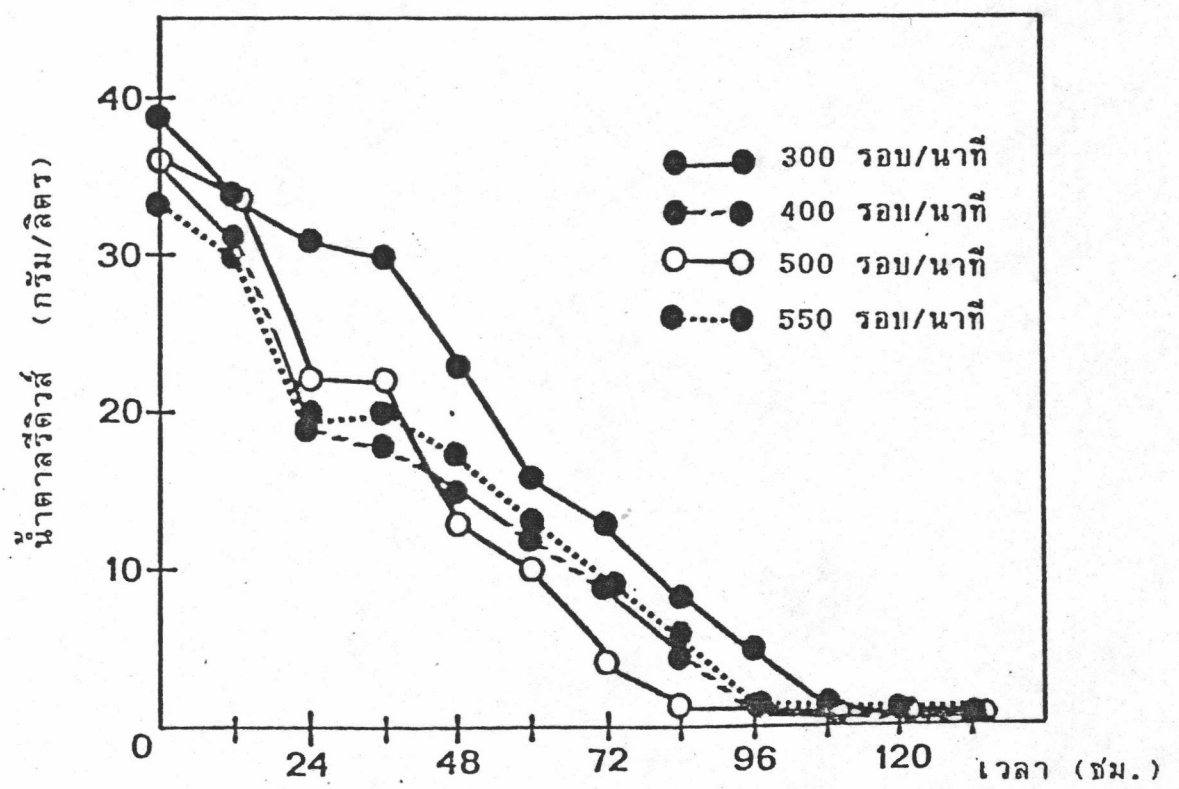
จากการศึกษาสภาวะต่าง ๆ ในขวดรูปชมพู่ พบว่าอาหารเหลวที่มีน้ำตาลแลคโตสปริมาณ 30 กรัม/ลิตร น้ำตาลกลูโคสปริมาณ 10 กรัม/ลิตร เป็นสารแหล่งคาร์บอน และสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันแล้ว ที่มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 1.5 กรัม/ลิตร แอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 5 กรัม/ลิตร เป็นสารแหล่งไนโตรเจน เป็นอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเพนนิซิลิน จี และอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเพื่อผลิตเพนนิซิลิน จี คือ 25°ช. ดังนั้นจึงเลือกอาหารเหลวดังกล่าว และอุณหภูมิ 25° ช. สำหรับการเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมอื่น ๆซึ่งไม่สามารถหาได้จากการทดลองในขวดรูปชมพู่ ได้แก่ อัตราการให้อากาศที่เหมาะสม ปริมาณของกรดฟีนิลอะซีติกที่เติมในครั้งแรก ตลอดจนระยะเวลา และปริมาณที่เติมในครั้งต่อไปตลอดการทดลอง อัตราการเติมสารแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ เพื่อให้เซลใช้เป็นแหล่งพลังงานในการสร้างเพนนิซิลิน จี อย่างต่อเนื่อง ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมักตลอดจนการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนและซัลเฟตที่มีอยู่ในน้ำหมัก ตลอดระยะเวลาการหมัก

2.1 <u>อัตราการให้อากาศที่เหมาะสม</u>

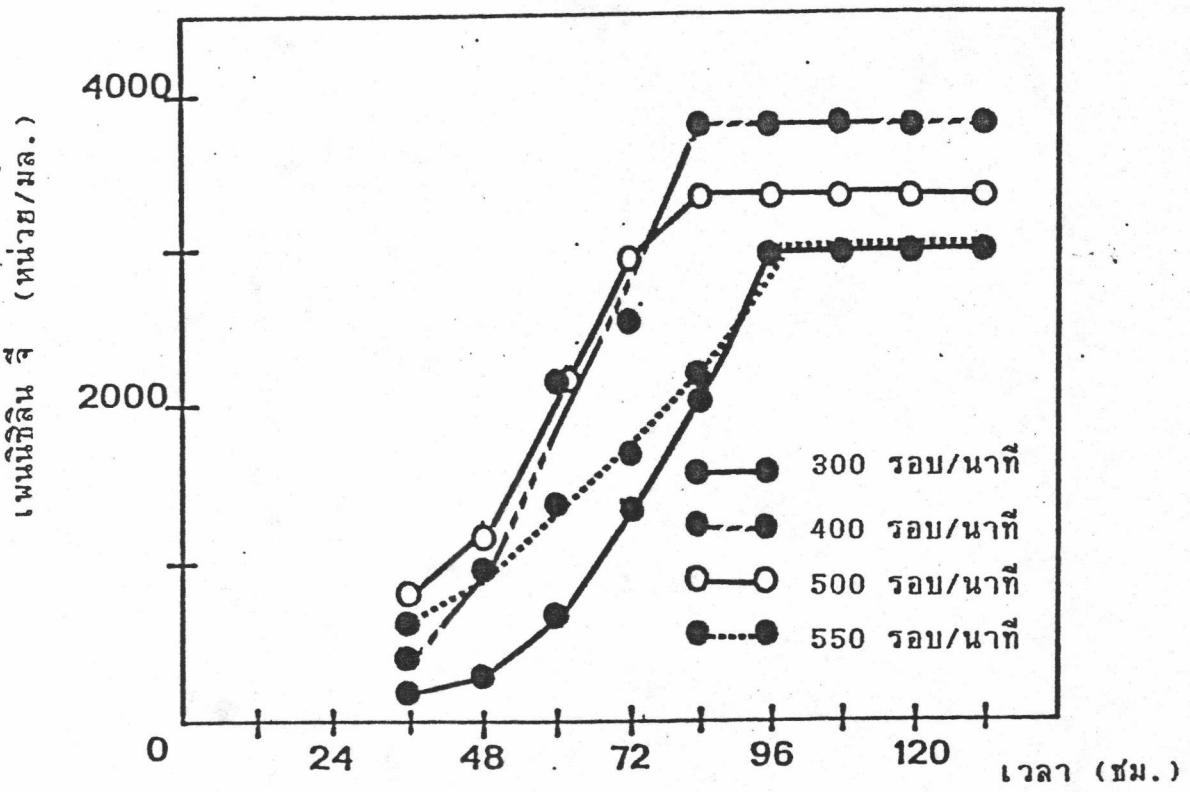
เลี้ยงเชื้อ <u>P. chrysogenum</u> A 88 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อตามภาคผนวกที่ 1.6 ตามวิธีการที่กล่าวไว้ในข้อ 2.3.5 โดยปล่อยอากาศเข้าถังหมัก 1 ลิตร/1 ลิตรของอาหาร/นาที คงที่ และผันแปรอัตราการกวน 300 ,400 ,500 และ 550 รอบ/นาที พบว่าที่อัตราการกวน 500 รอบ/นาที เชื้อมีอัตราการเจริญสูงสุด ให้ปริมาณเซลสูงสุด 16.8 กรัม/ลิตร ในชม. ที่ 60 (รูปที่ 8) ส่วนที่อัตราการกวน



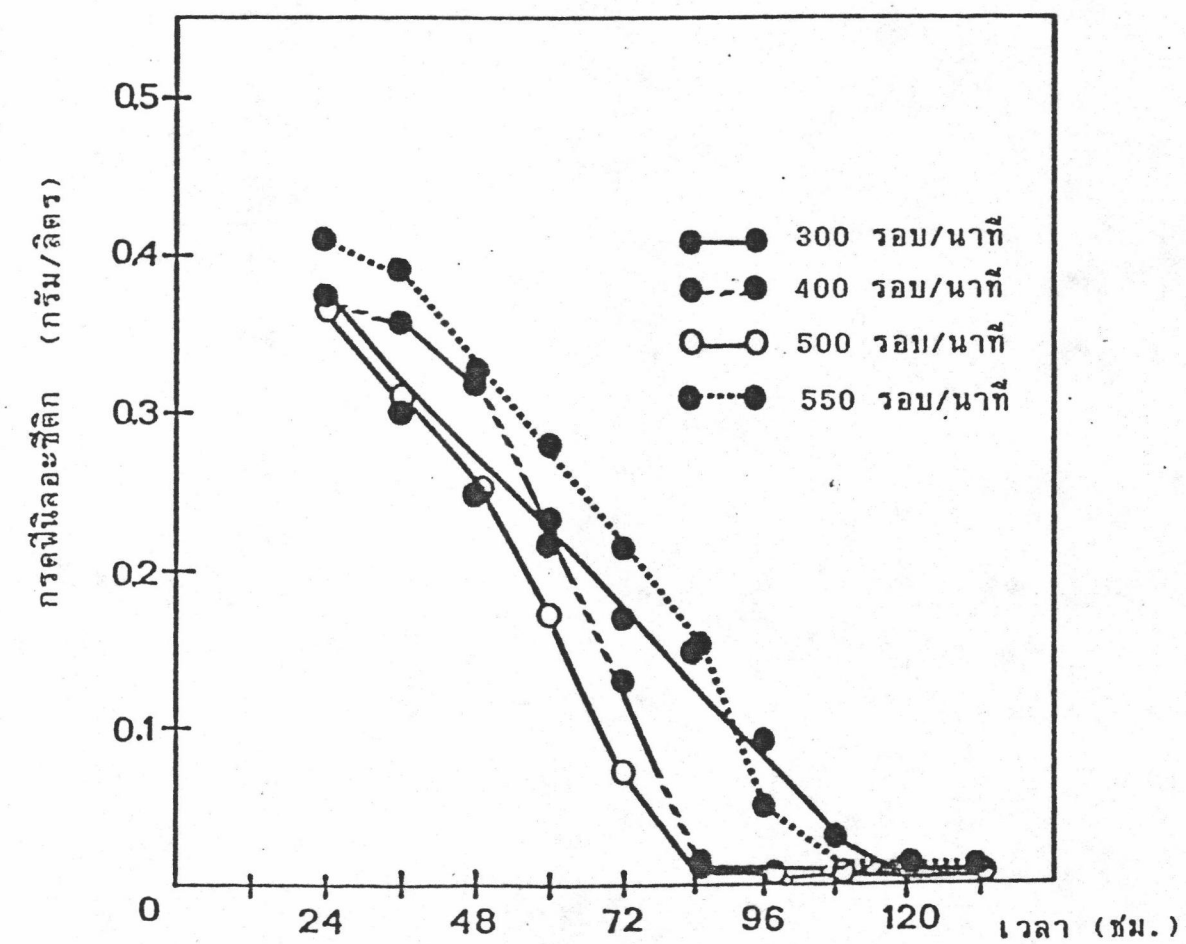
รูปที่ 8 ผลของอัตราการกวนต่อการเจริญของเชื้อ P. chrysogenum A 88



รูปที่ 9 ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่เหลือในน้ำหมัก เมื่อใช้อัตราการกวนแตกต่างกัน



รูปที่ 10 ผลของอัตราการกวนต่อการสร้างเพนนิซิลิน จี โดย P. chrysogenum A 88



รูปที่ 11 ปริมาณกรดฟีนิลอะซีติกที่เหลือในน้ำหมัก เมื่อใช้อัตราการกวนที่แตกต่างกัน

400 และ 550 รอบ/นาที ให้ปริมาณเซลสูงสุดช้ากว่า คือที่ ชม.ที่ 96 ส่วนปริมาณเซลใกล้เคียงกับปริมาณเซลที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้อัตราการกวน 500 รอบ/นาที คือ 17.0 กรัม/ลิตร และ 17.4 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ส่วนการหมักที่ใช้อัตราการกวน 300 รอบ/นาที นั้น การเจริญของเซลช้าและให้ปริมาณเซลสูงสุดเพียง 14.6 กรัม/ลิตร ใน ชม. ที่ 108 เมื่อตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่เหลือในน้ำหมักพบว่ามีความสัมพันธ์กับอัตราการเจริญที่กล่าวมาแล้ว คือที่อัตราการกวน 500 รอบ/นาที ซึ่งเซลมีอัตราการเจริญสูงสุด ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ในน้ำหมักจะลดลงอย่างเร็วที่สุด การหมักที่ใช้อัตราการกวน 300 รอบ/นาที ซึ่งมีอัตราการเจริญของเซลต่ำที่สุดนั้น การลดลงของน้ำตาลรีดิวส์ในน้ำหมักก็มีอัตราต่ำตามไปด้วย ส่วนที่อัตราการกวน 400 และ 550 รอบ/นาทีมีอัตราการลดของน้ำตาลรีดิวส์ใกล้เคียงกัน(รูปที่ 9)

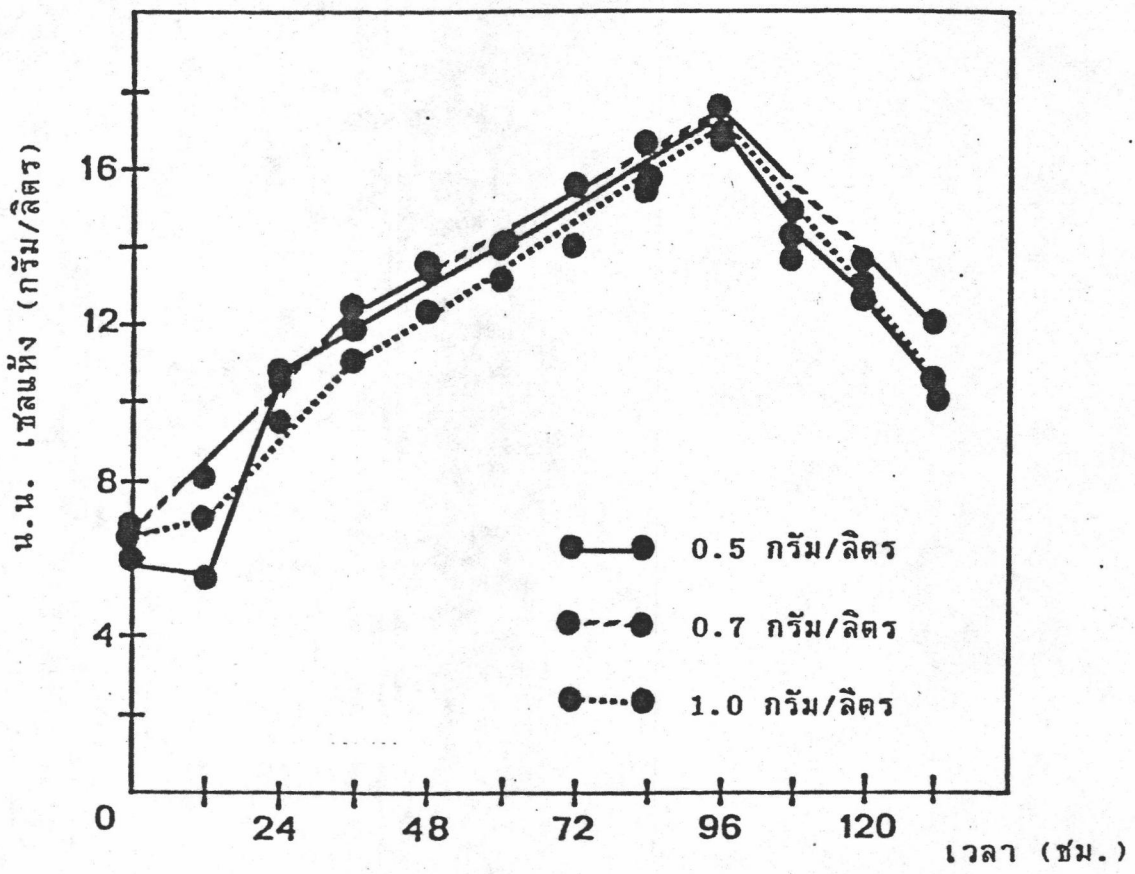
อัตราการกวนมีผลต่อการสร้างเพนนิซิลิน จี จากการทดลองพบว่าที่อัตราการกวน 300, 400, 500 และ 550 รอบ/นาที เชื้อสร้างเพนนิซิลิน จี สูงสุด 2,949, 3,829 3,360 และ 2,946 หน่วย/มล. ใน ชม. ที่ 96,84,84 และ 96 ตามลำดับ (รูปที่ 10) อัตราการกวน 400 รอบ/นาที เป็นอัตราที่ทำให้เชื้อราผลิตเพนนิซิลิน จี ได้สูงที่สุด จะเห็นได้ว่าในขณะที่ปริมาณเพนนิซิลิน จี ในถังหมักขึ้นสูงสุด ความเข้มข้นของกรดฟีนิลอะซีติกในน้ำหมักต่ำกว่า 0.1 กรัม/ลิตร (รูปที่ 11) การที่ปริมาณกรดฟีนิลอะซีติกมีระดับต่ำนี้อาจเป็นข้อจำกัดที่เซลไม่สามารถสร้างเพนนิซิลิน จี ได้ต่อไป

จากการผันแปรอัตราการกวน พบว่าอัตราการกวน 500 รอบ/นาที เชื้อมีการเจริญดีที่สุด แต่มีการสร้างเพนนิซิลิน จี ต่ำกว่าที่อัตราการกวน 400 รอบ/นาที ดังนั้นการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้อัตราการกวน 400 รอบ/นาที

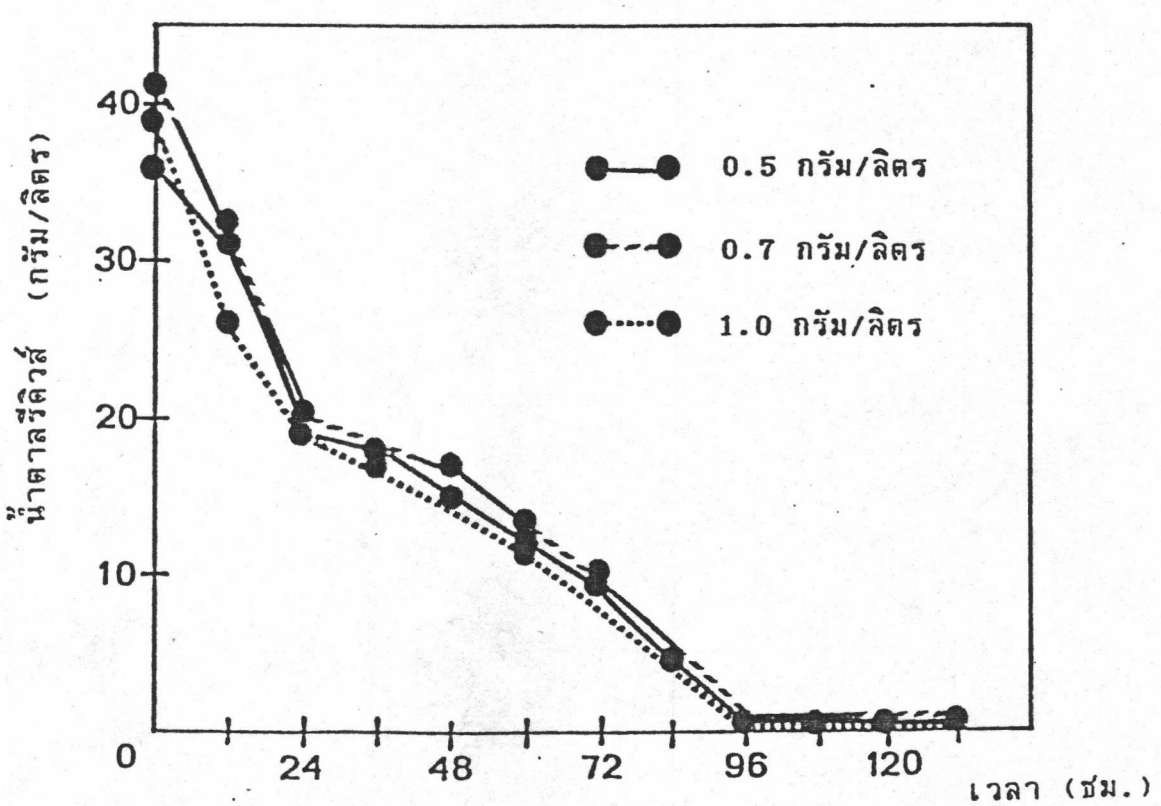
2.2 <u>ปริมาณกรดฟีนิลอะซีติกที่เหมาะสม</u>

จากผลการทดลองในข้อ 2.1 มีแนวโน้มว่าปริมาณกรดฟีนิลอะซีติก อาจจะเป็นข้อจำกัดในการสร้างเพนนิซิลิน จี ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงหาปริมาณกรดฟีนิลอะซีติกเริ่มต้นที่เหมาะสม

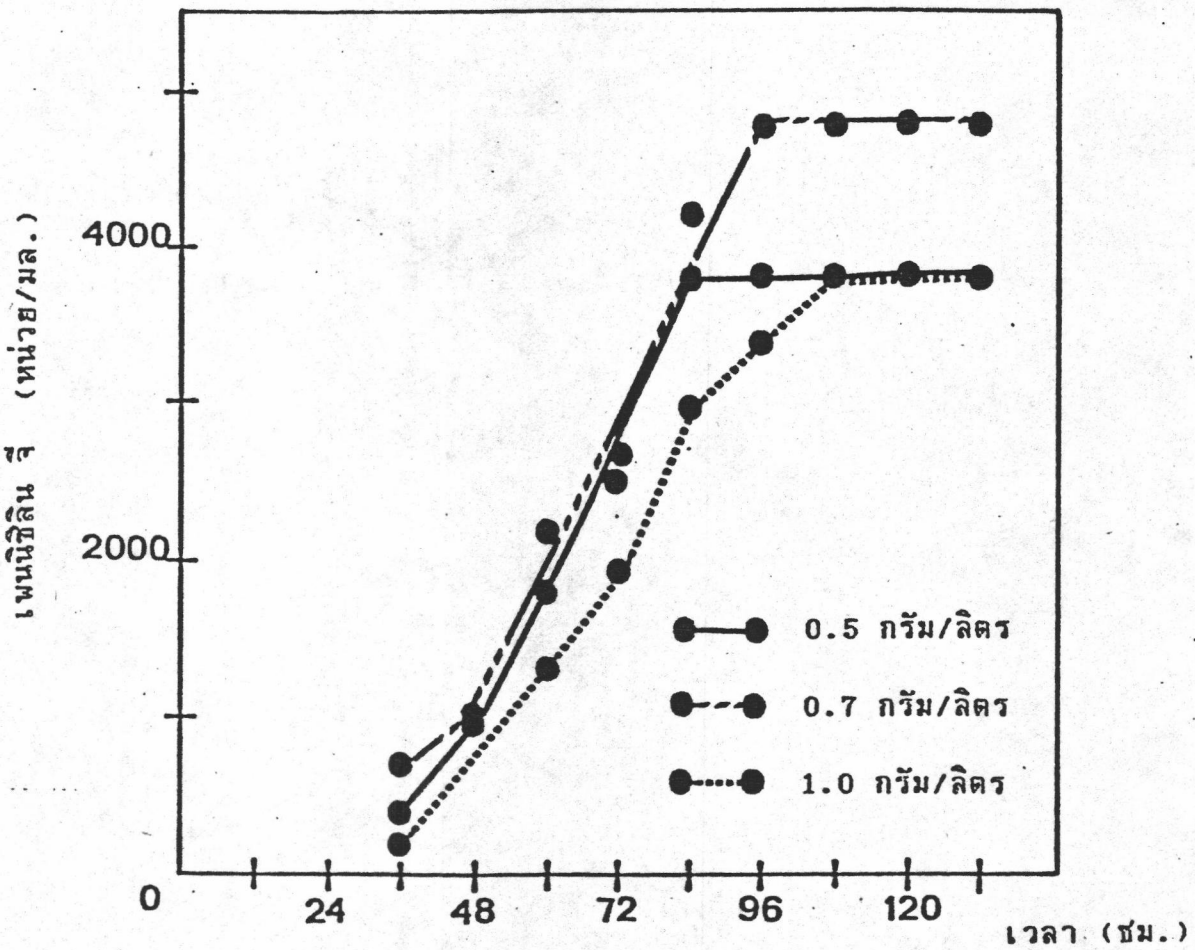
เลี้ยงเชื้อ <u>P. chrysogenum</u> A 88 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 2.3.5 โดยใช้อัตราการกวน 400 รอบ/นาที ในชม. ที่ 24 ของการหมักเติมกรดฟีนิลอะซีติก (36) โดยผันแปรปริมาณกรด PAA 0.5,0.7 และ 1.0 กรัม/ลิตร



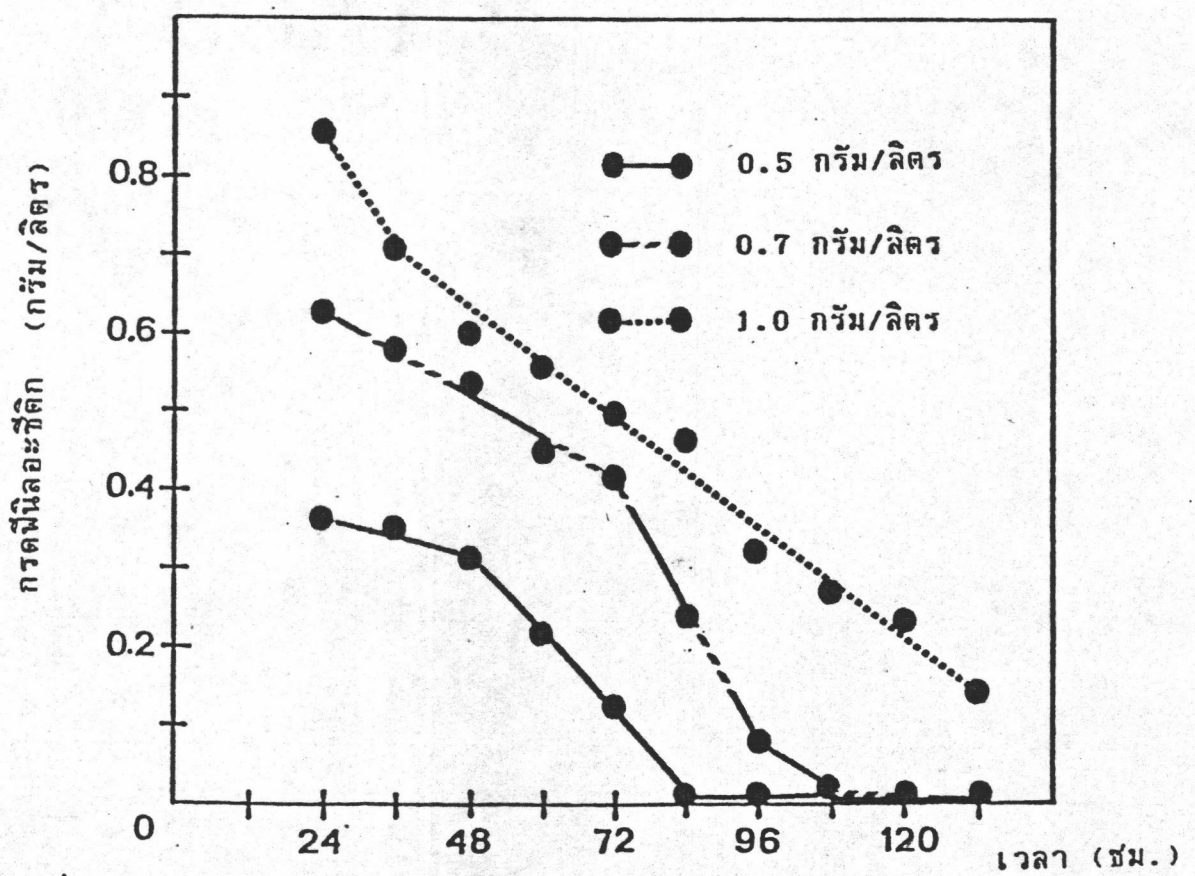
รูปที่ 12 ผลการผันแปรปริมาณกรดฟีนิลอะซีติกเริ่มต้น ต่อการเจริญของเชื้อ P. chrysogenum A88



รูปที่ 13 ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่เหลือในน้ำหมัก ในระยะเวลาต่างๆ เมื่อผันแปรปริมาณกรดฟีนิลอะซีติกเริ่มต้น



รูปที่ 14 ผลการผันแปรปริมาณกรดฟีนิลอะซีติกเริ่มต้น ต่อการสร้างเพนนิซิลิน จี โดย P. chrysogenum A88



รูปที่ 15 ปริมาณกรดฟีนิลอะซีติกที่เหลือในน้ำหมักในระยะเวลาต่างๆ เมื่อผันแปรปริมาณกรดฟีนิลอะซีติกเริ่มต้น

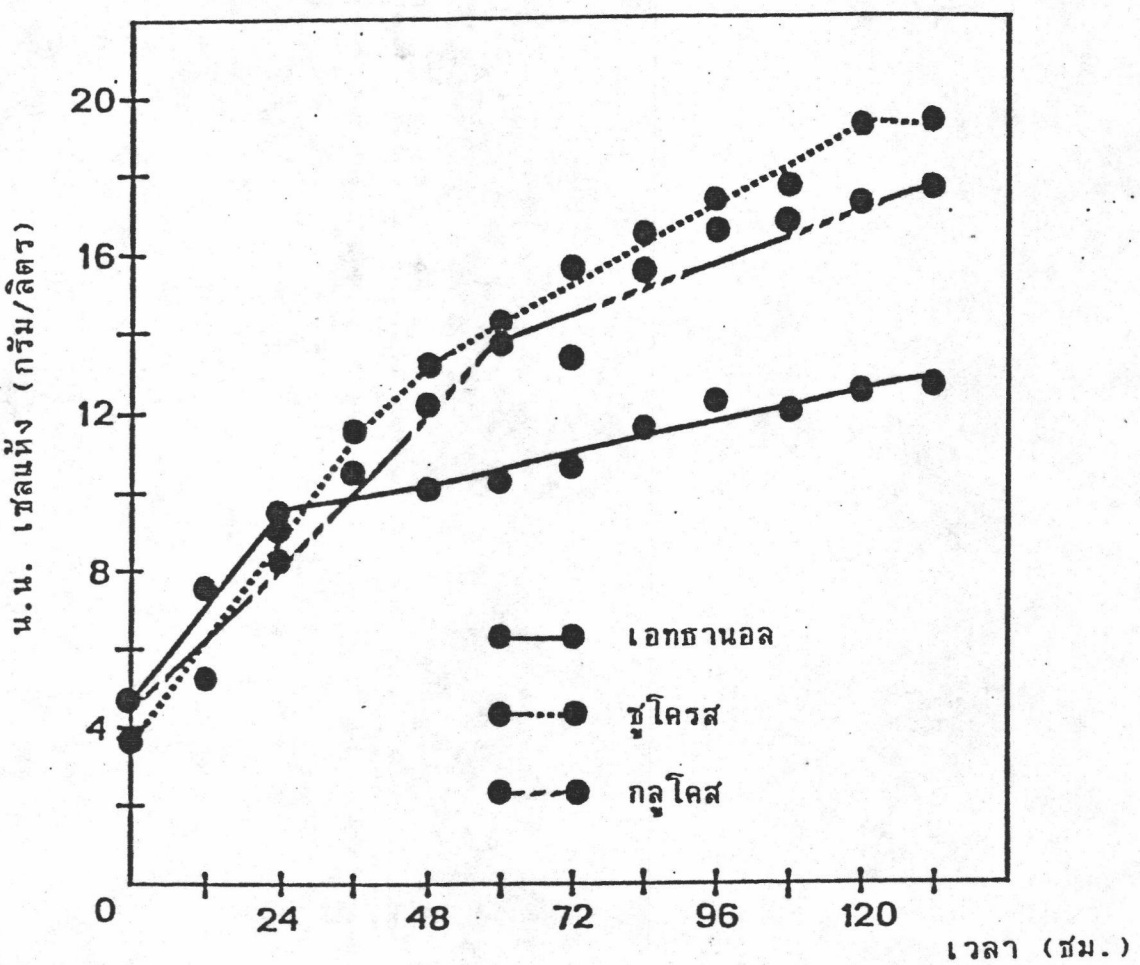
ตามลำดับพบว่า การเจริญของเชื้อที่มีกรด PAA 0.5 , 0.7 , และ 1.0 กรัม/ลิตร มีลักษณะใกล้เคียงกัน เชื้อราเจริญสูงสุด 17.0 กรัม/ลิตร ใน ชม.ที่ 96 ต่อจากนั้นการเจริญของเชื้อลดลง (รูปที่ 12) ทั้งนี้อาจจะเป็นเพราะเซลสลายตัวเนื่องจากปริมาณน้ำตาลรีดิวส์เหลือต่ำมากก็ได้ (รูปที่ 13).

ปริมาณกรดฟีนิลอะซีติกที่เติม มีผลต่อปริมาณเพนนิซิลิน จี จากการทดลองพบว่าการหมักโดยเติมกรดฟีนิลอะซีติกปริมาณ 0.7 กรัม/ลิตร เชื้อสร้างเพนนิซิลิน จี ได้สูงสุด 4,786 หน่วย/มล. ในชม.ที่ 96 การหมักที่เติมกรดฟีนิลอะซีติกปริมาณ 0.5 และ 1.0 กรัม/ลิตร เชื้อสร้างเพนนิซิลิน จี ได้สูงสุด 3,829 หน่วย/มล. ในชม.ที่ 84 และ 108 ตามลำดับ (รูปที่ 14) จะเห็นได้ว่าเมื่อเติมกรดฟีนิลอะซีติกปริมาณ 0.5 และ 0.7 กรัม/ลิตร ขณะที่ปริมาณเพนนิซิลิน จี ในถังหมักขึ้นสูงสุด ความเข้มข้นของกรดฟีนิลอะซีติกในถังหมักต่ำกว่า 0.1 กรัม/ลิตร (รูปที่ 15) ซึ่งอาจจะอยู่ในระดับต่ำเกินที่เซลจะนำไปใช้ในการสร้างเพนนิซิลิน จี ทำให้ปริมาณเพนนิซิลิน จี ในถังหมักไม่เพิ่มต่อไป แต่เมื่อเพิ่มปริมาณกรดฟีนิลอะซีติกเป็น 1.0 กรัม/ลิตร เชื้อสร้างเพนนิซิลิน จี ช้ากว่า โดยเชื้อสร้างเพนนิซิลิน จี สูงสุดในชม. ที่ 108 ขณะที่ความเข้มข้นของกรดฟีนิลอะซีติกที่เหลือในน้ำหมักสูงถึง 0.27 กรัม/ลิตร (รูปที่ 15) ปริมาณกรดฟีนิลอะซีติกตั้งต้น 1.0 กรัม/ลิตร อาจจะเป็นปริมาณที่สูงเกินไป ทำให้มีผลต่อการเจริญและประสิทธิภาพของเซลในการสร้างเพนนิซิลิน จี

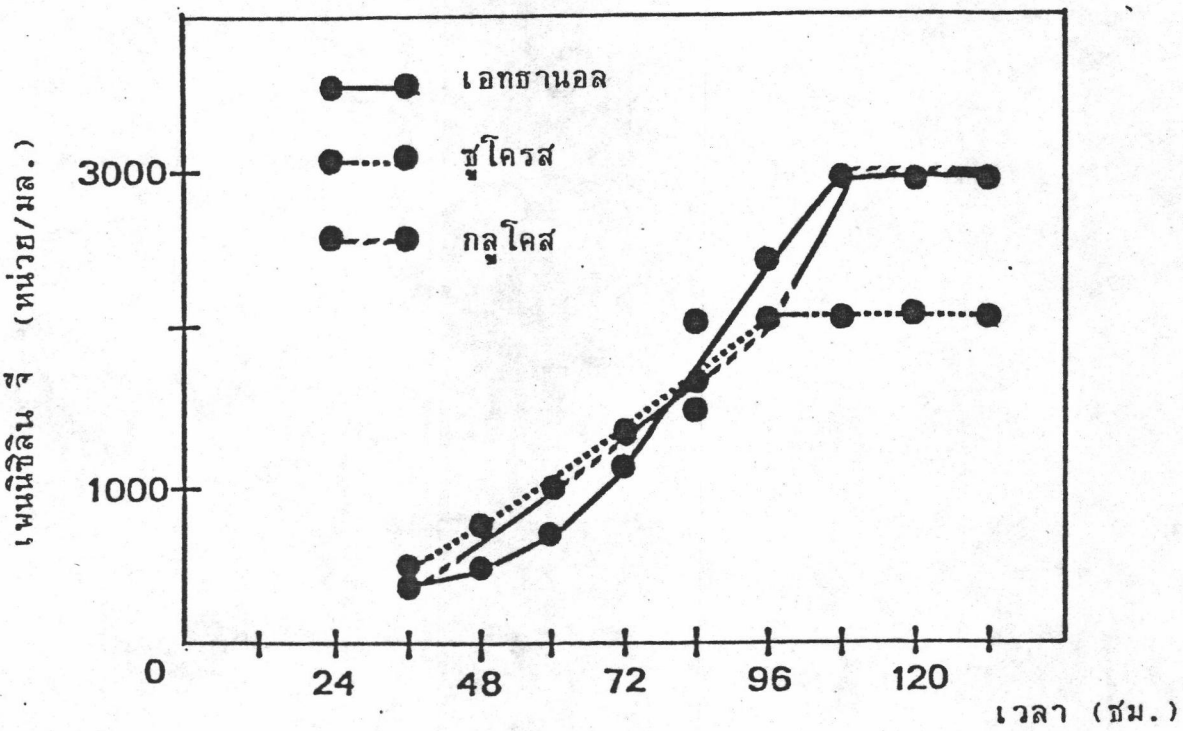
ฉะนั้นจากการผันแปรปริมาณกรดฟีนิลอะซีติกตั้งต้น พบว่า กรดฟีนิลอะซีติกตั้งต้นปริมาณ 0.7 กรัม/ลิตร เหมาะสมต่อการผลิตเพนนิซิลิน จี จึงใช้สำหรับการทดลองขั้นต่อไป

2.3 การเติมสารแหล่งคาร์บอนอื่น ๆ อย่างต่อเนื่องแทนการใช้แลคโตส

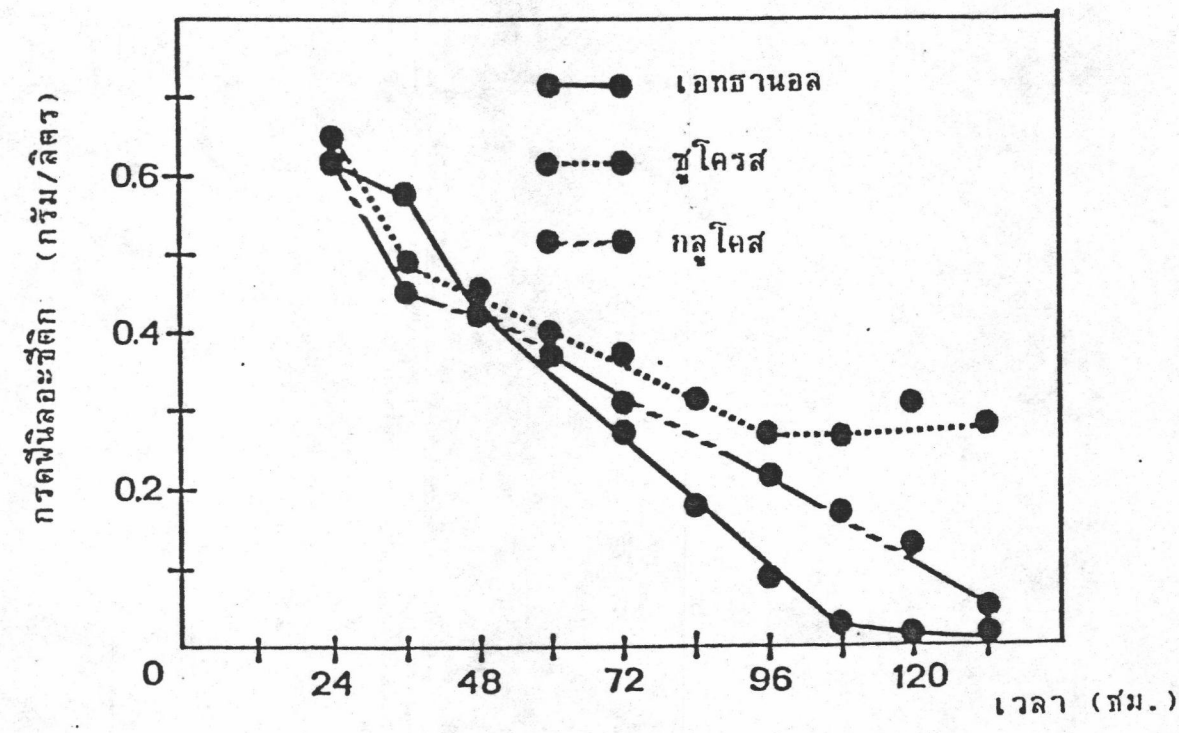
เลี้ยงเชื้อ P. chrysogenum A 88 ในถังหมักขนาด 5 ลิตรขนาดโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อตามภาคผนวกที่ 1.7 ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 2.3.5 โดยใช้อัตราน้ำที่ ในชม.ที่ 24 ของการหมักเติมกรดฟีนิลอะซีติกตั้งต้นปริมาณ 0.7 กรัม/ลิตร จากการทดลองของ Sheehan และคณะ (22) พบว่าเชื้อ P. chrysogenum A 88 สามารถใช้สารละลายเอทธานอลโดยการเติมอย่างต่อเนื่อง เป็นสารแหล่งคาร์บอนโดยเริ่มเติมในชม.ที่ 12 ของการหมัก ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือก ชม.ที่ 12 ของการหมักเป็นเวลา



รูปที่ 16 ผลการเติมสารแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ อย่างต่อเนื่อง ต่อการเจริญของเชื้อ P. chrysogenum A 88



รูปที่ 17 ผลของการเติมสารแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ อย่างต่อเนื่องต่อการสร้างเพนนิซิลิน จี โดย P. chrysogenum A88



รูปที่ 18 ปริมาณกรดฟีนิลอะซีติกที่เหลือในน้ำหมัก ในระยะเวลาต่างๆ เมื่อเติมสารแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ อย่างต่อเนื่อง

เริ่มเติมสารแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ กันดังนี้ สารละลายเอทธานอล 20% (ปริมาตร/ปริมาตร)ของ 95% เอทธานอล สารละลายซูโครส 20% (น้ำหนัก/ปริมาตร) และสารละลายกลูโคส 20% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ด้วยอัตราการเติม 5 มล./ชม. ทุก ๆ ชม. ตลอดการหมัก พบว่าเมื่อใช้สารละลายเอทธานอลเป็นสารแหล่งคาร์บอน เชื้อเจริญสูงสุดในชม.ที่ 132 ปริมาณเซล 12.6 กรัม/ลิตร (รูปที่ 16) เชื้อสร้างเพนนิซิลิน จี สูงสุด 2,949 หน่วย/มล. ในชม.ที่ 108 จากนั้นปริมาณเพนนิซิลิน จี คงที่ (รูปที่ 17) ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณกรดฟีนิลอะซีติกที่เหลืออยู่ในน้ำหมัก (รูปที่ 18) เมื่อใช้สารละลายซูโครสเป็นสารแหล่งคาร์บอน เชื้อเจริญสูงสุดใน ชม. ที่ 120 ด้วยปริมาณเซล 19.2 กรัม/ลิตร (รูปที่ 16) และเชื้อสร้างเพนนิซิลิน จี สูงสุด 2,072 หน่วย/มล. ใน ชม.ที่ 96 (รูปที่ 17) แต่เมื่อใช้สารละลายกลูโคสเป็นสารแหล่งคาร์บอน เชื้อเจริญสูงสุดใน ชม. ที่ 132 ปริมาณเซล 17.6 กรัม/ลิตร(รูปที่ 16) เชื้อสร้างเพนนิซิลิน จี สูงสุด 2,949 หน่วย/มล. (รูปที่ 17) จากผลการทดลองถึงแม้ว่าการเจริญของเชื้อเมื่อหมักโดยเติมสารละลายซูโครสใกล้เคียงกับการเจริญของเชื้อเมื่อหมักโดยเติมสารละลายกลูโคส และสูงกว่าการหมักโดยเติมสารละลายเอทธานอล แต่ปริมาณเพนนิซิลิน จี ที่ได้ต่ำกว่าการหมักโดยเติมสารละลายกลูโคส และสารละลายเอทธานอล

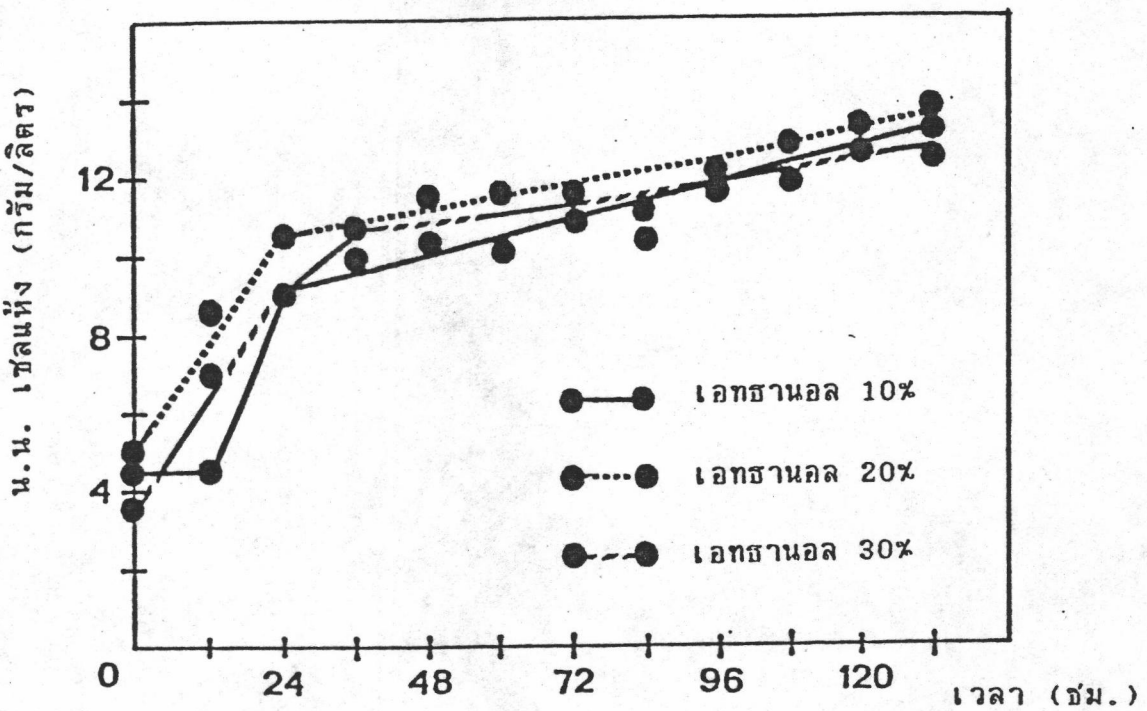
ดังนั้นจึงเลือกใช้สารละลายกลูโคส และสารละลายเอทธานอลเป็นสารแหล่งคาร์บอนโดยการเติมอย่างต่อเนื่องแทนการใช้น้ำตาลแลคโตส โดยจะทำการหาปริมาณที่เหมาะสมของสารแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการเติมในการทดลองขั้นต่อไป

2.4 ปริมาณที่เหมาะสมของเอทธานอลและกลูโคสที่ใช้ในการเติม

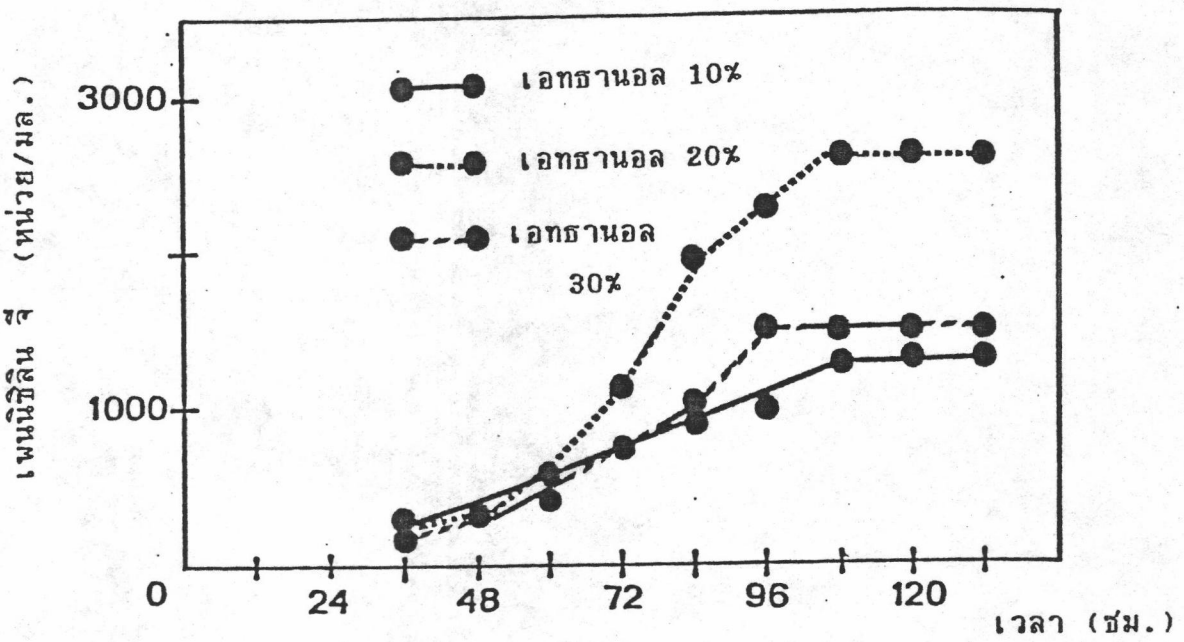
จากการทดลองในข้อ 2.3 พบว่าเมื่อใช้สารละลายเอทธานอล หรือสารละลายกลูโคสเติมอย่างต่อเนื่องในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้เชื้อสร้างเพนนิซิลิน จี ได้สูงใกล้เคียงกัน ฉะนั้นจึงทำการหาปริมาณที่เหมาะสมของสารแหล่งคาร์บอนทั้งสองที่ใช้ในการเติม

2.4.1 ปริมาณที่เหมาะสมของสารละลายเอทธานอลที่ใช้ในการเติม

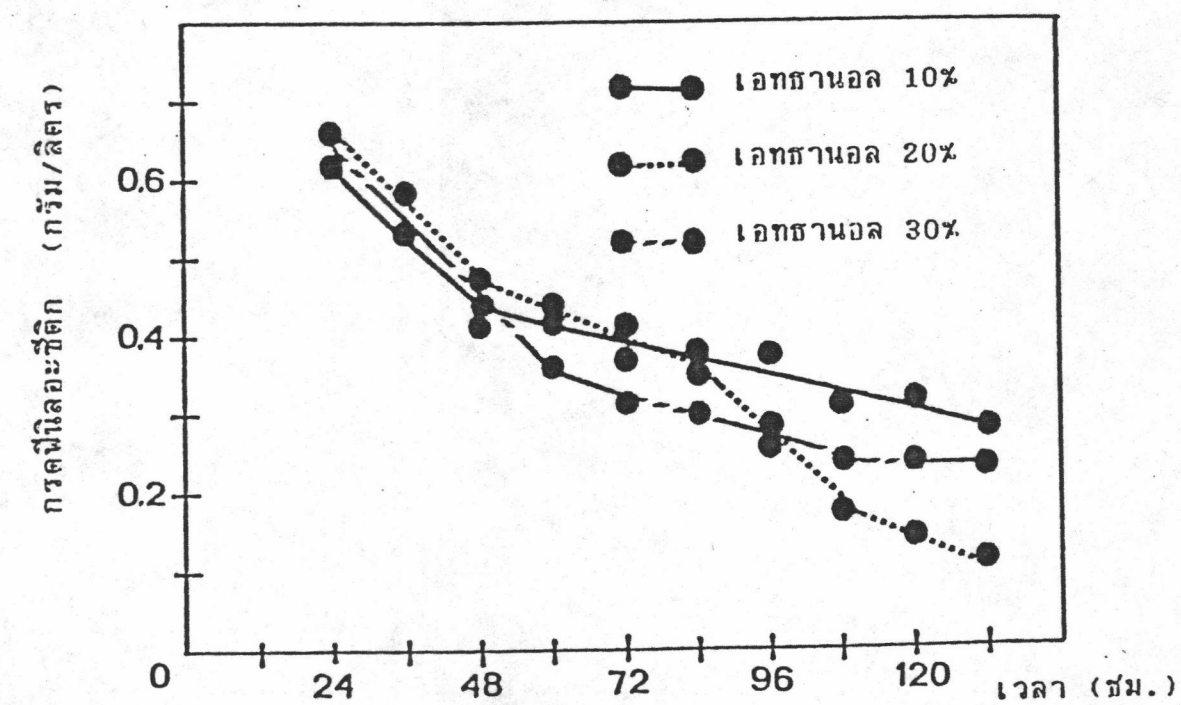
เลี้ยงเชื้อ P. chrysogenum A 88 ในถังหมัก 5 ลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อตามภาคผนวกที่ 1.7 ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 3.5 โดยใช้อัตราการกวน 400 รอบ/นาที ในชม.ที่ 24 ของการหมัก เติมกรดฟีนิลอะซีติกปริมาณ 0.7 กรัม/ลิตร เติมสารละลายเอทธานอลด้วยอัตราการเติม 5 มล./ชม. โดยเริ่มเติมใน ชม.ที่ 12 และ



รูปที่ 19 ผลการผันแปรความเข้มข้นของเอทธานอล ที่ใช้เติมเป็นสารแหล่งคาร์บอนอย่างต่อเนื่อง ต่อการเจริญของเชื้อ P. chrysogenum A.88.



รูปที่ 20 ผลการผันแปรความเข้มข้นของเอทธานอล ที่ใช้เติมเป็นสารแหล่งคาร์บอนอย่างต่อเนื่อง ต่อการสร้างเพนนิซิลิน จี โดย P. chrysogenum A.88



รูปที่ 21 ปริมาณกรดฟีนิลอะซีติกที่เหลือในน้ำหมัก ในระยะเวลาต่างๆ เมื่อผันแปรความเข้มข้นของเอทธานอลที่ใช้เติมเป็นสารแหล่งคาร์บอน อย่างต่อเนื่อง

เติมทุก ๆ ชม. ตลอดการหมัก โดยผันแปรความเข้มข้นของสารละลายเอทธานอลที่เติมดังนี้ 10%,20% และ 30% (ปริมาตร/ปริมาตร)ของเอทธานอล 95% พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารละลายเอทธานอลที่มีความเข้มข้น 10%,20% และ 30% เชื้อเจริญใกล้เคียงกัน (รูปที่ 19)

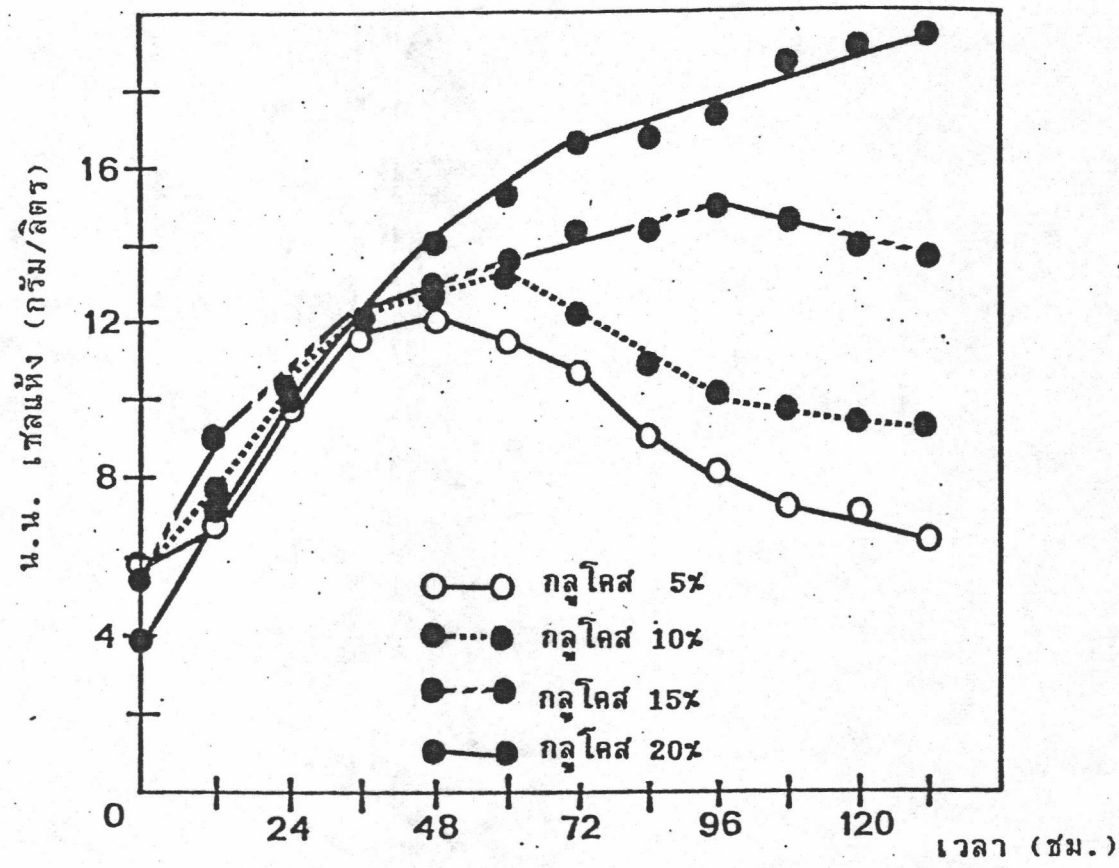
ความเข้มข้นของสารละลายเอทธานอลที่ใช้เติมมีผลต่อการสร้างเพนนิซิลิน จี ดังนี้ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารละลายเอทธานอลเข้มข้น 10% เชื้อสร้างเพนนิซิลิน จี สูงสุด 1,296 หน่วย/มล.ใน ชม.ที่ 108 สารละลายเอทธานอลเข้มข้น 20% เชื้อสร้างเพนนิซิลิน จี สูงสุด 2,592 หน่วย/มล.ใน ชม.ที่ 108 และสารละลายเอทธานอลเข้มข้น 30% เชื้อสร้างเพนนิซิลิน จี สูงสุด 1,494 หน่วย/มล. ใน ชม.ที่ 96(รูปที่ 20) ซึ่งปริมาณเพนนิซิลิน จี สัมพันธ์กับปริมาณกรดฟีนิลอะซีติกที่เหลือในน้ำหมัก (รูปที่ 21) จากผลการทดลองนี้สรุปว่า ความเข้มข้นของสารละลายเอทธานอลที่เหมาะสมคือ 20% ซึ่งมีผลให้เชื้อสร้างเพนนิซิลิน จี สูงสุด

2.4.2 ปริมาณที่เหมาะสมของสารละลายกลูโคสที่ใช้ในการเติม

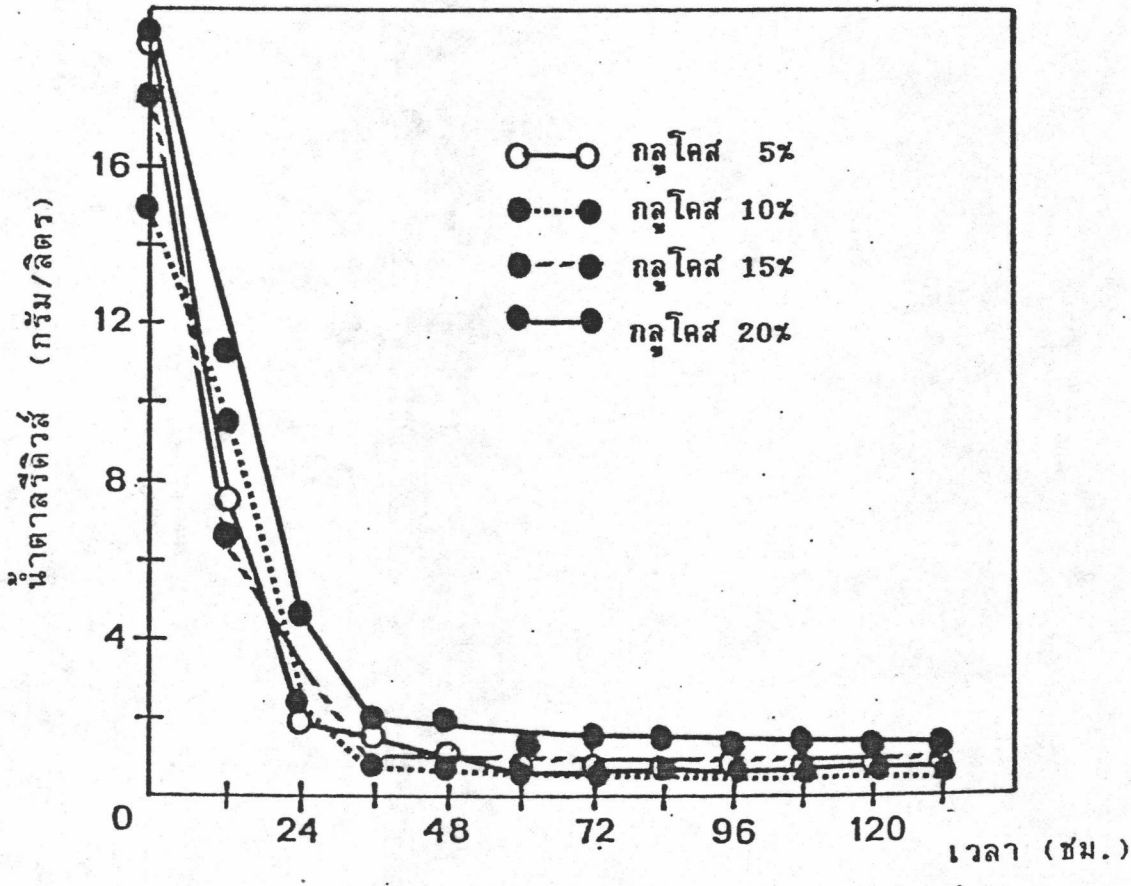
ทำการทดลองเหมือนการทดลองในข้อ 2.4.1 ข้างต้น โดยผันแปรความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสที่เติมดังนี้ 5%,10%,15% และ 20% (น้ำหนัก/ปริมาตร) พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารละลายกลูโคส 5%,10%,15% และ 20% เชื้อเจริญต่างกัน โดยให้ปริมาณเซลสูงสุด 12.0,13.2,15.0 และ 19.4 กรัม/ลิตร ใน ชม.ที่ 48,60,96 และ 132 ตามลำดับ (รูปที่ 22) เมื่อตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่เหลือในน้ำหมักพบว่ามีความสัมพันธ์ กับอัตราการเจริญของเชื้อที่กล่าวมาแล้ว(รูปที่ 23)

ความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสที่ใช้เติมมีผลต่อการสร้างเพนนิซิลิน จี ดังนี้ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารละลายกลูโคสเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% เชื้อสร้างเพนนิซิลิน จี สูงสุด 1,914 3,360 3,829 และ 2,520 หน่วย/มล. ตามลำดับ ใน ชม.ที่ 108 (รูปที่ 24)

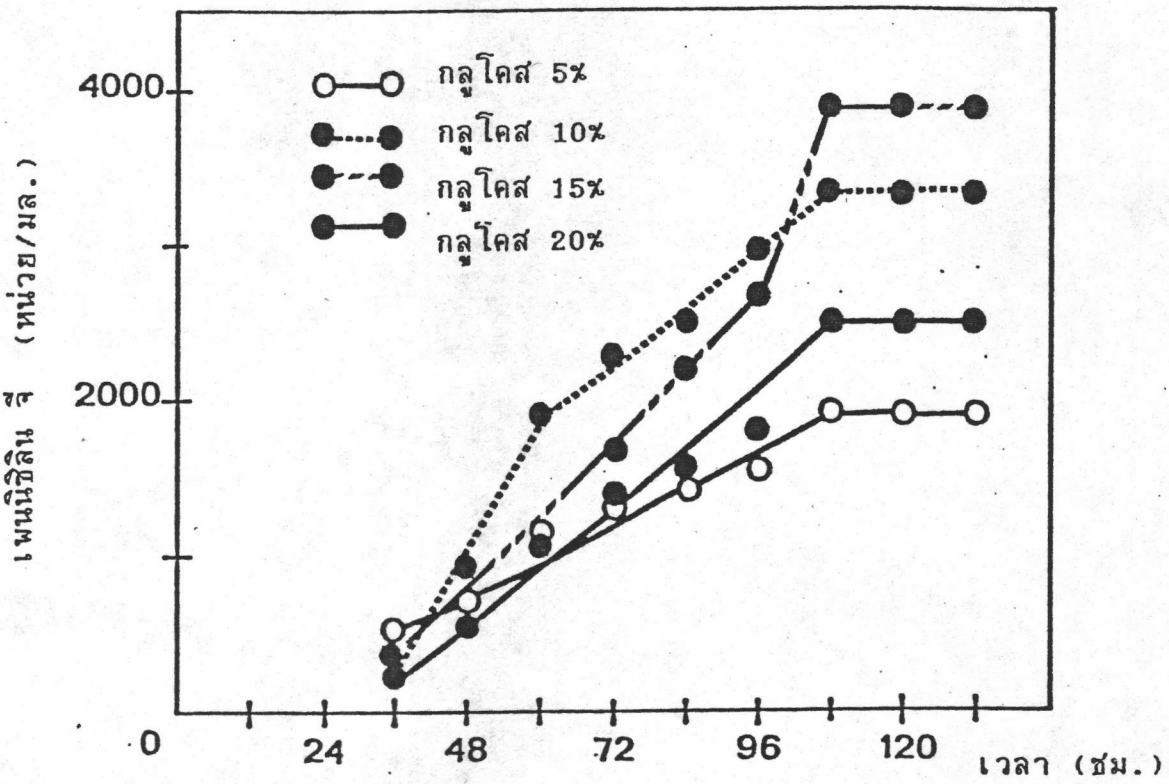
เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองในข้อ 2.4.1 กับข้อ 2.4.2 อาหารที่เติมสารละลายกลูโคสเข้มข้น 15% เชื้อสามารถสร้างเพนนิซิลิน จี สูงที่สุด และเมื่อพิจารณาถึงต้นทุนของสารแหล่งคาร์บอนที่ใช้เติม กลูโคสมีราคาถูกกว่าเอทธานอล ฉะนั้นจึงเลือกใช้สารละลายกลูโคสเข้มข้น 15% โดยการเติมอย่างต่อเนื่อง เป็นสารแหล่งคาร์บอนแทนการใช้น้ำตาลแลคโตส



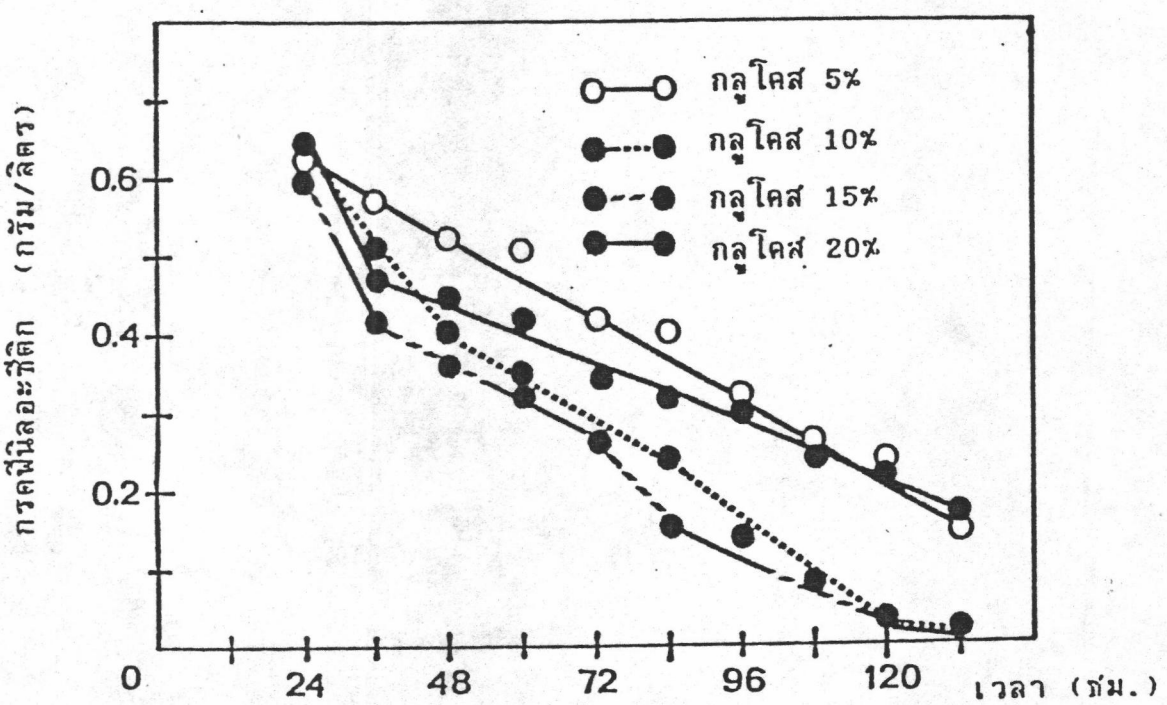
รูปที่ 22 ผลการผันแปรความเข้มข้นของกลูโคส ที่ใช้เติมเป็นสารแหล่งคาร์บอน อย่างต่อเนื่อง ต่อการเจริญของเชื้อ P. chrysogenum A 88



รูปที่ 23 ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่เหลือในน้ำหมัก ในระยะเวลาต่างๆ เมื่อผันแปรความเข้มข้นของกลูโคสที่ใช้เติมเป็นสารแหล่งคาร์บอน อย่างต่อเนื่อง



รูปที่ 24 ผลการผันแปรความเข้มข้นของกลูโคส ที่ใช้เติมเป็นสารแหล่งคาร์บอน อย่างต่อเนื่อง ต่อการสร้างเพนนิซิลิน จี โดย P. chrysogenum A 88



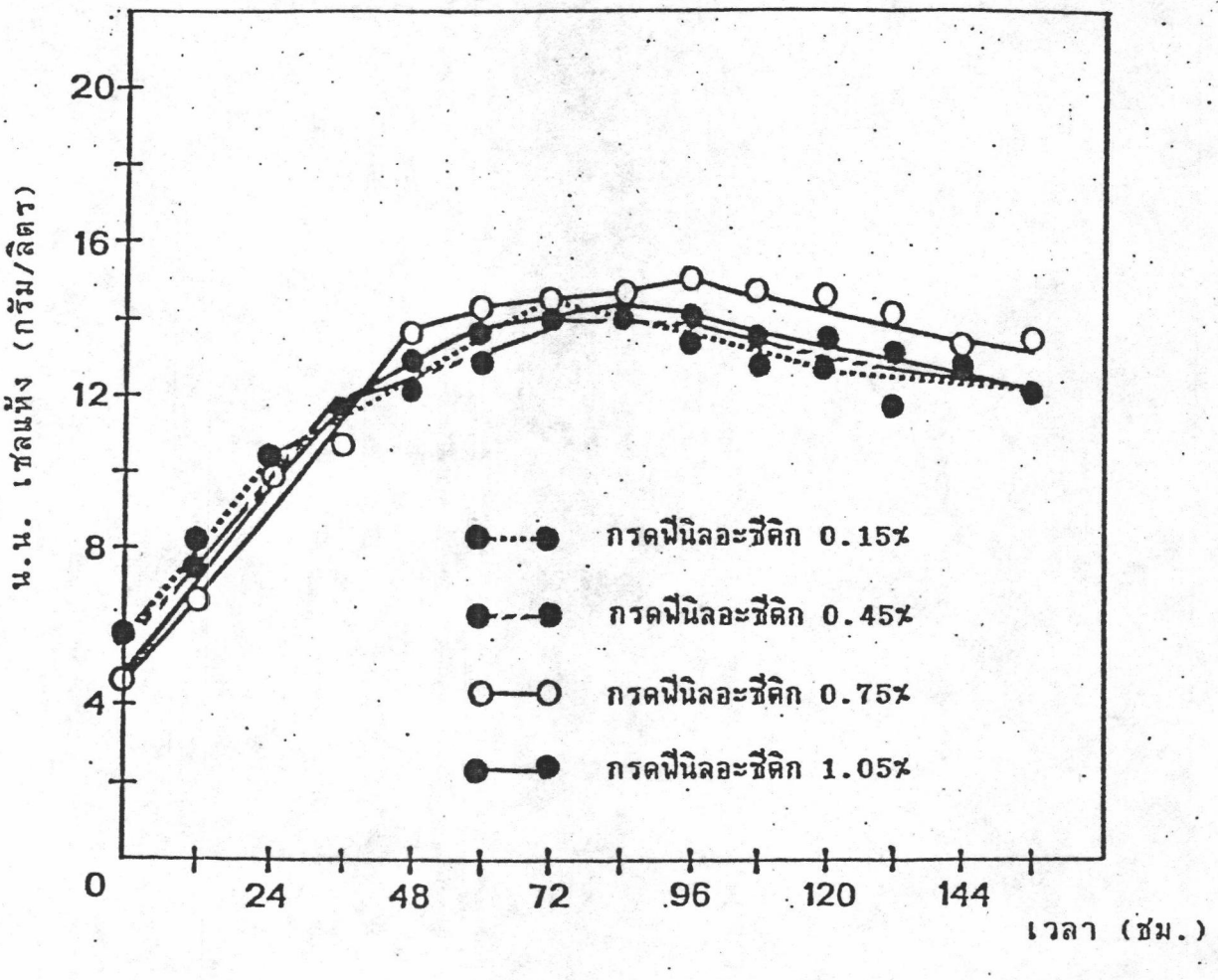
รูปที่ 25 ปริมาณกรดฟีนิลอะซีติกที่เหลือในน้ำหมัก ในระยะเวลาต่างๆ เมื่อผันแปรความเข้มข้นของกลูโคสที่ใช้เติมเป็นสารแหล่งคาร์บอน อย่างต่อเนื่อง

2.5 ปริมาณที่เหมาะสมของกรดฟีนิลอะซีติกที่ใช้เติมอย่างต่อเนื่อง

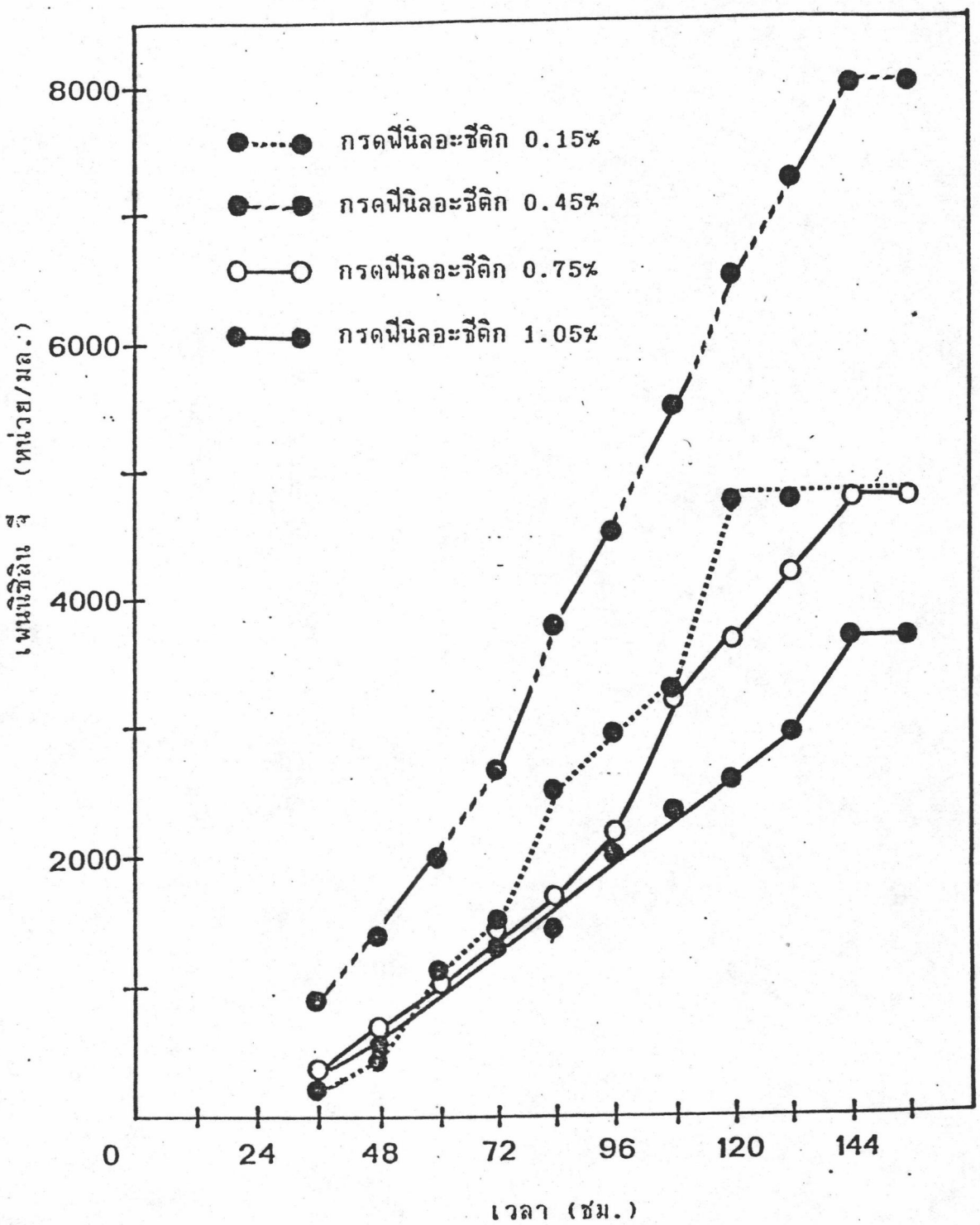
จากการทดลองในข้อ 2.4.2 พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารละลายกลูโคสเข้มข้น 15%(น้ำหนัก/ปริมาตร) เชื้อสร้างเพนนิซิลิน จี ได้สูงที่สุด จะเห็นได้ว่าขณะที่ปริมาณเพนนิซิลิน จี ในถังหมักขึ้นสูงสุด ความเข้มข้นของกรดฟีนิลอะซีติกในน้ำหมักต่ำกว่า 0.1 กรัม/ลิตร (รูปที่ 25) การที่ปริมาณกรดฟีนิลอะซีติกมีระดับต่ำนี้อาจเป็นข้อจำกัดที่เซลไม่สามารถสร้างเพนนิซิลิน จี ได้ต่อไป ฉะนั้นจึงทำการทดลองหาปริมาณที่เหมาะสมของกรดฟีนิลอะซีติกที่ใช้เติมอย่างต่อเนื่อง เพื่อให้เชื้อสามารถสร้างเพนนิซิลิน จี ต่อไปได้อีก

เลี้ยงเชื้อ P. chrysogenum A 88 ในถังหมัก 5 ลิตร ตามวิธีการที่กล่าวไว้ในข้อ 2.3.5 โดยใช้อัตราการกวน 400 รอบ/นาที เติมสารละลายกลูโคสเข้มข้น 15% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ด้วยอัตราการเติม 5 มล./ชม. ทุก ๆ ชม.ตลอดการหมัก โดยเริ่มเติมในชม.ที่ 12 เติมกรดฟีนิลอะซีติกปริมาณ 0.7 กรัม/ลิตร ใน ชม.ที่ 24 จากการทดลองในข้อ 2.4.2 อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารละลายกลูโคสเข้มข้น 15% (น้ำหนัก/ปริมาตร) พบว่าใน ชม.ที่ 48 ปริมาณกรดฟีนิลอะซีติกที่เหลือในน้ำหมัก 0.35 กรัม/ลิตร ซึ่งลดลง 50% จากปริมาณกรดฟีนิลอะซีติกที่เติมเริ่มต้น ดังนั้นจึงเริ่มเติมกรดฟีนิลอะซีติกอย่างต่อเนื่องในชม. ที่ 48 ด้วยอัตราการเติม 20 มล./ 6ชม. ทุก ๆ 6 ชม. ตลอดการหมัก โดยผันแปรความเข้มข้นของกรดฟีนิลอะซีติกที่ใช้เติมดังนี้ 0.15% 0.45% 0.75% และ 1.05% (น้ำหนัก/ปริมาตร) พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดฟีนิลอะซีติกความเข้มข้นดังกล่าว ให้ผลการเจริญของเชื้อใกล้เคียงกัน(รูปที่ 26)

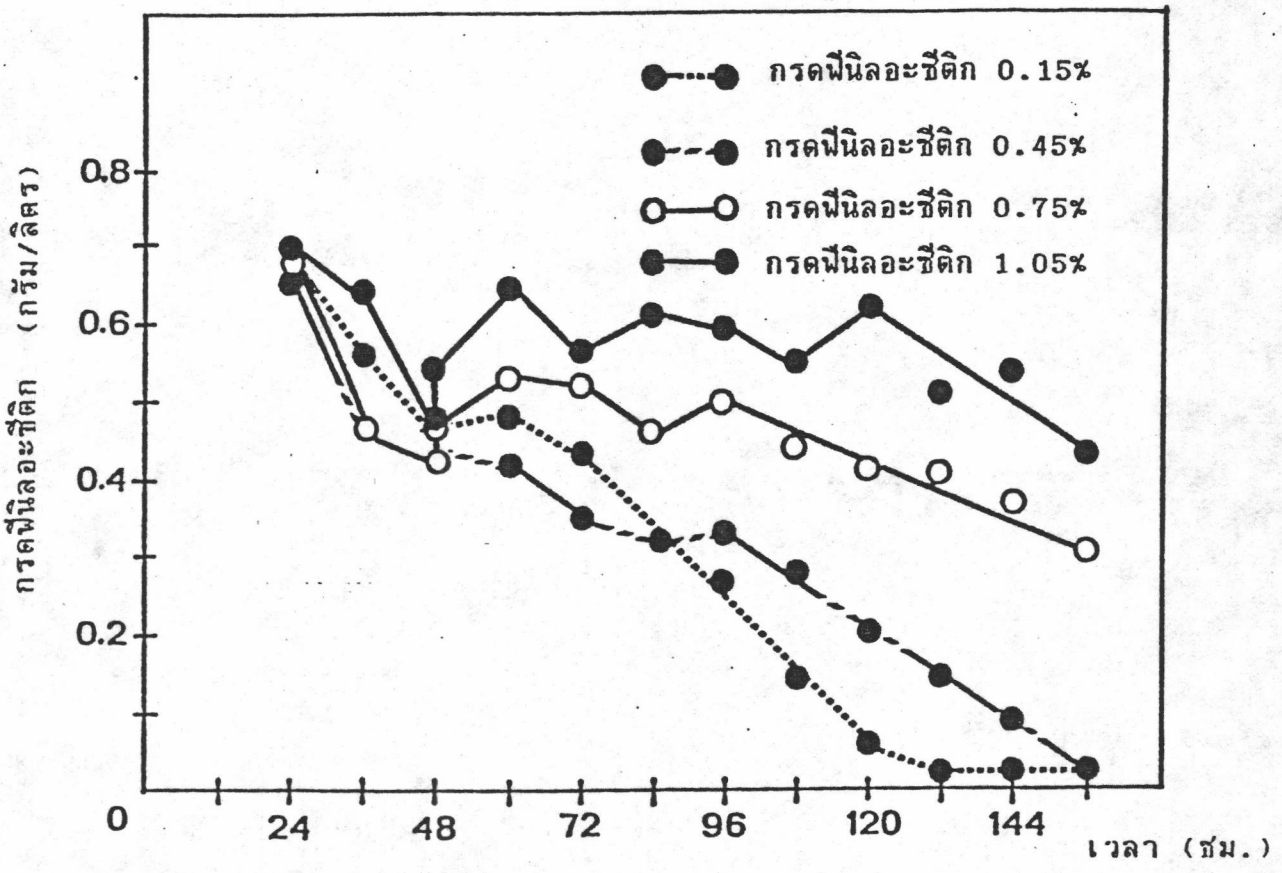
จากรูปที่ 27 จะเห็นได้ว่า การเติมกรดฟีนิลอะซีติกเข้มข้น 0.45% (น้ำหนัก/ ปริมาตร) ด้วยอัตราการเติม 20 มล./ 6ชม. ทุก ๆ 6 ชม.ตลอดการหมัก เชื้อสร้างเพนนิซิลิน จี สูงสุด 8,007 หน่วย/มล. ใน ชม. ที่ 144 และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณเพนนิซิลิน จี ที่ได้โดยการวิเคราะห์ด้วย HPLC ตามวิธีการวิจัยข้อ 3.2 พบว่าได้ปริมาณเพนนิซิลิน จี สูงที่สุด 3.5 กรัม/ลิตร เมื่อตรวจสอบปริมาณกรดฟีนิลอะซีติกที่เหลือในน้ำหมักเมื่อเติมกรดฟีนิลอะซีติกเข้มข้น 0.45% พบว่าในชม. ที่ 144 ซึ่งเป็นเวลาที่ปริมาณเพนนิซิลิน จี ในถังหมักขึ้นสูงสุด ปริมาณกรดฟีนิลอะซีติกในน้ำหมักเหลือเพียง 0.09 กรัม/ลิตร (รูปที่ 28) ซึ่งอาจจะอยู่ในระดับที่ต่ำเกินไปที่เซลจะนำไปสร้างเพนนิซิลิน จี แต่เมื่อทดลองเติมกรดฟีนิลอะซีติคเข้มข้น 0.75% และ 1.05% (น้ำหนัก/ปริมาตร) เชื้อสร้างเพน



รูปที่ 26 ผลของการเติมกรดฟีนิลอะซีติกความเข้มข้นต่างๆ กัน อย่างต่อเนื่องต่อการเจริญของเชื้อ P. chrysogenum A88



รูปที่ 27 ผลของการเติมกรดฟีนิลอะซีติกความเข้มข้นต่างๆ กัน อย่างต่อเนื่องต่อการสร้างเพนนิซิลิน จี โดย P. chrysogenum A88



รูปที่ 28 ปริมาณกรดฟีนิลอะซีติกที่เหลือในน้ำหมัก ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน เมื่อเติมกรดฟีนิลอะซีติกความเข้มข้นต่างๆ

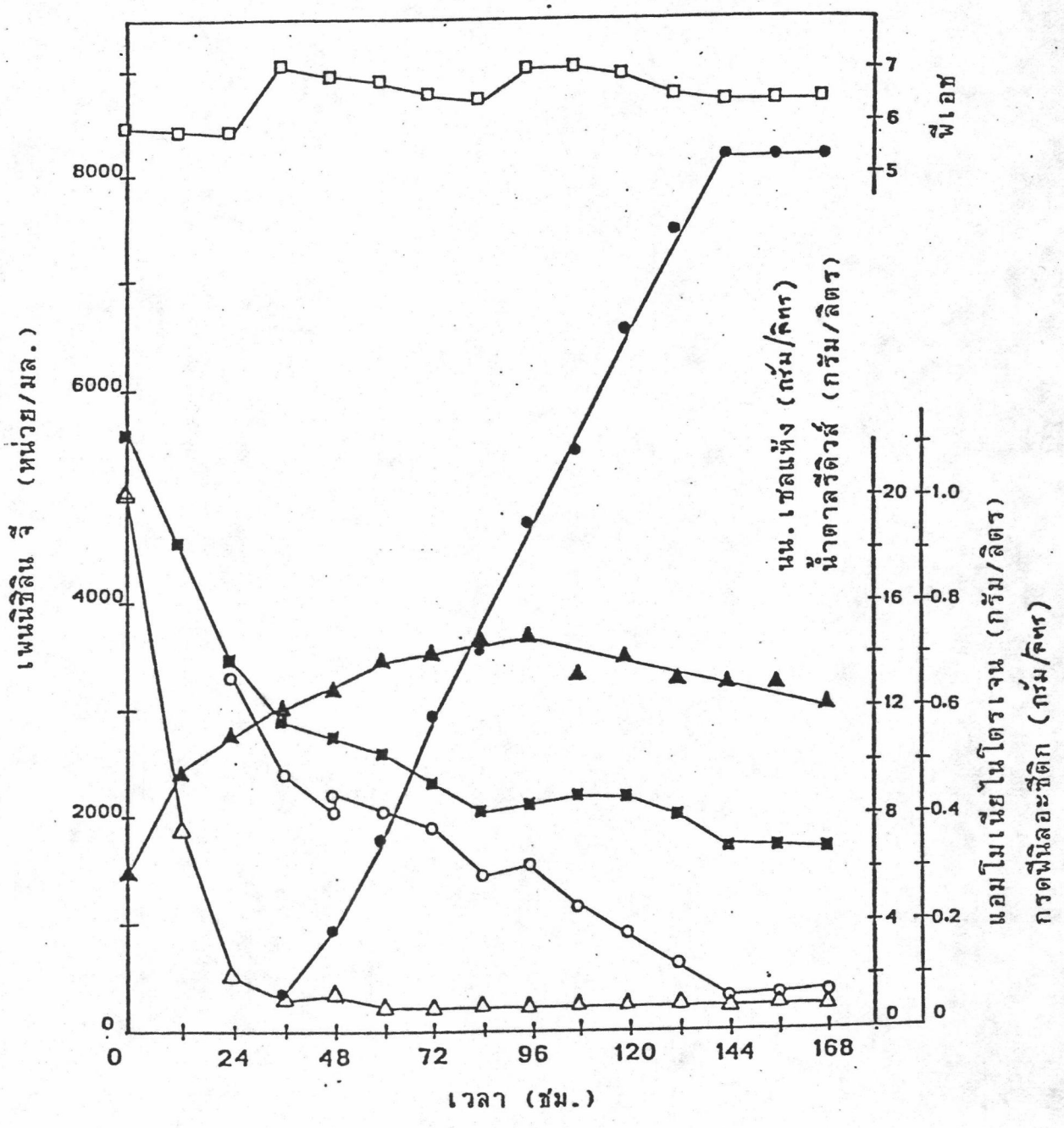
นิซิลิน จีได้ต่ำกว่าเมื่อเติมกรดฟีนิลอะซีติกเข้มข้น 0.45% และ ความเข้มข้นของกรดฟีนิลอะซีติกที่เหลือในน้ำหมักสูง (รูปที่ 28) ดังนั้นการเติมกรดฟีนิลอะซีติกเข้มข้น 0.75% และ 1.05% อาจจะเป็นปริมาณที่สูงเกินไป ทำให้มีผลต่อเซลในการสร้างเพนนิซิลิน จี

ฉะนั้นจากการทดลองนี้พบว่ากรดฟีนิลอะซีติกเข้มข้น 0.45% (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นปริมาณที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการเติมอย่างต่อเนื่อง

2.6 <u>การติดตามปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนในระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก</u>

จากการทดลองในข้อ 2.4 และ 2.5 พบว่าสารละลายกลูโคสเข้มข้น 15% (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดยการเติมอย่างต่อเนื่อง เป็นสารแหล่งคาร์บอนที่ทำให้เชื้อสร้างเพนนิซิลิน จี ได้สูงที่สุด และเพื่อให้เชื้อสามารถสร้างเพนนิซิลิน จี ได้อย่างต่อเนื่อง จึงต้องมีการเติมสารตั้งต้น โดยพบว่ากรดฟีนิลอะซีติกเข้มข้น 0.45% (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดยการเติมอย่างต่อเนื่อง เป็นปริมาณสารตั้งต้นที่เหมาะสมสำหรับการสร้างเพนนิซิลิน จี แต่อย่างไรก็ตาม ใน ชม. ที่ 144 ปริมาณเพนนิซิลิน จี คงที่ (รูปที่ 27) ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่าปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนในน้ำหมักต่ำเกินไป เป็นผลให้เซลหยุดสร้างเพนนิซิลิน จี (23)

เลี้ยงเชื้อ <u>P. chrysogenum</u> A 88 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 2.3.5 โดยใช้อัตราการกวน 400 รอบ/นาที เติมสารละลายกลูโคสเข้มข้น 15% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ด้วยอัตราการเติม 5 มล./ชม. ทุก ๆ ชม. ตลอดการหมัก โดยเริ่มเติมใน ชม. ที่ 12 เติมกรดฟีนิลอะซีติกปริมาณ 0.7 กรัม/ลิตร ใน ชม.ที่ 24 และใน ชม.ที่ 48 เติมกรดฟีนิลอะซีติกเข้มข้น 0.45%(น้ำหนัก/ปริมาตร) ด้วยอัตราการเติม 20 มล./ 6 ชม. ทุก ๆ 6 ชม.ตลอดการหมัก โดยเก็บตัวอย่างครั้งละ 50 มล. จากการทดลองพบว่าเชื้อสร้างเพนนิซิลิน จี สูงสุด 8,175 หน่วย/ มล. และเมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC ตามวิธีการวิจัยข้อ 3.2 ได้ 3.52 กรัม/ ลิตร ในชม.ที่ 144 และเมื่อวิเคราะห์หาปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจน ตามวิธีการวิจัยข้อ 3.4.1 พบว่าปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนเริ่มต้นเป็น 1.1 กรัม/ลิตร และเมื่อสิ้นสุดการหมักใน ชม.ที่ 168 ปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนเป็น 0.34 กรัม/ลิตร (รูปที่ 29) ซึ่งจากการรายงานของ Lure และคณะ พบว่าปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจน ที่เหมาะสมสำหรับการสร้างเพนนิซิลิน จี อยู่ระหว่าง 0.25-0.34 กรัม/ลิตร (23)



รูปที่ 29 การสร้างเพนนิซิลิน จี โดยเชื้อ P. chrysogenum A 88 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยที่ในชั่วโมงที่ 12 เริ่มเติมสารละลายกลูโคสเข้มข้น 15%(น้ำหนัก/ปริมาตร) ด้วยอัตราการเติม 5 มล./ชม. และในชั่วโมงที่ 48 เริ่มเติมกรดฟีนิลอะซีติกเข้มข้น 0.45% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ด้วยอัตราการเติม 20 มล./6 ชม.

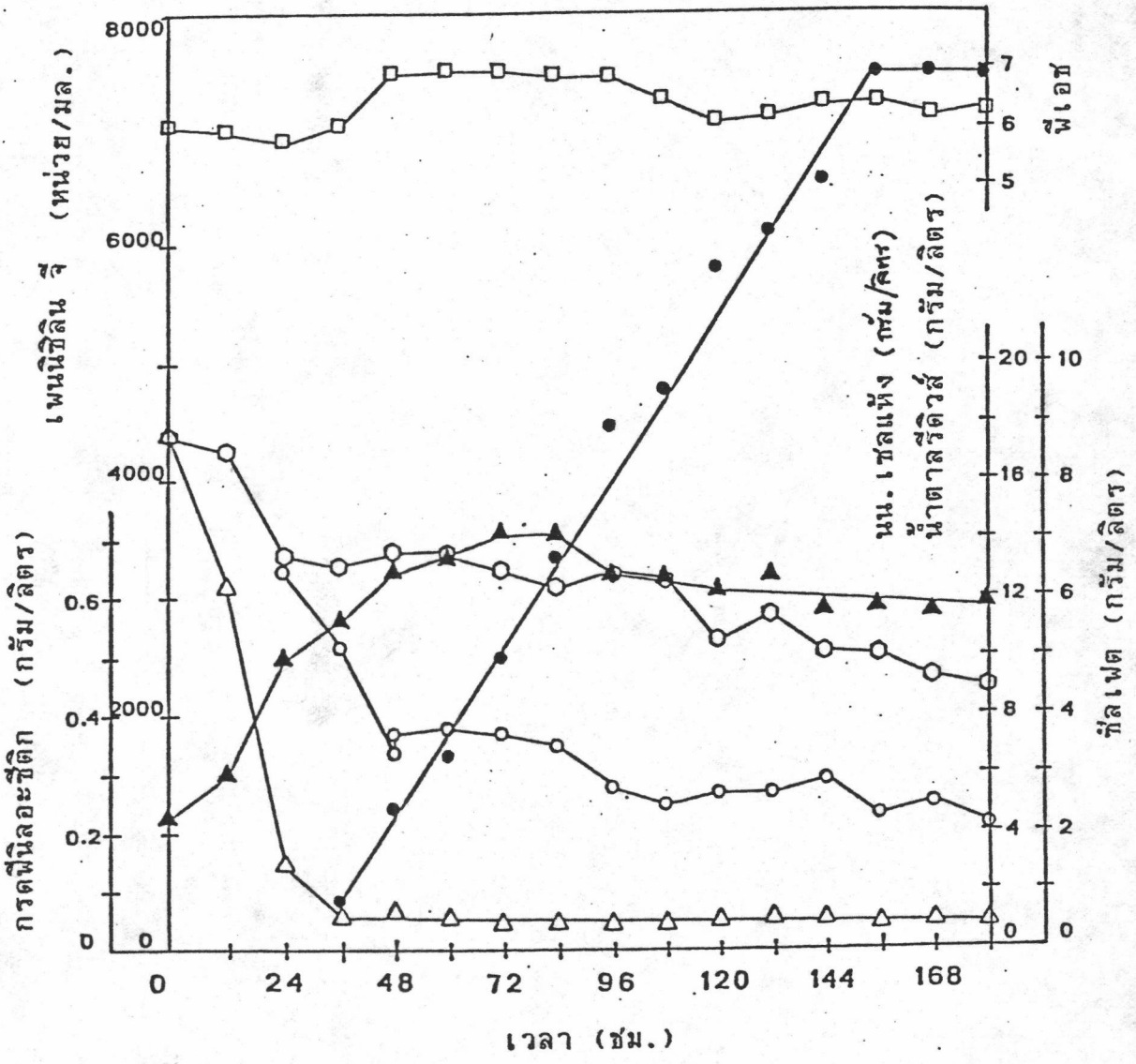
△—△ น้ำตาลรีดิวส์ ▲—▲ นน. เซลแห้ง
□—□ พีเอช ■—■ แอมโมเนียไนโตรเจน
○—○ กรดฟีนิลอะซีติก ●—● เพนนิซิลิน จี

ดังนั้นจากการติดตามปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนพบว่ามีปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนสูงพอที่เชื้อสามารถใช้ในการสร้างเพนนิซิลิน จี

2.7 <u>การเพิ่มอัตราการเติมกรดฟีนิลอะซีติก</u>

จากการทดลองในข้อ 2.6 พบว่าปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจนไม่ได้เป็นตัวจำกัดการสร้างเพนนิซิลิน จี จะเห็นได้ว่าใน ชม.ที่ 96 ปริมาณกรดฟีนิลอะซีติกในน้ำหมักลดลงเหลือ 0.3 กรัม/ลิตร ซึ่งเป็นปริมาณที่ค่อนข้างต่ำเป็นเหตุให้ในชม.ที่ 144 ซึ่งมีปริมาณเพนนิซิลิน จี ในถังหมักขึ้นสูงสุด ในขณะที่ปริมาณกรดฟีนิลอะซีติกในน้ำหมักเหลือเพียง 0.06 กรัม/ลิตร (รูปที่ 29) ซึ่งเป็นปริมาณที่ต่ำเกินที่เซลจะนำไปใช้ในการสร้างเพนนิซิลิน จี ทำให้ปริมาณเพนนิซิลิน จี ใน ถังหมักไม่เพิ่มต่อไป แต่จากการทดลองในข้อ 2.5 พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดฟีนิลอะซีติกเป็น 0.75 และ 1.05% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ทำให้เชื้อสร้างเพนนิซิลิน จี ต่ำกว่าเมื่อใช้กรดฟีนิลอะซีติกเข้มข้น 0.45% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ดังนั้นการเพิ่มปริมาณกรดฟีนิลอะซีติกในน้ำหมัก ในชม.ที่ 96 จึงต้องใช้กรดฟีนิลอะซีติกเข้มข้น 0.45% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ด้วยอัตราการเติมที่สูงขึ้นโดยคาดหวังว่าเชื้อจะสามารถสร้างเพนนิซิลิน จี ได้สูงกว่าในการทดลองที่ 2.6

เลี้ยงเชื้อ <u>P. chrysogenum</u> A 88 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 2.3.5 โดยใช้อัตราการกวน 400 รอบ/นาที เติมสารละลายกลูโคสเข้มข้น 15% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ด้วยอัตราการเติม 5 มล. /ชม. ทุก ๆ ชม. ตลอดการหมัก โดยเริ่มเติมใน ชม.ที่ 12 เติมกรดฟีนิลอะซีติก ปริมาณ 0.7 กรัม/ลิตร ในชม.ที่ 24 และในชม.ที่ 48 เติมกรดฟีนิลอะซีติกเข้มข้น 0.45% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ด้วยอัตราการเติม 20 มล./ 6 ชม. ทุก ๆ 6 ชม. จนถึง ชม.ที่ 96 เติมกรดฟีนิลอะซีติกเข้มข้น 0.45% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ด้วยอัตราการเติม 20 มล./3 ชม. ทุก ๆ 3 ชม. ตลอดการหมัก เก็บตัวอย่างครั้งละ 50 มล. จากการทดลองพบว่าเชื้อสร้างเพนนิซิลิน จี สูงสุด 7,452 หน่วย/มล. และเมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC ตามวิธีการวิจัยข้อ 3.2 ได้ 3.19 กรัม/ลิตร ใน ชม.ที่ 156 จะเห็นได้ว่า เมื่อเพิ่มอัตราการเติมกรดฟีนิลอะซีติก ใน ชม.ที่ 96 ไม่ได้ทำให้เชื้อราสร้างเพนนิซิลิน จี เพิ่มขึ้น และเป็นผลให้มีปริมาณกรดฟีนิลอะซีติกในน้ำหมักสูงเป็น 0.2 กรัม/ลิตร (รูปที่ 30) ดังนั้นการเพิ่มอัตราการเติมกรดฟีนิลอะซีติกใน ชม.ที่ 96 ไม่มีผลทำให้เชื้อสร้างเพนนิซิลิน จี เพิ่มขึ้น



รูปที่ 30 การสร้างเพนนิซิลิน จี โดยเชื้อ P. chrysogenum A 88 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยที่ในชั่วโมงที่ 12 เริ่มเติมสารละลายกลูโคสเข้มข้น 15%(น้ำหนัก/ปริมาตร) ด้วยอัตราการเติม 5 มล./ชม. และในชั่วโมงที่ 48 เริ่มเติมกรดฟีนิลอะซีติกเข้มข้น 0.45% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ด้วยอัตราการเติม 20 มล./6 ชม. และในชั่วโมงที่ 96 เริ่มเติมกรดฟีนิลอะซีติกเข้มข้น 0.45% ด้วยอัตราการเติม 20 มล./3 ชม.

△—△ น้ำตาลรีดิวส์ ▲—▲ นน. เซลแห้ง
□—□ พีเอช ○—○ ซัลเฟต
○—○ กรดฟีนิลอะซีติก ●—● เพนนิซิลิน จี

2.8 <u>การติดตามปริมาณซัลเฟตในระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก</u>

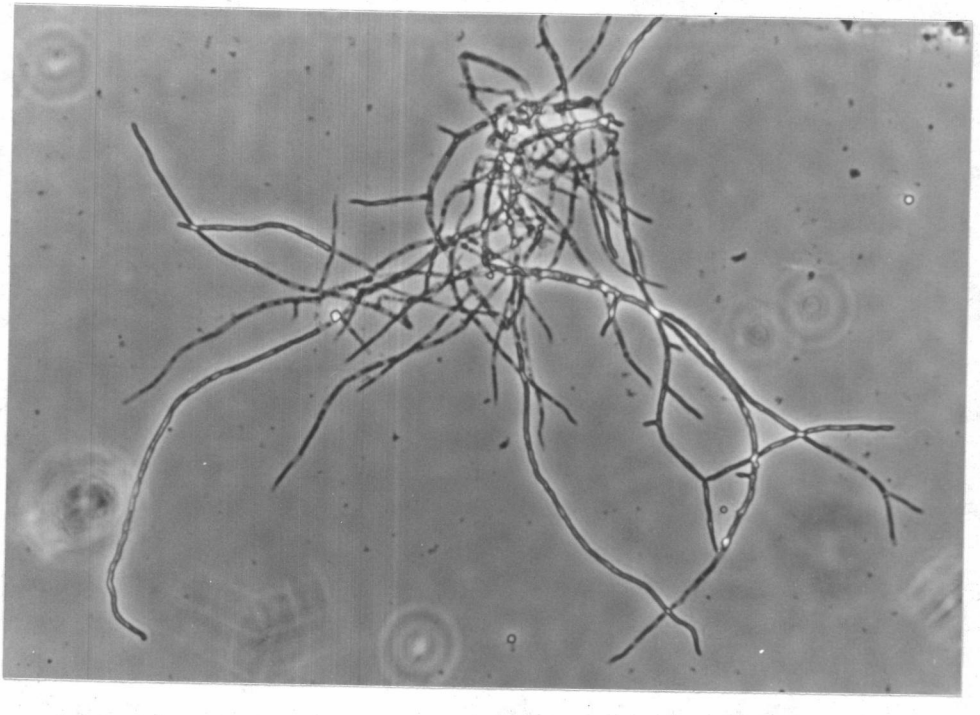
จากการทดลองในข้อ 2.7 ได้ติดตามปริมาณของซัลเฟตที่เหลือในน้ำหมักในระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมัก โดยวิเคราะห์หาปริมาณซัลเฟตตามวิธีการวิจัยในข้อ 3.4.1 พบว่าปริมาณซัลเฟตเริ่มต้น 8.8 กรัม/ลิตร และค่อย ๆ ลดลงจนสิ้นสุดการหมักในชม.ที่ 180 มีปริมาณซัลเฟต 4.5 กรัม/ลิตร (รูปที่ 30) จะเห็นได้ว่าซัลเฟตถูกใช้ไปเพียง 48.86% ของปริมาณซัลเฟตเริ่มต้นทั้งหมด จึงมีปริมาณซัลเฟตเหลือในน้ำหมักสูงถึง 51.14% ซึ่งปริมาณที่เหลือนี้ยังเพียงพอสำหรับเซลนำไปใช้ในการสร้างเพนนิซิลิน จี (37)

2.9 <u>ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงลักษณะกลุ่มสายใยของ P. chrysogenum A 88 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร</u>

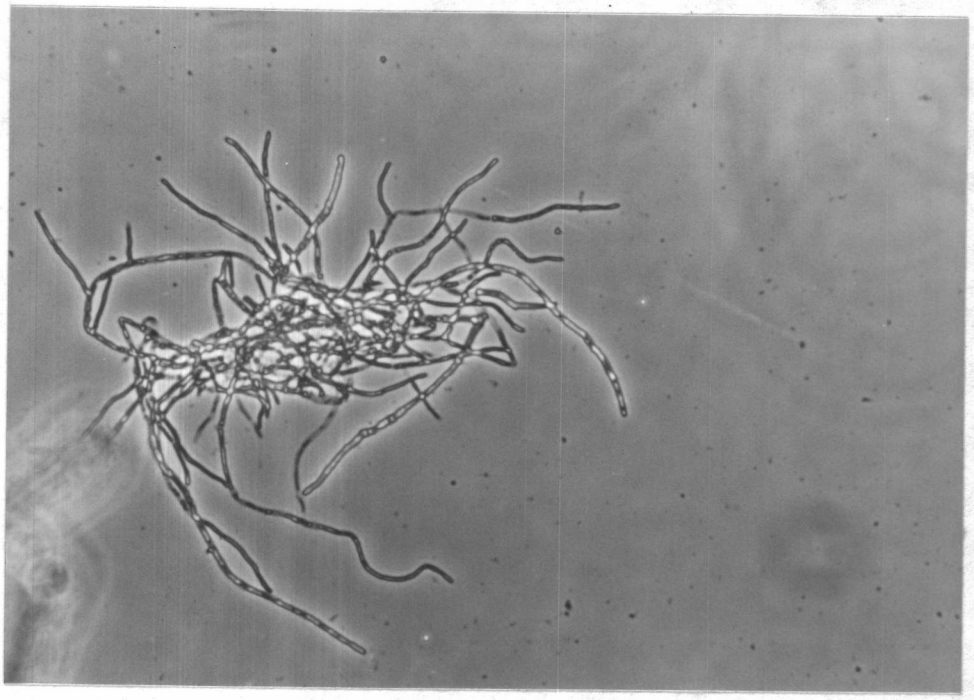
จากการทดลองในข้อ 2.6,2.7 และ 2.8 พบว่าปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจน ปริมาณซัลเฟต และปริมาณกรดฟีนิลอะซีติกในน้ำหมัก ไม่ใช่เป็นตัวจำกัดการสร้างเพนนิซิลิน จี ภายใต้การทดลองนี้ ฉะนั้นตัวที่เป็นตัวจำกัดการสร้างเพนนิซิลิน จี น่าจะเป็นสายใยของเชื้อที่ไม่สามารถสร้างเพนนิซิลิน จี ต่อไปได้อีก จึงได้นำสายใยที่ได้จากการทดลองในข้อ 2.6 มาถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์

ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์โดยใช้ phase contrast กำลังขยาย 10x5 (รูปที่ 31) แสดงให้เห็นถึงลักษณะกลุ่มสายใย (pellet) ของ <u>P. chrysogenum</u> A 88 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน ที่ได้จากการทดลองในข้อ 2.6 และกลุ่มสายใยที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อตามวิธีการวิจัยในข้อ 2.3.4 เป็นเวลา 36 ชม. จากการดู slide โดยทั่วไป พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อใน อาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ เป็น เวลา 36 ชม. ลักษณะกลุ่มสายใยจะเกาะกันอย่างหลวม ๆ มีสายใยที่ยาวเป็นลักษณะที่เหมาะสมสำหรับเป็นหัวเชื้อในการผลิตเพนนิซิลิน จี เนื่องจากเส้นใยที่ยาวกระจายทำให้แต่ละเส้นใยได้รับอาหารทั่วถึง

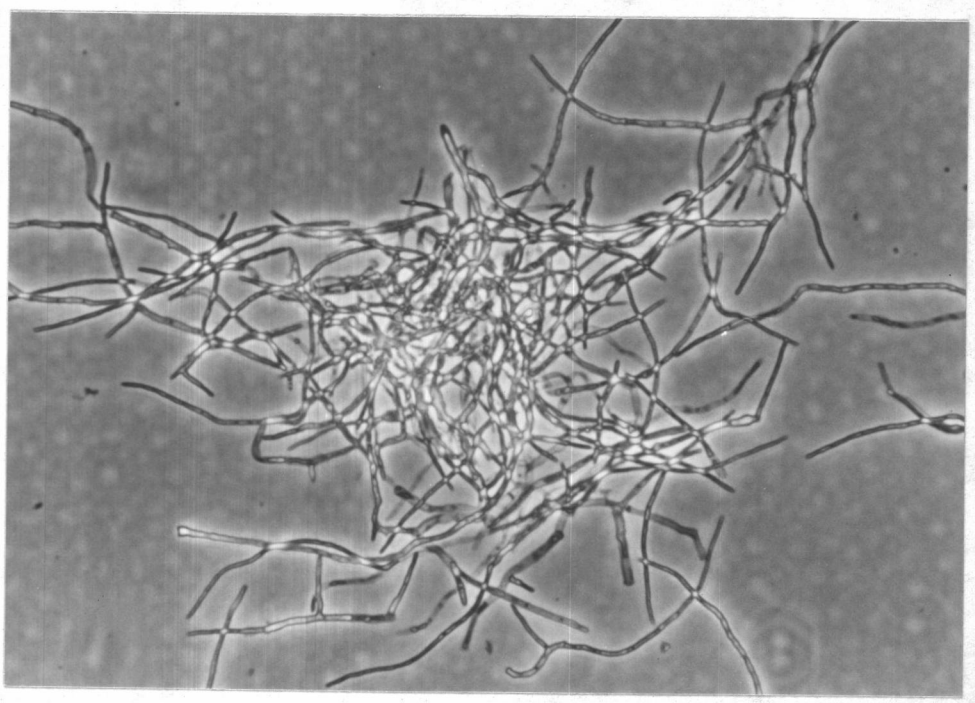
ลักษณะกลุ่มสายใยที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตเพนนิซิลิน จี ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เป็นเวลา 24,72,96 และ 120 ชม. จะมีขนาดกลุ่มสายใยที่แตกต่างกัน ตามระยะเวลาของการหมัก นั่นคือเมื่อเชื้อมีอายุมากขึ้น กลุ่มสายใยจะเกาะกันแน่นขึ้น เกิดเป็นกลุ่มสายใยที่มีขนาดโต (รูปที่ 31.2,31.3,31.4 และ 31.5 ตามลำดับ) เป็นผลทำให้สายใยที่อยู่ตรงกลางกลุ่มสายใย ขาดสารอาหาร ขาดออกซิเจน ทำให้สายใย



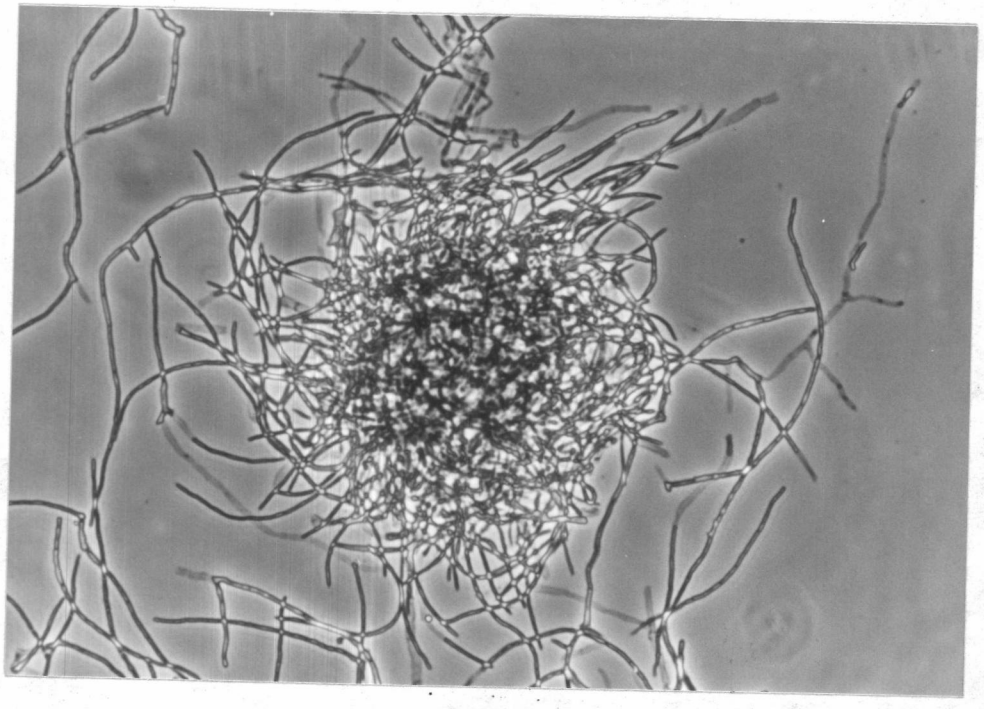
รูปที่ 31.1 ลักษณะกลุ่มสายใยของ P. chrysogenum A 88
เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ เป็นเวลา 36 ชม.



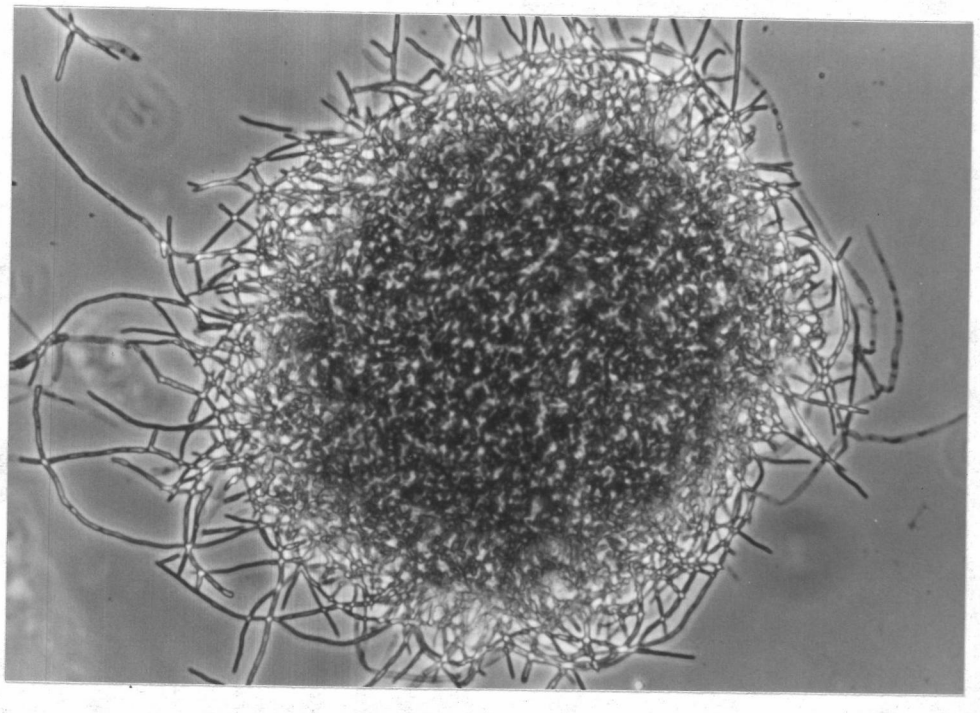
รูปที่ 31.2 ลักษณะกลุ่มสายใยของ P. chrysogenum A 88 เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตเพนนิซิลิน จี ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เป็นเวลา 24 ชม.



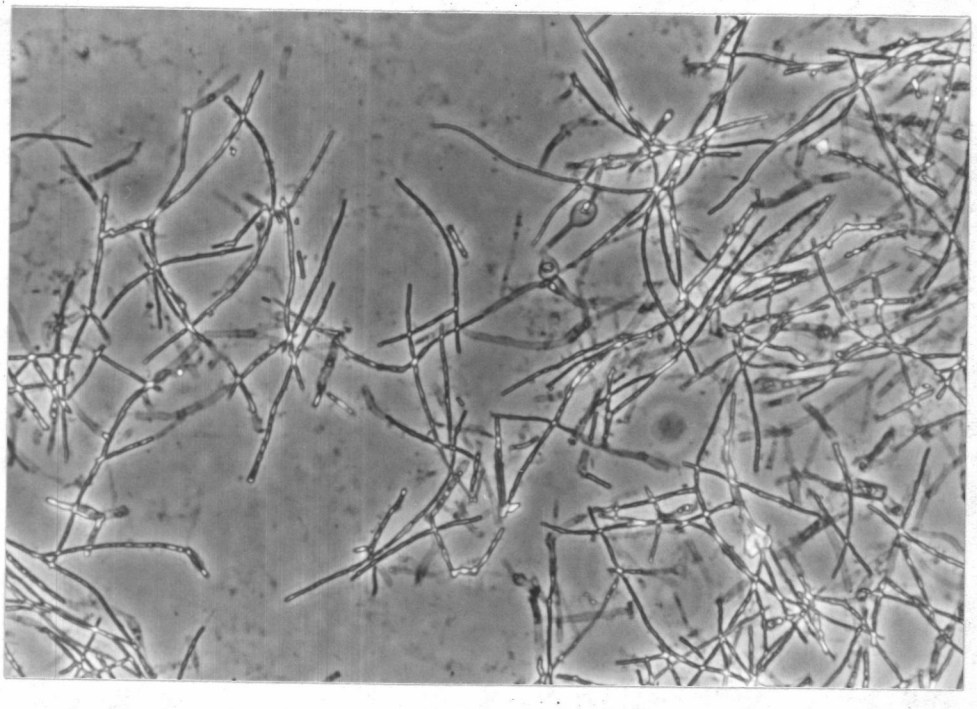
รูปที่ 31.3 ลักษณะกลุ่มสายใยของ P. chrysogenum A 88 เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตเพนนิซิลิน จี ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เป็นเวลา 72 ชม.



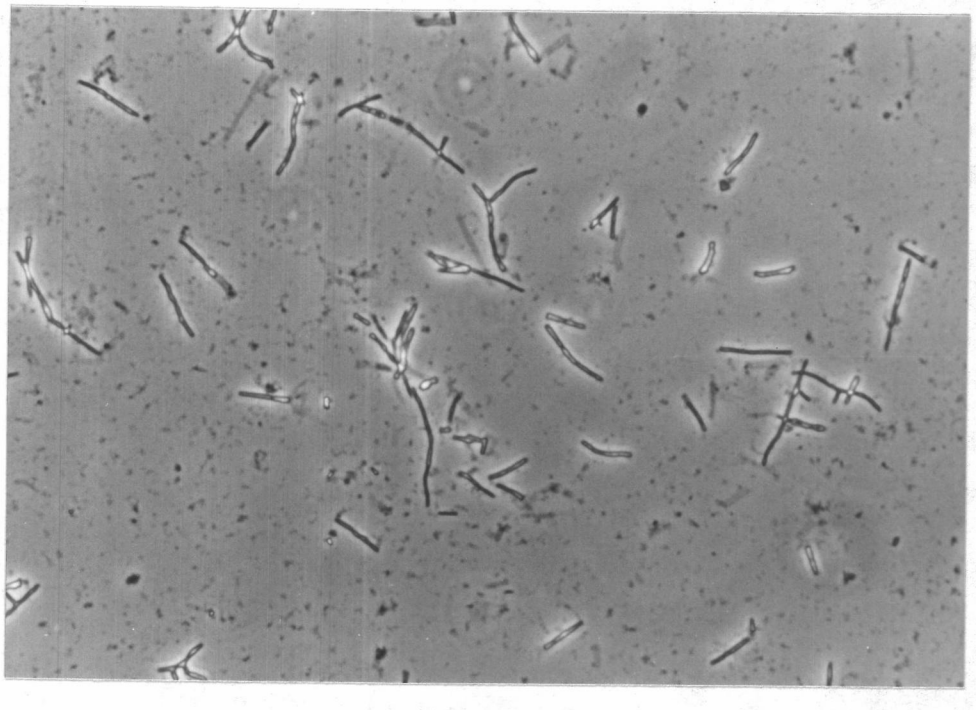
รูปที่ 31.4 ลักษณะกลุ่มสายใยของ P. chrysogenum A 88 เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตเพนนิซิลิน จี ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เป็นเวลา 96 ชม.



รูปที่ 31.5 ลักษณะกลุ่มสายใยของ P. chrysogenum A 88 เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตเพนนิซิลิน จี ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เป็นเวลา 120 ชม.



รูปที่ 31.6 ลักษณะกลุ่มสายใยของ P. chrysogenum A. 88 เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตเพนนิซิลิน จี ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เป็นเวลา 144 ชม.



รูปที่ 31.7 ลักษณะกลุ่มสายใยของ P. chrysogenum A 88 เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตเพนนิซิลิน จี ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เป็นเวลา 180 ชม.

เกิดการสลายตัวขึ้น (lysis) สายใยขาดเป็นส่วนเล็ก ๆ ในเวลาต่อมา คือ ในชม.ที่ 144 และ 180 ของการหมัก (รูปที่ 31.6 และ 31.7) ทำให้เซลมีประสิทธิภาพในการสร้างเพนนิซิลิน จี ต่ำ

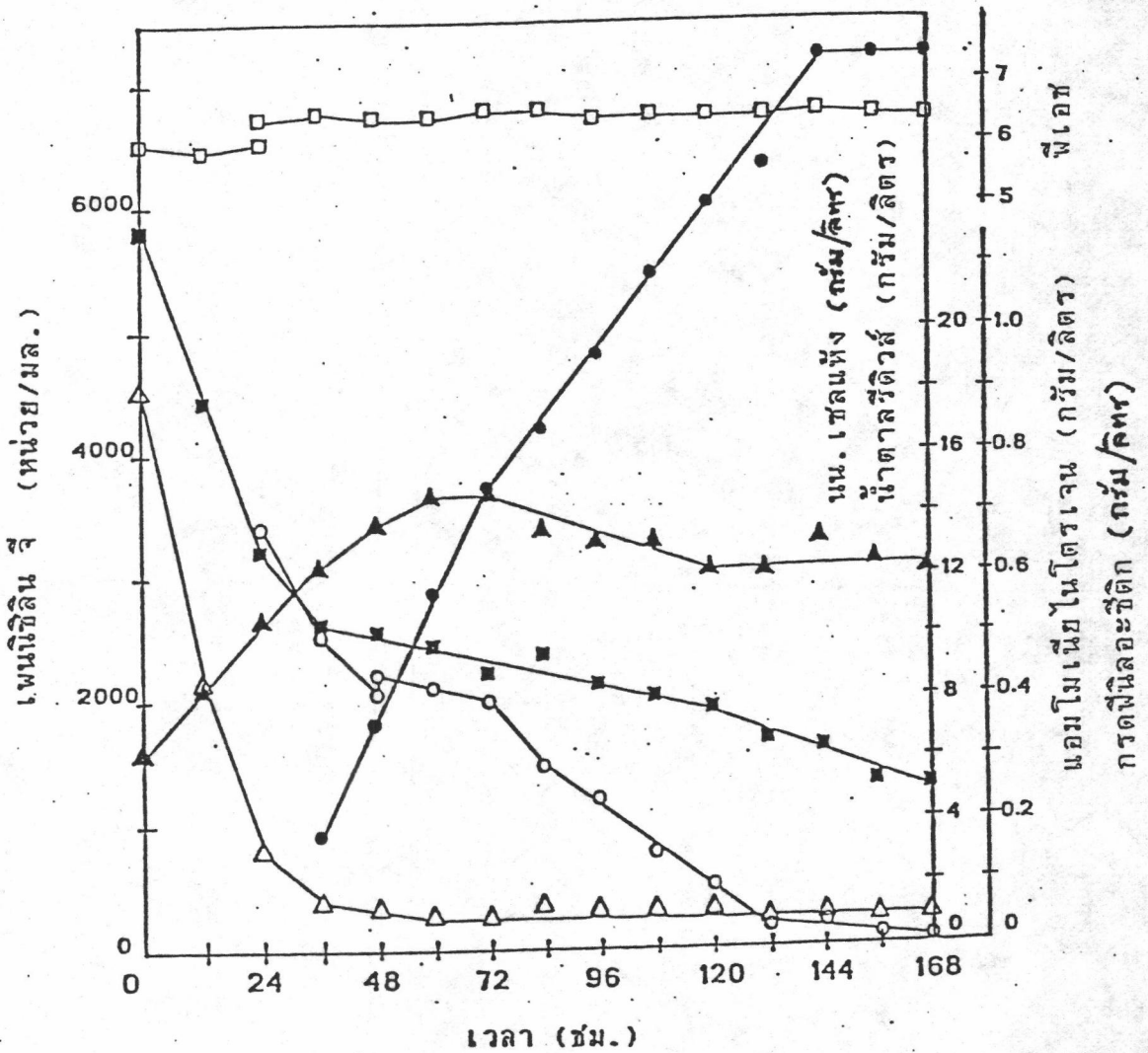
3.0 ผลของการควบคุม พีเอช

จากการทดลองในข้อ 2.1 - 2.9 ได้ควบคุมความเป็น กรด-ด่างให้อยู่ระหว่าง 5.8-7.1 ตามรายงานของ Sheehan และ คณะ (22) เนื่องจากมีรายงานพบว่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้อเป็น 6.0 (3) และความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการสร้างเพนนิซิลิน จี เป็น 6.5 (8) จึงทดลองเลี้ยงเชื้อโดยควบคุมพีเอช เป็น 2 ช่วงดังกล่าว

เลี้ยงเชื้อ P. chrysogenum A 88 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ตามวิธีการวิจัยที่กล่าวไว้ในข้อ 2.3.5 เติมสารละลายกลูโคสเข้มข้น 15% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ด้วยอัตราการเติม 5 มล./ชม. ทุก ๆ ชม.ตลอดการหมัก โดยเริ่มเติมในชม.ที่ 12 ใน ชม.ที่ 24 เติมกรดฟีนิลอะซีติกปริมาณ 0.7 กรัม/ลิตร ในชม.ที่ 48เติมกรดฟีนิลอะซีติกเข้มข้น 0.45% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ด้วยอัตราการเติม 20 มล./ 6 ชม. ทุก ๆ 6 ชม. ตลอดการหมัก เก็บตัวอย่างครั้งละ 50 มล. ใน ชม.ที่ 0-24 ชม. ซึ่งเป็นเวลาที่เชื้อกำลังเจริญ ไม่สร้างเพนนิซิลิน จี เนื่องจากไม่ได้เติมกรดฟีนิลอะซีติก ควบคุมพีเอช 5.9-6.1 และหลังจากเติมสารตั้งต้นใน ชม.ที่ 24 ควบคุมพีเอช 6.4-6.6 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10% และกรดซัลฟูริกเข้มข้น 10% พบว่าเชื้อสร้างเพนนิซิลิน จี สูงสุด 7,179 หน่วย/มล. และเมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC ตามวิธีการวิจัยข้อ 3.2 ได้ 3.1 กรัม/ลิตร ใน ชม.ที่ 144 และเชื้อเจริญสูงสุด 14.6 กรัม/ลิตร ใน ชม. ที่ 60 (รูปที่ 32)

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองนี้ กับการทดลองใน ข้อ 2.6 จะเห็นได้ว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ควบคุมระดับความเป็น กรด-ด่างให้อยู่ในระหว่าง 5.8-7.1 นั้น เชื้อสร้างเพนนิซิลิน จี ได้สูงกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ควบคุมความเป็น กรด-ด่างเป็น 2 ช่วง

จากการทดลองข้อ 3.0 นี้ได้ทำการเปรียบเทียบกับเมื่อใช้น้ำตาลแลคโตสปริมาณ 30 กรัม/ลิตร เป็นสารแหล่งคาร์บอน และเติมสารละลายกลูโคสเข้มข้น 15% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ด้วยอัตรา 5 มล. /ชม. ทุก ๆ ชม. ตลอดการหมักโดยเริ่มเติมใน ชม.ที่ 84 เนื่องจากว่าใน ชม.ที่ 84 ระดับปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่เหลือในน้ำหมักมีระดับต่ำ

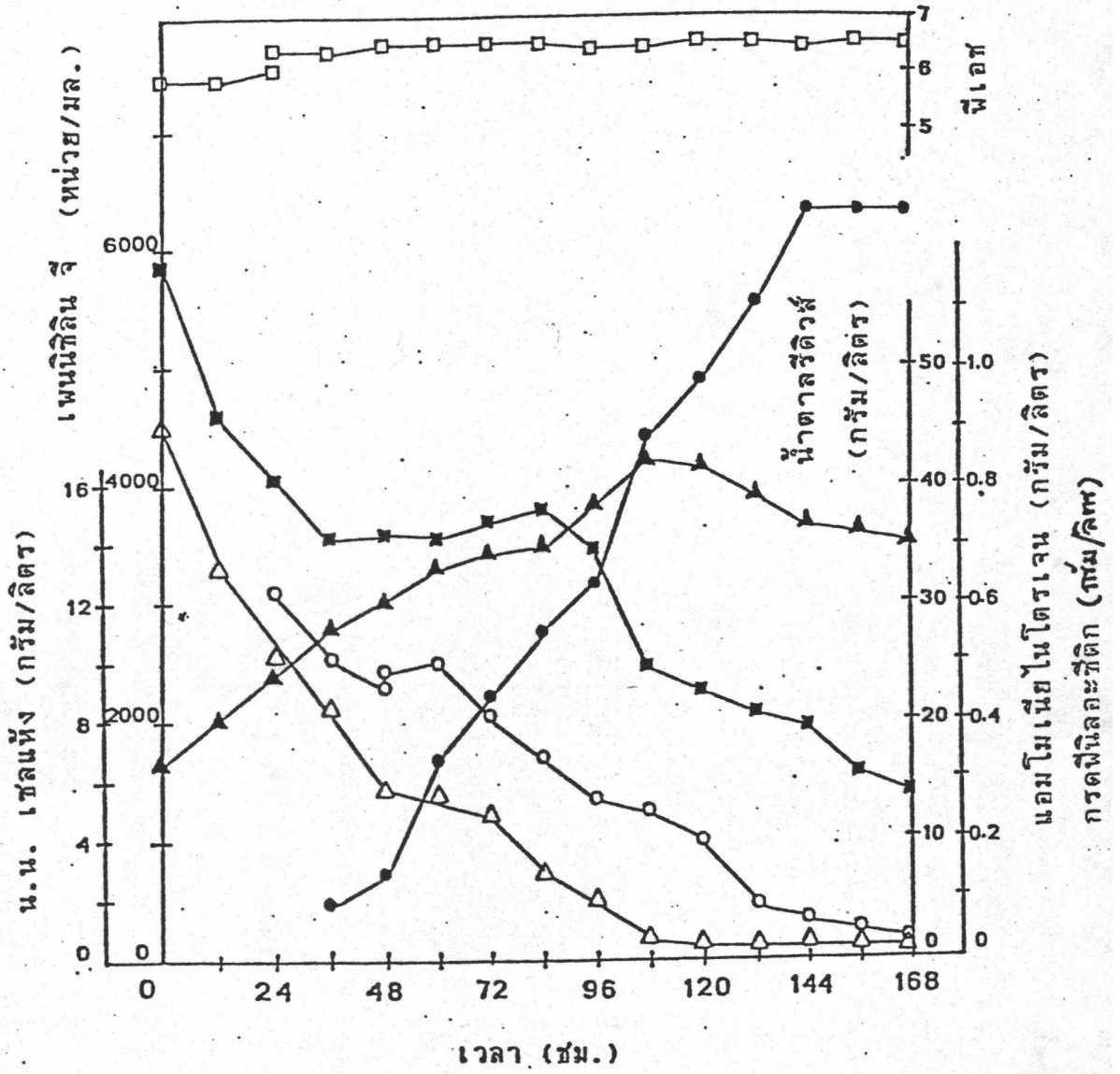


รูปที่ 32 การสร้างเพนนิซิลิน จี โดยเชื้อ P: chrysogenum A 88 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยที่ในชั่วโมงที่ 12 เริ่มเติมสารละลายกลูโคสเข้มข้น 15%(น้ำหนัก/ปริมาตร) ด้วยอัตราการเติม 5 มล./ชม. และในชั่วโมงที่ 48 เริ่มเติมกรดฟีนิลอะซีติกเข้มข้น 0.45% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ด้วยอัตราการเติม 20 มล./6 ชม. ในช่วงเวลา 0-24 ชม. ควบคุมพีเอช 5.9-6.1 และหลังจาก 24 ชม. ควบคุมพีเอช 6.4-6.6

△—△ น้ำตาลรีดิวส์ ▲—▲ นน.เซลแห้ง

□—□ พีเอช ■—■ แอมโมเนียไนโตรเจน

○—○ กรดฟีนิลอะซีติก ●—● เพนนิซิลิน จี



รูปที่ 33 การสร้างเพนนิซิลิน จี โดยเชื้อ P. chrysogenum A 88 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้น้ำตาลแลคโตสปริมาณ 30 กรัม/ลิตร เป็นสารแหล่งคาร์บอน และในชั่วโมงที่ 84 เริ่มเติมสารละลายกลูโคสเข้มข้น 15% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ด้วยอัตราการเติม 5 มล./ชม. ในชั่วโมงที่ 48 เริ่มเติมกรดฟีนิลอะซีติก 0.45% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ด้วยอัตราการเติม 20 มล./6 ชม. ในช่วงเวลา 0-24 ชม. ควบคุมพีเอช 5.9-6.1 หลังจาก 24 ชม. ควบคุมพีเอช 6.4-6.6

△—△ น้ำตาลรีดิวส์ ▲—▲ นน. เซลแห้ง
□—□ พีเอช ■—■ แอมโมเนียไนโตรเจน
○—○ กรดฟีนิลอะซีติก ●—● เพนนิซิลิน จี

(รูปที่ 33) พบว่าเชื้อเจริญได้สูงสุด 17.0 กรัม/ลิตร ใน ชม.ที่ 108 และสร้างเพนนิซิลิน จี สูงสุด 6,300 หน่วย/มล. และเมื่อวิเคราะห์โดย HPLC ตามวิธีการวิจัยข้อ 3.2 ได้ 2.79 กรัม/ลิตร ใน ชม.ที่ 144 (รูปที่ 33) จะเห็นได้ว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำตาลแลคโตสเชื้อเจริญได้สูงกว่าเมื่อใช้สารละลายกลูโคส โดยการเติมอย่างต่อเนื่อง แต่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารละลายกลูโคสอย่างต่อเนื่องเชื้อสร้างเพนนิซิลิน จี ได้สูงกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำตาลแลคโตส