# บทที่ 4

## สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้มุ่งที่จะทำให้สายพันธุ์กลายพันธุ์ของเชื้อ *Penicillium chrysogenum* ผลิตเพนิซิลลิน จี ได้มากขึ้น โดยการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเพนิซิลลิน จี ทั้งในระดับขวดเขย่าและถังหมักขนาด 5 ลิตร เริ่มจากการคัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์จำนวน 4 สายพันธุ์คือ UNN-151 UNNN-9 UNNN-17 และUNNN-28 โดยใช้สายพันธุ์ตั้งต้น A-88 เป็นตัวเปรียบเทียบ ผลจากการคัดเลือกพบว่าสายพันธุ์ UNNN-9 มีความเหมาะสม คือผลิตเพนิซิลลิน จี ได้ 1 กรัม/ลิตร ถึงแม้จะใกล้เคียงกับสายพันธุ์ UNNN-28 แต่เป็นสายพันธุ์ที่สร้างสปอร์ได้ดีกว่า ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงใช้สายพันธุ์ UNNN-9

การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเพนิซิลลิน จี นั้นทำได้โดยการปรับปรุงสูตรอาหารและสภาวะการเลี้ยง เช่น อุณหภูมิ อัตราการให้อากาศและอัตราการกวน เป็นต้น โดยอุณหภูมิเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญปัจจัยหนึ่ง นอกจากจะเพิ่มผลผลิตแล้ว ยังมีผลต่อการลดค่าใช้จ่าย หรือค่าพลังงานอีกด้วย ในการผลิตเพนิซิลลิน จี ส่วนใหญ่มักนิยมหมักที่อุณหภูมิ 25 °ซ. ด้วยมีรายงานว่าเหมาะสมสำหรับการผลิต(1,5) แต่ก็มีรายงานว่าสามารถผลิตได้จนถึงอุณหภูมิ 32 °ซ.(31,47, 71,68) โดยที่อุณหภูมิสูงเชื้อจะมีการเจริญที่ดี นอกจากการคงอุณหภูมิตลอดการหมักแล้ว ยังมีรายงานการเปลี่ยนอุณหภูมิในระหว่างการหมักจาก 25 °ซ.เป็น 30 °ซ. (58) และเปลี่ยนจาก 30 °ซ.เป็น 25 °ซ. (71)อีกด้วย จึงทำการทดลองหมักโดยใช้สภาวะดังกล่าว พบว่าสายพันธุ์ UNNN-9 เหมาะสมกับการหมักที่อุณหภูมิ 28 °ซ.ตลอดการหมัก โดยผลิตเพนิซิลลิน จี ได้มากกว่าสภาวะอื่น และใช้เวลาการหมักที่เร็วกว่า

ในการผลิตเพนิซิลลิน จี ในระดับขยายส่วน สิ่งสำคัญสิ่งแรกก็คือการมีหัวเชื้อที่มีคุณภาพดี สามารถผลิตเพนิซิลลิน จี ได้สูง ในระยะเวลาสั้น สายใยบางยาว อยู่กระจายอย่างหลวม ๆ เป็นลักษณะหัวเชื้อที่ดี พบว่าปริมาณสปอร์เริ่มต้นเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้หัวเชื้อมีลักษณะดี การใช้ปริมาณสปอร์เริ่มต้นที่น้อยเกินไป มีผลทำให้หัวเชื้อมีลักษณะเป็นก้อน (Pellet) ในการผลิต

เพนิซิลลิน จี ปริมาณสปอร์เริ่มต้นที่นิยมใช้อยู่ในช่วง $10^6$-$10^7$ สปอร์ และใช้หัวเชื้อปริมาตร 10 %(v/v) ของอาหารเลี้ยงเชื้อผลิตเพนิซิลลิน จี (25,52,70,78) สำหรับสายพันธุ์ UNNN-9 ก็เช่นเดียวกัน ปริมาณสปอร์เริ่มต้นที่เหมาะสมคือ $2.5 \times 10^7$ สปอร์/ขวด ซึ่งบรรจุอาหารเตรียมหัวเชื้อ 50 มล. นอกจากปริมาณสปอร์เริ่มต้นแล้ว แหล่งคาร์บอนเพื่อใช้เตรียมหัวเชื้อก็เป็นสิ่งสำคัญ เพื่อให้เชื้อมีการเจริญอย่างเต็มที่ ไม่ถูกจำกัดเนื่องจากปริมาณแหล่งคาร์บอนไม่เพียงพอ สำหรับการเตรียมหัวเชื้อของสายพันธุ์ UNNN-9 ใช้ซูโครสเข้มข้น 18 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากปัจจัยข้างต้นที่มีผลต่อการเตรียมหัวเชื้อที่ดีแล้ว อายุของหัวเชื้อเป็นปัจจัยที่สำคัญ คือถ้าใช้หัวเชื้อที่มีอายุน้อยจะทำให้การผลิตเพนิซิลลิน จี ช้าออกไป เชื้อต้องการเวลาในการปรับตัวมาก แต่ถ้าใช้หัวเชื้อที่มีอายุมากเกินไป การสร้างสารตัวกลางในการผลิตเพนิซิลลิน จี จะต่ำ ได้ปริมาณเพนิซิลลิน จี น้อย มีรายงานว่าหัวเชื้อที่ดีควรมีอายุอยู่ในช่วงกึ่งกลางการเจริญ (7) เช่นเดียวกับสายพันธุ์ UNNN-9 อายุหัวเชื้อที่เหมาะสมคือ 60 ชม.

การใช้กรดฟีนิลอะซิติกในการหมักเพื่อผลิตเพนิซิลลิน จี มีข้อจำกัด เนื่องมาจากความเป็นพิษของโมเลกุลที่ไม่แตกตัวไปมีผลยับยั้งการเจริญและลดการผลิตเพนิซิลลิน จี ในที่สุด ดังนั้น ปริมาณ ความเข้มข้นของกรดฟีนิลอะซิติก รวมทั้งเวลาการเติมต้องเหมาะสม (4,5,51,62) คือ ควรเติมหลังจากช่วงที่เชื้อมีการสังเคราะห์สารตัวกลางในการผลิตพร้อมแล้ว เพราะมีรายงานว่าในสายพันธุ์ที่ผลิตต่ำ จะมีเอนไซม์ปล่อยออกมาย่อยกรดฟีนิลอะซิติกภายนอกเซล ทำให้การรวมเป็นโมเลกุลเพนิซิลลิน จี ต่ำกว่าสายพันธุ์ที่ผลิตสูง (54) นอกจากสารตั้งต้นในการผลิตแล้ว ปริมาณแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในช่วงการผลิต ได้แก่ แลคโตส ต้องมีพอเพียงสำหรับการเจริญอย่างช้า ๆเพื่อไม่ให้สายใยสลายไปก่อนเวลาที่ผลิตได้สูงสุด (4,27,46) มีรายงานว่าการหมักโดยใช้แลคโตสควรเติมตั้งแต่เริ่มทำการหมัก เนื่องจากต้องมีการกระตุ้นเอนไซม์เบตากาแลคโตซิเดส เพื่อพร้อมที่จะย่อยแลคโตสไปใช้หลังจากที่กลูโคสหมด การย่อยใช้อย่างช้า ๆ นี้เองที่กระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์เพนิซิลลิน จี ขึ้น (6,33,47,48) และไม่ทำให้เกิดความเป็นกรดมากเกินไป จึงไม่ต้องมีการควบคุม pH (6,23,33,46,54,55) สำหรับสายพันธุ์ UNNN-9 ปริมาณแลคโตสที่เหมาะสมคือ 40 กรัม/ลิตร เติมกรดฟีนิลอะซิติกเข้มข้น 0.8 กรัม/ลิตร เมื่อเชื้ออายุ 48 ชม. พบว่าในสภาวะขวดเขย่านี้ทำให้ได้ปริมาณเพนิซิลลิน จี เพิ่มขึ้นจากสภาวะในการคัดเลือก 65 % มากกว่าสายพันธุ์ดั้งต้น A-88 101.21 % และมากกว่าสายพันธุ์ UNN-151 184.48 %

โดยทั่วไปการหมักในระดับถังหมัก เป็นขั้นตอนที่ทำให้เชื้อสามารถผลิตเพนิซิลลิน จี เพิ่มมากขึ้นกว่าในระดับขวดเขย่า เนื่องจากสามารถควบคุมให้มีอัตราการให้อากาศและอัตราการกวน หรือการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดีกว่าในระดับขวดเขย่า (30 74,75) มีรายงานว่าความเร็วในการกวนมีผลมากต่อการผลิตเพนิซิลลิน จี เนื่องจากทำให้สายใยมีโอกาสสัมผัสกับอาหาร สารตั้งต้น ออกซิเจน ได้ดี และทำให้การถ่ายเทเอากาซคาร์บอนไดออกไซด์ได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งกาซคาร์บอนไดออกไซด์นี้ ถ้ามีสะสมอยู่ในน้ำหมักสูงกว่า 8 % แล้วจะทำให้สายใยเปลี่ยนเป็นรูปกลมสั้นคล้ายยีสต์ และทำให้การผลิตเพนิซิลลิน จี ต่ำลง เนื่องจากเซลหันไปสร้างไคตินเพื่อซ่อมแซมผนังเซลแทน (25,76,77) แต่อัตราการกวนที่มากเกินไป ทำให้เซลเกิดการสลาย เนื่องจากถูกใบพัดตัดเส้นใย (5,44,74) สำหรับการหมักในถังหมักโดยสายพันธุ์ UNNN-9 อัตราการกวนที่เหมาะสมคือ 500 รอบ/นาที ทำให้การผลิตเพิ่มขึ้นกว่าขั้นตอนการคัดเลือก 83 % และเพิ่มมากกว่าสภาวะที่เหมาะสมในระดับขวดเขย่า 10.90 %

ในการหมักเพื่อผลิตสารทุติยภูมิ นิยมทำการหมักโดยการเติมสารที่เป็นปัจจัยสำคัญต่อการสร้างผลิตภัณฑ์ต่อเนื่อง เพราะเป็นการหมักที่ให้ผลิตภัณฑ์สูงกว่าการหมักโดยไม่เติมสารปัจจัย แต่การเติมสารนั้นจะต้องมีขั้นตอนและปริมาณที่เหมาะสม ซึ่งขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ ชนิดผลิตภัณฑ์ และสภาวะการหมัก สำหรับการหมักเพื่อผลิตเพนิซิลลิน จี นั้น สารที่มีการเติมอย่างต่อเนื่อง ได้แก่ กรดฟีนิลอะซิติก แอมโมเนียมอะซิเตต และสารแหล่งคาร์บอน โดยที่รักษาระดับแอมโมเนียไนโตรเจน ไม่ให้ต่ำกว่า 0.2-0.3 กรัม/ลิตร (25,32) และระดับของน้ำตาลรีดิวส์ให้อยู่ที่ประมาณ 2-3 กรัม/ลิตร (54) จากการทดลองพบว่าการเติมสารต่อเนื่องที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเพนิซิลลิน จี โดยสายพันธุ์ UNNN-9 คือเติมสารละลายผสมระหว่างกรดฟีนิลอะซิติกเข้มข้น 0.025 กรัม/มล.และแอมโมเนียมอะซิเตตเข้มข้น 0.1 กรัม/มล. ปริมาตร 12 มล.ทุก ๆ 12 ชม. โดยเริ่มเติมตั้งแต่ชม.ที่ 72 ของการหมัก และเมื่อระยะเวลาการหมักเท่ากับ 96 ชม.เริ่มเติมกลูโคสเข้มข้น 0.571 กรัม/มล. ด้วยอัตราเดียวกัน พบว่าทำให้การผลิตเพิ่มมากกว่าไม่มีการเติมสารต่อเนื่อง 44.26 % มากกว่าการผลิตก่อนปรับสภาวะคือในขั้นตอนคัดเลือก 164 % มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น A-88 221.95 % และมากกว่าสายพันธุ์ UNN-151 355.17 % โดยมี % Conversion เท่ากับ 3.17 %