บทที่ 3

ผลการทดลอง

1 การศึกษาประสิทธิภาพในการสร้างเพนนิซิลลิน จี ของ Penicillium chrysogenum N-151

เนื่องจากงานวิจัยนี้ได้ใช้ P. chrysogenum N-151 เป็นสายพันธุ์เริ่มต้นสำหรับทำกลายพันธุ์เพื่อปรับปรุงสายพันธุ์ให้มีประสิทธิภาพในการผลิตสูงขึ้น ดังนั้นจึงจำเป็นต้องนำสายพันธุ์ N-151 มาทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเพนนิซิลลิน จี เพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่ได้จากการทำกลายพันธุ์ในขั้นต่อ ๆ ไป ดังนี้

1.1 การผลิตเพนนิซิลลิน จี บนอาหารวุ้น

นำ P. chrysogenum N-151 มาทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเพนนิซิลลิน จี บนอาหารวุ้น (ตามวิธีการทดลองในข้อ 4.1) พบว่าในจำนวน 89 ซ้ำที่ทำการตรวจสอบ 53 ซ้ำ (หรือ 60 %) ให้ความกว้างบริเวณยับยั้ง 30 มิลลิเมตร ดังแสดงในตารางที่ 2

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

ความกว้างบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	จำนวน (ซ้ำ)	เปอร์เซนต์
27	1	1.12
28	6	6.74

ตารางที่ 2 : ต่อ

ความกว้างบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	จำนวน (ซ้ำ)	เปอร์เซนต์
29	8	8.99
30	53	59.55
31	13	14.61
32	5	5.62
33	2	2.25
34	1	1.12
เฉลี่ย 30.11	89	100

1.2 การสร้างเพนนิซิลลิน จี ในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า

นำสปอร์แขวนลอยของ P. chrysogenum N-151 มาหมักในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า (ตามวิธีการทดลองในข้อ 4.2) น้ำหมักที่ได้นำมาวิเคราะห์ปริมาณเพนนิซิลลิน จี ได้โดยวิธีชีววิทยา (ตามวิธีการทดลองในข้อ 4.2.1) พบว่าสร้างเพนนิซิลลิน จี ได้ 1,594 ยูนิต/มิลลิลิตร และโดยวิธี HPLC (ตามวิธีการทดลองในข้อ 4.2.2) พบว่าสร้างเพนนิซิลลิน จี ได้ 0.448 กรัม/ลิตร

2 การปรับปรุงสายพันธุ์ P. chrysogenum N-151

การปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยการทำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารก่อการกลายพันธุ์จะสำเร็จหรือไม่ ขึ้นกับการเลือกใช้ชนิดสารก่อการกลายพันธุ์ที่เหมาะสมกับจุลินทรีย์ที่จะทำการปรับปรุงสายพันธุ์ สารก่อการกลายพันธุ์ชนิดหนึ่งอาจให้ผลดีกว่าอีกชนิดหนึ่งในการชักนำให้เกิด

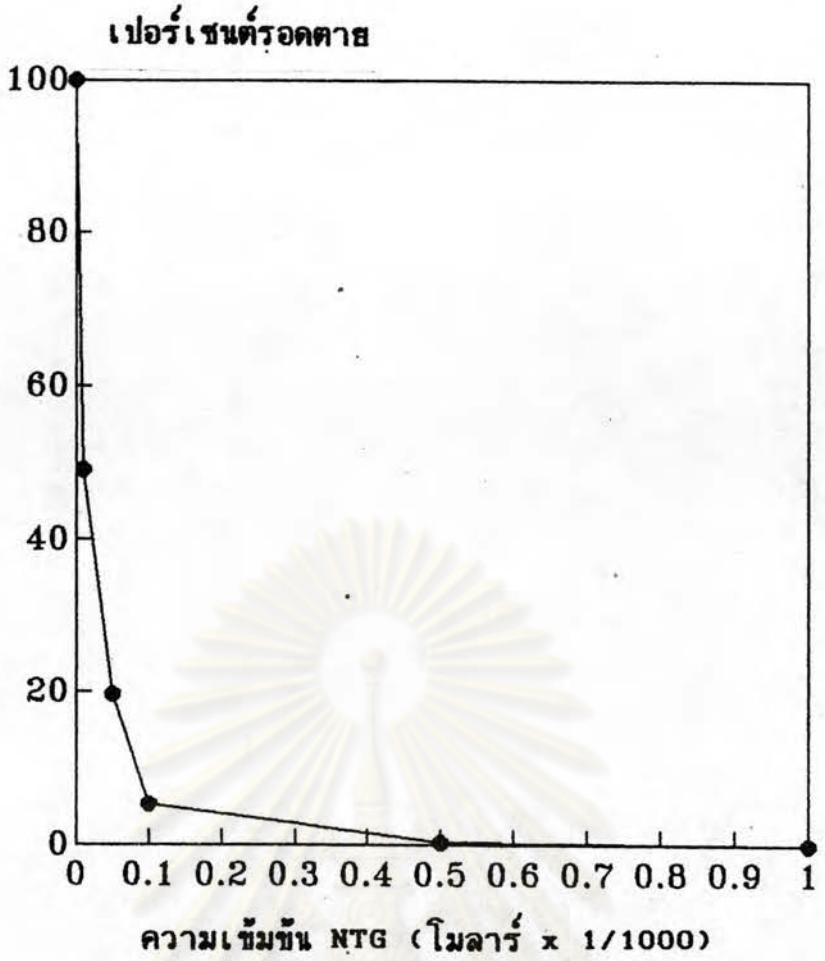
การกลายพันธุ์ (50, 55) สารก่อการกลายพันธุ์ที่เลือกใช้ในงานวิจัยนี้ คือสารที่นิยมใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์ทั่วไปคือ UV และ NTG ในการทดลองขั้นแรกนี้ได้กลายพันธุ์เชื้อสายพันธุ์ N-151 ด้วย UV และ NTG ไปพร้อม ๆ กัน แล้วคัดหาสายพันธุ์ที่ดีที่สุดเพื่อใช้เป็นสายพันธุ์ตั้งต้นในการทำกลายพันธุ์ขั้นต่อไป

2.1 การทำ P. chrysogenum N-151 ให้กลายพันธุ์ด้วย NTG และการคัดเลือกสายพันธุ์

นำสปอร์แขวนลอยของ P. chrysogenum N-151 ปริมาณ 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร มาเติมสารละลาย NTG ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ตามวิธีการทดลองในข้อ 5.1 นับจำนวนโคโลนี คำนวนเปอร์เซนต์รอดตายที่ความเข้มข้น NTG ต่าง ๆ ผลการทดลองดังแสดงใน ตารางที่ 3 และรูปที่ 18

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

ความเข้มข้นของ NTG (โมลาร์)	จำนวนสปอร์ที่งอก	เปอร์เซนต์รอดตาย (%)
0	2.296×10^5	100.000
1×10^{-5}	1.126×10^5	49.042
5×10^{-5}	4.500×10^4	19.595
1×10^{-4}	1.214×10^4	5.287
5×10^{-4}	6.840×10^2	0.298
1×10^{-3}	1.000×10^1	0.004



รูปที่ 18 : ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น NTG และเปอร์เซนต์รอดตายของสปอร์ P. chrysogenum N-151

เลือกเก็บสายพันธุ์จากการใช้ NTG ที่ความเข้มข้น 5×10^{-5} โมลาร์ ซึ่งมีเปอร์เซนต์รอดตายเท่ากับ 19.60 % (จากตารางที่ 3) มาคัดเลือกสายพันธุ์ต่อไป เหตุที่เก็บสายพันธุ์จากการใช้ NTG ที่ความเข้มข้นดังกล่าว เพราะให้เปอร์เซนต์รอดตายอยู่ในช่วง 11-22 % เนื่องจากมีรายงานว่าการทำกลายพันธุ์กับสปอร์แขวนลอยของ P. chrysogenum ด้วย NTG เพื่อปรับปรุงสายพันธุ์ให้ผลิตเพนนิซิลลิน จี สูงขึ้น จะเลือกสายพันธุ์จากกลุ่มที่มีเปอร์เซนต์การรอดตายอยู่ในช่วง 11-22 % (37)

ในการคัดเลือกสายพันธุ์ได้แยกสายพันธุ์ต่าง ๆ ออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มของสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่มีลักษณะสัณฐานวิทยา (morphology)เปลี่ยนไปจากสายพันธุ์ตั้งต้น และกลุ่มของสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่มีลักษณะคงเดิม ทั้งนี้เพื่อทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงลักษณะสัณฐานวิทยาและประสิทธิภาพในการผลิตเพนนิซิลลิน จี

2.1.1 ผลการศึกษาสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่มีลักษณะเปลี่ยนไป

จากการเก็บสายพันธุ์ที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาเปลี่ยนไปจากสายพันธุ์ตั้งต้นจำนวน 41 สายพันธุ์มาศึกษา พบว่าสามารถแบ่งออกได้เป็น 6 กลุ่มตามลักษณะของเชื้อที่ปรากฏบนอาหารวุ้น พี ดี เอ และอาหารวุ้นผลิตเพนนิซิลลิน จี ดังแสดงในตารางที่ 4 และ รูปที่ 19 ถึง 25

ตารางที่ 4 : ลักษณะ morphology ของสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาเปลี่ยนไปจากสายพันธุ์ตั้งต้นเมื่อเลี้ยงบนอาหารวุ้น พี ดี เอ และอาหารวุ้นผลิตเพนนิซิลลิน จี เป็นเวลา 7 วัน

กลุ่มที่	ลักษณะสัณฐานวิทยา
1 (รูปที่ 19)	* เทาอมเขียว ** เทาอมน้ำตาล
2 (รูปที่ 20)	* เทา-ดำ ** เทาอมเขียว
3 (รูปที่ 21)	* เขียวเข้ม ** เทาอมเขียว
4 (รูปที่ 22)	* น้ำตาล-เทา ** น้ำตาล-เทา
5 (รูปที่ 23)	* เขียวเข้มเกือบดำ ** เทาอมเขียว

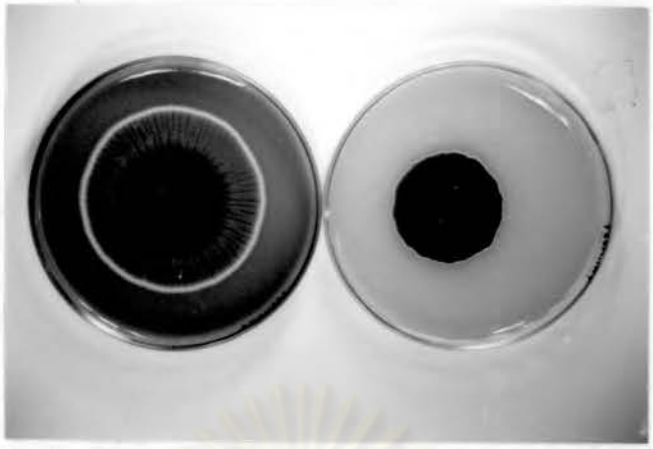
ตารางที่ 4 : ต่อ

กลุ่มที่	ลักษณะสัณฐานวิทยา
6 (รูปที่ 24)	* เขียวเข้มเกือบดำ ** เขียวเข้มเกือบดำ
P. chrysogenum N-151 (สายพันธุ์ตั้งต้น)(รูปที่ 25)	* เขียว ** เขียว

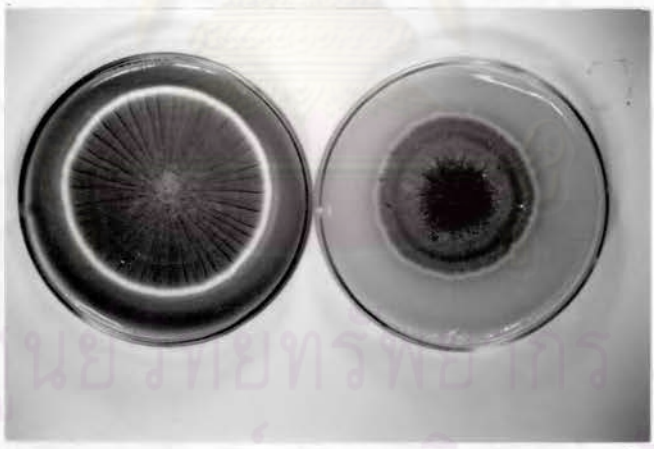
หมายเหตุ : * เลี้ยงบนอาหารวุ้น พี ดี เอ

** เลี้ยงบนอาหารวุ้นผลิตเพนนิซิลลิน จี

รูปที่ 19 : ลักษณะโคโลนีของสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาเปลี่ยนไปจากสายพันธุ์ตั้งต้นกลุ่มที่ 1 เมื่อเลี้ยงบนอาหารวุ้น พี ดี เอ (ขวา) และบนอาหารวุ้นผลิตเพนนิซิลลิน จี (ซ้าย) เป็นเวลา 7 วัน

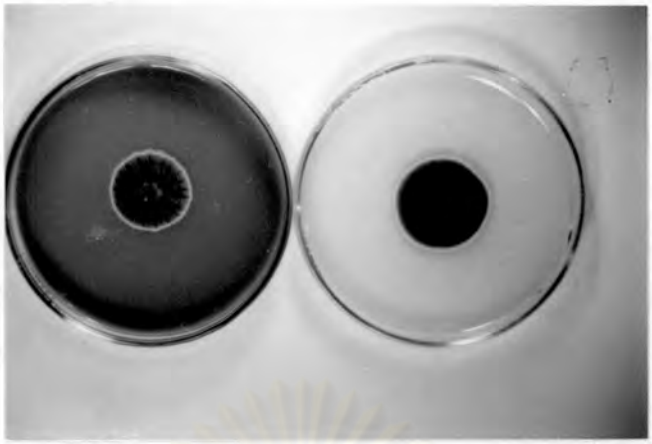


รูปที่ 20 : ลักษณะโคโลนีของสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาเปลี่ยนไปจากสายพันธุ์ตั้งต้นกลุ่มที่ 2 เมื่อเลี้ยงบนอาหารวุ้น พี ดี เอ (ขวา) และบนอาหารวุ้นผลิตเพนนิซิลลิน จี (ซ้าย) เป็นเวลา 7 วัน

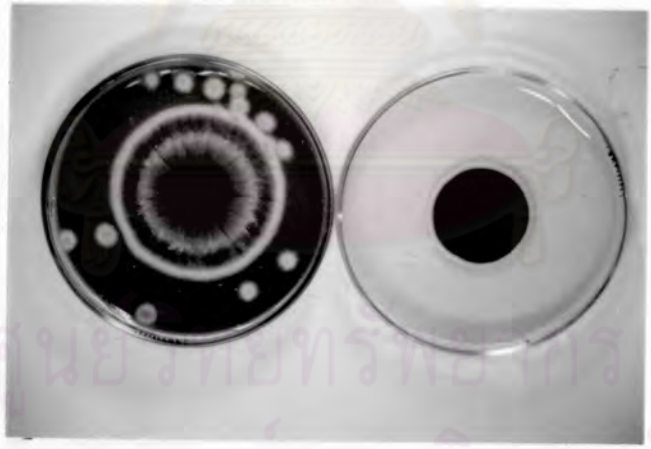


รูปที่ 21 : ลักษณะโคโลนีของสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาเปลี่ยนไปจากสายพันธุ์ตั้งต้นกลุ่มที่ 3 เมื่อเลี้ยงบนอาหารวุ้น พี ดี เอ (ขวา) และบนอาหารวุ้นผลิตเพนนิซิลลิน จี (ซ้าย) เป็นเวลา 7 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

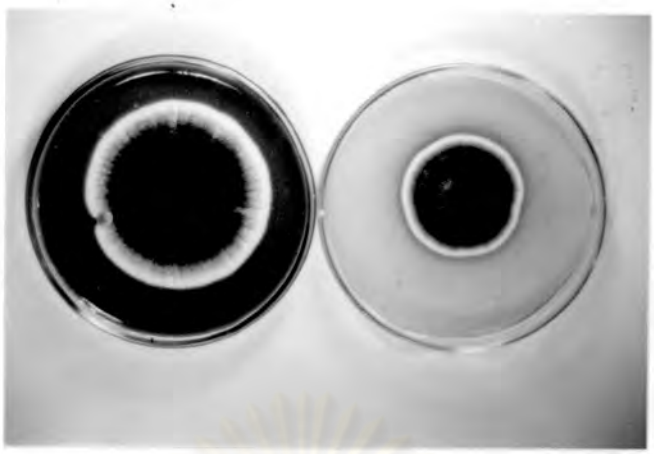


รูปที่ 22 : ลักษณะโคโลนีของสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาเปลี่ยนไปจากสายพันธุ์ตั้งต้นกลุ่มที่ 4 เมื่อเลี้ยงบนอาหารวุ้น พี ดี เอ (ขวา) และบนอาหารวุ้นผลิตเพนนิซิลลิน จี (ซ้าย) เป็นเวลา 7 วัน

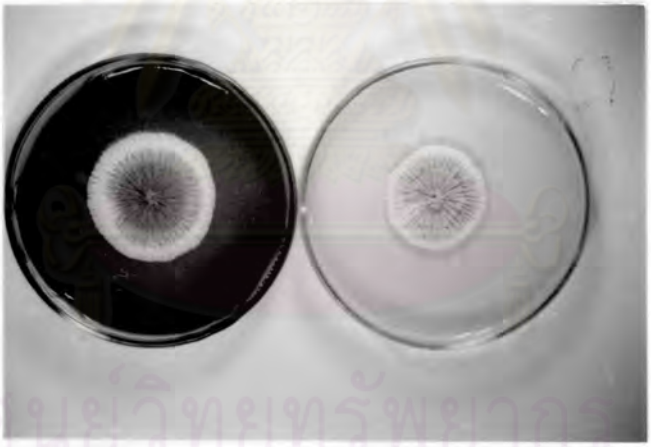


รูปที่ 23 : ลักษณะโคโลนีของสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาเปลี่ยนไปจากสายพันธุ์ตั้งต้นกลุ่มที่ 5 เมื่อเลี้ยงบนอาหารวุ้น พี ดี เอ (ขวา) และบนอาหารวุ้นผลิตเพนนิซิลลิน จี (ซ้าย) เป็นเวลา 7 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 24 : ลักษณะโคโลนีของสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาเปลี่ยนไปจากสายพันธุ์ตั้งต้นกลุ่มที่ 6 เมื่อเลี้ยงบนอาหารวุ้น พี ดี เอ (ขวา) และบนอาหารวุ้นผลิตเพนนิซิลลิน จี (ซ้าย) เป็นเวลา 7 วัน



รูปที่ 25 : ลักษณะโคโลนีของของ P. chrysogenum N-151 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ตั้งต้น เมื่อเลี้ยงบนอาหารวุ้น พี ดี เอ (ขวา) และบนอาหารวุ้นผลิตเพนนิซิลลิน จี (ซ้าย) เป็นเวลา 7 วัน

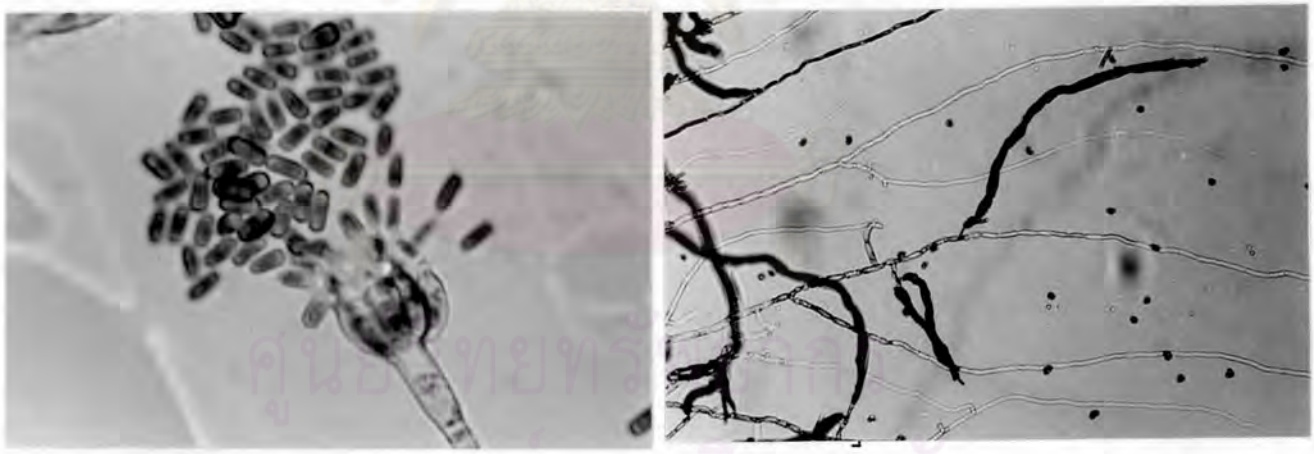
สายพันธุ์กลายพันธุ์ที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาเปลี่ยนไปจากสายพันธุ์ตั้งต้นทั้ง 6 กลุ่ม เมื่อนำมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศ์ สามารถแบ่งตามลักษณะการจัดเรียงตัวของสปอร์เป็น 2 กลุ่ม เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น **ดังแสดงในตารางที่ 5 และรูปที่ 26 ถึง 28**

ตารางที่ 5 : การจัดแบ่งกลุ่มของสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาเปลี่ยนไปจากสายพันธุ์ตั้งต้นตามการจัดเรียงตัวของสปอร์

การจัดเรียงตัวของสปอร์	กลุ่มของสายพันธุ์
การจัดเรียงตัวของสปอร์แบบที่ 1 (รูปที่ 26) ใน 1 เพนนิซิลลัส(penicillus) ประกอบด้วยสายของสปอร์มากกว่า 4 สาย โดยในแต่ละสายประกอบด้วยสปอร์ต่อกันเป็นสายยาวมาก	**กลุ่มที่ 1 2 3 และ 4**
การจัดเรียงของสปอร์แบบที่ 2 (รูปที่ 27) ใน 1 เพนนิซิลลัส (penicillus) ประกอบด้วยสายของสปอร์มากกว่า 4 สาย โดยในแต่ละสายประกอบด้วยสปอร์ต่อกันเป็นสายยาวแต่สั้นกว่าแบบที่ 1	**กลุ่มที่ 5 และ 6**

ตารางที่ 5 : ต่อ

การจัดเรียงตัวของสปอร์	กลุ่มของสายพันธุ์
การจัดเรียงของสปอร์ของสายพันธุ์ตั้งต้น (รูปที่ 28) ใน 1 เพนนิซิลลัส (penicillus) ประกอบด้วยสายของสปอร์ประมาณ 4 สาย โดยในแต่ละสายประกอบด้วยสปอร์ต่อกัน เป็นสายสั้นกว่าแบบที่ 1 และ 2 โดยมีสปอร์ในแต่ละสายประมาณ 8-15 สปอร์	**สายพันธุ์ตั้นต้น (P. chrysogenum N-151)**

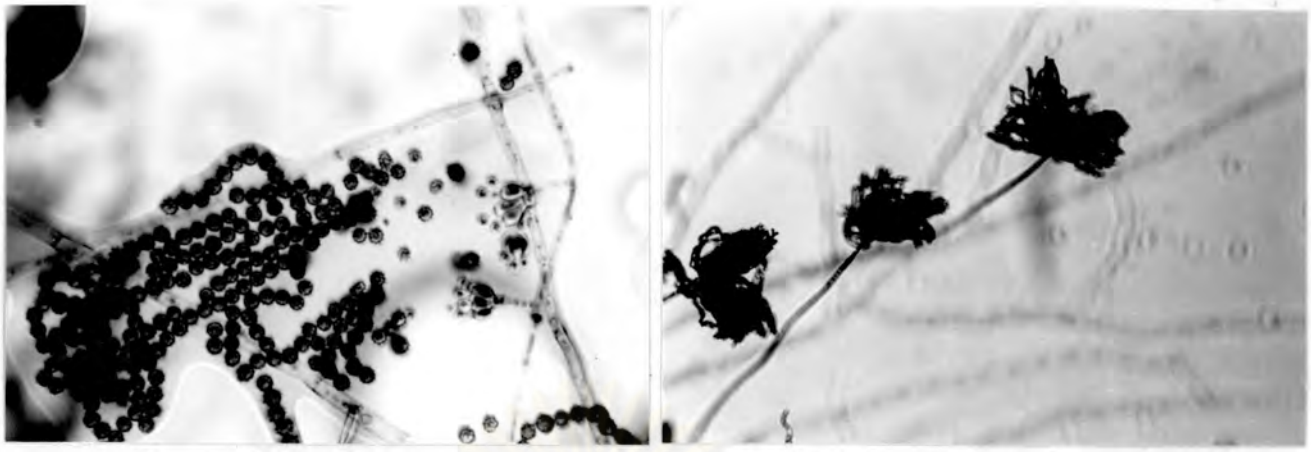


ก ข

รูปที่ 26 : ลักษณะการจัดเรียงตัวของสปอร์สายพันธุ์กลายพันธุ์ที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาเปลี่ยนไปจากสายพันธุ์ตั้งต้นแบบที่ 1

ก บนแผ่นสไลด์ย้อมสีด้วย methylene blue และปิดด้วยกระจกบาง กำลังขยาย 1000 เท่า

ข ลักษณะธรรมชาติ กำลังขยาย 100 เท่า

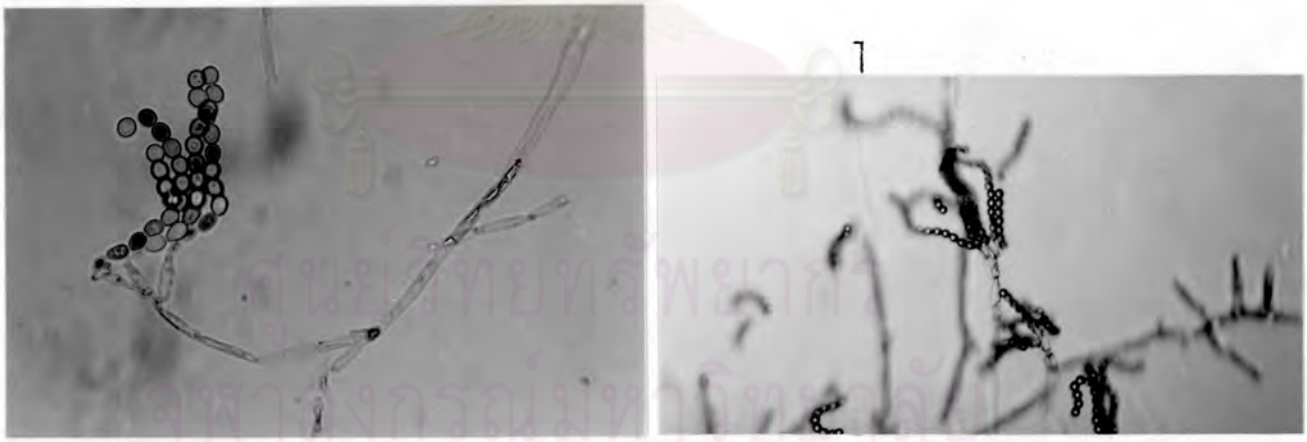


ก ข

รูปที่ 27 : ลักษณะการจัดเรียงตัวของสปอร์สายพันธุ์กลายพันธุ์ที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาเปลี่ยนไปจากสายพันธุ์ตั้งต้นแบบที่ 2

ก บนแผ่นสไลด์ย้อมสีด้วย methylene blue และปิดด้วยกระจกบาง กำลังขยาย 400 เท่า

ข ลักษณะธรรมชาติ กำลังขยาย 100 เท่า



ก ข

รูปที่ 28 : ลักษณะการจัดเรียงตัวของสปอร์สายพันธุ์ตั้งต้น (P. chrysogenum N-151)

ก บนแผ่นสไลด์ย้อมสีด้วย methylene blue และปิดด้วยกระจกบาง กำลังขยาย 400 เท่า

ข ลักษณะธรรมชาติ กำลังขยาย 100 เท่า

เมื่อนำสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาเปลี่ยนไปจากสายพันธุ์ตั้งต้น มาทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตเพนนิซิลลิน จี โดยวัดความกว้างบริเวณยับยั้งบนอาหารวุ้นทดสอบตามวิธีการทดลองในข้อ 4.1 พบว่าสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาเปลี่ยนไปจากสายพันธุ์ตั้งต้นทั้งหมด ให้ความกว้างบริเวณยับยั้งน้อยกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นอย่างเด่นชัด (ดังแสดงในตารางที่ 6) นั่นคือสายพันธุ์ที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาเปลี่ยนไปจะมีประสิทธิภาพในการผลิตเพนนิซิลลิน จี ลดลง

ตารางที่ 6 : ความกว้างบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) ความกว้างโคโลนี (มิลลิเมตร) potency index (ความกว้างบริเวณยับยั้ง/ความกว้างโคโลนี) กลุ่มของสายพันธุ์กลายพันธุ์โดยแยกตามลักษณะของสัณฐานวิทยาที่แตกต่างไปจากสายพันธุ์ตั้งต้น และชื่อของสายพันธุ์กลายพันธุ์ในแต่ละกลุ่ม

กลุ่มของสายพันธุ์กลายพันธุ์	ชื่อของสายพันธุ์กลายพันธุ์	ความกว้างบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ความกว้างโคโลนี (มิลลิเมตร)	ความกว้างบริเวณยับยั้ง/ความกว้างโคโลนี
1	1-N-1*	20	11	1.82
	1-N-2	18	11	1.64
	1-N-3	20	12	1.67
2	2-N-1	22	12	1.83
	2-N-2 *	22	11	2.00
	2-N-3 *	21	11	1.91
	2-N-4 *	21	12	1.75
	2-N-5	22	12	1.83

ตารางที่ 6 : ต่อ

กลุ่มของสายพันธุ์กลายพันธุ์	ชื่อของสายพันธุ์กลายพันธุ์	ความกว้างบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ความกว้างโคโลนี (มิลลิเมตร)	ความกว้างบริเวณยับยั้ง/ความกว้างโคโลนี
	3-N-1 *	**	10.5	-
	3-N-2 *	**	11	-
3	3-N-3	10	11	0.91
	3-N-4	10	11	0.91
	3-N-5	11	10.5	1.05
	4-N-1 *	**	11	-
4	4-N-2	**	10.5	-
	4-N-3	10	10.5	0.95
	5-N-1	22	10.5	2.10
	5-N-2 *	22	10.5	2.10
	5-N-3	22	10	2.20
	5-N-4 *	21	11	1.91
	5-N-5	21	10	2.10
5	5-N-6 *	20	10	2.00
	5-N-7 *	15	10	1.50
	5-N-8	16	10	1.60
	5-N-9	16	10	1.60
	5-N-10	21	11	1.91

ตารางที่ 6 : ต่อ

กลุ่มของสายพันธุ์กลายพันธุ์	ชื่อของสายพันธุ์กลายพันธุ์	ความกว้างบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ความกว้างโคโลนี (มิลลิเมตร)	ความกว้างบริเวณยับยั้ง/ความกว้างโคโลนี
6	6-N-1 *	20	12	1.67
	6-N-2	20	12	1.67
	6-N-3	21	12	1.75
	6-N-4	17	12	1.42
	6-N-5 *	16	12	1.33
	6-N-6	17	12	1.42
	6-N-7 *	22	12	1.83
	6-N-8	18	12	1.50
	6-N-9	17	12	1.42
	6-N-10*	16	12	1.33
	6-N-11	18	12	1.50
	6-N-12	22	12	1.83
	6-N-13	16	12	1.33
	6-N-14	14	12	1.17
	6-N-15	16	12	1.33
สายพันธุ์ควบคุม	N-151 *	30	9	3.33

หมายเหตุ :

* หมายถึงสายพันธุ์กลายพันธุ์ในแต่ละกลุ่มที่ถูกสุ่มเพื่อนำไปหาความสามารถในการสร้างเพนนิซิลลิน จี ในอาหารเหลวระดับขวดเขย่าต่อไป

** หมายถึงความกว้างยับยั้งเห็นขอบเขตไม่ชัดเจน

จากนั้นทำการสุ่มสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาเปลี่ยนไปจากสายพันธุ์ตั้งต้นในแต่ละกลุ่มอย่างอิสระ(random)(**เครื่องหมาย** *) จากตารางที่ 6 มาทดสอบประสิทธิภาพการสร้างเพนนิซิลลิน จี โดยนำสปอร์มาเลี้ยงในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า (**ตามวิธีการทดลองในข้อ** 4.2) และวิเคราะห์ปริมาณเพนนิซิลลิน จี ที่สร้างได้โดยวิธีชีววิทยา (**ตามวิธีการทดลองในข้อ** 4.2.1)เทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น (P. chrysogenum N-151) พบว่าสายพันธุ์ที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาเปลี่ยนไปสร้างเพนนิซิลลิน จี ได้น้อยกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นอย่างเด่นชัด (**ดังแสดงในตารางที่** 7)

ตารางที่ 7 : ความสามารถในการสร้างเพนนิซิลลิน จี ของสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาเปลี่ยนไปเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น

กลุ่มที่	ชื่อสายพันธุ์ที่ทำการสุ่มมาศึกษา	เพนนิซิลลิน จี (ยูนิต/มิลลิลิตร)
1	1-N-1	52
2	2-N-2	110
	2-N-3	85
	2-N-4	67
3	3-N-1	น้อย
	3-N-2	น้อย
4	4-N-1	น้อย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 : ต่อ

กลุ่มที่	ชื่อสายพันธุ์ที่ทำการสุ่มมาศึกษา	เพนนิซิลลิน จี (ยูนิต/มิลลิลิตร)
5	5-N-2	101
	5-N-4	75
	5-N-6	48
	5-N-7	44
6	6-N-1	60
	6-N-5	40
	6-N-7	71
	6-N-10	40
สายพันธุ์ดั้งต้น	N-151	1,594

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.1.2 การศึกษาสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาคงเดิม

ได้เก็บสายพันธุ์ที่มีลักษณะคงเดิมมา 443 สายพันธุ์ เพื่อมาศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตเพนนิซิลลิน จี โดยการวัดความกว้างบริเวณยับยั้งบนอาหารวุ้นทดสอบเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ N-151 ตามวิธีการทดลองในข้อ 6.1 ได้ผล ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 : จำนวนและความถี่ของสายพันธุ์กลายพันธุ์ 443 สายพันธุ์ ที่ให้ความกว้างบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)ขนาดต่างๆ เทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น

ความกว้างบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	จำนวนสายพันธุ์	% ของสายพันธุ์ทั้งหมด	N-151 (สายพันธุ์ตั้งต้น)	
			จำนวน (ซ้ำ)	%ของจำนวนที่ทดสอบ(89)
10	17	3.84	0	0.00
11	5	1.13	0	0.00
12	8	1.81	0	0.00
13	8	1.81	0	0.00
14	6	1.35	0	0.00
15	6	1.35	0	0.00
16	1	0.23	0	0.00
17	10	2.26	0	0.00
18	11	2.48	0	0.00
19	3	0.68	0	0.00
20	31	7.00	0	0.00
21	5	1.13	0	0.00
22	23	5.13	0	0.00
23	21	4.74	0	0.00
24	28	6.32	0	0.00
25	70	15.80	0	0.00

ตารางที่ 8 : ต่อ

ความกว้างบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	จำนวนสายพันธุ์	% ของสายพันธุ์ทั้งหมด	N-151 (สายพันธุ์ตั้งต้น)	
			จำนวน (ซ้ำ)	%ของจำนวนที่ทดสอบ(89)
26	17	3.84	0	0.00
27	27	6.09	1	1.12
28	24	5.42	6	6.74
29	6	1.35	8	8.99
30	65	14.67	53	59.55
31	7	1.58	13	14.61
32	14	3.16	5	5.62
33	12	2.71	2	2.25
34	11	2.48	1	1.12
35	7	1.58	0	0.00
ทั้งหมด	443	100.00	89	100.00

จากตารางที่ 8 จะเห็นว่าประมาณ 60 % ของสายพันธุ์ตั้งต้นให้ความกว้างบริเวณยับยั้งบนอาหารวุ้นทดสอบ 30 มิลลิเมตร โดยพบมีความแปรผันอยู่ในช่วง 27-34 มิลลิเมตร ส่วนสายพันธุ์กลายพันธุ์จะให้ความกว้างบริเวณยับยั้งที่มีความแปรผันสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น โดยพบตั้งแต่ 10-35 มิลลิเมตร สายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ให้ความกว้างบริเวณยับยั้งสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นคือ 35 มิลลิเมตร ซึ่งมีอยู่เพียง 7 สายพันธุ์จาก 443 สายพันธุ์ ควรถูกเก็บไว้เพื่อนำ

ไปคัดเลือกต่อไป แต่เนื่องจากการทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเพนนิซิลลิน จี โดยวิธีนี้มีปัจจัยหลายอย่าง ที่ทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนขึ้นจากการวัดความกว้างบริเวณยับยั้งบนอาหารวุ้นทดสอบเช่น ความลึกหรือค่า pH ของวุ้นอาหารทดสอบ อายุหรือปริมาณของจุลินทรีย์ทดสอบ ความสัมพันธ์ระหว่างการแพร่ของเพนนิซิลลิน จี และอัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทดสอบบนอาหารวุ้นทดสอบ และระยะเวลาในการบ่ม เป็นต้น (93,94)เนื่องจากความคลาดเคลื่อนดังกล่าวจึงเลือกเก็บสายพันธุ์ที่ให้ความกว้างบริเวณยับยั้ง 34-35 มิลลิเมตร ทั้งหมด 18 สายพันธุ์ เพื่อนำไปคัดเลือกต่อไปในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า (ขั้นทุติยภูมิ) **ตามวิธีการทดลองในข้อ 6.2 ได้ผล ดังแสดงในตารางที่ 9**

ตารางที่ 9 : ปริมาณเพนนิซิลลิน จี (ยูนิต/มิลลิลิตร)ในอาหารเหลวระดับขวดเขย่าของสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ขั้นปฐมภูมิ (18 สายพันธุ์) เปรียบเทียบกับความกว้างบริเวณยับยั้งของสายพันธุ์ดังกล่าวบนอาหารวุ้นทดสอบขั้นปฐมภูมิ

	บนอาหารวุ้นทดสอบ *		ในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า	
ชื่อของสายพันธุ์กลายพันธุ์	ความกว้างบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ความกว้างโคโลนี (มิลลิเมตร)	น้ำหนักไมซีเลียมแห้ง (กรัม/ลิตร)	เพนนิซิลลิน จี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
N-4	35	8	17.55	2136
N-10	35	8	21.58	2532
N-29	34	6	20.68	2000
N-31	34	6	25.78	1013
N-137	35	8	16.16	2077
N-261	34	8	14.46	1687
N-264	34	9	21.05	1594
N-266	34	8	19.78	1594
N-294	34	8	21.94	1594

ตารางที่ 9 : ต่อ

ชื่อของสายพันธุ์กลายพันธุ์	บนอาหารวุ้นทดสอบ * ความกว้างบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ความกว้างโคโลนี (มิลลิเมตร)	ในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า น้ำหนักไมซีเลียมแห้ง (กรัม/ลิตร)	เพนนิซิลลิน จี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
N-307	35	8	20.98	2136
N-322	34	9	25.94	1687
N-353	35	8	23.21	2000
N-370	34	6	14.80	1687
N-389	34	8	23.22	807
N-401	35	9	22.15	1609
N-406	34	7	20.39	1013
N-431	34	9	13.80	807
N-432	35	8	15.13	2077
N-151	** 30.11	** 9.25	18.70	1594

* ค่าความกว้างบริเวณยับยั้งและความกว้างโคโลนีบนอาหารวุ้นทดสอบขั้นปฐมภูมิของสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

** ค่าเฉลี่ยความกว้างบริเวณยับยั้งและความกว้างโคโลนีบนอาหารวุ้นทดสอบขั้นปฐมภูมิของสายพันธุ์ตั้งต้น (N-151)

จากตารางที่ 9 พบว่า 77.78 % ของสายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ในขั้นปฐมภูมิ สร้างเพนนิซิลลิน จี ได้มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นเมื่อนำมาทดสอบในอาหารเหลวขั้นทุติยภูมิ และสายพันธุ์ที่สร้างเพนนิซิลลิน จี สูงสุดคือ N-10 ได้คัดเลือกเพื่อเก็บไว้เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากการทำกลายพันธุ์ N-151 ด้วย UV ในข้อต่อไป

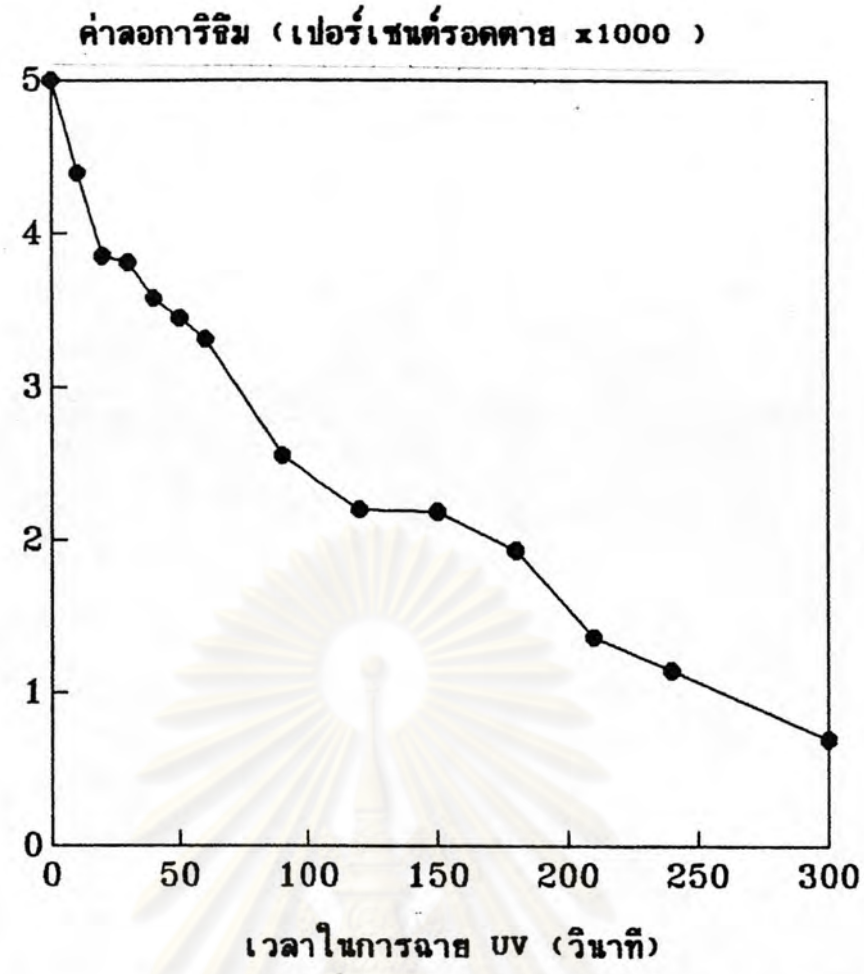
2.2 การทำ P. chrysogenum N-151 ให้กลายพันธุ์ด้วย UV และการคัดเลือกสายพันธุ์

2.2.1 การทำกลายพันธุ์ P. chrysogenum N-151 ด้วย UV

นำสปอร์แขวนลอยของ P. chrysogenum N-151 ปริมาณ 10^7 สปอร์/มิลลิลิตรมาทำกลายพันธุ์ด้วยการฉาย UV ที่เวลาต่าง ๆ กัน ตามวิธีการทดลองในข้อ 5.2 นับจำนวนโคโลนี คำนวนเปอร์เซนต์รอดตายจากการใช้ UV ฉายแสงเป็นเวลาต่างกัน ผลการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 10 และรูปที่ 29

ตารางที่ 10 : ผลการฉายแสงอุลตราไวโอเลตที่เวลาต่าง ๆ ต่อเปอร์เซนต์รอดตายของสปอร์ P. chrysogenum N-151

เวลาที่ฉายด้วย UV (นาที)	จำนวนสปอร์ที่งอก	เปอร์เซนต์ที่รอดตาย (%)	ค่าล็อค (log) ของ (% รอดตาย x 10^3)
0	5.260×10^6	100.000	5.000
10/60	1.296×10^6	24.639	4.392
20/60	3.760×10^5	7.148	3.854
30/60	3.420×10^5	6.502	3.813
40/60	3.020×10^5	5.742	3.579
50/60	1.486×10^5	2.825	3.451
1	1.086×10^5	2.065	3.315
1.5	1.896×10^4	0.361	2.557
2	8.340×10^3	0.159	2.201
2.5	8.080×10^3	0.154	2.188
3	4.500×10^3	0.086	1.935
3.5	1.232×10^3	0.023	1.362
4	7.520×10^2	0.014	1.146
5	2.820×10^2	0.005	0.699



รูปที่ 29 : ความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการฉาย UV และเปอร์เซนต์รอดตาย ของสปอร์ P. chrysogenum N-151

เลือกเก็บสายพันธุ์จากการใช้เวลาในการฉายแสง UV เป็นเวลา 1 นาที ซึ่งมีเปอร์เซนต์รอดตายของสปอร์เท่ากับ 2.07 % จากตารางที่ 10 มาทำการคัดเลือกสายพันธุ์ในขั้นปฐมภูมิต่อไป เหตุที่เก็บสายพันธุ์จากการใช้ UV ที่ใช้เวลาในการฉายแสงเป็น 1 นาที เพราะที่เวลาดังกล่าวจะให้เปอร์เซนต์รอดตายของสปอร์อยู่ในช่วง 1- 5 % ซึ่งเป็นช่วงที่นิยมใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์ P. chrysogenum (87,88)

2.2.2 การคัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์ขั้นปฐมภูมิ

ได้เก็บสายพันธุ์ที่มีลักษณะคงเดิมมา 747 สายพันธุ์ เพื่อมาศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตเพนนิซิลลิน จี โดยการวัดความกว้างบริเวณยับยั้งบนอาหารวุ้นทดสอบเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ N-151 ตามวิธีการทดลองในข้อ 6.1 ได้ผล ดังแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 : จำนวนและความถี่ของสายพันธุ์กลายพันธุ์ 747 สายพันธุ์ ที่ให้ความกว้างบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) ขนาดต่างๆ เทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น

ความกว้างบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	จำนวนสายพันธุ์	% ของสายพันธุ์ทั้งหมด	N-151 (สายพันธุ์ตั้งต้น)	
			จำนวน (ซ้ำ)	%ของจำนวนที่ทดสอบ(89)
10	5	0.67	0	0.00
11	1	0.13	0	0.00
12	1	0.13	0	0.00
13	1	0.13	0	0.00
14	2	0.27	0	0.00
15	7	0.94	0	0.00
16	1	0.13	0	0.00
17	2	0.27	0	0.00
18	6	0.80	0	0.00
19	5	0.67	0	0.00
20	21	2.81	0	0.00
21	5	0.67	0	0.00
22	19	2.54	0	0.00
23	14	1.87	0	0.00
24	26	3.48	0	0.00

ตารางที่ 11 : ต่อ

ความกว้างบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	จำนวนสายพันธุ์	% ของสายพันธุ์ทั้งหมด	N-151 (สายพันธุ์ตั้งต้น)	
			จำนวน (ซ้ำ)	%ของจำนวนที่ทดสอบ(89)
25	115	15.39	0	0.00
26	36	4.82	0	0.00
27	74	9.91	1	1.12
28	78	10.44	6	6.74
29	26	3.48	8	8.99
30	203	27.18	53	59.55
31	31	4.15	13	14.61
32	30	4.02	5	5.62
33	6	0.80	2	2.25
34	20	2.68	1	1.12
35	12	1.61	0	0.00
ทั้งหมด	747	100.00	89	100.00

จากตารางที่ 11 จะเห็นว่าประมาณ 60 % ของสายพันธุ์ตั้งต้น ให้ความกว้างบริเวณยับยั้งบนอาหารวุ้นทดสอบ 30 มิลลิเมตร โดยพบมีความแปรผันอยู่ในช่วง 27 -34 มิลลิเมตร ส่วนสายพันธุ์กลายพันธุ์จะให้ความกว้างบริเวณยับยั้งที่มีความแปรผันสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นโดยพบตั้งแต่ 10 - 35 มิลลิเมตร สายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ให้ความกว้างบริเวณยับยั้งสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นคือ 35 มิลลิเมตรซึ่งมีอยู่เพียง 12 สายพันธุ์ จาก 747 สายพันธุ์ ควรถูกเก็บไว้เพื่อนำไปคัดเลือกต่อไป แต่เนื่องจากการทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเพนนิซิลลิน จึ

โดยวิธีนี้มีปัจจัยหลายอย่าง ที่ทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนขึ้นจากการวัดความกว้างบริเวณยับยั้งบนอาหารวุ้นทดสอบ ดังได้กล่าวไว้แล้วในหน้าที่ 85 จึงเลือกเก็บสายพันธุ์ที่ให้ความกว้างบริเวณยับยั้ง 34-35 มิลลิเมตร ทั้งหมด 32 สายพันธุ์ เพื่อนำไปคัดเลือกในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า (ขั้นทุติยภูมิ) ต่อไป

2.2.3 การคัดเลือกสายพันธุ์ขั้นทุติยภูมิ

นำสายพันธุ์ทั้ง 32 สายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้มาทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตเพนนิซิลลิน จี ในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า ตามวิธีการทดลองในข้อ 6.2 โดยนำมาเปรียบเทียบกับค่าความกว้างบริเวณยับยั้งและความกว้างโคโลนีบนอาหารวุ้นทดสอบในการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิได้ผล ดังแสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 : ปริมาณเพนนิซิลลิน จี (ยูนิต/มิลลิลิตร)ในอาหารเหลวระดับขวดเขย่าของสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ขั้นปฐมภูมิ (32 สายพันธุ์) เปรียบเทียบกับความกว้างบริเวณยับยั้งของสายพันธุ์ดังกล่าวบนอาหารวุ้นทดสอบขั้นปฐมภูมิ

	บนอาหารวุ้นทดสอบ *		ในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า	
ชื่อของสายพันธุ์กลายพันธุ์	ความกว้างบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ความกว้างโคโลนี (มิลลิเมตร)	น้ำหนักไมซีเลียมแห้ง (กรัม/ลิตร)	เพนนิซิลลิน จี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
U-9	34	8	15.96	1609
U-29	34	8	19.25	1423
U-59 *	35	8	23.50	3177

ตารางที่ 12 : ต่อ

ชื่อของสายพันธุ์กลายพันธุ์	บนอาหารวุ้นทดสอบ *		ในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า	
	ความกว้างบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ความกว้างโคโลนี (มิลลิเมตร)	น้ำหนักไมซีเลียมแห้ง (กรัม/ลิตร)	เพนนิซิลลินจี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
U-70	34	8	21.96	1423
U-98	34	6	19.15	1594
U-133	34	6	15.75	1506
U-150	35	8	20.44	2532
U-397	34	8	17.66	1907
U-450	34	7	20.48	1907
U-451	34	8	17.42	1271
U-455	34	7	16.08	1437
U-456	34	7	21.19	1609
U-466	34	8.5	24.14	1594
U-470	34	8	14.84	1423
U-484	34	6	22.93	1357
U-485	35	8	23.20	1609
U-492	35	8	20.58	2019
U-496	35	8	17.42	2261
U-514	35	7.5	16.04	1907
U-559	34	7.5	24.27	1423
U-583	34	7	17.40	1594
U-584	34	7.5	19.78	1271

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 12 : ต่อ

ชื่อของสายพันธุ์กลายพันธุ์	บนอาหารวุ้นทดสอบ *		ในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า	
	ความกว้างบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ความกว้างโคโลนี (มิลลิเมตร)	น้ำหนักไมซีเลียมแห้ง (กรัม/ลิตร)	เพนนิซิลลินจี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
U-585	35	7	21.58	1506
U-587	34	7	19.87	2261
U-610	34	6	23.21	1506
U-630	35	6.5	17.85	1357
U-636	35	6	18.00	1609
U-649	35	7	18.33	2019
U-666	34	7	22.50	1271
U-669	35	6.5	23.34	1437
U-723	34	7.5	19.86	1357
U-727	35	8	19.99	2836
N-151	** 30.11	** 9.25	18.70	1594

* ค่าความกว้างบริเวณยับยั้งและความกว้างโคโลนีบนอาหารวุ้นทดสอบขั้นปฐมภูมิของสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

** ค่าเฉลี่ยความกว้างบริเวณยับยั้งและความกว้างโคโลนีบนอาหารวุ้นทดสอบขั้นปฐมภูมิของสายพันธุ์ตั้งต้น (N-151)

จากตารางที่ 12 พบว่า 78.13 % ของสายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ในขั้นปฐมภูมิ สร้าง

เพนนิซิลลิน จี ได้มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นเมื่อนำมาทดสอบในอาหารเหลวขั้นทุติยภูมิ สายพันธุ์ที่สร้างเพนนิซิลลิน จี สูงสุดคือ U-59 โดยสร้างได้ 3177 ยูนิต/มิลลิลิตร และเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ N-10 ที่เก็บไว้ซึ่งสร้างเพนนิซิลลิน จี ได้ 2532 ยูนิต/มิลลิลิตร จึงนำสายพันธุ์ U-59 มาใช้เป็นสายพันธุ์ตั้งต้นในการทำกลายพันธุ์รอบต่อไป

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

นำน้ำหมักของสายพันธุ์ U-59 จากการคัดเลือกในขั้นทุติยภูมิ ตารางที่ 12 มาวิเคราะห์ปริมาณเพนนิซิลลิน จี ที่สร้างได้ด้วย HPLC ตามวิธีการทดลองข้อ 4.2.2 พบว่าสามารถสร้างเพนนิซิลลิน จี ได้ 0.983 กรัม/ลิตร

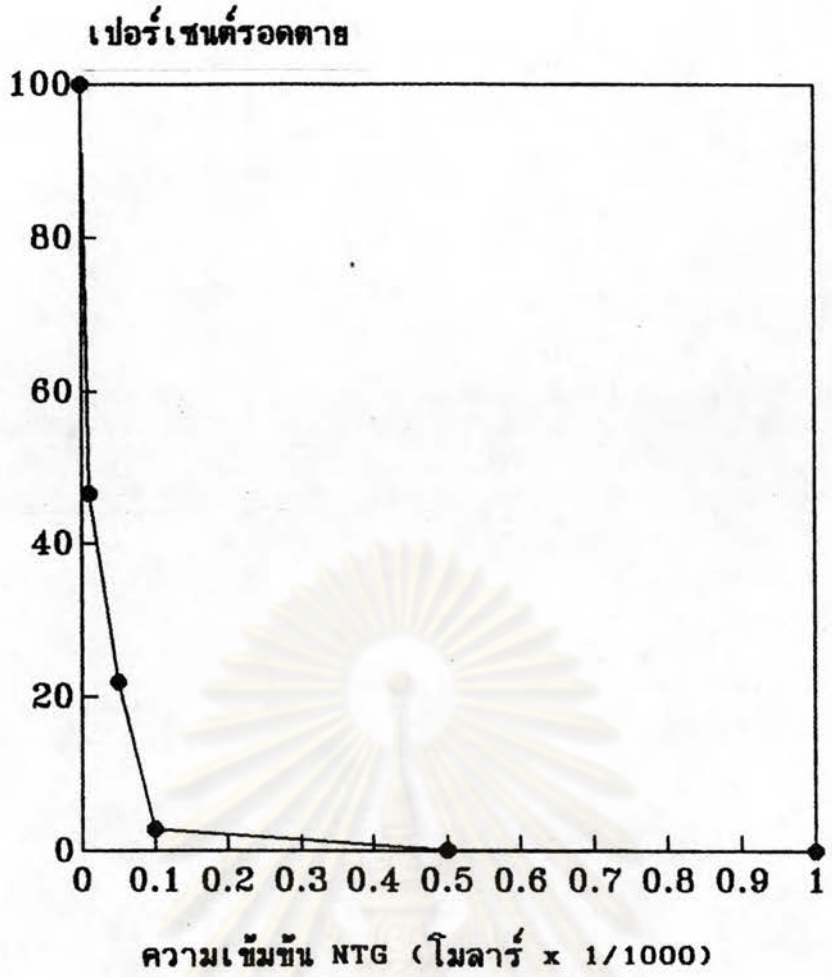
3 การปรับปรุงสายพันธุ์ U-59

3.1 การทำ P. chrysogenum U-59 ให้กลายพันธุ์ด้วย NTG

นำสปอร์แขวนลอยของ P. chrysogenum U-59 ปริมาณ 10^{6} สปอร์/มิลลิลิตร มาเติมสารละลาย NTG ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ตามวิธีการทดลองในข้อ 5.1 นับจำนวนโคโลนี คำนวนเปอร์เซนต์รอดตายที่ความเข้มข้น NTG ต่างๆ ผลการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 13 และรูปที่ 30

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

ความเข้มข้นของ NTG (โมลาร์)	จำนวนสปอร์ที่งอก	เปอร์เซนต์รอดตาย (%)
0	7.640×10^{5}	100.000
1×10^{-6}	3.560×10^{5}	46.597
5×10^{-5}	1.672×10^{5}	21.885
1×10^{-4}	2.128×10^{4}	2.785
5×10^{-4}	7.620×10^{2}	0.100
1×10^{-3}	2.200×10^{1}	0.003



รูปที่ 30 : ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น NTG และเปอร์เซนต์รอดตายของสปอร์ P. chrysogenum U-59

เลือกเก็บสายพันธุ์จากการใช้ NTG ที่ความเข้มข้น $5x10^{-5}$ โมลาร์ ซึ่งให้เปอร์เซนต์รอดตายของสปอร์เท่ากับ 21.855 % โดยอยู่ในช่วง 11-22 % (37) จากตารางที่ 13 มาคัดเลือกสายพันธุ์ในขั้นปฐมภูมิต่อไป

3.2 การคัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์ขั้นปฐมภูมิ

เก็บสายพันธุ์ที่มีลักษณะคงเดิมมา 820 สายพันธุ์ เพื่อมาศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตเพนนิซิลลิน จี โดยการวัดความกว้างบริเวณยับยั้งบนอาหารวุ้นทดสอบเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ U-59 ตามวิธีการทดลองในข้อ 6.1 ได้ผล ดังแสดงในตารางที่ 14

ตารางที่ 14 : จำนวนและความถี่ของสายพันธุ์กลายพันธุ์ 820 สายพันธุ์ ที่ให้ความกว้างบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) ขนาดต่างๆ เทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น

ความกว้างบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	จำนวนสายพันธุ์	% ของสายพันธุ์ทั้งหมด	U-59 (สายพันธุ์ตั้งต้น)	
			จำนวน (ซ้ำ)	%ของจำนวนที่ทดสอบ(60)
20	1	0.12	0	0.00
21	0	0.00	0	0.00
22	3	0.37	0	0.00
23	1	0.12	0	0.00
24	2	0.24	0	0.00
25	6	0.73	0	0.00
26	4	0.49	0	0.00
27	6	0.73	0	0.00
28	14	1.71	0	0.00
29	16	1.95	0	0.00
30	103	12.56	0	0.00
31	64	7.80	0	0.00
32	91	11.10	0	0.00
33	81	9.88	0	0.00
34	84	10.24	1	1.67
35	310	37.80	44	73.33

ตารางที่ 14 : ต่อ

ความกว้างบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	จำนวนสายพันธุ์	% ของสายพันธุ์ทั้งหมด	U-59 (สายพันธุ์ตั้งต้น)	
			จำนวน (ซ้ำ)	%ของจำนวนที่ทดสอบ(60)
36	19	2.32	15	25.00
37	15	1.83	0	0.00
ทั้งหมด	820	100.00	60	100.00

จากตารางที่ 14 จะเห็นว่าประมาณ 73 % ของสายพันธุ์ตั้งต้น ให้ความกว้างบริเวณยับยั้งบนอาหารวุ้นทดสอบ 35 มิลลิเมตร โดยพบมีความแปรผันอยู่ในช่วง 34 - 36 มิลลิเมตร ส่วนสายพันธุ์กลายพันธุ์จะให้ความกว้างบริเวณยับยั้งที่มีความแปรผันสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นโดยพบตั้งแต่ 20 -37 มิลลิเมตร สายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ให้ความกว้างบริเวณยับยั้งสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นคือ 37 มิลลิเมตร ซึ่งมีอยู่เพียง 15 สายพันธุ์ จาก 820 สายพันธุ์ ควรถูกเก็บไว้เพื่อนำไปคัดเลือกต่อไป แต่เนื่องจากการทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเพนนิซิลลิน จี โดยวิธีนี้มีปัจจัยหลายอย่าง ที่ทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนขึ้นจากการวัดความกว้างบริเวณยับยั้งบนอาหารวุ้นทดสอบ ดังได้กล่าวไว้แล้วในหน้าที่ 85 จึงเลือกเก็บสายพันธุ์ที่ให้ความกว้างบริเวณยับยั้ง 36-37 มิลลิเมตร ทั้งหมด 34 สายพันธุ์ เพื่อนำไปคัดเลือกต่อไปในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า (ขั้นทุติยภูมิ)

3.3 การคัดเลือกสายพันธุ์ขั้นทุติยภูมิ

นำสายพันธุ์ทั้ง 34 สายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้มาทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเพนนิซิลลิน จี ในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า ตามวิธีการทดลองในข้อ 6.2 โดยนำมาเปรียบเทียบกับค่าความกว้างบริเวณยับยั้งและความกว้างโคโลนีบนอาหารวุ้นทดสอบในการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ ได้ผล ดังแสดงในตารางที่ 15

ตารางที่ 15 : ปริมาณเพนนิซิลลิน จี (ยูนิต/มิลลิลิตร)ในอาหารเหลวระดับขวดเขย่าของสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ขั้นปฐมภูมิ (34 สายพันธุ์) เปรียบเทียบกับความกว้างบริเวณยับยั้งของสายพันธุ์ดังกล่าวบนอาหารวุ้นทดสอบขั้นปฐมภูมิ

	บนอาหารวุ้นทดสอบ *		ในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า	
ชื่อของสายพันธุ์กลายพันธุ์	ความกว้างบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ความกว้างโคโลนี (มิลลิเมตร)	น้ำหนักไมซีเลียมแห้ง (กรัม/ลิตร)	เพนนิซิลลิน จี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
UN-4	37	10	19.27	3088
UN-7	37	9	18.71	3986
UN-16	37	9	12.68	2836
UN-36	36	10	16.02	2836
UN-75	36	9	12.12	2836
UN-76	36	8	19.56	2836
UN-85	36	8	17.17	3088
UN-98	37	8	12.29	2836
UN-157	37	9	11.69	4464
UN-168	36	10	17.21	2836
UN-169	37	9	14.69	3088

ตารางที่ 15 : ต่อ

ชื่อของสายพันธุ์กลายพันธุ์	บนอาหารวุ้นทดสอบ *		ในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า	
	ความกว้างบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ความกว้างโคโลนี (มิลลิเมตร)	น้ำหนักไมซีเลียมแห้ง (กรัม/ลิตร)	เพนนิซิลลินจี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
UN-173	36	9	17.92	3986
UN-187	36	9	24.13	4464
UN-202	36	10	12.35	3986
UN-216	36	11	18.76	3986
UN-271	37	9	22.49	4724
UN-282	36	10	16.45	3088
UN-307	36	10	12.28	2836
UN-316	37	12	17.32	4724
UN-322	36	11	17.18	3088
UN-331	36	10	22.25	3986
UN-446	36	9.5	24.01	3088
UN-448	36	10	24.54	4464
UN-454	37	8.5	15.57	4464
UN-468	37	10	15.75	3088
UN-475	37	9	11.65	4724
UN-491	37	9	13.89	4724
UN-519	37	9	17.45	5000
UN-538	37	9	19.97	3088
UN-696*	37	10	12.98	5600

ตารางที่ 15 : ต่อ

ชื่อของสายพันธุ์กลายพันธุ์	บนอาหารวุ้นทดสอบ *		ในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า	
	ความกว้างบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ความกว้างโคโลนี (มิลลิเมตร)	น้ำหนักไมซีเลียมแห้ง (กรัม/ลิตร)	เพนนิซิลลิน จี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
UN-720	36	10	22.67	5000
UN-735	36	11	20.17	3986
UN-742	36	9.5	12.88	4724
UN-760	36	11.5	11.38	3088
U-59	** 35.23	** 9.83	19.78	3088

* ค่าความกว้างบริเวณยับยั้งและความกว้างโคโลนีบนอาหารวุ้นทดสอบขั้นปฐมภูมิของสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

** ค่าเฉลี่ยความกว้างบริเวณยับยั้งและความกว้างโคโลนีบนอาหารวุ้นทดสอบขั้นปฐมภูมิของสายพันธุ์ตั้งต้น (U-59)

จากตารางที่ 15 พบว่า 52.94 % ของสายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ในขั้นปฐมภูมิ สร้างเพนนิซิลลิน จี ได้มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นเมื่อนำมาทดสอบในอาหารเหลวขั้นทุติยภูมิ สายพันธุ์ที่สร้างเพนนิซิลลิน จี สูงสุดคือ UN-696 โดยสร้างได้ 5600 ยูนิต/มิลลิลิตร จึงนำสายพันธุ์ดังกล่าวมาใช้เป็นสายพันธุ์ตั้งต้นในการทำกลายพันธุ์รอบต่อไป

3.4 การตรวจสอบปริมาณเพนนิซิลลิน จี ที่สร้างได้ (กรัม/ลิตร) ด้วย HPLC

นำน้ำหมักของสายพันธุ์ UN-696 จากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ ตารางที่ 15 มาวิเคราะห์ปริมาณเพนนิซิลลิน จี ที่สร้างได้ด้วย HPLC ตามวิธีการทดลองข้อ 4.2.2 พบว่าสามารถสร้างเพนนิซิลลิน จี ได้ 1.321 กรัม/ลิตร

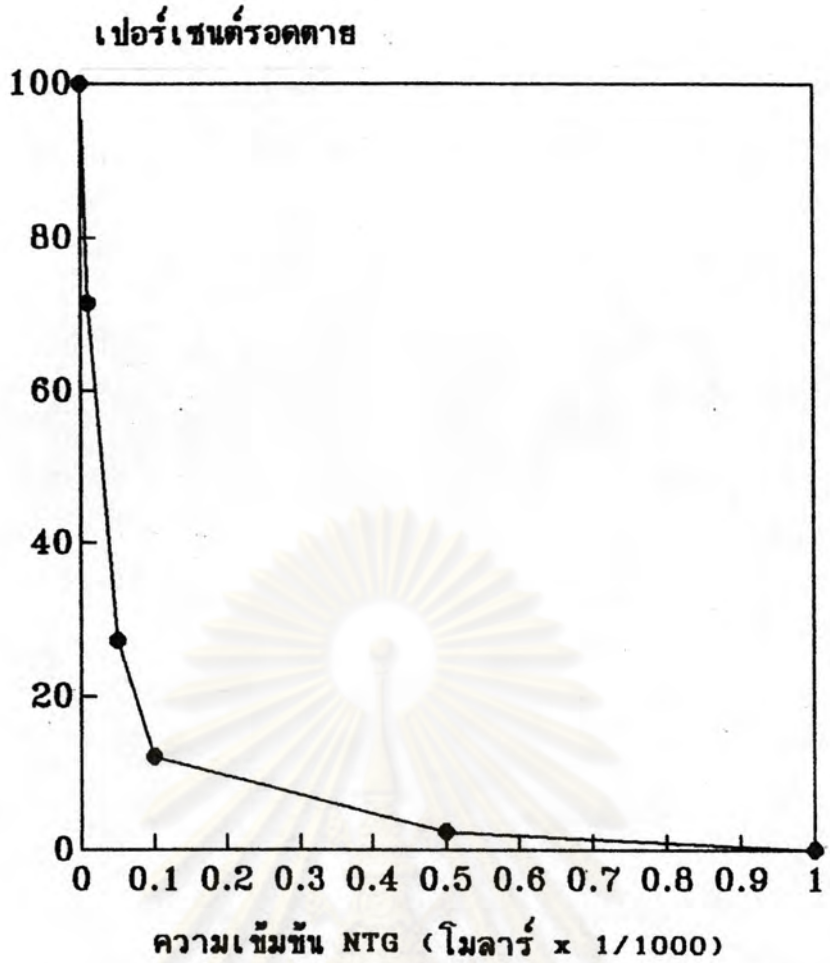
4 การปรับปรุงสายพันธุ์ UN-696

4.1 การทำ P. chrysogenum UN-696 ให้กลายพันธุ์ด้วย NTG

นำสปอร์แขวนลอยของ P. chrysogenum UN-696 ปริมาณ 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร มาเติมสารละลาย NTG ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ตามวิธีการทดลองในข้อ 5.1 นับจำนวนโคโลนี คำนวนเปอร์เซนต์รอดตายที่ความเข้มข้น NTG ต่าง ๆ ผลการทดลองดังแสดงใน ตารางที่ 16 และรูปที่ 31

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

ความเข้มข้นของ NTG (โมลาร์)	จำนวนสปอร์ที่งอก	เปอร์เซนต์รอดตาย (%)
0	6.180×10^5	100.000
1×10^{-5}	4.420×10^5	71.521
5×10^{-5}	1.686×10^5	27.282
1×10^{-4}	7.500×10^4	12.136
5×10^{-4}	1.462×10^4	2.366
1×10^{-3}	5.200×10^1	0.008



รูปที่ 31 : ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น NTG และเปอร์เซนต์รอดตายของสปอร์ P. chrysogenum UN-696

เลือกเก็บสายพันธุ์จากการใช้ NTG ที่ความเข้มข้น $1x10^{-4}$ โมลาร์ ซึ่งทำให้มีเปอร์เซนต์รอดตายของสปอร์เท่ากับ 12.136 % โดยอยู่ในช่วง 11-22 % (37) จากตารางที่ 16 มาคัดเลือกสายพันธุ์ในขั้นปฐมภูมิต่อไป

4.2 การคัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์ขั้นปฐมภูมิ

ได้เก็บสายพันธุ์ที่มีลักษณะคงเดิมมา 1201 สายพันธุ์ เพื่อมาศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตเพนนิซิลลิน จี โดยการวัดความกว้างบริเวณยับยั้งบนอาหารวุ้นทดสอบเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ UN-696 ตามวิธีการทดลองในข้อ 6.1 ได้ผล ดังแสดงในตารางที่ 17

ตารางที่ 17 : จำนวนและความถี่ของสายพันธุ์กลายพันธุ์ 1201 สายพันธุ์ ที่ให้ความกว้างบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) ขนาดต่างๆ เทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น

ความกว้างบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	จำนวนสายพันธุ์	% ของสายพันธุ์ทั้งหมด	UN-696 (สายพันธุ์ตั้งต้น)	
			จำนวน (ซ้ำ)	%ของจำนวนที่ทดสอบ(67)
22	1	0.08	0	0.00
23	0	0.00	0	0.00
24	2	0.17	0	0.00
25	3	0.25	0	0.00
26	2	0.17	0	0.00
27	0	0.00	0	0.00
28	10	0.83	0	0.00
29	0	0.00	0	0.00
30	38	3.16	0	0.00
31	33	2.75	0	0.00
32	68	5.66	1	1.49
33	113	9.41	2	2.99
34	72	6.00	2	2.99
35	239	19.90	6	8.96
36	268	22.31	19	28.36

ตารางที่ 17 : ต่อ

ความกว้างบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	จำนวนสายพันธุ์	% ของสายพันธุ์ทั้งหมด	UN-696 (สายพันธุ์ตั้งต้น)	
			จำนวน (ซ้ำ)	%ของจำนวนที่ทดสอบ(67)
37	317	26.39	34	50.75
38	35	2.91	3	4.48
ทั้งหมด	1201	100.00	67	100.00

จากตารางที่ 17 จะเห็นว่าประมาณ 51% ของสายพันธุ์ตั้งต้น ให้ความกว้างบริเวณยับยั้งบนอาหารวุ้นทดสอบ 37 มิลลิเมตร โดยพบมีความแปรผันในช่วง 32 - 38 มิลลิเมตร ส่วนสายพันธุ์กลายพันธุ์จะให้ความกว้างบริเวณยับยั้งที่มีความแปรผันสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นโดยพบตั้งแต่ 22 - 38 มิลลิเมตร ในการทดลองนี้ไม่พบสายพันธุ์ที่ให้ความกว้างบริเวณยับยั้งมากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น แต่เนื่องจากการทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเพนนิซิลลิน จีโดยวิธีนี้มีปัจจัยหลายอย่าง ที่ทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนขึ้นจากการวัดความกว้างบริเวณยับยั้งบนอาหารวุ้นทดสอบ ดังได้กล่าวไว้แล้วในหน้าที่ 85 จึงเลือกเก็บสายพันธุ์ที่ให้ความกว้างบริเวณยับยั้ง 38 มิลลิเมตร ทั้งหมด 35 สายพันธุ์ เพื่อนำไปคัดเลือกต่อไปในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า (ขั้นทุติยภูมิ)

4.3 การคัดเลือกสายพันธุ์ขั้นทุติยภูมิ

นำสายพันธุ์ทั้ง 35 สายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ มาทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตเพนนิซิลลิน จี ในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า ตามวิธีการทดลองในข้อ 6.2 โดยนำมาเปรียบเทียบกับค่าความกว้างบริเวณยับยั้งและความกว้างโคโลนีบนอาหารวุ้นทดสอบในการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิได้ผล ดังแสดงในตารางที่ 18

ตารางที่ 18 : ปริมาณเพนนิซิลลิน จี (ยูนิต/มิลลิลิตร)ในอาหารเหลวระดับขวดเขย่าของสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ขั้นปฐมภูมิ (35 สายพันธุ์)เปรียบเทียบกับความกว้างบริเวณยับยั้งของสายพันธุ์ดังกล่าวบนอาหารวุ้นทดสอบขั้นปฐมภูมิ

	บนอาหารวุ้นทดสอบ *		ในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า	
ชื่อของสายพันธุ์กลายพันธุ์	ความกว้างบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ความกว้างโคโลนี (มิลลิเมตร)	น้ำหนักไมซีเลียมแห้ง (กรัม/ลิตร)	เพนนิซิลลิน จี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
UNN-12	38	10	22.18	6273
UNN-24	38	10.5	23.35	5600
UNN-106	38	10.5	16.40	6639
UNN-146	38	10.5	19.32	6829
UNN-148	38	11.5	22.13	6273
UNN-151	38	10.5	17.42	6273
UNN-152	38	10	22.45	5000
UNN-158	38	10	21.69	5600
UNN-187	38	10	14.16	6273
UNN-188	38	10	21.23	5600
UNN-195	38	10	19.16	6273
UNN-210	38	9.5	20.03	5000

ตารางที่ 18 : ต่อ

ชื่อของสายพันธุ์กลายพันธุ์	บนอาหารวุ้นทดสอบ * ความกว้างบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ความกว้างโคโลนี (มิลลิเมตร)	ในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า น้ำหนักไมซีเลียมแห้ง (กรัม/ลิตร)	เพนนิซิลลินจี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
UNN-247	38	10	20.97	6273
UNN-380	38	8	25.35	5600
UNN-581	38	11.5	20.69	5000
UNN-582	38	11.5	18.38	6273
UNN-584	38	12	17.16	6273
UNN-588	38	7.5	18.38	6273
UNN-611	38	11.5	25.61	5600
UNN-632	38	8.5	23.25	5600
UNN-635	38	12	15.85	6639
UNN-645*	38	11.5	18.72	7026
UNN-646	38	11.5	22.56	6829
UNN-682	38	11.5	16.64	6273
UNN-686	38	11	25.23	6829
UNN-698	38	11.5	27.26	6639
UNN-773	38	11.5	23.38	6273
UNN-818	38	12	18.25	6273
UNN-973	38	12	16.33	5600
UNN-975	38	11.5	16.38	4464
UNN-1006	38	11	19.74	6273

ตารางที่ 18 : ต่อ

ชื่อของสายพันธุ์กลายพันธุ์	บนอาหารวุ้นทดสอบ * ความกว้างบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ความกว้างโคโลนี (มิลลิเมตร)	ในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า น้ำหนักไมซีเลียมแห้ง (กรัม/ลิตร)	เพนนิซิลลินจี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
UNN-1011	38	12	15.06	5600
UNN-1016	38	11.5	14.55	4464
UNN-1024	38	11.5	22.18	5000
UNN-1115	38	12	18.66	6829
UN-696	** 36.30	**11.69	16.28	5444

* ค่าความกว้างบริเวณยับยั้งและความกว้างโคโลนีบนอาหารวุ้นทดสอบขั้นปฐมภูมิของสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

** ค่าเฉลี่ยความกว้างบริเวณยับยั้งและความกว้างโคโลนีบนอาหารวุ้นทดสอบขั้นปฐมภูมิของสายพันธุ์ตั้งต้น (UN-696)

จากตารางที่ 18 พบว่า 82.86 % ของสายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ในขั้นปฐมภูมิ สร้างเพนนิซิลลิน จี ได้มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นเมื่อนำมาทดสอบในอาหารเหลวขั้นทุติยภูมิ สายพันธุ์ที่สร้างเพนนิซิลลิน จี สูงสุดคือ UNN-645 โดยสร้างได้ 7026 ยูนิต/มิลลิลิตร จึงนำสายพันธุ์ดังกล่าวมาใช้เป็นสายพันธุ์ตั้งต้นในการทำกลายพันธุ์รอบต่อไป

4.4 การตรวจสอบปริมาณเพนนิซิลลิน จี ที่สร้างได้ (กรัม/ลิตร) ด้วย HPLC

นำน้ำหมักของสายพันธุ์ UNN-645 จากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ ตารางที่ 18 มาวิเคราะห์ปริมาณเพนนิซิลลิน จี ที่สร้างได้ด้วย HPLC ตามวิธีการทดลองข้อ 4.2.2 พบว่าสามารถสร้างเพนนิซิลลิน จี ได้ 1.612 กรัม/ลิตร

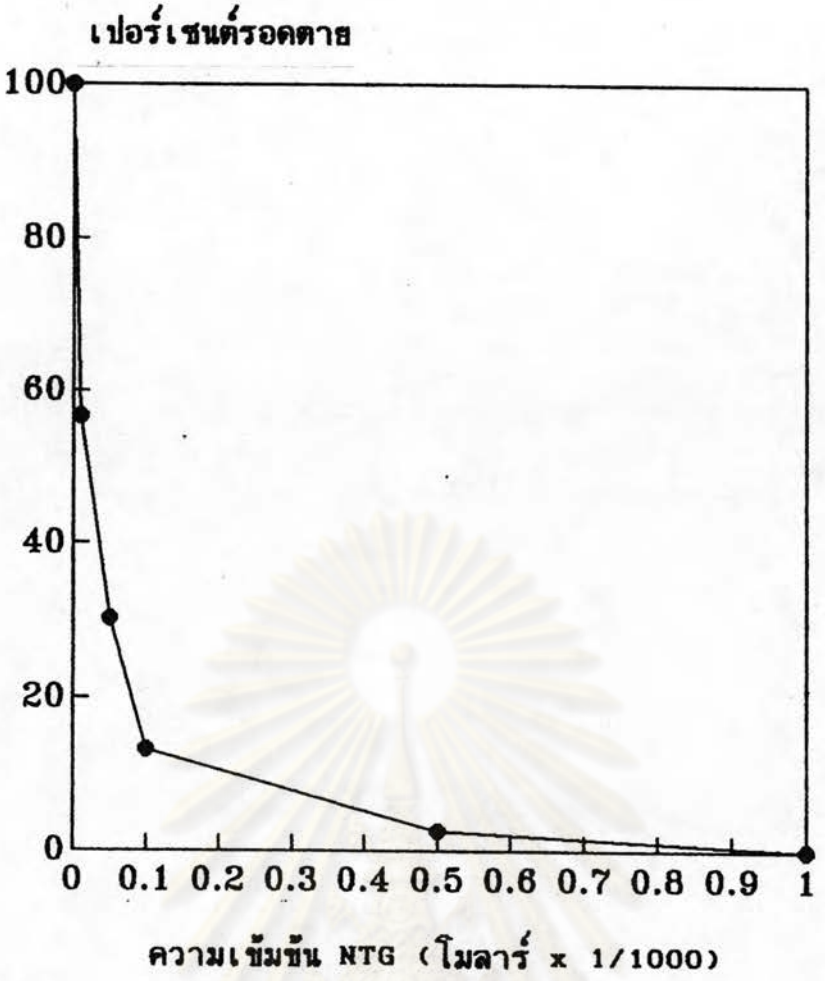
5 การปรับปรุงสายพันธุ์ UNN-645

5.1 การทำ P. chrysogenum UNN-645 ให้กลายพันธุ์ด้วย NTG

นำสปอร์แขวนลอยของ P. chrysogenum UNN-645 ปริมาณ 10^{6} สปอร์/มิลลิลิตร มาเติมสารละลาย NTG ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ตามวิธีการทดลองในข้อ 5.1 นับจำนวนโคโลนี คำนวนเปอร์เซนต์รอดตายที่ความเข้มข้น NTG ต่าง ๆ ผลการทดลองดังแสดงใน ตารางที่ 19 และรูปที่ 32

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

ความเข้มข้นของ NTG (โมลาร์)	จำนวนสปอร์ที่งอก	เปอร์เซนต์รอดตาย (%)
0	3.280×10^{5}	100.000
1×10^{-5}	1.856×10^{5}	56.585
5×10^{-5}	9.920×10^{4}	30.244
1×10^{-4}	4.360×10^{4}	13.293
5×10^{-4}	8.480×10^{3}	2.585
1×10^{-3}	6.400×10^{1}	0.020



รูปที่ 32 : ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น NTG และเปอร์เซนต์รอดตายของสปอร์ P. chrysogenum UNN-645

เลือกเก็บสายพันธุ์จากการใช้ NTG ที่ความเข้มข้น $1x10^{-4}$ โมลาร์ ซึ่งทำให้มีเปอร์เซนต์รอดตายของสปอร์เท่ากับ 13.293 % โดยอยู่ในช่วง 11-22 % (37) จากตารางที่ 19 มาคัดเลือกสายพันธุ์ในขั้นปฐมภูมิต่อไป

5.2 **การคัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์ขั้นปฐมภูมิ**

ได้เก็บสายพันธุ์ที่มีลักษณะคงเดิมมา 862 สายพันธุ์ เพื่อมาศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตเพนนิซิลลิน จี โดยการวัดความกว้างบริเวณยับยั้งบนอาหารวุ้นทดสอบเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ UNN-645 **ตามวิธีการทดลองในข้อ** 6.1 **ได้ผล ดังแสดงในตารางที่** 20

ตารางที่ 20 : จำนวนและความถี่ของสายพันธุ์กลายพันธุ์ 862 สายพันธุ์ ที่ให้ความกว้างบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) ขนาดต่างๆ เทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น

ความกว้างบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	จำนวนสายพันธุ์	% ของสายพันธุ์ทั้งหมด	UNN-645 (สายพันธุ์ตั้งต้น)	
			จำนวน (ซ้ำ)	%ของจำนวนที่ทดสอบ(50)
26	3	0.35	0	0.00
27	4	0.46	0	0.00
28	15	1.74	0	0.00
29	5	0.58	0	0.00
30	14	1.62	0	0.00
31	10	1.16	0	0.00
32	14	1.62	0	0.00
33	29	3.36	0	0.00
34	27	3.13	0	0.00
35	96	11.14	0	0.00
36	118	13.69	2	4.00
37	203	23.55	15	30.00
38	214	24.83	33	66.00
39	51	5.92	0	0.00
40	47	5.45	0	0.00
41	12	1.39	0	0.00
ทั้งหมด	862	100.00	50	100.00

จากตารางที่ 20 จะเห็นว่าประมาณ 66 % ของสายพันธุ์ตั้งต้น ให้ความกว้างบริเวณยับยั้งบนอาหารวุ้นทดสอบ 38 มิลลิเมตร โดยพบมีความแปรผันอยู่ในช่วง 36 - 38 มิลลิเมตร ส่วนสายพันธุ์กลายพันธุ์จะให้ความกว้างบริเวณยับยั้งที่มีความแปรผันสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นโดยพบตั้งแต่ 26 - 41 มิลลิเมตร สายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ให้ความกว้างบริเวณยับยั้งสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นคือ 39-41 มิลลิเมตรซึ่งมีอยู่ 110 สายพันธุ์ จาก 862 สายพันธุ์ ควรถูกเก็บไว้เพื่อนำไปคัดเลือกต่อไป แต่เนื่องจากมีจำนวนถึง 110 สายพันธุ์ซึ่งมีเป็นจำนวนมากที่ต้องนำไปคัดเลือกในระดับขวดเขย่า (ขั้นทุติยภูมิ) จึงเลือกเก็บสายพันธุ์ที่ให้ความกว้างบริเวณยับยั้ง 40-41 มิลลิเมตร ทั้งหมด 59 สายพันธุ์ เพื่อนำไปคัดเลือก

5.3 การคัดเลือกสายพันธุ์ขั้นทุติยภูมิ

นำสายพันธุ์ทั้ง 59 สายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้มาทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตเพนนิซิลลิน จี ในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า ตามวิธีการทดลองในข้อ 6.2 โดยนำมาเปรียบเทียบกับค่าความกว้างบริเวณยับยั้งและความกว้างโคโลนีบนอาหารวุ้นทดสอบในการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ ได้ผล ดังแสดงในตารางที่ 21

ตารางที่ 21 : ปริมาณเพนนิซิลลิน จี (ยูนิต/มิลลิลิตร)ในอาหารเหลวระดับขวดเขย่าของสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ขั้นปฐมภูมิ (59 สายพันธุ์) เปรียบเทียบกับความกว้างบริเวณยับยั้งของสายพันธุ์ดังกล่าวบนอาหารวุ้นทดสอบขั้นปฐมภูมิ

	บนอาหารวุ้นทดสอบ *		ในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า	
ชื่อของสายพันธุ์กลายพันธุ์	ความกว้างบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ความกว้างโคโลนี (มิลลิเมตร)	น้ำหนักไมซีเลียมแห้ง (กรัม/ลิตร)	เพนนิซิลลิน จี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
UNNN-207	40	10	23.25	6004
UNNN-208	41	11	21.76	7532

ตารางที่ 21 : ต่อ

ชื่อของสายพันธุ์กลายพันธุ์	บนอาหารวุ้นทดสอบ *		ในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า	
	ความกว้างบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ความกว้างโคโลนี (มิลลิเมตร)	น้ำหนักไมซีเลียมแห้ง (กรัม/ลิตร)	เพนนิซิลลินจี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
UNNN-209	40	10	25.20	6724
UNNN-210	40	10	21.14	6004
UNNN-216	40	10	23.04	6004
UNNN-234	40	9	21.63	5673
UNNN-241	41	11	23.21	7532
UNNN-291	40	9.5	23.08	5673
UNNN-296	40	9	19.86	6004
UNNN-301	40	8.5	24.56	7117
UNNN-304	40	8.5	20.99	6724
UNNN-305	40	8	23.45	6004
UNNN-307	40	8	23.89	6004
UNNN-324	40	10	19.34	6724
UNNN-338	40	10.5	21.38	5673
UNNN-341	40	10	21.53	6004
UNNN-347	40	10	23.97	5673
UNNN-349	41	10.5	25.75	7532
UNNN-353	40	9.5	21.86	6004
UNNN-354*	41	9.5	22.02	7971
UNNN-357	41	10	22.95	7532

ตารางที่ 21 : ต่อ

	บนอาหารวุ้นทดสอบ *		ในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า	
ชื่อของสายพันธุ์กลายพันธุ์	ความกว้างบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ความกว้างโคโลนี (มิลลิเมตร)	น้ำหนักไมซีเลียมแห้ง (กรัม/ลิตร)	เพนนิซิลลินจี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
UNNN-358	40	11.5	21.96	5673
UNNN-371	40	9	21.07	6724
UNNN-382	41	11.5	22.90	6724
UNNN-384	41	10.5	18.89	7117
UNNN-534	40	11.5	20.14	6004
UNNN-535	41	11	19.26	7117
UNNN-536	40	10.5	25.20	7117
UNNN-537	40	11.5	24.91	6724
UNNN-538	40	11	26.02	6004
UNNN-539	41	11	29.28	7117
UNNN-540	40	11.5	17.32	6004
UNNN-546	40	10.5	17.37	7117
UNNN-547	40	11	27.02	5673
UNNN-550	40	10.5	21.81	6004
UNNN-553	41	11.5	24.32	7117
UNNN-556	40	11.5	25.49	6724
UNNN-557	41	10	16.01	7117

ตารางที่ 21 : ต่อ

ชื่อของสายพันธุ์กลายพันธุ์	บนอาหารวุ้นทดสอบ *		ในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า	
	ความกว้างบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ความกว้างโคโลนี (มิลลิเมตร)	น้ำหนักไมซีเลียมแห้ง (กรัม/ลิตร)	เพนนิซิลลินจี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
UNNN-558	40	9	17.26	4522
UNNN-560	40	11.5	18.10	6004
UNNN-561	41	10.5	19.10	7532
UNNN-566	40	11.5	17.10	6004
UNNN-569	40	11.5	19.10	4522
UNNN-571	40	11.5	23.96	6004
UNNN-572	40	10	28.01	4522
UNNN-574	40	11.5	19.91	6724
UNNN-578	40	11.5	16.87	6004
UNNN-588	40	11.5	25.76	6004
UNNN-592	40	11.5	17.38	6004
UNNN-628	40	11	15.70	6004
UNNN-635	40	11	23.28	6724
UNNN-692	40	11.5	17.21	6004
UNNN-727	40	11.5	17.37	5673
UNNN-741	40	11.5	27.33	6004
UNNN-744	40	11.5	25.83	6004

ตารางที่ 21 : ต่อ

ชื่อของสายพันธุ์กลายพันธุ์	บนอาหารวุ้นทดสอบ * ความกว้างบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ความกว้างโคโลนี (มิลลิเมตร)	ในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า น้ำหนักไมซีเลียมแห้ง (กรัม/ลิตร)	เพนนิซิลลินจี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
UNNN-774	40	11.5	22.81	6004
UNNN-777	40	11.5	24.61	6724
UNNN-861	40	11.5	27.83	6724
UNNN-862	40	11.5	21.33	6004
UNN-645	** 37.62	**10.85	20.41	6724

* ค่าความกว้างบริเวณยับยั้งและความกว้างโคโลนีบนอาหารวุ้นทดสอบขั้นปฐมภูมิของสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

** ค่าเฉลี่ยความกว้างบริเวณยับยั้งและความกว้างโคโลนีบนอาหารวุ้นทดสอบขั้นปฐมภูมิของสายพันธุ์ตั้งต้น (UNN-645)

จากตารางที่ 21 พบว่า 23.73 % ของสายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ในขั้นปฐมภูมิ สร้างเพนนิซิลลิน จี ได้มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นเมื่อนำมาทดสอบในอาหารเหลวขั้นทุติยภูมิ สายพันธุ์ที่สร้างเพนนิซิลลิน จี สูงสุดคือ UNN-354 โดยสร้างได้ 7971 ยูนิต/มิลลิลิตร จึงนำสายพันธุ์ดังกล่าวมาใช้เป็นสายพันธุ์ตั้งต้นในการทำกลายพันธุ์รอบต่อไป

5.4 การตรวจสอบปริมาณเพนนิซิลลิน จี ที่สร้างได้ (กรัม/ลิตร) ด้วย HPLC

นำน้ำหมักของสายพันธุ์ UNNN-354 จากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ ตารางที่ 21 มาวิเคราะห์ปริมาณเพนนิซิลลิน จี ที่สร้างได้ด้วย HPLC ตามวิธีการทดลองข้อ 4.2.2 พบว่าสามารถสร้างเพนนิซิลลิน จี ได้ 2.372 กรัม/ลิตร

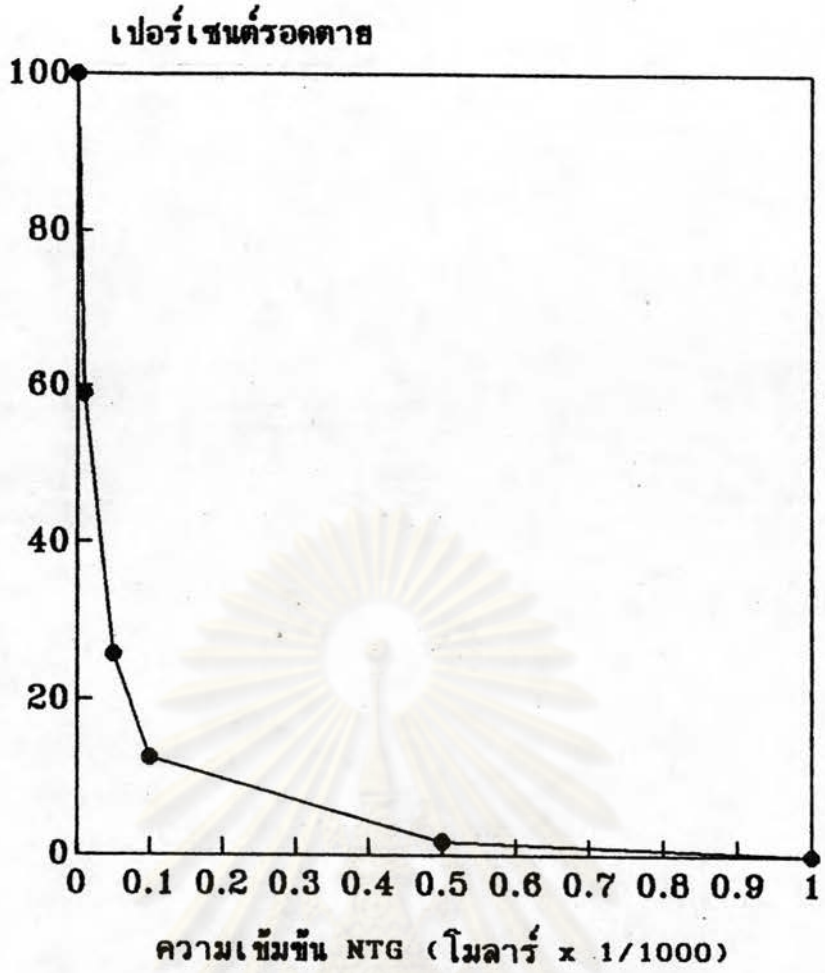
6 การปรับปรุงสายพันธุ์ UNNN-354

6.1 การทำ P. chrysogenum UNNN-354 ให้กลายพันธุ์ด้วย NTG

นำสปอร์แขวนลอยของ P. chrysogenum UNNN-354 ปริมาณ 10^{6} สปอร์/มิลลิลิตร มาเติมสารละลาย NTG ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ตามวิธีการทดลองในข้อ 5.1 นับจำนวนโคโลนี คำนวนเปอร์เซนต์รอดตายที่ความเข้มข้น NTG ต่าง ๆ ผลการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 22 และรูปที่ 33

ตารางที่ 22 : ผลของ NTG ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อเปอร์เซนต์รอดตายของสปอร์ P. chrysogenum UNNN-354

ความเข้มข้นของ NTG (โมลาร์)	จำนวนสปอร์ที่งอก	เปอร์เซนต์รอดตาย (%)
0	4.849×10^{5}	100.00
1×10^{-5}	2.863×10^{5}	59.05
5×10^{-5}	1.247×10^{5}	25.71
1×10^{-4}	6.090×10^{4}	12.56
5×10^{-4}	8.484×10^{3}	1.75
1×10^{-3}	5.200×10^{1}	0.01



รูปที่ 33 : ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น NTG และเปอร์เซนต์รอดตายของสปอร์ P. chrysogenum UNNN-354

เลือกเก็บสายพันธุ์จากการใช้ NTG ที่ความเข้มข้น $1x10^{-4}$ โมลาร์ ซึ่งทำให้มีเปอร์เซนต์รอดตายของสปอร์เท่ากับ 12.56 % โดยอยู่ในช่วง 11-22 % (37) จากตารางที่ 22 มาคัดเลือกสายพันธุ์ในขั้นปฐมภูมิต่อไป

6.2 การคัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์ขั้นปฐมภูมิ

ได้เก็บสายพันธุ์ที่มีลักษณะคงเดิมมา 772 สายพันธุ์ เพื่อมาศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตเพนนิซิลลิน จี โดยการวัดความกว้างบริเวณยับยั้งบนอาหารวุ้นทดสอบเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ UNNN-354 ตามวิธีการทดลองในข้อ 6.1 ได้ผล ดังแสดงในตารางที่ 23

ตารางที่ 23 : จำนวนและความถี่ของสายพันธุ์กลายพันธุ์ 772 สายพันธุ์ ที่ให้ความกว้างบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) ขนาดต่างๆ เทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น

ความกว้างบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	จำนวนสายพันธุ์	% ของสายพันธุ์ทั้งหมด	UNNN-354 (สายพันธุ์ตั้งต้น)	
			จำนวน (ซ้ำ)	%ของจำนวนที่ทดสอบ(45)
27	2	0.26	0	0.00
28	3	0.39	0	0.00
29	9	1.17	0	0.00
30	0	0.00	0	0.00
31	4	0.52	0	0.00
32	12	1.55	0	0.00
33	9	1.17	0	0.00
34	12	1.55	0	0.00
35	22	2.85	0	0.00
36	26	3.37	0	0.00
37	96	12.44	0	0.00
38	46	5.96	0	0.00
39	98	12.69	10	22.22
40	399	51.68	35	77.78
41	7	0.91	0	0.00

ตารางที่ 23 : ต่อ

ความกว้างบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	จำนวนสายพันธุ์	% ของสายพันธุ์ทั้งหมด	UNNN-354 (สายพันธุ์ตั้งต้น)	
			จำนวน (ซ้ำ)	%ของจำนวนที่ทดสอบ(45)
42	18	2.33	0	0.00
43	9	1.17	0	0.00
ทั้งหมด	772	100.00	45	100.00

จากตารางที่ 23 จะเห็นว่าประมาณ 78 % ของสายพันธุ์ตั้งต้น ให้ความกว้างบริเวณยับยั้งบนอาหารวุ้นทดสอบ 40 มิลลิเมตร โดยพบมีความแปรผันอยู่ในช่วง 39 - 40 มิลลิเมตร ส่วนสายพันธุ์กลายพันธุ์จะให้ความกว้างบริเวณยับยั้งที่มีความแปรผันสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นโดยพบตั้งแต่ 26 -44 มิลลิเมตร สายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ให้ความกว้างบริเวณยับยั้งสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นคือ 41-43 มิลลิเมตรซึ่งมีอยู่เพียง 34 สายพันธุ์ จาก 772 สายพันธุ์ ควรถูกเก็บไว้เพื่อนำไปคัดเลือกในขั้นทุติยภูมิต่อไป

6.3 การคัดเลือกสายพันธุ์ขั้นทุติยภูมิ

นำสายพันธุ์ทั้ง 34 สายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้มาทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตเพนนิซิลลิน จี ในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า **ตามวิธีการทดลองในข้อ** 6.2 โดยนำมาเปรียบเทียบกับค่าความกว้างบริเวณยับยั้งและความกว้างโคโลนีบนอาหารวุ้นทดสอบในการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิได้ผล **ดังแสดงในตารางที่** 24

ตารางที่ 24 : ปริมาณเพนนิซิลลิน จี (ยูนิต/มิลลิลิตร)ในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า ของสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ขั้นปฐมภูมิ (34 สายพันธุ์)เปรียบเทียบกับความกว้างบริเวณยับยั้งของสายพันธุ์ดังกล่าวบนอาหารวุ้นทดสอบขั้นปฐมภูมิ

	บนอาหารวุ้นทดสอบ *		ในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า	
ชื่อของสายพันธุ์กลายพันธุ์	ความกว้างบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ความกว้างโคโลนี (มิลลิเมตร)	น้ำหนักไมซีเลียมแห้ง (กรัม/ลิตร)	เพนนิซิลลินจี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
UNNNN-1	42	11.5	15.18	7971
UNNNN-2	42	11.5	23.87	8928
UNNNN-20	41	11.5	15.69	7971
UNNNN-82	42	11.5	23.56	6354
UNNNN-114	42	11.5	13.32	8436
UNNNN-164	42	11.5	15.90	7971
UNNNN-174	41	11	22.87	4522
UNNNN-225	41	10.5	16.70	7971
UNNNN-227	41	11	17.95	7971
UNNNN-229	41	11	25.14	6354
UNNNN-283	42	11.5	25.92	8928
UNNNN-285	42	11.5	20.18	7971
UNNNN-288	42	11.5	21.96	7971
UNNNN-293	43	10.5	15.62	11201

ตารางที่ 24 : ต่อ

ชื่อของสายพันธุ์กลายพันธุ์	บนอาหารวุ้นทดสอบ *		ในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า	
	ความกว้างบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ความกว้างโคโลนี (มิลลิเมตร)	น้ำหนักไมซีเลียมแห้ง (กรัม/ลิตร)	เพนนิซิลลินจี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
UNNNN-294	42	11.5	17.57	8928
UNNNN-296	42	10	21.88	8928
UNNNN-297	42	11.5	24.79	8928
UNNNN-300	43	11.5	13.71	10000
UNNNN-306	43	10.5	21.14	10000
UNNNN-312	42	11.5	14.30	7971
UNNNN-313	43	11	19.98	11201
UNNNN-314	42	11.5	16.97	7971
UNNNN-315	43	11	16.47	10000
UNNNN-316	42	11.5	19.09	8436
UNNNN-327	41	11.5	23.88	6354
UNNNN-336	41	11.5	21.94	8928
UNNNN-456	43	10.5	15.61	10000
UNNNN-482	42	10	23.00	8436
UNNNN-485*	43	9.5	19.06	12545
UNNNN-488	42	10.5	23.45	6354
UNNNN-526	42	8	12.94	7971
UNNNN-582	42	8	17.29	7971

ตารางที่ 24 : ต่อ

ชื่อของสายพันธุ์กลายพันธุ์	บนอาหารวุ้นทดสอบ *		ในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า	
	ความกว้างบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)	ความกว้างโคโลนี (มิลลิเมตร)	น้ำหนักไมซีเลียมแห้ง (กรัม/ลิตร)	เพนนิซิลลิน จี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
UNNNN-587	43	11	14.62	11201
UNNNN-616	43	11	22.12	10000
UNNN-354	** 39.78	**10.82	20.00	7971

* ค่าความกว้างบริเวณยับยั้งและความกว้างโคโลนีบนอาหารวุ้นทดสอบขั้นปฐมภูมิของสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

** ค่าเฉลี่ยความกว้างบริเวณยับยั้งและความกว้างโคโลนีบนอาหารวุ้นทดสอบขั้นปฐมภูมิของสายพันธุ์ตั้งต้น (UNNN-354)

จากตารางที่ 24 พบว่า 52.94 % ของสายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ในขั้นปฐมภูมิ สร้างเพนนิซิลลิน จี ได้มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นเมื่อนำมาทดสอบในอาหารเหลวขั้นทุติยภูมิ สายพันธุ์ที่สร้างเพนนิซิลลิน จี สูงสุดคือ UNNNN-485 โดยสร้างได้ 12,545 ยูนิต/มิลลิลิตร

6.4 การตรวจสอบปริมาณเพนนิซิลลิน จี ที่สร้างได้ (กรัม/ลิตร) ด้วย HPLC

นำน้ำหมักของสายพันธุ์ UNNNN-485 จากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ ตารางที่ 24 มาวิเคราะห์ปริมาณเพนนิซิลลิน จี ที่สร้างได้ด้วย HPLC ตามวิธีการทดลองข้อ 4.2.2 พบว่าสามารถสร้างเพนนิซิลลิน จี ได้ 3.132 กรัม/ลิตร

จากการปรับปรุงสายพันธุ์ P. chrysogenum N-151 โดยการทำกลายพันธุ์และคัดเลือกสายพันธุ์อย่างต่อเนื่อง โดยชักนำให้กลายพันธุ์ด้วยสารก่อการกลายพันธุ์ UV และตามด้วย NTG 4 ขั้น ตลอดจนการใช้วิธีที่มีประสิทธิภาพในการคัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์ในขั้นปฐมภูมิที่ได้ดัดแปลงขึ้น โดยใช้ความกว้างบริเวณยับยั้งบนอาหารวุ้นทดสอบเป็นเกณฑ์ในการคัดเลือก พบว่าความสามารถในการสร้างเพนนิซิลลิน จี ของสายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกว่าดีที่สุดหลังทำกลายพันธุ์ในแต่ละขั้นสูงเพิ่มขึ้นเป็นลำดับ **ดังแสดงในตารางที่ 25**

ตารางที่ 25 : สรุปความสามารถในการสร้างเพนนิซิลลิน จี ของสายพันธุ์เริ่มต้นและสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ได้ในแต่ละขั้นของการทำกลายพันธุ์

ชื่อของสายพันธุ์	ลำดับขั้นของการทำกลายพันธุ์	ความสามารถสร้างเพนนิซิลลิน จี	
		วิเคราะห์โดยวิธีชีววิทยา (ยูนิต/มิลลิลิตร)	วิเคราะห์โดยวิธี HPLC (กรัม/ลิตร)
P. chrysogenum N-151	สายพันธุ์เริ่มต้น	1,594	0.448
P. chrysogenum U-59	ได้จากทำกลายพันธุ์กับ N-151 ด้วย UV	3,177	0.983
P. chrysogenum UN-696	ได้จากทำกลายพันธุ์ U-59 ด้วย NTG	5,600	1.321

ตารางที่ 25 : ต่อ

ชื่อของสายพันธุ์	ลำดับขั้นของการทำกลายพันธุ์	ความสามารถสร้างเพนนิซิลลิน จี	
		วิเคราะห์โดยวิธีชีววิทยา (ยูนิต/มิลลิลิตร)	วิเคราะห์โดยวิธี HPLC (กรัม/ลิตร)
P. chrysogenum UNN-645	ได้จากทำกลายพันธุ์ UN-696 ด้วย NTG	7,026	1.612
P. chrysogenum UNNN-354	ได้จากทำกลายพันธุ์ UNN-645 ด้วย NTG	7,971	2.372
P. chrysogenum UNNNN-485	ได้จากทำกลายพันธุ์ UNNN-354 ด้วย NTG	12,545	3.132

7 การเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของความกว้างบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) หรือโพเทนซี อินเดกซ์ (potency index) บนอาหารวุ้นทดสอบ กับปริมาณเพนนิซิลลิน จี ที่สร้างได้จากสายพันธุ์กลายพันธุ์ต่าง ๆ ในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า

เมื่อนำค่าเฉลี่ยของความกว้างบริเวณยับยั้งและค่าโพเทนซี อินเดกซ์(45-89 ซ้ำ) จากขั้นการคัดเลือกปฐมิภูมิ ของสายพันธุ์ตั้งต้นในการทำกลายพันธุ์แต่ละขั้น (จากตารางที่ 11 14 17 20 และ 23 โดยค่าโพเทนซี อินเดกซ์ ของสายพันธุ์ตั้งต้นในการทำกลายพันธุ์แต่ละขั้น แสดงไว้ในภาคผนวกที่ 4) ได้แก่สายพันธุ์ N-151 U-59 UN-696 UNN-645 และ UNNN-354 มาเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างความกว้างบริเวณยับยั้งบนอาหารวุ้นทดสอบ (ขั้นปฐมภูมิ) ความกว้างบริเวณยับยั้งหารด้วยความกว้างโคโลนี (โพเทนซี อินเดกซ์) บนอาหารวุ้นทดสอบ (ขั้นปฐมภูมิ) และความสามารถในการสร้างเพนนิซิลลิน จี ในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า (ขั้นทุติยภูมิ) เพื่อศึกษาเปรียบเทียบถึงความสัมพันธ์ดังกล่าวในการตัดสินว่าควรใช้ค่าความกว้างบริเวณยับยั้ง หรือค่า โพเทนซี อินเดกซ์ เป็นเกณฑ์การคัดเลือกสายพันธุ์ขั้นปฐมภูมิจากการใช้วิธีคัดเลือกที่ได้ประยุกต์ขึ้น ผลดังแสดงตารางที่ 26

ตารางที่ 26 : เปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างความกว้างบริเวณยับยั้ง ความกว้างบริเวณยับยั้งหารด้วยความกว้างโคโลนี (potency index) และความสามารถในการสร้างเพนนิซิลลิน จี

สายพันธุ์	ความกว้างบริเวณยับยั้ง(มิลลิเมตร)*	ความกว้างบริเวณยับยั้งหารด้วยความกว้างโคโลนี (มิลลิเมตร) * (potency index)	เพนนิซิลลิน จี	
			(ยูนิต/มิลลิลิตร)	กรัม/ลิตร
N-151	30.11	3.26	1594	0.448
U-59	35.23	3.61	3177	0.983
UN-696	36.30	3.11	5600	1.321
UNN-645	37.62	3.48	7026	1.612
UNNN-354	39.78	3.68	7971	2.372

* เป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการคัดเลือกสายพันธุ์ในขั้นปฐมภูมิแต่ละขั้น

จากตารางที่ 26 เมื่อพิจารณาความสามารถในการสร้างเพนนิซิลลิน จี ของสายพันธุ์ N-151 U-59 UN-696 UNN-645 และ UNNN-354 ซึ่งเพิ่มสูงขึ้นตามลำดับเมื่อหมักในอาหารเหลวระดับขวดเขย่าคือ 1594 3177 5600 7026 และ 7971 ยูนิต/มิลลิลิตร โดยการวิเคราะห์ทางชีววิทยา หรือเพิ่มสูงขึ้นตามลำดับจาก 0.448 0.983 1.321 1.612 และ 2.372 กรัม/ลิตร โดยการวิเคราะห์ด้วย HPLC เมื่อนำความสามารถในการสร้างเพนนิซิลลิน จี ในอาหารเหลวมาเปรียบเทียบกับความกว้างบริเวณยับยั้งบนอาหารวุ้นทดสอบ พบว่าความกว้างบริเวณยับยั้งเพิ่มสูงขึ้นตามลำดับจาก 30.11 35.23 36.30 37.62 และ 39.78 มิลลิเมตร โดยมีลักษณะการเพิ่มสูงขึ้นตามลำดับสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นในอาหารเหลว แต่เมื่อพิจารณาจากค่า โพเทน ซี อินเดกซ์ พบว่ามีลักษณะไม่สอดคล้องตาม กล่าวคือจาก 3.26 3.61 3.11 3.48 และ 3.68 จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าค่า โพเทนซี อินเดกซ์ ไม่สัมพันธ์กับปริมาณเพนนิซิลลิน จี ที่สร้างได้จากสายพันธุ์ต่างๆ ในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า ดังนั้นในการคัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์ขั้นปฐมภูมิจากการใช้วิธีการที่ประยุกต์ขึ้นในงานวิจัยนี้ควรพิจารณาจากค่าความกว้างบริเวณยับยั้งที่วัดได้เพียงอย่างเดียว ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้อาศัยความกว้างบริเวณยับยั้งเป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกสายพันธุ์ขั้นปฐมภูมิหลังการทำกลายพันธุ์ทั้ง 5 ขั้น ข้างต้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย