บทที่ 3

ผลการทดลองและสรุป

3.1 การกลายพันธุ์ Penicillium chrysogenum ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต

โดยทั่วไป นิยมใช้แสงอุลตราไวโอเลตเป็นสารชักนำตัวแรกในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ทั้งนี้เพราะเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก และปลอดภัยที่สุดในการใช้งาน แหล่งแสงที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ควรปล่อยพลังงานออกมาในช่วงความยาวคลื่น 253.7 นาโนเมตร ซึ่งเป็นค่าความยาวคลื่นที่ใกล้เคียงกับค่าการดูดกลืนแสงของกรดนิวคลีอิก ทำให้ความยาวคลื่นดังกล่าวเป็นค่าความยาวคลื่นที่มีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ดีที่สุด (34,35,36)

ในการทดลอง ชักนำสปอร์ของเชื้อรา Penicillium chrysogenum ให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต โดยใช้เชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ A 88 เป็นเชื้อราสายพันธุ์ตั้งต้น อายุสปอร์ 7 วัน ทำการทดลองตามวิธีการทดลองข้อ 3.1 หลังจากบ่มเลี้ยงเชื้อในที่มืด ที่อุณหภูมิ 25°ซ. เป็นเวลา 5 วัน นับจำนวนโคโลนีที่เจริญ (สปอร์ที่รอด) คำนวณเปอร์เซนต์รอดได้ดังตารางที่ 2 และกราฟที่ 1

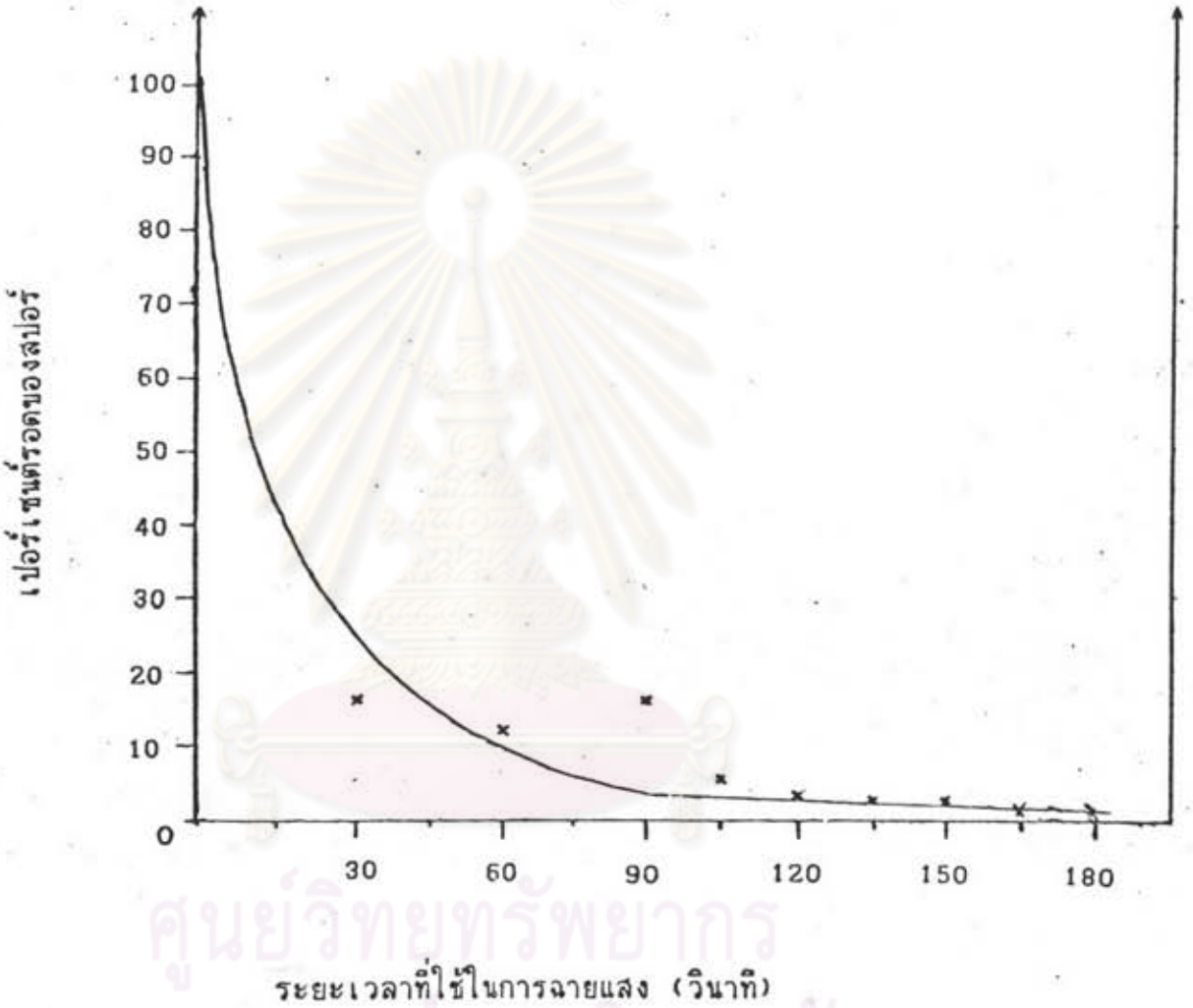
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 จำนวนโคโลนีที่เจริญและเปอร์เซนต์รอดของสปอร์ของเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ A 88 ภายหลังการฉายแสงอุลตราไวโอเลตในช่วงเวลาต่างๆ

เวลาในการฉายแสง (วินาที)	จำนวนสปอร์เริ่มต้นต่อจาน*	จำนวนโคโลนีทั้งหมดที่เจริญ (10 จาน)	จำนวนโคโลนีเฉลี่ยต่อจาน	เปอร์เซนต์รอดของสปอร์
0	148	1480	148.00	100.00
30	148	240	24.00	16.22
60	148	180	18.00	12.16
90	148	238	23.80	16.08
105	148	80	8.00	5.41
120	148	46	4.60	3.11
135	148	38	3.80	2.57
150	148	42	4.20	2.84
165	148	22	2.20	1.49
180	1480**	104	10.4	0.70

* จำนวนสปอร์เริ่มต้นต่อจานได้จากการนับจำนวนโคโลนีที่เจริญ (viable count)

** ที่เวลา 180 วินาที ของการฉายแสง เปอร์เซนต์รอดของสปอร์มีค่าต่ำ จึงต้องเพิ่มจำนวนสปอร์เริ่มต้นต่อจานเลี้ยงเชื้อที่ใช้มากกว่าที่ช่วงเวลาอื่น (ใช้จำนวนสปอร์มากขึ้น 10 เท่า)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กราฟที่ 1 เปอร์เซนต์รอดของเชื้อรา หลังจากชักนำสปอร์ของเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ A 88 ให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยใช้แสงอุลตราไวโอเลตเป็นสารชักนำ

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต จะเก็บคัดเลือกเชื้อที่ได้จากช่วงเปอร์เซนต์รอดระหว่าง 0.01-5.00% โดยเชื่อว่าจะสามารถพบเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่เกิดการกลายพันธุ์ได้มากกว่าที่ช่วงเปอร์เซนต์รอดอื่น (30,33,34,35,36) ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกเก็บเชื้อที่มีเปอร์เซนต์รอดตั้งแต่ 0.01-5.00% เพื่อทำการคัดเลือกต่อไป จากตารางที่ 2 พบว่า ช่วงเวลาการฉายแสงระหว่าง 120-180 วินาที ให้เปอร์เซนต์รอดของสปอร์อยู่ในช่วง 0.01-5.00% จึงเก็บเชื้อราทั้งหมดในช่วงเวลาการฉายแสงระหว่าง 120 ถึง 180 วินาที เพื่อนำมาทดสอบการผลิตเพนิซิลลิน จี ต่อไป

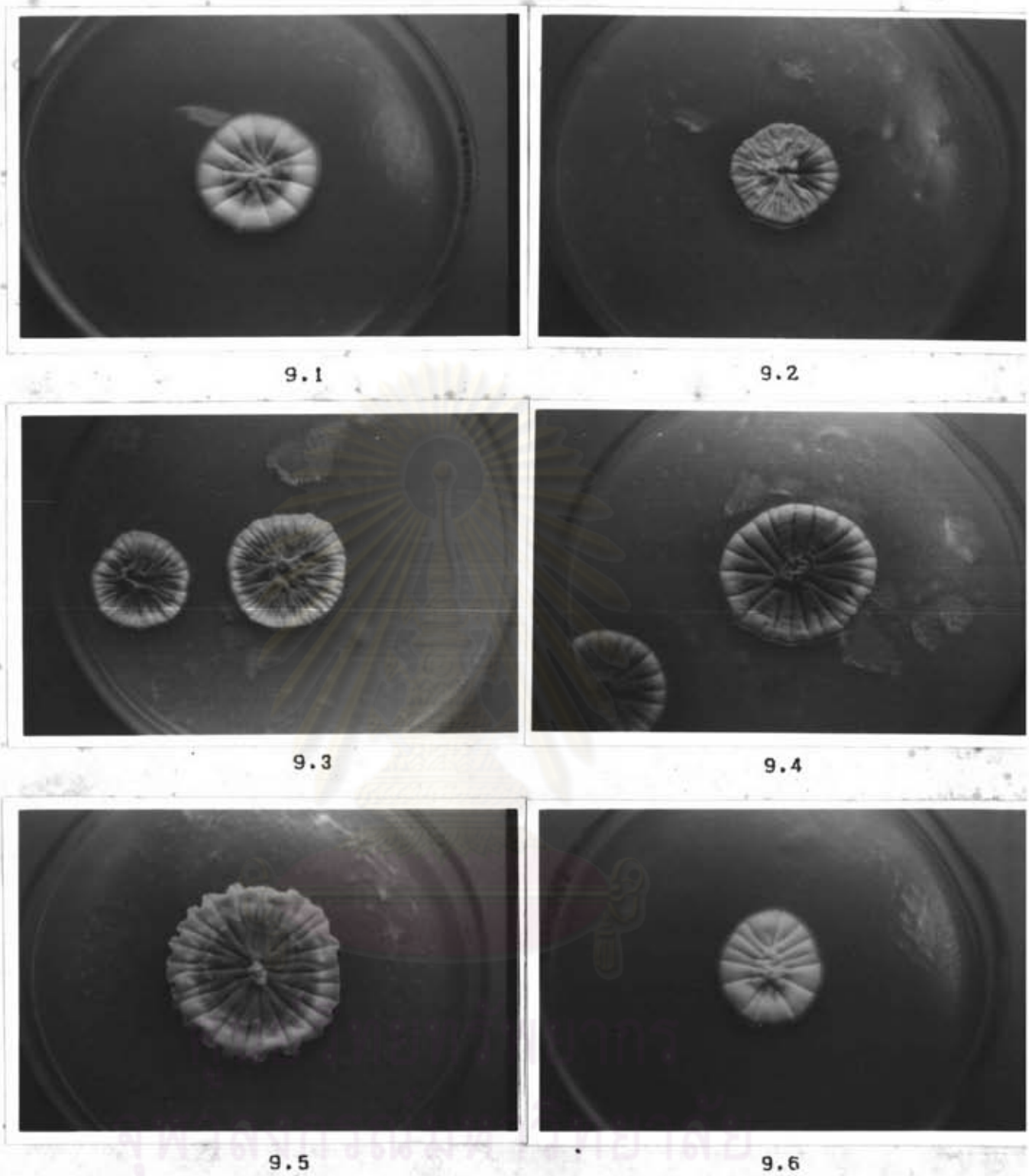
เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ A 88 บนอาหารแข็งโพเตโตเด็กซ์โตรส เชื้อราจะมีลักษณะโคโลนีแบนราบ ขอบหยัก เส้นใยเรียบ ไม่ฟู สปอร์เมื่อแก่มีสีเขียว มีจีบหยักบนโคโลนี และไม่สร้างสี (pigment) ลงในอาหารแข็งที่ใช้เลี้ยง ดังแสดงในภาพที่ 8 จากการเก็บคัดเลือกเชื้อ พบว่า มีเชื้อราบางโคโลนีที่เจริญขึ้นมาแล้วมีลักษณะต่างไปจากเดิม เช่น สร้างสปอร์สีขาว เหลือง เหลืองอ่อน เขียวอ่อน ลักษณะโคโลนีนูนขึ้นจนถึงโค้งแบบครึ่งวงกลม จีบหยักไม่เป็นระเบียบ จีบหยักถี่-ห่างขึ้น ขอบเรียบ ขนาดของโคโลนีต่างไป เป็นต้น ดังแสดงตัวอย่างในภาพที่ 9 โดยแสดงจำนวนและเปอร์เซนต์ของโคโลนีที่มีลักษณะภายนอกแตกต่างไปจากเชื้อราสายพันธุ์ตั้งต้น ดังตารางที่ 3

สำหรับบางโคโลนี ลักษณะที่แตกต่างไปจากเชื้อราสายพันธุ์ตั้งต้น จะมีสภาพไม่คงตัว เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในรุ่นต่อๆ ไป ลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปดังกล่าวจะเปลี่ยนกลับไปมีลักษณะเหมือนสายพันธุ์ตั้งต้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 8 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ A 88 อายุ 7 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



9.1 9.2

9.3 9.4

9.5 9.6

ภาพที่ 9 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ใหม่ที่ลักษณะภายนอกแตกต่างไปจากเชื้อราสายพันธุ์ดั้งต้น โดยเชื้อราสายพันธุ์ใหม่นี้ได้จากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

9.1 เชื้อราสายพันธุ์ดั้งต้น

9.2-9.6 เชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะภายนอกแตกต่างไป

ตารางที่ 3 จำนวน และเปอร์เซ็นต์ของโคโลนีที่ลักษณะภายนอกแตกต่างไปจากเชื้อรา *Penicillium chrysogenum* สายพันธุ์ A 88 ซึ่งเป็นเชื้อราสายพันธุ์ตั้งต้น

เวลาในการฉายแสง (วินาที)	จำนวนโคโลนีทั้งหมดที่เจริญ (ใน 10 จาน)	เปอร์เซนต์รอด	จำนวนโคโลนีที่มีการเปลี่ยนแปลง	เปอร์เซนต์ของโคโลนีที่มีการเปลี่ยนแปลง
0	1482	100.14	0	0.00
30	240	16.22	14	5.83
60	180	12.16	12	6.67
90	238	16.08	24	10.08
105	80	5.41	18	22.50
120	46	3.11	12	26.09
135	38	2.57	10	26.32
150	42	2.84	14	33.33
165	22	1.49	8	36.36
180	104*	0.70	30	28.85

* ที่เวลา 180 วินาที ของการฉายแสง เปอร์เซนต์รอดของสปอร์มีค่าต่ำ จึงต้องเพิ่มจำนวนสปอร์เริ่มต้นต่อจานเลี้ยงเชื้อที่ใช้มากกว่าที่ช่วงเวลาอื่น (ใช้จำนวนสปอร์มากขึ้น 10 เท่า)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 การคัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี สูงขึ้น หลังจากชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต

คัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่ได้หลังจากชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต ตามวิธีการทดลองข้อ 4 จากการคัดเลือกเชื้อราแบบปฐมภูมิ ตามวิธีการทดลองข้อ 4.1 เทียบกับเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ A 88 ซึ่งเป็นเชื้อราสายพันธุ์ตั้งต้น พบว่า เชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ A 88 ให้ความกว้างของบริเวณยับยั้ง 30 มม. เชื้อราสายพันธุ์ใหม่ให้ความกว้างของบริเวณยับยั้งอยู่ในช่วง 25-33 มม. จากตารางที่ 4 เก็บเชื้อราสายพันธุ์ใหม่จำนวน 252 สายพันธุ์ ที่ให้ความกว้างของบริเวณยับยั้งตั้งแต่ 30 มม. ขึ้นมา ตามวิธีการเก็บรักษาเชื้อตามวิธีการทดลองข้อ 2.2.1 และนำมาเพาะเลี้ยงตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.3 เพื่อนำมาคัดเลือกเชื้อราแบบทุติยภูมิ ตามวิธีการทดลองข้อ 4.2.1 และ 4.2.2 ต่อไป สามารถแบ่งจำนวนโคโลนีของเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ตามประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี ดังแสดงในตารางที่ 5

เมื่อวิเคราะห์หาปริมาณเพนิซิลลิน จี โดยวิธีทางชีววิทยา ตามวิธีการทดลองข้อ 4.2.1 เลี้ยงเชื้อราตามวิธีการทดลองข้อ 2.3.3 เก็บตัวอย่างที่ 96 120 และ 144 ชม. ของการเพาะเลี้ยง ตามลำดับ จากผลการทดลอง พบว่า เชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ A 88 มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี ในช่วงเวลา 96 120 และ 144 ชม. ของการเพาะเลี้ยงได้ประมาณ 1,675 1,990 และ 1,990 หน่วยต่อมล. ตามลำดับ เมื่อนำมาวิเคราะห์หาน้ำหนักเพนิซิลลิน จี โดยวิธีไฮเพอร์ฟอแมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี ตามวิธีการทดลองข้อ 4.2.2 พบว่า เชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ A 88 มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี ในช่วงเวลา 96 120 และ 144 ชม. ของการเพาะเลี้ยงได้ 0.90 0.95 และ 0.92 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แสดงโครมาโตแกรมดังภาพที่ 10 ส่วนเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่เก็บคัดเลือกไว้ จากการวิเคราะห์หาปริมาณเพนิซิลลิน จี โดยวิธีทางชีววิทยา และวิธีไฮเพอร์ฟอแมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี ตามวิธีการทดลองข้อ 4.2.1 และ 4.2.2 ตามลำดับ พบว่า 3.17% ของเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกไว้ทั้งหมดมีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี มากกว่าเชื้อราสายพันธุ์ตั้งต้น 78.57% ของเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกไว้ทั้งหมดมีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี เท่ากับเชื้อรา

ตารางที่ 4 จำนวนโคโลนีของเชื้อราสายพันธุ์ใหม่* เมื่อนำมาคัดเลือกแบบปฐมภูมิแล้วให้ความกว้างของบริเวณยับยั้งตั้งแต่ 30 มม. ขึ้นไป

เวลาในการฉายแสง (วินาที)	จำนวนโคโลนีทั้งหมด	จำนวนโคโลนีที่ให้ความกว้างของบริเวณยับยั้ง 30-33 มม.
120	46	33
135	38	34
150	42	30
165	22	16
180	104	80
รวม	252	193

* เชื้อราสายพันธุ์ใหม่ ได้จากการชักนำสปอร์ของเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ A 88 ให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยใช้แสงอุลตราไวโอเลตเป็นสารชักนำ จากการคัดเลือกเชื้อราแบบปฐมภูมิของเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ A 88 ให้ความกว้างของบริเวณยับยั้ง 30 มม.

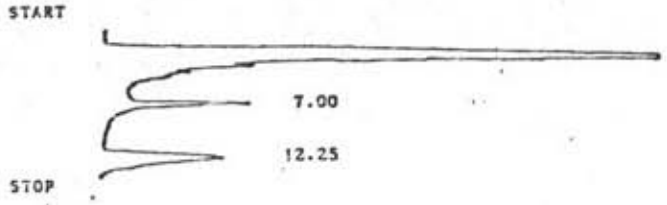
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 จำนวนโคโลนีของเชื้อราสายพันธุ์ใหม่*ที่ให้ความกว้างของบริเวณยับยั้งตั้งแต่ 30 มม. ขึ้นไป โดยแบ่งตามประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี (วิเคราะห์ผลด้วย HPLC)

เวลาในการฉายแสง (วินาที)	จำนวนโคโลนีที่ให้ความกว้างของบริเวณยังยั้ง 30 มม. ขึ้นไป	จำนวนโคโลนีของเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่ผลิตเพนิซิลลิน จี ลดลง	จำนวนโคโลนีของเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่ผลิตเพนิซิลลิน จี เท่าเดิม	จำนวนโคโลนีของเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่ผลิตเพนิซิลลิน จี สูงขึ้น
120	33	0	29	4
135	34	0	33	1
150	30	0	28	2
165	16	0	16	0
180	80	0	79	1
รวม	193	0	185	8

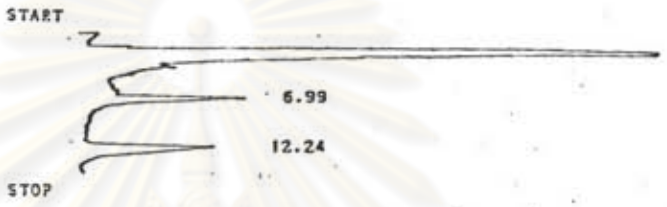
* เชื้อราสายพันธุ์ใหม่ ได้จากการชักนำสปอร์ของเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ A 88 ให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยใช้แสงอุลตราไวโอเลตเป็นสารชักนำ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



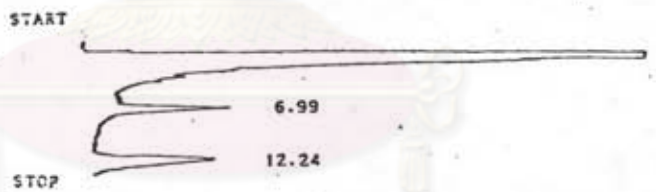
#	NAME	TIME	CONC	MK	AREA
		7.00	35.5701		27515
		12.25	64.4297		49836
	TOTAL		100.0000		77354

ภาพที่ 10.1



#	NAME	TIME	CONC	MK	AREA
		6.99	36.8790		29014
		12.24	63.1208		49659
	TOTAL		99.9999		78673

ภาพที่ 10.2



#	NAME	TIME	CONC	MK	AREA
		6.99	36.1427		28153
		12.24	63.8517		49741
	TOTAL		99.9999		77894

ภาพที่ 10.3

ภาพที่ 10 ลักษณะโครมาโตแกรมของเพนิซิลลิน จี ที่ได้จากการผลิตโดยเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ A 88 เมื่อใช้เพนิซิลลิน วี เป็น สารมาตรฐาน วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

t_R เพนิซิลลิน จี เท่ากับ 6.99-7.00 นาที

t_R เพนิซิลลิน วี เท่ากับ 12.24-12.25 นาที

ภาพที่ 10.1 เพนิซิลลิน จี ที่ชั่วโมงที่ 96 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ A 88

ภาพที่ 10.2 เพนิซิลลิน จี ที่ชั่วโมงที่ 120 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ A 88

ภาพที่ 10.3 เพนิซิลลิน จี ที่ชั่วโมงที่ 144 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ A 88

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 จำนวนและเปอร์เซนต์ของเชื้อราที่เก็บคัดเลือกไว้ หลังจากชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต เมื่อเทียบกับเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ A 88 ซึ่งเป็นเชื้อราสายพันธุ์ดั้งต้น โดยแบ่งตามประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี (วิเคราะห์ผลด้วย HPLC)

เวลาในการฉายแสง (วินาที)	จำนวนโคโลนีทั้งหมดที่คัดเลือกไว้	เชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่ให้ผลผลิตต่ำลง*		เชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่ให้ผลผลิตเท่าเดิม**		เชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่ให้ผลผลิตสูงขึ้น***	
		จำนวนโคโลนีที่ได้	%	จำนวนโคโลนีที่ได้	%	จำนวนโคโลนีที่ได้	%
120	46	10	21.74	32	69.57	4	8.69
135	38	4	10.53	33	86.84	1	3.03
150	42	8	19.05	32	76.19	2	4.76
165	22	4	18.18	18	81.82	0	0.00
180	104****	20	19.23	83	79.81	1	0.96
รวม	252	46	18.25	198	78.57	8	3.17

* เชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่สามารถผลิตเพนิซิลลิน จี ได้ 0.57-0.93 กรัมต่อลิตร

** เชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่สามารถผลิตเพนิซิลลิน จี ได้ 0.95 กรัมต่อลิตร

*** เชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่สามารถผลิตเพนิซิลลิน จี ได้ 1.00-1.19 กรัมต่อลิตร

**** ที่เวลา 180 วินาที ของการฉายแสง เปอร์เซนต์รอดของสปอร์มีค่าต่ำ จึงต้องเพิ่มจำนวนสปอร์เริ่มต้นต่อจานเลี้ยงเชื้อที่ใช้มากกว่าที่ช่วงเวลาอื่น (ใช้จำนวนสปอร์มากขึ้น 10 เท่า)

สายพันธุ์ตั้งต้น และ 18.25% ของเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกไว้ทั้งหมดมีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี น้อยกว่าเชื้อราสายพันธุ์ตั้งต้น ดังแสดงในตารางที่ 6

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพในการการผลิตเพนิซิลลิน จี พบว่า เชื้อราใหม่จำนวน 8 สายพันธุ์ หรือ 3.17% ของเชื้อราที่เก็บไว้ทั้งหมดมีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี ได้มากกว่าเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ A 88 มีลักษณะโคโลนีเหมือนเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ A 88 และมีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี ดังแสดงในตารางที่ 7

จากตารางที่ 7 ซึ่งแสดงประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี ของเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ใหม่จำนวน 8 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ หลังจากชักนำเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ A 88 ให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลตแล้ว พบว่า เชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CU 1-CU 8 มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี ได้สูงสุดอยู่ในช่วง 2,576-2,078 หน่วยต่อมล. หรือ 1.19-1.00 กรัมต่อลิตร เชื้อราจำนวน 8 สายพันธุ์นี้ มี 7 สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี ได้มากกว่า 1.0 กรัมต่อลิตร ขึ้นไป โดยเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CU 1 เป็นสายพันธุ์ที่ได้จากสปอร์ที่รอดหลังจากผ่านการฉายแสงอุลตราไวโอเลตนาน 120 วินาที มีลักษณะโคโลนีเหมือนเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ A 88 ดังแสดงในภาพที่ 11 มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี ได้มากกว่าเชื้อราสายพันธุ์อื่นที่ได้ใหม่ โดยในช่วงเวลา 96 120 และ 144 ชม. ของการเพาะเลี้ยง ผลิตเพนิซิลลิน จี ได้ 2,468 2,576 และ 2,468 หน่วยต่อมล. หรือ 1.15 1.19 และ 1.13 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แสดงโครมาโตแกรมดังภาพที่ 12

จากตารางที่ 6 และ 7 เมื่อฉายแสงอุลตราไวโอเลตกับสปอร์ของเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ A 88 แล้ว พบว่า ที่เวลา 120 วินาที ของการฉายแสง ทำให้เกิดการกลายพันธุ์และได้พบเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี สูงกว่าเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ A 88 ได้มากกว่าที่ช่วงเวลาอื่นของการฉายแสง ดังนั้น เวลาที่ 120 วินาที ของการฉายแสงอุลตราไวโอเลต จึงเป็นเวลาที่เหมาะสมในการชักนำให้สปอร์เชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ A 88 เกิดการกลายพันธุ์

ตารางที่ 7 ประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี ของเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ A 88 ซึ่งเป็นเชื้อราสายพันธุ์ดั้งเดิม และเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี มากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม ซึ่งได้จากการชักนำให้สปอร์ของเชื้อราสายพันธุ์ดั้งเดิมเกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต

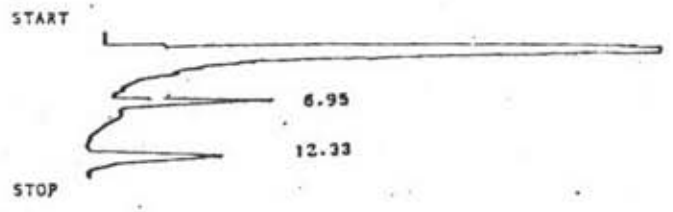
เชื้อราสายพันธุ์	เวลาในการฉายแสง (วินาที)	ความกว้างของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ได้จากการคัดเลือกเชื้อราแบบปฐมภูมิ (มม.)	การคัดเลือกเชื้อราแบบทุติยภูมิ					
			ปริมาณเพนิซิลลิน จี (หน่วยต่อมล.) ชม.ที่			น้ำหนักเพนิซิลลิน จี (กรัมต่อลิตร) ชม.ที่		
			96	120	144	96	120	144
A 88	0	30.0	1675	1990	1990	0.90	0.95	0.92
CU 1*	120	33.0	2468	2576	2468	1.15	1.19	1.13
CU 2*	150	33.0	2468	2468	2468	1.12	1.15	1.13
CU 3*	120	33.5	2364	2468	2468	1.07	1.14	1.11
CU 4*	135	33.0	2364	2364	2364	1.06	1.09	1.07
CU 5*	120	33.0	2169	2364	2169	1.04	1.09	1.05
CU 6*	120	34.0	2169	2169	2169	1.02	1.05	1.04
CU 7*	180	32.5	2078	2169	2078	1.00	1.04	1.01
CU 8	150	33.0	1990	2078	2078	0.98	1.00	0.99

* เชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี สูงสุด ได้มากกว่า 1.0 กรัมต่อลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

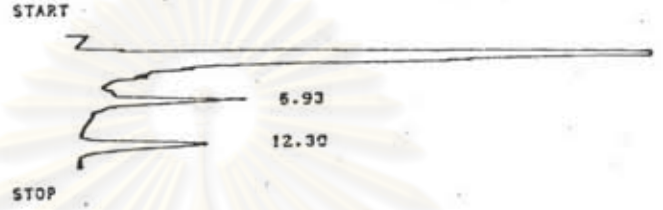
ภาพที่ 11 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CU 1 อายุ 7 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



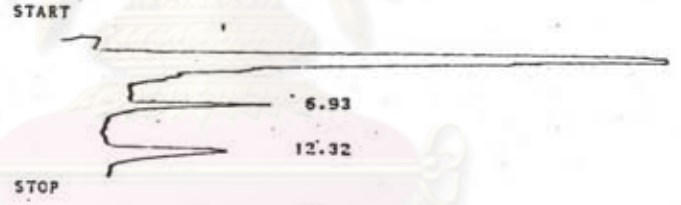
#	NAME	TIME	CONC	MK	AREA
		6.95	40.5406		33912
		12.33	59.4592		49738
	TOTAL		99.9999		83650

ภาพที่ 12.1



#	NAME	TIME	CONC	MK	AREA
		6.93	42.1023		35898
		12.30	57.8974		49365
	TOTAL		99.9999		85263

ภาพที่ 12.2



#	NAME	TIME	CONC	MK	AREA
		6.93	40.9641		35223
		12.32	59.0356		50762
	TOTAL		99.9999		85985

ภาพที่ 12.3

ภาพที่ 12 ลักษณะโครมาโตแกรมของเพนิซิลลิน จี ที่ได้จากการผลิตโดยเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CU 1 เมื่อใช้เพนิซิลลิน วี เป็นสารมาตรฐาน วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

t_R เพนิซิลลิน จี เท่ากับ 6.93-6.95 นาที

t_R เพนิซิลลิน วี เท่ากับ 12.30-12.33 นาที

ภาพที่ 12.1 เพนิซิลลิน จี ที่ชั่วโมงที่ 96 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CU 1

ภาพที่ 12.2 เพนิซิลลิน จี ที่ชั่วโมงที่ 120 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CU 1

ภาพที่ 12.3 เพนิซิลลิน จี ที่ชั่วโมงที่ 144 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CU 1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 การกลายพันธุ์ Penicillium chrysogenum ด้วยสารเคมี NTG

จากการทดลองชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต ตามผลการทดลองที่ 3.1 และ 3.2 พบว่า เชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ใหม่ คือ CU 1-CU 8 มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี ได้สูงกว่าเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ A 88 ซึ่งเป็นเชื้อราสายพันธุ์ตั้งต้น ในการทดลองชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยสารเคมี NTG นี้ เลือกเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CU 1 เป็นเชื้อราสายพันธุ์ตั้งต้น เนื่องจากการคัดเลือกเชื้อราตามผลการทดลองที่ 3.2 พบว่า เชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CU 1 เป็นเชื้อราที่ถูกชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์แล้วมีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี มากขึ้นจากเดิม และให้ผลผลิตสูงกว่าเชื้อราสายพันธุ์อื่นที่คัดเลือกไว้ โดยเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CU 1 มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี ได้สูงสุด 1.19 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 120 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งมากกว่าเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ A 88 0.24 กรัมต่อลิตร หรือผลิตได้ 1.25 เท่า ของสายพันธุ์ A 88

ในการทดลองชักนำสปอร์ของเชื้อรา Penicillium chrysogenum ให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยสารเคมี NTG โดยใช้เชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CU 1 เป็นเชื้อราสายพันธุ์ตั้งต้น อายุสปอร์ 7 วัน ทำการทดลองตามวิธีการทดลองข้อ 3.2 หลังจากบ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25°ซ. เป็นเวลา 5 วัน นับจำนวนโคโลนีที่เจริญ (สปอร์ที่รอด) คำนวณเปอร์เซนต์รอดได้ดังตารางที่ 9 และกราฟที่ 2

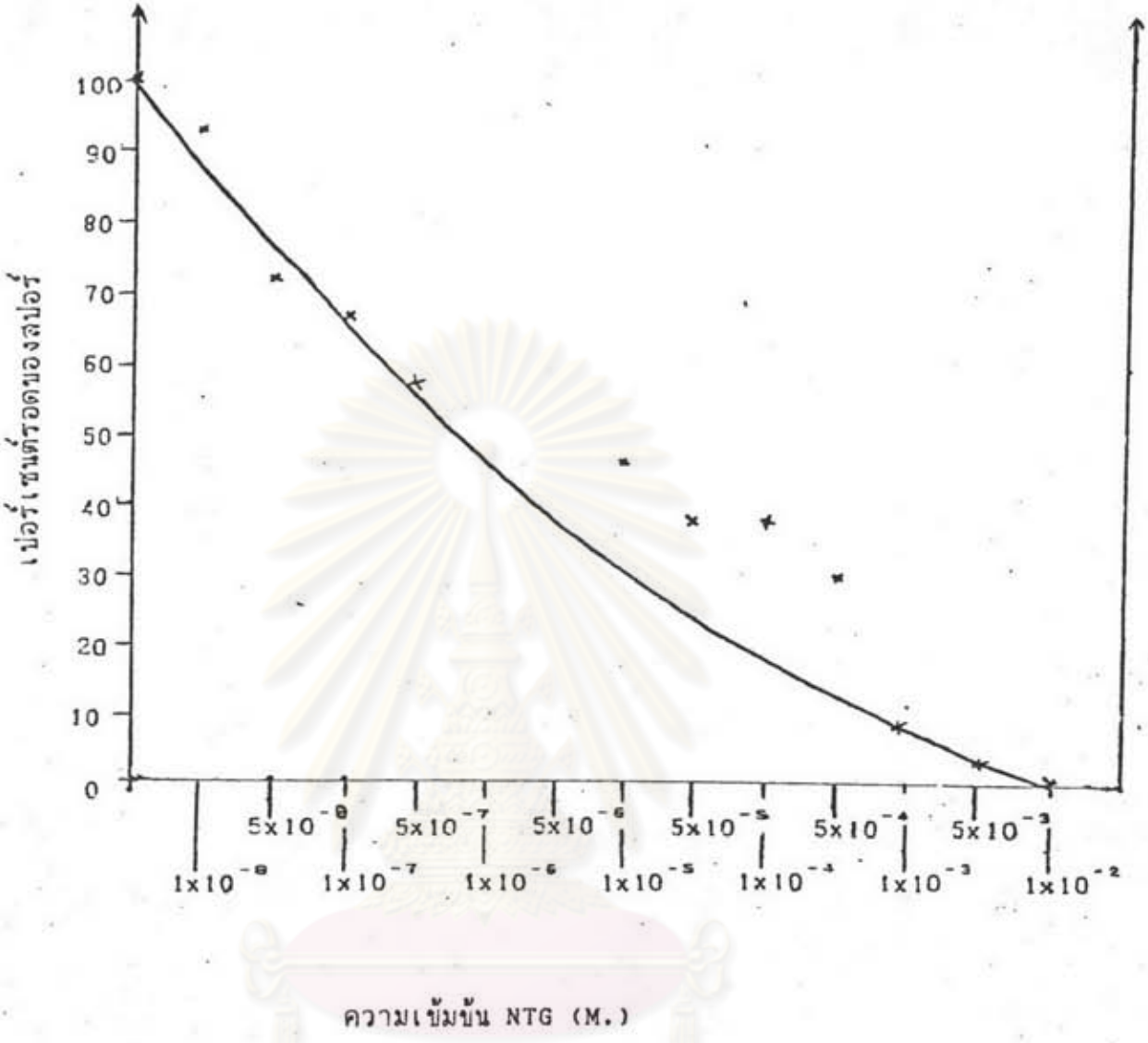
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 จำนวนโคโลนีที่เจริญและเปอร์เซนต์รอดของสปอร์ของเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CU 1 ภายหลังการเติม NTG ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

ความเข้มข้นของ NTG (M.)	จำนวนสปอร์เริ่มต้นต่อจาน*	จำนวนโคโลนีทั้งหมดที่เจริญ (10 จาน)	จำนวนโคโลนีเฉลี่ยต่อจาน	เปอร์เซนต์รอดของสปอร์
0	100	350	35.00	100.00
$1x10^{-8}$	100	324	32.40	92.57
$5x10^{-8}$	100	250	25.00	71.43
$1x10^{-7}$	100	234	23.40	66.86
$5x10^{-7}$	100	212	21.20	60.57
$1x10^{-6}$	100	172	17.20	49.14
$5x10^{-6}$	100	140	14.00	40.00
$1x10^{-5}$	100	160	16.00	45.71
$5x10^{-5}$	100	130	13.00	37.14
$1x10^{-4}$	100	130	13.00	37.14
$5x10^{-4}$	100	104	10.40	29.71
$1x10^{-3}$	1000**	376	37.60	10.74
$5x10^{-3}$	1000**	170	17.00	4.86
$1x10^{-2}$	1000**	22	2.20	0.63

* จำนวนโคโลนีที่ได้มีค่าต่ำ เนื่องจากในการทดลอง สปอร์ต้องผ่านการล้าง 2 ครั้ง เพื่อหยุดปฏิกิริยาของ NTG ก่อนนำมากระจายเพื่อเพาะเลี้ยงในจาน ทำให้มีการสูญเสียสปอร์ไปในระหว่างการล้าง (ถึงแม้ว่า สปอร์ที่ใช้เป็นตัวควบคุม (control) จะไม่ได้เติม NTG ลงไป แต่ทำการทดลองตามวิธีการทดลองข้อ 3.2 ในบทที่ 2 ทุกประการ)

** NTG ที่ความเข้มข้น $1x10^{-3}$-$1x10^{-2}$ โมลาร์ เปอร์เซนต์รอดของสปอร์มีค่าต่ำ จึงต้องเพิ่มจำนวนสปอร์เริ่มต้นต่อจานเลี้ยงเชื้อที่ใช้มากกว่าที่ช่วงเวลาอื่น (ใช้จำนวนสปอร์มากขึ้น 10 เท่า)



กราฟที่ 2 เปอร์เซนต์รอดของเชื้อรา หลังจากชักนำสปอร์ของเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CU 1 ให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยใช้สารเคมี NTG เป็นสารชักนำ

เมื่อใช้ NTG ในสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้เป็นสารชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ พบว่า NTG สามารถทำให้เกิดการกลายพันธุ์กับสปอร์ได้มากที่สภาวะที่ให้เปอร์เซนต์รอดระหว่าง 0-50% (35) จากตารางที่ 8 พบว่า NTG ความเข้มข้น $1x10^{-6}$ โมลาร์ ขึ้นไป ให้เปอร์เซนต์รอดของสปอร์อยู่ในช่วง 0-50% จึงเก็บเชื้อราทั้งหมดในช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ $1x10^{-6}$ ถึง $1x10^{-2}$ โมลาร์ เพื่อนำมาทดสอบการผลิตเพนิซิลลิน จี ต่อไป

เชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CU 1 ยังคงมีลักษณะโคโลนีเหมือนเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ A 88 คือ เมื่อเพาะเลี้ยงลงบนอาหารแข็งโพเตโตเด็กซ์โตรส เชื้อราจะมีลักษณะโคโลนีแบนราบ ขอบหยัก เส้นใยเรียบไม่ฟู สปอร์เมื่อแก่มีสีเขียว มีจีบหยักบนโคโลนี และไม่สร้างสี (pigment) ลงในอาหารแข็งที่ใช้เลี้ยง ส่วนเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่เก็บไว้มีบางโคโลนีที่เจริญขึ้นมาแล้วมีลักษณะต่างไปจากเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CU 1 และสายพันธุ์ A 88 เช่น สร้างสปอร์สีขาว เหลือง เหลืองอ่อน เขียวอ่อน ลักษณะโคโลนีนูนขึ้นจนถึงโค้งแบบครึ่งวงกลม จีบหยักไม่เป็นระเบียบ จีบหยักถี่-ห่างขึ้น ขอบเรียบขนาดของโคโลนีต่างไป เป็นต้น ดังแสดงตัวอย่างตามภาพที่ 9 โดยแสดงจำนวนและเปอร์เซนต์ของโคโลนีที่มีลักษณะภายนอกแตกต่างไปจากเชื้อราสายพันธุ์ตั้งต้น ดังตารางที่ 10

สำหรับบางโคโลนี ลักษณะที่แตกต่างไปจากเชื้อราสายพันธุ์ตั้งต้น จะมีสภาพไม่คงตัว เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในรุ่นต่อๆ ไป ลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปดังกล่าวจะเปลี่ยนกลับไปมีลักษณะเหมือนสายพันธุ์ตั้งต้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 9 จำนวน และเปอร์เซนต์ของโคโลนีที่มีลักษณะภายนอกแตกต่างไปจากเชื้อรา *Penicillium chrysogenum* สายพันธุ์ CU 1 ซึ่งเป็นเชื้อราสายพันธุ์ดั้งต้น

ความเข้มข้น NTG ที่ใช้ (M.)	จำนวนโคโลนีทั้งหมดที่เจริญ (ใน 10 จาน)	เปอร์เซนต์การรอด	จำนวนโคโลนีที่มีการเปลี่ยนแปลง	เปอร์เซนต์ของโคโลนีที่มีการเปลี่ยนแปลง
0	350	100.00	0	0.00
$1x10^{-8}$	324	92.57	2	0.62
$5x10^{-8}$	250	71.43	0	0.00
$1x10^{-7}$	234	66.86	0	0.00
$5x10^{-7}$	212	60.57	6	2.83
$1x10^{-6}$	172	49.14	12	6.98
$5x10^{-6}$	170	40.00	24	17.14
$1x10^{-5}$	160	45.71	26	16.25
$5x10^{-5}$	130	37.14	24	18.46
$1x10^{-4}$	130	37.14	28	29.23
$5x10^{-4}$	104	29.71	60	57.69
$1x10^{-3}$	376*	10.74	194	51.60
$5x10^{-3}$	170*	4.86	150	88.24
$1x10^{-2}$	22*	0.63	14	63.64

* NTG ที่ความเข้มข้น $1x10^{-3}$-$1x10^{-2}$ โมลาร์ เปอร์เซนต์รอดของสปอร์มีค่าต่ำ จึงต้องเพิ่มจำนวนสปอร์เริ่มต้นต่อจานเลี้ยงเชื้อที่ใช้มากกว่าที่ช่วงเวลาอื่น (ใช้จำนวนสปอร์มากขึ้น 10 เท่า)

3.4 การคัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการเพนิซิลลิน จี สูงขึ้น หลังจากชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG

คัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่ได้หลังจากชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยสารเคมี NTG ตามวิธีการทดลองข้อ 4 จากการคัดเลือกเชื้อราแบบปฐมภูมิ ตามวิธีการทดลองข้อ 4.1 เทียบกับเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CU 1 ซึ่งเป็นเชื้อราสายพันธุ์ตั้งต้น พบว่า เชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CU 1 ให้ความกว้างของบริเวณยับยั้ง 33 มม. เชื้อราสายพันธุ์ใหม่ให้ความกว้างของบริเวณยับยั้งอยู่ในช่วง 28-36 มม. จากตารางที่ 10 เก็บเชื้อราสายพันธุ์ใหม่จำนวน 1,404 สายพันธุ์ ที่ให้ความกว้างของบริเวณยับยั้งตั้งแต่ 33 มม. ขึ้นมา ตามวิธีการเก็บรักษาเชื้อตามวิธีการทดลองข้อ 2.2.1 และนำมาเพาะเลี้ยงตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.3 เพื่อนำมาคัดเลือกเชื้อราแบบทุติยภูมิ ตามวิธีการทดลองข้อ 4.2.1 และ 4.2.2 ต่อไป สามารถแบ่งจำนวนโคโลนีของเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ ตามประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี ดังแสดงในตารางที่ 11

เมื่อวิเคราะห์หาปริมาณเพนิซิลลิน จี โดยวิธีทางชีววิทยา ตามวิธีการทดลองข้อ 4.2.1 เลี้ยงเชื้อราตามวิธีการทดลองข้อ 2.3.3 เก็บตัวอย่างที่ 96 120 และ 144 ชม. ของการเพาะเลี้ยง ตามลำดับ จากผลการทดลอง พบว่า เชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CU 1 มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี ในช่วงเวลา 96 120 และ 144 ชม. ของการเพาะเลี้ยงได้ประมาณ 2,468 2,652 และ 2,576 หน่วยต่อมล. ตามลำดับ เมื่อนำมาวิเคราะห์หาน้ำหนักเพนิซิลลิน จี โดยวิธีไฮเพอร์ฟอแมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี ตามวิธีการทดลองข้อ 4.2.2 พบว่า เชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CU 1 มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี ในช่วงเวลา 96 120 และ 144 ชม. ของการเพาะเลี้ยงได้ 1.15 1.19 และ 1.15 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่เก็บคัดเลือกไว้ จากการวิเคราะห์หาปริมาณเพนิซิลลิน จี โดยวิธีทางชีววิทยาและวิธีไฮเพอร์ฟอแมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี ตามวิธีการทดลองข้อ 4.2.1 และ 4.2.2 ตามลำดับ พบว่า 1.99% ของเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกไว้ทั้งหมดมีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี มากกว่าเชื้อราสายพันธุ์ตั้งต้น 76.09% ของเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกไว้ทั้งหมดมีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี เท่ากับเชื้อราสายพันธุ์ตั้งต้น และ 21.94% ของเชื้อราสายพันธุ์

ตารางที่ 10 จำนวนโคโลนีของเชื้อราสายพันธุ์ใหม่* เมื่อนำมาคัดเลือกแบบปฐมภูมิแล้วให้ความกว้างของบริเวณยับยั้งตั้งแต่ 33 มม. ขึ้นไป

ความเข้มข้น NTG (โมลาร์)	จำนวนโคโลนีทั้งหมด	จำนวนโคโลนีที่ให้ความกว้างของบริเวณยับยั้ง 33-36 มม.
$1x10^{-6}$	172	127
$5x10^{-6}$	140	104
$1x10^{-5}$	160	120
$5x10^{-5}$	130	104
$1x10^{-4}$	130	99
$5x10^{-4}$	104	89
$1x10^{-3}$	376	289
$5x10^{-3}$	170	130
$1x10^{-2}$	22	16
รวม	1404	1078

* เชื้อราสายพันธุ์ใหม่ ได้จากการชักนำสปอร์ของเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CU 1 ให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยใช้สารเคมี NTG เป็นสารชักนำ จากการคัดเลือกเชื้อราแบบปฐมภูมิของเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CU 1 ให้ความกว้างของบริเวณยับยั้ง 33 มม.

ตารางที่ 11 จำนวนโคโลนีของเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่ให้ความกว้างของบริเวณยับยั้งตั้งแต่ 33 มม. ขึ้นไป โดยแบ่งตามประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี (วิเคราะห์ผลด้วย HPLC)

ความเข้มข้น NTG (โมลาร์)	จำนวนโคโลนีที่ให้ความกว้างของบริเวณยังยั้ง 33 มม. ขึ้นไป	จำนวนโคโลนีของเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่ผลิตเพนิซิลลิน จี ลดลง	จำนวนโคโลนีของเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่ผลิตเพนิซิลลิน จี เท่าเดิม	จำนวนโคโลนีของเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่ผลิตเพนิซิลลิน จี สูงขึ้น
$1x10^{-6}$	127	0	127	0
$5x10^{-6}$	104	0	102	2
$1x10^{-5}$	120	0	120	0
$5x10^{-5}$	104	0	100	4
$1x10^{-4}$	99	0	95	4
$5x10^{-4}$	89	0	83	6
$1x10^{-3}$	289	0	281	8
$5x10^{-3}$	130	0	126	4
$1x10^{-2}$	16	0	16	0
รวม	1078	0	1050	28

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 12 จำนวนและเปอร์เซนต์ของเชื้อราที่เก็บคัดเลือกไว้ หลังจากชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG เมื่อเทียบกับเชื้อรา Penicillium chrysogumen สายพันธุ์ CU1 ซึ่งเป็นเชื้อราสายพันธุ์ดั้งต้น โดยแบ่งตามประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี (วิเคราะห์ผลด้วย HPLC)

ความเข้มข้น NTG ที่ใช้ (M.)	จำนวนโคโลนีทั้งหมดที่คัดเลือกไว้	เชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่ให้ผลผลิตต่ำลง*		เชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่ให้ผลผลิตเท่าเดิม**		เชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่ให้ผลผลิตสูงขึ้น***	
		จำนวนโคโลนีที่ได้	%	จำนวนโคโลนีที่ได้	%	จำนวนโคโลนีที่ได้	%
$1x10^{-6}$	172	40	23.26	132	76.74	0	0.00
$5x10^{-6}$	140	34	24.29	104	74.29	2	1.42
$1x10^{-5}$	160	40	25.00	120	75.00	0	0.00
$5x10^{-5}$	130	26	20.00	100	76.92	4	3.08
$1x10^{-4}$	130	28	21.54	98	75.38	4	3.08
$5x10^{-4}$	104	14	13.46	84	80.77	6	5.77
$1x10^{-3}$	376****	82	21.81	286	76.06	8	2.13
$5x10^{-3}$	170****	38	22.35	128	75.29	4	2.35
$1x10^{-2}$	22****	6	27.27	16	72.73	0	0.00
รวม	1404	308	21.94	1068	76.09	28	1.99

* เชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่สามารถผลิตเพนิซิลลิน จี ได้ 0.76-1.15 กรัมต่อลิตร

** เชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่สามารถผลิตเพนิซิลลิน จี ได้ 1.19 กรัมต่อลิตร

*** เชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่สามารถผลิตเพนิซิลลิน จี ได้ 1.22-1.79 กรัมต่อลิตร

**** NTG ที่ความเข้มข้น $1x10^{-3}$-$1x10^{-2}$ โมลาร์ เปอร์เซนต์รอดของสปอร์มีค่าต่ำ จึงต้องเพิ่มจำนวนสปอร์เริ่มต้นต่อจานเลี้ยงเชื้อที่ใช้มากกว่าที่ช่วงเวลาอื่น (ใช้จำนวนสปอร์มากขึ้น 10 เท่า)

ใหม่ที่คัดเลือกไว้ทั้งหมดมีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี น้อยกว่าเชื้อราสายพันธุ์ตั้งต้น ดังแสดงในตารางที่ 12

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี พบว่า เชื้อราใหม่จำนวน 28 สายพันธุ์ หรือ 1.99% ของเชื้อราที่เก็บไว้ทั้งหมดมีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี ได้มากกว่าเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CU 1 มีลักษณะโคโลนีเหมือนเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CU 1 และ สายพันธุ์ A 88 มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี ดังแสดงในตารางที่ 13

จากตารางที่ 13 ซึ่งแสดงประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี ของเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ใหม่จำนวน 28 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ หลังจากชักนำเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CU 1 ให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG แล้ว พบว่า เชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CN 1-CN 28 มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี ได้สูงสุดอยู่ในช่วง 3,961-2,576 หน่วยต่อมล. หรือ 1.79-1.22 กรัมต่อลิตร เชื้อราจำนวน 28 สายพันธุ์นี้ มี 12 สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี ได้มากกว่า 1.5 กรัมต่อลิตร ขึ้นไป โดยเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CN 1 เป็นสายพันธุ์ที่ได้จากสปอร์ที่รอดหลังจากเติมสารเคมี NTG เข้มข้น 5×10^{-4} โมลาร์ มีลักษณะโคโลนีเหมือนเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CU 1 และสายพันธุ์ A 88 ดังแสดงในภาพที่ 13 มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี ได้มากกว่าเชื้อราสายพันธุ์อื่นที่คัดเลือกไว้ โดยในช่วงเวลา 96 120 และ 144 ชม. ของการเพาะเลี้ยงผลิตเพนิซิลลิน จี ได้ 3,795 3,961 และ 3,961 หน่วยต่อมล. หรือ 1.76 1.79 และ 1.77 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แสดงโครมาโตแกรมดังภาพที่ 14

จากตารางที่ 12 และ 14 เมื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์กับสปอร์ของเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CU 1 ด้วยสารเคมี NTG พบว่า NTG ที่ความเข้มข้น 5×10^{-4} โมลาร์ ทำให้เกิดการกลายพันธุ์และได้พบเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี สูงกว่าเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CU 1 ได้มากกว่าที่ความเข้มข้นอื่นของ NTG ดังนั้น NTG ที่ความเข้มข้น 5×10^{-4} โมลาร์ จึงเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการชักนำให้สปอร์ของเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CU 1 เกิดการกลายพันธุ์

ตารางที่ 13 ประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี ของเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CU 1 ซึ่งเป็นเชื้อราสายพันธุ์ดั้งต้น และเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี มากกว่าสายพันธุ์ดั้งต้น ซึ่งได้จากการชักนำให้สปอร์ของเชื้อราสายพันธุ์ดั้งต้นเกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG

เชื้อราสายพันธุ์	ความเข้มข้น NTG ที่ใช้ (โมลาร์)	ความกว้างของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ที่ได้จากการคัดเลือกเชื้อราแบบปฐมภูมิ (มม.)	การคัดเลือกเชื้อราแบบทุติยภูมิ					
			ปริมาณเพนิซิลลิน จี (หน่วยต่อลิตร) ชม.ที่			น้ำหนักเพนิซิลลิน จี (กรัมต่อลิตร) ชม.ที่		
			96	120	144	96	120	144
CU 1	0	33.0	2468	2652	2576	1.15	1.19	1.15
CN 1*	5×10^{-4}	36.0	3795	3961	3961	1.76	1.79	1.77
CN 2*	1×10^{-3}	36.0	3961	3961	3795	1.76	1.77	1.75
CN 3*	5×10^{-3}	35.5	3795	3961	3828	1.72	1.77	1.76
CN 4*	1×10^{-3}	36.0	3635	3795	3635	1.69	1.73	1.69
CN 5*	1×10^{-4}	35.0	3635	3635	3635	1.66	1.69	1.67
CN 6*	5×10^{-4}	36.0	3512	3635	3635	1.60	1.68	1.66
CN 7*	5×10^{-5}	35.5	3512	3635	3635	1.60	1.68	1.65
CN 8*	5×10^{-3}	35.5	3512	3512	3335	1.60	1.62	1.60
CN 9*	1×10^{-3}	35.0	3335	3335	3335	1.60	1.60	1.58
CN 10*	5×10^{-4}	36.0	3223	3335	3335	1.57	1.60.	1.58
CN 11*	1×10^{-4}	35.5	3223	3335	3195	1.56	1.60	1.55
CN 12*	5×10^{-4}	35.0	3060	3223	3060	1.48	1.50	1.47

ตารางที่ 13 (ต่อ) ประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี ของเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CU 1 ซึ่งเป็นเชื้อราสายพันธุ์ดั้งต้น และเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการผลผลิตเพนิซิลลิน จี มากกว่าสายพันธุ์ดั้งต้น ซึ่งได้จากการชักนำให้สปอร์ของเชื้อราสายพันธุ์ดั้งต้นเกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG

เชื้อราสายพันธุ์	ความเข้มข้น NTG ที่ใช้ (โมลาร์)	ความกว้างของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ที่ได้จากการคัดเลือกเชื้อราแบบปฐมภูมิ (มม.)	การคัดเลือกเชื้อราแบบทุติยภูมิ					
			ปริมาณเพนิซิลลิน จี (หน่วยต่อลิตร)			น้ำหนักเพนิซิลลิน จี (กรัมต่อลิตร)		
			ชม.ที่			ชม.ที่		
			96	120	144	96	120	144
CN 13	$5x10^{-4}$	35.0	3060	3060	3060	1.46	1.49	1.47
CN 14	$5x10^{-5}$	34.5	2932	3060	3060	1.43	1.49	1.48
CN 15	$5x10^{-4}$	35.0	2932	3060	2932	1.43	1.45	1.42
CN 16	$1x10^{-3}$	35.5	2932	2932	2932	1.41	1.42	1.41
CN 17	$5x10^{-6}$	34.0	2932	2932	2932	1.40	1.42	1.41
CN 18	$1x10^{-3}$	34.5	2906	2906	2808	1.39	1.40	1.38
CN 19	$5x10^{-3}$	35.0	2080	2906	2808	1.35	1.39	1.37
CN 20	$1x10^{-3}$	34.5	2808	2808	2808	1.35	1.37	1.35
CN 21	$5x10^{-5}$	35.0	2808	2808	2713	1.35	1.35	1.33
CN 22	$1x10^{-4}$	34.5	2713	2808	2713	1.33	1.35	1.32
CN 23	$1x10^{-3}$	34.0	2713	2713	2713	1.33	1.34	1.32
CN 24	$5x10^{-3}$	34.5	2713	2713	2621	1.34	1.34	1.31
CN 25	$1x10^{-3}$	34.0	2621	2713	2621	1.31	1.33	1.30

ตารางที่ 13 (ต่อ) ประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี ของเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CU 1 ซึ่งเป็นเชื้อราสายพันธุ์ดั้งต้น และเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี มากกว่าสายพันธุ์ดั้งต้น ซึ่งได้จากการชักนำให้สปอร์ของเชื้อราสายพันธุ์ดั้งต้นเกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG

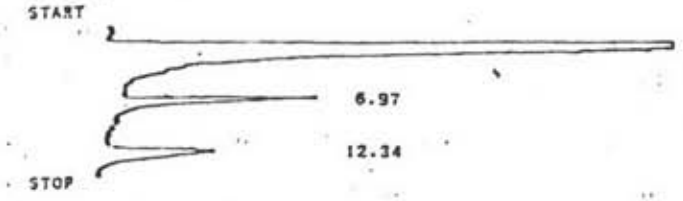
เชื้อรา สายพันธุ์	ความเข้มข้น NTG ที่ใช้ (โมลาร์)	ความกว้างของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ที่ได้จากการคัดเลือกเชื้อราแบบปฐมภูมิ (มม.)	การคัดเลือกเชื้อราแบบทุติยภูมิ					
			ปริมาณเพนิซิลลิน จี (หน่วยต่อลิตร) ชม.ที่			น้ำหนักเพนิซิลลิน จี (กรัมต่อลิตร) ชม.ที่		
			96	120	144	96	120	144
CN 26	$5x10^{-6}$	34.0	2621	2621	2621	1.26	1.30	1.28
CN 27	$5x10^{-5}$	34.0	2621	2621	2576	1.26	1.28	1.21
CN 28	$1x10^{-4}$	34.0	2576	2576	2576	1.18	1.22	1.21

* เชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี สูงสุด ได้มากกว่า 1.5 กรัมต่อลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 13 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CN 1 อายุ 7 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

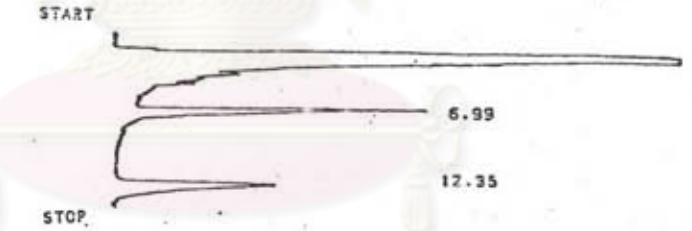


#	NAME	TIME	CONC	MK	AREA
		6.97	50.4768		49992
		12.34	49.5229		49048
	TOTAL		100.0000		99040

ภาพที่ 14.1

#	NAME	TIME	CONC	MK	AREA
		6.97	52.4000		54059
		12.35	47.5999		49107
	TOTAL		99.9999		103165

ภาพที่ 14.2



#	NAME	TIME	CONC	MK	AREA
		6.99	51.8251		52950
		12.35	48.1747		49221
	TOTAL		99.9999		102171

ภาพที่ 14.3

ภาพที่ 14 ลักษณะโครมาโตแกรมของเพนิซิลลิน จี ที่ได้จากการผลิตโดยเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CN 1 เมื่อใช้เพนิซิลลิน วี เป็นสารมาตรฐาน วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

t_R เพนิซิลลิน จี เท่ากับ 6.97-6.99 นาที

t_R เพนิซิลลิน วี เท่ากับ 12.34-12.35 นาที

ภาพที่ 14.1 เพนิซิลลิน จี ที่ชั่วโมงที่ 96 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CN 1

ภาพที่ 14.2 เพนิซิลลิน จี ที่ชั่วโมงที่ 120 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CN 1

ภาพที่ 14.3 เพนิซิลลิน จี ที่ชั่วโมงที่ 144 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CN 1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.5 การกลายพันธุ์ Penicillium chrysogenum ซ้ำด้วยสารเคมี NTG

จากการทดลองชักนำเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CU 1 ให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ตามผลการทดลองที่ 3.3 และ 3.4 พบว่าเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CN 1-CN 28 มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี ได้มากกว่าเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CU 1 ซึ่งเป็นเชื้อราสายพันธุ์ตั้งต้น ในการทดลองชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยสารเคมี NTG นี้ เลือกเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CN 1 เป็นเชื้อราสายพันธุ์ตั้งต้น เนื่องจากการคัดเลือกเชื้อราตามผลการทดลองที่ 3.4 พบว่า เชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CN 1 เป็นเชื้อราที่ถูกชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์แล้วมีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี เพิ่มขึ้นจากเดิม และมีประสิทธิภาพในการผลิตสูงกว่าเชื้อราสายพันธุ์อื่นที่คัดเลือกไว้ โดยเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CN 1 มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี ได้สูงสุด 1.79 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 120 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งมากกว่าเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CU 1 0.60 กรัมต่อลิตร หรือผลิตได้ 1.50 เท่า ของสายพันธุ์ CU 1 และมากกว่าเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ A 88 0.84 กรัมต่อลิตร หรือผลิตได้ 1.88 เท่า ของสายพันธุ์ A 88

ในการทดลองชักนำสปอร์ของเชื้อรา Penicillium chrysogenum ให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยสารเคมี NTG โดยใช้เชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CN 1 เป็นเชื้อราสายพันธุ์ตั้งต้น อายุสปอร์ 7 วัน ทำการทดลองตามวิธีการทดลองข้อ 3.2 หลังจากบ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25°ซ. เป็นเวลา 5 วัน นับจำนวนโคโลนีที่เจริญ (สปอร์ที่รอด) คำนวณเปอร์เซนต์รอดได้ดังตารางที่ 14 และกราฟที่ 3

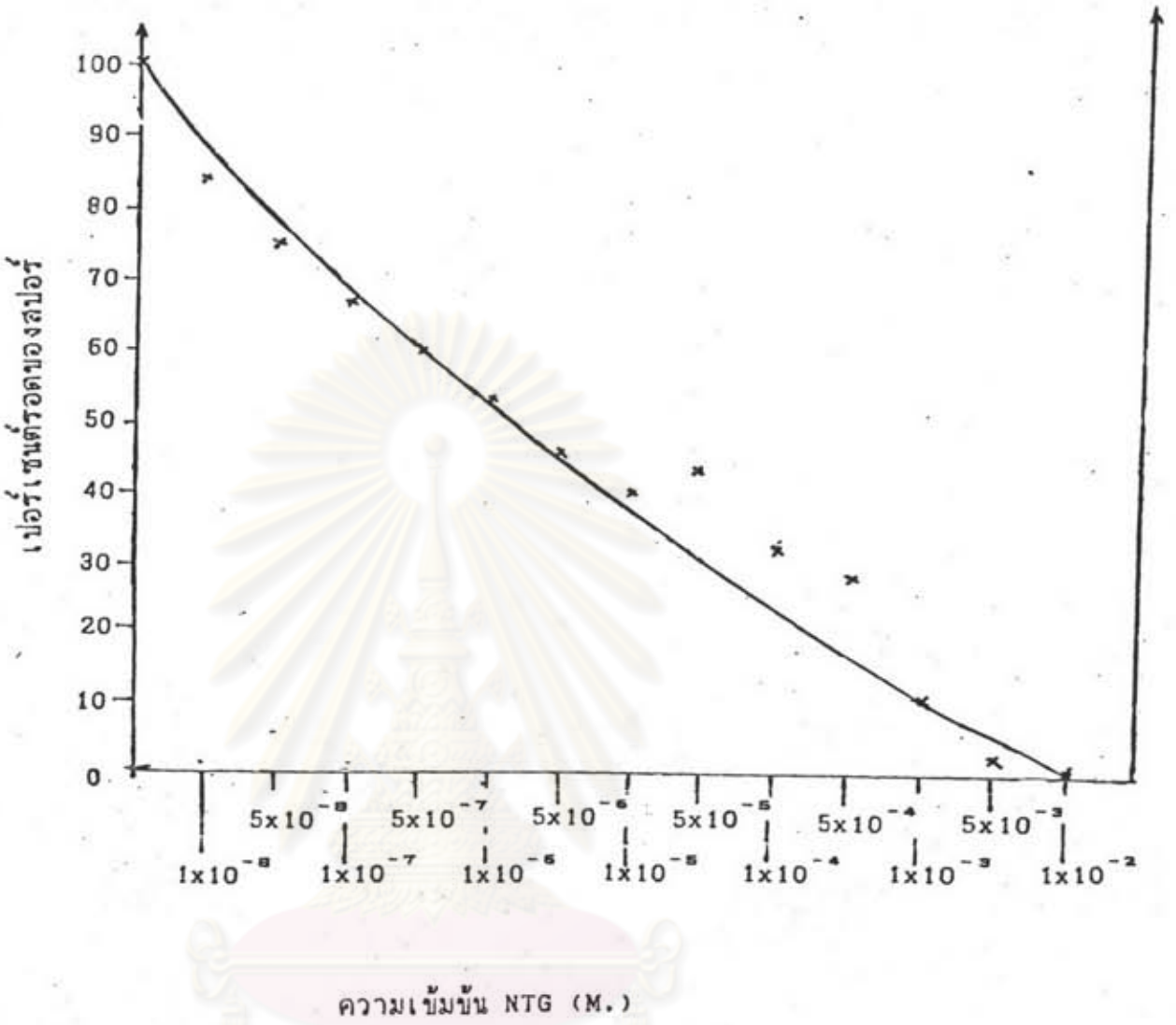
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 14 จำนวนโคโลนีที่เจริญและเปอร์เซนต์รอดของสปอร์ของเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CN 1 ภายหลังการเติม NTG ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

ความเข้มข้นของ NTG (M.)	จำนวนสปอร์เริ่มต้นต่อจาน*	จำนวนโคโลนีทั้งหมดที่เจริญ (10 จาน)	จำนวนโคโลนีเฉลี่ยต่อจาน	เปอร์เซนต์รอดของสปอร์
0	100	482	48.20	100.00
$1x10^{-8}$	100	402	40.20	83.40
$5x10^{-8}$	100	357	35.70	74.07
$1x10^{-7}$	100	319	31.90	66.18
$5x10^{-7}$	100	287	28.70	59.54
$1x10^{-6}$	100	251	25.10	52.07
$5x10^{-6}$	100	217	21.70	45.02
$1x10^{-5}$	100	190	19.00	39.42
$5x10^{-5}$	100	201	20.10	41.70
$1x10^{-4}$	100	154	15.40	31.95
$5x10^{-4}$	100	133	13.30	27.59
$1x10^{-3}$	1000**	485	48.50	10.06
$5x10^{-3}$	1000**	123	12.30	2.55
$1x10^{-2}$	1000**	36	3.60	0.75

* จำนวนโคโลนีที่ได้มีค่าต่ำ เนื่องจากในการทดลอง สปอร์ต้องผ่านการล้าง 2 ครั้ง เพื่อหยุดปฏิกิริยาของ NTG ก่อนนำมากระจายเพื่อเพาะเลี้ยงในจาน ทำให้มีการสูญเสียสปอร์ไปในระหว่างการล้าง (ถึงแม้ว่า สปอร์ที่ใช้เป็นตัวควบคุม (control) จะไม่ได้เติม NTG ลงไป แต่ทำการทดลองตามวิธีการทดลองข้อ 3.2 ในบทที่ 2 ทุกประการ)

** NTG ที่ความเข้มข้น $1x10^{-3}$-$1x10^{-2}$ โมลาร์ เปอร์เซนต์รอดของสปอร์มีค่าต่ำ จึงต้องเพิ่มจำนวนสปอร์เริ่มต้นต่อจานเลี้ยงเชื้อที่ใช้มากกว่าที่ช่วงเวลาอื่น (ใช้จำนวนสปอร์มากขึ้น 10 เท่า)



กราฟที่ 3 เปอร์เซนต์รอดของเชื้อรา หลังจากชักนำสปอร์ของเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CN 1 ให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยใช้สารเคมี NTG เป็นสารชักนำ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในการทดลองนี้จะเลือกเก็บเชื้อราที่ได้จากการเติม NTG แล้วมีเปอร์เซนต์รอดตั้งแต่ 0-50% ขึ้นมาทำการคัดเลือกต่อไป จากตารางที่ 14 พบว่า NTG ความเข้มข้น $5x10^{-6}$ โมลาร์ ขึ้นไป ให้เปอร์เซนต์รอดของสปอร์อยู่ในช่วง 0-50% จึงเก็บเชื้อราทั้งหมดในช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ $5x10^{-6}$ ถึง $1x10^{-2}$ โมลาร์ ขึ้นมา เพื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี ต่อไป

เชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CN 1 ยังคงมีลักษณะโคโลนีเหมือนเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CU 1 และ สายพันธุ์ A 88 คือ เมื่อเพาะเลี้ยงลงบนอาหารแข็งโพเตโตเด็กซ์โตรส เชื้อราจะมีลักษณะโคโลนีแบนราบ ขอบหยัก เส้นใยเรียบ ไม่ฟู สปอร์เมื่อแก่มีสีเขียวเข้ม มีจีบหยักบนโคโลนี และไม่สร้างสี (pigment) ลงในอาหารแข็งที่ใช้เลี้ยง ส่วนเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่เก็บ มีบางโคโลนีที่เจริญขึ้นมาแล้วมีลักษณะต่างไปจากเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CN 1 สายพันธุ์ CU 1 และสายพันธุ์ A 88 เช่น สร้างสปอร์สีขาว เหลือง เหลืองอ่อน เขียวอ่อน ลักษณะโคโลนีนูนขึ้นจนถึงโค้งแบบครึ่งวงกลม จีบหยักไม่เป็นระเบียบ จีบหยักถี่-ห่างขึ้น ขอบเรียบ ขนาดของโคโลนีต่างไป เป็นต้น ดังแสดงตัวอย่างตามภาพที่ 9 โดยแสดงจำนวนและเปอร์เซนต์ของโคโลนีที่มีลักษณะภายนอกแตกต่างไปจากเชื้อราสายพันธุ์ตั้งต้น ดังตารางที่ 15

สำหรับบางโคโลนี ลักษณะที่แตกต่างไปจากเชื้อราสายพันธุ์ตั้งต้น จะมีสภาพไม่คงตัว เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในรุ่นต่อๆ ไป ลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปดังกล่าวจะเปลี่ยนกลับไปมีลักษณะเหมือนสายพันธุ์ตั้งต้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 15 จำนวน และเปอร์เซนต์ของโคโลนีที่มีลักษณะภายนอกแตกต่างไปจากเชื้อรา *Penicillium chrysogenum* สายพันธุ์ CN 1 ซึ่งเป็นเชื้อราสายพันธุ์ตั้งต้น

ความเข้มข้น NTG ที่ใช้ (M.)	จำนวนโคโลนีทั้งหมดที่เจริญ (ใน 10 จาน)	เปอร์เซนต์การรอด	จำนวนโคโลนีที่มีการเปลี่ยนแปลง	เปอร์เซนต์ของโคโลนีที่มีการเปลี่ยนแปลง
0	482	100.00	0	0.00
$1x10^{-8}$	402	83.40	7	1.74
$5x10^{-8}$	357	74.04	21	5.88
$1x10^{-7}$	319	66.18	27	8.46
$5x10^{-7}$	287	59.54	30	10.45
$1x10^{-6}$	251	52.07	33	13.15
$5x10^{-6}$	217	45.02	32	14.75
$1x10^{-5}$	190	39.42	40	21.05
$5x10^{-5}$	201	41.70	63	31.34
$1x10^{-4}$	154	31.95	50	32.47
$5x10^{-4}$	133	27.59	54	40.60
$1x10^{-3}$	485	10.06	123	25.36
$5x10^{-3}$	123	2.55	70	56.91
$1x10^{-2}$	36	0.75	25	69.44

* NTG ที่ความเข้มข้น $1x10^{-3}$-$1x10^{-2}$ โมลาร์ เปอร์เซนต์รอดของสปอร์มีค่าต่ำ จึงต้องเพิ่มจำนวนสปอร์เริ่มต้นต่อจานเลี้ยงเชื้อที่ใช้มากกว่าที่ช่วงเวลาอื่น (ใช้จำนวนสปอร์มากขึ้น 10 เท่า)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.6 การคัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการเพนิซิลลิน จี สูงขึ้น หลังจากชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG

คัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่ได้หลังจากชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยสารเคมี NTG ตามวิธีการทดลองข้อ 4 จากการคัดเลือกเชื้อราแบบปฐมภูมิ ตามวิธีการทดลองข้อ 4.1 เทียบกับเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CN 1 ซึ่งเป็นเชื้อราสายพันธุ์ตั้งต้น พบว่า เชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CN 1 ให้ความกว้างของบริเวณยับยั้ง 36 มม. เชื้อราสายพันธุ์ใหม่ให้ความกว้างของบริเวณยับยั้งอยู่ในช่วง 32-40 มม. จากตารางที่ 16 เก็บเชื้อราสายพันธุ์ใหม่จำนวน 1,539 สายพันธุ์ ที่ให้ความกว้างของบริเวณยับยั้งตั้งแต่ 36 มม. ขึ้นมา ตามวิธีการเก็บรักษาเชื้อตามวิธีการทดลองข้อ 2.2.1 และนำมาเพาะเลี้ยงตามวิธีการทดลองในข้อ 2.3.3 เพื่อนำมาคัดเลือกเชื้อราแบบทุติยภูมิ ตามวิธีการทดลองข้อ 4.2.1 และ 4.2.2 ต่อไป สามารถแบ่งจำนวนโคโลนีของเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ตามประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี ดังแสดงในตารางที่ 17

เมื่อวิเคราะห์หาปริมาณเพนิซิลลิน จี โดยวิธีทางชีววิทยา ตามวิธีการทดลองข้อ 4.2.1 เลี้ยงเชื้อราตามวิธีการทดลองข้อ 2.3.3 เก็บตัวอย่างที่ 96 120 และ 144 ชม. ของการเพาะเลี้ยง ตามลำดับ จากผลการทดลอง พบว่า เชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CN 1 มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี ในช่วงเวลา 96 120 และ 144 ชม. ของการเพาะเลี้ยงได้ประมาณ 3,873 4,057 และ 3,961 หน่วยต่อมล. ตามลำดับ เมื่อนำมาวิเคราะห์หาน้ำหนักเพนิซิลลิน จี โดยวิธีไฮเพอร์ฟอแมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี ตามวิธีการทดลองข้อ 4.2.2 พบว่า เชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CN 1 มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี ในช่วงเวลา 96 120 และ 144 ชม. ของการเพาะเลี้ยงได้ 1.76 1.79 และ 1.77 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่เก็บคัดเลือกไว้ จากการวิเคราะห์หาปริมาณเพนิซิลลิน จี โดยวิธีทางชีววิทยา และวิธีไฮเพอร์ฟอแมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี ตามวิธีการทดลองข้อ 4.2.1 และ 4.2.2 ตามลำดับ พบว่า 1.23% ของเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกไว้ทั้งหมดมีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี มากกว่าเชื้อราสายพันธุ์ตั้งต้น 77.52% ของเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกไว้ทั้งหมดมีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี เท่ากับเชื้อราสายพันธุ์ตั้งต้น และ 21.25% ของเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกไว้ทั้งหมด

ตารางที่ 16 จำนวนโคโลนีของเชื้อราสายพันธุ์ใหม่* เมื่อนำมาคัดเลือกแบบปฐมภูมิแล้วให้ความกว้างของบริเวณยับยั้งตั้งแต่ 36 มม. ขึ้นไป

ความเข้มข้น NTG (โมลาร์)	จำนวนโคโลนีทั้งหมด	จำนวนโคโลนีที่ให้ความกว้างของบริเวณยับยั้ง 36-40 มม.
$5x10^{-6}$	217	152
$1x10^{-5}$	190	146
$5x10^{-5}$	201	155
$1x10^{-4}$	154	120
$5x10^{-4}$	133	103
$1x10^{-3}$	485	399
$5x10^{-3}$	123	95
$1x10^{-2}$	29	16
รวม	1539	1199

* เชื้อราสายพันธุ์ใหม่ ได้จากการชักนำสปอร์ของเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CN 1 ให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยใช้สารเคมี NTG เป็นสารชักนำ จากการคัดเลือกเชื้อราแบบปฐมภูมิของเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CN 1 ให้ความกว้างของบริเวณยับยั้ง 36 มม.

ตารางที่ 17 จำนวนโคโลนีของเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่ให้ความกว้างของบริเวณยับยั้งตั้งแต่ 36 มม. ขึ้นไป โดยแบ่งตามประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี (วิเคราะห์ผลด้วย HPLC)

ความเข้มข้น NTG (โมลาร์)	จำนวนโคโลนีที่ให้ความกว้างของบริเวณยังยั้ง 36 มม. ขึ้นไป	จำนวนโคโลนีของเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่ผลิตเพนิซิลลิน จี ลดลง	จำนวนโคโลนีของเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่ผลิตเพนิซิลลิน จี เท่าเดิม	จำนวนโคโลนีของเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่ผลิตเพนิซิลลิน จี สูงขึ้น
$5x10^{-6}$	152	0	151	1
$1x10^{-5}$	146	0	144	2
$5x10^{-5}$	155	0	154	1
$1x10^{-4}$	120	0	117	3
$5x10^{-4}$	103	0	99	4
$1x10^{-3}$	399	0	394	5
$5x10^{-3}$	95	0	92	3
$1x10^{-2}$	29	0	29	0
รวม	1199	0	1180	19

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 18 จำนวนและเปอร์เซนต์ของเชื้อราที่เก็บคัดเลือกไว้ หลังจากชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG เมื่อเทียบกับเชื้อรา Penicillium chrysogumen สายพันธุ์ CN1 ซึ่งเป็นเชื้อราสายพันธุ์ดั้งเดิม โดยแบ่งตามประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี (วิเคราะห์ผลด้วย HPLC)

ความเข้มข้น NTG ที่ใช้ (M.)	จำนวนโคโลนีทั้งหมดที่คัดเลือกไว้	เชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่ให้ผลผลิตต่ำลง*		เชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่ให้ผลผลิตเท่าเดิม**		เชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่ให้ผลผลิตสูงขึ้น***	
		จำนวนโคโลนีที่ได้	%	จำนวนโคโลนีที่ได้	%	จำนวนโคโลนีที่ได้	%
$5x10^{-6}$	217	63	29.03	153	70.51	1	0.46
$1x10^{-5}$	190	43	22.63	145	76.32	2	1.05
$5x10^{-5}$	201	46	22.88	154	76.62	1	0.50
$1x10^{-4}$	154	31	20.13	120	77.92	3	1.95
$5x10^{-4}$	133	28	21.05	101	75.94	4	3.01
$1x10^{-3}$	485****	83	17.11	397	81.86	5	1.03
$5x10^{-3}$	123****	26	21.14	94	76.42	3	2.44
$1x10^{-2}$	36****	7	19.44	29	80.56	0	0.00
รวม	1539	327	21.25	1193	77.52	19	1.23

* เชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่สามารถผลิตเพนิซิลลิน จี ได้ 0.90-1.67 กรัมต่อลิตร

** เชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่สามารถผลิตเพนิซิลลิน จี ได้ 1.79 กรัมต่อลิตร

*** เชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่สามารถผลิตเพนิซิลลิน จี ได้ 1.85-3.65 กรัมต่อลิตร

**** NTG ที่ความเข้มข้น $1x10^{-3}$-$1x10^{-2}$ โมลาร์ เปอร์เซนต์รอดของสปอร์มีค่าต่ำ จึงต้องเพิ่มจำนวนสปอร์เริ่มต้นต่อจานเลี้ยงเชื้อที่ใช้มากกว่าที่ช่วงเวลาอื่น (ใช้จำนวนสปอร์มากขึ้น 10 เท่า)

มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี น้อยกว่าเชื้อราสายพันธุ์ตั้งต้น ดังแสดงในตารางที่ 19

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี พบว่า เชื้อราใหม่จำนวน 19 สายพันธุ์ หรือ 1.23% ของเชื้อราที่เก็บไว้ทั้งหมดมีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี ได้มากกว่าเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CN 1 ส่วนใหญ่มีลักษณะโคโลนีเหมือนเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CN 1 สายพันธุ์ CU 1 และสายพันธุ์ A 88 ยกเว้นเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CNN 2 ที่มีลักษณะโคโลนีภายนอกต่างไปจากเดิม คือ เมื่อเลี้ยงลงบนอาหารแข็งโพเตโตเด็กซ์โตรส เชื้อราดังกล่าวจะสร้างสปอร์สีขาว ดังแสดงในภาพที่ 15 โดยเชื้อราทั้ง 19 สายพันธุ์ มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี ดังแสดงในตารางที่ 19

จากตารางที่ 19 ซึ่งแสดงประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี ของเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ใหม่จำนวน 19 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ หลังจากชักนำเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CN 1 ให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG แล้ว พบว่า เชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CNN 1-CNN 19 มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี ได้สูงสุดอยู่ในช่วง 8,594-4,136 หน่วยต่อมล. หรือ 3.65-1.85 กรัมต่อลิตร เชื้อราจำนวน 19 สายพันธุ์นี้ มี 8 สายพันธุ์ ที่สามารถผลิตเพนิซิลลินจีได้มากกว่า 3.0 กรัมต่อลิตรขึ้นไป โดยเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CNN 1 เป็นสายพันธุ์ที่ได้จากสปอร์ที่รอดหลังจากเติมสารเคมี NTG เข้มข้น 5×10^{-4} โมลาร์ มีลักษณะโคโลนีเหมือนเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CN 1 สายพันธุ์ CU 1 และสายพันธุ์ A 88 ดังแสดงในภาพที่ 16 มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี ได้มากกว่าเชื้อราสายพันธุ์อื่นที่คัดเลือกไว้ โดยในช่วงเวลา 96 120 และ 144 ชม. ของการเพาะเลี้ยงผลิตเพนิซิลลิน จี ได้ 8,232 8,594 และ 8,232 หน่วยต่อมล. หรือ 3.54 3.65 และ 3.62 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แสดงโครมาโตแกรมดังภาพที่ 17 ซึ่งมากกว่าเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CN 1 1.86 กรัมต่อลิตร หรือผลิตได้ 2.04 เท่า ของสายพันธุ์ CN 1 มากกว่าเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CU 1 2.46 กรัมต่อลิตร หรือผลิตได้ 3.07 เท่า ของสายพันธุ์ CU 1 และมากกว่าเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ A 88 2.70 กรัมต่อลิตร หรือผลิตได้ 3.84 เท่า ของสายพันธุ์ A 88

ภาพที่ 15 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CNN 2 อายุ 7 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 19 ประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี ของเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CN 1 ซึ่งเป็นเชื้อราสายพันธุ์ดั้งต้น และเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี มากกว่าสายพันธุ์ดั้งต้น ซึ่งได้จากการชักนำให้ลปอร์ของเชื้อราสายพันธุ์ดั้งต้นเกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG

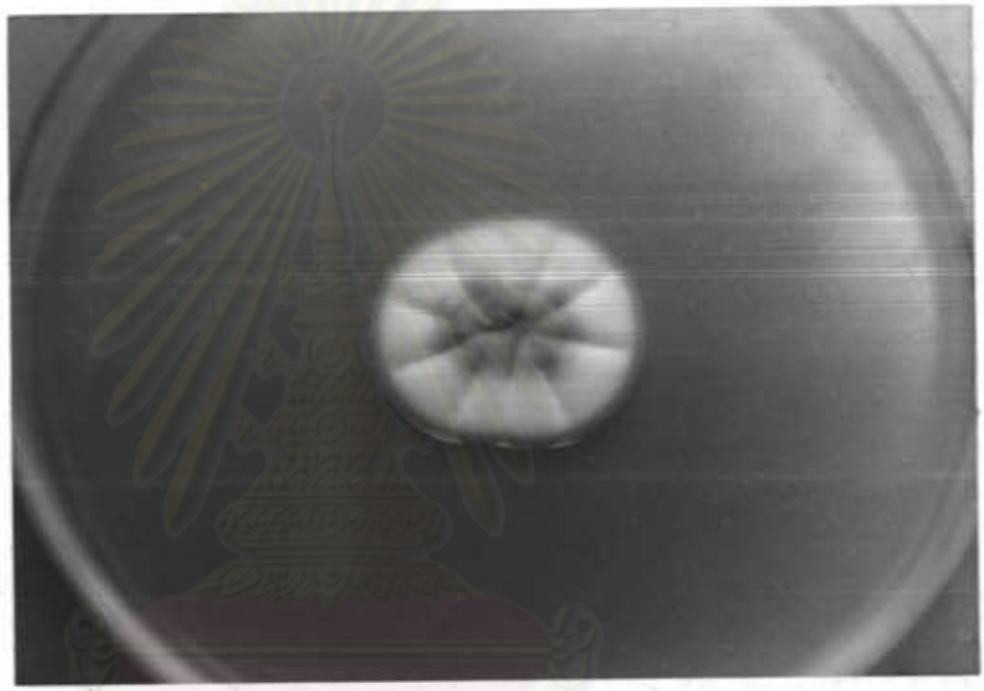
เชื้อรา สายพันธุ์	ความเข้มข้น NTG ที่ใช้ (โมลาร์)	ความกว้างของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ที่ได้จากการคัดเลือกเชื้อราแบบปฐมภูมิ (มม.)	การคัดเลือกเชื้อราแบบทุติยภูมิ					
			ปริมาณเพนิซิลลิน จี (หน่วยต่อลิตร) ชม.ที่			น้ำหนักเพนิซิลลิน จี (กรัมต่อลิตร) ชม.ที่		
			96	120	144	96	120	144
CN 1	0	36.0	3795	3961	3961	1.75	1.79	1.75
CNN 1*	$5x10^{-4}$	40.0	8232	8594	8232	3.54	3.65	3.62
CNN 2*	$1x10^{-3}$	40.0	7553	8232	7886	3.33	3.63	3.44
CNN 3*	$1x10^{-3}$	38.0	7553	7886	7553	3.28	3.38	3.27
CNN 4*	$5x10^{-3}$	39.0	7235	7553	7553	3.13	3.25	3.21
CNN 5*	$5x10^{-4}$	39.5	7235	7553	7235	3.13	3.19	3.14
CNN 6*	$5x10^{-3}$	39.0	6931	7235	6931	3.06	3.10	3.08
CNN 7*	$5x10^{-3}$	39.0	6931	6931	6931	3.02	3.06	3.03
CNN 8*	$5x10^{-4}$	38.0	6639	6931	6639	2.99	3.02	2.99
CNN 9	$5x10^{-6}$	38.5	6639	6639	6639	2.97	2.99	2.98
CNN 10	$1x10^{-4}$	39.0	6414	6639	6639	2.90	2.99.	2.95
CNN 11	$1x10^{-6}$	38.0	6414	6414	6359	2.82	2.85	2.83
CNN 12	$1x10^{-3}$	38.0	6359	6414	6359	2.82	2.85	2.83
CNN 13	$5x10^{-4}$	38.0	6091	6359	6091	2.77	2.80	2.75

ตารางที่ 19 (ต่อ) ประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี ของเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CN 1 ซึ่งเป็นเชื้อราสายพันธุ์ดั้งต้น และเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี มากกว่าสายพันธุ์ดั้งต้น ซึ่งได้จากการชักนำให้สปอร์ของเชื้อราสายพันธุ์ดั้งต้นเกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG

เชื้อรา สายพันธุ์	ความเข้มข้น NTG ที่ใช้ (โมลาร์)	ความกว้างของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ที่ได้จากการคัดเลือกเชื้อราแบบปฐมภูมิ (มม.)	การคัดเลือกเชื้อราแบบทุติยภูมิ					
			ปริมาณเพนิซิลลิน จี (หน่วยต่อลิตร) ชม.ที่			น้ำหนักเพนิซิลลิน จี (กรัมต่อลิตร) ชม.ที่		
			96	120	144	96	120	144
CNN 14	$1x10^{-5}$	38.0	6091	6091	6091	2.75	2.78	2.75
CNN 15	$1x10^{-4}$	38.0	5589	5589	5400	2.63	2.67	2.60
CNN 16	$1x10^{-3}$	38.0	4912	5128	4912	2.43	2.50	2.38
CNN 17	$1x10^{-4}$	38.0	4507	4507	4507	2.17	2.20	2.15
CNN 18	$5x10^{-5}$	38.5	4317	4317	4317	1.95	2.00	1.97
CNN 19	$5x10^{-5}$	38.0	3961	4136	3961	1.81	1.85	1.80

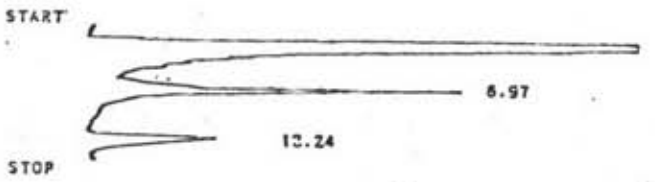
* เชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี สูงสุด ได้มากกว่า 3.0 กรัมต่อลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



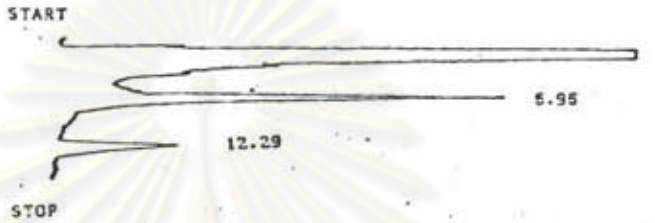
ภาพที่ 16 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CNN 1 อายุ 7 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



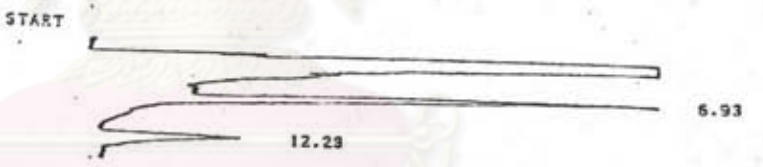
#	NAME	TIME	CONC	MK	AREA
		6.97	68.4724		107134
		12.24	31.3215		49315
	TOTAL		100.0000		156449

ภาพที่ 17.1



#	NAME	TIME	CONC	MK	AREA
		6.96	69.1157		111435
		12.29	30.8841		49794
	TOTAL		99.9999		161229

ภาพที่ 17.2



#	NAME	TIME	CONC	MK	AREA
		6.93	68.9288		109189
		12.28	31.0711		49219
	TOTAL		99.9999		158408

ภาพที่ 17.3

ภาพที่ 17 ลักษณะโครมาโตแกรมของเพนิซิลลิน จี ที่ได้จากการผลิตโดยเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CNN 1 เมื่อใช้เพนิซิลลิน วี เป็นสารมาตรฐาน วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

t_R เพนิซิลลิน จี เท่ากับ 6.93-6.97 นาที

t_R เพนิซิลลิน วี เท่ากับ 12.24-12.29 นาที

ภาพที่ 17.1 เพนิซิลลิน จี ที่ชั่วโมงที่ 96 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CNN 1

ภาพที่ 17.2 เพนิซิลลิน จี ที่ชั่วโมงที่ 120 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CNN 1

ภาพที่ 17.3 เพนิซิลลิน จี ที่ชั่วโมงที่ 144 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CNN 1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากตารางที่ 19 และ 20 เมื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์กับสปอร์ของเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CN 1 ด้วยสารเคมี NTG แล้ว พบว่า NTG ที่ความเข้มข้น $5x10^{-4}$ โมลาร์ ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ และได้พบเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี สูงกว่าเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CN 1 ได้มากกว่าที่ความเข้มข้นอื่นของ NTG ดังนั้น NTG ที่ความเข้มข้น $5x10^{-4}$ โมลาร์ จึงเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการชักนำให้สปอร์ของเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CN 1 เกิดการกลายพันธุ์

จากตารางที่ 20 เมื่อนำเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี ได้สูงที่สุดในแต่ละขั้นตอนของการกลายพันธุ์มาทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี พบว่า

เชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ A 88 มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี สูงสุด 0.95 กรัมต่อลิตร

เชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CU 1 มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี สูงสุด 1.19 กรัมต่อลิตร มากกว่า เชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ A 88 0.24 กรัมต่อลิตร หรือผลิตได้ 1.25 เท่า ของสายพันธุ์ A 88

เชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CN 1 มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี สูงสุด 1.79 กรัมต่อลิตร มากกว่า เชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CU 1 0.60 กรัมต่อลิตร หรือผลิตได้ 1.50 เท่า ของสายพันธุ์ CU 1 มากกว่าเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ A 88 0.84 กรัมต่อลิตร หรือผลิตได้ 1.88 เท่า ของสายพันธุ์ A 88

เชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CNN 1 มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี สูงสุด 3.65 กรัมต่อลิตร มากกว่า เชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CN 1 1.86 กรัมต่อลิตร หรือผลิตได้ 2.04 เท่า ของสายพันธุ์ CN 1 มากกว่าเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CU 1 2.46 กรัมต่อลิตร หรือผลิตได้ 3.07 เท่า ของสายพันธุ์ CU 1 มากกว่าเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ A 88 2.70 กรัมต่อลิตร หรือผลิตได้ 3.84 เท่า ของสายพันธุ์ A 88

ตารางที่ 20 ประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี ของเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ต่างๆ ที่ผลิตเพนิซิลลิน จี ได้สูงสุด ภายหลังจากถูกชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในแต่ละขั้น

เชื้อรา สายพันธุ์	primary screening (มม.)	secondary screening					
		ปริมาณเพนิซิลลิน จี (หน่วยต่อมล.)			น้ำหนักเพนิซิลลิน จี (กรัมต่อลิตร)		
		ชม.ที่			ชม.ที่		
		96	120	144	96	120	144
A 88	30.0	1785	1990	1820	0.91	0.95	0.92
CU 1	33.0	2576	2603	2468	1.16	1.19	1.14
CN 1	36.0	3635	3899	3765	1.70	1.79	1.75
CNN 1	40.0	8351	8632	8496	3.57	3.65	3.62

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย