บทที่ 1

บทนำ

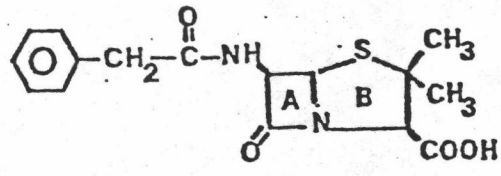
1. ประวัติความเป็นมา

เพนนิซิลินเป็นยาปฏิชีวนะชนิดแรกของโลกที่ค้นพบในปี ค.ศ. 1928 โดยนักวิทยาศาสตร์ชาวอังกฤษ ชื่อ Sir Alexander Fleming (1,2,3) Fleming พบว่าได้เกิดบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) รอบ ๆ โคโลนี (colony) ของเชื้อรา ซึ่งปนเปื้อนในจานเลี้ยงเชื้อ Staphylococci ที่เขากำลังศึกษาอยู่ จึงคิดว่าเชื้อรานั้นน่าจะปล่อยสารบางอย่างที่สามารถทำลาย Staphylococci ต่อมาได้จำแนก (identify) เชื้อราเป็น Penicillium notatum จากนั้น Fleming พบว่าสารที่เชื้อราปล่อยออกมารอบ ๆ โคโลนี สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค (pathogenic bacteria) ชนิดต่าง ๆ ได้ ในปีค.ศ.1932 Clutterbuck และคณะได้พยายามแยกสารที่เชื้อราปล่อยออกมา แต่ไม่สำเร็จเนื่องจากเขาสกัดสารตัวนี้ด้วยอีเทอร์ ทำให้สารสูญเสียความสามารถในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย (4) 5 ปีต่อมา Chain และผู้ร่วมงานได้แยกสารดังกล่าว และทำให้บริสุทธิ์บางส่วน(partial purification) แล้วทดสอบในสัตว์ทดลองได้ผลเป็นที่น่าพอใจ (5) ในปี ค.ศ.1943 มีการใช้สารที่เชื้อราปล่อยออกมา รักษาผู้ป่วยในสงครามโลกครั้งที่ 2 เป็นผลสำเร็จ และเรียกสารนั้นว่าเพนนิซิลิน ปัจจุบันนี้พบว่าฤทธิ์ของยาเพนนิซิลิน จี สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวกและแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบที่มีรูปร่างกลม นอกจากนี้ยังสามารถทำลายเชื้อ Clostridia sp. , Corynebacterium diphtheriae ซึ่งเป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรคคอตีบ (diphtheria), Bacillus sp. และ Treponema pallidum เป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรคซิฟิลิส (syphilis) ในคน (1,6,7)

เชื้อราที่สามารถสร้างเพนนิซิลินได้ นอกเหนือไปจาก P. notatum ดังกล่าวมาแล้ว ยังมีเชื้อราอีกหลายชนิดที่สามารถสร้างเพนนิซิลินได้ ได้แก่ Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ต่างๆ เช่น P. chrysogenum NRRL 1951 , P. chrysogenum Q-176 เป็นต้น นอกจากนี้ยังมี Aspergillus sp. (8) , Trichophyton sp. และ Epidermophyton sp. (9)

2. คุณสมบัติทางเคมี

โครงสร้างโมเลกุลของเพนนิซิลิน ประกอบด้วย 2 ส่วนที่สำคัญ คือ ส่วนนิวเคลียส ได้แก่โมเลกุลของกรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก (6-aminopenicillanic acid) และส่วนหมู่ข้างเคียง (side chain group) (1,9) โดยที่ส่วนนิวเคลียสประกอบด้วยส่วนสำคัญ 2 ส่วน คือ ส่วนวงแหวนไธอาโซลิดีน (thiazolidine ring) เชื่อมอยู่กับส่วนวงแหวนเบตาแลคแตม (betalactam ring) (8) (รูปที่ 1)



หมู่ข้างเคียง กรด 6-อะมิโนเพนนิซิลานิก

A = วงแหวนเบตาแลคแตม (betalactam ring)

B = วงแหวนไธอาโซลิดีน (thiazolidine ring)

รูปที่ 1 โครงสร้างโมเลกุลของเพนนิซิลิน จี (benzylpenicillin)

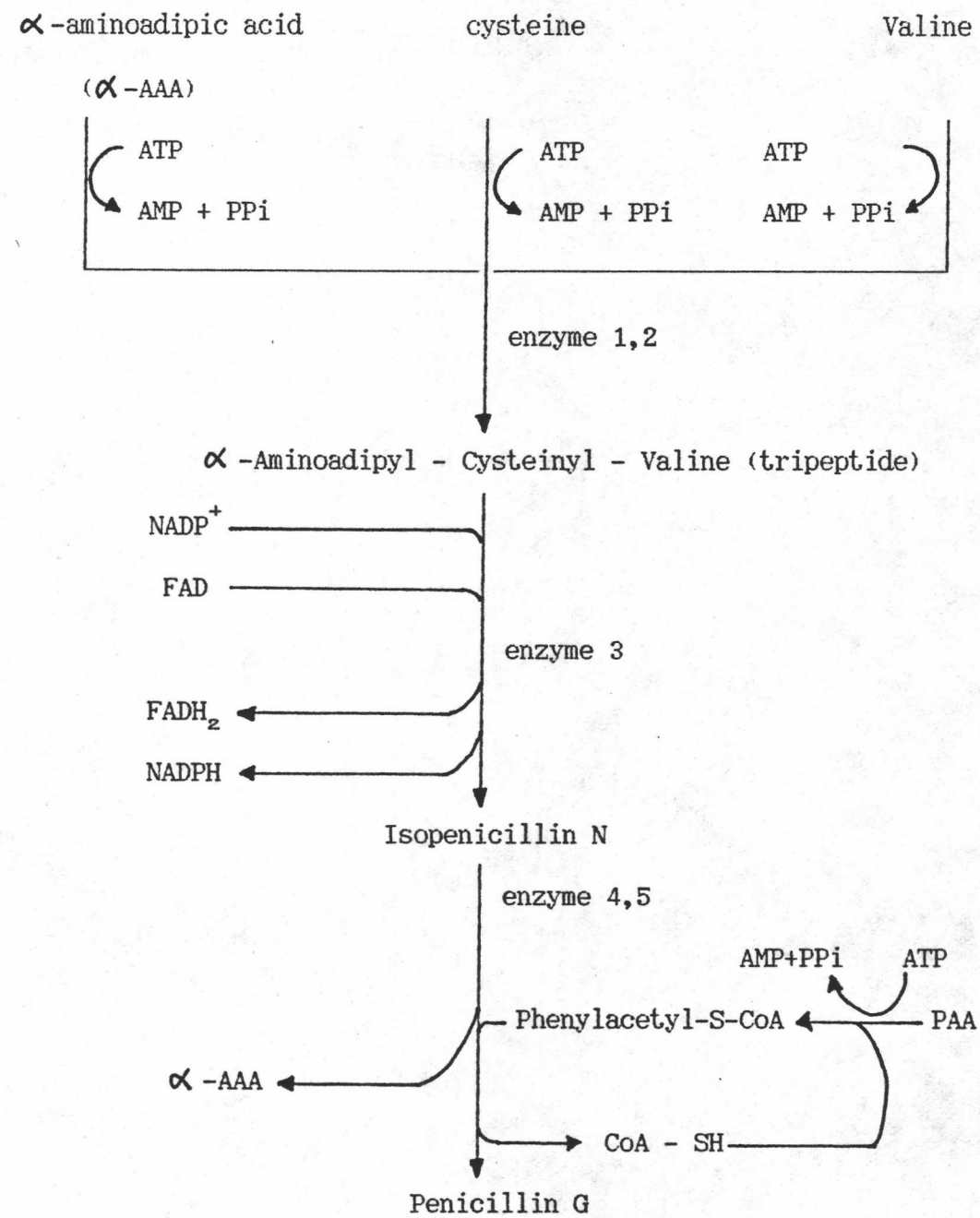
นิวเคลียสของยาเพนนิซิลิน เป็นส่วนที่สำคัญในการออกฤทธิ์ ถ้าส่วนนิวเคลียสในโมเลกุลของยาถูกทำลายโดยทางเคมี หรือถูกเปลี่ยนแปลงไปในร่างกายแล้ว ฤทธิ์ของยาที่มีต่อจุลชีพจะสูญเสียไปหมด (3) ส่วนของนิวเคลียสที่เป็นวงแหวนเบตาแลคแตมเป็นส่วนที่มีความไวต่อขบวนการสลาย (hydrolysis) โดยกรดหรือด่าง หรือเอนไซม์เพนนิซิลลาเนส (penicillanase) เอนไซม์ดังกล่าวสามารถทำลายเพนนิซิลิน โดยทำลายวงแหวนเบตาแลคแตม ดังนั้นเอนไซม์นี้จึงมีชื่อเรียกอีกอย่างว่า เบตาแลคแตมเมส (betalactamase) (3,8)

3. การสังเคราะห์ (biosynthesis) ของเพนนิซิลิน จี

3.1 กระบวนการสังเคราะห์ (biosynthesis pathway)

การสังเคราะห์เพนนิซิลิน จี โดยเชื้อราเริ่มด้วยกรดอะมิโน 3 ตัวคือ กรดแอลฟาอะมิโนอะดิปิก (α-aminoadipic acid) ซีสเทอีน(cysteine) และวาลีน (valine) (3,10,11) กรดอะมิโนแต่ละตัวจะถูกกระตุ้น (activated) ด้วยอะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (ATP) ต่อจากนั้นใช้เอนไซม์หลายชนิดในปฏิกิริยาการสังเคราะห์จนได้สายไตรเปปไทด์ (tripeptide) คือ แอลฟา อะมิโนอะดิพิล-ซีสทิลนิล-วาลีน (α-aminoadipyl-cysteinyl-valine) ซึ่งเป็นตัวกลาง (intermediate) ในการสังเคราะห์เพนนิซิลิน (12) จากนั้นสายไตรเปปไทด์เปลี่ยนไปเป็นไอโซเพนนิซิลิน เอ็น (isopenicillin N) เมื่อมีกรดฟีนิลอะซีติก ซึ่งเป็นหมู่ข้างเคียงของเพนนิซิลิน จี ผ่านเข้าเซลโดยการแพร่กระจาย (diffuse) ไอโซเพนนิซิลิน เอ็น จะถูกเปลี่ยนไปเป็นเพนนิซิลิน จี โดยอาศัยเอนไซม์ฟีนิลอะซีติกเอซิดโคเอไลเกส (phenylacetic acid-co A ligase) และ เอนไซม์เอซิลทรานสเฟอเรส (acyltransferase) (รูปที่ 2)

การสังเคราะห์เพนนิซิลิน โดยไม่เติมสารตั้งต้น (natural penicillins) เชื้อราจะสังเคราะห์เพนนิซิลินหลายชนิด (ตารางที่ 1) แต่เพนนิซิลินที่มีคุณสมบัติทำลายเชื้อแบคทีเรียมีชนิดเดียว คือ เพนนิซิลิน จี (8) เมื่อมีการเติมสารตั้งต้น (precursor) ชนิดต่าง ๆ เช่น กรดฟีนิลอะซีติก (phenylactic acid) กรดเฮกซาโนอิก (hexenoic acid) กรดออกทาโนอิก (octanoic acid) กรดฟีนอกซีอะซีติก (phenoxyacetic acid) กรดวาเลอริก (valeric acid) กรดบิวทาริก (butyric acid) เป็นต้น ทำให้เชื้อราสามารถสร้างเพนนิซิลินชนิดต่าง ๆ ขึ้นมากกว่า 100 ชนิด ตามสารตั้งต้นที่เติม แต่มีเพียง 2 ชนิด ที่ใช้รักษาโรค คือ เพนนิซิลิน จี และเพนนิซิลิน วี (8,9)



PAA = phenylacetic acid

enzyme 1 = δ - (L-α- aminoadipyl) - L-cysteine synthetase

enzyme 2 = δ - (L-α- aminoadipyl) - L-cysteine-D-Valine synthetase

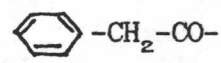
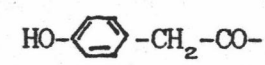
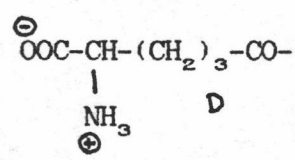
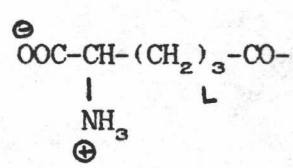
enzyme 3 = isopenicillin N synthetase

enzyme 4 = phenylacetic acid Co A ligase

enzyme 5 = acyltransferase

รูปที่ 2 แสดงขั้นตอนการสังเคราะห์เพนนิซิลิน จี (3)

ตารางที่ 1 ชนิดโครงสร้างโมเลกุลของเพนนิซิลินชนิดต่าง ๆ ที่ได้จากการหมักโดยไม่เติมสารตั้งต้น (natural penicillins) (8)

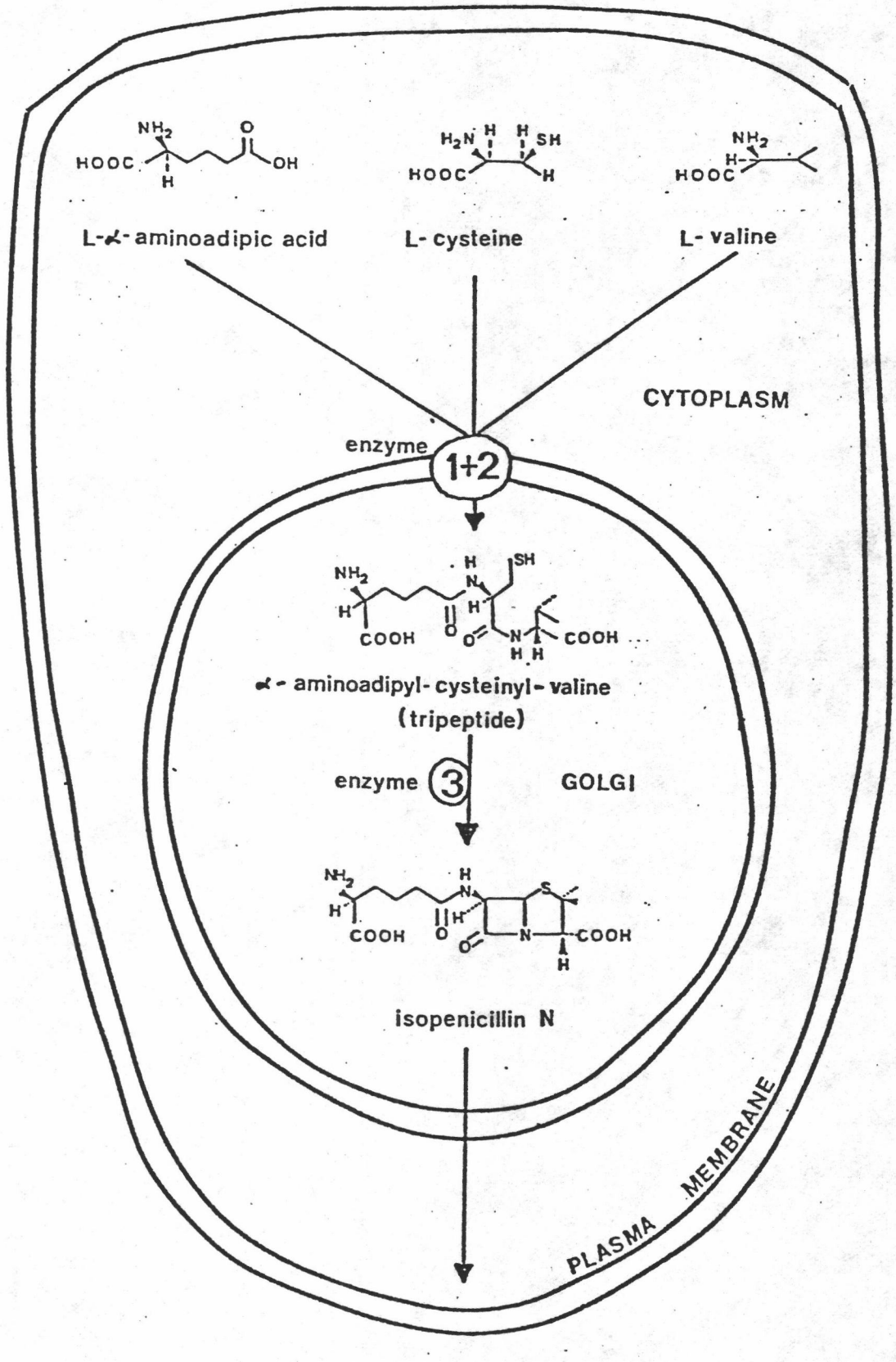
Designation	N - Acyl residue R.
Benzylpenicillin (penicillin G)	
2 - Pentenylpenicillin (penicillin F)	$CH_3-CH_2-CH=CH-CH_2-CO-$
n - Amylpenicillin (penicillin - Dihydro F)	$CH_3(CH_2)_4-CO-$
n -Heptylpenicillin (penicillin K)	$CH_3(CH_2)_6-CO-$
p - Hydroxybenzylpenicillin (Penicillin X)	
Penicillin N (Synnematin B) (D - 4 - Amino - 4 - carboxy n - butylpenicillin)	
Isopenicillin N (L - 4 Amino - 4 - carboxy n - butylpenicillin)	
Methylpenicillin	CH_3-CO-

3.2 ตำแหน่ง(localization)ของเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์เพนนิซิลิน จี

Kurylowiez และคณะพบว่า กอลไจ แอบพาราทัส(golgi apparatus) เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์และการปล่อย (secreation) เพนนิซิลิน จี โดยได้เสนอว่า เอนไซม์ไตรเปปไทด์ซินทิเทส (tripeptide synthetase) อยู่ที่เมมเบรน (membrane) ของ กอลไจ เวสสิเคิล (golgi vesicle) จะนำเอากรดอะมิโน 3 ชนิด คือ กรดแอลฟาอะมิโนอะดิปิก (α-aminoadipic acid) ซีสเทอีน (cysteine) และวาลีน (valine) จากไซโตพลาสซึม (cytoplasm) มาสร้างเป็นสายไตรเปปไทด์ (tripeptide) แล้วปล่อยเข้าในลูเมน (lumen) ของกอลไจเวสสิเคิล (13) และภายในกอลไจมีเอนไซม์ไอโซเพนนิซิลิน เอ็น ซิลทิเทส(isopenicillin N synthetase) ซึ่ง Abraham และคณะ ได้สกัดและทำให้บริสุทธิ์บางส่วน พบว่าเอนไซม์นี้เป็นโปรตีนและมีน้ำหนักโมเลกุล ประมาณ 32,000 (14) เอนไซม์ไอโซเพนนิซิลิน เอ็น ซินทิเทส เปลี่ยนสายไตรเปปไทด์เป็นไอโซเพนนิซิลิน เอ็น (รูปที่ 3) ต่อจากนั้นไอโซเพนนิซิลิน เอ็น ถูกปล่อยไปยังพลาสมาเมมเบรน (plasma membrane) Luengo และคณะพบว่าปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนหมู่ข้างเคียงเกิดขึ้นตรงบริเวณช่องว่างระหว่างผนังเซล(cell wall)และพลาสมาเมมเบรน(plasma membrane) ซึ่งเรียกว่า เพอริพลาสมิก สเปส (periplasmic space) โดยที่เอนไซม์ฟีนิลอะซีติกเอซิด โคเอไลเกส (phenylacetic acid-co A ligase) และเอนไซม์เอซิลทรานสเฟอเรส (acyltransferase) ซึ่งอยู่ในบริเวณเพอริพลาสมิก สเปส (periplasmic space) อาจเกาะอยู่ที่พลาสมาเมมเบรนก็ได้ (15) (รูปที่ 3) สำหรับกระบวนการปล่อยเพนนิซิลิน จี ผ่านผนังเซลมาอยู่ในน้ำหมักยังไม่ทราบแน่ชัด (3)

4. การพัฒนากระบวนการผลิตเพนนิซิลิน จี

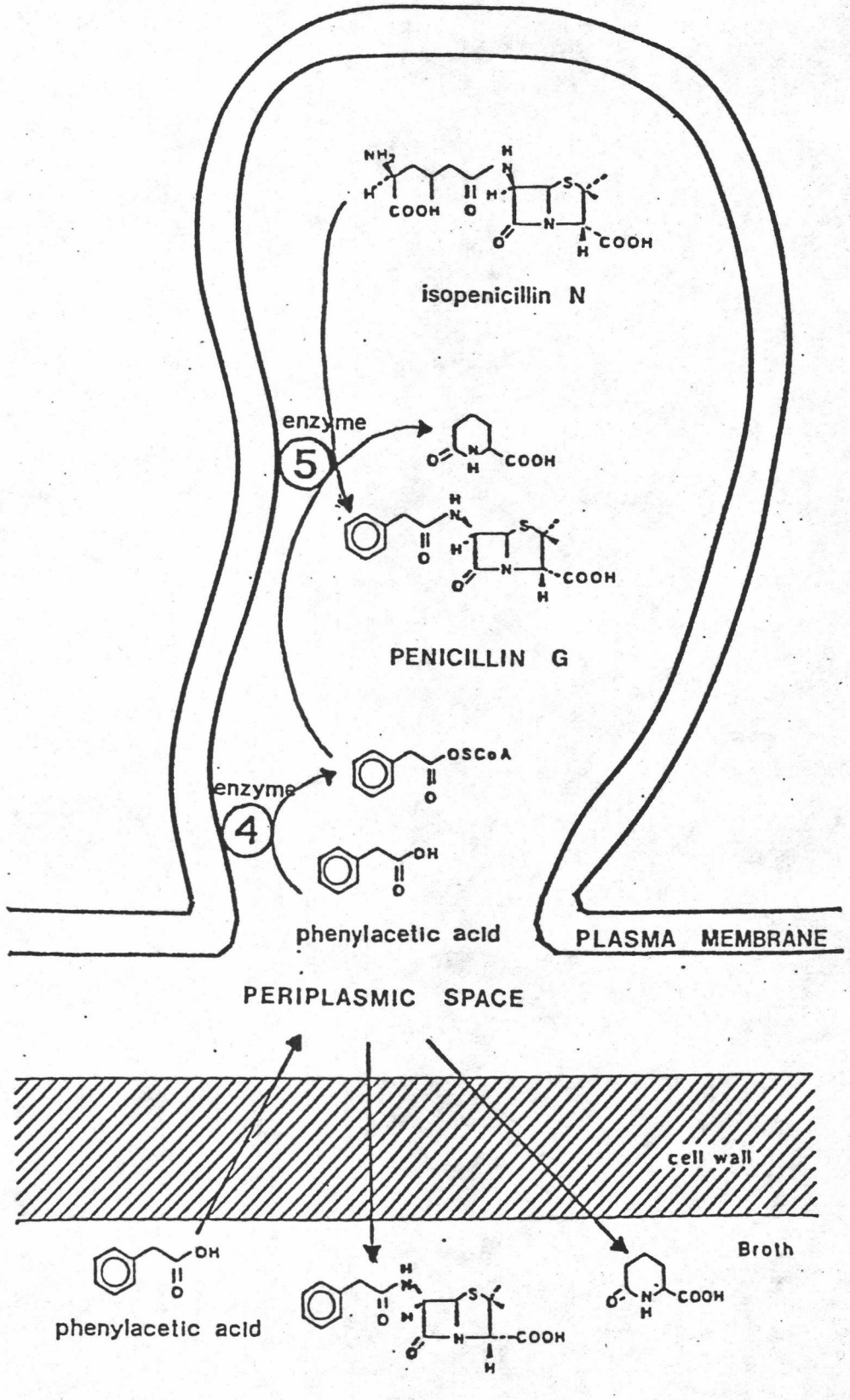
หลังจากมีการค้นพบเพนนิซิลินเป็นครั้งแรกในปี คศ.1928 และได้ทดลองรักษาผู้ป่วยในสงครามโลกครั้งที่ 2 เป็นผลสำเร็จ ในปี คศ.1941 จึงเริ่มมีการผลิตยาเพนนิซิลินในประเทศสหรัฐอเมริกา โดยการเลี้ยงเชื้อ Penicillium notatum บนอาหารแข็ง (surface culture) เป็นเวลา 5-10 วัน แล้วนำของเหลวที่อยู่ใต้เชื้อรา (liquid underlying the culture) มาหาปริมาณเพนนิซิลินได้ 10-20 หน่วย/มล. (1) ปี คศ.1938 Kluyver และ Perguin แสดงให้เห็นว่าสามารถเลี้ยงเชื้อราในอาหาร



enzyme 1 = α - (L-α aminoadipyl) -L-cysteine synthetase

enzyme 2 = α - (L-α -aminoadipyl) -L-cysteine-D-Valine synthetase

enzyme 3 = isopenicillin N



enzyme 4 = phenylacetic acid Co A ligase

enzyme 5 = acyltransferase

<u>รูปที่</u> 3 แสดงตำแหน่งของเอนไซม์ในเซลที่ใช้ในการสังเคราะห์เพนนิซิลิน (3)

เหลว (submerg culture) ได้ โดยใช้ แป้ง น้ำตาลแลคโตส และคอร์นสตีปลิเคอร์เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ (16) ต่อมาในปี คศ.1941 USDA.(United States Department of Agriculture) ได้พบเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่สามารถเจริญในอาหารเหลวได้ดีกว่า P. notatum คือ P. chrysogenum NRRL 1951 (1,9) หลังจากนั้น 7 ปี Moyer พบว่าการเติมกรดฟีนิลอะซีติกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้เพิ่มปริมาณการสร้างเพนนิซิลิน จี ได้ (1)

ต่อมามีการพัฒนากระบวนการผลิตเพนนิซิลิน จี โดยการหมักในอาหารเหลวด้วยวิธี batch fermentation โดยใช้น้ำตาลแลคโตสเป็นสารแหล่งคาร์บอน ใช้คอร์นสตีปลิเคอร์ (corn steep liquor) เป็นสารแหล่งไนโตรเจน พร้อมทั้งมีการเติมกรดฟีนิลอะซีติกเพื่อให้การผลิตเพนนิซิลิน จี สูงขึ้น (3) Whitaker รายงานว่าการปรับปรุงให้ได้ปริมาณเพนนิซิลิน จี สูงขึ้น จะต้องมีการเติมสารแหล่งคาร์บอน เช่น น้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลซูโครสอย่างต่อเนื่อง ในอัตราที่พอเหมาะในช่วงเวลาการหมัก (17) เพื่อป้องกันการสะสมของน้ำตาลเฮกโซส(hexose) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้ยังมีการเติมกรดฟีนิลอะซีติกและสารแหล่งไนโตรเจน จึงเกิดการหมักแบบ fed-batch fermention (3) ปัจจุบันได้มีการศึกษาการผลิตเพนนิซิลิน จี โดยวิธีการตรึงสายใย (immobilized mycelium) โดยในระยะแรกใช้โพลีอะคลีลาไมด์ เจล (polyacrylamide gel) ในระดับขวดเขย่า ได้ปริมาณเพนนิซิลิน จี เพียง 17% ของสายใยอิสระ ต่อมาพบว่าเมื่อใช้ แคลเซียมแอลจีเนต (calcium alginate) พบว่าได้ปริมาณเพนนิซิลิน จี สูงขึ้นเป็น 44% ของสายใยอิสระ (3) นอกจากนี้ยังใช้ ซีไลท์ (celite) (18)

5. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเพนนิซิลิน จี

5.1 วัตถุดิบ

5.1.1 สารแหล่งคาร์บอน

ในการผลิตเพนนิซิลิน จี ค่าใช้จ่ายส่วนใหญ่จะมาจากวัตถุดิบ คือ สารแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการหมัก (3) ฉะนั้นในการเลือกใช้สารแหล่งคาร์บอนจึงมีความสำคัญต่อต้นทุนการผลิตมาก สารแหล่งคาร์บอนที่ใช้ทั่วไปคือ น้ำตาลเพนโตส (pentose) น้ำตาลเฮกโซส (hexose) น้ำตาลโมเลกุลคู่ (disaccharides) น้ำตาลแลคโตส

เดกซ์ตริน (dextrin) แป้ง (starch) สารละลายแป้งที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ (starch hydrolysates) กากน้ำตาล (molasses) น้ำมันพืช (vegetable oils) (1,3) โดยมีรายงานว่าน้ำตาลแลคโตสเป็นสารแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดสำหรับการผลิตเพนนิซิลิน จี (3,9,11,19,20) เนื่องจากน้ำตาลแลคโตสจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์อย่างช้า ๆ โดยราสกุล Penicillium sp. (3,21) ทำให้ป้องกันการสะสมของน้ำตาลเฮกโซส(hexose) ที่เป็นสาเหตุของการยับยั้งการสังเคราะห์เพนนิซิลิน จี (3)

ส่วนการหมักเพนนิซิลินแบบ fed-batch สารแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการเติม (feed) เพื่อยืดอายุการทำงานของเชื้อรา คือ น้ำตาลกลูโคส หรือ น้ำตาลซูโครส โดยการเติมอย่างต่อเนื่องในอัตราที่พอเหมาะ จะช่วยป้องกันการสลายตัวของเส้นใยรา ทำให้ผลิตผลสูงขึ้น (3) นอกจากนี้ยังมีการใช้เอทธานอลเป็นสารแหล่งคาร์บอนโดยการเติมอย่างต่อเนื่อง (1,3,22) ข้อดีของการใช้เอทธานอลในการหมัก คือ เอทธานอลมีความบริสุทธิ์มากกว่าสารแหล่งคาร์บอนอื่นๆ ไม่มีสิ่งเจือปนทำให้สกัดเพนนิซิลินได้ง่าย นอกจากนี้เอทธานอลยังมีความหนืดต่ำ ทำให้สะดวกในการหมัก และเอทธานอลช่วยป้องกันการปนเปื้อนของจุลชีพอื่นในน้ำหมักด้วย (22)

5.1.2 <u>สารแหล่งไนโตรเจน</u>

การผลิตเพนนิซิลิน จี ในระดับอุตสาหกรรม ใช้คอร์นสตีปลิเคอร์เป็นสารแหล่งไนโตรเจน เนื่องจากคอร์นสตีปลิเคอร์มีสารอาหารต่างๆ เช่น กรดอะมิโน โปลีเปปไทด์ กรดแลคติก และเกลือแร่ต่างๆ ซึ่งจำเป็นในการสังเคราะห์เพนนิซิลินแล้ว คอร์นสตีปลิเคอร์ยังมีสารประกอบพวกฟีนิลอะลานีน (phenylalanine) ที่สามารถแตกตัวได้เป็นกรดฟีนิลอะซีติก ซึ่งเป็นสารตั้งต้น (percursor) ของการสังเคราะห์เพนนิซิลิน จี (1,9,21) ได้มีผู้พยายามใช้สารแหล่งไนโตรเจนอื่นแทนการใช้คอร์นสตีปลิเคอร์ จากการทดลองของห้องปฏิบัติการบริษัทแพน (Pan Laboratories) พบว่าสามารถใช้ แป้งเมล็ดฝ้าย (cottonseed flour) และฟาร์มีเดีย (pharmedia) ซึ่งเป็นชื่อทางการค้าแทนคอร์นสตีปลิเคอร์ได้ (1) ส่วนสารแหล่งไนโตรเจนอื่น ๆ ที่สามารถจะใช้ได้คือ เปลือกเมล็ดฝ้าย (cottonseed meal) และถั่วชนิดต่าง ๆ (1,3)

Lureและคณะได้แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของการเติมแอมโมเนียไนโตรเจน ในรูปของแอมโมเนียมซัลเฟต โดยพบว่าจะต้องรักษาความเข้มข้นของแอมโมเนียไนโตรเจน ให้อยู่ระหว่าง 250 - 340 ไมโครกรัม/มล. ตลอดช่วงเวลาการสัง

เคราะห์เพนนิซิลิน (23) เนื่องจากการขาดแอมโมเนียไนโตรเจนเป็นสาเหตุทำให้เกิดการสลายตัวของเส้นใยรา และทำให้อัตราการหายใจของเชื้อราลดลงอย่างรวดเร็ว (1)

5.1.3 <u>สารตั้งต้น</u>

สารตั้งต้นที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเพนนิซิลิน จี คือ กรดฟีนิลอะซีติก กรดฟีนิลอะซีติกมากกว่า 90% ถูกเปลี่ยนไปเป็นหมู่ข้างเคียง (side chain group) ของเพนนิซิลิน จี (1) เพื่อหลีกเลี่ยงการเป็นพิษต่อเซลของกรดฟีนิลอะซีติก จึงมีการเติมอย่างต่อเนื่อง และวิเคราะห์หาปริมาณกรดฟีนิลอะซีติกเป็นระยะในช่วงเวลาการหมัก โดยควบคุมความเข้มข้นของกรดฟีนิลอะซีติกในน้ำหมักให้อยู่ในช่วง 0.1 - 1.0 กรัม/ลิตร (3) ทำให้มีการใช้กรดฟีนิลอะซีติกอย่างมีประสิทธิภาพ (1,3)

Szarka พบว่า 1 - phenyl n - alkanes สามารถเป็นได้ทั้งสารแหล่งคาร์บอนสารแหล่งพลังงาน และสารตั้งต้น ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเพนนิซิลิน จี (1,24) โดยที่ 1 - phenyl n - alkane สามารถเปลี่ยนไปเป็นกรดฟีนิลอะซีติก ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (24)

5.2 <u>สภาวะที่เหมาะสม</u>

5.2.1 <u>อุณหภูมิ</u>

อุณหภูมิมีผลต่อการผลิตเพนนิซิลิน กล่าวคือที่อุณหภูมิประมาณ 30 ° ซ. จะทำให้เชื้อรามีการเจริญเติบโตเร็ว แต่ก็มีผลให้การสลายตัวของเพนนิซิลินเร็วขึ้นด้วย (3) ได้มีรายงานว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเพนนิซิลิน จี อยู่ระหว่าง 25 ° ซ.- 27 ° ซ. (3,11) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อราที่เราใช้ในการผลิตเพนนิซิลิน จี

5.2.2 <u>ความเป็นกรดด่าง</u>

ความเป็นกรดด่างของน้ำหมักที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเส้นใยรา และการสังเคราะห์เพนนิซิลิน จะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อราที่ใช้ (1) โดยทั่วไปความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเพนนิซิลิน จะอยู่ในช่วง 6.2 - 6.8 ถ้าความเป็นกรดด่างสูงกว่า 7.5 แล้วจะทำให้เพนนิซิลินสลายตัวได้ง่าย (3,10) ในขณะเดียวกันความเป็นกรดด่างมีผลต่อลักษณะภายนอก (morphology) ของเชื้อรา กล่าวคือ ที่ความเป็นกรดด่าง 6.0 เชื้อราจะมีสายใยบาง และยาว เกิดเป็นสายใย (filamentous) แต่ที่ความเป็นกรดด่าง 7.4 จะให้สายใยที่สั้นมีเซลบวมโต ทำให้เกิด

เป็นกลุ่มเส้นใย (pellet) (3) ดังนั้นจึงมีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อช่วยรักษาความเป็นกรดด่างให้อยู่ประมาณ 7.0 ส่วนการปรับความเป็นกรดด่างนั้นปรับโดยการเติมกรดซัลฟูริกและโซเดียมไฮดรอกไซด์ (11)

5.2.3 <u>อัตราการให้อากาศและอัตราการกวน</u>

อัตราการให้อากาศมีผลต่อปริมาณของออกซิเจนที่ละลายอยู่ในน้ำหมัก ซึ่งมีผลต่อการผลิตเพนนิซิลิน จี กล่าวคือ ถ้าปริมาณของออกซิเจนในน้ำหมักต่ำกว่า 25 - 30% ของอากาศอิ่มตัว (air saturation) จะทำให้อัตราการผลิตเพนนิซิลิน จี ลดลง (3,25,26,27) นอกจากนี้ปริมาณออกซิเจนยังมีผลต่อการเจริญของเชื้อ และ Phillip พบว่าออกซิเจนผ่านเข้าไปในกลุ่มเส้นใย (pellet) โดยวิธีการแพร่ (28) ถ้าปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักน้อย ทำให้บริเวณส่วนกลางของกลุ่มเส้นใยขาดออกซิเจนได้ง่าย ซึ่งเป็นสาเหตุของการสลายตัวของเซล (3) การควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก สามารถทำได้โดยการปรับอัตราการให้อากาศ ซึ่งส่วนใหญ่จะใช้อัตราการให้อากาศอยู่ระหว่าง 0.5 - 1.0 ลิตร/ 1 ลิตรของอาหาร/ นาที (vvm) (6)

สำหรับอัตราการกวน ถ้าเพิ่มอัตราการกวนแล้ว Konig พบว่าจะทำให้ระยะเวลาการผลิตเพนนิซิลิน จี สั้น และเชื้อรามีการเจริญเติบโตเร็วกว่าเมื่อใช้อัตราการกวนต่ำ (29) แต่ถ้าเพิ่มอัตราการกวนสูงเกินไป Varder และ Lilly พบว่าเซลจะมีเมตาโบไลท์ (metabolite) ไปในทางสร้างผนังเซลให้แข็งแรงขึ้น หรืออาจจะมีการซ่อมแซมเซลส่วนที่สึกหรอที่เกิดขึ้นเนื่องจากแรงเฉือนของใบพัด ทำให้อัตราการผลิตเพนนิซิลิน จี ลดลงอย่างรวดเร็ว (25)

5.2.4 <u>ลักษณะของเชื้อเริ่มต้นและปริมาณหัวเชื้อที่ใช้ในการหมัก</u>

ลักษณะของเชื้อเริ่มต้นมีผลต่อการผลิตเพนนิซิลิน จี (3,25) กล่าวคือ จำนวนสปอร์เริ่มต้นในอาหารเตรียมหัวเชื้อ จะมีผลต่อลักษณะของเชื้อเริ่มต้น ถ้าจำนวนสปอร์เริ่มต้นมากกว่า $5x10^{5}$ สปอร์/ลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ เชื้อเริ่มต้นจะมีลักษณะเป็นสายใย (filamentons) มีระดับเอนไซม์กลูโคส 6 ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส (glucose 6 - phosphate dehydrogenase) เอนไซม์ไอโซซิเตรท ดีไฮโดรจีเนส (isocitrate dehydrogenase) และ เอนไซม์แอลโดเลส (aldolase) สูง ทำให้มีการผลิตเพนนิซิลินสูง ถ้าหากจำนวนสปอร์เริ่มต้นต่ำกว่า $5x10^{5}$ สปอร์/ลิตรของอาหาร

เลี้ยงเชื้อ เชื้อเริ่มต้นจะมีลักษณะเป็นกลุ่มเส้นใย (pellet) มีระดับเอนไซม์ต่ำ ทำให้ประสิทธิภาพของการใช้กลูโคสต่ำ มีผลทำให้การผลิตเพนนิซิลินต่ำด้วย (3) สำหรับปริมาณหัวเชื้อที่ใช้ในการหมัก ส่วนใหญ่พบว่าอัตราการผลิตเพนนิซิลิน จี จะสูง เมื่อใช้หัวเชื้อปริมาณ 10% ของปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการหมัก (11,25)

6. <u>เหตุจูงใจในการทำวิจัย</u>

ข้อมูลเกี่ยวกับการพัฒนากระบวนการผลิตเพนนิซิลิน จี รวบรวมมาจากรายงานผลการวิจัย ส่วนข้อมูลของการพัฒนาการผลิตเพนนิซิลินที่ใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมนั้นต่างฝ่ายเก็บเป็นความลับไม่สามารถหามารายงานในที่นี้ได้ ฉะนั้นการวิจัยเพื่อพัฒนาการผลิตเพนนิซิลินจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งเพื่อที่จะใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการผลิตเพนนิซิลินในระดับอุตสาหกรรมต่อไป และเนื่องจากเพนนิซิลิน จี มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมยาและทางการแพทย์ แต่ในประเทศไทยยังไม่มีการผลิตเพนนิซิลิน จี ดังนั้นการศึกษาการผลิตเพนนิซิลิน จี อย่างจริงจังเป็นสิ่งจำเป็นมาก และเนื่องจากค่าใช้จ่ายส่วนใหญ่ในการผลิตเพนนิซิลิน จี มาจากวัตถุดิบที่ใช้ในการหมักตามที่กล่าวมาแล้ว ฉะนั้นการศึกษาหาแหล่งไนโตรเจน และสารแหล่งคาร์บอน ที่หาได้ง่ายภายในประเทศและราคาถูก จึงมีความสำคัญต่อการผลิต ดังได้กล่าวมาแล้วว่าในอุตสาหกรรมการผลิตเพนนิซิลิน จี สารแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ทั่วไป คือ คอร์นสตีปลิเคอร์ ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการผลิตแป้งข้าวโพด (2,21,30) แต่ในประเทศไทยไม่มีการผลิตคอร์นสตีปลิเคอร์ ถึงแม้ว่าจะมีโรงงานผลิตแป้งข้าวโพด ด้วยเหตุนี้จึงมีความจำเป็นที่จะต้องหาแหล่งไนโตรเจนมาทดแทน ส่วนสารแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตทั่วไป คือ น้ำตาลแลคโตส ซึ่งไม่มีการผลิตในประเทศไทย ทำให้มีราคาค่อนข้างสูง (ประมาณกิโลกรัมละ 32 บาท)

ดังนั้นโครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ ที่จะหาสารแหล่งไนโตรเจน และสารแหล่งคาร์บอน ที่มีอยู่ภายในประเทศ และมีราคาถูกมาทดแทนการใช้คอร์นสตีปลิเคอร์ และแลคโตส ในการผลิตเพนนิซิลิน จี โดยเชื้อ <u>Penicillium chrysogenum</u> A 88 ในระดับขวดเขย่า จากนั้นศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเพนนิซิลิน จี ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ต่อไป

7. ขั้นตอนการวิจัย

7.1 หาชนิดและปริมาณสารแหล่งไนโตรเจน และสารแหล่งคาร์บอน ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเพนนิซิลิน จี โดย Penicillium chrysogenum A 88 ในระดับขวดเขย่า โดยเน้นวัตถุดิบที่หาได้ในประเทศและมีราคาค่อนข้างต่ำ

7.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเพนนิซิลิน จี โดย Penicillium chrysogenum A 88 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

7.3 ศึกษาอัตราการเติมสารแหล่งพลังงาน และสารตั้งต้น คือ กรดฟีนิลอะซีติก (phenylacetic acid) ที่เหมาะสม ในระหว่างการผลิต (production phase) ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เพื่อให้ได้ปริมาณเพนนิซิลิน จี สูงสุด