บทที่ 4

บทวิจารณ์และสรุป

ในงานวิจัยนี้ได้ตั้งเป้าประสงค์หลักที่จะพยายามหาสารแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเพนนิซิลิน จี โดยเชื้อรา Penicillium chrysogenum A 88 เนื่องด้วยการผลิตเพนนิซิลิน จี ในระดับอุตสาหกรรมใช้คอร์นสตีปลีเคอร์เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน เพราะคอร์นสตีปลีเคอร์อุดมด้วยสารอาหารต่าง ๆ ที่จำเป็นในการสังเคราะห์เพนนิซิลิน จี และมีสารประกอบพวกฟีนิลอะลานีนที่สามารถแตกตัวเป็นสารตั้งต้นของการสร้างเพนนิซิลิน จี (1,21) แต่คอร์นสตีปลีเคอร์เป็นสารแหล่งไนโตรเจนที่ต้องมีการนำเข้าจากต่างประเทศ และมีราคาค่อนข้างสูง จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องศึกษาหาสารแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่มีภายในประเทศไทย และมีราคาถูกมาทดแทนการใช้คอร์นสตีปลีเคอร์ เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการผลิตเพนนิซิลิน จี ในประเทศไทย พร้อมกันนี้ก็พยายามหาสารแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกเพื่อมาทดแทนการใช้น้ำตาลแลคโตส และศึกษาการเติมกรดฟีนิลอะซีติกอย่างต่อเนื่อง เพื่อให้เชื้อสร้างเพนนิซิลิน จี ได้สูงขึ้น

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสร้างเพนนิซิลิน จี ในขวดรูปชมพู่ โดยเชื้อ P.chrysogenum A 88 พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันแล้ว เป็นสารแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน เชื้อสร้างเพนนิซิลิน จี ได้สูงสุด 3,590 หน่วย/มล. ในชั่วโมงที่ 120 และในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้คอร์นสตีปลีเคอร์เป็นสารแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน เชื้อสร้างเพนนิซิลิน จี ได้สูงสุด 3,570 หน่วย/มล. ในชั่วโมงที่ 120 จากการทดลองในข้อ 1.1.1 และ 1.1.2 จะเห็นได้ว่าสามารถใช้สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันแล้ว ปริมาตร 34.7% มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen) 1.5 กรัม/ลิตร (คำนวณจากภาคผนวกที่ 3) เป็นสารแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนแทนการใช้คอร์นสตีปลิเคอร์ได้ สำหรับประเทศไทยการใช้สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันแล้ว เป็นสารแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน มีข้อได้เปรียบกว่าการใช้คอร์นสตีปลิเคอร์ เนื่องจากเป็นวัตถุที่หาง่าย และราคาถูกกว่าคอร์นสตีปลิเคอร์ นอกจากนี้สารแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนก็มี

บทบาทสำคัญต่อเชื้อในการสร้างเพนนิซิลิน จี โดยทั่วไปแล้วการผลิตเพนนิซิลิน จี ใช้แอมโมเนียมซัลเฟต เป็นสารแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน เนื่องจากแอมโมเนียมซัลเฟตจะเป็นทั้งแหล่งไนโตรเจน และแหล่งซัลเฟต ในอัตราส่วนที่พอเหมาะสำหรับการสร้างเพนนิซิลิน จี อยู่แล้ว (1,3) ด้วยเหตุนี้ในการทดลองผลิตเพนนิซิลิน จี จึงใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นสารแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน และจากการทดลองในข้อ 1.1.3 พบว่า ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมสำหรับการสร้างเพนนิซิลิน จี คือ 5 กรัม/ลิตร

สารแหล่งคาร์บอนก็มีบทบาทสำคัญในการผลิตเพนนิซิลิน จี เพราะว่าจะเป็นค่าใช้จ่ายส่วนใหญ่ของการผลิตเพนนิซิลิน จี ในระดับอุตสาหกรรม ดังกล่าวมาแล้วในบทที่ 1 ดังนั้นการพิจารณาใช้สารแหล่งคาร์บอนในการผลิตเพนนิซิลิน จี จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง โดยทั่วไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเพนนิซิลิน จี ใช้สารแหล่งคาร์บอน 2 ชนิดร่วมกัน คือ น้ำตาลกลูโคส เป็นสารแหล่งคาร์บอนที่เชื้อราสามารถนำไปใช้ได้เร็วทำให้เชื้อราเจริญได้ดี จึงจำเป็นสำหรับการเจริญของเชื้อในระยะต้น แต่น้ำตาลกลูโคสจะเป็นตัวยับยั้งการสังเคราะห์ (catabolite repression) เพนนิซิลิน จี (38) จึงต้องให้ในปริมาณและเวลาที่พอเหมาะ โดยทั่วไปจะมีการใช้สารแหล่งคาร์บอนอีกตัวหนึ่งเพื่อทำหน้าที่ให้พลังงานแก่เซลอย่างต่อเนื่องในช่วงการผลิต (production phase) พบว่า สารแหล่งคาร์บอนที่นิยมใช้คือ น้ำตาลแลคโตส เนื่องด้วยน้ำตาลแลคโตสจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์อย่างช้า ๆ โดยเชื้อราสกุล Penicillium sp. ทำให้ไม่เกิดการสะสมของน้ำตาลเฮกโซสที่เป็นสาเหตุของการยับยั้งการสังเคราะห์เพนนิซิลิน จี (3,21) แต่น้ำตาลแลคโตสในประเทศไทยมีราคาแพง จึงพยายามทดลองหาสารแหล่งคาร์บอนอื่นมาทดแทนการใช้น้ำตาลแลคโตส จากการทดลองในข้อ 1.1.4 , 1.1.5 และ 1.1.6 พบว่า ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับการหมักเพื่อผลิตเพนนิซิลิน จี คือ 10 กรัม/ลิตร และพบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำตาลแลคโตสปริมาณ 30 กรัม/ลิตร เชื้อสร้างเพนนิซิลิน จี สูงสุด 4,200 หน่วย/มล. ในชั่วโมงที่ 120 ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แป้งมันสำปะหลังปริมาณ 30 กรัม/ลิตร เชื้อสร้างเพนนิซิลิน จี สูงสุด 2,520 หน่วย/มล. ในชั่วโมงที่ 120 ถึงแม้ว่าแป้งมันสำปะหลังเป็นสารแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกในประเทศไทย แต่ทว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แป้งมันสำปะหลัง เชื้อสร้างเพนนิซิลิน จี ต่ำกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำตาลแลคโตส ประมาณ 66.67% ดังนั้น ถึงแม้ว่าแป้งมันสำปะหลังจะมีราคาถูก แต่ก็

ไม่ใช่แหล่งคาร์บอนที่จะใช้แทนน้ำตาลแลคโตส เพราะให้ผลผลิตต่ำเกินไป

จากรายงานของ Whitaker พบว่า การเพิ่มปริมาณเพนนิซิลิน จี ให้สูงขึ้นอาจทำได้โดยการเติมสารแหล่งคาร์บอนอย่างต่อเนื่อง ซึ่งเป็นการหมักโดยวิธี fed-batch (17) แต่การทดลองด้วยวิธีนี้ ไม่สามารถทำได้ในระดับขวดเขย่า จึงต้องศึกษาในถังหมักขนาด 5 ลิตร ต่อไป

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเพนนิซิลิน จี นอกจากสารแหล่งคาร์บอน และสารแหล่งไนโตรเจนตามที่ศึกษามาแล้วนั้น อุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงเชื้อก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญ เพราะว่า อุณหภูมิก็มีผลต่อการเจริญของเชื้อ และการสังเคราะห์เพนนิซิลิน จี ทั้งนี้อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเพนนิซิลิน จี นั้น แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อราที่ใช้ผลิตเพนนิซิลิน จี (3) ได้ทำการทดลองเลี้ยงเชื้อ P.chrysogenum A 88 ในระดับขวดเขย่า ที่อุณหภูมิ 25 °ซ. และ 30 °ซ. จากการทดลองในข้อ 1.2 พบว่า ที่อุณหภูมิ 25 °ซ. และ 30 °ซ. เชื้อราเจริญได้ใกล้เคียงกัน แต่เชื้อสร้างเพนนิซิลิน จี สูงสุดแตกต่างกัน กล่าวคือ ที่อุณหภูมิ 25 °ซ. เชื้อสร้างเพนนิซิลิน จี สูงสุด 4,200 หน่วย/มล. ในชั่วโมงที่ 120 และที่อุณหภูมิ 30 °ซ. เชื้อสร้างเพนนิซิลิน จี สูงสุด 3,686 หน่วย/มล. ในชั่วโมงที่ 120 จะเห็นได้ว่า ที่อุณหภูมิ 25 °ซ. เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมกว่าสำหรับการผลิตเพนนิซิลิน จี โดยเชื้อรา P.chrysogenum A 88 ซึ่งตรงกับรายงานของ Sheehan และ คณะ (22)

การศึกษาการผลิตเพนนิซิลิน จี ในถังหมัก ปัจจัยที่ต้องคำนึงคือ เชื้อเริ่มต้น (inoculum) โดยพิจารณาถึง ลักษณะ ปริมาณ และอายุของเชื้อเริ่มต้น ฉะนั้นจึงต้องศึกษาการเจริญของเชื้อ P.chrysogenum A 88 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวกที่ 1.3) จากการทดลองในข้อ 1.3.1 พบว่า จำนวนสปอร์เริ่มต้นมีผลต่อลักษณะของเชื้อเริ่มต้น ดังนี้ คือ เมื่อใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้น $5x10^4$ และ $1x10^5$ สปอร์/ขวด เชื้อราเจริญเป็นกลุ่มสายใย (pellet) ขนาดใหญ่ แต่ถ้าใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้น $5x10^6$ สปอร์/ขวด เชื้อราเจริญเป็นกลุ่มสายใยขนาดเล็กมาก (รูปที่ 6.1 , 6.2) และถ้าใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้น $2.5x10^7$ สปอร์/ขวด เชื้อราเจริญเป็นสายใย (filamentous) กระจายไม่เกาะกลุ่ม (รูปที่ 6.3) ซึ่งเชื้อราที่เจริญเป็นเส้นใยกระจายเป็นลักษณะที่เหมาะสมสำหรับ

การผลิตเพนนิซิลิน จี เนื่องจากมีรายงานว่า เชื้อเริ่มต้นที่มีลักษณะเป็นสายใยสารอาหารผ่านเข้าเซลง่ายและ มีระดับเอนไซม์กลูโคส-6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส (glucose-6-phosphate dehydrogenase) เอนไซม์ไอโซซิเตรท ดีไฮโดรจีเนส (isocitrate dehydrogenase) และเอนไซม์แอลโดเลส (aldolase) สูง จึงมีผลให้การผลิตเพนนิซิลิน จี สูง (3) นอกจากจำนวนสปอร์เริ่มต้นที่มีผลต่อลักษณะของเชื้อเริ่มต้นตามที่กล่าวมาแล้ว ชนิดของสารแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อก็มีผลต่อลักษณะของเชื้อเริ่มต้นเช่นกัน จากผลการทดลองในข้อ 1.3.1 พบว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่ใช้คอร์นสตีปลิเคอร์เป็นสารแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน เชื้อราเจริญเป็นกลุ่มสายใยที่มีขนาดโตกว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่ใช้สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันแล้ว (รูปที่ 6.1 , 6.2) จะเห็นได้ว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่ใช้สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันแล้ว เป็นสารแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน โดยใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้น $2.5x10^7$ สปอร์/ขวด จะได้เชื้อราที่มีลักษณะเหมาะสมสำหรับเป็นหัวเชื้อของการผลิตเพนนิซิลิน จี ในถังหมัก

จากการติดตามการเจริญของเชื้อที่เพาะเลี้ยง โดยใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้น $2.5x10^7$ สปอร์/ขวด และใช้สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันแล้ว พบว่า อายุของเชื้อ ใช้ช่วงเวลาชั่วโมง ที่ 36 อยู่ในช่วงจุดกึ่งกลางของการเจริญแบบทวีคูณ (mid-log phase) ดังนั้นในการเตรียมหัวเชื้อเพื่อการศึกษาการผลิตเพนนิซิลิน จี ในถังหมักต่อไปจะเตรียมหัวเชื้อโดยใช้จำนวนสปอร์ $2.5x10^7$ สปอร์/ขวด ใช้อาหารที่มีสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันแล้ว เป็นแหล่งไนโตรเจน เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 36 ชั่วโมง และใช้หัวเชื้อปริมาณ 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) ซึ่งเป็นปริมาณหัวเชื้อที่ใช้ทั่วไป (11,25)

จากการทดลองในระดับขวดเขย่า พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยน้ำตาลแลคโตสปริมาณ 30 กรัม/ลิตร ร่วมกับน้ำตาลกลูโคส ปริมาณ 10 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันแล้ว ปริมาตร 347 มล./ลิตร ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต ปริมาณ 5 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน และอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการสร้างเพนนิซิลิน จี คือ ที่อุณหภูมิ 25 °ซ. นำองค์ประกอบ

ดังกล่าวมาทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมอื่น ๆ เพื่อให้เชื้อราสร้างเพนนิซิลิน จี ได้สูงขึ้น ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ได้มีผู้รายงานว่าปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการสร้างเพนนิซิลิน จี ในถังหมัก คือ ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก กล่าวคือ ถ้าปริมาณออกซิเจนในน้ำหมักต่ำกว่า 25-30% ของอากาศอิ่มตัว จะทำให้อัตราการผลิตเพนนิซิลิน จี ลดลง (3,25,26,27) นอกจากนั้นแล้ว ปริมาณออกซิเจนยังมีผลต่อการเจริญของเชื้อ กล่าวคือ ถ้าปริมาณออกซิเจนในน้ำหมักน้อย มีผลให้บริเวณส่วนกลางของกลุ่มสายใยขาดออกซิเจนได้ง่าย เป็นสาเหตุของการสลายตัวของเซล (3) ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักขึ้นอยู่กับ ส่วนประกอบของอาหาร อุณหภูมิ อัตราการให้อากาศ และอัตราการกวน ในการทดลองนี้ส่วนประกอบของอาหารคงที่ และใช้อุณหภูมิ 25 °ซ. ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตตลอดการหมัก และใช้อัตราการให้อากาศ 1 ลิตร/1 ลิตรของอาหาร/นาที ซึ่งเป็นอัตราการให้อากาศที่ใช้กันโดยทั่วไป (6) ดังนั้น จึงทำการผันแปรอัตราการกวน โดยใช้อัตราการกวน 300 , 400 , 500 และ 550 รอบ/นาที จากการทดลองในข้อ 2.1 พบว่า อัตราการกวนมีผลต่อการเจริญของเชื้อ คือ เมื่อใช้อัตราการกวนเพิ่มขึ้นจาก 300 , 400 และ 500 รอบ/นาที เชื้อมีการเจริญเพิ่มขึ้น ทั้งนี้เพราะว่า การเพิ่มอัตราการกวนเป็นการเพิ่มอากาศให้แก่อาหารเหลว แต่เมื่อเพิ่มอัตราการกวนเป็น 550 รอบ/นาที กลับเป็นผลให้เชื้อเจริญลดลง ซึ่งอาจเกิดขึ้นได้จากแรงเฉือนของใบพัดตัดสายใยของเชื้อรา จากการทดลองนี้พบว่า อัตราการกวน 500 รอบ/นาที เชื้อเจริญสูงที่สุดโดยให้ปริมาณเซลสูงสุด 16.8 กรัม/ลิตร ในชั่วโมงที่ 60 (รูปที่ 8) นอกจากนี้แล้วอัตราการกวนยังมีผลต่อการสร้างเพนนิซิลิน จี โดยพบว่า ที่อัตราการกวน 400 รอบ/นาที เชื้อสร้างเพนนิซิลิน จี ได้สูงสุด 3,829 หน่วย/มล. ในชั่วโมงที่ 84 (รูปที่ 10)

จากการทดลองในข้อ 2.1 ที่ใช้อัตราการกวน 400 รอบ/นาที เชื้อสร้างเพนนิซิลิน จี สูงสุดในชั่วโมงที่ 84 แล้วปริมาณเพนนิซิลิน จี คงที่ จะเห็นได้ว่า ขณะที่ปริมาณเพนนิซิลิน จี ในถังหมักขึ้นสูงสุด ความเข้มข้นของกรดฟีนิลอะซีติกในน้ำหมักต่ำกว่า 0.1 กรัม/ลิตร (รูปที่ 11) ซึ่งเป็นแนวโน้มว่า ปริมาณกรดฟีนิลอะซีติกเป็นข้อจำกัดในการสร้างเพนนิซิลิน จี จึงทดลองหาปริมาณกรดฟีนิลอะซีติกตั้งต้นที่เหมาะสม โดยผันแปรปริมาณกรดฟีนิลอะซีติกตั้งต้นดังนี้ 0.5 , 0.7 และ 1.0 กรัม/ลิตร จากการทดลองในข้อ 2.2 พบว่า ปริมาณกรดฟีนิลอะซีติกตั้งต้นดังกล่าว มีผลต่อการเจริญของเชื้อราน้อยมาก เชื้อรา

เจริญได้ใกล้เคียงกัน แต่มีผลต่อการสร้างเพนนิซิลิน จี โดยพบว่า ปริมาณกรดฟีนิลอะซีติกตั้งต้น 0.7 กรัม/ลิตร ทำให้เชื้อสร้างเพนนิซิลิน จี ได้สูงสุด 4,786, หน่วย/มล. ในชั่วโมงที่ 96 ส่วนปริมาณกรดฟีนิลอะซีติก 0.5 กรัม/ลิตร เป็นปริมาณที่น้อยเกินไป เมื่อเชลใช้ไประยะหนึ่ง ทำให้ปริมาณกรดฟีนิลอะซีติกที่เหลือในน้ำหมักมีน้อย เป็นผลให้เชลไม่สามารถนำไปใช้เป็นหมู่ข้างเคียงได้ จึงไม่มีการสังเคราะห์เพนนิซิลิน จี ต่อไป สำหรับปริมาณกรดฟีนิลอะซีติก 1.0 กรัม/ลิตร อาจเป็นปริมาณที่มากไป จึงมีผลต่อเชลในการสร้างเพนนิซิลิน จี Hersbach และคณะ (3) ได้รายงานไว้ว่า กรดฟีนิลอะซีติกเป็นกรดอ่อนที่สามารถแพร่กระจายอย่างอิสระผ่านเมมเบรน (membrane) ในรูปของ non dissociated ทำให้เกิด proton gradient อย่างรวดเร็วบริเวณรอบ ๆ เมมเบรน จึงเกิดการขัดขวางการย้อนกลับของ proton ทำให้ไม่เกิดการ coupling กับ oxidative phosphorylation จึงไม่มีการสร้าง ATP ทำให้มีผลต่อการสังเคราะห์เพนนิซิลิน จี

จากการศึกษาหาสารแหล่งคาร์บอน โดยเลี้ยงเชื้อ P.chrysogenum A 88 ในระดับขวดเขย่า ตามที่กล่าวมาแล้วนั้น ไม่สามารถหาสารแหล่งคาร์บอนอื่นมาทดแทนการใช้น้ำตาลแลคโตสได้ เพราะสารแหล่งคาร์บอนอื่นให้ปริมาณเพนนิซิลิน จี ต่ำเกินไป ดังนั้น การทดลองในถังหมักจึงได้ทดลองทดแทนการใช้น้ำตาลแลคโตส โดยการเติมสารละลายแหล่งคาร์บอนอย่างต่อเนื่อง แหล่งคาร์บอนที่ทดลองใช้ได้แก่ สารละลายกลูโคส สารละลายซูโครส และเอทธานอล เนื่องจากมีรายงานว่า ในการหมักเชื้อเพื่อผลิตเพนนิซิลิน จี สามารถเติมสารละลายแหล่งคาร์บอนอย่างต่อเนื่องเพื่อให้เชื้อใช้เป็นแหล่งพลังงานผลิตเพนนิซิลิน จี อย่างต่อเนื่อง (17,22) จากการทดลองในข้อ 2.3 พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สารละลายกลูโคส และสารละลายซูโครส เชื้อเจริญได้ใกล้เคียงกัน โดยให้ปริมาณเซลสูงสุด 17.6 และ 19.2 กรัม/ลิตร ในชั่วโมงที่ 132 และ 120 ตามลำดับ และในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สารละลายเอทธานอล เชื้อเจริญได้สูงสุดเพียง 12.6 กรัม/ลิตร ในชั่วโมงที่ 132 (รูปที่ 16) ส่วนผลของการเติมสารแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ต่อการสร้างเพนนิซิลิน จี พบว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สารละลายกลูโคสและสารละลายเอทธานอล เชื้อสร้างเพนนิซิลิน จี ได้สูงสุด 2,949 หน่วย/มล. เท่ากัน ในชั่วโมงที่ 108 (รูปที่ 17) จะเห็นได้ว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สารละลายซูโครส เชื้อเจริญได้

สูงมาก แต่เชื้อสร้างเพนนิซิลิน จี ได้เพียง 2,072 หน่วย/มล. ทั้งนี้อาจเนื่องจากเซลมีเมตาโบไลท์ไปในทางการสร้างเซล ทำให้เซลสร้างเพนนิซิลิน จี ได้น้อย เมื่อทดลองหาปริมาณที่เหมาะสมของสารละลายกลูโคส และสารละลายเอทธานอล ที่ใช้ในการเติมเพื่อให้ได้ปริมาณเพนนิซิลิน จี สูงสุด จากการทดลองในข้อ 2.4.1 และ 2.4.2 พบว่า สารละลายกลูโคสเข้มข้น 15% (น้ำหนัก/ปริมาตร) เชื้อสร้างเพนนิซิลิน จี ได้สูงที่สุด 3,829 หน่วย/มล. ในชั่วโมงที่ 108 (รูปที่ 24) และสารละลายเอทธานอลเข้มข้น 20% (ปริมาตร/ปริมาตร) เชื้อสร้างเพนนิซิลิน จี ได้สูงที่สุด 2,592 หน่วย/มล. ในชั่วโมงที่ 96 (รูปที่ 20) เมื่อเปรียบเทียบการสร้างเพนนิซิลิน จี โดยเชื้อรา P. chrysogenum A 88 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สารละลายกลูโคส และสารละลายเอทธานอล จะเห็นได้ว่า สารละลายกลูโคสเข้มข้น 15% (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นสารแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเพนนิซิลิน จี เนื่องจากให้ปริมาณเพนนิซิลิน จี สูง และเป็นสารแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกกว่าสารละลายเอทธานอลด้วย

จากการทดลองในข้อ 2.4.1 และ 2.4.2 พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สารละลายกลูโคสเข้มข้น 15% (น้ำหนัก/ปริมาตร) เชื้อสร้างเพนนิซิลิน จี ได้สูงที่สุดในชั่วโมงที่ 108 หลังจากนั้นปริมาณเพนนิซิลิน จี คงที่ จะเห็นได้ว่า ขณะที่ปริมาณเพนนิซิลิน จี ในถังหมักขึ้นสูงสุด ความเข้มข้นของกรดฟีนิลอะซีติกในน้ำหมักต่ำกว่า 0.1 กรัม/ลิตร (รูปที่ 25) ซึ่งอาจจะเป็นข้อจำกัดในการสร้างเพนนิซิลิน จี และได้มีรายงานว่า ความเข้มข้นของกรดฟีนิลอะซีติกในน้ำหมักควรจะต้องอยู่ในช่วง 0.1-1.0 กรัม/ลิตร (1,3) ดังนั้นเพื่อเพิ่มการสร้างเพนนิซิลิน จี ให้มีปริมาณสูงขึ้น จึงได้ทดลองเติมกรดฟีนิลอะซีติกอย่างต่อเนื่อง โดยหาความเข้มข้นที่เหมาะสม ดังการทดลองในข้อ 2.5 พบว่า การเติมกรดฟีนิลอะซีติกเข้มข้น 0.45% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ด้วยอัตราการเติม 20 มล./ 6 ชม. ทุก ๆ 6 ชั่วโมง ตลอดการหมัก โดยเริ่มเติมในชั่วโมงที่ 48 เป็นการเติมที่เหมาะสมสำหรับการสร้างเพนนิซิลิน จี ซึ่งเชื้อสร้างเพนนิซิลิน จี ได้สูงที่สุด 8,007 หน่วย/มล. หรือ 3.50 กรัม/ลิตร ในชั่วโมงที่ 144 ของการหมัก

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองในข้อ 2.5 กับผลการรายงานการผลิตเพนนิซิลิน จี โดยเชื้อ P. chrysogenum A 88 ในถังหมักขนาด 10 ลิตร โดยใช้สารละลาย

เอทธานอลเข้มข้น 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) ด้วยอัตราการเติม 30 มล./ชม. โดยเริ่มเติมในชั่วโมงที่ 12 เป็นสารแหล่งคาร์บอน และเติมโปแตสเซียมฟีนิลอะซีเตรท เข้มข้น 12.5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ด้วยอัตรา 10 มล./ 8 ชม. เป็นสารตั้งต้น พบว่า ในชั่วโมงที่ 119 เชื้อสร้างเพนนิซิลิน จี 3,950 หน่วย/มล. (22) เมื่อพิจารณาผลการทดลองทั้งสองจะเห็นว่า การใช้สารละลายกลูโคสเป็นสารแหล่งคาร์บอนมีแนวโน้มว่าจะสามารถใช้เป็นสารแหล่งคาร์บอนที่ดีสำหรับการผลิตเพนนิซิลิน จี แทนการใช้น้ำตาลแลคโตสได้

อย่างไรก็ตาม เมื่อทำการเติมกรดฟีนิลอะซีติกอย่างต่อเนื่องในปริมาณที่เหมาะสมแล้ว เมื่อถึงช่วงเวลาหนึ่ง เชื้อจะหยุดสังเคราะห์เพนนิซิลิน จี จึงต้องพิจารณาถึงปัจจัยอื่น ๆ ที่อาจจะมีผลต่อการสังเคราะห์เพนนิซิลิน จี ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า ปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจน และปริมาณซัลเฟต ในน้ำหมักต่ำเกินไป ทำให้มีผลต่อเชื้อในการสร้างเพนนิซิลิน จี หรือ ปริมาณกรดฟีนิลอะซีติกในชั่วโมงที่ 96 เริ่มลดลงต่ำ (รูปที่ 29) จึงทำการทดลองในข้อ 2.6 , 2.7 และ 2.8 เพื่อหาสาเหตุของปัจจัยเหล่านั้น พบว่าปัจจัยที่กล่าวมานั้น ไม่ได้เป็นตัวจำกัดการสังเคราะห์เพนนิซิลิน จี ภายใต้การทดลองนี้ ดังนั้น สาเหตุหนึ่งที่อาจจำกัดการสร้างเพนนิซิลิน จี คือ ตัวเชื้อราไม่มีความสามารถที่จะสังเคราะห์เพนนิซิลิน จี ต่อไปได้อีก โดยดูจากลักษณะของเชื้อในระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมักจากภาพถ่ายของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากการทดลองในข้อ 2.9 จะเห็นได้ว่า หลังจากชั่วโมงที่ 144 แล้ว สายใยจะขาดเป็นส่วน ๆ เกิดการสลายตัวของเซล ทำให้กิจกรรมต่าง ๆ ภายในเซลต่ำมาก จึงไม่มีการสร้างเพนนิซิลิน จี อีกต่อไป

ความเป็นกรดด่างเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ และการสร้างเพนนิซิลิน จี ได้มีผู้รายงานว่า ความเป็นกรดด่างของน้ำหมักที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการสังเคราะห์เพนนิซิลิน จี จะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อราที่ใช้ (1) โดยพบว่า ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเพนนิซิลิน จี คือ 6.5 (8) ส่วนความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ คือ 6.0 (3,10) ถ้าหากเปรียบเทียบการทดลองในข้อ 3.0 โดยการควบคุมความเป็นกรดด่างเป็น 2 ช่วง คือ ช่วงแรกซึ่งเป็นระยะการเจริญจะควบคุมความเป็นกรดด่าง 6.0 และหลังจากเติมสารตั้งต้น จะควบคุม

ความเป็นกรดด่าง 6.5 กับการทดลองที่ควบคุมความเป็นกรดด่างระหว่าง 5.8-7.1 ตลอดการหมัก ในการทดลองข้อ 2.6 พบว่า การเลี้ยงเชื้อที่ควบคุมความเป็นกรดด่างที่ระหว่าง 5.8-7.1 เชื้อสร้างเพนนิซิลิน จี ได้สูงที่สุด 8,175 หน่วย/มล. หรือ 3.52 กรัม/ลิตร ในชั่วโมงที่ 144 ส่วนการเลี้ยงเชื้อที่ควบคุมความเป็นกรดด่าง 2 ช่วง เชื้อสร้างเพนนิซิลิน จี สูงสุด 7,179 หน่วย/มล. หรือ 3.10 กรัม/ลิตร ในชั่วโมงที่ 144 ของการหมัก ดังนั้นการเลี้ยงเชื้อที่ควบคุมความเป็นกรดด่างอยู่ระหว่าง 5.8-7.1 ตลอดการหมัก น่าจะเป็นวิธีการที่เหมาะสมในการผลิตเพนนิซิลิน จี มากกว่า การเลี้ยงเชื้อที่ควบคุมความเป็นกรดด่าง 2 ช่วง

เมื่อเปรียบเทียบการใช้น้ำตาลแลคโตส จากการทดลองในข้อ 3.0. กับ สารละลายกลูโคสที่เติมอย่างต่อเนื่อง เป็นสารแหล่งคาร์บอนแล้ว พบว่า เมื่อใช้น้ำตาลแลคโตส เชื้อสร้างเพนนิซิลิน จี สูงสุด 6,300 หน่วย/มล. หรือ 2.97 กรัม/ลิตร ในชั่วโมงที่ 144 ของการหมัก แต่เมื่อใช้สารละลายกลูโคสโดยการเติมอย่างต่อเนื่อง เชื้อสร้างเพนนิซิลิน จี สูงสุด 7,179 หน่วย/มล. หรือ 3.10 กรัม/ลิตร ในชั่วโมงที่ 144 ของการหมัก จากผลการทดลองนี้พอจะสรุปได้ว่า การผลิตเพนนิซิลิน จี สามารถใช้สารละลายกลูโคสโดยเติมอย่างต่อเนื่อง เป็นสารแหล่งคาร์บอนแทนการใช้น้ำตาลแลคโตสได้ และมีข้อได้เปรียบกว่าด้วย เพราะสามารถลดต้นทุนการผลิต คาดว่าจะมีประโยชน์ในการศึกษาวิจัยระดับขยายส่วนต่อไป

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเพนนิซิลิน จี โดยเชื้อ P.chrysogenum A 88 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ในงานวิจัยนี้พบว่า เชื้อสามารถสร้างเพนนิซิลิน จี สูงสุด 8,175 หน่วย/มล. หรือ 3.52 กรัม/ลิตร ในชั่วโมงที่ 144 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สารละลายกลูโคสเข้มข้น 15% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ด้วยอัตราการเติม 5 มล./ชม. ทุก ๆ ชั่วโมง ตลอดการหมัก โดยเริ่มเติมในชั่วโมงที่ 12 และเติมสารละลายกรดฟีนิลอะซีติกเข้มข้น 0.45% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ด้วยอัตราการเติม 20 มล./ 6 ชม. ทุก ๆ 6 ชั่วโมง ตลอดการหมัก โดยเริ่มเติมในชั่วโมงที่ 48 และมีอาหารเลี้ยงเชื้อที่ควบคุมความเป็นกรดด่างอยู่ระหว่าง 5.8 - 7.1 จะเห็นได้ว่าปริมาณเพนนิซิลิน จี ที่เชื้อสร้างได้เป็นปริมาณที่ค่อนข้างต่ำ เมื่อเทียบกับการผลิตเพนนิซิลิน จี ใน

ระดับอุตสาหกรรมที่ให้ปริมาณเพนนิซิลิน จี สูงถึง 67,000-83,000 หน่วย/มล. หรือ 40-50 กรัม/ลิตร (3,8) เนื่องจาก เชื้อราที่ใช้มีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์เพนนิซิลิน จี ต่ำกว่าที่ใช้ในอุตสาหกรรม ซึ่งมีการพัฒนาสายพันธุ์มาเป็นเวลายาวนานอย่างต่อเนื่อง ฉะนั้นการพยายามปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อราตัวนี้ให้มีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์เพนนิซิลิน จี มากยิ่งขึ้นจึงเป็นงานวิจัยที่จะต้องดำเนินการต่อไป

ในการทดลองแต่ละครั้ง ถึงแม้ว่าใช้สูตรอาหารเดียวกันแต่บางครั้งให้ผลการทดลองที่มีความคาดเคลื่อน (error) คือ ปริมาณเพนนิซิลิน จี สูงสุดที่ได้อาจต่างกันไปบ้าง ทั้งนี้เนื่องมาจากสาเหตุต่าง ๆ ดังนี้ คือ

1. ในน้ำหมักมีปริมาณเพนนิซิลิน จี สูง การวิเคราะห์ปริมาณเพนนิซิลิน จี โดยวิธีทางชีววิทยา ตามวิธีการวิจัยข้อ 3.1 นั้น ต้องเจือจางน้ำหมักให้อยู่ในช่วงที่พอเหมาะ จึงเกิดความคลาดเคลื่อนในระหว่างการเจือจางขึ้นได้

2. การวิเคราะห์ปริมาณเพนนิซิลิน จีโดยวิธีการวิจัยข้อ 3.1 นั้น ต้องวัดความกว้างของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) การวัดแต่ละครั้งอาจเกิดความคลาดเคลื่อนได้ และเมื่อคำนวณค่าปริมาณเพนนิซิลิน จี ต้องคูณด้วยค่า dilution factor ทำให้ค่าปริมาณเพนนิซิลิน จี ผิดไปมากได้

แต่อย่างไรก็ตาม การคลาดเคลื่อนเล็กน้อยดังกล่าว ก็ไม่เป็นอุปสรรคต่อการสรุปผลการทดลอง เพราะผลการแปรผันปัจจัยต่าง ๆ ได้ปริมาณเพนนิซิลิน จี ต่างกันอย่างเห็นได้ชัดเจนมาก