สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี โดยเชื้อรา *Acremonium chrysogenum* ATCC 36225

นางสาวกาญจนา	พฤษพันธ์	รหัสนักศึกษา	35504303
นายศุภวัตร	ธำรงทรัพย์	รหัสนักศึกษา	35504344
นางสาวสุรางคนา	ทักษะศุภการ	รหัสนักศึกษา	35504348

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2538

ว.ท. ก 2539 ก
เลขหมู่ 2538
เลขทะเบียน 25402
วัน, เดือน, ปี 9 ก.ค. 2539

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

The studies of optimum condition for Cephalosporin C synthesis by *Acremonium chrysogenum* ATCC 36225.

Miss Kanchana	Pruesapan	35504303
Mr. Supawat	Thumrongsap	35504344
Miss Surangkana	Taksasupakan	35504348

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the

Requirment for the Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

1995

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารปฏิชีวนะเซฟา-โลสปอริน ซี โดยเชื้อรา *Acremonium chrysogenum* ATCC 36225	
โดย	นางสาวกาญจนา	พฤษพันธ์
	นายศุภวัตร	ธำรงทรัพย์
	นางสาวสุรางคนา	ทักษะศุภการ
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์	
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์อรไท	สุขเจริญ

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

ลายเซ็นต์

_____

(ดร. อุ่นเรือน ศิริวานิชกุล) หัวหน้าภาควิชา

คณะกรรมการโครงงานพิเศษ

_____

(รศ. ดร. ดุษณี ธนะบริพัฒน์) ประธานกรรมการ

_____

(ดร. อุ่นเรือน ศิริวานิชกุล) กรรมการ

_____

(อ. อรไท สุขเจริญ) กรรมการ

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี โดยเชื้อรา *Acremonium chrysogenum* ATCC 36225

นักศึกษา นางสาวกาญจนา พฤษพันธ์
นายศุภวัตร ธำรงทรัพย์
นางสาวสุรางคนา ทักษะศุภการ

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์อรไท สุขเจริญ

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

ปีการศึกษา 2538

บทคัดย่อ

การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี (Cephalosporin C) โดยเชื้อ *Acremonium chrysogenum* ATCC 36225 เพื่อหาแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแหล่งไขมันที่เหมาะสม โดยทำการทดลองในสภาวะที่มีความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 192 ชั่วโมง พบว่าแหล่งอาหารที่ให้เชื้อผลิตสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี ได้สูงสุด มีแหล่งคาร์บอนเป็น น้ำตาลฟรักโทสร้อยละ 1 แหล่งไนโตรเจนเป็นยูเรียร้อยละ 0.5 และแหล่งไขมันเป็นน้ำมันปาล์มซึ่งเป็นแหล่งไขมันที่ได้จากธรรมชาติ โดยปริมาณสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี ที่ได้เมื่อทำการตรวจวัดด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี (High Performance Liquid Chromatography) มีปริมาณเท่ากับ 79.86 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 168 ซึ่งในช่วงดังกล่าวค่าความเป็นกรดด่างมีค่าเท่ากับ 7.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	The studies of optimum condition for Cephalosporin C synthesis by *Acremonium chrysogenum* ATCC 36225
Name	Miss Kanchana Pruesapan
	Mr. Supawat Thumrongsap
	Miss Surangkana Taksasupakan
Special Project Advisor	Miss Oratai Sukcharoen
Department	Applied Biology
Academic year	1995

ABSTRACT

Cephalosporin C production by a highly productive *Acremonium chrysogenum* ATCC 36225 was studied under various concentrations of carbon , nitrogen and lipid sources. Cultures were incubated at 25° C for 192 hours on a rotary shaker at 250 rpm. *A. chrysogenum* ATCC 36225 produced a maximum yeild of Cephalosporin C in the medium containing fructose 1 % , urea 0.5 % and palm oil as carbon , nitrogen and lipid source respectively. Cephalosporin C was detected by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with maximum production of 79.86 µg/ml at 168 hours and pH 7.5.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต คณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณ อาจารย์อรไท สุขเจริญ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษที่ให้คำแนะนำรวมทั้งให้ความรู้ในด้านต่างๆ รศ.ดร.ดุษณี ธนะบริพัฒน์ ที่ได้กรุณาตรวจแก้ทางด้านภาษา ให้คำแนะนำต่างๆ และกรุณาเป็นประธานกรรมการพิจารณาโครงงานพิเศษ ดร.อุ่นเรือน ศิริวานิชกุล ที่ได้กรุณาเรื่องสถานที่ เครื่องมือทดลอง และกรุณาเป็นกรรมการพิจารณาโครงงานพิเศษ อาจารย์อารี กังแฮ และอาจารย์ดวงใจ โอชัยกุล ที่ให้คำแนะนำต่างๆ รวมทั้งพี่ๆ เจ้าหน้าที่ห้องทดลอง และเพื่อนๆที่ให้คำแนะนำในระหว่างการจัดทำโครงงานพิเศษนี้จนเสร็จสมบูรณ์

16 มีนาคม 2539

คณะผู้จัดทำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อโครงงานพิเศษภาษาไทย	ก
บทคัดย่อโครงงานพิเศษภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญรูป	ง
บทที่ 1 บทนำ	
1. เหตุจูงใจในการทำการวิจัย	1
2. วัตถุประสงค์	1
3. ขอบเขต	1
4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	
1. ประวัติและความเป็นมา	3
2. คุณสมบัติทางเคมี	4
3. การสังเคราะห์ (Biosynthesis)เซฟาโลสปอริน ซี	6
4. การพัฒนากระบวนการผลิตเซฟาโลสปอริน ซี	9
5. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเซฟาโลสปอริน ซี	10
6. สภาวะที่เหมาะสมของการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อการผลิตสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี	15
บทที่ 3 วิธีการทดลอง	
1. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	17
2. วิธีดำเนินการทดลอง	19
3. วิธีการวิเคราะห์	20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หน้า

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ชนิดของแหล่งคาร์บอน 22

2. ปริมาณที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน 30

3. ชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม 37

4. ปริมาณที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจน 39

5. ชนิดของแหล่งไขมันที่เหมาะสม 42

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและวิจารณ์ 45

ภาคผนวก ก. 47

ภาคผนวก ข. 49

เอกสารอ้างอิง 54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างของสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน	5
รูปที่ 2 ตัวอย่างอนุพันธ์กึ่งสังเคราะห์ของสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน	7
รูปที่ 3 กระบวนการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี	8
รูปที่ 4 แสดงปริมาณเซฟาโลสปอริน ซี ในอาหารที่มีเซลลูไบโอส และฟรักโทสร้อยละ 3 เป็นแหล่งคาร์บอน	23
รูปที่ 5 แสดงปริมาณเซฟาโลสปอริน ซี ในอาหารที่มีมอลโทส และไซโลส ร้อยละ 3 เป็นแหล่งคาร์บอน	24
รูปที่ 6 แสดงปริมาณเซฟาโลสปอริน ซี ในอาหารที่มีเซลลูโลส และกลูโคส ร้อยละ 3 เป็นแหล่งคาร์บอน	25
รูปที่ 7 แสดงปริมาณเซฟาโลสปอริน ซี ในอาหารที่มีแล็กโทส และอินนูลิน ร้อยละ 3 เป็นแหล่งคาร์บอน	26
รูปที่ 8 แสดงปริมาณเซฟาโลสปอริน ซี ในอาหารที่มีกาแล็กโทส และ ซอร์บิทอลร้อยละ 3 เป็นแหล่งคาร์บอน	27
รูปที่ 9 แสดงปริมาณเซฟาโลสปอริน ซี ในอาหารที่มีราฟฟิโนส และ น้ำแป้งร้อยละ 3 เป็นแหล่งคาร์บอน	28
รูปที่ 10 แสดงปริมาณเซฟาโลสปอริน ซี ในอาหารที่มีซูโครส และ แมนโนสร้อยละ 3 เป็นแหล่งคาร์บอน	29
รูปที่ 11 แสดงปริมาณเซฟาโลสปอริน ซี ในอาหารที่มีการผันแปรแหล่ง คาร์บอนราฟฟิโนสเป็นร้อยละ 1 , 2 , 3 , 4 , 5 ตามลำดับ	31
รูปที่ 12 แสดงปริมาณเซฟาโลสปอริน ซี ในอาหารที่มีการผันแปรแหล่ง คาร์บอนฟรักโทสเป็นร้อยละ 1 , 2 , 3 , 4 , 5 ตามลำดับ	32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หน้า

รูปที่ 13 แสดงปริมาณเซฟาโลสปอริน ซี ในอาหารที่มีการผันแปรแหล่งคาร์บอนกาแล็กโทสเป็นร้อยละ 1 , 2 , 3 , 4 , 5 ตามลำดับ 33

รูปที่ 14 แสดงปริมาณเซฟาโลสปอริน ซี ในอาหารที่มีการผันแปรแหล่งคาร์บอนซูโครสเป็นร้อยละ 1 , 2 , 3 , 4 , 5 ตามลำดับ 34

รูปที่ 15 แสดงปริมาณเซฟาโลสปอริน ซี ในอาหารที่มีการผันแปรแหล่งคาร์บอนมอลโทสเป็นร้อยละ 1 , 2 , 3 , 4 , 5 ตามลำดับ 35

รูปที่ 16 แสดงความเป็นกรดด่าง น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณการผลิตเซฟาโลสปอริน ซี โดยเชื้อรา ***Acremonium chrysogenum*** ATCC 36225 ในอาหารที่มีฟรักโทสร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน 36

รูปที่ 17 แสดงการผลิตสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี ในอาหารที่มีฟรักโทสร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรผันแหล่งไนโตรเจน 7 แหล่ง คือ โพแทสเซียมไนเตรต แอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมซัลเฟต ยูเรีย แอลอาร์จินีน แอลแอสพาราจีน 38

รูปที่ 18 แสดงการผลิตสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี โดยเชื้อรา ***Acremonium chrysogenum*** ATCC 36225 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีฟรักโทสร้อยละ 1 และ 0.5 เป็นแหล่งคาร์บอน โดยผันแปรแหล่งไนโตรเจนเป็นยูเรีย และแอลอาร์จินีนร้อยละ 0.5 , 0.2 และ 0.05 ตามลำดับ 40

รูปที่ 19 แสดงความเป็นกรดด่าง น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณการผลิตเซฟาโลสปอริน ซี โดยเชื้อรา ***Acremonium chrysogenum*** ATCC 36225 ในอาหารที่มีฟรักโทสร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน และมียูเรียร้อยละ 0.5 เป็นแหล่งไนโตรเจน 41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หน้า

รูปที่ 20 แสดงการผลิตสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี โดยเชื้อรา *Acremonium chrysogenum* ATCC 36225 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีชนิดของแหล่งไขมันแตกต่างกัน 43

รูปที่ 21 แสดงความเป็นกรดด่าง น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณการผลิตเซฟาโลสปอริน ซี โดยเชื้อรา *Acremonium chrysogenum* ATCC 36225 ในอาหารที่มีฟรักโทสร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน มียูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน และมีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งไขมัน 44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.เหตุจูงใจในการทำการวิจัย

ปัจจุบันยาปฏิชีวนะมีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมการผลิตยาและการใช้ประโยชน์ทางด้านการแพทย์ ซึ่งสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี (Cephalosporin C) เป็นสารปฏิชีวนะตัวหนึ่งที่มีความสำคัญเพราะมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับสารปฏิชีวนะเพนิซิลลิน (Penicillin) ต่อการทำลายเชื้อแบคทีเรียได้เหมือนกัน แต่จะทนต่อการทำลายโดยเอนไซม์เบตาแลคแตมเมส (β-Lactamase) ได้ดีกว่า และใช้ได้ดีกับผู้ป่วยที่แพ้ยาเพนิซิลลิน แต่เนื่องจากยาตัวนี้มีราคาแพงและยังไม่แพร่หลายในอุตสาหกรรมการผลิตยาปฏิชีวนะในประเทศไทย อีกทั้งค่าใช้จ่ายในการผลิตสารปฏิชีวนะส่วนใหญ่มาจากวัตถุดิบที่ใช้ในการหมัก ดังนั้นการหาแหล่งวัตถุดิบที่มีราคาถูกและหาได้ง่ายในท้องถิ่นมาใช้ จะช่วยลดต้นทุนในการผลิตสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี ในระดับอุตสาหกรรมได้ โดยใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูง คือ ***Acremonium chrysogenum*** ATCC 36225

2.วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาหาแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน แหล่งไขมันและความเข้มข้นที่เหมาะสมเพื่อให้เชื้อ ***Acremonium chrysogenum*** ATCC 36225 เจริญและสังเคราะห์สารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี ได้สูงสุด

3.ขอบเขต

เป็นการศึกษาแหล่งอาหารคือ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแหล่งไขมันในความเข้มข้นที่เหมาะสมเพื่อให้เชื้อ ***A. chrysogenum*** ATCC 36225 เจริญและสังเคราะห์สารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี ได้สูงสุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถผลิตสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี โดยใช้แหล่งอาหารที่หาได้ง่ายและราคาถูก

2. เพื่อเป็นแนวทางในการผลิตสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี ในระดับอุตสาหกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

1. ประวัติและความเป็นมา

การค้นพบและการพัฒนาเกี่ยวกับสารปฏิชีวนะ ในกลุ่มเซฟาโลสปอริน (Cephalosporin) นั้นได้เริ่มขึ้นในระหว่างยุคหลังสงคราม ในปี ค.ศ. 1948 โดย Brotzu ได้พบเชื้อจุลินทรีย์จากการแยกออกมาจากน้ำทะเลใกล้ๆ กับท่อระบายสิ่งโสโครกที่ Cagtiari ประเทศ Sardina ซึ่งเชื้อตัวนี้สามารถทำลายแบคทีเรีย ทั้งแกรมบวกและแกรมลบได้ และต่อมาได้จำแนกและพบว่าเป็นเชื้อราที่มีสายพันธุ์ที่เรียกว่า ***Cephalosporium acremonium*** ซึ่งต่อมาภายหลังได้มีการจัดจำแนกใหม่ แล้วให้ชื่อเชื้อว่า ***Acremonium chrysogenum*** (Lemke และ Brannon , 1972) ในระยะแรกนั้นความก้าวหน้าเกี่ยวกับเซฟาโลสปอรินเป็นไปอย่างช้าๆ ทั้งนี้เพราะกิจกรรมที่ดำเนินร่วมกันของสารในกลุ่มเซฟาโลสปอรินที่ยังไม่สามารถแยกออกจากกันได้ รวมถึงความสัมพันธ์ที่เกี่ยวกับสารปฏิชีวนะในกลุ่มของเพนิซิลลิน (Penicillin) ที่เกิดขึ้นเนื่องจากสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน เอ็น (Cephalosporin N) ซึ่งคิดว่าน่าจะเป็นสารในกลุ่มของเพนิซิลลินตัวใหม่ที่เรียกว่าเพนิซิลลิน เอ็น (Penicillin N : Abraham และ Newton ,1954) ซึ่งสารตัวนี้มีสูตรโมเลกุลเหมือนกับ ไอโซเพนิซิลลิน เอ็น (Isopenicillin N) แต่มีตำแหน่งต่างกัน สารปฏิชีวนะในกลุ่มเซฟาโลสปอรินที่แยกสกัดได้จากเชื้อรา *C. acremonium* ประกอบด้วยสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี (Cephalosporin C) , เซฟาโลสปอริน เอ็น (Cephalosporin N : Penicillin N) และเซฟาโลสปอริน พี (Cephalosporin P) โดยสารปฏิชีวนะ ทั้งสามตัวจะมีลักษณะและคุณสมบัติที่แตกต่างกัน ทั้งนี้เพราะว่า

ก. สารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน พี (Cephalosporin P) มีฤทธิ์ทำลายเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งเชื้อเหล่านี้จะเกิดการดื้อต่อสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน พี อย่างรวดเร็ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข. สารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน เอ็น (Cephalosporin N) ถึงแม้ว่ามีฤทธิ์ฆ่าแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบได้ดีแต่สามารถถูกย่อยสลายได้โดยเอนไซม์เพนิซิลลิเนส (Penicillinase) จากแบคทีเรียบางชนิด

ค. สารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี (Cephalosporin C) มีฤทธิ์ฆ่าทั้งแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ รวมทั้งสามารถทนต่อการย่อยสลายโดยเอนไซม์เพนิซิลลิเนส (Penicillinase) ได้ (Peberdy , 1987)

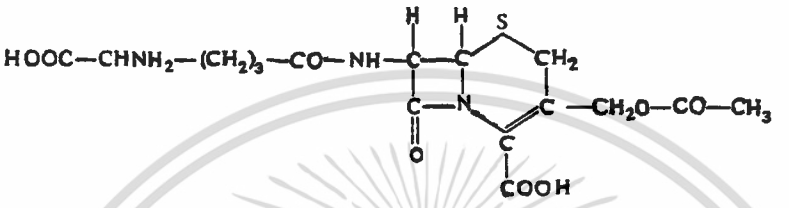
ในปัจจุบันมีการนำสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี ในรูปอนุพันธ์กึ่งสังเคราะห์โดยการเปลี่ยนสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี เป็น กรด 7-อะมิโนเซฟาโลสปอรานิก (7-aminosporanic acid : 7-ACA) โดยใช้วิธีการทางเคมีหรือการใช้เอนไซม์ตรึงรูป จากนั้นจึงใช้วิธีทางเคมี โดยการใช้ปฏิกริยาอะซีเลชั่น (Acylation) ทำให้ได้สารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอรินตัวใหม่ๆ

เชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี ได้นอกเหนือจาก *C. acremonium* ดังกล่าวมาแล้ว ยังมีเชื้อจุลินทรีย์อีกหลายชนิดที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี ได้ ได้แก่ เชื้อจุลินทรีย์พวก *Actinomycetes* เช่น ***Actinomycetes clavyligeros*** , ***Actinomycetes lipmani*** และ ***Actinomycetes lactamdyrans***

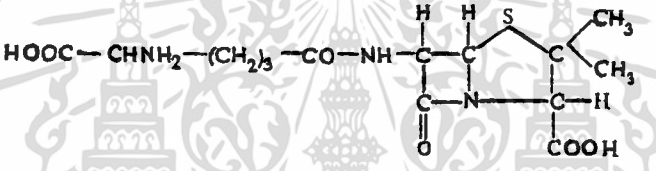
2.คุณสมบัติทางเคมี

สารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน มีสูตรโครงสร้างคล้ายสารปฏิชีวนะเพนิซิลลิน ซึ่งสารปฏิชีวนะทั้งสองนี้เป็นสารปฏิชีวนะใน กลุ่มเบตาแลคแตม (β-Lactam) โดยประกอบด้วยโครงสร้าง 2 ส่วน ที่สำคัญคือส่วนนิวเคลียสได้แก่โมเลกุลของ 7-อะมิโนเซฟาโลสปอรานิก (7-aminocephalosporanic) และส่วนของหมู่ข้างเคียง (side chain group) โดยในส่วนนิวเคลียสนั้นจะประกอบด้วยส่วนสำคัญอีก 2 ส่วนคือ ส่วนแรกเป็นส่วนวงแหวนที่เรียกว่าเบตาแลคแตม (β-Lactam ring) เชื่อมติดกับส่วนวงแหวนไดไฮโดรไทอาซีน (Dihydrothiazine ring) แทนที่จะเป็นวงแหวนไทอาโซลิดีน (thiazolidine ring) อย่างในสารปฏิชีวนะเพนิซิลลิน แต่ในเซฟาโลสปอริน เอ็น จะมีส่วนวงแหวนไทอาโซลิดีน แทนวงแหวนไดไฮโดรไทอาซีน ดังรูปที่ 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



Cephalosporin C



Cephalosporin N
(D-4-amino-4-carboxy-p-butylpenicillin)

รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างของสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

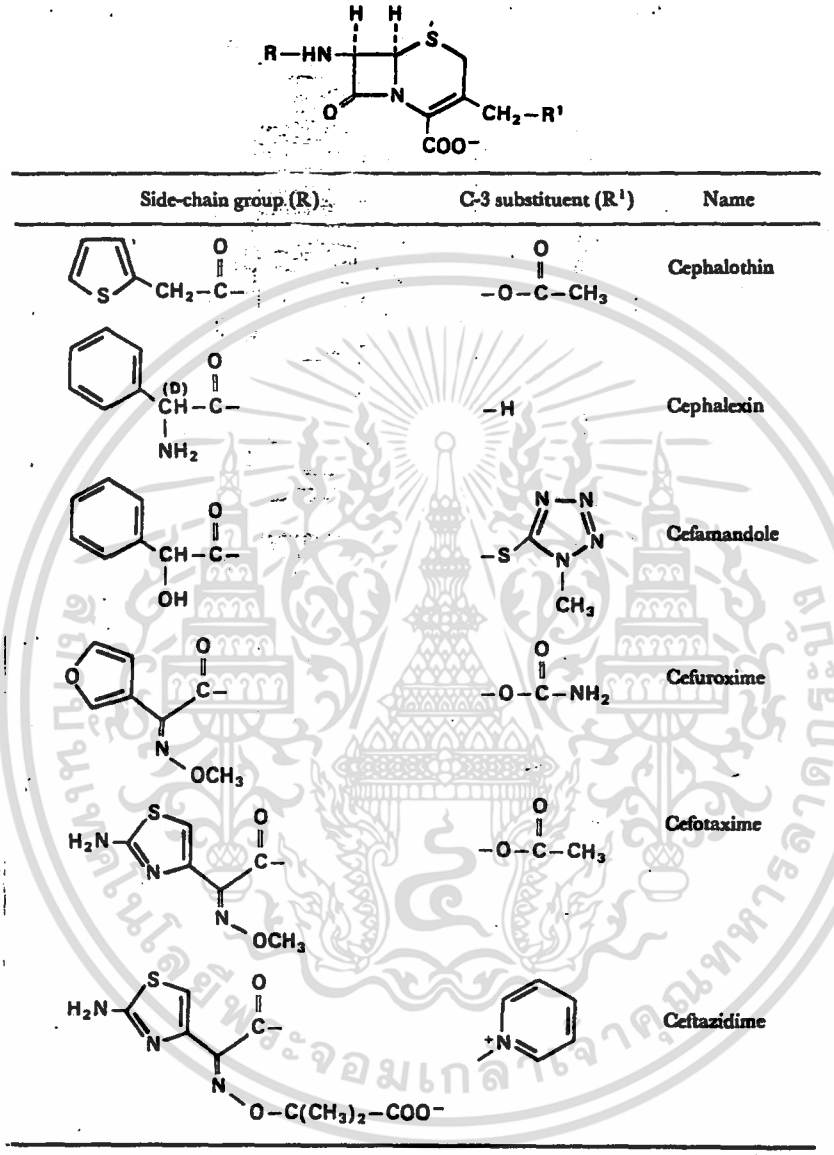
อนุพันธ์กึ่งสังเคราะห์ของเซฟาโลสปอรินได้จากการเปลี่ยนแปลงกลุ่มต่างๆที่ตำแหน่ง R และ R^1 ของ กรด 7-อะมิโนเซฟาโลสปอรานิก ดังรูปที่ 2 ส่วนโครงสร้างที่มีบทบาทสำคัญต่อการออกฤทธิ์ของสารจำพวกเซฟาโลสปอรินนั้นจะเป็นส่วนนิวเคลียส ถ้าส่วนนิวเคลียสในโมเลกุลของสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอรินถูกทำลายไม่ว่าจะโดยทางเคมีหรือถูกเปลี่ยนแปลงในร่างกายแล้ว ฤทธิ์ของสารดังกล่าวที่มีต่อจุลินทรีย์ก็จะสูญเสียไป ส่วนวงแหวนเบตาแลคแตมนั้นจะเป็นส่วนที่มีความไวต่อกระบวนการย่อย (Hydrolysis) ในสภาวะที่มีความเป็นด่างมากๆ หรือสภาวะที่มีเอนไซม์ เซฟาโลสปอรินเนสวงแหวนเบตาแลคแตมของสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอรินจะถูกทำลายและถูกเปลี่ยนแปลงโดยเอนไซม์อะมิเดส (Amidase) ได้กรด 7-อะมิโนเซฟาโลสปอรานิก แต่สารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอรินทนต่อกรด เบส ความร้อน และเอนไซม์เพนิซิลลิเนส ได้ดีกว่าสารปฏิชีวนะเพนิซิลลิน

3. การสังเคราะห์ (Biosynthesis) เซฟาโลสปอริน ซี

กระบวนการสังเคราะห์ (Biosynthesis pathway)

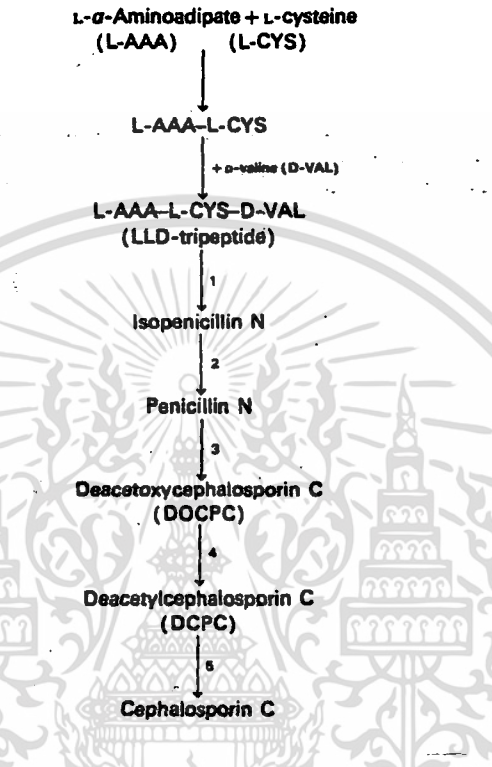
การสังเคราะห์เซฟาโลสปอริน ซี โดยเชื้อรา *C. acremonium* เริ่มด้วยสารตั้งต้นซึ่งเป็นกรดอะมิโน 3 ตัวคือ กรดแอลอะมิโนอะดิปิค (L-Aminoadipic acid) แอลซีสเตอีน (L-Cystein) และแอลวาลีน (L-Valine) กรดอะมิโนแต่ละตัวจะถูกกระตุ้นโดยอะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (ATP) ต่อจากนั้นใช้เอนไซม์หลายชนิดในปฏิกิริยาการสังเคราะห์จนได้สายไตรเปปไทด์ (Tripeptide) คือ แอลฟาอะมิโนอะดิพิล-ซีสทิลนิลวาลีน (α-Aminoadipyl-cysteinyl-valine) จากนั้นสายไตรเปปไทด์จะถูกเปลี่ยนไปเป็นไอโซเพนิซิลลิน เอ็น (Isopenicillin N) ซึ่งเป็นโมเลกุลที่มีวงแหวนเบตาแลคแตม และวงแหวนไทอาโซลิดีน จากนั้นไอโซเพนิซิลลิน เอ็น จะถูกเปลี่ยนไปเป็นเพนิซิลลิน เอ็น แล้วก็ถูกเปลี่ยนต่อไปเป็นดีอะซีทอกซีเซฟาโลสปอริน ซี (Deacetoxycephalosporin C) , ดีอะซีทิลเซฟาโลสปอริน ซี (Deacetylcephalosporin C) ตามลำดับ จนได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายคือ เซฟาโลสปอริน ซี โดยกระบวนการสังเคราะห์ทั้งหมดจะอาศัยเอนไซม์จำเพาะแต่ละขั้นตอน ดังรูปที่ 3 (Peberdy , 1987)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2 ตัวอย่างอนุพันธ์กึ่งสังเคราะห์ของสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



Reaction	Enzyme
1	Isopenicillin N synthetase (cyclase)
2	"Racemase"
3	DOCPC synthetase (expandase)
4	DCPC synthetase (dioxygenase)
5	DCPC acetyl-transferase

<u>รูปที่ 3</u> กระบวนการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การพัฒนากระบวนการการผลิตเซฟาโลสปอริน ซี

ในปี ค.ศ. 1951 Gottshall และคณะ ได้ทำการแยกสารที่ได้จากเชื้อรา *Cephalosporium* sp. ได้สารปฏิชีวนะที่เรียกว่า synnematin

ในปี ค.ศ. 1953 Abraham และคณะ ได้แบ่ง synnematin ออกเป็น 2 ชนิด คือ synnematin A และ synnematin B เนื่องจากมีองค์ประกอบต่างกัน และพบว่า synnematin B มีลักษณะคล้ายเซฟาโลสปอริน เอ็น (Newton และ Abraham , 1955)

ในปี ค.ศ. 1962 Demain และ Newkirk รายงานว่าได้มีการนำยากลุ่มเซฟาโลสปอรินมารักษาโรคติดเชื้อเป็นครั้งแรก

ในปี ค.ศ. 1967 Abraham และ Newton ได้แสดงให้เห็นว่าสามารถเลี้ยงเชื้อรา *Cephalosporium acremonium* ในอาหารเหลว (submerge culture) โดยจุลินทรีย์ตัวนี้จะสังเคราะห์สารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี และ เซฟาโลสปอริน เอ็น

ในปี ค.ศ. 1967 Smith และคณะ ได้รายงานว่าในขณะที่อัตราการผลิตสารเซฟาโลสปอริน ซี สูงสุดจะพบว่าเส้นใย (Hypha) จะเปลี่ยนจากลักษณะเรียวยาว ขยายใหญ่เป็นอาร์โทรสปอร์ (Arthrospore)

ในปี ค.ศ. 1968 Caltrider และคณะพบว่าการเติมเมไทโอนีน (methionine) ลงในอาหารเพาะเลี้ยง เชื้อสามารถเพิ่มปริมาณการสร้างสารปฏิชีวนะดังกล่าวได้ (Nash และ Huber ,1971) ต่อมาได้มีการพัฒนาการผลิตเซฟาโลสปอริน ซี โดยการหมักในอาหารเหลวด้วยวิธีการหมักแบบกะ (batch fermentation) โดยใช้น้ำตาลซูโครสและน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนหลัก (Heim et al. , 1984) หลังจากนั้นได้มีการพัฒนาเป็นการหมักแบบ fed-batch fermentation โดยมีการเติมสารละลายน้ำตาลกลูโคสกับเมไทโอนีนลงไป โดยหมักในถังหมักชนิด stirred tank ซึ่งมีแป้งถั่วลิสง (peanut flour) เป็นแหล่งอาหาร (Holzhauer-Rieger et al. , 1990)

ในปัจจุบันได้มีการศึกษาการผลิตสารเซฟาโลสปอริน ซี โดยวิธีการตรึงเซลล์ (Immobilized cells) โดยเชื้อยีสต์ *Trigoropsis variabilis* ถูกตรึงด้วย calcium gel bead (Gemeiner et al. , 1993)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเซฟาโลสปอริน ซี

วัตถุดิบ

1) แหล่งคาร์บอน

โดยทั่วไปแล้ว กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์และในขณะเดียวกันกลูโคสก็เป็นคาร์บอนคาตาโบไลท์ชนิดหนึ่งที่ควบคุมการผลิตสารปฏิชีวนะหลายชนิด (Martin และ Demain , 1980) หลักการหลีกเลี่ยงการควบคุมโดยคาร์บอนเมตาโบไลท์ กระทำได้โดยการเติมแหล่งคาร์บอนเป็นระยะๆ (Davey และ Johnson , 1953) หรือค่อยๆเติมทีละน้อย ซึ่งจากการศึกษาเชื้อราที่ผลิตสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี สามารถที่จะย่อยสลายสารจำพวกโพลีแซ็กคาไรด์ได้โดยเฉพาะ *C. acremonium* สามารถย่อยสลายและใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนได้ (Domsch และ Game , 1969) นอกจากนี้ยังมีการใช้แหล่งน้ำตาลกลูโคสและซูโครส (Heim et al. , 1984) โดยพบว่าแหล่งอาหารที่ประกอบด้วยส่วนผสมของน้ำตาลกลูโคส และซูโครส จุลินทรีย์จะใช้น้ำตาลกลูโคสก่อนอย่างรวดเร็วและหมดไปในช่วงการเจริญ (growth phase) แล้วใช้น้ำตาลซูโครสในช่วงการผลิตสารปฏิชีวนะ (antibiotic production phase) หลังจากนั้นอัตราการใช้น้ำตาลจะช้าลง (Demain , 1968) นอกจากนี้ในปี ค.ศ. 1974 Demain พบว่าในระหว่างการหมัก แหล่งคาร์บอน จะเป็นตัวควบคุมเมตาบอลิซึมทุติยภูมิ (secondary metabolism) ของ *C. acremonium* อีกด้วย

ในการหมักเซฟาโลสปอริน ซี แบบ fed-batch fermentation สารแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการเติม (feed) เพื่อยืดการทำงานของเชื้อรา คือ สารละลายน้ำตาลกลูโคสเมไทโอนีน โดยการเติมสารอาหารนี้จะเริ่มขึ้นหลังจากน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นได้ถูกใช้ไป (Holzhauer-Rieger et al. , 1990)

2) แหล่งไนโตรเจน

การเปลี่ยนชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนและสัดส่วนของแหล่งไนโตรเจนต่อแหล่งคาร์บอนที่มีอยู่ อาจจะแสดงในรูปของสัดส่วน C / N ต่างมีผลต่อการผลิตสารปฏิชีวนะ ซึ่งจากการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการหมักโดยเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

C. acremonium มีได้ทั้งที่เป็นสารอินทรีย์ และสารอนินทรีย์ แต่แหล่งไนโตรเจนที่นิยมใช้กันมากจะเป็นแอมโมเนียมซัลเฟต ที่มีความเข้มข้นไม่เกิน 100 มิลลิโมลาร์ หรือประมาณร้อยละ 1.3 ถ้าความเข้มข้นสูงกว่านี้จะมีผลในการยับยั้งการสร้างสารผลิตภัณฑ์เบตาแลคแตม

นอกจากนั้นแล้ว แอลแอสปาราจีน (L-Asparagine) และแอลอาร์จินีน (L-Arginine) จะเป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีความสำคัญ โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอสพาราจีนคือร้อยละ 1.2 ถ้าความเข้มข้นสูงเกินไปจะทำให้เกิดการสะสมของแอมโมเนียมทำให้มีค่าความเป็นกรดด่างเพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญของเชื้อราจะต่ำลง นอกจากนี้ ยังพบว่าการเติมไตรเบสิคแมกเนเซียมฟอสเฟต ($Mg_3(PO_4)_2 . 8H_2O$) ในอาหารจะกระตุ้นการผลิตผลิตภัณฑ์กลุ่มเบตาแลคแตมเพิ่มขึ้น (Shen et al. , 1984)

3) แหล่งซัลเฟอร์

ในปี ค.ศ. 1963 Demainและคณะ พบว่าการเติมดีแอลเมไทโอนีน (DL-methionine) หรือ ดีแอลนอร์ลิวซีน (DL-norluecine) ลงในอาหารขณะที่ทำการหมักซึ่งใช้เวลาในการหมักยังไม่ถึง 24 ชั่วโมง เช่น เติมลงไปในช่วงที่มีการเจริญของจุลินทรีย์สูงสุด (maximum growth) ซึ่งจะดีกว่าเติมลงไปในช่วงที่มีการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะแล้ว เมื่อเติมสารนี้ลงไปจะทำให้การสังเคราะห์สารเซฟาโลสปอริน ซี มีประสิทธิภาพสูงสุด โดยกรดอะมิโนทั้ง 2 ตัวดังกล่าว จะทำให้เกิดการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะเพิ่มขึ้น

จากการศึกษาของ Ott และคณะ ในปี ค.ศ. 1962 พบว่าการเติมบีเทน (betaine) หรือโคลีน (choline) ลงไปในอาหารจะเร่งการผลิตสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี ได้ดียิ่งขึ้น เมื่อมีเมไทโอนีนร่วมด้วย

4) แหล่งไขมัน

ในปี ค.ศ. 1994 Sohn และคณะ พบว่าเมื่อใช้เมทิลโอลิเอท (methyl oleate) เป็นแหล่งคาร์บอนที่ให้เชื้อ *C. acremonium* โดยสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี จะถูกผลิตขึ้นเมื่อเมทิลโอลิเอทถูกใช้ไป โดยกรดไขมันโอเลอิก (oleic acid , $C_{18:2}$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยการเปลี่ยนแปลงของกรดไขมันภายในเซลล์ของเชื้อ เกิดขึ้นในระหว่างการเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นและในระหว่างการหมักนอกจากนี้กรดไขมันยังมีผลทำให้ค่าความเป็นกรดด่างสูงขึ้นอีกด้วย

5) อนินทรีย์ฟอสเฟต

ถ้ามีอนินทรีย์ฟอสเฟตปริมาณสูงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะเร่งการใช้แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และกระบวนการหายใจซึ่งเป็นผลทำให้เซลล์เจริญดี แต่การผลิตสารปฏิชีวนะจะลดลง

ในปี ค.ศ. 1977 Aharonowitz และ Demain ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของอนินทรีย์ฟอสเฟตในอาหารที่ใช้สำหรับการผลิตสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอรินของเชื้อ ***Streptomyces claruligerus*** พบว่าการผลิตสารนี้จะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มฟอสเฟตจนถึงความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ แต่ถ้าเพิ่มปริมาณฟอสเฟตต่อไปอีกการผลิตสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี จะลดลง

ปริมาณอนินทรีย์ฟอสเฟตมีอิทธิพลต่อการผลิตสารปฏิชีวนะแต่ยังไม่ทราบกลไก (mechanism) ที่แน่ชัดเพียงแต่สันนิษฐานกันว่าเกี่ยวข้องกับความเข้มข้นของ ATP ภายในของเซลล์ เนื่องจากความเป็นจริงที่ว่าการผลิตสารปฏิชีวนะมักจะเริ่มต้นภายหลังจากที่มีการใช้อนินทรีย์ฟอสเฟตเกือบหมดไปจากอาหารเลี้ยงเชื้อ และจากการศึกษาของ Martin และคณะ (1978) เกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงของ ATP ในระหว่างที่มีการควบคุม การผลิตสารปฏิชีวนะเกิดขึ้นในขณะที่มีฟอสเฟตอยู่ด้วย ซึ่งเมื่อความเข้มข้นของอนินทรีย์ฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อสูง พบว่าความเข้มข้นของ ATP ภายในเซลล์จะเพิ่มขึ้นและจะเร่งเมตาโบไลต์ปฐมภูมิ (primary metabolism) แต่จะยับยั้งการผลิตสารปฏิชีวนะ และถ้าปริมาณอนินทรีย์ฟอสเฟตน้อยลงความเข้มข้นของ ATP ก็ลดลงด้วย แต่จะทำให้การผลิตสารปฏิชีวนะดำเนินต่อไปได้อีก จะเห็นได้ว่าการเปลี่ยนแปลงปริมาณของอนินทรีย์ฟอสเฟต ในอาหารที่ใช้สำหรับผลิตสารปฏิชีวนะมีความสำคัญสำหรับการผลิตชนิดและปริมาณของสารปฏิชีวนะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6) เกลืออนินทรีย์

สำหรับเกลืออนินทรีย์ที่นิยมใช้กันทั่วไปเพื่อเพิ่มการผลิตสารปฏิชีวนะ คือ โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) โดยในปี ค.ศ. 1946 Rake และ Donovick รายงานว่าการผลิต Streptomycin โดยเชื้อ ***Streptomyces hirseus*** จะเพิ่มขึ้นถ้าเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.5 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ถ้าเติมในปริมาณสูงจะยับยั้งการผลิต

ในปี ค.ศ. 1977 Ogata และคณะ พบว่าสารปฏิชีวนะ 9 - 60 ชนิดที่ผลิตจาก *Streptomyces* sp. นั้นสามารถเร่งอัตราการผลิตได้โดยการเติมแมกเนเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) ในความเข้มข้นสูง นอกจากนั้นการเติมแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) แมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2$) เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4$) เฟอรัสคลอไรด์ ($FeCl_2$) ต่างก็มีผลต่อการผลิตสารปฏิชีวนะ

7) โลหะที่ต้องการในปริมาณน้อย

โลหะหลายชนิดจำเป็นต่อสิ่งมีชีวิตเนื่องจากเป็นโคแฟกเตอร์ในปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น โดยโลหะดังกล่าว ได้แก่ แวเลียม โครเมียม แมกนีเซียม เหล็ก โคบอลต์ นิเกิล ทองแดง สังกะสี และ โมลิบดินั่ม สำหรับ แมกเนเซียม เหล็ก และ สังกะสี มักจะมีบทบาทในการผลิตสารเมตาโบไลต์ทุติยภูมิ (Secondary metabolites) ซึ่งความต้องการโลหะเหล่านี้จะมีอยู่ในปริมาณที่น้อยมาก

ปริมาณโลหะที่ต้องการสำหรับการผลิตสารปฏิชีวนะ และการเจริญของจุลินทรีย์จะต่างกัน โดยปกติแล้วความเข้มข้นของโลหะที่ต้องการสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ ประมาณ 10^{-7} โมลาร์ ของ แมกนีเซียม และ สังกะสี และ 2×10^{-7} โมลาร์ของเหล็ก แต่ความต้องการสำหรับการผลิตสารปฏิชีวนะจะมากกว่า 10 ถึง 100 เท่าและถ้าเติมในปริมาณที่มากขึ้นจะยับยั้งการผลิต ช่วงความเข้มข้นของโลหะที่มีผลต่อการผลิตสารเมตาโบไลต์ทุติยภูมิ (Secondary metabolites) เช่น สารปฏิชีวนะจะแคบกว่าการผลิตสารเมตาโบไลต์ปฐมภูมิ (Primary metabolites) และความเข้มข้นของโลหะ ในระดับที่ต้องการสำหรับการผลิตสารปฏิชีวนะ จะไม่มีผลยับยั้งการเจริญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8) สารตั้งต้นและสารชักนำ

การผลิตสารปฏิชีวนะจะต้องมีการเติมสารตั้งต้นเพื่อให้มีปริมาณการผลิตสารปฏิชีวนะสูงขึ้น เช่นการผลิตเพนิซิลลิน จี (Penicillin G) ในปริมาณสูงโดยเชื้อ ***Penicillium chrysogenum*** จะเกิดขึ้นโดยการเติมสารฟีนิลอะซีเตต (phenylacetate) เป็นสารตั้งต้นลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเพิ่มผลผลิต

ส่วนสารชักนำนั้น ในปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับสารชักนำยังไม่กว้างขวางมาก เนื่องจากกระทำได้ยากแต่ก็มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับสารชักนำ ได้แก่ เมไทโอนีน เป็นสารตั้งต้น และสารชักนำในการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอรินโดยเชื้อ *C. acremonium* (Drew และ Demain , 1975)

9) สารยับยั้ง

สารปฏิชีวนะหลายๆ ชนิดเป็นสารยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์ของสิ่งมีชีวิตที่ผลิตสารนั้นๆ ดังได้กล่าวมาแล้ว

10) ปัจจัยอื่นๆ

บางครั้งสารที่เติมลงไปเป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการผ่านเข้าออก (membrane permeability) ของจุลินทรีย์ที่ผลิตสารปฏิชีวนะ ซึ่งจะทำให้การผลิตสารปฏิชีวนะเพิ่มขึ้นหรือลดลงเนื่องจากเซลล์แตก

สภาพความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารก็มีความสำคัญ เนื่องจากมีผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบของอาหาร ในระหว่างการทำอาหารปราศจากจุลินทรีย์โดยใช้ความร้อนภายใต้ความดันสูง ทำให้เกิดสารใหม่ซึ่งอาจมีผลต่อการเจริญและการสร้างสารเมตาโบไลต์ของจุลินทรีย์ที่นำมาเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. สภาวะที่เหมาะสมของการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อการผลิตสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี

1) อุณหภูมิ

โดยทั่วไปอุณหภูมิที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารปฏิชีวนะค่อนข้างจะคงที่ที่อุณหภูมิหนึ่งตั้งแต่เริ่มต้นจนสิ้นสุด แต่อุณหภูมิที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะจะผันแปรในช่วงกว้าง และอุณหภูมิที่พอเหมาะสำหรับการเจริญมักจะไม่ใช้อุณหภูมิเดียวกับอุณหภูมิที่ผลิตสารปฏิชีวนะ ได้มีรายงานว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี จะอยู่ในช่วง 20-30 องศาเซลเซียส (Meurice , 1987) ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี คือ 25 องศาเซลเซียส (Nash และ Huber , 1971 ; Shen et al. , 1983 ; Heim et al. , 1984 และ Zhou et al. , 1993) หรือบางสายพันธุ์จะเจริญดีที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส (Matsumura et al. , 1982) ทั้งนี้ขึ้นกับสายพันธุ์ที่นำมาผลิต

2) ความเป็นกรดด่าง

ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการสังคราะห์สารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี ของเชื้อรา *C. acremonium* โดยทั่วไปอยู่ในช่วง 7.3 - 7.5 (Kennel และ Demain , 1978) เพราะถ้าค่าความเป็นกรดด่าง สูงไปจะทำให้อัตราการเจริญของเชื้อลดลง การปรับความเป็นกรดด่างนั้นมักจะปรับโดยการเติมด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Shen et al. , 1983) และสารละลายแอมโมเนียร้อยละ 25 (Zhou et al., 1993)

3) อัตราการให้อากาศและอัตราการกวน

จุลินทรีย์ที่ผลิตสารปฏิชีวนะจำนวนมากต้องการออกซิเจนในการเจริญ แต่ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำนั้นมีประมาณน้อยเกินไปจำเป็นต้องมีการให้อากาศ ในอาหารเหลวที่ใช้ในการผลิตสารปฏิชีวนะ (Brookere , 1973) นอกจากนั้นปริมาณออกซิเจนยังมีผลต่อชนิดและผลิตภัณฑ์ที่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเพิ่มปริมาณออกซิเจนในกระบวนการหมักของ *C. acremonium* จะทำให้การผลิตเพนิซิลลิน เอ็น ลดลง แต่เซฟาโลสปอริน ซี จะเพิ่มขึ้นเนื่องจากการเร่งการเกิดปฏิกริยาออกซิเดชั่นในการเปลี่ยนเพนิซิลลิน เอ็น ไปเป็นเซฟาโลสปอริน ซี (Stevens et al., 1962) อัตราการให้อากาศและอัตราการกวนในการผลิตสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอรินในระดับอุตสาหกรรมนั้นในระยะแรกจะเป็นไปโดยอาศัยประสบการณ์ ภายหลังเมื่อได้มีการทดลองมากขึ้น พบว่าออกซิเจนต่ำสุดในการสังเคราะห์เซฟาโลสปอริน ซี อยู่ระหว่าง ร้อยละ 10 ถึง ร้อยละ 20 ของอากาศอิ่มตัว (Feren และ Squires , 1969) ในการทดลองเปรียบเทียบการหมักสารเซฟาโลสปอริน ซี ในถังหมักชนิดต่างๆ กัน โดยใช้แป้งถั่วลิสง พบว่าอัตราการให้อากาศในช่วงแรก เป็น 100 รอบต่อนาที และลดลงเป็น 60 รอบต่อนาที หลังชั่วโมงที่ 84 (Zhou et al. , 1993)

สำหรับการกวนเมื่อเพิ่มอัตราการกวนเชื้อราจะเจริญเร็วกว่าเมื่อใช้ อัตราการกวนต่ำ แต่ถ้าเพิ่มอัตราการกวนมากเกินไปเซลล์จะมีเมตาโบไลท์ (metabolite) ไปในทางสร้างผนังเซลล์ให้แข็งแรงขึ้นหรืออาจจะมีการซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอที่เกิดจากแรงเฉือนของใบพัด ทำให้อัตราการผลิตเซฟาโลสปอริน ซี ลดลงอย่างรวดเร็ว (Zhou et al. , 1993)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

บทที่ 3
วิธีการทดลอง

1. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1) อุปกรณ์

- เครื่องแก้ว
- เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิได้ (incubator shaker)
- Autoclave
- ไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี (High Performance Liquid Chromatography : HPLC)
  (Shimadzu LC-6Ad , Japan.)
- ตู้ปลอดเชื้อ (Larminar air flow)
  (Faster S.R.L., Via Vespucci, 46-Ferrara, Italy.)
- กล้องจุลทรรศน์
  (Nikon SMZ-U Zoom 1:10 and UFX-DX, Japan.)
- เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter)
- เครื่องไล่ฟองอากาศ (Ultrasonic Cleaner)

2) สารเคมี

- เมทานอล
- สารละลายโซเดียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ไดไฮเดรต ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$)
- เซลลูไบโอส
- เซลลูโลส
- ฟรักโทส
- กาแล็กโทส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

25402

- อินนูลิน
- ซูโครส
- แป้ง
- ซอร์บิทอล
- ไซโลส
- แล็กโทส
- มอลโทส
- แมนโนส
- ราฟฟีโนส
- ยูเรีย
- แอลอาร์จินีน
- แอลแอสปาราจีน
- โพแทสเซียมไนเตรต
- แอมโมเนียมไนเตรต
- แอมโมเนียมคลอไรด์
- น้ำมันมะกอก
- น้ำมันงา
- น้ำมันมะพร้าว
- น้ำมันปาล์ม
- น้ำมันถั่วเหลืองผสมเมล็ดฝ้าย
- กรดปาล์มมิติก
- สารเคมีในสูตรอาหาร (ภาคผนวก ก.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. วิธีดำเนินการทดลอง

2.1) เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อรา *Acremonium chrysogenum* ATCC 36225 (American Type Collection Culture) ประเทศสหรัฐอเมริกา (ภาคผนวก ข. รูปที่ 1)

2.2) การเก็บจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

เขี่ยเชื้อ *Acremonium chrysogenum* ATCC 36225 โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อลาก (streak) ลงบนอาหารเอียง (slant agar) malt extract agar (ภาคผนวก ก.) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-14 วัน เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่แล้วจึงนำไปเก็บในตู้เย็น อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.3) การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

2.3.1 การเตรียมเชื้อ

เขี่ยเชื้อ *A. chrysogenum* ATCC 36225 จากเชื้อที่เก็บรักษาไว้ตามข้อ 2.2 ลงในอาหาร malt extract agar ซึ่งอยู่ในขวดแก้วแบน (ภาคผนวก ข. รูปที่ 2) เพื่อเพิ่มพื้นที่สัมผัสให้เชื้อรามากยิ่งขึ้น บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 10 วัน หลังจากนั้นนำเชื้อที่ได้มาทำเป็นสารละลายสปอร์แขวนลอย (spore suspension) โดยการล้างด้วยน้ำกลั่นผสม tween 80 แล้วกรองผ่านผ้าขาวบาง นำสปอร์แขวนลอยที่ได้มานับจำนวนสปอร์โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer)

2.3.2 การเลี้ยงเชื้อ *A. chrysogenum* ATCC 36225 เพื่อเป็นหัว เชื้อสำหรับผลิตสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร

ถ่ายเชื้อ 10 มิลลิลิตร ของสารละลายสปอร์แขวนลอยที่มีความเข้มข้น 1×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ที่เตรียมจากข้อ 2.3.1 ลงในอาหารที่ใช้สำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก.) 200 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข. รูปที่ 3) นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะที่จุลินทรีย์มีการเจริญอยู่ในช่วงกลางของระยะการเจริญเติบโตของเชื้อ (Mid log phase) (ภาคผนวก ข. รูปที่ 4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.3 การเลี้ยงเชื้อ *A. chrysogenum* ATCC 36225 เพื่อให้ผลิตเซฟาโลสปอริน ซี ในขวดรูปชมพู่ 250 มิลลิลิตร

ถ่ายเชื้อ 7 มิลลิลิตรจากหัวเชื้อที่มีความเข้มข้น $1x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ที่เตรียมได้จากข้อ 2.3.2 ลงในอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี (ภาคผนวก ก.) 70 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิได้ โดยใช้อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ทุกๆ 24 ชั่วโมง จนสิ้นสุดการหมัก รวมเวลาการหมัก 192 ชั่วโมง (ภาคผนวก ข. รูปที่ 5 - 10)

3. วิธีการวิเคราะห์

3.1) การวิเคราะห์หาปริมาณเซฟาโลสปอริน ซี โดยวิธีใช้เครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี(High Performance Liquid Chromatography)

นำตัวอย่างมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการกลั่น 3 ครั้ง (triple distilled water) แล้วนำมากรองผ่านกระดาษกรองเซลลูโลสอะซิเตต ขนาด 0.45 ไมครอนก่อนจึงฉีดสารละลายตัวอย่างดังกล่าว 20 ไมโครลิตร เข้าเครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี (Shimadzu 2C-6AD) ที่มีคอลัมน์เป็น C_{18} ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร ยาว 250 มิลลิเมตร สารละลายตัวพา (Mobile phase) เป็นสารละลายของเมทานอลร้อยละ 5 ในสารละลายโซเดียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ไดไฮเดรต ($NaH_2PO_4 . 2H_2O$) 0.02 โมลาร์ อัตราการไหลของสารละลายตัวพาเป็น 2 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดปริมาณสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี ภายหลังที่แยกผ่านคอลัมน์ ด้วยเครื่องตรวจวัดดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลต (Ultraviolatdetector) ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ใช้ความไวของเครื่องตรวจวัดเท่ากับ 0.02 AUFS (Ab-sorbance Unit Full Scale)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2) การวัดการเจริญของเชื้อรา *A. chrysogenum* ATCC 36225 โดยวิธีหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

นำตัวอย่างมากรองผ่านกระดาษกรองวัทแมน เบอร์ 4 ที่ทราบน้ำหนักแล้ว เพื่อแยกส่วนที่เป็นเซลล์ออกจากส่วนน้ำใส ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งน้ำหนักคงที่ ก่อนนำไปทำให้เย็นในเดซิเคเตอร์ (Desiccator) แล้วจึงนำมาชั่งน้ำหนักเซลล์แห้ง

3.3) การวัดค่าความเป็นกรดด่าง เพื่อหาความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการผลิตสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี ได้สูงสุด

โดยตรวจวัดความเป็นกรดด่างในตัวอย่างน้ำหมักที่เก็บมาวิเคราะห์ทุกวัน ด้วยกระดาษวิเคราะห์ค่าความเป็นกรดด่าง (pH paper)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสม สำหรับการผลิตสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี โดยเชื้อรา *Acremonium chrysogenum* ATCC 36225 ในขวดรูปชมพู่

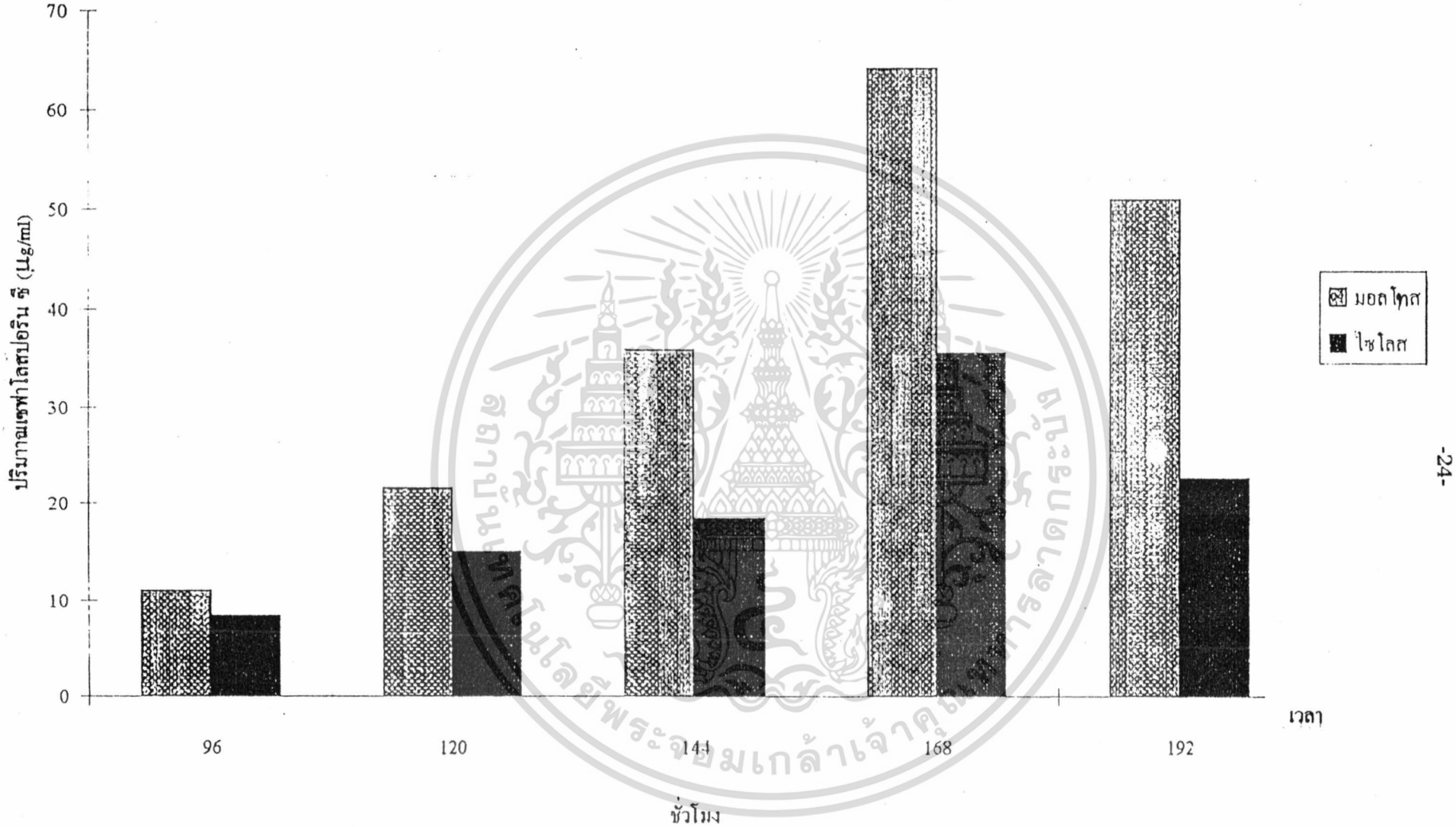
1) ชนิดของแหล่งคาร์บอน

เลี้ยงเชื้อรา *A. chrysogenum* ATCC 36225 ในขวดรูปชมพู่ตามวิธีการที่กล่าวไว้ในข้อ 2.3.3 โดยผันแปรชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ร้อยละ 3 แหล่งคาร์บอนที่ศึกษามี 14 แหล่งได้แก่ เซลลูไบโอส (Cellubiose) , เซลลูโลส (Cellulose) , ฟรักโทส (fructose) , กาแล็กโทส (Galactose) , กลูโคส (Glucose) , อินนูลิน (Inulin) , ซูโครส (Sucroce) , แป้ง (Soluble Strach) , ซอร์บิทอล (Sorbital) , ไซโลส (Xylose) , แล็กโทส (Lactose) , มอลโทส (Maltose) , แมนโนส (Man-nose) และราฟฟีโนส (Raffinose)

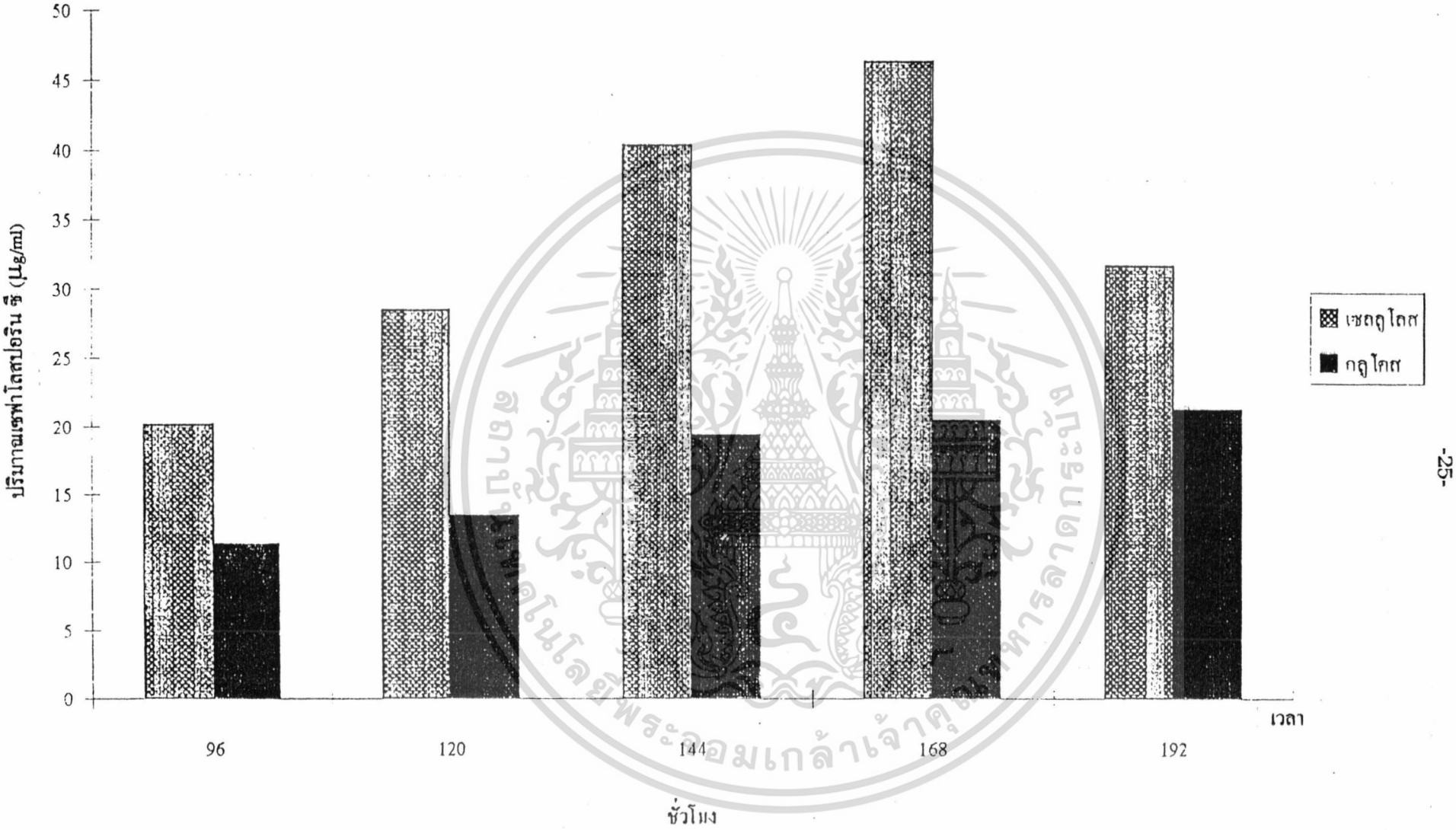
จากการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี โดยเชื้อรา *A. chrysogenum* โดยการเขย่า พบว่าเชื้อรา *A. chrysogenum* ให้ปริมาณเซฟาโลสปอริน ซี สูงสุดในแหล่งคาร์บอนที่ใช้ ราฟฟีโนส ฟรักโทส กาแล็กโทส ซูโครส และมอลโทส โดยให้ปริมาณเซฟาโลสปอริน ซี เป็น 88.60 , 75.05 , 65.92 , 69.82 และ 64.18 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 4-10) ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะได้ผันแปรปริมาณของแหล่งคาร์บอนดังกล่าวนี้ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

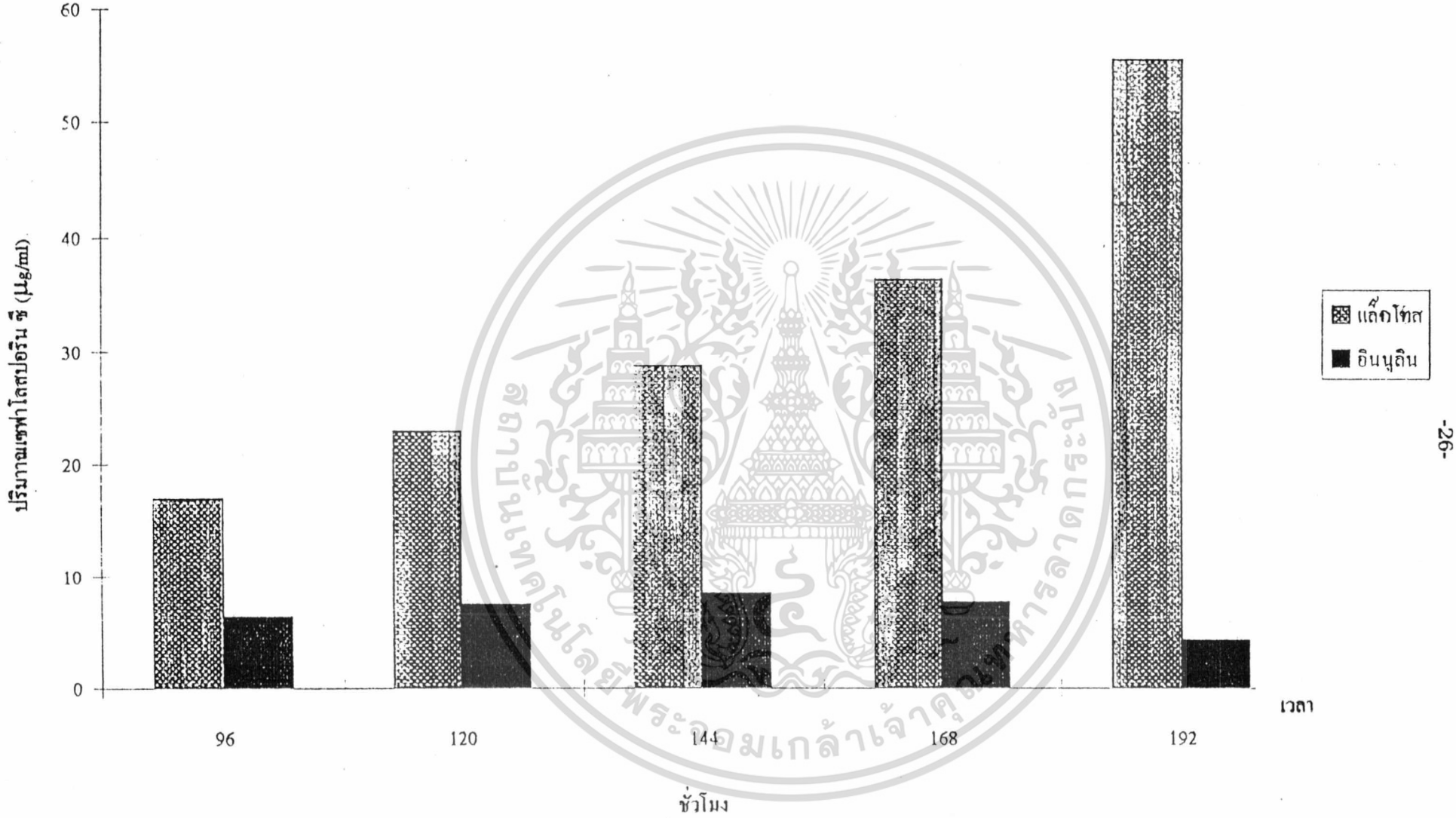
รูปที่ 4 แสดงปริมาณเซฟาโลสปอริน ซี ในอาหารที่มีเซลลูไบโอส และฟรักโทส ร้อยละ 3 เป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 6 แสดงปริมาณเซฟาโลสปอริน ซี ในอาหารที่มีมอลโทส และไซโลส ร้อยละ 3 เป็นแหล่งคาร์บอน



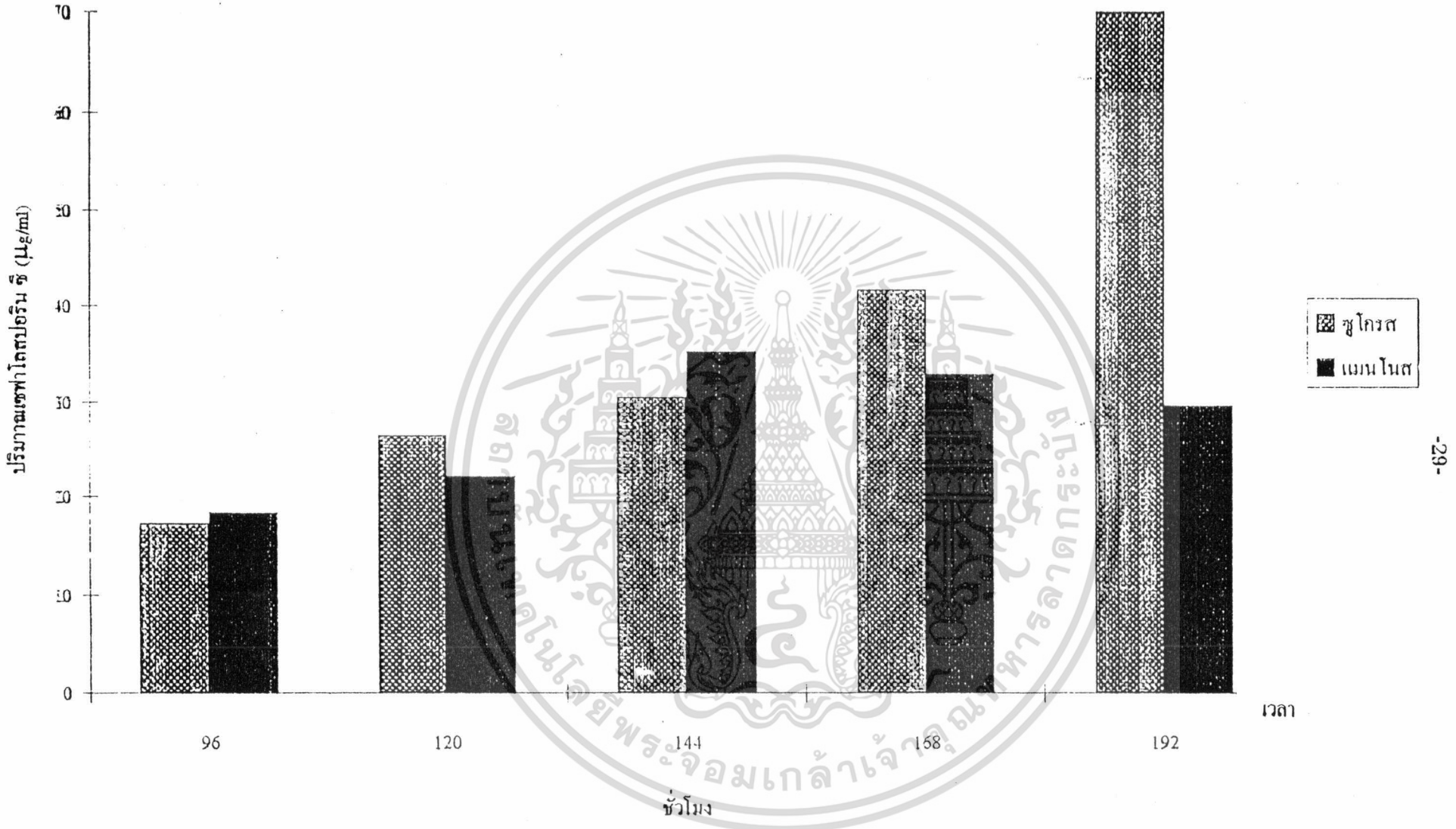
รูปที่ 6 แสดงปริมาณเซฟาโลสปอริน ซี ในอาหารที่มีเซลลูโลส และกลูโคส ร้อยละ 3 เป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 7 แสดงปริมาณเซฟาโลสปอริน ซี ในอาหารที่มีแล็กโทส และอินนูลิน ร้อยละ 3 เป็นแหล่งคาร์บอน

รูปที่ 8 แสดงปริมาณเซฟาโลสปอริน ซี ในอาหารที่มีกาแล็กโทส และซอร์บิทอล ร้อยละ 3 เป็นแหล่งคาร์บอน

รูปที่ 9 แสดงปริมาณเซฟาโลสปอริน ซี ในอาหารที่มีราฟฟิโนส และน้ำแป้ง ร้อยละ 3 เป็นแหล่งคาร์บอน

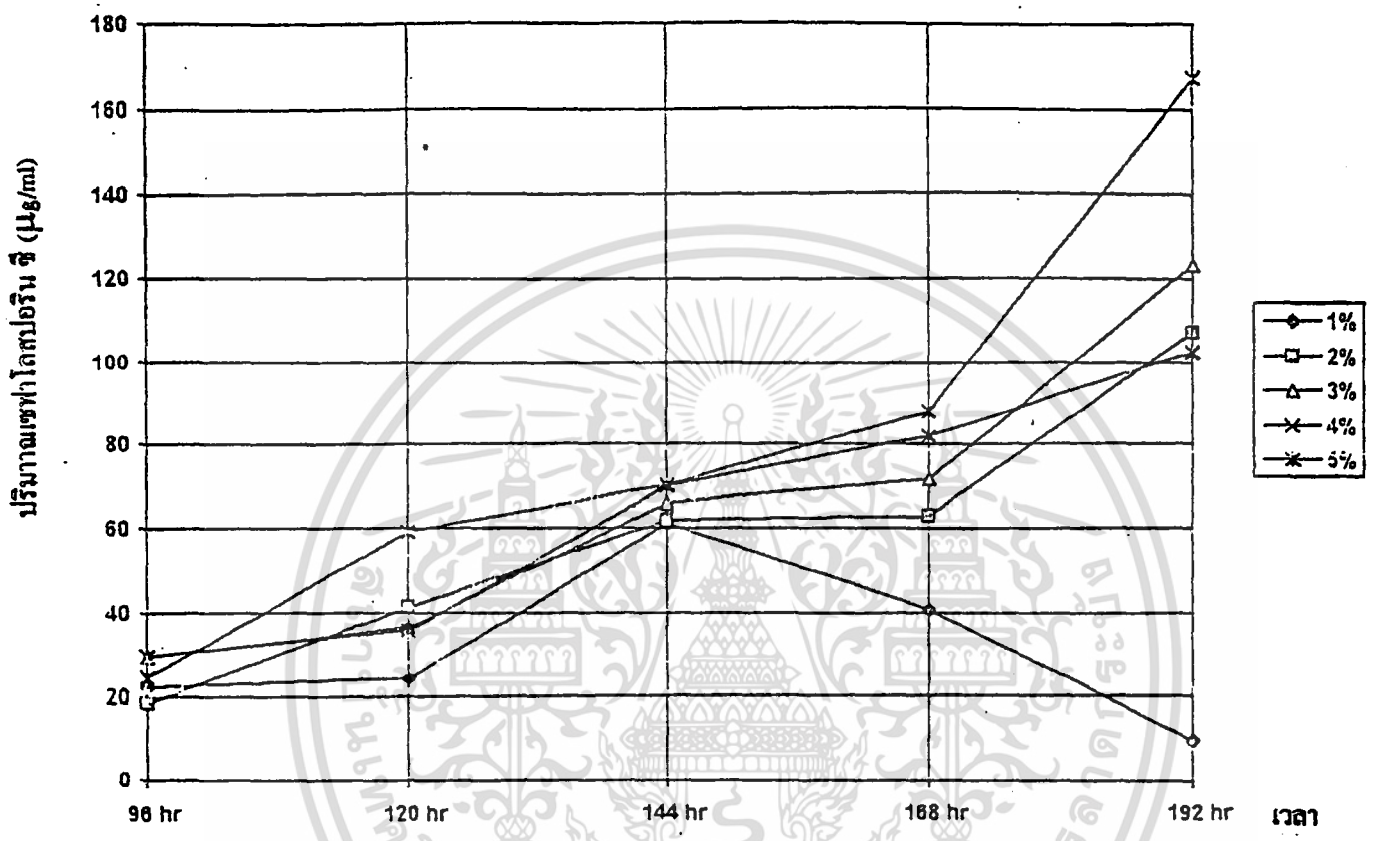


รูปที่ 10 แสดงปริมาณเซฟาโลสปอริน ซี ในอาหารที่มีซูโครส และแมนโนส ร้อยละ 3 เป็นแหล่งคาร์บอน

2) ปริมาณที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน

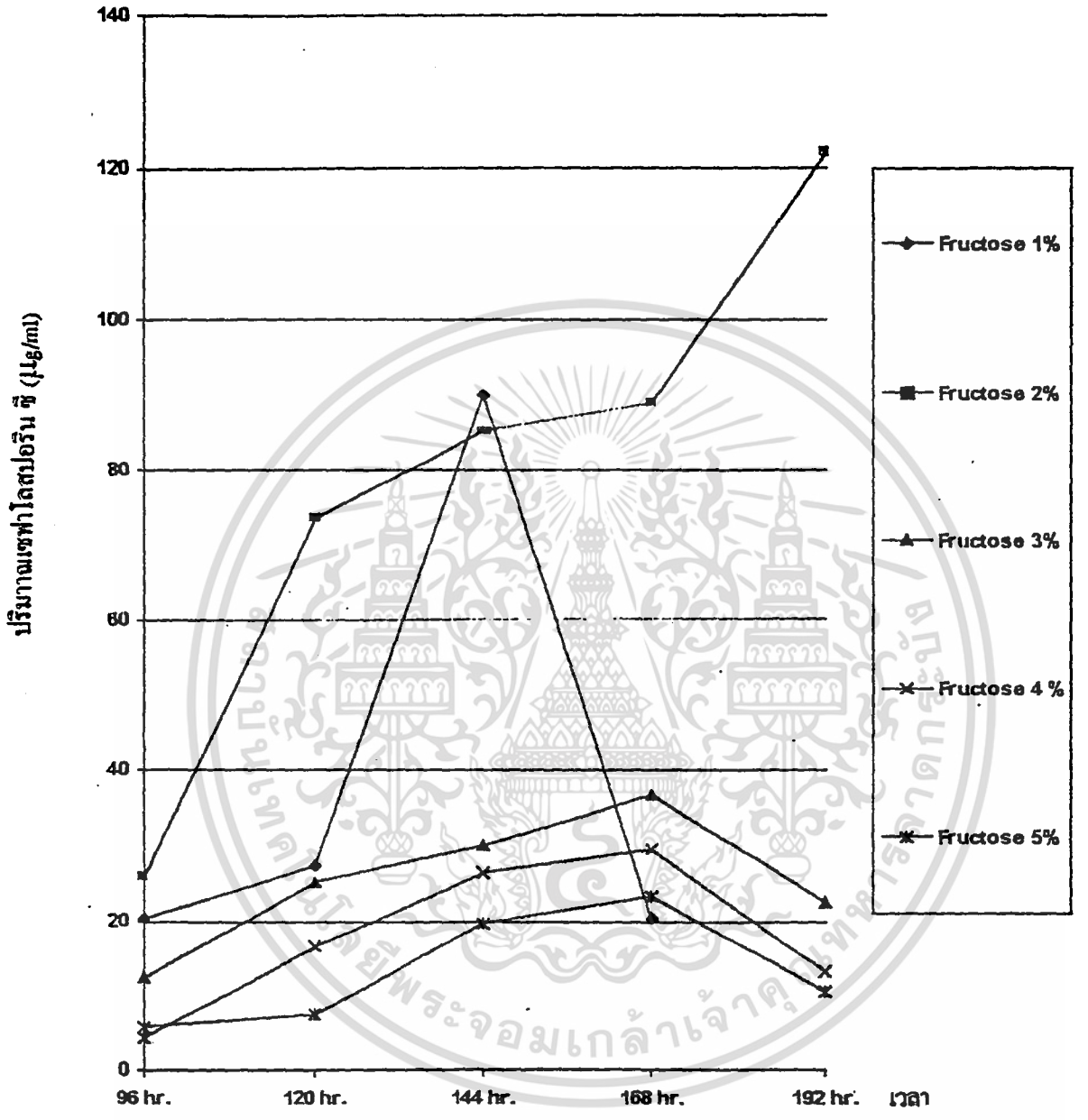
เลี้ยงเชื้อรา *A. chrysogenum* ATCC 36225 ในขวดรูปชมพู่ตามวิธีที่กล่าวไว้ในหัวข้อ 2.3.3 เพื่อศึกษาปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี ทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ ราฟฟีโนส ฟรักโทส กาแล็กโทส ซูโครส มอลโทส โดยแปรผันปริมาณแหล่งคาร์บอนที่ใช้เป็นร้อยละ 1 , 2 , 3 , 4 และ 5 ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ปริมาณเซฟาโลสปอริน ซี ตามวิธีการทดลองในข้อ 3.1 พบว่าเชื้อที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี ราฟฟีโนสเป็นแหล่งคาร์บอนในปริมาณร้อยละ 4 และฟรักโทสเป็นแหล่งคาร์บอน ในปริมาณร้อยละ 1 ให้ปริมาณการผลิตเซฟาโลสปอริน ซี สูงสุดตามลำดับโดย ให้ปริมาณเซฟาโลสปอริน ซี เท่ากับ 167.34 และ 112.09 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 11-15) ถึงแม้ว่าราฟฟีโนสให้ปริมาณการผลิตเซฟาโลสปอริน ซี ในปริมาณที่สูงแต่เนื่องจากราฟฟีโนสมีราคาแพงและต้องใช้ในปริมาณที่สูง ดังนั้นจึงเลือกใช้ฟรักโทสที่ปริมาณร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอนหลักในการทดลองขั้นต่อไป เพราะฟรักโทสมีราคาต่ำกว่าราฟฟีโนสมากและยังใช้ในปริมาณที่ต่ำกว่าด้วย ในช่วงที่มีการผลิตเซฟาโลสปอริน ซี สูงสุด ค่าความเป็นกรดด่างเป็น 6 และน้ำหนักเซลล์แห้งจะเพิ่มสูงขึ้นและคงที่ในชั่วโมงที่ 96 (รูปที่ 16)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



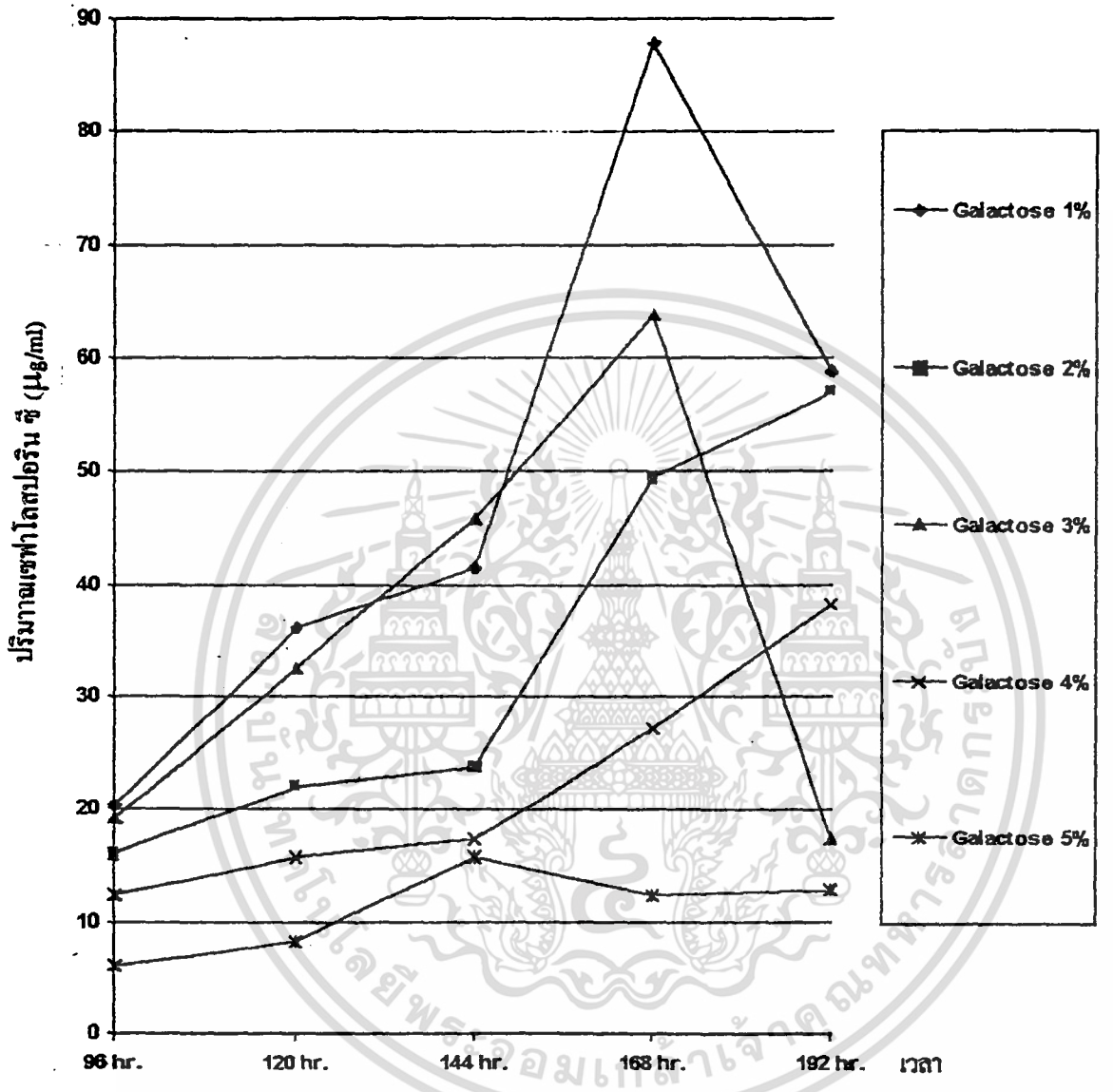
รูปที่ 11 แสดงปริมาณเซฟาโลสปอริน ซี ในอาหารที่มีการผันแปรแหล่งคาร์บอนราฟฟีโนส เป็นร้อยละ 1 , 2 , 3 , 4 , 5 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



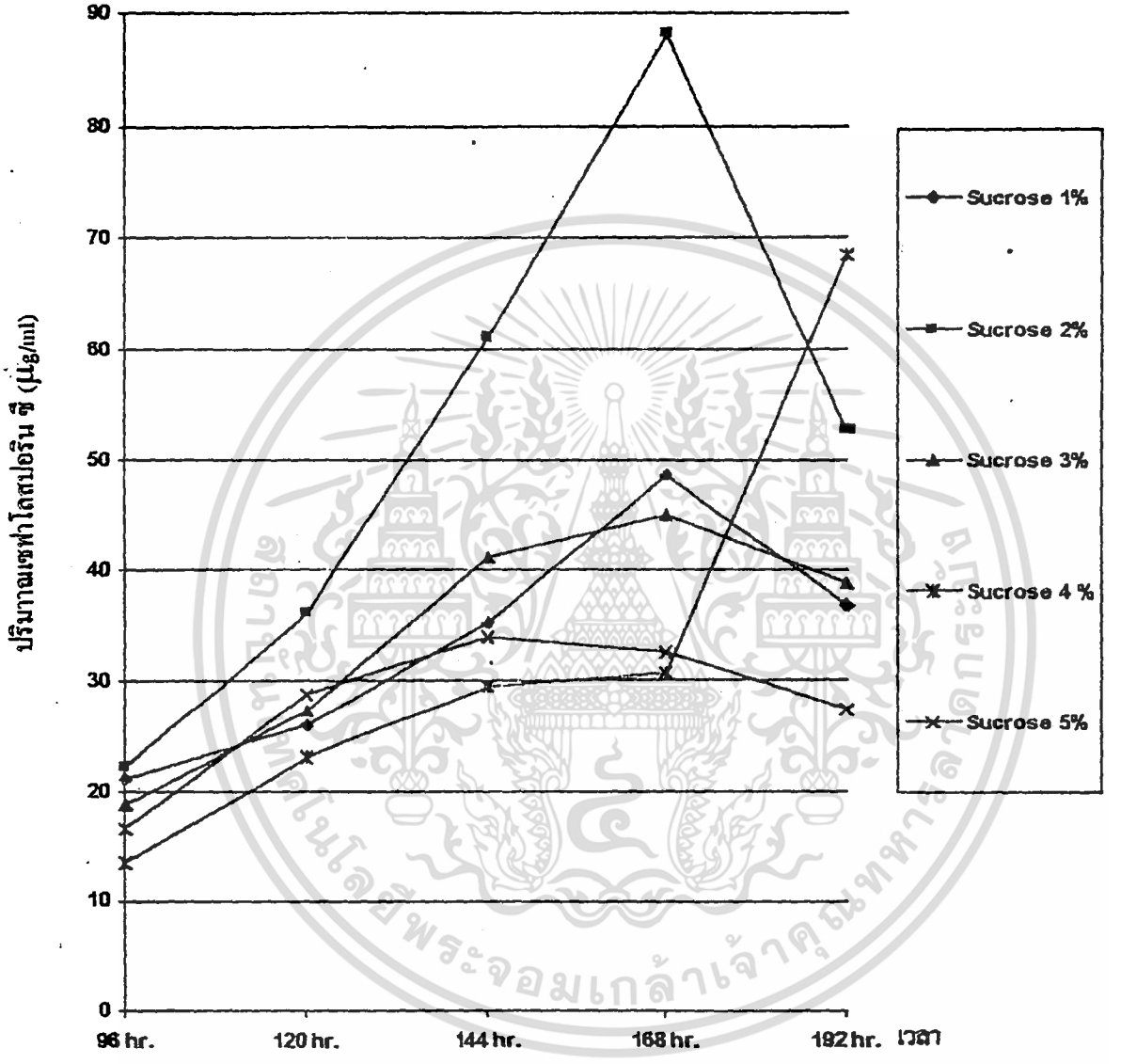
รูปที่ 12 แสดงปริมาณเซฟาโลสปอริน ซี ในอาหารที่มีการผันแปรแหล่งคาร์บอนฟรักโทส เป็นร้อยละ 1 , 2 , 3 , 4 , 5 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



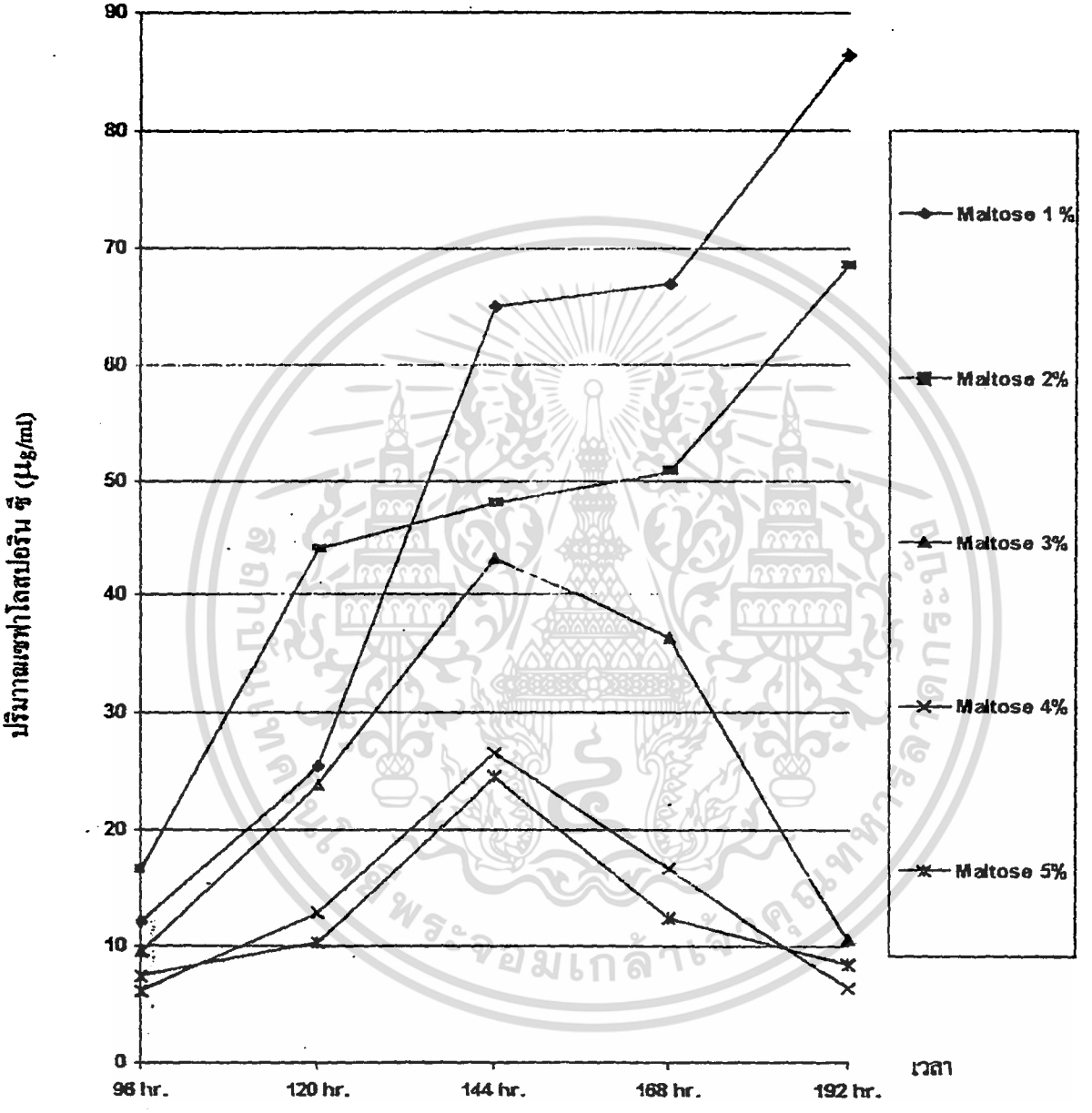
รูปที่ 13 แสดงปริมาณเซฟาโลสปอริน ซี ในอาหารที่มีการผันแปรแหล่งคาร์บอนกาแล็กโทส เป็นร้อยละ 1 , 2 , 3 , 4 , 5 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



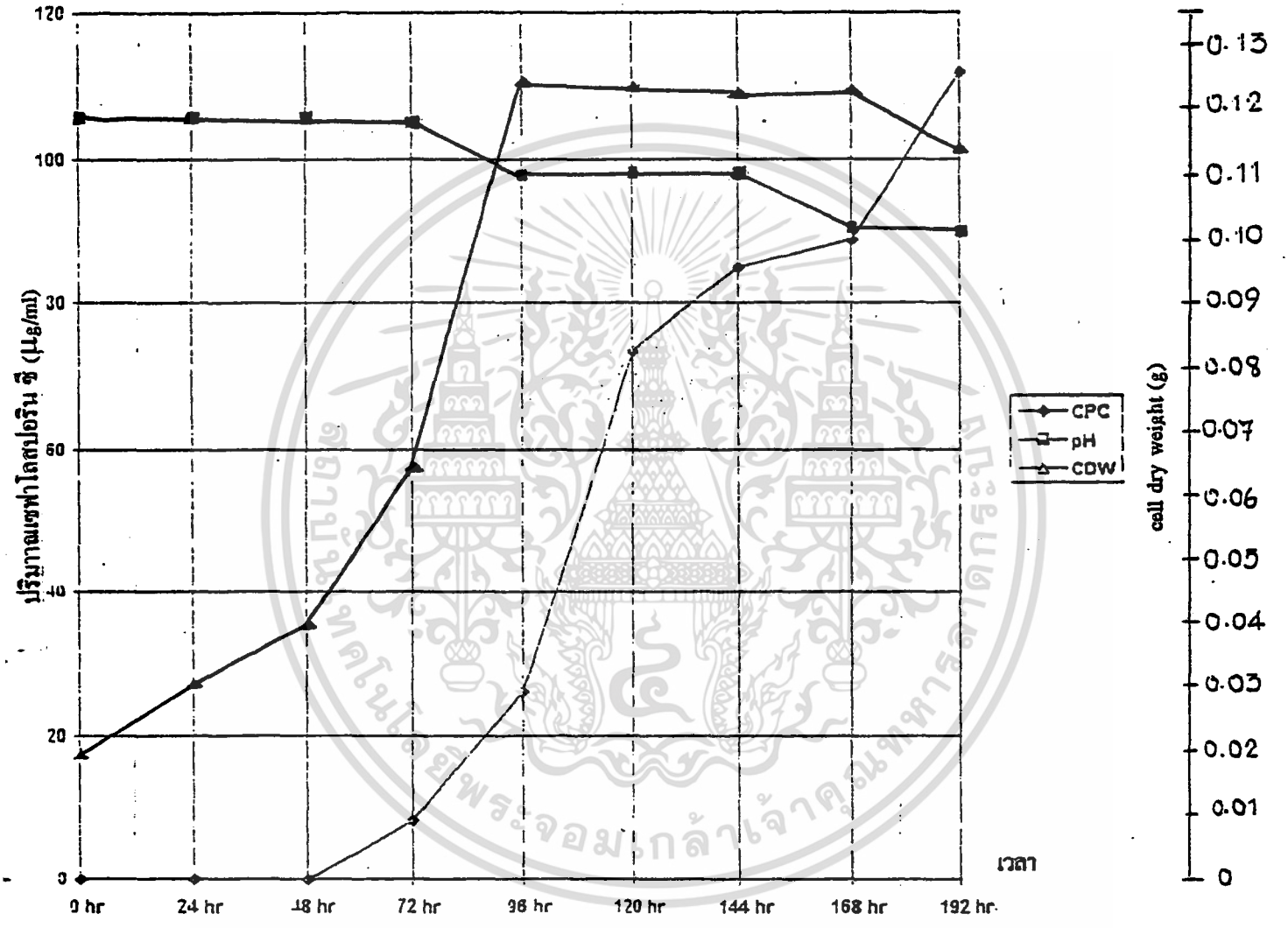
รูปที่ 14 แสดงปริมาณเซฟาโลสปอริน ซี ในอาหารที่มีการผันแปรแหล่งคาร์บอนซูโครส เป็นร้อยละ 1 , 2 , 3 , 4 , 5 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 15 แสดงปริมาณเซฟาโลสปอริน ซี ในอาหารที่มีการผันแปรแหล่งคาร์บอนมอลโทส เป็นร้อยละ 1 , 2 , 3 , 4 , 5 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 16 แสดงความเป็นกรดด่าง น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณการผลิตเซฟาโลสปอริน ซี โดยเชื้อรา *Acremonium chrysogenum* ATCC 36225 ในอาหารที่มีฟรักโทสร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน

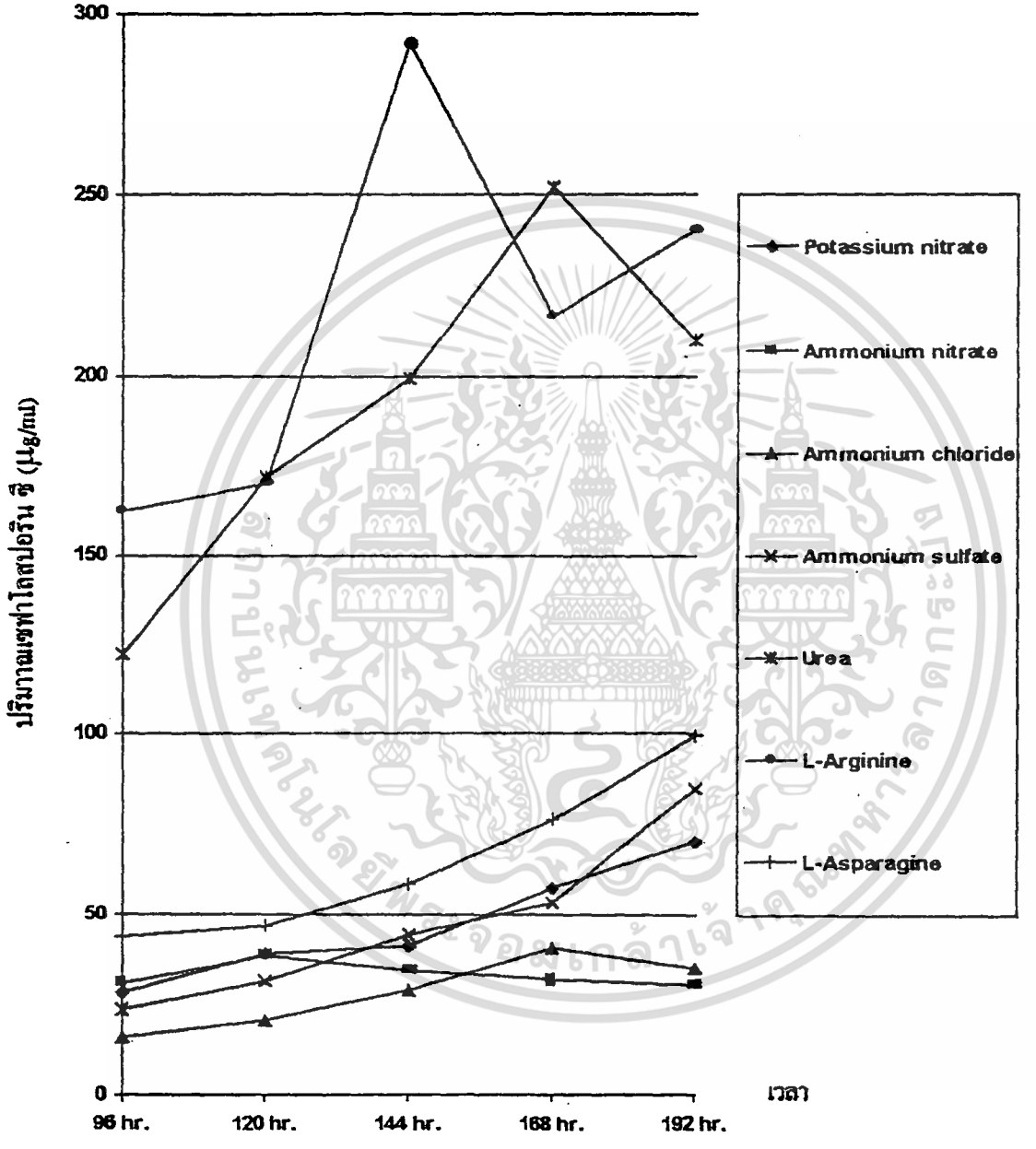
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3) ชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

เลี้ยงเชื้อรา *A. chrysogenum* ATCC 36225 ในขวดรูปชมพู่ตามวิธีที่กล่าวไว้ในหัวข้อ 2.3.3 โดยใช้น้ำตาลฟรักโทสปริมาณร้อยละ 1 เป็นสารแหล่งคาร์บอนและผันแปรชนิดของแหล่งไนโตรเจน โดยใช้แหล่งไนโตรเจนที่เป็นอินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ ยูเรีย (Urea) แอลอาร์จินีน (L-arginine) และแอลแอสปาราจีน (L-asparagine) ส่วนอนินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ โพแทสเซียมไนเตรต (KNO_3) แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) และแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) โดยปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่ใช้มีปริมาณร้อยละ 0.5

ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารเซฟาโลสปอริน ซี ตามวิธีการทดลองในหัวข้อ 3.1 พบว่าแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่ให้ปริมาณการผลิตเซฟาโลสปอริน ซี สูงกว่าแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยยูเรียและอาร์จินีนให้ปริมาณการผลิตเซฟาโลสปอริน ซี สูงสุดในปริมาณ 252.44 และ 249.48 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 17) ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเป็นการทดลองหาปริมาณที่เหมาะสมของอาร์จินีนและยูเรียที่มีต่อการผลิตสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี โดยเชื้อรา *A. chrysogenum* ATCC 36225 ในการผลิตเซฟาโลสปอริน ซี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 17 แสดงการผลิตสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี ในอาหารที่มีฟรักโทสร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรผันแหล่งไนโตรเจน 7 แหล่ง คือ โพแทสเซียมไนเตรต แอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมซัลเฟต ยูเรีย แอลอาร์จินีน แอลแอสพาราจีน

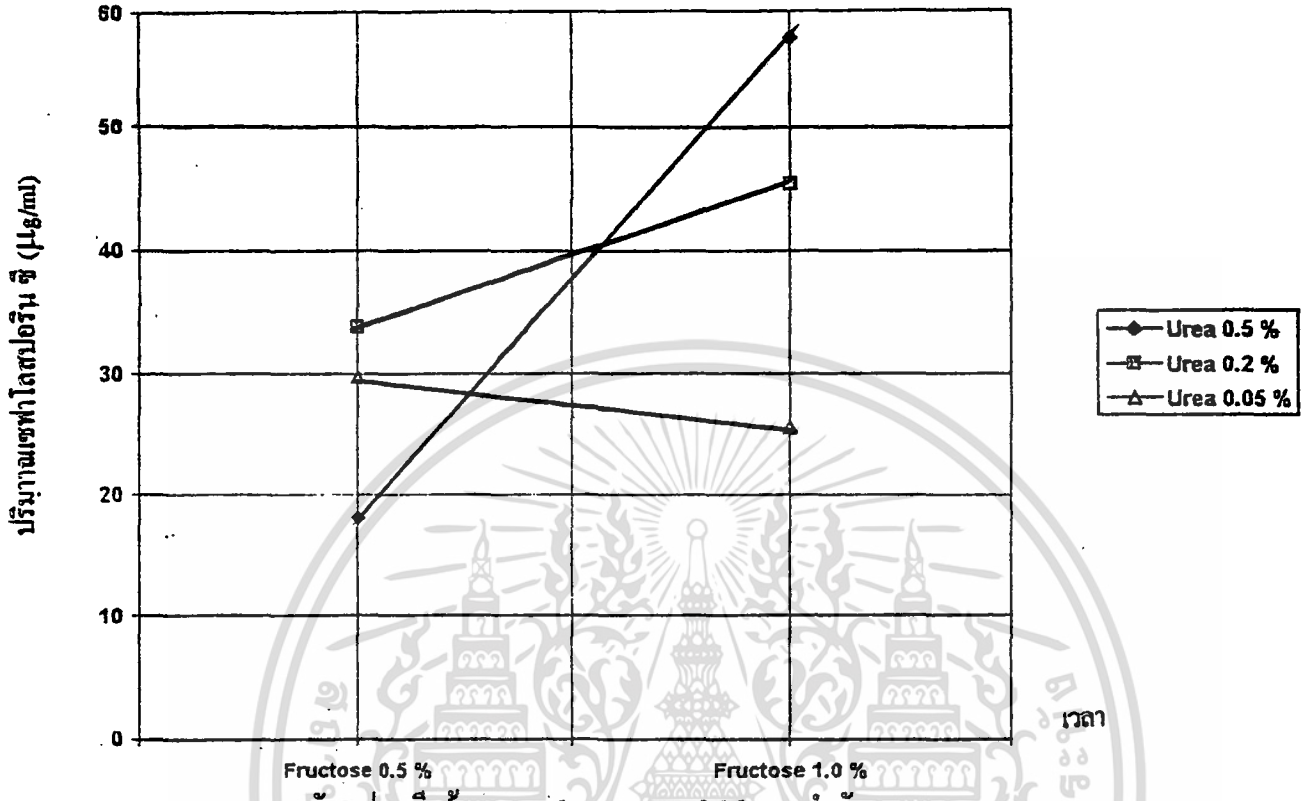
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4) ปริมาณที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจน

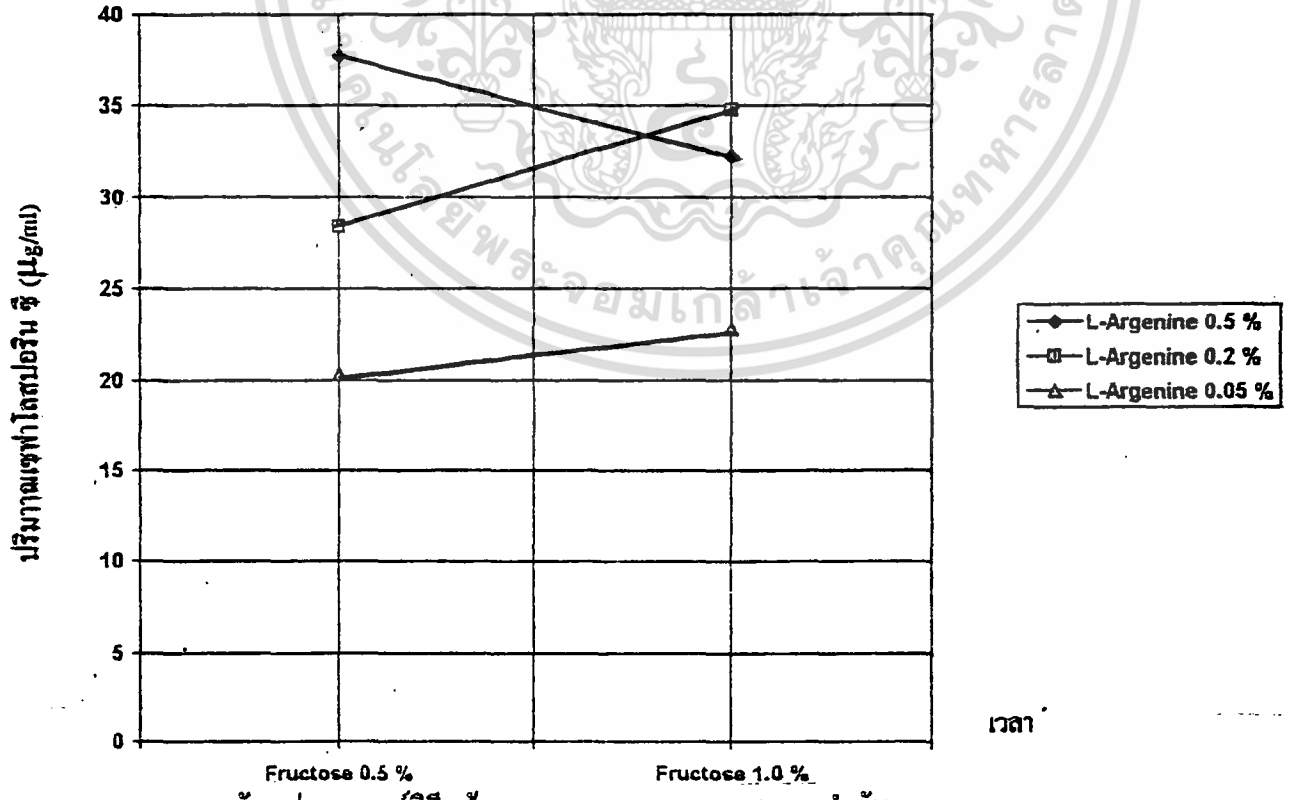
เลี้ยงเชื้อรา *A. chrysogenum* ATCC 36225 ในขวดรูปชมพู่ตามวิธีที่ กล่าวไว้ในหัวข้อ 2.3.3 และวางแผนการทดลองแบบ Factorial โดยผันแปรปริมาณของน้ำตาลฟรักโทสในปริมาณร้อยละ 1 และ 0.5 กับแปรผันชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่ปริมาณร้อยละ 0.5 , 0.2 และ 0.05 โดยแหล่งไนโตรเจนที่ใช้คือ อาร์จินีน และ ยูเรีย

ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี ตามวิธีการวิจัยในหัวข้อ 3.1 จากผลการทดลองพบว่า แหล่งไนโตรเจนที่ทำให้เชื้อ *A. chrysogenum* ATCC 36225 มีปริมาณการผลิตเซฟาโลสปอริน ซี สูงสุดคือ ยูเรีย และยังพบว่ายูเรียที่ปริมาณสูงจะให้ผลผลิตเซฟาโลสปอริน ซี สูงกว่าที่ยูเรียที่มีปริมาณต่ำ โดยใช้ปริมาณน้ำตาลฟรักโทสเท่ากับร้อยละ 1ใช้ปริมาณยูเรียร้อยละ 0.5 ซึ่งเชื้อสามารถผลิตสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี ได้ 57.81 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 18) ดังนั้นจึงเลือกใช้น้ำตาลฟรักโทสที่ปริมาณร้อยละ 1 และยูเรียที่ปริมาณร้อยละ 0.5 เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนเพื่อศึกษาหาชนิดของแหล่งไขมันที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี ในการทดลองขั้นต่อไป ซึ่งในช่วงการผลิตเซฟาโลสปอริน ซี สูงสุด ค่าความเป็นกรดด่างเป็น 7.5 น้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าสูงขึ้นจนถึงชั่วโมงที่ 96 จะมีค่าคงที่ (รูปที่ 19)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



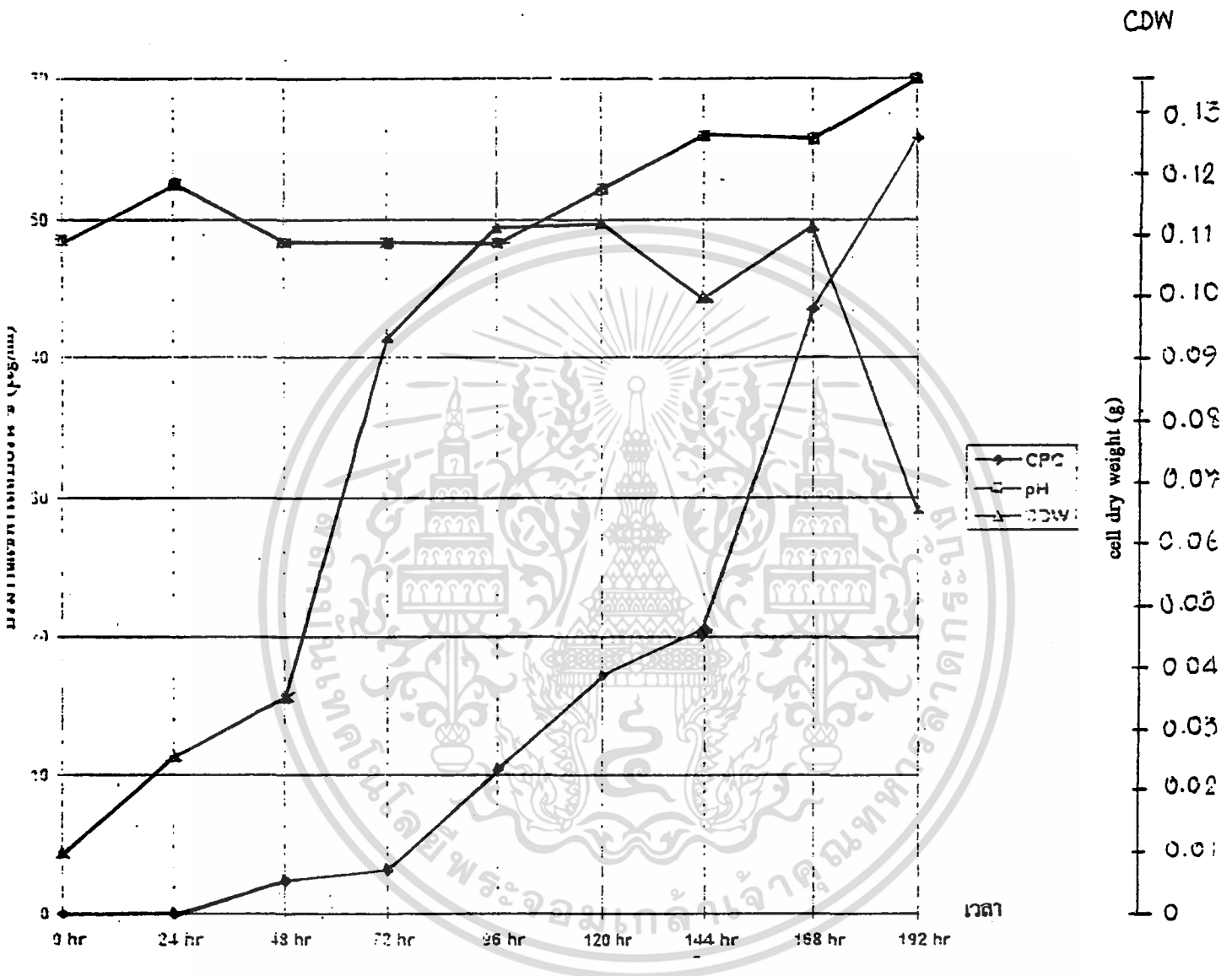
ก. ผันแปรยูเรียร้อยละ 0.5 , 0.2 และ 0.05 ตามลำดับ



ข. ผันแปรแอลอาร์จินีนร้อยละ 0.5 , 0.2 และ 0.05 ตามลำดับ

รูปที่ 18 แสดงการผลิตสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี โดยเชื้อรา *Acremonium chrysogenum* ATCC 36225 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีฟรักโทสร้อยละ 1 และ 0.5 เป็นแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ โดยผันแปรแหล่งไนโตรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเอกสารนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 19 แสดงความเป็นกรดด่าง น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณการผลิตเซฟาโลสปอริน ซี โดยเชื้อรา *Acremonium chrysogenum* ATCC 36225 ในอาหารที่มีฟรักโทสร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน และยูเรียร้อยละ 0.5 เป็นแหล่งไนโตรเจน

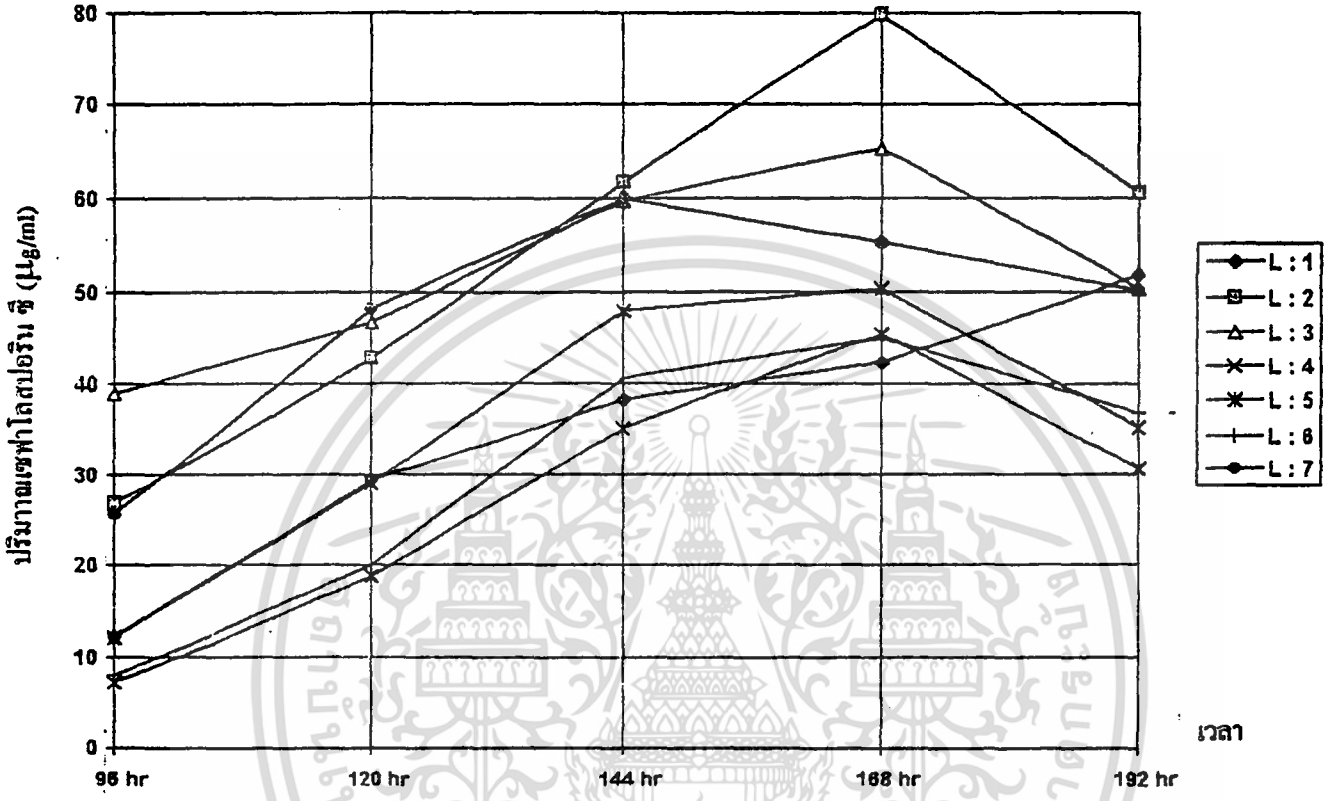
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5) ชนิดของแหล่งไขมันที่เหมาะสม

เลี้ยงเชื้อรา *A. chrysogenum* ATCC 36225 ในขวดรูปชมพู่ตามวิธีที่กล่าวไว้ในหัวข้อ 2.3.3 โดยใช้ฟรักโทสร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ยูเรียร้อยละ 0.5 เป็นแหล่งไนโตรเจน นำมาแปรผันชนิดของแหล่งไขมัน โดยใช้น้ำมันจากธรรมชาติ และ กรดไขมันที่ใช้ในห้องทดลองเป็นสารแหล่งไขมัน โดยใช้น้ำมันจากธรรมชาติคือ น้ำมันมะกอก น้ำมันงา น้ำมันมะพร้าว น้ำมันปาล์ม และ น้ำมันถั่วเหลืองผสมเมล็ดฝ้าย ส่วนกรดไขมันที่ใช้คือ กรดปาล์มมิติก และ กรดโอเลอิก

ทำการวิเคราะห์ปริมาณเซฟาโลสปอริน ซี ตามวิธีการทดลอง ในหัวข้อ 3.1 จากผลการทดลองพบว่าแหล่งไขมันที่ทำให้เชื้อ *A. chrysogenum* ATCC 36225 มีปริมาณการผลิตเซฟาโลสปอริน ซี สูงคือ น้ำมันจากธรรมชาติ ซึ่งแหล่งไขมันที่เชื้อสามารถใช้และให้ผลผลิตสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี ได้สูงสุดคือ น้ำมันปาล์ม โดยผลิตได้ 79.86 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 168 (รูปที่ 20) ดังนั้นจึงเลือกใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งไขมันสำหรับการผลิตสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี ซึ่งในช่วงที่มีการผลิตเซฟาโลสปอริน ซี สูงสุดค่าความเป็นกรดด่างเป็น 7.5 และปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าสูงขึ้นจนถึงชั่วโมงที่ 96 จะมีค่าคงที่ (รูปที่ 21)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



L : 1 คือ น้ำมันฝ้ายผสมถั่วเหลือง L : 2 คือ น้ำมันปาล์ม ,

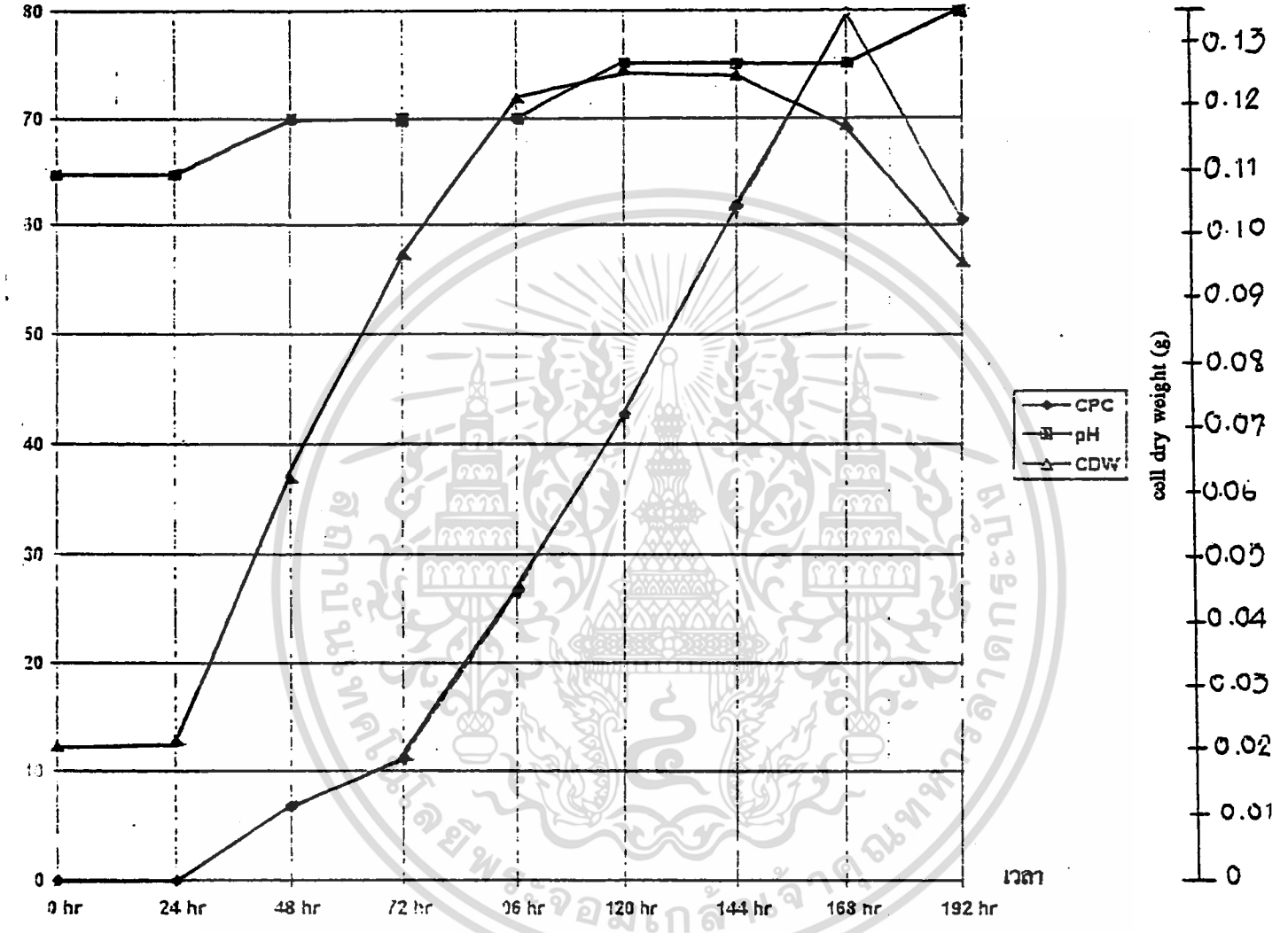
L : 3 คือ น้ำมันงา L : 4 คือ น้ำมันมะพร้าว,

L : 5 คือ กรดโอเลอิค L : 6 คือ กรดปาล์มิติก ,

L : 7 คือ น้ำมันมะกอก

รูปที่ 20 แสดงการผลิตสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี โดยเชื้อรา *Acremonium chrysogenum* ATCC 36225 เพื่อเลี้ยงในอาหารที่มีชนิดของแหล่งไขมันแตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 21 แสดงความเป็นกรดด่าง น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณการผลิตเซฟาโลสปอริน ซี โดยเชื้อรา *Acremonium chrysogenum* ATCC 36225 ในอาหารที่มีฟรักโทสร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน มียูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน และมีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งไขมัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและวิจารณ์

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสร้างสารปฏิชีวนะเซฟาโล-สปอริน ซี ในขวดรูปชมพู่โดยเชื้อ *A. chrysogenum* ATCC 36225 เพื่อศึกษาหาแหล่งคาร์บอนเป็นแหล่งอาหาร โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อตามรายงานของ Kennel และ Demain (1978) ซึ่งแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ คือ แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) และแหล่งไขมันที่ใช้คือ กรดโอเลอิก ดังภาคผนวก ก. ข้อ 2 จากการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอน พบว่าแหล่งคาร์บอนที่ทำให้เชื้อผลิตสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี ได้สูงสุดคือราฟฟีโนส ซึ่งให้ปริมาณสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี สูงถึง 164.34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 192 แต่เนื่องจากน้ำตาลราฟฟีโนสมีราคาแพงและหาได้ยาก รวมทั้งต้องใช้ความเข้มข้นสูงถึงร้อยละ 4 ดังนั้นจึงเลือกใช้น้ำตาลฟรักโทส ซึ่งผลิตสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี ได้สูง 112.09 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 192 เป็นสารแหล่งคาร์บอนเพราะน้ำตาลฟรักโทสมีราคาถูกกว่ามาก และหาได้มากในประเทศไทย รวมทั้งใช้ในปริมาณต่ำกว่าคือ ใช้ความเข้มข้นเพียงร้อยละ 1 ซึ่งเชื้อสามารถผลิตสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี ได้สูง เพราะในการผลิตสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี ในระดับอุตสาหกรรม ค่าใช้จ่ายส่วนใหญ่ขึ้นอยู่กับสารแหล่งคาร์บอน ดังนั้นการพิจารณาใช้สารแหล่งคาร์บอนในการผลิตจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง จากรายงานของ Zhou และคณะ (1993) พบว่าการหมักแบบ fed-batch จะมีการเติมแหล่งคาร์บอนลงไปในปริมาณที่น้อยอย่างต่อเนื่องเพื่อเป็นแหล่งพลังงานให้เชื้อ

สำหรับไนโตรเจนที่ทำให้เชื้อผลิตสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี ได้สูง พบว่าสารอินทรีย์ไนโตรเจนจะให้เชื้อผลิตสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี ได้สูงกว่าสารอนินทรีย์ไนโตรเจน ซึ่งสารอินทรีย์ไนโตรเจนที่ให้เชื้อผลิตสารปฏิชีวนะเซฟาโล-สปอริน ซี ได้สูงสุดคือ ยูเรีย และเมื่อแปรผันความเข้มข้น พบว่ายูเรียที่ความเข้มข้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ร้อยละ 0.5 ให้เชื้อผลิตสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี ได้สูงสุด คือผลิตได้ 67.81 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จากการศึกษาแหล่งไขมันที่มีผลต่อการผลิตสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี ของเชื้อ *A. chrysogenum* ATCC 36225 พบว่าน้ำมันจากธรรมชาติ จะให้เชื้อผลิตสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี ได้สูงกว่าไขมันสังเคราะห์ ซึ่งน้ำมันจากธรรมชาติให้เชื้อผลิตสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี ได้สูงสุดคือน้ำมันปาล์มโดยผลิตได้ 79.86 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 168 ซึ่งน้ำมันปาล์มนี้มีราคาถูกและหาได้ง่ายในประเทศไทย ดังนั้นจึงใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งไขมันในการผลิตสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี

นอกจากแหล่งอาหาร ทั้งสามแหล่งแล้ว ความเป็นกรดด่างก็มีผลต่อการผลิตสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี ของเชื้อ *A. chrysogenum* ATCC 36225 จากรายงานของ Shen และคณะ (1983) พบว่าค่าความเป็นกรดด่างสูงจะไปยับยั้งการผลิตสารปฏิชีวนะ และจากการทดลอง แหล่งไนโตรเจนที่ใช้คือ ยูเรีย ซึ่งยูเรียจะให้แอมโมเนียในกระบวนการหมัก ทำให้ค่าความเป็นกรดด่างสูงขึ้น จึงมีผลไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. chrysogenum* ATCC 36225 ทำให้ผลการผลิตสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี มีปริมาณที่ต่ำลง ดังนั้นจึงควรมีการควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง ให้อยู่ในช่วงที่เชื้อสามารถผลิตสารผลิตภัณฑ์ได้สูงสุด โดยจากการทดลองเชื้อรา *A. chrysogenum* ATCC 36225 ผลิตสารปฏิชีวนะเซฟาโลสปอริน ซี ได้สูงในช่วงค่าความเป็นกรดด่างประมาณ 7.5 ซึ่งสอดคล้องกับที่ Zhou และคณะ (1993)ได้ทำการศึกษาไว้กับเชื้อ ***Cephalosporium acremonium*** ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบดังภาคผนวก ก. ข้อ 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Malt extract agar

Malt extract	20.0	กรัม
Glucose	20.0	กรัม
Peptone	1.0	กรัม
agar	15.0	กรัม

ละลายส่วนผสมข้างต้นให้ผสมกันในน้ำกลั่น 1 ลิตร แล้วจึงเติมวุ้น (agar) หลอมวุ้นให้ละลายโดยใช้ความร้อน นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารที่ใช้ในการเตรียมหัวเชื้อ (Drew และ Demain , 1975)

Glucose	63.0	กรัม
DL-Methionine	3.0	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	7.5	กรัม
Oleic acid	1.5	กรัม
$FeNH_4SO_4 . 6H_2O$	150.0	มิลลิกรัม
K_2HPO_4	15.6	กรัม
KH_2PO_4	15.3	กรัม
$Na_2SO4 . 10H_2O$	1.7	กรัม
$MgSO_4 . 7H_2O$	367.0	มิลลิกรัม
$CaCl_2 . 2H_2O$	75.0	กรัม
$MnSO_4 . H_2O$	30.0	มิลลิกรัม
$ZnSO_4 . 7H_2O$	30.0	มิลลิกรัม
$CuSO_4 . 5H_2O$	8.0	มิลลิกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ละลายส่วนประกอบข้างต้นให้ผสมกันในน้ำกลั่นด้วยความร้อน ปรับความเป็นกรดด่างให้เท่ากับ 7.3 ด้วย 1 N. NaOH หรือ 1 N. H_2SO_4 นำไปฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. สูตรอาหารของ Zhou และคณะ , 1993

Peanut flour	50.00	กรัมต่อลิตร
Ammonium acetate	3.00	กรัมต่อลิตร
Methyloleate	1.50	กรัมต่อลิตร
DL-Methionine	3.00	กรัมต่อลิตร
Glucose monohydrate	11.00	กรัมต่อลิตร
Magnesium sulfate heptahydrate	1.25	กรัมต่อลิตร
Calcium sulfate dihydrate	1.25	กรัมต่อลิตร
Calcium carbonate	2.50	กรัมต่อลิตร
Desmophen (antifoam agent)	1.50	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	143.38	กรัมต่อลิตร
(feed) glucose monohydrate	500.00	กรัมต่อลิตร
DL-methionine	15.00	กรัมต่อลิตร

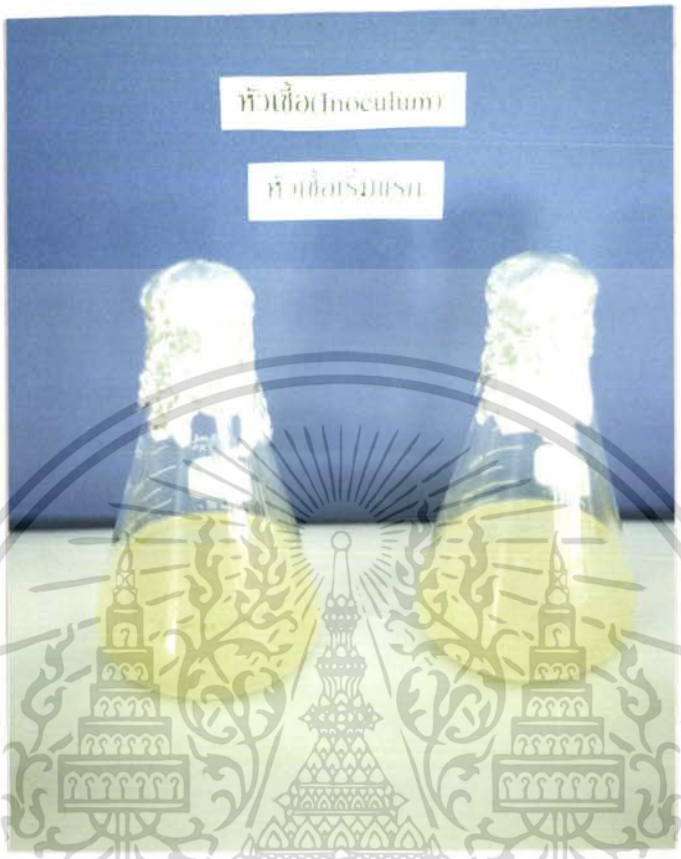
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.

รูปที่ 1 เชื้อรา *Acremonium chrysogenum* ATCC 36225

รูปที่ 2 เชื้อรา *A. chrysogenum* ATCC 36225 ในอาหาร malt extract agar

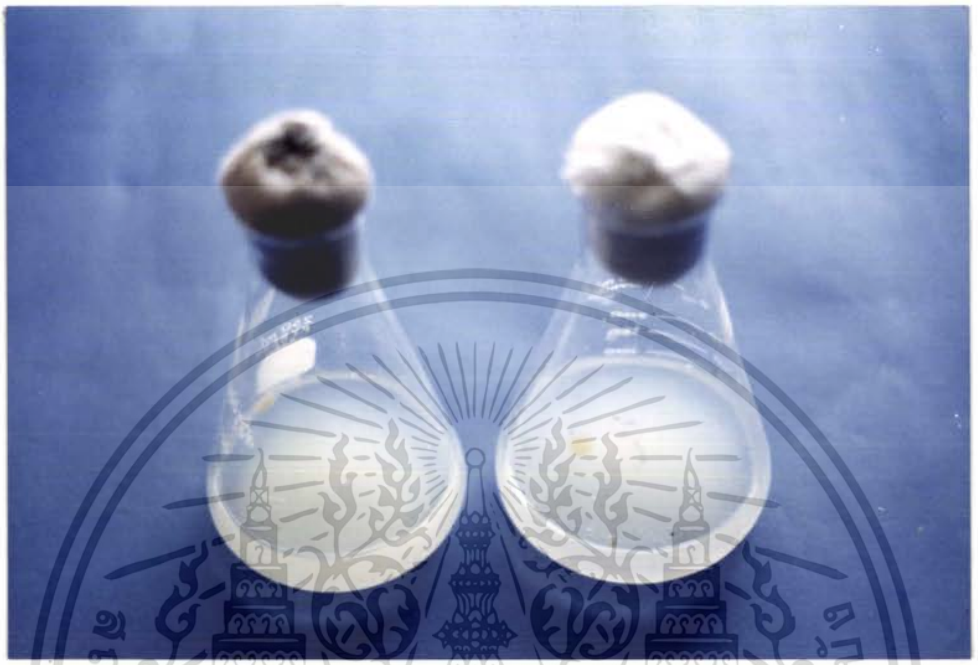
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3 หัวเชื้อ (Inoculum) เริ่มแรก

รูปที่ 4 หัวเชื้อหลังจากเลี้ยง *A. chrysogenum* ATCC 36225 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

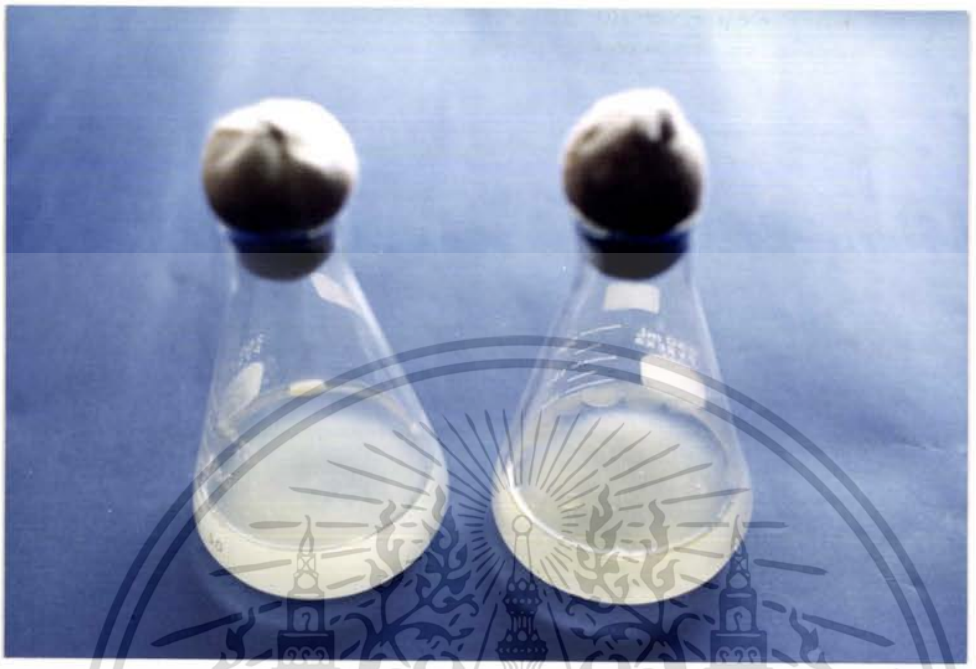
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



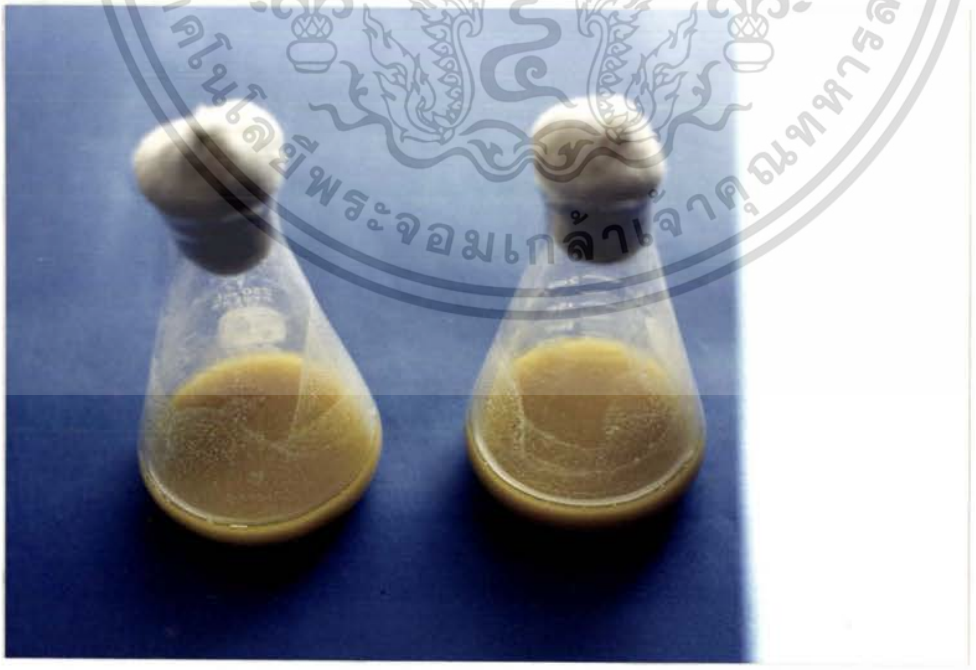
รูปที่ 5 อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลฟรักโทสเป็นแหล่งคาร์บอน

รูปที่ 6 น้ำหมักที่มีน้ำตาลฟรักโทสเป็นแหล่งอาหาร ซึ่งหมักเป็นเวลา 192 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

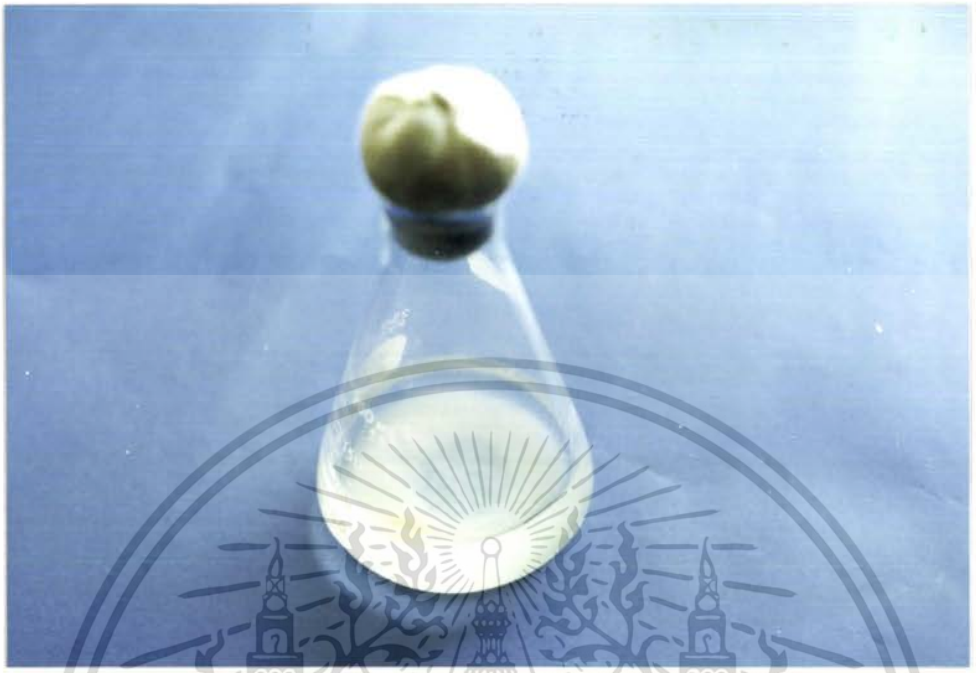


รูปที่ 7 อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลฟรักโทส , ยูเรีย เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน



รูปที่ 8 น้ำหมักที่มีน้ำตาลฟรักโทส , ยูเรีย เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน ตามลำดับ ที่เวลา 192 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 9 อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลฟรักโทส , ยูเรีย และน้ำมันปาล์ม เป็นแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแหล่งไขมัน ตามลำดับ

รูปที่ 10 น้ำหมักที่มีน้ำตาลฟรักโทส , ยูเรีย และน้ำมันปาล์ม เป็นแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแหล่งไขมัน ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

สุรินทร์ พลเสน. Cephalosporins. เภสัชวิทยา ภาควิชาเภสัชวิทยา , คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยมหิดล , 2537 , 459-469

Abraham, E. P. and Newton, G.G.F., 1954. Synthesis of D-δ-amino-δ-carboxyl-valerylglycine (a degradation product of Cephalosporin N) and of DL-δ-amino-δ-carboxyvaleramine , Biochem. J. 58 : 226-268.

Abraham, E. P. and Newton, G.G.F., 1967. Penicillin and cephalosporins, p. 1-16. Gottleib, In D. and Shaw, P.D.(ad.), Antibiotics, vol. 2 Springer-Veriag, New York.

Abraham, E. P. , Newton, G.G.F. , Crawford, K. , Burton, H.S. and Hale, C.W., 1953. Nature, 171 : 343.

Aharonowitz, Y. and Demain, A.L., 1977. Influence of inorganic phosphate and organic buffers on cephalosporin production by *Streptomyces clavuligerus*. Arch. Microbiol.

Brookes, R., 1969. Dissolved oxygene control. Process. Biochem. 4 : 27-34.

Caltrider, P. G., Huber, F.M. and Day, L.E., 1968. Effect of methionine and sulfate on the metabolism of *Cephalosporium acremonium*. Appl. Microbiol. 14 : 1913-1918.

Davey, V. F. and Johnson, M. J., 1953. Penicillin production in corn steep medium with continuous carbohydrate addition. Appl. Microbiol. 1: 208-211.

Demain, A. L. and Newkirk, J.F., 1962. Biosynthesis of cephalosporin C. Appl. Microbiol. 10 : 321-325.

Demain, A. L., Newkirk, J.F. and Henres, D., 1963. Effect of methionine, norleucine, and lysine derivatives on cephalosporin C formation in chemically defined media. J. Bacterial. 85 : 339-344.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Demain, A. L., 1974. Biochemistry of penicillin and cephalosporin C fermentations. Lloydia 37 : 147-167.

Demain, A. L., 1968. Regulatory mechanisms and the industrial production of secondary metabolites. Lloydia 31 : 395-418.

Drew, S. W., and Demain, A. L., 1975. The obligatory role of methionine in the conversion of sulfate to cephalosporin C. Eur. J. Appl. Microbiol. 1: 121-128.

Domasch , K.H. and Gams , W., 1969. Variability and potential of a soil fungus population to decompose pectin , xylan and carboxymethyl cellulose . Soil Biol. Biochem. 1 : 29-36.

Feren, C.J. and Squires , R.W., 1969. The relationship between critical oxygen level and antibiotic synthesis of capreomycin and cephalosporin C. Biotechnol Bioeng. 11 : 583-592.

Gemeiner, P., Stefuca, V., Welwardova, A., Chalkova, E., Welward, L., Kurillova, L. and Danielsson, B. 1993. Direct determination of the cephalosporin transforming activity of imobilized cells with use of and enzyme thermistor. Enz. Microb. Technol. 15 : 50-56.

Gottshall, R.Y., Roberth, J.M., Portwood, L.M. and Jennings, J.C., 1951. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 76 : 307.

Heim, J., Shen,Y.Q. , Wolfe, S. and Demain , A. L., 1984. Regulation of isopenicillin N synthetase and deacetoxycephalosporin C synthetase by carbon source during the fermentation of *Cephalosporium acremonium*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 19 : 232-236.

Holzhaver-Rieger, K., Zhou, W. and Schugerl, K., 1990. On line high performance liquid chormatography for the determination of cepphalosporin C and by products in complex fermentation broths. J. Chrom. 499 : 609-615.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kennel, Y. M. and Demain, A. L., 1978. Effect of carbon sources on β-lactam antibiotic formation by *Cephalosporium acremonium*. Exp. Mycol., 2 : 234.

Konig, B. Schugerl, K. and Seewald, C., 1982. Strategies of penicillin fermentation in tower loop reactors. Biotechnol. Bioeng. 24 : 259-280..

Lemke, P.A. and Brannon, D.R., 1972. Microbial syntheses of cephalosporin and penicillin compounds, in : Cephalosporins and Penicillin : Chemistry and Biology (E.S. Frynn, ed.), Academic Press, New York, pp. 370-437.

Martin J.F. and Demain A.L., 1980. Control of antibiotic biosynthesis. Microbiol. Rev. 44 : 232-251.

Martin J.F., Liras, P. and Demain A.L., 1978. ATP and adenylate energy change duriing phosphate mediated control of antibiotic synthesis. Biochem. Biophy. Res. Commun. 83 : 822-828.

Masumura M. , Yoshida T. and Taguchi T. , 1982. Synthesis of cephalosporin C by methionine analogue resistant mutant of *Cephalosporium acremonium*. Eur. J. Appl. Biotechnol. 16 : 114-118.

Maurice O.M. , 1987 . Morphology and physiology of *Penicillrium* and *Acremonium*. *Penicillrium* and *Acremonium*. 1 : 37-65.

Nash, C. H. and Huber, F.M., 1971. Antibiotic synthesis and morphological differentiation of *Cephalosporium acremonium*. Appl. Microbiol. 22 : 6-10.

Newton, G. G. F. and Abraham, E.P., 1977. Cephalosporin C, a new antibiotic contraining sulphur and D-aminoadipic acid. Nature. 175: 548.

Ogata, K., Osawa, H. and Tani, Y., 1977. Production of an antibiotic by *Strepptomyces* sp. a-60. J. Hement. Technol. 55 (3) : 285-289.

Ott, J. L., Gocezegki, C.W. , Pavey, D. , Farran, J.D. and Horton, D.R., 1962. Biosynthesis of cephalosporin C. I. Factors affecting on fermentation. Appl. Microbiol. 10 : 515-523.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Peberdy, J.F., 1987. Genetics of *Acremonium. Penicillium* and *Acremonium.* 1 : 93-109.

Rake, G. and Donovick, R., 1946. Studies on the nutritional requirments of *Stretomyces gricus* for the fromation of stretomycin. J. Bacteriol. 52 : 223-226.

Shen, Y.Q. , Hein, J. , Solomon, N.A. , Wolfe, S. and Demain, A.L., 1984. Repression of β-lactam production in *Cephalosporium acremonuim* by nitrogen sources. J. Antibiotics. 37 : 503-511.

Shen, Y. Q. , Kupka, J. , Wolfe, S., and Demain, A.L., 1983. Studies on the ring-cyclization and ring-expansion enzymes of β-lactam biosynthesis in *Cephalosporium acremonium.* Can. J. Microbiol. 29 : 488-496.

Smith, B., Warren, S.C. , Newton, G.G.F. and Abraham, E.P., 1967. Biosynthesis of penicillin N and cephalosporin C : antibiotic production and other teatures of metabolism of a *Cephalosporium sp.* Biochem. J. 103 ; 877-890.

Sohn, Y. S., Lee, K.C., Koh, Y.H. and Gil, G.H., 1994. Changes in cellular fatty acid composition of *Cephalosporium acremonium* during cephalosporin C production. Appl. and Environ. Microb., Mar. p. 947-952.

Stevens, C.M. , Abraham, E. P., Haung, F. and Sih, C.T., 1962. Incorporation of molecule oxygen at C-17 of cephalosporin C during its biosynthesis. Perspect. Biol. Med. 5 : 432.

Zhou, W. C., Holzhauer-Rieger, K. , Bayer, T. and Schugerl, K., 1993. Cephalosporin C production by a highly productive *Cephalosporium acremonium* strain in an airlift tower loop reactor with static mixers. J. of Biotech. 28 : 165-177.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้