บทที่ 4

บทสรุปและวิจารณ์

งานวิจัยนี้เป็นการปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อราเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเพนนิซิลลิน จี โดยเริ่มจากเชื้อ P. chrysogenum N-151 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ปรับปรุงมาจาก P. chrysogenum A-88 โดยโชตนา (102) เริ่มจากการทดสอบประสิทธิภาพการสร้างเพนนิซิลลิน จี ของ P. chrysogenum N - 151 ด้วยการวัดความกว้างบริเวณยับยั้งบนอาหารวุ้นทดสอบ พบว่าส่วนใหญ่ประมาณ 60% ให้ความกว้างบริเวณยับยั้ง 30 มิลลิเมตร และการสร้างเพนนิซิลลิน จี ในอาหารเหลวระดับขวดเขย่าสร้างได้ 1594 ยูนิต/มิลลิลิตร จากการวิเคราะห์ทางชีววิทยา และ 0.448 กรัม/ลิตร จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC จากนั้นนำสายพันธุ์ N-151 มาทำการปรับปรุงสายพันธุ์โดยการทำกลายพันธุ์ด้วยสารก่อการกลายพันธุ์ตามด้วยการคัดเลือกอย่างสุ่มซ้ำหลาย ๆ รอบ สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้หลังจากหนึ่งรอบของการทำกลายพันธุ์ จะนำมาใช้เป็นสายพันธุ์เริ่มต้นสำหรับทำกลายพันธุ์ในรอบต่อไป

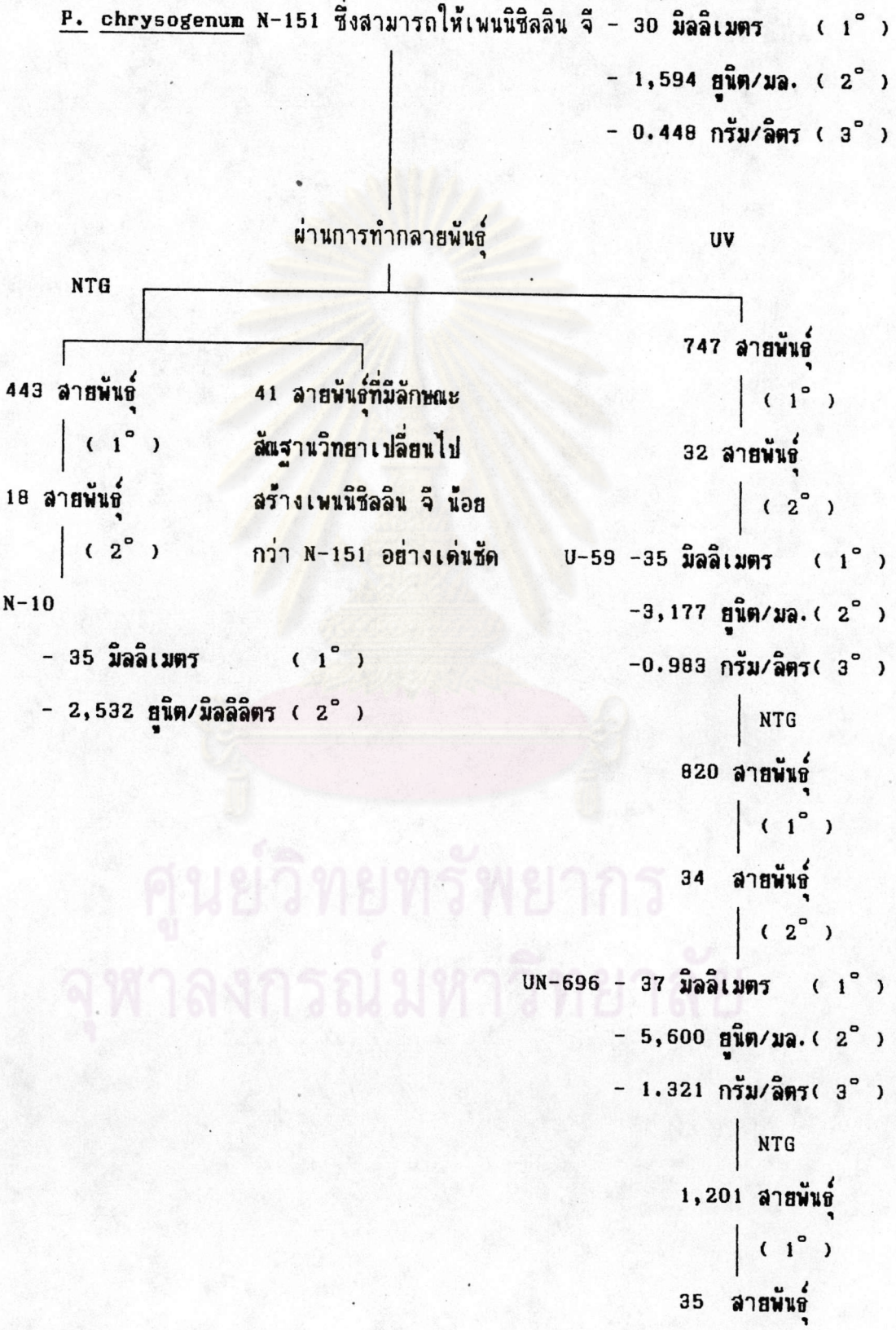
ในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้สารก่อการกลายพันธุ์ที่นิยมใช้แพร่หลายในการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ ได้แก่ UV ซึ่งเป็นกลุ่มแสงหรือรังสี และ NTG ซึ่งเป็นกลุ่มสารเคมี (13, 32,33) แต่เนื่องจากสารก่อการกลายพันธุ์ชนิดหนึ่ง อาจมีประสิทธิภาพในการชักนำให้กลายพันธุ์กับสายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่งได้ดีกว่าอีกชนิดหนึ่ง (50) ดังนั้นจึงใช้ทั้ง UV และ NTG สำหรับทำให้เกิดการกลายพันธุ์กับ N-151 ในขั้นแรกไปพร้อม ๆ กัน

จากการทำกลายพันธุ์กับ P. chrysogenum N-151 ด้วย NTG และ UV ไปพร้อม ๆ กัน พบว่าสายพันธุ์ที่สร้างเพนนิซิลลิน จี สูงที่สุด ได้จากการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผ่านการทำกลายพันธุ์ด้วย UV คือ U-59 โดยสร้างเพนนิซิลลิน จี ได้ 0.983 กรัม/ลิตร จึงนำสายพันธุ์ U-59 มาทำกลายพันธุ์ซ้ำด้วย NTG รวม 4 รอบ และในแต่ละรอบจะคัดเลือกได้สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเพนนิซิลลิน จี ดีที่สุด คือสายพันธุ์ UN-696 UNN-645 UNNN-354 และ UNNNN-485 ซึ่งสามารถสร้างเพนนิซิลลิน จี ได้ 1.321 1.612 2.372 และ 3.132 กรัม/ลิตร ตามลำดับ โดยมากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น N-151 เท่ากับ 119.95 170.70 230.33 386.07 และ 541.80 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ

จากการทำกลายพันธุ์ข้างต้นพบว่าสายพันธุ์ที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาต่างจากสายพันธุ์ตั้งต้นมีประสิทธิภาพในการสร้างเพนนิซิลลิน จี น้อยกว่าอย่างเด่นชัด ซึ่งมีลักษณะสอดคล้องกับที่มีผู้รายงานว่า Penicillium sp. ที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาเปลี่ยนไป จะมีความสามารถในการสร้างเพนนิซิลลินลดลง (50,74,75,76) สายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ว่าสร้างพนนิซิลลิน จี สูงในแต่ละรอบของการทำกลายพันธุ์พบว่ามีลักษณะสัณฐานวิทยาเหมือนกับสายพันธุ์ตั้งต้น N-151 ไม่ว่าจะเป็นลักษณะการเจริญบนอาหารวุ้น พี ดี เอ บนอาหารวุ้นผลิตเพนนิซิลลิน จี หรือรูปแบบการจัดเรียงตัวของสปอร์

การปรับปรุงสายพันธุ์ P. chrysogenum N-151 ในงานวิจัยนี้ การทำการกลายพันธุ์และคัดเลือกสายพันธุ์แต่ละรอบใช้เวลาประมาณ 35 วัน โดยในการทำกลายพันธุ์ 5 รอบ ได้ใช้เวลาในการปรับปรุงสายพันธุ์ทั้งสิ้น 175 วันหรือประมาณ 6 เดือน จำนวนสายพันธุ์ที่นำมาคัดเลือก ทั้งหมด 4073 สายพันธุ์ ซึ่งนับว่าเป็นการปรับปรุงสายพันธุ์ที่ค่อนข้างประสบผลและใช้เวลาไม่นานนัก เมื่อเทียบกับการปรับปรุงสายพันธุ์ในต่างประเทศ พบว่าการปรับปรุงสายพันธุ์ Wis .BL3-D10 ซึ่งสร้างเพนนิซิลลิน จี ได้ 800-1000 ยูนิต/มิลลิลิตร โดยคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีการเปลี่ยนแปลงตามธรรมชาติ 3 รอบ ทำกลายพันธุ์และคัดเลือกสายพันธุ์อีกหนึ่งรอบ ใช้เวลาในการปรับปรุงสายพันธุ์ 2 ปี ได้สายพันธุ์ Wis.49-133 ซึ่งมีความสามารถสร้างเพนนิซิลลิน จี ได้ 1500- 2000 ยูนิต/มิลลิลิตร ซึ่งเพิ่มขึ้นประมาณ 94.44 % และจากสายพันธุ์ Wis.49-133 ผ่านการคัดเลือกอีกหนึ่งรอบ ได้สายพันธุ์ Wis.51-20 ซึ่งสร้างเพนนิซิลลิน จี ได้ 2400 เพิ่มขึ้นประมาณ 37.14 % ใช้เวลาในการปรับปรุงสายพันธุ์เป็นเวลา 2 ปี (35) จากสายพันธุ์ Wis.51-20 นำมาผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์โดยทำกลายพันธุ์มากกว่า 6 รอบที่ห้องปฏิบัติการ 2 แห่ง ใช้เวลาในการปรับปรุงสายพันธุ์ประมาณ 25-30 ปี ได้สายพันธุ์ M-134 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ทางการค้าที่สร้างเพนนิซิลลิน จี ได้ประมาณ 15000 ยูนิต/มิลลิลิตร โดยสามารถสร้างเพนนิซิลลิน จี ได้มากกว่า Wis.51-20 ประมาณ 525 % (37)

จากงานวิจัยสามารถสรุปแผนภาพการปรับปรุงสายพันธุ์ของ P. chrysogenum ได้ดังนี้



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(2°)

UNN-645 - 38 มิลลิเมตร (1°)

- 7,026 ยูนิต/มล. (2°)

-1.612 กรัม/ลิตร (3°)

NTG

820 สายพันธุ์

(1°)

59 สายพันธุ์

(2°)

UNNN-354 - 41 มิลลิเมตร (1°)

-7,971 ยูนิต/มล.(2°)

-2.372 กรัม/ลิตร (3°)

NTG

772 สายพันธุ์

(1°)

34 สายพันธุ์

(2°)

UNNNN-485 - 43 มิลลิเมตร (1°)

-12,545 ยูนิต/มล.(2°)

-3.132 กรัม/ลิตร (3°)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หมายเหตุ 1 1° การทดสอบประสิทธิภาพในการสร้างเพนนิซิลลิน จี บนอาหารวุ้นทดสอบโดยวัดความกว้างบริเวณยับยั้ง

2 2° การทดสอบประสิทธิภาพในการสร้างเพนนิซิลลิน จี ในอาหารเหลวระดับเขย่าขวด วิเคราะห์โดยวิธีชีววิทยา

3 3° การทดสอบประสิทธิภาพในการสร้างเพนนิซิลลิน จี ในอาหารเหลวระดับเขย่าขวด วิเคราะห์ด้วย HPLC

ความสัมพันธ์ระหว่างความกว้างบริเวณยับยั้ง ค่าโพเทนซี อินเดกซ์ และประสิทธิภาพการสร้างเพนนิซิลลิน จี ในอาหารเหลว

ในการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ การคัดเลือกสายพันธุ์นับว่ามีความสำคัญมากเพราะถ้ามีการคัดเลือกที่มีประสิทธิภาพก็จะทำให้ได้สายพันธุ์ที่ต้องการในเวลารวดเร็ว โดยทั่วไปการคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะมักถูกแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน เพื่อให้เกิดความรวดเร็ว โดยขั้นตอนแรกเป็นการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิจะเป็นการคัดเลือกบนอาหารวุ้นทดสอบ ซึ่งทำได้รวดเร็วกว่าการคัดเลือกโดยเลี้ยงในอาหารเหลว ในขั้นตอนนี้จะคัดสายพันธุ์ที่ไม่ต้องการออกได้เป็นจำนวนมาก ทำให้มีจำนวนสายพันธุ์ไม่มากที่จะนำไปใช้คัดเลือกในขั้นทุติยภูมิต่อไป ซึ่งวิธีดังกล่าวจะทำให้การคัดเลือกเป็นไปอย่างรวดเร็ว (87,88,90)

หลักในการพิจารณาการเก็บสายพันธุ์กลายพันธุ์ในขั้นปฐมภูมิทำได้ 2 วิธีโดย เก็บสายพันธุ์โดยพิจารณาจากความกว้างบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้นบนอาหารวุ้นทดสอบ และพิจารณาจากค่าโพเทนซี อินเดกซ์ (ความกว้างบริเวณยับยั้งที่วัดได้หารด้วยความกว้างโคโลนี) แต่ในงานวิจัยนี้ไม่เลือกเก็บโดยอาศัยค่าโพเทนซี อินเดกซ์ เพราะมีรายงานว่าการคัดเลือกสายพันธุ์ด้วยการใช้ค่าโพเทนซี อินเดกซ์ มีประสิทธิภาพไม่ดีเท่าที่ควร (88)เนื่องจาก 57 สายพันธุ์จาก 15000 สายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกในขั้นปฐมภูมิโดยอาศัยค่าโพเทนซี อินเดกซ์เป็นเกณฑ์ เมื่อนำมาคัดเลือกในขั้นทุติยภูมิ พบว่ามีเพียง 7 สายพันธุ์หรือประมาณ 12.28 % ของสายพันธุ์ที่คัดเลือกในขั้นปฐมภูมิ (57 สายพันธุ์) สร้างเพนนิซิลลิน จี สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น

เมื่อพิจารณาจากผลการวิจัย (**ตารางที่ 26**) ถึงความสัมพันธ์ระหว่างความกว้างบริเวณยับยั้งบนอาหารวุ้นทดสอบ ค่าโพเทนซี อินเดกซ์ และประสิทธิภาพการสร้างเพนนิซิลลิน จี ในอาหารเหลว พบว่าความกว้างบริเวณยับยั้งจะเพิ่มจากต่ำไปสูงตามลำดับเมื่อเทียบกับความสามารถในการสร้างเพนนิซิลลิน จี ในอาหารเหลว ในขณะที่ค่าโพเทนซี อินเดกซ์ไม่แปรผันตาม ซึ่งแสดงว่าในการใช้วิธีการคัดเลือกสายพันธุ์ในขั้นปฐมภูมิที่ได้ดัดแปลงขึ้น (**ตามวิธีการทดลองข้อ** 6.1) ถ้าทำการคัดเลือกสายพันธุ์โดยอาศัยค่าโพเทนซี อินเดกซ์จะไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณเพนนิซิลลิน จี ที่สร้างได้ ในอาหารเหลวระดับขวดเขย่าได้ดีเท่ากับการคัดเลือกโดยอาศัยความกว้างบริเวณยับยั้งบนอาหารวุ้นทดสอบ

จากการคัดเลือกสายพันธุ์ขั้นปฐมภูมิโดยใช้วิธีดังกล่าวหลังทำกลายพันธุ์ทั้ง 5 รอบ พบว่าสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ในขั้นปฐมภูมิโดยเฉลี่ยประมาณ 58.12 % สามารถสร้างเพนนิซิลลิน จี ได้สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นเมื่อทดสอบขั้นทุติยภูมิ ซึ่งนับว่าเป็นวิธีที่ค่อนข้างมีประสิทธิภาพและสามารถคัดเลือกได้ครั้งละมากๆ ซึ่งในการทดลองนี้สามารถคัดเลือกได้ประมาณ 300 โคโลนีต่อหนึ่งวัน โดยสามารถเพิ่มการคัดเลือกได้มากกว่านี้ถ้าเพิ่มจำนวนหลุมอะลูมิเนียม และแผ่นกระจกสำหรับวัดความกว้างบริเวณยับยั้งให้มากขึ้นกว่าเดิม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย