หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1
บทนำ

เพนนิซิลลิน (penicillins)

1 ประวัติและการค้นพบ (1,2)

ในปี 1928-1929 Alexander Fleming สังเกตพบว่า Staphylococcus aureus ที่เลี้ยงไว้ในจานเลี้ยงเชื้อถูกปนเปื้อนด้วยเชื้อราสีเขียวจากอากาศ และเมื่อเชื้อรานั้นเจริญเติบโตมากขึ้นจะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ S. aureus รอบ ๆโคโลนีได้ Fleming ได้จัดจำแนกชนิดของราพบว่าอยู่ในชนิด Penicillium notatum และเมื่อแยกมาเลี้ยงในอาหารเหลว พบว่าสามารถสร้างสารที่มีคุณสมบัติต่อต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้และไม่เป็นพิษต่อสัตว์ทดลอง Fleming จึงเสนอว่าสารประกอบที่ได้จากการหมักในอาหารเหลวนี้ อาจนำมาใช้ในการรักษาโรคในมนุษย์ แม้ว่า Fleming ไม่ประสบผลในการแยกสารประกอบจากอาหารเหลว อย่างไรก็ตามได้ตั้งชื่อสารประกอบนั้นว่า เพนนิซิลลิน [ซึ่งต่อมาทราบภายหลังคือ เพนนิซิลลิน เอฟ (penicillin F)] ในสมัยนั้นผลการรายงานของ Fleming ไม่ได้รับความสนใจเนื่องจากความรู้ด้านชีวเคมี และเงินทุนที่ให้การสนับสนุนมีไม่เพียงพอ ต่อมาผลงานที่ Fleming เคยเสนอไว้ก็ได้รับความสนใจอย่างจริงจังในปี 1935 เนื่องจากมีการเสนอผลการรักษาโรคด้วย sulfanilamide ตลอดจนการทำงานของ Rene Duboos ณ.สถาบัน Rockefeller ในปี 1939 ได้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่แยกจากดินสามารถสร้างสารประกอบที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียชนิดอื่นได้ ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับเพนนิซิลลินที่ Flemingเคยรายงานไว้ ต่อมาแพทย์ทางอายุรเวช(pathologist)ชาวอังกฤษชื่อ Haward Florey และนักชีวเคมีชาวเยอรมันชื่อ Ernest Boris Chain ซึ่งเป็นกลุ่มนักวิจัยแห่งมหาวิทยาลัยออกฟอร์ดได้พยายามแยกเพนนิซิลลินและทำให้มีความบริสุทธิ์สูง ในปี 1940 ผลความสำเร็จได้ถูกตีพิมพ์เป็นบทความในวารสาร Lancet ซึ่งเป็นวารสารทางการแพทย์ของประเทศอังกฤษ ต่อมาบริษัทผลิตยาของประเทศอเมริกาได้พัฒนาเทคนิคในการผลิตเพนนิซิลลินได้ในระดับขยายส่วน เพื่อผลิตเป็นยาสำหรับใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อที่เกิดขึ้นในช่วงสงคราม และได้ใช้เรื่อยมาจนถึงปัจจุบัน ด้วยเหตุนี้ในปี 1945 จึงได้มีการมอบรางวัลโนเบิล (Noble Prize) แก่ Fleming, Florey

และ Chain สำหรับการค้นพบและพัฒนานำเพนนิซิลลินมาใช้เป็นยารักษาโรค

2 กลุ่มเพนนิซิลลินและความเป็นมา

การผลิตเพนนิซิลลินโดยใช้สายพันธุ์ราที่ Fleming ค้นพบในปี 1929 คือ P. notatum มาหมักในอาหารเหลว พบว่าเพนนิซิลลินที่หมักได้ส่วนใหญ่คือเพนนิซิลลิน เอฟ (penicillin F;2-penityl penicillin) ต่อมาได้มีการพัฒนาสายพันธุ์เพื่อใช้ในการผลิตเพนนิซิลลินจนได้สายพันธุ์ P. chrysogenum Q-176 และเมื่อนำมาหมักในอาหารเหลว พบว่าเพนนิซิลลินส่วนใหญ่ที่หมักได้คือเพนนิซิลลิน เค และส่วนน้อยคือไดไฮโดรเพนนิซิลลิน (dihydro penicillin) และเมื่อนำ P. chrysogenum Q-176 มาเลี้ยงในอาหารสูตรสังเคราะห์ (chemically defined medium) พบว่าเพนนิซิลลินส่วนใหญ่ที่หมักได้คือเพนนิซิลลิน เอฟ และ เค ต่อมาในปี 1946 Moyer และคณะได้สังเกตพบว่าถ้ามีการเติมคอนสตีฟ ลิเคอร์ (cornsteep liquor) ลงในอาหารหมักซึ่งมีเชื้อ P. chrysogenum พบว่าส่วนใหญ่ของเพนนิซิลลินที่หมักได้คือเพนนิซิลลิน จี เมื่อได้มีการศึกษาส่วนประกอบของคอนสตีฟ ลิเคอร์ พบว่าประกอบด้วย phenylalanine และจะสลายตัวได้เป็น phenethyl amine และ กรดฟีนิลอะซิติก และจากการศึกษามากมายถึงผลของกรดฟีนิลอะซิติก และสารเคมีอื่น ๆ ที่มีโครงสร้างโมเลกุลใกล้เคียงกับกรดฟีนิลอะซิติก (อนุพันธ์ของ phenylacetic เช่น ethanolamides หรือ substituted ethanolamides) ที่เติมลงในอาหารหมักมีผลทำให้เกิดการสังเคราะห์เพนนิซิลลิน จี มากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่า hydroxyphenyl-acetic acid สามารถชักนำให้เกิดเพนนิซิลลิน เอฟ phenoxyacetic acid สามารถชักนำให้เกิดเพนนิซิลลิน วี จึงเรียกสารเคมีที่เติมลงในอาหารหมักแล้วสามารถชักนำให้เกิดการสังเคราะห์ชนิดต่าง ๆ ของเพนนิซิลลินคือ สารตั้งต้นการเกิดผลิตภัณฑ์ (precursors) พบว่าสารตั้งต้นการเกิดผลิตภัณฑ์ที่เติมลงในอาหารหมักจะให้หมู่ข้างเคียง (R-side chain ;R-side group)กับ β-lactam nucleus ที่ถูกสร้างจาก β-lactam microorganisms เพื่อให้เกิดเป็นอนุพันธ์ต่าง ๆ ของเพนนิซิลลินซึ่งจะมีความแตกต่างที่หมู่ข้างเคียงเท่านั้น (1, 2) ถึงแม้ว่าเพนนิซิลลิน จี จะถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรีย พบว่าข้อเสียของเพนนิซิลลิน จี คือ (2,3)

1 เพนนิซิลลิน จี เสื่อมคุณภาพโดยกรด HCl ซึ่งเป็นกรดที่พบในกระเพาะอาหาร ดังนั้นหากให้เพนนิซิลลิน จี โดยการรับประทานจะให้ผลไม่ค่อยดีนัก

2 ฤทธิ์ของเพนนิซิลลิน จี ถูกทำลายโดยเอนไซม์เพนนิซิลลิเนส(penicillinase)

ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถเปลี่ยนโมเลกุลของเพนนิซิลลิน จี ให้เป็น penicilloic acid ซึ่งเป็นสารประกอบที่ไม่เป็นพิษต่อจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์เพนนิซิลลิเนส

3 เพนนิซิลลิน จี ทำให้เกิดอาการแพ้ (hypersensitivity reaction หรือ anaphylactic reaction) ซึ่งจะเกิดขึ้นกับผู้ที่เกิดอาการแพ้เพนนิซิลลิน จี เช่นอาจทำให้เกิดอาการบวมบริเวณรอบดวงตา บวมตามข้อมือ เกิดอาการคันตามผิวหนัง หายใจลั้น จนถึงขั้นอาการช็อค (fatal anaphylactic shock) ได้

จากข้อเสียของเพนนิซิลลิน จี ดังกล่าว จึงได้พยายามค้นหาอนุพันธ์ของเพนนิซิลลินชนิดใหม่ ๆเพื่อแก้ข้อเสียดังกล่าว ซึ่งก็คือเพนนิซิลลิน วี โดยเกิดจากการเติมสารตั้งต้นการเกิดผลิตภัณฑ์ phenoxyacetic acid ลงในอาหารหมัก เพนนิซิลลิน วี ได้ถูกรายงานในปี 1948 แต่ก็ยังไม่ได้ตรวจสอบคุณสมบัติที่สำคัญ จนกระทั่งในปี 1953 ในประเทศออสเตรเลียได้มีการศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ของเพนนิซิลลิน วี พบว่ามีคุณสมบัติดีกว่าเพนนิซิลลิน จี คือความทนต่อกรด HCl ในกระเพาะอาหาร อย่างไรก็ตามพบว่าเพนนิซิลลิน วี สามารถถูกทำลายฤทธิ์โดยจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์เพนนิซิลลิเนส และการรักษาด้วยเพนนิซิลลิน วี ก็ยังถือว่าเป็น narrow spectrum เช่นเดียวกับเพนนิซิลลิน จี (4)

การศึกษาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณเพนนิซิลลิน จี ในประเทศญี่ปุ่นโดยใช้วิธีทางเคมี (iodometric หรือ hydroxylamine chemical assay) เปรียบเทียบกับวิธีทางชีววิทยา (bioassay) ในอาหารหมักของ P. chrysogenum ที่ไม่มีการเติมสารตั้งต้นการเกิดผลิตภัณฑ์ ทำให้พบความขัดแย้งจากการวิเคราะห์ดังกล่าวคือ จากการวิเคราะห์ทางเคมีพบว่ามีปริมาณเพนนิซิลลิน จี สูงกว่าที่ได้จากการวิเคราะห์ทางชีววิทยามาก ๆ และจากการสังเกตการหมักเพนนิซิลลิน จี หลาย ๆ ครั้งในอาหารหมักโดยไม่เติมสารตั้งต้นการเกิดผลิตภัณฑ์จะให้สารประกอบชนิดหนึ่งซึ่งเมื่อวิเคราะห์ทางเคมีบอกได้ว่าคือเพนนิซิลลิน จี แต่เมื่อนำมาวิเคราะห์ทางชีววิทยาพบว่าไม่สามารถทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทดสอบได้หรือได้น้อย จากความรู้ที่ว่าการวิเคราะห์ทางเคมีเกี่ยวข้องกับส่วนของวงแหวนโมเลกุลเพนนิซิลลิน จี จึงคาดว่าสารประกอบดังกล่าวอาจเป็นแกนกลางของโมเลกุลเพนนิซิลลิน จี (β-lactam nucleus) ซึ่งไม่มีหมู่ข้างเคียง จึงทำให้ไม่มีผลต่อการทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทดสอบ (1)

ต่อมาพบว่าสารประกอบดังกล่าวคือ 6-aminopenicillanic acid (6-APA) ซึ่งไวต่อเอนไซม์เพนนิซิลลิเนสเช่นเดียวกับโมเลกุลเพนนิซิลลิน จี พบว่า 6-APA สามารถ

ถูกเปลี่ยนเป็นโมเลกุลเพนนิซิลลิน จี ได้โดยการเติม phenylacetyl chloride (5) 6-APA มีความเสถียรเมื่ออยู่ในอาหารหมักแม้ว่าจะถูกเก็บไว้เป็นเวลานาน จากการค้นพบว่า 6-APA สามารถเปลี่ยนเป็นอนุพันธ์เพนนิซิลลินชนิดต่าง ๆ ได้โดยการเติมหมู่ข้างเคียงด้วยวิธีทางเคมี ทำให้ 6- APA ได้รับความสนใจมากยิ่งขึ้น อย่างไรก็ตามพบว่า 6-APA มีความสามารถละลายน้ำได้สูงและถูกสร้างได้น้อย จึงเป็นการยากในการแยกออกจากอาหารหมักหลังจากได้มีการค้นพบเอนไซม์ penicillin acylase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ถูกสร้างแล้วปล่อยออกนอกเซลล์จากหลายสปีชีย์ของ แบคทีเรีย Nocardia Streptomyces และเชื้อราบางชนิด ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวทำให้เกิดการหลุดของหมู่ข้างเคียงออกจากโมเลกุลของเพนนิซิลลิน จี ทำให้ได้ 6-APA เกิดขึ้น หลังจากนั้นการผลิตเพนนิซิลลินกึ่งสังเคราะห์ (semi-synthetic penicillin)ชนิดต่างๆ จาก 6-APA โดยการเติมหมู่ข้างเคียงด้วยวิธีทางเคมีได้เริ่มทำกันมากขึ้น ปัจจุบันพบว่ามีอนุพันธ์ของเพนนิซิลลินชนิดใหม่ๆ เกิดขึ้นมากกว่า 3,000 ชนิด จึงทำให้เกิดการพัฒนาการรักษาโรคด้วยสารปฏิชีวนะเป็นอย่างมาก ซึ่งในการรักษาต้องการสารปฏิชีวนะที่มีคุณสมบัติที่ดี เช่น มีความทนต่อกรด HCl ในกระเพาะอาหาร ทนต่อเอนไซม์เพนนิซิลลิเนส เป็น broad spectrum เป็นต้น (1,4) เพนนิซิลลินกึ่งสังเคราะห์ที่สังเคราะห์ได้ใหม่ บางตัวที่มีคุณสมบัติดีก็จะถูกเลือกนำมาใช้ในการรักษาโรคในมนุษย์ ซึ่งแต่ละตัวอาจมีลักษณะเด่นที่จะถูกนำมาพิจารณาใช้ในการรักษาที่แตกต่างกัน โดยจะต้องพิจารณาว่าผู้ป่วยติดเชื้อเนื่องจากจุลินทรีย์ชนิดใด ในบางกรณีอาจใช้สารปฏิชีวนะมากกว่าหนึ่งชนิดในการรักษาซึ่งขึ้นกับความเห็นชอบของแพทย์ สารปฏิชีวนะกึ่งสังเคราะห์สามารถแบ่งได้ตามลักษณะเด่นที่ถูกนำมาใช้ในการรักษาผู้ป่วยเนื่องจากการติดเชื้อจากจุลินทรีย์ที่ต่างชนิดกัน แบ่งเป็นกลุ่ม ๆ ได้ดังนี้คือ (4)

1 Acid-resistant Penicillin

- phenoxypenicillins
- azidocillin

2 Penicillinase-Resistant Penicillin

- methicillin
- isoxazolyl penicillin
- cloxacillin
- oxacillin
- dicloxacillin
- nafcillin
- flucloxacillin
(floxacillin)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3 Broad Spectrum Penicillin

- ampicillin
- esters of ampicillin
- pivampicillin
- talampicillin
- bacampicillin
- hetacillin
- epicillin
- amoxycillin
- cyclacillin

4 Antiseudomonal Penicillins

- carbenicillin
- carindacillin
- carfecillin
- ticarcillin
- ureidopenicillins
- azlocillin
- mezlocillin
- piperacillin

5 Amidino Penicillins

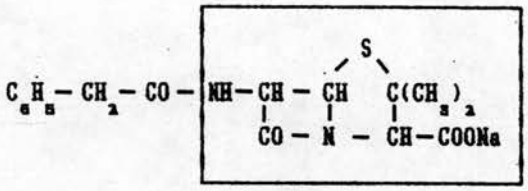
- mecillinam

6 Inhibitors of β-Lactamase

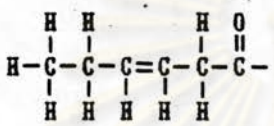
- clavulanic acid

จะพบว่ากลุ่มเพนนิซิลลินทั้งหมดที่กล่าวมาไม่ว่าจะเกิดจากการหมักในอาหารหมักที่มีการเติมสารตั้งต้นการเกิดผลิตภัณฑ์ หรือเกิดโดยวิธีกึ่งสังเคราะห์ก็ตาม พบว่ามีโครงสร้างพื้นฐานที่เหมือนกันคือ β-lactam nucleus และส่วนที่ทำให้เพนนิซิลลินมีความแตกต่างกันคือหมู่ข้างเคียง (R-side group) (2) **ดังแสดงในรูปที่ 1**

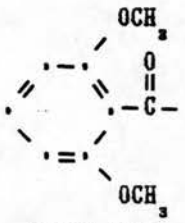
เพนนิซิลลิน จี (เบนซิลเพนนิซิลลิน) จัดเป็นสารปฏิชีวนะที่สำคัญ กล่าวคือถูกนำมาใช้ในทางการแพทย์ หรือถูกใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเพนนิซิลลินกึ่งสังเคราะห์ตัวอื่นที่มีประโยชน์ต่อมนุษย์ ความต้องการเพนนิซิลลิน จี เมื่อเปรียบเทียบกับยาชนิดอื่น ๆ นับว่าสูง ดังเช่นในปี ค.ศ. 1975 มีการผลิตเพนนิซิลลินจากโรงงานต่าง ๆ ทั่วโลกปริมาณทั้งสิ้น 35,000 ตัน 80 % ของยาที่ผลิตได้เป็นยาเพนนิซิลลินชนิดเพนนิซิลลิน จี โดย 50 % ของเพนนิซิลลิน จี ที่ผลิตขึ้นถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคด้านการแพทย์และ 43 % ถูกนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเพนนิซิลลินกึ่งสังเคราะห์ตัวอื่น ๆ (6 , 7) เพนนิซิลลิน จี มีชื่อ proprietary names ว่า penbenemid, solupen, crystapen (UK),crystapen G



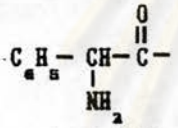
Sodium penicillin G



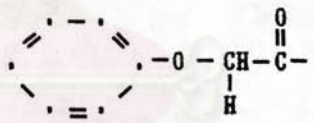
Penicillin F



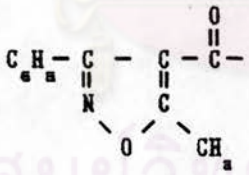
Methicillin



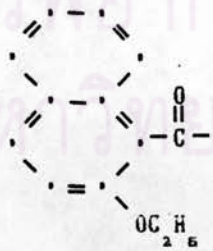
Ampicillin



Penicillin V



Oxacillin



Nafcillin

รูปที่ 1 : โครงสร้างส่วน β-lactam nucleus (ในกรอบสี่เหลี่ยม) และส่วนที่ทำให้เพนนิซิลลินมีความแตกต่างกันคือหมู่ข้างเคียง (R-side group)

ที่มา : Alcamo, 1983 (2)

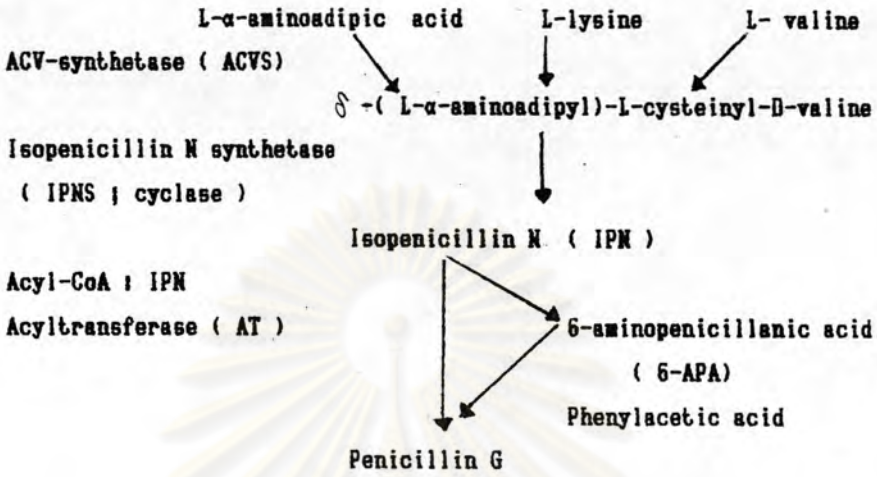
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(UK), pfizerpen G (USA), QIDpen G (USA), specilline G (Fr), nece-pen (Fr), pharmacillin (Ger) เป็นต้น เพนนิซิลลิน จี ยังคงใช้เป็นสารปฏิชีวนะ (antibiotic หรือ chemotherapeutic agent) ที่ดีตัวหนึ่ง เนื่องจากมีความเป็นพิษน้อย เมื่อเทียบกับกลุ่มของ chemotherapeutic agents ด้วยกัน เพนนิซิลลิน จี จัดว่าเป็น bactericidal และ narrow spectrum คือสามารถทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้บางชนิด (นอกจากมีผลต่อแบคทีเรียแล้ว พบว่ายังมีผลต่อ Actinomycetes sp. และ spirochaetes ได้อีกด้วย) โดยมากแล้วเพนนิซิลลิน จี มีผลต่อแบคทีเรียแกรมบวก จุลินทรีย์ที่สามารถต่อต้านผลการรักษาด้วย เพนนิซิลลิน จี จัดเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่ผลิตเอนไซม์เพนนิซิลลิเนส และกลุ่มที่ทนต่อการทำลายของเพนนิซิลลิน (4,8)

กรดเพนนิซิลลินไม่มีความเสถียร พบว่าในน้ำหมักจะถูกเปลี่ยนเป็นเพนนิซิลลินโซเดียม หรือเพนนิซิลลินโปตัสเซียมเพื่อให้เกิดความเสถียรมากยิ่งขึ้น เพนนิซิลลินจะมีความเสถียรในสภาวะที่เป็นของแข็งและจะสลายตัวอย่างช้าๆ เมื่ออยู่ในรูปสารละลาย และปฏิกิริยาการสลายตัวจะเร็วยิ่งขึ้นหากได้รับความร้อน (4)

3 เพนนิซิลลินและการสังเคราะห์

Veenstra และคณะ 1989 (9) กล่าวถึงวิถีของการสังเคราะห์เพนนิซิลลินและสารปฏิชีวนะพวก β-lactam อื่นๆ ว่าได้รับการศึกษาจนรู้วิถีการสังเคราะห์ที่ค่อนข้างแน่ชัดแล้วเมื่อไม่กี่ปีที่ผ่านมา ตลอดจนทราบเอนไซม์ที่สำคัญๆ ในแต่ละขั้นตอนของการสังเคราะห์เพนนิซิลลิน จี ดังแสดงในรูปที่ 2 มีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องที่สำคัญเช่นเอนไซม์ aminoadipyl cysteinylvaline (ACV) synthetase กระตุ้นให้เกิดการรวมตัวของกรดอะมิโน 3 ชนิด คือ L-α-aminoadipic acid L-lysine และ L-valine ให้เกิดเป็น tripeptide [LLD-δ-(α-aminoadipyl) cysteinylvaline หรือ LLD-ACV] จาก tripeptide เกิด cyclized โดยการนำไฮโดรเจน 4 อะตอมออกจาก LLD-ACV เกิดเป็น β-lactam thiazolidine ring ของ isopenicillin N (IPN) (10) โดยเอนไซม์ isopenicillin N synthetase (cyclase) ซึ่งเอนไซม์นี้ได้รับการศึกษากิจกรรมเมื่อแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์จาก C. acremonium (11,12) isopenicillin N เป็นสารตั้งต้นร่วมในวิถีของการสังเคราะห์ cephalosporins cephamycins และ เพนนิซิลลิน จี หรือ วี ในการเกิดเพนนิซิลลิน จี หรือ วี พบว่า isopenicillin N ถูกกระตุ้น



รูปที่ 2 : วิถีการสังเคราะห์เพนนิซิลลิน จี **ที่มา** : Veenstra และคณะ 1986 (9)

ปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ acyltransferase (AT) โดยในปฏิกิริยาที่เกิดพบว่า α-aminoadipyl ถูกนำออกจากโมเลกุลของ isopenicillin N และเกิดการแทนที่ของกรดฟีนิลอะซิติกเกิดเป็นเพนนิซิลลิน จี หรือแทนที่ด้วย phenoxyacetic acid เกิดเป็นเพนนิซิลลิน วี ในปัจจุบันยังไม่ทราบแน่ชัดว่า isopenicillin N เปลี่ยนเป็นเพนนิซิลลิน จี หรือ วี นั้น เกิดจากปฏิกิริยาแลกเปลี่ยนหมู่ข้างเคียงโดยมี acyl-coenzyme A:IPN AT เป็นตัวกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาโดยตรง หรือโดยการผ่าน intermediate (6-amino-penicillanic acid;6-APA) ก่อนที่จะแลกเปลี่ยนหมู่ข้างเคียงเพื่อเกิดเป็นเพนนิซิลลิน จี หรือ วี (9, 13 ,14)

4 ปัจจัยที่มีผลต่อการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะ

4.1 อาหาร

4.1.1 แหล่งคาร์บอน (carbon sources)

ปกติกลูโคสจัดว่าเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีเลิศสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ แต่ในขณะเดียวกันก็ขัดขวางการสร้างสารปฏิชีวนะ ดังนั้นในการผลิตสารปฏิชีวนะเช่น เพนนิซิลลิน จี โดย P. chrysogenum ในอาหารหมัก

จะใช้แหล่งคาร์บอน 2 ชนิด ชนิดแรกใช้เพื่อการเจริญเติบโตของ P. chrysogenum ซึ่งจะใช้ในปริมาณที่พอเหมาะแก่การเจริญเติบโตเท่านั้น โดยไม่ให้มีเหลือพอที่จะไปขัดขวางการสร้างสารปฏิชีวนะได้ (suppress) เมื่อการเจริญเติบโตมากที่สุดและปริมาณคาร์บอนชนิดแรกลดลงเนื่องจากถูกใช้ไปในการเจริญเติบโต เอนไซม์ที่สามารถ catabotite แหล่งคาร์บอนชนิดที่ 2 ก็สามารถทำงานได้ (derepress) ปรากฏการณ์ดังกล่าวจะทำให้ P. chrysogenum สร้างสารปฏิชีวนะได้ในปริมาณมาก (15) ในการผลิตเพนนิซิลลิน จี ในระดับอุตสาหกรรมนั้นแหล่งของคาร์บอนชนิดที่ 2 ที่ถูกใช้คือ แลคโตสเพราะจะเกิดเมตาโบไลต์อย่างช้าๆ และในการแก้ปัญหา carbon catabolite regulation โดยกลูโคสซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนชนิดแรกนั้นจะทำโดยการค่อย ๆ ป้อนกลูโคสอย่างช้า ๆ เข้าไปในอาหารหมัก (16) นอกจากกลูโคสจะมีผลต่อการยับยั้งการสร้างเพนนิซิลลินแล้ว พบว่า ซูโครส ฟรุคโตส หรือ กาแลคโตส ก็ให้ผลเช่นเดียวกับกลูโคส โพลีแซคคาไรด์เช่น แป้งและเดคตริน พบว่าก็มีผลเช่นเดียวกันแต่ผลของการยับยั้งจะน้อยกว่าเนื่องจากจะค่อย ๆ ถูก hydrolysis ไปเป็น กลูโคส อย่างช้า ๆ นั่นเอง (15)

4.1.2 แหล่งฟอสเฟต (phosphate source)

พบว่าปริมาณฟอสเฟตในอาหารหมักที่มีมากเกินไปจะไปกระตุ้นให้กลูโคสไปมีผลต่อการยับยั้งการสร้างเพนนิซิลลินมากขึ้น เนื่องจากจะทำให้เกิด phosphate-active transport system และ/หรือ catabolism ของกลูโคสขึ้น (15)

4.1.3 แหล่งไนโตรเจน (nitrogen source)

การสร้างเพนนิซิลลินโดย P. chrysogenum จะถูกยับยั้งโดยปริมาณ NH_4^+ ที่มีมากเกินพอ (17) และยังไม่ทราบว่า NH_4^+ มีกลไกอย่างไรต่อการยับยั้งการสังเคราะห์เพนนิซิลลิน (15)

4.2 อุณหภูมิ

พบว่าอุณหภูมิระหว่าง 20° และ 29° เซลเซียสในระหว่างการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวช่วงต้นๆ ไม่มีผลต่อปริมาณเพนนิซิลลินที่ถูกสร้างขึ้น อย่างไรก็ตามที่อุณหภูมิ 32° เซลเซียส ผลผลิตของสารปฏิชีวนะลดลงอย่างรวดเร็วในขณะที่เกิดกระบวนการ oxida-tive metabolic processes (18) มีการทดลองเกี่ยวกับผลของอุณหภูมิโดยการตั้งอุณหภูมิที่เหมาะสมแก่การเจริญเติบโตของเชื้อและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสร้างเพนนิซิลลินที่

อุณหภูมิ 30 และ 25°เซลเซียส ตามลำดับ โดยผู้ทำการทดลองไม่ได้แยก 2 ระยะของการทดลองออกจากกัน (19) ต่อมาได้มีการแยก 2 ระยะของการทดลองออกจากกัน และแสดงให้เห็นว่าอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อจะสูงสุดประมาณ 30° เซลเซียส ในขณะที่การสร้างเพนนิซิลลินจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วมากที่สุดที่อุณหภูมิ 20° เซลเซียส การหมักโดยการลดอุณหภูมิจาก 30°เซลเซียสไปเป็น 20° เซลเซียสหลังชั่วโมงที่ 40 ของการเลี้ยงเชื้อจะสามารถให้ปริมาณเพนนิซิลลินได้สูงขึ้น (20)

4.3 ผลของความเป็นกรด-ด่าง

การศึกษาผลของ pH ต่อการเจริญเติบโตและการสร้างเพนนิซิลลินของ P. notatum 1249-B21 พบว่า pH ที่เหมาะสมที่สุดต่อการเจริญเติบโตและการสร้างเพนนิซิลลินอยู่ในช่วง 5.0 - 7.5 ถ้า pH น้อย หรือ สูงกว่าในช่วงดังกล่าวปริมาณเพนนิซิลลินที่สร้างได้จะน้อยลง (21) พบว่าที่ pH ประมาณ 7.5 ปริมาณเพนนิซิลลินที่ถูกสร้างขึ้นจะสูงสุด (22) และ pH ประมาณ 5.5 อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อจะสูงสุด (22)

4.4 สารตั้งต้นการเกิดผลิตภัณฑ์ (precursor)

4.4.1 precursors ของ side chain

มีรายงานว่า phenylacetic acid เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลาย (degradation product) ของ benzylpenicillin และสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างเพนนิซิลลินได้ (23) ได้มีการใช้ phenyl acetate และอนุพันธ์ พบว่าสามารถกระตุ้นให้สร้างเพนนิซิลลิน และยังชักนำให้สร้างเพนนิซิลลิน จี ดังนั้นจึงแสดงให้เห็นว่าปัจจัยจำกัดในการสร้างเพนนิซิลลินชนิดต่าง ๆ ขึ้นกับชนิดของหมู่ข้างเคียงที่ได้จากสารตั้งต้นการเกิดผลิตภัณฑ์ ซึ่งสารตั้งต้นการเกิดผลิตภัณฑ์ที่ต่างกันที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถควบคุมการสร้างเพนนิซิลลินชนิดต่าง ๆ ได้ (24) ตัวอย่างผลของสารตั้งต้นการเกิดผลิตภัณฑ์เช่นกรดฟีนิลอะซิติกทำให้เกิด phenylacetyl side chain ของเพนนิซิลลิน จี (25 - 27) เป็นต้น

4.4.2 precursor of the β-lactam-thiazolidine ring nucleus

การสร้าง double-ring nucleus เกิดขึ้นในโมเลกุลของเพนนิซิลลินทุกชนิด การเกิด double-ring nucleus เกิดจากการเข้ารวมของสารตั้งต้น

การเกิดผลิตภัณฑ์ไปเป็นส่วนหนึ่งของโมเลกุลเพนนิซิลลินดังต่อไปนี้

4.4.2.1 การเข้ารวม (incoporation) ของ L-cysteine

การศึกษาโดยใช้ D-(β-^{14}C)cysteine เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นผลให้ได้ labeled mycelium และlabeled CO_2 ที่ได้จากการหายใจ แสดงให้เห็นว่า D-isomer สามารถผ่านเข้าสู่ไมซีเลียมได้ และจากการเติม L-(β-^{14}C) cysteine พบว่าเป็นสารตั้งต้นการเกิดผลิตภัณฑ์ในการเกิดเพนนิซิลลินที่ดีกว่า D-isomer (28) เมื่อเติม L-(β-^{14}C, ^{15}N, ^{35}S) cysteine ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้เกิดการสร้างเพนนิซิลลินซึ่งถูก labeled ลักษณะการเกิดเพนนิซิลลินเหมือนกับการเข้ารวมกันของกรดอะมิโนในการเกิดโปรตีน พบว่าสัดส่วนของ ^{14}C, ^{15}N และ ^{35}S isotopes ในเพนนิซิลลินจะสัมพันธ์กับสัดส่วนของ ^{14}C, ^{15}N และ ^{35}S isotopes ที่อยู่ในโมเลกุลของ L-(β-^{14}C, ^{15}N , ^{35}S)cysteine ที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (29) Stevens และคณะ (30) แสดงให้เห็นว่า ^{35}S-L-cysteine ถูกนำไปใช้ทันทีหลังจากเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อหลังชั่วโมงที่ 60 เพื่อเข้ารวมเป็นส่วนหนึ่งของโมเลกุลเพนนิซิลลิน และจะถูกนำไปใช้มากขึ้นเพื่อเกิดเป็นเพนนิซิลลินเมื่อชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อเพิ่มมากขึ้น

4.4.2.2 การเข้ารวม (incoporation) ของ L-valine

ได้มีการใช้ DL-(δ,-^{14}C) valine เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อกระตุ้นให้เกิดการสร้างเพนนิซิลลินได้สำเร็จ และจากการตรวจสอบโดยวิธีกัมมันตรังสี แสดงให้เห็นว่าส่วนหนึ่งของโมเลกุลเพนนิซิลลินมาจากการเข้ารวมของ valine โดยมีคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 หมู่คาร์บอคซิล และ หมู่เมธิลมาจาก valine (28)เมื่อเติม carboxy-labeled DL-valine ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะเป็นผลทำให้เกิดการสร้างเพนนิซิลลินซึ่งพบ ^{14}C ในหมู่คาร์บอคซิลที่เกาะกับคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ที่มาจาก valine และกลายมาเป็นส่วนหนึ่งของโมเลกุลเพนนิซิลลินในที่สุด(31)

5 เพนนิซิลลินและผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

เพนนิซิลลินจะมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย เนื่องจากไปยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย โดยโมเลกุลของเพนนิซิลลินจะเข้าไปขัดขวางการเกิด cross-link ของน้ำตาล hexose กับ peptidoglycan layer ระหว่างการสังเคราะห์ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ซึ่งจะทำให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียไม่มีความแข็งแรง เมื่อเกิดแรงดันที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ก็จะทำให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแตกได้ (2)

<u>การคัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์เพื่อใช้ในระดับอุตสาหกรรม</u>

การนำจุลินทรีย์มาใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมนับว่ามีประโยชน์อย่างมากในปัจจุบันและยิ่งทวีความสำคัญมากขึ้นในอนาคต เนื่องจากพลังงานและอาหารจะลดลงอย่างรวดเร็วจากการเพิ่มขึ้นของประชากร ทำให้มีการนำทรัพยากรธรรมชาติมาใช้มากยิ่งขึ้น ดังนั้นการนำจุลินทรีย์มาใช้ผลิตพลังงานเช่น เอทธานอล (ethanol) ผลิตอาหาร เช่นโปรตีนเซลล์เดี่ยว (single cell protein) ผลิตยาเช่นเพนนิซิลลิน (penicillin) ฯลฯ. จะมีความสำคัญเพิ่มมากขึ้นในอนาคต การนำจุลินทรีย์มาใช้ในทางอุตสาหกรรมเริ่มแรกนั้นจุลินทรีย์ได้จากการคัดแยกจากแหล่งธรรมชาติ แต่จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้โดยทั่วไปมีความสามารถสร้างผลิตภัณฑ์ที่ต้องการได้ในปริมาณต่ำ ดังนั้นจึงต้องทำการคัดแยกจุลินทรีย์อยู่ตลอดเวลาเพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่สามารถสร้างผลิตภัณฑ์ที่ต้องการมากที่สุด เมื่อคัดแยกสายพันธุ์จุลินทรีย์จากธรรมชาติได้แล้วในการเพิ่มผลผลิตให้มากขึ้นอาจทำโดยการหาสภาวะที่เหมาะสมของอาหารและสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการมากที่สุด แต่การเพิ่มผลผลิตของจุลินทรีย์มีขอบเขตจำกัดโดยความสามารถในการสร้างผลิตภัณฑ์สูงสุดของจุลินทรีย์ชนิดนั้นเอง ซึ่งความสามารถจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับการควบคุมโดยจีโนม (genome) เพราะฉะนั้นในการทำให้จุลินทรีย์ชนิดนั้นสร้างผลิตภัณฑ์ได้มากขึ้นกว่าเดิม จีโนมของจุลินทรีย์ต้องเกิดการเปลี่ยนแปลง (32) การเปลี่ยนแปลงจีโนมของจุลินทรีย์โดยการเกิดกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ (spontaneous หรือ natural mutation) มีโอกาสเกิดขึ้นได้น้อย คือใน $10^{6}-10^{10}$ เซลล์ที่เกิดขึ้นใหม่ จะมีเพียง 1 เซลล์เท่านั้นที่เกิดการกลายพันธุ์ซึ่งโอกาสที่จะทำการคัดเลือกพบนั้นเป็นไปได้ยาก ดังนั้นการปรับปรุงสายพันธุ์จึงทำโดยวิธีการชักนำให้กลายพันธุ์ ซึ่งอัตราการกลายพันธุ์ที่เกิดโดยวิธีชักนำจะสูงกว่าการเกิดตามธรรมชาติหลายเท่า คือประมาณ 10 -

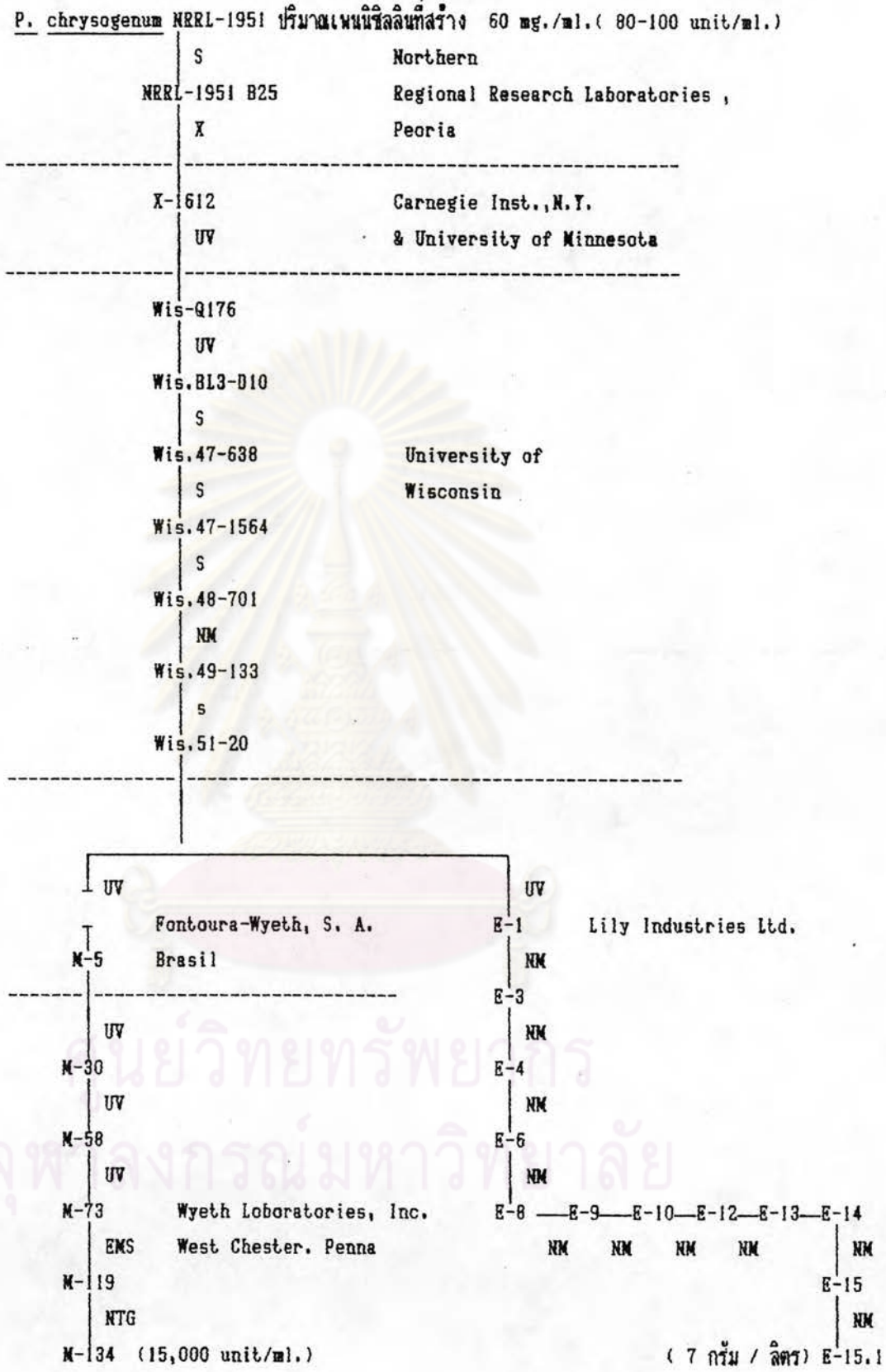
1,000 เท่าหรือมากกว่านั้น ซึ่งจะทำให้มีโอกาสพบเชื้อที่มีคุณสมบัติที่ดีเพิ่มมากขึ้น การพัฒนาใช้สิ่งก่อการกลายพันธุ์ (mutagen) มาชักนำให้กลายพันธุ์ในจุลินทรีย์จะทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในจุลินทรีย์เหล่านั้นได้ง่ายขึ้น ผลิตภัณฑ์ที่สร้างจากจุลินทรีย์ที่ถูกชักนำให้กลายพันธุ์อาจได้เท่า น้อย หรือ มากกว่าสายพันธุ์เดิม แต่ก็มีโอกาสคัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่สามารถสร้างผลผลิตสูงได้ (33) เช่นจากการศึกษาการสร้างคลอเตตราซัยคลิน (chlortetracycline) ใน mutants ของ Streptomyces viridifaciens ที่เกิดจากกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ และจากการชักนำให้กลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต พบว่า mutants ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติส่วนใหญ่จะสร้างสารปฏิชีวนะใกล้เคียงกับสายพันธุ์เดิม mutants ที่เกิดจากการชักนำให้กลายพันธุ์ส่วนใหญ่จะสร้างสารปฏิชีวนะได้น้อยลง แต่ก็มีบางส่วนที่สร้างสารปฏิชีวนะมากกว่าสายพันธุ์เดิม 2 เท่าหรือมากกว่า (34)

สิ่งก่อการกลายพันธุ์ที่ใช้ในการชักนำให้กลายพันธุ์มี 2 กลุ่มคือกลุ่มแสงหรือรังสีต่าง ๆ (physical mutagen) ที่นิยมได้แก่แสงอุลตราไวโอเลต (ultraviolet light ,UV) และ กลุ่มสารเคมี (chemical mutagen) ที่นิยมได้แก่ เอ็น-เมธิล-เอ็น-ไนโตร-เอ็น-ไนโตรโซกัวนิดีน (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine ; NTG or MNNG) (13 , 32 ,33) การทำกลายพันธุ์โดยใช้สิ่งก่อการกลายพันธุ์ถูกใช้อย่างแพร่หลายในการทำให้เกิดความแปรผันของดี เอ็น เอ ของจุลินทรีย์ เพราะอาจทำให้จุลินทรีย์มีความสามารถสร้างผลิตภัณฑ์ที่ต้องการสูงกว่าเดิมได้ การปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์บางชนิดที่ใช้ในอุตสาหกรรมยังคงใช้กระบวนการทำให้กลายพันธุ์และคัดเลือกสายพันธุ์ เหตุผลหลักสำคัญที่ยังคงใช้การทำกลายพันธุ์และคัดเลือกสายพันธุ์เพราะว่าไม่สามารถใช้การผสมพันธุ์โดยอาศัยเพศหรือยังไม่สามารถนำระบบการโคลน (cloning)ยีนของจุลินทรีย์ที่สนใจมาใช้ได้ ดังนั้นการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ต้องการอาจจะประสบผลสำเร็จได้โดยการชักนำให้กลายพันธุ์ ณ. ตำแหน่งหนึ่งหรือหลาย ๆ ตำแหน่งบนดี เอ็น เอ ในขณะที่ความต้องการทำกลายพันธุ์หลายๆ ตำแหน่งที่จำเพาะบนดี เอ็น เอ ของจุลินทรีย์ที่ต้องการปรับปรุงสายพันธุ์ (ตัวอย่างเช่นการปรับปรุงสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่สร้าง secondary metabolites)อาจทำได้โดยการทำกลายพันธุ์และคัดเลือกสายพันธุ์อย่างสุ่มหลายๆ รอบโดยห้องปฏิบัติการหนึ่งหรือหลายๆ ห้องปฏิบัติการร่วมกัน โดยสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่แยกได้หลังจากหนึ่งรอบของการทำกลายพันธุ์ถูกแยกเก็บไว้ก่อนที่จะถูกนำมาใช้เป็นจุดเริ่มต้นสำหรับการทำกลายพันธุ์ในรอบต่อ ๆ ไป ในบางกรณีที่ใช้สิ่งก่อการกลายพันธุ์ชนิดหนึ่งในการทำกลายพันธุ์หลาย ๆ รอบติดต่อกัน แล้วพบว่ามีแนวโน้มทำให้ได้

สายพันธุ์กลายพันธุ์ที่คัดเลือกได้สร้างผลิตภัณฑ์ลดลง สิ่งก่อการกลายพันธุ์ชนิดอื่น ๆ ควรถูกนำมาใช้แทนสิ่งก่อการกลายพันธุ์ดังกล่าวในการทำกลายพันธุ์รอบต่อไป (35)

ความสนใจในการปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อให้สร้างเพนนิซิลลินสูงขึ้นกว่าเดิมเพื่อนำมาใช้ในเชิงการค้าหรืออุตสาหกรรม เริ่มหลังจาก Fleming พบสายพันธุ์ที่สามารถสร้างเพนนิซิลลินได้ คือ P. notatum ในปี 1929 ซึ่งสามารถให้เพนนิซิลลินปริมาณต่ำคือประมาณ 2 - 20 ยูนิต/มิลลิลิตร (36) หลังจากทำการคัดเลือกสายพันธุ์ก็สามารถได้สายพันธุ์ที่สร้างเพนนิซิลลินสูงขึ้นกว่าเดิมคือเป็น 40-80 ยูนิต/มิลลิลิตรโดยสายพันธุ์ P. notatum NRRL 832 (36) แต่พบว่ายังสร้างเพนนิซิลลินปริมาณน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับ P. chrysogenum NRRL 1951 ซึ่งแยกได้จากผลไม้ที่ขึ้นราสามารถสร้างเพนนิซิลลินปริมาณสูงคือ 80 -100 ยูนิต/มิลลิลิตร (1, 35, 36) และเมื่อสายพันธุ์ NRRL 1951 ผ่านโปรแกรมการทำกลายพันธุ์อย่างต่อเนื่องหลาย ๆ รอบ (stepwise mutation) โดยห้องปฏิบัติการต่าง ๆ ทั้งของมหาวิทยาลัยหรือของโรงงานอุตสาหกรรม **ดังแสดงในรูปที่** 3 (35,37) เพื่อจะคัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์ของ P. chrysogenum ที่สามารถสร้างเพนนิซิลลินสูงกว่าสายพันธุ์เดิมโดยสายพันธุ์ NRRL 1951 หลังทำกลายพันธุ์โดย รังสีเอ็กซ์ หรือ แสงอุลตราไวโอเลตและผ่านการคัดเลือกจนได้สายพันธุ์ P. chrysogenum Q 176 ซึ่งสร้างเพนนิซิลลินสูงขึ้นเป็น 800-1,000 ยูนิต/มิลลิลิตร (35,36,38) สายพันธุ์ NRRL 1951 และ Q 176 เป็นสายพันธุ์ที่ให้ chrysogenin pigment ซึ่งเป็น pigment ที่มีสีเหลืองและสามารถละลายได้ในน้ำ ซึ่งจะทำให้ได้เพนนิซิลลินที่มีสีขาวปนเหลือง แต่เมื่อทำกลายพันธุ์กับ Q 176 และคัดเลือกสายพันธุ์ต่อไปทำให้ได้สายพันธุ์ที่ไม่สร้าง pigmentและสามารถสร้างเพนนิซิลลินที่สูงขึ้นกว่าเดิมได้ (1) ซึ่งในปัจจุบันได้สายพันธุ์กลายพันธุ์ของ P. chrysogenum (commercial strain) ที่สามารถสร้างเพนนิซิลลิน จี ปริมาณสูง และเมื่อได้มีการหาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างและพัฒนากระบวนการผลิตจนทำให้การผลิตเพนนิซิลลิน จี ในอุตสาหกรรมปัจจุบันได้สูงถึง 50,000-85,000 ยูนิต/มิลลิลิตร หรือมากกว่า (6,39) ตัวอย่างวิวัฒนาการปรับปรุงและคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อราที่สร้างเพนนิซิลลิน **ดังแสดงในตารางที่** 1 (6,32,36, 37,39,40)

การเปลี่ยนแปลงจีโนมจุลินทรีย์เพื่อให้มีความสามารถสร้างผลิตภัณฑ์ที่ต้องการสูงขึ้นกว่าเดิม นอกจากทำได้โดยการทำให้กลายพันธุ์แล้วยังสามารถทำได้โดยกลไกการเกิด recombination ซึ่งทำได้โดยชักนำให้เกิด parasexual recombination โดยนำสาย



รูปที่ 3 : การปรับปรุงสายพันธุ์โดยการทำกลายพันธุ์อย่างต่อเนื่อง

ที่มา : Saunders,1987 (35) และ Tien, 1981 (37)

DATE	STRAIN IDENTIFICATIOIN AND ORIGIN	YIELD (UNIT/ML.)	COMMENT
1929	P. notatum (Fleming)	2 - 20	wild type isolate
1941	P. notatum NRRL 832	40- 80	wild type isolate
1943	P. chrysogenum NRRL 1951	80 - 100	wild type isolate
	P. chrysogenum NRRL 1951 B 25	100 -200	(NRRL = Northern Regional Research Laboratories , Peoria)
1944	P. chrysogenum X 1612(Minnesota)	300- 500	-
1945	P. chrysogenum Q 176 (Wisconsin)	800-1,000	-
1947	P. chrysogenum BL 3 D10 (Wisconsin)	800-1,000	lack the yellow pigment chrysogenin
1949	P. chrysogenum 49-113 (Wisconsin)	1,500-2,000	poor growth
1951	P. chrysogenum 51-20 (Wisconsin)	2,400	very poor growth
1955	P. chrysogenum Commercial strain (In USSR)	8,000	-
1972	P. chrysogenum Commercial strain (In France)	12,000-15,000	-
-	P. chrysogenum M-119, M-134 (Wyeth lab,Inc. West Chester, Penna.)	15,000 or more	-
Current	P. chrysogenum Commercial strain	50,000 - 85,000	improved process and optimal condition

ตารางที่ 1 : ความก้าวหน้าในการเพิ่มผลผลิตของเพนนิซิลลินโดยการทำกลายพันธุ์และคัดเลือกสายพันธุ์

ที่มา : Riviere ,1977 (36) , Stanbury , 1984 (32) Tien, 1981 (37) และ Demain , 1973 (40)

พันธุ์ของ P. chrysogenum 2 สายพันธุ์ที่มีจีโนมต่างกันมาเจริญร่วมกัน สายใยของ 2 สายพันธุ์จะสามารถเชื่อมกันได้ในหลาย ๆ จุด ทำให้ได้สายพันธุ์ที่เป็น heterokaryons (สายใยที่ประกอบด้วยชนิดของ nucleus ที่แตกต่างกันมากกว่า 1) ในช่วงนี้ 2 นิวเคลียสที่ต่างกันเมื่ออยู่ในตำแหน่งใกล้กันภายในสายใย สามารถรวมกันและเกิดเป็น heterozygous diploid nucleus ซึ่งถ้าเกิด mitotic crossing over (recombination) และ vegetative haploidization (segregation) ก็จะได้ recombinants ซึ่งเป็นสายพันธุ์ใหม่เกิดขึ้นได้ (1, 32, 41, 42) ตัวอย่างการปรับปรุงสายพันธุ์โดยทำการเปลี่ยนแปลงจีโนมของจุลินทรีย์ด้วยการทำให้เกิด parasexual recombination เช่นใน A. niger ซึ่งสร้างกรดซิตริก (43) , P. chrysogenum ซึ่งสร้างเพนนิซิลลิน(42,44), Fusarium sp. ที่ทำให้เกิดโรคในมนุษย์ (45) เป็นต้น

การเปลี่ยนแปลงจีโนมจุลินทรีย์อีกวิธีหนึ่งทำได้โดยการหลอมโปรโตพลาสท์ (protoplast fusion) เช่น การหลอมโปรโตพลาสท์ระหว่างสายพันธุ์ของ P. chrysogenum โปรโตพลาสท์ทำโดยการใช้เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ของเส้นใย (mycelium) ในการเตรียมโปรโตพลาสท์และการรวมโปรโตพลาสท์ต้องทำในสภาวะที่เหมาะสม (46) ซึ่งผลการรวมกันของโปรโตพลาสท์จะทำให้ได้สายใยที่เป็น heterokaryons ได้ ซึ่งจะเป็นผลทำให้เกิด recombinants และทำให้เกิดสายพันธุ์ใหม่ได้ (32 ,47) มีการทดลองรวมโปรโตพลาสท์ระหว่าง P. caseicolum ที่ต่างสายพันธุ์กัน (ต่างออกโซโทรป) เพื่อปรับปรุงการผลิต anti- mucor (48) นอกจากการรวมโปรโตพลาสท์ระหว่างชนิด (species)เดียวกันแล้ว ยังมีการทดลองรวมโปรโตพลาสท์ต่างชนิด เช่น การรวมโปรโตพลาสท์ระหว่าง P. roquefortii กับ P. chrysogenum พบว่าสามารถทำให้เกิด heterokaryons และ ลูกผสม (hybrid) ชนิดต่าง ๆ (49) การรวมโปรโตพลาสท์ระหว่าง P. caseicolum กับ P. roqueforti , P. album กับ P. roqueforti, P. caseicolum กับ P. caseicolum (ต่างออกโซโทรป)พบว่าสามารถเกิดเป็น heterokaryons และลูกผสมชนิดต่าง ๆ ได้ (47)

แต่ถึงอย่างไรก็ตามการชักนำให้เกิด heterokaryons แล้วเกิดเป็น recombinant นั้น พบว่ามักไม่ค่อยนิยมใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์ เพราะส่วนใหญ่ของ recombinant ที่พบมักสร้างผลผลิตเท่าหรือน้อยกว่าสายพันธุ์เดิม แต่อาจนำวิธีดังกล่าวมาใช้เป็นส่วนประกอบหรือใช้ร่วมในแผนการปรับปรุงสายพันธุ์ที่ใช้วิธีหลักคือ การทำกลายพันธุ์และคัดเลือกสายพันธุ์ได้

(41, 50, 51)

การเปลี่ยนแปลงจีโนมจุลินทรีย์อีกวิธีหนึ่งอาจทำได้โดยการใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม (genetic engeneering หรือ recombinant DNA) สำหรับการเปลี่ยนแปลงยีนของราในการสร้างสารปฏิชีวนะโดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเป็นเทคนิคใหม่ที่ปัจจุบันได้รับความสนใจ โดยเป็นการทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกับยีนของราได้จำเพาะมากกว่าเทคนิคการชักนำให้กลายพันธุ์ แต่ปัญหาการใช้เทคนิคด้านพันธุวิศวกรรมในการปรับปรุงสายพันธุ์ราเพื่อให้สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยังมีอยู่มากมาย เนื่องจากขาดความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับการสังเคราะห์โมเลกุลสารปฏิชีวนะ และกลไกการควบคุมระดับโมเลกุลเกี่ยวกับกระบวนการเมตาโบลิซึม (metabolism)เพื่อเกิดการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะขึ้น (15 , 52) แม้ว่าการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะพวก β-lactam (เช่น penicillin G , cephalosporins , cephamycins , carbapenems , mono-bactams เป็นต้น) เอนไซม์บางตัวที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารปฏิชีวนะดังกล่าวจะได้มีการศึกษาจนรู้คุณสมบัติและได้ตั้งชื่อของเอนไซม์นั้นขึ้นก็ตาม แต่โดยส่วนรวมแล้ววิถีของการสังเคราะห์และกลไกควบคุมก็ยังต้องได้รับการศึกษาเพิ่มเติม (53)

ความสนใจที่หันมาปรับปรุงสายพันธุ์ของ P. chrysogenum โดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเริ่มจากได้มีการแยกยีนที่ให้การแสดงออกของเอนไซม์ INPS (isopenicillin N synthetase)จากจุลินทรีย์ต่างๆ ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะพวก β-lactam ring ได้ ปัจจุบันได้มีการศึกษาจนรู้ลำดับนิวคลิโอไทด์ของ INPS ยีนที่แยกได้จาก A. chrysogenum (54) Streptomyces clavuligerus (55) , A. nidulans (56) และ P. chrysogenum (57) สำหรับใน A. chrysogenum , P. chrysogenum และ A. nidulans ได้มีการโคลนยีน (cloning) ยีน INPS และทำให้แสดงออกใน E. coli ได้สำเร็จ (54, 56, 57) แต่อย่างไรก็ตามการโคลน INPS ยีนได้ก็ไม่ถือว่ามีประโยชน์ในการสร้างสารปฏิชีวนะเพราะ E. coli ไม่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้เอง เว้นแต่จะต้องโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะทั้งหมดลงใน E. coli และทำให้มีการแสดงออก (expressed)ได้ นั่นคือ E. coli จึงจะสามารถสร้างสารปฏิชีวนะที่ต้องการได้ (53) ดังนั้นทางที่เป็นไปได้ในการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์เพื่อให้สร้างเพนนิซิลลิน จี สูงขึ้นกว่าเดิม คือต้องโคลน IPNS ยีนจาก P. chrysogenum เข้าสู่ P. chrysogenum อีกสายพันธุ์หนึ่งเพื่อทำให้มีการเพิ่มปริมาณการสร้างเอนไซม์ IPNS

มากขึ้น ซึ่งอาจจะทำให้สามารถสร้างเพนนิซิลลิน จี ได้มากกว่าเดิมได้ (9)

นอกจากนี้ยังมีการแยกเอนไซม์ AT (acyltransferase) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างเพนนิซิลลิน จี จาก P. chrysogenum แต่ยังต้องมีการศึกษาหาลำดับของนิวคลีโอไทด์ต่อไปในอนาคต จากการโคลนยีน AT และทำให้มีการแสดงออกในสายพันธุ์กลายพันธุ์ของ P. chrysogenum Wis 54-1255 (ซึ่งไม่สามารถสร้างเพนนิซิลลิน จี) โดย (9) พบว่า transformant ที่ได้สามารถสร้างเพนนิซิลลิน จี ได้ และ transformant บางตัวมีจำนวนชุด (copy number) ของ AT ยีนสูงกว่าสายพันธุ์เดิม แต่ถึงอย่างไรก็ตามแม้ว่า transformant ที่ได้แม้มีจำนวนชุดของ AT ยีนสูงก็ตามแต่ปริมาณเพนนิซิลลิน จี ที่สร้างได้ก็ยังน้อยกว่าสายพันธุ์เดิม ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการแสดงออกของยีนมีประสิทธิภาพต่ำ ผู้ทำการทดลองนี้ได้ชี้ให้เห็นว่าการทำ transformation ดังกล่าวอาจเป็นแนวทางในการเพิ่มระดับกิจกรรม (activity level) ของการสังเคราะห์ selected emzymes ที่สำคัญซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เพนนิซิลลิน จี ได้ โดยต้องอาศัยความรู้ที่ว่าตำแหน่งของยีนบนโครโมโซมที่ต่างกัน (different chromosome loci) จะมีผลต่อการแสดงออก (expression) ของยีนที่ต่างกันควบคู่ไปด้วย ดังนั้นจุดที่จะสอดแทรกยีนที่โคลนได้เข้าไปในโครโมโซมเพื่อให้ได้การแสดงออกมีประสิทธิภาพสูงจึงมีผลต่อการได้สายพันธุ์ใหม่ที่ให้ระดับของเอนไซม์ที่สำคัญในการสร้างเพนนิซิลลิน จี สูงกว่าสายพันธุ์เดิมได้ ซึ่งอาจเป็นผลทำให้การสร้างเพนนิซิลลิน จี สูงขึ้นกว่าเดิมนั่นเอง

จะเห็นว่าในการปรับปรุงสายพันธุ์ P. chrysogenum เพื่อให้มีความสามารถในการสร้างเพนนิซิลลินสูงขึ้นกว่าเดิมนั้น การใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมยังไม่สามารถนำมาใช้ได้อย่างจริงจังซึ่งจะต้องมีการศึกษาอีกมากต่อไปในอนาคต

เมื่อทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สร้างผลผลิตที่ต้องการได้ในปริมาณสูงเป็นที่พอใจแล้ว จะต้องทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงและสร้างผลิตภัณฑ์ที่ต้องการสูงสุด ก่อนที่จะถูกนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมจริงๆ ซึ่งต้องศึกษาถึงปัจจัยต่างๆ เช่นอัตราการให้อากาศ (aeration) อัตราการกวน (agitation) pH อุณหภูมิ สารตั้งต้นการเกิดผลิตภัณฑ์ (precursor) และสารอาหารต่าง ๆ เป็นต้น เมื่อทำการศึกษาจนทราบสภาวะที่เหมาะสมแล้ว จุลินทรีย์อาจถูกนำมาใช้ได้เลยหรือถ้าสร้างผลผลิตไม่เป็นที่พอใจอาจทำการปรับปรุงสายพันธุ์ต่อไปอีก เช่นอาจชักนำให้กลายพันธุ์หรือใช้วิธีต่างๆ ดังที่กล่าวมาและคัดเลือกสายพันธุ์ที่สร้างผลผลิตมากขึ้น ซึ่งต้องหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงและสร้างผลิตภัณฑ์ที่

ต้องการสูงสุดสำหรับเชื้อที่ถูกคัดเลือกไว้อีกครั้ง (58)

การกลายพันธุ์ (mutation)

จากความหมายของการกลายพันธุ์และแบ่งการกลายพันธุ์ออกเป็นชนิดต่างๆ (59 , 60) การกลายพันธุ์หมายถึงการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับหน่วยควบคุมพันธุกรรมซึ่งก็คือยีนหรือโมเลกุลของดี เอ็น เอภายในเซลล์นั่นเอง การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นอาจเกี่ยวข้องกับโมเลกุลขนาดใหญ่ (macromolecules) หรือโมเลกุลขนาดเล็ก (micromolecules) สามารถแบ่งการกลายพันธุ์ได้เป็น 2 ชนิด

1 การกลายพันธุ์ในระดับยีน (gene mutation หรือ point mutation) เป็นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับ ดี เอ็น เอ ที่มีขนาดเล็กครอบคลุมเพียง 1-3 นิวคลีโอไทด์ แบ่งเป็น 2 ชนิดคือ

1.1 เบส - แพร์ ซับสติติวชัน (base-pair substitution)

การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นในธรรมชาติ (spontaneous mutation) ประมาณ 20 % เกิดเนื่องจากเบส - แพร์ ซับสติติวชัน อีก 80 % ที่เหลือเกิดเนื่องจากการกลายพันธุ์แบบเฟรมชิฟ (frameshift mutation) เบส-แพร์ ซับสติติวชัน แบ่งเป็น 2 ชนิดคือ

1.1.1 ทรานซิชัน (transition)

เป็นการแทนที่ของเบสเพียวรีนหนึ่งด้วยเบสเพียวรีนอีกตัวหนึ่ง หรือการเข้าแทนที่ของเบสไพริมิดีนหนึ่งด้วยเบสไพริมิดีนอีกตัวหนึ่ง ได้แก่ AT <---> GC หรือ CG<--->TA

1.1.2 ทรานสเวอร์ชัน (transversion)

เป็นการเข้าแทนที่ของเบสเพียวรีน ด้วยเบส ไพริมิดีน หรือ เบส ไพริมิดีน ด้วยเบส เพียวรีน ได้แก่ AT<--->CG , CG <---> GC, GC <---> TA, AT <---> TA

1.2 framsift mutation

เป็นการเปลี่ยนแปลงในรหัสของ ดี เอ็น เอ อาจเกิดขึ้นได้เนื่องจากการหลุดหายไปหรือเพิ่มขึ้นมาของ base-pair คู่หนึ่งหรือหลาย ๆ คู่ การกลายพันธุ์เนื่อง

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากการเกิด เบส-แพร์ ชับสติติวชัน สามารถทำให้เกิดรูปแบบต่าง ๆ ของการกลายพันธุ์คือ samesense nonsense และ missense mutation

2 การกลายพันธุ์ระดับโครโมโซม (chromosomal mutation) มี 2 แบบคือ

2.1 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครโมโซม เป็นการเปลี่ยนแปลงจำนวนของยีน หรือตำแหน่งของยีนบนโครโมโซม ได้แก่

2.1.1 **ดีลีชัน** (deletion) การหลุดหายไปของชิ้นส่วนของโครโมโซม ถ้ามีขนาดเล็กครอบคลุมยีนเพียงยีนเดียว หรือ 2 - 3 ยีนเรียกว่า small deletion การเกิดดีลีชันจะทำให้สิ่งมีชีวิตนั้นเป็นอันตรายถึงตายได้หากเกิดขึ้นบนโครโมโซมในสภาวะ hemizygous ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายีนทุกยีนมีความจำเป็นต่อการพัฒนาของสิ่งมีชีวิต

2.1.2 **ดูพลิเคชัน** (duplication) การที่ชิ้นส่วนของโครโมโซมแทรกเข้ามาทำให้จำนวนของยีนมีมากกว่า 1 ชุด การเกิดดูพลิเคชันจะต้องมีการแตกหักของโครโมโซมอย่างน้อย 2 ครั้ง เพื่อให้ชิ้นส่วนของโครโมโซมหลุดออกมา และจะต้องมีการแตกหักเกิดขึ้นบนโครโมโซมที่เป็น homozygous อีก 1 ครั้ง เพื่อชิ้นส่วนจากโครโมโซมแรกสามารถเข้ามาแทรกอยู่ในโครโมโซมที่เป็น homozygous ได้ การแทรกเข้ามาอาจจะเข้ามาแทรกตามลำดับของยีนบนโครโมโซมหรืออาจกลับทิศทาง ทำให้ลำดับของยีนเปลี่ยนไปได้

2.1.3 **อินเวอร์ชัน** (inversion)เป็นการหักกลับ หรือต่อแบบกลับทิศทางของชิ้นส่วนของโครโมโซม เกิดจากการที่โครโมโซมเกิดหักตรงส่วนหนึ่งส่วนใดแล้วส่วนของโครโมโซมที่ขาดออกเกิดการหมุนกลับ 180 องศา แล้วกลับไปสอดแทรกในโครโมโซมเดิมแต่กลับทิศทาง

2.1.4 **ทรานสโลเคชัน** (translocation)

เมื่อมีการฉีกขาดของโครโมโซม หรือเกิดการแตกหักขึ้นในต่างโครโมโซมกัน ส่วนที่หักออกมาของโครโมโซมหนึ่งอาจจะกลับไปเชื่อมติดกับปลายที่หักของอีกโครโมโซมหนึ่ง การเชื่อมติดกันของโครโมโซมอาจเป็นแบบ asymmetric ซึ่งจะทำให้เซลล์นั้นไม่สามารถจะมีชีวิตได้ตามปกติและจะถูกขจัดออกไปในที่สุดหรือถ้าเกิดกับเซลล์สืบพันธุ์ทำให้เกิด dominant lethal การเชื่อมติดกันที่เรียกว่า symmetric จะทำให้เกิดโครโมโซมใหม่ เรียกการเกิดแบบนี้ว่า reciprocal translocation

2.2 การเปลี่ยนแปลงจำนวน โครโมโซม

2.2.1 เซนตริก ฟิวชัน (centric fusion)

การที่โครโมโซมซึ่งมิได้เป็นคู่กัน 2 โครโมโซม (non-homologous) มาเชื่อมต่อกันโดยส่วนที่เป็นเซนโตรเมีย(centromere) หลุดหายไป

2.2.2 เซนตริก ฟิสชัน (centric fission) เกิดจากการที่โครโมโซมหนึ่งแยกตัวเองออกเป็น 2 โครโมโซม โดยสร้างเซนโตรเมียใหม่ขึ้น

2.2.3 อะนิวพลอยดี (aneuploidy)การมีโครโมโซมเพิ่มขึ้นหรือลดลงจากปกติ เช่น ปกติมีโครโมโซมเป็น 2n ในพวกอะนิวพลอยดีอาจจะมีโครโมโซมเป็น 2n-1 , 2n+1 , 2n-2 , 2n+2 เป็นต้น

2.2.4 โพลีพลอยดี (polyploidy) หมายถึงการมีจำนวนโครโมโซมมากกว่า 2 ชุด โดยปกติสิ่งมีชีวิตที่เป็นดิพพลอยด์ (diploid)จะมีโครโมโซมเป็น 2n แต่ถ้าเป็นพวกโพลีพลอย (polyploid) จะมี โครโมโซม เป็น 3n เป็นต้น

<u>สิ่งก่อการกลายพันธุ์</u>

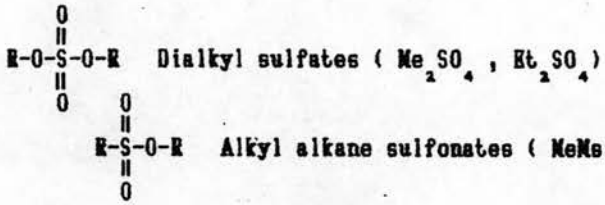
สิ่งก่อการกลายพันธุ์สามารถชักนำให้กลายพันธุ์ได้ในจุลินทรีย์เพราะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในสายของ ดี เอ็น เอ (deoxyribonucleic acid ;DNA)ซึ่งจะทำให้การแสดงออกของ ดี เอ็น เอ ผิดไปจากเดิมได้ (61,62) อาจแบ่งสิ่งก่อการกลายพันธุ์ที่ใช้ชักนำให้กลายพันธุ์ในจุลินทรีย์เป็น 3 กลุ่ม (59, 62, 63, 64) คือ

1 radiation (physical) mutagen ตัวอย่างเช่น รังสีอุลตราไวโอเลต (UV) ซึ่งจัดเป็นรังสีประเภทนอน-ไอออนไนซิ่ง (non-ionizing) รังสีเอกซ์ (X-ray) ซึ่งจัดเป็นรังสีประเภทไอออนไนซิ่ง (ionizing) เป็นต้น

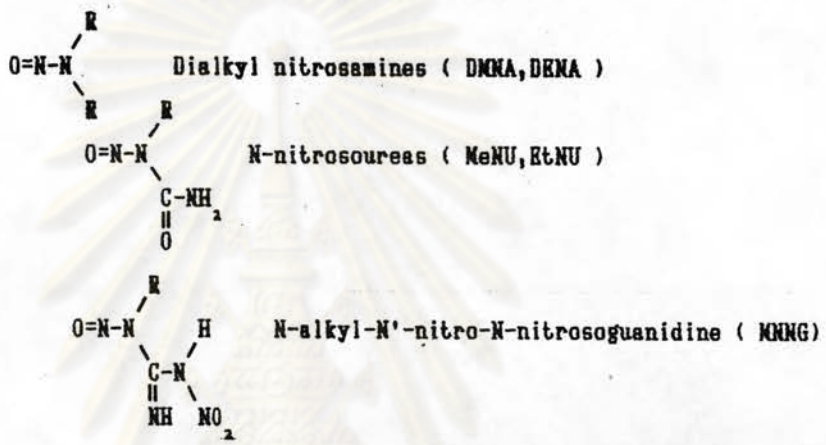
2 chemical mutagen แบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยได้ 7 กลุ่มตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นกับ ดี เอ็น เอ คือ

2.1 alkylation เป็นกลุ่มของสารเคมีที่สามารถให้หมู่อัลคิล (alkyl group)แก่โมเลกุล ดี เอ็น เอ ได้ในปฏิกิริยา อัลคิลเลชั่น (alkylation) สารเคมีกลุ่มนี้จัดเป็นสารที่ใช้ชักนำให้กลายพันธุ์กลุ่มใหญ่สุดเมื่อเทียบกับสารเคมีกลุ่มอื่น สามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยคือ ดังแสดงในรูปที่ 4

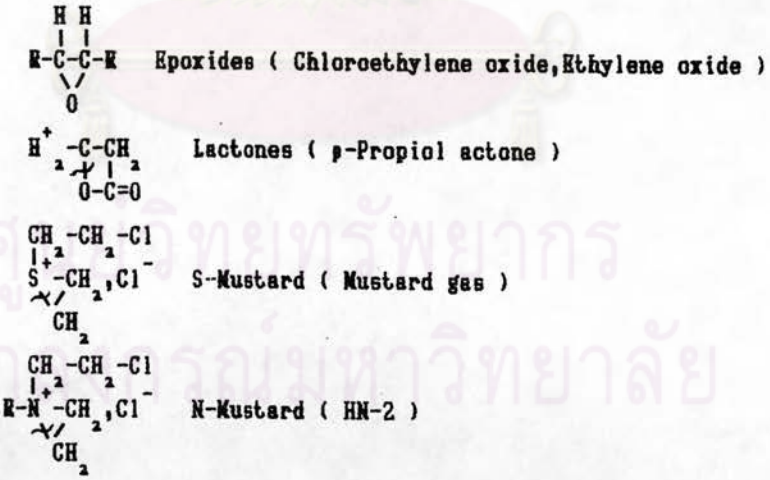
Alkyl sulfates



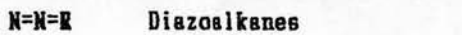
N-nitroso compounds



Cyclic compounds



Other compounds



รูปที่ 4 : สูตรโมเลกุลสารก่อการกลายพันธุ์เคมีในกลุ่มอัลคิเลชัน (Alkylation)

ที่มา : Singer , 1981 (62)

alkyl sulfates เช่น

- dialkyl sulfates (Me_2SO_4 , Et_2SO_4)
- alkyl alkane sulfonates (MeMs,EtES)

N-nitroso compounds เช่น

- dialkyl nitrosamines (DMNA,DENA)
- N-nitrosoureas (MeNU , EtNU)
- N-alkyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)

cyclic compounds เช่น

- epoxides (chloroethylene oxide, ethylene oxide)
- lactones (β-propiol actone)
- S-mustard (mustard gas)
- N-mustard (HN-2)

other copounds เช่น

- diazoalkanes

2.2 **arylation** เป็นกลุ่มสารเคมีที่ทำปฏิกิริยาโดยตรงกับดี เอ็น เอ โดยเกิดพันธะโควาเลนท์ (covalent bonding) ระหว่าง หมู่รีแอกทีพ ฟังชันนอล (reactive functional group) กับโมเลกุลของ ดี เอ็น เอ ตัวอย่างของสารเคมีในกลุ่มนี้เช่น 2-อะเซติลเอมีน ฟลูออรีน (2-acetylamine fluorene ; AAF) อัลฟาทอคซิน บี 1 (alflatoxin B_1) เป็นต้น

2.3 **intercalation** เป็นกลุ่มสารเคมีที่แทรกตัวเข้าไปยัง ดี เอ็น เอ ฮีลิกซ์ (DNA helix) และรวมตัวกับ ดี เอ็น เอ ซึ่งทำให้โครงสร้างของ ดี เอ็น เอ ผิดไปจากเดิมได้เนื่องจากการขยายตัวและคลายเกลียวของสายน้ำตาลฟอสเฟตซึ่งเป็นแกนของ ดี เอ็น เอ สารเคมีในกลุ่มนี้เช่น แอคติโนมัยซิน ดี (actinomycin D) โปรฟลาวิน (proflavin) เป็นต้น

2.4 **base analogue incorporation** เป็นกลุ่มสารเคมีที่ขัดขวางการจำลองตัว (duplication) ของ ดี เอ็น เอ ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นเบสแอนาลอคของเบสใน ดี เอ็น เอ ปกติ ซึ่งการที่มีเบสแอนาลอคอยู่ใน ดี เอ็น เอ จะทำให้เกิดการจับคู่ที่ผิดปกติ

ของเบสใน ดี เอ็น เอ ได้ สารเคมีในกลุ่มนี้เช่น 5-โบรโมยูราซิล (5-bromouracil; 5 -BU ซึ่งเป็นเบสแอนาลอคของไทมีน) 2-อะมิโนเพียวรีน (2-aminopurine ;2- AP ซึ่งเป็นเบสแอนาลอคของอะดีนีนหรือกัวนีน) เป็นต้น

2.5 **deamination** เป็นกลุ่มสารเคมีที่มีความสามารถเปลี่ยนโครงสร้างเบสโดยการเคลื่อนย้ายหมู่อะมิโน (amino group) ออกไปจากเบสกัวนีน เบสอะดีนีน และเบสไซโตซีน ตัวอย่างของสารเคมีในกลุ่มนี้เช่น กรดไนตรัส (nitrous acid ;HNO_2) ไฮดรอกซีลามีน (hydroxylamine ; NH_2OH) เป็นต้น

2.6 **metaphase poision** เป็นกลุ่มสารเคมีที่มีคุณสมบัติเลียนแบบโคลซิซีน (colchicine) อาจเรียกชื่อของสารในกลุ่มนี้ว่า C-mitotic agent ซึ่งสารเคมีกลุ่มนี้จะทำปฏิกิริยาขัดขวางการเกิดสปินเดิล ไฟเบอร์ (spindle fiber) โดยจะมีผลต่อการแยกตัวของโครโมโซมในระยะของการแบ่งเซลล์ได้ สารเคมีในกลุ่มนี้เช่น ไฮโดรคิวโนน (hydroquinone) โคลซีมิด (colcemid) เป็นต้น

2.7 **enzyme inhibition** เป็นกลุ่มสารเคมีที่ขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ (enzyme) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เบสเพียวรีนและเบสไพริมิดีน หรืออาจขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการซ่อมแซม ดี เอ็น เอ สารเคมีในกลุ่ม นี้เช่น คาเฟอีน (caffeine) ไฮดรอกซียูเรีย (hydroxyurea) เป็นต้น

3 **biological mutagen** ได้แก่ transposon และ phage Mu ซึ่งทั้ง 2 ชนิดสามารถทำให้กลายพันธุ์ได้โดยการแทรกของชิ้น ดี เอ็น เอ เข้าไปอย่างสุ่มในยีนต่าง ๆ ของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมได้

อุลตราไวโอเลต (UV) เป็นรังสีประเภทนอน-ไอออนไนซิ่ง (non-ionizing) เนื่องจากมีพลังงานระดับต่ำจึงไม่สามารถทำให้เกิดขบวนการไอออนไนเซชั่น (ionization) ได้ แสงอุลตราไวโอเลตทำให้เกิดการตายและกลายพันธุ์ในสิ่งมีชีวิตได้ จึงใช้เป็นสิ่งก่อการกลายพันธุ์ในการชักนำให้กลายพันธุ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งมักจะถูกเลือกใช้เป็นสิ่งก่อการกลายพันธุ์อันดับแรกในแผนการปรับปรุงสายพันธุ์ พบว่าภายในเซลล์สิ่งมีชีวิตโมเลกุลอินทรีย์ที่มีความสามารถดูดกลืนพลังงานได้ดีคือ วงแหวนอินทรีย์ (organic ring) ของเบสไพริมิดีน (pyrimidine) พบว่าแสงอุลตราไวโอเลตที่มีความยาวคลื่นประมาณ 2540 - 2560 ^{o}A

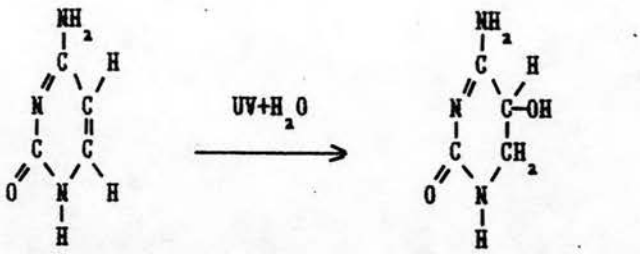
(254-256 นาโนเมตร) เป็นความยาวคลื่นที่ ดี เอ็น เอ สามารถดูดกลืนพลังงานจากแสงอุลตราไวโอเลตได้ดีกว่าโมเลกุลอินทรีย์อื่น ๆ ภายในเซลล์และนับว่าเป็นความยาวคลื่นที่ทำให้เกิดอัตราการกลายพันธุ์สูงในแบคทีเรีย ในการฉายแสงอุลตราไวโอเลตกับสารละลายของดี เอ็น เอ ในน้ำ พบว่าเบสไพริมิดีน (ไทมีน และ ไซโตซีน) เป็นส่วนสำคัญในการดูดกลืนพลังงานจากแสงอุลตราไวโอเลตและก่อให้เกิดปฏิกิริยาเคมีที่สำคัญดังต่อไปนี้ (59,60,65)

1 hydrolysis of cytosine โดยโมเลกุลของน้ำจะแทรกเข้าไปในตำแหน่ง C^4 และ C^5 ของพันธะ -C=C- (bond) **ดังแสดงในรูปที่ 5** ซึ่งจะเกิดขึ้นกับสายของดี เอ็น เอ ที่ได้มีการแยกออกจากคู่แล้วเท่านั้น (complementary strand)

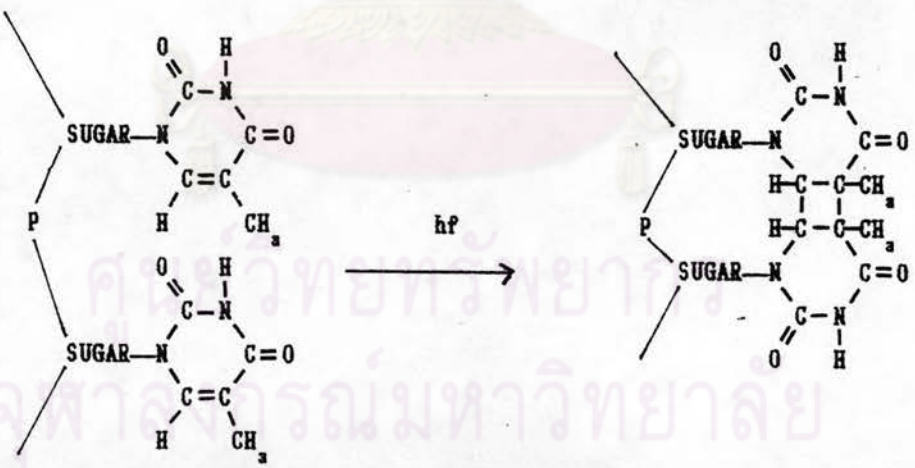
2 pyrimidine dimer ดี เอ็น เอเมื่อได้รับแสงอุลตราไวโอเลต เบสไพริมิดีนจะไวต่อแสงอุลตราไวโอเลตมากเป็น 10 เท่าของเบสเพียวรีน (purine)ภายใน ดี เอ็น เอ ที่เป็นสายคู่ การจับคู่กันของเบสอาจเกิดขึ้นระหว่างโมเลกุลของเบสไพริมิดีนบนสายเดียวกันหรือต่างสายก็ได้ โดยอาจเกิดระหว่าง C กับ T C กับ C T กับ T แต่ที่พบบ่อยที่สุดคือการเกิดการจับคู่เบสระหว่าง T กับ T บนสายเดียวกัน **ดังแสดงในรูปที่ 6** การเกิดไดเมอร์โดยการจับคู่เบสระหว่างไทมีนบนสายเดียวกันของ ดี เอ็น เอ อาจทำให้เกิดการบิดตัว (distorted)ของ ดี เอ็น เอ ฮีลิกซ์ (DNA helix) ซึ่งจะทำให้เกิดไดเมอร์โดยการจับคู่เบสระหว่างไทมีนซึ่งอยู่คนละสายของ ดี เอ็น เอ ได้ เหตุการณ์ที่เกิดขึ้นเหล่านี้จะทำให้ ดี เอ็น เอ ไม่สามารถแยกตัวออกจากกัน การเกิดไทมีนไดเมอร์เป็นสาเหตุหลักสำคัญ ที่ทำให้เกิดการตายในเซลล์หรือสปอร์ของจุลินทรีย์เนื่องจากการฉายแสงอุลตราไวโอเลต

3 อื่น ๆ เช่นอาจทำให้เกิด cross link ระหว่างสาย ดี เอ็น เอ ระหว่าง ดี เอ็น เอ กับโปรตีน และอาจเกิดการแตกหักของสาย ดี เอ็น เอได้ ซึ่งในข้อ 3 นี้จะพบไม่ค่อยบ่อยนัก

พบว่าแสงอุลตราไวโอเลตทำให้เกิดการกลายพันธุ์ชนิดเบส-แพร์ ซับสติติวชัน (base-pair substitution)ซึ่งที่พบคือแบบ ทรานซิชั่น (transition) จาก GC ไปเป็น AT เป็นส่วนใหญ่ จาก AT ไปเป็น GC เกิดน้อย แบบทรานสเวอร์ชัน (transversion) ซึ่งพบไม่ค่อยบ่อยนัก นอกจากนี้ยังอาจพบการกลายพันธุ์ชนิด เพรมชิพ อีกด้วย (59, 60)



รูปที่ 5 : การเกิด cytosine hydrate เนื่องจากการฉาย UV กับสารแขวนลอย ดี เอ็น เอ ในน้ำ **ที่มา** : Orgel, 1965 (61)

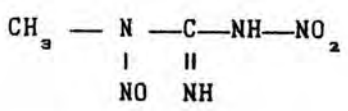


รูปที่ 6 : การเกิด Thymine dimer ภายในสายของ ดี เอ็น เอ

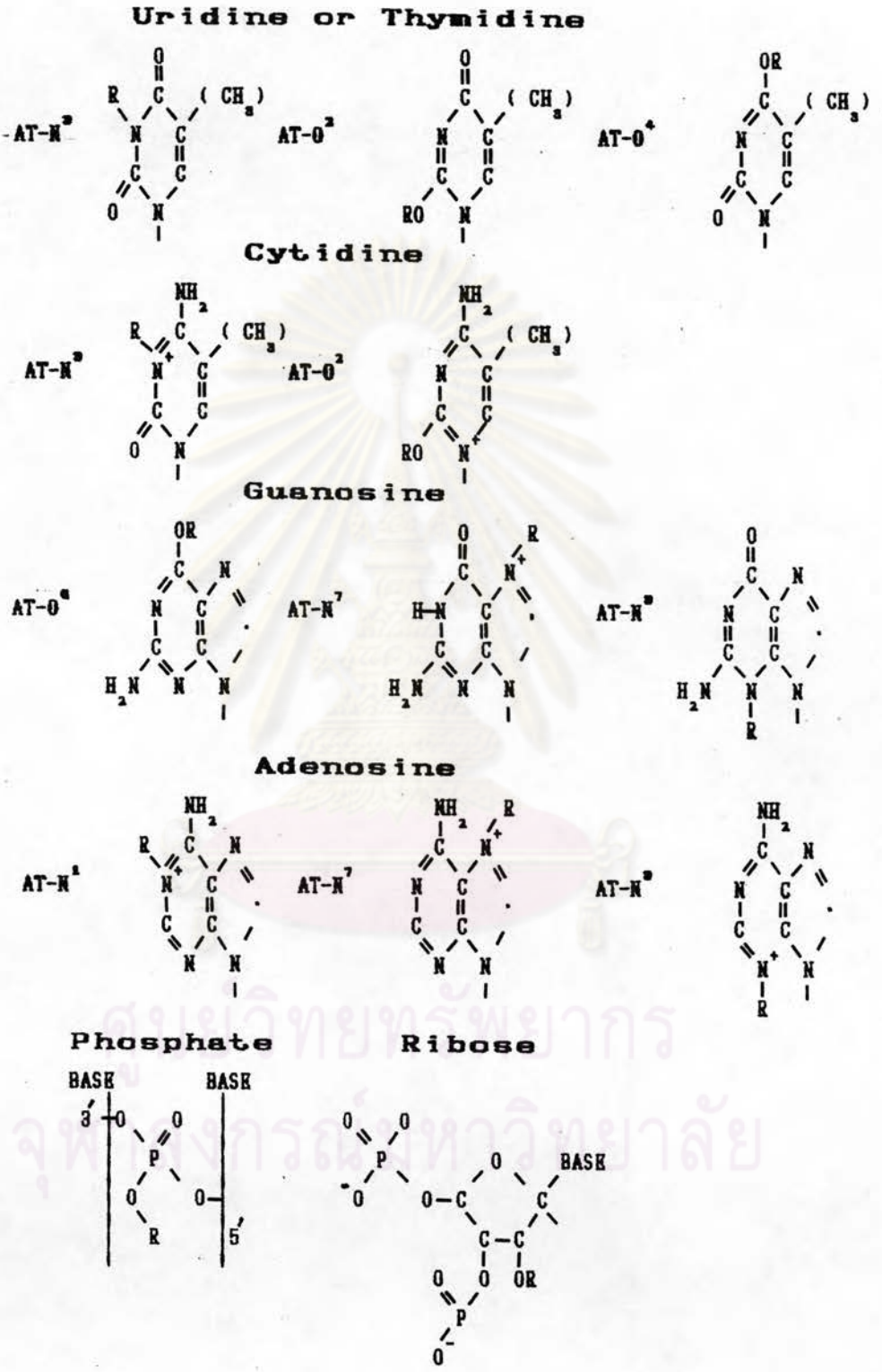
ที่มา : Glass ,1983 (60)

การเลือกใช้สภาวะที่เหมาะสมในการฉายแสงอุลตราไวโอเลต ควรเลือกใช้สภาวะที่ทำให้เซลล์หรือสปอร์มีเปอร์เซนต์รอดตายต่ำ ซึ่งขึ้นกับผู้ทำการทดลองว่าจะเลือกใช้ในช่วงใด อาจเลือก 30-70 % ที่รอดตาย หรือ 0.1-10 % ที่รอดตาย ซึ่งส่วนใหญ่มักเลือกใช้ช่วงหลังเพราะทำให้ได้โคโลนีไม่มากเกินไปในการคัดเลือก การใช้ความหนาแน่นของเซลล์หรือสปอร์เริ่มต้นในการฉายแสงอุลตราไวโอเลตนั้นส่วนใหญ่มักเลือกใช้ประมาณ 10^{7} เซลล์หรือสปอร์/มิลลิลิตร การควบคุมการฉายแสงอุลตราไวโอเลตทำโดยการเปิด-ปิดฝาจานเลี้ยงเชื้อ (petri dish)ไม่ใช่การเปิด-ปิดที่หลอดฉายแสงอุลตราไวโอเลต ในการฉายแสงที่ใช้ความยาวคลื่นแสง ช่วงเวลาที่ใช้ในการฉายแสง ระยะห่างของหลอดฉายแสงกับพื้นผิวของเซลล์หรือสปอร์แขวนลอยและช่วงเวลาของการเจริญของเชื้อ (growth phase) ที่เปลี่ยนไปในแต่ละครั้งของการทดลอง จะมีผลทำให้เปอร์เซนต์รอดตายมีความแตกต่างกันในแต่ละครั้งด้วย จำนวนโคโลนีรอดตายเมื่อถูกนำมากระจาย (spread plate) บนอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อในจานเลี้ยงเชื้อ จานเลี้ยงเชื้อควรจะถูกนำไปบ่มที่อุณหภูมิเหมาะสมแก่การเพาะเลี้ยงของจุลินทรีย์ชนิดนั้น ๆ และต้องเป็นที่ไม่มีแสงสว่างเพื่อหลีกเลี่ยงการเกิด photoreactivation (33, 66)

NTG (MNNG) = N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine ถูกใช้อย่างแพร่หลายในห้องปฏิบัติการเพื่อใช้เป็นสิ่งก่อการกลายพันธุ์ (mutagen)ในสิ่งมีชีวิตอย่างกว้างขวางตั้งแต่ prokaryotes cell ถึงสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงจีโนมของสิ่งมีชีวิตได้ NTG เป็นสารก่อมะเร็ง(carcinogen) ความเป็นอันตรายอยู่ในสภาพผงผลึกแห้ง ดังนั้นควรใช้ด้วยความระมัดระวัง หลีกเลี่ยงจากการสัมผัส การสูดดมหรือระวังอย่าให้เข้าสู่ระบบทางเดินอาหาร ควรระวังอย่าให้ถูกความร้อน และ/หรือนำห่วง platinum ตัก NTG เพราะจะทำให้ระเบิดพุ่งกระจายในอากาศได้ (60,67) NTG เป็นของแข็งที่มีมวลโมเลกุล 147.1 (1ไมโครโมลาร์ = 0.1471 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ; 1 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร =6.798 ไมโครโมลาร์) จุดหลอมเหลว (melting point ; mp.)= 188° เซลเซียส จุดเดือด (boiling point; bp.) =123.5° เซลเซียส และมีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็น



NTG เป็นสารประกอบที่ไวต่อแสงสว่าง (light- sensitive) เมื่อถูกแสงจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีส้ม-เขียว สามารถละลายได้ในตัวทำละลายมีขั้ว (polar solvents) มีความสามารถละลายน้ำได้น้อย (ละลายได้น้อยกว่า 0.5 %) มี half-life เมื่อละลายในน้ำที่อุณหภูมิห้องประมาณ 200 ชั่วโมง แต่จะเหลือ 90 นาทีในสารละลายเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37° เซลเซียส (68) NTG เป็นอัลคิลเลติง เอเจนท์ (alkylating agent) ซึ่งเป็นกลุ่มของสารเคมีที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ที่ใหญ่ที่สุด คุณสมบัติประจำกลุ่มคือความสามารถให้ หมู่อัลคิล (alkyl group) แก่โมเลกุลของดี เอ็น เอ ได้ในปฏิกิริยาอัลคิลเลชั่น (alkylation) ทำให้ หมู่อัลคิลเข้าไปในตำแหน่งต่างๆ ของเบสในดี เอ็น เอ และกลายเป็นอัลคิลเลเทด เบส (alkylated base) เช่นเข้าไปในตำแหน่ง N^7 N^3 และ O^6 ของเบสกัวนีน (guanine) เข้าไปในตำแหน่ง N^7 N^3 และ N^1 ของเบสอะดีนีน (adenine) เข้าไปในตำแหน่ง N^3 O^2 และ O^4 ของเบสยูราซิล (uracil) หรือเบสไทมีน (thimine) เข้าไปในตำแหน่ง N^3 และ O^2 ของเบสไซโตซีน (cytosine) เป็นต้น นอกจากนี้หมู่อัลคิลยังเข้าไปในตำแหน่ง phospodiester bond และ ribose ได้อีกด้วย ดังแสดงในรูปที่ 7 แต่พบว่าผลผลิตส่วนใหญ่ที่ได้จากการทำกลายพันธุ์เกิดเนื่องจากหมู่อัลคิลเข้าไปในตำแหน่ง N^7ของเบสกัวนีนเกิดเป็น N^7-อัลคิลเลเทดกัวนีน(N^7-alkylated G) ตัวอย่างของสารกลุ่มนี้ เช่นเอ็น-เมธิล-เอ็น-ไนโตร-เอ็น-ไนโตรโซกัวนิดีน (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine;NTG or MNNG) เมธิลมีเทน ซัลโฟเนต (methy methane sulphonate ; MMS) เอธิลมีเทน ซัลโฟเนต (ethyl methanesulphonate ; EMS) ฯลฯ. (59, 60 ,62) สำหรับ NTG ถูกรายงานเป็นครั้งแรกในปี 1960 ว่าเป็นสารเคมีชนิดใหม่ที่ทำให้กลายพันธุ์ได้ในแบคทีเรีย ซึ่งต่อมาได้ใช้อย่างแพร่หลายในการทำให้กลายพันธุ์ โดยจำนวนเซลล์ที่รอดตายจะขึ้นกับความเข้มข้นของ NTG และ ช่วงเวลาที่ใช้ ซึ่งมีผลทำให้เกิดการตายและชักนำให้กลายพันธุ์ (69) NTG จัดว่าเป็นสิ่งก่อการกลายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการชักนำให้กลายพันธุ์แม้ว่าปริมาณของ NTG ที่ใช้จะเป็นผลทำให้การตายของเซลล์น้อยก็ตาม การใช้ NTG ปริมาณสูงทำกลายพันธุ์อาจทำให้เกิด silent mutation ซึ่งเป็นลักษณะที่ไม่ต้องการในการปรับปรุงสายพันธุ์เกิดขึ้น ดังนั้นในการใช้ปริมาณสูงๆ ของ NTG จึงควรหลีกเลี่ยง (64) NTG สามารถทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ในหลาย ๆ จุดบนดี เอ็น เอ (multiple,clusters mutation)รอบ ๆ replication fork ของโครโมโซม เนื่องจาก NTG มีผลต่อยีนหลายยีนที่อยู่ใกล้กันบน ดี เอ็น เอ นั่นเอง จึง



รูปที่ 7 : หมู่อัลคิลของอัลคิลเลติง เอเจนต์เข้าไปยังตำแหน่งต่าง ๆ ของเบสใน ดี เอ็น เอ ,Phosphodiester bond และ Ribose

ที่มา : Singer , 1981 (62)

เหมาะที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในแผนการปรับปรุงสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่สร้าง secondary metabolite เช่น สารปฏิชีวนะได้ดี ซึ่งในการปรับปรุงสายพันธุ์นั้นจำเป็นต้องทำให้กลายพันธุ์กับยีนหลาย ๆ ยีนที่จำเพาะบน ดี เอ็น เอ เพื่อที่จะทำให้สายพันธุ์กลายพันธุ์นั้นสร้างสารปฏิชีวนะได้มากกว่าสายพันธุ์เดิมได้ (32,64,70) ในการทำการกลายพันธุ์ด้วย NTG จำนวนเซลล์รอดตายบางเซลล์อาจถูกชักนำให้กลายพันธุ์เกิดเป็นออกโซโทรป (auxotroph) หรือขนาดของโคโลนี (colony) สัณฐานวิทยา (morphology) ปริมาณและชนิดของผลิตภัณฑ์ สภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงและสร้างผลิตภัณฑ์ ฯลฯ แตกต่างไปจากเซลล์เดิมได้ (69) กรณีต้องการให้จำนวนเซลล์รอดตายมีเปอร์เซนต์เซลล์กลายพันธุ์สูงจะต้องหาสภาวะที่เหมาะสม (optimal condition) ในการใช้ NTG เช่นการใช้ NTG ทำกลายพันธุ์ในแบคทีเรีย (E. coli K 12) ต้องพิจารณาถึงความเข้มข้นของ NTG ที่ใช้ เช่นต้องการ val^R mutant ปริมาณมากจะใช้ NTG ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร ถ้าต้องการ auxotroph ปริมาณมากจะใช้ NTG ที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม /มิลลิลิตร เป็นต้น นอกจากนี้ยังต้องพิจารณาถึง pH ช่วงเวลาที่ใช้ หรือ ช่วงเวลาการเจริญเติบโตของเซลล์ (growth phase) ซึ่งปกติมักใช้ช่วงการแบ่งเซลล์ (log phase) ซึ่งปัจจัยดังกล่าวเป็นผลทำให้เปอร์เซ็นต์รอดตายมีความแตกต่างกัน กรณีที่ต้องการ val^R mutant ควรคัดเลือกจากเปอร์เซนต์รอดตายของ E. coli ที่ 50 % หรือมากกว่า กรณีที่ต้องการ auxotroph mutants ควรคัดเลือกจากเปอร์เซนต์รอดตายที่ 40 % หรือมากกว่า (71) ในกรณีใช้ NTG เพื่อทำการปรับปรุงสายพันธุ์โดยทำกลายพันธุ์ใน P. chrysogenum เพื่อสร้างเพนนิซิลลิน จี พบว่าสภาวะที่เหมาะสมของ NTG ที่ใช้มีความเข้มข้น 5×10^{-4} โมลาร์ pH 5.2 เป็นเวลา 16-24 นาที ซึ่งจะทำให้มีเปอร์เซนต์รอดตายของสปอร์เท่ากับ 11-22 % (37) พบว่า NTG สลายตัวในสภาวะเป็นกรด ได้ผลผลิตเป็น ไนตรัสแอซิด (nitrous acid) และสภาวะเป็นด่างจะสลายตัวให้ ไดอะโซมีเทน (diaso-methane) และที่ pH 5.5 ไม่เกิดการสลายตัว (69) การเตรียม NTG เพื่อใช้งานควรเตรียมใหม่ทุกครั้งในแต่ละการทดลอง ควรเก็บไว้ในที่มีอุณหภูมิต่ำเพื่อป้องกันการสลายตัว ในระหว่างการใช้งานควรใช้ในระบบบัฟเฟอร์ เช่น tris-buffer ที่ถูกปรับ pH เป็น 9.0 หรือใกล้เคียง (66) โดยในสภาวะ pH ที่เป็นด่าง NTG จะสลายตัวเป็นไดอะโซมีเทน (มีสูตรโครงสร้างเป็น $N \equiv N^{+} - \bar{C} - H_2$) ซึ่งเป็นสารเคมีที่มีประสิทธิภาพในการชักนำให้กลายพันธุ์สูง โดยไดอะโซมีเทนจะทำปฏิกิริยาแบบอัลคิลเลชั่นกับเบสกัวนีนในตำแหน่ง

N^7 และให้หมู่เมธิล($-CH_3$) กับเบสกัวนีนที่ตำแหน่ง N^7 ทำให้เกิดเป็น เมธิลเลเทด กัวนีน (methylated guanine) (59, 72, 73) ซึ่งจะมีผลต่อความผิดปกติของ ดี เอ็น เอ คือ (59, 72, 73,)

1 ทำให้การจับคู่ระหว่างเบสเปลี่ยนแปลงไป เช่น ปกติกัวนีนจะจับกับไซโตซีน แต่เมื่อเกิดปฏิกิริยาอัลคิลเลชั่นของเบสกัวนีนได้เป็น N^7-เมธิลเลเทด กัวนีน ซึ่งมีคุณสมบัติการเกิดไอออนไนเซชั่นแตกต่างไปจากกัวนีนปกติ ทำให้คุณสมบัติการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างเบสเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งมีผลทำให้การจับคู่ระหว่างเบสตามปกติผิดพลาดมากยิ่งขึ้น การจับคู่เบสที่ผิดไปของ N^7-เมธิลเลเทด กัวนีนโดยสามารถจับกับเบสไทมีน (thimine)ได้ จึงนำไปสู่การเกิดทรานซิชั่น มิวเตชั่น (transition mutation)โดย G≡C เปลี่ยนไปเป็น A=T ได้ ดังแสดงในรูปที่ 8

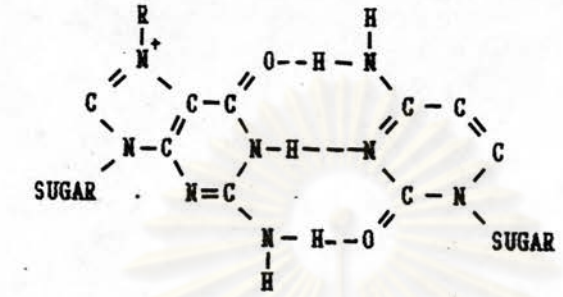
2 ทำให้การเชื่อมต่อระหว่างเบสกัวนีนกับน้ำตาลดีออกซีไรโบสฟอสเฟต (deoxyribosephosphate)หลอมตัวและหลุดออก เกิดเป็นช่องว่างขึ้นในสายของดี เอ็น เอ เรียกว่า apurinic gap ซึ่งถ้ามีการนำเบสอื่นเข้ามาแทนที่หากเป็นเบสที่ต่างไปจากตัวเดิมทำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบ ทรานซิชั่น และ ทรานสเวอร์ชั่น (transversion) ได้

3 ทำให้การเชื่อมต่อระหว่างเบสกัวนีนกับน้ำตาลดีออกซีไรโบสฟอสเฟต (deoxyribosephosphate) หลอมตัวและหลุดออก จะทำให้เหลือน้ำตาลซึ่งไม่คงตัวเกิดไฮโดรไลซิสขึ้น ทำให้มีการตัดขาดจากกันของสายโพลีนิวคลีโอไทด์ ซึ่งจะเกิดแบบสายเดี่ยวหรือทั้งสองสายก็ได้

4 เมื่อเกิดปฏิกิริยาอัลคิลเลชันกับเบสใน ดี เอ็น เอ จะมีขบวนการซ่อมแซมเข้าทำงานเพื่อแก้ไขหรือกำจัด อัลคิลเลติง เบสออกไป โดยการนำเบสที่มีตำหนิออกไปพร้อมกับเบสตัวอื่น ๆ ด้วย ทำให้เกิดช่องว่างบนสายของ ดี เอ็น เอ ซึ่งเมื่อมีการนำเบสเข้ามาในกระบวนการซ่อมแซม (error prone repair) อาจมีการนำเบสที่ผิดไปจากเดิมเข้ามาซึ่งจะทำให้กลายพันธุ์ขึ้น

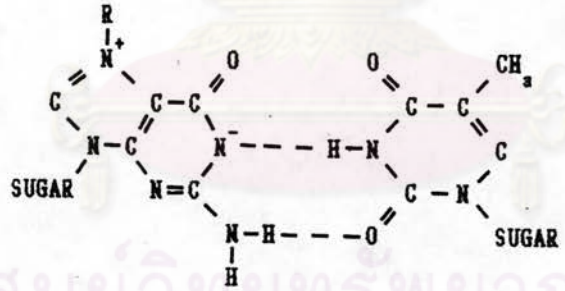
<u>การเลือกใช้ชนิดสิ่งก่อการกลายพันธุ์และปริมาณที่เหมาะสมในการทำกลายพันธุ์จุลินทรีย์</u>

การชักนำให้กลายพันธุ์นั้นไม่สามารถบอกได้ว่าควรเลือกใช้สิ่งก่อการกลายพันธุ์ชนิดใดจึงจะได้ผลดี ดังนั้นในการทำกลายพันธุ์จึงควรมีการทดลองใช้สิ่งก่อการกลายพันธุ์ตัวใดตัวหนึ่งก่อน เมื่อไม่ได้ผลตามที่ต้องการก็เปลี่ยนใช้สิ่งก่อการกลายพันธุ์ตัวอื่นต่อไป นอกจากปัญหา



Alkylated guanine pair Cytosine

(A)



Alkylated guanine pair Thymine

(B)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 8 : การจับคู่ระหว่างอัลคิลเลเทดกัวนีนกับไซโตซีน (A) และการจับคู่ระหว่างอัลคิลเลเทดกัวนีนกับไทมีน (B)

ที่มา : Orgel, 1965 (61)

ในการเลือกใช้สิ่งก่อการกลายพันธุ์แล้ว ยังต้องคำนึงถึงปริมาณที่ใช้และชนิดของจุลินทรีย์ที่จะนำมาทำกลายพันธุ์อีกด้วย จากการศึกษาผลของสิ่งก่อการกลายพันธุ์ 2 ชนิดและปริมาณที่ใช้เปรียบเทียบกันในสายพันธุ์กลายพันธุ์ 3 ชนิดของ Actinomyces streptomycini LS-1 ที่สามารถให้สารปฏิชีวนะคือ streptomycin ซึ่งสายพันธุ์ทั้ง 3 ได้จากการทำให้ A. streptomycini LS-1 กลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลตที่ปริมาณต่าง ๆ เมื่อนำสปอร์ของสายพันธุ์ทั้ง 3 มาทำให้กลายพันธุ์ซ้ำด้วย แสงอุลตราไวโอเลต หรือ เอธิลีนอิมีน (ethylenimine) ซึ่งเลือกใช้ปริมาณที่ทำให้มีเปอร์เซนต์รอดตายของสปอร์เท่ากับ 0.06% , 30 % และ 80 % ตามลำดับ ผลที่ได้คือสายพันธุ์กลายพันธุ์ชนิดที่ 1 และชนิดที่ 2 ให้สายพันธุ์ใหม่ที่สร้างสารปฏิชีวนะได้มากที่สุดและมากกว่าสายพันธุ์เดิม เมื่อใช้แสงอุลตราไวโอเลตหรือ เอธิลีนอิมีนในปริมาณที่ทำให้มีเปอร์เซนต์รอดตายของสปอร์ต่ำ (0.06 %) และพบว่าสายพันธุ์กลายพันธุ์ชนิดที่ 1 แสงอุลตราไวโอเลตจะให้ผลในการชักนำให้เกิดสายพันธุ์ใหม่ที่ให้สารปฏิชีวนะปริมาณสูงขึ้นกว่าเดิมได้ดีกว่าเอธิลีนอิมีน แต่ในสายพันธุ์กลายพันธุ์ชนิดที่ 2 เอธิลีนอิมีนจะให้ผลดีกว่าแสงอุลตราไวโอเลต ในสายพันธุ์กลายพันธุ์ชนิดที่ 3 จะให้สายพันธุ์ใหม่ที่ให้สารปฏิชีวนะมากที่สุดและมากกว่าสายพันธุ์เดิมได้นั้น ต้องใช้แสงอุลตราไวโอเลตหรือเอธิลีนอิมีนในปริมาณที่ทำให้มีเปอร์เซนต์รอดตายของสปอร์สูง (80 %) และ พบว่าแสงอุลตราไวโอเลตจะให้ผลดีกว่าเอธิลีนอิมีน (50) นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาถึงผลของสิ่งก่อการกลายพันธุ์ 3 ชนิดคือ EMS NTG และ 8 MOP(8-methoxypsoralen) ด้วยปริมาณต่างๆ กันในการทำให้กลายพันธุ์ A. nidulans เพื่อสร้างเพนนิซิลิน พบว่ากลุ่มของสปอร์แขวนลอยที่ถูกทำให้กลายพันธุ์ด้วยสิ่งก่อการกลายพันธุ์ดังกล่าว กับกลุ่มของสปอร์แขวนลอยที่ไม่ถูกทำให้กลายพันธุ์ จะได้โคโลนีที่มีความสามารถสร้างเพนนิซิลินในปริมาณที่แตกต่างกัน โดยพบว่าค่าเฉลี่ยของปริมาณเพนนิซิลินที่ได้จากกลุ่มโคโลนีรอดตายหลังจากสปอร์แขวนลอยถูกทำให้กลายพันธุ์ด้วยสิ่งก่อการกลายพันธุ์จะลดลง และเกิดความหลากหลายของปริมาณเพนนิซิลลินที่สร้างขึ้นในแต่ละโคโลนีเพิ่มมากขึ้น (ซึ่งจะทำให้มีโอกาสพบโคโลนีที่ให้ปริมาณเพนนิซิลินสูงกว่าสายพันธุ์เดิมได้) ตามปริมาณของสิ่งก่อการกลายพันธุ์ที่เพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ไม่ถูกทำให้กลายพันธุ์) โดยทั่วไปแล้วพบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณของสิ่งก่อการกลายพันธุ์จะทำเปอร์เซนต์รอดตายของสปอร์ลดลงและจำนวนของโคโลนีที่ได้จะสร้างผลผลิตมากขึ้นกว่าเดิม (+)และน้อยกว่าสายพันธุ์เดิม (-) โดยทั้ง 2 ลักษณะจะเพิ่มมากขึ้นตามปริมาณของสารก่อการกลายพันธุ์ที่เพิ่มมากขึ้น จากการเปรียบเทียบผลของสิ่งก่อการ

กลายพันธุ์ทั้ง 3 ชนิดในการชักนำให้กลายพันธุ์ พบว่าจำนวนสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่สร้างเพนนิซิลินสูงกว่าสายพันธุ์เดิม (+) และ จำนวนสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่สร้างเพนนิซิลินต่ำกว่าสายพันธุ์เดิม (-) จะเพิ่มขึ้นตามปริมาณของสิ่งก่อการกลายพันธุ์ที่เพิ่มมากขึ้น พบว่า NTG มีผลชักนำให้กลายพันธุ์เพื่อได้สายพันธุ์ที่สร้างเพนนิซิลินสูงขึ้นดีที่สุด รองลงมาคือ EMS และ 8 MOP ตามลำดับ (74)

ในกรณีเลือกชนิดของสิ่งก่อการกลายพันธุ์ที่เหมาะสมที่จะใช้ในการทำกลายพันธุ์ในสายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่งแล้ว จะต้องคำนึงถึงปริมาณที่เหมาะสมที่จะใช้อีกด้วย เช่น การใช้รังสีเอ็กซ์เพื่อทำกลายพันธุ์ใน Actinomyces subtropicus ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สร้างสารปฏิชีวนะ อัลโบมัยซิล (albomycin) พบว่าเมื่อปริมาณของสิ่งก่อการกลายพันธุ์เพิ่มมากขึ้นจะทำให้เปอร์เซนต์รอดตายของสปอร์ลดลงตามลำดับ ในขณะเดียวกันจำนวนของสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่สร้างสารปฏิชีวนะมากกว่าสายพันธุ์เดิม (+) และสร้างสารปฏิชีวนะน้อยกว่าสายพันธุ์เดิม (-) จะเพิ่มขึ้นตามปริมาณที่เพิ่มมากขึ้น โดยแต่ละปริมาณของสิ่งก่อการกลายพันธุ์ที่ใช้จะทำให้เกิดจำนวนของ(+)มากกว่าจำนวนของ (-) แต่เมื่อเพิ่มปริมาณของรังสีเอ็กซ์ให้มากขึ้นจนถึงปริมาณหนึ่ง จำนวนของ (+)และจำนวนของ(-) จะลดลงตามปริมาณที่เพิ่มมากขึ้นจากปริมาณดังกล่าว โดยจำนวนของ (+) จะลดลง ก่อนถึงปริมาณที่ทำให้จำนวนของ (-) ลดลงเล็กน้อย ดังนั้นเมื่อใช้ปริมาณที่สูงกว่าปริมาณดังกล่าวจึงมีโอกาสพบจำนวนของ (-) มากกว่าจำนวนของ (+) และเมื่อปริมาณสูงมากขึ้นโอกาสที่จะพบจำนวนของ (-) มากกว่าจำนวนของ (+)จะมีมากขึ้น จึงเป็นไปได้ว่าการที่จะให้ได้จำนวนของ (+) มาก ๆ ควรใช้ขนาดปริมาณของสิ่งก่อการกลายพันธุ์ในช่วงต่ำ-ปานกลาง ถ้าใช้ปริมาณที่สูงมากเกินไปโอกาสที่จะพบจำนวนของ(-)จะมีเพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับจำนวนของ (+)(50) ในการใช้ NTG ทำกลายพันธุ์ใน E. coli K12 เพื่อคัดเลือก val^R mutants หรือ auxotroph mutants ได้มีการหาความเข้มข้นของ NTG และเวลาที่ใช้เพื่อให้ได้ปริมาณที่เหมาะสมซึ่งจะทำให้ได้จำนวนของ val^R mutant หรือ จำนวนของ auxotroph ในปริมาณสูงที่สุด (71) ในการใช้ NTG เพื่อทำกลายพันธุ์ใน P. chrysogenum ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สร้างเพนนิซิลิน การเลือกใช้ปริมาณที่เหมาะสมทำได้คือเมื่อหาเปอร์เซนต์รอดตายของสปอร์ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าความเข้มข้นของ NTG ที่เพิ่มมากขึ้นจะทำให้เปอร์เซนต์รอดตายของสปอร์ลดลง ในการทดลองนี้ผู้ทำการทดลองใช้ NTG ที่ความเข้มข้นต่างๆ กันในสปอร์แขวนลอยเป็นเวลา 30 นาที และเลือกความเข้มข้นของ NTG ที่จะใช้โดยพิจารณาจากเปอร์

I 17045654

เชนต์รอดตายของสปอร์ต่ำและได้เปอร์เซนต์ของการเกิดออกโซโทรปสูง (ซึ่งเปอร์เซนต์การเกิดออกโซโทรปสูงจะถูกใช้เป็นตัวบ่งชี้ให้รู้ว่าเกิดเปอร์เซนต์การกลายพันธุ์สูง) เมื่อได้ความเข้มข้นของ NTG ($5x10^{-4}$ โมลาร์) ที่จะนำมาใช้แล้ว จะต้องทำการหาปริมาณที่เหมาะสมที่ทำให้ได้สายพันธุ์กลายพันธุ์ที่สามารถสร้างเพนนิซิลินสูงกว่าสายพันธุ์เดิม โดยแปรผันเวลาที่ใช้ พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของ NTG ที่คัดเลือกไว้ ในช่วงเวลาที่เหมาะสม(16-24 นาที) ซึ่งจะทำให้ได้เปอร์เซนต์รอดตาย =11-22 % ซึ่งปริมาณดังกล่าวจะเป็นปริมาณที่เหมาะสมที่สุดที่จะทำให้มีโอกาสพบสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่สร้างเพนนิซิลินสูงกว่าสายพันธุ์เดิมได้ (37)

<u>การเปลี่ยนแปลงจีโนม (genome)ของจุลินทรีย์หลังการทำกลายพันธุ์ทำให้การแสดงออกของ phenotype เปลี่ยนไป</u>

1 สัณฐานวิทยา (morphology) และ ผลผลิต (productivity)

จำนวนโคโลนีที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาเปลี่ยนแปลงหลังการทำกลายพันธุ์กับสปอร์แขวนลอยเช่นลักษณะสีของเส้นใย(mycelium) สีของสปอร์ ขนาด และ รูปร่างของโคโลนีจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณของสิ่งก่อการกลายพันธุ์ที่เพิ่มขึ้น (50 ,74) จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสัณฐานวิทยาของสายพันธุ์กลายพันธุ์ Actinomyces antibioticus ที่สร้างสารปฏิชีวนะ oleandomycin พบว่าจำนวนโคโลนีรอดตายหลังการทำกลายพันธุ์กับสปอร์แขวนลอยด้วยแสงอุลตราไวโอเลต ซึ่งเป็นโคโลนีที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาคล้ายกับสายพันธุ์เดิมจะมีสัดส่วนของจำนวนโคโลนีที่สร้างสารปฏิชีวนะสูงกว่าสายพันธุ์เดิม(+) เป็นจำนวนมากกว่าจำนวนโคโลนีที่สร้างสารปฏิชีวนะน้อยกว่าสายพันธุ์เดิม (-) ในขณะที่โคโลนีทั้งหมดที่ถูกนำมาทดสอบซึ่งมีสัณฐานวิทยาเปลี่ยนไป (โคโลนีไม่มีสี ; pigmentless) สร้างสารปฏิชีวนะน้อยกว่าสายพันธุ์เดิม (50) ซึ่งผลที่ได้มีลักษณะเช่นเดียวกับการทำกลายพันธุ์ใน A. nidulans ที่สร้างสารปฏิชีวนะคือเพนนิซิลลิน (74) การทำกลายพันธุ์ใน Streptomyces rimosus ที่สร้างสารปฏิชีวนะคือออกซีเตตราไซคลิน (75) การทำกลายพันธุ์ใน P. chrysogenum ที่สร้างสารปฏิชีวนะคือเพนนิซิลลิน (76)

แต่ก็มีรายงานว่าในแผนการปรับปรุงสายพันธุ์ที่สร้างเพนนิซิลลินของมหาวิทยาลัย Wisconsin โดยการทำกลายพันธุ์และคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถสร้างเพนนิซิลลินสูงกว่าสายพันธุ์เดิมนั้น ในการคัดเลือกโคโลนีรอดตายหลังการทำกลายพันธุ์ได้อาศัยลักษณะของสัณฐาน

วิทยาที่เปลี่ยนแปลงไปจากสายพันธุ์เดิมเป็นหลักในการพิจารณาเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ (77)

การศึกษาผลที่ได้จากการปรับปรุงสายพันธุ์โดยการทำกลายพันธุ์และคัดเลือกสายพันธุ์โดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนีรอดตายเป็นหลักในการคัดเลือก อาจไม่ใช่เรื่องง่าย ซึ่งอาจเกิดความไม่แน่ใจว่าในการคัดเลือกจำนวนโคโลนีที่มีสัณฐานวิทยาที่เปลี่ยนแปลงไป จะมีความสัมพันธ์กับการเกิดจำนวนโคโลนีที่สร้างสารปฏิชีวนะมากกว่าสายพันธุ์เดิม (+) ในสัดส่วนมากขึ้นหรือไม่เมื่อเปรียบเทียบกับการเกิดจำนวนโคโลนีที่สร้างสารปฏิชีวนะที่น้อยกว่าสายพันธุ์เดิม (74) ถ้าเป็นไปได้ในการคัดเลือกโคโลนีเพื่อหาสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่สร้างสารปฏิชีวนะสูงกว่าสายพันธุ์เดิมนั้น ควรหลีกเลี่ยงการคัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาที่เปลี่ยนไปจากสายพันธุ์เดิม (66)

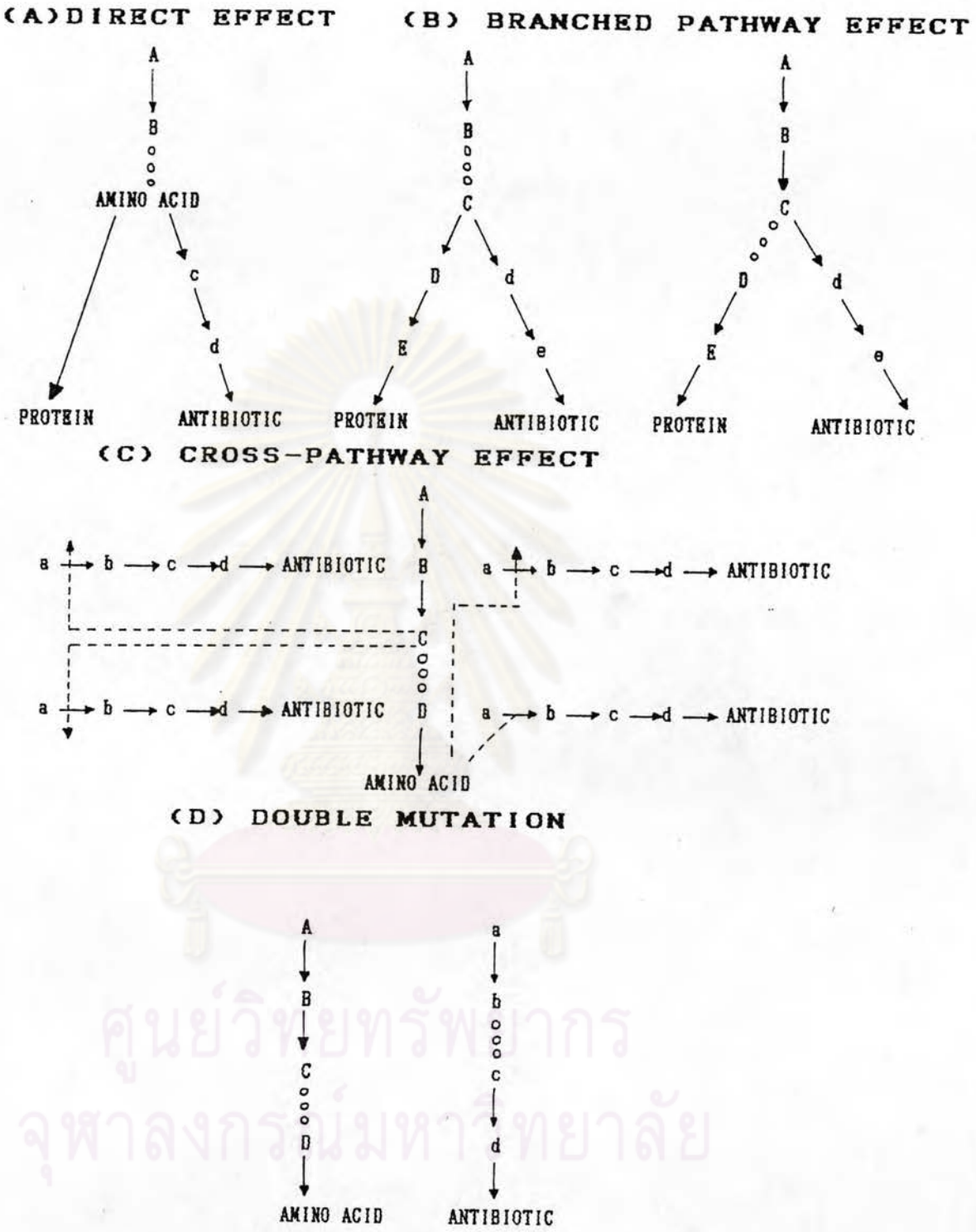
2 ออกโซโทรป (auxotroph ; nutritional mutation) และผลผลิต (productivity)

Demain (40) กล่าวว่าการเกิดออกโซโทรปมีผลอย่างมากต่อการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ทุติยภูมิเช่น เพนนิซิลลิน (ซึ่งอาจทำให้ออกโซโทรปที่ได้มีความสามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้มากขึ้นหรือน้อยลงกว่าเดิมได้) เหตุที่ออกโซโทรปมีผลต่อการสร้างผลิตภัณฑ์ทุติยภูมิสรุปได้เป็น 4 กรณี **ดังแสดงในรูปที่ 9** คือ

1 การกลายพันธุ์เกิดขึ้นในวิถีเมตาโบไลต์ขั้นปฐมภูมิ (primary metabolite pathway) ของการสังเคราะห์สารตั้งต้นการเกิดผลิตภัณฑ์ ซึ่งสารตั้งต้นการเกิดผลิตภัณฑ์นี้มีผลต่อการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ทุติยภูมิ เรียกผลที่เกิดแบบนี้ว่า direct effect

2 การกลายพันธุ์เกิดขึ้นในส่วนวิถีปกติ (common pathway) ก่อนที่จะมีการแตกสาขาของวิถี หรือเกิดขึ้นในวิถีเมตาโบไลต์ขั้นปฐมภูมิของการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ปฐมภูมิ (ซึ่งเป็นส่วนของสาขาที่แตกมาจากวิถีปกติ) ซึ่งในการกลายพันธุ์ในส่วนใดส่วนหนึ่งหรือทั้งสองจะมีผลในการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ปฐมภูมิและผลิตภัณฑ์ทุติยภูมิ เรียกผลที่เกิดแบบนี้ว่า branched pathway effect

3 การกลายพันธุ์เกิดขึ้นในวิถีเมตาโบไลต์ขั้นปฐมภูมิของการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ปฐมภูมิ ซึ่งไม่ใช่สารตั้งต้นการเกิดผลิตภัณฑ์ของการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ทุติยภูมิ แต่ผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ metabolite ภายในเซลล์ จะมีผลต่อวิถีของการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ทุติยภูมิ โดยการควบคุมแบบข้ามวิถี เรียกผลที่เกิดแบบนี้ว่า cross pathway regulation



รูปที่ 9 : ความเป็นไปได้เนื่องจากผลของออกโซโทรปต่อการเกิดผลิตภัณฑ์ทุติยภูมิ วงกลม =ขัดขวางการเกิดสารตัวกลาง (Intermediate) ในวิถีของการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ทุติยภูมิและผลิตภัณฑ์ปฐมภูมิ จุดไข่ปลา=กระตุ้นหรือยับยั้งการเกิดสารตัวกลางในวิถีของการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ทุติยภูมิและผลิตภัณฑ์ปฐมภูมิ **ที่มา** : Demain, 1973 (40)

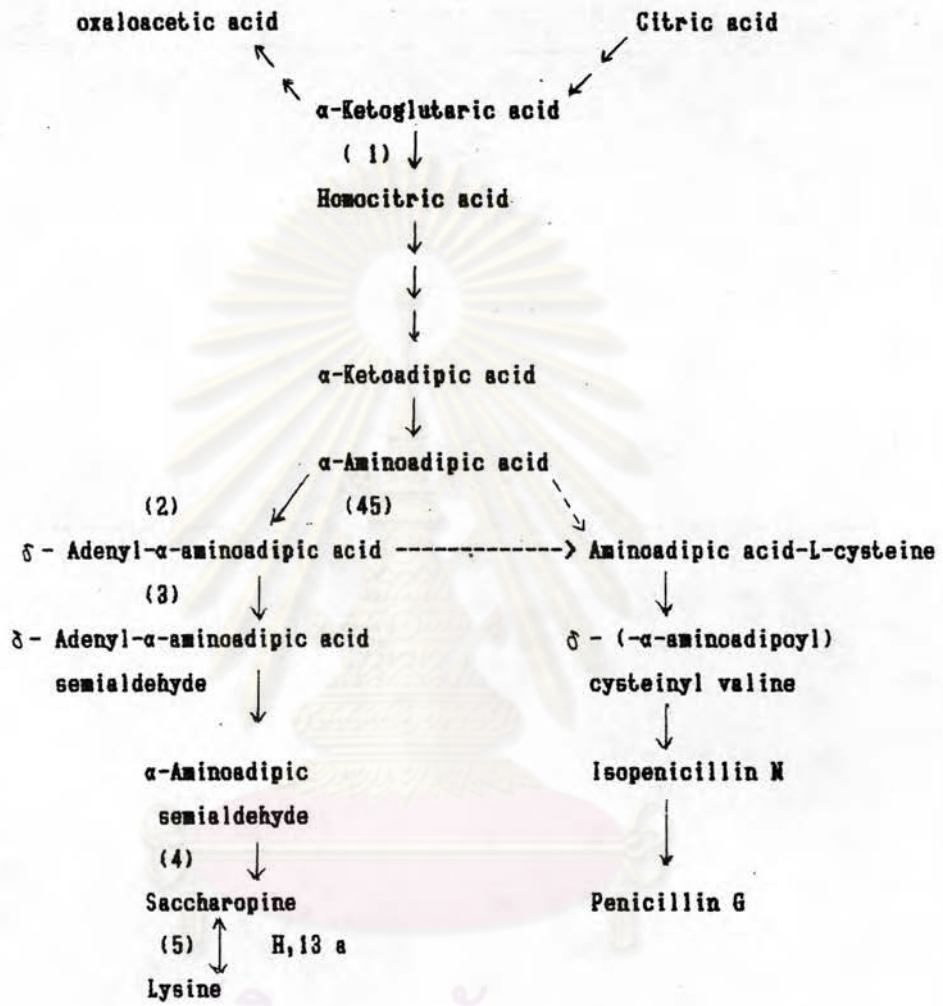
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4 การกลายพันธุ์เกิดใน 2 วิถี โดยวิถีหนึ่งเป็นวิถีของการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ปฐมภูมิ และอีกวิถีเป็นวิถีของการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ทุติยภูมิ เรียกผลที่เกิดแบบนี้ว่า double หรือ second mutation

ในกรณีที่ 1-3 อาจร่วมในการแสดงลักษณะออกโซโทรปและความสามารถในการสร้างผลิตภัณฑ์ทุติยภูมิ (สารปฏิชีวนะ) ของสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ได้หลังการทำกลายพันธุ์ด้วยสิ่งก่อการกลายพันธุ์ เรียกผลที่เกิดจากการแสดงออกแบบนี้ว่าผลของการแสดงออกร่วมกัน (pleiotropic effects) ซึ่งจะเป็นการยากที่จะบอกว่า ผลที่เกิดจากออกโซโทรปในการสร้างสารปฏิชีวนะจะเกิดเนื่องจาก pleiotropic effects หรือ secondary mutation

จากการศึกษาการทำกลายพันธุ์และคัดเลือกออกโซโทรปเพื่อทำการปรับปรุงสายพันธุ์ พบว่าออกโซโทรปที่คัดเลือกได้สร้างสารปฏิชีวนะได้น้อยกว่าสายพันธุ์เดิม (-) (58) ในการทำให้ P. chrysogenum กลายพันธุ์และคัดเลือกโคโลนีรอดตายที่เป็นออกโซโทรป พบว่าส่วนใหญ่ของออกโซโทรปสามารถสร้างเพนนิซิลลินได้น้อยกว่าสายพันธุ์เดิม ซึ่งการตรวจสอบจาก 172 ออกโซโทรป พบว่า 96.51 % ของออกโซโทรปสร้างเพนนิซิลลินน้อยกว่าสายพันธุ์เดิม เมื่อเปรียบเทียบการคัดเลือกโคโลนีรอดตายหลังการทำกลายพันธุ์กับ P. chrysogenum สายพันธุ์ C จำนวนโคโลนีที่คัดเลือกได้แบบสุ่ม (random) พบถึง 24 % ของจำนวนโคโลนีที่คัดเลือกสามารถสร้างเพนนิซิลลินเท่ากับหรือมากกว่าสายพันธุ์เดิม แต่เมื่อทำการคัดเลือกโคโลนีรอดตายหลังการทำกลายพันธุ์กับ P. chrysogenum สายพันธุ์ C, D , H และ Y โดยพิจารณาเฉพาะโคโลนีที่เป็นออกโซโทรป ปรากฏว่ามีเพียง 10 % ของจำนวนโคโลนีออกโซโทรปที่คัดเลือกสามารถสร้างเพนนิซิลลินเท่ากับหรือสูงกว่าสายพันธุ์เดิม ผู้ทำการทดลองได้วิเคราะห์ผลการทดลองว่าไม่มีความแน่นอนในความสัมพันธ์(correlation) ระหว่างการเกิดออกโซโทรกับปริมาณเพนนิซิลลินที่ถูกสร้างขึ้น ตัวอย่างของออกโซโทรปที่ต้องการ growth requirement ชนิดเดียวกัน เช่นต้องการ adenine (ade^-) จะสร้างเพนนิซิลลินปริมาณต่างๆ กัน แต่ก็ยังน้อยกว่าสายพันธุ์เดิม คือพบปริมาณเพนนิซิลลินที่ถูกสร้างขึ้นในแต่ละโคโลนีของ ade^- ตั้งแต่ 0 - 75 % ของปริมาณเพนนิซิลลินที่สร้างได้จากสายพันธุ์เดิม ออกโซโทรปที่ต้องการ growth requirement ชนิดเดียวกันแต่สร้างเพนนิซิลลินต่างกันมากนั้น ควรจะเป็นผลเนื่องจากการกลายพันธุ์ในส่วนของ genetic loci ที่ต่างกัน และถ้าความกลายพันธุ์ที่ต่างกัน (ต่าง locus) ถูกแสดงออกเนื่องจาก

pleiotropic effects ที่ต่างกันในแต่ละโคโลนี อาจเป็นผลทำให้ปริมาณเพนนิซิลลินที่ถูกสร้างขึ้นมีความแตกต่างกันด้วย ถ้าผลของ pleiotropic effect ที่ทำให้การแสดงออกของยีนในการสร้างเพนนิซิลลินเป็นลบ (ให้ปริมาณเพนนิซิลลินน้อยกว่าสายพันธุ์เดิม) มีมากและกระจายอย่างสุ่ม (random) ในระหว่างจำนวนของโคโลนีที่เป็นออกโซโทรปที่คัดเลือกไว้ จะทำให้ออกโซโทรปที่คัดเลือกได้ส่วนใหญ่สร้างเพนนิซิลลินได้น้อยกว่าสายพันธุ์เดิม (78) ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการเกิดออกโซโทรปกับผลผลิตที่สร้างจากออกโซโทรปมากมายเช่น ศึกษาในออกโซโทรปของ S. rimosus ซึ่งสร้างสารปฏิชีวนะ tetracycline จากการเปรียบเทียบ 53 ออกโซโทรปกับสายพันธุ์เดิม พบว่าออกโซโทรปทั้งหมดสร้างสารปฏิชีวนะได้น้อยกว่าสายพันธุ์เดิมคือได้ประมาณ 25 % ของสายพันธุ์เดิม แต่เมื่อมีการเติม growth requirement ในอาหาร complex medium มีจำนวน 10 ออกโซโทรปตอบสนอง และสามารถสร้างสารปฏิชีวนะเพิ่มขึ้นจาก 4- 28 % เป็น 65-144 % ของสายพันธุ์เดิม อย่างไรก็ตามพบว่าการเจริญของออกโซโทรปใน complex medium ที่เติม growth requirement จะเจริญเติบโตใกล้เคียงหรือพอๆ กับสายพันธุ์เดิมในอาหารที่ไม่เติม growth requirement ในกรณีสายพันธุ์เดิมแม้ว่ามีการเติม growth requirement ในอาหารก็ไม่สามารถเพิ่มการสังเคราะห์เพนนิซิลลินได้ จึงสรุปได้ 2 กรณีคือกรณีที่หนึ่งผลผลิตของผลิตภัณฑ์ทุติยภูมิเป็นผลมาจากการเป็นออกโซโทรปมากกว่าการเจริญเติบโตใน growth complex medium ส่วนอีกกรณีหนึ่งคือแม้ว่าการเกิดออกโซโทรปจะมีผลทำให้สร้างสารปฏิชีวนะได้น้อยกว่าสายพันธุ์เดิม แต่ก็สามารถเพิ่มผลผลิตได้โดยการเติม growth requirementในอาหาร (75) จากการศึกษาการเพิ่มผลผลิตของเพนนิซิลลินโดยการเติมไลซีน (lysine)ปริมาณต่างๆ ให้กับไลซีนออกโซโทรป (lysine $^-$) 3 สายพันธุ์ที่ได้จากการทำกลายพันธุ์กับ P. chrysogenum Wis 54-1255 ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต คือสายพันธุ์ H สายพันธุ์ 13 a และ สายพันธุ์ 45 ซึ่งทั้ง 3 สายพันธุ์สร้างเพนนิซิลลินน้อยกว่าสายพันธุ์เดิมคือ 57.5 % 1.33 % และ 0.42 % ของเพนนิซิลลินที่สร้างจากสายพันธุ์เดิมตามลำดับ จากการพยายามเพิ่มผลผลิตของเพนนิซิลลินโดยการเติมไลซีนปริมาณต่าง ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าสายพันธุ์ H เท่านั้นที่ถูกกระตุ้นให้เพิ่มผลผลิตเพนนิซิลลินให้สูงขึ้นกว่าเดิมได้อย่างเด่นชัด แต่ปริมาณเพนนิซิลลินที่สร้างได้ก็ยังน้อยกว่าสายพันธุ์เดิม ในสภาวะเดียวกันของการเติมไลซีนในอาหารให้กับสายพันธุ์เดิม ปริมาณไลซีนที่ค่อยๆ เพิ่มขึ้นจะทำให้เพนนิซิลลินที่ถูกสร้างจากสายพันธุ์เดิมมีปริมาณลดลงเรื่อย ๆ จากวิถีของการเกิดผลิตภัณฑ์ปฐมภูมิ (ไลซีน) และผลิตภัณฑ์ทุติยภูมิ (เพนนิซิลลิน) ซึ่งเป็นแบบ branch pathway ดังแสดงในรูปที่ 10 พบว่าสายพันธุ์



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 10 : วิถีของการเกิดไลซีนและเพนนิซิลลิน จี ใน P. chrysogenum , (1) Homocitrate synthase,(2) α-amino adipic acid reductase(activated), (3)α-amino adipic acid reductase (reduction), (4) Saccharopine reductase , (5) Saccharopine dehydrogenase , สายพันธุ์ 45 (45) ถูกขัดขวางการเกิดเนื่องจากผลของการเกิดออกโซโทรป ณ.ตำแหน่ง (2) และ สายพันธุ์ H และ 13 a ถูกขัดขวาง ณ.ตำแหน่ง (5),เส้นไข่ปลาแสดงถึงความเป็นไปได้ในการเกิด Aminoadipic acid-L-cysteine

ที่มา : O'Sullivan , 1973 (79)

H และสายพันธุ์ 13 a ถูกขัดขวางการเกิดปฏิกิริยา ณ.ตำแหน่ง saccharopine —> lysine และมีการสะสมของ saccharopine มาก ส่วนสายพันธุ์ 45 ถูกขัดขวางการเกิดปฏิกิริยา ณ.ตำแหน่ง α-aminoadipic acid ———> δ -adenyl-α-amino adepic acid และมีการสะสมของสารประกอบที่ไม่รู้จัก พบว่าปริมาณไลซีนที่ค่อยๆ เติมในอาหารหมักของสายพันธุ์ H เมื่อได้ความเข้มข้นหนึ่งเพนนิซิลลินจะถูกสร้างมากขึ้นสูงสุด แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไลซีนให้มากขึ้นจะทำให้ปริมาณเพนนิซิลลินที่ถูกสร้างค่อย ๆ ลดลง ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับสายพันธุ์เดิมคือเมื่อค่อย ๆ เติมไลซีนให้กับอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าปริมาณเพนนิซิลลินที่ถูกสร้างขึ้นลดลงตามลำดับเช่นกัน ที่เป็นเช่นนี้เพราะว่าปริมาณไลซีนและเมตาโบไลต์ที่ถูกย่อยสลายจากไลซีน เช่น α- aminoadipic acid จะไปยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ homocitrate synthase ซึ่งจะทำให้ปริมาณเพนนิซิลลินที่ถูกสร้างขึ้นลดลงจากเดิมได้ เหตุผลว่าทำไมเพนนิซิลลินถูกกระตุ้นให้สร้างมากขึ้นจากสายพันธุ์ H โดยการค่อย ๆ เติมไลซีนลงในอาหารนั้นไม่สามารถจะอธิบายได้ เพราะฉะนั้นวิถีการสังเคราะห์ไลซีนและเพนนิซิลลินจำเป็นต้องได้รับการศึกษาให้เกิดความเข้าใจมากยิ่งขึ้น (79)

ดังนั้นจึงเป็นการยากที่จะให้ข้อสรุปว่าการคัดเลือกโคโลนีเพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่สร้างสารปฏิชีวนะปริมาณสูงโดยพิจารณาการเกิดออกโซโทรป หรือการคัดเลือกโดยวิธีการสุ่มจากโคโลนีรอดตายหลังการทำกลายพันธุ์วิธีใดจะให้ผลที่จะนำไปใช้ได้ดีกว่า (40)

3 สภาวะในการหมักเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์ (fermentation condition) เปลี่ยนแปลงจากสายพันธุ์เดิม

สายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ได้จากการทำกลายพันธุ์เมื่อนำมาหมักในอาหารเหลวเปรียบเทียบกับสายพันธุ์เดิมโดยใช้สภาวะในการหมักอย่างเดียวกัน พบว่าสภาวะหนึ่งสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่แยกได้อาจสร้างเพนนิซิลลินสูงกว่าสายพันธุ์เดิม แต่ถ้าสภาวะการหมักเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม สายพันธุ์กลายพันธุ์ที่แยกได้อาจสร้างเพนนิซิลลินต่ำกว่าสายพันธุ์เดิมได้ (80) ดังนั้นในการทำกลายพันธุ์เพื่อปรับปรุงสายพันธุ์นั้น เมื่อทำการคัดเลือกได้สายพันธุ์กลายพันธุ์ที่สร้างเพนนิซิลลินปริมาณสูงกว่าสายพันธุ์เดิม (เมื่อเปรียบเทียบสภาวะการหมักแบบเดียวกัน) ควรจะนำสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ดังกล่าวมาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงและการสร้างเพนนิซิลลินอีกครั้งซึ่งจะเป็นวิธีที่ทำให้ผลผลิตที่สร้างสูงกว่าเดิมได้ (81)

โดยทั่วไปแล้ววิถีเมตาโบไลต์ของสายพันธุ์ราที่สามารถสร้างเพนนิซิลลินจะประกอบ

ด้วย 3 ระยะ (phase) คือ (80)

1 reaction connected with mycelial growth ซึ่งระยะนี้เป็นการเพิ่มจำนวน mycelium เป็นส่วนใหญ่ แหล่งคาร์บอนถูกใช้ไปอย่างรวดเร็ว ซึ่งจำนวนของ mycelium ที่เพิ่มมากขึ้นพบว่าไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณเพนนิซิลลินที่ถูกสร้างขึ้น

2 penicillin production เป็นระยะที่มีการเจริญเติบโตน้อยลง แหล่งคาร์บอนถูกใช้ไปอย่างช้า ๆ และเป็นระยะที่มีการสร้างเพนนิซิลลิน

3 autolysis เป็นระยะที่ mycelium เริ่มสลายตัว ปล่อยแอมโมเนียออกสู่อาหารหมักจนทำให้ค่า pH ของอาหารเพิ่มขึ้นเป็นประมาณ 8-9 ซึ่งจะมีผลต่อการสลายตัวของเพนนิซิลลินได้

ดังนั้นในการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างเพนนิซิลลินนั้นควรคำนึงถึง 2 ระยะ เป็นสำคัญ คือระยะการเพิ่มจำนวนไมซีเลียมและระยะการสร้างเพนนิซิลลิน ซึ่งจะเป็นผลทำให้การเพิ่มผลผลิตของเพนนิซิลลินเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ

4 ปฏิกิริยาเคมีเพื่อเกิดเป็นโครงสร้างโมเลกุลสารปฏิชีวนะเปลี่ยนไปจากเดิม

การใช้สิ่งก่อการกลายพันธุ์เพื่อชักนำจุลินทรีย์ให้กลายพันธุ์ อาจได้สายพันธุ์กลายพันธุ์ที่สร้างสารปฏิชีวนะที่มีโครงสร้างทางเคมีเปลี่ยนแปลงไปเพิ่มมากขึ้น ซึ่งในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของสารปฏิชีวนะนั้น ในบางกรณีอาจทำให้ความสามารถของสารปฏิชีวนะที่สร้างได้ไม่สามารถทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทดสอบได้ เช่น การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของสารปฏิชีวนะ chlorotetracycline ซึ่งพบหลังจากเกิดกระบวนการ dehydrogenation ที่ C- 5 ในโมเลกุล chlorotetracycline (82) การเปลี่ยนแปลงอื่น ๆ ในโครงสร้างทางเคมีของ chlorotetracycline ก็ให้ผลอย่างเดียวกัน (83 , 84) ในทางตรงกันข้ามโครงสร้างทางเคมีของสารปฏิชีวนะที่เปลี่ยนแปลงไป อาจเป็นผลที่ทำให้ความสามารถในการทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทดสอบสูงขึ้นหรือค่อนข้างสูงและยังมีผลต่อการเปลี่ยนแปลง inhibition spectrum อีกด้วย จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลง inhibition spectrum ของเพนนิซิลลิน ซึ่งเป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของเพนนิซิลลิน เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาเคมีในการสร้างโมเลกุลเพนนิซิลลินจาก mutant ที่แยกได้จากการทำกลายพันธุ์ใน P. chrysogenum WIS-51-20 พบว่าปฏิกิริยาในการเกิดโครงสร้างโมเลกุลของเพนนิซิลลิน

สามารถนำ α,w-dicarbonic acids เข้าไปรวมเป็นส่วนหนึ่งของโมเลกุลเพนนิซิลลินในส่วน side chain ได้ และจากการเลี้ยง mutant นี้ในอาหารสร้างเพนนิซิลลินซึ่งเติม adipic acid เป็น precursor พบว่าสามารถสร้างเพนนิซิลลินชนิดใหม่ขึ้นคือ 4-carboxy - n-butyl penicillin ซึ่งในขณะที่สายพันธุ์เดิมสังเคราะห์ benzyl-penicillin เพนนิซิลลินชนิดใหม่ที่สังเคราะห์จาก mutant ที่แยกได้นี้มีความสามารถในการทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมลบได้ ซึ่งความสามารถในการทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของของสารปฏิชีวนะชนิดนี้ต่อแบคทีเรียจะคล้ายกับ cephalosporin N ในขณะที่ benzylpenicillin ที่สร้างจากสายพันธุ์เดิมไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมลบได้ (85) การทำกลายพันธุ์เพื่อให้เกิดสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ ซึ่งมีความสามารถทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตต่อจุลินทรีย์ทดสอบได้มากชนิดขึ้น(broad inhibition spectrum) จะนำไปสู่การรักษาโรคที่ดีกว่าเดิมได้ เนื่องจากคุณภาพของสารปฏิชีวนะที่สร้างได้ดีขึ้นกว่าเดิม ดังมีรายงานโดย Kelner (86) ซึ่งได้ทำการคัดเลือก actinomycetes 7 ชนิดซึ่งไม่สามารถทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทดสอบ (Micrococcus lysodeiktikus , S. aureus และ E.coli) หรือถ้ามีความสามารถก็ได้เพียงเล็กน้อย โดยพบความกว้างบริเวณยับยั้งเพียง 0-2 มิลลิเมตรเท่านั้น 2 ใน 7 ของ actinomycetes ที่แยกได้สามารถทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทดสอบได้เพียงชนิดเดียว แต่ภายหลังจากทำกลายพันธุ์กับ actinomycetes ทั้ง 7 ด้วย UV และ X-rays พบว่าสามารถให้สายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ให้บริเวณยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทดสอบได้ นอกจากนี้ยังพบว่าสายพันธุ์กลายพันธุ์ต่างๆ ที่ได้สามารถสร้างสารปฏิชีวนะที่มี inhibition spectrum ต่อชนิดของจุลินทรีย์ทดสอบต่างกัน โดยบางสายพันธุ์กลายพันธุ์สามารถสร้างสารปฏิชีวนะที่มี inhibition spectrum ต่อจุลินทรีย์ทดสอบได้น้อยชนิด แต่ในขณะที่บางสายพันธุ์กลายพันธุ์สร้างสารปฏิชีวนะที่มี inhibition spectrum ต่อจุลินทรีย์ทดสอบได้หลายชนิด (broad inhibition spectrum) ดังนั้น Kelner จึงสรุปว่าจากการทำให้กลายพันธุ์ต่อสปอร์แขวนลอยของ actinomycetes ซึ่งเดิมสามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้น้อยหรือไม่ได้เลย แต่เมื่อเกิดกลายพันธุ์จะให้สายพันธุ์ที่สร้างสารปฏิชีวนะที่สามารถทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทดสอบได้ และมากกว่าสายพันธุ์เดิมได้ นอกจากนี้การทำกลายพันธุ์ยังได้สายพันธุ์กลายพันธุ์ที่สร้างสารปฏิชีวนะที่มี inhibition spectrum ต่อจุลินทรีย์ทดสอบได้ต่าง ๆ กัน ซึ่งเป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสาร

ปฏิชีวนะ เนื่องจากปฏิกิริยาเคมีในการเกิดสารปฏิชีวนะของสายพันธุ์กลายพันธุ์เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม การได้สารปฏิชีวนะที่มี broad inhibition spectrum จะทำให้คุณภาพของสารปฏิชีวนะดีขึ้นและมีประสิทธิภาพในการรักษาโรคได้ดีกว่าสารปฏิชีวนะชนิดเดิม

<u>การคัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์</u>

ในการคัดเลือกโคโลนีหลังจากประชากรของจุลินทรีย์ (microbial population) ถูกทำให้กลายพันธุ์ด้วยสิ่งก่อการกลายพันธุ์ (mutagen) จำนวนโคโลนีรอดตายถูกนำมาคัดเลือกเพื่อให้พบสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่สร้างผลิตภัณฑ์ที่ต้องการสูงขึ้นกว่าเดิม แต่ปัญหามีอยู่ 2 ประการคือ ต้องทำการคัดเลือกโคโลนีรอดตายจากการทำกลายพันธุ์มากน้อยเท่าไร และโคโลนีรอดตายโคโลนีใดควรถูกนำมาคัดเลือก นักสถิติได้แนะนำการแก้ปัญหาข้อแรกได้ชี้ให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ที่จะพบสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่สร้างผลิตภัณฑ์สูงกว่าสายพันธุ์เดิมอย่างแน่นอน จากจำนวนโคโลนีจำนวนมากที่ถูกนำมาคัดเลือกและตรวจสอบปริมาณผลิตภัณฑ์ที่สร้างได้แต่ละโคโลนีเปรียบเทียบกัน ซึ่งผู้ทำการทดลองต้องฝึกหัดให้เกิดความชำนาญ มีจำนวนเครื่องแย่าควบคุมอุณหภูมิและเวลาในการทำงานมากเพียงพอ การแก้ปัญหาข้อสองคือ โคโลนีควรถูกนำมาคัดเลือกเพื่อหาสายพันธุ์กลายพันธุ์ซึ่งให้ลักษณะที่ต้องการ ระหว่างโคโลนีไม่กลายพันธุ์ หรือระหว่างโคโลนีที่ให้ลักษณะที่ต้องการเป็นลบ (negative) ซึ่งการคัดเลือกโคโลนีที่ได้หลังจากทำกลายพันธุ์เพื่อหาโคโลนีที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้มากกว่าสายพันธุ์เดิมนั้น มีหลักการพิจารณาในการคัดเลือกได้หลายแบบ ซึ่งขึ้นกับผู้ทำการทดลองจะเลือกใช้แบบใดให้เหมาะสมกับงาน (66) หลักการที่จะนำมาพิจารณาในการคัดเลือกพอจะสรุปได้ดังนี้ (40, 66)

1 โคโลนีถูกนำมาคัดเลือกแบบสุ่ม (random) และทดสอบผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ เปรียบเทียบผลิตภัณฑ์ที่ได้แต่ละโคโลนี ซึ่งวิธีดังกล่าวเป็นวิธีการที่ง่ายแต่การคัดเลือกเป็นงานหนัก

2 คัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะสัณฐานวิทยา (morphology)แตกต่างไปจากสายพันธุ์เดิม

3 คัดเลือกโคโลนีบนอาหารวุ้นโดยใช้จุลินทรีย์ทดสอบที่ไว (sensitive) ต่อสารปฏิชีวนะ และทำการศึกษาเปรียบเทียบบริเวณยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทดสอบ อันเนื่องจากปริมาณสารปฏิชีวนะที่ถูกสร้างในปริมาณที่แตกต่างกันของแต่ละโคโลนี

4 คัดเลือกโคโลนีที่เป็นออกโซโทรป (auxotroph)

5 คัดเลือกโคโลนีที่เป็น prototroph ที่ได้จาก auxotroph (revertants)

6 คัดเลือกโคโลนีที่สามารถต่อต้าน (resistant)ปริมาณสารประกอบที่มีโครงสร้างคล้าย (analogues) กับ precursor ของการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ทุติยภูมิ (secondary products)

7 คัดเลือกโคโลนีที่สามารถต้านผลการยับยั้งการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ทุติยภูมิ (feedback effect) ที่เกิดขึ้นเนื่องจากปริมาณผลิตภัณฑ์ทุติยภูมิที่ถูกสร้างมากขึ้น

8 คัดเลือกโคโลนีที่สามารถต่อต้านผลความเป็นพิษ (toxic effects) ของผลิตภัณฑ์ทุติยภูมิ เมื่อเติมผลิตภัณฑ์ทุติยภูมิเข้าไปในระยะ trophophase ของจุลินทรีย์ที่ผลิตผลิตภัณฑ์ทุติยภูมินั้น

9 คัดเลือกโคโลนีที่สามารถต่อต้านผลความเป็นพิษ (toxic effects) ของ precursor ในการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ทุติยภูมิ

10 คัดเลือกโคโลนีที่สร้างสารปฏิชีวนะเพียงชนิดเดียวที่สนใจ ในขณะที่สายพันธุ์เดิมสามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้หลายชนิด

11 คัดเลือกโคโลนีที่สามารถสร้างผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ ในขณะที่สายพันธุ์เดิมไม่สามารถสร้างผลิตภัณฑ์ที่ต้องการนั้นได้

สำหรับการคัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่สร้างเพนนิซิลลินปริมาณสูง โคโลนีถูกนำมาคัดเลือกบนอาหารวุ้นทดสอบ (bioassay agar medium)โดยมีจุลินทรีย์ที่ไวต่อเพนนิซิลลินเป็นตัวทดสอบ ถ้าบริเวณยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทดสอบมีความแตกต่างกันเนื่องจากปริมาณเพนนิซิลินที่ถูกสร้างขึ้นในแต่ละโคโลนีที่แตกต่างกัน ก็สามารถทำการคัดเลือกโคโลนีที่สร้างเพนนิซิลินสูงกว่าสายพันธุ์เดิมได้ (87 ,88) ในการตรวจสอบปริมาณสารปฏิชีวนะที่สร้างจากโคโลนีที่เจริญเติบโตบนอาหารวุ้นผลิตสารปฏิชีวนะ สามารถสังเกตปริมาณสารปฏิชีวนะที่สร้างโดยใช้เซลล์แขวนลอยของจุลินทรีย์ทดสอบมากระจายบนผิวอาหารวุ้น หลังจากโคโลนีของเชื้อที่สร้างสารปฏิชีวนะเจริญเติบโตเต็มที่แล้ว จากนั้นนำไปบ่มในสภาพที่เหมาะสมแก่การเพาะเลี้ยงของจุลินทรีย์ทดสอบ วัดความกว้างบริเวณยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทดสอบ (clear หรือ inhibition zone)รอบโคโลนีของเชื้อที่สร้างสารปฏิชีวนะเปรียบเทียบกันระหว่างหลาย ๆโคโลนี จะพบว่าได้ความกว้างบริเวณยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทดสอบที่แตกต่างกัน (89) Demain (40)ได้กล่าวว่าถ้าความกว้าง

บริเวณยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทดสอบที่วัดได้ เป็นผลเนื่องจากปริมาณสารปฏิชีวนะที่ถูกสร้างจากโคโลนีที่เจริญเติบโตอย่างสมบูรณ์ (โดยมีขนาดของโคโลนีที่เหมาะสม)บนอาหารวุ้นทดสอบมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารปฏิชีวนะที่ถูกสร้างขึ้น เมื่อนำโคโลนีดังกล่าวมาหมักในอาหารเหลว (submerged culture)แล้ว จึงเป็นไปได้ที่จะนำหลักการดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์มากมายที่สร้างสารปฏิชีวนะปริมาณที่แตกต่างกันได้ ซึ่งจะทำให้คัดเลือกพบสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่สร้างสารปฏิชีวนะปริมาณสูงได้ในเวลารวดเร็ว

การปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อได้สายพันธุ์กลายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะปริมาณสูง วิธีการคัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์นับว่ามีความสำคัญ การนำสายพันธุ์กลายพันธุ์แต่ละโคโลนีที่ได้หลังการทำกลายพันธุ์มาเลี้ยงในอาหารเหลวในช่วงเวลาและสภาวะที่เหมาะสมจนได้สารปฏิชีวนะแล้ว จึงนำมาวิเคราะห์ปริมาณสารปฏิชีวนะที่สร้างได้แต่ละโคโลนีเปรียบเทียบกัน โคโลนีที่สร้างปริมาณสารปฏิชีวนะมากกว่าสายพันธุ์เดิมจะถูกแยกเก็บไว้ ปัญหาของวิธีดังกล่าวคือต้องใช้ฟลาสค์ เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเป็นจำนวนมาก ทำให้เสียเวลาในการคัดเลือก ซึ่งวิธีดังกล่าวจะไม่ประสบผลสำเร็จในการคัดเลือกเท่าที่ควร จึงได้มีการปรับปรุงวิธีการคัดเลือกให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ในการปรับปรุงสายพันธุ์ Cephalosporium sp. ที่ผลิตสารปฏิชีวนะ cephalosporin C หลังทำกลายพันธุ์กับสปอร์แขวนลอย สปอร์ถูกนำมากระจายบนผิวหน้าอาหารวุ้น หลังจากได้โคโลนีที่มีขนาดพอเหมาะ สายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ได้ผ่านการคัดเลือกขั้นต้นโดยนำเซลล์แขวนลอยของจุลินทรีย์ทดสอบ Alcaligenes faecalis ATCC 8750 มากระจายบนผิวหน้าอาหารวุ้นที่มีโคโลนีนั้นเจริญอยู่ นำจานเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะแก่การเพาะเลี้ยงของจุลินทรีย์ทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะสามารถคัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ให้สัดส่วนของบริเวณยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทดสอบต่อความกว้างของโคโลนีสูงกว่าสายพันธุ์เดิมได้ การคัดเลือกโดยการใช้วิธีดังกล่าว สามารถคัดเลือกโคโลนีที่ให้สัดส่วนดังกล่าวสูงกว่าสายพันธุ์เดิมได้ในระยะเวลาไม่นานนัก แม้ว่าการคัดเลือกโคโลนีจากความกว้างบริเวณยับยั้งบนอาหารวุ้นและในอาหารเหลวจะได้ผลไม่สอดคล้องกันนัก แต่ผลที่ได้จากการคัดเลือกบนอาหารวุ้นก็ให้ผลเป็นที่น่าพอใจ โดยเมื่อคัดเลือกได้โคโลนีจำนวนหนึ่งแล้ว จึงนำแต่ละโคโลนีที่คัดเลือกได้มาทำการคัดเลือกอีกครั้ง โดยนำมาหมักในอาหารเหลวเป็นระยะเวลาที่เหมาะสม หลังจากนั้นจึงนำของเหลวที่หมักได้ในแต่ละโคโลนีมาทำการวิเคราะห์ปริมาณสารปฏิชีวนะเปรียบเทียบกัน ซึ่งทำได้การวัดความกว้างบริเวณยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทดสอบบนอาหารวุ้นทดสอบ และเปรียบเทียบความกว้างบริเวณยับยั้งกับ

กราฟมาตรฐานที่ทำไว้ ก็จะทราบว่าแต่ละโคโลนีให้ปริมาณเพนนิซิลลินกี่ ยูนิต/มิลลิลิตร จากวิธีการคัดเลือกดังกล่าวทำให้สามารถเพิ่มผลผลิตจาก 175 ยูนิต/มิลลิลิตร จนได้สูงกว่า 1,000 ยูนิต / มิลลิลิตร ในเวลาไม่นานนัก (90) หลังจากนั้นก็ได้มีการปรับปรุงวิธีการคัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์อยู่ตลอดเวลา โดยได้มีการปรับปรุงวิธีการคัดเลือกบนอาหารวุ้นขั้นต้น (ขั้นปฐมภูมิ , primary screening) เช่นในการปรับปรุงสายพันธุ์ที่สร้างเพนนิซิลลิน หลังจากสปอร์แขวนลอยของ Aspergillus sp. ถูกทำกลายพันธุ์ สปอร์ถูกนำมากระจายบนผิวหน้าอาหารวุ้นผลิตเพนนิซิลลิน เมื่อโคโลนีเจริญเติบโตได้ 1-2 วัน ทำการย้ายโคโลนีด้วย steel cork borer ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 มิลลิเมตร แผ่นวุ้นที่เจาะได้ถูกย้ายไปวางในจานเลี้ยงเชื้อเปล่าที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมแก่การเพาะเลี้ยงของ Aspergillus sp. เป็นระยะเวลา 6 วัน จากนั้นจึงย้ายแผ่นวุ้นไปวางบนอาหารวุ้นทดสอบ เพื่อหาความกว้างบริเวณยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทดสอบ (B. subtilis)เปรียบเทียบความกว้างบริเวณยับยั้งที่ได้ ทำการคัดเลือกโคโลนีที่ให้ความกว้างของบริเวณยับยั้งสูงกว่าสายพันธุ์เดิม หลังจากนั้นจึงนำโคโลนีที่คัดเลือกได้ในขั้นต้นมาคัดเลือกอีกครั้งในอาหารเหลว แต่พบว่าประสิทธิภาพการคัดเลือกขั้นต้นไม่ดีเท่าที่ควร จึงทำการเจาะอาหารวุ้นผลิตเพนนิซิลลิน จี ด้วย steel cork borer แล้วนำมาวางในจานอาหารเลี้ยงเชื้อเปล่า ก่อนที่จะทำการถ่ายเชื้อของสายพันธุ์กลายพันธุ์ต่างๆ มาไว้บนอาหารวุ้นที่เจาะได้ บ่มเป็นเวลา 6 วัน ก่อนย้ายไปวางบนอาหารวุ้นทดสอบเพื่อวัดความกว้างบริเวณยับยั้งเปรียบเทียบกัน สายพันธุ์ที่คัดเลือกว่าดีถูกนำมาคัดเลือกอีกครั้งในอาหารเหลว (87) นอกจากนี้ยังมีการปรับปรุงการคัดเลือกสายพันธุ์สายพันธุ์กลายพันธุ์ของ P. chrysogenumที่ให้เพนนิซิลลินสูง โดยหลังจากสปอร์แขวนลอยถูกทำกลายพันธุ์แล้ว กระจายสปอร์บนอาหารวุ้นผลิตเพนนิซิลลิน หลังจากได้โคโลนีที่มีขนาดที่พอเหมาะจึงเติมเซลล์แขวนลอยของ B. subtilis ที่มี 0.106 ยูนิต/มิลลิลิตร ของเพนนิซิลลินเนส (penicillinase ,จะไปยับยั้ง activity ของเพนนิซิลลินที่ผลิตได้แต่ละโคโลนี ซึ่งจะทำให้ความกว้างบริเวณยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบไม่กว้างจนเกินไป) ลงบนผิวหน้าอาหารวุ้นโดยหมุนและกระจายให้ทั่ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28° เซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เก็บโคโลนีที่ให้บริเวณยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทดสอบสูง จากนั้นนำโคโลนีที่เก็บไว้มาคัดเลือกอีกครั้งในอาหารเหลว (88)

<u>การวิเคราะห์ปริมาณเพนนิซิลลิน จี</u>

การวิเคราะห์ปริมาณเพนนิซิลลิน จี ที่นิยม อาจจะทำได้ 2 วิธีใหญ่ ๆ คือ (91 , 92)

1 วิธีทางชีววิทยา (microbiological method หรือ bioassay)

ซึ่งทำได้หลายวิธี แต่ที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายและถือว่าเป็นวิธีพื้นฐานในการวิเคราะห์ปริมาณเพนนิซิลลิน จี คือ diffusion assay ซึ่งเป็นวิธีทางชีววิทยาและได้ถูกเสนอเป็นคนแรกโดย Fleming ในปี 1929 เป็นวิธีที่อาศัยการแพร่กระจาย (diffusion) ของเพนนิซิลลิน จี ในอาหารวุ้นที่มีจุลินทรีย์ทดสอบ ทำให้เกิดการทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทดสอบซึ่งทำให้เห็นเป็นบริเวณใสในอาหารวุ้นทดสอบ(inhibition zone) จากนั้นได้นำแนวความคิดดังกล่าวมาดัดแปลงโดยกลุ่มนักวิทยาศาสตร์แห่งมหาวิทยาลัย Oxford และเรียกวิธีการวิเคราะห์ดังกล่าวว่า cylinder (cup) plate method ซึ่งทำได้โดยการนำ cylinder ซึ่งอาจทำจากหลอดแก้วทนความร้อน (pyrex glass tube),glazed porcelian tube , stainless steel tube หรือ aluminium tube ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 8 มิลลิเมตร ปลายเปิดทั้ง 2 ด้านและถูกตัดให้มีความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร มาวางบนผิวของอาหารวุ้นที่มีจุลินทรีย์ทดสอบ โดยการแนบให้ติดกับผิวอาหารวุ้นหรือจมเล็กน้อยเพื่อป้องกันไม่ให้เวลาหยดสารละลายเพนนิซิลลิน จี ลงใน cylinderเกิดการไหลออกมาได้ หลังจากนั้นจึงนำจานเลี้ยงเชื้อดังกล่าวไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$ เซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ทำการวัดความกว้างบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้นรอบ ๆ cylinder ดังกล่าว(91) ในการวิเคราะห์ปริมาณเพนนิซิลลิน จี ในสารละลายตัวอย่างโดยวิธี cylinder plate method มักทำร่วมกับ serial dilution method เสมอ โดยการนำสารละลายตัวอย่างมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม ซึ่งจะทำให้เห็นความกว้างที่พอเหมาะของความกว้างบริเวณยับยั้งได้ จากนั้นจึงนำค่าของความกว้างบริเวณยับยั้งที่วัดได้มาเปรียบเทียบกับค่าความกว้างบริเวณยับยั้งที่ได้จากสารละลายเพนนิซิลลิน จี มาตรฐานซึ่งทราบความเข้มข้นที่แน่นอน (มีหน่วยเป็น ยูนิต /มิลลิลิตร) และผ่านการทำ serial dilution เช่นเดียวกับสารละลายตัวอย่าง ก็จะทำให้ทราบปริมาณยูนิต/มิลลิลิตรของเพนนิซิลลิน จี จากสารละลายตัวอย่างได้ (93) ในการทำ diffusion assay นั้น พบว่ามีปัจจัย (factors) ที่สำคัญหลายประการซึ่งทำให้ค่าของความกว้างบริเวณยับยั้งที่วัดได้มีความแตกต่างกันในการวัดแต่ละครั้งของการวิเคราะห์ ซึ่งในการวิเคราะห์ให้มีความถูกต้องแม่นยำนั้นปัจจัยต่าง ๆ ต้องถูกควบคุมให้คงที่ทุก ๆ ครั้ง ปัจจัยดังกล่าวคือ (93 ,94)

1 ความลึกของอาหารวุ้นทดสอบ

2 อายุของจุลินทรีย์ทดสอบ

3 pH ของอาหารวุ้นทดสอบ

4 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการแพร่กระจายของเพนนิซิลลิน จี และอัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทดสอบ ซึ่งความสามารถในการแพร่กระจายของเพนนิซิลลิน จี ขึ้นอยู่กับ 2 ปัจจัยคือ อุณหภูมิและ ความหนืดของสารละลายเพนนิซิลลิน จี

5 ความเข้มข้นหรือปริมาณ inoculum ของจุลินทรีย์ทดสอบในอาหารวุ้น

6 ระยะเวลาที่ทำการบ่มเพื่อทำการวัดความกว้างบริเวณยับยั้ง

จะพบว่าในการวิเคราะห์แบบ diffusion assay โดยวิธี cylinder plate method ค่อนข้างยุ่งยากเพราะต้องเตรียม cylinder ที่ปราศจากการปนเปื้อนในการวิเคราะห์แต่ละครั้ง ดังนั้น Fleming จึงเสนอว่า cylinder ที่บรรจุสารละลายเพนนิซิลลิน จี ไม่มีความจำเป็นต้องใช้ แต่อาจทำการเจาะอาหารวุ้นทดสอบให้เป็นรูด้วย steel cork borer ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 8 มิลลิเมตร แทน ซึ่งเรียกวิธีการวิเคราะห์แบบนี้ว่า Fleming's agar hole method (91) ซึ่งในงานวิจัยนี้จะใช้วิธีดังกล่าวในการวิเคราะห์ปริมาณเพนนิซิลลิน จี ในขั้นการคัดเลือกทุติยภูมิ (ในอาหารเหลว) โดยมีหน่วยของเพนนิซิลลิน จี ที่วิเคราะห์ได้เป็น ยูนิต/มิลลิลิตร

2 วิธีทางโครมาโตกราฟี (chromatography)

วิธีทางโครมาโตกราฟีที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณเพนนิซิลลิน จี ในปัจจุบันคือ HPLC (high-performance liquid chromatography)ซึ่งจะมีความถูกต้องและมีความแม่นยำสูง สามารถวิเคราะห์เพนนิซิลลิน จี ในหน่วยของ กรัม/มิลลิลิตรได้ และเป็นวิธีที่ดีกว่าการวิเคราะห์แบบ diffusion assay (bioassay) กล่าวคือสามารถวิเคราะห์ปริมาณเพนนิซิลลิน จี เพนนิซิลลิน วี และสารประกอบอื่น ๆ ที่ได้จากการสลายตัวของเพนนิซิลลิน จี ได้จำเพาะกว่า ในขณะที่วิธี diffusion assay เป็นเพียงการวิเคราะห์ปริมาณเพนนิซิลลินทั้งหมดที่หมักได้ในน้ำหมัก (อาจเป็นเพนนิซิลลิน จี หรือ วี เพนนิซิลลิน เค ฯลฯ.) ไม่สามารถแยกวิเคราะห์เพื่อทราบปริมาณเพนนิซิลลิน จี ที่สนใจเพียงชนิดเดียวได้ แต่ข้อดีของวิธี diffusion assay คือสามารถทำนาย antibacterial activity ของเพนนิซิลลินในน้ำหมักได้ ดังนั้นในการวิเคราะห์ปริมาณเพนนิซิลลินที่หมักได้ในน้ำหมักจึงต้องอาศัยควบคู่กันทั้ง 2 วิธีคือ diffusion assay และ HPLC เพื่อให้สามารถทราบถึง antibacterial activity ของเพนนิซิลลินในน้ำหมักที่หมักได้และปริมาณ

เพนนิซิลลิน จี ที่สนใจในหน่วยของน้ำหนักที่หมักได้จากน้ำหมัก (91,95,96)

ในการวิเคราะห์ปริมาณเพนนิซิลลิน จี ในน้ำหมักด้วย HPLC ควรทำการแยกเพนนิซิลลิน ออกจากน้ำหมักเสียก่อน แต่วิธีในการแยกยุ่งยากประกอบด้วยหลายขั้นตอน เช่น ปรับ pH ของสารละลายที่หมักได้ให้เป็น 2.0-2.5 สกัดด้วย butyl หรือ amylacetate และตกตะกอนด้วย potassium acetate (97) แต่การแยกเพนนิซิลลินออกจากน้ำหมักที่สามารถทำได้ง่ายกว่าได้ถูกรายงานโดย Luengo ซึ่งทำได้โดยการตกตะกอนเพนนิซิลลินในน้ำหมักด้วย แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate) 45 % w/v (98) จากนั้นกรองเอาส่วนใสทิ้งไป นำส่วนผลึกที่ตกตะกอนได้มาละลายในสารละลาย buffer แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC เพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป (92)

ในงานวิจัยนี้ใช้เทคนิคการทำกลายพันธุ์เพื่อปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อราที่สามารถสร้างเพนนิซิลลิน จี ได้ โดยใช้เชื้อรา P. chrysogenum N-151 เป็นสายพันธุ์เริ่มต้นผ่านโปรแกรมการทำกลายพันธุ์อย่างต่อเนื่องหลายรอบด้วยสิ่งก่อการกลายพันธุ์ UV(แสงอุลตราไวโอเลต) หรือ NTG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) โดยคาดว่าจะสามารถคัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์ของ P. chrysogenum ที่สามารถสร้างเพนนิซิลลิน จี สูงกว่าสายพันธุ์เดิมได้ และยังได้เล็งเห็นถึงความสำคัญในการคัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์ในขั้นปฐมภูมิ เพื่อให้เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพสูงและใช้เวลาในการคัดเลือกเพื่อให้ได้สายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ดีและมีความสามารถในการสร้างเพนนิซิลลิน จี สูงในเวลาอันรวดเร็ว จึงได้ทำการดัดแปลงและปรับปรุงวิธีการคัดเลือกในขั้นปฐมภูมิ โดยอาศัยจากข้อมูลที่ได้กล่าวมาเป็นหลัก และคาดหวังว่าจะสามารถนำวิธีดังกล่าวมาใช้ในแผนการปรับปรุงสายพันธุ์ของ P. chrysogenum ในขั้นการคัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ได้จากการชักนำให้กลายพันธุ์ด้วย UV หรือ NTG ซึ่งคาดว่าจะสามารถได้สายพันธุ์ของ P. chrysogenum ที่สร้างเพนนิซิลลิน จี ที่สูงกว่าสายพันธุ์เดิมได้ในเวลาอันรวดเร็ว

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการทำวิจัย

เพื่อเป็นการปรับปรุงสายพันธุ์ของรา P. chrysogenum ให้มีความสามารถในการผลิตเพนนิซิลลิน จี มากขึ้นกว่าเดิม

ขั้นตอนการวิจัย

1 ปรับปรุงวิธีการคัดเลือกสายพันธุ์ในขั้นปฐมภูมิ

2 ชักนำให้กลายพันธุ์อย่างต่อเนื่องหลายรอบโดยใช้ แสงอุลตราไวโอเลต (UV) และสารเคมี NTG กับ Penicillium chrysogenum N-151 ซึ่งใช้เป็นสายพันธุ์ตั้งต้น

3 คัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่สามารถสร้างเพนนิซิลลิน จี สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น โดยผ่านการคัดเลือกขั้น ปฐมภูมิ และ ทุติยภูมิ

4 วิเคราะห์ปริมาณเพนนิซิลลิน จี ที่ได้จากสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ว่าดีที่สุดด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอแม็นซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี(high performance liquid chromatography ,HPLC)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย