บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้เป็นการปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อรา เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก โดยเริ่มจากเชื้อรา *Gibberella fujikuroi* สายพันธุ์ N9-34 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ปรับปรุงมาจาก *Gibberella fujikuroi* สายพันธุ์ C โดย จันทร์ธิรา ลัภยพร (2536) งานวิจัยนี้นำสายพันธุ์ N9-34 มาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต 1 รอบ และตามด้วย NTG 2 รอบ

การปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อรานั้น ถ้าสามารถลดเวลาในการเพาะเลี้ยงลงได้ จะทำให้ขั้นตอนการคัดเลือกสายพันธุ์แต่ละรอบใช้เวลาลดลงมาก และทำให้คัดเลือกสายพันธุ์ได้จำนวนมากขึ้น ดังนั้นจากการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสูตรอาหารที่ประกอบด้วยกากเมล็ดฝ้ายย่อยด้วยกรดกำมะถันเป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งสามารถลดอายุหัวเชื้อเป็น 48 ชั่วโมงและลดเวลาในการเพาะเลี้ยงเหลือเพียง 7 วัน ทั้งนี้อาจเนื่องจากว่าในสูตรอาหารที่ใช้กากเมล็ดฝ้ายย่อยด้วยกรดกำมะถัน จะมีอินทรีย์ไนโตรเจนที่อยู่ในรูปสารโมเลกุลเล็ก เช่น กรดอะมิโน หรือเปบไทด์สายสั้นๆ ซึ่งง่ายต่อการนำไปใช้ในกระบวนการเมตาโบลิสมของไนโตรเจน ส่งผลให้เชื้อเจริญเร็วการใช้กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วเป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน นอกจากการปรับปรุงสายพันธุ์โดยการกลายพันธุ์แล้ว งานวิจัยนี้ยังมีวัตถุประสงค์ที่จะเพิ่มอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงเชื้อด้วย เพื่อให้เหมาะสมกับสภาวะแวดล้อมในประเทศไทย มีรายงานว่าการผลิต GA_3 สามารถผลิตได้ที่อุณหภูมิในช่วงกว้างตั้งแต่ 25-34 องศาเซลเซียส (Stodola et al. 1955; Gohlwar et al., 1984; Darken et al., 1959) ซึ่งการใช้อุณหภูมิในการผลิต GA_3 ขึ้นกับสายพันธุ์เชื้อที่ใช้ ดังนั้นงานวิจัยนี้

จึงเปลี่ยนอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อจาก 25 องศาเซลเซียสเป็น 28 องศาเซลเซียส เพื่อลดพลังงานในการหล่อน้ำเย็นในการผลิตระดับอุตสาหกรรม

ในการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์นั้น ความสำเร็จของการคัดเลือกสายพันธุ์จะขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพของการคัดเลือก เพราะถ้าการคัดเลือกที่มีประสิทธิภาพจะได้สายพันธุ์ที่ต้องการในเวลารวดเร็ว และวิธีคัดเลือกที่ดีต้องเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว คัดเลือกได้ครั้งละมากๆ โดยจะทำการคัดเลือก 2 ขั้นคือ ขั้นปฐมภูมิและขั้นทุติยภูมิ ซึ่งขั้นปฐมภูมิในการคัดเลือกสายพันธุ์ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนคือ ขั้นตอนแรกเป็นการคัดเลือกด้วยวิธี TLC โดยเปรียบเทียบความเข้มของการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ ระหว่างสายพันธุ์ตั้งต้นกับสายพันธุ์กลายพันธุ์ วิธีนี้ให้คะแนนด้วยสายตา ซึ่งจันทร์ธิรา ลัภยพร(2536) ได้รายงานไว้ว่าการตรวจสอบปริมาณ GA_3ด้วยวิธีนี้มีประสิทธิภาพพอที่จะใช้เป็นวิธีคัดเลือกสายพันธุ์ขั้นปฐมภูมิได้ โดยที่วิธี TLC สามารถแยกจุด GA_3 ที่มีความเข้มของการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์มากๆได้ แต่จะเกิดการผิดพลาดได้เมื่อความเข้มของการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ใกล้เคียงกัน แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้สามารถลดจำนวนตัวอย่างที่จะต้องนำไปตรวจสอบขั้นทุติยภูมิลงได้มาก จากนั้นจึงพัฒนาวิธี TLC จากการดูความเข้มจุด GA_3 ด้วยสายตามาใช้เครื่อง TLC- densitometer อ่านความเข้ม วิธีนี้อ่านค่าปริมาณ GA_3 ได้ระดับหนึ่ง ซึ่งดีกว่าการคาดคะเนด้วยสายตา จากนั้นเมื่อจำนวนตัวอย่างเหลือน้อยแล้วจึงคัดเลือกโดยการวิเคราะห์หาปริมาณ GA_3 ด้วยวิธี HPLC ซึ่งเป็นการคัดเลือกขั้นสุดท้าย วิธีนี้จะวัดปริมาณ GA_3 ในน้ำหมักได้ถูกต้อง แม่นยำกว่าวิธีอื่น จากการรายงานของ Sackett (1984) ได้นำน้ำหมักของ *G. fujikuroi* 14 สายพันธุ์ที่ผลิตจิบเบอเรลลินมาหาปริมาณ GA_3 ด้วยวิธี TLC-densitometric และ HPLC เปรียบเทียบกัน พบว่าปริมาณ GA_3 ที่ได้จากการวิเคราะห์ ด้วยวิธีทั้งสองมีความสัมพันธ์กันงานวิจัยนี้จึงนำเอาวิธีของ Sackett (1984) มาเป็นแนวทางในการพัฒนาวิธีการคัดเลือกในขั้นตอนที่ 2 โดยนำสายพันธุ์ที่ได้จากการกลายพันธุ์มา 50 สายพันธุ์ เพาะเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตจิบเบอเรลลินและหา

ปริมาณ GA_3 ที่เชื้อผลิตได้โดยใช้วิธีวิเคราะห์ 2 วิธีเปรียบเทียบกัน ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ทั้งสองมีความสอดคล้องกันมาก โดยมีค่าสัมประสิทธ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9545 ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงใช้วิธี TLC-densitometric สำหรับการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิครั้งที่สอง เนื่องจากวิธีนี้เหมาะกับงานประจำที่มีตัวอย่างมาก สแกนได้อย่างต่อเนื่องใช้เวลาน้อย และสิ้นเปลืองน้อยกว่าการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC แต่อย่างไรก็ตามวิธีการนี้ยังต้องอาศัยความแม่นยำและความชำนาญเพื่อให้ได้ค่าที่ถูกต้อง โดยจะต้องระมัดระวังเทคนิคการทำ TLC คือควบคุมปริมาณและความเข้มข้นสารตัวอย่างตลอดจนขนาดจุดให้มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 มิลลิเมตร เพราะการที่จุดมีขนาดใหญ่และปริมาณสารตัวอย่างเข้มข้นมากเกินไป มีผลทำให้การแยกไม่ดี และต้องควบคุมตัวแปรจากการทดลองให้เป็นมาตรฐานเดียว ตัวแปรดังกล่าวได้แก่ สารละลายตัวพา (mobile phase) (อมร เพชรสม,2534) นอกจากนี้แผ่นที่เตรียมไปสแกนควรจะสแกนทันทีถ้าเก็บไว้นานเกิน 24 ชั่วโมง การเรืองแสงจะน้อยลงและทำให้ปริมาณ GA_3 น้อยลงตามไปด้วย และควรเก็บแผ่นTLCไว้ในที่แห้งเพราะถ้ามีความชื้นจะเกิดการรบกวนของBaseline (Sackett,1984) ดังนั้นเมื่อทำขั้นตอน TLC เสร็จควรนำไปอ่านค่าปริมาณ GA_3 ด้วย TLC-densitometric ทันที

สิ่งก่อการกลายพันธุ์ที่ใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์ *G. fujikuroi* เพื่อผลิตจิบเบอเรลลิน มีรายงานว่าเมื่อใช้แสงอัลตราไวโอเลตร่วมกับ NTG ในการกลายพันธุ์ จะให้สายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ผลิตGA_3เพิ่มขึ้นมากกว่าการใช้สารชักนำตัวอื่นๆ(Kolblin et al.,1991) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงชักนำให้สปอร์ของเชื้อรา *G. fujikuroi* สายพันธุ์ N9-34 เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตสลับกับ NTG โดยที่สายพันธุ์ N9-34 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ตั้งต้นมีประสิทธิภาพการผลิต GA_3 577 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อนำสายพันธุ์ N9-34 มาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต พบว่าสายพันธุ์ UV-28 ผลิต GA_3 ได้สูงสุดคือ 701 มิลลิกรัมต่อลิตร มากกว่าสายพันธุ์ N9-34

21.49 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำสายพันธุ์ UV-28 มาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย NTG พบว่าสายพันธุ์ UN-84 ผลิต GA_3 ได้สูงสุดคือ 909 มิลลิกรัมต่อลิตร มากกว่าสายพันธุ์ UV-28 29.67 เปอร์เซ็นต์ และมากกว่าสายพันธุ์ N9-34 57.54 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำสายพันธุ์ UN-84 มาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วย NTG พบว่าสายพันธุ์ UNN-653 ผลิต GA_3 ได้สูงสุดคือ 1257 มิลลิกรัมต่อลิตร มากกว่าสายพันธุ์ UN-84 38.28 เปอร์เซ็นต์ และมากกว่าสายพันธุ์ N9-34 117.85 เปอร์เซ็นต์

จากการหาความเสถียรของสายพันธุ์ ที่คัดเลือกจากการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต พบว่าการผลิต GA_3 ของสายพันธุ์ที่กลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต ซึ่งคัดเลือกไว้ 5 สายพันธุ์ มีแนวโน้มที่ผลิต GA_3 ลดลงมากหลังจากถ่ายเชื้อไป 3 ครั้ง (21 วัน) แสดงให้เห็นว่าการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตการผลิต GA_3 ไม่คงที่ และเมื่อนำสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากการชักนำให้กลายพันธุ์ด้วย NTG มาหาความเสถียรโดยเพาะเลี้ยงหลังจากถ่ายเชื้อไป 2 ครั้ง และ 4 ครั้ง พบว่าสายพันธุ์ที่คัดเลือกมามีความเสถียรในระดับที่น่าพอใจ เมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์การเพิ่มปริมาณ GA_3 จากการกลายพันธุ์ด้วย NTG ทั้งสองครั้ง พบว่ามีแนวโน้มที่จะชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในด้านการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต GA_3 ได้ดีกว่าแสงอัลตราไวโอเลตซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Erokhina (1972) ที่ทดลองเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ NTG และแสงอัลตราไวโอเลต ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของ *Fusarium moniliform* พบว่า NTG สามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ดีกว่าแสงอัลตราไวโอเลตเช่นเดียวกัน

ในงานวิจัยนี้ในขั้นตอนการคัดเลือกสายพันธุ์ ใช้อาหารเหลวสำหรับผลิตจิบเบอเรลลินโดยใช้กากเมล็ดฝ้ายย่อยด้วยกรดกำมะถัน (ศุภชัย สมัปปิโต,2537) ต่อมาเมื่อนำสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่คัดเลือกได้มาเลี้ยงในอาหารเหลวสำหรับผลิตจิบเบอเรลลิน โดยใช้กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วซึ่งเป็นสูตรที่ ศุภชัย สมัปปิโต(2537) ปรับปรุงมาจากสูตรอาหารของ อรไท สุขเจริญ (2533) ซึ่งเพิ่มปริมาณกากถั่วเหลืองจาก 1.90 เป็น 5.90

กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน พบว่าเชื้อมีประสิทธิภาพในการผลิต GA_3 ได้มากกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสำหรับผลิตจิบเบอเรลลินโดยใช้กากเมล็ดฝ้ายย่อยด้วยกรดกำมะถัน เนื่องจากกากถั่วเหลืองซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการสกัดน้ำมันพบว่า มีโปรตีนสูงถึง 44 - 45 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกากเมล็ดฝ้ายซึ่งมีโปรตีนอยู่ 41 เปอร์เซ็นต์ (อุทัย คันโธ,2529) ดังนั้นในการปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อผลิตจิบเบอเรลลิน จึงควรใช้อาหารเหลวสำหรับผลิตจิบเบอเรลลินโดยใช้กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วเป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต GA_3 สายพันธุ์ N9-34 และ UNN-653 ในระดับขวดเขย่าโดยใช้สูตรอาหารที่ใช้กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว โดยปรับปรุงจากสูตรอาหารของ อรไท สุขเจริญ(2533) พบว่าลักษณะเส้นใยและสปอร์ของทั้งสองสายพันธุ์ไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อดูการผลิต GA_3 พบว่าสายพันธุ์ UNN-653 ผลิต GA_3 ได้มากกว่าสายพันธุ์ N9-34 และตั้งแต่วันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงสายพันธุ์ N9-34 จะผลิต GA_3 ได้ค่อนข้างคงที่ แต่สายพันธุ์ UNN-653 จะผลิตเพิ่มขึ้นเรื่อยๆทั้งนี้อาจจะเป็นเพราะว่าการใช้น้ำตาลของสายพันธุ์ UNN-653 หมดช้ากว่าจึงทำให้มีอาหารเพียงพอให้เซลล์สร้างผลิตภัณฑ์ได้มาก และมีช่วงเวลาการผลิตยาวขึ้น นอกจากนี้ประสิทธิภาพของการผลิต GA_3 น่าจะเกี่ยวข้องกับสีน้ำหมักด้วย จากรายงานของ อรไท สุขเจริญ (2533) พบว่าสีแดงของน้ำหมักเป็นไบคาวาริน (bikaverin) ซึ่งปริมาณไบคาวารินขึ้นอยู่กับสภาวะการเลี้ยงเชื้อ และจากการศึกษาของ Bu' Lock และคณะ(1974) พบว่าการผลิตไบคาวารินมีวิถีการผลิตมาจากโพลีคีไทด์ (polyketide) ในขณะที่วิถีการผลิตจิบเบอเรลลินมาจากไดเทอร์ปีน (diterpene) ซึ่งมีอะซีทิล โค เอ (Acetyl Co-A) เป็นสารตั้งต้นร่วมกัน โดยสีน้ำหมักของสายพันธุ์ UNN-653 ไม่เป็นสีแดง ซึ่งแสดงว่ามีการผลิตไบคาวารินต่ำหรือไม่ผลิตเลย จึงไม่มีการแย่งอะซีทิล โค เอ จากกระบวนการสร้าง GA_3 จึงทำให้สายพันธุ์นี้มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกดีขึ้น

เมื่อเปรียบเทียบกับการผลิต GA_3 ของสายพันธุ์ UNN-653 ในถังหมัก 5 ลิตร ในอาหารเหลวสำหรับผลิตจิบเบอเรลลินโดยใช้กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วโดยปรับปรุงจากสูตรอาหารของ อรไท สุขเจริญ(2533) พบว่าสายพันธุ์ UNN-653 ผลิต GA_3 ได้ 1310 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งน้อยกว่าระดับขวดเขย่าคิดเป็น 5.9 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการเพาะเลี้ยงในถังหมักมีการกวนที่รุนแรงอาจทำให้ไมซีเลียมแตกสลายได้ นอกจากนี้ อรไท สุขเจริญ(2533) ยังได้รายงานไว้ว่าปริมาณออกซิเจน ปริมาณน้ำตาล และความเป็นกรดด่างในน้ำหมักระหว่างการเพาะเลี้ยง ล้วนเป็นปัจจัยสำคัญและมีผลต่อการผลิต GA_3 ของสายพันธุ์ C ทั้งสิ้น โดยเฉพาะเมื่อมีการรักษาระดับน้ำตาลรีดิวซ์ให้คงที่ที่ 25 กรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต GA_3 จาก 537 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็น 1023 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนั้นสายพันธุ์ UNN-653 น่าจะมีการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิต GA_3 และมีการรักษาระดับน้ำตาลรีดิวซ์ในถังหมักให้คงที่ต่อไป โดยคาดหวังว่าเมื่อใช้สภาวะที่เหมาะสมแล้วประสิทธิภาพการผลิตน่าจะดีกว่านี้

จากงานวิจัยนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลและแนวทางในการปรับปรุงสายพันธุ์*G.fujikuroi* เพื่อเพิ่มผลผลิตกรดจิบเบอเรลลิกต่อไป การเริ่มต้นชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ควรจะหาเวลาการฉายแสงอัลตราไวโอเลต และความเข้มข้นของNTGที่เหมาะสม เพราะเป็นปัจจัยที่สำคัญในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ เพื่อให้ได้เชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่มีคุณสมบัติตามต้องการในเปอร์เซ็นต์ที่สูง และการมีวิธีคัดเลือกสายพันธุ์ที่รวดเร็วจะทำให้ประสบความสำเร็จในการกลายพันธุ์เนื่องจากงานวิจัยนี้การคัดเลือกสายพันธุ์ต้องทดสอบประสิทธิภาพการผลิต GA_3 ในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า ซึ่งต้องใช้เวลาเลี้ยงเชื้อตั้งแต่บนอาหารแข็งเอียงโพเทโตเด็กซ์โทรส จนกระทั่งมาเลี้ยงในอาหารเหลวแต่ละรอบใช้เวลานาน 21 วัน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการกลายพันธุ์และคัดเลือกสายพันธุ์ได้เพียง 3 รอบเท่านั้น อย่างไรก็ตามการปรับปรุงสายพันธุ์ยังต้องทำอย่างต่อเนื่อง พร้อมๆกับมีการเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้น

เพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพการผลิต GA_3 สูงยิ่งๆขึ้นและได้เชื้อสายพันธุ์ที่ทนอุณหภูมิสูงได้ จากงานวิจัยนี้สามารถสรุปขั้นตอนการปรับปรุงสายพันธุ์ *G. fujikuroi* สายพันธุ์ N9-34 ได้แผนภาพดังต่อไปนี้

G. fujikuroi N9-34 - ปริมาณ GA_3 577 มิลลิกรัมต่อลิตร
↓ UV
505 สายพันธุ์
↓ 1°
34 สายพันธุ์ *
↓ 3°
16 สายพันธุ์
UV-28 - ปริมาณ GA_3 701 มิลลิกรัมต่อลิตร
↓ NTG
546 สายพันธุ์
↓ 1°
88 สายพันธุ์
↓ 2°
13 สายพันธุ์
↓ 3°
5 สายพันธ์
UN-84 - ปริมาณ GA_3 909 มิลลิกรัมต่อลิตร
↓ NTG
789 สายพันธุ์
↓ 1°
133 สายพันธุ์
↓ 2°
17 สายพันธุ์
↓ 3°
12 สายพันธุ์
UNN-653 - ปริมาณ GA_3 1257 มิลลิกรัมต่อลิตร

* หมายเหตุ ยังไม่นำวิธี TLC densitometric มาใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์

หมายเหตุ
1° การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ ด้วยวิธี TLC โดยดูการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์
2° การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ ด้วยวิธี TLC-densitometric
3° การคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ ด้วยวิธี HPLC