บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การวิจัยนี้เป็นการปรับปรุงสายพันธุ์ Gibberella fujikuroi สายพันธุ์ C ให้มีประสิทธิภาพการผลิต GA_3 สูงขึ้น โดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตร้าไวโอเลตและ NTG อย่างต่อเนื่อง ตามด้วยการคัดเลือกสายพันธุ์

ในการปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อรานั้น การเตรียมสปอร์ให้ได้ปริมาณมากเพียงพอเป็นปัจจัยสำคัญปัจจัยหนึ่ง จากปัญหาที่ประสบในการกลายพันธุ์ Gibberella fujikuroi สายพันธุ์ C ด้วยแสงอุลตร้าไวโอเลต ตามการทดลองที่ 3.1 เชื้อราสายพันธุ์ดังกล่าวสร้างสปอร์ได้น้อยมากเมื่อเลี้ยงในอาหาร PDA เสริมแร่ธาตุ ทำให้การเตรียมสปอร์ให้ได้ปริมาณสปอร์มากพอเพื่อจะใช้ในการกลายพันธุ์ ตลอดจนการเตรียมสปอร์เพื่อใช้ในขั้นตอนต่างๆของการคัดเลือกสายพันธุ์ ต้องใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงนาน ทำให้เป็นอุปสรรคต่อการปรับปรุงสายพันธุ์ ในการทดลองที่ 3.1 เมื่อกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตร้าไวโอเลตจึงคัดเลือกสายพันธุ์ได้เพียง 41 สายพันธุ์เท่านั้น ดังนั้นหลังจากเสร็จการทดลองในข้อ 3.1 จึงพยายามแก้ปัญหาการสร้างสปอร์ของสายพันธุ์นี้ โดยปรับปรุงอาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะที่เหมาะสม Saito และ Hori (46) ได้รายงานการเลี้ยงเชื้อ Gibberella zeae บนอาหารวุ้นเปปโตน (peptone agar medium) และบ่มในที่มีแสงสว่าง พบว่า Gibberella zeae สร้างสปอร์ชนิด conidia จำนวนมาก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทดลองเลี้ยง Gibberella fujikuroi สายพันธุ์นี้ในอาหารวุ้นเปปโตนและบ่มในที่สว่าง ความเข้ม 9840 ลักซ์ พบว่าสภาวะดังกล่าวทำให้ Gibberella fujikuroi สร้าง microconidia ได้มากขึ้น ซึ่งเป็นปริมาณที่เพียงพอสำหรับใช้ในการวิจัย ทำให้ขั้นตอนการกลายพันธุ์และการคัดเลือกสายพันธุ์แต่ละรอบใช้เวลาลดลงมาก ดังนั้นการกลายพันธุ์ด้วย NTG ทั้งสองครั้งจึงสามารถคัดเลือกสายพันธุ์ได้ในปริมาณมากขึ้นเป็นลำดับ

Avalos (34) รายงานว่าการบ่มสปอร์ (preincubation) ก่อนการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย NTG จะเพิ่มประสิทธิภาพการกลายพันธุ์ ในการศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับการบ่มสปอร์ของ Gibberella fujikuroi สายพันธุ์ UV4-28 ก่อนการกลายพันธุ์ด้วย NTG พบ

ว่าช่วงเวลาที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 2-5 ชั่วโมง หลังจากนั้นสปอร์จะงอก germ tube และในระยะนี้ อัตราการอยู่รอดจะเพิ่มขึ้น ซึ่งตรงกับรายงานของ Avalos ที่รายงานไว้ว่าหลังจาก 6 ชั่วโมง และ 12 ชั่วโมง สปอร์จะงอก germ tube 80 และ 99 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ในช่วงเวลานี้อัตราการอยู่รอดจะเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด

Koelblin และคณะ(35) พบว่า NTG และ แสงอุลตร้าไวโอเลตเป็นสารก่อการกลายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูง ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะภายนอก รวมทั้งสี (pigment) ของโคโลนี และสีในน้ำหมัก ส่วน Avalos (34) ใช้ NTG ชักนำให้ Gibberella fujikuroi เกิดการกลายพันธุ์และได้คัดเลือกสายพันธุ์ที่สร้าง carotenoid pigment ในปริมาณที่สูง งานวิจัยนี้ ได้ผลสอดคล้องกับรายงานทั้งสอง กล่าวคือหลังจากกลายพันธุ์ Gibberella fujikuroi ด้วยแสงอุลตร้าไวโอเลตหรือ NTG จะพบสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่มีการเปลี่ยนแปลงทางด้านสีของเส้นใย ส่วนใหญ่เป็นสีม่วงอ่อนถึงม่วงแดงเข้ม หรือมีการเจริญช้า ตลอดจนสายพันธุ์ที่มีการสร้างสีในอาหารเหลวซึ่งจะผลิตสารสีแดงถึงแดงเข้ม สีเหลือง และสีส้ม หรือไม่มีการสร้างสีในน้ำหมักเลย ในขณะที่สายพันธุ์ดั้งต้นสร้างสีชมพูอ่อนในอาหารเหลว จากการสังเกตการสร้างสีเหล่านี้ในอาหารเหลวไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับประสิทธิภาพการผลิต GA_3 เลย

เนื่องจากไม่พบรายงานที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง การเปลี่ยนแปลงลักษณะภายนอกของสายพันธุ์กลายพันธุ์กับประสิทธิภาพการผลิต GA_3 ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงทำการศึกษาความสัมพันธ์ดังกล่าว ในการกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตร้าไวโอเลตตามการทดลองที่ 3.1 และการกลายพันธุ์ด้วย NTG ในการทดลองที่ 3.2.2 เมื่อแบ่งกลุ่มตามการเปลี่ยนแปลงลักษณะภายนอกของสายพันธุ์กลายพันธุ์ ตามสีของเส้นใย ลักษณะโคโลนี และการเจริญ แบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม พบว่าลักษณะภายนอกดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับประสิทธิภาพการผลิต GA_3 โดยสายพันธุ์ที่มีเส้นใยสั้น การเจริญช้า ผิวหน้าโคโลนีเรียบแบนเหมือนผ้าสักหลาด มีโอกาสพบสายพันธุ์ที่ผลิต GA_3 เพิ่มขึ้นน้อยมาก โดยในการทดลองที่ 3.1.3 ไม่พบสายพันธุ์ที่ผลิต GA_3 เพิ่มขึ้นเลย ส่วนการทดลองที่ 3.2.4 มีโอกาสพบเพียง 3.4 เปอร์เซนต์เท่านั้น ส่วนสายพันธุ์ที่มีเส้นใยสีม่วงอ่อนถึงม่วงแดงเข้ม ผิวหน้าโคโลนีหยัก การเจริญปานกลาง มีโอกาสพบสายพันธุ์ที่ผลิต GA_3 เพิ่มขึ้น 10 และ 7.3 เปอร์เซนต์ตามลำดับ แต่กลุ่มที่มีลักษณะเหมือนหรือใกล้เคียงกับสายพันธุ์ดั้งต้น เส้นใยยาวฟู การเจริญเร็ว จะมีโอกาสพบสายพันธุ์ที่ผลิต GA_3 เพิ่มขึ้นมากที่สุด คือพบ 18.2 และ 17.6 เปอร์เซนต์ ในการทดลองที่ 3.2.4 และ 3.3.2 ตามลำดับ ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าการคัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์เพื่อ

เพิ่มประสิทธิภาพการผลิต GA_3 สามารถใช้ลักษณะภายนอก (morphology) เป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกเบื้องต้นได้

เมื่อเปรียบเทียบการตรวจสอบประสิทธิภาพการผลิต GA_3 ด้วยการใช้ TLC กับการวิเคราะห์หาปริมาณ GA_3 ด้วย HPLC ตามผลการทดลองข้อ 3.4 พบว่าวิธีตรวจสอบปริมาณ GA_3 ด้วย TLC มีประสิทธิภาพพอที่จะใช้เป็นวิธีคัดเลือกสายพันธุ์ชั้นปฐมภูมิได้ แต่ถ้าจะให้ได้ผลที่มีความแม่นยำสูง จะต้องใช้ความระมัดระวังในเทคนิคอย่างมาก คือต้องควบคุมขนาดของจุดให้มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2 มิลลิเมตร การที่จุดมีขนาดใหญ่และมีปริมาณมากเกินไปจะมีผลทำให้การแยกไม่ดี ต้องมีการควบคุมตัวแปรจากการทดลองให้เป็นมาตรฐานเดียว ตัวแปรดังกล่าวได้แก่ ธรรมชาติของตัวดูดซับ ธรรมชาติของเฟสเคลื่อนที่ ความหนาและความสม่ำเสมอของตัวดูดซับ อุณหภูมิรอบระบบตัวทำละลายอิ่มตัว (environmental temperature) ปริมาณสารตัวอย่าง สมดุลความดันไอระหว่างแผ่น TLC กับบรรยากาศในถัง เป็นต้น (41)

อย่างไรก็ตาม เมื่อทดลองชักนำให้สปอร์ของเชื้อรา Gibberella fujikuroi เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตร้าไวโอเลต สลับกับ NTG สามารถคัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพการผลิต GA_3 เพิ่มขึ้นจากสายพันธุ์ดั้งเดิมได้ โดยสายพันธุ์ C ซึ่งเป็นสายพันธุ์ดั้งเดิม มีประสิทธิภาพการผลิต GA_3 สูงสุด 546 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 13 ของการเพาะเลี้ยง สายพันธุ์ UV4-28 ได้จากการกลายพันธุ์สปอร์ของสายพันธุ์ C ด้วยแสงอุลตร้าไวโอเลต มีประสิทธิภาพการผลิต GA_3 574 มิลลิกรัมต่อลิตร มากกว่าสายพันธุ์ C 5.1 เปอร์เซนต์ นอกจากนี้สายพันธุ์ C ยังสามารถผลิต ไบคาวาริน ทำให้น้ำหมักเป็นสีแดง (17) เป็นปัญหาในขั้นตอนการสกัดและการทำให้บริสุทธิ์ วิธีการกลายพันธุ์สามารถใช้ประโยชน์ในการกำจัด co-metabolite ที่ไม่ต้องการในน้ำหมักได้ (47) สายพันธุ์ UV4-28 ผลิตสีแดงในน้ำหมักน้อย จึงเหมาะสมที่จะใช้เป็นสายพันธุ์ดั้งเดิมในการกลายพันธุ์ต่อไป สายพันธุ์ 08-19 ได้จากการนำสปอร์ของสายพันธุ์ UV4-28 มาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย NTG มีประสิทธิภาพการผลิต GA_3 722 มิลลิกรัมต่อลิตร มากกว่าสายพันธุ์ UV4-28 25.7 เปอร์เซนต์ และมากกว่าสายพันธุ์ C 32.2 เปอร์เซนต์ สายพันธุ์ N6-3 N7-54 และ N9-34 ได้จากการนำสปอร์ของสายพันธุ์ 08-19 มาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วย NTG มีประสิทธิภาพการผลิต GA_3 850 852 และ 884 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ หรือผลิตเพิ่มจากสายพันธุ์ C 55.6 56 และ 62 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณ GA_3 ที่สายพันธุ์ N9-34 ผลิตได้ในระดับขวดเขย่ากับการผลิตในถังหมักขนาด 5 ลิตร ในวันที่ 13 ของการเพาะเลี้ยง พบว่าการเพาะเลี้ยงในถังหมักผลิต GA_3 เพิ่มขึ้นจากการผลิตในขวดเขย่าประมาณ 11 เปอร์เซนต์ ทั้งนี้เป็นเพราะการเพาะเลี้ยงในถังหมักสามารถใช้อัตราการกวนที่สูง ทำให้มีการถ่ายเทอากาศและสารอาหารได้ดีกว่าในระดับขวดเขย่า อย่างไรก็ตาม อรไท สุขเจริญ (17) ได้รายงานว่า ปริมาณออกซิเจน ปริมาณน้ำตาล และความเป็นกรดด่างในน้ำหมักระหว่างการเพาะเลี้ยง ล้วนเป็นปัจจัยสำคัญและมีผลต่อการผลิต GA_3 ของสายพันธุ์ C ทั้งสิ้น โดยเฉพาะเมื่อมีการรักษาระดับน้ำตาลรีดิวส์ในถังหมักให้คงที่ที่ 25 กรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต GA_3 จาก 537 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็น 1023 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนั้นถ้ามีการเพาะเลี้ยงสายพันธุ์ N9-34 ในถังหมัก โดยรักษาระดับน้ำตาลรีดิวส์ในถังหมักให้อยู่ในความเข้มข้นที่เหมาะสมเช่นเดียวกับงานของอรไท (17) น่าจะทำให้ประสิทธิภาพการผลิต GA_3 เพิ่มขึ้นได้ อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์ที่ผ่านการกลายพันธุ์แล้ว อาจมีการเจริญและความต้องการสารอาหารต่างไปจากสายพันธุ์ดั้งต้น เพื่อให้สายพันธุ์ใหม่มีประสิทธิภาพการผลิตผลิตภัณฑ์สูง จำเป็นต้องหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับสายพันธุ์ใหม่ ดังนั้นควรมีการวิจัยอย่างละเอียดเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับสายพันธุ์ N9-34 ต่อไป

ผลงานวิจัยนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลและเป็นแนวทางในการปรับปรุงสายพันธุ์ Gibberella fujikuroi เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต GA_3 ต่อไป การกลายพันธุ์และการคัดเลือกพันธุ์เป็นวิธีที่สามารถเพิ่มผลผลิตของ GA_3 ได้ตามวัตถุประสงค์ของงานวิจัย เนื่องจากการคัดเลือกสายพันธุ์แต่ละรอบมีปริมาณงานมากและต้องใช้เวลานาน เพราะต้องมีการสกัดสารที่ผลิตได้ของแต่ละสายพันธุ์ซึ่งมีหลายขั้นตอนก่อนที่จะนำมาวิเคราะห์ด้วย HPLC ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการกลายพันธุ์และคัดเลือกได้ 3 รอบเท่านั้น อย่างไรก็ตามการปรับปรุงสายพันธุ์นี้ยังต้องมีการทำอย่างต่อเนื่องอีกเพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงยิ่งๆขึ้น