บทที่ 4

บทวิจารณ์

ในการทดลองกลายพันธุ์เชื้อรา Penicillium chrysogenum เพื่อเพิ่มผลผลิตเพนิซิลิน จี นี้ ทำการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ 3 ครั้ง โดยใช้แสงอุลตราไวโอเลตเป็นสารชักนำเริ่มต้น (35,36,37) กับสปอร์ของเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ A 88 ตามด้วยการใช้สารเคมี NTG ในครั้งที่สองและสาม (32,36) กับสปอร์ของเชื้อราที่กลายพันธุ์และคัดเลือกแล้วว่ามีประสิทธิภาพในการเพนิซิลลิน จี สูงกว่าเชื้อราสายพันธุ์ตั้งต้น

การใช้แสงอุลตราไวโอเลตชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์จะขึ้นกับปัจจัยพื้นฐานหลายประการ ปัจจัยส่วนมากได้แก่ ความเข้มของแสงอุลตราไวโอเลต ระยะห่างระหว่างสปอร์กับแหล่งแสง ฯลฯ เชื้อแต่ละชนิดปัจจัยเหล่านี้มักจะไม่แตกต่างกัน ปัจจัยหลักที่สำคัญคือ เวลา จะแตกต่างกันขึ้นกับความไวของเชื้อแต่ละชนิด เวลายิ่งมากขึ้น เปอร์เซนต์รอดของสปอร์ยิ่งลดต่ำลง (32,35,36,37) จึงต้องเจือจางสปอร์ที่ผ่านการฉายแสงอุลตราไวโอเลตแล้วให้มีความหนาแน่นที่เหมาะสมก่อนนำมากระจายลงบนอาหารแข็ง เพื่อให้มีจำนวนโคโลนีเจริญขึ้นประมาณ 1-300 โคโลนีต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (34) สปอร์ที่ผ่านการฉายแสงเป็นเวลานาน มีเปอร์เซนต์รอดต่ำ ดังนั้น จำนวนสปอร์เริ่มต้นก่อนนำมากระจายจึงควรมีความหนาแน่นมากกว่าปกติ (35,36) ในการทดลองใช้ความหนาแน่นของสปอร์ 1×10^7 สปอร์ต่อมล. ฉายแสงอุลตราไวโอเลตไวโอเลต 0-180 วินาที มีเปอร์เซนต์รอดของสปอร์อยู่ในช่วง 100-0.70% โดยก่อนกระจายสปอร์ลงบนอาหารแข็งโพเตโตเด็กซ์โตรส ต้องเจือจางสปอร์ที่ผ่านการฉายแสงอุลตราไวโอเลตไวโอเลต 0-165 วินาที ให้มีความหนาแน่นของสปอร์ประมาณ 1,000 สปอร์ต่อมล. ส่วนสปอร์ที่ผ่านการฉายแสงอุลตราไวโอเลต 180 วินาที ต้องเจือจางให้มีความหนาแน่นของสปอร์ประมาณ 10,000 สปอร์ต่อมล. เนื่องจากที่เวลา 180 วินาที ของการฉายแสงอุลตราไวโอเลตกับสปอร์เชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ A 88 มีเปอร์เซนต์รอดเพียง 0.70% ถ้าเจือจางสปอร์ให้มีความหนาแน่นประมาณ 1,000 สปอร์ต่อมล. จะไม่พบสปอร์ที่รอดและเจริญเป็นโคโลนีของเชื้อรา ดังนั้น เพื่อให้พบสปอร์ที่รอดและเจริญเป็นโคโลนีของเชื้อราในแต่ละจานอาหารเลี้ยงเชื้อได้อย่างเหมาะสม จึงต้องเจือจาง

สปอร์ที่ผ่านการฉายแสงอุลตราไวโอเลต 180 วินาที ให้มีความหนาแน่นมากกว่าที่ช่วงเวลาอื่นประมาณ 10 เท่า หรือประมาณ 10,000 สปอร์ต่อมล.

ปัจจัยหลักที่สำคัญในการใช้สารเคมี NTG เป็นสารชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ คือ ความเข้มข้น Hopwood (35) รายงานว่า ความเข้มข้นของ NTG ยิ่งมาก เปอร์เซนต์รอดของสปอร์ยิ่งลดต่ำลง ดังนั้น เมื่อใช้ NTG ที่มีความเข้มข้นสูงกับสปอร์ของเชื้อราต้องเจือจางสปอร์ให้มีความหนาแน่นที่เหมาะสมก่อนนำมากระจายลงบนอาหารแข็งที่ใช้เลี้ยงในการทดลอง ใช้ความหนาแน่นของสปอร์เริ่มต้น $1x10^{6}$ สปอร์ต่อมล. เติมสารละลาย NTG ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายอยู่ในช่วง $1x10^{-3}$ ถึง $1x10^{-2}$ โมลาร์ หยุดปฏิกิริยาของ NTG โดยล้างสปอร์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง ในขั้นตอนล้างสปอร์นี้ ทำให้มีการสูญเสียสปอร์ไปจำนวนหนึ่ง จึงไม่สามารถคำนวณเปอร์เซนต์รอดที่แน่นอนของสปอร์ได้ เพื่อลดความผิดพลาดในขั้นตอนนี้ ในการทดลองจึงนำสปอร์ชุด (control) หรือสปอร์ที่ไม่ผ่านการเติมสารละลาย NTG มาทำการทดลองตามวิธีการทดลองข้อ 3.2 บทที่ 2 ทุกขั้นตอน หลังจากสปอร์เจริญเป็นโคโลนีของเชื้อราแล้ว จะคำนวณเปอร์เซนต์รอดของสปอร์ โดยใช้จำนวนโคโลนีของสปอร์ควบคุมเป็นจำนวนโคโลนีตั้งต้น NTG ในช่วงความเข้มข้น $1x10^{-3}$ ถึง $1x10^{-2}$ โมลาร์ สปอร์จะมีเปอร์เซนต์รอดต่ำ ดังนั้น ในช่วงความเข้มข้นดังกล่าว จึงต้องมีความหนาแน่นของสปอร์มากกว่าที่ช่วงความเข้มข้นอื่นประมาณ 10 เท่า หรือประมาณ 10,000 สปอร์ต่อมล. ในขณะที่ช่วงความเข้มข้นอื่นใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้นประมาณ 1,000 สปอร์ต่อมล. จึงสามารถพบจำนวนโคโลนีที่เหมาะสมในแต่ละจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี NTG NTG สามารถเข้าจับกับสปอร์ได้อย่างรวดเร็ว โดยทั่วไป เวลาที่ NTG สามารถเข้าจับกับสปอร์ได้อย่างสมบูรณ์ ใช้เวลาประมาณ 15 นาที (35,39) เมื่อ NTG เข้าจับกับสปอร์ NTG จะให้หมู่อัลคิล (CH_3) 1 หมู่ แก่เบสเพียวรินที่บริเวณ replication fork ของดีเอนเอที่กำลังจำลองตัวทันที ดังนั้น ถ้าต้องการประสบความสำเร็จในการชักนำสปอร์ให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี NTG เป็นสารชักนำ สปอร์ของเชื้อราที่นำมาใช้ควรอยู่ในสภาพเตรียมงอก (pregerminated) ก่อน (37,39) ตามรายงานของ Tien, W. (43) ทำสปอร์ให้อยู่ในสภาพเตรียมงอกโดยบ่มสปอร์ของเชื้อรา Penicillium chrysogenum ที่แขวนลอยในอาหารเพาะเลี้ยง ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 ชั่วโมง มีการกวนตลอดเวลา ก่อนเติมสารละลาย NTG ลงไป ในการทดลองได้ทำการทดลองตามวิธีการทดลองข้อ 3.2

บทที่ 2 โดยผันแปรเวลาที่ใช้ในการทำสปอร์ให้อยู่ในสภาพเตรียมงอกตั้งแต่ 0,30,60, 120,180,240,300 และ 360 นาที พบว่า ที่ช่วงเวลา 0-300 นาที สปอร์มีเปอร์เซนต์รอดค่อนข้างสูงและไม่เป็นไปตามสัดส่วนกับความเข้มข้นที่ใช้ นอกจากนี้ เชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่ได้ยังมีความหลากหลายของลักษณะภายนอกน้อย และตรวจสอบไม่พบเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี ได้สูงกว่าเชื้อราสายพันธุ์ดั้งต้น การทำสปอร์ให้อยู่ในสภาพเตรียมงอกโดยบ่มสปอร์เป็นเวลา 360 นาที หรือ 6 ชั่วโมง ก่อนเติมสารละลาย NTG พบว่า สปอร์ของเชื้อรามีเปอร์เซนต์รอดเป็นไปตามสัดส่วนกับความเข้มข้นที่ใช้ คือ ความเข้มข้นมาก เปอร์เซนต์รอดยิ่งต่ำลง พบความหลากหลายของลักษณะภายนอกของโคโลนีและสามารถตรวจพบเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี สูงกว่าเชื้อราสายพันธุ์ดั้งต้น

ในการทดลอง เชื้อราที่มีลักษณะภายนอกแตกต่างไปจากเชื้อราสายพันธุ์ดั้งต้นส่วนมากจะมีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี เท่ากับ หรือน้อยกว่าเชื้อราสายพันธุ์ดั้งต้น ซึ่ง Rogers,S.D. และ Holt,G.(44) รายงานว่า การกลายพันธุ์เป็นการชักนำให้พันธุกรรมหรือดีเอนเอเกิดการเปลี่ยนแปลงแบบสุ่ม ดีเอนเอส่วนที่มีการเปลี่ยนแปลงไปอาจมีหรือไม่มีผลต่อการผลิตเพนิซิลลิน จี แต่การที่ลักษณะภายนอกของเชื้อรามีความแตกต่างไปจากเชื้อราสายพันธุ์ดั้งต้น จะเป็นส่วนหนึ่งที่แสดงให้ทราบว่าพันธุกรรมบางส่วนของเชื้อราดังกล่าวมีการเปลี่ยนแปลงไป Ball, C. และ Mc Gonagle, M.P. (45) รายงานว่า เชื้อราที่มีลักษณะภายนอกเปลี่ยนแปลงไป มักมีประสิทธิภาพในการผลิตลดลง

Backus, M.P. และคณะ และ Sikyta,B. (25,36) รายงานว่า สภาวะที่สามารถพบเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตผลิตภัณฑ์ที่ต้องการสูงกว่าเชื้อราสายพันธุ์ดั้งต้นได้มากกว่าที่ช่วงสภาวะอื่น สภาวะดังกล่าวจะเป็นสภาวะที่เหมาะสมในการชักนำให้เชื้อราสายพันธุ์ดังกล่าวเกิดการกลายพันธุ์ ในการทดลองใช้แสงอุลตราไวโอเลตชักนำสปอร์ของเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ A 88 ให้เกิดการกลายพันธุ์ พบว่า ที่เวลา 120 วินาที ของการฉายแสง มีเปอร์เซนต์รอดของสปอร์ 3.11% พบเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี สูงกว่าเชื้อราสายพันธุ์ดั้งต้นได้มากกว่าที่ช่วงเวลาอื่น ดังนั้น เวลาที่ 120 วินาที ของการฉายแสงอุลตราไวโอเลตจึงเป็นเวลาที่เหมาะสมในการชักนำให้สปอร์ของเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ A 88 เกิดการกลายพันธุ์ ส่วนการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์กับสปอร์ของเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CU 1 และ CN 1 โดยใช้สารเคมี NTG เป็น

สารชักนำในครั้งที่สองและสาม พบว่า NTG ที่ความเข้มข้น $5x10^{-4}$ โมลาร์ มีเปอร์เซนต์รอดของสปอร์ 29.71% และ 27.59% พบเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี สูงกว่าเชื้อราสายพันธุ์ตั้งต้นได้มากกว่าที่ช่วงความเข้มข้นอื่น ดังนั้น NTG เข้มข้น $5x10^{-4}$ โมลาร์ จึงเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการชักนำให้สปอร์ของเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CU 1 และ CN 1 เกิดการกลายพันธุ์ ตามการทดลองของ Tien, W. ซึ่งทดลองชักนำให้สปอร์ของเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ M-134 เกิดการกลายพันธุ์ โดยใช้สารเคมี NTG เป็นสารชักนำ พบว่า NTG เข้มข้น $5x10^{-4}$ โมลาร์ เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์กับเชื้อราดังกล่าว เพราะสามารถพบเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่เกิดการกลายพันธุ์แล้วมีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี สูงขึ้นมากกว่าที่ช่วงความเข้มข้นอื่น (43)

เมื่อทดลองชักนำให้สปอร์ของเชื้อรา Penicillium chrysogenum เกิดการกลายพันธุ์ โดยใช้แสงอุลตราไวโอเลตสลับกับการใช้สารเคมี NTG แล้ว พบว่าสามารถคัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์ใหม่มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี สูงกว่าเชื้อราสายพันธุ์ตั้งต้นได้ โดยพบว่า เชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ A 88 ซึ่งเป็นเชื้อราสายพันธุ์ตั้งต้น มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี สูงสุด 0.95 กรัมต่อลิตร เชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CU 1 ซึ่งคัดเลือกได้จากการชักนำสปอร์ของเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ A 88 ให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยฉายด้วยแสงอุลตราไวโอเลตเป็นเวลา 120 วินาที มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี สูงสุด 1.19 กรัมต่อลิตร มากกกว่าเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ A 88 1.25 เท่า เชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CN 1 ซึ่งคัดเลือกได้จากการชักนำสปอร์ของเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CU 1 ให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยใช้สารเคมี NTG เข้มข้น $5x10^{-4}$ โมลาร์ มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี สูงสุด 1.79 กรัมต่อลิตร มากกกว่าเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CU 1 1.50 เท่า และมากกว่าเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ A 88 1.88 เท่า เชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CNN 1 ซึ่งคัดเลือกได้จากการชักนำสปอร์ของเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CN 1 ให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยใช้สารเคมี NTG เข้มข้น $5x10^{-4}$ โมลาร์ มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี สูงสุด 3.65 กรัมต่อลิตร มากกกว่าเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CN 1

2.04 เท่า มากกกว่าเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ CU 1 3.07 เท่า และมากกว่าเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ A 88 3.84 เท่า

ในการทดลองครั้งนี้จึงเป็นขั้นตอนที่สำคัญขั้นหนึ่ง ในการพยายามเพิ่มผลผลิตเพนิซิลลิน จี เพื่อให้สามารถผลิตเพนิซิลลิน จี ในแต่ละครั้งได้จำนวนมากขึ้น ตามวัตถุประสงค์ของการทดลอง นอกจากวิธีการกลายพันธุ์และคัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์ใหม่มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี เพิ่มขึ้นแล้วยังต้องอาศัยวิธีการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงและผลิตเพนิซิลลิน จี ของเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ด้วย จึงจะได้ปริมาณเพนิซิลลิน จี มากขึ้นตามความสามารถในการผลิตของเชื้อราสายพันธุ์ใหม่

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย