บทที่ 1

บทนำ

1. ประวัติความเป็นมา

เพนิซิลลิน เป็นยาปฏิชีวนะที่รู้จักแพร่หลายกันมานาน และเป็นยาปฏิชีวนะตัวแรกของโลก ถูกค้นพบอย่างบังเอิญในเดือนกันยายน ปี ค.ศ. 1928 โดยนักวิทยาศาสตร์ชาวอังกฤษ Dr.Alexander Fleming (1881-1955) ซึ่งเป็นศาสตราจารย์ทางด้านแบคทีเรียที่มหาวิทยาลัยประเทศอังกฤษ ในระหว่างที่เฟลมมิ่งกำลังทำงานวิจัยให้กับโรงพยาบาลเซนต์แมรี่นั้น เขาได้สังเกตเห็นอาหารแข็งที่เลี้ยงแบคทีเรีย Staphylococcus (แบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลมอยู่รวมกันเหมือนพวงองุ่น เป็นสาเหตุให้เกิดการอักเสบและอาหารเน่าเสีย) มีเชื้อราสีเขียวเจริญปนเปื้อนอยู่ โดยทั่วไปกลุ่มโคโลนีของ Staphylococcus มีการเจริญเป็นปกติ ยกเว้นบริเวณที่อยู่ใกล้โคโลนีของเชื้อราสีเขียวจะไม่มีการเจริญของ Staphylococcus เกิดขึ้น ทำให้เห็นเป็นบริเวณใส (clear zone) หรือบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) รอบๆ โคโลนีรา (1,2,3,4) เฟลมมิ่งคิดว่าเชื้อรานี้น่าจะปล่อยสารบางอย่างที่สามารถทำลาย Staphylococcus ออกมา เขาจึงเพาะเลี้ยงเชื้อรา และตรวจสอบสารประกอบที่เชื้อราปล่อยออกมากับแบคทีเรียชนิดต่างๆ พบว่า สารที่เชื้อราปล่อยออกมารอบๆ โคโลนีสามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค (pathogenic bacteria) ต่างๆ ได้ (1,4,5,6) เฟลมมิ่งจึงจำแนก (identify) เชื้อราสีเขียวนี้เป็น Penicillium notatum และเรียกสารที่เชื้อราผลิตและปล่อยออกมาว่า "เพนิซิลลิน" (penicillin) (1,2)

ในปี ค.ศ. 1932 Clutterbuck และคณะ ไม่ประสบผลสำเร็จในการทดลองสกัดแยกเพนิซิลลินออกมา เนื่องจากใช้อีเทอร์ในการสกัด ทำให้เพนิซิลลินสูญเสียคุณสมบัติในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย (7) ต่อมาในปี ค.ศ. 1938 Chain และคณะ ได้ประสบความสำเร็จในการสกัดแยกเพนิซิลลิน และทำให้บริสุทธิ์ได้บางส่วน (partial purification) เมื่อนำเพนิซิลลินที่สกัดได้มาใช้ทดสอบในสัตว์ทดลองก็ได้ผลเป็นที่น่าพอใจ (8)

ในเดือนกรกฎาคม ปี ค.ศ.1941 เริ่มมีโรงงานผลิตยาเพนิซิลลินขึ้นเป็นแห่งแรกในประเทศสหรัฐอเมริกา โดย Northern Regional Research Laboratory (NRRL) เมือง Peoria มลรัฐอิลลินอยส์ มี Kluyver และ Perguin ให้การสนับสนุนในการผลิต โดยเพาะเลี้ยง Penicillium notatum สายพันธุ์ NRRL 1249.B21 (สายพันธุ์เดียวกับที่เฟลมมิ่งค้นพบ) บนผิวหน้าของอาหารแข็ง (surface culture) เป็นเวลา 5-10 วัน การเพาะเลี้ยงโดยวิธีนี้จะแยกสกัดเพนิซิลลินออกจากอาหารได้ค่อนข้างยุ่งยาก เมื่อนำของเหลวใต้ชั้นเชื้อรา (liquid underlying the culture) มาหาปริมาณเพนิซิลลิน จะได้ผลผลิตเพนิซิลลินประมาณ 10-20 หน่วยต่อมล. (1 หน่วย มีค่าเท่ากับ 0.0006 มก. ของเบนซิลเพนิซิลลิน (เพนิซิลลิน จี) บริสุทธิ์ในรูปเกลือโซเดียม) นำมาใช้ประโยชน์ทางด้านเคมี ยา และคลินิค (6,9,10,11) ต่อมา NRRL ได้พัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงมาเป็นแบบ submerge culture คือ เลี้ยงในอาหารเหลว ซึ่งวิธีนี้จะง่ายในการแยกสกัดเพนิซิลลินออกจากอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง โดยอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงในวิธีนี้ประกอบด้วย แป้งที่ถูกย่อยสลายแล้ว (hydrolyzed starch) แลคโตส (lactose) และคอร์นสตีปลิเคอร์ (corn steep liquor) (12)

ในปี ค.ศ. 1942 Raper และ Alexander แยกเชื้อราสีเขียวสายพันธุ์ใหม่ได้จากแตงแคนตาลุป และจำแนกเชื้อราใหม่นี้เป็น Penicillium chrysogenum ให้ชื่อสายพันธุ์ว่า NRRL 1951 (6,10,11,13) มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลินได้ประมาณ 100 หน่วยต่อมล. (6) ต่อมาเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ NRRL 1951 นี้ได้กลายเป็นเชื้อราสายพันธุ์ตั้งต้นที่ใช้ในการผลิตเพนิซิลลินในระดับอุตสาหกรรมในปัจจุบัน โดยทาง USDA (United States Department of Agriculture) ได้ให้ความสนใจและสนับสนุนในการผลิตเพนิซิลลินในระดับอุตสาหกรรมอย่างจริงจัง จึงศึกษาค้นคว้าและให้ข้อเสนอแนะต่างๆ ในการผลิตเพนิซิลลินในระดับอุตสาหกรรมตลอดมา (6,9)

ในปี ค.ศ. 1943 ประสบผลสำเร็จในการนำเพนิซิลลินมาใช้รักษาผู้ป่วยในสงครามโลกครั้งที่ 2 (12,13) ในกลางปีเดียวกัน Raper และ Alexander ได้คัดเลือกพบเชื้อที่เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเอง (spontaneous mutation) จากเชื้อราสายพันธุ์ NRRL 1951 และให้ชื่อว่า NRRL 1951.B25 มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลินได้ประมาณ 250 หน่วยต่อมล. ซึ่งมากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นประมาณ 2-3 เท่า (6,9,10,11,16,17,18) แต่เชื้อราสายพันธุ์ใหม่นี้สร้างสารสี (pigment) สีเหลืองที่เรียกว่า chrysogenin หรือ penitrinic acid (สูตรโมเลกุล $C_{18}H_{22}O_6$) ลงใน

อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ทำให้ไม่เหมาะในการผลิตเพนิซิลลินเพื่อใช้ในการรักษาโรค (6) Raper และ Alexander จึงพยายามแยกเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลินได้มากกว่าเชื้อราสายพันธุ์ NRRL 1951.B25 แต่ไม่ประสบผลสำเร็จ (9, 10,11) USDA จึงร่วมมือกับสถาบัน Carnigie มหาวิทยาลัย Minnesota และมหาวิทยาลัย Wisconsin หันมาใช้วิธีชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในเชื้อรา เพื่อคัดเลือกหาเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลินได้มากขึ้น สารชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutagen) ตัวแรกที่นำมาใช้ คือ รังสีเอ็กซ์ (X-ray) โดย Dr. Demerec และคณะ ทดลองฉายรังสีเอ็กซ์กับสปอร์ของเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ NRRL 1951.B25 แล้วคัดเลือกได้เชื้อราสายพันธุ์ใหม่ ให้ชื่อว่า X-1612 (6,9,11,16,17,19,20,21,22,23,24) มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลินได้ประมาณ 500 หน่วยต่อมล. (6)

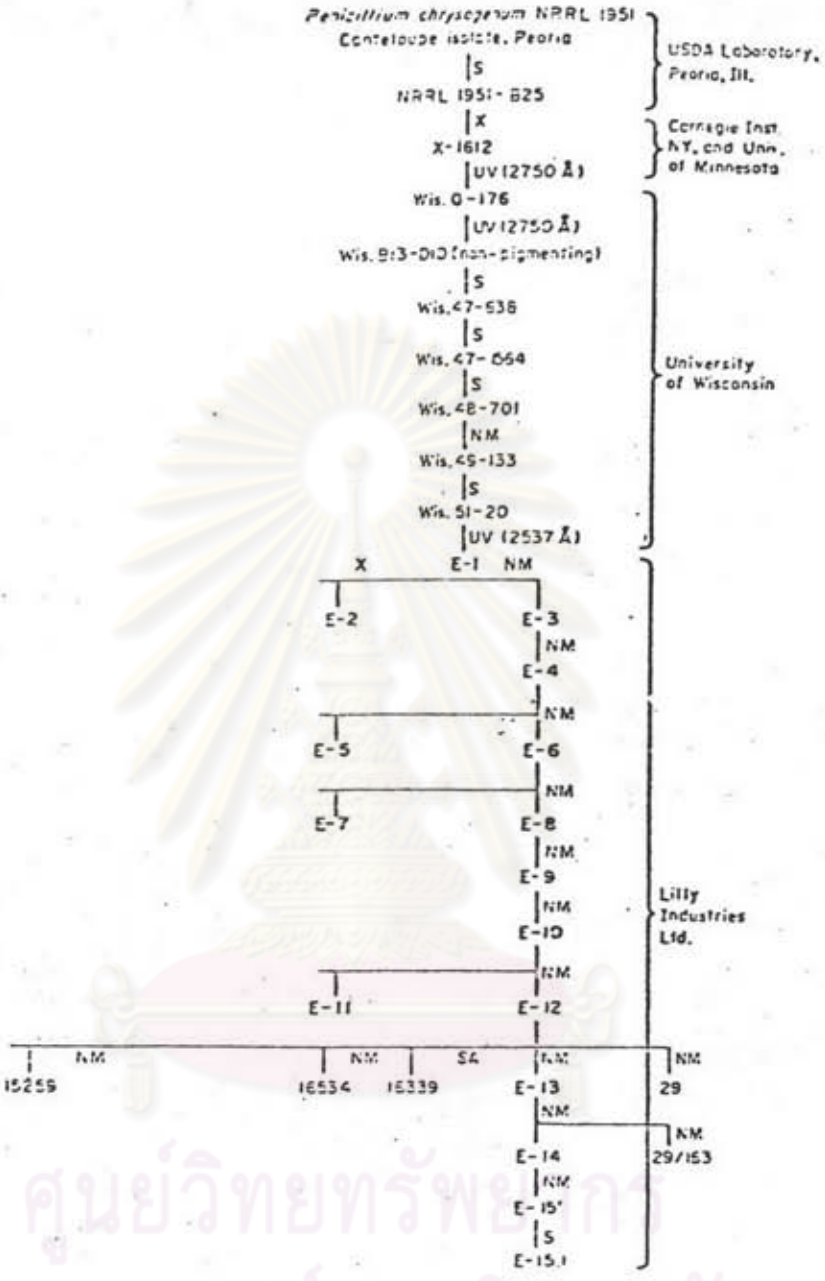
ในปี ค.ศ. 1945 Backus และ Stauffer แห่งมหาวิทยาลัยวิสคอนซิน ทดลองนำสปอร์ของเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ X-1612 มาฉายรังสีอุลตราไวโอเลต (Ultraviolet irradiation, UV) ที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร ทำการคัดเลือกได้เชื้อราสายพันธุ์ Wis Q-176 มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลินได้ประมาณ 920 หน่วยต่อมล. และไม่สร้างสีลงในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง (6, 11,16,25,26,27) จากนั้น ทางมหาวิทยาลัยวิสคอนซินจึงใช้เชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ Wis Q-176 นี้เป็นเชื้อราสายพันธุ์ตั้งต้นในการชักนำให้เกิดกลายพันธุ์ในการทดลองครั้งต่อไป (6,11) และในปี ค.ศ. 1945 นี้เองที่พบว่า เชื้อราสามารถสังเคราะห์เพนิซิลลิน (natural penicillin) ได้หลายชนิด แต่เพนิซิลลินที่มีคุณสมบัติในการทำลายเชื้อแบคทีเรียจะมีเพียงชนิดเดียว คือ เพนิซิลลิน จี (2) จึงมีการศึกษาค้นคว้าต่อจน ปี ค.ศ. 1948 พบว่า ถ้าเติมสารตั้งต้น (precursor) ที่เหมาะสม (เช่น กรดฟีนิลอะซิติก (phenylacetic acid; PAA หรืออนุพันธุ์อื่นๆ) ลงในอาหารเพาะเลี้ยง จะสามารถเปลี่ยนเพนิซิลลินที่จุลชีพสร้างให้กลายมาเป็นเพนิซิลลิน จี หรือเพนิซิลลินชนิดต่างๆ ได้มากกว่า 100 ชนิด ตามสารตั้งต้นที่เติม แต่มีเพนิซิลลินเพียง 2 ชนิด ที่ใช้รักษาโรคได้ คือ เพนิซิลลิน จี และ เพนิซิลลิน วี (2,11,12,13,28,29,30) หลังจากนั้นทางมหาวิทยาลัยวิสคอนซินยังคงทำการทดลองชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์และคัดเลือก (mutation and selection) อย่างต่อเนื่องเรื่อยมา โดยใช้ทั้งรังสี เช่น รังสีเอ็กซ์ (X-ray) รังสีอุลตราไวโอเลต (Ultravioler, UV) รังสีแกรมมา (ɣ-ray)

เป็นต้น และสารเคมีต่างๆ เช่น nitrogen mustard และ sarcolysine (p-di (2-chloroethyl) aminophenylanine) เป็นต้น ผลจากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ทำให้คัดเลือกได้เชื้อราสายพันธุ์ใหม่เป็นจำนวนมากที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลินได้มากกว่าเชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ NRRL 1951 หลายเท่า ดังเช่น เชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ NRRL 1951 มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลินได้ประมาณ 100 หน่วยต่อมล. หรือ 0.06 กรัมต่อลิตร เชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ E-15.1 มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลินได้ประมาณ 1,200 หน่วยต่อมล. หรือ 0.72 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในภาพที่ 1 และในปี ค.ศ. 1982 เชื้อราที่ใช้ผลิตเพนิซิลลินในระดับอุตสาหกรรมมีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลินได้ถึง 85,000 หน่วยต่อมล. หรือ 51 กรัมต่อลิตร (1)

ในปัจจุบันพบว่า ฤทธิ์ของยาเพนิซิลลิน จี สามารถทำลายแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวกและแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบที่มีรูปร่างกลม นอกจากนี้ยังสามารถทำลายเชื้อ Clostridia sp., Corynebacterium diphtheriae ซึ่งเป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรคคอตีบ (diphtheria) Bacillus sp. และ Treponema pallidum ซึ่งเป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรคซิฟิลิส (syphilis) ในคน (4,14,15)

เชื้อราที่สามารถผลิตเพนิซิลลินได้นอกเหนือจาก P.notatum P.chrysogenum สายพันธุ์ต่างๆ แล้ว ยังมี Aspergillus sp. (2) Trichophyton sp. และ Epidermophyton sp. (13)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

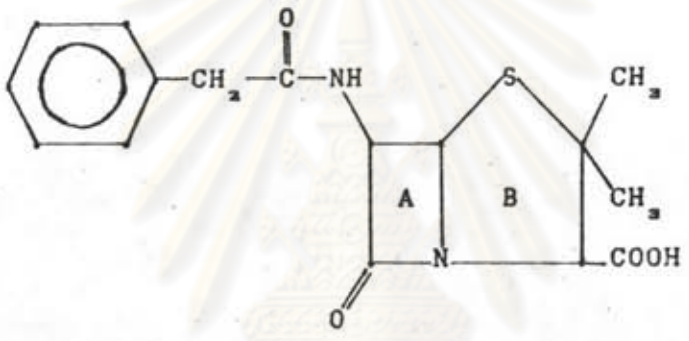


ภาพที่ 1 สายพันธุ์ของเชื้อรา Penicillium chrysogenum ที่ถูกชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์อย่างต่อเนื่อง (S คือ natural selection; UV, ultraviolet radiation; X, X-radiation; NM, nitrogen mustard; and SA, sarcolysine (p-di(2-chloroethyl)aminophenylalanine) (3)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. คุณสมบัติทางเคมี

โครงสร้างของโมเลกุลเพนิซิลลินประกอบด้วย 2 ส่วนหลักที่สำคัญ ได้แก่ ส่วนที่เป็นนิวเคลียส คือ โมเลกุลของกรด 6-อะมิโนเพนิซิลลานิก (6-aminopenicillanic acid, 6-APA) และส่วนหมู่ข้างเคียง (side chain group) (4,13) 6-APA จะประกอบด้วย 2 ส่วนสำคัญ คือ วงแหวนไธอาโซลิดีน (thiazolidine ring) และวงแหวนเบตาแลคแตม (betalactam ring) เชื่อมติดกัน ดังแสดงในภาพที่ 2 (2) น้ำหนักโมเลกุลของเพนิซิลลิน จี บริสุทธิ์ในรูปเกลือโซเดียม เท่ากับ 356.38 activity 1667 หน่วยต่อมก. (4)



หมู่ข้างเคียง กรด 6-อะมิโนเพนิซิลลินิก

A = วงแหวนเบตาแลคแตม (betalactam ring)

B = วงแหวนไธอาโซลิดีน (thiazolidine ring)

หมู่ข้างเคียงของเพนิซิลลิน จี คือ หมู่ฟินิล (phenyl group)

ภาพที่ 2 โครงสร้างของโมเลกุลของเพนิซิลลิน จี (benzyl penicillin)

นิวเคลียสของเพนิซิลลินเป็นส่วนที่สำคัญในการออกฤทธิ์ของยา ถ้าส่วนนิวเคลียสในโมเลกุลถูกทำลายโดยทางเคมีหรือถูกเปลี่ยนแปลงไปแล้ว ฤทธิ์ของยาที่มีต่อจุลชีพจะสูญเสียไปหมด (3)

ส่วนของเบตาแลคแตมในนิวเคลียสเป็นส่วนที่สังเคราะห์ขึ้นได้ยาก แต่เป็นส่วนที่แยกออกจากนิวเคลียสได้ง่ายที่สุด ส่วนของเบตาแลคแตมเป็นส่วนที่คงความมั่นคงของโมเลกุล เพราะเป็นส่วนที่มีความไวต่อกระบวนการสลายโดยกรดหรือด่าง ดังนั้น เมื่อให้รับประทานยาเพนิซิลลิน ยาจะถูกทำลายในกระเพาะอาหารเนื่องจากถูกสลายโดยกรดในกระเพาะอาหาร ยาที่ไม่ถูกดูดซึมในกระเพาะอาหารจะถูกทำลายที่ลำไส้ส่วนต้น เนื่องจากบริเวณนี้มีฤทธิ์เป็นด่าง (4)

ความเป็นกรด-ด่างมีผลต่อเพนิซิลลิน เพนิซิลลินนี้จะมีความเสถียรที่ช่วงความเป็นกรด-ด่าง 6-7 เท่านั้น นอกจากนี้พวกสารโลหะหนักจะเพิ่มการทำลายยาเพนิซิลลินในร่างกาย จึงมักมีการเติมสารอีดีทีเอ (EDTA) ลงในสารละลายยาเพนิซิลลิน เพื่อดึงโลหะหนักออกมาจากยา

นอกจากความเป็นกรด-ด่างแล้ว เอนไซม์เพนิซิลลาเนส (penicillanase) ยังสามารถทำลายยาเพนิซิลลินได้ โดยเอนไซม์จะแยกส่วนวงแหวนเบตาแลคแตมออกจากเพนิซิลลินที่ตำแหน่ง C-N ดังนั้น อาจเรียกเอนไซม์นี้ว่า เอนไซม์เบตาแลคแตมเมส (betalactamase)

ความสามารถในการละลายของเพนิซิลลินแต่ละชนิดขึ้นกับลักษณะของแขนเอซิล (acyl side chain) ที่มาเกาะกับ 6-APA และแคทไอออน (cation) ที่อยู่ในรูปเกลือของเพนิซิลลิน (2,3)

3. <u>การปรับปรุงสายพันธุ์</u>

จุลชีพสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type strains) มักให้ผลผลิตต่ำ เพื่อเป็นการลดต้นทุนการผลิต โดยทั่วไปจะพัฒนาสายพันธุ์จุลชีพที่มีความสำคัญทางอุตสาหกรรมด้วยวิธีปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อเพิ่มผลผลิตให้สูงขึ้นเท่าที่จะทำได้ (2) แนวทางในการปรับปรุงสายพันธุ์มักอาศัยเทคนิคพื้นฐาน 2 วิธี คือ การตัดต่อยีน และการกลายพันธุ์ (33)

เทคนิคการตัดต่อยีน เป็นเทคนิคที่เหมาะสมสำหรับการกลายพันธุ์จุลชีพที่ทราบถึงพื้นฐานทางพันธุกรรม (genetic background) รวมถึงกระบวนการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการแล้วเป็นอย่างดี (33,34) แต่เพนิซิลลินเป็นผลผลิตทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่ผลิตโดยเชื้อรา Penicillium chrysogenum นี้ ยังมีข้อมูลดังกล่าวน้อยมาก จึงไม่สามารถที่จะนำเทคนิคดังกล่าวเข้ามาใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์

โดยปกติ วิธีที่นิยมใช้และประสบความสำเร็จในการเพิ่มผลผลิตยาปฏิชีวนะมากที่สุด คือ การกลายพันธุ์กับจุลชีพที่ผลิตยาปฏิชีวนะนั้น ซึ่งสามารถชักนำได้หลายวิธีโดยใช้สารชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutagen) ได้แก่ รังสี หรือ สารเคมีต่างๆ วิธีนี้สามารถเพิ่มผลผลิตให้มากขึ้นจากเดิมได้ 2-4 เท่า ถ้าทำการชักนำอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 3-4 ปี และสามารถเพิ่มผลผลิตให้มากกว่าเดิมได้ 10-20 เท่า ถ้าทำการชักนำอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 10 ปี ขึ้นไป (31,32,34)

ในอดีต ผลผลิตเพนิซิลลิน จี ในระดับอุตสาหกรรมมีค่าน้อยกว่า 100 หน่วยต่อมล. (3) Dr.Demerec แห่งมหาวิทยาลัยวิสคอนซิน เริ่มศึกษาและทดลองกลายพันธุ์ขึ้นเป็นครั้งแรกใน ปี ค.ศ. 1945 โดยใช้รังสีเอ็กซ์เป็นตัวชักนำตัวแรก ดังแสดงในภาพที่ 1 โดยทำการทดลองกลายพันธุ์และคัดเลือกพันธุ์อย่างต่อเนื่องจนถึง ปี ค.ศ. 1953 จึงสามารถคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อรา Penicillium chrysogenum ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลินจี ได้ประมาณ 2,500 หน่วยต่อมล. (3,11,32) ต่อมามีผู้ให้ความสนใจเป็นจำนวนมากเข้าร่วมทำการทดลองปรับปรุงสายพันธุ์ตลอดจนหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตและพัฒนากระบวนการผลิต ปัจจุบันในระดับอุตสาหกรรมสามารถผลิตเพนิซิลลินจี ได้มากกว่า 85,000 หน่วยต่อมล. หรือประมาณ 51 กรัมต่อลิตร (2,31)

งานวิจัยนี้ ใช้เทคนิคการกลายพันธุ์ เพื่อปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อราที่สามารถผลิตเพนิซิลลิน จี ได้ โดยใช้เชื้อรา Penicillium chrysogenum สายพันธุ์ A 88 เป็นสายพันธุ์ตั้งต้น ชักนำให้เกิดกลายพันธุ์โดยใช้แสงอุลตราไวโอเลตสลับกับการใช้สารเคมี NTG คาดว่าจะสามารถชักนำให้เชื้อราสายพันธุ์ดังกล่าวเกิดการกลายพันธุ์เป็นเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี ได้สูงขึ้น

4. สารชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

การกลายพันธุ์ คือ การเปลี่ยนแปลงพันธุกรรม ซึ่งอาจเกิดขึ้นได้เอง (spontaneous mutation) หรือถูกชักนำให้เกิดขึ้น และการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นสามารถถ่ายทอดต่อไปได้ โดยปกติแล้วการกลายพันธุ์เองตามธรรมชาติ จะมีอัตราการเกิดที่ค่อนข้างต่ำ คือ มีน้อยกว่า 1 ในล้านเซลล์ ดังนั้น ถ้าต้องการเซลล์ที่เกิดการกลายพันธุ์ในอัตราที่สูงขึ้นและง่ายต่อการคัดเลือก ต้องอาศัยสารชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ซึ่งแบ่งเป็น 2 พวกใหญ่ๆ คือ สารรังสี และสารเคมี การเลือกใช้สารชักนำดังกล่าว จะขึ้นกับความสะดวกในการใช้ และโอกาสของผลสำเร็จที่จะได้รับ ถ้าต้องการประสบผลสำเร็จในการคัดเลือกเชื้อที่เกิดการกลายพันธุ์แล้ว มักจะใช้สารชักนำมากกว่า 1 ชนิด หรือที่เรียกว่า เป็นการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำ (repeated mutation) สารชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ทุกชนิดมักมีอันตราย ดังนั้น ในการทดลองจึงต้องทำด้วยความระมัดระวัง

4.1 สารรังสีที่ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ (radiation mutagens)

แบ่งออกเป็น 2 พวก คือ

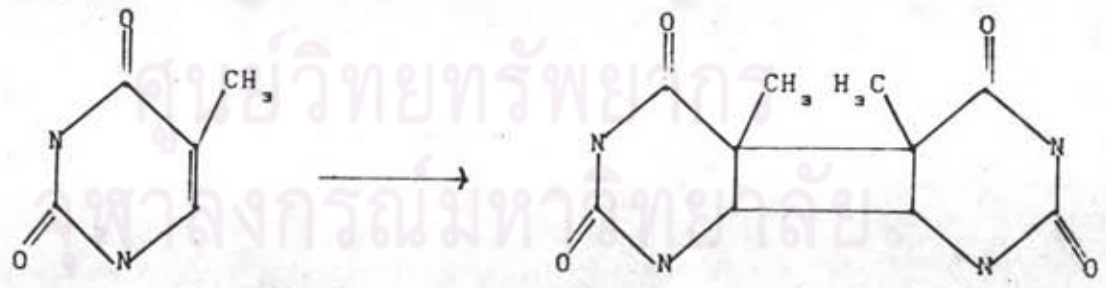
4.1.1 Ionizing radiations

ได้แก่ รังสีเอ็กซ์ รังสีแกรมา นิวตรอน และอนุภาคต่างๆ ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยทำให้โครโมโซมแตก (breakage) และทำให้โครงสร้างโครโมโซมเปลี่ยนแปลงไป ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์แบบ translocations และ inversions (35)

4.1.2 แสงอุลตราไวโอเลต

แสงอุลตราไวโอเลตเป็น physical mutagen ที่ใช้กันอย่างกว้างขวาง เพราะง่าย และสะดวกในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้อย่างดี เมื่อเลือกใช้ในช่วงเวลา ระยะห่างจากแหล่งแสง และความเข้มแสงที่พอเหมาะ สปอร์ที่ผ่านการฉายแสงอุลตราไวโอเลตแล้วเมื่อเจริญเป็นโคโลนีจะสามารถมองเห็นการเปลี่ยนแปลงของโคโลนีได้อย่างชัดเจน เช่น สีสปอร์ของราบางชนิดจะหมดไป จึงนิยมนำแสงอุลตราไวโอเลตมาใช้กันบ่อยๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ใช้เริ่มในงานปรับปรุงสายพันธุ์ (strain development) (35,36,37) แสงอุลตราไวโอเลตที่มีประสิทธิภาพเหมาะในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ต้องเป็นแสงอุลตราไวโอเลตที่ปล่อยพลังงานออกมาในช่วงความยาวคลื่นสั้นเท่านั้น ความยาวคลื่นดังกล่าวอยู่ในช่วงระหว่าง 200-300 นาโนเมตร

แหล่งแสงที่ใช้ควรปลดปล่อยพลังงานออกมาได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 253.7 นาโนเมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นที่เหมาะให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ดีที่สุด เพราะเป็นความยาวคลื่นที่ดีเอนเอสามารถดูดกลืนคลื่นแสงเข้าไปในกรดนิวคลีอิกได้สูงสุด ทำให้เกิดความผิดปกติบนสายดีเอนเอ (34,35,36) แสงอุลตราไวโอเลตที่ถูกดีเอนเอดูดกลืนเข้าไปนี้จะเป็นสาเหตุให้เกิดความผิดปกติกับเบสไพริมิดีน ทำให้เบสไพริมิดีน 2 ตัว ที่อยู่ชิดกันบนสายดีเอนเอเดียวกัน หรืออยู่ตรงข้ามกันเข้ามาเชื่อมอยู่ชิดกัน (dimerization) ด้วยพันธะโควาเลนท์ (covalent bond) เกิดเป็น thymine-thymine dimer, (ดังแสดงในภาพที่ 3) thymine-cytosine dimer หรือ cytosine-cytosine dimer ในอัตราส่วน 2:1:1 (37) หรือกรณีที่เกิดไดเมอร์บนสายดีเอนเอเดียวกันแล้วเป็นสาเหตุให้เกิดการบิดตัวของ double helix ไปจนเสียรูป ทำให้เกิดไดเมอร์บนสายดีเอนเอที่อยู่ตรงข้ามได้ ไดเมอร์จะมีผลต่อการจำลองตัวของดีเอนเอ เพราะพันธะโควาเลนท์ที่เกิดจะทำให้สายดีเอนเอทั้ง 2 สาย แยกออกจากกันไม่ได้ ดีเอนเอจึงจำลองตัวไม่ได้ เมื่อดีเอนเอต้องการจำลองตัวจะมีกลไกเข้ามาช่วยซ่อมแซม จึงอาจทำให้เกิดความผิดพลาดได้จากการนำเอาเบสคู่ใหม่เข้ามาแทนที่ ผลจากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้แสงอุลตราไวโอเลตนี้ ส่วนใหญ่จะเกิดการกลายพันธุ์แบบ GC-->AT ซึ่งเป็นการกลายพันธุ์แบบ transition mutations และอาจพบ transversion mutations, frameshift mutations และ deletions ได้ (31,32,35,36,37)

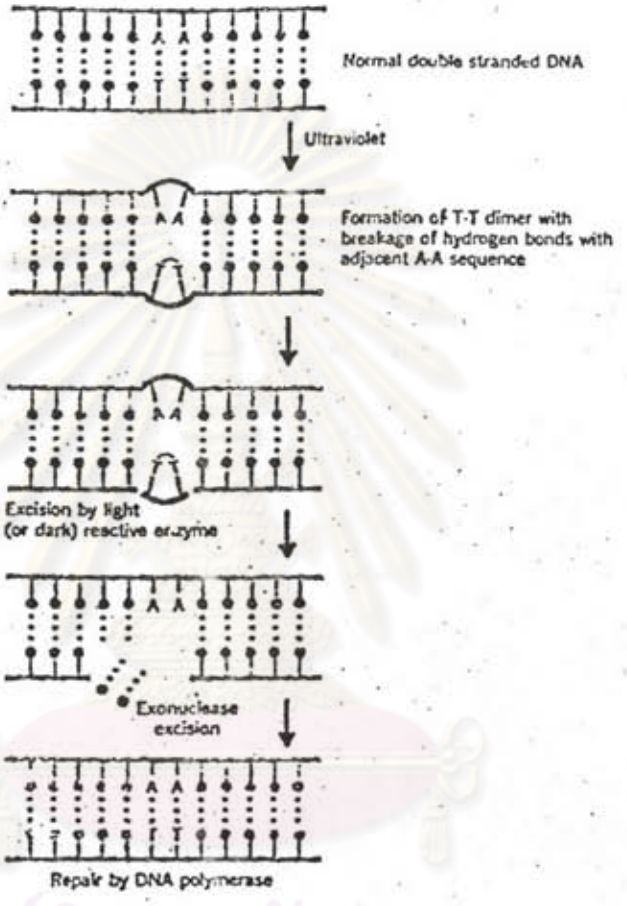


Thymine Thymine dimer

ภาพที่ 3 thymine-thymine-cyclobutane dimer ที่เกิดจากการฉายแสงอุลตราไวโอเลต (34,38)

ความผิดปกติของเบสที่เกิดจากแสงอุตราไวโอเลตนี้ สามารถทำให้กลับคืนสู่สภาพปกติได้ โดยนำสปอร์ที่ผ่านการฉายแสงอุลตราไวโอเลตแล้วไปฉายกับ visible light (แสงช่วงความยาวคลื่น 300-450 นาโนเมตร เช่น แสงแดด แสงจากหลอดฟลูโอเรสเซนท์) ปรากฏการณ์นี้เรียกว่า "photoreactivation" ซึ่งต้องอาศัยเอนไซม์เข้าช่วย เอนไซม์นี้จะทำงานโดยอาศัยแสงเป็นตัวกระตุ้นเข้าไปตัดไดเมอร์ให้ขาดออกกลายเป็นโมโนเมอร์ของเบสไพริมิดีน ไดเมอร์มากกว่า 80% ในจีโนม (genome) รวมทั้ง cross link ที่เกิดจากแสงอุลตราไวโอเลตจะสามารถเกิด photoreactivation ได้ ระบบการซ่อมแซมนี้จะไม่มีความผิดพลาด ดังนั้น ถ้าเกิดปรากฏการณ์ดังกล่าว จะไม่สามารถพบการกลายพันธุ์เกิดขึ้นได้เลย ในการทดลอง การป้องกันไม่ให้ค่าเปอร์เซนต์รอดของจุลชีพ หรือความถี่ของการกลายพันธุ์ผิดไปจากความเป็นจริง ต้องพยายามไม่ให้สปอร์ที่ผ่านการฉายแสงอุลตราไวโอเลตแล้วถูกแสงที่มีความยาวคลื่นในช่วง visible light ทันที ตั้งแต่เริ่มมีการฉายแสงอุลตราไวโอเลต เพื่อไม่ให้เกิดปฏิกิริยา photoreactivation ในสิ่งมีชีวิตต่างกัน ความยาวคลื่นแสงที่จะทำให้เกิดปฏิกิริยา photoreactivation จะต่างกัน เช่น ความยาวคลื่น 375 นาโนเมตร มีผลต่อ E.coli ความยาวคลื่น 453 นาโนเมตร มีผลต่อ Streptomyces griseus เป็นต้น แต่พออนุโลมได้ว่า ที่ความยาวคลื่น 525 นาโนเมตร จะมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยา photoreactivation ได้น้อย หลังการฉายแสงอุลตราไวโอเลต อาจทำการทดลองในขั้นตอนต่อๆ ไปโดยทำการทดลองภายใต้หลอดไฟสีเหลือง หรือทำในห้องมืดที่มี wrattern number 0B เป็นตัวกรอง ในห้องใหญ่ๆ อาจใช้ sodium vapour lamp ซึ่งปล่อยพลังงานที่ 589 นาโนเมตร ซึ่งเป็นหลอดไฟที่ใช้กับไฟถนนได้ (35,37)

ในระบบเซลล์เบสไพริมิดีนที่เกิดไดเมอร์เป็นสาเหตุใหญ่ของการตายและการบาดเจ็บของเซลล์ โดยเกิดการเปลี่ยนแปลงหลายขั้นตอน ในภาพที่ 4 แสดงกลไกการซ่อมแซมดีเอนเอที่เกิดไดเมอร์ คือ หนึ่ง ปรากฏการณ์ photorepair หรือ photoreactivation ซึ่งอาศัยเอนไซม์ที่ขึ้นกับแสง (visible light) ด้วย สอง คือ pyrimidine dimer จะถูกตัดออกจากดีเอนเอโดยกลไกการซ่อมแซมแบบ excision โดยเกิดเป็น nicked หรือช่องว่างก่อนหน้าตำแหน่งที่เกิดไดเมอร์ และมีการเติมให้เต็มโดย polynuclease action กลไกการซ่อมแซมทั้งสองเกิดจากการจำลองตัวของดีเอนเอที่มีประสิทธิภาพ และกลไกที่สาม คือ post reactivation repair เกิดขึ้นหลังจากมีการสังเคราะห์ดีเอนเอ เนื่องจาก replication fork ไม่สามารถแยก pyrimidine dimer ออก



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 4 แผนภาพการทำงานของแสงอุลตราไวโอเลตต่อการเกิด T^T dimers บนสายดีเอนเอ และการซ่อมแซมตัวเองของสายดีเอนเอภายหลังจากถูก visible light (34)

จากกันทำให้เกิดช่องว่างทางด้านซ้ายของดีเอนเอ และช่องว่างนั้นจะถูกเติมให้เต็มด้วยการแลกเปลี่ยนดีเอนเอจาก isopolar parental strand ของ sister molecule ที่บาดเจ็บ จึงเรียกว่า recombination repair หรือ daughter strand gap repair (34)

โดยทั่วไป การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต จะได้ผลมาก-น้อยขึ้นกับ

1 ความเข้มของแสง
2 ระยะเวลาที่ได้รับแสง
3 ระยะทางระหว่างแหล่งแสงกับจุลชีพ
4 ระยะและสภาพการเจริญของจุลชีพ
5 จำนวนจุลชีพ
6 สภาพการเจริญของจุลชีพ
และอื่นๆ

แสงอุลตราไวโอเลตที่นิยมใช้จะเป็นชนิด low-pressure mercury vapour หรือ germicidal lamp กำลังงาน 15 วัตต์ ปล่อยคลื่นแสง 253.7 นาโนเมตร ระยะเวลาที่ฉายแสงอยู่ในช่วง 30 วินาที ถึง 20 นาที ทั้งนี้ขึ้นกับความไว (sensitivity) ของจุลชีพแต่ละชนิด โดยระยะห่างระหว่างแหล่งแสงกับจุลชีพอย่างน้อย 20 ซม. ขึ้นไป ความหนาแน่นของสปอร์เริ่มต้น 1×10^7 สปอร์ต่อมล. (32,36,37) เปอร์เซนต์รอดที่เชื่อว่าจะพบจุลชีพสายพันธุ์ใหม่ที่เกิดการกลายพันธุ์ได้มากอยู่ในช่วงที่มีเปอร์เซนต์รอดระหว่าง 0.01-5.00% (30,33,34,35,36) เปอร์เซนต์รอดที่ได้จะต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นกับเวลาที่ใช้ในการฉายแสง เวลายิ่งเพิ่มมาก เปอร์เซนต์รอดยิ่งน้อยลง (37) สัดส่วนดังกล่าวเกือบเป็นเส้นตรง จนถึงช่วงหนึ่งที่เวลาที่ใช้มากขึ้นแต่อัตรารอดน้อยลงในสัดส่วนที่ต่ำ ทำให้สัดส่วนดังกล่าวผิดไป (35,37) ในขณะเดียวกัน ความร้อนที่เกิดจากการฉายแสงจะมีส่วนทำให้จุลชีพอ่อนแอและทำให้ค่าเปอร์เซนต์รอดที่ได้น้อยกว่าค่าที่ควรจะเป็นจริง ในระหว่างการฉายแสงควรมีการกวนสปอร์เบาๆ ตลอดเวลา เพื่อให้แสงส่องผ่านสปอร์ได้อย่างทั่วถึง การควบคุมแสงจะทำโดยการเปิด-ปิดฝาจานใส่อาหารเพาะเลี้ยง (petri dish plate) ที่ใส่สปอร์อยู่ จะไม่ใช้วิธีเปิด-ปิดไฟจากหลอดแสงอุลตราไวโอเลต (37)

นิยมใช้แสงอุลตราไวโอเลตเป็นสารชักนำตัวแรกในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ และเมื่อคัดเลือกได้จุลชีพสายพันธุ์ใหม่ที่ให้ผลผลิตสูงขึ้นก็สามารถนำมาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำอีก 2-3 ครั้ง โดยใช้สลับกับสารชักนำตัวอื่นๆ เช่น NTG (32,36)

4.2 สารเคมีที่ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ (chemical mutagens)

มีสารประกอบทางเคมีเป็นจำนวนมากที่ใช้เป็นสารชักนำ แต่มีสารเพียง 2-3 ชนิด เท่านั้นที่เหมาะสม สะดวกในการนำมาใช้งานเป็นประจำอย่างกว้างขวาง สารชักนำที่ดีและนิยมใช้มักจะมีการวางแนวทาง และเงื่อนไขในการใช้ไว้แล้ว แต่แนวทางและเงื่อนไขดังกล่าวไม่สามารถนำมาใช้ได้อย่างเฉพาะเจาะจงกับสิ่งมีชีวิตทุกชนิด

สารเคมีที่ใช้ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์จะแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มตาม mode of action ดังนี้

1 กลุ่มที่ทำให้เบสบนสายดีเอนเอ 1 ตัว หรือมากกว่านั้นเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมี ทำให้ดีเอนเอจำลองตัวเองไม่ได้ หรือมีการแปรเปลี่ยนเบสบนสายดีเอนเอ สารดังกล่าวได้แก่ nitrous acid และสารกลุ่ม alkylating agent

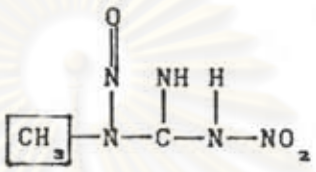
2 กลุ่มที่ทำให้เบสที่มีลักษณะใกล้เคียงกันบนสายดีเอนเอเกิดการเปลี่ยนแปลงทำให้การจำลองแบบของดีเอนเอสายใหม่เกิดความผิดพลาด สารดังกล่าวได้แก่ สารกลุ่ม base analogues เช่น 5-bromouridine (BU), 2-aminopurine (AP)

3 กลุ่มที่ทำให้เบสบนสายดีเอนเอเพิ่มขึ้นหรือหายไป 1-2 เบส ในระหว่างการจำลองตัวหรือซ่อมแซมดีเอนเอ สารดังกล่าวได้แก่ สารกลุ่ม frameshift mutagens เช่น acridines IRC compounds (35)

กลุ่มของสารที่มีผลต่อดีเอนเอ คือ กลุ่ม alkylating agent (20) (สารประกอบที่มีหมู่อัลคิล และสามารถย้ายหมู่อัลคิลตั้งแต่ 1 หมู่ ขึ้นไปให้กับโมเลกุลของสารอื่น (36)) เมื่อไม่นับรวมแสงอุลตราไวโอเลตแล้ว สารกลุ่ม alkylating agent จะเป็นสารที่ใช้ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ที่มีความแรงมากที่สุด สารกลุ่มนี้ได้แก่ ethylmethanesulfonate (EMS) methylmethanesulfonate (MMS) diethylsulfate (DES) N-methyl-N-nitro-N'-nitrosoguanidine (NTG) และ nitrogen mustard โดยก่อให้เกิดการกลายพันธุ์แบบ transitions transversions deletions และหรือ frameshift mutations (32,37)

4.2.1 N-methyl-N-nitro-N'-nitrosoguanidine (NTG)

NTG เป็นสารประกอบทางเคมีชนิดหนึ่งที่นิยมใช้กันมากในปัจจุบัน เพราะมีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์สูง เมื่อใช้ภายใต้สภาพที่เหมาะสม (32,35,37,39) สูตรโมเลกุล $C_4H_8N_4O_3$ และมีสูตรโครงสร้าง ดังแสดงในภาพที่ 5 น้ำหนักโมเลกุล 147.1 สามารถละลายน้ำได้สูงสุด 4 มก.ต่อมล. จุดหลอมเหลว 116-118°ซ. สามารถทำงานได้ดีในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่าง 6-9 (35)



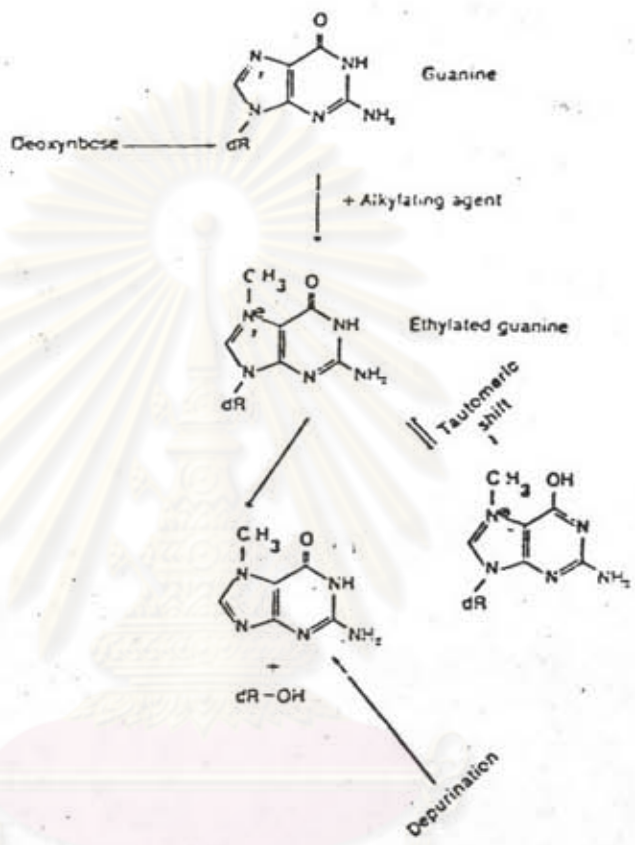
ภาพที่ 5 สูตรโครงสร้างโมเลกุลของ NTG (31)

การทำงานของ nitrosoguanidine หรือ NTG ต้องมีการแตกตัวออกจึงจะเป็นสารชักนำได้ NTG สามารถแตกตัวได้อย่างรวดเร็ว ในสภาวะที่เป็นกรด โดยเฉพาะอย่างยิ่งใน 0.1 M. HCl จะแตกตัวเป็น nitrous acid ถึงแม้ nitrous acid จะเป็นสารชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ชนิดหนึ่งก็ตาม แต่ไม่สามารถทำงานได้ในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่างที่ NTG ทำงานได้ ส่วนสภาวะที่เป็นด่าง NTG จะแตกตัวอย่างรวดเร็วเป็น diazomethane (CH_2N_2) ซึ่งเป็น strong methylating agent แล้วเข้าจับกับสปอร์อย่างรวดเร็ว (32,35,40) NTG จะกลายเป็นสารชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูง เมื่อสลายตัวอย่างรวดเร็วที่ค่าความเป็นกรด-ด่างในช่วง 8-9 นิยมละลาย NTG ใน สารละลาย Tris-maleic acid พีเอช 8.0 ที่อุณหภูมิ 37°ซ. (35) ช่วงเวลาที่ NTG เข้าสัมผัสกับสปอร์นั้นไม่ใช่ปัจจัยหลักที่สำคัญในการทดลอง เพราะ NTG สามารถเข้าจับกับสปอร์ได้อย่างรวดเร็ว แต่ในการทดลอง ควรให้เวลานานพอที่ NTG จะสัมผัสกับสปอร์ได้อย่างสมบูรณ์ (ประมาณ 15 นาที) (35,39) ปัจจัยหลักที่สำคัญของการใช้ NTG เป็นสารชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ คือ ความเข้มข้น ความเข้มข้นของ NTG ยิ่งมาก เปอร์เซนต์รอดของสปอร์ยิ่งต่ำลง จะพบสปอร์ที่กลายพันธุ์ไปแล้วเป็นจำนวนมากที่ช่วงความเข้มข้นที่ให้เปอร์เซนต์รอดของสปอร์อยู่ระหว่าง 0-50% นิยมใช้ความหนาแน่นของสปอร์เริ่มต้นประมาณ 1×10^8 สปอร์ต่อมล. (32,40)

017580

กลไกการทำงานที่แท้จริงในการชักนำให้ดีเอนเอของเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงโดย NTG นั้น ยังไม่เป็นที่เข้าใจกันมากนัก แต่เชื่อว่า NTG มีผลเป็นสารชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพมากกับเซลล์ที่กำลังมีการแบ่งตัวหรือช่วง logarithmic phase (37,39) ในระบบการจำลองตัว NTG จะชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์กับยีนที่อยู่ชิดกันได้หลายแห่ง ซึ่งปรากฏการณ์นี้เรียกว่า co-mutation ทำให้เกิดการจำลองตัวผิดพลาดในช่วงเล็กๆ ของดีเอนเอ ด้วยการเติมหมู่อัลคิล 1 หมู่ (ดังแสดงในภาพที่ 6) ให้กับเบสแล้วชักนำให้คู่เบสที่เกิดการเปลี่ยนแปลงเข้ามาอยู่ที่ replication fork ได้ดีกว่าคู่เบสปกติ (38,39) ทำให้เบสบนสายดีเอนเอเปลี่ยนแปลงไป เมื่อดีเอนเอแม่แบบมีการเปลี่ยนแปลงไปในระหว่างการจำลองตัว ทำให้ดีเอนเอสายใหม่ที่จำลองได้มีดีเอนเอต่างไปจากเดิม (39) ดังนั้น ถ้าต้องการประสบผลสำเร็จในการทดลองกลายพันธุ์โดยใช้ NTG เป็นสารชักนำ ควรทำให้เซลล์หรือสปอร์อยู่ในสภาพเตรียมงอก (pregerminated) ก่อน (37,39) 90% ของการกลายพันธุ์ที่ได้จากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG มักจะเกิด GC-->AT transitions และอาจเกิด deletions frameshift mutations โดยสัดส่วนของคู่เบส GC หายไป (31)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 6 การเติมหมู่อัลคิลให้กับเบสกวานีนซึ่งเกิดจากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG (36)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 สรุปความสามารถในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของแสงอุลตราไวโอเลตกับ NTG (32,36)

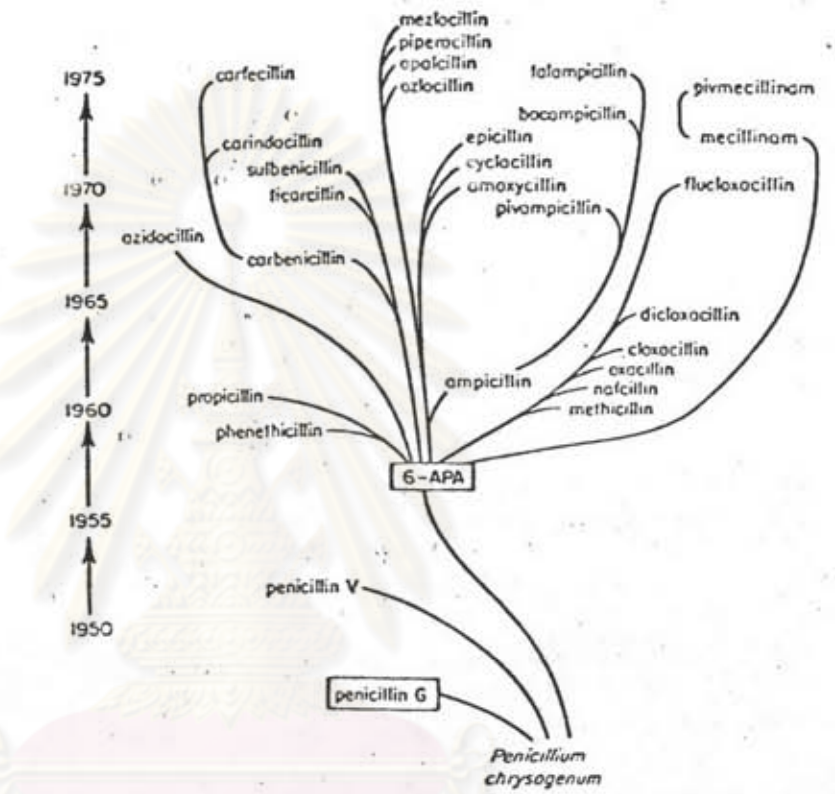
ชนิดของสารชักนำ	กลไกที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์	ประสิทธิภาพ	ผล	หมายเหตุ
UV	เกิดไดเมอร์ของเบสไพริมิดีน	ปานกลาง	GC-->AT transitions อาจเกิด transversions deletions บางครั้งกระตุ้นให้เกิด insertions และ chromosomal rearrangements	ใช้อย่างกว้างขวาง เป็นสารชักนำที่ให้ผลดีในช่วงที่มีระดับรอดต่ำ ต้องระวังการเกิดปฏิกิริยา photoreactivation
NTG	เติมหมู่อัลคิลให้เบสกวานีน ที่ replication fork	สูงมาก	GC-->AT transitions transversions และชักนำให้เกิด deletions ในอัตราต่ำ	เป็นสารชักนำที่ให้ผลดีในช่วงที่มีระดับรอดสูง (0-50%) ชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของดีเอนเอได้หลายตำแหน่ง ต้องใช้ความระมัดระวังในการใช้งาน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. เหตุจูงใจในการทำวิจัย

เพนิซิลลิน จี หรือ เบนซิลเพนิซิลลิน (benzyl penicillin) เป็นยาปฏิชีวนะจากธรรมชาติที่มีความสำคัญทางอุตสาหกรรมยา และมีประโยชน์อย่างมากในทางการแพทย์ แม้ว่าในปัจจุบัน ประสิทธิภาพของการรักษาด้วยยาเพนิซิลลิน จี ได้ลดลง เพราะการดื้อยาของจุลชีพ แต่เพนิซิลลิน จี ก็ยังมีความสำคัญมาก เพราะเป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตยาที่เป็นอนุพันธุ์ของเพนิซิลลิน จี หลายชนิด ซึ่งถูกผลิตขึ้นแบบกึ่งสังเคราะห์ (semisynthetic penicillins) เพื่อนำมาใช้แทนยาเพนิซิลลิน จี อนุพันธุ์ของเพนิซิลลิน จี ที่ผลิตใช้ในปัจจุบันมีหลายชนิด (ดังแสดงตัวอย่างในภาพที่ 7) และมีประสิทธิภาพสูง จึงนิยมใช้กันอย่างกว้างขวางมาก และนับว่าเป็นกลุ่มยาที่มีการใช้มากกว่ายาปฏิชีวนะอื่นๆ ดังนั้น เพนิซิลลิน จี จึงมีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมยามากในฐานะที่เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์อนุพันธุ์ต่างๆ (15) การผลิตเพนิซิลลินจากโรงงานต่างๆ ทั่วโลกใน ปี ค.ศ. 1975 มีปริมาณทั้งสิ้น 35,000 ตัน 80% ของเพนิซิลลินที่ผลิตได้เป็นเพนิซิลลิน จี โดย 57% ของเพนิซิลลิน จี ที่ผลิตขึ้นนั้น ถูกนำมาใช้ในการรักษาและศึกษาทางด้านการแพทย์ 43% ที่เหลือถูกนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเพนิซิลลินกึ่งสังเคราะห์ตัวอื่นๆ ที่มีประโยชน์ต่อทางการแพทย์ของมนุษย์ (14,15,30)

การผลิตเพนิซิลลินต้องอาศัยจุลชีพในการผลิต จุลชีพสายพันธุ์ดั้งเดิมจะให้ผลผลิตต่ำทำให้เพนิซิลลินที่ผลิตได้ในระยะแรกในแต่ละครั้งมีจำนวนน้อย ยาที่ได้จึงมีราคาแพงและไม่เพียงพอต่อการใช้ ดังนั้น จึงต้องศึกษาค้นคว้าหาจุลชีพสายพันธุ์ใหม่ๆ ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลินได้มากขึ้น โดยการปรับปรุงสายพันธุ์และการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต การปรับปรุงสายพันธุ์จะสามารถคัดหาจุลชีพสายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสูงขึ้นจากเดิม เพื่อให้สามารถผลิตเพนิซิลลินในแต่ละครั้งได้ในปริมาณที่มากขึ้น ราคายาถูกลงและเพียงพอต่อการใช้ ดังนั้น โครงงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะคัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเพนิซิลลิน จี ได้มากขึ้น ภายหลังจากชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ และใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาการกลายพันธุ์ต่อไป



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 7 อนุพันธุ์ของเพนิซิลลิน จี ซึ่งถูกผลิตขึ้นแบบกึ่งสังเคราะห์ (15)

6. ขั้นตอนการวิจัย

1 ชักนำให้เชื้อรา Penicillium chyrsogenum เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้แสงอุลตราไวโอเลตและสารเคมี NTG

2 คัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ที่ให้ผลผลิตเพนิซิลลิน จี สูงขึ้น

3 วิเคราะห์ปริมาณเพนิซิลลิน จี ที่ได้ด้วยเครื่องไฮเฟอร์ฟอแม็นซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี (HPLC) (41)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย