บทที่ 4

อภิปรายผลการวิจัยและสรุป

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสร้าง 3α,15β-DHC จาก LCA โดยเชื้อ Absidia sp. BA 16 ในขวดแก้วทรงกรวยพบว่า แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อเพื่อสร้าง 3α,15β-DHC คือแป้งมันสำปะหลังปริมาณ 40 กรัม/ลิตร และโซเดียมไนเตรทปริมาณ 5 กรัม/ลิตร ตามลำดับ จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อเพื่อสร้าง 3α,15β-DHC ซึ่งประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนดังกล่าวพบว่าสามารถสร้าง 3α,15β-DHC ได้ประมาณ 439 มก./ลิตร ในชม. ที่ 48 ของการหมัก เมื่อเปรียบเทียบกับองค์ประกอบของอาหารเหลวที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อการสร้าง 3α,15β-DHC จาก LCA โดยเชื้อ Cunninghamella blakesleeana ST 22 ซึ่งรายงานว่าใช้เดกซ์ตริน ปริมาณ 40 กรัม/ลิตร และแอสพาราจีนปริมาณ 15 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนตามลำดับ สามารถสร้าง 3α,15β-DHC ได้ประมาณ 382 มก./ลิตร ในวันที่ 7 ของการหมัก (11) จะเห็นว่าการใช้เชื้อ Absidia sp. BA 16 ในการสร้าง 3α,15β-DHC มีข้อได้เปรียบกว่า โดยสามารถใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่มีราคาถูกในการเลี้ยงเชื้อ นอกจากนั้นยังสามารถสร้างผลิตภัณฑ์ได้โดยใช้เวลาสั้นกว่าเชื้อ C. blakesleeana ST 22 ถึง 5 วันและได้ผลิตภัณฑ์มากกว่าประมาณ 57 มก./ลิตร

เนื่องจากมีรายงานว่าการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่รวมตัวเป็นเนื้อเดียวกับน้ำ (water miscible organic solvents) บางชนิดช่วยในการละลายสารตั้งต้นประเภทสเตียรอยด์ จะทำให้การสร้างผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้น (11,13-16,24-26) จึงทำการทดลองใช้ตัวทำละลายอินทรีย์บางชนิดช่วยในการละลาย LCA จากการทดลองโดยใช้เซลระยะพักของ Absidia sp. BA 16 พบว่า ไดออกเซนในปริมาณร้อยละ 1 (ปริมาตร/ปริมาตร) เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมที่สุด สามารถสร้าง 3α,15β-DHC ได้เป็นร้อยละ 184 ของปริมาณผลิตภัณฑ์ที่สร้างได้โดยไม่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ (แอคติวิตีสัมพัทธ์) แต่เมื่อใช้ DMSO ในปริมาณร้อยละ 1 (ปริมาตร/ปริมาตร) เป็นตัวทำละลาย LCA ปรากฏว่าไม่สามารถตรวจวัดผลิตภัณฑ์โดยวิธีแกสโครมาโตกราฟ ผลการทดลองนี้แตกต่างจากการสร้าง 3α,15β-DHC โดย C. blakesleeana ST 22 ซึ่งรายงานไว้ว่า DMSO เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมที่สุดในการช่วยละลาย LCA

โดยเมื่อใช้ DMSO ในปริมาณร้อยละ 1 (ปริมาตร/ปริมาตร) ทำให้สร้าง 3α, 15β-DHC ได้เป็นร้อยละ 200 ของปริมาณผลิตภัณฑ์ที่สร้างได้โดยไม่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ ส่วนการใช้ไดออกเซนในปริมาณร้อยละ 1 (ปริมาตร/ปริมาตร) ทำให้สร้าง 3α,15β-DHC ได้เพียงร้อยละ 114 ของปริมาณผลิตภัณฑ์ที่สร้างได้โดยไม่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ (11) ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากในกรณีของ Absidia sp. BA 16 DMSO อาจไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลง LCA ไปเป็น 3α, 15β-DHC แต่ไม่มีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาเดียวกันของเชื้อ C.blakesleeana ST 22 ซึ่งแสดงว่าเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เปลี่ยนแปลง LCA ไปเป็น 3α, 15β-DHC ของเชื้อทั้ง 2 นี้ อาจเป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติแตกต่างกัน

จากการศึกษาการเจริญของเชื้อ Absidia sp. BA 16 ที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวกที่ 1.2) เชื้อจะเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 45^{o} ซ. แต่เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสำหรับการสร้างผลิตภัณฑ์ (ภาคผนวกที่ 1.4) เชื้อจะเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30^{o} ซ. ผลการทดลองดังกล่าวอาจเกิดขึ้นเนื่องจากความแตกต่างขององค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยที่ในอาหารเหลวสำหรับเตรียมหัวเชื้อประกอบด้วยกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน ส่วนอาหารเหลวสำหรับการสร้างผลิตภัณฑ์ ประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนและโซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน รวมทั้งมีเกลือแร่ต่างๆอยู่ด้วยหลายชนิด จึงอาจเป็นไปได้ว่าการที่เชื้อเจริญได้ดีในอาหารทั้งสองชนิดที่อุณหภูมิต่างกัน เนื่องมาจากองค์ประกอบของอาหารที่แตกต่างกันดังกล่าว นอกจากนี้แล้วยังพบว่าการใช้หัวเชื้อซึ่งเจริญที่อุณหภูมิ 30^{o} ซ.มาเลี้ยงในอาหารสำหรับการสร้างผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิ 30^{o} ซ. เชื้อสามารถเจริญได้ดีกว่าเมื่อใช้หัวเชื้อซึ่งเลี้ยงที่อุณหภูมิ 45^{o} ซ. ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากเมื่อถ่ายเชื้อจากอาหารเตรียมหัวเชื้อซึ่งเจริญที่อุณหภูมิ 45^{o} ซ.ไปเลี้ยงในอาหารเหลวที่อุณหภูมิ 30^{o} ซ. เชื้อจะต้องปรับตัวให้เข้ากับอุณหภูมิซึ่งเปลี่ยนแปลงไป ทำให้การเจริญของเชื้อลดลง

เมื่อศึกษาการสร้าง 3α,15β-DHC โดย Absidia sp. BA 16 ที่อุณหภูมิต่างๆ โดยใช้เซลระยะพักพบว่า ในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 30^{o}- 45^{o} ซ. ความสามารถในการสร้างผลิตภัณฑ์ของเชื้อไม่แตกต่างกัน ซึ่งแสดงว่าเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง 3α,15β-DHC ของเชื้อ Absidia sp. BA 16 สามารถทำงานได้ในช่วงอุณหภูมิค่อนข้างกว้างเมื่อเทียบกับ

เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยาแบบเดียวกันของเชื้อ C. blakesleeana ST 22 ซึ่งมีรายงานว่าสามารถทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 33^{o}-40^{o} ซ. (11)

สำหรับความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมสำหรับการสร้าง 3α,15β-DHC นั้นพบว่าการสร้างผลิตภัณฑ์ดังกล่าวเกิดขึ้นได้ดีที่สุดที่พีเอช 8.5 ซึ่งใกล้เคียงกับความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมสำหรับการสร้าง 3α,15β-DHC โดย C. blakesleeana ST 22 คือที่พีเอช 8.4 (11) อย่างไรก็ตามจากการศึกษาผลของการควบคุมความเป็นกรดด่างที่พีเอชต่างๆต่อการเจริญของ Absidia sp. BA 16 ในถังหมักขนาด 5 ลิตรพบว่า ค่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้อคือที่พีเอชระหว่าง 6.0-8.0 ส่วนการควบคุมความเป็นกรดด่างที่พีเอช 8.5 ตลอดการหมักจะทำให้เชื้อเจริญได้ไม่ดี ดังนั้นจึงเลือกทดลองควบคุมความเป็นกรดด่างตลอดการหมักที่พีเอช 8.0 ซึ่งเชื้อสามารถเจริญได้ดีและเป็นค่าพีเอชที่เชื้อสามารถสร้างผลิตภัณฑ์ได้เป็นร้อยละ 65 ของการสร้างผลิตภัณฑ์ที่พีเอช 8.5 เพื่อเปรียบเทียบกับการหมักโดยไม่ควบคุมความเป็นกรดด่าง

จากการศึกษาการเจริญของเชื้อ Absidia sp. BA 16 เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตรโดยไม่ควบคุมความเป็นกรดด่างพบว่า การเจริญของเชื้อมีลักษณะใกล้เคียงกับการเจริญของเชื้อซึ่งเลี้ยงโดยควบคุมความเป็นกรดด่างที่พีเอช 8.0 ตลอดการหมัก แต่ปริมาณของเชื้อที่ได้จะต่ำกว่าการเลี้ยงโดยควบคุมพีเอชดังกล่าวเล็กน้อย และเมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อในการหมักโดยไม่ควบคุมความเป็นกรดด่าง พบว่าค่าพีเอชของอาหารจะค่อยๆเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป โดยในช่วงแรกจะเป็นค่าที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้อ และในช่วงที่ 2 จะเป็นค่าพีเอชซึ่งอยู่ในช่วงที่เหมาะสมสำหรับการสร้างผลิตภัณฑ์ ลักษณะดังกล่าวนี้เป็นลักษณะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อเพื่อการสร้างผลิตภัณฑ์อยู่แล้ว ดังนั้นจึงเลือกศึกษาสภาวะการหมักโดยไม่ควบคุมความเป็นกรดด่าง เพื่อเปรียบเทียบกับการหมักโดยควบคุมความเป็นกรดด่างที่พีเอช 8.0

เมื่อเปรียบเทียบกับการสร้าง 3α,15β-DHC ระหว่างการหมักทั้ง 2 แบบ พบว่าการหมักโดยไม่ควบคุมความเป็นกรดด่าง มีแนวโน้มว่าจะให้ผลิตภัณฑ์สูงสุดได้มากกว่าการหมักโดยควบคุมความเป็นกรดด่างที่พีเอช 8.0 แต่การหมักโดยควบคุมพีเอชที่ 8.0 นี้จะให้ผลิตภัณฑ์สูงสุดเร็วกว่าประมาณ 12 ชม. ดังนั้นเพื่อเป็นการลดต้นทุนที่จะต้องใช้ในการควบคุมความเป็นกรดด่าง การหมักโดยไม่ควบคุมความเป็นกรดด่างจึงน่าจะเป็นวิธีการที่เหมาะสมในการผลิต

3α,15β-DHC โดย Absidia sp. BA 16 ในระดับขยายส่วน

จากการทดลองเติม LCA ลงไปในถังหมักในชม.ที่ 56 ของการหมัก พบว่าทำให้สร้าง 3α,15β-DHC เพิ่มขึ้น นอกจากนั้นเมื่อทดลองเติมไดออกเซนในปริมาณร้อยละ 1 (ปริมาตร/ปริมาตร) ร่วมกับ LCA ในถังหมักในชม.ที่ 56 ของการหมัก จะทำให้การสร้างผลิตภัณฑ์เพิ่มมากขึ้นมากกว่าการเติม LCA เพียงอย่างเดียว ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองซึ่งมีรายงานว่า การเพิ่มความสามารถในการละลายของสารตั้งต้นโดยการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดและปริมาณที่เหมาะสมจะสามารถเพิ่มการสร้างสารประกอบประเภทสเตียรอยด์โดยจุลชีพได้ (11,16,24-27)ดังที่กล่าวไว้แล้วในตอนต้น

เมื่อเติม LCA ลงไปในถังหมัก 3 ครั้งในระหว่างการหมัก โดยครั้งที่ 1 เติม LCA ร่วมกับไดออกเซนในปริมาณร้อยละ 1 (ปริมาตร/ปริมาตร)ในชม.ที่ 56 ของการหมัก ครั้งที่ 2 เติม LCA ในชม.ที่ 72 ของการหมัก และครั้งที่ 3 เติม LCA ในชม.ที่ 84 ของการหมัก พบว่าจะทำให้สร้างผลิตภัณฑ์ได้สูงถึง 2.87 กรัม/ลิตรในชม.ที่ 90 ของการหมัก ซึ่งเป็นปริมาณสูงกว่าการสร้าง 3α,15β-DHC โดย C. blakesleeana ST 22 ซึ่งมีรายงานว่าสร้างผลิตภัณฑ์ได้สูงสุด 1.20 กรัม/ลิตร(11)

อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาการเติม LCA ลงไปในถังหมักแต่ละครั้งพบว่า ในการเติม LCA มากกว่า 1 ครั้ง จะทำให้ร้อยละของการเปลี่ยนสารตั้งต้นเป็นผลิตภัณฑ์ลดลง กล่าวคือ เมื่อเติม LCA ร่วมกับไดออกเซนเพียงครั้งเดียวในชม.ที่ 56 ของการหมัก จะสามารถสร้างผลิตภัณฑ์สูงสุดคิดเป็นร้อยละ 82 ของปริมาณ LCA ที่เติมทั้งหมด เมื่อเติม LCA ในระหว่างการหมัก 2 ครั้ง โดยครั้งที่ 1 เติมร่วมกับไดออกเซนในชม.ที่ 56 ของการหมักเช่นเดียวกัน และครั้งที่ 2 เติม LCA เพียงอย่างเดียวในชม.ที่ 72 ของการหมัก จะทำให้สร้างผลิตภัณฑ์สูงสุดคิดเป็นร้อยละ 71 ของปริมาณ LCA ที่เติมทั้งหมด ส่วนการเติม LCA ในระหว่างการหมัก 3 ครั้ง โดย 2 ครั้งแรกเติมด้วยวิธีการเดียวกับการทดลองที่เติม 2 ครั้ง และเติม LCA อีกครั้งหนึ่งในชม.ที่ 84 ของการหมักจะทำให้สร้างผลิตภัณฑ์สูงสุดคิดเป็นร้อยละ 62 ของปริมาณ LCA ทั้งหมด การที่ร้อยละของผลิตภัณฑ์ที่ได้ลดลงเช่นนี้ อาจเนื่องมาจากประการแรกช่วงเวลาของการเติมสารตั้งต้นแต่ละครั้งเชื้ออยู่ในระยะการเจริญที่แตกต่างกัน โดยเมื่อเติม LCA ครั้งแรกเชื้ออยู่ในระยะกึ่งกลางของการเจริญแบบทวีคูณ(log phase) ส่วนการเติม 2 ครั้งหลังเชื้ออยู่ในช่วงปลายของระยะการเจริญดังกล่าว หรือประการที่ 2 เนื่องจากทั้ง LCA และ 3α,15β-DHC เป็นสารประกอบประเภท

สเตียรอยด์ซึ่งละลายน้ำได้น้อย แม้จะมีตัวทำละลายอินทรีย์อยู่ด้วยก็ยังมีขีดจำกัด การเพิ่มความเข้มข้นของสารดังกล่าวในอาหารเลี้ยงเชื้ออาจทำให้เกิดการตกผลึก และผลึกนี้อาจไปขูดขีดทำความเสียหายต่อเซล ซึ่งมีผลทำให้ความสามารถในการสร้างผลิตภัณฑ์ลดลง ในการสร้าง 1-dehydro-11β hydroxy product จาก 11 -hydroxycortexolone 16,17-acetonide โดย Arthrobacter simplex และ Curvularia lunata มีรายงานว่า ขนาดผลึกของสารประกอบประเภทสเตียรอยด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ อาจมีผลต่อเชื้อราโดยไปขูดขีดทำให้เซลเสียหาย ซึ่งจะทำให้การสร้างผลิตภัณฑ์ลดลงได้(16)

แม้ว่าการเติม LCA 3 ครั้งในระหว่างการหมักจะทำให้ได้ผลผลิตสูงถึง 2.87 กรัม/ลิตร ในชม.ที่ 90 ของการหมักดังที่กล่าวแล้ว ในช่วงเวลาต่อมาพบว่า ปริมาณของ 3α,15β-DHC ลดลงอย่างรวดเร็วและเกิดผลิตภัณฑ์อื่น ซึ่งสามารถตรวจวัดได้โดยวิธีแกสโครมาโตกราฟ โดยมีรีเทนชันไทม์ประมาณ 16 นาที ทำให้คาดว่าผลิตภัณฑ์นี้อาจเป็นสารที่มีสูตรโครงสร้างใกล้เคียงกับกรดโคลิก(17) ผลิตภัณฑ์นี้เคยตรวจพบเพียงเล็กน้อยในช่วงท้ายของการหมักซึ่งควบคุมความเป็นกรดด่างที่พีเอช 8.0 โดยไม่เติม LCA ในการทดลองเติม LCA 3 ครั้งตรวจพบผลิตภัณฑ์นี้ในชม.ที่ 96 ของการหมัก และพบว่ามีปริมาณสูงสุดถึง 1.5 กรัม/ลิตรในชม.ที่ 102 ของการหมัก อาจเป็นไปได้ว่าการที่ 3α,15β-DHC ลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากชม.ที่ 90 ของการหมักเนื่องจากถูกเปลี่ยนรูปไปเป็นผลิตภัณฑ์นี้ ซึ่งอาจเกิดขึ้นเนื่องจาก ประการแรกในช่วงระยะเวลาดังกล่าวคือชม.ที่ 90 ของการหมัก ปริมาณของ 3α,15β-DHC สูงมากจนสามารถไปเหนี่ยวนำเอนไซม์ที่จะเปลี่ยนโครงสร้างของ 3α,15β-DHC ไปเป็นผลิตภัณฑ์ชนิดอื่นให้ทำงานได้ดีในช่วงเวลานั้น (คาดว่าเอนไซม์นี้น่าจะมีอยู่แล้ว แต่ปกติตรวจไม่พบผลิตภัณฑ์อื่นดังกล่าวเนื่องจากเอนไซม์ทำงานได้ไม่ดีนัก) ประการที่ 2 จากการที่พบว่าเกิดการสลายตัวของเซล(cell lysis) หลังจากชม.ที่ 90 ของการหมัก อาจเป็นไปได้ว่ามีเอนไซม์บางชนิดภายในเซลที่ออกมาสู่ภายนอก สามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ 3α,15β-DHC ไปเป็นผลิตภัณฑ์อื่น

จากการศึกษาทางอนุกรมวิธานของเชื้อ Absidia sp. BA 16 พบว่ามีลักษณะบางประการใกล้เคียงกับ Absidia corymbifera IFO 4009 และ Absidia butleri (Gongronella butleri) IFO 8080 แต่มีลักษณะบางประการแตกต่างกัน จึงสรุปได้ว่า Absidia sp. BA 16 มิได้เป็นเชื้อราชนิดเดียวกับเชื้อราสายพันธุ์มาตรฐานชนิดใดชนิดหนึ่งใน 2 สายพันธุ์ที่นำมาเปรียบเทียบ และอาจเป็นไปได้ว่า Absidia sp. BA 16

นี้จะเป็นเชื้อราในสกุล(genus)"Absidia" ชนิดใหม่ซึ่งยังไม่มีรายงานมาก่อน

ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้าง 3α,15β-DHC โดย Absidia sp. BA 16 ในงานวิจัยนี้พบว่าสามารถสร้างผลิตภัณฑ์สูงสุดได้ 2.87 กรัม/ลิตร ซึ่งเป็นปริมาณที่สูงกว่าปริมาณสูงสุดที่มีรายงานว่าสร้างโดย C. blakesleeana ST 22 อย่างไรก็ตาม จากการที่พบว่าผลิตภัณฑ์ดังกล่าวลดลงอย่างรวดเร็วในการทดลองเติม LCA 3 ครั้ง ระหว่างการหมักทำให้จะต้องมีการศึกษาเพื่อหาสาเหตุและวิธีการแก้ไขต่อไป

การสร้าง 3α,15β-DHC โดย Absidia sp. BA 16 ในงานวิจัยนี้เป็นเพียงการศึกษาขั้นต้นโดยเป็นการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสร้างผลิตภัณฑ์เฉพาะในการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง (batch process) ยังมีวิธีการอื่น ๆอีกมาก เพื่อเพิ่มผลผลิตในการสร้างสารประกอบประเภทสเตียรอยด์โดยจุลชีพซึ่งอาจนำมาใช้กับการสร้าง 3α,15β-DHC ได้ ตัวอย่างเช่นการใช้วิธีการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง (semi-continuous process)ในการผลิต triamcinolone จาก compound-F3 โดยเชื้อ Arthrobacter simplex (15) หรือการหมักโดยการใช้เซลของจุลชีพที่ถูกตรึง (immobilized cells) ในการผลิต prednisolone จาก hydrocortisone โดยเซลที่ถูกตรึงของ Corynebacterium simplex (28) เป็นต้น การเลือกใช้วิธีการที่เหมาะสมอาจช่วยให้สามารถสร้างผลิตภัณฑ์ได้ปริมาณสูงขึ้นและอาจช่วยลดระยะเวลารวมทั้งรายจ่ายในการผลิตได้