หลักการ ช่วงเวลาหลายปีมานี้นักวิทยาศาสตร์มุ่งเน้นการศึกษาเกี่ยวกับจุลินทรีย์กลุ่มเอนโดไฟท์กันมาก ปัจจุบันทราบกันดีว่าพืชเป็นแหล่งของจุลินทรีย์เอนโดไฟท์ที่หลากหลาย บ่งจำนวนแน่นอนไม่ได้ เอนโดไฟท์บางชนิดสร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่เป็นประโยชน์หลายชนิด ซึ่งการค้นพบนี้ก็กระตุ้นให้มีการค้นคว้าวิจัยทางด้านนี้กันมากที่จะแยกเชื้อเหล่านี้มาศึกษา ทั้งพืชและเอนโดไฟท์ต่างได้รับประโยชน์จากความเกี่ยวข้องพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน

เร็วๆ นี้ก็มีรายงานการค้นพบทั้งทั้งสารออกฤทธิ์ชีวภาพชนิดใหม่และเอนไซม์ที่น่าสนใจหลายชนิดจากเอนโดไฟท์ ความสำเร็จดังกล่าวก็เป็นที่มาของความต้องการที่จะมีวิธีการคัดกรองที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพ การนำจุลินทรีย์เช่นราเอนโดไฟท์มาใช้ประโยชน์ ก็เป็นวิธีคัดกรองที่ชาญฉลาดวิธีหนึ่ง นอกจากนี้การศึกษาด้านอนุกรมวิธานของจุลินทรีย์เหล่านี้ก็มีความสำคัญในแง่ที่จะหลีกเลี่ยงไม่ให้มีการแยกเชื้อแบบสุ่ม ซึ่งทั้งสองประการนี้มีความสำคัญอย่างยิ่ง เนื่องจากว่ายังมีฟังไจอีกมากมายจากถิ่นที่อยู่ที่แตกต่างกันที่รอการค้นพบ และนำมาศึกษาถึงคุณสมบัติที่มีประโยชน์

งานวิจัยทางด้านจุลินทรีย์เอนโดไฟท์ในประเทศไทยยังมีอยู่จำกัด เพื่อให้เข้าใจถึงความหลากหลายของฟังไจในถิ่นที่อยู่ที่แตกต่างกันในประเทศ ก็เป็นความจำเป็นเร่งด่วนที่จะต้องมีการศึกษาเพื่อให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับเอนโดไฟท์เพิ่มขึ้น

T 138881

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อแยกและบ่งบอกชนิดของราเอนโดไฟท์ที่แยกจากพืชยืนต้นและพืชล้มลุกทางภาคเหนือของไทย
2. เพื่อคัดกรองหาเชื้อราและแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่มีคุณสมบัติดี ในการสร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพและเอนไซม์สลายโพลี่แซคคาไรด์โดยใช้วิธีการที่จำเพาะ

ผลการวิจัย

1. สามารถแยกราเอนโดไฟท์จากพืชทุกชนิดที่นำมาทดลอง จำนวนและชนิดของราที่แยกได้มีความหลากหลาย ไม่พบความจำเพาะระหว่างพืชที่เป็นโฮสท์กับราที่แยกได้ ราบางชนิดไม่สามารถบ่งบอกชนิดได้เนื่องจากไม่สามารถชักนำให้มีการสร้างสปอร์ จึงจัดเป็นกลุ่ม Mycelia sterilia รา *Xylaria*, *Phoma*, *Phomopsis* และ Mycelia sterilia พบมากที่สุดในพืชยืนต้นขณะที่ *Phomopsis*, Myceria sterilia และ *Fusarium* spp พบมากในพืชล้มลุก
2. การคัดกรองหาราเอนโดไฟท์ที่สร้างแมนนาเนสโดยวิธี gel diffusion assay ในกลุ่มราที่แยกจากไผ่ 13 ชนิด จำนวน 226ไอโซเลท พบ 99 ไอโซเลท สร้างเอนไซม์แมนนาเนสได้ เพาะในอาหารแข็งที่มี phyta gel 0.7% (w/v) ให้วงใสขนาด 15-22 มม. *Fusarium* sp. GnCMU387 สร้างแมนนาเนสได้มากที่สุด ซึ่งเมื่อปรับสภาวะของ ส่วนประกอบของอาหารที่มี locust bean gum 3%(w/v) และ peptone 0.9% (w/v) เชื้อจะผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้นจาก 4.3 U/ml เป็น 23 U/ml เอนไซม์ทำงานได้ดีที่ pH 6.5 เมื่อบ่มเอนไซม์เป็นเวลา 3 ชม. ที่ 60°C ใน 0.1 M sodium acetate buffer pH 6.5
3. สารต้านมะเร็งแอล-แอสพาราจีเนส คัดกรองจากเชื้อราและแบคทีเรียเอนโดไฟท์ โดยวิธี Plate assay จากรา 481 ไอโซเลทและแบคทีเรีย 657 ไอโซเลท รา *Fusarium* sp. CMURb9, *Xylaria* sp. BARfT2-4 และแบคทีเรีย *Bacillus* sp. CMUHB4494 ผลิตเอนไซม์ได้สูงกว่าเชื้ออื่นๆ *Xylaria* sp. BARfT2-4 ผลิตเอนไซม์ แอล-แอสพาราจีเนสได้ 4.11 IUm^{-1} ราจะสร้างเอนไซม์ได้สูงกว่าแบคทีเรีย การปรับสภาวะในการเพาะเลี้ยงด้านอาหาร อุณหภูมิและพีเอช จะทำให้การผลิตเพิ่มขึ้น เอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อรา *Fusarium* sp. Rb9 มีความเป็นพิษต่อเซลล์ลิมโฟไซท์ของมนุษย์เท่ากับเอนไซม์ที่มีขายเป็นการค้าในรูปเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ผลิตจากเชื้อ *Erwinia chysanthemi*
4. การคัดกรองหาเชื้อราที่ผลิต แอล-มาลิค โดยการคัดกรองจากน้ำหมักที่มีกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร และตรวจการสร้างกรดโดยใช้ Thin Layer Chromatography (TLC) รา 30 ชนิดผลิตกรดมาลิค รา 3 ชนิดสร้างกรดทาร์ทาริค รา 14 ชนิดผลิตกรดมาลิคผสมกับกรดทาร์ทาริค เชื้อรา

Brotyodiplodia sp. ที่แยกได้จากต้นพยอมสร้างกรดได้สูง 3 กรัมต่อลิตร วิเคราะห์โดย HPLC เมื่อปรับสภาพอาหาร ให้เหมาะสม โดยใช้สูตรอาหารที่ประกอบด้วย (กรัมต่อลิตร) กลูโคส 150, polypeptone 9, แคลเซี่ยม 70, pH 7 บ่มที่ 30°C จะเพิ่มการผลิตกรดมาลิคจาก 3 กรัมต่อลิตร ไปเป็น 10 กรัมต่อลิตร

5. การคัดกรองเชื้อราเอนโดไฟท์ที่ผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส จำนวนมากกว่า 600ไอโซเลทที่แยกจากพืชยืนต้นและพืชสมุนไพรบางชนิด คัดเลือกได้ เชื้อรา 2 ชนิด คือ *Fusarium* sp. CMUQ22 และ Myceria sterilia D1ที่แยกได้จากก่อและพืชสมุนไพรตามลำดับ ซึ่งผลิตเอนไซม์ได้สูง เอนไซม์จากทั้งสองเชื้อนี้มีความจำเพาะสูงต่อไซเลนที่ได้จาก birch มากกว่าไซเลนที่ได้จาก oat spelt ของเหลือทิ้งทางการเกษตรสามารถใช้เป็นสับสเตรทในการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสจากเชื้อรา *Fusarium* sp. CMUQ22 ได้ หลังจากบ่มเชื้อในอาหารที่มีซังข้าวโพดหรือเปลือกทุเรียน 4 วันเชื้อจะผลิตเอนไซม์ได้ 15.4 U/ml และผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด 27 U/ml หลังบ่มไว้ 7 วัน เอนไซม์บริสุทธิ์ทำโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนี่ยมซัลเฟต การแลกเปลี่ยนประจุและการกรองผ่านเจล ซึ่งเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อราทั้งสองชนิดนี้ประกอบด้วย 2 subunits และมีน้ำหนักโมเลกุลเท่าๆ กัน เอนไซม์จากเชื้อ *Fusarium* sp. CMUQ22 มีน้ำหนักโมเลกุล 16 kDa และ 28 kDa ขณะที่เอนไซม์จากเชื้อ Myceria sterilia D1 จะมีน้ำหนักโมเลกุล 16.7 kDa และ 29.5 kDa เอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนจะทำงานได้ดีที่ 50°C เป็นเวลา 5 นาทีที่ pH 3-8 และมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 30-80°C

6. การตรวจกรองความสามารถในการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินจากเชื้อราเอนโดไฟท์กลุ่มไซลาเรียจำนวน 581 ไอโซเลท ราสายพันธุ์ *Xylaria* sp. CMUX144 จะผลิตเอนไซม์ manganese independent peroxidase ได้สูงสุด อุณหภูมิ ปริมาณกลูโคสและแอมโมเนี่ยมทาร์เทต เริ่มต้น มีผลต่อปริมาณเอนไซม์ที่ผลิต หลังการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม บ่มนาน 6 วัน จะสร้างเอนไซม์ได้ ถึง 195 U/l และสร้างได้สูงเพิ่มขึ้นถึง 292 U/l เมื่อเติม veratryl alcohol ในอาหารที่เพาะเลี้ยง

7. วิธี dual culture โดยการนำเชื้อทดสอบและเอนโดไฟท์มาเพาะคู่ขนานกัน เป็นวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการคัดกรองเชื้อที่เป็นปฏิปักษ์ต่อ *Colletotrichum musae* (เชื้อสาเหตุโรคแอนเทรกของกล้วย) คัดได้เชื้อ Mycelia sterilia G155 ที่ให้ผลในการต้านราสาเหตุโรคแอนเทรกของกล้วยได้ดี เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสม ที่ประกอบด้วย (%w/v) $(NH_4)_2SO_4$ 0.5, KH_2PO_4 0.9, corn meal 13.3, beef extract 1 ปรับ pH 4 บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28-30°C)และ เขย่า (ความเร็ว 124 rpm) สารออกฤทธิ์ต้านเชื้อรา *C. musae* ที่สร้างโดยเชื้อรา Myceria sterilia G155

มี 3 ชนิด แสดงโดยค่า R_f 3 ค่า(R_f 0.54, 0.37 และ 0.09) เมื่อตรวจสอบโดยใช้ autobiography assay

8. ราและแบคทีเรียเอนโดไฟท์สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพต้านราและแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุโรค 4 ชนิดคือ *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeroginosa*, *Candida albicans*, และ *Aspergilus niger* แบคทีเรียเอนโดไฟท์ *Bacillus* sp EB43 สร้างสารต้านราและแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบได้สูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีโพลี่แซคคาไรด์เป็นแหล่งคาร์บอน สารที่สร้างขึ้นสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ

การค้นพบ พืชป่าของไทยเป็นแหล่งที่ดีของจุลินทรีย์เอนไฟต์ พืชยืนต้นจะเป็นโฮสท์ที่ดีของราเอนโดไฟท์เมื่อ

เปรียบเทียบกับพืชล้มลุก กลุ่มราเอนโดไฟท์ที่น่าสนใจที่สุดคือ *Fusarium* spp., *Xylaria*, และ Mycelia sterilia

งานวิจัยในอนาคต เนื่องจากจุลินทรีย์เอนโดไฟท์มีจำนวนและการกระจายอย่างมากมายเกินกว่าที่คาดไว้ ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องมีโปรแกรมการแยกเชื้อและตรวจอนุกรมวิธานของเชื้ออย่างมีระบบที่ต่อเนื่อง นอกจากนี้ก็มีความจำเป็นในการที่จะต้องขยายการใช้อาหารและสภาพการเพาะเลี้ยงที่หลากหลายขึ้น เพื่อประกันว่าจะสามารถแยกเชื้อเอนโดไฟท์ได้เกือบทั้งหมดที่มีอยู่ในพืชนั้นๆ เนื่องจากจุลินทรีย์เป็นแหล่งสำคัญสำหรับการสร้างเอนไซม์และสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่มีความสำคัญทางเทคโนโลยีชีวภาพ ดังนั้นโปรแกรมในการคัดกรองจากธรรมชาติ เพื่อหาเชื้อที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ชนิดใหม่และเอนไซม์ที่น่าสนใจและมีคุณค่าได้อย่างประสบความสำเร็จ จึงมีความจำเป็นต้องออกแบบให้เหมาะสม และมีประสิทธิภาพ การใช้วิธีการทางพันธุศาสตร์นั้นสามารถทำได้ในระดับหนึ่งเมื่อทราบว่า เอนไซม์หรือสารออกฤทธิ์ที่สนใจนั้นคืออะไร เนื่องจากสามารถใช้ยีนที่ให้รหัสของสารที่มีขายเป็นการค้ามาทำเป็นโพรบ และออกแบบแม่พิมพ์สำหรับเพิ่มจำนวนยีนที่ต้องการค้นหาเพื่อให้ตรวจสอบได้ แต่อย่างไรก็ตามถ้าสารที่น่าสนใจนั้นเป็นสารชนิดใหม่ วิธีการคัดกรองแบบสุ่มก็ยังจำเป็นอยู่