บทนำ

ความเป็นมา

เชื้อราเป็นศัตรูพืชที่มีความสำคัญและก่อให้เกิดปัญหาต่อการเกษตรกรรมของประเทศ ทั้งความเสียหายต่อผลผลิตและการปนเปื้อนของสารเคมีที่ใช้ในการกำจัดเชื้อรา ซึ่งก่อให้เกิดผลร้าย ทั้งต่อสิ่งแวดล้อม สุขภาพของประชากร และเศรษฐกิจ การลดหรือเลิกการใช้สารเคมีกำจัดเชื้อรา โดยใช้สารชีวภาพทดแทน จึงเป็นแนวทางที่สำคัญในการลดปัญหาดังกล่าวนี้ รวมทั้งยังช่วยส่งเสริมและพัฒนาการเกษตรอินทรีย์ของประเทศให้ก้าวหน้า และยั่งยืนต่อไป แนวทางหนึ่งที่มีความเป็นไปได้และกำลังได้รับความสนใจจากนักวิทยาศาสตร์ทั่วโลก คือการใช้เอนไซม์ ซึ่งเป็นสารชีววัตถุที่สามารถย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อรา หรือยับยั้งการงอกของสปอร์ ในการควบคุมและกำจัดเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในพืชหลายประเภท (*1*) หนึ่งในเอนไซม์ที่สำคัญนี้คือ เอนไซม์ไคติเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ ซึ่งมีความสามารถในการย่อยพันธะ β-1,4 glycosidic ให้ได้ผลผลิตเป็น N-acetylglucosamine และ chitooligosaccharide ที่มีความยาวต่างๆกัน (*2*) เหตุที่เอนไซม์นี้มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้เป็นเพราะ เส้นใยของเชื้อรานั้นมีไคตินเป็นโครงสร้างหลัก (*3*) เอนไซม์ไคติเนส นั้นสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตที่หลากหลายตั้งแต่เชื้อแบคทีเรียทั้งบนดินและในทะเล เชื้อรา รวมทั้งพืช โดยเฉพาะในพืชตระกูลถั่ว และสัตว์บางประเภท (*4*) มีผลการวิจัยเป็นจำนวนมากที่ได้แสดงถึงความสามารถของ เอนไซม์ไคติเนสที่เตรียมได้จากแหล่งต่างๆ ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพืชชนิดต่างๆ หลายประเภท โดยผลจากการรายงานส่วนใหญ่พบว่าเอนไซม์ไคติเนสจากพืช และแบคทีเรียมีความสามารถดีในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา (*5*)

วัตถุประสงค์ เฉพาะในปีที่ ๑

1 เพื่อผลิตเอนไซม์ไคติเนสจากแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* ด้วยเทคโนโลยีพันธุวิศวกรรม

2 เพื่อตรวจสอบความสามารถของเอนไซม์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคในพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศ

3 เพื่อคัดหาแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* ที่สามารถควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคในพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศ

ขอบเขตการวิจัย

ในโครงการวิจัยนี้ ผู้วิจัยจะทำการผลิตและศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ ไคติเนส จากเชื้อ *Bacillus licheniformis* DSM 13 และ 8785 ก่อน เพราะมีอยู่แล้วในห้องปฏิบัติการ โดยจะทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตให้ได้ในปริมาณมาก จากนั้นจะทำการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ ทางชีวเคมี และความสามารถในการยับยั้งเชื้อราที่ก่อโรคในพืชที่เป็นปัญหาที่สำคัญของประเทศ คือ *Aspergillus niger* และ *Didymella bryoniae* รวมทั้งจะได้ทำการคัดหาเชื้อแบคทีเรีย โดยเฉพาะในกลุ่ม *Bacillus* ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราที่สำคัญทั้ง ๒ เพิ่มเติมด้วย โดยการทำวิจัยนี้จะใช้เทคโนโลยีสหสาขาทั้งทางพันธุวิศวกรรม ชีวเคมี และจุลชีววิทยา ในการ สกัดแยกเชื้อ บ่งชี้ชนิดของเชื้อ สกัดแยกเอนไซม์ และยีนของเอนไซม์ การผลิตเอนไซม์จากเชื้อ *E. coli* รวมทั้งการวิเคราะห์ ชนิดของแบคทีเรีย และคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ได้พัฒนาขึ้น

ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย (Conceptual Framework)

ไคตินเป็นโครงสร้างหลักที่สำคัญของผนังเซลล์ของรา ดังนั้นเอนไซม์ที่สามารถสลายไคตินได้จึงควรมีคุณสมบัติที่ดีในการยับยั้งหรือจำกัดการเจริญเติบโตของเชื้อรา หรือการงอกของสปอร์ ข้อสมมุติฐานนี้สามารถยืนยันได้จากการที่พบว่าพืชหลายชนิด ใช้ไคติเนสเป็นส่วนหนึ่งของวิธีการป้องกันการถูกทำลายจากศัตรูพืช (plant defense mechanism) โดยพบว่าพืชส่วนมากสามารถถูกกระตุ้นให้ผลิตเอนไซม์ไคติเนสได้ เมื่อถูกรบกวนด้วยเชื้อรา ดังนั้นจึงมีนักวิจัยทั่วโลกให้ความสนใจเป็นจำนวนมากในการประยุกต์ใช้ความสามารถในการย่อยสลายไคตินของเอนไซม์ไคติเนสในการควบคุมและป้องกันพืชจากการถูกทำลายโดยเชื้อรา โดยส่วนใหญ่แล้วจะเป็นการสร้างพืชที่ถูกดัดแปลงพันธุกรรม (transgenic plants) ให้มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เพื่อป้องกันการถูกทำลายโดยเชื้อราที่ก่อโรคในพืชชนิดต่างๆ โดยการถ่ายยีนไคติเนส จากแบคทีเรีย หรือพืชที่มีเอนไซม์นี้เข้าไปในจีโนมของพืชที่ต้องการสร้างให้มีความต้านทานเชื้อรา เช่น ฝ้าย แตงกวา และมันฝรั่ง เป็นต้น ซึ่งจากรายงานการวิจัยพบว่า พืชเหล่านี้สามารถต้านทานการติดเชื้อราได้ในระดับหนึ่ง แต่เป็นที่ทราบกันดีอยู่แล้วว่าข้อด้อยที่สำคัญของวิธีการใช้ไคติเนสในการป้องกันเชื้อราด้วยวิธีนี้คือ พืชที่ได้รับการดัดแปลงพันธุกรรมนี้ยังไม่เป็นที่ยอมรับโดยเฉพาะพืชที่จะใช้ในการบริโภค นอกจากนั้นแล้วยังอาจเกิดความเสี่ยงทางสิ่งแวดล้อมและระบบนิเวศน์จากการถ่ายทอดยีนไปยังพืชชนิดอื่นด้วย (*5*)

ดังนั้นในโครงการวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นทำการศึกษาวิธีการอีกวิธีการหนึ่งที่น่าสนใจและไม่เกี่ยวข้องกับการผลิตพืชดัดแปลงพันธุกรรมคือการปรับปรุงให้สามารถใช้ไคติเนสเป็นสารควบคุมชีวภาพ (biocontrol reagent) ที่สามารถย่อยสลายได้ง่าย (biodegradable) โดยจะเตรียมเอนไซม์ให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมในฉีดพ่นลงบนผลและใบของพืชเศรษฐกิจทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยวโดยตรง จากการสืบค้นข้อมูลพบว่ามีรายงานจำนวนหนึ่งที่แสดงว่าเอนไซม์ที่สกัดได้จากเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus sp.* และ *Streptomyces sp.* เชื้อรา *Trichoderma harzianum* รวมทั้งพืช เช่น แตงกวา (*6*) มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญ และการงอกของสปอร์ของเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคพืชชนิดต่างๆได้ดี นอกจากนั้นแล้วยังมีรายงานที่แสดงถึงการนำเอนไซม์ที่สกัดได้จาก มันเทศ (yam) ไปฉีดพ่นเพื่อป้องกันการติดเชื้อราในผลสตอเบอรี่ด้วย จากข้อมูลเบื้องต้นที่กล่าวมาแล้วนี้ทำให้นำไปสู่แผนการดำเนินการวิจัยในโครงการนี้ที่จะทำการสกัดแยก (clone) และแสดงออกยีนจาก แบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* โดยเคยมีรายงานมาก่อนบ้างแล้วว่าเอนไซม์ chitinase บางชนิด มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ (*7*) โดยเหตุที่เลือกศึกษาเอนไซม์จาก *Bacillus* เป็นเพราะห้องปฏิบัติการของข้าพเจ้าได้มีการศึกษาและวิจัยคุณสมบัติของเอนไซม์ไคติเนส จากแบคทีเรียชนิดนี้ในการย่อยไคตินที่เตรียมได้จากเปลือก ปูและกุ้ง มาก่อนแล้ว (*2*) แต่ยังไม่เคยศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา โดยจะนำยีนของเอนไซม์ที่สกัดแยกได้นั้นนำไปแสดงออกใน *E.coli* เพราะเป็นระบบการแสดงออกที่มี

ประสิทธิภาพสูง สามารถผลิตเอนไซม์ได้เป็นจำนวนมาก (8) แล้วจึงทำการปรับปรุงคุณภาพเอนไซม์ให้เหมาะสมต่อการนำไปใช้เป็นสารฉีดพ่น

ดังนั้นผลลัพธ์ที่ได้จากโครงการวิจัยนี้จะเป็นองค์ความรู้ใหม่ทั้งเกี่ยวกับโครงสร้างและหน้าที่ของเอนไซม์ไคติเนสจากแหล่งที่ยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน และการประยุกต์ใช้เอนไซม์ที่ได้พัฒนาขึ้นให้เป็นผลิตภัณฑ์ชีววัตถุเพื่อใช้ในการกำจัดเชื้อราชนิดใหม่ โดยมุ่งเน้นที่จะศึกษาความสามารถในการกำจัดเชื้อราที่มีความสำคัญต่อพืชเศรษฐกิจของประเทศไทยได้แก่ ๒ เชื้อ คือ *Aspergillus niger* และ *Didymella bryoniae*

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. ทำการโคลนยีนจากเชื้อ *Bacillus licheniformis* DSM13 และ DSM8785 ที่แยกมาได้ไปไว้ในพลาสมิดที่เหมาะสมเพื่อการแสดงออกใน แบคทีเรีย *E. coli*
2. ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์จากเชื้อ *E. coli* โดยการปรับค่าตัวแปรต่างๆ อาทิเช่น จังหวะ ช่วงเวลา และความเข้มข้นของสาร IPTG อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยง เป็นต้น รวมทั้งสภาวะที่เหมาะสมในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์เพื่อการวิเคราะห์ในขั้นต่อไป
3. ตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราของเอนไซม์ที่ได้ผลิตขึ้น โดยทำการตรวจสอบบนจานเลี้ยงเชื้อ แล้วสังเกตุวงใสที่เกิดขึ้น