



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพ

เทคโนโลยีชีวภาพ

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การคัดกรองเชื้อราที่ผลิตเปปไทด์ไบโอติกส์โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล

Molecular Screening for Peptaibiotics Producing Fungi

นามผู้วิจัย นางสาวสโรชา ปัญจนวพร

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ชนิกุล ชูตระกูล, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์สุนิษฐ์ นิธิสินประเสริฐ, D.Sc.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การคัดกรองเชื้อราที่ผลิตเปปไทด์โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล

Molecular Screening for Peptaibiotics Producing Fungi

โดย

นางสาวสโรชา ปัญจนวพร

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

พ.ศ. 2551

สโรชา ปัญจนวพร 2551: การคัดกรองเชื้อราที่ผลิตเปปไทด์ไบโอดีคส์โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล ปรินญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์, Ph.D. 96 หน้า

เปปไทด์ไบโอดีคส์ (peptaibiotics) เป็นสารปฏิชีวนะในกลุ่มเปปไทด์สายยาว 5 – 21 เรซิดิวส์ ประกอบด้วย α -aminoisobutyric acid (Aib) และกรดอะมิโนไม่มาตรฐาน การสังเคราะห์เปปไทด์ไบโอดีคส์เป็นระบบ non – ribosomal system โดยกลุ่มเอนไซม์ non – ribosomal peptide synthetases (NRPSs) ที่ควบคุมโดยยีน *nrps* การค้นพบและศึกษาสารกลุ่มนี้ที่มีรายงานมาก่อน นิยมใช้เทคนิคทางเคมี งานวิจัยนี้มีเป้าหมายในการใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล โดยการพัฒนาไพรเมอร์จำเพาะสำหรับกระบวนการพีซีอาร์เพื่อคัดกรองเชื้อราที่ผลิตเปปไทด์ไบโอดีคส์ ตลอดจนการศึกษามีเชื้อควบคุมการทดลอง คือ *Trichoderma asperellum* BCC12530 การทดสอบกระบวนการคัดกรองเชื้อราที่ผลิตเปปไทด์ไบโอดีคส์โดยมีตัวอย่างเชื้อราทั้งหมด 57 สายพันธุ์ พบว่าเทคนิคพีซีอาร์กับไพรเมอร์จำเพาะสามารถใช้คัดกรองเชื้อราได้ในระดับเบื้องต้นเท่านั้น โดยเชื้อที่พบยีนมีมากกว่าเชื้อที่ผลิตเปปไทด์ไบโอดีคส์ได้จริง 1.87 เท่าและอาจบอกได้ว่าเทคนิคพีซีอาร์กับไพรเมอร์มีความจำเพาะน้อยกว่าเทคนิคอื่นที่ใช้ในการศึกษานี้ ซึ่งการคัดกรองจะมีประสิทธิภาพสูงขึ้นเมื่อวิเคราะห์ควบคู่กับการตรวจสอบกรดอะมิโน Aib ด้วย Thin Layer Chromatography (TLC) และการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งทางชีวภาพ ซึ่งพบว่าสามารถจัดกลุ่มเชื้อราที่คาดว่ามีการสังเคราะห์เปปไทด์ไบโอดีคส์ได้ และพบเชื้อที่น่าสนใจควรศึกษาในลำดับต่อไป ได้แก่ *Clonostachys rogersoniana* BCC4862 และ *Mariannaea camptospora* BCC12193 จากงานวิจัยนี้สามารถกล่าวได้ว่าเทคนิคพีซีอาร์และไพรเมอร์มีประสิทธิภาพเพียงพอ ใช้คัดกรองและค้นหาเชื้อราสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่อาจมีความสามารถในการผลิตเปปไทด์ไบโอดีคส์ได้ในระดับเบื้องต้น

Sarocho Panchanawaporn 2008: Molecular Screening for Peptaibiotics Producing Fungi. Master of Science (Biotechnology), Major Field: Biotechnology, Department of Biotechnology. Thesis Advisor: Assistant Professor Suttipun Keawsompong, Ph.D. 96 pages.

Peptaibiotics are defined as a group of polypeptide antibiotics that contain the α -aminoisobutyric acid (Aib) and have been shown to have a wide spectrum of biological activities. The synthesis of peptaibiotic compound involves a non-ribosomal system based on peptide synthase (*nrps*) genes. A wide variety of novel forms of these compounds have been discovered and identified solely on chemical techniques. The present work used established PCR strategies in a screening for peptaibiotic producing fungi. The putative peptaibiotics producing strain, *Trichoderma asperellum* BCC12530, was used to identify the relevant genes and prove the peptaibiotics producing, and compared with TLC analysis and bioassays. These protocols were adapted to screen 57 strains of various filamentous fungi. Molecular screening by PCR with specific primers was less specific to target the peptaibiotic producing fungi than other methods used in this study. The strains presenting *nrps* gene from the total fungal isolates were 1.87 times more than another two screening methods. Chemical and bioassay analyses could be used, together with the molecular approach for the efficient screening of peptaibiotic producing fungi, some of which have been previously reported to produce peptaibiotics. *Clonostachys rogersoniana* BCC4862 and *Mariannaea camptospora* BCC12193 showed interesting results indicating the gene and Aib related to peptaibiotic production. This capability will be used for further primary screening of peptaibiotics from other sources and the results validated as the potential screening protocols.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

____ / ____ / ____

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์ กรรมการที่ปรึกษา และ อ. ดร. ชนิกุล ชูตระกูล กรรมการ ที่ได้ช่วยเหลือในการวางแผนการทำวิจัยของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ตลอดจนการให้คำปรึกษาแนะนำอบรมสั่งสอนในทุกเรื่องตลอดการทำงานวิจัยและการตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร. สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ ประธานการสอบและ อ. ดร. จันทิรา ปัญญา ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำ และช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี และขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอนให้ความรู้จนสำเร็จการศึกษาในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ ดร. ปัทมา พิทยขจรวุฒิ และ ดร. ชลรัชต์ บุญลาภประดับ ห้องปฏิบัติการวิจัยทรัพยากรชีวภาพ หน่วยปฏิบัติการ Bioresources Technology ดร.สิทธิรักษ์ รอยตระกูล ห้องปฏิบัติการบริการ โปรตีนโอมิก สถาบันจีโนม และ ดร.วรรณพ วิเศษสงวน ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางอาหาร หน่วยปฏิบัติการวิจัยกลางไบโอเทค ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ที่ให้คำปรึกษาแนะนำต่าง ๆ ตลอดจนให้ความช่วยเหลือในส่วนของ การวิเคราะห์มวลด้วยเทคนิค HPLC, LC/ESI-MS และ MALDI-TOF เป็นอย่างดี ทำให้การวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้

ขอขอบพระคุณสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ที่ให้ทุนสถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย (พ.ศ. 2549) และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ทุนอุดหนุนการค้นคว้าและวิจัยประเภทวิทยานิพนธ์ (พ.ศ. 2550)

ขอขอบคุณ เพื่อน ๆ พี่ ๆ และน้อง ๆ ในห้องปฏิบัติการ รวมทั้งเพื่อนร่วมรุ่นปริญญาโททุกคน ที่คอยให้คำปรึกษาแนะนำ และร่วมทุกข์ร่วมสุขกันมา ขอขอบคุณพี่ ๆ เจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในด้านต่าง ๆ เสมอมา

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่สาวและน้องชาย ที่คอยสนับสนุน ให้ความรัก และให้กำลังใจในทุก ๆ เรื่อง ซึ่งเป็นสิ่งที่สำคัญที่สุดในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

สโรชา ปัญจนาวร

กรกฎาคม 2551

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	22
ผลและวิจารณ์	37
สรุป	74
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	76
ภาคผนวก	86
ภาคผนวก ก. เทคนิคทางชีวสารสนเทศและชีวโมเลกุล	87
ภาคผนวก ข. ข้อมูลจากการทดลอง	92
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	96

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	เชื้อราที่มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะในกลุ่มไทไบโอติกส์	7
2	การเปรียบเทียบเอนไซม์พื้นฐานของการสังเคราะห์เปปไทด์หรือโปรตีนทั้ง 2 ระบบ คือ ระบบไรโบโซมและไม่ใช่ไรโบโซม	8
3	ลำดับกรดอะมิโนในส่วน consensus sequence motifs ที่มีบริเวณอนุรักษ์สูงของแต่ละโดเมนในเอนไซม์ NRPSs	12
4	ลำดับกรดอะมิโนสัญลักษณ์ของยีน <i>tex1</i> ในโดเมน A ของเชื้อรา <i>T. virens</i>	19
5	เชื้อราจาก BCC สายพันธุ์ที่มีรายงานและคาดว่าสามารถผลิตเปปไทไบโอติกส์ทั้งหมด 49 สายพันธุ์	22
6	แสดงเชื้อ <i>Hypocrea</i> หรือ <i>Trichoderma</i> ที่แยกจากตัวอย่างดิน	24
7	เปอร์เซ็นต์ของสารละลายระหว่างน้ำและอะซิโตนไนไตรท์ (ACN) ในการวิเคราะห์ HPLC	29
8	ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาคัดกรองเชื้อรา	31
9	9 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสารสกัดเชื้อ <i>T. asperellum</i> BCC 12530 จากอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 % ME ที่เติมกรดอะมิโน Aib ความเข้มข้นต่างๆ	38
10	กิจกรรมการยับยั้ง <i>B. cereus</i> ATCC 11778 โดยเปรียบเทียบกันระหว่างสารสกัดของ <i>T. asperellum</i> BCC 12530 ก่อนและหลังการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วย TLC	46
11	ค่า <i>m/z</i> จากการวิเคราะห์ LC/ESI-MS ในรูปแบบ doubly และ singly charges ของสารสกัด <i>T. asperellum</i> BCC 12530	54
12	การวิเคราะห์มวลของ trichotoxins ที่มีการรายงานมาแล้ว	54
13	ชื่อยีน รหัส และเชื้อราจากฐานข้อมูลธนาคารยีน NCBI สำหรับออกแบบไพรเมอร์คู่ C4F&C6R	56
14	องค์ประกอบที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยาพีซีอาร์และไพรเมอร์แต่ละคู่	61
15	การคัดกรองและแบบกลุ่มเชื้อราเป็น 6 กลุ่มโดยการคัดกรองยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิต การตรวจสอบกรดอะมิโน Aib และการทดสอบยับยั้งเชื้อก่อโรค	64

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
16	การศึกษาโคลนจากไพรเมอร์ C2F&C5R โดยโปรแกรม Blastp version 2.2.18+	68
17	ลำดับสัญลักษณ์ของเชื้อ <i>T. asperellum</i> BCC12530 และ <i>H. lixii</i> BCC488 จากลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการทำพีซีอาร์กับไพรเมอร์ C2F&AibR	73
ตารางผนวกที่		
ก1	การระบุสายพันธุ์เชื้อโดยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของยีน ITS1, 5.8s และ ITS2 ด้วยไพรเมอร์ ITS1&ITS4	87
ข1	เปรียบเทียบการวิเคราะห์กิจกรรมการยับยั้งเชื้อ <i>B. cereus</i> ATCC 11778 ระหว่างเทคนิค Agar well plate และ microdilution assay	92
ข2	การวิเคราะห์สารสกัดต่อการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก <i>B. cereus</i> ATCC 11778 ด้วยเทคนิค microdilution assay	93
ข3	การวิเคราะห์สารสกัดต่อการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ <i>E. coli</i> ATCC 25922 ด้วยเทคนิค microdilution assay	94
ข4	การวิเคราะห์สารสกัดต่อการยับยั้งเชื้อราเซลล์เดี่ยว <i>C. albicans</i> ATCC 90028 ด้วยเทคนิค microdilution assay	95

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 องค์ประกอบของเปปไทด์ไบโอดีทที่จำเพาะ (uncommon constituent) กรดอะมิโนแบบไม่มาตรฐานหรือกรดลิวซีน	4
2 ลำดับกรดอะมิโนที่เป็นสมาชิกของเปปไทด์ไบโอดีทในแต่ละ subfamilies; SF 1 – 9 และกรดอะมิโน Aib หรือ U	6
3 เอนไซม์พื้นฐานที่จำเป็นสำหรับการสังเคราะห์เปปไทด์หรือโปรตีน (ก.) แบบระบบไรโบโซม และ (ข.) ระบบไม่ผ่านไรโบโซม	8
4 โมดูลและโดเมนของเอนไซม์ NRPSs หรือ PES	10
5 ภาพจำลองโครงสร้างของโมดูลในเอนไซม์ NRPSs ประกอบด้วยส่วนที่เป็นลำดับอนุรักษณ์แต่ละโดเมน	11
6 โครงสร้างสารเมตาบอไลต์จากกระบวนการสังเคราะห์แบบไม่ผ่านไรโบโซม โดยแบ่งกลุ่มตามการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	13
7 รูปแบบการเกิด membrane permeation ของสารปฏิชีวนะ amphipathic α -helical linear peptide	16
8 แบบจำลองการระบุตำแหน่งของลำดับกรดอะมิโนสัญลักษณ์ (signature sequence หรือ binding-pocket constituent) และส่วนที่เป็น core sequences เป็นลำดับที่มีความอนุรักษณ์สูง	19
9 องค์ประกอบสำคัญ 3 ส่วนของเครื่องวัดสเปกตรัมมวล	20
10 วิธีการสกัดสาร (Extraction) I – III และขั้นตอนการสกัดสาร	25
11 การวิเคราะห์กรดอะมิโนโดย TLC เปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB และการเติมกรดอะมิโนอิสระ Aib	36
12 การตรวจสอบกรดอะมิโนในสารสกัดโดยวิธี TLC เพื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดอะมิโน Aib อิสระที่เติมในอาหาร 3 % ME เลี้ยงเชื้อ <i>T. asperellum</i> BCC 12530	38
13 กิจกรรมการยับยั้งเชื้อ <i>B. cereus</i> ด้วยเทคนิคดูดซับสารในหลุมอาหารแข็งของสารสกัดจากเชื้อราตัวอย่าง	39
14 โครงสร้างยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการศึกษาวิธีการสกัดสารแบบที่ III	41

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
15	% recovery ของ gramicidin, bacitracin และ amphotericin B เมื่อสกัดด้วยวิธีแบบที่ III	41
16	การทำให้สารสกัดจากเชื้อ <i>T. asperellum</i> BCC 12530 บริสุทธิ์บางส่วนโดย Thin Layer Chromatography (TLC)	42
17	การทดสอบยับยั้ง <i>B.cereus</i> ATCC 11778 โดยเทคนิค agar well diffusion	44
18	การเปรียบเทียบวิธีการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดโดยเทคนิค agar well diffusion และ microdilution	45
19	การเปรียบเทียบระบบเฟสเคลื่อนที่ในเทคนิค TLC	47
20	การตรวจสอบกรดอะมิโนโดยเปรียบเทียบกันระหว่างสารสกัดก่อนและหลังการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วย TLC จาก <i>T. asperellum</i> BCC 12530	48
21	การวิเคราะห์กรดอะมิโนด้วย HPLC โดย AccQ•Tag™ method	49
22	แสดงการวิเคราะห์กรดอะมิโนด้วยเทคนิค TLC กับสารสกัดเชื้อราทั้งหมด 27 สายพันธุ์	51
23	การวิเคราะห์มวลโดยเทคนิค LC-ESI/MS	53
24	แบบจำลองบางส่วนของยีน <i>pes</i> โดยประกอบด้วย A, T และ C-domain และตำแหน่งของไพรเมอร์ทั้ง 3 คู่ คือ C2F&C5R, C4F&C6R และ C2F&AibR	55
25	การทดสอบหาอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมของไพรเมอร์ C2F&C5R	57
26	การหาองค์ประกอบและสภาวะที่เหมาะสมในการทำพีซีอาร์ของไพรเมอร์ C4F&C6R	58
27	การหาองค์ประกอบและสภาวะที่เหมาะสมในการทำพีซีอาร์ของไพรเมอร์ C2F&AibR โดยการปรับความเข้มข้น MgCl ₂ และไพรเมอร์ทั้ง 2 ด้าน	59
28	การทดสอบหาอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมในการทำพีซีอาร์ของไพรเมอร์ C2F&AibR	60
29	สภาวะ อุณหภูมิ และเวลาที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยาพีซีอาร์และไพรเมอร์แต่ละคู่	61
30	การทำพีซีอาร์จากจีโนมจีโนมของ <i>T. asperellum</i> BCC12530 (เชื้ออ้างอิง) กับไพรเมอร์ C2F&C5R, C4F&C6R และ C2F&AibR	61

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
ก1 การทำ multiple alignment โดยใช้โปรแกรม ClustalW (version 2) ของข้อมูลลำดับกรดอะมิโนเพื่อออกแบบไพรเมอร์ C4F&C6R	88
ก2 การทำ multiple alignment ส่วน A-domain ของกรดอะมิโน Aib จากฐานข้อมูล NCBI โดยโปรแกรม CLUSTAL W (2) และตำแหน่งไพรเมอร์ C2F&AibR	91

การคัดกรองเชื้อราที่ผลิตเปปไทด์ไบโอติกส์โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล

Molecular Screening for Peptaibiotics Producing Fungi

คำนำ

ปัจจุบันนี้เชื้อแบคทีเรียและราก่อโรคจำนวนมากมีความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะสูงขึ้น ดังนั้นการแสวงหาแหล่งของสารปฏิชีวนะชนิดใหม่หรือที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าเดิม จึงมีความสำคัญเพื่อให้ทันต่อความต้องการ สารปฏิชีวนะในกลุ่มเปปไทด์ชนิดหนึ่งคือ เปปไทด์ไบโอติกส์ (peptaibiotics) มีกิจกรรมทางชีวภาพสูงต่อการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและเชื้อรา สามารถทำลายผนังเซลล์จนเกิดรูรั่วได้ อีกทั้งสารดังกล่าวสามารถทนต่อการสลายได้ดีเป็นผลให้เปปไทด์ไบโอติกส์ได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้น

สารปฏิชีวนะในกลุ่มเปปไทด์ผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายกลุ่ม โดยทั่วไปจะพบในเชื้อรา และมักมีคุณสมบัติในการต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค โดยเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะเปปไทด์คือ non-ribosomal peptide synthetases (NRPSs) ซึ่งแปลรหัสจากยีน *nrps* เอนไซม์เหล่านี้มีโครงสร้างเป็น โมดูล (module) หลายโมดูลต่อเนื่องกัน แต่ละโมดูลประกอบด้วยโดเมน (domain) ที่มีความจำเพาะต่อปฏิกิริยา ในส่วนโดเมนเหล่านี้พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์ (conserve sequence) หลายตำแหน่งซึ่งเป็นประโยชน์ในการออกแบบและสังเคราะห์ไพรเมอร์จำเพาะ (specific primers) ต่ออินไดไพรเมอร์จำเพาะจะสามารถใช้ในการคัดกรองเชื้อราที่มีการผลิตเปปไทด์ไบโอติกส์ได้ โดยการทำพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction; PCR) รวมทั้งการใช้เทคนิคทางเคมี คือ Thin Layer Chromatography (TLC) เพื่อตรวจสอบกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของเปปไทด์ไบโอติกส์ และการทดสอบกิจกรรมทางชีวภาพ (bioassay) ของสารสกัด ก็จัดเป็นกระบวนการคัดกรองสารปฏิชีวนะเปปไทด์ได้เช่นกัน

เทคนิคทางชีวโมเลกุลคือ การทำพีซีอาร์ ซึ่งคาดว่าจะสามารถใช้ประโยชน์ในการคัดกรองเชื้อราที่ผลิตเปปไทด์ไบโอติกส์ได้ และเป็นวิธีการปฏิบัติในระยะเวลาสั้น ครั้นละหลายตัวอย่าง อีกทั้งยังช่วยลดแรงงานคน สามารถประยุกต์ใช้กับจุลินทรีย์กลุ่มอื่น ๆ ได้ ดังนั้นวิธีการคัดกรองทางชีวโมเลกุลนี้จึงได้รับความสนใจและน่าเชื่อถือมากขึ้นในปัจจุบัน

วัตถุประสงค์

1. เพื่อพัฒนาไพรเมอร์จำเพาะ (specific primers) ร่วมกับวิธีพีซีอาร์ตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับ non ribosomal peptide synthetase (*nrps*) และ peptaibiotic synthetase (*pes*) ในเชื้อรา
2. เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบประสิทธิภาพการใช้ไพรเมอร์จำเพาะในการทำพีซีอาร์ตรวจสอบยีน *nrps* และ *pes* กับวิธี TLC และการทดสอบทางชีวภาพ (bioassay)

การตรวจเอกสาร

1. เปปไทไบโอติกส์ (Peptaibiotics)

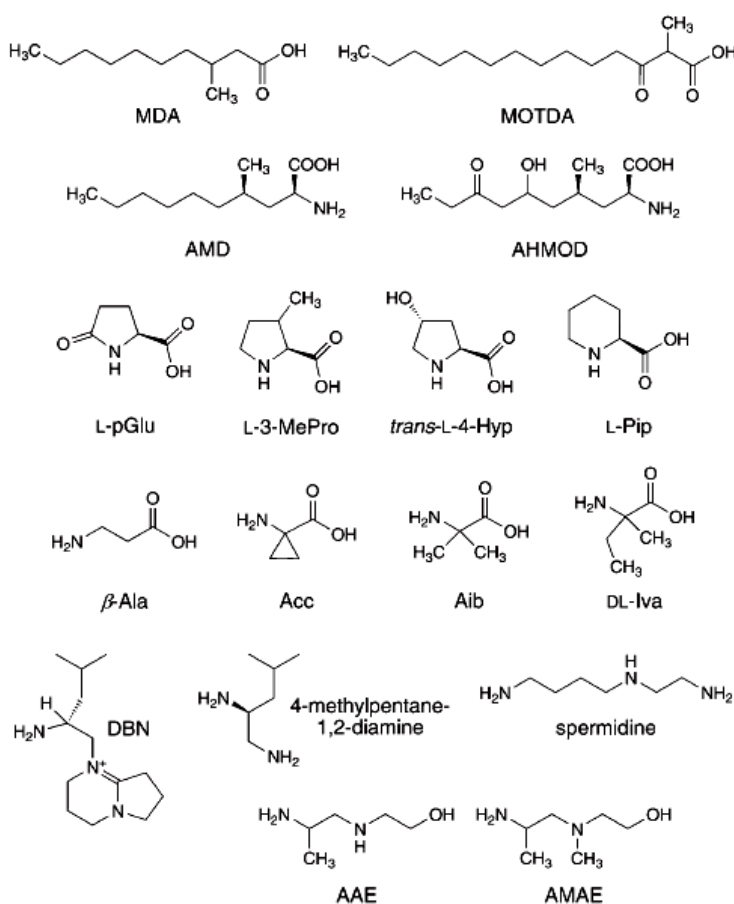
1.1 นิยามและลักษณะที่สำคัญของเปปไทไบโอติกส์

เปปไทไบโอติกส์เป็นสารปฏิชีวนะจำพวกเปปไทด์สายตรง (linear peptide antibiotic) จากเชื้อรา มีลักษณะสำคัญคือ สายเปปไทด์มีความยาว 5 – 21 เรซิดิวส์ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 500 – 2,200 ดัลตัน (Dalton) ในสายเปปไทด์ประกอบด้วยกรดอัลฟาอะมิโนไอโซบิวทิริก (α -aminoisobutyric acid; Aib) ปริมาณสูง โดยมากจะมีกรดอะมิโนแบบไม่มาตรฐาน (non-standard amino acids) และ/หรือ กรดลิโปอะมิโน (lipoamino acid) (ภาพที่ 1) เป็นองค์ประกอบด้วย กรดอะมิโนทางด้านปลายไนโตรเจน (N – terminus) และคาร์บอน (C – terminus) มีการดัดแปลง (modification) ไปจากกรดอะมิโนปกติ โดยเปปไทไบโอติกส์สามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อย (subgroup) ตามลักษณะสำคัญบางประการรวมทั้งปลายด้านไนโตรเจนและคาร์บอน (Degenkolb *et al.*, 2006; Krause *et al.*, 2006; Degenkolb *et al.*, 2007) ได้ดังนี้

1.1.1 เปปไทโบล (peptaibol) เป็นเปปไทด์ที่มีการดัดแปลงปลายด้านไนโตรเจนโดยเกิดปฏิกิริยาอะซิไทลเลชัน (acetylation) กับกรดอะซิติกเกิดเป็นหมู่อะซิไทล (acetyl) และปลายด้านคาร์บอนเป็น กรดอะมิโนแอลกอฮอล์ (1,2 – amino alcohol) เช่น phenylalaninol (Pheol), valinol (Valol) หรือ leucinol (Leuol)

1.1.2 ลิโปเปปไทโบล (lipopeptaibol) มีลักษณะเฉพาะที่ปลายไนโตรเจนเป็น lipophilic acyl chain คือการเกิดปฏิกิริยาอะซิไทลเลชันหรือ อะซิเลต (acylated) กับกรดไขมัน (fatty acid) ความยาวสายขนาดกลาง (8 – 15 คาร์บอน) เช่น octanoic, decanoic หรือ cis-dec-4-enoic acid เป็นต้น ส่วนปลายด้านคาร์บอนเป็นกรดอะมิโนแอลกอฮอล์เช่นเดียวกับเปปไทโบลและความยาวสายเปปไทด์เท่ากับ 6 – 10 เรซิดิวส์ (Toniole *et al.*, 2001) ตัวอย่างของลิโปเปปไทโบลที่สำคัญคือ trichogins จากเชื้อ *T. longibrachiatum* มีขนาด 11 เรซิดิวส์ ปลายไนโตรเจนเป็น N-octanoyl และปลายคาร์บอนเป็น leucinol (Auvion-Guette *et al.*, 1992) เป็นต้น

1.1.3 ลิโปอะมิโนเปปไทด์ (lipoaminopeptide) หรือ อะมิโนลิโปเปปไทด์ (aminolipopeptide) เป็นเปปไทด์ที่มีปลายในโตเจนเกิดอะซิเลตกับกรดหรือกรดไขมันขนาด 4-15 ที่อิ่มหรือไม่อิ่มตัว และปลายด้านคาร์บอนเป็นกรดอะมิโนแอลกอฮอล์เช่นเดียวกับเปปไทโดล นอกจากนี้ในสายเปปไทด์ตำแหน่งเรซิดิวที่ 1 มักเป็น L-proline-, trans-4-hydroxy-L-proline หรือ cis-4-methyl-L-proline และที่สำคัญคือ ตำแหน่งเรซิดิวที่ 2 จะเป็น lipoamino acid ได้แก่ 2-amino-6-hydroxy-4-methyl-8-oxo-decanoic acid (AHMOD) ตัวอย่างลิโปอะมิโนเปปไทด์ เช่น culicinin มี butanoic acid (BTA) เกิดปฏิกิริยาอะซิเลชันที่ปลายในโตเจน มี AHMOD ที่เรซิดิวที่ 2 และที่ปลายคาร์บอนเป็น 2-(2'-aminopropyl) aminoethanol (APAE) (He *et al.*, 2006) เป็นต้น



ภาพที่ 1 องค์ประกอบของเปปไทโดลที่จำเพาะ (uncommon constituent) กรดอะมิโนแบบไม่มาตรฐานและ/หรือกรดลิโปอะมิโน

ที่มา: Degenkolb, *et al.* (2007)

นอกจากนี้ยังมียังมีเปปไทด์โอบีโอติกส์บางชนิดที่ไม่ได้จัดอยู่ใน 3 กลุ่มย่อยตามที่กล่าวมาแล้ว เช่น cicadapeptins ขนาด 7 เรซิดิวส์ ผลิตจากเชื้อ *Cordyceps heteropoda* เป็นราก่อโรคในแมลง (entomopathogenic fungus) ซึ่งสารนี้มีการดัดแปลงปลายในโตรเจนโดยเกิดปฏิกิริยาอะซิทธิลเลชันกับ *N*-decanoic acid และที่ปลายคาร์บอนเกิดพันธะเอไมด์กับ 1,2-diamino-4-methylpentane (Krasnoff *et al.*, 2005)

ปัจจุบันมีรายงานเกี่ยวกับเปปไทด์โอบีโอติกส์ จำนวนมากกว่า 300 ชนิด ในด้านต่าง ๆ เช่น โครงสร้าง ลำดับกรดอะมิโน กิจกรรมการทำงาน และแหล่งจุลินทรีย์ที่ผลิต เป็นต้น ในฐานข้อมูล Peptaibol database ที่เว็บไซต์ www.cryst.bbk.ac.uk/peptaibol/home.shtml (Whitmore and Wallace, 2004)

1.2 การจำแนกเปปไทด์โอบีโอติกส์

เปปไทด์โอบีโอติกส์สามารถจัดจำแนกได้เป็น 9 subfamilies (SFs) ตามจำนวนและตำแหน่งของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ โดยเฉพาะตำแหน่งของกรดอะมิโน Aib (ภาพที่ 2, ตัวอักษรทึบ) (Chugh and Wallace, 2001; Neuhof *et al.*, 2007) ซึ่งจัดเป็นกลุ่มหลักๆ ได้ดังนี้

1.2.1 เปปไทด์โอบีโอติกส์ขนาดใหญ่ มีจำนวนกรดอะมิโน 17 – 21 เรซิดิวส์ โดยจะมีกรดอะมิโน Aib 6 – 9 เรซิดิวส์ อยู่ในตำแหน่งที่ 1 หรือ 2, 3, 4, 6, 8, 10, 13 , 16 และ 17 ได้แก่ SF1 เช่น alamethicin, longhibrachin และ trichorzin เป็นต้น

1.2.2 เปปไทด์โอบีโอติกส์ขนาดกลาง มีจำนวนกรดอะมิโน 11 – 16 เรซิดิวส์ มีกรดอะมิโน Aib 3 – 7 เรซิดิวส์ ได้แก่ SF2-8 ซึ่งแต่ละ SF แยกโดยตำแหน่งของกรดอะมิโน Aib อยู่ในตำแหน่งที่ 1 หรือ 2, 3 หรือ 4, 7, 8, 9 และ 12 หรือ 14 เช่น hazianin, trichorovin, trichogin และ trikoningin เป็นต้น

1.2.3 เปปไทด์โอบีโอติกส์ขนาดเล็ก มีจำนวนกรดอะมิโน 5 – 10 เรซิดิวส์ ได้แก่ SF9 ซึ่งเป็นกลุ่มที่ยังมีการค้นพบไม่มากนัก เช่น peptaibolin มีกรดอะมิโน Aib อยู่ในตำแหน่งที่ 2 และ 4 เป็นต้น

SF1		SF5	
- PF -A IAQ V GL PFV EQF	Alamethicin_F30	GL GGL GIL	Trichogin_A_IV
- IA A IAQ V GL PFV KQGF	Longibrachin_LGAIV	GV GGV GIL	Trikoningin_KB_1
- SA X --QXV GL PL Q QW	Trichorzin_PA_IV	XGV GGV GIL	Trikoningin_KB_II
F S XL --QG IAA PF Q QW	Chrysospermin_C		
SF2		SF6	
F GL XGL HQ XH PF	Antiamoebin_I	WA LL QL LL QL QL	Ampullosporin
F DUU VGL HQ XHA -F	Emerimicin_IV	WV XAQA S MA L QL	Tylopeptin_A
-V DUU VGL HQ XH -F	Bergofungin_D	WV XAQA S MA L QL	Tylopeptin_B
SF3		SF7	
L IQ IT L HQ XH PF	L1_zervamicin	LP Y QQ L ZQ AL	LP237_F5
W IQ IT L HQ XH PF	Emerimicin_IIA	LP F QQ L ZQ AL	LP237_F7
WX Q IT L PQ H X P FG	XR586	LP F QQ L ZQ AL	LP237_F8
SF4		SF8	
N L PSV P L L PL	Harzianin_HC_I	HL XH L X H X HXI	Clonostachin
Q L PA I P L L PL	Harzianin_HC_XV		
N I --- I P L L PI	Trichorovin_TV_XIIa	SF9	
XQV --- V P L L PL	Hypomurocin_HMA2	L L L F	Peptaibolin

ภาพที่ 2 ลำดับกรดอะมิโนที่เป็นสมาชิกของเปปไทโไบโอติกในแต่ละ subfamilies; SF 1 – 9 และกรดอะมิโน Aib หรือ U แสดงเป็นตัวทึบ

ที่มา: Chugh and Wallace (2001)

1.3 แหล่งเปปไทโไบโอติกส์ (peptidaiotic sources)

แหล่งจุลินทรีย์ที่มีการสังเคราะห์เปปไทโไบโอติกส์ คือ เชื้อรา โดยเฉพาะกลุ่มเชื้อราดิน (soil-borne fungi) และเชื้อราก่อโรคพืช (plant-pathogenic fungi) รวมถึงพวกเชื้อราที่สร้างสี (fungicolous species, mycophilic taxa) ทั่วไปแล้วสายพันธุ์เชื้อราที่ไม่อาศัยเพศ (fungi imperfecti) มีรายงานกลุ่มเชื้อราที่สามารถผลิตสารเหล่านี้จำนวนมาก ได้แก่ *Trichoderma*, *Acremonium*, *Paecilomyces* และ *Emericellopsis* นอกจากนี้ มีข้อมูลของเชื้อราสายพันธุ์อื่นๆ ที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการผลิตสารกลุ่มเปปไทโไบโอติกส์ด้วย แสดงในตารางที่ 1 (Degenkolb *et al.*, 2003)

นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบเปปไทโไบโอติกส์ กลุ่มเปปไทโบล จากเชื้อราที่เป็น basidiomycetes เช่น เชื้อ *Boletus* spp. ซึ่งพบว่าผลิต boletusin ขนาด 19 เรซิดิวส์ มีกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิด และ *Tylopilus neofelleus* ผลิต tylopeptins A, B โดยสกัดได้จากก้านเห็ด ประกอบด้วย 14 เรซิดิวส์ ปลายคาร์บอนเป็น leucinol และมีกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิด แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคและแบคทีเรียแกรมลบ (Lee *et al.*, 1999a; Lee *et al.*, 1999b)

ตารางที่ 1 เชื้อราที่มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะในกลุ่มไทไบโอติกส์

Name of peptaibiotic	Isolated from
Chrysospermins	<i>Sepedonium chrysospermum</i>
Peptaibolin	<i>Sepedonium</i> sp.
Ampullosporins	<i>Sepedonium ampullosporum</i>
Hypomurocins A and B	<i>Hypocrea muroiana</i>
Some of the hypelcins	<i>Hypocrea peltata</i>
Clonostachin	<i>Clonostachys</i> sp.
Aibellin	<i>Verticimonosporium ellipticum</i>
Stilboflavins	<i>Stilbella flavipes</i>
Antiamoebin I	<i>Verticillium epiphytum</i>
Gliodeliquescin	<i>Gliocladium deliquescens</i>
Efraeptins	<i>Tolypocladium inflatum</i>

ที่มา: Degenkolb *et al.* (2003)

2. การสังเคราะห์เปปไทไบโอติกส์

การสังเคราะห์เปปไทไบโอติกส์ในเชื้อรา มีระบบควบคุมการสร้างที่จำเพาะคือไม่ใช้ระบบของไรโบโซม (non-ribosomal system) แต่เป็นการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ขนาดใหญ่ที่มีหลายหน้าที่ (multifunctional enzyme) ได้แก่ เอนไซม์ nonribosomal peptide synthetases (NRPSs) ซึ่งมีองค์ประกอบและการทำงานคล้ายกับระบบไรโบโซม (ribosomal system)

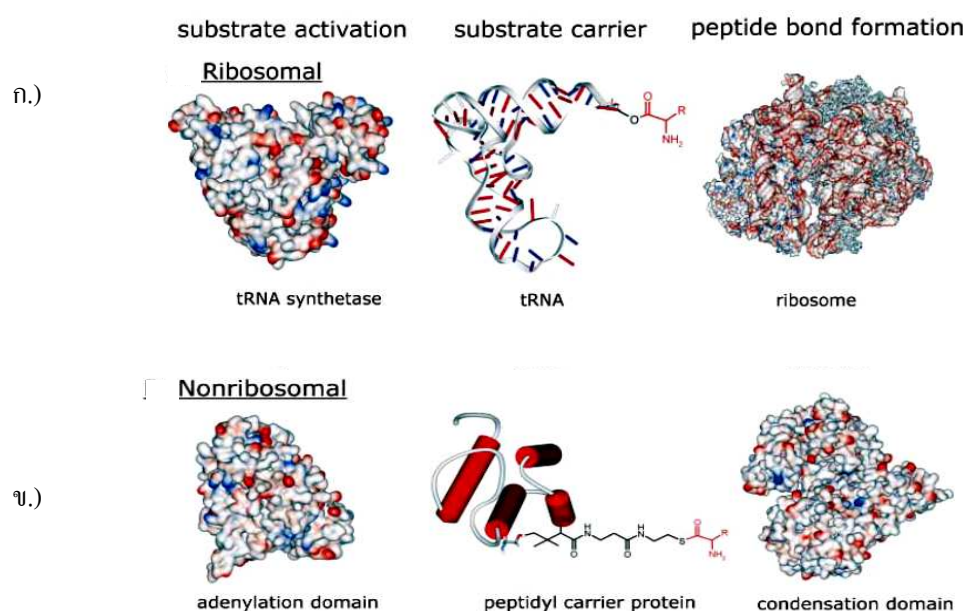
2.1 การเปรียบเทียบระบบการสังเคราะห์เปปไทด์

การสังเคราะห์เปปไทด์หรือโปรตีนทั้ง 2 ระบบคือ ระบบไรโบโซมและไม่ใช้ไรโบโซมแสดงการเปรียบเทียบเอนไซม์พื้นฐานของแต่ละระบบและการทำงานในตารางที่ 2 ระบบไรโบโซมจะประกอบด้วย เอนไซม์ t-RNA synthetases, t-RNA และไรโบโซม (ภาพที่ 3 ก.) โดย t-RNA synthetases ทำหน้าที่กระตุ้นกรดอะมิโนกลายเป็น acyl adenylate จากนั้น t-RNA นำกรดอะมิโนที่อยู่ในสถานะกระตุ้นส่งมายังไรโบโซมเพื่อสร้างพันธะเปปไทด์ (peptide bond) กับกรดอะมิโนตัวที่สองบน t-RNA โมเลกุลถัดไป และเกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องกันไปได้ผลิตภัณฑ์เป็นเปปไทด์หรือโปรตีนนั่นเอง

ในภาพที่ 3 ข.) แสดงเอนไซม์พื้นฐานของระบบการสังเคราะห์เปปไทด์โดยไม่ใช้ไรโบโซม ประกอบด้วย adenylation domain (โดเมน A) ทำหน้าที่กระตุ้นกรดอะมิโนเป็น acyl adenylate เช่นเดียวกับ t-RNA synthetase แต่มีโครงสร้างของเอนไซม์ไม่เกี่ยวข้องกัน ซึ่งกรดอะมิโนที่กระตุ้นแล้วจะขนส่งโดย peptidyl carrier protein หรือ thiolation domain (โดเมน PCP หรือ T ตามลำดับ) และ condensation domain (โดเมน C) จะทำหน้าที่เชื่อมพันธะเปปไทด์ระหว่างกรดอะมิโนที่อยู่ตำแหน่ง (n-1) บนโดเมน T (Finking and Marahiel, 2004)

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบเอนไซม์พื้นฐานของการสังเคราะห์เปปไทด์หรือโปรตีนทั้ง 2 ระบบ คือ ระบบไรโบโซมและไม่ใช้ไรโบโซม

System	Basic enzymes	
	Ribosomal synthesis	Nonribosomal synthesis
1. cognation and activation amino acid	t-RNA synthetases	A domain
2. transportation unit	t-RNA	PCP or T domain
3. formation of a peptide bond	ribosome	C domain



ภาพที่ 3 เอนไซม์พื้นฐานที่จำเป็นสำหรับการสังเคราะห์เปปไทด์หรือโปรตีน ก.) แบบระบบไรโบโซม และ ข.) ระบบไม่ผ่านไรโบโซม

ที่มา: Finking and Marahiel (2004)

การสังเคราะห์เปปไทด์โดยระบบไรโบโซม เกิดขึ้นในกระบวนการเมตาบอลิซึมขั้นปฐมภูมิ (primary metabolism) และทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนที่จำเป็นในเซลล์ อย่างไรก็ตามการสังเคราะห์เปปไทด์โดยไรโบโซมจะจำเพาะกับกรดอะมิโนมาตรฐานจำนวน 20 ชนิดมาเป็น building blocks ของโปรตีน ในขณะที่สับสเตรตของเอนไซม์ NRPSs ในระบบไม่ใช้ไรโบโซมนั้นใช้กรดอะมิโนแบบไม่มาตรฐาน (non proteinogenic amino acids) หรือมีการดัดแปลงแตกต่างกันออกไปเป็นองค์ประกอบ (Marahiel *et al.*, 1997) ดังนั้นความหลากหลายของโครงสร้างเปปไทด์ รวมทั้งเปปไทด์ไบโอดีคส์จากระบบนี้ จึงมีความสามารถและประสิทธิภาพที่แตกต่างไปจากระบบไรโบโซม

2.2 การจำแนกโดเมนในโมดูล

เอนไซม์ NRPSs ในระบบไม่ใช้ไรโบโซม ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว ประกอบด้วยโมดูล (modules) หลายโมดูลจัดเรียงกันอยู่ แต่ละโมดูลจะเป็นตัวกำหนดกรดอะมิโนในสายโซ่โพลีเปปไทด์ ซึ่งมีหน้าที่รับผิดชอบการนำเอาแต่ละกรดอะมิโนหรือ building block มาเชื่อมกันด้วยพันธะเปปไทด์รวมเป็นสายเปปไทด์หรือโปรตีนที่ยาวขึ้น (Finking and Marahiel, 2004) ดังนั้นเอนไซม์ NRPSs ทำหน้าที่เป็นแม่แบบ ในการกำหนดกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในสายเปปไทด์ไบโอดีคส์

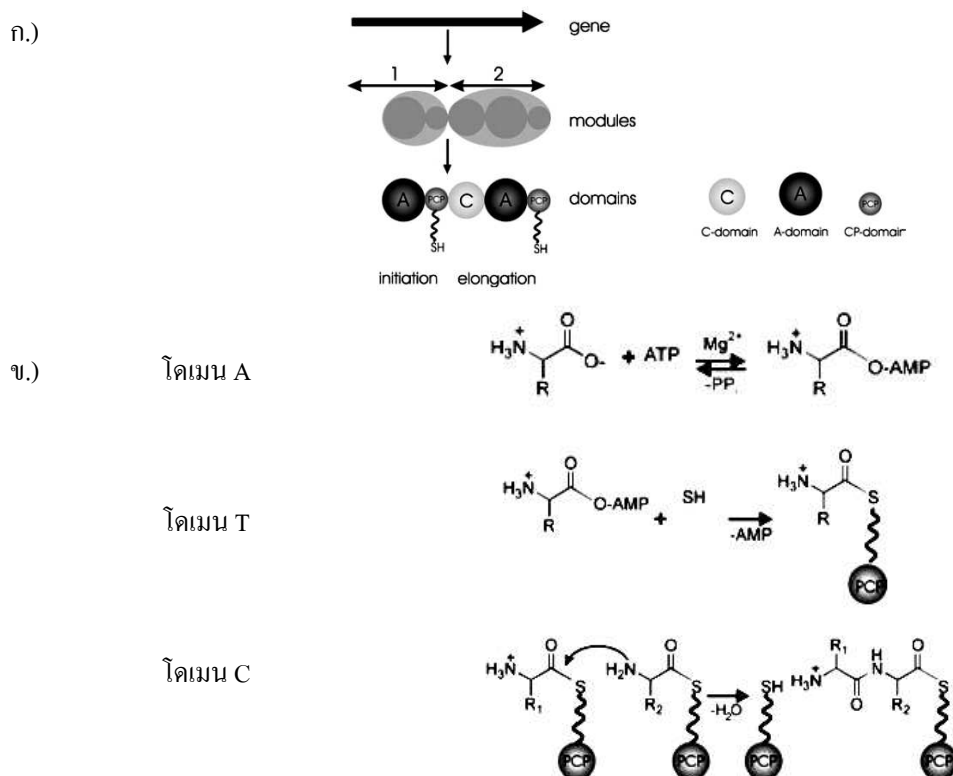
การสังเคราะห์เปปไทด์โดยระบบไม่ใช้ไรโบโซม สามารถแบ่งหน่วยเอนไซม์ย่อยๆ ภายในโมดูลได้ ซึ่งเรียกว่า โดเมน (domains) โดเมนเหล่านี้จะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาขั้นต่ำ แสดงในภาพที่ 4 ในแต่ละโมดูลประกอบด้วยโดเมนที่สำคัญ 3 โดเมนและมีหน้าที่ต่าง ๆ กัน (Marahiel *et al.*, 1997; Mootz and Marahiel, 1997; Finking and Marahiel, 2004; von Dohren, 2004) ดังนี้

2.2.1. Adenylation (A) domain มีขนาดประมาณ 500 เรซิดิวส์ ทำหน้าที่ substrate activation คือกระตุ้นกรดอะมิโนหรือสับสเตรตด้วย ATP ให้อยู่ในสถานะ amino acyl adenylate

2.2.2. Peptidyl carrier protein (PCP) หรือ Thiolation (T) domain มีขนาดประมาณ 80-100 เรซิดิวส์ ทำหน้าที่ขนส่งกรดอะมิโนที่กระตุ้นแล้ว โดยโคแฟกเตอร์ 4'-phosphopantetheine (4'PP) จะเกิดปฏิกิริยา posttranslational phosphopantetheinylation กับ carrier protein (CP) เกิดเป็นโดเมน PCP ทำให้มี serine residue บนโดเมน PCP จากนั้นกรดอะมิโนที่

กระตุ้นแล้วจากโดเมน A จะเกิดการจับแบบ covalent binding กลายเป็นพันธะ thioester กับ serine residue ซึ่งมีลักษณะเป็นแขนยาวยืดหยุ่นได้ดี

2.2.3. Condensation (C) domain ขนาดประมาณ 450 เรซิดิวส์ เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพันธะเปปไทด์ (peptide bond formation) ระหว่างกรดอะมิโนที่กระตุ้นแล้วบนโดเมน T ที่อยู่ติดกันไปในตำแหน่ง n และ (n-1) ทำให้พันธะ thioester ของกรดอะมิโนตำแหน่ง (n-1) จะหลุดออก และสายเปปไทด์จะไปอยู่บนโดเมน T ทางตำแหน่ง n ซึ่งเป็นโมดูลถัดไป จากนั้นจะเกิดปฏิกิริยาเติมกรดอะมิโนโดยเอนไซม์เหล่านี้เพื่อเพิ่มความยาวสายเปปไทด์ (elongation) ต่อเนื่องกันไป



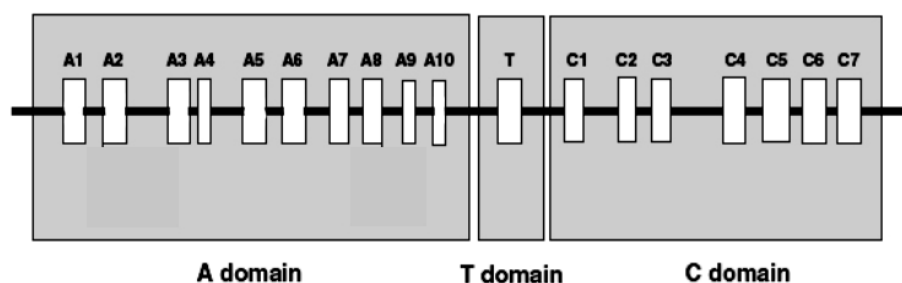
ภาพที่ 4 โมดูลและโดเมนของเอนไซม์ NRPSs ก.) แบบจำลองโมดูลได้จากการถอดรหัสของยีน *nrps* โดยแต่ละโมดูลสามารถแบ่งย่อยได้เป็นโดเมน ข.) แสดงการทำงานของแต่ละโดเมน ดังนี้ โดเมน A ทำหน้าที่กระตุ้นสับสเตรตหรือกรดอะมิโน, โดเมน PCP หรือ T ทำหน้าที่ขนส่งกรดอะมิโนที่กระตุ้นแล้วไปตำแหน่งที่เหมาะสม คือโดเมน C เกิดการสร้างพันธะเปปไทด์เชื่อมกรดอะมิโนระหว่างโดเมน PCP 2 โมดูลที่อยู่ติดกันทำให้สายเปปไทด์ยาวขึ้น (elongation)

ที่มา: Finking and Marahiel (2004)

นอกจากโดเมนเหล่านี้ ยังมีโดเมนอื่นๆ อีกนอกจาก 3 โดเมนหลักที่กล่าวแล้วข้างต้น เช่น epimerisation domain ทำหน้าที่ดัดแปลงโครงสร้างกรดอะมิโนจาก L-isomer ไปเป็น D-isomer ซึ่งเป็นโดเมนที่อยู่ต่อกับ T domain และ methyltransferase domain เป็นโดเมนที่อยู่ต่อกับ A domain ทำหน้าที่เติมหมู่เมทิลในตำแหน่งหมู่เอไมด์ของกรดอะมิโนเกิดเป็นพันธะ N-methylated peptide bond ซึ่งโดเมนเหล่านี้ทำให้ได้โครงสร้างเปปไทด์ที่หลากหลายยิ่งขึ้น มีกิจกรรมทางชีวภาพ และทำให้ทนต่อการสลายตัว (proteolytic cleavage) ได้ดี (Marahiel *et al.*, 1997; von Dohren, 2004)

2.3 บริเวณอนุรักษ์ของโดเมน

ในแต่ละโดเมนจะมีบริเวณลำดับอนุรักษ์ (Conserved sequence motifs) อยู่จำนวนมาก การระบุตำแหน่งของบริเวณอนุรักษ์ในโดเมนจากการตรวจสอบลำดับกรดอะมิโน (amino acid sequence) ซึ่งมีส่วน consensus sequence motifs ต่าง ๆ (ภาพที่ 5 และ ตารางที่ 3) โดยบริเวณเหล่านี้มีประโยชน์สำหรับการออกแบบไพรเมอร์จำเพาะและการทำฟิชเชอร์เพื่อใช้ในการบ่งชี้ *nrps* ที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ NRPSs



ภาพที่ 5 ภาพจำลองโครงสร้างของโมดูลในเอนไซม์ NRPSs ประกอบด้วยส่วนที่เป็นลำดับอนุรักษ์ (consensus sequence motifs; รูปสี่เหลี่ยมสีขาว) บนแต่ละโดเมน
ที่มา: Vizcaino *et al.* (2005)

ตารางที่ 3 ลำดับกรดอะมิโนในส่วน consensus sequence motifs ที่มีบริเวณอนุรักษ์สูงของแต่ละโดเมนในเอนไซม์ NRPSs

Domain ^a	Region ^b (core) ^c	Consensus sequence
adenylation	A1	L(TS)YxEL
	A2 (core 1)	LKAGxAYL(VL)P(Bechinger <i>et al.</i>)D
	A3 (core 2)	LAYxxYTSG(ST)TGxPKG
	A4	FDxS
	A5	NxYGPTE
	A6 (core 3)	GELxIxGxG(VL)ARGYL
	A7 (core 4)	Y(RK)TGDL
	A8 (core 5)	GRxDxQVKIRGxRIELGEIE
	A9	LPxYM(IV)P
	A10	NGK(VL)DR
thiolation	T (core 6)	DxFFxxLGG(HD)S(Bechinger <i>et al.</i>)
condensation	C1	SxAQxR(LM)(WY)xL
	C2	RHExLRTxF
	C3 (His)	MHHxISDG(WV)S
	C4	YxD(FY)AVW
	C5	(IV)GxFVNT(QL)(CA)xR
	C6	(HN)QD(YV)PFE
	C7	RDxSRNPL

^a จากภาพที่ 5

^b แต่ละส่วนของเอนไซม์ที่มี consensus sequence แสดงในภาพที่ 5 รูปสี่เหลี่ยมสีขาว

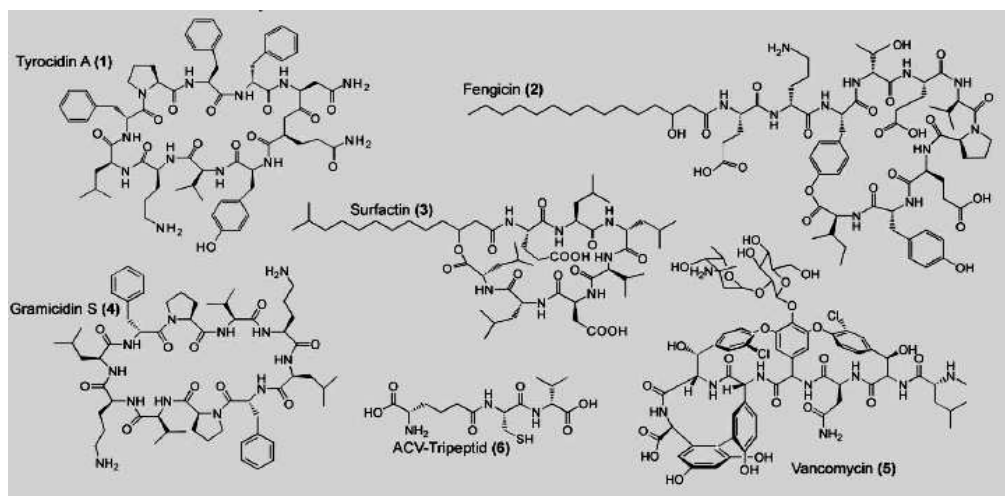
^c ส่วน core ของเอนไซม์เป็นส่วนสำคัญต่อการทำงาน

ที่มา: Marahiel *et al.* (1997)

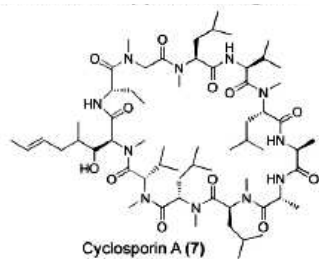
3. สารเมตาบอไลต์กลุ่มเปปไทด์จากระบบไม่ใช้ไรโบโซม

สารเมตาบอไลต์กลุ่มเปปไทด์จากระบบการสังเคราะห์โดยระบบไม่ใช้ไรโบโซมจัดเป็นคลาส (class) หนึ่งของผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ (natural product) ที่มีคุณสมบัติพิเศษทางเภสัช ซึ่งพบว่ามีโครงสร้างที่หลากหลาย ตัวอย่างของสารเมตาบอไลต์เปปไทด์เหล่านี้ โดยแบ่งกลุ่มตามกิจกรรมการออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ทั้งหมด 4 กลุ่ม แสดงในภาพที่ 6 ก. – ง. (Marahiel *et al.*, 1997; Schwarzer *et al.*, 2003) ภาพที่ 6 ก. กลุ่ม antibiotic หรือ antibiotics precursors เช่น ACV-tripeptide (6) เป็นตัวอย่างของสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ยาปฏิชีวนะเพนนิลลิน penicillin และ cephalosporine ส่วนสารอื่น ๆ ในภาพที่ 6 ก. เป็นกลุ่มสารที่มีกิจกรรมเป็นสารปฏิชีวนะ และเปปไทด์ไบโอติกส์จัดเป็นเพนนิลลิน (family) หนึ่งในกลุ่มนี้ด้วย ภาพที่ 6 ข. กลุ่ม immunosuppressive agent เช่น cyclosporine (7) สามารถกดภูมิคุ้มกันได้ ใช้ในการ

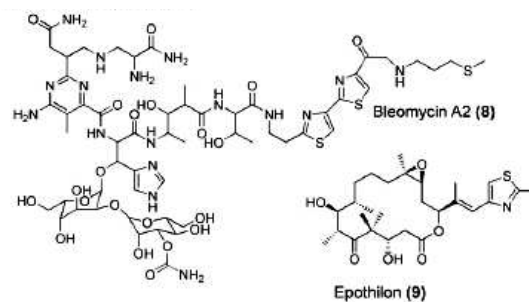
ก. antibiotics/antibiotic precursors



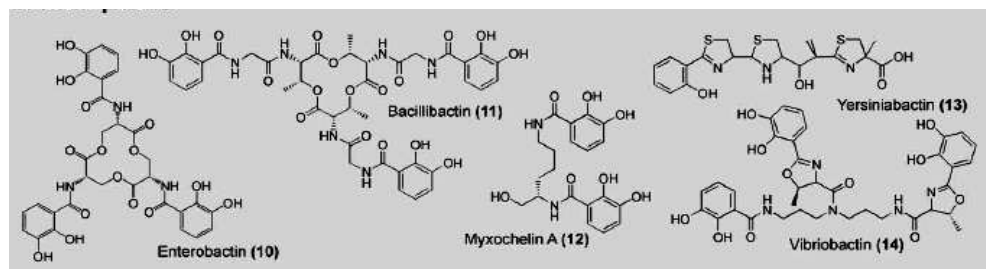
ข. immunosuppressive agent



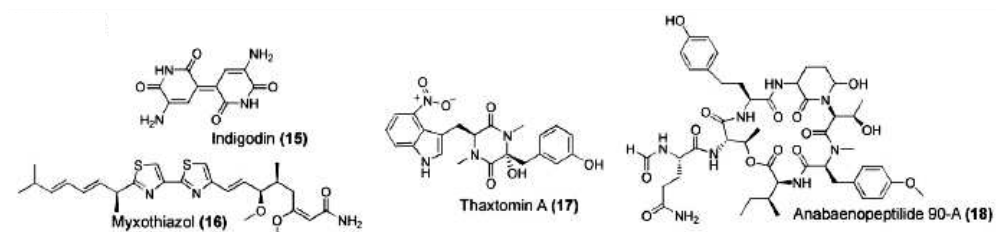
ค. cytostatic agents



ง. siderophores



จ. อื่น ๆ



ภาพที่ 6 โครงสร้างสารเมตาบอไลต์จากกระบวนการสังเคราะห์แบบไม่ผ่านไรโบโซม โดยแบ่งกลุ่มตามการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ที่มา: Schwarzer *et al.* (2003)

รักษาการปลูกถ่ายอวัยวะ ภาพที่ 6 ค. กลุ่ม cytostatic agent เช่น bleomycin (8) epothilon (9) และ ตามลำดับ ซึ่งแสดงคุณสมบัติเป็น cytostatic คือการควบคุมเซลล์ให้อยู่ในสภาวะคงที่ซึ่งรักษาโรคมะเร็งได้ ภาพที่ 6 ง. กลุ่ม siderophores เป็นกลุ่มของสารประกอบธาตุเหล็ก (iron-chelating substance) เช่น bacillibactin (11) ซึ่งการผลิตขึ้นอยู่กับปริมาณธาตุเหล็ก (Fe) ในสิ่งแวดล้อมที่เชื้อผู้ผลิตอาศัยอยู่ ส่วนกลุ่มอื่น ๆ (ภาพที่ 6 จ.) เช่น indigodin (15) เป็นรงควัตถุ (pigment), thaxtomin A (17) เป็นท็อกซิน และ anabaenopeptilide (18) เป็นเปปไทด์ที่ยังไม่ทราบหน้าที่ (Schwarzer *et al.*, 2003; Finking and Marahiel, 2004) เป็นต้น

จากข้อมูลดังกล่าวนี้จะเห็นได้ว่าผลิตภัณฑ์จำพวกเปปไทด์ของกระบวนการผลิตโดยระบบไม่ใช่ไรโบโซม ก่อนข้างมีความหลากหลายสูงรวมถึงกลุ่มสารที่มีคุณสมบัติทางชีวภาพ มีกิจกรรมในการยับยั้งเชื้อเป้าหมาย เป็นผลให้ผลิตภัณฑ์เปปไทด์เหล่านี้ได้รับความสนใจ และมีการศึกษาในหลายด้าน

4. กลไกและกิจกรรมการทำงานของเปปไทด์ไบโอติกส์

4.1 กลไกการทำงาน (mechanisms of action)

โครงสร้างของสายเปปไทด์ไบโอติกส์มีลักษณะเป็นแบบ amphipathic α -helical linear peptide มีประจุบวก (net positive charges) โมเลกุลส่วนใหญ่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ดังนั้นกลไกการทำงานของเปปไทด์ไบโอติกส์เหล่านี้ ส่วนใหญ่เกิดการเข้าทำปฏิกิริยาโดยการจับและแทรกซึมกับเยื่อหุ้มเซลล์ (มีคุณสมบัติเป็น phospholipid bilayer) ซึ่งเรียกว่า membrane permeation และเรียกเปปไทด์ที่มีคุณสมบัติดังกล่าวนี้ว่า membrane-active peptides กลไกสำคัญ 2 แบบคือ การทำลายและรบกวนสภาวะของเยื่อหุ้มเซลล์โดย carpet-like model และการสร้างรูแบบ barrel-stave model (Oren and Shai, 1998; Lohner and Blondelle, 2005; Duclouhier, 2006)

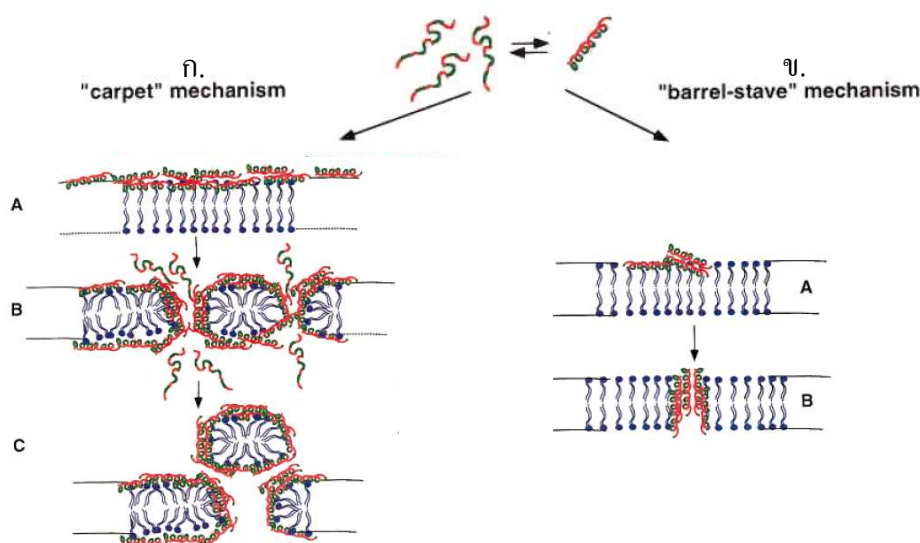
กลไกแบบ carpet-like model เริ่มต้นจากเปปไทด์ที่มีโครงสร้าง α -helical เข้าจับและปกคลุมบนผิวเยื่อหุ้มเซลล์ในลักษณะการปูพรม การแทรกผ่านเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์เป้าหมายขึ้นอยู่กับอัตราส่วนความเข้มข้นของโมเลกุลเปปไทด์มากถึงระดับหนึ่งเท่านั้น ซึ่งต่างกับ barrel-stave model คือไม่แทรกไปยังบริเวณส่วนเยื่อหุ้มที่เป็นลิปิดโดยตรง แต่จะจับกับหมู่ phospholipid headgroups ทำให้ส่วนลิปิดที่อยู่ภายในเบียดเข้าหากันเอง (ภาพที่ 7 ก.) ขั้นตอนสำคัญของกระบวนการนี้ คือ 1. เปปไทด์โมเลกุลเดี่ยวซึ่งมีประจุบวกเข้าจับกับ phospholipid headgroups ซึ่งมีประจุลบ 2. เปปไทด์โมเลกุลเดี่ยวเกิดการกระจายทั่วผิวน้ำเยื่อหุ้มเซลล์ โดย

ประจุบวกที่เกิดจากกรดอะมิโนบนเปปไทด์ทำปฏิกิริยากับประจุลบของ phospholipid headgroups หรือโมเลกุลน้ำ 3. เรซิดิวที่เป็น hydrophilic ด้านหน้าของเปปไทด์โมเลกุลเดี่ยวเกิดการหมุนเข้าหาส่วนเยื่อหุ้มเซลล์ที่เป็น hydrophilic เช่นกัน และส่วนลิพิดเกิดการบิดงอเข้าหากัน และ 4. เยื่อหุ้มเซลล์จะแยกออกจากกันเนื่องจากเกิดการรบกวนสภาพของชั้น bilayer ซึ่งมีลักษณะโค้งเข้าหากัน เรียกว่า micellisation เป็นผลให้เกิดช่องโหว่ บางรายงานเรียกกลไกการเกิดรูรั่วแบบนี้ว่า toroidal หรือ wormhole model

กระบวนการสร้างรูรั่วทะลุผ่านเยื่อหุ้มเซลล์แบบดั้งเดิมนี้อธิบายได้โดย barrel-stave model ซึ่งเปปไทด์โครงสร้าง α -helical หลายโมเลกุลเชื่อมต่อกัน เป็นผลให้ด้าน hydrophobic surfaces เกิดปฏิกิริยากับฟอสโฟลิพิดส่วนกลางของเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยแรง hydrophobic interaction ส่วนด้าน hydrophilic surfaces มีลักษณะเป็นช่องโหว่ (transmembrane pore) ทำให้เกิดรูรั่วกับเยื่อหุ้มเซลล์ (ภาพที่ 7 ข.) การเกิดกลไก barrel-stave model มี 4 ขั้นตอนหลักๆ คือ 1. การจับกันของเปปไทด์โมเลกุลเดี่ยว (monomer) ที่มีโครงสร้างเป็น α -helical แล้ว กับเยื่อหุ้มเซลล์ 2. เกิดการจดจำพันธะการจับกันของโมเลกุลเดี่ยวกับเยื่อหุ้มเซลล์ เป็นผลให้มีความหนาแน่นของผิวหน้าเยื่อหุ้มเซลล์ลดน้อยลง 3. โมเลกุลเดี่ยวที่เชื่อมต่อกันอย่างน้อย 2 โมเลกุล เกิดการแทรกเข้าไปที่เยื่อหุ้มเซลล์และเริ่มต้นการสร้างช่องโหว่ และ 4. เกิดการเพิ่มจำนวนและดึงเปปไทด์โมเลกุลเดี่ยวเข้าหากันขยายช่องโหว่ให้ใหญ่ขึ้น (Oren and Shai, 1998; Lohner and Blondelle, 2005; Duclouhier, 2006)

ตัวอย่างการศึกษาการทำงานของเปปไทด์โอบิติกส์ เช่น alamethicin เป็นเปปไทด์โอบิตที่มีขนาด 20 เรซิดิวส์ จะมีลักษณะบิดงอแบบ helical distorter เนื่องจากมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนบางชนิดเช่น โพรลีน หรือ ไกลซีน ซึ่งลักษณะพิเศษดังกล่าวนี้ทำให้เกิดการสร้างรูรั่วหรือช่องโหว่ และกลไกการเกิดช่องมีสาเหตุเนื่องจากไอออน ซึ่งเรียกว่า voltage-gated ซึ่งเป็นแบบ barrel-stave model (Chugh and Wallace, 2001; Duclouhier, 2004)

trichogin เป็นเปปไทด์โอบิติกส์กลุ่มลิโปเปปไทด์โอบิต มีขนาด 11 เรซิดิวส์ซึ่งสั้นกว่า alamethicin ครั้งหนึ่ง พบว่าส่วนปลายในโตรเจนเป็น N – octanoyl เกิดการแทรกเข้าไปในเยื่อหุ้ม lipid bilayer บางส่วนและโครงสร้างหลัก α -helical จับกับผิวเซลล์ด้านนอกในลักษณะของกลไกแบบ carpet-like model (Epand *et al.*, 1999; Chugh and Wallace, 2001)



ภาพที่ 7 รูปแบบการเกิด membrane permeation ของสารปฏิชีวนะ amphipathic α -helical linear peptide โดยแสดงเป็นแบบ carpet-like model (ก.) และ barrel-stave model (ข.) ตามลำดับ ขั้นตอน A คือการเข้าจับผิวหน้าเยื่อหุ้มเซลล์ โดยเปปไทด์ที่เกิดเป็นโครงสร้าง α -helical ด้าน hydrophobic surfaces (green area) ขั้นตอน B และ C คือการแทรกผ่านสู่บริเวณชั้นไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยเปปไทด์หันด้าน hydrophilic surfaces (red area) ออกสู่สารละลายทำให้เกิดช่อง

ที่มา: Oren and Shai (1998)

4.2 กิจกรรมการทำงาน (activity)

เปปไทด์โอบิดิกส์มีกิจกรรมต่อต้านการเจริญของจุลินทรีย์ค่อนข้างกว้าง ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและเชื้อรา เปปไทด์โอบิดิกส์บางชนิดสามารถต่อต้านไวรัสและโปรโตซัวได้ด้วย ตัวอย่างของเปปไทด์โอบิดิกส์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น trichokonins เป็นเปปไทด์โอบิดิกส์ที่มีความคงตัวในหลายอุณหภูมิและ pH สังเคราะห์ได้จากเชื้อรา *T. konigii* SMF2 มีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* และ *Streptococcus faecalis* อีกทั้งสามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช (plant pathogen) ได้แก่ *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* และ *Rhizoctonia solani* (Song et al., 2006)

สิทธิบัตร US patent No. 6582949 แสดงเปปไทด์โอบิดิกส์ที่สามารถควบคุมและต่อต้านการเจริญของปรสิตได้ คือ cephaibols มีกรดอะมิโน 16 เรซิดิวส์ ผลิตจากเชื้อรา *Acremonium tubakii* FH 1685 DSM 12774 ซึ่งทดสอบการยับยั้งพยาธิในลำไส้ เช่น ตัวอ่อน

ของพยาธิตัวกลมในไก่ (*Ascaridia galli*) รวมทั้งพวกโปรโตซัวด้วย เช่น ตัวอ่อนของหมัดในแมว (*Ctenocephalide felis*) อีกทั้งสาร cephaibols นี้สามารถพัฒนาไปเป็นผลิตภัณฑ์ยาที่ใช้กับคน และสัตว์ได้ (Vertesy *et al.*, 2003)

เปปไทโทไบโอติกส์บางชนิดมีกิจกรรมการยับยั้งเซลล์มะเร็ง เช่น culicinin D ซึ่งผลิตโดยเชื้อราก่อโรคในแมลง *Culicinomyces clavisporus* LL-12I252 ซึ่งเป็นเปปไทโบลขนาดสั้น 10 เรซิดิวส์ มีโครงสร้างเป็น α -helix สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม MDA468 (PTEN-negative) โดยแสดงค่า LC_{50} น้อยกว่า $0.007 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (He *et al.*, 2006)

peptaivirin A และ B เป็นเปปไทโทไบโอติกส์ขนาดใหญ่ 19 เรซิดิวส์ ผลิตจากเชื้อราที่ยังไม่ทราบจีนัส สายพันธุ์ KGT142 แสดงกิจกรรมการยับยั้งไวรัส Tobacco mosaic virus (TMV) ได้ดี โดยแสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 74 และ 79 ที่ความเข้มข้น $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ตามลำดับ (Yun *et al.*, 2000) นอกจากนี้มีรายงานว่า Peptaivirin A และ B จากเชื้อรา *Apiocrea* sp. 14T สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคพืช *Corynebacterium lilium* เชื้อรา *Aspergillus niger* อีกทั้งมีคุณสมบัติยับยั้งเซลล์มะเร็ง K562 (leukemia) และ UACC62 (melanoma) (Yeo *et al.*, 2002)

5. การศึกษายีน *nrps* โดยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

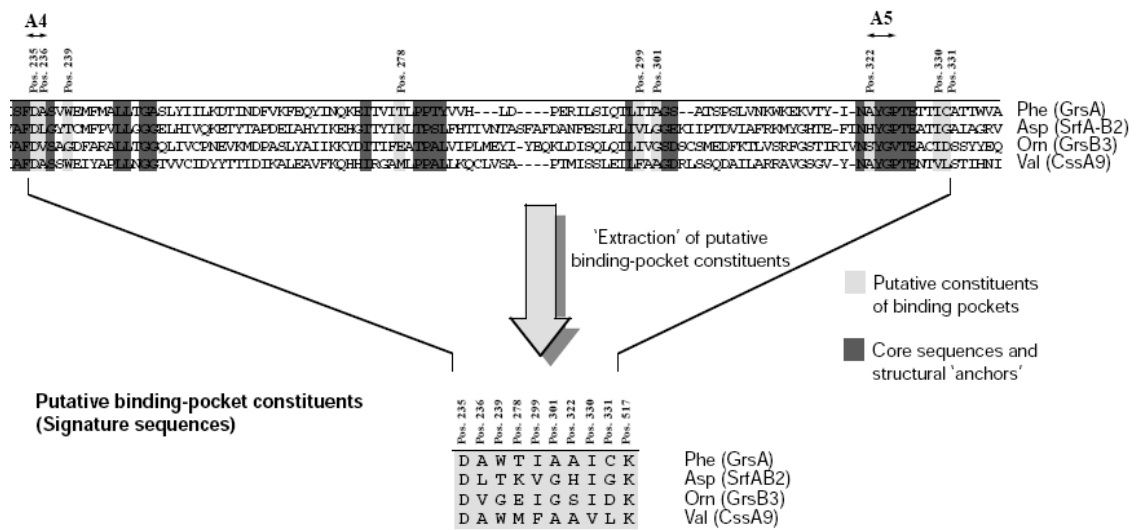
มีรายงานเกี่ยวกับการใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล เช่น การทำฟิชเชอร์และไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณอนุรักษ์บนโดเมนของเอนไซม์ NRPSs ที่ถอดและแปลรหัสจากยีน *nrps* การโคลนยีน หรือการตรวจสอบยีนโดยใช้โพรบ (probe hybridization) ตัวอย่างของการศึกษาเหล่านี้ เช่น Wilhite และคณะ (2001) รายงานการโคลน cDNA บางส่วน ขนาด 5 kb ของยีน *psy1* ซึ่งแปลรหัสได้เอนไซม์ putative peptide synthetase (เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม NRPSs) จากเชื้อ *T. virens* ซึ่งการศึกษานี้มีการคัดแยกยีนโดยการทำฟิชเชอร์กับไพรเมอร์ที่ออกแบบจากโดเมน A ในส่วน core 2 และ core 4 Wiest และคณะ (2002) ได้รายงานชิ้นยีนทั้งหมดที่เกี่ยวข้องกับ เอนไซม์ peptaibol synthetase ในเชื้อราสายพันธุ์เดียวกัน คือ *T. virens* โดยใช้ชื่อยีน *nrps* นี้ว่า *tex1* มีขนาด 62.8 กิโลเบส ซึ่งแปลเป็นกรดอะมิโน TEX1 ได้ 18 โมดูลโดยพบว่าสามารถสังเคราะห์เปปไทโบลคือ trichorzins TVA และ TVB มีขนาด 18 เรซิดิวส์ การศึกษานี้ใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากส่วนของโดเมน A บริเวณอนุรักษ์ core 2 และ core 5 จากเอนไซม์ และยีนดังกล่าวนี้ได้ขึ้นทะเบียนไว้ที่ฐานข้อมูล NCBI ด้วยรหัส AAM78457 ซึ่งทั้ง 2 รายงานดังกล่าวคาดว่าเป็นยีนเดียวกันโดย *psy1* เป็นส่วนทาง 3' terminal ของยีน *tex1*

การศึกษาชิ้น *pes* บางส่วนในเชื้อรา *T. asperellum* ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ เปปไทด์ไอบีโอติกส์ trichotoxins ซึ่งการศึกษานี้ได้ผลิตโพรบจากการทำพีซีอาร์ในส่วนโดเมน A บริเวณอนุรักษ core 2 และ core 5 สำหรับตรวจสอบโคลนของ *T. asperellum* ทั้งหมด 25 โคลน และพบว่าลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากโคลนมี 86 % identity กับโปรตีน NRPSs อื่นๆ รวมทั้ง TEX1 ด้วย (Chutrakul and Peberdy, 2005)

ยีน *salp1* ซึ่งเป็น peptide synthetase gene ขนาด 19 กิโลเบส ประกอบด้วย 4 โมดูลของเชื้อรา *T. hanzonia* CECT 2413 การคัดกรองยีนยีนดังกล่าวด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบจากโดเมน A ในส่วน core 1 และ core 5 (Vizcaino *et al.*, 2005) ซึ่งใช้หลักการหาบริเวณ consensus sequences ของยีนแบบเดียวกับการศึกษาของ Wilhite และคณะ ปี 2001 และ Wiest และคณะ ในปี 2002 โดยเชื้อราสายพันธุ์ดังกล่าวคาดว่าผลิตเปปไทด์ไอบีโอติกส์ขนาด 18 และ 11 เรซิดิวส์ ซึ่งมีมวลโมเลกุล $[M+H]^+$ m/z เท่ากับ 1,711 – 1,781 และ 1,197 – 1,227 Da ตามลำดับ และเอนไซม์ Salps1 ได้รับการพิสูจน์ว่าไม่เกี่ยวข้องกับการผลิต siderophore อีกด้วย (Vizcaino *et al.*, 2006)

6. การศึกษาลำดับกรดอะมิโนสัญลักษณ์ (Signature sequence)

การตรวจสอบลำดับกรดอะมิโนสัญลักษณ์มีต้นแบบจากเอนไซม์ GrsA ซึ่งเป็น peptide synthetases สำหรับผลิต gramicidin S โดยใช้โมดูลแรก ซึ่งจำเพาะกับกรดอะมิโน phenylalanine โดยมีการศึกษาโครงสร้าง 3 มิติของผลึกโปรตีน (crystal) ในส่วนโดเมน PheA (phenylalanine-activating adenylation domain) พบว่ามีตำแหน่งต่างๆ สำหรับจดจำ สับสเตรตที่จำเพาะบนโดเมน A ดังนั้นจึงใช้หลักเกณฑ์ดังกล่าวมาเป็นแนวทางการทำนายกรดอะมิโนบนเปปไทด์ไอบีโอติกส์ (Stachelhaus and Marahiel, 1995) ลำดับกรดอะมิโนสัญลักษณ์จะอยู่ในส่วนโดเมน A โดยจะประกอบไปด้วย 8 – 10 เรซิดิวส์ (Stachelhaus *et al.*, 1999) ซึ่งกรดอะมิโนในตำแหน่งต่างๆ นี้จะเป็นสัญลักษณ์ในการกำหนดสับสเตรตที่จำเพาะ (ภาพที่ 8) ตัวอย่างจากการศึกษาของ Wiest และคณะ ค.ศ. 2002 แสดงลำดับสัญลักษณ์ของยีน *tex1* ในโดเมน A จากทุกโมดูลของเปปไทด์ไอบีโอติกส์ trichothazines รวมทั้งลำดับกรดอะมิโนสัญลักษณ์ของ aminoisobutyric acid (Aib; U) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนสำคัญของเปปไทด์ไอบีโอติกส์ (ตารางที่ 4)



ภาพที่ 8 แบบจำลองการระบุตำแหน่งของลำดับกรดอะมิโนสัญลักษณ์ (signature sequence หรือ binding-pocket constituent, แถบสีอ่อน) และส่วนที่เป็น core sequences เป็นลำดับที่มีความอนุรักษ์สูง (แถบสีเข้ม)

ที่มา: Stachelhaus *et al.* (1999)

ตารางที่ 4 ลำดับกรดอะมิโนสัญลักษณ์ของยีน *tex1* ในโดเมน A ของเชื้อรา *T. virens* โดย J: isovaline, U: aminoisobutyric acid (Aib), V-OH: valinol

Amino acid	Module	Signature sequence position								
		235	236	239	278	299	301	322	330	331
Q	6	D	G	G	M	V	G	G	N	Y
Q	17	D	G	G	M	V	G	G	N	Y
J/U	7	D	C	G	W	V	V	G	V	V
U	1	D	L	G	Y	L	A	G	V	F
U	9	D	L	G	Y	L	A	G	C	F
U	12	D	L	G	Y	L	A	G	V	F
U	15	D	L	G	F	L	A	G	V	F
U	16	D	L	G	F	L	A	G	L	F
U/A	5	D	L	G	W	L	C	G	V	F
A	3	D	V	G	F	V	A	G	V	L
A	8	D	I	F	V	V	A	G	V	I
L	11	D	F	L	Y	F	G	G	V	V
L/V	14	D	A	A	L	I	G	A	V	F
V	4	D	M	G	F	L	G	G	V	C
V-OH	18	D	A	I	I	I	V	G	V	T
G	2	D	I	G	M	V	V	G	V	I
S	10	D	V	G	Y	L	A	A	V	Y
P	13	D	V	L	F	C	G	L	I	C

ที่มา: Wiest *et al.* (2002)

7. การศึกษาสเปกตรัมมวล (Mass spectrometry; MS) ของเปปไทด์ไบโอดีคส์

เทคนิค MS คือการวัดอัตราส่วนมวลต่อประจุของไอออน (mass-to-charge ratio; m/z) และเขียนกราฟความเข้มฟังก์ชันระหว่างความหนาแน่นของไอออน (intensities) และ m/z โดยแสดงผลในรูปแบบของ คัลตันส์ (Daltons; Da) ต่อ 1 ยูนิตประจุ (Juliana and Filho, 2007) ปัจจุบันเทคนิค MS นี้ มีการพัฒนาและประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ทางเคมีและชีวภาพแล้วค่อนข้างมาก ทำให้ MS เป็นเครื่องมือสำคัญสำหรับการศึกษาวงจรชีวภาพหรือผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ เช่น จุลชีพและพืชสมุนไพร เป็นต้น เครื่องวัดสเปกตรัมมวล (mass spectrometer) ประกอบไปด้วย 3 ส่วนสำคัญ คือ แหล่งกำเนิดประจุ (ionization source) เครื่องวิเคราะห์มวล (mass analyzer) และเครื่องตรวจวัด (detector) แสดงในภาพที่ 9 ซึ่งการรายงานนี้จะกล่าวเฉพาะเทคนิคสำหรับการศึกษาสเปกตรัมมวลของเปปไทด์ไบโอดีคส์เท่านั้น



ภาพที่ 9 องค์ประกอบสำคัญ 3 ส่วนของเครื่องวัดสเปกตรัมมวล ก.) แหล่งกำเนิดประจุ ข.) เครื่องวิเคราะห์มวล และ ค.) เครื่องตรวจวัด

แหล่งกำเนิดประจุที่นิยมใช้สำหรับการศึกษาเปปไทด์ไบโอดีคส์ คือ Fast atom/ion bombardment (FAB) ซึ่งวิธีนี้เป็นเทคนิคแรกๆ ที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้สำหรับศึกษาโมเลกุลสารที่ไม่ระเหย (non-volatile molecules) และมีขั้ว (polar molecules) มีการศึกษาเพื่อหาลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ไบโอดีคส์โดย FAB ประกอบกับ tandem mass spectrometry (MS/MS) การศึกษามวลและหาลำดับกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในเปปไทด์ไบโอดีคส์โดยการวิเคราะห์ FAB-MS เช่น atroviridins A, B และ C จากเชื้อ *T. atroviride* (Oh *et al.*, 2000) peptaivirins A และ B เปปไทด์โบลขนาด 19 เรซิดิวส์ แยกได้จากเชื้อราสายพันธุ์ KGT142 (Yun *et al.*, 2000) และ เปปไทด์ไบโอดีคส์ clonostachins มีขนาด 14 เรซิดิวส์ มีปลายคาร์บอนเป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ ผลิตจากเชื้อรา *Clonostachys* sp. F5898 (Chikanishi *et al.*, 1997) เป็นต้น

แหล่งกำเนิดประจุที่สร้างโดยเทคนิค Liquid Secondary Ionization (LSI) จะผสมกับเมทริกซ์ เช่น 3-nitrobenzyl alcohol ที่อิมด้วย LiCl ดังนั้นมวลโมเลกุลอาจมีไอออนของ

ลิเทียมด้วย และวิธี LSI จะสามารถใช้ประกอบกับ MS/MS เพื่อหาลำดับกรดอะมิโนในโครงสร้างได้ ตัวอย่างเปปไทด์โอดีคส์ที่ศึกษาด้วยเทคนิค LSI-MS เช่น harzianin HB I ขนาด 11 เรซิดิวส์ จากเชื้อ *T. harzianum* (Augeven-Bour *et al.*, 1997)

การสร้างไอออนอีกวิธีหนึ่งคือ Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation (MALDI) โดยจะนำตัวอย่างมาผสมกับเมทริกซ์และจับตัวเป็นผลึก (crystal) ซึ่งเป็นของแข็งก่อนแล้วใช้เลเซอร์ยิงไปเป็นการสร้างไอออนให้กับตัวอย่าง โดยวิธีนี้มักเกิดมวล m/z แบบ singly charge คือมวลที่มีหนึ่งประจุ เช่น $[M+H]^+$ เป็นต้น ตัวอย่างของเปปไทด์โอดีคส์ที่ศึกษาด้วยวิธีนี้ เช่น การวิเคราะห์ MS ของเปปไทด์โอดีคส์ที่ผลิตโดยเชื้อรา *Trichoderma/Hypocrea* เพื่อทำนายโครงสร้างของเปปไทด์โอดีคส์ร่วมกับความสัมพันธ์ทางโมเลกุล ด้วยเทคนิค Intact-cell MALDI-TOF คือการสกัดสารอย่างรวดเร็วโดยทำลายเส้นใยเชื้อราจำนวนเล็กน้อยและสกัดด้วยสารละลาย acetonitrile : methanol : water (1 : 1 : 1) แล้วนำสารสกัดไปวิเคราะห์มวลด้วยแหล่งกำเนิดประจุคือ MALDI และการวิเคราะห์มวลโดย Time-of-Flight (TOF) (Neuhof *et al.*, 2007) มีรายงานการใช้เทคนิคดังกล่าวนี้ในการศึกษาปัจจัยแสงต่อการสร้าง atroviridins ในเชื้อ *H. atroviridis* อีกด้วย (Zelakowska-Komon *et al.*, 2007)

อีกวิธีที่นิยมในการศึกษาโปรตีนหรือเปปไทด์ที่มีขนาดมวลใหญ่ (macromolecules) คือ Electrospray ionisation (ESI) ซึ่งเทคนิคนี้ค่อนข้างมีข้อได้เปรียบคือ ช่วยลดขั้นตอนการทดสอบ รวมทั้งปัญหาเรื่องการจับตัวกับเมทริกซ์เพื่อสร้างคริสตัล ซึ่งมักทำให้เกิดไอออนที่ไม่ใช่มวลที่แท้จริง (pseudo molecular ions) เทคนิคนี้มักใช้ต่อเนื่องกับเครื่องมืออื่น ได้แก่ HPLC ซึ่งจะเรียกว่า LC-ESI/MS เช่น การศึกษาโมเลกุลและลำดับของ trichobrachins จากเชื้อ *Trichoderma parceramosum* (syn. *T. longibrachiatum*) โดยเทคนิค LC/ESI-MS มีแหล่งกำเนิดไอออน ESI และการวิเคราะห์มวลโดย ion trap (Krause *et al.*, 2007) เทคนิคต่อเนื่องนี้สามารถตรวจสอบเปปไทด์โอดีคส์ปริมาณน้อยๆ ได้จากสิ่งแวดล้อมด้วย เช่น การตรวจหา alamethicin F50 ในตะกอนจากน้ำทะเล ซึ่งพบว่าเทคนิคดังกล่าวสามารถตรวจพบสารทดสอบได้ในระดับพิโคกรัมต่อกรัมของตะกอน (Poirier *et al.*, 2007) ดังนั้นจะเห็นได้ว่า LC-ESI-IT/MS มีประสิทธิภาพสูงและตรวจสอบสารที่มีปริมาณน้อยๆ ได้ดี นอกจากนี้ มีการศึกษาที่ใช้แหล่งกำเนิดไอออน ESI เช่นเดียวกัน แต่มีการวิเคราะห์มวลต่างกันออกไปคือ การเชื่อมระหว่าง 2 เทคนิค ได้แก่ Quadrupole และ reflectron TOF เรียกว่า QTOF เช่น trichotoxins จาก *T. harzianum* ซึ่งพบว่ามียค่า m/z เป็น singly doubly และ triply charges คือมวลที่มีการเพิ่ม electron charge เป็น 1, 2 หรือ 3 ตามลำดับ เป็นต้น (Suwan *et al.*, 2000)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. เชื้อจุลินทรีย์

1.1 เชื้อราที่ใช้ในการทดลองทั้งหมด 57 สายพันธุ์ จาก 2 แหล่งเก็บสายพันธุ์จุลินทรีย์ ดังนี้

1.1.1 ห้องปฏิบัติการเก็บรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ (Biotec Culture Collection; BCC) ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) โดยเป็นเชื้อราในกลุ่มจีโนมที่คาดว่าสามารถผลิตเปปไทด์หรือเปปไทโดลิติกส์ทั้งหมด 49 สายพันธุ์ แสดงในตารางที่ 5 เก็บรักษาเชื้อโดยเลี้ยงบนอาหารแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA, Bacto™) ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ผสมกับกลีเซอรอล 50 % เก็บที่ - 80 °C การเตรียมหัวเชื้อทำโดยเพาะเชื้อในจานอาหาร PDA และบ่มที่ 25 °C เป็นเวลา 7 - 10 วัน

ตารางที่ 5 เชื้อราที่คาดว่าสามารถผลิตเปปไทโดลิติกส์จากห้องปฏิบัติการเก็บรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์

Microorganism	BCC No.	Group
<i>Acremonium murorum</i>	5762	Soil fungi
<i>Acremonium polychromum</i>	242	Soil fungi
<i>Acremonium polychromum</i>	4913	Soil fungi
<i>Acremonium roscolum</i>	4870	Alkaline tolerant fungi
<i>Acremonium</i> sp.	5978	Palm fungi
<i>Acremonium</i> sp.	9257	Marine fungi
<i>Acremonium</i> sp.	18314	Unspecified
<i>Acremonium</i> sp. (<i>Clonostachys rogersoniana</i>)	4862	Alkaline tolerant fungi
<i>Acremonium</i> sp. (<i>Fusarium oxysporum</i>)	4868	Alkaline tolerant fungi
<i>Acremonium</i> sp. (<i>Verticillium luteo-album</i>)	4744	Alkaline tolerant fungi
<i>Acremonium strictum</i>	5763	Soil fungi
<i>Hypocrea</i> sp. (<i>Bionectria pityrodes</i>)	4293	Soil fungi
<i>Paecilomyces carneus</i>	17957	Unspecified
<i>Paecilomyces cinnamomeus</i>	2107	Insect Pathogenic fungi
<i>Paecilomyces farinosus</i>	17978	Unspecified
<i>Paecilomyces inflatus</i>	18241	Unspecified
<i>Paecilomyces javanicus</i>	17980	Unspecified
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	372	Soil fungi
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	496	Soil fungi
<i>Paecilomyces marquandii</i>	107	Soil fungi
<i>Paecilomyces marquandii</i>	108	Soil fungi
<i>Paecilomyces marquandii</i>	4506	Soil fungi
<i>Paecilomyces</i> sp.	17467	Unspecified
<i>Paecilomyces variotii</i>	17535	Unspecified
<i>Paecilomyces variotii</i>	17797	Unspecified

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Microorganism	BCC No.	Group
<i>Stilbella annulata</i>	4653	Alkaline tolerant fungi
<i>Stilbella annulata</i>	4916	Soil fungi
<i>Stilbella emericellopsis</i>	3903	Seed fungi
<i>Stilbella fimetaria</i>	4985	Soil fungi
<i>Stilbella holubovae</i>	12353	Freshwater fungi
<i>Stilbella</i> sp.	4742	Alkaline tolerant fungi
<i>Stilbella</i> sp.	7545	Seed fungi
<i>Stilbella</i> sp.	8283	Wood Decay Fungi
<i>Trichoderma koningii</i>	17392	Unspecified
<i>Trichoderma pseudokoningii</i> (<i>Trichoderma qhanense</i>)	18053	Unspecified
<i>Trichoderma</i> sp.	12542	Palm fungi
<i>Trichoderma</i> sp.	14173	Palm fungi
<i>Trichoderma</i> sp.	20419	-
<i>Trichoderma</i> sp. (<i>Hypocrea lixii</i>)	488	Soil fungi
<i>Trichoderma</i> sp. (<i>Hypocrea lixii</i>)	14814	-
<i>Trichoderma</i> sp. (<i>Mariannaea camptospora</i>)	12193	Freshwater fungi
<i>Trichoderma</i> sp. (<i>Paraconiothyrium estuarinum</i>)	19994	Marine fungi
<i>Trichoderma</i> sp. (<i>Trichoderma asperellum</i>)	196	Soil fungi
<i>Trichoderma</i> sp. (<i>Trichoderma asperellum</i>)	12530	Palm fungi
<i>Trichoderma</i> sp. (<i>Trichoderma atroviride</i>)	11207	Aquatic fungi
<i>Trichoderma</i> sp. (<i>Trichoderma hazianum</i>)	436	Soil fungi
<i>Trichoderma</i> sp. (<i>Trichoderma parceramosum</i>)	17716	Unspecified
<i>Trichoderma</i> sp. (<i>Trichoderma velutinum</i>)	13402	Saprobic fungi
unknown (<i>Talaromyces stipitatus</i>)	17183	Unspecified

หมายเหตุ ในวงเล็บแสดงการระบุสายพันธุ์เชื้อโดยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของยีน ITS1, 5.8s และ ITS2 (ตารางผนวกที่ ก1) และจะใช้ชื่อสายพันธุ์ที่ได้สำหรับงานวิจัยนี้ในลำดับต่อไป

1.1.2 ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ ทั้งหมด 8 สายพันธุ์แยกจากดินจากอำเภอเมือง จังหวัดกระบี่ แสดงในตารางที่ 6

1.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบกิจกรรมการยับยั้ง โดยเชื้อแบคทีเรียที่เลือกมาทดสอบเป็นเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งมีอาการกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ โรคท้องร่วง เกิดอาการคลื่นเหียน อาเจียน อาการเกิดขึ้นหลากหลายขึ้นกับปริมาณเชื้อและหรือพิษที่ปะปนในอาหาร (Singleton, 2004) ได้แก่ เชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *Bacillus cereus* TISTR 687 (ATCC 11778) เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli* TISTR 887 (ATCC 25922) นอกจากนี้มีเชื้อยีสต์ *Candida albicans* ATCC 90028 ที่ก่อโรคในระบบสืบพันธุ์เพศหญิงและช่องปาก หัวเชื้อแบคทีเรียและยีสต์เตรียมโดย steak ให้ได้โคโลนีเดี่ยวบนอาหาร Tryptic Soy

Agar (TSA, Bacto™) และ RPMI – MOPS (Sigma®) ตามลำดับ บ่มที่ 37 °C ซ้ำกัน และเก็บรักษาเชื้อในอาหารเหลวผสมกลีเซอรอลมีความเข้มข้นสุดท้าย 15 % ที่อุณหภูมิ – 80 °C

ตารางที่ 6 แสดงเชื้อ *Hypocrea* หรือ *Trichoderma* ที่แยกจากตัวอย่างดินทั้งหมด 8 สายพันธุ์

Microorganism	Isolate No.	Collection site
<i>Hypocrea lixii</i>	KU 0066	Than Bok Khorani National Park
<i>Hypocrea lixii</i>	KU 0084	
<i>Trichoderma asperellum</i>	KU 0087	
<i>Hypocrea lixii</i>	KU 0101	Khao Phanom Bencha National Park, Huai To Waterfall
<i>Hypocrea lixii</i>	KU 0102	
<i>Hypocrea lixii</i>	KU 0107	
<i>Hypocrea lixii</i>	KU 0113	
<i>Trichoderma aureoviride</i>	KU 0119	

หมายเหตุ เชื้อจีสและสปีชีส์ของเชื้อราระบุจากการวิเคราะห์ส่วนของยีน ITS1 5.8S และ ITS2 ของ rRNA gene (ตารางผนวกที่ ก1)

2. การผลิตและสกัดสารเปปไทด์จากเชื้อรา

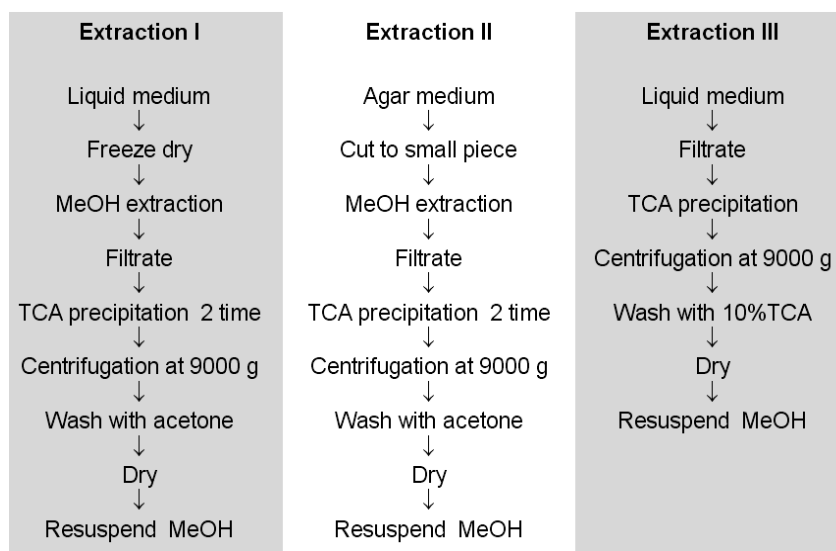
2.1 การผลิตสารเปปไทด์จากเชื้อรา

เตรียมหัวเชื้อราจากอาหารแข็ง 3 % malt extract (3 % ME ประกอบด้วย 3 % malt extract และ 0.3 % peptone) ตัดเป็นชิ้นเล็ก ลงหัวเชื้อในอาหารเหลว 3 % ME ปริมาณ 50 ml ที่เติมกรดอะมิโนอิสระ α - Aminoisobutyric acid; Aib (Sigma – Aldrich, ประเทศสหรัฐอเมริกา) ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml จำนวน 2 ขวด บ่มที่ 25 °C สถานะนิ่ง (static state) มีแสง จนกระทั่งเชื้อเจริญเต็มบนผิวหน้าอาหารเหลวประมาณ 7 – 14 วัน

2.2 การสกัดสารเปปไทด์จากเชื้อรา

การทดสอบหาวิธีการสกัดที่เหมาะสมโดยดัดแปลงจาก Yvon และคณะ (1989) และ Stone และ Williams (1993) มีทั้งหมด 3 วิธีการ (ภาพที่ 10) วิธีการสกัด I คือนำเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเหลว 3 % ME (อุปกรณ์และวิธีการข้อ 2.1) มาทำให้แห้งด้วย freeze dry จากนั้นนำตัวอย่างแห้งทั้งหมดมาสกัดด้วยเมทานอลโดยการเติมจนท่วมตัวอย่าง นำไปเขย่าเป็นเวลา 30 – 60 นาที กรองด้วยกระดาษกรอง นำสารละลายมาตกตะกอน (precipitation) ด้วย trichloroacetic acid (TCA) โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 % เติมน้ำแข็งเป็นเวลา 1 ชม. ปั่นเหวี่ยงที่ 9,000 g ล้างด้วยอะซิโตน ตากให้แห้ง และละลายสารสกัดในเมทานอล วิธีการสกัด II คือเลี้ยงเชื้อ

ในอาหารแข็ง 3 % ME จำนวน 4 plate ตัดเชื้อเป็นชิ้นเล็กๆ และสกัดเชื้อสดโดยวิธีการเดียวกับวิธีการสกัด I วิธีการสกัด III คือเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว 100 ml กรองเศษเซลล์ออก ตกตะกอนด้วย TCA โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 % แช่ในน้ำแข็งเพื่อตกตะกอน เป็นเวลา 1 ชม. ปั่นเหวี่ยงที่ 9,000 g ล้างด้วย 10 % TCA ตกตะกอนให้แห้งและละลายตะกอนในเมทานอล ปริมาณ 300 μ l ต่ออาหารที่สกัด 100 ml เก็บสารสกัดที่ -20°C



ภาพที่ 10 วิธีการสกัดสาร I – III และขั้นตอนการสกัดสาร

2.3 การตรวจสอบวิธีการสกัดสาร III กับยาปฏิชีวนะ

การตรวจสอบวิธีการสกัดสารที่ III กับยาปฏิชีวนะโครงสร้างต่างๆ ได้แก่ gramicidin, bacitracin, vancomycin, ampicillin, chloramphenicol และ amphotericin B โดยเติมลงใน 3 % ME ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 100 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ และนำมาสกัดวิธีการ III จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วย HPLC (X-Terra[®] MS C18, 3.5 μm , 2.1x50 mm, Waters, ประเทศไอร์แลนด์) โดยชะด้วยระบบสารละลายที่เป็นสัดส่วนกันระหว่างน้ำและอะซิโตไนไตรล์ (ACN, HPLC grade) 0 – 100 % ระยะเวลา 20 นาที หาพื้นที่ใต้กราฟของพีคเปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 0.5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ และคำนวณ % recovery ดังนี้

$$\% \text{ recovery} = \left[\frac{\text{area peak of extracted antibiotics}}{\text{area peak of standard antibiotics}} \right] \times 100$$

3. การทดสอบทางกิจกรรมการยับยั้งทางชีวภาพ

3.1 การทดสอบยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

3.1.1 เทคนิคดูดซับสารในหลุมอาหารแข็ง (Agar well diffusion) ปรับปรุงจากวิธีของ Richardson และคณะ (1968) โดยเตรียมจานเพาะเชื้อเป้าหมายคือ *B. cereus* ATCC 11778 บนอาหารแข็ง TSA ปริมาตร 20 ml อุณหภูมิ 45 °C ซึ่งมีความหนาแน่นเชื้อ 1×10^6 CFU.ml⁻¹ รอให้อาหารแข็งตัวจึงเจาะเป็นหลุมด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 mm แล้วเติมสารสกัดทดสอบในหลุมๆ ละประมาณ 20 µl รอจนกระทั่งเมทานอล (สารละลายของสารสกัด) ระเหยหมด ประมาณ 10 – 15 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ตรวจสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใส (clear zone) คำนวณเป็น % relative inhibition กับบริเวณใสที่ได้จาก chloramphenicol 100 µg.ml⁻¹ ดังนี้

$$\% \text{ relative inhibition} = \frac{\text{diameter of crude extraction} - \text{diameter of MeOH}}{\text{diameter of chloramphenicol} - \text{diameter of MeOH}} \times 100$$

3.1.2 การทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียแบบ microdilution method ในระดับ 96 – well plate โดยปรับปรุงจากวิธีการมาตรฐาน Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests; Approved Standard Seventh Edition (M7 – A7) ของสถาบัน Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) โดยเติมสารสกัดตัวอย่าง 20 µl ต่อหลุม ตั้งไว้นจนกระทั่งสารละลายเมทานอลระเหยหมดประมาณ 10 – 15 นาที เตรียมลงหัวเชื้อเป้าหมายของการศึกษานี้ ได้แก่ *B. cereus* ATCC 11778 และ *E. coli* ATCC 25922 ให้มีความหนาแน่นเซลล์เท่ากับ 5×10^3 CFU.ml⁻¹ โดยมีปริมาตรสุดท้าย 100 µl ต่อหลุม บ่ม 16 – 18 ชั่วโมง 37 °C และพัฒนาการเติมสีฟลูออเรสเซนซ์ resazurin ที่ความเข้มข้น 0.05 mM ปริมาณ 50 µl ต่อหลุม วัดค่า fluorescent intensity ด้วยความยาวแสงกระตุ้น (excitation) 530 nm และความยาวแสงแผ่ออก (emission) 590 nm โดยเครื่อง microtiter plate reader รุ่น Victor3 (PerkinElmer, ประเทศสหรัฐอเมริกา) และนำค่าความหนาแน่นของแสงฟลูออเรสเซนซ์ (intensity) มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งดังนี้

$$\% \text{ inhibition} = \left[\frac{1 - (\text{FI of sample} - \text{FI of background})}{(\text{FI of growth control} - \text{FI of background})} \right] \times 100$$

FI of sample คือ ค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescent intensity) ของชุดทดสอบที่ประกอบด้วยสารสกัด อาหารเลี้ยงเชื้อและหัวเชื้อ

FI of background คือ ค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ของชุดทดสอบที่ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ

FI of growth control คือ ค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ของชุดทดสอบที่ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อและหัวเชื้อ

กำหนดความเข้มข้นของสารทดสอบที่มี % inhibition มากกว่าหรือเท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์ เป็นผลบวก (positive result) สำหรับการคัดกรองขั้นต้น (primary screening) และการคัดกรองขั้นที่สอง (secondary screening) จะเจือจางสารทดสอบลงทีละ 2 เท่า (two fold dilution) เพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารทดสอบต่ำที่สุดในการยับยั้งเชื้อ (minimum inhibitory concentration; MIC) โดยกำหนด ค่า MIC คือความเข้มข้นของสารทดสอบน้อยที่สุดที่มีการยับยั้งเชื้อเป้าหมายมากกว่าหรือเท่ากับ 90 %

3.2 การทดสอบยับยั้งเชื้อยีสต์ *C. albicans* ATCC 90028

การทดสอบยับยั้งเชื้อราในระดับ 96 – well plate โดยเติมสารสกัด 20 µl ต่อหลุม ระบายเมทานอลออก เติม 10 % DMSO 100 µl และลงเชื้อ *C. albicans* ATCC 90028 ปริมาณ 100 µl ให้มีความเข้มข้นเซลล์ 4×10^5 เซลล์ต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เติมสีฟลูออเรสเซนซ์ resazurin ความเข้มข้น 0.05 mM ปริมาตร 25 µl ต่อหลุม บ่มต่ออีก 35 นาที วัดค่า fluorescent intensity ที่ความยาวคลื่นแสงเช่นเดียวกับข้อ 3.1 คำนวณ % inhibition ตามสูตร ข้อ 3.1 โดยกำหนด % inhibition มากกว่าหรือเท่ากับ 50 % เป็นผลบวกในการคัดกรองขั้นต้น และในการคัดกรองขั้นที่สองจะเจือจางสารทดสอบทีละ 2 เท่า เพื่อหาค่า Median inhibitory concentration (IC₅₀) คือความเข้มข้นสารทดสอบที่ทำให้เกิดการยับยั้งเป็นครึ่งหนึ่งจากตัวควบคุมการเจริญ หรือเกิดการยับยั้ง 50 %

4. การวิเคราะห์กรดอะมิโนโดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง (Analytical TLC)

การวิเคราะห์กรดอะมิโนด้วย TLC คัดแปลงจาก Heathcote (1968) และ Bruckner และคณะ (1983) โดยการนำสารสกัดน้ำหมักมาไฮโดรไลซ์ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 N

อัตราส่วน 1 ต่อ 4 (สารสกัด : กรดเข้มข้น) โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 120 °C เป็นเวลา 12 – 16 ชม. และละลายไฮโดรไลเซต (hydrolysate) ที่ได้ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 0.1 N ปริมาตร 1 ใน 2 ส่วน ของปริมาตรตัวอย่างที่ใช้ จากนั้นโหลตัวอย่างบนแผ่นซิลิกาขนาด 20 x 20 cm² (Cat No. 105715.0001, Merck, ประเทศสหรัฐอเมริกา) ซึ่งใช้เป็น stationary phase โดยมีระบบสารตัว ทำละลายคลอโรฟอร์ม : เมทานอล : น้ำ : กรดอะซิติกเข้มข้น อัตราส่วน 65 : 25 : 4 : 3 และ ไอโซโพรพานอล : เมทานอล : น้ำ อัตราส่วน 40 : 2 : 10 เป็น mobile phase บ่มที่ 110 °C 10 นาที และตรวจสอบโดยสเปกโตรสโคปีสีด้วยนินไฮดริน (ninhydrin) ความเข้มข้น 20 mg.ml⁻¹ ใน เอทานอล บ่มต่อที่ 110 °C 5 นาที จะปรากฏจุดสีแดง น้ำตาล หรือเหลืองของกรดอะมิโน

5. การศึกษาสารสกัดของเชื้อรา *T. asperellum* BCC12530

5.1 การทำสารสกัดให้บริสุทธิ์บางส่วนโดย TLC

จากหัวข้อ 2.2 เพิ่มปริมาณการผลิตเป็น 1 l นำไปสกัดด้วยวิธีการสกัดที่ III ซึ่งน้ำหนัก สารสกัดแห้งและละลายด้วยเมทานอลให้มีความเข้มข้น 50 mg.ml⁻¹ นำสารสกัดหยabdังกล่าวมา ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยหยดบนแผ่น TLC (Merck, ประเทศสหรัฐอเมริกา) โดยมีระบบเฟส เคลื่อนที่เป็นบิวทานอล : กรดอะซิติก : น้ำ อัตราส่วน 6 : 2 : 2 และตรวจสอบด้วยการสเปกโตรเมตรี น้ำ เมื่อปล่อยให้แห้งจะพบบริเวณที่ไม่เปียกน้ำ (Bruckner *et. al*, 1983) จุดส่วนที่ไม่เปียกแล้วน้ำ ละลายในเมทานอล ปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนสารละลาย ระเหยเมทานอล ออกในสภาวะสุญญากาศ ด้วยเครื่อง vacuum dryer ซึ่งน้ำหนักแห้งของสารที่ได้และปรับความเข้มข้นสารที่บริสุทธิ์ บางส่วนนี้ด้วย เมทานอลให้มีความเข้มข้น 20 mg.ml⁻¹

5.2 การวิเคราะห์กรดอะมิโนโดยวิธี High Pressure Liquid Chromatography (HPLC)

การวิเคราะห์กรดอะมิโนด้วย reverse-phase HPLC ของสารสกัดจาก *T. asperellum* BCC 12530 ที่ผ่านกระบวนการไฮโดรไลส์และทำปฏิกิริยากับ Waters AccQ•Fluor™ reagent (สารฟลูออเรสเซนต์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจสอบ) เกิดเป็น สารอนุพันธ์ของกรดอะมิโน ตามกระบวนการของ AccQ•Tag™ method โดยใช้คอลัมน์ NovaPak C₁₈ (3.9 x 150 mm., 4μl, Waters, ประเทศสหรัฐอเมริกา) ะด้วยสารละลายเฟส เคลื่อนที่แบบ isocratic system คือ น้ำ 40 % และอะซิโตไนไตรล์ 60 % อัตราเร็ว 1 ml.min⁻¹ ตรวจสอบฟลักด้วย Water 470 Scanning Fluorescence Detector monitoring ที่ความยาวคลื่น แสงกระตุ้นและแสงแผ่อกเท่ากับ 250 และ 395 nm ตามลำดับ

5.3 การวิเคราะห์โมเลกุลสารสกัดด้วย Mass Spectrometry (LC-ESI/MS)

การวิเคราะห์โมเลกุลสารสกัดด้วยระบบต่อเนื่อง HPLC รุ่น Agilent 1200 series (Agilent Technologies, ประเทศสหรัฐอเมริกา) ใช้คอลัมน์ Luna[®] C18 (2) (4.6 x 100 mm, 5 μ m, Phenomenex, ประเทศสหรัฐอเมริกา) โดยมีระบบสารละลายแสดงในตารางที่ 7 และ MS โดยมี Electrospray (ESI) เป็นแหล่งกำเนิดไอออนและใช้ควบคู่กับเครื่องตรวจวัดแบบ Time of Flight – Mass Spectrometer (TOF-MS) รุ่น micrOTOF (Bruker Daltonis[®], ประเทศเยอรมัน) โดยนำตัวอย่างสารสกัดที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วย TLC แล้ว (วิธีการข้อ 5.1) ที่ความเข้มข้น 20 mg.ml⁻¹ ในเมทานอล ฉีดปริมาตร 2 μ l และตรวจสอบไอออนประจุบวก

ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์ของสารละลายระหว่างน้ำและอะซิโตไนไตรท์ (ACN) ในการวิเคราะห์ HPLC

Time (min:sec)	% A (H ₂ O)	% B (ACN)
00:00	90	10
19:00	0	100
29:00	0	100
33:00	90	10
35:00	90	10

5.4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดย Lowry protein assay

การวัดปริมาณโปรตีนดัดแปลงวิธีการของ Lowry และคณะ (1951) เตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ใช้ คือ vancomycin ความเข้มข้น 0.000, 0.078, 0.156, 0.312 และ 0.625 μ g.ml⁻¹ ปริมาตร 25 μ l เติมน้ำ A (alkaline copper tartate solution) 250 μ l ผสมตั้งไว้ 10 นาที และเติมน้ำ B (1x folin reagent) 25 μ l ผสมตั้งไว้ 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 nm นำค่า OD ที่ได้ไปหาปริมาณโปรตีนโดยเปรียบเทียบกับกราฟโปรตีนมาตรฐาน

6. เทคนิคทางชีวโมเลกุล

6.1 การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อรา

การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction) ใช้กระบวนการที่ดัดแปลงมาจากการรายงานของ Raeder และ Broda (1985) โดยขั้นตอนแรกคือ การบดเส้นใยสดกับไนโตรเจนเหลวจนกระทั่งได้เป็นผงละเอียด นำเส้นใยผงดังกล่าวมาประมาณ 50 μg เติม extraction buffer (200 μmole Tris HCl pH 8.5, 250 μmole NaCl, 25 μmole EDTA และ 0.5 % (v/v) SDS) 500 μl ผสมกัน 5 นาที เติมฟีนอล 350 μl ผสมกัน 5 นาที และเติม คลอโรฟอร์ม : ไอโซ-เอมิลแอลกอฮอล์ (24 : 1) 150 μl นำไปปั่นเหวี่ยงที่ $\geq 10,000 \text{ g}$ 4 °C 30 นาที ย้ายส่วนใสลงหลอดใหม่ เติม RNase A (1 U. μl^{-1} , Fermentus, ประเทศสหรัฐอเมริกา) 5 U ต่อสารละลายดีเอ็นเอ 1 ml ผสมและบ่มที่ 37 °C 15 นาที เติม คลอโรฟอร์ม : ไอโซ-เอมิลแอลกอฮอล์ 1 เท่าตัว ปั่นเหวี่ยงที่ $\geq 10,000 \text{ g}$ 4 °C 10 นาที ย้ายส่วนใสออก เติมไอโซ-โพรพานอล 0.54 เท่าตัว ผสมกันและบ่มที่ -20 °C 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที 4 °C 10 นาที เติมเอทานอล 70 % 500 μl ปั่นเหวี่ยงที่ $\geq 10,000 \text{ g}$ 4 °C 5 นาที ทิ้งเอทานอลแล้วทำให้แห้งโดย vacuum dryer 10 นาที นำจีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้ไปละลายน้ำปราศจากไอออนและเก็บที่ -20 °C

6.2 การคัดกรองเชื้อราโดยตรวจสอบยีน *nrps* จากจีโนม

6.2.1 ไพร์เมอร์ตรวจสอบยีน *nrps* และ โมดูล Aib

ไพร์เมอร์สำหรับใช้ตรวจสอบยีน *nrps* และ โมดูล Aib สำหรับการศึกษาแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ในตารางที่ 8 โดยไพร์เมอร์สังเคราะห์จาก KU-VECTOR Custom DNA Laboratory (มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประเทศไทย) ซึ่งไพร์เมอร์ C2F&C5R (Chutrakul and Peberdy, 2005) ออกแบบจากส่วน core 2 หรือ A 3 และ core 5 หรือ A 8 บน A – domain ตามลำดับ ซึ่งคาดว่าจะมีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 0.8 kb ไพร์เมอร์ C4F&C6R โดย C4F และ C6R ออกแบบจากส่วน core 4 หรือ A 7 บน A – domain และ core 6 บน T – domain ตามลำดับ ซึ่งคาดว่าจะมีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 0.6 kb โดยการออกแบบจะนำยีนที่เกี่ยวข้องต่อการผลิตสารเปปไทด์ไบโอติกส์หรือสารปฏิชีวนะกลุ่มเปปไทด์ของเชื้อราหลายชนิดจากฐานข้อมูลจากธนาคารยีน (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) จากนั้นนำข้อมูลของลำดับกรดอะมิโนมาทำ multiple alignment โดยใช้โปรแกรม ClustalW (version 2, <http://www.ebi.ac.uk>) เพื่อหาบริเวณอนุรักษ์มาประกอบการออกแบบไพร์เมอร์ ไพร์เมอร์คู่สุดท้ายคือ C2F&AibR จะเป็นไพร์เมอร์ที่ระบุถึงโมดูล Aib ซึ่งคาดว่าจะมีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 0.42 kb โดย AibR ออกแบบจากส่วนของโดเมน A ระหว่าง A 4 และ A 5 ที่เกี่ยวข้องกับโมดูล Aib บนยีน *nrps* ของเชื้อ *T. virens*

(Wiest *et al.*, 2002) จำนวน 7 โมดูลและยีน *pes* ของเชื้อ *T. asperellum* (Chutrakul and Peberdy, 2005) จำนวน 2 โมดูล และไพรเมอร์ที่ได้เหล่านี้เป็น degenerate primers

ตารางที่ 8 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาคัดกรองเชื้อรา

Name of primers	Nucleotide sequence
C2F ^a	5'- ASM GGG ASY ACG GGR ARS CCR AAR GG-3'
C5R ^a	5'- YTC TAT YTC GCS GAG YTC DAT GCG-3'
C4F ^b	5'- TAY AAR ACC GGY GAY YTG GC -3'
C6R ^b	5'- CYG ATG SAR TCG CCR CCS AG -3'
AibR ^b	5'- ARR SWT SWR AAG ACT CAV GTC TC -3'

หมายเหตุ S คือ C หรือ G, M คือ A หรือ C, Y คือ C หรือ T, R คือ A หรือ G, D คือ A หรือ G หรือ T, W คือ A หรือ T และ V คือ A หรือ C หรือ G

^a ไพรเมอร์จากการรายงานของ Chutrakul and Peberdy (2005)

^b ไพรเมอร์ที่ออกแบบในงานวิจัยนี้

6.2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เปปไทด์โอบิติกส์ โดยเทคนิคพีซีอาร์และไพรเมอร์ (วิธีการข้อที่ 6.2.1) กับจีโนมิกส์ของเชื้อรา โดยทดสอบองค์ประกอบและสภาวะที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยาพีซีอาร์ ซึ่งจะอ้างอิงตามวิธีการของ Sambrook และคณะ (1989) และคัดแปลงความเข้มข้น $MgCl_2$ ไพรเมอร์ ตั้งแต่ 2 – 10 mM และอุณหภูมิในขั้นตอน annealing โดยการทำ gradient PCR แปรผันอุณหภูมิ 51 – 63 °C โดยใช้ตัวควบคุมเชิงบวก (positive control) คือ *T. asperellum* BCC12530 และเครื่อง Thermal cycle (Biometra, ประเทศเยอรมัน)

6.2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 5.8S และ ITS2 ของ rRNA gene

นำดีเอ็นเอของเชื้อราที่สกัดได้มาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ universal primer ITS1 (TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) และ ITS4 (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) (White *et al.*, 1990) เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรงส่วน ITS1 5.8S และ ITS2 ของ rRNA gene โดยทำปฏิกิริยาในปริมาตรรวม 20 μ l ซึ่งประกอบด้วยดีเอ็นเอ 25 ng, dNTPs 0.2 mM, เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 1 unit, $MgCl_2$ 1.5 mM, ไพรเมอร์ (ITS1 และ ITS4) 1 μ M, 1X PCR buffer และนำปราชจากไอออนนิ่งฆ่าเชื้อ โปรแกรมพีซีอาร์เริ่มต้นด้วย

denaturation ที่ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที แล้วตามด้วย denaturing ที่ 95 °C เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่ 50 °C เป็นเวลา 30 วินาที และ extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 90 วินาที จำนวน 40 รอบ

6.3 การตรวจสอบลำดับยีน *nrps*

6.3.1 การเตรียมคอมพีเทนต์เซลล์ (competent cell)

เชื้เชื้อ *E. coli* เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยวลงบนอาหารแข็ง Luria-Bertani Agar (LB agar 1 l: Tryptone 10 g, Yeast extract 5 g, NaCl 10 g, วุ้น 20 g และปรับ pH เท่ากับ 7.2) ป่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 คืน นำโคโลนีเดี่ยวที่ได้มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB (LB 1 l: Tryptone 10 g, Yeast extract 5 g, NaCl 10 g และปรับ pH เท่ากับ 7.2) ปริมาตร 5 ml เชื้อ 250 rpm ที่ 37 °C เป็นเวลา 1 คืน ถ่ายเชื้อปริมาตร 2.5 ml ลงในอาหารเหลว LB 50 ml เชื้อที่สภาวะเดิมเป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง หรือจนเซลล์เจริญมีความขุ่นที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm เท่ากับ 0.2 ถึง 0.4 นำขวดอาหารที่เชื้อเจริญมาแช่เย็นในน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที ตกตะกอนเซลล์โดย การหมุนเหวี่ยงที่ 6,500 g ที่ 4 °C นาน 10 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้งแล้วเติม อาหาร Transformation and Storage Solution (TSS) (TSS 1 l ; LB 850 ml, PEG 100 g, DMSO 50 ml, 50 mM MgCl₂ 50 ml จาก stock 1 M และปรับ pH เท่ากับ 6.5) ที่เย็นจัด ปริมาตร 500 µl แบ่งเก็บใส่หลอดขนาด 1.5 ml (eppendorf) หลอดละ 100 µl เก็บที่ -80 °C (Sambrook *et al.*, 1989)

6.3.2 การสกัดชิ้นดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลด้วย QIAquick Gel Extraction (QIAGEN, ประเทศเยอรมัน)

ตัดชิ้นเจลในตำแหน่งที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ต้องการใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 ml จากนั้นปฏิบัติตามขั้นตอนที่แนบมากับชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล QIAquick Gel Extraction ตามลำดับ ขั้นตอนดีเอ็นเอออกจากคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ EB ตามความเหมาะสม (30 – 50 µl) และเก็บที่ -20 °C

6.3.3 การโคลนชิ้นดีเอ็นเอโดย InsTAclone™ PCR Cloning (Fermentus, ประเทศสหรัฐอเมริกา)

การสร้างดีเอ็นเอลูกผสมทำโดยนำชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายจากกระบวนการพีซีอาร์ แล้วแยกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ นำมาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pTZ57R โดยใช้เอนไซม์ T4 DNA ligase (1

U. μ l⁻¹, Fermentus, ประเทศสหรัฐอเมริกา) 1 U, 1x ligation buffer ในปริมาตรสุดท้าย 20 μ l บ่มที่อุณหภูมิห้อง 60 นาที ซึ่งอัตราส่วนระหว่างชิ้นดีเอ็นเอและพลาสมิด แสดงในสูตรข้างล่างนี้ จากนั้นนำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่คอมพลีเทนท์เซลล์ *E. coli* DH5 α ตามวิธีเตรียมข้อ 6.3.4 (transformation) โดยที่ Molar ratio คืออัตราส่วนของเวกเตอร์ต่อ ดีเอ็นเอเป้าหมาย ซึ่งส่วนใหญ่เท่ากับ 1 ต่อ 3

$$\text{Molar ratio} \times \frac{\text{ng of vector} \times \text{kb size of insert DNA}}{\text{kb of vector}} = \text{ng of insert DNA}$$

6.3.4 การเคลื่อนย้ายพลาสมิดเข้าสู่คอมพลีเทนท์เซลล์ *E. coli* (transformation)

นำคอมพลีเทนท์เซลล์ 100 μ l ผสมกับพลาสมิด 50 – 100 ng (กรณีพลาสมิดสายผสมใช้ 500 ng) แช่ในน้ำแข็ง 30 นาที ทำ heatshock โดยนำเซลล์ไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 °C นาน 90 วินาที ย้ายไปแช่ในน้ำแข็งทันที นาน 2 นาที เติมน้ำอาหารเหลว SOC 1 ml เขย่า 250 rpm บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเกลี่ยบนอาหารแข็ง LA ที่มี 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-gal ใน DMF 20 μ g.ml⁻¹) ปริมาตร 40 μ l และ 0.1 M isopropylthio- β -galactoside (IPTG) ปริมาตร 4 μ l บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 คืน โคโลนีที่ได้รับพลาสมิดสายผสมมีสีขาว ส่วนโคโลนีที่ได้รับพลาสมิดที่ไม่มีชิ้นดีเอ็นเอมีสีฟ้า

6.3.5 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจาก *E. coli* ด้วย QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN, ประเทศเยอรมัน)

คัดเลือกพลาสมิดลูกผสมจากโคลนของ *E. coli* ที่มีโคโลนีสีขาว โดยย้ายโคโลนีเดี่ยวลงในอาหาร LB ที่ผสมเพนนิซิลลิน บ่มที่ 37 °C เขย่า 200 rpm ข้ามคืน แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนเซลล์ (pellet) จากนั้นปฏิบัติตามขั้นตอนของชุด QIAprep Spin Miniprep ตามลำดับ ขั้นตอนการแยกออกจากคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ EB ตามความเหมาะสม (30 – 50 μ l) และเก็บที่ -20 °C

6.3.6 การตรวจสอบโคลนด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

การตรวจสอบโคลนเพื่อหาความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย จะทำโดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ องค์ประกอบของปฏิกิริยา (ปริมาตรรวม 30 μ l) มีดังนี้ น้ำปราศจากไอออน 23 μ l, 1X บัฟเฟอร์ (yellow tango buffer), *EcoRI* (10 U. μ l⁻¹, Fermentus, ประเทศสหรัฐอเมริกา), *SauIII*A (10 U. μ l⁻¹, Fermentus, ประเทศสหรัฐอเมริกา) และตัวอย่างพลาสมิดดี

เอ็นเอ (จากวิธีการข้อ 6.3.5) ที่มีความเข้มข้น 25-50 ng บ่มที่ 37 °C 2 – 3 ชม. และตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

6.3.7 การตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis)

ผสมสารละลายดีเอ็นเอปริมาตรที่เหมาะสมกับ 6x loading dye (Fermentus, ประเทศลิทัวเนีย) แล้วตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอโดยการวิ่งในอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสที่มีอะกาโรส 0.8 % เตรียมด้วยบัฟเฟอร์ 1x TBE (5x TBE; Tris base 54 g, boric acid 27.5 g, 0.5 M EDTA 20 ml, pH 8.0 ในปริมาตร 1 l) ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ ใช้ขนาดดีเอ็นเอมาตรฐานได้แก่ 1 kb ladder และ 100 bp ladder (Fermentus, ประเทศสหรัฐอเมริกา) ตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยการย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น $0.5 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ นาน 15 นาที ล้างน้ำกลั่นนาน 10 นาที ตรวจดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต และ ถ่ายภาพด้วยเครื่อง Gel Doc รุ่น Syngene – Gene Genius (Syngene, ประเทศสหรัฐอเมริกา)

6.3.8 การหาลำดับเบสของโคลน

นำโคลนต่างๆ ที่คัดเลือกได้จากข้อ 6.3.6 ไปหาลำดับเบสบางส่วนของชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์แบบ universal (forward และ reverse) ได้แก่ M13/pUC primer และ T7 promoter sequencing primer โดยส่งโคลนไปหาลำดับเบสที่หน่วยบริการ Macrogen (macrogen, ประเทศเกาหลี) นำผลลำดับเบสที่ได้มาแปลเป็นกรดอะมิโนในเฟรมที่ถูกต้องด้วยโปรแกรม 6 frame analysis (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/>) และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BlastX (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) เพื่อวิเคราะห์ลำดับเบสเปรียบเทียบกับโปรตีนในฐานข้อมูล

7. การศึกษาลำดับสัญลักษณ์ (Signature sequences)

ใช้โปรแกรม NRPSpredictor ในเว็บไซต์ <http://www-ab.informatik.uni-tuebingen.de/software/NRPSpredictor> (Rausch *et al.*, 2005) วิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนที่ต้องการเพื่อศึกษาลำดับกรดอะมิโนสัญลักษณ์ซึ่งจะเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนสัญลักษณ์จากยีน *tex1* ของเชื้อ *T. virens* ที่ผลิตเปปไทด์ไบโอติกส์ TVB ขนาด 18 เรซิดิวส์ มีการรายงานยีนทั้งหมดแล้วในฐานข้อมูล NCBI ดังนั้นจึงสามารถใช้ยีนที่เกี่ยวข้องนี้ทั้งหมด 18 โมดูลมาวิเคราะห์ได้ (Wiest *et al.*, 2002)

8. สถานที่ทำการทดลอง

8.1 ห้องปฏิบัติการวิจัยชีวโมเลกุล ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กรุงเทพฯ

8.2 ห้องปฏิบัติการ Bioassay หน่วยปฏิบัติการ Bioresources Technology ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC)

9. ระยะเวลาในการทดลอง

การทดลองครั้งนี้เริ่มตั้งแต่ มิถุนายน 2549 ถึง พฤษภาคม 2551

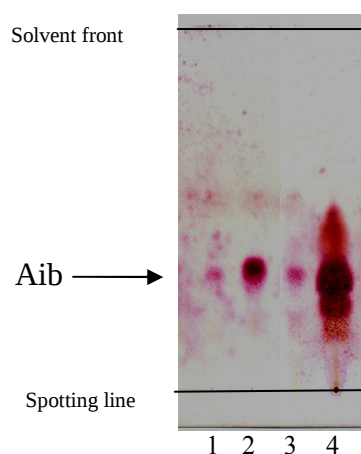
ผลและวิจารณ์

1. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต สกัด และตรวจสอบเปปไทด์

จากการศึกษาของ Jaworski และ Bucker (1999) Suwan และคณะ (2000) Duclohier และคณะ (2004) Krause และคณะ (2006) และ Neuhof และคณะ (2007) พบว่าเชื้อ *T. asperellum* สามารถผลิตเปปไทด์ออกฤทธิ์ เช่น thichotoxins ดังนั้นจึงคัดเลือกเชื้อ *T. asperellum* BCC 12530 เพื่อเป็นสายพันธุ์อ้างอิงสำหรับงานวิจัยนี้

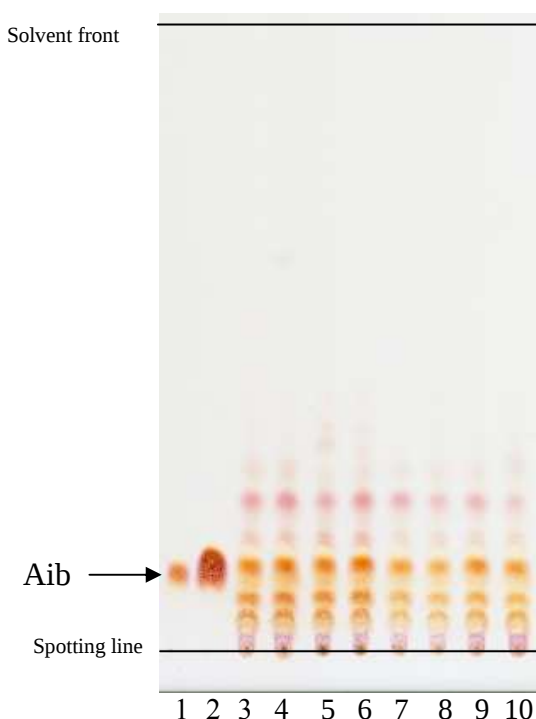
1.1 การทดสอบอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

การใช้อาหารเลี้ยงเชื้อโดยเปรียบเทียบอาหารเหลว 2 ชนิด คือ 3 % ME และ PDB ซึ่งเติมกรดอะมิโน Aib อิสระ ที่ความเข้มข้น $50 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ ทดสอบกับเชื้อ *T. asperellum* BCC 12530 และ *Clonostachys rogersoniana* BCC 4862 พบว่าอาหาร 3 % ME มีการผลิต putative peptiobiotics ได้ดีกว่าอาหาร PDB จากการวิเคราะห์กรดอะมิโนโดย TLC ของสารสกัดที่ผ่านกระบวนการไฮโดรไลต์แล้ว โดยอาหาร 3 % ME มีการสร้างกรดอะมิโนหลายชนิด และปริมาณมากกว่าในอาหาร PDB (ภาพที่ 11) ซึ่งพิจารณาจากจำนวนจุดและความเข้มของกรดอะมิโน ดังนั้นจึงเลือกใช้อาหาร 3 % ME เพื่อทดสอบการคัดกรองเชื้อที่ผลิตเปปไทด์ออกฤทธิ์ในลำดับต่อไป



ภาพที่ 11 การเปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB และ 3 % ME โดยการวิเคราะห์ TLC เลนที่ 1 – 2 คือ Aib ความเข้มข้น 100 และ $1,000 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, 3 – 4 คือ *T. asperellum* BCC 12530 ในอาหาร PDB และ 3 % ME ตามลำดับ

การทดสอบผลของปริมาณกรดอะมิโน Aib อิสระในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Aib free amino acid supplement) ต่อการผลิตสารเปปไทด์หรือเปปไทไบโอติกส์ โดยการเติมกรดอะมิโน Aib อิสระที่ความเข้มข้น 0, 50, 100 และ 1,000 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 % ME สำหรับเลี้ยงเชื้อ *T. asperellum* BCC 12530 โดยมีการทดลอง 2 ครั้ง เมื่อนำสารสกัดที่ผ่านการไฮโดรไลส์มาตรวจสอบโดยเทคนิค TLC พบว่าที่ความเข้มข้นกรดอะมิโน Aib 0 และ 50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ มีจุดของกรดอะมิโนต่าง ๆ ใหญ่และความเข้มมากกว่าที่ความเข้มข้นกรดอะมิโน Aib 100 และ 1,000 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ เมื่อหยดลงบนแผ่น TLC ในปริมาณที่เท่ากัน (ภาพที่ 12) และเมื่อวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนหรือเปปไทด์โดยวิธี Lowry protein assay (Lowry *et al.*, 1951) พบว่าที่ความเข้มข้นกรดอะมิโน Aib 50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ มีการผลิตโปรตีนหรือเปปไทด์สูงที่สุดเท่ากับ 0.45 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (ตารางที่ 9) โดยรายงานของ Leclerc *et al.* (1998) ได้เติมกรดอะมิโน Aib และ glutamic ปริมาณ 0.8 % หรือเท่ากับ 8,000 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ซึ่งเป็นปริมาณที่สูงมาก พบว่ามีการผลิตเปปไทไบโอติกส์ของเชื้อ *T. longibrachiatum* น้อยกว่าในอาหารที่ไม่มีการเติมกรดอะมิโนใด ๆ แต่ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีสารที่เป็น analogues หลักสูงขึ้นอย่างชัดเจนโดยผลิตภัณฑ์รวมทั้งหมดต่ำลง ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่ากรดอะมิโนที่เติมลงไปในปริมาณที่สูงเกิดการยับยั้งการผลิตได้ สำหรับการศึกษาครั้งนี้ พบว่าความเข้มข้น Aib 100 และ 1,000 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ สูงเกินไปทำให้มีการผลิตต่ำกว่าที่ความเข้มข้น 0 และ 50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าเชื้อทดสอบมีการผลิตสารในปริมาณที่สูงกว่าเมื่อเติมกรดอะมิโน Aib อิสระ 50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 % ME ดังนั้นจึงใช้อาหารและความเข้มข้นของกรดอะมิโน Aib ดังกล่าวนี้ในการทดลองลำดับต่อไป



ภาพที่ 12 การตรวจสอบกรดอะมิโนในสารสกัดโดยวิธี TLC เพื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดอะมิโน Aib อิสระที่เติมในอาหาร 3 % ME เลี้ยงเชื้อ *T. asperellum* BCC 12530 เลนที่ 1 – 2 คือกรดอะมิโน Aib marker ความเข้มข้น 1 และ 10 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ เลนที่ 3 – 4 คือ ไม่มีการเติมกรดอะมิโน Aib เลนที่ 5 – 6 เติมกรดอะมิโน Aib อิสระที่ความเข้มข้น 50 เลนที่ 7 – 8 เติมกรดอะมิโน Aib อิสระที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ และเลนที่ 9 – 10 เติมกรดอะมิโน Aib อิสระที่ความเข้มข้น 1,000 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ โดยที่เลนที่ 3, 5, 7 และ 9 คือ การทดลองครั้งที่ 1 และเลนที่ 4, 6, 8 และ 10 คือการทดลองครั้งที่ 2

ตารางที่ 9 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสารสกัดเชื้อ *T. asperellum* BCC 12530 จากอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 % ME ที่เติมกรดอะมิโน Aib ความเข้มข้นต่างๆ

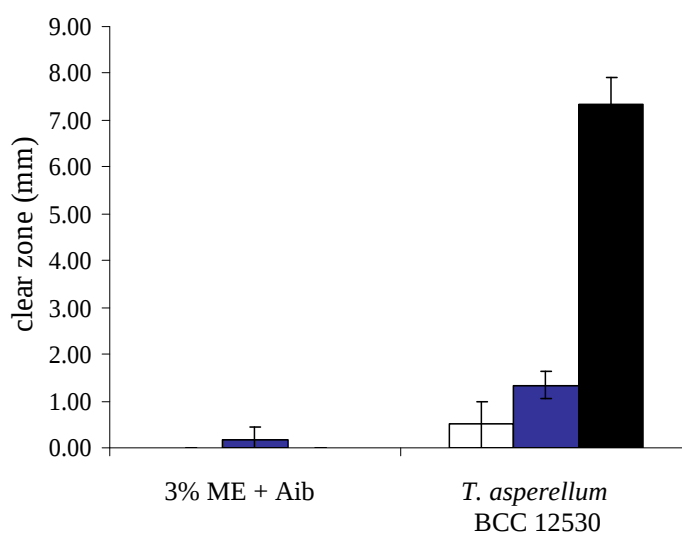
Aib concentration ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	Exp. I		Exp. II	
	$\mu\text{g.ml}^{-1}$	SD	$\mu\text{g.ml}^{-1}$	SD
0	0.4010	0.0089	0.4166	0.0109
50	0.4470	0.0093	0.4482	0.0062
100	0.2870	0.0145	0.2778	0.0102
1,000	0.2459	0.0146	0.2620	0.0079

หมายเหตุ ผลการทดลอง 2 ครั้งและแต่ละครั้งวัดปริมาณโปรตีน 3 ซ้ำ

1.2 วิธีการสกัดสารกลุ่มเปปไทด์และเปปไทโดลิกส์

1.2.1 การทดสอบและเปรียบเทียบวิธีการสกัดสารเปปไทด์

การทดสอบการสกัดเปปไทด์จากอาหารเลี้ยงเชื้อ *T. asperellum* BCC 12530 โดยเปรียบเทียบวิธีการสกัดทั้ง 3 แบบ ดังแสดงในอุปกรณ์และวิธีการข้อ 2.2 ซึ่งการทดลองนี้มีตัวควบคุมได้แก่ 3 % ME + Aib ($50 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) โดยเชื้อทดสอบคือ การตรวจสอบวิธีการสกัดเปปไทด์คือ การแสดงกิจกรรมยับยั้งแบคทีเรียเป้าหมาย *B. cereus* ATCC 11778 ด้วยเทคนิคดูดซับสารในหลุมอาหารแข็ง (agar well diffusion) แสดงในภาพที่ 13 โดยมีตัวควบคุมการทดสอบกิจกรรมการยับยั้ง คือ MeOH และมี clear zone เท่ากับ 0 mm พบว่าวิธีการสกัดสาร III สามารถสกัดสารจากตัวอย่างเชื้อ *T. asperellum* BCC 12530 ได้ดีที่สุด โดยดูจากบริเวณยับยั้งเชื้อ *B. cereus* มากกว่าวิธีการสกัดสาร I และ II ประมาณ 3 – 4 เท่า ซึ่งคาดว่ากระบวนการล้างตะกอนของตัวอย่างด้วย อะซิโชนในวิธีการสกัดสาร I และ II อาจมีผลต่อการเสื่อมสลาย (denaturation) ของเปปไทด์ในตัวอย่างสารสกัดได้ (Vives and Lebleu, 2003) ดังนั้นจึงสรุปว่าวิธีการสกัด III สามารถสกัดสารกลุ่มเปปไทด์ได้ดีกว่าวิธีการอื่นที่ทดสอบ ดังนั้นจากการทดลองนี้สามารถคัดเลือกวิธีการสกัดสาร III ซึ่งคาดว่าเหมาะสมเพื่อใช้ในการทดลองลำดับต่อไป



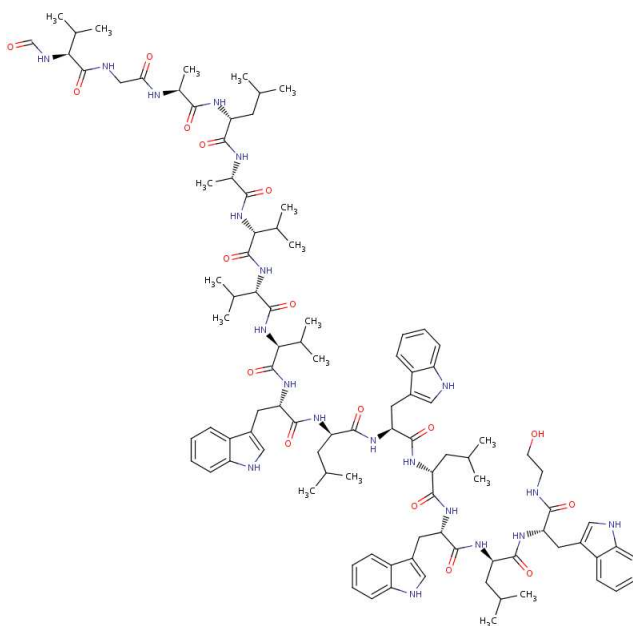
ภาพที่ 13 กิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ATCC 11778 ด้วยเทคนิคดูดซับสารในหลุมอาหารแข็งของสารสกัดจากเชื้อรา *T. asperellum* BCC 12530 โดยเปรียบเทียบวิธีการสกัดสาร I, II และ III คือ □, ■ และ ■ ตามลำดับ (ทดสอบการยับยั้ง 3 ซ้ำ)

1.2.2 การตรวจสอบวิธีการสกัดสาร III กับยาปฏิชีวนะมาตรฐาน

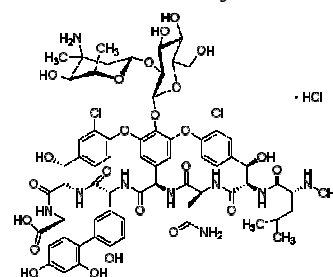
การศึกษาวิธีการสกัด III เพิ่มเติมเกี่ยวกับความสามารถในการสกัดสารกลุ่มต่าง ๆ โดยคัดเลือกยาปฏิชีวนะหลายกลุ่ม (ภาพที่ 14) ดังนี้ กลุ่ม peptide antibiotics ได้แก่ gramicidin (ก.) และ bacitracin (ข.) กลุ่ม glycopeptide antibiotics ได้แก่ vancomycin (ค.) กลุ่ม β – lactam antibiotics ได้แก่ ampicillin (ง.) กลุ่ม phenicol antibiotics ได้แก่ chloramphenicol (จ.) และกลุ่ม polyene antibiotics ได้แก่ amphotericin B (ฉ.) การตรวจสอบยาปฏิชีวนะมาตรฐานหลังการสกัดเปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนแล้วตามอุปกรณ์และ วิธีการทดลองข้อ 2.3 และคำนวณ % recovery พบว่ากลุ่มสารที่สามารถสกัดออกมาได้ด้วยวิธีการสกัด III ได้แก่ gramicidin, bacitracin และ amphotericin B เมื่อคำนวณพื้นที่ใต้กราฟของยาปฏิชีวนะมาตรฐานหลังการสกัดเปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะที่ทราบความเข้มข้น ได้ % recovery แสดงในภาพที่ 15 โดย gramicidin มี % recovery สูงสุด ส่วน vancomycin ampicillin และ chloramphenicol คาดว่ามี % recovery ต่ำกว่า 0.5 % (คำนวณจากปริมาณเนื้อสารต่ำสุดคือ 50 ng ที่สามารถตรวจสอบด้วย HPLC) เนื่องจากไม่พบพีคของสารหลังสกัด

การสกัดสารแบบ III สามารถสกัดสารในกลุ่มเปปไทด์ได้ โดยเฉพาะเปปไทด์ที่มีโครงสร้างเป็นสายยาว คือ gramicidin ซึ่งใช้เป็นตัวแทนสารเปปไทด์ไบโอติกส์ ส่วน bacitracin เป็นเปปไทด์ที่มีโครงสร้างเป็นวงร่วมกับสายตรงและ amphotericin B เป็นสารในกลุ่ม polyene สามารถสกัดออกมาได้แต่มี % recovery ต่ำมาก ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าวิธีการสกัด III มีความเหมาะสมต่อการสกัดสารในกลุ่มเปปไทด์หรือเปปไทด์ไบโอติกส์ ซึ่งมีโครงสร้างแบบสายยาว มากกว่ากลุ่มอื่น ๆ

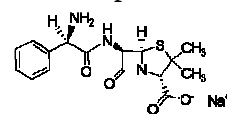
ก. Gramicidin



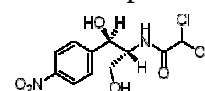
ค. Vancomycin



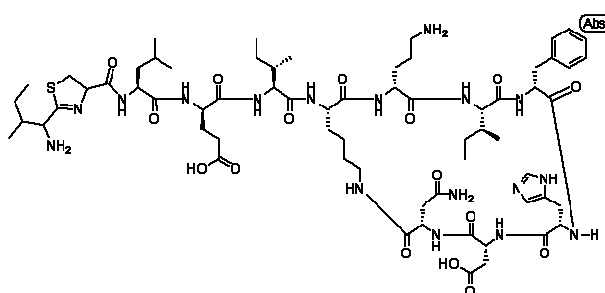
ง. Ampicillin



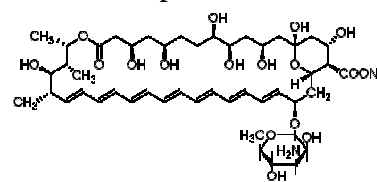
จ. Chloramphenicol



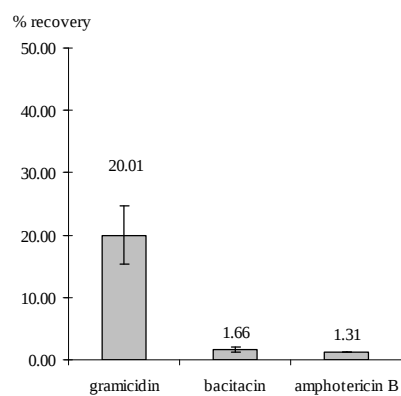
ช. Bacitracin



ฉ. Amphotericin B



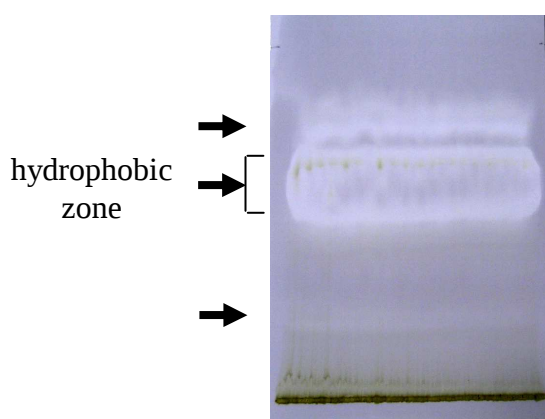
ภาพที่ 14 โครงสร้างขบวนการชีวเคมีที่ใช้ในการศึกษาวิธีการสกัดสารแบบ Extraction III
ที่มา: <http://www.sigmaaldrich.com> และ <http://www.drugbank.ca>



ภาพที่ 15 % recovery ของ gramicidin, bacitracin และ amphotericin B เมื่อสกัดด้วยวิธี
Extraction III (ทดลอง 2 ครั้ง)

1.3 การทำสารสกัดให้บริสุทธิ์บางส่วน

การศึกษาสารสกัดเปปไทด์ของเชื้อราอ้างอิง *T. asperellum* BCC 12530 โดยขั้นตอนการผลิตจะเพิ่มขนาดการหมักเป็น 1 l และสกัดด้วย TCA ดังที่ได้กล่าวไปแล้วในวิธีการทดลองข้อที่ 2 พบว่าได้สารสกัดหยาบทั้งหมด 62.5 mg.l^{-1} จากนั้นทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยการผ่านโครมาโตกราฟีแบบบาง (วิธีการทดลองข้อที่ 5.1) พบว่าสามารถแยกแต่ละสารที่มีความสามารถในการละลายต่างกันได้ ซึ่งการทดลองนี้แยกสารได้ 3 ส่วน (ภาพที่ 16) โมเลกุลที่ชอบน้ำหรือมีขั้วมากจะเคลื่อนที่ช้าและอยู่ในตำแหน่งด้านล่างของแผ่น TLC ส่วนโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำ ละลายได้ในบิวทานอลดีกว่าจะเคลื่อนไปอยู่ด้านบนของแผ่น TLC โดยผลิตภัณฑ์ที่สนใจคือ ส่วนที่ไม่ละลายน้ำ (hydrophobic zone) ปริมาณมากที่สุดแสดงในภาพที่ 16 (ลูกศรกลาง) คาดว่าเป็นผลิตภัณฑ์หลักของเชื้อดังกล่าวและแยกออกจาก TLC นำไปศึกษาในลำดับต่อไป ซึ่งสารสกัดที่บริสุทธิ์บางส่วนมีความใสและสะอาดมากกว่าสารสกัดที่ยังไม่ผ่านขบวนการนี้ เนื่องจากสิ่งสกปรกสีน้ำตาลเข้มจากสารสกัดจับติดอยู่บนแผ่นซิลิกาโดยเฉพาะตำแหน่งที่หยดสารสกัด ทำให้เทคนิคนี้สามารถแยกสารให้บริสุทธิ์ได้บางส่วน



ภาพที่ 16 การทำให้สารสกัดจากเชื้อ *T. asperellum* BCC 12530 บริสุทธิ์บางส่วนโดยโครมาโตกราฟีแบบบาง (TLC) ระบบเฟสเคลื่อนที่คือ บิวทานอล : กรดอะซิติก : น้ำ เป็นอัตราส่วน 6 : 2 : 2 บริเวณที่แห้งเมื่อสเปรย์ด้วยน้ำซึ่งคาดว่าจะมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพแสดงโดยลูกศรชี้

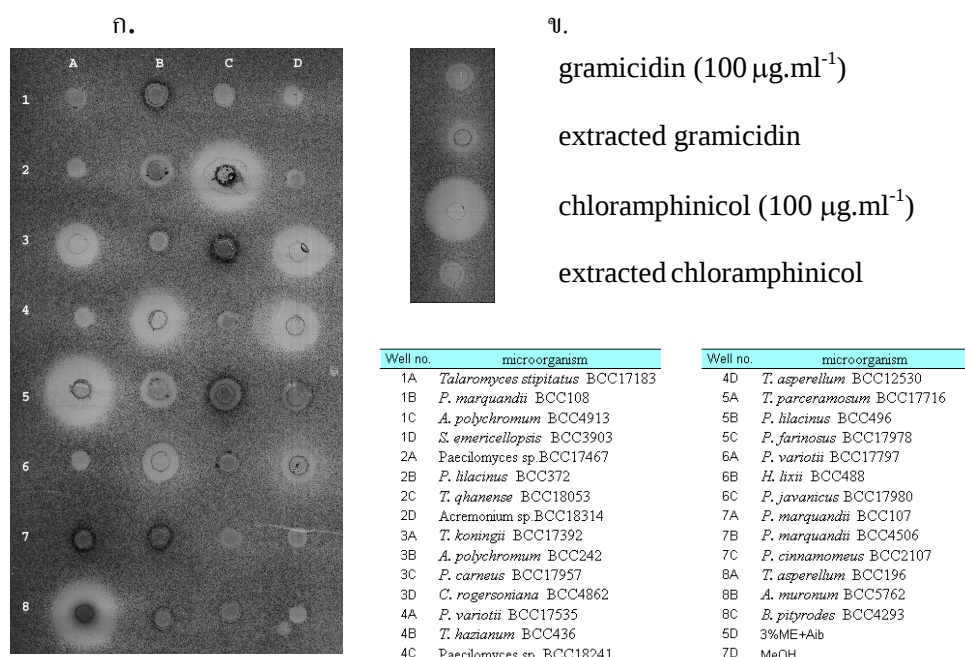
1.4 การทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากตัวอย่าง

1.4.1 การใช้เทคนิคการดูดซับสารในหลุมอาหารแข็ง (agar well diffusion)

การทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียสายพันธุ์ *B. cereus* ATCC 11778 ด้วยเทคนิคการดูดซับสารในหลุมอาหารแข็งกับเชื้อที่สกัดโดยวิธีที่ III ทั้งหมด 27 สายพันธุ์ และเชื้อสายพันธุ์อ้างอิงคือ *T. asperellum* BCC 12530 โดยเชื้อที่คัดเลือกมาทดสอบเป็นกลุ่มที่มีรายงานมาก่อนว่าเป็นแหล่งผลิตเปปไทด์ไบโอติกส์ (Degenkolb *et al.*, 2003) ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 17 และคำนวณเป็น % relative inhibition เทียบกับ chloramphenicol ($100 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) เนื่องจากมีเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณส่วนใสสูงสุด ซึ่งพบว่าที่ % relative inhibition สูงกว่าหรือเท่ากับ 90 % ขึ้นไปมีเพียง 4 สายพันธุ์ (ตารางผนวกที่ ข1) ได้แก่ *Trichoderma* sp. BCC17716, *Trichoderma* sp. BCC196, *T. pseudokoningii* BCC18053 และ *C. rogersoniana* BCC4862 และบางตัวอย่างมีบริเวณส่วนใสไม่คมชัด โดยบริเวณขอบวงมีความขุ่นของเชื้อปรากฏอยู่หรือมีลักษณะเป็นวงซ้อนวงจาง ๆ (halo zone) เช่นหลุมที่ 2C, 4B, 5A, 6D และ 8A เป็นต้น ซึ่งเป็นลักษณะที่เชื้อสามารถเจริญได้บางส่วน หรืออาจมีสารประกอบมากกว่า 1 ชนิดอยู่ในสารสกัดนั้น โดยแต่ละสารมีความสามารถในการแพร่บนอาหารแข็ง ขนาดโมเลกุล และความสามารถในการละลายไม่เท่ากัน (Mahon and Manuselis, 1995) และในการทดลองนี้มีสารปฏิชีวนะคือ chloramphenicol และ gramicidin เป็นสารทดสอบด้วย โดย gramicidin มีมวลโมเลกุลค่อนข้างใหญ่มากประมาณ 1,800 – 1,900 Da (Chitta and Gross, 2004) และมีโครงสร้างเป็นแบบเปปไทด์สายยาวเช่นเดียว กันกับเปปไทด์ไบโอติกส์ ที่คาดว่ามีการแพร่ในอาหารแข็งได้ยากกว่า chloramphenicol ซึ่งมีขนาดมวลโมเลกุลเล็กคือ 323 Da (www.simaaldrich.com) จึงเกิดบริเวณส่วนใสน้อยกว่า ด้วยสาเหตุดังกล่าวทำให้ไม่ได้ขนาดบริเวณส่วนใสที่ถูกต้อง ดังนั้นจึงควรมีวิธีทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงกว่านี้คือเทคนิค microdilution

1.4.2 การใช้เทคนิค microdilution method จากวิธีมาตรฐาน CLSI

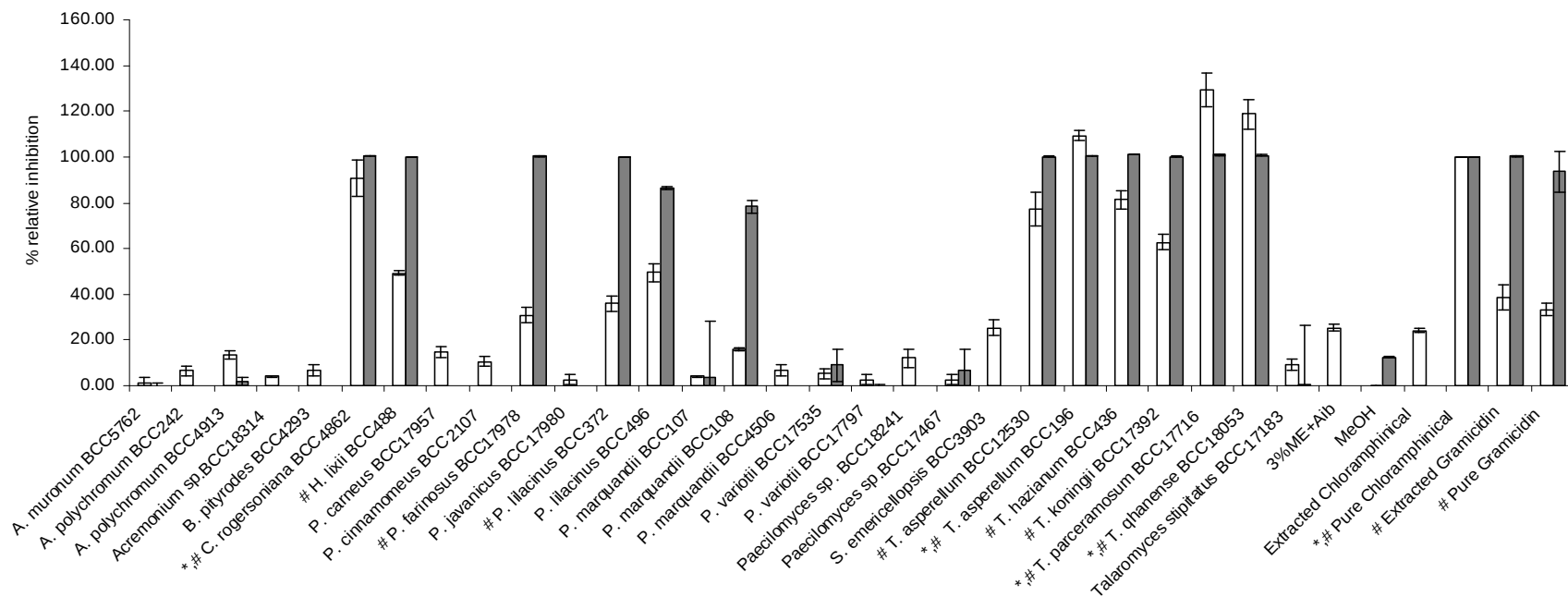
การทดสอบการยับยั้งของสารสกัดโดยเทคนิค microdilution method จะใช้ 96 well plate ซึ่งอ้างอิงตามวิธีมาตรฐาน CLSI (อุปกรณ์และวิธีการ ข้อ 3.1) จะเห็นว่าสารสกัดจากกระบวนการสกัดวิธีที่ III ละลายในเมทานอล 100 % จึงต้องคำนึงถึงตัวทำลายด้วย ซึ่งอาจมีผลต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วย ดังนั้นจึงหาความเข้มข้นตัวทำลายต่ำสุดที่ไม่มีผลต่อเชื้อแบคทีเรีย จะเห็นว่าตัวทำลายต่าง ๆ ที่ทดสอบ ต้องมีความเข้มข้น 3.125 - 6.25 % โดยปริมาตร (ไม่แสดงข้อมูล) จึงไม่มีผลยับยั้งเชื้อ *B. cereus* และ *E. coli* ซึ่งการทดสอบการยับยั้งอาจไม่เห็นผลการ



ภาพที่ 17 การทดสอบยับยั้ง *B.cereus* ATCC 11778 โดยเทคนิค agar well diffusion ก.) สารสกัดจากเชื้อทดสอบ ทั้ง 27 สายพันธุ์ และ ข.) ชุดตัวควบคุมการทดลอง

ยับยั้งจากสารสกัด เนื่องจากต้องใช้ปริมาณสารสกัดน้อยมาก ดังนั้นจึงดัดแปลงกระบวนการเติมสารสกัด โดยเติมในหลุมตามปริมาณที่ต้องการและระเหยตัวทำละลายเมทานอลออกจนแห้ง จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเชื้อและลงเชื้อตามวิธีมาตรฐาน ซึ่งจากวิธีดังกล่าวนี้จะป้องกันการเกิดผลที่ผิดพลาด (false positive result) จากตัวทำละลายได้

เมื่อทดสอบสารสกัดของเชื้อราทั้งหมด 27 สายพันธุ์ เช่นเดียวกับผลการทดลองข้อ 1.4.1 การใช้เทคนิคดูดซับสารในหลุมอาหารแข็ง มาทดสอบแบบ microdilution โดยใช้ 96 well plate กับเชื้อ *B. cereus* ATCC 11778 พบว่า มีเชื้อที่ผ่านการคัดกรองแบบ primary screening เพิ่มขึ้นจาก 4 สายพันธุ์ (14.81 %) ในวิธี agar well diffusion เป็น 10 สายพันธุ์ (37.04 %) โดยแสดงการเปรียบเทียบทั้ง 2 วิธีดังในภาพที่ 18 (ตารางภาคผนวกที่ ข1) อีกทั้งในวิธี microdilution ยังไม่เกิดปัญหาเรื่องการแพร่กระจายของโมเลกุลสารปฏิชีวนะที่ทดสอบ โดยจะพบว่า gramicidin มี % relative inhibition มากกว่าหรือเท่ากับ 90 % ดังนั้นจึงคาดว่าสารปฏิชีวนะที่ทดสอบจะแสดงกิจกรรมและเกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อเป้าหมายได้จริง ซึ่งจะเห็นว่าวิธีทดสอบโดยเทคนิค 96 well plate มีประสิทธิภาพและมีความไวสูงกว่า อีกทั้งมีการจัดการที่ง่าย สามารถทดสอบสารสกัดจำนวนมากพร้อมกันได้ ดังนั้นจะทำการทดสอบยับยั้งแบคทีเรียด้วยเทคนิค microdilution สำหรับการวิเคราะห์สารสกัดในลำดับต่อไป



ภาพที่ 18 การเปรียบเทียบวิธีการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดโดยเทคนิค agar well diffusion (□) และ microdilution (■)

หมายเหตุ * เชื้อที่ให้ผลการยับยั้ง (% relative inhibition $\geq$ 90) เมื่อทดสอบด้วยเทคนิค agar well diffusion

เชื้อที่ให้ผลการยับยั้ง (% relative inhibition $\geq$ 90) เมื่อทดสอบด้วยเทคนิค microdilution

1.4.3 การทดสอบการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ATCC 11778 ของสารสกัด *T. asperellum* BCC 12530

การทดสอบกิจกรรมการยับยั้ง *B. cereus* ATCC 11778 ด้วยเทคนิค microdilution โดยเปรียบเทียบกันระหว่างสารสกัดอย่างหยาบของ *T. asperellum* BCC 12530 ก่อนและหลังการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วย TLC พบว่าสารสกัดที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนมีค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อเป้าหมาย (minimum inhibitory concentration; MIC) เท่ากับ $500 \mu\text{g.ml}^{-1}$ ส่วนสารสกัดอย่างหยาบมีกิจกรรมการยับยั้งน้อยกว่า ซึ่งพบว่ามีค่า MIC เท่ากับ $1,000 \mu\text{g.ml}^{-1}$ (ตารางที่ 10) ดังนั้นวิธีการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วย TLC สามารถช่วยกำจัดสิ่งสกปรกออกจากสารที่ต้องการ ซึ่งทำให้สารมีความบริสุทธิ์สูงขึ้นเมื่อทดสอบกิจกรรมการยับยั้งแล้วจึงมีค่า MIC ลดลง และคาดว่าส่วนที่ขูดออกจาก TLC เป็นผลิตภัณฑ์หลักที่ต้องการ

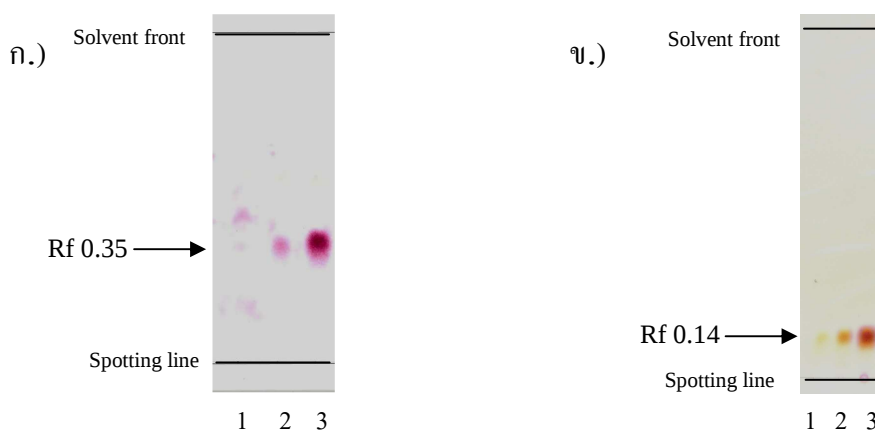
ตารางที่ 10 กิจกรรมการยับยั้ง *B. cereus* ATCC 11778 โดยเปรียบเทียบกันระหว่างสารสกัดของ *T. asperellum* BCC 12530 ก่อนและหลังการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วย TLC

Sample	Concentration ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	% Inhibition	SD	MIC ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)
Partial purified by TLC	1,000	98.34	0.33	500
	500	91.40	0.22	
	250	70.03	4.00	
	125	85.52	4.22	
Crude extract	1,000	94.30	2.79	1,000
	500	36.63	0.67	
	250	52.45	2.32	
	125	40.91	2.09	
Control	TLC (blank)	20.54	0.34	
	MeOH	3.50	1.12	
	3 % ME	38.66	2.61	

1.5 การวิเคราะห์กรดอะมิโนโดย TLC

1.5.1 การทดสอบเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase)

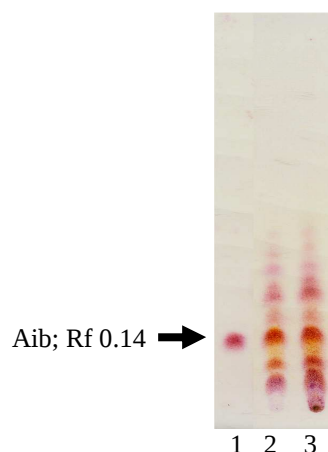
การวิเคราะห์หึ่งค์ประกอบกรดอะมิโนโดย TLC ซึ่งจะใช้กรดอะมิโน Aib เป็นตัวบ่งชี้ (marker) ของสารกลุ่มเปปไทโดอิกส์ ซึ่งการทดสอบระบบตัวทำละลายสำหรับเป็นเฟสเคลื่อนที่ 2 ระบบเปรียบเทียบกับ เมื่อพิจารณาแผ่น TLC หลังจากสเปรย์ด้วยสารละลายนินไฮดริน (ninhydrin) แล้วพบว่าระบบสารละลายที่ 1 ไอโซ-โพรพานอล : เมทานอล : น้ำ อัตราส่วน 40 : 2 : 10 มีค่า Rf ของ Aib เท่ากับ 0.35 ลักษณะจุด (spot) สีแดงอมชมพู ซึ่งความเข้มข้นที่ตรวจสอบได้ คือที่ 100 และ 1,000 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ ส่วนความเข้มข้น 10 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ จะเห็นว่าสีของจุดค่อนข้างจางมากและลักษณะไม่เป็น spot ของกรดอะมิโน (ภาพที่ 19 ก. เลนที่ 1) และระบบที่ 2 คือ คลอโรฟอร์ม : เมทานอล : น้ำ : กรดอะซิติกเข้มข้น อัตราส่วน 65 : 25 : 4 : 3 พบว่า มีค่า Rf ของ Aib เท่ากับ 0.14 ลักษณะ spot เป็นสีแดงส้ม ซึ่งความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจสอบได้คือ 10 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (ภาพที่ 19 ข. เลนที่ 1) และมีลักษณะของ spot กรดอะมิโนคมชัดมากกว่าในสารละลายระบบแรก อีกทั้งระบบไอโซ-โพรพานอล : เมทานอล : น้ำ มีการแยกแต่ละ spot ของกรดอะมิโนไม่ดีเท่าที่ควร คือ spot มีลักษณะเป็นหางยาว (tailing หรือ smear) ซึ่งทำให้กรดอะมิโนแต่ละ spot อาจซ้อนทับกันได้และนอกจากนี้ยังปรากฏสิ่งสกปรก (backgrounds) คราบสีชมพูจำนวนมาก ดังนั้นจึงเลือกระบบตัวทำละลาย คลอโรฟอร์ม : เมทานอล : น้ำ : กรดอะซิติกเข้มข้น ซึ่งมี spot ของกรดอะมิโนค่อนข้างคมชัดสำหรับการตรวจสอบกรดอะมิโน Aib ต่อไป



ภาพที่ 19 การเปรียบเทียบระบบเฟสเคลื่อนที่ ก.) ไอโซ-โพรพานอล : เมทานอล : น้ำ อัตราส่วน 40 : 2 : 10 และ ข.) คลอโรฟอร์ม : เมทานอล : น้ำ : กรดอะซิติกเข้มข้น อัตราส่วน 65 : 25 : 4 : 3 และเลนที่ 1, 2 และ 3 คือกรดอะมิโน Aib ที่ความเข้มข้น 10, 100 และ 1,000 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ ตามลำดับ (ลูกศรชี้)

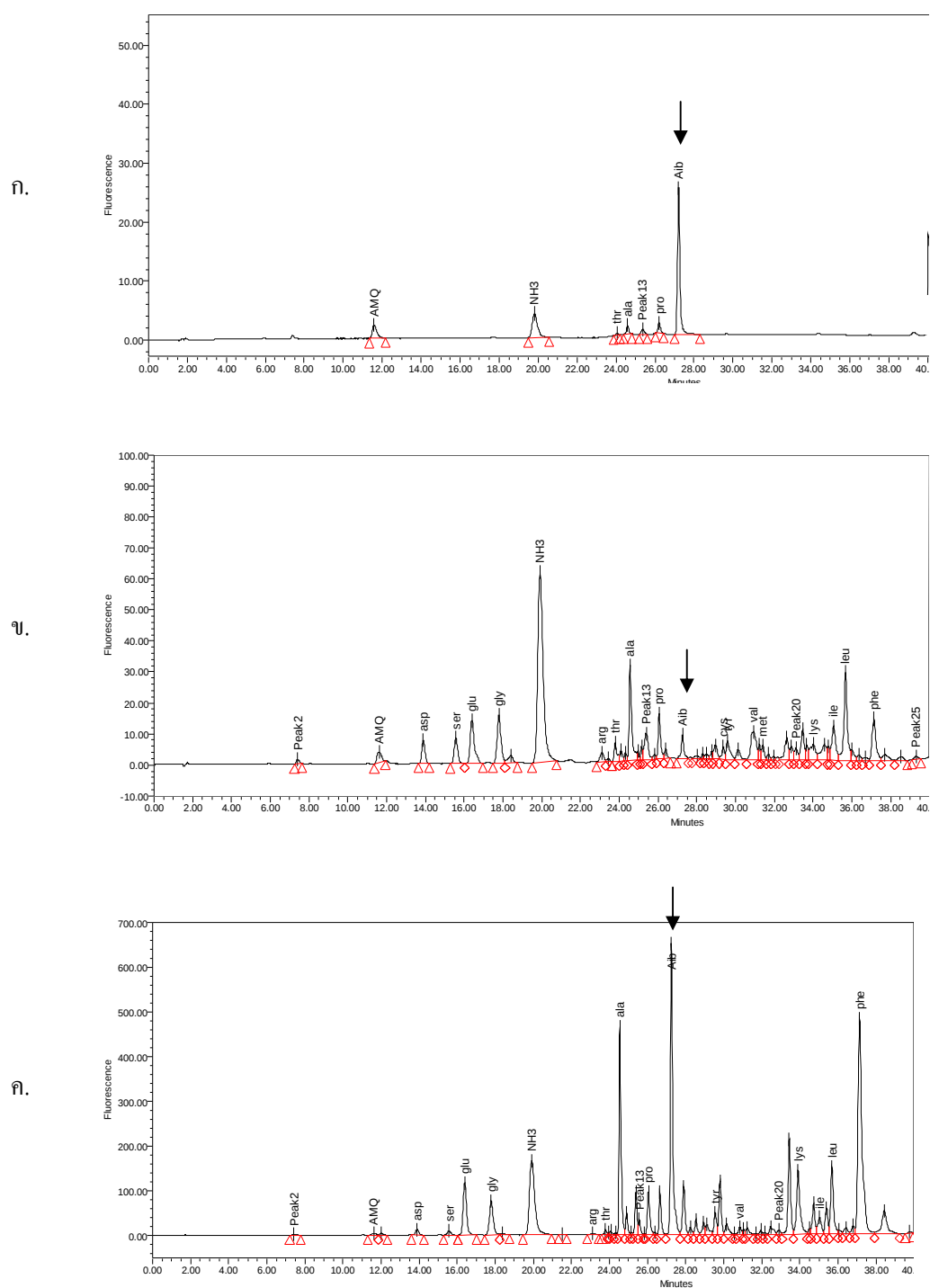
1.5.2 การตรวจสอบกรดอะมิโนของสารสกัดจาก *T. asperellum* BCC 12530

สารสกัดก่อนและหลังการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วย TLC จาก *T. asperellum* BCC 12530 ที่ผ่านการไฮโดรไลส์แล้ว พบว่าทั้ง 2 กรณี มีกรดอะมิโนในปริมาณใกล้เคียงกันโดยดูจากขนาดและความเข้มสีของแต่ละจุด (spot) ซึ่งมีกรดอะมิโนที่ปรากฏค่อนข้างชัดเจน โดยสารทั้ง 2 กรณีมีกรดอะมิโน Aib เป็นองค์ประกอบด้วย (ภาพที่ 20 ลูกศรชี้ จุดสีชมพูเข้มหรือแดง) และสารที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนยังมีความสะอาด ไม่เกิดเป็นหางหรือแถบ (tailing หรือ smear band) ของแต่ละจุดกรดอะมิโน โดยเฉพาะใกล้จุดเริ่มต้นของโครมาโตกราฟฟีด้วย จากการศึกษากรดอะมิโนโดย TLC ตามที่กล่าวมาแล้วข้างต้น



ภาพที่ 20 การตรวจสอบกรดอะมิโนโดยเปรียบเทียบกันระหว่างสารสกัดก่อนและหลังการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วย TLC จาก *T. asperellum* BCC 12530 เลนที่ 1 กรดอะมิโน Aib มาตรฐานเป็น marker มีค่า $R_f = 0.14$ (ลูกศรชี้) เลนที่ 2 สารสกัดหลังการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วย TLC และเลนที่ 3 สารสกัดก่อนทำให้บริสุทธิ์บางส่วน ตัวอย่างละ 5 μ l ระบบสารละลายเฟสเคลื่อนที่คลอโรฟอร์ม : เมทานอล : น้ำ : กรดอะซิติกเข้มข้น อัตราส่วน 65 : 25 : 4 : 3 และตรวจสอบโดยสเปรย์สารละลายนินไฮดริน

ศึกษาเพิ่มเติมเพื่อยืนยันเทคนิคดังกล่าว ด้วยวิธีการที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าคือการวิเคราะห์กรดอะมิโนด้วย HPLC (วิธีการทดลอง 5.1) ของสารสกัดหยาบจาก *T. asperellum* BCC 12530 ที่ผ่านกระบวนการไฮโดรไลส์พบว่าในสารตัวอย่างมีกรดอะมิโน Aib เป็นองค์ประกอบสูงถึง 23.44 % คำนวณเป็นความเข้มข้นจากพื้นที่ใต้กราฟเปรียบเทียบกับกรดอะมิโนมาตรฐาน Aib (1 mg.ml^{-1}) ได้เท่ากับ 2.79 mg.ml^{-1} โดยปรากฏพีคขึ้นที่เวลา 27.75 นาที ส่วนในตัวอย่างควบคุมเชิงลบคือ สารสกัดอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 % ME ที่เติม Aib $50 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$ พบว่ามี Aib

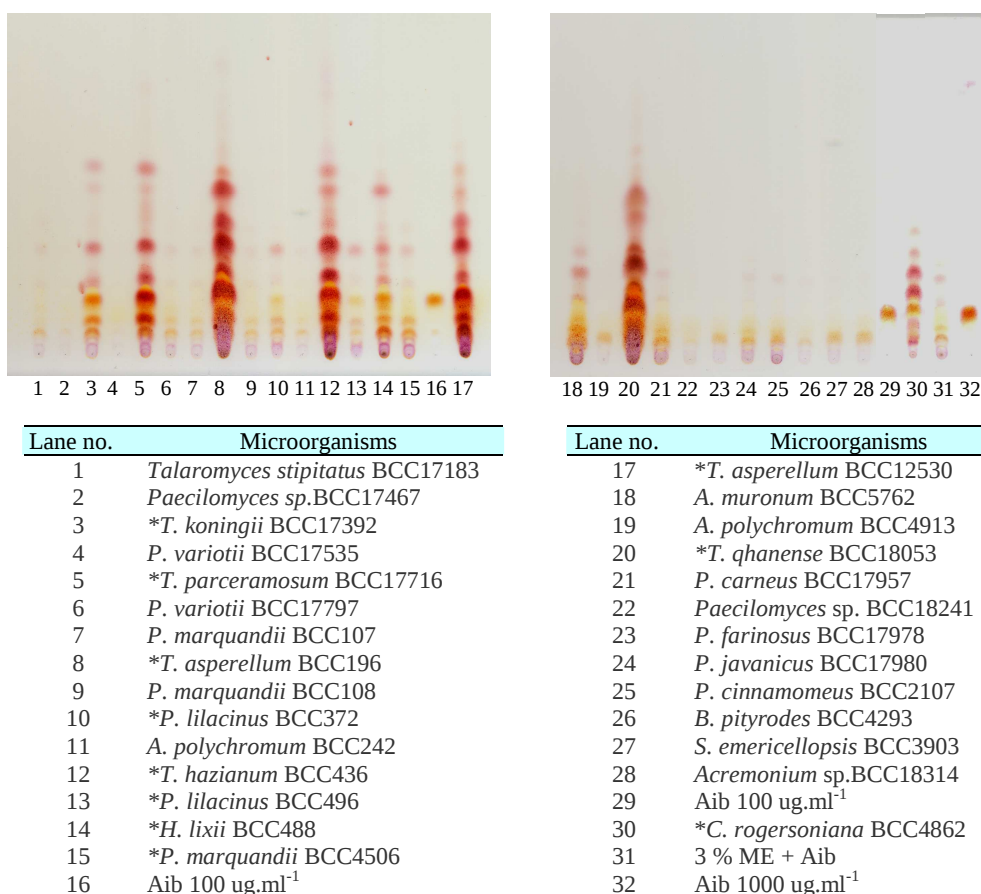


ภาพที่ 21 การวิเคราะห์กรดอะมิโนด้วย HPLC โดย AccQ•Tag™ method ก.) คือ กรดอะมิโนมาตรฐาน Aib ข.) สารสกัดอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 % ME ที่เติมกรดอะมิโน Aib $50 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (ตัวควบคุมเชิงลบ) และ ค.) สารสกัดจาก *T. asperellum* BCC 12530 ที่ผ่านการไฮโดรไลส์

จำนวนเล็กน้อยเท่านั้นที่สกัดออกมาได้ คือความเข้มข้นเท่ากับ 0.04 mg.ml^{-1} (ภาพที่ 21) และจากผลการทดลองนี้สามารถบอกได้ว่ากรดอะมิโน Aib ที่พบในสารสกัดเกิดจากการผลิตของเชื้อ ไม่ได้มาจากการตกค้างของกรดอะมิโนดังกล่าวที่เดิมในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยการทดลองของ Raap และคณะ (2004) พบว่ากรดอะมิโน Aib ที่เป็นองค์ประกอบของ zervamicins สังเคราะห์ได้จากกรดอะมิโนอื่นๆ ด้วย ได้แก่ กรดอะมิโน Iva (iso-valine)

T. asperellum BCC 12530 ที่ใช้เป็นเชื้อควบคุมตลอดการทดลองในงานวิจัยนี้ ได้รับการพิสูจน์อย่างชัดเจนแล้วโดย HPLC (AccQ•Tag™ method) ว่าสร้างสารที่มีกรดอะมิโน Aib เป็นองค์ประกอบ ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญของเปปไทด์ไทโรซีน และจากการวิเคราะห์กรดอะมิโนด้วย HPLC ทำให้มั่นใจได้ว่าการตรวจสอบกรดอะมิโน Aib โดยวิธี TLC ตามที่กล่าวมาก่อนแล้ว มีประสิทธิภาพเพียงพอต่อการคัดกรองสารสกัดที่มี Aib เป็นองค์ประกอบได้และเป็นวิธีการที่ราคาต่ำ

การทดสอบเทคนิคการวิเคราะห์กรดอะมิโนด้วย TLC โดยนำมาคัดกรองเชื้อราเพิ่มเติมอีก 27 สายพันธุ์ (ภาพที่ 22) นอกจากเชื้ออ้างอิง *T. asperellum* BCC 12530 ดังที่ได้กล่าวไปแล้วเพื่อวิเคราะห์แนวโน้มในการใช้เทคนิคนี้สำหรับการคัดกรองเชื้อที่มีการผลิตเปปไทด์ไทโรซีน พบว่าสามารถแบ่งแยกเชื้อราได้ชัดเจนระหว่างกลุ่มที่คาดว่าจะผลิตและไม่ได้ผลิตเปปไทด์ไทโรซีน โดยกลุ่มที่คาดว่าจะผลิตได้แก่ จีนิส *Trichoderma* และ telomorph คือ *Hypocrea* ทั้งหมด และมีจีนิส *Paecilomyces* บางสายพันธุ์ นอกจากนี้พบว่าเชื้อที่มีกรดอะมิโน Aib ในสารสกัด เมื่อทดสอบกิจกรรมการยับยั้ง พบว่ามีผลในการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ATCC 11778 โดยเทคนิค microdilution ด้วย (ผลและวิจารณ์ข้อ 1.4.2) ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่ากิจกรรมการยับยั้งเกิดจากสารเปปไทด์ไทโรซีนในสารสกัดและเทคนิค TLC นี้มีประสิทธิภาพเพียงพอในการคัดกรองเชื้อราที่ผลิตเปปไทด์ไทโรซีน



ภาพที่ 22 แสดงการวิเคราะห์กรดอะมิโนด้วยเทคนิค TLC กับสารสกัดเชื้อราทั้งหมด 27

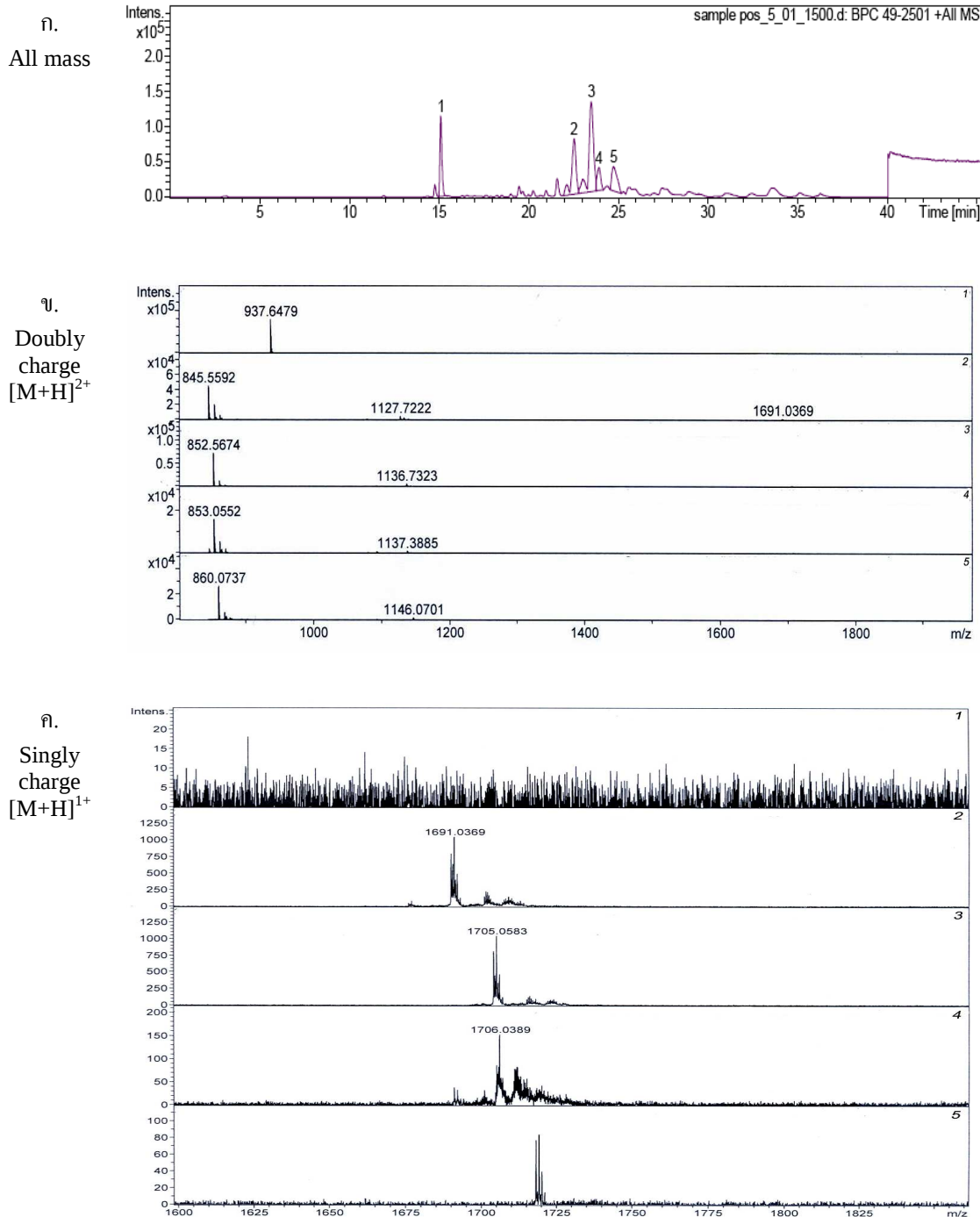
สายพันธุ์ โดยมีกรดอะมิโน Aib เป็น marker

หมายเหตุ * เชื้อราที่พบว่ามีการกรดอะมิโน Aib เป็นองค์ประกอบในสารสกัด

1.6 การวิเคราะห์มวลโมเลกุลสารสกัดด้วย LC/MS

การวิเคราะห์มวลด้วยเทคนิค LC/MS ของสารสกัดเชื้อ *T. asperellum* BCC 12530 โดยใช้ ESI เป็นการสร้างประจุให้มวลที่ทดสอบ โดยนำสารสกัด *T. asperellum* BCC 12530 ที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วย TLC ความเข้มข้น 20 mg.ml⁻¹ ปริมาณ 2 µl มาวิเคราะห์ตามวิธีการทดลองข้อ 5.5 พบว่าได้มวลของสารที่ชัดเจนทั้งหมดอย่างน้อย 5 ค่า จากพีคของมวลสารทั้งหมด (All MS) ที่เวลา 15.1, 22.5, 23.5, 23.9 และ 24.7 min (ภาพที่ 23 ก.) และมวลที่ได้คาดว่ามีลักษณะเป็น doubly charge $[M+2H]^{2+}$ คือค่า m/z ที่อ่านได้เพิ่มหรือลดลงเป็นสองเท่าเนื่องจากอิเล็กตรอนที่เพิ่มหรือลดลงสองเท่า (Price, 1991; Suwan *et al.*, 2000)

จากการวิเคราะห์สารโดยเทคนิค LC-ESI/MS นี้ แสดงสเปกตรัมในภาพที่ 23 ข. ได้ค่า m/z ของสารลำดับที่ 1 – 5 คือ 937.6479, 845.5592, 852.5674, 853.0552 และ 860.0737 Da ซึ่งเป็น doubly charge $[M+2H]^{2+}$ นอกจากนี้ยังพบค่า m/z 1691.0369, 1705.0583 และ 1706.0389 ซึ่งเป็น singly charge $[M+H]^+$ ในสารลำดับที่ 2 – 4 พิกของสารลำดับที่ 1 และ 5 ในแบบ singly charge พบว่ามีความหนาแน่นของสเปกตรัมต่ำมาก (low intensities) เมื่อเปรียบเทียบกับพิกของสาร 2 – 4 (ภาพที่ 23 ค.) มวลที่แท้จริง (M) คำนวณจาก doubly charge โดยโปรแกรม HyStar 3.2 ได้ดังนี้ 1874.2879, 1690.1105, 1704.1269, 1705.1104 และ 1719.1395 (ตารางที่ 11) จากค่ามวลที่ได้นี้ ลำดับที่ 2 – 5 คาดว่าเป็นมวลของสาร trichotoxins ตรงกับที่มีรายงานมาก่อนแล้วและแสดงในตารางที่ 12 (Jaworski and Brückner, 1999; Suwan *et al.*, 2000; Duclohier *et al.*, 2004; Krause *et al.*, 2006; Neuhof *et al.*, 2007) ซึ่งอาจมีมวลต่างกันเล็กน้อย 1 – 2 Da ขึ้นกับแต่ละเทคนิคที่ใช้ในการหามวลโมเลกุลที่แตกต่างกันไปด้วย นอกจากนี้ จะเห็นได้ว่าสารสกัดมีลักษณะจำเพาะคือ มีมวลโมเลกุลที่ใกล้เคียงกันจำนวนมากโดยมีมวลต่างกัน 1, 14 หรือ 16 Da เป็นต้น เนื่องจากคุณสมบัติที่สำคัญอีกประการหนึ่งของการสังเคราะห์เปปไทด์ไฮโดติกส์ โดยกลุ่มเอนไซม์ NRPSs ในเชื้อราจะสามารถสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ผสมกัน และมีมวลต่างกันเล็กน้อย (microheterogenous peptide mixtures) โดยองค์ประกอบของกรดอะมิโนหรือ 1, 2 – amino alcohol เปลี่ยนแปลงไป (Pocsfalvi *et al.*, 1997; Krause *et al.*, 2007; Stoppacher *et al.*, 2007) เช่น การเปลี่ยนจากกรดอะมิโน Gln ไปเป็น Glu ในเรซิดิวส์ที่ 18 ของ trichorzianine ทำให้มวลโมเลกุลเปลี่ยนจาก 1962.1 Da ไปเป็น 1963.1 Da (Stoppacher *et al.*, 2007) หรือการเปลี่ยนจากกรดอะมิโน Hyp (*trans*-4-hydroxy-L-proline) ไปเป็น Pro ในเรซิดิวส์ที่ 13 ของ antiamoebins ชนิดที่ I และ II ทำให้มวลโมเลกุลเปลี่ยนจาก 1670 Da ไปเป็น 1654 Da (Jaworski and Brückner, 2000) เป็นต้น สารประกอบที่ได้มีลักษณะจำเพาะคือ microheterogeneity ดังที่ได้กล่าวไปแล้ว ทำให้มีมวลของสารที่มีขนาดใกล้เคียงกันเกิดขึ้นมากกว่า 1 ค่า แต่เป็นสารในกลุ่มเดียวกันหรือเป็น analogues กัน และจากการวิเคราะห์ LC/MS ของสารสกัดเชื้อ *T. asperellum* BCC 12530 เมื่อคำนวณมวลที่ได้คาดว่าพิกที่ 3 และ 4 มีมวลเท่ากับ 1704.1269 และ 1705.1104 Da คาดว่าเป็น neutral trichotoxins (trichotoxin A-50) และ acidic trichotoxins (trichotoxin A-40) ตามลำดับซึ่งมีมวลต่างกัน 1 Da โดยเกิดจากสภาพการเป็นกรดและกลางของกรดอะมิโน Glu – Gln ที่เป็นองค์ประกอบ ดังที่มีรายงานมาแล้ว ส่วนพิกที่ 2 และ 5 มีมวลเท่ากับ 1690.1105 และ 1719.1395 Da ต่างกับ พิกที่ 3 และ 4 เท่ากับ 14 Da เหมือนกัน ซึ่งคาดว่าอาจจะมีกรดอะมิโนต่างชนิดกันเป็นองค์ประกอบ ส่วนพิกของสารประกอบที่ 1 มีมวล 1874.2879 Da นั้นยังไม่ตรงกับในรายงานใด ๆ



ภาพที่ 23 การวิเคราะห์มวลโดยเทคนิค LC-ESI/MS ก. พิกของมวลสารประกอบทั้งหมด (all mass) อย่างน้อย 5 ชนิดที่ตรวจสอบได้เป็นประจวบกับสัมพันธ์กับเวลา และ ข. และ ค. เป็นสเปกตรัมของสารทั้ง 5 ชนิดในช่วง m/z 800 – 1,900 Da (doubly charge $[M+2H]^{2+}$) และ 1,600 – 1,875 Da (singly charge $[M+H]^{1+}$) ตามลำดับ

ตารางที่ 11 ค่า m/z จากการวิเคราะห์ LC-ESI/MS ในรูปแบบ doubly และ singly charge ของสารสกัด *T. asperellum* BCC 12530

Peak	Time	Monoisotopic mass (M)*	$[M+2H]^{2+}$	$[M+H]^+$
1	15.1	1874.2879	937.6479	-
2	22.5	1690.1105	845.5592	1691.0369
3	23.5	1704.1269	852.5674	1705.0583
4	23.9	1705.1104	853.0552	1706.0389
5	24.7	1719.1395	860.0737	-

หมายเหตุ *คำนวณจากค่า m/z $[M+2H]^{2+}$ โดยโปรแกรม HyStar 3.2

ตารางที่ 12 การวิเคราะห์มวลของ trichotoxins ที่มีการรายงานมาแล้ว

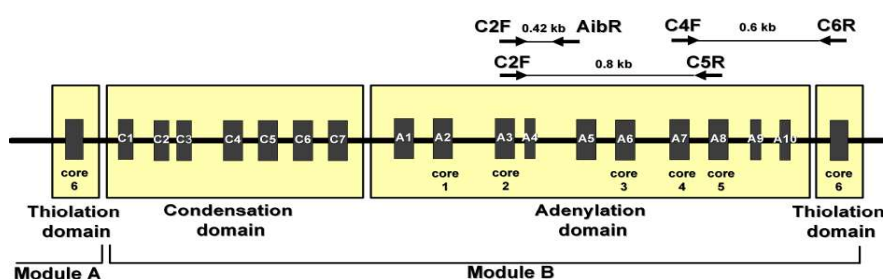
Type of trichotoxins	microorganism	Mass	reference
Trichotoxins A-40	<i>T. viride</i> NRRL 5242	$[M] = m/z$ 1690, 1704, 1718	Jaworski and Brückner (1999)
Trichotoxin mixture	<i>T. harzianum</i> PC01	$[M] a = m/z$ 1675, 1689, 1703, 1717, 1731	Suwan <i>et al.</i> (2000)
Trichotoxins A-50E	-	$[M+H]^+ = m/z$ 1689.7 $[M+Na]^+ = m/z$ 1712.1,	Duclohier <i>et al.</i> (2004)
Trichotoxins A-50I	<i>T. asperellum</i>	$[M] = m/z$ 1689, 1703, 1717	Krause <i>et al.</i> (2006)
Trichotoxins A-50	<i>T. asperellum</i> NRRL 5242	$[M] = m/z$ 1660, 1674, 1688, 1702, 1716, 1730	Neuhof <i>et al.</i> (2007)

จากการศึกษาสามารถยืนยันได้ว่าสารสกัดจากเชื้อ *T. asperellum* BCC 12530 ได้ผลิตสารที่เป็นกลุ่มเปปไทด์ไฮโดติกส์ เนื่องจากการวิเคราะห์กรดอะมิโน Aib ที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดด้วยวิธี TLC และ HPLC และคาดว่าเป็นสารประกอบ trichotoxins โดยการวิเคราะห์มวลจากเทคนิค LC-ESI/MS ดังนั้นเชื้อ *T. asperellum* BCC 12530 สามารถนำมาเป็นเชื้อราอ้างอิง สำหรับการทดสอบวิธีการคัดกรองเชื้อราที่ผลิตสารในกลุ่มเปปไทด์ไฮโดติกส์ในลำดับต่อไป

1.7 การออกแบบไพรเมอร์และทดสอบสภาวะการทำพีซีอาร์ที่เหมาะสม

1.7.1 การวิเคราะห์ข้อมูลทางชีวสารสนเทศและการออกแบบไพรเมอร์

การทดสอบหาขึ้นที่เกี่ยวกับการผลิตเปปไทด์โอดีคส์โดยเทคนิคพีซีอาร์ จะมีไพรเมอร์ที่เกี่ยวข้องทั้งหมด 3 คู่ ได้แก่ C2F&C5R, C4F&C6R และ C2F&AibR แสดงตำแหน่งของแต่ละคู่ไพรเมอร์ในภาพที่ 26 ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์คู่ที่อุปกรณ์และวิธีการข้อ 6.2.1 โดยไพรเมอร์ C2F&C5R และ C4F&C6R จะจำเพาะกับส่วนของยีน *nrps* ในโดเมน A และ T ตามลำดับ ส่วนไพรเมอร์ C2F&AibR จะจำเพาะต่อโมดูลที่เป็น Aib เท่านั้น



ภาพที่ 24 แบบจำลองบางส่วนของยีน *pes* โดยประกอบด้วย A, T และ C-domain และตำแหน่งของไพรเมอร์ทั้ง 3 คู่ คือ C2F&C5R, C4F&C6R และ C2F&AibR ที่ใช้ในการศึกษานี้

ฐานข้อมูลที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ C4F และ C6R แสดงใน ตารางที่ 13 ซึ่งเป็นข้อมูลของเชื้อรา 9 สายพันธุ์ที่มียีน *nrps* แสดงการทำ multiple alignment ด้วยโปรแกรม Clustal W และตำแหน่งไพรเมอร์ในภาพผนวกที่ ก1 ส่วนไพรเมอร์ AibR ออกแบบได้จากยีนส่วนที่เป็นโมดูลของ Aib ของเชื้อรา 2 สายพันธุ์ คือ *T. virens* (Wiest, *et al.*, 2002) และ *T. asperellum* (Chutrakul and Peberdy, 2005) จำนวนทั้งหมด 9 โมดูล แสดงการทำ multiple alignment และตำแหน่งไพรเมอร์ในภาพผนวกที่ ก2 เมื่อนำไพรเมอร์ที่ออกแบบได้มาตรวจสอบโอกาสการเกิด self complementary ด้วยโปรแกรม OligoCalc (Kibbe, 2007) ไม่พบโครงสร้าง hairpin formation แต่มีโอกาสเกิด self – annealing ได้ 3 – 12 แบบ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์ปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้

ตารางที่ 13 ชื่อยีน รหัส และเชื้อราจากฐานข้อมูลธนาคารยีน NCBI สำหรับออกแบบไพรเมอร์คู่ C4F&C6R

Name of gene / Accession no.	Organisms	References
<i>nrps</i> / AAX63399	<i>Hypocrea virens</i> (Hvir)	Wei <i>et al.</i> (2005)
<i>pes</i> / BAC78651	<i>Aspergillus oryzae</i> (Aory)	Ishida <i>et al.</i> (2002)
<i>salps 1</i> / AJ784403	<i>Trichoderma harzianum</i> (Thar)	Vizcaino <i>et al.</i> (2005)
<i>pes</i> / CAA61605	<i>Metarhizium anisopliae</i> (Mani)	Bailey <i>et al.</i> (1996)
<i>nrps</i> / AAM78457	<i>Trichoderma virens</i> (Tvir)	Wiest <i>et al.</i> (2002)
<i>pes1</i> / AAK16599	<i>Hypocrea virens</i> (Hvir)	Wilhite <i>et al.</i> (2001)
<i>pes</i> / AAG24639	<i>Trichoderma asperellum</i> (Tasp)	Chutrakul and Peberdy (2005)
<i>pes</i> / AAD00581	<i>Aureobasidium pullulans</i> (Apul)	Peery <i>et al.</i> (1997)
<i>pes</i> / AAP56239	<i>Emericella nidulans</i> (Enid)	Haas <i>et al.</i> (2003)

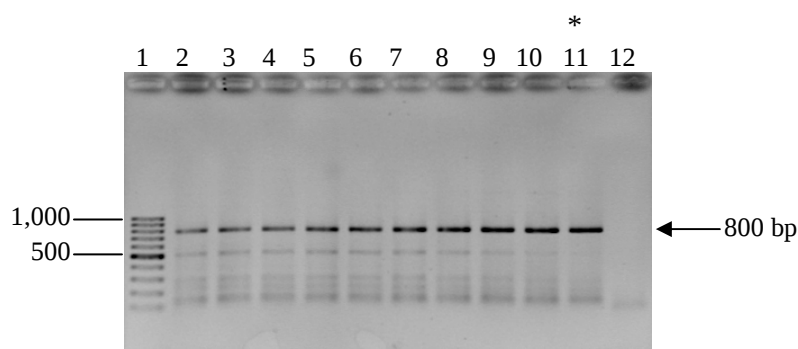
1.7.2 การทดสอบองค์ประกอบและสภาวะที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยาพีซีอาร์

ไพรเมอร์แต่ละคู่จะนำมาทดสอบหาองค์ประกอบและสภาวะการทำพีซีอาร์ที่เหมาะสม โดยมีจีโนมดีเอ็นเอของ *T. asperellum* BCC12530 เป็นแม่แบบ การหาองค์ประกอบของพีซีอาร์ที่เหมาะสม โดยปรับปริมาณสารที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในปฏิกิริยา ได้แก่ ปริมาณ $MgCl_2$ ความเข้มข้นไพรเมอร์และการทดสอบหาอุณหภูมิ annealing (T_m) ที่เหมาะสม

การทดสอบไพรเมอร์ C2F&C5R พบว่าสามารถทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ขนาดผลิตภัณฑ์ประมาณ 800 คู่เบส โดยมีความเข้มข้น $MgCl_2$ เท่ากับ 4 mM และไพรเมอร์ทั้ง 2 ด้านเท่ากับ 0.4 mM (Chutrakul and Peberdy, 2005) การทดสอบหาอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสม โดยการทำ gradient PCR ในช่วง T_m เท่ากับ 51 – 61 °C พบว่าที่อุณหภูมิ annealing เท่ากับ 61 °C มีความเหมาะสมที่สุด (ภาพที่ 25 เลนที่ 11)

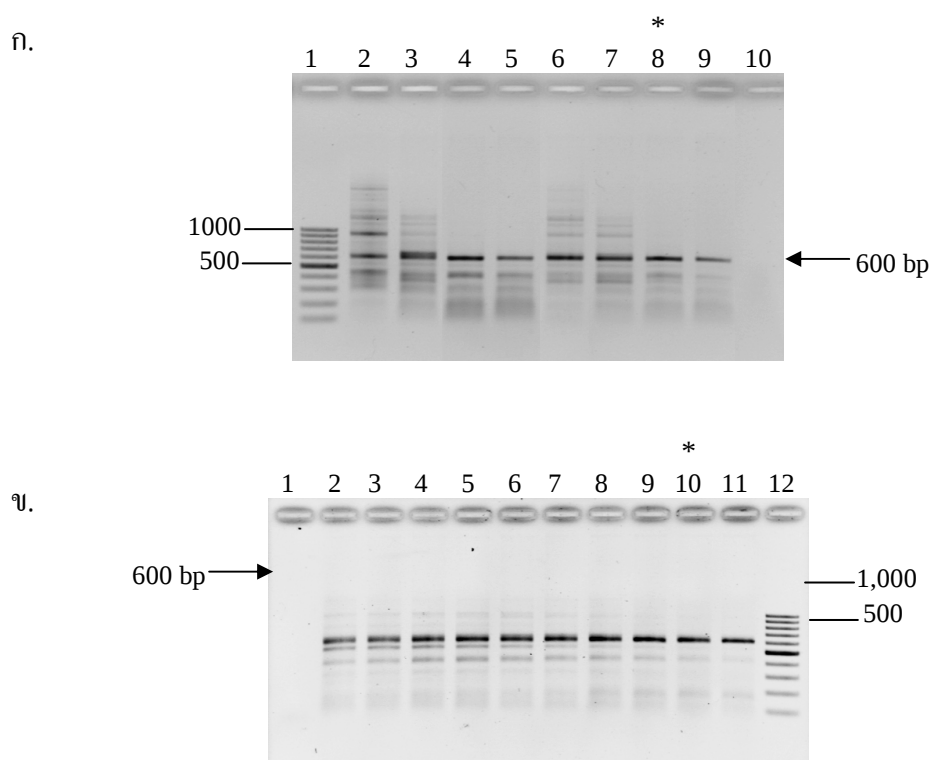
ปฏิกิริยาพีซีอาร์ของไพรเมอร์ C4F&C6R มีขนาดผลิตภัณฑ์ประมาณ 600 คู่เบส โดยการทดลองปรับค่าความเข้มข้น $MgCl_2$ และไพรเมอร์ทั้ง 2 ด้านให้เหมาะสมก่อน พบว่าความเข้มข้น $MgCl_2$ เท่ากับ 8 mM และไพรเมอร์เท่ากับ 0.2 mM (ภาพที่ 26 ก. เลนที่ 8) จากนั้นทดสอบหาอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสม โดยการทำ gradient PCR ในช่วง T_m เท่ากับ 53 – 63 °C พบว่าที่อุณหภูมิ annealing เท่ากับ 62 °C มีลักษณะแถบผลิตภัณฑ์ชัดเจนและมี non – specific band น้อยกว่าอุณหภูมิอื่นๆ ดังนั้นอุณหภูมิ annealing 62 °C จึงมีความเหมาะสมที่สุด (ภาพที่ 26 ข. เลนที่ 10)

ปฏิกิริยาพีซีอาร์ของไพรเมอร์ C2F&AibR มีขนาดผลิตภัณฑ์ประมาณ 420 คู่เบส โดยการทดลองปรับค่าความเข้มข้น $MgCl_2$ และไพรเมอร์ทั้ง 2 ด้านให้เหมาะสมก่อน พบว่าที่ความเข้มข้น $MgCl_2$ เท่ากับ 6 และ 8 mM โดยความเข้มข้นไพรเมอร์ C2F และ AibR เท่ากับ 0.2 และ 0.4 mM ตามลำดับ มีลักษณะแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ชัดเจนที่สุดและมี non – specific band น้อยกว่าที่ความเข้มข้น $MgCl_2$ และไพรเมอร์อื่นๆ (ภาพที่ 27 เลนที่ 3 และ 6) จากนั้นทดสอบหาอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสม โดยการทำ gradient PCR ในช่วง T_m เท่ากับ 53 – 63 °C และเปรียบเทียบความเข้มข้น $MgCl_2$ 2 ค่าที่กล่าวมาแล้ว (ภาพที่ 28 ก. และ ข.) พบว่าที่อุณหภูมิ annealing เท่ากับ 58.5 °C และความเข้มข้น $MgCl_2$ 8 mM มีลักษณะแถบผลิตภัณฑ์ชัดเจนกว่าอุณหภูมิอื่นๆ ดังนั้นอุณหภูมิ annealing 58.5 °C และความเข้มข้น $MgCl_2$, ไพรเมอร์ C2F และไพรเมอร์ AibR เท่ากับ 8, 0.2 และ 0.4 mM ตามลำดับ จึงมีความเหมาะสมที่สุด (ภาพที่ 28 ข. เลนที่ 7)



ภาพที่ 25 การทดสอบหาอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมของไพรเมอร์ C2F&C5R โดยมีจีโนมดีเอ็นเอของ *T. asperellum* BCC12530 เป็นแม่แบบ
เลนที่ 1 คือ 100 bp DNA ladder
เลนที่ 2 – 11 คือ อุณหภูมิ annealing เท่ากับ 51, 51.9, 53, 54.2, 55.4, 56.6, 57.8, 59, 60.1 และ 61 °C ตามลำดับ
เลนที่ 12 คือ ตัวควบคุมเชิงลบ (น้ำเป็นแม่แบบ)

หมายเหตุ * คือสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการนำไปใช้



ภาพที่ 26 การหาค่าประกอบและสถานะที่เหมาะสมในการทำพีซีอาร์ของไพรเมอร์ C4F&C6R

โดยมีจีโนมดีเอ็นเอของ *T. asperellum* BCC12530 เป็นแม่แบบ

ก. การปรับความเข้มข้น $MgCl_2$ และไพรเมอร์ทั้ง 2 ด้าน

เลนที่ 1 คือ 100 bp DNA ladder

เลนที่ 2, 3, 4 และ 5 มีความเข้มข้น $MgCl_2$ เท่ากับ 4, 6, 8 และ 10 mM ตามลำดับและไพรเมอร์ทั้ง 2 ด้านเท่ากับ 0.4 mM

เลนที่ 6, 7, 8 และ 9 มีความเข้มข้น $MgCl_2$ เท่ากับ 4, 6, 8 และ 10 mM ตามลำดับและไพรเมอร์ทั้ง 2 ด้านเท่ากับ 0.2 mM

เลนที่ 10 คือ ตัวควบคุมเชิงลบ (น้ำเป็นแม่แบบ)

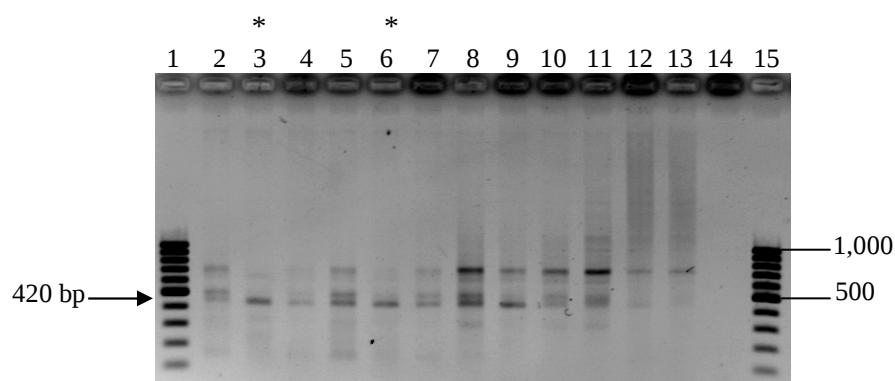
ข. การทดสอบหาอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมไพรเมอร์ C4F&C6R

เลนที่ 1 คือ ตัวควบคุมเชิงลบ (น้ำเป็นแม่แบบ)

เลนที่ 2 – 11 คือ อุณหภูมิ annealing เท่ากับ 53, 53.9, 55, 56.2, 57.4, 58.6, 59.8, 61, 62.1 และ 63 °C ตามลำดับ

เลนที่ 12 คือ 100 bp DNA ladder

หมายเหตุ * คือสถานะที่เหมาะสมที่สุดในการนำไปใช้



ภาพที่ 27 การหาค่าประกอบและสภาวะที่เหมาะสมในการทำพีซีอาร์ของไพรเมอร์ C2F&AibR โดยมีจีโนมดีเอ็นเอของ *T. asperellum* BCC12530 เป็นแม่แบบโดยการปรับความเข้มข้น $MgCl_2$ และไพรเมอร์ทั้ง 2 ด้าน

เลนที่ 1 และ 15 คือ 100 bp DNA ladder

เลนที่ 2 มีความเข้มข้น $MgCl_2$, C2F และ AibR เท่ากับ 8, 0.4 และ 0.4 mM ตามลำดับ

เลนที่ 3 มีความเข้มข้น $MgCl_2$, C2F และ AibR เท่ากับ 8, 0.2 และ 0.4 mM ตามลำดับ

เลนที่ 4 มีความเข้มข้น $MgCl_2$, C2F และ AibR เท่ากับ 8, 0.2 และ 0.2 mM ตามลำดับ

เลนที่ 5 มีความเข้มข้น $MgCl_2$, C2F และ AibR เท่ากับ 6, 0.4 และ 0.4 mM ตามลำดับ

เลนที่ 6 มีความเข้มข้น $MgCl_2$, C2F และ AibR เท่ากับ 6, 0.2 และ 0.4 mM ตามลำดับ

เลนที่ 7 มีความเข้มข้น $MgCl_2$, C2F และ AibR เท่ากับ 6, 0.2 และ 0.2 mM ตามลำดับ

เลนที่ 8 มีความเข้มข้น $MgCl_2$, C2F และ AibR เท่ากับ 4, 0.4 และ 0.4 mM ตามลำดับ

เลนที่ 9 มีความเข้มข้น $MgCl_2$, C2F และ AibR เท่ากับ 4, 0.2 และ 0.4 mM ตามลำดับ

เลนที่ 10 มีความเข้มข้น $MgCl_2$, C2F และ AibR เท่ากับ 4, 0.2 และ 0.2 mM ตามลำดับ

เลนที่ 11 มีความเข้มข้น $MgCl_2$, C2F และ AibR เท่ากับ 2, 0.4 และ 0.4 mM ตามลำดับ

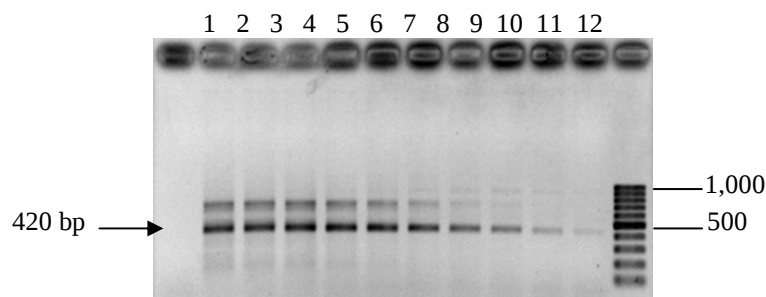
เลนที่ 12 มีความเข้มข้น $MgCl_2$, C2F และ AibR เท่ากับ 2, 0.2 และ 0.4 mM ตามลำดับ

เลนที่ 13 มีความเข้มข้น $MgCl_2$, C2F และ AibR เท่ากับ 2, 0.2 และ 0.2 mM ตามลำดับ

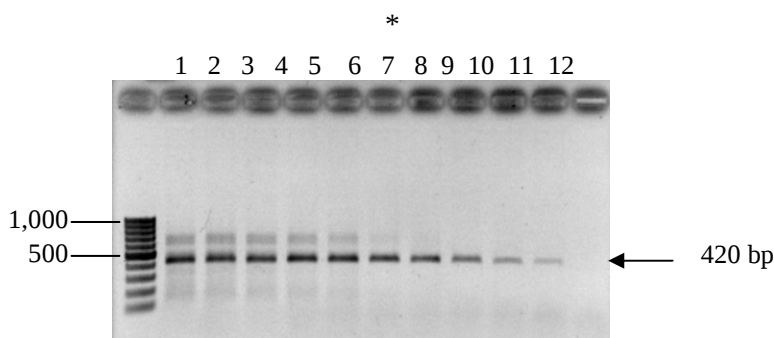
เลนที่ 14 คือ ตัวควบคุมเชิงลบ (น้ำเป็นแม่แบบ)

หมายเหตุ * คือสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการนำไปใช้

ก. 6 mM $MgCl_2$



ข. 8 mM $MgCl_2$



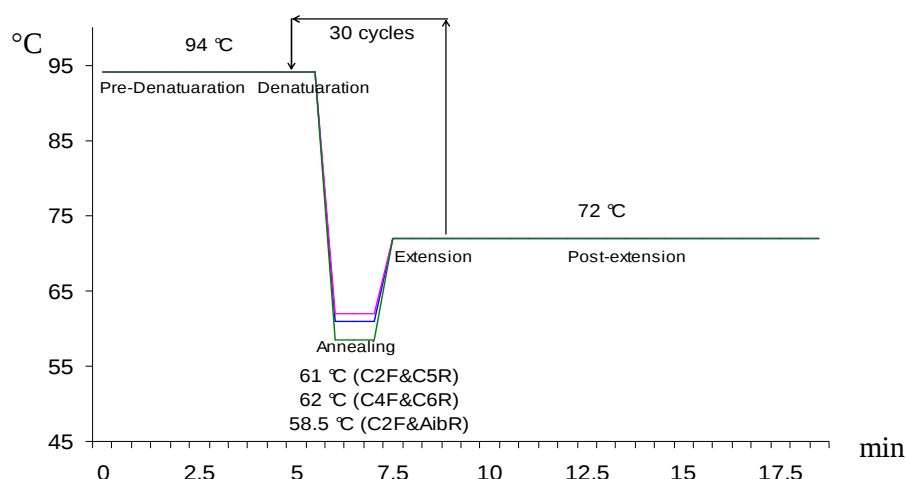
ภาพที่ 28 การทดสอบหาอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมในการทำพีซีอาร์ของไพรเมอร์ C2F&AibR โดยมีจีโนมดีเอ็นเอของ *T. asperellum* BCC12530 เป็นแม่แบบ และ ก. และ ข. เปรียบเทียบความเข้มข้น $MgCl_2$ ที่ 6 และ 8 mM ตามลำดับ เลนที่ ก. 1 และ ข. 12 คือ ตัวควบคุมเชิงลบ (น้ำเป็นแม่แบบ) เลนที่ 2 – 11 คือ อุณหภูมิ annealing เท่ากับ 53, 53.9, 55, 56.2, 57.4, 58.6, 59.8, 61, 62.1 และ 63 °C ตามลำดับ เลนที่ ก. 12 และ ข. 1 คือ 100 bp DNA ladder

หมายเหตุ * คือสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการนำไปใช้

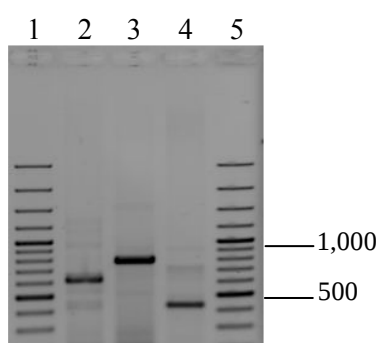
จากการทดลองเพื่อหาค่าที่เหมาะสมและการทดสอบอุณหภูมิ annealing (T_m) ที่เหมาะสมของกระบวนการทำพีซีอาร์และไพรเมอร์ทั้ง 3 คู่ คือ C2F&C5R, C4F&C6R และ C2F&AibR แสดงในตารางที่ 14 และภาพที่ 29 ซึ่งในการคัดกรองกลุ่มเชื้อราที่สนใจและคาดว่าเกี่ยวข้องกับการผลิตเปปไทด์ไฮโดลิกซ์ ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลจะมีเชื้ออ้างอิงคือ *T. asperellum* BCC12530 (ภาพที่ 30) ซึ่งพบว่าเมื่อทำพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ทั้ง 3 คู่ ได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาดตรงกับที่ระบุไว้แล้วเบื้องต้น ดังนั้นจึงบอกได้ว่าเชืวดังกล่าวมียีน *nrps* ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเปปไทด์ไฮโดลิกซ์ ซึ่งอาจเป็น trichotoxins ตามผลการวิเคราะห์สารสกัดด้วยเทคนิคทางเคมี รวมทั้งการตรวจสอบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียด้วย

ตารางที่ 14 องค์ประกอบที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยาพีซีอาร์และไพรเมอร์แต่ละคู่

PCR composition	C2F&C5R (μl)	C4F&C6R (μl)	C2F&AibR (μl)
H ₂ O	16.68	15.68	15.18
10x Mg ²⁺ free buffer (Finnzymes, Finland)	2.5	2.5	2.5
MgCl ₂ (50 mM)	2	4	4
DNA genomic template (~50 ng.μl ⁻¹)	1	1	1
dNTP (10 mM)	0.5	0.5	0.5
Forward primer (10 mM)	1	0.5	0.5
Reverse primer (10 mM)	1	0.5	1
DyNazyme TM II DNA Polymerase (2U.μl ⁻¹) (Finnzymes, Finland)	0.32	0.32	0.32
Total volume	25	25	25



ภาพที่ 29 สภาวะ อุณหภูมิ และเวลาที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยาพีซีอาร์และไพรเมอร์แต่ละคู่



ภาพที่ 30 การทำพีซีอาร์จากจีโนมดีเอ็นเอของ *T. asperellum* BCC12530 (เชื้ออ้างอิง) กับไพรเมอร์ C4F&C6R (เลนที่ 2) C2F&C5R (เลนที่ 3) และ C2F&AibR (เลนที่ 4) ซึ่งมีขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 600, 800 และ 420 bp ตามลำดับโดยองค์ประกอบและสภาวะพีซีอาร์ที่เหมาะสม เลนที่ 1 และ 5 คือ 100 bp DNA ladder

2. การทดสอบคัดกรองเชื้อราที่สังเคราะห์เปปไทด์

การหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อการคัดกรองเชื้อราโดยเทคนิคต่างๆ ได้แก่ เทคนิคทางเคมี คือ การตรวจสอบกรดอะมิโน Aib ด้วย TLC เทคนิคทางชีวโมเลกุล คือ การคัดกรองยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเปปไทด์กับโอดิกส์ด้วยไพรเมอร์ชุดต่างๆ อีกทั้งมีการทดสอบคุณสมบัติทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรค ได้แก่ ตัวแทนเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ และเชื้อยีสต์ ดังนั้น เพื่อทดสอบกระบวนการคัดกรองโดยเทคนิคเหล่านี้ จึงทำการทดลองกับเชื้อราจำนวน 57 สายพันธุ์ โดยเลือกสายพันธุ์ที่มีรายงานว่าเกี่ยวกับการสังเคราะห์เปปไทด์โอดิกส์ เช่น *Trichoderma*, *Peacillomyces*, *Acremonium* และ *Stilbela* (Degenkolb et al., 2003) รวมทั้งเชื้อราจีนัสอื่นๆ พบว่าสามารถจัดเชื้อราทั้งหมดเป็นกลุ่มต่างๆ ได้ 6 กลุ่ม (ตารางที่ 15) ตามผลการทดลองดังนี้

กลุ่มที่ I คิดเป็น 36.84 % เป็นกลุ่มให้ผลบวกในการคัดกรองจากการทำพีซีอาร์ตรวจสอบยีน *nrps* และ/หรือ Aib module gene การตรวจสอบ Aib โดย TLC และ การตรวจสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและ/หรือยีสต์ พบว่าเชื้อที่จัดในกลุ่มนี้เป็นส่วนใหญ่ ได้แก่ สายพันธุ์ *Trichoderma* (anamorphic type) และ *Hypocrea* (telomorphic type) คิดเป็น 76.19 % (16 สายพันธุ์ จาก 21 สายพันธุ์)

กลุ่มที่ II เป็นกลุ่มที่ไม่มีกิจกรรมการยับยั้งต่อเชื้อเป้าหมายที่ใช้ แต่ให้ผลบวกในการทดสอบอื่นๆ ซึ่งกลุ่มนี้เป็นเชื้อสายพันธุ์ *Trichoderma* และ *Hypocrea* เท่านั้น และพบเพียง 5.26 % จากเชื้อทั้งหมด คาดว่าเชื้อมีการผลิตสารที่มี Aib เป็นองค์ประกอบ แต่มีความเข้มข้นต่ำ (จุดบน TLC จาง) ดังนั้นสารดังกล่าวจึงอาจมีประสิทธิภาพไม่เพียงพอในการยับยั้งเชื้อเป้าหมาย เนื่องจากปริมาณการสร้างต่ำหรือโครงสร้างสารที่ผลิตไม่สมบูรณ์ เช่น สารมีความยาวของสายเปปไทด์สั้นหรืออยู่ในโครงสร้างที่ไม่มีผลต่อผนังหรือเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อเป้าหมาย เป็นต้น

กลุ่มที่ III คาดว่าเป็นกลุ่มที่ผลิตสารโดยเอนไซม์ NRPSs แต่อาจไม่ใช่กลุ่มเปปไทด์โอดิกส์ คิดเป็น 7.02 % จากเชื้อราทั้งหมด เนื่องจากไม่พบกรดอะมิโน Aib ในสารสกัด แต่พบยีนและมีกิจกรรมการยับยั้ง จากรายงานที่มีมาก่อนแล้วเอนไซม์ NRPSs สามารถผลิตสารกลุ่มอื่นที่มีกรดอะมิโนและอนุพันธ์ของกรดอะมิโน (amino acid – derivetives) เป็นองค์ประกอบด้วย เช่น penicillin, cyclosporine, AM-toxin และ ennatiins เป็นต้น (Hoffmeister and Keller, 2007) ดังนั้นเชื้อรากลุ่มนี้จึงมีโอกาสมียีน *nrps* และสารสกัดที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้โดยที่ไม่ใช่สารกลุ่มเปปไทด์โอดิกส์

กลุ่มที่ IV เป็นกลุ่มขนาดใหญ่อีกกลุ่มหนึ่ง โดยมี 31.58 % จากเชื้อราทั้งหมด ซึ่งเชื้อกลุ่มนี้ให้ผลการตรวจสอบด้วยพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ C2F&C5R และ/หรือ C4F&C6R แต่ไม่พบกรดอะมิโน Aib และกิจกรรมการยับยั้งเชื้อเป้าหมาย คาดว่าเชื้อกลุ่มนี้มียีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตอยู่ แต่ไม่มีการแสดงออกของยีนเกิดเป็นสถานะ silencing เนื่องจากยีนเหล่านี้มีลักษณะเป็น cluster ทำให้มียีนอื่นๆ นอกจากยีนโครงสร้าง เช่น regulatory gene เพื่อควบคุมการสังเคราะห์สารด้วย (Bok *et al.*, 2006; Bergmann *et al.*, 2007) ดังนั้นการแสดงออกของยีนจะขึ้นอยู่กับปัจจัยภายในและปัจจัยภายนอก เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อหรือสิ่งแวดล้อมในกระบวนการหมัก เป็นต้น แต่ในการคัดกรองด้วยพีซีอาร์เป็นการตรวจสอบที่ยีนโครงสร้างในส่วนโดเมน A และ T เท่านั้น โดยไม่ได้คำนึงถึงยีนควบคุมใด ๆ ดังนั้นสามารถบอกได้ว่าเชื้อรากลุ่มนี้มียีนโครงสร้าง แต่ไม่มีการแสดงออกของยีนหรือแสดงออกในปริมาณที่ต่ำ ซึ่งไม่สามารถตรวจสอบได้จากการคัดกรองโดยการวิเคราะห์กรดอะมิโน Aib หรือกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ในการทดลองนี้

กลุ่มที่ V เป็นเชื้อที่มีกิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* แต่ไม่พบยีนและกรดอะมิโน Aib ซึ่งจากการทดลองนี้พบ 2 สายพันธุ์ เป็นยีสต์ *Stilbella* และคิดเป็น 3.51 % จากเชื้อทั้งหมด คาดว่ากิจกรรมการยับยั้งเกิดจากสารปฏิชีวนะกลุ่มอื่น ที่ไม่เกี่ยวข้องกับเปปไทโดติกส์และยีน *nrps* แต่สามารถสกัดสารออกมาได้โดยวิธีการสกัด III เช่น สารกลุ่ม polyene เป็นต้น

กลุ่มที่ VI คิดเป็น 15.79 % จากเชื้อทั้งหมด ได้แก่เชื้อยีสต์ *Acremonium*, *Stilbella* และ *Talaromyces* (เป็น telomorphic type ของเชื้อ *Penicillium*) ซึ่งพบว่าเป็นกลุ่มเชื้อที่ไม่ได้ให้ผลบวกในการคัดกรองตามเทคนิคต่างๆ ที่กล่าวมาแล้ว ดังนั้นอาจบอกได้ว่าเชื้อกลุ่มนี้ไม่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารปฏิชีวนะรวมทั้งเปปไทโดติกส์และยีน *nrps* ด้วย

จากกระบวนการคัดกรอง พบว่าการทดสอบคุณสมบัติทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อตัวแทนแบคทีเรียแกรมลบ คือ *E. coli* ATCC 25922 (ตารางผนวกที่ ข3) ไม่มีสารสกัดจากตัวอย่างเชื้อราที่ให้ผลบวก (MIC $\geq$ 90) ในการทดสอบนี้ ซึ่งมีการศึกษาสารกลุ่มเปปไทโดติกส์จำนวนมากที่ไม่พบการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ เช่น peptavirin A และ B ไม่แสดงกิจกรรมการยับยั้ง *E. coli* AB 1157 (Yeo *et al.*, 2002) heliferins เป็นลิโปเปปไทด์โบล ซึ่งไม่แสดงกิจกรรมการยับยั้ง *E. coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* (Toniolo *et al.*, 2001) septocylindrins A และ B จากเชื้อรา *Septocylindrium* sp. ไม่แสดงกิจกรรมการยับยั้ง *E. coli* (wild type) แต่สามารถยับยั้ง *E. coli* imp (membrane permeability mutant) ได้ที่ MIC 8 – 32 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (Summers *et al.*, 2007) คาดว่าเนื่องจากเชื้อหุ้มเซลล์แบคทีเรียแกรมลบประกอบด้วย branched-fatty acid ในชั้น phospholipid ปริมาณน้อยกว่าและมี inner membrane ที่ซับซ้อนมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก

(Lohner and Blondelleb, 2005) ซึ่งสารกลุ่มเปปไทด์โอบิดิกส์มีลักษณะโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) จึงชอบแทรกเข้าไปยังชั้นลิพิดในเยื่อหุ้มเซลล์มากกว่า ดังนั้นโมเลกุลเปปไทด์โอบิดิกส์จึงแทรกเข้าไปยังเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบได้ยาก ทำให้เกิดกิจกรรมได้จำเพาะต่อเยื่อหุ้มเซลล์บางชนิดโดยมากเป็นกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก ยีสต์ และรา ซึ่งขึ้นอยู่กับโครงสร้างและองค์ประกอบของสารด้วย

ตารางที่ 15 การคัดกรองและแบ่งกลุ่มเชื้อราเป็น 6 กลุ่มโดยการคัดกรองยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิต การตรวจสอบกรดอะมิโน Aib และการทดสอบยับยั้งเชื้อก่อโรค

No.	Group No.	Code	Microorganism	PCR detection		Aib detection	Antibicrobial assay	
				<i>nrps</i> gene	Aib module	TLC	<i>B. cereus</i> ^a	<i>C. albicans</i> ^b
1		BCC4862	<i>Clonostachys rogersoniana</i>	✓	-	✓	✓	✓
2		BCC488	<i>Hypocrea lixii</i>	✓	✓	✓	✓	✓
3		BCC14814	<i>Hypocrea lixii</i>	✓	✓	✓	✓	✓
4		KU 66	<i>Hypocrea lixii</i>	✓	✓	✓	✓	-
5		KU 101	<i>Hypocrea lixii</i>	✓	✓	✓	✓	✓
6		KU 102	<i>Hypocrea lixii</i>	✓	✓	✓	✓	-
7		KU 107	<i>Hypocrea lixii</i>	✓	✓	✓	✓	-
8		KU 113	<i>Hypocrea lixii</i>	✓	✓	✓	✓	-
9		BCC12193	<i>Mariannaea camptospora</i>	✓	-	✓	✓	✓
10		BCC372	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	✓	-	✓	✓	✓
11	I	BCC496	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	✓	-	✓	-	✓
12		BCC4506	<i>Paecilomyces marquandii</i>	✓	-	✓	✓	-
13		BCC196	<i>Trichoderma asperellum</i>	✓	-	✓	✓	✓
14		BCC12530	<i>Trichoderma asperellum</i>	✓	✓	✓	✓	-
15		BCC436	<i>Trichoderma hazianum</i>	✓	✓	✓	✓	✓
16		BCC17392	<i>Trichoderma koningii</i>	✓	✓	✓	✓	-
17		BCC17716	<i>Trichoderma parceramosum</i>	✓	-	✓	✓	-
18		BCC18053	<i>Trichoderma qhanense</i>	-	✓	✓	✓	-
19		BCC14173	<i>Trichoderma</i> sp.	✓	✓	✓	✓	-
20		BCC20419	<i>Trichoderma</i> sp.	✓	✓	✓	✓	-
21		BCC12542	<i>Trichoderma</i> sp.	✓	✓	✓	✓	-
22		KU 84	<i>Hypocrea lixii</i>	✓	✓	✓	-	-
23	II	BCC11207	<i>Trichoderma atroviride</i>	✓	-	✓	-	-
24		KU 119	<i>Trichoderma aureoviride</i>	✓	✓	✓	-	-
25		BCC5762	<i>Acremonium murorum</i>	✓	✓	-	-	✓
26	III	BCC4293	<i>Bionectria pityrodes</i>	✓	-	-	-	✓
27		BCC4868	<i>Fusarium oxysporum</i>	✓	-	-	✓	✓
28		BCC17978	<i>Paecilomyces farinosus</i>	✓	-	-	✓	-

ตารางที่ 15 (ต่อ)

No.	Group No.	Code	Microorganism	PCR detection		Aib detection	Antibicrobial assay	
				<i>nrps</i> gene	Aib module	TLC	<i>B. cereus</i> ^a	<i>C. albicans</i> ^b
29		BCC4913	<i>Acremonium polychromum</i>	✓	-	-	-	-
30		BCC4870	<i>Acremonium roscolum</i>	✓	-	-	-	-
31		BCC5763	<i>Acremonium strictum</i>	✓	-	-	-	-
32		BCC17957	<i>Paecilomyces carneus</i>	✓	-	-	-	-
33		BCC2107	<i>Paecilomyces cinnamomeus</i>	✓	-	-	-	-
34		BCC17980	<i>Paecilomyces javanicus</i>	✓	-	-	-	-
35		BCC107	<i>Paecilomyces marquandii</i>	✓	-	-	-	-
36		BCC108	<i>Paecilomyces marquandii</i>	✓	-	-	-	-
37	IV	BCC17467	<i>Paecilomyces</i> sp.	✓	-	-	-	-
38		BCC18241	<i>Paecilomyces</i> sp.	✓	✓	-	-	-
39		BCC17535	<i>Paecilomyces variotii</i>	✓	✓	-	-	-
40		BCC17797	<i>Paecilomyces variotii</i>	✓	-	-	-	-
41		BCC19994	<i>Paraconiothyrium estuarinum</i>	✓	-	-	-	-
42		BCC4985	<i>Stilbella fimetaria</i>	✓	-	-	-	-
43		BCC8283	<i>Stilbella</i> sp.	✓	-	-	-	-
44		KU 87	<i>Trichoderma asperellum</i>	✓	✓	-	-	-
45		BCC13402	<i>Trichoderma velutinum</i>	✓	-	-	-	-
46		BCC4744	<i>Verticillium luteo-album</i>	✓	✓	-	-	-
47	V	BCC4653	<i>Stilbella annulata</i>	-	-	-	-	✓
48		BCC7545	<i>Stilbella</i> sp.	-	-	-	-	✓
49		BCC242	<i>Acremonium polychromum</i>	-	-	-	-	-
50		BCC9257	<i>Acremonium</i> sp.	-	-	-	-	-
51		BCC5978	<i>Acremonium</i> sp.	-	-	-	-	-
52		BCC18314	<i>Acremonium</i> sp.	-	-	-	-	-
53	VI	BCC4916	<i>Stilbella annulata</i>	-	-	-	-	-
54		BCC3903	<i>Stilbella emericellopsis</i>	-	-	-	-	-
55		BCC12353	<i>Stilbella holubovae</i>	-	-	-	-	-
56		BCC4742	<i>Stilbella</i> sp.	-	-	-	-	-
57		BCC17183	<i>Talaromyces stipitatus</i>	-	-	-	-	-

หมายเหตุ ^a การทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *B. cereus* ATCC 11778 (ตารางผนวกที่ ข2)

^b การทดสอบการยับยั้งเชื้อยีสต์ *C. albicans* ATCC 90028 (ตารางผนวกที่ ข4)

จากการคัดกรองเชื้อราจำนวน 57 สายพันธุ์ พบว่าเทคนิคพีซีอาร์และไพรเมอร์จำเพาะสามารถตรวจสอบยีน *nrps* โดยไพรเมอร์ C2F&C5R และ/หรือ C4F&C6R ได้ทั้งหมด 78.95 % และในจำนวนนี้มีการพบยีนที่เกี่ยวข้องกับ Aib module โดยไพรเมอร์ C2F&AibR เท่ากับ 46.67 % โดยในกลุ่มนี้จะเป็นยีสต์ *Trichoderma* และ *Hypocrea* 80.95 % ซึ่งคาดว่าเนื่องจากไพรเมอร์ AibR ออกแบบจากยีสต์ *Trichoderma* 2 สายพันธุ์เท่านั้น จึงทำให้มีผลจำเพาะที่ยีสต์ทั้ง 2 ซึ่ง

เป็น anamorphic – telomorphic type ซึ่งกันและกัน นอกจากนี้ในเชื้อทั้งหมด พบเชื้อที่คาดว่าผลิตเปปไทด์ไบโอติกส์ 42.11 % (มีกรดอะมิโน Aib จากการวิเคราะห์ TLC) โดยในกลุ่มนี้ทั้งหมดจะมียีน *nrps* และ/หรือยีนที่เกี่ยวข้องกับ Aib module 100 % จะเห็นได้ว่าการคัดกรองเชื้อที่ผลิตเปปไทด์ไบโอติกส์ด้วยเทคนิคฟิชอาร์และไพรเมอร์ที่จำเพาะเพียงขั้นตอนเดียวจะยังมีประสิทธิภาพไม่เพียงพอ เพราะเชื้อที่พบยีนมีมากกว่าเชื้อที่ผลิตเปปไทด์ไบโอติกส์ได้จริง 1.87 เท่า ดังนั้นการพบยีนที่ศึกษาเกิดขึ้นได้ง่ายกว่าการพบเชื้อที่ผลิตเปปไทด์ไบโอติกส์ได้จริง และอาจบอกได้ว่าเทคนิคฟิชอาร์กับไพรเมอร์มีความจำเพาะน้อยกว่าเทคนิคอื่นที่ใช้ในการศึกษานี้ แต่มีความรวดเร็ว สะดวกและสามารถทำพร้อมกันหลายตัวอย่างได้ดีกว่าเทคนิคอื่นๆ แต่อย่างไรก็ตามเทคนิคฟิชอาร์และไพรเมอร์จำเพาะสามารถใช้เป็นการคัดกรองเบื้องต้นได้ โดยช่วยลดจำนวนตัวอย่างหรือเชื้อทดสอบเพื่อนำไปคัดกรองด้วยเทคนิคอื่น ๆ ในลำดับต่อไป และจากเทคนิคทั้งหมดที่ใช้ในการคัดกรอง ได้แก่ การตรวจสอบยีน การตรวจสอบกรดอะมิโน Aib และการทดสอบกิจกรรมทางชีวภาพ ทำให้สามารถจำแนกกลุ่มเชื้อที่สามารถผลิตเปปไทด์ไบโอติกส์ออกจากเชื้ออื่นๆ คือ กลุ่มที่ I ซึ่งการทดสอบดังกล่าว สามารถคัดกรองเชื้อสายพันธุ์ที่ไม่มีรายงานและคาดว่าจะเป็แหล่งผลิตเปปไทด์ไบโอติกส์ใหม่ ได้แก่ *Clonostachys rogersoniana* BCC4862 และ *Mariannaea camptospora* BCC12193 ซึ่งเป็นเชื้อที่น่าสนใจ มีกิจกรรมทางชีวภาพโดยสามารถยับยั้งเชื้อเป้าหมายได้แก่ *B. cereus* ATCC 11778 และ *C. albicans* ATCC 90028 อีกทั้งสารสกัดของเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์ มีกรดอะมิโน Aib ประกอบอยู่ด้วย ซึ่งอาจพบการผลิตเปปไทด์ไบโอติกส์ชนิดใหม่ที่ควรศึกษาในลำดับต่อไป

3. การศึกษาความจำเพาะของไพรเมอร์ C2F&C5R

การคัดกรองเชื้อราด้วยการทำฟิชอาร์กับไพรเมอร์ C2F&C5R ซึ่งคาดว่าจะสามารถระบุถึงยีน *nrps* โดยเฉพาะส่วนที่เป็นโดเมน A จากจีโนมของเชื้อราได้ พบว่าไพรเมอร์คู่นี้สามารถคัดกรองเชื้อราได้หลายجنัสและคิดเป็น 78.95 % ของเชื้อที่ทดสอบ 57 สายพันธุ์ และการศึกษานี้เพื่อทดสอบไพรเมอร์ดังกล่าวว่าสามารถทำฟิชอาร์แล้วได้ผลิตภัณฑ์บางส่วนของยีน *nrps* จากเชื้อราสายพันธุ์อื่น ๆ นอกจาก *Trichoderma* และ *Hypocrea* หรือไม่ โดยเชื้อที่ทดสอบนอกจาก 2 จินัสดังกล่าวนี้ ได้แก่ *Acremonium*, *Bionectria*, *Clonostachy* และ *Paecilomyces* นำมาทำฟิชอาร์กับไพรเมอร์ C2F&C5R โคลนขึ้นยีนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) จากนั้นแปลรหัสในเฟรมที่ถูกต้องจะได้ลำดับกรดอะมิโนประมาณ 270 เรซิดิวส์ นำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Blastp (protein blast) ที่เว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi> แสดงผลการวิเคราะห์ดังในตารางที่ 16 โดยเรียง 5 ลำดับแรกที่มีความใกล้เคียงกับลำดับกรดอะมิโนของ

โคลนเชื้อตัวอย่าง พบว่าโคลนของเชื้อ *Acremonium murorum* BCC5762 *Bionectria pityrodes* BCC4293 *Clonostachys rogersoniana* BCC4862 และ *Trichoderma asperellum* BCC12530 มีความคล้ายกับเอนไซม์ ACV synthetase, cyclosporine synthetase, peptide synthetase และ non-ribosomal peptide synthetase ซึ่งทั้งหมดเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ NRPS โดยบางโคลนเหมือนกับเอนไซม์ bassianolide synthetase ซึ่งเป็นเอนไซม์ PKS-NRPS hybrid (Jirakkakul *et. al.*, 2008) โดยมากแล้วเอนไซม์ดังกล่าวนี้จะมีโดเมน A และ T ประกอบอยู่ด้วย และบางโคลนมีความเหมือนกับ aerothricin synthetase ที่เกี่ยวข้องกับการผลิต aerothricin ซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะแบบ cyclic peptide (Kohchi *et. al.*, 2005) ด้วย สำหรับเชื้อ *Paecilomyces variotii* BCC17535 มีลำดับกรดอะมิโนต่างจากกลุ่มเอนไซม์ NRPS มากที่สุด โดยมีความคล้ายกับ polyketide synthase (PKS) และ fusarin synthetase ซึ่ง fusarin เป็นสารปฏิชีวนะจากเอนไซม์ PKS-NRPS hybrid เช่นกัน (Gaffoor *et. al.*, 2005) นอกจากนี้มีบางโคลนที่คล้ายกับเอนไซม์ alpha-aminoadipate reductase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในกระบวนการสังเคราะห์กรดอะมิโน L-Lys ในเชื้อรา (Zu *et. al.*, 2006) โดยจะมีหน้าที่ทำปฏิกิริยา 2 ชนิดคือ adenylation และ reduction จะเห็นว่ามี ความใกล้เคียงกับหน้าที่ของโดเมน A ในเอนไซม์ NRPS ดังนั้นลำดับของกรดอะมิโนอาจมีความคล้ายคลึงกันได้

จากการศึกษาสามารถบอกได้ว่าเชื้อราจำพวกต่าง ๆ ที่ทำพีซีอาร์โดยไพรเมอร์ C2F&C5R มีลำดับกรดอะมิโนเป็นกลุ่มยีน *nrps* ซึ่งเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ NRPSs โดยเชื้อเหล่านี้เป็นยีนส์ที่ค่อนข้างพบน้อยว่าเป็นแหล่งผลิตสารกลุ่มเปปไทด์ ได้แก่ *Bionectria* และ *Clonostachy* ส่วนเชื้อ *Trichoderma*, *Acremonium* และ *Paecilomyces* เป็นแหล่งผลิตเปปไทด์ไบโอติกส์อยู่แล้ว และควรมียีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิต ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าไพรเมอร์ C2F&C5R สามารถใช้เป็น universal primers ในการคัดกรองจีโนมดีเอ็นเอของเชื้อราสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ในกลุ่ม NRPSs หรือมียีน *nrps* ได้อย่างชัดเจน

ตารางที่ 16 การศึกษาโคลนจากไพรเมอร์ C2F&C5R โดยโปรแกรม **Blastp version 2.2.18+** วันที่ 8 สิงหาคม 2551

Microorganism	No. of clones	Blastp				
		NCBI code	Enzyme	Microorganism	Score (Bits)	E Value
<i>Acremonium murorum</i> BCC5762	28	gb AAM78457.1	nonribosomal peptide synthetase; NRPS	<i>Hypocrea virens</i>	353	1e-95
		emb CAH05060.1	peptide synthetase	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	330	1e-88
		emb CAH05059.1 	peptide synthetase	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	288	2e-76
		emb CAH05061.1 	peptide synthetase	<i>Trichoderma asperellum</i>	288	3e-76
		emb CAH05065.1 	peptide synthetase	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	283	9e-75
	36	dbj BAG16424.1	hypothetical aerothricin synthetase 1	fungal sp. NR7379	397	4e-109
		gb AAM78457.1 	nonribosomal peptide synthetase; NRPS	<i>Hypocrea virens</i>	388	2e-106
		gb AAR98915.1 	peptide synthetase	<i>Trichoderma asperellum</i>	376	1e-102
		ref XP_001262581.1	nonribosomal peptide synthase	<i>Neosartorya fischeri</i>	372	1e-101
		emb CAH05067.1 	peptide synthetase	<i>Trichoderma asperellum</i>	352	2e-95
	49	emb CAA61605.1 	peptide synthetase	<i>Metarhizium anisopliae</i>	310	1e-82
		ref XP_001804295.1	hypothetical protein SNOG_14098	<i>Phaeosphaeria nodorum</i>	287	5e-76
		ref XP_001273105.1	nonribosomal peptide synthase	<i>Aspergillus clavatus</i>	281	5e-74
		ref XP_001825738.1 	hypothetical protein	<i>Aspergillus oryzae</i>	279	2e-73
		ref XP_001390682.1 	unnamed protein product	<i>Apergillus niger</i>	278	3e-73
	58	dbj BAG16424.1 	hypothetical aerothricin synthetase 1	fungal sp. NR7379	322	2e-86
		ref XP_001262581.1 	nonribosomal peptide synthase	<i>Neosartorya fischeri</i>	312	2e-83
		gb AAM78457.1 	nonribosomal peptide synthetase; NRPS	<i>Hypocrea virens</i>	306	1e-81
		gb AAR98915.1 	peptide synthetase	<i>Trichoderma asperellum</i>	298	4e-79
		gb AAX59996.1	non-ribosomal peptide synthetase	<i>Hypocrea virens</i>	291	3e-77

ตารางที่ 16 (ต่อ)

Microorganism	No. of clones	Blastp				
		NCBI code	Enzyme	Microorganism	Score (Bits)	E Value
<i>Bionectria pityrodes</i> BCC4293	16	gb AAK21902.1 AF335329_1	alpha-aminoadipyl-cysteinyI-valine synthetase	<i>Kallichroma tethys</i>	528	1e-148
		sp P25464 ACVS_CEPAC	ACV synthetase	<i>Acremonium chrysogenum</i>	492	1e-137
		gb AAA03914.1 	ACV synthetase	<i>Emericella nidulans</i>	477	5e-133
		ref XP_660225.1	ACV synthetase	<i>Aspergillus nidulans</i>	476	6e-133
	20	sp P27742 ACVS_EMENI	ACV synthetase	<i>Emericella nidulans</i>	476	6e-133
		emb CAA82227.1 	cyclosporine synthetase	<i>Tolypocladium inflatum</i>	351	4e-95
		gb ABR28366.2 	bassianolide synthetase	<i>Xylaria</i> sp. BCC 1067	351	4e-95
		ref XP_001396439.1	hypothetical protein An13g03040	<i>Aspergillus niger</i>	345	2e-93
	34	gb AAX09985.1	nonribosomal peptide synthetase 3	<i>Cochliobolus heterostrophus</i>	323	7e-87
		gb AAX09983.1	nonribosomal peptide synthetase 1	<i>Cochliobolus heterostrophus</i>	321	3e-86
		ref XP_001912726.1	unnamed protein product	<i>Podospora anserina</i>	265	3e-69
		ref XP_001210411.1	hypothetical protein ATEG_00325	<i>Aspergillus terreus</i>	244	4e-63
	62	ref XP_001258701.1	hybrid NRPS/PKS enzyme	<i>Neosartorya fischeri</i>	233	9e-60
		ref XP_001392496.1	hypothetical protein An08g03790	<i>Aspergillus niger</i>	225	2e-57
		ref XP_001826816.1 	hypothetical protein	<i>Aspergillus oryzae</i>	224	4e-57
		ref XP_001396439.1 	hypothetical protein An13g03040	<i>Aspergillus niger</i>	317	6e-85
		emb CAA82227.1 	cyclosporine synthetase	<i>Tolypocladium inflatum</i>	315	2e-84
		gb ABR28366.2 	bassianolide synthetase	<i>Xylaria</i> sp. BCC 1067	299	2e-79
		gb AAX09985.1 	nonribosomal peptide synthetase 3	<i>Cochliobolus heterostrophus</i>	299	2e-79
		gb AAX63399.1	non-ribosomal peptide synthetase	<i>Hypocrea virens</i>	290	8e-77

ตารางที่ 16 (ต่อ)

Microorganism	No. of clones	Blastp			
		NCBI code	Enzyme	Microorganism	Score (Bits) E Value
<i>Clonostachys rogersoniana</i> BCC4862	3	gb AAM78457.1 	nonribosomal peptide synthetase; NRPS	<i>Hypocrea virens</i>	321 3e-86
		emb CAH05067.1 	peptide synthetase	<i>Trichoderma asperellum</i>	314 4e-84
		gb AAR98915.1 	peptide synthetase	<i>Trichoderma asperellum</i>	312 2e-83
	27	dbj BAG16424.1 	hypothetical aerothricin synthetase 1	fungal sp. NR7379	305 3e-81
		ref XP_001262581.1	nonribosomal peptide synthase, putative	<i>Neosartorya fischeri</i>	292 2e-77
		ref XP_382491.1	hypothetical protein FG02315.1	<i>Gibberella zeae</i>	423 7e-117
		ref XP_001240129.1	hypothetical protein CIMG_09750	<i>Coccidioides immitis</i>	328 4e-88
		gb AAP78735.1	nonribosomal peptide synthase	<i>Alternaria brassicae</i>	323 1e-86
	59	ref XP_001805009.1	hypothetical protein SNOG_14834	<i>Phaeosphaeria nodorum</i>	321 5e-86
		gb AAX09986.1	nonribosomal peptide synthetase 4	<i>Cochliobolus heterostrophus</i>	312 1e-83
		dbj BAG16424.1 	hypothetical aerothricin synthetase 1	fungal sp. NR7379	292 2e-77
		gb AAM78457.1 	nonribosomal peptide synthetase; NRPS	<i>Hypocrea virens</i>	289 1e-76
		gb AAR98915.1 	peptide synthetase	<i>Trichoderma asperellum</i>	289 1e-76
		ref XP_001262581.1 	nonribosomal peptide synthase, putative	<i>Neosartorya fischeri</i>	283 1e-74
		emb CAI38799.1 	peptide synthetase	<i>Hypocrea lixii</i>	278 3e-73
<i>Paecilomyces variotii</i> BCC17535	202	ref XP_001394029.1	hypothetical protein An11g00250	<i>Aspergillus niger</i>	380 9e-104
		ref XP_001398521.1	hypothetical protein An18g00520	<i>Aspergillus niger</i>	349 1e-94
		ref XP_001258701.1 	hybrid NRPS/PKS enzyme, putative	<i>Neosartorya fischeri</i>	197 9e-49
		gb AAR92217.1 	polyketide synthase	<i>Gibberella moniliformis</i>	194 9e-48
		gb AAT28740.1	fusarin synthetase; FUSS	<i>Gibberella fujikuroi</i>	193 9e-48
	205	ref XP_001266925.1	alpha-aminoadipate reductase large subunit, putative	<i>Neosartorya fischeri</i>	511 2e-143
		ref XP_751705.1	alpha-aminoadipate reductase large subunit	<i>Aspergillus fumigatus</i>	511 2e-143
		ref XP_001820194.1 	hypothetical protein	<i>Aspergillus oryzae</i>	511 2e-143
		ref XP_001271987.1	alpha-aminoadipate reductase large subunit	<i>Aspergillus clavatus</i>	509 9e-143
		ref XP_001213135.1	L-aminoadipate-semialdehyde dehydrogenase large subunit	<i>Aspergillus terreus</i>	506 9e-142

ตารางที่ 16 (ต่อ)

Microorganism	No. of clones	Blastp			
		NCBI code	Enzyme	Microorganism	Score (Bits) E Value
<i>Trichoderma asperellum</i> BCC12530	22	gb AAR98915.1 	peptide synthetase	<i>Trichoderma asperellum</i>	540 3e-152
		gb AAM78457.1 	nonribosomal peptide synthetase; NRPS	<i>Hypocrea virens</i>	488 2e-136
		gb AAX59995.1 	non-ribosomal peptide synthetase	<i>Hypocrea virens</i>	428 2e-118
		dbj BAG16424.1 	hypothetical aerothricin synthetase 1	fungal sp. NR7379	420 5e-116
		ref XP_001262581.1 	nonribosomal peptide synthase, putative	<i>Neosartorya fischeri</i>	389 2e-106
	26	gb AAG24639.4 	peptide synthetase	<i>Trichoderma asperellum</i>	527 3e-148
		emb CAI38799.1 	peptide synthetase	<i>Hypocrea lixii</i>	280 7e-74
		dbj BAG16424.1 	hypothetical aerothricin synthetase 1	fungal sp. NR7379	273 8e-72
		gb AAK16599.1 AF351825_1	peptide synthetase 1	<i>Hypocrea virens</i>	273 9e-72
		gb AAM78457.1 	nonribosomal peptide synthetase; NRPS	<i>Hypocrea virens</i>	272 2e-71
	51	gb AAR98915.1 	peptide synthetase	<i>Trichoderma asperellum</i>	527 4e-148
		gb AAM78457.1 	nonribosomal peptide synthetase; NRPS	<i>Hypocrea virens</i>	475 1e-132
		gb AAX59995.1 	non-ribosomal peptide synthetase	<i>Hypocrea virens</i>	421 3e-116
		dbj BAG16424.1 	hypothetical aerothricin synthetase 1	fungal sp. NR7379	410 7e-113
		ref XP_001262581.1 	nonribosomal peptide synthase, putative	<i>Neosartorya fischeri</i>	381 3e-104
	73	gb AAG24639.4 	peptide synthetase	<i>Trichoderma asperellum</i>	525 1e-147
		emb CAI38799.1 	peptide synthetase	<i>Hypocrea lixii</i>	280 8e-74
		gb AAK16599.1 AF351825_1	peptide synthetase 1	<i>Hypocrea virens</i>	273 9e-72
		gb AAX59996.1 	non-ribosomal peptide synthetase	<i>Hypocrea virens</i>	273 2e-71
		gb AAM78457.1 	nonribosomal peptide synthetase; NRPS	<i>Hypocrea virens</i>	272 2e-71

4. การศึกษาลำดับสัญลักษณ์และลำดับกรดอะมิโน

การคัดกรองเชื้อราโดยการทำฟิชเชอร์กับไพรเมอร์ C2F&AibR เพื่อตรวจสอบ Aib module พบว่าเชื้อส่วนใหญ่ที่มีขนาดผลิตภัณฑ์ฟิชเชอร์ที่ต้องการคือจีโนม *Trichoderma* และ *Hypocrea* อาจมีสาเหตุมาจากไพรเมอร์ AibR ออกแบบจากเชื้อ *Trichoderma* 2 สายพันธุ์ (ภาพผนวกที่ ก2) เท่านั้น เป็นผลให้ไพรเมอร์ไม่จำเพาะกับเชื้ออื่น ๆ และจากการศึกษาในหัวข้อนี้เพื่อตรวจสอบว่าผลิตภัณฑ์ฟิชเชอร์จากไพรเมอร์ C2F&AibR ที่ได้มีความเกี่ยวข้องกับ Aib module โดยคัดเลือกตัวอย่างเชื้อรา ได้แก่ *T. asperellum* BCC12530 และ *H. lixii* BCC488 มาหาลำดับกรดอะมิโนและลำดับสัญลักษณ์ (ตารางที่ 17) ลำดับสัญลักษณ์จะอยู่บริเวณอนุรักษ A4 – A5 บนโดเมน A โดยเริ่มนับที่เรซิดิวส์ D ซึ่งเป็นเรซิดิวส์ที่ 235 ของโดเมน A ในโมดูล phenylalanine ของเอนไซม์ GrsA ซึ่งนับเป็นกรดอะมิโนสัญลักษณ์ตำแหน่งที่ 1 (Stachelhaus and Marahiel, 1995) ลำดับสัญลักษณ์ในการศึกษานี้มีทั้งหมด 9 เรซิดิวส์ในตำแหน่งดังนี้ 235, 236, 239, 278, 299, 301, 322, 330 และ 331

การศึกษาโคลนของตัวอย่างเชื้อรา *T. asperellum* BCC12530 และ *H. lixii* BCC488 และลำดับสัญลักษณ์เปรียบเทียบกับยีน *tex1* ของเชื้อ *T. virens* (Wiest et al., 2002) พบว่า *T. asperellum* BCC12530 จำนวนทั้งหมด 4 โคลนมีลำดับสัญลักษณ์เหมือน Aib module ส่วน *H. lixii* BCC488 มี 2 โคลนเท่านั้น โดยโคลนที่ได้ลำดับสัญลักษณ์ของ Aib module จะมี % identity กับยีน *tex1* มากกว่า 70 % ส่วนโคลนอื่น ๆ ของ *H. lixii* BCC488 พบว่าโคลนที่ 4 มีลำดับสัญลักษณ์ตรงกับโมดูลของกรดอะมิโน Leu หรือ Val ในยีน *tex1* และโคลนที่ 27 นั้นไม่ตรงกลับลำดับสัญลักษณ์ของโมดูลใด ๆ ในยีน *tex1* รวมทั้งยีนอื่น ๆ ที่มีรายงานมาก่อน

ดังนั้นจากการวิเคราะห์โคลนทั้งหมด 8 โคลนจากเชื้อ 2 สายพันธุ์ โดยทำฟิชเชอร์กับไพรเมอร์ C2F&AibR พบว่าเป็น Aib module จำนวน 6 โคลนหรือคิดเป็น 75.0 % จะเห็นได้ว่าไพรเมอร์ C2F&AibR สามารถคัดกรองเชื้อราในจีโนม *Trichoderma* และ *Hypocrea* โดยการระบุว่ามี Aib module ที่เป็นส่วนของเอนไซม์ที่สำคัญต่อการผลิตเปปไทด์ไบโอติกส์ได้

ตารางที่ 17 ลำดับสัญลักษณ์ของเชื้อ *T. asperellum* BCC12530 และ *H. lixii* BCC488 จากลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการทำพีซีอาร์กับไพรเมอร์ C2F&AibR

Strains	Clone No.	Module; M (% Identity)	Amino acid specificity of module	Signature sequence position ^a								
				235	236	239	278	299	301	322	330	331
<i>T. asperellum</i>	BCC12530_1	M1 (90%), M12 (90%), M15 (80%)	Aib	D	L	G	Y	L	A	G	V	F
	BCC12530_8	M15 (70%), M16 (70%)	Aib	D	L	G	F	L	A	G	V	F
	BCC12530_27	M1 (90%), M12 (90%), M15 (80%)	Aib	D	L	G	Y	L	A	G	V	F
	BCC12530_36	M1 (70%), M12 (70%)	Aib	D	V	G	Y	L	V	G	V	F
<i>H. lixii</i>	BCC488_4	M14 (70%)	Leu/Val	D	A	A	L	I	V	G	V	F
	BCC488_8	M1 (90%), M12 (90%), M15 (80%)	Aib	D	L	G	Y	L	A	G	V	F
	BCC488_27	-	unknown	D	M	G	W	I	A	G	V	F
	BCC488_39	M15 (70%), M16 (70%)	Aib	D	L	G	F	L	A	G	X	D
<i>T. virens</i> ^b	tex1_module 1	Aib Modules of <i>tex1</i> gene	Aib	D	L	G	Y	L	A	G	V	F
	tex1_module 5		Aib/Ala	D	L	G	W	L	C	G	V	F
	tex1_module 9		Aib	D	L	G	Y	L	A	G	C	F
	tex1_module 12		Aib	D	L	G	Y	L	A	G	V	F
	tex1_module 15		Aib	D	L	G	F	L	A	G	V	F
	tex1_module 16		Aib	D	L	G	F	L	A	G	L	F
	tex1_module 2	Other Modules of <i>tex1</i> gene	Gln	D	I	G	M	V	V	G	V	I
	tex1_module 3		Ala	D	V	G	F	V	A	G	V	L
	tex1_module 4		Val	D	M	G	F	L	G	G	V	C
	tex1_module 6		Gln	D	G	G	M	V	G	G	N	Y
	tex1_module 7		Iva/Aib	D	C	G	W	V	V	G	V	V
	tex1_module 8		Ala	D	I	F	V	V	A	G	V	I
	tex1_module 10		Ser	D	V	G	Y	L	A	A	V	Y
	tex1_module 11		Leu	D	F	L	Y	F	G	G	V	V
	tex1_module 13		Pro	D	V	L	F	C	G	L	I	C
	tex1_module 14		Leu/Val	D	A	A	L	I	G	A	V	F
	tex1_module 17		Gln	D	G	G	M	V	G	G	N	Y
	tex1_module 18		Val-OH	D	A	I	I	I	V	G	V	T

หมายเหตุ ^a ใช้โปรแกรมจาก <http://www-ab.informatik.uni-tuebingen.de/software/NRPSpredictor> (Rausch, *et. al.*, 2005)

^b จากการศึกษาของ Wiest, *et. al.* (2002)

สรุป

การศึกษานี้มีเชื้อควบคุมการทดลองคือ *T. asperellum* BCC12530 พบว่ามียีน *nrps* และยีนที่เกี่ยวข้องกับ Aib module เมื่อทดสอบด้วยพีซีอาร์และไพรเมอร์ทั้ง 3 คู่ ได้แก่ C2F&C5R C4F&C6R และ C2F&AibR สารสกัดมีกรดอะมิโน Aib เป็นองค์ประกอบ ตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC และ HPLC มีกิจกรรมการยับยั้ง *B. cereus* ATCC 11778 การวิเคราะห์มวลโมเลกุลของสารสกัดด้วย MALDI – TOF และ LC – ESI/MS พบว่ามีค่า m/z เป็นแบบ doubly charge $[M+2H]^{2+}$ และคำนวณมวล mono – isotopic mass ได้เท่ากับ 1690.11 1704.13 1705.11 และ 1719.14 Da ซึ่งตรงกับมวลของ trichotoxins ที่มีรายงานมาก่อน

การทดสอบคัดกรองเชื้อราที่สังเคราะห์เปปไทด์ไบโอติกส์โดยเทคนิคทางชีวโมเลกุล คือ การทำ พีซีอาร์กับไพรเมอร์จำเพาะจำนวน 3 คู่ ดังกล่าวมาแล้ว เทียบกับเทคนิคทางเคมี คือ การวิเคราะห์กรดอะมิโน Aib ด้วย TLC และการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งเชื้อเป้าหมาย ได้แก่ *B. cereus* ATCC 11778 *E. coli* ATCC 25922 และ *Candida albicans* ATCC 90028 ด้วยเทคนิค microdilution method ในระดับ 96 well plate พบว่าสามารถแยกเชื้อราทดสอบจำนวน 57 สายพันธุ์เป็นกลุ่มต่าง ๆ ได้ 6 กลุ่ม โดยเฉพาะเชื้อราที่คาดว่าจะมีการสังเคราะห์เปปไทด์ไบโอติกส์ และจากการทดสอบพบเชื้อที่น่าสนใจควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในลำดับต่อไป ได้แก่ *Clonostachys rogersoniana* BCC4862 และ *Mariannaea camptospora* BCC12193 แต่อย่างไรก็ตามการใช้เทคนิคพีซีอาร์กับไพรเมอร์เพื่อคัดกรองเชื้อที่ผลิตเปปไทด์ไบโอติกส์ อาจใช้ได้ในระดับเบื้องต้นเพื่อลดปริมาณเชื้อที่ใช้คัดกรองในเทคนิคอื่นๆ ลำดับต่อไปเท่านั้น เนื่องจากเชื้อที่ตรวจพบยีนมีมากกว่าเชื้อที่ผลิตเปปไทด์ไบโอติกส์ได้จริง 1.87 เท่า ดังนั้นการพบยีนที่ศึกษาจึงมีโอกาสเกิดขึ้นได้มากกว่าการพบเชื้อที่ผลิตเปปไทด์ไบโอติกส์ได้จริง และอาจบอกได้ว่าเทคนิคพีซีอาร์กับไพรเมอร์มีความจำเพาะน้อยกว่าเทคนิคอื่นที่ใช้ในการศึกษานี้ แต่มีความรวดเร็ว สะดวกและสามารถทำพร้อมกันหลายตัวอย่างได้ดีกว่าเทคนิคอื่นๆ

การศึกษาลำดับกรดอะมิโนและลำดับสัญลักษณ์จากผลิตภัณฑ์พีซีอาร์กับไพรเมอร์จำเพาะ C2F&AibR พบว่าสามารถคัดเลือกเชื้อที่มียีน Aib module ได้เฉพาะเชื้อราจิโนส *Trichoderma* และ *Hypocrea* ซึ่งระบุลำดับสัญลักษณ์ที่เป็น Aib module ได้ 62.5 % และไพรเมอร์จำเพาะ C2F&C5R เพื่อระบุยีน *nrps* พบว่าสามารถนำมาใช้คัดกรองเชื้อราได้ในสายพันธุ์ที่ใช้ใน

การศึกษานี้และอาจจะใช้เป็น universal primer ได้ โดยเชื้อหลายชนิดที่พบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เมื่อทดสอบแล้วมีความใกล้เคียงหรือเป็นยีนในกลุ่ม *nrps* ได้อย่างชัดเจน

จากการศึกษากระบวนการคัดกรองเชื้อราด้วยพีซีอาร์และไพรเมอร์จำเพาะ ควบคู่กับการวิเคราะห์กรดอะมิโน Aib ด้วย TLC และการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งทางชีวภาพเหล่านี้ คาดว่ามีประสิทธิภาพเพียงพอในการคัดกรองและค้นหาเชื้อราสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่มีความสามารถในการผลิตเปปไทด์ไบโอดีส์ได้ และอาจเป็นโอกาสในการค้นพบเปปไทด์หรือเปปไทด์ไบโอดีส์รวมทั้งแหล่งเชื้อราชนิดใหม่ๆ ในขอบเขตที่กว้างขึ้นในลำดับต่อไป

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- Augeven-Bour, I., S. Rebuffat, C. Auvin, C. Goulard, Y. Prigent and B. Bodo. 1997. Harzianin HB I, an 11-residue peptaibol from *Trichoderma harzianum*: Isolation, sequence, solution synthesis and membrane activity. **J. Chem. Soc.** (10): 1587-1594.
- Auvin-Guette, C., S. Rebuffat, Y. Prigent and B. Bodo. 1992. Trichogin A IV, an 11-residue lipopeptaibol from *Trichoderma longibrachiatum*. **J. Am. Chem. Soc.** 114: 2170-2174.
- Bailey, A. M., M. J. Kershaw, B. A. Hunt, I. C. Paterson and A. Keith. 1996. Cloning and sequence analysis of an intron-containing domain from a peptide synthetase-encoding gene of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Gene.** 173 (2): 195-197.
- Bergmann, S., J. Schumann, K. Scherlach, C. Lange, A. A. Brakhage and C. Hertweck. 2007. Genomics-driven discovery of PKS-NRPS hybrid metabolites from *Aspergillus nidulans*. **Nature Chem. Biol.** 4: 213-217.
- Bok, J. W., D. Noordermeer, S. P. Kale and N. P. Keller. 2006. Secondary metabolic gene cluster silencing in *Aspergillus nidulans*. **Molec. Microbiol.** 61: 1636-1645.
- Brückner, H., G. Jung and M. Przybylski. 1983. Chromatographic and mass spectrometric characterization of the structures of the polypeptide antibiotics samarosporin and stilbellin and identity with emerimicin. **Chromatographia.** 17 (12): 679-685.
- Chikanishi, T., K. Hasumi, T. Harada, N. Kawasaki and A. Endo. 1997. Clonostachin, a novel peptaibol that inhibits platelet aggregation. **J. Antibiot. (Tokyo).** 50 (2): 105-110.

- Chitta, R. K. and M. L. Gross, 2004. Electrospray ionization-mass spectrometry and tandem mass spectrometry reveal self-association and metal-ion binding of hydrophobic peptides: A study of the gramicidin dimer. **Biophys. J.** 86: 473-479.
- Chugh, J. K. and B. A. Wallace. 2001. Peptaibols: models for ion channels. **Biochem. Soc. Trans.** 29 (Pt 4): 565-70.
- Chutrakul, C. and J. F. Peberdy. 2005. Isolation and characterisation of a partial peptide synthetase gene from *Trichoderma asperellum*. **FEMS Microbiol. Lett.** 252: 257-65.
- Degenkolb, T., A. Berg, W. Gams, B. Schlegel and U. Grafe. 2003. The occurrence of peptaibols and structurally related peptaibiotics in fungi and their mass spectrometric identification via diagnostic fragment ions. **J. Pept. Sci.** 9 (11-12): 666-678.
- Degenkolb, T., T. Grafenhan, A. Berg, H. I. Nirenberg, W. Gams and H. Brückner. 2006. Peptaibiotics: screening for polypeptide antibiotics (peptaibiotics) from plant-protective *Trichoderma* Species. **Chem. Biodiv.** 3: 593-610.
- Degenkolb, T., J. Kirschbaum and H. Brückner. 2007. New Sequences, Constituents, and Producers of Peptaibiotics: An Updated Review. **Chem. Biodiv.** 4: 1051-1067.
- Duclohier, H. 2004. Helical kink and channel behaviour: a comparative study with the peptaibols alamethicin, trichotoxin and antiamoebin. **Eur. Biophys. J.** 33: 169-174.
- Duclohier, H. 2006. Bilayer lipid composition modulates the activity of dermaseptins, polycationic antimicrobial peptides. **Eur. Biophys. J.** 35: 401-409.

- Duclohier, H., G. M. Alder, C. L. Bashford, H. Brückner, J. K. Chugh and B. A. Wallace. 2004. Conductance studies on trichotoxin_A50E and implications for channel structure. **Biophys. J.** 87 (3): 1705-1710.
- Eisendle, M., H. Oberegger, I. Zadra and H. Haas. 2003. The siderophore system is essential for viability of *Aspergillus nidulans*: functional analysis of two genes encoding L-ornithine N 5-monooxygenase (sidA) and a non-ribosomal peptide synthetase (sidC). **Molec. Microbiol.** 49 (2): 359-375.
- Epand, R. F., R. M. Epand, V. Monaco, S. Stoia, F. Formaggio, M. Crisma and C. Toniolo. 1999. The antimicrobial peptide trichogin and its interaction with phospholipid membranes. **Eur. J. Biochem.** 266: 1021-1028.
- Finking, R. and M. A. Marahiel. 2004. Biosynthesis of nonribosomal peptides. **Annu. Rev. Microbiol.** 58: 453–88.
- Glenn, A. E., C. W. Bacon, R. Price and R. T. Hanlin. 1996. Molecular phylogeny of acremonium and its taxonomic implications. **Mycologia.** 88 (3): 369-383.
- He, H., J. E. Janso, H. Y. Yang, V. S. Bernan, S. L. Lin and K. Yu. 2006. Culicinin D, an antitumor peptaibol produced by the fungus *Culicinomyces clavisporus*, strain LL-12I252. **J. Nat. Prod.** 69 (5): 736-41.
- Heathcote, J. G. 1968. The analysis by TLC of the amino acids of protein hydrolysates and of biological fluids. **Plant Foods Hum. Nutr.** 16: 85-91.
- Hoffmeister, D. and N. P. Keller. 2007. Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. **Nat. Prod. Rep.** 24: 393-416.
- Ishida, H., Y. Hata, A. Kawato, Y. Abe, M. Sano and M. Machida. 2002. Molecular characterization of the gene (sid2) encoding non-ribosomal peptide synthetase and the clustered genes involved in the ferrichrome biosynthesis of

- Aspergillus oryzae*. **EMBL/GenBank/DDBJ databases**. Accession no. BAC78651.
- Jaworski, A. and H. Brückner. 1999. Detection of new sequences of peptaibol antibiotics trichotoxins A-40 by on-line liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. **J. Chromatogr. A.** 862 (2): 179-89.
- Jaworski, A. and H. Brückner. 2000. New sequences and new fungal producers of peptaibol antibiotics antiamoebins. **J. Pep. Sci.** 6 (4): 149-167.
- Jirakkakul, J., J. Punya, S. Pongpattanakitsote, P. Paungmoung, N. Vorapreeda, A. Tachaleat, C. Klomnara, M. Tanticharoen and S. Cheevadhanarak. 2008. Identification of the nonribosomal peptide synthetase gene responsible for bassianolide synthesis in wood-decaying fungus *Xylaria* sp. BCC1067. **Microbiology.** 154: 995 - 1006.
- Juliana, F. d. S. D. and E. R. Filho. 2007. Peptaibols of *Trichoderma*. **Nat. Prod. Rep.** 24: 1128–1141.
- Kibbe, W. A. 2007. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. **Nucleic Acids Res.** 35: 43-46.
- Kohchi, M., K. Masubuchi, T. Murata, T. Okada and N. Shimma. 2005. **Aerothricin derivatives**. U.S. Patent 6849709.
- Krasnoff, S. B., R. F. Reategui, M. M. Wagenaar, J. B. Gloer and D. M. Gibson. 2005. Cicadapeptins I and II: new Aib-containing peptide from the entomopathogenic fungus *Cordyceps heteropoda*. **J. Nat. Prod.** 68: 50-55.
- Krause, C., J. Kirschbaum and H. Brückner. 2006. Peptaibiomics: an advanced, rapid and selective analysis of peptaibiotics/peptaibols by SPE/LC-ES-MS. **Amino Acids.** 30 (4): 435-43.

- Krause, C., J. Kirschbaum and H. Brückner. 2007. Peptaibiotics: microheterogeneity, dynamics, and sequences of trichobrachins, peptaibiotics from *Trichoderma parceramosum* Bissett (*T. longibrachiatum* Rifai). **Chem. Biodiv.** 4 (6): 1083-1102.
- Leclerc, G., S. Rebuffat, C. Goulard and B. Bodo. 1998. Directed biosynthesis of peptaibol antibiotics in two *Trichoderma* strains I. fermentation and isolation. **J. Antibiot.** 170-177.
- Lee, S. J., W. H. Yeo, B. S. Yun and I. D. Yoo. 1999a. Isolation and sequence analysis of new peptaibol, boletusin, from *Boletus* spp. **J. Pept. Sci.** 5 (8): 374-378.
- Lee, S. J., B. S. Yun, D. H. Cho and I. D. Yoo. 1999b. Tylopeptins A and B, new antibiotic peptides from *Tylophilus neofelleus*. **J. Antibiotics.** 52 (11): 998-1006.
- Lohner, K. and S. E. Blondelle. 2005. Molecular mechanisms of membrane perturbation by antimicrobial peptides and the use of biophysical studies in the design of novel peptide antibiotics. **Comb. Chem. High Throughput Screen.** 8: 241-256.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193: 265-275.
- Mahon, C. R. and G. Manuselis. 1995. Concepts in antimicrobial therapy. B. Procedures in antimicrobial susceptibility testing. pp. 58-89. In C. R. Mahon and G. Manuselis, eds. **Textbook of diagnostic microbiology**. W.B. Saunders Company, Philadelphia.
- Marahiel, M. A., T. Stachelhaus and H. D. Mootz. 1997. Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. **Chem. Rev.** 97: 2651-2673.

- Mootz, H. D. and M. A. Marahiel. 1997. Biosynthetic systems for nonribosomal peptide antibiotic assembly. **Curr .Opin. Chem. Bio.** 1: 543-551.
- Neuhof, T., R. Dieckmann, I. S. Druzhinina, C. P. Kubicek and H. von Dohren. 2007. Intact-cell MALDI-TOF mass spectrometry analysis of peptaibol formation by the genus *Trichoderma*/Hypocrea: can molecular phylogeny of species predict peptaibol structures? **Microbiol.** 153 (Pt 10): 3417-3437.
- Oh, S.-U., S.-J. Lee, J.-H. Kim and I.-D. Yoo. 2000. Structural elucidation of new antibiotic peptides, atroviridins A, B and C from *Trichoderma atroviride*. **Tetrahedron Lett.** 41 (1): 61-64.
- Oren, Z. and Y. Shai. 1998. Mode of action of linear amphipathic α -helical antimicrobial peptides. **Biopolymers.** 47: 451-463.
- Peery, R. B., S. J. Thornewell, M. B. Tobin and P. L. Skatrud. 1997. Discovery of an MDR-like gene adjacent to a peptide synthetase in *Aureobasidium pullulans*. **EMBL/GenBank/DDBJ databases.** Accession no. AAD00581.
- Pocsfalvi, G., A. Ritieni, P. Ferranti, G. Randazzo, K. Vekey and A. Malorni. 1997. Microheterogeneity characterization of a paracelsin mixture from *Trichoderma reesei* using high-energy collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. **Rapid Commun. Mass Spectrom.** 11 (8): 922-930.
- Poirier, L., J.-C. Amiard, F. Mondeguer, F. Quiniou, N. Ruiz, Y. F. Pouchus and M. Montagu. 2007. Determination of peptaibol trace amounts in marine sediments by liquid chromatography/electrospray ionization-ion trap-mass spectrometry. **J. Chromatogr. A.** 1160 (1-2): 106-113.
- Price, P. 1991. Standard definitions of terms relating to mass spectrometry. **J. Am. Soc. Mass Spectrom.** 2: 336-348.

- Raap, J., K. Erkelens, A. Ogrel, D., A., Skladnev and H. Brückner 2005. Fungal biosynthesis of non-ribosomal peptide antibiotics and α , α -dialkylated amino acid constituents. **J. Pept. Sci.** 11(6): 331-338.
- Raeder, U. and P. Broda. 1985. Preparation of DNA from filamentous fungi. **Lett. Appl. Microbiol.** 1: 17-20.
- Rausch, C., T. Weber, O. Kohlbacher, W. Wohlleben and D. H. Huson. 2005. Specificity prediction of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases (NRPS) using Transductive Support Vector Machines (TSVM). **Nucleic Acids Res.** 33 (18): 5799-5808.
- Richardson, H., A. H. Emslie-Smith and B. W. Senuor. 1968. Agar diffusion method for the assay of colicins. **App. Microb.** 10: 1468-1474.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. **Molecular cloning: A laboratory manual**. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Schwarzer, D., R. Finking and M. A. Marahiel. 2003. Nonribosomal peptides: from genes to products. **Nat. Prod. Rep.** 20: 275–287.
- Singleton, P. 2004. **Bacteria in biology, biotechnology and medicine** (6th ed.). John Wiley & Sons Inc., New York.
- Song, X.-Y., Q.-T. Shen, S.-T. Xie, X.-L. Chen, C.-Y. Sun and Y.-Z. Zhang. 2006. Broad-spectrum antimicrobial activity and high stability of Trichokonins from *Trichoderma koningii* SMF2 against plant pathogens. **FEMS Microbiol Lett.** 260: 119-125.
- Stachelhaus, T. and M. A. Marahiel. 1995. Modular structure of peptide synthetases revealed by dissection of the multifunctional enzyme GrsA. **J. Biol. Chem.** 270: 6163-6169.

- Stachelhaus, T., H. D. Mootz and M. A. Marahiel. 1999. The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. **Chem. Bio.** 6: 493-505.
- Stone, K. L. and K. R. Williams. 1993. Enzymatic digestion of protein and HPLC peptide isolation. In P. Matsudaira, ed. **A practical guide to protein and peptide purification for microsequencing**. Academic Press, San Diego.
- Stoppacher, N., B. Reithner, M. Omann, S. Zeilinger, R. Krska and R. Schuhmacher. 2007. Profiling of trichorzianines in culture samples of *Trichoderma atroviride* by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Commun. Mass Spectrom.** 21 (24): 3963-3970.
- Summers, M. Y., F. Kong, X. Feng, M. M. Siegel, J. E. Janso, E. I. Graziani and G. T. Carter. 2007. Septocylindrins A and B: peptaibols produced by the terrestrial fungus *Septocylindrium* sp. LL-Z1518. **J. Nat. Prod.** 70: 391-396.
- Suwan, S., M. Isobe, S. Kanokmedhakul, N. Lourit, K. Kanokmedhakul, K. Soyong and K. Koga. 2000. Elucidation of high micro-heterogeneity of an acidic-neutral trichotoxin mixture from *Trichoderma harzianum* by electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **J. Mass Spectrom.** 35 (12): 1438-1451.
- Toniolo, C., M. Crisma, F. Formaggio, C. Peggion, R. F. Epand and R. M. Epand. 2001. Lipopeptaibols, a novel family of membrane active, antimicrobial peptides. **Cell. Mol. Life Sci.** 58: 1179 - 1188.
- Vertesy, L., M. Kurz, M. Schiell and J. Hofmann. 2003. **Cephaibols: novel antiparasitics from *Acremonium tubakii*, process for their production, and use thereof**. U.S. Patent 7067112.

- Vives, E. and B. Lebleu. 2003. One-pot labeling and purification of peptide and proteins with fluorescein maleimide. **Tetrahedron Lett.** 44: 5389-5391.
- Vizcaino, J. A., R. E. Cardoza, L. Dubost, B. Bodo, S. Gutierrez and E. Monte. 2006. Detection of peptaibols and partial cloning of a putative peptaibol synthetase gene from *T. harzianum* CECT 2413. **Folia Microbiol. (Praha)**. 51 (2): 114-120.
- Vizcaino, J. A., L. Sanz, R. E. Cardoza, E. Monte and S. Gutierrez. 2005. Detection of putative peptide synthetase genes in *Trichoderma* species: Application of this method to the cloning of a gene from *T. harzianum* CECT 2413. **FEMS Microbiol. Lett.** 244 (1): 139-148.
- von Dohren, H. 2004. Biochemistry and general genetics of nonribosomal peptide synthetases in fungi. **Adv. Biochem. Engin./Biotechnol.** 88: 217–264.
- Wei, X., F. Yang and D. C. Straney. 2005. Multiple non-ribosomal peptide synthetase genes determine peptaibol synthesis in *Trichoderma virens*. **Can. J. Microbiol.** 51 (5): 423-9.
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee and J. W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. Sninsky and T. J. White, eds. **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. Academic Press, New York.
- Whitmore, L. and B. A. Wallace. 2004. The peptaibol database: a database for sequences and structures of naturally occurring peptaibols. **Nucleic Acids Res.** 32 (Database issue): D593-4.
- Wiest, A., D. Grzegorski, B.-W. Xu, C. Goulard, S. Rebuffat, D. J. Ebbole, B. Bodo and C. Kenerley. 2002. Identification of peptaibols from *Trichoderma virens* and cloning of a peptaibol synthetase. **J. Bio. Chem.** 277 (23): 20862-20868.

- Wilhite, S. E., R. D. Lumsden and D. C. Straney. 2001. Peptide synthetase gene in *Trichoderma virens*. **App. Environ. Microbiol.**: 5055-5062.
- Xu, H., B. Andi, J. Qian, A. H. West and P. F. Cook. 2006. The α -aminoadipate pathway for lysine biosynthesis in fungi. **Cell Biochem. Biophys.** 46: 1085-9195.
- Yeo, W.-H., B.-S. Yun, Y.-S. Kim, S.-J. Lee, I.-D. Yoo, K.-S. Kim, E.-K. Park, J.-C. Lee and Y. H. Kim. 2002. Antiviral, antimicrobial, and cytotoxic properties of peptavirins A and B produced by *Apiocrea* sp. 14T. **Plant Pathol. J.** 18: 18-22.
- Yun, B.-S., I.-D. Yoo, Y. H. Kim, Y.-S. Kim, S.-J. Lee, K.-S. Kim and W.-H. Yeo. 2000. Peptaivirins A and B, two new antiviral peptaibols against TMV infection. **Tetrahedron Lett.** 41 (9): 1429-1431.
- Yvon, M., C. Chabanet and J. P. Plissier. 1989. Solubility of peptides in trichloroacetic acid (TCA) solutions. Hypothesis on the precipitation mechanism. **Int. J. Peptide Protein Res.** 34 (3): 166-176.
- Zelakowska-Komon, M., T. Neuhoof, R. Dieckmann, H. von Dohren, A. Herrera-Estrella, C. P. Kubicek and I. S. Druzhinina. 2007. The formation of atroviridin by *Hypocrea atroviridis* is conidiation-associated, and positively regulated by blue light and the G-protein GNA3. **Eukaryot Cell.** 6: 2332-2342.
- Zhang, N., L. A. Castlebury, A. N. Miller, S. M. Huhndorf, C. L. Schoch, K. A. Seifert, A. Y. Rossman, J. D. Rogers, J. Kohlmeyer and G.-H. Sung. 2006. An overview of the systematics of the Sordariomycetes based on a four-gene phylogeny. **Mycologia.** 98 (6): 1076–1087.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
เทคนิคทางชีวสารสนเทศและชีวโมเลกุล

1. ข้อมูลการศึกษาขึ้น ITS1, 5.8s และ ITS2 ด้วยไพรเมอร์ ITS1&ITS4

ตารางผนวกที่ ก1 การระบุสายพันธุ์เชื้อโดยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของยีน ITS1, 5.8s และ ITS2 ด้วยไพรเมอร์ ITS1&ITS4

Code	microorganism	Identities
BCC11207	<i>Trichoderma atroviride</i>	548/550 (99%)
BCC12193	<i>Mariannaea camptospora</i>	508/513 (99%)
BCC12530	<i>Trichoderma asperellum</i>	504/504 (100%)
BCC13402	<i>Trichoderma velutinum</i>	573/576 (99%)
BCC14814	<i>Hypocrea lixii</i>	570/574 (99%)
BCC17183	<i>Talaromyces stipitatus</i>	525/530 (99%)
BCC17535	<i>Paecilomyces variotii</i>	518/522 (99%)
BCC17716	<i>Trichoderma parceramosum</i>	574/579 (99%)
BCC18053	<i>Trichoderma ghanense</i>	579/582 (99%)
BCC18241	<i>Cephalotheca sulfurea</i>	505/523 (96%)
BCC196	<i>Trichoderma asperellum</i>	550/555 (99%)
BCC19994	<i>Paraconiothyrium estuarinum</i>	480/485 (98%)
BCC372	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	549/552 (99%)
BCC4293	<i>Bionectria pityrodes</i>	496/498 (99%)
BCC436	<i>Trichoderma harzianum</i>	550/552 (99%)
BCC4506	<i>Paecilomyces marquandii</i>	480/485 (98%)
BCC4744	<i>Verticillium luteo-album</i>	518/523 (99%)
BCC4862	<i>Clonostachys rogersoniana</i>	457/461 (99%)
BCC4868	<i>Fusarium oxysporum</i>	482/483 (99%)
BCC488	<i>Hypocrea lixii</i>	544/546 (99%)
BCC496	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	485/487 (99%)
BCC5762	<i>Acremonium murorum</i>	495/497 (99%)
KU101	<i>Hypocrea lixii</i>	546/550 (99%)
KU102	<i>Hypocrea lixii</i>	547/551 (99%)
KU103	<i>Hypocrea lixii</i>	566/568 (99%)
KU107	<i>Hypocrea lixii</i>	549/549 (100%)
KU119	<i>Trichoderma aureoviride</i>	552/555 (99%)
KU66	<i>Hypocrea lixii</i>	568/571 (99%)
KU84	<i>Hypocrea lixii</i>	558/563 (99%)
KU86.2	<i>Trichoderma asperellum</i>	552/554 (99%)
KU87	<i>Trichoderma asperellum</i>	508/509 (99%)

หมายเหตุ ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยโปรแกรม BLASTN (version 2.2.18) วันที่ 17 เมษายน 2551 ในเว็บ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

2. การวิเคราะห์ลำดับเบสโดย multiple alignment และตำแหน่งไพรเมอร์

C4F

```

nrps_Hvir_a      ESVKTNVSF IKDPIWLWKGLPGKPGRQGRLYKTGDLVRYHKDGS----LS 257
nrps_Hvir_d      NPTKTAADF IESPAWVK-----RGRTGRLYKTGDLVRYKKDGS----LQ 287
nrps_Hvir_b      DIDKTEKAF IESPRWLKHGANNSSENSSTRVYKTGDLVRYNEDGS----LS 251
nrps_Hvir_c      EPEKTAADF IQDPTWLLQ-----FGRSGRMVYKTGDLVCYNEDGT----LM 251
pes_Aory         DPKTAAAF IHDPAMLVSGHNGYAGRSGRLYKTGDLGKYDPDGS--IV 273
salps1_Thar      DDRKTAADF LDHTRWLKQ-----AGRSGRLYKTGDLVRYSEDGS----LI 274
pes_Mani_a       APEKTAADF ITG-PDWGPLT--RQGA PRRLYKTGDLARYNPDGT----IH 277
pes_Mani_c       LDETTRARF ITN-PAWA--K--GQGD--RRFYKTGDLVKYNPDGT----ID 294
pes_Mani_b       DAEKTKKSF ICN-PIWSR-T---QPGVDRRFYKTGDLVRYNSDGS----LH 322
nrps_Tvir_m13_Pro ATADVASNWMEN-VDWLP-G--NN--NKRVTYRTGDLVRRNADGT----FE 238
nrps_Tvir_m2_Gly DSEKTKLAIVYDLPDWAPRR--ESQYUNRFYKSGDLCCYNPDGA----IE 272
nrps_Tvir_m7_Aib/Iva DPVRTSGSTVYNLPNWAPNR--RDKYUNRFYKSGDLGLYNADGT----IQ 251
nrps_Tvir_m1_Aib DFTKTESMVRSLPEWVPNR--TSTHWRDYKSGDLCRYNADGT----ME 256
nrps_Tvir_m15_Aib DPERTSSSTLYNLPKWAPRP--DSKHWNKFYKSGDLCCYNPQDGT----IE 263
nrps_Tvir_m4_Val/Leu DPVRTSGSTVYNLPNWAPNR--RDKYUNRFYKSGDLGLYNADGT----IQ 251
nrps_Tvir_m11_Leu NPDKTQEAAILYDLPEWAPRP--DENNUGRFYKTGDLGFYNANGK----IE 286
nrps_Tvir_m12_Aib DPQRSKETIITELPPWAPKQVSDAHLWSRFYKSGDLCCYNPNGT----LE 287
nrps_Tvir_m16_Aib DVERTKATMYKLPAWAPYQ--DQPSWSRFYKSGDLASYNPDGT----LE 283
nrps_Tvir_m9_Aib  DVRTTEAAVVKSLPDWAPFR--EQSSGSRFNKSGDLGVYNPDGT----IE 276
nrps_Tvir_m5_Aib  DPIRTKASILESSPRWAPRC--ESQHUNRFYLTGDFCCYNPDGT----IE 250
nrps_Tvir_m3_Ala  DPAKTVSSTLTTLPNWAPRA--NDRKWGRFYKTGDLGFYNPDGT----IH 284
nrps_Tvir_m10_Ser DPEKTAATVTLEPEWAPRR--QSTTUNRFYRTGDLGFYDHDGM----LH 281
nrps_Tvir_m14_Leu/Val DKDKTASSIVAALPDWAPNR--RSHHWNRFYKTGYLAKYNPDGT----LQ 249
nrps_Tvir_m8_Ala  DPVKTATATITGLPQWVPKR--DSIHWRDYLTGDLGFINEAGN----LE 262
pes1_Hvir        DEEKTRKSF IKEVEWLPSEA---NVGERRFYKTGDLVRYNLDGY----VE 249
nrps_Tvir_m18_Valol DEEKTRKSF IKEVEWLPSEA---NVGERRFYKTGDLVRYNLDGY----VE 245
nrps_Tvir_m6_Gln  DADRKNKSF ITNVDCLPKSI---ISGPHRFYLTGDLVRYTPDQG----LE 245
nrps_Tvir_m17_Gln DKMKTEESFVCEIGSLPSSL---LHEPKRFYLTGDLVRYNSNGE----LE 292
pes_Tasp         NEERTSASF IDDLWMMPP-----TGSKVYRSGDLAKFNPDGT----IE 263
pes_Apul_b       MPELTSKIIINH-----PNYGRIYRSGDLGRLLPDGT----IL 247
pes_Enid_a       LPEVTARVFI RS-----KEFGP-LYRTGDKARIVWDESGHQVIE 292
pes_Enid_b       LKDVTDTKYIWN-----EDAGQRLYYTGDLVRMLSDGS----LE 267

```

ภาพผนวกที่ ก1 การทำ multiple alignment โดยใช้โปรแกรม ClustalW (version 2) ของข้อมูลลำดับกรดอะมิโนเพื่อออกแบบไพรเมอร์ C4F และ C6R โดยลูกศรแสดงตำแหน่งของไพรเมอร์

```

nrps_Hvir_a      FAGRKD-NQVKINGHRVELDEIEVRLHEYIT--GMVHATAEIIIVPK--NS 302
nrps_Hvir_d      FLGRKD-AQVKIRGQVRVELDEDVERLIQESMP--NVIRAAAEVVIIPQGVNS 334
nrps_Hvir_b      YVGRKD-AQVKIRGQVRVELGEIETLVQEYLP--DAKQIVAEVILPQAERP 298
nrps_Hvir_c      FLGRKD-TQVKIRGQVRVELGEIEHRVEECFL--ESSQVAAEVIGPY---N 295
pes_Aory         FAGRKD-TQVKLRGQVRVELGEIESQLNARLT--AEITVIVEVIKPKSSGG 320
salps1_Thar     FVGRKD-TQVKIRGQVRVELGEVEHHLRECLQ--DAREIIVELIKPEGKDS 321
pes_Mani_a      FIGRKD-TQVKLRGLRIELGEIEHHISVHGF--TQHAIVILPKSGPCKER 324
pes_Mani_c      YVGRKD-TQFKLHGQRIESSEIEHHLSTDHR--IRHAMILLSKSKSGQQR 341
pes_Mani_b      ILGRGD-TQIKLYGQRLDLTDIEAQIIDHQPSLRQVTVEAIMPKGTTTRKT 371
nrps_Tvir_m13_Pro FMGRKD-TQVKLHGQVRVELGEIESRIHEFLP-KDMAAIVAVVKDEHEHDS 286
nrps_Tvir_m2_Gly YLTKRD-TQVKIRGLRVELGEIEYHLQHAIN--EIRQVAVDVINGENGSS 319
nrps_Tvir_m7_Aib/Iva FASRKD-TRIKIRGLRVELSEVEHHVKTALS--RRPSGCCRC CIRSTRWC 298
nrps_Tvir_m1_Aib  FGSRKD-GQVKIRGLRVELGEIEHHIREALE--GVKQVAVDVANGDGGAI 303
nrps_Tvir_m15_Aib FATRKD-TQIKIRGLRVELGEVQHIIQQALP--DARQVAVDVYKGENGTN 310
nrps_Tvir_m4_Val/Leu FFSRKD-TQVKIRGLRVELGEVEHHIQTALH--GVRQIAVDVYKGDHGTN 343
nrps_Tvir_m11_Leu FSSRKD-TQVKIRGLRVELGEIEYQVQASVE--EIRQIAVDVIKTDNGSN 333
nrps_Tvir_m12_Aib FYSRKD-TQVKIRGLRVELGEVEHHIRELLE--GVRQVAVDVLTSCTGTG 334
nrps_Tvir_m16_Aib FSNRKD-TQVKIRGLRVELGEVEYHVRVALK--VLVKLLLTYSRPIP-VQ 329
nrps_Tvir_m9_Aib  FSSRKD-TQVKIRGLRVELGEVEHAVQVALD--GVHQAIVDVFKGDNQGT 323
nrps_Tvir_m5_Aib  YHGRKD-TQIKIRGLRVELGEVEHQIRNFLG--ESVHVTVDVHKKFESGSV 297
nrps_Tvir_m3_Ala  YSGRKD-TQVKIRGLRVELGEVEHHIRNSLD--SVRQVAVDVLRTETGTN 331
nrps_Tvir_m10_Ser FASRKD-TQVKIRGLRVELGEVEHRIQGS LD--GVRQVAVDVFKTEKGAN 328
nrps_Tvir_m14_Leu/Val YYSRKD-TQVKIRGLRVELGEVEHHIQS LI--DAQQVAVDVFNNTAGVN 296
nrps_Tvir_m8_Ala  YCTRKD-TQVKIRGQRLDELGEIEHHIQANLE--SVRQVAVDVIKSDAGST 309
pes1_Hvir       YLGRKD-TQVKVRGQRIELGEIEHHIKNSNT--AIEHAVVDITRNAGRES 296
nrps_Tvir_m18_Valol YLGRKD-TQVKVRGQRIELGEIEHHIKNSNT--AIEHAVVDITRNAGRES 292
nrps_Tvir_m6_Gln YLGRKD-TQVKLRGQRLDELGEIEYHVKKSLA--NIEHAVVDVAHRETGDT 292
nrps_Tvir_m17_Gln YLGRKD-SQVKLRGQRLDELGEIEYNITQSLS--SVRHVAVDVMMHRQAGDS 339
pes_Tasp       VIGRRD-TQVKLRGQRIELGEIEHLIMSELK--DVRYAVADVVEREAGKI 310
pes_Apul_b     QIGRTD-DQVKIRGQRIELGEISGCLLQFPS--VQNCIAEVIKTADKER 293
pes_Enid_a     YLGRIRTDQVKINGRVELGEIESVVAAVEG--VREAVAVVVKRDSKSN 340
pes_Enid_b     YITRVD-DLVKLGRIELSEISFALRGCHE--LVESVETMILS-RKDRP 313
      *      *: * *: :. :

```

```

nrps_Hvir_a      -----VVSHQIPTIHSISTEERGNIA RHL 344
nrps_Hvir_d      _ _ _ _ _ IPTTSTARIITIPAEVEQTLFQNL 379
nrps_Hvir_b      TPVLVVFTPEPRIVS-----ETTEEVTLRLRIPSDVLELRLAEYL 335
nrps_Hvir_c      NRILVAFIQCTGPD-----AAATLLPAPSHVMDHLKSKHL 329
pes_Aory       QPTLVAFILASQSTKKNGDTEI-----KSAELSDDLRKTLSKADAEIAKVL 365
salps1_Thar    KPMLAAFLCLDADQ-----NKDSGSI--VVEMEYQLADRL 355
pes_Mani_a     LVVALSLKDFLPDTSKTSNVR----LIPEEAQERASKQVADIKEQLSRHV 370
pes_Mani_c     LTAIISLESVPPSAAR-DVPQ----LIQAES---AQLEVSLIRKKLAESV 383
pes_Mani_b     LAAFFVMDPDDPGSTVDSLDS----TPISLTP-QLQKDLQELQSSLALS 416
nrps_Tvir_m13_Pro LLAFLWYTEG--AVASQPTAH----LMEVVT-D-EARSMISFVDSLSGMVL 329
nrps_Tvir_m2_Gly LVAYFSFNEESKTADARVQD--DDKGFPMISIDEDLQARIITASGELRVVL 367
nrps_Tvir_m7_Aib/Iva QVWPHTFALAMKQGLLVLAEGFDECDFPFIEMNDGMQERLTAVISQLNISL 348
nrps_Tvir_m1_Aib IVSYFCFTDETTRTAGKNYET--NVRDIFAPMTSDLQSQLTALVGQLGVTL 351
nrps_Tvir_m15_Aib LAAYFCFSDETTRTVGVNDDA--SG-GPFLPISDLQSCLAAVVSKLSISL 357
nrps_Tvir_m4_Val/Leu LVAYICFTDEIRVAGVNSDD--SS--PFFSIDQKLNRLNALVGNLKVTL 389
nrps_Tvir_m11_Leu LVAYLCFNDEIRQL-HNADV--NG--PFSPLDTNLQETLAGAIGKLSVTL 378
nrps_Tvir_m12_Aib LVSYICFNDDSQSPSPELKA--SD--IYLPDADIAQARITSMVGELSVTL 380
nrps_Tvir_m16_Aib GSSHISVSRMKHARQAFLNQ--ME-SIFLPVTEELQAQLTNMISQLNVTL 376
nrps_Tvir_m9_Aib PRGYFSFSDS--RQIHEAH--PS-GPFQAIDEKLQARLTVAIGKLNIAL 368
nrps_Tvir_m5_Aib LVAYIGYSEET--MDNPDE-----IFIPLTDDLQDFHMASQLSILL 338
nrps_Tvir_m3_Ala LVSYICFSSEKKIPGNVDP--EGDDIFLFMTESIQTDLNTAINKLNILL 379
nrps_Tvir_m10_Ser LVAYLCFTSDTKTPDQNTDF--EGKDVFA SIDTELQINLGKMLTELNSSL 376
nrps_Tvir_m14_Leu/Val LVSFICFNNDTLPASMTADL--TSNDIVLRLTDDLKDSINSLGLHNVVL 344
nrps_Tvir_m8_Ala LVAFVSFSDATDQTVTDTRVIANG--PFSTLDGDFQATISRLIGILSTLM 357
pes1_Hvir      LLAFICFTSQQAESVS--K----EIRLTVTEELREMFSDIVTTISSNL 340
nrps_Tvir_m18_Valol LLAFICFTSQQAESVS--K----EIRLTVTEELREMFSDIVTTISSNL 336
nrps_Tvir_m6_Gln LIAFVSFKEKMATTSG-----NILLNDDLRLVALATIMEHLKMSL 332
nrps_Tvir_m17_Gln LVAFISFGHANTKWTSDDL----CLNLVAPNETMRSTLGSRLRENKASL 385
pes_Tasp      LVAFVTFRNYARPAADSTAD----LEDYFIVDEIVTSSFSQSLVQNLQAL 356
pes_Apul_b     LMAFWIPSGYSKDSYILQP-----DKNLEEIIKSIYAHLDNL 332
pes_Enid_a     GEQIVACLVDAAADGEGRE-----KIAQQAQKNAAQHL 373
pes_Enid_b     VRUVVAFLCAPKAAGDADEGL-----LVLDLTDGRDIARAASLQARNVL 356

```

ภาพผนวกที่ ก1 (ต่อ)

```

nrps_Hvir_a      PSYMPVNIYLTMDLPL-TATGKIDRKRLREIG---GEFTLQQLVEPQTV 390
nrps_Hvir_d      PSYMPVSVFFPEIGALP-LGATGKLNRLKLEIG---SSLSSQRLAEARIV 425
nrps_Hvir_b      PMYMIPSVLFLVRELPL-MTPTGKMNRRLREIG---ATFTMKKLVEIQTG 381
nrps_Hvir_c      PHHMIPTLFFSVRQLPL-MTATGKVNRRSLQDIG---ASLSAQDVAEMQTA 375
pes_Aory         PRYMVPNAYISVNYIP-VLISGKTDKRLREFG---ATVDLQQLDQGTNN 411
salps1_Thar     PAYMIPSVCFALAEMP-KTTSKGTDRKQLIEMG---QSFSAQQLADMNNSN 401
pes_Mani_a       PHYMVPETWIVVEAIP-LMLSGKMARSQVSKWI---AEMDDETYDRAVGV 416
pes_Mani_c       PGYMVPISLWLVVDHMS-MTVSGKLNRLKLEMTKWV---EQMEDVVFATSADA 429
pes_Mani_b       PRYMIPATYIRMSQMP-MNSSSGKTNRAALRTMA---AQFSETQWSDYSLE 462
nrps_Tvir_m13_Pro PSYMPSSYLIFEGKPDQTVNGKVNRLGALLAHA---HNLSTQDRLRFAPV 376
nrps_Tvir_m2_Gly PSYMPVPTFFIPCSYLP-TSTSVKLDKALKGYT---AALSADSLSKYSLI 413
nrps_Tvir_m7_Aib/Iva PRYMVPTFFIPCCYMP-SITSRKLDNRNLRRT---AALSQEQLVITYSLQ 394
nrps_Tvir_m1_Aib PRYMIPTMFIPCCYMP-FITSTKLDKMLRLAM---SELSKQDVARYSLV 397
nrps_Tvir_m15_Aib PRYMIPTMFILCSYMP-FITSTKLDKRLKLT---GALDKTQIAQYSL 403
nrps_Tvir_m4_Val/Leu PQYMIPTLYIPCSFMP-SIISTKLDKRLRRT---ADLTRDQLSEYSLQ 435
nrps_Tvir_m11_Leu PRYMIPTFYIPCSYMP-SITSGKLDKRLKRT---AALSQSELNKFSLH 424
nrps_Tvir_m12_Aib PRYMIPTLFIPCKYMP-FITSTKLDKRLKLT---ASLGRDELHYSLI 426
nrps_Tvir_m16_Aib PRYMVPSTLFLPCRYMP-FIATSKLDKRLKLT---SELSHEDHAAVSLR 422
nrps_Tvir_m9_Aib PRYMIPTLFIPCKYMP-SITSTKLDKRLRRT---LLLTQSELA MFYSYR 414
nrps_Tvir_m5_Aib PRYMVPTLFIPCSQMP-HLTSGKLDKRLRRLT---SALNQQLHSYALE 384
nrps_Tvir_m3_Ala PRYMIPTFYIPCSYMP-LISSGKLDKRLKRT---AALAQEELAYSLE 425
nrps_Tvir_m10_Ser PTYMIPTMFIPCAAMP-FITSSKLDKRLRRLT---AELSQDQLEAYSL 422
nrps_Tvir_m14_Leu/Val PGYMIPTLFPVIPSMP-LVTSGKLDKRLKLT---ASVPKQLEAYALT 390
nrps_Tvir_m8_Ala PRYMVPSTAFIPCAKGP-EFQHTGGRYKKRLA---ASLSQEDMAAYSLA 403
pes1_Hvir        PSHMIPKYLIPVDYMP-HNAAGKLDKRLVASI---AKLTDDLSNYLAG 386
nrps_Tvir_m18_Valol PSHMIPKYLIPVDYMP-HNAAGKLDKRLVASI---AKLTDDLSNYLAG 382
nrps_Tvir_m6_Gln PGYMVPSTILPVREMP-FITSMKVDKRLKLT---AALSLEETISFLV 378
nrps_Tvir_m17_Gln PAYMVPSTILPLQCMF-FITSMKLDRTQLRALG---SSLSSEELAAFTPG 431
pes_Tasp         PNYMIPSVIFPLWDMF-PNTSQKIDRMLRGLV---ADMSQEAISNFSIN 402
pes_Apul_b       PAYMVPDALVPVSAIP-QTSQKIDKRLASDG---SALTVEDLNAYSRG 378
pes_Enid_a       ASFCPTTYTTFDVLPL-RSSSGKVDKRLAVQLQEKPDVPIKNGSEESA 422
pes_Enid_b       PENMIPSVYLIVKKIP-KTPSAKVDRLALQAAY---AAVDIDKWENNVP 402

```

C6R

```

A--PKRRP-KTAVERQLQKLWSQILGIS-LDIIGLDDSFLLKMGDSISAM 436
HTGPKRQP-TTDIEHKLQNLWSKVLDIKPASMIGLDDSFLLKGGNSITAM 474
EG-TKRPP-TTRLEQQIQAVWSEVLNID-VSKIGIDDSFFQLGGDSITAM 428
TRHKRRP-ITEIEQLMQTIWARILQIN-LETIGLDDAFFQLGGDSIGAM 423
GP---ARE-LTDLEQLRHRGWQVQLKD-PEGIRPNDNFFALGGDSIAM 456
ST-KKRQP-TTELESKLQDLWARVLNIS-PASVGLDDSFLLKGGDSITAM 448
HSQEGEGATEMEHEIQQLVYSELLNLA-LSRIPLDRSFLSLGGDSISAM 465
EDLEGSHIPATVMEHKIQKMLCQVLNLQ-T--VRLDRSFLSLGGDSITAM 476
NKVKE--LPSTDLKRLQQLWSAVLCID-IDMIGAKDSFFLLKGGDSV-AM 508
VSKSE--PPSTTMEFTLRDLWAQVLQID-AESIGKNDSSFLRIGGDSISAI 423
S-GKKRAP-ETPMESQLQIWAQILNIS-MESIGRDDSFLLKGGDSITAI 460
G-GKKRSPGTVIMERILQAIWSRILCIP-SENIGLDDSFLLKGGDSITAI 442
D-SKKRAP-ENEMETRIQAIWADLLKLP-TSSIGRDDSFLLRGGDSIAAI 444
D-GKKRSP-ETRWR-CSSKLWSELLGIP-IESIGRDDSFLLKGGDSITAI 449
S-GIKRAP-ETSMERKLQIWSVVLGIS-QDSIGRDDSFLLKGGDSIK-- 480
G-VSKRAP-ETPMELQLQNIWSKLLSIP-SESIGRDDSFLLKGGDSIMAI 471
N-SKKRVP-ETEMETRLQAIWSEILNLP-IDSIGRDDSFLLKGGDSITAI 473
N-CVKRMP-ETEMETRMQELWSTVLHMP-KEEIGCDDSFLLKGGDSIAAI 469
--CNKRTP-ETPMESLIQRIWSEILHIP-LDSIGRDDSFLLKGGDSITAI 460
D-AQKEAP-ETEMEVLRLQNIWARILGLP-AHSIGRDDSFLLRIGGDSISAI 431
D-ANKRAP-DTAMEIRLQQLWADILNIP-PQAIKDDSFLLNIGGDSIAAI 472
V-NEKQAP-ETEMEIRLQKLWAEVLDLP-EASIGRHDNFMRIIGGDSIAAI 469
G-GDKRQP-ETEMEVLRLQELWAVLLNMP-AASIGRDDSFLLRIGGDSIAAI 437
N-EEKVAP-QTAMESRIQKIWAQVLNIS-IDSIGRDDSFLLKGGDSVVISI 450
Q-RLPFRDCSTDTEFWIRHQWATTLDLP-AETVGVDNFFYSLGGDSIRIV 434
K-RD-YIAPSTPMKMLANLWAQVLKIS-SEDIGKNDSSFLKGGDSISSI 425
K-AD-KIEPTTHMEFKLRDLWAQILKIS-AEEIGKNDSSFLKGGDSISAI 478
K-RE-KTLPTTELEFKLRDLWARILRVD-PESISKFDSFLEIGGDSISAI 449
A-DDDETSELSATEQQLASALADTLQMS-QTSIGRSTSFLLGLDVSVAI 426
ECWRHSDEAAASSVQQLVIRLVAETGDVS-DSAIPGTLEYVSGIDSLGAM 471
EGPGDAEDDAATATQIIETVAALVHVE-SSTITKSNRLRSLGVDSLCA 451

```

ภาพผนวกลที่ ก1 (ต่อ)

```

                                C2F
Tasp_m1_Aib      YNAAAYVLFTSGSTGTPKGLVMQHAAVCTSQTAITKRLGMTSDVRLQLQFAASFVFDLSIGE 16
Tvir_m1_Aib      RNAAYVLSTSGSTGTPKGLVMQHQAVCTSQTAITKRLMTSDVKMLQFAASFVFDLSIGE 97
Tvir_m7_Aib_Iva  SNAAYVLFTSGSTGTPKGLVMEHRSVCTSQTAITKRLKIRPSARTLQFAAHVFDCAVGEI 12
Tvir_m16_Aib     HNAAAYVLFTSGSTGVPKGLVMTHGGISTSQMAIKRWGINSSNRTLQFVVPNVFDLCLGES 64
Tvir_m12_Aib     SNAAYVLFTSGSTGTPKGLVMQHGAVCTSQTATAKRLSLTPDVRLQFAAYVFDLSIGE 10
Tvir_m5_Aib      RNAAYVLFTSGSTGTPKGFVIEHKAVCTSQTAITNRLGLHRGVRMLQFAAYVFDLSVGEI 61
Tvir_m15_Aib     DNAAYVLFTSGSTGTPKGLVMQHGSVCTSQTATAVKRLGLTPSVRMLQFAAFVFDLSIGE 84
Tvir_m9_Aib      RNAAYVLFTSGSTGIPKGLIMEHGSVCTSQVAIAKRLGLNSKVRILQFAAFVFDLSIGE 67
Tasp_m12_Aib     QCSKMCSLLSGSTAYQVRVLSWSPGPFVAVKRLLKGLKLHSNVRMLQFAAFVFDLSIGE 30
:               :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :
:               :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :

Tasp_m1_Aib      VGPWVVGGLCVPESETRMNDLVFINTMKINWAYLTPSFTRTLNPSDVPGLLELLFFAGE 22
Tvir_m1_Aib      FGPWVVGGLCVPESETRMNDLVNFINTMKINWAYLTPSFARTLNPDVDPGLLELLFFAGE 15
Tvir_m7_Aib_Iva  ISSLFTGGCLFVPSDHDHMRNALPEFIRQNKINYMWSTPSFIRTLSPMDVPSLELVVLVGE 18
Tvir_m16_Aib     ILQLISGACIFIPSEYTRMNGLKDFITEHKINTLFLTPSFVRTLSPDQLPSVTLLLLAGE 12
Tvir_m12_Aib     VAPLIHGACVCPSEETRMNGLKEFIRDARINWAYLTPSFVRTLRPEDVPSLQLLLLAGE 16
Tvir_m5_Aib      CCTLICGACLVIPSDEVRLNNLAKFMREKINWAFVTPSFIRTLPEADVPKLELVLLCGE 12
Tvir_m15_Aib     IAPLITGACLCIPSETRMNSLTQFIRDMEINWAFVTPSFIRTLNPEVPGGLDLVLLAGE 14
Tvir_m9_Aib      VGPLISGACICVPSEHIRKNSIANFINROGITWYLTTPSFVRTIKASEVPMVKLLLLAGE 12
Tasp_m12_Aib     VAPLISGACVCPSEEARLNDIAGFIREMNVNWAYLTPSFVRVLTPEEVPSLELLLLAGE 36
. *.*: :*: : * : * : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

                                AibR
Tasp_m1_Aib      AVGRDVFEAWFGKVRLLINGWGAETCVFSTLHEWKSLESSLTVGSPVGGYCWIVDPQNP 28
Tvir_m1_Aib      AVRRDVFEAWFGRLRLINGWGAETCVFSTLHEWKSLESLTIGRPVGGHCWIVDPQDP 21
Tvir_m7_Aib_Iva  AVTRDIMDTWFGKVRLLINGWGAETCVFSTIHEWQSIDESPLTIGRSVGGFCWIVDPEDP 24
Tvir_m16_Aib     AVPRDILTTWFGKVRLLINGWGAETCLFSSLHQFQSVDESPLTIGRPVGGFCWVVDPTNA 18
Tvir_m12_Aib     AVGRDILDWFGKVRLLINGWGAETCVFSTLHEWSSIDESPLTIGRPVGGYCWIVEAEDS 22
Tvir_m5_Aib      ASDKKILEIWVGKVLFNWGAETCVFSSLHEWKSVTESPLTVGKPVASFIIWIVDPKNP 18
Tvir_m15_Aib     AVPRDVLTTWFGQVRLINGWGAETCVFSTLHEWKS VNESPLTIGKPVGGFCWVVPEDP 20
Tvir_m9_Aib      AVPRDIFATWFGKRLRLINGWGAETCCFSTLHEMAICGRESFYCRFPVGGFCWIVDPENP 18
Tasp_m12_Aib     ITPRDIFNTWVGKVRFISWGAETCVFSSLHEWKSASESPLNVGKPVGALCWIVDPDCQ 42
: : : : * : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

```

ภาพผนวกที่ ก2 การทำ multiple alignment ส่วน A-domain ของกรดอะมิโน Aib จากฐานข้อมูล NCBI โดยโปรแกรม CLUSTAL W (2) และตำแหน่งไพรเมอร์ C2F&AibR (ลูกศร), แถบสีเข้มแสดงตำแหน่งของกรดอะมิโนสัญลักษณ์ (signature) ทั้ง 9 เรซิดูส์ Tasp คือ *T. asperellum* (Chutakul and Peberdy, 2005) Tvir คือ *T. Virens* (Wiest *et al.*, 2002) m คือ โมดูลที่ลำดับต่างๆ

ภาคผนวก ข

ข้อมูลจากการทดลอง

ตารางผนวกที่ ข1 เปรียบเทียบการวิเคราะห์กิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ATCC 11778
ระหว่างเทคนิค Agar well plate และ microdilution assay

Well no.	BCC No.	Microorganism	Agar well plate		96 well plate	
			% relative inhibition	SD	% relative inhibition	SD
1A	BCC17183	<i>Talaromyces stipitatus</i>	35.24	4.63	0.31	26.01
1B	BCC108	<i>Paecilomyces. marquandii</i>	40.00	2.04	78.27	2.89
1C	BCC4913	<i>Acremonium polychromum</i>	38.10	2.27	1.64	1.80
1D	BCC3903	<i>Stilbella emericellopsis</i>	46.67	2.72	-26.79	2.39
2A	BCC17467	<i>Paecilomyces</i> sp.	30.48	0.51	6.61	9.55
2B	BCC372	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	54.29	4.70	99.99	0.17
2C	BCC18053	<i>Trichoderma qhanense</i>	113.33	8.90	100.82	0.33
2D	BCC18314	<i>Acremonium</i> sp.	31.43	2.62	-7.09	11.07
3A	BCC17392	<i>Trichoderma koningii</i>	73.33	3.34	100.03	0.37
3B	BCC242	<i>Acremonium polychromum</i>	33.33	4.35	-18.94	2.31
3C	BCC17957	<i>Paecilomyces carneus</i>	39.05	0.26	-11.84	1.52
3D	BCC4862	<i>Clonostachyrogersoniana</i>	93.33	8.58	100.79	0.03
4A	BCC17535	<i>Paecilomyces variotii</i>	32.38	4.83	9.00	6.96
4B	BCC436	<i>Trichoderma hazianum</i>	86.67	3.20	101.04	0.13
4C	BCC18241	<i>Paecilomyces</i> sp.	37.14	6.10	-24.41	9.80
4D	BCC12530	<i>Trichoderma asperellum</i>	83.81	7.08	100.09	0.23
5A	BCC17716	<i>T.parceramosum</i>	120.95	8.52	100.89	0.46
5B	BCC496	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	63.81	3.81	86.38	0.67
5C	BCC17978	<i>Paecilomyces farinosus</i>	50.48	3.76	100.37	0.24
6A	BCC17797	<i>Paecilomyces variotii</i>	30.48	4.61	-0.84	1.50
6B	BCC488	<i>Hypocrea lixii</i>	63.81	0.77	100.07	0.03
6C	BCC17980	<i>Paecilomyces javanicus</i>	30.48	4.61	-14.42	1.79
7A	BCC107	<i>Paecilomyces marquandii</i>	31.43	2.62	3.57	24.81
7B	BCC4506	<i>Paecilomyces marquandii</i>	33.33	0.26	-7.40	0.30
7C	BCC2107	<i>Paecilomyces cinnamomeus</i>	36.19	0.00	-19.70	7.50
8A	BCC196	<i>Trichoderma asperellum</i>	106.67	0.00	100.47	0.19
8B	BCC5762	<i>Acremonium muronum</i>	29.52	5.04	-10.72	11.67
8C	BCC4293	<i>Bionectria pityrodes</i>	33.33	4.01	-23.37	11.07
5D	3%ME+Aib		46.67	1.56	-22.74	5.18
7D	MeOH		28.57	2.84	12.42	0.34
1E	Extracted Chloramphenicol		45.71	1.73	-11.76	5.27
1F	Pure Chloramphenicol		100.00	1.87	100.00	0.00
1G	Extracted Gramicidin		56.19	6.44	100.28	0.23
1H	Pure Gramicidin		52.38	3.60	93.63	8.81

หมายเหตุ คำนวณ % relative inhibition โดยเทียบกับ chloramphenicol 100 µg.ml⁻¹

ตารางผนวกที่ ข2 การวิเคราะห์สารสกัดต่อการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *B. cereus* ATCC 11778 ด้วยเทคนิค microdilution method

Code	Microorganism	Rep. I	Rep. II	% inhibition	SD	Evaluate*
BCC5762	<i>Acremonium murorum</i>	11751	13524	-10.66	11.59	-
BCC242	<i>Acremonium polychromum</i>	602	618	100.57	0.10	Positive
BCC4913	<i>Acremonium polychromum</i>	11445	11172	1.63	1.79	-
BCC4870	<i>Acremonium roscolum</i>	20963	19414	-4.98	5.99	-
BCC9257	<i>Acremonium</i> sp.	14471	13028	30.23	5.58	-
BCC5978	<i>Acremonium</i> sp.	16614	15194	18.45	5.49	-
BCC18314	<i>Acremonium</i> sp.	12589	11908	-7.06	4.45	-
BCC5763	<i>Acremonium strictum</i>	20640	18050	-0.37	10.02	-
BCC4293	<i>Bionectria pityrodes</i>	14849	13155	-23.28	11.08	-
BCC4862	<i>Clonostachys rogersoniana</i>	617	658	100.32	0.27	Positive
BCC4868	<i>Fusarium oxysporum</i>	967	935	100.22	0.12	Positive
BCC14814	<i>Hypocrea lixii</i>	853	857	100.75	0.02	Positive
BCC488	<i>Hypocrea lixii</i>	580	620	102.14	0.15	Positive
KU 101	<i>Hypocrea lixii</i>	876	925	100.50	0.19	Positive
KU 102	<i>Hypocrea lixi</i>	947	903	100.37	0.17	Positive
KU 107	<i>Hypocrea lixii</i>	994	965	100.07	0.11	Positive
KU 113	<i>Hypocrea lixii</i>	985	933	100.18	0.20	Positive
KU 66	<i>Hypocrea lixii</i>	971	967	100.13	0.02	Positive
KU 84	<i>Hypocrea lixi</i>	13166	13553	32.37	1.50	-
BCC12193	<i>Mariannaea camptospora</i>	946	931	100.29	0.06	Positive
BCC17957	<i>Paecilomyces carneus</i>	12878	12642	-11.79	1.54	-
BCC2107	<i>Paecilomyces cinnamomeus</i>	14180	13032	-19.62	7.51	-
BCC17978	<i>Paecilomyces farinosus</i>	646	719	99.90	0.48	Positive
BCC17980	<i>Paecilomyces javanicus</i>	12903	13171	-14.35	1.75	-
BCC372	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	13703	13345	-18.86	2.34	-
BCC496	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	695	735	99.60	0.26	Positive
BCC107	<i>Paecilomyces marquandii</i>	12991	9216	3.53	24.69	-
BCC108	<i>Paecilomyces marquandii</i>	692	754	99.53	0.41	Positive
BCC4506	<i>Paecilomyces marquandii</i>	3267	2856	77.90	2.69	-
BCC17467	<i>Paecilomyces</i> sp.	10044	11500	6.59	9.52	-
BCC18241	<i>Paecilomyces</i> sp.	14863	13363	-24.30	9.81	-
BCC17535	<i>Paecilomyces variotii</i>	11045	9989	8.95	6.91	-
BCC17797	<i>Paecilomyces variotii</i>	11461	11689	-0.83	1.49	-
BCC19994	<i>Paraconiothyrium estuarinum</i>	13843	13622	30.33	0.85	-
BCC4916	<i>Stilbella annulata</i>	23717	18214	-9.23	21.28	-
BCC4653	<i>Stilbella annulata</i>	17350	15629	15.25	6.65	-
BCC3903	<i>Stilbella emericellopsis</i>	14556	14182	-26.67	2.45	-
BCC4985	<i>Stilbella fimetaria</i>	16862	16509	14.18	1.37	-
BCC12353	<i>Stilbella holubovae</i>	11474	11345	43.03	0.50	-
BCC8283	<i>Stilbella</i> sp.	13527	14971	27.50	5.58	-
BCC7545	<i>Stilbella</i> sp.	13587	13690	30.84	0.40	-
BCC4742	<i>Stilbella</i> sp.	12521	12927	35.84	1.57	-
BCC17183	<i>Talaromyces stipitatus</i>	9469	13428	0.34	25.89	-
BCC196	<i>Trichoderma asperellum</i>	667	675	100.01	0.05	Positive
KU 87	<i>Trichoderma asperellum</i>	14524	15262	23.98	2.85	-
BCC12530	<i>Trichoderma asperellum</i>	677	748	99.63	0.46	Positive
BCC11207	<i>Trichoderma atroviride</i>	9351	10086	52.28	2.84	-
KU 119	<i>Trichoderma aureoviride</i>	10487	13577	39.63	11.95	-
BCC436	<i>Trichoderma hazianum</i>	2224	2153	85.98	0.46	-
BCC17392	<i>Trichoderma koningii</i>	729	708	99.57	0.14	Positive
BCC17716	<i>Trichoderma parceramosum</i>	643	610	100.42	0.22	Positive
BCC18053	<i>Trichoderma qhanense</i>	641	627	100.35	0.09	Positive
BCC12542	<i>Trichoderma</i> sp.	965	1027	99.98	0.24	Positive
BCC14173	<i>Trichoderma</i> sp.	868	983	100.36	0.44	Positive
BCC20419	<i>Trichoderma</i> sp.	992	951	100.11	0.16	Positive
BCC13402	<i>Trichoderma velutinum</i>	14915	14982	23.68	0.26	-
BCC4744	<i>Verticillium luteo-album</i>	16317	13268	24.53	11.79	-
	ME+Aib	11216	12092	41.69	3.39	-
	MeOH	21032	20451	-8.00	2.25	-

หมายเหตุ * เกณฑ์การให้ผล positive คือ % inhibition มากกว่าหรือเท่ากับ 90 %

ตารางผนวกที่ ข3 การวิเคราะห์สารสกัดต่อการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* ATCC 25922
ด้วยเทคนิค microdilution method

Code	Microorganism	Rep. I	Rep. II	% inhibition	SD	Evaluate*
BCC5762	<i>Acremonium murorum</i>	13981	13884	5.13	3.42	-
BCC242	<i>Acremonium polychromum</i>	12491	12111	16.56	2.02	-
BCC4913	<i>Acremonium polychromum</i>	11906	12430	17.49	6.50	-
BCC4870	<i>Acremonium roscolum</i>	21966	19062	-2.14	10.67	-
BCC9257	<i>Acremonium</i> sp.	17377	16106	17.47	4.67	-
BCC5978	<i>Acremonium</i> sp.	19513	18737	5.08	2.85	-
BCC18314	<i>Acremonium</i> sp.	11746	12482	17.87	7.55	-
BCC5763	<i>Acremonium strictum</i>	21076	19765	-1.65	4.82	-
BCC4293	<i>Bionectria pityrodes</i>	15293	14350	-1.10	0.77	-
BCC4862	<i>Clonostachys rogersoniana</i>	8210	8291	44.94	4.30	-
BCC4868	<i>Fusarium oxysporum</i>	20199	18559	3.76	6.03	-
BCC14814	<i>Hypocrea lixii</i>	18017	15935	16.25	7.65	-
BCC488	<i>Hypocrea lixii</i>	13297	13219	9.86	3.51	-
KU 101	<i>Hypocrea lixii</i>	21511	20389	-4.41	4.12	-
KU 102	<i>Hypocrea lixi</i>	17940	18365	10.13	1.56	-
KU 107	<i>Hypocrea lixii</i>	18072	18510	9.41	1.61	-
KU 113	<i>Hypocrea lixii</i>	16123	16272	20.29	0.55	-
KU 66	<i>Hypocrea lixii</i>	18120	18669	8.88	2.02	-
KU 84	<i>Hypocrea lixi</i>	19112	19134	5.09	0.08	-
BCC12193	<i>Mariannaea camptospora</i>	19923	19456	2.15	1.72	-
BCC17957	<i>Paecilomyces carneus</i>	11513	11410	22.44	3.39	-
BCC2107	<i>Paecilomyces cinnamomeus</i>	12506	12285	15.90	2.80	-
BCC17978	<i>Paecilomyces farinosus</i>	12612	12635	14.30	4.01	-
BCC17980	<i>Paecilomyces javanicus</i>	13881	13807	5.75	3.53	-
BCC372	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	11753	11300	21.99	1.65	-
BCC496	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	12927	13590	9.85	7.18	-
BCC107	<i>Paecilomyces marquandii</i>	12497	12089	16.62	1.88	-
BCC108	<i>Paecilomyces marquandii</i>	10267	10492	30.03	5.01	-
BCC4506	<i>Paecilomyces marquandii</i>	11146	11413	23.72	5.22	-
BCC17467	<i>Paecilomyces</i> sp.	15113	13944	0.95	1.89	-
BCC18241	<i>Paecilomyces</i> sp.	11956	11719	19.81	2.73	-
BCC17535	<i>Paecilomyces variotii</i>	15102	13808	1.47	2.51	-
BCC17797	<i>Paecilomyces variotii</i>	16445	15627	-9.61	0.15	-
BCC19994	<i>Paraconiothyrium estuarinum</i>	20632	17881	4.40	10.11	-
BCC4916	<i>Stilbella annulata</i>	20814	19428	-0.10	5.09	-
BCC4653	<i>Stilbella annulata</i>	21744	20319	-4.83	5.24	-
BCC3903	<i>Stilbella emericellopsis</i>	12484	13051	13.29	6.71	-
BCC4985	<i>Stilbella fimetaria</i>	17136	14820	21.43	8.51	-
BCC12353	<i>Stilbella holubovae</i>	17050	16243	17.96	2.97	-
BCC8283	<i>Stilbella</i> sp.	15651	15016	24.78	2.33	-
BCC7545	<i>Stilbella</i> sp.	18697	17174	11.26	5.60	-
BCC4742	<i>Stilbella</i> sp.	18914	17439	10.01	5.42	-
BCC17183	<i>Talaromyces stipitatus</i>	15801	14388	-0.26	7.00	-
BCC196	<i>Trichoderma asperellum</i>	8638	10023	37.38	10.76	-
KU 87	<i>Trichoderma asperellum</i>	19132	20483	1.53	4.96	-
BCC12530	<i>Trichoderma asperellum</i>	12797	11964	16.00	0.23	-
BCC11207	<i>Trichoderma atroviride</i>	18601	18086	9.14	1.89	-
KU 119	<i>Trichoderma aureoviride</i>	17510	16524	16.03	3.62	-
BCC436	<i>Trichoderma hazianum</i>	10847	11303	25.15	6.16	-
BCC17392	<i>Trichoderma koningii</i>	13788	12704	9.94	1.47	-
BCC17716	<i>Trichoderma parceramosum</i>	9766	8863	37.49	0.57	-
BCC18053	<i>Trichoderma qhanense</i>	11037	10632	26.84	1.89	-
BCC12542	<i>Trichoderma</i> sp.	18852	17966	8.80	3.26	-
BCC14173	<i>Trichoderma</i> sp.	17156	16664	16.59	1.81	-
BCC20419	<i>Trichoderma</i> sp.	18276	17921	10.41	1.30	-
BCC13402	<i>Trichoderma velutinum</i>	19346	19110	4.54	0.87	-
BCC4744	<i>Verticillium luteo-album</i>	19696	18888	4.21	2.97	-
ME		12396	12798	14.49	5.89	-
MeOH		17061	17166	15.53	0.39	-

หมายเหตุ * เกณฑ์การให้ผล positive คือ % inhibition มากกว่าหรือเท่ากับ 90 %

ตารางผนวกที่ ๔4 การวิเคราะห์สารสกัดต่อการยับยั้งเชื้อราเซลล์เดี่ยว *C. albicans* ATCC 90028
ด้วยเทคนิค microdilution method

Code	Microorganism	Rep. I	Rep. II	% inhibition	SD	Evaluate
BCC5762	<i>Acremonium murorum</i>	2547	2619	83.79	0.57	Positive
BCC242	<i>Acremonium polychromum</i>	9444	8639	11.87	6.34	-
BCC4913	<i>Acremonium polychromum</i>	8475	9532	12.29	8.32	-
BCC4870	<i>Acremonium rosacolum</i>	11347	12926	-22.60	12.43	-
BCC9257	<i>Acremonium</i> sp.	7068	7375	32.13	2.42	-
BCC5978	<i>Acremonium</i> sp.	11375	9602	-4.25	13.96	-
BCC18314	<i>Acremonium</i> sp.	11598	11132	-14.01	3.67	-
BCC5763	<i>Acremonium strictum</i>	8682	8113	19.04	4.48	-
BCC4293	<i>Bionectria pityrodes</i>	3395	3021	76.83	2.94	Positive
BCC4862	<i>Clonostachys rogersoniana</i>	976	1081	101.10	0.83	Positive
BCC4868	<i>Fusarium oxysporum</i>	1652	1453	95.26	1.57	Positive
BCC14814	<i>Hypocrea lixii</i>	3597	3493	73.07	0.82	Positive
BCC488	<i>Hypocrea lixii</i>	11320	10628	-9.65	5.45	-
KU 101	<i>Hypocrea lixii</i>	4445	4246	64.16	1.57	Positive
KU 102	<i>Hypocrea lixi</i>	12516	11215	-19.58	10.24	-
KU 107	<i>Hypocrea lixii</i>	13638	12254	-31.61	10.90	-
KU 113	<i>Hypocrea lixii</i>	11650	11138	-14.33	4.03	-
KU 66	<i>Hypocrea lixii</i>	6104	5317	48.96	6.20	-
KU 84	<i>Hypocrea lixi</i>	13182	11618	-25.53	12.32	-
BCC12193	<i>Mariannaea camptospora</i>	1202	1092	99.78	0.87	Positive
BCC17957	<i>Paecilomyces carneus</i>	7024	9047	23.07	15.93	-
BCC2107	<i>Paecilomyces cinnamomeus</i>	9617	11528	-5.18	15.05	-
BCC17978	<i>Paecilomyces farinosus</i>	6337	8360	30.72	15.93	-
BCC17980	<i>Paecilomyces javanicus</i>	7975	8201	22.48	1.78	-
BCC372	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	5889	5215	50.72	5.31	Positive
BCC496	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	3639	3526	72.66	0.89	Positive
BCC107	<i>Paecilomyces marquandii</i>	9883	9658	3.75	1.77	-
BCC108	<i>Paecilomyces marquandii</i>	10868	9747	-2.23	8.83	-
BCC4506	<i>Paecilomyces marquandii</i>	8554	9687	10.99	8.92	-
BCC17467	<i>Paecilomyces</i> sp.	9284	10041	4.95	5.96	-
BCC18241	<i>Paecilomyces</i> sp.	6886	6469	38.19	3.28	-
BCC17535	<i>Paecilomyces variotii</i>	11239	8328	3.60	22.92	-
BCC17797	<i>Paecilomyces variotii</i>	8993	9496	9.61	3.96	-
BCC19994	<i>Paraconiothyrium estuarinum</i>	6787	7536	32.80	5.90	-
BCC4916	<i>Stilbella annulata</i>	10803	9675	-1.47	8.88	-
BCC4653	<i>Stilbella annulata</i>	4475	3531	67.97	7.43	Positive
BCC3903	<i>Stilbella emericellopsis</i>	11200	10955	-10.81	1.93	-
BCC4985	<i>Stilbella fimetaria</i>	7791	9494	16.31	13.41	-
BCC12353	<i>Stilbella holubovae</i>	10653	8845	3.99	14.24	-
BCC8283	<i>Stilbella</i> sp.	11295	11234	-12.89	0.48	-
BCC7545	<i>Stilbella</i> sp.	4313	3856	67.07	3.60	Positive
BCC4742	<i>Stilbella</i> sp.	6919	6720	36.61	1.57	-
BCC17183	<i>Talaromyces stipitatus</i>	9593	9033	8.84	4.41	-
BCC196	<i>Trichoderma asperellum</i>	4016	4182	66.90	1.31	Positive
KU 87	<i>Trichoderma asperellum</i>	9832	9988	2.19	1.23	-
BCC12530	<i>Trichoderma asperellum</i>	9234	8573	13.40	5.20	-
BCC11207	<i>Trichoderma atroviride</i>	11303	10706	-9.99	4.70	-
KU 119	<i>Trichoderma aureoviride</i>	10168	10844	-4.44	5.32	-
BCC436	<i>Trichoderma hazianum</i>	8629	11833	-1.38	25.23	-
BCC17392	<i>Trichoderma koningii</i>	5919	8181	34.04	17.81	-
BCC17716	<i>Trichoderma parceramosum</i>	3388	3389	74.82	0.01	Positive
BCC18053	<i>Trichoderma qhanense</i>	2285	2159	87.81	0.99	Positive
BCC12542	<i>Trichoderma</i> sp.	11010	12862	-20.37	14.58	-
BCC14173	<i>Trichoderma</i> sp.	11896	12486	-23.21	4.65	-
BCC20419	<i>Trichoderma</i> sp.	10194	11920	-10.58	13.59	-
BCC13402	<i>Trichoderma velutinum</i>	6816	7168	34.69	2.77	-
BCC4744	<i>Verticillium luteo-album</i>	8621	10028	8.71	11.08	-
	ME+Aib	9102	9096	11.23	0.05	-
	MeOH	12484	12749	-27.94	2.09	-

หมายเหตุ * เกณฑ์การให้ผล positive คือ % inhibition มากกว่าหรือเท่ากับ 50 %

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวสโรชา ปัญจนวพร
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 20 มิถุนายน 2523
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	วท.บ. สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (เกียรตินิยมอันดับหนึ่ง)
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	ผู้ช่วยนักวิจัย 2
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ 113 ถนนพหลโยธิน ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง ปทุมธานี 12120
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	1. ทุนสถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย (Thailand Graduate Institute of Science and Technology, TGIST) (พ.ศ. 2549) 2. ทุนอุดหนุนการค้นคว้าและวิจัยประเภทวิทยานิพนธ์ (พ.ศ. 2550)