

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ได้ให้การสนับสนุนด้านงบประมาณในการทำงานวิจัยนี้ (งบประมาณประจำปี 2553-2554) และคณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณรัชดา หริตกุล และ ดร. ชลรัชต์ บุญลาภประดับ จากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำหรับความช่วยเหลือในการทำงานวิจัยด้านการทำสารให้บริสุทธิ์ และการอ่านโครงสร้างทางเคมีของสารโพลีคีไทด์ นอกจากนี้ขอขอบคุณ ดร.ไว ประทุมผาย ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ และ ดร.เมธี ขาดวง ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ได้ให้คำแนะนำเกี่ยวกับการทดลองและการวิเคราะห์ผลทางสถิติที่ใช้ในงานวิจัยนี้

ทรงศักดิ์ วัฒนชัยเสรีกุล
อนุวัฒน์ เตชะฤทธิ์
จันทิรา ปัญญา
สุภาภรณ์ ชีวะธนรักษ์

คณะผู้วิจัย

บทคัดย่อ

โพลีคีไทด์เป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีคุณสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะ สารลดโคเลสเตอรอล และสารต้านมะเร็ง ที่สามารถพบได้ในแบคทีเรียและราหลายชนิด เนื่องจากโพลีคีไทด์มักจะมาจากจุลินทรีย์ที่บางชนิดจะเจริญเติบโตช้า หรือมีความยากลำบากในการเพาะเลี้ยง ดังนั้นจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจอย่างยิ่งที่จะนำยีนโพลีคีไทด์ขึ้นเทสจากจุลินทรีย์ผู้ผลิต ไปใส่ในจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่เจริญเติบโตได้เร็วแทน เช่น *Aspergillus* sp. ในการศึกษาการแสดงออกของยีน *pkamt* จาก *Xylaria* sp. BCC1067 ใน *A. oryzae* พบว่า *A. oryzae* MTG4 ที่มียีน *pkamt* ดังกล่าว สามารถผลิต anhydromevalonolactone (AMVL) ที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลายชนิด เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร Malt Extract Broth (MEB) ที่ยังไม่ได้ผ่านการหาค่าสูตรอาหารที่เหมาะสม โดยสามารถผลิต AMVL ได้เพียง 60 มิลลิกรัม/ลิตร ที่เวลา 21 วัน ซึ่งมีปริมาณน้อยและไม่เพียงพอต่อการนำไปใช้ประโยชน์ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาชนิดและปริมาณของแหล่งของคาร์บอนและไนโตรเจน ที่จะใช้ในสูตรอาหารสำหรับการผลิตสาร AMVL โดยทำการทดลองแบบ Factorial Design และ Plackett-Burman Design เพื่อหาแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสม รวมถึงตัวแปรอิสระอื่น ๆ ที่มีผลต่อการผลิต AMVL อย่างมีนัยสำคัญ และทำการศึกษาระดับที่เหมาะสมที่สุดของแต่ละปัจจัยโดยวิธี Response Surface Methodology แบบ Central Composite Design *A. oryzae* MTG4 ซึ่งมียีน *pkamt* จะถูกนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่าง ๆ ตามการทดลองที่ได้ออกแบบไว้ในขวดเขย่าที่อุณหภูมิ 25 °C ที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 23 วัน โดยทำการทดลองซ้ำเป็นจำนวน 2 ครั้ง จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างวิเคราะห์หาปริมาณ AMVL ที่ผลิตได้โดย HPLC ข้อมูลที่ได้จะนำมาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิต AMVL ประกอบไปด้วย NaNO_3 9.687 กรัม/ลิตร, K_2HPO_4 2.432 กรัม/ลิตร, KH_2PO_4 0.147 กรัม/ลิตร, Trace element 0.397 มล./ฟลาสก์, sucrose 70 กรัม/ลิตร, KCl 0.25 กรัม/ลิตร, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.75 กรัม/ลิตร และ $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2 กรัม/ลิตร แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ได้จะเป็นสมการแบบ quadratic สามารถนำมาใช้ในการทำนายการผลิตเมื่อใช้สารอาหารในระดับต่าง ๆ *A. oryzae* MTG4 ถูกนำมาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่เหมาะสมดังกล่าวเป็นเวลา 23 วัน พบว่ามีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) เท่ากับ 0.052 ชม^{-1} และสามารถ AMVL ได้ถึง 200 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งมีปริมาณมากกว่าสูตรเดิม (MEB) ถึง 3.4 เท่า ที่มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดเพียง 0.039 ชม^{-1}

ABSTRACT

Polyketides, found in several bacteria and fungi, represent one of the largest groups of natural products, which exhibit the antibiotic, anticholesterolemic and anticancer properties. Since many useful polyketides originate from sources that are difficult or even impossible to cultivate, it is of interest to heterologously express the polyketide synthase (PKS) gene in other hosts, which are easier to cultivate and have high growth rate such as *Aspergillus* sp. The preliminary results from the study of heterologous expression of *pksm1* from *Xylaria* sp. BCC1067 in *A. oryzae* showed that *A. oryzae* MTG4, carrying *pksm1* could produce anhydromevalonolactone (AMVL) which is used as a precursor of the biosynthesis of several bioactive compounds when it was cultivated in an unoptimized medium, Malt Extract Broth (MEB). The productivity of AMVL was only 60 mg/L at 21 days, which was not sufficient for further application. This project, therefore, aims to develop an optimized medium for a higher production of AMVL by *A. oryzae*. The experiment was carried out by using Factorial and Plackett-Burman Design in order to search for the type and amount of carbon and nitrogen sources, as well as to investigate the significance of each variable to the amount of AMVL produced. After that the suitable level of each variable was studied by Response Surface Methodology using Central Composite Design. *A. oryzae* MTG4 carrying *pksm1* gene was cultivated in the media according to the experimental design in shake flasks for 23 days at 25 °C and 200 rpm, with 2 replicates. The samples were analyzed for AMVL using HPLC. The statistical analysis showed that the optimized medium consisted of 9.687 g/L NaNO₃, 2.432 g/L K₂HPO₄, 0.147 g/L KH₂PO₄, 0.397 mL/flask Trace element, 70 g/L sucrose, 0.25 g/L KCl, 0.75 g/L MgSO₄·7H₂O and 2 g/L Na₃C₆H₅O₇·2H₂O. A mathematical model obtained from the experiment was quadratic equation, which can be used for prediction of AMVL when nutrients are used in the different levels. *A. oryzae* MTG4 was cultivated in the optimized medium for 23 days with maximum specific growth rate ($\mu_{\max}$) of 0.052hr⁻¹. Moreover, the AMVL production in the optimized medium was approximately 200 mg/L, that was 3.4 times higher than using unoptimized medium (MEB), with the $\mu_{\max}$ of only 0.039 hr⁻¹.

กิตติกรรมประกาศ.....	ก
บทคัดย่อ.....	ข
ABSTRACT.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญภาพ.....	จ
สารบัญตาราง.....	ฉ
บทนำ.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
ขอบเขตของการวิจัย.....	4
การออกแบบการวิจัย.....	5
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	8
วิธีดำเนินการวิจัย.....	9
ผลการวิจัยและวิจารณ์.....	12
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	25
บรรณานุกรม.....	27
ประวัติคณะผู้วิจัย.....	37

สารบัญภาพ

- ภาพที่ 1** ปริมาณการผลิต anhydromevalonolactone ที่เวลา 21 วัน (A: mg/L; B: mg/g dw) เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *Aspergillus oryzae* MTG4 โดยใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ชนิดต่าง ๆ 13
- ภาพที่ 2** Response surface plot แสดงความเข้มข้นของตัวแปรอิสระ NaNO_3 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 และ Trace element ที่มีต่อปริมาณการผลิต AMVL จาก *A. oryzae* MTG4..... 20
- ภาพที่ 3** การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำหนักแห้งของ *A. oryzae* MTG4 ใน optimized medium และ unoptimized medium (MEB)..... 23
- ภาพที่ 4** ปริมาณ anhydromevalonolactone ที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* MTG4 ใน optimized medium และ unoptimized medium (MEB)..... 24

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1	ค่าในระดับต่าง ๆ ของตัวแปรที่ใช้ในการทดลองแบบ Plackett-Burman Design.....	10
ตารางที่ 2	ค่าเฉลี่ยปริมาณ anhydromevalonolactone (mg/L) ผลได้ (yield, mg/g dw) และ biomass (g/L) ที่ได้จากการทดลองแบบ Factorial Design เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่แตกต่างกัน.....	12
ตารางที่ 3	การทดลองแบบ Plackett-Burman Design แสดงปริมาณ AMVL ที่ผลิตได้.....	14
ตารางที่ 4	ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของการทดลองแบบ Plackett-Burman Design.....	14
ตารางที่ 5	ระดับของตัวแปรที่ใช้สำหรับ Central Composite Design ของอาหารที่ใช้ในการผลิต anhydromevalonolactone จาก <i>A. oryzae</i> MTG4.....	15
ตารางที่ 6	การทดลองแบบ Central Composite Design แสดงปริมาณของ AMVL ในแต่ละการทดลองซึ่งมีองค์ประกอบของสารอาหารที่แตกต่างกัน.....	16
ตารางที่ 7	การวิเคราะห์ความเหมาะสมของการใช้แบบจำลองในการอธิบายผลการทดลอง.....	16
ตารางที่ 8	การทดสอบ Lack of fit ของแต่ละแบบจำลอง.....	17
ตารางที่ 9	ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนสำหรับ Response Surface Quadratic Model.....	17
ตารางที่ 10	ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของแต่ละตัวแปรเมื่อทำการวิเคราะห์โดยใช้ coded Value.....	18
ตารางที่ 11	ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ NaNO_3 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 และ Trace element ต่อการผลิต AMVL.....	21
ตารางที่ 12	การเปรียบเทียบราคาของ medium และ ปริมาณของโพสดีไทด์ AMVL ที่ผลิตได้ระหว่าง optimized และ unoptimized medium.....	22