

6. ผลการทดลอง คำวิจารณ์และข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาต่อของผลงานการวิจัยเรื่อง “การเพิ่มผลผลิตการสังเคราะห์โปรตีนในรา *Aspergillus oryzae* โดยการควบคุมกิจกรรมของ เอนไซม์โปรติเอส (ว.1-ด 2547)” และ “ศึกษาคุณสมบัติและการแยกยีนที่เกี่ยวข้อง ในวิถีการ สังเคราะห์สาร polyketide จากรา *Xylaria* sp.BCC1067 (ว.1-ด 2548)” ซึ่งคณะผู้วิจัยได้นำยีน *pkmsmt* ที่แยกได้จากรา *Xylaria* sp.BCC1067 มาใช้ศึกษาต่อของการวิจัย โดยอาศัยระบบที่คณะผู้วิจัยได้ ประดิษฐ์และพัฒนาขึ้นมาใหม่ ดังนี้

จากรายงานความก้าวหน้างานวิจัยในระยะที่ 1 คณะผู้วิจัยได้สร้าง expression vector สองชนิดคือ pPNGB และ pPNGB-MT (รูปที่ 1) ซึ่ง vector ทั้งสองชนิดนี้มีองค์ประกอบหลักภายในวงคล้ายคลึงกัน แต่ vector pPNGB-MT จะมียีน *pkmsmt* ที่ได้จากรา *Xylaria* sp.BCC1067 [1] ซึ่งยีนดังกล่าว ยังไม่ทราบหน้าที่ ที่ชัดเจนต่อการผลิตสารเมตาบอไลต์ชนิดใดในรา *Xylaria* sp.BCC1067 ดังนั้นจึงมีความสนใจ ที่จะนำยีนดังกล่าว มาบรรจุลงใน expression vector ที่คณะผู้วิจัยได้สร้างขึ้น เพื่อเป็นการทดสอบว่า expression vector สามารถที่จะควบคุมการแสดงออกของยีนใด ๆ ได้หรือไม่

ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการสร้าง cDNA ของยีน *pkmsmt* จาก RNA ของรา *Xylaria* sp.BCC1067 โดยอาศัย Forward & Reverse primer และใช้เอ็นไซม์ LongAmp Tag DNA polymerase (Fermentas) ในการจำลองและเพิ่มปริมาณสาย ดีเอ็นเอให้มากขึ้นได้ ดังนี้

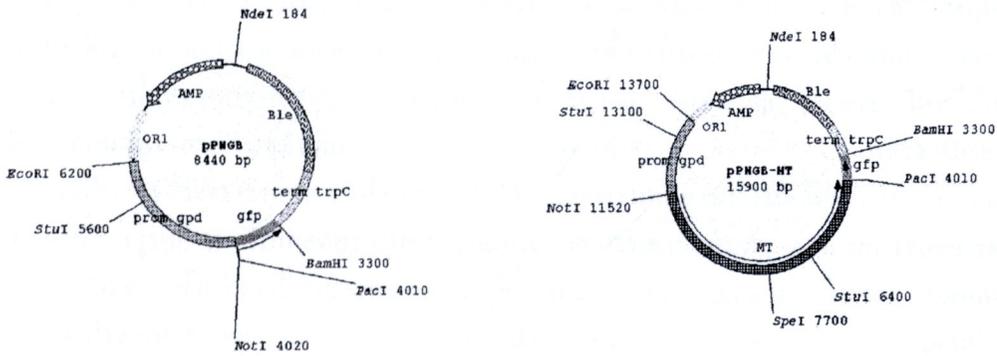
XMTEF primer 5'-GAAAGCGGCCGCATGGATGAGCCTATAGCTATCATTGG-3'

MTPacRn primer 5'-GCGTAAATTAATAAACTTCACTGCCTCATCCTGCT-3'

PCR reaction

PCR reaction			PCR condition		
-	10X Buffer	5 ml	Denature	94°C,	10 sec
-	10 mM dNTP	4 ml	Annealing	58°C,	5 sec
-	20 pmol XMTEF	4 ml	Extension	72°C,	7 min
-	20 pmol MTPacRn	4 ml			} 30 cycles
-	25 mM MgSO ₄	4 ml			
-	LongAmp enzyme	1 ml			
-	Water	30 ml			

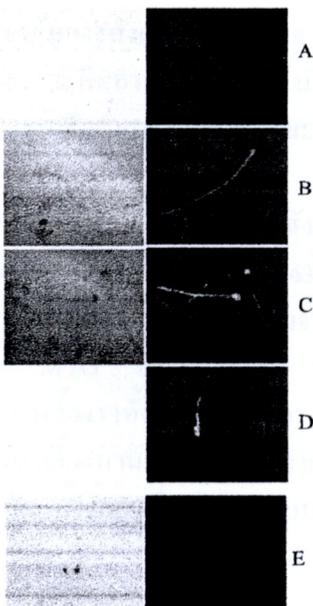
จากนั้นนำ cDNA *pkmsmt* gene ไป subclone เข้าไปในตำแหน่งของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *NotI* และ *PacI* ใน vector pPNGB (รูปที่ 1a) ผ่านกระบวนการเชื่อมจำเพาะด้วยเอ็นไซม์ T₄ DNA Ligase (Promega) และส่งถ่ายขึ้นดีเอ็นเอ (Bacterial transformation) เข้าไปในแบคทีเรีย *E. coli* DH5a ซึ่งจากการทดลอง พบว่าสามารถสร้าง expression vector pPNGB-MT ได้ (รูปที่ 1b)



รูปที่ 1 แสดงแผนภูมิรูปภาพของ expression vector ชนิด pPNGB (1a) และ pPNGB-MT

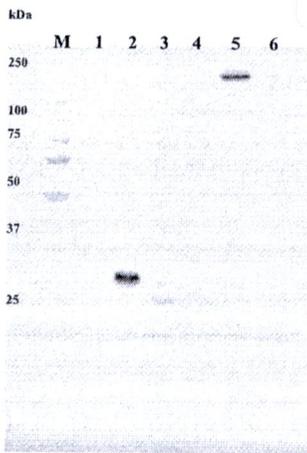
(1b)

จากนั้นคณะผู้วิจัยได้นำ expression vector pPNGB-MT ไปส่งถ่ายเข้าไปในรา (Fungal transformation) *A. oryzae* U1638 ซึ่งเป็นราที่มีความบกพร่องต่อการสร้างเอ็นไซม์โปรติเอส โดยอาศัยกระบวนการที่เรียกว่า Chemical transformation ที่ปรับปรุงให้มีความเหมาะสมต่อการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ของรามาวิธี ของสุภาภรณ์ [2] และทำการคัดเลือกรา transformant บนอาหารที่มีส่วนผสมของยา phleomycin เข้มข้น 200 ug/ml ซึ่งจากการทดลอง พบว่ามีรา transformant ที่สามารถเจริญได้บนอาหารที่มียาจำนวน 34 transformant จากนั้นนำราทั้งหมดไปทดสอบการเรืองแสง สีเขียวภายใต้กล้อง Fluorescent microscope พบว่ามีราเพียง 5 transformant เท่านั้นที่สามารถเรืองแสง สีเขียวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ดังกล่าวได้ คือรา *A. oryzae* MTG No.1 – 5 ตามลำดับ จากนั้นได้นำราทั้ง 5 transformant แต่ละระหว่างการทดลองรา *A. oryzae* MTG2 ไม่สามารถที่จะเลี้ยงให้เจริญต่อไปได้ ดังนั้นจึงเหลือราที่เรืองแสงได้เพียง 4 transformant คือ *A. oryzae* MTG1, MTG3, MTG4 และ MTG5 (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 แสดงผลการทดสอบการเรืองแสง สีเขียวภายใต้กล้อง Fluorescent microscope ของรา *A. oryzae* MTG1, (A) MTG3 (B), MTG4 (C), MTG5 (D) transformant ทั้ง 4 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม *A. oryzae* U1638 (E)

จากนั้นนำราทั้ง 4 transformant ไปเลี้ยงในอาหาร Malt Extract Broth (MEB) เพื่อสกัดโปรตีน (Intracellular soluble protein extraction) เพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค western hybridization เพื่อทดสอบคุณสมบัติในการสังเคราะห์ fusion pksmt-gfp protein ได้หรือไม่ โดยเปรียบเทียบกับราสายพันธุ์ดั้งเดิม (U1638) และราUGFP ที่มีคุณสมบัติในการสังเคราะห์เฉพาะโปรตีน GFP [3] จากการทดลองพบว่า มีเพียงรา UGFP และ MTG4 เท่านั้น (รูปที่ 3) ที่ให้ผลตอบสนอง (positive) ต่อการเข้าจับกับตัว Anti-gfp (Promega) โดยที่รา UGFP ซึ่งเป็นราที่สามารถสังเคราะห์ได้เฉพาะ GFP protein ให้ผล positive ที่ขนาดของโปรตีนประมาณ 27 kDa แต่โปรตีนของรา MTG4 ให้ผล positive ที่ขนาดของโปรตีนประมาณ 300 kDa โดยเทียบกับโปรตีนขนาดมาตรฐาน (Protein marker, position protein plus; Biorad)



รูปที่ 3 แสดงผล Western hybridization ระหว่าง Intracellular soluble protein กับ anti-gfp

M = Protein marker

1 = Protein from *A. oryzae* U1638

2 = Protein from *A. oryzae* UGFP

3 = Protein from *A. oryzae* MTG1

4 = Protein from *A. oryzae* MTG3

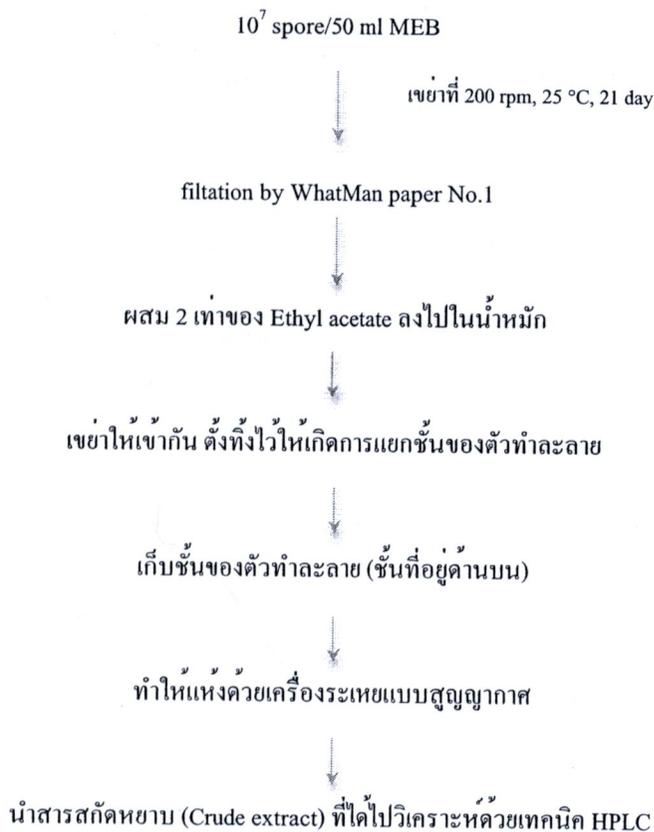
5 = Protein from *A. oryzae* MTG4

6 = Protein from *A. oryzae* MTG5

ซึ่งจากการวิจัยในระยะแรก ทางคณะสามารถสร้างรา *A. oryzae* MTG4 ที่มีคุณสมบัติในการสังเคราะห์ fusion pksmt-gfp protein ได้ แต่เนื่องด้วยยีน pksmt เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (Secondary metabolite) ดังนั้นในการวิจัยระยะที่สอง คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาถึงคุณสมบัติต่าง ๆ ของรา *A. oryzae* MTG4 เช่น อัตราการเจริญ ลักษณะทางกายภาพต่อการสังเคราะห์ Secondary metabolite ได้ดังนี้

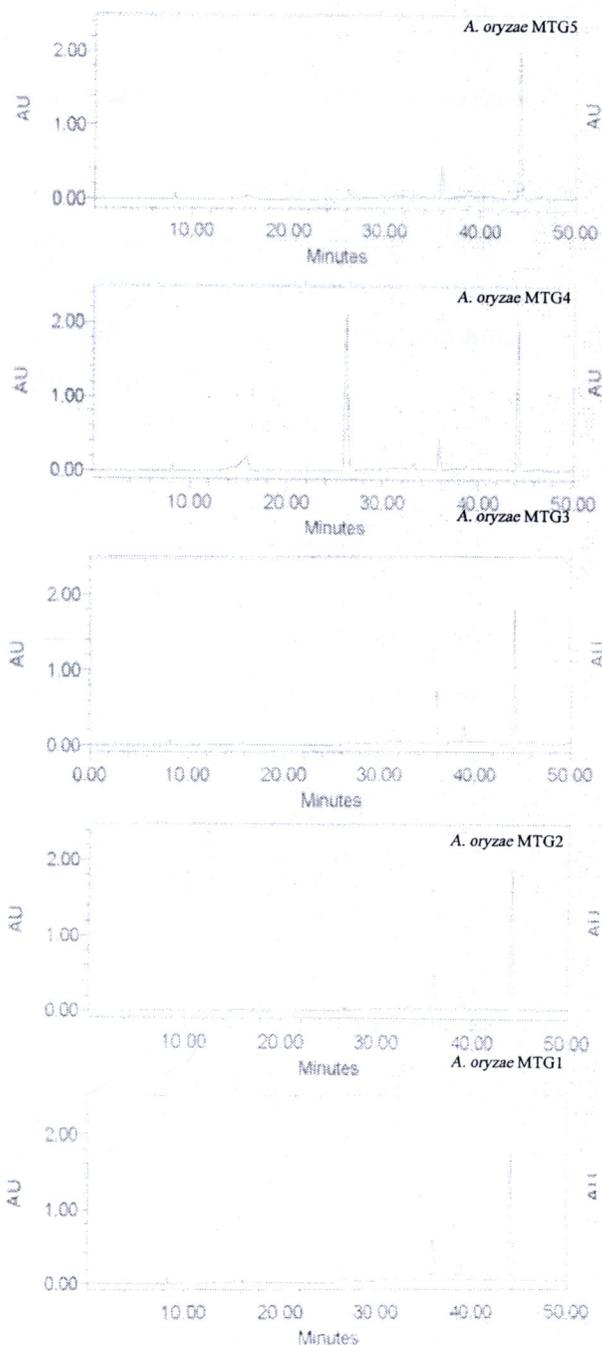
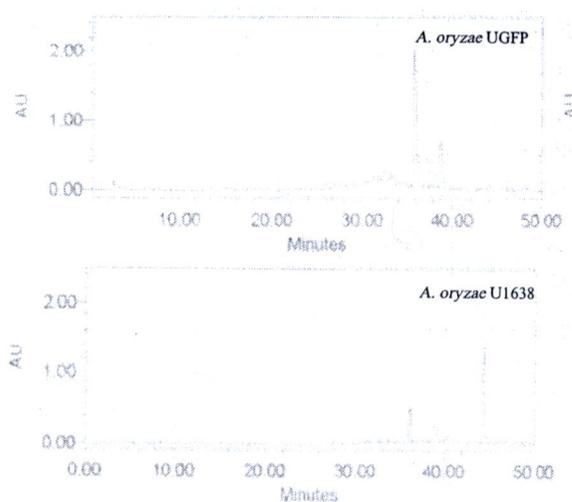
6.1 การทดสอบคุณสมบัติในการสังเคราะห์สารเมตาบอไลต์ของรา *A. oryzae* MTG transformant เปรียบเทียบกับรา *A. oryzae* U1638

การทดลองนี้เป็นการตรวจสอบคุณสมบัติในการสังเคราะห์สารเมตาบอไลต์ของรา *A. oryzae* MTG transformant ว่ามีความแตกต่างไปจากรา *A. oryzae* U1638 หรือไม่ โดยทำการเลี้ยงราทั้งหมดในอาหาร MEB ในสภาวะการเขย่าที่อัตรา 200 rpm ที่อุณหภูมิ 25 C โดยทำการเลี้ยงนาน 21 วัน จากนั้น ทำการเก็บเซลล์และน้ำหมักไปสกัดด้วย Ethyl acetate และทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแบบสูญญากาศ ดังรูป



ซึ่งสารสกัดหยาบที่ได้ จะนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC และใช้รูปแบบการแยกสารผ่านคอลัมน์ C18 reverse phase ตามเทคนิคของจิราภรณ์และคณะ (2008) [4] โดยทำการเก็บค่าการดูดกลืนแสง ของสารในช่วงความยาวคลื่นที่ 210 nm จากการทดลองเมื่อทำการเลี้ยงรา *A. oryzae* U1638 เทียบกับรา *A. oryzae* UGFP และ *A. oryzae* MTG transformants ในอาหาร MEB ในสภาวะการเขย่าที่อัตรา 200 rpm และเก็บน้ำหมักที่ได้ไปสกัดหยาบสารเมตาบอไลต์หยาบ (Crude extract) จากนั้นนำสารสกัดหยาบ ไปวิเคราะห์หารูปแบบการสังเคราะห์สารเมตาบอไลต์ด้วยเทคนิค HPLC พบว่ารา *A. oryzae* MTG4 มีการสังเคราะห์สารเมตาบอไลต์ที่แตกต่างไปจากรา *A. oryzae* U1638 และ *A. oryzae* UGFP นั่นคือ มีการพบว่ารา *A. oryzae* MTG4 สามารถสังเคราะห์สารเมตาบอไลต์เพิ่มขึ้นถึงสามช่วงเวลาของการแยก คือที่เวลา 14 16 และ 26 นาทีของการแยกผ่านคอลัมน์ โดยได้ตั้งชื่อสารว่า compound A, B และ C ตามลำดับ (รูปที่ 4) ส่วนสาร *A. oryzae* MTG 1, 3 และ 5 ไม่พบความแตกต่างที่ชัดเจน เมื่อเทียบกับราสายพันธุ์ดั้งเดิม

จากผลการทดลองข้างต้น พบว่ารา *A. oryzae* MTG4 มีการแสดงคุณสมบัติทุกประการของการเป็น fungal heterologous host ที่สามารถควบคุมให้ราแสดงคุณสมบัติของยีนที่เป็น heterologous gene ซึ่งในที่นี้หมายถึงยีน *pkSmt* ที่แยกได้จากรา *Xylaria* sp.BCC1067 ภายใต้สภาวะการควบคุม การแสดงออกของยีนดังกล่าวด้วย *gpdA* promoter และ *trpC* terminator ที่ประกอบรวมกันขึ้นเป็น expression vector (ตามรูปที่ 1a และ 1b) ที่ได้สร้างขึ้นมาในการวิจัยนี้

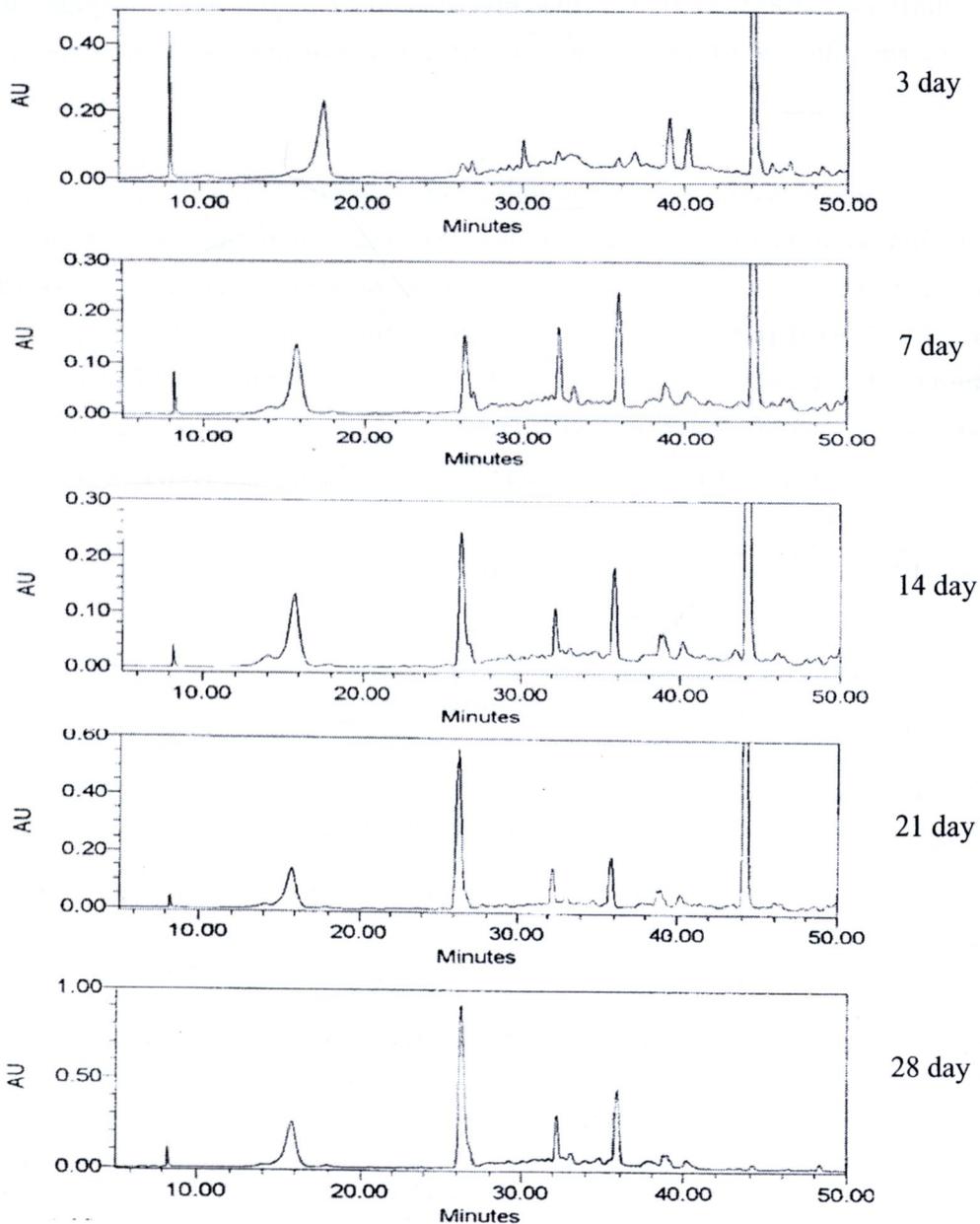


รูปที่ 4 แสดงผลการวิเคราะห์สารสกัดหยาบ (Crude) ที่ผลิตขึ้นในรา *A. oryzae* โดยเปรียบเทียบระหว่าง ราสายพันธุ์ดั้งเดิม (U1638) ราที่ไม่มียีน *pkamt* (UGFP) และราที่ได้รับยีน *pkamt* (MTG transformants)

จากรูปที่ 4 แสดงให้เห็นความแตกต่างของสารสกัดหยาบที่แยกออกจากรำหมักเลี้ยงเชื้อของรา *A. oryzae* ชนิดต่าง ๆ ที่แยกผ่านคอลัมส์ HPLC พบว่า รา *A. oryzae* MTG4 เท่านั้นที่มีรูปแบบการสังเคราะห์สารเมตาบอไลต์ที่แตกต่างไปจากราชนิดอื่น ๆ นั่นคือพบว่ามีสารสังเคราะห์เพิ่มขึ้น ณ เวลาการแยกผ่านคอลัมส์ที่ 14 16 และ 26 นาที ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตาม ยังไม่สามารถระบุได้ชัดเจนว่าสารเมตาบอไลต์ทั้งสามชนิด มีการผลิตที่เกี่ยวข้องกับเวลาในการเลี้ยงหรือไม่ ดังนั้นจึงทำการทดลองเพื่อหาความสัมพันธ์ของเวลาในการเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการผลิต สารเมตาบอไลต์ในรา *A. oryzae* MTG4 เปรียบเทียบกับ ราสายพันธุ์ดั้งเดิม (U1638)

6.2 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตสารเมตาบอไลต์จากรา *A. oryzae* MTG4

การทดลองนี้ได้นำรา *A. oryzae* U1638 และ MTG4 transformant มาศึกษาหาความสัมพันธ์ของการผลิตสารเมตาบอไลต์ ภายใต้การปรับเปลี่ยนเวลาในการเลี้ยงเชื้อ โดยได้ทำการเลี้ยงเซลล์ราทั้งสองชนิด ข้างต้นใน อาหาร MEB ซึ่งใช้สปอร์เริ่มต้นที่ 10^7 spoer/50 ml MEB จากนั้นนำไปเขย่าเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 °C ที่อัตรา 200 rpm ทำการเก็บเซลล์และน้ำหมักมาสกัดเอาสารสกัดหยาบ (Crude) ทุกวัน โดยทำการเก็บผลนาน 28 วัน



รูปที่ 5 แสดงผลการวิเคราะห์สารสกัดหยาบที่แยกได้จากน้ำหมักเลี้ยงเชื้อของรา *A. oryzae* MTG4 ณ วันต่าง ๆ ของการเลี้ยง โดยทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

จากผลการทดลอง สารสกัดหยาบที่แยกได้จากรา *A. oryzae* MTG4 transformant ณ วันต่าง ๆ เมื่อนำเอาไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC พบว่าสารเมตาบอไลต์ A และ B สามารถผลิตได้ตลอดการเลี้ยงเชื้อ แต่สารเมตาบอไลต์ C จะพบว่าเริ่มผลิตได้ เมื่อเวลาผ่านไประยะหนึ่ง คือ สาร C ถูกผลิตเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อหลังวันที่ 14 และผลิตได้สูงสุดเมื่อทำการเลี้ยงนาน 21 วัน หลังจากนั้น ผลผลิตของสาร C ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ในขณะที่สาร A และ B ปริมาณการผลิตไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยยะ ตลอดการทดลอง อย่างไรก็ตาม สารเมตาบอไลต์ทั้งสามชนิด ซึ่งเกิดจากการทำงานของเอ็นไซม์ *pkamt* แต่ผู้วิจัยยังไม่สามารถระบุหน้าที่คุณสมบัติของสารเมตาบอไลต์ดังกล่าวได้ ดังนั้นในการทดลองต่อไป เป็นการศึกษาถึงคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารเมตาบอไลต์ โดยการนำสารสกัดหยาบไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Bioassay

6.3 การศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพของสารเมตาบอไลต์หยาบจากรา *A. oryzae* MTG4

การทดลองนี้เป็นการศึกษาคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ที่สำคัญต่อเซลล์เป้าหมาย โดยทำการเลี้ยง รา *A. oryzae* U1638 และ MTG4 transformant ในอาหาร MEB ที่สภาวะการเขย่าที่ 200 rpm, 25 °C นาน 21 วัน จากนั้นทำการสกัดเอาสารสกัดหยาบให้ได้ปริมาณ 5 – 10 mg นำสารสกัดที่ได้ ไปวิเคราะห์หาการออกฤทธิ์ต่อ เซลล์เป้าหมายต่าง ๆ เช่น เซลล์มะเร็ง แบคทีเรีย รา แมลง ไวรัส ฯ โดยส่งไปวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการ Bioassay ของศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (สช.) แสดงผลในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบที่แยกได้ต่อเซลล์เป้าหมาย [5]

Target cell	Crude compound from <i>A. oryzae</i> strain		Unit	
	U1638	MTG4		
Anti-HSV-1 (<i>Herpes simplex virus type 1</i>)	Inactive	Inactive	IC ₅₀	µg/ml
Cytotoxicity (Vero cell line)	Non-cytotoxic	Non-cytotoxic	IC ₅₀	µg/ml
Anti-fungal (<i>Candida albicans</i>)	Inactive	Inactive		µg/ml
Anti-rice blast (<i>Magnaporthe oryzae</i>)	Inactive	Inactive		µg/ml
Anti-malaria (<i>Plasmodium falciparum</i>)	Inactive	Inactive	MIC	µg/ml
Anti-TB (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>)	Inactive	Inactive	IC ₅₀	µg/ml
Anticancer				
- KB (Oral cavity cancer)	Inactive	33.61	IC ₅₀	µg/ml
- MCF7 (Breast cancer)	Inactive	Positive	IC ₅₀	µg/ml
- NCI H187 (Small cell lung cancer)	Inactive	Inactive	IC ₅₀	µg/ml
Anti-bacteria				
- <i>E. Coli</i>	Negative	Positive		
- <i>S. aureus</i>	Negative	Positive		



จากการทดสอบคุณสมบัติการออกฤทธิ์ชนิดต่าง ๆ ต่อเซลล์เป้าหมายของสารสกัดหยาบ (Crude extract) ที่ได้จากรา *A. oryzae* U1638 และ MTG4 transformant พบว่าสารสกัดหยาบที่ได้จากราสายพันธุ์ดั้งเดิม ไม่มีคุณสมบัติการออกฤทธิ์ใด ๆ เลย แต่สารสกัดหยาบที่ได้จากรา *A. oryzae* MTG4 transformant พบว่ามีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งที่เป็น gram negative และ gram positive นอกจากนี้ยังพบว่ามีคุณสมบัติในการทำลายเซลล์มะเร็งช่องปากชนิด oral cavity cancer cell และมีผล positive ต่อการแบ่งเซลล์ของมะเร็งเต้านมด้วย

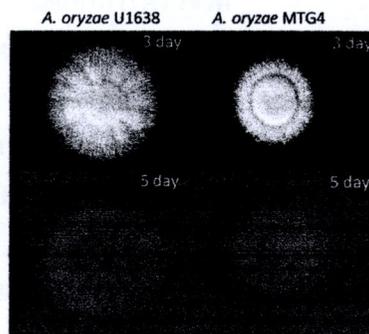
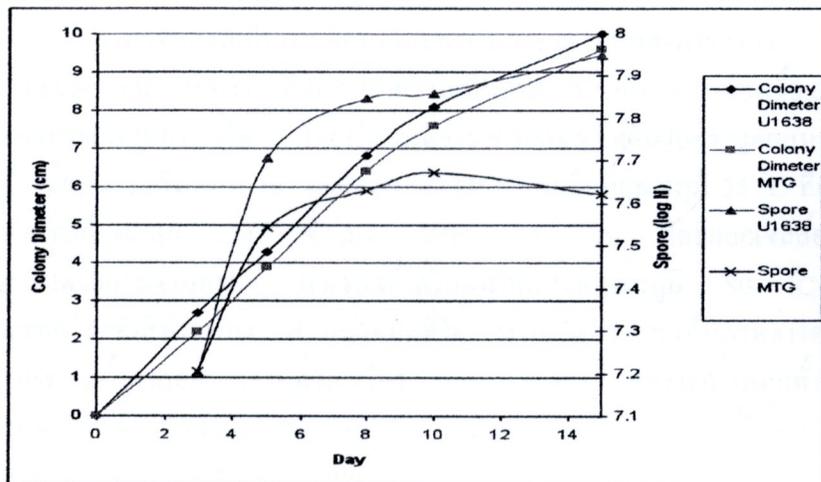
แต่อย่างไรก็ตาม ผลการออกฤทธิ์ของสารสกัดหยาบที่ได้มีค่าที่ไม่สูงจนสามารถที่จะนำไปใช้เป็นยาต้านมะเร็งได้ และนอกจากนั้นในสารสกัดหยาบที่ไรโซคลอง ยังประกอบไปด้วยสารเมตาบอไลต์อื่น ๆ อีกหลายชนิด ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องแยกสารเมตาบอไลต์ให้บริสุทธิ์เพื่อที่จะสามารถทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารเมตาบอไลต์ได้อย่างแท้จริง

ในการวิจัยนี้ ได้ใช้เทคนิคทางอนุพันธุศาสตร์ ในการควบคุมให้ราเจ้าผลิตโปรตีน เอ็นไซม์ หรือ สารเมตาบอไลต์ ซึ่งกลไกดังกล่าว อาจจะมีผลกระทบต่อปัจจัยทางชีววิทยาพื้นฐานของเซลล์เจ้าบ้านได้ ดังนั้นจึงมีความสนใจที่จะศึกษาถึงลักษณะทางกายภาพที่เปลี่ยนไปของราลูกผสมต่อการเจริญเติบโต โดยเปรียบเทียบกับราสายพันธุ์ดั้งเดิม ซึ่งคุณลักษณะที่สนใจในการศึกษาประกอบด้วย การสร้างสปอร์และเส้นใยความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญในอาหารเหลว ต่อการผลิตสาร และค่าเป็นกรด ค่าของน้ำหนักที่ได้ต่อการผลิตสาร เป็นต้น

6.4 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เปลี่ยนแปลงไปของราลูกผสม เมื่อเปรียบเทียบกับราสายพันธุ์ดั้งเดิม

การทดลองนี้ เป็นการติดตามคุณลักษณะทางการยภาพที่ปรากฏของราลูกผสมเปรียบเทียบกับราสายพันธุ์ดั้งเดิม โดยทำการเลี้ยงราทั้งสองชนิดในอาหาร MEA agar ซึ่งใช้ปริมาณสปอร์ของราเริ่มต้นที่ 1000 spore/spot หยดสปอร์ลงกึ่งกลางของเพลตอาหาร จากนั้นนำไปบ่มที่ 30 °C ทำการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีทุกวัน และตรวจนับปริมาณสปอร์ที่ผลิตได้ในแต่ละวัน โดยการเติมสารละลาย 0.01% Tween20 ลงไปในเพลตอาหาร ปริมาณ 5 ml จากนั้นทำการชุบสปอร์ให้กระจายโดยทั่ว ๆ ในสารละลาย คูดสารละลายสปอร์ไปตรวจนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นำข้อมูลที่ได้มาสร้างความสัมพันธ์ระหว่างขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางต่อปริมาณสปอร์ แสดงผลดังรูปที่ 6

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่.....19 มิ.ย. 2555.....
เลขทะเบียน.....249953.....
เลขเรียกหนังสือ.....



รูปที่ 6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญของราบนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตสปอร์ เปรียบเทียบระหว่างราสายพันธุ์ดั้งเดิมกับราลูกผสมคัดแปลงพันธุกรรม

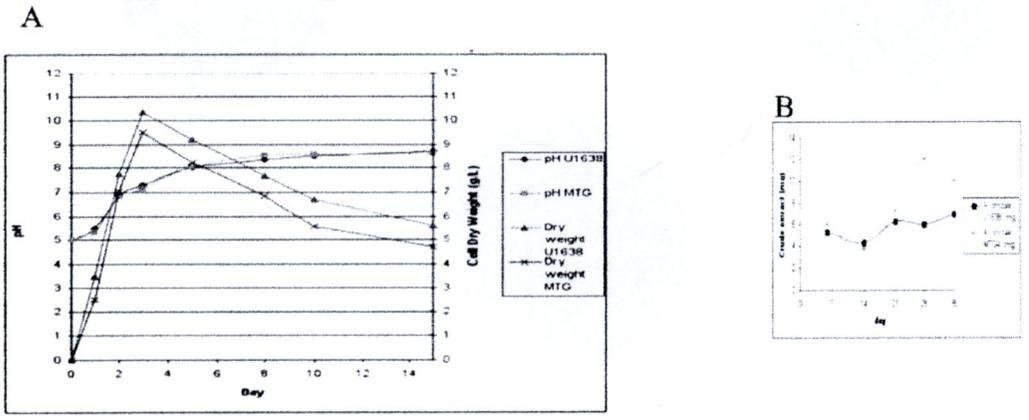
จากการทดลอง การศึกษาลักษณะทางกายภาพที่เปลี่ยนแปลงไปของราลูกผสม เมื่อเปรียบเทียบกับราสายพันธุ์ดั้งเดิม โดยติดตามคู่อัตรการขยายโคโลนีรา บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งต่อการผลิตสปอร์ พบว่าเมื่อพิจารณาถึงลักษณะที่มองเห็นด้วยตาเปล่า ลักษณะของโคโลนีราสายพันธุ์ดั้งเดิมมีการผลิตสปอร์บริเวณที่กลางโคโลนีรา ก่อนที่จะผลิตสปอร์ลามออกไปตามการงอกของโคโลนีรา ซึ่งบริเวณดังกล่าวเป็นบริเวณที่เส้นใยมีอายุมากพอสมควร แต่ในโคโลนีของราลูกผสม พบว่ามีการสร้างสปอร์ ไปพร้อม ๆ กับการแผ่ขยายโคโลนีรา และเมื่อพิจารณาอัตราการแผ่ขยายโคโลนีราบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยยะ ของราทั้งสองชนิด นั่นคือ ราทั้งสองชนิดมีอัตราการแผ่ขยายโคโลนีใกล้เคียงกัน และเมื่อพิจารณาถึงอัตรา การผลิตสปอร์ของรา พบว่าราลูกผสมผลิตสปอร์ได้น้อยกว่าราสายพันธุ์ดั้งเดิมทั้ง ๆ ที่เมื่อเปรียบเทียบกับลักษณะการผลิตสปอร์ จะพบว่าราลูกผสมมีการผลิตสปอร์เร็วไวก่อนราสายพันธุ์ดั้งเดิม แต่ปริมาณสปอร์ที่โคกกลับมีจำนวนน้อยกว่าราสายพันธุ์ดั้งเดิมอย่างมีนัยยะ นั่นอาจจะเป็นเพราะว่าราลูกผสมได้รับยีน *pkSmt* เข้าไปในโครโมโซมของราแบบสุ่ม (Random chromosome integration) และยีนดังกล่าว ไปแทรกเข้าไปในบริเวณที่อาจจะทำให้ลักษณะทางกายภาพของราเปลี่ยนแปลงไป

อย่างไรก็ตาม ลักษณะทางกายภาพที่เปลี่ยนแปลงไปของราลูกผสม ไม่ทำให้ราดังกล่าวสูญเสียลักษณะ บางประการไปได้ โดยเฉพาะ ลักษณะที่สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น การผลิตซีอิ๊วเต้าเจี้ยว เป็นต้น ดังนั้นจึงไม่ถือว่าราลูกผสมที่สร้างขึ้นมาจะเป็นราอันตราย ดังนั้นจึงจะได้ทำการศึกษาหาสภาวะการเจริญของ ราลูกผสมในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตสารเมตาบอไลต์ต่อไป

6.5 ศึกษาอัตราการเจริญของราลูกผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวต่อการผลิตสารเมตาบอไลต์

การทดลองนี้เป็นการศึกษาอัตราการเจริญของราในอาหารเหลว โดยทำการตรวจวัดน้ำหนักเซลล์แห้งของรา เทียบกับค่าความเป็นกรด ค่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ และปริมาณน้ำหนักแห้งของสารสกัดหยาบที่ได้ โดยทำการเลี้ยงราสายพันธุ์ดั้งเดิมและราลูกผสม ในอาหาร MEB ซึ่งใช้สปอร์ราเริ่มต้นที่ 10^7 spore/50 ml MEB บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 °C ที่อัตราการเขย่า 200 rpm ทำการเก็บผลทุก 24 ชั่วโมง นาน 14 วัน โดยแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักด้วยการกรองด้วยกระดาษกรอง นำเซลล์ที่ได้ไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 80 °C ซึ่งน้ำหนักเซลล์แห้งด้วยเครื่องชั่งสี่ตำแหน่ง ส่วนน้ำหมักที่ได้ นำไปวัดค่าความเป็นกรดด้วยเครื่อง pH meter วัดปริมาณน้ำตาลอย่างหยาบด้วยเครื่อง refractometer และนำน้ำหมักทั้งหมด ไปสกัดเอาสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate สารสกัดหยาบที่ได้จะนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารเมตาบอไลต์ ด้วยเทคนิค HPLC

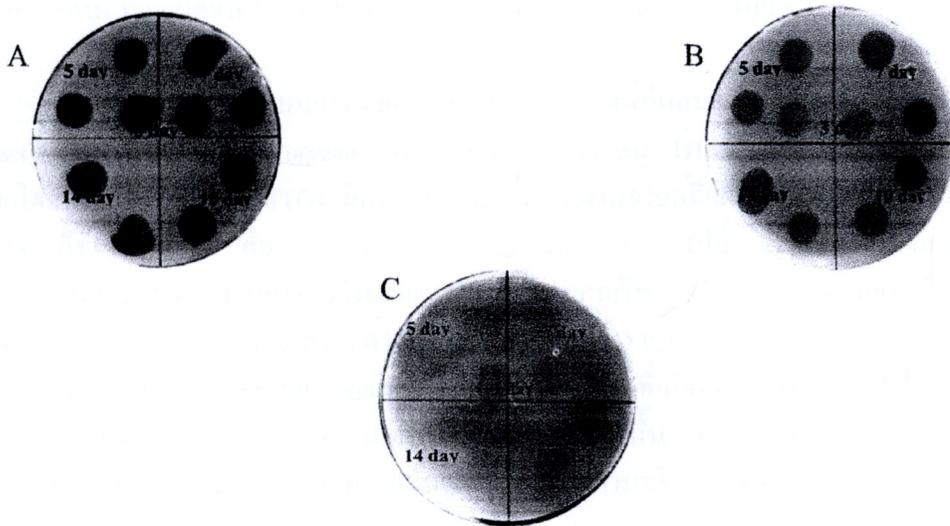
จากการทดลอง พบว่าอัตราการเจริญของราทั้งสองชนิดในอาหารเหลว ที่แสดงผลในรูปแบบน้ำหนักเซลล์ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยยะ นั่นคือราทั้งสองชนิด มีอัตราการเจริญได้ใกล้เคียงกัน และเมื่อพิจารณาถึงค่าความเป็นกรดค่างของน้ำหมัก พบว่าลักษณะการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดค่างของน้ำหมักที่ได้จากราทั้งสองสายพันธุ์ ไม่มีความแตกต่างกันแต่อย่างใด นั้นแสดงให้เห็นว่า ราลูกผสมที่ได้รับยีน *pkSmt* เข้าไป ไม่มีคุณสมบัติทางชีววิทยา (Morphology) ที่เปลี่ยนแปลงไป (รูปที่ 7)



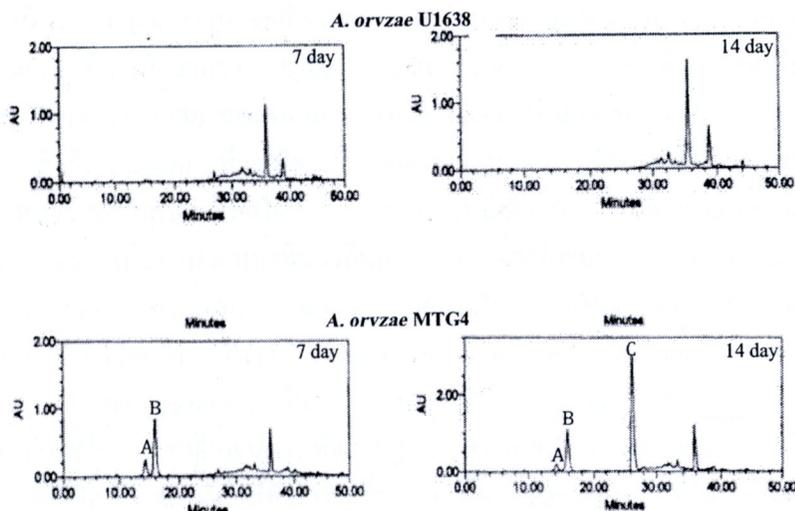
รูปที่ 7 แสดงผลการวิเคราะห์อัตราการเจริญของราลูกผสมและราสายพันธุ์ดั้งเดิมในอาหารเหลวต่อการผลิตสารสกัดหยาบและค่าความเป็นกรดค่างของน้ำหมัก ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการเลี้ยง โดย A) แสดงความสัมพันธ์ ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้งต่อค่าความเป็นกรดค่างของน้ำหมักที่เวลาการเลี้ยงต่าง ๆ และ B) แสดงความแตกต่าง ระหว่างปริมาณน้ำหนักของสารสกัดหยาบที่ได้จากราทั้งสองชนิด ณ เวลาต่าง ๆ

สารสกัดหยาบที่ได้ ณ เวลาต่าง ๆ บางส่วน ถูกแบ่งไปทดสอบการออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ แบคทีเรีย โดยทำการเตรียมสารสกัดหยาบให้มีความเข้มข้นที่ 100 mg/ml H₂O จากนั้นนำไปหยดลงบนเพลต ที่มีเชื้อแบคทีเรียชนิด *E. Coli* และ *S. aureus*

จากนั้นทำการหยดลงเพลตอาหาร จุดละประมาณ 20 μ l นำเพลตอาหารไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 1 วัน จากนั้นติดตามดูการสร้าง clear zone รอบ ๆ จุดที่หยดสารละลายบนเพลตเชื้อ จากการทดลองพบว่า สารสกัดหยาบละลาย ที่ได้จากราลูกผสม สามารถก่อให้เกิดพื้นที่ clear zone บนเพลตเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดได้ทุก ๆ จุดการทดสอบ ในขณะที่ สารสกัดหยาบละลาย จากราสายพันธุ์ดั้งเดิม ไม่สามารถที่จะก่อให้เกิดพื้นที่ clear zone ทั้งที่เป็นเพลตอาหาร ของเชื้อ *E. Coli* หรือ *S. aureus* ได้เลย (รูปที่ 8) นั้นแสดงให้เห็นว่า ภายในส่วนผสมของสารสกัดหยาบที่ได้จากราลูกผสม มีองค์ประกอบบางประการที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งที่เป็น gram negative & positive ได้ อย่างไรก็ตาม เนื่องมาจากในตัวสารสกัดหยาบที่นำมาทดลอง มีองค์ประกอบของสารเมตาบอไลต์ หลากหลายชนิด ซึ่งไม่เป็นที่แน่ชัดว่ามีองค์ประกอบของสารเมตาบอไลต์ชนิดใดอยู่บ้าง ดังนั้น จึงนำสารสกัดหยาบที่ได้ไปวิเคราะห์ แยกองค์ประกอบ ด้วยเทคนิค HPLC ว่าภายในสารผสมทั้งหมด มีสัดส่วนของสารเมตาบอไลต์ชนิดใด เจือปนอยู่มากน้อยเท่าไร ต่อไป



รูปที่ 8 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบ โดยทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อ เมื่อ A) เป็นการทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อ *E. Coli* O157:H7 ของสารสกัดหยาบที่ได้จากราลูกผสม *A. oryzae* MTG4, B) เป็นการทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อ *S. Aureus* ของสารสกัดหยาบที่ได้จากราลูกผสม *A. oryzae* MTG4 และ C) เป็นการทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อ *E. Coli* O157:H7 ของสารสกัดหยาบที่ได้จากราสายพันธุ์ดั้งเดิม *A. oryzae* U1638



รูปที่ 9 แสดงผลการวิเคราะห์รูปแบบการสังเคราะห์สารเมตาบอไลต์ที่ผสมอยู่ในสารสกัดหยาบ ที่แยกได้จากราสายพันธุ์ดั้งเดิมและราลูกผสม ด้วยเทคนิค HPLC

จากการวิเคราะห์รูปแบบการสังเคราะห์สารเมตาบอไลต์ที่ผสมอยู่ในสารสกัดหยาบ (Crude extract) ที่แยกได้จากรา *A. oryzae* MTG4 และ *A. oryzae* U1638 พบว่าในสารสกัดหยาบที่แยกได้จากรา *A. oryzae* MTG4 มีการสังเคราะห์สารเมตาบอไลต์ที่แตกต่างไปจากรา *A. oryzae* U1638 ถึง 3 ชนิด คือ compound A, B และ C (รูปที่ 9) ซึ่งสารทั้งสามชนิดนี้อาจจะเป็นสารออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ตลอดจนมีฤทธิ์ในการฆ่าเซลล์มะเร็งช่องปากและมะเร็งเต้านม ตามผลการวิเคราะห์ Bioassay (ตารางที่ 1) แต่อย่างไรก็ตาม ผลการวิเคราะห์ Bioactivity test ที่ได้ เป็นผลที่เกิดจากสารผสม ซึ่งยังไม่สามารถบ่งชี้ได้ว่าเป็นผลการออกฤทธิ์ของสารเมตาบอไลต์ชนิดใด ดังนั้น ควรมีการแยกสารเมตาบอไลต์ทั้งสามชนิดให้มีความบริสุทธิ์ นอกจากนั้นจะได้นำสารเมตาบอไลต์บริสุทธิ์ที่ได้ ไปวิเคราะห์หาอัตลักษณ์เฉพาะของสาร โดยอาศัยเทคนิคทางด้าน Structural elucidation เพื่อจำแนกว่าสารเมตาบอไลต์ทั้งสามชนิดมีโครงสร้างทางเคมีอย่างไร และมีความสัมพันธ์ กับการทำงานของยีน *pksm1* ที่แยกได้จากรา *Xylaria* sp.BCC1067 ภายใต้การควบคุมการแสดงออกของยีน ดังกล่าวในรา *A. oryzae* MTG4