7. สรุปและวิจารณ์ผล

การวิจัยนี้เป็นการนำผลงานวิจัยที่ได้ดำเนินการบรรลุผลก่อนหน้า มาทำการต่อยอดการวิจัย โดยนำยีน pksmt ที่แยกได้จากรา *Xylaria* sp.BCC1067 [1] มาเชื่อมต่อเข้ากับ vector ที่ถูกดัดแปลงขึ้นใหม่จากงานวิจัย ของอนุวัฒน์ [3] ได้ vector ใหม่คือ pPNGB และ pPNGB-MT ตามลำดับ [5] ซึ่งยีน *pksmt* ที่แยกได้ ยังไม่มีการรายงานผลการศึกษาวิจัย ว่ามีความสัมพันธ์ต่อการสังเคราะห์สารเมตาบอไลต์ชนิดใด แต่จากการวิเคราะห์ โดยอาศัยเทคนิคทางด้าน Bioinformatics tool เพื่อทำนายหน้าที่ของยีนดังกล่าว ด้วยโปรแกรม Conserved Domain Architecture (CDART) พบว่ายีน *pksmt* มีความใกล้เคียงกับการทำงานของยีน *mlcB* ซึ่งสังเคราะห์สาร compactin ในรา *Penicillium citrinum* และใกล้เคียงกับยีน *PKSN* ซึ่งสังเคราะห์สาร alternapyrone ในรา *Alternalia solani* [6] แต่อย่างไรก็ตาม ผลการทำนายหน้าที่ที่ได้ ยังไม่สามารถที่จะระบุ หน้าที่ของยีน pksmt ที่แท้จริงได้ ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงได้นำ vector ที่ดัดแปลงขึ้นใหม่ คือ pPNGB-MT ที่ได้ มาใช้ในการวิจัย เพื่อศึกษาหาหน้าที่ที่แท้จริงของยีน pksmt ภายใต้การควบคุมการแสดงออกในรา *A. oryzae*

เมื่อได้นำ expression vector pPNGB-MT ส่งถ่ายเข้าสู่เซลล์ของรา *A. oryzae* ด้วยเทคนิค Chemical transformation [2] พบว่า สามารถสร้างราลูกผสมชนิดใหม่ที่มียีน *pksmt* ขึ้นมาได้ และเมื่อใช้เทคนิคทางด้าน Molecular เข้ามาจำแนกราลูกผสม เพื่อแยกลักษณะที่ต้องการของราลูกผสมที่เกิดขึ้น ด้วยการอาศัยเทคนิคที่ หลากหลาย เช่น Drug resistant selective, Sounthern hybridization, Western hybridization และ green fluoresent expressing พบว่า สามารถจำแนกราลูกผสมชนิดใหม่ คือ รา *A. oryzae* MTG4 ที่สามารถแสดงคุณบัติที่ต้องการทุกประการได้ เช่น ราลูกผสมสามารถเจริญได้ดีบนอาหารที่มีส่วนผสมของยา Phleomycin และราดังกล่าวสามารถเรืองแสงสีเขียวภายใต้กล้อง Fluorescent microscope ได้ และพบโปรตีนหลอม (Fusion protein) ที่มีขนาดใกล้เคียงกับการคำนวณได้ นอกจากนั้น ยังพบว่าราลูกผสมที่ได้ สามารถผลิตสารเมตาบอไลต์ชนิดใหม่ ที่ไม่พบในราสายพันธุ์ดั้งเดิมได้ และเมื่อวิเคราะห์คุณสมบัติการออกฤทธิ์ของสารเมตาบอไลต์ สกัดหยาบที่แยกได้จากราลูกผสม พบว่าสารสกัดหยาบมีฤทธิ์ในการต้านการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย และมีฤทธิ์ในการฆ่าเซลล์มะเร็งช่องปากได้ และเมื่อศึกษาลักษณะทางกายภาพ ที่เปลี่ยนแปลงไปของราลูกผสม พบว่า การใส่ยีน *pksmt* เข้าไปในเซลล์ของ ราดังกล่าว ไม่มีผลกระทบต่อลักษณะพื้นฐานทางกายภาพของราแต่อย่างใด

แต่อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาราลูกผสมดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้ข้างต้นยังไม่สามารถระบุหน้าที่ที่ชัดเจนของยีน *pksmt* ได้ เนื่องจากยังไม่สามารถระบุได้ว่า สารเมตาบอไลต์ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นได้ในรา *A. oryzae* MTG4 นั่นจัดเป็นสารสังเคราะห์ทุติยภูมิกลุ่มใด (Secondary metabolite) ดังนั้นควรมีการแยกสารเมตาบอไลต์ทั้งสามชนิดดังกล่าวให้บริสุทธิ์ เพื่อนำไปวิเคราะห์หาอัตลักษณ์ของสาร และเนื่องด้วยในการวิจัยนี้ ได้ส่งถ่ายยีน *pksmt* เพียงยีนเดียวเข้าไปในรา *A. oryzae* และได้พิสูจน์แล้วว่าราลูกผสมดังกล่าวมีการผลิตโปรตีนหลอม (fusion *pksmt-gfp* protein) ได้เพียงชนิดเดียวที่มีขนาดของโปรตีนประมาณ 300 kDa แต่กลับพบว่าราลูกผสมที่ได้ สามารถสังเคราะห์สารเมตาบอไลต์ได้ถึง สามชนิด คือ compound A, B

และ C ตามลำดับ (รูปที่ 8) นั้นแสดง ให้เห็นว่า สารเมตาบอไลต์ทั้งสามชนิด น่าจะมีความเกี่ยวข้องกัน ในเชิงกระบวนการสังเคราะห์สารเมตาบอไลต์ (Metabolome) ดังนั้น หากสามารถระบุลักษณะ Biosynthesis pathway ของสารทั้งสามชนิด เพื่อเชื่อมโยงกับรูปแบบการทำงานของยีน *pksmt* ได้ จะสามารถสร้างความสัมพันธ์เชิงการสังเคราะห์ของสารเมตาบอไลต์ ทั้งสามชนิดได้

นอกจากนั้น ในส่วนของผลการออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้ เกิดจากการทดลองโดยใช้สารสกัดหยาบ (Crude extract) ที่ได้จากราลูกผสม *A. oryzae* MTG4 ซึ่งในสารสกัดหยาบที่ใช้ทดลอง มีองค์ประกอบของ สารชนิดอื่น ๆ นอกเหนือจาก compound A, B และ C อยู่มากมายหลายชนิด (ดูผลจากรูปแบบการวิเคราะห์ สารสกัดหยาบด้วยเทคนิค HPLC; รูปที่ 4) ซึ่งยังไม่สามารถระบุได้ชัดเจนว่า การออกฤทธิ์ต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งช่องปากกับออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ได้ เป็นผลเนื่องจากการออกฤทธิ์ของสารเมตาบอไลต์ชนิดใด ดังนั้นจำเป็นที่จะต้องแยกสารเมตาบอลไต์ทั้งสามชนิดให้มีความบริสุทธิ์เพียงพอต่อการนำไปทดสอบหา ความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ

ดังนั้นในการศึกษาวิจัยที่จะทำต่อยอดการวิจัยนี้ ในอนาคตจะเป็นการศึกษาเพื่อแยกบริสุทธิ์สารเมตาบอไลต์ทั้งสามชนิด โดยอาศัยกระบวนการทางเคมีและนำสารบริสุทธิ์ที่ได้ไปวิเคราะห์อัตลักษณ์ของสาร ด้วยเทคนิค Structural Elucidation ตลอดจนนำสารเมตาบอไลต์บริสุทธิ์ที่ได้ไปวิเคราะห์หาคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ต่อเซลล์ทดสอบชนิดต่าง ๆ นอกจากนั้นจะทำการศึกษาหาความสัมพันธ์เชิงหน้าที่ของยีน ต่อการสังเคราะห์สารเมตาบอไลต์ในรูปแบบของ Biosynthesis pathway ของสารเมตาบอไลต์ เพื่อใช้เป็นพื้นฐานของการศึกษากลไกการสังเคราะห์สารเมตาบอไลต์ภายในเซลล์ของราทั้งหมด (Fungal Metabolome) ตลอดจนนำเทคนิคที่พัฒนาขึ้น ไปใช้เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนอื่น ๆ ในรา *Aspergillus* sp. เช่น ยีนกลุ่ม Non-ribosomal peptide synthetase (*NRPS*), Fatty acid synthase (*FAS*) และ polyketide หรือเอ็นไซม์ชนิดอื่น ๆ ได้ในอนาคต