

8. สรุปผลการทดลอง และวิจารณ์ผล

ในการศึกษาวิจัยนี้ ได้นำเชื้อรา *A. oryzae* MTG4 ที่ถูกสร้างขึ้นด้วยกระบวนการทางพันธุวิศวกรรม (Genetics engineering) ภายใต้โครงการวิจัยเรื่อง “การวิเคราะห์หน้าที่ของยีน polyketide synthase ที่คาดว่าจะสามารถผลิตสารลดระดับคอเลสเตอรอลโดยการแสดงออกใน Heterologous fungal host” (ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยในปีงบประมาณ 2551 – 2553) และได้จดสิทธิบัตรเชื้อราดังกล่าวตามคำขอเลขที่ 1003000062 เมื่อวันที่ 2 มกราคม 2553 มาใช้ศึกษาต่อของงานวิจัย

โดยในการศึกษาทดลองนี้ สามารถแยกบริสุทธิ์สารที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นได้ใหม่ในรา *A. oryzae* MTG4 ด้วยกระบวนการทาง Chemical Purification ต่าง ๆ เช่น HPLC, Sephadex Column Chromatography, Silica Column Chromatography และ Semi-prep HPLC column Chromatography เพื่อแยกสารเป้าหมายให้มีความบริสุทธิ์สูงสุด ซึ่งจากการทดลอง ได้นำเชื้อรา *A. oryzae* MTG4 มาเลี้ยงในอาหาร malt extract media (MEB) ในถังหมักขนาด 25 L ในสภาวะการให้อากาศ 200 rpm ที่อุณหภูมิ 25 °C นาน 21 วัน จากนั้นทำการกรองแยกเอาแต่เฉพาะน้ำหมัก เพื่อนำไปสกัดเอาสารสกัดหยาบ (Crude extract) ด้วยการใช้ตัวทำละลาย Ethyl acetate ในสัดส่วน น้ำหมักต่อตัวทำละลาย เป็น 1 : 2 ส่วน และทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแบบสูญญากาศ (Evaporator) ซึ่งจากการทดลอง สามารถสกัดแยกเอาสารสกัดหยาบออกจากน้ำหมักได้มากถึง 1.2 g และเมื่อนำสารสกัดหยาบที่ได้ไปวิเคราะห์แยกองค์ประกอบต่าง ๆ ด้วยเทคนิค HPLC โดยเปรียบเทียบกับเชื้อราสายพันธุ์ดั้งเดิม (*A. oryzae* U1638) พบว่าเชื้อรา *A. oryzae* MTG4 มีสารสังเคราะห์ชนิดใหม่ที่ไม่พบในราสายพันธุ์ดั้งเดิม เพิ่มมากขึ้นถึง 3 ชนิด คือ Compound A, B และ C

เมื่อนำสารสกัดหยาบที่ได้จากรา *A. oryzae* MTG4 มาแยกบริสุทธิ์องค์ประกอบสารต่าง ๆ ออกจากกัน ด้วยกระบวนการ Chemical Purification ข้างต้น พบว่าสามารถแยกบริสุทธิ์ได้เฉพาะสาร Compound A และ B ได้มากถึง 7 mg และ 5 mg ตามลำดับ (ส่วน Compound C ยังอยู่ในระหว่างการดำเนินการวิจัยต่อเนื่องอยู่) และเมื่อนำสารบริสุทธิ์ทั้งสองชนิดข้างต้น ไปวิเคราะห์หาอัตลักษณ์ทางโครงสร้างเคมีของสาร ด้วยกระบวนการ Chemical Elucidation ต่าง ๆ เช่น NMR, 2D-NMR, IR, MS และ UV-Vis spectra พบว่าสารทั้งสองชนิด เป็นสาร analog ซึ่งกันและกัน โดยมีมวลโมเลกุลที่เท่ากันที่ m/z 128 และมีสูตรโมเลกุลคือ $C_8H_{10}O_3$ แต่สารทั้งสองชนิด มีความแตกต่างกันที่หมู่ฟังก์ชัน hydroxyl [-OH] ที่จับกับโครงสร้างหลัก โดย Compound A พบว่าหมู่ hydroxyl [-OH] จับกับคาร์บอนในตำแหน่งที่ 4 ซึ่งเป็นคาร์บอนที่อยู่ในรูป Methyl ทำให้ตำแหน่งบริเวณนี้เรียกรวมกันว่า 4-Hydroxymethyl ส่วน Compound B หมู่ฟังก์ชัน hydroxyl [-OH] จับกับโครงสร้างหลักที่ตำแหน่งคาร์บอนตัวที่ 5 ซึ่งเป็นคาร์บอนในรูปปกติ ดังนั้นทำให้สาร Compound A มีชื่อเรียกทางเคมีว่า 4-(hydroxymethyl)-5,6-dihydropyran-2-one และ Compound B มีชื่อเรียกทางเคมีว่า 5-hydroxy-4-methyl-5,6-dihydropyran-2-one (รูปที่ 12) โดยสารทั้งสองชนิดจัดอยู่ในกลุ่มโพลีคีไทด์ชนิดไพโรน แต่อย่างไรก็ตาม เนื่องจากสารทั้งสองชนิดเป็นสารออกฤทธิ์ชนิดใหม่ ซึ่งไม่พบในฐานข้อมูลเคมี Scifinder ดังนั้นในการวิจัยนี้ จึงยังไม่สามารถคาดการณ์กระบวนการสังเคราะห์สารทั้งสองชนิดได้ว่าเกิดขึ้นได้อย่างไรภายในเซลล์ แต่จากการสืบค้นข้อมูล พบว่าสารไพโรนที่พบทั่ว ๆ ไป สามารถสังเคราะห์ขึ้นได้ด้วยการเชื่อมต่อพันธะระหว่าง Acetyl Co-A 1 unit กับ Malonyl Co-A 2 unit ก่อนที่จะเกิดการ Cyclization เพื่อก่อให้เกิดเป็นวงไพโรน (รูปที่ 13) ภายใต้การทำงานของเอนไซม์กลุ่ม Polyketide Synthase (PKS) และเมื่อนำสารประกอบไพโรนทั้งสองชนิดที่ได้ ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพกับเซลล์เป้าหมายต่าง ๆ พบว่าสารประกอบไพโรนทั้ง A และ B มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งช่องปากและเซลล์มะเร็งเต้านม โดยพบว่าสารประกอบไพโรนชนิด A มีค่าการออกฤทธิ์ (IC_{50}) ที่ดีกว่าสารประกอบไพโรนชนิด B ทั้งนี้เป็นที่น่าสังเกตว่าสารประกอบไพโรนทั้งสองชนิด มีสูตรโมเลกุลและมวลโมเลกุลที่เท่ากัน เพียงแต่แตกต่างกันที่ตำแหน่งของหมู่ hydroxyl ที่เกาะกับวงไพโรนเท่านั้น แต่กลับให้ค่าการออกฤทธิ์ที่ต่างกันอย่างชัดเจน นั้นแสดงให้เห็นว่า หากมีการปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันต่าง ๆ ที่เกาะอยู่กับวงไพโรน น่าจะสามารถเพิ่มหรือลดค่าการออกฤทธิ์ ตลอดจนน่าจะทำให้เกิดผลการออกฤทธิ์ต่อเซลล์ทดลองชนิดอื่น ๆ ได้เป็นอย่างดี

จากการวิจัยของ McGlacken และคณะ [12] ได้มีการรวบรวมการประยุกต์ใช้สารไพโรน เพื่อใช้เป็นยาหรือสารเคมีบำบัดต่าง ๆ เช่นการนำไพโรน ไปเป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารสเตอรอลชนิด Bufaria

ซึ่งมีฤทธิ์ในการรักษาโรคโลหิตจาง หรือสารสเตอรอลชนิด Peripyrone ซึ่งเป็นสารลดระดับคอเรสเตอรอล หรือใช้สังเคราะห์สาร Warfarin ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของ HIV-1 protease ซึ่งใช้เป็นยาค้านไวรัสเอดส์ได้ หรือใช้ไฟโรนเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สาร Arisugacin ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ ACAT (acyl-Coenzyme A: Cholesterol O-acyltransferase) ซึ่งใช้บรรเทาอาการโรคความจำเสื่อมได้ (Alzheimer) นอกจากนี้ไฟโรนเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารเคมีเภสัชต่าง ๆ แล้ว ยังพบว่าสามารถนำสารไฟโรนไปใช้สังเคราะห์ยาปราบศัตรูพืชบางชนิดได้ เช่น การสังเคราะห์สาร Herbarins และ 6-Alkyl-2-pyrone ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราบางประเภท

ซึ่งจากข้อมูลต่าง ๆ ที่ได้ แสดงให้เห็นว่าสารไฟโรน เป็นสารตั้งต้นที่ดี ที่สามารถนำไปประยุกต์เพื่อสังเคราะห์สารออกฤทธิ์อื่น ๆ ได้หลากหลายชนิด เนื่องจากโครงสร้างของไฟโรนเป็นวงแหวนหกเหลี่ยมซึ่งมีความเสถียรทางโครงสร้าง และนอกเหนือจากนั้นแล้ว หมู่ฟังก์ชันต่าง ๆ ภายในวงแหวนไฟโรนมีเพียงไม่กี่ชนิด ดังนั้นสามารถใช้กระบวนการทางเคมีบังคับให้เกิดปฏิกิริยาในตำแหน่งเป้าหมายได้ถูกต้องและแม่นยำได้ ทำให้การออกแบบยาผลิตภัณฑ์ (Drug target) สามารถทำได้ง่ายและได้สารตามต้องการ ซึ่งในการวิจัยนี้สามารถค้นพบสารไฟโรนที่มีโครงสร้างไม่เหมือนไฟโรนทั่วไป และยังไม่มีความรู้ว่ามีผู้ใดเคยค้นพบมาก่อน ซึ่งสารทั้งสองชนิดมีชื่อทางเคมี คือ Compound A: 4-(hydroxymethyl)-5,6-dihydro-pyran-2-one และ Compound B: 5-hydroxy-4-methyl-5,6-dihydro-pyran-2-one ซึ่งผู้วิจัยและคณะ คาดว่าสารใหม่ทั้งสองชนิด จะเป็นประโยชน์ต่อการนำไปใช้เป็นสารตั้งต้น เพื่อสังเคราะห์สารเคมีเภสัชหรือสารออกฤทธิ์ชนิดใหม่ ๆ ได้ ซึ่งคณะผู้วิจัยได้ยื่นจดสิทธิบัตรสาร 4-(hydroxymethyl)-5,6-dihydro-pyran-2-one และ 5-hydroxy-4-methyl-5,6-dihydro-pyran-2-one ไว้กับกรมทรัพย์สินทางปัญญา ตามคำขอเลขที่ 1001000566 เมื่อวันที่ 1 เมษายน 2553 แล้ว