5. ระยะเวลาดำเนินการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นผลงานการวิจัยร่วมระหว่าง สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ (สรบ.) กับศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ศช.) ภายใต้การสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (มจธ.) โดยมีระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย รวม 1 ปี เริ่มโครงการตั้งแต่ ตุลาคม 2553 - กันยายน 2554 และได้รับงบประมาณตลอดโครงการวิจัยรวม 526,500 บาท (ห้าแสนสองหมื่นหกพันห้าร้อยบาทถ้วน)

ขั้นตอนการวิจัย	ปีงบประมาณ 2554
	เดือนที่ 1 - 4 / เดือนที่ 5 - 8 / เดือนที่ 9 - 12
1) ทำการเลี้ยงรา *A. oryzae* MTG4 ในถังหมักขนาด 50 – 100 ลิตร	⟷
2) แยกสกัดเอาสารสกัดหยาบที่ได้จากการเลี้ยงตามข้อ 1 และวิเคราะห์สารสกัดหยาบที่ได้ด้วยเทคนิค HPLC เปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบที่ได้จาก *A. oryzae* U1638	⟷
3) แยกสารสกัดหยาบตามข้อ 2 ให้มีความบริสุทธิ์ด้วยกระบวนการ Chemical purification	⟷
4) วิเคราะห์หาอัตลักษณ์โครงสร้างทางโมเลกุลของสารบริสุทธิ์ที่ได้ด้วยเทคนิคทาง Chemical spectrograph ต่าง ๆ ดังนี้	
- Thin Layer Chromatography (TLC)	
- HPLC	⟷
- NMR	
- MS	
- UV-Visible spectrograph	
- IR	
5) ทำนายและแปรผลเพื่อหาโครงสร้างโมเลกุลของสาร	⟷
6) วิเคราะห์คุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด	⟷
7) สรุปผลและจัดทำรายงานการทดลองฉบับสมบูรณ์	⟷

6. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้นำรา *A. oryzae* สายพันธุ์ MTG4 ซึ่งเป็นราที่ถูกดัดแปลงพันธุกรรมให้มียีน *pksmt* ที่แยกได้จากรา *Xylaria* sp.BCC 1067 ด้วยกระบวนการทางอณูพันศาสตร์ (Genetics engineering) ซึ่งราสายพันธุ์ดังกล่าว ถูกสร้างขึ้นจากผลงานวิจัยเรื่อง "การวิเคราะห์หน้าที่ของยีน polyketide synthase ที่คาดว่าจะสามารถผลิตสารลด ระดับคอเลสเตอรอล โดยการแสดงออกใน heterologous fungal host" (รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ ปีงบประมาณ 2552 – 2553) มาใช้ต่อยอดศึกษาวิจัย โดยได้ทำการเลี้ยงรา *A. oryzae* MTG4 เปรียบเทียบกับราสายพันธุ์ดั้งเดิม (U1638) ในสภาวะควบคุมการทดลองในห้องปฏิบัติการ เพื่อควบคุมให้ราทั้งสองชนิดสังเคราะห์สาร Secondary metabolite โดยทำตรวจสอบความแตกต่างของสารสกัดหยาบที่ได้ด้วยเทคนิค HPLC จากนั้นจะแยกสาร matabolite ที่พบว่าแตกต่างกันให้มีความบริสุทธิ์ขึ้นด้วยกระบวนการทาง Chemical purification เพื่อให้ได้สาร matabolite ที่มีความบริสุทธิ์มากที่สุด โดยสารที่ได้จะถูกนำไปวิเคราะห์หาอัตลักษณะทางเคมีด้วยกระบวนการทาง chemical elucidation ต่าง ๆ ตลอดจนแบ่งสารบริสุทธิ์ที่ได้ส่วนหนึ่ง ไปวิเคราะห์หาคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทาง ชีวภาพต่าง ๆ โดยกระบวนการทดลองทั้งหมดที่กล่าวมา ทำได้ตามขั้นตอนดังนี้

6.1 จุลินทรีย์และสภาวะการเลี้ยง

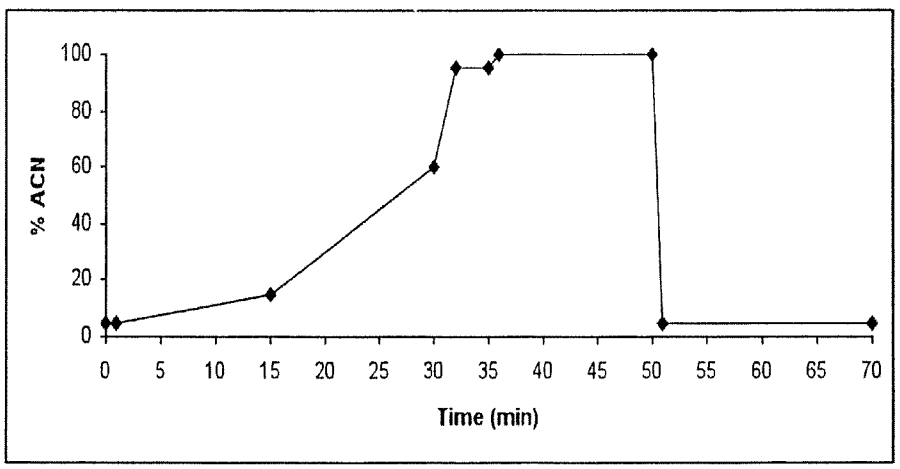
ราที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือรา *A. oryzae* MTG4 เป็นราที่ถูกสร้างขึ้นด้วยกระบวนการทางพันธุวิศวกรรมจากผลงานวิจัย เรื่อง ""การวิเคราะห์หน้าที่ของยีน polyketide synthase ที่คาดว่าจะสามารถผลิตสารลดระดับคอเลสเตอรอล โดยการแสดงออกใน heterologous fungal host" (รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ ปีงบประมาณ 2552 – 2553) โดยทำการเลี้ยงเทียบกับรา *A. oryzae* U1638 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ดั้งเดิมในอาหารมอลต์สกัด (malt extract) ที่อุณหภูมิ 25°C 200 rpm นาน 2 – 3 สัปดาห์ จากนั้นนำอาหารหมักที่ได้มาแยกเอาเฉพาะส่วนอาหารเหลวด้วยการกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 ส่วนน้ำหมักที่ได้ จะนำไปสกัดแยกเอาสารสกัดหยาบออกด้วยตัวทำละลาย Ethyl acetate

การเตรียมหัวเชื้อสปอร์ราเพื่อใช้ในงานวิจัย ทำโดยการเลี้ยงรา *A. oryzae* ในอาหารวุ้นแข็งของ Malt extract บ่มที่อุณหภูมิ 25°C นาน 5 – 7 วัน ก่อนที่จะขูดสปอร์ให้ละลายในสารละลาย 0.1% Tween20 โดยอาหารเหลว malt extract ที่ใช้ในงานทดลองจะใช้หัวเชื้อสปอร์ราเข้มข้น 10^7 spore/50 ml media และเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ปริมาณ 25 – 30 ลิตร

6.2 การตรวจวิเคราะห์ราทรานส์ฟอร์เมนที่สังเคราะห์สารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ด้วยเทคนิคเฮชพีเอลซี (HPLC) และสภาวะการเลี้ยงเชื้อและการสกัดสาร

ทำการเก็บอาหารเหลวหมักที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ (Culture broth) ไปสกัดเอาสารทุติยะภูมิ (secondary metabolites) โดยการนำอาหารเหลวหมักที่ครบกำหนดเวลาไปกรองแยกกากเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยกระดาษกรอง (Whatman No.1) จากนั้นนำอาหารเหลวที่ผ่านการกรองไปผสมกับตัวทำละลายเอธิลอะซิเทต (Ethyl acetate) ในสัดส่วน 1 ต่อ 2 เขย่าให้ส่วนผสมเข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เกิดการแยกชั้นของส่วนผสม ทำการเก็บชั้นของ ethyl acetate ที่อยู่ด้านบน (top phase) ไว้ จากนั้นเติมผงแมกนีเซียมซัลเฟต (Magnesium Sulfate anhydrate, $MgSO_4$) ลงไปเพื่อดูดน้ำออกจากตัวทำละลาย Ethyl acetate ประมาณ 2 – 3 กรัมต่อ 300 มิลลิลิตรสารละลาย เขย่าให้ทั่ว ๆ (ให้สังเกตุว่าสารละลายจะใสขึ้น) จากนั้นทำการกรองด้วยกระดาษกรองเพื่อแยกตะตอน $MgSO_4$ ออกไป แล้วนำสารละลายที่ได้ไปทำให้แห้งด้วยการระเหยภายใต้ความดันต่ำด้วยเครื่องระเหยอิเวปเพอเลเตอร์ (Rotary Evaporator)

เมื่อผ่านการระเหยเอาสารละลายออกไปจะเหลือตะกอนสารอยู่บริเวณรอบ ๆ ก้นขวด ทำการละลายตะกอนเหล่านั้นด้วย 1 มิลลิลิตรของ 100% Methanol จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีเฮชพีเอลซี (HPLC) โดยใช้รูปแบบการแยกสารด้วยคอลัมน์ (column) ชนิด reverse phase C18 และใช้ตัวทำละลายพา (mobile phase) ที่แปรผันความเข้มข้นของเปอร์เซ็นสาร Acetonitrile (ACN) เริ่มตั้งแต่ 5% ถึง 100% (ตามรูปที่ 1)



รูปที่ 1 แสดงรูปแปรผันความเข้มข้นของสารละลาย Acetonitrile ที่ผ่านเข้าเครื่อง HPLC

ตามระยะเวลาต่าง ๆ ของการทดลอง

ซึ่งจะทำการฉีดสารสกัดปริมาณ 10 – 20 ไมโครลิตร เข้าไปในเครื่อง HPLC (Waters HPLC System 600 pump and controller, 996 PDA detector) จากนั้นวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้ของราเอ็มทีจีทรานส์ฟอร์เมน (MTG transformant) เปรียบเทียบกับราต้นแบบ (*A. oryzae* U1638)

6.3 สภาวะการแยกบริสุทธิ์สารสังเคราะห์ทุติยะภูมิ

การแยกสารบริสุทธิ์จากขบวนการสังเคราะห์ทุติยะภูมิที่ได้จากการเลี้ยงรา *A. oryzae* MTG4 จะทำการเลี้ยงราในอาหาร เหลวมอลต์สกัด (malt extract media) จำนวน 25 ลิตร โดยใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้นที่ 10^8 สปอร์ต่ออาหารหนึ่งลิตร ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 °C ที่อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที นาน 21 วัน จากนั้นทำการกรองเก็บเฉพาะอาหารเหลว นำไปสกัดแยกเอาสารด้วยวิธีตามข้อที่ 6.1 โดยใช้ตัวทำละลายเอธิลอะซิเทต (ethyl acetate) จำนวน 50 ลิตรในการสกัด ทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแบบสูญญากาศ (evaporator) ซึ่งจะได้สารสกัดหยาบ (Crude extract) หนักประมาณ 3 กรัม

สารสกัดหยาบจะถูกนำไปผ่านกระบวนการแยกเพื่อทำให้สารบริสุทธิ์ โดยทั่วไปตัวอย่างจะถูกแยกด้วยคอลัมน์ (Column) โดยเทคนิคที่เรียกว่า คอลัมน์โครมาโตกราฟี (Column Chromatography) วิธีการนี้มีคอลัมน์ให้เลือกใช้หลายประเภทขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของสารที่ต้องการสกัด อย่างเช่นคอลัมน์ Sephadex LH20 คอลัมน์ขนาด 2.5 x 51 เซนติเมตร (cm) สามารถแยกสารได้ตามขนาดของโมเลกุลโดยใช้เมทานอล (Methanol, MeOH) เป็นตัวชะพาสารให้เคลื่อนที่ ทำการเก็บส่วนใสที่ผ่านคอลัมส์ทุก ๆ 10 นาที จะได้ส่วนใสประมาณ 20 มิลลิลิตรต่อแฟคชั่น หลังจากนั้นจะอาศัยเทคนิค thin layer chromatography (TLC) เพื่อใช้ในการตรวจสอบและรวบรวมส่วนสกัด (fractions) ที่มีสารคล้ายคลึงกันโดยการส่องดูด้วยแสง UV ความยาวคลื่น 254 nm หรือ 210 nm

จากนั้นจะทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ขั้นต่อไป โดยอาศัยคุณสมบัติในการละลายหรือคุณสมบัติการมีขั้วของสารด้วยการแยกผ่านซิลิก้าคอลัมน์ (Silica column) ซึ่งทำการชะสารที่ถูกแพ็คในซิลิก้าคอลัมส์ด้วย 100% ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane, CH_2Cl_2) และเก็บสารแต่ละส่วน (fraction) ประมาณ 100 มิลลิลิตรต่อการเก็บ ซึ่งจะทำการเปลี่ยนสารชะ โดยใช้สารไดคลอโรมีเทนที่ผสมกับเมทธานอล (CH_2Cl_2: MeOH) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ 2 4 6 8 และ 10% ตามลำดับ โดยทำการเก็บส่วนใส ทุก ๆ 30 มิลลิลิตร หลังจากชะด้วยไดคลอโรมีเทนที่มี 10% ของเมทานอลแล้วจะชะสารออกจากคอลัมส์ครั้งสุดท้ายด้วย 100% Methanol นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

6.4 การวิเคราะห์อัตลักษณ์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

เมื่อได้สารบริสุทธิ์ที่มีปริมาณน้ำหนักที่เพียงพอ (ประมาณ 3 – 5 mg) จะทำการนำสารบริสุทธิ์ที่ได้ไปวิเคราะห์หาอัตลักษณ์ของสาร โดยใช้กระบวนการและเทคนิคต่าง ๆ ดังนี้

1) เทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) ซึ่งจะใช้หลักการของโมเมนต์แม่หล็กและปรากฏการณ์นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ของ ^1H และ ^{13}C ในการหาโครงสร้าง ทางเคมีโดยใช้ค่า chemical shifts ในการคำนวนเพื่อสร้าง framework ของโมเลกุล เทคนิค NMR ถือได้ว่าเป็นเครื่องมือที่มี ความสำคัญสูงในการใช้พิสูจน์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ ค่า chemical shifts ของ ^1H และ ^{13}C จาก 1D NMR สามารถใช้ทำนายประเภทพันธะเคมีของโปรตอนและคาร์บอนในขั้นต้นได้ การประกอบโครงสร้างของโมเลกุลจำเป็นต้องใช้เทคนิค ของ 2D NMR (HMQC, HMBC, COSY, NOESY) ซึ่งมีความละเอียดซับซ้อนเพิ่มมากยิ่งขึ้น การวิเคราะห์ข้อมูล โดยใช้เทคนิคเหล่านี้สามารถให้รายละเอียดการเชื่อมต่อทางพันธะเคมีของโปรตอนและคาร์บอนรวมถึง stereochemistry ของโมเลกุล

2) High Resolution mass spectroscophe (HR-MS) อาศัยหลักการในการตรวจวัดมวลแบบ High Resolution เพื่อใช้คำนวนหาสูตรโครงสร้างเคมีของสารบริสุทธิ์ ซึ่งมีความจำเป็นในการพิสูจน์โครงสร้าง

ของโมเลกุล และใช้ในการยืนยันความถูกต้องของโครงสร้างที่ได้มาว่าตรงกับสูตรเคมีหรือไม่

3) อินฟราเรด (IR) สเปกโตรสโคปีจะใช้ตรวจวัดประเภทการสั่นของพันธะเคมีภายในโครงสร้างของโมเลกุลสาร ซึ่งมีประโยชน์ในการพิสูจน์และยืนยัน functional groups ในโครงสร้างของโมเลกุล

4) UV-Visible สเปกโตรสโคปี ใช้วัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 190 - 1100 นาโนเมตรของสารเคมีที่ละลายได้ในตัวทำละลาย เพื่อคำนวนหาความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนสูงสุด เนื่องจากกลุ่มพันธะเคมีต่าง ๆ ภายในโครงสร้างโมเลกุล จะมีความสามารถในการดูดกลืนแสง UV ที่ความยาวคลื่นที่แตกต่างกัน ซึ่งข้อมูลของ UV-Visible สเปกโตรสโคปีที่ได้ จะสามารถนำมาใช้ในการจำแนก functional groups บางส่วนในโครงสร้างของโมเลกุลได้

5) Polarimeter เป็นเครื่องวัดค่า polarization ของตัวอย่าง ซึ่งเรียกว่าค่าออปติคอลโรเทชัน (Optical Rotation) สารที่มีคุณสมบัติในการบิด plane of polarized light เท่านั้นที่สามารถแสดงค่าออปติคอลโรเทชันได้ ซึ่งค่า specific rotation นี้เป็นคุณสมบัติทางกายภาพคล้ายกับจุดเดือดของสารตัวอย่าง ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของสารแต่ละชนิดดังนั้นเทคนิคนี้ จึงสามารถนำมาใช้ในการยืนยันเอกลักษณ์ทางเคมีของสารได้ และค่าออปติคอลโรเทชันจะมีความสัมพันธ์กับความบริสุทธิ์ (องค์ประกอบในส่วนผสม) และความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ไม่บริสุทธิ์เพียงพอจะทำให้การวัดค่าออปติคอลโรเทชันคลาดเคลื่อน และได้ผลวิเคราะห์ที่ไม่สามารถเชื่อถือได้

ข้อมูลของสารบริสุทธิ์ที่ผ่านการวิเคราะห์อัตลักษณ์ตามกระบวนการต่าง ๆ นั้นจะถูกนำไปแปลผลเพื่อสร้างรูปแบบ (Model) ของโครงสร้างโมเลกุลของสาร โดยใช้ chemical jigsaw ในการสร้างแบบจำลอง

6.5 การวิเคราะห์คุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

สารบริสุทธิ์ที่แยกได้จะถูกนำไปวิเคราะห์หาคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bio-assay) โดยวิเคราะห์คุณสมบัติในการต้านแบคทีเรีย (Antibacteria) รา (antifungal) คุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง (anti-tumor) คุณสมบัติในการฆ่าแมลงศัตรูพืช (anti-pesticide) ฯลฯ โดยจะทำการส่งไปวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioassay Lab) ของศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ศช.)