รายงานโครงการวิจัย

การผลิตสารทุติยภูมิออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

Production of Bioactive Secondary Metabolites from Microbial to Promote Plant Growth

กรมวิชาการเกษตร

นางสาวภรณี สว่างศรี
Paranee Sawangsri

ปี พ.ศ. 2565

รายงานโครงการวิจัย

การผลิตสารทุติยภูมิออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

Production of Bioactive Secondary Metabolites from Microbial to Promote Plant Growth

กรมวิชาการเกษตร

นางสาวภรณี สว่างศรี

Paranee Sawangsri

ปี พ.ศ. 2565

คำปรารภ

ปัจจุบันมีการศึกษา คิดค้น และพัฒนาสารทุติยภูมิออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นผลผลิตจากจุลินทรีย์เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในด้านการแพทย์ อุตสาหกรรมอาหาร สิ่งแวดล้อม พลังงาน และการเกษตรอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งการปลูกพืชในระบบเกษตรอินทรีย์ สารทุติยภูมิออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์จึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการแก้ไขปัญหาสารพิษตกค้างในพืชผลการเกษตรที่มีความปลอดภัยและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ทั้งยังเป็นการอนุรักษ์ เพิ่มมูลค่า และใช้ประโยชน์จากความหลากหลายทางพันธุกรรมที่มีอยู่ภายในประเทศอย่างคุ้มค่าและยั่งยืน สอดรับกับแนวทางการพัฒนาประเทศด้วยนโยบาย BCG เพื่อให้สามารถนำนวัตกรรมที่ได้จากความหลากหลายทางชีวภาพไปประยุกต์ใช้ในเชิงพาณิชย์ ก่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อภาคการเกษตร สังคม และสิ่งแวดล้อม อันจะนำไปสู่การพัฒนาประเทศที่มีความยั่งยืนต่อไป

โครงการวิจัย การผลิตสารทุติยภูมิออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช มีเป้าหมายในการนำเทคโนโลยีชีวภาพขั้นสูงมาใช้ในการพัฒนากระบวนการผลิตกรดอะมิโนลีวูลินิค (ALA) และสารเมลาโทนินจากจุลินทรีย์ เพื่อลดขั้นตอนการผลิตและพัฒนาให้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น อาทิ เช่น การทำให้เกิดการกลายพันธุ์ การโคลนยีน ตัดต่อยีนเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตสารชีวภาพนั้นๆ ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับโปรตีน ซึ่งเป็นวิธีการที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในวงการแพทย์ เพื่อการนำสารเหล่านี้ไปใช้ประโยชน์อย่างเต็มประสิทธิภาพในอนาคต โดยการพัฒนางานวิจัยเหล่านี้สามารถที่จะต่อยอดสู่การใช้ประโยชน์ได้จริงทั้งในเชิงวิชาการ อีกทั้งยังเป็นแนวทางในการพัฒนาต่อยอดหรือขยายผลในเชิงพาณิชย์ได้

คณะผู้วิจัยฯ คาดหวังเป็นอย่างยิ่งว่า โครงการวิจัยฯ นี้ จะให้ความรู้ และเป็นประโยชน์ต่อผู้อ่านทุกท่าน ให้สามารถนำความรู้ไปประยุกต์ใช้ให้เกิดผลสัมฤทธิ์ต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ 5
ผู้วิจัย 6
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ 7
บทนำ 8
บทคัดย่อ 11
กิจกรรมงานวิจัยที่ 1 การพัฒนาการผลิตสารทุติยภูมิออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์โดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช 14
กิจกรรมงานวิจัยที่ 2 การผลิตและการใช้ประโยชน์ของสารเมลาโทนินจากจุลินทรีย์การเพื่อส่งเสริมเจริญเติบโตของพืชในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม 55
บทสรุปและข้อเสนอแนะ 88
บรรณานุกรม 89

กรมวิชาการเกษตร

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัย การผลิตสารทุติยภูมิออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ดำเนินงานภายใต้แผนงานวิจัย การวิจัยและพัฒนาการอนุรักษ์และใช้ประโยชน์จากความหลากหลายทางชีวภาพของพืชและจุลินทรีย์ เพื่อเพิ่มมูลค่าและพัฒนานวัตกรรม แผนงานย่อย การพัฒนาประสิทธิภาพการผลิตเห็ดและจุลินทรีย์เพื่อใช้ประโยชน์เชิงพาณิชย์ ดำเนินงานในปีงบประมาณ 2562 - 2564 โดยได้รับการสนับสนุนในการจัดสรรงบประมาณให้ดำเนินการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.)

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) ที่จัดสรรงบประมาณเพื่อสนับสนุนโครงการวิจัยในครั้งนี้ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ปฏิบัติงานวิจัย โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความร่วมมือของคณะผู้วิจัยทุกท่าน การให้คำแนะนำ กลั่นกรอง และช่วยเหลือแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ จากผู้อำนวยการแผนงานวิจัย นางขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ คณะผู้เชี่ยวชาญ คณะกรรมการที่ปรึกษาวิชาการ จึงขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบคุณ ดร.กฤตยา เพชรผึ้ง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับคุณสมบัติและการวิเคราะห์ปริมาณสาร และ นายอนุสรณ์ เทียนศิริฤกษ์ กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร ในการวิเคราะห์ค่า EC ของดิน

ขอขอบคุณคณะผู้วิจัยทุกท่าน นายคำแหง แก้งคำ และนางสาวดิณนภา แก้วแดง ผู้ช่วยวิจัย ที่ให้ความร่วมมือและทำงานวิจัยอย่างมุ่งมั่น ส่งผลให้การดำเนินงานบรรลุวัตถุประสงค์ สนับสนุนให้งานวิจัยสามารถถ่ายทอดองค์ความรู้สู่ผู้ใช้ประโยชน์ ตลอดจนรวบรวมและจัดทำรายงานผลการวิจัยเสร็จสิ้นเรียบร้อย ส่งผลให้โครงการวิจัยประสบผลสำเร็จลุล่วงสมบูรณ์

(นางสาวภรณี สว่างศรี)
หัวหน้าโครงการวิจัยฯ

กรมวิชาการเกษตร

ผู้วิจัย

นางสาวภรณี สว่างศรี	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ	หัวหน้าโครงการ
นางนัยเนตร เจริญสันติ ทานากะ	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ	ผู้ร่วมวิจัย
นางสาวอรุโณทัย ซาววา	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ	ผู้ร่วมวิจัย
นางสุภาวดี ง้อเหรียญ	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ	ผู้ร่วมวิจัย
นางสาวศุภลักษ์ สัตยสมิทสถิต	ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก กองวิจัยพัฒนาเมล็ดพันธุ์	ผู้ร่วมวิจัย

กรมวิชาการเกษตร

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

E.Coli	*Escherichia coli*
IPTG	Isopropyl-***β***-*D*-thiogalactoside
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CDS	coding sequence
DMSO	dimethylsulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
DW	distrilled water
LB	Luria-Bertani
MDA	Malondialdehyde
MS	Murashige&Stoog
PAGE	poly-acrylamide gel electrophoresis
PCR	polymerase chain reaction
PEG	polyethylene glycol
rpm	revolution per minute
SDS	sodium lauryl sulfate
Tween20	polyoxyethylene(20)Sorbitan Monolaurate

กรมวิชาการเกษตร

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของโครงการวิจัย

จุลินทรีย์เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม ปัจจุบันจึงมีการศึกษา คิดค้น และพัฒนาสารทุติยภูมิออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นผลผลิตจากจุลินทรีย์เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในด้านการแพทย์ อุตสาหกรรม อาหาร สิ่งแวดล้อม พลังงาน และการเกษตรอย่างแพร่หลาย ในระบบการผลิตพืชมีความสัมพันธ์กับจุลินทรีย์โดยตรง สารทุติยภูมิออกฤทธิ์ทางชีวภาพมีบทบาทสำคัญในระบบการทำการเกษตรกรรมในยุคใหม่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการปลูกพืชในระบบเกษตรอินทรีย์ เนื่องจากปัญหาการตกค้างของสารเคมีในผลผลิตเกษตร จึงมีการนำสารชีวภาพจากจุลินทรีย์มาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ทางการเกษตร

สารทุติยภูมิออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิดสามารถนำไปใช้ในการควบคุมและกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชได้ กรด 5-อะมิโนลีวูลินิค (ALA) และ เมลาโทนิน เป็นสารที่ได้รับความสนใจจากนักวิจัยอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน เนื่องจากเป็นสารที่มีศักยภาพสูงในการใช้เป็นสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช โดยสาร ALA นั้นสามารถนำมาใช้ประโยชน์ด้านการเกษตรได้หลากหลาย อาทิ เป็นสารกระตุ้นการเจริญเติบโต เพื่อทดแทนสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (Plant Growth Regulator, PGR) โดยสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสและการสร้างรงควัตถุ นอกจากนี้หากใช้ในปริมาณความเข้มข้นสูงยังสามารถใช้ทดแทนสารกำจัดวัชพืชและสารกำจัดแมลงได้โดยไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ ส่วนสารเมลาโทนิน สามารถเพิ่มความต้านทานของพืชต่อความเครียดจากสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่างๆ เช่น การขาดน้ำ ความร้อน ดินเค็ม เป็นต้น จึงถือได้ว่าเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชชนิดหนึ่ง ซึ่งเป็นแนวทางในการนำมาประยุกต์ใช้ในภาคการเกษตรกรรมเพื่อทุเลาปัญหาผลผลิตตกต่ำจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพอากาศในอนาคตได้ ซึ่งจะเป็นการพัฒนากระบวนการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรแบบยั่งยืน เพื่อลดต้นทุนการผลิตให้กับเกษตรกร ลดปัญหาการตกค้างของสารเคมีในผลผลิตเกษตร โดยเฉพาะอย่างยิ่งเพื่อการผลิตอาหารที่ปลอดภัย สามารถสร้างความเชื่อมั่นให้กับผู้บริโภคและยังช่วยฟื้นฟู บำรุง รักษาสิ่งแวดล้อมให้คงอยู่ในสภาพที่สมดุลตลอดไป

โครงการวิจัยนี้ยังเป็นการผลักดันและต่อยอดงานวิจัยของหน่วยงานไปสู่การพัฒนาสารทางเลือกใหม่ส่งเสริมการพัฒนาระบบการเกษตรแบบยั่งยืน ลดการใช้สารเคมี การผลิตสารชีวภาพซึ่งเป็นสารที่มีศักยภาพซึ่งสามารถส่งเสริมให้เป็นทางเลือกของเกษตรกรในการใช้สารชีวภาพที่มีความปลอดภัยสูง ทดแทนการใช้สารเคมีเกษตรซึ่งเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตและสภาพแวดล้อม

วัตถุประสงค์

1) เพื่อศึกษาและพัฒนาการผลิตสารชีวภาพ กรด 5-อะมิโนลีวูลินิค (ALA) และ สารเมลาโทนินโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ

2) เพื่อศึกษาคุณสมบัติของสาร สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสาร ALA และเมลาโทนิน เพื่อการนำไปใช้ประโยชน์เป็นสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

3) เพื่อศึกษาและทดสอบประสิทธิภาพของสาร ALA และเมลาโทนินในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและเพิ่มความต้านทานของพืชต่อความเครียดจากสภาวะดินเค็ม และการขาดน้ำ

วิธีการวิจัย

โครงการวิจัย **การผลิตสารทุติยภูมิออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช** มุ่งเน้น การพัฒนากรรมวิธีการผลิตสารชีวภาพ กรด 5-อะมิโนลีวูลินิค (5-aminolevulinic acid; ALA) และการสังเคราะห์สารเมลาโทนินในพืชโดยอาศัยเทคนิคการโคลนยีน การสร้างรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอเพื่อการถ่ายฝากเข้าสู่

ระบบเซลล์ยีสต์และแบคทีเรียเจ้าบ้าน (*Escherichia coli*) เพื่อการพัฒนาและเพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการผลิตสารชีวภาพดังกล่าว โดยยังเป็นการผลักดันและต่อยอดงานวิจัยของหน่วยงานไปสู่การพัฒนาให้ถึงเกษตรกรผู้ใช้ประโยชน์ มีระยะเวลาดำเนินโครงการ 3 ปี (ปี 2562-2564) ประกอบด้วย 2 กิจกรรม 4 การทดลอง ดังนี้

<u>กิจกรรมที่ 1</u> การพัฒนาการผลิตสารทุติยภูมิออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์โดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ประกอบด้วย 2 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 1.1 การผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิก โดยรีคอมบิแนนท์ *E. coli*

การทดลองที่ 1.2 การศึกษาประสิทธิภาพของกรด 5-อะมิโนลีวูลินิคเพื่อการประยุกต์ใช้ทางการเกษตร

<u>กิจกรรมที่ 2</u> การผลิตและการใช้ประโยชน์ของสารเมลาโทนินจากจุลินทรีย์เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ประกอบด้วย 2 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 2.1 การผลิตสารเมลาโทนินจากจุลินทรีย์เพื่อควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

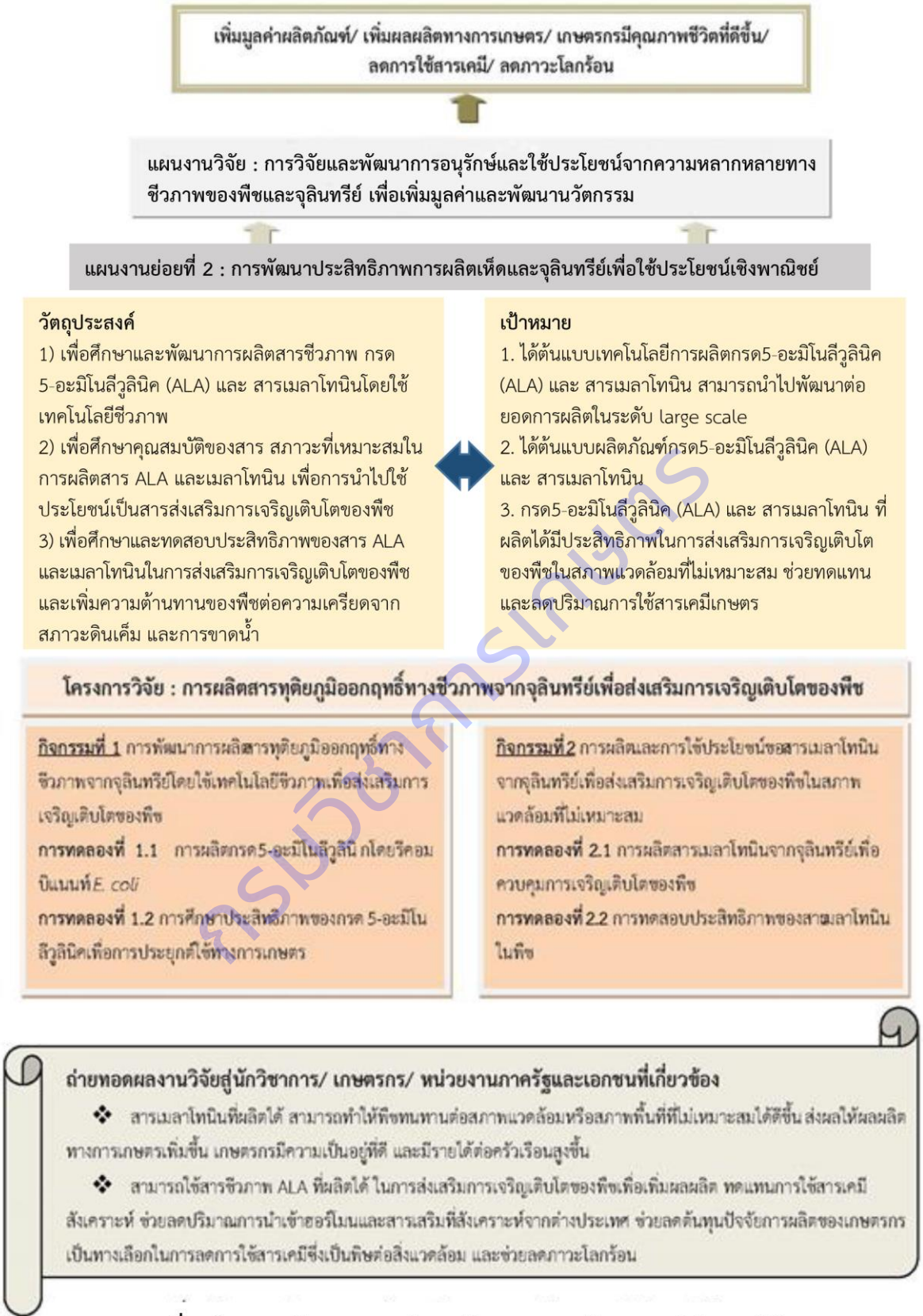
การทดลองที่ 2.2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารเมลาโทนินเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม

กิจกรรมที่ 1 การพัฒนาการผลิตสารทุติยภูมิออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์โดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ดำเนินในปี 2562-2564 ศึกษาและพัฒนาการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิค (ALA) จากจุลินทรีย์โดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ การโคลนยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการผลิตและการถ่ายฝากยีนในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* เพื่อกระตุ้นการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน การพัฒนากรรมวิธีการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิค (ALA) ให้ได้ปริมาณมากและร่นระยะเวลาในการผลิตให้เร็วขึ้น การขยายการผลิตในระดับถังหมักเพื่อลดต้นทุน การทดสอบประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ศึกษาการยับยั้งการเจริญของวัชพืช และการควบคุมการเจริญของหนอนกระทู้ การพัฒนาผลิตภัณฑ์กรด 5-อะมิโนลีวูลินิครูปแบบผงแห้ง ศึกษาวิธีการเก็บรักษา ตลอดจนความคงตัวของสาร เพื่อให้สามารถนำไปขยายผลสู่การใช้ประโยชน์และสามารถต่อยอดการผลิตในระดับ large scale ต่อไป

กิจกรรมที่ 2 การผลิตและการใช้ประโยชน์ของสารเมลาโทนินจากจุลินทรีย์เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ดำเนินในปี 2563-2564 ศึกษาการผลิตสารเมลาโทนิน โดยการพัฒนาเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* ให้สามารถผลิตสารเมลาโทนิน ด้วยการโคลนยีนที่ควบคุมการทำงานของเอนไซม์ 2 ชนิดที่ทำหน้าที่สังเคราะห์เมลาโทนินจากพืชและสัตว์ ถ่ายฝากรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ และกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน ศึกษาปัจจัยในการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่มีผลต่อการแสดงออกของโปรตีนและปริมาณของสารเมลาโทนินที่ผลิตได้ การทดสอบประสิทธิภาพของสารโดยวิธีการทางเคมีวิเคราะห์ และ bioassay การเพิ่มความต้านทานของพืชต่อความเครียดจากสภาวะดินเค็ม และการขาดน้ำ

อย่างไรก็ตาม ขอบเขตของการดำเนินงานวิจัยในโครงการฯ ยังครอบคลุมถึงการทดสอบประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เพื่อให้สามารถนำไปขยายผลสู่การใช้ประโยชน์และสามารถต่อยอดการผลิตในระดับ large scale ต่อไป

กรมวิชาการเกษตร



ภาพความเชื่อมโยงของวัตถุประสงค์และเป้าหมายของโครงการวิจัยภายใต้แผนงาน

กรมวิชาการเกษตร

บทคัดย่อ

กรด 5-อะมิโนลีวูลินิค (5-aminolevulinic acid; ALA) และเมลาโทนิน เป็นสารชีวภาพที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านการเกษตรเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ทดแทนการใช้สารเคมี และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาสารชีวภาพกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกและ เมลาโทนินโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ การผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกจากรีคอมบิแนนท์ *E. coli* เพื่อใช้ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช การสร้างรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอของยีน *hem* A ซึ่งเกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์ 5-aminolevulinic acid synthase (ALAS) โคลนได้จากเชื้อ *Rhodobacter* sp ซึ่งมีลำดับเบส 1,224 bp กระตุ้นการแสดงออกของโปรตีนโดยเชื่อมต่อยีนเข้าสู่โปรตีนเวคเตอร์ pLATE52 เมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์ แล้วแปรรหัสเป็นลำดับเปปไทด์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank พบว่า มีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของ 5-aminolevulinate synthase ของ *R. sphaeroides* โดยมีลำดับของเปปไทด์เท่ากับ 407 อะมิโน แอซิด (Accession No. WP_011337894.1 ที่ identity 100 เปอร์เซ็นต์) ทำการถ่ายฝากพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) พบว่าสามารถชักนำการผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ ALAS ซึ่งมีขนาดประมาณ 45 กิโลดาลตัน ด้วย 1 mM IPTG นาน 6 ชั่วโมง เมื่อเติมสารตั้งต้นของปฏิกิริยา 30 mM Glycine และ 10 mM Succinic Acid และเลี้ยงเซลล์ต่อจนครบ 12-16 ชั่วโมง สามารถผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิก ได้ดีที่สุด สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิคได้ในปริมาณสูง คือ อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เท่ากับ 6-7 ตามลำดับ

การเพิ่มศักยภาพการผลิตกรดอะมิโนลีวูลินิคจากรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ในระบบถังหมักขนาด 50 ลิตร สามารถเพิ่มปริมาณการผลิตได้ในปริมาณสูงถึง 615.928 uM การใช้ประโยชน์ด้านการเกษตร พบว่า การใช้ในปริมาณความเข้มข้นต่ำกว่า 1 mM สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช การใช้กรด 5-อะมิโนลีวูลินิค ความเข้มข้นสูงกว่า 2 mM มีผลต่อทำลายเซลล์เมมเบรนของวัชพืช และส่งผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของหนอนกระทู้ผัก อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ยังได้พัฒนาผลิตภัณฑ์กรด 5-อะมิโนลีวูลินิคในรูปแบบผงแห้ง โดยใช้เทคนิคการทำแห้งแบบพ่นฝอย ซึ่งจะเป็นแนวทางในการพัฒนาศักยภาพการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิค ในเชิงพาณิชย์ต่อไป

การพัฒนาวิธีการผลิตและประยุกต์ใช้เมลาโทนินจากจุลินทรีย์เพื่อเสริมสร้างความทนทานต่อความเครียดของพืช เป็นแนวทางในการช่วยลดความเสียหายของผลผลิตทางการเกษตร โดยในงานวิจัยนี้ได้ทำการสังเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เมลาโทนิน ได้แก่ *Serotonin N-acetyltransferase* (*AANAT*) และ *caffeic acid O-methyltransferase (COMT)* นำมาเชื่อมต่อใส่เวคเตอร์ pETDuet ฝากถ่ายสู่ *E. coli* และชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนทั้ง 2 ตัวพร้อมกัน จากนั้นทำการทดสอบปัจจัยในการชักนำการแสดงออกโปรตีน พบว่าโปรตีนจะแสดงออกได้ดี เมื่อใช้สารชักนำการแสดงออก (IPTG) ที่ความเข้มข้น 0.1 mM และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และการสังเคราะห์เมลาโทนินโดยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดจะให้ประสิทธิภาพดีที่สุด ที่ปริมาณสารตั้งต้น Serotonin 1 mM เมื่อขยายปริมาณการเลี้ยง *E. coli* ในระดับถังหมักขนาดเล็กเพื่อการผลิตเมลาโทนินโดยใช้ปัจจัยข้างต้น สกัดและตรวจวิเคราะห์ปริมาณเมลาโทนินที่ผลิตได้ พบว่าในอาหารเลี้ยงมีปริมาณเมลาโทนินอยู่ที่ประมาณ 2.7 µg/mL

การทดสอบประสิทธิภาพของสารเมลาโทนินเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม พบว่าสารเมลาโทนินที่ความเข้มข้น 50 และ 100 µM สามารถเพิ่มอัตราการงอกของเมล็ดแตงในสภาพดินเค็มอย่างมีนัยสำคัญและสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของแตงร้านในสภาพดินเค็มได้ นอกจากนี้เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารเมลาโทนินในการเพิ่มความทนแล้งของมะเขือเทศ พบว่าการให้สารเมลาโทนินที่ 50 µM สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของมะเขือเทศในสภาพแล้งจำลองอย่างมีนัยสำคัญ และพบว่าการให้สารเมลาโทนินที่ความเข้มข้นเดียวกันโดยการฉีดพ่นทางใบและรดที่โคนต้น สามารถลดการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชั่นจากการขาดน้ำของใบมะเขือเทศในสภาพโรงเรือนได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร

Abstract

5-aminolevulinic acid (ALA) and melatonin are the biological substances that can use as efficient and environmentally friendly plant growth promoters in agriculture instead the use of harmful chemicals agents. The purpose of this research is therefore to develop the biotechnology technique for enhancing the production of 5-aminolevulinic acid and melatonin. In this study, the 5-aminolevulinic acid was produced from recombinant *E. coli* by the recombinant DNA technology. Th e *hem*A gene from *Rhodobacter* sp. which directly encoding 5-aminolevulinic acid synthase (ALAS) enzyme was also used in this experiment. Th e full-length nucleotide sequences of the *hem*A gene obtained from PCR cloning technique was approximately 1,224 bp. After overexpressed the *hem*A gene within the expression vector (pLATE52) and translated nucleotide sequence to peptide sequence, the GenBank protein-protein BLAST results of peptide from constructed recombinant ALAS showed almost 100% similarity with peptide sequences of *R. sphaeroides hemA* gene (407 amino acids; accession number WP_011337894.1). The recombinant DNA was then transformed into *E. coli* BL21 (DE3) and the results indicated that the molecular mass about 45 kDa of recombinant ALAS was observed after adding 1 mM IPTG for 6 hours, followed by the adding of 30 mM glycine and 10 mM succinic acid, a substrate for ALA biosynthesis, after 12-16 hours of culture. The optimum temperature and pH required to reach maximum 5-aminolevulinic acid production were 30-37 °C and 6-7, respectively.

In order to increase the 5-aminolevulinic acid production potential of engineered recombinant ALAS, the fermentation systems were conducted in 50 L bioreactors. The results indicated that the fermentation systems could increase the production of 5-aminolevulinic acid up to 615.928 uM, while the optimum concentrations for regulating plant growth or controlling weeds and cutworms were less than 1 mM or above 2 mM, respectively. Furthermore, the *dried* powder of 5-aminolevulinic acid was also developed in this research by using spray drying technique. This product prototype would be beneficial for the further commercial-scale production of 5-aminolevulinic acid.

The research of microbial production of melatonin and application for plant growth promotion under abiotic stresses may be the one of the solutions to prevent crop lost. In this study, the ectopic overproduction of melatonin was established in *Escherichia coli* by combining the sheep Serotonin N-acetyltransferase gene (*AANAT*) and the rice caffeic acid O-methyltransferase gene *(COMT)* and co-expressing two enzymes. After the optimization of fermentation conditions, the two enzymes were found to express well at 37˚C and at 0.1 mM of Isopropyl *β*-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). While the melatonin production by these enzymes was at the highest efficiency when the precursor (Serotonin) concentration at 1 mM. Then, melatonin production by this system was performed in a 2-L fermenter followed by the extraction and detection. Finally, the highest Melatonin yield was found at 2.7 µg/mL. However, the further effort is needed to improve the production yield for agricultural application.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัย

On the other hand, the study of effect of melatonin on plant stress tolerant were carried out. Melatonin at 50 and 100 µM was found to significantly increase cucumber seed germination and also promote the seedling growth in salinity soil. While 50 µM of melatonin significantly promoted tomato seedlings growth in MS media with 5% polyethylene glycol (PEG). Likewise, 50 µM of melatonin by foliar spray and irrigation could decrease oxidative stress of tomato leaves caused by drought stress in greenhouse.

กรมวิชาการเกษตร

กิจกรรมที่ 1

การพัฒนาการผลิตสารทุติยภูมิออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์โดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

Development of Microbial Bioactive Secondary Metabolite Production using Biotechnology to Promote Plant Growth

ภรณี สว่างศรี นัยเนตร เจริญสันติ ทานากะ สุภาวดี ง้อเหรียญ ศุภลักษ์ สัตยสมิทสถิต
Paranee Sawangsri Naiyanate Jaroensanti Tanaka Supawadee Ngorian Supalak Sattayasamitsathit

คำสำคัญ

กรด 5-อะมิโนลีวูลินิค รีคอมบิแนนท์ *E. coli* การแสดงออกของยีน สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช
5-aminolevulinic acid, recombinant *E. coli,* gene expression, plant growth promoter

บทคัดย่อ

การผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกจากรีคอมบิแนนท์ *E. coli* สามารถนำมาใช้ประโยชน์ด้านการเกษตรเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช งานวิจัยนี้ได้ทำการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกจากรีคอมบิแนนท์ *E. coli* โดยใช้เทคโนโลยีรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ ในการสังเคราะห์เอนไซม์ 5-aminolevulinic acid synthase (ALAS) จากยีน *hem* A ซึ่งโคลนได้จากเชื้อแบคทีเรีย *Rhodobacter* sp โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ 1,224 คู่เบส กระตุ้นการแสดงออกของยีน *hem* A โดยเชื่อมต่อยีนเข้าสู่เวคเตอร์พาหะ pLATE52 เมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์ แล้วแปรรหัสเป็นลำดับเปปไทด์ เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank พบว่า มีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของ 5-aminolevulinate synthase ของ *R. sphaeroides* โดยมีลำดับของเปปไทด์เท่ากับ 407 อะมิโน แอซิด (Accession No. WP_011337894.1 ที่ identity 100 เปอร์เซ็นต์) ทำการถ่ายฝาก พลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) พบว่า สามารถชักนำการผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ ALAS ซึ่งมีขนาดประมาณ 45 กิโลดาลตัน ด้วย 1 mM IPTG นาน 6 ชั่วโมง และเมื่อเติมสารตั้งต้นของปฏิกิริยา 30 mM Glycine และ 10 mM Succinic Acid ทำการเลี้ยงเซลล์ต่อ 12-16 ชั่วโมง สามารถผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิก ได้ดีที่สุด โดยมีสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิคได้ในปริมาณสูง คือ อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เท่ากับ 6-7 ตามลำดับ

การเพิ่มศักยภาพการผลิตกรดอะมิโนลีวูลินิคจากรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ในระบบถังหมักขนาด 50 ลิตร สามารถเพิ่มปริมาณการผลิตได้ในปริมาณสูงถึง 615.928 uM การใช้ประโยชน์ด้านการเกษตร พบว่า การใช้ในปริมาณความเข้มข้นต่ำกว่า 1 mM สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช การใช้กรด 5-อะมิโนลีวูลินิค ความเข้มข้นสูงกว่า 2 mM มีผลต่อทำลายเซลล์เมมเบรนของวัชพืช และส่งผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของหนอนกระทู้ผัก อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ยังได้พัฒนาผลิตภัณฑ์กรด 5-อะมิโนลีวูลินิคในรูปแบบผงแห้ง โดยใช้เทคนิคการทำแห้งแบบพ่นฝอย ซึ่งจะเป็นแนวทางในการพัฒนาศักยภาพการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิค ในเชิงพาณิชย์ต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร

Abstracts

The production of 5-aminolevulinic acid (ALA) from recombinant *E. coli* can be used for agricultural purposes as a plant growth promoter. In this study, the 5-aminolevulinic acid was produced from recombinant *E. coli* by the recombinant DNA technology. The *hem*A gene from *Rhodobacter* sp. which directly encoding 5-aminolevulinic acid synthase (ALAS) enzyme was also used in this experiment. The full-length nucleotide sequences of the *hem*A gene obtained from PCR cloning technique was approximately 1,224 bp. After overexpressed the *Hem* A gene within the *expression vector* (pLATE52) and translated nucleotide sequence to peptide sequence, the GenBank protein-protein BLAST results of *peptide* from constructed recombinant ALAS showed almost 100% similarity with peptide sequences of *R. sphaeroides hem*A gene (407 amino acids; accession number WP_011337894.1). The recombinant DNA was then transformed into *E. coli* BL21 (DE3) and the results indicated that the molecular mass about 45 kDa of recombinant ALAS was observed after adding 1 mM IPTG for 6 hours, followed by the adding of 30 mM glycine and 10 mM succinic acid, a substrate for ALA biosynthesis, after 12-16 hours of culture. The optimum temperature and pH required to reach maximum 5-aminolevulinic acid production were 30-37 °C and 6-7, respectively.

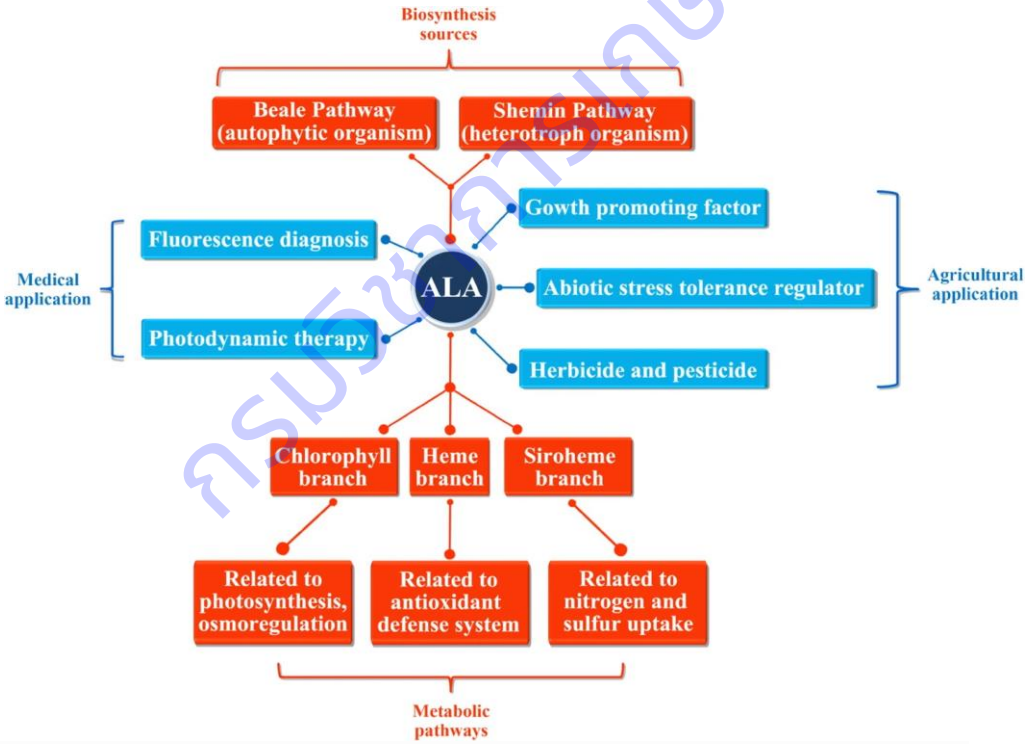
In order to increase the 5-aminolevulinic acid production potential of engineered recombinant ALAS, the fermentation systems were conducted in 50 L bioreactors. The results indicated that the fermentation systems could increase the production of 5-aminolevulinic acid up to 615.928 uM, while the optimum concentrations for regulating plant growth or controlling weeds and cutworms were less than 1 mM or above 2 mM, respectively. Furthermore, the dried powder of 5-aminolevulinic acid was also developed in this research by using spray drying technique. This product prototype would be beneficial for the further commercial-scale production of 5-aminolevulinic acid.

ศูนย์วิทยทรัพยากร

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กรด 5-อะมิโนลีวูลินิค (5-aminolevulinic acid; ALA) เป็นสารชีวภาพที่กำลังได้รับความสนใจจากนักวิจัยในหลายประเทศทั่วโลก เนื่องจากเป็นกรดอะมิโนที่มี 5 คาร์บอน ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์เตตราไพโรล เช่น คลอโรฟิลล์ ไฟโคบิริน ฮีม และวิตามินบี 12 ในสิ่งมีชีวิต และมีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของพืช สัตว์ สาหร่าย และแบคทีเรีย โดยสาร ALA สามารถนำมาใช้ประโยชน์ด้านการเกษตรได้หลากหลาย เช่น เป็นสารกระตุ้นการเจริญเติบโต (Growth stimulator) เพื่อทดแทนการใช้สารกลุ่มฮอร์โมนพืช โดยสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสและการสร้างรงควัตถุ นอกจากนี้หากใช้ในปริมาณความเข้มข้นสูงยังมีคุณสมบัติเป็นสารกำจัดวัชพืช (Photodynamic herbicides) และสารกำจัดแมลง (Porphyric insecticides) ได้ โดยไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ ALA จึงเป็นสารชีวภาพทางเลือกเพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรของเกษตรกรในระบบการผลิตเกษตรอินทรีย์ (Organic Agriculture) หรือเกษตรปลอดสารพิษ เป็นทางเลือกหนึ่งในการพัฒนากระบวนการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรแบบยั่งยืน เพื่อลดต้นทุนการผลิตให้กับเกษตรกร ลดปัญหาการใช้สารเคมีเกษตร โดยเฉพาะอย่างยิ่งเพื่อการผลิตอาหารที่ปลอดภัยให้สามารถสร้างความเชื่อมั่นให้กับผู้บริโภคและช่วยฟื้นฟู บำรุง รักษาสิ่งแวดล้อมให้คงอยู่ในสภาพที่สมดุลตลอดไป



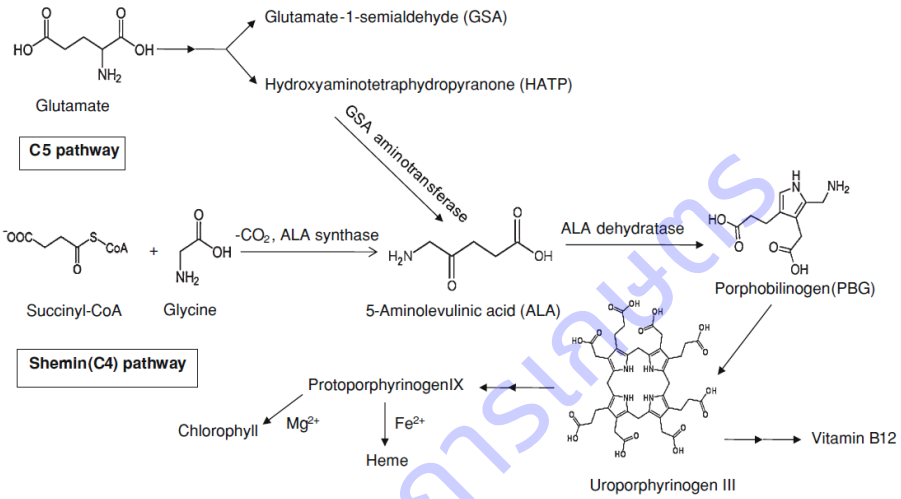
(Wu *et al.*, 2019)

กลไกและการประยุกต์ใช้ประโยชน์ของกรด 5-อะมิโนลีวูลินิคทางด้านการแพทย์และการเกษตร

กรด 5-อะมิโนลีวูลินิค เป็นกรดอะมิโนที่มี 5 คาร์บอน ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์เตตราไพโรล เช่น คลอโรฟิลล์ ไฟโคบิริน ฮีม และวิตามินบี 12 ในสิ่งมีชีวิต และมีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของพืช สัตว์ สาหร่าย และแบคทีเรีย แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสามารถสร้าง ALA ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์พอร์ไฟริน เช่น คลอโรฟิลล์ ไฟโคบิลลิน ฮีม และวิตามินบี12 (Sasikala *et al.*, 1994) ปัจจุบันกรด 5-อะมิโนลีวูลินิค เป็น

กรมวิชาการเกษตร

สารชีวภาพที่กำลังได้รับความสนใจจากนักวิจัยในหลายประเทศทั่วโลก เนื่องจากสามารถนำมาใช้ประโยชน์ด้านการเกษตรได้หลากหลาย เช่น เป็นสารกระตุ้นการเจริญเติบโต (Growth stimulator) เพื่อทดแทนการใช้สารกลุ่มฮอร์โมนพืช โดยสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสและสร้างรงควัตถุ นอกจากนี้หากใช้ในปริมาณความเข้มข้นสูงยังสามารถใช้ทดแทนสารกำจัดวัชพืช และสารกำจัดแมลงได้ โดยไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ ในธรรมชาติมีแบคทีเรียที่สังเคราะห์ ALA ได้หลายชนิด เช่น *Clostridium thermoaceticum, Escherichia coli, Pseudomonas riboflavin, Rhodobacter sphaeroides, Rhodopseudomonas* sp. เป็นต้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *Rhodobacter* sp. สามารถผลิต ALA ได้ในปริมาณที่สูงกว่าแบคทีเรียในกลุ่มอื่นๆ แต่มีข้อจำกัดในด้านการเพาะเลี้ยงที่ยุ่งยากซับซ้อน



การสังเคราะห์ทางชีวภาพของกรด 5-อะมิโนลีวูลินิก และ tetrapyrrole compounds ในวิถี C5 และวิถี Shemin (C4) (Sasaki *et al*., 2002)

การประยุกต์ใช้ในด้านการเกษตร มีรายงานการศึกษาผลของ ALA ที่ความเข้มข้น 0.06-0.6 mM สามารถนำมาใช้แช่เมล็ด หรือฉีดพ่นทางรากและใบ โดยมีบทบาทส่งเสริมการเจริญของ พริก ถั่ว แตงกวา ผักโขม กระเทียม มันฝรั่ง ข้าว ข้าวโพด ข้าวบาร์เลย์ ข้าวสาลี หัวไชเท้า อินทผาลัม เนื้อเยื่ออินทผาลัมที่เพาะเลี้ยง และแปะก๊วย (Hotta *et al.,* 1997) ALA ยังช่วยเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทส (Nishihara *et al.,* 2003) เพิ่มการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ในที่มีแสงและยับยั้งการปลดปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ในที่มืด (Richter *et al.,* 2010) ทั้งยังช่วยเพิ่มอัตราการเกิดกระบวนการไนโตรเจน แอสซิมิเลชั่น, ซัลเฟอร์ แอสซิมิเลชั่น (Maruyama, 2012) และเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ไนไตรท์ รีดักเทส ในพืช (Mishra and Srivastava, 1983) นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้ ALA เพื่อให้พืชหลายชนิดสามารถทนความกดดันจากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น สภาพดินเค็มจัดในการปลูกทานตะวัน และอินทผาลัม โดยจะไปส่งเสริมการเพิ่มแรงดันออสโมซิส และยับยั้งการดูดซึม Na^+ เข้าสู่ปลายราก (Akram and Ashraf, 2011 ; Youssef, 2008) ความสามารถทนต่ออากาศเย็นจัดของพริกแดง และถั่วเหลือง (Korkmaz and Korkmaz, 2009 ; Balestrasse *et al.,* 2010) ทนต่อสภาพดินที่ปนเปื้อนด้วยยาฆ่าแมลง (Kumar *et al.,* 1999) ในด้านการกำจัดวัชพืช (Herbicides) การใช้ ALA ที่ความเข้มข้นสูงๆ (2-5 mM) สามารถใช้เป็นสารกาจัดวัชพืชที่มีความปลอดภัยต่อมนุษย์ โดยกลไกการเข้าไปทำลายชั้นเมมเบรนของพืช ทำให้ใบและลำต้นเหี่ยวเฉาเกิดการสูญเสียน้ำและตายในที่สุด (Sasaki *et al.,* 1987) การพ่นสาร ALA บนในวัชพืชภายใต้สภาวะไร้แสง สาร ALA เปลี่ยนรูปเป็น protochlorophyllide เมื่อมีแสงอาทิตย์ จะทำหน้าที่เป็นตัว

กรมวิชาการเกษตร

photosynthesizers (เปลี่ยนเป็น triplet oxygen ที่มีศักยภาพในการออกซิไดซ์ singlet oxygen) ออกซิเจนในรูป singlet oxygen จะออกซิไดซ์อย่างรุนแรง (superoxidizes) ต่อฟอสโฟลิปิดของผนังเซลล์ของใบพืช ผนังเซลล์ถูกทำลาย วัชพืชตาย สาร ALA สามารถกำจัดวัชพืชชนิดใบเลี้ยงคู่มากกว่าพืชใบเลี้ยงเดี่ยว Sasaki และคณะ (1990) ทำการทดสอบประสิทธิภาพในการกำจัดวัชพืช *Trifolium repens* ของน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยง *Rhodobacter sphaeroides* 4 วัน (มีสาร ALA 4 มิลลิโมล) โดยพ่น 10 มิลลิลิตรต่อ 150 ตารางเซนติเมตร พบว่าหลังจากพ่นในวันที่ 1, 2 และ 3 ให้ค่า herbicide activity (พื้นที่ของใบพืชที่ถูกทำลายต่อพื้นที่ของใบพืชที่ดีคูณร้อย) 83, 90 และ 95% ตามลำดับ และเมื่อเติมสาร α,α –dipilidyl (5 มิลลิโมล) ซึ่งเป็นสารส่งเสริมการออกฤทธิ์ของสารกำจัดวัชพืช ลงในน้ำหมัก มีผลเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดวัชพืชได้ถึงร้อยละ 100 (หลังการพ่น 1, 2 และ 3 วัน) การค้นพบสารกำจัดแมลง (Insecticides) เกิดขึ้นเช่นเดียวกับการค้นพบสารกำจัดวัชพืช เนื่องจากทั้งพืช และเซลล์สัตว์ มีวิถีการสังเคราะห์สารเตตราไพโรลจากกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกไปเป็น protoporphyrin lX (Proto) เช่นเดียวกัน ดังนั้นจึงมีการพัฒนากระบวนการ photodynamic เพื่อใช้ในการควบคุมแมลง ซึ่งได้มีการทดลองในหนอนคืบกะหล่ำ *Trichoplusia ni* โดยพ่นสาร ALA ที่ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ +2,2- dipyridyl (Dpy) 30 มิลลิโมลาร์ ทิ้งไว้ 1 คืนที่ไม่มีแสง อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เพื่อให้เกิดการสะสมของสารเตตราไพโรลโดยเฉพาะ protoporphyrin lX (Proto) เมื่อหนอนได้รับแสงเพียงไม่กี่ชั่วโมงพบว่าหนอนมีลักษณะเฉื่อยชา และอ่อนปวกเปียกเนื่องจากมีการสูญเสียน้ำในร่างกายและตายในที่สุด (Rebeiz *et al*., 1988) ดังนั้น ALA จึงเป็นสารชีวภาพที่มีความปลอดภัยและมีศักยภาพสูงในกระบวนการผลิตทางการเกษตร (Wang *et al.,* 2003)

เทคโนโลยีชีวภาพสามารถเข้ามาช่วยในการพัฒนากรรมวิธีการผลิตสาร ALA ให้ง่ายและรวดเร็วยิ่งขึ้น โดยวิธีการโคลนยีนที่เกี่ยวข้องในการผลิตเอนไซม์ ALA synthase (ALAS) จากเชื้อแบคทีเรีย และให้มีการ over expression เพื่อการผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ ซึ่งจะช่วยร่นระยะเวลาให้กระบวนการสังเคราะห์ ALA จาก succinyl CoA และ glycine ใน Shemin pathway (C_4 pathway) เกิดได้เร็วยิ่งขึ้น (Jordan, 1991) ซึ่งผลผลิตที่ได้ คือ ALA ยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ ALAS ของเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* มี 2 ยีน คือ *hemA* และ *hemT* โดยมีรายงานการศึกษาการโคลนยีนและการแสดงออกของยีน *hemA* และ *hemT* เพื่อการผลิต ALA (Neidle and Kaplan, 1993)

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1) เพื่อศึกษาและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิค จากรีคอมบิแนนท์ *E. coli*

2) เพื่อศึกษาคุณสมบัติของสาร สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสาร ALA เพื่อเป็นแนวทางในการใช้ประโยชน์เป็นสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

ขอบเขตการวิจัย

ดำเนินการคัดเลือกได้จุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิค (ALA) โคลนยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการผลิตและการถ่ายฝากยีนในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* เพื่อกระตุ้นการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนเพื่อการพัฒนากรรมวิธีการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิค (ALA) ให้ได้ปริมาณมากและร่นระยะเวลาในการผลิตให้เร็วขึ้น ขยายการผลิตในระดับถังหมักเพื่อลดต้นทุน การทดสอบประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ศึกษาการยับยั้งการเจริญของวัชพืชและการควบคุมการเจริญของหนอนกระทู้ การพัฒนาผลิตภัณฑ์กรด 5-อะมิโนลีวูลินิครูปแบบผงแห้ง การเก็บรักษา ตลอดจนความคงตัวของสาร เพื่อให้สามารถนำไปขยายผลสู่การใช้ประโยชน์และสามารถต่อยอดการผลิตในระดับ large scale ต่อไป

สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการ

ระเบียบวิธีการวิจัย

อุปกรณ์

1. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
2. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง (Thermal Cycle 9700)
3. เครื่องวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรม ABI Prism 310 Genetic Analyzer
4. เครื่องหมุนเหวี่ยงตกตะกอนความเร็วสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิต่ำได้ (Refrigerated Centrifuge)
5. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
6. ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (incubator shaker)
7. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และ -80 องศาเซลเซียส
8. ชุดถ่ายภาพเจล Gel Documentation
9. อุปกรณ์ในการสกัดดีเอ็นเอ ได้แก่ โกร่ง หลอดใส่ตัวอย่างขนาดต่างๆ ไมโครปิเปต ขนาด P1,000 P200 P20 และ P2 ไมโครลิตร
10. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ
11. สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR)
12. สารเคมีที่ใช้ในการทำ Electrophoresis และ Molecular Weight Marker
13. สารเคมีที่ใช้ในการโคลนยีน T&A Cloninng Kit ® (RBC Bioscience)
14. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากเจล QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)
15. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas)
16. เชื้อแบคทีเรียเซลล์เจ้าบ้าน (Competent Cells) *Escherichia coli* สายพันธุ์ BL21(DE3)
17. Expression Vector : aLICator LIC Cloning and Expression system (Thermo Scientific)
18. สารเคมีสำหรับใช้กับเครื่องวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรม ABI Prism 310
19. ไพรเมอร์สำหรับใช้ในปฏิกิริยา PCR ได้แก่
    - ไพรเมอร์ยีน *hem* A (synthase) : Ex_HemA-F, Ex_HemA-R
    - ไพรเมอร์ aLICator LIC Cloning and Expression system : LIC Forward, LIC Reverse
21. การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปและโปรแกรมบนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต
    - โปรแกรม BLAST จาก http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Blast/
    - โปรแกรม ClustalW Multiple Alignment จาก http://www.ebi.ac.uk/clustalw/
    - โปรแกรม DNAStar software analysis (DNASTAR, Inc, USA)
    - โปรแกรม CromasPro version 1.33 จาก http://www.technelysium.com.au/ChromasPro.html
    - โปรแกรม NEBcutter2 จาก http://tools.neb.com/NEBcutter2/
22. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่างๆ ได้แก่ Nutrient agar (NA), Luria-Bertani (LB), LB-Ampicillin/IPTG/X-Gal

ศูนย์วิทยทรัพยากร

วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1.1 การผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิก โดยรีคอมบิแนนท์ *E. coli* (เริ่มต้นปี 2562 สิ้นสุดปี 2563)

1. การสร้างรีคอมบิแนนท์ *E. coli* เพื่อการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิก

1.1 การสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย *Rhodobacter* sp.

ทำการสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรีย โดยการเลี้ยงเพิ่มปริมาณเซลล์ของแบคทีเรียในอาหารเหลว Luria-Bertani (LB broth) (เตรียม 1 ลิตร : NaCl 10 กรัม, Tryptone 10 กรัม, Yeast extract 5 กรัม, ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ด้วย ddH_2O) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว160 รอบ/นาที นาน 16 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนเซลล์แบคทีเรียใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร ที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เทส่วนใสทิ้ง เก็บส่วนที่เป็นตะกอนเซลล์แบคทีเรีย ล้างตะกอนเซลล์ด้วย TE Buffer 2 ครั้ง เติม SDS ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 40 ไมโครลิตร เติม Proteinase K (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 8 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง ผสมให้เข้ากันทุก 15 นาที เติม 2 เท่า CTAB (บ่ม 65 องศาเซลเซียสก่อนใช้) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ บ่ม 65 องศาเซลเซียสนาน 20 นาที ผสมทุก 5 นาที เติม chloroform : isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ ปั่นหวี่ยง 14,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ที่ 0 องศาเซลเซียส ดูดน้ำใสใส่หลอดใหม่ (ประมาณ 700 ไมโครลิตร) เติม 0.6 เท่า ของ isoproponol และ 0.1 volume ของ 3 M NaOAC ผสมเบาๆ เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยง 14,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที ทิ้งน้ำใส ล้างตะกอนด้วยเอทานอลร้อยละ 70 ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ 5 นาที ปั่นเหวี่ยง 14,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที ทิ้งน้ำใส ระเหยแอลกอฮอล์ที่ตกค้างในหลอดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ปั่นเหวี่ยงนาน 1 นาที เติม TE + RNase 15 ไมโครลิตร บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ตรวจวัดปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่ได้ โดยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ $OD_{260/280}$ และตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโดยแยกบน 1 เปอร์เซ็นต์ Agarose gel ใน 1XTBE buffer ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 250 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที แช่แผ่นเจลในเอธิเดียมโบรไมด์ (ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) นาน 5 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเครื่อง Gel Documentation บันทึกภาพแถบดีเอ็นเอ และเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

1.2 การสังเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์ 5-aminolevulinic acid synthase (ALAS)

ทำการสังเคราะห์ยีน *hem* A ซึ่งเกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์ 5-aminolevulinic acid synthase (ALAS) ในปฏิกิริยาการสังเคราะห์กรดอะมิโนลีวูลินิก โดยอาศัยปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยคู่ไพรเมอร์ Ex_HemA-F และ Ex_HemA-R

Ex_HemA-F 5’ GGT TGG GAA TTG CAA GAC TAC AAT CTG GCA CTC GAT ACC 3’

Ex_HemA-R 5’ GGA GAT GGG AAG TCA TTA GGC AAC GAC CTC GGC GCG ATT C 3’

เตรียมส่วนผสมปฏิกิริยา PCR ต่อ 1 หลอด ดังนี้

ดีเอ็นเอ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร)	2	ไมโครลิตร
10x PCR buffer	2	ไมโครลิตร
4mM dNTP	2	ไมโครลิตร
50 mM $MgCl_2$	0.6	ไมโครลิตร
ไพร์เมอร์ Ex_HemA-F (5 ไมโครโมล)	1	ไมโครลิตร
ไพร์เมอร์ Ex_HemA-R (5 ไมโครโมล)	1	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase (0.5 ยูนิต/ไมโครลิตร, Immulase)	0.15	ไมโครลิตร
dH_2O	11.25	ไมโครลิตร

กรมวิทยาศาสตร์บริการ

รวมปฏิกิริยาทั้งหมด	20	ไมโครลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมด ผสมตามสัดส่วนข้างบนลงในหลอด PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร จากนั้นนำหลอดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ thermal cycle (Gene Amp 9700) โดยมีอุณหภูมิ เวลา จำนวนรอบ ของการทำ PCR ดังนี้

95 องศาเซลเซียส	7 นาที	จำนวน 1 รอบ
94 องศาเซลเซียส	30 วินาที	จำนวน 40 รอบ
60 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
72 องศาเซลเซียส	2 นาที	
72 องศาเซลเซียส	5 นาที	
4 องศาเซลเซียส infinity (∞)		

ตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR ปริมาตร 3 ไมโครลิตร และ loading dye 1 ไมโครลิตร โดยการแยกบน 1.5 เปอร์เซ็นต์ Agarose gel electrophoresis และเตรียมดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุด QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) โดยนำผลผลิต PCR ที่เหลือ มาแยกใน 1.2 เปอร์เซ็นต์ low melting gel ด้วยวิธี gel electrophoresis แล้วย้อมด้วย Gel Star (Cambrex) หลังจากนั้นตัดแถบดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการประมาณ 2 กิโลเบส บนเครื่อง Dark Reader Transilluminators ใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ชั่งน้ำหนักเจลที่ได้ เติมสารละลาย QG Buffer ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักเจล นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เขย่าแรงๆ ทุก 15 นาที จนเจลละลายหมด (สีของสารละลายควรมีสีเหลือง ถ้ามีสีม่วงให้เติม 3M NaOAC 10 ไมโครลิตร) เติม Isopropanol (แช่เย็น) ปริมาตร 1 เท่าของน้ำหนักเจล ผสมให้เข้ากัน จากนั้นย้ายสารละลายทั้งหมดใส่ใน Binding Column บ่มทิ้งไว้ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทน้ำใสส่วนล่างทิ้ง เติม PE Buffer 750 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทน้ำใสส่วนล่างทิ้ง ย้าย Binding Column วางลงบนหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม EB Buffer (บ่มที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส) 15 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ 15–30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพด้วย 1.5 เปอร์เซ็นต์ Agarose gel electrophoresis จะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 2 กิโลเบส และเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอ ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

1.3 การเชื่อมต่อชิ้นยีนเข้าสู่ protein expression vector และถ่ายฝากเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน

นำชิ้นส่วนของยีน *hem* A เชื่อมต่อเข้ากับเวคเตอร์พาหะ (aLICator LIC Cloning and Expression system) (ขนาดประมาณ 4,500 คู่เบส) ซึ่งมีตำแหน่งของ T7 promoter ทำหน้าที่ถอดรหัสพันธุกรรมและแปลรหัสของยีนให้เป็นโปรตีน ทำการเชื่อมต่อชิ้นยีนเข้ากับ Expression vector เพื่อให้เกิดการสังเคราะห์recombinant protein โดยเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาดังนี้

ชิ้นดีเอ็นเอของยีน *hem* A (100 นาโนกรัม)	1	ไมโครลิตร
5X LIC Buffer	2	ไมโครลิตร
T4 DNA Polymerase, 1U/ul	1	ไมโครลิตร
ddH_2O	6	ไมโครลิตร
ปฏิกิริยาทั้งหมด	10	ไมโครลิตร

ผสมปฏิกิริยาให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยง 3-5 วินาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 0.5 M EDTA ปริมาตร 0.6 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติม LIC Vector (60 นาโนกรัม,

กรมวิทยาศาสตร์

0.02 pmol DNA) ผสมปฏิกิริยาให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยง 3-5 วินาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เตรียมถ่ายฝากเข้าสู่เซลล์ *E. coli* ทันที

1.4 การถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3)

ทำการถ่ายฝากพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม (Ligation) จากข้อ 1.3 ที่ได้สู่เซลล์แบคทีเรียเพื่อเพิ่มปริมาณใน competent cell (*E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3)) โดยวิธี heat shock และเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB - Ampicillin/IPTG/X-Gal (อาหาร LB 1 ลิตร : NaCl 10 กรัม, Tryptone 10 กรัม, Yeast extract 5 กรัม, Bacto-Agar 15 กรัม และ ddH_2O) ที่มีสารปฏิชีวนะ Ampicillin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เทอาหารลงจานเลี้ยงเชื้อประมาณ 10 - 15 มิลลิลิตร หลังจากอาหารแข็งแล้วเติม 100 mM IPTG 100 ไมโครลิตร และ X-Gal (50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) 20 ไมโครลิตร ลงบนอาหาร แล้วเกลี่ยจนผิวหน้าอาหารแห้ง จากนั้นทำการถ่ายฝากยีนเข้าสู่เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) โดยนำปฏิกิริยา ligation ที่เตรียมไว้ 5 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดคอมพิเทนต์เซลล์ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และแช่บนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที นำไป Heat - shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที นำไปแช่บนน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 15 นาที เติม S.O.C. medium 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้รับการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียแล้วไปเกลี่ยบนอาหาร LB - Ampicillin/IPTG/X-Gal ที่เตรียมไว้ข้างต้น นำบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 14-16 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีสีขาวของเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* ที่มีชิ้น insert ของยีน *hem* A ไปเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติม Ampicillin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที นาน 14 - 16 ชั่วโมง เพื่อนำไปใช้สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอในขั้นตอนต่อไป

1.5 การตรวจสอบการปรากฏของยีน *hem* A ใน aLICator LIC Cloning and Expression system

ทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมจากเซลล์รีคอมบิแนนท์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) เก็บตะกอนเซลล์ที่ได้จากข้อ 1.4 โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เพื่อนำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัด GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) ทำการละลายตะกอนเซลล์ด้วย Resuspension Solution 250 ไมโครลิตร เติม Lysis Solution 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลง 4 – 6 ครั้ง เติม Neutralization Solution 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยกลับหลอดขึ้นลง 4 – 6 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นย้ายสารละลายเซลล์ลงใน GeneJET™ spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม Wash Solution 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) ย้าย GeneJET™ spin column วางบนหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Elution Buffer 25 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้นาน 15 – 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพด้วย 1.5 เปอร์เซ็นต์ Agarose gel electrophoresis เก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ทำการตรวจสอบการปรากฏของยีนในเซลล์แบคทีเรียที่ได้รับการถ่ายฝากพลาสมิดสายผสม โดยอาศัยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ LIC Forward 5’ TAATACGACTCACTATAGGG 3’ และ LIC Reverse 5’ GAGCGGATAACAATTTCACACAGG 3’ เตรียมส่วนผสมปฏิกิริยา PCR ดังนี้

พลาสมิดดีเอ็นเอ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร)	2	ไมโครลิตร
10x PCR buffer	2	ไมโครลิตร
4mM dNTP	2	ไมโครลิตร
50 mM $MgCl_2$	0.6	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ LIC Forward (5 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ไพรเมอร์ LIC Reverse (5 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase (0.5 ยูนิต/ไมโครลิตร, Immulase)	0.15	ไมโครลิตร
ddH_2O	11.25	ไมโครลิตร
รวมปฏิกิริยาทั้งหมด	20	ไมโครลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำหลอดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ thermal cycle โดยรอบของการทำปฏิกิริยา PCR มีดังนี้

95 องศาเซลเซียส	7 นาที	จำนวน 1 รอบ
94 องศาเซลเซียส	30 วินาที	จำนวน 25 รอบ
58 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
72 องศาเซลเซียส	3 นาที	
72 องศาเซลเซียส	5 นาที	
4 องศาเซลเซียส	infinity (∞)	

ตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR ที่ได้ด้วยวิธี Electrophoresis ใน 1.5 เปอร์เซ็นต์ agarose gel นาน 30 นาที ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า 250 โวลต์ นำไปย้อมเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide (ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) จากนั้นนำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation เทียบขนาดของดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker (Fermentas) พร้อมบันทึกภาพ และเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

1.6 การตรวจสอบความถูกต้องของยีน *hem* A โดยวิธีวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์

จากการตรวจพบการปรากฏของชิ้นยีน *hem* A (ขนาด~ 1,200 bp) ในพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม แล้วจึงนำมาตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

- การทำปฏิกิริยา cycle sequencing

เตรียมปฏิกิริยา cycle sequencing ในหลอด 0.2 มิลลิลิตร ดังนี้

ผลผลิต PCR (ประมาณ 100 นาโนกรัม)	1	ไมโครลิตร
BigDye™ Terminator Cycle Sequencing V3.1	2	ไมโครลิตร
Ready Reaction buffer	1	ไมโครลิตร
Primer ไพร์เมอร์ M13-F (5 ไมโครโมล)	1.6	ไมโครลิตร
dH_2O	4.4	ไมโครลิตร
รวมปริมาตร	10	ไมโครลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมด ผสมตามสัดส่วนข้างบนลงในหลอด PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำหลอดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ thermal cycle (Gene Amp 9700) โดยมีรอบการทำ PCR ดังนี้

96 องศาเซลเซียส	1 นาที	จำนวน 1 รอบ
96 องศาเซลเซียส	10 วินาที	จำนวน 25 รอบ
50 องศาเซลเซียส	5 วินาที	
60 องศาเซลเซียส	4 นาที	
4 องศาเซลเซียส	infinity (∞)	

- การล้างสีฟลูออเรสเซนต์ส่วนเกิน

นำปฏิกิริยา cycle sequencing จากข้างต้นมาล้างสีฟลูออเรสเซนต์ส่วนเกิน โดยนำปฏิกิริยา

ศูนย์วิทยทรัพยากร

ดังกล่าวใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร เติม stock solution A (dH_2O 16 ไมโครลิตร : 95 เปอร์เซ็นต์ Ethanol 64 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที (ผสมโดยกลับหลอดขึ้นลงทุก 5 นาที) นำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เทน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ Ethanol 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลงนาน 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทน้ำใสทิ้งปล่อยตะกอนให้แห้งในที่มืด

- การเตรียมตัวอย่างเข้าเครื่อง ABI PRISM 310® DNA Sequencer

ละลายตะกอนที่ได้ด้วย Hidi formamide จำนวน 10 ไมโครลิตร จากนั้นปั่นให้อยู่ที่ก้นหลอด ดูดสารละลายทั้งหมดใส่หลอด septa นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที แล้วย้ายลงบนน้ำแข็งทันที ตัวอย่างที่ได้นี้ก็พร้อมที่จะเข้าเครื่อง ABI PRISM 310® DNA Sequencer เพื่อวิเคราะห์ลำดับเบสต่อไป

1.7 การศึกษาการแสดงออกในระดับโปรตีนของรีคอมบิแนนท์ *E. coli*

การกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีน (fusion protein) ในเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ทำโดยเตรียมเชื้อตั้งต้นของเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มี recombinant plasmid ของยีน *hem* A นำมาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว LB-Ampicillin (ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง จากนั้นดูดเซลล์ตั้งต้น 3 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเหลว LB–Ampicillin ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที วัดความขุ่นของอาหาร จนกระทั่ง OD_{600} เท่ากับ 0.5 จากนั้นเปรียบเทียบการชักนำการแสดงออกของยีนด้วย isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) โดยปรับให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 และ 3 mM IPTG เลี้ยงต่อเป็นเวลา 6 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างเซลล์ทุก 1 ชั่วโมง จนครบ 6 ชั่วโมง นำตัวอย่างแต่ละช่วงเวลาไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เพื่อเก็บตะกอนเซลล์ แล้วนำมาละลายด้วย 2x sample buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปมาต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที วิเคราะห์ขนาดของ recombinant protein ด้วย 8 เปอร์เซ็นต์ SDS–PAGE ใน Tris-glycine buffer (0.025 M Tris pH 8.3, 0.192 M Glycine, 0.1 เปอร์เซ็นต์ SDS) โดยให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 120 โวลต์ เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง จากนั้นย้อมสีแผ่นเจลด้วยสารละลาย PageBlue™ Protein Staining Solution (Fermentas) และล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น 4-5 ครั้ง จนมองเห็นแถบโปรตีนชัดเจน บันทึกผลการการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ fusion protein ในแต่ละชั่วโมง

2. การผลิตกรดอะมิโนลีวูลินิค 5-Aminolevulinic acid (ALA)

2.1 การศึกษาชนิดของสารตั้งต้นที่มีผลต่อการชักนำการผลิตกรดอะมิโนลีวูลินิค

เตรียมเชื้อตั้งต้นของเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มี recombinant plasmid ของยีน *hem* A มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว LB-Ampicillin (ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบ/นาที เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง จากนั้นตรวจวัดความขุ่นของเซลล์แขวนลอย ปรับความค่าความขุ่นของเซลล์แขวนลอย OD_{600} เท่ากับ ≤1.0 ในอาหารเหลว LB–Ampicillin ปริมาตร 250 มิลลิลิตร จากนั้นชักนำการแสดงออกของยีนด้วย isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) โดยปรับให้มีความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 1 mM IPTG และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบ/นาที และเลี้ยงต่อเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพการชักนำการผลิตสาร ALA โดยการเติมสารตั้งต้น ได้แก่ ไกลซีน กรดซัคซินิค และกลูตาเมท ดังนี้ 60 mM Glycine, 30mM Glycine + 10mM Succinic Acid, 10mM L-Glutamic Acid, 30mM L-Glutamic

กรมวิทยาศาสตร์

Acid, 10mM Levulenic Acid และ 30mM Levulenic Acid ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบ/นาที และเลี้ยงเซลล์ต่อจนครบ 48 ชั่วโมง

ตรวจวัดปริมาณสาร ALA ที่ผลิตได้จากการชักนำโดยใช้สารตั้งต้นต่างชนิด โดยการตรวจวัดปริมาณสาร ALA ดังนี้ ปั่นแยกตะกอนเซลล์ ดูดสารละลายส่วนใสปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองใหม่ เติมสารละลาย Sodium acetate buffer ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (pH 4.6) และสารละลาย Acetone ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาที และทำให้เย็นทันทีในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นเติมสารละลาย Ehrlich's reagent ปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที ตรวจวิเคราะห์ปริมาณ ALA ที่ผลิตได้ โดยนำสารละลายดังกล่าวไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 553 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสาร ALA ที่ความเข้มข้น 0-100 uM

2.2 การศึกษาสภาวะปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดอะมิโนลีวูลินิค (ALA)

2.2.1 ศึกษาสภาวะอุณหภูมิที่มีผลต่อการสังเคราะห์กรดอะมิโนลีวูลินิค

เตรียมอาหารเหลว LB–Ampicillin ปริมาตร 200 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที รอจนอาหารเย็น เติมเชื้อตั้งต้นของเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มี recombinant plasmid DNA ของยีน *hem* A วัดความขุ่นของเซลล์แขวนลอย ปรับค่าความขุ่นของเซลล์แขวนลอย OD600 อยู่ในช่วง 0.7-1.0 ในอาหารเหลว LB–Ampicillin ปริมาตร 200 มิลลิลิตร จากนั้นกระตุ้นการแสดงออกของยีน *hem* A ด้วยสาร isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) ปรับให้มีความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 1 mM IPTG บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 160 รอบ/นาที เลี้ยงต่อจนครบ 6 ชั่วโมง แล้วจึงเติมสารตั้งต้นในการทำปฏิกิริยาด้วย 30mM Glycine และ 10 mM Succinic Acid ทำการทดสอบการผลิตสาร ALA ที่อุณหภูมิ 30 37 และ 45 องศาเซลเซียส อุณหภูมิละ 3 ซ้ำ บ่มต่อจนครบ 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำสารละลาย ALA ที่ผลิตได้ ไปตรวจวิเคราะห์ปริมาณสาร ALA ที่ผลิตได้ ด้วยเครื่อง spectrophotometer

2.2.2 ศึกษาสภาวะความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหารที่มีผลต่อการสังเคราะห์กรดอะมิโนลีวูลินิค

เตรียมอาหารเหลว LB–Ampicillin ปริมาตรขวดละ 200 มิลลิลิตร แล้วจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที รอจนอาหารเย็น เติมเชื้อตั้งต้นของเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มี recombinant plasmid DNAของยีน *hem* A วัดความขุ่นของเซลล์แขวนลอย ปรับค่าความขุ่นของเซลล์แขวนลอย OD_{600} อยู่ในช่วง 0.7-1.0 ในอาหารเหลว LB–Ampicillin ที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เท่ากับ 5 6 และ 7 ฟลาส์กละ 200 มิลลิลิตร ทำ 4 ซ้ำ จากนั้นกระตุ้นการแสดงออกของยีน *hem* A ด้วยสาร isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) ปรับให้มีความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 1 mM IPTG บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 160 รอบ/นาที เลี้ยงต่อจนครบ 6 ชั่วโมง แล้วจึงเติมสารตั้งต้นในการทำปฏิกิริยาด้วย 30mM Glycine และ 10 mM Succinic Acid บ่มต่อจนครบ 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำสารละลาย ALA ที่ผลิตได้ ไปตรวจวิเคราะห์ปริมาณสาร ALA ที่ผลิตได้ ด้วยเครื่อง spectrophotometer ต่อไป

2.3 การศึกษากระบวนการผลิตกรดอะมิโนลีวูลินิค (ALA) ในระบบถังหมักขนาดเล็ก

2.3.1 การทดสอบการผลิตกรดอะมิโนลีวูลินิค (ALA) ในระบบถังหมักขนาดเล็ก (BIOFLO 2000 Fermenter)

ทำการเตรียมเชื้อตั้งต้น (starter) ของเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มี recombinant plasmid ของยีน *hem* A มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว LB-Ampicillin (ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ที่ผ่านการนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบ/นาที เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อตั้งต้น (starter) จากนั้นเตรียมอาหารเหลว LB–Ampicillin

ศูนย์วิทยทรัพยากร

ปริมาตร 3,000 มิลลิลิตร ในโถแก้ว (chamber) สำหรับใช้ในการเลี้ยงเซลล์ ปิดระบบทั้งหมด แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที รอจนอาหารเย็น เติมเชื้อตั้งต้น (starter) ของเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มี recombinant plasmid ของยีน *hem* A วัดความขุ่นของเซลล์แขวนลอย ปรับค่าความขุ่นของเซลล์แขวนลอย OD_{600} อยู่ในช่วง 0.7-1.0 ในอาหารเหลว LB–Ampicillin ปริมาตร 3,000 มิลลิลิตร จากนั้นกระตุ้นการแสดงออกของยีน *hem* A ด้วยสาร isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) โดยปรับให้มีความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 1 mM IPTG ตั้งค่าอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวนด้วยความเร็ว 130 รอบ/นาที เลี้ยงต่อจนครบ 6 ชั่วโมง แล้วจึงทำการชักนำการผลิตสาร ALA โดยการเติมสารตั้งต้นปฏิกิริยาด้วย 30mM Glycine และ 10 mM Succinic Acid และเลี้ยงเซลล์ต่อจนครบ 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำสารละลาย ALA ที่ผลิตได้ ไปกรองผ่าน filter membrane ขนาด 0.2 ไมโครเมตร เพื่อแยกเอาตะกอนเซลล์ และโปรตีนของเซลล์แบคทีเรียออก โดยวิธีการกรองด้วยระบบสุญญากาศ ตรวจวิเคราะห์ปริมาณสาร ALA ที่ผลิตได้ ด้วยเครื่อง spectrophotometer ดังนี้ ปั่นแยกตะกอนเซลล์ ดูดสารละลายส่วนใสปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองใหม่ เติมสารละลาย Sodium acetate buffer ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (pH 4.6) และสารละลาย Acetone ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาที และทำให้เย็นทันทีในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นเติมสารละลาย Ehrlich's reagent ปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที ตรวจวิเคราะห์ปริมาณ ALA ที่ผลิตได้ โดยนำสารละลายดังกล่าวไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 553 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสาร ALA ที่ความเข้มข้น 0-100 uM

2.3.2 การพัฒนากระบวนการผลิตกรดอะมิโนลีวูลินิค (ALA) ในระบบถังหมักขนาด 50 ลิตร

เตรียมอาหารเหลว LB–Ampicillin ปริมาตร 2,000 มิลลิลิตร ในโถแก้ว (chamber) สำหรับใช้ในการเลี้ยงเซลล์ ปิดระบบทั้งหมด แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที รอจนอาหารเย็น เติมเชื้อตั้งต้น (starter) ของเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มี recombinant plasmid ของยีน *hem* A วัดความขุ่นของเซลล์แขวนลอย ปรับค่าความขุ่นของเซลล์แขวนลอย OD_{600} = 0.7-1.0 ในอาหารเหลว LB–Ampicillin ปริมาตร 20 ลิตร จากนั้นกระตุ้นการแสดงออกของยีน *hem* A ด้วยสาร isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) โดยปรับให้มีความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 1 mM IPTG และมีอัตราการกวนด้วยความเร็วประมาณ 130 รอบ/นาที เลี้ยงต่อจนครบ 6 ชั่วโมง แล้วจึงทำการชักนำการผลิตสาร ALA โดยการเติมสารตั้งต้นปฏิกิริยาด้วย 30mM Glycine และ 10 mM Succinic Acid และเลี้ยงเซลล์ต่อ จนครบ 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำสารละลาย ALA ที่ผลิตได้ ไปกรองผ่าน filter membrane ขนาด 0.2 ไมโครเมตร เพื่อแยกเอาตะกอนเซลล์ และโปรตีนของเซลล์แบคทีเรียออก โดยวิธีการกรองด้วยระบบสุญญากาศ ตรวจวิเคราะห์ปริมาณสาร ALA ที่ผลิตได้ ด้วยเครื่อง spectrophotometer

สถานที่ทำการวิจัย ห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ระยะเวลาดำเนินงาน ตุลาคม 2561 - กันยายน 2563

กรมวิทยาศาสตร์

การทดลองที่ 1.2 การศึกษาประสิทธิภาพของกรด 5-อะมิโนลีวูลินิคเพื่อการประยุกต์ใช้ทางการเกษตร

1. การศึกษาคุณสมบัติของกรดอะมิโนลีวูลินิค (ALA) ในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช

การทดสอบคุณสมบัติของสาร ALA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่มีผลในการกระตุ้นการเจริญเติบโตในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว/ใบเลี้ยงคู่

1.1 การผลิตสารละลายกรดอะมิโนลีวูลินิค (ALA)

เตรียมเชื้อตั้งต้นของเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มี recombinant plasmid ของยีน *hem* A มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว LB-Ampicillin ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบ/นาที เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง จากนั้นตรวจวัดความขุ่นของเซลล์แขวนลอย ปรับความค่าความขุ่นของเซลล์แขวนลอย OD_{600} เท่ากับ ≤1.0 ในอาหารเหลว LB–Ampicillin ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ชักนำการแสดงออกของยีนด้วย isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) โดยปรับให้มีความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 1 mM IPTG และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบ/นาที และเลี้ยงต่อเป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยเติมสารละลาย 30mM Glycine และ 10 mM Succinic Acid เพื่อการชักนำการสังเคราะห์สาร ALA

1.2 การเตรียมสารละลายกรดอะมิโนลีวูลินิคให้มีความเข้มข้นสูง

นำสารละลาย ALA ที่ผลิตได้จากข้อ 1.1 ไปทำให้มีความเข้มข้นขึ้น โดยอาศัยเทคนิค evaporation ด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator) เตรียมโดยนำสารละลาย ALA ที่ผลิตได้ นำไปกรองผ่าน filter membrane ขนาด 0.2 ไมโครเมตร และนำเข้าเครื่องระเหยสารแบบหมุน จนตัวอย่างมีปริมาตรลดลง และมีความเข้มข้นสูงขึ้น จากนั้นนำตัวอย่างไปตรวจวิเคราะห์ปริมาณสาร ALA ที่ได้

1.3 การทดสอบคุณสมบัติของสาร ALA ที่มีผลในการกระตุ้นการเจริญเติบโตในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว/ใบเลี้ยงคู่

ทำการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวนอกเมล็ดพืชที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ ข้าว สำหรับทดสอบสาร ALA ขั้นตอนแรกฟอกเมล็ดพืชที่จะนำไปทดสอบด้วย Sodium hypochlorite แกว่งเบาๆเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ แกว่งเบาๆเป็นเวลา 5 นาที และล้างในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเป็นเวลา10 นาที นำเมล็ดวางบนกระดาษกรองเบอร์ 1 ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ ซับน้ำให้แห้ง

การทดสอบคุณสมบัติของสาร ALA ในการกระตุ้นการเจริญของเมล็ดพันธุ์พืชทดสอบ ได้แก่ ข้าว ฟักทอง ผักชีลาว พริกขี้หนูสวน คะน้า และคื่นช่าย โดยการนำเมล็ดพืชที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อ แช่ในสาร ALA ความเข้มข้น 1 mM และ 10 mM เป็นเวลา 60 นาที เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (แช่น้ำกลั่น) โดยปิดภาชนะที่แช่ให้มิดชิดหลีกเลี่ยงการโดนแสง จากนั้นนำเมล็ดพันธุ์พืชที่แช่ในสารละลาย ALA วางในขวดที่มีอาหารวุ้นที่นึ่งฆ่าเชื้อ นำไปบ่มในที่ไม่มีแสงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วจึงค่อยเปิดให้ได้รับแสงนาน 7 วัน บันทึกผลการเจริญเติบโต

2. การศึกษาคุณสมบัติของกรดอะมิโนลีวูลินิค (ALA) ในการยับยั้งการเจริญของวัชพืช

การผลิตสาร ALA ในระบบถังหมัก โดยเตรียมเชื้อตั้งต้น (starter) ของเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มี recombinant plasmid DNA ของยีน *hem* A มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว LB-Ampicillin (ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 2,000 มิลลิลิตร ที่ผ่านการนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบ/นาที เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นเชื้อตั้งต้น จากนั้นเตรียมอาหารเหลว LB–Ampicillin ปริมาตร 2,000 มิลลิลิตร ในโถแก้ว (chamber) สำหรับใช้ในการเลี้ยงเซลล์ ปิดระบบทั้งหมด แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที รอจนอาหารเย็น เติมเชื้อตั้งต้น ของ

กรมวิชาการเกษตร

เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มี recombinant plasmid DNA วัดความขุ่นของเซลล์แขวนลอย ด้วยเครื่อง spectrophotometer ปรับค่าความขุ่นของเซลล์แขวนลอย OD_{600} อยู่ในช่วง 0.7-1.0 ในอาหารเหลว LB–Ampicillin ปริมาตร 3,000 มิลลิลิตร จากนั้นทำการกระตุ้นการแสดงออกของยีน *hem* A ด้วยสาร isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) โดยปรับให้มีความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 1 mM IPTG นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตั้งค่าการกวนของใบพัดที่อัตราความเร็ว 130 รอบ/นาที เลี้ยงต่อจนครบ 6 ชั่วโมง แล้วจึงทำการชักนำการผลิตสาร ALA โดยการเติมสารตั้งต้นปฏิกิริยา 30mM Glycine และ 10 mM Succinic Acid เลี้ยงเซลล์ต่อโดยมีการอัดอากาศที่แรงดัน 0.65 MPa เป็นระยะทุก 1 นาที และหยุดพัก 1.5 นาที นานจนครบ 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำสารละลาย ALA ที่ผลิตได้ ไปกรองผ่าน filter membrane ขนาด 0.2 ไมโครเมตร เพื่อแยกเอาตะกอนเซลล์และโปรตีนของเซลล์แบคทีเรียออก โดยวิธีการกรองด้วยระบบสุญญากาศ

ตรวจวิเคราะห์ปริมาณสาร ALA ที่ผลิตได้ ด้วยเครื่อง spectrophotometer ดังนี้ ปั่นแยกตะกอนเซลล์ ดูดสารละลายส่วนใสปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองใหม่ เติมสารละลาย Sodium acetate buffer ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (pH 4.6) และสารละลาย Acetone ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาที และทำให้เย็นทันทีในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นเติมสารละลาย Ehrlich's reagent ปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที ตรวจวิเคราะห์ปริมาณ ALA ที่ผลิตได้ โดยนำสารละลายดังกล่าวไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 553 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสาร ALA ที่ความเข้มข้น 0-100 uM

2.1 การทดสอบคุณสมบัติของกรดอะมิโนลีวูลินิค (ALA) ในการยับยั้งการเจริญของวัชพืช

2.1.1 การทดสอบกลไกการเข้าทำลายชั้น membrane ของพืช

- การทดสอบในสภาวะกล่องควบคุมความชื้น (moist chamber) เตรียมโดยใช้กล่องพลาสติกใส ตัดสำลีเป็นชิ้น ชุบด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำมาหุ้มที่บริเวณก้านใบวัชพืช แบ่งพื้นที่ใบของวัชพืชเป็น 2 ส่วน ใช้ปิเปตหยดสารละลาย ALA (ที่ผลิตได้จากข้อ 1) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดบริเวณส่วนใดส่วนหนึ่งของใบในสภาวะไม่มีแสง ปิดฝากล่อง บ่มนานประมาณ 12-16 ชั่วโมง จากนั้นนำออกมาวางในสภาพที่มีแสง นาน 2-3 วัน สังเกตการเปลี่ยนแปลงของ cell membrane เปรียบเทียบกับใบพืชที่หยดด้วยน้ำกลั่น

- การทดสอบในกระถาง เตรียมต้นวัชพืช (บาหยา) ปลูกลงกระถาง เลือกใบที่ใช้ทดสอบ ทำเครื่องหมายแบ่งพื้นที่ใบของวัชพืชที่จะใช้ทดสอบเป็น 2 ส่วน ใช้ปิเปตหยดสารละลาย ALA (ที่ผลิตได้จากข้อ 1) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบริเวณผิวใบส่วนใดส่วนหนึ่ง บ่มในสภาวะไม่มีแสงนานประมาณ 12-16 ชั่วโมง จากนั้นนำกระถางออกมาวางในสภาพที่มีแสง นาน 7-14 วัน สังเกตการเปลี่ยนแปลงของใบ เปรียบเทียบกับใบพืชที่ไม่หยดสารละลาย ALA

2.2 การทดสอบชนิดของวัชพืชที่ตอบสนองต่อกลไกการเข้าทำลายของกรดอะมิโนลีวูลินิค

เตรียมต้นวัชพืชเพื่อนำมาใช้ทดสอบ ได้แก่ ลูกใต้ใบ น้ำนมราชสีห์ และหญ้ายาง ฉีดพ่นสาร ALA ที่ผลิตได้จากข้อ 1 บ่มในสภาวะไม่มีแสง นานประมาณ 12-16 ชั่วโมง จากนั้นนำออกมาวางในสภาพที่มีแสง สังเกตการเปลี่ยนแปลงของใบและลำต้น

3. การศึกษาคุณสมบัติของกรดอะมิโนลีวูลินิค (ALA) ในการควบคุมการเจริญเติบโตของหนอนกระทู้

ทำการเลี้ยงหนอนกระทู้ผักวัย 1-2 ในกล่องพลาสติกใส กล่องละ 1 ตัว แล้วจึงงดให้อาหารนาน 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงให้อาหารเทียมขนาด 0.5 x 0.5 เซนติเมตร ที่มีสาร ALA เคลือบบริเวณผิวอาหาร โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD มีกรรมวิธีการทดลอง 5 กรรมวิธี เปรียบเทียบปริมาณสาร ALA ในอาหาร ที่ระดับต่างๆ ได้แก่ 50 40

ศูนย์วิทยทรัพยากร

30 และ 20 ไมโครลิตร และเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ไม่ให้สาร ALA) แต่ละกรรมวิธีมีจำนวน 18 ซ้ำๆละ 1 ตัว จากนั้นให้ตัวหนอนอยู่ในที่มืด ไม่มีแสงนาน 1 คืน จากนั้นให้หนอนได้รับแสงและให้อาหารเทียมตามปกติ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ไม่ให้สาร ALA) เมื่อหนอนกินอาหารจนหมด หลังจากนั้นวันต่อมาจึงให้อาหารเทียมปกติ บันทึกผลการเจริญเติบโต วัดขนาดความยาวลำตัวทุก 3 วัน จนตัวหนอนตายหรือเข้าดักแด้

4. การพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์ของกรดอะมิโนลีวูลินิค (ALA) ในรูปแบบผงแห้ง

4.1 เตรียมรูปแบบผลิตภัณฑ์กรดอะมิโนลีวูลินิคใน (ALA) รูปแบบผงแห้ง โดยผลิต ALA จากเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่ได้รับการถ่ายฝาก พลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมของยีน *hem* A มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB -Ampicillin (ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) เมื่อกระตุ้นการทำงานของยีนด้วยสาร 1 mM IPTG แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง เติมสารตั้งต้น แล้วเลี้ยงเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง นำสารละลาย ALA ที่ผลิตได้ไปกรองผ่าน filter membrane ขนาด 0.2 ไมโครเมตร และผ่านกระบวนการ Freeze drying ที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส และ Spray drying ตั้งค่าต่างๆของเครื่อง ดังนี้ Inlet temperature 140 องศาเซลเซียส (Outlet temperature 80 องศาเซลเซียส) aspirator 100 % Pump 28% Nozzle cleaner 6 จนตัวอย่างมีสภาพเป็นผงแห้ง นำไปวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ aminolevulinic acid จากตัวอย่างผลิตภัณฑ์ด้วยเครื่อง UHPLC ดังนี้

- เตรียมตัวอย่างเพื่อตรวจวิเคราะห์ โดยนำตัวอย่างผลิตภัณฑ์ 0.1 g ละลายน้ำ 10 ml แล้วกรองผ่าน membrane filter ขนาดรูพรุน 0.2 um
- เตรียมสารละลายมาตรฐาน aminolevulinic acid ด้วย H_2O ให้ได้ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.2 และ 0.3 mg/ml
- การทำอนุพันธ์ด้วย AccqTag reagent นำสารมาตรฐาน/ตัวอย่าง มาทำปฏิกิริยากับ AccqTag reagent (Waters, USA) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 55 °ซ แล้วกรองผ่าน membrane filter ขนาดรูพรุน 0.2 um แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC
- วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ aminolevulinic acid ในผลิตภัณฑ์ตัวอย่าง ด้วยเครื่อง Ultra High Liquid Chromatograph (UHPLC) ผลิตภัณฑ์ของ Shimadzu รุ่น Nexera-2 LD-30AD เครื่องตรวจวัดชนิด Photo diode array รุ่น SPD-M20A ระบบฉีดสารอัตโนมัติรุ่น SIL-30AC โดยกำหนดสภาวะเครื่อง UHPLC สำหรับการวิเคราะห์สาร ดังนี้

คอลัมน์:	GL Sciences InertSustainSwift C18 (150mm × 2.1mm × 1.9 um)
อุณหภูมิคอลัมน์:	38 องศาเซลเซียส
อัตราการไหล:	0.5 ml/min
ตัวพา:	H_2O (ตัวพา A)
	2% acetate buffer pH 5 (ตัวพา B)
	Acetonitrile (ตัวพา C)
	ด้วยระบบ gradient : 0.1–7.5 นาที 83% (B) และ 17% (C)
	12.0–12.5 นาที 60% (A) และ 40% (C)
	12.51–15 นาที 100% (A)
เครื่องตรวจวัด:	Fluorescent detector: Ex 250 nm Em 395 nm
ปริมาตรการฉีด:	0.5 ul
เวลาที่ใช้:	15 นาที

กรมวิชาการเกษตร

4.2 ศึกษาความคงตัวของผลิตภัณฑ์ระหว่างการเก็บรักษา ที่สภาวะอุณหภูมิ 4 และ -20 องศาเซลเซียส โดยการนำออกมาตรวจวิเคราะห์ปริมาณ ALA ทุก 2 เดือน ด้วยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 553 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสาร ALA ที่ความเข้มข้น 0-100 uM คำนวนค่าร้อยละอัตราการลดลงของปริมาณกรดอะมิโนลีวูลินิคใน (ALA) จากสูตร

$$\text{อัตราการลดลงร้อยละ} = \frac{\text{ปริมาณสารตั้งต้น} - \text{ปริมาณสารสุดท้าย}}{\text{ปริมาณสารตั้งต้น}} \times 100$$

สถานที่ทำการวิจัย ห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ระยะเวลาดำเนินงาน ตุลาคม 2562 - กันยายน 2564

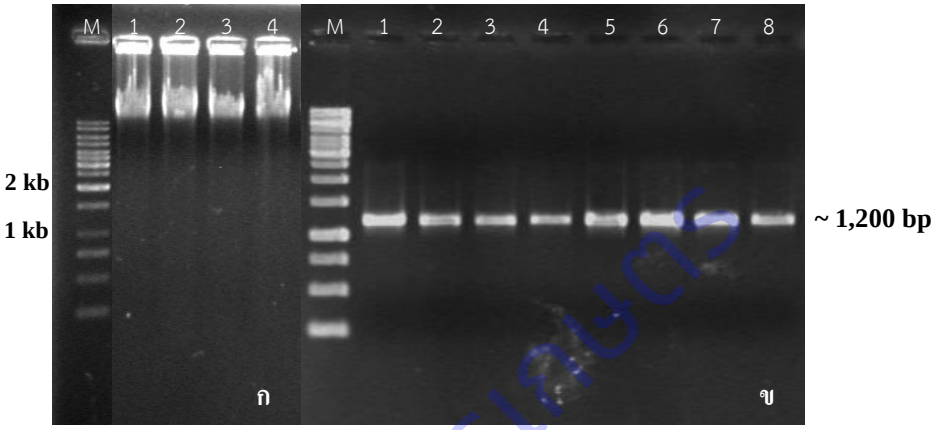
กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1.1 การผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิก โดยรีคอมบิแนนท์ *E. coli* (เริ่มต้นปี 2562 - สิ้นสุดปี 2563)

1. การสร้างรีคอมบิแนนท์ *E. coli* เพื่อการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิก

การสังเคราะห์ยีน *hem* A ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการผลิตเอนไซม์ ALA synthase จาก genomic DNA ของเชื้อ *Rhodobacter* sp. ด้วยวิธี PCR Amplification โดยนำไพรเมอร์ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะกับยีน *hem* A มาทดสอบกับกรดนิวคลีอิกของเชื้อแบคทีเรียโดยใช้เทคนิค PCR ได้ชิ้นส่วนของยีน *hem* A ที่มีขนาดประมาณ 1,200 bp ดังภาพที่ 1.1-1



ภาพที่ 1.1-1 แสดง genomic DNA ของเชื้อแบคทีเรีย *Rhodobacter* sp. (ก) และ ผลผลิต PCR ของยีน *hem* A ซึ่งมีขนาดประมาณ 1,200 bp (ข)

จากนั้นทำการโคลนชิ้นยีน *hem* A และเชื่อมต่อเข้าสู่เวคเตอร์พาหะ Protein Expression Vector (aLICator LIC Cloning and Expression system) ซึ่งมีแผนที่แสดงตำแหน่งของยีน *hem* A ดังภาพที่ 1.1-2 โดยออกแบบไพรเมอร์ที่มีตำแหน่งของปลาย 5’ ที่สามารถเชื่อมต่อกับส่วนของเวคเตอร์ ดังนี้

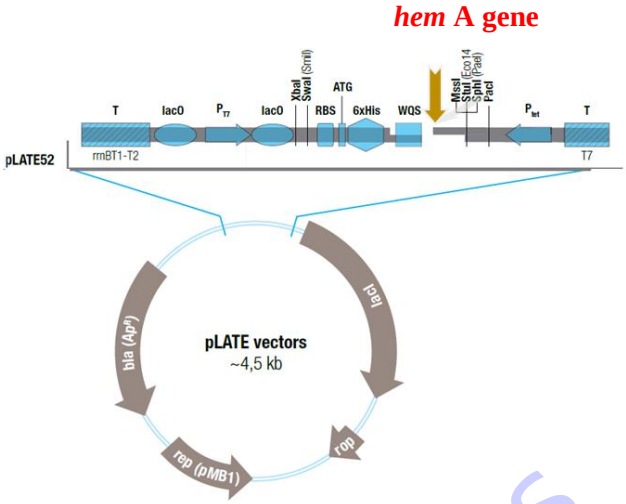
Ex_HemA-F 5’ GGT TGG GAA TTG CAA GAC TAC AAT CTG GCA CTC GAT ACC 3’

Ex_HemA-R 5’ GGA GAT GGG AAG TCA TTA GGC AAC GAC CTC GGC GCG ATT C 3’

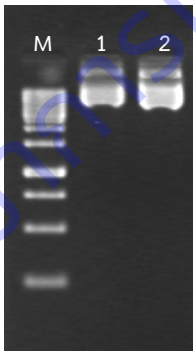
แล้วจึงถ่ายฝากพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมของยีน *hem* A เข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) เพื่อการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน ได้พลาสมิดดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 5.7 กิโลเบส และถ่ายชิ้นส่วนของยีนเข้าสู่เซลล์ *E. coli* (DH5α) คัดเลือกโคลนที่มีชิ้นยีน และเลี้ยงเพิ่มปริมาณเซลล์ในอาหารเหลว LB ที่มีสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 ug/ml เพื่อทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอได้ ดังภาพที่ 1.1-3 ตรวจสอบการปรากฏของชิ้นยีนด้วยเทคนิค PCR พบว่าเมื่อนำผลผลิต PCR มาแยกบน 1.5 เปอร์เซ็นต์ agarose gel electrophoresis ย้อมเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide (ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จากนั้นนำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV Transiluminators เปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker (Fermentas) สามารถตรวจพบชิ้นยีนที่มีขนาดประมาณ 1,200 bp ดังภาพที่ 1.1-4 และเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hem* A ที่โคลนได้ ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบว่า มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ ส่วนของ 5-aminolevulic acid synthase isozyme (*hem*A) gene ของเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* (Accession no. L07490.1) ที่ identity 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีขนาด 1,224 bp ดังภาพที่ 1.1-5 และเมื่อแปรรหัส

กรมวิชาการเกษตร

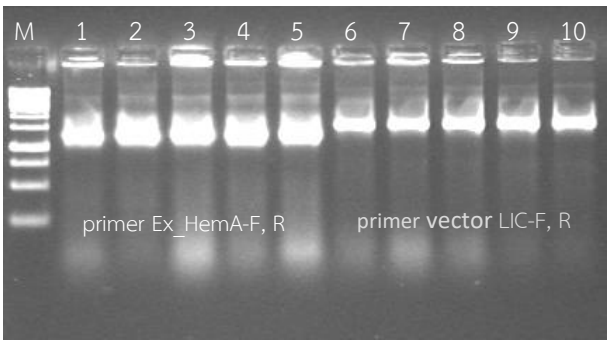
เป็นลำดับของกรดอะมิโน พบว่า มีความคล้ายคลึงกับ 5-aminolevulinate synthase ของ *R. sphaeroides* (Accession no. WP_011337894.1 ที่ identity 100 เปอร์เซ็นต์ ดังภาพที่ 1.1-6



ภาพที่ 1.1-2 แผนที่ตำแหน่งของยีน *hem* A ที่สอดแทรกอยู่ภายใน Expression Vector (aLICator LIC Cloning and Expression system)



ภาพที่ 1.1-3 แสดงพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมของ expression vector ที่มียีน *hem* A Lane M; DNA Marker 1 kb, Lane 1-2; พลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมที่มียีน *hem* A ซึ่งได้รับการถ่ายฝากเข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3)



ภาพที่ 1.1-4 การตรวจสอบการปรากฏของยีน *hem* A ในพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม โดยใช้เทคนิค PCR Lane M; DNA Marker 1 kb, Lane 1-5; ผลผลิต PCR จากไพรเมอร์ยีน Ex_HemA-F, Ex_HemA-R, Lane 6-10; ผลผลิต PCR จากไพรเมอร์เวคเตอร์ (LIC Forward, LIC Reverse

กรมวิชาการเกษตร

Rhodobacter sphaeroides 5-aminolevulic acid synthase isozyme (hemA) gene, complete cds, and ORFA
Sequence ID: L07490.1Length: 3681Number of Matches: 1
Range 1: 1947 to 3170GenBankGraphics Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2261 bits(1224)	0.0	1224/1224(100%)	0/1224(0%)	Plus/Plus

```
Query  1     ATGGACTACAATCTGGCACTCGATACCGCTCTGAACCGGCTCCATACCGAGGGCCGGTAC  60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1947  ATGGACTACAATCTGGCACTCGATACCGCTCTGAACCGGCTCCATACCGAGGGCCGGTAC  2006

Query  61    CGGACCTTCATCGACATCGAGCGGCGCAAGGGTGCCTTCCCGAAAGCCATGTGGCGCAAG  120
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2007  CGGACCTTCATCGACATCGAGCGGCGCAAGGGTGCCTTCCCGAAAGCCATGTGGCGCAAG  2066

Query  121   CCCGACGGGAGCGAGAAGGAAATCACCGTCTGGTGCGGCAACGACTATCTCGGCATGGGC  180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2067  CCCGACGGGAGCGAGAAGGAAATCACCGTCTGGTGCGGCAACGACTATCTCGGCATGGGC  2126

Query  181   CAGCATCCGGTGGTGCTGGGGGCCATGCACGAGGCGCTGGATTCGACCGGCGCCGGGTCG  240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2127  CAGCATCCGGTGGTGCTGGGGGCCATGCACGAGGCGCTGGATTCGACCGGCGCCGGGTCG  2186

Query  241   GGCGGCACGCGCAACATCTCGGGCACCACGCTCTATCACAAGCGCCTCGAGGCCGAGCTC  300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2187  GGCGGCACGCGCAACATCTCGGGCACCACGCTCTATCACAAGCGCCTCGAGGCCGAGCTC  2246

Query  301   GCCGACCTGCACGGCAAGGAAGCGGCGCTGGTCTTCTCGTCGGCCTATATCGCCAACGAC  360
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2247  GCCGACCTGCACGGCAAGGAAGCGGCGCTGGTCTTCTCGTCGGCCTATATCGCCAACGAC  2306

Query  361   GCGACCCTCTCGACGCTGCCGCAGCTGATCCCGGGCCTCGTCATCGTCTCGGACAAGTTG  420
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2307  GCGACCCTCTCGACGCTGCCGCAGCTGATCCCGGGCCTCGTCATCGTCTCGGACAAGTTG  2366

Query  421   AACCACGCTTCGATGATCGAGGGCATCCGCCGCTCGGGCACCGAGAAGCACATCTTCAAG  480
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2367  AACCACGCTTCGATGATCGAGGGCATCCGCCGCTCGGGCACCGAGAAGCACATCTTCAAG  2426

Query  481   CACAATGACCTCGACGACCTGCGCCGGATCCTGACCTCGATCGGCAAGGACCGTCCGATC  540
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2427  CACAATGACCTCGACGACCTGCGCCGGATCCTGACCTCGATCGGCAAGGACCGTCCGATC  2486

Query  541   CTCGTGGCCTTCGAATCCGTCTATTCGATGGATGGCGACTTCGGCCGCATCGAGGAGATC  600
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2487  CTCGTGGCCTTCGAATCCGTCTATTCGATGGATGGCGACTTCGGCCGCATCGAGGAGATC  2546

Query  601   TGCGACATCGCCGACGAGTTCGGCGCGCTGAAATACATCGACGAGGTCCATGCCGTCGGC  660
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2547  TGCGACATCGCCGACGAGTTCGGCGCGCTGAAATACATCGACGAGGTCCATGCCGTCGGC  2606

Query  661   ATGTACGGCCCCCGCGGCGGCGGCGTGGCCGAGCGGGACGGGCTGATGGACCGGATCGAC  720
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2607  ATGTACGGCCCCCGCGGCGGCGGCGTGGCCGAGCGGGACGGGCTGATGGACCGGATCGAC  2666

Query  721   ATCATCAACGGGACGCTGGGCAAGGCCTATGGCGTGTTCGGCGGCTATATCGCGGCCTCG  780
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2667  ATCATCAACGGGACGCTGGGCAAGGCCTATGGCGTGTTCGGCGGCTATATCGCGGCCTCG  2726

Query  781   TCAAAGATGTGCGACGCGGTGCGCTCCTACGCGCCGGGCTTCATCTTCTCGACCTCGCTG  840
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2727  TCAAAGATGTGCGACGCGGTGCGCTCCTACGCGCCGGGCTTCATCTTCTCGACCTCGCTG  2786

Query  841   CCGCCCGTCGTGGCGGCCGGTGCGGCGGCCTCGGTGCGCCACCTCAAGGGCGATGTGGAG  900
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2787  CCGCCCGTCGTGGCGGCCGGTGCGGCGGCCTCGGTGCGCCACCTCAAGGGCGATGTGGAG  2846
```

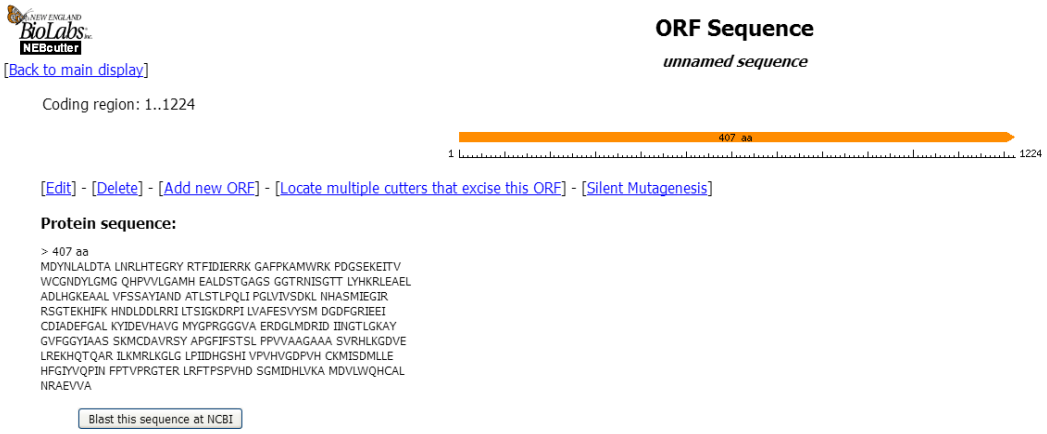
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ภาพที่ 1.1-5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบว่ามีความคล้ายคลึงกับส่วนของ 5-aminolevulic acid synthase isozyme (*hem*A) gene ของเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* (Accession no. L07490.1) ที่ identity 100 เปอร์เซ็นต์

```
Query  901   CTGCGCGAGAAGCACCAGACCCAGGCCCGCATCCTGAAGATGCGCCTCAAGGGGCTCGGC  960
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2847  CTGCGCGAGAAGCACCAGACCCAGGCCCGCATCCTGAAGATGCGCCTCAAGGGGCTCGGC  2906

Query  961   CTGCCGATCATCGACCACGGCTCGCACATCGTGCCGGTCCATGTGGGCGACCCCGTGCAC  1020
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2907  CTGCCGATCATCGACCACGGCTCGCACATCGTGCCGGTCCATGTGGGCGACCCCGTGCAC  2966

Query  1021  TGCAAGATGATCTCGGACATGCTGCTCGAGCATTTCGGCATCTATGTCCAGCCGATCAAC  1080
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2967  TGCAAGATGATCTCGGACATGCTGCTCGAGCATTTCGGCATCTATGTCCAGCCGATCAAC  3026

Query  1081  TTCCCGACCGTGCCGCGCGGGACCGAGCGGCTGCGCTTCACCCCGTCGCCCGTGCATGAT  1140
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  3027  TTCCCGACCGTGCCGCGCGGGACCGAGCGGCTGCGCTTCACCCCGTCGCCCGTGCATGAT  3086

Query  1141  TCCGGCATGATCGATCACCTCGTGAAGGCCATGGACGTGCTCTGGCAGCACTGTGCGCTG  1200
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  3087  TCCGGCATGATCGATCACCTCGTGAAGGCCATGGACGTGCTCTGGCAGCACTGTGCGCTG  3146

Query  1201  AATCGCGCCGAGGTCGTTGCCTGA  1224
             ||||||||||||||||||||||||
Sbjct  3147  AATCGCGCCGAGGTCGTTGCCTGA  3170
```

ภาพที่ 1.1-5 (ต่อ) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบว่ามีความคล้ายคลึงกับส่วนของ 5-aminolevulic acid synthase isozyme (*hem*A) gene ของเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* (Accession no. L07490.1) ที่ identity 100 เปอร์เซ็นต์

กรมวิชาการเกษตร



[Back to main display]

ORF Sequence

unnamed sequence

Coding region: 1..1224

407 aa

1 1224

[Edit] - [Delete] - [Add new ORF] - [Locate multiple cutters that excise this ORF] - [Silent Mutagenesis]

Protein sequence:

> 407 aa
MDYNLALDTA LNRLHTEGRY RTFIDIERRK GAFPKAMWRK PDGSEKEITV
WCGNDYLGMG QHPVVLGAMH EALDSTGAGS GGTRNISGTT LYHKRLEAEL
ADLHGKEAAL VFSSAYIAND ATLSTLPQLI PGLVIVSDKL NHASMIEGIR
RSGTEKHIFK HNDLDDLRRI LTSIGKDRPI LVAFESVYSM DGDFGRIEEI
CDIADEFGAL KYIDEVHAVG MYGPRGGGVA ERDGLMDRID IINGTLGKAY
GVFGGYIAAS SKMCDAVRSY APGFIFSTSL PPVVAAGAAA SVRHLKGDVE
LREKHQTQAR ILKMRLKGLG LPIIDHGSHI VPVHVGDPVH CKMISDMLLE
HFGIYVQPIN FPTVPRGTER LRFTPSPVHD SGMIDHLVKA MDVLWQHCAL
NRAEVVA

Blast this sequence at NCBI

5-aminolevulinate synthase [Rhodobacter sphaeroides]
Sequence ID: WP_011337894.1Length: 407Number of Matches: 1
Related Information
Gene-associated gene details
Identical Proteins-Identical proteins to WP_011337894.1
Range 1: 1 to 407GenPeptGraphics Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
805 bits(2078)	0.0	407/407(100%)	407/407(100%)	0/407(0%)

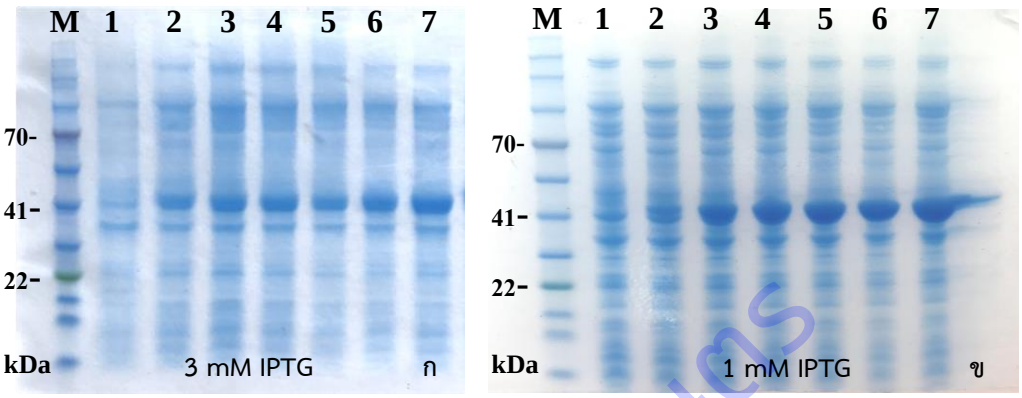
```
Query  1    MDYNLALDTALNRLHTEGRYRTFIDIERRKGAFPKAMWRKPDGSEKEITVWCGNDYLGMG  60
            MDYNLALDTALNRLHTEGRYRTFIDIERRKGAFPKAMWRKPDGSEKEITVWCGNDYLGMG
Sbjct  1    MDYNLALDTALNRLHTEGRYRTFIDIERRKGAFPKAMWRKPDGSEKEITVWCGNDYLGMG  60

Query  61   QHPVVLGAMHEALDSTGAGSGGTRNISGTTLYHKRLEAELADLHGKEAALVFSSAYIAND  120
            QHPVVLGAMHEALDSTGAGSGGTRNISGTTLYHKRLEAELADLHGKEAALVFSSAYIAND
Sbjct  61   QHPVVLGAMHEALDSTGAGSGGTRNISGTTLYHKRLEAELADLHGKEAALVFSSAYIAND  120

Query  121  ATLSTLPQLIPGLVIVSDKLNHASMIEGIRRSGTEKHIFKHNDLDDLRRILTSIGKDRPI  180
            ATLSTLPQLIPGLVIVSDKLNHASMIEGIRRSGTEKHIFKHNDLDDLRRILTSIGKDRPI
Sbjct  121  ATLSTLPQLIPGLVIVSDKLNHASMIEGIRRSGTEKHIFKHNDLDDLRRILTSIGKDRPI  180

Query  181  LVAFESVYSMDGDFGRIEEICDIADEFGALKYIDEVHAVGMYGPRGGGVAERDGLMDRID  240
            LVAFESVYSMDGDFGRIEEICDIADEFGALKYIDEVHAVGMYGPRGGGVAERDGLMDRID
Sbjct  181  LVAFESVYSMDGDFGRIEEICDIADEFGALKYIDEVHAVGMYGPRGGGVAERDGLMDRID  240

Query  241  IINGTLGKAYGVFGGYIAASSKMCDAVRSYAPGFIFSTSLPPvvaagaaasvRHLKGDVE  300
            IINGTLGKAYGVFGGYIAASSKMCDAVRSYAPGFIFSTSLPPVVAAGAAASVRHLKGDVE
Sbjct  241  IINGTLGKAYGVFGGYIAASSKMCDAVRSYAPGFIFSTSLPPVVAAGAAASVRHLKGDVE  300

Query  301  LREKHQTQARILKMRLKGLGLPIIDHGSHIVPVHVGDPVHCKMISDMLLEHFGIYVQPIN  360
            LREKHQTQARILKMRLKGLGLPIIDHGSHIVPVHVGDPVHCKMISDMLLEHFGIYVQPIN
Sbjct  301  LREKHQTQARILKMRLKGLGLPIIDHGSHIVPVHVGDPVHCKMISDMLLEHFGIYVQPIN  360

Query  361  FPTVPRGTERLRFTPSPVHDSGMIDHLVKAMDVLWQHCALNRAEVVA  407
            FPTVPRGTERLRFTPSPVHDSGMIDHLVKAMDVLWQHCALNRAEVVA
Sbjct  361  FPTVPRGTERLRFTPSPVHDSGMIDHLVKAMDVLWQHCALNRAEVVA  407
```

ภาพที่ 1.1-6 การเปรียบเทียบลำดับของอะมิโนแอซิดของยีน *hem*A ที่ได้จากการโคลนเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีน NCBI ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับ 5-aminolevulinate synthase ของ *Rhodobacter sphaeroides* (Accession No. WP_011337894.1) ที่ identity 100 เปอร์เซ็นต์

ศูนย์วิทยทรัพยากร

การศึกษาการแสดงออกในระดับโปรตีนของรีคอมบิแนนท์ *E. coli*

การถ่ายฝากพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมของยีน *hem* A เข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) เพื่อการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน เปรียบเทียบการชักนำการแสดงออกของยีนด้วยสาร IPTG ที่ความเข้มข้น 1 mM และ 3 mM เป็นเวลานาน 6 ชั่วโมง เก็บเซลล์ทุก 1 ชั่วโมง เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE พบการแสดงออกของโปรตีนสูงสุดในชั่วโมงที่ 6 โดยรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ ALA synthase ที่ได้มีขนาดประมาณ 45 กิโลดาลตัน ดังภาพที่ 1.1-7



ภาพที่ 1.1-7 การแสดงออกของโปรตีน fusion protein (ลูกศรชี้) ที่ได้รับการชักนำการแสดงออกของยีน *hem* A โดย 3mM IPTG (ก) และ 1 mM IPTG (ข) Lane M; protein marker Lane 1-8; recombinant *E. coli* BL21 (DE3) ที่ได้รับการกระตุ้นนาน 0, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 ชั่วโมง ตามลำดับ

2. การผลิตกรดอะมิโนลีวูลินิค 5-Aminolevulinic acid (ALA)

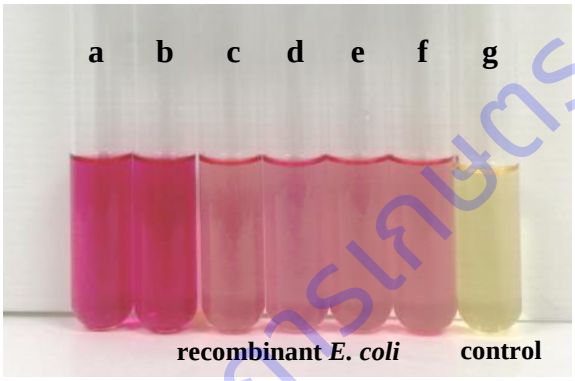
2.1 การศึกษาชนิดของสารตั้งต้นที่มีผลต่อการชักนำการผลิตกรดอะมิโนลีวูลินิค

การทดสอบการชักนำการผลิตสาร ALA จากการชักนำการทำงานของยีน *hem* A ด้วย 1 mM IPTG ทำให้มีกิจกรรมของเอนไซม์ ALA synthase โดยใช้เซลล์ตั้งต้น OD_{600} = 0.5 เมื่อเวลาผ่านไปนาน 6 ชั่วโมง เติมสารตั้งต้นชนิดต่างๆ ได้แก่ 60mM Glycine, 30mM Glycine +10mM Succinic Acid, 10 mM L-Glutamic Acid, 10 mM Levulenic Acid, 30 mM Levulenic Acid ทำการชักนำการผลิตสาร ALA โดยการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบ/นาที และเลี้ยงเซลล์ต่อจนครบ 24 ชั่วโมง ทำการตรวจวัดปริมาณสาร ALA ที่ผลิตได้ โดยการทำปฏิกิริยากับสารละลาย Ehrlich's reagent เมื่อนำสารละลายดังกล่าวไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 553 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสาร ALA ที่ความเข้มข้น 0-100 uM พบว่า 30mM Glycine + 10 mM Succinic Acid สามารถจากการชักนำการผลิตสาร ALA ได้ดีที่สุด โดยวัดปริมาณสาร ALA ได้เท่ากับ 249.970 uM รองลงมา ได้แก่ การเติมสาร 60mM Glycine, 30 mM Levulenic Acid, 10 mM L-Glutamic Acid และ 10 mM Levulenic Acid โดยวัดปริมาณสาร ALA ได้ 204.937, 75.519, 47.996 และ 46.016 uM ตามลำดับ ดังตารางที่ 1.1-1 ภาพที่ 1.1-8

กรมวิทยาศาสตร์

ตารางที่ 1.1-1 แสดงผลการเปรียบเทียบปริมาณการสังเคราะห์กรดอะมิโนลีวูลินิค (ALA) ที่ผลิตได้โดยสารตั้งต้นชนิดต่างๆภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง

สารตั้งต้น	ปริมาณสาร ALA (uM)
60 mM Glycine	204.937
30 mM Glycine + 10 mM Succinic Acid	249.970
10 mM L-Glutamic Acid	47.996
10 mM Levulenic Acid	46.016
30 mM Levulenic Acid	75.519
ชุดควบคุม (ไม่ใส่สารตั้งต้น)	44.994



ภาพที่ 1.1-8 การผลิตสาร aminolevulinic acid (ALA) จาก recombinant *E. coli* ที่ได้เลี้ยงในอาหาร LB + ampicillin 100 mg/L +1mM IPTG และเติมสารตั้งต้นแต่ละชนิด ดังนี้ 30mM Glycine + 10 mM Succinic Acid (a), 60mM Glycine (b), 30 mM Levulenic Acid (c), 10 mM L-Glutamic Acid (d), 10 mM Levulenic Acid (e), LB+ ampicillin 100 mg/L +1mM IPTG (f), และ LB+ ampicillin 100 mg/L (g)

กรมวิชาการเกษตร

2.2 การศึกษาสภาวะปัจจัยที่มีผลต่อการสังเคราะห์กรดอะมิโนลีวูลินิค

2.2.1 การศึกษาผลของสภาวะอุณหภูมิที่มีผลต่อการสังเคราะห์กรดอะมิโนลีวูลินิค

จากการศึกษาอุณหภูมิที่มีผลต่อการผลิตสาร ALA ของ recombinant *E. coli* โดยการเปรียบเทียบอุณหภูมิ 3 ช่วง ได้แก่ 30 37 และ 45 องศาเซลเซียส พบว่า อุณหภูมิที่มีผลให้สามารถผลิตสาร ALA ได้ในปริมาณสูงที่สุด คือ 30 รองลงมาคือ 37 และ 45 องศาเซลเซียส โดยให้ค่าเฉลี่ยการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนลีวูลินิค เท่ากับ 354.254 351.288 และ 217.175 uM ตามลำดับ ดังตารางที่ 1.1-2

2.2.2 การศึกษาผลของสภาวะค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหารที่มีผลต่อการสังเคราะห์กรดอะมิโนลีวูลินิค

จากการศึกษาผลค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหารที่มีผลต่อการผลิตสาร ALA ของ recombinant *E. coli* โดยการเปรียบเทียบระดับความเป็นกรด-ด่าง ของอาหาร LB ในช่วง 5 6 และ 7 พบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่าง ของอาหาร LB มีผลต่อปริมาณการผลิตกรดอะมิโนลีวูลินิค โดยพบว่า ที่ระดับความเป็นกรด-

ด่าง ของอาหาร LB เท่ากับ 7 จะให้ค่าเฉลี่ยปริมาณกรดอะมิโนลีวูลินิค สูงที่สุด เท่ากับ 364.29 uM รองลงมา คือ pH 6 และ 5 โดยให้ค่าการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนลีวูลินิค เท่ากับ 331.34 และ 231.85 uM ตามลำดับ ดังตารางที่ 1.1-2

ตารางที่ 1.1-2 แสดงผลของสภาวะอุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่มีผลต่อการสังเคราะห์กรดอะมิโนลีวูลินิค (ALA)

สภาวะปัจจัย / ปริมาณสาร ALA (uM)	อุณหภูมิ (°C)			pH		
	30	37	45	5	6	7
รีคอมบิแนนท์ *E. coli*	354.254	351.288	217.175	231.85	331.34	364.29

2.3 การศึกษากระบวนการผลิตกรดอะมิโนลีวูลินิคในระบบถังหมักขนาดเล็ก

2.3.1 การทดสอบการผลิตกรดอะมิโนลีวูลินิค (ALA) ในระบบถังหมัก (BIOFLO 2000 Fermenter)

จากการทดสอบการขยายขนาดการผลิตสาร ALA โดยการนำเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่ได้รับการถ่ายฝากพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมของยีน *hem* A มาทำการเพาะเลี้ยงในระบบถังหมัก (BIOFLO 2000 Fermenter) ดังภาพที่ 1.1-9 โดยใช้อาหารเหลว LB -Ampicillin (ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 3,000 มิลลิลิตร เมื่อกระตุ้นการทำงานของยีนด้วยสาร 1 mM IPTG และมีการอัดอากาศเป็นระยะ นาน 6 ชั่วโมง จึงทำการชักนำการผลิตสาร ALA ด้วยสารตั้งต้นปฏิกิริยา 30mM Glycine และ 10 mM Succinic Acid นำไปเลี้ยงเพิ่มปริมาณเซลล์ในสภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยมีอัตราการกวนด้วยความเร็ว 130 รอบ/นาที จนครบเวลานาน 12-16 ชั่วโมง แล้วจึงนำสารละลาย ALA ที่ผลิตได้ นำไปกรองผ่าน filter membrane ขนาด 0.2 ไมโครเมตร ดังภาพที่ 1.1-10 เมื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณสาร ALA พบว่า การผลิตในระบบถังหมักขนาดเล็กข้างต้น สามารถเพิ่มปริมาณการผลิตสาร ALA ได้ในปริมาณที่มากขึ้นเท่ากับ 489.073 µM ซึ่งจะเป็นแนวทางในพัฒนาและศึกษาสภาวะปัจจัยที่เหมาะสมในการผลิตสาร ALA ต่อไป

ภาพที่ 1.1-9 การผลิตกรดอะมิโนลีวูลินิค (ALA) ในระบบถังหมักขนาดเล็ก (BIOFLO 2000 Fermenter)

กรมวิทยาศาสตร์

ภาพที่ 1.1-10 การแยกตะกอนเซลล์และโปรตีนของเซลล์แบคทีเรียออกโดยวิธีการกรองด้วยระบบสุญญากาศผ่าน filter membrane ขนาด 0.2 ไมโครเมตร

2.3.2 การทดสอบการผลิตกรดอะมิโนลีวูลินิคในระบบถังหมักขนาด 50 ลิตร

การพัฒนากระบวนการผลิตกรดอะมิโนลีวูลินิค (ALA) จากการทดสอบเลี้ยงเพิ่มปริมาณเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มี recombinant plasmid ของยีน *hem* A ในอาหารเหลว LB -Ampicillin (ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 20 ลิตร ในระบบถังหมักขนาด 50 ลิตร ดังภาพที่ 1.1-11 และกระตุ้นการแสดงออกของยีน *hem* A ด้วยสาร 1 mM IPTG และมีอัตราการกวนด้วยความเร็วประมาณ 80 รอบ/นาที เมื่อครบ 6 ชั่วโมง จึงทำการเติมสารตั้งต้นปฏิกิริยาการผลิตสาร ALA โดยการเติมสาร 30mM Glycine และ 10 mM Succinic Acid และเลี้ยงเซลล์ต่อจนครบ 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำสารละลาย ALA ที่ผลิตได้ ไปกรองผ่าน filter membrane ขนาด 0.2 ไมโครเมตร เพื่อแยกเอาตะกอนเซลล์ และโปรตีนของเซลล์แบคทีเรียออก โดยวิธีการกรองด้วยระบบสุญญากาศ เมื่อตรวจวิเคราะห์ปริมาณสาร ALA ด้วยเครื่อง spectrophotometer พบว่า สามารถผลิต ALA ได้ในปริมาณสูงถึง 615.928 uM อย่างไรก็ตามเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาและเพื่อให้สารที่ผลิตได้มีความเข้มข้นมากยิ่งขึ้น งานวิจัยนี้จึงได้เตรียมกรดอะมิโนลีวูลินิคให้อยู่ในรูปแบบผงแห้ง โดยใช้เทคนิคการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze drying) และ spray dry ดังภาพที่ 1.1-12 และ 1.1-13

กรมวิทยาศาสตร์

ภาพที่ 1.1-11 การผลิตกรดอะมิโนลีวูลินิค (ALA) ในระบบถังหมักขนาด 50 ลิตร

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 1.2 การศึกษาประสิทธิภาพของกรด 5-อะมิโนลีวูลินิคเพื่อการประยุกต์ใช้ทางการเกษตร

(เริ่มต้นปี 2563 สิ้นสุดปี 2564)

1. การศึกษาคุณสมบัติของกรดอะมิโนลีวูลินิค (ALA) ในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช

- การทดสอบคุณสมบัติของสาร ALA ที่ความเข้มข้นต่างๆในการกระตุ้นการเจริญเติบโตในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว/ใบเลี้ยงคู่

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพของสาร ALA (สารมาตรฐาน) ในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช เพื่อทดสอบหาปริมาณสารที่มีผลต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ ข้าว ฟักทอง ผักชีลาว พริกขี้หนูสวน คะน้า และคื่นฉ่าย พบว่า ที่ความเข้มข้นของสารละลาย 1 mM ALA สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของรากและลำต้น ของพืช ได้แก่ ข้าว คะนาต้น พริกขี้หนูสวน และผักชีลาว ได้ดีที่สุด เมื่อเทียบกับที่ความเข้มข้นของสาร 10mM ALA และชุดความคุม (น้ำกลั่น) ส่วนที่ความเข้มข้นสารละลาย 10 mM ALA สามารถกระตุ้นการงอกและเจริญเติบโตของฟักทองได้ดีที่สุด เมื่อเทียบกับ 1 mM ALA และชุดความคุม (น้ำกลั่น) ส่วนในคื่นฉ่าย พบว่า สาร ALA ไม่มีผลต่อการงอกและการเจริญเติบโต (ภาพที่ 1.2-1)

การผลิตสารละลายกรดอะมิโนลีวูลินิค (ALA) จากการนำเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่ได้รับการถ่ายฝากพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมของยีน *hem* A มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB -Ampicillin (ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) เมื่อกระตุ้นการทำงานของยีนด้วยสาร 1 mM IPTG แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง และนำสารละลาย ALA ที่ผลิตได้ไปกรองผ่าน filter membrane ขนาด 0.2 ไมโครเมตร แล้วนำสารที่ได้ไปทำให้มีความเข้มข้นสูงขึ้น ด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator) (ภาพที่ 1.2-2) โดยได้สาร ALA ที่มีความเข้มข้น 4,177.82 uM

เมื่อนำสารละลายกรดอะมิโนลีวูลินิค (ALA) ที่ผลิตได้ข้างต้น มาปรับความเข้มข้นของสารเท่ากับ 1mM ALA เพื่อนำมาทดสอบการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช ได้แก่ ข้าว คะน้าต้น และแตงกวา พบว่า กรดอะมิโนลีวูลินิค (ALA) มีผลในการกระตุ้นการเจริญเติบโต โดยช่วยเพิ่มจำนวน ความยาวราก และความสูงต้น ของเมล็ดกวางตุ้ง และแตงกวา ในคะน้ามีผลในการเพ่มจำนวนราก และในเมล็ดข้าวมีผลในการเพิ่มความยาวราก เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (แช่น้ำกลั่น) (ตารางที่ 1.2-1, ภาพที่ 1.2-3)

กรมวิชาการเกษตร

ข้าว หลังการทดสอบ 7 วัน

ชุดควบคุม(น้ำกลั่น) **1 mM ALA** **10 mM ALA**

คะน้า หลังการทดสอบ 7 วัน

ชุดควบคุม(น้ำกลั่น) **1 mM ALA** **10 mM ALA**

พริกขี้หนูสวน หลังการทดสอบ 16 วัน

ชุดควบคุม(น้ำกลั่น) **1 mM ALA** **10 mM ALA**

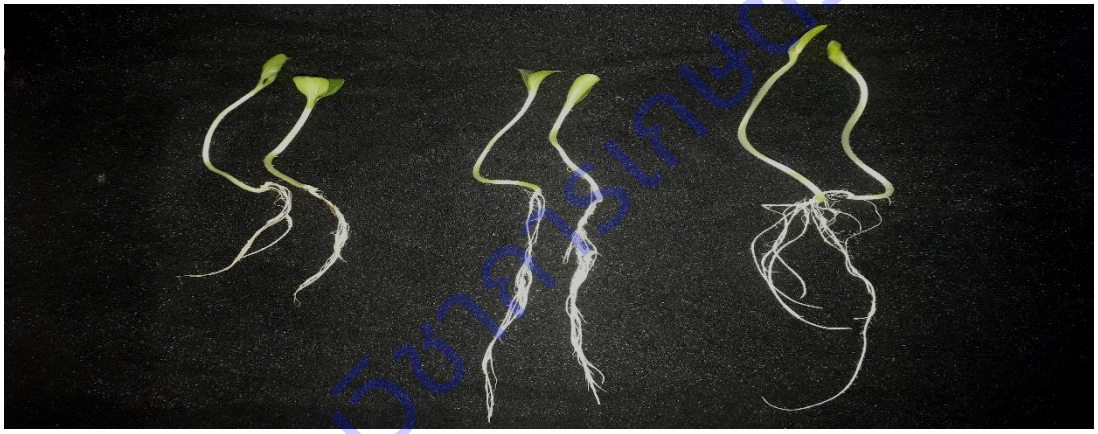
ภาพที่ 1.2-1 การเปรียบเทียบความเข้มข้นต่างๆของสาร ALA ที่มีผลในการกระตุ้นการเจริญเติบโตในพืชทดสอบ (ข้าว คะน้าต้น พริกขี้หนูสวน ผักชีลาว และฟักทอง)

กรมวิชาการเกษตร

ผักชีลาว หลังการทดสอบ 11 วัน

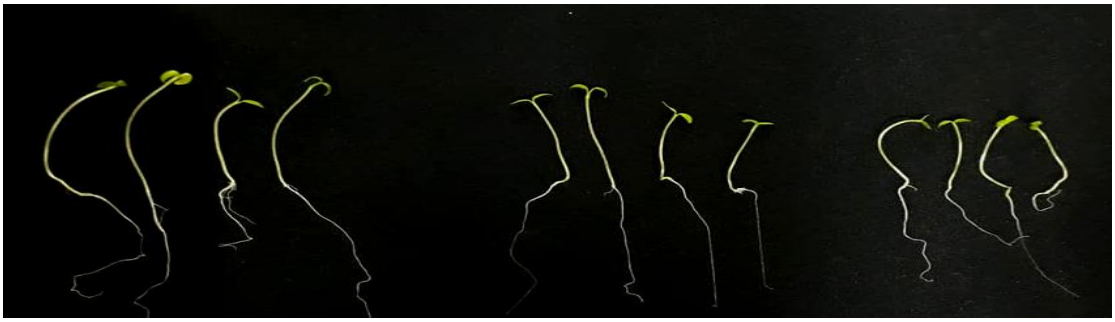
ชุดควบคุม(น้ำกลั่น) **1 mM ALA** **10 mM ALA**

ฟักทอง หลังการทดสอบ 11 วัน



ชุดควบคุม(น้ำกลั่น) **1 mM ALA** **10 mM ALA**

คื่นช่าย หลังการทดสอบ 16 วัน



ชุดควบคุม(น้ำกลั่น) **1 mM ALA** **10 mM ALA**

ภาพที่ 1.2-1 (ต่อ) การเปรียบเทียบความเข้มข้นต่างๆของสาร ALA ที่มีผลในการกระตุ้นการเจริญเติบโตในพืชทดสอบ (ข้าว คะน้าต้น พริกขี้หนูสวน ผักชีลาว ฟักทอง และคื่นช่าย)

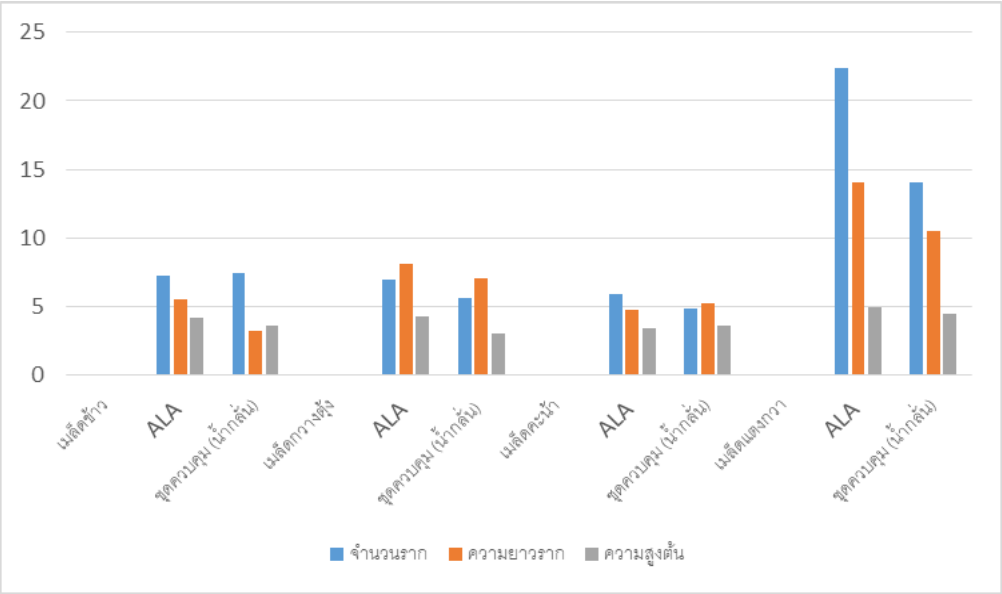
กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 1.2-2 การเตรียมสารละลายกรดอะมิโนลีวูลินิคให้มีความเข้มข้นสูง ด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator)

ตารางที่ 1.2-1 ค่าเฉลี่ยของจำนวนราก ความยาวราก และความสูงต้น ของพืชทดสอบ (ข้าว กวางตุ้ง คะน้า และแตงกวา) ที่ได้รับสารสารละลายกรดอะมิโนลีวูลินิค

พืชทดสอบ/กรรมวิธี	ค่าเฉลี่ย		
	จำนวนราก	ความยาวราก (ซม.)	ความสูงต้น (ซม.)
เมล็ดข้าว			
ALA	7.22	5.54	4.14
ชุดควบคุม (น้ำกลั่น)	7.44	3.24	3.63
เมล็ดกวางตุ้ง			
ALA	6.93	8.14	4.25
ชุดควบคุม (น้ำกลั่น)	5.64	7.07	2.97
เมล็ดคะน้า			
ALA	5.86	4.74	3.36
ชุดควบคุม (น้ำกลั่น)	4.85	5.25	3.60
เมล็ดแตงกวา			
ALA	22.40	14.03	4.92
ชุดควบคุม (น้ำกลั่น)	14.05	10.48	4.41

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 1.2-3 กราฟแสดงผลของสารสารละลายกรดอะมิโนลีวูลินิคที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืชทดสอบ (ข้าว กวางตุ้ง คะน้า และแตงกวา)

2. การศึกษาคุณสมบัติของกรดอะมิโนลีวูลินิค (ALA) ในการยับยั้งการเจริญของวัชพืช

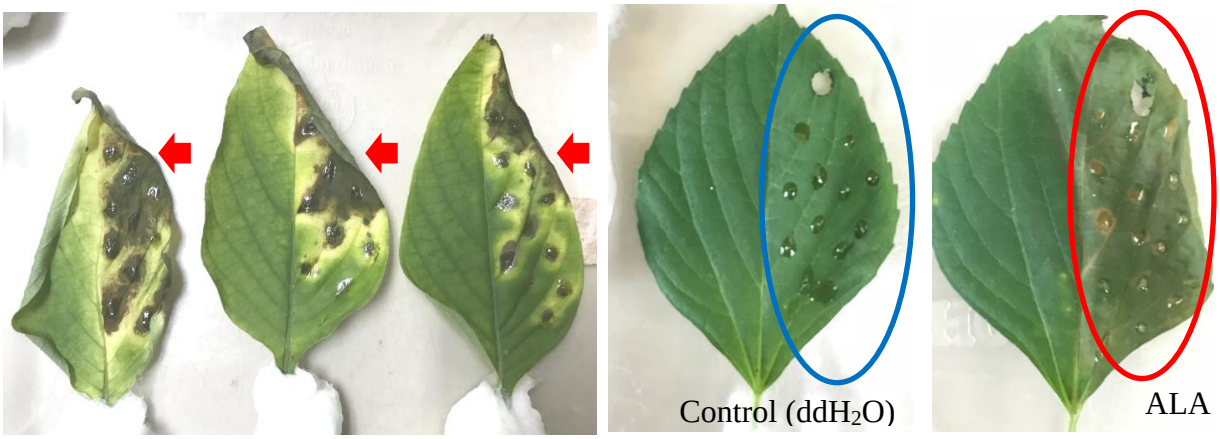
จากการทดสอบการขยายขนาดการผลิตสาร ALA โดยการนำเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่ได้รับการถ่ายฝากพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมของยีน *hem* A มาทำการเพาะเลี้ยงในระบบถังหมัก โดยใช้อาหารเหลว LB - Ampicillin (ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 2,000 มิลลิลิตร เมื่อกระตุ้นการทำงานของยีนด้วยสาร 1 mM IPTG และมีการอัดอากาศเป็นระยะ นาน 6 ชั่วโมง จึงทำการชักนำการผลิตสาร ALA ด้วยสารตั้งต้นปฏิกิริยา 30mM Glycine และ 10 mM Succinic Acid นำไปเลี้ยงเพิ่มปริมาณเซลล์ในสภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยมีอัตราการกวนด้วยความเร็ว 130 รอบ/นาที จนครบเวลานาน 24 ชั่วโมง (ตั้งแต่เติมสาร IPTG) แล้วจึงนำสารละลาย ALA ที่ผลิตได้ไปกรองผ่าน filter membrane ขนาด 0.2 ไมโครเมตร เมื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณสาร ALA พบว่า การผลิตในระบบถังหมักขนาดเล็กข้างต้น สามารถเพิ่มปริมาณการผลิตสาร ALA ได้ในปริมาณที่มากขึ้นเท่ากับ 521.16 µM ซึ่งจะใช้ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป

2.1 การทดสอบคุณสมบัติของกรดอะมิโนลีวูลินิค (ALA) ในการยับยั้งการเจริญของวัชพืช

- การทดสอบกลไกการทำลายชั้น membrane ของพืช

จากผลการทดสอบกลไกการทำลายของชั้น membrane ของพืช ทั้งในสภาวะกล่องควบคุมความชื้น (moist chamber) และ การทดสอบในกระถาง พบว่า เมื่อหยดกรดอะมิโนลีวูลินิค (ALA) ลงบนบริเวณส่วนของใบในสภาวะไม่มีแสง นาน 12-16 ชั่วโมง จากนั้นเมื่อนำออกมาวางในสภาพที่มีแสง นาน 2-3 วัน สังเกตพบการเปลี่ยนแปลงของ cell membrane เกิดรอยไหม้ที่ใบมีรอยแผลสีน้ำตาล (ภาพที่ 1.2-5) เนื้อใบมีสีซีด ใบเหี่ยวเฉา เกิดการสูญเสียน้ำและตายในที่สุด (Sasaki *et al.,* 1987) ซึ่งเกิดจากสาร ALA เปลี่ยนรูปเป็น protochlorophyllide เมื่อมีแสงอาทิตย์ จะทำหน้าที่เป็นตัว photosynthesizers (เปลี่ยนเป็น triplet oxygen ที่มีศักยภาพในการออกซิไดซ์ singlet oxygen) ออกซิเจนในรูป singlet oxygen จะออกซิไดซ์อย่างรุนแรง (superoxidizes) ต่อฟอสโฟลิปิดของผนังเซลล์ของใบพืช ผนังเซลล์ถูกทำลาย วัชพืชตาย (ภาพที่ 1.2-6)

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 1.2-5 ลักษณะการทำลายชั้น membrane ในใบวัชพืชที่หยดกรดอะมิโนลีวูลินิค (ALA) เมื่อทดสอบในสภาวะกล่องควบคุมความชื้น (moist chamber) และบ่มในสภาพที่มีแสง นาน 2-3 วัน

ภาพที่ 1.2-6 ลักษณะการทำลายชั้น membrane ในใบวัชพืชโดยกรดอะมิโนลีวูลินิค (ALA) (ลูกศร) เมื่อทดสอบในวัชพืช (บาหยา) ที่ปลูกในกระถาง หลังการหยดสาร ALA บ่มในที่มืด 1 คืน หลังจากนั้นนำออกมาให้ได้รับแสงปกติ นาน 7-14 วัน

กรมวิชาการเกษตร

2.2 การทดสอบชนิดของวัชพืชที่ตอบสนองต่อกลไกการเข้าทำลายของกรดอะมิโนลีวูลินิค

ผลการทดสอบนำวัชพืชบาหยา ลูกใต้ใบ น้ำนมราชสีห์ และหญ้ายาง ฉีดพ่นสารละลาย ALA ที่ผลิตได้ บ่มในสภาวะไม่มีแสง นานประมาณ 12-16 ชั่วโมง เมื่อนำออกมาวางในสภาพที่มีแสง 7-14 วัน พบว่า สามารถสังเกตการเปลี่ยนแปลงในส่วนของใบและลำต้น เกิดรอยไหม้ มีรอยแผลสีน้ำตาล ใบแห้ง ใบเหี่ยวเฉาเกิดการสูญเสียน้ำ ใบแห้งตาย และร่วงในที่สุด (ภาพที่ 1.2-7)

ก

ข

ค

ภาพที่ 1.2-7 การทดสอบชนิดของวัชพืชที่ตอบสนองต่อกลไกการเข้าทำลายของกรดอะมิโนลีวูลินิค ได้แก่ ลุกใต้ใบ (ก) น้ำนมราชสีห์ (ข) และ หญ้ายาง (ค)

ศูนย์วิทยทรัพยากร

3. การศึกษาคุณสมบัติของกรดอะมิโนลีวูลินิค (ALA) ในการควบคุมการเจริญเติบโตของหนอนกระทู้

การทดสอบคุณสมบัติของกรดอะมิโนลีวูลินิค (ALA) ในการควบคุมการเจริญเติบโตของหนอนกระทู้ผักวัย 1-2 โดยงดให้อาหารนาน 24 ชั่วโมง ก่อนแล้วจึงให้อาหารเทียมที่มีสาร ALA เคลือบบริเวณผิวอาหาร วางแผนการทดลองแบบ CRD กำหนดกรรมวิธีการทดลอง 5 กรรมวิธี (ปริมาตรสาร ALA 50 40 30 และ 20 ไมโครลิตร) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ไม่ให้สาร ALA) แต่ละกรรมวิธีมีจำนวน 18 ซ้ำๆละ 1 ตัว จากนั้นให้ตัวหนอนอยู่ในที่มืด ไม่มีแสงนาน 1 คืน จากนั้นให้ได้รับแสงและให้อาหารเทียมตามปกติ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ไม่ให้สาร ALA) พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน หนอนกระทู้ที่ได้รับสาร ALA มีอัตราการเจริญเติบโตที่ลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุม (ไม่ให้สาร ALA) ซึ่งคำนวนจาก ร้อยละของอัตราการเจริญของหนอนเมื่อได้รับสาร = [ความยาวลำตัว (หลัง) – ความยาวลำตัว(ก่อน)]/ ความยาวลำตัว(หลัง) x 100

จากผลการทดสอบ หนอนที่ได้รับกรดอะมิโนลีวูลินิค (ALA) ทุกกรรมวิธีจะมีลักษณะอาการเฉื่อย ชา และอ่อนปวกเปียก กินอาหารได้ช้า (ภาพที่ 1.2-8) โดยพบว่า กรรมวิธี T1 มีค่าร้อยละของอัตราการเจริญเติบโตของหนอนกระทู้ผักหลังจากได้รับ ALA นาน 7 วัน น้อยที่สุดเท่ากับ 67.16 และ T2 T4 และ T3 มีค่า 72.86 73.04 และ 73.82 ตามลำดับ โดยมีค่าความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1.2-2)

ภาพที่ 1.2-8 ลักษณะหนอนกระทู้ผักที่ได้รับกรดอะมิโนลีวูลินิค (ALA) มีอาการเฉื่อย ชา และอ่อนปวกเปียก กินอาหารได้ช้า

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 1.2-2 แสดงผลค่าเฉลี่ยร้อยละของอัตราการเจริญเติบโตของหนอนกระทู้ผักหลังจากได้รับ ALA นาน 7 วัน

กรรมวิธี	ค่าเฉลี่ยร้อยละของอัตราการเจริญเติบโตของหนอนกระทู้ผัก
T1 (ALA 50 ul)	67.16 b[1/]
T2 (ALA 40 ul)	72.86 b
T3 (ALA 30 ul)	73.82 b
T4 (ALA 20 ul)	73.04 b
ชุดควบคุม (ไม่ให้สาร ALA)	137.31 a
F-test	**
cv	39.82

** : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

1/ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Ducan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

4. การพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์ของกรดอะมิโนลีวูลินิค (ALA) ในรูปแบบผงแห้ง

การเตรียมสารละลายกรดอะมิโนลีวูลินิค (ALA) โดยนำสารละลาย ALA ที่ผลิตได้ไปทำให้มีความเข้มข้นขึ้นโดยอาศัยเทคนิคการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze drying) และ Spray drying เพื่อนำตัวอย่างสารละลายอยู่ในสภาพผงแห้ง (ภาพที่ 1.2-9, 1.2-10) โดยสามารถคงสภาพ และยืดอายุการเก็บรักษาได้ง่ายขึ้น จากการผลิตสาร ALA จากการนำเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่ได้รับการถ่ายฝาก พลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมของยีน *hem* A มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB -Ampicillin (ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) เมื่อกระตุ้นการทำงานของยีนด้วยสาร 1 mM IPTG แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง และนำสารละลาย ALA ที่ผลิตได้จากข้อ 1 นำไปกรองผ่าน filter membrane ขนาด 0.2 ไมโครเมตร และนำเข้าเครื่อง Freeze drying และ Spray drying จนตัวอย่างมีสภาพเป็นผงแห้ง เก็บรักษาผลิตภัณฑ์กรดอะมิโนลีวูลินิค (ALA) ที่สภาวะอุณหภูมิ 4 และ -20 องศาเซลเซียส เพื่อทดสอบความคงตัวของสาร ALA ในรูปแบบรูปแบบผลิตภัณฑ์แห้ง Freeze dry และ Spray dry

กรมวิทยาศาสตร์

ภาพที่ 1.2-9 ผลิตภัณฑ์กรดอะมิโนลีวูลินิค (ALA) ที่ผ่านการทำให้อยู่ในสภาพผงแห้ง โดยใช้เทคนิคการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze drying)

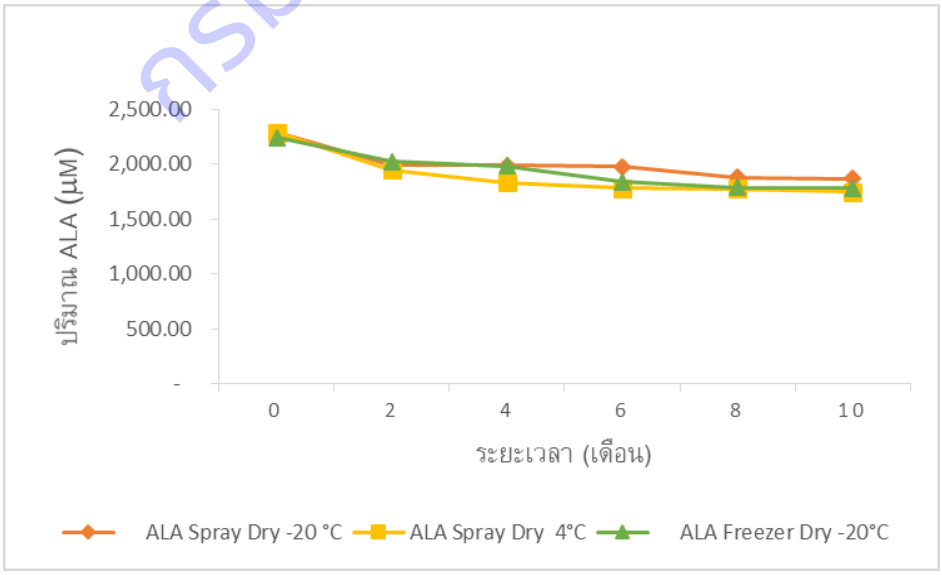
ภาพที่ 1.2-10 ผลิตภัณฑ์กรดอะมิโนลีวูลินิค (ALA) ที่ผ่านการทำให้อยู่ในสภาพผงแห้ง โดยใช้เทคนิค spray drying

กรมวิชาการเกษตร

การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์กรดอะมิโนลีวูลินิค (ALA) ที่สภาวะอุณหภูมิ 4 และ -20 องศาเซลเซียส เพื่อทดสอบความคงตัวของสาร ALA ในรูปแบบรูปแบบผลิตภัณฑ์แห้ง Freeze dry และ Spray dry เมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลานาน 10 เดือน ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส พบว่า รูปแบบผลิตภัณฑ์ผงแห้ง Spray dry มีความคงตัวที่ดีกว่า Freeze dry โดยมีค่าร้อยละของอัตราการลดลงของปริมาณกรดอะมิโนลีวูลินิค (ALA) เท่ากับ 18.19 และ 20.45 ตามลำดับ การเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ไม่สามารถเก็บรูปแบบผลิตภัณฑ์ผงแห้ง Freeze dry ได้ เนื่องจากจะเกิดความชื้นภายในส่งผลให้ผลิตภัณฑ์มีลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปจากผงแห้งกลายเป็นเกร็ดเปียกน้ำ ส่วนผลิตภัณฑ์ผงแห้ง Spray dry ยังสามารถมีอายุการเก็บรักษาได้ แต่มีค่าร้อยละของอัตราการลดลงของปริมาณกรดอะมิโนลีวูลินิค (ALA) สูงสุดเท่ากับ 22.59 (ตารางที่ 1.2-3, ภาพที่ 1.2-11)

ตารางที่ 1.2-3 การเก็บรักษาและความคงตัวของกรดอะมิโนลีวูลินิค (ALA) ในรูปแบบผลิตภัณฑ์ผงแห้ง (Spray Dry และ Freeze Dry)

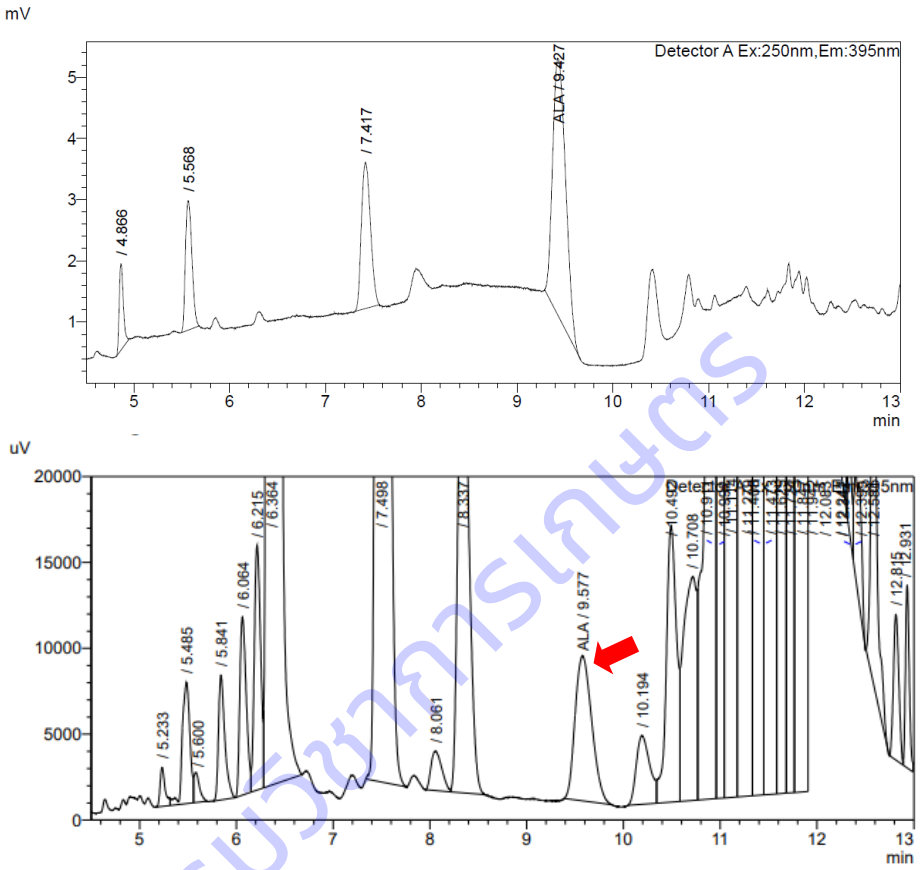
ระยะเวลาการเก็บรักษา (เดือน)	ปริมาณ ALA (uM) รูปแบบผงแห้ง (Spray Dry)		ปริมาณ ALA (uM) รูปแบบผงแห้ง (Freeze Dry)
	Temp. -20 °C	Temp. 4°C	Temp. -20°C
0	2,286.36	2,286.36	2,240.68
2	1,990.10	1,947.31	2,025.03
4	1,987.78	1,832.97	1,982.37
6	1,980.10	1,780.44	1,839.69
8	1,882.74	1,776.27	1,789.69
10	1,870.44	1,769.90	1,782.46
อัตราการลดลงของปริมาณสาร ALA (%)	18.19	22.59	20.45



ภาพที่ 1.2-11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของปริมาณกรดอะมิโนลีวูลินิค (ALA) ในรูปแบบผลิตภัณฑ์ผงแห้ง (Spray Dry และ Freeze Dry) และระยะเวลาการเก็บรักษาที่ 0-10 เดือน

กรมวิชาการเกษตร

อย่างไรก็ตามเมื่อนำตัวอย่างผลิตภัณฑ์ผงแห้ง Spray dry ไปวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดอะมิโนลีวูลินิค (ALA) ในผลิตภัณฑ์ผงแห้ง ด้วยเครื่อง UHPLC พบว่า สามารถตรวจพบโครมาโตแกรมของ aminolevulinic acid จากผลิตภัณฑ์ และสามารถตรวจพบปริมาณกรดอะมิโนลีวูลินิค (ALA) ได้เท่ากับ 5.93 mg/g sample เมื่อวิเคราะห์และเปรียบเทียบกับตัวอย่างสารมาตรฐาน (ภาพที่ 1.2-12)



ภาพที่ 1.2-12 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน aminolevulinic acid และผลิตภัณฑ์ตัวอย่าง จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC

กรมวิชาการเกษตร

อภิปรายผล

การพัฒนาการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิก (ALA) จากรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ในขั้นตอนการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน พบการแสดงออกของโปรตีนสูงสุดในชั่วโมงที่ 6 โดยการกระตุ้นการทำงานของยีน *hem* A เพื่อผลิตเอนไซม์ ALA synthase ด้วยสาร IPTG ที่ความเข้มข้น 1 mM และ 3 mM ซึ่งจากการทดลองพบว่า 1 mM IPTG สามารถกระตุ้นการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนได้ในปริมาณสูงกว่าการใช้ 3 mM IPTG ซึ่งจะช่วยในการลดต้นทุนการผลิตได้ดี เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ตรวจพบแถบโปรตีนที่มีการกระตุ้นขนาดประมาณ 45 กิโลดาลตัน อย่างไรก็ตาม Warnick and Burnham (1971) รายงานเอนไซม์ ALAS ของเชื้อ *Rhodobacter sphaeroides* มีขนาดเท่ากับ 57 กิโลดาลตัน และมียีนที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ ALAS ดังกล่าว จำนวน 2 ยีน คือ *hemA* และ *hemT* (Neidle and Kaplan, 1993)

ในกระบวนการสังเคราะห์กรด 5-อะมิโนลีวูลินิก เมื่อทำการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ALA synthase และเติมสารตั้งต้น 30 mM Glycine + 10 mM Succinic Acid และเลี้ยงเซลล์ต่อจนครบ 24 ชั่วโมง พบว่า สามารถชักนำการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิก ได้ดีที่สุด เมื่อเทียบกับการเติมสาร 60mM Glycine, 30 mM Levulenic Acid, 10 mM L-Glutamic Acid และ 10 mM Levulenic Acid อย่างไรก็ตามสภาวะปัจจัยของอุณหภูมิก็มีผลต่อการสังเคราะห์กรด 5-อะมิโนลีวูลินิก พบว่า recombinant *E. coli* สามารถผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกได้ดีที่สุด ในช่วงอุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส และสภาวะค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหารที่เหมาะสม คือ pH 6-7 โดยสัมพันธ์กับปริมาณการสังเคราะห์กรดอะมิโนลีวูลินิคได้ในปริมาณสูง

การศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของวัชพืช ซึ่งพบว่า กรดอะมิโนลีวูลินิคมีคุณสมบัติในการทำให้ cell membrane บริเวณผิวใบเกิดรอยไหม้มีรอยแผลสีน้ำตาล หรือเนื้อใบมีสีซีด ใบเหี่ยวเฉาเกิดการสูญเสียน้ำและตายในที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Sasaki และคณะ (1987) ซึ่งได้อธิบายว่าเกิดจากสาร ALA เปลี่ยนรูปเป็น protochlorophyllide เมื่อมีแสงอาทิตย์จะทำหน้าที่เป็นตัว photosynthesizers (เปลี่ยนเป็น triplet oxygen ที่มีศักยภาพในการออกซิไดซ์ singlet oxygen) ออกซิเจนในรูป singlet oxygen จะออกซิไดซ์อย่างรุนแรง (superoxidizes) ต่อฟอสโฟลิปิดของผนังเซลล์ของใบพืช และผนังเซลล์นั้นจะถูกทำลาย วัชพืชตายในที่สุด ส่วนผลต่อการควบคุมการเจริญเติบโตของหนอนกระทู้ พบว่า หลังการให้สาร ALA นาน 7 วัน มีผลให้การเจริญเติบโตของตัวหนอนลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ให้สาร ALA ซึ่ง Rebeiz *et al*. (1988) รายงานว่า ในเซลล์พืชและเซลล์สัตว์ มีวิถีการสังเคราะห์สารเตตราไพโรลจากกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกไปเป็น protoporphyrin lX (Proto) เช่นเดียวกัน โดยได้ทดลองในหนอนใยผัก *Trichoplusia ni* เมื่อให้สาร ALA ที่ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์+2,2- dipyridyl (Dpy) 30 มิลลิโมลาร์ ทิ้งไว้ 1 คืนที่ไม่มีแสง เพื่อให้เกิดการสะสมของสารเตตราไพโรล โดยเฉพาะ protoporphyrin lX (Proto) เมื่อหนอนได้รับแสงเพียงไม่กี่ชั่วโมง หนอนจะมีลักษณะเฉื่อย ชา และอ่อนปวกเปียกเนื่องจากมีการสูญเสียน้ำในร่างกาย

กรมวิทยาศาสตร์บริการ

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

การสังเคราะห์กรด 5-อะมิโนลีวูลินิกจากรีคอมบิแนนท์ *E. coli* โดยการสร้างรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอซึ่งมียีน *hem* A ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการผลิตเอนไซม์ 5-aminolevulinic acid synthase (ALAS) ซึ่งสังเคราะห์ได้จาก genomic DNA ของเชื้อ *Rhodobacter* sp. แล้วเชื่อมต่อเข้าสู่เวคเตอร์พาหะ Protein Expression Vector ซึ่งมีตำแหน่งจดจำที่มีความจำเพาะกับยีน แล้วถ่ายฝากพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) เพื่อใช้ในขั้นตอนการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนซึ่งมีขนาดประมาณ 45 กิโลดาลตัน

การพัฒนากระบวนการผลิตกรดอะมิโนลีวูลินิค (ALA) ในระบบถังหมัก (BIOFLO 2000 Fermenter) และถังหมักขนาด 50 ลิตร โดยการชักนำการแสดงออกของยีน *hem* A จากรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ด้วย 1 mM IPTG เพื่อกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ALA synthase นาน 6 ชั่วโมง แล้วจึงเติมสารตั้งต้นของปฏิกิริยาการสังเคราะห์กรด 5-อะมิโนลีวูลินิก คือ 30 mM Glycine + 10 mM Succinic Acid และเลี้ยงเซลล์ต่อจนครบ 24 ชั่วโมง พบว่า สามารถชักนำการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิกได้ดีที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าสภาวะอุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส และสภาวะค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหารที่เหมาะสมที่สุด คือ pH 6-7 มีผลต่อการสังเคราะห์กรดอะมิโนลีวูลินิค สามารถเพิ่มปริมาณการผลิตสาร ALA ได้ในปริมาณสูงถึง 615.928 uM

การศึกษาการใช้ประโยชน์ของกรดอะมิโนลีวูลินิคด้านการเกษตร พบว่า การใช้ในปริมาณความเข้มข้นต่ำกว่า 1 mM สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช การใช้กรด 5-อะมิโนลีวูลินิค ความเข้มข้นสูงกว่า 2 mM มีผลต่อทำลายเซลล์เมมเบรนของวัชพืช (บาหยา ลูกใต้ใบ น้ำนมราชสีห์ และหญ้ายาง) เมื่อทดสอบโดยการหยดกรดอะมิโนลีวูลินิค ลงบนบริเวณส่วนของใบในสภาวะไม่มีแสง นาน 12-16 ชั่วโมง จากนั้นเมื่อนำออกมาวางในสภาพที่มีแสง นาน 2-3 วัน สังเกตพบการเปลี่ยนแปลงของ cell membrane เกิดรอยไหม้ที่ใบมีรอยแผลสีน้ำตาล เนื้อใบมีสีซีด ใบเหี่ยวเฉาเกิดการสูญเสียน้ำและตายในที่สุด ส่วนผลต่อการควบคุมการเจริญเติบโตของหนอนกระทู้ พบว่า หลังการให้สาร ALA นาน 7 วัน มีผลให้อัตราการเจริญเติบโตของตัวหนอนลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ให้สาร ALA โดยพบว่าหนอนจะมีลักษณะเฉื่อย ชา กินอาหารได้น้อยลง และอ่อนปวกเปียกเนื่องจากมีการสูญเสียน้ำในร่างกาย

อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ได้พัฒนากรดอะมิโนลีวูลินิค (ALA) ในรูปแบบผลิตภัณฑ์ผงแห้ง เพื่อให้สารที่ผลิตได้มีความเข้มข้นมากยิ่งขึ้น และง่ายต่อการเก็บรักษา โดยอาศัยเทคนิคการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze drying) และ Spray drying สามารถพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์รูปแบบผงแห้ง โดยมีความคงตัว สามารถเก็บรักษาในสภาวะอุณหภูมิ -20 และ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 10 เดือน โดยมีอัตราการลดลงของปริมาณสาร ALA ประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะเป็นแนวทางในการพัฒนาการผลิตสาร ALA และขยายผลในเชิงพาณิชย์เพื่อการประยุกต์ใช้ในด้านการเกษตรและอื่นๆต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

กิจกรรมที่ 2

การผลิตและการใช้ประโยชน์ของสารเมลาโทนินจากจุลินทรีย์เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม

Melatonin production by microorganism and application for plant growth promotion under abiotic stresses

นัยเนตร เจริญสันติ ทานากะ ภรณี สว่างศรี อรุโณทัย ซาววา
Naiyanate Jaroensanti Tanaka Paranee Sawangsri Aroonothai Sawwa

คำสำคัญ

เมลาโทนิน จุลินทรีย์ รีคอมบิแนนท์ สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช การต้านทานความเครียด
Melatonin, microorganism, recombinant, plant growth regulator, stress tolerant

บทคัดย่อ

ในปัจจุบัน เนื่องจากสภาพภูมิอากาศโลกที่แปรปรวน ทำให้เกิดสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของพืชและสร้างความเสียหายทางด้านการเกษตรบ่อยครั้ง เมลาโทนิน (N-acetyl-5-methoxytryptamine) ถูกค้นพบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ทั้งในสัตว์ จุลินทรีย์และในพืช มีรายงานว่าการให้สารเมลาโทนินจากภายนอกต่อพืช สามารถเพิ่มความต้านทานของพืชต่อความเครียดจากสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่างๆ เช่น การขาดน้ำ ความร้อน ดินเค็ม การพัฒนาวิธีการผลิตและประยุกต์ใช้เมลาโทนินจากจุลินทรีย์เพื่อเสริมสร้างความทนทานต่อความเครียดของพืช เป็นแนวทางในการช่วยลดความเสียหายของผลผลิตทางการเกษตร โดยในกิจกรรมที่ 2 การผลิตเมลาโทนินจากจุลินทรีย์ ได้ทำการสังเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เมลาโทนิน ได้แก่ *Serotonin N-acetyltransferase* (*AANAT*) และ *caffeic acid O- methyltransferase (COMT)* นำมาเชื่อมต่อใส่เวกเตอร์ pETDuet ฝากถ่ายสู่ *E. coli* และชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนทั้ง 2 ตัวพร้อมกัน จากนั้นทำการทดสอบปัจจัยในการชักนำการแสดงออกโปรตีน พบว่าโปรตีนจะแสดงออกได้ดี เมื่อใช้สารชักนำการแสดงออก (IPTG) ที่ความเข้มข้น 0.1 mM และอุณหภูมิ 37˚C และการสังเคราะห์เมลาโทนินโดยเอนไซม์ทั้ง 2 ตัวจะให้ประสิทธิภาพดีที่สุด ที่ปริมาณสารตั้งต้น Serotonin 1 mM เมื่อขยายปริมาณการเลี้ยง *E. coli* ในระดับถังหมักขนาดเล็กเพื่อการผลิตเมลาโทนินโดยใช้ปัจจัยข้างต้น สกัดและตรวจวิเคราะห์ปริมาณเมลาโทนินที่ผลิตได้ พบว่าในอาหารเลี้ยงมีปริมาณเมลาโทนินอยู่ที่ประมาณ 2.7 µg/mL ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับรายงานในต่างประเทศที่ใช้ *E. coli* ดัดแปลงพันธุกรรมจากแกะและพืช พบว่าในการทดลองนี้สามารถผลิตเมลาโทนินได้สูงกว่า แต่ยังต้องอาศัยการศึกษาวิจัยต่อไปเพื่อผลิตสารในปริมาณที่สูงขึ้นให้เพียงพอกับการนำมาใช้ประโยชน์ทางการเกษตร

ในส่วนการทดสอบประสิทธิภาพของสารเมลาโทนินเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะ พบว่าสารเมลาโทนินที่ความเข้มข้น 50 และ 100 µM สามารถเพิ่มอัตราการงอกของเมล็ดแตงในสภาพดินเค็มอย่างมีนัยสำคัญและสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของแตงร้านในสภาพดินเค็มได้ นอกจากนี้ เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารเมลาโทนินในการเพิ่มความทนแล้งของมะเขือเทศ พบว่าการให้สารเมลาโทนินที่ 50 µM สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของมะเขือเทศในสภาพแล้งจำลองอย่างมีนัยสำคัญ และพบว่าการให้สาร

กรมวิชาการเกษตร

เมลาโทนินที่ความเข้มข้นเดียวกันโดยการฉีดพ่นทางใบและรดที่โคนต้น สามารถลดการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชั่นจากการขาดน้ำของใบมะเขือเทศในสภาพโรงเรือนได้

Abstracts

Nowadays environmental stresses due to the climate change limit plant growth and usually link to agriculture damage. Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) has been discovered as endogenous molecule inherent from diverse animals, microbes and plants. Exogenous melatonin was reported to promote plant tolerant to the environmental stresses such as drought, heat, salinity stress. The research of microbial production of melatonin and application for plant growth promotion under abiotic stresses may be the one of the solutions to prevent crop lost. In this study, the ectopic overproduction of melatonin was established in *Escherichia coli* by combining the sheep Serotonin N-acetyltransferase gene (*AANAT*) and the rice caffeic acid O- methyltransferase gene *(COMT)* and co-expressing two enzymes. After the optimization of fermentation conditions, the two enzymes were found to express well at 37˚C and at 0.1 mM of Isopropyl *β*-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). While the melatonin production by these enzymes was at the highest efficiency when the precursor (Serotonin) concentration at 1 mM. Then, melatonin production by this system was performed in a 2-L fermenter followed by the extraction and detection. Finally, the highest Melatonin yield was found at 2.7 µg/mL. This level was higher than the previous report which performed the same heterologous expression system. However, the further effort is needed to improve the production yield for agricultural application.

On the other hand, the study of effect of melatonin on plant stress tolerant were carried out. Melatonin at 50 and 100 µM was found to significantly increase cucumber seed germination and also promote the seedling growth in salinity soil. While 50 µM of melatonin significantly promoted tomato seedlings growth in MS media with 5% polyethylene glycol (PEG). Likewise, 50 µM of melatonin by foliar spray and irrigation could decrease oxidative stress of tomato leaves caused by drought stress in greenhouse.

กรมวิชาการเกษตร

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

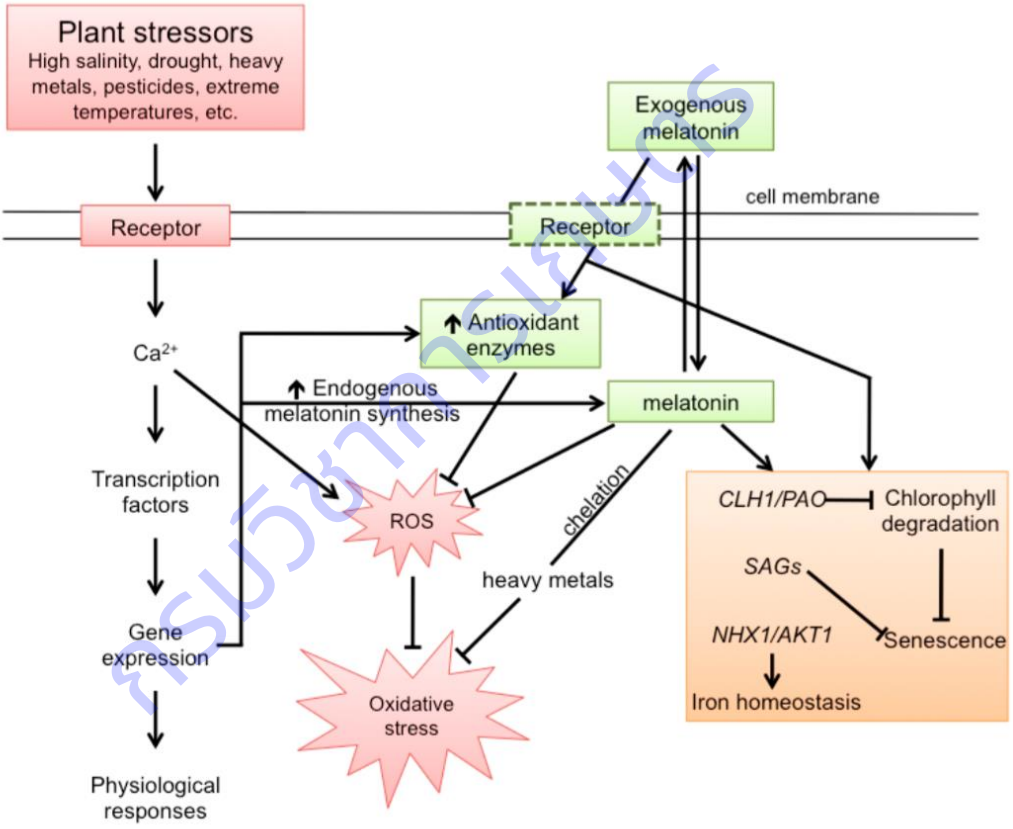
สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (Plant growth regulators; PGRs) คือสารเคมีใดๆ ที่พืชผลิตขึ้นเอง และรวมถึงสารที่สังเคราะห์ขึ้นทางวิทยาศาสตร์ ซึ่งมีผลในการควบคุมการเจริญเติบโตของพืช โดยในส่วนของสารเคมีที่พืชผลิตขึ้นใช้เองนั้นจะถูกเรียกว่า ไฟโตฮอร์โมน (Phytohormone) ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน ได้มีการนำเอาสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชมาใช้ในการเกษตรกรรมอย่างแพร่หลาย ทั้งในลักษณะของสารเร่งการออกดอก สารฆ่าวัชพืช สารเร่งการสุกของผลไม้ เป็นต้น สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่มีการนำมาใช้อย่างแพร่หลายในเชิงเกษตรกรรมในปัจจุบัน ได้แก่ สารสังเคราะห์ในกลุ่มออกซิน จิบเบอเรลลิน ไซโตไคนิน เอทิลีนและสารปลดปล่อยเอทีลิน สารยับยั้งหรือชะลอการเจริญเติบโตของพืช สารสังเคราะห์เหล่านี้บางตัวออกฤทธิ์ในลักษณะที่เป็นอโกนิสต์หรือทำงานคล้ายกับไฟโตฮอร์โมน และบางตัวทำงานเป็นแอนตาโกนิสต์หรือเข้าไปยับยั้งการสังเคราะห์ การส่งสัญญาณหรือการเคลื่อนย้ายไฟโตฮอร์โมนหนึ่งชนิดหรืออาจจะมากกว่าในพืช อย่างไรก็ดี การผลิตหรือสังเคราะห์สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชนั้น ต้องอาศัยองค์ความรู้ด้านโครงสร้างและกระบวนการทำงานของไฟโตฮอร์โมนที่ได้มีการศึกษาค้นคว้า นอกจากประโยชน์ทางการเกษตรแล้ว สารสังเคราะห์ทางเคมีที่ออกฤทธิ์เหมือนหรือยับยั้งฮอร์โมนนั้นแตกต่างกับการใช้ไฟโตฮอร์โมนโดยตรง ซึ่งการใช้สารสังเคราะห์ทางเคมีต้องมีการศึกษาวิเคราะห์ถึงผลข้างเคียงในการใช้ประกอบไปด้วย

เมลาโทนิน (N-acetyl-5-methoxytryptamine) เป็นสาร indoleamine ซึ่งมีกรดอะมิโน tryptophan เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์ เมลาโทนินเป็นฮอร์โมนในมนุษย์ ทำหน้าที่ควบคุมระบบนาฬิกาในร่างกาย (Brainard *et al*., 2001) นอกจากนี้ เมลาโทนินยังถูกค้นพบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ทั้งในสัตว์ จุลินทรีย์และในพืช ในหลายปีที่ผ่านมา ได้มีรายงานเกี่ยวกับหน้าที่ของเมลาโทนินในพืช (Arnao *et al*.,2014) พบว่าเมลาโทนินสามารถควบคุมการเจริญเติบโตของพืช เร่งการงอกของเมล็ด (Zhang *et al*.,2013) นอกจากนี้ ได้มีรายงานเกี่ยวกับการให้สารเมลาโทนินจากภายนอกต่อพืช สามารถเพิ่มความต้านทานของพืชต่อความเครียดจากสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่างๆ เช่น การขาดน้ำ ความร้อน ดินเค็ม เป็นต้น (Wang *et al*.,2013; Weeda *et al*.,2014) เมลาโทนินจึงถือได้ว่าเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชชนิดหนึ่ง ซึ่งอาจนำมาใช้ในการเกษตรกรรมเพื่อทุเลาปัญหาผลผลิตตกต่ำจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพอากาศในอนาคตได้

การค้นพบเมลาโทนินในพืชได้ถูกรายงานเป็นครั้งแรกในปี 1995 โดยDubbelsและคณะ ซึ่งทำการวิเคราะห์ปริมาณเมลาโทนินในมะเขือเทศ กล้วย แตงกวา บีทรูทและยาสูบ Dubbelsและคณะยังพบว่าต้นยาสูบพันธุ์ที่สามารถต้านทานความเสียหายจากออกซิเดชั่นได้ดีที่สุดนั้นมีปริมาณเมลาโทนินมากกว่าพันธุ์อื่นๆ ซึ่งสอดคล้องกับหน้าที่ของเมลาโทนินในการดักจับอนุมูลอิสระที่มีรายงานในสัตว์ (Dubbels *et al*.,1995) ในปีเดียวกันนี้ Hattoriและคณะก็ได้รายงานการค้นพบเมลาโทนินในพืชอีกหลายชนิด (Hattori *et al*.,1995)

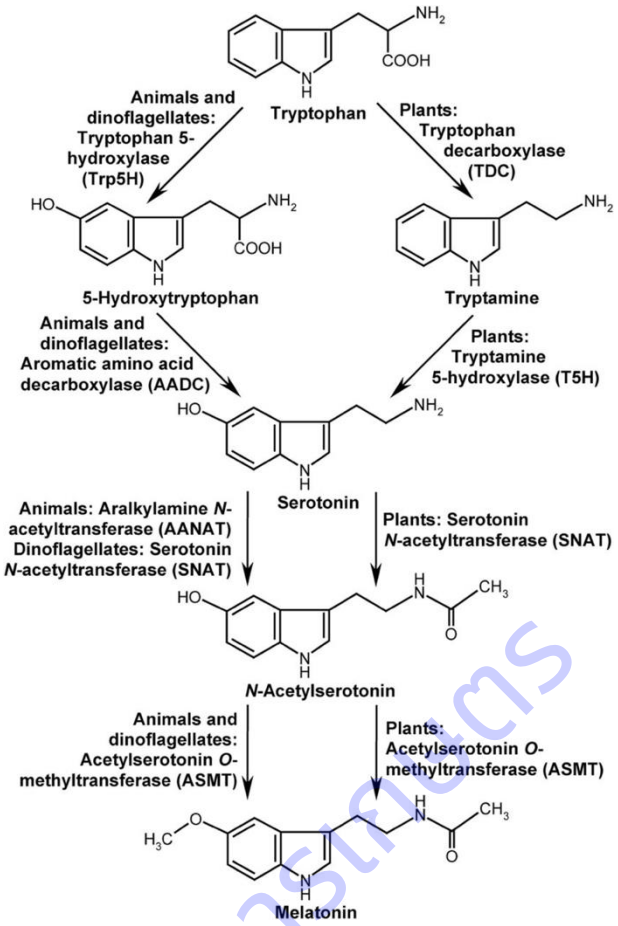
ในคนและสัตว์ เมลาโทนินมีหน้าที่ควบคุมนาฬิกาในร่างกาย ปริมาณเมลาโทนินในกระแสเลือดจะมีมากที่สุดในช่วงกลางคืน และต่ำที่สุดในช่วงกลางวัน (Reiter, 1991) ในพืช นักวิจัยหลายกลุ่มได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเมลาโทนินกับนาฬิกาชีวิตของพิช แต่ไม่พบว่าเมลาโทนินในพืชมีปริมาณสูงขึ้นในช่วงกลางคืน ในทางกลับกัน ปริมาณเมลาโทนินจะเพิ่มขึ้นในพืชที่ได้รับแสงอาทิตย์ เปรียบเทียบกับพืชที่ปลูกในที่ร่ม (Tan *et al*.,2007) การวิจัยในลูกแอปเปิ้ลและลูกเชอรี่ ปริมาณเมลาโทนินในผลมีสูงที่สุด ในช่วงที่ผลมีการขยายขนาดเซลล์อย่างรวดเร็วไปพร้อมๆกับการหายใจของเซลล์ที่เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นระยะที่เกิดอนุมูลอิสระในเซลล์มากที่สุด (Zhao *et al*.,2013; Lei *et al*.,2013) นักวิจัยสองกลุ่มนี้ชี้ให้เห็นว่า เมลาโทนินมีหน้าที่สำคัญในการต่อต้านอนุมูลอิสระในเชอรรี่และแอปเปิ้ล

เมื่อพืชได้รับความเครียดจากสิ่งแวดล้อมทั้งความเครียดจากสิ่งมีชีวิต (biotic stress)เช่น แมลง แบคทีเรีย และความเครียดจากสิ่งไม่มีชีวิต(abiotic stress) เช่น ความแล้ง ความเค็ม อุณหภูมิ เป็นต้น พืชจะมีการตอบสนองต่อความเครียดเหล่านี้ด้วยการสร้างอนุมูลอิสระของออกซิเจน reactive oxygen species (ROS) ซึ่งเป็นพิษต่อแบคทีเรียและกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานในพืช ทั้งนี้ อนุมูลอิสระเหล่านี้ก็สามารถสร้างความเสียหายต่อเซลล์พืชด้วยเช่นกัน ดังนั้น เมื่อได้รับความเครียด พืชจึงมีกลไกกระตุ้นการสร้างเมลาโทนินและกระตุ้นการแสดงออกของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการต่อต้านอนุมูลอิสระ เพื่อป้องกันความเสียหายของเซลล์จากอนุมูลอิสระ เมลาโทนินสามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระและ เปลี่ยนเป็นอนุภาคที่ไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ นอกจากนี้ เมลาโทนินยังสามารถยับยั้งการทำงานของยีนที่เกี่ยวข้องกับความชราและยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตอนุมูลอิสระในสภาพขาดน้ำ มีผลช่วยรักษาระบบการสังเคราะห์แสงของต้นพืชและยับยั้งการสลายตัวของเม็ดคลอโรฟิลล์ จึงช่วยให้พืชสามารถทนแล้งได้มากขึ้น (Reiter *et al*.,2015)



กลไกการทำงานของเมลาโทนินภายในพืชเพื่อต้านทานความเครียดจากสิ่งแวดล้อม

สำหรับกระบวนการสังเคราะห์เมลาโทนินในสิ่งมีชีวิตนั้น ได้รับการศึกษามายาวนานในสัตว์มีกระดูกสันหลัง กรดอะมิโน tryptophan เป็นสารตั้งต้นในการบวนการสังเคราะห์เมลาโทนินทั้งในสัตว์และพืช ทั้งนี้ จากการศึกษากระบวนการสังเคราะห์เมลาโทนินในข้าว (Park *et al*.,2012) พบว่าในพืชกระบวนการสังเคราะห์เมลาโทนินผ่านทาง tryptamine pathway เป็นหลัก ซึ่งต่างจากในสัตว์ที่มีกระบวนการสังเคราะห์ผ่านทาง 5-Hydroxytryptophan pathway เป็นหลัก



(Hardeland *et al*., 2015)

กระบวนการสังเคราะห์เมลาโทนินในพืชและสัตว์

จากงานวิจัยในมะเขือเทศ การโคลนยีนของเอนไซม์ N-acetyltransferase (SNAT) จากสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas reinhardtii* และเพิ่มการแสดงออกในมะเขือเทศ สามารถช่วยเพิ่มปริมาณเมลาโทนินในมะเขือเทศได้ (Okazaki *et al*.,2009) และจากงานวิจัยในหลากหลายชนิดพืชพบว่า เอนไซม์ SNAT และ Acetylserotonin *O*- methyltransferase (ASMT) อาจเป็นขั้นกำหนดอัตราของการสังเคราะห์เมลาโทนิน (Hardeland *et al*.,2015) นอกจากนี้ ในปี 2557 มีรายงานว่าเอนไซม์ caffeic acid *O*- methyltransferase (COMT) มีส่วนเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เมลาโทนินจากเซโลโทนินจากการศึกษาใน *Arabidopsis thaliana* (Byeon *et al*.,2014c) แต่จากผลการวิเคราะห์ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์เหล่านี้ (Back *et al*.,2016) สรุปได้ว่าในสภาพแวดล้อมปกติ เอนไซม์ SNATและ ASMT ทำหน้าที่หลักในกระบวนการสังเคราะห์เมลาโทนิน ในปี 2559 ได้มีรายงานการผลิตเมลาโทนินโดยการถ่ายฝากยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เมลาโทนินเข้าสู่ยีสต์ เพื่อให้ยีสต์ผลิตเมลาโทนินจากน้ำตาลกลูโคส แสดงให้เห็นถึงโอกาสในการใช้จุลินทรีย์เพื่อการผลิตสารเมลาโทนิน (Germann *et al*.,2016)

แม้ว่างานวิจัยเกี่ยวกับเมลาโทนินในพืชได้ชี้ให้เห็นว่าสารนี้มีประสิทธิภาพต่อพืชในหลายด้าน แต่การนำสารเมลาโทนินมาใช้ทางเกษตรกรรมยังมีไม่มาก ในปัจจุบัน เมลาโทนินนั้นสามารถผลิตได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี และการสกัดจากพืชที่มีเมลาโทนินในปริมาณมาก เช่น เมล็ดมัสตาร์ด (Manchester *et al*.,2000) เป็นต้น ในประเทศอเมริกาได้มีการจำหน่ายเมลาโทนินในรูปแบบอาหารเสริมหรือเวชภัณฑ์ช่วยแก้ไขปัญหาด้านการนอน แต่ยังมีราคาสูงและยังไม่มีรายงานการนำไปใช้ในแปลงเกษตรกรรม ดังนั้น หากสามารถพัฒนาวิธีการผลิตสารเมลา

กรมวิชาการเกษตร

โทนินในปริมาณมากและไม่ยุ่งยากโดยใช้เทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพได้ จะทำให้การใช้ประโยชน์ของสารแผ่ไปในวงกว้างขึ้น และจะเป็นแนวทางเพิ่มปริมาณของผลผลิตทางเกษตรกรรมได้ การผลิตสารเมลาโทนินโดยใช้ *Escherichia Coli* (*E.Coli*) ดัดแปลงยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เมลาโทนินโดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศกรรม เป็นวิธีการผลิตสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชโดยไม่ใช้การสังเคราะห์ทางเคมี และถ้าประสบความสำเร็จก็จะเป็นการผลิตที่จะใช้ต้นทุนต่ำ สามารถต่อยอดนำสารเมลาโทนินที่ได้จากจุลินทรีย์ มาทำเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในการเกษตร เพื่อแก้ปัญหาผลผลิตตกต่ำจากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อไปได้ โดยกิจกรรมงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ ดังนี้

1) เพื่อศึกษาและพัฒนาการผลิตสารเมลาโทนินโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ
2) เพื่อศึกษาคุณสมบัติและปัจจัยที่เหมาะสมในการผลิตสารเมลาโทนินด้วยจุลินทรีย์
3) เพื่อศึกษาและทดสอบประสิทธิภาพของสารเมลาโทนินในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและเพิ่มความต้านทานของพืชต่อความเครียดจากสภาวะดินเค็มและการขาดน้ำ

ขอบเขตการวิจัย

การผลิตสารเมลาโทนินโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ ทำการศึกษาข้อมูลของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เมลาโทนินในพืช ดำเนินการพัฒนาเซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* (*E. coli*) ให้สามารถผลิตสารเมลาโทนินด้วยการโคลนยีนของเอนไซม์ 2 ชนิดที่ทำหน้าที่สังเคราะห์เมลาโทนินจากพืชและสัตว์ โคลนยีนใส่ในเวกเตอร์ที่ต่อกับโปรโมเตอร์ เพิ่มการแสดงออกของยีนเพื่อการถ่ายฝากใน *E. coli* ถ่ายฝากยีนและศึกษาปัจจัยในการเลี้ยงที่มีผลต่อการแสดงออกของเอนไซม์ ศึกษาปริมาณของสารเมลาโทนินที่ผลิตได้ด้วยวิธีการทางเคมีวิเคราะห์ รวมทั้งศึกษาประสิทธิภาพของเมลาโทนินที่ผลิตได้จาก *E. coli* ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของแตงร้านและต้นอ่อนมะเขือเทศภายใต้สภาวะเครียดด้วยวิธีการทาง bioassay

กรมวิชาการเกษตร

ระเบียบวิธีการวิจัย

อุปกรณ์

1. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
2. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง (Thermal Cycle 9700)
3. เครื่องวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรม ABI Prism 310 Genetic Analyzer
4. เครื่องหมุนเหวี่ยงตกตะกอนความเร็วสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิต่ำได้ (Refrigerated Centrifuge)
5. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
6. ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (incubator shaker)
7. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และ -80 องศาเซลเซียส
8. ชุดถ่ายภาพเจล Gel Documentation
9. อุปกรณ์ในการสกัดดีเอ็นเอ ได้แก่ โกร่ง หลอดใส่ตัวอย่างขนาดต่างๆ ไมโครปิเปต ขนาด P1,000 P200 P20 และ P2 ไมโครลิตร
10. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ
11. สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR)
12. สารเคมีที่ใช้ในการทำ Electrophoresis และ Molecular Weight Marker
13. เชื้อแบคทีเรียเซลล์เจ้าบ้าน (Competent Cells) *Escherichia coli*

วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 2.1 การผลิตสารเมลาโทนินจากจุลินทรีย์เพื่อควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

ศึกษาและพัฒนาวิธีการผลิตสารเมลาโทนินโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ ด้วยการศึกษาข้อมูลของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เมลาโทนินในพืชและสัตว์ โคลนยีนของเอนไซม์ 2 ชนิด ใส่ในเวกเตอร์ที่ต่อกับโปรโมเตอร์และเพิ่มการแสดงออกของยีนเพื่อการถ่ายฝากใน *E. coli* ถ่ายฝากยีนและศึกษาปัจจัยในการเลี้ยงที่มีผลต่อการแสดงออกของเอนไซม์ วิเคราะห์ปริมาณของสารเมลาโทนินที่ผลิตได้

- สถานที่ทำการวิจัย ห้องปฏิบัติการด้านชีวโมเลกุลและห้องปฏิบัติการด้านจุลินทรีย์ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
- ระยะเวลาดำเนินการ ตุลาคม 2562 – ธันวาคม 2564
- สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

ชุดการดัดแปลงพันธุกรรม, เวกเตอร์สำหรับ *E. coli* ที่ใช้ในการแสดงออกของโปรตีนวัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่จำเป็นในงานโมเลกุลชีววิทยา, สารเมลาโทนินบริสุทธิ์เพื่อใช้เป็นตัวอย่างควบคุมในการวิเคราะห์, สารตั้งต้น Serotonin, วัสดุอุปกรณ์ในการเลี้ยง *E. coli*, ถังหมักขนาดเล็ก (Fermentor), Rotary evaporator, อุปกรณ์กรองสาร, สารเคมีในการสกัดสารอินทรีย์

- วิธีดำเนินการ

1. การโคลนและสังเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเมลาโทนินจากพืชและสัตว์

(การโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเมลาโทนินจากพืช)

ศึกษาข้อมูลของยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเมลาโทนินในข้าว ออกแบบไพรเมอร์เพื่อทำการโคลนยีน *OsSNAT* และยีน *OsCOMT*

กรมวิทยาศาสตร

เตรียมตัวอย่างพืชและสกัดอาร์เอ็นเอ นำใบข้าวมาสกัดอาร์เอ็นเอด้วยชุดสกัด GeneJET RNA Purification Kit (Thermo scientific) นำอาร์เอ็นเอที่ได้มาทำปฏิกิริยา Reverse transcript เพื่อสร้าง cDNA โดยใช้ PrimeScript RT reagent Kit (Takara Bio)

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจาก cDNA โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *OsSNAT* และ *OsCOMT* นำผลผลิตพีซีอาร์ที่เพิ่มปริมาณได้มาทำการตรวจสอบลำดับเบสด้วยการทำ DNA sequencing
(การสังเคราะห์ยีน *AANAT* ของแกะ)

หาข้อมูลลำดับเบสของยีนจากฐานข้อมูล The European Nucleotide Archive (ENA) ทำการปรับนิวคลีโอไทด์ให้เป็น codon ที่เหมาะสมกับการผลิตโปรตีนใน *E. coli* และสั่งสังเคราะห์ยีนในลักษณะที่แทรกเข้าอยู่ในเวกเตอร์ pETDuet-1

2. การตรวจสอบชิ้นส่วนยีน *OsCOMT* และยีน *AANAT* ในเวกเตอร์ pETDuet-1 และทดสอบการแสดงออกของเอนไซม์

นำเวกเตอร์ pETDuet-1 ที่มีชิ้นส่วนของยีน *OsCOMT* และยีน *AANAT* ถ่ายเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α คัดเลือกโคโรนีที่ขึ้นได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียา Ampicilin นำโคโรนีที่ได้มาทำ Colony PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 2 คู่บนเวกเตอร์ที่อยู่ในตำแหน่งคร่อมของบริเวณชิ้นส่วนยีนทั้งสองชิ้น คัดเลือกโคโรนีที่มีชิ้นส่วนยีนไปทำการเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อสกัดพลาสมิด สกัดพลาสมิดและนำพลาสมิดที่ได้ไปอ่านลำดับเบสเพื่อตรวจสอบความถูกต้องของยีนทั้งสองตัวบนเวกเตอร์ด้วยการทำ DNA sequencing

ทดสอบการแสดงออกของเอนไซม์ AANAT และ OsCOMT แบบหยาบด้วยวิธี SDS-PAGE โดยการนำเวกเตอร์ pETDuet-1 ที่มีชิ้นส่วนของยีน *OsCOMT* และยีน *AANAT* ถ่ายเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 คัดเลือกโคโลนีที่ขึ้นได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียา Ampicillin ชักนำการแสดงออกของโปรตีนด้วยการเติม 100mM IPTG ปริมาณ 1 mL ตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน โดยทำการสกัดโปรตีนก่อนแยกด้วยวิธี SDS-PAGE

3. การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการเลี้ยง *E. coli* เพื่อการผลิตเมลาโทนิน

3.1 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการชักนำการแสดงออกของเอนไซม์ AANAT และ OsCOMT

นำ *E. coli* ที่ทดสอบการแสดงออกแล้ว มาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มี Ampicillin ชักนำการแสดงออกของโปรตีนด้วยการเติม 100mM IPTG นำน้ำเลี้ยงไปเลี้ยงต่อในตู้เขย่าที่อุณหภูมิ 30˚C, 37˚C และ 40˚C ตู้ละ 4 หลอด เป็นเวลา 16 ชั่วโมง หลังจากนั้น ทำการปรับความเข้มข้นของน้ำเลี้ยงแต่ละหลอดให้มีค่า OD600 เท่ากันด้วยน้ำกลั่น เปรียบเทียบการแสดงออกของเอนไซม์ โดยทำการสกัดโปรตีนก่อนแยกด้วยวิธี SDS-PAGE

3.2 การศึกษาปริมาณ IPTG ที่เหมาะสมต่อการชักนำการแสดงออกของเอนไซม์ AANAT และ OsCOMT

นำ *E. coli* ที่ทดสอบการแสดงออกแล้ว มาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มี Ampicillin ชักนำการแสดงออกของโปรตีนด้วยการเติมสาร IPTG ให้มีความเข้มข้น 0.1 mM, 1 mM และ 3 mM ตามลำดับ นำน้ำเลี้ยงไปเลี้ยงต่อในตู้เขย่าที่อุณหภูมิ 37˚C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง หลังจากนั้น ทำการปรับความเข้มข้นของน้ำเลี้ยงแต่ละหลอดให้มีค่า OD600 เท่ากันด้วยน้ำกลั่น เปรียบเทียบการแสดงออกของเอนไซม์ โดยทำการสกัดโปรตีนก่อนแยกด้วยวิธี SDS-PAGE

3.3 การศึกษาปริมาณสารตั้งต้น Serotonin ที่เหมาะสมต่อการผลิตสารเมลาโทนิน

นำ *E. coli* ที่ทดสอบการแสดงออกแล้วจากวิธีการข้อ 4) มาเลี้ยงในอาหารเหลว 2 mLที่มี Ampicillin เลี้ยงในอุณหภูมิ 37˚C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ชักนำการแสดงออกของโปรตีนด้วยการเติมสาร IPTG ลงในน้ำเลี้ยงแต่ละหลอด ให้มีความเข้มข้น 0.1 mM และเติมสารตั้งต้น Serotonin ในปริมาณ 1, 3, 5 mM ทำซ้ำ 3 ซ้ำ

ลิขสิทธิ์การใช้งาน

นำน้ำเลี้ยงไปเลี้ยงต่อในตู้เขย่าที่ปิดไม่ให้แสงลอดเข้า ที่อุณหภูมิ 37˚C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แยกน้ำเลี้ยงออกมาและกรองด้วย Filter ขนาดรูพรุน 0.2 μM ตรวจสอบปริมาณเมลาโทนินที่ผลิตได้จากน้ำเลี้ยง *E. coli* ในกรรมวิธีข้างต้น ด้วยเครื่อง UHPLC

3.4 การขยายปริมาณการเลี้ยง *E. coli* เพื่อการผลิตเมลาโทนินในระดับถังหมักขนาดเล็ก

นำ *E. coli* ที่ทดสอบการแสดงออกแล้วมาเลี้ยงในอาหารเหลว 30 mLที่มี Ampicillin เลี้ยงในอุณหภูมิ 37˚C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง นำน้ำเลี้ยง 20 mL มาเลี้ยงต่อในอาหารเหลว LB 2,000 mLที่มี Ampicillin ที่อุณหภูมิ 37˚C จนได้น้ำเลี้ยงที่มีค่า OD600 อยู่ระหว่าง 0.6 - 0.8 ชักนำการแสดงออกของโปรตีนด้วยการเติมสาร IPTG ลงในน้ำเลี้ยงให้มีความเข้มข้น 0.1 mM และเติมสารตั้งต้น Serotonin 1 mM จากนั้น นำน้ำเลี้ยงใส่ Fermentor (New Brunswick BioFlo 2000) และประกอบเข้าตัวเครื่อง ตั้งค่าการหมุนของใบพัดอยู่ที่ 120 rpm และอุณหภูมิ 37°C เลี้ยง *E. coli* ใน Fermentor เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แยกน้ำเลี้ยงออกมา และกรองด้วย Filter ขนาดรูพรุน 0.2 μM แบ่งน้ำเลี้ยง 5 mL ที่ผ่านการกรองแล้ว นำไปวิเคราะห์ปริมาณสารเมลาโทนินด้วย UHPLC

นำน้ำเลี้ยงที่ผ่านการกรองแล้ว มาสกัดสารเมลาโทนินแบบหยาบ โดยใช้ Ethyl acetate : น้ำเลี้ยงในอัตราส่วน 1 : 2 และสกัดซ้ำ 2-3 ครั้ง นำสารสกัดที่อยู่ใน Ethyl acetate ทำระเหยด้วยเครื่อง Rotary evaporator

ละลายตะกอนสารสกัดด้วย Methanol แบ่งสารละลาย 5 mL เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณเมลาโทนินด้วย UHPLC และเก็บสารสกัดที่เหลือในขวดสีชา เพื่อใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพต่อไป

- การบันทึกข้อมูล

บันทึกผลและเก็บข้อมูลวิจัย ได้แก่ อุณหภูมิในการเลี้ยง *E. coli* ที่เหมาะสมในการแสดงออกของยีน ปริมาณของสารตั้งต้นที่เหมาะสมในกับการสังเคราะห์เมลาโทนินใน *E. coli* ปริมาณการแสดงออกของโปรตีน และปริมาณเมลาโทนินในน้ำเลี้ยง

การทดลองที่ 2.2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารเมลาโทนินเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในสภาพแวดล้อม

ศึกษาประสิทธิภาพของสารเมลาโทนินบริสุทธิ์และสารเมลาโทนินที่ผลิตได้จาก *E. coli* ในการส่งเสริมการงอกและการเจริญเติบโตของแตงร้านในดินเค็ม ศึกษาประสิทธิภาพของสารเมลาโทนินในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นอ่อนมะเขือเทศภายใต้สภาวะเครียดแบบจำลอง และประสิทธิภาพของสารเมลาโทนินในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของมะเขือเทศระยะออกดอก ภายใต้สภาวะขาดน้ำในระดับโรงเรือน

- สถานที่ทำการวิจัย ห้องปฏิบัติการด้านจุลินทรีย์ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และโรงเรือน สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
- ระยะเวลาดำเนินการ ตุลาคม 2563 – ธันวาคม 2564
- สิ่งที่ใช้ในการทดลอง
  วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่จำเป็นในงานโมเลกุลชีววิทยา, สารเมลาโทนินบริสุทธิ์เพื่อใช้เป็นตัวอย่างควบคุมในพืช, วัสดุอุปกรณ์ในการเลี้ยง *E. coli,* วัสดุเพาะปลูก, ต้นกล้ามะเขือเทศ, เมล็ดแตงร้าน, ตู้ปลอดเชื้อ, ตู้ควบคุมอุณหภูมิ, เครื่องวัดการดูดกลืนแสง
- วิธีดำเนินการ

กรมวิชาการเกษตร

1. การทดสอบประสิทธิภาพของสารเมลาโทนินในการเพิ่มอัตราการงอกของเมล็ดแตงภายใต้สภาพดินเค็ม

1.1 การทดสอบประสิทธิภาพของสารเมลาโทนินบริสุทธิ์ในการเพิ่มอัตราการงอกของเมล็ดแตงภายใต้สภาพดินเค็ม

ชุบเมล็ดแตงร้านด้วยสารเมลาโทนินบริสุทธิ์ ก่อนนำไปปลูกในถาดพลาสติกที่ใส่ดินที่มีสารละลายเกลือ NaCl ความเข้มข้น 200 mM หรือค่า EC อยู่ที่ประมาณ 2.4 mS/cm เปรียบเทียบอัตราการงอกของเมล็ด (%) ที่ได้รับการชุบสารละลายเมลาโทนินที่ความเข้มข้น 50, 100, 150 μM และไม่ได้รับการชุบสารละลายเมลาโทนินก่อนการปลูก ทำซ้ำ 5 ซ้ำ วางถาดเพาะไว้ในที่มืดที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 30˚C เพื่อเพาะเมล็ด นับจำนวนเมล็ดที่มีรากสีขาวงอกออกมา ต่อเมล็ดที่ไม่งอก ทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 3 วัน และวิเคราะห์อัตราการงอกของเมล็ด

1.2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารเมลาโทนินแบบหยาบจากน้ำเลี้ยง *E. coli* ในการเพิ่มอัตราการงอกของเมล็ดแตงภายใต้สภาพดินเค็ม

ชุบเมล็ดแตงร้านด้วยสารละลายเมลาโทนินที่สกัดจากน้ำเลี้ยง *E. coli* จากการทดลองที่ 2.1 ก่อนนำไปปลูกในถาดพลาสติกที่ใส่ดินที่มีสารละลายเกลือ NaCl ความเข้มข้น 200 mM หรือค่า EC อยู่ที่ประมาณ 2.4 mS/cm เปรียบเทียบอัตราการงอกของเมล็ด (%) ที่ได้รับการชุบด้วยสารละลายเมลาโทนินที่ความเข้มข้น 50 และ 100 μM และไม่ได้รับการชุบสารละลายเมลาโทนินก่อนการปลูก ทำซ้ำ 5 ซ้ำ

วางถาดเพาะไว้ในที่มืดที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 30˚C เพื่อเพาะเมล็ด นับจำนวนเมล็ดที่มีรากสีขาวงอกออกมาต่อเมล็ดที่ไม่งอก ทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 3 วัน และวิเคราะห์อัตราการงอกของเมล็ด จากนั้น เพาะเมล็ดในตู้ควบคุมอุณหภูมิโดยให้แสงต่อเป็นเวลาอีก 7 วัน และวัดความยาวของลำต้นอ่อนเพื่อวิเคราะห์การเจริญเติบโตของเมล็ดแตงร้าน

2. การทดสอบประสิทธิภาพของสารเมลาโทนินบริสุทธิ์ในการเพิ่มความทนแล้งของมะเขือเทศ

2.1 การทดสอบประสิทธิภาพของสารเมลาโทนินบริสุทธิ์/สารเมลาโทนินแบบหยาบจากน้ำเลี้ยง *E. coli* ในการเพิ่มความทนแล้งของมะเขือเทศในสภาพขวดปลอดเชื้อระดับห้องปฏิบัติการ

เตรียมอาหารเหลวสูตร MS ใส่ในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ขวดละ 50 mL ทำความสะอาดผิวเมล็ดมะเขือเทศด้วย 70% EtOH และ 20% โซเดียมไฮโปคลอไรท์ ล้างน้ำให้สะอาด เพาะเมล็ดมะเขือเทศในอาหารเหลวสูตร MS เป็นเวลา 14 วัน ย้ายต้นอ่อนมะเขือเทศลงในอาหารเหลวสูตร MS ที่มีส่วนประกอบของ PEG8000 5% และสารเมลาโทนิน 50, 100, 150 μM ทำซ้ำ 5 ซ้ำ บันทึกอัตราความยาวของลำต้นเหนือใบเลี้ยงคู่ เมื่อมะเขือเทศมีอายุ 45 วัน

2.2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารเมลาโทนินบริสุทธิ์ ในการเพิ่มความทนแล้งของมะเขือเทศในสภาพโรงเรือน

นำต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์เชอรี่ อายุ 30 วัน ย้ายลงปลูกในกระถางขนาด 12 นิ้วที่ใส่ดินดำผสมขุยมะพร้าว วางกระถางในโรงเรือนหลังคาทึบ และรดน้ำต้นมะเขือเทศจนหน้าดินชุ่มทุกๆ 3 วัน เมื่อย้ายกล้าลงปลูกในกระถางได้ 30 วัน เริ่มการลดปริมาณน้ำในดิน โดยใช้วิธีการของ Cherono และคณะ (2020) ที่ปรับปรุงเล็กน้อย คัดเลือกต้นมะเขือเทศที่มีความสูงและจำนวนกิ่งใกล้เคียงกัน (ประมาณ 11-13 กิ่ง) แบ่งกระถางเป็น 5 กลุ่มตามกรรมวิธีการทดลอง วางแผนการทดลองแบบ CRD โดยมีกรรมวิธีการทดลอง 5 กรรมวิธี 6 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ลดปริมาณน้ำ + พ่นสารละลายเมลาโทนินที่ความเข้มข้น 50 μM (M50)

กรรมวิธีที่ 2 ลดปริมาณน้ำ + พ่นสารละลายเมลาโทนินที่ความเข้มข้น 100 μM (M100)

กรรมวิธีที่ 3 ลดปริมาณน้ำ + พ่นสารละลายเมลาโทนินที่ความเข้มข้น 150 μM (M150)

กรมวิชาการเกษตร

กรรมวิธีที่ 4 ลดปริมาณน้ำ + พ่นด้วยน้ำกลั่น (C)

กรรมวิธีที่ 5 ให้น้ำตามปกติ (WW)

หลังจากลดปริมาณน้ำได้ 7 วัน เริ่มทำการให้สารเมลาโทนินบริสุทธิ์ โดยใช้สารละลายเมลาโทนินที่ความเข้มข้นตามข้างต้น ฉีดพ่นที่ใบ 20 mL และรดที่โคนต้นมะเขือเทศ 30 mL ทำการให้สารเมลาโทนินทุกๆ 3 วัน เป็นเวลา 1 เดือน เก็บตัวอย่างใบมะเขือเทศ และเก็บผลมะเขือเทศของแต่ละกรรมวิธี วิเคราะห์และเปรียบเทียบการเจริญเติบโต

2.3 การทดสอบประสิทธิภาพของสารเมลาโทนินแบบหยาบจากน้ำเลี้ยง *E. coli* ในการเพิ่มความทนแล้งของมะเขือเทศในสภาพโรงเรือน

นำต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์ราชินี อายุ 30 วัน ย้ายลงปลูกในกระถางขนาด 12 นิ้วที่ใส่ดินดำผสมขุยมะพร้าว วางกระถางในโรงเรือนหลังคาทึบ และรดน้ำต้นมะเขือเทศจนหน้าดินชุ่มทุกๆ 3 วัน เมื่อย้ายกล้าลงปลูกในกระถางได้ 30 วัน เริ่มการลดปริมาณน้ำในดิน โดยใช้วิธีการของ Cherono และคณะ (2020) ที่ปรับปรุงเล็กน้อย คัดเลือกต้นมะเขือเทศที่มีความสูงและจำนวนกิ่งใกล้เคียงกัน (ประมาณ 11-13 กิ่ง) แบ่งกระถางเป็น 4 กลุ่มตามกรรมวิธีการทดลอง วางแผนการทดลองแบบ CRD โดยมีกรรมวิธีการทดลอง 4 กรรมวิธี 6 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ลดปริมาณน้ำ + พ่นสารละลายเมลาโทนินแบบหยาบที่ความเข้มข้น 50 μM (E50)

กรรมวิธีที่ 2 ลดปริมาณน้ำ + พ่นสารละลายเมลาโทนินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 100 μM (M100)

กรรมวิธีที่ 3 ลดปริมาณน้ำ + พ่นด้วยน้ำกลั่น (C)

กรรมวิธีที่ 4 ให้น้ำตามปกติ (WW)

หลังจากลดปริมาณน้ำได้ 7 วัน เริ่มทำการให้สารเมลาโทนิน โดยใช้สารละลายเมลาโทนินที่ความเข้มข้นตามข้างต้น ฉีดพ่นที่ใบ 50 mL และรดที่โคนต้นมะเขือเทศ 50 mL ทำการให้สารเมลาโทนินทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 1 เดือน เก็บตัวอย่างใบมะเขือเทศของแต่ละกรรมวิธี วิเคราะห์ปริมาณสาร MDA ตามวิธีของ Cherono และคณะ (2020) ที่ปรับปรุงเล็กน้อย เพื่อเปรียบเทียบสภาวะเครียดของมะเขือเทศ ดังนี้

วิธีวิเคราะห์ปริมาณสาร MDA จากใบมะเขือเทศสด

ชั่งน้ำหนักใบพืช (g) และนำมาบดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว จากนั้นเติมสารละลาย trichloroacetic acid (TCA) ความเข้มข้น 0.1% ปริมาตร 1 mL นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 12,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที ดูดส่วนน้ำใสปริมาตร 550 µL ลงในหลอดใหม่ จากนั้นเติม thiobarbituric acid (TBA) ความเข้มข้น 0.5% ในสารละลาย TCA ความเข้มข้น 20% หลอดละ 550µL ปิดฝาหลอดให้สนิท นำไปต้มที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 25 นาที รอให้เย็นลง หลังจากนั้น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 7500 rpm เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายปริมาตร 1 mL มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 และ 600 nm ปริมาณ MDA คำนวณได้จากสูตรต่อไปนี้

ปริมาณ MDA (µmol/g FW) = [(A532-A600) x 1 x 1,000]/(155 x น้ำหนักใบ)

- การบันทึกข้อมูล

บันทึกผลอัตราการงอกของเมล็ดแตงร้านภายใต้สภาพดินเค็ม ความยาวของลำต้นมะเขือเทศที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ ขนาดผลมะเขือเทศ และปริมาณสาร MDA ของใบมะเขือเทศที่เลี้ยงสภาพโรงเรือนในช่วงติดดอก

ศูนย์วิทยทรัพยากร

ผลการวิจัย

การทดลองที่ 2.1 การผลิตสารเมลาโทนินจากจุลินทรีย์เพื่อควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

1. การโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเมลาโทนินจากพืช

1.1 การออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน และโคลนชิ้นส่วนของยีน *OsSNAT* และ Os*COMT* จากข้าว

จากฐานข้อมูล mRNA ใน NCBI สามารถออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน สำหรับเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน ด้วยวิธี PCR ได้ดังต่อไปนี้

SNAT1_UTR-F : ACCTTCCCCGACCTTATCTG

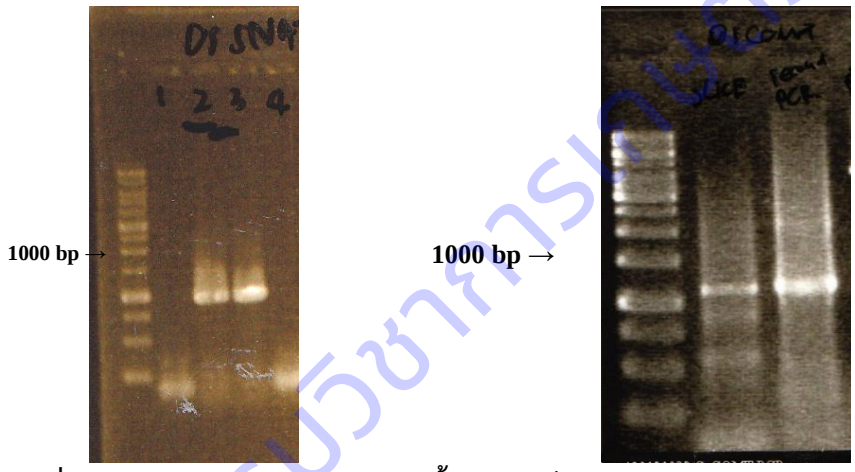
SNAT1_UTR-R : CGTGGTGCAGACAACAAGAT

OsCOMT_F : ATGGGTTCTACAGCCGCC

OsCOMT_R : CTACTTTGTGAACTCGATGG

นำไพรเมอร์ที่สังเคราะห์ได้ มาใช้เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีนจาก cDNA ของข้าว ด้วยเอนไซม์ GoTaq (Promega) ได้ผลผลิต PCR ของยีน *OsSNAT* และยีน *OsCOMT* ดังภาพที่ 2.1-1

OsSNAT ***OsCOMT***



ภาพที่ 2.1-1 ภาพ Electrophoresis ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *OsSNAT* และยีน *OsCOMT*

นำผลผลิต PCR มาแยกบน 1 เปอร์เซ็นต์ agarose gel electrophoresis ย้อมเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide จากนั้นนำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV Transiluminators เปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอกับ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker (GOLDBIO) สามารถตรวจพบชิ้นยีน *OsSNAT* ที่มีขนาดประมาณ 1,000 bp และ *OsCOMT* ที่มีขนาดประมาณมากกว่า 1,000 bp

กรมวิชาการเกษตร

1.2 การตรวจสอบความถูกต้องของยีน *OsSNAT* ที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์ SNAT โดยวิธีวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ผลจากการโคลนยีน *OsSNAT* ที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์ SNAT ที่เปลี่ยนสาร Serotonin เป็นสาร N-acetylserotonin ในข้าว และการตรวจสอบการปรากฏของยีน *OsSNAT* ด้วยเทคนิค PCR พบว่าเมื่อนำผลผลิต PCR มาแยกบน 1.5 เปอร์เซ็นต์ agarose gel electrophoresis ย้อมเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide จากนั้นนำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV Transiluminators เปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอกับ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker (GOLDBIO) สามารถตรวจพบชิ้นยีนที่มีขนาดประมาณ 1,073 bp จากนั้นนำพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมที่ได้ไปวิเคราะห์ดำดับนิวคลิโอไทด์และลำดับของกรดอะมิโนเพื่อนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน NCBI พบว่า มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของยีน *serotonin N-acetyltransferase (SNAT1)* ของ Oryza sativa Japonica (Accession No. XM_015782401) ที่ 100 เปอร์เซ็นต์ ดังภาพที่ 2.1-2

```
>PREDICTED: Oryza sativa Japonica Group serotonin N-acetyltransferase 1, chloroplastic-
like (LOC4339123), mRNA
Sequence ID: XM_015782401.2 Length: 1205
Range 1: 188 to 952
Score:1413 bits(765), Expect:0.0,
Identities:765/765(100%),  Gaps:0/765(0%), Strand: Plus/Plus
Query  40   ATGGCGCCCGCCGCCTCCGCCTCCGCCTCCGCCGTCGTCACACCGTCCTCTTTCAGATGC  99
Sbjct  188  ATGGCGCCCGCCGCCTCCGCCTCCGCCTCCGCCGTCGTCACACCGTCCTCTTTCAGATGC  247

Query  100  GTCCCCACGGCGTCGTGCGGTTTGGGGGCCCGGGGTAAAGCCCCCGCGCCGCGCCGGCTT  159
Sbjct  248  GTCCCCACGGCGTCGTGCGGTTTGGGGGCCCGGGGTAAAGCCCCCGCGCCGCGCCGGCTT  307

Query  160  CTCCACGACCACGCGCAAGGTAAAAAACGGGCTGCGGCAACTTGGTCCTTGAAGGCTGGT  219
Sbjct  308  CTCCACGACCACGCGCAAGGTAAAAAACGGGCTGCGGCAACTTGGTCCTTGAAGGCTGGT  367

Query  220  CTGTGGGACTCCCTTAGATCCGGATTTTTGAAGAGTAATAACAGTACAGAGACAGTAGAG  279
Sbjct  368  CTGTGGGACTCCCTTAGATCCGGATTTTTGAAGAGTAATAACAGTACAGAGACAGTAGAG  427

Query  280  CCACCATCAGCACCAATTGAAGAGGAAGAACCTTTGCCCGAGGAACTAGTACTCCTAGAA  339
Sbjct  428  CCACCATCAGCACCAATTGAAGAGGAAGAACCTTTGCCCGAGGAACTAGTACTCCTAGAA  487

Query  340  AGGACACTTGCTGATGGCAGCACAGAGCAGATCATATTTTCTTCAGCTGGAGATGTTAAT  399
Sbjct  488  AGGACACTTGCTGATGGCAGCACAGAGCAGATCATATTTTCTTCAGCTGGAGATGTTAAT  547

Query  400  GTGTATGATCTCCAAGCTTTATGCGACAAGGTGGGATGGCCACGCAGACCCCTAACCAAA  459
Sbjct  548  GTGTATGATCTCCAAGCTTTATGCGACAAGGTGGGATGGCCACGCAGACCCCTAACCAAA  607

Query  460  ATAGCAGCATCCTTAAGAAACAGTTACCTGGTTGCTACACTACATTCAGTTACTATGCCT  519
Sbjct  608  ATAGCAGCATCCTTAAGAAACAGTTACCTGGTTGCTACACTACATTCAGTTACTATGCCT  667

Query  520  TCAAAAGCAGAGGGAGAAGAGAGGAAGCAACTAATTGGTATGGCGCGAGCAACTTCAGAC  579
Sbjct  668  TCAAAAGCAGAGGGAGAAGAGAGGAAGCAACTAATTGGTATGGCGCGAGCAACTTCAGAC  727

Query  580  CATGCCTTTAATGCTACCATTTGGGATGTTCTCGTTGACCCTTCATATCAGGGTCAAGGT  639
Sbjct  728  CATGCCTTTAATGCTACCATTTGGGATGTTCTCGTTGACCCTTCATATCAGGGTCAAGGT  787

Query  640  CTTGGTAAAGCGTTAATGGAGAAAGTAATCCGAACTTTGCTCCAGAGAGACATCAGCAAT  699
Sbjct  788  CTTGGTAAAGCGTTAATGGAGAAAGTAATCCGAACTTTGCTCCAGAGAGACATCAGCAAT  847

Query  700  ATTACGCTGTTTGCAGATAACAAAGTTGTAGATTTCTACAAGAACTTGGGATTCGAAGCT  759
Sbjct  848  ATTACGCTGTTTGCAGATAACAAAGTTGTAGATTTCTACAAGAACTTGGGATTCGAAGCT  907

Query  760  GACCCTCAAGGCATCAAGGGCATGTTCTGGTACCCCAGATTTTAG  804
Sbjct  908  GACCCTCAAGGCATCAAGGGCATGTTCTGGTACCCCAGATTTTAG  952
```

ภาพที่ 2.1-2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *OsSNAT* ที่วิเคราะห์ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI

กรมวิชาการเกษตร

2. การสังเคราะห์ยีน AANAT ของแกะ

จากการค้นหาข้อมูลลำดับเบสของยีนจากฐานข้อมูล ENA พบลำดับเบสของยีน AANAT ในส่วน CDS (Accession No. AAC48690.1)

>ENA|AAC48690|AAC48690.1 Ovis aries (sheep) arylalkylamine N-acetyltransferase: Location: 1.624

ATGTCCACGCCGAGCGTCCACTGCCTGAAACCCTCGCCTTTGCACCTGCCCTCTGGGATCCCAG
GGTCCCCAGGCCGCCAGCGGCGCCACACGCTCCCTGCCAACGAGTTCCGCTGCCTCACCCCAGA
GGACGCTGCCGGCGTGTTTGAGATTGAGCGAGAGGCCTTCATCTCTGTCTCCGGCAACTGCCCC
CTGAATCTGGACGAGGTCCAGCACTTCCTGACCCTGTGTCCCGAGCTGTCCCTGGGCTGGTTCG
TGGAGGGCCGCCTCGTGGCCTTCATCATCGGCTCCCTGTGGGATGAGGAGAGACTTACTCAGGA
GTCGCTGGCACTGCACAGGCCCAGGGGCCACAGCGCCCACCTGCACGCGCTGGCCGTGCACCGC
AGCTTCCGGCAGCAAGGCAAGGGCTCCGTCCTGCTCTGGCGCTACCTGCACCACGTGGGCGCCC
AGCCAGCCGTGCGCCGGGCGGTGCTCATGTGCGAGGACGCGCTGGTGCCCTTTTACCAGAGGTT
TGGCTTCCATCCCGCGGGCCCATGTGCCATCGTCGTGGGCTCACTGACCTTCACGGAGATGCAC
TGCTCCCTGCGGGGCCACGCCGCCCTGCGCCGGAACAGTGACCGCTGA

นำมาปรับนิวคลีโอไทด์ข้างต้นให้เป็น codon ที่เหมาะสมกับการผลิตโปรตีนใน *E. coli* และปรับเปลี่ยนลำดับเบสที่เป็นจุดตัดด้วย restriction enzyme ด้านในบริเวณยีน ได้ลำดับเบสที่นำไปสังเคราะห์ต่อได้ ดังนี้

ATGAGCACCCCGAGCGTTCACTGCCTGAAGCCGAGCCCGCTGCACCTGCCGAGCGGTATCCCGG
GCAGCCCGGGTCGTCAGCGTCGTCACACCCTGCCGGCGAACGAGTTCCGTTGCCTGACCCCGGA
GGATGCGGCGGGCGTGTTCGAGATCGAACGTGAGGCGTTTATTAGCGTTAGCGGTAACTGCCCG
CTGAACCTGGATGAAGTGCAGCACTTTCTGACCCTGTGCCCGGAACTGAGCCTGGGCTGGTTCG
TGGAGGGTCGTCTGGTTGCGTTTATCATTGGCAGCCTGTGGGACGAGGAACGTCTGACCCAGGA
GAGCCTGGCGCTGCACCGTCCGCGTGGTCACAGCGCGCACCTGCACGCGCTGGCGGTTCACCGT
AGCTTCCGTCAGCAGGGTAAAGGCAGCGTGCTGCTGTGGCGTTACCTGCACCATGTTGGTGCGC
AGCCGGCGGTGCGTCGTGCGGTTCTGATGTGCGAAGACGCGCTGGTGCCGTTCTATCAACGTTT
TGGTTTTCATCCGGCGGGTCCGTGCGCGATTGTGGTTGGCAGCCTGACCTTTACCGAGATGCAT
TGCAGCCTGCGTGGTCATGCGGCGCTGCGTCGTAACAGCGATCGTTAA

3. การตรวจสอบชิ้นส่วนยีน *OsCOMT* และยีน *AANAT* ในเวคเตอร์ *pETDuet-1*

- จากการค้นหาข้อมูลลำดับเบสของยีนจากฐานข้อมูล NCBI พบลำดับเบสของยีน *OsCOMT* ในส่วน CDS (Accession No. AK064768.1) ดังนี้

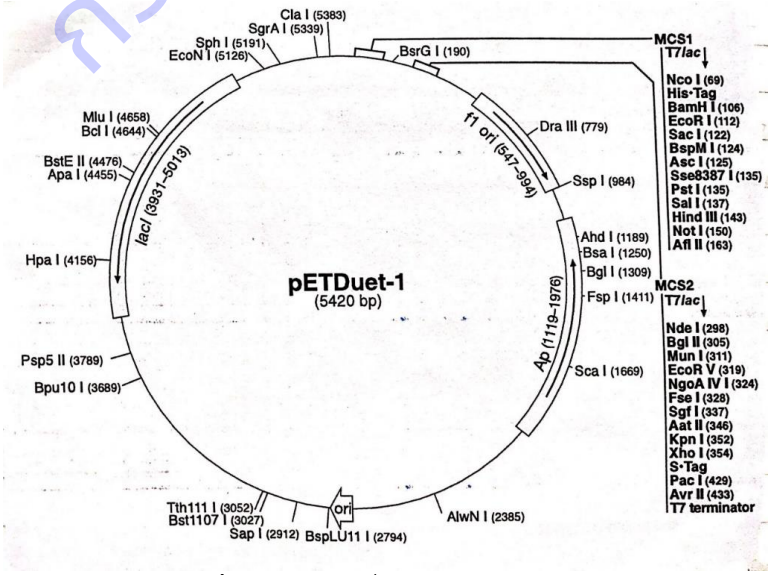
ATGGGTTCTACAGCCGCCGACATGGCCGCGGCGGCCGACGAGGAGGCGTGCATGTACGCGCTGC
AGCTGGCGTCGTCGTCGATCCTGCCGATGACGCTCAAGAACGCCATCGAGCTGGGCCTGCTCGA
GACGCTGCAGTCCGCCGCCGTCGCCGGAGGAGGGGGGAAGGCGGCGCTGCTGACGCCGGCGGAG
GTGGCCGACAAGCTGCCGTCCAAGGCGAACCCGGCGGCGGCCGACATGGTGGACCGCATGCTCC
GCCTGCTCGCCTCCTACAACGTCGTCAGGTGCGAGATGGAGGAGGGCGCCGACGGCAAGCTCTC
CCGCCGCTACGCCGCCGCGCCGGTGTGCAAGTGGCTGACGCCCAACGAGGACGGCGTCTCCATG
GCCGCCCTCGCCCTCATGAACCAGGACAAGGTCCTCATGGAGAGCTGGTACTACCTTAAGGACG
CAGTCCTGGACGGCGGCATCCCGTTCAACAAGGCGTACGGGATGACGGCGTTCGAGTACCACGG
CACGGACGCCCGCTTCAACCGCGTCTTCAACGAGGGCATGAAGAACCACTCCGTCATCATCACC
AAGAAGCTGCTCGACCTCTACACCGGCTTCGACGCCGCCTCCACCGTCGTCGACGTCGGCGGCG
GCGTGGGCGCCACTGTGGCCGCCGTCGTCTCCCGCCACCCGCACATCCGGGGGATCAACTACGA
CCTCCCCCACGTCATCTCCGAGGCGCCGCCGTTCCCCGGGGTGGAGCACGTCGGCGGCGACATG
TTCGCCTCCGTGCCCCGCGGCGGCGACGCCATCCTGATGAAGTGGATCCTCCACGACTGGAGCG
ACGAGCACTGCGCGCGGCTGCTCAAGAACTGCTACGACGCGCTGCCGGAGCACGGGAAGGTGGT
GGTGGTGGAGTGCGTGCTGCCGGAGAGCTCCGACGCGACGGCGAGGGAGCAGGGGGTGTTCCAC

GTCGACATGATCATGCTCGCCCACAACCCCGGCGGCAAGGAGAGGTACGAGAGGGAGTTCAGGG
AGCTCGCCCGCGCCGCCGGATTCACCGGCTTCAAGGCCACCTACATCTACGCCAACGCCTGGGC
CATCGAGTTCACAAAGTAG

จากนั้น ทำการสั่งสังเคราะห์ลำดับเบสของยีน *OsCOMT* ของข้าว โดยปรับนิวคลีโอไทด์ข้างต้นให้เป็น codon ที่เหมาะสมกับการผลิตโปรตีนใน *E.Coli* และปรับเปลี่ยนลำดับเบสที่เป็นจุดตัดด้วย restriction enzyme ด้านในบริเวณยีน จะได้ลำดับเบสที่นำไปสังเคราะห์ต่อได้ ดังนี้

ATGGGTAGCACCGCGGCGGATATGGCGGCGGCGGCGGATGAGGAAGCGTGCATGTACGCGCTGC
AGCTGGCGAGCAGCAGCATCCTGCCGATGACCCTGAAGAACGCGATTGAGCTGGGCCTGCTGGA
AACCCTGCAAAGCGCGGCGGTTGCGGGTGGCGGTGGCAAAGCGGCGCTGCTGACCCCGGCGGAA
GTGGCGGACAAGCTGCCGAGCAAGGCGAACCCGGCGGCGGCGGACATGGTTGATCGTATGCTGC
GTCTGCTGGCGAGCTACAACGTGGTTCGTTGCGAAATGGAGGAAGGCGCGGATGGCAAGCTGAG
CCGTCGTTATGCGGCGGCGCCGGTTTGCAAATGGCTGACCCCGAACGAGGATGGTGTGAGCATG
GCGGCGCTGGCGCTGATGAACCAGGATAAGGTTCTGATGGAAAGCTGGTACTATCTGAAAGACG
CGGTGCTGGATGGTGGCATCCCGTTCAACAAGGCGTACGGCATGACCGCGTTTGAGTACCACGG
CACCGACGCGCGTTTCAACCGTGTTTTTAACGAGGGTATGAAAAACCACAGCGTGATCATTACC
AAGAAACTGCTGGACCTGTACACCGGCTTCGATGCGGCGAGCACCGTGGTTGACGTGGGTGGCG
GTGTTGGTGCGACCGTGGCGGCGGTGGTTAGCCGTCACCCGCACATCCGTGGCATTAACTATGA
TCTGCCGCACGTTATTAGCGAGGCTCCGCCGTTCCCGGGTGTGGAACACGTTGGCGGTGACATG
TTTGCGAGCGTGCCGCGTGGCGGTGATGCGATCCTGATGAAGTGGATTCTGCACGACTGGAGCG
ATGAGCACTGCGCGCGTCTGCTGAAGAACTGCTACGATGCGCTGCCGGAACACGGTAAAGTGGT
TGTGGTTGAGTGCGTTCTGCCGGAAAGCAGCGATGCGACCGCGCGTGAGCAAGGCGTGTTCCAC
GTTGATATGATCATGCTGGCGCACAACCCGGGCGGTAAAGAGCGTTATGAGCGTGAATTTCGTG
AACTGGCGCGTGCGGCGGGTTTCACCGGTTTTAAGGCGACCTACATCTATGCGAACGCGTGGGC
GATTGAATTTACCAAATAA

- นำชิ้นส่วนของยีน *AANAT* และยีน *OsCOMT* ที่ได้รับการสังเคราะห์เชื่อมต่อเข้าสู่เวคเตอร์ pETDuet-1 (ภาพที่ 2.1-3) โดยยีน *AANAT* เชื่อมต่อเข้าบริเวณ MCS1 และยีน *OsCOMT* เชื่อมต่อเข้าบริเวณ MCS2 ตามลำดับ



ภาพที่ 2.1-3 แผนที่เวคเตอร์ pETDuet-1

กรมวิชาการเกษตร

เมื่อนำเวคเตอร์ pETDuet-1ที่มีชิ้นส่วนของยีน *AANAT* และยีน *OsCOMT* ถ่ายฝากเข้าสู่ *E. coli* และคัดเลือกโคโรนีด้วยการทำ Colony PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ดังต่อไปนี้

ลำดับไพรเมอร์ที่ใช้ในการคัดเลือกโคโรนี

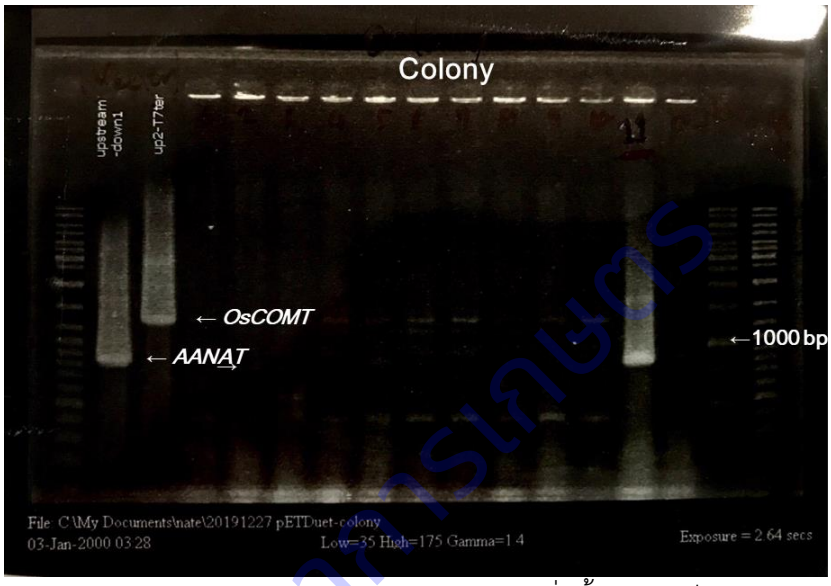
(1) Duet-Upstream : ATG CGT CCG GCG TAG AGG ATC

(2) Duet-Down1 : GAT TAT GCG GCC GTG TAC AA

(3) Duet-Up2 : TTG TAC ACG GCC GCA TAA TC

(4) T7-terminator : TGC TAG TTA TTG CTC AGC GG

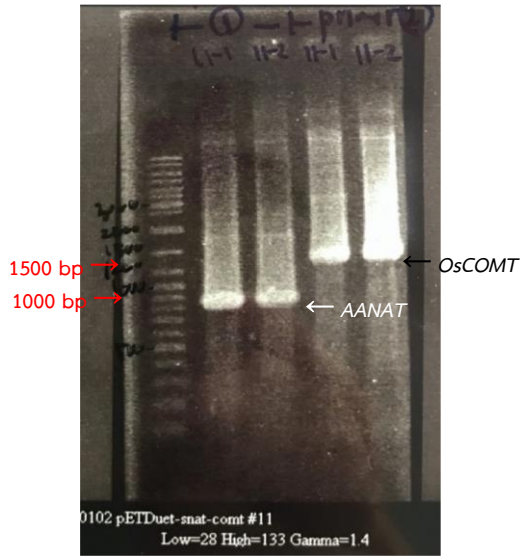
พบว่าได้โคโลนีที่มีชิ้นส่วนของยีน *AANAT* แสดงในภาพที่ 2.1-4



ภาพที่ 2.1-4 ภาพ Electrophoresis ของ Colony PCR และโคโลนีที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *AANAT*

จากการนำโคโลนีเบอร์ 11 ที่มีชิ้นส่วนของยีน *AANAT* ไปเลี้ยงในอาหารเหลวและสกัดเอาพลาสมิดออกมาเพื่อตรวจสอบชิ้นส่วนของยีนอีกครั้ง พบว่า โคโลนีเบอร์ 11 มีชิ้นส่วนของทั้งยีน *AANAT* และยีน *OsCOMT* ดังในภาพที่ 2.1-5

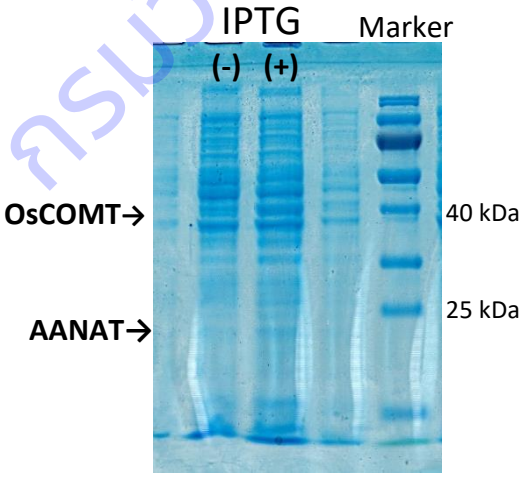
ศูนย์วิทยทรัพยากร



ภาพที่ 2.1-5 ภาพ Electrophoresis ของโคโลนีเบอร์ 11 ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *AANAT* และยีน *OsCOMT*

4. การทดสอบการแสดงออกของเอนไซม์ AANAT และ OsCOMT แบบหยาบ

นำโคโลนีเบอร์ 11 ที่มีเวคเตอร์ pETDuet-1 ซึ่งมีชิ้นส่วนของยีน *AANAT* และยีน *OsCOMT* มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาณ 2 mLที่อุณหภูมิ 37˚C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง หลังจากนั้น นำน้ำเลี้ยง 1 mL มาเลี้ยงต่อในอาหารเหลว LB 100 mLที่มี Ampicillin ที่อุณหภูมิ 37˚C เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จนได้น้ำเลี้ยงที่มีค่า OD_{600} อยู่ระหว่าง 0.4 - 0.8 จากนั้นทำการชักนำการแสดงออกของโปรตีนด้วยการเติม 100 mM IPTG ปริมาณ 1 mL และเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30˚C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำน้ำเลี้ยงที่ได้มาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนของเหลวและตะกอน นำตะกอน (เซลล์ *E. coli*)ที่ได้ไปตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ได้ผลดังภาพที่ 2.1-6 ทั้งนี้จากฐานข้อมูล NCBI โปรตีน AANAT มีขนาดประมาณ 23 kDa และโปรตีน OsCOMT มีขนาดประมาณ 39 kDa



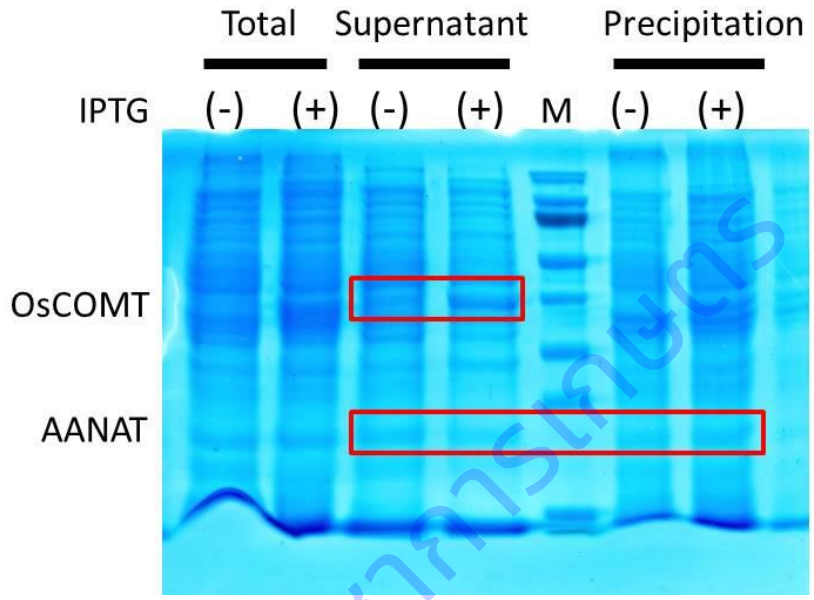
ภาพที่ 2.1-6 ภาพแสดงแถบโปรตีนที่แยกด้วยวิธี SDS-PAGE ของโคโรนีเบอร์ 11 ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *AANAT* และยีน *OsCOMT*

จากผลในภาพที่ 1-5 เมื่อทำการชักนำการแสดงออกของโปรตีนด้วย IPTG (IPTG(+)) พบว่ามีแถบโปรตีนที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นอยู่ที่ขนาดประมาณ 40 kDa ซึ่งคาดว่าเป็นโปรตีน OsCOMT และพบแถบโปรตีนที่มีขนาดต่ำกว่า

กรมวิทยาศาสตร์

25 kDa ซึ่งคาดว่าเป็นโปรตีน AANAT โดยในขั้นต่อไป จะทำการแยกโปรตีนจาก *E. coli* ในส่วน soluble protein เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของเอนไซม์ที่ถูกต้อง

เมื่อเลี้ยง *E. coli* ที่มีพลาสมิดซึ่งมีชิ้นส่วนของทั้งสองยีน ทำการชักนำการแสดงออกของโปรตีน AANAT และ OsCOMT ด้วย IPTG ตามวิธีข้างต้น จากนั้น เลี้ยง *E. coli* อุณหภูมิ 30˚C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำให้เซลล์ *E. coli* แตกและนำน้ำเลี้ยงมาวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE โดยแยกโปรตีนส่วนตะกอนเซลล์ (precipitation) และส่วนน้ำใสที่เป็นสารละลายจากเซลล์ที่แตกตัว (supernatant) พบแถบโปรตีนซึ่งคาดว่าเป็นเอนไซม์ AANAT (<25 kDa) ทั้งใน supernatant และ precipitation และพบแถบโปรตีน OsCOMT (~40 kDa) มีปริมาณเพิ่มขึ้นจากการชักนำด้วย IPTG ในส่วน supernatant อย่างเดียวดังในภาพที่ 2.1-7



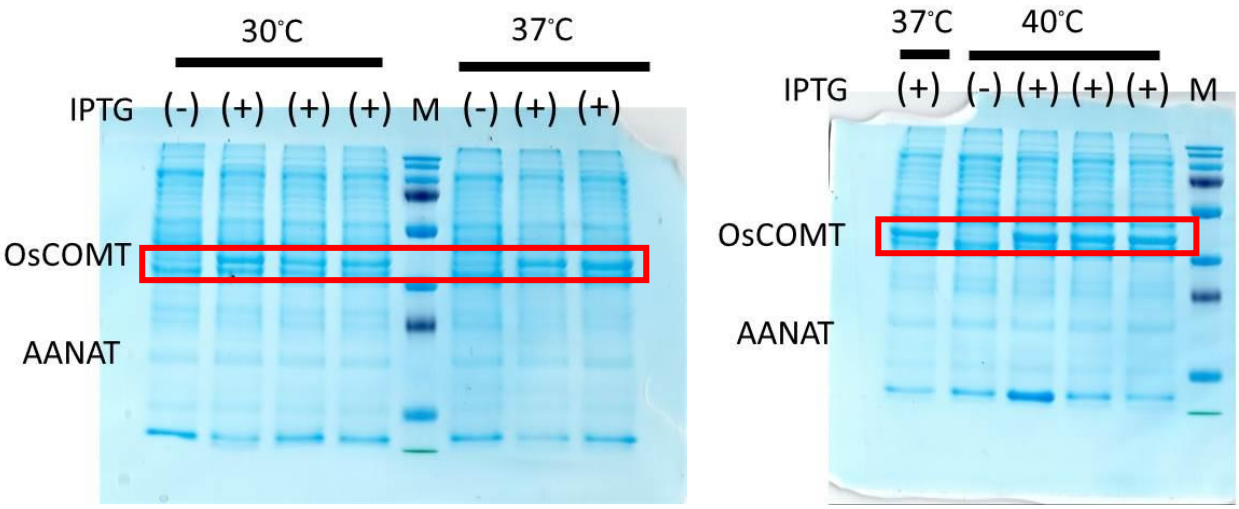
ภาพที่ 2.1-7 ภาพแสดงแถบโปรตีนที่แยกโปรตีนส่วนตะกอนเซลล์ (precipitation) และส่วนน้ำใส(supernatant) ออกจากกันและวิเคราะห์ขนาดด้วยวิธี SDS-PAGE

จากผลการทดลองนี้แสดงว่า เอนไซม์ OsCOMT ที่ชักนำได้นั้นมีการแสดงออกที่ถูกต้องและอยู่ในลักษณะ soluble protein ที่คาดว่าสามารถทำงานได้ ส่วนเอนไซม์ AANAT นั้น จำเป็นต้องทำการPurification เพื่อวิเคราะห์ความถูกต้องของโปรตีนต่อไป

5. การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการเลี้ยง *E. coli* เพื่อการผลิตเมลาโทนิน

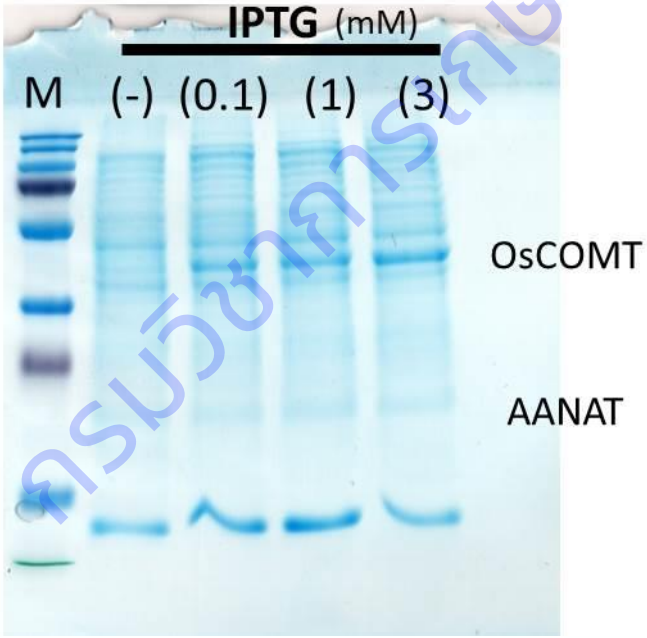
เมื่อเลี้ยง *E. coli* จากข้อ 4. ที่มีพลาสมิดซึ่งมีชิ้นส่วนของยีน *AANAT* และยีน *OsCOMT* ตามวิธีการข้อ 4. และแบ่งน้ำเลี้ยงออกให้เท่าๆ กัน หลอดละ 50 mL จำนวน 12 หลอด ทำการชักนำการแสดงออกของโปรตีน AANAT และ OsCOMT ด้วยการเติม IPTG 9 หลอดและไม่เติม IPTG 3 หลอด นำน้ำเลี้ยงไปเลี้ยงต่อในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30˚C, 37˚C และ 40˚C ตู้ละ 4 หลอด เป็นเวลา 16 ชั่วโมงเพื่อทำการทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการชักนำโปรตีน ผลการทดสอบพบว่า การแสดงออกของเอนไซม์ AANAT ไม่มีความแตกต่างกันในแต่ละอุณหภูมิ ส่วนเอนไซม์ OsCOMT ที่อุณหภูมิ 37˚C และ 40˚C มีปริมาณการแสดงออกมากกว่าที่อุณหภูมิ 30˚C (กรอบสีแดงในภาพที่ 2.1-8) แต่ไม่พบความแตกต่างระหว่างที่อุณหภูมิ 37˚C และ 40˚C

ศรีนครินทร์



ภาพที่ 2.1-8 ภาพแสดงแถบโปรตีนของ *E.Coli* ที่ได้ชักนำให้แสดงโปรตีนในอุณหภูมิที่แตกต่างกัน

เมื่อชักนำการแสดงออกของโปรตีนด้วยการเติมสาร IPTG ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ 0.1 mM, 1 mM และ 3 mM ลงในน้ำเลี้ยงแต่ละหลอดและชักนำการแสดงออกของโปรตีนที่อุณหภูมิ 37°C พบว่า ความเข้มข้นของ IPTG ไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณการแสดงออกของโปรตีน OsCOMT และ AANAT (ภาพที่ 2.1-9)



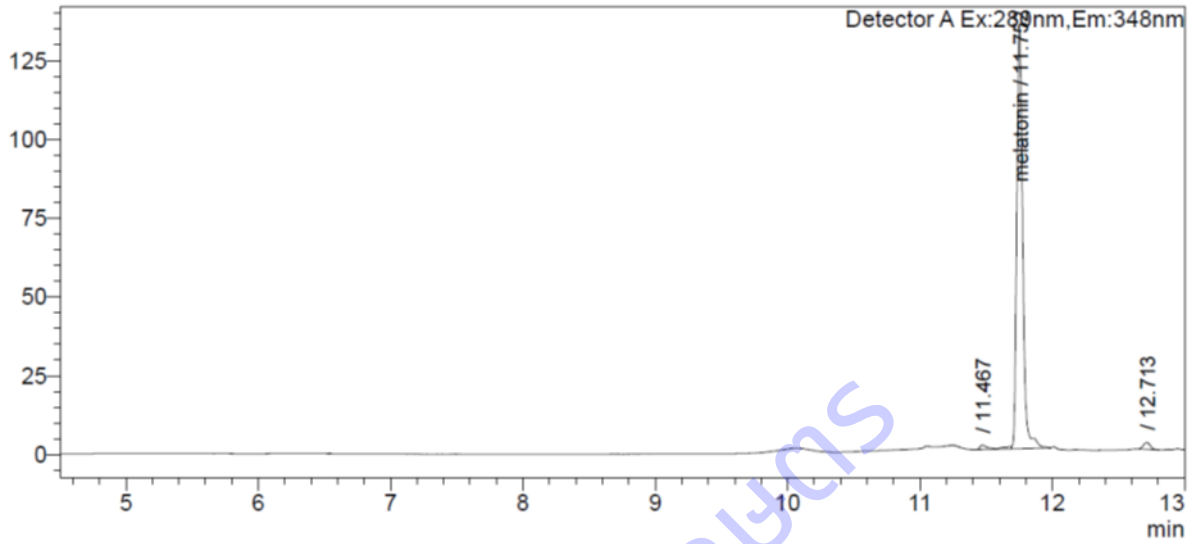
ภาพที่ 2.1-9 ภาพแสดงแถบโปรตีนของ *E.Coli* ที่ชักนำการแสดงออกด้วยความเข้มข้นของ IPTG ที่ แตกต่างกัน

จากผลการทดลองข้างต้น ปัจจัยที่เหมาะสมต่อการแสดงออกของเอนไซม์ OsCOMT และ AANAT คือ การให้สาร IPTG ที่ความเข้มข้น 0.1 mM เพื่อชักนำการแสดงออกของเอนไซม์และการเลี้ยง *E. coli* ที่อุณหภูมิ 37°C เพื่อให้ได้ปริมาณเอนไซม์สำหรับการผลิตเมลาโทนิน

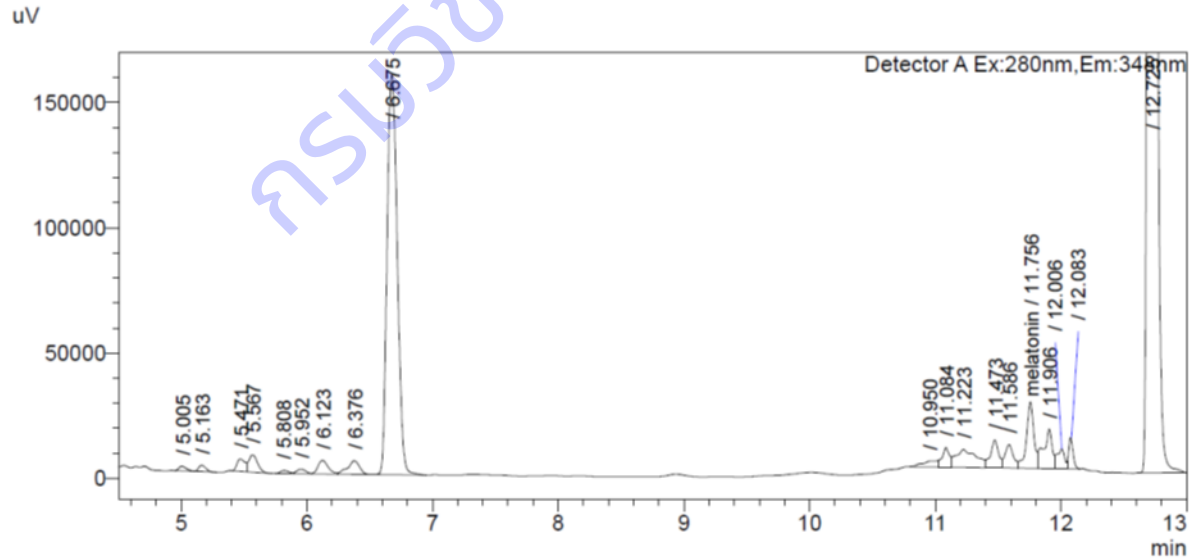
เมื่อได้ข้อมูลอุณหภูมิและความเข้มข้นของ IPTG ที่เหมาะสมต่อการแสดงออกของเอนไซม์เพื่อการผลิตเมลาโทนิน จึงเลี้ยง *E. coli* ที่มีพลาสมิดซึ่งมีชิ้นส่วนของยีน *AANAT* และยีน *OsCOMT* ตามวิธีการข้อ 4. จากนั้น เติม IPTG และสารตั้งต้น Serotonin ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน และเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ *E. coli* ผลิตเมลาโทนิน จากนั้น นำน้ำเลี้ยงมาปั่นเหวี่ยงและแยกตะกอนออก นำน้ำเลี้ยงที่ได้มากรองผ่าน membrane filter ขนาดรูพรุน 0.2 µm และนำไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของเมลาโทนินด้วยเครื่อง UHPLC

กรมวิชาการเกษตร

พบว่า เมื่อให้สารตั้งต้น Serotonin ที่ 1 mM (0.213 mg/mL) จะได้สารเมลาโทนิน 0.278 µg/ml และ เมื่อให้สารตั้งต้น Serotonin ที่ 3 mM (0.638 mg/mL) จะได้สารเมลาโทนิน 0.329 µg/ml โดยผลการวิเคราะห์ปริมาณเมลาโทนิน จะได้รูปกราฟโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน melatonin ดังภาพที่ 2.1-10 และได้รูปกราฟโครมาโตแกรมของตัวอย่างน้ำเลี้ยง ดังภาพที่ 2.1-11 ตามลำดับ



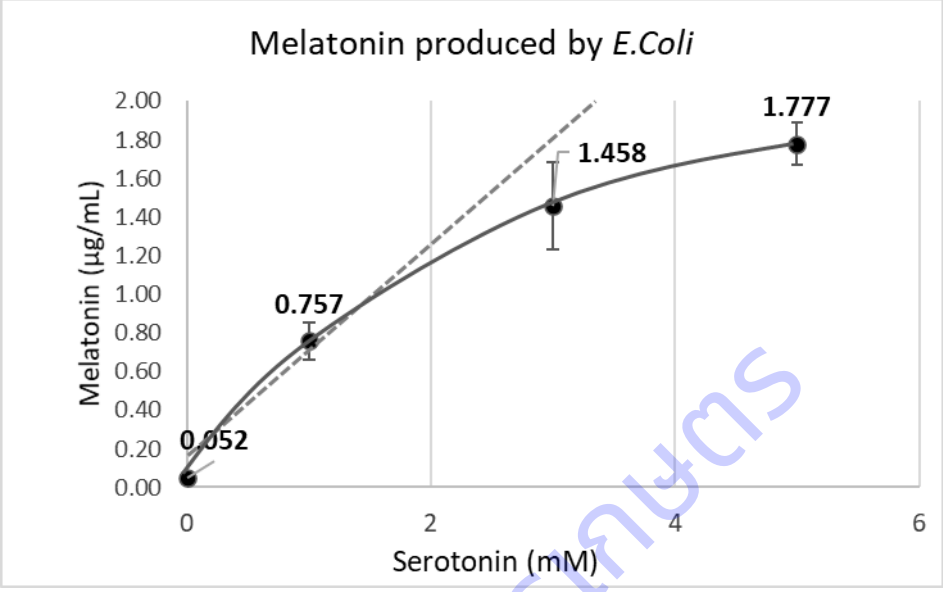
ภาพที่ 2.1-10 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน melatonin



ภาพที่ 2.1-11 โครมาโตแกรมของตัวอย่างน้ำเลี้ยง *E. coli*

กรมวิชาการเกษตร

นอกจากนี้ การศึกษาปัจจัยความเข้มข้นของสารตั้งต้น Serotonin ที่ส่งผลต่อปริมาณการสังเคราะห์เมลาโทนินของ *E. coli* พบว่า อัตราส่วนปริมาณเมลาโทนินที่สังเคราะห์ได้ต่อปริมาณสารตั้งต้น มีแนวโน้มลดลงตามความเข้มข้นของสารตั้งต้น Serotonin ที่เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 2.1-12) ดังนั้น จากผลการทดลอง เมื่อให้ปริมาณสารตั้งต้น Serotonin 1 mM เอนไซม์ที่แสดงออกใน *E. coli* จะสามารถสังเคราะห์เมลาโทนินได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงที่สุด



ภาพที่ 2.1-12 ผลของปริมาณสารตั้งต้นต่อการสังเคราะห์เมลาโทนินใน *E. coli*

เมื่อขยายปริมาณการเลี้ยง *E. coli* ในระดับถังหมักขนาดเล็กเพื่อการผลิตเมลาโทนินโดยใช้ปัจจัยข้างต้น และนำน้ำเลี้ยงมาสกัดด้วย Ethyl acetate เพื่อลดปริมาณน้ำตาลและเพิ่มความเข้มข้นของสาร (ภาพที่ 2.1-13) ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณเมลาโทนินที่ผลิตได้ ตามตารางที่ 1 โดยการเลี้ยง*E. coli* ในระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร และสกัดด้วย Ethyl acetate พบปริมาณเมลาโทนินสูงที่สุดอยู่ที่ประมาณ 2.7 µg/mL

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 2.1-13 การขยายปริมาณการเลี้ยง *E. coli* เพื่อการผลิตเมลาโทนินในระดับถังหมักขนาดเล็ก

ตารางที่ 2.1-1 ปริมาณเมลาโทนิน ที่วิเคราะห์ได้จากน้ำเลี้ยง *E. coli* ในรูปแบบต่างๆ

Sample	Total concentration (ug/mL)
100 mL culture_Freeze dry	1.21
100 mL culture_Extraction	1.70
500 mL fresh culture	0.53
500 mL culture_Extraction	2.72

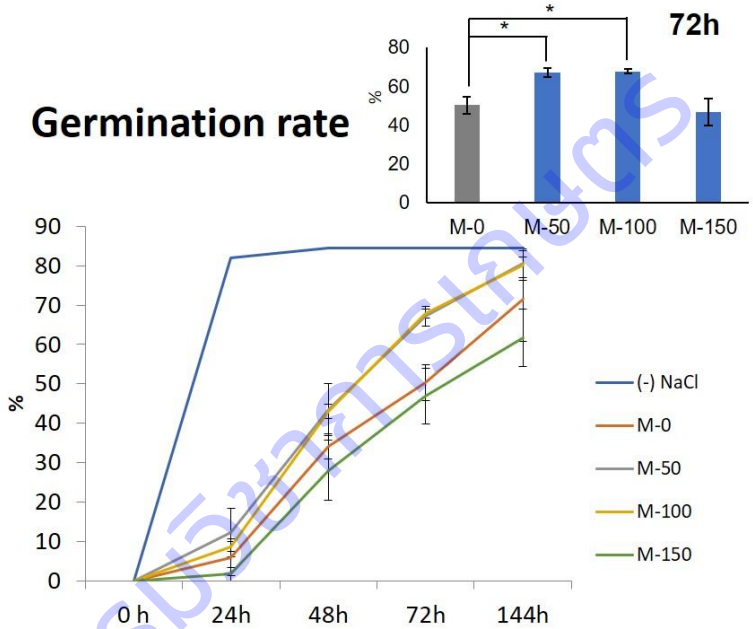
กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 2.2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารเมลาโทนินเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม

1. การทดสอบประสิทธิภาพของสารเมลาโทนินในการเพิ่มอัตราการงอกของเมล็ดแตงภายใต้สภาพดินเค็ม

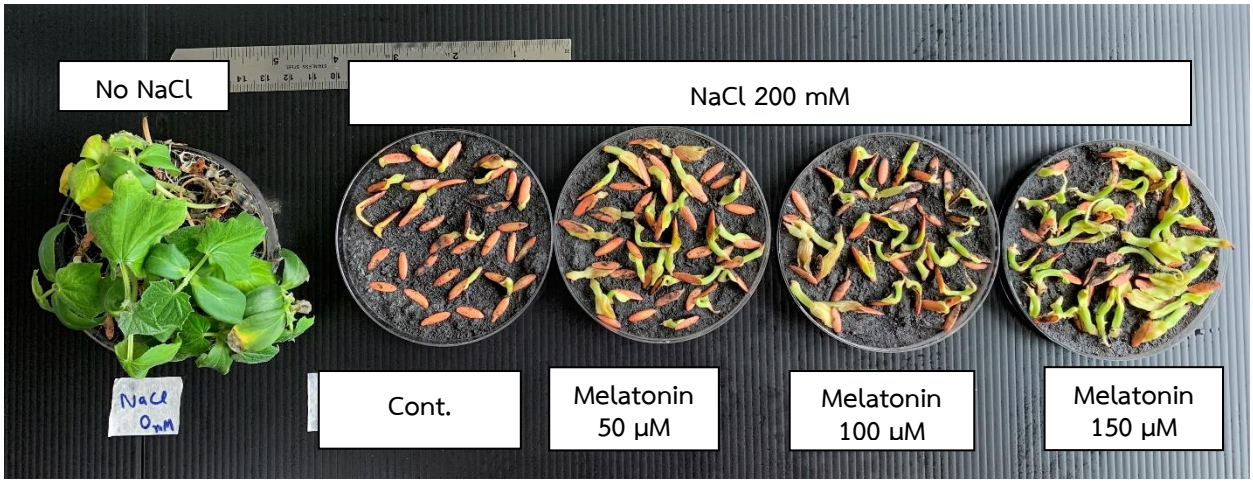
1.1 การทดสอบประสิทธิภาพของสารเมลาโทนินบริสุทธิ์ในการเพิ่มอัตราการงอกของเมล็ดแตงภายใต้สภาพดินเค็ม

เมื่อเพาะเมล็ดแตงร้านที่ชุบสารเมลาโทนินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในดินที่มีสารละลายเกลือ NaCl 200 mM พบว่า ที่ระยะการเพาะ 24 ชั่วโมง ไม่มีความแตกต่างระหว่างเมล็ดที่ได้รับสารเมลาโทนินและไม่ได้รับสารเมลาโทนิน แต่ที่ระยะเพาะ 72 ชั่วโมง พบว่าเมล็ดที่ได้รับสารเมลาโทนิน 100 และ 150 μM มีอัตราการงอกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และอัตราการงอกของเมล็ดแตงร้านภายใต้สภาพดินเค็มอยู่ที่ระดับเดียวกับเมล็ดแตงร้านที่ปลูกในสภาพดินปกติ (ภาพที่ 2.2-1, ภาพที่ 2.2-2) จากผลการทดลอง แสดงให้เห็นว่าสารเมลาโทนินมีประสิทธิภาพช่วยเพิ่มอัตราการงอกของเมล็ดแตงร้านในสภาพดินเค็มได้



ภาพที่ 2.2-1 กราฟแสดงอัตราการงอกของเมล็ดแตงร้านที่ชุบเมลาโทนินที่ความเข้มข้นต่างๆ ก่อนเพาะเมล็ดภายใต้สภาพดินเค็ม (* : student *t*-test $p<0.05$)

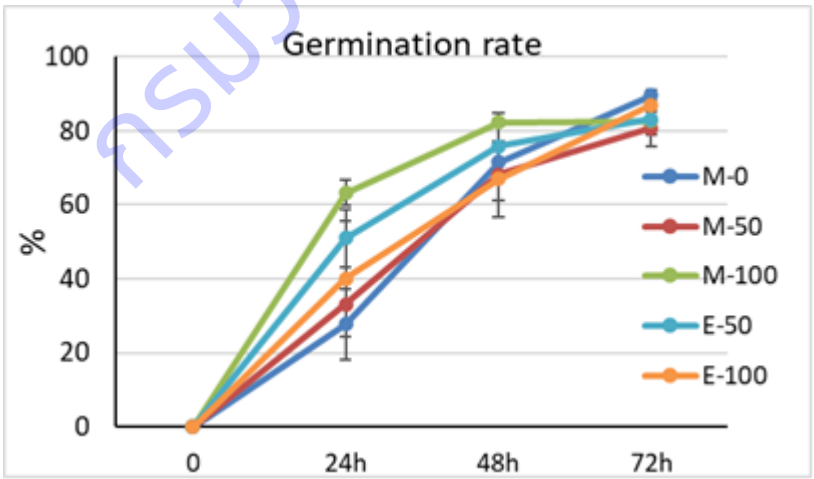
กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 2.2-2 แสดงสภาพการเจริญเติบโตของเมล็ดแตงร้านที่ได้รับและไม่ได้รับเมลาโทนินที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาพดินเค็ม

1.2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารเมลาโทนินแบบหยาบจากน้ำเลี้ยง *E. coli* ในการเพิ่มอัตราการงอกของเมล็ดแตงภายใต้สภาพดินเค็ม

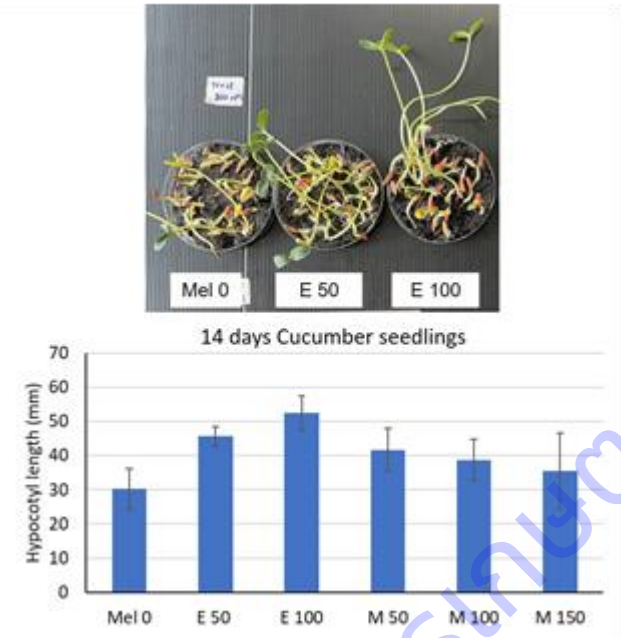
เมื่อเพาะเมล็ดแตงร้านที่ชุบสารเมลาโทนินแบบหยาบที่ความเข้มข้นต่างๆ ในดินที่มีสารละลายเกลือ NaCl 200 mM พบว่า ที่ระยะการเพาะ 24 ชั่วโมง พบว่าเมล็ดที่ได้รับสารเมลาโทนินแบบหยาบ 50 µM [E-50] และ 100 µM [E-100] รวมทั้งเมล็ดที่ได้รับสารเมลาโทนินบริสุทธิ์ 50 µM [M-50] และ 100 µM [M-100] มีอัตราการงอกเพิ่มขึ้น แต่ที่ระยะเพาะ 72 ชั่วโมง พบว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างเมล็ดที่ได้รับสารเมลาโทนินและไม่ได้รับสารเมลาโทนิน (ภาพที่ 2.2-3)



ภาพที่ 2.2-3 กราฟแสดงอัตราการงอกของเมล็ดแตงร้านที่ชุบเมลาโทนินแบบหยาบและบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ก่อนเพาะเมล็ดภายใต้สภาพดินเค็ม

กรมวิชาการเกษตร

เมื่อเพาะเมล็ดแตงร้านในสภาพดินเค็มต่อไปที่อุณหภูมิ 30°C อีก 14 วัน พบว่าต้นอ่อนแตงร้านที่ได้รับเมลาโทนินทุกกรรมวิธีมีความยาวของลำต้นอ่อนมากกว่าแตงร้านที่ไม่ได้รับเมลาโทนิน (ภาพที่ 2.2-4) แสดงให้เห็นว่าเมลาโทนินแบบหยาบที่ผลิตได้จาก *E. coli* มีแนวโน้มเพิ่มความต้านทานเค็มและส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นอ่อนแตงร้านได้



ภาพที่ 2.2-4 กราฟและภาพแสดงสภาพการเจริญเติบโตของเมล็ดแตงร้านที่ได้รับเมลาโทนินแบบหยาบและบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้สภาพดินเค็ม

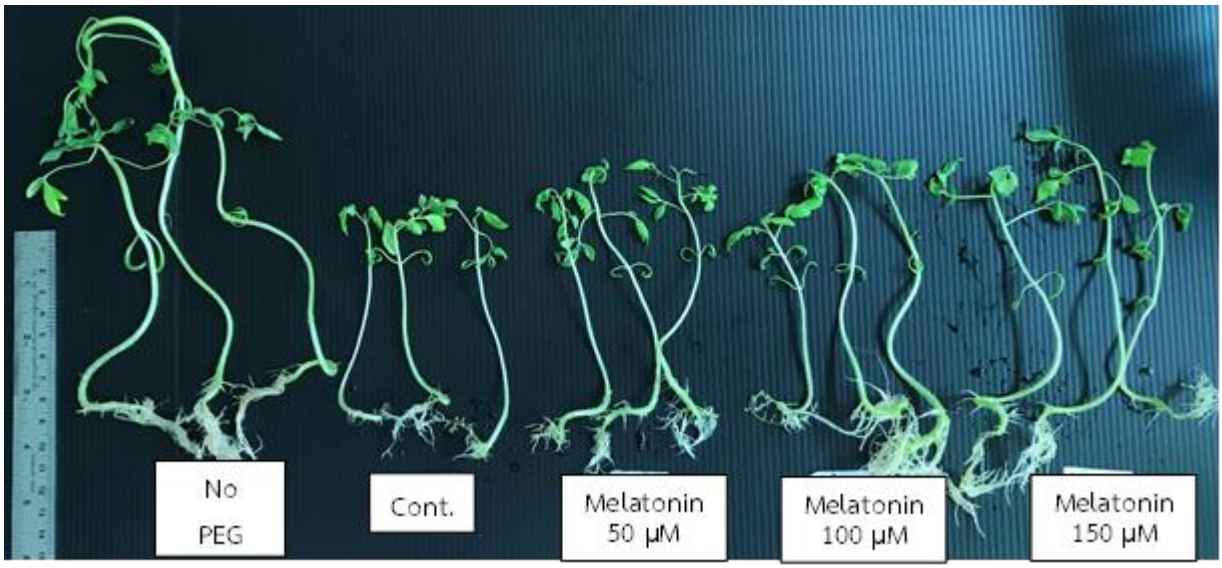
กรมวิชาการเกษตร

2. การทดสอบประสิทธิภาพของสารเมลาโทนินในการเพิ่มความทนแล้งของมะเขือเทศ

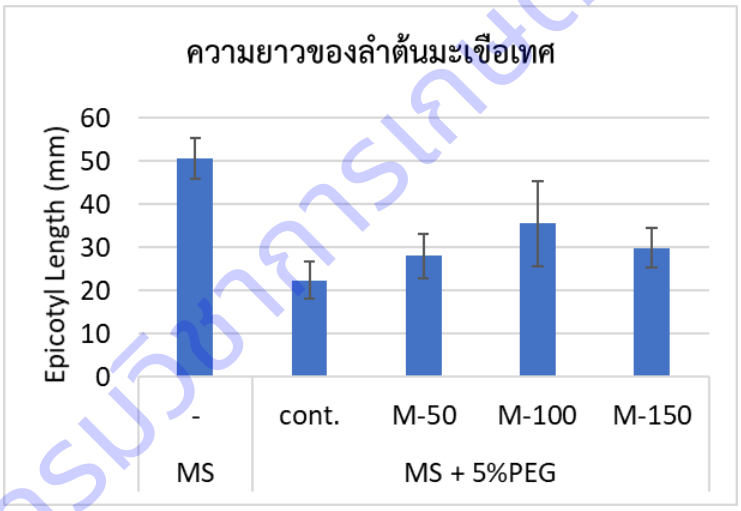
2.1 การทดสอบประสิทธิภาพของสารเมลาโทนินในการเพิ่มความทนแล้งของมะเขือเทศในสภาพขวดปลอดเชื้อระดับห้องปฏิบัติการ

- การทดสอบประสิทธิภาพของสารเมลาโทนินบริสุทธิ์ในการเพิ่มความทนแล้งของมะเขือเทศในสภาพขวดปลอดเชื้อในระดับห้องปฏิบัติการ

เมื่อเปรียบเทียบกับต้นอ่อนที่เลี้ยงด้วยอาหาร MS ปกติ [No PEG] พบว่าต้นอ่อนมะเขือเทศที่เลี้ยงในอาหาร MS ที่มีส่วนประกอบของ Polyethylene glycol (PEG) 5% [Cont., Melatonin50, 100 และ 150 µM] มีการชะลอการเจริญเติบโต ลำต้นสั้นลง ใบเหี่ยวเฉา (ภาพที่ 2.2-5) เมื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของต้นอ่อนมะเขือเทศที่ได้รับและไม่ได้รับสารเมลาโทนิน พบว่า ต้นอ่อนมะเขือเทศที่ได้รับสารเมลาโทนิน [Melatonin50, 100 และ 150 µM] มีความยาวของลำต้นบริเวณเหนือใบเลี้ยงคู่มากกว่าต้นมะเขือเทศที่ไม่ได้รับสารเมลานิน [Cont.] (ภาพที่ 2-6) และมีการเจริญเติบโตที่ดีกว่า นอกจากนี้ ในทุกกรรมวิธีที่เลี้ยงต้นอ่อนมะเขือเทศในอาหาร MS ซึ่งมีส่วนประกอบของ PEG ต้นอ่อนมะเขือเทศที่ได้รับสารเมลาโทนิน 100 µM มีการเจริญเติบโตและมีลำต้นยาวมากที่สุด แสดงให้เห็นว่า สารเมลาโทนินมีแนวโน้มช่วยเพิ่มความทนแล้งของมะเขือเทศในระดับห้องปฏิบัติการได้



ภาพที่ 2.2-5 ภาพแสดงต้นอ่อนมะเขือเทศที่ได้รับและไม่ได้รับสารเมลาโทนิน ภายใต้สภาพแล้งแบบจำลองด้วยการเติม Polyethylene glycol (PEG) ในสภาพขวดปลอดเชื้อ

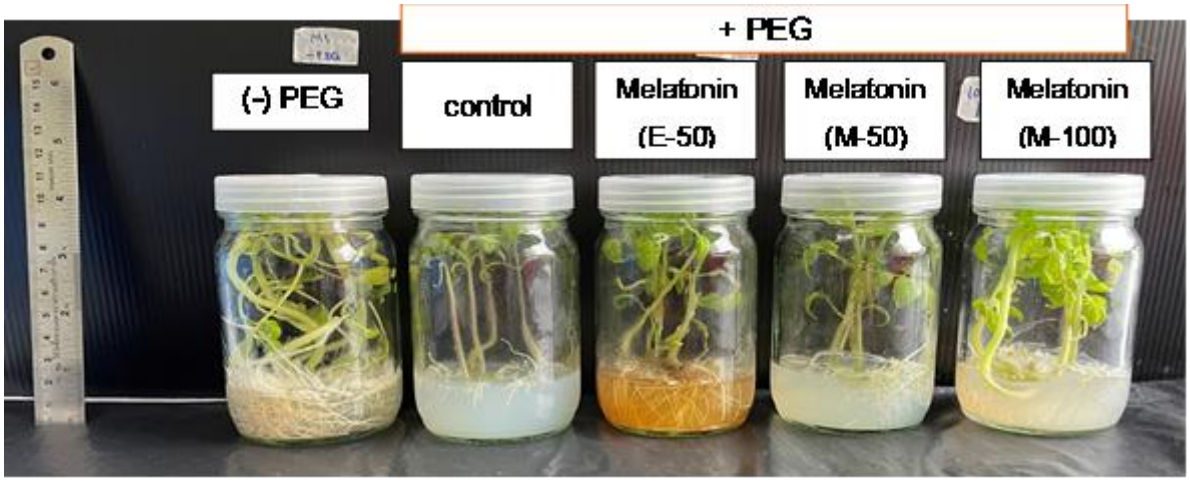


ภาพที่ 2.2-6 กราฟแสดงอัตราการเจริญเติบโตของต้นอ่อนมะเขือเทศภายใต้สภาพแล้งแบบจำลองด้วยการเติม Polyethylene glycol (PEG) ในสภาพขวดปลอดเชื้อ

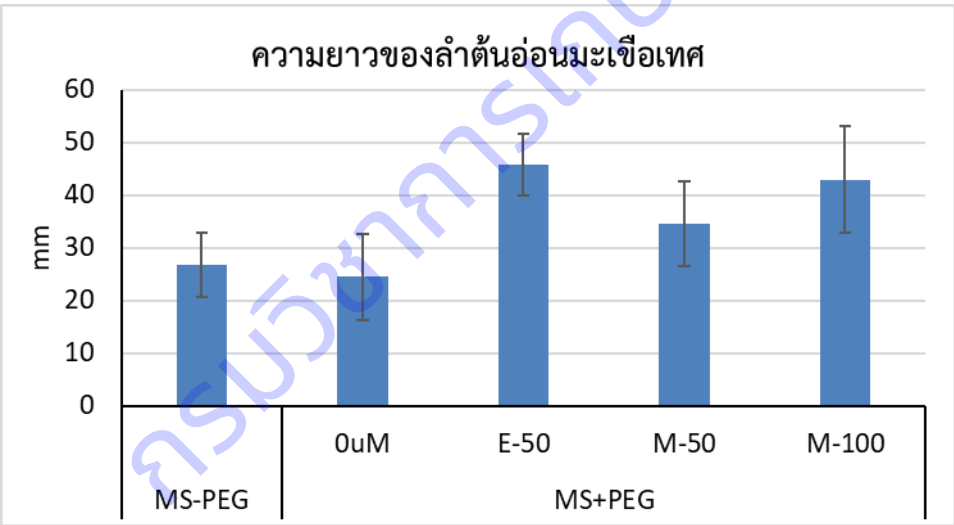
- การทดสอบประสิทธิภาพของสารเมลาโทนินแบบหยาบที่ผลิตได้จาก *E. coli* ในการเพิ่มความทนแล้งของมะเขือเทศในสภาพขวดปลอดเชื้อในระดับห้องปฏิบัติการ

เช่นเดียวกับผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารเมลาโทนินบริสุทธิ์ เมื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของต้นอ่อนมะเขือเทศที่ได้รับและไม่ได้รับสารเมลาโทนินแบบหยาบที่เลี้ยงในอาหาร MS ที่มีส่วนประกอบของ PEG 5% พบว่าต้นอ่อนมะเขือเทศที่ได้รับสารเมลาโทนินแบบหยาบ [Melatonin (E-50)] มีการเจริญเติบโตของรากและมีความยาวของลำต้นบริเวณเหนือใบเลี้ยงคู่มากกว่าต้นมะเขือเทศที่ไม่ได้รับสารเมลาโทนิน [Control] (ภาพที่ 2.2-7 และภาพที่ 2.2-8) แสดงให้เห็นว่า สารเมลาโทนินที่ได้จากการสังเคราะห์โดย *E. coli* มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับสารเมลาโทนินบริสุทธิ์ ทั้งนี้ จากในภาพที่ 2.2-7 กรรมวิธีที่ใช้สารเมลาโทนินแบบหยาบนั้นอาหาร MS มีสีเหลืองกว่ากรรมวิธีอื่นอย่างชัดเจน เนื่องจากมีองค์ประกอบของอาหาร LB ตกค้างอยู่ เช่น น้ำตาล เป็นต้น

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 2.2-7 ภาพแสดงต้นอ่อนมะเขือเทศที่ได้รับและไม่ได้รับสารเมลาโทนิน ภายใต้สภาพแล้งแบบจำลองด้วยการเติม Polyethylene glycol (PEG) ในสภาพขวดปลอดเชื้อ



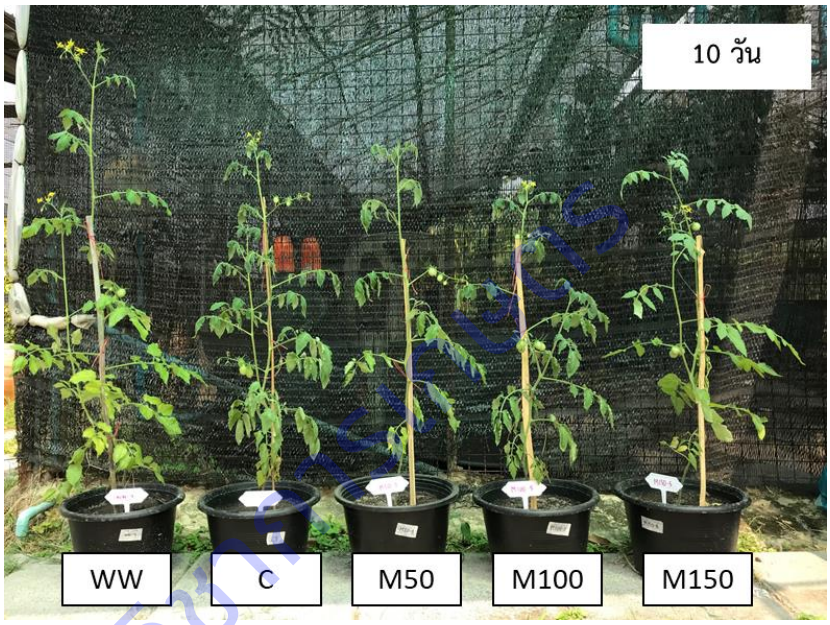
ภาพที่ 2.2-8 กราฟแสดงอัตราการเจริญเติบโตของต้นอ่อนมะเขือเทศได้รับและไม่ได้รับสารเมลาโทนิน ภายใต้สภาพแล้งแบบจำลองด้วยการเติม Polyethylene glycol (PEG)

กรมวิชาการเกษตร

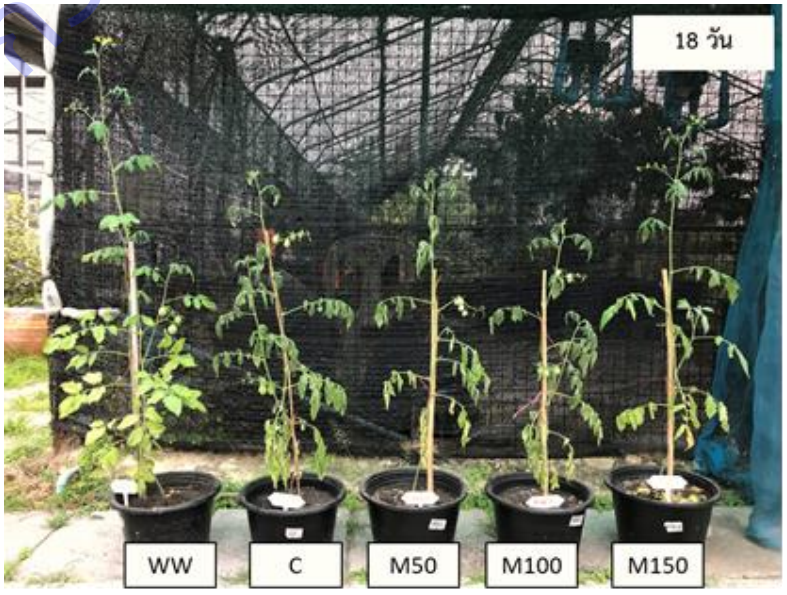
2.2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารเมลาโทนินในการเพิ่มความทนแล้งของมะเขือเทศช่วงติดดอกในสภาพโรงเรือน

- การทดสอบประสิทธิภาพของสารเมลาโทนินบริสุทธิ์ในการเพิ่มความทนแล้งของมะเขือเทศช่วงติดดอกในสภาพโรงเรือน

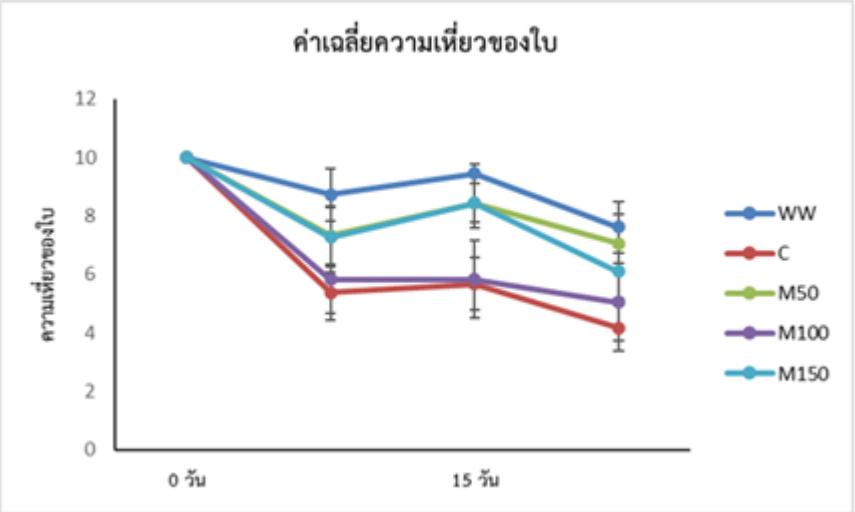
หลังจากลดปริมาณการให้น้ำต้นมะเขือเทศพันธุ์เชอรี่ต่อเนื่องกันเป็นเวลา 10 วัน จะสามารถสังเกตเห็นความเหี่ยวของใบมะเขือเทศในกรรมวิธี C, M50, M100 และ M150 เมื่อเปรียบเทียบกับต้นมะเขือเทศในกรรมวิธีที่ให้น้ำตามปกติ (WW) ตามภาพที่ 2.2-9 และเมื่อสังเกตเห็นความเหี่ยวของใบได้ได้ชัดเจนยิ่งขึ้นเมื่อวันที่ 18 ของการลดปริมาณการให้น้ำ ตามภาพที่ 2.2-10 และ 2.2-11



ภาพที่ 2.2-9 ภาพแสดงลักษณะใบและลำต้นของมะเขือเทศ หลังจากเริ่มลดปริมาณน้ำ 10 วัน

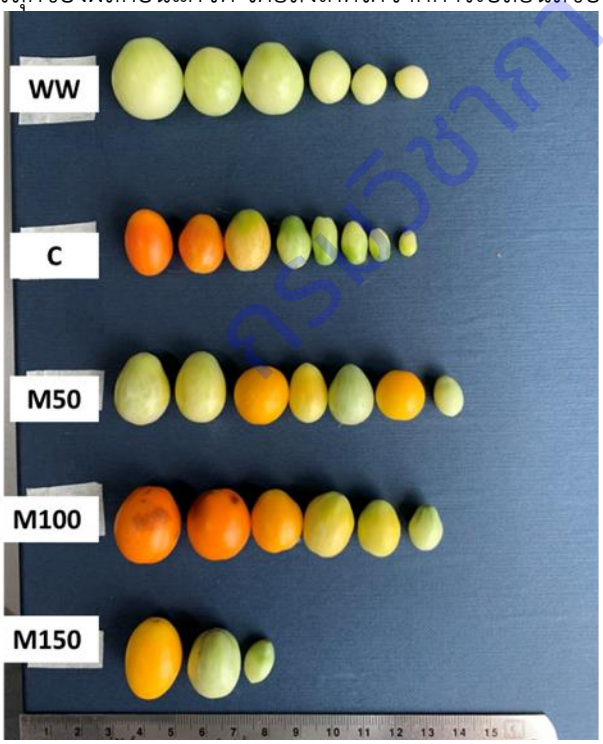


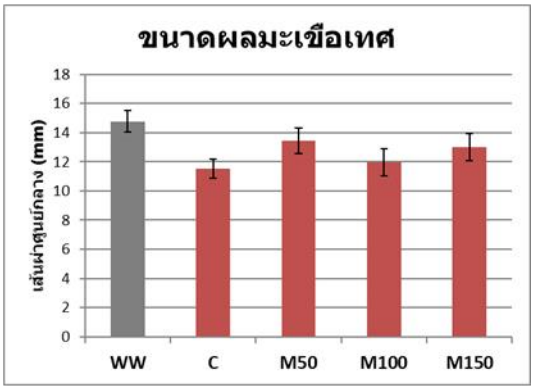
ภาพที่ 2.2-10 ภาพแสดงลักษณะใบและลำต้นของมะเขือเทศ หลังจากเริ่มลดปริมาณน้ำ 18 วัน



ภาพที่ 2.2-11 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยความเหี่ยวของใบมะเขือเทศในแต่ละกรรมวิธี โดยให้คะแนนจากอัตราส่วนการม้วนงอของใบ (0 = ใบม้วนงอ 100%, 5 = ใบม้วนงอ 50%, 10 = ใบม้วนงอ 0%)

เมื่อเก็บผลและเปรียบเทียบขนาดผลมะเขือเทศของแต่ละกรรมวิธี พบว่า ผลมะเขือเทศของกรรมวิธีที่ลดปริมาณการให้น้ำ (C, M50, M100 และ M150) จะมีขนาดเล็กกว่ากรรมวิธีให้น้ำปกติ (WW) (ภาพที่ 2.2-12) โดยกรรมวิธีทั้งหมดที่ให้สารเมลาโทนิน (M50, M100 และ M150) มีขนาดผลมะเขือเทศขนาดใหญ่กว่ากรรมวิธีควบคุม (C) โดยการให้เมลาโทนินที่ความเข้มข้น 50 µM สามารถเพิ่มขนาดผลมะเขือเทศได้มากที่สุด รวมทั้งมีแนวโน้มในการลดการสุกของผลก่อนแก่จัด โดยสังเกตได้จากการเปลี่ยนสีของผลมะเขือเทศจะช้ากว่ากรรมวิธีควบคุม (C)



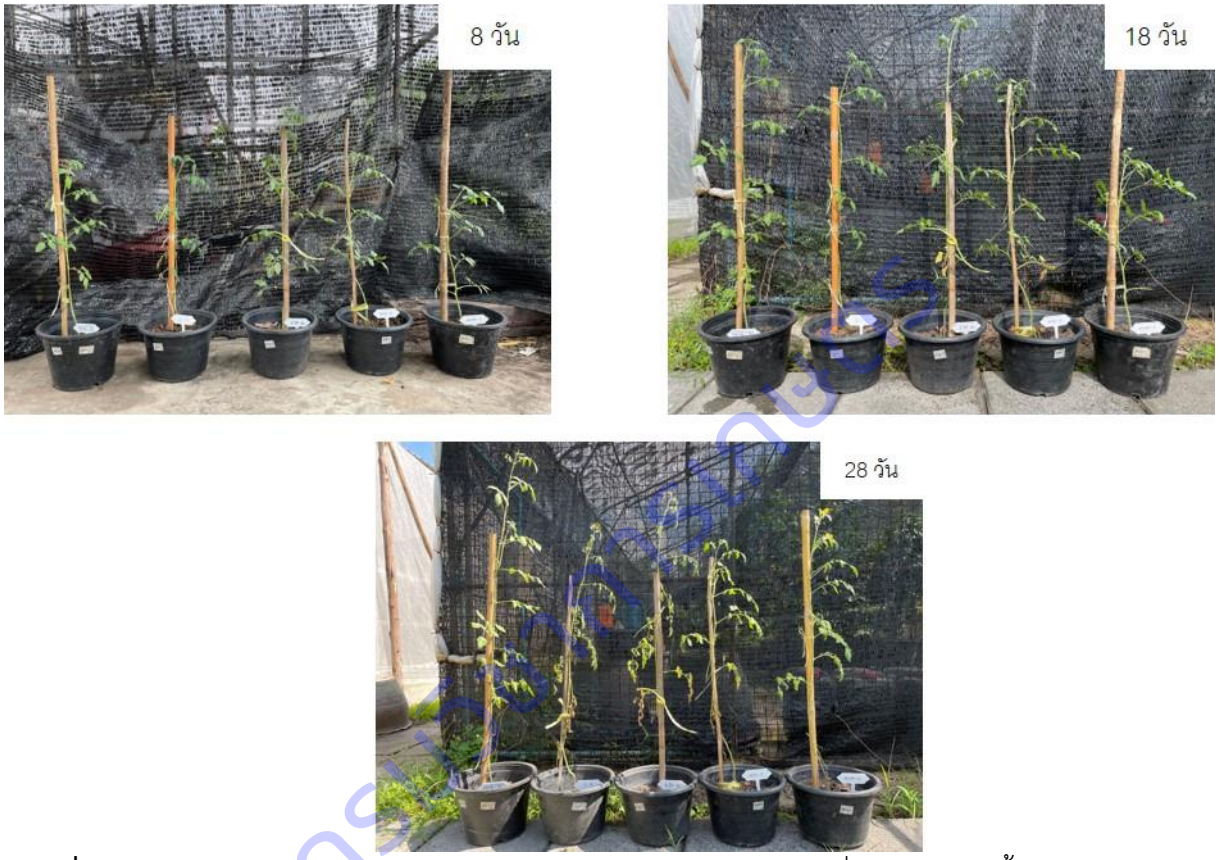


ภาพที่ 2.2-12 ภาพแสดงตัวอย่างผลมะเขือเทศจากกรรมวิธีที่ให้และไม่ให้เมลาโทนิน (ซ้าย) และกราฟแสดงขนาดผลมะเขือเทศ (ขวา) ในสภาพแล้ง

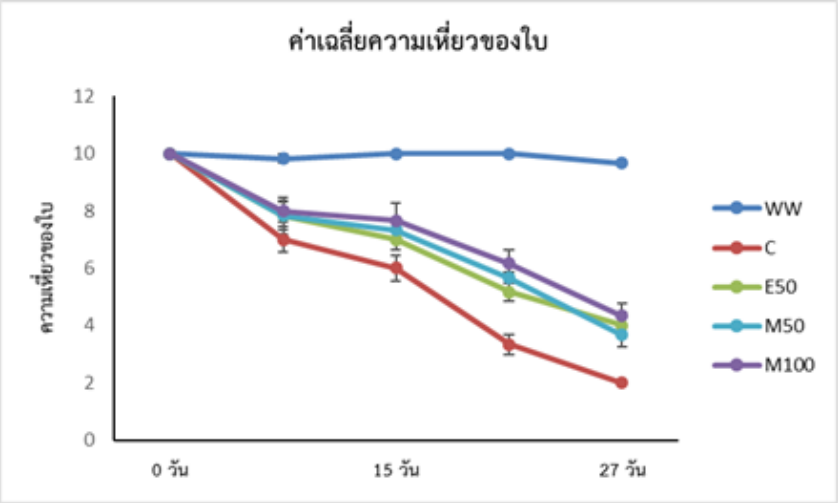
กรมวิชาการเกษตร

2.3 การทดสอบประสิทธิภาพของสารเมลาโทนินแบบหยาบในการเพิ่มความทนแล้งของมะเขือเทศช่วงติดดอกในสภาพโรงเรือน

หลังจากลดปริมาณการให้น้ำต้นมะเขือเทศพันธุ์ราชินีต่อเนื่องกันเป็นเวลา 8 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับต้นมะเขือเทศในกรรมวิธีที่ให้น้ำตามปกติ [WW] ใบของมะเขือเทศในกรรมวิธีลดปริมาณการให้น้ำ [C, E50, E50 และ M100] จะเริ่มเหี่ยวลง ตามภาพที่ 2.2-13 และเมื่อสังเกตเห็นความเหี่ยวของใบได้ได้ชัดเจนเมื่อวันที่ 28 ของการลดปริมาณการให้น้ำ ตามภาพที่ 2.2-13 และ 2.2-14

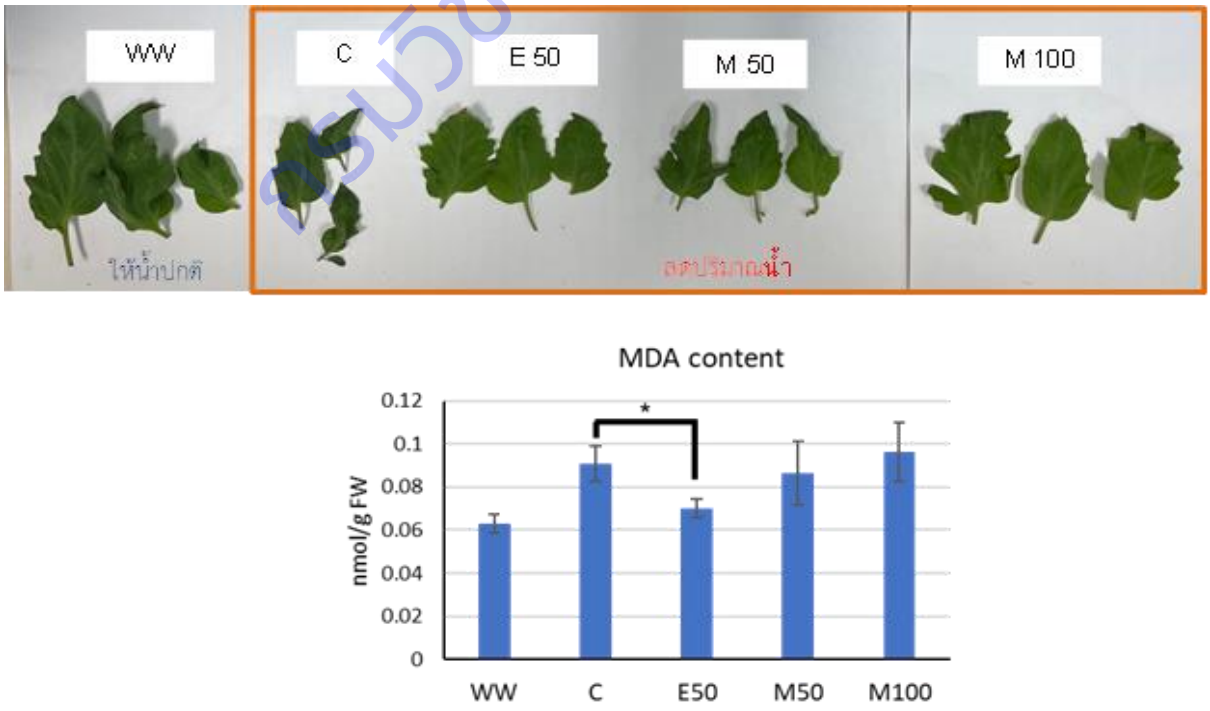


ภาพที่ 2.2-13 ภาพแสดงลักษณะใบและลำต้นของมะเขือเทศ หลังจากเริ่มลดปริมาณน้ำ 8, 18 และ 28 วัน กระถางนับจากทางซ้ายมือ กรรมวิธี WW, C, E50, M-50 และ M-100



ภาพที่ 2.2-14 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยความเหี่ยวของใบมะเขือเทศในแต่ละกรรมวิธี โดยให้คะแนนจากอัตราส่วนการม้วนงอของใบ (0 = ใบม้วนงอ 100%, 5 = ใบม้วนงอ 50%, 10 = ใบม้วนงอ 0%)

เมื่อเก็บใบมะเขือเทศของแต่ละกรรมวิธี ณ วันที่ 28 หลังจากเริ่มลดปริมาณการให้น้ำ มาวิเคราะห์ปริมาณ Malondialdehyde (MDA) ซึ่งเป็นสารที่บ่งชี้ถึงภาวะเครียดออกซิเดชั่นในเซลล์พืช พบว่าตัวอย่างในกรรมวิธีลดปริมาณน้ำทั้งหมด [C, E50, M50 และ M100] มีปริมาณ MDA มากกว่ากรรมวิธีให้น้ำปกติ [WW] และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกรรมวิธีที่ให้และไม่ให้เมลาโทนินพบว่ากรรมวิธีที่ให้เมลาโทนินแบบหยาบ [E50] มีปริมาณ MDA น้อยกว่ากรรมวิธีควบคุม [C] อย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 2.2-15) แต่ไม่พบความแตกต่างของปริมาณ MDA ระหว่างกรรมวิธีควบคุมกับกรรมวิธีที่ให้เมลาโทนินบริสุทธิ์ จากผลการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่า เมลาโทนินแบบหยาบที่ผลิตได้จาก *E. coli* มีประสิทธิภาพในการลดภาวะเครียดออกซิเดชั่นที่เกิดจากการขาดน้ำในใบมะเขือเทศได้ และมีแนวโน้มเพิ่มความต้านทานแล้งของมะเขือเทศในระดับโรงเรือนเช่นเดียวกับในห้องปฏิบัติการ



ภาพที่ 2.2-15 ภาพแสดงตัวอย่างใบมะเขือเทศที่นำมาวิเคราะห์ปริมาณ MDA และกราฟแสดงค่าเฉลี่ยปริมาณ MDA ของใบมะเขือเทศในแต่ละกรรมวิธี (* : student *t*-test $p<0.05$)

อภิปรายผล

ในการผลิตสารเมลาโทนินจากจุลินทรีย์โดยใชเทคโนโลยีชีวภาพ ได้ทำการโคลนและสังเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเมลาโทนิน ได้แก่ *AANAT* และ *OsCOMT* นำมาเชื่อมต่อเวกเตอร์ pETDuet-1 ฝากถ่ายสู่ *E. coli* และชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนทั้ง 2 ตัวพร้อมกัน จากนั้น ทำการทดสอบปัจจัยในการชักนำการแสดงออกโปรตีน พบว่าโปรตีนจะแสดงออกได้ดี เมื่อใช้สารชักนำการแสดงออก (IPTG) ที่ความเข้มข้น 0.1 mM อุณหภูมิ 37˚C และการสังเคราะห์เมลาโทนินโดยเอนไซม์ทั้ง 2 ตัวจะให้ประสิทธิภาพดีที่สุด ที่ปริมาณสารตั้งต้นเซโรโทนิน 1 mM จากนั้นทดลองเลี้ยง *E. coli* โดยใช้ปัจจัยข้างต้นและขยายปริมาณการเลี้ยงในระดับถังหมักขนาดเล็กและทำการสกัดน้ำเลี้ยงเพื่อขจัดน้ำตาลและเพิ่มความเข้มข้นของสาร ทำให้ได้สารเมลาโทนินแบบหยาบในรูปแบบของแข็งและของเหลว โดยสามารถผลิตเมลาโทนินได้สูงสุดอยู่ที่ประมาณ 2.7 µg/mL หากเปรียบเทียบกับรายงานในต่างประเทศ (Byeon and Back, 2016) ที่ใช้ *E. coli* ดัดแปลงพันธุกรรมจากสัตว์และพืช ซึ่งผลิตได้อยู่ที่ 1.5 µg/mL พบว่าในการทดลองนี้สามารถผลิตเมลาโทนินได้มากกว่า แต่อย่างไรก็ดี ในปี 2021 มีรายงานการพัฒนา *E.coli* ดัดแปลงพันธุกรรมที่สามารถผลิตเมลาโทนินได้มากถึง 0.65 g/L โดยใช้การโคลนยีนที่สามารถสังเคราะห์สารที่อยู่ในกระบวนการสังเคราะห์เมลาโทนินจากแบคทีเรีย *Streptomyces albulus* และ *Xanthomonas campestris* ซึ่งเป็นการลบล้างข้อจำกัดของเอนไซม์สังเคราะห์เมลาโทนินที่พบในพืชและสัตว์ (Zhang *et al*., 2021) ดังนั้นการใช้ข้อมูลยีนจากแบคทีเรียและการออกแบบกระบวนการสังเคราะห์เมลาโทนินเพื่อผลิตสารในปริมาณที่สูงขึ้นกว่านี้ ยังต้องอาศัยการศึกษาวิจัยต่อไป

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารเมลาโทนินทั้งแบบบริสุทธิ์และสารเมลาโทนินแบบหยาบที่ผลิตได้เองในการเพิ่มความต้านทานความเครียด 2 ประเภท คือ ความเค็ม และความแล้ง แสดงให้เห็นว่า สารเมลาโทนินสามารถเพิ่มอัตราการงอกและการเจริญเติบโตของแตงร้านในสภาพดินเค็ม รวมถึงสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของมะเขือเทศทั้งระยะต้นอ่อน และระยะออกดอกในสภาพแล้งโดยการลดปริมาณภาวะออกซิเดชั่นในเซลล์พืชได้ ผลที่ได้จากการทดลองนี้ สอดคล้องกับรายงานเกี่ยวกับกลไกการทำงานและประสิทธิภาพของสารเมลาโทนินในต่างประเทศ (Nawaz *et al*., 2021) ที่พบว่าเมลาโทนินมีส่วนช่วยในการซ่อมแซม Mitochondria ในเซลล์พืชที่ได้รับความเครียด ส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ Anti-oxidant ที่ช่วยยับยั้งทำลายเซลล์พืชโดยสารอนุมูลอิสระต่างๆ (Reactive oxygen species; ROS) และช่วยรักษาอัตราการสังเคราะห์แสงของพืชที่ได้รับความเครียด อย่างไรก็ดี ชนิดของพืชและชนิดของความเครียดเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อประสิทธิภาพของเมลาโทนิน ดังเช่นจากการทดลองนี้ที่พบว่า ในแตงร้าน เมลาโทนินที่ความเข้มข้น 50 และ 100 µM สามารถเพิ่มอัตราการงอกของเมล็ดในสภาพดินเค็มได้ดี ส่วนในมะเขือเทศ เมลาโทนินที่ความเข้มข้น 50 มีแนวโน้มที่จะส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นมะเขือเทศในสภาพแล้งได้ดีที่สุด ดังนั้น ในการศึกษาการใช้เมลาโทนินเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชต้องคำนึงถึงชนิดของความเครียดและชนิดของพืชเป้าหมายด้วย

กรมวิทยาศาสตร์

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

จากการดำเนินงานวิจัยได้จุลินทรีย์ (*E. coli*) ดัดแปลงพันธุกรรมที่สามารถผลิตสารเมลาโทนิน จากการโคลนและสังเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เมลาโทนิน ได้ข้อมูลอุณหภูมิ ความเข้มข้นของสารชักนำและสารตั้งต้นที่เหมาะสมในการผลิตเมลาโทนินด้วย *E. coli* รวมทั้งได้สารเมลาโทนินแบบหยาบในรูปของแข็ง นอกจากนี้ จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารเมลาโทนิน ได้ข้อมูลความเข้มข้นและวิธีการให้สารเมลาโทนินเพื่อเพิ่มความต้านทานดินเค็มของเมล็ดแตงร้านและความต้านทานแล้งของมะเขือเทศ ในการนำไปใช้ประโยชน์ องค์ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยเกี่ยวกับประสิทธิภาพเมลาโทนินในการเพิ่มความต้านทานต่อความเครียดในมะเขือเทศและแตงร้าน สามารถนำไปต่อยอดโดยการนำไปปรับใช้สารเมลาโทนินกับพืชอื่นๆ ได้ อีกทั้งเทคโนโลยีการผลิตสารเมลาโทนินจากจุลินทรีย์ระดับถังหมักขนาดเล็ก และกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ต้นแบบ สามารถต่อยอดใช้ในการผลิตสารชีวภาพอื่นๆจากจุลินทรีย์ได้เช่นเดียวกัน

จากผลการดำเนินงานวิจัย ชิ้นส่วนยีน *AANAT* และยีน *OsCOMT* ที่อยู่ในเวกเตอร์ pETDuet-1 เมื่อนำมาทดสอบการแสดงออกใน *E. coli* ได้โปรตีนที่สามารถสังเคราะห์เมลาโทนินจากสารเริ่มต้นเซโรโทนิน ตามสมมติฐานเบื้องต้นของการทดลอง แสดงให้เห็นว่าขั้นตอนการโคลนและถ่ายฝากยีนทั้งสองตัวนี้ รวมถึงการกระตุ้นการแสดงออกใน *E. coli* ประสบความสำเร็จในขั้นหนึ่ง แต่เมื่อนำ *E. coli* ที่ได้รับการถ่ายฝากยีนซึ่งอยู่ในเวกเตอร์ pETDuet-1 มาศึกษาปัจจัยภายนอกเพื่อใช้ในการผลิตสารเมลาโทนิน พบว่าปัจจัยเหล่านี้ไม่มีผลต่อการแสดงออกของโปรตีน AANAT และปริมาณโปรตีน AANAT อยู่ในระดับต่ำกว่าที่คาดหมาย ซึ่งอาจเป็นปัจจัยที่ส่งผลให้ปริมาณเมลาโทนินที่ได้จากการสังเคราะห์ของเอนไซม์ AANAT และ OsCOMT ยังอยู่ในระดับต่ำเช่นเดียวกัน ในอนาคตหากสามารถเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน AANAT และ OsCOMT หรือมีข้อมูลเอนไซม์ที่สามารถสังเคราะห์เมลาโทนินในประสิทธิภาพที่สูงกว่า จะทำให้สามารถผลิตเมลาโทนินใน *E. coli* ได้ในปริมาณมากขึ้นและเพียงพอต่อการนำไปใช้ทางการเกษตรต่อไป นอกจากนี้ จากการทดลองพบว่าสารเมลาโทนินมีความอ่อนไหวต่อแสงและไม่คงรูปในสภาพสารละลายน้ำ ดังนั้น จำเป็นต้องศึกษาวิธีการเก็บรักษา และรูปแบบผลิตภัณฑ์สารเมลาโทนินเพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ทางการเกษตรต่อไปในอนาคต

จากการดำเนินงานวิจัยของกิจกรรมที่ 2 ผลผลิตที่ได้คือจุลินทรีย์ (*E. coli*) ดัดแปลงพันธุกรรมที่สามารถผลิตสารเมลาโทนิน จากการโคลนและสังเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เมลาโทนิน ได้ข้อมูลอุณหภูมิ ความเข้มข้นของสารชักนำและสารตั้งต้นที่เหมาะสมในการผลิตเมลาโทนินด้วย *E. coli* รวมทั้งได้สารเมลาโทนินแบบหยาบในรูปของแข็ง นอกจากนี้จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารเมลาโทนิน ได้ข้อมูลความเข้มข้นและวิธีการให้สารเมลาโทนินเพื่อเพิ่มความต้านทานดินเค็มของเมล็ดแตงร้านและความต้านทานแล้งของมะเขือเทศ ในการนำไปใช้ประโยชน์ องค์ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยเกี่ยวกับประสิทธิภาพเมลาโทนินในการเพิ่มความต้านทานต่อความเครียดในมะเขือเทศและแตงร้าน สามารถนำไปต่อยอดโดยการนำไปปรับใช้สารเมลาโทนินกับพืชอื่นๆ ได้ อีกทั้งเทคโนโลยีการผลิตสารเมลาโทนินจากจุลินทรีย์ระดับถังหมักขนาดเล็ก และกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ต้นแบบ สามารถต่อยอดใช้ในการผลิตสารชีวภาพอื่นๆจากจุลินทรีย์ได้เช่นเดียวกัน

กรมวิชาการเกษตร

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

บทสรุป

การพัฒนาการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิก (ALA) ได้ต้นแบบเทคโนโลยีในการผลิตจากรีคอมบิแนนท์ *E. coli* สามารถผลิตได้รีคอมบิแนนท์โปรตีนซึ่งมีขนาดประมาณ 45 กิโลดาลตัน และสามารถนำรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ดังกล่าวไปสังเคราะห์กรดอะมิโนลีวูลินิคได้ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง ตลอดกระบวนการผลิต โดยการใช้ชนิดของสารตั้งต้นปฏิกิริยาการสังเคราะห์คือ 30 mM Glycine และ 10 mM Succinic Acid ทำให้สามารถเพิ่มศักยภาพการผลิตกรดอะมิโนลีวูลินิคจากรีคอมบิแนนท์ *E. coli* ใน lab scale และระบบถังหมักขนาด 50 ลิตร สามารถเพิ่มปริมาณการผลิตได้ในปริมาณสูง แนวทางการใช้ประโยชน์ด้านการเกษตร การใช้ในปริมาณความเข้มข้นต่ำกว่า 1 mM สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช การใช้กรด 5-อะมิโนลีวูลินิค ความเข้มข้นสูงกว่า 2 mM มีผลต่อทำลายเซลล์เมมเบรนของวัชพืช (บาหยา ลูกใต้ใบ น้ำนมราชสีห์ และหญ้ายาง) มีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ cell membrane ทำให้เกิดรอยไหม้ที่ใบมีรอยแผลสีน้ำตาล เนื้อใบมีสีซีด ใบเหี่ยวเฉาเกิดการสูญเสียน้ำและตายในที่สุด และส่งผลต่อการควบคุมการเจริญเติบโตของหนอนกระทู้

การผลิตสารเมลาโทนิน ได้ต้นแบบเทคโนโลยีการผลิตสารเมลาโทนินจากจุลินทรีย์ (*E. coli*) ดัดแปลงพันธุกรรมและได้ข้อมูลปัจจัยที่เหมาะสมในการผลิตได้แก่ อุณหภูมิ ความเข้มข้นของสารชักนำและสารตั้งต้นในการผลิตเมลาโทนินด้วย *E. coli* นอกจากนี้การทดสอบประสิทธิภาพของสารเมลาโทนิน ได้ข้อมูลความเข้มข้นที่เหมาะสมและกระบวนการให้สารเมลาโทนินเพื่อเพิ่มความต้านทานดินเค็มของเมล็ดแตงร้านและความต้านทานแล้งของมะเขือเทศ

โครงการวิจัยนี้ได้พัฒนาผลิตภัณฑ์ 2 ต้นแบบ คือ 1) กรด 5-อะมิโนลีวูลินิค รูปแบบผงแห้ง โดยเทคนิคการทำแห้งแบบพ่นฝอย และ 2) สารเมลาโทนินจากจุลินทรีย์แบบหยาบ ซึ่งจะเป็นแนวทางในการพัฒนาศักยภาพการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิคและสารเมลาโทนินในเชิงพาณิชย์ต่อไป

ข้อเสนอแนะ

องค์ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยเกี่ยวกับประสิทธิภาพของสารชีวภาพทั้ง 2 ชนิดนี้ สามารถนำไปขยายผลและปรับใช้กับพืชทดสอบชนิดอื่นๆ เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตและต้านทานความเครียดจากสภาพแวดล้อมได้

การพัฒนาการผลิตสารชีวภาพกรด 5-อะมิโนลีวูลินิค และสารเมลาโทนิน สามารถต่อยอดการวิจัยโดยเลือกใช้สารตั้งต้นชนิดอื่นที่มีความเหมาะสม หาได้ง่าย และราคาถูก เพื่อช่วยในการลดต้นทุนด้านการผลิตได้ในอนาคต

เทคโนโลยีการผลิตกรด 5-อะมิโนลีวูลินิค และสารเมลาโทนิน จากจุลินทรีย์ดัดแปลงพันธุกรรมในระดับถังหมักขนาดเล็ก และรูปแบบการผลิตผลิตภัณฑ์ต้นแบบ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการผลิตสารชีวภาพชนิดอื่นๆ ได้ และเป็นแนวทางในการขยายผลการผลิตในระดับอุตสาหกรรมเชิงพาณิชย์ต่อไป

หากโครงการวิจัยนี้ ได้รับการสนับสนุนให้สามารถพัฒนาต่อยอดเพื่อการขยายการผลิตในระดับอุตสาหกรรมหรือเชิงพาณิชย์ ก็จะมีผลกระทบในวงกว้างทั้งในทางการแพทย์ และโดยเฉพาะอย่างยิ่งในด้านการเกษตร สามารถใช้ประโยชน์เป็นสารชีวภาพทางเลือกใหม่ในการเป็นสารเสริมช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช และสารกำจัดวัชพืชซึ่งมีความปลอดภัยสูง ช่วยส่งเสริมนโยบายลดการใช้สารเคมี สร้างความยั่งยืนในระบบนิเวศน์การเกษตร ลดปัญหาสารพิษตกค้างในผลิตผลทางการเกษตร ตลอดจนสร้างความเชื่อมั่นให้กับผู้บริโภคต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

บรรณานุกรม

เอกสารอ้างอิง

กิจกรรมที่ 1

Akram, N.A. and M. Ashraf. 2011. Pattern of accumulation of inorganic elements in sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants subjected to salt stress and exogenous application of 5-aminolevulinic acid. Pak. J. Bot. 43(1): 521-530.

Balestrasse, K.B., M.L. Tomaro, A. Batlle and G.O. Noriega. 2010. The role of 5-aminolevulinic acid in the response to cold stress in soybean plants. Phytochemistry. 71: 2038-2045.

Jordan, P.M. 1991. Biosynthesis of 5-aminolevulinic acid andits transformation into uroporphyrinogen Ill in animals and bacteria. In *Biosynthesis of Tetrapyrroles* (Jordan, P.M., Ed.), pp. 1-66. Elsevier, Amsterdam.

Hotta, Y., T. Tanaka, H. Takaoka, Y. Takeuchi and M. Konnai. 1997. Promotive effects of 5-aminolevulinic acid on the yield of several crops. Plant Growth Regul. 22: 109-114.

Korkmaz, A. and Y. and Korkmaz. 2009. Promotion by 5-aminolevulinic acid pepper seed Germination and seedling emergence under low-temperature stress. Sci. Hort. 119: 98-102.

Kumar, A.M., S. Chaturvedi, and D. SÖll. 1999. Selective inhibition of HEMA gene expression by photooxidation in *Arabidopsis thaliama*. Phytochem. 51: 847-851.

Neidle, E. L. and S. Kaplan. 1993. Expression of the *Rhodobacter sphaeroides hemA* and *hemT* genes, encoding two 5-aminolevulinic acid synthase isozymes. J. Bacteriol. 175:2292–2303.

Nishihara, E., K. Kondo, M.M. Parvez, K. Takahashi, K. Watanabe and K. Tanaka. 2003. Role of 5-aminolevulinic acid (ALA) on active oxygen-scavenging system in NaCl-treated spinach (*Spinacia oleracea*). J. Plant. Physiol. 160: 1085-1091.

Maruyama-Nakashita, A. 2012. Sulfate uptake, cysteine and GSH contents are increased by 5-aminolevulinic acid in *Arabidopsis thaliana*. Sulfur metabolism in plants proceedings of the international plant sulfur workshop. 1: 85-89.

Mishra, S.N. and H.S. Srivastava. 1983. Stimulation of nitrate reductase activity by delta aminolevulinic acid in excised maize leaves. Experientia. 39: 1118-1120.

Rebeiz, C.A., A. Montazer-Zouhoor, J. M. Mayasich, B. C. Tripathy, S. M. Wu and C. C. Rebeiz. 1988. Photodynamic Herbicides. Recent development and molecular basis of selectivity. *Crit. Rev. Plant Sci.* 6: 385-434.

Richter, A., E. Peter, Y. PÖrs, S. Lorenzen and B. Grimm. 2010. Rapid dark repression of 5-aminolevulinic acid synthesis in green barley leaves. Plant. Cell. Physiol. 51(5): 670-681.

Sasaki, K., S. Ikeda, Y. Nishizawa and M. Hayashi. 1987. Production of 5-aminolevulinic acid by photosynthetic bacteria. J. Ferment. Technol. 65: 511-515.

Sasaki, K., N. Noparatnaraporn and S. Nagai. 1990. Production of 5-aminolevulinic acid as a herbicide from swine waste by *Rhodobacter sphaeroides.* Ann. Rep. 1C Biotech. 13: 277-281.

ศูนย์วิทยทรัพยากร

Sasikala, Ch., Ch.V. Ramana and P.R. Rao. 1994. 5-Aminolevulinic acid: A potential herbicide/ insecticide from microorganisms. Biotechnol. Prog. 10: 451-459.

Wang, J.J., W.B. Jiang, Z. Zhang, Q.H. Yao, H. Matsui and H. Ohara. 2003. 5-Aminolevulinic acid and its application in agriculture. Plant. Physiol. Commune. 39: 185-192.

Warnick, G.R. and B.F. Burnham. 1971. Regulation of prophyrin biosynthesis. Purification and characterization of 5–aminolevulinic acid synthase. J Biol Chem. 1971 Nov 25; 246(22):6880–6885.

Wu, Y., W. Liao, M.M. Dawuda, L. Hu and J. Yu. 2019. 5-Aminolevulinic acid (ALA) biosynthetic and metabolic pathways and its role in higher plants: a review. *Plant Growth Regul* 87, 357–374. https://doi.org/10.1007/s10725-018-0463-8

Youssef, T. and M.A. Awad. 2008. Mechanisms of enhancing photosynthetic gas exchange in date palm Seedling (*Phoenix dactylifera* L.) under salinity stress by 5-aminolevulinic acid based fertilizer. J. Plant. Growth Regul. 27: 1-9.

Zhang, L., J. Chen, N. Chen, J. Sun, P. Zheng and Y. Ma. 2013. Cloning of two 5-aminolevulinic acid synthase isozymes HemA and HemO from *Rhodopseudomonas palustris* with favorable characteristics for 5-aminolevulinic acid production. Biotechnol Lett 2013 May 22;35(5):763-8. Epub 2013 Jan 22.

<u>กิจกรรมที่ 2</u>

Arnao, M.B., and J. Hernández-Ruiz. 2014. Melatonin: plant growth regulator and/or biostimulator during stress? Trends Plant Sci. 19, 789–797.

Back, K., DX. Tan and RJ. Reiter. 2016. Melatonin biosynthesis in plants: multiple pathways catalyze tryptophan to melatonin in the cytoplasm or chloroplasts. J Pineal Res.61, 426-437.

Brainard, G.C., J.P. Hanifin, J.M. Greeson, B. Byrne, G. Glickman, E. Gerner and M.D. Rollag. 2001. Action spectrum for melatonin regulation in humans: evidence for a novel circadian photoreceptor. Journal of Neuroscience, 21(16), 6405-6412.

Byeon Y. and K. Back. 2016. Melatonin production in Escherichia coli by dual expression of serotonin N-acetyltransferase and caffeic acid O-methyltransferase. Appl Microbiol Biotechnol. 100: 6683–91.

Byeon, Y., S.Park, H.Y. Lee, Y.-S.Kim and K. Back. 2014c. Elevated production of melatonin in transgenic rice seeds expressing rice tryptophan decarboxylase. J. Pineal Res. 56, 275–282.

Cherono, S., C. Ntini, M. Wassie, M.D. Mollah, M.A. Belal, C. Ogutu and Y. Han. 2020. Exogenous Application of Melatonin Improves Drought Tolerance in Coffee by Regulating Photosynthetic Efficiency and Oxidative Damage. Journal of the American Society for Horticultural Science, -1, 1-9.

กรมวิชาการเกษตร

Dubbels, R., R.J. Reiter, E. Klenke, A. Goebel, E. Schnakenberg, L. Ehlers, H.W. Schiwara and W. Schloot. 1995. Melatonin in edible plants identified by radioimmunoassay and by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. J. Pineal Res. 18, 28–31.

Germann SM., SA. Baallal Jacobsen, K. Schneider, SJ. Harrison, NB. Jensen, X. Chen, SG. Stahlhut, I. Borodina, H. Luo, J. Zhu, J. Maury and J. Forster. 2016. Glucose-based microbial production of the hormone melatonin in yeast Saccharomyces cerevisiae. Biotechnol J. May;11(5): 717-24.

Grossman, A.R., M. Lohr and S.I. Chung. 2004. *Chlamydomonas reinhardtiil* in the landscape of pigments. Annu Rev Genet .38: 119-173.

Hallmann, A. 2007. Algal Transgenics and Biotechnology. *Transgenic Plant J.* 1(1): 81-98.

Hardeland, R. 2015. Melatonin in plants and other phototrophs – advances and gaps concerning the diversity of functions. J. Exp. Bot. 66, 627–646.

Hattori, A., H. Migitaka, M. Iigo, M. Itoh, K. Yamamoto, R. Ohtani-Kancho, M. Hara,T. Sazuki and R.J. Reiter. 1995. Identification of melatonin in plants and its effects on plasma melatonin levels and binding to melatonin receptors in vertebrates. Biochem. Mol. Biol. Int. 35, 627–634.

Lei, Q., L. Wang, D.X. Tan, Y. Zhao, X.D. Zheng, H. Chen, Q.T. Li, B.X. Zuo and J. Kong. 2013. Identification of genes for melatonin synthetic enzymes in “Red Fuji” apple (Malus domesticus Borkh. cv. Red) and their expression and melatonin production during fruit development. J. Pineal Res. 55, 443–451.

Manchester, L.C., DX. Tan, RJ. Reiter, W. Park, K. Monis and W. Qi. 2000. High levels of melatonin in the seeds of edible plants: possible function in germ tissue proetection. Life Sci. 67(25):3023-9.

Nawaz K, R. Chaudhary, A. Sarwar, B. Ahmad, A. Gul, C. Hano, BH. Abbasi and S. Anjum. 2021. Melatonin as Master Regulator in Plant Growth, Development and Stress Alleviator for Sustainable Agricultural Production: Current Status and Future Perspectives. Sustainability. 13(1):294.

Okazaki, M., K. Higuchi, Y. Hanawa, Y. Shiraiwa and H. Ezura. 2009. Cloning and characterization of a *Chlamydomonas reinhardtii* cDNA arylalkylamine N-acetyltransferase and its use in the genetic engineering of melatonin content in the Micro-Tom tomato. J. Pineal Res. 43, 373–382.

Park, S., K. Lee, Y.S. Kim and K. Back. 2012. Tryptamine 5-hydroxylase-deficient Sekiguchi rice induces synthesis of 5-hydroxytryptophan and N-acetyltryptamine but decreases melatonin biosynthesis during senescence of detached rice leaves. J. Pineal Res. 52, 211–216.

Reiter, RJ., DX.Tan, Z.Zhou, MH. Cruz, L. Fuentes-Broto and A. Galano. 2015. Phytomelatonin: assisting plants to survive and thrive. Molecules. 20(4):7396-437.

Tal, O., A. Haim, O.Harel and Y. Gerchman. 2011. Melatonin as an antioxidant and its semi-lunar rhythm in green macroalga Ulva sp. Journal of experimental botany, 62(6), 1903-1910.

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

Tan, D.X., L.C. Manchester, P. Helton and R.J. Reiter. 2007. Phytoremediative capacity of plants enriched with melatonin. Plant Signal. Behav. 2, 51–516.

Wang, P., X. Sun, C. Chang, F. Feng, D. Liang and L. Cheng. 2013. Delay in leaf senescence of Malus hupehensis by long-term melatonin application is associated with its regulation of metabolic status. J. Pineal Res. 55, 424–434.

Weeda, S., N. Zhang, X. Zhao, G. Ndip, Y. Guo, G. A.Buck. 2014. Arabidopsis transcriptome analysis reveals key roles of melatonin in plant defense systems. PLoS ONE 9:93462.

Zhang, N., B. Zhao, H.J. Zhang, S. Weeda, C. Yang and Z.C. Yang. 2013. Melatonin promotes water-stress tolerance, lateral root formation, and seed germination in cucumber (*Cucumis sativus* L.). J. Pineal Res. 54, 15–23.

Zhang, Y., Y. He and N. Zhang. 2021. Combining protein and metabolic engineering strategies for biosynthesis of melatonin in *Escherichia coli*. Microb Cell Fact 20, 170.

Zhao,Y., D.X. Tan, Q. Lei, H. Chen, L. Wang, Q.T. Li, Y. Gao and J. Kong. 2013. Melatonin and its potential biological functions in the fruits of sweet cherry. J. Pineal Res. 55, 79–88.

กรมวิชาการเกษตร