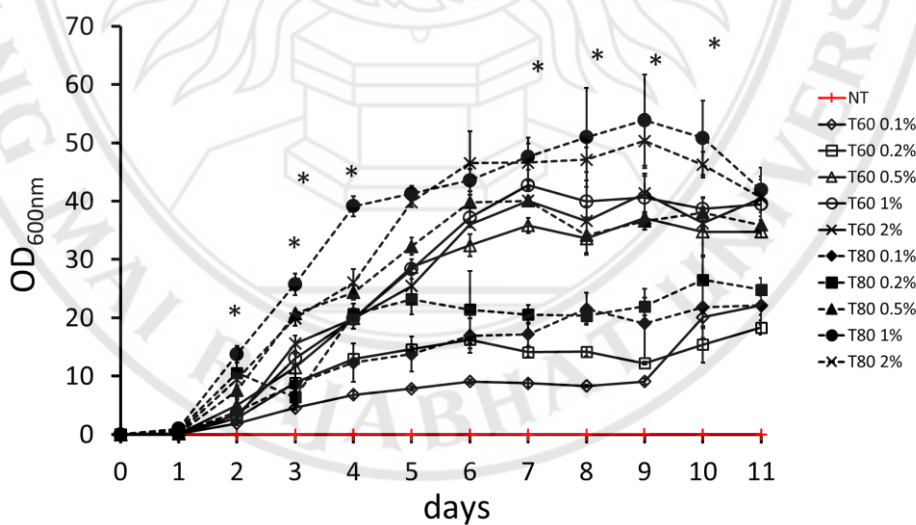


บทที่ 4

ผลการทดลอง

การตรวจสอบหาความเข้มข้นของ Tween ที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงเชื้อ *M. furfur*

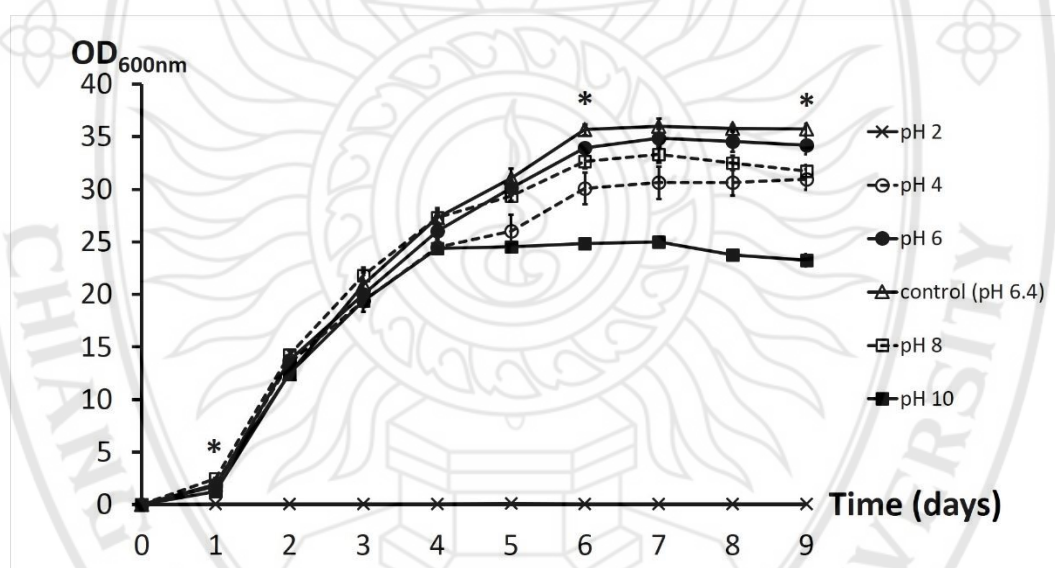
เนื่องจากเชื้อ *M. furfur* ไม่สามารถสังเคราะห์กรดไขมันได้ ในการทดลองจึงจำเป็นต้องเติมไขมันลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อเลือกอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อ *M. furfur* CBS 1878^T ซึ่งเป็นเชื้อมาตรฐานที่รู้จักกันแพร่หลายที่สุดและมีรายงานวิจัยมากที่สุดในบรรดาไอโซเลทต่าง ๆ ของสปีชีส์ *M. furfur* โดยเติม Tween 60 และ 80 ลงในอาหาร YPD broth ที่ความเข้มข้น 0-2% พบว่า เมื่อไม่ใส่ Tween เชื้อไม่สามารถเจริญได้ใน YPD broth แต่เชื้อเจริญได้ดีที่สุดที่ 1% Tween 80 และเจริญได้น้อยที่สุดในชุดการทดลองที่ 0.1% Tween 60 ที่น่าสนใจคือพบว่าที่ความเข้มข้น Tween ต่ำกว่า 0.2% การเจริญของเชื้อจะลดลงอย่างชัดเจนและเพิ่มขึ้นมากที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5% ขึ้นไป ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะเลือกใช้ความเข้มข้นที่ไม่มากไม่น้อยเกินไปและเชื้อสามารถเจริญได้ในเกณฑ์ดีคือ 0.5% Tween 60 (ภาพที่ 4.1)



ภาพที่ 4.1 การเจริญของเชื้อ *M. furfur* CBS 1878^T ในอาหาร YPD broth ที่เติม Tween 60 และ 80 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 11 วัน (NT: no Tween, T60: Tween 60, T80: Tween 80) แสดงค่าเป็น mean $\pm$ SD (n=3) (*: $p < 0.05$)

ผลของ pH ต่อการเจริญของเชื้อ *M. furfur*

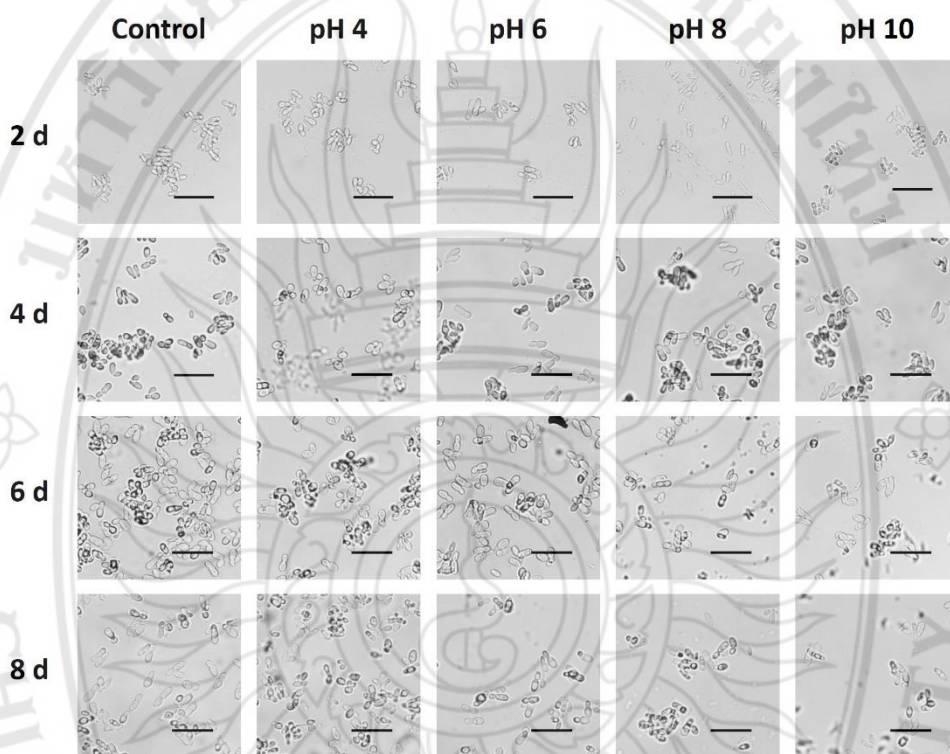
ในการศึกษาหาความสัมพันธ์ของ pH กับการเจริญของ *M. furfur* CBS 1878^T พบว่าเชื้อไม่สามารถเจริญได้ที่ pH 2 แต่สามารถเจริญได้ที่ pH 4-10 โดยในระยะ lag phase (วันที่ 0-1) และ log phase (วันที่ 1-4) เชื้อสามารถเจริญได้ไม่แตกต่างกันในแต่ละชุดการทดลอง แต่หลังจากวันที่ 4 เป็นต้นไป เชื้อในชุดการทดลอง pH 10 เข้าสู่ stationary phase ก่อนและมีค่า OD ต่ำสุดในชุดการทดลองที่เชื้อสามารถเจริญได้ ชุดการทดลองอื่นพบว่าเชื้อเข้าสู่ stationary phase ที่วันที่ 6 โดยค่า OD สูงสุดที่วัดได้คือชุดทดลองที่ pH control (6.4), pH 6, pH 8, pH 4 และ pH 10 ตามลำดับ (ภาพที่ 4.2)



ภาพที่ 4.2 การเจริญของเชื้อ *M. furfur* CBS 1878^T ในอาหาร YPD broth ที่เติม 0.5% Tween 60 ที่อุณหภูมิ 30°C ระยะเวลา 9 วัน ที่ค่า pH ต่าง ๆ แสดงค่าเป็น mean $\pm$ SD (n=3) (*: $p < 0.05$)

ผลของ pH ต่อสัณฐานของเชื้อ *M. furfur*

เชื้อ *Malassezia* เป็น dimorphic fungus ที่สามารถพบสัณฐานได้ทั้ง ยีสต์ (yeast form) และ สายรา (mycelial form หรือ hyphal form) บนผิวหนังคน ในการศึกษาหาความสัมพันธ์ของ pH กับสัณฐานของเชื้อ *M. furfur* CBS 1878^T ไม่พบว่าเชื้อที่บ่มไว้ใน pH ต่าง ๆ หรือระยะเวลาต่าง ๆ มีการเปลี่ยนแปลงสัณฐานจากยีสต์ไปเป็นสายรา และไม่พบความแตกต่างของขนาดของเซลล์ในแต่ละ pH (ภาพที่ 4.3)

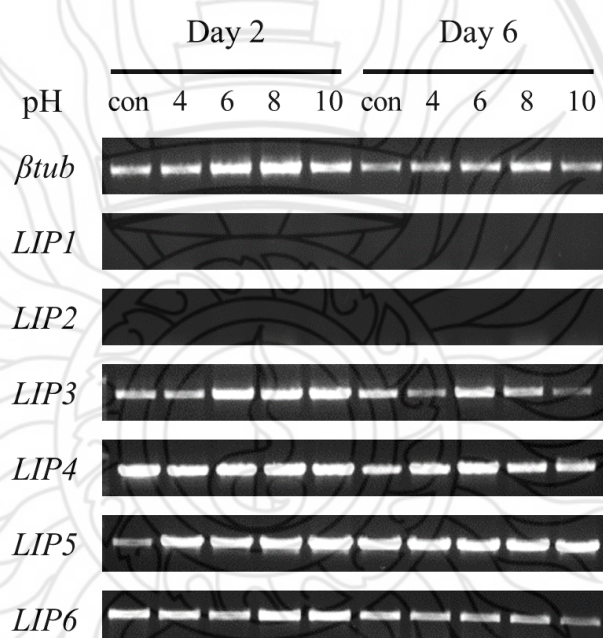


ภาพที่ 4.3 สัณฐานของเชื้อ *M. furfur* CBS 1878^T ในอาหาร YPD broth ที่เติม 0.5% Tween 60 ที่อุณหภูมิ 30°C ระยะเวลา 8 วัน ที่ค่า pH ต่าง ๆ (กำลังขยาย 400X) แถบแสดงความยาว 20 μ m

ผลของ pH ต่อการแสดงออกของเอนไซม์ไลเปสของ *M. furfur* ในระดับ transcription

จากข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank พบยีน lipase รวมทั้งหมด 6 ยีน (*LIP1-LIP6*) โดยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละยีนเป็น ORF จาก cDNA โดยเป็น complete sequence จำนวน 4 ยีน (*LIP1-4*) และ partial sequence จำนวน 2 ยีน (*LIP5-6*) ได้ออกแบบไพรเมอร์

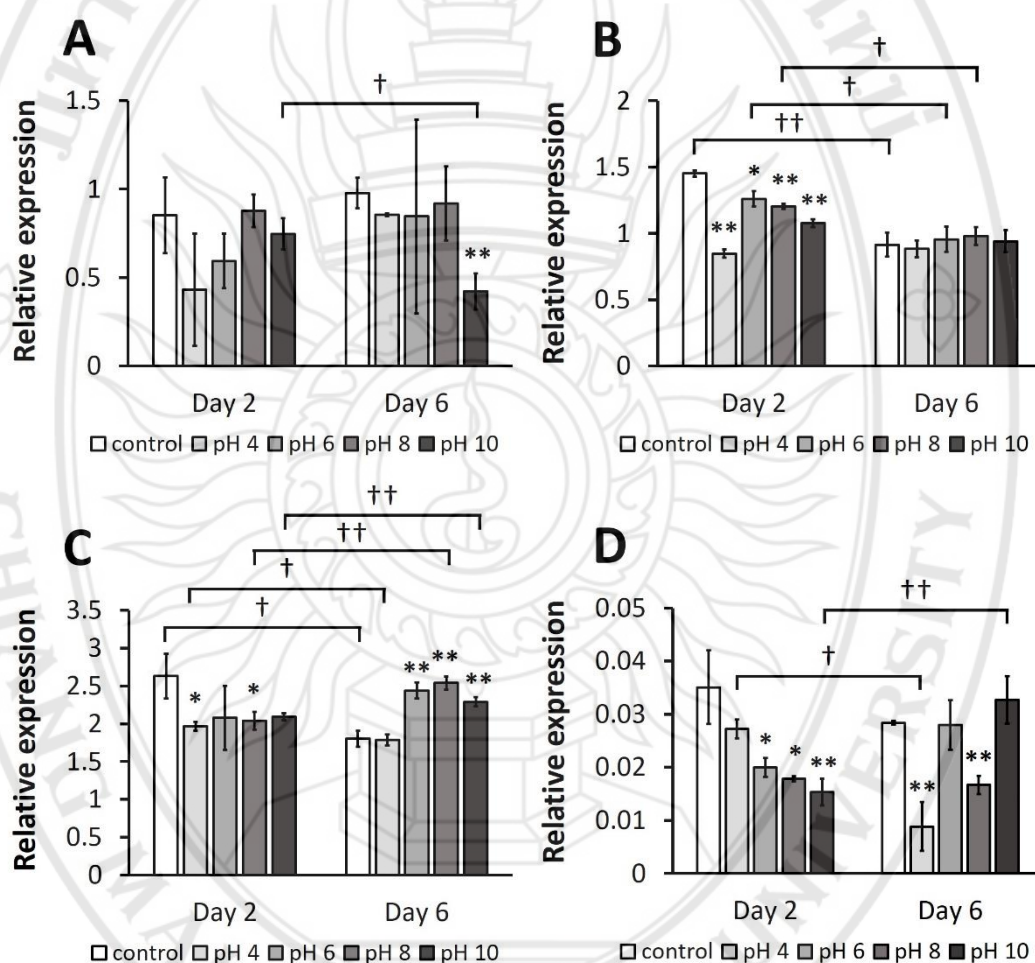
ด้วยโปรแกรม Primer3 ร่วมกับ BLAST ที่จำเพาะกับ lipase และ beta-tubulin (βtub = reference gene) (ตารางที่ 3.1) และนำมาเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้แม่พิมพ์เป็น cDNA ที่ได้มาจากการทำ reverse transcription ของ total RNA ที่สกัดจากเชื้อ *M. furfur* CBS 1878^T ที่เลี้ยงไว้ที่ pH ต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 2 และ 6 วัน พบว่า สามารถสกัด RNA ได้จากทุกตัวอย่าง (βtub positive) และพบการแสดงออกของยีน *LIP3-LIP6* แต่ไม่พบการแสดงออกของยีน *LIP1* และ *LIP2* ในทุกชุดการทดลอง (ภาพที่ 4.4)



ภาพที่ 4.4 ผล RT-PCR ของยีน *LIP1-LIP6* และ βtub ของ *M. furfur* CBS 1878^T ในอาหาร YPD broth ที่เติม 0.5% Tween 60 ที่อุณหภูมิ 30°C ของวันที่ 2 และ 6 (con: ชุด control ที่ไม่ปรับค่า pH (pH 6.4))

ในการตรวจหาปริมาณการแสดงออกของยีน ได้ใช้เทคนิค qPCR โดยใช้แม่พิมพ์เป็น cDNA ที่ได้มาจากการทำ reverse transcription ของ total RNA ที่สกัดจากเชื้อ *M. furfur* CBS 1878^T ที่เลี้ยงไว้ที่ pH ต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 2 และ 6 วัน และใช้ไพรเมอร์สำหรับ qPCR ที่จำเพาะกับ lipase และ beta-tubulin (βtub = reference gene) (ตารางที่ 3.2) ยีน *LIP1* และ *LIP2* ไม่สามารถวัดค่าการแสดงออกของยีนได้ สอดคล้องกับผลของ RT-PCR ที่ไม่พบการ

แสดงออกของยีนนี้ สำหรับยีน *LIP3-LIP6* สามารถวัดค่าการแสดงออกได้ในทุก pH รวมถึง control (pH 6.4) โดยค่าการแสดงออกของยีน *LIP3-LIP6* เมื่อเทียบกับ βtub ไม่พบความแตกต่างระหว่าง pH หรือระหว่างระยะเวลาที่ชัดเจน แต่ยีน *LIP6* เฉพาะในวันที่ 2 มีการแสดงออกลดลงไปตามค่า pH ที่เพิ่มขึ้น และยีน *L15* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในวันที่ 6 ใน pH 6, 8, และ 10 จากผล RT-PCR และ qPCR สามารถสรุปได้ว่า ยีน *LIP3-LIP6* เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ lipase ของ *M. furfur* (ภาพที่ 4.5)

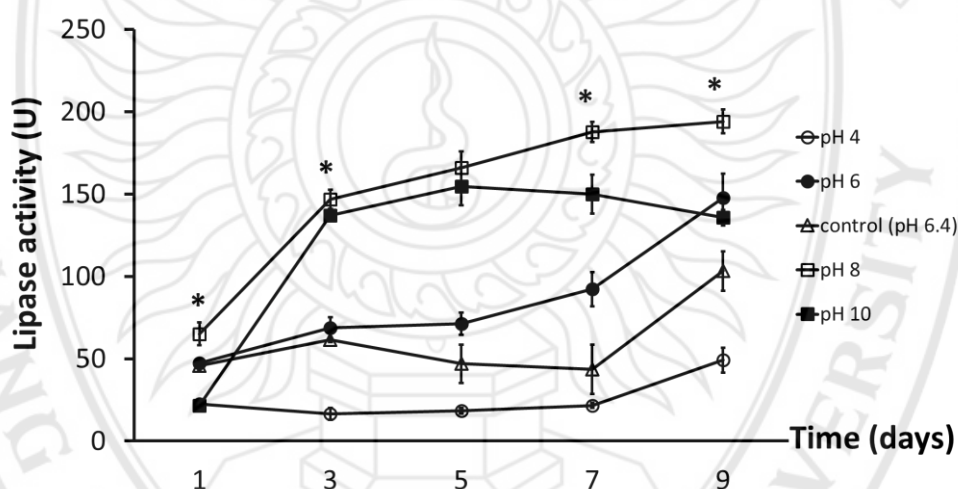


ภาพที่ 4.5 ค่าการแสดงออกของยีน *LIP4-LIP6* ของ *M. furfur* CBS 1878^T ในอาหาร YPD broth ที่เติม 0.5% Tween 60 ที่อุณหภูมิ 30°C ของวันที่ 2 และ 6 ค่าการแสดงออกของยีนวัดด้วยเทคนิค qPCR ที่ใช้ยีน β -tubulin เป็นยีนควบคุม แสดงค่าเป็น mean $\pm$ SD (n=3) เครื่องหมาย * แทนค่าทางสถิติเปรียบเทียบระหว่างแต่ละ pH กับชุดควบคุม (control) ภายในวันเดียวกัน (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$) และเครื่องหมาย + แทนค่าทางสถิติเปรียบเทียบระหว่าง

pH เดียวกันของวันที่ 2 และ 6 ($\dagger$: $p < 0.05$, $\dagger\dagger$: $p < 0.01$) (ภาพ A: *LIP3*, ภาพ B: *LIP4*, ภาพ C: *LIP5*, ภาพ D: *LIP6*)

ผลของ pH ต่อการแสดงออกของเอนไซม์ไลเปสของ *M. furfur* ในระดับ translation

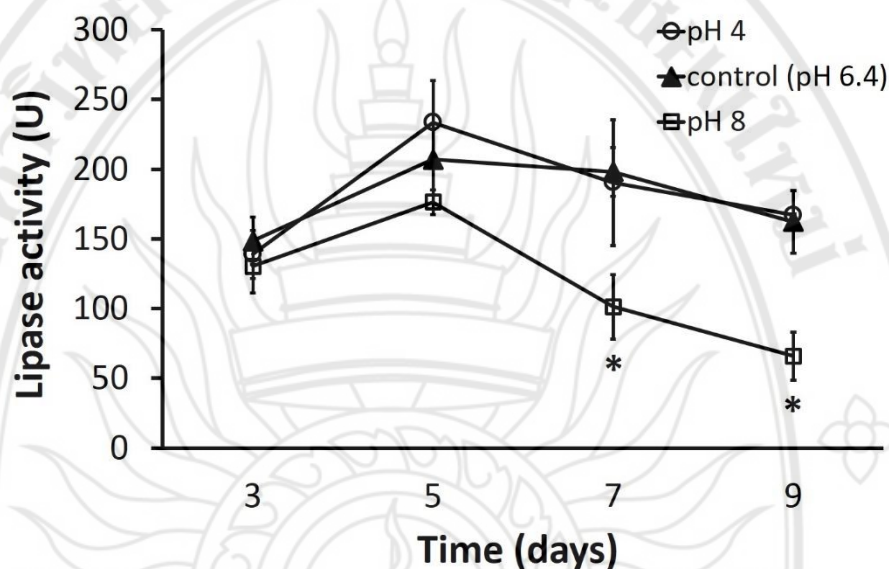
จากการวัดค่า lipase activity ของ *M. furfur* พบว่าในช่วงวันที่ 1-7 ค่า extracellular lipase activity ของ pH 8 มีค่าสูงสุด ตามด้วย pH 10, pH 6, control, และ pH 4 โดยค่า extracellular lipase activity ของ pH 8 และ pH 10 ของเชื้อในระยะ stationary phase สูงกว่าค่า extracellular lipase activity ของ pH อื่น ๆ อย่างชัดเจน ที่น่าสนใจคือค่า extracellular lipase activity มีแนวโน้มลดลงหลังวันที่ 5 ในขณะที่ extracellular lipase activity ของ pH อื่น ๆ ยังเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ (ภาพที่ 4.6)



ภาพที่ 4.6 ค่า extracellular lipase activity ของ *M. furfur* CBS 1878^T ในอาหาร YPD broth ที่เติม 0.5% Tween 60 ที่อุณหภูมิ 30°C ของวันที่ 1-9 แสดงค่าเป็น mean $\pm$ SD ($n=3$) โดยกำหนดให้ lipase activity 1U เท่ากับการไฮโดรไลซ์ 4-NPP ที่ปล่อย 4-NP ปริมาณ 1 nmol ในระยะเวลา 1 ชั่วโมง (*: $p < 0.05$)

เนื่องจากวันที่ 1 เชื้อยังไม่เจริญเพียงพอที่จะสามารถเก็บเซลล์มาสกัดโปรตีนได้ จึงเริ่มทำการวัดค่า intracellular lipase activity ของ *M. furfur* ตั้งแต่วันที่ 3 เป็นต้นไป ซึ่งพบว่า

ทั้ง pH 4, control, และ pH 8 ต่างมีค่าสูงขึ้นถึงวันที่ 5 จากนั้นมีแนวโน้มที่ลดลงเรื่อย ๆ สอดคล้องกับการเจริญเติบโตของเชื้อที่เริ่มถดถอยเมื่อเข้าสู่ stationary phase ที่น่าสนใจคือพบค่า intracellular lipase activity สูงสุดในชุดการทดลอง pH 4 และต่ำสุดที่ pH 8 โดยค่า intracellular lipase activity ของ pH 8 ลดลงเปรียบเทียบกับชุดการทดลองอื่นอย่างชัดเจนตั้งแต่วันที่ 5 เป็นต้นไป (ภาพที่ 4.7)



ภาพที่ 4.7 ค่า intracellular lipase activity ของ *M. furfur* CBS 1878^T ในอาหาร YPD broth ที่เติม 0.5% Tween 60 ที่อุณหภูมิ 30°C ของวันที่ 3-9 แสดงค่าเป็น mean $\pm$ SD (n=3) โดยกำหนดให้ lipase activity 1U เท่ากับการไฮโดรไลส์ 4-NPP ที่ปล่อย 4-NP ปริมาณ 1 nmol ในระยะเวลา 1 ชั่วโมง (*: $p < 0.05$)