



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การผลิตสารต้านเชื้อราจากยีสต์ *Aureobasidium pullulans* สายพันธุ์เขตร้อนที่คัดแยกได้ในประเทศไทย

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข

มิถุนายน 2555

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การผลิตสารต้านเชื้อราจากยีสต์ *Aureobasidium pullulans* สายพันธุ์
เขตร้อนที่คัดแยกได้ในประเทศไทย

ผู้วิจัย สังกัด

1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สีหนาท ประสงค์สุข ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา สำนักงานกองทุนสนับสนุน
การวิจัย

และ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5380174

ชื่อโครงการ: การผลิตสารต้านเชื้อราจากยีสต์ *Aureobasidium pullulans* สายพันธุ์เขตร้อนที่คัดแยกได้ในประเทศไทย

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สีหนาท ประสงค์สุข ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อีเมล: Sehanat.p@chula.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 24 เดือน

บทคัดย่อ: จากการนำ *Aureobasidium pullulans* สายพันธุ์เขตร้อนที่คัดแยกได้ในประเทศไทย จำนวน 10 สายพันธุ์ ได้แก่ Deenam 001 BCU, Deenam 003 BCU, Deenam 008 BCU, Deenam 007 BCU, Deenam 009 BCU, NRRL 58514, NRRL 58536, NRRL 58516, NRRL 58517 และ NRRL 58520 มาผลิตสารต้านเชื้อราและทำการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดที่ได้ในการต้านเชื้อราก่อโรคกลุ่ม *Aspergillus* spp. ทั้ง 4 สายพันธุ์ (*A. flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus*, *A. terreus*) โดยวิธี Well diffusion และ Conidial germination inhibition assay พบว่าสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 มีฤทธิ์สูงสุดในการยับยั้งเชื้อรา *Aspergilli* ได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ เมื่อนำสายพันธุ์ดังกล่าวมาทำการเพิ่มผลผลิตของสารต้านเชื้อรา โดยทำการศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน คือ กลูโคส และ ซูโครส ที่ความเข้มข้น 1.5, 2.0 และ 2.5% (w/v) พบว่าสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งคาร์บอนกลูโคสความเข้มข้น 2.5% (w/v) มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราก่อโรคในกลุ่ม *Aspergillus* spp. ได้สูงสุดทั้ง 4 สายพันธุ์ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 75.00±0.00, 60.00 ±0.05, 60.00±0.00 และ 50.00±0.00 เปอร์เซ็นต์ ต่อ *A. flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus* และ *A. terreus* ตามลำดับ จากนั้นนำ *A. pullulans* NRRL 58536 มาศึกษาผลของกรดอะมิโน พบว่าสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในกรดอะมิโนภาวะที่มีฟีนอลอะลานีน ร่วมกับลิซีนมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *A. flavus* ได้ประสิทธิภาพสูงสุด ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 175.00±0.05 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในกรดอะมิโนภาวะที่มีโปรลีนร่วมกับลิซีน พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *A. terreus* ได้ประสิทธิภาพสูงสุด ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 120.00±0.01 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่สารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในกรดอะมิโนภาวะที่มีฟีนอลอะลานีนร่วมกับโปรลีน และ ลิซีน มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *A. niger* และ *A. fumigatus* ได้ประสิทธิภาพสูงสุด ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 146.00±0.08 และ 170.00±0.06 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับเมื่อนำสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 มาตรวจสอบด้วยเทคนิคเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง เปรียบเทียบกับสารต้านเชื้อราออริโอบาซิดิน เอ (aureobasidin A) พบว่าสารที่ถูกแยกได้จากสารสกัดสายพันธุ์นี้มีค่า Rf เท่ากันกับออริโอบาซิดิน เอ มีค่า Rf เท่ากับ 0.68 บนแผ่น TLC และยังพบสารที่แตกต่างกันอีก 2 ตำแหน่ง มีค่า Rf เท่ากับ 0.45 และ 0.59 จากนั้นนำสารสกัดบริเวณที่มีค่า Rf เท่ากับออริโอบาซิดิน เอ มาวิเคราะห์โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบางอีกครั้ง และทำการวิเคราะห์เพิ่มเติมด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography เทคนิค Spectrophotometry เทคนิค MALDI-TOF Mass Spectrometry และเทคนิค ¹H-Nuclear Magnetic Resonance ผลการทดลองพบว่า *A. pullulans* NRRL 58536 ผลิตสารต้านเชื้อราที่มีผลการวิเคราะห์สอดคล้องกับสารต้านเชื้อราออริโอบาซิดิน เอ

คำหลัก : *Aureobasidium pullulans*, สารต้านเชื้อรา, ออริโอบาซิดินเอ, *Aspergillus*

Abstract

Project Code : MRG5380174

Project Title : Production of antifungal agent from tropical yeast *Aureobasidium pullulans* isolated in Thailand

Investigator : Assistant Professor Dr. Sehanat Prasongsuk

E-mail Address : Sehanat.p@chula.ac.th

Project Period : 24 months

Abstract: Antifungal agent from 10 tropical strains isolated in Thailand of *Aureobasidium pullulans* including Deenarn 001 BCU, Deenarn 003 BCU, Deenarn 008 BCU, Deenarn 007 BCU, Deenarn 009 BCU, NRRL 58514, NRRL 58536, NRRL 58516, NRRL 58517 and NRRL 58520 was produced and the extracts were pretested for antifungal activity against 4 pathogenic *Aspergillus* spp. (*A. flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus*, *A. terreus*) using well diffusion method and conidial germination inhibition assay. The extract from *A. pullulans* NRRL 58536 showed the most efficient inhibitory activities against all 4 *Aspergilli*. This strain was selected to enhance antifungal agent production using carbon source optimization including glucose and sucrose at the concentrations of 1.5, 2.0 and 2.5% (w/v). The most effective extract was obtained from *A. pullulans* NRRL 58536 grown in 2.5% (w/v) of glucose by exhibiting inhibitory activities against all 4 *Aspergilli* with percent inhibition of 75.00±0.00, 60.00±0.05, 60.00±0.00 and 50.00±0.00 percent for *A. flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus* and *A. terreus*, respectively. *A. pullulans* NRRL 58536 was further subjected for studying the effect of amino acid on antifungal agent production. The highest antifungal activities against *A. flavus* was obtained from crude extract of *A. pullulans* NRRL 58536 under the condition of Phenylalanine plus Leucine with percent inhibition of 175.00±0.05 percent while the condition of Proline plus Leucine gave the highest antifungal activities against *A. terreus* with percent inhibition of 120.00±0.01 percent. The condition of Phenylalanine plus Proline and Leucine gave the highest antifungal activities against *A. niger* and *A. fumigatus* with percent inhibition of 146.00±0.08 and 170.00±0.06 percent respectively. The extract of *A. pullulans* NRRL 58536 was analyzed using Thin Layer Chromatography (TLC) with aureobasidin A (Ab A) as a comparative standard. The R_f values as 0.68 of *A. pullulans* NRRL 58536 crude extract was corresponded to that of Ab A observed on TLC plate and two spots of other compounds with different R_f values (0.45 and 0.59) were revealed. The extract containing similar R_f with that of Ab A was further analyzed using TLC, High Performance Liquid Chromatography, Spectrophotometry, MALDI-TOF Mass Spectrometry and ¹H-Nuclear Magnetic Resonance techniques. The results showed that *A. pullulans* NRRL 58536 produced the antifungal agent with characters corresponded to that of Ab A.

Keywords : *Aureobasidium pullulans*, Antifungal agent, aureobasidin A, *Aspergillus*

Executive summary

Ten tropical strains of *Aureobasidium pullulans* were cultivated for antifungal agent production and the extracts were screened for antifungal activity against 4 pathogenic *Aspergillus* spp. (*A. flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus*, *A. terreus*) using well diffusion method and conidial germination inhibition assay. The extract from *A. pullulans* No.23 (NRRL 58536) showed the most efficient inhibitory activities against all 4 *Aspergilli*. This strain was selected for enhanced production of antifungal agent using optimization of carbon source and amino acid supplement. The most effective extract was obtained from the condition of 2.5% (w/v) glucose by exhibiting inhibitory activities against all 4 *Aspergilli* with percent inhibition of 75, 60, 60 and 50 for *A. flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus* and *A. terreus*, respectively. When using amino acids as nutrient supplement, the highest antifungal activities against *A. flavus* was obtained under the condition of phenylalanine plus leucine (175% inhibition) while the condition of proline plus leucine gave the highest antifungal activities against *A. terreus* with 120% inhibition. The condition of phenylalanine plus proline and leucine gave the highest antifungal activities against *A. niger* and *A. fumigatus* with 146 and 170% inhibition respectively. By using Thin Layer Chromatography analysis, the R_f values as 0.68 of *A. pullulans* NRRL 58536 crude extract was corresponded to that of aureobasidin A (AbA) and two spots of other compounds with different R_f values (0.45 and 0.59) were revealed. The extract (at $R_f = 0.6$) had characters corresponded to that of AbA analyzed using High Performance Liquid Chromatography, Spectrophotometry, MALDI-TOF Mass Spectrometry and ^1H -Nuclear Magnetic Resonance techniques

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดกรองเชื้อยีสต์ *Aureobasidium pullulans* ที่คัดแยกได้ในประเทศไทยที่มีความสามารถในการผลิตสารต้านเชื้อรา
2. เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารต้านเชื้อรา
3. เพื่อทราบคุณสมบัติของสารต้านเชื้อราและตรวจสอบโครงสร้างที่ได้

วิธีทดลอง

1. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา *A. pullulans*

นำเชื้อ *A. pullulans* ที่ทำการคัดแยกและจัดจำแนกแล้วซึ่งสามารถผลิตสารต้านเชื้อราได้อย่างน้อยจำนวน 10 สายพันธุ์ จากคลังเชื้อของหน่วยปฏิบัติการวิจัยการใช้ประโยชน์จากชีวมวลพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มาทำการศึกษาดังวิธีดังนี้

1.1 นำเชื้อไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง Yeast Malt Agar (YMA) และในอาหารเหลว Yeast Malt Broth (YMB) ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3-4 วัน

1.2 สังเกตโคโลนียีสต์ที่เจริญบนจานเพาะเลี้ยงแล้วคัดแยกออกมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2. ผลิตสารต้านเชื้อราจาก *A. pullulans* (Takesako และคณะ, 1991)

2.1 เลี้ยงเชื้อ *A. pullulans* ในอาหารสูตร Seed culture medium เป็นเวลา 2 วัน แล้วถ่ายเชื้อปริมาตร 1% ลงอาหารสูตร Production I แล้วเลี้ยงต่อเป็นเวลา 56 ชั่วโมง จากนั้นเติมอาหารสูตร production II ปริมาตร 1/5 ของอาหารสูตร production I ทำการเลี้ยงต่ออีก 78 ชั่วโมง

2.2 เก็บเชื้อที่ได้มาปั่นแยกเซลล์ นำส่วนตะกอนเซลล์มาบดแล้วสกัดด้วยเอทานอล(95%)

2.3 กรองเซลล์ออกด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ นำส่วนของเหลวที่ได้ไประเหยด้วยเครื่องกลั่นสุญญากาศ (evaporator) จะเหลือส่วนสารละลายเล็กน้อย นำไปเติมด้วยเอธิลอะซิเตท เขย่าให้เข้ากันแล้วแยกชั้นของเอธิลอะซิเตท ไประเหยด้วยเครื่องกลั่นสุญญากาศจนแห้ง สกัดซ้ำด้วยเอธิลอะซิเตท 3 ครั้ง จะได้ส่วนที่เหลือเป็นส่วนของหยดน้ำมันติดอยู่ที่ข้างขวด

2.4 ละลายสารตัวอย่างด้วยไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

3. ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเชื้อรา

นำสารสกัดมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเชื้อราก่อโรค เช่น *Aspergillus* spp. โดยทดสอบคุณสมบัติด้วยวิธีดังนี้

3.1 Paper disc method (Tachibana, Ishikawa และ Itoh, 2005) หรือ Well diffusion method

3.2 Conidial germination inhibition assay ดัดแปลงจาก (Lavermicocca และคณะ, 2000)

4. ศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารต้านเชื้อราเชื้อ

ทำการคัดเลือก *A. pullulans* ที่สามารถผลิตสารต้านเชื้อราได้ประสิทธิภาพสูงสุดจำนวน 1 สายพันธุ์ โดยพิจารณาจากขนาดของ clear zone และเปอร์เซ็นต์การออกของสปอร์เชื้อราในชุดควบคุมและชุดทดลอง มาทำการหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารต้านเชื้อราด้วยวิธีดังนี้

4.1 ศึกษาหาช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารต้านเชื้อราโดยใช้

Spectrophotometry นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟเทียบกับเวลา

4.2 ศึกษาชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน

ทำการศึกษาแหล่งคาร์บอน 2 ชนิด คือ กลูโคส และ ซูโครส โดยปรับองค์ประกอบในอาหารสูตร Production I ให้มีความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน คือ 1.5, 2.0, 2.5 % ตามลำดับ โดยมีอัตราส่วน C/N 3,4, 5

4.3 ศึกษาการใช้แหล่งอาหารเสริม

ทำการศึกษาแหล่งอาหารเสริมจำพวก amino acid group เช่น Phenylalanine, Proline, Leucine

5. ทำปฏิกิริยาบางส่วนของสารต้านเชื้อรา

นำสารต้านเชื้อราที่ผลิตได้มาทำปฏิกิริยาบางส่วนและวิเคราะห์สารที่ได้โดยใช้เทคนิคดังต่อไปนี้

5.1 เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (Thin layer chromatography)

จุดสารสกัดที่ละลายใน DMSO และอริโอบาซิดิน เอ ที่ละลายใน DMSO ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ลงบนแผ่น TLC รอให้แห้งแล้วนำไปวางใน TLC tank ที่มีเอทิลอะซิเตทเป็นระบบตัวทำละลาย (solvent system) เมื่อสารละลายเคลื่อนที่ถึงจุดที่กำหนดแล้ว ให้ยกแผ่น TLC ออก ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วนำไปใส่ในขวดแก้วที่มีไออ้อมตัวของไอโอดีน วัดระยะทางของสารสกัดและระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ นำไปคำนวณค่า Rf เทียบกับอริโอบาซิดิน เอ

5.2 เทคนิค High Performance Liquid Chromatography (Takesako และคณะ, 1991)

นำสารสกัดที่ได้จากการทำโครมาโทกราฟีแบบชั้นบางมาทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน อริโอบาซิดิน เอ ที่มีความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เพื่อทำเป็นกราฟมาตรฐาน โดยใช้โครมาโทกราฟีแบบเฟสผัสนกลับ (reversed-phase chromatography) ใช้คอลัมน์ชนิด C18 ใช้ UV detector คอลัมน์ที่ใช้คือ คอลัมน์ Chrom Spher 5 C18 (4.6 × 250 มิลลิเมตร) ของบริษัท Varian ขนาดรูพรุน (pore size) 100 อังสตรอม ขนาด particle 5 ไมโครเมตร และใช้ UV detector ที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร ซึ่งมีอะซิโตนไนโตร และน้ำเป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราส่วน 7.5:2.5 ตามลำดับ อัตราการไหลเท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ปริมาณที่ใช้ในการฉีด 20 ไมโครลิตร โดยทำการเตรียมกราฟสารมาตรฐานอริโอบาซิดิน เอ ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และสารสกัดที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยการจุดจุดของสารสกัดที่ปรากฏขึ้นอยู่ในระดับเดียวกันกับอริโอบาซิดิน เอ บนแผ่น TLC มาละลายในตัวทำละลายอะซิโตนไนโตร ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำส่วนของของเหลวไปทำการวิเคราะห์

5.3 เทคนิค Spectrophotometry สำหรับการวิเคราะห์โปรตีนเบื้องต้นในสารต้านเชื้อรา

ทำการเตรียมสารมาตรฐานอริโอบาซิดิน เอ ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และสารสกัดที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยการจุดจุดของสารสกัดที่ปรากฏขึ้นอยู่ในระดับเดียวกันกับอริโอบาซิดิน เอ บนแผ่น TLC นำมาละลายในตัวทำละลายเมทานอล ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำส่วนของของเหลวไปทำการวิเคราะห์โปรตีนเบื้องต้นโดยใช้ Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นช่วง 200-400 นาโนเมตร โดยทำการเปรียบเทียบสเปกตรัมค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดที่ได้กับสารมาตรฐานอริโอบาซิดิน เอ

5.4 เทคนิค MALDI-TOF Mass Spectrometry สำหรับการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสารต้านเชื้อรา (ดัดแปลงจาก Ikai และคณะ, 1991)

ทำการเตรียมสารมาตรฐานอริโอบาซิดิน เอ ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และสารสกัดที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยการจุดจุดของสารสกัดที่ปรากฏขึ้นอยู่ในระดับเดียวกันกับอริโอบาซิดิน เอ บนแผ่น TLC นำมาละลายในตัวทำละลายอะซิโตนไนโตร จากนั้นนำไปการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนของของเหลวไปทำการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลสารสกัด โดยในการวิเคราะห์จะใช้ 2, 5-dihydroxybenzoic acid (DHB) เป็น matrix ในอัตราส่วนของสารสกัด: DHB

คือ 9:1 (v/v) และกำหนดให้เป็น linear positive mode ที่กำลังไฟฟ้า 20 กิโลวัตต์ จากนั้นทำการเปรียบเทียบสเปกตรัมของสารสกัดที่ได้กับสารมาตรฐานอริโอบาซิดิน เอ

6. ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพสารต้านเชื้อราที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

นำสารต้านเชื้อราที่สกัดได้มาทดสอบประสิทธิภาพต่อเชื้อราก่อโรคที่ใช้ในการทดลองนี้ คือ *Aspergilli* spp. (*A. niger*, *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*) โดยทดสอบคุณสมบัติด้วยวิธีดังนี้

6.1 วิธี Well diffusion (Tachibana และคณะ, 2005)

นำสารสกัดที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (Thin layer chromatography) มาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอีกครั้งตามวิธีการในข้อ 3.1

6.2 วิธี Conidial germination inhibition assay ดัดแปลงจาก (Lavermicocca และคณะ, 2000)

นำสารสกัดที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (Thin layer chromatography) มาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอีกครั้งตามวิธีการในข้อ 3.2

6.3 ทำการตรวจสอบสารสกัดด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (Thin layer chromatography) (McCormack, Wildman และ Jeffries, 1994)

นำสารสกัดที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (Thin layer chromatography) มาตรวจสอบสารสกัดอีกครั้งตามวิธีการในข้อ 5.1

7. วิเคราะห์โครงสร้างสารต้านเชื้อราที่ผลิตได้ (Ikai และคณะ, 1991)

7.1 ทำการวิเคราะห์โครงสร้างสารต้านเชื้อราที่ผลิตได้ด้วยวิธี ¹H-Nuclear Magnetic Resonance (¹H-NMR)

ทำการเตรียมสารมาตรฐานอริโอบาซิดิน เอ ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และสารสกัดที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยทำการขูดจุดของสารสกัดที่ปรากฏขึ้นอยู่ในระดับเดียวกันกับอริโอบาซิดิน เอ บนแผ่น TLC นำมาละลายในตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม จากนั้นนำไปการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนของของเหลวไปทำการวิเคราะห์หาโครงสร้างสารสกัด โดยใช้วิธี ¹H-NMR ซึ่งนิวคลีไอที่ใช้ในสนามแม่เหล็กคือโปรตอน (Proton) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ในช่วงความยาวคลื่นวิทยุ 500 เมกะเฮิร์ตซ์ จากนั้นทำการเปรียบเทียบสเปกตรัมของสารสกัดที่ได้กับสารมาตรฐานอริโอบาซิดิน เอ

ผลการทดลอง

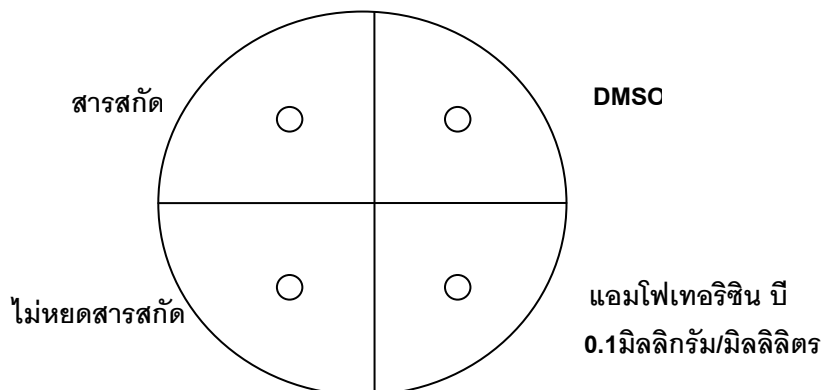
1. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา *A. pullulans*

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเชื้อรา *A. pullulans* ทั้ง 10 สายพันธุ์ที่คัดแยกได้ในประเทศไทยพบว่าเซลล์มีรูปร่างหลากหลาย ได้แก่ บลาสโตสปอร์ หรือ budding cell เซลล์ฟอง คลาไมโดสปอร์ เส้นใย และเส้นใยเทียม เป็นต้น โดยลักษณะของบลาสโตสปอร์โปร่งใส รูปร่างค่อนข้างกลมถึงรี มีขนาดแตกต่างกัน มีเซลล์ที่แตกหน่อแตกออกจากบลาสโตสปอร์ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลานานขึ้นเซลล์จะมีขนาดใหญ่ และมีผนังหนาขึ้น เรียกว่าเซลล์ฟอง (swollen cell) โดยในบางสายพันธุ์อาจมีสีเข้มขึ้นเนื่องจากการสร้างเม็ดสีเมลานิน เรียกว่า คลาไมโดสปอร์ เส้นใยมีลักษณะโปร่งใส เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลาจะเปลี่ยนเป็นสีเข้มขึ้นจากการสร้างเม็ดสีเมลานิน และมีผนังหนาขึ้น บางครั้งมีเอนโดโคนิเดียเกิดขึ้นจากภายในด้านข้าง หรือปลายของเส้นใย ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *A. pullulans* ดังนั้นสรุปได้ว่าทั้ง 10 สายพันธุ์เป็น *A. pullulans* จริง

2. การผลิตสารต้านเชื้อราและการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา

2.1 วิธี Well diffusion

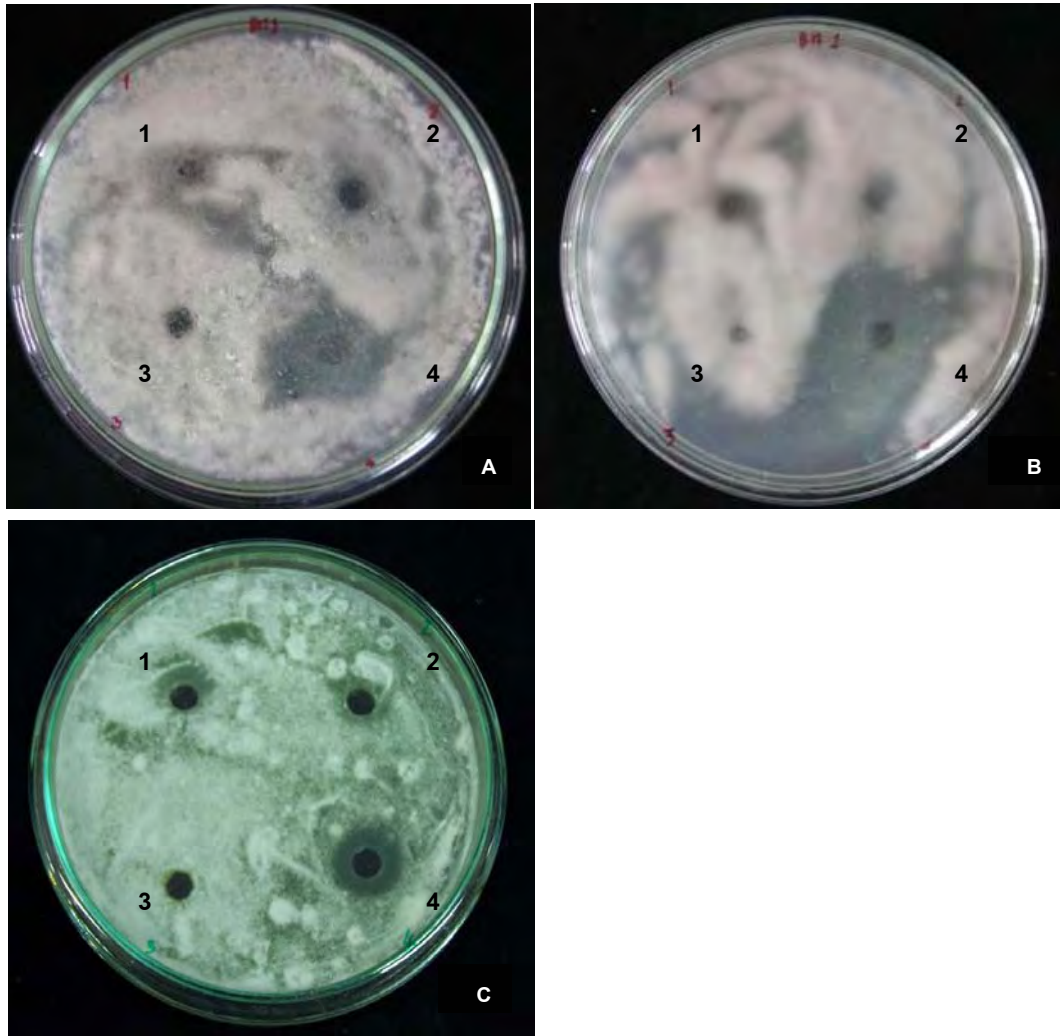
จากการนำสารที่สกัดได้จากเชื้อรา *A. pullulans* ทั้ง 10 สายพันธุ์มาทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อราก่อโรคในกลุ่ม *Aspergillus* spp. ด้วยวิธี Well diffusion บนจานเลี้ยงเชื้อที่เคลือบด้วยสปอร์ของ *Aspergillus* spp. ดังรูปที่ 1 สังเกตบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ที่เกิดขึ้น และคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (% inhibition) ได้ผลดังตารางที่ 1 โดยพบว่า สารสกัดจาก *A. pullulans* ทั้ง 10 สายพันธุ์มีฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคที่นำมาทดสอบดังนี้ สารสกัดจาก *A. pullulans* Deenam 001 BCU มีฤทธิ์ในการต้าน *A. flavus*, *A. niger* และ *A. fumigatus* (รูปที่ 2) สารสกัดจาก *A. pullulans* Deenam 003 BCU มีฤทธิ์ในการต้าน *A. flavus*, *A. niger* และ *A. terreus* (รูปที่ 3) สารสกัดจาก *A. pullulans* Deenam 008 BCU มีฤทธิ์ในการต้าน *A. niger* และ *A. fumigatus* (รูปที่ 4) สารสกัดจาก *A. pullulans* Deenam 007 BCU มีฤทธิ์ในการต้าน *A. flavus* และ *A. fumigatus* (รูปที่ 5) สารสกัดจาก *A. pullulans* Deenam 009 BCU มีฤทธิ์ในการต้าน *A. fumigatus* เพียงชนิดเดียว (รูปที่ 6) สารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58514 และ NRRL 58536 มีฤทธิ์ในการต้าน *A. flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus* และ *A. terreus* ได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ (รูปที่ 7-8) สารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58516 มีฤทธิ์ในการต้าน *A. niger* และ *A. fumigatus* (รูปที่ 9) ส่วนสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58517 และ NRRL 58520 มีฤทธิ์ในการต้าน *A. fumigatus* เพียงชนิดเดียว(รูปที่ 10-11)



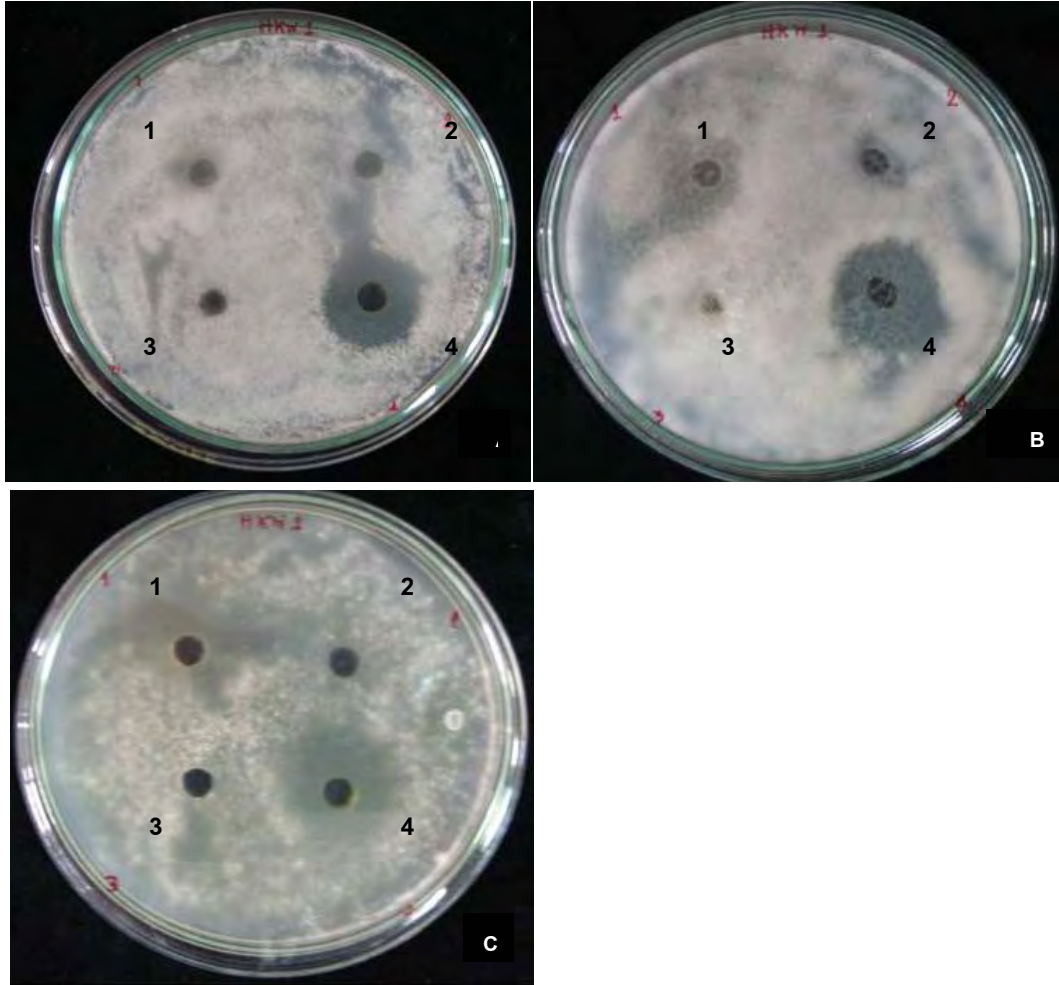
รูปที่ 1 ตำแหน่งของสารสกัดที่ใช้ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเชื้อราบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อโดยวิธี Well diffusion

ตารางที่ 1 ความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus* spp. ของสารสกัดจาก *A. pullulans* ทั้ง 10 สายพันธุ์ โดยวิธี Well diffusion

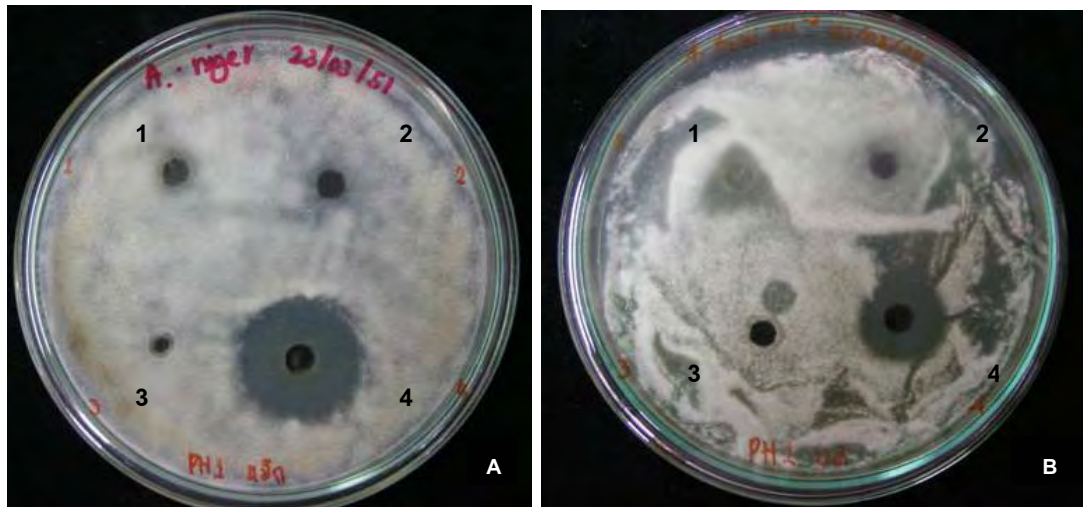
สายพันธุ์ ที่ผลิตสารสกัด	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (%) (% inhibition)			
	<i>A. flavus</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. terreus</i>
Deenam 001 BCU	30.00±0.00	13.00±0.06	43.00±0.06	00.00±0.00
Deenam 003 BCU	12.00±0.03	47.00±0.06	00.00±0.00	53.00±0.06
Deenam 008 BCU	00.00±0.00	10.00±0.00	27.00±0.06	00.00±0.00
Deenam 007 BCU	18.00±0.03	00.00±0.00	27.00±0.06	00.00±0.00
Deenam 009 BCU	00.00±0.00	00.00±0.00	38.00±0.03	00.00±0.00
NRRL 58514	35.00±0.08	32.00±0.03	43.00±0.06	32.00±0.03
NRRL 58536	50.00±0.00	50.00±0.00	20.00±0.00	45.00±0.05
NRRL 58516	00.00±0.00	15.00±0.05	53.00±0.06	00.00±0.00
NRRL 58517	00.00±0.00	00.00±0.00	17.00±0.06	00.00±0.00
NRRL 58520	00.00±0.00	00.00±0.00	27.00±0.06	00.00±0.00



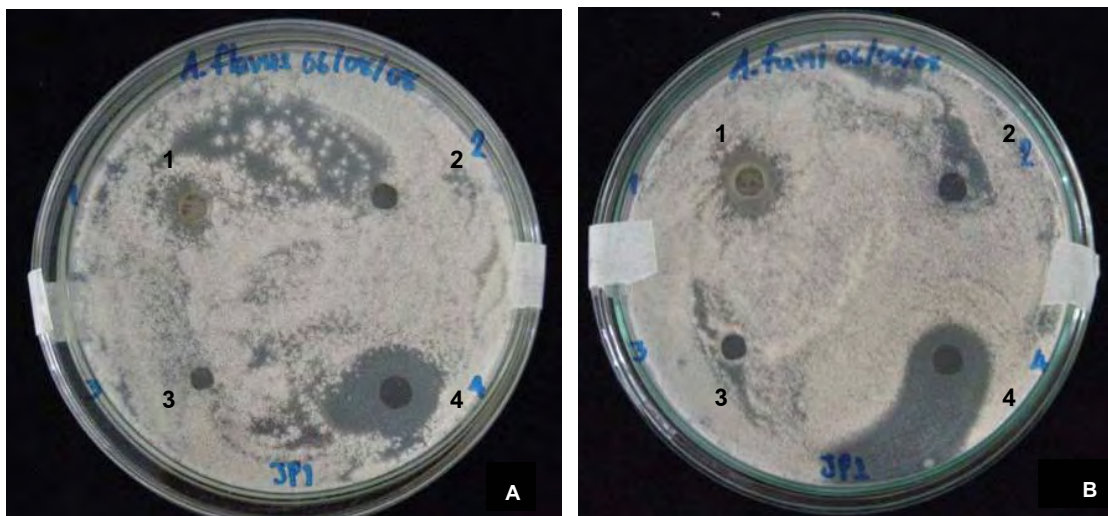
รูปที่ 2 ความสามารถในการยับยั้ง *A. flavus* (A) *A. niger* (B) และ *A. fumigatus* (C) ของสารสกัดจาก *A. pullulans* Deenarn 001 BCU โดย หมายเลข 1 คือ สารสกัด หมายเลข 2 คือ สาร DMSO หมายเลข 3 คือ ไม่หยดสารสกัด และ หมายเลข 4 คือ แอมโฟเทอริซิน บี ความเข้มข้น 0.1มิลลิกรัม/มิลลิลิตร



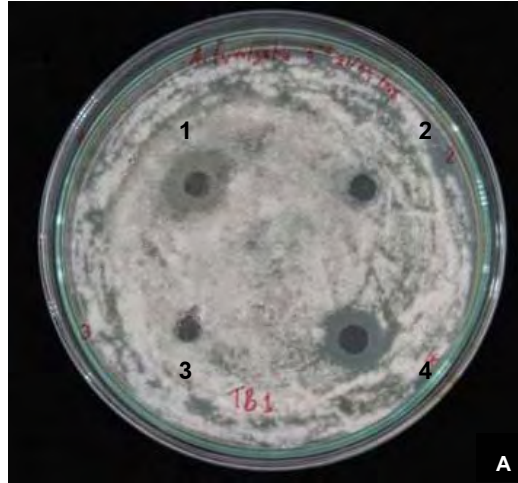
รูปที่ 3 ความสามารถในการยับยั้ง *A. flavus* (A) *A. niger* (B) และ *A. terreus* (C) ของสารสกัดจาก *A. pullulans* Deenarn 003 BCU โดย หมายเลข 1 คือ สารสกัด หมายเลข 2 คือ สาร DMSO หมายเลข 3 คือ ไม่หยดสารสกัด และ หมายเลข 4 คือ แอมโฟเทอริซิน บี ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร



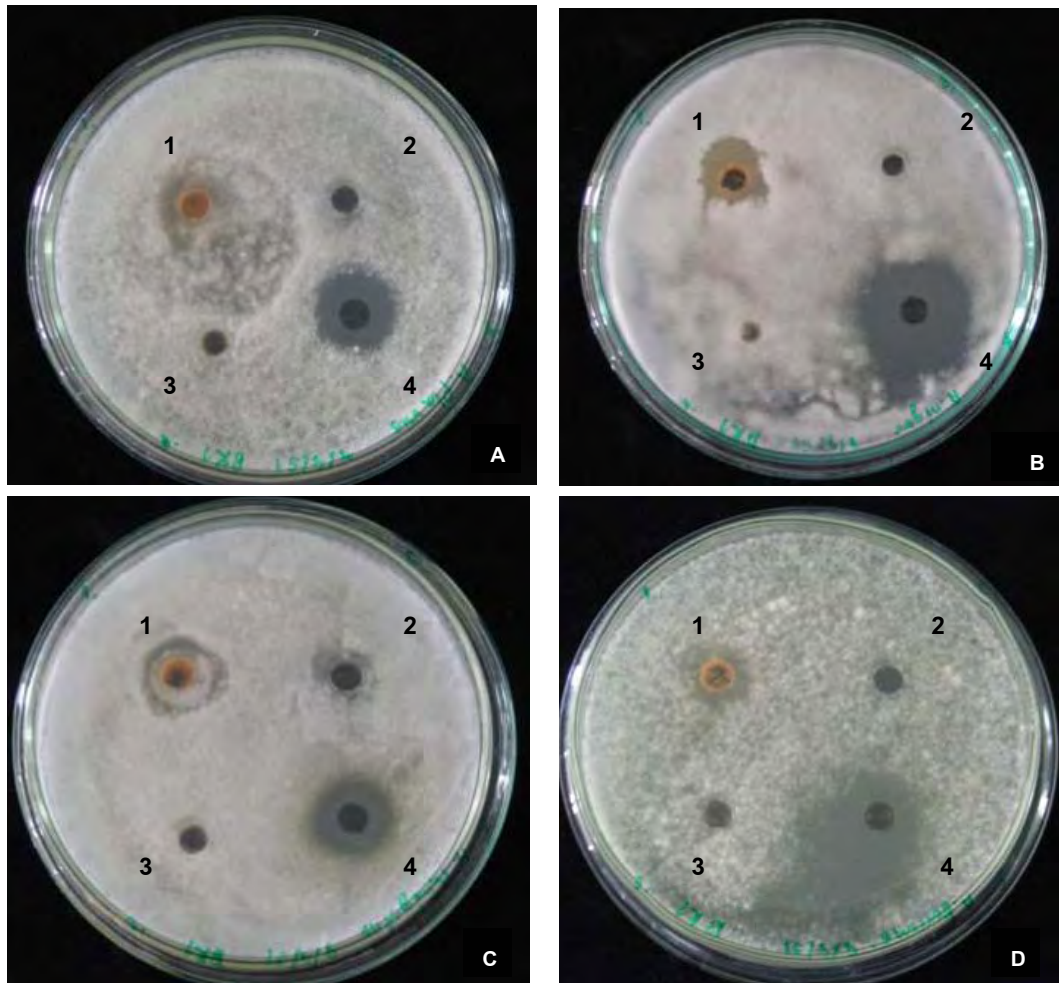
รูปที่ 4 ความสามารถในการยับยั้ง *A. niger* (A) และ *A. fumigatus* (B) ของสารสกัดจาก *A. pullulans* Deenarn 008 BCU โดย หมายเลข 1 คือ สารสกัด หมายเลข 2 คือ สาร DMSO หมายเลข 3 คือ ไม่หยดสารสกัด และ หมายเลข 4 คือ แอมโฟเทอริซิน บี ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร



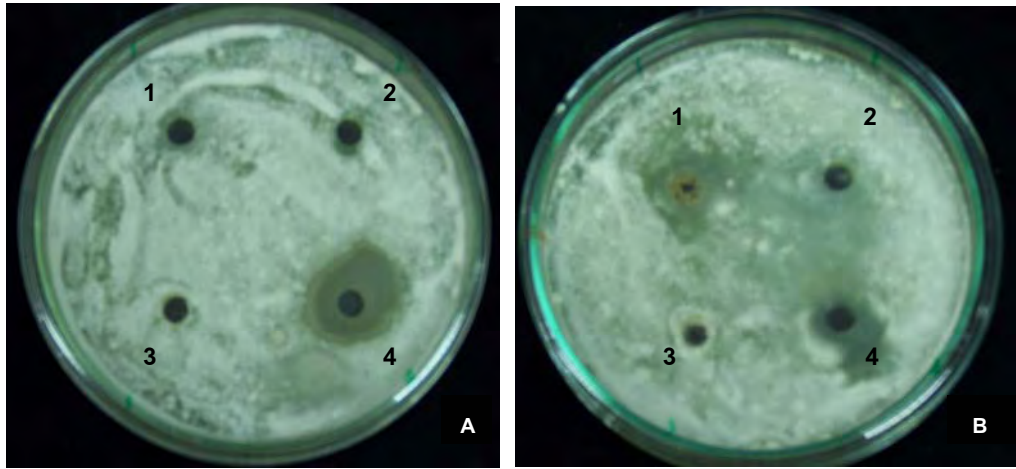
รูปที่ 5 ความสามารถในการยับยั้ง *A. flavus* (A) และ *A. fumigatus* (B) ของสารสกัดจาก *A. pullulans* Deenarn 007 BCU โดย หมายเลข 1 คือ สารสกัด หมายเลข 2 คือ สาร DMSO หมายเลข 3 คือ ไม่หยดสารสกัด และ หมายเลข 4 คือ แอมโฟเทอริซิน บี ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร



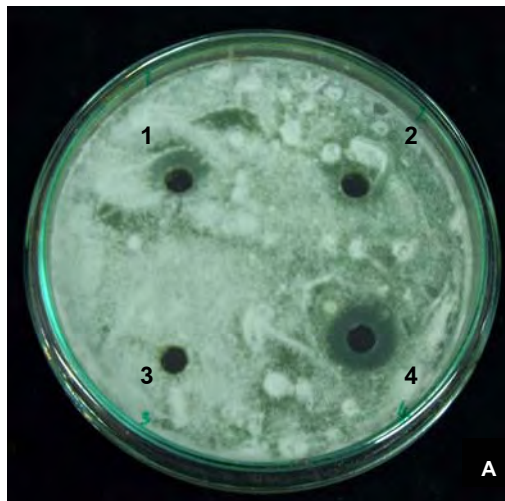
รูปที่ 6 ความสามารถในการยับยั้ง *A. fumigatus* (A) ของสารสกัดจาก *A. pullulans* Deenam 009 BCU โดยหมายเลข 1 คือ สารสกัด หมายเลข 2 คือ สาร DMSO หมายเลข 3 คือ ไม่หยดสารสกัด และ หมายเลข 4 คือ แอมโฟเทอริซิน บี ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร



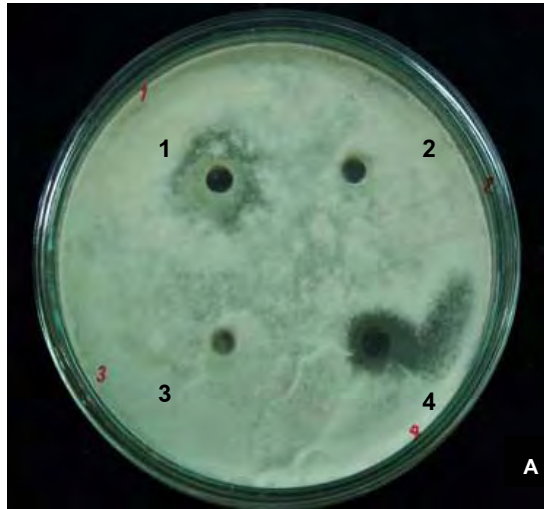
รูปที่ 7 ความสามารถในการยับยั้ง *A. flavus* (A) *A. niger* (B) *A. fumigatus* (C) และ *A. terreus* (D) ของสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58514 โดย หมายเลข 1 คือ สารสกัด หมายเลข 2 คือ สาร DMSO หมายเลข 3 คือ ไม่หยดสารสกัด และ หมายเลข 4 คือ แอมโฟเทอริซิน บี ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร



รูปที่ 9 ความสามารถในการยับยั้ง *A. niger* (A) และ *A. fumigatus* (B) ของสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58516 โดย หมายเลข 1 คือ สารสกัด หมายเลข 2 คือ สาร DMSO หมายเลข 3 คือ ไม่หยดสารสกัด และ หมายเลข 4 คือ แอมโฟเทอริซิน บี ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร



รูปที่ 10 ความสามารถในการยับยั้ง *A. fumigatus* (A) ของสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58517 โดย หมายเลข 1 คือ สารสกัด หมายเลข 2 คือ สาร DMSO หมายเลข 3 คือ ไม่หยดสารสกัด และ หมายเลข 4 คือ แอมโฟเทอริซิน บี ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร



รูปที่ 11 ความสามารถในการยับยั้ง *A. fumigatus* (A) ของสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58520 โดยหมายเลข 1 คือ สารสกัด หมายเลข 2 คือ สาร DMSO หมายเลข 3 คือ ไม่หยดสารสกัด และ หมายเลข 4 คือ แอมโฟเทอริซิน บี ความเข้มข้น 0.1มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

2.2 วิธี Conidial germination inhibition assay

จากการนับจำนวนสปอร์เชื้อราที่งอกบนจานเพาะเลี้ยงและคำนวณเป็นค่าเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์ โดยเทียบกับชุดควบคุม พบว่า สารสกัดจาก *A. pullulans* ทั้ง 10 สายพันธุ์ มีฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคที่นำมาทดสอบดังนี้ สารสกัดจาก *A. pullulans* Deenarn 001 BCU สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *A. flavus*, *A. niger* และ *A. terreus* ได้ 36.94 ± 0.08 , 28.51 ± 0.06 และ 39.5 ± 0.36 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สารสกัดจาก *A. pullulans* Deenarn 003 BCU สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *A. flavus*, *A. niger* และ *A. fumigatus* ได้ 29.78 ± 0.08 , 45.96 ± 0.06 และ 48.94 ± 0.08 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สารสกัดจาก *A. pullulans* Deenarn 008 BCU สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *A. niger* และ *A. fumigatus* ได้ 23.83 ± 0.13 และ 34.83 ± 0.13 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สารสกัดจาก *A. pullulans* Deenarn 007 BCU สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *A. flavus* และ *A. fumigatus* ได้ 34.89 ± 0.08 และ 33.89 ± 0.08 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจาก *A. pullulans* Deenarn 009 BCU สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *A. fumigatus* ได้ 36.94 ± 0.08 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่สารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58514 และ NRRL 58536 สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *A. flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus* และ *A. terreus* ได้ 38.83 ± 0.13 , 36.94 ± 0.08 , 39.94 ± 0.08 , 35.00 ± 0.00 และ 43.96 ± 0.06 , 40.83 ± 0.12 , 33.93 ± 0.10 , 39.89 ± 0.09 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58516 สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *A. niger* และ *A. fumigatus* ได้ 24.94 ± 0.08 และ 48.89 ± 0.16 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58517 และ NRRL 58520 สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *A. fumigatus* ได้ 26.93 ± 0.09 และ 32.94 ± 0.08 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์การงอกและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์ *Aspergillus* spp. ที่ถูกบ่มร่วมกับสารสกัดจาก *A. pullulans* ทั้ง 10 สายพันธุ์

สายพันธุ์ที่ผลิตสารสกัด	เปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ (%) (% germination)				เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์ (%) (% inhibition)			
	<i>A. flavus</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. terreus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. terreus</i>
Deenarn 001 BCU	63.06±0.08	71.48±0.07	60.50±0.36	100.00±0.00	36.94±0.08	28.51±0.06	39.50±0.36	00.00±0.00
Deenarn 003 BCU	70.22±0.08	54.04±0.06	100.00±0.00	51.06±0.08	29.78±0.08	45.96±0.06	00.00±0.00	48.94±0.08
Deenarn 008 BCU	100.00±0.00	76.17±0.13	65.17±0.13	100.00±0.00	00.00±0.00	23.83±0.13	34.83±0.13	00.00±0.00
Deenarn 007 BCU	65.11±0.08	100.00±0.00	66.11±0.08	100.00±0.00	34.89±0.08	00.00±0.00	33.89±0.08	00.00±0.00
Deenarn 009 BCU	100.00±0.00	100.00±0.00	63.06±0.08	100.00±0.00	00.00±0.00	00.00±0.00	36.94±0.08	00.00±0.00
NRRL 58514	61.17±0.13	63.06±0.08	60.06±0.08	65.00±0.00	38.83±0.13	36.94±0.08	39.94±0.08	35.00±0.00
NRRL 58536	56.06±0.06	59.17±0.12	66.07±0.10	60.11±0.09	43.96±0.06	40.83±0.12	33.93±0.10	39.89±0.09
NRRL 58516	100.00±0.00	75.06±0.08	51.11±0.16	100.00±0.00	00.00±0.00	24.94±0.08	48.89±0.16	00.00±0.00
NRRL 58517	100.00±0.00	100.00±0.00	73.07±0.09	100.00±0.00	00.00±0.00	00.00±0.00	26.93±0.09	00.00±0.00
NRRL 58520	100.00±0.00	100.00±0.00	67.06±0.08	100.00±0.00	00.00±0.00	00.00±0.00	32.94±0.08	00.00±0.00

หมายเหตุ ชุดควบคุม คือ จำนวนสปอร์ที่ขึ้นบนอาหาร ภายหลังจากบ่มสารละลาย DMSO ร่วมกับสปอร์แขวนลอยของ *Aspergillus* spp. โดยจำนวนสปอร์ที่ขึ้นบนอาหารชุดควบคุมเทียบเป็น 100 เปอร์เซ็นต์

3. ศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารต้านเชื้อรา

จากการนำสารสกัดที่ได้จากเชื้อรา *A. pullulans* ทั้ง 10 สายพันธุ์ มาทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อรากลุ่ม *Aspergillus* spp. (*A. flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus* และ *A. terreus*) พบว่าสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 มีฤทธิ์สูงสุดในการยับยั้ง โดยพิจารณาจากจำนวนของเชื้อรา *Aspergillus* spp. ที่สารสกัดสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ เพอร์เซ็นต์การออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา จึงนำมาศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารต้านเชื้อราด้วยวิธีดังนี้

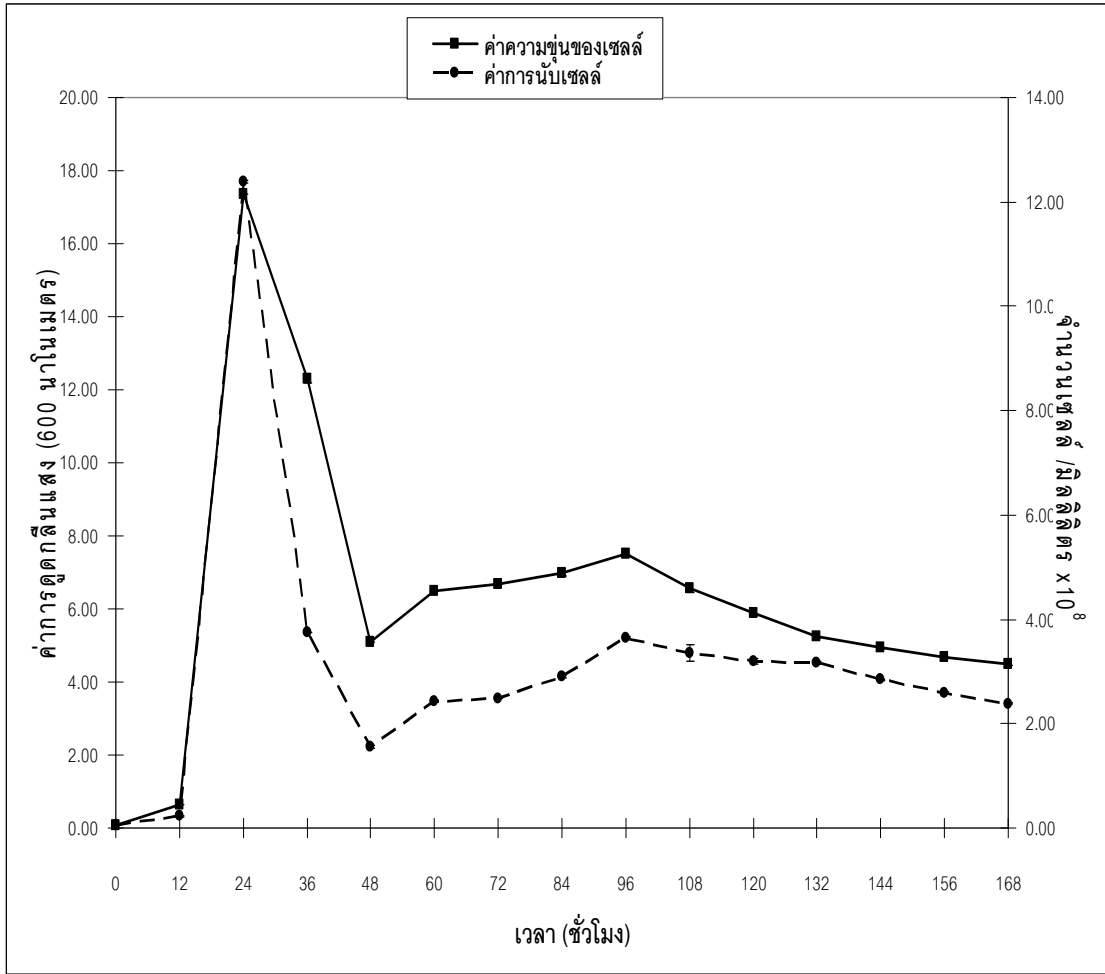
3.1 ศึกษาหาช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารต้านเชื้อราโดยใช้

เทคนิค Spectrophotometry

จากการนำเชื้อ *A. pullulans* NRRL 58536 มาทำการวัดค่าความขุ่นเพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์โดยใช้ spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และทำการนับจำนวนเซลล์โดยใช้ haemocytometer ที่เวลาเริ่มต้น 0 ชั่วโมง ทำการวัดค่าความขุ่นและนับจำนวนเซลล์ทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 168 ชั่วโมง พบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง เชื้อราจะเจริญเติบโตได้สูงสุดซึ่งวัดค่าความขุ่นของเซลล์ได้ 17.37 ± 0.01 และนับจำนวนเซลล์ได้ $12.40 \pm 0.03 \times 10^8$ เซลล์/มิลลิลิตร ซึ่งช่วงเวลาหลังจากนั้นพบว่าเซลล์มีอัตราการเจริญเติบโตลดลง และที่เวลา 56 ชั่วโมง ได้ทำการเติมอาหารสูตร Production II ลงไปในปริมาตร 1/5 ของอาหารสูตร Production I พบว่าอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์สูงขึ้นในช่วงเวลาหลังจาก 56 ชั่วโมง จนกระทั่งถึงเวลาที่ 96 ชั่วโมง พบว่าเซลล์มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดแต่น้อยกว่าในช่วงเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งวัดค่าความขุ่นของเซลล์ได้ 7.50 ± 0.02 และนับจำนวนเซลล์ได้ $3.65 \pm 0.01 \times 10^8$ เซลล์/มิลลิลิตร และในช่วงเวลาหลังจากนั้นจนกระทั่งครบเวลา 168 ชั่วโมง พบว่าอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ลดลงตามลำดับ (ตารางที่ 3) จากนั้นนำค่าความขุ่นของเซลล์และค่าจำนวนเซลล์ที่นับได้มาสร้างกราฟเปรียบเทียบกับเวลา (รูปที่ 12)

ตารางที่ 3 ผลการวัดค่าความขุ่นและการนับจำนวนเซลล์/มิลลิลิตรของเชื้อ *A. pullulans* NRRL 58536

ครั้งที่	จำนวนชั่วโมง	ค่าการดูดกลืนแสง (600 นาโนเมตร)	จำนวนเซลล์/มิลลิลิตร ($\times 10^8$)
1	0	0.09 \pm 0.00	0.05 \pm 0.00
2	12	0.65 \pm 0.02	0.23 \pm 0.02
3	24	17.37 \pm 0.01	12.40 \pm 0.03
4	36	12.30 \pm 0.10	3.75 \pm 0.01
5	48	5.11 \pm 0.01	1.56 \pm 0.02
6	60	6.50 \pm 0.10	2.44 \pm 0.01
7	72	6.70 \pm 0.02	2.50 \pm 0.02
8	84	7.00 \pm 0.10	2.90 \pm 0.03
9	96	7.50 \pm 0.02	3.65 \pm 0.01
10	108	5.70 \pm 0.02	3.35 \pm 0.15
11	120	5.20 \pm 0.03	3.20 \pm 0.05
12	132	5.10 \pm 0.01	3.17 \pm 0.02
13	144	4.93 \pm 0.03	2.84 \pm 0.02
14	156	4.70 \pm 0.03	2.60 \pm 0.01
15	168	4.50 \pm 0.05	2.39 \pm 0.01



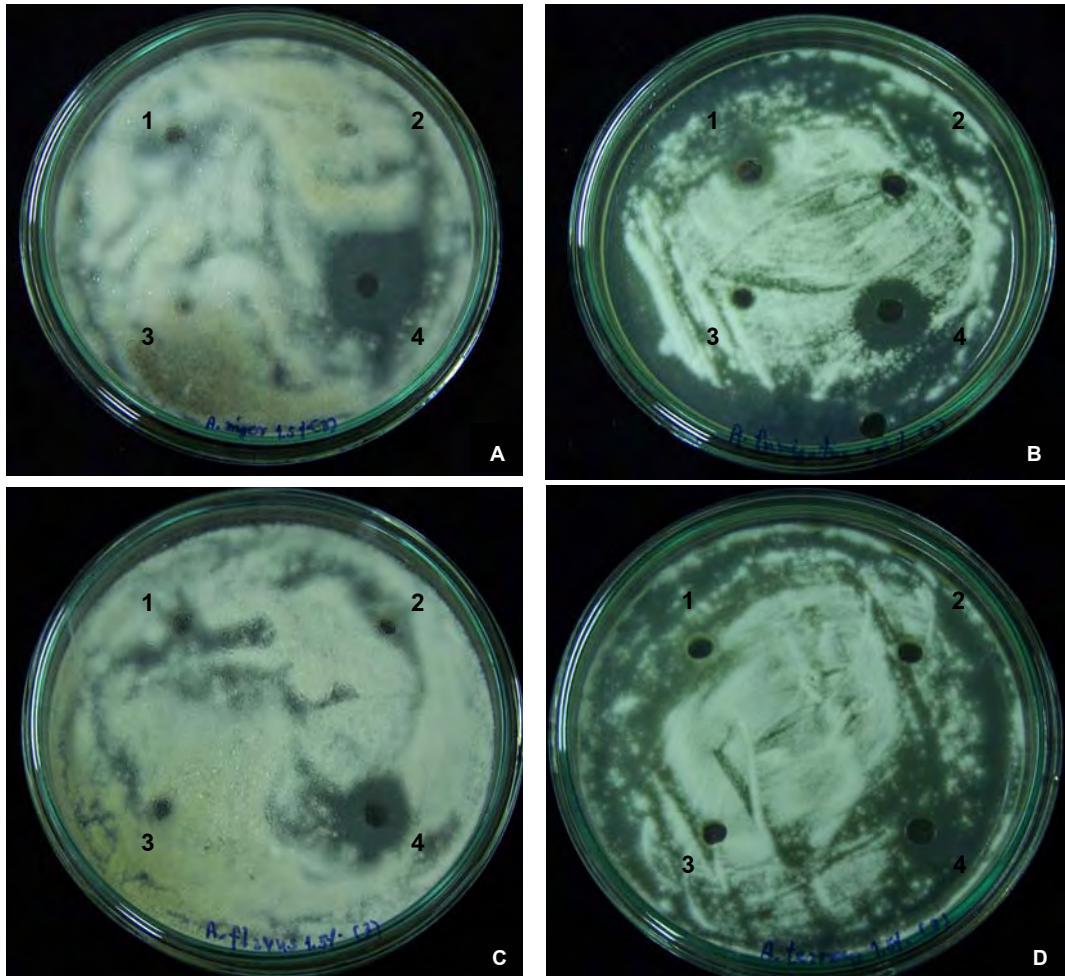
รูปที่ 12 ผลการศึกษากราฟการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. pullulans* NRRL 58536 เปรียบเทียบกับเวลา

3.2 ศึกษาชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน

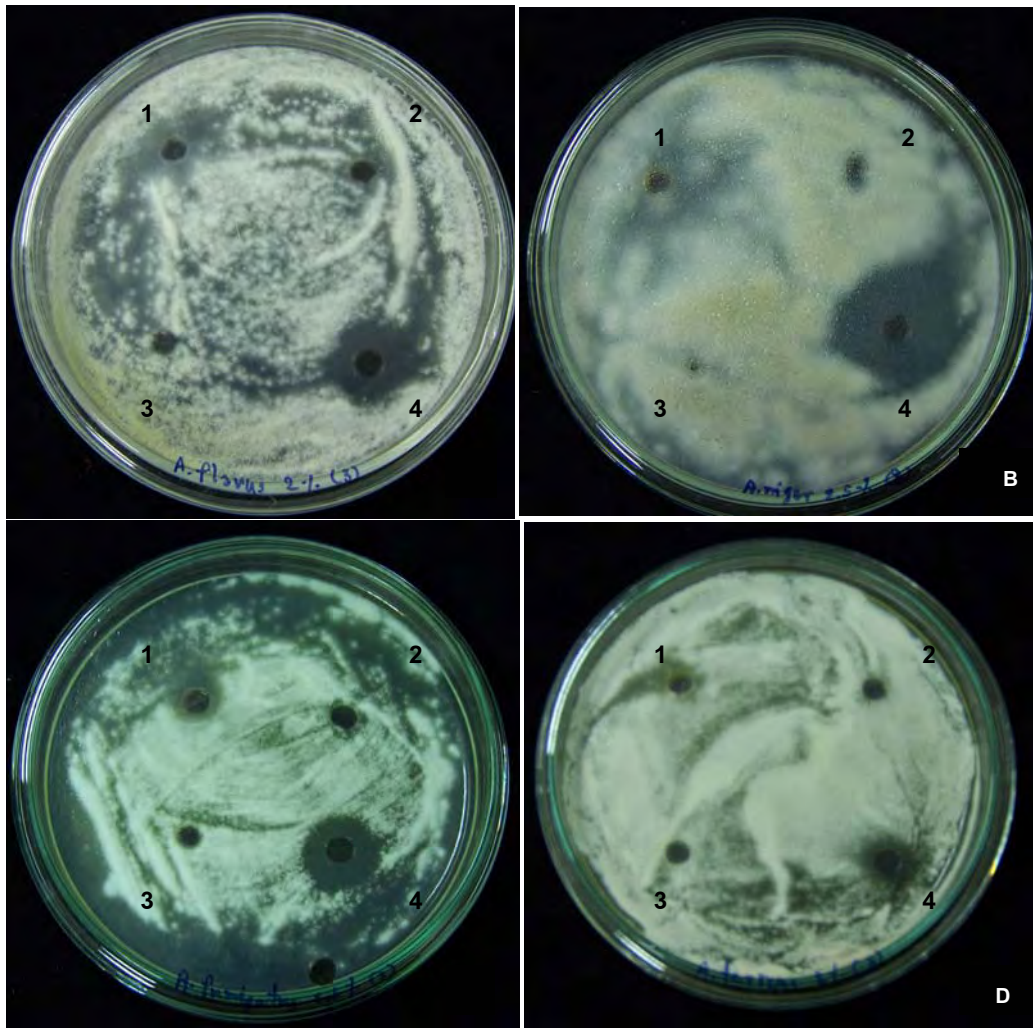
จากการนำเชื้อรา *A. pullulans* NRRL 58536 มาทำการศึกษาแหล่งคาร์บอน 2 ชนิด คือ กลูโคส และ ซูโครส ที่มีความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน 1.5 2.0 และ 2.5% (w/v) จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อราก่อโรคในกลุ่ม *Aspergillus* spp. ด้วยวิธี Well diffusion บนจานเลี้ยงเชื้อที่เคลือบด้วยสปอร์ของ *Aspergillus* spp. สังเกตบริเวณยับยั้งและคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ได้ผลดังตารางที่ 4 โดยพบว่าสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งคาร์บอนกลูโคสความเข้มข้น 1.5% (w/v) มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราก่อโรคในกลุ่ม *Aspergillus* spp. ทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *A. flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus* และ *A. terreus* ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 10.00 ± 0.00 , 23.00 ± 0.06 , 48.00 ± 0.03 และ 10.00 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (รูปที่ 13) ส่วนสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งคาร์บอนกลูโคสความเข้มข้น 2.0% (w/v) พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *Aspergillus* spp. ทั้ง 4 สายพันธุ์เช่นกัน ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 52.00 ± 0.08 , 47.00 ± 0.06 , 25.00 ± 0.06 และ 47.00 ± 0.05 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (รูปที่ 14) ขณะที่สารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งคาร์บอนกลูโคสความเข้มข้น 2.5% (w/v) พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราก่อโรคในกลุ่ม *Aspergillus* spp. ทั้ง 4 สายพันธุ์ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 75.00 ± 0.00 , 60.00 ± 0.05 , 60.00 ± 0.00 และ 50.00 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (รูปที่ 15) และเมื่อทำการทดสอบความสามารถในการต้านเชื้อรา โดยคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์ โดยเทียบกับชุดควบคุม พบว่า สารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งคาร์บอนกลูโคสทั้ง 3 ความเข้มข้น มีฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคที่นำมาทดสอบทั้ง 4 สายพันธุ์ ดังนี้ สารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งคาร์บอนกลูโคสความเข้มข้น 1.5% (w/v) สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *A. flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus* และ *A. terreus* ได้ 24.94 ± 0.08 , 37.83 ± 0.00 , 32.94 ± 0.08 และ 26.00 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งคาร์บอนกลูโคสความเข้มข้น 2.0% (w/v) สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *A. flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus* และ *A. terreus* ได้ 45.91 ± 0.06 , 43.91 ± 0.06 , 43.96 ± 0.06 และ 27.89 ± 0.08 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ขณะที่สารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งคาร์บอนกลูโคสความเข้มข้น 2.5% (w/v) สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *A. flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus* และ *A. terreus* ได้ 54.94 ± 0.08 , 52.89 ± 0.08 , 50.89 ± 0.08 และ 33.94 ± 0.08 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 5) ส่วนสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งคาร์บอนซูโครสทั้ง 3 ความเข้มข้น เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อราก่อโรคในกลุ่ม *Aspergillus* spp. ด้วยวิธี Well diffusion และ วิธี Conidial germination inhibition assay พบว่าไม่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราก่อโรคในกลุ่ม *Aspergillus* spp. ทั้ง 4 สายพันธุ์

ตารางที่ 4 ความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus* spp. ของสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งคาร์บอนกลูโคส โดยวิธี well diffusion

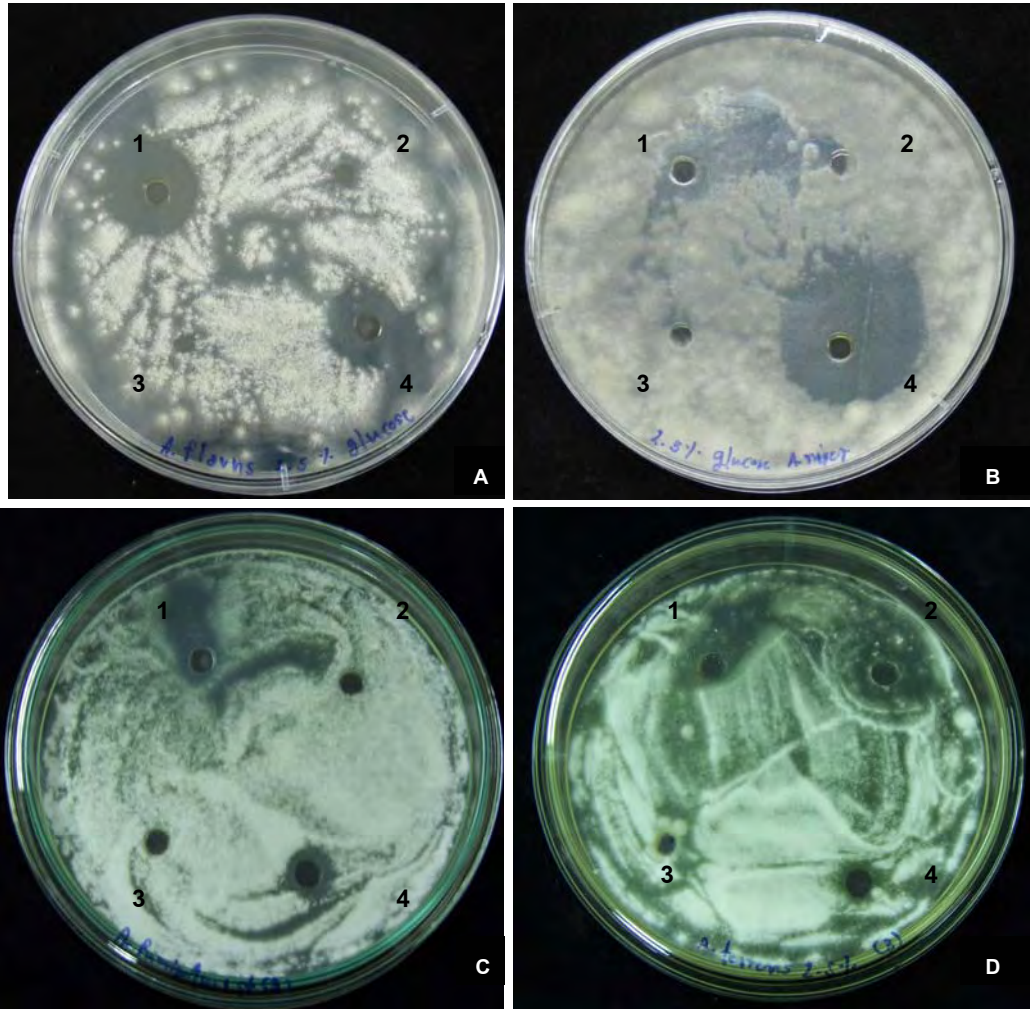
เชื้อรา <i>Aspergillus</i> spp.	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (% inhibition) ของสารสกัดที่ผลิตในแหล่งคาร์บอนกลูโคส (%)		
	1.5% (w/v)	2.0% (w/v)	2.5% (w/v)
<i>A. flavus</i>	10.00±0.00	52.00±0.08	75.00±0.00
<i>A. niger</i>	23.00±0.06	47.00±0.06	60.00±0.05
<i>A. fumigatus</i>	48.00±0.03	25.00±0.06	60.00±0.00
<i>A. terreus</i>	10.00±0.00	47.00±0.05	50.00±0.00



รูปที่ 13 ความสามารถในการยับยั้ง *A. flavus* (A) *A. niger* (B) *A. fumigatus* (C) และ *A. terreus* (D) ของ สารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งคาร์บอนกลูโคสความเข้มข้น 1.5 % (w/v) โดย หมายเลข 1 คือ สารสกัด หมายเลข 2 คือ สาร DMSO หมายเลข 3 คือ ไม่หยดสารสกัด และ หมายเลข 4 คือ แอมโฟ เทอริซิน บี ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร



รูปที่ 14 ความสามารถในการยับยั้ง *A. flavus* (A) *A. niger* (B) *A. fumigatus* (C) และ *A. terreus* (D) ของสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งคาร์บอนกลูโคสความเข้มข้น 2.0 % (w/v) โดยหมายเลข 1 คือ สารสกัด หมายเลข 2 คือ สาร DMSO หมายเลข 3 คือ ไม่หยดสารสกัด และ หมายเลข 4 คือ แอมโฟเทอริซิน บี ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร



รูปที่ 15 ความสามารถในการยับยั้ง *A. flavus* (A) *A. niger* (B) *A. fumigatus* (C) และ *A. terreus* (D) ของสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งคาร์บอนกลูโคสความเข้มข้น 2.5 % (w/v) โดยหมายเลข 1 คือ สารสกัด หมายเลข 2 คือ สาร DMSO หมายเลข 3 คือ ไม่หยดสารสกัด และ หมายเลข 4 คือ แอมโฟเทอริซิน บี ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์การงอกและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์ *Aspergillus* spp. ที่ถูกบ่มร่วมกับสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งคาร์บอนกลูโคส

ความเข้มข้นกลูโคส (%w/v)	เชื้อรา <i>Aspergillus</i> spp	เปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ (%) (% germination)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์ (%) (% inhibition)
1.5	<i>A. flavus</i>	75.06±0.08	24.94±0.08
	<i>A. niger</i>	62.17±0.00	37.83±0.00
	<i>A. fumigatus</i>	67.06±0.08	32.94±0.08
	<i>A. terreus</i>	74.00±0.00	26.00±0.00
2.0	<i>A. flavus</i>	54.09±0.06	45.91±0.06
	<i>A. niger</i>	56.09±0.06	43.91±0.06
	<i>A. fumigatus</i>	56.04±0.06	43.96±0.06
	<i>A. terreus</i>	72.11±0.08	27.89±0.08
2.5	<i>A. flavus</i>	45.06±0.08	54.94±0.08
	<i>A. niger</i>	47.11±0.08	52.89±0.08
	<i>A. fumigatus</i>	49.11±0.08	50.89±0.08
	<i>A. terreus</i>	66.06±0.08	33.94±0.08

หมายเหตุ ชุดควบคุม คือ จำนวนสปอร์ที่ขึ้นบนจานอาหาร ภายหลังจากบ่มสารละลาย DMSO ร่วมกับสปอร์แขวนลอยของ *Aspergillus* spp. โดยจำนวนสปอร์ที่ขึ้นบนจานอาหารชุดควบคุมเทียบเป็น 100 เปอร์เซ็นต์

3.3 ศึกษาการใช้แหล่งอาหารเสริม

จากการศึกษาชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน พบว่าสารสกัดจาก

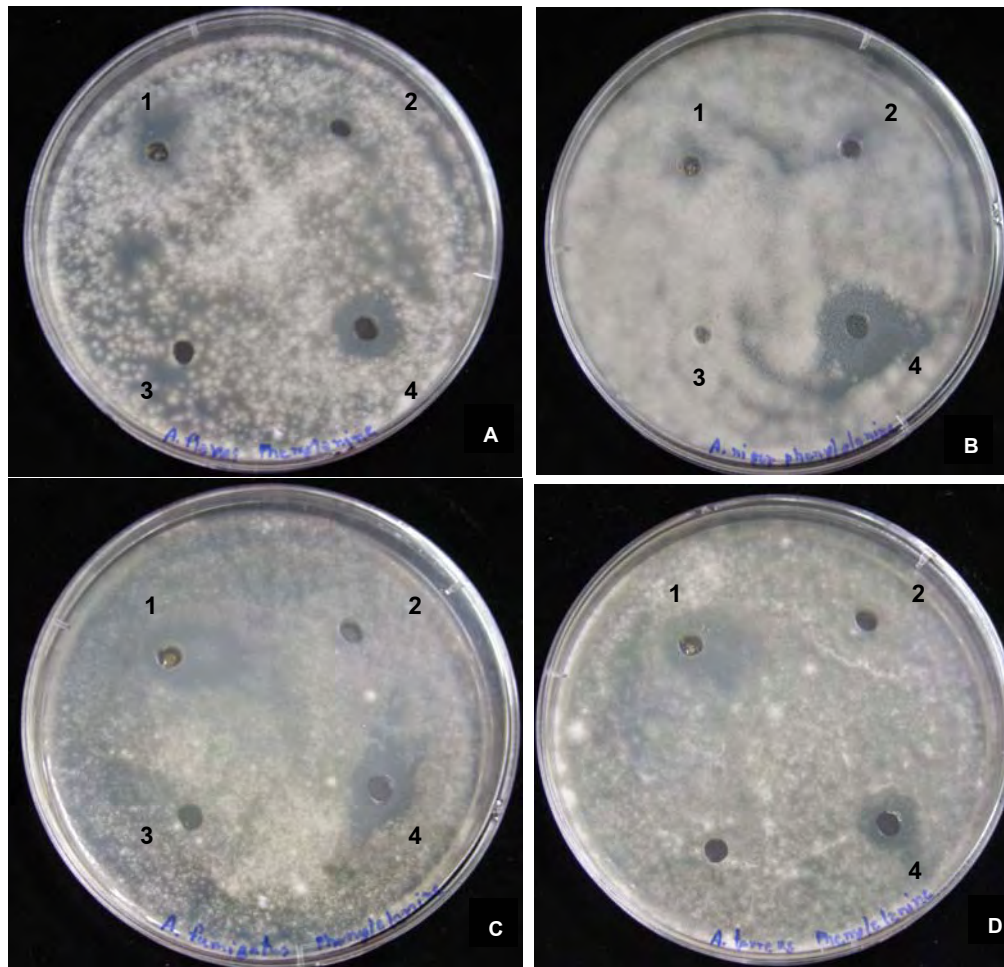
A. *pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งคาร์บอนกลูโคสความเข้มข้น 2.5% (w/v) มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราก่อโรคในกลุ่ม *Aspergillus* spp. ทั้ง 4 สายพันธุ์ได้สูงสุด จากนั้นนำมาศึกษาการใช้แหล่งอาหารเสริมจำพวกกรดอะมิโน ได้แก่ ฟีนิลอะลานีน โพรลีน และ ลิวซีน โดยจัดแบ่งกรดอะมิโน ออกเป็น 7 ภาวะ ได้แก่ (1) ฟีนิลอะลานีน (2) โพรลีน (3) ลิวซีน (4) ฟีนิลอะลานีน และ โพรลีน (5) ฟีนิลอะลานีน และ ลิวซีน (6) โพรลีน และ ลิวซีน (7) ฟีนิลอะลานีน โพรลีน และ ลิวซีน ตามลำดับ โดยทำการเลี้ยงเชื้อ A. *pullulans* NRRL 58536 ในอาหารสูตร Production I ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 2.5% (w/v) และทำการเลี้ยงเชื้อต่อในอาหารสูตร Production II ที่มีกรดอะมิโนในแต่ละภาวะที่ความเข้มข้น 0.01 % (w/v) และนำมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อราก่อโรคในกลุ่ม *Aspergillus* spp. (A. *flavus*, A. *niger*, A. *fumigatus* และ A. *terreus*) ด้วยวิธี Well diffusion บนจานเลี้ยงเชื้อที่เคลือบด้วยสปอร์ของ *Aspergillus* spp. สังเกตบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้นและคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ได้ผลดังตารางที่ 6 โดยพบว่าสารสกัดจาก A. *pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 1 (ฟีนิลอะลานีน) มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราก่อโรคในกลุ่ม *Aspergillus* spp. ทั้ง 4 สายพันธุ์ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 53.00 ± 0.06 , 50.00 ± 0.00 , $125 \pm 0.000.06$ และ 107.00 ± 0.06 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (รูปที่ 16) สารสกัดจาก A. *pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 2 (โพรลีน) พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราก่อโรคในกลุ่ม *Aspergillus* spp. ทั้ง 4 สายพันธุ์ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 32.00 ± 0.03 , 97.00 ± 0.06 , 45.00 ± 0.05 และ 100.00 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (รูปที่ 17) สารสกัดจาก A. *pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 3 (ลิวซีน) พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราก่อโรคในกลุ่ม *Aspergillus* spp. ทั้ง 4 สายพันธุ์ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 141.00 ± 0.01 , 40.00 ± 0.00 , 20.00 ± 0.00 และ 103.00 ± 0.03 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (รูปที่ 18) ส่วนสารสกัดจาก A. *pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 4 (ฟีนิลอะลานีน และ โพรลีน) พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราก่อโรคในกลุ่ม *Aspergillus* spp. ทั้ง 4 สายพันธุ์ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 75.00 ± 0.02 , 65.00 ± 0.01 , 125.00 ± 0.02 และ 90.00 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (รูปที่ 19) ขณะที่สารสกัดจาก A. *pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 5 (ฟีนิลอะลานีน และ ลิวซีน) พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราก่อโรคในกลุ่ม *Aspergillus* spp. ทั้ง 4 สายพันธุ์ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 175.00 ± 0.05 , 100.00 ± 0.00 , 160.00 ± 0.05 และ 55.00 ± 0.10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (รูปที่ 20) และสารสกัดจาก A. *pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 6 (โพรลีน และ ลิวซีน) พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราก่อโรคในกลุ่ม *Aspergillus* spp. ทั้ง 4 สายพันธุ์ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 97.00 ± 0.06 , 25.00 ± 0.01 , 165.00 ± 0.01 และ 120.00 ± 0.01 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (รูปที่ 21) นอกจากนี้สารสกัดจาก A. *pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 7 (ฟีนิลอะลานีน โพรลีน และ ลิวซีน) พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราก่อโรคในกลุ่ม *Aspergillus* spp. ทั้ง 4 สายพันธุ์ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 100.00 ± 0.00 , 146.00 ± 0.08 , 170.00 ± 0.06 และ 20.00 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (รูปที่ 22) และเมื่อทำการทดสอบความสามารถในการต้านเชื้อรา โดยคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์ โดยเทียบกับชุดควบคุม พบว่า สารสกัดจาก A. *pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนทั้ง 7 ภาวะ มีฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคที่นำมาทดสอบทั้ง 4 สายพันธุ์ ดังนี้ โดยสารสกัดจาก A. *pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 1 (ฟีนิลอะลานีน) สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของ A. *flavus*, A. *niger*, A. *fumigatus* และ A. *terreus* ได้ 33.33 ± 0.02 , 48.67 ± 0.12 , 68.17 ± 0.13 และ 58.92 ± 0.12 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สารสกัดจาก A. *pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 2 (โพรลีน) สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของ A. *flavus*, A. *niger*, A. *fumigatus* และ A. *terreus*

ได้ 28.43 ± 0.11 , 55.89 ± 0.08 , 52.94 ± 0.08 และ 55.08 ± 0.12 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 3 (ลิวซีน) สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *A. flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus* และ *A. terreus* ได้ 69.87 ± 0.10 , 31.94 ± 0.08 , 24.94 ± 0.08 และ 58.83 ± 0.12 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 4 (ฟีนิลอะลานีน และ โพรลีน) สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *A. flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus* และ *A. terreus* ได้ 54.93 ± 0.09 , 46.87 ± 0.10 , 68.11 ± 0.08 และ 56.94 ± 0.08 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ขณะที่สารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 5 (ฟีนิลอะลานีน และ ลิวซีน) สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *A. flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus* และ *A. terreus* ได้ 74.87 ± 0.10 , 55.94 ± 0.08 , 72.96 ± 0.06 และ 32.89 ± 0.08 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 6 (โพรลีน และ ลิวซีน) สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *A. flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus* และ *A. terreus* ได้ 56.89 ± 0.08 , 25.89 ± 0.08 , 72.96 ± 0.06 และ 65.89 ± 0.08 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้สารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 7 (ฟีนิลอะลานีน โพรลีน และ ลิวซีน) สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *A. flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus* และ *A. terreus* ได้ 55.89 ± 0.08 , 69.91 ± 0.06 , 77.96 ± 0.06 และ 22.94 ± 0.08 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 7)

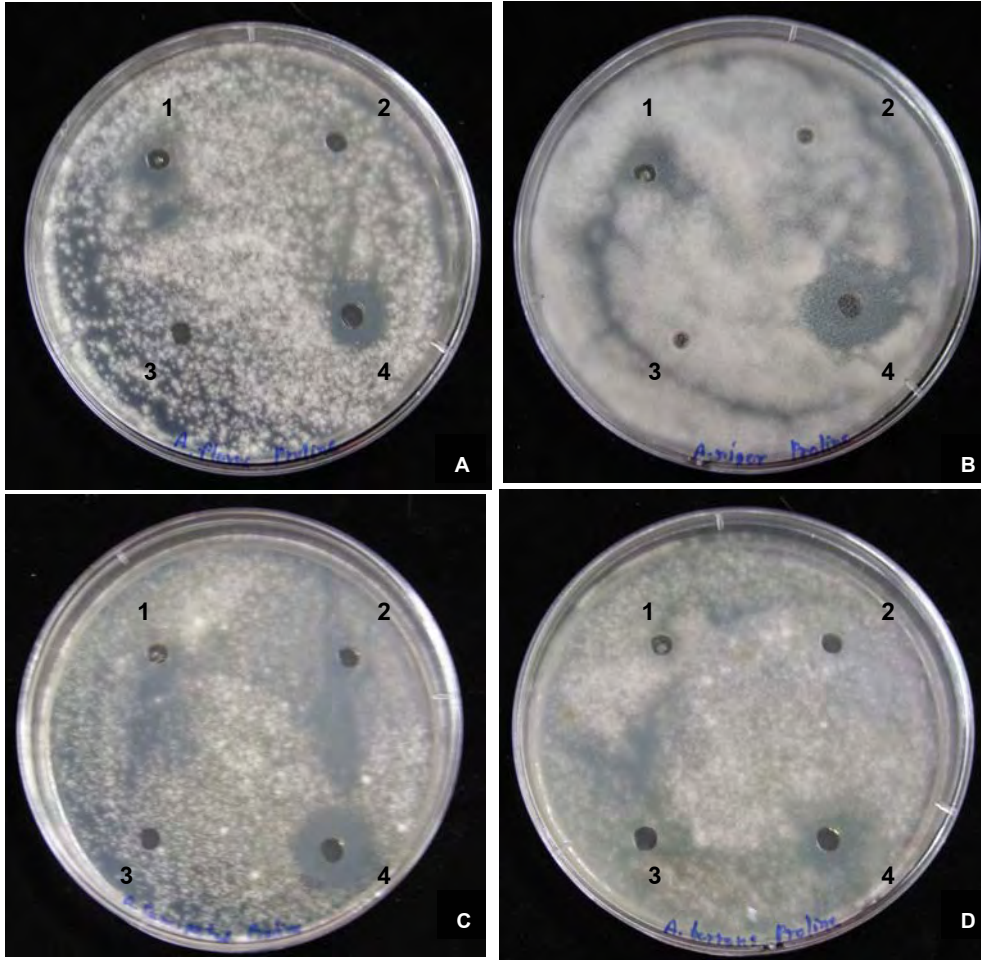
ตารางที่ 6 ความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus* spp. ของสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโน โดยวิธี

Well diffusion

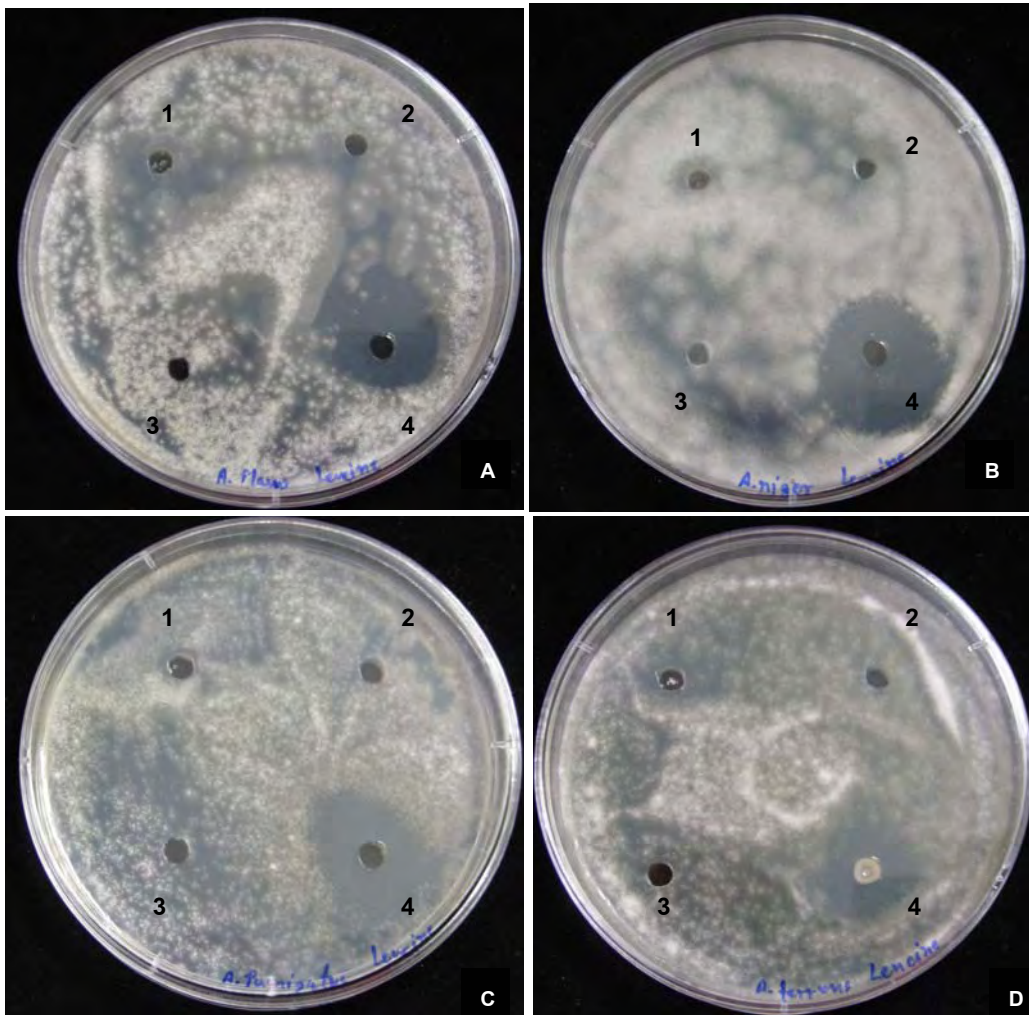
เชื้อรา <i>Aspergillus</i> spp.	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (% inhibition) ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโน (%)						
	ฟีนิลอะลานีน	โพรลีน	ลิวซีน	ฟีนิลอะลานีน และโพรลีน	ฟีนิลอะลานีน และลิวซีน	โพรลีน และลิวซีน	ฟีนิลอะลานีน โพรลีน และลิวซีน
<i>A. flavus</i>	53.00±0.06	32.00±0.03	141.00±0.01	75.00±0.02	175.00±0.05	97.00±0.06	100.00±0.00
<i>A. niger</i>	50.00±0.00	97.00±0.06	40.00±0.00	65.00±0.01	100.00±0.00	25.00±0.01	146.00±0.08
<i>A. fumigatus</i>	125.00±0.06	45.00±0.05	20.00±0.00	125.00±0.02	160.00±0.05	165.00±0.01	170.00±0.06
<i>A. terreus</i>	107.00±0.06	100.00±0.00	103.00±0.03	90.00±0.00	55.00±0.10	120.00±0.01	20.00±0.00



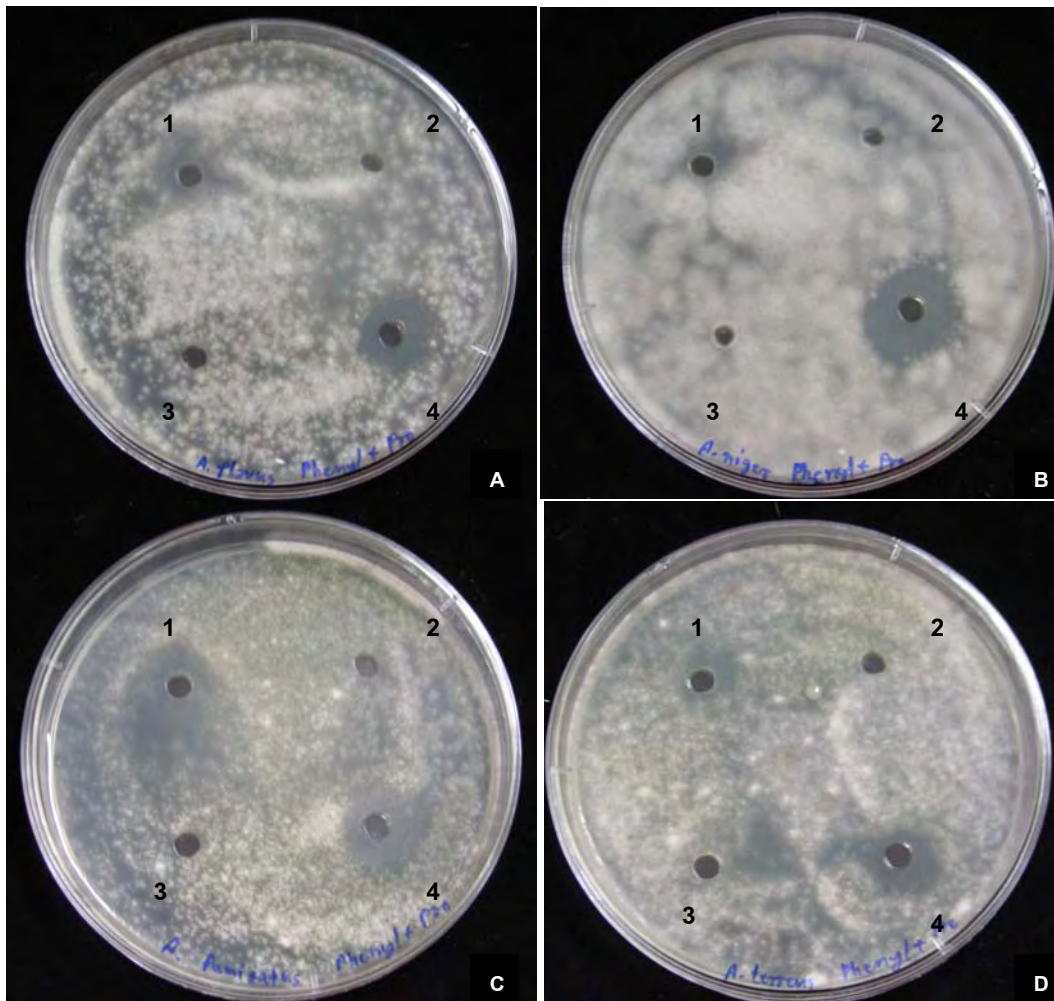
รูปที่ 16 ความสามารถในการยับยั้ง *A. flavus* (A) *A. niger* (B) *A. fumigatus* (C) และ *A. terreus* (D) ของสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 1 (ฟีนอลอะลานีน) โดย หมายเลข 1 คือ สารสกัด หมายเลข 2 คือ สาร DMSO หมายเลข 3 คือ ไม่หยดสารสกัด และ หมายเลข 4 คือ แอมโฟเทอริซิน บี ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร



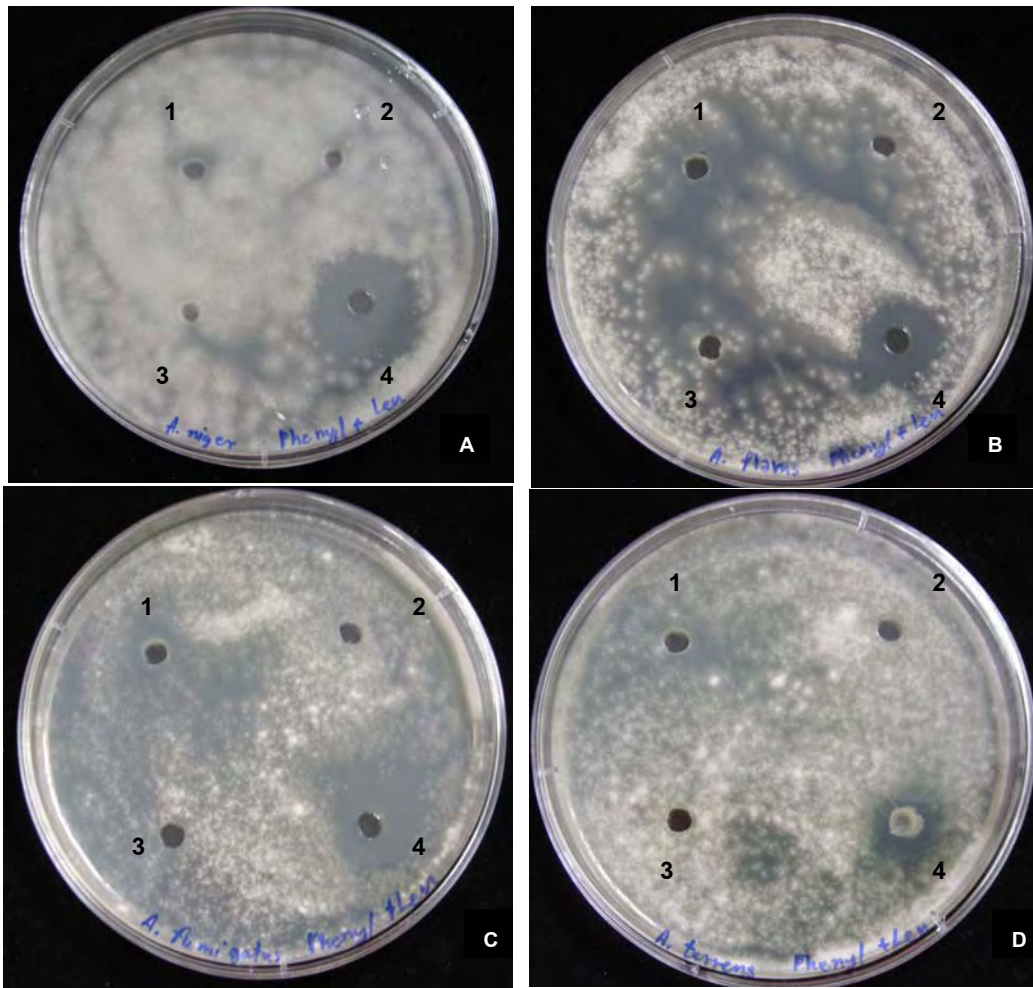
รูปที่ 17 ความสามารถในการยับยั้ง *A. flavus* (A) *A. niger* (B) *A. fumigatus* (C) และ *A. terreus* (D) ของสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 2 (โพรลีน) โดย หมายเลข 1 คือ สารสกัด หมายเลข 2 คือ สาร DMSO หมายเลข 3 คือ ไม่หยดสารสกัด และ หมายเลข 4 คือ แอมโฟเทอริซิน บี ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร



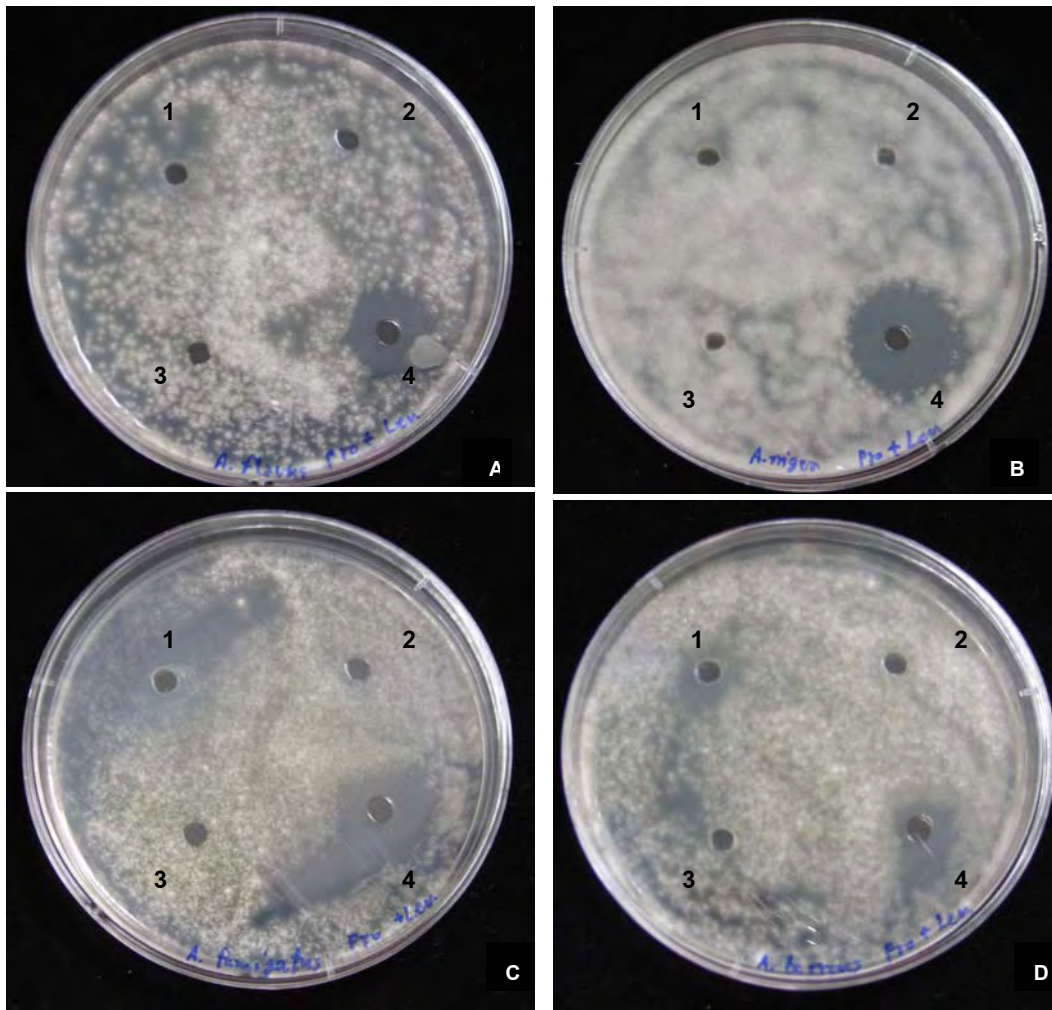
รูปที่ 18 ความสามารถในการยับยั้ง *A. flavus* (A) *A. niger* (B) *A. fumigatus* (C) และ *A. terreus* (D) ของสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 3 (ลิวซีน) โดย หมายเลข 1 คือ สารสกัด หมายเลข 2 คือ สาร DMSO หมายเลข 3 คือ ไม่หยดสารสกัด และ หมายเลข 4 คือ แอมโฟเทอริซิน บี ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร



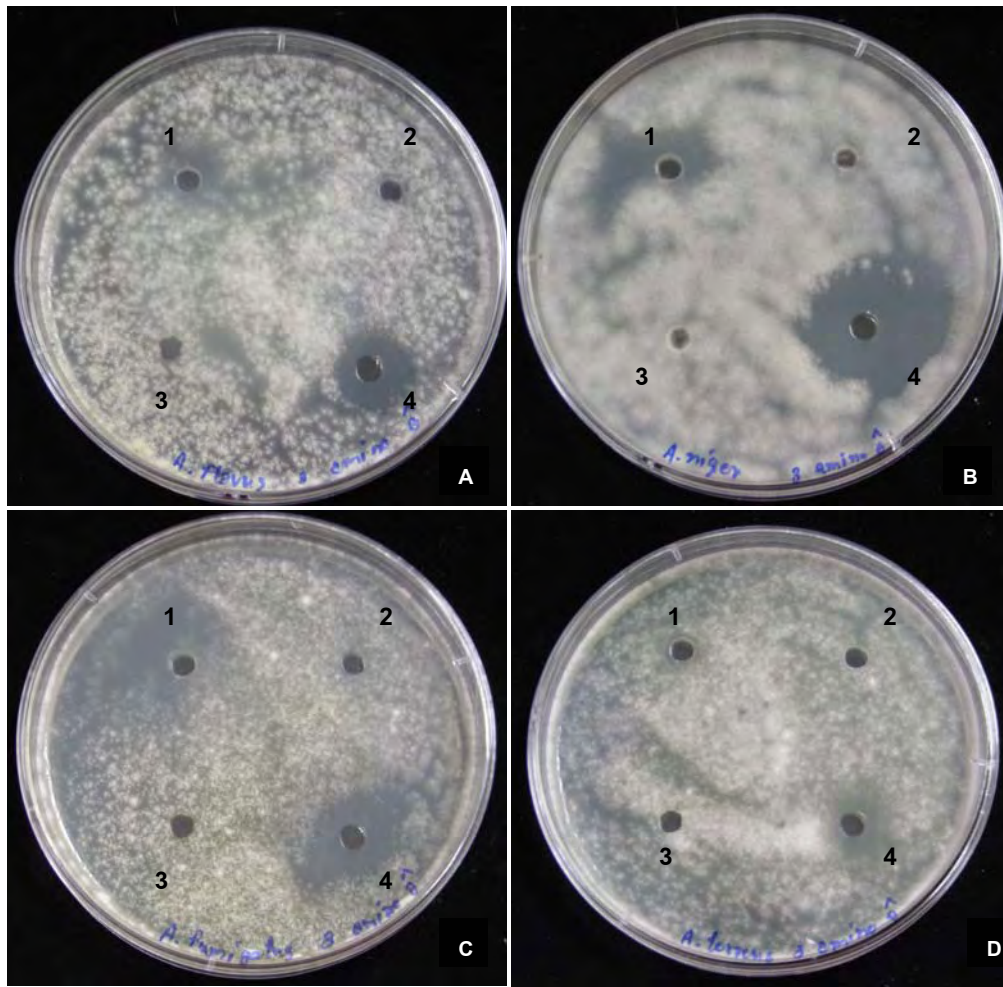
รูปที่ 19 ความสามารถในการยับยั้ง *A. flavus* (A) *A. niger* (B) *A. fumigatus* (C) และ *A. terreus* (D) ของสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 4 (ฟีนอลอะลานีน และ โพรลีน) โดย หมายเลข 1 คือ สารสกัด หมายเลข 2 คือ สาร DMSO หมายเลข 3 คือ ไม่หยดสารสกัด และ หมายเลข 4 คือ แอมโฟเทอริซิน บี ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร



รูปที่ 20 ความสามารถในการยับยั้ง *A. flavus* (A) *A. niger* (B) *A. fumigatus* (C) และ *A. terreus* (D) ของสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 5 (ฟีนิลอะลานีน และ ลิวซีน) โดย หมายเลข 1 คือ สารสกัด หมายเลข 2 คือ สาร DMSO หมายเลข 3 คือ ไม่หยดสารสกัด และ หมายเลข 4 คือ แอมโฟเทอริซิน บี ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร



รูปที่ 21 ความสามารถในการยับยั้ง *A. flavus* (A) *A. niger* (B) *A. fumigatus* (C) และ *A. terreus* (D) ของสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 6 (โพรลีน และ ลิวซีน) โดย หมายเลข 1 คือ สารสกัด หมายเลข 2 คือ สาร DMSO หมายเลข 3 คือ ไม่หยดสารสกัด และ หมายเลข 4 คือ แอมโฟเทอริซิน บี ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร



รูปที่ 22 ความสามารถในการยับยั้ง *A. flavus* (A) *A. niger* (B) *A. fumigatus* (C) และ *A. terreus* (D) ของสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 7 (ฟีนอลอะลานีน โพรลีน และ ลิวซีน) โดยหมายเลข 1 คือ สารสกัด หมายเลข 2 คือ สาร DMSO หมายเลข 3 คือ ไม่หยดสารสกัด และ หมายเลข 4 คือ แอมโฟเทอริซิน บี ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์การงอกและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์ *Aspergillus* spp. ที่ถูกบ่มร่วมกับสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโน

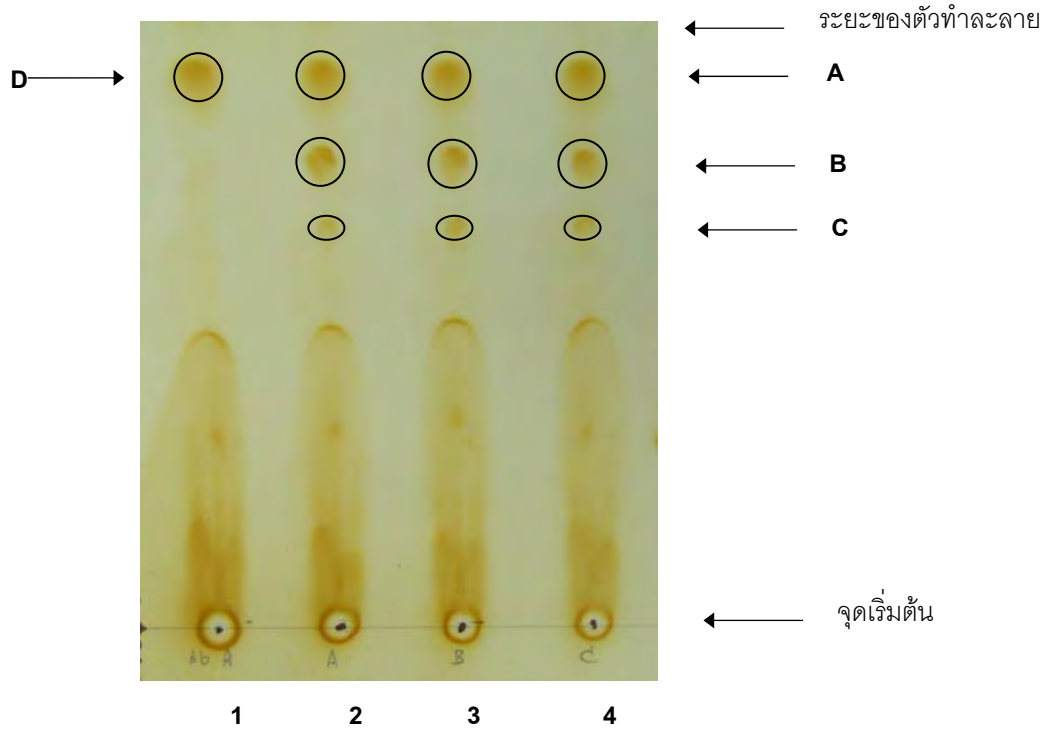
กรดอะมิโน	เชื้อรา <i>Aspergillus</i> spp.	เปอร์เซ็นต์การงอก ของสปอร์ (%) (% germination)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์ (%) (% inhibition)
ฟีนิลอะลานีน	<i>A. flavus</i>	66.67±0.02	33.33±0.02
	<i>A. niger</i>	51.33±0.12	48.67±0.12
	<i>A. fumigatus</i>	31.83±0.13	68.17±0.13
	<i>A. terreus</i>	41.08±0.12	58.92±0.12
โพรลีน	<i>A. flavus</i>	71.57±0.11	28.43±0.11
	<i>A. niger</i>	44.11±0.08	55.89±0.08
	<i>A. fumigatus</i>	47.06±0.08	52.94±0.08
	<i>A. terreus</i>	44.92±0.12	55.08±0.12
ลิวซีน	<i>A. flavus</i>	30.13±0.10	69.87±0.10
	<i>A. niger</i>	68.06±0.08	31.94±0.08
	<i>A. fumigatus</i>	75.06±0.08	24.94±0.08
	<i>A. terreus</i>	41.17±0.12	58.83±0.12
ฟีนิลอะลานีน และโพรลีน	<i>A. flavus</i>	45.07±0.09	54.93±0.09
	<i>A. niger</i>	53.13±0.10	46.87±0.10
	<i>A. fumigatus</i>	31.89±0.08	68.11±0.08
	<i>A. terreus</i>	43.06±0.08	56.94±0.08
ฟีนิลอะลานีน และลิวซีน	<i>A. flavus</i>	25.13±0.10	74.87±0.10
	<i>A. niger</i>	44.06±0.08	55.94±0.08
	<i>A. fumigatus</i>	27.04±0.06	72.96±0.06
	<i>A. terreus</i>	67.11±0.08	32.89±0.08
โพรลีน และลิวซีน	<i>A. flavus</i>	43.11±0.08	56.89±0.08
	<i>A. niger</i>	74.11±0.08	25.89±0.08
	<i>A. fumigatus</i>	27.04±0.06	72.96±0.06
	<i>A. terreus</i>	34.11±0.08	65.89±0.08
ฟีนิลอะลานีน โพรลีน และลิวซีน	<i>A. flavus</i>	44.11±0.08	55.89±0.08
	<i>A. niger</i>	30.09±0.06	69.91±0.06
	<i>A. fumigatus</i>	22.04±0.06	77.96±0.06
	<i>A. terreus</i>	77.06±0.08	22.94±0.08

หมายเหตุ ชุคควบคุม คือ จำนวนสปอร์ที่ขึ้นบนจานอาหาร ภายหลังบ่มสารละลาย DMSO ร่วมกับสปอร์แขวนลอยของ *Aspergillus* spp. โดยจำนวนสปอร์ที่ขึ้นบนจานอาหารชุคควบคุมเทียบเป็น 100 เปอร์เซ็นต์

4. ทำปฏิกิริยาบางส่วนของสารต้านเชื้อรา

4.1 เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (Thin layer chromatography)

จากการศึกษาชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอนรวมถึงศึกษาการใช้แหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนในการผลิตสารต้านเชื้อรา พบว่าสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 5 (ฟีนิลอะลานีน และ ลิวซีน) มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *A. flavus* ได้สูงสุด ส่วนสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 6 (โพรลีน และ ลิวซีน) มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *A. terreus* ได้สูงสุด ขณะที่สารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 7 (ฟีนิลอะลานีน โพรลีน และ ลิวซีน) มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *A. niger* และ *A. fumigatus* ได้สูงสุด จึงนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (TLC) เทียบกับสารมาตรฐาน อริโอบาซิดิน เอ โดยใช้ระบบตัวทำละลายคือเอธิลอะซิเตต พบว่าสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 5 (ฟีนิลอะลานีน และ ลิวซีน) ภาวะที่ 6 (โพรลีน และ ลิวซีน) และภาวะที่ 7 (ฟีนิลอะลานีน โพรลีน และ ลิวซีน) ประกอบด้วยสารที่มีค่า Rf แตกต่างกัน 3 ชนิด (รูปที่ 23) แต่ละชนิด มีค่า Rf เท่ากับ 0.45 (ตำแหน่ง C) 0.59 (ตำแหน่ง B) และ 0.68 (ตำแหน่ง A) ตามลำดับ ส่วนอริโอบาซิดิน เอ มาตรฐาน มีค่า Rf เท่ากับ 0.68 (ตำแหน่ง D) (รูปที่ 23)



รูปที่ 23 โครมาโทแกรมแสดงผลการตรวจสอบสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา ที่ได้จากเชื้อรา

A. pullulans NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโน ด้วยเทคนิค TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลายคือ เอธิลอะซิเตต

1. สารมาตรฐาน ออร์โอบาซิดิน เอ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

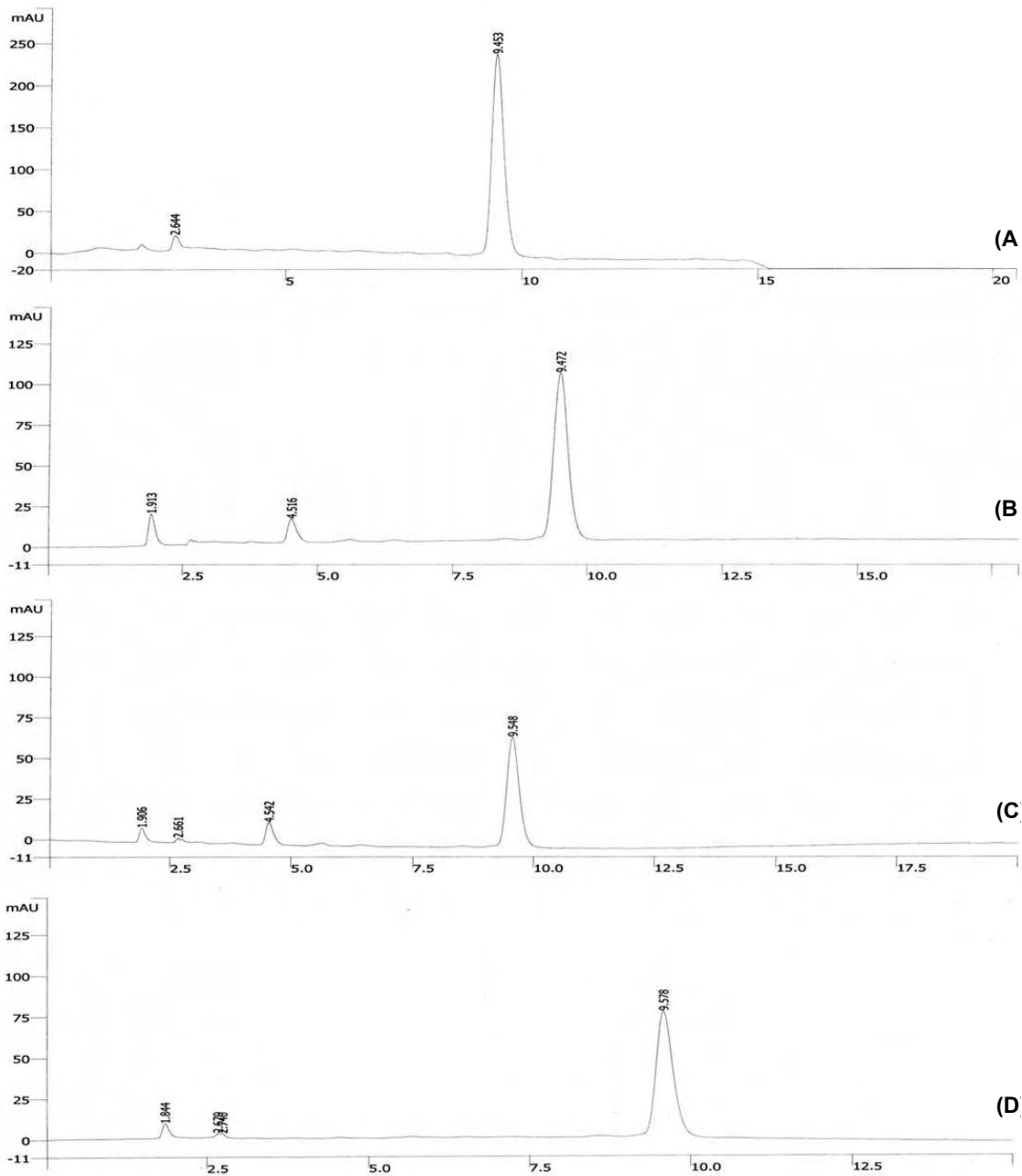
2. สารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 5 (ฟีนอลอะลานีน และ ลิวซีน)

3. สารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 6 (โพรลีน และ ลิวซีน)

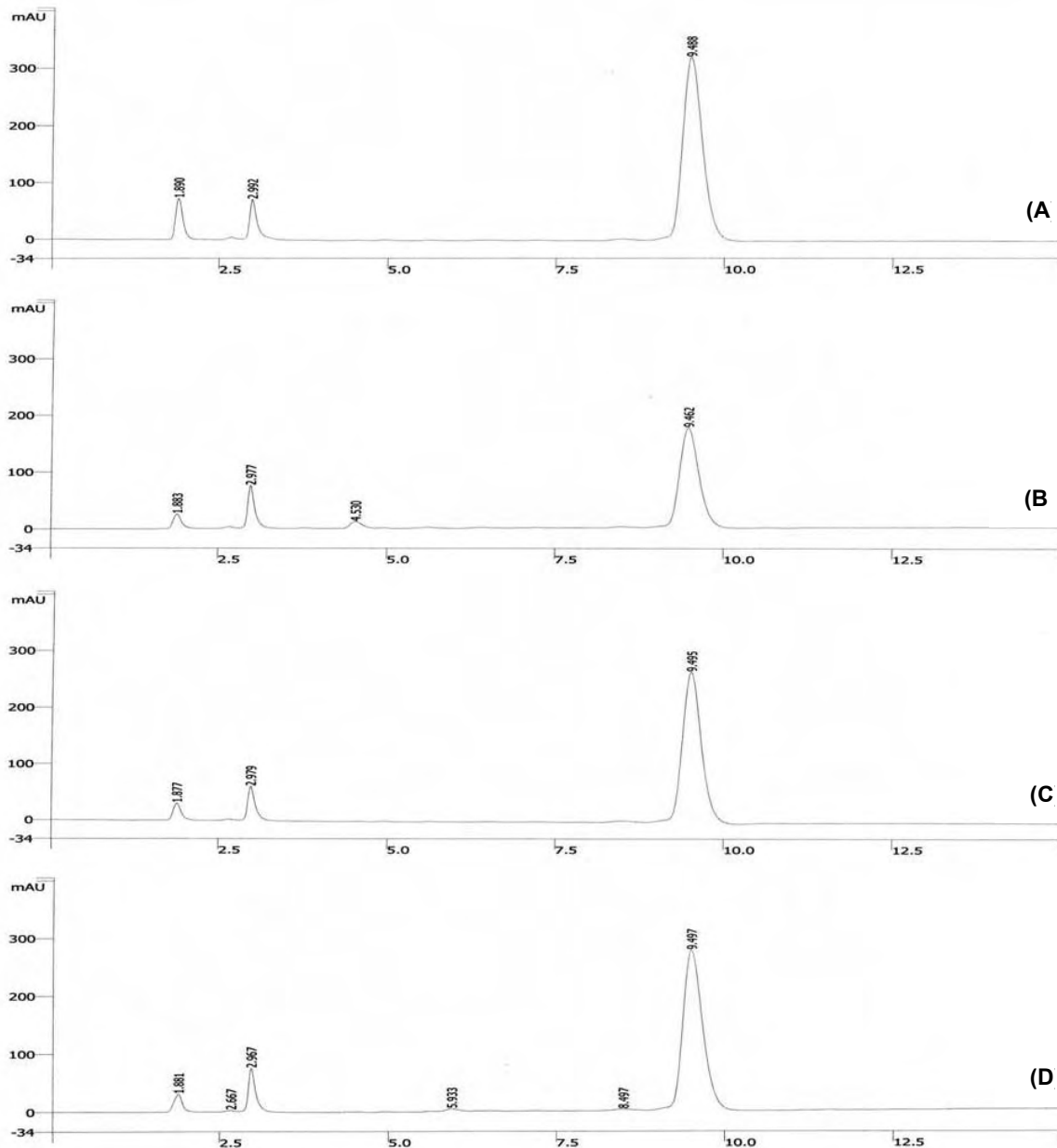
4. สารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 7 (ฟีนอลอะลานีน โพรลีน และ ลิวซีน)

4.2 เทคนิค High Performance Liquid Chromatography

นำสารสกัด *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 5 (ฟีนิลอะลานีน และ ลิวซีน) ภาวะที่ 6 (โพรลีน และ ลิวซีน) และภาวะที่ 7 (ฟีนิลอะลานีน โพรลีน และ ลิวซีน) มาวิเคราะห์โดยการโครมาโทกราฟีแบบชั้นบางและทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยทำการขูดจุดของสารสกัดที่ปรากฏขึ้นอยู่ในระดับเดียวกันกับออริโอบาซิดิน เอ บนแผ่น TLC มาละลายในตัวทำละลายอะซีโตไนไตร ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ด้วยเครื่อง HPLC ของบริษัท Varian รุ่น Prostar ประเทศสหรัฐอเมริกา เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานออริโอบาซิดิน เอ ที่มีความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เพื่อทำเป็นกราฟมาตรฐาน โดยใช้โครมาโทกราฟีแบบเฟสผันกลับ (reversed-phase chromatography) ใช้คอลัมน์ชนิด C18 ใช้ UV detector คอลัมน์ที่ใช้คือ คอลัมน์ Chrom Spher 5 C18 (4.6 × 250 มิลลิเมตร) ของบริษัท Varian ขนาดรูพรุน (pore size) 100 อังสตรอม ขนาด particle 5 ไมโครเมตร และใช้ UV detector ที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร โดยมีอะซีโตไนไตร และน้ำเป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราส่วน 7.5:2.5 ตามลำดับ อัตราการไหลเท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ปริมาณที่ใช้ในการฉีด 20 ไมโครลิตร พบว่าสารมาตรฐานออริโอบาซิดิน เอ ปรากฏ peak ขึ้นที่เวลา 9.453 ส่วนสารสกัดจากเชื้อ *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 5 (ฟีนิลอะลานีน และ ลิวซีน) ภาวะที่ 6 (โพรลีน และ ลิวซีน) และ ภาวะที่ 7 (ฟีนิลอะลานีน โพรลีน และ ลิวซีน) ปรากฏ peak ขึ้นที่เวลา 9.472, 9.548 และ 9.578 (รูปที่ 24) เนื่องจาก peak ของสารมาตรฐานออริโอบาซิดิน เอ กับสารสกัดที่ใช้วิเคราะห์ทั้ง 3 ภาวะ ปรากฏ peak ขึ้นในเวลาที่ไม่เท่ากันซึ่งอาจจะไม่เป็นสารชนิดเดียวกันจึงได้ทำการวิเคราะห์สารสกัดที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยเทคนิค HPLC อีกครั้งโดยการผสมสารสกัดกับสารมาตรฐานออริโอบาซิดิน เอ ในอัตราส่วน 2:1 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เพื่อตรวจสอบ peak กราฟของสารสกัดกับสารมาตรฐานว่าเป็นสารชนิดเดียวกันหรือไม่ จากการทดลองพบว่า peak กราฟของสารสกัดจากเชื้อ *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 5 (ฟีนิลอะลานีน และ ลิวซีน) ภาวะที่ 6 (โพรลีน และ ลิวซีน) และ ภาวะที่ 7 (ฟีนิลอะลานีน โพรลีน และ ลิวซีน) รวมเป็น peak เดียวกันกับสารมาตรฐานออริโอบาซิดิน เอ ที่เวลา 9.462, 9.497 และ 9.495 (รูปที่ 25)



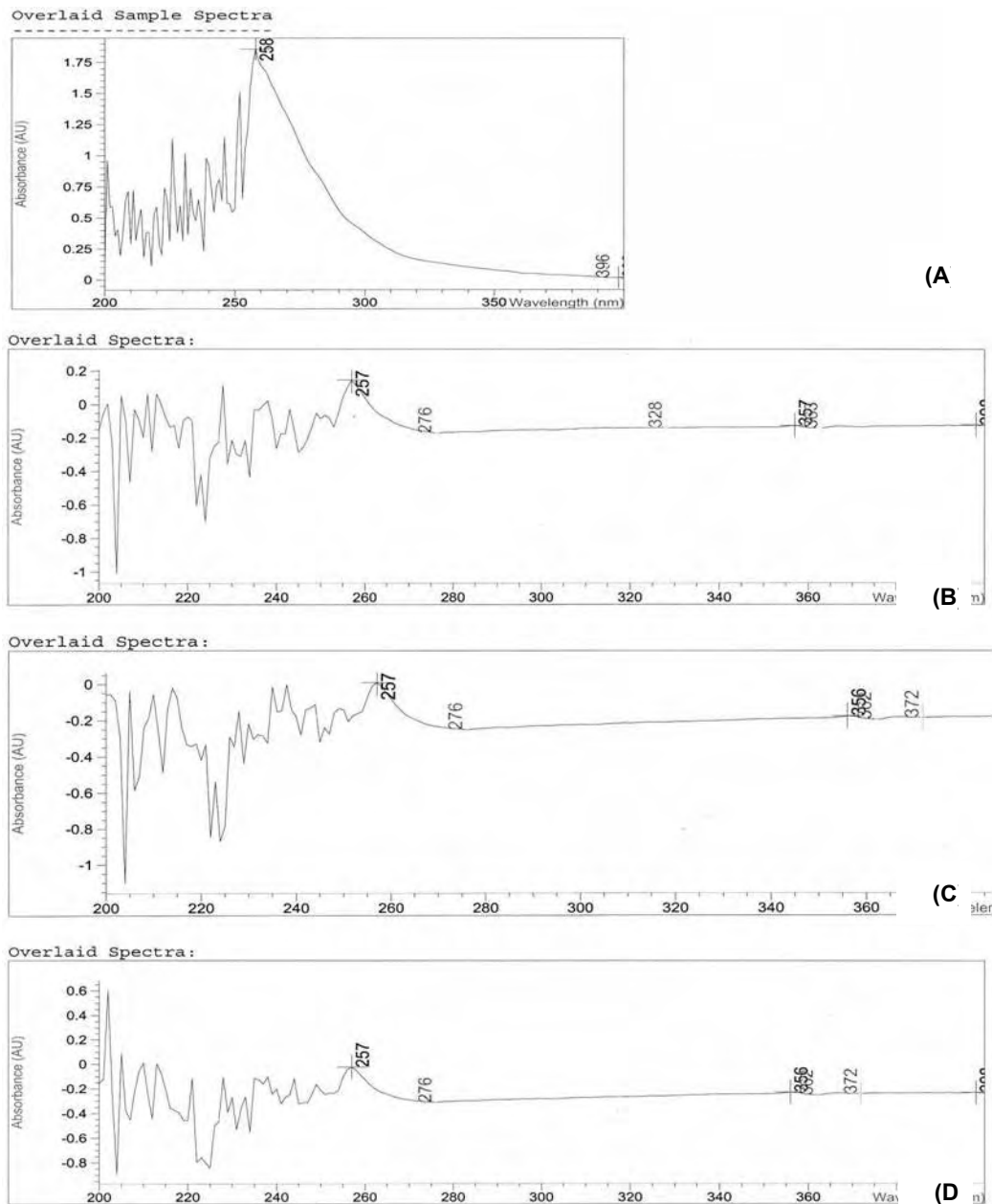
รูปที่ 24 กราฟจากการตรวจสอบด้วย HPLC ของออร์โอบาซิดิน เอ ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร (A) สารสกัด *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 5 (ฟีนอลอะลานีน และ ลิ่วซีน) (B) สารสกัด *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 6 (โพรลีน และ ลิ่วซีน) (C) สารสกัด *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 7 (ฟีนอลอะลานีน โพรลีน และ ลิ่วซีน) (D)



รูปที่ 25 กราฟจากการตรวจสอบด้วย HPLC ของออร์โอบาซิดิน เอ ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร (A) สารสกัด *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 5 (ฟีนอละลานีน และ ลิวซีน) ผสมสารมาตรฐานออร์โอบาซิดิน เอ ในอัตราส่วน 2:1 (B) สารสกัด *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 6 (โพรลีน และ ลิวซีน) ผสมสารมาตรฐานออร์โอบาซิดิน เอ ในอัตราส่วน 2:1 (C) สารสกัด *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 7 (ฟีนอละลานีน โพรลีน และ ลิวซีน) ผสมสารมาตรฐานออร์โอบาซิดิน เอ ในอัตราส่วน 2:1 (D)

4.3 เทคนิค Spectrophotometry สำหรับการวิเคราะห์โปรตีนเบื้องต้นในสารต้านเชื้อรา

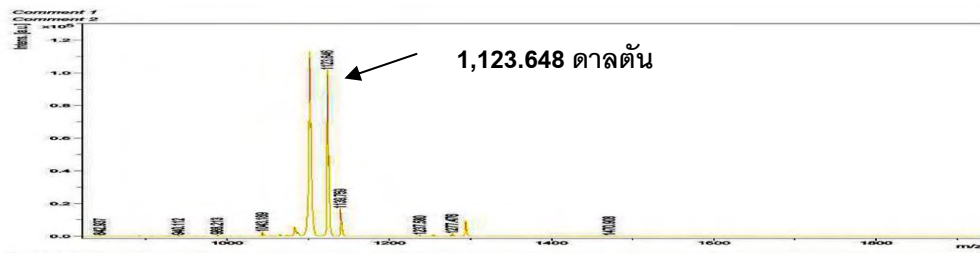
นำสารสกัด *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 5 (ฟีนิลอะลานีน และ ลิวซีน) ภาวะที่ 6 (โพรลีน และ ลิวซีน) และภาวะที่ 7 (ฟีนิลอะลานีน โพรลีน และ ลิวซีน) มาตรวจสอบโดยการทำให้โครมาโทกราฟีแบบชั้นบางและทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยการจุดจุดของสารสกัดที่ปรากฏขึ้นอยู่ในระดับเดียวกันกับออริโอบาซิดิน เอ บนแผ่น TLC มาละลายในตัวทำละลายเมทานอล ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำส่วนของของเหลวไปทำการวิเคราะห์โปรตีนเบื้องต้นโดยใช้ Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นช่วง 200-400 นาโนเมตร โดยทำการเปรียบเทียบสเปกตรัมค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดที่ได้กับสารมาตรฐานออริโอบาซิดิน เอ ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร พบว่าสารสกัดจากเชื้อ *A. pullulans* NRRL 58536 ทั้ง 3 ภาวะ มีค่าสเปกตรัมการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 257 นาโนเมตร ส่วนสารมาตรฐานออริโอบาซิดิน เอ มีค่าสเปกตรัมการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 258 นาโนเมตร (รูปที่ 26)



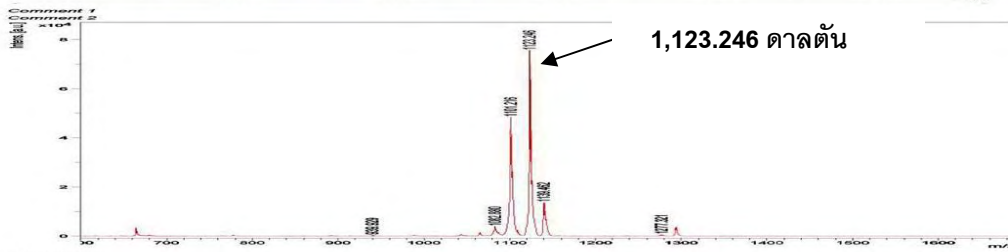
รูปที่ 26 สเปกตรัมค่าการดูดกลืนแสงจากการทดสอบด้วยเทคนิค Spectrophotometry ของ ออริโอบาซิดิน เอ ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร (A) สารสกัด *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 5 (ฟีนิลอะลานีน และ ลิ่วซีน) (B) สารสกัด *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 6 (โพรลีน และ ลิ่วซีน) (C) สารสกัด *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 7 (ฟีนิลอะลานีน โพรลีน และ ลิ่วซีน) (D)

4.4 เทคนิค MALDI-TOF Mass Spectrometry สำหรับการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสารต้านเชื้อรา

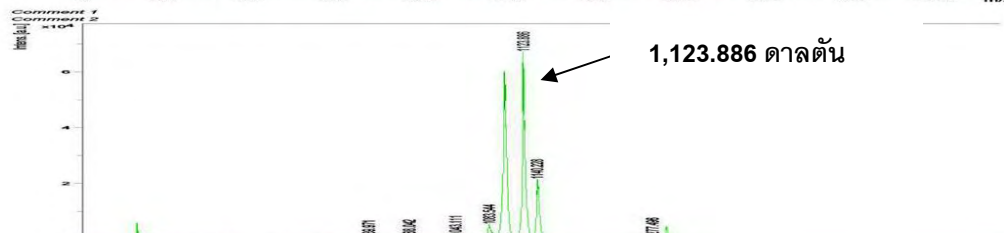
ผลการทดลองนำสารสกัด *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 5 (ฟีนิลอะลานีน และ ลิวซีน) ภาวะที่ 6 (โพรลีน และ ลิวซีน) และภาวะที่ 7 (ฟีนิลอะลานีน โพรลีน และ ลิวซีน) มาตรวจสอบโดยการโครมาโทกราฟีแบบชั้นบางและทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยทำการจุดจุดของสารสกัดที่ปรากฏขึ้นอยู่ในระดับเดียวกันกับออริโอบาซิดิน เอ บนแผ่น TLC มาละลายในตัวทำละลายอะซีโตไนไตร ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำส่วนของของเหลวไปทำการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลสารสกัด โดยในการวิเคราะห์จะใช้ 2, 5-dihydroxybenzoic acid (DHB) เป็น matrix ในอัตราส่วนของสารสกัด: DHB คือ 9:1 (v/v) และกำหนดให้เป็น linear positive mode ที่กำลังไฟฟ้า 20 กิโลโวลต์ จากนั้นทำการเปรียบเทียบสเปกตรัมน้ำหนักโมเลกุลของสารสกัดที่ได้กับสารมาตรฐานออริโอบาซิดิน เอ ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร พบว่าสารมาตรฐานออริโอบาซิดิน เอ มีน้ำหนักโมเลกุล 1,123.648 ดาลตัน ส่วนสารสกัดจากเชื้อ *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 5 (ฟีนิลอะลานีน และ ลิวซีน) ภาวะที่ 6 (โพรลีน และ ลิวซีน) และภาวะที่ 7 (ฟีนิลอะลานีน โพรลีน และ ลิวซีน) มีผลของสเปกตรัมน้ำหนักโมเลกุล 1,123.246, 1,123.886 และ 1,123.551 ดาลตัน (รูปที่ 27)



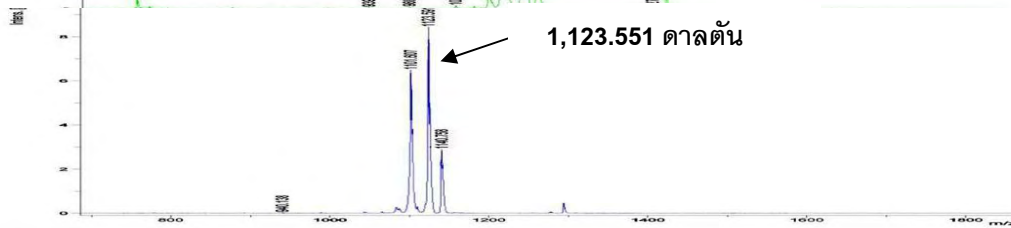
(A)



(B)



(C)



(D)

รูปที่ 27 MALDI-TOF สเปกตรัมของ ออริโอบาซิดิน เอ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร (A) สารสกัด *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 5 (ฟีนิลอะลานีน และ ลิวซีน) (B) สารสกัด *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 6 (โพรลีน และ ลิวซีน) (C) สารสกัด *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 7 (ฟีนิลอะลานีน โพรลีน และ ลิวซีน) (D)

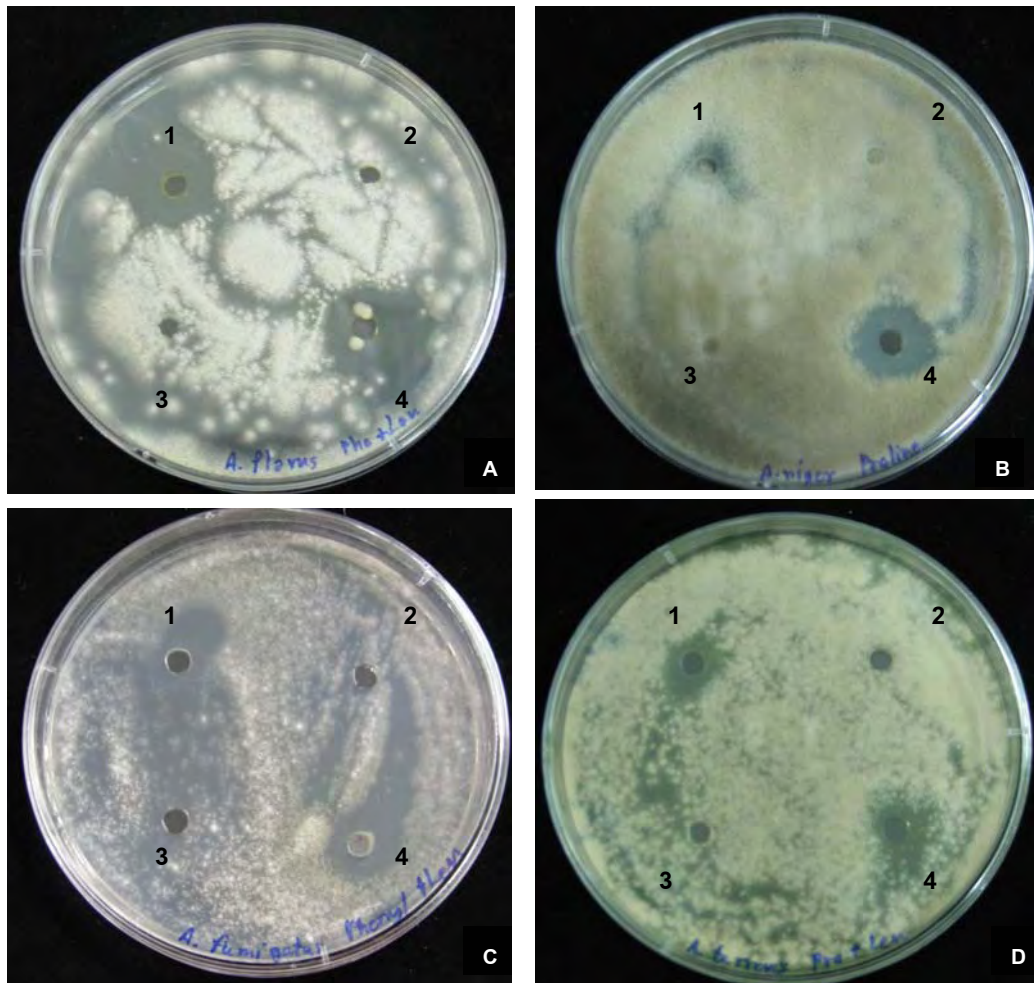
5. ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพสารต้านเชื้อราที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

5.1 วิธี Well diffusion

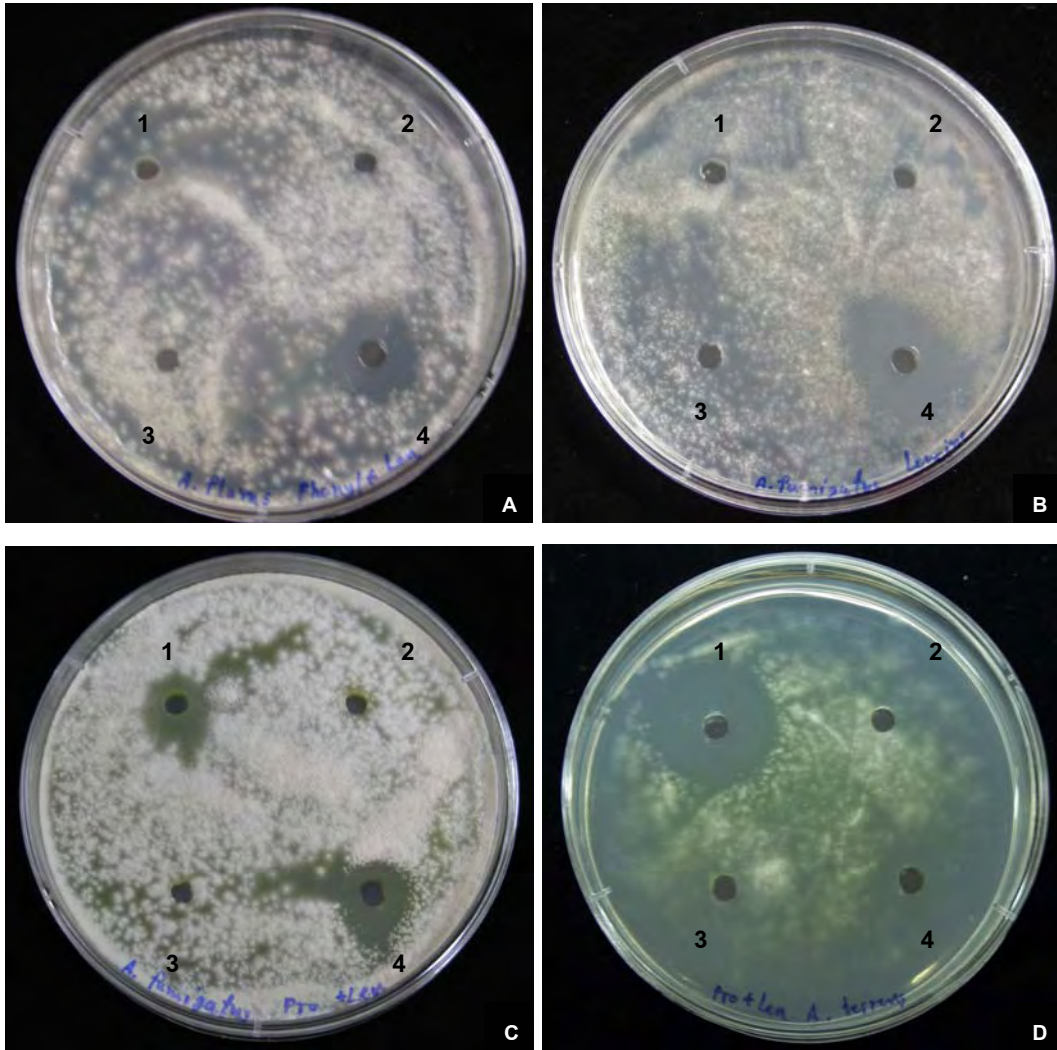
นำสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 5 (ฟีนิลอะลานีน และ ลิวซีน) ภาวะที่ 6 (โพรีลีน และ ลิวซีน) และภาวะที่ 7 (ฟีนิลอะลานีน โพรีลีน และ ลิวซีน) ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบางมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อราก่อโรคในกลุ่ม *Aspergillus* spp. อีกครั้ง ด้วยวิธี Well diffusion บนจานเลี้ยงเชื้อที่เคลือบด้วยสปอร์ของ *Aspergillus* spp. สังเกตบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้นและคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ได้ผลดังตารางที่ 8 โดยพบว่าสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 5 (ฟีนิลอะลานีน และ ลิวซีน) มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *A. flavus* ได้สูงสุด ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 183.00 ± 0.02 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 28) ส่วนสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 6 (โพรีลีน และ ลิวซีน) พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *A. terreus* ได้สูงสุด ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 168.00 ± 0.06 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 29) ขณะที่สารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 7 (ฟีนิลอะลานีน โพรีลีน และ ลิวซีน) มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *A. niger* และ *A. fumigatus* ได้สูงสุด ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 191.00 ± 0.24 และ 190.00 ± 0.05 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (รูปที่ 30)

ตารางที่ 8 ความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus* spp. ของสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน โดยวิธี Well diffusion

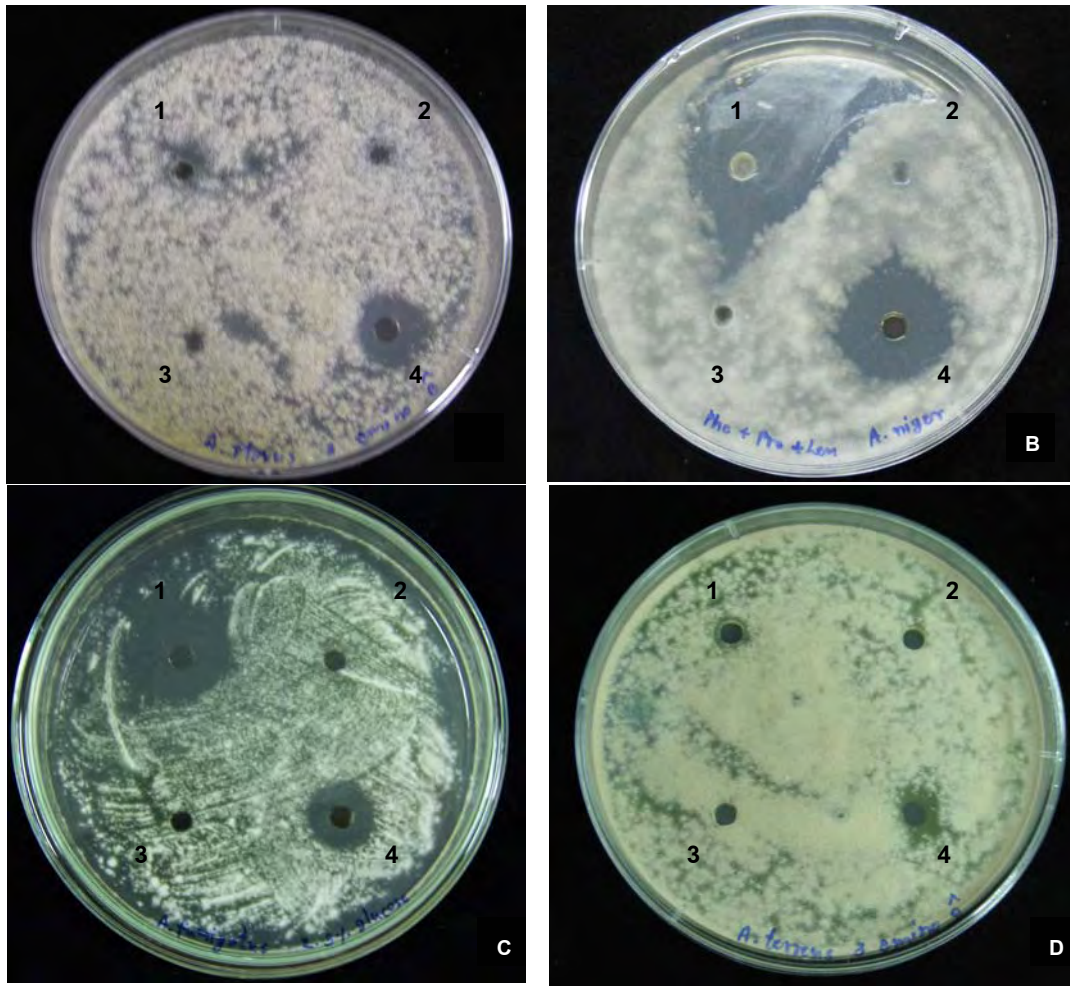
เชื้อรา <i>Aspergillus</i> spp.	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (% inhibition) จากสารสกัดที่ทำบริสุทธิ์บางส่วน (%)		
	ฟีนอลอะลานีน และลิวซีน	โพรลีน และลิวซีน	ฟีนอลอะลานีน โพรลีน และลิวซีน
<i>A. flavus</i>	183.00±0.02	99.00±0.01	105.00±0.04
<i>A. niger</i>	105.00±0.07	20.00±0.01	191.00±0.24
<i>A. fumigatus</i>	173.00±0.03	157.00±0.01	190.00±0.05
<i>A. terreus</i>	54.00±0.02	168.00±0.06	28.00±0.01



รูปที่ 28 ความสามารถในการยับยั้ง *A. flavus* (A) *A. niger* (B) *A. fumigatus* (C) และ *A. terreus* (D) ของสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 5 (ฟีนอลอะลานีน และ ลิวซีน) ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน โดย หมายเลข 1 คือ สารสกัด หมายเลข 2 คือ สาร DMSO หมายเลข 3 คือ ไม่หยดสารสกัด และ หมายเลข 4 คือ แอมโฟเทอริซิน บี ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร



รูปที่ 29 ความสามารถในการยับยั้ง *A. flavus* (A) *A. niger* (B) *A. fumigatus* (C) และ *A. terreus* (D) ของสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 6 (โพรลีน และ ลิวซีน) ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน โดย หมายเลข 1 คือ สารสกัด หมายเลข 2 คือ สาร DMSO หมายเลข 3 คือ ไม่หยดสารสกัด และ หมายเลข 4 คือ แอมโฟเทอริซิน บี ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร



รูปที่ 30 ความสามารถในการยับยั้ง *A. flavus* (A) *A. niger* (B) *A. fumigatus* (C) และ *A. terreus* (D) ของสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 7 (ฟีนอลอะลานีน โพรลีน และ ลิวซีน) ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน โดย หมายเลข 1 คือ สารสกัด หมายเลข 2 คือ สาร DMSO หมายเลข 3 คือ ไม่หยดสารสกัด และ หมายเลข 4 คือ แอมโฟเทอริซิน บี ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

5.2 วิธี Conidial germination inhibition assay

นำสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 5 (ฟีนิลอะลานีน และ ลิวซีน) ภาวะที่ 6 (โพรสลิน และ ลิวซีน) และภาวะที่ 7 (ฟีนิลอะลานีน โพรสลิน และ ลิวซีน) ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบางมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อราก่อโรคในกลุ่ม *Aspergillus* spp. อีกครั้ง โดยคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์ โดยเทียบกับชุดควบคุม พบว่าสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 5 (ฟีนิลอะลานีน และ ลิวซีน) ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *A. flavus* ได้สูงสุด 77.88 ± 0.09 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 6 (โพรสลิน และ ลิวซีน) ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *A. terreus* ได้สูงสุด 71.91 ± 0.07 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่สารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 7 (ฟีนิลอะลานีน โพรสลิน และ ลิวซีน) ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *A. niger* และ *A. fumigatus* ได้สูงสุด 77.00 ± 0.20 และ 79.17 ± 0.24 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 9)

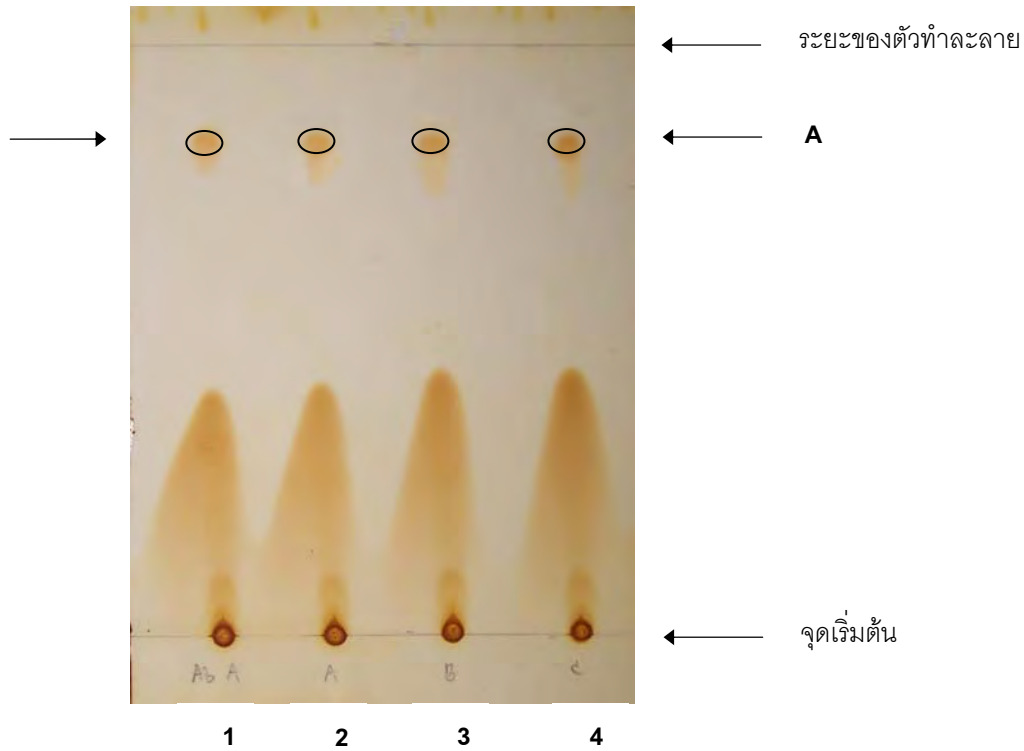
ตารางที่ 9 เปอร์เซ็นต์การงอกและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์ *Aspergillus* spp. ที่ถูกบ่มร่วมกับสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโน ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

กรดอะมิโนที่ใช้ในการผลิตสารสกัดที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน	เชื้อรา <i>Aspergillus</i> spp.	เปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ (%) (% germination)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์ (%) (% inhibition)
ฟีนิลอะลานีน และลิวซีน	<i>A. flavus</i>	22.11±0.09	77.88±0.09
	<i>A. niger</i>	41.17±0.12	58.83±0.12
	<i>A. fumigatus</i>	24.25±0.18	75.75±0.18
	<i>A. terreus</i>	69.17±0.13	30.83±0.13
โพรลีน และลิวซีน	<i>A. flavus</i>	42.00±0.16	58.00±0.16
	<i>A. niger</i>	76.50±0.14	23.50±0.14
	<i>A. fumigatus</i>	32.20±0.16	67.80±0.16
	<i>A. terreus</i>	28.09±0.07	71.91±0.07
ฟีนิลอะลานีน โพรลีน และลิวซีน	<i>A. flavus</i>	42.07±0.09	57.93±0.09
	<i>A. niger</i>	23.00±0.20	77.00±0.20
	<i>A. fumigatus</i>	20.83±0.24	79.17±0.24
	<i>A. terreus</i>	75.17±0.13	24.83±0.13

หมายเหตุ ชุดควบคุม คือ จำนวนสปอร์ที่ขึ้นบนจานอาหาร ภายหลังจากบ่มสารละลาย DMSO ร่วมกับสปอร์แขวนลอยของ *Aspergillus* spp. โดยจำนวนสปอร์ที่ขึ้นบนจานอาหารชุดควบคุมเทียบเป็น 100 เปอร์เซ็นต์

5.3 ทำการตรวจสอบสารสกัดด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (Thin layer chromatography)

นำสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 5 (ฟีนิลอะลานีน และ ลิวซีน) ภาวะที่ 6 (โพรลีน และ ลิวซีน) และภาวะที่ 7 (ฟีนิลอะลานีน โพรลีน และ ลิวซีน) ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบางมาตรวจสอบสารสกัดอีกครั้ง โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ออร์โอบาซิดิน เอ โดยใช้ระบบตัวทำละลายคือเอธิลอะซิเตต พบว่าสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนทั้ง 3 ภาวะประกอบด้วยสารที่มีค่า Rf ภาวะละ 1 ชนิด (รูปที่ 31) แต่ละภาวะมีค่า Rf เท่ากับ 0.68 (ตำแหน่ง A) ส่วนออร์โอบาซิดินเอมาตรฐาน มีค่า Rf เท่ากับ 0.68 (ตำแหน่ง B) (รูปที่ 31)



รูปที่ 31 โครมาโทแกรมแสดงผลการตรวจสอบสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา ที่ได้จากเชื้อรา

A. pullulans NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโน ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน ด้วยเทคนิค TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลายคือ เอธิลอะซิเตต

1. สารมาตรฐาน ออร์โอบาซิดิน เอ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
2. สารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 5 (ฟีนอลอะลานีน และ ลิวซีน)
3. สารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 6 (โพรลีน และ ลิวซีน)
4. สารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 7 (ฟีนอลอะลานีน โพรลีน และ ลิวซีน)

6. วิเคราะห์โครงสร้างสารต้านเชื้อราที่ผลิตได้

6.1 ทำการวิเคราะห์โครงสร้างสารต้านเชื้อราที่ผลิตได้ด้วยวิธี $^1\text{H-Nuclear Magnetic Resonance}$ ($^1\text{H-NMR}$)

นำสารสกัด *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 5 (ฟีนอลอะลานีน และ ลิวซีน) ภาวะที่ 6 (โพรลีน และ ลิวซีน) และภาวะที่ 7 (ฟีนอลอะลานีน โพรลีน และ ลิวซีน) มาตรวจสอบโดยการโครมาโทกราฟีแบบชั้นบางและทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยทำการจุดจุดของสารสกัดที่ปรากฏขึ้นอยู่ในระดับเดียวกันกับออริโอบาซิดิน เอ บนแผ่น TLC มาละลายในตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำส่วนของของเหลวไปทำการวิเคราะห์หาโครงสร้างสารสกัด โดยใช้วิธี $^1\text{H-NMR}$ ซึ่งนิวคลีไอที่ใช้ในสนามแม่เหล็กคือ โปรตอน (Proton) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ในช่วงความยาวคลื่นวิทยุ 500 เมกะเฮิรท์ซ จากนั้นทำการเปรียบเทียบสเปกตรัมของสารสกัดที่ได้กับสารมาตรฐานออริโอบาซิดิน เอ ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร พบว่าสารสกัดจากเชื้อ *A. pullulans* NRRL 58536 ทั้ง 3 ภาวะ มีผลของสเปกตรัมสอดคล้องกับสารมาตรฐานออริโอบาซิดิน เอ (รูปที่ 32)

6. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง และข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา *A. pullulans*

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเชื้อรา *A. pullulans* ทั้ง 10 สายพันธุ์พบว่าเซลล์มีรูปร่างหลายรูปแบบ ได้แก่ บลาสโตสปอร์ โคนิเดียปฐมภูมิ โคนิเดียทุติยภูมิ หรือ budding cell เซลล์พอง คลาไมโดสปอร์ เส้นใย และเส้นใยเทียม เป็นต้น โดยลักษณะของบลาสโตสปอร์โปร่งใส รูปร่างค่อนข้างกลมถึงรี มีขนาดแตกต่างกัน มี budding cell แยกออกจากบลาสโตสปอร์ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลานานขึ้นเซลล์จะมีขนาดใหญ่ และมีผนังหนาขึ้น เรียกว่าเซลล์พอง (swollen cell) โดยในบางสายพันธุ์อาจมีสีเข้มขึ้นเนื่องจากการสร้างเม็ดสีเมลานิน เรียกว่าคลาไมโดสปอร์ เส้นใยมีลักษณะโปร่งใส เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลานานจะเปลี่ยนเป็นสีเข้มขึ้นจากการสร้างเม็ดสีเมลานิน และมีผนังหนาขึ้น บางครั้งมีเอนโดโคนิเดียเกิดขึ้นจากภายใน ด้านข้าง หรือปลายของเส้นใย ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่อธิบายโดย Hermandes-nijhof (1977) และ Domsch และคณะ (1993)

2. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเชื้อรา

2.1 วิธี Well diffusion

จากการนำสารที่สกัดได้จากเชื้อราทั้ง 10 สายพันธุ์ มาทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อราก่อโรคในกลุ่ม *Aspergillus* spp. พบว่า *A. pullulans* NRRL 58536 ออกฤทธิ์สูงสุดในการต้านเชื้อราก่อโรคที่นำมาทดสอบทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *A. flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus* และ *A. terreus* โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 50.00 ± 0.00 , 50.00 ± 0.00 , 20.00 ± 0.00 และ 45.00 ± 0.05 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งได้เคยมีรายงานว่า สารต้านเชื้อรา ออริโอบาซิดิน เอ ที่ผลิตได้จากเชื้อรา *A. pullulans* สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคกลุ่ม *Candida* spp. และกลุ่มอื่นๆ ได้แล้ว ยังสามารถยับยั้งเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* spp. บางสายพันธุ์ได้ดี เช่น *A. terreus*, *A. nidulans* และ *A. clavatus* เป็นต้น แต่พบว่าไม่มีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ยับยั้งได้ไม่ติดต่อเชื้อรา *A. fumigatus*, *A. flavus* และ *A. niger* (Takesako และคณะ, 1993) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสารสกัดจากเชื้อรา *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อนที่คัดแยกได้จากประเทศไทยสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *A. fumigatus*, *A. flavus* และ *A. terreus* ได้ (Lotrakul และคณะ, 2009)

ซึ่งการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยวิธีนี้เป็นวิธีที่นิยมใช้ทดสอบสารต้านจุลชีพ โดยเฉพาะกับสารที่มีปริมาณน้อย โดยเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งจะสัมพันธ์กับปริมาณสารที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลชีพ (Gaydos และ Harrington, 1982) แต่เนื่องด้วยจากการทดลองสารที่สกัดได้จาก *A. pullulans* ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรานั้นยังเป็นสารสกัดหยาบ และยังมีปริมาณสารอื่นเจือปนอยู่หลายชนิด ดังนั้นหากต้องการให้สารสกัดมีฤทธิ์การยับยั้งที่ดีขึ้นจึงควรทำให้สารสกัดนั้นมีความบริสุทธิ์มากขึ้น

2.2 วิธี Conidial germination inhibition assay

จากการนำสารที่สกัดได้จาก *A. pullulans* ทั้ง 10 สายพันธุ์ มาทดสอบความสามารถในการต้านเชื้อรา โดยคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์ พบว่าสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 มีฤทธิ์สูงสุดในการยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *A. flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus* และ *A. terreus* ได้ 43.96 ± 0.06 , 40.83 ± 0.12 , 33.93 ± 0.10 และ 39.89 ± 0.09 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

จากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus* spp. ทั้ง 4 สายพันธุ์ด้วยวิธี Well diffusion นั้นคือสายพันธุ์เดียวกันกับที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *Aspergillus* spp. ด้วย ซึ่งเชื้อราในกลุ่ม *Aspergilli* เป็นเชื้อราฉวยโอกาสที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ (opportunistic fungi) สามารถก่อโรคในคนหรือสัตว์ที่มีความผิดปกติของภูมิคุ้มกัน โรคที่เกิดขึ้นเรียกว่า Aspergillosis อาการของโรคมิตั้งแต่เล็กน้อยจนถึงเป็นสาเหตุให้ผู้ป่วยเสียชีวิต ส่วนใหญ่ทำให้เกิดการติดเชื้อในร่างกายได้หลายระบบ ได้แก่ หู ตา จมูก และ

ปอด การติดเชื้อราในบางคนเชื้อจะลุกลามไปยังกระดูก สมอง เยื่อหุ้มสมอง ระบบประสาท หรือเกิดเนื้อตายเนื่องมาจากการติดเชื้อที่อวัยวะภายในต่างๆ (Schett และคณะ, 1998) เชื้อราในสกุลนี้ที่ก่อโรครุนแรงได้แก่ *A. fumigatus* *A. flavus* *A. niger* และ *A. terreus* (พรรณกร อิมวิทยา, 2538)

จากฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus* spp. ทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้ดีนั้นจึงน่าจะมีการศึกษาต่อไปในแง่ของการทำเป็นยาต้านเชื้อราต่อไปในอนาคต

3. ศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารต้านเชื้อรา

3.1 ศึกษาหาช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารต้านเชื้อราโดยใช้

เทคนิค Spectrophotometry

จากการทดลองนำเชื้อรา *A. pullulans* NRRL 58536 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราก่อโรคกลุ่ม *Aspergillus* spp. ได้สูงสุด จึงนำมาศึกษาหาช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารต้านเชื้อรา โดยในการทดลองเป็นการเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบ Fed batch คือเป็นการเติมอาหารเข้าไปเพิ่มโดยไม่มีการถ่ายอาหารที่เพาะเลี้ยงเชื้อแล้วออกมา ซึ่งมีข้อดีคือ ทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโตเป็นจำนวนมาก และทำให้ได้มวลของเซลล์ในปริมาณสูง (สมใจ ศิริโชค, 2547) พบว่าในช่วงเวลา 0-6 ชั่วโมง (lag phase) เป็นช่วงการปรับตัวของเซลล์กล้าเชื้อที่เติมลงไปในการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงจำนวนของเซลล์จะเป็นศูนย์ในช่วงระยะเวลาหนึ่ง แสดงถึงการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่ และเกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์เอนไซม์ที่จำเป็นสำหรับการเจริญในสภาวะแวดล้อมนี้ จากนั้นในช่วงเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตสูงสุดซึ่งวัดค่าความขุ่นของเซลล์ได้ 17.37 ± 0.01 และนับจำนวนเซลล์ได้ $12.40 \pm 0.03 \times 10^8$ เซลล์/มิลลิลิตร จึงจัดเซลล์อยู่ในช่วงเอกซโปเนนเชียล (exponential หรือ log phase) เป็นช่วงที่มีสมดุของการเจริญการสังเคราะห์สารที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์เพิ่มขึ้นด้วยอัตราที่คงที่ ดังนั้นเซลล์จึงแบ่งตัวประชากรเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า ในช่วงเวลาคงที่ ช่วงเวลาหลังจากชั่วโมงที่ 24 พบว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตลดลง เมื่อครบเวลา 56 ชั่วโมง ได้ทำการเติมอาหารสูตร Production II ปริมาตร 1/5 ของอาหารสูตร Production I ลงไป และทำการเลี้ยงต่ออีก 78 ชั่วโมง พบว่าที่เวลา 96 ชั่วโมง เซลล์มีการเจริญเติบโตสูงขึ้นแต่ต่ำกว่าในช่วงเวลาที่ 24 ชั่วโมงซึ่งวัดค่าความขุ่นของเซลล์ได้ 7.50 ± 0.02 และนับจำนวนเซลล์ได้ $3.65 \pm 0.01 \times 10^8$ เซลล์/มิลลิลิตร เนื่องจากเซลล์บางส่วนเข้าสู่ช่วงการเจริญลดลง (decline phase) ในช่วงนี้อัตราการตายของเซลล์มีค่ามากกว่าอัตราการเจริญ ซึ่งทำให้ความหนาแน่นของเซลล์ลดลง จากนั้นทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ที่เวลา 134 ชั่วโมง เนื่องจากเมื่อเซลล์เข้าสู่ช่วงนี้สารอาหารที่จำเป็นถูกใช้หมดไป หรือเกิดการสะสมของสารพิษอยู่ภายในเซลล์เรียกว่าสารประกอบทุติยภูมิ (secondary metabolite) ซึ่งเป็นสารที่เชื้อราสร้างขึ้นมาเพื่อตอบสนองต่อความจำเป็นบางประการ เช่น เพื่อป้องกันตนเองจากเชื้อราชนิดอื่น เป็นต้น (เพ็ญแข วันไชยธนวงศ์, 2544)

3.2 ศึกษาชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน

จากการทดลองนำเชื้อรา *A. pullulans* NRRL 58536 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราก่อโรคกลุ่ม *Aspergillus* spp. ได้สูงสุด จึงนำมาทำการศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารต้านเชื้อราจากแหล่งคาร์บอน 2 ชนิด คือ กลูโคส และ ซูโครส ที่มีความเข้มข้น 1.5 2.0 และ 2.5% (w/v) พบว่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งจากสารสกัด *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งคาร์บอนกลูโคสความเข้มข้น 2.5% (w/v) มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราก่อโรคในกลุ่ม *Aspergillus* spp. ทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *A. flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus* และ *A. terreus* ได้สูงสุด ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 75.00 ± 0.00 , 60.00 ± 0.05 , 60.00 ± 0.00 และ 50.00 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อทำการทดสอบความสามารถในการต้านเชื้อราโดยคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การออกของสปอร์ และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการออกของสปอร์ พบว่าสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 สามารถยับยั้งการเจริญของสปอร์ของ *A. flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus* และ *A. terreus* ได้ 54.94 ± 0.08 , 52.89 ± 0.08 , 50.89 ± 0.00 และ 33.94 ± 0.08 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งได้สอดคล้องกับรายงานผลการทดลองเกี่ยวกับการใช้แหล่งคาร์บอนกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าการสังเคราะห์เอนไซม์ Phenoxazinone และยาปฏิชีวนะ Actinomycin

ได้ปริมาณสูงขึ้นเนื่องจากกลูโคสไปมีผลต่อการเพิ่มอัตราการเจริญของเชื้อซึ่งจะไปมีผลต่อการเพิ่มการผลิตสารประกอบทุติยภูมิ (Gallo และ Katz, 1993)

โดยธรรมชาติเซลล์ของสิ่งมีชีวิตรวมถึงจุลินทรีย์ต้องการสารอาหารบางอย่างสำหรับการเจริญเติบโตสารอาหารเหล่านี้จะต้องมีธาตุซึ่งเป็นส่วนประกอบและโครงสร้างของเซลล์ โดยธาตุเหล่านี้มีความจำเป็นต่อกระบวนการสังเคราะห์ ซึ่งองค์ประกอบหลักของจุลินทรีย์คือ คาร์บอน จุลินทรีย์ที่ได้พลังงานจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารอินทรีย์ในปริมาณที่มากพอจะเป็นแหล่งพลังงานที่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ (เพ็ญแข วันไชยชนวงศ์, 2544)

3.3 ศึกษาการใช้แหล่งอาหารเสริม

จากการศึกษาชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน พบว่าสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งคาร์บอนกลูโคสความเข้มข้น 2.5% (w/v) มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* spp. ทั้ง 4 สายพันธุ์ได้สูงสุด เมื่อนำมาศึกษาการใช้แหล่งอาหารเสริมจำพวกกรดอะมิโน ได้แก่ ฟีนิลอะลานีน โพรลีน และ ลิวซีน โดยจัดแบ่งกรดอะมิโน ออกเป็น 7 ภาวะ ได้แก่ (1) ฟีนิลอะลานีน (2) โพรลีน (3) ลิวซีน (4) ฟีนิลอะลานีน และ โพรลีน (5) ฟีนิลอะลานีน และ ลิวซีน (6) โพรลีน และ ลิวซีน (7) ฟีนิลอะลานีน โพรลีน และ ลิวซีน ตามลำดับ โดยทำการเลี้ยงเชื้อ *A. pullulans* NRRL 58536 ในอาหารสูตร Production I ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 2.5% (w/v) และทำการเลี้ยงเชื้อต่อในอาหารสูตร Production II ที่มีกรดอะมิโนในแต่ละภาวะที่ความเข้มข้น 0.01% (w/v) พบว่าสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 5 (ฟีนิลอะลานีน และ ลิวซีน) มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *A. flavus* ได้สูงสุด ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 175.00 ± 0.05 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 6 (โพรลีน และ ลิวซีน) พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *A. terreus* ได้สูงสุด ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 120.00 ± 0.01 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่สารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 7 (ฟีนิลอะลานีน โพรลีน และ ลิวซีน) มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *A. niger* และ *A. fumigatus* ได้สูงสุด ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 146.00 ± 0.08 และ 170.00 ± 0.06 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และเมื่อทำการทดสอบความสามารถในการต้านเชื้อรา โดยคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์ พบว่าสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 5 (ฟีนิลอะลานีน และ ลิวซีน) สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *A. flavus* ได้สูงสุด 74.87 ± 0.10 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 6 (โพรลีน และ ลิวซีน) สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *A. terreus* ได้สูงสุด 65.89 ± 0.08 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่สารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 7 (ฟีนิลอะลานีน โพรลีน และ ลิวซีน) สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *A. niger* และ *A. fumigatus* ได้สูงสุด 69.91 ± 0.06 และ 77.96 ± 0.06 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และได้เคยมีรายงานผลการทดลองเกี่ยวกับการใช้กรดอะมิโนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสารต้านเชื้อรา ทำการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งด้วยเชื้อรา *Candida albicans* พบว่าสารต้านเชื้อราดังกล่าวสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งได้ (Mittendorf และคณะ, 2002)

จุลินทรีย์บางชนิดต้องการไนโตรเจนในสารอินทรีย์ เช่น กรดอะมิโน โดยแหล่งของไนโตรเจนได้แก่ ถั่วเหลือง ถั่วลิสง ปลา เนื้อสัตว์ ยีสต์สกัด เป็นต้น ซึ่งไนโตรเจนจัดเป็นองค์ประกอบของเซลล์ร้อยละ 10 ของน้ำหนักเซลล์ ดังนั้นในอาหารเลี้ยงเชื้อควรมีปริมาณไนโตรเจนที่เพียงพอสำหรับเซลล์ที่ต้องการ (เพ็ญแข วันไชยชนวงศ์, 2544) และนอกจากนี้ได้มีรายงานว่าออริโอบาซิดิน เป็นสารกลุ่มเดปซิเปปไทด์แบบวงแหวน (cyclic depsipeptide) ประกอบด้วยกรดแอสพาร์ตอิล 8 ชนิด และกรดไฮดรอกซิล 1 ชนิด ออริโอบาซิดิน มีโครงสร้าง 18 ชนิด และมีโครงสร้างของกรดอะมิโนที่เป็นโครงสร้างหลักในทุกโครงสร้าง 3 ชนิด คือ ฟีนิลอะลานีน โพรลีน และ ลิวซีน (Takesako และคณะ, 1993) ดังนั้นกรดอะมิโนทั้ง 3 ชนิดน่าจะมีบทบาทในการชักนำให้เซลล์ผลิตสารต้านเชื้อราได้ประสิทธิภาพดีขึ้น

4. ทำปฏิกิริยาบางส่วนของสารต้านเชื้อรา

4.1 เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (Thin layer chromatography)

จากการศึกษาชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอนรวมถึงศึกษาการใช้แหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนในการผลิตสารต้านเชื้อรา พบว่าสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 5 (ฟีนิลอะลานีน และ ลิวซีน) มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *A. flavus* ได้สูงสุด ส่วนสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 6 (โพรลีน และ ลิวซีน) มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *A. terreus* ได้สูงสุด ขณะที่สารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 7 (ฟีนิลอะลานีน โพรลีน และ ลิวซีน) มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *A. niger* และ *A. fumigatus* ได้สูงสุด จึงนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง เทียบกับสารมาตรฐาน ออริโอบาซิดิน เอ โดยใช้ระบบตัวทำละลายคือเอทิลอะซิเตต พบว่าสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 5 (ฟีนิลอะลานีน และ ลิวซีน) ภาวะที่ 6 (โพรลีน และ ลิวซีน) และภาวะที่ 7 (ฟีนิลอะลานีน โพรลีน และ ลิวซีน) ประกอบด้วยสารที่มีค่า Rf แตกต่างกัน 3 ชนิด แต่ละชนิด มีค่า Rf เท่ากับ 0.45 (ตำแหน่ง C) 0.59 (ตำแหน่ง B) และ 0.68 (ตำแหน่ง A) ตามลำดับ ส่วนออริโอบาซิดินเอ มาตรฐาน มีค่า Rf เท่ากับ 0.68 (ตำแหน่ง D)

ในการแยกสารด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง เป็นโครมาโทกราฟีแบบดูดซับ ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ในการแยกสาร การทำให้สารบริสุทธิ์ หรือใช้ระบุชนิดของสารและจำนวนสารที่เป็นองค์ประกอบในของผสม โดยอาศัยหลักการที่สารต่างชนิดกันจะกระจายตัวอยู่ในเฟสคงที่และเฟสเคลื่อนที่ได้ไม่เท่ากัน การที่สารในของผสมแยกออกจากกันได้เนื่องจากสารแต่ละตัวจะถูกดูดซับไว้ไม่เท่ากัน สารที่ถูกดูดซับไว้มากย่อมเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าสารที่ถูกดูดซับได้น้อย ซึ่งจากหลักการนี้ทำให้สามารถแยกสารที่มีสภาพขั้วต่างกันออกจากกันได้ ในการทดลองนี้เลือกใช้แผ่นโครมาโทกราฟีที่มีตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจล ซึ่งใช้ได้กับสารเกือบทุกชนิด และเนื่องจาก ออริโอบาซิดิน เอ เป็นสารประเภทพอลิเปปไทด์ ที่มีสภาพขั้วค่อนข้างสูงสามารถละลายได้ดีใน เอทานอล เมทานอล คลอโรฟอร์ม และเอทิลอะซิเตต เป็นต้น (Takesako และคณะ, 1991) จึงได้เลือกใช้เอทิลอะซิเตตซึ่งเป็นตัวทำละลายที่สามารถทำละลาย ออริโอบาซิดิน เอ และพาสารถให้เคลื่อนที่บนแผ่น TLC ได้ค่อนข้างเหมาะสมกว่าเอทานอลและเมทานอลที่มีสภาพขั้วค่อนข้างสูงเกินไป หรือ คลอโรฟอร์มซึ่งมีสภาพขั้วต่ำเกินไป สำหรับการแยก ออริโอบาซิดิน เอ และสารสกัดที่ได้ ซึ่งจะทำให้ผลการแยกสารได้ไม่ดีเท่าที่ควร

ดังนั้นจากรูปแบบของการแยกสารบนแผ่น TLC สารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราที่ใช้ทดสอบนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าเป็นออริโอบาซิดิน เอ เนื่องจากสภาพความมีขั้วค่อนข้างใกล้เคียงกัน สังเกตได้จากการแยกสารได้ ณ ตำแหน่งที่มีค่า Rf เท่ากันบนแผ่น TLC

4.2 เทคนิค High Performance Liquid Chromatography

ผลจากการทดลองนำสารสกัด *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 5 (ฟีนิลอะลานีน และ ลิวซีน) ภาวะที่ 6 (โพรลีน และ ลิวซีน) และภาวะที่ 7 (ฟีนิลอะลานีน โพรลีน และ ลิวซีน) มาวิเคราะห์โดยการโครมาโทกราฟีแบบชั้นบางและทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยการขูดจุดของสารสกัดที่ปรากฏขึ้นอยู่ในระดับเดียวกันกับออริโอบาซิดิน เอ บนแผ่น TLC มาละลายในตัวทำละลายอะซิโตไนไตร จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาตรวจสอบด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (HPLC) ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพและความไวสูงในการแยกองค์ประกอบต่างๆ ออกจากกัน โดยอาศัยความแตกต่างของการกระจายตัวของสารตัวอย่างระหว่าง 2 เฟส ที่ไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน คือ เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ทำหน้าที่ในการชะล้างหรือพาสารเคลื่อนที่ผ่านเฟสอยู่กับที่ และเฟสอยู่กับที่ (stationary phase) ทำหน้าที่ในการแยกสารหรือองค์ประกอบของสารตัวอย่างออกจากกัน โดยมีหลักการทำงานคือ ขณะเฟสเคลื่อนที่ผ่านเฟสอยู่กับที่ องค์ประกอบหรือสารชนิดต่างๆ ในสารตัวอย่างจะมีการเคลื่อนที่ผ่านเข้าและออกระหว่างเฟสทั้งสองและมีการหน่วงเหนี่ยว (retention) ในเฟสอยู่กับที่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีขององค์ประกอบหรือสารแต่ละชนิดที่อยู่ในสารตัวอย่างที่มีความจำเพาะต่อเฟสทั้งสอง จากความแตกต่างนี้ทำให้สารแต่ละชนิดเคลื่อนที่ผ่านเฟสอยู่กับที่ในอัตราที่ต่างกัน ทำให้มีการแยกเกิดขึ้น ระยะเวลาที่สารแต่ละชนิดใช้ในการเคลื่อนที่ผ่านเฟสอยู่กับที่ (retention time) จะแสดงออกมาในรูปของตำแหน่ง peak บนโครมาโทแกรมซึ่งสามารถนำมาใช้ประโยชน์ด้านการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและเชิงปริมาณได้ (แมน

อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม, 2535) ทำการทดสอบด้วยเครื่อง HPLC ของบริษัท Varian รุ่น Prostar ประเทศสหรัฐอเมริกา เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานออริโอบาซิดิน เอ ที่มีความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เพื่อทำเป็นกราฟมาตรฐาน โดยใช้โครมาโทกราฟีแบบเฟสผันกลับ (reversed-phase chromatography) ใช้คอลัมน์ชนิด C18 ใช้ UV detector คอลัมน์ที่ใช้คือคอลัมน์ Chrom Spher 5 C18 (4.6 × 250 มิลลิเมตร) ของบริษัท Varian ขนาดรูพรุน (pore size) 100 อังสตรอม ขนาด particle 5 ไมโครเมตร และใช้ UV detector ที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร โดยมีอะซิโตนในไตร และน้ำเป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราส่วน 7.5:2.5 ตามลำดับ อัตราการไหลเท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ปริมาณที่ใช้ในการฉีด 20 ไมโครลิตร พบว่าสารมาตรฐานออริโอบาซิดิน เอ ปรากฏ peak ขึ้นที่เวลา 9.453 ส่วนสารสกัดจากเชื้อ *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 5 (ฟีนิลอะลานีน และ ลิวซีน) ภาวะที่ 6 (โพรลีน และ ลิวซีน) และภาวะที่ 7 (ฟีนิลอะลานีน โพรลีน และ ลิวซีน) ปรากฏ peak ขึ้นที่เวลา 9.472, 9.548 และ 9.578 เนื่องจาก peak ของสารมาตรฐานออริโอบาซิดิน เอ กับสารสกัดที่ใช้วิเคราะห์ทั้ง 3 ภาวะ ปรากฏ peak ขึ้นในเวลาที่ไม่เท่ากันซึ่งอาจจะไม่เป็นสารชนิดเดียวกันจึงได้ทำการวิเคราะห์สารสกัดที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยเทคนิค HPLC อีกครั้งโดยการผสมสารสกัดกับสารมาตรฐานออริโอบาซิดิน เอ ในอัตราส่วน 2:1 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เพื่อตรวจสอบ peak กราฟของสารสกัดกับสารมาตรฐานว่าเป็นสารชนิดเดียวกันหรือไม่ จากการทดลองพบว่า peak กราฟของสกัดจากเชื้อ *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 5 (ฟีนิลอะลานีน และ ลิวซีน) ภาวะที่ 6 (โพรลีน และ ลิวซีน) และภาวะที่ 7 (ฟีนิลอะลานีน โพรลีน และ ลิวซีน) รวมเป็น peak เดียวกันกับสารมาตรฐานออริโอบาซิดิน เอ ที่เวลา 9.462, 9.497 และ 9.495 ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าสารสกัดที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนที่ใช้ทดสอบนั้นเป็นสารชนิดเดียวกันกับออริโอบาซิดิน เอ เนื่องจากผลการทดลองมีความสอดคล้องกัน

4.3 เทคนิค Spectrophotometry สำหรับการวิเคราะห์โปรตีนเบื้องต้นในสารต้านเชื้อรา

จากการทดลองนำสารสกัด *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 5 (ฟีนิลอะลานีน และ ลิวซีน) ภาวะที่ 6 (โพรลีน และ ลิวซีน) และภาวะที่ 7 (ฟีนิลอะลานีน โพรลีน และ ลิวซีน) ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Spectrophotometry พบว่าสารสกัดทั้ง 3 ภาวะ มีค่าสเปกตรัมการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 257 นาโนเมตร ส่วนสารมาตรฐานออริโอบาซิดิน เอ มีค่าสเปกตรัมการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 258 นาโนเมตร เนื่องจากออริโอบาซิดิน เอ เป็นสารกลุ่มเดปซิเปปไทด์แบบวงแหวน (cyclic depsipeptide) ประกอบด้วยกรดแอสปาร์ทิก 8 ชนิด และกรดไฮดรอกซิล 1 ชนิด (Takesako และคณะ, 1993) จึงจัดเป็นสารประเภทโปรตีนที่มีการแตกตัวเป็น subunit ขนาดเล็ก เมื่อนำสารมาวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer จึงสามารถวิเคราะห์สารกลุ่มที่มีโครงสร้างเป็นวงแหวน เช่น กลุ่มอะโรมาติก กลุ่มกรดอะมิโน และเบสไพริมิดีน เป็นต้น ในช่วงที่สายตาไม่สามารถมองเห็นได้ที่ช่วงความยาวคลื่น 200-400 นาโนเมตร นอกจากนี้ฟีนิลอะลานีนยังจัดเป็นสารจำพวกกรดอะมิโน สามารถดูดกลืนแสงสูงสุดได้ที่ความยาวคลื่น 258 นาโนเมตร แต่ในผลการทดลองพบว่าสารสกัดทั้ง 3 ชนิด มีค่าสเปกตรัมการดูดกลืนแสงสูงสุดต่ำกว่าสารมาตรฐานออริโอบาซิดิน เอ 1 นาโนเมตร เนื่องจากสารสกัดทั้ง 3 กลุ่มเป็นสารที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนซึ่งยังคงเหลือสิ่งเจือปนอยู่บ้าง อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์โดยเทคนิคนี้เป็นการวิเคราะห์สารได้เพียงคร่าวๆ เท่านั้น จึงควรใช้เทคนิคอื่นๆเข้ามาวิเคราะห์ด้วย เช่น IR, NMR หรือ Mass spectroscopy เป็นต้น จะทำให้ผลการวิเคราะห์นั้นถูกต้องแม่นยำขึ้น (แมน อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม, 2535)

4.4 เทคนิค MALDI-TOF Mass Spectrometry สำหรับการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุล ของสารต้านเชื้อรา

จากการทดลองนำสารสกัด *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 5 (ฟีนิลอะลานีน และ ลิวซีน) ภาวะที่ 6 (โพรลีน และ ลิวซีน) และภาวะที่ 7 (ฟีนิลอะลานีน โพรลีน และ ลิวซีน) ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF Mass Spectrometry ซึ่งเป็นเทคนิคทางเคมีวิเคราะห์ที่ใช้ศึกษาหาข้อมูลเกี่ยวกับมวลโมเลกุลของสารโดยอาศัยหลักการทำให้โมเลกุลของสารแตกตัวเป็นไอออนนั้น พบว่าสารมาตรฐานออริโอบาซิดิน เอ มีน้ำหนักโมเลกุล 1,123.648 ดาลตัน ส่วนสารสกัดจากเชื้อ *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 5 (ฟีนิลอะลานีน และ ลิวซีน) ภาวะที่ 6 (โพรลีน และ ลิวซีน) และภาวะที่ 7 (ฟีนิลอะลานีน โพรลีน และ ลิวซีน) มี

ผลของสเปกตรัมน้ำหนักโมเลกุล 1,123.246, 1,123.886 และ 1,123.551 ดาลตัน โดยในปี 1991 Takesako และคณะ ได้รายงานผลการทดลองน้ำหนักโมเลกุลของสารออริโอบาซิดิน เอ คือ 1,070 -1,148 ดาลตัน ซึ่งในผลการทดลองพบว่าน้ำหนักโมเลกุลมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 1,123 ดาลตัน ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าสารสกัดที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนทั้ง 3 กลุ่ม เป็นสารชนิดเดียวกันกับออริโอบาซิดิน เอ

5. ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพสารต้านเชื้อราที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

5.1 วิธี Well diffusion

จากการทดลองนำสารสกัดที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบางมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อราที่ก่อโรคในกลุ่ม *Aspergillus* spp. ทั้ง 4 สายพันธุ์พบว่าสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 5 (ฟีนอลอะลานีน และ ลิวซีน) มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *A. flavus* ได้สูงสุด ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 183.00 ± 0.02 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 6 (โพรลีน และ ลิวซีน) พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *A. terreus* ได้สูงสุด ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 168.00 ± 0.06 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่สารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 7 (ฟีนอลอะลานีน โพรลีน และ ลิวซีน) มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *A. niger* และ *A. fumigatus* ได้สูงสุด ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 191.00 ± 0.24 และ 190.00 ± 0.05 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เนื่องจากสารสกัดที่นำมาทดสอบมีความบริสุทธิ์ของสารมากขึ้นจึงทำให้มีความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้นซึ่งมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสูงขึ้น จึงมีความเป็นไปได้ว่าสารสกัดที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนทั้ง 3 ภาวะ เป็นสารชนิดเดียวกันกับออริโอบาซิดิน เอ และมีความน่าสนใจในการนำสารต้านเชื้อราที่ผลิตได้ไปทำการศึกษาค้นคว้าต่อในแง่ของการทำเป็นยาต้านเชื้อราต่อไปในอนาคต เพราะออริโอบาซิดิน เอ มีกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของการทำงานของเอนไซม์ไอพีซีซินเทส (IPC synthase) ซึ่งมีผลไปยับยั้งการสังเคราะห์สฟิงโกลิปิด ที่เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ที่พบได้ทั้งในสัตว์และเชื้อรา (Nagiec และคณะ, 1997) อย่างไรก็ตามการยับยั้งการทำงานของไอพีซีซินเทสของออริโอบาซิดินเอ ไม่มีผลไปยับยั้งการสังเคราะห์สฟิงโกลิปิดในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

5.2 วิธี Conidial germination inhibition assay

จากการทดลองนำสารสกัดที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบางมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อราที่ก่อโรคในกลุ่ม *Aspergillus* spp. ทั้ง 4 สายพันธุ์โดยคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์เทียบกับชุดควบคุม พบว่าสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 5 (ฟีนอลอะลานีน และ ลิวซีน) ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *A. flavus* ได้สูงสุด 77.88 ± 0.09 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 6 (โพรลีน และ ลิวซีน) ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *A. terreus* ได้สูงสุด 71.91 ± 0.07 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่สารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 7 (ฟีนอลอะลานีน โพรลีน และ ลิวซีน) ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *A. niger* และ *A. fumigatus* ได้สูงสุด 77.00 ± 0.20 และ 79.17 ± 0.24 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เนื่องจากสารสกัดที่นำมาทดสอบมีความบริสุทธิ์ของสารมากขึ้นจึงทำให้มีความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้นซึ่งมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสูงขึ้น จึงมีความเป็นไปได้ว่าสารสกัดที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนทั้ง 3 ภาวะ เป็นสารชนิดเดียวกันกับออริโอบาซิดิน เอ จึงมีความน่าสนใจอย่างยิ่งที่จะนำมาพัฒนาเป็นยาต้านเชื้อราชนิดใหม่ เนื่องจากออริโอบาซิดิน เอ มีความเป็นพิษต่ำในการทดลองกับสัตว์ทดลอง นอกจากนี้ยังพบว่าออริโอบาซิดิน เอ จะทำลายเฉพาะเซลล์ที่กำลังเจริญพันธุ์ของ *Candida albicans* โดยไม่มีผลกระทบต่อเซลล์ที่อยู่ในระยะพัก ออริโอบาซิดิน เอ ไม่ได้มีผลต่อการยับยั้งการผลิต DNA RNA หรือโปรตีนอื่นๆ ไม่มีผลในการลดการผลิตสารประกอบกลูโคสต่างๆในเซลล์ ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า กลไกการทำงานของออริโอบาซิดิน มีความแตกต่างจากแอมโฟเทอริซิน บี และสารต่อต้านเชื้อราชนิดอื่นๆ (Endo และคณะ, 1997) นอกจากนี้ยังพบว่า ออริโอบาซิดิน เอ สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อปรสิต *Toxoplasma gondii* ซึ่งเป็นเชื้อฉวยโอกาสที่มักพบในโรคเอดส์และผู้ป่วยที่มีระบบภูมิคุ้มกันบกพร่อง จากการ

ทดลองพบว่าออร์โอบาซิดิน เอ มีผลไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไอพีซี ซินเทส ซึ่งจะมีผลไปยับยั้งการสังเคราะห์สฟิงโกลิปิดที่เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์เชื้อรา จึงมีผลทำให้โครงสร้างภายในของเชื้อปรสิต *T. gondii* เกิดการสูญเสียไป (Sonda และคณะ, 2005)

5.3 ทำการตรวจสอบสารสกัดด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (Thin layer chromatography)

จากผลการทดลองนำสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 5 (ฟีนิลอะลานีน และ ลิวซีน) ภาวะที่ 6 (โพรีลีน และ ลิวซีน) และภาวะที่ 7 (ฟีนิลอะลานีน โพรีลีน และ ลิวซีน) ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบางมาตรวจสอบสารสกัดอีกครั้ง โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ออร์โอบาซิดิน เอ โดยใช้ระบบตัวทำละลายคือเอธิลอะซิเตต พบว่าสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 5 (ฟีนิลอะลานีน และ ลิวซีน) ภาวะที่ 6 (โพรีลีน และ ลิวซีน) และภาวะที่ 7 (ฟีนิลอะลานีน โพรีลีน และ ลิวซีน) ประกอบด้วยสารที่มีค่า Rf ภาวะละ 1 ชนิด แต่ละภาวะมีค่า Rf เท่ากับ 0.68 (ตำแหน่ง A) ส่วนสารมาตรฐาน ออร์โอบาซิดิน เอ มีค่า Rf เท่ากับ 0.68 (ตำแหน่ง B)

เนื่องจากสารสกัดที่นำมาทดสอบมีความบริสุทธิ์ของสารมากขึ้นจึงมีผลทำให้กำจัดสารสกัดชนิดอื่นที่มีสภาพขั้วแตกต่างกับสารมาตรฐานออกไปได้ ดังนั้นจากรูปแบบของการแยกสารบนแผ่น TLC สารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราที่ใช้ทดสอบนั้นมีความเป็นไปได้ว่าเป็นออร์โอบาซิดิน เอ เนื่องจากสภาพความมีขั้วค่อนข้างใกล้เคียงกัน สังเกตได้จากการแยกสารได้ ณ ตำแหน่งที่มีค่า Rf เท่ากันบนแผ่น TLC

6. วิเคราะห์โครงสร้างสารต้านเชื้อราที่ผลิตได้

6.1 ทำการวิเคราะห์โครงสร้างสารต้านเชื้อราที่ผลิตได้ด้วยวิธี $^1\text{H-Nuclear Magnetic Resonance}$ ($^1\text{H-NMR}$)

จากผลการทดลองนำสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 5 (ฟีนิลอะลานีน และ ลิวซีน) ภาวะที่ 6 (โพรีลีน และ ลิวซีน) และภาวะที่ 7 (ฟีนิลอะลานีน โพรีลีน และ ลิวซีน) ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบางมาวิเคราะห์โครงสร้างสารต้านเชื้อราเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานออร์โอบาซิดิน เอ โดยใช้วิธี $^1\text{H-NMR}$ ซึ่งนิวคลีไอที่ใช้ในสนามแม่เหล็กคือโปรตอน (Proton) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ในช่วงความยาวคลื่นวิทยุ 500 เมกะเฮิรตซ์ ซึ่งโปรตอน NMR มีหลักการทำงานคือ โปรตอนทุกตัวในโมเลกุลที่มีความเท่าเทียมกันทางเคมีจะมี chemical shift ที่เดียวกันและจะเกิดเรโซแนนซ์ที่เดียวกัน ดังนั้นใน NMR สเปกตรัมสารแต่ละตัวจะมีเพียง peak เดียว โปรตอนทุกตัวเรียกว่ามี chemically equivalent ในทางตรงกันข้าม ถ้าโมเลกุลมีโปรตอนมากกว่า 1 ชนิดที่ไม่เท่าเทียมกันทางเคมี NMR สเปกตรัมจะมีหลาย peak (มัน อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม, 2535) จากการทดลองพบว่าสารสกัดจากเชื้อ *A. pullulans* NRRL 58536 ทั้ง 3 ภาวะมีผลของสเปกตรัมสอดคล้องกับสารมาตรฐานออร์โอบาซิดิน เอ จึงมีความเป็นไปได้ว่าสารสกัดที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนทั้ง 3 ภาวะ เป็นสารชนิดเดียวกันกับออร์โอบาซิดิน เอ

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

เนื่องจากสารต้านเชื้อราจาก *A. pullulans* เป็นสารที่อยู่ภายในเซลล์ ซึ่งมีปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับสารประเภทหลั่งออกภายนอกเซลล์ ดังนั้นหากต้องการศึกษาในแง่การนำไปใช้ประโยชน์ควรทำการผลิตในระดับที่ใหญ่ขึ้น (large scale) หรือนำเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพในการทำให้น้ำเลี้ยงเซลล์แตกมาใช้ในการวิจัย เช่น เครื่องบดอย่างละเอียด (Homogenizer) เพื่อให้ได้ปริมาณสารที่ต้องการมากเพียงพอต่อการศึกษาในแง่ที่เป็นประโยชน์ในด้านการแพทย์ เช่นการผลิตยาต้านเชื้อรา หรือการผลิตเพื่อการบำบัดไปในอนาคต

7. ภาคผนวก

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ
อยู่ในระหว่างการเขียนเพิ่มเติมและแก้ไข
2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์
 - เชิงวิชาการ ได้มีการนำผลงานวิจัยที่ได้ ไปเป็นองค์ความรู้ในการสอนรายวิชา 2305583 Biotechnology of plant fungi
3. อื่นๆ
 - มีการนำเสนอผลงานวิจัยในที่ประชุมวิชาการระดับนานาชาติ คือ
Prasongsuk S., Ployngam S., Lotrakul P. and Punnapayak H. 2011. Production of antifungal agents from tropical strains of *Aureobasidium pullulans*. **Society for Industrial Microbiology Annual Meeting, New Orleans, LA, USA.**