โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดคาเฟอิก กรดเฟอรูลิกและกรดพาราคูมาริก โดยใช้เห็ดขอนขาวและเห็ดนางนวล

Biotransformation of caffeic acid, ferulic acid and *p*-coumaric acid by *Lentinus squarrosulus* mont. and *Pleurotus djamor*

ชื่อนิสิต นางสาวพัชรลักษณ์ โพธิ์วัง

ภาควิชา เคมี

ปีการศึกษา 2560

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดคาเฟอิก กรดเฟอรูลิกและกรดพาราคูมาริก โดยใช้เห็ดขอนขาวและเห็ดนางนวล

Biotransformation of caffeic acid, ferulic acid and *p*-coumaric acid by *Lentinus squarrosulus* mont. and *Pleurotus djamor*

โดย

นางสาวพัชรลักษณ์ โพธิ์วัง

รายงานนี้เป็นสวนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2560

โครงการ การเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดคาเฟอิก กรดเฟอรูลิกและกรดพาราคูมาริกโดยใช้เห็ดขอนขาวและเห็ดนางนวล

โดย นางสาวพัชรลักษณ์ โพธิ์วัง

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
คณะกรรมการสอบโครงการ

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สันติ ทิพยางค์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นวพร วินยเวคิน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิตรตรา เพียภูเขียว)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เฟื่องฟ้า อุ่นอบ)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

..... หัวหน้าภาควิชาเคมี
(รองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิชัย พาราสุข)

วันที่ ..... เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2561

คุณภาพของการเขียนรายงานเล่มนี้อยู่ในระดับ ☑ ดีมาก ☐ ดี ☐ พอใช้

ชื่อโครงการ การเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดคาเฟอิก กรดเฟอรูลิกและกรดพาราคูมาริกโดยใช้เห็ดขอนขาวและเห็ดนางนวล
ชื่อนิสิตในโครงการ นางสาวพัชรลักษณ์ โพธิ์วัง เลขประจำตัว 5733136223
ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นวพร วินยเวคิน
ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิตรตรา เพียภูเขียว
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2560

บทคัดย่อ

กระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดคาเฟอิก กรดเฟอรูลิก และกรดพาราคูมาริกเป็นกระบวนการที่มีประโยชน์อย่างมากทางอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากให้ผลิตภัณฑ์ที่มีประโยชน์เช่น วานิลลินที่มีคุณสมบัติเป็นสารให้กลิ่น (Flavoring agent) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และมีฤทธิ์ต้านยีสต์ รา และแบคทีเรีย งานวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษากระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดคาเฟอิก กรดเฟอรูลิกและกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดขอนขาวและเห็ดนางนวล ขั้นแรกเป็นการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดคาเฟอิก กรดเฟอรูลิก และกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดขอนขาวและเห็ดนางนวลด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) จากนั้นติดตามอัตราการเปลี่ยนแปลงของสารตั้งต้นสารผลิตภัณฑ์และสารมัธยันตร์ที่เกิดขึ้นทุกวันเป็นเวลา 7 วัน จากการทดลองพบว่า เห็ดขอนขาวและเห็ดนางนวลสามารถเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของสารตั้งต้นทั้ง 3 ชนิดได้ทั้งหมดภายใน 7 วัน อย่างไรก็ตาม คณะวิจัยไม่สามารถตรวจพบสารมัธยันตร์หรือผลิตภัณฑ์หลักได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อในตัวอย่างกรดคาเฟอิกและกรดเฟอรูลิก และพบผลิตภัณฑ์หลักที่เวลา 12.2 และ 33.7 นาที ในตัวอย่างกรดพาราคูมาริก และหลังจากเปรียบเทียบเวลาของผลิตภัณฑ์เหล่านี้พบว่าผลิตภัณฑ์ที่เวลา 12.2 นาทีคล้ายกับกรดพาราไฮดรอกซีเบนโซอิก เมื่อทำผลิตภัณฑ์ ที่เวลา 33.7 นาทีให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค HPLC และระบุเอกลักษณ์ด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมทรี (ESI-QTOF-MS) และเทคนิคโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (^{1}H NMR) พบว่าได้ผลิตภัณฑ์คล้ายกับ (*E*)-5-(2-carboxyvinyl)-2-(4-hydroxyphenyl)-2,3-dihydrobenzofuran-3-carboxylic acid ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ไม่มีรายงานมาก่อนและควรได้รับการศึกษาถึงโครงสร้างและชีววิถีการสังเคราะห์และคุณสมบัติต่อไป

คำสำคัญ: การเปลี่ยนรูปทางชีวภาพ, กรดคาเฟอิก, กรดเฟอรูลิก, กรดพาราคูมาริก

Project Title Biotransformation of caffeic acid, ferulic acid and *p*-coumaric acid by *Lentinus squarrosulus* mont. and *Pleurotus djamor*

Student Name Miss Patcharalak Phowang Student ID 5733136223

Advisor Name Assistant Professor Nawaporn Vinayavekhin, Ph.D.

Co-advisor Name Assistant Professor Jittra Piapukiew, Ph.D.

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic Year 2017

Abstract

Biotransformation of caffeic acid, ferulic acid and *p*-coumaric acid is the process that is highly beneficial to the food industry, because they gave beneficial products, such as vanillin, is a flavoring agent and an antioxidant and possesses anti-yeast, antifungal and antibacterial activities. This research focuses on studying biotransformation of caffeic acid, ferulic acid and *p*-coumaric acid by *Lentinus squarrosulus* mont. and *Pleurotus djamor*. The first step involved investigation of products from biotransformation of caffeic acid, ferulic acid and *p*-coumaric acid by *Lentinus squarrosulus* mont. and *Pleurotus djamor* by using high performance liquid chromatography (HPLC). After that the rates of changes of the substrates, products and intermediates were followed everyday for 7 days. The results showed that *L. squarrosulus* mont. and *P. djamor*. could biotransform all 3 substrates within 7 days of incubation. However, neither intermediates nor major products could be detected in the culture supernatants of the caffeic acid or ferulic acid samples. The only major products that were detected in the the *p*-coumaric acid samples had the retention time of 12.2 and 33.7 minutes, and after comparing the retention time with those of standards, the product at retention time of 12.2 likely was *p*-hydroxybenzoic acid. After purifying product at retention time of 33.7 minutes by HPLC and identifying this product by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (^{1}H NMR) and mass spectrometry (ESI-QTOF-MS), the product was found likely (*E*)-5-(2-carboxyvinyl)-2-(4-hydroxyphenyl)-2,3-dihydrobenzofuran-3-carboxylic acid. The product had not been reported earlier and could be the subject of investigation for its structure, biosynthesis and activities in the future.

Keywords: Biotransformation, caffeic acid, ferulic acid, *p*-coumaric acid

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดคาเฟอิก กรดเฟอรูลิกและกรดพาราคูมาริกโดยใช้เห็ดขอนขาวและเห็ดนางนวลสำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดี จึงขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นวพร วินยเวคิน อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำตลอดการทำวิจัย อีกทั้งยังสละเวลาในการให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ และขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.สันติ ทิพยางค์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เฟื่องฟ้า อุ่นอบ ที่กรุณาสละเวลาในการตรวจทานเล่มรายงานและให้เกียรติเป็นกรรมการ ในโครงการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิตรตรา เพียภูเขียว อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการร่วม และพี่ๆ ในห้องปฏิบัติการทุกท่าน ตลอดจนภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาเอื้อเฟื้อเครื่องมือในการทำงานวิจัย และได้ให้ความรู้ที่มีประโยชน์อย่างยิ่งต่อผู้ทำวิจัย รวมทั้งให้การสนับสนุนในด้านต่างๆ ในการทำงานวิจัยนี้ให้ประสบความสำเร็จเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ปีการศึกษา 2560 ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณทุกกำลังใจและความช่วยเหลือจากครอบครัวรวมทั้งเพื่อนๆ ในภาควิชาเคมี ผู้วิจัยจะขอระลึกในความกรุณาของทุกท่านที่ได้กล่าวมาข้างต้น และบุคคลที่ไม่ได้เอ่ยนามไว้ ณ ที่นี้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ	1
1.2 วัตถุประสงค์และขอบเขตงานวิจัย	2
1.3 ทฤษฎีที่สำคัญและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	7
บทที่ 2 วิธีการทดลอง	8
2.1 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	8
2.2 สายพันธุ์ของเห็ด อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี	8
2.3 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA), PDB, minimal medium และวิธีการเลี้ยงเชื้อเห็ดขอนขาวและเห็ดนางนวล	10
2.4 การเตรียมสารละลายความเข้มข้น 50 mg/ml ของกรดคาเฟอิกกรดเฟอรูลิก และกรดพาราคูมาริก	11
2.5 การศึกษากระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดคาเฟอิก กรดเฟอรูลิก และกรดพาราคูมาริก โดยเห็ดขอนขาวและเห็ดนางนวล	11
2.6 การศึกษาอัตราการเปลี่ยนรูปของผลิตภัณฑ์ของกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดคาเฟอิก กรดเฟอรูลิก และกรดพาราคูมาริกโดยใช้เห็ดขอนขาวและเห็ดนางนวล	12
2.7 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)	12
บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	15
3.1 การวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) เพื่อนำค่าเวลาที่สารมาตรฐานเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ (retention time) เทียบกับเวลาที่สารที่ได้จากกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์	15
3.2 การวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานของกรดคาเฟอิก กรดเฟอรูลิกและกรดพาราคูมาริกที่ความเข้มข้น 5% 0.5% 1.67% 0.167% และ 0.05% โดยเทคนิคด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)	16
3.3 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดคาเฟอิก กรดเฟอรูลิกและกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดขอนขาวและเห็ดนางนวล	18

3.4 การศึกษาอัตราการเปลี่ยนรูปของกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพ 28
3.5 การระบุเอกลักษณ์ผลิตภัณฑ์จากกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดพาราคูมาริก โดยเห็ดนางนวล 34
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง 40
เอกสารอ้างอิง 41
ภาคผนวก 43
ประวัติผู้วิจัย 59

สารบัญตาราง

ตารางที่	**หน้า**
2.1 อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่และสัดส่วนของเฟสเคลื่อนที่ชนิด B ที่เวลาต่างๆ ในการตรวจสอบและติดตามอัตราการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดคาเฟอิก กรดเฟอรูลิกและกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดขอนขาวและเห็ดนางนวล	12
2.2 อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่และสัดส่วนของเฟสเคลื่อนที่ชนิด B ที่เวลาต่างๆ ในการแยกผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพ	14
3.1 เวลาที่สารมาตรฐานความเข้มข้น 0.5% เคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์และค่าความยาวคลื่นที่ดูดกลืนมากที่สุดที่วิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC โดยใช้เครื่องตรวจวัดเป็น DAD	15
3.2 ความเข้มข้นของกรดคาเฟอิก กรดเฟอรูลิกและกรดพาราคูมาริกก่อนเจือจางที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร	16
3.3 ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์โดยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดนางนวล	37

สารบัญรูป

ภาพที่	หน้า
1.1 โครงสร้างของกรดกรดคาเฟอิก	2
1.2 วิถีการเปลี่ยนรูปของกรดคาเฟอิก	2
1.3 โครงสร้างของกรดเฟอรูลิก	3
1.4 วิถีการเปลี่ยนรูปของกรดเฟอรูลิก	4
1.5 โครงสร้างของกรดพาราคูมาริก	4
1.6 วิถีการเปลี่ยนรูปของกรดพาราคูมาริก	5
1.7 เห็ดขอนขาว (*Lentinus squarrosulus* mont.)	6
1.8 เห็ดนางนวล (*Pleurotus djamor*)	6
3.1 กราฟมาตรฐานของกรดคาเฟอิกที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร	17
3.2 กราฟมาตรฐานของกรดเฟอรูลิกที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร	17
3.3 กราฟมาตรฐานของกรดพาราคูมาริกที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร	18
3.4 โครมาโทแกรมของกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดคาเฟอิกโดยเห็ดขอนขาวในครั้งที่ 1 (a) และครั้งที่ 2 (b) ที่วิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร โดยแกน x คือเวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ (นาที) และแกน y คือ intensity (mAU)	19
3.5 โครมาโทแกรมของกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดคาเฟอิกโดยเห็ดนางนวลในครั้งที่ 1 (a) และครั้งที่ 2 (b) ที่วิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร โดยแกน x คือเวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ (นาที) และแกน y คือ intensity (mAU)	20
3.6 โครมาโทแกรมของกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดเฟอรูลิกโดยเห็ดขอนขาวในครั้งที่ 1 (a) และครั้งที่ 2 (b) ที่วิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร โดยแกน x คือเวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ (นาที) และแกน y คือ intensity (mAU)	21
3.7 โครมาโทแกรมของกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดเฟอรูลิกโดยเห็ดนางนวลในครั้งที่ 1 (a) และครั้งที่ 2 (b) ที่วิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร โดยแกน x คือเวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ (นาที) และแกน y คือ intensity (mAU)	22
3.8 โครมาโทแกรมของกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดขอนขาวในครั้งที่ 1 (a) และ (b) ที่วิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC ที่ความยาวคลื่น 262 และ 310 นาโนเมตร ตามลำดับ และครั้งที่ 2 (c) และ (d) ที่ความยาวคลื่น 262 และ 310 นาโนเมตร ตามลำดับ โดยแกน x คือเวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ (นาที) และแกน y คือ intensity (mAU)	24
3.9 โครมาโทแกรมของกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดนางนวลในครั้งที่ 1 (a) และ (b) ที่วิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC ที่ความยาวคลื่น 262 และ 310 นาโนเมตร ตามลำดับ และครั้งที่ 2 (c) และ (d) ที่ความยาวคลื่น 262 และ 310 นาโนเมตร ตามลำดับ โดยแกน x คือเวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ (นาที) และแกน y คือ intensity (mAU)	26

ภาพที่ **หน้า**

3.10 กราฟแสดงอัตราการลดลงของกรดคาเฟอิกของกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดคาเฟอิกโดยเห็ดขอนขาว ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร 28
3.11 กราฟแสดงอัตราการลดลงของกรดคาเฟอิกของกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดคาเฟอิกโดยเห็ดนางนวล ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร 28
3.12 กราฟแสดงอัตราการลดลงของกรดเฟอรูลิก ของกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดเฟอรูลิกโดยเห็ดขอนขาว ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร 29
3.13 กราฟแสดงอัตราการลดลงของกรดเฟอรูลิก ของกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดเฟอรูลิกโดยเห็ดนางนวล ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร 29
3.14 กราฟแสดงอัตราการลดลงของกรดพาราคูมาริก ของกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดขอนขาว ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร 29
3.15 กราฟแสดงอัตราการลดลงของกรดพาราคูมาริกของกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดนางนวล ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร 30
3.16 กราฟแสดงอัตราการรวมตัวของผลิตภัณฑ์ที่ออกมาที่เวลา 12.2 นาที ที่ได้จากกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดขอนขาว ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร 30
3.17 กราฟแสดงอัตราการรวมตัวของผลิตภัณฑ์ที่ออกมาที่เวลา 33.7 นาที ที่ได้จากกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดขอนขาว ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร 30
3.18 กราฟแสดงอัตราการรวมตัวของผลิตภัณฑ์ที่ออกมาที่เวลา 33.7 นาที ที่ได้จากกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดนางนวล ที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร 31
3.19 กราฟแสดงอัตราการรวมตัวของผลิตภัณฑ์ที่ออกมาที่เวลา 12.2 นาที ที่ได้จากกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดนางนวล ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร 31
3.20 กราฟแสดงอัตราการรวมตัวของผลิตภัณฑ์ที่ออกมาที่เวลา 33.7 นาที ที่ได้จากกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดนางนวล ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร 32
3.21 กราฟแสดงอัตราการรวมตัวของผลิตภัณฑ์ที่ออกมาที่เวลา 33.7 นาที ที่ได้จากกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดนางนวล ที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร 35
3.22 แมสสเปกตรัมของสารผลิตภัณฑ์ที่เวลา 33.7 นาที ที่ได้จากการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดนางนวล 34
3.23 แสดง ^{1}H NMR สเปกตรัมของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดนางนวลในช่วงเคมิคัลชิฟต์ 0-5 ppm 36
3.24 แสดง ^{1}H NMR สเปกตรัมของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดนางนวลในช่วงเคมิคัลชิฟต์ 5-8 ppm 37
3.25 โครงสร้างของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดนางนวลที่วิเคราะห์โครงสร้างโดย ^{1}H NMR 39

บทที่ 1

บทนำ

1.1) ความเป็นมาและเหตุจูงใจในการนำเสนอโครงการ

กระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพ (Biotransformation) เป็นกระบวนการที่ใช้ระบบทางชีวภาพเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเพื่อเปลี่ยนสารตั้งต้นเป็นผลิตภัณฑ์ชนิดอื่น มักใช้ในการปรับแต่งโครงสร้างยาหรือสารเคมีต่างๆ โดยเฉพาะโครงสร้างที่สังเคราะห์ได้ยากด้วยกระบวนการทางเคมี นอกจากนี้ยังเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม

สารประกอบฟีนอล (Phenolic compounds) เช่นกรดคาเฟอิก (caffeic acid) กรดเฟอรูลิก (ferulic acid) และกรดพาราคูมาริก (*p*-coumaric acid) เป็นสารที่พบตามธรรมชาติในพืชหลายชนิด เช่น ข้าวโพด ข้าวโอ๊ต และข้าวฟ่าง เป็นต้น[1] และเป็นสารประกอบที่สำคัญที่ได้จากการโฮโดรไลส์กากของพืช เช่น ชานอ้อย เพราะเหตุนี้จึงมีงานวิจัยจำนวนมากที่พยายามเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดเหล่านี้ ตัวอย่างเช่น กระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดคาเฟอิกโดย *Capsicum frutescens*[2] ได้ผลิตภัณฑ์เป็นวานิลลิน (vanillin) กระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดเฟอรูลิกโดย *B. subtilis*[3] และ *Pycnoporus cinnabarinus*[4] ซึ่งให้ผลิตภัณฑ์คือวานิลลิน และโดย *Aspergillus niger*[6] ซึ่งให้ผลิตภัณฑ์คือ 2-เมทอกซี-4-ไวนิลฟีนอล (2-methoxy-4-vinylphenol) และนอกจากนี้ยังมีการศึกษากระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดพาราคูมาริกโดย *Paecilomyces variotii*[6] และ *Azotobacter* sp. strain SSB81[7] ซึ่งให้ผลิตภัณฑ์คือ กรดพาราไฮดรอกซีเบนโซอิก (*p*-hydroxybenzoic acid) อีกด้วย

จากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของสารประกอบฟีนอล เช่น กรดคาเฟอิก กรดเฟอรูลิก และกรดพาราคูมาริก จะพบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นสารประกอบฟีนอลที่มีประโยชน์อย่างมากในเชิงอุตสาหกรรม เช่น วานิลลินที่มีคุณสมบัติเป็นสารให้กลิ่น (Flavoring agent) ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหาร นอกเหนือจากคุณสมบัติเป็นสารให้กลิ่นแล้ว วานิลลินยังมีคุณสมบัติทางชีวภาพหลายอย่าง เช่น สารต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านยีสต์ รา และแบคทีเรีย[8] นอกจากวานิลลินแล้ว ยังมี 2-เมทอกซี-4-ไวนิลฟีนอล ที่มีรสเผ็ดร้อน และมีกลิ่นหอมเหมือนกานพลูจึงมีคุณสมบัติในการเป็นสารให้กลิ่น และเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ[9] ด้วย

เห็ดขอนขาว (*Lentinus squarrosulus* mont.) และเห็ดนางนวล (*Pleurotus djamor*) เป็นราในไฟลัมเบสิดิโอไมโคตา (Basidiomycota) ซึ่งเป็นราผุขาว (White rot fungi) เป็นราที่ย่อยสลายสารประกอบของเซลล์ในไม้ได้ทั้งลิกนินและเซลลูโลส เนื่องจากในอุตสาหกรรม สารประกอบฟีนอลได้มาจากการไฮโดรไลส์ลิกนินเป็นหลัก งานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาความเป็นไปได้ในการนำเห็ดสองชนิดนี้มาใช้ในกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดคาเฟอิก กรดเฟอรูลิก และกรดพาราคูมาริก และศึกษาผลิตภัณฑ์ของกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพนี้ ซึ่งอาจมีประโยชน์ในทางอุตสาหกรรม เป็นการช่วยเพิ่มมูลค่าของสารเหล่านี้ต่อไป

1.2) วัตถุประสงค์และขอบเขตของงานวิจัย

1.2.1) เพื่อตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่อาจจะเกิดขึ้นจากกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดคาเฟอิก กรดเฟอรูลิก และกรดพาราคูมาริก โดยใช้เห็ดขอนขาวและเห็ดนางนวลด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC)

1.2.2) เพื่อแยกผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค HPLC

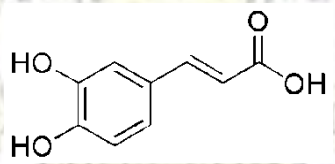
1.2.3) เพื่อระบุเอกลักษณ์ของผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (Nuclear Magnetic Resonance; NMR) และแมสสเปกโตรเมทรี (Mass spectrometry; MS)

1.2.4) เพื่อศึกษาอัตราการเปลี่ยนรูปของผลิตภัณฑ์ของกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดคาเฟอิก กรดเฟอรูลิก และกรดพาราคูมาริกโดยใช้เห็ดขอนขาวและเห็ดนางนวล

1.3) ทฤษฎีที่สำคัญและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

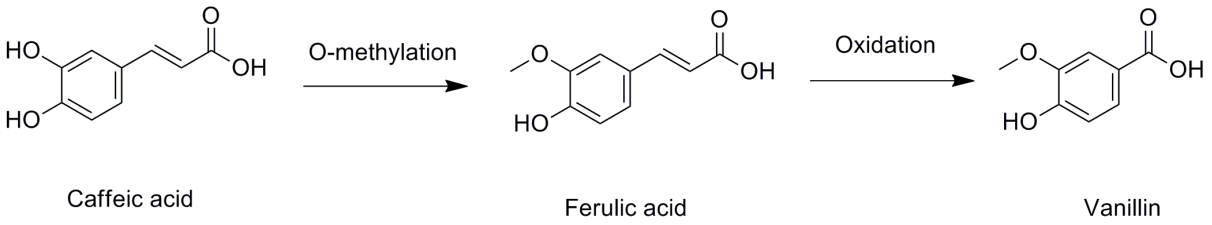
1.3.1) กระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดคาเฟอิกq1

กรดคาเฟอิก (caffeic acid หรือ 3,4-dihydroxycinnamic acid) เป็นสารที่มีโครงสร้างดังรูปที่ 1.1 โดยอาจอยู่ในรูปของกรดอิสระ หรือจับกันเป็นโอลิโกเมอร์ หรือเชื่อมด้วยสารประกอบอินทรีย์ในรูปของกลูโคไซด์และเอสเทอร์ พบกรดคาเฟอิกได้ในผลไม้ผัก และเครื่องเทศ



รูปที่ 1.1 โครงสร้างของกรดกรดคาเฟอิก

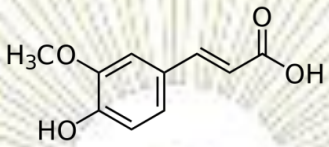
ในปี 2000 Ravishankar และคณะ[10] ใช้ *Capsicum frutescens* เปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดคาเฟอิก ได้ผลิตภัณฑ์เป็นวานิลลิน โดยขั้นแรกกรดคาเฟอิกจะถูกเมทิลเลต (methylate) ที่ตำแหน่ง เมตา (meta) ได้เป็นกรดเฟอรูลิก ซึ่งสามารถถูกออกซิไดซ์ต่อได้เป็นวานิลลิน ดังรูปที่ 1.2



รูปที่ 1.2 วิถีการเปลี่ยนรูปของกรดคาเฟอิก[13]

1.3.2) กระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดเฟอรูลิก

กรดเฟอรูลิก (ferulic acid หรือ 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid) เป็นสารประกอบฟีนอลซึ่งมีโครงสร้างดังรูปที่ 1.3 กรดเฟอรูลิกเป็นกรดที่พบมากในธัญพืชเช่น ข้าว ข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าวโอ๊ต และเมล็ดกาแฟ เป็นต้น



รูปที่ 1.3 โครงสร้างของกรดเฟอรูลิก

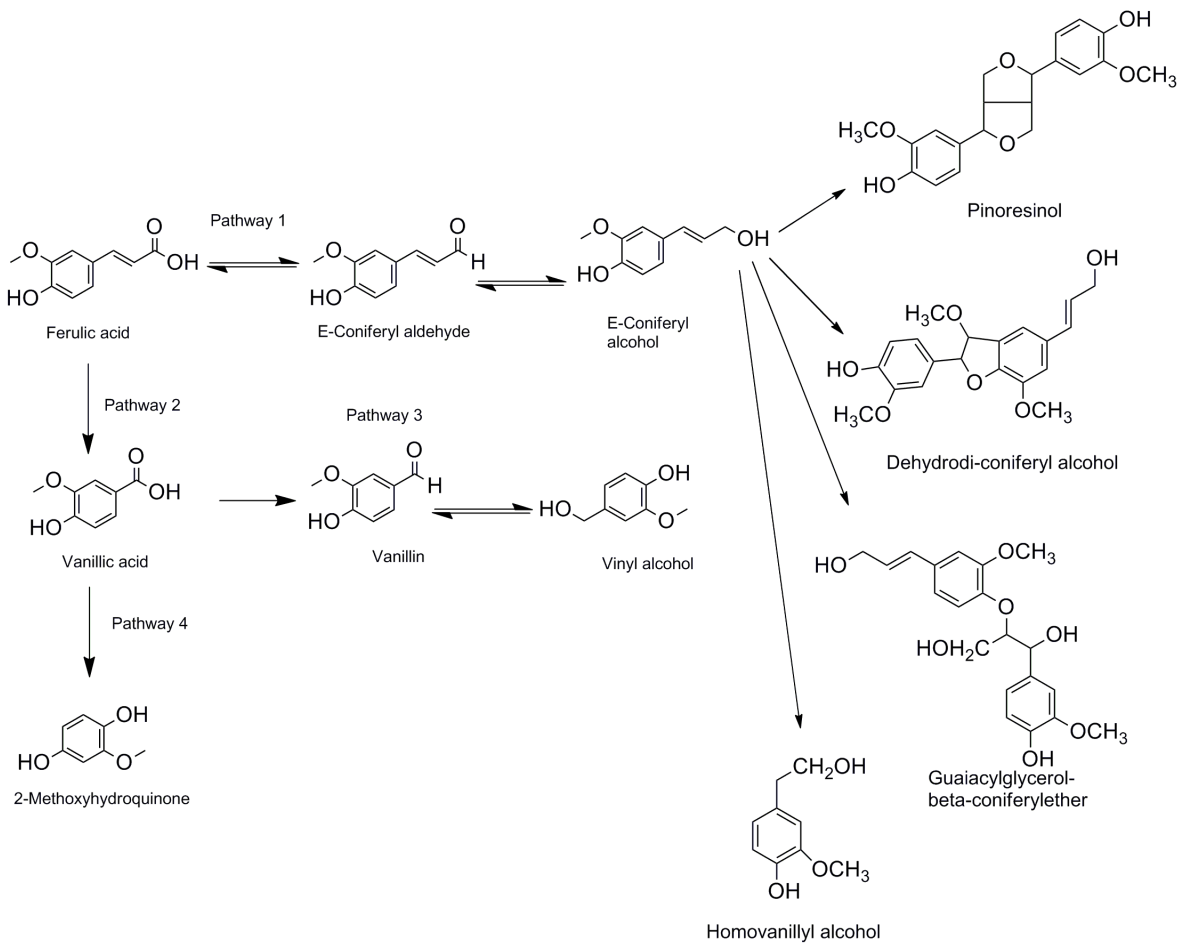
ในหลายปีที่ผ่านมาได้มีงานวิจัยเกี่ยวกับกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดเฟอรูลิกดังนี้

ในปี 1994 Asther และคณะ[4] ศึกษาการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดเฟอรูลิกโดยใช้ *Pycnoporus cinnabarinus* I-937 ซึ่งพบว่าให้ผลิตภัณฑ์คือวานิลลิน และมีวิถีการเปลี่ยนรูปดังรูปที่ 1.4 กระบวนการแคทาบอลิซึมของกรดเฟอรูลิกโดยรา *Pycnoporus cinnabarinus* I-937 มีหลายวิถีดังนี้ วิถีที่ 1 เกิดรีดักชันของกรดเฟอรูลิกนำไปสู่ผลิตภัณฑ์ที่เป็นแอลกอฮอล์และไดเมอร์หลายชนิด ในขณะที่วิถีที่เหลือ เกิดผ่านการสลายสายโซ่โพรพาโนอิกของกรดเฟอรูลิก ให้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดวานิลลิกในวิถีที่ 2 เมื่อกรดวานิลลิกถูกรีดิวส์ต่อหรือผ่านการกำจัดคาร์บอนไดออกไซด์จะทำให้ได้ไวนิลแอลกอฮอล์ (vinyl alcohol) ในวิถีที่ 3 หรือ 2-เมทอกซีไฮโดรควิโนน (2-methoxyhydroquinone) ในวิถีที่ 4 ตามลำดับ

ในปี 2007 Sachan และคณะ[11] ศึกษาการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดเฟอรูลิกโดยใช้ *Streptomyce sannanensis* MTCC 6637 ซึ่งพบว่าให้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นกรดวานิลลิก (vanillic acid) นอกจากผลิตภัณฑ์หลักแล้วคณะยังพบวานิลลิน (vanillin) เป็นสารมัธยันตร์อีกด้วย

ในปี 2014 Sachan และคณะ[12] ศึกษาการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดเฟอรูลิกโดยใช้ *Bacillus cereus* SAS-3006 พบว่าได้ผลิตภัณฑ์หลักเช่นเดียวกับ diploid strain DAR2 คือ 2-เมทอกซี-4-ไวนิลฟีนอล (2-methoxy-4-vinylphenol) นอกจากผลิตภัณฑ์หลักแล้ว คณะยังพบสารมัธยันตร์อื่นๆ เช่น วานิลลิน กรดวานิลลิก กรด 3, 4-ไดไฮดรอกซีเบนโซอิก (3, 4-Dihydroxybenzoic acid) อะซีโตวานิลโลน (acetovanillone) และวานิลลิวแอลกอฮอล์ (vanillyl alcohol)

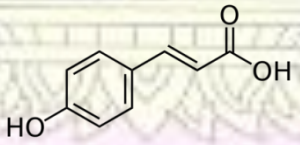
ในปี 2010 Castañeda และคณะ[5] ศึกษาการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดเฟอรูลิกโดยใช้ *Aspergillus niger* สองสายพันธุ์คือ diploid strain DAR2 และ wild strain C28B25 พบว่าสายพันธุ์ diploid strain DAR2 เร่งการเกิดปฏิกิริยากำจัดหมู่คาร์บอกซิลออกเกิดเป็น 2-เมทอกซี-4-ไวนิลฟีนอล และสายพันธุ์ wild strain C28B25 ให้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดวานิลลิก



รูปที่ 1.4 วิถีการเปลี่ยนรูปของกรดเฟอรูลิก[4]

1.3.3) กระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดพาราคูมาริก

กรดพาราคูมาริก (*p*-coumaric acid หรือ 4-hydroxycinnamic acid) เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีโครงสร้างดังรูปที่ 1.5 มีลักษณะเป็นผลึกแข็งสีขาวละลายในน้ำได้ สามารถพบได้ตามธรรมชาติและผักผลไม้ต่างๆ เช่นถั่วลิสง แครอท และพริกสีเขียว เป็นต้น



รูปที่ 1.5 โครงสร้างของกรดพาราคูมาริก

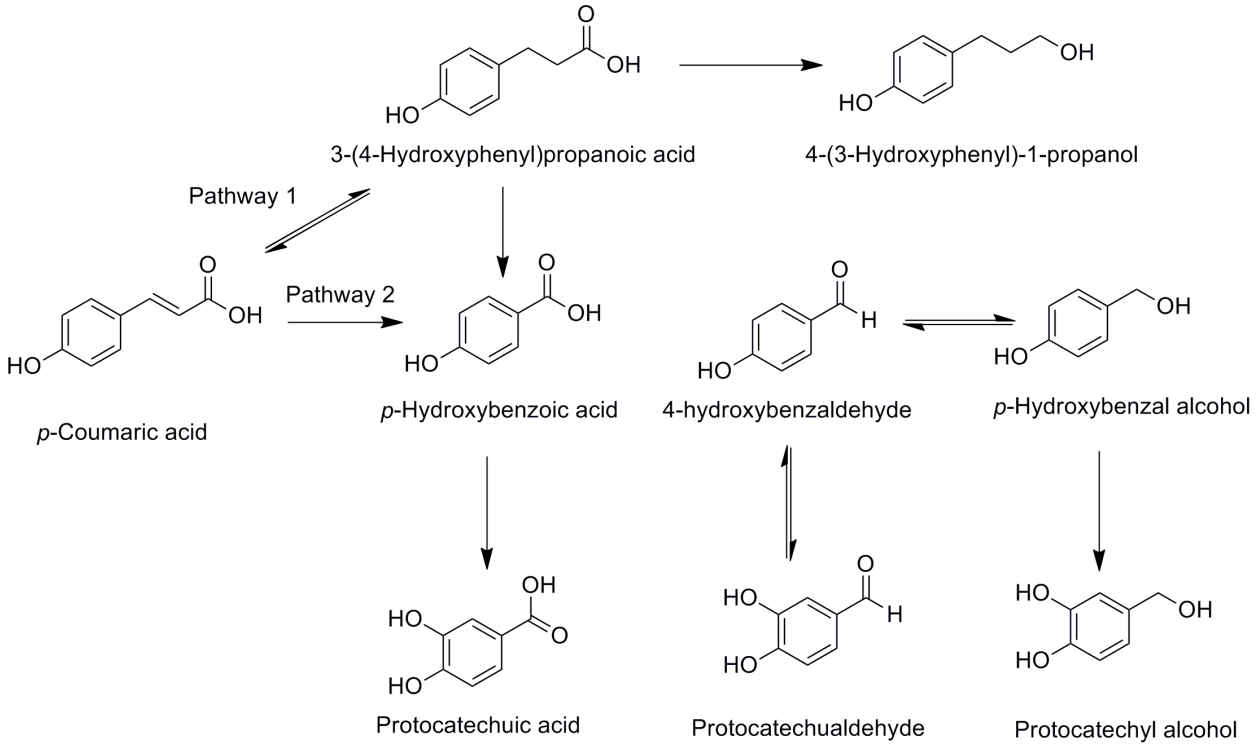
งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดพาราคูมาริกมีดังนี้

ในปี 2001 Alvarado และคณะ[13] แสดงวิถีกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดพาราคูมาริกเป็นกรดพาราไฮดรอกซีเบนโซอิก (*p*-hydroxybenzoic acid) โดยใช้ *Pycnoporus cinnabarinus* ดังรูปที่ 1.6 วิถีเมแทบอลิซึมของ *P. cinnabarinus* มีสองเส้นทางหลัก เส้นทางแรกเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยารีดักชันของสายโซ่ของพาราคูมาริกเป็นกรด 3-(4-ไฮดรอกซีฟีนิล)-1-โพรพานอล (3-(4-hydroxyphenyl)-1-propanol) และเส้นทางที่ 2 เกิดจากการสลายสายโซ่โพรพาโนอิกของกรดพาราคูมาริกและทำให้ได้กรดพาราไฮดรอกซีเบนโซอิกเป็น

ผลิตภัณฑ์หลัก และถูกออกซิไดซ์ต่อไปเป็นกรดโปรโตคาทีคูอิก (protocatechuic acid) กรด 2 ชนิดหลังนี้ยังถูกรีดิวซ์ต่อได้เป็นพาราไฮดรอกซีเบนซิลแอลกอฮอล์ (*p*-hydroxybenzyl alcohol) และโปรโตคาทีคิวแอลกอฮอล์ (protocatechylalcohol)

ในปี 2005 Mitra และคณะ[6] ศึกษากระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดพาราคูมาริกโดยใช้ *Paecilomyces variotii* และผลิตภัณฑ์หลักคือ กรดพาราไฮดรอกซีเบนโซอิก และกรดโปรโตคาทีคูอิก

ในปี 2012 Pati และคณะ[7] ศึกษากระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดพาราคูมาริกโดยใช้ *Azotobacter* sp. strain SSB81 พบว่าได้ผลิตภัณฑ์หลักเช่นเดียวกันกับข้างต้นคือ กรดพาราไฮดรอกซีเบนโซอิก และกรดโปรโตคาทีคูอิกทั้งนี้ Pati และคณะพบว่า *Azotobacter* sp. strain SSB81 จะเปลี่ยนรูปกรดพาราคูมาริกเป็นพาราไฮดรอกซีเบนซัลดีไฮด์ (*p*-hydroxybenzaldehyde) ก่อนซึ่งไม่เสถียรและสารนี้จะถูกออกซิไดซ์ต่อเป็นกรดพาราไฮดรอกซีเบนโซอิกและกรดโปรโตคาทีคูอิกอย่างรวดเร็ว



รูปที่ 1.6 วิถีการเปลี่ยนรูปของกรดพาราคูมาริก[13]

1.3.4) เห็ดขอนขาว

เห็ดขอนขาว (*Lentinus squarrosulus* mont.) เป็นเห็ดที่ขึ้นได้เองตามธรรมชาติ ตามขอนไม้ที่ผุพังในเขตป่าร้อนชื้น มีลักษณะเป็นเห็ดสีขาวและมีกรวยตื้นคล้ายแตรเกิดดอกเดี่ยวหรือเป็นกลุ่มโคนติดกันดังรูปที่ 1.7 เป็นเห็ดที่มีการเจริญเติบโตได้รวดเร็ว และนอกจากนี้ยังมีศักยภาพในการย่อยสลายทางชีวภาพ เช่น ลิกนิน

รูปที่ 1.7 เห็ดขอนขาว (*Lentinus squarrosulus* mont.)

ตัวอย่างของการใช้เห็ดขอนขาวในกระบวนการย่อยสลายสารทางชีวภาพมีดังนี้

ในปี 2004 Wuyep และคณะ[14] ศึกษากระบวนการย่อยสลายขี้เลื่อยโดยใช้เห็ดขอนขาว ซึ่งให้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมคือ กลูโคส และเอทานอล

ในปี 2012 Isikhuemhen และคณะ[15] ศึกษาวิธีการหมักอาหารแบบแข็ง (Solid-State Fermentation, SSF) โดยใช้เห็ดขอนขาวเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และใช้กากข้าวโพดเป็นสารตั้งต้น ซึ่งพบว่าให้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นน้ำตาลกลูโคสและกาแลกโตส

1.3.5) เห็ดนางนวล

เห็ดนางนวล (*Pleurotus djamor*) เห็ดนางนวลเป็นเห็ดที่เกิดเป็นกลุ่มซ้อนกันบนท่อนไม้ และกิ่งไม้แห้งโดยมีลักษณะเป็นหมวก กว้าง 2-5 เซนติเมตร เป็นรูปพัดหรือกรวยตื้นชมพูดังรูปที่ 1.8 สำหรับการนำเห็ดนางนวลมาย่อยสลายสารทางชีวภาพ ในปี 2017 Sánchez-Cantú และคณะ[16] เลี้ยงเห็ดนางนวลบนอาหารแบบแข็งกับสารตกค้างจากน้ำมันละหุ่ง (castor cake) พบว่า น้ำย่อยรวม (enzyme cocktail) ในเห็ดนางนวลสามารถสลายลิกนิน เฮมิเซลลูโลส และเซลลูโลสได้

รูปที่ 1.8 เห็ดนางนวล (*Pleurotus djamor*)

1.4) ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบอัตราการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดคาเฟอิก กรดเฟอรูลิก และกรดพาราคูมาริกโดยใช้เห็ดขอนขาวและเห็ดนางนวล และทราบเอกลักษณ์ของผลิตภัณฑ์หลักที่เกี่ยวข้อง

บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1) วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

2.1.1) วัสดุพื้นฐานภายใน

2.1.1.1) บีกเกอร์

2.1.1.2) หลอดหยด

2.1.1.3) ขวดขนาด 30 ml

2.1.1.4) กระบอกตวง

2.1.1.5) ไมโครปิเปตต์

2.1.1.6) หลอดเซนติฟิวก์ขนาด 1.7, 15 และ 50 ml

2.1.1.7) จานเลี้ยงเชื้อ

2.1.1.8) ขวดก้นกลมขนาด 250 ml

2.1.1.9) กรวยแยกขนาด 500 ml

2.1.2) เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

2.1.2.1) เครื่องชั่งน้ำหนัก

2.1.2.2) เครื่องปั่นเหวี่ยง

2.1.2.3) เครื่องอบฆ่าเชื้อ (Autoclave)

2.1.2.4) เครื่องเขย่า

2.1.2.5) ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Flow Clean Bench)

2.1.2.6) เครื่องเป่าแก๊สไนโตรเจน (Nitrogen evaporator)

2.1.2.7) โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography; HPLC)

2.1.2.8) เครื่องกลั่นระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator)

2.2) สายพันธุ์ของเห็ด อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี

2.2.1) สายพันธุ์ของเห็ด

2.2.1.1) เห็ดขอนขาว (*Lentinus squarrosulas* mont.)

2.2.1.2) เห็ดนางนวล (*Pleurotus djamo*

2.2.2) อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.2.2.1) NH_4NO_3 (J.T. Baker; Analytical grade)2.2.2.2) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (Ajax Finechem; Analytical univar reagent)

2.2.2.3) NaCl (Ajax Finechem; Analytical univar reagent)

2.2.2.4) KH_2PO_4 (Ajax Finechem; Analytical univar reagent)

2.2.2.5) Na_2HPO_4 (Ajax Finechem; Analytical univar reagent)

2.2.2.6) $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (Ajax Finechem; Analytical univar reagent)

2.2.2.7) D-glucose (Ajax Finechem; Analytical univar reagent)

2.2.2.8) Potato dextrose broth (PDB) (Himedia)

2.2.2.9) Agar powder (Himedia; Bacteriological grade)

2.2.3) สารเคมี

2.2.3.1) กรดคาเฟอิก (Caffeic acid) (TCI; > 98.0%)

2.2.3.2) กรดเฟอรูลิก (trans-Ferulic acid) (TCI; > 98.0%)

2.2.3.3) กรดพาราคูมาริก (trans-*p*-Coumaric acid) (TCI; > 98.0%)

2.2.3.4) เมทานอล (Methanol) (Honeywell; HPLC grade)

2.2.3.5) เอทิลอะซิเตท (Ethyl acetate) (Fisher Scientific; Analytical reagent grade)

2.2.3.6) คลอโรฟอร์ม (Chloroform) (RClLabscan; Analytical grade)

2.2.3.7) ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide; DMSO) (RClLabscan; Analytical grade)

2.2.3.8) กรดแกลลิก (Gallic acid hydrate) (TCI; > 98.0%)

2.2.3.9) 2-เมทอกซี-4-ไวนิลฟีนอล (2-Methoxy-4-vinylphenol)(Alfa Aesar; >96.0%)

2.2.3.10) กรดพาราไฮดรอกซีเบนโซอิก (*p*-Hydroxybenzoic acid) (G.P.R.; General purpose reagent)

2.2.3.11) กรด 3,5-ไดเมทอกซี-4-ไฮดรอกซีซินนามิก (3, 5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid หรือ sinapinic acid) (TCI; > 98.0%)

2.2.3.12) กรดทรานส์-ซินนามิก (trans-cinnamic acid) (TCI;> 98.0%)

2.2.3.13) วานิลลิน (Vanillin) (Alfa Aesar; 99%)

2.2.3.14) 4-เอทิลฟีนอล (4-ethylphenol) (TCI; > 97.0%)

2.2.3.15) 4-ไวนิลฟีนอล (4-vinylphenol) (Alfa Aesar; 10.0 - 15.0%)

2.3) การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA), Potato dextrose broth (PDB), minimal medium และวิธีการเลี้ยงเชื้อเห็ดขอนขาวและนางนวล

2.3.1) การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

ชั่ง PDB 3.6 g ในขวดรูปกรวยขนาด 500 ml แล้วเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 150 ml จากนั้นใส่วุ้นเจลาติน 2.25 g แล้วนำไปเข้าเครื่องอบฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ตั้งไว้ให้อุณหภูมิประมาณ 40-60 องศาเซลเซียส แล้วเติม streptomycin (100 mg/ml) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อและกรองผ่าน syringe filter ขนาด 0.2 µm ปริมาตร 50 µl แล้วจากนั้น เทลงจานเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการอบด้วยอุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จานละประมาณ 15 ml ในตู้ปลอดเชื้อ

2.3.2) เตรียมสต็อกเชื้อสำหรับเห็ดนางนวลและเห็ดขอนขาว

ในตู้ปลอดเชื้อ นำแท่งสับเชื้อเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.8 เซนติเมตร ที่ฆ่าเชื้อด้วยการรนไฟสามครั้งและทิ้งไว้ให้เย็น มาตัดแผ่นวุ้นเจลาตินที่มีเชื้อเห็ดโตเต็มจาน ใส่แผ่นวุ้นเจลาตินประมาณ 20 ชิ้นลงในขวดที่มีน้ำกลั่นประมาณสามในสี่ของปริมาตรขวด จากนั้น ปิเปตต์น้ำมันพาราฟิล์ม 2 ml ปิดทับด้านบน เก็บที่อุณหภูมิห้อง

2.3.3) การเลี้ยงเห็ดบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

ในตู้ปลอดเชื้อ รนไฟแท่งเหล็กปลายแหลมที่ใช้เขี่ยเชื้อจนแดงสามครั้ง ทิ้งให้เย็น จากนั้น ใช้แท่งเหล็กจิ้มแผ่นเห็ดที่ต้องการเลี้ยงจากสต็อกเชื้อในข้อ 2.3.2) มาวางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ปิดฝาและพันด้วยพาราฟิล์มแล้วใส่ในถุงพลาสติก บ่ม 7 วันที่อุณหภูมิห้อง เห็ดนางนวลและเห็นขอนขาวจะโตเต็มจานเลี้ยงเชื้อ

2.3.4) การเตรียมสต็อกของสารละลาย $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ความเข้มข้น 20 mg/ml

ชั่ง $MgSO_4 \cdot 7H_2O$0.2 g ลงในขวดขนาด 30 ml เติมน้ำกลั่น 10 ml และอบฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2.3.5) การเตรียมสต็อกของสารละลาย $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ความเข้มข้น 6.62 mg/ml

ชั่ง $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$ 0.0662 g ลงในขวดขนาด 30 ml ใส่น้ำกลั่น 10 ml และอบฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2.3.6) การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ minimal medium

ชั่ง NH_4NO_3 0.9 g NaCl 0.06 g KH_2PO_4 0.3 g และกลูโคส 1.5 g ใส่ในขวดขนาด 400 ml เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 300 ml แล้วปรับ pH ด้วยสารละลาย HCl หรือ NaOH จน pH=7 อบฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และเติมสารละลาย $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ เข้มข้น 20 mg/ml (ข้อ 2.3.4) ปริมาตร 3 ml และสารละลาย $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ เข้มข้น 6.62 mg/ml (ข้อ 2.3.5) ปริมาตร 3 ml

2.3.7) การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB

ชั่ง PDA 0.6 g ลงในขวดขนาด 50 ml ใส่น้ำกลั่น 25 ml และอบฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2.3.8) การเลี้ยงเห็ดขอนขาวและเห็ดนางนวลในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB

ในตู้ปลอดเชื้อ ปิเปตต์อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB 10 ml ลงในขวดขนาด 30 ml ที่อบฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีแล้ว นำแท่งสับเชื้อเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.8 เซนติเมตร ที่ฆ่าเชื้อด้วยการรนไฟสามครั้งและทิ้งไว้ให้เย็น มาตัดแผ่นวุ้นเจลาตินที่มีเชื้อเห็ดโตเต็มจานเลี้ยงเชื้อ 2 ชิ้นใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่ม 3 วันในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง

2.4) การเตรียมสารละลายความเข้มข้น 50 mg/ml ของกรดคาเฟอิก กรดเฟอรูลิก และกรดพาราคูมาริก

ชั่งกรดคาเฟอิก 0.5 g ในหลอดเซนติฟิวก์ขนาด 15 ml เติม DMSO จนมีปริมาตร 10 ml ทำซ้ำกับกรดเฟอรูลิก และกรดพาราคูมาริกเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

2.5) การศึกษากระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดคาเฟอิก กรดเฟอรูลิก และกรดพาราคูมาริก โดยเห็ดขอนขาวและเห็ดนางนวล

เลี้ยงเห็ดขอนขาวดังข้อ 2.3.8) ในตู้ปลอดเชื้อ ใช้แท่งเหล็กเขี่ยเชื้อที่รนไฟจนแดงสามครั้งและทิ้งให้เย็นแล้วตีเส้นใยของเห็ดขอนขาวให้เป็นชิ้นเล็กๆ ปิเปตต์อาหารเลี้ยงเชื้อ minimal medium 10 ml ลงในขวดขนาด 30 ml ที่อบฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ปิเปตต์สารละลายกรดคาเฟอิกใน DMSO ความเข้มข้น 50 mg/ml ปริมาตร 200 µl ลงในขวดเดียวกัน จากนั้น ตัดปลายปิเปตต์ทิปออกประมาณ 2 มิลลิเมตร เพื่อปิเปตต์เส้นใยของเห็ดขอนขาวในอาหารเลี้ยงเชื้อ 500 µl ลงในขวด บ่ม 7 วันในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ทำซ้ำกับสารละลายกรดเฟอรูลิกและกรดพาราคูมาริก และกับเห็ดนางนวล กรองเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อผ่านสำลีและเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ในการทดลองนี้มีชุดควบคุมเห็ดโดยทำแบบเดียวกับด้านบนแต่ไม่ใส่สารตั้งต้น และชุดควบคุมสารตั้งต้นโดยทำแบบเดียวกับด้านบนแต่ไม่ใส่เห็ดใน PDB โดยในการคำนวณเปอร์เซ็นต์การสลายตัวของสารตั้งต้น และเปอร์เซ็นต์การเกิดของสารผลิตภัณฑ์จะคำนวณตามสูตรดังต่อไปนี้

$$D\ (\%) = \frac{(A_0 - A_t)}{A_0} \times 100 \quad (1)$$

$$C\ (\%) = \frac{A_i}{A_0} \times 100 \quad (2)$$

D คือ เปอร์เซ็นต์การสลายตัวของสารตั้งต้น

C คือ เปอร์เซ็นต์การเกิดของสารผลิตภัณฑ์

A_t คือ พื้นที่ใต้กราฟของสารตั้งต้นที่เวลาใดๆ

A_0 คือ พื้นที่ใต้กราฟของสารตั้งต้นในวันที่ศูนย์

A_i คือ พื้นที่ใต้กราฟของสารผลิตภัณฑ์ที่เวลาใดๆ

2.6) การศึกษาอัตราการเปลี่ยนรูปของผลิตภัณฑ์ของกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดคาเฟอิก กรดเฟอรูลิก และกรดพาราคูมาริกโดยใช้เห็ดขอนขาวและเห็ดนางนวล

ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดคาเฟอิก เลี้ยงเห็ดขอนขาวดังข้อ 2.5) แต่หลังจากปิเปตต์เห็ดขอนขาวลงใน minimal medium แล้วเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อจากเชื้อที่เลี้ยงปริมาตร 500 µl ทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน ทำซ้ำกับกรดเฟอรูลิกและกรดพาราคูมาริก และกับเห็ดนางนวล

2.7) การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ใช้คอลัมน์ Gemini 5 µm C18 110A เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.60 มิลลิเมตร ยาว 50 มิลลิเมตร เฟสเคลื่อนที่ชนิด A (Mobile phase A) ประกอบด้วย น้ำมิลลิคิว 95% เมทานอล 5% และกรดฟอร์มิก 0.1% เฟสเคลื่อนที่ชนิด B (Mobile phase B) ประกอบด้วย น้ำมิลลิคิว 5% เมทานอล 95% และกรดฟอร์มิก 0.1%วิเคราะห์ที่ความยาวคลื่น 220, 262, 310 และ 341 nm และให้ photodioade array detector สแกนความยาวคลื่นตั้งแต่ 190-345 nm หรือ 190-800 nm ด้วยอัตรา 5 Hz ใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่และสัดส่วนของเฟสเคลื่อนที่ชนิด B ที่เวลาต่างๆเป็นดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่และสัดส่วนของเฟสเคลื่อนที่ชนิด B ที่เวลาต่างๆ ในการตรวจสอบและติดตามอัตราการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดคาเฟอิก กรดเฟอรูลิกและกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดขอนขาวและเห็ดนางนวล

เวลา (นาที)	อัตราการไหล (ml/min)	%B
0.0	0.2	0
0.0	0.2	0
3.0	0.2	0
3.1	0.4	0
5.0	0.4	0
5.1	0.4	20
45.0	0.4	70
45.1	0.5	100
53.0	0.5	100
53.1	0.5	0
59.5	0.5	0
60.0	0.1	0

2.8.1) การเตรียมสารละลายมาตรฐานเพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

เจือจางสารละลายมาตรฐานผสมของสารตั้งต้นความเข้มข้น 5% ใน DMSO 20 µl ใน minimal medium 1000 µl ในหลอดเซนติฟิวก์ขนาด 1.7 ml จากนั้นปิเปตต์สารละลายที่เจือจางแล้วนี้ 80 µl และเฟสเคลื่อนที่ชนิด A 320 µl ลงในขวดตัวอย่างขนาด 2 ml ทำซ้ำกับสารละลายมาตรฐานผสมของสารตั้งต้นความเข้มข้น 0.5%, 0.05%, 1.67% และ 0.167% ใน DMSO และสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0.5% ของ กรดแกลลิก, 2-เมทอกซี-4-ไวนิลฟีนอล, กรดพาราไฮดรอกซีเบนโซอิก, กรด 3,5-ไดเมทอกซี-4-ไฮดรอกซีซินนามิก, กรดทรานส์-ซินนามิก, วานิลลิน, 4-เอทิลฟีนอลและ 4-ไวนิลฟีนอลใน DMSO

2.8.2) การเตรียมสารตัวอย่างเพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

ปิเปตต์สารตัวอย่างที่ได้จากการบ่ม 80 µl และเฟสเคลื่อนที่ชนิด A 320 µl ใส่ขวดตัวอย่างขนาด 2 ml ฉีด 100 µl เพื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

2.8.2) การสกัดผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดนางนวล

เลี้ยงเห็ดนางนวลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดพาราคูมาริก ดังข้อ 2.5) จำนวน 10 ขวด จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่กรองเก็บได้จากทั้ง 10 ขวดมาเก็บรวมกัน (ปริมาตรรวม 100 ml) สกัดด้วยเอทิลอะซิเตตปริมาตร 3x100 ml ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น ถ้าไม่แยกชั้นหรือแยกช้า แบ่งสารละลายใส่หลอดเซนติฟิวก์ขนาด 50 ml และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5000*g* เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ (ชั้นบน) ไประเหยแห้งด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ ถ่ายสารสกัดในขวดตัวอย่างขนาด 4 ml โดยชะด้วยเอทิลอะซิเตต 3x1ml เป่าด้วยแก๊สไนโตรเจนจนแห้งและเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส ละลายใน 2.5 ml คลอโรฟอร์มก่อนทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค HPLC (ดังข้อ 2.8.3)

2.8.3) การทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดพาราคูมาริกด้วยเห็ดนางนวลบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค HPLC

ใช้คอลัมน์ที่ใช้คือ VertiSep^{TM}UPS C18 เส้นผ่านศูนย์กลาง 10 มิลลิเมตร ยาว 150 มิลลิเมตร flow gradient เป็นดังตารางที่ 2.2 ฉีดสารตัวอย่างจากข้อ 2.8.2) ครั้งละ 100 µl เพื่อแยกสารด้วยเทคนิค HPLC โดยให้ fraction collector เลือกเก็บสารตามพีคที่ตรวจพบที่ความยาวคลื่น 310 nm ระหว่างนาทีที่ 25-40 ทำซ้ำจนแยกสารตัวอย่างจากข้อ 2.8.2) จนหมดนำ fraction ที่มีผลิตภัณฑ์ (นาทีที่ 37.3-40.5) มาเทรวมกันในขวดก้นกลม นำไประเหยแห้งด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ถ่ายสารใส่ขวดตัวอย่างขนาด 4 ml โดนชะด้วยเอทิลอะซิเตต 3x1 ml เป่าด้วยแก๊สไนโตรเจนจนแห้งเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส วิเคราะห์หามวลอย่างละเอียดของสารด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมทรี (ESI-QTOF-MS) และเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (^{1}H NMR) โดยใช้ acetone-d_6 เป็นตัวทำละลาย

ตารางที่ 2.2 อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่และสัดส่วนของเฟสเคลื่อนที่ชนิด B ที่เวลาต่างๆ ในการแยกผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพ

เวลา (นาที)	อัตราการไหล (ml/min)	%B
0.0	1.5	0
0.0	1.5	0
3.0	1.5	0
3.1	3.0	0
5.0	3.0	0
5.1	3.0	20
45.0	3.0	70
45.1	3.0	100
53.0	3.0	100
53.1	3.0	0
59.5	3.0	0
60.0	0.1	0

บทที่ 3
ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

ในบทนี้เป็นผลของกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดคาเฟอิก กรดเฟอรูลิกและกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดขอนขาวและเห็ดนางนวลโดยการนำสารละลายมาตรฐานของผลิตภัณฑ์ต่างๆที่ความเข้มข้น 0.5% มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) เพื่อนำค่าเวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์มาเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพ หลังจากนั้นจึงนำข้อมูลต่างๆ มาทำกราฟมาตรฐานของสารตั้งต้นทั้ง 3 ชนิดเพื่อเปรียบเทียบปริมาณของสารตั้งต้นที่ลดลงและต่อมาเป็นการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพหลังจากการบ่ม 7 วัน แล้วศึกษาถึงอัตราการเปลี่ยนรูปของกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพ เพื่อระบุผลิตภัณฑ์หลักที่อาจจะเกิดขึ้นที่เวลาอื่น เพื่อดูอัตราการหายไปของสารตั้งต้น และเพื่อดูอัตราการผลิตของผลิตภัณฑ์หลักที่เกิดขึ้น และสุดท้ายเป็นการระบุเอกลักษณ์ของผลิตภัณฑ์หลักที่ได้ด้วยเทคนิคเทคนิคแมสสเปกโตรเมทรี (ESI-QTOF-MS) และเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (^{1}H NMR)

3.1) การวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) เพื่อนำค่าเวลาที่สารมาตรฐานเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ (retention time) เทียบกับเวลาที่สารที่ได้จากกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์

ในหัวข้อนี้เป็นการระบุเวลาที่สารมาตรฐานเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์เพื่อเปรียบเทียบค่าเวลานี้กับสารตั้งต้นที่เหลือ และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดคาเฟอิก กรดเฟอรูลิกและกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดขอนขาวและเห็ดนางนวล ในการศึกษาก่อนหน้านี้ของกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดคาเฟอิกกรดเฟอรูริก และกรดพาราคูมาริกพบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้มีหลากหลายชนิดดังวิถีต่างๆ ในบทที่ 1 จึงเตรียมสารละลายมาตรฐาน 0.5% ของผลิตภัณฑ์ดังตารางที่ 3.1 มาวิเคราะห์เหตุที่เตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.5% เนื่องจากมีความเข้มข้นเป็น 1 ใน 10 ของความเข้มข้นเริ่มต้นของสารตั้งต้น (ที่ความเข้มข้น 5% พีคของผลิตภัณฑ์อิ่มตัวทำให้ไม่เห็นยอดพีค) ของกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพ (ดังหัวข้อ 2.5) และหลังจากนั้นนำสารละลายมาตรฐานนี้มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้ตัวตรวจวัดเป็น Diode array detector (DAD) ได้ผลดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 เวลาที่สารมาตรฐานความเข้มข้น 0.5% เคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์และค่าความยาวคลื่นที่ดูดกลืนมากที่สุดที่วิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC โดยใช้เครื่องตรวจวัดเป็น DAD

สาร	เวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ (นาที)	ความยาวคลื่นสูงสุด (นาโนเมตร)
กรดคาเฟอิก (caffeic acid)	14.1	215
กรดเฟอรูลิก (ferulic acid)	18.8	322
กรดพาราคูมาริก (*p*-coumaric acid)	17.7	309
กรดแกลลิก (gallic acid)	7.9	214
2-เมทอกซี-4-ไวนิลฟีนอล (2-Methoxy-4-vinylphenol)	26.8	262
กรดพาราไฮดรอกซีเบนโซอิก (*p*-hydroxybenzoic acid)	12.5	256
3,5-ไดเมทอกซี-4-ไฮดรอกซีซินนามิก (3, 5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid)	19.1	236
กรดซินนามิก (cinnamic acid)	28.3	278
วานิลลิน (vanillin)	14.8	229
4-เอทิลฟีนอล (4-ethylphenol)	28.4	220
4-ไวนิลฟีนอล (4-vinylphenol)	25.8	257

จากตารางที่ 3.1 ที่แสดงสารมาตรฐานที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC โดยคอลัมน์เป็นชนิด reverse phase ซึ่งจะให้เฟสนิ่งเป็นสารที่ไม่มีขั้ว ดังนั้นสารที่ออกมาก่อนจะมีสภาพขั้วที่มากกว่าสารที่ออกมาทีหลัง เมื่อลองพิจารณาสภาพขั้วของ 2-เมทอกซี-4-ไวนิลฟีนอลและ 4-ไวนิลฟีนอล (4-vinylphenol) ซึ่งมีสภาพขั้วต่ำจึงทำให้ออกมาทีหลังจะพบว่าสารทั้งสองชนิดนี้มีโครงสร้างคล้ายกันคือมีสายแอลคีน ซึ่งสายแอลคีนนี้เป็นสายที่ไม่มีขั้วจึงทำให้ลดความแรงของสภาพขั้วของโมเลกุล ในทำนองเดียวกันกับ 4-เอทิลฟีนอล ที่มีสายแอลเคนและกรดซินนามิกที่มีวงเบนซีนที่มีสายแอลคีนซึ่งส่วนนี้ก็จะทำให้ความมีขั้วของโมเลกุลลดลงด้วยจึงทำให้สารพวกนี้ที่ออกมาในเวลาที่ช้ากว่าและนอกจากนี้ตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซิลยังอยู่ในทิศที่มีค่าไดโพโมเมนต์หักล้างกันทำให้สภาพขั้วต่ำ

เมื่อพิจารณาถึงค่าความยาวคลื่นที่สูงที่สุดของการดูดกลืนแสง พบว่าปกติสารประกอบอะโรมาติกจัดอยู่ในหมู่โครโมฟอร์ (chromophore) ซึ่งสารกลุ่มนี้คือสารประกอบอินทรีย์ที่สามารถดูดกลืนแสงช่วงอัลตราไวโอเลตได้ โดยจะพบว่าถ้าหมู่โครโมฟอร์เหล่านี้เกิดคอนจูเกต (conjugate) กันเองจะทำให้เกิดแถบการดูดกลืนที่เลื่อนไปในทางความยาวคลื่นที่มากขึ้น ดังตัวอย่างเช่น 4-ไวนิลฟีนอล และ 4-เอทิลฟีนอล ที่มีโครงสร้างคล้ายๆ กันแต่แตกต่างกันตรงที่ 4-ไวนิลฟีนอล มีพันธะคู่เพิ่มขึ้นมา 1 ตำแหน่งจึงทำให้ 4-ไวนิลฟีนอล นี้เกิดการคอนจูเกตกันเองทำให้ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงกว่า 4-เอทิลฟีนอล ซึ่งมาจากสาเหตุที่ว่าการคอนจูเกตทำให้อิเล็กตรอนในออร์บิทัลสามารถเคลื่อนที่ได้มากขึ้น ทำให้อิเล็กตรอนสามารถเคลื่อนที่หรือเปลี่ยนสภาวะได้ง่ายเมื่อจำนวนพันธะคู่ที่คอนจูเกตเพิ่มมากขึ้น จะทำให้โมเลกุลดูดกลืนรังสีที่ความยาวคลื่นยาวขึ้น เนื่องจากระดับพลังงานสภาวะของอิเล็กตรอนเข้าใกล้กันมากขึ้น เป็นผลให้พลังงานที่ใช้ในการเปลี่ยน

สภาวะของอิเล็กตรอนจาก bonding orbital ไปยัง antibonding orbital มีค่าลดลงและความเข้มข้นในการดูดกลืนแสงก็จะลดลงด้วย

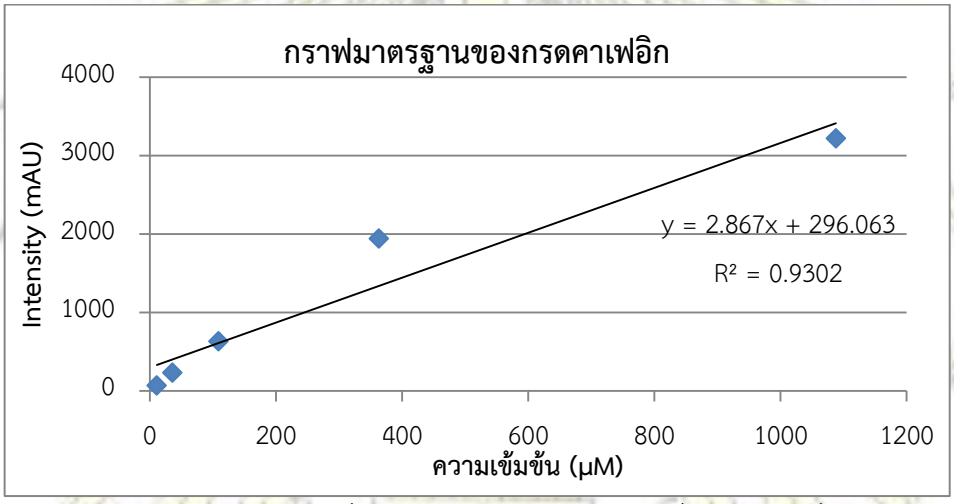
3.2) การวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานของกรดคาเฟอิก กรดเฟอรูลิกและกรดพาราคูมาริกที่ความเข้มข้น 0.05% 0.167% 0.5% 1.67% และ 5% ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

ในหัวข้อนี้เป็นการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานของกรดคาเฟอิก กรดเฟอรูลิกและกรดพาราคูมาริก เพื่อนำไปสร้างกราฟมาตรฐาน และบ่งบอกถึงปริมาณของสารตั้งต้นที่เหลือหลังจากกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพโดยเห็ดขอนขาวและเห็ดนางนวลและนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC และเลือกความเข้มข้นก่อนเจือจางเป็น 5% เนื่องจากเป็นความเข้มข้นของสารตั้งต้นเริ่มต้นของกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพ และหลังจากนั้น จึงเจือจางต่อไปเป็นความเข้มข้น 0.05% 0.167% 0.5% และ 1.67% ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร เพราะเนื่องจากที่ความยาวคลื่นนี้ให้ค่า intensity ของสารตั้งต้นที่สูงที่สุด และหลังจากนั้นก็นำค่าความเข้มข้นของสารตั้งต้นและค่า intensity ไปสร้างกราฟมาตรฐาน เพื่อดูแนวโน้มสารตั้งต้นที่หายไปหลังการบ่ม

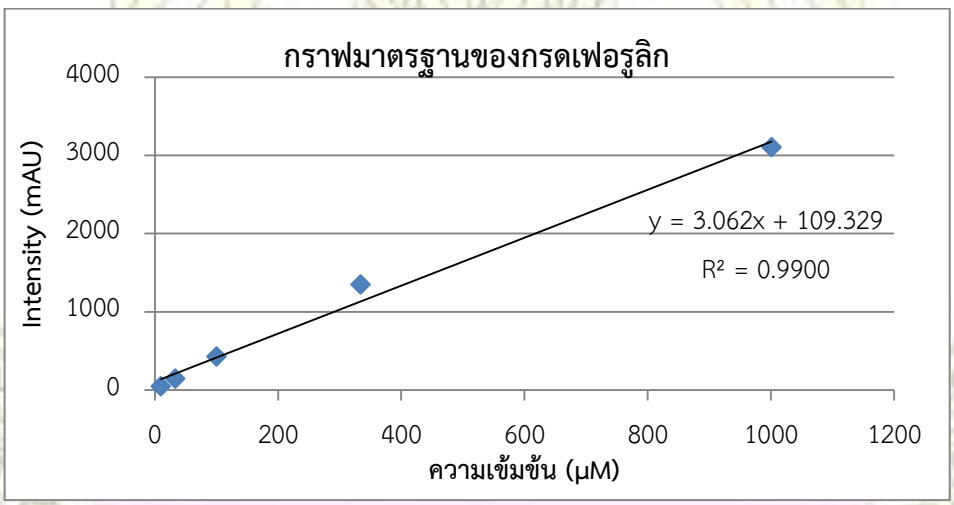
ตารางที่ 3.2 ความเข้มข้นของกรดคาเฟอิก กรดเฟอรูลิกและกรดพาราคูมาริกก่อนเจือจางที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร

สาร	ความเข้มข้น		เวลาที่สารออก (นาที)	Intensity (mAU)
	(%)	(μM)		
กรดคาเฟอิก	5	1088	14.0	3219
	1.67	363	14.0	1942
	0.5	109	14.1	628
	0.167	36	14.1	230
	0.05	11	14.1	68
	เวลาที่สารออกเฉลี่ย (นาที)		14.1	
กรดเฟอรูลิก	5	1001	18.5	3103
	1.67	334	18.7	1349
	0.5	100	18.7	427
	0.167	33	18.8	147
	0.05	10	18.8	46
	เวลาที่สารออกเฉลี่ย (นาที)		18.7	

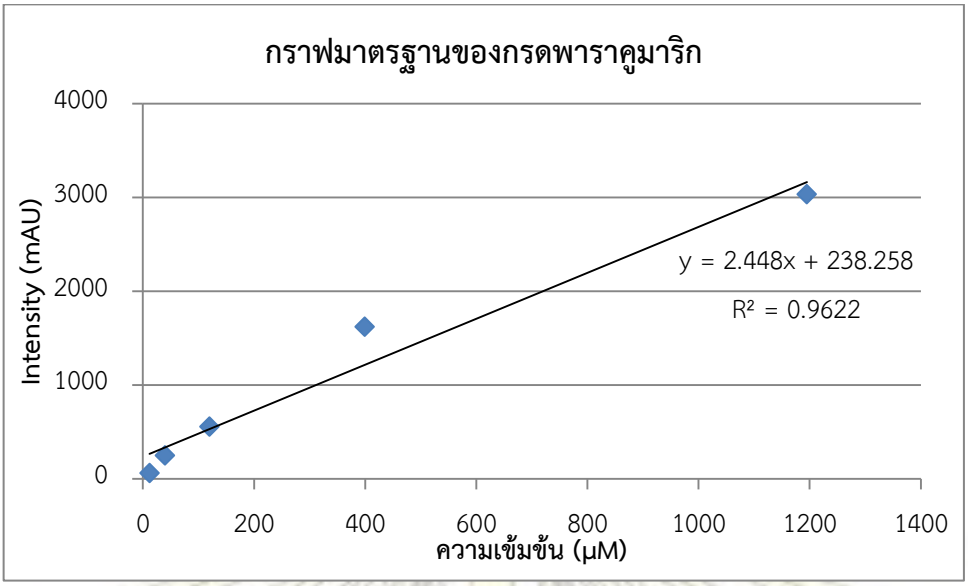
สาร	ความเข้มข้น (%)	ความเข้มข้น (%)	เวลาที่สารออก (นาที)	Intensity (mAU)
กรดพาราคูมาริก	5	1195	17.4	3031
	1.67	399	17.6	1618
	0.5	120	17.7	554
	0.167	40	17.7	249
	0.05	12	17.7	61
	เวลาที่สารออกเฉลี่ย (นาที)		17.6	



รูปที่ 3.1 กราฟมาตรฐานของกรดคาเฟอิกที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร



รูปที่ 3.2 กราฟมาตรฐานของกรดเฟอรูลิกที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร



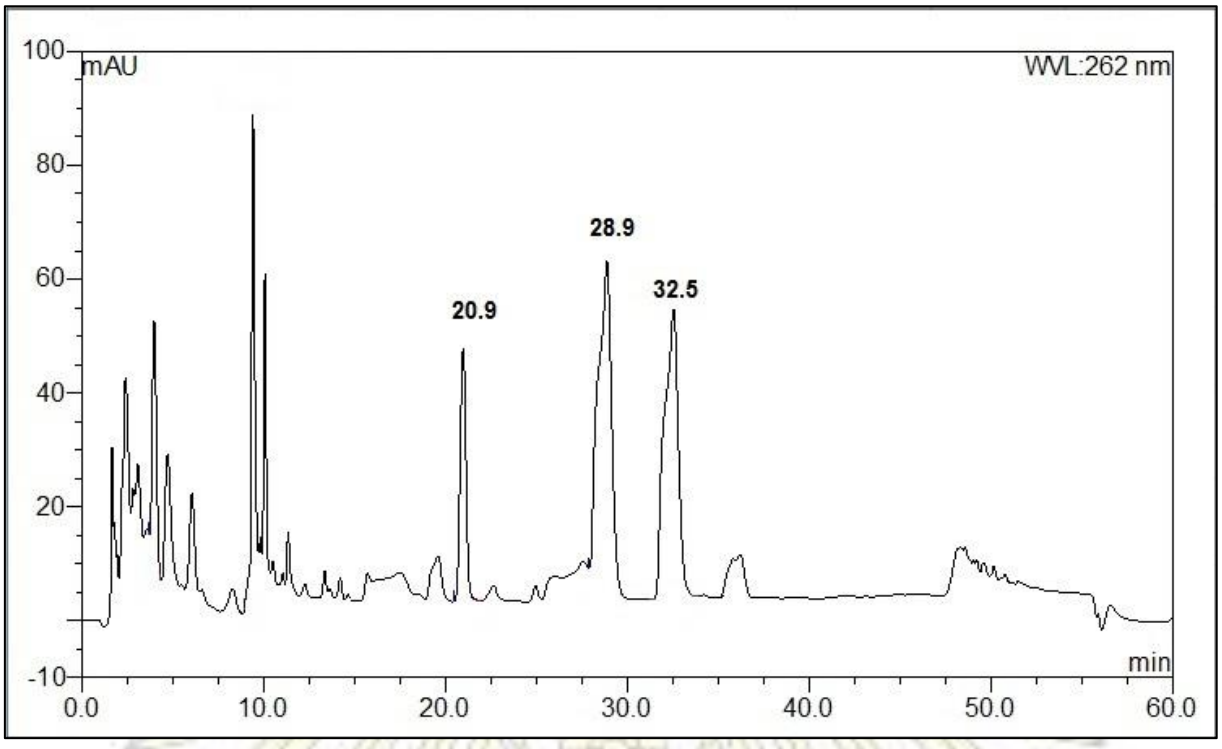
รูปที่ 3.3 กราฟมาตรฐานของกรดพาราคูมาริกที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร

จากตารางที่ 3.2 แสดงค่าความเข้มข้นในหน่วยของเปอร์เซ็นต์ และไมโครโมลาร์รวมถึงเวลาที่สารตั้งต้นเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ โดยจะพบว่ากรดคาเฟอิก กรดเฟอรูลิกและกรดพาคารูมาริกออกมาที่เวลา 14.1 18.7 และ 17.6 นาที ตามลำดับและหลังจากการพล็อตกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารตั้งต้น (μM) ในแกน x และค่า intensity ในแกน y ได้กราฟมาตรฐานดังรูปที่ 3.1 ถึง 3.3 โดยสมการกราฟมาตรฐานของกรดคาเฟอิกคือ $y = 2.867x + 296.063$ และมีค่า $R^2 = 0.9302$ สมการกราฟมาตรฐานของกรดเฟอรูลิกคือ $y = 3.062x + 109.329$ และมีค่า $R^2 = 0.9900$ และสมาการกราฟมาตรฐานของกรดพาราคูมาริกคือ $y = 2.448x + 238.258$ และค่า $R^2 = 0.9622$ และเมื่อพิจารณาค่า R^2 ของกราฟมาตรฐานของสารตั้งต้นทั้ง 3 พบว่ามีค่าใกล้เคียง 1

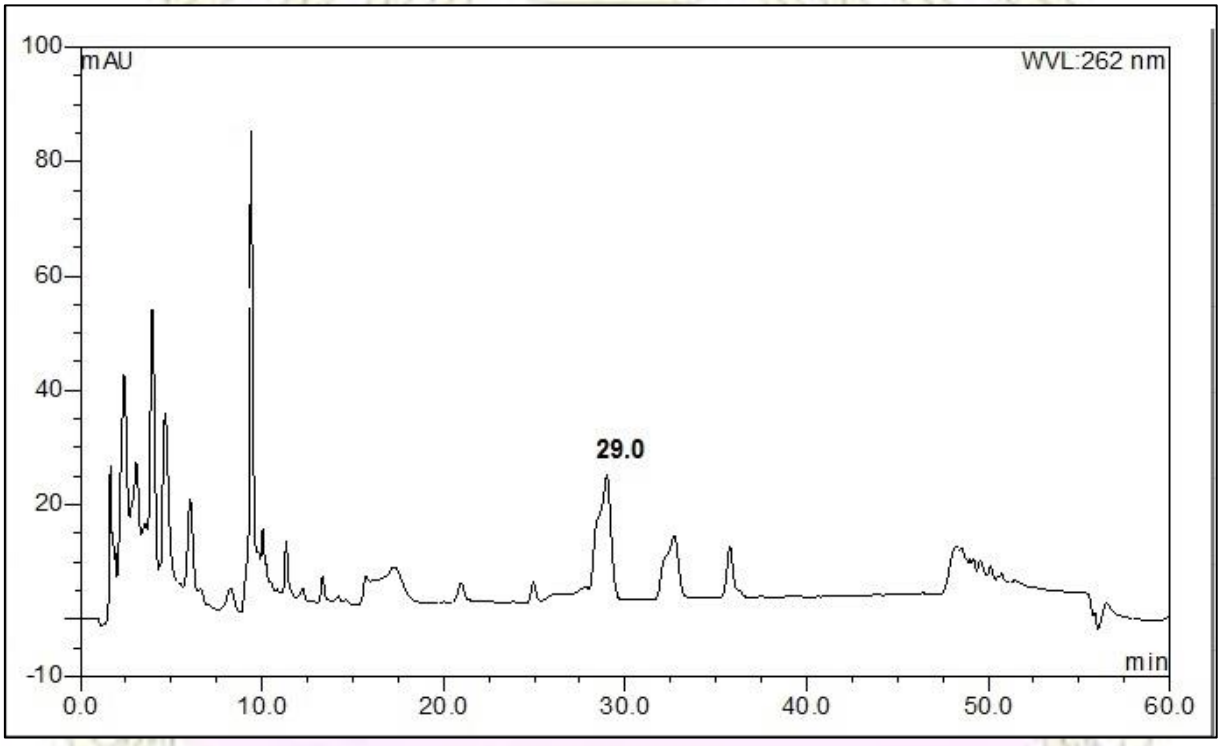
3.3) การตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดคาเฟอิก กรดเฟอรูลิกและกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดขอนขาวและเห็ดนางนวล

ในการทดลองนี้เป็นการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่อาจเกิดขึ้นจากการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดคาเฟอิก กรดเฟอรูลิกและกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดขอนขาวและเห็ดนางนวล โดยการบ่มสารตั้งต้นทั้งสามชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อของเห็ดขอนขาวหรือเห็ดนางนวลอยู่ โดยบ่มเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC และเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ว่าผลิตภัณฑ์ที่พบออกมาที่เวลาเท่าไร และนำไปเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานดังตารางที่ 3.1

(a)

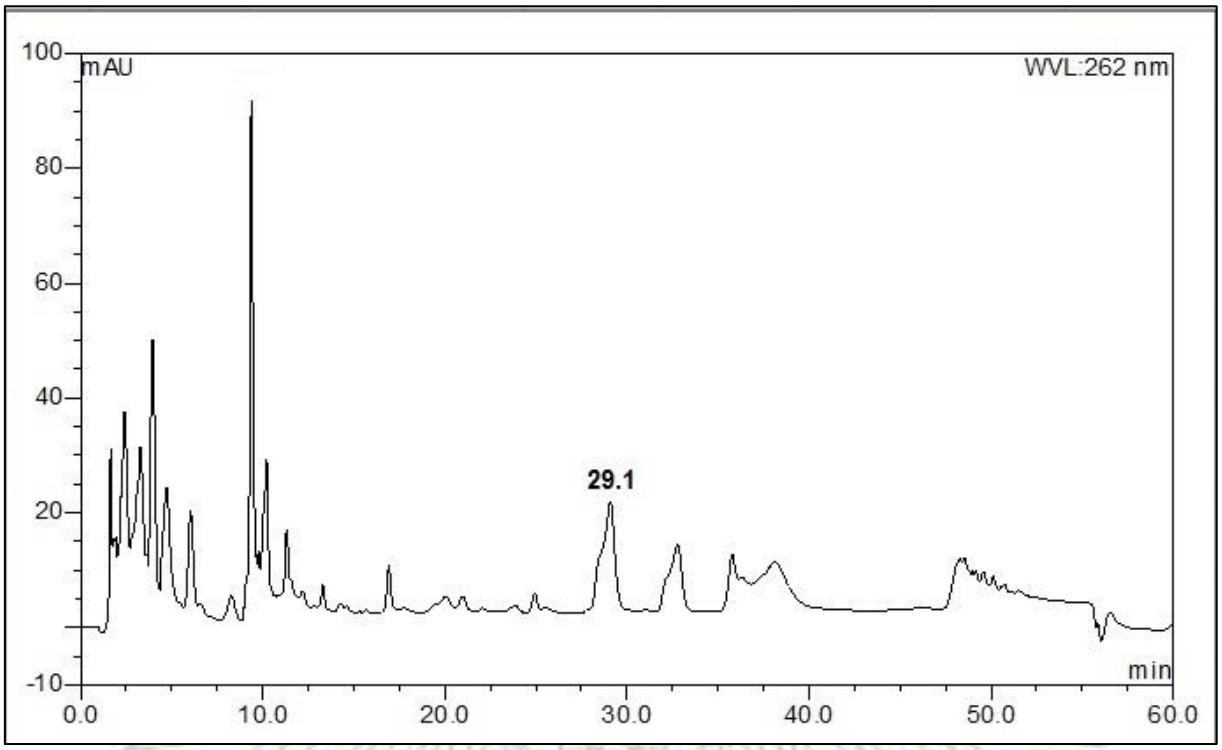


(b)

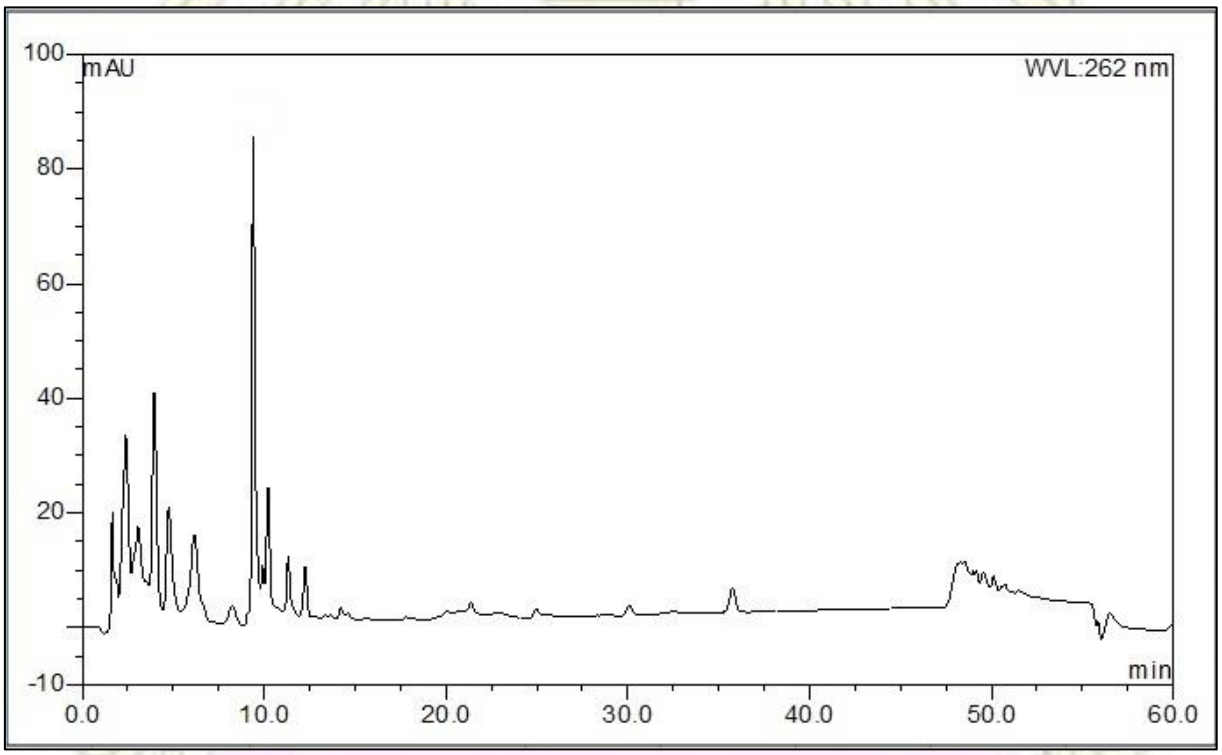


รูปที่ 3.4 โครมาโทแกรมของกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดคาเฟอิกโดยเห็ดขอนขาวในครั้งที่ 1 (a) และครั้งที่ 2 (b) ที่วิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร โดยแกน x คือเวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ (นาที) และแกน y คือ intensity (mAU)

(a)

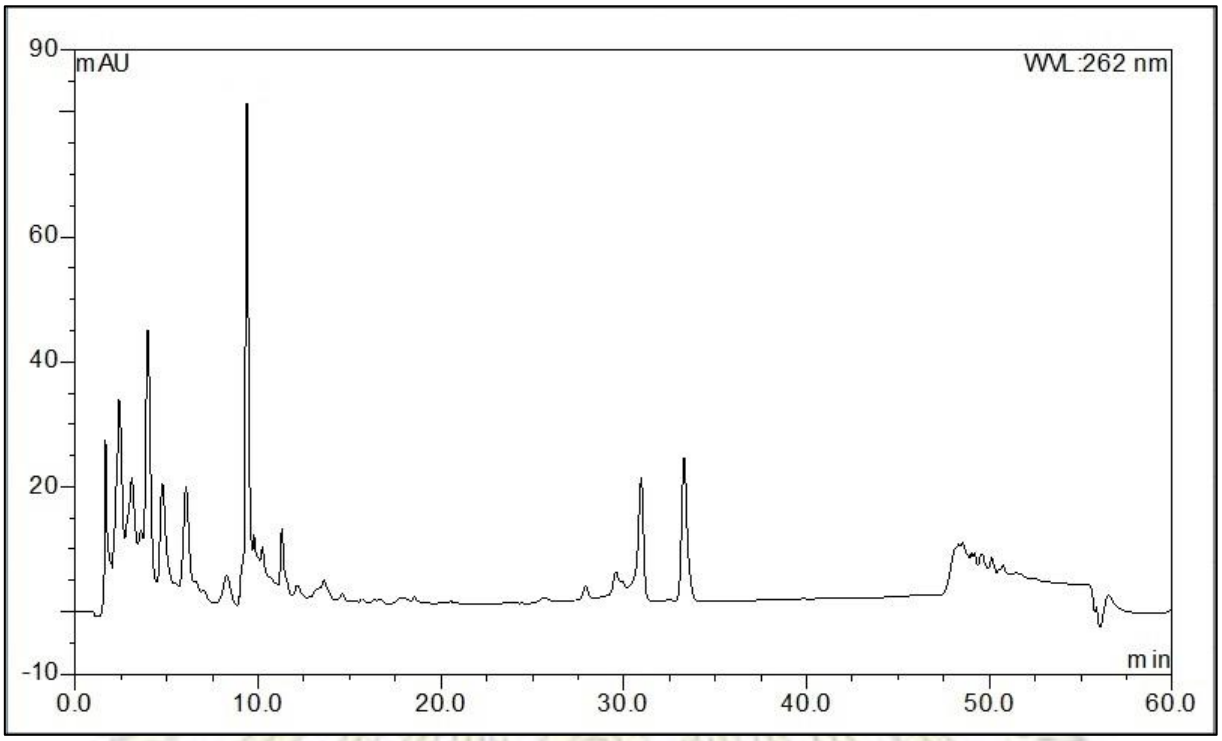


(b)

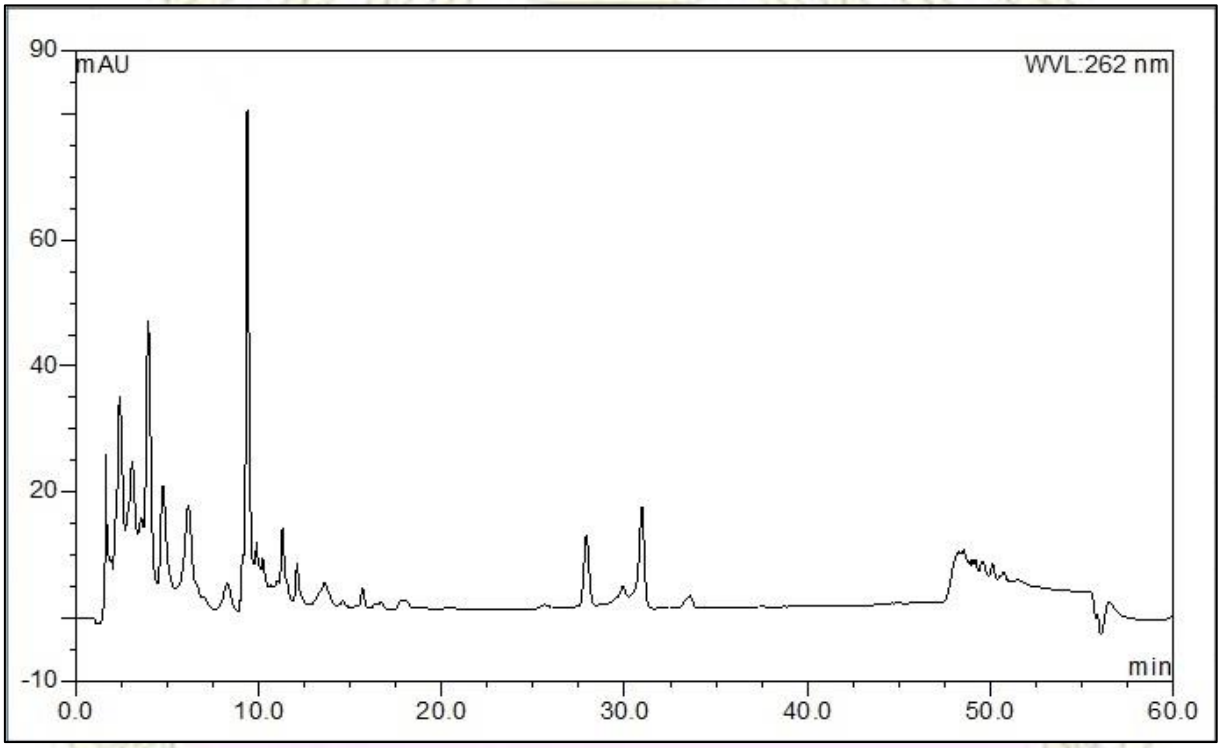


รูปที่ 3.5 โครมาโทแกรมของกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดคาเฟอิกโดยเห็ดนางนวลในครั้งที่ 1 (a) และครั้งที่ 2 (b) ที่วิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร โดยแกน x คือเวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ (นาที) และแกน y คือ intensity (mAU)

(a)

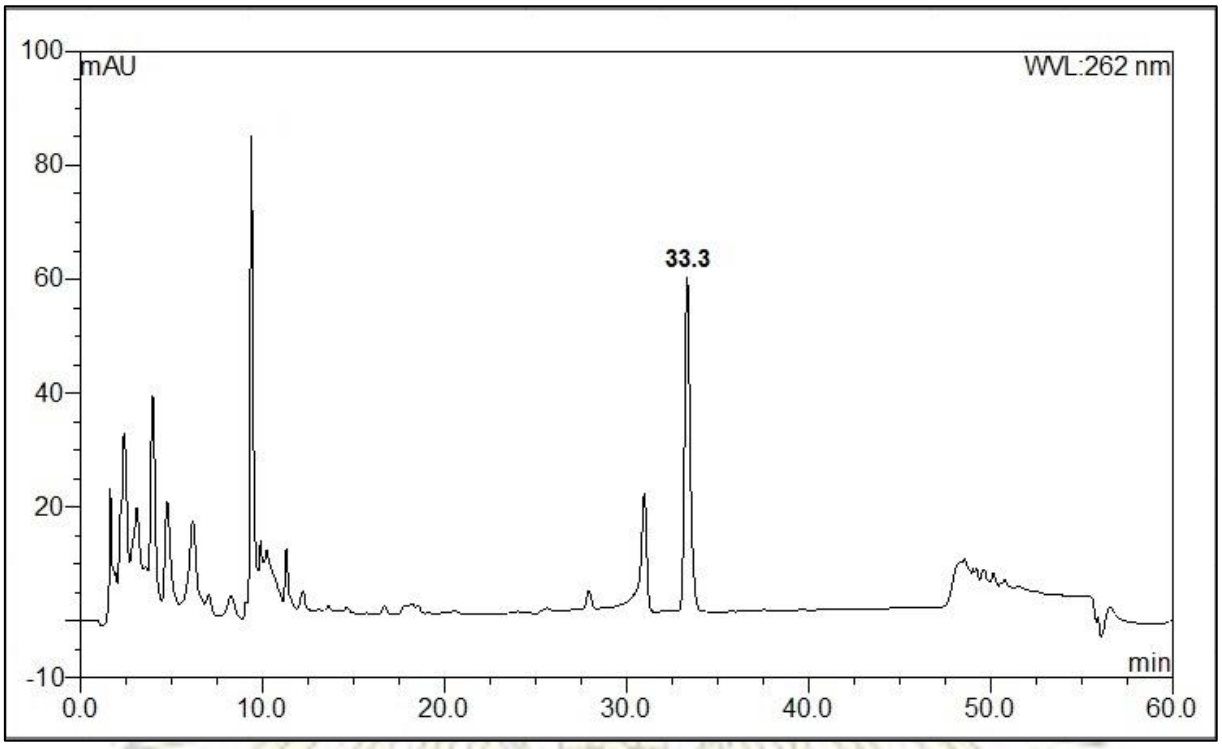


(b)

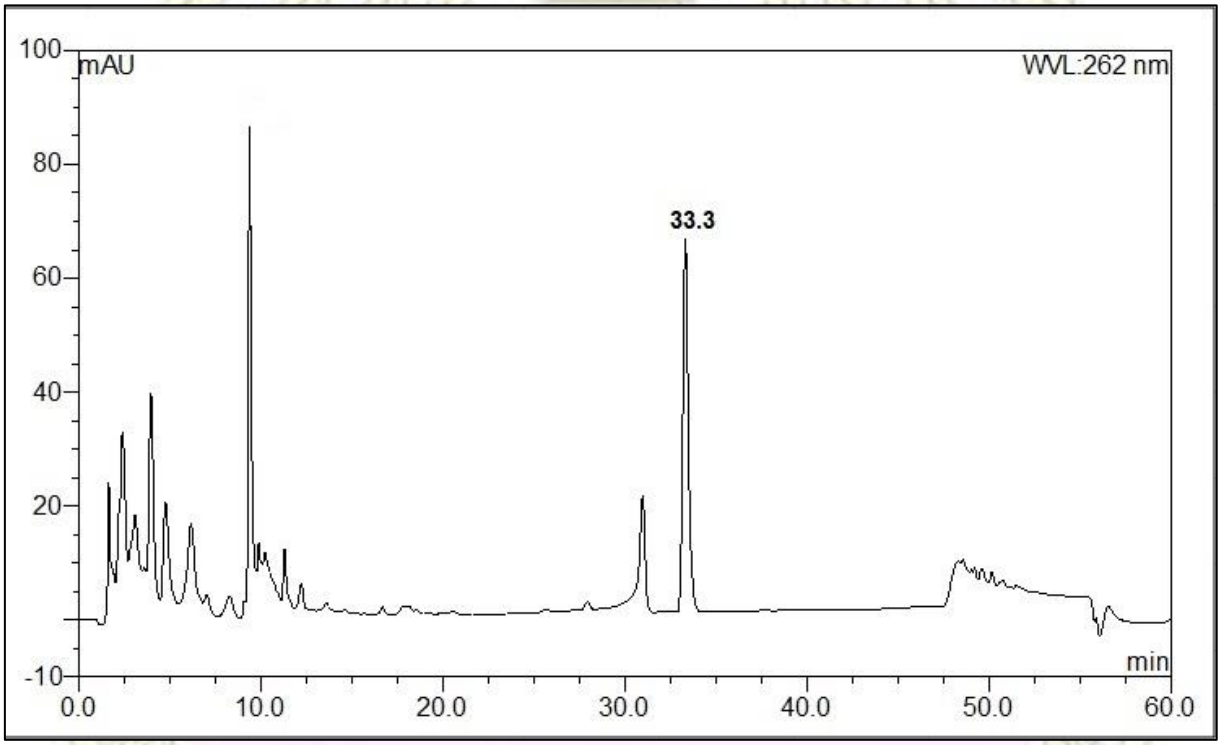


รูปที่ 3.6 โครมาโทแกรมของกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดเฟอรูลิกโดยเห็ดขอนขาวในครั้งที่ 1 (a) และครั้งที่ 2 (b) ที่วิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร โดยแกน x คือเวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ (นาที) และแกน y คือ intensity (mAU)

(a)

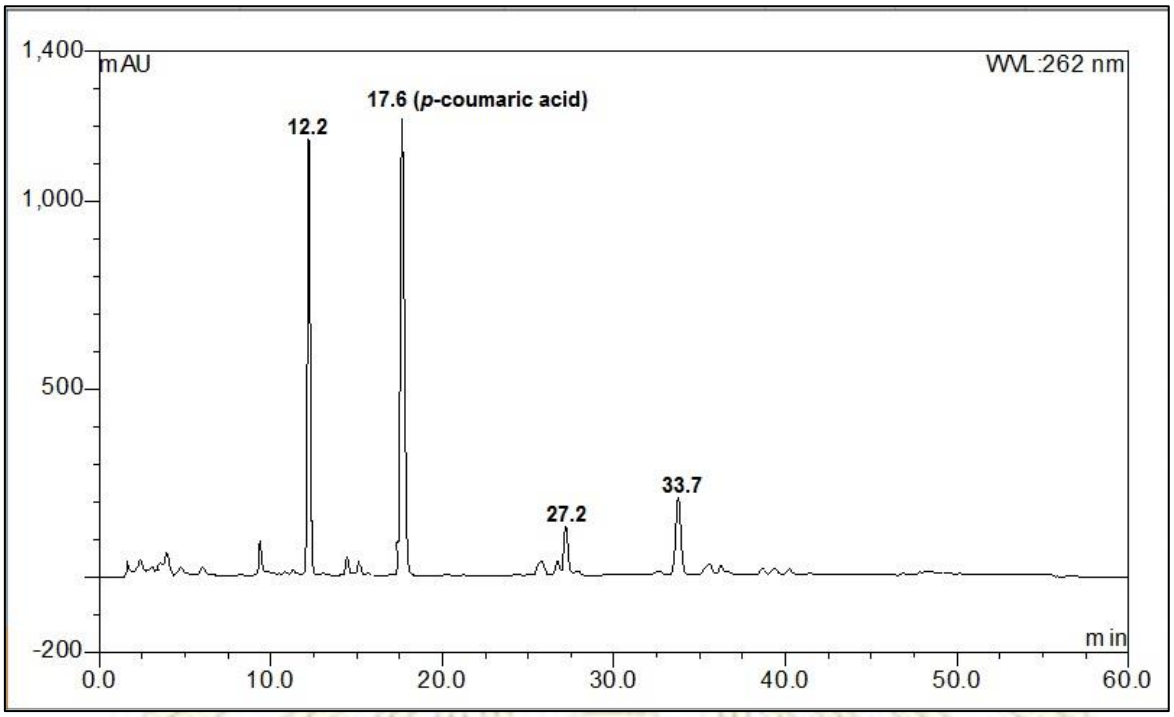


(b)

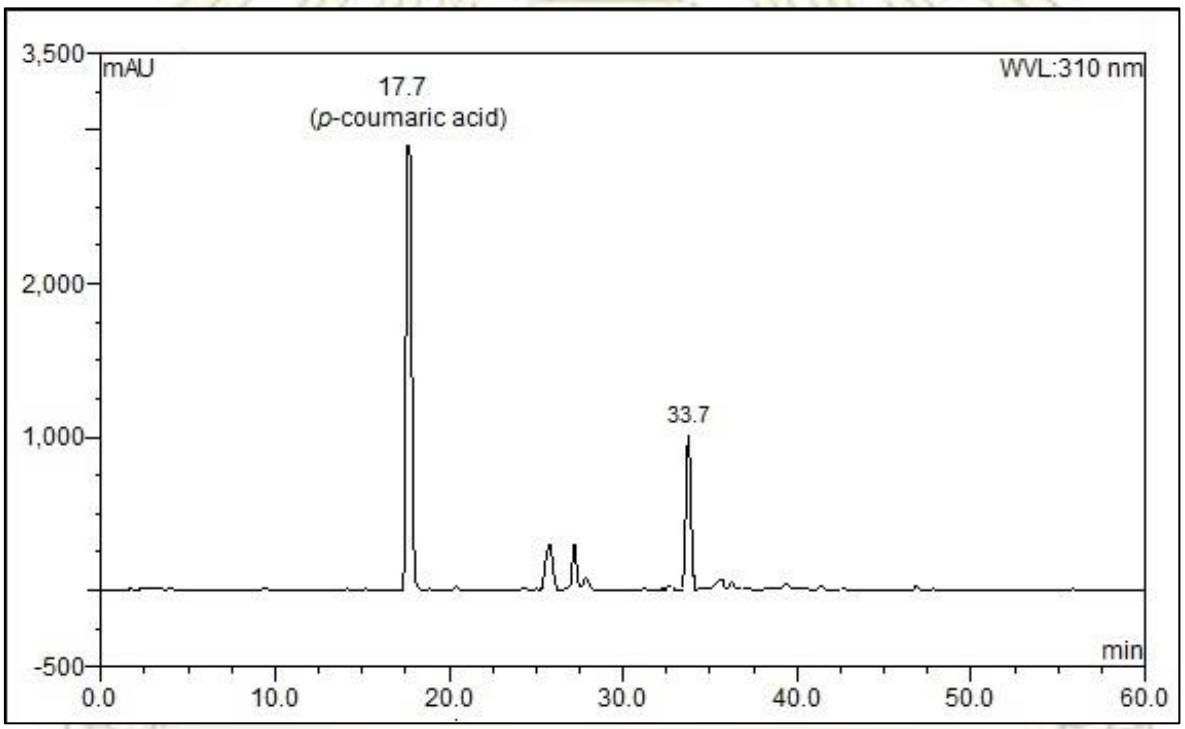


รูปที่ 3.7 โครมาโทแกรมของกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดเฟอรูลิกโดยเห็ดนางนวลในครั้งที่ 1 (a) และครั้งที่ 2 (b) ที่วิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร โดยแกน x คือเวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ (นาที) และแกน y คือ intensity (mAU)

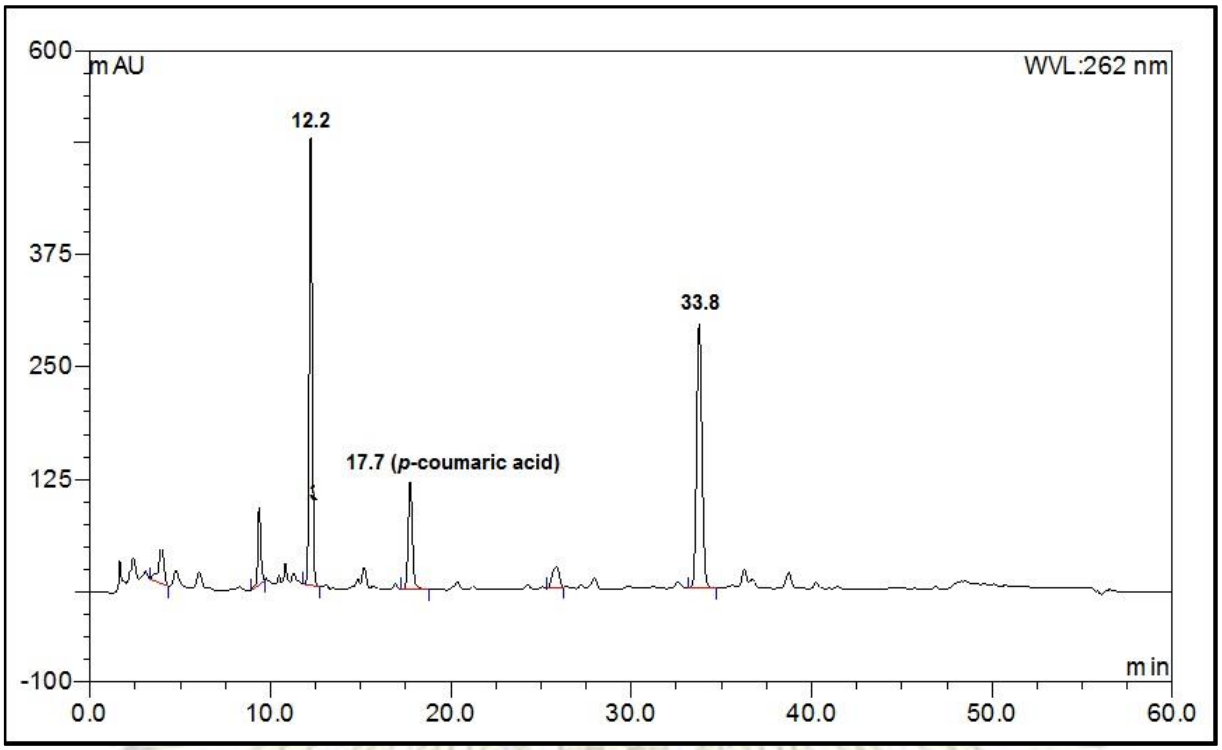
(a)


1,400
1,000
500
-200
mAU
WVL:262 nm
12.2
17.6 (p-coumaric acid)
27.2
33.7
min
0.0
10.0
20.0
30.0
40.0
50.0
60.0

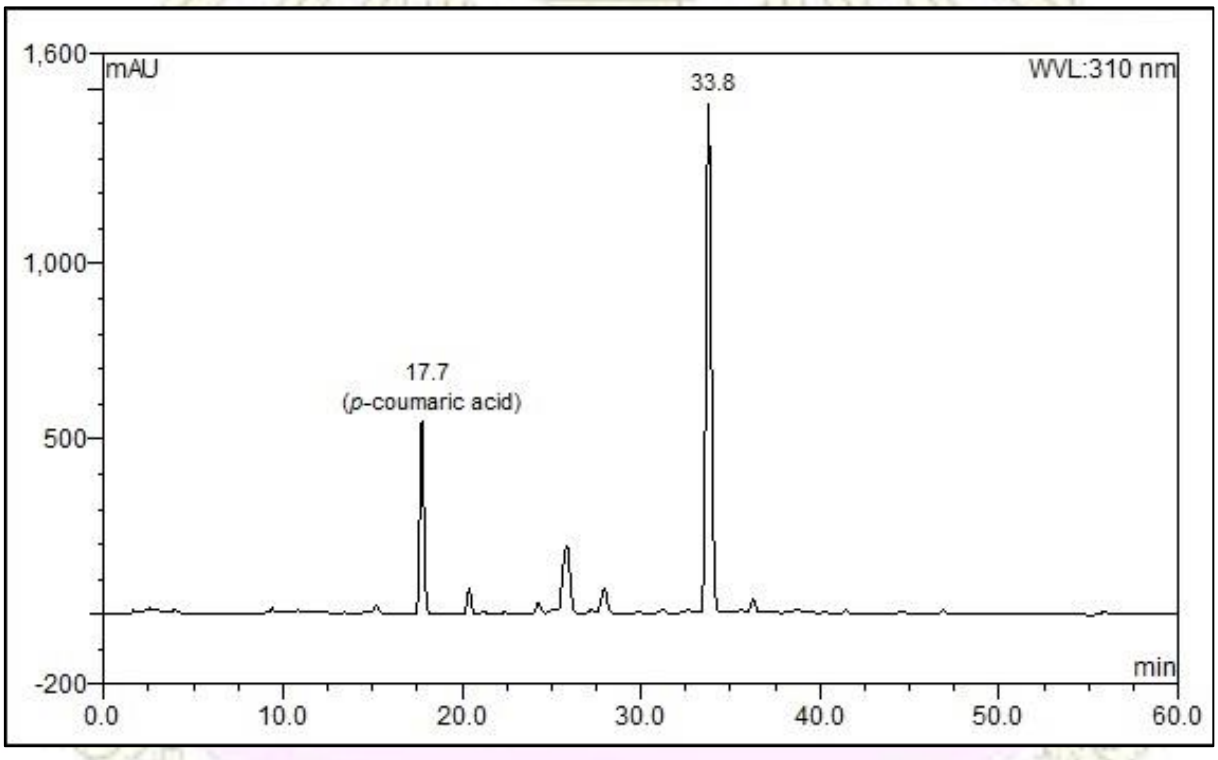
(b)


3,500
2,000
1,000
-500
mAU
WVL:310 nm
17.7
(p-coumaric acid)
33.7
min
0.0
10.0
20.0
30.0
40.0
50.0
60.0

(c)

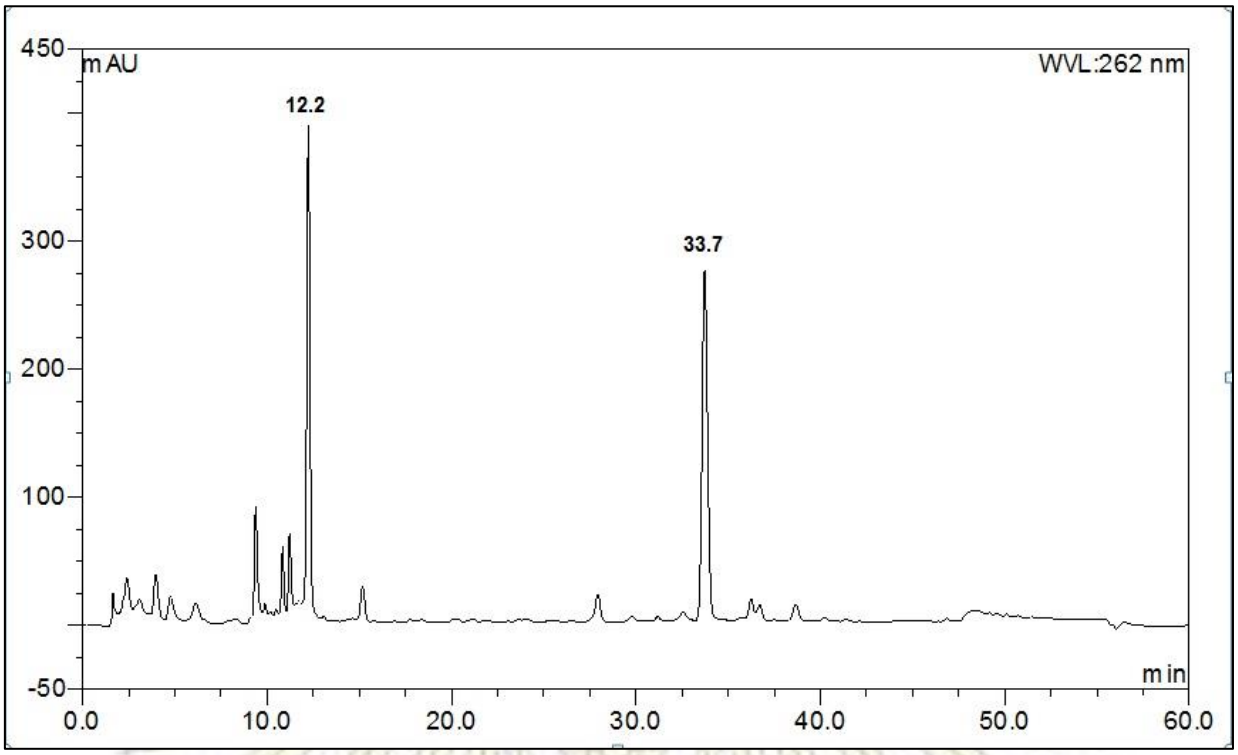


(d)

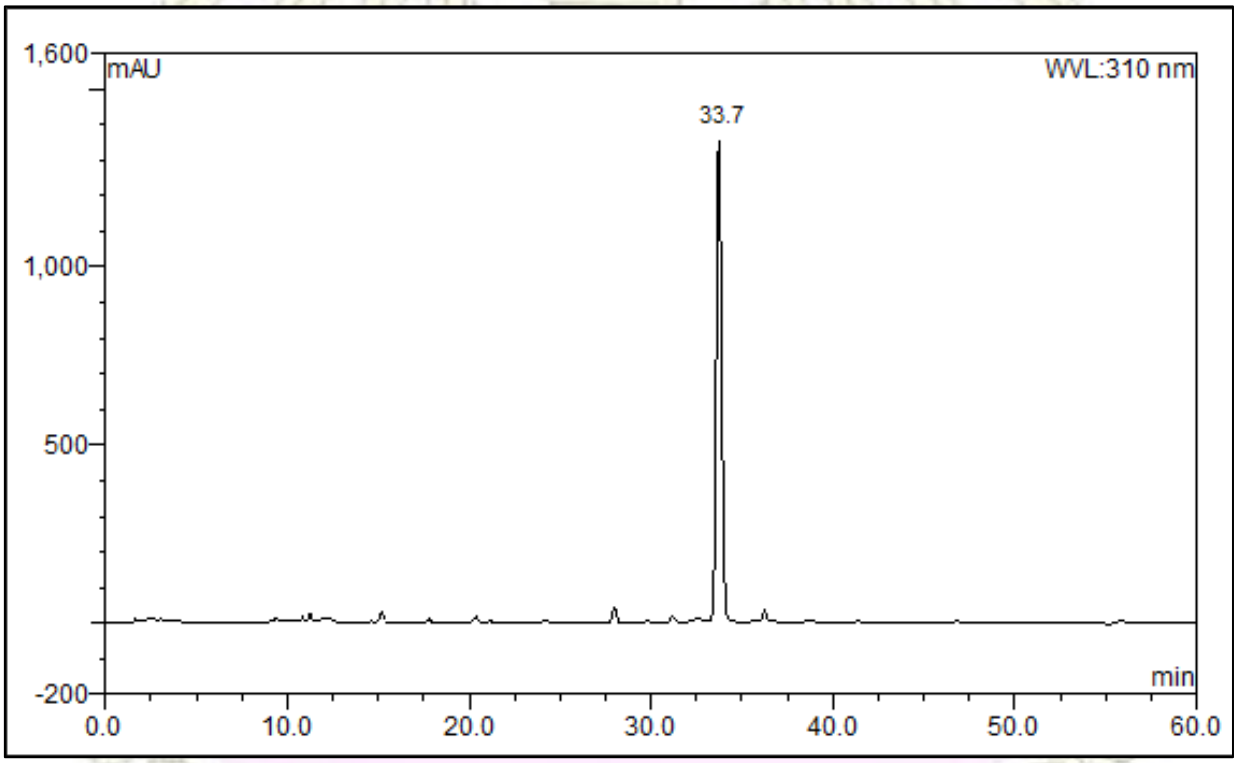


รูปที่ 3.8 โครมาโทแกรมของกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดขอนขาวในครั้งที่ 1 (a) และ (b) ที่วิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC ที่ความยาวคลื่น 262 และ 310 นาโนเมตร ตามลำดับ และครั้งที่ 2 (c) และ (d) ที่ความยาวคลื่น 262 และ 310 นาโนเมตร ตามลำดับ โดยแกน x คือเวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ (นาที) และแกน y คือ intensity (mAU)

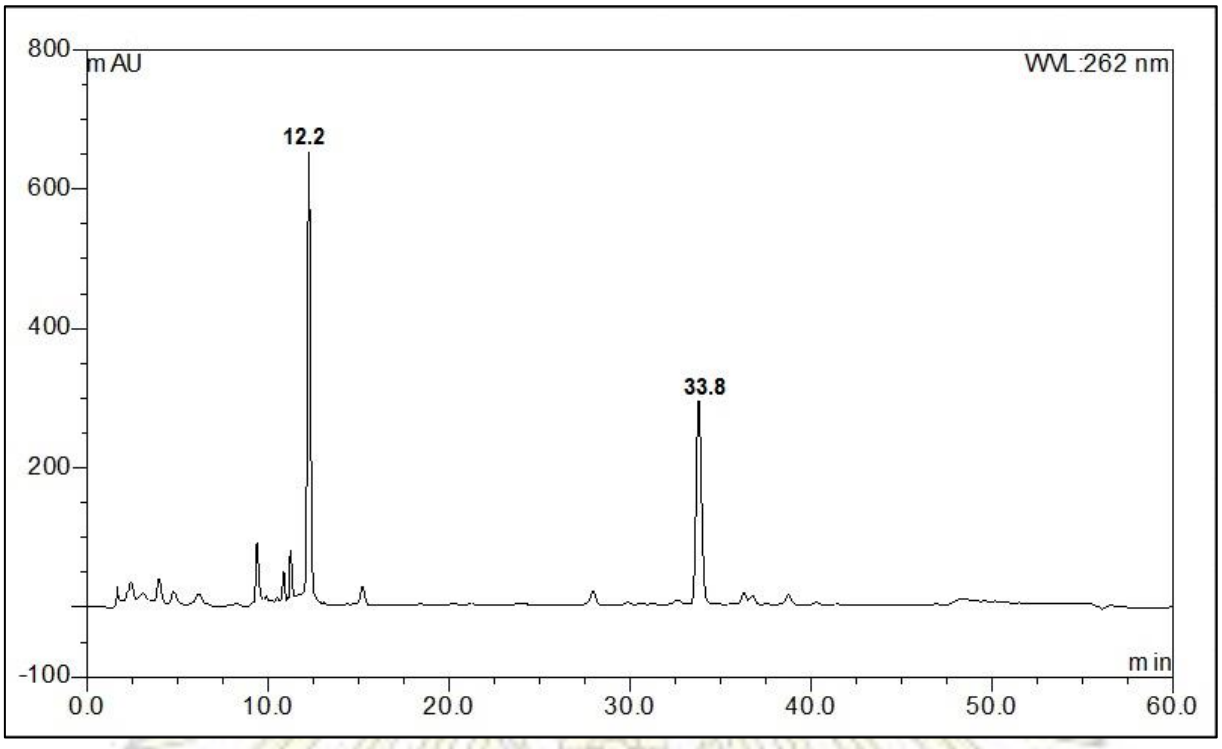
(a)


450
300
200
100
-50
mAU
WVL:262 nm
12.2
33.7
min
0.0
10.0
20.0
30.0
40.0
50.0
60.0

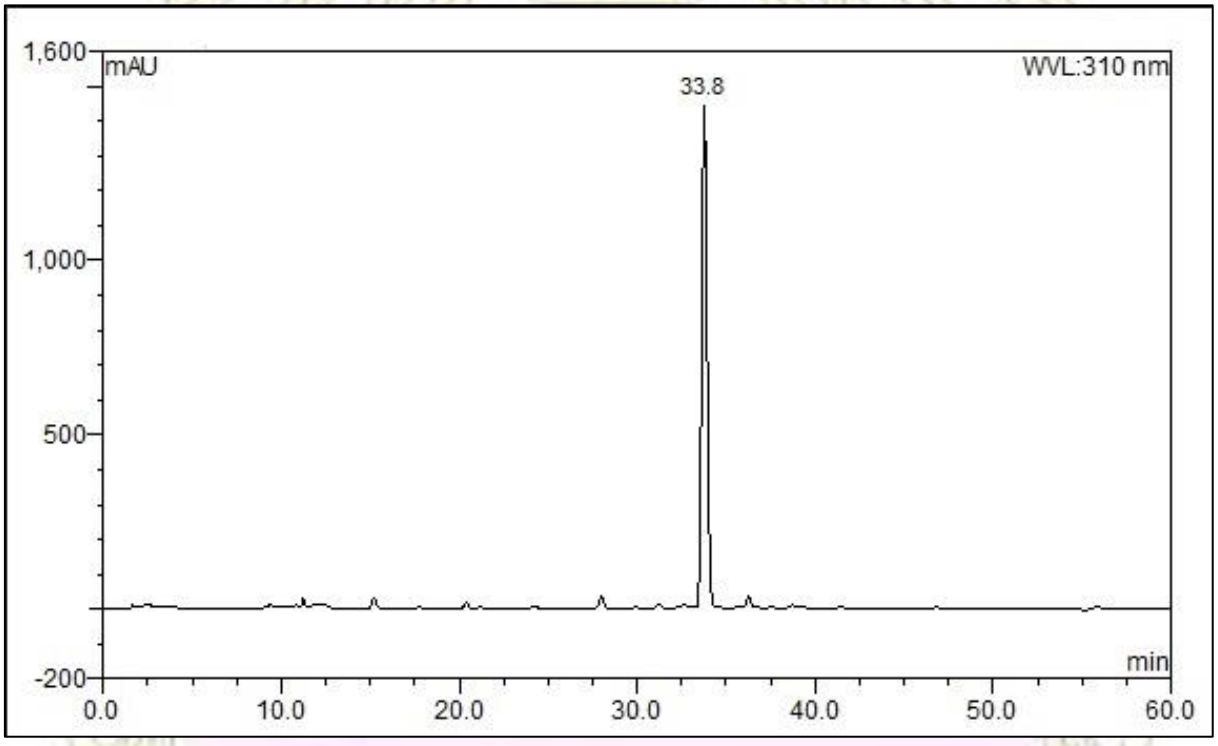
(b)


1,600
1,000
500
-200
mAU
WVL:310 nm
33.7
min
0.0
10.0
20.0
30.0
40.0
50.0
60.0

(c)



(d)



รูปที่ 3.9 โครมาโทแกรมของกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดนางนวลในครั้งที่ 1 (a) และ (b) ที่วิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC ที่ความยาวคลื่น 262 และ 310 นาโนเมตร ตามลำดับ และครั้งที่ 2 (c) และ (d) ที่ความยาวคลื่น 262 และ 310 นาโนเมตร ตามลำดับ โดยแกน x คือเวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ (นาที) และแกน y คือ intensity (mAU)

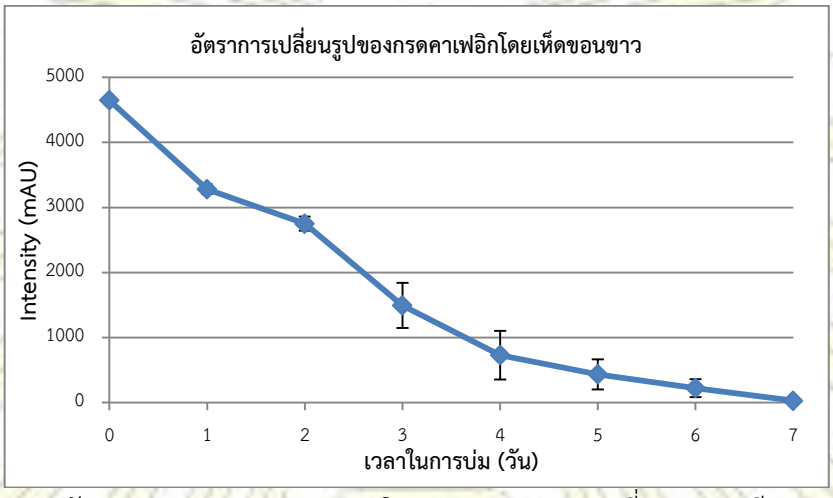
จากโครมาโทรแกรมการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดคาเฟอิกโดยเห็ดขอนขาวและเห็ดนางนวลดังรูปที่ 3.5 (a) และ (b) และรูปที่ 3.6 (a) และ (b) ตามลำดับ และโครมาโทรแกรมการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดเฟอรูลิกโดยเห็ดขอนขาวและเห็ดนางนวลดังรูปที่ 3.7 (a) และ (b) และรูปที่ 3.8 (a) และ (b) ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมดังรูปที่ A15 ให้ข้อมูลคือไม่ปรากฏพีคของสารตั้งต้น และพบพีคของผลิตภัณฑ์ที่ได้ และเมื่อพิจารณาค่า intensity ของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นพบว่ามีค่า intensity ต่ำเป็นอย่างมากเมื่อเทียบกับ 0.5% ของสารตั้งต้น (สารตั้งต้นที่ใช้มีความเข้มข้นเท่ากับ 5%) ดังรูปที่ A1 และนอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณของสารตั้งต้นที่หายไปไม่สัมพันธ์กับปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเนื่องมาจาก สารตั้งต้นอาจเข้าไปติดที่บริเวณเซลล์ของเห็ด หรือสารตั้งต้นอาจเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ชนิดอื่นภายในเซลล์ของเห็ดแต่ไม่ปลดปล่อยผลิตภัณฑ์เหล่านั้นออกมาสู่ภายนอกเซลล์ของเห็ด และหลังจากการเปรียบเทียบค่า retention time ดังตารางที่ 3.1 พบว่า ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการบ่มกรดคาเฟอิกหรือกรดเฟอรูลิกทั้งโดยเห็ดขอนขาวหรือเห็ดนางนวลมีค่า retention time ไม่ตรงกับสารมาตรฐานชนิดใดเลย

จากโครมาโทรแกรมการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดขอนขาวดังรูปที่ 3.8 (a) (b) (c) และ (d) และเปรียบเทียบกับชุดควบคุมดังรูปที่ A15 พบว่าที่ความยาวคลื่นในการตรวจวิเคราะห์ที่ 262 นาโนเมตร (รูปที่ 3.8 (a) และ (c)) มีผลิตภัณฑ์เกิดขึ้น 2 ชนิดคือ ผลิตภัณฑ์ที่เวลา 12.2 และ 33.7 นาที และที่ความยาวคลื่นนี้มีปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่เวลา 12.2 นาที มากที่สุด ซึ่งแตกต่างกับที่ความยาวคลื่นในการวิเคราะห์ที่ 310 นาโนเมตร (รูปที่ 3.8 (b) และ (d)) ที่มีผลิตภัณฑ์ที่เวลา 33.7 นาที ปริมาณมากที่สุด ในทำนองเดียวกันกับกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพโดยเห็ดนางนวลดังรูปที่ 3.9 (a) (b) (c) และ (d) ที่ความยาวคลื่นในการวิเคราะห์ 262 นาโนเมตร พบผลิตภัณฑ์ที่เวลา 12.2 และ 33.7 นาที และที่ความยาวคลื่นในการวิเคราะห์ 310 นาโนเมตร พบเพียงผลิตภัณฑ์ที่เวลา 33.7 นาที และไม่พบพีคของสารตั้งต้นและหลังจากการเปรียบเทียบค่า retention time ดังตารางที่ 3.1 พบว่า ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการบ่มกรดพาราคูมาริกทั้งโดยเห็ดขอนขาวหรือเห็ดนางนวลที่ retention time 12.2 นาที อาจเป็นกรดพาราไฮดรอกซีเบนโซอิก และเมื่อพิจารณาจากวิถีการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดพาราคูมาริกในบทที่ 1 พบว่า กรดพาราคูมาริกสามารถเปลี่ยนรูปเป็นกรดพาราไฮดรอกซีเบนโซอิกได้

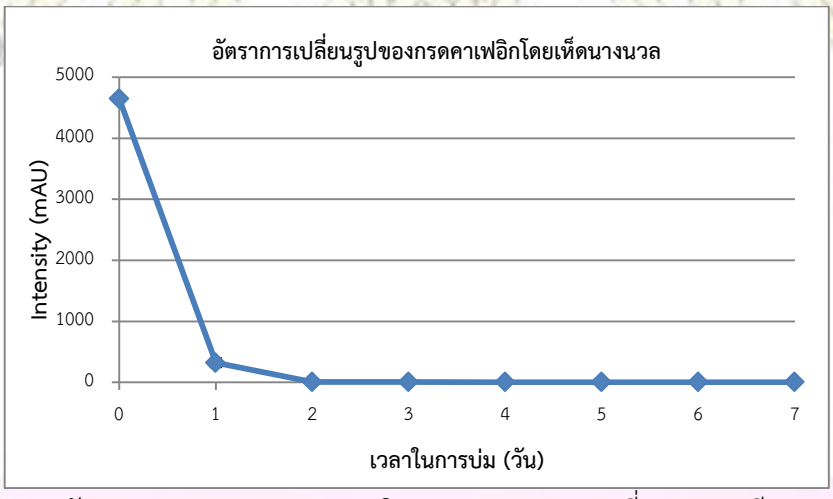
3.4) การศึกษาอัตราการเปลี่ยนรูปของกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพ

ในหัวข้อนี้เป็นการติดตามอัตราการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพเพื่อระบุถึงสารตั้งต้นที่อาจเกิดขึ้นในช่วงเวลาอื่น หรือสารมัธยันตร์ที่อาจจะเกิดขึ้นเพื่อติดตามอัตราการหายไปของสารตั้งต้นและอัตราการเกิดของผลิตภัณฑ์หลักหรืออาจจะพบผลิตภัณฑ์หลักหรือสารมัธยันตร์เกิดขึ้นในช่วงเวลาอื่น

การทดลองนี้ทำโดยบ่มสารตั้งต้นในสารละลายที่มีเห็ดขอนขาว หรือเห็ดนางนวลเป็นเวลา 7 วันทำ 3 ซ้ำ และในแต่ละวันของการบ่มจะเก็บตัวอย่างหลังจากนั้นก็วิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเทคนิค HPLC

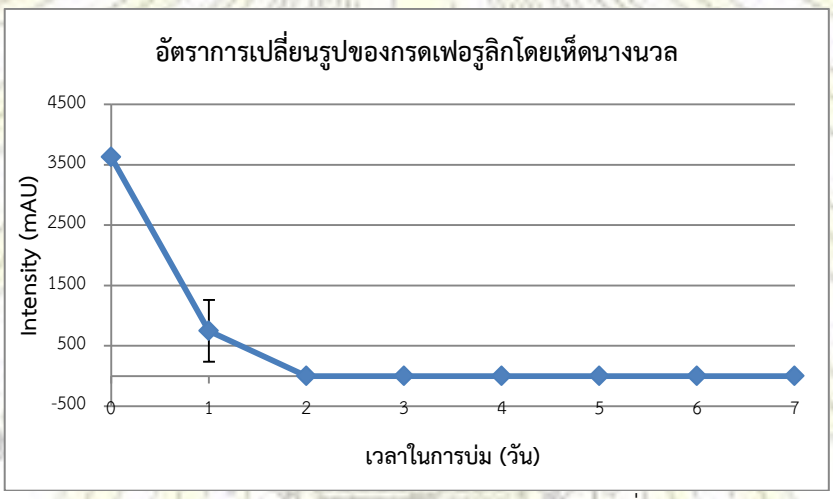


รูปที่ 3.10 กราฟแสดงอัตราการลดลงของกรดคาเฟอิกของกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดคาเฟอิกโดยเห็ดขอนขาว ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร

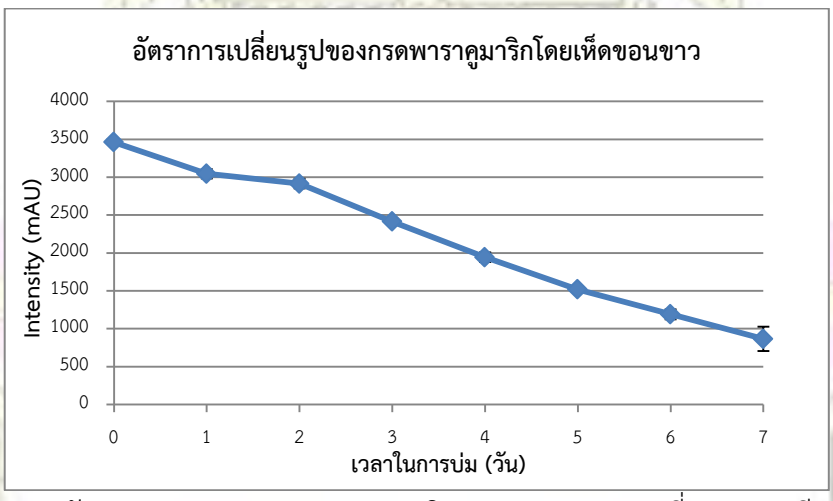


รูปที่ 3.11 กราฟแสดงอัตราการลดลงของกรดคาเฟอิกของกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดคาเฟอิกโดยเห็ดนางนวล ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร

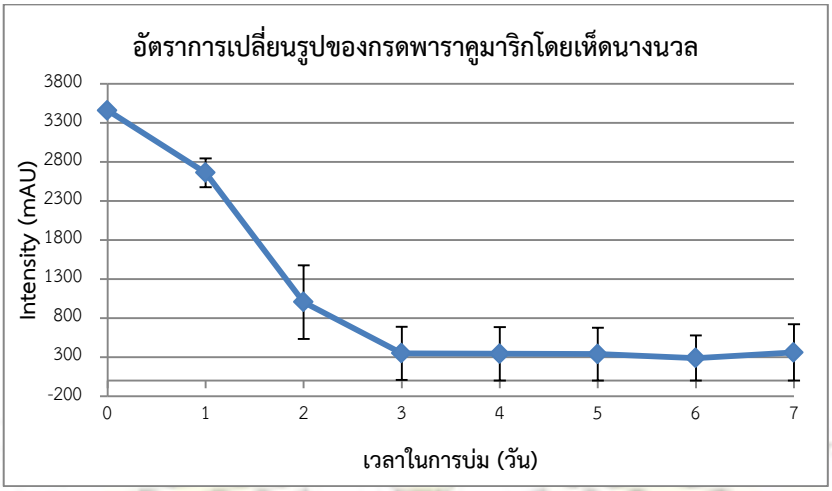
รูปที่ 3.12 กราฟแสดงอัตราการลดลงของกรดเฟอรูลิกของกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดเฟอรูลิกโดยเห็ดขอนขาว ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร



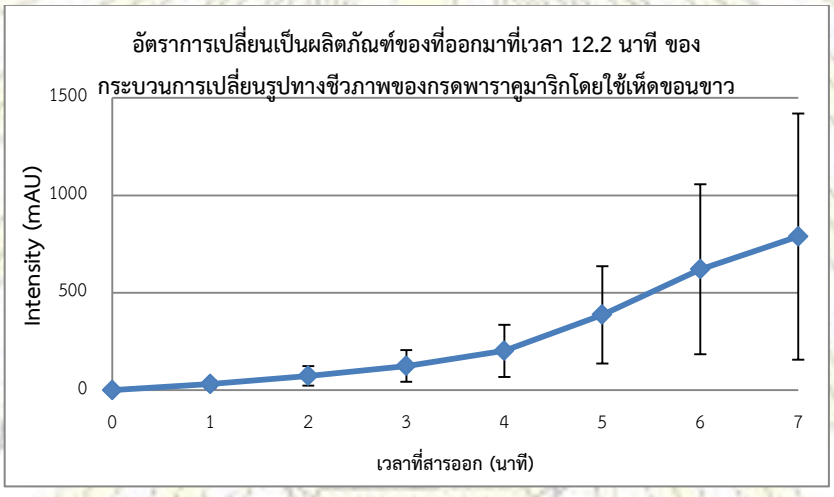
รูปที่ 3.13 กราฟแสดงอัตราการลดลงของกรดเฟอรูลิกของกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดเฟอรูลิกโดยเห็ดนางนวล ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร



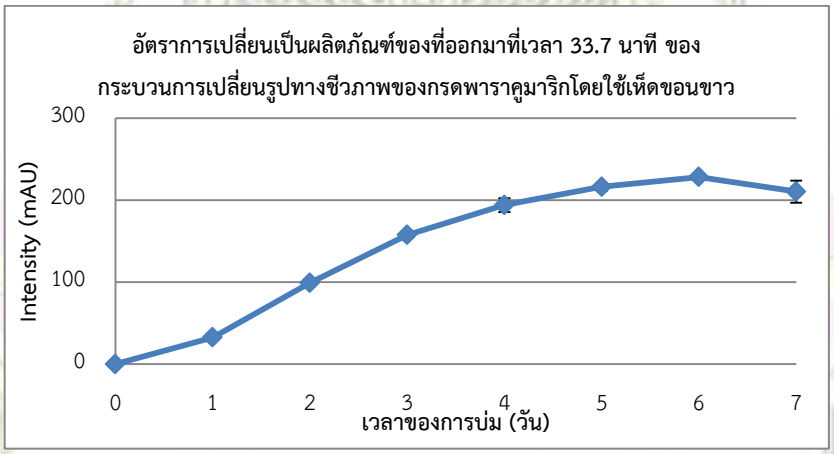
รูปที่ 3.14 กราฟแสดงอัตราการลดลงของกรดพาราคูมาริกของกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดขอนขาว ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร



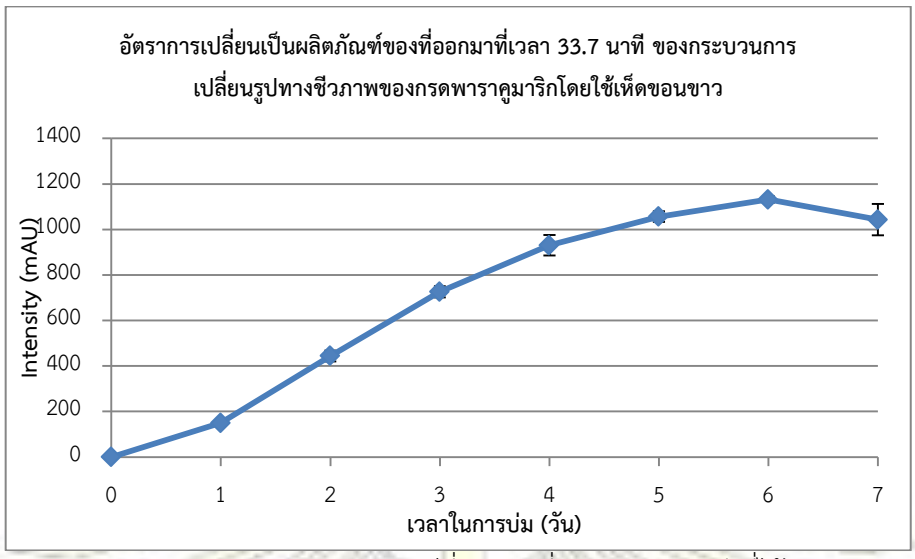
รูปที่ 3.15 กราฟแสดงอัตราการลดลงของกรดพาราคูมาริกของกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดนางนวล ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร



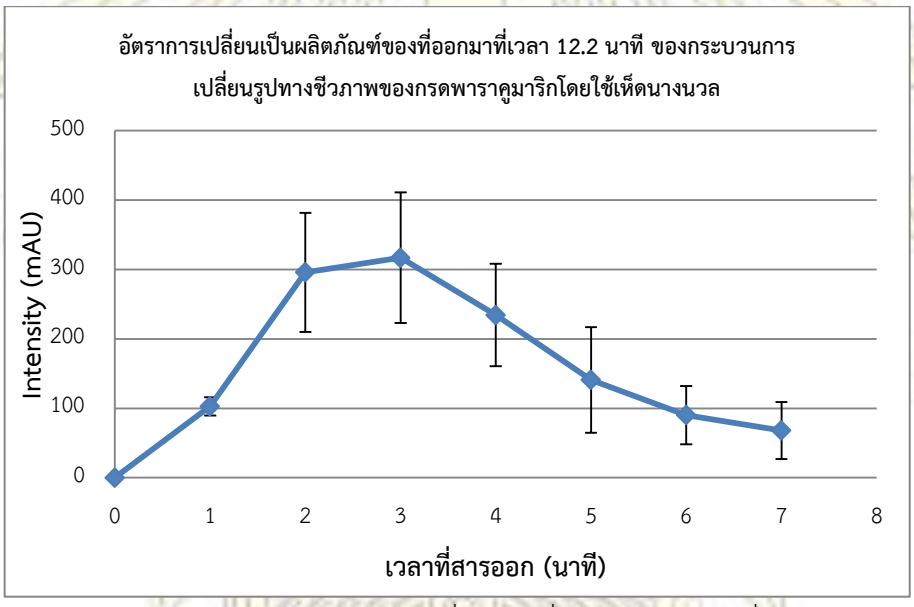
รูปที่ 3.16 กราฟแสดงอัตราการรวมตัวของผลิตภัณฑ์ที่ออกมาที่เวลา 12.2 นาที ที่ได้จากกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดขอนขาว ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร



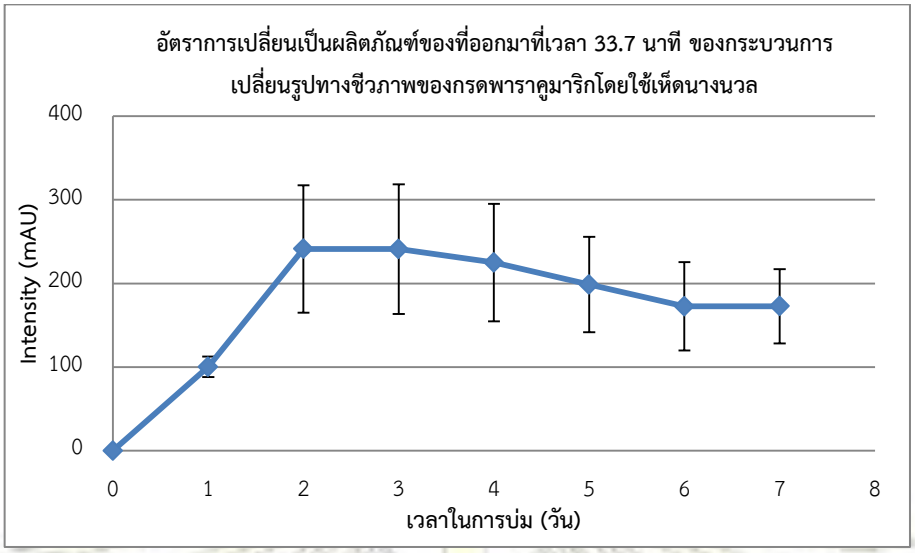
รูปที่ 3.17 กราฟแสดงอัตราการรวมตัวของผลิตภัณฑ์ที่ออกมาที่เวลา 33.7 นาที ที่ได้จากกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดขอนขาว ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร



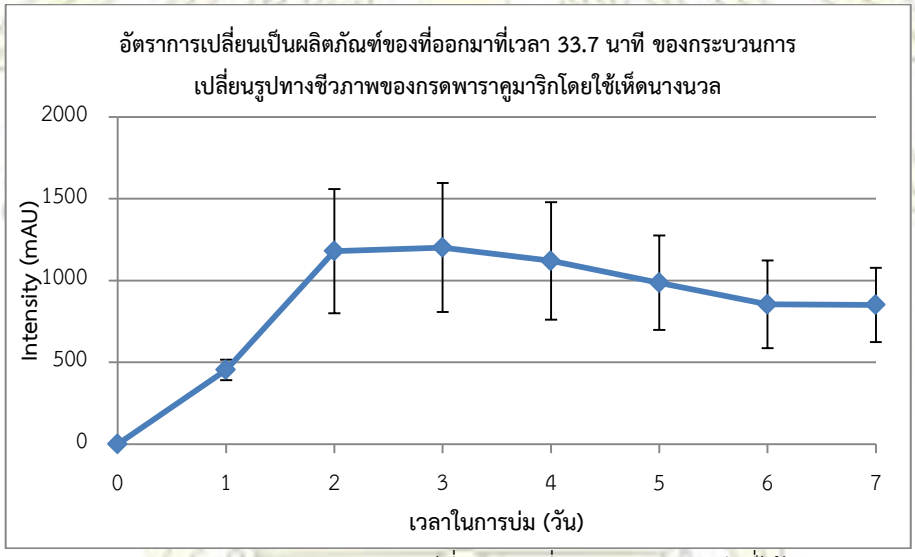
รูปที่ 3.18 กราฟแสดงอัตราการรวมตัวของผลิตภัณฑ์ที่ออกมาที่เวลา 33.7 นาที ที่ได้จากกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดนางนวล ที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร



รูปที่ 3.19 กราฟแสดงอัตราการรวมตัวของผลิตภัณฑ์ที่ออกมาที่เวลา 12.2 นาที ที่ได้จากกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดนางนวล ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร



รูปที่ 3.20 กราฟแสดงอัตราการรวมตัวของผลิตภัณฑ์ที่ออกมาที่เวลา 33.7 นาที ที่ได้จากกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดนางนวล ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร



รูปที่ 3.21 กราฟแสดงอัตราการรวมตัวของผลิตภัณฑ์ที่ออกมาที่เวลา 33.7 นาที ที่ได้จากกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดนางนวล ที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร

จากการศึกษาอัตราการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดคาเฟอิกโดยเห็ดขอนขาวดังรูปที่ 3.10 พบว่ากรดคาเฟอิกค่อย ๆ สลายตัวภายใน 7 วันของการบ่ม โดยในวันที่ 7 ของการบ่ม กรดคาเฟอิกสลายตัวไป 99% เมื่อเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟของกรดคาเฟอิกที่ความเข้มข้น 5% (ที่เทียบกับ 5% เนื่องจากเป็นความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่ใช้เริ่มต้น) และนอกจากนี้ พบผลิตภัณฑ์ที่ได้ระหว่างการบ่ม 7 วันคือ ผลิตภัณฑ์ที่เวลา 23.9 นาที ซึ่งพบมากที่สุดในวันที่ 2 ของการบ่ม และลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 3 ดังรูป A9 และมี intensity น้อยมากจนถึงวันที่ 7 ของการบ่ม เมื่อพิจารณา intensity ในวันที่ 2 ซึ่งให้ปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่เวลา 23.9 นาทีมากที่สุด พบว่ามีพื้นที่ใต้กราฟเท่ากับ 62 mAU*min และเมื่อเปรียบเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟ ของกรดคาเฟอิกที่ความเข้มข้น 5% พบว่า เกิดผลิตภัณฑ์เพียงแค่ 5% เท่านั้น ซึ่งไม่สอดคล้องกับปริมาณของกรดคาเฟอิกที่

หายไป ในทำนองเดียวกับการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดคาเฟอิกโดยเห็ดนางนวล ดังรูปที่ 3.11 พบว่ากรดคาเฟอิกสลายตัวอย่ารวดเร็วในวันแรกของการบ่ม และสลายตัวจนใกล้หมดในวันที่ 2 ของการบ่ม และพบว่าในวันที่ 7 ของการบ่ม กรดคาเฟอิกสลายตัวได้ใกล้ 100% เมื่อเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟของกรดคาเฟอิก ที่ความเข้มข้น 5% และนอกจากนี้ พบผลิตภัณฑ์ที่ได้ระหว่างการบ่ม 7 วันคือ ผลิตภัณฑ์ที่เวลา 23.9 นาที ซึ่งพบมากที่สุดในวันที่ 1 ของการบ่ม และลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 2 ดังรูป A10 เมื่อพิจารณา intensity ในวันที่ 1 ซึ่งให้ปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่เวลา 23.9 นาทีมากที่สุด พบว่ามีพื้นที่ใต้กราฟเท่ากับ 41 mAU*min และเมื่อเปรียบเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟ ของกรดคาเฟอิกที่ความเข้มข้น 5% พบว่า เกิดผลิตภัณฑ์เพียงแค่ 3% เท่านั้น ซึ่งไม่สอดคล้องกับปริมาณของกรดคาเฟอิกที่หายไป

จากการการศึกษาอัตราการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดเฟอรูลิกโดยเห็ดขอนขาว ดังรูป 3.12 พบว่ากรดเฟอรูลิกสลายตัวอย่ารวดเร็ว และใกล้หมดในวันแรกของการบ่ม และนอกจากนี้ในระหว่างการบ่ม 7 วัน พบผลิตภัณฑ์ที่เวลา 27.2 และ 31.2 นาที ดังรูป A11 ที่มีปริมาณมากสุดในวันแรกของการบ่ม และลดลงในวันที่สองของการบ่ม สำหรับผลิตภัณฑ์ที่เวลา 27.2 นาที พบเพียงแค่ 3 แรกของการบ่ม แต่ผลิตภัณฑ์ที่เวลา 31.2 นาทีเหลือปริมาณน้อยมากในวันที่ 7 ของกรบ่ม เมื่อพิจารณา intensity ในวันที่ 1 ซึ่งให้ปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่เวลา 27.2 และ 31.2 นาที มากที่สุดพบว่ามีพื้นที่ใต้กราฟเท่ากับ 112 และ 127 mAU*min ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟ ของกรดเฟอรูลิกที่ความเข้มข้น 5% พบว่าเกิดผลิตภัณฑ์เพียงแค่ 10% และ 11% ตามลำดับเท่านั้น ซึ่งไม่สอดคล้องกับปริมาณของกรดคาเฟอิกที่หายไป ในทำนองเดียวกันกับการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดเฟอรูลิกโดยเห็ดนางนวล ที่ให้ผลิตภัณฑ์คล้ายกันคือที่เวลา 27.2 และ 31.2 นาที ดังรูป A12 โดยผลิตภัณฑ์ทั้งสองชนิดนี้พบมากสุดในวันแรกของการบ่มและหลังจากนั้นลงจนในวันที่ 7 มีปริมาณเหลือน้อยมาก เมื่อพิจารณา intensity ในวันที่ 1 ซึ่งให้ปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่เวลา 27.2 และ 31.2 นาที มากที่สุดพบว่ามีพื้นที่ใต้กราฟเท่ากับ 90 และ 67 mAU*min ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟ ของกรดเฟอรูลิกที่ความเข้มข้น 5% พบว่า เกิดผลิตภัณฑ์เพียงแค่ 7% และ 5% ตามลำดับเท่านั้นซึ่งไม่สอดคล้องกับปริมาณของกรดคาเฟอิกที่หายไป

จากผลิตที่เกิดขึ้นปริมาณน้อยๆ ของการบ่มกรดคาเฟอิกและกรดเฟอรูลิกทั้งโดยเห็ดขอนขาวหรือเห็ดนางนวลที่กล่าวข้างต้น พบว่ามีปริมาณไม่สอดคล้องกับผลิตภัณฑ์ที่หายไป เนื่องจากสาเหตุที่สารตั้งต้นเข้าไปติดที่เซลล์ของเห็ด หรือสารตั้งต้นอาจเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ชนิดอื่นภายในเซลล์ของเห็ดแต่ไม่ปลดปล่อยผลิตภัณฑ์เหล่านั้นออกมา ทำให้เมื่อกรองเส้นใยของเห็ดในอาหารเลี้ยงเชื้อออกไปสารเหล่านั้นก็ออกไปด้วย ทำให้สูญเสียสารตั้งต้นหรือผลิตภัณฑ์เหล่านั้นไป และนอกจากนี้ยังพบสารมัธยันตร์ที่เวลาต่างๆ และหลังจากการเปรียบเทียบสารมัธยันตร์ที่พบกับสารมาตรฐานดังตารางที่ 3.1 พบว่าสารมัธยันตร์มีค่า retention time ไม่ตรงกับสารมาตรฐาน

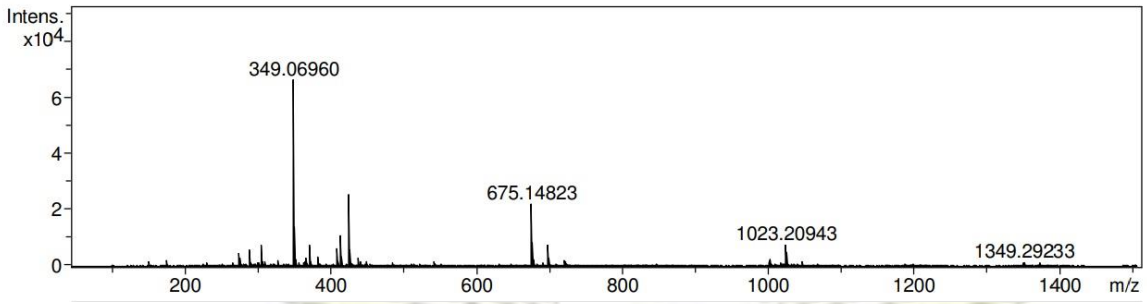
จากการศึกษาอัตราการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดขอนขาวดังรูปที่ 3.14 พบว่ากรดพาราคูมาริกค่อยๆ สลายตัวอย่างช้าๆ จนในวันสุดท้ายของการบ่มกรดพาราคูมาริกสลายตัวไป 88% และพบผลิตภัณฑ์หลักที่เวลา 12.2 และ 33.7 นาที โดยผลิตภัณฑ์ที่เวลา 12.2 นาทีจะค่อยๆ มีปริมาณมากขึ้นโดยมีปริมาณมากสุดในวันที่ 7 ของการบ่มดังรูปที่ 3.16 มีพื้นที่ใต้กราฟเท่ากับ 155 mAU*min ซึ่งมีเกิดผลิตภัณฑ์ที่เวลานี้เป็น 12% เมื่อเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟของกรดพาราคูมาริกที่ความเข้มข้น 5% และผลิตภัณฑ์

ที่เวลา 33.7 นาที มีปริมาณมากที่สุดวันที่ 6 ของการบ่ม พบว่าผลิตภัณฑ์ชนิดนี้ให้ค่า intensity สูงสุดเมื่อวิเคราะห์ที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร ดังรูปที่ 3.18 พบว่าในวันที่ 6 ผลิตภัณฑ์นี้มีพื้นที่ใต้กราฟเท่ากับ 406 mAU*min ซึ่งเกิด 31% เมื่อเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟของกรดพาราคูมาริกที่ความเข้มข้น 5% และนอกจากนี้ยังพบสารที่เวลา 27.2 นาที ที่มี intensity มากที่สุดในวันที่ 3 ของการบ่มดังรูปที่ A13 และหลังจากนั้น intensity ก็ลดลงเรื่อยๆ จนเหลือน้อยมากในวันที่ 7 ของการบ่ม และเมื่อพิจารณาพื้นที่ใต้กราฟของสารที่เวลา 27.2 นาทีในวันที่ 2 พบว่ามีพื้นที่ใต้กราฟเท่ากับ 69 mAU*min ซึ่งเกิดเพียงแค่ 5% เมื่อเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟของกรดพาราคูมาริกที่ความเข้มข้น 5% ดังนั้นการบ่มกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดขอนขาวให้ผลิตภัณฑ์หลักสองชนิดคือ ผลิตภัณฑ์ที่เวลา 12.2 และ 33.7 นาที และมาสารมัธยันตร์คือสารที่ออกมาที่เวลา 27.2 นาที และจากการศึกษาอัตราการเปลี่ยนรูปของกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดนางนวล พบว่ามีสารที่ออกมาหลักๆ ที่เวลาเดียวกันคือ ที่เวลา 12.2 27.2 และ 33.7 นาที โดยจะพบว่าผลิตภัณฑ์ที่เวลา 12.2 และ 27.2 นาที มีค่า intensity มากที่สุดในวันที่ 3 (ดังรูปที่ 3.19) และวันที่ 1 ตามลำดับ ดังรูปที่ A14 โดยมีพื้นที่ใต้กราฟเท่ากับ 63 และ 64 mAU*min ตามลำดับ ซึ่งต่างก็เกิดขึ้นเพียง 5% โดยจะพบว่าผลิตภัณฑ์ที่เวลา 12.2 และ 27.2 มีปริมาณที่เกิดมีน้อยมาก ซึ่งต่างจากผลิตภัณฑ์ที่เวลา 33.7 นาที ดังรูป 3.21 ที่มีค่า intensity มากที่สุดในวันที่ 3 ของการบ่ม โดยมีพื้นที่ใต้กราฟเท่ากับ 428 mAU*min ซึ่งเกิดผลิตภัณฑ์เป็น 32% เมื่อเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟของกรดพาราคูมาริกที่ความเข้มข้น 5% ดังนั้นผลิตภัณฑ์หลักของการบ่มกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดนางนวลคือผลิตภัณฑ์ที่ออกมาที่เวลา 33.7 นาที และหลังจากเปรียบเทียบค่า retention time กับสารมาตรฐานดังตารางที่ 3.1 พบว่าผลิตภัณฑ์ที่เวลา 12.2 นาที อาจเป็นกรดพาราไฮดรอกซีเบนโซอิก

3.5) การระบุเอกลักษณ์ผลิตภัณฑ์จากกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดนางนวล

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าผลิตภัณฑ์หลักที่พบเพียงแค่กระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดขอนขาวและเห็ดนางนวลโดยให้ผลิตภัณฑ์ออกมาที่เวลา 33.7 และ 12.2 นาที และพบว่าผลิตภัณฑ์ที่เวลา 12.2 นาทีอาจเป็นกรดพาราไฮดรอกซีเบนโซอิก ดังนั้นในการทดลองนี้เป็นการระบุเอกลักษณ์ของผลิตภัณฑ์ที่เวลา 33.7 นาทีซึ่งจากหัวข้อที่ 3.4) พบว่าผลิตภัณฑ์นี้เกิดขึ้นมากในกระบวนการบ่มของกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดนางนวล จึงเลือกบ่มกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดนางนวลจำนาน 10 ซ้ำเป็นเวลา 7 วันและสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต หลังจากนั้นก็ทำผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค HPLC และระบุเอกลักษณ์ด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมทรี (ESI-QTOF-MS) และเทคนิคโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (^{1}H NMR)

3.8.1 การวิเคราะห์ด้วยแมสสเปกโตรเมทรี

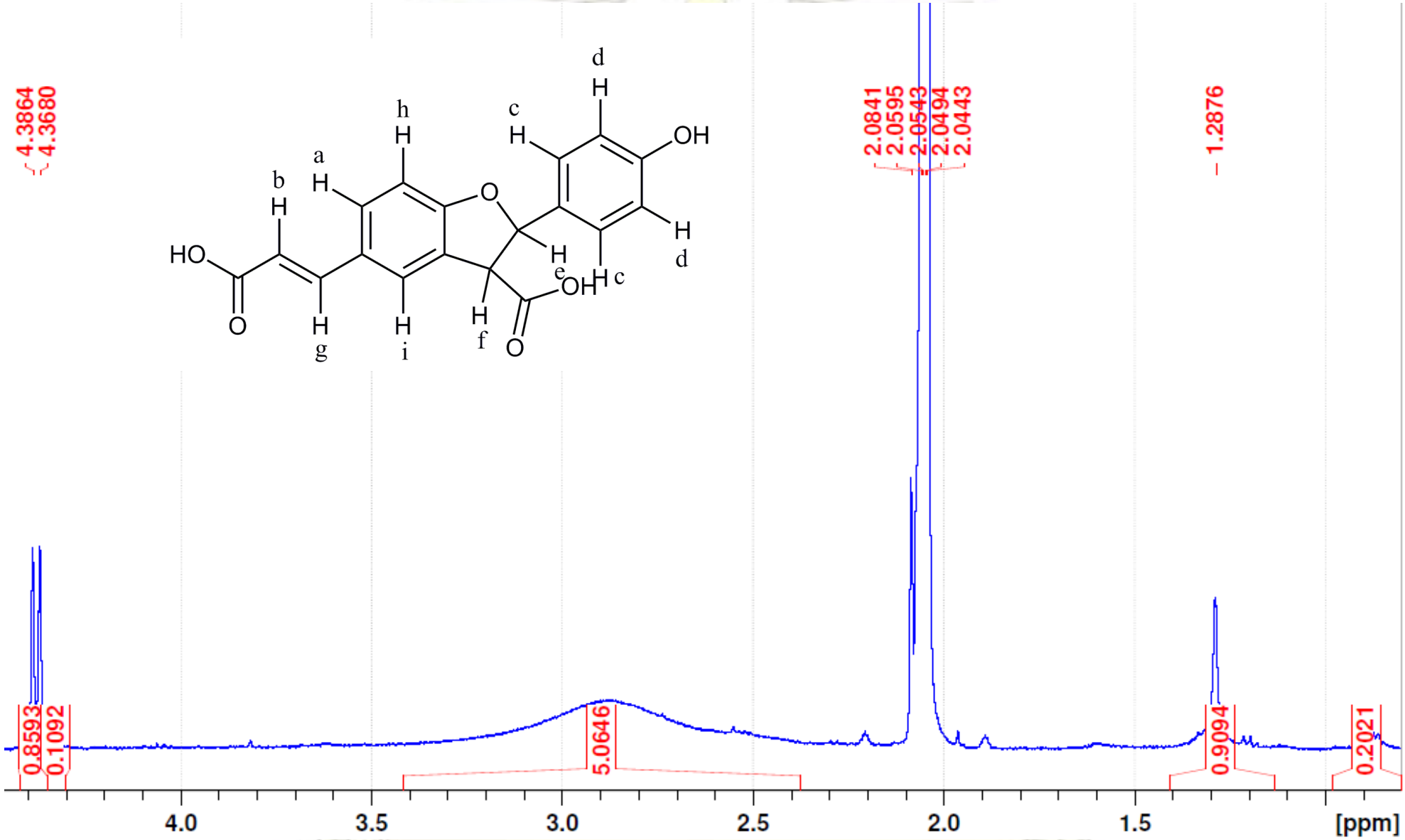


รูปที่ 3.22 แมสสเปกตรัมของสารผลิตภัณฑ์ที่เวลา 33.7 นาที ที่ได้จากการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดนางนวล

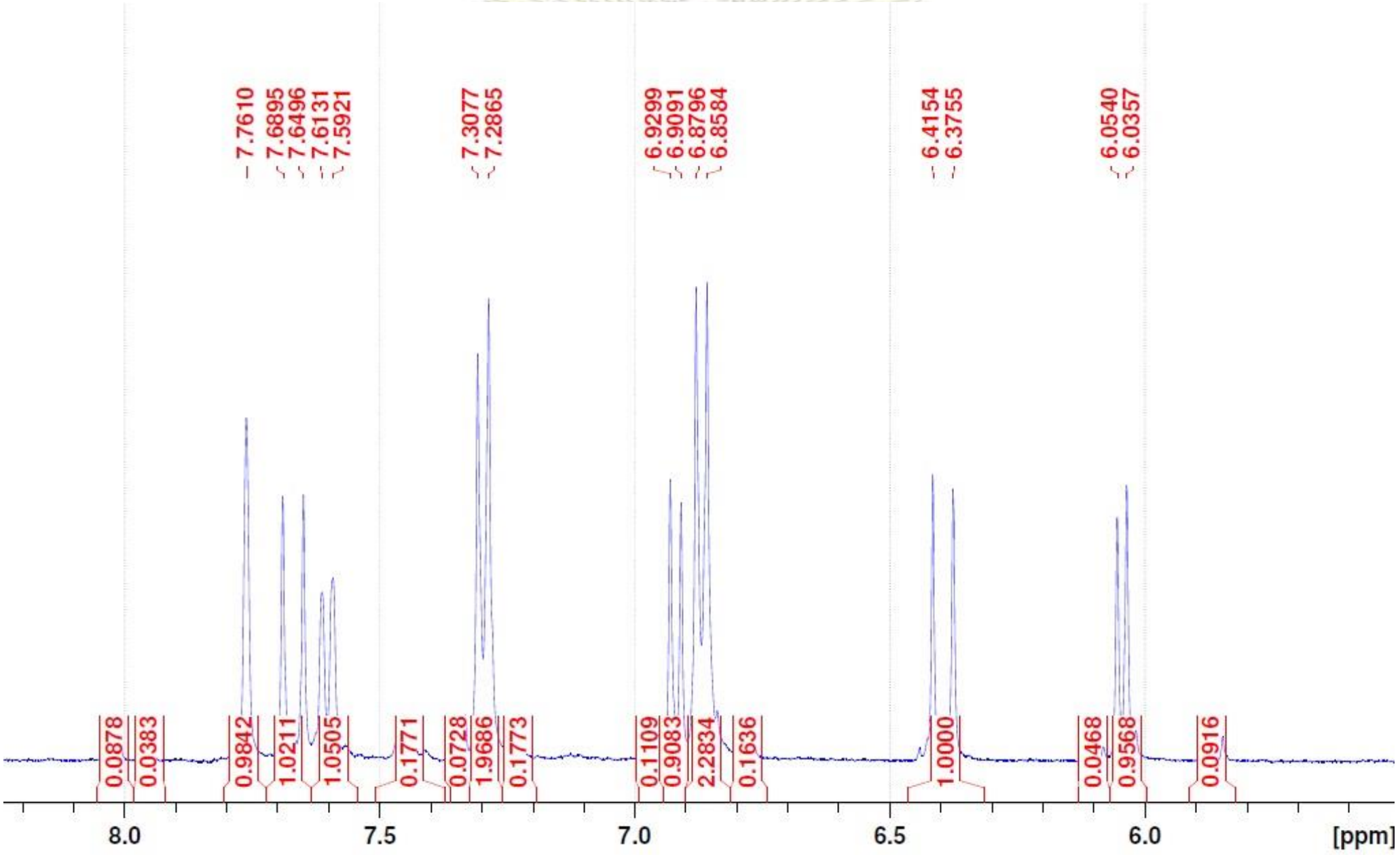
จากการเปรียบเทียบเวลาในการเคลื่อนที่ของสารผลิตภัณฑ์กับกรดพาราคูมาริกพบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการบ่มกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดนางนวลออกมาช้ากว่ากรดพาราคูมาริก นั้นแสดงว่าผลิตภัณฑ์นี้ต้องมีสภาพขั้วต่ำกว่ากรดพาราคูมาริก

จากรูป 3.22 ที่แสดงแมสสเปกตรัมของสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดนางนวล พบค่าประจุต่อมวล (m/z) เท่ากับ 349.06960 ซึ่งเกิดไอออนของโซเดียมเข้ามาอยู่ร่วมกับไอออนของผลิตภัณฑ์เกิดเป็น $[M+Na]^+$ นอกจากนี้ที่ประจุต่อมวลเท่ากับ 675.14823 เกิดจากไอออนของผลิตภัณฑ์รวมตัวกันเป็นไดเมอร์เกิดเป็น $[2M+Na]^+$ และรวมกันเป็นไตรเมอร์ $[3M+Na]^+$ ที่ประจุต่อมวลเท่ากับ 1001.22703 จากข้อมูลนี้ทำให้ได้ค่ามวลโมเลกุลของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 326.07923 g/mol และมีสูตรทางเคมีคือ $C_{18}H_{14}O_6$

3.8.2 การวิเคราะห์โดยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์



รูปที่ 3.23 แสดง ^{1}H NMR สเปกตรัมของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดนางนวลในช่วงเคมิคัลชิฟต์ 0-5 ppm

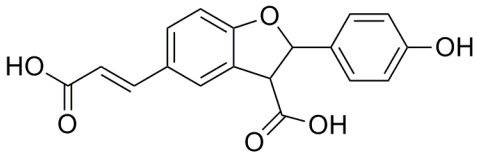


รูปที่ 3.24 แสดง ^{1}H NMR สเปกตรัมของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดนางนวลในช่วงเคมิคัลชิฟต์ 5-8 ppm

ตารางที่ 3.3 ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์โดยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดนางนวล

เคมิคัลชิฟต์	splitting	จำนวนโปรตอน	ตำแหน่งของไฮโดรเจน
4.38 (J=7.4 Hz)	d	1	f
6.04 (J=7.3 Hz)	d	1	e
6.40 (J=16.0 Hz)	d	1	b
6.87 (J=8.5 Hz)	d	2	d
6.92 (J=8.3 Hz)	d	1	h
7.30 (J=8.5 Hz)	d	2	c
7.60 (J=8.4 Hz)	d	1	i
7.67 (J=16.0 Hz)	d	1	a
7.76	s	1	g

จากการวิเคราะห์ ^{1}H NMR โดยใช้ acetone-d_6 เป็นตัวทำละลายจะพบพีคของ acetone-d_6 ที่ประมาณ 2.0 ppm และนอกจากนี้ยังพบว่าที่ค่าเคมิคัลชิฟท์ที่ 7.69 และ 6.42 ppm มีค่าคงที่ควบคู่เท่ากัน จึงน่าจะเป็นตำแหน่งของพันธะคู่ตรงตำแหน่ง a และ b ตามลำดับในทำนองเดียวตำแหน่ง e และ f ที่ค่าเคมิคัลชิฟท์เท่ากับ 6.05 และ 4.39 ppm ตามลำดับ สาเหตุที่ค่าเคมิคัลชิฟท์ของตำแหน่ง e และ f ต่ำกว่าตำแหน่ง a และ b เนื่องจากตำแหน่ง a และ b อยู่ใกล้กับหมู่คาร์บอกซิลจึงทำให้อิเล็กตรอนโดนดึงทำให้ไม่บดบังอะตอมของไฮโดรเจนค่าเคมิคัลชิฟท์จึงสูงกว่าตำแหน่งที่มีอิเล็กตรอนบดบัง นอกจากนี้ที่ค่าเคมิคัลชิฟท์เท่ากับ 7.31 และ 6.91 ppm จะปรากฏสองพีค และมีพื้นที่ใต้พีคเท่ากับสองบ่งบอกว่ามีไฮโดรเจนที่เหมือนกันสดองตัวดังนั้นที่ค่าเคมิคัลชิฟท์เท่ากับ 7.31 และ 6.91 ppm เป็นของไฮโดรเจนตรงตำแหน่ง c และ d ตามลำดับ ที่ค่าเคมิคัลชิฟท์เท่ากับ 7.76 ppm จะปรากฏเป็นพีคเดี่ยวและมีพื้นที่ใต้พีคเท่ากับหนึ่งนั้นคือไฮโดรเจนตรงตำแหน่ง g และที่ค่าเคมิคัลชิฟท์เท่ากับ 7.61 และ 6.93 ppm มีพีคสองพีคซึ่งทั้งคู่นี้มีพื้นที่ใต้พีคเท่ากับหนึ่ง นั้นคือไฮโดรเจนตรงตำแหน่ง i และ h ตามลำดับ เนื่องจากเมื่ออิเล็กตรอนตรงหมู่ไฮดรอกซิลเคลื่อนที่ลงมาจะทำให้ประจุลบเกิดที่ตำแหน่ง h ทำให้เกิดการบดบังของอิเล็กตรอน ค่าเคมิคัลชิฟท์ของตำแหน่ง h จึงน้อยกว่าตำแหน่ง i และจากข้อมูลทั้งหมดแล้วจะพบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดพาราคูมาริกโดยใช้เห็ดขอนขาวอาจมีโครงสร้างดังรูปที่ 3.25 โดยโครงสร้างดังรูปที่ 3.25 นี้เป็นเพียงการสันนิษฐานอย่างคร่าวๆ ควรวิเคราะห์ด้วย ^{13}C NMR เพิ่มเติมด้วย



(*E*)-5-(2-carboxyvinyl)-2-(4-hydroxyphenyl)-2,3-dihydrobenzofuran-3-carboxylic acid

รูปที่ 3.25 โครงสร้างของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดนางนวลที่วิเคราะห์โครงสร้างโดย ^{1}H NMR

บทที่ 4
สรุปผลการทดลอง

จากการตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดคาเฟอิก กรดเฟอรูลิกและกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดขอนขาวและเห็ดนางนวล ด้วยเทคนิค HPLC พบว่ามีเพียงกระบวนการเปลี่ยนรูปของกรดพาราคูมาริกเท่านั้น ที่ให้ผลิตภัณฑ์ออกมาที่เวลา 33.7 นาที และนอกจากนี้ยังพบว่า ผลิตภัณฑ์ที่เวลา 12.2 นาทีที่อาจเป็นกรดพาราไฮดรอกซีเบนโซอิก หลังจากนั้นก็ศึกษาอัตราการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพ พบว่าการเปลี่ยนรูปของกรดคาเฟอิกและกรดเฟอรูลิกทั้งโดยเห็ดขอนขาวและเห็ดนางนวล ไม่เกิดผลิตภัณฑ์หลักเกิดขึ้น เกิดเพียงสารมัธยันตร์ โดยสารมัธยันตร์ของการบ่มกรดคาเฟอิกโดยเห็ดขอนขาว พบสารมัธยันตร์ออกมาที่เวลา 23.9 นาที ซึ่งจะพบมากในวันที่ 2 ของการบ่มและมีน้อยมากในวันที่ 7 ส่วนการบ่มกรดคาเฟอิกโดยเห็ดนางนวลพบสารมัธยันตร์ออกมาที่เวลา 23.9 นาที ซึ่งพบเพียงแค่วันแรกของการบ่มและหายไปในวันที่ 2 การบ่มกรดเฟอรูลิกโดยเห็ดขอนขาวและเห็ดนางนวลให้สารมัธยันตร์ที่เหมือนกันคือที่เวลา 27.2 และ 31.2 นาที โดยผลิตภัณฑ์ที่เวลา 27.2 นาทีพบเพียงแค่วันแรกของการบ่มหลังจากนั้นจะไม่พบผลิตภัณฑ์ชนิดนี้ และผลิตภัณฑ์ที่เวลา 31.2 นาทีที่พบมากในวันแรกหลังจากนั้นก็มีปริมาณลดลงลดลง จนในวันสุดท้ายของการบ่มมีปริมาณน้อยมาก จะพบได้ว่าสารมัธยันตร์ทั้งหมดที่กล่าวมาข้างต้นได้สลายตัวไป แต่กลับไม่พบผลิตภัณฑ์อื่นหลังจากที่พบสารมัธยันตร์เหล่านี้ อาจเนื่องมาจากสารมัธยันตร์อาจเข้าไปติดที่ผนังเซลล์ หรือสารอาจเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ชนิดอื่นภายในเซลล์แต่ไม่ปลดปล่อยผลิตภัณฑ์เหล่านั้นออกมา ทำให้ไม่พบผลิตภัณฑ์หลักที่เวลาอื่นได้ และการบ่มกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดขอนขาว ให้ผลิตภัณฑ์หลักสองชนิดคือที่เวลา 12.2 และ 33.7 นาที และพบว่าผลิตภัณฑ์ที่เวลา 12.2 นาทีอาจเป็นกรดพาราไฮดรอกซีเบนโซอิก ซึ่งกรดนี้มีปริมาณเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ใน 7 วันของการบ่ม ซึ่งแตกต่างจากผลิตภัณฑ์ที่เวลา 33.7 นาทีที่มีปริมาณมากสุดในวันที่ 6 และลดลงในวันที่ 7 และการบ่มกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดนางนวล ให้ผลิตภัณฑ์หลักใน 7 เช่นเดียวกับการบ่มโดยเห็ดขอนขาวผลิตภัณฑ์ที่เวลา 33.7 นาที โดยมีปริมาณมากที่สุดในวันที่ 3 ส่วนผลิตภัณฑ์ที่เวลา 12.2 และ 27.2 นาที มีมากในวันที่ 2 และ 3 ตามลำดับ และหลังจากทำผลิตภัณฑ์ที่เวลา 33.7 นาที ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค HPLC และระบุเอกลักษณ์ด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมทรี (ESI-QTOF-MS) และเทคนิคโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (^{1}H NMR) พบว่าได้ผลิตภัณฑ์อาจเป็น (*E*)-5-(2-carboxyvinyl)-2-(4-hydroxyphenyl)-2,3-dihydrobenzofuran-3-carboxylic acid

การศึกษาวิจัยในอนาคต

การศึกษาถึงโครงสร้างของผลิตภัณฑ์ที่เวลา 33.7 นาทีด้วยเทคนิคอื่นเพื่อยืนยันโครงสร้างที่แน่นอน การศึกษาสารมัธยันตร์ที่อาจเกิดขึ้นระหว่างกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดคาเฟอิก กรดเฟอรูลิกและกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดขอนขาวและเห็ดนางนวล การศึกษาคุณสมบัติทางวิถีชีวสังเคราะห์ของผลิตภัณฑ์ที่เวลา 33.7 นาที รวมถึงสารมัธยันตร์อื่นๆ ในวิถีอีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

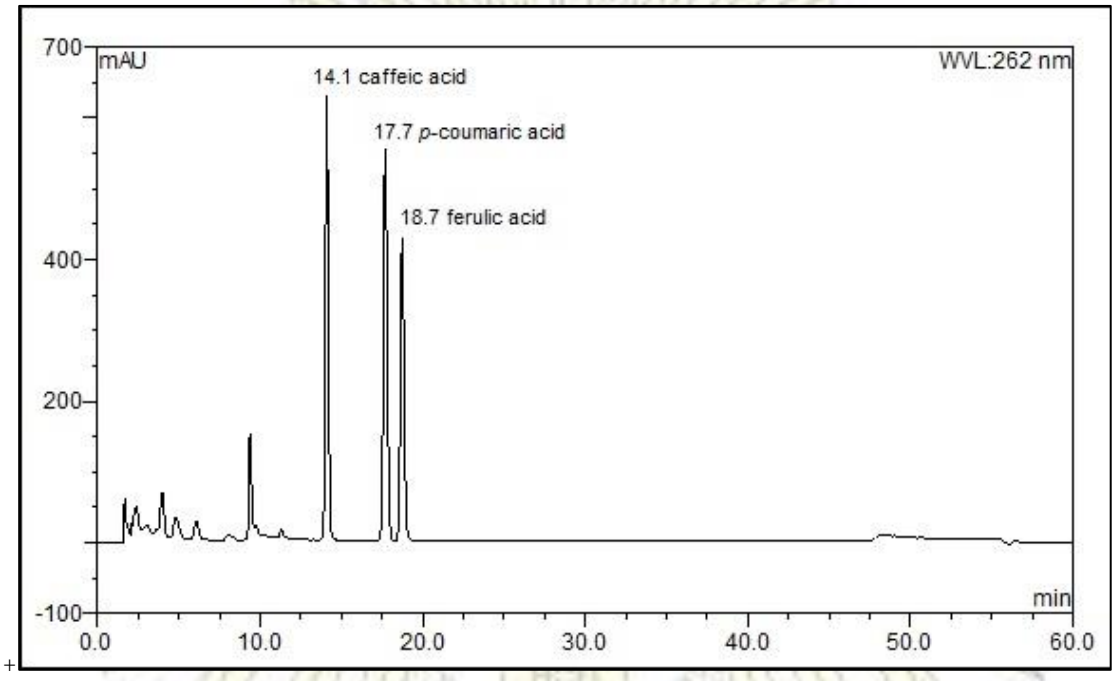
1. Shide, G.E.; Wuyep, P.E.; Nok, A.J. Studies on the degradation of wood sawdust by *Lentinus squarrosulus* (Mont.) Singer**.** *African Journal of Biotechnology*, **2004**, *3*, 395-398.
2. Ravishankar , G. A.; Rao, S.R. Biotransformation of protocatechuic aldehyde and caffeic acid to vanillin and capsaicin in freely suspended and immobilized cell cultures of *Capsicum frutescens*. *Journal of Biotechnology*, **2000**, *76*, 137-146.
3. Oddou, J.; Stentelaire, C.; Lesage, M.L.; Asther, M.; Colonna, C. B. Improvement of ferulic acid bioconversion into vanillin by use of high-density cultures of *Pycnoporus cinnabarinus. Appl Microbiol Biotechnol*, **1999**, *23*, 1-6.
4. Falconnier, B.; Lapierre, C.; Meessen, L.L.; Yonnet, G.; Brunerie, P.; Ceccaldi, C.B.; Corrieu, G.; Asther, M. Vanillin as a product of ferulic acid biotransformation by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus* 1-937: Identification of metabolic pathways. *Journal of Biotechnology*, **1994**, *37*, 123-132**.**
5. Peña, B.I.; Serrano, R.G.; Zamora, G.E.; Augur, C.; Loera, O.; Castañeda, S.G. Biotransformation of ferulic acid to 4-vinylguaiacol by a wild and a diploid strain of *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, **2010**, *101,* 4721–4724.
6. Sachan, A.; Ghosh, S.; Mitra, A. Biotransformation of *p*-coumaric acid by *Paecilomyces variotii*. *The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology*, **2006**, *42*, 35–41.
7. Gauri, S.S.; Mandal, M.S.; Dey, S.; Pati, R.B. Biotransformation of *p*-coumaric acid and 2,4-dichlorophenoxy acetic acid by *Azotobacter* sp. strain SSB81. *Bioresource Technology*, **2012**, *126,* 350–353.
8. Sinha, K.A.; Sharma, K.U.; Sharma, N. A comprehensive review on vanilla flavor: Extraction, isolation and quantification of vanillin and others constituents. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, **2008***, 59*, 299-326.
9. Terpinc, P.; Polak, T.; Šegatin, N.; Hanzlowsky, A.; Ulrih, P.N.; Abramovic, H. Antioxidant properties of 4-vinyl derivatives of hydroxycinnamic acids. *Food Chemistry*, **2011**, *128*, 62-69.
10. Converti, A.; Aliakbarian, B.; Domínguez, J.M.; Vázquez, B. G.; Perego, P. Microbial production of biovanillin**.** *Brazilian Journal of Microbiology*, **2010**, *41*, 519-530.

11. Ghosh, S.; Sachan, A.; Sen, K. S.; Mitra, A. Microbial transformation of ferulic acid to vanillic acid by *Streptomyces sannanensis* MTCC 6637. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology,* **2007**, *34*, 131-138.
12. Mishra, S.; Sachan, A.; Vidyarthi, S. A.; Sachan, G. S. Microbial production of 4-vinylguaiacol fromferulic acid by *Bacillus cereus* SAS-3006. *Biocatalysis and Biotransformation,* **2014**, *32*, 259–266.
13. Alvarado,E. I.; Lomascolo, A.; Navarro, D. Evidence of a new biotransformation pathway of *p*-coumaric acid into *p*-hydroxybenzaldehyde in *Pycnoporus cinnabarinus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, **2001**, *57,* 725–730.
14. Shide, E. G.; Wuyep, P. A.; Nok, A. J. Studies on the degradation of wood sawdust by *Lentinus squarrosulus* (Mont.) Singer. *African Journal of Biotechnology*, **2004**, *3*, 395-398.
15. Isikhuemhen, S. O.; Mikiashvili, A. N.; Adenipekun, O. C.; Ohimain, I. E.; Shahbazi, G. The tropical white rot fungus, *Lentinus squarrosulus* Mont.:lignocellulolytic enzymes activities and sugar release from cornstalks under solid state fermentation. *World J Microbiol Biotechnol*, **2012**, *28*, 1961–1966.
16. Cantú, S. M.; Moreno, O. L.; Cassellis, C. E.; Castro, M. M.;Hernández, C. D. Solid-State Treatment of Castor Cake Employing the Enzymatic Cocktail Produced from *Pleurotus djamor* Fungi**.** *Appl Biochem Biotechnol*, **2017**.

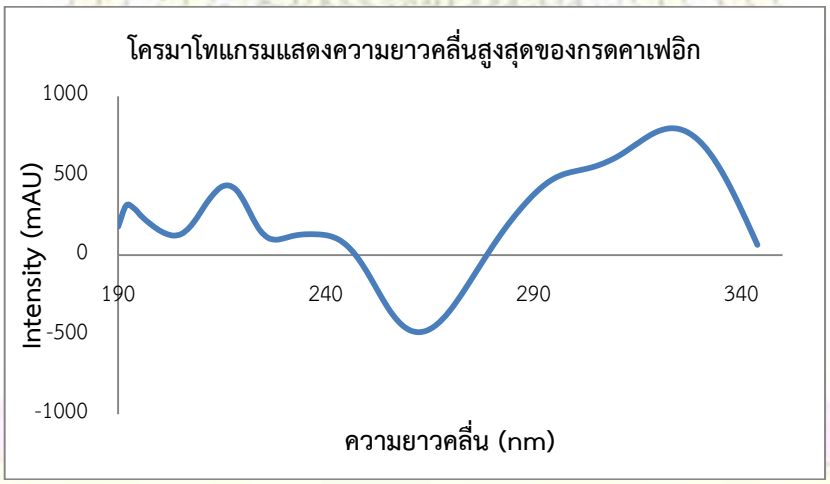
ภาคผนวก

รูปที่ A1

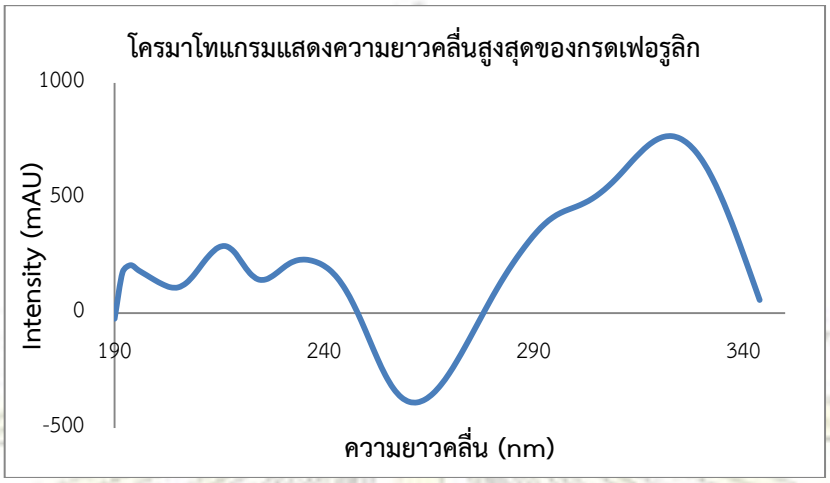
(a) โครมาโทแกรมของกรดคาเฟอิก กรดเฟอรูลิกและกรดพาราคูมาริกที่ความเข้มข้น 0.5% เมื่อแกน x คือเวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ และแกน y คือ intensity ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร



(b) โครมาโทแกรมแสดงความยาวคลื่นสูงสุดที่ได้จาก DAD ของกรดคาเฟอิก แกน x คือความยาวคลื่น และแกน y คือ intensity



(c) โครมาโทแกรมแสดงความยาวคลื่นสูงสุดที่ได้จาก DAD ของกรดเฟอรูลิก แกน x คือความยาวคลื่นและแกน y คือintensity

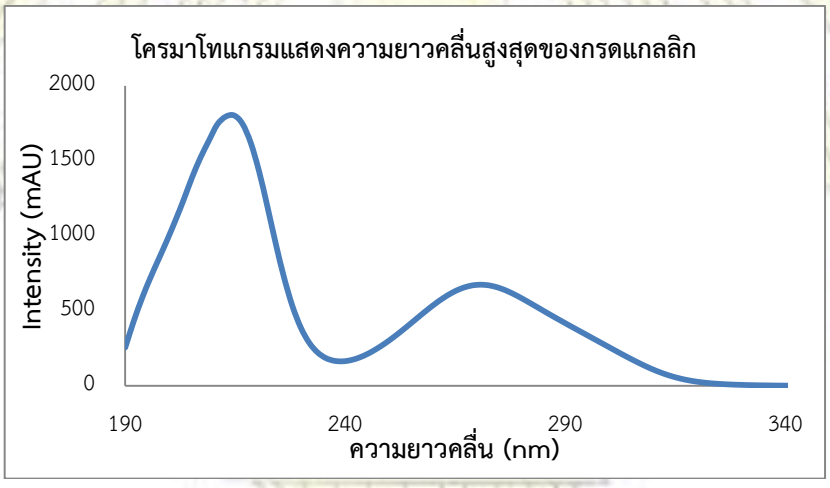


(d) โครมาโทแกรมแสดงความยาวคลื่นสูงสุดที่ได้จาก DAD ของกรดพาราคูมาริก แกน x คือความยาวคลื่นและแกน y คือintensity

รูป A2

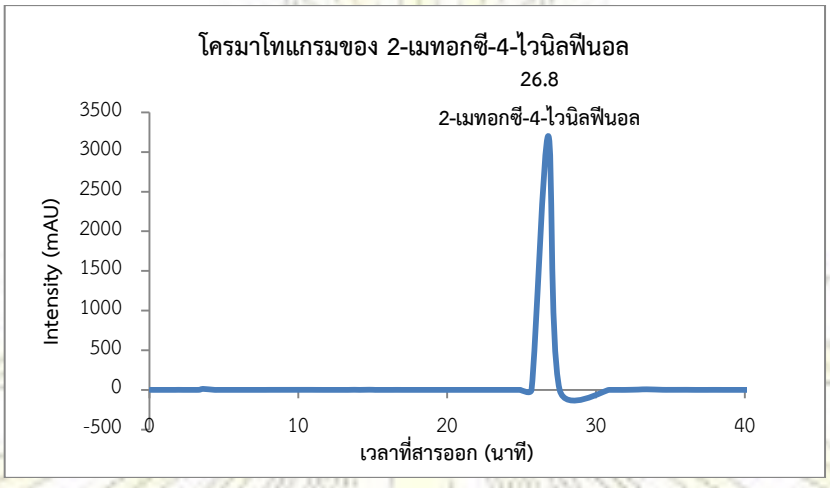
(a) โครมาโทแกรมของกรดกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 0.5% เมื่อแกน x คือเวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ และแกน y คือ intensity ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร

(b) โครมาโทแกรมแสดงความยาวคลื่นสูงสุดที่ได้จาก DAD ของกรดแกลลิก แกน x คือความยาวคลื่นและแกน y คือintensity

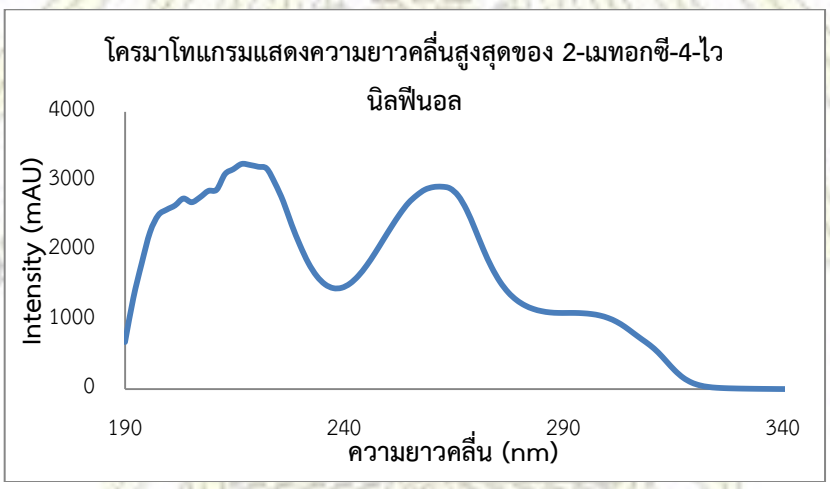


รูปที่ A3

(a) โครมาโทแกรมของ 2-เมทอกซี-4-ไวนิลฟีนอลที่ความเข้มข้น 0.5% เมื่อแกน x คือเวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ และแกน y คือ intensity ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร

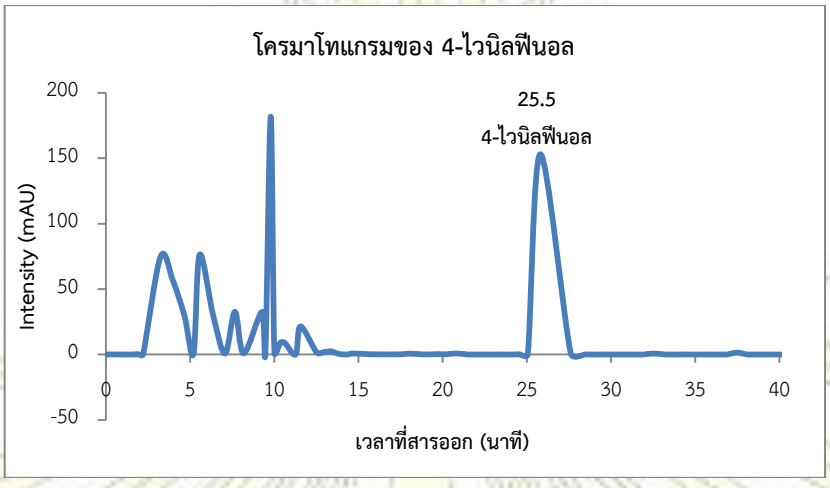


(b) โครมาโทแกรมแสดงความยาวคลื่นสูงสุดที่ได้จาก DAD ของ 2-เมทอกซี-4-ไวนิลฟีนอล แกน x คือความยาวคลื่นและแกน y คือintensity

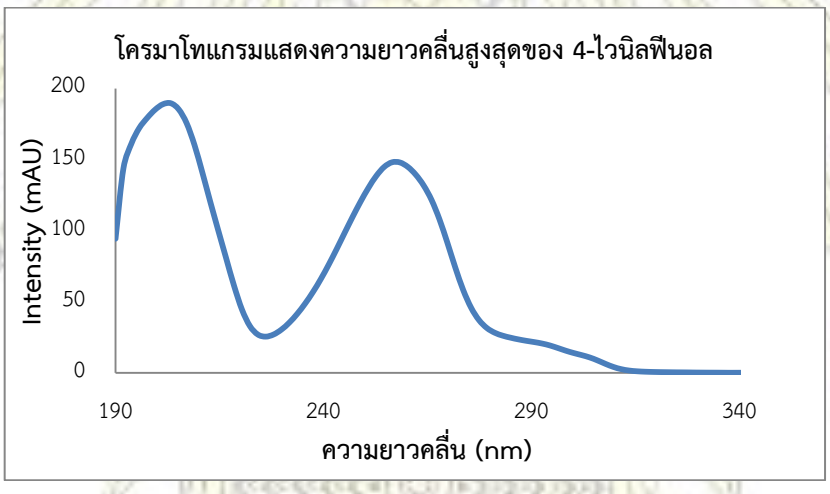


รูปที่ A4

(a) โครมาโทแกรมของ 4-ไวนิลฟีนอลที่ความเข้มข้น 0.5% เมื่อแกน x คือเวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ และแกน y คือ intensity ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร



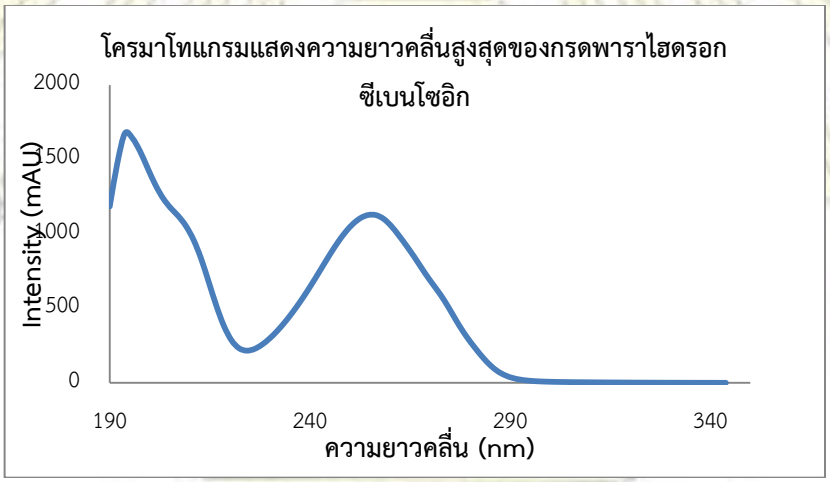
(b) โครมาโทแกรมแสดงความยาวคลื่นสูงสุดที่ได้จาก DAD ของ 4-ไวนิลฟีนอล เมื่อแกน x คือความยาวคลื่นและแกน y คือintensity



รูปที่ A5

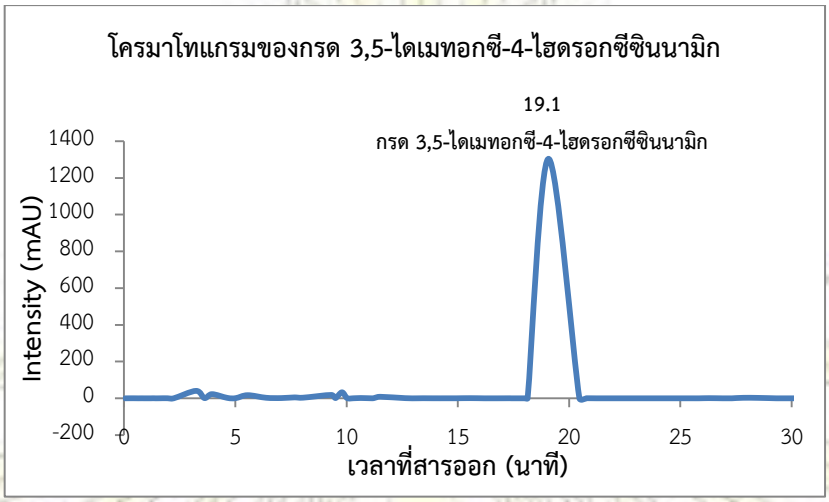
(a) โครมาโทแกรมของกรดพาราไฮดรอกซีเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 0.5% เมื่อแกน x คือเวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ และแกน y คือ intensity ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร

(b) โครมาโทแกรมแสดงความยาวคลื่นสูงสุดที่ได้จาก DAD ของกรดพาราไฮดรอกซีเบนโซอิก เมื่อแกน x คือความยาวคลื่นและแกน y คือintensity

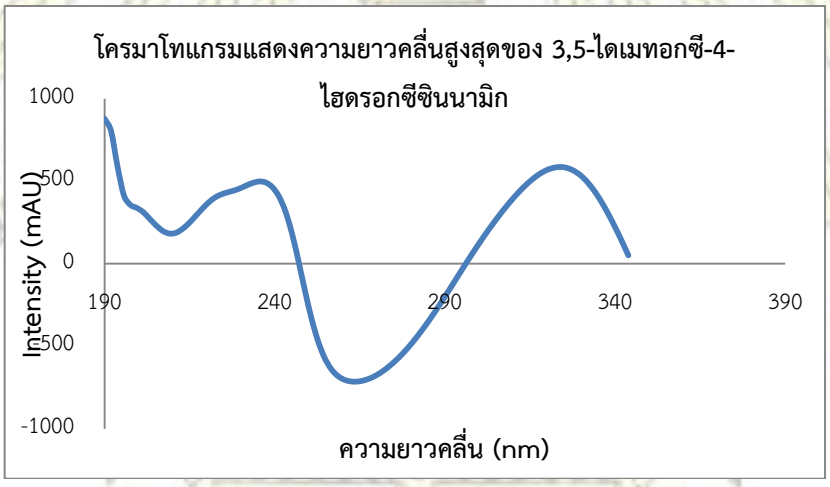


รูปที่ A6

(a) โครมาโทแกรมของกรด 3,5-ไดเมทอกซี-4-ไฮดรอกซีซินนามิก ที่ความเข้มข้น 0.5% เมื่อแกน x คือเวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ และแกน y คือ intensity ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร



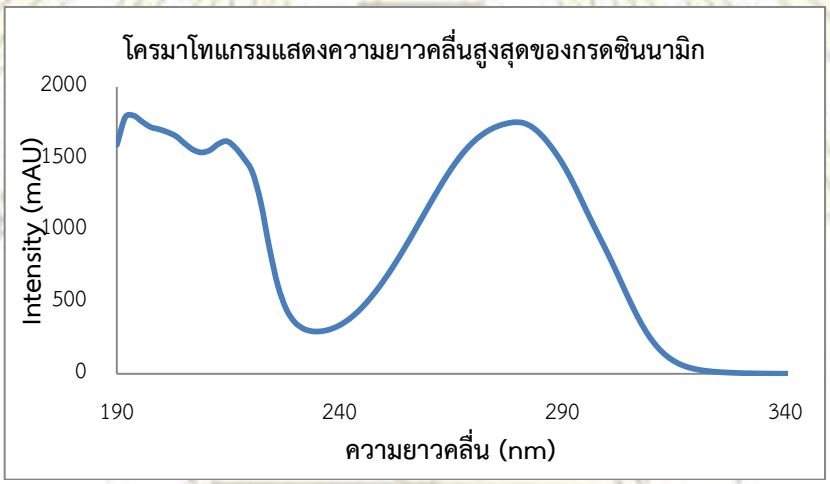
(b) โครมาโทแกรมแสดงความยาวคลื่นสูงสุดที่ได้จาก DAD ของ กรด3,5-ไดเมทอกซี-4-ไฮดรอกซีซินนามิกเมื่อแกน x คือความยาวคลื่นและแกน y คือintensity



รูปที่ A7

(a) โครมาโทแกรมของกรดซินนามิกที่ความเข้มข้น 0.5% เมื่อแกน x คือเวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ และแกน y คือ intensity ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร

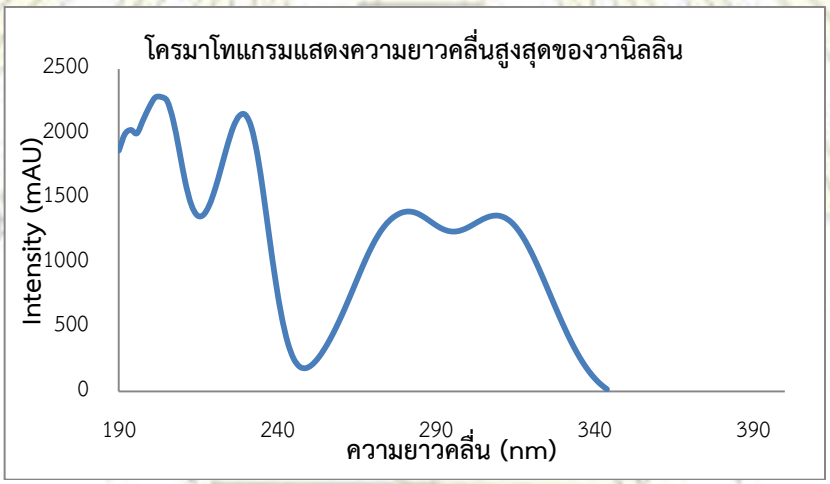
(b) โครมาโทแกรมแสดงความยาวคลื่นสูงสุดที่ได้จาก DAD ของกรดซินนามิก เมื่อแกน x คือความยาวคลื่นและแกน y คือintensity



รูปที่ A8

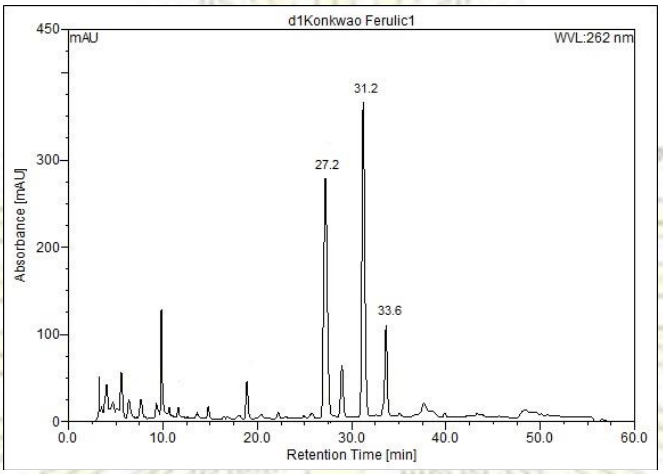
(a) โครมาโทแกรมของวานิลลินที่ความเข้มข้น 0.5% เมื่อแกน x คือเวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ และแกน y คือ intensity ที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร

(b) โครมาโทแกรมแสดงความยาวคลื่นสูงสุดที่ได้จาก DAD ของวานิลลิน เมื่อแกน x คือความยาวคลื่นและแกน y คือintensity

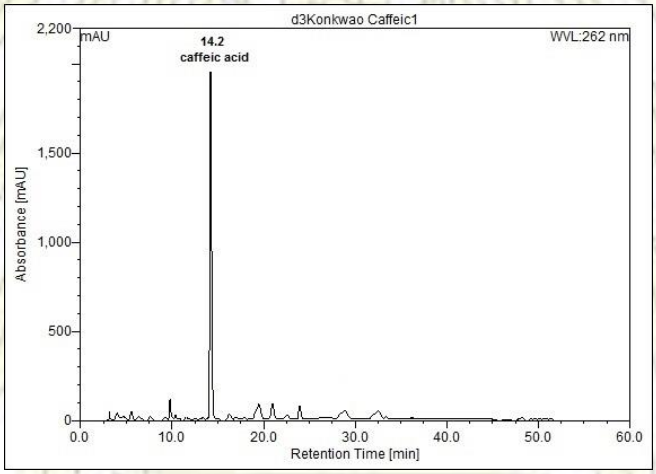


รูปที่ A9

(a) โครมาโทแกรมของกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดคาเฟอิกโดยเห็ดขอนขาวในวันที่ 1 ของการบ่ม เมื่อแกน x คือเวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ และแกน y คือ intensity ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร

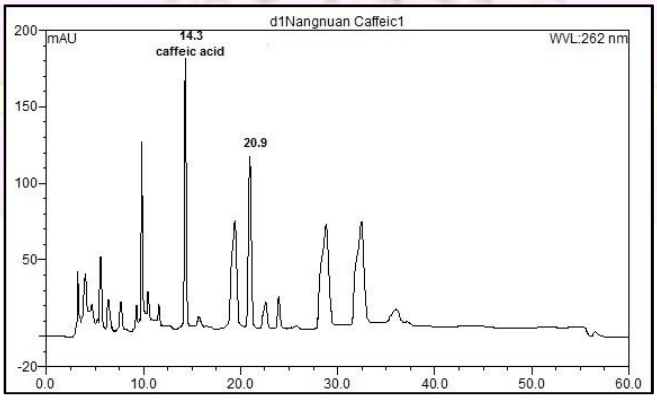


(b) โครมาโทแกรมของกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดคาเฟอิกโดยเห็ดขอนขาวในวันที่ 3 ของการบ่ม เมื่อแกน x คือเวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ และแกน y คือ intensity ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร

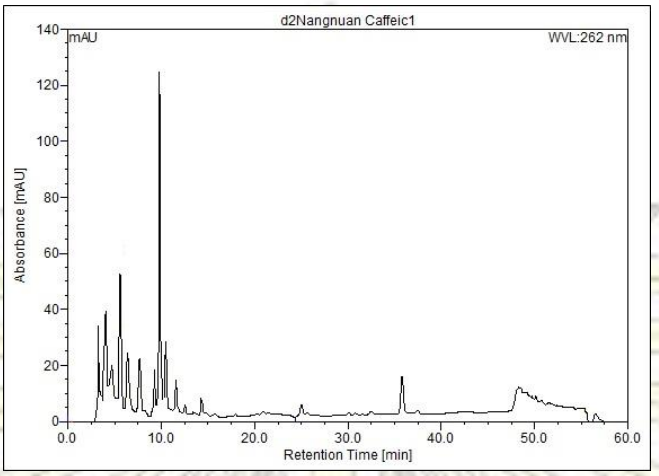


รูปที่ A10

(a) โครมาโทแกรมของกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดคาเฟอิกโดยเห็ดนางนวลในวันที่ 1 ของการบ่ม เมื่อแกน x คือเวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ และแกน y คือ intensity ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร

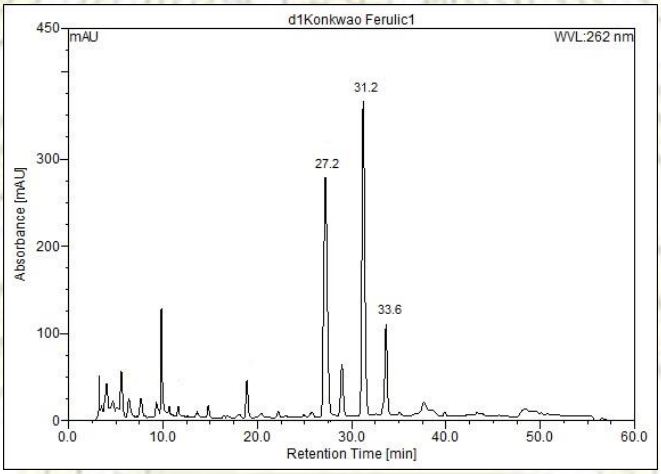


(b) โครมาโทแกรมของกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดคาเฟอิกโดยเห็ดนางนวลในวันที่ 2 ของการบ่ม เมื่อแกน x คือเวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ และแกน y คือ intensity ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร

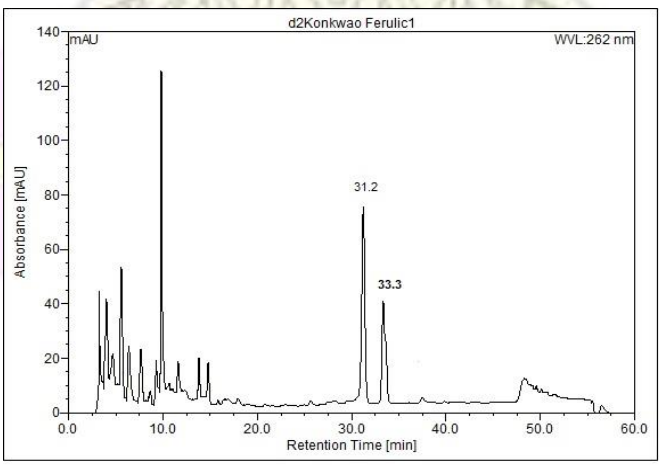


รูปที่ A11

(a) โครมาโทแกรมของกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดเฟอรูลิกโดยเห็ดขอนขาวในวันที่ 1 ของการบ่ม เมื่อแกน x คือเวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ และแกน y คือ intensity ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร

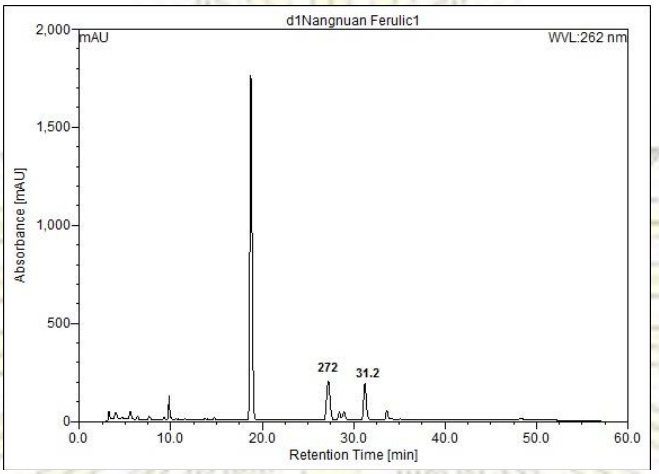


(b) โครมาโทแกรมของกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดเฟอรูลิกโดยเห็ดขอนขาวในวันที่ 2 ของการบ่ม เมื่อแกน x คือเวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ และแกน y คือ intensity ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร

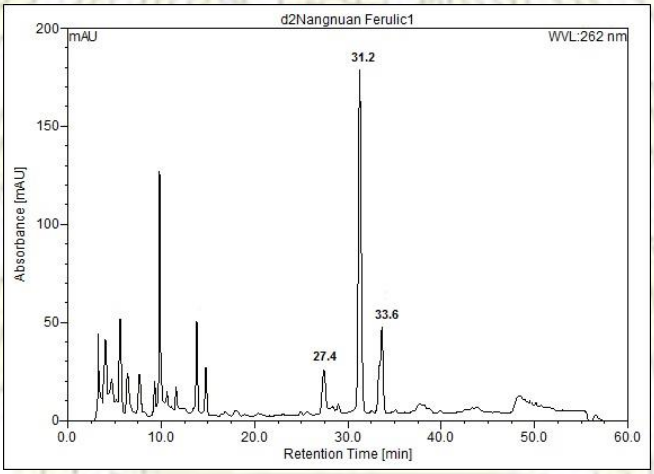


รูปที่ A12

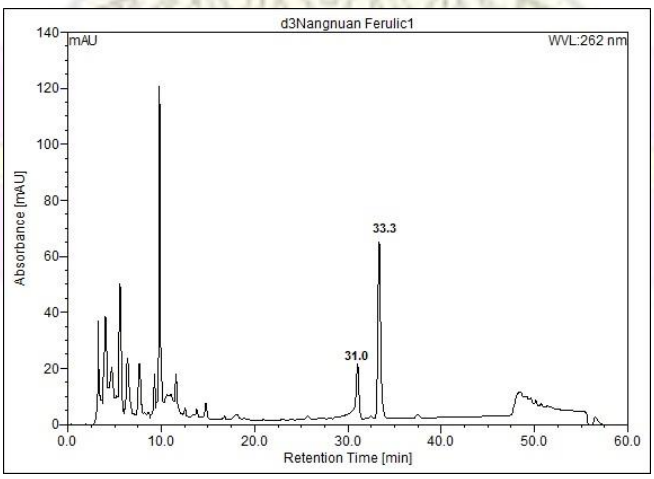
(a) โครมาโทแกรมของกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดเฟอรูลิกโดยเห็ดนางนวลในวันที่ 1 ของการบ่ม เมื่อแกน x คือเวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ และแกน y คือ intensity ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร



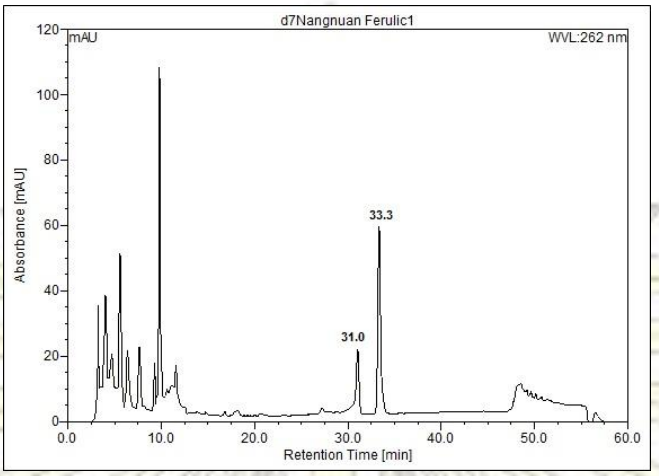
(b) โครมาโทแกรมของกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดเฟอรูลิกโดยเห็ดนางนวลในวันที่ 2 ของการบ่ม เมื่อแกน x คือเวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ และแกน y คือ intensity ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร



(c) โครมาโทแกรมของกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดเฟอรูลิกโดยเห็ดนางนวลในวันที่ 3 ของการบ่ม เมื่อแกน x คือเวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ และแกน y คือ intensity ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร

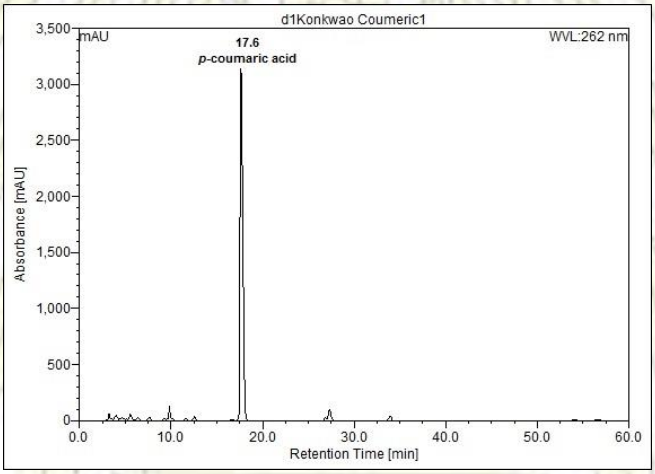


(d) โครมาโทแกรมของกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดเฟอรูลิกโดยเห็ดนางนวลในวันที่ 7 ของการบ่ม เมื่อแกน x คือเวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ และแกน y คือ intensity ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร

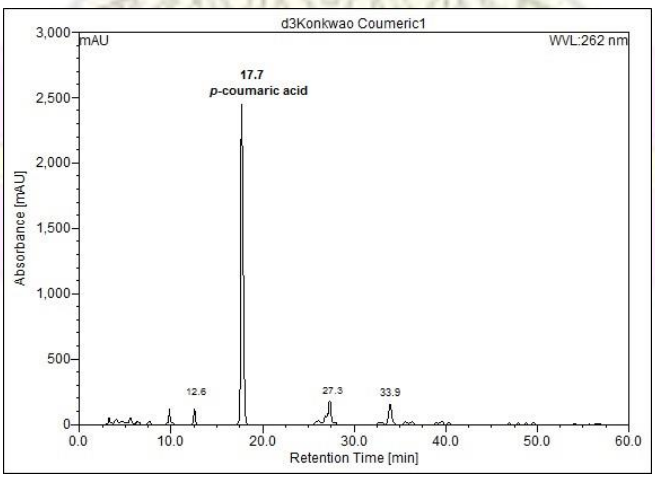


รูปที่ A13

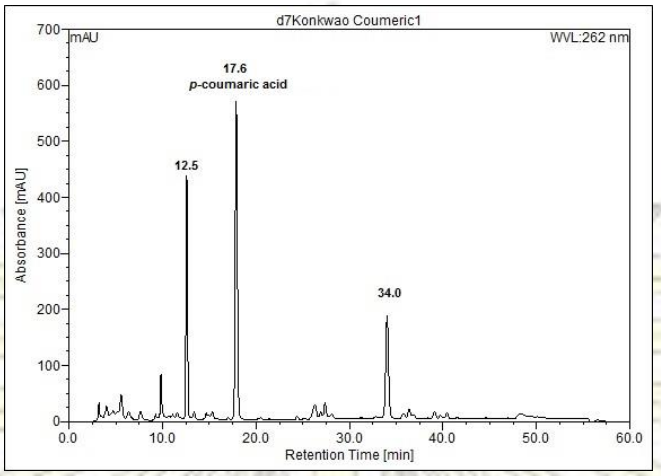
(a) โครมาโทแกรมของกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดขอนขาวในวันที่ 1 ของการบ่ม เมื่อแกน x คือเวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ และแกน y คือ intensity ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร



(b) โครมาโทแกรมของกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดขอนขาวในวันที่ 3 ของการบ่ม เมื่อแกน x คือเวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ และแกน y คือ intensity ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร

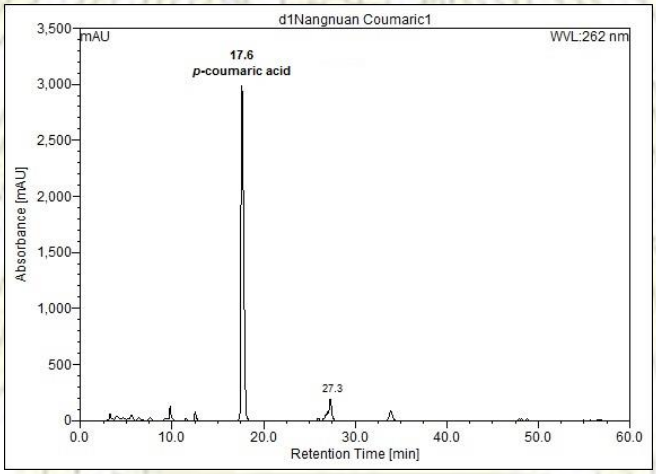


(c) โครมาโทแกรมของกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดขอนขาวในวันที่ 7 ของการบ่ม เมื่อแกน x คือเวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ และแกน y คือ intensity ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร

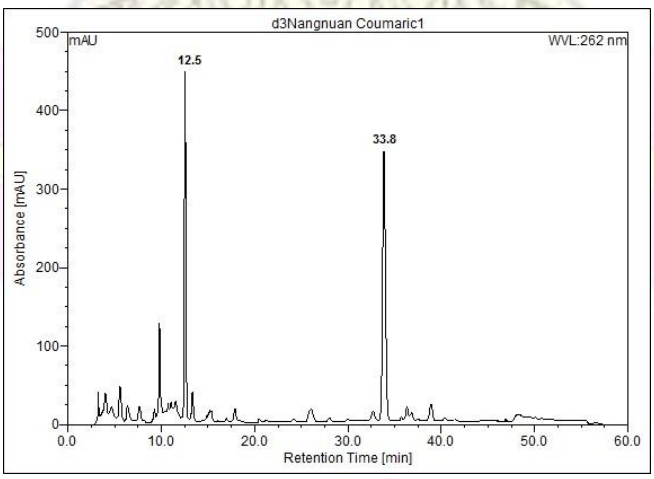


รูปที่ A14

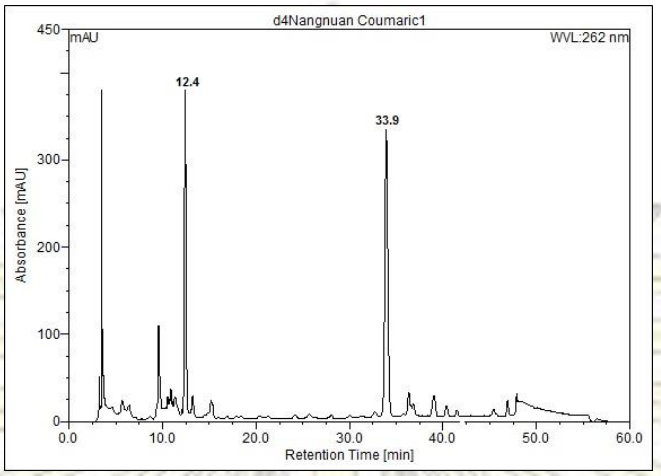
(a) โครมาโทแกรมของกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดนางนวลในวันที่ 1 ของการบ่ม เมื่อแกน x คือเวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ และแกน y คือ intensity ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร



(b) โครมาโทแกรมของกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดนางนวลในวันที่ 3 ของการบ่ม เมื่อแกน x คือเวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ และแกน y คือ intensity ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร

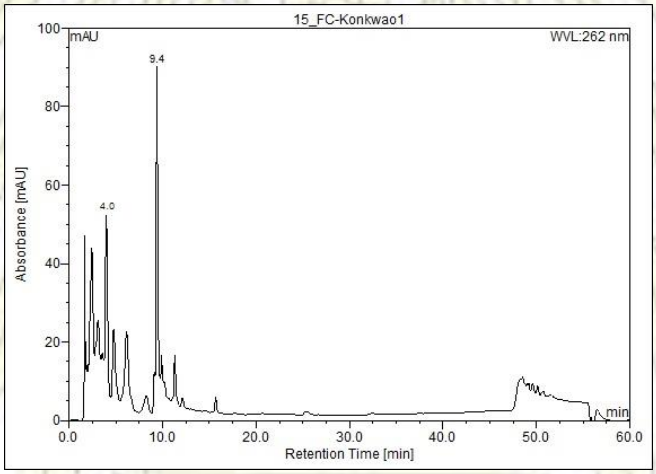


(c) โครมาโทแกรมของกระบวนการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพของกรดพาราคูมาริกโดยเห็ดนางนวลในวันที่ 4 ของการบ่ม เมื่อแกน x คือเวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ และแกน y คือ intensity ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร

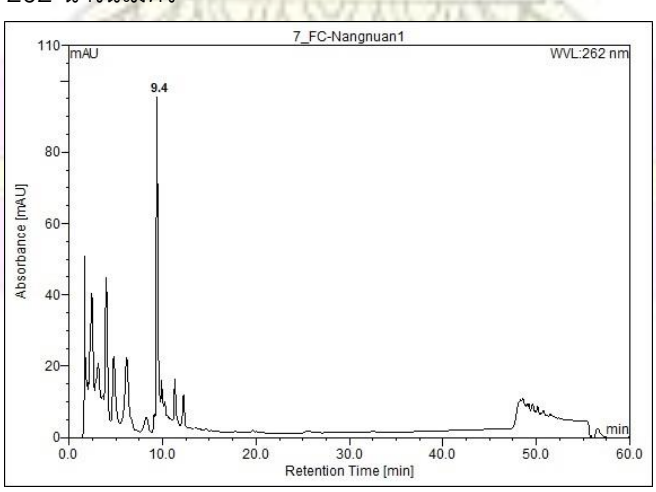


รูปที่ A15

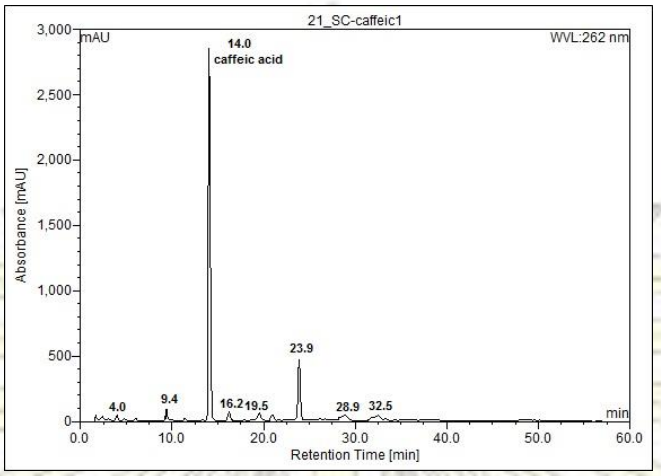
(a) โครมาโทแกรมของชุดควบคุมเห็ดขอนขาว เมื่อแกน x คือเวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ และแกน y คือ intensity ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร



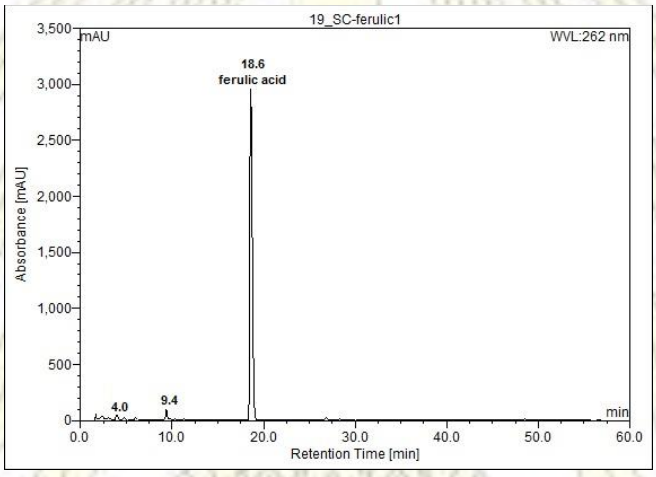
(b) โครมาโทแกรมของชุดควบคุมเห็ดนางนวล เมื่อแกน x คือเวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ และแกน y คือ intensity ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร



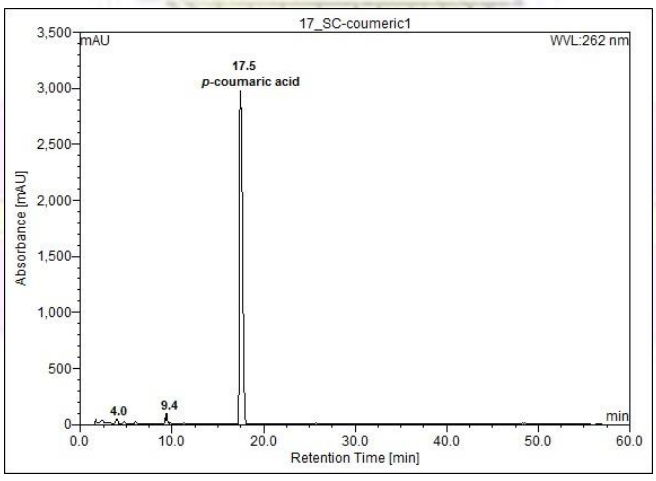
(c) โครมาโทแกรมของชุดสารตั้งต้นของกรดคาเฟอิก เมื่อแกน x คือเวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ และแกน y คือ intensity ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร



(d) โครมาโทแกรมของชุดสารตั้งต้นของกรดเฟอรูลิก เมื่อแกน x คือเวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ และแกน y คือ intensity ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร



(d) โครมาโทแกรมของชุดสารตั้งต้นของกรดพาราคูมาริก เมื่อแกน x คือเวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ และแกน y คือ intensity ที่ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร



ประวัติผู้วิจัย

นางสาวพัชรลักษณ์ โพธิ์วัง เกิดเมื่อวันที่ 4 กรกฎาคม 2538 ที่จังหวัด สิงห์บุรี สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนสิงห์บุรีจังหวัด สิงห์บุรี เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2557 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ บ้านเลขที่ 33 หมู่ที่ 1 ตำบล เชิงกลัด อำเภอ บางระจัน จังหวัด สิงห์บุรี รหัสไปรษณีย์ 16130 อีเมล Patcha38522@gmail.com