

การตรวจหาสารต้านเชื้อราจาก *Aureobasidium pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน

นางสาวเสาวลักษณ์ พลอยงาม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2552
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DETERMINATION OF ANTIFUNGAL AGENTS FROM TROPICAL STRAINS OF
Aureobasidium pullulans

Miss Saowaluk Ployngam

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2009
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การตรวจหาสารต้านเชื้อราจาก *Aureobasidium pullulans*
สายพันธุ์เขตร้อน

โดย

นางสาวเสาวลักษณ์ พลอยงาม

สาขาวิชา

เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

อาจารย์ ดร. สีนาท ประสงค์สุข

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

รองศาสตราจารย์ ดร. หรรษา ปุณณะพยัคฆ์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ปรีดา บุญ-หลง)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์ ดร. สีนาท ประสงค์สุข)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร. หรรษา ปุณณะพยัคฆ์)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร. สุมาลี พิษญากร)

เสาวลักษณ์ พลอยงาม : การตรวจหาสารต้านเชื้อราจาก *Aureobasidium pullulans* สายพันธุ์
เขตร้อน. (DETERMINATION OF ANTIFUNGAL AGENTS FROM TROPICAL STRAINS OF
Aureobasidium pullulans) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : อ.ดร.สีหนาท ประสงค์สุข, อ.ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์ร่วม : รศ.ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์; 116 หน้า.

ในการศึกษานี้ดำเนินการเพื่อตรวจหา สารต้านเชื้อราจาก *Aureobasidium pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน
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 นำ *A.*
pullulans ทั้ง 10 สายพันธุ์ มาผลิตสารต้านเชื้อราและทำการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดที่ได้ในการต้านเชื้อ
ราก่อโรคกลุ่ม *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 มีฤทธิ์
สูงสุดในการยับยั้งเชื้อรา *Aspergilli* ได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ เมื่อนำสายพันธุ์ดังกล่าวมาทำการเพิ่มผลผลิตของสารต้าน
เชื้อรา โดยทำการศึกษากาหาวะที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน คือ กลูโคส และ ซูโครส ที่ความเข้มข้น 1.5, 2.0
และ 2.5% (w/v) พบว่าสารสกัด จาก *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 พบว่าสารสกัด
จาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในกรดอะมิโน ภาวะที่มีฟีนอลอะลานีน ร่วมกับลิวซีนมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *A.*
flavus ได้ประสิทธิภาพสูงสุด ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 175.00±0.05 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสารสกัดจาก *A. pullulans*
NRRL 58536 ในกรดอะมิโน ภาวะที่มี โพรลีน ร่วมกับ ลิวซีน พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *A. terreus* ได้
ประสิทธิภาพสูงสุด ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 120.00±0.01 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่สารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL
58536 ในกรดอะมิโนภาวะที่มีฟีนอลอะลานีนร่วมกับโพรลีน และ ลิวซีน มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *A. niger* และ *A.*
fumigatus ได้ประสิทธิภาพสูงสุด ซึ่งมี เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 146.00±0.08 และ 170.00±0.06 เปอร์เซ็นต์
ตามลำดับ เมื่อนำสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 มาตรวจสอบด้วยเทคนิค เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้น
บาง เปรียบเทียบกับสารต้านเชื้อราออริโอบาซิดิน เอ (aureobasidin A) พบว่าสารที่ถูกแยกได้จากสารสกัดสาย
พันธุ์นี้มีค่า 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 มาวิเคราะห์
โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบางอีกครั้ง และทำการวิเคราะห์เพิ่มเติมด้วยเทคนิค High Performance Liquid
Chromatography เทคนิค Spectrophotometry เทคนิค MALDI-TOF Mass Spectrometry และเทคนิค ¹H-
Nuclear Magnetic Resonance ผลการทดลองพบว่า *A. pullulans* NRRL 58536 ผลิตสารต้านเชื้อราที่มีผลการ
วิเคราะห์สอดคล้องกับสารต้านเชื้อราออริโอบาซิดิน เอ

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ.....ลายมือชื่อนิสิต.....

ปีการศึกษา.....2552.....ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5072541423: MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: *Aureobasidium pullulans* / AUREOBASIDIN A / ANTIFUNGAL AGENTS

SAOWALUK PLOYNGAM : DETERMINATION OF ANTIFUNGAL AGENTS FROM TROPICAL STRAINS OF *Aureobasidium pullulans*. ADVISOR : SEHANAT PRASONGSUK, Ph.D., CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. HUNSA PUNNAPAYAK, Ph.D., 116 pp.

Determination of antifungal agents from 10 tropical strains of *Aureobasidium pullulans* including Deenam 001 BCU, Deenam 003 BCU, Deenam 008 BCU, Deenam 007 BCU, Deenam 009 BCU, NRRL 58514, NRRL 58536, NRRL 58516, NRRL 58517 and NRRL 58520 was investigated. All strains were cultivated for antifungal agent production 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 Rf 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 Rf values (0.45 and 0.59) were revealed. The extract containing similar Rf 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.

Field of Study :Biotechnology.....Student's Signature.....

Academic year : ...2009.....Advisor's Signature.....

Co-Advisor's Signature.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี โดยการอนุเคราะห์ จากหลายฝ่าย ขอขอบพระคุณ อ.ดร.สีหนาท ประสงค์สุข อาจารย์ที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์ หลัก เป็นอย่างสูงที่กรุณาให้ ความรู้ คำปรึกษา และแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์และถูกต้องยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ อาจารย์ที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์ ร่วม ที่กรุณา ให้ความรู้คำปรึกษา และตรวจแก้ต้นฉบับวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องครบถ้วน

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.ปรีดา บุญ -หลง หัวหน้าภาควิชาพฤกษศาสตร์ ที่กรุณาเป็น ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และตรวจแก้ต้นฉบับให้สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ที่กรุณาเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ และตรวจแก้ต้นฉบับให้สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.สุมาลี พิชญางกูร ที่กรุณา เป็นกรรมการ (ผู้ทรงคุณวุฒิจาก ภายนอก) ในการสอบวิทยานิพนธ์และตรวจแก้ต้นฉบับให้สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ และหน่วยปฏิบัติการวิจัย การใช้ประโยชน์จากชีวมวล พืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย

ขอขอบคุณ สมาชิก ในหน่วย ปฏิบัติการวิจัยการใช้ประโยชน์จากชีวมวล พืช บุคลากรใน หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ และภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ทุกท่าน

สุดท้ายนี้ขอกราบระลึกถึงพระคุณของบิดา มารดา ผู้วางรากฐานให้โอกาสทางการศึกษา และญาติพี่น้องผู้มีอุปการคุณทุกท่าน ที่ให้การสนับสนุนช่วยเหลือและเป็นกำลังใจ ที่ดีตลอดมา ทำให้งานวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์สำหรับนิสิต ครั้งที่ 2/2552 (ภาค ปลาย ปีการศึกษา2551) บัณฑิตวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูป.....	ฎ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
3. วิธีดำเนินการวิจัย.....	19
อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	19
สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	20
เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	21
วิธีดำเนินงานวิจัย.....	21
1. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา <i>A. pullulans</i>	21
2. การผลิตสารต้านเชื้อราจาก <i>A. pullulans</i>	21
3. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเชื้อรา.....	22
4. ศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารต้านเชื้อรา	23
5. ทำบริสุทธิ์บางส่วนสารต้านเชื้อรา.....	24
6. ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพสารต้านเชื้อราที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน...	25
7. วิเคราะห์สารต้านเชื้อราที่ผลิตได้.....	26
4. ผลการทดลอง.....	27
1. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา <i>A. pullulans</i>	27
2. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเชื้อรา.....	38
2.1 วิธี Well diffusion.....	38
2.2 วิธี Conidial germination inhibition assay	50

3. ศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารต้านเชื้อรา	52
3.1 ศึกษาหาช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารต้านเชื้อราโดยใช้เทคนิค Spectrophotometry.....	52
3.2 ศึกษาชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน.....	55
3.3 ศึกษาการใช้แหล่งอาหารเสริม.....	61
4. ทำบริสุทธิ์บางส่วนสารต้านเชื้อรา	73
4.1 เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (Thin layer chromatography).....	73
4.2 เทคนิค High Performance Liquid Chromatography.....	75
4.3 เทคนิค Spectrophotometry สำหรับการวิเคราะห์โปรตีนเบื้องต้นในสารต้านเชื้อรา.....	78
4.4 เทคนิค MALDI-TOF Mass Spectrometry สำหรับการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลสารต้านเชื้อรา.....	80
5. ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพสารต้านเชื้อราที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน.....	82
5.1 วิธี Well diffusion.....	82
5.2 วิธี Conidial germination inhibition assay	87
5.3 ทำการตรวจสอบสารสกัดด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (Thin layer chromatography).....	89
6. วิเคราะห์โครงสร้างสารต้านเชื้อราที่ผลิตได้.....	91
6.1 ทำการวิเคราะห์โครงสร้างสารต้านเชื้อราที่ผลิตได้ด้วยวิธี ¹ H-Nuclear Magnetic Resonance (¹ H-NMR).....	91
5. สรุปผลการทดลอง อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	93
สรุปและอภิปรายผลการทดลอง.....	93
1. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา <i>A. pullulans</i>	93
2. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเชื้อรา.....	93
2.1 วิธี Well diffusion.....	93
2.2 วิธี Conidial germination inhibition assay	94
3. ศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารต้านเชื้อรา	94

3.1	ศึกษาหาช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารต้านเชื้อราโดยใช้เทคนิค Spectrophotometry.....	94
3.2	ศึกษาชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน.....	95
3.3	ศึกษาการใช้แหล่งอาหารเสริม.....	96
4.	ทำปฏิกิริยาบางส่วนสารต้านเชื้อรา	97
4.1	เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (Thin layer chromatography).....	97
4.2	เทคนิค High Performance Liquid Chromatography.....	98
4.3	เทคนิค Spectrophotometry สำหรับการวิเคราะห์โปรตีนเบื้องต้นในสารต้านเชื้อรา.....	99
4.4	เทคนิค MALDI-TOF Mass Spectrometry สำหรับการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลสารต้านเชื้อรา.....	100
5.	ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพสารต้านเชื้อราที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน.....	101
5.1	วิธี Well diffusion.....	101
5.2	วิธี Conidial germination inhibition assay	101
5.3	ทำการตรวจสอบสารสกัดด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (Thin layer chromatography).....	102
6.	วิเคราะห์โครงสร้างสารต้านเชื้อราที่ผลิตได้.....	103
6.1	ทำการวิเคราะห์โครงสร้างสารต้านเชื้อราที่ผลิตได้ด้วยวิธี ¹ H-Nuclear Magnetic Resonance (¹ H NMR).....	103
	ข้อเสนอแนะ.....	104
	รายการอ้างอิง.....	105
	ภาคผนวก.....	109
	ภาคผนวก ก.....	110
	ภาคผนวก ข.....	113
	ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	116

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อราของ ออริโอบาซิดิน เอ เมื่อเปรียบเทียบกับ แอมโฟเทอริซิน B	11
2 ความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา <i>Aspergillus</i> spp. ของสารสกัดจาก <i>A. pullulans</i> ทั้ง 10 สายพันธุ์ โดยวิธี Well diffusion.....	39
3 เพอร์เซ็นต์การงอกและเพอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์ <i>Aspergillus</i> spp. ที่ถูกบ่มร่วมกับสารสกัดจาก <i>A. pullulans</i> ทั้ง 10 สายพันธุ์.....	51
4 ผลการศึกษากราฟการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>A. pullulans</i> NRRL 58536.....	53
5 ความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา <i>Aspergillus</i> spp. ของสารสกัดจาก <i>A. pullulans</i> NRRL 58536 ในแหล่งคาร์บอนกลูโคส โดยวิธี well diffusion.....	56
6 เพอร์เซ็นต์การงอกและเพอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์ <i>Aspergillus</i> spp. ที่ถูกบ่มร่วมกับสารสกัดจาก <i>A. pullulans</i> NRRL 58536 ในแหล่งคาร์บอนกลูโคส.....	60
7 ความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา <i>Aspergillus</i> spp. ของสารสกัดจาก <i>A. pullulans</i> NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโน โดยวิธี Well diffusion.....	63
8 เพอร์เซ็นต์การงอกและเพอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์ <i>Aspergillus</i> spp. ที่ถูกบ่มร่วมกับสารสกัดจาก <i>A. pullulans</i> NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโน.....	71
9 ความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา <i>Aspergillus</i> spp. ของสารสกัดจาก <i>A. pullulans</i> NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดย วิธี Well diffusion.....	83
10 เพอร์เซ็นต์การงอกและเพอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์ <i>Aspergillus</i> spp. ที่ถูกบ่มร่วมกับสารสกัดจาก <i>A. pullulans</i> NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโน ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน.....	88

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1 โครงสร้างของพุลูลูแลน.....	7
2 โครงสร้างของ ออริโอบาซิดิน โครงสร้าง A ถึง R.....	7
3 โครงสร้างของ Aureobasidin A.....	9
4 วิธีการสังเคราะห์สฟิงโกลิปิด ในสัตว์และเชื้อรา.....	10
5 ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อรา <i>A. pullulans</i> Deenam 001 BCU เมื่อเลี้ยงใน YMB เป็นเวลา 7 วัน.....	28
6 ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อรา <i>A. pullulans</i> Deenam 003 BCU เมื่อเลี้ยงใน YMB เป็นเวลา 7 วัน.....	29
7 ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อรา <i>A. pullulans</i> Deenam 008 BCU เมื่อเลี้ยงใน YMB เป็นเวลา 7 วัน.....	30
8 ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อรา <i>A. pullulans</i> Deenam 007 BCU เมื่อเลี้ยงใน YMB เป็นเวลา 7 วัน.....	31
9 ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อรา <i>A. pullulans</i> Deenam 009 BCU เมื่อเลี้ยงใน YMB เป็นเวลา 7 วัน.....	32
10 ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อรา <i>A. pullulans</i> NRRL 58514 เมื่อเลี้ยงใน YMB เป็นเวลา 7 วัน.....	33
11 ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อรา <i>A. pullulans</i> NRRL 58536 เมื่อเลี้ยงใน YMB เป็นเวลา 7 วัน.....	34
12 ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อรา <i>A. pullulans</i> NRRL 58516 เมื่อเลี้ยงใน YMB เป็นเวลา 7 วัน.....	35
13 ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อรา <i>A. pullulans</i> NRRL 58517 เมื่อเลี้ยงใน YMB เป็นเวลา 7 วัน.....	36
14 ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อรา <i>A. pullulans</i> NRRL 58520 เมื่อเลี้ยงใน YMB เป็นเวลา 7 วัน.....	37
15 ตำแหน่งของสารสกัดที่ใช้ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเชื้อราบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อโดยวิธี Well diffusion.....	38
16 ความสามารถในการยับยั้ง <i>A. flavus</i> <i>A. niger</i> และ <i>A. fumigatus</i> ของสารสกัดจาก <i>A. pullulans</i> Deenam 001 BCU	40

รูปที่	ฉ หน้า
17 ความสามารถในการยับยั้ง <i>A. flavus</i> <i>A. niger</i> และ <i>A. terreus</i> ของสารสกัดจาก <i>A. pullulans</i> Deenam 003 BCU.....	41
18 ความสามารถในการยับยั้ง <i>A. niger</i> และ <i>A. fumigatus</i> ของสารสกัดจาก <i>A. pullulans</i> Deenam 008 BCU.....	42
19 ความสามารถในการยับยั้ง <i>A. flavus</i> และ <i>A. fumigatus</i> ของสารสกัดจาก <i>A. pullulans</i> Deenam 007 BCU.....	43
20 ความสามารถในการยับยั้ง <i>A. fumigatus</i> ของสารสกัดจาก <i>A. pullulans</i> Deenam 009 BCU.....	44
21 ความสามารถในการยับยั้ง <i>A. flavus</i> <i>A. niger</i> <i>A. fumigatus</i> และ <i>A. terreus</i> ของสารสกัดจาก <i>A. pullulans</i> NRRL 58514.....	45
22 ความสามารถในการยับยั้ง <i>A. flavus</i> <i>A. niger</i> <i>A. fumigatus</i> และ <i>A. terreus</i> ของสารสกัดจาก <i>A. pullulans</i> NRRL 58536.....	46
23 ความสามารถในการยับยั้ง <i>A. niger</i> และ <i>A. fumigatus</i> ของสารสกัดจาก <i>A. pullulans</i> NRRL 58516.....	47
24 ความสามารถในการยับยั้ง <i>A. fumigatus</i> ของสารสกัดจาก <i>A. pullulans</i> NRRL 58517.....	48
25 ความสามารถในการยับยั้ง <i>A. fumigatus</i> ของสารสกัดจาก <i>A. pullulans</i> NRRL 58520.....	49
26 ผลการวัดค่าความชื้นและการนับจำนวนเซลล์/มิลลิลิตรของเชื้อ <i>A. pullulans</i> NRRL 58536 เปรียบเทียบกับเวลา.....	54
27 ความสามารถในการยับยั้ง <i>A. flavus</i> <i>A. niger</i> <i>A. fumigatus</i> และ <i>A. terreus</i> ของสารสกัดจาก <i>A. pullulans</i> NRRL 58536 ในแหล่งคาร์บอนกลูโคสความเข้มข้น 1.5 % (w/v).....	57
28 ความสามารถในการยับยั้ง <i>A. flavus</i> <i>A. niger</i> <i>A. fumigatus</i> และ <i>A. terreus</i> ของสารสกัดจาก <i>A. pullulans</i> NRRL 58536 ในแหล่งคาร์บอนกลูโคสความเข้มข้น 2.0 % (w/v).....	58
29 ความสามารถในการยับยั้ง <i>A. flavus</i> <i>A. niger</i> <i>A. fumigatus</i> และ <i>A. terreus</i> ของสารสกัดจาก <i>A. pullulans</i> NRRL 58536 ในแหล่งคาร์บอนกลูโคสความเข้มข้น 2.5 % (w/v).....	59

รูปที่	ฐ หน้า
30 ความสามารถในการยับยั้ง <i>A. flavus</i> <i>A. niger</i> <i>A. fumigatus</i> และ <i>A. terreus</i> ของสารสกัดจาก <i>A. pullulans</i> NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโน ภาวะที่ 1 (ฟีนิลอะลานีน).....	64
31 ความสามารถในการยับยั้ง <i>A. flavus</i> <i>A. niger</i> <i>A. fumigatus</i> และ <i>A. terreus</i> ของสารสกัดจาก <i>A. pullulans</i> NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโน ภาวะที่ 2 (โพรีลีน).....	65
32 ความสามารถในการยับยั้ง <i>A. flavus</i> <i>A. niger</i> <i>A. fumigatus</i> และ <i>A. terreus</i> ของสารสกัดจาก <i>A. pullulans</i> NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโน ภาวะที่ 3 (ลิวซีน).....	66
33 ความสามารถในการยับยั้ง <i>A. flavus</i> <i>A. niger</i> <i>A. fumigatus</i> และ <i>A. terreus</i> ของสารสกัดจาก <i>A. pullulans</i> NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโน ภาวะที่ 4 (ฟีนิลอะลานีน และ โพรีลีน).....	67
34 ความสามารถในการยับยั้ง <i>A. flavus</i> <i>A. niger</i> <i>A. fumigatus</i> และ <i>A. terreus</i> ของสารสกัดจาก <i>A. pullulans</i> NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโน ภาวะที่ 5 (ฟีนิลอะลานีน และลิวซีน).....	68
35 ความสามารถในการยับยั้ง <i>A. flavus</i> <i>A. niger</i> <i>A. fumigatus</i> และ <i>A. terreus</i> ของสารสกัดจาก <i>A. pullulans</i> NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโน ภาวะที่ 6 (โพรีลีน และ ลิวซีน).....	69
36 ความสามารถในการยับยั้ง <i>A. flavus</i> <i>A. niger</i> <i>A. fumigatus</i> และ <i>A. terreus</i> ของสารสกัดจาก <i>A. pullulans</i> NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโน ภาวะที่ 7 (ฟีนิลอะลานีน โพรีลีน และ ลิวซีน).....	70
37 โครมาโทแกรมแสดงผลการตรวจสอบสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา ที่ได้จาก เชื้อรา <i>A. pullulans</i> NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโน ด้วยเทคนิค TLC.....	74
38 กราฟจากการตรวจสอบด้วย HPLC ของอริโอบาซีดิน เอ ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (A) สารสกัด <i>A. pullulans</i> NRRL 58536 ในภาวะที่ 5 (ฟีนิลอะลานีน และ ลิวซีน)(B) สารสกัด <i>A. pullulans</i> NRRL 58536 ในภาวะที่ 6 (โพรีลีน และ ลิวซีน) (C) สารสกัด <i>A. pullulans</i> NRRL 58536 ในภาวะที่ 7 (ฟีนิลอะลานีน โพรีลีน และ ลิวซีน) (D).....	76

39	กราฟจากการตรวจสอบด้วย HPLC ของออริโอบาซิดิน เอ ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (A) สารสกัด <i>A. pullulans</i> NRRL 58536 ในภาวะที่ 5 (ฟีนิลอะลานีน และ ลิวซีน) ผสมสารมาตรฐานออริโอบาซิดิน เอ ในอัตราส่วน 2:1 (B) สารสกัด <i>A. pullulans</i> NRRL 58536 ในภาวะที่ 6 (โพรสลิน และ ลิวซีน) ผสมสารมาตรฐานออริโอบาซิดิน เอ ในอัตราส่วน 2:1 (C) สารสกัด <i>A. pullulans</i> NRRL 58536 ในภาวะที่ 7 (ฟีนิลอะลานีน โพรสลิน และ ลิวซีน) ผสมสารมาตรฐานออริโอบาซิดิน เอ ในอัตราส่วน 2:1 (D).....	77
40	สเปกตรัมค่าการดูดกลืนแสงจากการทดสอบด้วยเทคนิค Spectrophotometry....	79
41	MALDI-TOF สเปกตรัม.....	81
42	ความสามารถในการยับยั้ง <i>A. flavus</i> <i>A. niger</i> <i>A. fumigatus</i> และ <i>A. terreus</i> ของสารสกัดจาก <i>A. pullulans</i> NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโน ภาวะที่ 5 (ฟีนิลอะลานีน และ ลิวซีน).....	84
43	ความสามารถในการยับยั้ง <i>A. flavus</i> <i>A. niger</i> <i>A. fumigatus</i> และ <i>A. terreus</i> ของสารสกัดจาก <i>A. pullulans</i> NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโน ภาวะที่ 6 (โพรสลิน และ ลิวซีน).....	85
44	ความสามารถในการยับยั้ง <i>A. flavus</i> <i>A. niger</i> <i>A. fumigatus</i> และ <i>A. terreus</i> ของสารสกัดจาก <i>A. pullulans</i> NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโน ภาวะที่ 7 (ฟีนิลอะลานีน โพรสลิน และ ลิวซีน).....	86
45	โครมาโทแกรมแสดงผลการตรวจสอบสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา ที่ได้ จากเชื้อรา <i>A. pullulans</i> NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโน ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน ด้วยเทคนิค TLC.....	90
46	โปรตอนแอนไอออนสเปกตรัม.....	92

บทที่ 1

บทนำ

ในปัจจุบัน โรคที่เกิดจากการติดเชื้อราจัดเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ผู้ป่วยโรคเอดส์ และในกลุ่มผู้ป่วยที่ใช้ยากดภูมิคุ้มกัน เช่น ผู้ป่วยโรคมะเร็ง ผู้ป่วยที่มีความผิดปกติในระบบภูมิคุ้มกัน และผู้ป่วยที่มีการผ่าตัดเปลี่ยนถ่ายอวัยวะ เป็นต้น โรคติดเชื้อรายังอาจพบได้ในผู้ป่วยห้องอภิบาลผู้ป่วยหนัก (ICU) ซึ่งใช้ยาต้านจุลชีพที่มีฤทธิ์กว้างในการรักษาเป็นระยะเวลานาน นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วยซึ่งเป็นโรคติดเชื้อราที่ร่างกายนั้นรักษาได้ยาก ยาที่นิยมนำมาใช้รักษาโรคติดเชื้อราในปัจจุบันมีหลายชนิด เช่น แอมโฟเทอริซิน บี (amphotericin B) ฟลูไซโตซิน (flucytocin) และยาในกลุ่มเอโซล (azole) เป็นต้น อย่างไรก็ตามยาทั้งหมดที่กล่าวมานั้นยังไม่พบว่ามียาชนิดใดที่ให้ผลการรักษาในระดับที่น่าพอใจ ทั้งในด้านประสิทธิภาพในการรักษาที่ครอบคลุมโรคติดเชื้อราได้หลากหลายชนิด ความเป็นพิษต่อร่างกาย หรือโอกาสที่เชื้อจะดื้อยา (พรรณกร อิมวิททยา, 2538) ยาที่วงการแพทย์ใช้เป็นยามาตรฐานในการรักษาโรคเชื้อราคือ แอมโฟเทอริซิน บี (amphotericin B) ซึ่งมีความสามารถในการทำลายเซลล์ของเชื้อราที่มีการเจริญพันธุ์และเซลล์ที่อยู่ในระยะพัก แต่ยังมีปัญหาด้านสารพิษตกค้างในหลอดเลือดดำ (พรรณกร อิมวิททยา และ นันทจักร เกรินทร์, 2543) ยาฟลูไซโตซินมีขอบเขตการต้านเชื้อราที่แคบกว่าแอมโฟเทอริซิน บี ส่วนยาในกลุ่มเอโซล นั้นมีพิษน้อยกว่าแอมโฟเทอริซิน บี และมีประสิทธิภาพในการรักษาค่อนข้างดี (Georgopapadakou และ Walsh, 1994, 1996) แต่พบว่ามีฤทธิ์ของเชื้อราต่อยาในกลุ่มเอโซล (Hitchcock, Pye และ Troke, 1933) จากปัญหาที่กล่าวมาข้างต้นประกอบกับยาต้านเชื้อราที่ใช้อยู่ในปัจจุบันยังมีไม่เพียงพอต่อความต้องการ ดังนั้นการค้นคว้าและพัฒนายาหรือสารต้นแบบใหม่ๆ ที่มีโครงสร้างและกลไกการออกฤทธิ์ที่แตกต่างจากยาต้านเชื้อราที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันจึงมีความสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่งต่อการพัฒนาเพื่อให้ได้ยาที่มีประสิทธิภาพที่ดี มีความเจาะจงต่อเชื้อรา ผลข้างเคียงต่ำ และมีปัญหาการดื้อยาน้อย โดยคาดหวังว่าสารต้นแบบกลุ่มใหม่ที่มีโครงสร้างทางเคมีและกลไกการออกฤทธิ์ที่แตกต่างไปจากยาต้านเชื้อราเดิมนี้อาจจะสามารถออกฤทธิ์ต้านเชื้อราที่ดื้อต่อยากลุ่มที่ใช้ในปัจจุบันได้ นอกจากนี้การค้นคว้าและพัฒนาสารต้านเชื้อราใหม่ ๆ ต้องคำนึงถึงการออกฤทธิ์ที่จำเพาะเจาะจงต่อเชื้อรา โดยให้มีผลกระทบต่อมนุษย์น้อยที่สุด

ในปี ค.ศ. 1991 Takesako และคณะสามารถสกัดสารต้านเชื้อราชนิดใหม่ได้ และให้ชื่อว่า ออริโอบาซิดิน (aureobasidins) โดยสกัดจาก *Aureobasidium pullulans* สายพันธุ์ R106 ซึ่งสารที่สกัดได้เป็นสารในกลุ่มเดปซิเปปไทด์แบบวงแหวน (cyclic depsipeptide) ประกอบด้วยกรดแอลฟาอะมิโน (α -amino acid) 8 ชนิด และกรดไฮดรอกซีล (hydroxyl acid) 1 ชนิด ออริโอบาซิดิน

มีโครงสร้าง 18 ชนิด จำแนกเป็นชนิด A ถึง R โดยแต่ละชนิดจะมีองค์ประกอบทางโครงสร้างแตกต่างกันเพียงไม่กี่ตำแหน่ง น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยทั่วไปประมาณ 1,070-1,148 ดาลตัน ลักษณะเป็นผงไม่มีสี จุดเดือดประมาณ 155-157 องศาเซลเซียส มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{60}H_{92}N_8O_{11}$ (Takesako และคณะ, 1991)

ออริโอบาซิดิน เอ เป็นสารต้านเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงในขั้นทดลอง (*in vitro*) มีกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไอพีซี ซินเทส (IPC synthase) ซึ่งมีผลไปยับยั้งการสังเคราะห์สฟิงโกลิปิดที่เป็นส่วนประกอบสำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ ที่พบได้ทั้งในสัตว์และเชื้อรา (คณาวรรณพจนานคม, 2544) และแสดงผลการยับยั้งเชื้อราที่ก่อโรคหลายชนิด เช่น *Candidia albicans*, *Cryptococcus neoformans* และ *Aspergillus* spp. บางสายพันธุ์ และมีความเป็นพิษต่ำในการทดลองกับสัตว์ทดลอง รวมทั้งการทดลองยาชนิดนี้จะทำลายเฉพาะเซลล์ที่กำลังเจริญพันธุ์ของ *C. albicans* นอกจากนี้ออริโอบาซิดินไม่ได้มีผลต่อการยับยั้งการผลิต DNA, RNA หรือโปรตีนอื่นๆ และไม่มีผลในการลดการผลิตสารประกอบกลูโคสต่างๆในเซลล์ ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่ากลไกการทำงานของออริโอบาซิดิน มีความแตกต่างจาก แอมโฟเทอริซิน บี และสารต่อต้านเชื้อราชนิดอื่นๆ (พรพรรณกร อิมวิทยา และ นันทจักร เกรินทร์, 2543) ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาและ พัฒนาเพื่อให้ได้ยาต้านเชื้อราที่มีประสิทธิภาพที่ดีต่อไป

A. pullulans เป็นเชื้อราคล้ายยีสต์ (yeast-like fungus) ที่มีแหล่งที่อยู่ที่หลากหลายในธรรมชาติ เช่น บนผิวใบพืชและผลไม้, ในดิน หรือตามผนังห้องน้ำ เป็นต้น (Ramos และ Acha, 1975; Prasongsuk และคณะ, 2005) *A. pullulans* พบได้ในแถบประเทศเขตร้อน เช่น บราซิล อินเดีย มาเลเซีย และจาไมกา นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสามารถคัดแยก *A. pullulans* ได้จากในพื้นที่ร่มของกรุงเทพมหานคร และป่าสนเขาในประเทศไทย (Punnapayak และคณะ, 2003)

นอกจาก *A. pullulans* สามารถสร้างสารต้านเชื้อราได้แล้ว ยังมีความสำคัญในการผลิตสารหลายชนิดที่มีประโยชน์ต่ออุตสาหกรรม เช่น พอลิเมอร์ชีวภาพ ที่เรียกว่า พูลูลูลัน (pullulan) ซึ่งเป็นพอลิแซคคาไรด์ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ (Prasongsuk และคณะ, 2005)

Lotrakul และคณะ (2009) ได้รายงานถึงการคัดแยก *A. pullulans* จากห้องน้ำบริเวณต่างๆของกรุงเทพมหานครและปริมณฑล ซึ่งเป็นพื้นที่ที่มีความชื้นสูง และเป็นแหล่งที่อยู่ของเชื้อราหลายชนิดด้วยกัน จึงเป็นที่น่าสนใจว่า เชื้อ *A. pullulans* ที่พบบริเวณผนังห้องน้ำ น่าจะมีความสามารถผลิตสารต้านเชื้อราชนิดอื่นได้เพื่อประโยชน์ในการอยู่รอด โดยสามารถคัดแยก *A. pullulans* ได้จำนวน 10 ไอโซเลต และทำการผลิตสารต้านเชื้อราต่อโรคในกลุ่ม *Aspergillus* spp. ซึ่งพบว่าเชื้อ *A. pullulans* จำนวน 4 ไอโซเลต สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* spp. ได้แตกต่างกัน แต่ในงานวิจัยนี้ยังมีข้อจำกัดในเรื่องของปริมาณสารต้านเชื้อราที่ผลิตได้ยังมีปริมาณน้อย

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมุ่งทำการผลิตสารต้านเชื้อราจากเชื้อ *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อนที่คัดแยกได้ในประเทศไทย หาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารต้านเชื้อรา ทำสารต้านเชื้อราให้มีความบริสุทธิ์บางส่วน และวิเคราะห์โครงสร้างของสารต้านเชื้อราที่ผลิตได้ ซึ่งอาจนำไปสู่การพัฒนาเพื่อนำไปผลิตยาต้านเชื้อราที่มีประสิทธิภาพที่ดีต่อไป

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อทำการตรวจสอบหาสารต้านเชื้อราจาก *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน
2. เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารต้านเชื้อราจาก *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารต้านเชื้อราจาก *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เชื้อรา *Aureobasidium pullulans*

Aureobasidium pullulans เป็นเชื้อราคล้ายยีสต์ (yeast-like fungus) เดิมมีการจัดจำแนก อยู่ใน Class Deuteromycetes (Fungi imperfecti) Order Moniliales Family Dermatiaceae (Cooke, 1959; Ramos และ Acha, 1975) มีชื่อเรียกหลายชื่อด้วยกัน เช่น *Pullularia pullulans*, *Dermatium pullulans*, *A. vitis*, *P. fermentans* เป็นต้น (Cooke, 1959; Ramos และ Acha, 1975; Hermanides-nijhof, 1977) *A. pullulans* มีชื่อสามัญว่า “ยีสต์ดำ” (Black yeast) เนื่องจากสามารถผลิตเม็ดสีเมลานิน (melanin pigment) ได้ในระหว่างการเจริญ ทำให้โคโลนีมีสีดำ *A. pullulans* มีรูปร่างได้หลายลักษณะ เช่น บลาสโตสปอร์ (blastospore) เซลล์พอง (swollen cell) คลาไมโดสปอร์ (chlamydospore) เส้นใยแท้ (hyphae) หรือ เส้นใยเทียม (pseudohyphae) เป็นต้น (Ramos และ Acha, 1975) ปัจจุบันมีการจัดจำแนก *A. pullulans* ไว้ ดังนี้ (Yurlova และคณะ, 1999; De Hoog และคณะ, 1999)

Kingdom Fungi

Phylum Ascomycota

Class Dothideomycetes

Order Dothideales

Family Dothideaceae

Genus *Aureobasidium*

Species *Aureobasidium pullulans*

การจัดจำแนก *A. pullulans* แต่เดิมนั้น ใช้หลายวิธีประกอบกัน ทั้งทางสัณฐานวิทยา และสรีรวิทยา เช่น ลักษณะของโคโลนี และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ (Hermanides-nijhof, 1977) การใช้แหล่งอาหารต่างๆกัน (Substrate utilization) การสร้างเมลานิน (Dennis และ Buhagiar, 1973) การสร้างโคนิเดีย (conidiogenesis) ภาวะการสร้างพอลิแซคคาไรด์ (De Hoog และ Yurlova, 1994) และลักษณะของเส้นใย (Takeo และ De Hoog, 1991) เป็นต้น ในปัจจุบันได้ มีการนำเทคนิค

ทางชีววิทยาโมเลกุลมาใช้ร่วมในการจัดจำแนก ซึ่งทำให้การจัดจำแนกมีความสะดวกขึ้น สามารถแยกความแตกต่างได้ในระดับชนิด (species) เทคนิคที่นิยมใช้ได้แก่ การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ nuclear ribosomal DNA Internal transcribed spacer (ITS) (Yurlova และคณะ, 1999; Punnapayak และคณะ, 2003)

ลักษณะของโคโลนี และสัณฐานวิทยาของ *A. pullulans*

เมื่อ *A. pullulans* เจริญเติบโตบนอาหารกึ่งแข็ง Malt extract agar (MEA) เป็นเวลา 7 วัน โคโลนีของ *A. pullulans* จะมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 40 มิลลิเมตร ลักษณะโคโลนีเรียบ และเป็นเมือก มีสีครีมหรือชมพูในระยะแรกที่เลี้ยง เมื่อเวลาผ่านไปโคโลนีอาจเปลี่ยนเป็นสีเข้มขึ้นหรือเปลี่ยนเป็นสีอื่น เช่น สีเขียวมะกอก สีแดง เหลือง น้ำตาลอ่อน และดำ เป็นต้น มีเส้นใยสั้นๆ ขึ้นรอบๆ โคโลนี ลักษณะของเส้นใยเรียบ โปร่งใส เห็นผนังกันชัดเจน ความกว้างเส้นใยประมาณ 3-12 ไมโครเมตร เมื่อเลี้ยงนานขึ้นอาจเปลี่ยนเป็นสีเข้ม และมีผนังเซลล์หนาขึ้น เรียกว่าเป็น คลาไมโดสปอร์ (chlamydospore) มีการสร้างโคโคนีเดียจากภายใน (endoconidia) ด้านข้าง หรือปลายของเส้นใย (Hermanides-nijhof, 1977)

ลักษณะโคโคนีเดียปฐมภูมิ (primary conidia) เป็นเซลล์เดี่ยว ค่อนข้างกลม โปร่งใส ผนังเรียบ มีรูปร่างหลากหลายและมีขนาดแตกต่างกัน มักสร้างโคโคนีเดียทุติยภูมิ (secondary conidia) ขนาดเล็ก หรือ budding cell โดยอาจสร้าง secondary conidia ขนาดเล็กหลายเซลล์โดยยังติดอยู่กับเซลล์แม่ มีรูปร่างคล้ายกับนิ้วมือ และเมื่อ secondary conidia หลุดออกไป ในบางเซลล์อาจปรากฏแผลจากการหลุดออกของโคโคนีเดีย (bud scar) (Hermanides-nijhof, 1977; Domsch และคณะ, 1993)

นิเวศวิทยาของ *A. pullulans*

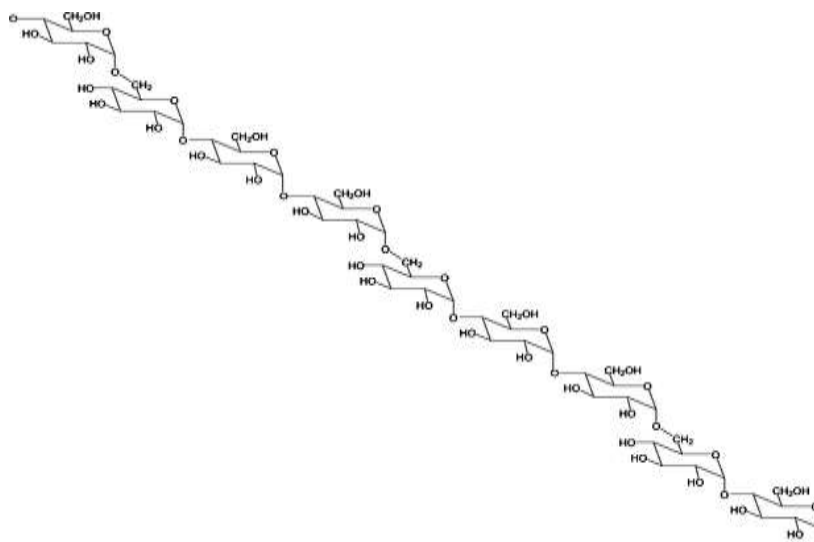
A. pullulans เป็นเชื้อราที่มีแหล่งที่อยู่หลากหลายในธรรมชาติ สามารถพบได้ทั่วไป บนผิวใบพืชและผลไม้ ดิน (Ramos และ Acha, 1975) เศษฟาง หญ้าแห้ง (Cooke, 1959) หรือในสถานที่ที่มีความชื้นสูง เช่น ผนังห้องน้ำ (Prasongsuk และคณะ 2005) หรือแม้แต่ในฟองน้ำทะเล (Shigemori และคณะ, 1998) *A. pullulans* ยังสามารถพบได้ทั้งในแถบประเทศเขตร้อน เช่น บราซิล อินเดีย มาเลเซีย และจาไมกา แถบประเทศเขตอบอุ่น เช่น เยอรมนี แคนาดา เดนมาร์ก เนเธอร์แลนด์ ออสเตรเลีย อังกฤษ และสหรัฐอเมริกา หรือในเขตแห้งแล้ง เช่น อียิปต์ อิรัก ปากีสถาน และ อัฟริกาใต้ (Deshpande Rale และ Lynch, 1992) สำหรับในประเทศไทย มีรายงานว่าสามารถคัดแยก *A. pullulans* ได้จากเขตกรุงเทพมหานคร และป่าสนเขาในประเทศไทย (Punnapayak และคณะ, 2003)

การประยุกต์ใช้ประโยชน์จาก *A. pullulans*

A. pullulans มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมอย่างยิ่ง เพราะสามารถผลิตเอนไซม์ เช่น อะไมเลส เพคติเนส และ ไฮแลนเนส และมีการใช้ประโยชน์จาก *A. pullulans* ในการผลิต โปรตีนเซลล์เดี่ยว (single cell protein) (Deshpande และคณะ, 1992) นอกจากนี้ *A. pullulans* สามารถผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพ ที่เรียกว่า พูลูลูแลน (pullulan) ซึ่งเป็นพอลิแซคคาไรด์ที่หลั่งออกภายนอกเซลล์ขณะเพาะเลี้ยง พูลูลูแลน ประกอบด้วยน้ำตาลมอลโตไตรโอส หรือ มอลโตเตตระโอสต่อกันด้วยพันธะแอลฟา 1, 6 (α -1, 6 linkages) (รูปที่ 1) (Leather, 2003)

ในอดีต *A. pullulans* ถูกแบ่งออกเป็น 2 varieties คือ *A. pullulans* var. *pullulans* ซึ่งโคโลนีเป็นสีครีม ชมพู เหลือง หรือน้ำตาลอ่อน หลังจากเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MEA เป็นเวลา 3 สัปดาห์ และ *A. pullulans* var. *melanigenum* ซึ่งโคโลนีจะกลายเป็นสีเขียวเข้ม หรือดำ เนื่องจากมี เส้นใยสีเข้ม (dark hyphae) (Hermandes-nijhof, 1977)

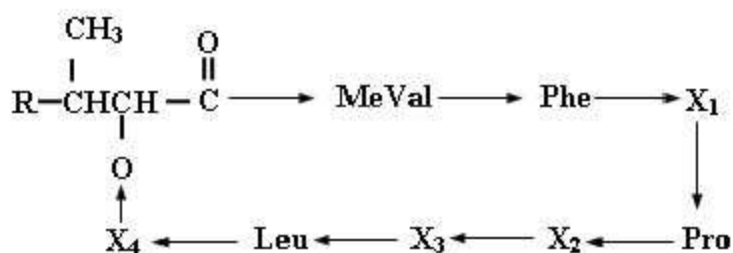
Yurlova และคณะ (1996) ได้ใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลมา ช่วยในการจัดจำแนก *A. pullulans* และได้เสนอการจำแนกเป็น variety ใหม่คือ *A. pullulans* var. *aubasidani* ซึ่ง *A. pullulans* var. *aubasidani* นี้สามารถผลิตพอลิแซคคาไรด์ที่มีโครงสร้างคล้ายพูลูลูแลน เรียกว่า ออบาซิแดน (aubasidan) ได้ ซึ่งออบาซิแดนนั้นเป็นกลูแคน (glucan) ที่ต่อกันด้วยพันธะ แอลฟา 1,4 บีตา 1,6 และ บีตา 1,3 ไกลโคซิดิก (Yurlova และ De Hoog, 1997) นอกจากนี้ Yurlova และคณะยังได้รวมสอง varieties ที่มีอยู่เดิมเข้าด้วยกัน เป็น variety เดียวคือ *A. pullulans* var. *pullulans* โดย *A. pullulans* var. *aubasidani* ไม่สามารถใช้ เมลธิลแอลฟาดีกลูโคส (methyl- α -D-glucose) และ แลคโตส (lactose) เป็นแหล่งคาร์บอนได้ ซึ่งต่างจาก *A. pullulans* var. *pullulans* ที่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนทั้งสองได้ ซึ่งความแตกต่างดังกล่าวนี้ สามารถนำมาใช้ระบุชนิดของ variety ของ *A. pullulans* ได้ในเบื้องต้น



รูปที่ 1 โครงสร้างของพุลลูแลน (Leather, 2003)

ออริโอบาซิดิน (Aureobasidins)

ออริโอบาซิดิน (aureobasidins) เป็นสารกลุ่มเดปซีเปปไทด์แบบวงแหวน (cyclic depsipeptide) ที่ผลิตได้จากยีสต์ *A. pullulans* ประกอบด้วยกรดแอลฟาอะมิโน (α -amino) 8 ชนิด และกรดไฮดรอกซิล (hydroxyl acid) 1 ชนิด ออริโอบาซิดิน มีโครงสร้าง 18 ชนิด จำแนกเป็นชนิด A ถึง R โดยแต่ละชนิดจะมีองค์ประกอบทางโครงสร้างแตกต่างกันเพียงไม่กี่ตำแหน่ง (รูปที่ 2) (Takesako และคณะ, 1991; Ikai, Shiomi และคณะ, 1991)



รูปที่ 2 โครงสร้างของ ออริโอบาซิดิน โครงสร้าง A ถึง R (Ikai, Shiomi และคณะ 1991)

Compound	R	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
AbA	C ₂ H ₅	MePhe	alle	MeVal	βHOMeVal
AbB	CH ₃	MePhe	alle	MeVal	βHOMeVal
AbC	C ₂ H ₅	MePhe	Val	MeVal	βHOMeVal
AbD	C ₂ H ₅	MePhe	alle	MeVal	γHOMeVal
AbE	C ₂ H ₅	βHOMePhe	alle	MeVal	βHOMeVal
AbF	C ₂ H ₅	MePhe	alle	Val	βHOMeVal
AbG	C ₂ H ₅	MePhe	alle	MeVal	MeVal
AbH	C ₂ H ₅	MePhe	alle	MeVal	Val
AbI	C ₂ H ₅	MePhe	Leu	MeVal	βHOMeVal
AbJ	C ₂ H ₅	MePhe	alle	MeVal	N. βMeAsp
AbK	CH ₃	MePhe	alle	MeVal	MeVal
AbL	C ₂ H ₅	MePhe	Val	MeVal	MeVal
AbM	C ₂ H ₅	Phe	alle	MeVal	MeVal
AbN	C ₂ H ₅	MePhe	alle	MeVal	DH _{3,4} MeVal
AbO	C ₂ H ₅	MePhe	alle	MeVal	βHOMePhe
AbP	C ₂ H ₅	MePhe	alle	Val	MeVal
AbQ	C ₂ H ₅	MePhe	alle	MeVal	MePhe
AbR	C ₂ H ₅	βHOMePhe	alle	MeVal	MeVal

MePhe = *N*-methylphenylalanine, all = alloisoleucine , MeVal = *N*-methylvaline

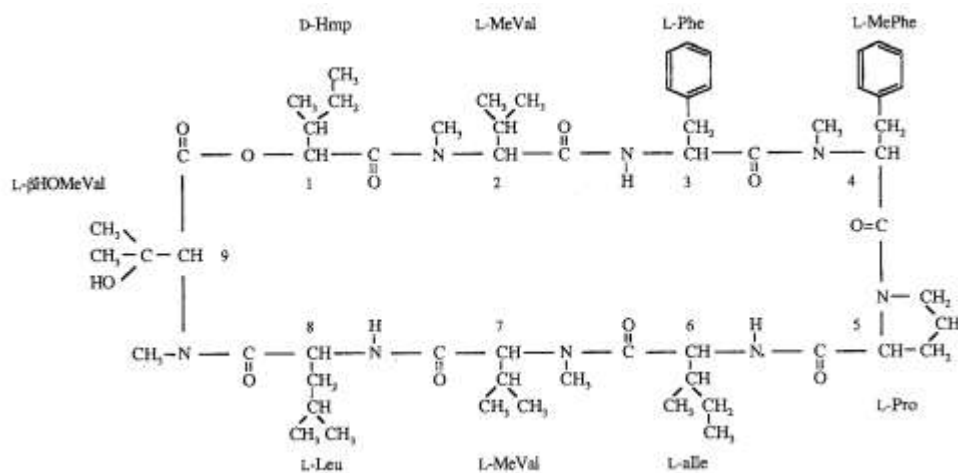
βHOMeVal = β-Hydroxy-*N*-methylvaline, Val = valine , Phe = Phenylalanine, Leu = Leucine

N. βMeAsp = N,β-dimethylaspartic acid, γHOMeVal = γ-Hydroxy-*N*-methylvaline

DH_{3,4}MeVal = 2,3-didehydro-*N*-methylvaline

ออริโอบาซิดินทั้ง 18 โครงสร้างนั้น โครงสร้าง A เป็นโครงสร้างที่พบมากที่สุด (รูปที่ 2) และมีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งเชื้อราที่ก่อโรคหลายชนิด (Takesako และคณะ, 1991;1993) มีประสิทธิภาพสูงทั้งในชั้นหลอดทดลอง (*in vitro*) และในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) (Kurome และคณะ,

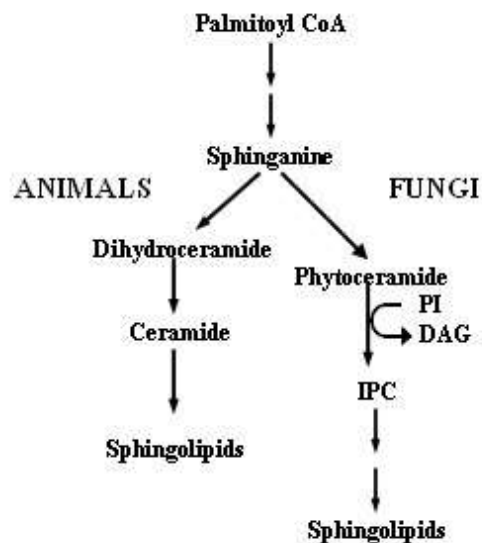
1996) (ตารางที่ 1) โดยแสดงผลการยับยั้งเชื้อรา เช่น *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* และ *Aspergillus* spp. บางสายพันธุ์ แต่แสดงผลยับยั้งได้น้อยใน *A. fumigatus* และ *A. flavus* (Takesako และคณะ, 1991; 1993; Zhong, Jeffries และ Georgopapadakou, 1996) โดย ออริโอบาซิดิน เอ มีความเป็นพิษต่ำในการทดลองกับสัตว์ทดลอง นอกจากนี้ยังพบว่าออริ โอบาซิดิน เอ จะทำลายเฉพาะเซลล์ที่กำลังเจริญพันธุ์ของ *C. albicans* โดยไม่มีผลกระทบต่อเซลล์ที่อยู่ในระยะพัก ออริโอบาซิดิน เอ ไม่ได้มีผลต่อการยับยั้งการผลิต DNA RNA หรือโปรตีนอื่นๆ ไม่มีผลในการลดการผลิตสารประกอบกลูโคสต่างๆในเซลล์ ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า กลไกการทำงานของออริโอบาซิดิน มีความแตกต่างจากแอมโฟเทอริซิน บี และสารต่อต้านเชื้อราชนิดอื่นๆ (Endo และคณะ, 1997)



รูปที่ 3 โครงสร้างของ Aureobasidin A (Takesako และคณะ, 1993)

ออริโอบาซิดิน เอ มีกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไอพีซีซินเทส (IPC synthase) ซึ่งมีผลไปยับยั้งการสังเคราะห์สฟิงโกลิปิด ที่เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ที่พบได้ทั้งในสัตว์และเชื้อรา (Nagiec และคณะ, 1997)

อย่างไรก็ดี พบว่าในการยับยั้งการทำงานของไอพีซี ซินเทสของออริโอบาซิดินเอ ไม่มีผลไปยับยั้งการสังเคราะห์สฟิงโกลิปิดในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 วิธีที่การสังเคราะห์สฟิงโกลิพิดในสัตว์และเชื้อรา (Zhong และคณะ, 2000)

เนื่องจากยาด้านเชื้อราที่ใช้กันอยู่ ในปัจจุบัน ล้วนมีข้อจำกัดในการรักษาทั้งสิ้น ทั้งในแง่ของ ประสิทธิภาพในการรักษา การมีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วย หรือโอกาสที่เชื้อจะดื้อย า ทำให้ อริโอบาซิดิน เอ นั้น เป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งที่จะนำมาพัฒนาเป็นยาด้านเชื้อราชนิดใหม่ เนื่องจากมีข้อดีหลาย ประการ ทั้งในด้านประสิทธิภาพในการรักษา (ตารางที่1) และการไม่มีผลข้างเคียงในสัตว์ทดลองดังที่ กล่าวมาข้างต้น

ตารางที่ 1 ฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อราของ ออริโอบาซิดิน เอ เมื่อเปรียบเทียบกับ แอมโฟเทอริซิน บี (Takesako และคณะ, 1993)

Strain	TIMM No.	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
		AbA	Amphotericin B
<i>Candida albicans</i>	0144	<0.04	2.5
<i>C. albicans</i>	1529	<0.04	2.5
<i>C. albicans</i>	1623	<0.04	2.5
<i>C. albicans</i> var. <i>stellatoidea</i>	1308	<0.04	0.63
<i>C. tropicalis</i>	0312	0.08	2.5
<i>C. tropicalis</i>	0315	0.08	2.5
<i>C. kefyr</i>	0298	0.16	2.5
<i>C. parapsilosis</i>	0287	0.16	5
<i>C. krusei</i>	0270	<0.04	2.5
<i>C. guilliermondii</i>	0257	0.08	1.25
<i>C. glabrata</i>	1062	<0.04	2.5
<i>C. glabrata</i>	1064	0.08	2.5
<i>Cryptococcus neoformans</i>	0354	0.63	2.5
<i>Cr. neoformans</i>	0355	0.31	2.5
<i>Cr. neoformans</i>	0363	0.31	2.5
<i>Cr. terreus</i>	0424	0.31	2.5
<i>Rhodotorula rubra</i>	0923	0.63	10
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0063	20	5
<i>A. fumigatus</i>	0068	> 80	5
<i>A. clavatus</i>	0056	0.16	2.5
<i>A. flavus</i>	0058	> 80	20
<i>A. nidulans</i>	0112	0.16	10
<i>A. niger</i>	0113	> 80	5
<i>A. terreus</i>	0120	5	80
<i>Penicillium citrinum</i>	1330	> 80	10
<i>P. commune</i>	1331	1.25	20
<i>P. crustorum</i>	1332	> 80	20
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	1189	10	5
<i>T. mentagrophytes</i>	1196	> 80	5
<i>T. rubrum</i>	1216	> 80	1.25
<i>Microsporum canis</i>	0760	> 80	20
<i>Epidermophyton floccosum</i>	0431	2.5	2.5
<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	0482	0.31	5
<i>Phialophora verrucosa</i>	0903	> 80	20
<i>Exophiala werneckii</i>	1334	1.25	10
<i>Cladosporium bantianum</i>	0343	0.63	10
<i>Cl. carrionii</i>	0337	1.25	10
<i>Sporothrix schenckii</i>	0959	> 80	5
<i>Histoplasma capsulatum</i>	0713	0.16	2.5
<i>H. capsulatum</i>	0714	0.08	5
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	0880	0.31	2.5
<i>Geotrichum candidum</i>	0694	0.63	20
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	1690	<0.04	0.31
<i>B. dermatitidis</i>	0126	0.31	2.5

ยาสำหรับรักษาโรคติดเชื้อรา

ยาที่ใช้รักษาโรคติดเชื้อราที่วงการแพทย์นิยมใช้เป็นมาตรฐานในการรักษา คือ แอมโฟเทอริซิน บี (amphotericin B) ฟลูไซโตซินิน (flucytosine) และยาในกลุ่มเอโซล (azole) เช่น ไมโคนาโซล (miconazole) คีโตโคนาโซล (ketoconazole) ไตรเอโซล (triazoles) และ ฟลูโคนาโซล (fluconazoles) เป็นต้น

1. แอมโฟเทอริซิน บี

เป็นยากลุ่ม พอลีเอิน (polyenes) เป็นยาปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์กว้างในการรักษา มีแมโครไลด์ (macrolide) เป็นสารประกอบ โดยตัวยาจะรวมกับสเตอรอล (sterols) โดยเฉพาะ เออโกสเตอรอล (ergosterols) ซึ่งอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อรา ทำให้เซลล์สูญเสียสภาพเกลือแร่ เนื่องจากมีการรั่วไหลของ โปแตสเซียม และแมกนีเซียม (Gentry, 1990) แอมโฟเทอริซิน บี ไม่ละลายน้ำและจากการรับประทานจะดูดซึมได้ไม่ดี จึงต้องให้ยาทางหลอดเลือดดำ ซึ่งทำให้เกิดมีสารตกค้างที่หลอดเลือดดำ (Gold และคณะ, 1956)

2. ฟลูไซโตซินิน

ยากลุ่มนี้ที่นำมารักษาโรคเชื้อราคือ 5-fluorocytosine ละลายน้ำได้ดี สามารถรับประทานได้ เมื่อเข้าสู่ร่างกายแล้วจะผ่านเข้าไปในเซลล์ราซึ่งเอนไซม์ cytosine deaminase จะเปลี่ยนยาให้เป็น 5-fluorouracil มีฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ RNA ทำให้เซลล์ตาย นอกจากนี้ยังถูกเปลี่ยนเป็น 5-fluoro-2'-deoxyuridylic ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ thymidylate synthase มีฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ DNA ข้อดีของยา คือ cytosine deaminase ในร่างกายคนมีจำนวนน้อยมาก หรือไม่มี จึงมีฤทธิ์เฉพาะกับเชื้อรา แต่ยังมีขอบเขตการต้านเชื้อราที่น้อยกว่าแอมโฟเทอริซิน บี (Waldorf และ Polak, 1983)

3. ยากลุ่มเอโซล

ยากลุ่มนี้มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ cytochrome demethylase ทำให้เชื้อราสร้าง เออโกสเตอรอลไม่ได้ ทำให้เกิดการสะสมของฟอสโฟลิปิดในเซลล์ ทำให้เซลล์ตาย มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อราดีกว่ากลุ่มพอลีเอิน แต่มีพิษน้อยกว่าแอมโฟเทอริซิน บี และมีประสิทธิภาพในการรักษาค่อนข้างดี (Georgopapadakou และ Walsh, 1994, 1996) แต่ก็พบว่ามีฤทธิ์ของเชื้อราต่อยาในกลุ่มเอโซล (Hitchcock และคณะ, 1993)

เชื้อรากลุ่ม *Aspergillus* species

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ลักษณะรูปร่างเป็นเส้นใยที่แตกแขนงและมีผนังกัน แต่ละส่วนที่กันแล้วมีนิวเคลียสหลายอัน โคนิดิโอฟอร์เกิดจากฟุตเซลล์ (foot cell) โคนิดิโอฟอร์อาจมีผนังกันหรือไม่ก็ได้ ที่ส่วนปลายของโคนิดิโอฟอร์จะโป่งออกเป็นเวสซิเคิล (vesicle) และมีส่วนที่ยื่นออกมาเป็นสเตอริกมา (sterigma) ซึ่งอาจมีชั้นเดียว หรือสองชั้นก็ได้ โคนิเดียจะถูกสร้างชั้นภายในสเตอริกมา โคนิเดียที่สร้างขึ้นภายหลังจะดันโคนิเดียอันแรกๆ ออกมาและยังติดต่อกันอยู่จึงเกิดเป็นสายของโคนิเดีย โคนิเดียมีสีต่างๆ กัน และเป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อแต่ละชนิดส่วนใหญ่ มีสีดำ น้ำตาล เขียว (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ, 2547)

ลักษณะทางนิเวศวิทยาและการติดต่อ

เชื้อรา *Aspergillus* spp. มีประมาณ 600 สายพันธุ์ พบได้บ่อยที่สุดตามสิ่งแวดล้อมทั่วโลก และพบทั่วไปตามดิน ฝุ่นละอองในอากาศ กองใบไม้ ใบหญ้าที่เน่าเปื่อย บริเวณที่มีอากาศหนาวหรือตามทะเลทราย *Aspergillus* สามารถก่อโรคได้กว้างขวางโรคที่เกิ ดขึ้นเรียกว่า Aspergillosis อาการมีตั้งแต่เล็กน้อยจนถึงเป็นสาเหตุให้ผู้ป่วยถึงแก่กรรม (พรรณกร อิมวิทยา, 2538) สายพันธุ์ที่มีความรุนแรงในการก่อโรคมากที่สุดและมีการศึกษาวิจัยกันมาก คือ *Aspergillus fumigatus* รองลงมาคือ *A. niger*, *A. flavus*, และ *A. terreus* ตามลำดับ แต่ตามปกติเชื้อ *Aspergillus* เป็นเชื้อหนึ่งที่จัดอยู่ในกลุ่มราปนเปื้อน จะไม่ก่อโรคในคนที่มีสุขภาพร่างกายแข็งแรงปกติ ผู้ที่มีโอกาสติดเชื้อจึงเป็นผู้ที่มีความบกพร่องของภูมิคุ้มกันของร่างกาย หรือป่วยด้วยโรคอื่นอยู่ก่อน หรือได้รับยากดภูมิคุ้มกัน เช่นผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัด เปลี่ยนอวัยวะ เป็นต้น โรค Aspergillosis มีได้หลายรูปแบบ ได้แก่ แสดงอาการแพ้สปอร์ของรา (Allergic Aspergillosis) เชื้อรวมตัวเจริญเป็นก้อนอยู่ในช่องว่างภายในร่างกาย (Invasive Aspergillosis) และเชื้อบุกรุกเนื้อเยื่อต่างๆ ของร่างกาย (Aspergilloma) นอกจากนี้โรคติดเชื้อในช่องหูส่วนนอก (Otomycosis) ก็พบว่ามีส่วนสาเหตุจากราในตระกูล *Aspergillus* (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ, 2547)

สาเหตุของเชื้อราในการก่อให้เกิดโรค

เชื้อสาเหตุของโรคมีหลายสปีชีส์ แต่เชื้อที่เป็นสาเหตุที่รุนแรงที่สุด ได้แก่ *A. fumigatus* และ *A. flavus* ร่างกายจะได้รับเชื้อนี้โดยการหายใจเอาสปอร์เข้าไป แต่บางรายก็เกิดการติดเชื้อราในหู โดยทั่วไปภูมิคุ้มกันของร่างกายสามารถที่จะกำจัดเชื้อนี้ออกจากร่างกายได้ หากร่างกายไม่สามารถกำจัดเชื้อนี้ออกจากร่างกายก็จะทำให้เกิดการติดเชื้อได้ ในประเทศไทยจากการตรวจสอบผู้เสียชีวิต 16,219 ราย พบว่าเชื้อราเป็นสาเหตุการตายร้อยละ 1 ส่วนในสหรัฐอเมริกา *Aspergillus* เป็นอันดับที่ 3 ของสาเหตุการตายของโรคที่เกิดจากเชื้อรา (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ, 2547)

โรคที่เกิดจากเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ, 2547)

1. ก่อโรคที่ปอด (Pulmonary Aspergillosis)

เกิดจากการสูดดมเชื้อ ราซึ่ง อาจเกิดปฏิกิริยาภูมิคุ้มกันมีความไวผิดปกติ (hypersensitivity) ผู้ป่วยมีอาการหอบหืด (bronchial asthma) นอกจากนี้บางรายมีปฏิกิริยาตอบสนองของเนื้อเยื่อที่ปอดซึ่งแบ่งได้เป็น 4 แบบคือ

1.1 Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis

เกิดจากปฏิกิริยาภูมิคุ้มกันของร่างกายมีความไวผิดปกติต่อเชื้อที่อยู่ตามหลอดลม เชื้อไม่บุกรุกเข้าเนื้อเยื่อของปอด แต่จะจับอยู่ที่หลอดลม เยื่อหลอดลมอาจแดง และนูนเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เชื้อได้และมักเป็นเชื้อ *A. fumigatus* ผู้ป่วยมีอาการหอบ ไอ มีเสมหะปนเลือด การให้ยาฆ่าเชื้อราพ่นเข้าไปในคอของผู้ป่วยมักไม่ได้ผล จำเป็นต้องให้ยาพวกสเตียรอยด์

1.2 Extrinsic Allergic Alveolitis (Hypersensitivity Pneumonitis)

พบได้ในคนที่สูดดมโคโคนิเดียและสายราชของเชื้อเข้าไปเป็นจำนวนมาก เช่น คนงานในโรงกลั่นสุรา (malt workers lung) ซึ่งเชื้อที่ปนเปื้อนมาได้แก่ *A. clavatus* ปนเปื้อนอยู่ในข้าวบาร์เลย์ อาการเกิดขึ้นประมาณ 6 ชั่วโมง ภายหลังจากสูดดม มีอาการไอ หอบ มีไข้ หนาวสั่น ภาพถ่ายรังสีปอดพบ diffuse interstitial infiltrate ถ้าผู้ป่วยยังคงสูดดมเชื้อต่อไปจะเกิด granulomatous disease

1.3 Invasive Bronchopulmonary Aspergillosis

เกิดจากการสูดดมเชื้อรา ทำให้เชื้อเข้าไปอยู่ในหลอดลมและบุกรุกเข้าหลอดเลือดและเนื้อเยื่อในปอด มักเกิดตามหลังโรคปอดอักเสบจากเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส การผ่าตัดปอด อาจเป็นโรคแทรกซ้อนในผู้ป่วยโรคมะเร็งและโรคเอดส์ นานๆครั้งจะมีรายงานก่อโรคในผู้ป่วยที่ไม่มีประวัติการเจ็บป่วยมาก่อน และตรวจไม่พบความบกพร่องทางภูมิคุ้มกันของร่างกาย

1.4 Aspergilloma

มักเกิดขึ้นในรายที่ปอดมีโพรงอยู่แล้ว เช่น วัณโรคปอด โรคถุงลมโป่งพอง หลังปอดบวม เชื้อเข้าไปอยู่ในโพรง ร่างกายมักไม่มีปฏิกิริยาตอบสนองเรียกกลุ่มเชื้อราที่เข้าไปอยู่ในโพรงว่า fungus ball มักพบในผู้สูงอายุ ผู้ป่วยมีอาการไอ มีเสมหะปนเลือดเป็นพักๆ และตรวจพบเชื้อ *A. fumigatus* ได้จากเสมหะ

2. ก่อโรคที่ระบบประสาท (Nervous System Aspergillosis)

เป็นผลจากการติดเชื้อที่ปอด แล้วเชื้อกระจายเข้ากระแสเลือด หรือเชื้อบุกรุกจากตา จมูก จากการผ่าตัดสมอง โรคอาจอยู่ที่สมอง ส่วนซีรีบรัม หรือสมอง ส่วนซีรีเบลลัม ผู้ป่วยมีอาการปวดศีรษะ ชะคลื่นไส้ อาเจียน มีไข้ ชัก ความดันในลูกตาเพิ่มขึ้น ถ้าเป็นที่สมองน้อยจะเสียการทรงตัว นอกจากนี้โรคอาจอยู่ที่ไขสันหลังเกิดอาการอ่อนแรงของแขนหรือขา แล้วแต่ตำแหน่งที่โรคไปกดเบียด

3. ก่อโรคที่ผิวหนัง (Cutaneous Aspergillosis)

โรคที่ผิวหนังเกิดจากการกระจายของเชื้อเข้ากระแสเลือดหรือในภาวะที่ผิวหนังเสียรูป เช่น ถูกไฟไหม้ น้ำร้อนลวก ลักษณะทางคลินิกอาจเป็นตุ่ม ก้อน ที่ผิวหนัง ผิวหนังหนา สีคล้ำ บางครั้งโรคอาจเป็นผื่นคันและปวด ต่อมากลายเป็นแผลเรื้อรัง

4. ก่อโรคที่บริเวณ จมูก หู

โพรงอากาศบริเวณจมูกมักพบเชื้อ *Aspergillus* และทำให้เกิดการอักเสบ และยังมี การตรวจพบเชื้อ *Aspergillus* บริเวณหูชั้นนอกในคนที่ชอบแคะหู ซึ่งอาจก่อโรค otomycosis ผู้ป่วยจะมีอาการปวด คันในหู

5. ก่อโรคที่ตา

ในรายที่ผู้ป่วยกระจกตามีบาดแผล มักพบเชื้อ *Aspergillus* นอกจากนี้เชื้อ *Aspergillus* ที่อยู่ตามธรรมชาติ มักจะตรวจพบได้บริเวณตาของคนปกติ ซึ่งอาจก่อโรคกระจกตาอักเสบ ได้ (mycotic keratitis) บางรายก่อโรคในเบ้าตา ซึ่งมักกระจายมาจากไซนัส

6. ก่อโรคที่เล็บ (Onychomycosis)

โรคที่เล็บซึ่งเกิดจากเชื้อ *Aspergillus* มักมีสีน้ำตาลหรือดำ อาจพบจุดขาว (leukonychia) ได้ เนื้อเล็บจะยุ่ย ผิวหนังข้างๆเล็บจะไม่พบความผิดปกติ ถ้าจะมาตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ด้วยน้ำยาไปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ พบสายรามิฟงกัน เมื่อนำไปเพาะจะได้เชื้อที่เป็นตัวก่อโรค มีรายงานการเกิดโรคที่เล็บจากเชื้อ *A. terreus*

7. ก่อโรคมัยเซโตมา (Mycetoma)

คำว่ามัยเซโตมาหมายถึง พยาธิสภาพที่มีการบวมของผิวหนัง (tumefaction) มีทางไหลออกของหนอง (draining sinus) และมีโคโลนีของเชื้ออยู่รวมกันเป็นกลุ่ม (grain) ถ้าเชื้อก่อโรคเป็นแบคทีเรียชั้นสูงเรียกว่า *Actionomycotic mycetoma* แต่ถ้าเชื้อก่อโรคเป็นเชื้อราเรียกว่า *Eumycotic mycetoma (Maduromycotic mycetoma)* ทางห้องปฏิบัติการจำเป็นต้องแยกให้ได้ว่าเกิดจากเชื้ออะไร เพื่อประโยชน์ในการรักษาผู้ป่วย เพราะการใช้ยาไม่เหมือนกัน ซึ่งเชื้อ *Aspergillus* เป็นสาเหตุหนึ่งที่ก่อโรค *Eumycotic mycetoma*

8. ก่อโรคแพร่กระจาย (Disseminated Aspergillosis)

Aspergillus สามารถก่อโรคที่อวัยวะใดๆ ก็ได้ เช่น หัวใจ กล้ามเนื้อ ตับและไต เป็นสาเหตุให้ผู้ป่วยถึงแก่กรรม มักพบในผู้ป่วยที่ภูมิคุ้มกันของร่างกายต่ำ ถ้าตรวจทางพยาธิวิทยา พบสายราไม่มีสี สายราแตกแขนง ทำมุม 45 องศา (dichotomous branching) ประกอบกับการตรวจพบ บกระเปาะเมื่อก่อโรคที่อวัยวะภายใน เรียกชื่อโรคว่า systemic hyalohyphomycosis โดยอาศัยสายราไม่มีสีเป็นหลัก ต่อเมื่อเพาะเชื้อขึ้นจึงสามารถเรียกชื่อเฉพาะคือ Aspergillosis ได้

งานวิจัยเกี่ยวกับสารต้านเชื้อราหรือออริโอบาซิดินที่ผลิตได้จาก *A. pullulans*

Takesako และคณะ (1991) ทำการคัดแยกเชื้อ *A. pullulans* สายพันธุ์ R106 และสามารถผลิตสารต้านเชื้อราชนิดใหม่ขึ้นมาได้ ชื่อว่า “ออริโอบาซิดิน” (aureobasidin) มีโครงสร้าง 18 ชนิด จำแนกเป็นชนิด A ถึง R ซึ่งแต่ละชนิดจะมีองค์ประกอบแตกต่างกันไม่มีที่ตำแหน่ง ซึ่งชนิดที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งเชื้อรากลุ่มคือ ออริโอบาซิดิน เอ (aureobasidin A) โดยสามารถยับยั้งเชื้อราได้ดังนี้ *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* และ *Aspergillus* spp. บางสายพันธุ์

Endo และคณะ (1997) ได้ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อราของออริโอบาซิดิน เอ กับเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งในการทดลองใช้ออริโอบาซิดิน เอ ที่ปริมาณความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากผลการทดลองพบว่าจำนวนเซลล์ของเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบเริ่มลดปริมาณลงหลังจากทำการบ่มเป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง และพบว่าจำนวนเซลล์จะถูกทำลายไปจนเกือบหมดหลังจากทำการบ่มเป็นเวลา 5-6 ชั่วโมง โดยกลไกการยับยั้งเชื้อราของออริโอบาซิดิน เอ จะมีผลทำให้เซลล์ของเชื้อราเกิดการปลดปล่อยกรดอะมิโนภายในโครงสร้างออกมา จึงมีผลทำให้โครงสร้างภายในเซลล์เชื้อราถูกทำลายให้สูญเสียชีวิต

Zhong และคณะ (2000) ทำการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อราของออริโอบาซิดิน เอ กับคุณสมบัติที่ไวต่อการสังเคราะห์เอนไซม์ไอพีซี ซินเทส (IPC Synthase) ในเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อรากลุ่ม *Candida* spp. คือ *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* และ *C. krusei* และเชื้อรากลุ่ม *Aspergillus* spp. คือ *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* และ *A. terreus* จากการทดลองพบว่าออริโอบาซิดิน เอ มีผลต่อความไวในการสังเคราะห์เอนไซม์ไอพีซี ซินเทส (IPC Synthase) ของเชื้อรากลุ่ม *Candida* spp. ทั้ง 5 สายพันธุ์ และเชื้อรากลุ่ม *Aspergillus* spp. 1 สายพันธุ์คือ *A. terreus* ซึ่งมีผลทำให้ออริโอบาซิดิน เอ มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งเชื้อราดังกล่าว

Sonda และคณะ (2005) ได้ศึกษาฤทธิ์ของออริโอบาซิดิน เอ ต่อเชื้อปรสิต *Toxoplasma gondii* ซึ่งเป็นเชื้ออวยโอกาสที่มักพบในโรคเอดส์ และผู้ป่วยที่มีระบบภูมิคุ้มกันบกพร่อง จากการทดลองพบว่าออริโอบาซิดิน เอ มีผลไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไอพีซี ซินเทส ซึ่งจะมีผลไปยับยั้งการสังเคราะห์สฟิงโกลิปิดที่เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์เชื้อรา จึงมีผลทำให้โครงสร้างภายในของเชื้อปรสิต *T. gondii* เกิดการสูญเสียชีวิต

Tanaka และคณะ (2006) ได้ศึกษาฤทธิ์ของออริโอบาซิดิน เอ ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อปรสิต *Lishmania amazonensis* ทั้งการทดลองในหลอดทดลอง (*in vitro*) และในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) จากการทดลองพบว่าออริโอบาซิดิน เอ ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ สามารถออกฤทธิ์

ยับยั้งเชื้อปรสิต *L.amazonensis* ได้ 90% เนื่องจากองค์ประกอบหลักในการสังเคราะห์สฟิงโกลิปิดในเชื้อปรสิต *L.amazonensis* คือ เอนไซม์ไอพีซี ซินเทส ซึ่งออริโอบาซิดิน เอ สามารถยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ไอพีซี ซินเทส ได้

Liu และคณะ (2007) ทำการตรวจสอบฤทธิ์การต้านเชื้อราของออริโอบาซิดิน เอ กับ เชื้อร่าก่อโรคพืชทั้ง 5 สายพันธุ์ได้แก่ *Penicillium digitatum*, *P. italicum*, *P. expansum*, *Botrytis cinerea*, *Monilinia fructicola* ทั้งในการทดลองแบบ ในหลอดทดลอง (*in vitro*) และในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) จากการทดลองพบว่าออริโอบาซิดิน เอ สามารถยับยั้งเชื้อร่าก่อโรคพืชทั้ง 5 สายพันธุ์ได้ โดยลดอัตราการงอกของโคนิเดีย (conidia) ทำให้โคนิเดีย (conidia) เกิดการงอกช้าลง ควบคุมการยืดยาวของ เส้นใยและชักนำให้เกิดความผิดปกติของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไฮฟา (hypha) ของเชื้อร่า

Lotrakul และคณะ (2009) ทำการคัดแยกและจัดจำแนกเชื้อ รา *A. pullulans* จากห้องน้ำบริเวณต่างๆของกรุงเทพมหานครและปริมณฑล จำนวน 10 ไอโซเลต และพบว่าเชื้อ รา *A. pullulans* จำนวน 4 ไอโซเลต สามารถผลิตสารต้านเชื้อร่าก่อโรค *A. fumigatus*, *A. flavus* และ *A. terreus* ได้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

อุปกรณ์	บริษัท / ประเทศ
เครื่องเขย่า (Shaker) รุ่น SPL15	Labcon/The Republic of South Africa
หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave)	Ta Chang Medical Instrument Factory/ Taiwan
เครื่องระเหยภายใต้สุญญากาศแบบหมุน (Rotary Vacuum Evaporator) รุ่น N-N series	Tokyo Rikakikai Co., LTD/ Japan
แผ่นโครมาโตกราฟแบบผิวบางเคลือบด้วยซิลิกาเจล (silica gel 60)	Merck/ Germany
เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น PP-50	Sartorius/ Germany
เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น BL610	Sartorius/ Germany
เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น TC-205	Denver Instrument Company/ USA
ตู้เขี่ยเชื้อแบบ laminar flow รุ่น BV 123	ISSOC/ Thailand
ตู้อบ (Hot air oven)	Binder / USA
อุปกรณ์นับเม็ดเลือด (Haemocytometer)	Brand/ Germany
กล้องจุลทรรศน์รุ่น CH 30 RF200	Olympus/ Japan
กล้องจุลทรรศน์รุ่น BX-51	Olympus/ Japan
เครื่องปั่นเหวี่ยงรุ่น Rotofix32	Hettich/ Germany
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV/VIS Spectrophotometer) รุ่น 2800	Unico/USA
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV/VIS Spectrophotometer) รุ่น HP 8453	Agilent/USA
เครื่อง High Performance Liquid Chromatography รุ่น Prostar	Varian/ USA
เครื่อง Nuclear Magnetic Resonance	Varian/ USA
เครื่อง Mass Spectrometry รุ่น autoflex II	Bruker/ Germany

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมี

ยีสต์สกัด (Yeast extract)
 มอลท์สกัด (Malt extract)
 กลูโคส (Glucose)
 ซูโครส (Sucrose)
 แอมโมเนียมซัลเฟต ((NH₄)₂SO₄)
 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH₂PO₄)
 แมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO₄·7H₂O)
 แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl₂·2H₂O)
 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)
 ไอรอน(III) คลอไรด์ (FeCl₃·6H₂O)
 ซิงค์ซัลเฟต (ZnSO₄·7H₂O)
 อะซีโตนไนไตร (CH₃CN)
 เอทิลอะซิเตท (CH₃COOC₂H₅)
 ทวิน 80 (Tween 80)
 ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (CH₃SOCH₃)
 เอทานอล (C₂H₅OH)
 ฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine)
 โพลีน (Proline)
 ลิวซีน (Leucine)
 ออริโอบาซิดิน เอ (Aureobasidin A)

บริษัท / ประเทศ

Difco/ USA
 Difco/ USA
 Sigma/ USA
 Carlo Erba Reagent/ Italy
 Carlo Erba Reagent/ Italy
 Carlo Erba Reagent/ Italy
 Carlo Erba Reagent/ Italy
 Schrlau / Spain
 Merck/ Germany
 Carlo Erba Reagent/ Italy
 May & Baker/ England
 Ajax Finechem/ Australia
 Carlo Erba Reagent/ Italy
 Fluka/ Switzerland
 Carlo Erba Reagent/ Italy
 Merck/ Germany
 Sigma/ USA
 Fluka/ Switzerland
 Himedia/India
 Takara/Japan

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

เชื้อ *A. pullulans* จำนวน 10 สายพันธุ์ ได้แก่ Deenam 001 BCU, Deenam 003 BCU, Deenam 007 BCU, Deenam 008 BCU, Deenam 009 BCU, NRRL 58514 (Manitchotpsit 001 BCU), NRRL 58516 (Manitchotpsit 002 BCU), NRRL 58517 (Manitchotpsit 003 BCU), NRRL 58520 (Manitchotpsit 004 BCU), NRRL 58536 (Manitchotpsit 005 BCU) และ เชื้อรา *Aspergilli* spp. (*A. niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. terreus*) จากคลังเชื้อของหน่วยปฏิบัติการวิจัยการใช้ประโยชน์จากชีวมวลพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีดำเนินงานวิจัย

1. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา *A. pullulans*

นำเชื้อ *A. pullulans* ที่ทำการคัดแยกและจัดจำแนกแล้วจำนวน 10 สายพันธุ์ จากคลังเชื้อของหน่วยปฏิบัติการ วิจัยการใช้ประโยชน์จากชีวมวลพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร Yeast Malt Broth (YMB) (ภาคผนวก ก) นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ทำการเตรียมสไลด์ของเชื้อเพื่อศึกษา รูปร่างและลักษณะของเซลล์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยเปรียบเทียบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *A. pullulans* ที่อธิบายโดย Domsch และคณะ (1993) De Hoog และ Yurlova (1994) และ Hermanides-Nijhof (1997)

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

2.1 เลี้ยงเชื้อ *A. pullulans* ในอาหารสูตร Seed culture medium (ภาคผนวก ก) นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน แล้วถ่ายเชื้อ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารสูตร Production I (ภาคผนวก ก) เลี้ยงต่อเป็นเวลา 56 ชั่วโมง จากนั้นเติมอาหารสูตร Production II (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 1/5 ของอาหารสูตร production I ทำการเลี้ยงต่ออีก 78 ชั่วโมง โดยเลี้ยงเชื้อที่ภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง

2.2 เก็บเชื้อที่ได้มาปั่นเหวี่ยง แยกเซลล์ที่ความเร็ว 6,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนตะกอนเซลล์มาบดแล้วสกัดด้วยเอทานอล (95%)

2.3 กรองเซลล์ออกด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ นำส่วนของเหลวที่ได้ไประเหยด้วยเครื่องกลั่นสุญญากาศ (evaporator) จะเหลือส่วนสารละลายเล็กน้อย นำไปเติมด้วย เอทิลอะซิเตท

เขย่าให้เข้ากันแล้วแยกชั้นของเอทิลอะซิเตท ไประเหยด้วยเครื่องกลั่นสุญญากาศจนแห้ง สกัดซ้ำด้วยเอทิลอะซิเตท 3 ครั้ง จะได้ส่วนที่เหลือเป็นส่วนของหยดน้ำมันติดอยู่ที่ข้างขวด

2.4 ละลายสารตัวอย่างด้วยไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

3. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเชื้อรา

เชื้อราก่อโรคที่ใช้ในการตรวจสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อราคือ *A. niger*, *A. fumigatus*, *A. flavus* และ *A. terreus* โดยนำมาทดสอบฤทธิ์ของสารต้านเชื้อราที่ได้ด้วยวิธี Well diffusion และ Conidial germination inhibition assay

3.1 วิธี Well diffusion (Tachibana และคณะ, 2005)

3.1.1 เลี้ยงเชื้อราที่จะใช้ทดสอบในอาหารแข็งเอียง PDA เป็นเวลา 3-4 วัน เต็ม 1% (v/v) tween 80 ในน้ำกลั่น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดอาหารเพื่อทำสปอร์แขวนลอย โดยเขี่ยให้สปอร์ของรากระจายตัวใน 1% tween 80 ทำการนับสปอร์โดยใช้ อุปกรณ์นับเม็ดเลือด (haemocytometer) แล้วปรับจำนวนให้ได้ 1×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

3.1.2 ดูดสปอร์แขวนลอยที่เตรียมได้มา 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารกึ่งแข็ง PDA ให้ทั่ว รอยนูน

3.1.3 นำแท่งเจาะ (cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะลงบนจานเพาะเชื้อจำนวน 4 ตำแหน่ง โดยในจานเพาะเชื้อเดียวกันให้หยดสารสกัดปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในตำแหน่งที่ 1 ส่วนตำแหน่งที่ 2 หยดไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ตำแหน่งที่ 3 ไม่หยดสารสกัด และตำแหน่งที่ 4 หยดด้วยแอมโฟเทอริซิน บี ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เป็นชุดควบคุม

3.1.4 บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-4 วัน ตรวจสอบการเกิดบริเวณยับยั้ง (clear zone) ที่เกิดขึ้นบนจานเพาะเชื้อ วัด เส้นผ่านศูนย์กลาง วงยับยั้งของสารสกัดและสารมาตรฐานแอมโฟเทอริซิน บี นำค่าที่ได้มาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (% inhibition) วิธีคำนวณดังภาคผนวก ข

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

3.2.1 เตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อราที่ใช้ทดสอบโดย ให้มีจำนวนสปอร์ 1×10^3 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

3.2.2 ปิเปตสารสกัดผสมกับสปอร์แขวนลอยในอัตราส่วน 1:10 ตามลำดับใน micro well plate นำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที โดยที่ชุดควบคุมใช้สารละลาย DMSO แทนสารสกัด

3.2.3 ปิเปตสปอร์แขวนลอยมา 0.1 มิลลิลิตร และเกลี่ยลงบนจานอาหารกึ่งแข็ง PDA นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-3 วัน

3.2.4 นับจำนวนสปอร์ที่ขึ้นบนจานอาหาร คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ (% germination) และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์ (% inhibition) โดยเทียบกับชุดควบคุม วิธีคำนวณดังภาคผนวก ข

4. ศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารต้านเชื้อรา

ทำการคัดเลือกเชื้อ *A. pullulans* ที่สามารถผลิตสารต้านเชื้อราได้ประสิทธิภาพสูงสุดจำนวน 1 สายพันธุ์ โดยพิจารณาจากจำนวนของเชื้อรา *Aspergillus* spp. ที่สารสกัดสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งได้ เปอร์เซ็นต์การออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา (% inhibition) และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา มาทำการหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารต้านเชื้อราด้วยวิธีดังนี้

4.1 ศึกษาหาช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารต้านเชื้อราโดยใช้เทคนิค Spectrophotometry

4.1.1 เลี้ยงเชื้อ *A. pullulans* ในอาหารสูตร Seed culture medium เป็นเวลา 2 วัน นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง

4.1.2 ทำการถ่ายเชื้อปริมาตร 1% ลงอาหารสูตร Production I นำเชื้อมาทำการวัดค่าความขุ่นเพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์โดยใช้ spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และทำการนับจำนวนเซลล์โดยใช้ haemocytometer ที่เวลาเริ่มต้น 0 ชั่วโมง ทำการวัดค่าความขุ่นและนับจำนวนเซลล์ทุก 12 ชั่วโมง ทำการเลี้ยงจนถึงเวลา 56 ชั่วโมง

4.1.3 ทำการเติมอาหารสูตร Production II ปริมาตร 1/5 ของอาหารสูตร Production I ทำการเลี้ยงต่ออีก 78 ชั่วโมง โดยเลี้ยงเชื้อที่ภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลาที่กำหนดนำค่าความขุ่นและค่าจำนวนเซลล์ที่นับได้มาสร้างกราฟเปรียบเทียบเกี่ยวกับเวลา

4.2 ศึกษาชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน

ทำการศึกษาน้ำหนักคาร์บอน 2 ชนิด คือ กลูโคส และ ซูโครส โดยปรับองค์ประกอบในอาหารสูตร Production I ให้มีความเข้มข้นของน้ำหนักคาร์บอน คือ 1.5 2.0 และ 2.5% (w/v) ตามลำดับ โดยมีอัตราส่วน C/N คือ 3 4 และ 5 ตามลำดับ

4.3 ศึกษาการใช้แหล่งอาหารเสริม

นำเชื้อ *A. pullulans* ที่สามารถผลิตสารต้านเชื้อราได้ประสิทธิภาพสูงสุดในแหล่งคาร์บอนโดยการพิจารณาจาก เปอร์เซ็นต์การออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา (% inhibition) และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราในชุดควบคุมและชุดทดลอง มา ทำการศึกษา การใช้แหล่งอาหารเสริมจำพวกกรดอะมิโน 3 ชนิด คือ ฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine), โพรลีน (Proline), ลิวซีน (Leucine) 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 ที่ความเข้มข้น 0.01% (w/v)

5. ทำบริสุทธิ์บางส่วนของสารต้านเชื้อรา

นำสารต้านเชื้อราที่ผลิตได้มาทำบริสุทธิ์บางส่วนและวิเคราะห์สารที่ได้โดยใช้เทคนิคดังต่อไปนี้

5.1 เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (Thin layer chromatography)

จุดสารสกัดที่ ละลายใน DMSO และอริโอบาซิดิน เอ ที่ละลายใน DMSO ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ลงบนแผ่น TLC รอให้แห้งแล้วนำไปวางใน TLC tank ที่มีเอทิลอะซิเตทเป็นระบบตัวทำละลาย (solvent system) เมื่อสารละลายเคลื่อนที่ถึงจุดที่กำหนดแล้ว ให้ยกแผ่น TLC ออก ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วนำไปใส่ในขวดแก้วที่มีไออิมตัวของไอโอดีน 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 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 ซึ่งมีอะซีโตนไตร และน้ำเป็นเฟสเคลื่อนที่

อัตราส่วน 7.5:2.5 ตามลำดับ อัตราการไหลเท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ปริมาณที่ใช้ในการฉีด 20 ไมโครลิตร โดยทำการเตรียมกราฟสารมาตรฐานออริโอบาซิดิน เอ ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และสารสกัดที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยทำการจุดจุดของสารสกัดที่ปรากฏขึ้นอยู่ในระดับเดียวกันกับออริโอบาซิดิน เอ บนแผ่น TLC มาละลายในตัวทำละลายอะซีโตนไตร ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำส่วนของของเหลวไปทำการวิเคราะห์

5.3 เทคนิค Spectrophotometry สำหรับการวิเคราะห์โปรตีนเบื้องต้นในสารต้านเชื้อรา

ทำการเตรียมสารมาตรฐานออริโอบาซิดิน เอ ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และสารสกัดที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยทำการจุดจุดของสารสกัดที่ปรากฏขึ้นอยู่ในระดับเดียวกันกับออริโอบาซิดิน เอ บนแผ่น TLC นำมาละลายในตัวทำละลาย เมทานอล ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำส่วนของของเหลวไปทำการวิเคราะห์โปรตีนเบื้องต้นโดยใช้ Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นช่วง 200-400 นาโนเมตร โดยทำการเปรียบเทียบสเปกตรัมค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดที่ได้กับสารมาตรฐานออริโอบาซิดิน เอ

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

ทำการเตรียมสารมาตรฐานออริโอบาซิดิน เอ ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และสารสกัดที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน โดยทำการจุดจุดของสารสกัดที่ปรากฏขึ้นอยู่ในระดับเดียวกันกับออริโอบาซิดิน เอ บนแผ่น TLC นำมาละลายในตัวทำละลายอะซีโตนไตร จากนั้นนำไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนของของเหลวไปทำการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลสารสกัด โดยในการวิเคราะห์จะใช้ 2, 5-dihydroxybenzoic acid (DHB) เป็น matrix ในอัตราส่วนของสารสกัด : DHB คือ 9:1 (v/v) และกำหนดให้เป็น linear positive mode ที่กำลังไฟฟ้า 20 กิโลโวลต์ จากนั้นทำการเปรียบเทียบสเปกตรัมของสารสกัดที่ได้กับสารมาตรฐานออริโอบาซิดิน เอ

6. ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพสารต้านเชื้อราที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

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

ทำการเตรียมสารมาตรฐานออริโอบาซิดิน เอ ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และสารสกัดที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยทำการจุดจุดของสารสกัดที่ปรากฏขึ้นอยู่ในระดับเดียวกันกับออริโอบาซิดิน เอ บนแผ่น TLC นำมาละลายในตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม จากนั้นนำไปการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนของของเหลวไปทำการวิเคราะห์หาโครงสร้างสารสกัด โดยใช้วิธี $^1\text{H-NMR}$ ซึ่งนิวเคลียสไอที่ใช้ในสนามแม่เหล็กคือโปรตอน (Proton) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ในช่วงความยาวคลื่นวิทยุ 500 เมกะเฮิรตซ์ จากนั้นทำการเปรียบเทียบสเปกตรัมของสารสกัดที่ได้กับสารมาตรฐานออริโอบาซิดิน เอ

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา *A. pullulans*

จากการนำเชื้อ *A. pullulans* ที่ทำการคัดแยกและจัดจำแนกแล้วจำนวน 10 สายพันธุ์มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร Yeast Malt Broth (YMB) นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ทำการเตรียมสไลด์ของเชื้อเพื่อศึกษา รูปร่างและลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (รูปที่ 5-14) พบว่าแต่ละสายพันธุ์มีรูปร่างลักษณะภายใต้กล้องดังนี้

ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อรา *A. pullulans* Deenam 001 BCU พบเส้นใยเทียม โคนิเดียทุกติดยูมิติดอยู่ที่ปลายของเส้นใยเทียม เซลล์พอง คลาไมโดสปอร์ คลาไมโดโคนิเดีย และบลาสโตสปอร์ (รูปที่ 5A-E)

ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อรา *A. pullulans* Deenam 003 BCU พบเส้นใยเทียม บลาสโตสปอร์ เซลล์พอง คลาไมโดสปอร์ และ budding cell (รูปที่ 6A-D)

ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อรา *A. pullulans* Deenam 008 BCU พบ budding cell เซลล์พอง เส้นใย เส้นใยเทียม และ บลาสโตสปอร์ (รูปที่ 7A-E)

ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อรา *A. pullulans* Deenam 007 BCU พบเซลล์พอง budding cell บลาสโตสปอร์ เส้นใยเทียม และคลาไมโดสปอร์ (รูปที่ 8A-D)

ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อรา *A. pullulans* Deenam 009 BCU พบเซลล์พองที่ปลายเส้นใย บลาสโตสปอร์ เส้นใยเทียม เส้นใย โคนิเดียทุกติดยูมิติดอยู่ที่ปลาย และด้านข้างของเส้นใย และ budding cell (รูปที่ 9A-D)

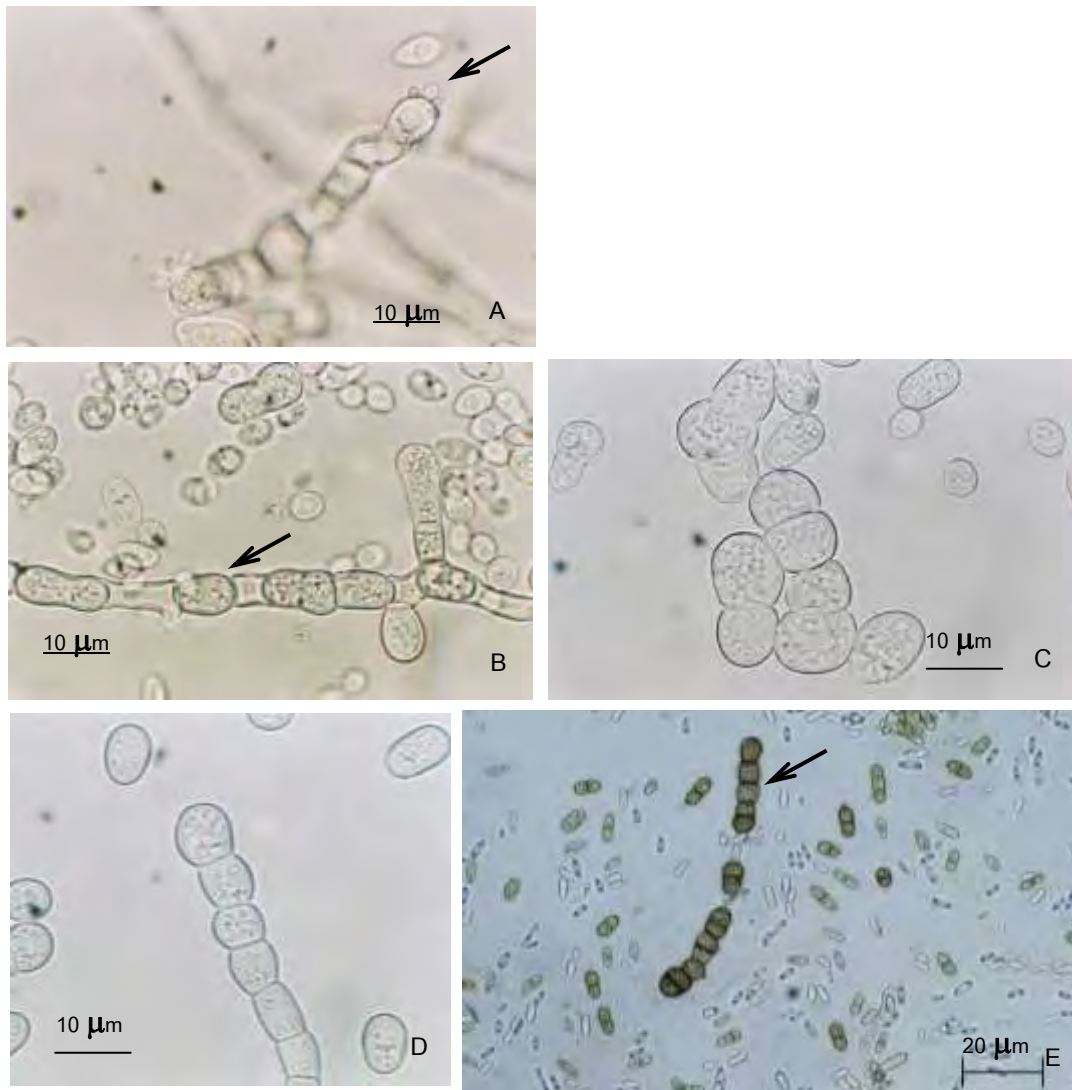
ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อรา *A. pullulans* NRRL 58514 พบเส้นใยเทียมขนาดสั้นๆ บลาสโตสปอร์ เซลล์พองและมีเม็ดสีภายในเซลล์ โคนิเดียทุกติดยูมิติดอยู่ที่ปลายของเส้นใยเทียม และ budding cell (รูปที่ 10A-D)

ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อรา *A. pullulans* NRRL 58536 พบเซลล์พอง บลาสโตสปอร์ เส้นใยเทียม และคลาไมโดสปอร์ (รูปที่ 11A-D)

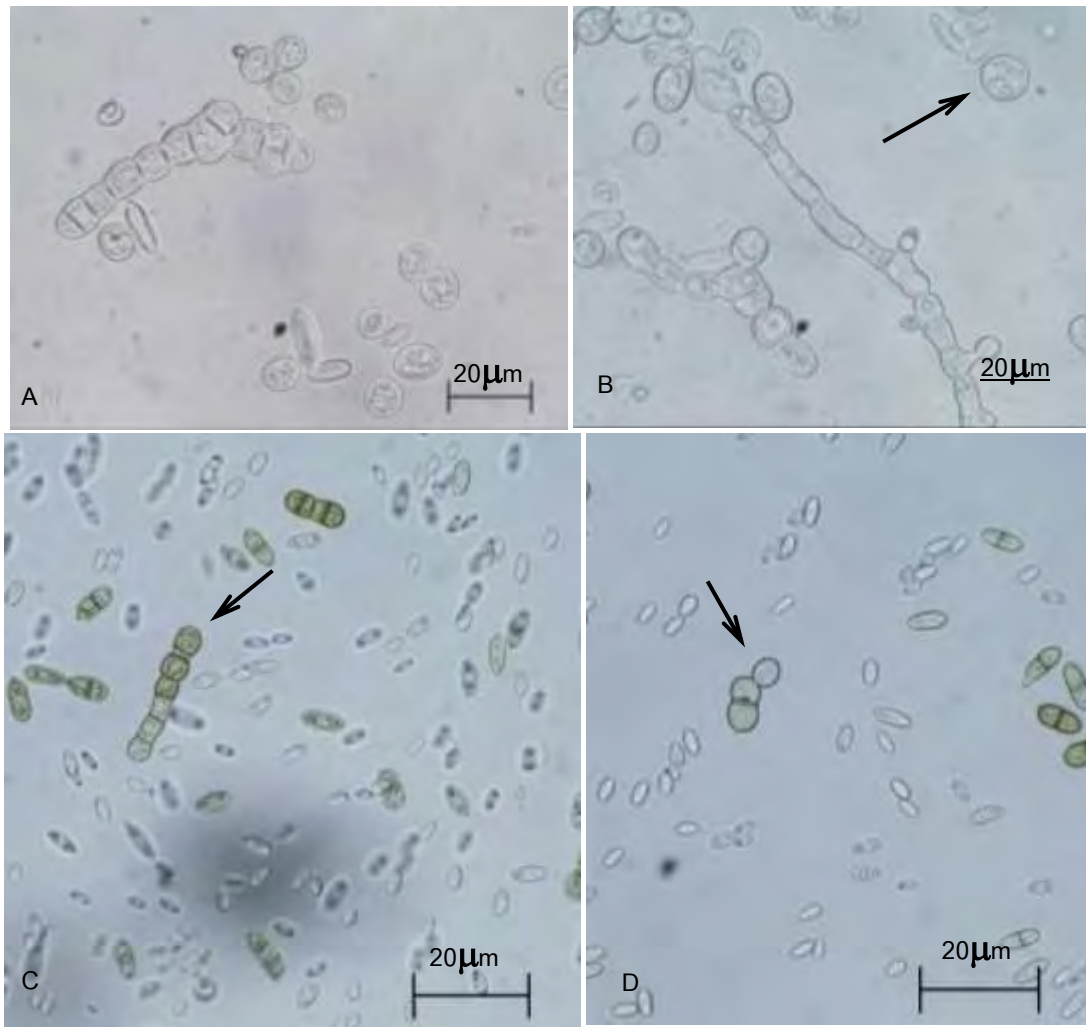
ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อรา *A. pullulans* NRRL 58516 พบเส้นใยเทียม เซลล์พอง โคนิเดียทุกติดยูมิติดอยู่ที่ปลายของเส้นใยเทียม บลาสโตสปอร์ และ budding cell (รูปที่ 12A-D)

ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อรา *A. pullulans* NRRL 58517 พบเส้นใยเทียม เซลล์พอง budding cell และบลาสโตสปอร์ (รูปที่ 13A-D)

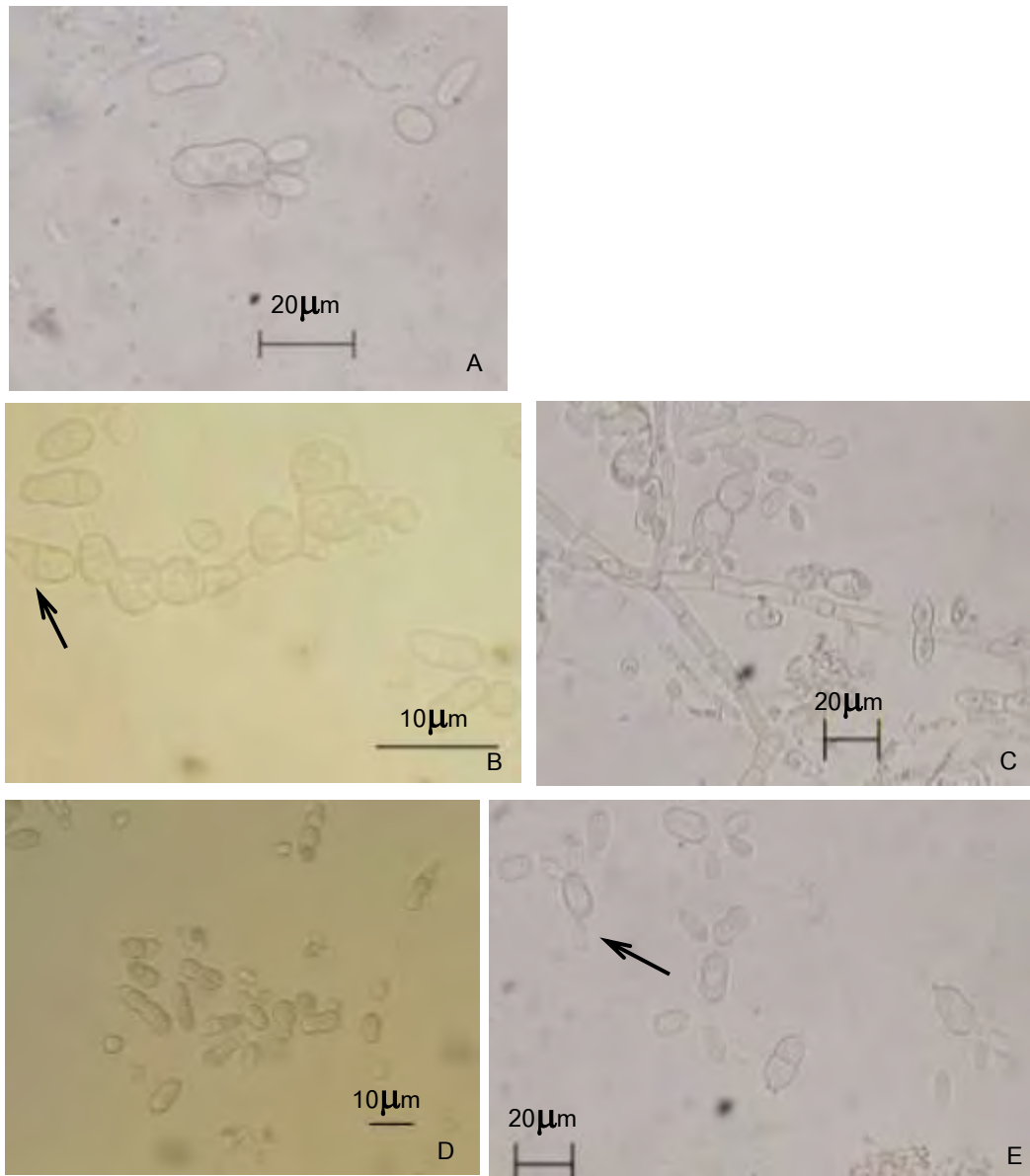
ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อรา *A. pullulans* NRRL 58520 พบเส้นใยเทียม โคนิเดียทุติยภูมิติดอยู่ที่ปลายของเส้นใยเทียม คลาไมโดสปอร์ บลาสโตสปอร์ และเซลล์พอง (รูปที่ 14A-D)



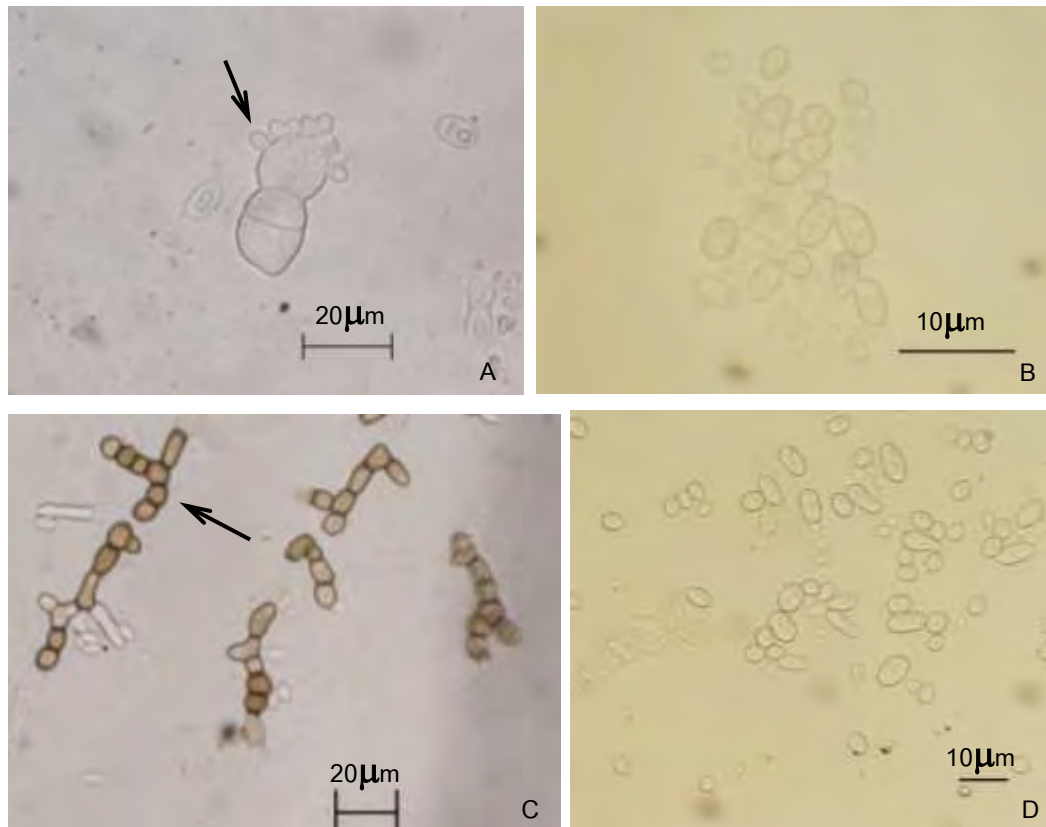
รูปที่ 5 ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อรา *A. pullulans* Deenarn 001 BCU เมื่อเลี้ยงใน YMB เป็นเวลา 7 วัน พบโคนิเดียที่ปลายเส้นใย (ลูกศรชี้) (A) เส้นใยเทียม และคลาไมโดสปอร์ (ลูกศรชี้) (B) เซลล์พอง (C) บลาสโตสปอร์และเส้นใยเทียม (D) เส้นใยเทียม และคลาไมโดสปอร์ (ลูกศรชี้) (E)



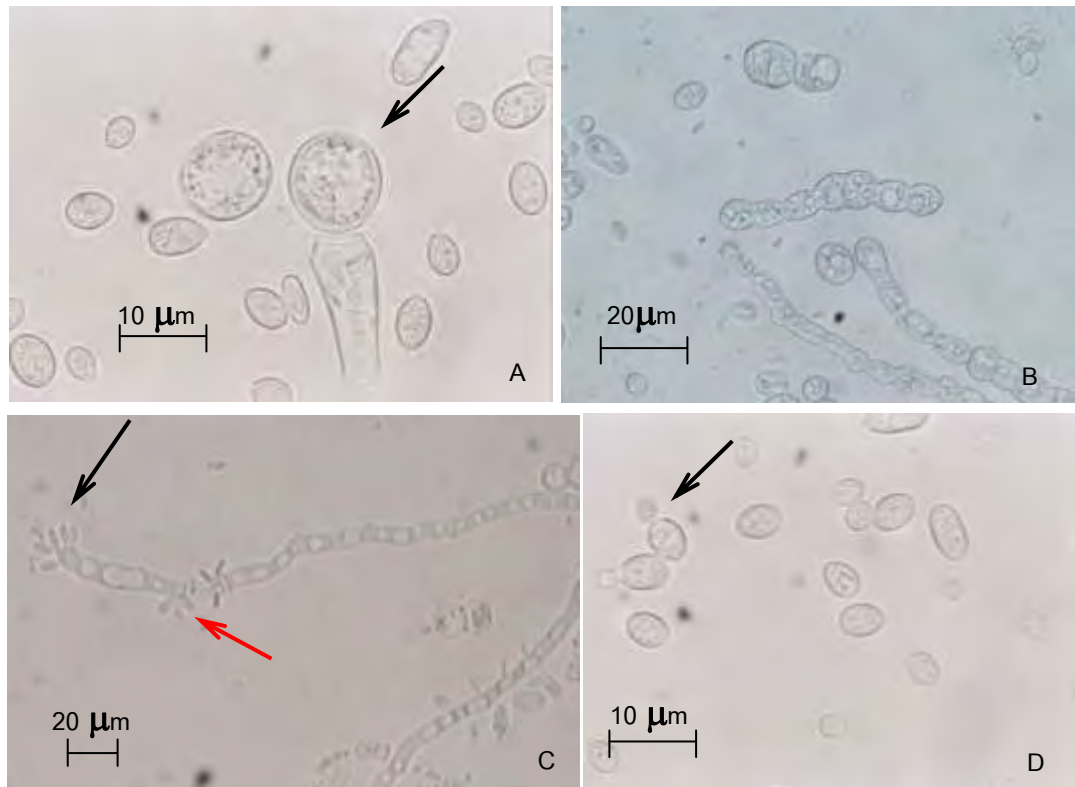
รูปที่ 6 ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อรา *A. pullulans* Deenam 003 BCU เมื่อเลี้ยงใน YMB เป็นเวลา 7 วัน พบเส้นใยเทียม (A) เซลล์ฟอง (ลูกศรชี้) และเส้นใย (B) เส้นใยเทียม คลาไมโดสปอร์ (ลูกศรชี้) และโคนิเดีย (C) budding cell (ลูกศรชี้) โคนิเดีย และคลาไมโดสปอร์ (D)



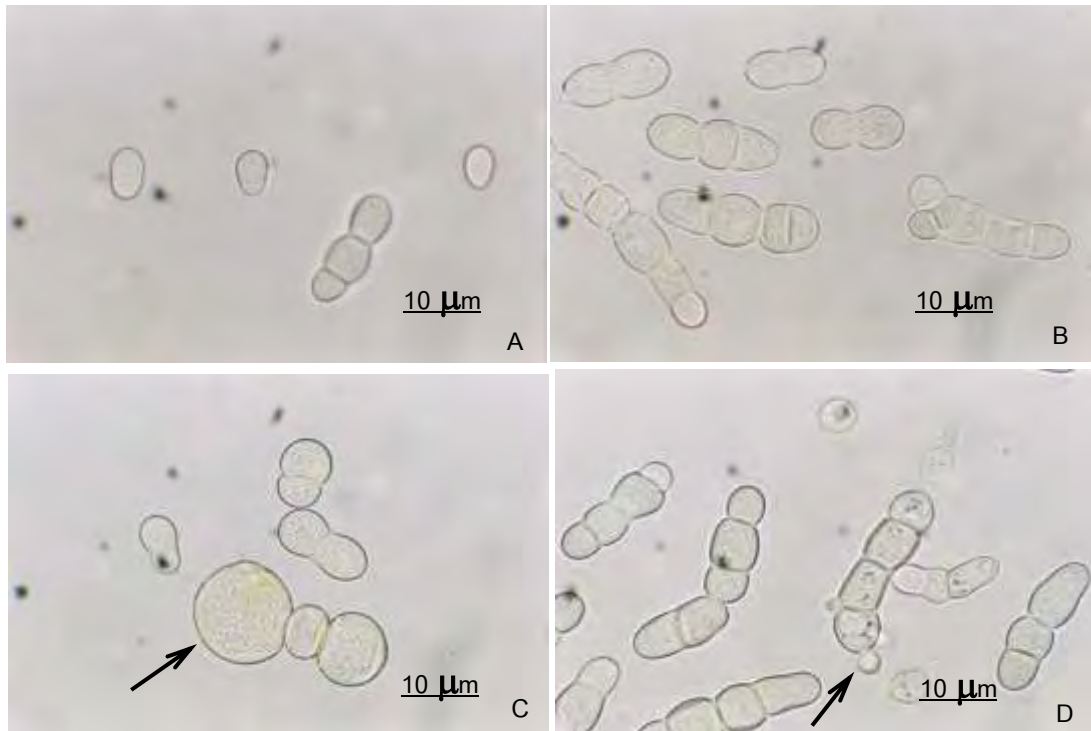
รูปที่ 7 ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อรา *A. pullulans* Deenarn 008 BCU เมื่อเลี้ยงใน YMB เป็น เวลา 7 วัน พบ budding cell (A) เซลล์พอง และมีการงอกของ germ tube (ลูกศรชี้) (B) เส้นใย (C) โคนินเดีย (D) budding cell (ลูกศรชี้) และ บลาสโตสปอร์ (E)



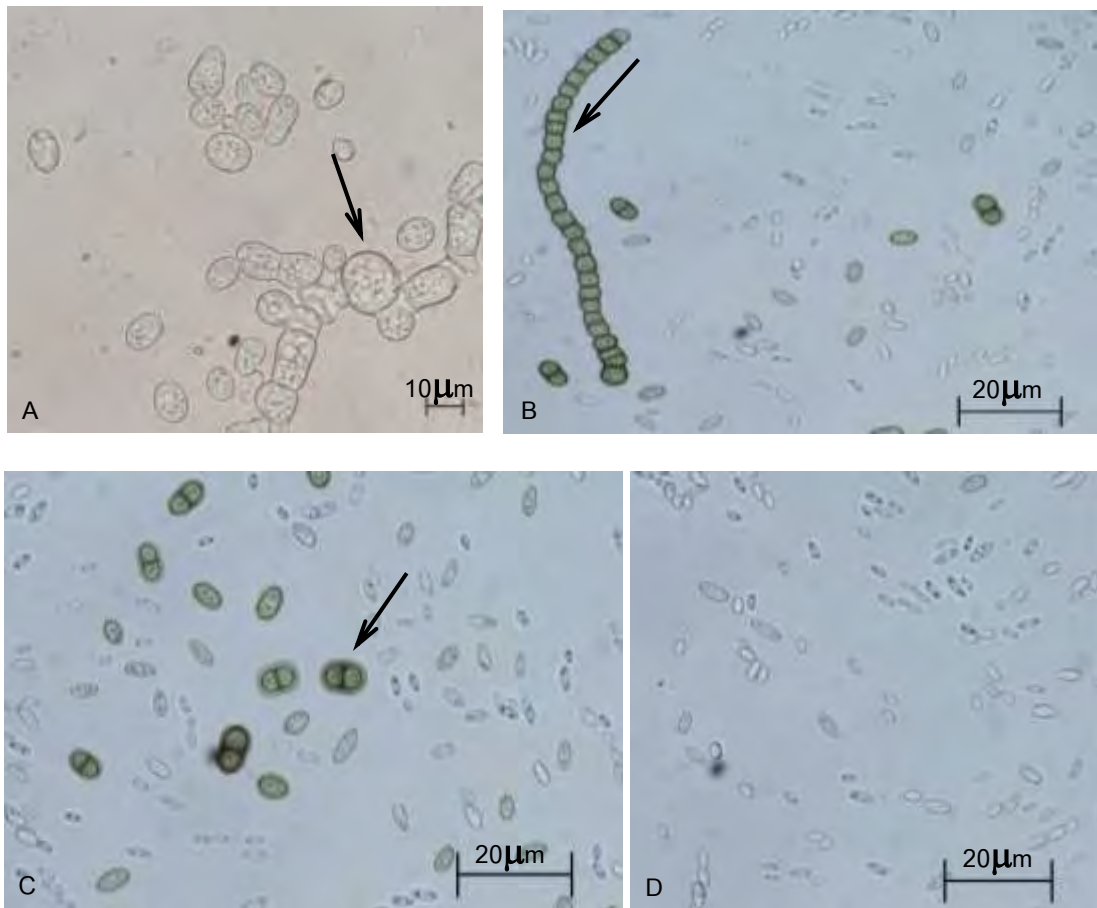
รูปที่ 8 ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อรา *A. pullulans* Deenam 007 BCU เมื่อเลี้ยงใน YMB เป็นเวลา 7 วัน พบเซลล์พอง และ budding cell (ลูกศรชี้) (A) บลาสโตสปอร์ (B) คลาไมโดสปอร์ (ลูกศรชี้) และเส้นใยเทียม (C) บลาสโตสปอร์ (D)



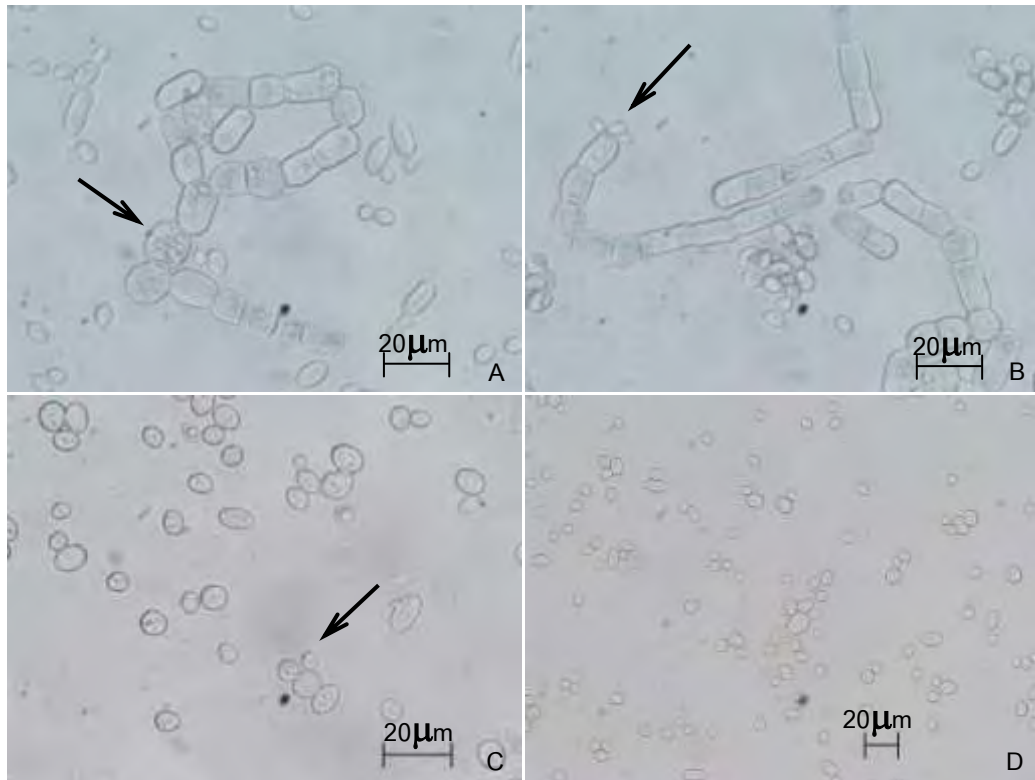
รูปที่ 9 ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อรา *A. pullulans* Deenarn 009 BCU เมื่อเลี้ยงใน YMB เป็นเวลา 7 วัน พบเซลล์ฟองที่ปลายเส้นใย (ลูกศรชี้) และ บลาสโตสปอร์ (A) เส้นใยเทียม (B) เส้นใย โคนิเดียมติดอยู่ที่ปลายของเส้นใย (ลูกศรสีดำ) และโคนิเดียมติดอยู่ด้านข้างของเส้นใย (ลูกศรสีแดง) (C) บลาสโตสปอร์และ budding cell (ลูกศรชี้) (D)



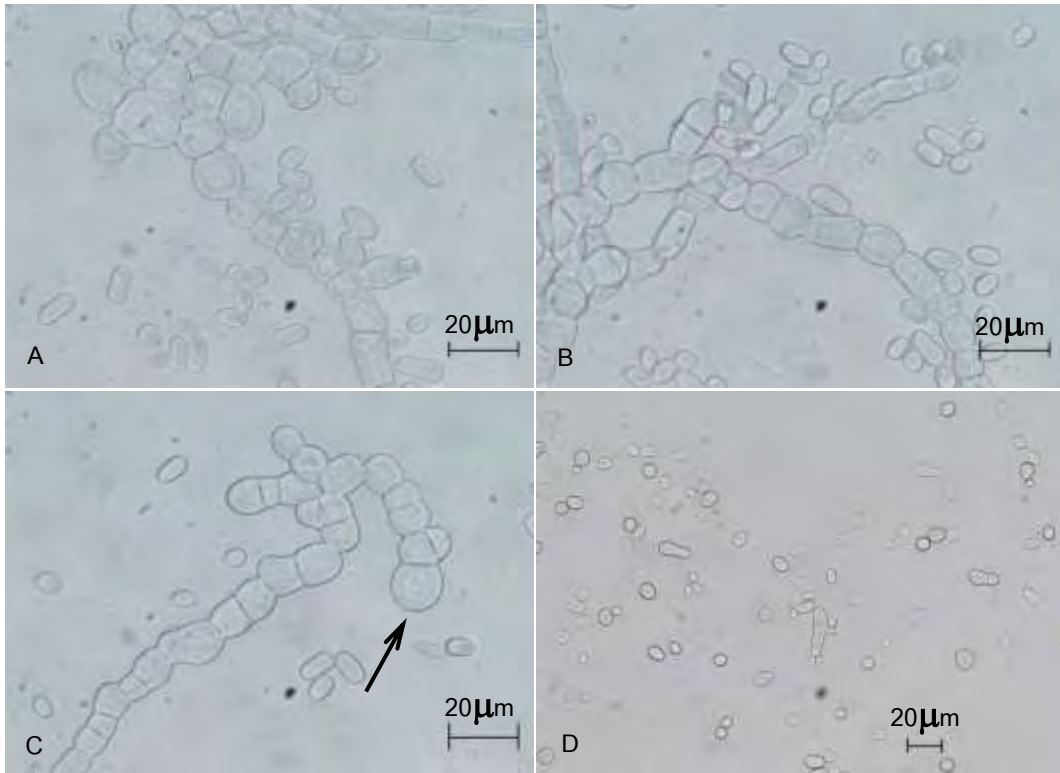
รูปที่ 10 ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อรา *A. pullulans* NRRL 58514 เมื่อเลี้ยงใน YMB เป็นเวลา 7 วัน พบเส้นใยเทียมขนาดสั้นๆ บลาสโตสปอร์ (A, B) เซลล์พองที่มีเม็ดสีภายในเซลล์ (ลูกศรชี้) (C) โคนิเดียทุติยภูมิติดอยู่ที่ปลายของเส้นใยเทียม (ลูกศรชี้) และเส้นใยเทียม (D)



รูปที่ 11 ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อรา *A. pullulans* NRRL 58536 เมื่อเลี้ยงใน YMB เป็นเวลา 7 วัน พบเซลล์พอง (ลูกศรชี้) และ บลาสโตสปอร์ (A) เส้นใยเทียม (ลูกศรชี้) และคลาไมโดสปอร์ (B) คลาไมโดสปอร์ (ลูกศรชี้) (C) บลาสโตสปอร์ (D)



รูปที่ 12 ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อรา *A. pullulans* NRRL 58516 เมื่อเลี้ยงใน YMB เป็นเวลา 7 วัน พบเส้นใยเทียมและเซลล์พอง (ลูกศรชี้) (A) เส้นใยเทียมและโคนิเดียติดอยู่ที่ปลายเส้นใยเทียม (ลูกศรชี้) (B) budding cell (ลูกศรชี้) (C) บลาสโตสปอร์ (D)



รูปที่ 13 ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อรา *A. pullulans* NRRL 58517 เมื่อเลี้ยงใน YMB เป็นเวลา 7 วัน พบ เส้นใยเทียมและเซลล์ฟอง (A) เส้นใยเทียมและโคนิเดีย (B) เส้นใยเทียมและเซลล์ฟองที่ปลายเส้นใยเทียม (ลูกศรชี้) (C) บลาสโตสปอร์ (D)

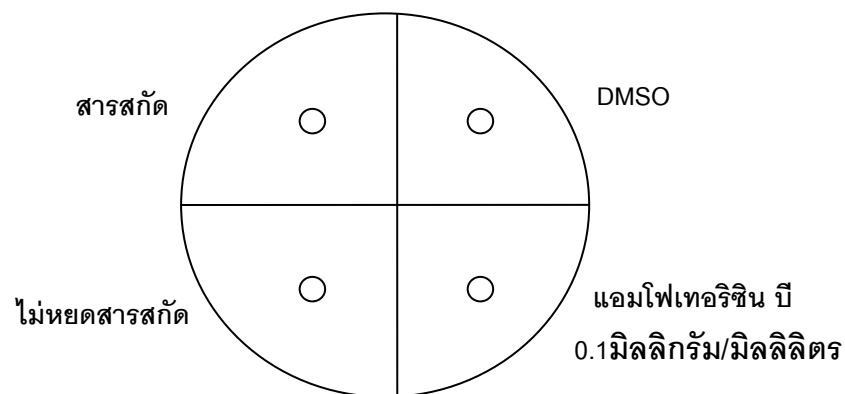


รูปที่ 14 ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อรา *A. pullulans* NRRL 58520 เมื่อเลี้ยงใน YMB เป็นเวลา 7 วัน พบเส้นใยเทียม บลาสโตสปอร์ เซลล์พอง และโคนิเดียติดอยู่ที่ปลายของเส้นใยเทียม (ลูกศรชี้) (A) เส้นใยเทียมและคลาไมโดสปอร์ (ลูกศรชี้) (B) เส้นใยเทียม คลาไมโดสปอร์และโคนิเดียติดอยู่ที่ปลายของเส้นใยเทียม (ลูกศรชี้) (C) คลาไมโดสปอร์ที่ปลายเส้นใยเทียม (ลูกศรชี้) (D)

2. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเชื้อรา

2.1 วิธี Well diffusion

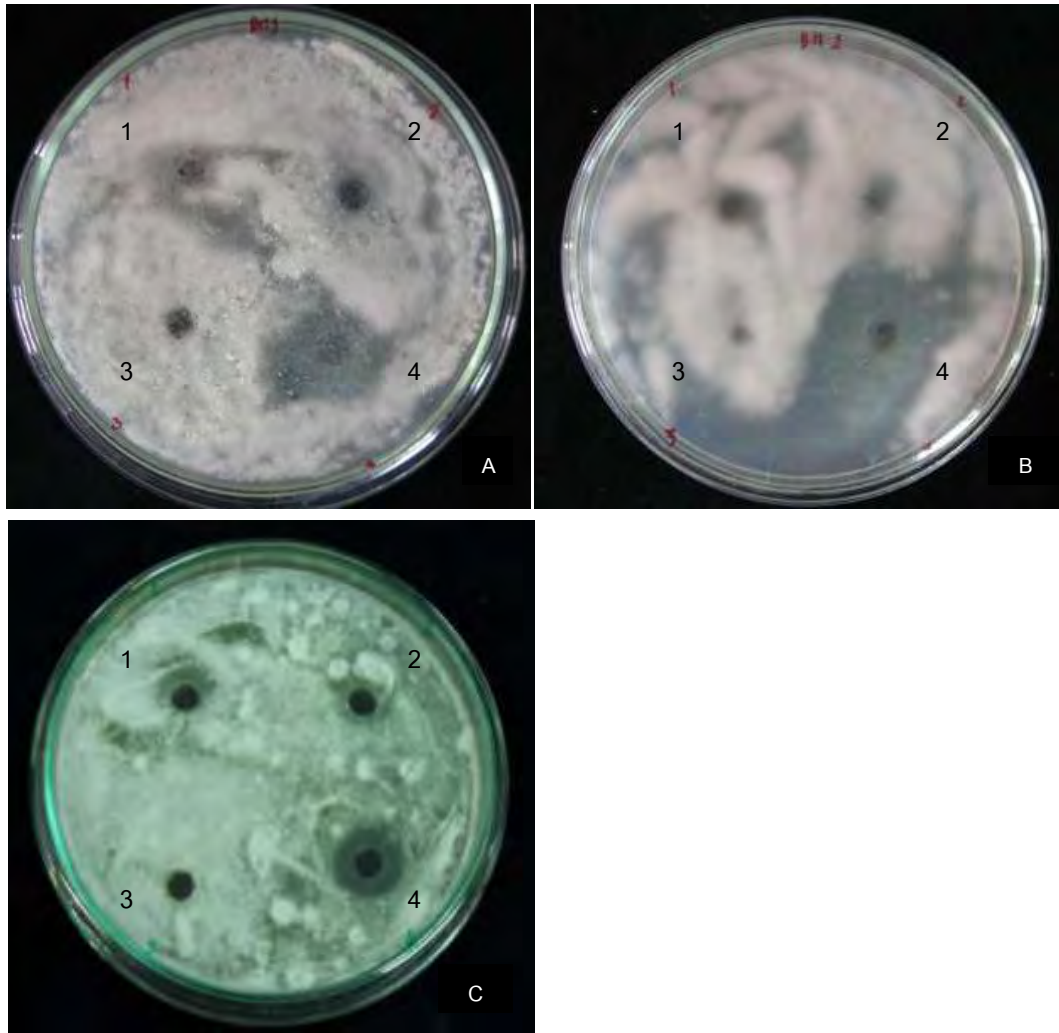
จากการนำสารสกัดได้จากเชื้อรา *A. pullulans* ทั้ง 10 สายพันธุ์มาทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อราก่อโรคในกลุ่ม *Aspergillus* spp. ด้วยวิธี Well diffusion บนจานเลี้ยงเชื้อที่เคลือบด้วยสปอร์ของ *Aspergillus* spp. ดังรูปที่ 15 สังเกตบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ที่เกิดขึ้น และคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (% inhibition) ได้ผลดังตารางที่ 2 โดยพบว่า สารสกัดจาก *A. pullulans* ทั้ง 10 สายพันธุ์มีฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคที่นำมาทดสอบดังนี้ สารสกัดจาก *A. pullulans* Deenam 001 BCU มีฤทธิ์ในการต้าน *A. flavus*, *A. niger* และ *A. fumigatus* (รูปที่ 16) สารสกัดจาก *A. pullulans* Deenam 003 BCU มีฤทธิ์ในการต้าน *A. flavus*, *A. niger* และ *A. terreus* (รูปที่ 17) สารสกัดจาก *A. pullulans* Deenam 008 BCU มีฤทธิ์ในการต้าน *A. niger* และ *A. fumigatus* (รูปที่ 18) สารสกัดจาก *A. pullulans* Deenam 007 BCU มีฤทธิ์ในการต้าน *A. flavus* และ *A. fumigatus* (รูปที่ 19) สารสกัดจาก *A. pullulans* Deenam 009 BCU มีฤทธิ์ในการต้าน *A. fumigatus* เพียงชนิดเดียว (รูปที่ 20) สารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58514 และ NRRL 58536 มีฤทธิ์ในการต้าน *A. flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus* และ *A. terreus* ได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ (รูปที่ 21-22) สารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58516 มีฤทธิ์ในการต้าน *A. niger* และ *A. fumigatus* (รูปที่ 23) ส่วนสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58517 และ NRRL 58520 มีฤทธิ์ในการต้าน *A. fumigatus* เพียงชนิดเดียว (รูปที่ 24-25)



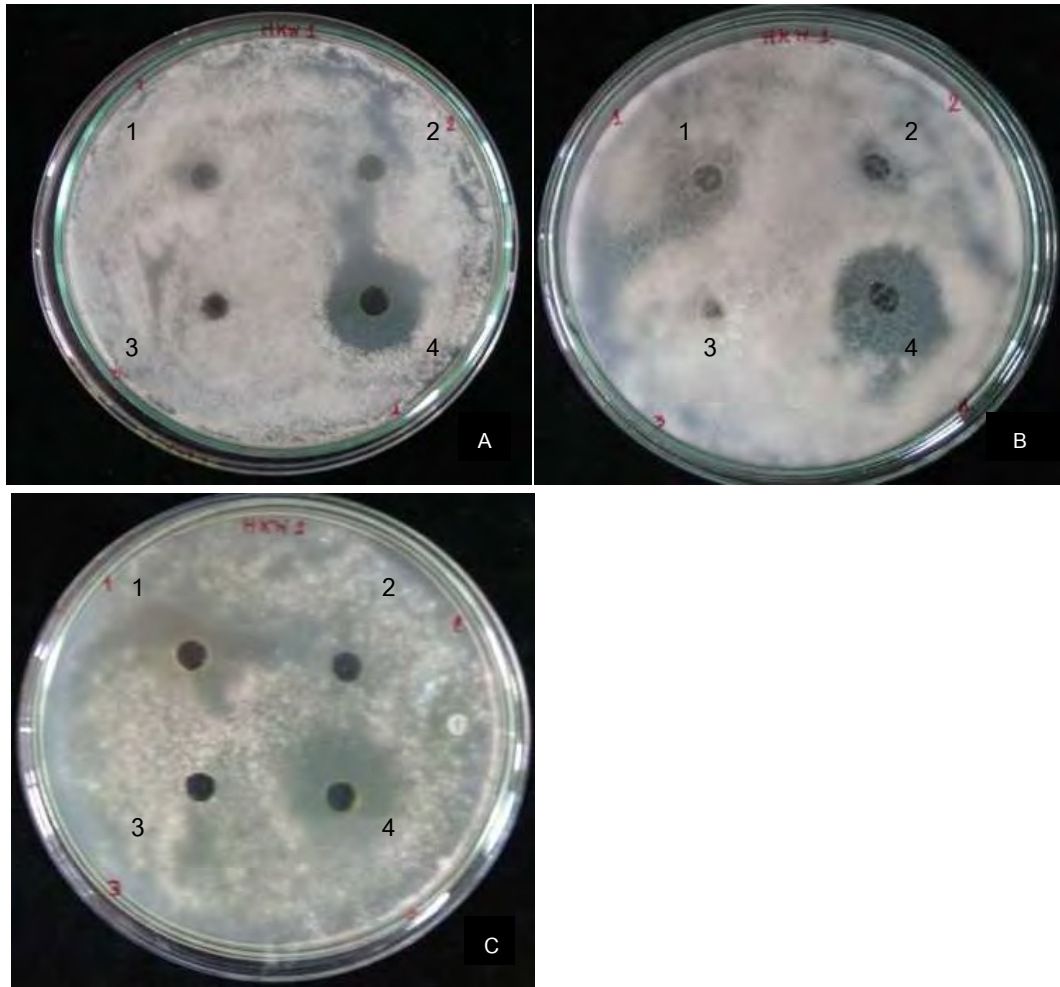
รูปที่ 15 ตำแหน่งของสารสกัดที่ใช้ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเชื้อราบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อโดยวิธี Well diffusion

ตารางที่ 2 ความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus* spp. ของสารสกัดจาก *A. pullulans* ทั้ง 10 สายพันธุ์ โดยวิธี Well diffusion

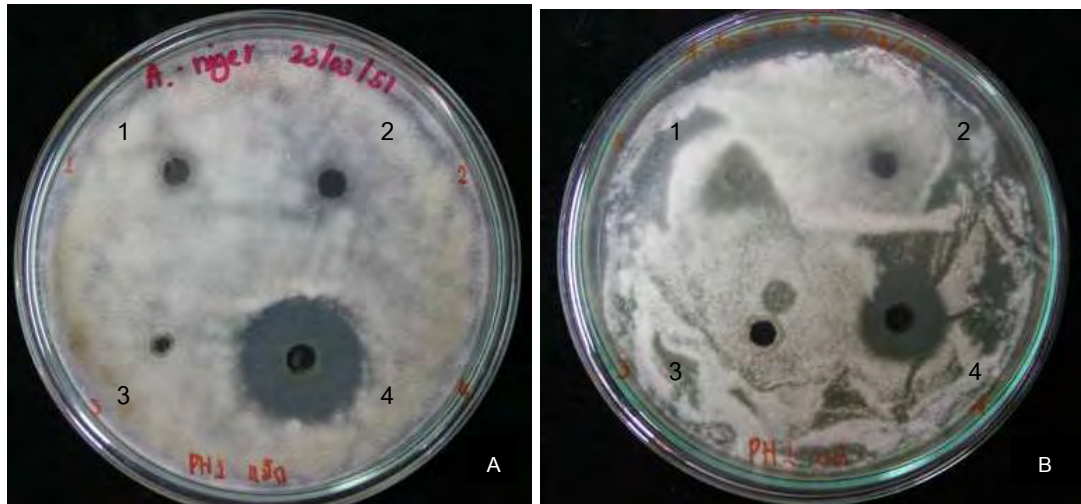
สายพันธุ์ ที่ผลิตสารสกัด	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (%) (% inhibition)			
	<i>A. flavus</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. terreus</i>
Deenarn 001 BCU	30.00±0.00	13.00±0.06	43.00±0.06	00.00±0.00
Deenarn 003 BCU	12.00±0.03	47.00±0.06	00.00±0.00	53.00±0.06
Deenarn 008 BCU	00.00±0.00	10.00±0.00	27.00±0.06	00.00±0.00
Deenarn 007 BCU	18.00±0.03	00.00±0.00	27.00±0.06	00.00±0.00
Deenarn 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



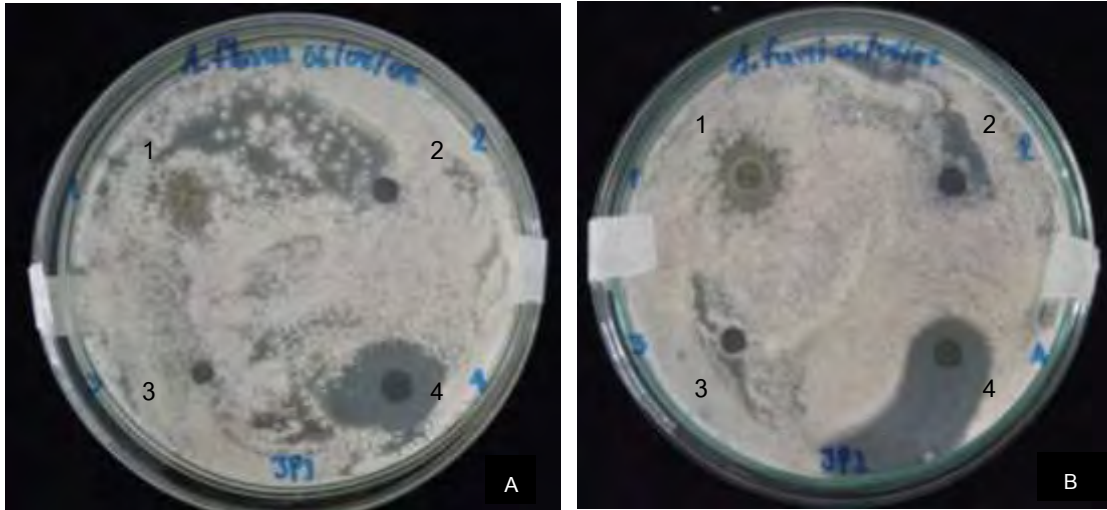
รูปที่ 16 ความสามารถในการยับยั้ง *A. flavus* (A) *A. niger* (B) และ *A. fumigatus* (C) ของสารสกัดจาก *A. pullulans* Deenam 001 BCU โดย หมายเลข 1 คือ สารสกัด หมายเลข 2 คือ สาร DMSO หมายเลข 3 คือ ไม่หยดสารสกัด และ หมายเลข 4 คือ แอมฟิเทอริซิน บี ความเข้มข้น 0.1มิลลิกรัม/มิลลิลิตร



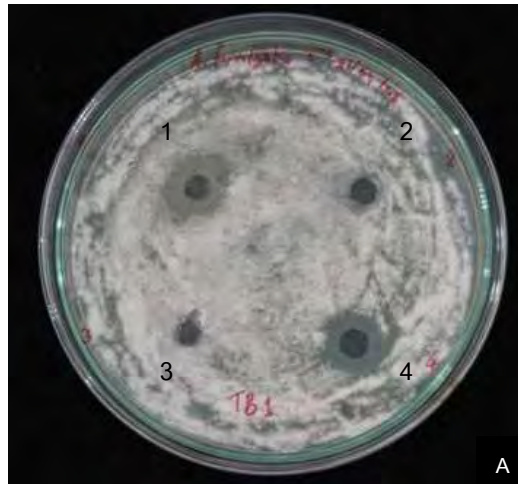
รูปที่ 17 ความสามารถในการยับยั้ง *A. flavus* (A) *A. niger* (B) และ *A. terreus* (C) ของสารสกัดจาก *A. pullulans* Deenarn 003 BCU โดย หมายเลข 1 คือ สารสกัด หมายเลข 2 คือ สาร DMSO หมายเลข 3 คือ ไม่หยดสารสกัด และ หมายเลข 4 คือ แอมโฟเทอริซิน บี ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร



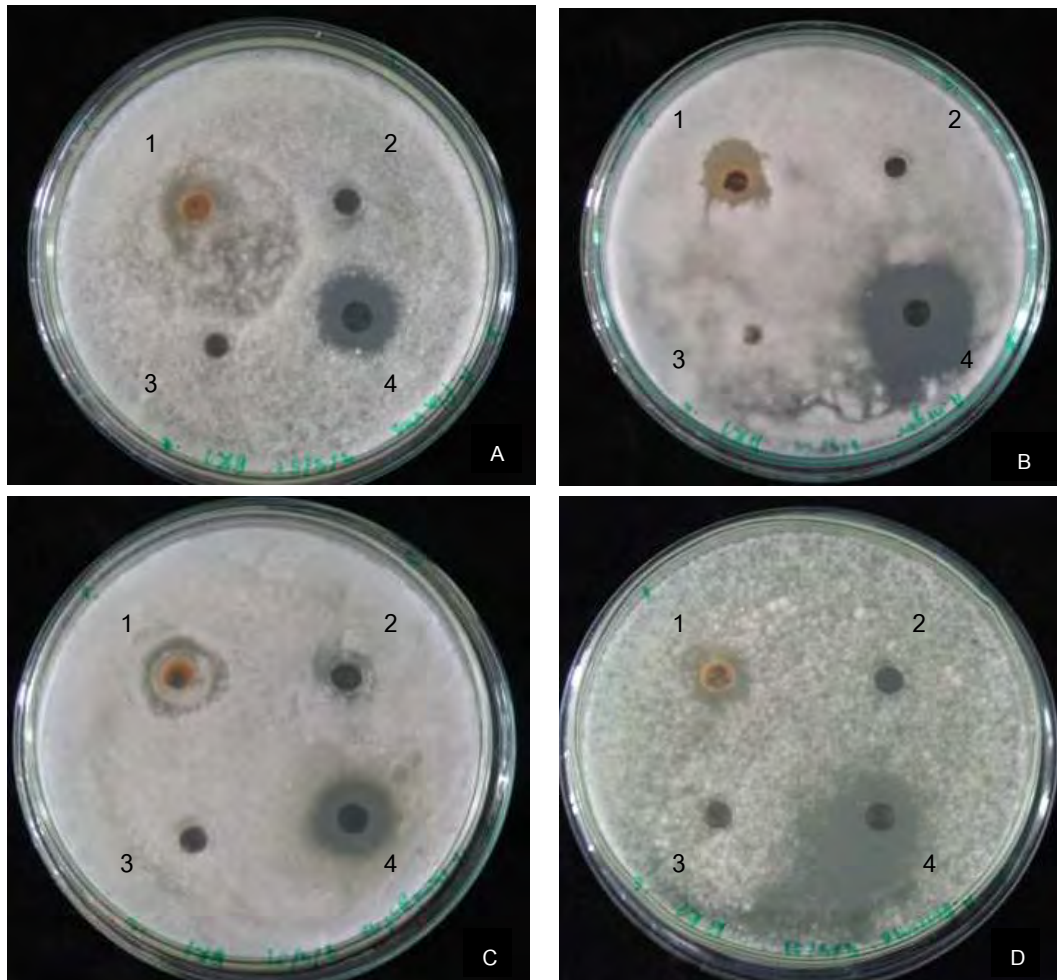
รูปที่ 18 ความสามารถในการยับยั้ง *A. niger* (A) และ *A. fumigatus* (B) ของสารสกัดจาก *A. pullulans* Deenam 008 BCU โดย หมายเลข 1 คือ สารสกัด หมายเลข 2 คือ สาร DMSO หมายเลข 3 คือ ไม่หยดสารสกัด และ หมายเลข 4 คือ แอมโฟเทอริซิน บี ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร



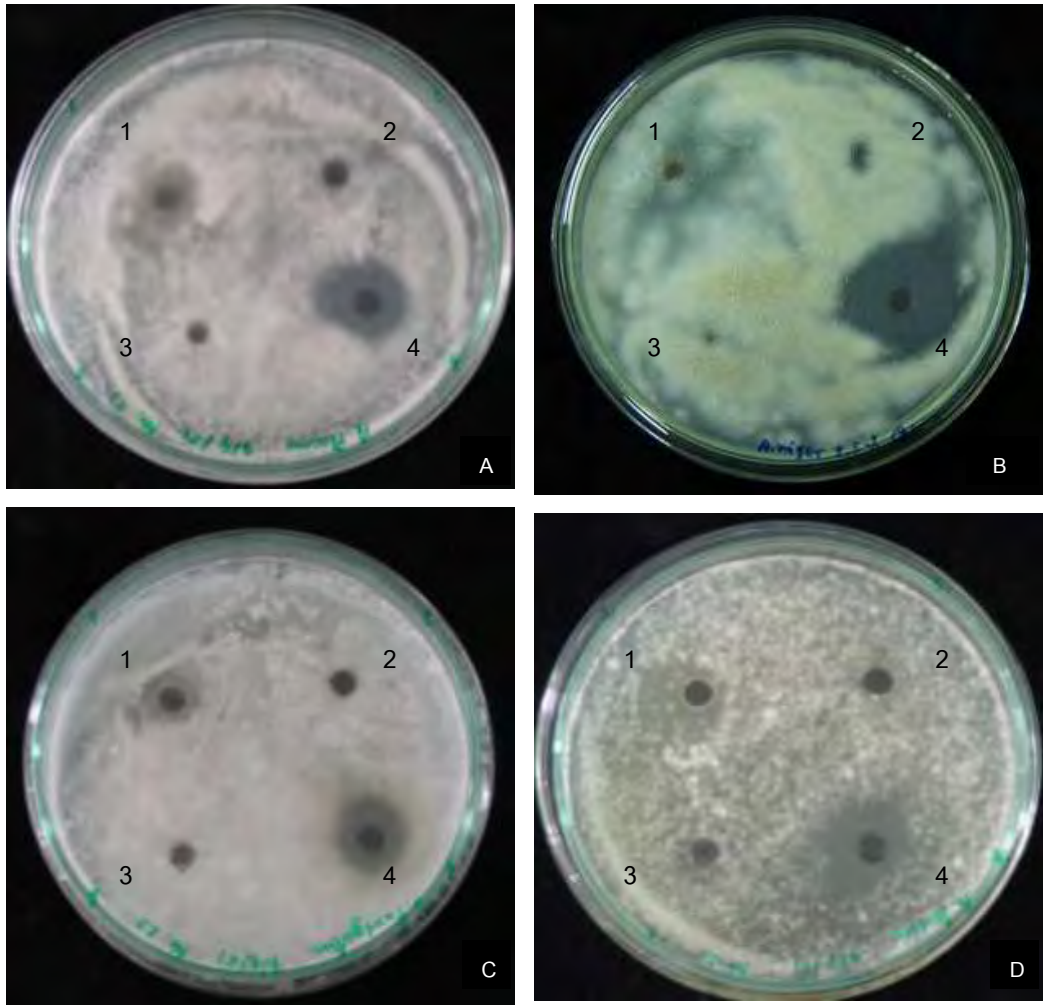
รูปที่ 19 ความสามารถในการยับยั้ง *A. flavus* (A) และ *A. fumigatus* (B) ของสารสกัดจาก *A. pullulans* Deenarn 007 BCU โดย หมายเลข 1 คือ สารสกัด หมายเลข 2 คือ สาร DMSO หมายเลข 3 คือ ไม่หยดสารสกัด และ หมายเลข 4 คือ แอมโฟเทอริซิน บี ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร



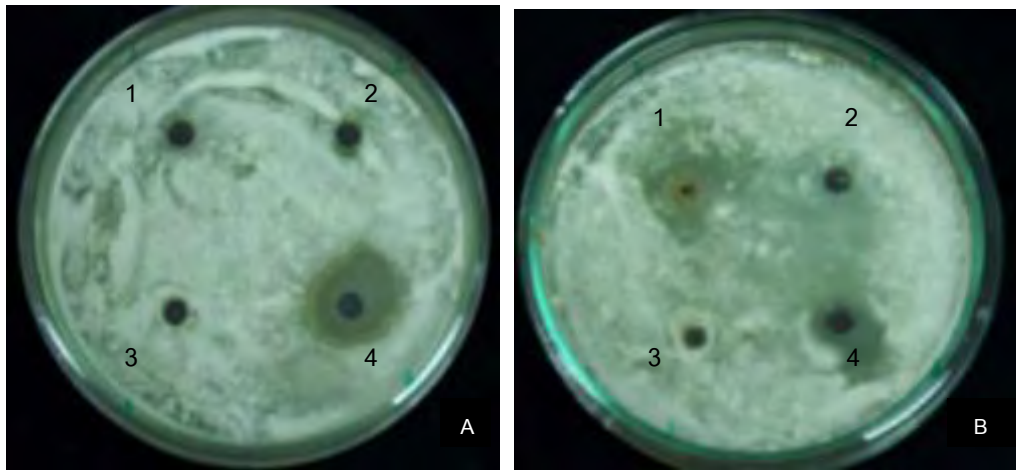
รูปที่ 20 ความสามารถในการยับยั้ง *A. fumigatus* (A) ของสารสกัดจาก *A. pullulans* Deenarn 009 BCU โดย หมายเลข 1 คือ สารสกัด หมายเลข 2 คือ สาร DMSO หมายเลข 3 คือ ไม่หยดสารสกัด และ หมายเลข 4 คือ แอมโฟเทอริซิน บี ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร



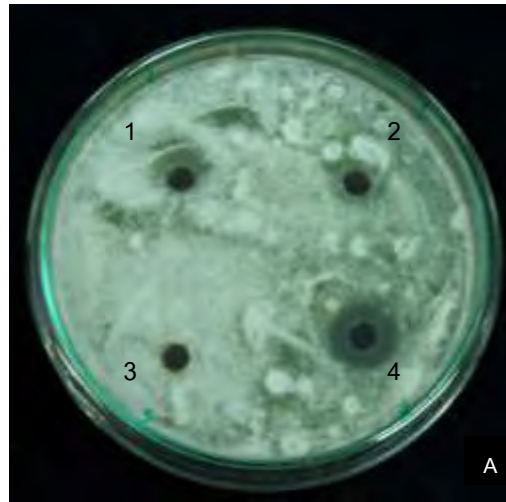
รูปที่ 21 ความสามารถในการยับยั้ง *A. flavus* (A) *A. niger* (B) *A. fumigatus* (C) และ *A. terreus* (D) ของสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58514 โดย หมายเลข 1 คือ สารสกัด หมายเลข 2 คือ สาร DMSO หมายเลข 3 คือ ไม่หยดสารสกัด และ หมายเลข 4 คือ แอมโฟเทอริซิน บี ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร



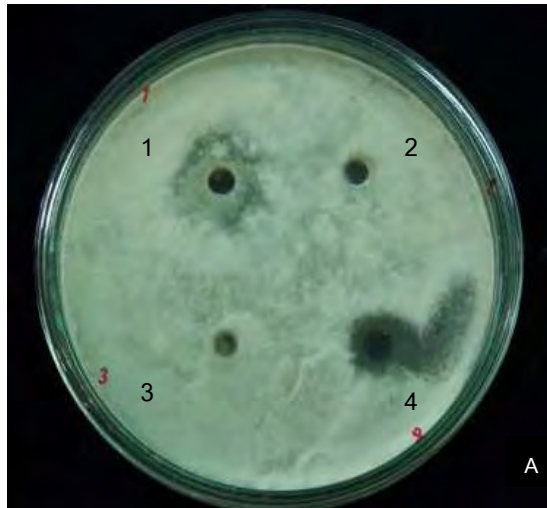
รูปที่ 22 ความสามารถในการยับยั้ง *A. flavus* (A) *A. niger* (B) *A. fumigatus* (C) และ *A. terreus* (D) ของสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 โดย หมายเลข 1 คือ สารสกัด หมายเลข 2 คือ สาร DMSO หมายเลข 3 คือ ไม่หยดสารสกัด และ หมายเลข 4 คือ แอมโฟเทอริซิน บี ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร



รูปที่ 23 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 แอมฟิเทอริซิน บี ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร



รูปที่ 24 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 25 ความสามารถในการยับยั้ง *A. fumigatus* (A) ของสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58520 โดย หมายเลข 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* Deenam 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* Deenam 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* Deenam 008 BCU สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *A. niger* และ *A. fumigatus* ได้ 23.83 ± 0.13 และ 34.83 ± 0.13 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สารสกัดจาก *A. pullulans* Deenam 007 BCU สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *A. flavus* และ *A. fumigatus* ได้ 34.89 ± 0.08 และ 33.89 ± 0.08 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจาก *A. pullulans* Deenam 009 BCU สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *A. fumigatus* ได้ 36.94 ± 0.08 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ สารสกัดจาก *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 3)

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์การงอกและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์ *Aspergillus* spp. ที่ถูกบ่มร่วมกับสารสกัดจาก *A. pullulans* ทั้ง 10 สายพันธุ์

สายพันธุ์ที่ผลิต สารสกัด	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>
Deenam 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
Deenam 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
Deenam 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
Deenam 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
Deenam 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 จำนวนสปอร์ที่ขึ้นบนจานอาหาร ภายหลังจากบ่มสารละลาย DMSO ร่วมกับสปอร์แขวนลอยของ *Aspergillus* spp. โดยจำนวนสปอร์ที่ขึ้นบนจานอาหารชุดควบคุมเทียบเป็น 100 เปอร์เซ็นต์

3. ศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารต้านเชื้อรา

จากการนำสารสกัดที่ได้จากเชื้อรา *A. pullulans* ทั้ง 10 สายพันธุ์ มาทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อราก่อโรคในกลุ่ม *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

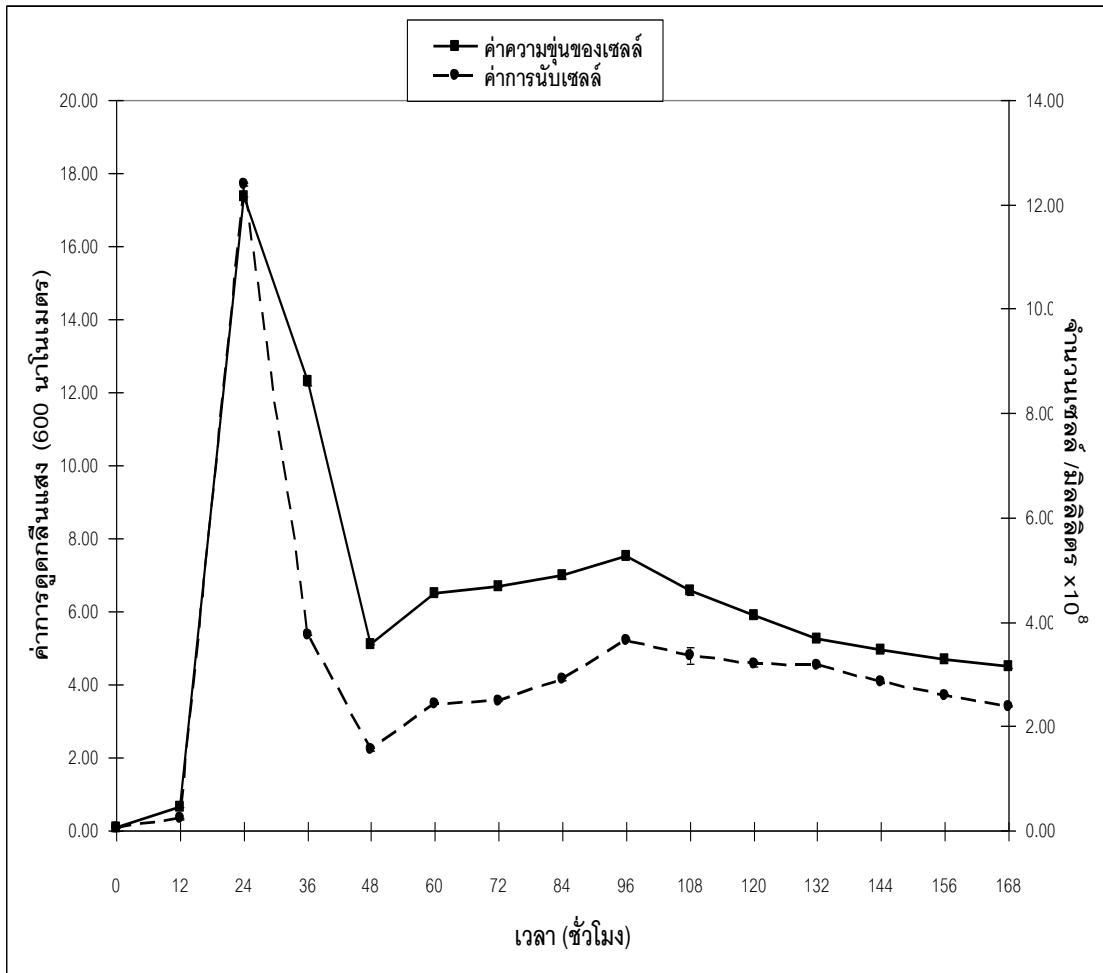
3.1 ศึกษาหาช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารต้านเชื้อราโดยใช้

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 ซึ่งช่วงเวลาหลัง จากนั้นพบว่าเซลล์มีอัตราการเจริญเติบโตลดลง 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 4) จากนั้นนำค่าความขุ่นของเซลล์และค่าจำนวนเซลล์ที่นับได้มาสร้างกราฟเปรียบเทียบเทียบกับเวลา (รูปที่ 26)

ตารางที่ 4 ผลการวัดค่าความชื้นและการนับจำนวนเซลล์/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



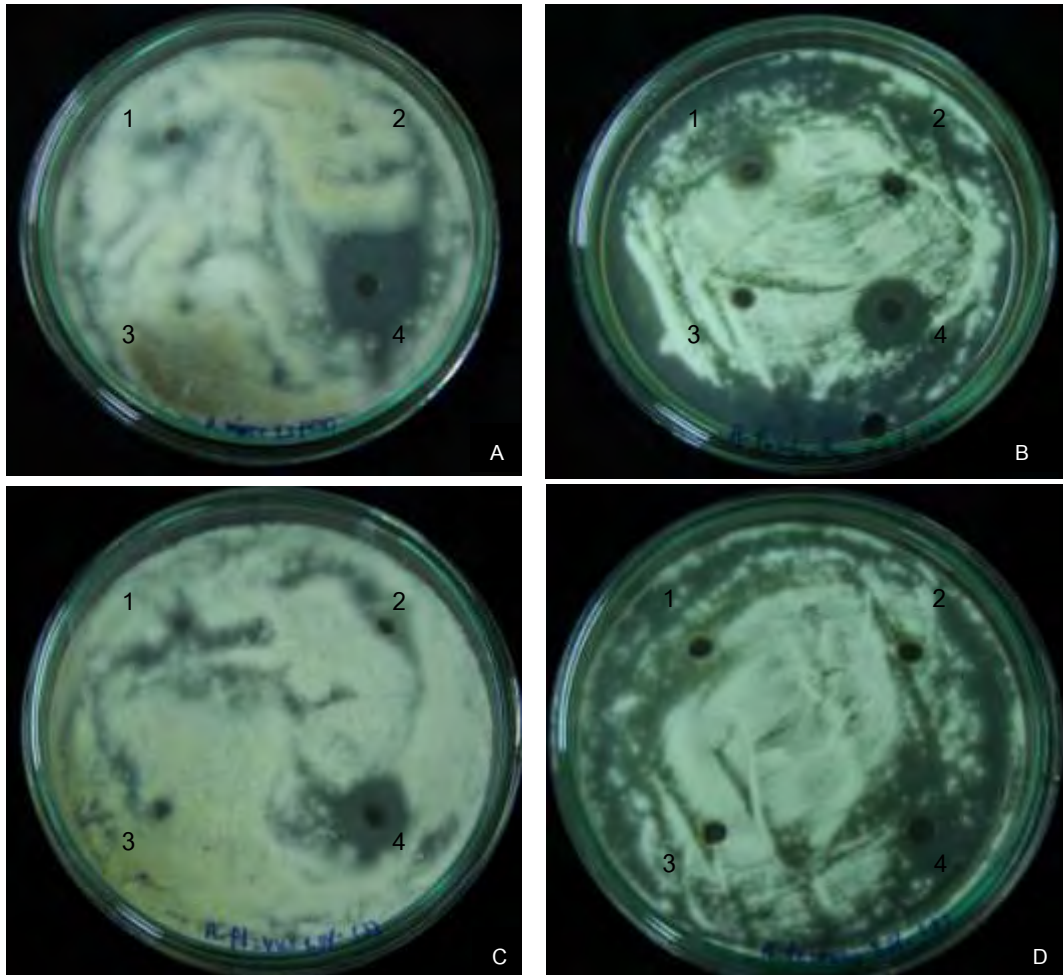
รูปที่ 26 ผลการศึกษากราฟการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. pullulans* NRRL 58536 เปรียบเทียบกับเวลา

3.2 ศึกษาชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน

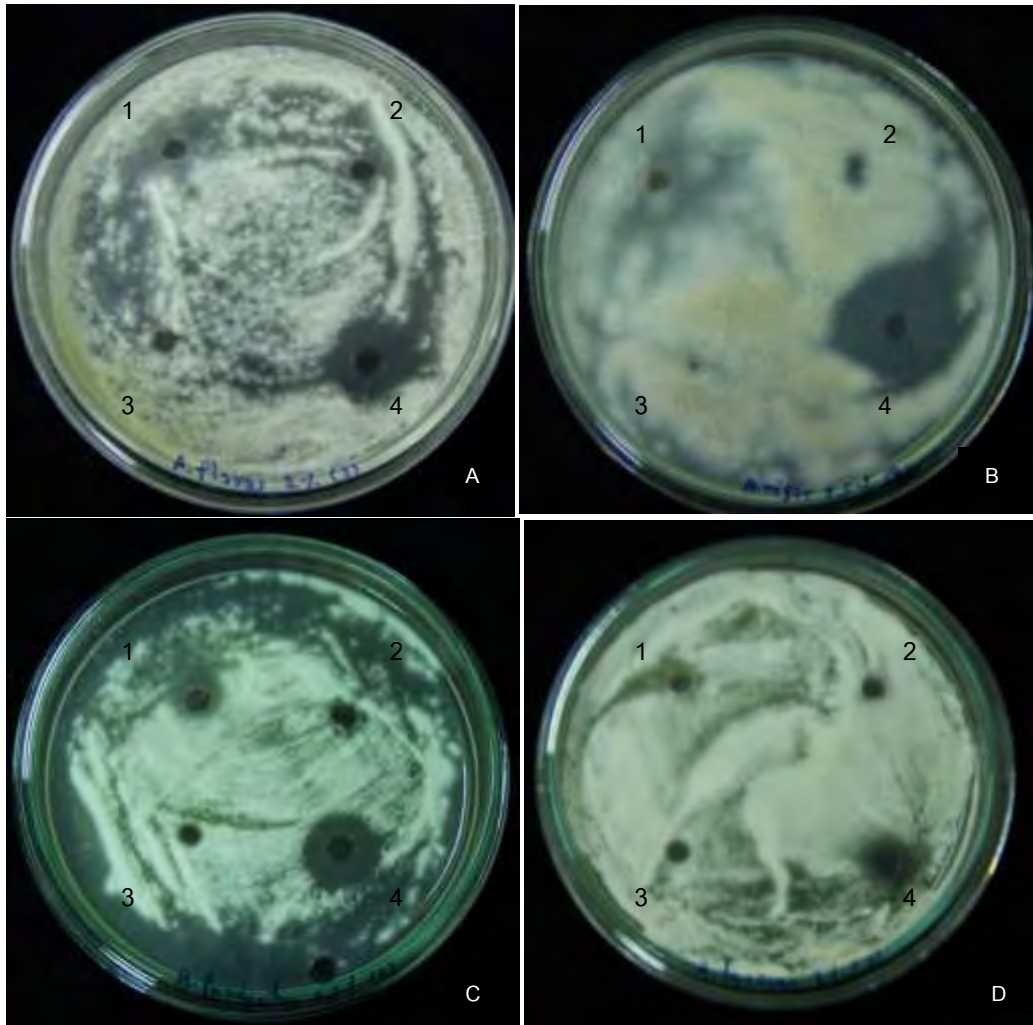
จากการนำเชื้อรา *A. pullulans* NRRL 58536 มาทำการศึกษาแหล่งคาร์บอน 2 ชนิด คือ กลูโคส และ ซูโครส ที่มีความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน 1.5 2.0 และ 2.5% (w/v) จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อราก่อโรคในกลุ่ม *Aspergillus* spp. ด้วยวิธี Well diffusion บนจานเลี้ยงเชื้อที่เคลือบด้วยสปอร์ของ *Aspergillus* spp. สังเกตบริเวณยับยั้งและคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ได้ผลดังตารางที่ 5 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 27) 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 28) 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 29) 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 6) ส่วนสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งคาร์บอน ซูโครสทั้ง 3 ความเข้มข้น เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อราก่อโรคในกลุ่ม *Aspergillus* spp. ด้วยวิธี Well diffusion และ วิธี Conidial germination inhibition assay พบว่าไม่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราก่อโรคในกลุ่ม *Aspergillus* spp. ทั้ง 4 สายพันธุ์

ตารางที่ 5 ความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus* spp. ของสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งคาร์บอนกลูโคส โดยวิธี well diffusion

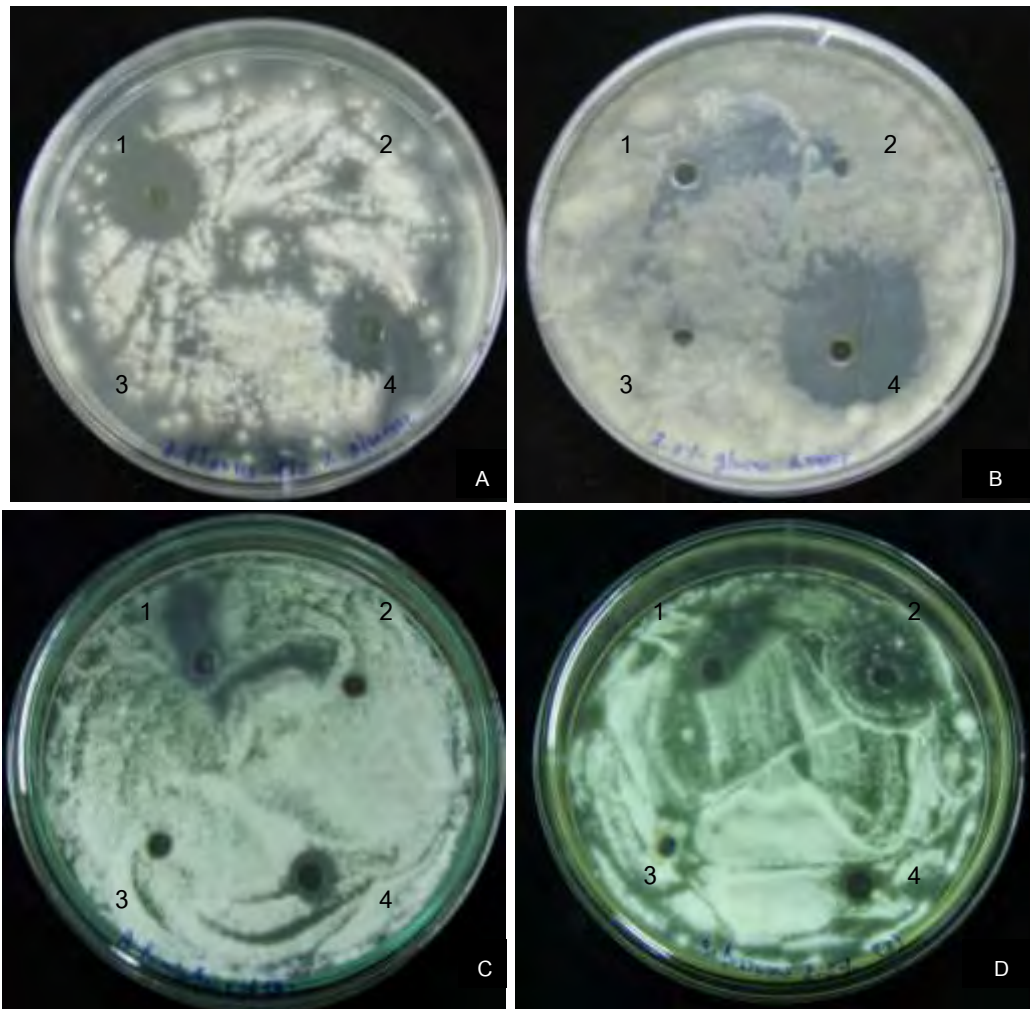
เชื้อรา <i>Aspergillus</i> spp.	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (% inhibition) ของสารสกัดที่ผลิตใน แหล่งคาร์บอนกลูโคส (%)		
	1.5% (w/v)	2.0% (w/v)	2.5% (w/v)
<i>A. flavus</i>	10.00±0.00	52.00±0.08	75.00±0.00
<i>A. niger</i>	23.00±0.06	47.00±0.06	60.00±0.05
<i>A. fumigatus</i>	48.00±0.03	25.00±0.06	60.00±0.00
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



รูปที่ 27 ความสามารถในการยับยั้ง *A. flavus* (A) *A. niger* (B) *A. fumigatus* (C) และ *A. terreus* (D) ของสารสกัดจาก *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 แอมโฟเทอริซิน บี ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร



รูปที่ 28 ความสามารถในการยับยั้ง *A. flavus* (A) *A. niger* (B) *A. fumigatus* (C) และ *A. terreus* (D) ของสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งคาร์บอนกลูโคสความเข้มข้น 2.0 % (w/v) 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 ในแหล่งคาร์บอนกลูโคสความเข้มข้น 2.5 % (w/v) โดย หมายเลข 1 คือ สารสกัด หมายเลข 2 คือ สาร DMSO หมายเลข 3 คือ ไม่หยดสารสกัด และ หมายเลข 4 คือ แอมฟิเทอริซิน บี ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ตารางที่ 6 เปอร์เซ็นต์การงอกและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์ *Aspergillus* spp. ที่ถูกบ่มร่วมกับสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งคาร์บอนกลูโคส

ความเข้มข้น กลูโคส (%w/v)	เชื้อรา <i>Aspergillus</i> spp.	เปอร์เซ็นต์การงอก ของสปอร์ (%) (% germination)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง การงอกของสปอร์ (%) (% 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 ภายหลังบ่มสารละลาย DMSO ร่วมกับสปอร์แขวนลอยของ *Aspergillus* spp. โดยจำนวนสปอร์ที่ขึ้นบนจานอาหารชุดควบคุมเทียบเป็น 100 เปอร์เซ็นต์

3.3 ศึกษาการใช้แหล่งอาหารเสริม

จากการศึกษาชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน พบว่าสารสกัดจาก

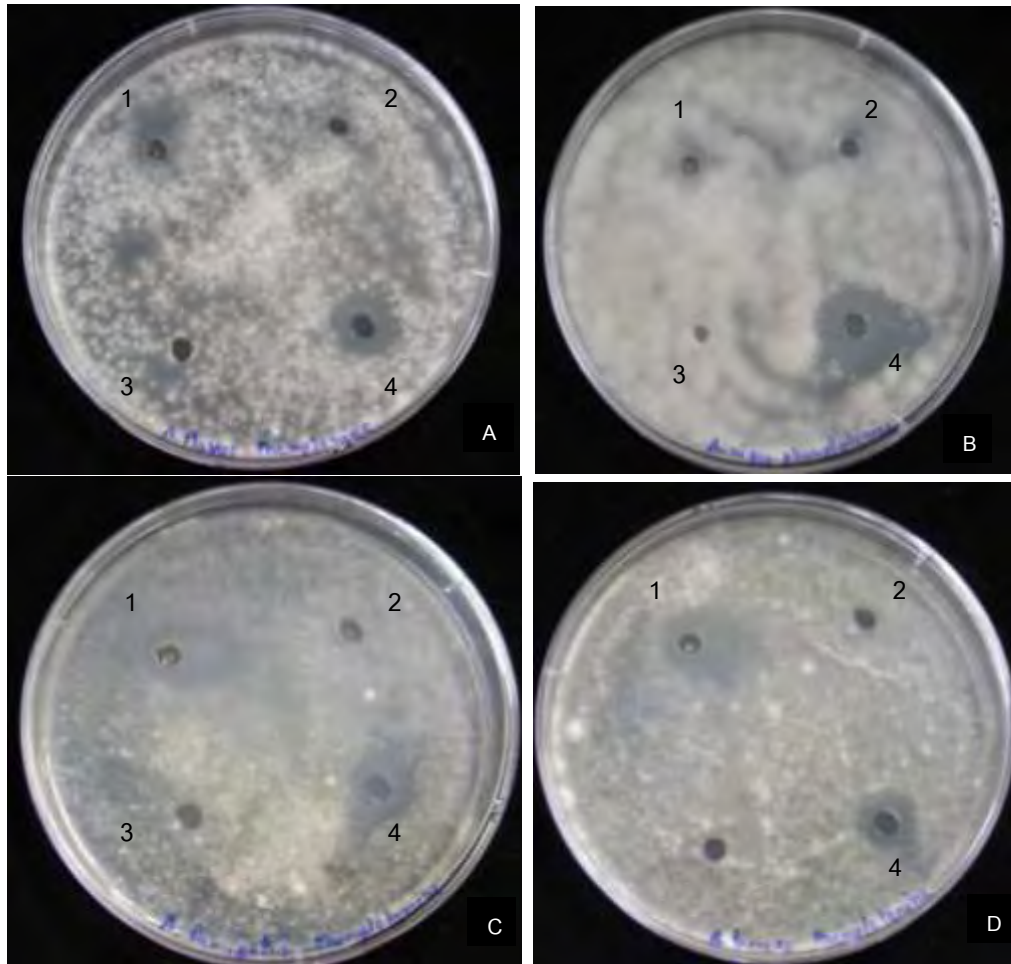
A. pullulans NRRL 58536 ในแหล่งคาร์บอนกลูโคสความเข้มข้น 2.5% (w/v) มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราก่อโรคในกลุ่ม *Aspergillus* spp. ทั้ง 4 สายพันธุ์ได้สูงสุด จากนั้นนำมาศึกษาการใช้แหล่งอาหารเสริมจำพวกกรดอะมิโน ได้แก่ ฟีนิลอะลานีน โพรลีน และ ลิวซีน โดยจัดแบ่งกรดอะมิโน ออกเป็น 7 ภาวะ ได้แก่ (1) ฟีนิลอะลานีน (2) 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) และทำการเลี้ยง เชื้อต่อ ในอาหารสูตร Production II ที่มีกรดอะมิโนในแต่ละภาวะที่ความเข้มข้น 0.01 % (w/v) และนำมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อราก่อโรคในกลุ่ม *Aspergillus* spp. (*A. flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus* และ *A. terreus*) ด้วยวิธี Well diffusion บนจานเลี้ยงเชื้อที่เกลี่ยด้วยสปอร์ของ *Aspergillus* spp. สังเกตบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้นและคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ได้ผลดังตารางที่ 7 โดยพบว่าสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริม กรดอะมิโนภาวะที่ 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 30) สารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริม กรดอะมิโนภาวะที่ 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 31) สารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริม กรดอะมิโนภาวะที่ 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 32) ส่วนสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริม กรดอะมิโนภาวะที่ 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 33) 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 34) และสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริม กรดอะมิโนภาวะที่ 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 35) นอกจากนี้สารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 7 (ฟีนิลอะลานีน โพรลีน และ ลิวซีน) พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราก่อโรคในกลุ่ม *Aspergillus* spp. ทั้ง 4 สายพันธุ์ ซึ่ง เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 100.00 ± 0.00 , 146.00 ± 0.08 , 170.00 ± 0.06 และ 20.00 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (รูปที่ 36 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) สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ ของ *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) สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ ของ *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 8)

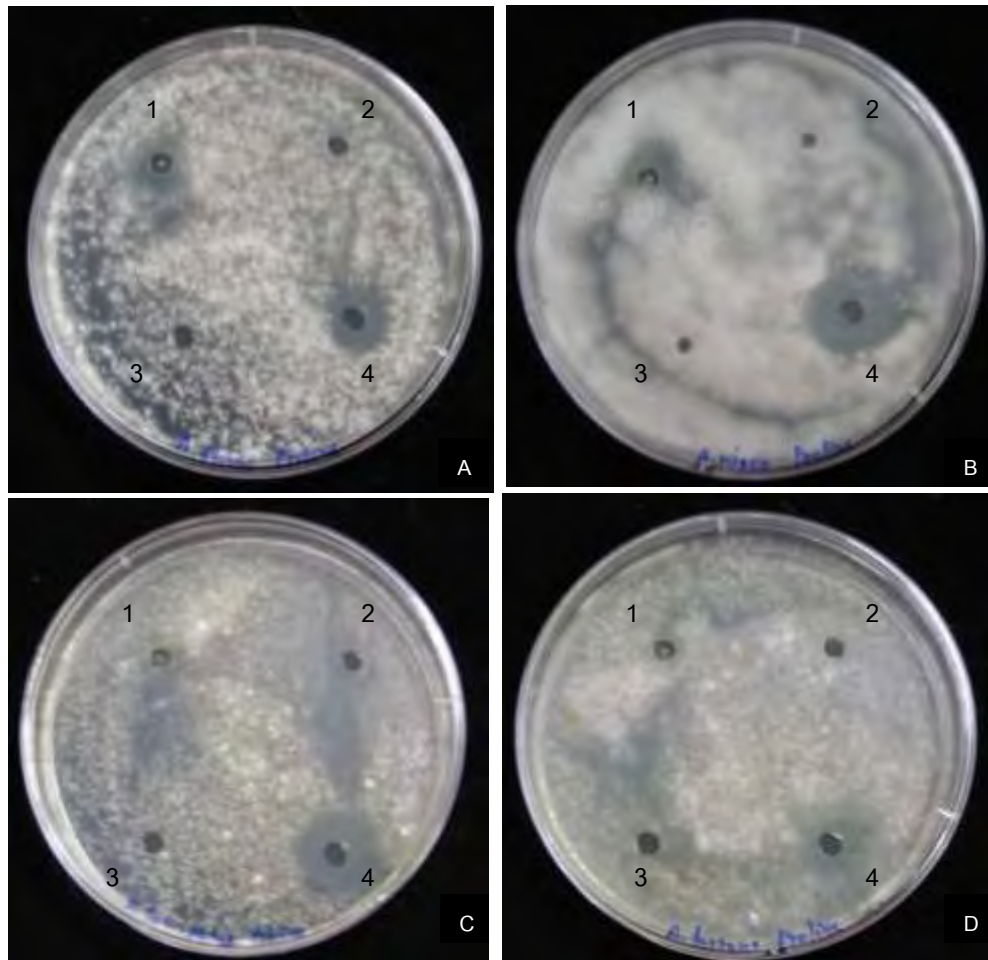
ตารางที่ 7 ความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus* spp. ของสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโน โดยวิธี

Well diffusion

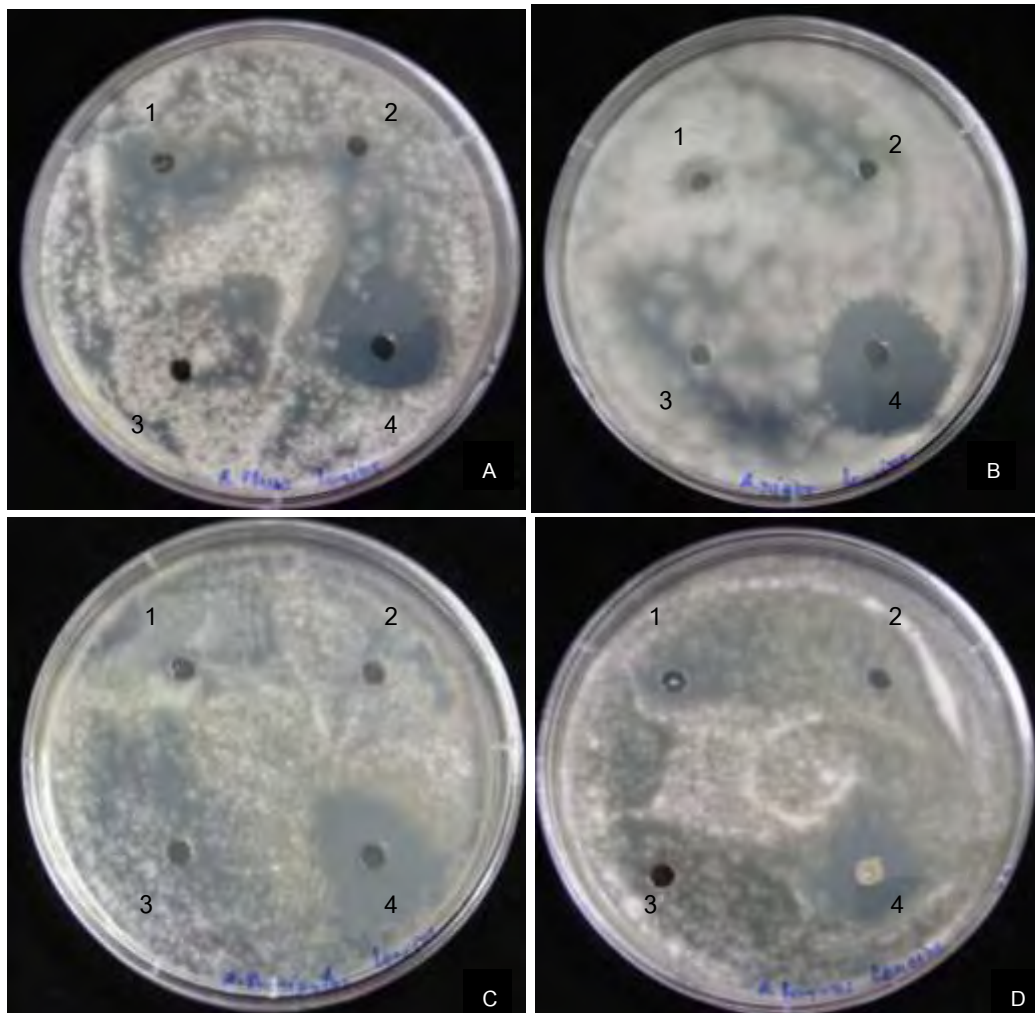
เชื้อรา <i>Aspergillus</i> spp.	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (% inhibition) ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโน (%)						
	ฟีนิลอะลานีน	โพรลีน	ลิวซีน	ฟีนิลอะลานีน และโพรลีน	ฟีนิลอะลานีน และลิวซีน	โพรลีน และลิวซีน	ฟีนิลอะลานีน โพรลีน และลิวซีน
<i>A. flavus</i>	53.00±0.06	32.00±0.03	141.00±0.01	75.00±0.02	175.00±0.05	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



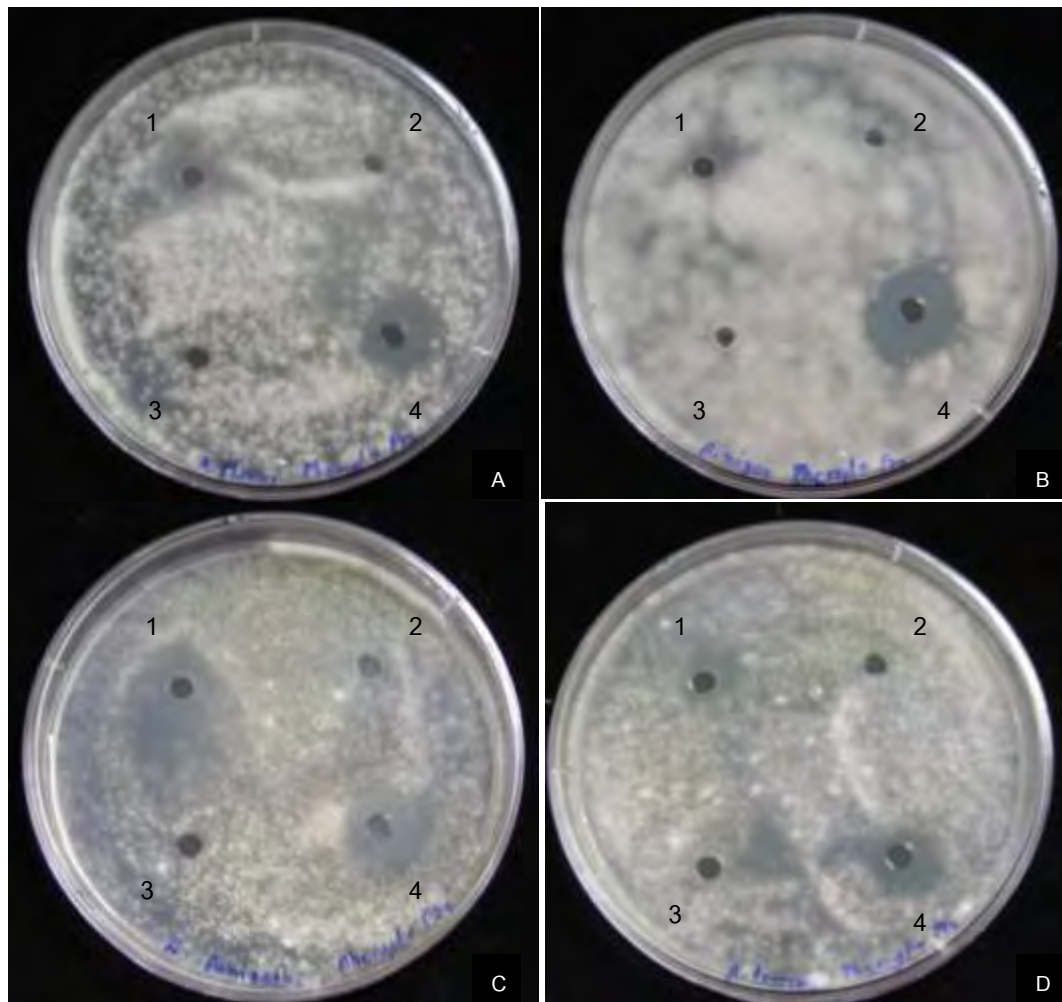
รูปที่ 30 ความสามารถในการยับยั้ง *A. flavus* (A) *A. niger* (B) *A. fumigatus* (C) และ *A. terreus* (D) ของสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโน ภาวะที่ 1 (ฟีนอลอะลานีน) โดย หมายเลข 1 คือ สารสกัด หมายเลข 2 คือ สาร DMSO หมายเลข 3 คือ ไม่หยดสารสกัด และ หมายเลข 4 คือ แอมโฟเทอริซิน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



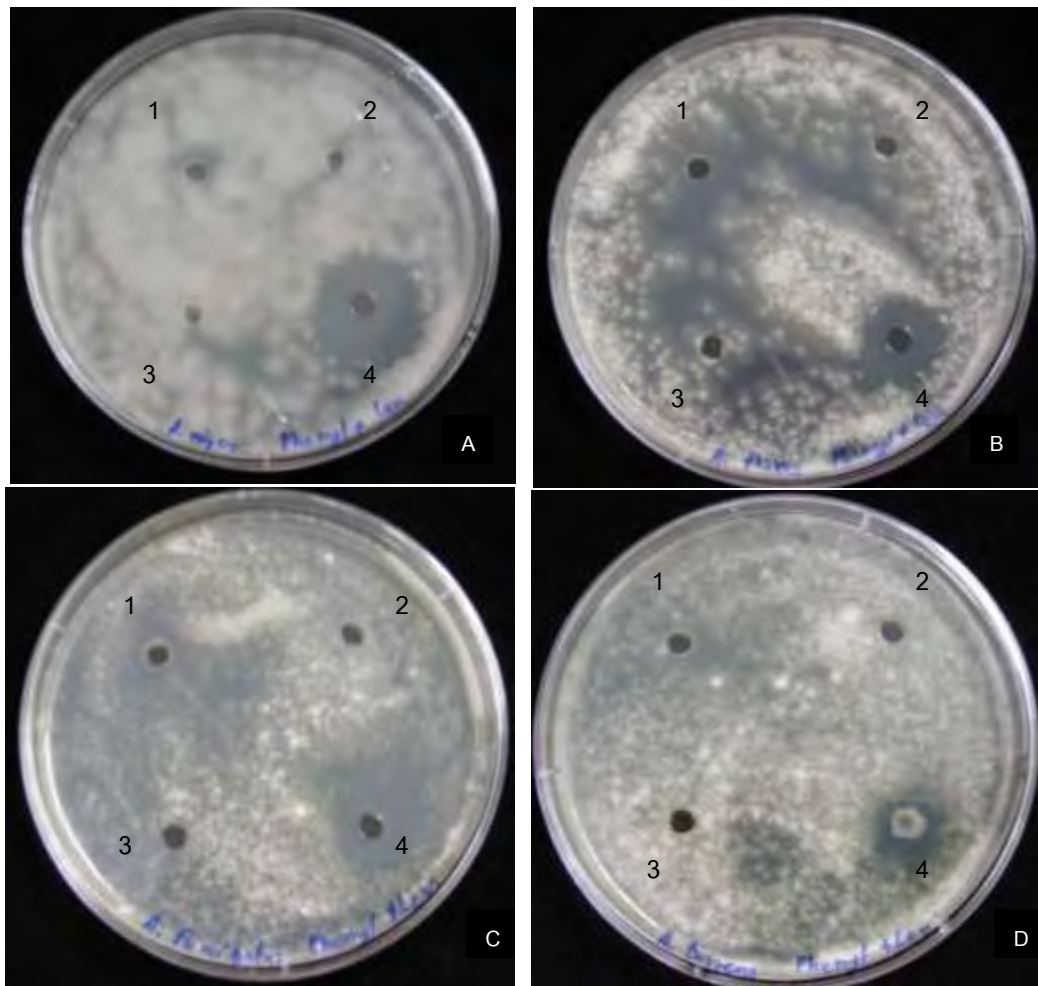
รูปที่ 31 ความสามารถในการยับยั้ง *A. flavus* (A) *A. niger* (B) *A. fumigatus* (C) และ *A. terreus* (D) ของสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 2 (โพรลีน) โดย หมายเลข 1 คือ สารสกัด หมายเลข 2 คือ สาร DMSO หมายเลข 3 คือ ไม่หยดสารสกัด และ หมายเลข 4 คือ แอมฟิเทอริซิน บี ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร



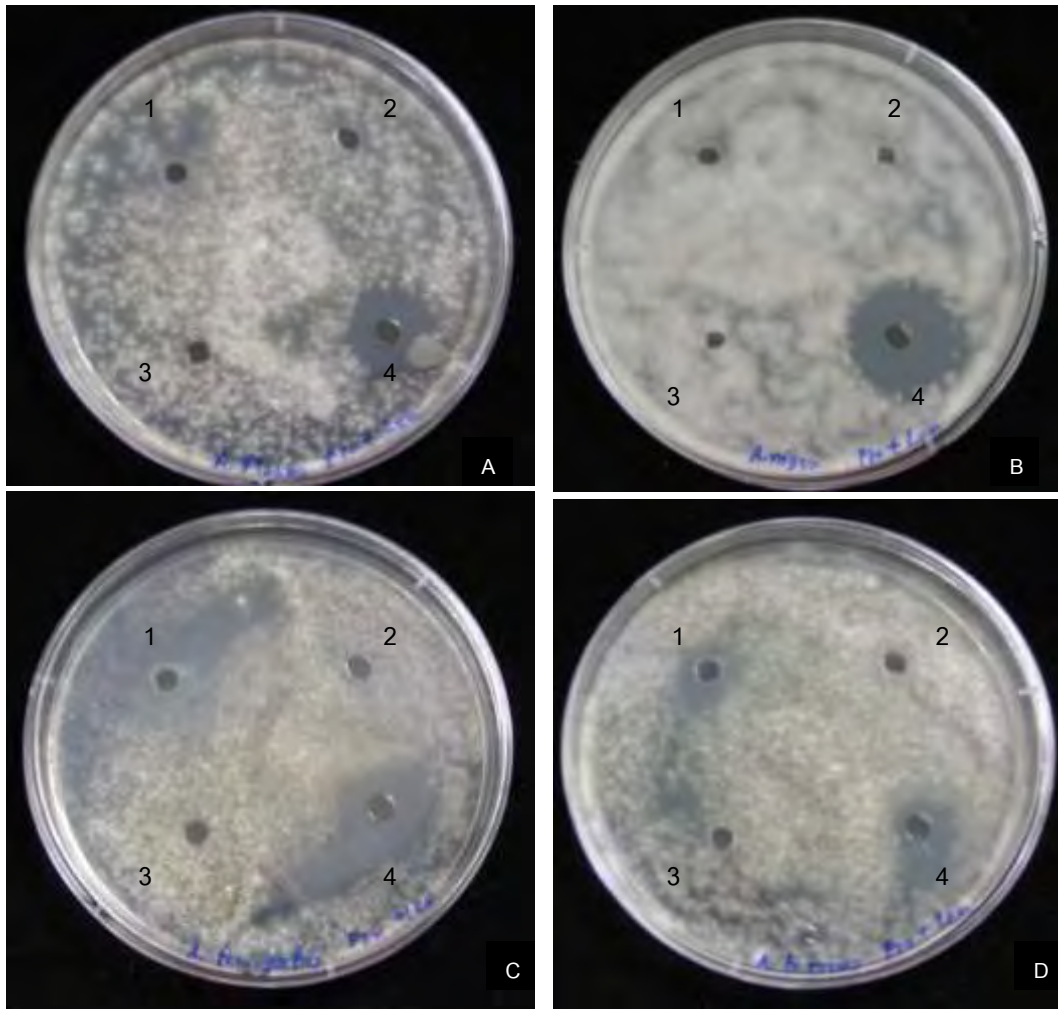
รูปที่ 32 ความสามารถในการยับยั้ง *A. flavus* (A) *A. niger* (B) *A. fumigatus* (C) และ *A. terreus* (D) ของสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโน ภาวะที่ 3 (ลิวซีน) โดย หมายเลข 1 คือ สารสกัด หมายเลข 2 คือ สาร DMSO หมายเลข 3 คือ ไม่หยดสารสกัด และ หมายเลข 4 คือ แอมโฟเทอริซิน บี ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร



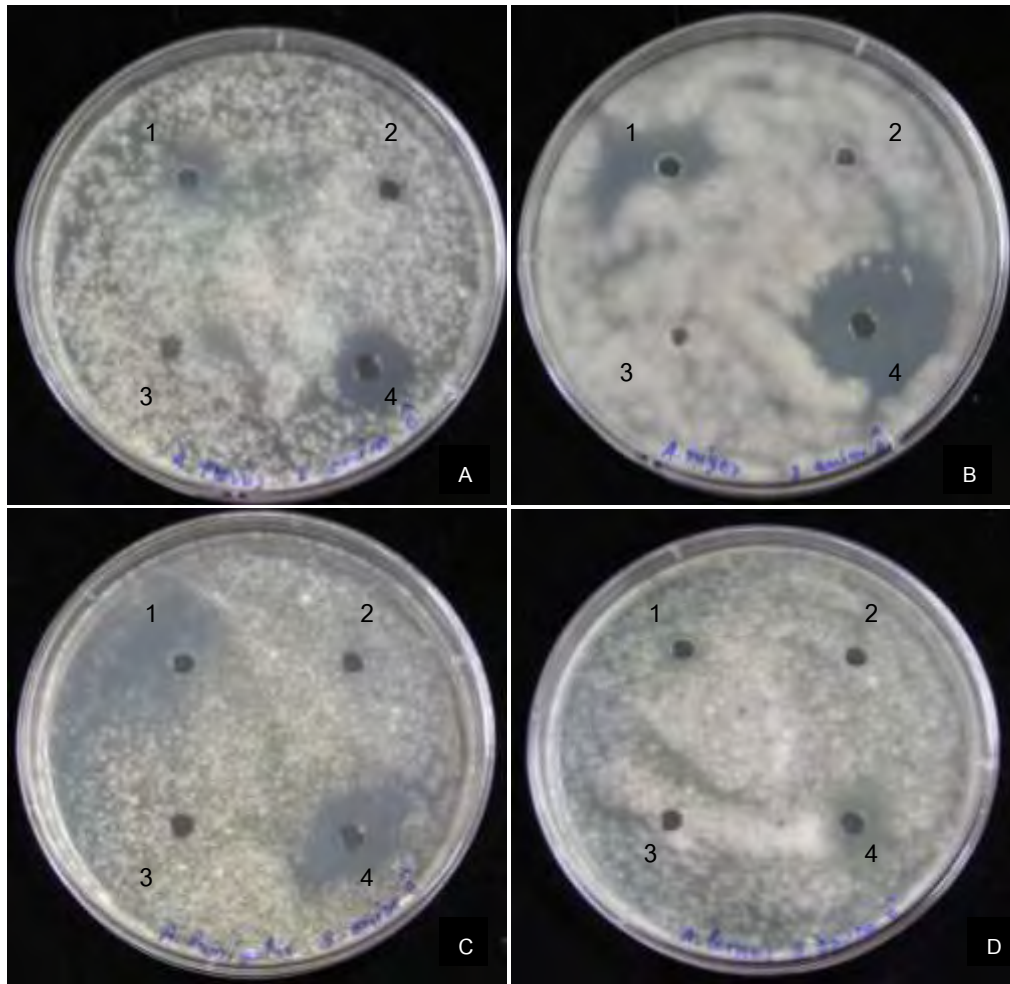
รูปที่ 33 ความสามารถในการยับยั้ง *A. flavus* (A) *A. niger* (B) *A. fumigatus* (C) และ *A. terreus* (D) ของสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโน ภาวะที่ 4 (ฟีนอลอะลานีน และ โพรลีน) โดย หมายเลข 1 คือ สารสกัด หมายเลข 2 คือ สาร DMSO หมายเลข 3 คือ ไม่หยดสารสกัด และ หมายเลข 4 คือ แอมโฟเทอริซิน บี ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร



รูปที่ 34 ความสามารถในการยับยั้ง *A. flavus* (A) *A. niger* (B) *A. fumigatus* (C) และ *A. terreus* (D) ของสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโน ภาวะที่ 5 (ฟีนอลอะลานีน และ ลิวซีน) โดย หมายเลข 1 คือ สารสกัด หมายเลข 2 คือ สาร DMSO หมายเลข 3 คือ ไม่หยดสารสกัด และ หมายเลข 4 คือ แอมฟิเทอริซิน บี ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร



รูปที่ 35 ความสามารถในการยับยั้ง *A. flavus* (A) *A. niger* (B) *A. fumigatus* (C) และ *A. terreus* (D) ของสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 6 (โพรีลิน และ ลิวิซีน) 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 36 ความสามารถในการยับยั้ง *A. flavus* (A) *A. niger* (B) *A. fumigatus* (C) และ *A. terreus* (D) ของสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโน ภาวะที่ 7 (ฟีนอลอะลานีน 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

ตารางที่ 8 เปอร์เซ็นต์การงอกและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์ *Aspergillus* spp. ที่ถูกปนเปื้อนร่วมกับสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโน

กรดอะมิโน	เชื้อรา <i>Aspergillus</i> spp.	เปอร์เซ็นต์การงอก ของสปอร์ (%) (% germination)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอก ของสปอร์ (%) (% 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
โพวรีน	<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

ตารางที่ 8 (ต่อ)

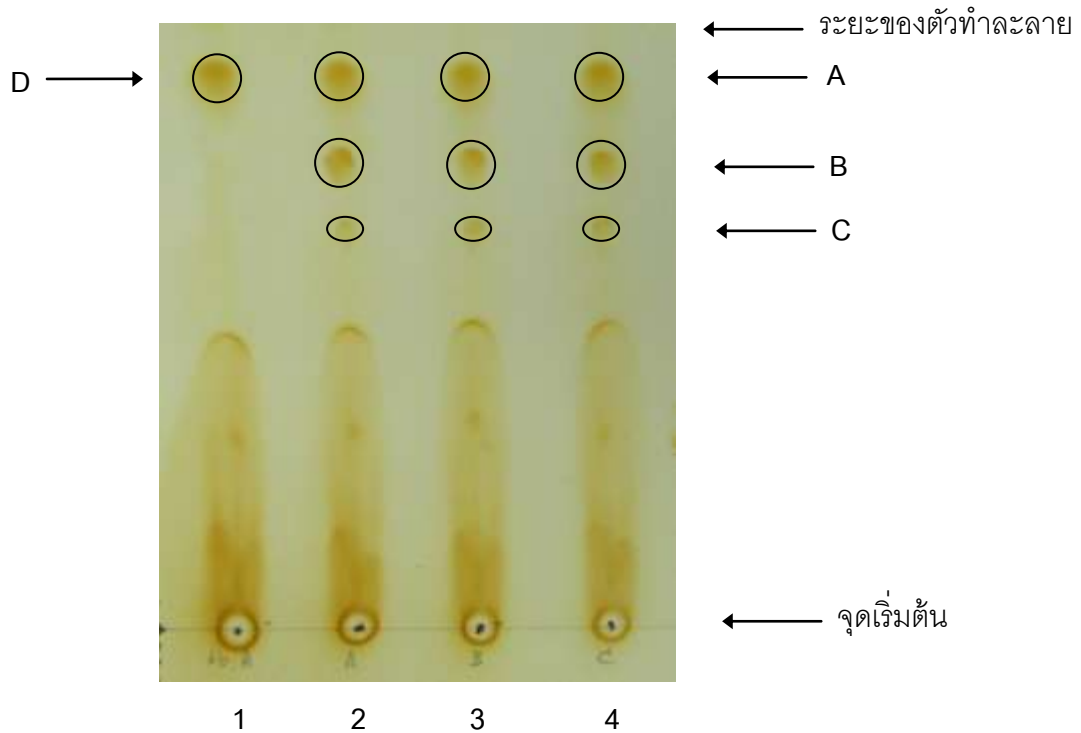
กรดอะมิโน	เชื้อรา <i>Aspergillus</i> spp.	เปอร์เซ็นต์การงอก ของสปอร์ (%) (%germination)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอก ของสปอร์ (%) (% inhibition)
ฟีนิลอะลานีน และโพวรีน	<i>A. flavus</i>	45.07±0.09	54.93±0.09
	<i>A. niger</i>	53.13±0.10	46.87±0.10
	<i>A. fumigatus</i>	31.89±0.08	68.11±0.08
	<i>A. terreus</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
โพวรีน 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 โพวรีน 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 ชุดควบคุม คือ จำนวนสปอร์ที่ขึ้นบนจานอาหาร ภายหลังบ่มสารละลาย DMSO ร่วมกับสปอร์แขวนลอยของ *Aspergillus* spp. โดยจำนวนสปอร์ที่ขึ้นบนจานอาหารชุดควบคุมเทียบเป็น 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 (โพรสลิน และ ลิวซีน) มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *A. terreus* ได้สูงสุด ขณะที่สารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโน ภาวะที่ 7 (ฟีนิลอะลานีน โพรสลิน และ ลิวซีน) มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *A. niger* และ *A. fumigatus* ได้สูงสุด จึงนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (TLC) เทียบกับสารมาตรฐาน ออริโอบาซิดิน เอ โดยใช้ระบบตัวทำละลายคือเอทิลอะซิเตต พบว่าสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 5 (ฟีนิลอะลานีน และ ลิวซีน) ภาวะที่ 6 (โพรสลิน และ ลิวซีน) และภาวะที่ 7 (ฟีนิลอะลานีน โพรสลิน และ ลิวซีน) ประกอบด้วยสารที่มีค่า Rf แตกต่างกัน 3 ชนิด (รูปที่ 37) แต่ละชนิด มีค่า Rf เท่ากับ 0.45 (ตำแหน่ง C) 0.59 (ตำแหน่ง B) และ 0.68 (ตำแหน่ง A) ตามลำดับ ส่วนออริโอบาซิดิน เอ มาตรฐาน มีค่า Rf เท่ากับ 0.68 (ตำแหน่ง D) (รูปที่ 37)

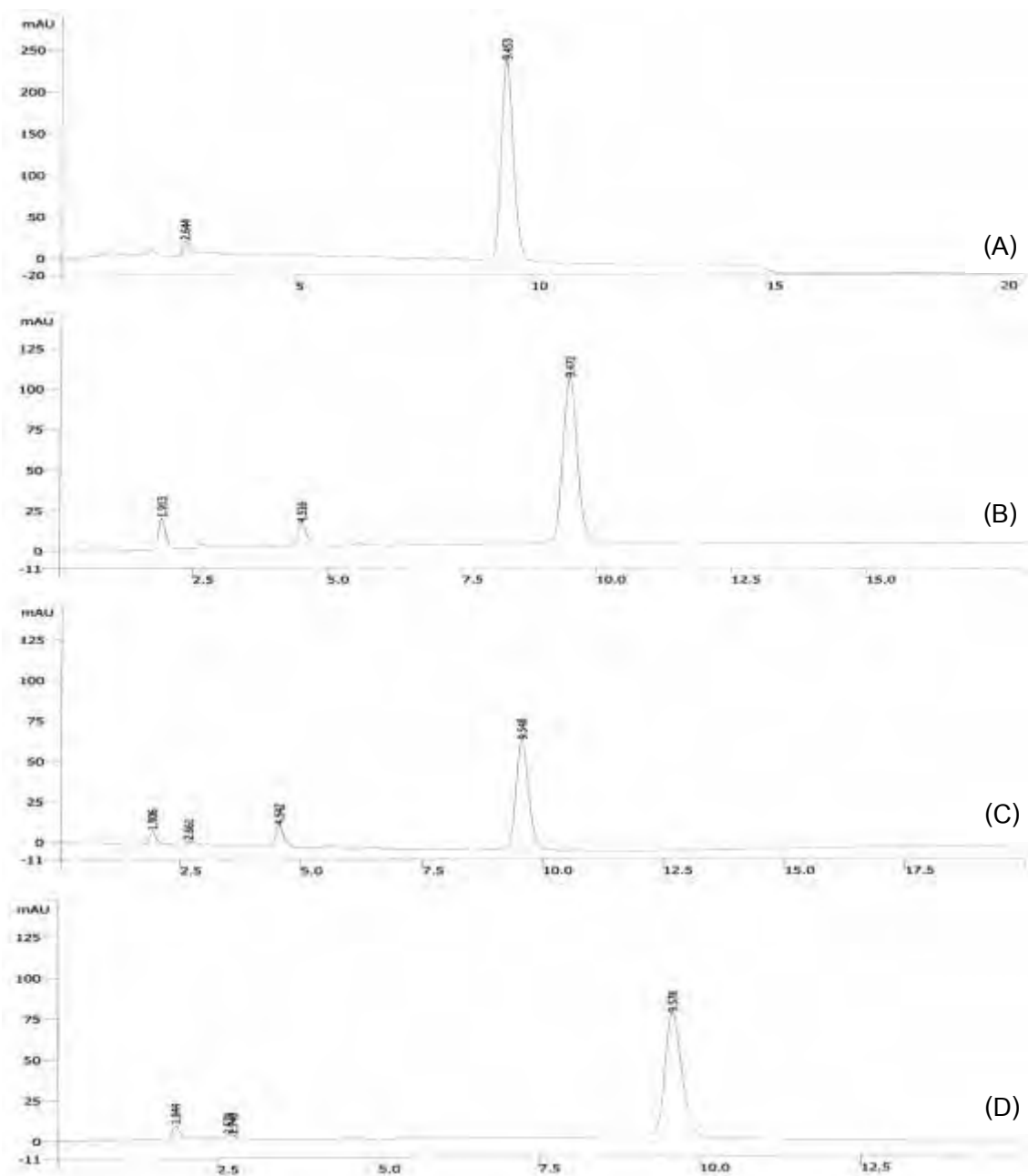


รูปที่ 37 โคโรมาโทรแกรมแสดงผลการตรวจสอบสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา ที่ได้จากเชื้อรา *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโน ด้วยเทคนิค TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลายคือ เอธิลอะซีเตต

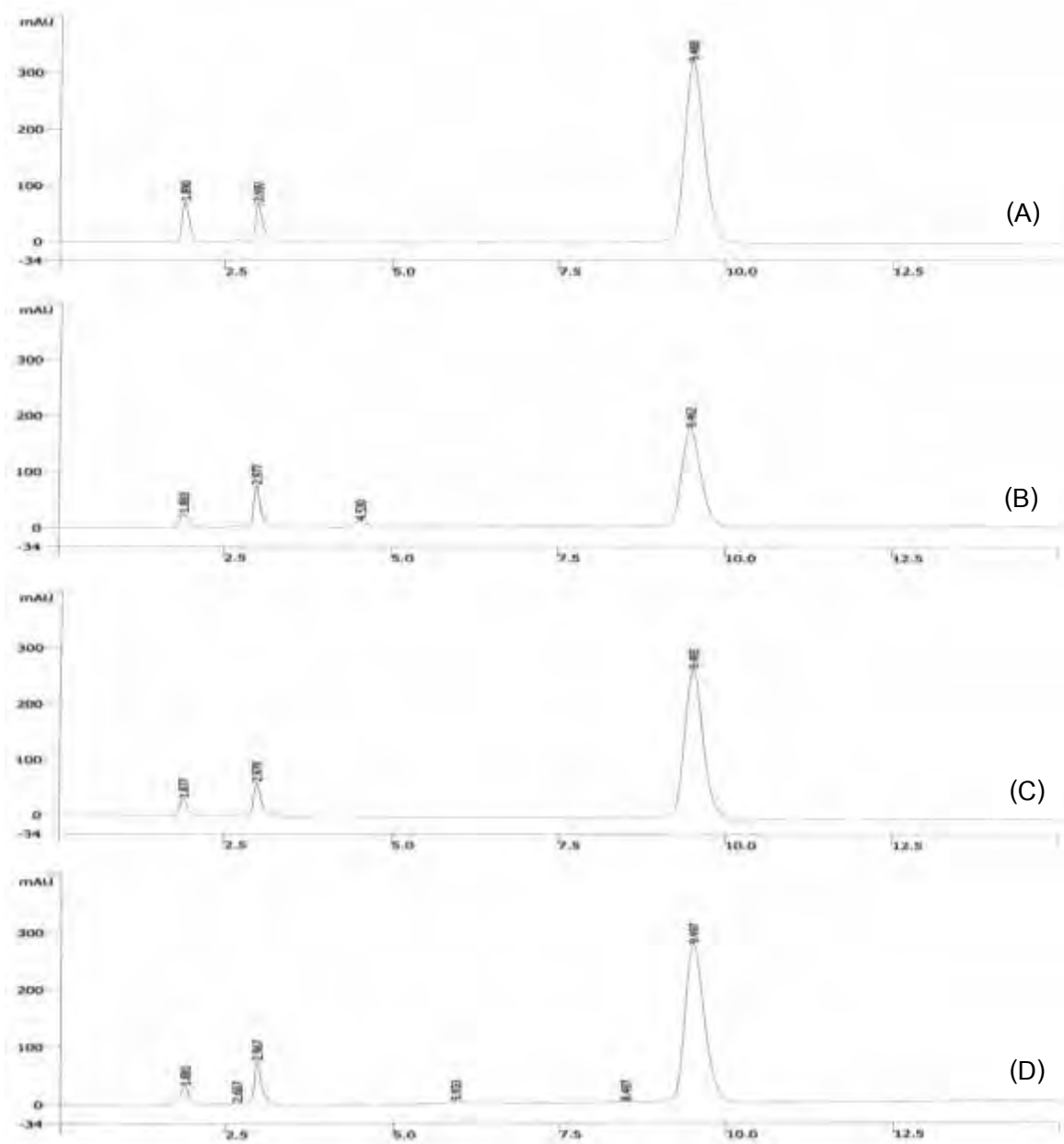
1. สารมาตรฐาน ออร์โทปาทิน เอ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
2. สารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 5 (พีนิลอะลานีน และ ลิวซีน)
3. สารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 6 (โพรลีน และ ลิวซีน)
4. สารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536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

4.2 เทคนิค High Performance Liquid Chromatography

นำสารสกัด *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโน ภาวะที่ 5 (ฟีนิลอะลานีน และ ลิวซีน) ภาวะที่ 6 (โพรีลีน และ ลิวซีน) และภาวะที่ 7 (ฟีนิลอะลานีน โพรีลีน และ ลิวซีน) มาวิเคราะห์โดยการทำให้โครมาโทกราฟีแบบชั้นบางและทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยทำการจุดจุดของสารสกัดที่ปรากฏขึ้นอยู่ในระดับเดียวกันกับออริโอบาซิดิน เอ บนแผ่น TLC มาละลายในตัวทำละลายอะซีโต ไนไตร ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มา วิเคราะห์ด้วยเทคนิค 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 พบว่าสารมาตรฐาน ออริโอบาซิดิน เอ ปรากฏ peak ขึ้นที่เวลา 9.453 ส่วนสารสกัดจากเชื้อ *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโน ภาวะที่ 5 (ฟีนิลอะลานีน และ ลิวซีน) ภาวะที่ 6 (โพรีลีน และ ลิวซีน) และภาวะที่ 7 (ฟีนิลอะลานีน โพรีลีน และ ลิวซีน) ปรากฏ peak ขึ้นที่เวลา 9.472, 9.548 และ 9.578 (รูปที่ 38) เนื่องจาก peak ของสารมาตรฐาน ออริโอบาซิดิน เอ กับสารสกัดที่ใช้วิเคราะห์ทั้ง 3 ภาวะ ปรากฏ peak ขึ้นในเวลาที่ไม่เท่ากันซึ่งอาจจะไม่เป็นสารชนิดเดียวกันจึงได้ทำการวิเคราะห์สารสกัดที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยเทคนิค HPLC อีกครั้ง โดยการผสมสารสกัดกับสารมาตรฐานออริโอบาซิดิน เอ ในอัตราส่วน 2:1 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เพื่อตรวจสอบ peak กราฟของสารสกัดกับสารมาตรฐานว่าเป็น สารชนิดเดียวกันหรือไม่ จากการทดลองพบว่า peak กราฟของสารสกัดจากเชื้อ *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 5 (ฟีนิลอะลานีน และ ลิวซีน) ภาวะที่ 6 (โพรีลีน และ ลิวซีน) และภาวะที่ 7 (ฟีนิลอะลานีน โพรีลีน และ ลิวซีน) รวมเป็น peak เดียวกันกับสารมาตรฐานออริโอบาซิดิน เอ ที่เวลา 9.462, 9.497 และ 9.495 (รูปที่ 39)



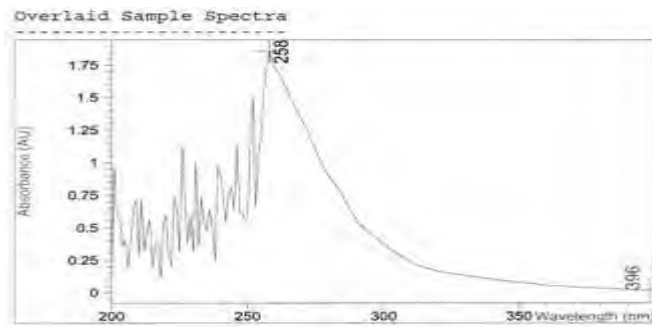
รูปที่ 38 กราฟจากการตรวจสอบด้วย HPLC ของอริโอปาซิดิน เอ ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (A) สารสกัด *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 5 (ฟีนิลอะลานีน และ ลิวซีน) (B) สารสกัด *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 6 (ไพโรลีน และ ลิวซีน) (C) สารสกัด *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 7 (ฟีนิลอะลานีน ไพโรลีน และ ลิวซีน) (D)



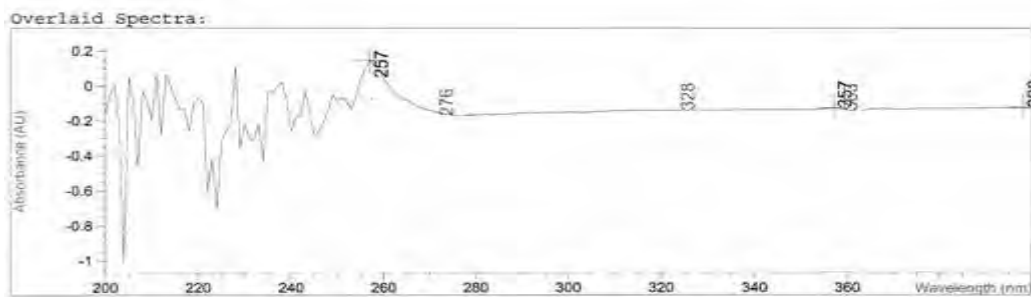
รูปที่ 39 กราฟจากการตรวจสอบด้วย HPLC ของอริโอบาซิดิน เอ ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร (A) สารสกัด *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 5 (ฟีนิลอะลานีน และ ลิวซีน) ผสมสารมาตรฐานอริโอบาซิดิน เอ ในอัตราส่วน 2:1 (B) สารสกัด *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโน ภาวะที่ 6 (ไพโรลีน และ ลิวซีน) ผสมสารมาตรฐานอริโอบาซิดิน เอ ในอัตราส่วน 2:1 (C) สารสกัด *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโน ภาวะที่ 7 (ฟีนิลอะลานีน ไพโรลีน และ ลิวซีน) ผสมสารมาตรฐานอริโอบาซิดิน เอ ในอัตราส่วน 2:1 (D)

4.3 เทคนิค Spectrophotometry สำหรับการวิเคราะห์โปรตีนเบื้องต้นในสารต้านเชื้อรา

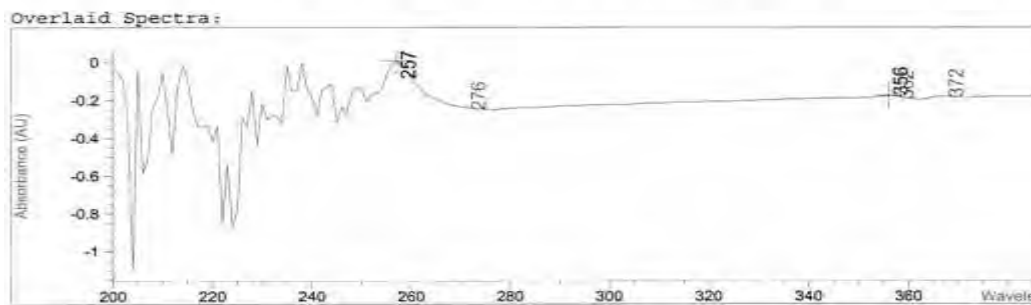
นำสารสกัด *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 5 (ฟีนอลอะลาซีน และ ลิวซีน) ภาวะที่ 6 (ไพโรลีน และ ลิวซีน) และภาวะที่ 7 (ฟีนอลอะลาซีน ไพโรลีน และ ลิวซีน) มาตรวจสอบโดยการทำโครมาโทกราฟีแบบชั้นบางและทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยทำการจุดจุดของสารสกัดที่ปรากฏขึ้นอยู่ในระดับเดียวกันกับออริโอบาซิดิน เอ บนแผ่น TLC มาละลายในตัวทำละลายเมทานอล ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำส่วนของ ของเหลวไปทำการวิเคราะห์โปรตีนเบื้องต้นโดยใช้ Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นช่วง 200-400 นาโนเมตร โดยทำการเปรียบเทียบสเปกตรัมค่าการดูดกลืนแสงของ สารสกัดที่ได้กับสารมาตรฐานออริโอบาซิดิน เอ ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร พบว่าสารสกัดจากเชื้อ *A. pullulans* NRRL 58536 ทั้ง 3 ภาวะ มีค่าสเปกตรัมการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 257 นาโนเมตร ส่วนสารมาตรฐานออริโอบาซิดิน เอ มีค่าสเปกตรัมการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 258 นาโนเมตร (รูปที่ 40)



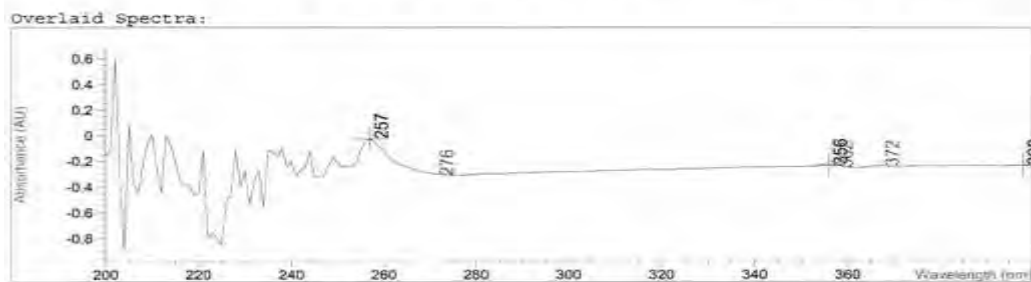
(A)



(B)



(C)

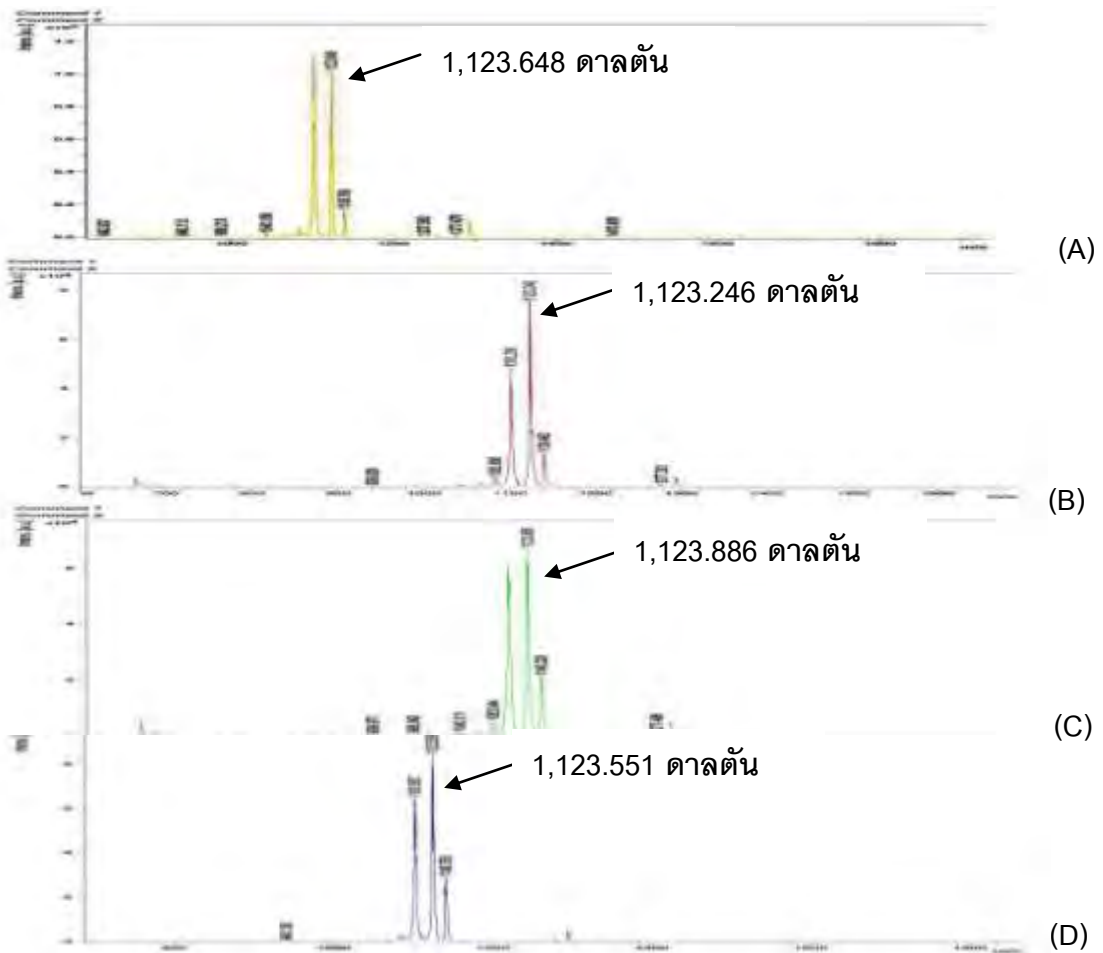


(D)

รูปที่ 40 สเปกตรัมค่าการดูดกลืนแสงจากการทดสอบด้วยเทคนิค Spectrophotometry ของ ออริโอบาซิดิน เอ ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร (A) สารสกัด *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 5 (ฟีนิลอะลานีน และ ลิวซีน) (B) สารสกัด *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 6 (ไพโรลีน และ ลิวซีน) (C) สารสกัด *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 7 (ฟีนิลอะลานีน ไพโรลีน และ ลิวซีน) (D)

4.4 เทคนิค MALDI-TOF Mass Spectrometry สำหรับการวิเคราะห์ น้ำหนักโมเลกุลของสารต้านเชื้อรา

ผลการทดลอง นำสารสกัด *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโน ภาวะที่ 5 (ฟีนิลอะลานีน และ ลิวซีน) ภาวะที่ 6 (โพรลีน และ ลิวซีน) และภาวะที่ 7 (ฟีนิลอะลานีน โพรลีน และ ลิวซีน) มาตรวจสอบโดยการทำให้โครมาโทกราฟีแบบชั้นบางและทำให้บริสุทธิ์บางส่วน โดยทำการจุดจุดของสารสกัดที่ปรากฏขึ้น อยู่ในระดับเดียวกันกับออริโอบาซิดิน 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 41)



รูปที่ 41 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 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโน ภาวะที่ 6 (ไพโรลีน และ ลิวซีน) (C) สารสกัด *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 7 (ฟีนิลอะลานีน ไพโรลีน และ ลิวซีน) (D)

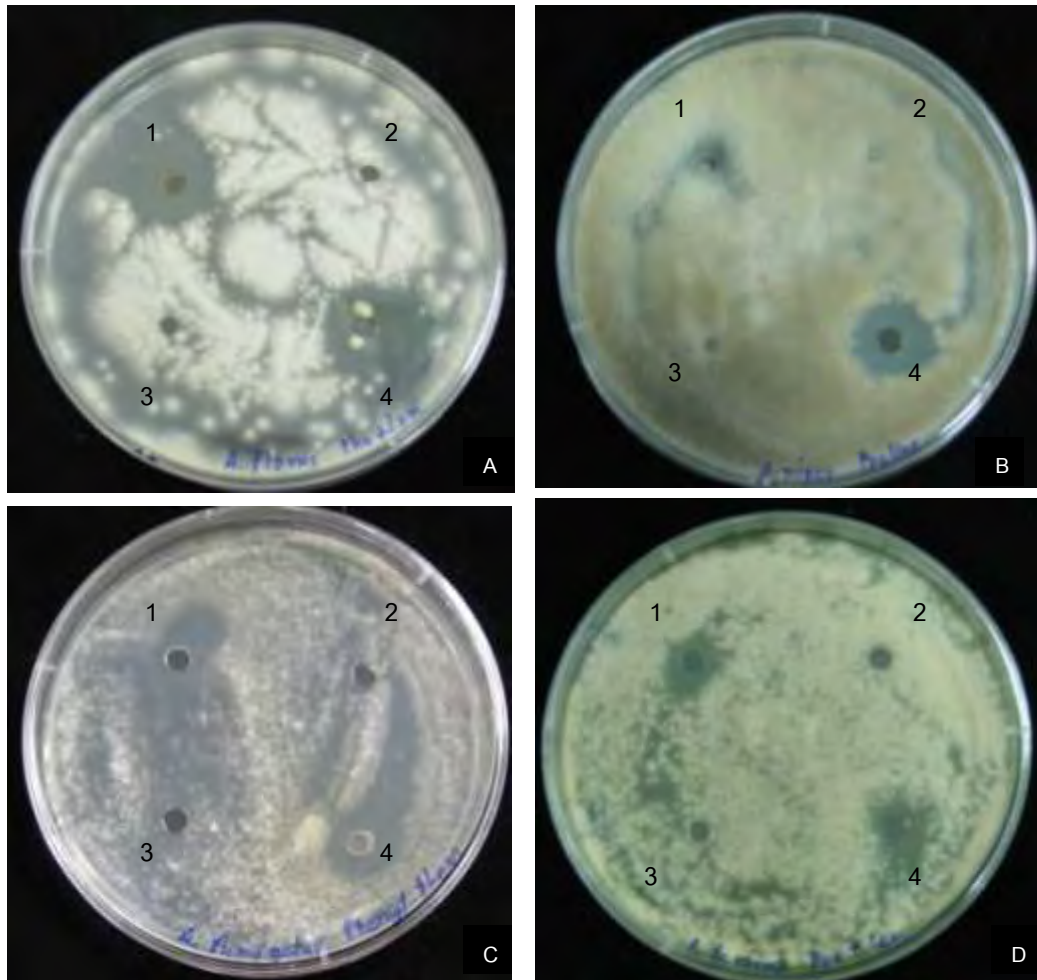
5. ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพสารต้านเชื้อราที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

5.1 วิธี Well diffusion

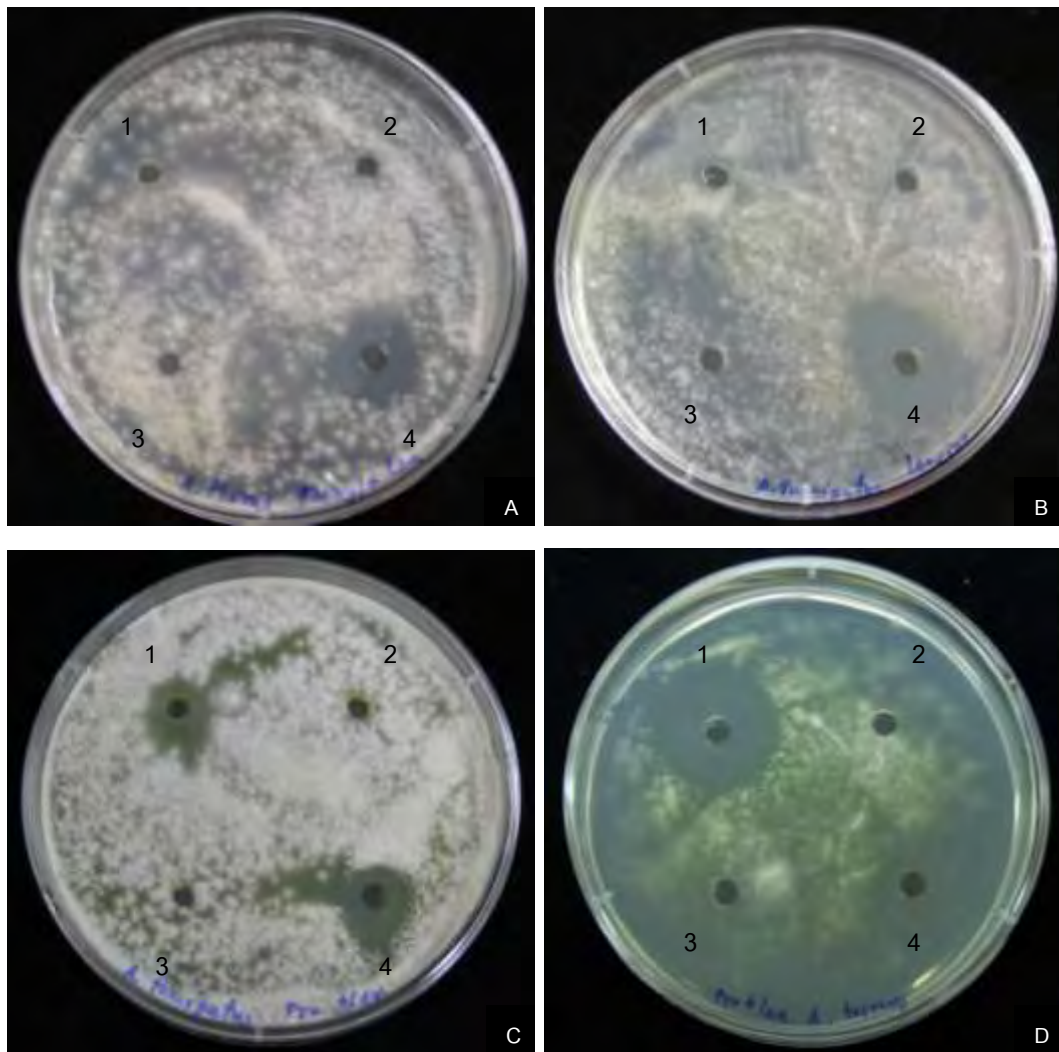
นำสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 5 (พีนิลอะลานีน และ ลิวซีน) ภาวะที่ 6 (ไพโรลีน และ ลิวซีน) และภาวะที่ 7 (พีนิลอะลานีน ไพโรลีน และ ลิวซีน) ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบางมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อราก่อโรคในกลุ่ม *Aspergillus* spp. อีกครั้ง ด้วยวิธี Well diffusion บนจานเลี้ยงเชื้อที่เคลือบด้วยสปอร์ของ *Aspergillus* spp. สังเกตบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้นและคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ได้ผลดังตารางที่ 9 โดยพบว่าสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 5 (พีนิลอะลานีน และ ลิวซีน) มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *A. flavus* ได้สูงสุด ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 183.00 ± 0.02 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 42) ส่วนสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 6 (ไพโรลีน และ ลิวซีน) พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *A. terreus* ได้สูงสุด ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 168.00 ± 0.06 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 43) ขณะที่สารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโน ภาวะที่ 7 (พีนิลอะลานีน ไพโรลีน และ ลิวซีน) มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *A. niger* และ *A. fumigatus* ได้สูงสุด ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 191.00 ± 0.24 และ 190.00 ± 0.05 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (รูปที่ 44)

ตารางที่ 9 ความสามารถในการยับยั้ง เชื้อรา *Aspergillus* spp. ของสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน โดยวิธี Well diffusion

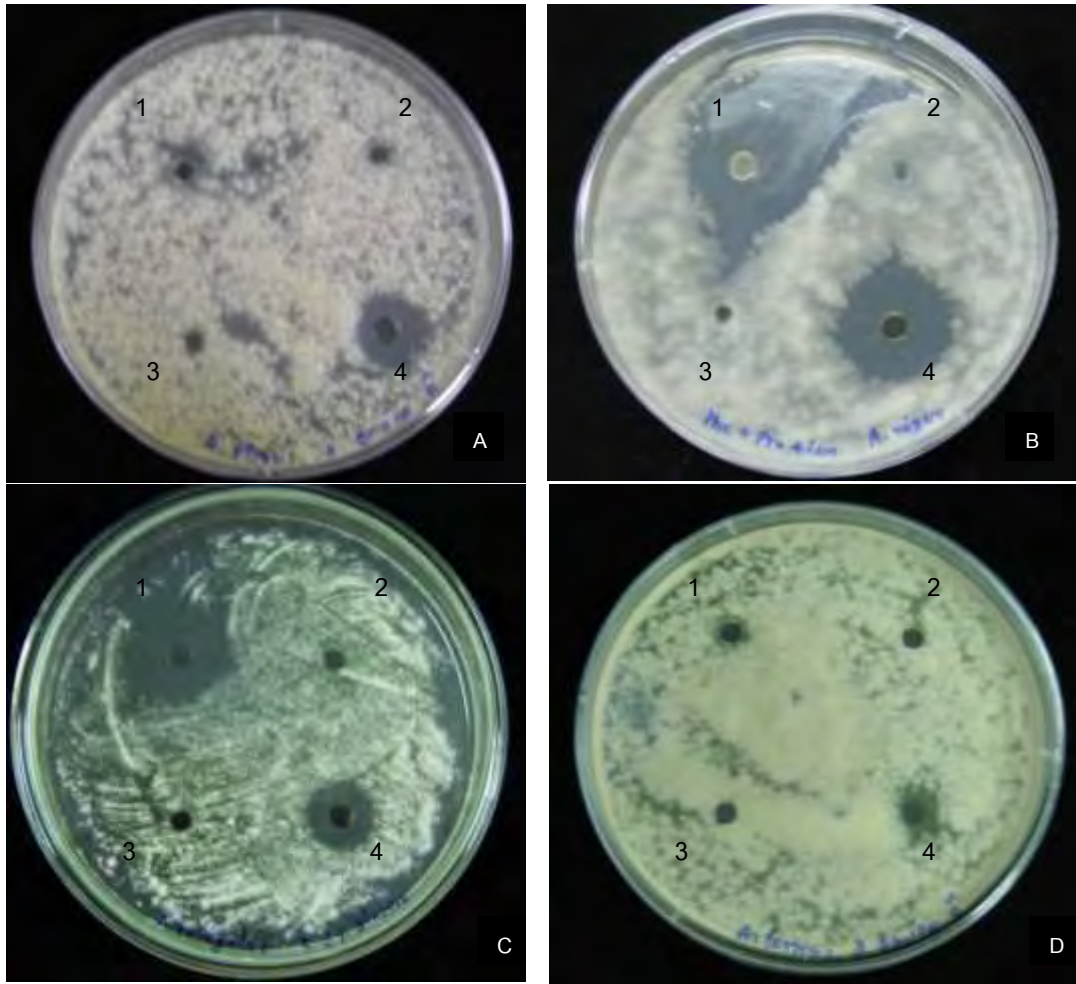
เชื้อรา <i>Aspergillus</i> spp.	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (% inhibition) จากสารสกัดที่ทำบริสุทธิ์บางส่วน (%)		
	ฟีนอลอะลานีน และลิวซีน	โพรลีน และลิวซีน	ฟีนอลอะลานีน โพรลีน และลิวซีน
<i>A. flavus</i>	183.00±0.02	99.00±0.01	105.00±0.04
<i>A. niger</i>	105.00±0.07	20.00±0.01	191.00±0.24
<i>A. fumigatus</i>	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 42 ความสามารถในการยับยั้ง *A. flavus* (A) *A. niger* (B) *A. fumigatus* (C) และ *A. terreus* (D) ของสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโน ภาวะที่ 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 43 ความสามารถในการยับยั้ง *A. flavus* (A) *A. niger* (B) *A. fumigatus* (C) และ *A. terreus* (D) ของสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโน ภาวะที่ 6 (โพรีลิน และ ลิวซีน) ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน โดย หมายเลข 1 คือ สารสกัด หมายเลข 2 คือ สาร DMSO หมายเลข 3 คือ ไม่หยดสารสกัด และ หมายเลข 4 คือ แอมโฟเทอริน บี ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร



รูปที่ 44 ความสามารถในการยับยั้ง *A. flavus* (A) *A. niger* (B) *A. fumigatus* (C) และ *A. terreus* (D) ของสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 7 (ฟีนิลอะลานีน 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 (โพวรีน และ ลิวซีน) และภาวะที่ 7 (ฟีนิลอะลานีน โพวรีน 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 (โพวรีน และ ลิวซีน) ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *A. terreus* ได้สูงสุด 71.91 ± 0.07 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่สารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 7 (ฟีนิลอะลานีน โพวรีน และ ลิวซีน) ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *A. niger* และ *A. fumigatus* ได้สูงสุด 77.00 ± 0.20 และ 79.17 ± 0.24 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 10)

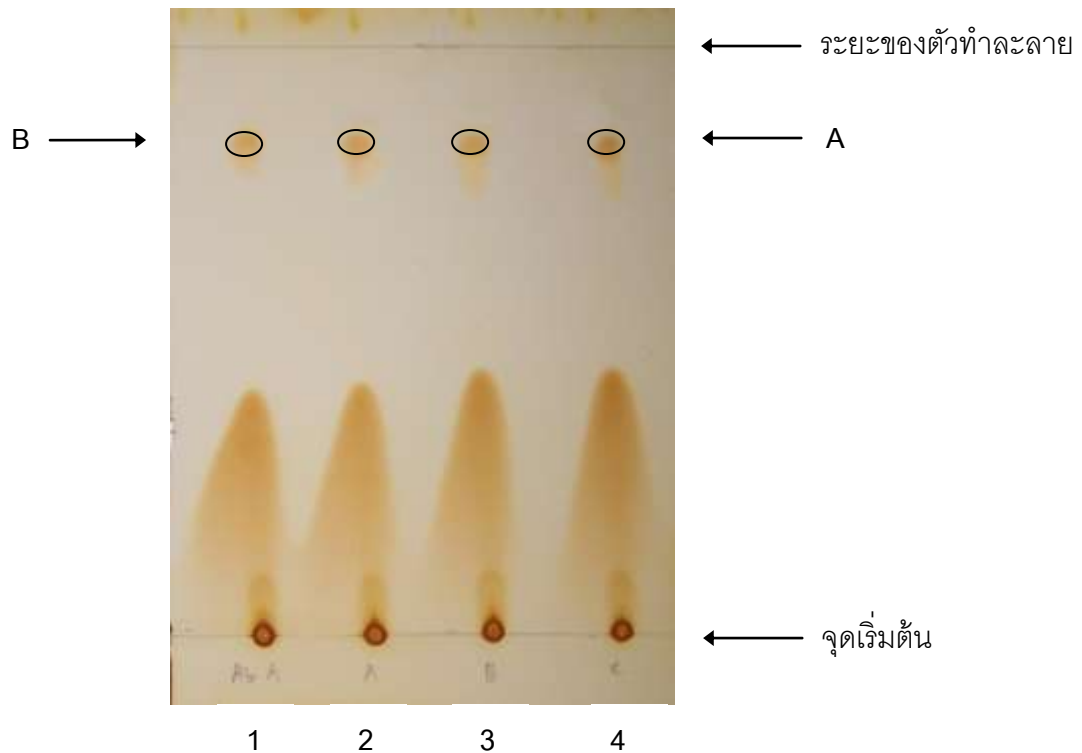
ตารางที่ 10 เปอร์เซ็นต์การงอกและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์ *Aspergillus* spp. ที่ถูกบ่มร่วมกับสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโน ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

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 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนในภาวะที่ 5 (ฟีนิลอะลานีน และ ลิวซีน) ภาวะที่ 6 (โพรลีน และ ลิวซีน) และภาวะที่ 7 (ฟีนิลอะลานีน โพรลีน และ ลิวซีน) ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง มาตรวจสอบสารสกัดอีกครั้ง โดยเปรียบ เทียบกับ สารมาตรฐาน ออริโอบาซิดิน เอ โดยใช้ระบบตัวทำละลายคือ เอธิลอะซิเตต พบว่าสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโน ทั้ง 3 ภาวะ ประกอบด้วยสารที่มีค่า Rf ภาวะละ 1 ชนิด (รูปที่ 45) แต่ละภาวะมีค่า Rf เท่ากับ 0.68 (ตำแหน่ง A) ส่วนออริโอบาซิดินเอ มาตรฐาน มีค่า Rf เท่ากับ 0.68 (ตำแหน่ง B) (รูปที่ 45)



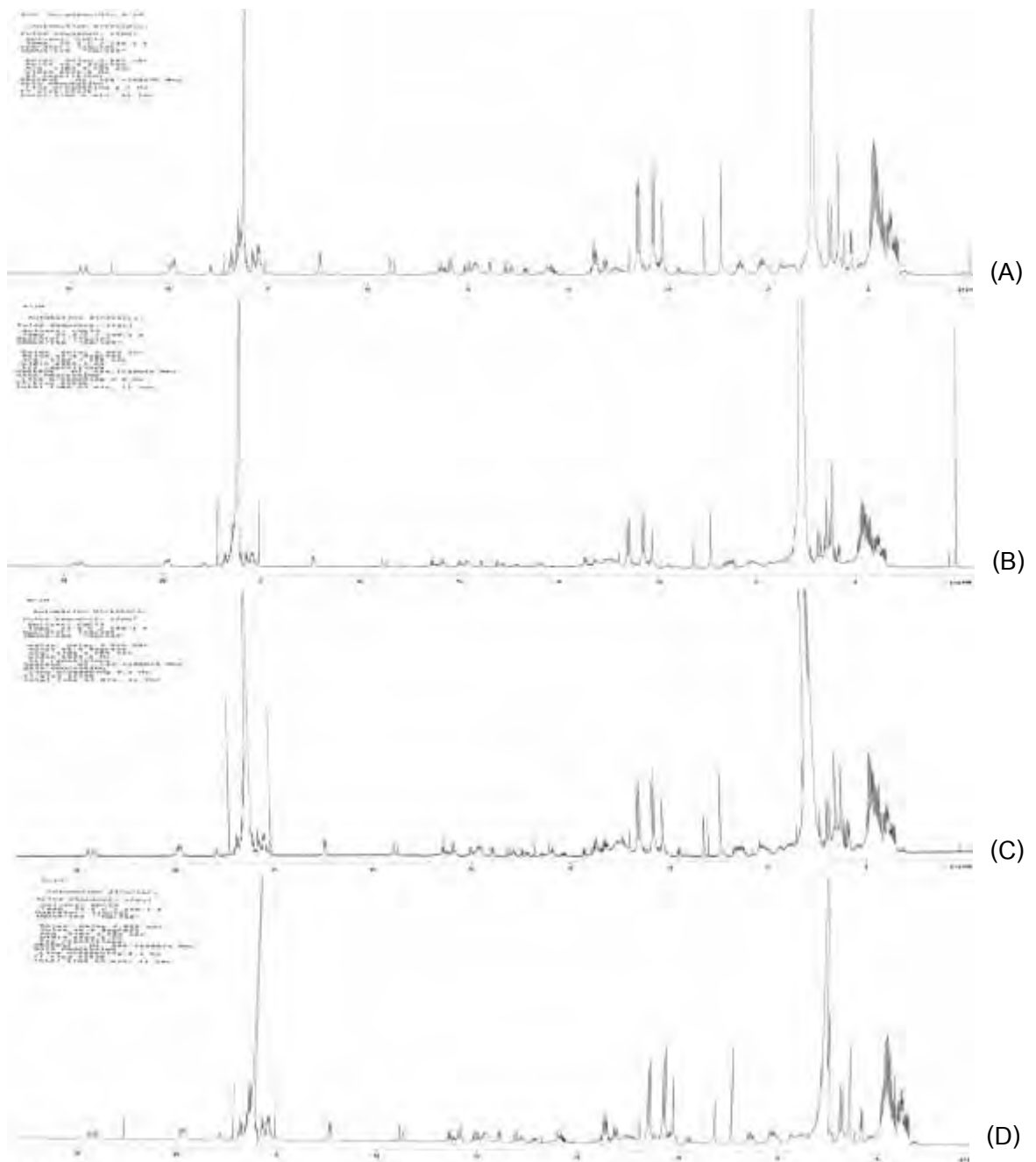
รูปที่ 45 โคโรมาโทแกรมแสดงผลการตรวจสอบสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา ที่ได้จากเชื้อรา *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโน ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน ด้วยเทคนิค TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลายคือ เฮกซิลอะซีเตต

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

6. วิเคราะห์โครงสร้างสารต้านเชื้อราที่ผลิตได้

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

นำสารสกัด *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโน ภาวะที่ 5 (ฟีนอลอะลานีน และ ลิวซีน) ภาวะที่ 6 (โพรีลีน และ ลิวซีน) และภาวะที่ 7 (ฟีนอลอะลานีน โพรีลีน และ ลิวซีน) มาตรวจสอบโดยการโครมาโทกราฟีแบบชั้นบางและทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยการจุดจุดของสารสกัดที่ปรากฏขึ้นอยู่ในระดับเดียวกันกับออริโอบาซิดิน เอ บนแผ่น TLC มาละลายในตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำส่วนของของเหลวไปทำการวิเคราะห์หาโครงสร้างสารสกัด โดยใช้วิธี $^1\text{H-NMR}$ ซึ่งนิวเคลียสไอที่ใช้ในสนามแม่เหล็กคือโปรตอน (Proton) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ในช่วงความยาวคลื่นวิทยุ 500 เมกะเฮิรตซ์ จากนั้นทำการเปรียบเทียบสเปกตรัมของสารสกัดที่ได้กับสารมาตรฐาน ออริโอบาซิดิน เอ ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร พบว่าสารสกัดจากเชื้อ *A. pullulans* NRRL 58536 ทั้ง 3 ภาวะ มีผลของสเปกตรัมสอดคล้องกับสารมาตรฐานออริโอบาซิดิน เอ (รูปที่ 46)



รูปที่ 46 โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ ออริโอบาซิดิน เอ ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (A) สารสกัด *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโน ภาวะที่ 5 (ฟีนอลอะลาanine และ ลิวซีน) (B) สารสกัด *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 6 (ไพโรลีน และ ลิวซีน) (C) สารสกัด *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 7 (ฟีนอลอะลาanine ไพโรลีน และ ลิวซีน) (D)

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

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 เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลาจะเปลี่ยนเป็นสีเข้มขึ้นจากการสร้างเม็ดสีเมลานิน และมีผนังหนาขึ้น บางครั้งมีเอนโด โคนิเดียเกิดขึ้นจากภายใน ด้านข้าง หรือปลายของเส้นใย ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่อธิบายโดย Hermanides-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* สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคในกลุ่ม *Candida* spp. และกลุ่มอื่นๆ ได้แล้ว ยังสามารถยับยั้งเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* spp. บางสายพันธุ์ได้ดี เช่น *A. terreus*, *A. nidulans* และ *A. clavatus* เป็นต้น แต่พบว่ามีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ยับยั้งได้ไม่ดีต่อเชื้อรา *A. fumigatus*, *A. flavus* และ *A. niger* (Takesako และคณะ, 1993) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า สารสกัดจากเชื้อรา *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อนที่คัดแยกได้จากประเทศไทยสามารถ ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *A. fumigates*, *A. flavus* และ *A. terreus* ได้ (Lotrakul และคณะ, 2009)

ซึ่งการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยวิธีนี้เป็นวิธีที่นิยมใช้ทดสอบสารต้านจุลชีพ โดยเฉพาะกับสารที่มีปริมาณน้อย โดยเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งจะสัมพันธ์กับปริมาณสารที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลชีพ (Gaydos และ Harrington, 1982) แต่เนื่องด้วยจากการทดลอง สารที่สกัดได้จาก *A. pullulans* ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา นั้นยังเป็นสารสกัดหยาบ 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 อาการของโรคมี่ตั้งแต่เล็กน้อยจนถึงเป็นสาเหตุให้ผู้ป่วยเสียชีวิต ส่วนใหญ่ทำให้เกิดการ ติดเชื้อในร่างกายได้หลายระบบ ได้แก่ หู ตา จมูก และปอด การติดเชื้อรานี้บางคนเชื้อจะลุกลามไปยังกระดูก สมอง เยื่อหุ้มสมอง ระบบประสาท หรือเกิดเนื้อตายเนื่องมาจากการติดเชื้อที่อวัยวะภายในต่างๆ (Schett และ คณะ, 1998) เชื้อราในสกุลนี้ที่ก่อโรครุนแรงได้แก่ *A. fumigatus* *A. flavus* *A. niger* และ *A. terreus* (พรพรรณ อิมวิททยา, 2538)

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

3. ศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารต้านเชื้อรา

3.1 ศึกษาหาช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารต้านเชื้อราโดยใช้เทคนิค Spectrophotometry

จากการทดลองนำเชื้อรา *A. pullulans* NRRL 58536 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* spp. ได้สูงสุด จึงนำมาศึกษาหาช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารต้านเชื้อรา โดยในการทดลองเป็นการเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบ Fed batch คือเป็นการเติมอาหารเข้าไปเพิ่มโดยไม่มีการถ่ายอาหารที่เพาะเลี้ยงเชื้อแล้วออกมา ซึ่งมี ข้อดีคือ ทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโตเป็นจำนวนมาก และทำให้ได้มวลของเซลล์ในปริมาณสูง (สมใจ ศิริโชค, 2547) พบว่าในช่วงเวลา 0-6 ชั่วโมง (lag phase) เป็นช่วงการปรับตัวของเซลล์ถ้าเชื้อที่เติมลงไปในการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงจำนวนของเซลล์จะเป็นศูนย์ในช่วงระยะเวลาหนึ่ง แสดงถึงการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่ และเกี่ยวข้องกับกลไกการสังเคราะห์เอนไซม์ที่จำเป็นสำหรับเจริญในสภาวะแวดล้อมนี้ จากนั้นในช่วงเวลา 24 ชั่วโมงพบว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตสูงสุด ซึ่งวัดค่าความขุ่นของเซลล์ได้ 17.37 ± 0.01 และนับจำนวนเซลล์ได้ $12.40 \pm 0.03 \times 10^8$ เซลล์/มิลลิลิตร จึงจัดเซลล์อยู่ในช่วงเอกซ์โปเนนเชียล (exponential หรือ log phase) เป็นช่วงที่มีสมดุลของการเจริญการสังเคราะห์สารที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์เพิ่มขึ้นด้วยอัตราที่คงที่ ดังนั้นเซลล์จึงแบ่งตัวประชากรเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า ในช่วงเวลา คงที่ ช่วงเวลาหลังจากชั่วโมงที่ 24 พบว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตลดลง เมื่อครบเวลา 56 ชั่วโมง ได้ทำการเติม อาหารสูตร Production II ปริมาตร 1/5 ของอาหารสูตร Production I ลงไป และทำการเลี้ยงต่ออีก 78 ชั่วโมง พบว่าที่เวลา 96 ชั่วโมง เซลล์มีการเจริญเติบโตสูงขึ้นแต่ ต่ำกว่าในช่วงเวลาที่ 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) ซึ่งเป็นสารที่เชื้อราสร้างขึ้นมาเพื่อตอบสนอง ต่อความจำเป็นบางประการ เช่น เพื่อป้องกันตนเองจากเชื้อราชนิดอื่น เป็นต้น (เพ็ญแข วันไชยธนวงศ์, 2544)

3.2 ศึกษาชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน

จากการทดลองนำเชื้อรา *A. pullulans* NRRL 58536 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* spp. ได้สูงสุด จึงนำมาทำการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารต้านเชื้อราจากแหล่ง คาร์บอน 2 ชนิด คือ กลูโคส และ ซูโครส ที่มีความเข้มข้น 1.5 2.0 และ 2.5% (w/v) พบว่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง จากสารสกัด *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งคาร์บอนกลูโคสความเข้มข้น 2.5% (w/v) มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* spp. ทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *A. flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus* และ *A. terreus* ได้สูงสุด ซึ่งมี

เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 75.00 ± 0.00 , 60.00 ± 0.05 , 60.00 ± 0.00 และ 50.00 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อทำการทดสอบความสามารถในการต้านเชื้อรา โดยคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การออกของสปอร์ และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์ 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 ซึ่งได้สอดคล้องกับรายงานผลการทดลองเกี่ยวกับการใช้แหล่งคาร์บอนกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่ามีการสังเคราะห์เอนไซม์ Phenoxazinone และยาปฏิชีวนะ Actinomycin ได้ปริมาณสูงขึ้น เนื่องจากกลูโคสไปมีผลต่อการเพิ่ม อัตราการเจริญของเชื้อซึ่งจะไปมีผลต่อการเพิ่มการผลิต สารประกอบทุติยภูมิ (Gallo และ Katz, 1993)

และโดยธรรมชาติเซลล์ของสิ่งมีชีวิตรวมถึงจุลินทรีย์ต้องการสารอาหารบางอย่าง สำหรับการเจริญเติบโตสารอาหารเหล่านี้จะต้องมีธาตุซึ่งเป็นส่วนประกอบและโครงสร้างของเซลล์ โดยธาตุเหล่านี้มีความจำเป็นต่อกระบวนการสังเคราะห์ ซึ่งองค์ประกอบหลักของจุลินทรีย์คือ คาร์บอน จุลินทรีย์ที่ได้พลังงานจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารอินทรีย์ในปริมาณที่มากพอจะเป็นแหล่งพลังงานที่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ (เพ็ญแข วันไชยธนวงศ์, 2544)

3.3 ศึกษาการใช้แหล่งอาหารเสริม

จากการศึกษาชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน พบว่าสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งคาร์บอนกลูโคสความเข้มข้น 2.5% (w/v) มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราก่อโรคในกลุ่ม *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 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโน ภาวะที่ 5 (ฟีนิลอะลานีน และ ลิวซีน) มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *A. flavus* ได้สูงสุด ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 175.00 ± 0.05 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริม กรดอะมิโนภาวะที่ 6 (โพรลีน และ ลิวซีน) พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *A. terreus* ได้สูงสุด ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 120.00 ± 0.01 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่สารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโน ภาวะที่ 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 (โพรีลีน และ ลิวซีน) สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *A. terreus* ได้สูงสุด 65.89 ± 0.08 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่สารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 7 (ฟีนิลอะลานีน โพรีลีน และ ลิวซีน) สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *A. niger* และ *A. fumigatus* ได้สูงสุด 69.91 ± 0.06 และ 77.96 ± 0.06 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และได้เคยมีรายงานผลการทดลองเกี่ยวกับ การใช้กรดอะมิโนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสารต้านเชื้อรา ทำการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งด้วยเชื้อรา *Candida albicans* พบว่าสารต้านเชื้อราดังกล่าวสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งได้ (Mittendorf และคณะ, 2002)

จุลินทรีย์บางชนิดต้องการไนโตรเจนในสารอินทรีย์ เช่น กรดอะมิโน โดยแหล่งของไนโตรเจนได้แก่ ถั่วเหลือง ถั่วลิสง ปลา เนื้อสัตว์ ยีสต์สกัด เป็นต้น ซึ่งไนโตรเจน จัดเป็นองค์ประกอบของเซลล์ร้อยละ 10 ของน้ำหนักเซลล์ ดังนั้นในอาหารเลี้ยงเชื้อควรมีปริมาณไนโตรเจนที่เพียงพอ สำหรับเซลล์ที่ต้องการ (เพ็ญแข วันไชยธนวงศ์, 2544) และนอกจากนี้ได้มีรายงานว่าออริโอบาซิดิน เป็นสารกลุ่มเดปซิเปปไทด์แบบวงแหวน (cyclic depsipeptide) ประกอบด้วยกรดแอสปาร์ทิก 8 ชนิด และกรดไฮดรอกซีลิวซีน 1 ชนิด ออริโอบาซิดิน มีโครงสร้าง 18 ชนิด และมี โครงสร้าง ของกรดอะมิโนที่เป็นโครงสร้างหลักใน ทุกโครงสร้าง 3 ชนิด คือ ฟีนิลอะลานีน โพรีลีน และ ลิวซีน (Takesako และคณะ, 1993) ดังนั้นกรดอะมิโนทั้ง 3 ชนิด น่าจะมีบทบาทในการชักนำให้เซลล์ผลิตสารต้านเชื้อราได้ประสิทธิภาพดีขึ้น

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 (โพรีลีน และ ลิวซีน) มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *A. terreus* ได้สูงสุด ขณะที่สารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 7 (ฟีนิลอะลานีน โพรีลีน และ ลิวซีน) มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *A. niger* และ *A. fumigatus* ได้สูงสุด จึงนำมา

ตรวจสอบด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง เทียบกับสารมาตรฐาน ออริโอบาซิดิน เอ โดยใช้ระบบตัวทำละลายคือเอทิลอะซิเตต พบว่าสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 5 (ฟีนิลอะลานีน และ ลิวซีน) ภาวะที่ 6 (โพรสลิน และ ลิวซีน) และ ภาวะที่ 7 (ฟีนิลอะลานีน โพรสลิน 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 ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งที่ยิยมใช้ในการแยกสาร การทำให้สารบริสุทธิ์ หรือใช้ระบุชนิด ของสารและจำนวนสารที่เป็นองค์ประกอบในของผสม โดยอาศัยหลักการที่สารต่างชนิดกันจะกระจายตัวอยู่ในเฟสคงที่และเฟสเคลื่อนที่ได้ไม่เท่ากัน การที่สารในของผสมแยกออกจากกันได้เนื่องจากสารแต่ละตัวจะถูกดูดซับไว้ไม่เท่ากัน สารที่ถูกดูดซับไว้มากยอมเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าสารที่ถูกดูดซับได้น้อย ซึ่งจากหลักการนี้ ทำให้สามารถแยกสารที่มี สภาพขั้วต่างกันออกจากกันได้ ในการทดลองนี้เลือกใช้แผ่นโครมาโทกราฟีที่มีตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจล ซึ่งใช้ได้ดีกับสารเกือบทุกชนิด และเนื่องจาก ออริโอบาซิดิน เอ เป็นสารประเภทพอลิเปปไทด์ ที่มีสภาพขั้วค่อนข้าง สูง สามารถละลายได้ดีใน เอทานอล เมทานอล คลอโรฟอร์ม และเอทิลอะซิเตต เป็นต้น (Takesako และคณะ, 1991) จึงได้เลือกใช้เอทิลอะซิเตตซึ่งเป็นตัวทำละลายที่สามารถทำละลาย ออริโอบาซิดิน เอ และพาสารให้เคลื่อนที่บนแผ่น TLC ได้ค่อนข้างเหมาะสมกว่าเอทานอลและเมทานอลที่มีสภาพขั้วค่อนข้างสูงเกินไป หรือ คลอโรฟอร์มซึ่งมีสภาพขั้วต่ำเกินไปสำหรับการแยก 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 (โพรสลิน และ ลิวซีน) และภาวะที่ 7 (ฟีนิลอะลานีน โพรสลิน และ ลิวซีน) มาวิเคราะห์โดยการโครมาโทกราฟีแบบชั้นบางและทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยทำการจุดจุดของสารสกัดที่ปรากฏขึ้นอยู่ในระดับเดียวกันกับออริโอบาซิดิน เอ บนแผ่น TLC มาละลายในตัวทำละลายอะซิโตไนโตร จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาตรวจสอบด้วยเทคนิค โครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (HPLC) ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพและ

ความไวสูงในการแยกองค์ประกอบต่างๆ ออกจากกันโดยอาศัยความแตกต่างของการกระจายตัวของสารตัวอย่างระหว่าง 2 เฟส ที่ไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน คือ เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ทำหน้าที่ในการชะล้างหรือพาสารเคลื่อนที่ผ่านเฟสอยู่กับที่ และเฟสอยู่กับที่ (stationary phase) ทำหน้าที่ในการแยกสารหรือองค์ประกอบของสารตัวอย่างออกจากกัน โดยมีหลักการทำงานคือ ขณะเฟสเคลื่อนที่ผ่านเฟสอยู่กับที่องค์ประกอบหรือสารชนิดต่างๆ ในสารตัวอย่างจะมีการเคลื่อนที่ผ่านเข้าและออกระหว่างเฟสทั้งสองและมีการหน่วงเหนี่ยว (retention) ในเฟสอยู่กับที่ที่ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของ องค์ประกอบหรือสารแต่ละชนิดที่อยู่ในสารตัวอย่างที่มีความจำเพาะต่อเฟสทั้งสอง จากความแตกต่างนี้ทำให้สารแต่ละชนิดเคลื่อนที่ผ่านเฟสอยู่กับที่ในอัตราที่แตกต่างกัน ทำให้มีการแยก เกิดขึ้น ระยะเวลาที่สารแต่ละชนิดใช้ในการเคลื่อนที่ผ่านเฟสอยู่กับที่ (retention time) จะแสดงออกมาในรูปของตำแหน่ง peak บนโครมาโทแกรมซึ่งสามารถนำมาใช้ประโยชน์ด้านการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและเชิงปริมาณได้ (แมน อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม, 2535) ทำการทดสอบด้วยเครื่อง HPLC ของบริษัท Varian รุ่น Prostar ประเทศสหรัฐอเมริกา เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานออริโอ บาซิดิน 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 โดยมีอะซีโตนไตร 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 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโน ภาวะที่ 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 ดังนั้นจึงมีความ

เป็นไปได้ว่าสารสกัดที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนที่ใช้ทดสอบนั้นเป็นสารชนิดเดียวกันกับออร์โอบาซิดิน เอ เนื่องจากผลการทดลองมีความสอดคล้องกัน

4.3 เทคนิค Spectrophotometry สำหรับการวิเคราะห์โปรตีนเบื้องต้นในสารต้านเชื้อรา

จากการทดลองนำสาร สกัด *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 มีค่าสเปกตรัมการดูดกลืนแสงสูงสุด ที่ 257 นาโนเมตร ส่วนสารมาตรฐานออร์โอบาซิดิน เอ มีค่าสเปกตรัมการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 258 นาโนเมตร เนื่องจากออร์โอบาซิดิน เอ เป็นสารกลุ่มเดปซิเปปไทด์แบบวงแหวน (cyclic depsipeptide) ประกอบด้วยกรดแอสปาร์ติก 8 ชนิด และกรดไฮดรอกซิล 1 ชนิด (Takesako และคณะ, 1993) จึงจัดเป็นสารประเภทโปรตีนที่มีการแตกตัวเป็น subunit ขนาดเล็ก เมื่อนำสารมาวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer จึงสามารถวิเคราะห์สารกลุ่มที่มีโครงสร้างเป็นวงแหวน เช่น กลุ่มอะโรมาติก กลุ่มกรดอะมิโน และเบสไพริมิดีน เป็นต้น ในช่วงที่สายตาไม่สามารถมองเห็น ได้ที่ช่วงความยาวคลื่น 200-400 นาโนเมตร นอกจากนี้ฟีนิลอะลานีนยังจัดเป็นสารจำพวกกรดอะมิโน สามารถดูดกลืนแสงสูงสุดได้ที่ความยาวคลื่น 258 นาโนเมตร แต่ในผลการทดลองพบว่าสารสกัดทั้ง 3 ภาวะ มีค่าสเปกตรัมการดูดกลืนแสงสูงสุดต่ำกว่าสารมาตรฐานออร์โอบาซิดิน 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 สำหรับการวิเคราะห์ น้ำหนักโมเลกุลของสารต้านเชื้อรา

จากการทดลองนำสาร สกัด *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 พบว่า สารมาตรฐานออร์โอบาซิดิน เอ มีน้ำหนักโมเลกุล 1,123.648 ดาลตัน ส่วนสารสกัดจากเชื้อ *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโน ภาวะที่ 5 (ฟีนิลอะลานีน และ ลิวซีน)

ภาวะที่ 6 (โพรสลิน และ ลิวซีน) และภาวะที่ 7 (ฟีนิลอะลานีน โพรสลิน และ ลิวซีน) มีผลของสเปกตรัมน้ำหนักโมเลกุล 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

จากการทดลองนำสารสกัดที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบางมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อราก่อโรคในกลุ่ม *Aspergillus* spp. ทั้ง 4 สายพันธุ์พบว่าสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริม กรดอะมิโนภาวะที่ 5 (ฟีนิลอะลานีน และ ลิวซีน) มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *A. flavus* ได้สูงสุด ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 183.00 ± 0.02 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 6 (โพรสลิน และ ลิวซีน) พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *A. terreus* ได้สูงสุด ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 168.00 ± 0.06 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่สารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 7 (ฟีนิลอะลานีน โพรสลิน และ ลิวซีน) มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *A. niger* และ *A. fumigatus* ได้สูงสุด ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 191.00 ± 0.24 และ 190.00 ± 0.05 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เนื่องจากสารสกัดที่นำมาทดสอบมีความบริสุทธิ์ของสารมากขึ้นจึงทำให้มีความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้นซึ่งมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา สูงขึ้น จึงมีความเป็นไปได้ว่าสารสกัดที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน ทั้ง 3 ภาวะ เป็นสารชนิดเดียวกันกับออริโอบาซิดิน เอ และมีความน่าสนใจในการนำสารต้านเชื้อราที่ผลิตได้ไปทำการศึกษาต่อในแง่ของการทำเป็นยาต้านเชื้อราต่อไปในอนาคต เพราะออริโอบาซิดิน เอ มีกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ การทำงานของเอนไซม์ไอพีซีซินเทส (IPC synthase) ซึ่งมีผลไปยับยั้งการสังเคราะห์สฟิงโกลิปิด ที่เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ที่พบได้ทั้งในสัตว์และเชื้อรา (Nagiec และคณะ, 1997) อย่างไรก็ตามก็ตีพบว่าในการยับยั้งการทำงานของไอพีซีซินเทสของออริโอบาซิดินเอ ไม่มีผลไปยับยั้งการสังเคราะห์สฟิงโกลิปิดในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

5.2 วิธี Conidial germination inhibition assay

จากการทดลองนำสารสกัดที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยเทคนิคโครมาโท-

กราฟี่แบบชั้นบางมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อราก่อโรคในกลุ่ม *Aspergillus* spp. ทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์ เทียบกับชุดควบคุม พบว่าสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริม กรดอะมิโนภาวะที่ 5 (ฟีนิลอะลานีน และ ลิวซีน) ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *A. flavus* ได้สูงสุด 77.88 ± 0.09 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริม กรดอะมิโนภาวะที่ 6 (โพรลีน และ ลิวซีน) ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *A. terreus* ได้สูงสุด 71.91 ± 0.07 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่สารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริม กรดอะมิโนภาวะที่ 7 (ฟีนิลอะลานีน โพรลีน และ ลิวซีน) ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *A. niger* และ *A. fumigatus* ได้สูงสุด 77.00 ± 0.20 และ 79.17 ± 0.24 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เนื่องจากสารสกัดที่นำมาทดสอบมีความบริสุทธิ์ของสารมากขึ้นจึงทำให้มีความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้นซึ่งมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสูงขึ้น จึงมีความเป็นไปได้ว่าสารสกัดที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน ทั้ง 3 ภาวะ เป็นสารชนิดเดียวกันกับออริโอบาซิดิน เอ จึงมีความน่าสนใจอย่างยิ่งที่จะนำมาพัฒนาเป็นยาต้านเชื้อราชนิดใหม่ เนื่องจากออริโอบาซิดิน เอ มีความเป็นพิษต่ำในการทดลองกับสัตว์ทดลอง นอกจากนี้ยังพบว่าออริโอบาซิดิน เอ จะทำลายเฉพาะเซลล์ที่กำลังเจริญพันธุ์ของ *Candida albicans* โดยไม่มีผลกระทบต่อเซลล์ที่อยู่ในระยะพัก ออริโอบาซิดิน เอ ไม่ได้มีผลต่อการยับยั้ง การผลิต DNA RNA หรือโปรตีนอื่นๆ ไม่มีผลในการลดการผลิตสารประกอบกลูโคสต่างๆในเซลล์ ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า กลไกการทำงานของออริโอบาซิดิน มีความแตกต่างจากแอมโฟเทอรีซิน บี และสารต่อต้านเชื้อราชนิดอื่นๆ (Endo และคณะ, 1997) นอกจากนี้ยังพบว่า ออริโอบาซิดิน เอ สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อปรสิต *Toxoplasma gondii* ซึ่งเป็นเชื้อฉวยโอกาสที่มักจะพบในโรคเอดส์และผู้ป่วยที่มีระบบภูมิคุ้มกันบกพร่อง จาก การทดลองพบว่าออริโอบาซิดิน เอ มีผลไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไอพีซี ซินเทส ซึ่งจะมีผลไปยับยั้งการสังเคราะห์หีสฟิงโกลิปิดที่เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์เชื้อรา จึงมีผลทำให้โครงสร้างภายในของเชื้อปรสิต *T. gondii* เกิดการสูญเสียไป (Sonda และคณะ, 2005)

5.3 ทำการตรวจสอบสารสกัดด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (Thin layer chromatography)

จากผลการทดลอง นำสารสกัด จาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 5 (ฟีนิลอะลานีน และ ลิวซีน) ภาวะที่ 6 (โพรลีน และ ลิวซีน) และภาวะที่ 7 (ฟีนิลอะลานีน โพรลีน และ ลิวซีน) ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบางมาตรวจสอบสารสกัดอีกครั้ง โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ออริโอบาซิดิน เอ โดย

ใช้ระบบตัวทำละลายคือเอธิลอะซิเตต พบว่าสารสกัดจาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 5 (ฟีนิลอะลานีน และ ลิวซีน) ภาวะที่ 6 (โพรีลีน และ ลิวซีน) และ ภาวะที่ 7 (ฟีนิลอะลานีน โพรีลีน และ ลิวซีน) ประกอบด้วยสารที่มี ค่า Rf ภาวะละ 1 ชนิด แต่ละภาวะมีค่า Rf เท่ากับ 0.68 (ตำแหน่ง A) ส่วนสารมาตรฐาน ออริโอบาซิดิน เอ มีค่า Rf เท่ากับ 0.68 (ตำแหน่ง B)

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

6. วิเคราะห์โครงสร้างสารต้านเชื้อราที่ผลิตได้

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

จากผลการทดลอง นำสารสกัด จาก *A. pullulans* NRRL 58536 ในแหล่งอาหารเสริมกรดอะมิโนภาวะที่ 5 (ฟีนิลอะลานีน และ ลิวซีน) ภาวะที่ 6 (โพรีลีน และ ลิวซีน) และภาวะที่ 7 (ฟีนิลอะลานีน โพรีลีน และ ลิวซีน) ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบางมาวิเคราะห์โครงสร้างสารต้านเชื้อราเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานออริโอบาซิดิน เอ โดยใช้วิธี $^1\text{H-NMR}$ ซึ่งนิวเคลียสที่ใช้ในสนามแม่เหล็กคือโปรตอน (Proton) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ในช่วงความยาวคลื่นวิทยุ 500 เมกะเฮิรตซ์ ซึ่งโปรตอน NMR มีหลักการทำงานคือโปรตอนทุกตัว ในโมเลกุลที่มีความเท่าเทียมกันทางเคมี จะมี chemical shift ที่เดียวกันและจะเกิดเรโซแนนซ์ที่เดียวกัน ดังนั้นใน NMR สเปกตรัมสารแต่ละตัวจะมีเพียง peak เดียว โปรตอนทุกตัวเรียกว่ามี chemically equivalent ในทางตรงกันข้าม ถ้าโมเลกุลมีโปรตอนมากกว่า 1 ชนิดที่ไม่เท่าเทียมกันทางเคมี NMR สเปกตรัมจะมีหลาย peak (แม้ว่า อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม , 2535) จากการทดลองพบว่าสารสกัดจากเชื้อ *A. pullulans* NRRL 58536 ทั้ง 3 ภาวะมีผลของสเปกตรัมสอดคล้องกับสารมาตรฐานออริโอบาซิดิน เอ จึงมีความเป็นไปได้ว่าสารสกัดที่ ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนทั้ง 3 ภาวะ เป็นสารชนิดเดียวกันกับออริโอบาซิดิน เอ

ข้อเสนอแนะในงานวิจัย

เนื่องจากสารต้านเชื้อราจาก *A. pullulans* เป็นสารที่อยู่ภายในเซลล์ ซึ่งมีปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับสารประเภทหลังออกภายนอกเซลล์ ดังนั้นหากต้องการศึกษาในแง่การนำไปใช้ประโยชน์ ควรทำการผลิตในระดับที่ใหญ่ขึ้น (large scale) หรือนำเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพในการทำให้ผนังเซลล์แตกมาใช้ในการวิจัย เช่น เครื่องบดอย่างละเอียด (Homogenizer) เพื่อให้ได้ปริมาณสารที่ต้องการมากเพียงพอต่อการศึกษาในแง่ที่เป็นประโยชน์ในด้านการแพทย์ เช่น การผลิตยาต้านเชื้อรา หรือการผลิตเพื่อการค้าต่อไปในอนาคต

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- คนาวรรณ พจนาคม. 2544. ความก้าวหน้าของสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา. วารสารมหาวิทยาลัยศิลปากร. 21: 233-256.
- นางลักษณีย์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. 2547. จุลชีววิทยาทั่วไป. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- พรรณกร อิมวิทยา และ นันทจักร เกษนพงศ์. 2543. ยาต้านเชื้อรา. ใน พรรณกร อิมวิทยา (บรรณาธิการ), โรคติดเชื้อรา, หน้า 166-178. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์สำนักเลขาธิการคณะรัฐมนตรี.
- พรรณกร อิมวิทยา. 2538. เชื้อราอวยโอกาสชนิดสายราไม่มีสีและการก่อโรค. ใน เชื้อรากล่อโรคในคน, หน้า 158-167. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์สามัคคีสาร (ดอกหญ้า).
- เพ็ญแข วันไชยธนวงศ์. 2544. เทคโนโลยีชีวภาพ. ลำปาง: บรรณกิจการพิมพ์
- แมน อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม. 2535. Principles and Techniques of Instrumental Analysis. กรุงเทพมหานคร: ชวนพิมพ์.
- สมใจ ศิริโชค. 2547. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. กรุงเทพมหานคร: ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ.

ภาษาอังกฤษ

- Cooke, W. B. 1959. An ecological life history of *Aureobasidium pullulans* (de Bary) arnaud. Journal of Mycopathologia et Mycologia applicata 17: 1-43.
- De Hoog, G. S., Zalar, P., Urzi, C., Leo, F., Yurlova, N. A. and Sterflinger, K. 1999. Relationship of dothideaceous black yeasts and meristematic fungi based on 5.8s and ITS2 rDNA sequence comparison. Studies in Mycology 43: 31-37.
- Dennis, C. and Buhagiar, R. W. M. 1973. Comparative study of *Aureobasidium pullulans*, *A. prunorum* sp. Nov. and *Trichosporon pullulans*. Journal of Transactions British Mycological Society 60: 567-575.
- Deshpande, M. S., Rale, V. B. and Lynch, J. M. 1992. *Aureobasidium pullulans* in applied microbiology: a status report. Journal of Enzyme Microbial Technology 14: 514-527.

- Domsch, K. H., Gams, W. and Anderson, T. H. 1993. Compendium of soil fungi. Volume I. London: Academic Press.
- Endo, M., Takesako, K., Yamaguchi, H. 1997. Fungicidal Action of Aureobasidin A, a Cyclic Depsipeptide Antifungal Antibiotic, against *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Antimicrobial Agents and Chemother 41: 672-676.
- Gallo, M. and Katz, E. 1993. Regulation of Secondary Metabolite Biosynthesis: Catabolite Repression of Phenoxazinone by Glucose. Journal of Biochem 53(3): 493-498.
- Georgopapadakou, N. H. and Walsh, T. J. 1996. Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies. Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy 40: 279-291.
- Gold, W., Stout, H. A., Pagano, J. F. and Donovan, R. 1956. Amphotericins A and B, antifungal antibiotics produced by a *Streptomyces*. I. *in vitro* studies. Antibiotics Annual: Proceedings of the Symposium on Antibiotics 579-586.
- Hermanides-Nijhof, E. J. 1977. *Aureobasidium* and allied genera. *Studies in Mycology* 15: 141-166.
- Hitchcock, C. A., Pye, G. W., Troke, P. F., Johnson, E. M. and Warnock, D. W. 1993. Fluconazole resistance in *Candida glabrata*. Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy 37: 1962-1965.
- Ikai, K., Shiomi, K., Takesako, K., Mizutani, S., Yamamoto, J., Ogawa, Y. AND Ueno, M. 1991. Structures of Aureobasidins B TO R. Journal of Antibiotics 44: 1187-1198.
- Kurome, T., Inami, K., Inoue, T., Ikai, K., Takesako, K., Kato, I. and Shiba, T. 1996. Total synthesis of an antifungal cyclic depsipeptide aureobasidin A. Tetrahedron 52: 4327-4346.
- Leathers, T. D. 2003. Biotechnological production and applications of pullulan. Applied Microbiology and Biotechnology 62: 468-473.
- Liu, X., Wang, J., Gou, P., Mao, C., Zhu, Z. R., Li, H. 2007. In vitro inhibition of postharvest pathogens of fruit and control of gray mold strawberry and green mold of citrus by aureobasidin A. Journal of Food Microbiology 119: 223-229.

- Mittendorf, J., Kunisch, F., Matzke, M., Christian, H., Schmidt, A., and Schonfeld, W. 2002. Novel antifungal β -amino acids: synthesis and activity against *Candida albicans*. Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy 12: 607-610.
- Nagiec, M. M., Nagiec, E. E., Baltisberger, J. A., Wells, G. B., Lester, R. L. and Dickson, R. C. 1997. Sphingolipid synthesis as a target for antifungal drugs. Journal of Biological Chemistry 272: 9809-9817.
- Prasongsuk, S., Sullivan, R. F., Kuhirun, M., Eveleigh, D. E. and Punnapayak, H. 2005. Thailand habitats as sources of pullulan-producing strains of *Aureobasidium pullulans*. World Journal of Microbiology & Biotechnology 21: 393-398.
- Punnapayak, H., Sudhadham, M., Prasongsuk, S. and Pichayangkura, S. 2003. Characterization of *Aureobasidium pullulans* isolated from airborne spores in Thailand. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 30: 89-94.
- Ramos, S. and Acha, I. G. 1975. A vegetative cycle of *Pullularia pullulans*. Journal of Transactions British Mycological Society 64: 129-135.
- Shigemori, H., Tenma, M., Shimazaki, K. and Kobayashi, J. 1998. Three new metabolites from the marine yeast *Aureobasidium pullulans*. Journal of Natural Products 61: 696-698.
- Sonda, S., Sala, G., Ghidoni, R., Hemphill, A., Peters, J. 2005. Inhibitory Effect of Aureobasidin A on *Taxoplasma gondii*. Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy 49: 1794-1800.
- Tachibana, S., Ishikawa, H. and Itoh, K. 2005. Antifungal activities of compounds isolated from the leaves of *Taxus cuspidate* var. *nana* against plant pathogenic fungi. Journal of the institute of Wood Science 51: 181-184.
- Takeo, K. and Hoog, G. S. 1991. Karyology and hyphal characters as taxonomic criteria in Ascomycetous black yeasts and related fungi. Antonie van Leeuwenhoek 60: 35-42.
- Takesako, K., Ikai, K., Haruna, F., Endo, M., Shimanaka, K. and Sono, E. 1991. Aureobasidins, new antifungal antibiotics taxonomy, fermentation, isolation and properties. Journal of Antibiotics 44: 919-924.

- Takesako, K., Kuroda, H., Inoue, T., Haruna, F., Yoshikawa, Y. and Kato, Ikunoshin. 1993. Biological properties of Aureobasidin A, A cyclic depsipeptide antifungal antibiotic. Journal of Antibiotics 46: 1414-1420.
- Waldorf, A. R. and Polak, A. 1983. Mechanisms of action of 5-fluorocytosine. Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy 23: 79-85.
- Walsh, T. J., Petraitis, V., Petraitiene, R., Field-Ridley, A., Sutton, D., Ghannoum, M., Sein, T., Schaufele, R., Peter, J., Bacher, J., Casler, H., Armstrong, D., Espinel-Ingroff, A., Rinaldi, M. G. and Lyman, C. A. 2003. Experimental pulmonary aspergillosis due to *Aspergillus terreus*: pathogenesis and treatment of an emerging fungal pathogen resistant to amphotericin B. Journal of Infectious Diseases 188: 305-319.
- Yurlova, N. A., Hoog, G. S. and Gerrits van den Ende, A. H. G. 1999. Taxonomy of *Aureobasidium* and allied genera. Studies in Mycology 43: 63-69.
- Zhong, W., Jeffries, M. W. and Georgopapadakou, N. H. 2000. Inhibition of Inositol Phosphorylceramide Synthase by Aureobasidin A in *Candida* and *Aspergillus* Species. Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy 44: 651-653.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีเตรียม

1. Potato Dextrose Agar (PDA)

มันฝรั่ง	200	กรัม
น้ำตาลเดกซ์โทรส	20	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น		

หั่นมันฝรั่งเป็นชิ้นลูกเต๋าขนาดประมาณ 1 x 1 เซนติเมตร ต้มกับน้ำกลั่น เมื่อสุกแล้วกรองเอาแต่น้ำ จากนั้นเติมน้ำตาลเดกซ์โทรสแล้วปรับปริมาตรให้ใกล้ 1 ลิตร ปรับ pH เท่ากับ 5.5 เติมวุ้นแล้วต้มจนวุ้นละลายหมด สุดท้ายปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. Potato Dextrose Broth (PDB)

มันฝรั่ง	200	กรัม
น้ำตาลเดกซ์โทรส	20	กรัม
น้ำกลั่น		

วิธีเตรียมเช่นเดียวกับการเตรียมอาหารสูตร PDA แต่ไม่เติมวุ้น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. Yeast Malt Agar (YMA)

Yeast extract	5	กรัม
Malt extract	5	กรัม
Bacto peptone	5	กรัม
น้ำตาลกลูโคส	20	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น		

ละลายส่วนผสมทั้งหมดยกเว้นวุ้นด้วยน้ำกลั่น แล้วเติมวุ้น จากนั้นนำไปต้มจนวุ้นละลายหมด แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ด้วยเครื่องนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. Yeast Malt Broth (YMB)

Yeast extract	5	กรัม
Malt extract	5	กรัม
Bacto peptone	5	กรัม
น้ำตาลกลูโคส	20	กรัม
น้ำกลั่น		

วิธีเตรียมเช่นเดียวกับการเตรียมอาหารสูตร YMA แต่ไม่เติมวุ้น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. Seed Culture Medium (สำหรับผลิตสารต้านเชื้อรา)

Yeast-nitrogenous base	0.67%
น้ำตาลกลูโคส	2%

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรตามต้องการ แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ด้วยเครื่องนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

6. Production Medium I (สำหรับผลิตสารต้านเชื้อรา)

น้ำตาลกลูโคส	2%
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.5%
KH_2PO_4	0.15%
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05%
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.01%
NaCl	0.01%
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.5 $\mu\text{g/ml}$
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5 $\mu\text{g/ml}$

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่นตามลำดับ ปรับปริมาตรตามต้องการ แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

7. Production Medium II (สำหรับผลิตสารต้านเชื้อรา)

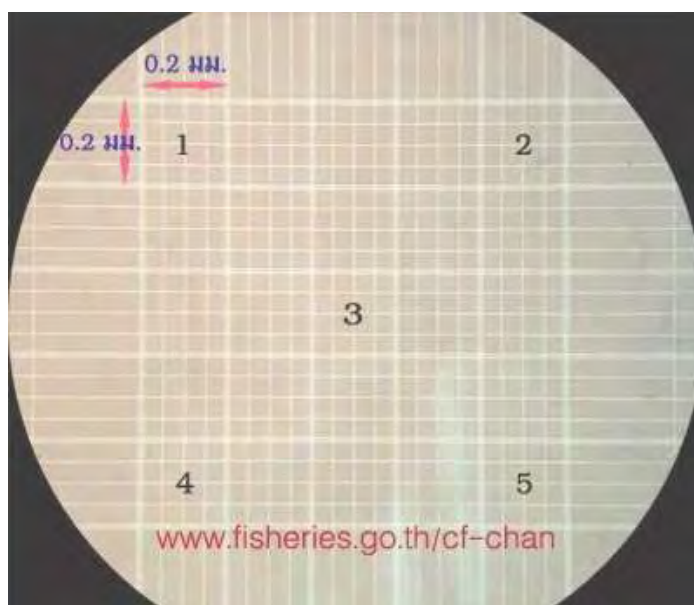
น้ำตาลกลูโคส	10%
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.5%
Bacto-Peptone	5%
KH ₂ PO ₄	0.75%
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.25%
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.05%
NaCl	0.05%
FeCl ₃ ·6H ₂ O	2.5 µg/ml
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2.5 µg/ml

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่นตามลำดับ ปรับปริมาตรตามต้องการ แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

1. การนับจำนวนเซลล์ยีสต์ด้วยวิธี Direct Microscopic Count โดยใช้ Haemocytometer

Haemocytometer เป็นอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับนับเม็ดเลือด แต่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการนับสปอร์ของราหรือจำนวนเซลล์จุลินทรีย์ได้ Haemocytometer เป็นสไลด์ที่มีช่องแบ่งไว้เป็นตาราง เมื่อปิดด้วย cover glass ซึ่งใช้เฉพาะกับอุปกรณ์จะทำให้ มีความลึกระหว่างตัวสไลด์กับ cover glass ทำให้บรรจุของเหลวซึ่งมีตัวอย่าง ที่ต้องการนับจำนวนไว้ได้ ซิดแบ่งจะแบ่งออกเป็นช่องสี่เหลี่ยมจัตุรัส 25 ช่อง แต่ละช่องมีขนาด 0.2×0.2 ตารางมิลลิเมตร ซึ่งภายในแต่ละช่องจะแบ่งย่อยออกเป็น 16 ช่องเล็ก แต่ละช่องมีขนาด 0.05×0.05 ตารางมิลลิเมตร ดังนั้นเมื่อปิดทับสไลด์ด้วย cover glass ซึ่งใช้เฉพาะกับอุปกรณ์นี้ ของเหลวที่บรรจุอยู่จึงมีปริมาตรเท่ากับ 0.00025 ลูกบาศก์มิลลิเมตร



ในการนับจำนวนเซลล์ควรเจือจางเซลล์ให้มีปริมาณที่สามารถนับได้สะดวกและแม่นยำไม่เจือจางหรือหนาแน่นจนเกินไป ในการนับให้หยดน้ำตัวอย่างที่ต้องการนับจำนวนเซลล์ลงบน Haemocytometer แล้วปิดทับด้วย cover glass จากนั้นนำไปตรวจนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ถ้า นับจากช่องใหญ่ควรนับอย่างน้อย 5 ช่อง

วิธีการคำนวณ

ปริมาตรใน 25 ช่องใหญ่ (400 ช่องเล็ก)	=	0.1	ลูกบาศก์มิลลิเมตร
สมมติค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ใน 1 ช่องใหญ่	=	X	เซลล์
สมมติค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ใน 1 ช่องเล็ก	=	Y	เซลล์
นั่นคือ	X	=	16Y เซลล์

ดังนั้น

ใน 0.1 ลบ.มม. มีจำนวนเซลล์ทั้งหมด	X x 25	หรือ	Y x 16 x 25	เซลล์
ใน 1.0 ลบ.มม. มีจำนวนเซลล์ทั้งหมด	X x 25 x 10	หรือ	Y x 16 x 25 x 10	เซลล์
ใน 1 ลบ.ซม. มีจำนวนเซลล์ทั้งหมด	X x 25 x 10 x 1000	หรือ	Y x 16 x 25 x 10 x 1000	เซลล์
หรือเท่ากับ	X x 25 x 10 ⁴	หรือ	4Y x 10 ⁶	เซลล์ต่อมิลลิลิตร

2. การคำนวณค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Ratio of front (RF))

เมื่อนำแผ่นโครมาโทกราฟีแบบผิวบางออกจากโถแก้วที่บรรจุตัวทำละลายแล้ววัดระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (solvent front) และระยะการเคลื่อนที่ของสารที่ปรากฏบนแผ่นโครมาโทกราฟี จากนั้นนำมาคำนวณตามสูตรดังนี้

$$R_f = \frac{\text{ระยะการเคลื่อนที่}}{\text{ระยะที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$

3. การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (% inhibition)

เมื่อวัดเส้นผ่านศูนย์กลางวงยับยั้งของสารสกัด และสารมาตรฐาน แอมโฟเทอริซิน บี ที่เกิดขึ้นบนจานเพาะเชื้อ จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณดังนี้

$$\% \text{inhibition} = 100 - \left[\left(1 - \frac{T}{C} \right) \right] \times 100$$

C	=	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่เกิดจากการยับยั้งเชื้อราด้วยแอมโฟเทอริซิน บี
T	=	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่เกิดจากการยับยั้งเชื้อราด้วยสารสกัด

4. การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ (% germination)

เมื่อสปอร์เชื้อราในชุดควบคุมและชุดทดลอง เจริญในระยะเวลาที่กำหนด ทำการนับสปอร์ที่มีการเจริญบนจานอาหาร จากนั้นนำมาคำนวณดังนี้

$$\% \text{germination} = \frac{T}{C} \times 100$$

C = จำนวนสปอร์บนจานอาหารชุดควบคุม

T = จำนวนสปอร์บนจานอาหารชุดที่ทดลอง

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว เสาวลักษณ์ พลอยงาม เกิดเมื่อวันที่ 8 ธันวาคม พ.ศ. 2527 ที่จังหวัดชลบุรี สำเร็จปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จ. พิษณุโลก ในปีการศึกษา 2549 จากนั้นได้ศึกษาต่อในระดับปริญญา วิทยาศาสตร์ มหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2550 สำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา 2552

ทุนสนับสนุนการทำวิจัย

ขณะศึกษา ได้รับทุน สนับสนุนการทำวิจัยจาก ทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์สำหรับนิสิต ครั้งที่ 2/2552 ภาคปลาย ปีการศึกษา 2551 จากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย หมายเลข โครงการ F-31-GS-ES13 เลขที่ 152

การเสนอผลงาน

Ployngam, S., Lotrakul, P., Punnapayak, H., Prasongsuk S. 2009. OPTIMIZATION OF ANTIFUNGAL AGENTS PRODUCTION FROM TROPICAL STRAINS OF *Aureobasidium pullulans*. In Proceeding of The 21st Annual Meeting and International Conference of Thai Society for Biotechnology: 747-753. Queen Sirikit National Convention Center Bangkok, Thailand. September 24-25, 2009.