



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: สารปฏิชีวนะจากราเอ็นโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรไทยบางชนิด

โดย รองศาสตราจารย์ ดร. สุรัชย์ พรภักกุล และคณะ

31 มกราคม 2554

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: สารปฏิชีวนะจากราเอ็นโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรไทยบางชนิด

คณะผู้วิจัย

1. รองศาสตราจารย์ ดร. สุรัชย์ พรหมกุล

2. รองศาสตราจารย์ ดร. ประกิตต์สินี สีहनนท์

สังกัด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่ให้การสนับสนุนเงินทุนการวิจัย โดยตลอดโครงการนี้ ขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ ดร. โสภณ เรืองสำราญ ที่เป็นพี่ปรึกษาในโครงการนี้และให้คำปรึกษางานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยดี ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. นงลักษณ์ ศรีอุบลมาศ ที่ช่วยเหลือในการพิสูจน์เอกลักษณ์ราเอ็นโดไฟท์

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. นงนุช เหมืองสิน และ รองศาสตราจารย์ ดร. ณรงค์ศักดิ์ ชัยชิต ที่ช่วยเหลือการวิเคราะห์โครงสร้างโดย X-ray crystallography ขอขอบคุณ หน่วยปฏิบัติการวิจัยไบโอออร์แกนิกเคมี (Research Center for Bioorganic Chemistry) และ ภาควิชาเคมี ที่สนับสนุนสถานที่และอุปกรณ์เครื่องมือในการวิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร. สุรัชย์ พรหมกุล

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2554

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: DBG5080017

ชื่อโครงการ: สารปฏิชีวนะจากราเอ็นโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรไทยบางชนิด

ชื่อนักวิจัย: รองศาสตราจารย์ ดร. สุรัชย์ พรภักกุล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

E-mail Address: psuracha@chula.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 1 สิงหาคม พ.ศ. 2550 ถึงวันที่ 30 กันยายน พ.ศ. 2552

การศึกษาด้านจุลชีพของราเอ็นโดไฟต์ที่คัดเลือกมาสี่สายพันธุ์คือ *Mycocleptodiscus* sp., *Alternaria* sp., *Fusarium* sp. และ *Emericella varicolor* การเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร yeast extract sucrose ราเอ็นโดไฟต์ *Mycocleptodiscus* sp., *Alternaria* sp., และ *Fusarium* sp. ผลิตสารต้านจุลชีพได้ดีที่สุด ส่วนการเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร malt extract ราเอ็นโดไฟต์ *Emericella varicolor* เจริญได้ดีและผลิตสารต้านจุลชีพได้ สารต้านจุลชีพที่แยกได้จากราเอ็นโดไฟต์ *Mycocleptodiscus* sp. ประกอบด้วย cyclo(L-leuciny-L-prolinyl), cyclo(L-alaniny-L-tryptophanyl) และ (L-tryptophanyl-L-seriny) จาก *Alternaria* sp. ประกอบด้วย cyclo(L-leuciny-L-prolinyl), allantoin และ ergosterol peroxide และ จาก *Fusarium* sp. ประกอบด้วย bassiatin และ beauvericin การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลชีพด้วย broth dilution MIC assays และ 2-[4-iodophenyl]-3-[4-dinitrophenyl]-5-phenyltetrazolium chloride (INT) colorimetric assay พบว่า cyclo(L-Ala-L-Trp) ที่ความเข้มข้น 125 µg/mL แสดงฤทธิ์การยับยั้งแบบฆ่าจุลชีพ *E. coli* และ *P. aeruginosa* และแบบหยุดการเจริญเติบโตสำหรับ *C. albicans* ส่วน cyclo(L-Leu-L-Pro) แสดงฤทธิ์การยับยั้งแบบฆ่าจุลชีพ *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* และ *P. aeruginosa* ที่ความเข้มข้น 50 µg/mL และ แสดงฤทธิ์การยับยั้งแบบฆ่าจุลชีพและแบบหยุดการเจริญเติบโตสำหรับ *C. albicans* ที่ความเข้มข้น 50 µg/mL และ 25 µg/mL ตามลำดับ ขณะที่สารสังเคราะห์แสดงฤทธิ์การยับยั้ง *C. albicans* แบบหยุดการเจริญเติบโตเท่านั้น ergosterol peroxide มีฤทธิ์ยับยั้ง *B. subtilis* ATCC 6633, *E. coli* ATCC 25922 และ *C. albicans* ATCC 10231 ได้แบบหยุดการเจริญเติบโตที่ค่า MIC 7.82 µg/ml (23.84 µM), 31.25 µg/ml (95.27 µM), และ 62.5 µg/ml (190.55 µM) ตามลำดับ bassiatin มีฤทธิ์ยับยั้งแบบฆ่าจุลชีพ *E. coli* และ *P. acnes* ที่ค่า MBC 250 และ 500 µg/ml ตามลำดับ ขณะที่ beauvericin มีฤทธิ์ยับยั้งแบบฆ่าจุลชีพ *E. coli* ที่ค่า MBC 250 µg/ml การแยกสารเมแทบอไลต์ของ *Emericella varicolor* ไม่ได้สารต้านจุลชีพโดยการทดสอบด้วย broth dilution MIC assays ที่ความเข้มข้น 250 µg/ml แต่ได้สารใหม่ สองชนิด emervaridione และ varioxiranediol และได้สารที่มีรายงานแล้วก่อนหน้านี้สามชนิด คือ stellatic acid, ergosterol และ dihydroterrein ส่วนการเพาะเลี้ยงในอาหาร MEB ที่มีปริมาณมอลต์ต่ำ แยกได้ xanthone 4 ชนิด และ terrein

จากการศึกษาด้านจุลชีพของราเอ็นโดไฟต์สี่สายพันธุ์ น้ำเลี้ยงและ/หรือสารสกัดหยابน้ำเลี้ยงและเส้นใยราแสดงฤทธิ์ต้านจุลชีพที่ดีกว่าสารต้านจุลชีพเดี่ยวๆที่แยกได้ ไม่ว่าจะเป็นใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟีที่ตัวดูดซับเป็นชนิดซิลิกา หรือ Sephadex LH20 หรือ reverse phase ก็จะไม่สามารถแยกได้สารออกฤทธิ์ต้านจุลชีพเดี่ยวๆที่มีประสิทธิภาพสูงออกมาได้ อย่างไรก็ตามได้พบข้อสังเกตอย่างหนึ่งว่าราใดที่น้ำเลี้ยงและ/หรือสารสกัดหยาบของราแสดงฤทธิ์การต้านจุลชีพที่ดี รานั้นจะผลิตสารเมแทบอไลต์ที่เป็น nucleotide base เช่น uracil และ thymine ร่วมอยู่ด้วย และพบว่า ราชอบที่จะผลิต uracil มากกว่า thymine และ uracil ที่ผลิตขึ้นจะมีอยู่ในปริมาณมาก

คำหลัก: endophyte, endophytic fungi, metabolites, Antimicrobial

Abstract

Project Code: DBG5080017
Project Title: Antibiotics from endophytic fungi isolated from some Thai medicinal plants
Investigator: Associate Professor Surachai Pornpakakul, PhD Chulalongkorn University
E-mail Address: psuracha@chula.ac.th
Project Period: 1 August 2007 to 30 September 2009

Antimicrobial metabolites of four selected endophytic fungi including *Mycoleptodiscus* sp., *Alternaria* sp., *Fusarium* sp. and *Emericella variecolor* were investigated. The *Mycoleptodiscus* sp., *Alternaria* sp., and *Fusarium* sp. cultured in yeast extract sucrose media provided antimicrobial metabolites higher than other media while *Emericella variecolor* cultured in MEB provided high amount of cell mass and could produce antimicrobial metabolites. Antimicrobial metabolites isolated from *Mycoleptodiscus* sp. were comprised of cyclo(L-leuciny-L-prolinyl), cyclo(L-alaniny-L-tryptophanyl) and (L-tryptophanyl-L-seriny). Antimicrobial metabolites isolated from *Alternaria* sp. were comprised of cyclo(L-leuciny-L-prolinyl), allantoin and ergosterol peroxide. Antimicrobial metabolites isolated from *Fusarium* sp. were comprised of bassiatin and beauvericin. Antimicrobial activity of those compounds were determined by broth dilution MIC assays and 2-[4-iodophenyl]-3-[4-dinitrophenyl]-5-phenyltetrazolium chloride (INT) colorimetric assay. The isolated cyclo(L-Ala-L-Trp) exhibited antimicrobial activity against *E. coli* and *P. aeruginosa* with minimal bactericidal concentration (MBC) value of 125 µg/mL and against *C. albicans* with minimal inhibition concentration (MIC) value of 125 µg/mL while the isolated cyclo(L-Leu-L-Pro) exhibited antimicrobial activity against *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* with MBC value of 50 µg/mL and against *C. albicans* with MIC values of 50 and 25 µg/mL, respectively. In addition antimicrobial activity of synthetic cyclo(L-Leu-L-Pro), cyclo(Ala-Tryp) and cyclo(Tryp-Ser) were also determined. It was found that the syththetic cyclic dipeptides in D,D and L,L series exhibited only inhibitory activity against *Candida albicans*. Ergosterol peroxide exhibited antimicrobial activity against *B. subtilis*, *E. coli* and *C. albicans* with MIC values of 7.82 µg/ml (23.84 µM), 31.25 µg/ml (95.27 µM), and 62.5 µg/ml (190.55 µM), respectively. Bassiatin exhibited antimicrobial activity against *E. coli* and *Propionibacterium acnes* with MBC value of 250 and 500 µg/ml, respectively while beauvericin exhibited antimicrobial activity against *E. coli* with MBC value of 250 µg/ml. Isolation of *Emericella variecolor* metabolites cultured in MEB gave two new metabolites, named emervaridione and varioxiranediol, and three known compounds, stellatic acid, ergosterol and dihydroterrein while four xanthones and terrein were isolated from the culture in lower malt media. By broth dilution MIC assays at 250 µg/ml all of the isolated metabolites from *E. variecolor* was inactive.

In the course of our investigations we found that culture broth and crude extract of broth and of mycelia displayed higher antimicrobial activity than the singly isolated compound. Attempts to isolate compounds with high activity using silicagel, Sephadex LH20 or reverse phase as absorbent was unsuccessful. However, we discovered that the endophytic fungi, which their broth or crude extract displayed high antimicrobial activity, also produced nucleotide base, uracil and/or thymine, and uracil was mainly found.

Keywords: endophyte, endophytic fugi, metabolites, Antimicrobial

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	
บทคัดย่อ	
Abstract	
บทนำ	1
วิธีการทดลอง	3
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	28
สรุปผลการทดลอง	61
เอกสารอ้างอิง	63
Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.	66
ภาคผนวก	67
- บทความส่งตีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศ 1 เรื่อง	68
Liangsakul, J., Srisurichan, S., Muangsin, N., Chaichit, N., Pornpakakul, S. 8-[(3,3-Dimethyloxiran-2-yl)methoxymethyl]-11-hydroxy-2-isopropenyl-5-methyl-12-oxo-1,2,3,12-tetrahydropyrano[3,2-a]xanthen-1-yl acetate. <i>Acta Crystallographica</i> , 2009, E65 , 2558-2559.	
- manuscript บทความส่งตีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศซึ่งมีหัวข้อเรื่อง	70
"Emervaridione and varioxiranediol, two new metabolites from an endophytic fungus <i>Emericella varicolor</i> "	

บทนำ

ด้วยปัจจุบันนี้มีความต้องการยาปฏิชีวนะชนิดใหม่เพื่อนำไปใช้ในการบำบัดรักษาโรคทั้งในคนและสัตว์ที่ยังไม่มียาที่ให้ผลในทางการรักษา เพื่อการทดแทนยาที่ใช้ในการรักษาแล้วก่อให้เกิดการดื้อยาหรือเพื่อนำมาทดแทนยาที่ใช้อยู่ในปัจจุบันซึ่งแสดงผลข้างเคียงอันไม่พึงประสงค์ โดยแหล่งที่มาของสารเหล่านั้นที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก คือ ราและ/หรือแบคทีเรีย เนื่องจากราและ/หรือแบคทีเรียมีความหลากหลายทางสายพันธุ์และยังมีอีกจำนวนมากที่ยังไม่มีผู้ค้นพบ นอกจากนี้ราและ/หรือแบคทีเรียยังเป็นแหล่งที่สำคัญแหล่งหนึ่งในการสร้างสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพและสามารถนำมาใช้เป็นยารักษาโรคได้

ราเอ็นโดไฟต์เป็นกลุ่มราประเภทหนึ่งที่เจริญอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของพืชที่ยังมีชีวิตอยู่โดยไม่ทำให้พืชชนิดนั้นเกิดโรค ราเอ็นโดไฟต์สามารถเจริญอยู่ได้ทุกส่วนของพืช ได้แก่ ใบ กิ่ง ก้าน เปลือก ลำต้น และราก ราเอ็นโดไฟต์นั้นได้มีการศึกษาอย่างจริงจังตลอดระยะเวลาเกือบ 20 ปี โดยพบว่าราเอ็นโดไฟต์มีประโยชน์ต่อพืชที่มันอาศัยอยู่ ตัวอย่างเช่น การสร้างสารที่เป็นประโยชน์เพื่อป้องกันการคุกคามพืชผู้ให้อาศัยโดยสัตว์และแมลง การสร้างสารที่ยับยั้งหรือป้องกันจุลชีพก่อโรคพืช การสร้างสารที่ช่วยควบคุมการเจริญเติบโตของพืช และการช่วยให้พืชผู้ให้อาศัยทนแล้งได้ดีขึ้น นอกจากนี้ยังพบอีกว่าราเอ็นโดไฟต์สามารถสร้างสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ เช่น ฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ และ รา ฤทธิ์การทำลายเชื้อมาลาเรีย และฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็ง เป็นต้น จากรายงานการวิจัยที่ได้ตีพิมพ์ไว้พบว่าเอ็นโดไฟต์สามารถสร้างสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ในการต่อต้านแบคทีเรีย รา ไวรัส และโปรโตซัวที่ก่อให้เกิดโรคในพืช ในสัตว์ และในคน และบางชนิดเป็นสารปฏิชีวนะที่มีศักยภาพในการต่อต้านจุลชีพที่ดีซึ่งมีแนวโน้มสูงในการพัฒนาเป็นยาปฏิชีวนะชนิดใหม่ ตัวอย่างเช่น ราเอ็นโดไฟต์ *Cryptosporiopsis quercina* สร้างเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านราก่อโรคในคน *Candida albican* และ *Trichophyton* spp. และ *C. quercina* ยังสร้าง cryptocin ซึ่งมีฤทธิ์ในการต่อต้านราก่อโรคพืช ส่วนการสร้างสารปฏิชีวนะของเอ็นโดไฟต์ในกลุ่มของ *Streptomyces* spp. มีรายงานว่าสาร munumbicins มีฤทธิ์ต่อต้านแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Bacillus anthracis* และ *Mycobacterium tuberculosis* โดยเฉพาะ munumbicin B มีฤทธิ์ต่อต้าน *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อยาเมธิซิลลิน และสาร munumbicin D มีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* และสาร kakadumycin A และ D มีฤทธิ์ต่อต้าน แบคทีเรียแกรมบวก เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบอีกว่าราเอ็นโดไฟต์ *Muscodor albus* สร้างสารปฏิชีวนะที่ระเหยได้ซึ่งจะมีประโยชน์อย่างมากในการถนอมรักษาผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรและผู้ค้นพบได้จดสิทธิบัตรการนำเอ็นโดไฟต์ชนิดนี้ไปใช้ประโยชน์ โดยดูรายละเอียดได้ใน US 20030186425

จากที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่าราเอ็นโดไฟต์เป็นแหล่งผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญในอนาคต โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารปฏิชีวนะ ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงให้ความสนใจในการศึกษาวิจัยราเอ็นโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรไทยที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารปฏิชีวนะที่ใช้ทางด้านการเกษตร การป้องกันหรือการรักษาโรคสัตว์และโรคผิวหนังคน ซึ่งคาดว่าจะได้ราเอ็นโดไฟต์ที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ที่ดีและอาจนำไปสู่การผลิตยาด้วยเทคโนโลยีชีวภาพในอนาคต

วิธีการทดลอง

1. การคัดกรองหาราเอ็นโดไฟท์ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้

นาราเอ็นโดไฟท์ที่รวมรวบไว้โดยหน่วยปฏิบัติการวิจัยไบโอออร์แกนิกเคมี ภาควิชาเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตั้งแต่ปี 47 และที่ได้จากการแยกราเอ็นโดไฟท์จากเสม็ดขาว มาคัดกรองหาราเอ็นโดไฟท์ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้ โดยใช้เทคนิค dual culture agar diffusion มีรายละเอียด ดังนี้

เชื้อเชื้อแบคทีเรียทดสอบและยีสต์ทดสอบจากหลอดเก็บเชื้อลงบนจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 90 มม. ที่ใส่อาหาร NA สำหรับการทดสอบสารออกฤทธิ์ต่อต้านแบคทีเรียและ YMA สำหรับการทดสอบสารออกฤทธิ์ต่อต้านยีสต์ตามลำดับ บ่มเชื้อแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 37 °C และ บ่มยีสต์ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 18-24 ชม. เชื้อเชื้อแบคทีเรียและยีสต์เหล่านี้จากจานเลี้ยง 4-5 โคโลนีลงในอาหารเลี้ยง NB และ YMB ปริมาตร 5 มล. ในหลอดทดลอง ตามลำดับ บ่มเชื้อแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 37 °C และ บ่มยีสต์ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2-8 ชม. ทำการปรับความขุ่นของหัวเชื้อจุลชีพทดสอบให้เท่ากับ ความขุ่นของ McFarland เบอร์ 0.5 จากนั้นใช้สำลีพันปลายไม้ที่ฆ่าเชื้อแล้วจุ่มลงไป ในหัวเชื้อที่เตรียมไว้ นำมาป้ายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อทำการ NA และ YMA ที่อยู่ในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 90 มม. เป็นแนว 60 องศา 3 ทิศทาง ทั้งอาหารเลี้ยงเชื้อที่ป้ายเชื้อจุลชีพทดสอบแล้วไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-5 นาที เจาะชั้นเอ็นโดไฟท์ที่แยกได้บริสุทธิ์แล้วซึ่งบ่มบนอาหาร MEA ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 1-3 สัปดาห์ (ขึ้นอยู่กับอัตราการเจริญเติบโตของราเอ็นโดไฟต์) ด้วยที่เจาะชั้นรา (cork hole borer) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 7.5 มม. ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำชิ้นส่วนของราเอ็นโดไฟท์ที่ต้องการทดสอบมาวางทับลงบนอาหารแข็ง นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบที่เกิดขึ้น

จุลชีพ 5 ชนิด ที่ใช้ในการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งจุลชีพ ประกอบด้วย

แบคทีเรียแกรมบวก: *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

แบคทีเรียแกรมลบ: *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

ยีสต์: *Candida albicans* ATCC 10231

2. ศึกษาการสร้างสารปฏิชีวนะของราเอ็นโดไฟต์ที่คัดเลือก

ราเอ็นโดไฟต์ที่คัดเลือกไว้ ประกอบด้วย

ก. ราเอ็นโดไฟต์ *Mycoleptodiscus* sp. ที่แยกได้จากใบกวาวเครือขาว *Pueraria mirifica*

ข. ราเอ็นโดไฟต์ *Alternaria* sp. ที่แยกได้จากใบพลูคาว *Houttuynia cordata* Thunb.

ค. ราเอ็นโดไฟต์ *Fusarium* sp. ที่แยกได้จากใบเสม็ดขาว *Melaluca cajuputi*

ง. ราเอ็นโดไฟต์ *Emericella varicolor* ที่แยกได้จากใบเปล้าใหญ่ *Croton oblongifolius*

นำมาศึกษาการสร้างสารปฏิชีวนะของราเอ็นโดไฟต์ที่เลือกได้ในอาหารเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน โดยเพาะเลี้ยงราเอ็นโดไฟต์ที่คัดเลือกไว้บนอาหารแข็ง 5 ชนิด

PDA (potato dextrose agar),

MEA (malt extract agar),

YEA (yeast extract sucrose agar),

SDA (sabouraud's dextrose agar) และ

CMA (corn meal agar)

เมื่อราเจริญสมบูรณ์แล้วจึงนำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลชีพโดยวิธี Dual Agar diffusion เช่นเดียวกับในขั้นตอนการคัดกรองหาเอ็นโดไฟต์ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้ (ดู ข้อ 1 ข้างต้น) อาหารเพาะเลี้ยงชนิดใดที่ทำให้ราสร้างสารออกฤทธิ์ในการยับยั้งจุลชีพได้ดีที่สุดก็จะเลือกอาหารชนิดนั้นสำหรับการขยายขนาดการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว

3. ศึกษาอัตราการเจริญเติบโต (growth curve) ในอาหารเหลวและการสร้างสารเมแทบอลิต์ที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ

3.1 การศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของราเอ็นโดไฟต์

เพาะเลี้ยงราในอาหารที่ราสร้างสารออกฤทธิ์ในการยับยั้งจุลชีพได้ดีที่สุด บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นจะขึ้นวันที่มีราเจริญอยู่เต็มบนอาหารเพาะเลี้ยงโดยใช้ sterile cork borer No.4 ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 7.5 มิลลิเมตร นำชิ้นราที่เจาะได้ถ่ายลงขวดรูปชมพู่ (flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุด้วยอาหารเหลวซึ่งเป็นชนิดเดียวกับที่ได้จากการศึกษามาแล้ว ตามข้อ 2 ข้างต้น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยใส่ชิ้นรา 5 ชิ้นต่อขวด จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง

เก็บตัวอย่างราที่เพาะเลี้ยงไว้มาวิเคราะห์ทุกๆ 2 วันและเก็บ 3 ชั่วโมง โดยกรองแยกเส้นใยและน้ำเลี้ยงเชื้อออกจากกันโดยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 เส้นใยเชื้อราที่ได้จะนำไปอบแห้งในเครื่อง Hot air oven ที่อุณหภูมิ 60 °C นำมาชั่งน้ำหนักแห้งจนน้ำหนักที่ได้คงที่ จากนั้นทำการ plot graph ระหว่างน้ำหนักแห้งกับระยะเวลาเพาะเลี้ยงเพื่อศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อรา

3.2 การสร้างสารเมแทบอลิต์ที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ

ส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อที่กรองได้นำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลชีพโดยวิธี Agar well diffusion เพื่อศึกษาว่าระยะเวลาใดที่ราเอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้สร้างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพได้ดีที่สุด โดยที่วิธีการดำเนินการเป็นดังนี้

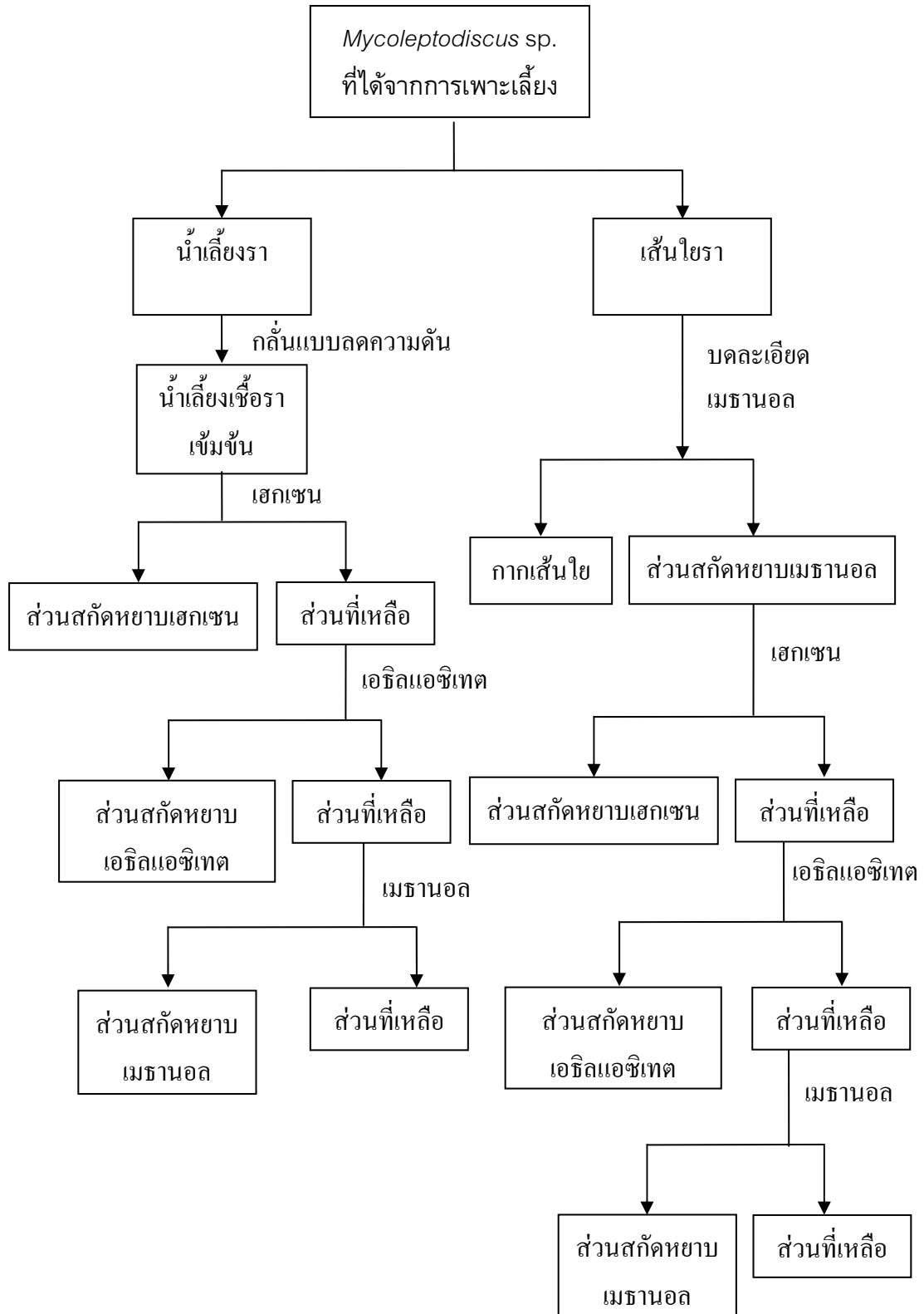
เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ทดสอบเช่นเดียวกับการทดสอบด้วยเทคนิค dual culture agar diffusion แต่จะต่างกันตรงที่เจาะรูอาหารแข็งในจานเพาะเลี้ยงจุลชีพที่ใช้ในการทดสอบนี้ด้วย sterile cork borer No.4 ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 7.5 มิลลิเมตร แล้วใช้เข็มเขี่ยชิ้นรูนึงในน้ำยาฆ่าเชื้อหยอดน้ำเลี้ยงราที่จะทดสอบหาฤทธิ์การยับยั้งจุลชีพลงในหลุมที่เจาะไว้ด้วย micropipette หลุมละ 100 ไมโครลิตร ทำ 3 ซ้ำ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อให้สารแพร่เข้าไปในอาหารเลี้ยงเชื้อก่อน จากนั้นนำไปบ่มต่อในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดผลการยับยั้งจุลชีพที่ได้ โดยวัดโซนใสที่เกิดขึ้นรอบๆ รูที่เจาะไว้ จากขอบด้านหนึ่งถึงอีกด้านหนึ่ง หาค่าเฉลี่ย แล้วบันทึกผล

4. การเลี้ยงขยายขนาด การสกัดแยกสารปฏิชีวนะ และ ศึกษาโครงสร้างทางเคมี

4.1 ราเอนโดไฟต์ *Mycoleptodiscus* sp. ที่แยกได้จากใบกวาวเครือขาว *Pueraria mirifica*

นำราเอนโดไฟต์ *Mycoleptodiscus* sp. มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง YEA ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เจาะขึ้นเชื้อราโดยใช้ sterile cork borer No.4 ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 7.5 มิลลิเมตร นำขึ้นเชื้อราจำนวน 5 ชิ้น ถ้ายใส่ในขวดรูปชมพู่ (flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YEB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยเลี้ยงทั้งหมด 22 ลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 18 วัน เมื่อครบกำหนดนำอาหารเลี้ยงเชื้อมารองแยกเส้นใยเชื้อรากับน้ำเลี้ยงเชื้อราออกจากกัน

นำราเอนโดไฟต์ *Mycoleptodiscus* sp. ที่เพาะเลี้ยงได้มาทำการกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ซึ่งจะได้ส่วนของเส้นใยราและส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อ แล้วจึงนำทั้ง 2 ส่วนที่แยกได้นี้มาสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ได้แก่ เฮกเซน เอธิลเอซิเทต และเมทานอล ดังแสดงไว้ในแผนภาพที่ 1



แผนภาพที่ 1 การสกัดแยกน้ำเลี้ยงและเส้นใยรา *Mycoleptodiscus* sp.

4.1.1 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพของสารสกัดหยาบจากเส้นใยราและน้ำเลี้ยงรา

สารสกัดหยาบจากเส้นใยราและน้ำเลี้ยงราทั้ง 8 ส่วน ได้แก่ ส่วนสกัดหยาบเฮกเซน ส่วนสกัดหยาบเอทิลแอลกอฮอล์ ส่วนสกัดหยาบเมทานอลและส่วนที่เหลือจากการสกัดด้วยเมทานอล นำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลชีพโดยใช้วิธี paper disk diffusion method โดยใช้สารสกัดหยาบอย่างละ 20.0 มิลลิกรัม ผสมกับตัวทำละลาย 10% DMSO ในน้ำที่มี Tween 80 อยู่ 1% ปริมาตร 1 ml ซึ่งจะได้เป็นสารละลายความเข้มข้น 20.0 mg/ml จากนั้นนำไปเจือจางต่อด้วยตัวทำละลายให้ได้ระดับความเข้มข้น 10.0 mg/ml และ 5.0 mg/ml ตามลำดับ

ก. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพมาตรฐาน 5 ชนิด

นำตัวอย่างทดสอบที่เตรียมไว้มาหยดลงบน paper disk ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7.0 มิลลิเมตร (อบฆ่าเชื้อแล้ว) ปริมาตร 10 µl เมื่อ paper disk แห้ง จึงนำมาวางบนจานเพาะจุลชีพที่ใช้ในการทดสอบ 5 ชนิด คือ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 10231 จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 คืน แล้วทำการวัดขนาดวงใสที่เกิดขึ้น

โดยในการทดสอบใช้สารละลายสารชุดควบคุม ดังนี้

ชุดควบคุมบวก (Positive Control)

Penicillin G 10 µg/disk

Streptomycin 10 µg/disk

Ketoconazole 10 µg/disk

ชุดควบคุมลบ (Negative Control)

ตัวทำละลาย 10% DMSO

ข. การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งราก่อโรคพืช

ในการทดสอบใช้ราก่อโรคพืช 4 ชนิด คือ *Phytophthora* sp., *Alternaria* sp., *Colletotrichum* sp. และ *Fusarium* sp.

เลี้ยงราก่อโรคพืชบนอาหาร PDA ให้มีอายุ 4 วัน จากนั้นนำตัวอย่างทดสอบที่เตรียมไว้มาหยดลงบน paper disk ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7.0 มิลลิเมตร (อบฆ่าเชื้อแล้ว) เช่นเดียวกับข้างต้น เมื่อ paper disk แห้งแล้วนำมาวางบนจานเพาะเลี้ยงที่ราก่อโรคเจริญอยู่ โดยจะวาง 4 จุด ห่างจากโคโลนีของเชื้อราประมาณ 1.5 cm. ใช้ Captane, Iprodione และ Ketokonazole ความเข้มข้น 10 µg เป็น Positive control จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 3-4 วัน แล้วอ่านผลการทดลอง

4.1.2 การแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากเส้นใยและน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟต์ให้บริสุทธิ์และการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

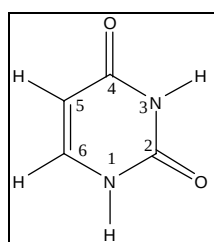
การเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว YEB ที่อุณหภูมิสภาพห้องเป็นเวลา 18 วัน แยกเส้นใยและน้ำเลี้ยงด้วยการกรอง ส่วนน้ำเลี้ยงนำไปทำให้เข้มข้นจนได้ปริมาตร 1.5 ลิตร และทำการสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซนและเอธิลเอซิเตต, โดยลำดับ จากนั้นส่วนน้ำเลี้ยงหลังการสกัดนำไปทำให้แห้งแบบเยือกแข็งจนแห้งแล้วสกัดด้วยเมทานอล ส่วนเส้นใยสกัดด้วยเมทานอลและนำไปประเหยตัวทำละลายจากนั้นสกัดส่วนที่เหลืออยู่ด้วยเฮกเซน, เอธิลเอซิเตตและเมทานอล โดยลำดับ หลังจากการระเหยตัวทำละลาย ส่วนสกัดทั้งหมดนำไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลชีพ 5 ชนิด คือ แบคทีเรียแกรมบวก: *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 แบคทีเรียแกรมลบ: *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และยีสต์: *Candida albicans* ATCC 10231 และใช้ penicillin G, erythromycin, sulfadimidine, streptomycin, iprodione และ ketoconazole เป็นสารอ้างอิงการทดสอบ

ก. การแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบเอธิลเอซิเตตจากน้ำเลี้ยง

สารสกัดหยาบเอธิลเอซิเตตที่ได้จากน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟต์นำมาสกัดด้วยเอธิลเอซิเตตและเมทานอล ตามลำดับ ของแข็งส่วนที่เหลือหลังจากการสกัดนำมาล้างด้วยเมทานอล ได้ Uracil เป็นของแข็งสีครีมหนัก 800 มิลลิกรัม

สารสกัดเอธิลเอซิเตตของสารสกัดหยาบเอธิลเอซิเตตจากน้ำเลี้ยง 5.30 กรัม นำมาแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ (320 กรัม) คอลัมน์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร สูง 80 เซนติเมตร และชะคอลัมน์โดยเพิ่มสภาพขั้วตัวชะจาก เฮกเซน-ไดคลอโรมีเทน, ไดคลอโรมีเทน, ไดคลอโรมีเทน-เมทานอล ไปจนถึงเมทานอล ตามลำดับ แต่ละส่วนแยกวิเคราะห์ด้วย TLC ส่วนแยกใดที่คล้ายคลึงกับจะรวมเข้าด้วยกัน ซึ่งทำให้ได้ส่วนแยกที่รวมเข้ากันได้ทั้งหมด 25 ส่วนแยก

ลำดับส่วนที่ BE13, BE16 และ BE22 ที่ได้มาจากคอลัมน์โครมาโทกราฟีที่ชะด้วย 2-10% เมทานอลในไดคลอโรมีเทน มีของแข็งเกิดขึ้นในระหว่างการระเหยตัวทำละลาย แยกของแข็งโดยการกรองและล้างของแข็งที่ได้ด้วยเมทานอล ได้ Uracil เป็นของแข็งสีน้ำตาลอ่อนหนัก 20 มิลลิกรัม รวมทั้งสองส่วนได้ Uracil ทั้งหมด 820 มิลลิกรัม



mp = 314-315 °C

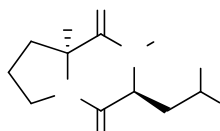
$V_{\max}(\text{KBr}): 3420, 1738, 1671 \text{ และ } 854 \text{ cm}^{-1}$

δ_H (DMSO, 400 MHz): 3.73 (1H, dd, $J = 3.6$ และ 4.8 Hz, 6-H), 4.13 (1H, dd, $J = 4.4$ และ 6.0 Hz, 3-H), 5.46 (1H, dd, $J = 0.60$ และ 2.6 Hz, 5-H), 7.40 (1H, d, $J = 5.6$, 6-H) ppm

δ_C (DMSO, 100 MHz): 100.7 (C-5), 142.7 (C-6), 152.2 (C-2) และ 164.3 (C-4) ppm

m/z 113.0370 $[M+H]^+$; cal $C_4H_4N_2O_2$ 113.0351

ส่วนแยก BE11 ของสารสกัดหยาบเอธิลแอซิทเทตจากน้ำเลี้ยงเชื้อซึ่งได้มาจากคอลัมน์โครมาโทกราฟีที่ชะด้วย 2 % เมธานอลในไดคลอโรมีเทน นำมาทำการตกผลึกออกจากตัวทำละลายผสมเฮกเซน-ไดคลอโรมีเทน ได้ Cyclo(L-Leu-L-Pro) เป็นผลึกสีขาวหนัก 11 มิลลิกรัม



ละลายได้ใน CH_2Cl_2 และ $CHCl_3$ R_f ของสารเท่ากับ 0.638 โดยใช้ 100% ไดคลอโรมีเทนเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่

m.p. : 156-157 °C ; [157-158 (Nitecki, 1968)]

$[\alpha]_D^{20}$: -132 (c 0.24 ใน CH_2Cl_2) [- 133 (c 1 ใน EtOH) (Nitecki, 1968)]

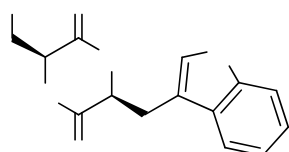
FT-IR สเปกตรัม (KBr) 3253, 2954, 1672, 1637, 1554, 1434 cm^{-1}

1H -NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 0.99 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, 13-H), 1.04 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, 12-H), 1.56 (1H, ddd, $J = 4.8, 9.9$ และ 10 Hz, 10-H_b), 1.76 (1H, m, 11-H), 1.94 (1H, m, 4-H_b), 2.06 (1H, m, 4-H_a), 2.10 (1H, m, 10-H_a), 2.17 (1H, m, 5-H_b), 2.39 (1H, ddd, $J = 2.8, 7.2$ และ 13.2 Hz, 5-H_a), 3.61 (2H, m, 3-H), 4.06 (1H, dd, $J = 3.2$ และ 10 Hz, 9-H) และ 4.10 (1H, dd, $J = 8.0$ และ 8.8 Hz, 6-H) ppm

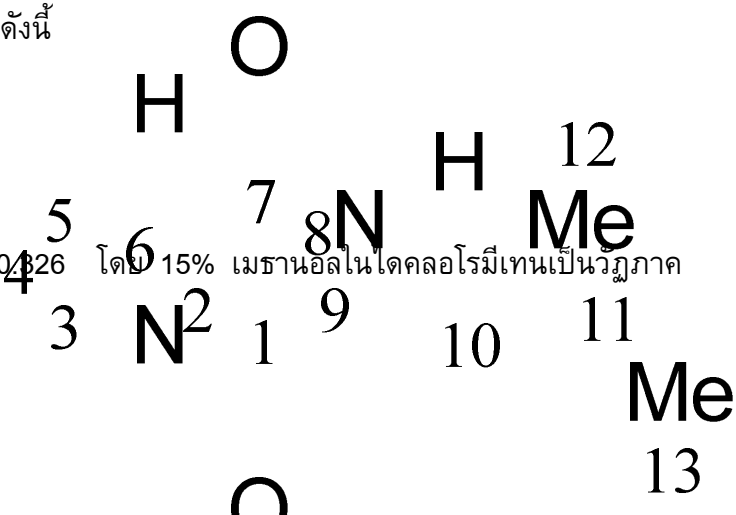
^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ 21.2 (C-13), 22.8 (C-4), 23.4 (C-12), 24.7 (C-11), 28.2 (C-5), 38.6 (C-10), 45.6 (C-3), 53.4 (C-9), 59.0 (C-6), 166.2 (C-1) และ 170.2 (C-7) ppm

HR/ESI-TOF MS spectrum m/z : 211.1443 $[M+H]^+$; cal $C_{11}H_{18}N_2O_2$ 211.1446

ส่วนแยกของสารสกัดหยาบเอธิลแอซิทเทตจากน้ำเลี้ยงเชื้อมาซึ่งได้มาจากคอลัมน์โครมาโทกราฟีที่ชะด้วย 4 % เมธานอลในไดคลอโรมีเทน นำมาแยกต่อด้วยเฟลชคอลัมน์โครมาโทกราฟีและใช้ 4-6% เมธานอลในไดคลอโรมีเทนเป็นตัวชะ ในระหว่างการระเหยตัวทำละลายเกิดการตกตะกอน แยกได้ของแข็งโดยการกรองจากนั้นล้างของแข็งที่ได้ด้วยตัวทำละลายผสม ไดคลอโรมีเทน-เมธานอล ได้ cyclo(L-Ser-L-Tryp) หรือ 2-((1H-indol-3-yl)methyl)-6-(hydroxymethyl)piperazine-2,5-dione เป็นของแข็งสีขาวหนัก 5 มิลลิกรัม ที่ได้มีสมบัติ ดังนี้



ละลายได้ใน MeOH R_f ของ สารเท่ากับ 0.26 โดย 15% เมธานอลในไดคลอโรมีเทนเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่



m.p. : 245-246 °C

$[\alpha]_D^{20}$ - 67 (c 0.050 ใน MeOH) [lit. $[\alpha]_D^{25}$ -213 (c 0.4, MeOH) (Li, X. et al., 2007.) และ $[\alpha]_D$ - 100 (c 0.5, CH₃OH).] (Tullberg et al, 2006)]

FT-IR สเปกตรัม (KBr) 3430, 2875-3164, 1644, 1450, 1059, 1326, 841, 744 cm⁻¹

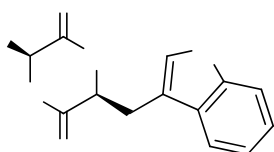
¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ 2.75 (1H, dd, J = 6.0 และ 11.2 Hz, -CH_aH_bOH), 3.21 (1H, dd, J = 4.4 และ 14.0 Hz, -CH_aH_b), 3.26 (1H, dd, J = 3.6 และ 11.2 Hz, -CH_aH_bOH), 3.29 (1H, m, -CH_aH_b), 3.73 (1H, dd, J = 3.6 และ 4.8 Hz, 6-H), 4.13 (1H, dd, J = 4.4 และ 6.0 Hz, 3-H), 6.92 (1H, dd, J = 7.6 และ 6.8 Hz, 5'-H), 7.00 (1H, dd, J = 8.0 และ 7.2 Hz, 6'-H), 7.02 (1H, s, 3'-H), 7.26 (1H, d, J = 8.0 Hz, 4'-H) และ 7.51 (1H, d, J = 7.6 Hz, 7'-H) ppm

¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ 30.5 (-CH₂), 56.0 (C-3), 57.4 (C-6), 63.4 (-CH₂OH), 108.6 (C-2'), 110.9 (C-4'), 118.3 (C-7'), 118.7 (C-5'), 121.2 (C-6'), 124.1 (C-3'), 127.5 (C-3a), 136.5 (C-7a), 166.6 (C-5) และ 168.7 (C-2) ppm

แมสสเปกตรัม (HR/ES-TOF MS spectrum) m/z 274.1191 [M+H]⁺; cal C₁₄H₁₅N₃O₃ 274.1191

ส่วนแยกที่ BE18 น้ำหนัก 398.2 มิลลิกรัม นำมาแยกอีกครั้งด้วยเทคนิคแฟลชคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ (80 กรัม) และการชะจะเพิ่มสภาพขั้วจาก ไดคลอโรมีเทน, ไดคลอโรมีเทน-เมทานอล ไปจนถึงเมทานอล ตามลำดับ

ส่วนที่ RBE03 ซึ่งได้มาจากการนำ BE18 ของสารสกัดหยาบเอริลแอซิทเตตจากน้ำเลี้ยงเชื้อมาแยกอีกครั้งด้วยแฟลชคอลัมน์โครมาโทกราฟีและใช้ 4-6% เมทานอลในไดคลอโรมีเทนเป็นตัวชะ แยกของแข็งออกมาโดยการกรองจากนั้นล้างของแข็งที่ได้ด้วยเมทานอล ได้ cyclo(L-Alanine-L-Tryptophane) หรือ 2-((1*H*-indol-3-yl)methyl)-6-methylpiperazine-2,5-dione ของแข็งสีขาวหนัก 15 มิลลิกรัม ที่ได้มีสมบัติ ดังนี้



ละลายได้ใน DMSO, EtOH ผสม H₂O ในอัตราส่วน 1:1 และละลายได้เล็กน้อยใน MeOH; R_f ของสารเท่ากับ 0.353 โดยใช้ 15 % เมทานอลในไดคลอโรมีเทนเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่

m.p. : 281-282 °C

$[\alpha]_D^{20}$: +16 (c 0.10 ใน EtOH:H₂O)

FT-IR สเปกตรัม (KBr) 3407, 3059, 2854, 1673, 1461, 1320, 841, 793 cm⁻¹

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 0.01 (1H, d, J = 7.2 Hz, -CH₃), 6.91 (1H, d, J = 8.0 Hz, 4'-H), 2.85 (1H, dd, J = 7 และ 14.4 Hz, -CH_aH_b), 2.85 (1H, dd, J = 4.0 และ 14.4 Hz, -CH_aH_b), 3.19 (1H, brq, J = 7.2 Hz, 6-H), 3.71 (1H, m, 3-H), 6.54 (1H, dt, J = 8.0 และ 7.2 Hz, 4'-H), 6.64 (1H, dt, 6'-H), 6.91 (1H, d, J = 8.0 Hz, 4'-H) และ 7.17 (1H, d, J = 8.0 Hz, 7'-H) ppm

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 20.0 (- CH_3), 29.3 (- CH_2), 50.2 (C-6), 55.8 (C-3), 108.9 (C-2'), 111.5 (C-5'), 118.8 (C-4'), 119.4 (C-7'), 121.2 (C-6'), 125.0 (C-3'), 128.2 (C-3a), 136.2 (C-7a), 167.2 (C-2) และ 168.2 (C-5) ppm

แมสสเปกตรัม (HR/ES-TOF MS spectrum) m/z 258.1239 $[\text{M}+\text{H}]^+$; cal $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$ 258.1242

4.2 ราเอนโดไฟต์ *Alternaria* sp. ที่แยกได้จากใบพลูดาว *Houttuynia cordata* Thunb.

ราเอนโดไฟต์ *Alternaria* sp. ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง YEA อายุ 20 วัน นำมาเจาะด้วย sterile cork borer No.4 ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 7.5 มิลลิเมตร เพื่อการนำเอาชิ้นวัณที่มีเส้นใยของราเอนโดไฟต์ *Alternaria* sp. มาเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุด้วยอาหารเลี้ยงเหลว YEB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จำนวน 5 ชิ้นต่อขวด โดยเลี้ยงทั้งหมด ปริมาตร 22 ลิตร บ่มเชื้อไว้ในอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 วัน

นำราเอนโดไฟต์ที่เพาะเลี้ยงไว้มาทำการกรองแยกด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ซึ่งจะได้ส่วนของเส้นใยราและส่วนของน้ำเลี้ยงรา แล้วนำทั้ง 2 ส่วนที่แยกได้นี้มาสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ได้แก่ เฮกเซน เอธิลเอซิเทต และเมทานอล ตามลำดับ ดังแสดงไว้ในแผนภาพที่ 2

4.2.1 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลชีพของส่วนสกัดหยาบที่ได้จากราเอนโดไฟต์ *Alternaria* sp.

การเตรียมตัวอย่างทดสอบ

นำส่วนสกัดหยาบทั้ง 8 ส่วนคือ ส่วนสกัดหยาบเมทานอล ส่วนสกัดหยาบเอธิลเอซิเทต ส่วนสกัดหยาบเฮกเซน และ ส่วนที่เหลือจากการสกัดของน้ำเลี้ยงรา ส่วนสกัดหยาบเมทานอล ส่วนสกัดหยาบเอธิลเอซิเทต ส่วนสกัดหยาบเฮกเซน และ ส่วนที่เหลือจากการสกัดของเส้นใย มาอย่างละ 20.0 มิลลิกรัม ผสมกับตัวทำละลาย 10% DMSO ในน้ำปริมาตร 1 ml จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 20.0 mg/ml แล้วนำไปเจือจางด้วยตัวทำละลายให้ได้ระดับความเข้มข้น 10.0 mg/ml และ 5 mg/ml ตามลำดับ

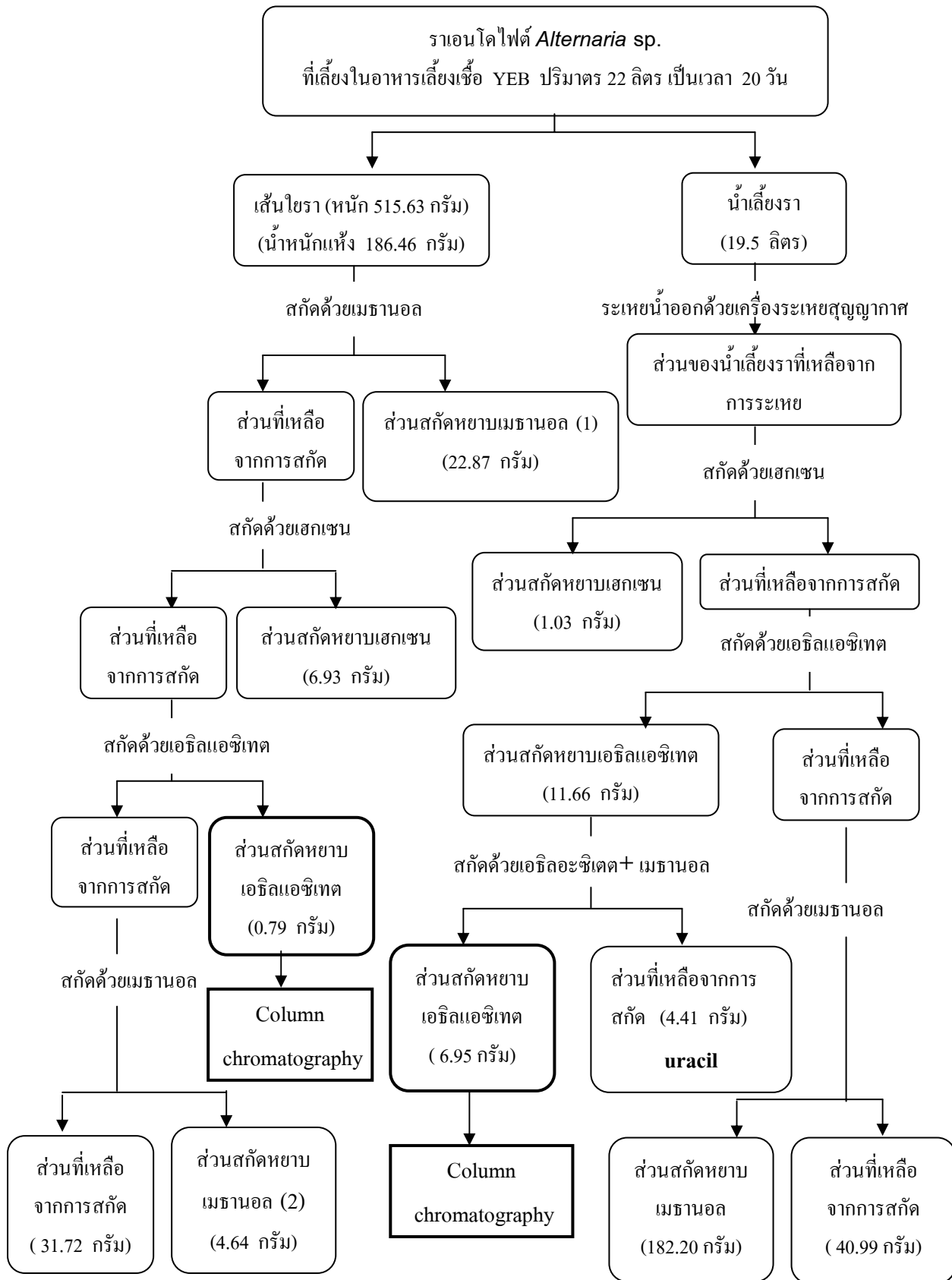
การเตรียมสารละลายสารชุดควบคุม

ชุดควบคุมบวก (Positive Control)

- สารละลาย Penicillin G 10 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$
- สารละลาย Streptomycin 10 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$
- สารละลาย Ketoconazole 10 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$

ชุดควบคุมลบ (Negative Control)

- ตัวทำละลาย 10% DMSO ในน้ำ



แผนภาพที่ 2 ขั้นตอนการสกัดแยกสารจากเส้นใยและน้ำเลี้ยง

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลชีพของส่วนสกัดหยาบโดยใช้วิธี **Paper disk diffusion** (Weaver และคณะ, 1994 และ Joseph และ คณะ, 1998)

นำส่วนสกัดที่ได้จากเส้นใยและน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟต์ทั้งหมดไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง จุลชีพหยดลงบน paper disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7.5 มิลลิเมตร (อบฆ่าเชื้อแล้ว) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ทำทั้งหมด 3 ซ้ำ โดยแบคทีเรียบ่มนาน 18-24 ชั่วโมง ขณะที่ยีสต์บ่มนาน 48 ชั่วโมง

นอกจากนั้นยังทดสอบฤทธิ์การยับยั้งราก่อโรคพืช 4 ชนิด *Phytophthora palmivora*, *Alternaria brassicicola*, *Collectotrichum gloeosporioides* และ *Fusarium oxysporum* ด้วยเช่นกัน โดยเลี้ยงเชื้อราในอาหาร PDA ให้มีอายุ 4 วัน จากนั้นนำส่วนสกัดจากราเอนโดไฟต์มาละลายใน 10 % DMSO ในน้ำ (negative control) แล้วหยดลงบน paper disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร (อบฆ่าเชื้อแล้ว) ทำทั้งหมด 3 ซ้ำ โดยใช้ Captane, Iprodione และ Ketokonazole ความเข้มข้น 10 µg เป็น Positive control นำไปบ่ม 2 วันที่อุณหภูมิห้อง แล้วอ่านผลการทดลอง

4.2.2 การแยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดหยาบจากเส้นใยและน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟต์ *Alternaria* sp. ให้บริสุทธิ์และการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

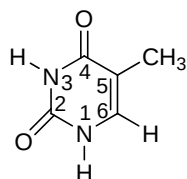
ก. การแยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดหยาบเอริลแอซิเตตจากน้ำเลี้ยงรา

นำส่วนสกัดหยาบเอริลแอซิเตตจากน้ำเลี้ยงรา น้ำหนัก 11.66 กรัม มาสกัดแยกด้วยเมธานอล ได้สารสกัดหยาบ 6.95 กรัม และส่วนตะกอนที่ไม่ละลายในเมธานอลปริมาณ 4.41 กรัม จากนั้นนำส่วนสกัดหยาบปริมาณ 5.30 กรัม มาแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ (320 กรัม) โดยใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.0 เซนติเมตร สูง 80.0 เซนติเมตร และชะคอลัมน์โดยเพิ่มสภาพขั้วตัวชะจาก เฮกเซน-ไดคลอโรมีเทน, ไดคลอโรมีเทน, ไดคลอโรมีเทน-เมธานอล ไปจนถึงเมธานอล แต่ละส่วนแยกวิเคราะห์ด้วย TLC ส่วนแยกใดที่คล้ายคลึงกับจะรวมเข้าด้วยกัน ซึ่งทำให้ได้ส่วนแยกที่รวมเข้ากันได้ทั้งหมด 28 ส่วน ดังนี้

ส่วนแยกที่ BE014-BE015 ของสารสกัดหยาบเอริลแอซิเตตจากน้ำเลี้ยงรา ที่แยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ 2 % เมธานอลในไดคลอโรมีเทนเป็นตัวชะ มีลักษณะเป็นน้ำมันสีเหลืองปนของแข็งสีขาว นำส่วนแยกนี้มาล้างน้ำมันสีเหลืองออกด้วยเฮกเซน จากนั้นนำไปตกผลึกซ้ำด้วยตัวทำละลายผสมเฮกเซน-ไดคลอโรมีเทน ได้ Cyclo(L-Leu-L-Pro) หรือ 3-isobutyl-hexahydropyrido [1,2-α] pyrazine-1,4-dione ที่เป็นผลึกสีขาวหนัก 44.33 มิลลิกรัม (0.20 % w/v) ซึ่งสามารถละลายได้ในคลอโรฟอร์ม

ส่วนแยกที่ BE017 ของสารสกัดหยาบเอริลแอซิเตตจากน้ำเลี้ยงรา ที่แยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี และใช้ 2 % เมธานอลในไดคลอโรมีเทนเป็นตัวชะ นำมาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีอีกครั้งโดยใช้ 100% ไดคลอโรมีเทน-เมธานอลเป็นตัวชะ ส่วนแยกที่ 129-132 ซึ่งได้มาจากการชะโดยใช้ 5 % เมธานอลในไดคลอโรมีเทน มีผลึกสีขาวปนกับน้ำมันสีส้ม ล้างน้ำมันสีส้มออกด้วยไดคลอโร

มีเซนและเมธานอลแล้วกรองแยกผลึกออกแล้วนำมาตกผลึกซ้ำด้วยตัวทำละลายผสมไดคลอโรมีเทน-เมธานอล ได้ Thymine เป็นผลึกสีขาวหนัก 21.2 มิลลิกรัม (0.0964%) ละลายได้ในตัวเทอร์เรียมออกไซด์



mp = 314-315 °C

$\lambda_{\max}$ CH₂Cl₂ (ε): 264.06 นาโนเมตร [$\lambda_{\max}$ H₂O (ε) 263.75 นาโนเมตร (Fashman, G.D.,1975)]

$\nu_{\max}$ (KBr): 3449, 2925, 1670, 1448 และ 770 cm⁻¹

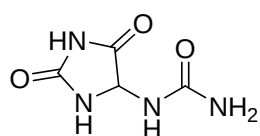
δ_{H} (DMSO-*d*₆, 400 MHz) 2.48 (3H, s, CH₃), 7.22 (1H, s, 6-H) , 10.57 (1H, s, 1-H), 10.96 (1H, s, 3-H) ppm

δ_{C} (DMSO-*d*₆, 100 MHz) 12.2 (C-5), 108.1 (C-5), 138.2 (C-6) , 151.9 (C-4), 165.3 (C-2) ppm

HR/ESI-TOF MS spectrum *m/z* 127.0521[M+H]⁺; cal C₅H₆N₂O₂ 127.0507

สารสกัดหยาบเอธิลอะซีเตตจากส่วนน้ำเลี้ยง นำมาล้างเอธิลอะซีเตตและการกรองได้ uracil ปริมาณ 4.41 กรัม การกรองส่วนแยกที่ BE 018 ของสารสกัดหยาบเอธิลอะซีเตตจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่แยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี และใช้ 2-4 % เมธานอลในไดคลอโรมีเทนเป็นตัวชะ และการล้างของแข็งที่ได้จากการกรองด้วยไดคลอโรมีเทน-เมธานอล ทำให้ได้ uracil เป็นผงสีขาวเพิ่มอีกหนัก 149 มิลลิกรัม (รวม 4.559 กรัม)(20.72 % w/v)

ส่วนแยกที่ BE023 ของสารสกัดหยาบเอธิลอะซีเตตจากน้ำเลี้ยงรา ที่แยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี และใช้ 6-10 % เมธานอลในไดคลอโรมีเทนเป็นตัวชะ ล้างน้ำมันสีส้มออกด้วยเมธานอลแล้วกรองแยกผลึกออกมา ได้ allantoin ผลึกสีขาวหนัก 31.9 มิลลิกรัม ซึ่งละลายได้ในไดเมทิลซัลฟอกไซด์



mp = 229-230 °C

$[\alpha]_D^{20}$ -7(c 0.05, EtOH:H₂O (1:1))

FT-IR สเปกตรัม (KBr), $\nu_{\max}$ 3438, 3337, 3061, 3186, 2762, 1781, 1720, 1666, 1529 และ 1181 (s) cm⁻¹

δ_{H} (DMSO-*d*₆, 400 MHz) 5.21 (2H, d, *J*=8Hz), 5.79 (s), 6.92 (1H, d, *J*=8Hz), 8.04 (s), 10.56 (s) ppm

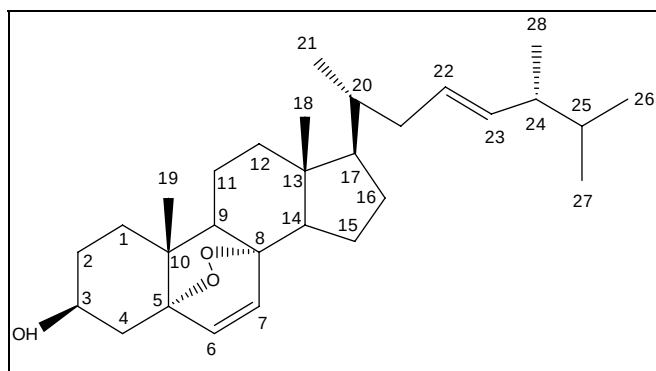
δ_{C} (DMSO-*d*₆, 100 MHz) 62.8, 157.2, 157.9, 174.0 ppm

HR/ESI-TOF MS spectrum *m/z* 181.0038 [M+Na]⁺; cal C₄H₆N₄O₃ 181.0036

ข. การแยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดหยาบเอธิลแอซิเตตจากเส้นใย

นำส่วนสกัดหยาบเอธิลแอซิเตตจากเส้นใย น้ำหนัก 700 มิลลิกรัม มาแยกด้วยเทคนิค คอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ (81.40 กรัม) คอลัมน์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.0 เซนติเมตร สูง 50.0 เซนติเมตร และชะคอลัมน์โดยเพิ่มสภาพขั้วตัวชะจาก เฮกเซน-ไดคลอโรมีเทน, ไดคลอโรมีเทน, ไดคลอโรมีเทน-เมทานอล ไปจนถึงเมทานอล แต่ละส่วนแยกวิเคราะห์ด้วย TLC ส่วนแยกใดที่คล้ายคลึงกับจะรวมเข้าด้วยกัน ซึ่งทำให้ได้ส่วนแยกที่รวมเข้ากันได้ทั้งหมด 27 ส่วน

ส่วนแยกที่ ME04 ของส่วนสกัดหยาบเอธิลแอซิเตตจากเส้นใยที่แยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ 40% เฮกเซนในไดคลอโรมีเทนเป็นตัวชะ ซึ่งเป็นน้ำมันสีเหลืองปนของแข็งสีขาว นำมาล้างส่วนน้ำมันออกด้วยเฮกเซนได้ Ergosterol peroxide เป็นของแข็งสีขาวหนัก 21.4 มิลลิกรัม (0.0973%)



$R_f = 0.65$ (50 % Hexane ใน CH_2Cl_2)

mp = 182-183°C

$V_{\max}(\text{KBr})$: 3424 (br), 2953, 2863, 1703, 1633, 1555, 1450, 1365, 1038 และ 960 cm^{-1}

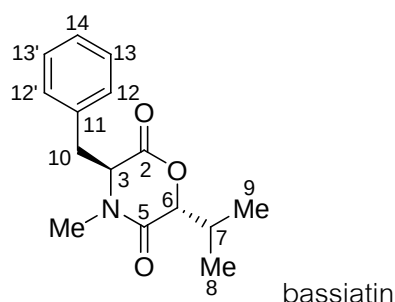
δ_{H} (CDCl_3 , 400 MHz) 6.53 (1H, d, $J = 4.8$, H-6), 6.27 (1H, d, $J = 8.4$, H-7) 5.25 (1H, dd, $J_1 = 7.6$ และ $J_2 = 14.8$, H-22), 5.18 (1H, dd, $J_1 = 7.6$ และ $J_2 = 14.8$, H-23), 4.00 (1H, m, H-3), 2.14 (1H, m, H-1), 2.07 (1H, m, H-20), 2.04 (1H, m, H-12), 1.98 (1H, m, H-4), 1.95 (1H, m, H-1), 1.89 (1H, m, H-24), 1.87 (1H, m, H-2), 1.78 (1H, m, H-15), 1.74 (1H, m, H-4), 1.64 (1H, m, H-11), 1.60 (1H, m, H-14), 1.58 (1H, m, H-2), 1.53 (1H และ 1H, m และ m, H-9 และ H-16), 1.52 (1H, m, H-25), 1.42 (1H, m, H-11), 1.38 (1H, m, H-2), 1.28 (1H, m, H-12), 1.26 (1H และ 1H, m และ m, H-16 และ H-17), 1.03 (3H, d, $J = 6.0$, H-27), 0.95 (3H, d, $J = 6.8$, H-28), 0.93 (3H, s, H-19), 0.87 (3H, d, $J = 6.0$, H-26), 0.85 (3H, s, H-18) และ 0.84 (3H, d, $J = 6.0$, H-21) ppm

δ_{C} (CDCl_3 , 100 MHz) 135.44 (CH-7), 135.22 (CH-23), 132.31 (CH-22), 130.75 (CH-6), 82.20 (C-8), 79.46 (C-5), 66.46 (CH-3), 56.19 (CH-17), 51.69 (CH-14), 51.08 (CH-9), 44.58 (C-13), 42.79 (CH-24), 39.77 (CH-20), 39.35 (CH-12), 36.98 (C-10), 36.92 (CH₂-1), 34.70 (CH₂-4), 33.08 (CH-25), 30.10 (CH₂-2), 28.68 (CH₂-15), 23.42 (CH₂-16), 20.90 (CH₃-27), 20.65 (CH₂-11), 19.98 (CH₃-26), 19.67 (CH₃-21), 18.21 (CH₃-19), 17.59 (CH₃-28) และ 12.89 (CH₃-18) ppm

4.3 ราเอ็นโดไฟต์ *Fusarium* sp. ที่แยกได้จากใบเสมีดขาว *Melaluca cajuputi*

ราเอ็นโดไฟต์ *Fusarium* sp. ที่แยกได้จากใบเสมีดขาว *Melaluca cajuputi* เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง YEA อายุ 16 วัน จากนั้นนำมาเจาะด้วย sterile cork borer No.4 ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 7.5 มิลลิเมตร เพื่อนำเอาชิ้นวัณที่มีเส้นใยของราเอ็นโดไฟต์ *Alternaria* sp. มาเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุด้วยอาหารเลี้ยงเหลว YEB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จำนวน 5 ชิ้นต่อขวด โดยเลี้ยงทั้งหมดปริมาตร 35 ลิตร บ่มเชื้อไว้แบบตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 18 วัน

นำราเอ็นโดไฟต์ที่เพาะเลี้ยงไว้มาทำการกรองแยกด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ซึ่งจะได้ส่วนของเส้นใยราและส่วนของน้ำเลี้ยงรา เส้นใยรอบแห้งในตู้อบอากาศร้อน 55 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาสกัดด้วยเฮกเซน (500 ml x5), EtOAc (500 ml x5) และ MeOH (500 ml x5) ตามลำดับ ในระหว่างการระเหยตัวทำละลายของสารสกัดเอธิลแอซิเตต (EtOAc extract) เกิดตกตะกอนออกมา หลังจากกรอง นำตะกอนสีเขาวอมเหลืองมาล้างด้วยสารละลาย 70% CH₂Cl₂ ใน MeOH ทำให้ได้ bassiatin เป็นของแข็งสีขาว (93 mg) นำ bassiatin มาตกผลึกซ้ำออกจาก CH₂Cl₂-MeOH ได้ผลึกที่สามารถนำไปวิเคราะห์ยืนยันโครงสร้างได้ด้วยเทคนิค X-ray crystallography



mp = 143-145 °C

$[\alpha]_D^{20} +138$ (c 0.28, CHCl₃) [lit. $[\alpha]_D^{25} +181.05$ (c 0.024, CHCl₃)] (Kagamizono et. al 1995)

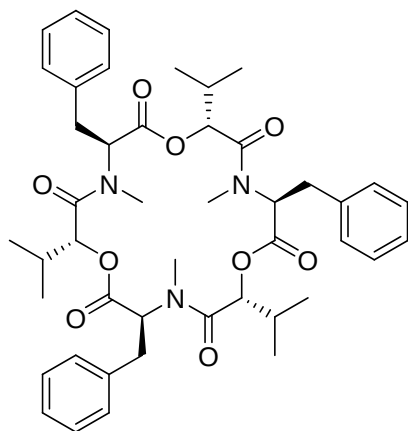
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_H 0.76 (3H, d, J = 6.8 Hz, 8-H₃), 0.84 (3H, d, J = 7.1 Hz, 9-H₃), 2.30 (1H, m, 7-H), 2.98 (1H, d, J = 2.2 Hz, 7-H), 3.03 (3H, s, N-CH₃), 3.19 (1H, dd, J = 14.0, 4.6 Hz, 10-H(H)), 3.29 (1H, dd, J = 14.0, 3.9 Hz, 10-H(H)), 4.41 (1H, t, J = 4.6 Hz, 3-H), 7.11-7.14 (2H, m, 12-H and 12'-H), 7.37-7.29 (3H, m, 13-H, 13'-H and 14-H)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ_C 15.1 (C-9), 18.6 (C-8), 29.6 (C-7), 32.4 (N-CH₃), 37.0 (C-10), 62.7 (C-3), 81.2 (C-6), 128.2 (C-14), 129.2 (C-13,13'), 129.7 (C-12,12'), 134.1 (C-11), 165.5 (C-5), 167.3 (C-2).

HRESIMS m/z 284.1265 $[M+Na]^+$ calcd for C₁₅H₁₉NO₃Na 284.1257

ส่วนของเหลวผลกรองนำไประเหยตัวทำละลายออก แล้วนำไปแยกด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟีที่เพิ่มสภาพขั้วการชะจาก เฮกเซน, EtOAc ไปจนถึง MeOH ส่วนแยกที่เหมือนกันจากการวิเคราะห์ด้วย TLC นำมารวมเข้าด้วยกัน ส่วนแยกที่ได้จากการรวมกันซึ่งได้มาจากการชะด้วยเฮกเซน-

EtOAc (60:40) นำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟีที่เพิ่มสภาพชั่วคราวจาก EtOAc ไปจนถึง MeOH ได้ beauvericin (12 mg) ที่เป็นของแข็งสีขาว



$[\alpha]_D^{20} +11.7$ (c 0.73, CHCl_3) [lit. $[\alpha]_D^{20} +69$ (c 0.7, C_6H_6)] (Ovchinnikov, Y. A., et al., 1971) [lit. $[\alpha]_D^{25} +65.8$ (c 1, CH_3OH)] (Hamil, et al., 1969)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.35 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, CH_3), 0.82 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, CH_3), 1.94 (1H, m, $\beta\text{-CH}$, hiv), 2.95 (1H, dd, $J = 14.4, 12.2$ Hz, $\beta\text{-CH(H)}$, phe), 3.07 (3H, s, N-CH_3), 3.45 (1H, dd, $J = 14.4, 4.5$ Hz, $\beta\text{-CH(H)}$, phe), 4.81 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, $\alpha\text{-CH}$, hiv), 5.74 (1H, dd, $J = 12.2, 4.5$ Hz, $\alpha\text{-CH}$, phe), 7.17-7.22 (2H, m, Ph), 7.23-7.31 (3H, m, Ph) ppm

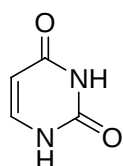
^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 17.0 and 18.5 ($2\times\text{CH}_3$, hiv), 29.8 ($\beta\text{-CH}$, hiv), 31.8 ($\beta\text{-CH}_2$, phe), 34.6 (N-CH_3), 56.6 ($\alpha\text{-CH}$, phe), 75.8 ($\alpha\text{-CH}$, hiv), 126.9, 128.5 (x2), 128.6 (x2) and 136.3 (all aromatic C, phe), 169.9 (C=O), 170.46 (C=O), ppm

HRESIMS m/z 784.4156 $[\text{M}]^+$ calcd for $\text{C}_{45}\text{H}_{58}\text{N}_3\text{O}_9\text{Na}$ 784.4168

ส่วนแยกจากการรวมกันจากการชะด้วย เฮกเซน-EtOAc (75:25) มีลักษณะเป็นของแข็งปนกันของเหลวหนืดเติม Hexane-EtOAc (90:10) เข้าไปเพื่อชะล้างของเหลวหนืดออก จากนั้นนำของแข็งไปตกผลึกออกจาก Hexane-EtOAc ได้ Ergosterol (96.2 mg) เป็นของแข็งสีขาว

ส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อรามาสกัดด้วยตัวทำละลาย เฮกเซน เอธิลเอซิเทต และเมทานอลตามลำดับ หลังจากระเหยตัวทำละลายออก แต่ละสารสกัดนำไปแยกด้วยเซาเด็กซ์ แองเอช-20 คอลัมน์โครมาโทกราฟี และแยกส่วนแยกที่มีสารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพนำไปแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีไม่ว่าจะใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจลหรือรีเวิร์สเฟสก็ไม่สามารถแยกสารให้บริสุทธิ์ได้

สำหรับส่วนแยกที่ได้จากสารสกัดหยาบเมทานอลของน้ำเลี้ยงด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีที่ชะด้วย 100% MeOH นำมาล้างด้วย 10% H_2O in MeOH ได้ uracil เป็นของแข็งสีขาว

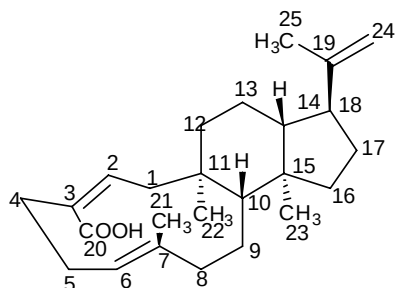


4.4 ราเอ็นโดไฟต์ *Emericella varicolor* ที่แยกได้จากใบเปล้าใหญ่ *Croton oblongifolius*

4.4.1 สารเมแทบอลิท์ของราเอ็นโดไฟต์ *Emericella varicolor* จากการเพาะเลี้ยงในอาหาร MEB

ราเอ็นโดไฟต์ *Emericella varicolor* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง malt extract agar (MEA) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน นำมาเจาะด้วย sterile cork borer No.4 ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 7.5 มิลลิเมตร เพื่อนำเอาชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของราเอ็นโดไฟต์มาเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุด้วยอาหารเลี้ยงเหลว MEB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (malt extract 2.5%, glucose 0.2%, and bacterial peptone 0.1%) จำนวน 5 ขันต่อขวด โดยเลี้ยงทั้งหมดปริมาตร 35 ลิตร ป่มเชื้อไว้แบบตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 วัน นำราเอ็นโดไฟต์ที่เพาะเลี้ยงไว้มาทำการกรองแยกด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ซึ่งจะได้ส่วนของเส้นใยราและส่วนของน้ำเลี้ยงรา

เส้นใยรา (เปียก) (1.13 กิโลกรัม) นำมาสกัดด้วย MeOH (2 L x 5) หลังจากกระเหยตัวทำละลายออกไป ของแข็งสีน้ำตาลเข้มที่ได้นำไปสกัดด้วย EtOAc (2 L x 5) สารสกัด EtOAc ที่ได้นำไปกระเหยตัวทำละลายออกได้เป็นสารหนืดสีน้ำตาล (5.96 g) จากนั้นนำไปแยกด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยชะด้วยตัวทำละลายเป็นขั้นๆจาก hexane–ethyl acetate ไปจนถึง ethyl acetate–methanol ส่วนแยกที่เหมือนกันจากการวิเคราะห์ด้วย TLC นำมารวมเข้าด้วยกัน ในระหว่างการกระเหยตัวทำละลายออกจากส่วนแยกจากรวมกันที่ได้จากการชะด้วย hexane–ethyl acetate (85:15) เกิดการตกตะกอนขึ้น หลังจากกรองตะกอนออกทำให้ได้ stellatic acid (11 mg) เป็นของแข็งสีขาว



m.p. 228-230 °C;

$[\alpha]_D^{25} +8$ (CHCl₃, c 0.3);

EIMS (EI 70 eV) m/z 370 [M^+ , 53 %], 355 (23), 327 (32), 257 (12), 246 (15), 203 (29), 189 (100), 175 (24), 161 (40), 147 (52), 135 (40), 121 (45), 107 (60), 95 (50), 93 (48), 81 (42), 67 (28) and 55 (24);

λ_{max} (CHCl₃) (ϵ) 245 (5617) nm;

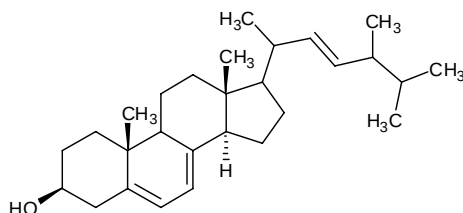
V_{max} (KBr) 3435 (br.s), 2945 (w), 2855 (w), 1745 (m), 1649 (m), 1563 (m), 1411 (m), 1264 (w) and 1022 (w) cm⁻¹;

δ_H (CDCl₃, 400 MHz) 5.94 (1H, d, 4.4 Hz, 2-H), 4.97 (1H, dd, 4.8 and 4.8 Hz, 6-H), 4.75 (s, 1H, H-24), 4.73 (1H, s, 24-H), 2.89 (1H, d, 12.0 Hz, 4-H), 2.71 (1H, dd, 6.8 and 7.6 Hz, 1-H), 2.31 (1H, m, 5-H), 2.26 (1H, m, 18-H), 2.11 (1H, m, 5-H), 2.09 (1H, m, 1-H), 2.06 (1H, m, 8-H), 1.97 (1H, m, 8-H),

1.90 (1H, m, 16-H), 1.87 (1H, m, 4-H), 1.75 (3H, s, 25-H), 1.57 (1H, m, 13-H), 1.54 (1H, m, 16-H), 1.50 (1H, m, 9-H), 1.48 (1H, m, 17-H), 1.46 (1H, m, 12-H), 1.32 (3H, s, 21-H), 1.31 (1H, m, 13-H), 1.30 (1H, m, 17-H), 1.28 (1H, m, 12-H), 1.26 (1H, m, 10-H), 1.20 (1H, m, 12-H), 1.17 (1H, m, 14-H), 0.90 (s, 3H, 22-H) and 0.84 (3H, s, 23-H) ppm;

δ_c (CDCl₃, 100 MHz) 173.19 (20-CO), 150.16 (2-CH), 148.12 (19-C), 138.74 (7C), 125.28 (3-C), 123.68 (6-CH), 109.61 (24-CH₂), 54.43 (14-CH), 49.63 (10-CH), 47.59 (18-CH), 45.85 (15-C), 42.64 (1-CH₂), 41.15 (13-CH₂), 40.37 (8-CH₂), 39.17 (12-CH₂), 37.92 (11-C), 34.85 (4-CH₂), 27.69 (16-CH₂), 27.35 (5-CH₂), 24.13 (22-CH₃), 22.27 (9-CH₂), 21.03 (17-CH₂), 19.98 (25-CH₃), 15.98 (21-CH₃) and 15.57 (23-CH₃) ppm.

ในระหว่างการระเหยตัวทำละลายออกจากส่วนแยกจากรวมกันที่ได้จากการชะด้วย hexane–ethyl acetate (80:20) เกิดการตกตะกอนขึ้น หลังจากกรองตะกอนออกทำให้ได้ ergosterol (10 mg)



m.p. 167-168 °C;

$[\alpha]_D^{20}$ -84(CHCl₃, c 0.1);

ESIMS: $[M+H]^+$ 397.3421;

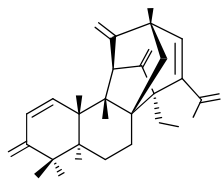
λ_{max} 325(967), 345 (864) nm;

V_{max} (KBr) 3427(br), 2956(s), 2871(s), 1654(w), 1553(w), 1459(m), 1382(m), 1370(m), 1241(w), 1158(w), 1127(w), 1111(w), 1058(m), 1039(m), 983(m), 969(m), 834(w), 802(w) cm⁻¹;

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) 5.56 (1H, dd, J = 1, 5.2 Hz, H-6), 5.38 (1H, dd, J = 1, 5.2 Hz, H-7), 5.19 (1H, m, H-22), 5.18 (1H, m, H-23), 3.63 (1H, H-3), 2.47(1H, ddd, J = 2.8, 4.8, 14.0 Hz, H-4), 2.27 (1H, dd, J = 12.4, 13.6, m, H-4), 2.07(1H, m, H-12), 2.04 (1H, m, H-20), 1.98 (1H, m, H-9), 1.92 (1H, m, H-2), 1.91 (1H, m, H-1), 1.90 (1H, m, H-14), 1.72 (1H, m, H-16), 1.64 (1H, m, H-11), 1.64 (1H, m, 15), 1.58 (1H, m, H-11), 1.50 (1H, m, H-2), 1.47(1H, m, H-25), 1.35 (1H, m, H-15), 1.32 (1H, m, H-1), 1.28 (1H, m, H-16), 1.25 (1H, m, H-17), 1.24 (1H, m, H-12), 1.03 (3H, d, J = 6.4 Hz, H-27), 0.93(3H, s, H-19), 0.90 (3H, d, J = 6.8 Hz, H-28), 0.82 (3H, d, J = 6.4 Hz, H-26), 0.82 (3H, J = 6 Hz, H-21), 0.62 (3H, s, H-18) ppm;

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): 141.37 (s, C-8), 139.77 (s, C-5), 135.56 (d, C-23), 131.94 (d, C-22), 119.57 (d, C-6), 116.26 (d, C-7), 70.44 (d, C-3), 55.68 (d, C-17), 54.54 (d, C-14), 46.21 (d, C-9), 42.80(d, C-24), 42.80 (s, C-13), 40.73 (t, C-4), 40.45 (d, C-20), 39.05 (t, C-12), 38.35 (t, C-1), 37.00 (s, C-10), 33.07 (d, C-25), 31.93 (t, C-2), 28.30 (t, C-16), 22.99 (t, C-15), 21.09 (q, C-27), 21.09 (t, C-11), 19.96 (q, C-26), 19.65 (q, C-21), 17.61 (q, C-28), 16.27 (q, C-19), 12.04 (q, C-18) ppm.

ส่วนแยกจากรวมกันที่ได้จากการชะด้วย hexane–ethyl acetate (30:70) นำมาตกผลึกออกจากคลอโรฟอร์ม (CHCl₃) ได้สารใหม่ คือ emervaridione เป็นผลึกใสไม่มีสี (13 mg)



m.p. 235-236 °C(dec);

$[\alpha]_D^{20}$ -220° (CHCl₃, c 0.1);

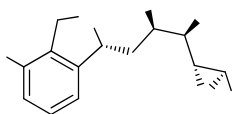
HRESIMS $[M+Na]^+$ = 431.1834 (calc for C₂₅H₂₈O₅Na 431.183451);

λ_{max} (EtOH) (ϵ) 308.05 (335), 252 (1329); V_{max} (KBr) 3464 (br.s), 2970 (w), 2927 (w), 1753 (m), 1711 (w), 1659 (m), 1555 (m), 1415 (w), 1250 (w), 1015 (w) nm;

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) 6.80 (1H, s, H-6'), 6.76 (1H, d, J = 10.4 Hz, H-1), 5.87 (1H, d, J = 10.4 Hz, H-2), 4.70 (1H, s, H-9'), 4.62 (1H, s, H-9''), 4.55 (1H, d, 10 Hz, H-1'), 4.45 (1H, d, J = 9.2 Hz, H-1''), 3.63 (1H, s, H-11), 2.87 (brs, OH-9), 2.32 (1H, d, J = 11.6 Hz, H-12), 2.06 (1H, dd, J = 6, 14 Hz, H-5), 2.00 (1H, m, H-6), 1.75 (1H, m, H-7), 1.72 (1H, m, H-6), 1.51 (1H, m, H-7), 1.29 (1H, d, J = 12 Hz, H-12), 1.27 (3H, s, H-10'), 1.20 (3H, s, H-13), 1.09 (3H, s, H-15), 1.04 (3H, s, H-14) ppm;

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) 202.71 (s, C-3), 202.25 (s, C-4'), 166.22 (s, C-8'), 152.66 (s, C-7'), 150.03 (d, C-1), 144.41 (d, C-6'), 138.29 (s, C-3'), 126.34 (d, C-2), 103.03 (t, C-9'), 82.00 (s, C-9), 72.32 (t, C-1'), 73.20 (d, C-11), 57.48 (s, C-2'), 51.26 (s, C-8), 50.19 (s, C-5'), 47.85 (t, C-12), 44.46 (s, C-4), 43.64 (s, C-10), 41.09 (d, C-5), 25.05 (q, C-15), 24.93 (t, C-6), 22.21 (q, C-14), 19.60 (q, C-10'), 17.52 (q, C-13), 16.88 (t, C-7) ppm.

ส่วนน้ำเลี้ยงรานำไปทำให้แห้งแบบเยือกแข็งได้เป็นของแข็งสีน้ำตาลเข้ม (33.0 g) จากนั้นนำไปสกัดด้วย EtOAc (500 ml x 5) ในอ่างอัลตราโซนิก หลังจากกระเหยตัวทำละลายได้กากสีน้ำตาลเข้ม (760 mg) นำกากที่เหลืออยู่นี้ไปแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (silica gel, 20 g) และชะด้วยตัวทำละลายเป็นขั้นๆจาก hexane–ethyl acetate ไปจนถึง ethyl acetate–methanol ส่วนแยกที่เหมือนกันจากการวิเคราะห์ด้วย TLC นำมารวมเข้าด้วยกัน ส่วนแยกจากการรวมกันซึ่งได้จากการชะด้วย hexane–ethyl acetate (45:55) นำมาทำการตกผลึกออกจากคลอโรฟอร์มทำให้ได้สารใหม่ (Varioxiranediol) เป็นผลึกใสไม่มีสี (10 mg)



m.p. 156-157 °C;

$[\alpha]_D^{20}$ +46 (c 0.1, EtOH);

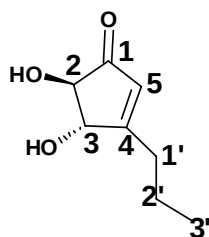
(HRESIMS) $[M+Na]^+$ 303.1216, calcd $[M+Na]^+$ 303.1208;

$\lambda_{\max}$ (268, 914), (275, 959), (299, 198); $V_{\max}$ (KBr) 3415(br,s), 2921(w), 2860(w), 1641(w), 1555(m), 1418(w), 1483(w), 1418(w), 1333(w), 1263(w), 1049(w), 1001(w), 933(w), 827(w)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz); 7.27 (1H, t, $J = 7.5$ Hz, H-4), 6.76 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5), 6.75 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-3), 5.58 (1H, m, H-1'), 5.17 (1H, dd, $J = 2.5, 12.5$ Hz, OCH_2 -1), 5.14 (1H, dd, $J = 2.0, 12.5$ Hz, OCH_2 -1), 3.86 (1H, ddd, $J = 2.5, 5.0, 8.0$ Hz, H-3'), 3.84 (3H, s, OCH_3 -2), 3.70 (1H, dd, $J = 4.5, 5.5$ Hz, H-4'), 3.06 (1H, dq, $J = 2.5, 5.0$ Hz, H-6'), 2.96 (1H, dd, $J = 2.5, 4.0$ Hz, H-5'), 2.25 (1H, ddd, $J = 3.5, 8.5, 14.5$ Hz, H-2'), 2.00 (1H, ddd, $J = 2.5, 7.0, 14.5$ Hz, H-2'), 1.33 (3H, d, $J = 5.0$ Hz, H-7') ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz); 154.13 (s, C-2), 142.81 (s, C-6), 129.55 (d, C-4), 126.78 (s, C-1), 113.17 (d, C-3), 109.21 (d, C-5), 82.69 (d, C-1'), 71.71 (d, C-4'), 71.10 (t, CH_2O -1), 70.53 (d, C-3'), 58.99 (d, C-5'), 55.24 (q, OCH_3 -2), 51.41 (d, C-6'), 37.11 (t, C-2'), 17.21 (q, C-7') ppm.

ส่วนแยกจากการรวมกันซึ่งได้จากการชะด้วย hexane–ethyl acetate (25:75) นำมาแยกให้ได้อสารบริสุทธิ์โดย PTLC (silica gel) ซึ่งใช้ hexane–ethyl acetate (25:75) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ทำให้ได้ dihydroterrein (4 mg) เป็นน้ำมันสีน้ำตาลอ่อน.



$[\alpha]_D^{25} -21$ (c 0.1, EtOH) ;

ESIMS $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 179.52$;

$\lambda_{\max}(\epsilon)$ 241 (26) nm;

$V_{\max}$ (KBr) 3433(br, s), 2961(w), 2921(w), 2871(w), 1705 (s), 1635(s), 1564 (s), 1412 (s), 1342 (w), 1125 (m), 1080 (m), 1018(w);

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3); 5.96 (1H, s, H-5), 4.63 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-3), 4.25 (1H, d, $J = 2.8$ Hz, H-2), 2.47 (2H, dt, H-1'), 1.61 (2H, tq, H-2'), 0.98 (3H, t, $J = 7.2$ Hz, H-3') ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3); 203.20 (s, C-1), 179.16 (s, C-4), 126.34 (d, C-5), 81.58 (d, C-2), 77.57 (d, C-3), 31.74 (t, C-1'), 19.92 (t, C-2'), 13.87 (q, C-3') ppm.

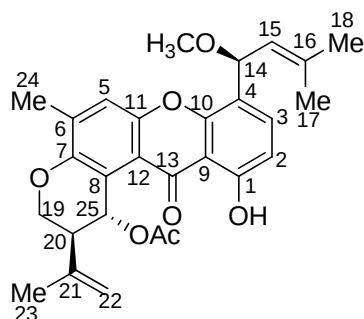
4.4.2 สารเมแทบอลิท์ของราเอ็นโดไฟต์ *Emericella varicolor* จากการเพาะเลี้ยงในอาหาร MEB ปริมาณสารสกัดมอลต์ต่ำ

ราเอ็นโดไฟต์ *Emericella varicolor* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง malt extract agar (MEA) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน นำมาเจาะด้วย sterile cork borer No.4 ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 7.5 มิลลิเมตร เพื่อการนำเอาชิ้นวัณที่มีเส้นใยของราเอ็นโดไฟต์มาเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุด้วยอาหารเลี้ยงเหลว MEB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (malt extract 2.0%) จำนวน

5 ขั้นตอนขวด โดยเลี้ยงทั้งหมดปริมาตร 20 ลิตร บ่มเชื้อไว้แบบตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 45 วัน นำราเอนโดไฟต์ที่เพาะเลี้ยงไว้มาทำการกรองแยกด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ซึ่งจะได้ส่วนของเส้นใยและส่วนของน้ำเลี้ยงรา

เส้นใย (เปียก) (253 กิโลกรัม) นำมาสกัดด้วย MeOH (500 mL x 10) หลังจากระเหยตัวทำละลายออกไป ของแข็งสีแดงเข้มที่ได้ (13.95 g) นำไปสกัดด้วย EtOAc (500 mL x 10) สารสกัด EtOAc ที่ได้นำไประเหยตัวทำละลายออกได้เป็นสารหนืดสีแดงเข้ม (5.86 g) จากนั้นนำไปแยกด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยชะด้วยตัวทำละลายเป็นขั้นๆจาก hexane–ethyl acetate ไปจนถึง ethyl acetate–methanol ส่วนแยกที่เหมือนกันจากการวิเคราะห์ด้วย TLC นำมารวมเข้าด้วยกัน

ในระหว่างการระเหยตัวทำละลายออกจากส่วนแยกจากรวมกันที่ได้จากการชะด้วย hexane–ethyl acetate (90:10) นำมาแยกด้วย preparative thin layer chromatography (prep. TLC) และทำการตกผลึกออกจากคลอโรฟอร์มได้เป็น Shamixanthone (20 mg) ที่เป็นผลึกสีเหลือง



m.p. 139-140°C;

$[\alpha]_D^{20} +16^\circ$ (c 0.1, CHCl₃);

UV (CHCl₃): $\lambda_{\max}$ (l) 240 (19325), 259 (8932), 270 (11368), 278 (12992), 300 (3654), and 397 (2030) nm;

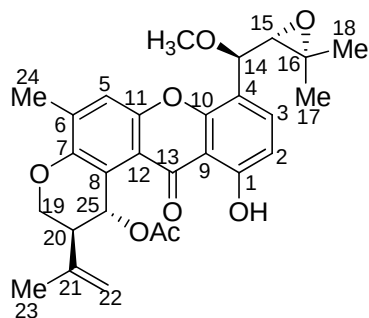
IR $\nu_{\max}$ (KBr): 3447 (OH), 2921, 2851, 1734 (C=O), 1645, 1567, 1478, 1419, 1240, 1116, 1022, and 820 cm⁻¹;

EIMS m/z 406 [M⁺, 20%], 388 (11), 375 (13), 363 (25), 337 (53), 310 (34), 295 (100), 279 (12), 255 (15), 242 (20), and 67 (24);

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) (1.75 (3H, s, CH3-17), 1.79 (3H, s, CH3-18), 1.85 (3H, s, CH3-23), 2.36 (3H, s, CH3-24), 2.73 (1H, s, H-20), 3.49 (1H, d, J = 5.5 Hz, H-14a), 3.50 (1H, d, J = 6.0 Hz, H-14b), 4.34 (1H, dd, J = 2.8, 10.8 Hz, H-19b), 4.43 (1H, dd, J = 2.8, 11.2 Hz, H-19a), 4.58 (1H, s, H-22b), 4.80 (1H, s, H-22a), 5.09 (1H, s, 25-OH), 5.31 (1H, dd, J = 7.2, 7.6 Hz, H-15), 5.41 (1H, s, H-25), 6.74 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-2), 7.30 (1H, s, H-5), 7.44 (1H, d, J = 8.4 Hz), 12.60 (1H, s, 1-OH) ppm;

¹³CNMR (100 MHz, CDCl₃) (184.5 (C-13), 159.7 (C-1), 152.8 (C-10), 152.3 (C-11), 149.4 (C-7), 142.6 (C-21), 138.4 (C-6), 136.6 (C-3), 133.3 (C-16), 121.7 (C-15), 120.9 (C-8), 119.4 (C-5), 118.9 (C-9), 116.7 (C-12), 112.3 (C-22), 109.8 (C-2), 109.2 (C-4), 64.6 (C-19), 63.2 (C-25), 44.9 (C-20), 27.5 (C-14), 25.8 (C-17), 22.6 (C-23), 17.9 (C-18), 17.5 (C-24) ppm.

ส่วนแยกจากรวมกันที่ได้จากการชะด้วย hexane–ethyl acetate (80:20) นำมาทำการตกผลึกออกจาก $\text{CHCl}_3\text{-Et}_2\text{O-Hexane}$ ทำให้ได้ 14-Methoxytajixanthone-25-acetate (70 mg) ที่เป็นผลึกสีเหลือง



m.p. 219-220°C;

$[\alpha]_D^{20}$ 20 -38 (c 0.1, CHCl_3);

UV (CHCl_3): λ_{max} (ε) 387 (6916), 295 (9880), 274 (15413), 267 (30628), 253 (31616), and 237 (57304) nm;

IR ν_{max} (KBr) 3447 (OH), 2921, 1746 (C=O), 1637, 1559, 1470, 1423, 1369, 1236, 1077, 1018, and 828 cm^{-1} ;

EIMS m/z 494 [M^+ , 8%], 451 (6), 434 (16), 423 (16), 363 (100), 347 (12), 333 (14), 307 (10), and 293 (8);

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 1.23 (3H, s, CH_3 -17), 1.31 (3H, s, CH_3 -18), 1.89 (3H, s, CH_3 -23), 2.08 (3H, s, OAc-25), 2.35 (3H, s, CH_3 -24), 2.72 (1H, s, H-20), 3.17 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-15), 4.31 (1H, dd, J = 3.2, 11.2 Hz, H-19b), 4.55 (1H, d, J = 11.2 Hz, H-19a), 4.63, (1H, d, J = 8.0 Hz, H-14b), 4.76 (1H, s, H-22b), 4.81 (1H, s, H-22a), 6.83 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-2), 6.90 (1H, s, H-25), 7.26 (1H, s, H-5), 7.66 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-3), 13.14 (1H, s, 1-OH) ppm;

$^{13}\text{CNMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 183.2 (C-13), 170.0 (-OCCH₃), 162.2 (C-1), 152.5 (C-10), 151.6 (C-11), 150.3 (C-7), 141.4 (C-21), 138.0 (C-6), 135.1 (C-3), 120.3 (C-5), 116.2 (C-12), 115.5 (C-9), 114.9 (C-8), 112.8 (C-22), 110.8 (C-2), 109.1 (C-4), 76.1 (C-14), 66.7 (C-15), 65.5 (C-25), 63.8 (C-19), 57.8 (C-16), 42.4 (C-20), 24.8 (C-17), 22.4 (C-23), 21.3 (-OCCH₃), 19.8 (C-18), 17.4 (C-24) ppm.

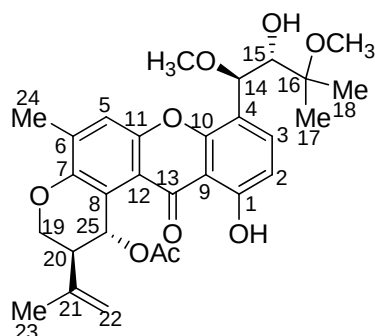
ส่วนแยกจากรวมกัน (150 mg) ที่ได้จาก การชะด้วย Hexane-EtOAc (75:25) นำมาทำการตกผลึกออกจาก $\text{CHCl}_3\text{-Et}_2\text{O-Hexane}$ ได้เป็น Tajixanthone methanoate (100 mg) ที่เป็นผลึกสีเหลือง

m.p. 197-198°C;

$[\alpha]_D^{20}$ -105.0 (c 0.1, CHCl_3);

UV (CHCl_3): λ_{max} (ε) 399 (10170), 300 (18527), 278 (72640), 268 (61744), 258 (49032), and 238 (99880) nm;

IR $V_{\max}$ (KBr): 3447 (OH), 2968, 2925, 1766 (C=O), 1641, 1567, 1466, 1477, 1345, 1240, 1190, 1092 and 1049 (C-O-C), 820 and 765 cm^{-1} ;

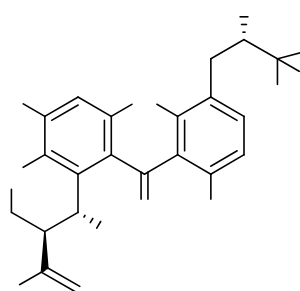


EI MS m/z 454 [M^+ , 11%), 424 (10), 385 (10), 363 (11), 333 (28), 255 (11), and 73 (100);

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} (ppm): 1.28 (3H, s, CH_3 -17), 1.32 (3H, s, CH_3 -18), 1.84 (3H, s, CH_3 -23), 2.35 (3H, s, CH_3 -24), 2.69 (1H, dd, $J = 10.4, 14.0$ Hz, H-14b), 2.73 (1H, d, $J = 1.0$ Hz, H-20), 3.12 (1H, dd, $J = 1.6, 14.0$ Hz, H-14a), 3.29 (3H, s, 14- OCH_3), 3.77 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-15), 4.34 (1H, dd, $J = 3.2, 11.2$ Hz, H-19b), 4.42 (1H, dd, $J = 3.6, 11.2$ Hz, H-19a), 4.57 (1H, s, H-22b), 4.80 (1H, s, H-22a), 5.06 (1H, d, $J = 4.0$ Hz, 25-OH), 5.40 (1H, s, H-25), 6.78 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2), 7.22 (1H, s, H-5), 7.57 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3), 13.14 (1H, s, 1-OH);

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} (ppm): 184.4 (C-13), 160.2 (C-1), 153.0 (C-10), 152.0 (C-11), 149.5 (C-7), 142.5 (C-21), 138.3 (C-6), 138.2 (C-3), 121.0 (C-8), 119.1 (C-5), 116.9 (C-12), 116.8 (C-9), 112.3 (C-22), 109.9 (C-2), 109.2 (C-4), 77.3 (C-16), 76.5 (C-15), 64.5 (C-19), 63.2 (C-25), 49.2 (- OCH_3), 44.9 (C-20), 31.2 (C-14), 22.5 (C-23), 20.9 (C-18), 19.2 (C-17), 17.4 (C-24).

ส่วนแยกจากรวมกัน (265 mg) ที่ได้จากการชะด้วย Hexane-EtOAc (60:40) นำมาทำการตกผลึกออกจาก CHCl_3 - Et_2O -Hexane ได้เป็น Tajixanthone hydrate (130 mg) ที่เป็นผลึกสีเหลือง



m.p. 194-195°C;

$[\alpha]_D^{20}$ -76° (c 0.23, CHCl_3);

UV (CHCl_3): $\lambda_{\max}$ (ϵ) 237 (45760), 257 (17248), 268 (29920), 278 (24640), 300 (6160), and 399 (2640) nm;

IR $V_{\max}$ (KBr) 3486 (OH), 3073, 2976, 2883, 1797 and 1738 (C=O), 1645, 1571, 1474, 1345, 1244, 1046 and 1026 (C-O-C), 898 and 820 cm^{-1} ;

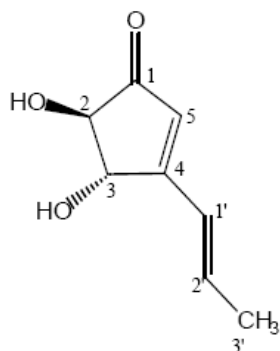
EI MS m/z 440 [M^+ , 14%], 409 (14), 398 (8), 371 (44), 333 (100), 283 (46), 271 (22), 255 (56), 242 (8), 225 (56), and 59 (39);

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} (ppm): 1.34 (3H, s, CH_3 -17), 1.39 (3H, s, CH_3 -18), 1.82 (3H, s, CH_3 -23), 2.28 (3H, s, CH_3 -24), 2.37 (1H, s, 16-OH), 2.44 (1H, s, 15-OH), 2.63 (1H, dd, $J = 10.8, 14.0$ Hz, H-14b), 2.69 (1H, s, H-20), 3.16 (1H, dd, $J = 1.2, 14.0$ Hz, H-14a), 3.70 (1H, d, $J = 10.8$ Hz, H-15), 4.31 (1H, dd, $J = 2.8, 10.8$ Hz, H-19b), 4.41 (1H, dd, $J = 2.0, 10.8$ Hz, H-19a), 4.53 (1H, s, H-22b), 4.77 (1H, s, H-22a), 4.98 (1H, d, $J = 4.0$ Hz, 25-OH), 5.34 (1H, s, H-25), 6.72 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2), 7.19 (1H, s, H-5), 7.49 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3), 12.54 (1H, s, 1-OH);

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} (ppm): 184.3 (C-13), 160.3 (C-1), 153.1 (C-10), 151.9 (C-11), 149.5 (C-7), 142.5 (C-21), 138.5 (C-6), 138.3 (C-3), 120.8 (C-8), 119.1 (C-5), 116.8 (C-12), 116.3 (C-9), 112.3 (C-22), 109.9 (C-2), 109.2 (C-4), 77.7 (C-15), 72.9 (C-16), 64.5 (C-19), 63.2 (C-25), 44.8 (C-20), 32.0 (C-14), 26.5 (C-17), 23.6 (C-18), 22.6 (C-23), 17.4 (C-24).

สารสกัดหยาบเอธิลแอซิเตตของน้ำเลี้ยง (384.7 mg) นำไปแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีที่ใช้ซิลิกาเจล (100 g) เป็นตัวดูดซับและเพิ่มสภาพขั้วของตัวชะจาก เฮกเซน EtOAc ไปจนถึง MeOH

ส่วนแยกจากรวมกันที่ได้จากการชะด้วย Hexane-EtOAc (20:80) (45 mg) ทำการตกผลึกออกจาก CHCl_3 -Hexane จากนั้นกรองและล้างผลึกด้วยเฮกเซนได้เป็นของแข็งสีขาว (16 mg) นำไปตกผลึกซ้ำด้วย CHCl_3 -Hexane ได้ Terrein เป็นผลึกใสไม่มีสี (16 mg)



m.p. 128-130 $^{\circ}\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 69$ (CHCl_3 , c 0.1);

λ_{max} (CHCl_3) (ϵ) 277 (11580) and 235 (12936) nm; [Lit (Dunn et.al., 1975);

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 155$ (c H_2O); m.p. 121-122 $^{\circ}\text{C}$;

λ_{max} (EtOH) (ϵ) 273 (30000) and 345 (125) nm];

ν_{max} (KBr) 3396 (br), 2914 (w), 2848 (w), 1785 (w), 1692 (w), 1629 (s), 1563 (s), 1415 (m), 1330 (m), 1193 (m), 1112 (m), 1084 (m), 960 (m) and 863 (m) cm^{-1} ;

MS (EI 70 eV) m/z 155 [$(M+H)^+$, 78 %], 139 (100), 121 (43), 109 (28), 95 (25), 79 (50), 67 (16) and 65 (17);

δ_H (CDCl₃, 400 MHz) 6.73 (1H, dq, J = 14 and 6.8 Hz, 2'-H), 6.33 (1H, d, 15.6 Hz, 1'-H), 5.95 (1H, s, 2-H), 4.82 (1H, d, 2.4 Hz, 3-H), 4.20 (1H, d, 2.8 Hz, 2-H) and 1.88 (3H, d, 1.2 Hz, 3'-H) ppm;

δ_C (CDCl₃, 100 MHz) 202.68 (1-C=O), 168.34 (4-C), 141.57 (2'-CH), 125.07 (1'-CH), 124.94 (5-CH), 81.90 (2-CH), 76.86 (3-CH) and 19.61 (3'-CH₃) ppm.

5. การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งจุลชีพของสารประกอบที่แยกได้

การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งจุลชีพของสารประกอบที่แยกได้ใช้วิธี The Minimum Inhibitory Concentration Method (MIC) (Jorgensen และคณะ, 1999) ซึ่งเป็นการหาความเข้มข้นของสารที่ต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลชีพได้โดยใช้ Microtiter Plate Broth Dilution Technique ที่มีขั้นตอนการทดสอบ ดังนี้

ก. การเตรียมสารละลายสารประกอบ

นำสารประกอบ 1.0 มิลลิกรัม ผสมกับตัวทำละลาย 10 % DMSO ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 มิลลิลิตร จะได้สารละลายสารประกอบที่มีความเข้มข้น 250 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งเป็นความเข้มข้นแรกในระดับความเข้มข้นที่เราต้องการ หลังจากนั้นก็เจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ระดับความเข้มข้น 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81 และ 3.91 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ

ระดับความเข้มข้นของสารละลายสารประกอบ คือ

ความเข้มข้นสุดท้าย 125 $\mu\text{g/ml}$

ความเข้มข้นสุดท้าย 62.5 $\mu\text{g/ml}$

ความเข้มข้นสุดท้าย 31.25 $\mu\text{g/ml}$

ความเข้มข้นสุดท้าย 15.63 $\mu\text{g/ml}$

ความเข้มข้นสุดท้าย 7.82 $\mu\text{g/ml}$

ความเข้มข้นสุดท้าย 3.91 $\mu\text{g/ml}$

ความเข้มข้นสุดท้าย 1.96 $\mu\text{g/ml}$

ความเข้มข้นสุดท้าย คือ ความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายสารประกอบที่วัดได้ใน 96 well microtiter plate หลังจากเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและจุลชีพแขวนลอยทดสอบลงไป

ข. การเตรียมสารละลายสารชุดควบคุมบวก (Positive Control)

ใช้ Penicillin G, Erythromycin, Sulfadimidine, Streptomycin, iprodione และ Ketoconazole เป็นสารชุดควบคุมบวก ในการเจือจางสารละลายทำเช่นเดียวกับการเจือจางสารประกอบในข้อ ก

ค. การเตรียมเชื้อจุลชีพ

จุลชีพสำหรับทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบประกอบด้วย แบคทีเรียแกรมบวก 2 ชนิดได้แก่ *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* แบคทีเรียแกรมลบ 2 ชนิดได้แก่ *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* และเชื้อรา 1 ชนิดได้แก่ *Candida albicans* การ

เตรียมเชื้อทดสอบจะเตรียมโดยแบคทีเรียจะนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Mueller Hinton Broth (MHB) และราจะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yeast-Malt Extract Broth (YMB)

ง. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพ

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพจะทำการทดสอบใน 96 well microtiter plate โดยก่อนการหยอดสารละลายสารประกอบและสารชุดควบคุมบวก

สารที่ใส่ลงใน 96 well microtiter plate มีดังนี้

Negative Control

- Broth Media + 10% DMSO
- Broth Media + 10% DMSO + Suspension ของเชื้อ (ให้อ่านผลทันที ก่อนการบ่มเชื้อ)
- Broth Media + 10% DMSO + Suspension ของเชื้อ (ผ่านการบ่มเชื้อ ก่อนอ่านผล เพื่อเป็น control ว่าเชื้อจุลชีพที่ใช้สามารถเจริญได้
- Broth Media + สารละลายสารประกอบตามระดับความเข้มข้น

Positive Control

- Broth Media + Suspension ของเชื้อ + ระดับความเข้มข้นของยา

Test sample

- Broth Media + Suspension ของเชื้อ + ระดับความเข้มข้นของสารละลายสารประกอบ ปริมาตรที่ใช้ คือ Suspension ของเชื้อ 50 μ l และสารละลายสารประกอบ 50 μ l ซึ่งจะรวมได้ ปริมาตรที่ใช้ 100 μ l / 1 well

จ. การอ่านผล

อ่านผลการทดลองเป็นค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ด้วยเครื่อง Sunrise Microtiter Plate Reader

ฉ. การแปลผล

ให้เปรียบเทียบค่า Absorbance ของ Broth media + suspension ของเชื้อก่อนบ่มเชื้อกับค่า Absorbance ของ Broth media + ลำดับความเข้มข้นของสารละลายสารประกอบ โดยให้เปรียบเทียบกับค่า Absorbance ของ Broth media + suspension ของเชื้อ + ลำดับความเข้มข้นของสารละลายสารประกอบ (Test Sample) หลังจากบ่มเชื้อแล้ว 24 ชั่วโมง

หากค่า Absorbance ของ Test Sample หรือยา Positive Control มีค่าสูงกว่า แสดงว่า สารละลายสารประกอบหรือยาในความเข้มข้นนั้นๆ ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลชีพ

แต่ถ้าค่า Absorbance ของ Test Sample หรือยา Positive Control มีค่าต่ำกว่า แสดงว่า สารละลายสารประกอบหรือยาในความเข้มข้นนั้นๆ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลชีพได้

ความเข้มข้นของสารละลายสารประกอบตัวสุดท้ายที่มีค่าต่ำกว่า ค่านั้นคือค่า MIC (Minimal Inhibitory Concentration)

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาการสร้างสารปฏิชีวนะของราเอ็นโดไฟต์ที่รวบรวมไว้ตั้งแต่ปี 47 โดยหน่วยปฏิบัติการวิจัยไบโอออร์แกนิกเคมี ภาควิชาเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และที่ได้จากการแยกราเอ็นโดไฟต์จากเสม็ดขาว และการคัดกรองหาเอ็นโดไฟต์ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้ โดยใช้เทคนิค dual culture agar diffusion ได้ราเอ็นโดไฟต์สี่สายพันธุ์เพื่อการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารเมแทบอลิไต์ยับยั้งจุลชีพที่สร้างขึ้น ประกอบด้วย

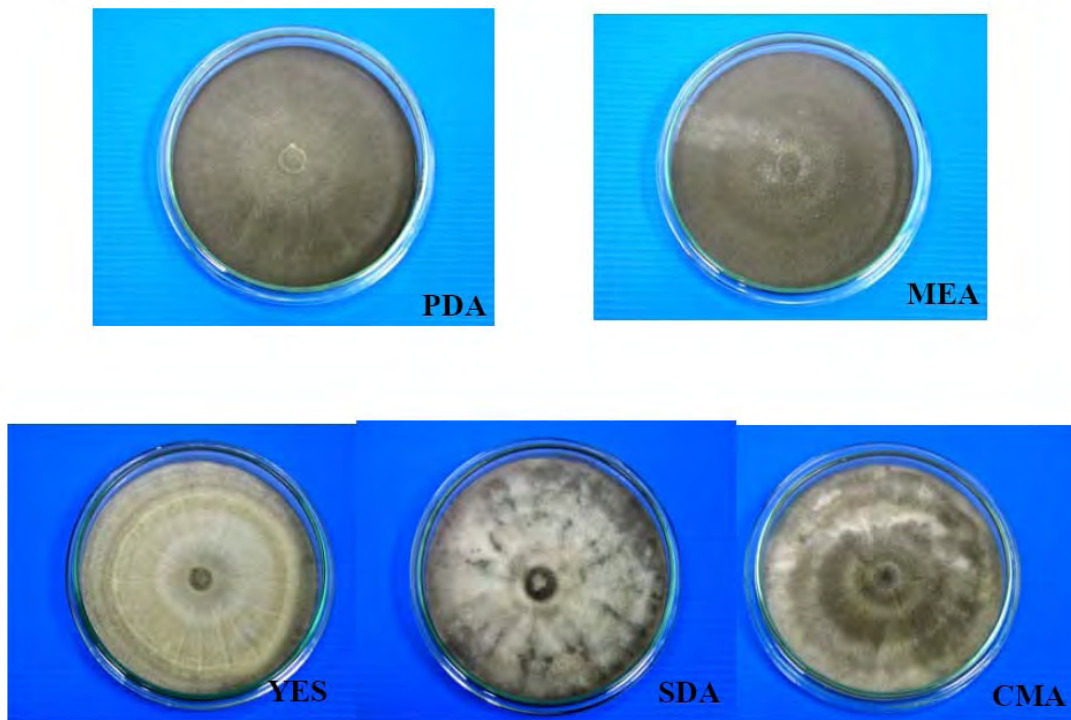
- ก. ราเอ็นโดไฟต์ *Mycoleptodiscus* sp. ที่แยกได้จากใบกวาวเครือขาว *Pueraria mirifica*
- ข. ราเอ็นโดไฟต์ *Alternaria* sp. ที่แยกได้จากใบพลูขาว *Houttuynia cordata* Thunb.
- ค. ราเอ็นโดไฟต์ *Fusarium* sp. ที่แยกได้จากใบเสม็ดขาว *Melaluca cajuputi*
- ง. ราเอ็นโดไฟต์ *Emericella varicolor* ที่แยกได้จากใบเปล้าใหญ่ *Croton oblongifolius*

1. สารปฏิชีวนะที่สร้างโดยราเอ็นโดไฟต์ *Mycoleptodiscus* sp. ที่แยกได้จากใบกวาวเครือขาว *Pueraria mirifica*

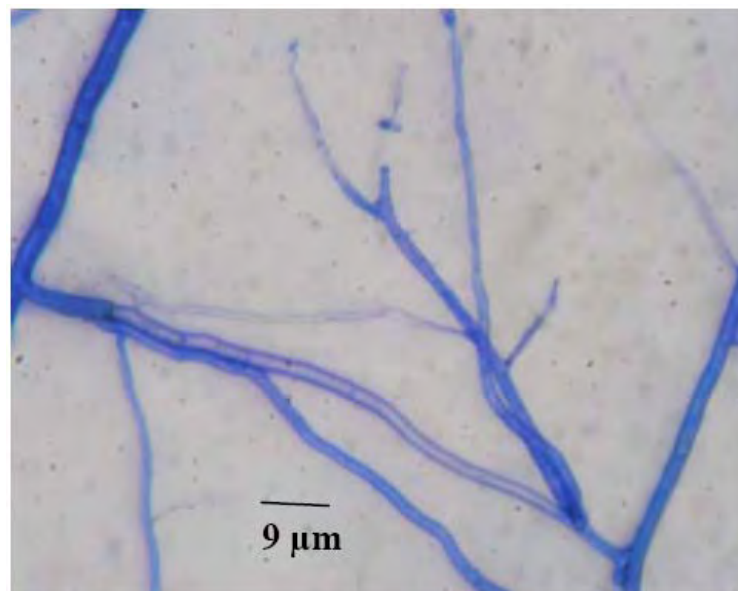
จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเอ็นโดไฟต์ *Mycoleptodiscus* sp. เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5 ชนิด ได้แก่ PDA (Potato Dextrose Agar), MEA (Malt Extract Agar), YEA (Yeast Extract Sucrose Agar), SDA (Sabouraud's Dextrose Agar) และ CMA (Corn Meal Agar) พบว่าลักษณะของโคโลนี สีของเส้นใย และสีของอาหารเลี้ยงเชื้อที่สร้างขึ้น จะมีลักษณะที่แตกต่างกันออกไปในแต่ละอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าและส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอพบว่า ราเอ็นโดไฟต์ *Mycoleptodiscus* sp. ไม่สร้างสปอร์ในอาหารทั้ง 5 ชนิด ดังแสดงในรูปที่ 1 และ 2

จากการพิสูจน์ทางอนุชีววิทยา เมื่อเทียบบริเวณ 5.8S RNA และบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ของราเอ็นโดไฟต์ (รูปที่ 3) กับข้อมูลใน GenBank พบว่ามีความเหมือนกับ *Mycoleptodiscus terrestris* 99.3% และ 90.9% ตามลำดับ ดังนั้นจึงจัดราเอ็นโดไฟต์นี้ เป็น *Mycoleptodiscus* sp.

การศึกษาการสร้างสารปฏิชีวนะของราเอ็นโดไฟต์ *Mycoleptodiscus* sp. ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง 5 ชนิด คือ PDA (potato dextrose agar), MEA (malt extract agar), YEA (yeast extract sucrose agar), SDA (sabouraud's dextrose agar) และ CMA (corn meal agar) ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลชีพโดยวิธี Dual Agar diffusion (Jorgensen, 1999) (รูปที่ 4 และตาราง 1) พบว่าการเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร YEA ราเอ็นโดไฟต์นี้สร้างสารปฏิชีวนะในการยับยั้ง *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Candida albicans* ATCC 10231 ด้วยวงใสการยับยั้ง 1.25, 3.20 และ 1.70 cm ตามลำดับ ดังนั้นอาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมสำหรับการสารปฏิชีวนะของรานี้คือ yeast extract sucrose



รูปที่ 1 ลักษณะโคโลนีของราเอนโดไฟต์ *Mycoleptodiscus* sp. เมื่อเลี้ยงในอาหารแข็ง 5 ชนิด ได้แก่ PDA, MEA, YEA, SDA และ CMA ซึ่งบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 วัน



รูปที่ 2 ลักษณะของเส้นใยราเอนโดไฟต์ *Mycoleptodiscus* sp. ที่แยกได้จากใบกวาวเครือขาว *Pueraria mirifica*

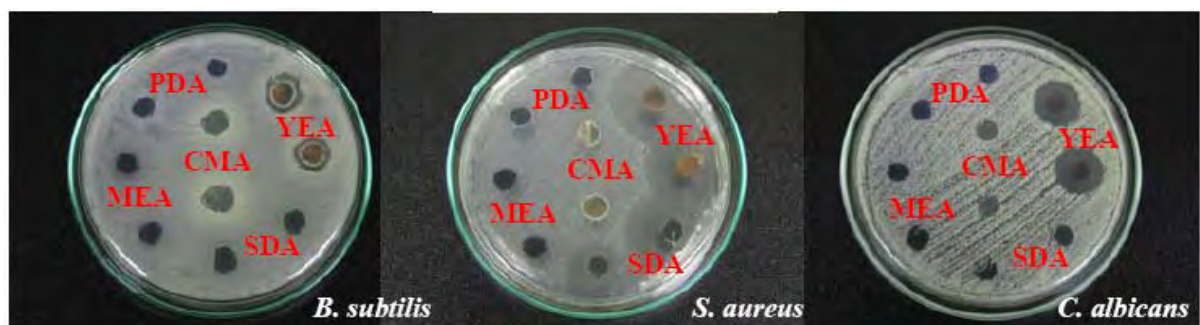
```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          10          20          30          40          50
          18S                      ITS1
GAACCTGCGG AAGGATCATT AACAGGAAAA GGGTACCCTC GCGGTCCCGA
                      ITS1
TTCTCAAACC ACTGTTTACC AACGTTTCG TTGCCTCGGC GGGCCGGCAC
                      ITS1
TGGCTCGACT GGC GCCCCTC CTTCGGGAGG AGCAGCCCGC CGCAGGACGC
                      ITS1
TACAAAACCA TTCTGTTCGA AGAACGTCTG ATTTTACCTT CGCGAATGCG
          ITS1                      5.8S
ATAAATACAA CTTTCAACAA TGGATCTCTT GGCTCCAGCA TCGATGAAGA
          5.8S
ACGCAGCGAA ATGCGATAAC TAGTGTGAAT TGCAGATTTT AGTGAATCAT
          5.8S
CGAGTCTTTG AACGCACATT GCGCCTCTTG GTATTCCTCG AGGCATGCCT
          5.8S                      ITS2
ATTCGAGCGT CGTTTTCGACC CTTAAGCGCA AGCTTAGTGT TGGGGACCGC
                      ITS2
CCCTGAAATA CGGAGGCGGC CCTTGAATCC ATCGGCGGTG CCGGTGCAGC
                      ITS2
CTGGAGCGCA GCAGCAATGC AGCTTTAAGC AGCCCGAAGC CTGCCGGACA
          ITS2                      28S
AACGAACTT CATTTTCTCA CGTCGACCTC GAATTAGGTA GGGATACCCG

```

C

รูปที่ 3 ลำดับเบสบริเวณ 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S ของราเอนโดไฟต์ *Mycoleptodiscus* sp. ที่แยกได้จากใบกวาวเครือขาว *Pueraria mirifica*

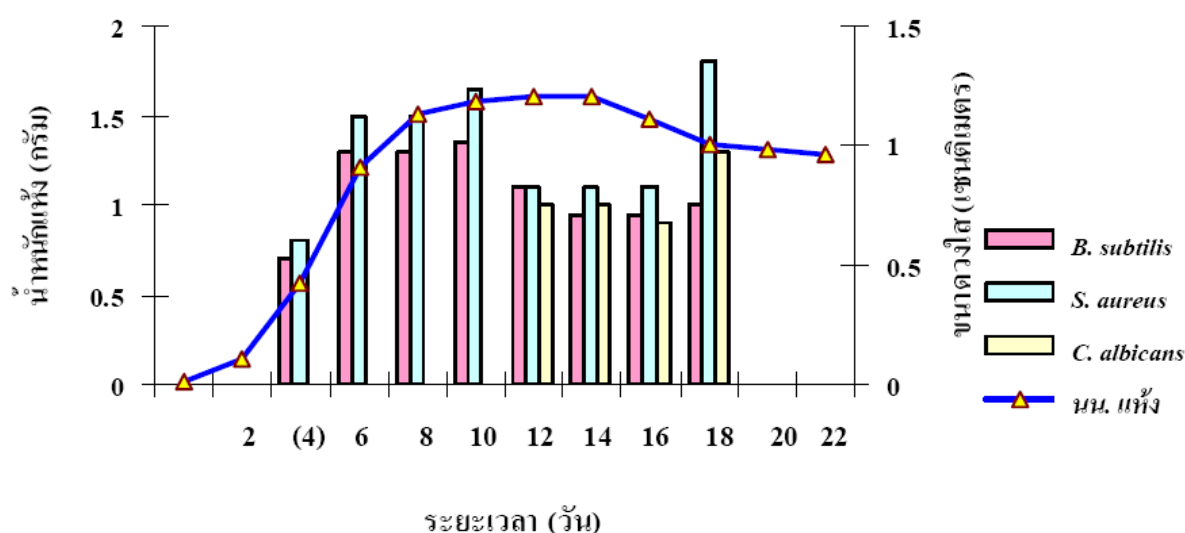


รูปที่ 4 วงใสการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของราเอนโดไฟต์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA, MEA, YEA, SDA และ CMA

ตารางที่ 1ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลชีพ (บริเวณใสรอบโคโลนี) ของเชื้อราเอนโดไฟต์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแต่ละชนิดโดยใช้วิธี Dual agar diffusion ในการทดสอบ

อาหารเลี้ยงเชื้อ	บริเวณใสรอบโคโลนี (ซม.)				
	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
PDA	-	1.40	-	-	-
MEA	1.20	-	-	-	-
YES	1.25	3.20	-	-	1.70
SDA	1.10	2.00	-	-	-
CMA	2.50	-	-	-	-

การศึกษาอัตราการเจริญเติบโต (growth curve) และการสร้างสปอร์ของราเอนโดไฟต์ *Mycoleptodiscus* sp. ในอาหารเหลว yeast extract broth (YEB) โดยการศึกษาการสร้างสปอร์ของราเอนโดไฟต์ดำเนินการโดยนำราที่เพาะเลี้ยงไว้ ณ ระยะเวลาต่างๆ มากรองเส้นใยออก บันทึกน้ำหนักเส้นใยแห้งและนำน้ำเลี้ยงราที่กรองเส้นใยออกมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลชีพ โดยวิธี Agar well diffusion (Acar และ Goldenstein, 1992; Jorgensen และคณะ, 1999) พบว่าราเริ่มสร้างสปอร์ประมาณวันที่สี่ของการเพาะเลี้ยง และสร้างสปอร์ที่ออกฤทธิ์ได้ดีหลังจากการเพาะเลี้ยงได้ประมาณ 18 วัน และหลังจาก ประมาณ 20 วันของการเพาะเลี้ยงไม่ปรากฏมีสปอร์อีกต่อไป (ดู รูปที่ 5) จากแผนภาพ รูปที่ 5 ราที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว YES เข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่ (stationary phase) ประมาณวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง



รูปที่ 5 แผนภาพแสดงการเจริญเติบโต (growth curve) และการสร้างสปอร์ของราเอนโดไฟต์ *Mycoleptodiscus* sp. ในอาหารเหลว yeast extract broth (YEB)

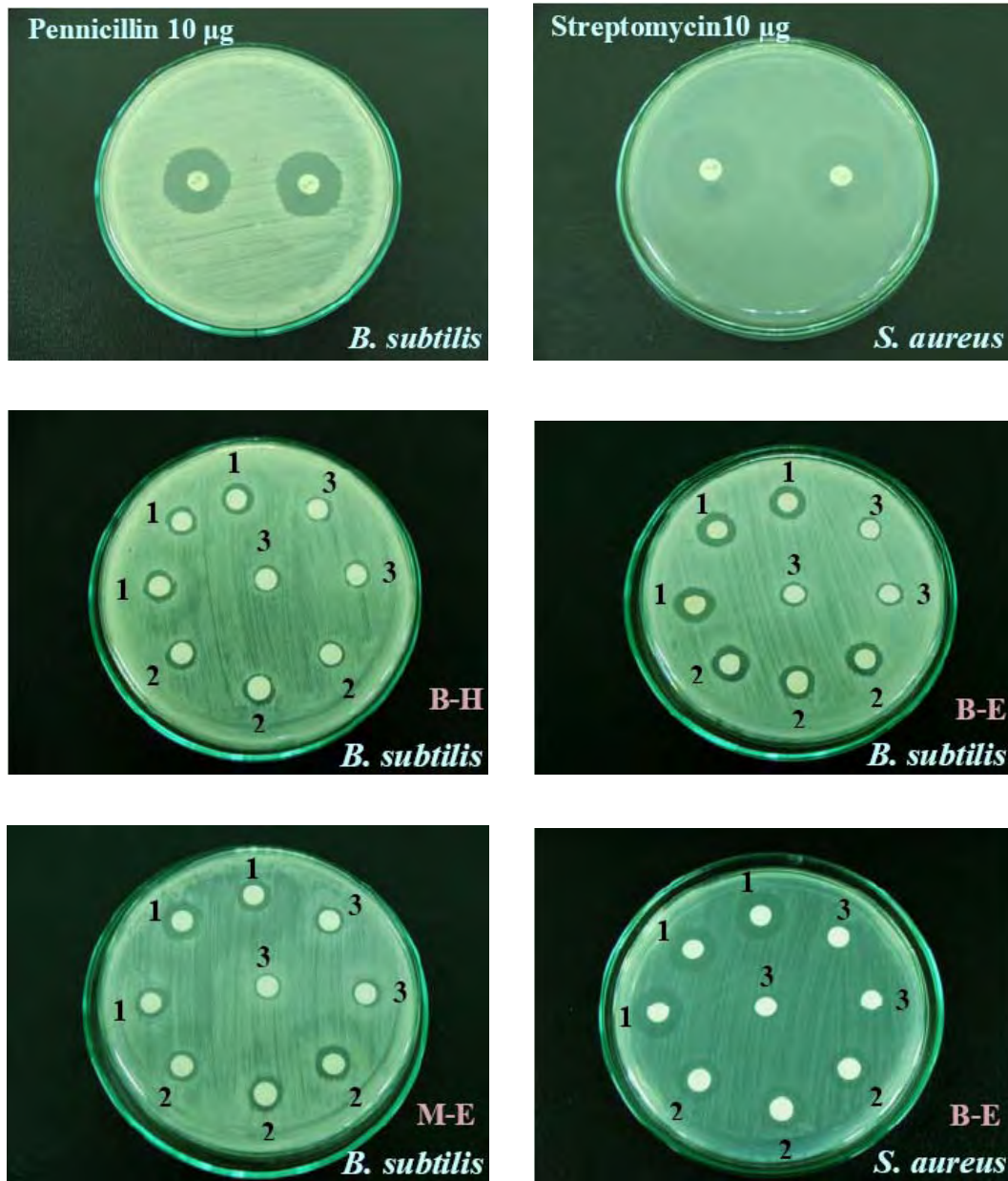
จากข้อมูลที่ได้จากการศึกษาการสารปฏิชีวนะโดยราเอ็นโดไฟต์ *Mycoleptodiscus* sp. นี้ จึงขยายขนาดการเพาะเลี้ยง เป็น 20 ลิตร และเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18 วัน หลังจากกรองแยกเวย์สไยและน้ำเลี้ยงด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ส่วนน้ำอาหารเลี้ยงเชื้อราที่กรองได้ทั้งหมด 18 ลิตรไประเหยน้ำออกด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 34 °C จนกระทั่งได้อาหารเลี้ยงเข้มข้นประมาณ 1 ลิตร จากนั้นนำมาสกัดด้วยเฮกเซน เอทิลเอซิเตต และเมธานอล ตามลำดับ ส่วนเส้นใยราเปียกนำมาบดให้ละเอียดแล้วนำไปแช่ในเมธานอล นำสารสกัดเมธานอลไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนที่อุณหภูมิ 34 °C จนได้ของเหลวหนืดสีน้ำตาลดำ จากนั้นของเหลวหนืดนี้มาสกัดด้วยเฮกเซน เอทิลเอซิเตต และเมธานอล ตามลำดับ

เมื่อนำส่วนสกัดหยาบทั้ง 8 ส่วน ได้แก่ สารสกัดหยาบเฮกเซน สารสกัดหยาบเอทิลเอซิเตต สารสกัดหยาบเมธานอลและส่วนที่เหลือจากการสกัดด้วยเมธานอล ของทั้งที่ได้จากเส้นใยราและน้ำเลี้ยงรา มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพทั้ง 5 ชนิด คือ *B. subtilis*, *C. albican*, *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *S. aureus* ด้วยวิธี paper disk diffusion สารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพได้ คือ สารสกัดหยาบเฮกเซนและสารสกัดหยาบเอทิลเอซิเตต ที่ได้จากเส้นใยและน้ำเลี้ยง (ดู ตารางที่ 2 และรูปที่ 6) โดยยับยั้ง *B. subtilis* และ *S. aureus* จากผลการศึกษาการสร้างสารปฏิชีวนะในอาหารเหลว YES ในเบื้องต้นราสร้างสารยับยั้ง *C. albican* ได้ดี แต่สารสกัดหยาบไม่ยับยั้ง *C. albican* ของสารสกัดหยาบอาจเป็นไปได้ว่าสารยับยั้ง *C. albican* ที่สร้างโดยรานี้ไม่คงสภาพและอาจสลายตัวหรือถูกทำลายไปในระหว่างขั้นตอนการสกัด

ตารางที่ 2 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลชีพของสารสกัดหยาบจากเส้นใยและอาหารเลี้ยงราเอ็นโดไฟต์ *Mycoleptodiscus* sp. ที่ขยายขนาดการเพาะเลี้ยงใน YES เป็นเวลา 18 วัน

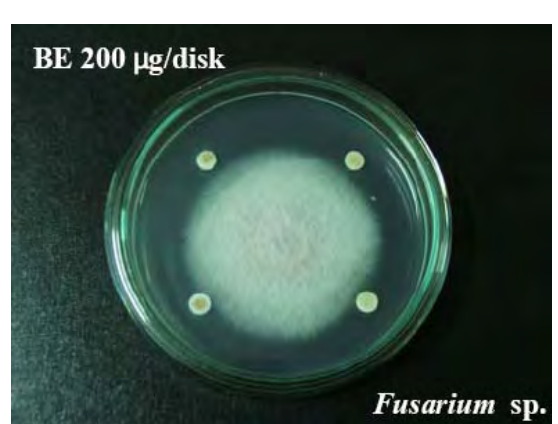
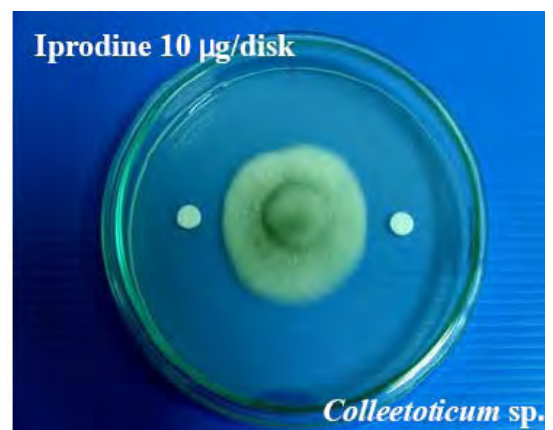
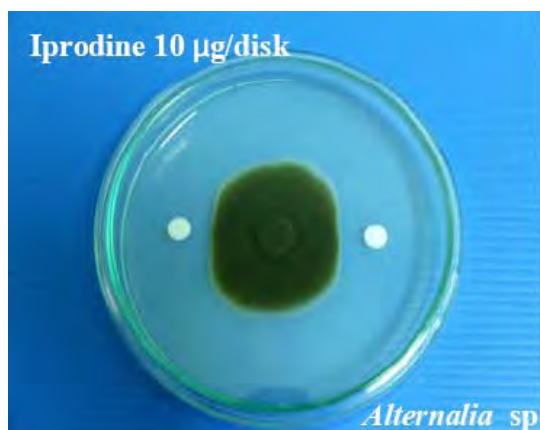
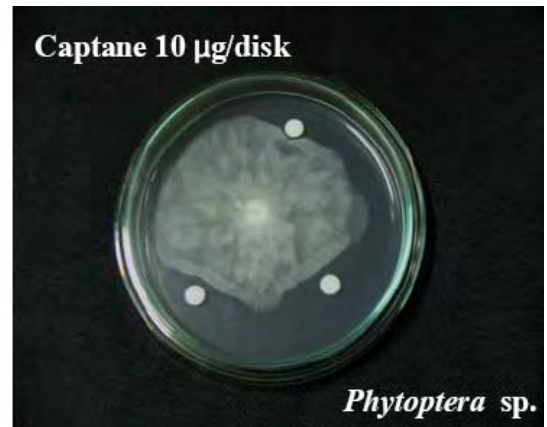
ส่วนสกัดหยาบ (50 µg/disk)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (Inhibition Zone) (มิลลิเมตร)				
	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>C. albicans</i> ATCC 10231
BH	8.5	7.0	-	-	-
BE	9.0	9.0	-	-	-
BM	7.0	-	-	-	-
BR	8.5	-	-	-	-
MH	8.0	8.5	-	-	-
ME	9.0	8.5	-	-	-
MM	7.5	-	-	-	-
MR	7.0	-	-	-	-

- หมายถึง ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลชีพที่ความเข้มข้น 50 µg/disk; BH, BE, BM และ BR หมายถึง ส่วนสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงราเมื่อสกัดด้วยเฮกเซน, เอทิลเอซิเตต, เมธานอล และส่วนที่เหลือจากการสกัดด้วยเมธานอล ตามลำดับ และ MH, ME, MM และ MR หมายถึง ส่วนสกัดหยาบจากเส้นใยราเมื่อสกัดด้วยเฮกเซน, เอทิลเอซิเตต, เมธานอล และส่วนที่เหลือจากการสกัดด้วยเมธานอล ตามลำดับ



รูปที่ 6ฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพของสารสกัดหยาบจากเส้นใยและน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟต์ *Mycoleptodiscus* sp. ที่ขยายขนาดการเพาะเลี้ยงใน YES เป็นเวลา 18 วัน โดยวิธี paper disk diffusion โดยที่ 1 หมายถึง สารสกัดหยาบความเข้มข้น 200 µg/disk; 2 หมายถึง สารสกัดหยาบความเข้มข้น 100 µg/ disk; 3 หมายถึง สารสกัดหยาบความเข้มข้น 50 µg/ disk; B-H หมายถึง ส่วนสกัดหยาบเฮกเซนจากส่วนอาหารเลี้ยงรา; B-E หมายถึง ส่วนสกัดหยาบเอธิลแอลกอฮอล์จากส่วนอาหารเลี้ยงรา และ M-E หมายถึง ส่วนสกัดหยาบเอธิลแอลกอฮอล์จากส่วนเส้นใยรา

จากการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งราก่อโรคพืช 4 ชนิด คือ *Alternaria* sp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp. และ *Phytophthora* sp. โดยใช้ Captane, Iprodione และ Ketokonazole ความเข้มข้น 10 µg เป็น Positive control และใช้ 10% DMSO ในน้ำ เป็น negative control พบว่ามีเพียงสารสกัดหยาดด้วยเอธิลเอซิทेटของน้ำเลี้ยง (BE) เท่านั้นที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช *Fusarium* sp. ได้เล็กน้อย (รูปที่ 7)



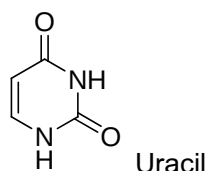
รูปที่ 7 ฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคพืชของสารสกัดหยาดจากอาหารเลี้ยงราเอนโดไฟต์ *Mycocleptodiscus* sp. ที่ขยายขนาดการเพาะเลี้ยงใน YES เป็นเวลา 18 วัน โดยวิธี paper disk diffusion

การเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว YEB ที่อุณหภูมิสภาพห้องเป็นเวลา 18 วัน แยกเส้นใยและน้ำเลี้ยงด้วยการกรอง ส่วนน้ำเลี้ยงนำไปทำให้เข้มข้นจนได้ปริมาตร 1.5 ลิตร และทำการสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซนและเอธิลเอซิเตต, โดยลำดับ จากนั้นส่วนน้ำเลี้ยงหลังการสกัดนำไปทำให้แห้งแบบเยือกแข็งจนแห้งแล้วสกัดด้วยเมทานอล ส่วนเส้นใยสกัดด้วยเมทานอลและนำไปประเหยตัวทำละลายจากนั้นสกัดส่วนที่เหลืออยู่ด้วยเฮกเซน, เอธิลเอซิเตตและเมทานอล โดยลำดับ

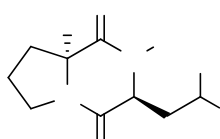
สารสกัดหยาบเอธิลเอซิเตตที่ได้จากน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟต์ซึ่งมีของแข็งปนอยู่นำมาสกัดด้วยเอธิลเอซิเตตและเมทานอล ตามลำดับ ของแข็งส่วนที่เหลือหลังจากการสกัดนำมาล้างด้วยเมทานอล ได้ Uracil

หลังจากการระเหยตัวทำละลาย ส่วนสกัดทั้งหมดนำไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลชีพ 5 ชนิด คือ แบคทีเรียแกรมบวก: *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 แบคทีเรียแกรมลบ: *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และยีสต์: *Candida albicans* ATCC 10231 และใช้ penicillin G, erythromycin, sulfadimidine, streptomycin, iprodione และ ketoconazole เป็นสารอ้างอิงการทดสอบ พบว่าสารสกัดเอธิลเอซิเตตของน้ำเลี้ยงมีฤทธิ์ต้านจุลชีพ จึงนำสารสกัดนี้ไปแยกด้วยเทคนิค silica gel column chromatography และชะคอลัมน์โดยเพิ่มสภาพขั้วตัวชะจาก เฮกเซน-ไดคลอโรมีเทน, ไดคลอโรมีเทน, ไดคลอโรมีเทน-เมทานอล ไปจนถึงเมทานอล ตามลำดับ แต่ละส่วนแยกวิเคราะห์ด้วย TLC ส่วนแยกใดที่คล้ายคลึงกับจะรวมเข้าด้วยกัน ซึ่งทำให้ได้ส่วนแยกที่รวมเข้ากันได้ทั้งหมด 25 ส่วนแยก

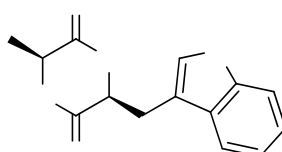
ลำดับส่วนแยกที่ BE13, BE16 และ BE22 ที่ได้มาจากคอลัมน์โครมาโทกราฟีที่ชะด้วย 2-10% เมทานอลในไดคลอโรมีเทน มีของแข็งเกิดขึ้นในระหว่างการระเหยตัวทำละลาย แยกของแข็งโดยการกรองและล้างของแข็งที่ได้ด้วยเมทานอล ได้ Uracil เป็นของแข็งสีน้ำตาลอ่อนหนัก 20 มิลลิกรัม รวมทั้งสองส่วนได้ Uracil ทั้งหมด 820 มิลลิกรัม



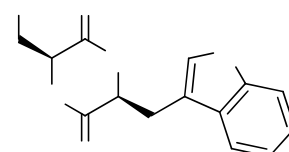
ส่วนการแยกส่วนแยกที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพแยกได้สารที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพที่อยู่ในกลุ่มไซคลิกไดเพปไทด์ 3 สาร ซึ่งประกอบด้วยสารที่มีรายงานว่าเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติสามชนิด คือ cyclo(L-Leu-L-Pro), cyclo(L-Ala-L-Trp) และ cyclo(L-Ser-L-Trp)



cyclo(L-Leu-L-Pro)



cyclo(L-Ala-L-Trp)



cyclo(L-Ser-L-Trp)

โดยที่ส่วนแยกของสารสกัดหยาบเอธิลเอซิทิตจากน้ำเลี้ยงเชื้อซึ่งได้มาจากคอลัมน์โครมาโทกราฟีที่ชะด้วย 2 % เมธานอลในไดคลอโรมีเทน นำมาทำการตกผลึกออกมาจากตัวทำละลายผสมเฮกเซน-ไดคลอโรมีเทน ทำให้ได้ Cyclo(L-Leu-L-Pro) เป็นผลึกสีขาว จากข้อมูล HRESIMS (m/z 258.1239 $[M+H]^+$), 1D และ 2D NMR และ การเปรียบเทียบข้อมูล specific rotation $[\alpha]_D^{20}$ -132 (c 0.24, ethanol) กับข้อมูลที่มีรายงานไว้ $\{[\alpha]_D^{25}$ -133 (c 1, ethanol) (Nitecki, 1968) และ $[\alpha]_D^{24}$ -124 (c 0.4, ethanol) (Yan et al, 2004)} ทำให้สามารถระบุโครงสร้างของสารนี้ว่าเป็น c(L-leucinyl-L-Prolinyl) หรือ Cyclo(L-Leu-L-Pro) ซึ่งเป็นสารไซคลิกไคเพพไทด์ที่อยู่ทั่วไปในธรรมชาติในอาณาจักรพืชและ protist (Prasad 1995)

ในปี 2002 Yongcheng Lin และคณะ ได้รายงานการพบ Cyclo(L-Leu-L-Pro) จากเชื้อรา *Veruculinea* No. 2606 จากต้นโกงการในทะเลสาบ Bahamas (Yongcheng Lin และคณะ, 2002)

และยังมีการรายงานว่ายับยั้งการสร้างแอฟลาท็อกซอนและการเจริญของรา (aflatoxin production and fungal growth) (Yan et al 2004), มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ (Rhee, K.-H. 2002, 2003 and 2004) การเสริมฤทธิ์ต้านจุลชีพ (Rhee, K.-H. 2004) มีฤทธิ์ anti-leukemic activity (Rhee, K.-H. 2002) และหน่วงการเจริญในการงอกและในรากของข้าว (Cronan, 1998).

ส่วนแยกของสารสกัดหยาบเอธิลเอซิทิตจากน้ำเลี้ยงเชื้อมาซึ่งได้มาจากคอลัมน์โครมาโทกราฟีที่ชะด้วย 4 % เมธานอลในไดคลอโรมีเทน นำมาแยกต่อด้วยแฟลชคอลัมน์โครมาโทกราฟีและการชะจะเพิ่มสภาพขั้วจาก ไดคลอโรมีเทน, ไดคลอโรมีเทน-เมธานอล ไปจนถึงเมธานอล ในส่วนแยกที่ใช้ 4-6% เมธานอลในไดคลอโรมีเทนเป็นตัวชะ ในระหว่างการระเหยตัวทำละลายเกิดการตกตะกอน แยกได้ของแข็งโดยการกรอง จากนั้นล้างของแข็งที่ได้ด้วยตัวทำละลายผสม ไดคลอโรมีเทน-เมธานอล ได้ cyclo(L-Alanine-L-Tryptophane) หรือ 2-((1H-indol-3-yl)methyl)-6-methylpiperazine-2,5-dione ของแข็งสีขาว จากข้อมูล HRESIMS (m/z 258.1239 $[M+H]^+$), 1D และ 2D NMR และ การเปรียบเทียบข้อมูล specific rotation, $[\alpha]_D^{20}$ +16 (c 0.1, ethanol), กับ cyclo(L-Ala-L-Trp) ที่ได้จากการสังเคราะห์ $\{[\alpha]_D$ +10.4 (c 0.48, ethanol)} ตามที่มีรายงานไว้แล้วก่อนหน้านี้ (Nakashima and Slater, 1969) นอกจากนี้ cyclo(L-Alanine-L-Tryptophane) ว่าพบใน *Aspergillus ruber* IFO 6004 (Arai, K. et. al. 1989) และ *Aspergillus* sp. ที่ได้จากทะเล (Li, Y. et al. 2004)

ส่วนแยกของสารสกัดหยาบเอธิลเอซิทิตจากน้ำเลี้ยงเชื้อมาซึ่งได้มาจากคอลัมน์โครมาโทกราฟีที่ชะด้วย 6 % เมธานอลในไดคลอโรมีเทน นำมาแยกต่อด้วยแฟลชคอลัมน์โครมาโทกราฟีและใช้ 4-6% เมธานอลในไดคลอโรมีเทนเป็นตัวชะ ในระหว่างการระเหยตัวทำละลายเกิดการตกตะกอน แยกได้ของแข็งโดยการกรอง จากนั้นล้างของแข็งที่ได้ด้วยตัวทำละลายผสม ไดคลอโรมีเทน-เมธานอล ได้ cyclo(L-Ser-L-Tryp) หรือ 2-((1H-indol-3-yl)methyl)-6-(hydroxymethyl)piperazine-2,5-dione เป็นของแข็งสีขาว จากข้อมูล HRESIMS (m/z 274.1191 $[M+H]^+$) 1D และ 2D NMR และ การเปรียบเทียบข้อมูล specific rotation, $[\alpha]_D^{20}$ - 67 (c 0.050 ใน MeOH) กับ cyclo(L-Ser-L-Tryp) ที่ได้

จากการสังเคราะห์ $[[\alpha]_D -100$ (c 0.5, CH₃OH).] (Tullberg et al, 2006) และสารที่มีรายงานว่าแยกได้จากธรรมชาติ $[\alpha]_D^{25} -213$ (c 0.4, MeOH) (Li, X. et al., 2007.) แม้ว่า specific rotation มีค่าน้อยกว่าที่มีรายงานไว้ แต่ ¹H and ¹³C NMR ของสารนี้สอดคล้องกับ cyclo(L-Ser-L-Trp) ที่รายงานไว้ก่อนหน้านี้โดย Tullberg และคณะ และตรงกับสารที่สังเคราะห์ขึ้นโดยผู้วิจัย จาก specific rotation ของ cyclo(L-Ser-L-Trp) ที่แยกได้มีค่าน้อยกว่าที่มีรายงานไว้ อาจเป็นไปได้ว่าสารที่แยกได้นี้เป็นอีกชนิดหนึ่งอยู่ สารไซคลิกไดเพปไทด์ทั้งสามที่แยกได้นำไปทำการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารเหล่านี้โดยใช้เทคนิค broth dilution MIC assays ในการยั้งจุลชีพ 5 ชนิด ได้ผลดังแสดงในตาราง 3 ซึ่งจะเห็นได้ว่า Cyclo(L-Ser-L-Trp) ที่แยกได้มีฤทธิ์การยับยั้ง *Candida albicans* ได้ดีด้วยค่า MIC 7.18 μ M ซึ่งต่ำกว่าค่า MIC ของ ketoconazole และ iprodine 2.6 และ 4.2 เท่าตามลำดับ

ตาราง 3 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของ cyclo(L-Leu-L-Pro), cyclo(L-Ala-L-Trp) และ cyclo(L-Ser-L-Trp) โดยใช้เทคนิค broth dilution MIC assays (Jorgensen และคณะ, 1999)

isolated compounds	MIC values (μ M)				
	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> ATCC	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
	ATCC 6633	ATCC 25923	25922	ATCC 27853	ATCC 10231
cyclo(L-Ala-L-Trp)	-	-	194.55	-	243.19
cyclo(L-Ser-L-Trp)	57.25	457.86	-	-	7.18
cyclo(L-Leu-L-Pro)	9.33	-	297.62	-	148.81
Penicillin G	1.40	1.40			
Erythromycin	0.03	0.03			
Sulfadimidine	1.80	1.80			
Streptomycin	0.34	0.34	0.34	0.34	
Iprodine					30.29
Ketoconazole					18.82

- = The results were inactive at the concentration of 125 μ g/ml.

นอกจากนี้ ได้ทำการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลชีพของสารที่สังเคราะห์ขึ้นและที่แยกได้เพื่อยืนยันฤทธิ์การยับยั้งของสารเหล่านี้อีกครั้งโดยใช้วิธี paper disk diffusion และ broth dilution MIC assays และได้ใช้วิธี colorimetric assay ด้วย 2-[4-iodophenyl]-3-[4-dinitrophenyl]-5-phenyltetrazolium chloride (INT) ในการยืนยันว่าการยับยั้งเป็นแบบหยุดการเจริญเติบโต (bacteriostatic activity) หรือเป็นแบบฆ่าจุลชีพ (bactericidal activity) ผลที่ได้แสดงไว้ดังในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลชีพของสารสังเคราะห์และสารที่แยกได้[#]

	<i>B. subtilis</i>		<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>C. albicans</i>	
	Disc	MIC	Disc	MIC	Disc	MIC	Disc	MIC	Disc	MIC
สารสังเคราะห์										
cyclo(<i>D</i> -Ala- <i>D</i> -Trp)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.24 ^a
cyclo(<i>D</i> -Ala- <i>L</i> -Trp)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.24 ^a
cyclo(<i>L</i> -Ala- <i>D</i> -Trp)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.24 ^a
cyclo(<i>L</i> -Ala- <i>L</i> -Trp)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.91 ^a
cyclo(<i>D</i> -Ser- <i>D</i> -Trp)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	125 ^a
cyclo(<i>L</i> -Ser- <i>L</i> -Trp)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.24 ^a
สารที่แยกได้										
cyclo(<i>L</i> -Ala- <i>L</i> -Trp)	-	-	-	-	-	125 ^d	-	125 ^d	-	125 ^a
cyclo(<i>L</i> -Ser- <i>L</i> -Trp)	-	-	nil	-	nil	-	nil	-	-	-
cyclo(<i>L</i> -Leu- <i>L</i> -Pro)	-	50 ^d	-	50 ^d	nil	50 ^d	nil	50 ^d	-	25 ^b
Penicillin G	nd	-	-	0.24 ^d	nd	-	nd	-	nd	nd
Streptomycin	17/15/12	1.95	14/12/7	3.91 ^d	17/12/-	0.49 ^d	11/6/-	0.24 ^c	nd	nd
Kanamycin	17/17/14	1.95 ^c	16/9/8	1.95 ^d	15/10/-	0.98 ^d	10/-/-	3.91 ^a	nd	nd
Ketoconazole	nd	nd	nd	nd	nd		nd	nd	15/10/-	0.24 ^a

[#] Disc และ MIC หมายถึง การทดสอบโดยวิธี paper disk diffusion และ broth dilution MIC assays ตามลำดับ; nil หมายถึง เห็นวงใสการยับยั้งน้อย ที่ความเข้มข้น 500 µg/disc; MIC ในหน่วย µg/mL; สำหรับ positive control เช่น 17/12/- หมายถึง ขนาดวงใสการยับยั้ง ในหน่วย mm ที่ความเข้มข้น 500 µg/disc, ที่ความเข้มข้น 250 µg/disc และ ที่ความเข้มข้น 100 µg/disc ตามลำดับ และ - หมายถึง ไม่ยับยั้งสำหรับการทดสอบ โดยวิธี paper disk diffusion และ broth dilution MIC assays ที่ความเข้มข้น 500 µg/disc หรือต่ำกว่า และ 250 µg/mL หรือต่ำกว่า; nd หมายถึง ไม่ได้ทดสอบ

^a ไม่ยับยั้งจุลชีพเมื่อทดสอบด้วยวิธี 2-[4-iodophenyl]-3-[4-dinitrophenyl]-5-phenyltetrazolium chloride (INT) colorimetric assay;

^b และ ^c หมายถึง ยับยั้งจุลชีพเมื่อทดสอบด้วยวิธี 2-[4-iodophenyl]-3-[4-dinitrophenyl]-5-phenyltetrazolium chloride (INT) colorimetric assay ที่ความเข้มข้น 50 µg/mL และ 3.91 µg/mL ตามลำดับ

^d หมายถึง ผลการทดสอบด้วยวิธี 2-[4-iodophenyl]-3-[4-dinitrophenyl]-5-phenyltetrazolium chloride (INT) colorimetric assay ที่ความเข้มข้นเดียวกับวิธี broth dilution MIC assays

จากการทดสอบโดยวิธี paper disk diffusion สารที่ได้จากการสังเคราะห์ทั้งหมดไม่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพ ขณะที่สารที่แยกได้ cyclo(L-Ser-L-Trp) และ cyclo(L-Leu-L-Pro) แสดงฤทธิ์การยับยั้งน้อยมากที่ความเข้มข้น 500 µg/disc โดย cyclo(L-Ser-L-Trp) ที่จากการแยกแสดงฤทธิ์การยับยั้ง *S. aureus*, *E. coli* และ *P. aeruginosa* และ cyclo(L-Leu-L-Pro) ที่จากการแยกแสดงฤทธิ์การยับยั้ง *E. coli* และ *P. aeruginosa*

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลชีพ broth dilution MIC assays และ colorimetric assay ด้วย 2-[4-iodophenyl]-3-[4-dinitrophenyl]-5-phenyltetrazolium chloride (INT) ที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 250 µg/mL พบว่า สารสังเคราะห์แสดงฤทธิ์การยับยั้ง *C. albicans* เท่านั้นและเป็นการยับยั้งเป็นแบบหยุดการเจริญเติบโต (bacteriostatic activity) ขณะที่ สารเมแทบอลิท์ที่แยกได้ cyclo(L-Ala-L-Trp) ที่ความเข้มข้น 125 µg/mL แสดงฤทธิ์การยับยั้งแบบฆ่าจุลชีพ *E. coli* และ *P. aeruginosa* และแบบหยุดการเจริญเติบโตสำหรับ *C. albicans* ส่วน cyclo(L-Leu-L-Pro) แสดงฤทธิ์การยับยั้งแบบฆ่าจุลชีพ *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* และ *P. aeruginosa* ที่ความเข้มข้น 50 µg/mL และ แสดงฤทธิ์การยับยั้งแบบฆ่าจุลชีพและแบบหยุดการเจริญเติบโตสำหรับ *C. albicans* ที่ความเข้มข้น 50 µg/mL และ 25 µg/mL ตามลำดับ

จากผลการทดสอบนี้ บ่งชี้ว่าฤทธิ์การยับยั้งจุลชีพของสารประกอบไซคลิกไดเปปไทด์ที่แยกได้มีสิ่งเจือปนที่อาจเสริมฤทธิ์การยับยั้งจุลชีพของสารประกอบไซคลิกไดเปปไทด์เดี่ยวๆ และด้วยเหตุนี้ในการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลชีพในภายหลัง (ดังผลในตาราง 4) ฤทธิ์การยับยั้งจุลชีพน้อยกว่าครั้งแรก (ดังผลในตาราง 3) จึงอาจเป็นไปได้ว่าสารที่เจือปนนี้ไม่คงสภาพโดยเฉพาะอย่างยิ่งสารเจือปนของ cyclo(L-Ser-L-Trp)

2. สารปฏิชีวนะที่สร้างโดยราเอ็นโดไฟต์ *Alternaria* sp. ที่แยกได้จากใบพลูคาว

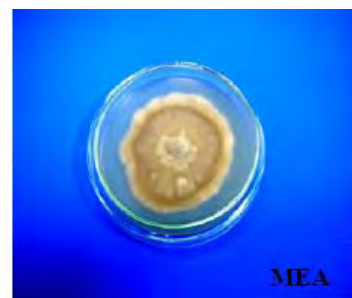
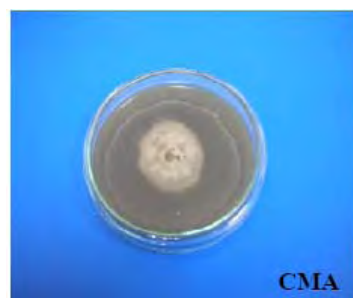
จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเอ็นโดไฟต์ *Alternaria* sp. ที่แยกได้จากใบพลูคาว เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5 ชนิด ได้แก่ PDA (Potato Dextrose Agar), MEA (Malt Extract Agar), YEA (Yeast Extract Sucrose Agar), SDA (Sabouraud's Dextrose Agar) และ CMA (Corn Meal Agar) พบว่าลักษณะของโคโลนี สีของเส้นใย และสีของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ราสร้างขึ้น จะมีลักษณะที่แตกต่างกันออกไปในแต่ละอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าและส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอพบว่า ราเอ็นโดไฟต์ *Alternaria* sp. อายุ 14 วันไม่สร้างสปอร์ในอาหารทั้ง 5 ชนิด ดังแสดงในรูปที่ 8 แต่รานี้สร้างสปอร์ได้ในอาหาร PDA เมื่อเลี้ยงนาน 7 เดือน ซึ่งเมื่อนำมาย้อมด้วย lactophenol blue เพื่อดูลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบลักษณะของสปอร์จะมีลักษณะต่อกันเป็นสายยาว ดังแสดงในรูปที่ 9

จากการพิสูจน์ทางอนุชีววิทยา เมื่อเทียบส่วน ITS region ของราเอ็นโดไฟต์นี้กับข้อมูลใน GenBank พบว่ามีความเหมือนกับราเอ็นโดไฟต์ *Alternaria* sp. 100%

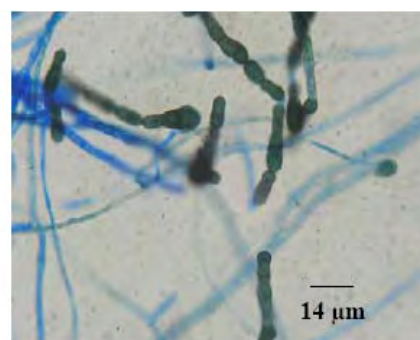
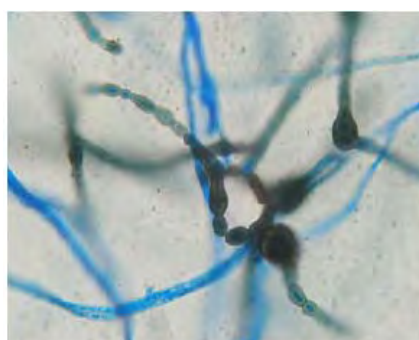
```

          10          20          30          40          50
CGTAGGTGAA CCTGCGGAGG GATCATTACA CAAATATGAA GCGGGGCTGG
AATCTCTCGG GGTACAGCC TTGCTGAATT ATCACCCTT GTCTTTTGCG
TACTTCTTGT TTCCTTGGTG GGTCGCCCA CCACTAGGAC AACATAAAC
CTTTTGTAAT TGCAATCAGC GTCAGTAACA AATTAATAAT TACAACTTTC
AACAACGGAT CTCTTGGTTC TGGCATCGAT GAAGAACGCA GCGAAATGCG
ATAAGTAGTG TGAATTGCAG AATTCAGTGA ATCATCGAAT CTTTGAACGC
ACATTGCGCC CTTTGGTATT CCAAAGGGCA TGCCTGTTCT AGCGTCATTT
GTACCCTCAA GCTTTGCTTG GTGTTGGGCG TCTTGTCTCT AGCTTTGCTG
GAGACTCGCC TTAAAGTAAT TGGCAGCCGG CCTACTGGTT TCGGAGCGCA
GCACAAGTCG CACTCTCTAT CAGCAAAGGT CTAGCATCCA TTAAGCCTTT
TTTCAACTTT TGACCTCGGA TCAGGTAGG

```

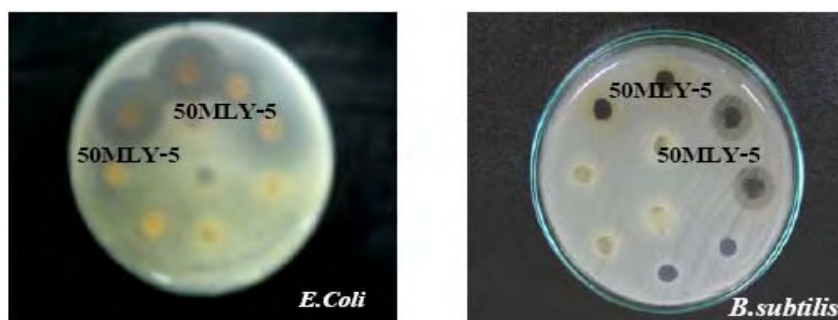


รูปที่ 8 ภาพแสดงลักษณะโคโลนีของราเอนโดไฟต์ *Alternaria* sp. อายุ 14 วัน ในอาหาร แข็ง 5 ชนิด



รูปที่ 9 ราเอนโดไฟต์ *Alternaria* sp. (a) ลักษณะโคโลนีเจริญบน PDA อายุ 14 วัน (b) mycelia

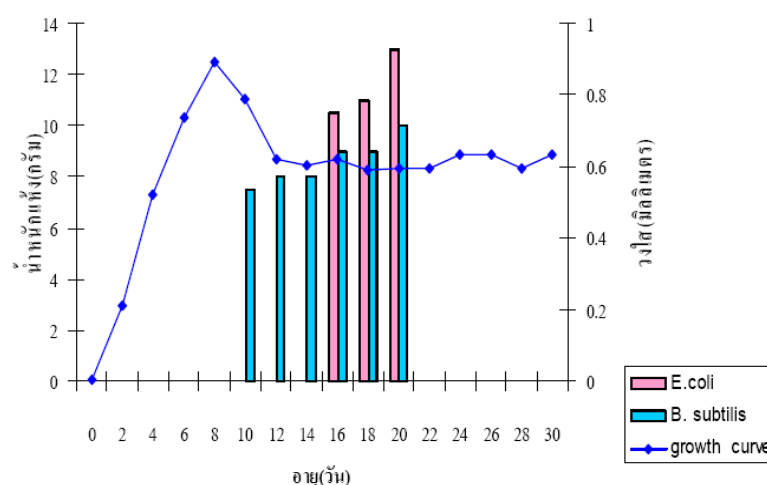
การศึกษาการสร้างสารปฏิชีวนะของราที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง 5 ชนิด คือ PDA (potato dextrose agar), MEA (malt extract agar), YEA (yeast extract sucrose agar), SDA (sabouraud's dextrose agar) และ CMA (corn meal agar) ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลชีพโดยวิธี Dual Agar diffusion (รูปที่ 10) พบว่าการเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร YEA ราเอนโดไฟต์นี้สร้างสารปฏิชีวนะในการยับยั้ง *E. coli* ได้เป็นวงใส 13 มิลลิเมตร และ *B. subtilis* ได้ 9 มิลลิเมตร ในอาหารแข็งชนิด YEA (รูปที่ 4.22) และยังยับยั้ง *B. subtilis* ได้ 10 มิลลิเมตร ในอาหารแข็งชนิด MEA



รูปที่ 10 การยับยั้ง *Escherichia coli* และ *Bacillus subtilis* ของ ราเอนโดไฟต์ *Alternaria* sp. ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง YEA

การศึกษาช่วงเวลาการสร้างสารเมแทบอลิท์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลชีพทดสอบของราเอนโดไฟต์ *Alternaria* sp.

การเจริญเติบโตของราเอนโดไฟต์ *Alternaria* sp. ในอาหาร YEB (รูปที่ 11) พบว่ารามีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในช่วงวันแรกถึงวันที่ 6 ประมาณวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงราได้เข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่ (stationary phase) และการศึกษาการสร้างสารปฏิชีวนะของรา โดยทดสอบสารปฏิชีวนะในน้ำเลี้ยง ณ เวลาการเพาะเลี้ยง พบว่าราสร้างสารเมแทบอลิท์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลชีพ *E. coli* ATCC 25922 และ *B. subtilis* ATCC 6633 ได้ดีที่สุด เมื่อรามีอายุ 20 วัน



รูปที่ 11 การเจริญเติบโตและการสร้างสารยับยั้งจุลชีพของราเอนโดไฟต์ *Alternaria* sp. ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว YES

การสกัดและการแยกสารประกอบของสารสกัดที่ได้จากราเอนโดไฟต์ *Alternaria* sp.

หลังจากการขยายขนาดการเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟต์ *Alternaria* sp. ในอาหารเหลว YES เป็นเวลา 20 วัน ทำการกรองแยกด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ซึ่งจะได้ส่วนของเส้นใยและส่วนของน้ำเลี้ยงรา แล้วนำทั้ง 2 ส่วนที่แยกได้มาสกัดต่อด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ได้แก่ เฮกเซน เอธิลเอซิเทต และเมทานอล ตามลำดับ

จากนั้นนำสารสกัดหยาบที่ได้จากเส้นใยและน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟต์ทั้งหมดมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลชีพทั้ง 5 ชนิด คือ *B. subtilis*, *C. albicans*, *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *S. aureus* ด้วยวิธี Paper disk diffusion พบว่า สารสกัดหยาบเฮกเซนจากเส้นใย สารสกัดหยาบเมทานอลจากเส้นใย สารสกัดหยาบเมทานอลจากน้ำเลี้ยง และ ส่วนที่เหลือจากการสกัดน้ำเลี้ยงด้วยตัวทำละลาย มีฤทธิ์ยับยั้ง *B. subtilis* ที่ความเข้มข้น 200 µg/disc สารสกัดหยาบเฮกเซนจากน้ำเลี้ยง สารสกัดหยาบเอธิลเอซิเทตจากเส้นใย และ สารสกัดหยาบเอธิลเอซิเทตจากน้ำเลี้ยงรา สามารถยับยั้ง *B. subtilis* และ *E. coli* ได้ที่ความเข้มข้น 200 µg/disc (ดูตาราง 5 และรูปที่ 12)

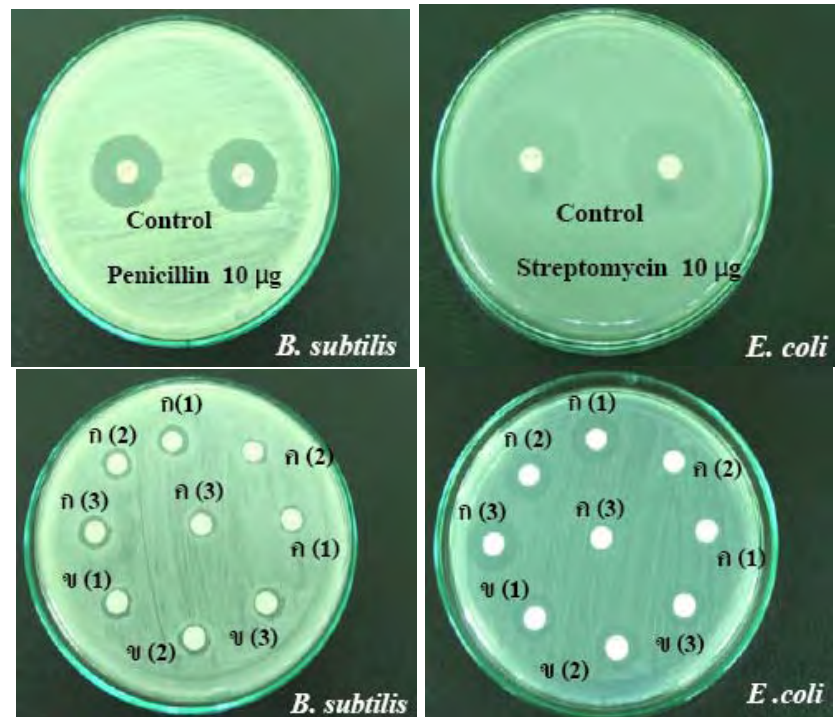
นอกจากนี้ยังได้ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบทั้งหมดในการยับยั้งราก่อโรคพืช 4 ชนิด คือ *Phytophthora palmivora*, *Alternaria brassicicola*, *Collectotrichum gloeosporioides* และ *Fusarium oxysporum* โดยใช้ Captane, Iprodione และ Ketokonazole ที่ความเข้มข้น 10 µg เป็น positive control และใช้ 10% DMSO ในน้ำ เป็น negative control พบว่าส่วนสกัดหยาบเอธิลเอซิเทตจากเส้นใยและน้ำเลี้ยงราที่ความเข้มข้น 200 µg/disc ยับยั้งราก่อโรคพืช *Phytophthora palmivora* และ *Alternaria brassicicola* (รูปที่ 13) ได้

ตารางที่ 5 ฤทธิ์การยับยั้งจุลชีพของสารสกัดหยาบจากเส้นใยและน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟต์ *Alternaria* sp.

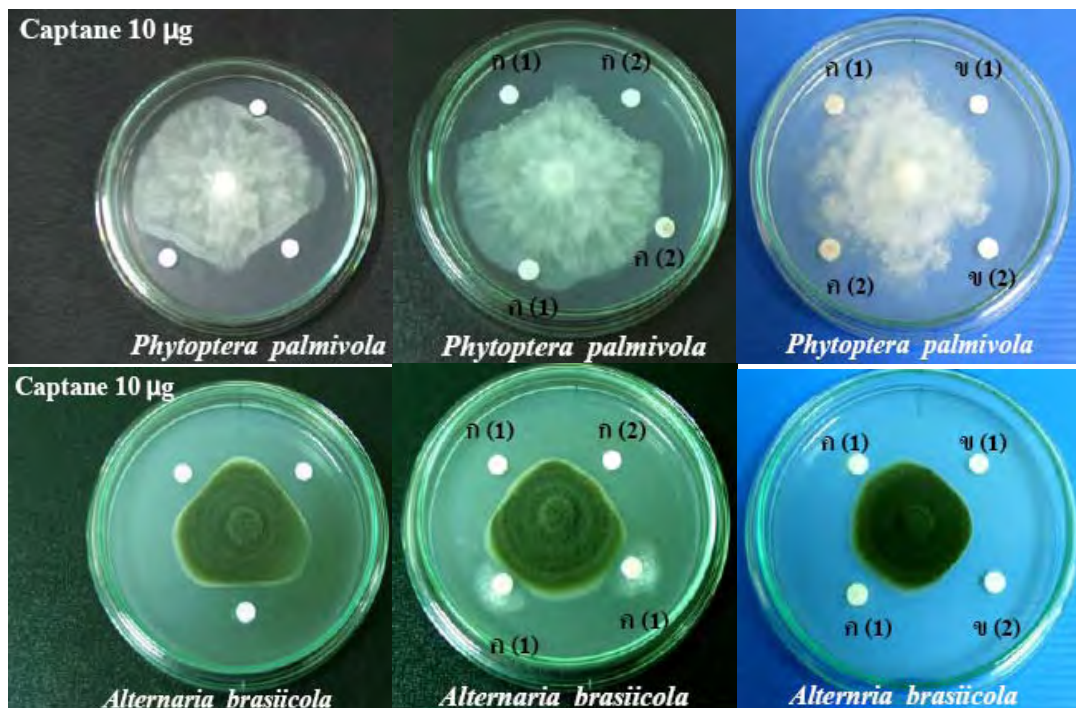
ความเข้มข้น 200 µg/disc

ส่วนสกัดหยาบ ความเข้มข้น	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (Inhibition Zone) (มิลลิเมตร)				
	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
เฮกเซนจากเส้นใย	8	-	-	-	-
เฮกเซนจากน้ำเลี้ยงรา	8	-	8	-	-
เอธิลเอซิเทตจากเส้นใย	7.5	-	8	-	-
เอธิลเอซิเทตจากน้ำเลี้ยงรา	8	-	10	-	-
เมทานอลจากเส้นใย	8	-	-	-	-
เมทานอลจากน้ำเลี้ยงรา	7.5	-	-	-	-
ส่วนที่เหลือจากน้ำเลี้ยงรา	8.5	-	-	-	-

หมายเหตุ (-) ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพที่ความเข้มข้น 200 µg



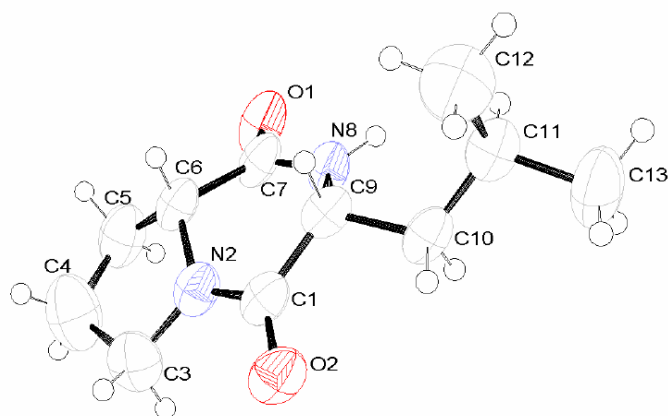
รูปที่ 12ฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียทดสอบของสารสกัดหยาบจากเส้นใยและน้ำเลี้ยงรา *Alternaria* sp. ที่ความเข้มข้น 200 µg/disc (ก) สารสกัดหยาบเอริธรมัยซินจากน้ำเลี้ยง, (ข) สารสกัดหยาบเอริธรมัยซินจากเส้นใย และ (ค) negative control (10 % DMSO ในน้ำ)



รูปที่ 13ฤทธิ์การราที่ก่อโรคพืชของสารสกัดหยาบจากเส้นใยและน้ำเลี้ยงรา *Alternaria* sp. ที่ความเข้มข้น 200 µg/disc (ก) สารสกัดหยาบเอริธรมัยซินจากน้ำเลี้ยง, (ข) สารสกัดหยาบเอริธรมัยซินจากเส้นใย และ (ค) negative control (10 % DMSO ในน้ำ)

สารสกัดหยาบเอริลแอซิทेटจากส่วนเส้นใยและน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟต์ *Alternaria* sp. นำมาแยกโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟีที่ใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ ตัวชะที่ใช้ได้แก่ เฮกเซน, เฮกเซน-ไดคลอโรมีเทน, ไดคลอโรมีเทน, ไดคลอโรมีเทน-เมทานอล และเมทานอล ตามลำดับ ได้สารทั้งหมด 5 ชนิด

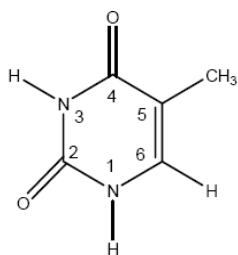
ลำดับส่วนที่ BE014-BE015 ของสารสกัดหยาบเอริลแอซิทेटจากน้ำเลี้ยงที่แยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ 2% เมทานอลในไดคลอโรมีเทนเป็นตัวชะ ได้ส่วนแยกมีลักษณะเป็นสีเหลืองปนของแข็งสีขาว นำส่วนแยกนี้มาล้างน้ำมันสีเหลืองออกด้วยเฮกเซน จากนั้นนำไปตกผลึกซ้ำด้วยตัวทำละลายผสมเฮกเซน-ไดคลอโรมีเทน ได้เป็นผลึกสีขาว จากข้อมูลแมสสเปกตรัม (HR/ES-TOF MS spectrum) ของสารนี้ m/z 211.1443 $[M+H]^+$; cal 211.1446 ทำให้ทราบสูตรโมเลกุล คือ $C_{11}H_{18}N_2O_2$ และจากข้อมูล 1D และ 2D-NMR และ specific rotation ระบุได้ว่าสารนี้คือ Cyclo(L-Leu-L-Pro) ซึ่งตรงกับข้อมูลของ Cyclo(L-Leu-L-Pro) ที่มีรายงานไว้ก่อนหน้านี้โดย Pei-Sheng และคณะ, 2004 และ Madeline และคณะ, 1995 นอกจากนี้ Cyclo(L-Leu-L-Pro) สามารถตกผลึกได้ผลึกที่ดีสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค X-ray crystallography ยืนยันโครงสร้างของ cyclo(L-Leu-L-Pro) ได้อีกทางหนึ่ง ดังรูป



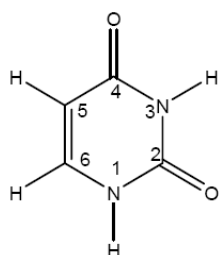
Ortep structure ของ cyclo(L-Leu-L-Pro)

ซึ่งจากการสืบค้นข้อมูล cyclo(L-Leu-L-Pro) ที่แยกได้นี้ยังไม่มีรายงานพบในรา *Alternaria* sp. มาก่อน

ส่วนแยกที่ BE017 ของสารสกัดหยาบเอริลแอซิทेटจากน้ำเลี้ยงราที่แยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ 2% เมทานอลในไดคลอโรมีเทนเป็นตัวชะ นำแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีอีกครั้งโดยใช้ 100% ไดคลอโรมีเทน-เมทานอลเป็นตัวชะ พบว่าส่วนที่ 129-132 ที่ได้จากการชะด้วย 5 % เมทานอลในไดคลอโรมีเทนมีผลึกสีขาวปนกับน้ำมันสีส้ม หลังจากล้างน้ำมันสีส้มออกด้วยไดคลอโรมีเทนและเมทานอลแล้วกรองแยกผลึกออกมา นำผลึกมาตกผลึกซ้ำด้วยตัวทำละลายผสมไดคลอโรมีเทน-เมทานอล ได้ผลึกสีขาว จากข้อมูล 1H NMR และ MS บ่งชี้ว่าสารนี้คือ Thymine

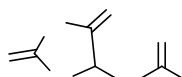


การกรองแยกตะกอนออกจากสารสกัดหยาบเอธิลแอซิทจากน้ำเลี้ยงได้เป็นผงสีขาว จากข้อมูล ^1H NMR และ MS บ่งชี้ว่าสารนี้คือ pyrimidine-2,4(1*H*,3*H*)-dione หรือ uracil นอกจากนี้ยังสามารถแยก uracil ได้เพิ่มเติมอีกจากการกรองแยกผงสีขาวออกจากส่วนแยกที่ BE 018 ที่ได้มาจากการแยกของสารสกัดหยาบเอธิลแอซิทจากน้ำเลี้ยงด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีซึ่งใช้ 2-4% เมธานอลในไคคลอโรมีเทนเป็นตัวชะ



Uracil มีรายงานว่า Lactic Acid Bacteria (*Lactobacillus brevis* sp. *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus* sp. และ *Leuconostoc mesenteroides*) ยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae* และ *Debaryomyces hansenii*) และเชื้อรา (*Alternaria solani* และ *Cladosporium* sp.) สามารถเปลี่ยน Uridine ที่มีอยู่ในมะเขือเทศสุกให้เป็น Uracil ได้ (Alyssa และคณะ, 2005) และแยกได้จากสารสกัดหยาบเอธิลแอซิทจาก Limnic bacteria เมื่อเลี้ยงในอาหาร Luria-Bertani เป็นเวลา 3 วัน ที่ 28°C (Rajendra, P. M. และคณะ, 2001)

ส่วนแยกที่ BE023 ที่ได้มาจากการแยกของสารสกัดหยาบเอธิลแอซิทจากน้ำเลี้ยงด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีซึ่งใช้ 6-10 % เมธานอลในไคคลอโรมีเทนเป็นตัวชะ หลังจากล้างน้ำมันสีส้มออกด้วยเมธานอลแล้วกรองแยกผลึกออกมาได้ผลึกสีขาวหนักที่ละลายได้ในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ จากข้อมูล 1D และ 2D-NMR และ mass spectroscopy บ่งชี้ว่าผลึกสีขาวที่ได้นี้ คือ allantoin และ ข้อมูล specific rotation $[\alpha]_D^{20} -7(c\ 0.05, \text{EtOH:H}_2\text{O}, 1:1)$ บ่งชี้ว่าเป็น (-)-allantoin ซึ่ง allantoin ที่แยกได้นี้ยังไม่มีรายงานว่าพบในรา *Alternaria* sp. มาก่อน



การแยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดหยาบเอธิลแอซิทจากเส้นใย

นำส่วนสกัดหยาบเอธิลแอซิทจากเส้นใยมาแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ และตัวชะที่ใช้ ได้แก่ เฮกเซน-ไคคลอโรมีเทน, ไคคลอโรมีเทน, ไคคลอโรมีเทน-เมธานอล และเมธานอล ตามลำดับ

ส่วนแยกที่ ME04 ที่ได้มาจากการแยกสารสกัดหยาบเอธิลเอซิทเทตจากเส้นใยด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ 40 % เฮกเซนในไดคลอโรมีเทนเป็นตัวชะ ส่วนแยกนี้เป็นน้ำมันสีเหลืองปนของแข็งสีขาว หลังจากล้างส่วนน้ำมันออกด้วยเฮกเซนได้ของแข็งสีขาว จากข้อมูลทางสเปกโทสโกปี ได้แก่ 1D และ 2D NMR และ mass spectroscopy บ่งชี้ได้ว่าของแข็งสีขาวนี้คือ ergosterol peroxide หรือ $5\alpha,8\alpha$ -epidioxy-24(R)-methyl-cholesta-6,22-dien-3 β -ol และข้อมูลทางสเปกโทสโกปีและ specific rotation ของสารที่แยกได้สอดคล้องกับที่มีรายงานไว้ก่อนหน้านี้ (Bok, 1999 และ Zhang, H.L. และคณะ, 2005) ergosterol peroxide มีรายงานว่าเคยพบในรา *Alternaria* sp. (Zhang, H.L. และคณะ, 2005) มาแล้วก่อนหน้านี้ซึ่งสามารถพบได้ในราและพืช และสารนี้เป็นสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยโดยมีรายงานว่ามียุทธในการยับยั้งการเจริญของจุลชีพและมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งหลายชนิด เช่น

Kahlos และ คณะ ได้สกัดและแยก ergosterol peroxide จากรา *Inonotus rariatus* และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) และเซลล์มะเร็งซาร์โคมา (Walker 256) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 42 และ 35 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (Kahlos และคณะ, 1989)

Bok และ คณะ สกัดและแยก ergosterol peroxide จากเชื้อรา *Cordyceps sinensis* และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (K526, Jurkat, HL-60 และ RPMI-8226), เซลล์มะเร็งผิวหนัง (WM-1341) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 65, 48, 60, 63 และ 49 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (Bok และ คณะ, 1999)

Cantrell และคณะ สกัดและแยก ergosterol peroxide จากต้น *Ajuga remota* Benth. และทดสอบความเป็นพิษต่อ *Mycobacterium tuberculosis* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 1.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (Cantrell และคณะ, 1999)

Nam และ คณะ สกัดและแยก ergosterol peroxide จากเชื้อรา *Paecilomyces tenuipes* และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (SNU-1), เซลล์มะเร็งตับ (SNU-354) และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (SNU-C4) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.2, 2.2 และ 4.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (Nam และ คณะ, 2001)

Takei และ คณะ สกัดและแยก ergosterol peroxide จากเห็ด *Sarcodon asparatus* และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (HL-60) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (Takei และ คณะ, 2005)

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพด้วยวิธี Minimum Inhibitory Concentration Method (MIC)

ผลทดสอบฤทธิ์ของสารทั้งหมดที่แยกได้ไม่แสดงฤทธิ์การยับยั้งราก่อโรคพืช 4 ชนิด ที่ความเข้มข้น 125 μ g/disc สารประกอบที่ทำการแยกได้ คือ Cyclo(L-Leu-L-Pro), thymine, uracil, allantoin และ ergosterol peroxide ได้นำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพด้วยวิธี Minimum Inhibitory Concentration Method (MIC) โดยใช้ Penicillin G, Erythromycin, Sulfadimidine และ Streptomycin เป็น positive control สำหรับแบคทีเรีย ใช้ Iprodione และ Ketoconazole เป็น positive control สำหรับยีสต์ ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 6

allantoin มีฤทธิ์ยับยั้ง *B. subtilis* ATCC 6633 และ *C. albicans* ATCC 10231 ที่ค่า MIC 1.96 µg/ml (12.40 µM) และ 15.63 µg/ml (98.92 µM) ตามลำดับ Cyclo(L-Leu-L-Pro) มีฤทธิ์ยับยั้ง *B. subtilis* ATCC 6633, *E. coli* ATCC 25922 และ *C. albicans* ATCC 10231 ได้ที่ค่า MIC 1.96 µg/ml (9.28 µM), 62.5 µg/ml (296.0 µM) และ 31.25 µg/ml (31.25 µM) ตามลำดับ และ ergosterol peroxide มีฤทธิ์ยับยั้ง *B. subtilis* ATCC 6633, *E. coli* ATCC 25922 และ *C. albicans* ATCC 10231 ได้ที่ค่า MIC 7.82 µg/ml (23.84 µM), 31.25 µg/ml (95.27 µM), และ 62.5 µg/ml (190.55 µM) ตามลำดับ ในขณะที่ Thymine และ Uracil ไม่มีความสามารถในการยับยั้งจุลชีพ

ตารางที่ 6 ค่า MIC ในการยับยั้งจุลชีพของสารประกอบที่แยกได้จากราเอ็นโดไฟต์ *Alternaria* sp.

สาร	ค่า MIC [µg/ml (µM)]				
	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>C. albicans</i> ATCC 10231
Cyclo(L-Leu-L-Pro)	1.96 (9.28)	-	62.5 (296.0)	-	31.25 (148)
Thymine	-	-	-	-	-
Uracil	-	-	-	-	-
allantoin	15.63 (98.92)	-	-	-	1.96 (12.40)
ergosterol peroxide	7.82 (23.84)	-	31.25 (95.27)	-	62.5 (190.55)
Penicillin G	0.5 (1.40)	0.5 (1.40)	-	-	-
Erythromycin	0.025 (0.034)	0.025 (0.034)	-	-	-
Sulfadimidine	0.5 (1.797)	0.5 (1.797)	-	-	-
Streptomycin	0.5 (0.343)	0.5 (0.343)	0.5 (0.343)	0.5 (0.343)	-
Iprodine	-	-	-	-	50 (30.29)
Ketoconazole	-	-	-	-	50 (18.82)

(-) หมายถึง ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพที่ความเข้มข้นสูงสุด 125 µg / ml

รายงานวิจัยเกี่ยวกับสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิที่สร้างจาก *Alternaria* sp. ที่เคยรายงานไว้แล้ว ได้แก่

Suemitsu และคณะ, 1995 รายงานการพบ Zinnimidine และ 5-(3',3'-Dimethylallyloxy)-7-methoxy-6-methylphalide จากน้ำเลี้ยงรา *Alternaria porri* สารทั้ง 2 ชนิดนี้มีคุณสมบัติเป็น phytotoxins

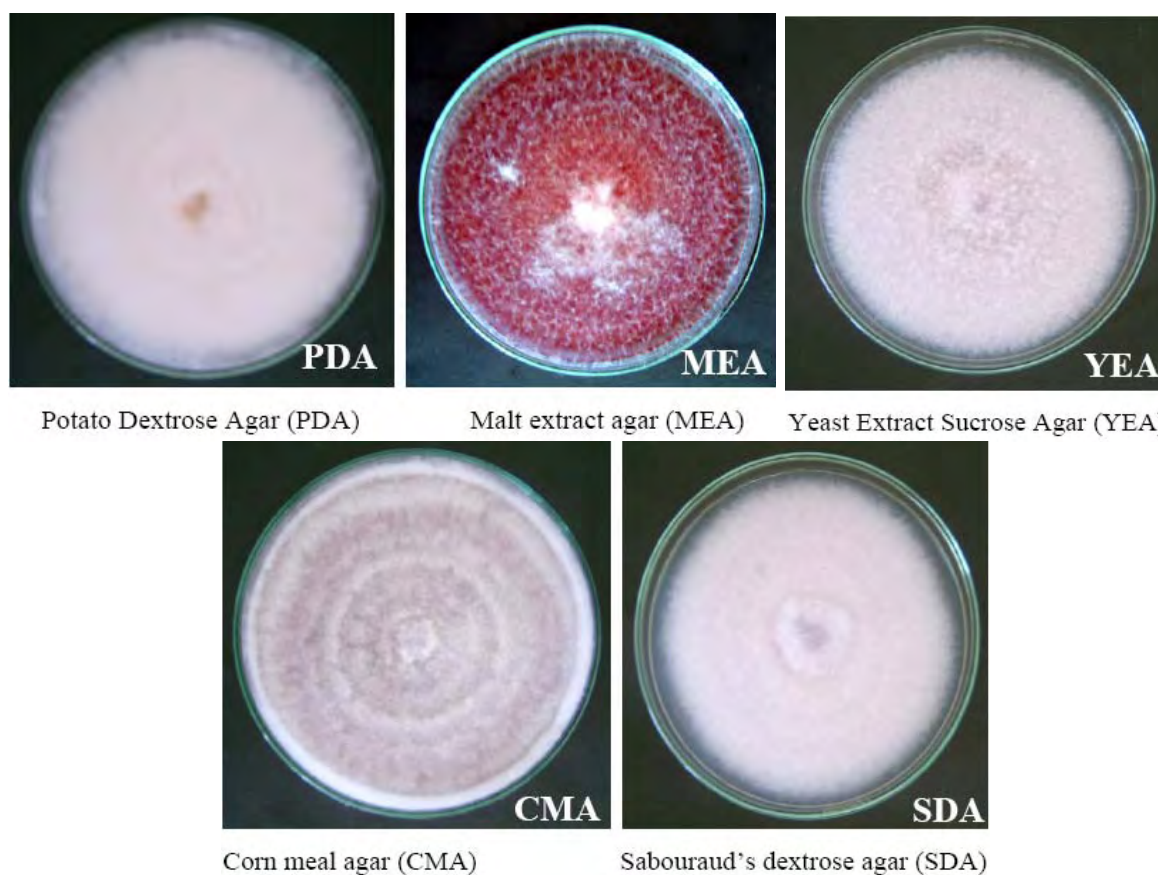
Thomas และคณะ, 2003 รายงานการพบสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิชนิดใหม่คือ Infectopyrone ที่แยกได้จากเส้นใยรา *Alternaria infectoria* โดยสารนี้มีสมบัติเป็น mycotoxin

Michele และคณะ, 2004 แยกสาร Radicinols และ Radicinin จาก *Alternaria radicina* ซึ่งสาร 2 ชนิดนี้จะลดการงอกของรากแครอท

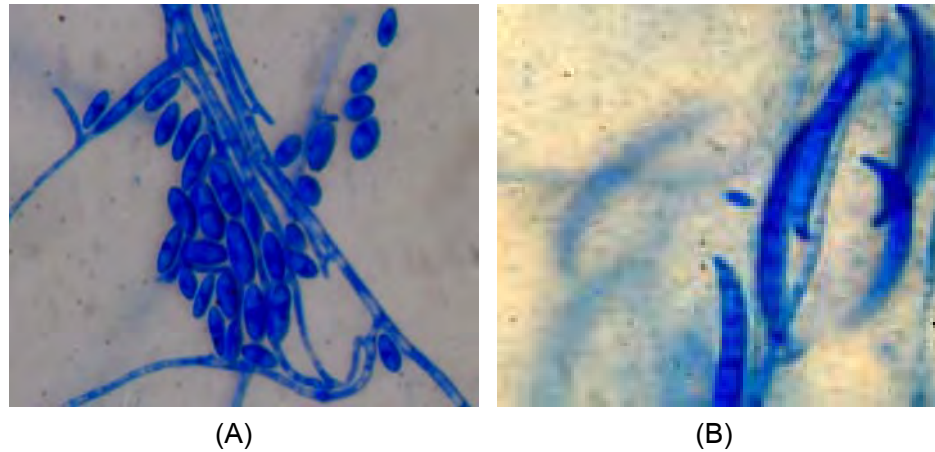
Zhang, H.L. และคณะ, 2005 แยกสารเมแทบอไลต์ทุติภูมิจากน้ำเลี้ยงรา *Alternaria* sp. ที่สกัดด้วยเอธิลแอลกอฮอล์และ *n*-butanol แล้วแยกโดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟีได้สาร 6 ชนิดคือ *p*-benzyloxy-phenol, *p*-hydroxy phenyl ethylamine, 3-hydroxymethyl-8-hydroxyl-pyrroloperazine-2,5-dione, 3-isobutyl-6-secbutyl-piperazine-2,5-dione, 5 α ,8 α -epidioxy-ergosta-6,22-diene-3 β -ol และ 3 β -hydroxy-cholesta-5-ene โดย *p*-benzyloxy-phenol, *p*-hydroxy phenyl ethylamine, 3-hydroxymethyl-8-hydroxyl-pyrroloperazine-2,5-dione เป็นสารที่พบเป็นครั้งแรกในราชินีสนนี้

3. สารปฏิชีวนะที่สร้างโดยราเอ็นโดไฟต์ *Fusarium sp.* ที่แยกได้จากใบเสม็ดขาว *Melaluca cajuputi*

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเอ็นโดไฟต์ *Fusarium sp.* เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5 ชนิด ได้แก่ PDA (Potato Dextrose Agar), MEA (Malt Extract Agar), YEA (Yeast Extract Sucrose Agar), SDA (Sabouraud's Dextrose Agar) และ CMA (Corn Meal Agar) พบว่าลักษณะของโคโลนี สีของเส้นใย และสีของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ราสร้างขึ้น จะมีลักษณะที่แตกต่างกันออกไปในแต่ละอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าและส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอพบว่าราเอ็นโดไฟต์นี้ไม่สร้างสปอร์ในอาหารทั้ง 5 ชนิด หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน ดังแสดงในรูปที่ 14 แต่จากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 45 วันบนอาหาร PDA ราสร้าง microconidia และ macroconidia (รูป 15) ที่เป็นข้อบ่งชี้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Fusarium sp.* (Fournier and Magni, 2002)



รูปที่ 14 ลักษณะโคโลนีของราเอ็นโดไฟต์ *Fusarium sp.* ที่แยกได้จากใบเสม็ดขาว ซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง 5 ชนิดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14 วัน



รูปที่ 15 (A) Microconidia และ (B) Macroconidia ของราเอ็นโดไฟต์ *Fusarium* sp.

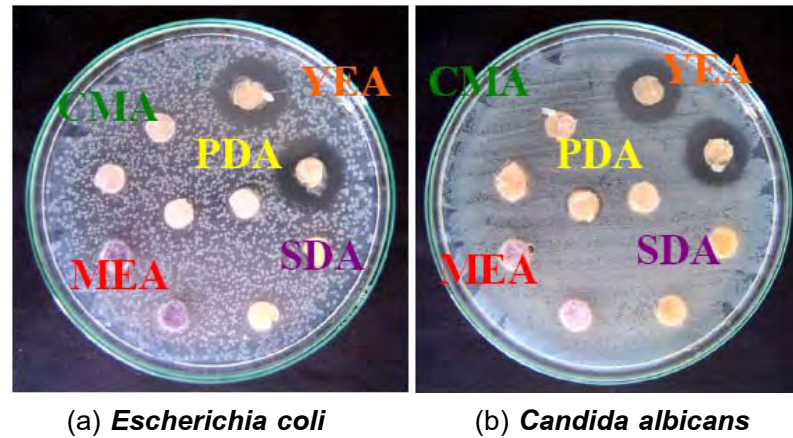
และจากการพิสูจน์ทางอนุชีววิทยา เมื่อเทียบบริเวณ 5.8S RNA และบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ของราเอ็นโดไฟต์ กับข้อมูลใน GenBank พบว่ามีความเหมือนกับ *Fusarium* sp. 93% ดังนั้นราเอ็นโดไฟต์นี้จึงจัดเป็น *Fusarium* sp.

```

5'TTAAGTTCAG CGGGTATTCC TACCTGATCC GAGGTCAACC TTGATAAATT
AGGGGTTTTA CGGCAGGGGA CCGGTCCAAC TAATAGGCGA GATAATATTT
ACTACGTCTA GAGTGTGAAC CGACTCCGCC ACTAATTTTA AGGGGCTACC
GCCATACGGT AGGCCCCCAA CGCTAAGCAA CAGAAGGCTT AAGGGTTGAA
ATGACGCTCG AACAGGCATG CCCACTAGAA TACTAATGGG CGCAATGTGC
GTTCAAAGAT TCGATGATTC ACTGAATTCT GCAATTCACA TTACTTATCG
CATTCGCTG CGTTCCTCAT CGATGCCAGA ACCAAGAGAT CCGTTGTTGA
AAGTTTTAAC TTATTTAGTT GTAATTCAGA TATCCAGTAA TTAAACAGAG
TTTAATGGGG CGCCGGCGGG CTTACCCGTG CCTACCGGGT AGGCACTTAC
AGGTAAGTGC ACTACAGGGT AGGTACGACC CGCCGAGGCA ACGTTAGGTA
TGTTACATG GGGTTTGGGA GTTATAAACT CTTTAATGAT CCCTCCGCTG
GTTACCAAC GGAGACCTTG TTACGACTT 3'

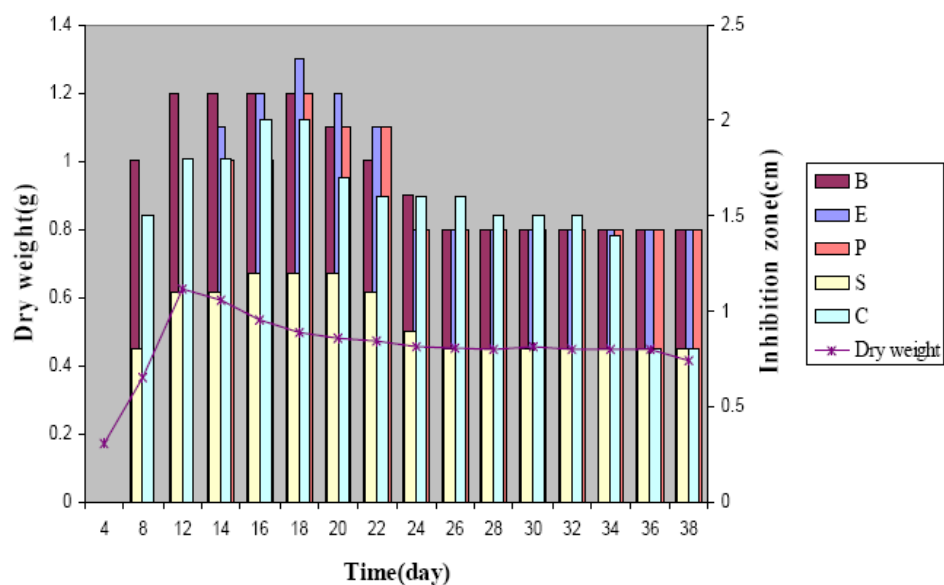
```

การศึกษาการสร้างสารปฏิชีวนะของราเอ็นโดไฟต์ *Fusarium* sp. ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง 5 ชนิด คือ PDA (potato dextrose agar), MEA (malt extract agar), YEA (yeast extract sucrose agar), SDA (sabouraud's dextrose agar) และ CMA (corn meal agar) ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลชีพโดยวิธี Dual Agar diffusion (Jorgensen, 1999) (รูปที่ 16) พบว่าการเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร YEA ดังนั้นอาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมสำหรับการสารปฏิชีวนะของรานี้คือ yeast extract sucrose

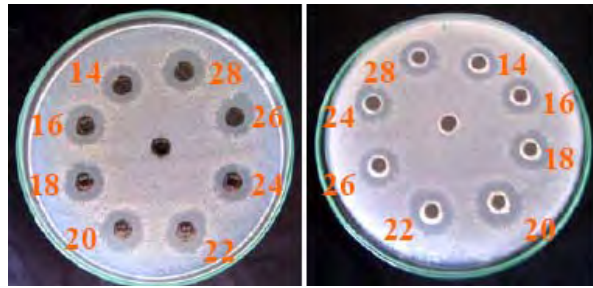


รูปที่ 16 ผลการยับยั้ง *Escherichia coli* และ *Bacillus subtilis* ของ ราเอ็นโดไฟต์ *Fusarium* sp. ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง YEA เป็นเวลา 20 วัน ที่ทดสอบด้วยวิธี Dual culture activity assay

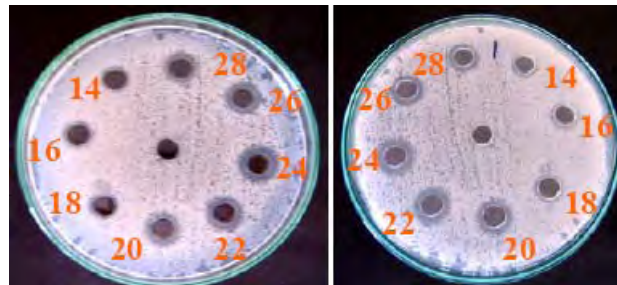
การศึกษาอัตราการเจริญเติบโต (growth curve) และการสร้างสารปฏิชีวนะของราเอ็นโดไฟต์ *Fusarium* sp. ในอาหารเหลว yeast extract broth (YEB) โดยการศึกษาการสร้างสารปฏิชีวนะดำเนินการโดยนำราที่เพาะเลี้ยงไว้ ณ ระยะเวลาต่างๆ มากรองเส้นใยออก บันทึกน้ำหนักเส้นใยแห้ง และนำน้ำเลี้ยงราที่กรองเส้นใยออกมามาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลชีพ โดยวิธี Agar well diffusion (Jorgensen และคณะ, 1999) พบว่าราเริ่มสร้างสารปฏิชีวนะประมาณวันที่แปดของการเพาะเลี้ยง และสร้างสารปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์ได้ดีหลังจากการเพาะเลี้ยงได้ประมาณ 18 วัน (ดู รูปที่ 17 และ 18) และราที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว YES เข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่ (stationary phase) ประมาณวันที่ 14 ของการเพาะเลี้ยง



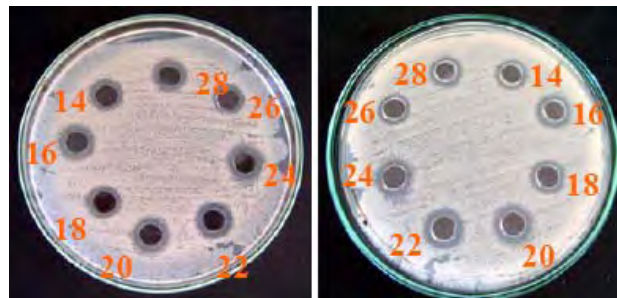
รูปที่ 17 การเจริญเติบโต (growth curve) และการสร้างสารปฏิชีวนะของราเอ็นโดไฟต์ *Fusarium* sp. ในอาหารเหลว yeast extract broth (YEB)



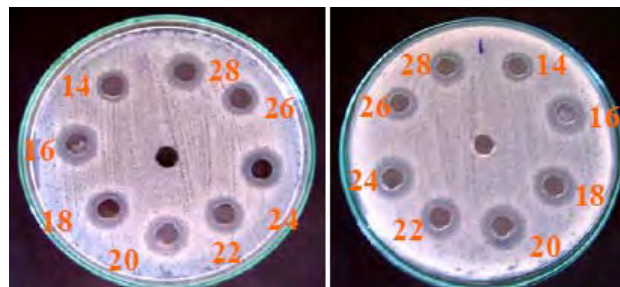
Bacillus subtilis



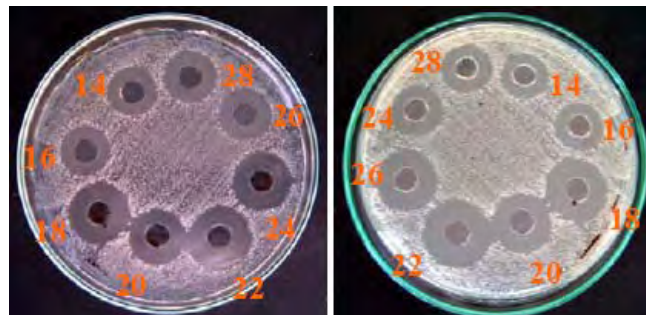
Staphylococcus aureus



Escherichia coli



Pseudomonas aeruginosa



Candida albicans

รูปที่ 18ฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของน้ำเลี้ยงจากการเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟต์ *Fusarium* sp. ในอาหารเหลว yeast extract broth (YEB) ที่ทดสอบโดยวิธี Agar well diffusion

สารเมแทบอลิท์ที่แยกได้จากราเอนโดไฟต์ *Fusarium* sp.

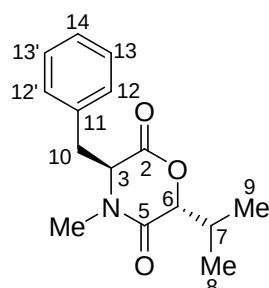
หลังจากเพิ่มขนาดการเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟต์ *Fusarium* sp. ในอาหารเหลว YEB ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 18 วัน น้ำราที่เพาะเลี้ยงมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman no. 1 เพื่อแยกเส้นใยและน้ำเลี้ยง ส่วนน้ำเลี้ยงทำให้เข้มข้นจนได้ปริมาตร 4 ลิตร แล้วนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน, EtOAc และ MeOH ตามลำดับ ส่วนเส้นใยทำให้แห้งในตู้อบอากาศร้อน 45 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาสกัดด้วยตัวทำละลาย เฮกเซน, EtOAc และ MeOH ตามลำดับ จากนั้นสกัดที่ได้หลังจากการระเหยตัวทำละลายออกแล้ว นำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพโดยวิธี paper disk diffusion ได้ผลดังแสดงไว้ในตารางที่ 7 สารสกัดหยาบเอธิลเอซิเตตและเมธานอลจากส่วนเส้นใยและน้ำเลี้ยง และส่วนที่เหลือหลังจากการสกัดน้ำเลี้ยง แสดงฤทธิ์การยับยั้งจุลชีพ

ตารางที่ 7 ฤทธิ์การยับยั้งจุลชีพของสารสกัดหยาบจากเส้นใยและน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟต์ *Fusarium* sp. ที่ความเข้มข้น 100 µg/disc

ส่วนสกัดหยาบ	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (Inhibition Zone) (มิลลิเมตร)				
	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginos</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
เฮกเซนจากเส้นใย	-	-	-	-	-
เอธิลเอซิเตตจากเส้นใย	1.40	1.10	1.40	1.50	1.80
เมธานอลจากเส้นใย	1.00	1.00	0.80	1.00	-
เฮกเซนจากน้ำเลี้ยงรา	-	-	-	-	0.80
เอธิลเอซิเตตจากน้ำเลี้ยง	1.50	1.10	1.40	1.50	2.00
เมธานอลจากน้ำเลี้ยง	1.50	1.00	1.50	1.50	1.40
ส่วนที่เหลือจากน้ำเลี้ยง	1.20	1.10	1.00	1.10	1.20
10% DMSO ในน้ำ	-	-	-	-	-

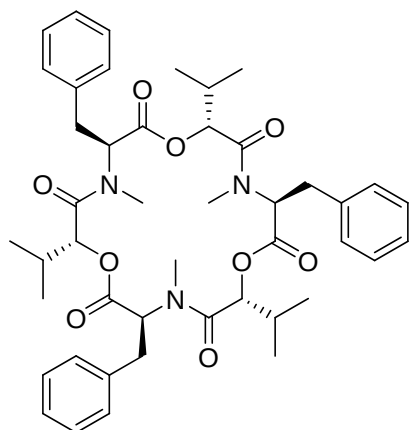
(-) ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพที่ความเข้มข้น 100 µg/disc

ในระหว่างการระเหยสารสกัด EtOAc จากเส้นใยรา Bassiatin เกิดการตกตะกอนออกมาจากตัวทำละลายและทำการแยก Bassiatin ออกโดยการกรอง

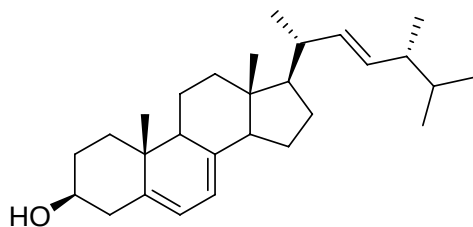


สารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพเหล่านี้นำมาแยกโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟีที่ใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ และการชะด้วยการเพิ่มสภาพขั้วตัวชะจาก เฮกเซน, เฮกเซน-ไดคลอโรมีเทน, ไดคลอโรมีเทน, ไดคลอโรมีเทน-เมธานอล ไปจนถึงเมธานอล

ส่วนแยกที่ได้จากสารสกัดหยาบเอริลแอซิเตตของเส้นใยด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีที่ชะด้วย 40% เฮกเซนใน EtOAc นำมาล้างด้วย 60% เฮกเซนใน EtOAc ได้ Beauvericin เป็นของแข็งสีขาว

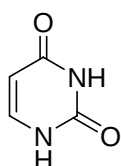


ส่วนแยกที่ได้จากสารสกัดหยาบเอริลแอซิเตตของเส้นใยด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีที่ชะด้วย 85% เฮกเซนใน EtOAc นำมาล้างด้วย 90% เฮกเซนใน EtOAc ได้ Ergosterol เป็นของแข็งสีขาว



ส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อรานำมาสกัดด้วยตัวทำละลาย เฮกเซน เอริลแอซิเตต และเมทานอล ตามลำดับ หลังจากระเหยตัวทำละลายออก แต่ละสารสกัดนำไปแยกด้วยเซาเด็กซ์ แองเอช-20 คอลัมน์โครมาโทกราฟี และแยกส่วนแยกที่มีสารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพนำไปแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีไม่ว่าจะใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจลหรือรีเวิร์สเฟสก็ไม่สามารถแยกสารให้บริสุทธิ์ได้

ยกเว้น ส่วนแยกที่ได้จากสารสกัดหยาบเมทานอลของน้ำเลี้ยงด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีที่ชะด้วย 100% MeOH หลังจากนำมาล้างด้วย 10% H₂O in MeOH ได้ uracil เป็นของแข็งสีขาว



การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพด้วยวิธี Minimum Inhibitory Concentration Method (MIC)

Bassiatin เป็นสารที่มีรายงานว่าแยกได้มาจากน้ำเลี้ยงของ *Beauveria bassiana* และสารนี้มีฤทธิ์ยับยั้งการจับตัวรวมกันของเกล็ดเลือด (platelet aggregation inhibitor) (Kagamizono, T. et al., 1995)

Beauvericin มีรายงานว่าแยกได้จาก *Beauveria bassiana*, และราอื่นๆอีกหลายชนิด ได้แก่ *Fusarium* sp. และสารนี้มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวกและ mycobacteria (Logrieco, A. et al., 1998), เป็นพิษต่อ แมลง (Gupta, S. et al., 1991), ต่อ brine shrimp (*Artemia salina*) (Hamill, R. L. et al., 1969), ต่อ human hematopoietic, epithelial, และ fibroblastoid cells (Logrieco, A. et al.,

1997); และต่อ IARC/LCL 171 human B lymphocytes (Logrieco, A. et al., 1996) นอกจากนี้ยังมี ความสามารถในการชักนำให้เกิด apoptosis และ DNA fragmentation (Ojcius, M. et al., 1991). Beauvericin ยังทำให้เกิด negative inotropic effect (การลด cardiac contraction strength) และ negative chronotropic effect (การลด frequency of cardiac spontaneous beating activity) ในหัวใจ หนูตะเภาที่แยกออกมา (Lemmens-Gruber, R. et al., 2000), ซึ่งผลนี้บ่งชี้ถึงแนวโน้มความเสี่ยงของ ความเป็นพิษต่อหัวใจ

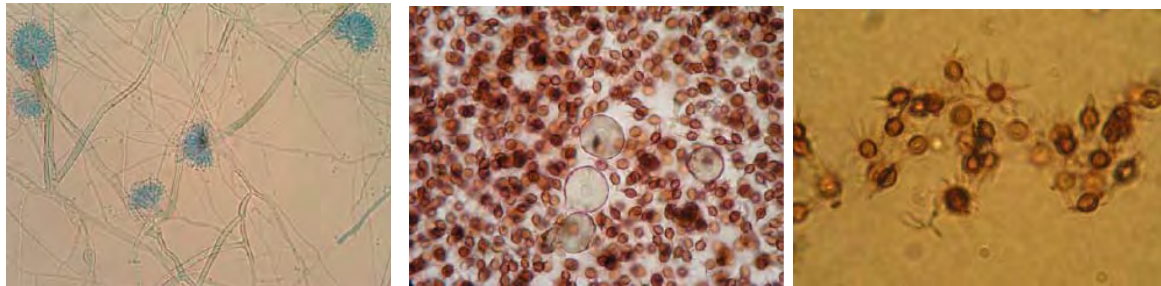
สารประกอบที่ทำการแยกได้ คือ bassiatin, และ beauvericin ได้นำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพด้วยวิธี Minimum Inhibitory Concentration Method (MIC) โดย 2-[4-iodophenyl]-3-[4-dinitrophenyl]-5-phenyltetrazolium chloride (INT) colorimetric assay ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 8 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลชีพด้วย INT colorimetric assay bassiatin มีฤทธิ์ยับยั้ง *E. coli* และ *P. acnes* ที่ค่า MIC 250 และ 500 µg/ml ตามลำดับ ขณะที่ beauvericin มีฤทธิ์ยับยั้ง *E. coli* ที่ค่า MIC 250 µg/ml

ตารางที่ 8 ฤทธิ์การยับยั้งจุลชีพของ bassiatin และ beauvericin

Test microorganism	MIC (µg/ml)	
	bassiatin	beauvericin
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-
<i>Escherichia coli</i>	250	250
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	-
<i>Propionibacterium acnes</i>	500	-
- inactive		

4. สารเมแทบอลิท์ที่สร้างโดย *Emericella varicolor* ที่แยกได้จากใบเปล้าใหญ่ *Croton oblongifolius*

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเอนโดไฟต์ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 45 วันบนอาหาร PDA (รูป 19) และจากการพิสูจน์ทางอณูชีววิทยา เมื่อเทียบบริเวณ 5.8S RNA และบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ของราเอนโดไฟต์ กับข้อมูลใน GenBank ที่มีความเหมือนกับ *Emericella varicolor* 96.064% (99.261% ungapped) บ่งชี้ว่ารานี้คือ *Emericella varicolor*



Slide culture of *Emericella varicolor* (a) conidia and conidiophores (40x) (b) ascus and ascospores (40x) (c) spike of sexual spores (100x)



Scanning Electron Microscope of *Emericella varicolor* (a) conidia and coniospore (Bar = 10 μm) (b) ascus (Bar = 1 μm) (c) spike of sexual spore (Bar = 1 μm)

AAAAGGTTTCG	TAGTGACCTG	CGGAGGATCA	TTACCGAGTG
AGGGCTGCCT	CCGGGCGCCC	AACCTCCAC	CCGTGAATAC
CTAACACTGT	TGCTTCGGCG	GGGAGCCCTC	TCGGGGGCGA
GCCGCCGGAG	ACCACTGAAC	TTCATGCCTG	TAGTGATGAG
TCTGAGCCTA	AATGAAAATT	TAGTCAAAAC	TTTCAACAAT
GGATCTCTTG	GTTCCGGCAT	CGATGAAGAA	CGCAGCGAAC
TGCGATAAGT	AATGTGAATT	GCAGAATTCA	GTGAATCATC
GAGTCTTTGA	ACGCACATTG	CGCCCCCTGG	CATTCCGGGG
GGCATGCCTG	TCCGAGCGTC	ATTGCTGCCC	TTCAAGCCCG
GCTTGTGTGT	TGGGTCGTCG	TCCCCCCC	GGGACGGGCC
CGAAAGGCAG	CGGCGGCACC	GTGTCCGGTC	CTCGAGCGTA
TGGGGCTTTG	TCACCCGCTC	GATTAGGGCC	GGNCGGGNGC
CANCCGGCNT	CTCCAACCTT	ATTTTCTCTCA	GTTGACCTCT
GATCANGTAG	GATACCCNCT	NAANTTANAT	ATCAANANAN
AANTNTNN			

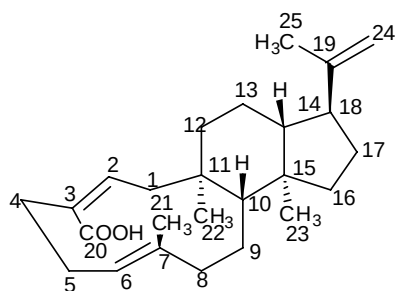
Nucleotide sequences of partial 18S region, complete ITS1-5.8S-ITS2 region

รูปที่ 19 สัณฐานวิทยาของราเอนโดไฟต์ *Emericella varicolor*

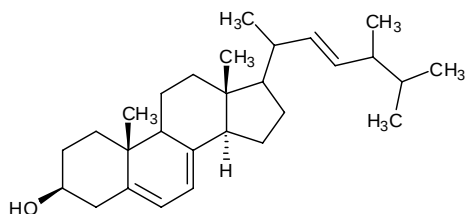
4.4.2 สารเมแทบอไลต์ของราเอ็นโดไฟต์ *Emericella varicolor* จากการเพาะเลี้ยงในอาหาร MEB

ราเอ็นโดไฟต์ *Emericella varicolor* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง malt extract agar (MEA) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน นำมาเจาะด้วย sterile cork borer No.4 ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 7.5 มิลลิเมตร เพื่อการนำเอาชิ้นรุ้นที่มีเส้นใยของราเอ็นโดไฟต์มาเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุด้วยอาหารเลี้ยงเหลว MEB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (malt extract 2.5%, glucose 0.2%, and bacterial peptone 0.1%) จำนวน 5 ขันต่อขวด โดยเลี้ยงทั้งหมดปริมาตร 35 ลิตร ป่มเชื้อไว้แบบตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 วัน นำราเอ็นโดไฟต์ที่เพาะเลี้ยงไว้มาทำการกรองแยกด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ซึ่งจะได้ส่วนของเส้นใยและส่วนของน้ำเลี้ยงรา

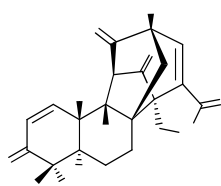
เส้นใยรา (เปียก) (1.13 กิโลกรัม) นำมาสกัดด้วย MeOH (2 L x 5) หลังจากระเหยตัวทำละลายออกไป ของแข็งสีน้ำตาลเข้มที่ได้นำไปสกัดด้วย EtOAc (2 L x 5) สารสกัด EtOAc ที่ได้นำไประเหยตัวทำละลายออกได้เป็นสารหนืดสีน้ำตาล (5.96 g) จากนั้นนำไปแยกด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยชะด้วยตัวทำละลายเป็นขั้นๆจาก hexane–ethyl acetate ไปจนถึง ethyl acetate–methanol ส่วนแยกที่เหมือนกันจากการวิเคราะห์ด้วย TLC นำมารวมเข้าด้วยกัน ในระหว่างการระเหยตัวทำละลายออกจากส่วนแยกจากรวมกันที่ได้จากการชะด้วย hexane–ethyl acetate (85:15) เกิดการตกตะกอนขึ้น หลังจากกรองตะกอนออกทำให้ได้ stellatic acid (11 mg) เป็นของแข็งสีขาว



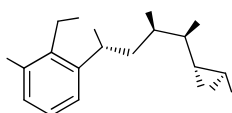
ในระหว่างการระเหยตัวทำละลายออกจากส่วนแยกจากรวมกันที่ได้จากการชะด้วย hexane–ethyl acetate (80:20) เกิดการตกตะกอนขึ้น หลังจากกรองตะกอนออกทำให้ได้ ergosterol (10 mg)



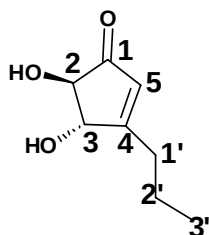
ส่วนแยกจากรวมกันที่ได้จากการชะด้วย hexane–ethyl acetate (30:70) นำมาตกผลึกออกจากคลอโรฟอร์ม (CHCl₃) ได้สารใหม่ คือ emervaridione เป็นผลึกใสไม่มีสี (13 mg)



ส่วนน้ำเลี้ยงรานำไปทำให้แห้งแบบเยือกแข็งได้เป็นของแข็งสีน้ำตาลเข้ม (33.0 g) จากนั้นนำไปสกัดด้วย EtOAc (500 ml x 5) ในอ่างอัลตราโซนิก หลังจากระเหยตัวทำละลายได้กากสีน้ำตาลเข้ม (760 mg) นำกากที่เหลืออยู่นี้ไปแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (silica gel, 20 g) และชะด้วยตัวทำละลายเป็นขั้นๆ จาก hexane–ethyl acetate ไปจนถึง ethyl acetate–methanol ส่วนแยกที่เหมือนกันจากการวิเคราะห์ด้วย TLC นำมารวมเข้าด้วยกัน ส่วนแยกจากการรวมกันซึ่งได้จากการชะด้วย hexane–ethyl acetate (45:55) นำมาทำการตกผลึกออกจากคลอโรฟอร์มทำให้ได้สารใหม่ (Varioxiranediol) เป็นผลึกใสไม่มีสี (10 mg)



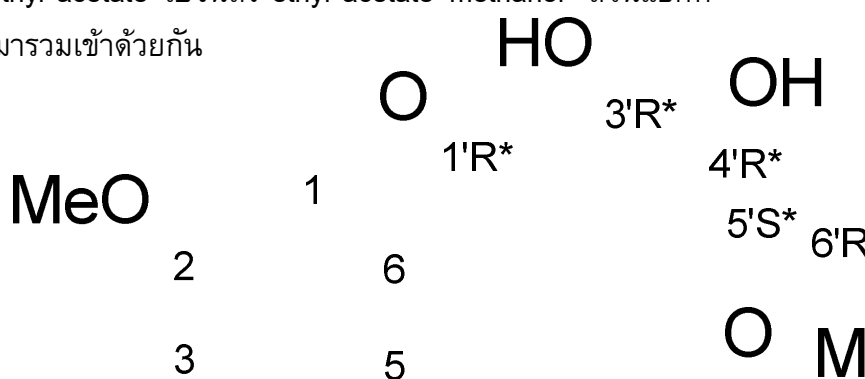
ส่วนแยกจากการรวมกันซึ่งได้จากการชะด้วย hexane–ethyl acetate (25:75) นำมาแยกให้ได้สารบริสุทธิ์โดย PTLC (silica gel) ซึ่งใช้ hexane–ethyl acetate (25:75) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ทำให้ได้ dihydroterrein (4 mg) เป็นน้ำมันสีน้ำตาลอ่อน.



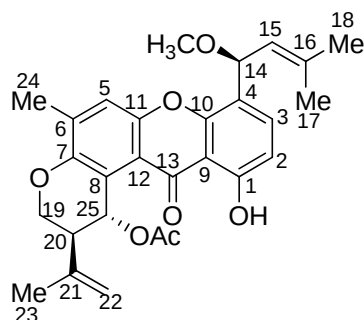
4.4.2 สารเมแทบอลิท์ของราเอ็นโดไฟต์ *Emericella varicolor* จากการเพาะเลี้ยงในอาหาร MEB ปริมาณสารสกัดมอลต์ต่ำ

ราเอ็นโดไฟต์ *Emericella varicolor* นี้ได้นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว MEB (7.5 L) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 สัปดาห์ หลังจากการแยกเส้นใยและน้ำเลี้ยงออกจากกันด้วยการกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman no.1 เส้นใยและน้ำเลี้ยงนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายแล้วแยกสารเมแทบอลิท์ที่สร้างขึ้นด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

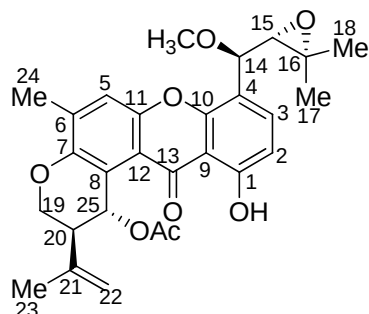
เส้นใยรา (เปียก) นำมาสกัดด้วย MeOH (500 mL x 10) หลังจากระเหยตัวทำละลายออกไปของแข็งสีแดงเข้มที่ได้ นำไปสกัดด้วย EtOAc (500 mL x 10) สารสกัด EtOAc ที่ได้นำไประเหยตัวทำละลายออกได้เป็นสารหนืดสีแดงเข้ม จากนั้นนำไปแยกด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยชะด้วยตัวทำละลายเป็นขั้นๆ จาก hexane–ethyl acetate ไปจนถึง ethyl acetate–methanol ส่วนแยกที่เหมือนกันจากการวิเคราะห์ด้วย TLC นำมารวมเข้าด้วยกัน



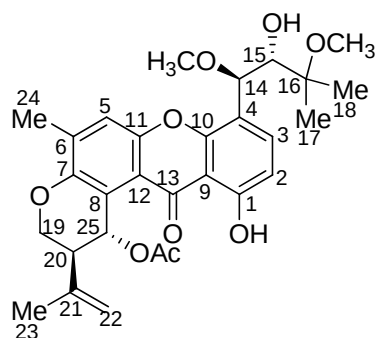
ในระหว่างการระเหยตัวทำละลายออกจากส่วนแยกจากรวมกันที่ได้จากการชะด้วย hexane-ethyl acetate (90:10) นำมาแยกด้วย preparative thin layer chromatography (prep. TLC) และทำการตกผลึกออกจากคลอโรฟอร์มได้เป็น Shamixanthone ที่เป็นผลึกสีเหลือง



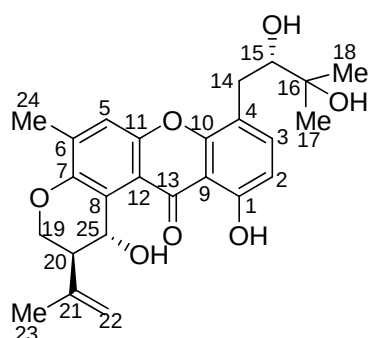
ส่วนแยกจากรวมกันที่ได้จากการชะด้วย hexane-ethyl acetate (80:20) นำมาทำการตกผลึกออกจาก $\text{CHCl}_3\text{-Et}_2\text{O-Hexane}$ ทำให้ได้ 14-Methoxytajixanthone-25-acetate ที่เป็นผลึกสีเหลือง



ส่วนแยกจากรวมกันที่ได้จากการชะด้วย Hexane-EtOAc (75:25) นำมาทำการตกผลึกออกจาก $\text{CHCl}_3\text{-Et}_2\text{O-Hexane}$ ได้เป็น Tajixanthone methanoate ที่เป็นผลึกสีเหลือง

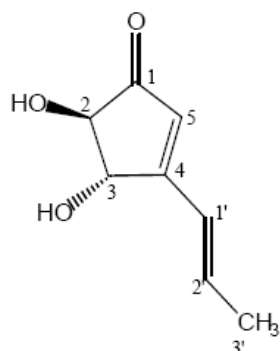


ส่วนแยกจากรวมกันที่ได้จากการชะด้วย Hexane-EtOAc (60:40) นำมาทำการตกผลึกออกจาก $\text{CHCl}_3\text{-Et}_2\text{O-Hexane}$ ได้เป็น Tajixanthone hydrate ที่เป็นผลึกสีเหลือง



สารสกัดหยาบเอธิลแอซิเตตของน้ำเลี้ยงนำไปแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีที่ใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับและเพิ่มสภาพขั้วของตัวชะจาก เฮกเซน EtOAc ไปจนถึง MeOH ส่วนแยกจากรวมกันที่ได้จากการชะด้วย Hexane-EtOAc (20:80)

ส่วนแยกจากรวมกันที่ได้จากการชะด้วย Hexane-EtOAc (20:80) ทำการตกผลึกออกจาก CHCl_3 -Hexane จากนั้นกรองและล้างผลึกด้วยเฮกเซนได้เป็นของแข็งสีขาว ต่อมานำไปตกผลึกซ้ำด้วย CHCl_3 -Hexane ได้ Terrein เป็นผลึกใสไม่มีสี



การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพด้วยวิธี Minimum Inhibitory Concentration Method (MIC) ของสารประกอบที่ทำการแยกได้จาก ราเอ็นโดไฟต์ *Emericella varicolor* นี้ คือ Terrein, Tajixanthone hydrate, Tajixanthone methanoate, 14-Methoxytajixanthone-25-acetate, Shamixanthone, dihydroterrein, ergosterol, stellatic acid และสารใหม่ 2 สาร คือ Varioxiranediol และ emervaridione ทั้งหมดไม่มีฤทธิ์ ยับยั้งจุลชีพที่ความเข้มข้น 250 $\mu\text{g/ml}$

ข้อสังเกตของการสร้างสารต้านจุลชีพของราเอ็นโดไฟต์

จากการศึกษาสารต้านจุลชีพของราเอ็นโดไฟต์สี่สายพันธุ์คือ *Mycocleptodiscus* sp., *Alternaria* sp., *Fusarium* sp. และ *Emericella varicolor* ผู้วิจัยแยกสารต้านจุลชีพได้แต่ฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารเหล่านั้นไม่ได้สูงเช่นเดียวกับที่น้ำเลี้ยงและ/หรือสารสกัดหยาบของราได้แสดงฤทธิ์ออกมา ไม่ว่าจะใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟีที่ตัวดูดซับเป็นชนิดซิลิกา หรือ Sephadex LH20 หรือ reverse phase ก็จะไม่สามารถแยกได้สารออกฤทธิ์ต้านจุลชีพเดี่ยวๆที่มีประสิทธิภาพสูงออกมาได้ อย่างไรก็ตามผู้วิจัยได้พบข้อสังเกตอย่างหนึ่งว่าราใดที่น้ำเลี้ยงและ/หรือสารสกัดหยาบของราแสดงฤทธิ์การต้านจุลชีพที่ดี ราชั้นจะผลิตสารเมแทบอลิท์ที่เป็น nucleotide base เช่น uracil และ thymine รวมอยู่ด้วย และพบว่า ราชอบที่จะผลิต uracil มากกว่า thymine และ uracil ที่ผลิตขึ้นจะมีอยู่ในปริมาณมาก ซึ่งความสัมพันธ์ของการผลิต nucleotide base และ สารต้านจุลชีพของรา ผู้วิจัยได้สืบค้นข้อมูลแต่ยังไม่มีรายงานไว้ ทำให้ความสัมพันธ์นี้ยังคงเป็นปริศนาที่ต้องมีการค้นคว้าต่อไป

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาสารต้านจุลชีพของราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์คือ *Mycoleptodiscus* sp. ที่แยกได้จากใบกวาวเครือขาว *Pueraria mirifica*, *Alternaria* sp. ที่แยกได้จากใบพลูควาว *Houttuynia cordata* Thunb., *Fusarium* sp. ที่แยกได้จากใบเสม็ดขาว *Melaluca cajuputi* และ *Emericella varicolor* ที่แยกได้จากใบเปล้าใหญ่ *Croton oblongifolius* ได้ผลดังนี้

การเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร yeast extract sucrose ราเอ็นโดไฟต์ *Mycoleptodiscus* sp., *Alternaria* sp., และ *Fusarium* sp. ผลิตสารต้านจุลชีพได้ดีที่สุด ส่วนการเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร malt extract ราเอ็นโดไฟต์ *Emericella varicolor* เจริญได้ดีและผลิตสารต้านจุลชีพได้

การแยกสารต้านจุลชีพที่ผลิตโดยราเอ็นโดไฟต์ *Mycoleptodiscus* sp. โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้สาร 4 ชนิด คือ uracil, cyclo(L-leucinyl-L-prolinyl), cyclo(L-alaninyl-L-tryptophanyl) และ cyclo(L-tryptophanyl-L-serinyl) การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลชีพด้วย broth dilution MIC assays และ 2-[4-iodophenyl]-3-[4-dinitrophenyl]-5-phenyltetrazolium chloride (INT) colorimetric assay ที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 250 µg/mL พบว่า สารเมแทบอไลต์ที่แยกได้ cyclo(L-Ala-L-Trp) ที่ความเข้มข้น 125 µg/mL แสดงฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli* และ *P. aeruginosa* และแบบหยุดการเจริญเติบโตสำหรับ *C. albicans* ส่วน cyclo(L-Leu-L-Pro) แสดงฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* และ *P. aeruginosa* ที่ความเข้มข้น 50 µg/mL และ แสดงฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย และแบบหยุดการเจริญเติบโตสำหรับ *C. albicans* ที่ความเข้มข้น 50 µg/mL และ 25 µg/mL ตามลำดับ ขณะที่สารสังเคราะห์แสดงฤทธิ์การยับยั้ง *C. albicans* เท่านั้นและเป็นการยับยั้งเป็นแบบหยุดการเจริญเติบโต (bacteriostatic activity) จากผลการทดสอบนี้บ่งชี้ว่าฤทธิ์การยับยั้งจุลชีพของสารประกอบไซคลิกไดเปปไทด์ที่แยกได้มีสิ่งเจือปนที่อาจเสริมฤทธิ์การยับยั้งจุลชีพของสารประกอบไซคลิกไดเปปไทด์เดี่ยวๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารเจือปนของ cyclo(L-Ser-L-Trp)

การแยกสารต้านจุลชีพที่ผลิตโดยราเอ็นโดไฟต์ *Alternaria* sp. โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้สาร 5 ชนิด คือ uracil, thymine, cyclo(L-leucinyl-L-prolinyl), allantoin และ ergosterol peroxide การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลชีพด้วย broth dilution MIC assays allantoin มีฤทธิ์ยับยั้ง *B. subtilis* ATCC 6633 และ *C. albicans* ATCC 10231 ที่ค่า MIC 1.96 µg/ml (12.40 µM) และ 15.63 µg/ml (98.92 µM) ตามลำดับ Cyclo(L-Leu-L-Pro) มีฤทธิ์ยับยั้ง *B. subtilis* ATCC 6633, *E. coli* ATCC 25922 และ *C. albicans* ATCC 10231 ได้ที่ค่า MIC 1.96 µg/ml (9.28 µM), 62.5 µg/ml (296.0 µM) และ 31.25 µg/ml (31.25 µM) ตามลำดับ และ ergosterol peroxide มีฤทธิ์ยับยั้ง *B. subtilis* ATCC 6633, *E. coli* ATCC 25922 และ *C. albicans* ATCC 10231 ได้ที่ค่า MIC 7.82 µg/ml (23.84 µM), 31.25 µg/ml (95.27 µM), และ

62.5 µg/ml (190.55 µM) ตามลำดับ ขณะที่ Thymine และ Uracil ไม่มีความสามารถในการยับยั้งจุลชีพ

การแยกสารต้านจุลชีพที่ผลิตโดยราเอ็นโดไฟต์ *Fusarium* sp. โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้สาร 4 ชนิด คือ uracil, bassiatin, beauvericin และ ergosterol การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลชีพด้วย INT colorimetric assay bassiatin มีฤทธิ์ยับยั้ง *E. coli* และ *P. acnes* ที่ค่า MIC 250 และ 500 µg/ml ตามลำดับ ขณะที่ beauvericin มีฤทธิ์ยับยั้ง *E. coli* ที่ค่า MIC 250 µg/ml

การแยกสารเมแทบอไลต์ของราเอ็นโดไฟต์ *Emericella variecolor* ที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพจากการเพาะเลี้ยงในอาหาร MEB โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีพบว่าไม่ได้สารต้านจุลชีพ แต่ได้สารใหม่ สองชนิด ซึ่งได้ตั้งชื่อว่า emervaridione และ varioxiranediol และได้สารที่มีรายงานแล้วก่อนหน้านี้สามชนิด คือ stellatic acid, ergosterol และ dihydroterrein ส่วนการเพาะเลี้ยงในอาหาร MEB ที่มีปริมาณมอลต์ต่ำ สามารถแยกได้ shamixanthone, 14-methoxytajixanthone-25-acetate, tajixanthone methanoate, tajixanthone hydrate, และ terrein ซึ่งสารทั้งหมดที่แยกได้จาก ราเอ็นโดไฟต์ *Emericella variecolor* ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพ โดยการทดสอบด้วย broth dilution MIC assays ที่ความเข้มข้น 250 µg/ml

จากการศึกษาสารต้านจุลชีพของราเอ็นโดไฟต์สี่สายพันธุ์ น้ำเลี้ยงและ/หรือสารสกัดหยาบน้ำเลี้ยงและเส้นใยราแสดงฤทธิ์ต้านจุลชีพที่ดีกว่าสารต้านจุลชีพเดี่ยวๆที่แยกได้ ไม่ว่าจะเป็นใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟีที่ตัวดูดซับเป็นชนิดซิลิกา หรือ Sephadex LH20 หรือ reverse phase ก็ไม่สามารถแยกได้สารออกฤทธิ์ต้านจุลชีพเดี่ยวๆที่มีประสิทธิภาพสูงออกมาได้ อย่างไรก็ตามก็ผู้วิจัยได้พบข้อสังเกตอย่างหนึ่งว่าราใดที่น้ำเลี้ยงและ/หรือสารสกัดหยาบของราแสดงฤทธิ์การต้านจุลชีพที่ดี รานั้นจะผลิตสารเมแทบอไลต์ที่เป็น nucleotide base เช่น uracil และ thymine ร่วมอยู่ด้วย และพบว่า ราชอบที่จะผลิต uracil มากกว่า thymine และ uracil ที่ผลิตขึ้นจะมีอยู่ในปริมาณมาก ซึ่งความสัมพันธ์ของการผลิต nucleotide base และ สารต้านจุลชีพของรา

เอกสารอ้างอิง

- Acar, J. F. and Goldenstein, F. W. 1992. Disc susceptibility test. In Lorain, V. (ed.). *Antibiotics in Laboratory Medicine*. (3 rd ed.). Maryland: Baltimore, pp. 17-52.
- Arai, T., Mikami, Y., Fukushima, K., Utsumi, T., Yazawa, K. 1973. A new antibiotic, leucinostatin, derived from *Penicillium lilacium*. *J. Antibiot.* **26**, 157-161.
- Bok, J. W., Lerner, L., Chinton, J., Hans, G. K., Tower, G. H. 1999. Antitumor sterols from the mycelia of *Codyceps sinensis*. *Phytochemistry*. **51**, 591-598.
- Cantrell, T., Rajab, M. S., Franzblau, S. G., Fronczek, F. R., Fischer, N. H. 1999. Antimycobacterial ergosterol-5,8-endoperoxide from *Ajuga remota*. *Planta Med.* **65**, 732-734.
- Cronan, J. M., Davidson, T. R., Singleton, F. L., Colwell, R. R., Cardellina, J. H.. 1998. Plant growth promoters isolated from a marine bacterium associated with *Palythoa* sp. *Nat. Prod. Lett.* **11**, 271-278.
- Fournier, J., Magni, J. F. 2002. Pyrenomycetes from southwestern France [Online]. Available from: <http://www.pyrenomycetes.free.fr/index.htm> [2009, March 14]
- Gupta, S., Krasnoff, S. B., Underwood, N. L., Renwick, J. A. A., Roberts, D. W. 1991. Isolation of beauvericin as an insect toxin from *Fusarium semitectum* and *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. *Mycopathologia* **115**, 185-189.
- Hamill, R. L., Higgins, C. E., Boaz, H. E., Gorman, M. 1969. The structure of beauvericin, a new depsipeptide antibiotic toxic to *Artemia salina*. *Tetrahedron Lett.* **49**, 4255-4258.
- Jorgensen, J. H., Turnidge, J. D., Washington, J. A. 1999. Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. In: Murray, P. R., Tenover, F. C., Baron, E. J., Tenover, F. C., Tenover, F. C., Tenover, F. C. (ed) *Manual of clinical microbiology*, 7th ed. ASM Press, Washington DC, pp 1526-1542.
- Joseph, P. J., Dave, R. I., Shah, N. P. 1998. Antagonism between yoghurt bacteria and probiotic bacteria isolated from commercial starter cultures, commercial yoghurt and probiotic capsule. *Food Australia*. **50**(1): 20-23.
- Kagamizono, T., Nishino, E., Matsumoto, K., Kawashima, A., Kishimoto, M., Sakai, N., He, B., Chen, Z., Adachi, T., Morimoto, S., Hanada, K. 1995. Bassiatin, a New Platelet Aggregation Inhibitor Produced by *Beauveria bassiana* K-717. *J. Antibiot.* **48**(12), 1407-1412.
- Kahlos, K., Kangas, L., Hiltunen, R. 1989. Ergostrol peroxide, an active compound from *Inonotus radiatus*. *Planta Med.* **55**, 389-390.

- Kolig, G. M., Wright, A. D., Aust, H. J., Draeger, S., Schulz, B., 1999. Geniculol, a new biologically active diterpene from the endophytic fungus *Geniculosporium* sp. *J. Nat. Prod.* **62**, 155-157.
- Lemmens-Gruber, R., Rachoy, B., Steininger, E., Kouri, K., Saleh, P., Krska, R., Josephs, R., Lemmens, M. 2000. The effect of the *Fusarium* metabolite beauvericin on electromechanical and physiological properties in isolated smooth and heart muscle preparations of guinea pigs. *Mycopathologia* **149**, 5–12.
- Li, X., Yao, Y., Sun, G., Lin, W., Sattler, I. 2007. Chemical constituents from marine-derived fungus of *Penicillium* sp. *Nat. Prod. Res. Dev.* **19**, 804-806.
- Li, Y., Li, X., Kim, S. K., Kang, J. B., Choi, H. D., Rho, J. R., Son, B. W. 2004. Golmaenone, a New Diketopiperazine Alkaloid from the Marine-Derived Fungus *Aspergillus* sp. *Chem. Pharm. Bull.* **52**(3), 375-376.
- Lin, Y., Wu, X., Deng, Z., Wang, J., Zhou, S., Vrijmoed, L. L., Jones, E.B... 2002. The metabolites of the mangrove fungus *Verruculina enalia* No. 2606 from a salt lake in the Bahamas. *Phytochemistry*. **59**, 469-471.
- Logrieco, A., Moretti, A., Fornelli, F., Fogliano, V., Ritieni, A., Caiaffa, M. F., Randazzo, G., Bottalico, A., Macchia, L. 1996. Fusaproliferin production by *Fusarium subglutinans* and its toxicity to *Artemia salina*, SF-9 insect cells, and IARC/LCL 171 human B lymphocytes. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 3378–3384.
- Logrieco, A., Ritieni, A., Moretti, A., Randazzo, G., Bottalico, A. 1997. Beauvericin and fusaproliferin: new emerging fusarium toxins. *Cereal Res. Commun.* **25**, 407–413.
- Logrieco, A., Moretti, A., Castella, G., Kostecki, M., Golinski, A., Ritieni, A., Chelkowski, J. 1998. Beauvericin production by *Fusarium* species. *Appl Environ Microbiol* **64**(8), 3084–3088
- Michele, S. F., Carolina, V. T., Annalisa, D. G., Angelo, V. C., Antonio, L. G., Francesco, P. F. 2004. Radicinols and Radicinins Phytotoxins Produced by *Alternaria radicina* on Carrots. *J. Agric. Food. Chem.* **52**, 3655-3660.
- Nakashima, R., Slater, G.P. 1969. Configuration of echinulin II. Optical rotatory dispersion of echinulin, hydroechinulin, and the stereoisomeric 3-methyl-6(indolyl-3-methyl)-piperazine-2,5-diones. *Canadian Journal of Chemistry*, **47**, 2069-2074
- Nam, K. S., Jo, Y. S., Kim, Y. H., Hyun, J. W., Kim, H. W. 2001. Cytotoxic activities of acetoxyscirpenediol and ergosterol peroxide from *Paecilomyces tenuipes*. *Life Science*. **69**, 229 – 237.

- Nitecki, D. E., Halpern, B. and Westley, J. W. 1968. A simple Route to Sterically Pure Diketopiperazines. *J. Org. Chem.* **33**, 864-866.
- Ovchinnikov, Y. A., Ivanov, V. T., Mikhaleva, I. I., 1971. The synthesis and some properties of beauvericin. *Tetrahedron Lett.*, **12**(2), 159-162.
- Ojcious, M., Zychlinsky, A., Zheng, L. M., Young, J. D.-E. 1991. Ionophore-induced apoptosis: role of DNA fragmentation and calcium fluxes. *Exp. Cell Res.* **197**, 43-49.
- Prasad, C. 1995. Bioactive cyclic dipeptides. *Peptides*. 16, 151-164.
- Rhee, K.-H. 2002. Isolation and characterization of *Streptomyces* sp. KH-614 producing anti-VRE (vancomycin-resistant enterococci) antibiotics. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 48, 321-327.
- Rhee, K.-H. 2003. Purification and identification of an antifungal agent from *Streptomyces* sp. KH-614 antagonistic to rice blast fungus, *Pyricularia oryzae*. *J. microbiol. biotechnol.* 13, 984-988.
- Rhee, K.-H. 2004. Cyclic dipeptides exhibit synergistic, broad spectrum antimicrobial effects and have anti-mutagenic properties. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 24, 423-7.
- Strobel, G., Daisy, B., 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 491-502.
- Suemitsu, R., Ohnishi, K., Morikawa, Y., Nagatomo, S. 1995. Zinnimidine and 5-(3'3'-Dimethylallyloxy)-7-methoxy-6-methylphthalide from *Alternaria porri*. *Phytochemistry*. **38**(2), 495-497.
- Takei, T., Yoshida, M., Ohnishi-kameyama, M., Kobori, M. 2005. Ergosterol peroxide, an apoptosis-inducing component isolated from *Sarcodon asparatus* (Berk.) S.ito. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**, 212-215.
- Thomas, O. L., Nigel, B. P., Birgitte, A. 2003. Infectopyrone, a potential mycotoxin from *Alternaria infectoria*. *Tetrahedron Lett.* **44**, 4511-4513.
- Tullberg, M., Grøtli, M., Luthman, K. 2006 Efficient synthesis of 2,5-diketopiperazines using microwave assisted heating *Tetrahedron* **62**, 7484-7491.
- Weaver, R. W., Angle, J. S., Botlomey, P. S. 1994. Methods of Soil Analysis, Part 2. *Microbiology and Biochemical Properties*. Madison: Soil Science Society of America.
- Yan, P.-S., Song, Y., Sakuno, E., Nakajima, H., Nakagawa, H., Yabe, K. 2004. Cyclo(L-Leucyl-L-Prolyl) Produced by *Achromobacter xylosoxidans* Inhibits Aflatoxin Production by *Aspergillus parasiticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**(12), 7466-7473.
- Zhang, H. L., Tian, L., Fu, H., Pei, Y. H., Hua, H. M. 2005. Studies on constituents from the fermentation of *Alternaria* sp. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. **30**(5), 353-353.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

- 1.1 Liangsakul, J., Srisurichan, S., Muangsin, N., Chaichit, N., Pornpakakul, S. 8-[(3,3-Dimethyloxiran-2-yl)methoxymethyl]-11-hydroxy-2-isopropenyl-5-methyl-12-oxo-1,2,3,12-tetrahydropyrano[3,2-a]xanthen-1-yl acetate. *Acta Crystallographica*, 2009, **E65**, 2558-2559.
- 1.2 Liangsakul, J., Pornpakakul, S., Sangvichien, E., Muangsin, N., Sihanonth, P. Emervaridione and varioxiranediol, two new metabolites from an endophytic fungus *Emericella varicolor* *Tetrahedron Letters*, 2011, xx, xx-xx.