

การแยก *Aureobasidium pullulans* ที่สร้างสารต้านเชื้อรา

นางสาวพัชรวรรณ ดীনาน

สถาบันวิทยบริการ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2549

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ISOLATION OF *Aureobasidium pullulans* AS PRODUCERS OF ANTIFUNGAL AGENTS**



**Miss Pacharawan Deenarn**

**สถาบันวิทยบริการ**  
**จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**  
**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements**  
**for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology**

**Faculty of Science**

**Chulalongkorn University**

**Academic Year 2006**

**Copyright of Chulalongkorn University**


หัวข้อวิทยานิพนธ์      การแยก *Aureobasidium pullulans* ที่สร้างสารต้านเชื้อรา  
โดย                              นางสาวพัชรวรรณ ตีนาน  
สาขาวิชา                      เทคโนโลยีชีวภาพ  
อาจารย์ที่ปรึกษา              รองศาสตราจารย์ ดร. ھرรษา ปุณณะพยัคฆ์  
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม       ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พงศ์ธาริน โฉ่ห้ตระกูล

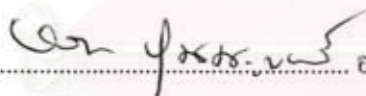
---

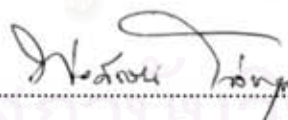
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง  
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

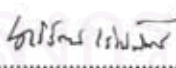
  
..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์  
(ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมณะเสวก)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

  
..... ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. ปรีดา บุญ-หลง)

  
..... อาจารย์ที่ปรึกษา  
(รองศาสตราจารย์ ดร. ھرรษา ปุณณะพยัคฆ์)

  
..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พงศ์ธาริน โฉ่ห้ตระกูล)

  
..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งทิพัฒน์)

พัชรวรรณ คีนาน: การแยก *Aureobasidium pullulans* ที่สร้างสารต้านเชื้อรา (ISOLATION OF *Aureobasidium pullulans* AS PRODUCERS OF ANTIFUNGAL AGENTS) อาจารย์ที่ปรึกษา: รศ. ดร.हरषा ปุณณะพยัคฆ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม: ผศ. ดร. พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล; 87 หน้า.

การคัดแยก *Aureobasidium pullulans* จากห้องน้ำในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล โดยใช้อาหารสูตร com meal agar (CMA) และ malt extract agar (MEA) สูตร half strength และทำการจัดจำแนกเชื้อที่ได้โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน การผลิต และลักษณะสมบัติของ exopolysaccharide (EPS) ด้วยเทคนิค Infrared spectroscopy พบว่าสามารถคัดแยกเชื้อรา *A. pullulans* ได้จำนวน 10 ไอโซเลต ได้แก่ KT1 BM1 TB1 PHI JP1 VM1 HKW1 HKW2 HKW3 และ HKW4 จากห้องน้ำในเขตกรุงเทพมหานคร นำเชื้อรา *A. pullulans* ทั้ง 10 ไอโซเลตมาผลิตสารต้านเชื้อราและทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อรากลุ่ม *Aspergillus* spp. โดย paper disc method และ conidial germination inhibition assay พบว่าเชื้อรา *A. pullulans* 4 ไอโซเลต ได้แก่ KT1 BM1 KHW1 และ KHW2 สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus* spp. ได้แตกต่างกัน โดยสารสกัดจากทั้ง 4 ไอโซเลตดังกล่าว สามารถยับยั้งเชื้อรา *A. terreus* ได้ นอกจากนี้พบว่า *A. pullulans* ไอโซเลต KT1 มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *A. fumigatus* ในขณะที่ *A. pullulans* ไอโซเลต BM1 สามารถยับยั้ง *A. fumigatus* และ *A. flavus* ด้วยเช่นกัน เมื่อนำสารสกัดจาก *A. pullulans* ทั้ง 4 ไอโซเลตดังกล่าว มาตรวจสอบด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (Thin layer chromatography) เปรียบเทียบกับสารต้านเชื้อราออริโอบาซิดิน เอ (aureobasidin A) พบว่าสามารถแยกสารสกัดจาก *A. pullulans* ทั้ง 4 ไอโซเลต ได้สารหลายชนิดบนแผ่น TLC และมีค่าแห่งของสารที่มีค่า Rf ใกล้เคียงกับออริโอบาซิดิน เอ เมื่อตรวจสอบความสามารถในการต้านเชื้อราของสารที่แยกได้บนแผ่น TLC พบว่า สารสกัดจาก *A. pullulans* ทั้ง 4 ไอโซเลตดังกล่าว มีสารที่ยับยั้งเชื้อราในตำแหน่งเดียวกันกับออริโอบาซิดินเอ โดยสารสกัดจาก *A. pullulans* ไอโซเลต KT1 มีสารที่ยับยั้ง *A. fumigatus* และ *A. terreus* จำนวน 1 ชนิด คือสารที่มีค่า Rf เท่ากับ 0.4 ในขณะที่สารสกัดจาก *A. pullulans* ไอโซเลต HKW1 HKW2 และ BM1 มีสารที่ยับยั้งเชื้อรา *A. terreus* จำนวน 1 ชนิด คือสารที่มีค่า Rf เท่ากับ 0.4 นอกจากนั้นสารสกัดจาก *A. pullulans* ไอโซเลต BM1 ยังมีสารที่ยับยั้ง *A. flavus* และ *A. fumigatus* มากกว่า 1 ชนิด คือสารที่มีค่า Rf เท่ากับ 0.4 และ 0.675 ตามลำดับ

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ  
ปีการศึกษา 2549

ลายมือชื่อนิสิต.....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....



# # 4672346723: MAJOR BIOTECHNOLOGY

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

PACHARAWAN DEENARN: ISOLATION OF *Aureobasidium pullulans* AS PRODUCERS OF ANTIFUNGAL AGENTS. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. HUNSA PUNNAPAYAK, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR: ASSIST. PROF. PONGTHARIN LOTRAKUL, Ph.D.; 87 pp.

*Aureobasidium pullulans* was screened from various bathroom surfaces in Bangkok and vicinities using half strength corn meal agar (CMA) and malt extract agar (MEA). Ten isolates were obtained including KT1, BM1, TB1, PH1, JP1, VM1, HKW1, HKW2, HKW3 and HKW4 . They were identified as *Aureobasidium pullulans* based on morphological characteristic, physiological tests, exopolysaccharide (EPS) production and EPS characteristic (IR spectroscopy). They were cultivated on production medium to produce antifungal agents and their extracts were tested for their fungicidal activities against the pathogenic fungi (*Aspergillus* spp.) using paper disc method and conidial germination inhibition assay. The extracts from 4 isolates including KT1, BM1, KHW1, and KHW2 had activity against *A. terreus*, while the extracts of KT1 and BM1 also showed activity against *A. fumigatus*. Moreover, the extract from isolate BM1 indicated the ability to inhibit the growth of *A. flavus*. When the antifungal agents from the crude extracts of all 4 isolates were separated using Thin Layer Chromatography (TLC) compared to the aureobasidin A antifungal antibiotic, a number of compounds was detected. The compounds separated from crude extracts of each isolate on TLC plate showed similar Rf value to that of aureobasidin A. These compounds on the TLC plates were tested for antifungal activities. The extracts of all isolates showed inhibition zones corresponded to the bands of TLC plate. Compounds (Rf = 0.4) from KT1 showed activity against *A. fumigatus* and *A. terreus* while compounds (Rf = 0.4) from HKW1 HKW2 and BM1 had activities against *A. terreus* . Moreover, the extract of BM1, which showed two spots of fungicidal compounds with different Rf values (0.4 and 0.675), had activities against *A. flavus* and *A. fumigatus*.

Field of Study Biotechnology

Academic year 2006

Student's signature.....

Advisor's signature.....

Co-advisor's signature.....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี โดยการอนุเคราะห์จากหลายฝ่าย ขอกราบ  
ขอบพระคุณ รศ. ดร. หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ เป็นอย่างสูงที่กรุณาให้  
ความรู้ คำปรึกษา และแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์และถูกต้องยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ผศ. ดร. พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้ความรู้  
คำปรึกษา และตรวจแก้ต้นฉบับวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องครบถ้วน

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

ขอขอบพระคุณ รศ. ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ที่กรุณาเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์  
และตรวจแก้ต้นฉบับให้สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ผศ. ดร. วรินทร์ ชวศิริ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ที่กรุณาให้ความรู้  
คำแนะนำเกี่ยวกับเทคนิคต่างๆ ทางด้านเคมีสำหรับการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ อ.ดร. สีหนาท ประสงค์สุข ที่กรุณาให้คำแนะนำ ข้อมูลและคำปรึกษา  
ต่างๆ และให้การช่วยเหลือในตลอดการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ อ. นิสาล ทศศรี มหาวิทยาลัยบูรพา ที่กรุณาให้คำแนะนำ และข้อมูลใน  
การทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ โครงการผลิตนักวิจัยด้านความหลากหลายทางชีวภาพระดับปริญญาโท-  
เอก ประจำปีงบประมาณ 2548 จากศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านความหลากหลายทางชีวภาพ คณะ  
วิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนสนับสนุนในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ และหน่วยปฏิบัติการวิจัย  
การใช้ประโยชน์จากชีวมวลพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบคุณ คุณจตุพล เหลียงสกุล ที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับเทคนิคต่างๆ ทางด้านเคมีสำหรับ  
การทำวิจัย

ขอขอบคุณ สมาชิกในหน่วยปฏิบัติการวิจัยการใช้ประโยชน์จากชีวมวลพืช บุคลากรใน  
หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ และภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ทุกท่าน

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และญาติพี่น้องของข้าพเจ้า ที่ให้การสนับสนุน  
ช่วยเหลือและเป็นกำลังใจตลอดมา ทำให้งานวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูป.....	ฉ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
3. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง.....	11
อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	11
สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	12
เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	13
วิธีดำเนินงานวิจัย.....	13
1. การคัดแยก <i>A. pullulans</i> .....	13
2. การจัดจำแนก <i>A. pullulans</i> .....	13
3. การเตรียมสารด้านเชื้อรา .....	14
4. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเชื้อรา.....	15
5. การตรวจสอบสารที่ได้ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี.....	16
4. ผลการทดลอง.....	18
1. การคัดแยก <i>A. pullulans</i> .....	18
2. การจัดจำแนก <i>A. pullulans</i> .....	23
2.1 การจัดจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	23
2.2 การจัดจำแนกโดยการตรวจสอบความสามารถในการใช้แหล่งอาหาร ต่างๆ.....	35
2.3 การตรวจสอบการสร้างเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (Exopolysaccharide, EPS).....	37

3. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเชื้อรา.....	45
3.1 Paper disc method.....	45
3.2 Conidial germination inhibition assay.....	51
4. การตรวจสอบสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี.....	52
4.1 เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (Thin layer chromatography).....	52
4.2 เทคนิค High Performance Liquid Chromatography.....	56
5. วิจัยนั้ผลการทดลอง.....	63
1. การคัดแยก <i>A. pullulans</i> .....	63
2. การจัดจำแนก <i>A. pullulans</i> .....	64
2.1 การจัดจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	64
2.2 การจัดจำแนกโดยการตรวจสอบความสามารถ ในการใช้แหล่งอาหารต่างๆ.....	65
2.3 การตรวจสอบการสร้างเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์.....	67
3. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเชื้อรา.....	67
3.1 Paper disc method.....	67
3.2 Conidial germination inhibition assay.....	68
4. การตรวจสอบสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี.....	69
4.1 เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (Thin layer chromatography).....	69
4.2 เทคนิค High Performance Liquid Chromatography.....	71
6. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	73
1. การคัดแยก <i>A. pullulans</i> .....	73
2. การจัดจำแนก <i>A. pullulans</i> .....	73
3. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเชื้อรา.....	73
4. การตรวจสอบสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี.....	74
รายการอ้างอิง.....	75



ภาคผนวก.....	80
ภาคผนวก ก.....	81
ภาคผนวก ข.....	85
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	87



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1	
ฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อราของ ออริโอบาซิดิน เอ เมื่อเปรียบเทียบกับ แอมโฟเทอริซิน B .....	7
2	
สถานที่เก็บตัวอย่างและผลการคัดแยก <i>A. pullulans</i> .....	18
3	
ความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ของเชื้อรา ที่แยกได้ทั้ง 10 ไอโซเลต.....	36
4	
ความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ของเชื้อรา ที่แยกได้ทั้ง 10 ไอโซเลต.....	37
5	
ความถี่ช่วงรังสี IR ของหมู่ฟังก์ชันในเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ จากเชื้อราที่แยกได้ทั้ง 10 ไอโซเลต.....	38
6	
ความถี่ช่วงรังสี IR ที่เป็นลักษณะพิเศษของหมู่ฟังก์ชันบางหมู่.....	38
7	
ความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา <i>Aspergillus</i> spp. ของสารสกัด จาก <i>A. pullulans</i> ทั้ง 10 ไอโซเลต โดย paper disc method .....	46
8	
เปอร์เซ็นต์การงอกและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์ <i>Aspergillus</i> spp. ที่ ถูกบ่มร่วมกับสารสกัดจาก <i>A. pullulans</i> ทั้ง 10 ไอโซเลต.....	51

## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1 โครงสร้างของ ออริโอบาซิดิน โครงสร้าง A ถึง R.....	4
2 โครงสร้างของ Aureobasidin A.....	5
3 วิธีการสังเคราะห์สฟิงโกลิปิด ในสัตว์ และเชื้อรา.....	6
4 โครงสร้างของพุลลูแลน.....	10
5 ห้องน้ำที่ปักอาศัย เขตคลองเตย กรุงเทพมหานคร สถานที่คัดแยกเชื้อรา ไอโซเลต KT1.....	20
6 ห้องน้ำที่ปักอาศัย เขตบางมด กรุงเทพมหานคร สถานที่คัดแยกเชื้อรา ไอโซเลต BM1.....	20
7 ห้องน้ำตึกแถบ นีละนิธิ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร สถานที่คัดแยก เชื้อราไอโซเลต TB1 .....	21
8 ห้องน้ำตึกฟิสิกส์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร สถานที่คัดแยก เชื้อราไอโซเลต PH1.....	21
9 ห้องน้ำตึกจุลจักรพงษ์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร สถานที่คัดแยก เชื้อราไอโซเลต JP1.....	21
10 ห้องน้ำที่ปักอาศัย อนุสาวรีย์ชัยสมรภูมิ กรุงเทพมหานคร สถานที่คัดแยก เชื้อราไอโซเลต VM1.....	22
11 ห้องน้ำวัดกุนนทีรุทธาราม เขตห้วยขวาง กรุงเทพมหานคร สถานที่คัดแยก เชื้อราไอโซเลต HKW1 และ HKW2.....	22
12 ห้องน้ำตลาดสดห้วยขวาง เขตห้วยขวาง กรุงเทพมหานคร สถานที่คัดแยก เชื้อราไอโซเลต HKW3.....	22
13 ห้องน้ำที่ปักอาศัย เขตห้วยขวาง กรุงเทพมหานคร สถานที่คัดแยก เชื้อราไอโซเลต HKW4.....	23
14 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราไอโซเลต KT1 เมื่อเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง MEA เป็นเวลา 7 วัน.....	25
15 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราไอโซเลต BM1 เมื่อเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง MEA เป็นเวลา 7 วัน.....	26

รูปที่	หน้า
16 ลักษณะ โคลินิของเชื้อราไอโซเลต TB1 เมื่อเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง MEA เป็นเวลา 7 วัน.....	27
17 ลักษณะ โคลินิของเชื้อราไอโซเลต PH1 เมื่อเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง MEA เป็นเวลา 7 วัน.....	28
18 ลักษณะ โคลินิของเชื้อราไอโซเลต JP1 เมื่อเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง MEA เป็นเวลา 7 วัน.....	29
19 ลักษณะ โคลินิของเชื้อราไอโซเลต VM1 เมื่อเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง MEA เป็นเวลา 7 วัน.....	30
20 ลักษณะ โคลินิของเชื้อราไอโซเลต HKW1 เมื่อเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง MEA เป็นเวลา 7 วัน.....	31
21 ลักษณะ โคลินิของเชื้อราไอโซเลต HKW2 เมื่อเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง MEA เป็นเวลา 7 วัน.....	32
22 ลักษณะ โคลินิของเชื้อราไอโซเลต HKW3 เมื่อเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง MEA เป็นเวลา 7 วัน.....	33
23 ลักษณะ โคลินิของเชื้อราไอโซเลต HKW4 เมื่อเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง MEA เป็นเวลา 7 วัน.....	34
24 การเปรียบเทียบความสามารถในการใช้แหล่งอาหารของเชื้อ.....	35
25 สเปกตรัมของพอลิแลนมาตรฐาน.....	39
26 สเปกตรัมของพอลิแซคคาไรด์จากเชื้อราไอโซเลต KT1.....	39
27 สเปกตรัมของพอลิแซคคาไรด์จากเชื้อราไอโซเลต BM1.....	40
28 สเปกตรัมของพอลิแซคคาไรด์จากเชื้อราไอโซเลต TB1.....	40
29 สเปกตรัมของพอลิแซคคาไรด์จากเชื้อราไอโซเลต PH1.....	41
30 สเปกตรัมของพอลิแซคคาไรด์จากเชื้อราไอโซเลต JP1.....	41
31 สเปกตรัมของพอลิแซคคาไรด์จากเชื้อราไอโซเลต VM1.....	42
32 สเปกตรัมของพอลิแซคคาไรด์จากเชื้อราไอโซเลต HKW1.....	42
33 สเปกตรัมของ พอลิแซคคาไรด์จากเชื้อราไอโซเลต HKW2.....	43
34 สเปกตรัมของพอลิแซคคาไรด์จากเชื้อราไอโซเลต HKW3.....	43
35 สเปกตรัมของพอลิแซคคาไรด์จากเชื้อราไอโซเลต HKW4.....	44

รูปที่	หน้า
36 ตำแหน่งของกระดาษกรองที่จุ่มด้วยสารที่ใช้ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเชื้อราบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดย paper disc method.....	45
37 ความสามารถในการยับยั้ง <i>A. fumigatus</i> <i>A. terreus</i> <i>A. niger</i> และ <i>A. flavus</i> ของสารสกัดจาก <i>A. pullulans</i> ไอโซเลต KT1.....	47
38 ความสามารถในการยับยั้ง <i>A. fumigatus</i> , <i>A. terreus</i> <i>A. flavus</i> และ <i>A. niger</i> ของสารสกัดจาก <i>A. pullulans</i> ไอโซเลต BM1.....	48
39 ความสามารถในการยับยั้ง <i>A. terreus</i> <i>A. flavus</i> <i>A. fumigatus</i> และ <i>A. niger</i> ของสารสกัดจาก <i>A. pullulans</i> ไอโซเลต HKW1.....	49
40 ความสามารถในการยับยั้ง <i>A. terreus</i> <i>A. niger</i> <i>A. flavus</i> และ <i>A. fumigatus</i> ของสารสกัดจาก <i>A. pullulans</i> ไอโซเลต HKW2.....	50
41 โครมาโทแกรมแสดงผลการตรวจสอบสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราที่ได้จาก <i>A. pullulans</i> ทั้ง 4 ไอโซเลต ด้วยเทคนิค TLC .....	52
42 โครมาโทแกรมแสดง inhibition zone ในการยับยั้งเชื้อรา <i>A. fumigatus</i> ของสารสกัดที่ได้จาก <i>A. pullulans</i> ทั้ง 4 ไอโซเลต เมื่อข้อมสึด้วยแลคโตฟีนอลบลู.....	53
43 โครมาโทแกรมแสดง inhibition zone ในการยับยั้งเชื้อรา <i>A. flavus</i> ของสารสกัดที่ได้จาก <i>A. pullulans</i> ทั้ง 4 ไอโซเลต เมื่อข้อมสึด้วยแลคโตฟีนอลบลู.....	54
44 โครมาโทแกรมแสดง inhibition zone ในการยับยั้งเชื้อรา <i>A. terreus</i> ของสารสกัดที่ได้จาก <i>A. pullulans</i> ทั้ง 4 ไอโซเลต เมื่อข้อมสึด้วยแลคโตฟีนอลบลู.....	55
45 เครื่อง HPLC Varian รุ่น Pro star ที่ใช้ในการตรวจสอบ.....	56
46 กราฟจากการทำ HPLC ของสารมาตรฐาน ออริโอบาซิดิน เอ ที่ความเข้มข้น 0(A) 5(B) และ 10(C) มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร.....	57
47 กราฟจากการทำ HPLC ของสารมาตรฐาน ออริโอบาซิดิน เอ ที่ความเข้มข้น 15(D)และ 20(E) มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร.....	58
48 กราฟจากการทำ HPLC ของสารมาตรฐาน ออริโอบาซิดิน เอ ที่ความเข้มข้น 0(A) 20(B) และ 40(C) มิลลิกรัม/มิลลิลิตร.....	60
49 กราฟจากการทำ HPLC ของสารมาตรฐาน ออริโอบาซิดิน เอ ที่ความเข้มข้น 60(D) 80(E) และ 100(F) มิลลิกรัม/มิลลิลิตร.....	61
50 กราฟจากการทำ HPLC ของสารมาตรฐาน ออริโอบาซิดิน เอ ที่ความเข้มข้น 0(A) 60(B) และ 100(C) มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร.....	62



## บทที่ 1

### บทนำ

ในปัจจุบัน โรคติดเชื้อราจัดเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญ ดังจะเห็นได้จากจำนวนที่เพิ่มขึ้นของการติดเชื้อในผู้ป่วยที่มีความบกพร่องของภูมิคุ้มกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ผู้ป่วยโรคเอดส์ ผู้ป่วยโรคมะเร็ง ผู้ป่วยที่มีความผิดปกติในระบบภูมิคุ้มกัน หรือผู้ป่วยที่มีการผ่าตัดเปลี่ยนถ่ายอวัยวะ เป็นต้น โรคติดเชื้อราอาจพบได้ในผู้ป่วยห้องอภิบาลผู้ป่วยหนัก (ICU) ซึ่งใช้ยาต้านจุลชีพที่มีฤทธิ์กว้างในการรักษาเป็นระยะเวลานาน และยังพบว่าผู้ป่วยซึ่งเป็นโรคติดเชื้อราทั่วร่างกายนั้นรักษาได้ยาก ยาที่นิยมนำมาใช้รักษาโรคติดเชื้อราในปัจจุบันมีหลายชนิด เช่น แอมโฟเทอริซิน บี (amphotericin B) ฟลูไซโตซิน (flucytosin) และยาในกลุ่มเอโซล (azole) เป็นต้น (Georgopapadakou และ Walsh, 1996; Endo และคณะ, 1997) แต่ในบรรดายาทั้งหมดที่กล่าวมานั้น ยังไม่มียาชนิดใดที่ให้ผลการรักษาในระดับที่น่าพอใจ ทั้งในด้านประสิทธิภาพในการรักษาที่ครอบคลุมโรคติดเชื้อราได้หลากหลายชนิด ความเป็นพิษต่อร่างกาย หรือโอกาสที่เชื้อจะดื้อยา (พรพรรณ อิมวิทยา และ นันทจักร เกรันพงศ์, 2543) ยาที่วงการแพทย์ใช้เป็นมาตรฐานในการรักษาโรคจากเชื้อราคือ แอมโฟเทอริซิน บี ซึ่งจะมีความสามารถในการทำลายเซลล์ของเชื้อราที่มีการเจริญพันธุ์และเซลล์ที่อยู่ในระยะพัก แต่ยังมีปัญหาด้านสารพิษที่ตกค้างในหลอดเลือดดำ (Gold และคณะ, 1956) ยาฟลูไซโตซินมีขอบเขตการต้านเชื้อราที่แคบกว่าแอมโฟเทอริซิน บี ส่วนยาในกลุ่มเอโซลนั้นมีพิษน้อยกว่าแอมโฟเทอริซิน บี และมีประสิทธิภาพในการรักษาค่อนข้างดี (Georgopapadakou และ Walsh, 1994, 1996) แต่ก็พบว่ามีกรณีของเชื้อราดื้อยาในกลุ่มนี้ (Hitchcock, Pye และ Troke, 1993) การออกฤทธิ์ของยาด้านเชื้อราในปัจจุบันนั้นมักก่อให้เกิดผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยที่ใช้ยานั้น เนื่องจากเชื้อราเป็น eucaryote เช่นเดียวกับมนุษย์ ดังนั้นการทำงานต่อเป้าหมายของยาด้านเชื้อราส่วนใหญ่จึงมีผลข้างเคียงต่อเซลล์ของมนุษย์ นอกจากนี้ยาด้านเชื้อราที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันยังมีไม่เพียงพอต่อความต้องการ (Takesako และคณะ, 1993) ดังนั้นการค้นคว้าและพัฒนาหรือสารต้นแบบใหม่ๆ ที่มีโครงสร้างและกลไกการออกฤทธิ์ที่แตกต่างจากยาด้านเชื้อราที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน จึงมีความสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่งต่อการพัฒนาเพื่อให้ได้ยาที่มีประสิทธิภาพดี มีความเจาะจงต่อเชื้อรา ผลข้างเคียงต่ำ และมีปัญหาการดื้อยาน้อย โดยคาดหวังว่าสารต้นแบบกลุ่มใหม่ที่มีโครงสร้างทางเคมีและกลไกการออกฤทธิ์ที่แตกต่างไปจากยาด้านเชื้อราเดิมนี้ จะสามารถออกฤทธิ์ต้านเชื้อราที่ดื้อต่อยาที่ใช้ในปัจจุบันได้

ในปี ค.ศ.1991 Takesako และคณะสามารถสกัดสารต้านเชื้อราชนิดใหม่ได้ และให้ชื่อว่า ออริโอบาซิดิน (aureobasidins) โดยสกัดจาก *Aureobasidium pullulans* สายพันธุ์ R106 ออริโอบาซิดิน เป็นสารกลุ่มเดปซิเปปไทด์แบบวงแหวน (cyclic depsipeptide) มีโครงสร้าง 18 ชนิด จำแนกเป็นชนิด A ถึง R โดยแต่ละชนิดจะมีองค์ประกอบทางโครงสร้างแตกต่างกันเพียงไม่กี่ตำแหน่ง ในออริโอบาซิดินทั้ง 18 โครงสร้างนั้น ออริโอบาซิดิน เอ (aureobasidin A) เป็นโครงสร้างที่พบมากที่สุด และมีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งเชื้อรา ออริโอบาซิดิน เอ เป็นสารต้านเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงในขั้นทดลอง (in vitro) และแสดงผลการยับยั้งเชื้อราที่ก่อโรคหลายชนิด เช่น *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* และ *Aspergillus* spp. บางสายพันธุ์ (Takesako และคณะ, 1991; 1993; Zhong, Jeffries และ Georgopapadakou, 2000)

ในงานวิจัยนี้จึงมุ่งทำการคัดแยก *A. pullulans* จากห้องน้ำในบริเวณต่างๆของกรุงเทพมหานครและปริมณฑล เนื่องจากในห้องน้ำเป็นแหล่งที่อยู่ที่มีความชื้นและมีเชื้อจุลินทรีย์อาศัยอยู่มากมายหลายชนิด จึงน่าจะมีการแข่งขันเพื่อความอยู่รอด เพื่อนำเชื้อ *A. pullulans* ที่คัดแยกได้มาจัดจำแนก และทำการผลิตสารต้านเชื้อรา รวมถึงการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อราก่อโรค และตรวจสอบสารต้านเชื้อราดังกล่าวด้วยวิธี โครมาโทกราฟี ตามลำดับ

### วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อคัดแยก *Aureobasidium pullulans* ที่สร้างสารต้านเชื้อราได้ในประเทศไทย
2. เพื่อศึกษาสมบัติทางชีวภาพของสารต้านเชื้อราที่สกัดได้จาก *Aureobasidium pullulans*

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เป็นแนวทางในการพัฒนาเพื่อให้ได้สารต้านเชื้อราจาก *Aureobasidium pullulans* ที่คัดแยกได้ในประเทศไทย และมีศักยภาพในการเป็นยาต้านเชื้อราที่ดีต่อไป

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### ยาสำหรับรักษาโรคติดเชื้อรา

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

##### 1. แอมโฟเทอริซิน บี

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

##### 2. ฟลูไซโตซิน

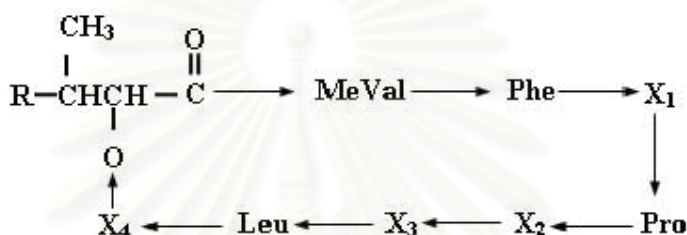
ยากลุ่มนี้ที่นำมารักษาโรคเชื้อราคือ 5-fluorocytosine ละลายน้ำได้ดี สามารถรับประทานได้ เมื่อเข้าสู่ร่างกายแล้วจะผ่านเข้าไปในเซลล์ราซึ่งเอนไซม์ cytosine deaminase จะเปลี่ยนยาให้เป็น 5-fluorouracil มีฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ RNA ทำให้เซลล์ตาย นอกจากนี้ยังถูกเปลี่ยนเป็น 5-fluoro-2'-deoxyuridylic ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์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

##### 3. ยากลุ่มเอโซล

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

### ออริโอบาซิดิน (Aureobasidins)

ออริโอบาซิดิน (aureobasidins) เป็นสารกลุ่มเปปไทด์แบบวงแหวน (cyclic depsipeptide) ที่ผลิตได้จากยีสต์ *Aureobasidium pullulans* ประกอบด้วยกรดแอลฟาอะมิโน ( $\alpha$ -amino) 8 ชนิด และกรดไฮดรอกซิล (hydroxyl acid) 1 ชนิด ออริโอบาซิดิน มีโครงสร้าง 18 ชนิด จำแนกเป็นชนิด A ถึง R โดยแต่ละชนิดจะมีองค์ประกอบทางโครงสร้างแตกต่างกันเพียงไม่กี่ตำแหน่ง (รูปที่ 1) (Takesako และคณะ, 1991; Ikai, Shiomi และคณะ, 1991)



Compound	R	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>
AbA	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	MePhe	alle	MeVal	$\beta$ HOMeVal
AbB	CH <sub>3</sub>	MePhe	alle	MeVal	$\beta$ HOMeVal
AbC	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	MePhe	Val	MeVal	$\beta$ HOMeVal
AbD	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	MePhe	alle	MeVal	$\gamma$ HOMeVal
AbE	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	$\beta$ HOMePhe	alle	MeVal	$\beta$ HOMeVal
AbF	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	MePhe	alle	Val	$\beta$ HOMeVal
AbG	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	MePhe	alle	MeVal	MeVal
AbH	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	MePhe	alle	MeVal	Val
AbI	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	MePhe	Leu	MeVal	$\beta$ HOMeVal
AbJ	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	MePhe	alle	MeVal	<i>N</i> . $\beta$ MeAsp
AbK	CH <sub>3</sub>	MePhe	alle	MeVal	MeVal
AbL	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	MePhe	Val	MeVal	MeVal
AbM	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	Phe	alle	MeVal	MeVal
AbN	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	MePhe	alle	MeVal	DH <sub>3,4</sub> MeVal
AbO	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	MePhe	alle	MeVal	$\beta$ HOMePhe
AbP	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	MePhe	alle	Val	MeVal
AbQ	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	MePhe	alle	MeVal	MePhe
AbR	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	$\beta$ HOMePhe	alle	MeVal	MeVal

รูปที่ 1 โครงสร้างของ ออริโอบาซิดิน โครงสร้าง A ถึง R (Ikai, Shiomi และคณะ 1991)

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

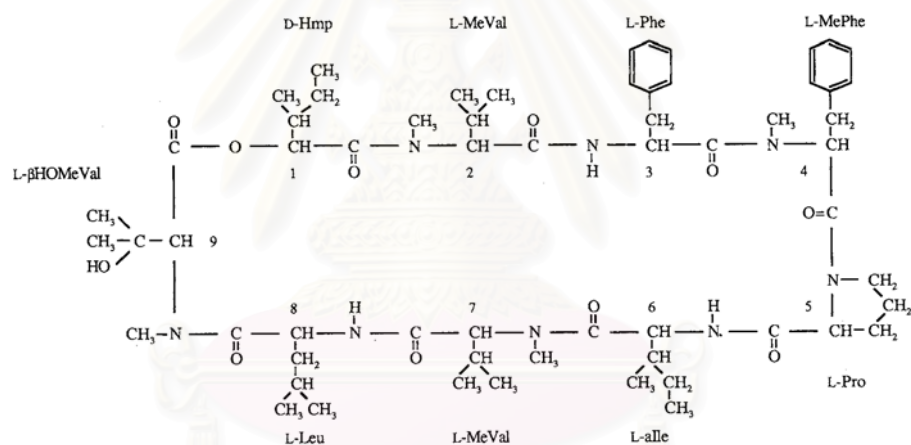
$\beta$ HOMeVal =  $\beta$ -Hydroxy-*N*-methylvaline, Val = valine, Phe = Phenylalanine, Leu = Leucine

*N*.  $\beta$ MeAsp = *N*, $\beta$ -dimethylaspartic acid,  $\gamma$ HOMeVal =  $\gamma$ -Hydroxy-*N*-methylvaline

DH<sub>3,4</sub>MeVal = 2,3-didehydro-*N*-methylvaline

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

คณะ, 1996) โดยแสดงผลการยับยั้งเชื้อรา เช่น *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* และ *Aspergillus* spp. บางสายพันธุ์ แต่แสดงผลยับยั้งได้น้อยใน *A. fumigatus* และ *A. flavus* (Takesako และคณะ, 1991; 1993; Zhong, Jeffries และ Georgopapadaku, 2000) โดย อริโอบาซิดิน เอ มีความเป็นพิษต่ำในการทดลองกับสัตว์ทดลอง นอกจากนี้ยังพบว่าอริโอบาซิดิน เอ จะทำลายเฉพาะเซลล์ที่กำลังเจริญพันธุ์ของ *C. albicans* โดยไม่มีผลกระทบต่อเซลล์ที่อยู่ในระยะพัก อริโอบาซิดิน เอ ไม่ได้มีผลต่อการยับยั้งการผลิต DNA RNA หรือโปรตีนอื่นๆ ไม่มีผลในการลดการผลิตสารประกอบกลูโคสต่างๆในเซลล์ ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า กลไกการทำงานของอริโอบาซิดิน มีความแตกต่างจากแอมโฟเทอริซิน บี และสารต่อต้านเชื้อราชนิดอื่นๆ (Endo และคณะ, 1997)

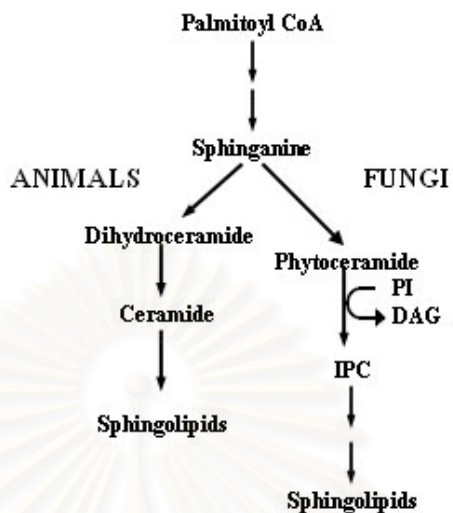


รูปที่ 2 โครงสร้างของ Aureobasidin A (Takesako และคณะ, 1993)

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

อย่างไรก็ดี พบว่าในการยับยั้งการทำงานของไอพีซีซินเทสของอริโอบาซิดินเอ ไม่มีผลไปยับยั้งการสังเคราะห์สฟิงโกลิปิดในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (รูปที่ 3)





รูปที่ 3 วิธีการสังเคราะห์สฟิงโกลิปิด ในสัตว์ และเชื้อรา (Zhong และคณะ, 2000)

เนื่องจากยาต้านเชื้อราที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน ล้วนมีข้อจำกัดในการรักษาทั้งสิ้น ทั้งในแง่ของประสิทธิภาพในการรักษา การมีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วย หรือโอกาสที่เชื้อจะดื้อยา ทำให้ ออริโอบาซิดิน เอ นั้นจึงเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งที่จะนำมาพัฒนาเป็นยาต้านเชื้อราชนิดใหม่ เนื่องจากมีข้อดีหลายประการ ทั้งในด้านประสิทธิภาพในการรักษา (ตารางที่1) และการไม่มีผลข้างเคียงในสัตว์ทดลองดังที่กล่าวมาข้างต้น

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

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

### *Aureobasidium pullulans*

*Aureobasidium pullulans* เป็นเชื้อราคล้ายยีสต์ (yeast-like fungus) เดิมมีการจัดจำแนกอยู่ใน Class Deuteromycetes (Fungi imperfecti) Order Moniliales Family Dermatiaceae (Cooke, 1959; Ramos และ Acha, 1975) มีชื่อเรียกหลายชื่อด้วยกัน เช่น *Pullularia pullulans*, *Dermatium*

*pullulans*, *Aureobasidium vitis*, *Pullularia fermentans* เป็นต้น (Cooke, 1959; Ramos และ Acha, 1975; Hermanides-nijhof, 1977) *A. pullulans* มีชื่อสามัญว่า “Black yeast” เนื่องจากสามารถผลิตเม็ดสีเมลานิน (melanin pigment) ได้ในระหว่างการเจริญ ทำให้โคโลนีสีดำ *A. pullulans* มีรูปร่างได้หลายลักษณะ เช่น บลาสโตสปอร์ (blastospore) เซลล์พอง (swollen cell) คลาไมโดสปอร์ (chlamydospore) เส้นใยแท้ (hypae) หรือ เส้นใยเทียม (pseudohyphae) เป็นต้น (Ramos และ Acha, 1975) ปัจจุบันมีการจัดจำแนก *A. pullulans* ไว้ ดังนี้ (Yurlova และคณะ, 1999; De Hoog และคณะ, 1999)

Kingdom Fungi

Division Ascomycota

Class Euascomycetes

Order Dothideales

Family Dothideaceae

Genus *Aureobasidium*

Species *Aureobasidium pullulans*

การจัดจำแนก *A. pullulans* แต่เดิมนั้น ใช้หลายวิธีประกอบกัน ทั้งทางสัณฐานวิทยา และ สรีรวิทยา เช่น ลักษณะของโคโลนี และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ (Hermanides-nijhof, 1977) การใช้แหล่งอาหารต่างๆกัน (Substrate utilization) การสร้างเมลานิน (Dennis และ Buhagiar, 1973) การสร้างโคนิเดีย (conidiogenesis) ภาวะการสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ (De Hoog และ Yurlova, 1994) การจัดทำคาริโอไทป์ (karyology) และลักษณะของเส้นใย (Takeo และ De Hoog, 1991) เป็นต้น ในปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล มาใช้ร่วมในการจัดจำแนก ซึ่งทำให้การจัดจำแนกมีความสะดวกขึ้น สามารถแยกความแตกต่างได้ในระดับชนิด (species) เทคนิคที่นิยมใช้ ได้แก่ การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ nuclear ribosomal DNA Internal transcribed spacer (ITS) (Yurlova และคณะ, 1999; Hunsu Punnapayak และคณะ, 2003)

#### ลักษณะของโคโลนี และสัณฐานวิทยาของ *A. pullulans*

เมื่อ *A. pullulans* เจริญเติบโตบนอาหารกึ่งแข็ง Malt extract agar (MEA) เป็นเวลา 7 วัน โคโลนีของ *A. pullulans* จะมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 40 มิลลิเมตร ลักษณะโคโลนีเรียบ และเป็นเมือก มีสีครีมหรือชมพูในระยะแรกทีเดียว เมื่อเวลาผ่านไปโคโลนีอาจเปลี่ยนเป็นสีเข้มขึ้นหรือเปลี่ยนเป็นสีอื่น เช่น สีเขียวมะกอก สีแดง เหลือง น้ำตาลอ่อน และดำ เป็นต้น มีเส้นใยสั้นๆ ขึ้น

รอบๆ โคลนีส ลักษณะของเส้นใยเรียบ โปร่งใส เห็น Septum ชัดเจน ความกว้างเส้นใยประมาณ 3-12 ไมโครเมตร เมื่อเลี้ยงนานขึ้นอาจเปลี่ยนเป็นสีเข้ม และมีผนังเซลล์หนาขึ้น เรียกว่าเป็น คลาไมโดสปอร์ (chlamydospore) มีการสร้างโคนิเดียจากภายใน (endoconidia) ด้านข้าง หรือปลายของเส้นใย (Hermanides-nijhof, 1977)

ลักษณะโคนิเดียปฐมภูมิ (primary conidia) เป็นเซลล์เดี่ยว ก่อนข้างกลม โปร่งใส ผนังเรียบ มีรูปร่างหลากหลายและมีขนาดแตกต่างกัน มักสร้างโคนิเดียทุติยภูมิ (secondary conidia) ขนาดเล็ก หรือ budding cell โดยอาจสร้าง secondary conidia ขนาดเล็กหลายเซลล์โดยยังติดอยู่กับเซลล์แม่ มีรูปร่างคล้ายกับนิ้วมือ และเมื่อ secondary conidia หลุดออกไป ในบางเซลล์อาจปรากฏผลจากการหลุดออกของโคนิเดีย (bud scar) (Hermanides-nijhof, 1977; Domsch และคณะ, 1993)

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

*A. pullulans* มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมอย่างยิ่ง เพราะสามารถผลิตเอนไซม์ เช่น อะไมเลส เพคติเนส และ ไซแลนเนส และมีการใช้ประโยชน์จาก *A. pullulans* ในการผลิต โปรตีนเซลล์เดี่ยว (single cell protein) (Deshpande และคณะ, 1992) นอกจากนี้ *A. pullulans* สามารถผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพ ที่เรียกว่า พูลลูแลน (pullulan) ซึ่งเป็นพอลิแซคคาไรด์ที่หลั่งออกภายนอกเซลล์ขณะเพาะเลี้ยง พูลลูแลน ประกอบด้วยน้ำตาลมอลโตไตรโอส หรือ มอลโตเตตระโอสต่อกันด้วยพันธะแอลฟา 1,6 ( $\alpha$ -(1,6) linkages) (รูปที่ 4) (Leather, 2003)

ในอดีต *A. pullulans* ถูกแบ่งออกเป็น 2 varieties คือ *A. pullulans* var. *pullulans* ซึ่งโคลนีสเป็นสีครีม ชมพู เหลือง หรือน้ำตาลอ่อน หลังจากเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MEA เป็นเวลา 3 สัปดาห์ และ *A. pullulans* var. *melanigenum* ซึ่งโคลนีสจะกลายเป็นสีเขียวยเข้ม หรือดำ เนื่องจากมีเส้นใยสีเข้ม (dark hyphae) (Hermanides-nijhof, 1977)

Yurlova และคณะ (1996) ได้ใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลมาช่วยในการจัดจำแนก *A. pullulans* และได้เสนอการจำแนกเป็น variety ใหม่คือ *A. pullulans* var. *aubasidani* ซึ่ง *A. pullulans* var.

*aubasidani* นี้สามารถผลิตพอลิแซคคาไรด์ที่มีโครงสร้างคล้ายพุลลูแลน เรียกว่า ออบาซิเดน (aubasidan) ได้ ซึ่งออบาซิเดนนั้นเป็นกลูแคน (glucan) ที่ต่อกันด้วยพันธะ แอลฟา 1,4 บีตา 1,6 และ บีตา 1,3 glycosidic linkages (Yurlova และ De Hoog, 1997) นอกจากนี้ Yurlova และคณะยังได้รวมสอง varieties ที่มีอยู่เดิมเข้าด้วยกัน เป็น variety เดียวคือ *A. pullulans* var. *pullulans* โดย *A. pullulans* var. *aubasidani* ไม่สามารถใช้ เมลลิลแอลฟาดีกลูโคส (methyl- $\alpha$ -D-glucose) และ แลคโตส (lactose) เป็นแหล่งคาร์บอนได้ ซึ่งต่างจาก *A. pullulans* var. *pullulans* ที่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนทั้งสองได้ ซึ่งความแตกต่างดังกล่าวนี้ สามารถนำมาใช้ระบุชนิดของ variety ของ *A. pullulans* ได้ในเบื้องต้น



รูปที่ 4 โครงสร้างของพุลลูแลน (Leather, 2003)



### บทที่ 3

#### วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

##### อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

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

## สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมี	บริษัท / ประเทศ
ผงสกัดยีสต์ (Yeast extract)	Difco/ USA
ผงสกัดมอลท์ (Malt extract)	Difco/ USA
กลูโคส (Glucose)	Sigma/ USA
ซูโครส (Sucrose)	Carlo Erba Reagent/ Italy
แอมโมเนียมซัลเฟต ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Carlo Erba Reagent/ Italy
โปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Carlo Erba Reagent/ Italy
แมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	Carlo Erba Reagent/ Italy
แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O)	Schrlau / Spain
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	Merck/ Germany
ไฮดรอน(III) คลอไรด์ (FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O)	Carlo Erba Reagent/ Italy
ซิงค์ซัลเฟต (ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	May & Baker/ England
แอมโมเนียมอะซิเตท (CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> )	Ajax Finechem/ Australia
แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH <sub>4</sub> Cl)	Merck/ Germany
แอมโมเนียมซัลเฟต ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Schrlau / Spain
แอล-แอสพาราจีนโมโนไฮเดรต (C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .H <sub>2</sub> O)	Fluka/ Switzerland
โซเดียมไนเตรต (NaNO <sub>3</sub> )	Carlo Erba Reagent/ Italy
ยูเรีย (NH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub> )	Ajax Finechem/ Australia
อะซีโตไนไตร (CH <sub>3</sub> CN)	Ajax Finechem/ Australia
เอทิลอะซิเตท (CH <sub>3</sub> COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub> )	Carlo Erba Reagent/ Italy
ทวิน 80 (Tween 80)	Fluka/ Switzerland
ไดเมทิลซัลโฟไซด์ (CH <sub>3</sub> SOCH <sub>3</sub> )	Carlo Erba Reagent/ Italy
เอทานอล (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)	Merck/ Germany
เมทานอล (CH <sub>3</sub> OH)	Carlo Erba Reagent/ Italy
อะซิติกแอซิด (CH <sub>3</sub> COOH)	Merck/ Germany
แลคโตฟีโนลบลู (Lacto phenol blue)	Fluka/ Switzerland

## เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

เชื้อรา *Aspergillus niger* *A. flavus* *A. fumigatus* และ *A. terreus* จากคลังเชื้อของหน่วยปฏิบัติการวิจัยการใช้ประโยชน์จากชีวมวลพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## วิธีดำเนินงานวิจัย

### 1. การคัดแยก *A. pullulans*

เก็บเชื้อโดยใช้ไม้พันสำลีที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อ ป้ายเชื้อจากผนังห้องน้ำในแหล่งที่อยู่อาศัยหรือห้องน้ำสาธารณะ ในบริเวณต่างๆของกรุงเทพมหานคร และปริมณฑล โดยนำเชื้อที่ได้มาป้ายบนอาหารคัดแยกเชื้อ corn meal agar (CMA) และ malt extract agar (MEA) สูตร half-strength (Sehanat Prasongsuk และคณะ, 2005) นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3-4 วัน สังเกตโคโลนียีสต์ที่เจริญบนจานเพาะเลี้ยงแล้วคัดแยกออกมาเลี้ยงบนอาหาร yeast malt agar (YMA) หรือ potato dextrose agar (PDA)

### 2. การจัดจำแนก *A. pullulans*

2.1 การจัดจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Domsch และคณะ, 1993; De Hoog และ Yurlova, 1994; Hermanides-Nijhof, 1997)

นำเชื้อที่คัดแยกได้มาเลี้ยงบนอาหาร malt extract agar (MEA) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน เพื่อศึกษาลักษณะการเจริญของโคโลนีบนอาหารกึ่งแข็ง และเตรียมสไลด์ของเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร yeast malt broth (YMB) เป็นเวลา 7 วัน เพื่อสังเกตรูปร่างและลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เปรียบเทียบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *A. pullulans* ที่อธิบายโดย Domsch และคณะ (1993) De Hoog และ Yurlova (1994) และ Hermanides-Nijhof (1997)

2.2 การจัดจำแนกโดยตรวจสอบความสามารถในการใช้แหล่งอาหารต่างๆ (Barnett, Payne และ Yarrow, 2000)

เลี้ยง *A. pullulans* ในอาหารสูตร YMB เมื่อเชื้อเจริญทำการนับจำนวนเซลล์แขวนลอยโดยใช้ Haemocytometer แล้วปรับจำนวนให้ได้  $2.5 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำการถ่ายเชื้อที่เตรียมได้จำนวน 0.1 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นปริมาตร 4 มิลลิลิตร เติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และ yeast nitrogen base ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร (กรณีตรวจสอบความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน) และเติมแหล่ง

ไนโตรเจนชนิดต่างๆความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และ yeast carbon base ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร (กรณีตรวจสอบความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจน) นำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน สังเกตการเปลี่ยนแปลงในหลอดทดลองโดยเปรียบเทียบกับชุดที่เติมเชื้อลงในน้ำกลั่นซึ่งเป็นชุดควบคุม (กรณีที่เมื่อเลี้ยงไปเป็นระยะเวลา 7 วันแล้วยังไม่มีการเจริญของเชื้อ ให้เลี้ยงต่อไปอีกเป็นเวลา 3 สัปดาห์ แล้วจึงบันทึกผลการทดลอง)

### 2.3 การตรวจสอบการสร้างเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (Exopolysaccharide, EPS)

(Sehanat Prasongsuk และคณะ, 2005)

#### 2.3.1 เลี้ยงเชื้อ *A. pullulans* ในอาหารสูตร production medium (PM)

(Ueda และคณะ, 1963) เขย่าที่ 120 รอบต่อนาที (rpm) อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน

2.3.2 ทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออกที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำสารละลายส่วนใสมาตกตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์ด้วย เอทานอล (95%) ในสัดส่วน 2:1 (เอทานอล: สารละลายส่วนใส)

2.3.3 นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากการตกตะกอนไปอบให้แห้งที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.3.4 วิเคราะห์โครงสร้างของพอลิแซ็กคาไรด์ ด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโตรสโกปี (Infrared-spectroscopy) เทียบกับพุลูลแลนมาตรฐานจากบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.3.5 ทำการเก็บเชื้อที่ได้ไว้เป็น stock culture โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร YMB เป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้นเก็บเชื้อในหลอดฝาเกลียวปลอดเชื้อ เติมสารละลายกลีเซอรอลจนมีความเข้มข้นสุดท้ายในหลอดเก็บเชื้อเป็น 5% (v/v) จากนั้นทำให้เชื้อเยือกแข็งด้วยไนโตรเจนเหลว และนำไปเก็บที่ตู้เย็น -80 องศาเซลเซียส

### 3. การเตรียมสารตั้งต้นเชื้อรา (Takesako และคณะ, 1991)

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

3.2 เก็บเชื้อที่ได้มาปั่นแยกเซลล์ นำส่วนตะกอนเซลล์มาบดแล้วสกัดด้วยเอทานอล(95%)

3.3 กรองเซลล์ออกด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ นำส่วนของเหลวที่ได้ไปประเหยด้วยเครื่องกลั่นสุญญากาศ (evaporator) จะเหลือส่วนสารละลายเล็กน้อย นำไปเติมด้วยเอธิลอะซิเตท เขย่าให้เข้ากันแล้วแยกชั้นของเอธิลอะซิเตท ประเหยด้วยเครื่องกลั่นสุญญากาศจนแห้ง สกัดซ้ำด้วยเอธิลอะซิเตท 2-3 ครั้ง จะได้ส่วนที่เหลือเป็นส่วนของหยดน้ำมันติดอยู่ที่ข้างขวด

3.4 ละลายสารตัวอย่างด้วยไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

#### 4. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเชื้อรา

เชื้อร่าก่อโรคที่ใช้ในการตรวจสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อร่าคือ *Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *A. flavus* และ *A. terreus* โดยนำมาทดสอบฤทธิ์ของสารต้านเชื้อร่าที่ได้ด้วยวิธี Paper disc method และ Conidial germination inhibition assay

##### 4.1 Paper disc method (Tachibana, Ishikawa และ Itoh, 2005)

4.1.1 เลียงเชื้อร่าที่จะใช้ทดสอบในอาหารแข็งแข็ง PDA เป็นเวลา 3-4 วัน เติม 1% (v/v) tween 80 ในน้ำกลั่น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดอาหารเพื่อทำสปอร์แขวนลอย โดยเขี่ยให้สปอร์ของร่ากระจายตัวใน 1% tween 80 ทำการนับสปอร์โดยใช้ haemocytometer แล้วปรับจำนวนให้ได้  $1 \times 10^5$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร

4.1.2 คุดสปอร์แขวนลอยที่เตรียมได้มา 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารกึ่งแข็ง PDA ให้ทั่ว รอนจนแห้ง

4.1.3 นำกระดาษกรองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 60 มิลลิเมตรจุ่มสารสกัดที่ได้ และวางบนจานเพาะเชื้อโดยในจานเพาะเชื้อเดียวกันให้วาง กระดาษกรองที่ไม่จุ่มสาร กระดาษกรองที่จุ่ม DMSO และกระดาษกรองที่จุ่มด้วยออริโอบาซินดิน เอ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นชุดควบคุม

4.1.4 บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-4 วัน ตรวจสอบการเกิดบริเวณยับยั้ง (clear zone) ที่เกิดขึ้นบนจานเพาะเชื้อ วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงยับยั้งของสารสกัดเปรียบเทียบกับเส้นผ่าศูนย์กลางวงยับยั้งของ ออริโอบาซินดิน เอ

4.2 Conidial germination inhibition assay คัดแปลงจาก Lavermicocca และคณะ (2000)

4.2.1 เตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อร่าที่ใช้ทดสอบโดยให้มีจำนวนสปอร์  $1 \times 10^3$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร

4.2.2 ปิเปตสารสกัดผสมกับสปอร์แขวนลอยในอัตราส่วน 1:10 ตามลำดับ ใน micro well plate นำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที โดยที่ชุดควบคุมใช้สารละลาย DMSO แทนสารสกัด

4.2.3 ปิเปตสปอร์แขวนลอยมา 0.1 มิลลิลิตร และเกลี่ยลงบนจานอาหารกึ่งแข็ง PDA นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-3 วัน

4.2.4 นับจำนวนสปอร์ที่ขึ้นบนจานอาหาร คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ (% germination) และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์ (% inhibition) โดยเทียบกับชุดควบคุม วิธีคำนวณดังกล่าวพบวก ข

## 5. การตรวจสอบสารที่ได้ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี

### 5.1 เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (Thin layer chromatography)

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

5.1.2 นำแผ่น TLC ทำการทดลองตามข้อ 5.1.1 แต่ไม่ต้องนำไปใส่ขวดแก้วที่มีไออัมตัวของไอโอดีน ให้นำมาพ่นด้วยสปอร์ของเชื้อรา *Aspergillus* spp. ที่แขวนลอยในน้ำมะเขือเทศ ซึ่งมีจำนวนสปอร์  $1 \times 10^6$  สปอร์/ มิลลิลิตร โดยใช้ TLC 1 แผ่น ต่อการพ่นเชื้อรา 1 ชนิด ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง

5.1.3 นำแผ่น TLC ไปบ่มในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารกึ่งแข็ง water agar ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-3 วัน

5.1.4 นำแผ่น TLC ที่มีเชื้อราเจริญอยู่ไปย้อมสีด้วยแลคโตฟีนอลบลู เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปล้างสีออกด้วย กรดอะซิติก 5% (v/v) เป็นเวลา 10 นาที รอให้แห้ง

5.1.5 สังเกตตำแหน่งของ clear zone ที่เกิดขึ้นบนแผ่น TLC

5.2 การตรวจสอบสารสกัดจาก *A. pullulans* ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (Takesako และคณะ, 1991)

นำสารที่ได้จากการทำโครมาโทกราฟีแบบชั้นบางมาทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค HPLC เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน อริโอบาซิดินเอ ที่เตรียมให้มีความเข้มข้นต่างๆกันเพื่อทำเป็นกราฟ



มาตรฐาน โดยใช้โครมาโทกราฟีแบบเฟสผันกลับ (reversed-phase chromatography) ใช้คอลัมน์ชนิด C18 ใช้ UV detector คอลัมน์ที่ใช้คือ

5.2.1 คอลัมน์ Lichrocart C18 ( $4.0 \times 125$  มิลลิเมตร) ของบริษัท Merck ขนาดรูพรุน (pore size) 100 อังสตรอม ขนาด particle 5 ไมโครเมตร และใช้ UV detector ที่ความยาวคลื่น 258 นาโนเมตร โดยทำการเตรียม สารมาตรฐานออร์โอบาซิดิน เอ ที่ความเข้มข้นต่างกัน และสารสกัดจากทั้ง 4 สายพันธุ์ ละลายในเมทานอล โดยมีอะซีโตนไตร และน้ำเป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราส่วน 7.5:2.5 ตามลำดับ อัตราการไหลเท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

5.2.2 คอลัมน์ Prevail C18 ( $4.6 \times 250$  มิลลิเมตร) ของบริษัท Alltech ขนาดรูพรุน (pore size) 110 อังสตรอม ขนาด particle 5 ไมโครเมตร โดยทำการเตรียม สารมาตรฐานออร์โอบาซิดิน เอ ที่ความเข้มข้นต่างกันตั้งแต่ 0-100 มก./มล. และสารสกัดจากทั้ง 4 สายพันธุ์ โดย

5.2.2.1 ละลายในเมทานอล ใช้ UV detector ที่ความยาวคลื่น 258 นาโนเมตร โดยมีอะซีโตนไตร และน้ำเป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราส่วน 7.5:2.5 ตามลำดับ อัตราการไหลเท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

5.2.2.1 ละลายในอะซีโตนไตร ใช้ UV detector ที่ความยาวคลื่น 216 นาโนเมตร โดยมีอะซีโตนไตร และน้ำเป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราส่วน 7.5:2.5 ตามลำดับ อัตราการไหลเท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 1. การคัดแยก *A. pullulans*

ทำการเก็บตัวอย่างและคัดแยก *A. pullulans* โดยเก็บตัวอย่างจากสถานที่ต่างๆในเขตกรุงเทพมหานคร และปริมณฑล จากพื้นหรือผนังห้องน้ำ และ พื้นผิวของสุขภัณฑ์ ผลการทดลองสามารถคัดแยกเชื้อราที่มีลักษณะคล้าย *A. pullulans* ได้ทั้งหมด 10 ไอโซเลต (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 สถานที่เก็บตัวอย่างและผลการคัดแยก *A. pullulans*

สถานที่เก็บตัวอย่าง	เชื้อจุลินทรีย์ที่พบ	ไอโซเลต ที่ได้
ห้องน้ำสาธารณะ สวนจตุจักร กรุงเทพฯ	เชื้อราเส้นใยสีดำ เส้นใยสีเขียว เส้นใยสีขาว และแบคทีเรีย	-
ห้องน้ำสาธารณะ สยามแสควร์ กรุงเทพฯ	เชื้อราเส้นใยสีดำ เส้นใยสีเขียว เส้นใยสีขาว ยีสต์ และแบคทีเรีย	-
ห้องน้ำในที่พักอาศัย เขตคลองเตย กรุงเทพฯ	เชื้อราเส้นใยสีเขียว เส้นใยสีขาว แบคทีเรียและยีสต์	KT1
ห้องน้ำในที่พักอาศัย เขตบางมด กรุงเทพฯ	เชื้อราเส้นใยสีดำ เส้นใยสีเขียว เส้นใยสีขาวและยีสต์	BM1
ห้องน้ำสาธารณะ มหาวิทยาลัยรังสิต อ.เมือง จ.ปทุมธานี	เชื้อราเส้นใยสีดำ เส้นใยสีเขียว เส้นใยสีขาว และแบคทีเรีย	-
ห้องน้ำสาธารณะ อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี	เชื้อราเส้นใยสีดำและ เส้นใยสีเขียว	-
ห้องน้ำในที่พักอาศัย เขตบางรัก กรุงเทพฯ	เชื้อราเส้นใยสีดำ เส้นใยสีเขียว เส้นใยสีขาว และแบคทีเรีย	-
ห้องน้ำในที่พักอาศัย เขตคลองตัน กรุงเทพฯ	เชื้อราเส้นใยสีเขียว เส้นใยสีขาว และแบคทีเรีย	-

ตารางที่ 2 (ต่อ)

สถานที่เก็บตัวอย่าง	เชื้อจุลินทรีย์ที่พบ	ไอโซเลต ที่ได้
ห้องนํ้ามหาวิทยาลัยรามคำแหง เขตบางกะปิ กรุงเทพฯ	เชื้อราเส้นใยสีดำ เส้นใยสีเขียว เส้นใยสีขาว และแบคทีเรีย	-
ห้องนํ้าจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ	เชื้อราเส้นใยสีดำ เส้นใยสีเขียว เส้นใยสีขาว แบคทีเรียและยีสต์	TB1 PH1 JP1
ห้องนํ้ามหาวิทยาลัยศิลปากร อ.เมือง จ.นครปฐม	เชื้อราเส้นใยสีดำ เส้นใยสีเขียว เส้นใยสีขาว และแบคทีเรีย	-
ห้องนํ้า โรงเรียนมหิดลวิทยานุสรณ์ อ.พุทธมณฑล จ.นครปฐม	เชื้อราเส้นใยสีดำ เส้นใยสีเขียว เส้นใยสีขาว และแบคทีเรีย	-
ห้องนํ้าสาธารณะ บิมน้ำมัน บางจาก เขตตลิ่งชัน กรุงเทพฯ	เชื้อราเส้นใยสีดำ เส้นใยสีเขียว เส้นใยสีขาว และแบคทีเรีย	-
ห้องนํ้าที่פקอาศัย อนุสาวรีย์ชัยสมรภูมิ กรุงเทพฯ	เชื้อราเส้นใยสีดำ เส้นใยสีเขียว เส้นใยสีขาว แบคทีเรียและยีสต์	VM1
ห้องนํ้าสาธารณะ บิมน้ำมัน ปตท. อ.ดอนตูม จ.นครปฐม	เชื้อราเส้นใยสีดำ เส้นใยสีเขียว เส้นใยสีขาว และแบคทีเรีย	-
ห้องนํ้าสาธารณะ บิมน้ำมัน ปตท. อ.นครชัยศรี จ.นครปฐม	เชื้อราเส้นใยสีดำ เส้นใยสีเขียว เส้นใยสีขาว และแบคทีเรีย	-
ห้องนํ้าสาธารณะ วัดกุณนที่รุทธาราม เขตห้วยขวาง กรุงเทพฯ	เชื้อราเส้นใยสีดำ เส้นใยสีเขียว เส้นใยสีขาว แบคทีเรียและยีสต์	HKW1 HKW2
ห้องนํ้าสาธารณะ ตลาดสดห้วยขวาง เขตห้วยขวาง กรุงเทพฯ	เชื้อราเส้นใยสีดำ เส้นใยสีเขียว เส้นใยสีขาว แบคทีเรียและยีสต์	HKW3
ห้องนํ้าที่פקอาศัย เขตห้วยขวาง กรุงเทพฯ	เชื้อราเส้นใยสีดำ เส้นใยสีเขียว เส้นใยสีขาว แบคทีเรียและยีสต์	HKW4

สถานที่เก็บตัวอย่างที่สามารถคัดแยกเชื้อราที่คาดว่าเป็ *A. pullulans* ได้ เป็นห้องน้ำที่มีความชื้นและพื้นผิวที่เก็บตัวอย่างมีลักษณะเปียกชื้นตลอดเวลา (รูปที่ 5-13) โดยพบเชื้อดังกล่าวขึ้นเป็นโคโลนีสีดำบนจานอาหารที่ใช้คัดแยก เจริญร่วมกับเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดได้แก่ เชื้อราเส้นใย สีเขียว เส้นใยสีขาว และเส้นใยสีดำ รวมถึงเชื้อแบคทีเรีย

ส่วนสถานที่ที่ไม่สามารถคัดแยก *A. pullulans* ได้ บางแห่งเป็นห้องน้ำที่มีความชื้นค่อนข้างต่ำ มีพื้นผิวแห้ง หรือมีการทำความสะอาดบ่อยครั้ง พบเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อราเส้นใย ทั้งเชื้อราที่มีเส้นใยสีเขียว เส้นใยสีขาว และเส้นใยสีดำ รวมถึงพบเชื้อแบคทีเรียจำนวนหนึ่ง



รูปที่ 5 ห้องน้ำที่พักอาศัย เขตคลองเตย กรุงเทพมหานคร สถานที่คัดแยกเชื้อราไอโซเลต KT1 บริเวณที่เก็บตัวอย่างคือช่องระบายน้ำของอ่างล้างมือ (ลูกศรชี้)



รูปที่ 6 ห้องน้ำที่พักอาศัย เขตบางมด กรุงเทพมหานคร สถานที่คัดแยกเชื้อราไอโซเลต BM1 บริเวณที่เก็บตัวอย่างคือขอบกระเบื้องปูพื้นห้องน้ำ (ลูกศรชี้)



รูปที่ 7 ห้องน้ำตึกแถบ นีละนิธิ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร สถานที่คัดแยกเชื้อราไอโซเลต TB1 บริเวณที่เก็บตัวอย่างคือ ขอบกระเบื้องปูผนังห้องน้ำ (ลูกศรชี้)



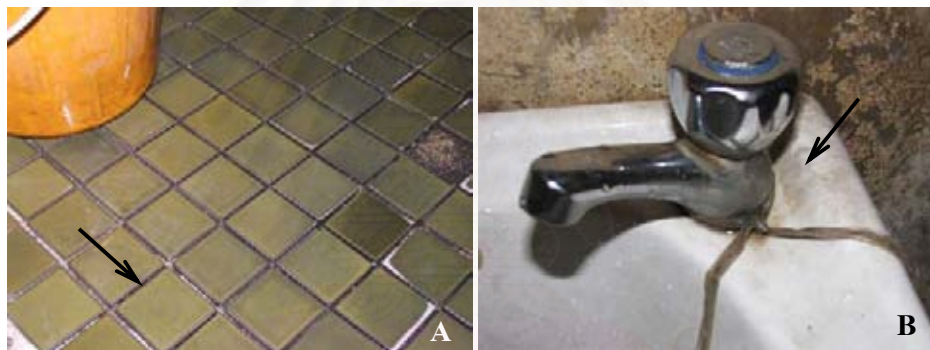
รูปที่ 8 ห้องน้ำตึกฟิสิกส์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร สถานที่คัดแยกเชื้อราไอโซเลต PH1 บริเวณที่เก็บตัวอย่างคือ ช่องระบายน้ำบนอ่างล้างมือ (ลูกศรชี้)



รูปที่ 9 ห้องน้ำตึกจุลจักรพงษ์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร สถานที่คัดแยกเชื้อราไอโซเลต JP1 บริเวณที่เก็บตัวอย่างคือ ขอบระหว่างกระเบื้องปูผนัง (ลูกศรชี้)



รูปที่ 10 ห้องน้ำที่พักอาศัย อนุสาวรีย์ชัยสมรภูมิ กรุงเทพมหานคร สถานที่คัดแยกเชื้อรา  
ไอโซเลต VM1 บริเวณที่เก็บตัวอย่างคือ ขอบกระเบื้องฝาผนังห้องน้ำ (ลูกศรชี้)



รูปที่ 11 ห้องน้ำวัดกุนนทีรุทธาราม เขตห้วยขวาง กรุงเทพมหานคร สถานที่คัดแยกเชื้อราไอโซเลต  
HKW1 และ HKW2 บริเวณที่เก็บตัวอย่างคือ พื้นห้องน้ำ (A) ขอบระหว่างกระเบื้องปูพื้น (ลูกศรชี้)  
ใต้เชื้อราไอโซเลต HKW1 และ อ่างล้างมือ (B) บริเวณใกล้ก๊อกน้ำ(ลูกศรชี้) ใต้เชื้อราไอโซเลต  
HKW2



รูปที่ 12 ตลาดสดห้วยขวาง เขตห้วยขวาง กรุงเทพมหานคร สถานที่คัดแยกเชื้อราไอโซเลต  
HKW3 บริเวณที่เก็บตัวอย่างคือ บริเวณช่องระบายน้ำอ่างล้างมือ (ลูกศรชี้)





รูปที่ 13 ห้องน้ำที่พักอาศัย เขตห้วยขวาง กรุงเทพมหานคร สถานที่คัดแยกเชื้อราไอโซเลต HKW4 บริเวณที่เก็บตัวอย่างคือ บริเวณกระเบื้องปูฝาผนังใกล้อ่างล้างมือ (ลูกศรชี้)

## 2. การจัดจำแนก *A. pullulans*

### 2.1 การจัดจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากการเลี้ยงเชื้อราทั้ง 10 ไอโซเลต ที่คัดแยกได้บนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารกึ่งแข็งสูตร MEA เป็นเวลา 7 วัน และเตรียมสไลด์ของเชื้อ ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร YMB เป็นเวลา 7 วัน เพื่อสังเกตรูปร่างและลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (รูปที่ 14-23) พบว่าแต่ละไอโซเลตมีลักษณะโคโลนี และรูปร่างลักษณะภายใต้กล้องดังนี้

ลักษณะโคโลนีของเชื้อราไอโซเลต KT1 (รูปที่ 14A) โคโลนีสีครีมอมชมพู และเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้มและเขียวเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้มจนเกือบดำเมื่อเลี้ยง เป็นเวลา 14 วันขึ้นไป ปรากฏเส้นใยเป็นเส้นสั้นๆรอบโคโลนีชัดเจน ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบเส้นใยเทียมขนาดสั้นๆ บลาสโตสปอร์ เซลล์พองและมีเม็ดสีภายในเซลล์ โคโคนีเดียวทุกชนิดอยู่ที่ปลายของเส้นใยเทียม และ budding cell (รูปที่ 14B-E)

ลักษณะโคโลนีของเชื้อราไอโซเลต BMI (รูปที่ 15A) โคโลนีสีครีมอมชมพู และเปลี่ยนเป็นสีเหลือง เหลืองเข้ม และเขียว เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้มจนเกือบดำเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 14 วันขึ้นไป ปรากฏเส้นใยสั้นๆรอบโคโลนีชัดเจน ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบเส้นใยเทียม โคโคนีเดียวทุกชนิดอยู่ที่ปลายของเส้นใยเทียม เซลล์พอง คลาไมโดสปอร์ คลาไมโคโคนีเดียว และบลาสโตสปอร์ (รูปที่ 15B-F)

ลักษณะโคโลนีของเชื้อราไอโซเลต TBI (รูปที่ 16A) โคโลนีเป็นสีครีมอมชมพูในการเพาะเลี้ยง 7 วันแรก และเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้มและน้ำตาลอ่อนเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 14 วันขึ้นไป ปรากฏเส้นใยสั้นๆรอบโคโลนีชัดเจน ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบเซลล์พองที่ปลายเส้นใย บลาสโตสปอร์ เส้นใยเทียม เส้นใย โคโคนีเดียวทุกชนิดที่ติดอยู่ที่ปลาย และด้านข้างของเส้นใย และ budding cell (รูปที่ 16B-E)

ลักษณะโคโลนีของเชื้อราไอโซเลต PH1 (รูปที่ 17A) โคโลนีเป็นสีครีมอมชมพูในการเพาะเลี้ยง 7 วันแรก และเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้มและน้ำตาลอ่อนเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 14 วันขึ้นไป ปรากฏเส้นใยสั้นๆรอบโคโลนีชัดเจน ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบ budding cell เซลล์ฟอง เส้นใย เส้นใยเทียม และ บลาสโตสปอร์ (รูปที่ 17B-F)

ลักษณะโคโลนีของเชื้อราไอโซเลต JP1 (รูปที่ 18A) โคโลนีเป็นสีครีมอมชมพูในการเพาะเลี้ยง 7 วันแรก และเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้มและน้ำตาลอ่อนเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 14 วันขึ้นไป ปรากฏเส้นใยสั้นๆรอบโคโลนีชัดเจน ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบเซลล์ฟอง budding cell บลาสโตสปอร์ เส้นใยเทียม และคลาไมโดสปอร์ (รูปที่ 18B-E)

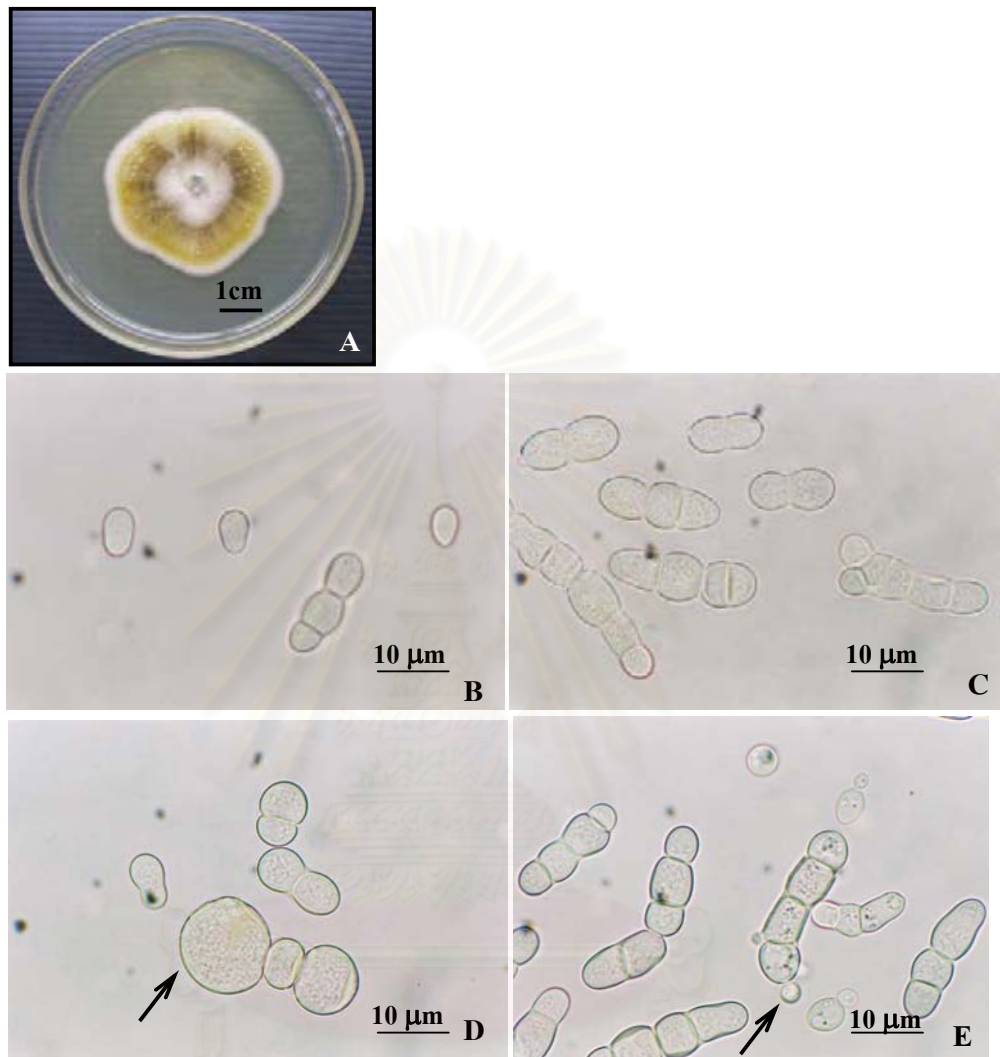
ลักษณะโคโลนีของเชื้อราไอโซเลต VM1 (รูปที่ 19A) โคโลนีสีครีมอมชมพูเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วันเมื่อเวลานานขึ้นจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้ม และสีเขียวเข้มในการเพาะเลี้ยงตั้งแต่ 14 วันขึ้นไป ปรากฏเส้นใยสั้นๆรอบโคโลนีชัดเจน ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบเซลล์ฟอง บลาสโตสปอร์ เส้นใยเทียม และคลาไมโดสปอร์ (รูปที่ 19B-E)

ลักษณะโคโลนีของเชื้อราไอโซเลต HKW1 (รูปที่ 20A) โคโลนีสีครีมอมชมพู ไม่เปลี่ยนสีเมื่ออายุมากขึ้น ปรากฏเส้นใยสั้นๆรอบโคโลนีชัดเจน ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบเส้นใยเทียม บลาสโตสปอร์ เซลล์ฟอง คลาไมโดสปอร์ และ budding cell (รูปที่ 20B-E)

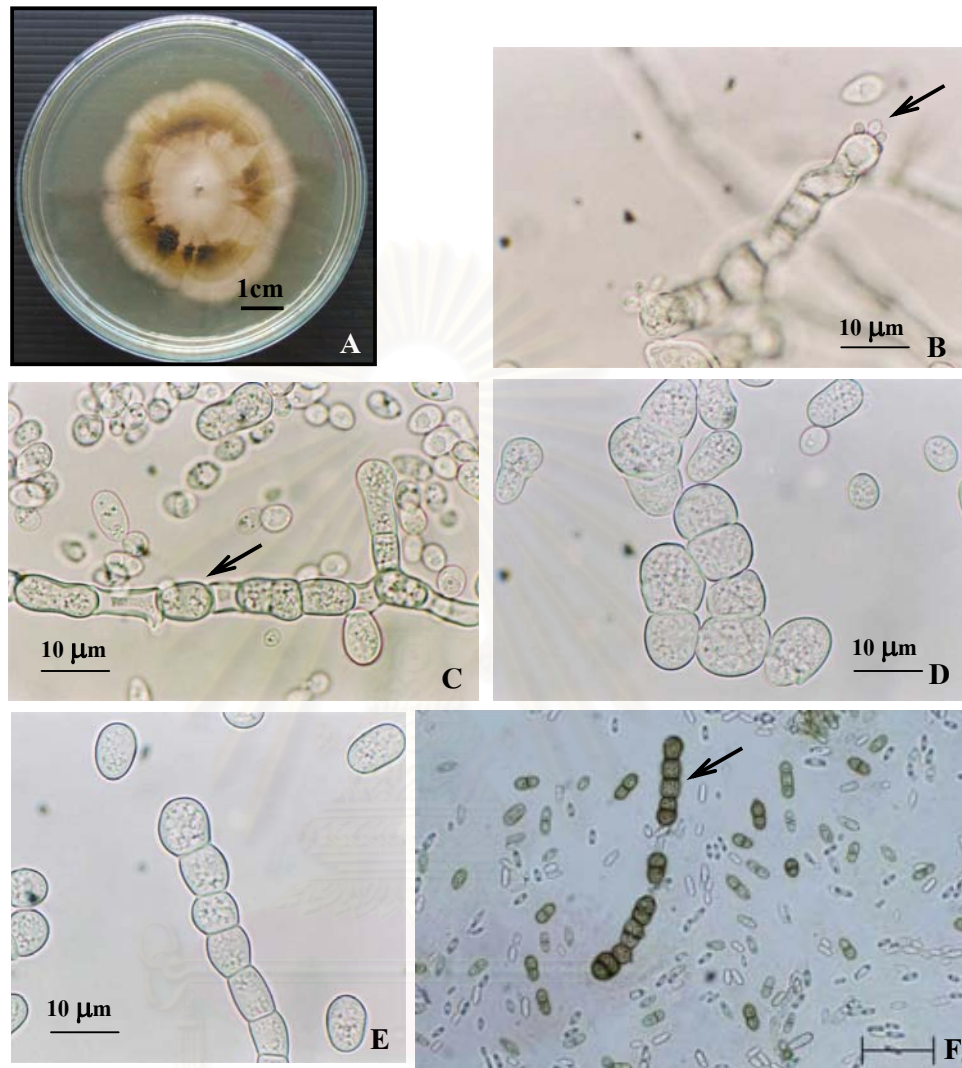
ลักษณะโคโลนีของเชื้อราไอโซเลต HKW2 (รูปที่ 21A) โคโลนีสีครีมอมชมพูเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน และมีบางส่วนของโคโลนีเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อนถึงเข้ม เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วันขึ้นไป ปรากฏเส้นใยสั้นๆรอบโคโลนีชัดเจน ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบเส้นใยเทียม เซลล์ฟอง โคนิเดียทุกยวมิตติอยู่ที่ปลายของเส้นใยเทียม บลาสโตสปอร์ และ budding cell (รูปที่ 21B-E)

ลักษณะโคโลนีของเชื้อราไอโซเลต HKW3 (รูปที่ 22A) โคโลนีสีครีมอมชมพูเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน และมีบางส่วนของโคโลนีเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อนถึงเข้ม เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วันขึ้นไป ปรากฏเส้นใยสั้นๆรอบโคโลนีชัดเจน ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบเส้นใยเทียม เซลล์ฟอง budding cell และบลาสโตสปอร์ (รูปที่ 22B-E)

ลักษณะโคโลนีของเชื้อราไอโซเลต HKW4 (รูปที่ 23A) โคโลนีสีครีมอมชมพูเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน และเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วันขึ้นไป โคโลนีบางส่วนเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้ม ปรากฏเส้นใยสั้นๆรอบโคโลนีชัดเจน ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบเส้นใยเทียม โคนิเดียทุกยวมิตติอยู่ที่ปลายของเส้นใยเทียม คลาไมโดสปอร์ บลาสโตสปอร์ และเซลล์ฟอง (รูปที่ 23B-E)

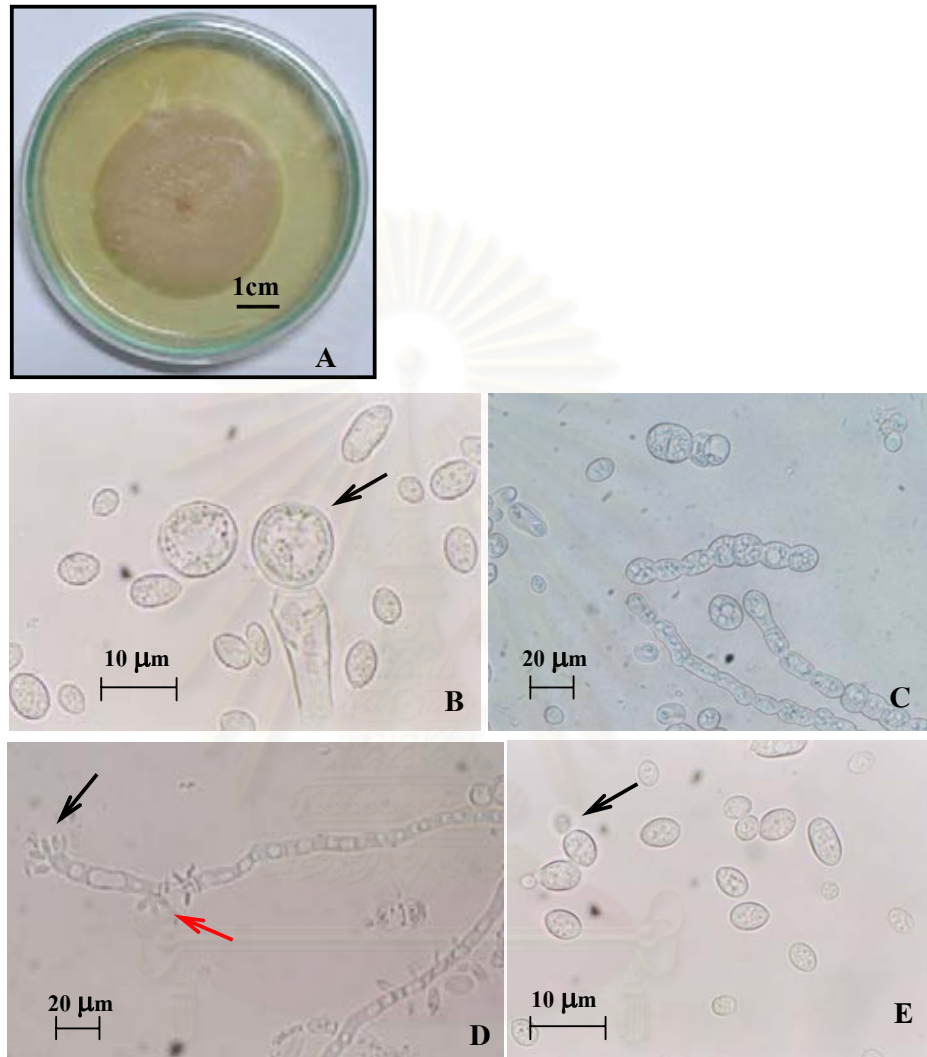


รูปที่ 14 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราไอโซเลต KT1 เมื่อเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง MEA เป็นเวลา 7 วัน (A) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์เมื่อเลี้ยงใน YMB เป็นเวลา 7 วัน พบเส้นใยเทียมขนาดสั้นๆ บลาสโตสปอร์ (B,C) เซลล์พองที่มีเม็ดสีภายในเซลล์ (ลูกศรชี้) (D) โคนิเดียทุกขุมมีติดอยู่ที่ปลายของเส้นใยเทียม (ลูกศรชี้) และเส้นใยเทียม (E)

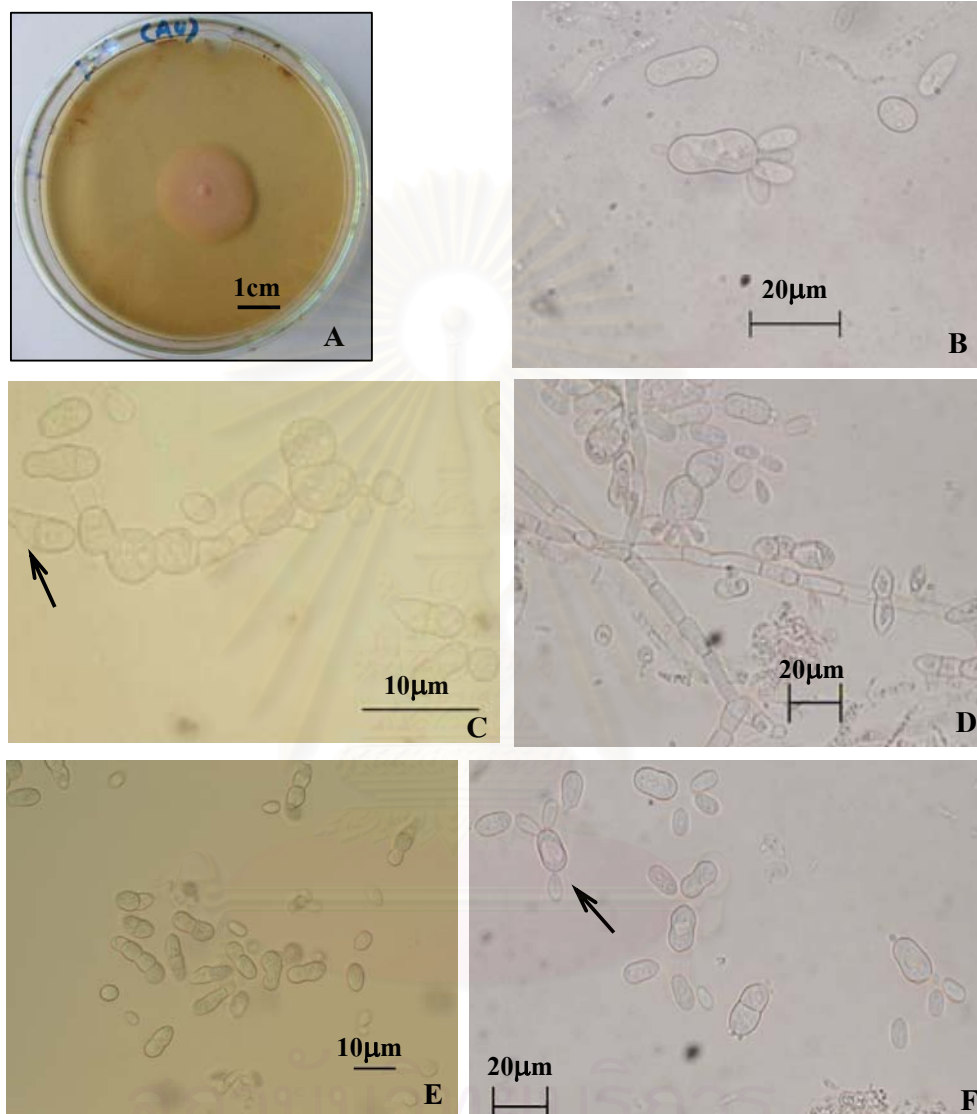


รูปที่ 15 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราไอโซเลต BM1 เมื่อเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง MEA เป็นเวลา 7 วัน (A) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์เมื่อเลี้ยงใน YMB เป็นเวลา 7 วัน พบโคนิเดียที่ปลายเส้นใย (ลูกศรชี้) (B) เส้นใยเทียม และคลาไมโดโคนิเดีย (ลูกศรชี้) (C) เซลล์ฟอง (D) บลาสโตสปอร์และเส้นใยเทียม (E) เส้นใยเทียม และคลาไมโดสปอร์ (ลูกศรชี้) (F)



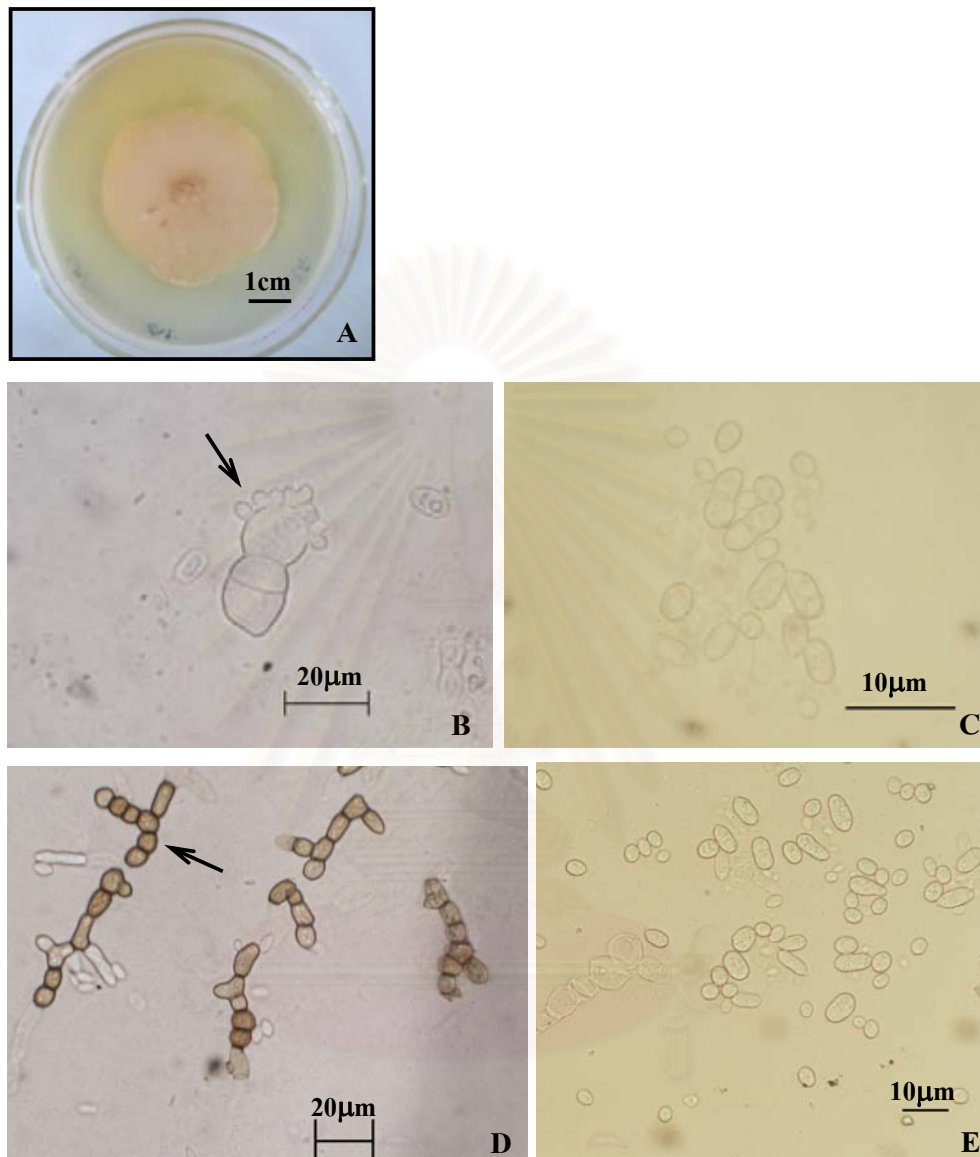


รูปที่ 16 ลักษณะโคโคนีของเชื้อราไอโซเลต TB1 เมื่อเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง MEA เป็นเวลา 7 วัน (A) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์เมื่อเลี้ยงใน YMB เป็นเวลา 7 วัน พบเซลล์ฟองที่ปลายเส้นใย (ลูกศรชี้) และ บลาสโตสปอร์ (B) เส้นใยเทียม (C) เส้นใย โคนิเดียมติดอยู่ที่ปลายของเส้นใย (ลูกศรสีดำ) และ โคนิเดียมติดอยู่ด้านข้างของเส้นใย (ลูกศรสีแดง) (D) บลาสโตสปอร์และ budding cell (ลูกศรชี้) (E)

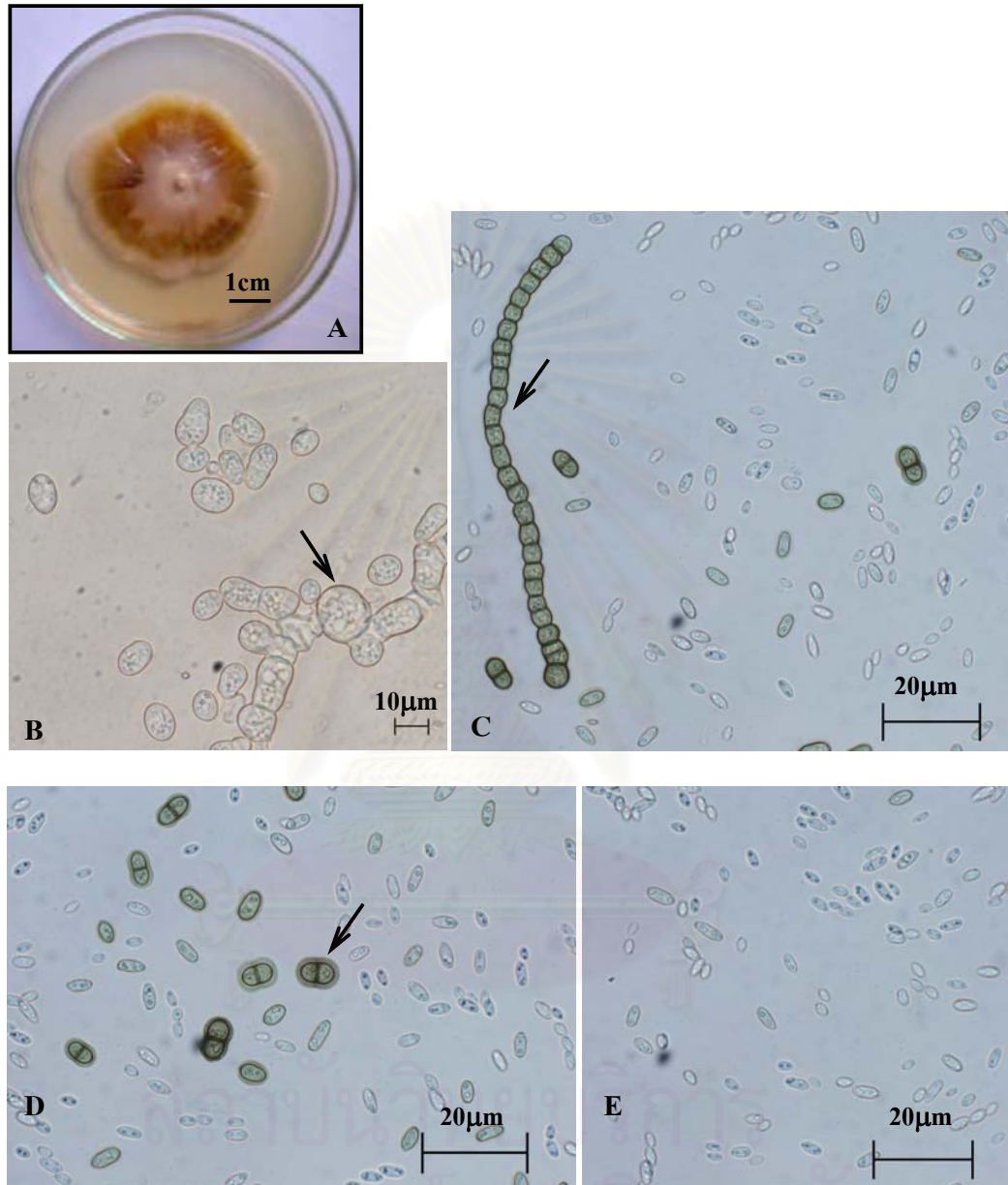


รูปที่ 17 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราไอโซเลต PH1 เมื่อเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง MEA เป็นเวลา 7 วัน (A) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์เมื่อเลี้ยงใน YMB เป็นเวลา 7 วัน พบ budding cell (B) เซลล์พอง และมีการงอกของ germ tube (ลูกศรชี้) (C) เส้นใย (D) โคนิเดีย (E) budding cell (ลูกศรชี้) และ บลาสโตสปอร์ (F)

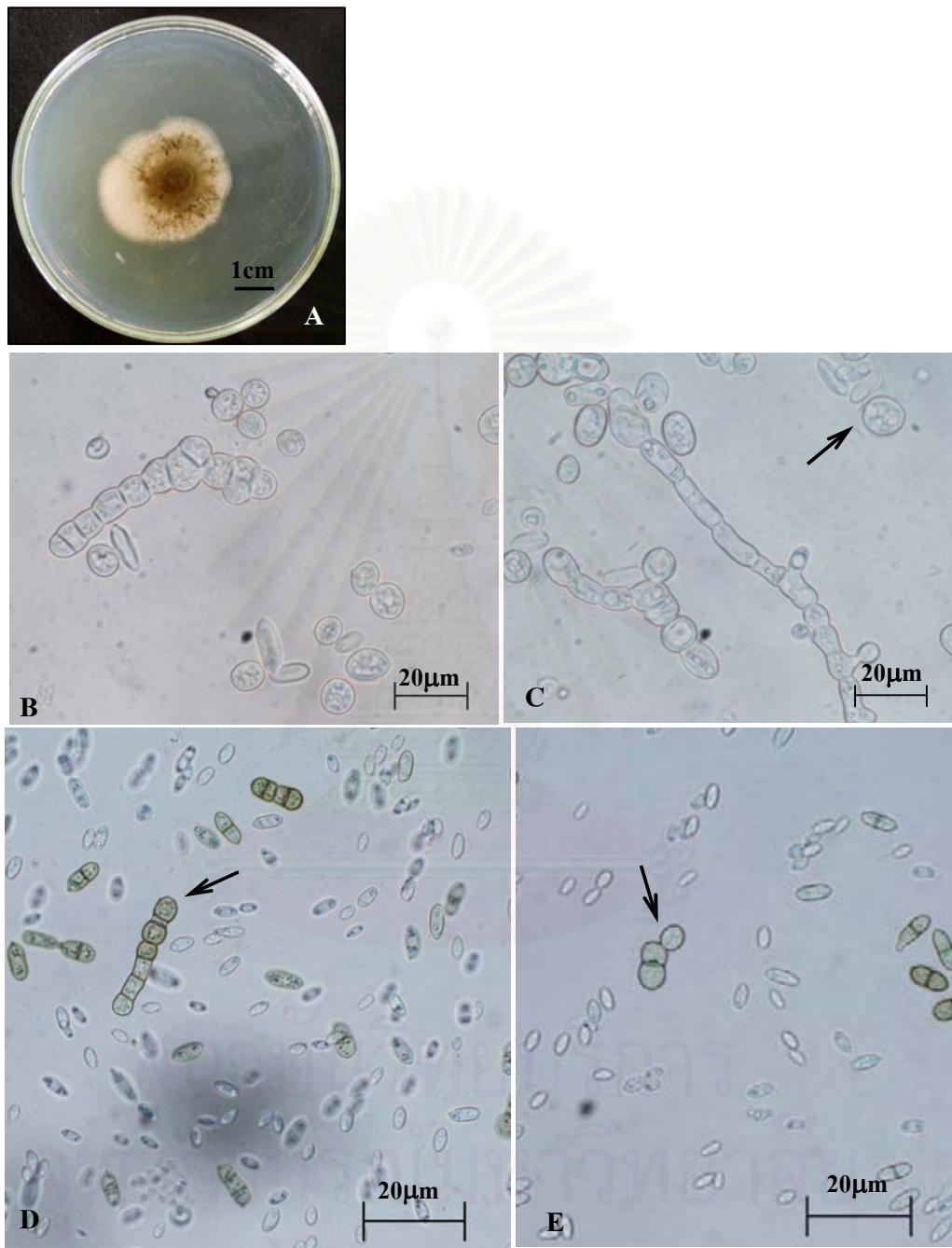




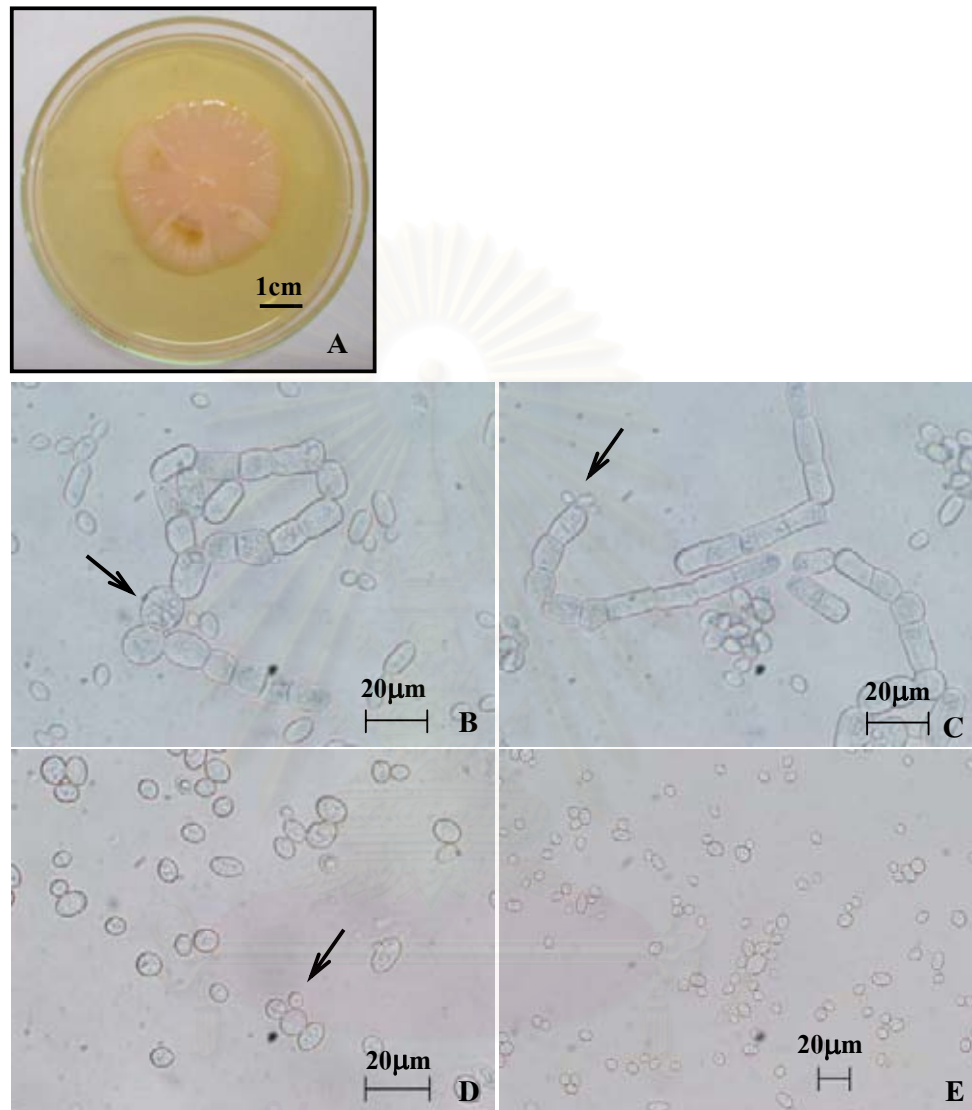
รูปที่ 18 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราไอโซเลต JP1 เมื่อเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง MEA เป็นเวลา 7 วัน (A) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์เมื่อเลี้ยงใน YMB เป็นเวลา 7 วัน พบเซลล์ฟอง และ budding cell (ลูกศรชี้)(B) บลาสโตสปอร์ (C) คลาไมโดสปอร์ (ลูกศรชี้) และเส้นใยเทียม (D) บลาสโตสปอร์ (E)



รูปที่ 19 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราไอโซเลต VM1 เมื่อเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง MEA เป็นเวลา 7 วัน (A) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์เมื่อเลี้ยงใน YMB เป็นเวลา 7 วัน พบเชดล์ฟอง (ลูกศรชี้) และ บลาสโตสปอร์ (B) เส้นใยเทียม (ลูกศรชี้) และคลาไมโดสปอร์ (C) คลาไมโดสปอร์ (ลูกศรชี้) (D) บลาสโตสปอร์ (E)

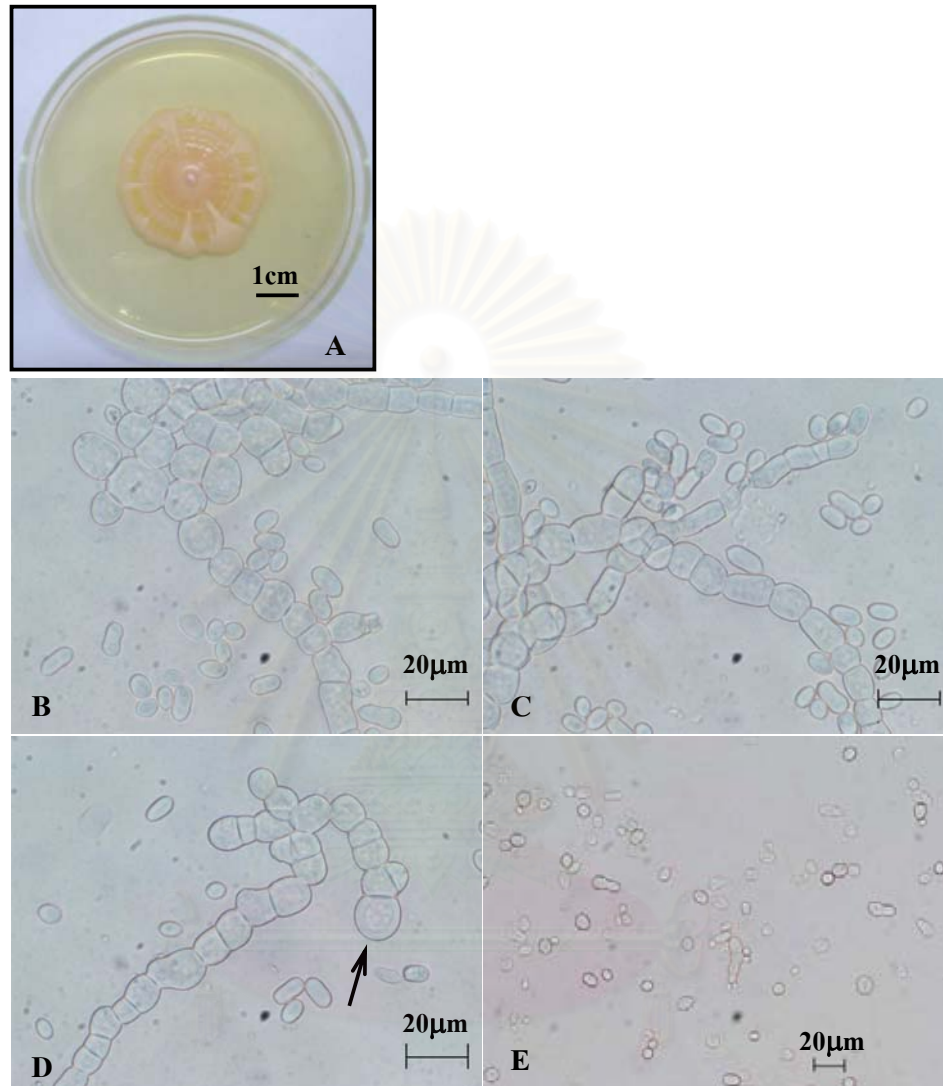


รูปที่ 20 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราไอโซเลต HKW1 เมื่อเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง MEA เป็นเวลา 7 วัน (A) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์เมื่อเลี้ยงใน YMB เป็นเวลา 7 วัน พบเส้นใยเทียม (B) เซลล์ฟอง (ลูกศรชี้) และเส้นใย (C) เส้นใยเทียม คลาไมโดสปอร์ (ลูกศรชี้) และโคนิเดีย (D) budding cell (ลูกศรชี้) โคนิเดีย และคลาไมโดสปอร์ (E)

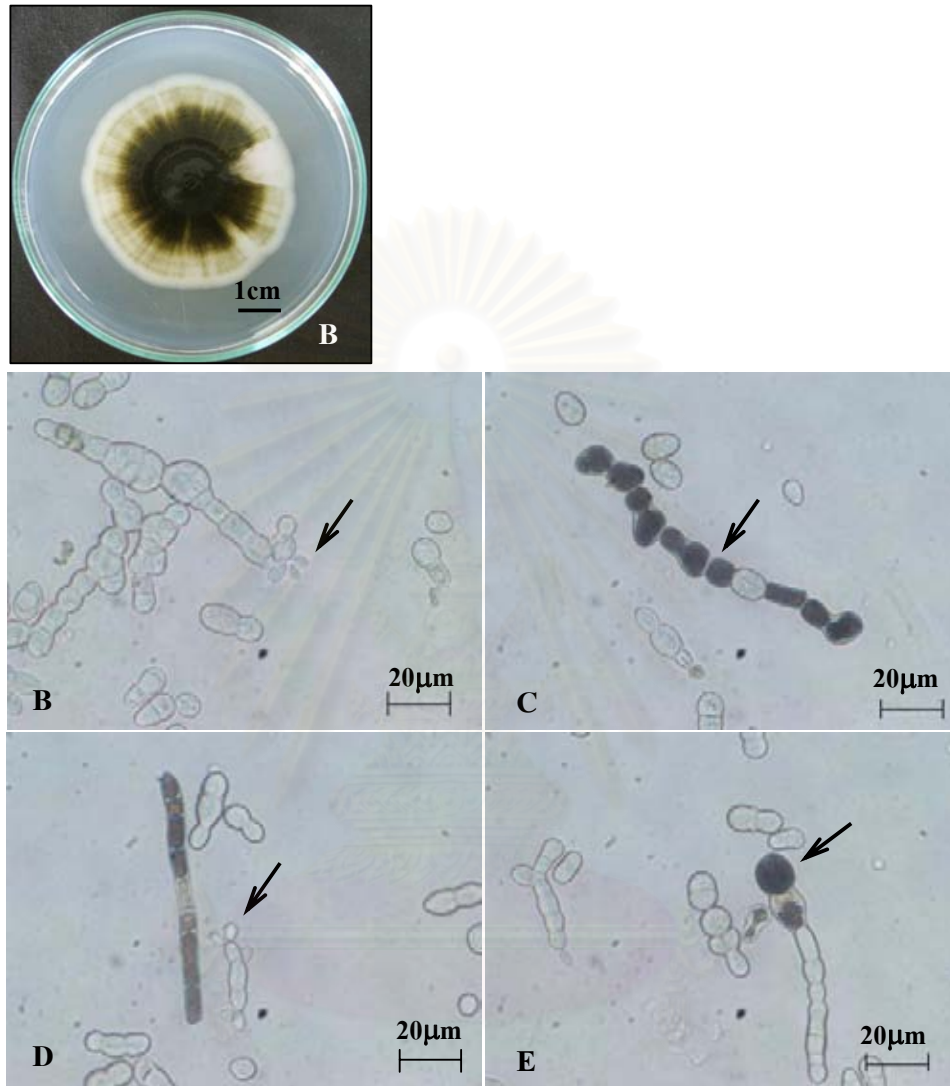


รูปที่ 21 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราไอโซเลต HKW2 เมื่อเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง MEA เป็นเวลา 7 วัน (A) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์เมื่อเลี้ยงใน YMB เป็นเวลา 7 วัน พบเส้นใยเทียม และเซลล์ฟอง (ลูกศรชี้) (B) เส้นใยเทียม และโคนิเดียติดอยู่ที่ปลายเส้นใยเทียม (ลูกศรชี้) (C) budding cell (ลูกศรชี้) (D) บลาสโตสปอร์ (E)





รูปที่ 22 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราไอโซเลต HKW3 เมื่อเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง MEA เป็นเวลา 7 วัน (A) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์เมื่อเลี้ยงใน YMB เป็นเวลา 7 วัน พบเส้นใยเทียม และเซลล์ฟอง (B) เส้นใยเทียม และ โคินเดีย (C) เส้นใยเทียม และเซลล์ฟองที่ปลายเส้นใยเทียม (ลูกครี) (D) บลาสโตสปอร์ (E)

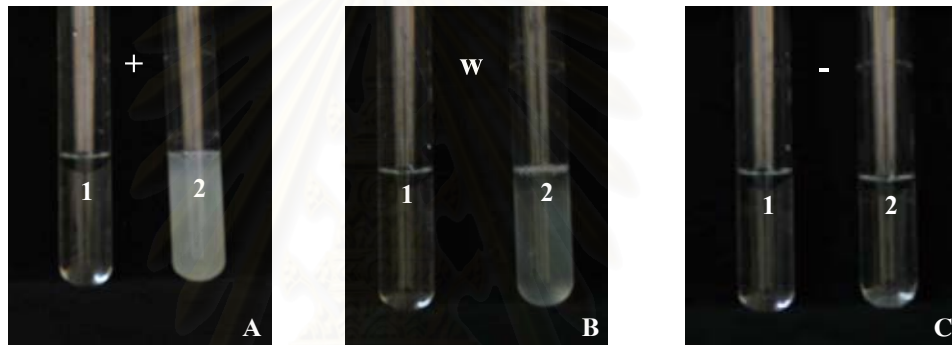


รูปที่ 23 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราไอโซเลต HKW4 เมื่อเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง MEA เป็นเวลา 7 วัน (A) ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์เมื่อเลี้ยงใน YMB เป็นเวลา 7 วัน พบเส้นใยเทียม บลาสโตสปอร์ เซลล์ฟอง และโคนิเดียติดอยู่ที่ปลายของเส้นใยเทียม (ลูกศรชี้) (B) เส้นใยเทียม และคลาไมโดสปอร์ (ลูกศรชี้) (C) เส้นใยเทียม คลาไมโดสปอร์ และโคนิเดียติดอยู่ที่ปลายของเส้นใยเทียม (ลูกศรชี้) (D) คลาไมโดสปอร์ที่ปลายเส้นใยเทียม (ลูกศรชี้) (E)



## 2.2 การจัดจำแนกโดยตรวจสอบความสามารถในการใช้แหล่งอาหารต่างๆ

จากการตรวจสอบความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจนและแหล่งคาร์บอนของเชื้อราทั้ง 10 ไอโซเลต โดยการประมาณระดับความขุ่นของเชื้อที่เจริญในหลอดทดลองด้วยสายตา (รูปที่ 24) แหล่งคาร์บอนที่เชื้อราทั้ง 10 ไอโซเลต ไม่สามารถใช้ได้คือ อัลฟาเซลลูโลส ( $\alpha$ -cellulose) เอทานอล และ เมททานอล (ตารางที่ 3) จากการตรวจสอบการใช้แหล่งไนโตรเจนพบว่าทั้ง 10 ไอโซเลต สามารถใช้แหล่งไนโตรเจนทุกชนิดที่ใช้ทดสอบได้ค่อนข้างดี (ตารางที่ 4)



รูปที่ 24 การเปรียบเทียบความสามารถในการใช้แหล่งอาหารของเชื้อ โดยการประมาณความขุ่นของเชื้อที่เจริญในหลอดตัวอย่าง (หมายเลข 2) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (หมายเลข 1) โดยกำหนดเครื่องหมาย + แทนการใช้แหล่งอาหารได้และเชื้อมีการเจริญดี (รูป A) เครื่องหมาย w แทนการใช้แหล่งอาหารได้น้อยและเชื้อมีการเจริญน้อย (รูป B) และเครื่องหมาย - แทนการใช้แหล่งอาหารไม่ได้และเชื้อไม่มีการเจริญ (รูป C) จากการสังเกตระดับความขุ่นด้วยสายตา

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 ความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ของเชื้อราที่แยกได้ทั้ง 10 ไอโซเลต

แหล่งคาร์บอน	ไอโซเลต											
	KT 1	BM 1	TB 1	PH 1	JP 1	VM 1	HKW 1	HKW 2	HKW 3	HKW 4	NRRL Y -2311-1*	NRRL Y-7469*
D-arabinose	+	w	w	w	+	+	+	w	+	w	nd	nd
L-arabinose	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	nd	nd
D-cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$\alpha$ -Cellulose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ethanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd	nd
D-fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-galactose	w	w	w	+	+	+	+	w	w	+	+	+
$\beta$ -D-glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycerol	+	w	w	+	+	w	w	+	+	+	w	w
$\beta$ -lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltotriose	+	+	w	+	w	+	+	w	w	+	nd	nd
Mannitol	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nd	nd
D-melezitose.2H <sub>2</sub> O	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nd	nd
Methanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd	nd
Methyl- $\alpha$ -D-glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-salicin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-sorbose	w	w	w	w	+	+	+	+	+	+	nd	nd
Starch (soluble)	+	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+
D-sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-trehalose.2H <sub>2</sub> O	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-xylose	+	+	w	w	+	+	+	+	+	+	+	+

+ = สามารถใช้แหล่งอาหารได้ - = ไม่สามารถใช้แหล่งอาหารได้ w = สามารถใช้แหล่งอาหารได้น้อย

\* = สายพันธุ์มาตรฐาน *A. pullulans* NRRL Y-2311-1 และ *A. pullulans* NRRL Y-7469 (Sehanat Prasongsuk และคณะ, 2005)

ตารางที่ 4 ความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆของเชื้อราที่แยกได้ทั้ง 10 ไอโซเลต

แหล่ง ไนโตรเจน	ไอโซเลต											
	KT 1	BM 1	TB 1	PH 1	JP 1	VM 1	HKW 1	HKW 2	HKW 3	HKW 4	NRRL Y- 2311-1*	NRRL Y- 7469*
Ammonium acetate	w	w	+	+	+	w	w	+	+	+	nd	nd
Ammonium chloride	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nd	nd
Ammonium nitrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nd	nd
Ammonium sulfate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nd	nd
L-glycine	+	+	w	w	+	+	+	+	+	+	+	+
L-asparagine. H <sub>2</sub> O	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Lysine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sodium nitrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Urea	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nd	nd

+ = สามารถใช้แหล่งอาหารได้ - = ไม่สามารถใช้แหล่งอาหารได้ w = สามารถใช้แหล่งอาหารได้น้อย

\* = สายพันธุ์มาตรฐาน *A. pullulans* NRRL Y-2311-1 และ *A. pullulans* NRRL Y-7469 (Sehanat Prasongsuk และคณะ, 2005)

nd = no data

### 2.3 การตรวจสอบการสร้างเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (Exopolysaccharide, EPS)

จากการนำเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จาก เชื้อราที่แยกได้ทั้ง 10 ไอโซเลต ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโตรสโคปี เปรียบเทียบกับพอลูแลนมาตรฐานจากบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา ผลการตรวจสอบพบหมู่ฟังก์ชันที่สำคัญของ เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ของ เชื้อราทั้ง 10 ไอโซเลต ใกล้เคียงกับพอลูแลนมาตรฐาน ได้แก่ อัลเคน (C-H) หมู่ไฮดรอกซิล (OH) คาร์บอนที่ต่อกับหมู่ไฮดรอกซิล หรือต่อกับคาร์บอนด้วยกัน (C-OH, C-C) และ หมู่

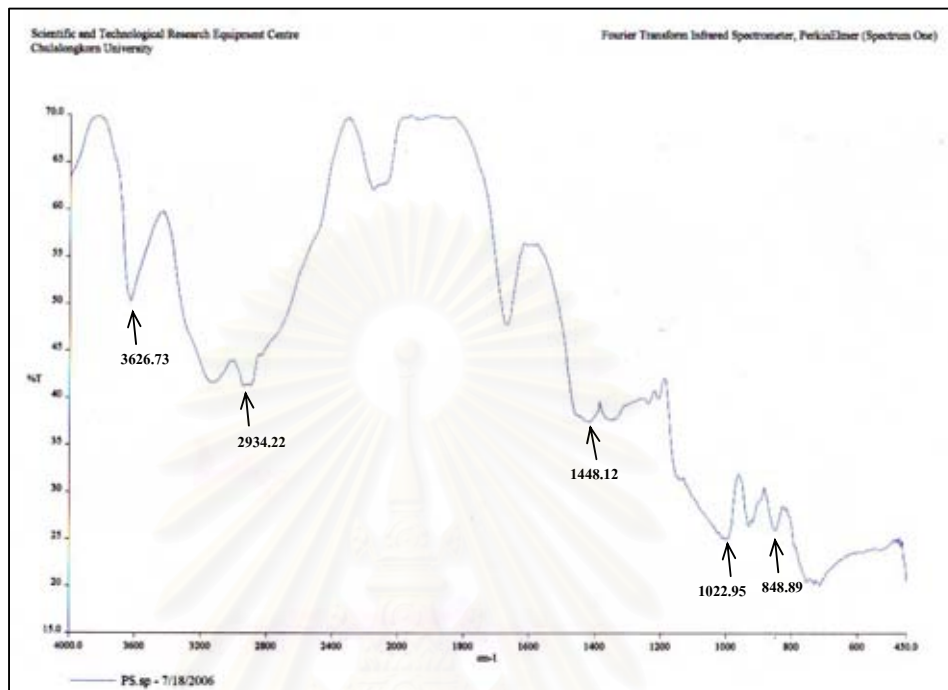
โครงสร้างแบบอัลฟา ( $\alpha$ -configuration) (ตารางที่ 5 และ รูปที่ 25-35) โดยเปรียบเทียบกับความถี่ของหมู่ฟังก์ชันที่มีอ้างอิงไว้ (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 5 ความถี่ช่วงรังสี IR ของหมู่ฟังก์ชันในเอกโซพอลิแซกคาไรด์จากเชื้อราที่แยกได้ทั้ง 10 ไอโซเลต

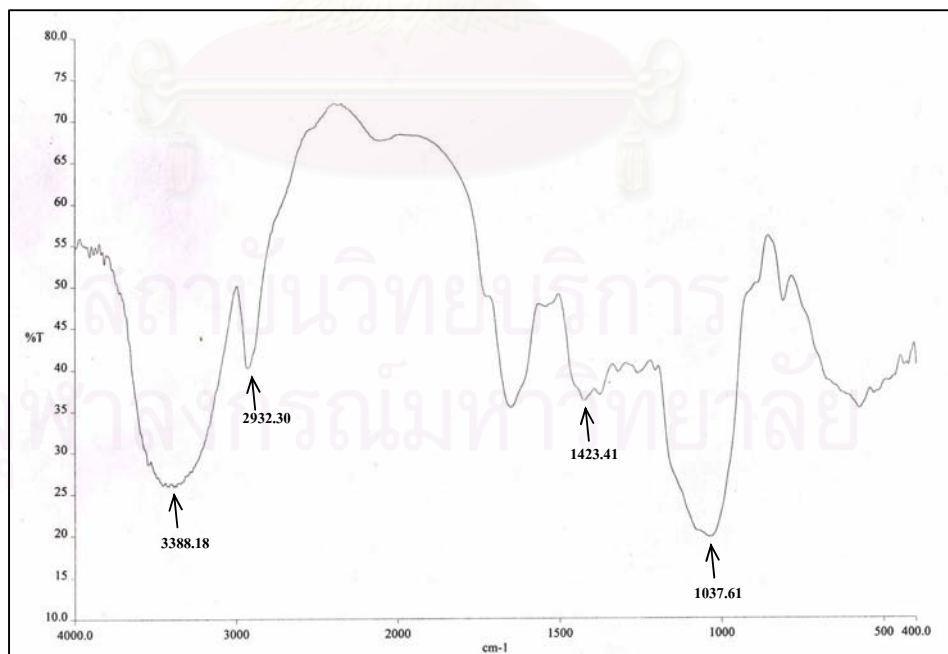
พอลิแซกคาไรด์ ของไอโซเลต	ความถี่ของหมู่ฟังก์ชัน (ซม. <sup>-1</sup> )				
	C-C	C-H	C-O	O-H	$\alpha$ - configuration
พุลลูแลน มาตรฐาน(Sigma)	1448.12	2934.22	1022.95	3626.73	850
KT1	1423.41	2932.30	1037.61	3388.18	-
BM1	1419.87	2929.73	1020.92	3429.30	858.19
TB1	1428.47	2930.84	1021.10	3432.30	849.10
PH1	1427.80	2930.12	1018.84	3426.44	849.69
JP1	1425.08	2931.05	1019.41	3434.84	849.04
VM1	1419.90	2928.45	1018.72	3433.26	852.35
HKW1	1423.75	2925.30	1015.57	3435.11	849.65
HKW2	1421.40	2926.33	1017.34	3433.89	852.43
HKW3	1413.89	2923.73	1022.63	3286.74	848.22
HKW4	1423.76	2931.08	1018.81	3431.21	848.72

ตารางที่ 6 ความถี่ช่วงรังสี IR ที่เป็นลักษณะพิเศษของหมู่ฟังก์ชันบางหมู่ (ที่มา: วิชัย รวีตระกูล และคณะ, 2526)

ความถี่ (ซม. <sup>-1</sup> )	หมู่ฟังก์ชัน
3600	O-H
2950	C-H, CH <sub>2</sub> และ CH <sub>3</sub>
1050	$\overset{\circ}{\text{C}}$ -O
1370-1450	C-C

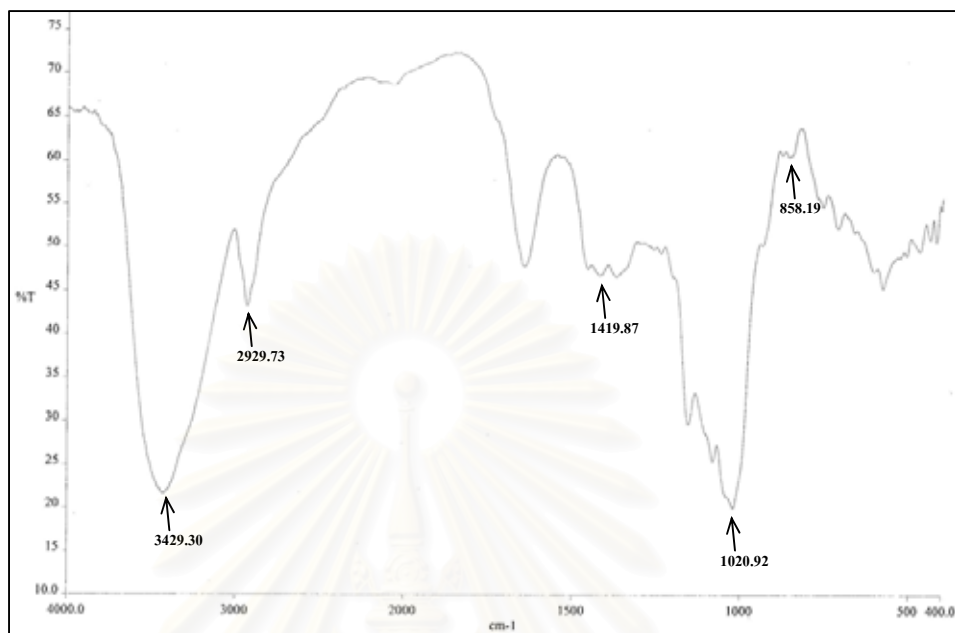


รูปที่ 25 สเปกตรัมของพอลิวูเทนมาตรฐาน (บริษัท Sigma, USA)

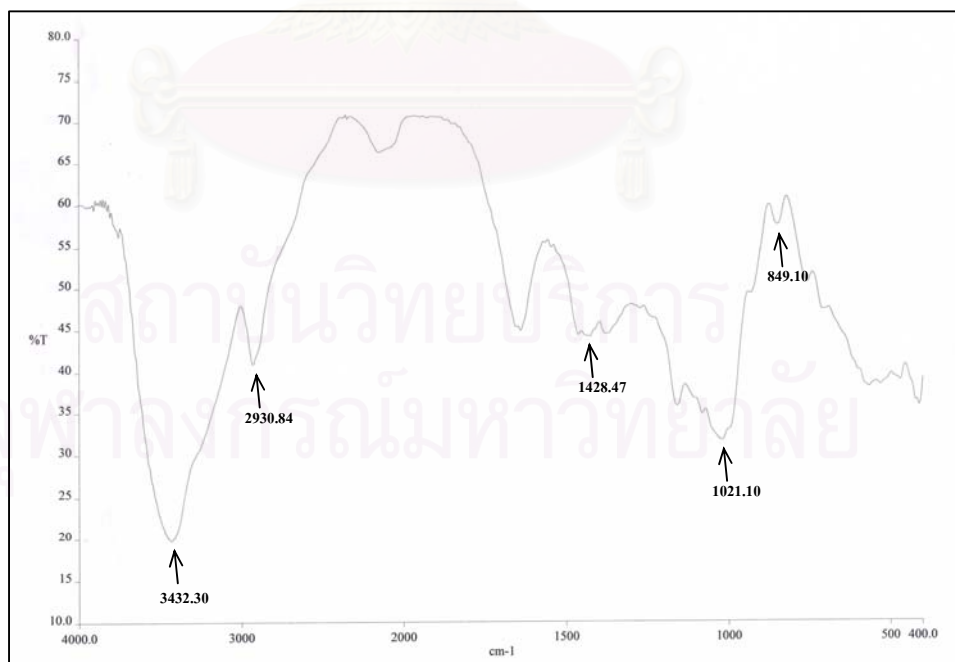


รูปที่ 26 สเปกตรัมของพอลิแซคคาไรด์จากเชื้อราไอโซเลต KT1

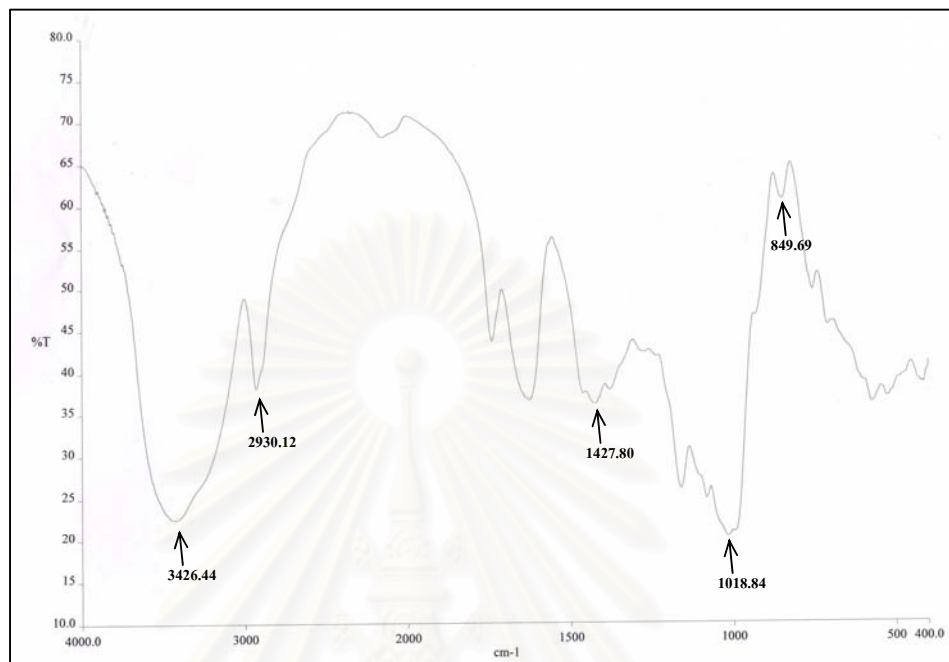




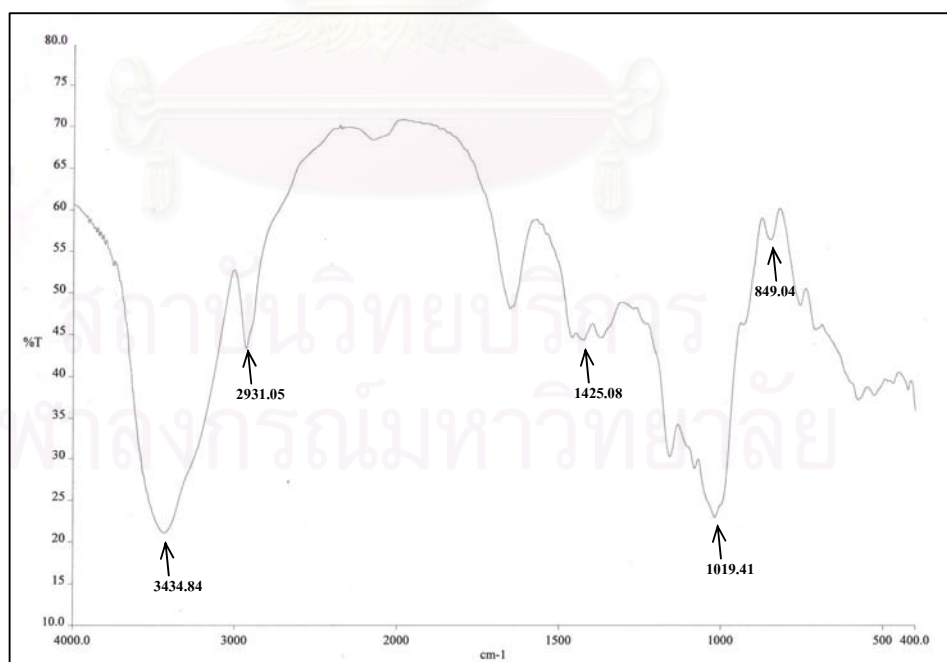
รูปที่ 27 สเปกตรัมของพอลิแซคคาไรด์จากเชื้อราไอโซเลต BM1



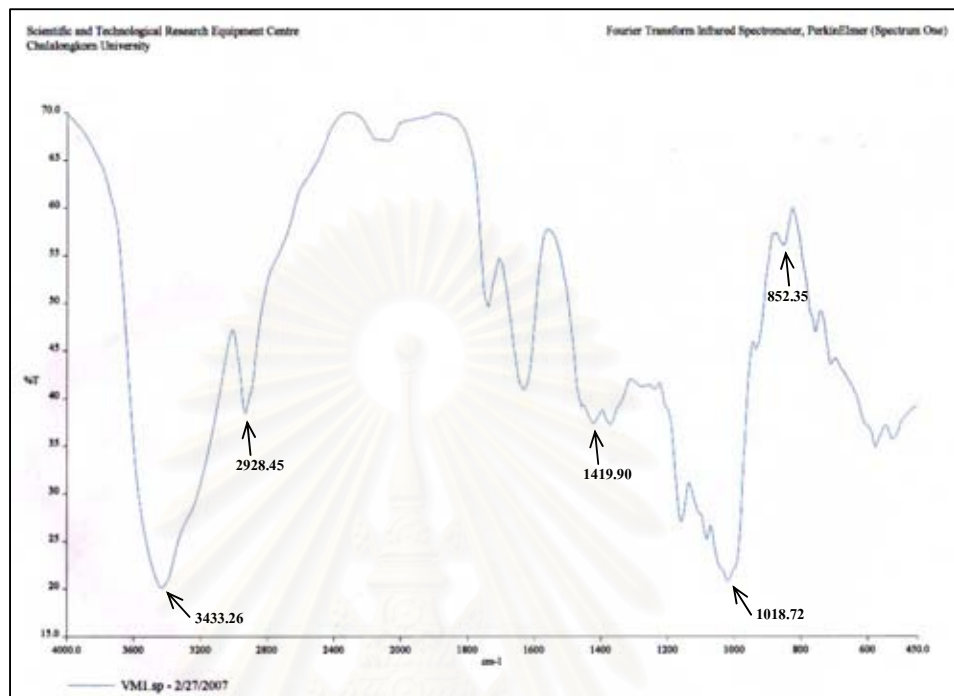
รูปที่ 28 สเปกตรัมของพอลิแซคคาไรด์จากเชื้อราไอโซเลต TB1



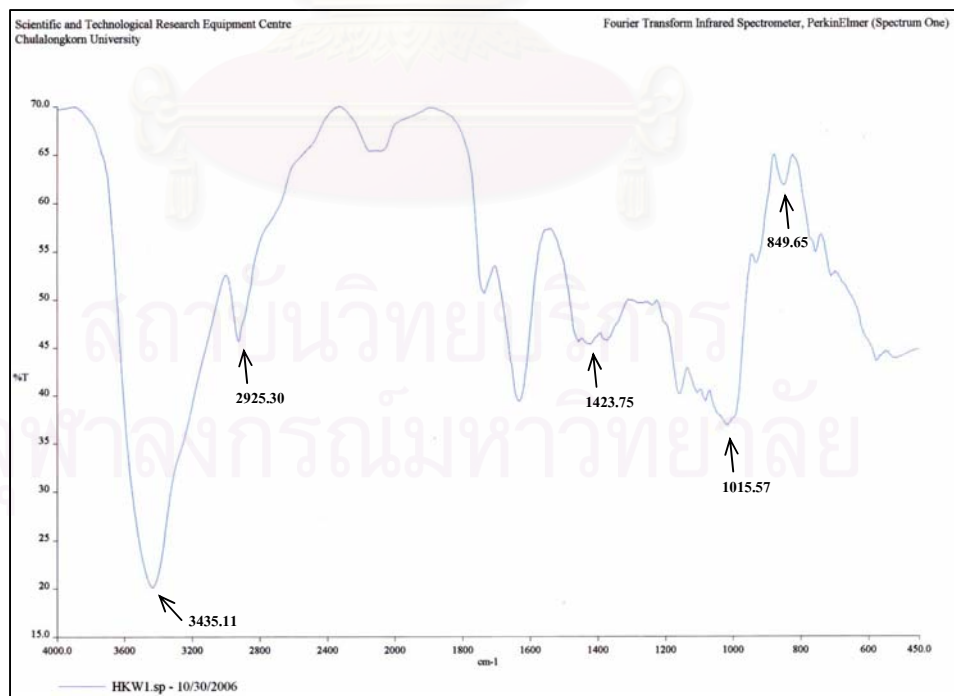
รูปที่ 29 สเปกตรัมของพอลิแซคคาไรด์จากเชื้อราไอโซเลต PH1



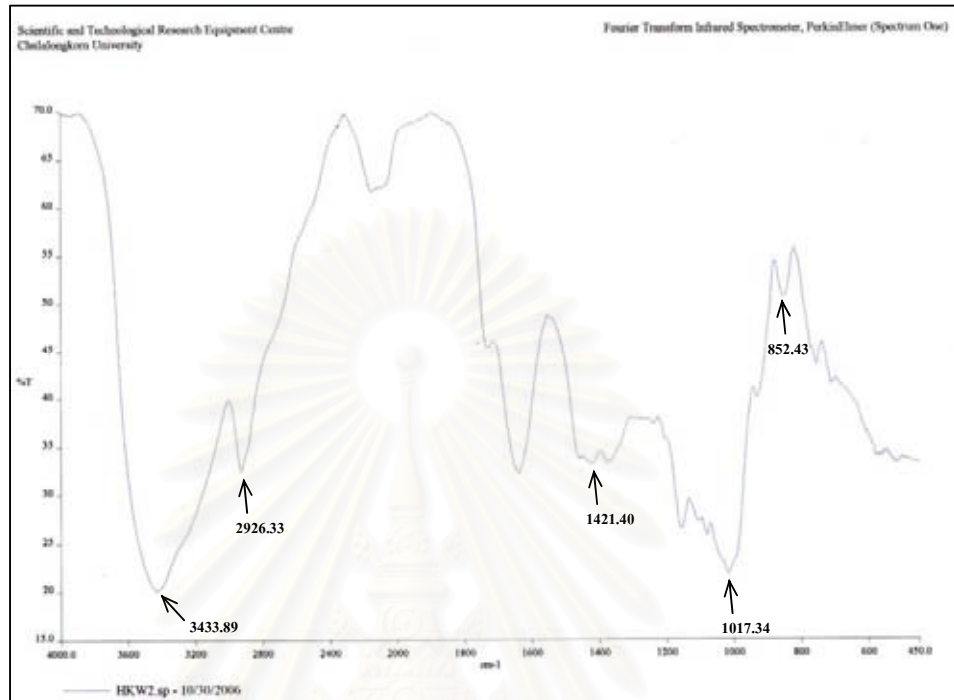
รูปที่ 30 สเปกตรัมของพอลิแซคคาไรด์จากเชื้อราไอโซเลต JP1



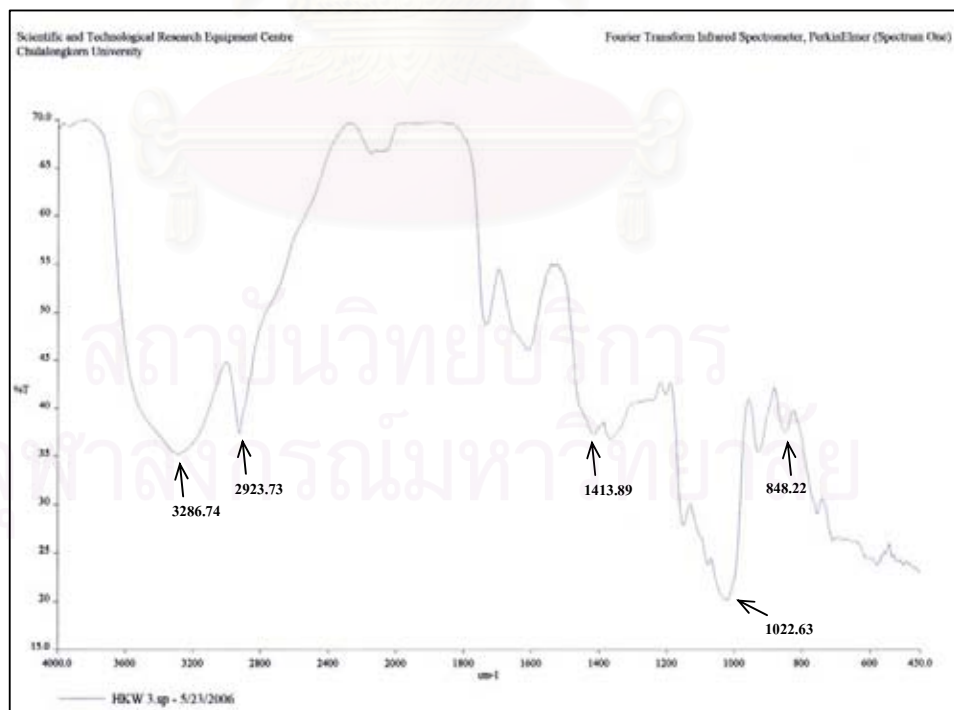
รูปที่ 31 สเปกตรัมของพอลิแซคคาไรด์จากเชื้อราไอโซเลต VM1



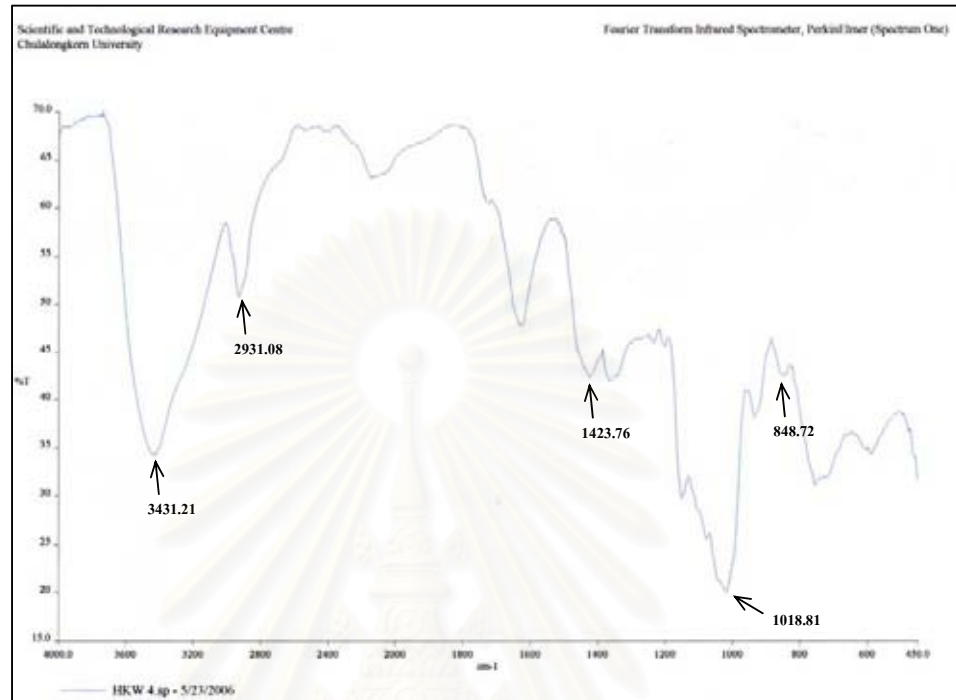
รูปที่ 32 สเปกตรัมของพอลิแซคคาไรด์จากเชื้อราไอโซเลต HKW1



รูปที่ 33 สเปกตรัมของพอลิแซคคาไรด์จากเชื้อราไอโซเลต HKW2



รูปที่ 34 สเปกตรัมของพอลิแซคคาไรด์จากเชื้อราไอโซเลต HKW3



รูปที่ 35 สเปกตรัมของพอลิแซคคาไรด์จากเชื้อราไอโซเลต HKW4

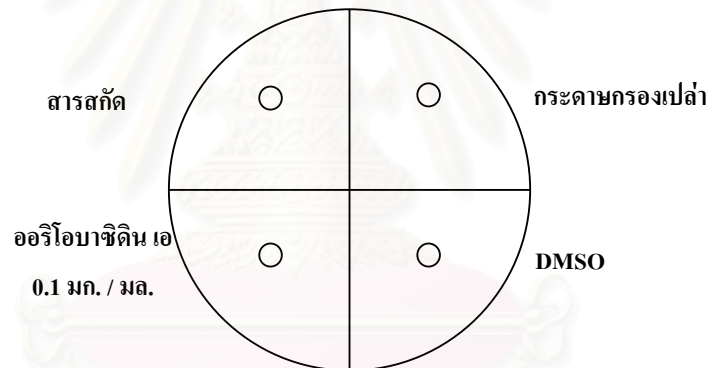
สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



### 3. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเชื้อรา

#### 3.1 Paper disc method

จากการนำสารที่สกัดได้จาก *A. pullulans* ทั้ง 10 ไอโซเลต มาทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อราก่อโรคในกลุ่ม *Aspergillus* spp. ด้วย paper disc method โดยการวางกระดาษกรองที่จุ่มสารสกัดบนจานเลี้ยงเชื้อที่เคลือบด้วยสปอร์ของ *Aspergillus* spp. ดังรูปที่ 36 และสังเกต inhibition zone ที่เกิดขึ้น ได้ผลดังตารางที่ 7 โดยพบว่า มีสารสกัดจาก *A. pullulans* 4 ไอโซเลต ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคที่นำมาทดสอบ โดยสารสกัดจาก *A. pullulans* ไอโซเลต KT1 มีฤทธิ์ในการต้าน *Aspergillus fumigatus* และ *A. terreus* (รูปที่ 37) สารสกัดจาก *A. pullulans* ไอโซเลต BM1 มีฤทธิ์ในการต้าน *A. fumigatus* *A. flavus* และ *A. terreus* (รูปที่ 38) ส่วนสารสกัดจาก *A. pullulans* ไอโซเลต HKW1 และ HKW2 มีฤทธิ์ในการต้าน *A. terreus* เพียงชนิดเดียว (รูปที่ 39-40)



รูปที่ 36 ตำแหน่งของกระดาษกรองที่จุ่มด้วยสารที่ใช้ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเชื้อราบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดย paper disc method

ตารางที่ 7 ความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus* spp. ของสารสกัดจาก *A. pullulans* ทั้ง 10 ไอโซเลต โดย paper disc method

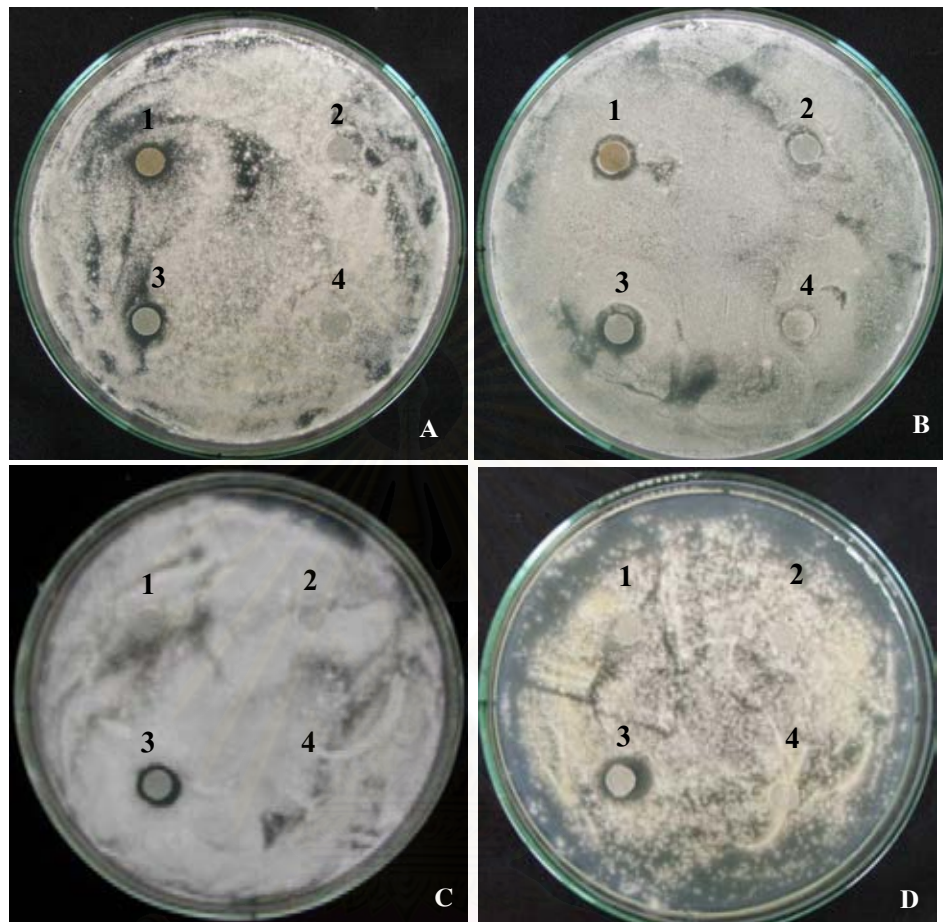
ไอโซเลต ที่ผลิตสารสกัด	อัตราส่วนของ clear zone (clear zone ratio)			
	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. terreus</i>
KT1	1.00	-	-	0.87
BM1	1.00	0.70	-	1.00
TB1	-	-	-	-
PH1	-	-	-	-
JP1	-	-	-	-
VM1	-	-	-	-
HKW1	-	-	-	1.00
HKW2	-	-	-	0.53
HKW3	-	-	-	-
HKW4	-	-	-	-

#### หมายเหตุ

อัตราส่วนของ clear zone คือ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางที่เกิดจากการยับยั้งเชื้อรา ด้วยสารสกัดจากแต่ละไอโซเลต เทียบกับขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางที่เกิดจากการยับยั้งเชื้อราด้วย ออริโอบาซิ ดิน เอ

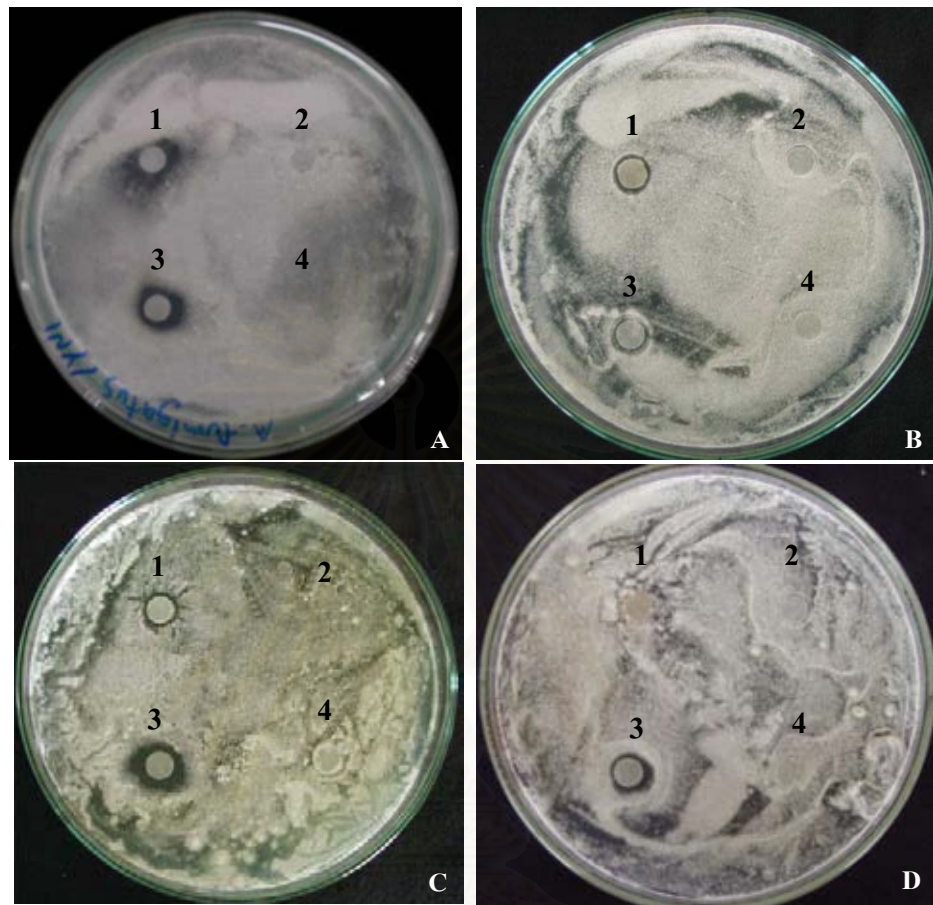
- = สารสกัดไม่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราที่ทดสอบ

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 37 ความสามารถในการยับยั้ง *A. fumigatus* (A) *A. terreus* (B) *A. niger* (C) และ *A. flavus* (D) ของสารสกัดจาก *A. pullulans* ไอโซเลต KT1 โดย หมายเลข 1 คือ กระจายกรองที่จุ่มสารสกัด หมายเลข 2 คือกระจายกรองเปล่า หมายเลข 3 คือกระจายกรองที่จุ่มด้วยอริโอบาซิดิน เอ ความเข้มข้น 0.1 มก./มล. และ หมายเลข 4 คือ กระจายกรองที่จุ่มด้วย DMSO

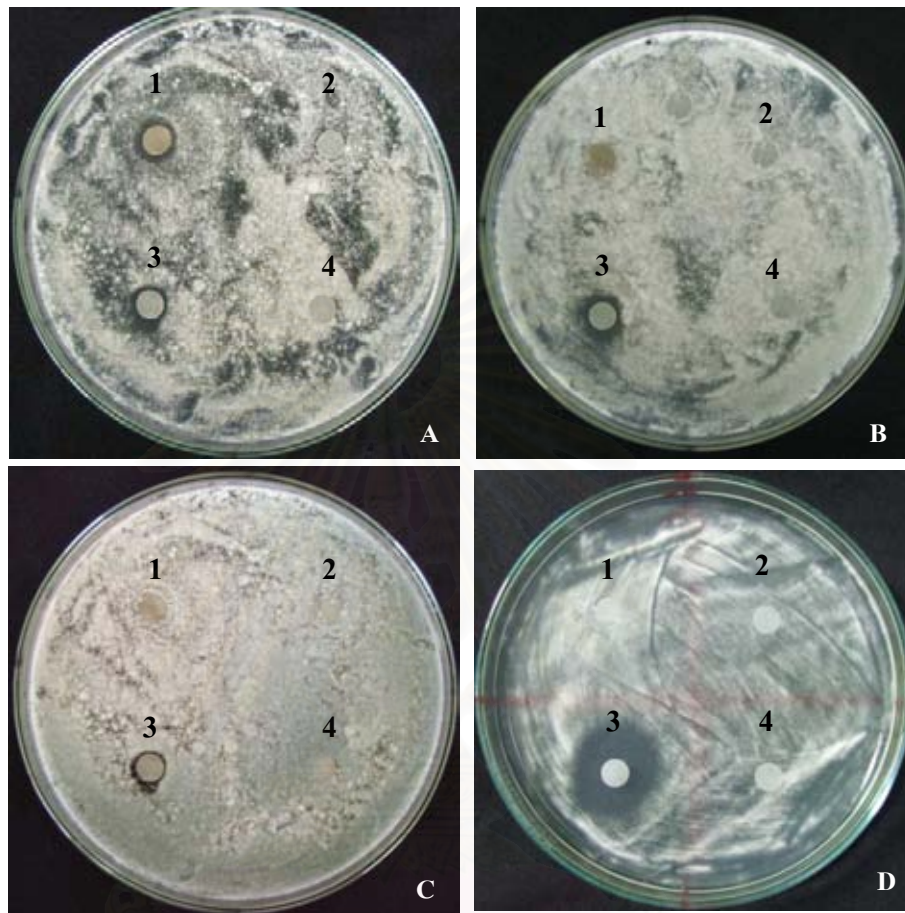
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 38 ความสามารถในการยับยั้ง *A. fumigatus* (A) *A. terreus* (B) *A. flavus* (C) และ *A. niger* (D) ของสารสกัดจาก *A. pullulans* ไอโซเลต BM1 โดย หมายเลข 1 คือ กระจายกรองที่จุ่มสารสกัด หมายเลข 2 คือกระจายกรองเปล่า หมายเลข 3 คือกระจายกรองที่จุ่มด้วยอริโอบาซิดิน เอ ความเข้มข้น 0.1 มก./มล. และ หมายเลข 4 คือ กระจายกรองที่จุ่มด้วย DMSO

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

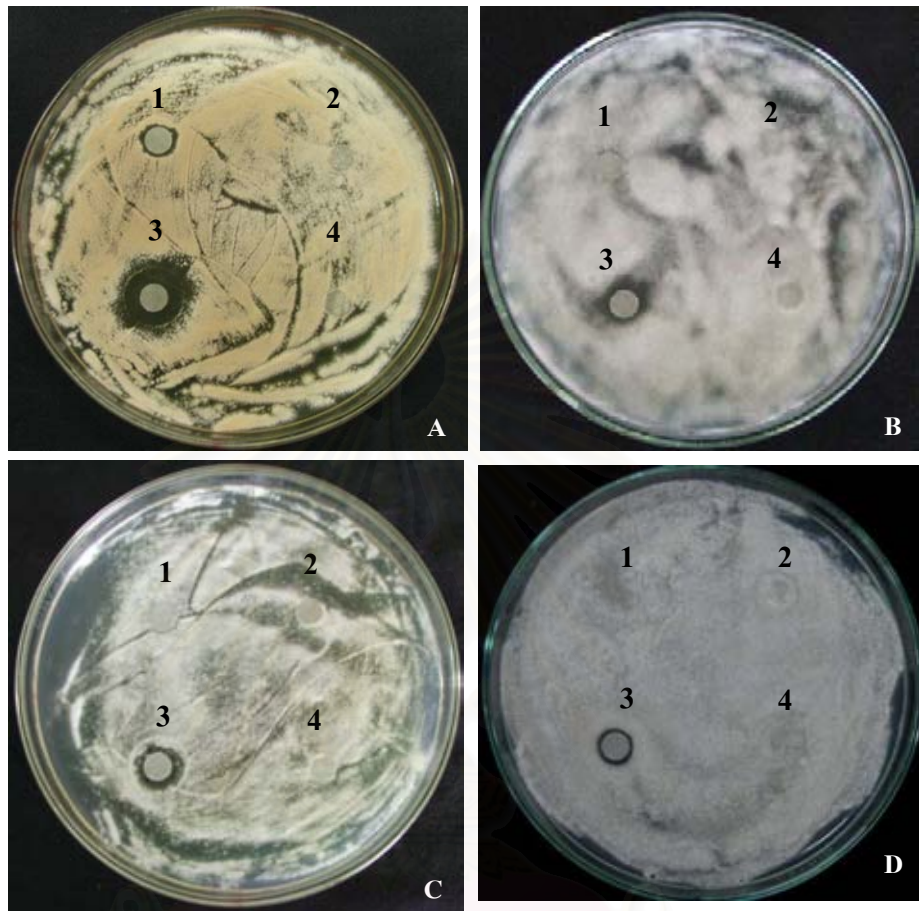




รูปที่ 39 ความสามารถในการยับยั้ง *A. terreus* (A) *A. flavus* (B) *A. fumigatus* (C) และ *A. niger* (D) ของสารสกัดจาก *A. pullulans* ไอโซเลต HKW1 โดย หมายเลข 1 คือ กระจาดยกรองที่จุ่มสารสกัด หมายเลข 2 คือกระจาดยกรองเปล่า หมายเลข 3 คือกระจาดยกรองที่จุ่มด้วยอริโอบาซิดิน เอ ความเข้มข้น 0.1 มก./มล. และ หมายเลข 4 คือ กระจาดยกรองที่จุ่มด้วย DMSO

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





รูปที่ 40 ความสามารถในการยับยั้ง *A. terreus* (A) *A. niger* (B) *A. flavus* (C) และ *A. fumigatus* (D) ของสารสกัดจาก *A. pullulans* ไอโซเลต HKW2 โดย หมายเลข 1 คือ กระจาดยกรองที่จุ่มสารสกัด หมายเลข 2 คือกระจาดยกรองเปล่า หมายเลข 3 คือกระจาดยกรองที่จุ่มด้วยอริโอบาซิดิน เอ ความเข้มข้น 0.1 มก./มล. และ หมายเลข 4 คือ กระจาดยกรองที่จุ่มด้วย DMSO

### 3.2 Conidial germination inhibition assay

จากการนับจำนวนสปอร์เชื้อราที่งอกบนจานเพาะเลี้ยง และคำนวณเป็นค่าเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกโดยของสปอร์ เทียบกับชุดควบคุมพบว่า สารสกัดจาก *A. pullulans* 4 ไอโซเลต ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคที่นำมาทดสอบคือ สารสกัดจาก *A. pullulans* ไอโซเลต KT1 สามารถยับยั้งการเจริญของสปอร์ของ *Aspergillus fumigatus* และ *A. terreus* ได้ 57.10 และ 50.49 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจาก *A. pullulans* ไอโซเลต BM1 สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *A. fumigatus* *A. flavus* และ *A. terreus* ได้ 52.79 36.55 และ 36.58 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ขณะที่ สารสกัดจาก *A. pullulans* ไอโซเลต HKW1 และ HKW2 สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *A. terreus* ได้ 38.87 และ 42.46 ตามลำดับ (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 เปอร์เซ็นต์การงอกและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์ *Aspergillus* spp. ที่ถูกบ่มร่วมกับสารสกัดจาก *A. pullulans* ทั้ง 10 ไอโซเลต

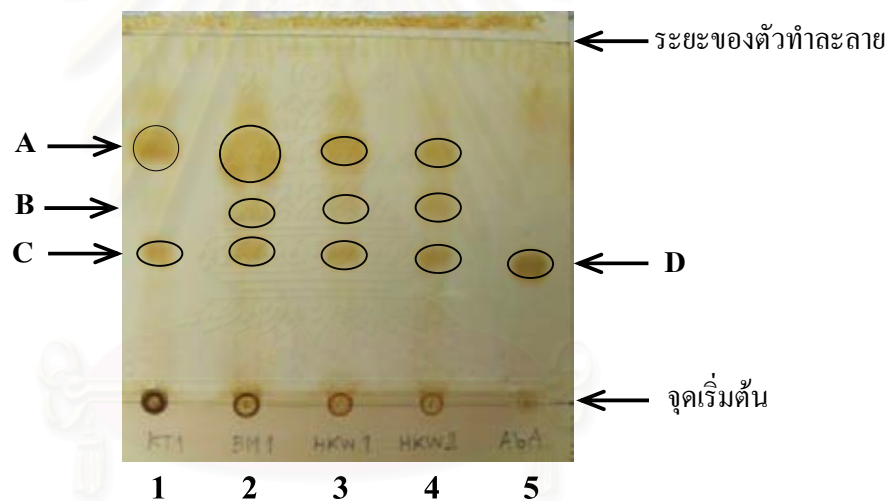
ไอโซเลต ที่ผลิตสารสกัด	เปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ (%) (% germination)			เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์ (%) (% inhibition)		
	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. terreus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. terreus</i>
KT1	57.10	100	50.49	42.90	0	49.51
BM1	52.79	36.55	36.58	47.21	63.45	63.42
TB1	100	100	100	0	0	0
PH1	100	100	100	0	0	0
JP1	100	100	100	0	0	0
VM1	100	100	100	0	0	0
HKW1	100	100	61.13	0	0	38.87
HKW2	100	100	57.54	0	0	42.46
HKW3	100	100	100	0	0	0
HKW4	100	100	100	0	0	0

หมายเหตุ ชุดควบคุม คือ จำนวนสปอร์ที่ขึ้นบนจานอาหาร ภายหลังบ่มสารละลาย DM SO ร่วมกับสปอร์แขวนลอยของ *Aspergillus* spp. โดยจำนวนสปอร์ที่ขึ้นบนจานอาหารชุดควบคุมเทียบเป็น 100 เปอร์เซ็นต์

#### 4. การตรวจสอบสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี

##### 4.1 เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (Thin layer chromatography)

จากการนำสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา จาก *A. pullulans* ทั้ง 4 ไอโซเลต ได้แก่ KT1 BM1 HKW1 และ HKW2 มาตรวจสอบด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (TLC) เทียบกับสารมาตรฐาน ออริโอบาซิดิน เอ โดยใช้ระบบตัวทำละลายคือเอทิลอะซิเตต พบว่า สารสกัดจาก *A. pullulans* ไอโซเลต BM1 HKW1 และ HKW2 ประกอบด้วยสารที่มีค่า Rf แตกต่างกัน 3 ชนิด (รูปที่ 41) แต่แต่ละชนิด มีค่า Rf เท่ากับ 0.40 (ตำแหน่ง C) 0.55 (ตำแหน่ง B) และ 0.675 (ตำแหน่ง A) ขณะที่สารสกัดจาก *A. pullulans* ไอโซเลต KT1 ประกอบด้วยสารที่มีค่า Rf แตกต่างกัน 2 ชนิด โดยมีค่า Rf เท่ากับ 0.40 (ตำแหน่ง C) และ 0.675 (ตำแหน่ง A) ตามลำดับ ส่วนออริโอบาซิดินเอ มาตรฐาน มีค่า Rf เท่ากับ 0.375 (ตำแหน่ง D) (รูปที่ 41)



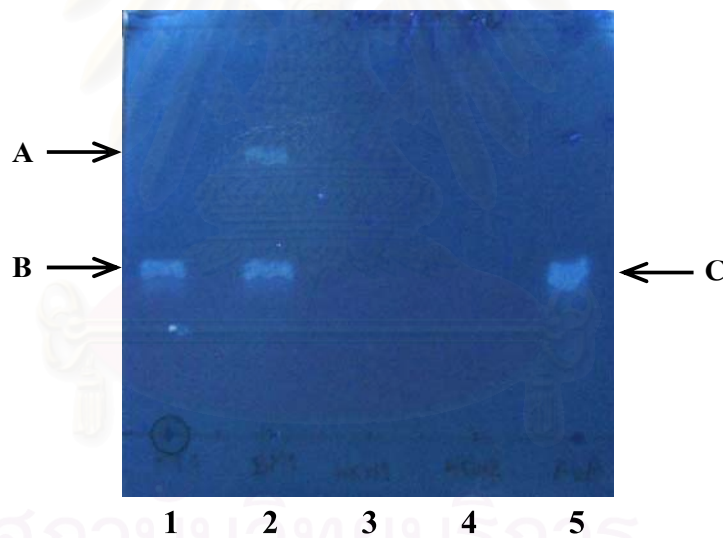
รูปที่ 41 โครมาโทแกรมแสดงผลการตรวจสอบสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา ที่ได้จาก *A. pullulans* ทั้ง 4 ไอโซเลต ด้วยเทคนิค TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลายคือ เอทิลอะซิเตต

1. สารสกัดจาก *A. pullulans* ไอโซเลต KT1
2. สารสกัดจาก *A. pullulans* ไอโซเลต BM1
3. สารสกัดจาก *A. pullulans* ไอโซเลต HKW1
4. สารสกัดจาก *A. pullulans* ไอโซเลต HKW2
5. สารมาตรฐาน ออริโอบาซิดิน เอ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *Aspergillus* spp. ของสารสกัดจาก *A. pullulans* ทั้ง 4 ไอโซเลต หลังจากแยกด้วยวิธี TLC เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ออริโอบาซินดิน เอ ได้ผลดังรูปที่ 42-43

จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้ง *A. fumigatus* พบว่าสารสกัดจาก *A. pullulans* ไอโซเลต KT1 มีสารที่ยับยั้ง *A. fumigatus* 1 ชนิด คือบริเวณสารที่มีค่า Rf เท่ากับ 0.40 (ตำแหน่ง B) และ สารสกัดจาก *A. pullulans* ไอโซเลต BM1 มีสาร 2 ชนิดที่สามารถยับยั้ง *A. fumigatus* คือ ตำแหน่งของสารที่มีค่า Rf เท่ากับ 0.40 (ตำแหน่ง B) และ 0.675 (ตำแหน่ง A) ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจาก *A. pullulans* ไอโซเลต HKW1 และ HKW2 ไม่พบ inhibition zone

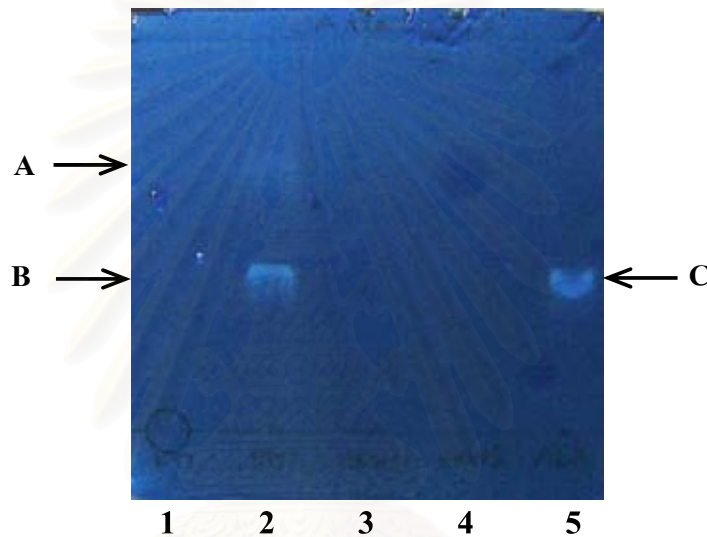
สำหรับตำแหน่งที่ยับยั้ง *A. fumigatus* ของออริโอบาซินดิน เอ มีค่า Rf เท่ากับ 0.40 (ตำแหน่ง C) (รูปที่ 42)



รูปที่ 42 โครมาโทแกรมแสดง inhibition zone ในการยับยั้งเชื้อรา *A. fumigatus* ของสารสกัดที่ได้จาก *A. pullulans* ทั้ง 4 ไอโซเลต เมื่อย้อมสีด้วยแลคโตฟีนอลบลู

1. สารสกัดจาก *A. pullulans* ไอโซเลต KT1
2. สารสกัดจาก *A. pullulans* ไอโซเลต BM1
3. สารสกัดจาก *A. pullulans* ไอโซเลต HKW1
4. สารสกัดจาก *A. pullulans* ไอโซเลต HKW2
5. สารมาตรฐาน ออริโอบาซินดิน เอ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

การทดสอบความสามารถในการยับยั้ง *A. flavus* พบว่ามีเพียงสารสกัดจาก *A. pullulans* ไอโซเลต BM1 มีสารที่สามารถยับยั้ง เชื้อราดังกล่าว โดยพบสาร 2 ชนิด คือตำแหน่งของสารที่มีค่า Rf เท่ากับ 0.40 (ตำแหน่ง B) และ 0.675 (ตำแหน่ง A) ตามลำดับ ส่วนตำแหน่งที่ยับยั้ง *A. flavus* ของออริโอบาซินดิน เอ มีค่า Rf เท่ากับ 0.40 (ตำแหน่ง C) (รูปที่ 43)

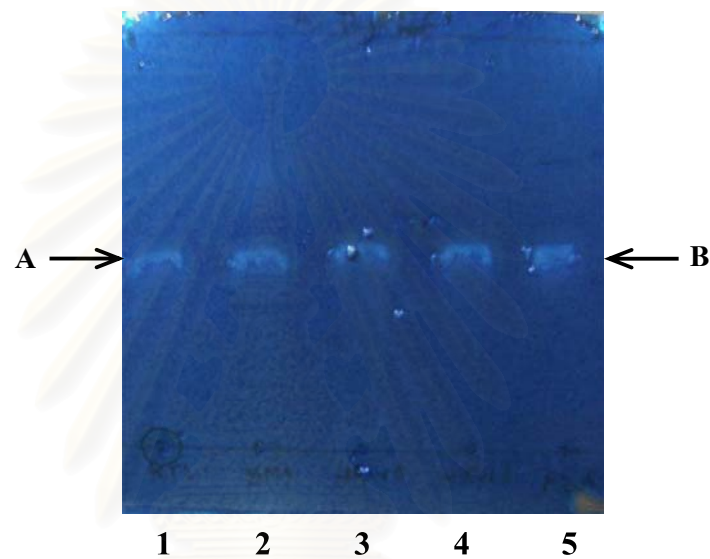


รูปที่ 43 โครมาโทแกรมแสดง inhibition zone ในการยับยั้งเชื้อรา *A. flavus* ของสารสกัดที่ได้จาก *A. pullulans* ทั้ง 4 ไอโซเลต เมื่อเชื่อมสีด้วยแลคโตฟีนอลบลู

1. สารสกัดจาก *A. pullulans* ไอโซเลต KT1
2. สารสกัดจาก *A. pullulans* ไอโซเลต BM1
3. สารสกัดจาก *A. pullulans* ไอโซเลต HKW1
4. สารสกัดจาก *A. pullulans* ไอโซเลต HKW2
5. สารมาตรฐาน ออริโอบาซินดิน เอ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร



การทดสอบความสามารถในการยับยั้ง *A. terreus* พบว่าสารสกัดจาก *A. pullulans* ไอโซเลต KT1 BM1 HKW1 และ HKW2 มีสารที่ยับยั้งเชื้อราดังกล่าวโดย มีสารที่สามารถยับยั้ง *A. terreus* ที่ตำแหน่งเดียวกัน 1 ชนิด คือตำแหน่งของสารที่มีค่า Rf เท่ากับ 0.40 (ตำแหน่ง A) และตำแหน่งที่ยับยั้งเชื้อราของออริโอบาซินดิน เอ มีค่า Rf เท่ากับ 0.40 (ตำแหน่ง B) (รูปที่ 44)



รูปที่ 44 โครมาโทแกรมแสดง inhibition zone ในการยับยั้งเชื้อรา *A. terreus* ของสารสกัดที่ได้จาก *A. pullulans* ทั้ง 4 ไอโซเลต เมื่อย้อมสีด้วยแลคโตฟีนอลบลู

1. สารสกัดจาก *A. pullulans* ไอโซเลต KT1
2. สารสกัดจาก *A. pullulans* ไอโซเลต BM1
3. สารสกัดจาก *A. pullulans* ไอโซเลต HKW1
4. สารสกัดจาก *A. pullulans* ไอโซเลต HKW2
5. สารมาตรฐาน ออริโอบาซินดิน เอ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

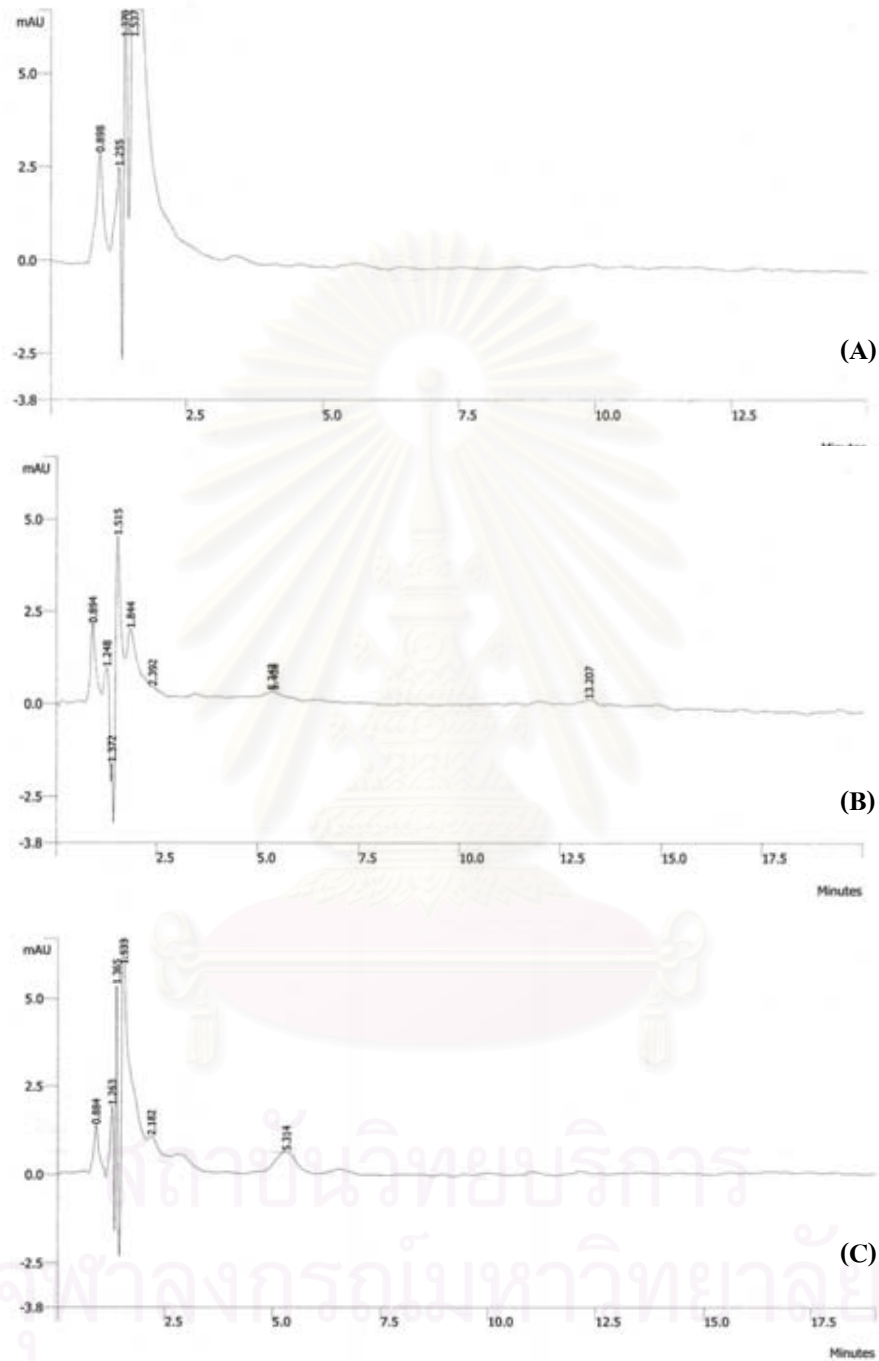
#### 4.2 เทคนิค High Performance Liquid Chromatography

นำสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา ที่ตรวจสอบได้จากการทำโครมาโทกราฟีแบบชั้นบางมาตรวจสอบด้วยเทคนิค HPLC ด้วยเครื่อง HPLC ของบริษัท Varian รุ่น Pro star ประเทศสหรัฐอเมริกา (รูปที่ 45) โดยใช้โครมาโทกราฟีแบบเฟสผันกลับ (Reversed-phase chromatography) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานออริโอบาซิดิน เอ ดังนี้

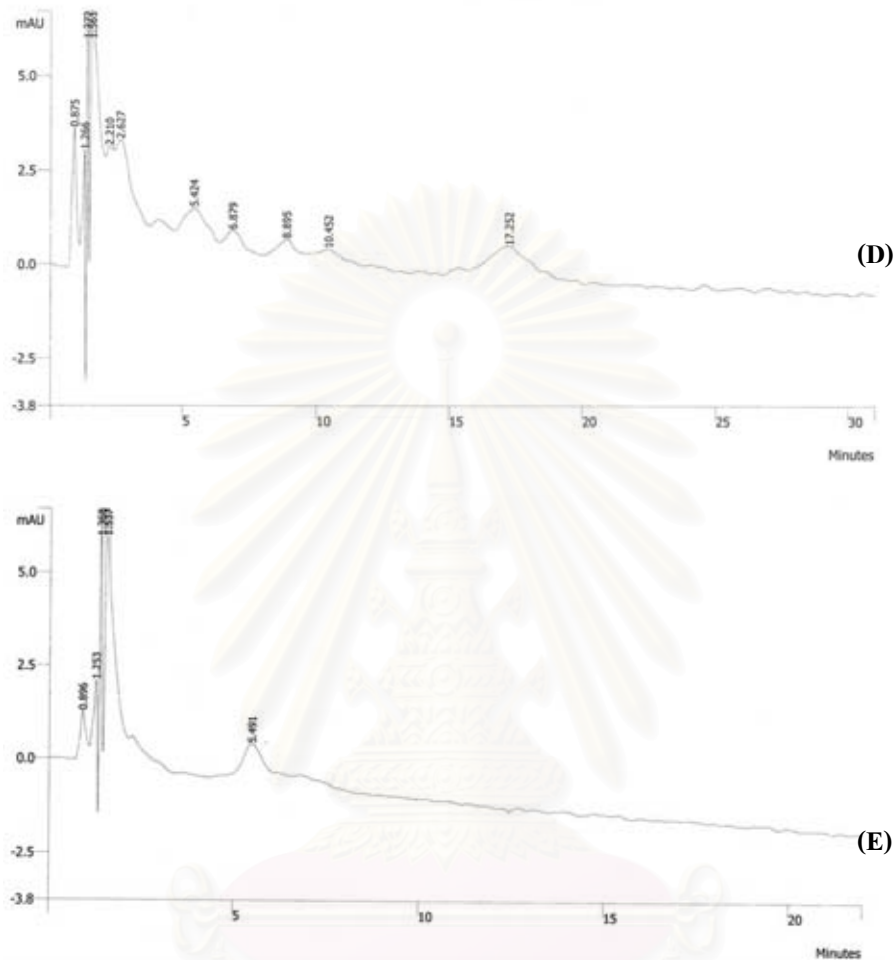
4.2.1 คอลัมน์ Lichrocart C18 (4.0 × 125 มิลลิเมตร) ของบริษัท Merck ขนาดรูพรุน (pore size) 100 อังสตรอม ขนาด particle 5 ไมโครเมตร และใช้ UV detector ที่ความยาวคลื่น 258 นาโนเมตร โดยทำการเตรียม สารมาตรฐานออริโอบาซิดิน เอ ที่ความเข้มข้นต่างกัน สำหรับการทำการกราฟมาตรฐาน และสารสกัดจาก *A. pullulans* ทั้ง 4 ไอโซเลต ละลายในเมทานอล โดยมีอะซีโตไนไตร และน้ำเป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราส่วน 7.5:2.5 ตามลำดับ อัตราการไหลเท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จากการทดลองใช้คอลัมน์ Lichrocart C18 (4.0 × 125 มิลลิเมตร) ของบริษัท Merck ดังรูปที่ 46-47



รูปที่ 45 เครื่อง HPLC Varian รุ่น Pro star ที่ใช้ในการตรวจสอบ



รูปที่ 46 กราฟจากการทำ HPLC ของ สารมาตรฐานอโรโกราฟีโนลีน เอ ที่ความเข้มข้น 0 (A) 5 (B) และ 10 (C) มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร ตามลำดับ ใช้คอลัมน์ Lichrocart C18 (4.0 × 125 มิลลิเมตร) ของ บริษัท Merck โดยมีอะซีโตนไนโตร และน้ำเป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราส่วนที่ อัตราส่วน 7.5:2.5 ตามลำดับ อัตราการไหลเท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที 50 องศาเซลเซียส ใช้UV detector ที่ความยาวคลื่น 258 นาโนเมตร



รูปที่ 47 กราฟจากการทำ HPLC ของ ออร์ิโอบาซิดิน เอ ที่ความเข้มข้น 15 (D) และ 20 (E) มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร ตามลำดับ ใช้คอลัมน์ Lichrocart C18 (4.0 × 125 มิลลิเมตร) ของบริษัท Merck โดยมีอะซิโตนไนโตร และน้ำเป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราส่วน 7.5:2.5 ตามลำดับ อัตราการไหลเท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที 50 องศาเซลเซียส ใช้ UV detector ที่ความยาวคลื่น 258 นาโนเมตร

จากการทดลอง peak ที่พบตั้งแต่เริ่มตรวจสอบถึงช่วงนาทีที่ 2 เป็น peak ของตัวทำละลายที่ใช้ในการแยก ส่วนที่ความเข้มข้นของ ออร์ิโอบาซิดินเท่ากับ 10 และ 20 มก./ มล. พบ peak ขึ้นที่ นาทีที่ 5.314 และ 5.491 ตามลำดับ แต่สัญญาณของ peak ที่ปรากฏมี sensitivity ที่ต่ำมาก ยังไม่สามารถยืนยันได้ว่าเป็นสารมาตรฐานออร์ิโอบาซิดิน เอ หรือไม่ และเนื่องจากที่ความเข้มข้น 5 มก./ มล. ไม่พบ peak ของสารใดๆ และที่ความเข้มข้น 15 มก./มล พบ peak ครอบคลุมจำนวนหลาย peak ที่

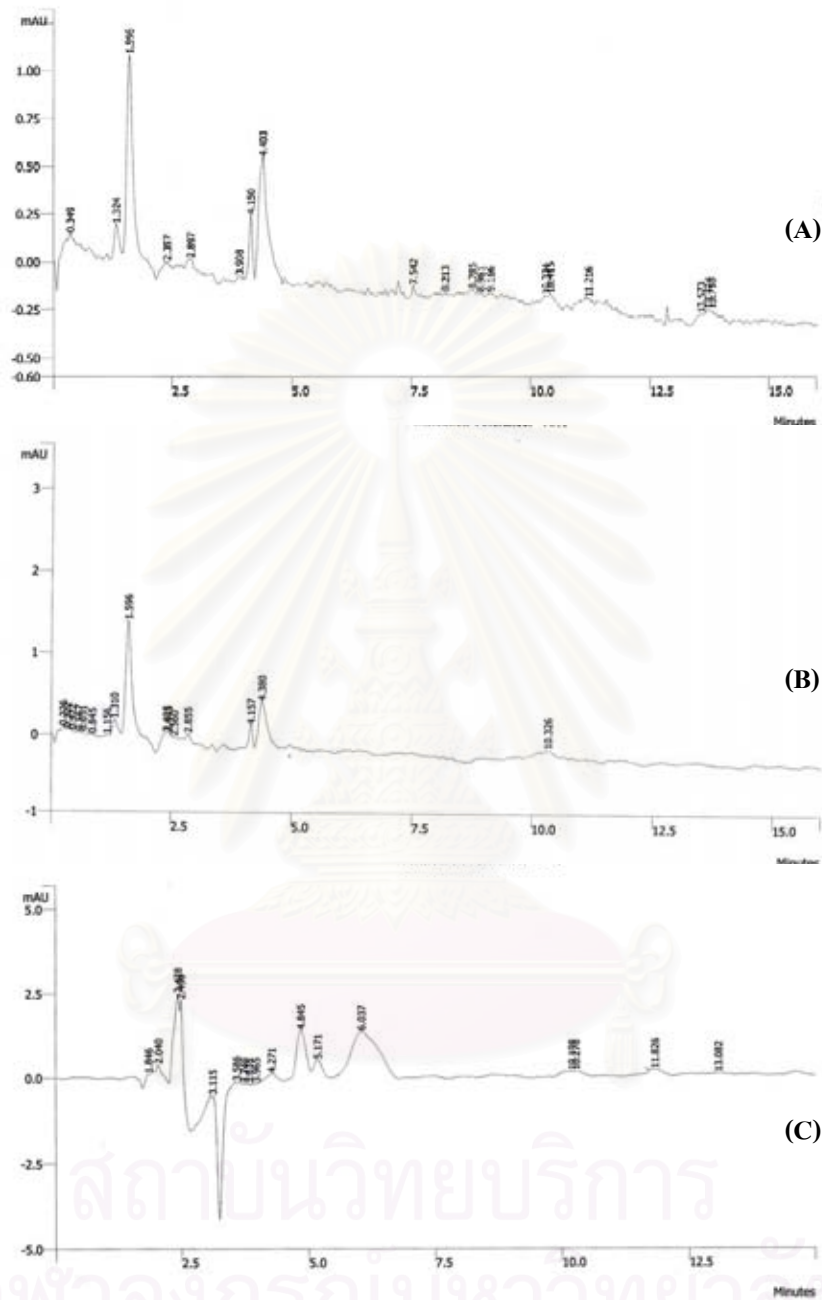
ไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นสารมาตรฐานออริโอบาซิดิน เอ หรือไม่ ทำให้ต้องทำการตรวจสอบซ้ำอีกครั้ง โดยเปลี่ยนคอลัมน์ให้มีขนาดยาวขึ้น คือ

4.2.2 คอลัมน์ Prevail C18 (4.6×250 มิลลิเมตร) ของบริษัท Alltech ขนาดรูพรุน (pore size) 110 อังสตรอม ขนาด particle 5 ไมโครเมตร โดยทำการเตรียม สารมาตรฐาน ออริโอบาซิดิน เอ ที่ความเข้มข้นต่างกัน เพื่อทำเป็นกราฟมาตรฐาน และสารสกัดจาก *A. pullulans* ทั้ง 4 ไอโซเลต ละลายในเอทานอลโดยมีอะซีโตรไนไตร และน้ำเป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราส่วน 7.5:2.5 ตามลำดับ อัตราการไหลเท่ากับ 1.0 มิลลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ใช้ UV detector ที่ความยาวคลื่น 258 นาโนเมตร โดยมุ่งหวังให้ผลในการแยกดีขึ้น ผลที่ได้ดังรูปที่ 48-49

พบว่าเมื่อเปลี่ยนเป็นคอลัมน์ Prevail C18 (4.6×250 มิลลิเมตร) ของ Alltech โดยยังคงระบบต่างๆเหมือนเดิม พบว่าช่วงเวลานาทีที่เริ่มตรวจสอบจนถึงนาทีที่ 5 พบ peak ของตัวทำละลายที่ใช้ ส่วนการตรวจสอบ ออริโอบาซิดิน เอ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 20-100 มก./ มล. พบ peak ครอบคลุมหลาย peak และไม่สามารถระบุได้ว่า peak ใดเป็น peak ของสารมาตรฐาน ออริโอบาซิดิน เอ จึงทำการเปลี่ยนตัวทำละลายออริโอบาซิดินเอเป็นการละลายในอะซีโตรไนไตร และเปลี่ยนช่วงตรวจสอบของ UV detector เป็นที่ 216 นาโนเมตร เนื่องจากทำการ scan หาช่วงการดูดกลืนแสงสูงสุดของออริโอบาซิดินเอ ในอะซีโตรไนไตรได้ที่ 216 นาโนเมตร ผลที่ได้ดังรูปที่ 50 พบว่าที่ออริโอบาซิดิน ความเข้มข้น 0 60 และ 100 มก./ มล. ตั้งแต่เริ่มตรวจสอบถึงประมาณนาทีที่ 5 พบเพียงแค่ peak ของ ตัวทำละลายที่ใช้เท่านั้น ไม่พบสัญญาณของ peak ที่บ่งบอกได้ว่าตรวจพบสารมาตรฐานออริโอบาซิดิน เอ

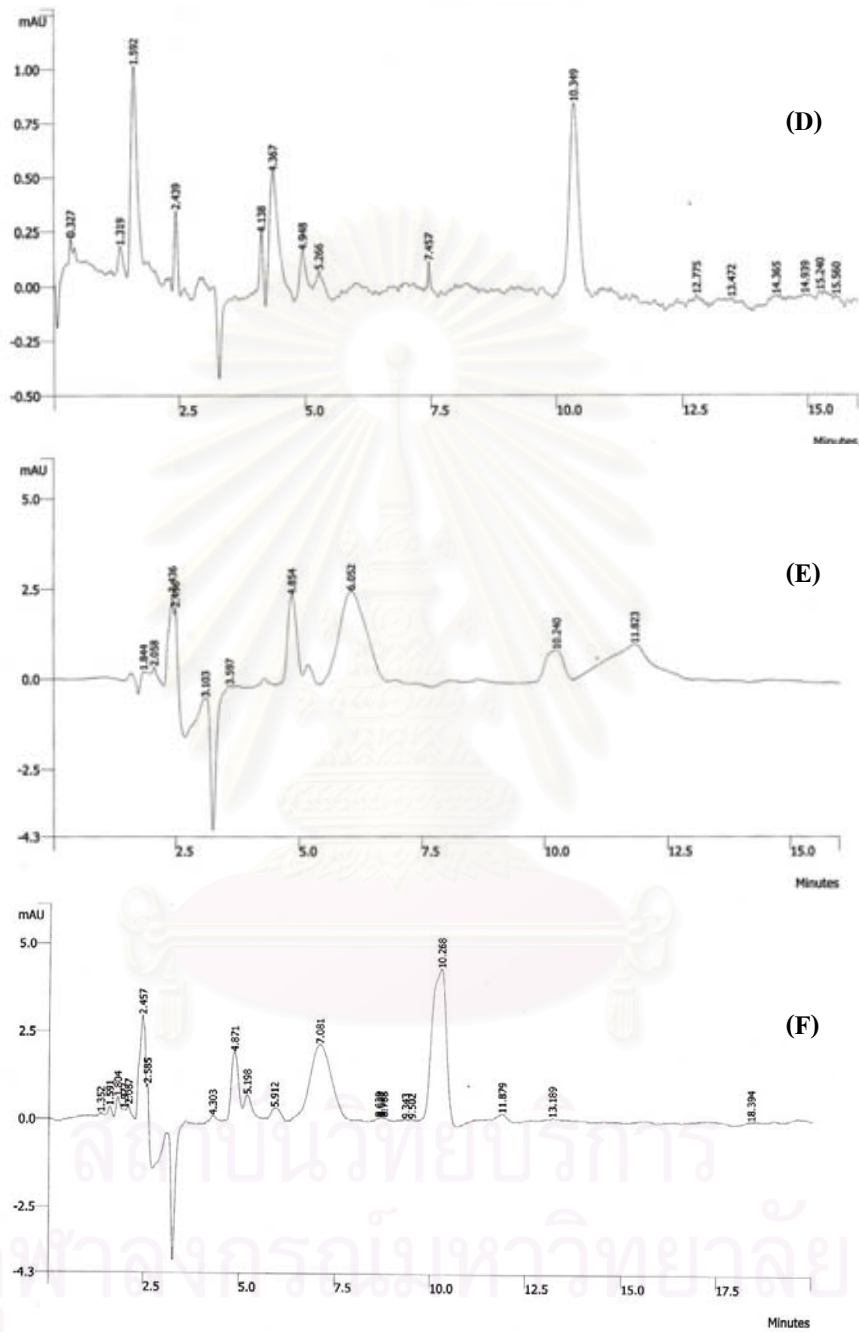
จากการตรวจสอบสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราด้วยเทคนิค HPLC พบว่า ยังไม่สามารถหาคอลัมน์ และสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบสารดังกล่าวได้เนื่องจากยังไม่สามารถตรวจสอบสารมาตรฐานออริโอบาซิดิน เอ จากคอลัมน์และสภาวะที่ใช้ได้ดังกล่าว

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

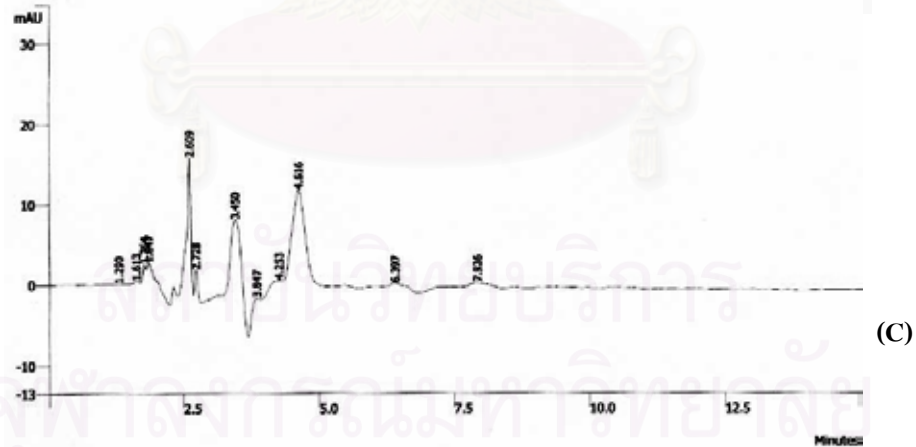
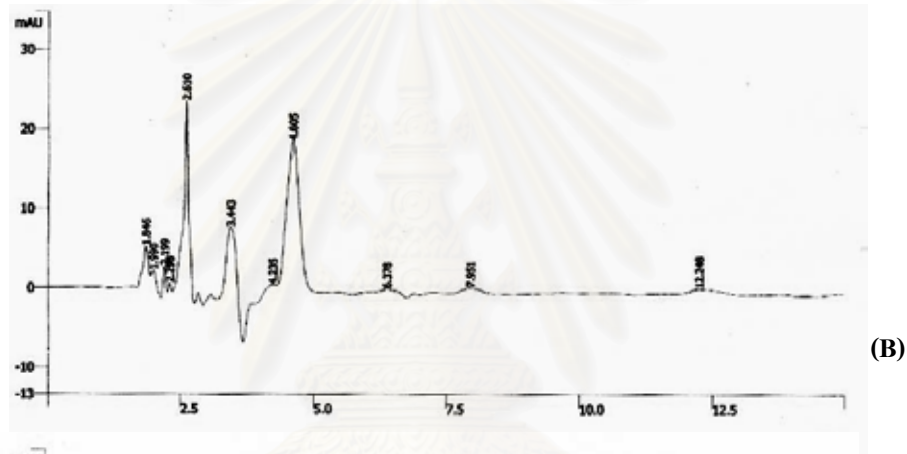
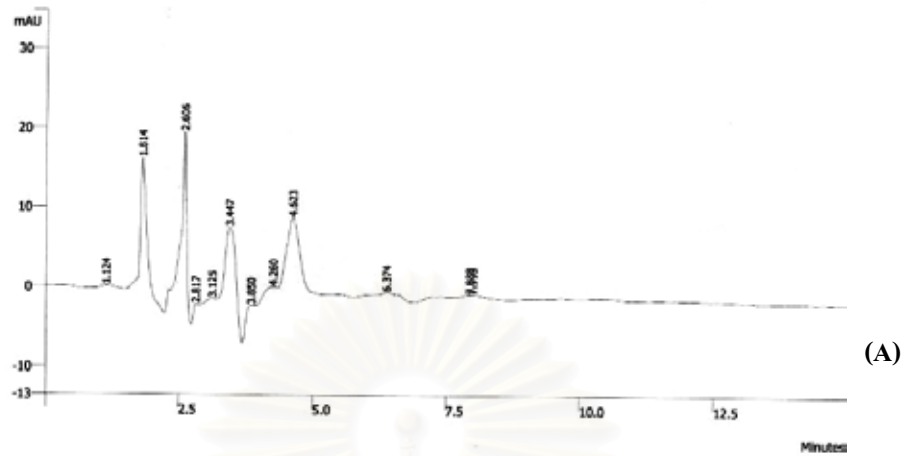


รูปที่ 48 กราฟจากการทำ HPLC ของ ออริโอบาซิดิน เอ ที่ความเข้มข้น 0 (A) 20 (B) และ 40 (C) มก./มล. ตามลำดับ ใช้คอลัมน์ชนิด Prevail C18 (4.6×250 มิลลิเมตร) ของ Alltech โดยมีอะซีโตไนไตร และน้ำเป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราส่วน 7.5:2.5 ตามลำดับ อัตราการไหลเท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อ นาที 50 องศาเซลเซียส ใช้ UV detector ที่ความยาวคลื่น 258 นาโนเมตร





รูปที่ 49 กราฟจากการทำ HPLC ของ ออร์ลิบาชิดิน เอ ที่ความเข้มข้น 60 (D) 80 (E) และ 100 (F) มก./มล. ตามลำดับ ใช้คอลัมน์ชนิด Prevail C18 (4.6×250 มิลลิเมตร) ของ Alltech โดยมีอะซิโตนในไตร และน้ำเป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราส่วน 7.5:2.5 ตามลำดับ อัตราการไหลเท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อ นาที 50 องศาเซลเซียส ใช้UV detector ที่ความยาวคลื่น 258 นาโนเมตร



รูปที่ 50 กราฟจากการทำ HPLC ของ ออริโอบาซิน เอ ที่ความเข้มข้น 0 (A) 60 (B) และ 100 (C) มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร ตามลำดับ ใช้คอลัมน์ชนิด Prevail C18 (4.6×250 มิลลิเมตร) ของ Alltech โดยมีอะซิโตนไนโตร และน้ำเป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราส่วน 7.5:2.5 ตามลำดับ อัตราการไหลเท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที 50 องศาเซลเซียส ใช้ UV detector ที่ความยาวคลื่น 216 นาโนเมตร

## บทที่ 5

### วิจารณ์ผลการทดลอง

#### 1. การคัดแยก *A. pullulans*

*A. pullulans* เป็นเชื้อราที่มีแหล่งที่อยู่หลากหลาย เช่น ใบพืช ผลไม้ ดิน และ ฟองน้ำทะเล (Ramos และ Acha, 1975; Shigemori และคณะ, 1998) หรือเศษฟาง หญ้าแห้ง เศษไม้ที่ผุพัง (Cooke, 1959) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Sehanat Prasongsuk และคณะ (2005) สามารถคัดแยก *A. pullulans* ได้จากผนังห้องน้ำในประเทศไทย ซึ่งสอดคล้องกับที่เคยมีการคัดแยก *A. pullulans* ได้จากประเทศเขตร้อน เช่น มาเลเซีย บราซิล อินเดีย จาไมกา (Domsch และคณะ, 1993) รวมถึงประเทศไทย (Hunsa Punnapayak และคณะ, 2003; Sehanat Prasongsuk และคณะ, 2005) ซึ่งในการคัดแยก *A. pullulans* มุ่งทำการคัดแยกเชื้อในห้องน้ำจากสถานที่ต่างๆ ในเขตกรุงเทพมหานคร และปริมณฑล เนื่องจากในห้องน้ำเป็นแหล่งที่มีความชื้นและเป็นแหล่งที่อยู่ของเชื้อจุลินทรีย์ โดยเฉพาะเชื้อราอยู่หลากหลายชนิด ดังนั้นจึงน่าจะมียeast *A. pullulans* ที่สามารถสร้างสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ เพื่อประโยชน์ในการอยู่รอดในสิ่งแวดล้อม โดยการคัดแยกใช้อาหาร CMA และ MEA สูตร half strength เพื่อลดปริมาณสารอาหารในอาหารคัดแยกเชื้อ ทำให้มีจำนวนเชื้อชนิดอื่นที่ไม่ต้องการ ขึ้นบนอาหารที่ใช้คัดแยกไม่มากเกินไปจนยากต่อการแยก *A. pullulans* ส่วนเชื้อ *A. pullulans* ที่ต้องการยังสามารถขึ้นได้ในอาหารที่ใช้คัดแยก แม้จะมีสารอาหารปริมาณน้อย เนื่องจาก *A. pullulans* มีลักษณะรูปร่างของเซลล์หลายรูปแบบ โดยเฉพาะ คลาไมโดสปอร์ เป็นรูปร่างหนึ่งซึ่งเชื้อสร้างผนังเซลล์หนาขึ้น มีสีเข้ม และสามารถดำรงอยู่ได้แม้ในภาวะที่มีสารอาหารน้อยก็ตาม

สถานที่เก็บตัวอย่างที่สามารถคัดแยก *A. pullulans* ได้ ทั้งหมดอยู่ในเขตกรุงเทพมหานคร ได้แก่ ห้องน้ำในที่พักอาศัยเขตคลองเตย ห้องน้ำในที่พักอาศัยเขตบางมด ห้องน้ำจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ ห้องน้ำที่พักอาศัย อนุสาวรีย์ชัยสมรภูมิ ห้องน้ำวัดกุณนที่รุทธาราม เขตห้วยขวาง ห้องน้ำสาธารณะตลาดสดห้วยขวาง ห้องน้ำที่พักอาศัย เขตห้วยขวาง กรุงเทพฯ (รูปที่ 5-13) โดยสามารถพบ *A. pullulans* ขึ้นเป็นโคโลนีสีดำบนจานอาหารที่ใช้คัดแยก ซึ่งเจริญร่วมกับเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดได้แก่ เชื้อราเส้นใยสีเขียว เส้นใยสีขาว และเส้นใยสีดำ รวมถึงเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ชนิดอื่น โดยทุกแหล่งที่สามารถคัดแยก *A. pullulans* ได้เป็นห้องน้ำที่มีความชื้นค่อนข้างมากและพื้นผิวที่เก็บตัวอย่างมีลักษณะเปียกชื้นอยู่ตลอด โดยจากแหล่งที่อยู่ของ

*A. pullulans* ที่คัดแยกได้บนพื้นผิวนั้นพบว่ามีสีของโคโลนีที่เจริญหลายสีด้วยกัน เช่น สีดำ สีเหลือง สีส้ม เป็นต้น

ส่วนสถานที่ที่ไม่สามารถคัดแยก *A. pullulans* ได้ พบเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อราเส้นใย ทั้งเชื้อราที่มีเส้นใยสีเขียว เส้นใยสีขาว และเส้นใยสีดำ รวมถึงพบเชื้อแบคทีเรีย โดยบางสถานที่เป็นห้องน้ำที่มีลักษณะพื้นผิวค่อนข้างแห้ง และเป็นห้องน้ำที่ไม่ค่อยมีผู้ใช้บ่อยครั้ง เช่น บิมน้ำมันในบางแห่ง แต่มีร่องรอยของเชื้อจุลินทรีย์เจริญอยู่บนพื้นผิว และมีสีของโคโลนีเป็นสีดำ บางสถานที่เป็นห้องน้ำที่มีผู้ใช้บ่อยครั้ง เช่น ห้องน้ำสาธารณะ สยามแอสคัวร์ มีพื้นผิวเปียกชื้น แต่มีการทำความสะอาดบ่อยครั้ง พบเพียงเชื้อรา แบคทีเรีย และยีสต์ชนิดอื่นเจริญอยู่จำนวนหนึ่ง ซึ่งมีหลายปัจจัยที่ทำให้ไม่สามารถคัดแยกเชื้อจากในบางสถานที่ เช่น ความชื้นของห้องน้ำ ณ ช่วงเวลาที่คัดแยกและความถี่ในการทำความสะอาดห้องน้ำด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ เป็นต้น

## 2. การจัดจำแนก *A. pullulans*

### 2.1 การจัดจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อที่คัดแยกได้และสันนิษฐานในเบื้องต้นว่าเป็น *A. pullulans* ทั้งหมด 10 ไอโซเลต พบว่าเซลล์มีรูปร่างหลายรูปแบบ ได้แก่ บลาสโตสปอร์ โคโคนิเดีย ปฐมภูมิ โคโคนิเดียทุติยภูมิ หรือ budding cell เซลล์พอง คลาไมโดสปอร์ เส้นใย และเส้นใยเทียม เป็นต้น โดยลักษณะของบลาสโตสปอร์โปร่งใส รูปร่างค่อนข้างกลมถึงรี มีขนาดแตกต่างกัน มี budding cell แยกออกจากบลาสโตสปอร์ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลานานขึ้นเซลล์จะมีขนาดใหญ่ และมีผนังหนาขึ้น เรียกว่าเซลล์พอง (swollen cell) โดยในบางสายพันธุ์อาจมีสีเข้มขึ้นเนื่องจากการสร้างเม็ดสีเมลานิน เรียกว่าคลาไมโดสปอร์ เส้นใยมีลักษณะโปร่งใส เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลาจะเปลี่ยนเป็นสีเข้มขึ้นจากการสร้างเม็ดสีเมลานิน และมีผนังหนาขึ้น บางครั้งมีเอนโดโคโคนิเดียเกิดขึ้นจาก ภายใน ด้านข้าง หรือปลายของเส้นใย จากการเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง MEA เป็นเวลา 7 วัน พบว่าในระยะแรกของการเพาะเลี้ยง ทุกไอโซเลต โคโลนีมีสีครีมอมชมพู และปรากฏเส้นใยสั้นๆ รอบโคโลนีชัดเจน โดยไอโซเลต KT1 BM1 และ VM1 จะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้มและเขียวเข้มจนเกือบดำ ไอโซเลต TB1 PH1 และ JP1 เปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้มจนถึงน้ำตาลอ่อน ไอโซเลต HKW1 ไม่เปลี่ยนสีเมื่ออายุมากขึ้น ส่วนไอโซเลต HKW2 และ HKW3 โคโลนีบางส่วนเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อนจนถึงเข้ม ขนาดโคโลนีประมาณ 3.0 - 6.5 เซนติเมตร ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่อธิบายโดย Hermanides-nijhof (1977) และ Domsch และคณะ (1993)

อย่างไรก็ดีในการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาจำแนกชนิด *A. pullulans* นั้นอาจมีความคลาดเคลื่อนได้เนื่องจาก *A. pullulans* มีความคล้ายคลึงกับยีสต์อื่นเช่น *Trichosporon pullulans*

*Hormonema* spp. หรือกับยีสต์ในสกุล *Aureobasidium* ด้วยกัน โดยเฉพาะ *Aureobasidium* ชนิดอื่นๆ และ *Hormonema* sp. ที่มีลักษณะโคโลนีเริ่มแรกในการเพาะเลี้ยงเป็นสีครีมหรือชมพู และเปลี่ยนเป็นสีเข้มขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลานานขึ้น มีคลาไมโดสปอร์ และสามารถสร้างเอนโดโคโคนิเดียได้เช่นเดียวกัน (De Hoog และ Yurlova, 1994) หรือในกรณี *T. pullulans* ซึ่งเป็นยีสต์ที่มีเซลล์รูปร่างหลายแบบ เช่น เส้นใย บลาสโตสปอร์ โคนิเดีย เป็นต้น แม้ว่าโคโลนีของ *T. pullulans* จะมีสีครีมหรือชมพูตั้งแต่ในระยะแรกของการเพาะเลี้ยงโดยไม่เปลี่ยนสีไปตลอดการเพาะเลี้ยง (Dennis และ Buhagiar, 1973) แต่ก็มี *A. pullulans* ที่เป็นสายพันธุ์ที่ไม่ผลิตเม็ดสีเมลานินเช่นกัน ดังนั้นการจัดจำแนก *A. pullulans* จำเป็นต้องอาศัยวิธีอื่นมาประกอบนอกเหนือจากวิธีสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยา

## 2.2 การจัดจำแนกโดยการตรวจสอบความสามารถในการใช้แหล่งอาหารต่างๆ

จากการตรวจสอบความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อราที่แยกได้ทั้ง 10 ไอโซเลต เปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน *A. pullulans* NRRL Y-2311-1 และ NRRL Y-7469 พบว่าทุกไอโซเลตที่คัดแยกได้สามารถใช้ D-cellobiose D-fructose  $\beta$ -D-glucose  $\beta$ -lactose D-maltose D-mannose D-melezitose.2H<sub>2</sub>O methyl- $\alpha$ -D-glucose D-salicin D-sucrose และ D-trehalose.2H<sub>2</sub>O ได้ดี ในขณะที่ไม่สามารถใช้  $\alpha$ -Cellulose Methanol และ Ethanol ได้ สำหรับการใช้อใช้ D-arabinose L-arabinose D-galactose Glycerol Maltotriose Mannitol D-salicin Sorbitol L-sorbose Starch (soluble) และ D-xylose ของทั้ง 10 ไอโซเลตนั้นมีความสามารถในการใช้ได้แตกต่างกัน คือบางไอโซเลตสามารถใช้แหล่งคาร์บอนดังกล่าวได้ดี แต่บางไอโซเลตสามารถใช้ได้น้อย ซึ่งจากการที่ไม่สามารถใช้เซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนได้นั้น สอดคล้องกับสายพันธุ์มาตรฐาน *A. pullulans* NRRL Y-2311-1 และ NRRL Y-7469 และรายงานที่พบว่า *A. pullulans* ไม่สามารถใช้ cellulose แต่สามารถใช้ cellobiose เป็นแหล่งคาร์บอนได้ (Dennis และ Buhagiar, 1973; De Hoog และ Yurlova, 1994; Saha, Freer และ Bothast, 1994) อย่างไรก็ตามจากรายงานอื่นๆ พบว่า *A. pullulans* สามารถผลิตเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดส ( $\beta$ -glucosidase) และ อัลฟากลูโคซิเดส ( $\alpha$ -glucosidase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยได้ทั้ง crystalline cellulose cellobiose และ cello-oligosaccharide (Saha และคณะ 1994; Hayashi และคณะ, 1999; Okagbue และคณะ 2001; Iembo และคณะ, 2002) แต่ในปี ค.ศ. 2005 Kudanga และ Mwenje ได้ผลิต เซลลูเลส จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ที่คัดแยกจากเขตร้อน (tropical isolates) โดยใช้เปลือกของต้น Msasa เป็นแหล่งคาร์บอน ทำให้สามารถผลิต endoglucanase และ exoglucanase ได้ โดย *A. pullulans* ดังกล่าวจะสามารถใช้ carboxymethyl cellulose และ  $\alpha$ -cellulose เป็นแหล่งคาร์บอนได้ Cernakova และคณะ, 1980 พบว่า *A. pullulans* มีแอกติวิตีของ เซลลูเลส  $\alpha$ -glucosidase  $\beta$ -glucosidase และ exo-1,4- $\alpha$ -



glucosidase ทำให้สามารถสรุปได้ว่า *A. pullulans* มีทั้งสายพันธุ์ที่สามารถใช้  $\alpha$ -cellulose เป็นแหล่งคาร์บอนได้และไม่ได้ สำหรับเชื้อที่คัดแยกได้ทั้ง 10 ไอโซเลต ไม่สามารถใช้  $\alpha$ -cellulose เป็นแหล่งคาร์บอนได้

นอกจากนี้ Dennis และ Buhagiar (1973) พบว่า ความสามารถในการใช้ glycerol และ D-arabinose สามารถบอกความแตกต่างระหว่าง *A. pullulans* และ *Trichosporon pullulans* ได้ กล่าวคือ *T. pullulans* ไม่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนทั้งสองได้ แต่ในขณะที่ *A. pullulans* สามารถใช้แหล่งคาร์บอนทั้งสองได้ ส่วนความสามารถในการใช้ D-arabinose และ D-galactose ยังสามารถบอกความแตกต่างระหว่าง *A. pullulans* และ *Aureobasidium prunorum* ได้คือ *A. prunorum* ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มี D-arabinose และ D-galactose เป็นแหล่งคาร์บอน แต่ในขณะที่ *A. pullulans* สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนดังกล่าว

ความสามารถในการใช้ เมลลิลแอลฟาดีกลูโคส (methyl- $\alpha$ -D-glucose) สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง *A. pullulans* และ ยีสต์ที่มีลักษณะคล้ายคลึงกัน กล่าวคือ *A. pullulans* สามารถใช้ เมลลิลแอลฟาดีกลูโคส แต่ในขณะที่ *Kabatiella* sp. ไม่สามารถใช้ได้ (De Hoog และ Yurlova, 1994) ส่วนความสามารถในการใช้ เอทานอล และ เมทานอลของเชื้อราทั้ง 10 ไอโซเลต สอดคล้องกับ De Hoog และ Yurlova, 1994 ที่รายงานว่า *A. pullulans* ไม่สามารถใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนได้ ส่วน เอทานอล มีบางไอโซเลตที่สามารถใช้ได้ และบางไอโซเลตไม่สามารถใช้ได้ นอกจากนี้ Yurlova และคณะ (1996) พบว่า *A. pullulans* var. *aubasiani* ไม่สามารถใช้ เมลลิลแอลฟาดีกลูโคส (methyl- $\alpha$ -D-glucose) และ แลคโตส (lactose) เป็นแหล่งคาร์บอนได้ ซึ่งต่างจาก *A. pullulans* var. *pullulans* ที่ต้องสามารถใช้แหล่งคาร์บอนทั้งสองได้ ซึ่งความแตกต่างดังกล่าวนี้ สามารถนำมาใช้ระบุ variety ของ *A. pullulans* ได้ ซึ่งเชื้อราที่คัดแยกได้ทั้ง 10 ไอโซเลต สามารถใช้แหล่งคาร์บอนทั้งสองดังกล่าวได้ กล่าวคือเชื้อราทั้ง 10 ไอโซเลตนั้น เป็น *A. pullulans* var. *pullulans*

สำหรับการตรวจสอบความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจน พบว่าเชื้อราทั้ง 10 ไอโซเลต สามารถใช้แหล่งไนโตรเจนที่นำมาตรวจสอบได้ทุกชนิด โดยสามารถใช้ ammonium chloride ammonium nitrate ammonium sulfate L-asparagine, H<sub>2</sub>O sodium nitrate urea และ L-lysine ได้ดี และสามารถใช้อmonium acetate L-glycine ได้แตกต่างกันเล็กน้อย โดยในบางไอโซเลตใช้ได้ดี บางไอโซเลตใช้ได้น้อย สอดคล้องกับความสามารถในการใช้ L-lysine ได้ดีของสายพันธุ์มาตรฐาน *A. pullulans* NRRL Y-2311-1 และ NRRL Y-7469 และการตรวจพบ แอคติวิตีของ ยูรีเอส (urease) ใน *A. pullulans* (Cernakova และคณะ, 1980; De Hoog และ Yutlova, 1994;



Sehanat Prasongsuk และคณะ, 2005) แต่ก็มีรายงานว่า *A. pullulans* บางสายพันธุ์ไม่สามารถใช้ Lysine เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ (Cooke และ Matsuura, 1963)

### 2.3 การตรวจสอบการสร้างเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์

เมื่อตรวจสอบโครงสร้างของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ของเชื้อราที่คัดแยกได้ทั้ง 10 ไอโซเลต ด้วยเทคนิค IR-spectroscopy พบว่ามีความถี่ช่วงรังสี IR ของหมู่ฟังก์ชัน สอดคล้องกับ พูลูลูแลนมาตรฐาน (Sigma, USA) คือมีความถี่ของหมู่ฟังก์ชันที่สำคัญในพูลูลูแลนคือ C-C C-H C-O O-H และ  $\alpha$ -configuration ซึ่งความถี่ที่ 850  $\text{cm}^{-1}$  เป็นความถี่ของหมู่โครงสร้างแบบ  $\alpha$ -configuration (Yurlova และ De Hoog, 1997) โดยเชื้อราไอโซเลต KT1 ไม่พบ peak ของ  $\alpha$ -configuration เนื่องจาก เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ของเชื้อราไอโซเลต KT1 อาจมีสารอื่น เช่น เมลานิน เจือปนอยู่มาก เพราะจากการสังเคราะห์ของพอลิเมอร์จากไอโซเลตดังกล่าวพบว่ามีส่วนที่เชื่อมมากกว่าไอโซเลตอื่น ซึ่งอาจรบกวนต่อการวิเคราะห์ อย่างไรก็ตามจากการตรวจสอบเปรียบเทียบรูปแบบของสเปกตรัมเปรียบเทียบกับพูลูลูแลนมาตรฐาน สามารถสรุปได้ว่าเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากเชื้อราทั้ง 10 ไอโซเลต เป็น พูลูลูแลน และสอดคล้องกับการจัดจำแนกของเชื้อราทั้ง 10 ไอโซเลต ว่าเป็น *A. pullulans* var. *pullulans*

อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์ถึงความเป็นพูลูลูแลนของ เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้ สามารถใช้การตรวจสอบด้วย นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโกปี (Nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR) เพิ่มเติม จะทำให้ทราบถึงโครงสร้างโดยละเอียดของพูลูลูแลนได้ ทั้งสามวิธีดังกล่าว ที่ใช้จัดจำแนก *A. pullulans* คือ การจัดจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา การจัดจำแนกโดยตรวจสอบความสามารถในการใช้แหล่งอาหารต่างๆ และการตรวจสอบการสร้างเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ สามารถสรุปได้ในเบื้องต้นว่าเชื้อราทั้ง 10 ไอโซเลตที่คัดแยกได้นั้นเป็น *A. pullulans* var. *pullulans* แต่ทั้งนี้หากมีการนำเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล คือ การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ nuclear ribosomal DNA Internal transcribed spacer (ITS) มาใช้ร่วมในการจัดจำแนก อาจทำให้สามารถแยกความแตกต่างได้ในระดับสปีชีส์ (Yurlova และคณะ, 1999; Hunsu Punnapayak และคณะ, 2003)

## 3. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเชื้อรา

### 3.1 Paper disc method

จากการนำสารที่สกัดได้จากเชื้อราทั้ง 10 ไอโซเลต มาทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อราก่อโรคในกลุ่ม *Aspergillus* spp. พบว่า มี *A. pullulans* 4 ไอโซเลตที่สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคที่นำมาทดสอบโดย *A. pullulans* ไอโซเลต KT1 มีฤทธิ์ในการต้าน *Aspergillus*

*fumigatus* และ *A. terreus* ส่วน *A. pullulans* ไอโซเลต BM1 มีฤทธิ์ในการต้าน *A. fumigatus* *A. flavus* และ *A. terreus* ขณะที่ *A. pullulans* ไอโซเลต HKW1 และ HKW2 มีฤทธิ์ในการต้าน *A. terreus* ซึ่งสอดคล้องกับที่มีรายงานว่า สารต้านเชื้อรา ออริโอบาซิดิน เอ ที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* นอกจากสามารถยับยั้งเชื้อร่าก่อโรคในกลุ่มอื่นๆ แล้วยังสามารถยับยั้ง *Aspergillus* spp. บางสายพันธุ์ได้ดี ได้แก่ *A. terreus* *A. nidulans* และ *A. clavatus* แต่ยับยั้งได้น้อยใน *A. fumigatus* *A. flavus* และ *A. niger*

วิธีการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยวิธีนี้เป็นวิธีที่นิยมใช้ทดสอบสารต้านจุลชีพ โดยเฉพาะกับสารที่มีปริมาณน้อย โดยเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (clear zone) จะสัมพันธ์กับปริมาณสารที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลชีพ (Gaydos และ Harrington, 1982) แต่เนื่องด้วยจากการทดลอง สารที่สกัดได้จาก *A. pullulans* ทั้ง 4 ไอโซเลต ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรานั้นยังเป็นสารสกัดหยาบ และยังมีปริมาณสารอื่นเจือปนอยู่หลายชนิด ทำให้ยังไม่สามารถระบุได้ถึงปริมาณความเข้มข้นที่แน่นอนของเนื้อสารที่สามารถออกฤทธิ์ต้านเชื้อราได้จากบริเวณยับยั้งเชื้อรา (clear zone) เนื่องจากบนแผ่นกระดาษกรองที่จุ่มด้วยสารสกัดนั้นอาจมีปริมาณสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อราได้ในปริมาณไม่เท่ากัน ดังนั้นหากต้องการทราบปริมาณความเข้มข้นน้อยที่สุดของสารที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราที่ทดสอบนั้น ควรทราบความเข้มข้นที่แน่นอนของสารออกฤทธิ์ที่มีอยู่ในสารสกัดที่แน่นอน หรือทำให้สารสกัดนั้นมีความบริสุทธิ์เพิ่มมากขึ้น

### 3.2 Conidial germination inhibition assay

จากการนำสารที่สกัดได้จาก *A. pullulans* ทั้ง 10 ไอโซเลต มาทดสอบความสามารถในการต้านเชื้อรา โดยคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์ พบว่าสารสกัดจาก *A. pullulans* 4 ไอโซเลต ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราที่นำมาทดสอบคือ *A. pullulans* ไอโซเลต KT1 สามารถยับยั้งการเจริญของสปอร์ของ *Aspergillus fumigatus* และ *A. terreus* ได้ 57.10 และ 50.49 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วน *A. pullulans* ไอโซเลต BM1 สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *A. fumigatus* *A. flavus* และ *A. terreus* ได้ 52.79 36.55 และ 36.58 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ขณะที่ *A. pullulans* ไอโซเลต HKW1 และ HKW2 สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *A. terreus* ได้ 38.87 และ 42.46 ตามลำดับ

จากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจาก *A. pullulans* ทั้ง 4 ไอโซเลตที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus* spp. ด้วย paper disc method นั้นคือ ไอโซเลตเดียวกันกับที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *Aspergillus* spp. ด้วย ซึ่งเชื้อราในกลุ่ม Aspergilli เป็นเชื้อราฉวยโอกาสที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ (opportunistic fungi) สามารถก่อโรคในคนหรือสัตว์ที่มีความ

ผิดปกติของภูมิคุ้มกัน โรคที่เกิดขึ้นเรียกว่า Aspergillosis อาการของโรคมักมีตั้งแต่เล็กน้อยจนถึงเป็นสาเหตุให้ผู้ป่วยเสียชีวิต ส่วนใหญ่ทำให้เกิดการติดเชื้อในร่างกายได้หลายระบบ ได้แก่ หู ตา จมูก และปอด การติดเชื้อนี้อาจจะลุกลามไปยังกระดูก สมอง เยื่อหุ้มสมอง ระบบประสาท หรือเกิดเนื้อตายเนื่องมาจากการติดเชื้อที่อวัยวะภายในต่างๆ (Schett และคณะ, 1998) เชื้อราในสกุลนี้ที่ก่อโรครุนแรงได้แก่ *A. fumigatus* *A. flavus* *A. niger* และ *A. terreus* (พรรณกร อิมวิทยา, 2538) แต่ *A. terreus* มีความแตกต่างจาก Aspergilli สายพันธุ์อื่นๆ คือมีเพียง *A. terreus* เท่านั้นที่ต้านทานต่อยาต้านเชื้อรา แอมโฟเทอริซินบี (Walsh และคณะ, 2003; Sullon และคณะ, 1999; Steinbach และคณะ, 2004) ดังนั้น ผู้ป่วยจะมีอัตราการติดเชื้อจาก *A. terreus* สูงกว่า *Aspergillus* ประเภทอื่นๆ (Iwen และคณะ, 1998)

จากฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจาก *A. pullulans* 4 ไอโซเลตดังกล่าว ที่สามารถยับยั้งเชื้อราในกลุ่มนี้ โดยเฉพาะสารสกัดของทั้ง 4 ไอโซเลตนั้นสามารถยับยั้งเชื้อรา *A. terreus* ได้ดี ดังนั้น จึงน่าจะมีการศึกษาต่อไปในแง่ของการทำเป็นยาต้านเชื้อราต่อไปในอนาคต

#### 4. การตรวจสอบสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี

##### 4.1 เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (Thin layer chromatography)

จากการนำสารสกัดจาก *A. pullulans* 4 ไอโซเลต ที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา ได้แก่ *A. pullulans* ไอโซเลต KT1 BM1 HKW1 และ HKW2 มาตรวจสอบด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (TLC) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ออริโอบาซินิน เอ โดยสารสกัดจาก *A. pullulans* ทั้ง 4 ไอโซเลต สามารถแยกเป็นสารได้หลายตัว และมีตำแหน่งของสารที่มีค่า Rf เท่ากับ 0.40 ซึ่งใกล้เคียงกับ ออริโอบาซินิน เอ ที่มีค่า Rf ในช่วง 0.375-0.4 ดังนั้นเพื่อตรวจสอบว่าตำแหน่งดังกล่าวมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราหรือไม่ เมื่อข้อมลด้วย แลคโตฟีนอลบลูที่สามารย้อมติดสีเชื้อรา ทำให้ inhibition zone ที่มีการยับยั้งการเจริญของเชื้อราไม่ติดสีข้อมลดังกล่าว ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับโครมาโตแกรมที่ตรวจสอบด้วยไอโอดีน คือ

จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้ง *A. fumigatus* พบว่าสารสกัดจาก *A. pullulans* ไอโซเลต KT1 และ BM1 มีตำแหน่งที่ยับยั้งเชื้อราดังกล่าว โดยสารสกัดจาก *A. pullulans* ไอโซเลต KT1 มีสารที่ยับยั้ง *A. fumigatus* 1 ชนิด คือสารที่มีค่า Rf เท่ากับ 0.40 และ สารสกัดจาก *A. pullulans* ไอโซเลต BM1 มีสาร 2 ชนิดที่สามารถยับยั้ง *A. fumigatus* คือสารที่มีค่า Rf เท่ากับ 0.40 และ 0.675 ตามลำดับ ส่วนตำแหน่งที่ยับยั้ง *A. fumigatus* ของออริโอบาซินิน เอ มีค่า Rf เท่ากับ 0.40

การทดสอบความสามารถในการยับยั้ง *A. flavus* พบว่าสารสกัดจาก *A. pullulans* ไอโซเลต BM1 มีสารที่ยับยั้ง เชื้อราดังกล่าว 2 ชนิด คือสารที่มีค่า Rf เท่ากับ 0.40 และ 0.675 ตามลำดับ ส่วนตำแหน่งที่ยับยั้ง *A. flavus* ของออริโอบาซิไดน เอ มีค่า Rf เท่ากับ 0.40

การทดสอบความสามารถในการยับยั้ง *A. terreus* พบว่าสารสกัดจาก *A. pullulans* ไอโซเลต KT1 BM1 HKW1 และ HKW2 มีสารที่ยับยั้ง เชื้อราดังกล่าวโดย สารสกัดจาก *A. pullulans* ทั้ง 4 ไอโซเลต มีสารที่สามารถยับยั้ง *A. terreus* ที่ตำแหน่งเดียวกัน 1 ชนิด มีค่า Rf เท่ากับ 0.40 และตรงกันกับตำแหน่งที่ยับยั้งเชื้อราของออริโอบาซิไดน เอ ซึ่งมีค่า Rf เท่ากับ 0.40

ในการแยกสารด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง เป็นโครมาโทกราฟีแบบดูดซับ ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งที่ยิยมใช้ในการแยกสาร การทำให้สารบริสุทธิ์ หรือใช้ระบุชนิดของสารและจำนวนสารที่เป็นองค์ประกอบในของผสม โดยอาศัยหลักการที่สารต่างชนิดกันจะกระจายตัวอยู่ในเฟสคงที่และเฟสเคลื่อนที่ได้ไม่เท่ากัน การที่สารในของผสมแยกออกจากกันได้เนื่องจากสารแต่ละตัวจะถูกดูดซับไว้ไม่เท่ากัน สารที่ถูกดูดซับไว้มากย่อมเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าสารที่ถูกดูดซับได้น้อย ซึ่งจากหลักการนี้ ทำให้สามารถแยกสารที่มีสภาพขั้วต่างกันออกจากกันได้ จากในการทดลองเลือกใช้แผ่นโครมาโทกราฟีที่มีตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจล ซึ่งใช้ได้กับสารเกือบทุกชนิด และเนื่องจาก ออริโอบาซิไดน เอ เป็นสารประเภทพอลิเปปไทด์ ที่มีสภาพขั้วค่อนข้างสูง สามารถละลายได้ดีในเอทานอล เมทานอล คลอโรฟอร์ม และเอทิลอะซิเตท เป็นต้น (Takesako และคณะ, 1991) จึงได้เลือกใช้เอทิลอะซิเตทซึ่งเป็นตัวทำละลายที่สามารถทำละลาย ออริโอบาซิไดน เอ และพาให้เคลื่อนที่บนแผ่น TLC ได้ค่อนข้างเหมาะสมกว่าเอทานอลและ เมทานอลที่มีสภาพขั้วค่อนข้างสูงเกินไป หรือ คลอโรฟอร์มซึ่งมีสภาพขั้วต่ำเกินไปสำหรับการแยก ออริโอบาซิไดน เอ และสารสกัดที่ได้ ซึ่งจะทำให้ผลการแยกสารได้ไม่ดีเท่าที่ควร

ดังนั้นจากรูปแบบของการแยกสารบนแผ่น TLC สารสกัดจาก *A. pullulans* ไอโซเลต KT1 HKW1 และ HKW2 ที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราที่ใช้ทดสอบนั้นอาจเป็นสารชนิดเดียวกัน จึงมีความเป็นไปได้ว่าเป็นออริโอบาซิไดน เอ เนื่องจากสภาพความมีขั้วค่อนข้างใกล้เคียงกัน สังเกตได้จากการแยกสารได้ ณ ตำแหน่งที่มีค่า Rf ใกล้เคียงกันบนแผ่น TLC ส่วนสารสกัดจาก *A. pullulans* ไอโซเลต BM1 มีสารมากกว่า 1 ชนิดในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อรา *A. fumigatus* และ *A. flavus* แต่มีสารชนิดเดียวในการออกฤทธิ์ต้าน *A. terreus* โดยสารที่มีตำแหน่งตรงกันกับ ออริโอบาซิไดน เอ จึงมีความเป็นไปได้ว่าเป็น ออริโอบาซิไดน เอ เนื่องจากการมีสภาพขั้วใกล้เคียงกันของสาร ส่วนสารอีกชนิดหนึ่งที่แยกได้จากสารสกัดจาก *A. pullulans* ไอโซเลต BM1 ที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *A. fumigatus* และ *A. flavus* เป็นสารที่มีขั้วสูงกว่า ออริโอบาซิไดน เอ เนื่องจากมีค่า Rf ที่สูงกว่า ยังไม่สามารถระบุได้แน่ชัดว่าเป็นสารชนิดใด ซึ่งถ้าต้องการทราบองค์ประกอบของสารทุกตัวที่มีฤทธิ์



ในการด้านเชื่อว่าป็นสารชนิดใด ควรแยกให้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นและวิเคราะห์โครงสร้างของสารแต่ละชนิดนั้นต่อไป การวิเคราะห์โครงสร้างของสารด้วย นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโกปี (Nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR) หรือ Mass spectrometry การวิเคราะห์กรดอะมิโนที่มีอยู่ในสารสกัดโดยการทำ Amino acid analysis เป็นต้น และทำการศึกษาต่อถึงความสามารถในการด้านเชื่อว่าของสารดังกล่าวเพิ่มเติม

#### 4.2 เทคนิค High Performance Liquid Chromatography

จากการทดลองได้เลือกใช้คอลัมน์แบบเฟสผันกลับ (Reversed-phase chromatography) ชนิด C18 เนื่องจากเหมาะสมกับ ออริโอบาซิดิน เอ ซึ่งเป็นสารพอลิเปปไทด์ที่มีขั้วสูง โดยคอลัมน์ชนิดนี้มีเฟสอยู่กับที่เป็นสารที่ไม่มีขั้ว และเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายที่มีขั้ว ทำให้สามารถชะสารผสมมีขั้วที่ต้องการออกมาได้ โดยเฟสอยู่กับที่เป็นซิลิกาที่มีหมู่ -OH ถูกแทนที่ด้วยหมู่ octadecyl ที่มีคาร์บอน 18 ตัว ( $\text{Si-C}_{18}\text{H}_{37}$ ) โดยในการทดลองใช้คอลัมน์คือ คอลัมน์ Lichrocart C18 ( $4.0 \times 125$  มิลลิเมตร) ของบริษัท Merck ขนาดรูพรุน (pore size) 100 อังสตรอม ขนาด particle 5 ไมโครเมตร และใช้ UV detector ที่ความยาวคลื่น 258 นาโนเมตร เนื่องจากมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดในเมทธานอลที่ความยาวคลื่นดังกล่าว ซึ่งสารมาตรฐานออริโอบาซิดิน เอ และสารสกัดจาก *A. pullulans* ทั้ง 4 ไอโซเลต ละลายในเมทธานอล โดยมีอะซิโตนไตร และน้ำ เป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราส่วน 7.5:2.5 ตามลำดับ อัตราการไหลเท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ผลที่ได้คือพบเพียง peak ของตัวทำละลายที่ใช้ในที่นี่คือ เมทธานอล และพบสัญญาณของ peak ที่ต่ำมาก รวมถึงมี peak อื่นรบกวนหลาย peak ทำให้ไม่สามารถระบุได้ว่า peak ใดเป็น peak ของ ออริโอบาซิดิน เอ ซึ่งจากการที่พบสัญญาณ peak ที่ต่ำอาจเนื่องจากการแยกที่ไม่ดีเพียงพอกับความยาวของคอลัมน์ และ ขนาดรูพรุน (pore size) ของเฟสอยู่กับที่อาจยังไม่เหมาะสมต่อการแยก ออริโอบาซิดิน เอ ซึ่ง Takesako และคณะ, 1991 ได้ใช้คอลัมน์สำหรับแยก ออริโอบาซิดินเอ คือ C18 คอลัมน์ที่มีขนาดรูพรุน 120 อังสตรอม และจากการเปลี่ยนไปใช้คอลัมน์ที่มีขนาดยาวขึ้น และมีขนาดรูพรุนใกล้เคียงกับที่มีรายงานการแยก ออริโอบาซิดิน โดยมุ่งหวังให้ได้ การแยกที่ดีขึ้น คือใช้ คอลัมน์ Prevail C18 ( $4.6 \times 250$  มิลลิเมตร) ของบริษัท Alltech ขนาดรูพรุน (pore size) 110 อังสตรอม ขนาด particle 5 ไมโครเมตร โดยยังใช้สภาวะในการแยกเหมือนเดิม ผลที่ได้ พบว่า มีแค่ peak ของตัวทำละลายที่ใช้ และ peak อื่นหลาย peak และไม่สามารถระบุได้ว่า peak ใดเป็น peak ของสารมาตรฐาน ออริโอบาซิดิน เอ จึงอาจเป็นไปได้ว่าตัวทำละลายที่ใช้ ละลายออริโอบาซิดิน เอ ยังไม่เหมาะสม จึงทำละลายใหม่ในในอะซิโตนไตร และเปลี่ยนช่วง ตรวจสอบของ UV detector เป็นที่ 216 นาโนเมตร เนื่องจากทำการ scan หาช่วงการดูดกลืนแสงสูงสุดของออริโอบาซิดินเอ ในอะซิโตนไตรได้ที่ 216 นาโนเมตร ผลที่ได้คือ พบเพียงแค่ peak



ของ ตัวทำละลายที่ใช้เท่านั้น ไม่พบสัญญาณของ peak ที่บ่งบอกได้ว่าตรวจพบสารมาตรฐานอริโอบาซิดิน เอ เป็นไปได้ว่า เฟสคงที่ที่ใช้ มีขนาด particle ขนาดของรูพรุน และมีความไม่เหมาะสมในการดูดซับ สารพอลิเปปไทด์อริโอบาซิดิน เอ รวมถึงความสามารถของเฟสเคลื่อนที่ที่จะสามารถชะสารที่ต้องการออกมา อาจมีความแรงของสภาพขั้วยังไม่เพียงพอ



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 6

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

#### สรุปผลการทดลอง

##### 1. การคัดแยก *A. pullulans*

สามารถคัดแยกเชื้อราที่กล่าวว่าเป็น *A. pullulans* จากเขตกรุงเทพมหานครได้ทั้งหมด 10 ไอโซเลต ได้แก่ KT1 BM1 TB1 PH1 JP1 VM1 HKW1 HKW2 HKW3 และ HKW4 โดยสามารถพบเชื้อดังกล่าวเจริญร่วมกับเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด ได้แก่ เชื้อราเส้นใยสีเขียว เส้นใยสีขาว และเส้นใยสีดำ รวมถึงเชื้อแบคทีเรีย และยีสต์ชนิดอื่น

##### 2. การจัดจำแนก *A. pullulans*

เชื้อราที่ได้เมื่อจัดจำแนกโดยอาศัย 3 วิธีประกอบกันคือ การจัดจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา การจัดจำแนกโดยตรวจสอบความสามารถในการใช้แหล่งอาหารต่างๆ และการตรวจสอบการสร้างเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ สามารถสรุปได้ในเบื้องต้นว่าเชื้อราทั้ง 10 ไอโซเลต ที่คัดแยกได้นั้นเป็น *A. pullulans* และสามารถบอกได้ว่าเป็น *A. pullulans* var. *pullulans* เนื่องจากความสามารถในการใช้ เมลลิลแอลฟาดีกลูโคสและ แลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน

##### 3. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเชื้อรา

จากเชื้อราที่คัดแยกได้ทั้งหมด 10 ไอโซเลต มีเพียง 4 ไอโซเลต ที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* spp. ได้บางสายพันธุ์แตกต่างกันดังนี้ *A. pullulans* ไอโซเลต KT1 มีฤทธิ์ในการต้าน *Aspergillus fumigatus* และ *A. terreus* ส่วน *A. pullulans* ไอโซเลต BM1 มีฤทธิ์ในการต้าน *A. fumigatus* *A. flavus* และ *A. terreus* ขณะที่ *A. pullulans* ไอโซเลต HKW1 และ HKW2 มีฤทธิ์ในการต้าน *A. terreus* และจากฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากไอโซเลตดังกล่าว ที่สามารถยับยั้งเชื้อราในกลุ่มนี้ได้ จึงน่าจะมีการศึกษาต่อในแง่ของการทำเป็นยาต้านเชื้อราต่อไปในอนาคต

#### 4. การตรวจสอบสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี

สารสกัดจาก *A. pullulans* ไอโซเลต KT1 HKW1 และ HKW2 มีสาร 1 ชนิดที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราที่ใช้ทดสอบและมีความเป็นไปได้ที่เป็นสารชนิดเดียวกับออริโอบาซิดิน เอ เนื่องจากสภาพความมีขั้วของสารมีความใกล้เคียงกัน ส่วนสารสกัดจาก *A. pullulans* ไอโซเลต BM1 มีสารมากกว่า 1 ชนิดในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อรา *A. fumigatus* และ *A. flavus* แต่มีสารเพียงชนิดเดียวในการออกฤทธิ์ต้าน *A. terreus* และ 1 ใน 2 ชนิดนั้นมีความเป็นไปได้ที่เป็นสารชนิดเดียวกับออริโอบาซิดิน เอ

#### ข้อเสนอแนะในงานวิจัย

1. ในการคัดแยก *A. pullulans* มักประสบความสำเร็จในการแยกเชื้อจากแหล่งที่อยู่ก่อนข้างมีความชื้นสูง มีพื้นผิวก่อนข้างเปียกชื้นอยู่ตลอดเวลา ดังนั้นการเลือกสุ่มพื้นที่เก็บตัวอย่างจึงก่อนข้างมีความสำคัญในการได้มาของเชื้อ ซึ่งควรคำนึงถึงปัจจัยหลายอย่างเช่น เล็กเก็บตัวอย่างที่ห้องน้ำที่มีพื้นผิวก่อนข้างเปียกชื้นตลอดเวลา และมีผู้ใช้เป็นประจำ หรือห้องน้ำที่มีความถี่ในการทำมาสะอาดด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อโรคน้อย ทำให้มีโอกาสสูงในการพบ *A. pullulans*
2. เนื่องจากสารต้านเชื้อราจาก *A. pullulans* เป็นสารที่อยู่ภายในเซลล์ ซึ่งมีปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับสารประเภทหลังออกภายนอกเซลล์ ดังนั้นหากต้องการศึกษาในแง่การนำไปใช้ประโยชน์ควรทำการผลิตในระดับที่ใหญ่ขึ้น (large scale) เพื่อให้ได้ปริมาณสารที่ต้องการมากเพียงพอต่อการศึกษาในแง่ที่เป็นประโยชน์ในด้านการแพทย์ เช่นการผลิตยาต้านเชื้อรา หรือการผลิตเพื่อการค้า

## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

- คนาวรรณ พจนานคม. 2544. ความก้าวหน้าของสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา. *วารสารมหาวิทยาลัยศิลปากร* 21: 233-256.
- พรรณกร อิ่มวิทยา และ นันทจักร เกรินพงษ์. 2543. ยาด้านเชื้อรา. ใน พรรณกร อิ่มวิทยา (บรรณาธิการ), *โรคติดเชื้อรา*, หน้า 166-178. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์สำนักเลขานุการคณะรัฐมนตรี.
- พรรณกร อิ่มวิทยา. 2538. เชื้อราฉวยโอกาสชนิดสายราไม่มีสีและการก่อโรค. ใน *เชื้อรากับโรคในคน*, หน้า 158-167. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์สามัคคีสาร (ดอกหญ้า).
- วิชัย ธีวตระกูล. 2526. *การประยุกต์สเปกโตรสโกปีในเคมีอินทรีย์*. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์ห้องเรียน.

### ภาษาอังกฤษ

- Barnett, J. A., Payne, R. W. and Yarrow, D. 2000. *Yeasts: characteristics and identification*. Third edition. New York: Cambridge University Press.
- Cernakova, M., Kratochvilova, K., Suty, L., Zemek, J. and Kuniak, E. 1980. Biochemical similarities among strains of *Aureobasidium pullulans* (de Bary) arnaud. *Folia Microbiologica* 25: 68-73.
- Cooke, W. B. 1959. An ecological life history of *Aureobasidium pullulans* (de Bary) arnaud. *Mycopathologia et Mycologia applicata* 17: 1-43.
- Cooke, W. B. and Matsuura, G. 1963. Physiological studies in the black yeasts. *Mycopathologia et Mycologia Applicata* 21: 225-271.
- De Hoog, G. S. and Yurlova, N. A. 1994. Conidiogenesis, nutritional physiology and taxonomy of *Aureobasidium* and *Hormonema*. *Antonie van Leeuwenhoek* 65: 41-54.
- De Hoog, G. S., Zalar, P., Urzi, C., Leo, F., Yurlova, N. A. and Sterflinger, K. 1999. Relationship of dothideaceous black yeasts and meristematic fungi based on 5.8s and ITS2 rDNA sequence comparison. *Studies in Mycology* 43: 31-37.

- Dennis, C. and Buhagiar, R. W. M. 1973. Comparative study of *Aureobasidium pullulans*, *A. prunorum* sp. Nov. and *Trichosporon pullulans*. *Transactions British Mycological Society* 60: 567-575.
- Deshpande, M. S., Rale, V. B. and Lynch, J. M. 1992. *Aureobasidium pullulans* in applied microbiology: a status report. *Enzyme Microbial Technology* 14: 514-527.
- DiDomenico, B. 1999. Novel antifungal drugs. *Current Opinion in Microbiology* 2: 509-515.
- Domsch, K. H., Gams, W. and Anderson, T. H. 1993. *Compendium of soil fungi*. Volume I. London: Academic Press.
- Endo, M., Takesako, K., Kato, I. and Yamaguchi, H. 1997. Fungicidal action of Aureobasidin A, a cyclic depsipeptide antifungal antibiotic, against *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41: 672-676.
- Gaydos, J. M. and Harrington B. J. 1982. Agar disk diffusion for the quality control testing of autoclave elution disks. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 21: 516-518.
- Gentry, L. O. 1990. Update on antimicrobial agents. *Systemic antifungal agents* 17: 194-202.
- Georgopapadakou, N. H. and Walsh, T. J. 1994. Human mycoses: drugs and targets for emerging pathogens. *Science* 264: 371-373.
- Georgopapadakou, N. H. and Walsh, T. J. 1996. Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40: 279-291.
- Gold, W., Stout, H. A., Pagano, J. F. and Donovan, R. 1956. Amphotericins A and B, antifungal antibiotics produced by a *Streptomyces*. I. *in vitro* studies. *Antibiotics Annual: Proceedings of the Symposium on Antibiotics* 579-586.
- Hayashi, S., Sako, S., Yokoi, H., Takasaki, Y. and Imada, K. 1999. Purification and characterization of the intracellular  $\beta$ -glucosidase from *Aureobasidium* sp. ATCC 20524. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 22: 160-163.
- Hermanides-Nijhof, E. J. 1977. *Aureobasidium* and allied genera. *Studies in Mycology* 15: 141-166.
- Hitchcock, C. A., Pye, G. W., Troke, P. F., Johnson, E. M. and Warnock, D. W. 1993. Fluconazole resistance in *Candida glabrata*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 37: 1962-1965.

- Iembo, T., De Silva, R., Pagnocca, F. C. and Gomes, E. 2002. Production, characterization, and properties of  $\beta$ -glucosidase and  $\beta$ -xylosidase from a strain of *Aureobasidium* sp. *Applied Biochemistry and Microbiology* 38: 549-552.
- Ikai, K., Takesako, K., Shiomi, K., Moriguchi, M., Umeda, Y., Yamamoto, J. and Kato, I. 1991. Structure of Aureobasidin A. *Journal of Antibiotics* 44: 925-933.
- Ikai, K., Shiomi, K., Takesako, K., Mizutani, S., Yamamoto, J., Ogawa, Y. AND Ueno, M. 1991. Structures of Aureobasidins B TO R. *Journal of Antibiotics* 44: 1187-1198.
- Iwen, P. C., Rupp, M. E., Langnas, A. N., Redd, E. C. and Hinrichs, S. H. 1998. Invasive pulmonary aspergillosis due to *Aspergillus terreus*: 12-year experience and review of the literature. *Clinical Infectious Diseases* 26: 1092-1097.
- Kudanga, T. and Mwenje, E. 2005. Extracellular cellulose production by tropical isolates of *Aureobasidium pullulans*. *Canadian Journal of Microbiology* 51: 773-776.
- Kurome, T., Inami, K., Inoue, T., Ikai, K., Takesako, K., Kato, I. and Shiba, T. 1996. Total synthesis of an antifungal cyclic depsipeptide aureobasidin A. *Tetrahedron* 52: 4327-4346.
- Lavermicocca, P., Valerio, F., Evidente, A., Lazzaroni, S., Corsetti, A. and Gobbetti, M. 2000. Purification and Characterization of Novel Antifungal Compounds from the Sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 4084-4090.
- Leathers, T. D. 2003. Biotechnological production and applications of pullulan. *Applied Microbiology and Biotechnology* 62: 468-473.
- Lucca, A. J. and Walsh, T. J. 1999. Antifungal Peptides: Novel Therapeutic compounds against emerging pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43: 1-11.
- Nagiec, M. M., Nagiec, E. E., Baltisberger, J. A., Wells, G. B., Lester, R. L. and Dickson, R. C. 1997. Sphingolipid synthesis as a target for antifungal drugs. *The Journal of Biological Chemistry* 272: 9809-9817.
- Okaglue, R. N., Mwenje, E., Kudanga, Siwela, M. and Sibanda, T. 2001. Isolation of *Aureobasidium pullulans* from Zimbabwean sources and glucosidase activities of selected isolates. *South African Journal of Botany* 67: 157-160.



- Prasongsuk, S., Sullivan, R. F., Kuhirun, M., Eveleigh, D. E. and Punnapayak, H. 2005. Thailand habitats as sources of pullulan-producing strains of *Aureobasidium pullulans*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 21: 393-398.
- Punnapayak, H., Sudhadham, M., Prasongsuk, S. and Pichayangkura, S. 2003. Characterization of *Aureobasidium pullulans* isolated from airborne spores in Thailand. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 30: 89-94.
- Ramos, S. and Acha, I. G. 1975. A vegetative cycle of *Pullularia pullulans*. *Transactions British Mycological Society* 64: 129-135.
- Saha, B. C., Freer, S. N. and Bothast, R. J. 1994. Production, purification, and properties of a thermostable  $\beta$ -glucosidase from color variant strain of *Aureobasidium pullulans*. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 3774-3780.
- Schett, G., Casati, B., Willinger, B., Weinlander, G., Binder, T., Grabenwoger, F., Sperr, W., Geissler, K. and Jager, U. 1998. Endocarditis and aortal embolization caused by *Aspergillus terreus* in a patient with acute lymphoblastic leukemia in remission: diagnosis by peripheral-blood culture. *Journal of Clinical Microbiology* 36: 3347-3351.
- Shigemori, H., Tenma, M., Shimazaki, K. and Kobayashi, J. 1998. Three new metabolites from the marine yeast *Aureobasidium pullulans*. *Journal of Natural Products* 61: 696-698.
- Steinbach, W. J., Benjamin, D. K., Kontoyiannis, D. P., Perfect, J. R., Lutsar, I., Marr, K. A., Lionakis, M. S., Torres, H. A., Jafri, H. and Walsh, T. J. 2004. Infections due to *Aspergillus terreus*: a multicenter retrospective analysis of 83 cases. *Clinical Infectious Diseases* 39: 192-198.
- Sullon, D. A., Sanchie, S. E., Revankar, S. G., Forthergill, A. W. and Rinaldi, M. G. 1999. In vitro amphotericin B resistance in clinical isolates of *Aspergillus terreus*, with a head-to-head comparison to voriconazole. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 2343-2345.
- Tachibana, S., Ishikawa, H. and Itoh, K. 2005. Antifungal activities of compounds isolated from the leaves of *Taxus cuspidate* var. *nana* against plant pathogenic fungi. *Journal of the institute of Wood Science* 51: 181-184.
- Takeo, K. and Hoog, G. S. 1991. Karyology and hyphal characters as taxonomic criteria in Ascomycetous black yeasts and related fungi. *Antonie van Leeuwenhoek* 60: 35-42.

- Takesako, K., Ikai, K., Haruna, F., Endo, M., Shimanaka, K. and Sono, E. 1991. Aureobasidins, new antifungal antibiotics taxonomy, fermentation, isolation and properties. *Journal of Antibiotics* 44: 919-924.
- Takesako, K., Kuroda, H., Inoue, T., Haruna, F., Yoshikawa, Y. and Kato, Ikunoshin. 1993. Biological properties of Aureobasidin A, A cyclic depsipeptide antifungal antibiotic. *Journal of Antibiotics* 46: 1414-1420.
- Ueda, S., Fujita, K., Komatsu, K. and Nakashima, Z. 1963. Polysaccharide produced by the genus *Pullularia*. *Applied Microbiology* 11: 211-215.
- Waldorf, A. R. and Polak, A. 1983. Mechanisms of action of 5-fluorocytosine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 23: 79-85.
- Walsh, T. J., Petraitis, V., Petraitiene, R., Field-Ridley, A., Sutton, D., Ghannoum, M., Sein, T., Schaufele, R., Peter, J., Bacher, J., Casler, H., Armstrong, D., Espinel-Ingroff, A., Rinaldi, M. G. and Lyman, C. A. 2003. Experimental pulmonary aspergillosis due to *Aspergillus terreus*: pathogenesis and treatment of an emerging fungal pathogen resistant to amphotericin B. *The Journal of Infectious Diseases* 188: 305-319.
- Yurlova, N. A., Uijthof, J. M. J. and Hoog, G. S. 1996. Distinction of species in *Aureobasidium* and related genera by PCR-ribotyping. *Antonie van Leeuwenhoek* 69: 323-329.
- Yurlova, N. A. and Hoog, G. S. 1997. A new variety of *Aureobasidium pullulans* characterized by exopolysaccharide structure, nutritional physiology and molecular features. *Antonie van Leeuwenhoek* 72: 141-147.
- Yurlova, N. A., Hoog, G. S. and Gerrits van den Ende, A. H. G. 1999. Taxonomy of *Aureobasidium* and allied genera. *Studies in Mycology* 43: 63-69.
- Zhong, W., Jeffries, M. W. and Georgopapadakou, N. H. 2000. Inhibition of Inositol Phosphorylceramide Synthase by Aureobasidin A in *Candida* and *Aspergillus* Species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44: 651-653.



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ก

### อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีเตรียม

#### 1. Potato Dextrose Agar (PDA)

มันฝรั่ง	200	กรัม
น้ำตาลเดกซ์โทรส	20	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น		

หั่นมันฝรั่งเป็นชิ้นลูกเต๋ารายขนาดประมาณ 1 x 1 เซนติเมตร ต้มกับน้ำกลั่น เมื่อสุกแล้วกรองเอาแต่น้ำ จากนั้นเติมน้ำตาลเดกซ์โทรสแล้วปรับปริมาตรให้ใกล้ 1 ลิตร ปรับ pH เท่ากับ 5.5 เติมวุ้นแล้ว ต้มจนวุ้นละลายหมด สุดท้ายปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

#### 2. Potato Dextrose Broth (PDB)

มันฝรั่ง	200	กรัม
น้ำตาลเดกซ์โทรส	20	กรัม
น้ำกลั่น		

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

#### 3. Yeast Malt Agar (YMA)

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

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

#### 4. Yeast Malt Broth (YMB)

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

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

#### 5. Corn Meal Agar (CMA)

Corn Meal	20	กรัม
Peptone	40	กรัม
น้ำตาลกลูโคส	40	กรัม
วุ้น	15	กรัม

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

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## 6. Malt Extract Agar (MEA)

Malt extract	25	กรัม
วุ้น	15	กรัม

ละลาย Malt extract ด้วยน้ำกลั่น แล้วเติมวุ้น จากนั้นนำไปต้มจนวุ้นละลายหมด แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

## 7. Seed Culture Medium (สำหรับผลิตสารต้านเชื้อรา)

Yeast-nitrogenous base	0.67%
น้ำตาลกลูโคส	2%

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

## 8. Production Medium I (สำหรับผลิตสารต้านเชื้อรา)

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

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

## 9. Production Medium II (สำหรับผลิตสารต้านเชื้อรา)

น้ำตาลกลูโคส	10%
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.5%
Bacto-Peptone	5%
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.75%
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.25%
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.05%
NaCl	0.05%
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2.5 $\mu\text{g/ml}$
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.5 $\mu\text{g/ml}$

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

## 10. Production medium (สำหรับผลิตเอกโซพอลิแซคคาไรด์)

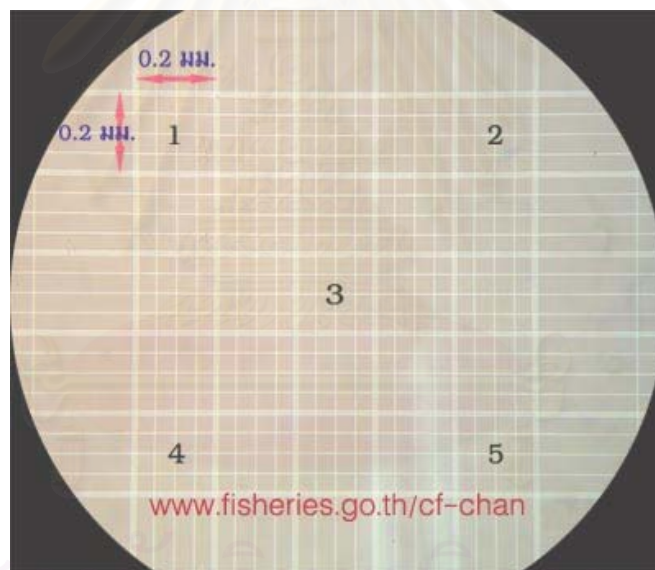
น้ำตาลซูโครส	5%
Bacto-Peptone	0.06%
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.5%
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.04%
NaCl	0.1%
Yeast extract	0.04%

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่นตามลำดับ ปรับ pH ให้ได้ 6.5 ปรับปริมาตรตามต้องการ แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

## ภาคผนวก ข

### 1. การนับจำนวนเซลล์ยีสต์ด้วยวิธี Direct Microscopic Count โดยใช้ Haemocytometer

Haemocytometer เป็นอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับนับเม็ดเลือด แต่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการนับสปอร์ของราหรือจำนวนเซลล์จุลินทรีย์ได้ Haemocytometer เป็นสไลด์ที่มีช่องแบ่งไว้เป็นตาราง เมื่อปิดด้วย cover glass ซึ่งใช้เฉพาะกับอุปกรณ์จะทำให้มีความลึกระหว่างตัวสไลด์กับ cover glass ทำให้บรรจุของเหลวซึ่งมีตัวอย่างที่ต้องการนับจำนวนไว้ได้ จีดแบ่งจะแบ่งออกเป็นช่องสี่เหลี่ยมจตุรัส 25 ช่อง แต่ละช่องมีขนาด 0.2 x 0.2 ตารางมิลลิเมตร ซึ่งภายในแต่ละช่องจะแบ่งย่อยออกเป็น 16 ช่องเล็ก แต่ละช่องมีขนาด 0.05 x 0.05 ตารางมิลลิเมตร ดังนั้นเมื่อปิดทับสไลด์ด้วย cover glass ซึ่งใช้เฉพาะกับอุปกรณ์นี้ ของเหลวที่บรรจุอยู่จึงมีปริมาตรเท่ากับ 0.00025 ลูกบาศก์มิลลิเมตร



ในการนับจำนวนเซลล์ควรเจือจางเซลล์ให้มีปริมาณที่สามารถนับได้สะดวกและแม่นยำไม่เจือจางหรือหนาแน่นจนเกินไป ในการนับให้หยดน้ำตัวอย่างที่ต้องการนับจำนวนเซลล์ลงบน Haemocytometer แล้วปิดทับด้วย cover glass จากนั้นนำไปตรวจนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ถ้านับจากช่องใหญ่ควรนับอย่างน้อย 5 ช่อง

**วิธีการคำนวณ**

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

ดังนั้น

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

**2. การคำนวณค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Ratio of front (RF))**

เมื่อนำแผ่นโครมาโทกราฟีแบบผิวบางออกจากโถแก้วที่บรรจุตัวทำละลายแล้ววัดระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (solvent front) และระยะการเคลื่อนที่ของสารที่ปรากฏบนแผ่นโครมาโทกราฟี จากนั้นนำมาคำนวณตามสูตรดังนี้

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

**3. การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ (%germination)**

เมื่อสปอร์เชื้อราในชุดควบคุมและชุดทดลอง เจริญในระยะเวลาที่กำหนด ทำการนับสปอร์ที่มีการเจริญบนจานอาหาร จากนั้นนำมาคำนวณดังนี้

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

C = จำนวนสปอร์บนจานอาหารชุดควบคุม

T = จำนวนสปอร์บนจานอาหารชุดที่ทดลอง

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว พัชรวรรณ ดินาน เกิดเมื่อวันที่ 26 พฤศจิกายน พ.ศ. 2522 ที่จังหวัดชลบุรี สำเร็จปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร จ.นครปฐม เมื่อปี พ.ศ. 2546 จากนั้นได้ศึกษาต่อในระดับปริญญาโท-เอก หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำเร็จการศึกษาในปี พ.ศ. 2550

### ทุนสนับสนุนการทำวิจัย

ขณะศึกษาได้รับทุนสนับสนุนการทำวิจัยจากโครงการผลิตนักวิจัยด้านความหลากหลายทางชีวภาพระดับปริญญาโท-เอก ประจำปีงบประมาณ 2548 จากศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านความหลากหลายทางชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### การเสนอผลงาน

เสนอผลงานวิจัยในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ “The 10<sup>th</sup> Biological Sciences Graduate Congress” ณ National University of Singapore ประเทศ สิงคโปร์ ในหัวข้องานวิจัย “Screening of *Aureobasidium pullulans* for the antifungal agents” วันที่ 30 พฤศจิกายน – 2 ธันวาคม 2548

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย