

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การพิสูจน์เอกลักษณ์และการจัดจำแนกราเอ็นโคไฟต์สายพันธุ์ KBLM13

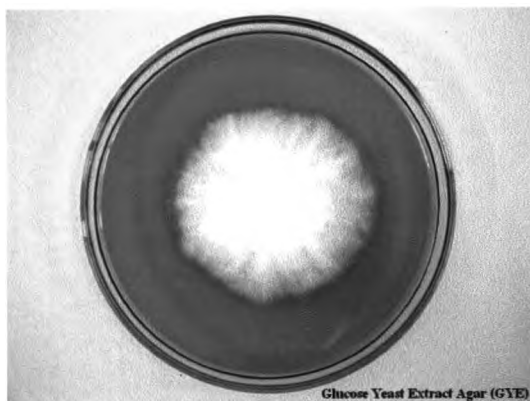
4.1.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ก. ผลของการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งที่ต่างกัน 5 ชนิด

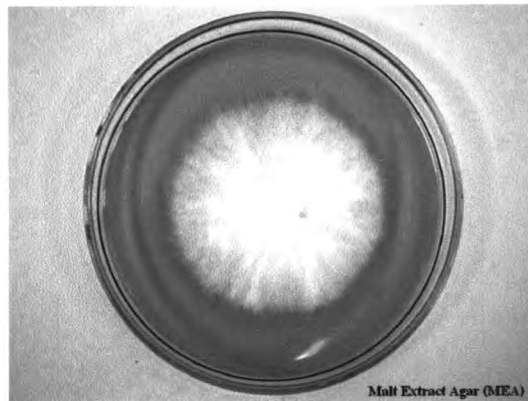
จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเอ็นโคไฟต์สายพันธุ์ KBLM13 เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5 ชนิด ได้แก่ Glucose Yeast Extract Agar (GYA), Malt Extract Agar (MEA), Potato Dextrose Agar (PDA), Sabouraud's Dextrose Agar (SDA) และ Yeast Extract Sucrose Agar (YEA) พบว่าลักษณะของโคโลนี สีของเส้นใย และสีของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ราสร้างขึ้น จะมีลักษณะที่แตกต่างกันออกไปในแต่ละอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเอ็นโคไฟต์สายพันธุ์ KBLM13 เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่ต่างกัน 5 ชนิด

อาหารเลี้ยงเชื้อ	ลักษณะโคโลนี	สีของเส้นใย	สีของอาหารเลี้ยงเชื้อ	ลักษณะสปอร์
GYA	ฟู	ขาว	แดงเข้ม	ไม่สร้างสปอร์
MEA	ฟู	ขาว	แดงอ่อน	ไม่สร้างสปอร์
PDA	ฟู	ขาว	ไม่สร้างสี	ไม่สร้างสปอร์
SDA	ฟู	ขาวอมชมพู	แดงเข้มปานกลาง	ไม่สร้างสปอร์
YEA	ไม่ฟู	ขาวอมชมพู	เหลืองปนแดง	ไม่สร้างสปอร์



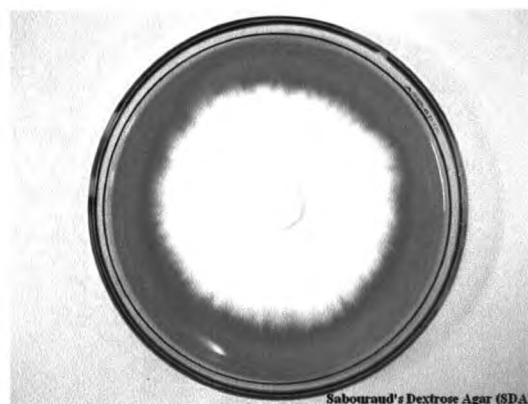
Glucose Yeast Extract Agar (GYE)



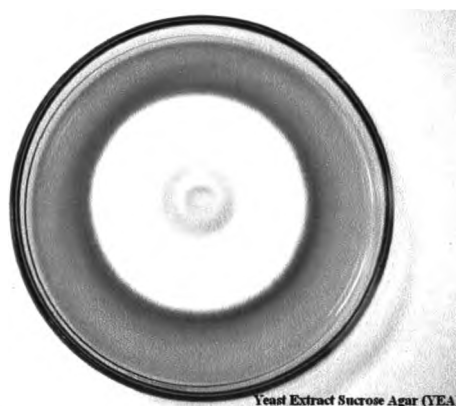
Malt Extract Agar (MEA)



Potato Dextrose Agar (PDA)



Sabouraud's Dextrose Agar (SDA)



Yeast Extract Sucrose Agar (YEA)

รูปที่ 4.1 ลักษณะโคโดเนียของราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM13 เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 5 ชนิด

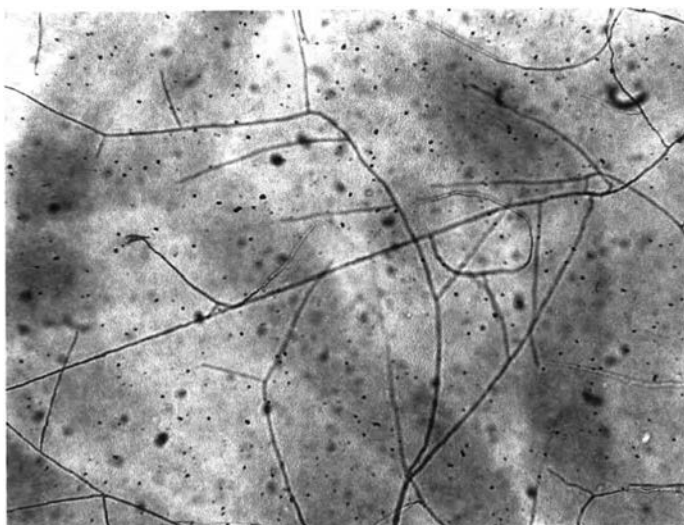
จากผลการศึกษาถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยา (ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.1) เมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า ส่องดูด้วยกล้อง และทำ slide culture พบว่าไม่มีสปอร์ (รูปที่ 4.2) จึงเป็นไปได้ที่ราเอ็นโคไฟต์สายพันธุ์ KBLM13 เป็นราที่ไม่มีการสร้างสปอร์หรือยังไม่อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมที่จะมีการสร้างสปอร์ และในอาหาร PDA (รูปที่ 4.3) ยังพบว่า หากเลี้ยงเชื้อไว้เป็นเวลาที่นานขึ้นจะมีเส้นสีค้ำอกขึ้นมาจากผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเป็นที่งอกขึ้นมานั้น เรียกว่า สโตรมา ดังนั้นจึงได้นำราเอ็นโคไฟต์สายพันธุ์ KBLM13 นี้ ไปเลี้ยงบนท่อนไม้เพื่อดูลักษณะของสโตรมาที่สมบูรณ์เพื่อเป็นข้อมูลในการจัดจำแนกชนิดของเชื้อต่อไป

นอกจากนี้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ต่างชนิดกัน ได้แก่ GYA, MEA, PDA, SDA และ YEA จะมีผลต่อลักษณะของโคโลนีและสีของเส้นใย รวมไปถึงการสร้างสารสี (pigment) ในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย ทั้งนี้เนื่องจากในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดนั้นจะมีธาตุอาหารที่ไม่เหมือนกัน เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร GYA, MEA, SDA และ YEA ซึ่งมีส่วนผสมของ peptone และ yeast extract ที่เชื้อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน มีผลต่อการสร้างสารสีในอาหารที่มีความเข้มข้นต่างกันออกไป แต่สำหรับในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA ไม่มีส่วนผสมของ peptone และ yeast extract ทำให้เชื้อไม่มีการสร้างสารสีในอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้การที่อาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดมีธาตุอาหารที่ไม่เหมือนกัน อาจส่งผลต่อการสร้างสารเมแทบอลิซึมที่ต่างกันด้วย

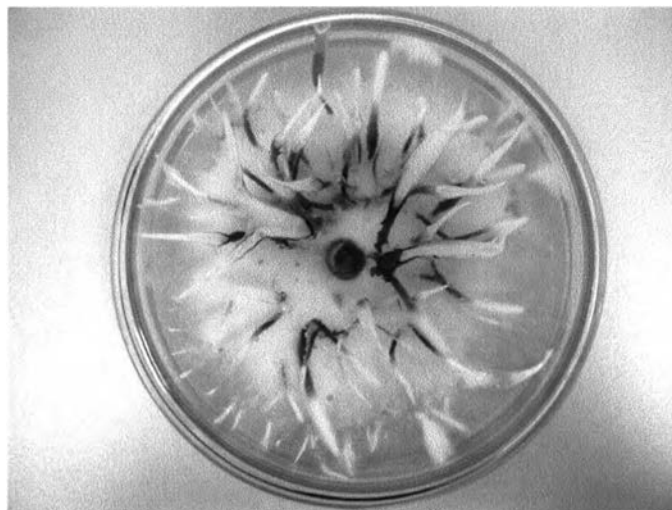
ข. ผลของการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง ในขวดทรงสูง

อันเนื่องมาจากราเอ็นโคไฟต์สายพันธุ์ KBLM13 เมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าและทำ slide culture ไม่พบการสร้างสปอร์ ทำให้ไม่สามารถจัดจำแนกได้ว่าราชนิดนี้เป็นราเอ็นโคไฟต์ชนิดใด จึงต้องมีการเลี้ยงใหม่ในสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนไปจากการเลี้ยงในงานเพาะเชื้อแบบธรรมดา คือการเพาะเลี้ยงเชื้อในขวดทรงสูงที่มีการใส่กิ่งไม้ลงไปเพื่อให้เชื้อได้มีการเจริญไปยังกิ่งไม้และชักนำให้เชื้อมีการสร้างสโตรมาหรือสปอร์เกิดขึ้น

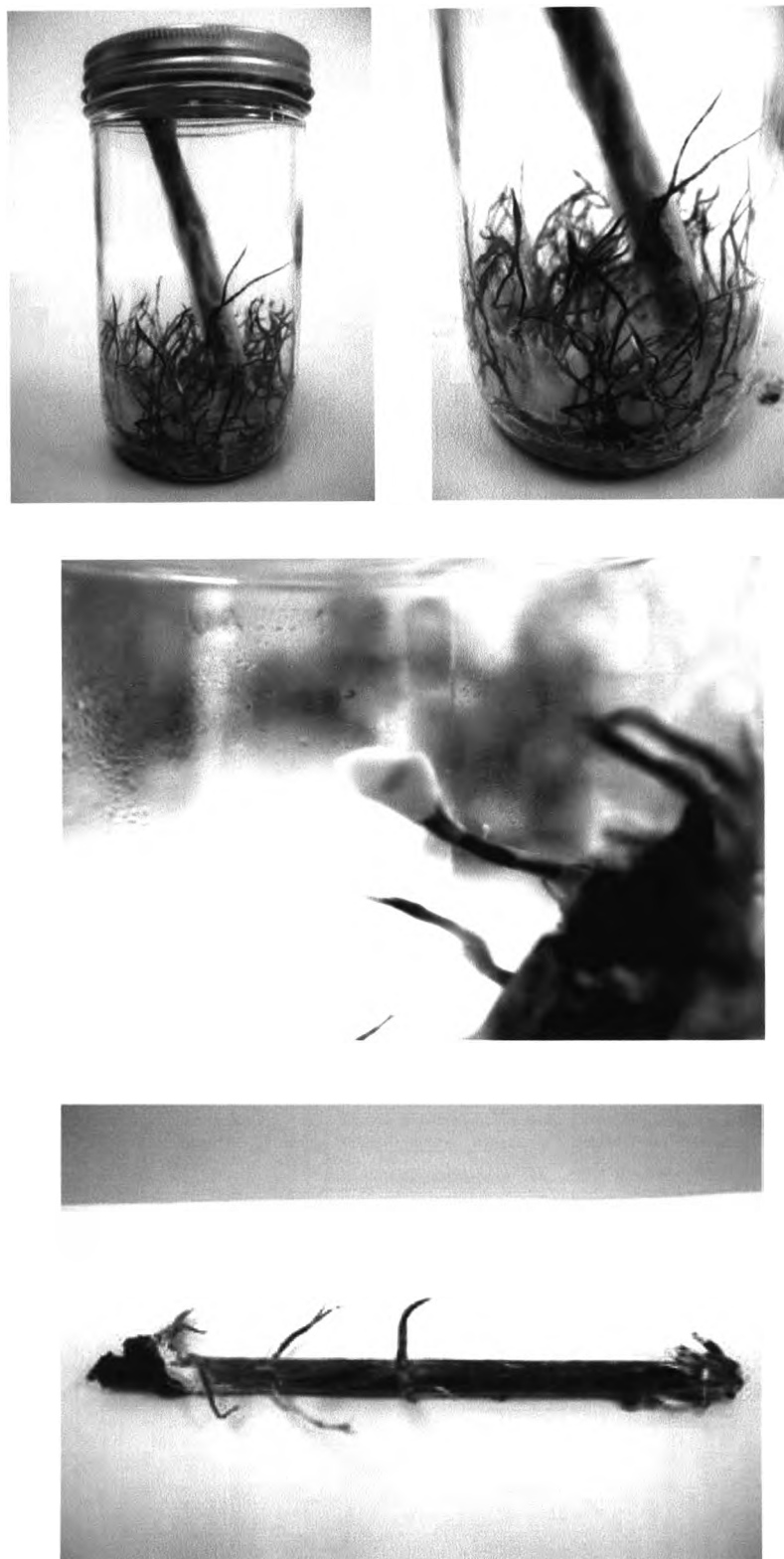
จากการศึกษาการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งในขวดทรงสูงพบว่า ราเอ็นโคไฟต์สายพันธุ์ KBLM13 จะมีการสร้างสโตรมาเกิดขึ้นทั้งบริเวณกิ่งไม้ที่ใส่ลงไปและบริเวณผิวหน้าอาหารแข็ง ลักษณะของสโตรมาที่สร้างขึ้นมานั้นจะเป็นเส้นสีดำ มีปมขนาดเล็กสีขาวอยู่ที่ปลายของสโตรมาแต่ละเส้น และจะมีเส้นใยสีขาวขึ้นปกคลุมกิ่งไม้ที่ใส่ลงไปด้วย ดังแสดงไว้ในรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.2 ลักษณะของเส้นใยราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM13 (x100)



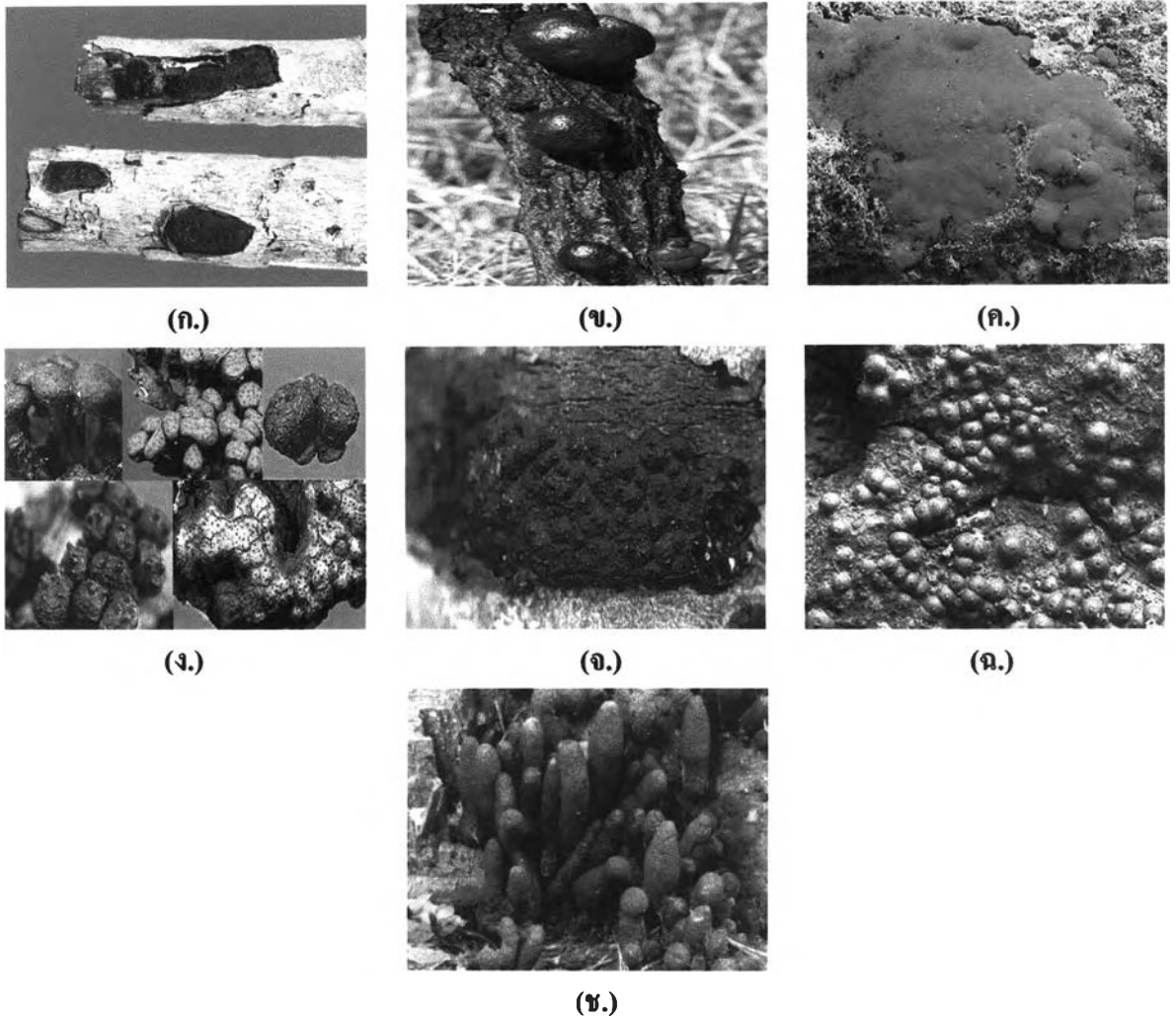
รูปที่ 4.3 ลักษณะโคโลนีแสดงสโตรมาของราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM13 เมื่อเจริญบนอาหาร
เลี้ยงเชื้อแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA)



รูปที่ 4.4 การสร้างสโตรมาของราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM13 เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อบนกิ่งไม้
ในขวดทรงสูง

จากการสร้างสโตรมาของราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM13 สามารถจัดจำแนกได้ว่าราชนิดนี้เป็นราเอ็นโดไฟต์ *Xylaria* sp. [128] ซึ่งเป็นจิ้นส์หนึ่งของราเอ็นโดไฟต์ในตระกูล Xylariaceae หรืออาจเรียกว่า Endophytic Xylariaceae [128] ราชนิดนี้จะมีลักษณะที่ต่างจากราชนิดอื่นอย่างชัดเจน คือ ราเอ็นโดไฟต์ส่วนใหญ่จะไม่มีการสร้างสโตรมา แต่ราเอ็นโดไฟต์ในตระกูล Xylariaceae นี้ จะมีการสร้างของสโตรมาอย่างชัดเจนและสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

ร่า Xylariaceae นี้เป็นราตระกูลหนึ่งในคลาส Ascomycetes ที่จัดอยู่ในกลุ่ม Non-Clavicipitaceous grass endophyte ซึ่งประกอบด้วยจิ้นส์ประมาณ 40 จิ้นส์ แม้ว่าราตระกูลนี้จะสามารถพบได้เกือบทุกประเทศในโลก แต่ก็ยังพบว่า รา Xylariaceae จะมีความหลากหลายทางชีวภาพมากในเขตประเทศแถบโซนร้อน ในเริ่มแรกของการศึกษาการจัดแบ่งร่ากลุ่ม Xylariaceae มักจะเกิดความสับสนอันเนื่องมาจากร่ากลุ่มนี้มีความหลากหลายทางรูปร่างลักษณะมาก และปัญหาอีกอย่างก็คือความขาดแคลนสปีชีส์ที่ได้จากประเทศแถบโซนร้อน ร่ากลุ่มนี้มีสกุลที่รู้จักกันดี คือ *Xylaria*, *Hypoxyton* และ *Daldinia* มีรายงานถึง 11 สกุล ของร่า Xylariaceae ที่พบว่าเป็นราเอ็นโดไฟต์ ซึ่งจะมีการรวม *Camillea* เข้าเป็นสกุลที่ 12 ที่พบว่าเป็นราเอ็นโดไฟต์ สกุลที่เป็นตัวแทนของราเอ็นโดไฟต์ คือ *Biscogniauxia*, *Daldinia*, *Hypoxyton*, *Kretzschmaria*, *Nemania*, *Rosellinia* และ *Xylaria* [129-131] (รูปที่ 4.5) โดยคุณสมบัติที่น่าสนใจของร่าในกลุ่มนี้ คือ ร่า Xylariaceae จะสามารถผลิตสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิที่มีความหลากหลายอยู่หลายชนิด ซึ่งจะต่างจากเชื้อร่า Ascomycetes ทั่วไป สารประกอบหลักที่ร่า Xylariaceae สร้างขึ้น เช่น ไดไฮโดรไอโซคูมาริน (Dihydroisocoumarins) พังคาโพโรนิน (Punctaporonins) ไฮโคซาลาซิน (Cytochalasins) บิวไทโรแลกโตน (Butyrolactones) และอนุพันธ์ของกรดซัคซินิก (Succinic acid Derivatives) [132] เป็นต้น



รูปที่ 4.5 ตัวอย่างราเอ็นโคไฟต์ในตระกูล Xylariaceae

- (ก.) *Biscogniauxia marginata* (แหล่งที่มา: http://www.grzyby.strafa.pl/Biscogniauxia_maginato.html)
- (ข.) *Daldinia concentrica* (แหล่งที่มา: [http://www.mykoweb.com/photos/Daldinia_concentrica\(ms-01\).jpg](http://www.mykoweb.com/photos/Daldinia_concentrica(ms-01).jpg))
- (ค.) *Hypoxylon* sp. (แหล่งที่มา: <http://www.mycology.com/AAU/WestAfrica/Hypoxylon.htm>)
- (ง.) *Kretzschmaria* sp. (แหล่งที่มา: http://www.nifg.org.uk/species/photos/Kretzschmaria_deusta2.jpg)
- (จ.) *Nemania* sp. (แหล่งที่มา: http://mycology.sinica.edu.tw/xylariaceae/Genus_Nemaria.asp)
- (ฉ.) *Rosellinia* sp. (แหล่งที่มา: <http://www.mycology.com/AAU/WestAfrican/Rosellinia.htm>)
- (ช.) *Xylaria polymorpha* (แหล่งที่มา: http://www.kki.pl/zenit/grzyby_spyt/ga181.htm)

4.2 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการสร้างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพของราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM13

การศึกษาการสร้างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพของราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM13 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 5 ชนิด ได้แก่ Glucose Yeast Extract Broth (GYB), Malt Extract Broth (MEB), Potato Dextrose Broth (PDB), Sabouraud's Dextrose Broth (SDB) และ Yeast Extract Sucrose Broth (YEB) แล้วทดสอบฤทธิ์การยับยั้งด้วยวิธี Agar-Well Diffusion พบว่า การสร้างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพของราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM13 มีความแตกต่างกันระหว่างอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดโดยพิจารณาจากขนาดของวงใสรอบรูที่เจาะไว้ (ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4.2) และจำนวนสารที่เคลื่อนที่เมื่อตรวจสอบด้วยการทำ TLC

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM13 สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพได้ดี คือ อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SDB และ GYB ที่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อจุลชีพทดสอบได้ทั้ง 5 ชนิดด้วยกัน ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Candida albicans* ATCC 10231 แต่เมื่อเปรียบเทียบความแรงของฤทธิ์ต้านจุลชีพโดยวัดจากวงใสรอบๆ รูที่เจาะไว้พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SDB สามารถสร้างสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งที่ดีกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว GYB โดยที่เชื้อที่สามารถยับยั้งได้ดีที่สุด คือ *C. albicans* ATCC 10231 รองลงมาคือ *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *B. subtilis* ATCC 6633 ตามลำดับ

และในอาหารเลี้ยงเชื้อบางชนิดราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM13 ก็ไม่มีการสร้างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพได้เลย คือ อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PDB ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบที่แตกต่างกัน ราคีจะมีความสามารถในการสร้างสารได้ไม่เท่ากันสังเกตได้จากความแรงในการยับยั้งเชื้อทดสอบ ในตารางที่ 4.2 ทั้งนี้อาจเนื่องจากว่าสารที่ราสร้างขึ้นมานั้นมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทดสอบอย่างเฉพาะเจาะจงกับเชื้อบางชนิดเท่านั้น

ราเอ็นโคไฟต์สามารถสร้างสารยับยั้งจุลชีพซึ่งเป็นเมแทบอไลต์ทุติยภูมิได้เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสมและปริมาณสารตั้งต้นที่พอเหมาะ ซึ่งสิ่งเหล่านี้เป็นข้อจำกัดของการผลิตสารยับยั้งจุลชีพตามธรรมชาติของราเอ็นโคไฟต์ นอกจากนี้ยังอาจมีการทำลายสารที่ผลิตขึ้นมาในระยะเวลาอันสั้นๆ ก่อนที่จะถูกค้นพบและนำมาใช้ประโยชน์ได้ [133] ดังนั้นในการหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้ราสร้างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพ โดยทำการเลี้ยงราเอ็นโคไฟต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างชนิดกัน จึงเป็นการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมและปริมาณซับสเตรทให้เหมาะสม เนื่องจากสิ่งเหล่านี้มีผลต่อการสร้างสารทางชีวภาพของรา [134]

ตารางที่ 4.2 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการสร้างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพของราเอ็นโคไฟต์ สายพันธุ์ KBLM13

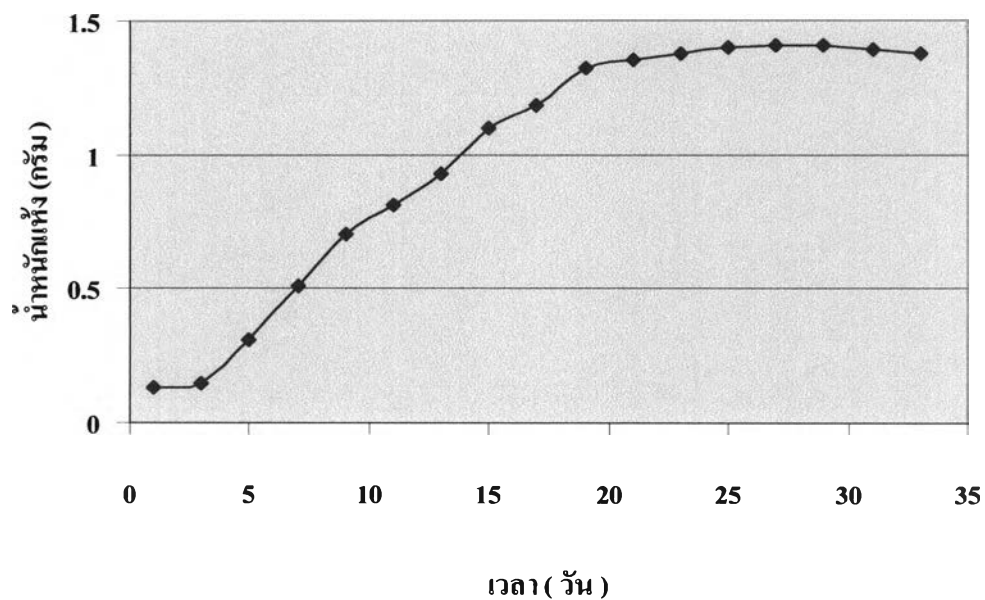
อาหารเลี้ยงเชื้อ	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (มิลลิเมตร)				
	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
GYB	9	10	15	9	12
MEB	-	-	8	-	11
PDB	-	-	-	-	-
SDB	9	12	15	11	13
YEB	-	-	9	9	10

หมายเหตุ - = ไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง

4.3 อัตราการเจริญเติบโต (growth curve) และช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการสร้างสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิของราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM13

4.3.1 ผลของการหาอัตราการเจริญเติบโต (growth curve)

จากการวัดอัตราการเจริญเติบโตของราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM13 เมื่อนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีความเหมาะสมต่อการสร้างสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพ คือ อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Sabouraud's Dextrose Broth (SDB) ทำการเก็บวันเว้นวัน ครั้งละ 3 flask เป็นเวลา 35 วัน นำมากรองแยกเส้นใยกับน้ำเลี้ยงออกจากกัน เก็บน้ำเลี้ยงเชื้อไว้ทดสอบฤทธิ์ และนำเส้นใยมาหาค้นน้ำหนักแห้ง ชั่งน้ำหนัก เขียนกราฟเส้นเพื่อดูอัตราการเจริญเติบโตของราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM13 ดังแสดงในรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.6 กราฟแสดงอัตราการเจริญเติบโตของราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM13

จากรูปที่ 4.6 จะเห็นได้ว่า เมื่อเลี้ยงราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM13 ในช่วง 5-15 วัน จะมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วและเมื่อเข้าสู่ช่วงหลังจากวันที่ 15 การเจริญเติบโตจะเริ่มน้อยลงเข้าสู่ระยะ stationary phase ซึ่งเป็นระยะที่ราจะมีการสร้างสารเมแทบอลิต์ขึ้นมาเพื่อป้องกันตัวเองจากสิ่งแวดล้อมภายนอกหลังจากที่ราใช้อาหารไปกับการเจริญเติบโตในช่วง 15 วันแรก

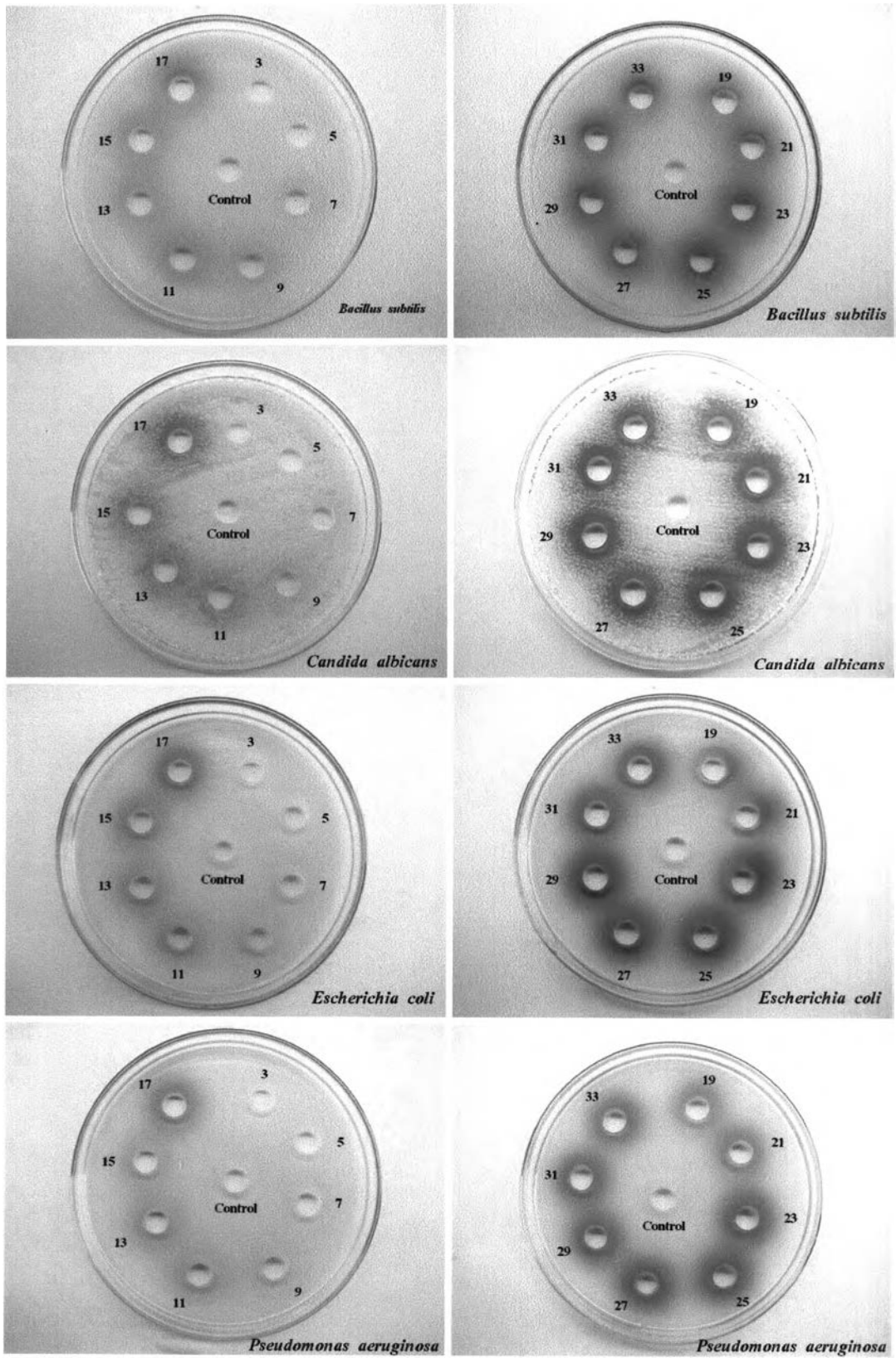
4.3.2 ช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการสร้างสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิ

จากข้อ 4.3.1 หลังจากที่ทำกรกรองแยกเส้นใยและน้ำเลี้ยงเชื้อออกจากกัน โดยที่เส้นใยนำไปหำน้ำหนักแห้งเพื่อหาอัตราการเจริญเติบโตแล้วนั้น สำหรับน้ำเลี้ยงเชื้อที่เก็บไว้ในแต่ละครั้งนำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพ แสดงผลดังตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.7

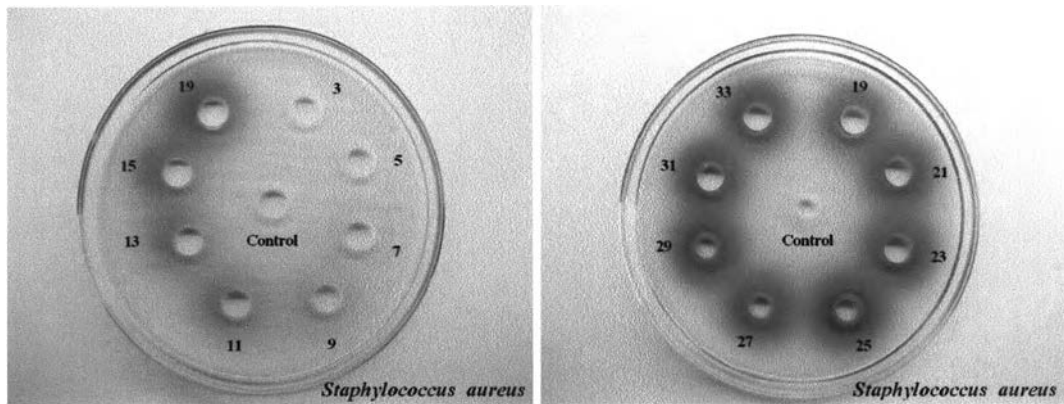
ตารางที่ 4.3 ช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการสร้างสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพของน้ำเลี้ยงเชื้อราเอ็นโคไฟต์สายพันธุ์ KBLM13

เวลา (วัน)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงไฮ (มิลลิเมตร)				
	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
1	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-
15	10	9	-	-	-
17	10	10	12	-	11
19	11	13	13	-	13
21	12	15	13	11	13
23	12	15	15	12	14
25	12	15	15	12	15
27	13	14	15	13	14
29	13	13	15	13	14
31	13	13	13	13	13
33	12	12	13	12	13
35	12	12	13	10	12

หมายเหตุ - = ไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง



รูปที่ 4.7 วงใส (Inhibition Zone), แสดงช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการสร้างสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิ ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพของน้ำเลี้ยงเชื้อราเอ็น โคไฟด์สายพันธุ์ KBLM13



รูปที่ 4.7 (ต่อ)

จากผลการทดลองในตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.7 พบว่าช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการสร้างสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพของน้ำเลี้ยงเชื้อราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM13 ที่ดีคือ ช่วงระยะเวลาเมื่อเลี้ยงได้ 23-35 วัน ซึ่งสังเกตได้จากวงใสรอบๆ หลุมที่หยอดน้ำเลี้ยงเชื้อลงไป โดยจะออกฤทธิ์ได้ดีที่สุดกับเชื้อ *C. albicans* ATCC 10231 รองลงมาคือ *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *B. subtilis* ATCC 6633 ตามลำดับ

ดังนั้น ในการเลี้ยงเพื่อนำมาสกัดแยกสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิจากราเอ็นโดไฟต์สายพันธุ์ KBLM13 ช่วงเวลาที่เหมาะสมที่สุด คือ ต้องเลี้ยงเชื้อไว้นานประมาณ 28 วัน หรือ 4 สัปดาห์ เพราะเป็นช่วงที่ราสร้างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งได้ดีที่สุด



4.4 การเลี้ยงเชื้อ การสกัด และการแยกสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพจากราเอ็นโคไฟต์สายพันธุ์ KBLM13

นำราเอ็นโคไฟต์สายพันธุ์ KBLM13 มาเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว SDB ปริมาตร 20 ลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 28 วัน เมื่อบ่มเชื้อไว้ครบ 28 วัน จึงนำมากรอง แยกส่วนจะได้ส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อและเส้นใยรา

นำส่วนเส้นใยราที่ทำให้แห้งแล้วหนัก 207.57 กรัม มาแช่ในดัวทำละลายเฮกเซน 5 ครั้ง ระบายดัวทำละลายเฮกเซนออกได้สารสกัดหยาบเฮกเซนของเส้นใยรา (MH) หนัก 2.68 กรัม จากนั้นนำเส้นใยราที่เหลือมาสกัดด้วยเอธิลเอซิเตต แล้วนำไประเหยให้แห้งจะได้สารสกัดหยาบเอธิลเอซิเตตจากเส้นใยราหนัก 2.67 กรัม (ME) สุดท้ายนำเส้นใยราที่เหลือมาทำการสกัดด้วยเมธานอล แล้วนำไประเหยให้แห้งจะได้สารสกัดหยาบเมธานอลจากเส้นใยราหนัก 51.09 กรัม (MM) จากนั้นเส้นใยราที่เหลือสกัดด้วยเอธิลเอซิเตต 5 ครั้ง ระบายดัวทำละลายให้แห้งได้สารสกัดหยาบเอธิลเอซิเตตของเส้นใยรา (ME) หนัก 2.67 กรัม สุดท้ายนำเส้นใยราที่เหลือมาสกัดด้วยเมธานอล แล้วนำไประเหยดัวทำละลายให้แห้ง จะได้สารสกัดหยาบเมธานอลของเส้นใยรา (MM) หนัก 51.09 กรัม

ส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อนำมาระเหยน้ำออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary Vacuum Evaporator) ที่อุณหภูมิ 35°C จนได้น้ำเลี้ยงเชื้อเข้มข้นหนัก 127.34 กรัม จากนั้นนำส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อเข้มข้นที่ได้มาสกัดด้วยเอธิลเอซิเตต แล้วระเหยให้แห้งจะได้สารสกัดหยาบเอธิลเอซิเตตของน้ำเลี้ยงเชื้อ (BE) หนัก 7.5 กรัม นำสารสกัดหยาบที่เหลือสกัดด้วยเมธานอล แล้วระเหยให้แห้งจะได้สารสกัดหยาบเมธานอลของน้ำเลี้ยงเชื้อ (BM) หนัก 63.41 กรัม

นำส่วนของสารสกัดหยาบที่ได้ทั้งหมด คือ MH, ME, MM, BE และ BH มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพด้วยเทคนิค Paper Disc Method พบว่าส่วนของสารสกัดหยาบ ME และ BE มีฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพได้ดี (ตารางที่ 4.4) นำสารสกัดหยาบทั้ง 2 ส่วนมาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีที่มีซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ ตัวชะที่ใช้ได้แก่ เฮกเซน, เฮกเซน-ไดคลอโรมีเทน, ไดคลอโรมีเทน, ไดคลอโรมีเทน-เมธานอล และเมธานอล ตามลำดับ ได้สารทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ สารบริสุทธิ์ 1 สารบริสุทธิ์ 2 และสารบริสุทธิ์ 3

ตารางที่ 4.4 ฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพของสารสกัดหยาบจากเส้นใยและน้ำเลี้ยงเชื้อราเอ็น โคไฟด์
สายพันธุ์ KBLM 13

สารสกัดหยาบ (5 mg / ml)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (Inhibition Zone) (มิลลิเมตร)				
	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
	ATCC 6633	ATCC 10231	ATCC 25922	ATCC 27853	ATCC 25923
MH	-	-	-	-	-
ME	16	18	16	8	17
MM	-	3	-	-	-
BE	17	19	16	15	16
BM	-	9	-	-	7

หมายเหตุ - = ไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง

4.5 การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่ได้จากกราเอ็นโคไฟต์สายพันธุ์ KBLM13

4.5.1 การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ 1

ลำดับส่วนที่ ME02 ของสารสกัดหยาบเอธิลเอซเตดของเส้นใย (ME) ที่ได้จากการชะด้วย 50 % ไดคลอโรโรมีเทนในเฮกเซน ลักษณะของสารที่ได้จะเป็นของเหลวหนืดสีเหลือง นำมาทำการแยกสารด้วยวิธี Preparative TLC โดยใช้ 5% เมธานอลในคลอโรฟอร์มเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ จะได้ผงสีขาวหนัก 18.2 มิลลิกรัม (สารบริสุทธิ์ 1) ซึ่งสามารถละลายได้ในคลอโรฟอร์มและเมธานอล มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 83-86 °C และมีค่า $[\alpha]_D^{25} + 253$ (c 0.10, CHCl₃) จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC โดยใช้ 5% เมธานอลในคลอโรฟอร์มเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ และตรวจสอบตำแหน่งของสารด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) ที่ค่าความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร และย้อมด้วย Vanillin / H₂SO₄ จะได้สารบริสุทธิ์ 1 ที่มีค่า R_f เท่ากับ 0.75 (5% MeOH ใน CHCl₃)

จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโกปีของสารบริสุทธิ์ 1 (ภาคผนวก ข. รูปที่ 2) พบว่ามีการดูดกลืนแสงที่ความถี่ 2925 (w), 1710 (m), 1643 (m), 1563 (s), 1419 (s), 1244 (m) และ 808 (m) cm⁻¹ ดังแสดงในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ตำแหน่งการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสารบริสุทธิ์ 1

แถบการดูดกลืนแสง (cm ⁻¹)	ความเข้ม	แสดงลักษณะ
2925	ต่ำ	C-H สันแบบยืด
1710	ปานกลาง	C=O สันแบบยืดของ Ester
1643	ปานกลาง	C=C สันแบบยืดของ Aromatic
1563	สูง	C=C สันแบบยืดของ Aromatic
1419	สูง	C-H สันแบบงอของ CH ₂ , CH ₃
1244	ปานกลาง	C-O สันแบบยืด
808	ปานกลาง	C-H สันแบบงอนอกระนาบ

จากข้อมูลโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัม ($^1\text{H-NMR}$ spectrum, CDCl_3 , 400 MHz) และ gCOSY ของสารบริสุทธิ์ 1 (ภาคผนวก ข. รูปที่ 8) ปรากฏสัญญาณที่ค่าเคมีคอลชิฟท์ (δ_{H} , ppm) ของ 3 aromatic proton ที่ δ_{H} 6.83, 6.95 และ 7.48 ppm ; 3 methyl proton ที่ δ_{H} 1.52 ppm; 1 สัญญาณ singlet ของ methoxy proton ที่ δ_{H} 3.98 ppm; 1 proton ที่คู่ควบกับ methyl proton (δ_{H} 1.52) ด้วย $J = 3.6$ Hz ที่ δ_{H} 4.59 ppm และ 2 geminal proton ที่ δ_{H} 2.29 และ 2.88 ppm ที่คู่ควบกับ proton (δ_{H} 4.59) ด้วย $J = 10.8$ และ 6.0 Hz

จากข้อมูลคาร์บอน-13 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัม ($^{13}\text{C-NMR}$ spectrum, CDCl_3 , 100 MHz) และ gHSQC ของสารบริสุทธิ์ 1 (ภาคผนวก ข. รูปที่ 6) พบสารบริสุทธิ์ 1 มีจำนวนคาร์บอนทั้งหมด 10 อะตอม ซึ่งประกอบด้วย 1 methoxy carbon ที่ δ_{C} 74.14 ppm; 3 aromatic methine carbon ที่ δ_{C} 110.88, 119.20 และ 134.46 ppm; 1 methylene carbon ที่ δ_{C} 20.72 ppm; 3 quaternary carbon ที่ δ_{C} 113.50, 141.99 และ 161.19 ppm; 1 methyl group ที่ δ_{C} 56.19 ppm และ 1 carbonyl group ที่ δ_{C} 162.80 ppm

จากค่าเคมีคอลชิฟท์ของ $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ จะได้ว่าสูตรโมเลกุลของสารบริสุทธิ์ 1 น่าจะเป็น $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_3$ ซึ่งมีค่า DBE เท่ากับ 6 และทำให้ทราบว่าโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ 1 ประกอบด้วย aromatic 1 วง และ วง 1 วง

จากข้อมูล 2D-NMR ผลจากการวิเคราะห์ด้วย gHSQC, gHMBC และ gCOSY ประกอบกับข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ที่สรุปไว้ดังตารางที่ 4.6 และ 4.7 จะได้ว่าสารบริสุทธิ์ 1 คือ Mellein [135] ดังแสดงในรูปที่ 4.8 ซึ่งเป็นสารที่เคยมีรายงานว่า (-)-mellein $\{[\alpha]_{\text{D}}^{26} -259$ (c 0.50, $\text{CHCl}_3\}$ [135] แยกได้จาก Phytophathogen *Septoria nodorum* และ (+)-mellein ได้มาจากการสังเคราะห์ [135] ดังนั้นสารบริสุทธิ์ 1 คือ S-mellein หรือ (S)-(+)-8-methoxy-3-methyl-isochroman-1-one ซึ่งเป็นสารใหม่ที่พบรายงานการแยกได้จากธรรมชาติ

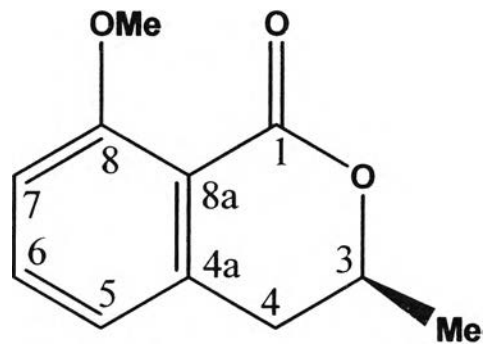
นอกจากนี้ยังพบว่าไม่มีการรายงานถึงฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพของสารชนิดนี้

ตารางที่ 4.6 แสดงค่า $^1\text{H-NMR}$ (δ_{H}), $^{13}\text{C-NMR}$ (δ_{C}), gHSQC, gHMBC และ gCOSY ของสารบริสุทธิ์ 1

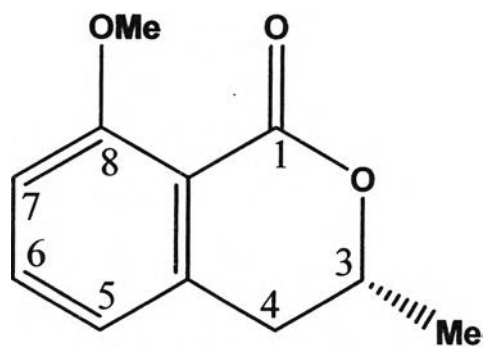
ตำแหน่ง	$^{13}\text{C-NMR}$ (δ_{C}),	$^1\text{H-NMR}$ (δ_{H})	gHMBC	gCOSY
1	162.80	-	-	-
2	20.72	1.52 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, 3-Me)	C-1, C-3, C-4	H-3
3	74.14	4.59 (1H, ddq, $J = 3.6, 10.8$ และ 6.0 Hz, 3-H)	C-8	H-4, Me
4	36.12	2.88 (2H, dd, $J = 3.6$ และ 16.0 Hz, 4-H)	C-3, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, Me	H-3
		2.29 (2H, dd, $J = 10.8$ และ 16.0 Hz, 4-H)	-	-
5	110.38	6.95 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, 5-H)	C-1, C-7, C-9, C-10	H-6, H-7
6	134.46	7.48 (1H, dd, $J = 8.4$ และ 7.6 Hz, 6-H)	C-5, C-8, C-9, C-10	H-5, H-7
7	119.20	6.83 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, 7-H)	C-5, C-6, C-8, C-9, C-10	H-5, H-6
8	141.99	-	-	-
9	113.50	-	-	-
10	161.19	-	-	-
11	56.19	3.98 (3H, s, OMe)	C-5, C-10	-

ตารางที่ 4.7 แสดงค่า $^1\text{H-NMR}$ (δ_{H}), $^{13}\text{C-NMR}$ (δ_{C}) ของสารบริสุทธิ์ 1 เทียบกับ Mellein [135]

ตำแหน่ง	สารบริสุทธิ์ 1 (CDCl_3 , 400 MHz)		Mellein [135] (CDCl_3 , 300 MHz)	
	$^1\text{H-NMR}$	$^{13}\text{C-NMR}$	$^1\text{H-NMR}$	$^{13}\text{C-NMR}$
1	-	162.80	-	162.7
Me	1.52 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, Me)	20.72	1.48 (3H, d, $J = 6.1$ Hz, Me)	20.7
3	4.59 (1H, ddq, $J = 3.6, 10.8$ และ 6.0 Hz, 3-H)	74.14	4.55 (1H, m, 3-H)	74.1
4	2.88 (2H, dd, $J = 3.6$ และ 16.0 Hz, 4-H)	36.12	2.87 (2H, m, 4-H)	36.1
	2.29 (2H, dd, $J = 10.8$ และ 16.0 Hz, 4-H)		ไม่รายงาน	ไม่ รายงาน
5	6.83 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, 5-H)	119.20	6.80 (1H, d, $J = 7.3$ Hz, 5-H)	119.1
6	7.48 (1H, dd, $J = 8.4$ และ 7.6 Hz, 6-H)	134.46	7.45 (1H, m, 6-H)	134.4
7	6.95 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, 7-H)	110.88	6.92 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, 7-H)	110.8
8	-	141.99	-	141.9
9	-	113.50	-	113.6
10	-	161.19	-	161.1
OMe	3.98 (3H, s, OMe)	56.19	3.95 (3H, s, OMe)	56.1



รูปที่ 4.8 โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ 1



รูปที่ 4.9 โครงสร้างทางเคมีของ Mellein

4.5.2 การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ 2

ลำดับส่วนที่ BE08 ของสารสกัดหยาบเอธิลเอซิดของน้ำเลี้ยงเชื้อ (BE) ที่ได้จากการชะด้วย 2 % เมทานอลในไดคลอโรมีเทน ลักษณะของสารที่ได้เป็นผลึกสีขาว ทำการแยกผลึกออกมาโดยการตกผลึกซ้ำด้วยตัวทำละลายผสม เฮกเซน - ไดคลอโรมีเทน ได้ผลึกสีขาวหนัก 31.3 มิลลิกรัม (สารบริสุทธิ์ 2) ละลายได้ในไดคลอโรมีเทน คลอโรฟอร์ม และเมทานอล มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 147-149 °C และมีค่า $[\alpha]_D^{25}$ -189 (c 0.10 ใน CHCl_3) จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC โดยใช้ 10 % เมทานอลในคลอโรฟอร์มเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ และตรวจสอบตำแหน่งของสารด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) ที่ค่าความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร และย้อมด้วย Vanillin / H_2SO_4 จะได้สารบริสุทธิ์ 2 ที่มีค่า R_f เท่ากับ 0.46 (5% MeOH ใน CHCl_3)

จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโตรสโคปีของสารบริสุทธิ์ 2 (ภาคผนวก ข. รูปที่ 10) พบว่ามีการดูดกลืนแสงที่ความถี่ 3216 (m), 2963 (w), 2875 (w), 1674 (s), 1419 (s), 645 (w) และ 528 (w) cm^{-1} ดังแสดงในตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 ตำแหน่งการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสารบริสุทธิ์ 2

แถบการดูดกลืนแสง (cm^{-1})	ความเข้ม	แสดงลักษณะ
3216	ปานกลาง	N-H สั่นแบบยืดของ N-H
2875-2963	ต่ำ	C-H สั่นแบบยืดของ CH_2 , CH_3
1674	สูง	C=O สั่นแบบยืดของ N-H
1419	สูง	C-H สั่นแบบงอของ CH_2 , CH_3
645	ต่ำ	N-C=O สั่นแบบงอ
528	ต่ำ	C-C=O สั่นแบบงอนอกระนาบ

จากข้อมูลโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัม ($^1\text{H-NMR}$ spectrum, CDCl_3 , 400 MHz) และ gCOSY ของสารบริสุทธิ์ 2 (ภาคผนวก ข. รูปที่ 16) ปรากฏสัญญาณที่ค่าเคมีคอลชิฟ (δ_{H} , ppm) ของ 3 methine proton ที่ δ_{H} 2.62, 3.93 และ 4.07 ppm; 6 methylene proton ที่ δ_{H} 1.90, 2.03, 2.04, 2.37, 3.60 และ 3.64 ppm และ 2 methyl proton ที่ δ_{H} 0.90 และ 1.06 ppm

จากข้อมูลคาร์บอน-13 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัม ($^{13}\text{C-NMR}$ spectrum, CDCl_3 , 100 MHz) และ gHSQC ของสารบริสุทธิ์ 2 (ภาคผนวก ข. รูปที่ 14) พบสารบริสุทธิ์ 2 มีจำนวนคาร์บอนทั้งหมด 10 อะตอม ซึ่งประกอบด้วย 2 methine carbon ที่ δ_{C} 58.81 และ 60.37 ppm; 3 methylene carbon ที่ δ_{C} 22.36, 28.52 และ 45.14 ppm; 2 methyl carbon ที่ δ_{C} 16.03 และ 19.23 ppm; 1 quaternary carbon ที่ δ_{C} 28.34 ppm และ 2 carbonyl group ที่ δ_{C} 164.92 และ 170.06 ppm

จากค่าเคมีคอลชิฟของ $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ จะได้ว่าสูตรโมเลกุลของสารบริสุทธิ์ 2 น่าจะเป็น $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$ ซึ่งมีค่า DBE เท่ากับ 4 และทำให้ทราบว่าโครงสร้างสารบริสุทธิ์ 2 ประกอบด้วย วง 2 วง

จากข้อมูล 2D-NMR ผลจากการวิเคราะห์ด้วย gHSQC, gHMBC และ gCOSY ประกอบกับข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ที่สรุปไว้ดังตารางที่ 4.9 และ 4.10 จะได้ว่าสารบริสุทธิ์ 2 คือ Cyclo(L)-Pro-(L)-Val [$[\alpha]_D^{20}$ -157 (c1.0, CDCl_3)] [136] ดังแสดงในรูปที่ 4.10 ซึ่งเป็นสารที่เคยมีรายงานว่า Cyclo(L)-Pro-(L)-Val นี้ แยกได้มาจากแบคทีเรีย *Halobacillus litoralis* YS3106 ซึ่งใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ Halolitoralin A ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Candida albicans*, *Tricophyton rubrum*, *Gaeumannomyces graminis*, *Rhizotonia cerealis*, *Helminthosporium sivism* และ *Fusarium graminearum* ที่ค่า MIC เท่ากับ 20, 25, 300, 200, 300 และ 350 ตามลำดับ [136] นอกจากนี้ยังพบสารในกลุ่มเดียวกันกับ Cyclo(L)-Pro-(L)-Val คือ Cyclo(D)-Pro-(D)-Val [$[\alpha]_D^{26}$ -157 (c1.0, CDCl_3)] [137] ที่แยกได้มาจากแบคทีเรีย สายพันธุ์ CF-20 (CECT5719) และ C-148 (CECT5718) ซึ่งเป็น marine bacteria ชนิดหนึ่ง เมื่อได้ทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Vibrio anguillarum* พบว่า Cyclo(L)-Pro-(L)-Val มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. anguillarum* ที่ค่า MIC เท่ากับ 0.05 $\mu\text{g} / \text{ml}$ [137]

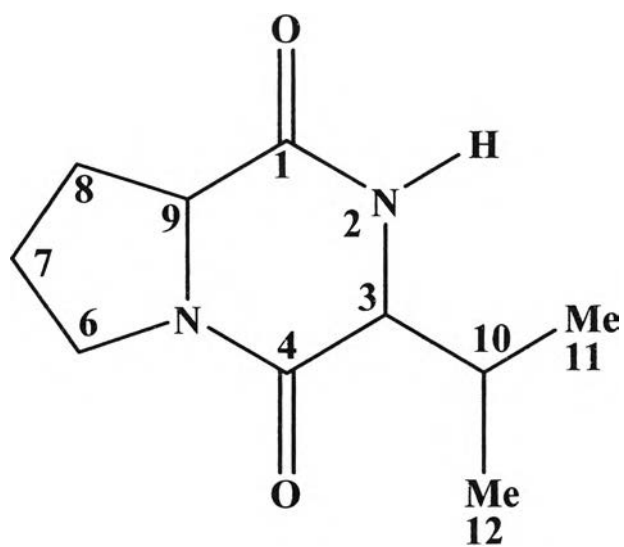
นอกจากนี้ ในการวิจัยนี้เป็นครั้งแรกที่แยก Cyclo(L)-Pro-(L)-Val ได้จากรา *Xylaria* sp.

ตารางที่ 4.9 แสดงค่า $^1\text{H-NMR}$ (δ_{H}), $^{13}\text{C-NMR}$ (δ_{C}), gHSQC, gHMBC และ gCOSY
ของสารบริสุทธิ์ 2

ตำแหน่ง	$^{13}\text{C-NMR}$ (δ_{C})	$^1\text{H-NMR}$ (δ_{H})	gHMBC	gCOSY
1	170.06	-	-	-
2	-	6.08	C-4	-
3	60.37	3.93 (1H, brs, 3-H)	C-8, C-10, C-11, C-12	H-6, H-10
4	164.92	-	-	-
N	-	-	-	-
6	45.14	3.64 (2H, m, 6-H)	C-7 C-8 C-10	H-6, H-7, H-8
		3.60 (2H, m, 6-H)	C-7, C-8	H-6, H-7, H-8
7	22.36	2.03 (2H, 7-H)	C-1, C-7 C-8C-9 C-10	H-6, H-7, H-8, H-9
		1.90 (2H, 7-H)	C-3, C-6, C-8,C-9, C-10	H-6, H-7, H-8
8	28.52	2.37 (2H, 8-H)	C-6, C-7, C-8, C-9	H-7, H-8, H-9
		2.04 (2H, 8-H)	C-1, C-7, C-8, C-10	H-6, H-7, H-8, H-9
9	58.81	4.07 (1H, $J = 4.0$ Hz, 9-H)	C-8, C-10	H-3, H-7, H-8
10	28.34	2.62 (1H, 10-H)	C-3, C-4, C-11, C-12	H-3, H-10, H-11, H-12
11	19.23	0.90 (3H, d, $J = 4.0$ Hz, 12-H))	C-3, C-8, C-10, C-12	H-10
12	16.03	1.06 (3H, d, $J = 4.0$ Hz, 11-H)	C-3, C-8, C-10, C-11	H-10, H-11

ตารางที่ 4.10 แสดงค่า $^1\text{H-NMR}$ (δ_{H}), $^{13}\text{C-NMR}$ (δ_{C}) ของสารบริสุทธิ์ 2 เทียบกับ
Cyclo(L)-Pro-(L)-Val [136]

ตำแหน่ง	สารบริสุทธิ์ 2 (CDCl ₃ , 400 MHz)		Cyclo(L)-Pro-(L)-Val [136] (CDCl ₃ , 300 MHz)	
	$^1\text{H-NMR}$	$^{13}\text{C-NMR}$	$^1\text{H-NMR}$	$^{13}\text{C-NMR}$
1	-	170.06	-	170.2
2	-	-	-	-
6	3.64 (2H, m, 6-H)	45.14	3.55	45.0
	3.60 (2H, m, 6-H)		3.63	
7	2.03 (2H, 7-H)	22.36	2.02-1.99	22.2
	1.90 (2H, 7-H)		1.93-1.88	
8	2.37 (2H, 8-H)	28.52	2.40-2.30	28.4
	2.04 (2H, 8-H)		2.11-2.01	
9	4.07 (1H, $J = 4.0$ Hz, 9-H)	58.81	4.09	58.7
4	-	164.92	-	164.9
N	6.08 (1H, s, NH)	-	5.72	-
3	3.93 (1H, brs, 3-H)	60.37	3.94	60.3
10	2.62 (1H, 10-H)	28.34	2.64	28.4
11	0.90	19.23	0.91	19.0
	(3H, d, $J = 4.0$ Hz, 12-H)			
12	1.06	16.03	1.06	15.9
	(3H, d, $J = 4.0$ Hz, 11-H)			



รูปที่ 4.10 โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ 2

4.5.3 การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ 3

ลำดับส่วนที่ BE13 ของสารสกัดหยาบเอธิลเอซิเตคของน้ำเลี้ยงเชื้อ (BE) ที่ได้จากการชะด้วย 5 % เมธานอลในไดคลอโรมีเทน ลักษณะของสารที่ได้เป็นผลึกสีขาว ทำการแยกผลึกให้บริสุทธิ์ โดยการตกผลึกซ้ำด้วยตัวทำละลายผสมเฮกเซน-คลอโรฟอร์ม ได้ผลึกสีขาวหนัก 243.8 มิลลิกรัม (สารบริสุทธิ์ 3) ละลายได้ในไดคลอโรมีเทน คลอโรฟอร์ม และเมธานอล มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 210-212 °C และมีค่า $[\alpha]_D^{25}$ -198 (c 0.10 ใน MeOH) จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC โดยใช้ 10 % เมธานอลในคลอโรฟอร์ม เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ และตรวจสอบตำแหน่งของสารด้วยแสงอัลตราไวโอเลต (UV) ที่ค่าความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร และย้อมด้วย Vanillin / H₂SO₄ จะได้สารบริสุทธิ์ 3 ที่มีค่า R_f เท่ากับ 0.30 (5% MeOH ใน CHCl₃)

จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโตรสโคปีของสารบริสุทธิ์ 3 (ภาคผนวก ข. รูปที่ 18) พบว่ามีการดูดกลืนแสงที่ความถี่ 3482 (m), 2871-3089 (w), 1683 (s), 1646 (s), 1561 (m), 14212 (s), และ 793 (s) cm⁻¹ ดังแสดงในตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 ตำแหน่งการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสารบริสุทธิ์ 3

แถบการดูดกลืนแสง (cm ⁻¹)	ความเข้ม	แสดงลักษณะ
3482	ปานกลาง	N-H สันแบบยืด
2871-3089	ต่ำ	C-H สันแบบยืดของ CH ₂ , CH ₃
1683	สูง	C=O สันแบบยืดของ Ester
1646	สูง	C=C สันแบบยืดของ Aromatic
1561	ปานกลาง	N-H สันแบบยืด
1412	สูง	C-H สันแบบงอของ CH ₂ , CH ₃
793	สูง	N-C=O สันแบบงอ

จากข้อมูลโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัม ($^1\text{H-NMR}$ spectrum, CDCl_3 , 400 MHz) และ gCOSY ของสารบริสุทธิ์ 3 (ภาคผนวก ข. รูปที่ 24) ปรากฏสัญญาณที่ค่าเคมีคอลชิฟท์ (δ_{H} , ppm) ของ 1 methine proton ที่ δ_{H} 4.08 ppm และ 8 methylene proton ที่ δ_{H} 1.91, 2.03, 2.06, 2.37, 3.55, 3.61, 3.89 และ 4.08 ppm

จากข้อมูลคาร์บอน-13 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัม ($^{13}\text{C-NMR}$ spectrum, CDCl_3 , 100 MHz) และ gHSQC ของสารบริสุทธิ์ 3 (ภาคผนวก ข. รูปที่ 22) พบสารบริสุทธิ์ 3 มีจำนวนคาร์บอนทั้งหมด 7 อะตอม ซึ่งประกอบด้วย 2 carbonyl group ที่ δ_{C} 163.51 และ 169.97 ppm; 1 methine carbon ที่ δ_{C} 58.5 ppm และ 4 methylene carbon ที่ δ_{C} 22.4, 28.4, 45.3 และ 46.62 ppm

จากค่าเคมีคอลชิฟท์ของ $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ จะได้ว่าสูตรโมเลกุลของสารบริสุทธิ์ 3 น่าจะเป็น $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$ ซึ่งมีค่า DBE เท่ากับ 4 และทำให้ทราบว่าโครงสร้างสารบริสุทธิ์ 3 ประกอบด้วย วง 2 วง

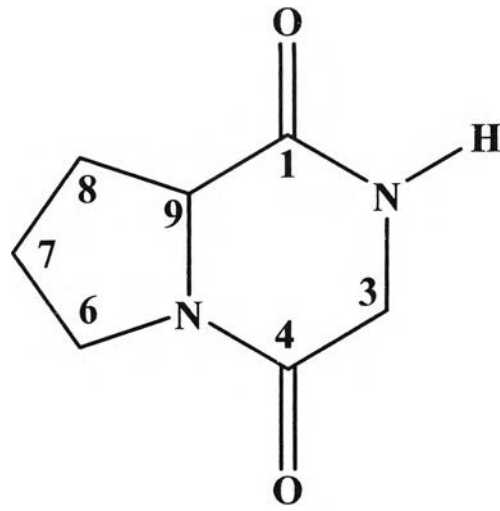
จากข้อมูล 2D-NMR ผลจากการวิเคราะห์ด้วย gHSQC, gHMBC และ gCOSY ประกอบกับข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ที่สรุปไว้ดังตารางที่ 4.12 และ 4.13 จะได้ว่าสารบริสุทธิ์ 3 คือ Cyclo[Gly-(S)-Pro] [138] ดังแสดงในรูปที่ 4.14-4.16 ซึ่งเป็นสารที่เคยมีรายงานว่า Cyclo[Gly-(S)-Pro] นี้ เป็นสารที่ได้สังเคราะห์ขึ้นมาจาก Desferrioxamine B ซึ่งเป็นยาที่ชื่อว่า Desferal ที่ใช้กับผู้ป่วยที่เป็นโรคราลัสซีเมีย [138] ดังนั้นสารบริสุทธิ์ 3 ซึ่งก็คือ Cyclo[Gly-(S)-Pro] หรือ hexahydro-pyrrolo[1,2-*a*]pyrazine-1,4-dione เป็นสารใหม่ที่พบการรายงานการแยกจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

ตารางที่ 4.12 แสดงค่า $^1\text{H-NMR}$ (δ_{H}), $^{13}\text{C-NMR}$ (δ_{C}), gHSQC, gHMBC และ gCOSY ของสารบริสุทธิ์ 3

ตำแหน่ง	$^{13}\text{C-NMR}$ (δ_{C}),	$^1\text{H-NMR}$ (δ_{H})	gHMBC	gCOSY
1	169.97	-	-	-
2	-	6.90	-	-
3	46.62	3.89 (2H, dd, $J = 4.4$ และ 16.4 Hz, 3-H)	C-1, C-3, C-4	H-3, H-9
		4.08 (2H, d, $J = 15.2$ Hz, 3-H)	C-1, C-3, C-4, C-7, C-8	H-3, H-7, H-8, H-9
4	163.51	-	-	-
5	-	-	-	H-3
6	45.32	3.61 (2H, m, 6-H)	C-7, C-8, C-9	H-6, H-7, H-8
		3.55 (2H, m, 6-H)	C-7, C-8, C-9	H-6, H-7, H-8
7	22.40	2.03 (2H, m, 7-H)	C-7, C-9	H-3, H-6, H-7, H-8, H-9
		1.91 (2H, m, 7-H)	C-6, C-9	H-6, H-7, H-8
8	28.44	2.37 (2H, m, 8-H)	C-3, C-6, C-7, C-9	H-3, H-7, H-8, H-9
		2.06 (2H, m, 8-H)	C-1, C-7, C-9	H-3, H-6, H-7, H-8, H-9
9	58.53	4.08 (1H, dd, $J = 5.2$ และ 15.6 Hz, 9-H)	C-1, C-3, C-4, C-7, C-8	H-3, H-7, H-8, H-9

ตารางที่ 4.13 แสดงค่า $^1\text{H-NMR}$ (δ_{H}), $^{13}\text{C-NMR}$ (δ_{C}) ของสารบริสุทธิ์ 3 เทียบกับ
Cyclo[Gly-(S)-Pro] [138]

ตำแหน่ง	สารบริสุทธิ์ 3 (CDCl ₃ , 400 MHz)		Cyclo[Gly-(S)-Pro] [138] (CDCl ₃ , 300 MHz)	
	$^1\text{H-NMR}$	$^{13}\text{C-NMR}$	$^1\text{H-NMR}$	$^{13}\text{C-NMR}$
1	-	169.97		169.93
2	6.90	-	6.8	-
3	3.89 (2H, dd, $J = 4.4$ และ 16.4 Hz, 3-H)	46.62	3.2-4.2	46.01
	4.08 (2H, d, $J = 15.2$ Hz, 3-H)		3.2-4.2	
4	-	163.51	-	163.54
5	-	-	-	-
6	3.61 (2H, m, 6-H)	45.32	3.2-4.2	45.02
	3.55 (2H, m, 6-H)		3.2-4.2	
7	2.03 (2H, m, 7-H)	22.40	1.5-2.55	22.14
	1.91 (2H, m, 7-H)		1.5-2.55	
8	2.37 (2H, m, 8-H)	28.44	1.5-2.55	28.16
	2.06 (2H, m, 8-H)		1.5-2.55	
9	4.08 (1H, dd, $J = 5.2$ และ 15.6 Hz, 9-H)	58.53	3.2-4.2	58.33



รูปที่ 4.11 โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ 3

4.6 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารปฏิชีวนะ

4.6.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารปฏิชีวนะด้วยวิธี Minimum Inhibitory Concentration Method (MIC)

จากสารปฏิชีวนะที่ทำการแยกได้ คือ สารปฏิชีวนะ 1, สารปฏิชีวนะ 2 และสารปฏิชีวนะ 3 นำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ด้วย วิธี Minimum Inhibitory Concentration Method (MIC) ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 ค่า MIC ของสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์

สาร	ค่า MIC ของสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ [$\mu\text{g} / \text{ml}$ (μM)]				
	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
สารปฏิชีวนะ 1	62.5 (325.18)	250 (1300.73)	250 (1300.73)	0	62.5 (325.18)
สารปฏิชีวนะ 2	7.82 (39.86)	0	62.5 (318.55)	125 (637.10)	250 (1274.21)
สารปฏิชีวนะ 3	125 (811.16)	0	0	0	125 (811.16)
Streptomycin	-	-	15.63 (10.71)	62.5 (42.81)	-
Penicillin G	15.63 (43.88)	-	-	-	7.82 (21.96)
Ketoconazole	-	31.25 (58.80)	-	-	-

หมายเหตุ - = ไม่ได้ทดสอบ 0 = ไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง