



รายงานการวิจัย  
เรื่อง  
องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเชื้อรา  
จากดินอินทรีย์ในพื้นที่พรุ จังหวัดนราธิวาส

โดย

ผศ.ดร. สุกัญญา เดชอดิศัย  
ผศ.ดร. ฉัตรชัย วัฒนากิริมย์สกุล  
สาขาวิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์  
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

และ

ศูนย์ศึกษาการพัฒนาพิกุลทองอันเนื่องมาจากพระราชดำริ

จากเงินงบประมาณแผ่นดิน ปี พ.ศ. 2560-2562

ปี พ.ศ. 2564

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงาน กปร. ปีงบประมาณ 2560-2562 คณะผู้วิจัย ขอขอบพระคุณเป็นอย่างยิ่ง

ขอขอบคุณผู้อำนวยการศูนย์ศึกษากาการพัฒนาพิกุลทองอันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดนราธิวาส นักวิจัยและเจ้าหน้าที่ในศูนย์ฯ ทุกท่าน รวมทั้งนักวิจัยและเจ้าหน้าที่ที่ศูนย์วิจัยและศึกษาระบบชาติป่าพรุสิรินธร ที่อำนวยความสะดวกและให้ความอนุเคราะห์ในการเข้าพื้นที่เก็บตัวอย่าง สำนักวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่ช่วยติดต่อประสานงานและอำนวยความสะดวกในการเข้าพื้นที่ มา ณ โอกาสนี้ด้วย

ขอขอบคุณ สาขาวิชาเภสัชเวชและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ในการสนับสนุนพื้นที่และอุปกรณ์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ในการทำวิจัยในครั้งนี้ ตลอดจนขอบคุณ นักศึกษาปริญญาโท นางสาวนริศร แก้วชุติมา และ นางสาวนชรีน บาซอ และนักศึกษาปริญญาเอก นายเสถียรพงษ์ ภูผา ที่เป็นผู้ช่วยวิจัยในโครงการนี้

คณะผู้วิจัย

ธันวาคม 2564

## บทคัดย่อ

จากผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ 5 อย่าง ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (รักษาความผิดปกติของเม็ดสี) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแอลฟาโทโคฟีโนล (รักษาเบาหวาน) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระซีลีเนียม (รักษาโรคสมองเสื่อม, Alzheimer's disease) ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (รักษาโรคมะเร็ง) และฤทธิ์ต้านการอักเสบ (รักษาอาการอักเสบต่างๆ) ของจุลินทรีย์ในดินอินทรีย์ในพื้นที่พรุ จังหวัดนราธิวาส จำนวน 104 ตัวอย่าง

พบสารสกัดที่น่าสนใจ จากเชื้อรา 2 ชนิด คือ SPSF318 ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโทโคฟีโนลที่ดี และ SPSF224 ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแอลฟาโทโคฟีโนลที่ดี เมื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อราทั้งสองด้วย molecular method พบว่า SPSF318 เป็นเชื้อราชนิด *Aspergillus flavus* และ SPSF224 เป็นเชื้อราชนิด *Penicillium maxillae*

ในการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อรา SPSF318 (*Aspergillus flavus*) โดยมุ่งเน้นการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโทโคฟีโนล เริ่มด้วยการแยกสารสกัดเป็น 5 ชนิด ได้แก่ สารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตทของน้ำเลี้ยงเชื้อรา (BE), สารสกัดชั้นน้ำของน้ำเลี้ยงเชื้อรา (BW), สารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตทจากเส้นใยเชื้อรา (CE), สารสกัดชั้นเฮกเซนจากเส้นใยเชื้อรา (CH) และสารสกัดชั้นเมทานอลจากเส้นใยเชื้อรา (CM) สารสกัด BE และ BW มีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระโทโคฟีโนลในเซลล์เมลานโนไซท์ชนิด B16F1 อย่างมีนัยสำคัญ จึงสามารถลดกระบวนการสังเคราะห์เมลานินได้ นอกจากนั้นจากการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพ พบว่า BE, CE และ BW มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) และ *S. epidermidis* และต้านแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* และ *Escherichia coli*

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมี สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ 4 ชนิด ได้แก่ kojic acid, ditryptophenaline และ 2,3,5-trihydroxybenzamide โดยแยกได้จาก BE และ CE ส่วนสาร diglycerol แยกได้จาก CM ซึ่งสาร 2,3,5-trihydroxybenzamide (CE2) และ diglycerol ยังไม่เคยมีรายงานสารที่แยกได้จากเชื้อราชนิดนี้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จัดเป็นรายงานวิจัยแรกในการรายงานการพบสารดังกล่าวในเชื้อราชนิดนี้ และจากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่แยกได้ พบว่า kojic acid มีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระโทโคฟีโนลที่ดี โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 8.73  $\mu$ g/ml

ในการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อรา SPSF224 (*Penicillium maxillae*) โดยมุ่งทดสอบฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระแอลฟาโทโคฟีโนลของสารสกัดจากเชื้อราดังกล่าว โดยเริ่มจากการเตรียมสารสกัดเป็น 5 ชนิด กล่าวคือ ชั้นเอทิลอะซิเตทของเซลล์ (CE) ชั้นเอทิลอะซิเตทของน้ำเลี้ยงเชื้อรา (BE) ชั้นเฮกเซนของเซลล์ (CH) ชั้นเมทานอลของเซลล์ (CM) และชั้นน้ำของน้ำเลี้ยงเชื้อรา (BW) โดยทั้งหมดพบสารกลุ่มแทนนินและอัลคาลอยด์ เมื่อเปรียบเทียบผลของสารสกัดเชื้อรา SPSF224 ทั้งห้าชนิด พบว่า CE มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการกำจัดอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่าร้อยละ  $31.25 \pm 5.89$  และมีปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกและสารกลุ่มฟลาโวนอยด์สูงที่สุดคือ  $8.89 \pm 0.40$  มิลลิกรัมแกลลิกแอซิดต่อกรัมน้ำหนักแห้งและ  $7.73 \pm 0.19$  มิลลิกรัมควอซิทินต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

ผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีววิทยาพบว่า CH มีฤทธิ์ดีที่สุดในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส โดยมีค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งร้อยละ 50 เท่ากับ 490 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ BE มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus*

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของ CH ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี แมสสเปคโตรเมตรี พบว่ามีสาร *n*-hexadecanoic acid, 2,6-dimethyl-N-(2-methyl-alpha-phenylbenzyl) aniline และ 3beta-acetoxy-6-nitroandrost-5-en-17-one เป็นส่วนประกอบหลักของสารสกัด นอกจากนี้สารกึ่งบริสุทธิ์ PM1 ซึ่งแยกได้จาก BE พบว่ามี 3-(1-methylbutyl)-1,2,4-cyclopentanetrione และ suberic dihydrazide เป็นส่วนประกอบหลัก ซึ่งสารกึ่งบริสุทธิ์ PM1 ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสได้ดี ถึงร้อยละ  $91.83 \pm 1.59$  และสารกึ่งบริสุทธิ์ PM2 ซึ่งสามารถแยกได้จาก CE พบว่ามีความเป็นไปได้ที่จะเป็นสารกลุ่มอนุพันธ์ของแคโรทีนอยด์และสารสีกลุ่มโพลีอิน

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาแรกเกี่ยวกับการศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ทางชีววิทยาของสารสกัดจากเชื้อรา *P. maximae* ซึ่งองค์ความรู้ที่ได้สามารถใช้เป็นข้อมูลอ้างอิง ในการค้นหาหรือสารต้นแบบจากเชื้อรา เพื่อนำมาใช้พัฒนาเป็นยาหรือผลิตภัณฑ์สุขภาพในการดูแลผู้ป่วยเบาหวานต่อไป

โดยสรุปนอกจากเชื้อราทั้งสองชนิดที่นำมาศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าพื้นที่พรุ จังหวัดนราธิวาสยังเป็นแหล่งที่ตรวจพบเชื้อราที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี ดังนั้นพื้นที่ดังกล่าวจึงมีความน่าสนใจที่จะใช้เป็นแหล่งศึกษาเกี่ยวกับสารจากธรรมชาติ โดยเฉพาะการหาสารใหม่ที่สามารถนำมาพัฒนาเป็นยาต้นแบบ (lead compound) ในการรักษาโรคต่างๆต่อไป

**คำหลัก:** องค์ประกอบทางเคมี ฤทธิ์ทางชีวภาพ ฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส ฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส เชื้อรา พรุโต๊ะแดง ดินอินทรีย์

## สารบัญเรื่อง

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อและคำหลัก	ii
สารบัญเรื่อง	iv
สารบัญตาราง	v
สารบัญรูป	vi
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	vii
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การทบทวนวรรณกรรม	4
ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย	13
ผลและวิจารณ์ผล	24
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	42
เอกสารอ้างอิง	46
ประวัติและผลงานวิจัยที่สำคัญของนักวิจัย	50
ภาคผนวก	60

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า	
1	สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ได้จากเชื้อรา	7
2	สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสที่ได้จากเชื้อรา	10
3	สารสกัดหยาบทั้ง 5 ส่วนของเชื้อรา <i>A. flavus</i> ลักษณะทางกายภาพ น้ำหนักและPercent yield ของสารสกัดเมื่อเทียบกับเชื้อราที่นำมาสกัด	25
4	ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ที่ความเข้มข้น 20 µg/ml ของสารสกัดหยาบทั้ง 5 ส่วนของเชื้อรา <i>A. flavus</i>	26
5	<sup>1</sup> H-NMR spectrum data ของ compound BE1 และ kojic acid	27
6	<sup>1</sup> H-NMR and <sup>13</sup> C-NMR spectrum data ของ compound CE1 และ ditryptophenaline	28
7	<sup>1</sup> H-NMR data of compound CM1 (in DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ; 500 MHz)	31
8	IC <sub>50</sub> of isolated compounds on tyrosinase inhibitory activity	32
9	การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสและการยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานิน ในเซลล์เมลานोไซท์ชนิด B16F1 จากสารสกัดหยาบของเชื้อรา <i>A. flavus</i>	33
10	ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากเชื้อรา <i>A. flavus</i> (SPSF318)	34
11	MIC และ MBC ของสารสกัดและสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จาก <i>A. flavus</i>	35
12	สารสกัดจากเชื้อราชนิด <i>Penicillium maximae</i> (SPSF224)	36
13	การศึกษาพฤษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดจากเชื้อราชนิด <i>Penicillium maximae</i> (SPSF224)	37
14	Total phenolic content และ Total flavonoids content ของสารสกัดจากเชื้อราชนิด <i>Penicillium maximae</i> (SPSF224)	37
15	ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสของสารสกัดต่าง ๆ จากเชื้อรา SPSF224	39
16	ผลการทดสอบการกระตุ้นการหลั่ง insulin ใน cell line (INS-1E) ของสารสกัดต่าง ๆ จากเชื้อรา SPSF224	39
17	Percent inhibition of DPPH radical scavenging activity at 200 µg/ml of <i>P. maximae</i> extracts	40
18	ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจาก เชื้อรา <i>P. maximae</i> (SPSF224)	41

## สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	Pathway of melanin biosynthesis in mammalian	5
2	โครงสร้างของสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทซิเนสที่แยกได้จากเชื้อรา	8
3	ศูนย์วิจัยและศึกษาธรรมชาติป่าพรุสิรินธร จังหวัดนราธิวาส	11
4	ขั้นตอนการเกิด dopachrome	15
5	แสดงปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสสาร p-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside ด้วยเอนไซม์ $\alpha$ -glucosidase ไปเป็นผลิตภัณฑ์ p-nitrophenol ที่มีสีเหลืองใส และน้ำตาล glucose	17
6	การเลี้ยงเพื่อเพิ่มสารสกัดหยาบของเชื้อรา <i>A. flavus</i>	25
7	โครงสร้างทางเคมีของ BE1 (Kojic acid)	27
8	โครงสร้างทางเคมีของ CE1 (Ditryptophenaline)	29
9	โครงสร้างทางเคมีของ CE2 (2,3,5-Trihydroxybenzamide)	30
10	โครงสร้างทางเคมีของ CM1 (Diglycerol)	31
11	แผนภาพการสกัดสารของเชื้อรา SPSF224	36
12	GC-MS ของสารกึ่งบริสุทธิ์ PM1	38
13	องค์ประกอบหลักทางเคมีของ PM1	38

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

$J$	=	Coupling constant (NMR)
$\delta$	=	Chemical shift (NMR) (ความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ระดับ 50%)
$\mu\text{l}$	=	Microliter
BSA	=	Bovine serum albumin
DMSO	=	Dimethyl sulfoxide
EtOAc	=	Ethyl acetate
HPLC	=	High performance liquid chromatography (HPLC)
IC <sub>50</sub>	=	The half-maximal inhibitory concentration
IR	=	Infrared Spectroscopy (IR)
M	=	Molar
MeOH	=	Methanol
ml	=	Milliliter
MS	=	Mass Spectroscopy (MS)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	=	Disodium hydrogen phosphate,
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	=	Sodium dihydrogen phosphate monohydrate,
NaN <sub>3</sub>	=	Sodium azide
NMR	=	Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR)
PDB	=	Potato Dextrose Broth (อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อราซึ่งเตรียมมาจากมันฝรั่ง)
PTLC	=	Preparative thin layer chromatography (PTLC)
TLC	=	Thin layer chromatography
U	=	Unit
UV-Vis	=	Ultraviolet Visible (UV-Vis) Spectroscopy,
V <sub>i</sub>	=	Initial velocity (อัตราเร็วเริ่มต้น)

## บทนำ

สืบเนื่องจากสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ได้มีพระราชดำริให้ทำการศึกษา จุลินทรีย์ทนกรดในพื้นที่พรุ จังหวัดนราธิวาส เพื่อให้ทราบชนิดของจุลินทรีย์ที่ทนต่อสภาพความเป็นกรดจัด ซึ่งอาจสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ทั้งในด้านการเกษตรและด้านการแพทย์

ทางกรมพัฒนาที่ดินได้ทำการแยก คัดเลือก และศึกษากิจกรรมของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อย สลายสารอินทรีย์ และจุลินทรีย์ที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ในระดับห้องปฏิบัติการแล้ว และอยู่ ระหว่าง การศึกษาในโรงเรือนกระจกและภาคสนาม เพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ต่อไป

ทั้งนี้ทางคณะผู้วิจัย ได้นำเชื้อจุลินทรีย์ที่น่าสนใจ มาเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวน และนำสารสกัดที่ได้ มาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น โดยฤทธิ์ทางชีวภาพที่ศึกษา จะเป็นฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ ได้แก่ ฤทธิ์ ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส ฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส ฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะซิติลคอลิเนสเตอเรส ฤทธิ์ ความเป็นพิษต่อ เซลล์มะเร็ง และฤทธิ์ต้านการอักเสบ ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้ เป็นการศึกษาเพื่อนำจุลินทรีย์มา ใช้ให้เกิดประโยชน์ โดยอาจเป็นแหล่งผลิตสารที่สามารถนำไปพัฒนา เป็นยาใหม่ ต่อไปในอนาคตได้

จากโครงการก่อนหน้า คือ การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของจุลินทรีย์ในดินอินทรีย์ในพื้นที่พรุ จังหวัด นราธิวาส จำนวน 104 ตัวอย่าง ซึ่งประกอบด้วยสารสกัดจากเชื้อ *Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp., *Gongronella* sp., *Penicillium* sp. จำนวน 4, 12, 2 และ 83 ตัวอย่าง ตามลำดับ และอีก 3 ตัวอย่างที่ ขณะนี้ยังไม่สามารถ พิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อเราได้ (unidentified) ว่าเป็นเชื้อชนิดใด โดยนำตัวอย่างทั้งหมด มาทดสอบฤทธิ์ ทางชีวภาพ 5 อย่าง ได้แก่ ฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส (รักษาความผิดปกติของเม็ดสี) ฤทธิ์ ต้านเอนไซม์ แอลฟาไกลูโคซิเดส (รักษาเบาหวาน) ฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะซิติลคอลิเนสเตอเรส (รักษาโรคสมอง เสื่อม, Alzheimer's disease) ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (รักษาโรคมะเร็ง) และฤทธิ์ต้านการ อักเสบ (รักษาอาการอักเสบต่างๆ)

จากผลการทดลองพบว่ามี 3 ตัวอย่างซึ่งได้จากเชื้อ *Penicillium* sp. มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส ที่ดี (มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส > 50% ที่ความเข้มข้น 20 µg/ml) ได้แก่ SPSF0318BE, SPSF0318CE และ SPSF045BE (สารมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบนี้คือ ปวกหาด (water extract of *Artocarpus lakoocha*) และ kojic acid โดยมีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสเท่ากับ  $98.82 \pm 3.97$  และ  $75.46 \pm 1.80\%$  ตามลำดับ

และพบ 1 ตัวอย่างมีฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะซิติลคอลิเนสเตอเรสที่ดี (มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะซิติล คอลิเนสเตอเรส > 80% ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml) ได้แก่ SPSF013BE (*Trichoderma* sp.) (สาร มาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบนี้คือ Galantamine มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะซิติลคอลิเนสเตอเรส  $97.69 \pm 0.95\%$ )

พบ 14 ตัวอย่างมีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ที่ดี (มีความเป็นพิษต่อ เซลล์มะเร็งเต้านมที่ความเข้มข้น 25 µg/ml > 80%) โดยเป็นตัวอย่างจากสารสกัดเชื้อรากลุ่ม *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. และ *Trichoderma* sp. จำนวน 10, 3 และ 1 ตัวอย่าง ตามลำดับ เมื่อนำตัวอย่าง ที่มี พิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (Human gingival fibroblast (HGF)) พบว่า

ทุกตัวอย่างมีพิษต่อเซลล์ปกติมากกว่า 20% (สารมาตรฐานในการทดสอบนี้ คือ Camptothecin โดยมีพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมเท่ากับ  $94.01 \pm 0.17\%$  และพิษต่อเซลล์ปกติ (HGF)  $73.14 \pm 3.63\%$ )

สำหรับฤทธิ์ด้านการอักเสบ ผลการทดสอบพบ 39 ตัวอย่าง มีฤทธิ์ด้านการอักเสบที่ดี (ยับยั้งการหลั่ง nitric oxide จาก macrophage cell (RAW 264.7) ที่ความเข้มข้น  $25 \mu\text{g/ml} > 60\%$ ) โดยเป็นตัวอย่างจากสารสกัดจากเชื้อรากลุ่ม *Penicillium* sp. และ *Aspergillus* sp. จำนวน 34 และ 5 ตัวอย่าง ตามลำดับ โดยมี 18 ตัวอย่าง ที่มีพิษต่อเซลล์ที่ใช้ทดสอบมากกว่า 20% ในการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบ ใช้ Indomethacin เป็นสารมาตรฐาน โดยมีฤทธิ์ด้านการอักเสบ  $61.08 \pm 0.68 \%$  และมีพิษ ต่อเซลล์ที่ใช้ทดสอบ  $25.42 \pm 2.99 \%$

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส พบ 62 ตัวอย่าง ที่มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสที่ดี (มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส ที่ความเข้มข้น  $2 \text{ mg/ml} > 70\%$ ) โดยเป็นตัวอย่างจากสารสกัดจากเชื้อรา กลุ่ม *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp. และ *Gongronella* sp. จำนวน 54, 4, 2 และ 2 ตัวอย่าง ตามลำดับ ในการทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส ใช้ Acarbose เป็นสารมาตรฐาน โดยมีฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส  $86.87 \pm 0.66\%$

จากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นทั้งหมด 104 ตัวอย่าง พบว่ามี 4 ตัวอย่างที่น่าสนใจ คือ SPSF318BE, SPSF318CE, SPSF224BE และ SPSF224CE โดยตัวอย่างทั้ง 4 ตัว มาจากเชื้อ 2 ชนิด คือ SPSF318 และ SPSF224 ซึ่งเชื้อราทั้งสองเป็นเชื้อราในกลุ่ม *Penicillium* sp. เหมือนกัน โดยเชื้อราทั้งสอง แยกเป็น 2 ตัวอย่าง คือ ส่วนที่เป็นสารสกัดชั้น ethyl acetate ของอาหารเลี้ยงเชื้อ (broth, BE) และ ส่วนของสารสกัดชั้น ethyl acetate ของเซลล์ (cell, CE)

เนื่องจากตัวอย่างจากสารสกัดจากเชื้อรากลุ่ม *Penicillium* sp. (SPSF318) มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ ไทโรซิเนสที่ดี ซึ่งในปัจจุบันการศึกษาเพื่อหาสารสกัดที่มีฤทธิ์ที่ดีในการต้านเอนไซม์ดังกล่าวค่อนข้างหาได้ยาก นอกจากนั้นตัวอย่างจากส่วนของสารสกัดชั้น ethyl acetate ของเซลล์ (SPSF318CE) ยังมี ฤทธิ์ที่ดีในการต้านการอักเสบ และฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม ดังนั้น *Penicillium* sp. (SPSF318) จึงน่าสนใจในการนำมาเลี้ยงเพิ่มปริมาณ เพื่อใช้ในการแยกสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ (active compound) ต่อไป

นอกจากนั้นยังมีสารตัวอย่างที่น่าสนใจอีก 2 ตัวอย่าง คือ SPSF224BE และ SPSF224CE เนื่องจากมีฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสที่ดี และตัวอย่างทั้งสองได้จากเชื้อเดียวกัน คือ *Penicillium* sp. (SPSF224) และตัวอย่างทั้งสอง ยังมีฤทธิ์ที่ดีในการต้านการอักเสบ โดยไม่เป็นพิษกับเซลล์ที่ใช้ทดสอบ นอกจากนั้น SPSF224CE ยังมีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมปานกลาง โดยไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติ ดังนั้น *Penicillium* sp. (SPSF224) จึงเป็นอีกหนึ่งตัวอย่างที่น่าสนใจ ในการนำมาเลี้ยงเพิ่ม ปริมาณ เพื่อใช้ในการแยกสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ (active compound) ต่อไป

เพราะฉะนั้นในการศึกษาครั้งนี้เราสามารถพบสารสกัดที่น่าสนใจ จากเชื้อ *Penicillium* sp. 2 ชนิด คือ SPSF318 และ SPSF224 ที่จะนำไปเลี้ยงเพิ่มปริมาณ เพื่อใช้ในการแยกสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ (active compounds) ทางชีวภาพในลำดับต่อไป โดยเฉพาะการหาสารออกฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสและฤทธิ์ ต้านเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส ตามลำดับ ซึ่งเป็นฤทธิ์ที่สารสกัดทั้งสองมีฤทธิ์ดีในขั้นการทดสอบจากสารสกัด

## วัตถุประสงค์

1. เพื่อสนองพระราชดำริให้ทำการศึกษาจุลินทรีย์ในพื้นที่พรุ จังหวัดนราธิวาส
2. เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อรา (Fungal identification) ทั้ง 2 ชนิดที่สนใจ คือ SPSF318 และ SPSF224
3. เพื่อแยกสารสำคัญจากสารสกัดเชื้อรา 2 ชนิด ที่มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส และฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส ที่ได้แก่ SPSF318 และ SPSF224 ตามลำดับ
4. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส และฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากเชื้อรา 2 ชนิด คือ SPSF318 และ SPSF224 ตามลำดับ
5. เพื่อศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้
6. เพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนการนำใช้จุลินทรีย์ในดินอินทรีย์ในพื้นที่พรุ จังหวัดนราธิวาส ในการนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ทั้งทางการแพทย์หรือการต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ
7. เพื่อใช้เป็นฐานข้อมูลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของจุลินทรีย์ในดินอินทรีย์ในพื้นที่พรุ จังหวัดนราธิวาส
8. เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนายาหรือเวชสำอางจากจุลินทรีย์ในดินอินทรีย์ในพื้นที่พรุ จังหวัดนราธิวาส

## การทบทวนวรรณกรรม

ในงานวิจัยชิ้นนี้เป็นการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเชื้อรา จากดินอินทรีย์ ในพื้นที่พรุ จังหวัดนราธิวาส โดยคัดเลือกเชื้อรา 2 ชนิด ที่มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส และฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส ตามลำดับ โดยการคัดเลือกเชื้อราทั้ง 2 ชนิด ได้จากผลวิจัยของโครงการการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของจุลินทรีย์ในดินอินทรีย์ในพื้นที่พรุ จังหวัดนราธิวาส จำนวน 104 ตัวอย่าง

### การศึกษาฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส (Study on anti-tyrosinase activity)

Melanin เป็น pigment ที่สำคัญ พบใน แบคทีเรีย รา พืช สัตว์ และคน ถูกหลั่งโดยเซลล์ melanocyte ในชั้นใต้ผิวหนัง ทำหน้าที่ปกป้องผิวจากรังสี UV โดยดูดกลืนแสง UV เอาไว้ ไม่ให้ทำลายผิวหนัง สีของ pigment ที่พบมีตั้งแต่สีเหลืองจนถึงสีดำ ขึ้นกับปริมาณ และการกระจาย ของ melanin โดยที่ melanin นั้นถูกสร้างโดยกระบวนการ melanogenesis ด้วย enzyme tyrosinase ซึ่งจะทำให้เกิดปฏิกิริยา oxidation ขึ้น เปลี่ยนสารตั้งต้นคือ amino acid tyrosine ไปเป็นสารตัวกลาง ที่จะเปลี่ยนไปเป็น melanin ต่อไป หากกระบวนการ melanogenesis เกิดมากเกินไป จะทำให้เกิดภาวะ hyperpigment นำไปสู่ความผิดปกติ เช่น ฝ้า กระ มะเร็งผิวหนัง ซึ่งการรักษาหรือแก้ไขภาวะผิดปกติ ที่เกิดจากการสร้าง melanin มากเกินไป ทำได้โดยการยับยั้งการสร้าง melanin ผ่านการยับยั้ง การทำงานของเอนไซม์ tyrosinase ซึ่งมีบทบาทความสำคัญในกระบวนการสร้าง melanin และการยับยั้งเอนไซม์นี้ยังสามารถประยุกต์ใช้เป็น whitening agent ในด้านความสวยความงาม ส่วนในทางการเกษตร อาจนำไปประยุกต์ใช้ในการเพิ่มคุณภาพผลิตผลทางการเกษตร ในการป้องกันการเกิดรอยคล้ำ (browning) ของพืช ผัก ผลไม้ จากการถูกกระแทกได้ ซึ่งในปัจจุบันได้มีการศึกษาเพื่อหา สารที่มีฤทธิ์ในการต้านเอนไซม์ tyrosinase (tyrosinase inhibitor) โดยส่วนใหญ่จะสกัดสารจากแหล่งธรรมชาติ เช่น พืช และจุลินทรีย์ต่างๆ หรือ สังเคราะห์สารใหม่ขึ้นมา

Tyrosinase inhibitor ซึ่งเป็นที่รู้จักกันดีและมีการนำมาใช้กันอย่างแพร่หลาย เช่น kojic acid และ arbutin โดยทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นสารที่ได้มาจากธรรมชาติ ซึ่งมีการนำมาใช้เป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์ เครื่องสำอาง เพื่อผิวขาวและใช้เป็น positive control ในการทดสอบฤทธิ์การต้านเอนไซม์ tyrosinase (Kim and Uyama, 2005) สารทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นสารที่ได้จากธรรมชาติ โดย kojic acid เป็นสารที่ได้จากเชื้อรา และนำมาใช้ในเวชสำอาง (Bentley, 2006) ในปัจจุบันมีการค้นคว้า วิจัยหาสารที่เป็น tyrosinase inhibitor กันมากขึ้นเพื่อหาสารที่มีประสิทธิภาพที่ดี ปลอดภัยและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ สำหรับประเทศไทย เครื่องสำอาง หรือยาที่มีคุณสมบัติเป็น whitening agent นั้น เป็นที่ต้องการของตลาดเป็นอย่างมาก ซึ่งสารที่เป็น whitening agent ที่ปลอดภัย และมีคุณภาพดีนั้นมีอยู่ไม่กี่ชนิด ทั้งยังมีราคาแพงอีกด้วย ทำให้มีความสนใจที่จะศึกษาวิจัยหาสารที่เป็น tyrosinase inhibitor จากจุลินทรีย์ในดินเปรี้ยวและดินอินทรีย์ ในพื้นที่พรุ จังหวัดนราธิวาส ในการนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ทั้งทางการแพทย์หรือการต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ

เนื่องจากในประเทศของเรานั้น มีสมุนไพรอยู่เป็นจำนวนมาก และมีเพียงบางชนิดเท่านั้น ที่ได้ทดสอบฤทธิ์นี้แล้ว เช่น ปวกหาด (Tengamnuay *et al.*, 2006) ซึ่งพบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ tyrosinase ที่ดี โดยการทดสอบฤทธิ์นี้ในสมุนไพรไทยหรือจุลินทรีย์ จะทำให้เกิดองค์ความรู้ใหม่ๆ ขึ้น และหากพบสารที่มีฤทธิ์น่าสนใจ ก็สามารถนำไปพัฒนาประยุกต์ใช้ต่อไปได้

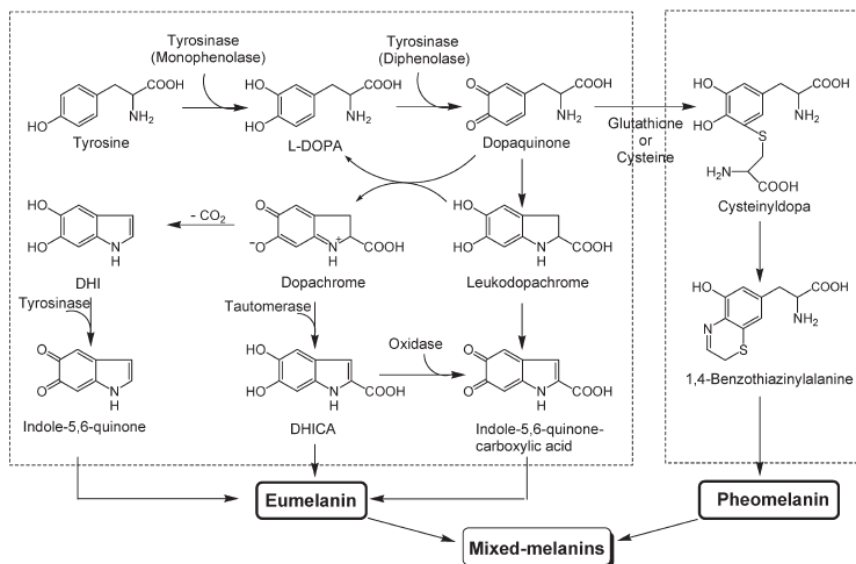
## งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Melanin เป็นสารสีชนิดหนึ่งที่พบได้มาก สามารถพบได้ในพวกแบคทีเรีย รา พืช และสัตว์ เป็น heterogenous polyphenol-like biopolymer โครงสร้างเป็นสารประกอบมีสีตั้งแต่ สีเหลือง จนถึงสีดำ ชนิดและปริมาณของ melanin ที่ถูกสร้างจากเซลล์ melanocyte ซึ่งกระจายรอบ ๆ เซลล์ keratinocyte จะเป็นตัวกำหนดสีที่แท้จริงของผิวหนัง ลักษณะลายของม้าลาย ยีราฟและสัตว์ที่มีลายต่างๆ เกิดจากการที่เซลล์ melanocyte กระจายไม่สม่ำเสมอ เช่นเดียวกับสีผิว และสีผมของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ที่ขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง ซึ่งปัจจัยที่สำคัญที่สุดคือ ปริมาณและการกระจายของ melanin โดยถูกสร้างจากเซลล์ melanocyte ซึ่งกระจายอยู่ในชั้น dermis ของผิวหนัง บทบาทของ melanin คือ ปกป้องผิว จากรังสี UV และกำจัดสารอนุมูลอิสระพวก reactive oxygen species การที่มีการสร้างหรือมีการสะสม melanin มากเกินไปจะทำให้เกิดภาวะผิดปกติเช่น ฝ้า กระ มะเร็งผิวหนัง เป็นต้น การสร้าง melanin นั้น สร้างผ่านกระบวนการ oxidation โดยมี amino acid tyrosine เป็นสารตั้งต้น (Riley, 1993)

Melanin มี 2 ชนิด คือ

Eumelanin: สีดำหรือสีน้ำตาล

Pheomelanin: สีเหลืองหรือสีแดง



รูปที่ 1 Pathway of melanin biosynthesis in mammalian (Riley, 1993)

### Pathway ในการสังเคราะห์ eumelanin (ดังรูปที่ 1 )

แบ่งเป็น 2 phase คือ proximal และ distal phase ใน proximal phase จะเกิดปฏิกิริยา oxidation ของ tyrosine หรือ L-DOPA ไปเป็น o-dopaquinone โดยอาศัยเอนไซม์ tyrosinase ซึ่ง o-dopaquinone ที่เกิดขึ้นนี้สามารถเกิดปฏิกิริยาต่อไปได้ 2 ทาง คือ

- เกิด intramolecular 1,4 addition คือ amino group ที่เป็น side chain ของ o-dopaquinone เกิด cyclization เข้ากับวง benzene ได้เป็น leukodopachrome ซึ่งจะเปลี่ยนไปเป็น dopachrome อย่างรวดเร็วโดยอาศัย o-dopaquinone ตัวอื่นๆช่วยในการเร่งปฏิกิริยา ซึ่ง o-dopaquinone เหล่านี้จะถูก reduce กลับไปเป็น L-DOPA

- อีกปฏิกิริยาหนึ่ง คือ *o*-dopaquinone จะเกิดปฏิกิริยา water addition ที่วง benzene ได้เป็น 2,4,5-trihydroxyphenylalanine (TOPA) ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยา oxidation ไปเป็น *p*-topaquinone ซึ่งก็อาศัย *o*-dopaquinone ตัวอื่นๆในการเกิดปฏิกิริยาเช่นเดียวกัน ซึ่ง *p*-topaquinone นี้จะเกิดปฏิกิริยาต่อไปจนได้เป็น dopachrome

ส่วน distal phase นั้น จะเป็นขั้นตอนที่เกี่ยวกับการเกิดปฏิกิริยาของ dopachrome ซึ่งได้จาก proximal phase โดยจะอาศัยเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์จนได้เป็น eumelanin

#### Pathway ในการสังเคราะห์ pheomelanin

เกิดจากสารที่มี thiol group เช่น glutathione และ cysteine จับกับ *o*-dopaquinone ได้เป็น cysteinyl-dopa หรือ glutathionyl-dopa ซึ่งจะเกิด cyclization และ polymerization ต่อไปจนได้เป็น pheomelanin (Riley, 1993)

Tyrosinase หรืออาจเรียกว่า phenolase, monophenol oxidase, catechol oxidase เป็นเอนไซม์ที่มี copper อยู่ พบทั่วไปในพืชและสัตว์ มีความสำคัญในกระบวนการสร้าง melanin โดยเร่งปฏิกิริยา 2 อย่างคือ

- hydroxylation ของ tyrosine ได้เป็น 3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)
- oxidation ของ 3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) ไปเป็น *o*-dopaquinone

ในอุตสาหกรรมอาหาร tyrosinase เป็นเอนไซม์ที่มีผลต่อการเร่งปฏิกิริยา oxidation ของสาร กลุ่ม phenolic ในผักผลไม้ไปเป็นสารกลุ่ม quinones เมื่อเซลล์ของพืชถูกทำลาย ทำให้ผัก ผลไม้เกิด เป็นรอยช้ำสีคล้ำและมีกลิ่น ทำให้เสียคุณค่าทางอาหารและเสียมูลค่าทางการค้า นอกจากนี้ tyrosinase ยังมีความสำคัญในการเจริญเติบโตของแมลง ช่วยในเรื่องการพรางตัว การสร้างเปลือกแข็ง ของแมลง การหายใจของแผลและการสร้างแคปซูลของพวกแบคทีเรีย (Kim and Uyama, 2005)

วิธีวิเคราะห์ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ tyrosinase ในปัจจุบันมีหลายวิธีอาทิ เช่น การวัดการใช้ ออกซิเจนขณะเกิดปฏิกิริยา oxidation ของ enzyme tyrosinase การจับเวลาที่ใช้ใน การกระตุ้นปฏิกิริยา โดยจำกัดปริมาณ enzyme tyrosinase แต่วิธีที่นิยมใช้ในการทดสอบคือ spectrophotometry ซึ่งเป็นการประเมินการทำงานของเอนไซม์ tyrosinase ที่เหลืออยู่จากการวัดปริมาณ ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นคือ dopachrome ซึ่งค่าจากการทดลองจะถูกคำนวณและแสดงเป็น tyrosinase inhibition (%) (Sasaki and Yoshizaki, 2002) หรือ tyrosinase activity (%) (Lee *et al.*, 2002) ซึ่งมีหลักการทดลองเช่นเดียวกัน เพียงแต่คำนวณต่างกัน ดังนี้

#### **Tyrosinase inhibition (%)**

แสดงค่าเป็น % ของเอนไซม์ tyrosinase ที่ถูกยับยั้งการทำงาน ซึ่งคำนวณจากปริมาณของเอนไซม์ที่เหลือที่สามารถทำงานได้อยู่ โดยวัดจากปริมาณ dopachrome ที่เกิดขึ้นซึ่งเป็น product จากการเกิดปฏิกิริยาของ L-DOPA หรือ L-tyrosine และมีเอนไซม์ tyrosinase เร่งปฏิกิริยา ดังนั้นหากสารที่นำมาทดสอบมีฤทธิ์ที่ดีในการยับยั้งเอนไซม์ จะพบว่า dopachrome ก็ก็จะเกิดขึ้นน้อย ซึ่งวัดได้จากค่าการดูดกลืนแสง เมื่อคำนวณเป็น % inhibition จะได้ค่า % ที่สูง

## Tyrosinase activity (%)

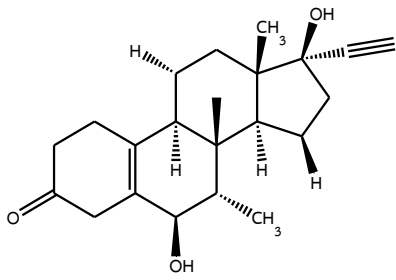
แสดงค่าเป็น % ของเอนไซม์ tyrosinase ที่ยังมี activity อยู่ หากสารที่นำมาทดสอบมีฤทธิ์ที่ดี ในการยับยั้งเอนไซม์ ค่า tyrosinase activity (%) ที่ได้จะมีค่าน้อย ซึ่งหลักการทดสอบคล้ายกันกับการทดสอบ เพื่อหาค่า tyrosinase inhibition (%)

จากการทบทวนวรรณกรรม พบว่ามีรายงานสารที่แยกได้จากเชื้อราและมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ ไทโรซิเนส ดังแสดงในตารางที่ 1 และโครงสร้างของสารดังกล่าวแสดงในรูปที่ 2

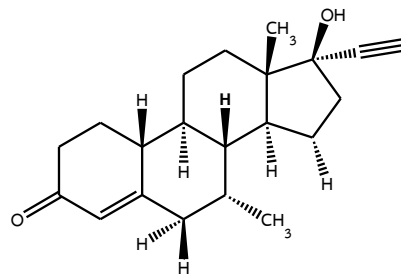
ตารางที่ 1 สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ได้จากเชื้อรา

Fungus	Compound	IC <sub>50</sub> (μM)*	Reference
<i>Rhizopus stolonifer</i>	6β-Hydroxytibolone [1]	7.45	Choudhary <i>et al.</i> , 2010
	Δ <sup>4</sup> -Tibolone [2]	8.19	
<i>Fusarium oxysporum</i>	11α, 15β -Dihydroxytibolone [3]	5.12	
	11α, 15β -Dihydroxy-Δ <sup>5</sup> -tibolone [4]	7.10	
<i>Phellinus linteus</i>	Protocatechualdehyde [5]	32.23	Kang <i>et al.</i> , 2004
<i>Phallus indusiatus</i>	5-(Hydroxymethyl)-2-furfural [6]	45.0	Sharma <i>et al.</i> , 2004
<i>Paecilomyces gunnii</i>	Paecilomycones A [7]	0.11	Lu <i>et al.</i> , 2014
	Paecilomycones B [8]	0.17	
	Paecilomycones C [9]	0.14	
<i>Metarhizium sp.</i>	2-Hydroxytyrosol [10]	13.0	Uchida <i>et al.</i> , 2014

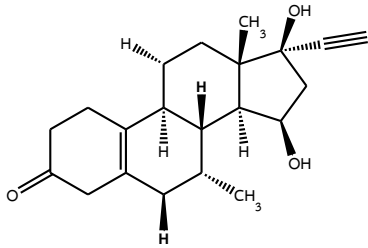
\* IC<sub>50</sub> = The half-maximal inhibitory concentration



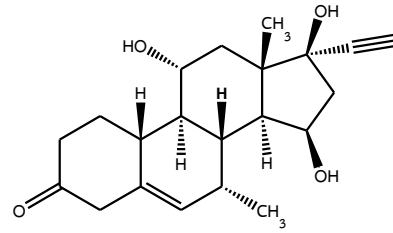
6β-Hydroxytibolone [1]



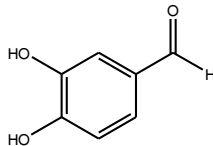
Δ<sup>4</sup>-Tibolone [2]



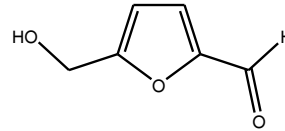
11α, 15β -Dihydroxytibolone [3]



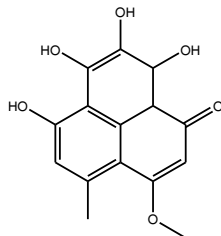
11α, 15β -Dihydroxy-Δ<sup>5</sup>-tibolone [4]



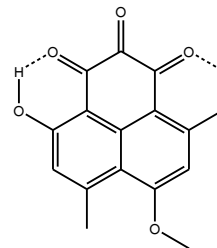
Protocatechualdehyde [5]



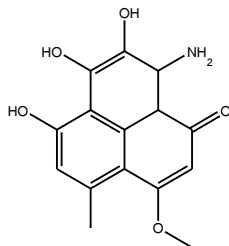
5-(Hydroxymethyl)-2-furfural [6]



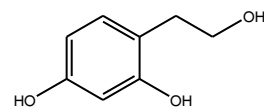
Paecilomyces A [7]



Paecilomyces B [8]



Paecilomyces C [9]



2-Hydroxytyrosol [10]

รูปที่ 2 โครงสร้างของสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทซิเนสที่แยกได้จากเชื้อรา

## การศึกษาฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส (Study on anti- $\alpha$ -glucosidase activity)

ปัจจุบันโรคเบาหวานถือเป็นปัญหาสุขภาพ ที่มีความสำคัญและมีอุบัติการณ์การเกิดโรคในทิศทางที่เพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ ในปี พ.ศ. 2556 มีผู้เป็นเบาหวานทั่วโลกทั้งสิ้น 382 ล้านคน โดยมีประเทศจีน มาเป็นอันดับหนึ่ง ตามด้วยอินเดียและสหรัฐอเมริกา เป็นอันดับ 2 และ 3 ตามลำดับ สำหรับประเทศไทย มีผู้เป็นเบาหวานแล้วกว่า 3.5 ล้านคน และคาดว่าหากไม่มีการดำเนินการใดๆ ในปี พ.ศ. 2573 ผู้ป่วยเบาหวานจะเพิ่มมากขึ้นเป็น 552 ล้านคน ดังนั้นโรคนี้อาจถือว่าเป็นความเจ็บป่วยเรื้อรังอันดับต้นๆ ของประเทศ จึงมีความจำเป็นในการคิดค้น และพัฒนาแนวทางการรักษาอย่างต่อเนื่อง เพื่อลดความรุนแรง ของโรค และอัตราการเกิดผู้ป่วยโรคเบาหวาน (IDF, 2013)

โรคเบาหวานเป็นภาวะเรื้อรังของการมีระดับน้ำตาลในเลือดสูง ซึ่งเกิดจากความบกพร่องของร่างกาย การผลิตฮอร์โมนอินซูลินหรือการทำงานของฮอร์โมนอินซูลินหรือทั้งสองกรณี โดยสาเหตุที่ทำให้เกิดอาการโรคเบาหวาน เกิดขึ้นเนื่องจากการที่ร่างกายไม่สามารถใช้น้ำตาลได้อย่างเหมาะสม ซึ่งโดยปกติ น้ำตาลจะเข้าสู่เซลล์ร่างกายเพื่อใช้เป็นพลังงานภายใต้การควบคุมของฮอร์โมนอินซูลิน ซึ่งผู้ที่เป็นโรคเบาหวานร่างกายจะไม่สามารถนำน้ำตาลไปใช้งานได้อย่างมีประสิทธิภาพ ผลที่เกิดขึ้นทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดสูงขึ้น ในระยะยาวจะมีผลในการทำลายหลอดเลือด หากไม่ได้รับการรักษาอย่างเหมาะสม อาจนำไปสู่สภาวะแทรกซ้อนที่รุนแรงได้

ยาที่ใช้เพื่อควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วยเบาหวานในปัจจุบันมีหลายชนิด จำแนก ตามกลไกการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกัน โดยกลไกหนึ่งที่สำคัญเกี่ยวข้องกับเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส (alpha-glucosidase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีอยู่ในร่างกายผลิตจากตับอ่อนทำหน้าที่ ในการย่อยน้ำตาลโมเลกุลใหญ่ ให้เป็นโมเลกุลเดี่ยว เพื่อให้ร่างกายสามารถดูดซึมน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวนี้ออกสู่กระแสเลือดได้ ดังนั้นจึงมีการคิดค้นยาที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ alpha-glucosidase ที่ผนังลำไส้ ทำให้การดูดซึมกลูโคสจากทางเดินอาหารเกิดขึ้นช้าลง ยาในกลุ่มนี้ ได้แก่ acarbose, voglibose และ miglitol เป็นต้น ดังนั้นจึงมีความพยายามในการคิดค้นหาสารอื่นๆที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ alpha-glucosidase เพื่อควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดและพัฒนายาในกลุ่มนี้ต่อไป โดยเฉพาะสารที่ได้จากธรรมชาติโดยแหล่งของสารสำคัญ ทางยาอาจมาจากพืชสมุนไพร สิ่งมีชีวิตอื่นๆ ตลอดจนจากเชื้อจุลินทรีย์ เช่น เชื้อรา ซึ่งมีรายงานการค้นพบสารที่แยกได้จากเชื้อราหลายชนิดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ alpha-glucosidase ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสที่ได้จากเชื้อรา

No.	Scientific name	Compound name	IC <sub>50</sub>	Reference
1	<i>Aspergillus aculeatus</i>	Aspergillusol A	465±2 µM	Ingavat et al., 2009
2	<i>Aspergillus</i> sp. 16-5B	1H-2-benzopyran-1-one, 3,4-dihydro-4,6,8-trihydroxy-3-methoxy-3,7-dimethyl-	90.4±2.9 µM	Liu et al., 2015b
		Aspergifuranone	9.05±0.60 µM	
		Pestaphthalides A	69.6±3.5 µM	
3	<i>Aspergillus terreus</i>	AspernolidesA	175.18±5.95 µM	Dewi et al., 2014
		Butyrolactone I	52.17±5.68 µM	
		Butyrolactone II	96.01±3.70 µM	
		Butyrolactone I 4',4''-triacetate	84.18±8.98 µM	
4	<i>Epicoccum</i> sp. HS-1	11-deoxydiaporthein A	11.9±0.4 µM	Xia et al., 2015b
		Isopimarane diterpene	4.6±0.1 µM	
5	<i>Ganoderma eucocontextum</i>	Ganoderone A	13.7±2.3 µM	Wang et al., 2015
		Ganoleuconin E	12.7±2.1 µM	
		Ganoleuconin M	13.6±3.1 µM	
		Ganoleuconin N	2.5±0.7 µM	
		Ganoleuconin P	5.9±2.2 µM	
6	<i>Ganoderma lucidum</i>	Ganoderol B	48.5±6.2 µg/ml	Fatmawati et al., 2011
7	<i>Inonotus obliquus</i>	3β-hydroxycinnamolide	3.39±0.07 mM	Ying et al., 2014
		Inotolactones A	0.24±0.01 mM	
		Inotolactones B	0.24±0.01 mM	
8	<i>Nectria</i> sp. HN001	Citreoisocoumarinol	392.5±1.7 µM	Cui et al., 2016
		Citreoisocoumarin	538.7±4.3 µM	
		Epicitreoisocoumarinol	343.7±1.0 µM	
		Nectriacids A	121.8±0.4 µM	
		Nectriacids B	23.5±0.3 µM	
		Nectriacids C	42.3±0.2 µM	
9	<i>Penicillium chermesinum</i>	3-hydroxy-6'-O-desmethylterphenyllin	4.9 µM	Huang et al., 2011
		3,3''-dihydroxy-6'-O-desmethylterphenyllin	2.9 µM	
		6'-O-desmethylterphenyllin	0.9 µM	
		Chermesinones A	24.5 µM	

ตารางที่ 2 สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสที่ได้จากเชื้อรา (ต่อ)

No.	Scientific name	Compound name	IC <sub>50</sub>	Reference
10	<i>Penicillium pinophilum</i>	(±)-penifupyrone	14.4±0.5 µM	Liu et al., 2015c
		6'-methyl-[1,1'-biphenyl]-3,3',4',5-tetraol	2.2±0.1 µM	
		Pinazaphilones A	81.7±0.5 µM	Liu et al., 2015c
		Pinazaphilones B	28.0±0.2 µM	
		Sch1385568	16.6±0.5 µM	
11	<i>Penicillium</i> sp. F70614	Diketopiperazine	35 µg/ml	Kwon et al., 2000
12	<i>Xylaria</i> sp. BL321	07H239-A	6.54 µM	Song et al., 2012b

ศูนย์วิจัยและศึกษาระรรมชาติป่าพรุสิรินธร จังหวัดนราธิวาส (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 ศูนย์วิจัยและศึกษาระรรมชาติป่าพรุสิรินธร จังหวัดนราธิวาส

ที่มา: <https://www.google.com/search?q=ศูนย์วิจัยและศึกษาระรรมชาติป่าพรุสิรินธร> (สืบค้นวันที่ 16 พฤศจิกายน 2564)

ศูนย์วิจัยและศึกษาระรรมชาติป่าพรุสิรินธร หรือ ป่าพรุโต๊ะแดง เป็นป่าพรุที่มีเนื้อที่และอุดมสมบูรณ์มากที่สุดที่ยังเหลืออยู่ในประเทศไทย ตั้งอยู่ในอำเภอสุไหงโกทิง จังหวัดนราธิวาส ป่าพรุแห่งนี้ถือเป็นผืนสุดท้ายของภาคใต้ที่มีความอุดมสมบูรณ์ธรรมชาติรุ่มรื่น มีลักษณะเด่นที่สำคัญ คือ ความหลากหลายทางพันธุกรรม ความหลากหลายของพันธุ์พืชและสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในป่าดงดิบที่มีน้ำท่วมขังตลอดปี อุดมสมบูรณ์ไปด้วยสัตว์ป่าและพรรณไม้ โดยมีลำน้ำสำคัญหลายสายไหลผ่าน ได้แก่ คลองสุไหงปาดี แม่น้ำบางนรา และคลองโต๊ะแดง อันเป็นที่มาของชื่อป่านั่นเอง เป็นป่าพรุที่สมเด็จพระกนิษฐาธิราชเจ้าฯ ทรงสนพระทัยและ

ทรงงานวิจัยป่าพรุด้วยพระองค์เอง โดยเสด็จมาทรงงานยังป่าพรุโต๊ะแดงหลายครั้ง จนคนนราธิวาสยกป่าพรุโต๊ะแดงให้เป็นของสมเด็จพระกนิษฐาธิราชเจ้าฯ และเรียกป่าพรุแห่งนี้ว่า “ป่าพรุสิรินธร”

ศูนย์วิจัยและศึกษาธรรมชาติป่าพรุสิรินธรเป็นส่วนหนึ่งของป่าพรุโต๊ะแดง ป่าพรุแห่งสุดท้ายของประเทศไทย ซึ่งครอบคลุมพื้นที่ของ 3 อำเภอ คือ อำเภอดากใบ อำเภอสุไหงโกลก และอำเภอสุไหงปาดี มีพื้นที่ประมาณ 120,000 ไร่ แต่ส่วนที่สมบูรณ์โดยประมาณมีเพียง 50,000 ไร่ เป็นป่าที่ยังคงความอุดมสมบูรณ์ด้วยสัตว์ป่าและพันธุ์ไม้นานาพรรณ และยังมีสัตว์ป่าที่พบหลายชนิด เช่น ค่าง ชะมด หมูป่า หมีขอ แมวป่าหัวแบน ซึ่งเป็นสัตว์ป่าคุ้มครองที่หายากชนิดหนึ่งของไทย

ความอุดมสมบูรณ์ของพื้นที่ป่าพรุโต๊ะแดง จึงเป็นแหล่งที่น่าสนใจในการศึกษาเชื้อราดินที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี และความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อราดินชนิดใหม่ๆ ที่อาจจะพบได้ เพื่อเป็นข้อมูลในการพัฒนางานวิจัยที่เกี่ยวกับผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติที่มีประโยชน์ต่อมนุษย์ ตลอดจนการวิจัยหาสารต้นแบบ (lead compound) ใหม่ๆ เพื่อนำมาเป็นสารตั้งต้นในการพัฒนายาต่างๆ ต่อไป

## ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

### 1) เตรียมสารสกัดจากเชื้อรา

เชื้อราที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ.ดร. เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เป็นผู้แยกเชื้อและพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อรา ซึ่งเป็นเชื้อราที่ได้จากดินอินทรีย์ในพื้นที่พรุจังหวัดนครราชสีมา โดยเชื้อราที่สนใจ จะส่งไปจำแนกเชื้อราโดยใช้ข้อมูลทางพันธุกรรม (Molecular genetic identification) และเทคนิคอื่นๆ เพื่อให้ทราบชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้อง หากเป็นเชื้อที่เคยค้นพบแล้ว ในกรณีที่เป็นเชื้อสายพันธุ์ใหม่ จะดำเนินการขอพระราชทานชื่อใหม่ นอกจากนี้เชื้อที่สนใจจะถูกนำมาเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณในการเตรียมสารสกัดในลำดับต่อไป

#### 1.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Broth (PDB)

##### ส่วนผสม

1. น้ำที่ได้จากการต้มมันฝรั่ง 3 ลิตร (มันฝรั่งปอกเปลือก 8 กิโลกรัมและน้ำ 8 ลิตรหรืออัตราส่วน 1:1)
2. น้ำกลั่น 12 ลิตร
3. Dextrose 300 กรัม

\*\*หมายเหตุสูตรการเตรียม PDB 15 ลิตร (บรรจุ 250/1 flask; ได้จำนวน 65 flask)

##### ขั้นตอนการเตรียมเตรียมน้ำมันฝรั่งต้ม

น้ำมันฝรั่งที่ปอกเปลือกมาหั่นเป็นลูกเต๋านำมาต้มกับน้ำประมาณ 1 ชั่วโมง ปิดไฟและรอให้เย็นประมาณ 15 นาที ปรับปริมาตรให้ได้น้ำหนักที่ชั่งไว้ครั้งแรกด้วยน้ำกรองเอาส่วนที่เป็นน้ำ บรรจุใส่ถุงพลาสติกทนความร้อน และนำไปแช่แข็งเพื่อให้ส่วนที่เป็นแป้งเกาะตัว

##### ขั้นตอนการทำ

1. ตวงน้ำ 10 ลิตรใส่ภาชนะที่เตรียมไว้
2. ตวงน้ำมันฝรั่ง (ที่ได้จากการต้มแช่แข็งและกรองแล้ว) 3 ลิตร
3. ชั่งน้ำตาล D-glucose 300 กรัม ต้มกับน้ำกลั่นที่เหลืออีก 2 ลิตร และเทรวมในภาชนะคนให้เข้ากัน
4. ตวง 250 มิลลิลิตรลงใน Flask ที่เตรียมไว้และอุดจุกสำลีไว้
5. นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 120 °C เป็นเวลา 15-30 นาที
6. นำออกมาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

หมายเหตุ: อาหารที่เตรียมไว้เก็บได้นานเป็นเดือนหรือจนกว่าจะ Contaminate แต่ส่วนใหญ่จะเตรียม PDB ก่อน subculture เชื้อ ประมาณ 1 วัน (ให้แน่ใจก่อนว่าเชื้อโตเต็มที่แล้ว แล้วค่อยเตรียมอาหาร ทั้งนี้ ก็เพื่อป้องกันการเกิด Contaminate ของอาหารเลี้ยงเชื้อ)

#### 1.2 การเตรียมอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA); 400 ml / 1 ขวด

##### วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้

- Plate 5 cm
- Plate 10 cm
- Duran 500 ml
- ถุงพลาสติกบรรจุ

## วัตถุดิบ

- Dextrose
- Agar
- น้ำกลั่น
- หัวมันฝรั่งสด

## ขั้นตอนการทำ

1. นำมันฝรั่งที่ได้มาทำความสะอาด และปอกเปลือกใส่ในถุง และชั่งน้ำหนักเปลือกที่ได้ ลบกับน้ำหนักมันฝรั่ง ในตอนแรกได้เท่ากับ 8 กิโลกรัม
2. หั่นมันฝรั่งที่ได้เป็นลูกเต๋า  $1 \times 1 \text{ cm}^2$  ใส่ลงในหม้อที่บรรจุน้ำปริมาณ 8 ลิตร (ในอัตราส่วน 1:1)
3. นำไปตั้งไฟ ประมาณ 1 ชั่วโมง ปิดไฟและรอประมาณ 15 นาที และกรองเอาแต่น้ำด้วยตะแกรง นำน้ำที่กรองได้ ไปปรับปริมาณให้ได้น้ำหนักที่ชั่งไว้ครั้งแรกด้วยน้ำ คือ 8 ลิตร และบรรจุใส่ถุงพลาสติกทนความร้อน และนำไปแช่แข็งที่  $-20^\circ \text{C}$  เพื่อให้ส่วนที่เป็นแป้งเกาะตัว ทิ้งไว้
4. นำน้ำมันฝรั่งออกจากช่องแช่แข็งอุณหภูมิ  $-20^\circ \text{C}$  นำไปทำให้ละลายด้วยไมโครเวฟ เวลา 8 นาที
5. น้ำมันฝรั่งที่ละลายเรียบร้อยแล้ว มากรองด้วยผ้าขาวบาง จนเป็นสารละลายใส พักไว้
6. ชั่งส่วนผสมอื่น ๆ เพื่อทำ Potato dextrose agar (PDA) คือ Dextrose 8 กรัม และ Agar 6 กรัม ใส่ในขวดบรรจุ Duran<sup>®</sup> ขนาด 500 ml นำน้ำมันฝรั่งที่กรองเรียบร้อยแล้ว มาใส่ในขวด Duran<sup>®</sup> ปริมาณ 80 ml และน้ำกลั่น 320 ml
7. นำขวด Duran<sup>®</sup> ที่ผสมส่วนผสมเรียบร้อยแล้ว เข้าเครื่อง autoclave  $121^\circ \text{C}$  เป็นเวลา 15 นาที และนำออก มาตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง
8. เมื่อต้องการนำ PDA มาใช้ อาจแข็งเป็นวัน ให้นำมาให้ความร้อนจนละลายเป็นสารละลายและนำมาเทใส่ plate ที่เตรียมไว้ โดยเทใส่ plate เล็ก (เส้นผ่านศูนย์กลาง (diameter, d) = 5 cm) จำนวน 3 plate, plate ใหญ่ (d = 10 cm) จำนวน 8 plate และรอจนอาหารใน plate แข็ง นำไปเก็บในตู้อุณหภูมิ  $25^\circ \text{C}$

### **1.3 การ subculture เชื้อจาก slant ลง plate มีวิธีการดังนี้:**

1. นำเชื้อที่แยกได้ มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณ โดย subculture ลงใน plate เล็ก จำนวน 3 plate ที่บรรจุอาหาร PDA ไว้แล้ว
2. โดยลน needle ให้ร้อนจนแดง และลนปากขวด slant ทุกครั้งที่เปิดปิด
3. เชี่ยวเชื้อใส่ตรงกลาง plate ปริมาณเล็กน้อย
4. ทิ้งไว้ 5-7 วัน รอตุการเติบโตของเชื้อรา เพื่อ subculture เชื้อลง plate ใหญ่ต่อไป
5. นำเชื้อใน plate เล็ก subculture เชื้อลง plate ใหญ่ จำนวน 6 plate และรอเชื้อโตตุการเปลี่ยนแปลง 5-7 วัน

### **1.4 การ subculture เชื้อจาก plate ลง flask**

1. นำ PDB ที่เตรียมไว้ใน Erlenmeyer flask ขนาด 500 ml ปริมาตร 250 ml เตรียมไว้ จำนวน 6 flask
2. นำ plate ใหญ่ ที่เชื้อโตเต็มที่แล้ว มา subculture ลงใน flask เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อ โดยใช้ไปมีดจุ่ม 95% ethanol นำไปผ่านเปลวไฟ แล้วรอให้เย็น
3. หลังจากนั้นนำไปตัดชิ้นส่วนบริเวณขอบของ colony ให้มีขนาดชิ้นละ  $1 \times 1$  ตารางเซนติเมตร จำนวน 5 ชิ้น แล้วทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว potato dextrose broth (PDB) ปริมาตร 250 ml ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ (flask) ขนาด 500 ml
4. นำไป incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 สัปดาห์

## 1.5 การสกัดเชื้อรา

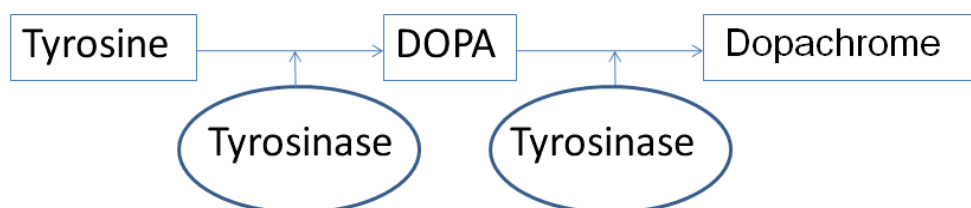
1. นำน้ำเลี้ยงเชื้อรา ไปสกัดด้วยตัวทำละลายทางเคมี เพื่อหาสาร โดยการกรองเส้นใยของเชื้อราออกโดยกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1
2. การสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อราโดยใช้ ethyl acetate (EtOAc) โดยใช้อัตราส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อรา ต่อ EtOAc เท่ากับ 2:1 ทำการสกัดทั้งหมด 2 ครั้ง แล้วนำ EtOAc ที่ได้จากการสกัดทั้งสองครั้งมารวมกัน ส่วนที่เหลือนำไปทำแห้ง ด้วยเครื่อง rotary evaporator จะได้สารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อรา (BT, Broth)
3. นำน้ำเลี้ยงเชื้อราที่สกัดด้วย EtOAc มาใส่สารกำจัดน้ำ (dehydrating agent) คือ sodium sulphate anhydrous ลงไป
4. หลังจากนั้นกรอง แล้วนำสารละลายที่ได้ไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่ อุณหภูมิ 40 -50 °C จนได้สารสกัดหยาดจากน้ำเลี้ยงเชื้อรา (BE, Broth EtOAc)
5. การสกัดเส้นใยเชื้อราโดยนำเส้นใยของเชื้อราแช่ใน methanol (MeOH) เป็นเวลา 2 วัน
6. นำสารละลาย MeOH ไปทำให้เข้มข้น โดยการระเหยตัวทำละลายบางส่วนออกไป จากนั้นเติมน้ำลงไป แล้วนำไปสกัดด้วย hexane ในอัตราส่วน 2:1 โดยทำการสกัดซ้ำ 2 ครั้ง แล้วนำ hexane ที่ได้จากการสกัดไปทำแห้ง หลังจากนั้นนำสารละลาย aqueous MeOH ที่ผ่านการสกัดด้วย hexane แล้ว นำไปสกัดต่อด้วย EtOAc ในอัตราส่วน 2:1 เช่นกัน โดยสกัดด้วย EtOAc 2 ครั้งซึ่งจากการสกัดดังกล่าวจะได้ สารสกัด 2 ส่วน คือ Cell hexane (CH) และ Cell EtOAc (CE) ตามลำดับ

## 2) การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

### 2.1 การศึกษาฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส (Study on anti-tyrosinase activity)

#### หลักการ

หลักการที่นิยมใช้ในการทดสอบคือ spectrophotometry ซึ่งเป็นการประเมินการทำงานของเอนไซม์ tyrosinase ที่เหลืออยู่ จากการวัดปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นคือ dopachrome (รูปที่ 4) ซึ่งเป็นสารที่มีสีแดง สารตั้งต้นที่ใช้ในการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ในการทดลองครั้งนี้คือ L-DOPA และในการทดสอบจะเปรียบเทียบกับ positive control 2 ชนิด คือ kojic acid ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ดีและมีการใช้อยู่ในปัจจุบัน และ positive control อีกชนิด คือ ปวกหาด ซึ่งเป็นสารสกัดเข้มข้นจากแก่นมะหาด ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง tyrosinase enzyme ได้ดี



รูปที่ 4 ขั้นตอนการเกิด dopachrome

ค่าที่คำนวณได้สามารถแสดงเป็น

-tyrosinase inhibition (%) (Sasaki and Yoshizaki, 2002)

-tyrosinase activity (%) (Lee *et al.*, 2002)

ซึ่งทั้ง 2 วิธีมีหลักการทดลองเช่นเดียวกันเพียงแต่คำนวณต่างกัน โดยการทดลองในครั้งนี้จะคำนวณเป็น % tyrosinase inhibition ซึ่งหมายถึงความสามารถของสารสกัดที่สามารถยับยั้ง tyrosinase enzyme ได้ โดยวัดจากปริมาณ dopachrome ที่เกิดขึ้น ซึ่งเป็น product จากการเกิดปฏิกิริยาของ L-DOPA หรือ L-tyrosine และมีเอนไซม์ tyrosinase เร่งปฏิกิริยา ดังนั้นหากสารที่นำมาทดสอบมีฤทธิ์ที่ดีในการยับยั้งเอนไซม์ จะพบว่า dopachrome ก็จะไม่เกิดขึ้นน้อย ซึ่งวัดได้จากค่าการดูดกลืนแสง เมื่อคำนวณเป็น % inhibition จะได้อ่านค่า % ที่สูง

ค่าที่คำนวณได้จะเปรียบเทียบกับ positive control นอกจากนี้ยังสามารถหาค่า  $IC_{50}$  ได้ ซึ่งต้องเตรียมสารที่ต้องการทดสอบและ positive control เป็นความเข้มข้นต่างๆ คำนวณ tyrosinase inhibition (%) ของแต่ละความเข้มข้นแล้วนำค่า % ที่ได้มา plot กราฟความสัมพันธ์กับความเข้มข้น ก็จะสามารถหาค่า  $IC_{50}$  ได้

### การเตรียมสารเคมี

- การเตรียม 20 mM Phosphate buffer pH 6.8
 

Solution A:	$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ (312 mg)	ละลายในน้ำกลั่น 100 mL
Solution B:	$Na_2HPO_4$ (284 mg)	ละลายในน้ำกลั่น 100 mL

 ผสมและปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 6.8
- เตรียม Tyrosinase solution:
 

ละลาย Mushroom tyrosinase 0.5 mg  
ด้วย 20 mM Phosphate buffer ( pH 6.8 ) 5 mL
- เตรียม L-DOPA solution:
 

ละลาย L-DOPA 0.8 mg  
ด้วย 20 mM Phosphate buffer ( pH 6.8 ) 5 mL
- เตรียม Kojic acid solution: ละลาย Kojic acid 1 mg ใน solvent ที่เหมาะสม 5 mL
- การเตรียม test sample solution: ละลาย extract 1 mg ใน solvent ที่เหมาะสม 5 mL

### การทดลองและแปลผล

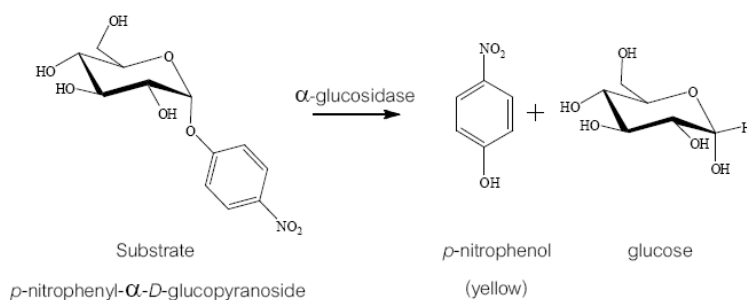
- ผสมสารลงใน microplate ลงในแต่ละ wells โดยแบ่งเป็น
 

A (control)	Mushroom tyrosinase solution 20 $\mu$ L Phosphate buffer (pH 6.8) 140 $\mu$ L Solvent ที่ใช้ 20 $\mu$ L
B (blank ของ control)	Phosphate buffer (pH 6.8) 160 $\mu$ L Solvent ที่ใช้ 20 $\mu$ L
C (test sample)	Mushroom tyrosinase solution 20 $\mu$ L Phosphate buffer (pH 6.8) 140 $\mu$ L 20 $\mu$ L ของ test sample ใน solvent
D (blank ของ test sample)	Phosphate buffer (pH 6.8) 160 $\mu$ L 20 $\mu$ L ของ test sample ใน solvent
- หลังจากผสมสารตามขั้นตอนที่ 1 แล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้อง ( $25^\circ C$ ) เป็นเวลา 10 นาที
- เติม L- DOPA ความเข้มข้น 0.85 mM จำนวน 20  $\mu$ L ในทุก wells

4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 nm ด้วย microplate reader
5. วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 °C) เป็นเวลา 20 นาที
6. วัดค่าการดูดกลืนแสงอีกครั้ง
7. บันทึกและแปลผลตามสูตรดังนี้  $\% \text{ inhibitory} = [(A-B)-(C-D)] \times 100/(A-B)$

## 2.2 การศึกษาฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส (Study on anti- $\alpha$ -glucosidase activity)

การศึกษาศักยภาพยับยั้งเอนไซม์  $\alpha$ -glucosidase เป็นการศึกษาที่อาศัยปฏิกิริยาการเกิดสี (colorimetric method) ของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น โดยติดตามการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนไป ด้วยเครื่อง UV-visible spectroscopy ในการติดตามผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสสาร *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside ซึ่งเป็นสารละลายไม่มีสี ด้วยเอนไซม์  $\alpha$ -glucosidase ไปเป็นผลิตภัณฑ์ *p*-nitrophenol ซึ่งเป็นสารละลายสีเหลืองใสที่มีความยาวคลื่น 405 nm (รูปที่ 5) ซึ่งถ้าสารตัวอย่างมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์  $\alpha$ -glucosidase สีของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจะน้อยและค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้จะมีค่าต่ำ (Walker *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2008; You *et al.*, 2011; Dej-adisai & Pitakbut, 2015)



**รูปที่ 5** แสดงปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสสาร *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside ด้วยเอนไซม์  $\alpha$ -glucosidase ไปเป็นผลิตภัณฑ์ *p*-nitrophenol ที่มีสีเหลืองใส และน้ำตาล glucose (Rungporn *et al.*, 2009)

### ขั้นตอนการเตรียม

1. การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 (0.01 M)

สารละลาย A: เตรียมสารละลาย  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  ความเข้มข้น 0.02 M โดยนำ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  มา 0.312 g มาละลายน้ำ 100 ml

สารละลาย B: เตรียมสารละลาย  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ความเข้มข้น 0.02 M โดยนำ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  มา 0.284 g มาละลายน้ำ 100 ml

หลังจากนั้นนำสารละลาย A 19.5 ml และ B 30.5 ml ผสมกันจนได้สารละลาย AB ที่มี pH 7 แล้วนำสารละลายที่ได้มาปรับความเข้มข้นให้ได้ 0.01 M โดยการเติมน้ำ 50 ml ลงไปใน สารละลาย AB จากนั้นนำ Bovine serum albumin (BSA) 0.2 g และ  $\text{NaN}_3$  0.02 g มาละลายใน สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เตรียมไว้ 100 ml

2. การเตรียมสารละลายเอนไซม์  $\alpha$ -glucosidase (1 Unit/ml)

ซึ่งเอนไซม์  $\alpha$ -glucosidase 1 Unit (from *Saccharomyces cerevisiae*, Type I, lyophilized powder, Sigma, G5003-1KU) มาละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เตรียมไว้ จำนวน 1 ml

### 3. การเตรียมสารละลายสารตั้งต้น (4 mM)

ซึ่งสาร *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside 1.21 mg (เท่ากับ 4  $\mu$ mole) มาละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เตรียมไว้ จำนวน 1 ml

### 4. ขั้นตอนการเตรียมสารละลายตัวอย่างและสารละลายมาตรฐาน (8 mg/ml)

ซึ่งสารตัวอย่างและสารมาตรฐาน Acarbose อย่างละ 8 mg มาละลายในน้ำหรือ DMSO (ตามความสามารถในการละลายของสารตัวอย่าง) จำนวน 1 ml

### ขั้นตอนการทดสอบ

ในการทดลองจะนำสารละลายทั้งหมดที่เตรียมไว้มาทำปฏิกิริยาใน well-plate จำนวน 4 wells (A, B, C, D) โดยแต่ละ well จะมีปริมาตรเท่ากับ 200  $\mu$ l โดยนำสารละลายที่เตรียมใส่ลงใน well-plate ดังต่อไปนี้

- Well A (Control)	100 $\mu$ l ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.01 M pH 7 50 $\mu$ l สารละลายเอนไซม์ $\alpha$ -glucosidase ที่ความเข้มข้น 1 U/ml
- Well B (Blank)	50 $\mu$ l ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.01 M pH 7 50 $\mu$ l สารละลายเอนไซม์ $\alpha$ -glucosidase ที่ความเข้มข้น 1 U/ml 50 $\mu$ l น้ำหรือ DMSO (ตามความสามารถในการละลายของสารตัวอย่าง)
- Well C (Positive control)	50 $\mu$ l ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.01 M pH 7 50 $\mu$ l สารละลายเอนไซม์ $\alpha$ -glucosidase ที่ความเข้มข้น 1 U/ml 50 $\mu$ l สารละลายมาตรฐาน Acarbose ที่ความเข้มข้น 8 mg/ml (ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2 mg/ml)
- Well D (Test sample)	50 $\mu$ l ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.01 M pH 7 50 $\mu$ l สารละลายเอนไซม์ $\alpha$ -glucosidase ที่ความเข้มข้น 1 U/ml 50 $\mu$ l สารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้น 8 mg/ml (ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2 mg/ml)

หลังจากใส่สารละลายต่าง ๆ ครบแล้ว จึงนำไป incubate ที่ 37 °C นาน 2 นาที หลังจากนั้นใส่สารละลายสารตั้งต้นที่ความเข้มข้น 4  $\mu$ mole/ml จำนวน 50 $\mu$ l ลงในแต่ละ well แล้วนำไปทำ ปฏิกิริยาที่ 37 °C โดยทำการวัดปริมาณสาร *p*-nitrophenol ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาที่ความยาวคลื่น 405 nm ทุก ๆ 30 วินาที นาน 10 นาทีด้วยเครื่อง microplate reader

### ขั้นตอนการวิเคราะห์ผล

#### 1. การคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งเอนไซม์ $\alpha$ -glucosidase

นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm (แกน Y) กับเวลา (แกน X) กราฟที่ได้จะเป็นเส้นตรงในช่วงแรกและเป็นเส้นโค้งในช่วงหลัง ค่าเปอร์เซ็นต์ในการ ยับยั้งจะคำนวณจากอัตราเร็วเริ่มต้น (initial velocity,  $V_i$ ) ซึ่งจะคำนวณได้จากช่วงแรกที่เป็นเส้นตรง โดยคำนวณหาความชันจากการลากเส้นตรง (linarity line) โดยเลือกค่าการดูดกลืนแสงที่เกิดขึ้น จริงที่ใกล้เคียงกับเส้นตรงในอุดมคติมากที่สุด มาคำนวณดังแสดงในสมการต่อไปนี้

$$\text{อัตราเร็วเริ่มต้น (initial velocity, } V_i) = \text{slope} = \frac{\text{การเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสง } \Delta Y}{\text{การเปลี่ยนแปลงเวลา } \Delta X}$$

จากนั้นนำค่าอัตราเร็วเริ่มต้นของกลุ่มควบคุมมาลบด้วยอัตราเร็วเริ่มต้นของกลุ่มทดลอง (สารละลายตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐาน) นำผลต่างที่ได้หารด้วยอัตราเร็วเริ่มต้นของกลุ่มควบคุม และคูณ 100 จะได้ค่าเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้ง ดังสมการต่อไปนี้

$$\text{ค่าเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้ง} = \frac{(V_i \text{ control} - V_i \text{ treatment}) \times 100}{V_i \text{ control}}$$

(% alpha-glucosidase inhibition)

## 2. การคำนวณค่าความเข้มข้นที่ทำให้เกิดการยับยั้งเอนไซม์ $\alpha$ -glucosidase 50 เปอร์เซ็นต์ ( $IC_{50}$ )

คำนวณโดยการสร้างกราฟเส้นตรงระหว่างค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่าง และสารมาตรฐาน (แกน X) และค่าเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งเอนไซม์  $\alpha$ -glucosidase (แกน Y) โดยใช้ความเข้มข้นของสารตัวอย่างและสารมาตรฐานอย่างน้อย 5 ความเข้มข้น คำนวณค่า  $IC_{50}$  โดยแทนค่า  $y = 50$  ลงในสมการเส้นตรง

### 2.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์

#### หลักการ

การตรวจสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นแบคทีเรียและรา มีวิธีหลัก 2 รูปแบบคือ วิธี ทดสอบด้วยการให้สารซึมผ่านในอาหารวุ้น (agar diffusion method) และวิธีทดสอบด้วยการเจือจางสาร (dilution method)

#### วิธีทดสอบด้วยการให้สารซึมผ่านในอาหารวุ้น (agar diffusion method)

หลักการของวิธีนี้คือ กระจายเชื้อบนอาหารวุ้น แล้วใส่สารสกัดในสิ่งรองรับ เพื่อให้ สามารถซึมผ่านเข้าไปในอาหารวุ้น หลังการบ่มเพาะ สารประกอบ ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ ในสารสกัด ทั้งชนิดยับยั้งการเจริญและฆ่า จะก่อให้เกิดวงใสรอบสิ่งรองรับที่ใส่สารสกัด แล้ววัดขนาด บริเวณใสที่เกิดขึ้น ซึ่งจะวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง บริเวณใสนี้เป็นหน่วยมิลลิเมตร วิธีการนี้ โดยทั่วไปมักทำการทดสอบยาเพียงความเข้มข้นเดียว เพราะขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลาง บริเวณใสที่ได้ พบว่าเป็นสัดส่วนโดยตรง กับความไวของเชื้อที่ทดสอบ ตัวอย่างที่ต้องการ ทดสอบ แต่ทั้งนี้วิธีการทดสอบชนิดนี้ขึ้นอยู่กับความสามารถในการแพร่ของสารผ่านเนื้อวุ้น

วิธีนี้ทำได้หลายรูปแบบขึ้นกับชนิดของสิ่งรองรับ และมักเรียกชื่อวิธีการตามสิ่งรองรับที่ ใช้ เช่น

- สิ่งรองรับที่เป็นหลุม ซึ่งได้จากการเจาะหลุมในอาหารวุ้น แล้วเติมสารละลายลงไป จะเรียกว่าวิธี agar-well diffusion method

- สิ่งรองรับเป็นกระดาษชั้กลม ซึ่งใส่สารละลายก่อนวางบนอาหารวุ้น จะเรียกว่าวิธี agar disk diffusion method

- สิ่งรองรับเป็นถ้วยโลหะไม่เป็นสนิมทรงกระบอก จะเรียกว่า cup-diffusion method

ในขั้นต้น ของการตรวจสอบศักยภาพ ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัด ส่วนใหญ่จะ ใช้วิธี agar disk diffusion method ในการทดสอบ เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวกที่สุด และง่ายที่สุด

#### วิธีทดสอบด้วยการเจือจางสาร (dilution method)

ทำโดยการเจือจางสารสกัดในอาหารเหลว (broth dilution method) หรืออาหารวุ้น (agar dilution method) ให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ แล้วจึงใส่เชื้อที่ต้องการทดสอบ ลงใน หรือบนอาหารเหล่านี้ ภายหลังการบ่มเพาะ สังเกตความขุ่นใสในอาหารเหลว และมีหรือไม่มี เชื้อเจริญบนอาหารวุ้น จากนั้น ดูว่า

ความเข้มข้นใดที่ต่ำที่สุด ที่ไม่มีเชื้อเจริญ ค่าที่ได้ถือว่า เป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ (minimal inhibitory concentration, MIC) กรณีต้องการรู้ว่าสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อเป็นชนิดยับยั้งหรือฆ่าเชื้อ ให้ทดสอบ ต่อไป โดยการใช้ loop ปราศจากเชื้อแต่ละลงในอาหารเหลว หรือเขี่ยบริเวณที่ไม่มีเชื้อเจริญ บน อาหารวุ้นตั้งแต่ช่วงค่า MIC ขึ้นไป แล้วเพาะบนอาหารวุ้น ภายหลังกการบ่มเพาะ สังเกตว่า มีหรือไม่มีเชื้อเจริญขึ้นมา และดูว่าความเข้มข้นใดต่ำที่สุดที่ไม่มีเชื้อเจริญ หรือเกือบไม่มี เชื้อเจริญ (99.9% ถูกฆ่า) ค่าที่ได้ถือว่าเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อ (minimal microbicidal concentration, MMC) ถ้าเจาะจงกับเชื้อแบคทีเรียจะเป็น minimal bactericidal concentration, MBC และถ้าเจาะจงกับเชื้อราจะเป็น minimal fungicidal concentration , MFC นำค่าที่ได้ขึ้นไปเปรียบเทียบกับค่า MIC ถ้าค่าทั้งสองเท่ากัน หรือไม่เกินสองความ เข้มข้น แสดงว่าสารสกัดมีศักยภาพฆ่าเชื้อ แต่ถ้าต่างกันหลายความเข้มข้น แสดงว่าสารสกัด มีศักยภาพเฉพาะยับยั้งการเจริญของเชื้อ

สำหรับสารสกัดที่มีสีหรือมีความขุ่นถ้าทดสอบโดยวิธี เจือจางในอาหารเหลว อาจไม่ สามารถหา ค่า MIC ได้ ต้องใช้วิธีการเจือจางในอาหารแข็ง

### เชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบประกอบด้วย

#### (1) Gram positive bacteria:

*Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus epidermidis*

*Cutibacterium acnes*

#### (2) Gram negative bacteria:

*Pseudomonas aeruginosa*

*Escherichia coli*

#### (3) Yeast

*Candida albicans*

#### (4) Fungi

*Trichophyton rubrum*

*Trichophyton mentagrophytes*

*Microsporum gypseum*

### การทดสอบ ใช้วิธีการทดสอบ 2 วิธี

#### 1. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์เบื้องต้น

โดยวิธี Agar disc diffusion method (Lorian, 2005)

##### 1.1 การเตรียมสารสกัด

เตรียมสารสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม ที่ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 100-500 mg/ml บนแผ่น paper disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm จำนวน 10  $\mu$ l จะได้ ความเข้มข้นของสารเท่ากับ 1-5 mg/disc โดยมี positive control คือ ยา oxacillin (1  $\mu$ g/disc) สำหรับแบคทีเรีย เชื้อยีสต์ใช้ ยา amphotericin B (25  $\mu$ g/disc), เชื้อรากล่อโรคกลากใช้ ยา ketoconazole (25  $\mu$ g/disc)

## 1.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

โดยเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และ *S. epidermidis* บนอาหาร Mueller hinton agar (MHA) ที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพาะเลี้ยงเชื้อ *P. acnes* บนอาหาร Brain heart infusion agar (BHIA) ที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใน anaerobic jar

เพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ บนอาหาร Sabouraud dextrose agar (SDA) ที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เชื้อเข้ามา 2-3 โคโลนี ใส่ใน 0.85% NaCl ไร่เชื้อ และปรับ ความขุ่นของเชื้อให้เท่ากับ 0.5 McFarland standard

เพาะเลี้ยงเชื้อรากล่องโรครากบนอาหาร SDA ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา ประมาณ 10 วัน เติมน้ำ 0.85 % NaCl ประมาณ 5 ml ล้างสปอร์ของเชื้อออกจากอาหาร SDA slant นำสารละลายของเชื้อรามา กรองผ่านสำลีที่ฆ่าเชื้อแล้ว นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่กรองได้ ปรับให้มี จำนวนสปอร์ประมาณ 10<sup>6</sup> spore/ml โดยวัดค่า O.D. ให้อยู่ในช่วง 0.14-0.17 ที่ความยาวคลื่น 530 nm

## 1.3 วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์

ใช้ cotton swab ไร่เชื้อ จุ่มแบคทีเรียและยีสต์ที่ปรับความขุ่นเสร็จแล้ว มาป้าย ให้ทั่วผิว วุ้นอาหาร MHA, BHIA และ SDA วางแผ่น disc ที่หยดสารสกัดไว้แล้ว และ ชุดควบคุม incubate ที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมงสำหรับเชื้อ *S. aureus* และ *S. epidermidis* และ 48 ชั่วโมง สำหรับเชื้อ *P. acnes* และเชื้อยีสต์ตามลำดับ

ดูค่าน้ำเลี้ยงเชื้อของเชื้อรากล่องโรครากที่ปรับความขุ่นเสร็จแล้ว จำนวน 0.5 ml ใส่ลงใน อาหารเลี้ยงเชื้อ SDA ที่หลอมเหลว (45 °C) จำนวน 24.5 ml ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้จนวุ้นแข็งตัว วาง disc ที่หยดสารสกัดไว้ นำไป incubate ที่ อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 4 วัน

สังเกตการเกิดวงใสรอบแผ่น disc และวัดขนาดวงใส ด้วย vernier caliper

## 2. การทดสอบหาค่า Minimal inhibitory concentration (MIC), Minimal bactericidal concentration (MBC) และ Minimal fungicidal concentration (MFC)

นำสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ โดยวิธี Disc diffusion มาหาค่า MIC, MBC และ MFC โดยวิธี micro broth dilution ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Lorian, 1996, CLSI, 2000 และ CLSI, 2002 โดยมีวิธีการดังนี้

### 2.1 วิธีการเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

เพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ตามวิธี Disc diffusion เจือจางเชื้อต่อด้วยอาหาร Mueller hinton broth (MHB) สำหรับเชื้อ *S. aureus* และ *S. epidermidis*, Brain heart infusion broth (BHIB) สำหรับเชื้อ *P. acnes* และ อาหาร Sabouraud dextrose broth (SDB) สำหรับเชื้อยีสต์และเชื้อรากล่องโรคราก ในอัตราส่วน 1 : 100 เท่า

## วิธีการทดสอบ

### หาค่า MIC

นำสารสกัดมาเตรียมความเข้มข้นเริ่มต้นมากกว่าที่ต้องการ 50 เท่า จากนั้น เจือจางในอาหารเหลว MHB, BHIB หรือ SDB แบบลำดับสอง ใน microtiter plate ประมาณ 10 ความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ความเข้มข้นสูงสุดที่ทดสอบคือ 2000 µg/ml แล้วเติมเชื้อ จุลินทรีย์ในข้อ 2.1 ลงไป ทุกหลุม ( $10^5$  CFU/หลุม) นำไปเพาะเลี้ยง incubate ที่  $35^{\circ}\text{C}$  เป็น เวลา 18-24 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรีย *S. aureus* และ *S. epidermidis*, 48 ชั่วโมง สำหรับ เชื้อ *P. acnes* และ *C. albicans* ส่วนเชื้อราก่อโรคกลาก incubate ที่  $30^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 4-7 วัน

อ่านผลค่า MIC คือค่าความเข้มข้นต่ำสุด ของสารสกัดหรือยาปฏิชีวนะ ที่ยับยั้ง เชื้อได้ (wellใส)

### หาค่า MBC หรือ MFC

โดยการเพาะเชื้อจากทุกหลุมที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ เพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar (TSA) สำหรับเชื้อ *S. aureus* และ *S. epidermidis*, BHIA สำหรับเชื้อ *P. acnes* และ SDA สำหรับเชื้อรา ทำความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ นำไปเพาะเลี้ยง ที่เวลา และ อุณหภูมิ เช่นเดียวกับการหาค่า MIC

อ่านผล ค่า MBC หรือค่า MFC คือค่าความเข้มข้นต่ำสุด ของสารสกัดและ ยาปฏิชีวนะที่สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้

### Positive control

- แบคทีเรีย ใช้ยา oxacillin
- เชื้อราก่อโรคกลาก ใช้ยา ketoconazole
- เชื้อยีสต์ใช้ยา amphotericin B

**หมายเหตุ** หากสารสกัดขุ่น เมื่อผสมในอาหารเหลว จะทำการทดสอบโดยวิธี agar dilution โดยผสมสารสกัดในวุ้นอาหารหลอมเหลว แล้วหยดเชื้อ  $10^4$  cfu/spot incubate ที่ อุณหภูมิและ เวลาเช่นเดียวกับการทดสอบวิธี micro broth dilution อ่านผล ค่า MIC คือ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่มีเชื้อ ขึ้นบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ การทดสอบโดยวิธีจะหาได้เฉพาะค่า MIC

## 2.4 การแยกสารให้บริสุทธิ์

นำสารสกัดจากเชื้อราทั้งสองชนิด มาศึกษาองค์ประกอบทางเคมี โดยการแยกสารให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธีการทาง chromatography ต่างๆ เช่น classical column chromatography (silica gel, Sephadex<sup>®</sup> LH-20), thin layer chromatography (TLC) และ preparative thin layer chromatography (PTLC) รวมถึงการใช้ high performance liquid chromatography (HPLC) แล้วจึงนำสารที่แยกได้ มาหาสูตรโครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิคทาง spectroscopy ต่อไป

## 2.5 การหาสูตรโครงสร้างทางเคมี

การกำหนดสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบอินทรีย์ โดยอาศัยข้อมูลทาง spectroscopy ซึ่งมีทั้งแบบแปลความหมายโดยตรงจาก spectrum ของสารนั้น และเปรียบเทียบกับ spectrum ของสารประกอบที่มีรายงานไว้แล้ว ซึ่งในการกำหนดโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบอินทรีย์โดยการวิเคราะห์จาก spectrum ชนิดใดชนิดหนึ่ง อาจจะให้ผลคลาดเคลื่อนได้

ดังนั้นการวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบอินทรีย์ จึงจำเป็นต้องใช้ข้อมูลจากเทคนิคทาง spectroscopy หลายๆเทคนิคประกอบกันในการพิจารณา เช่น การหา functional group ที่สำคัญในโครงสร้างโดยใช้ Ultraviolet Visible (UV-Vis) Spectroscopy, Infrared Spectroscopy (IR) การหาสูตรโครงสร้างของสารโดยใช้เทคนิค Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR) และหามวลโมเลกุลของสารโดยใช้ Mass Spectroscopy (MS) จากเทคนิคที่กล่าวมาข้างต้น สามารถยืนยันโครงสร้างที่ได้จากการพิสูจน์เอกลักษณ์

## ผลและวิจารณ์ผล

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของจุลินทรีย์ในดินอินทรีย์ในพื้นที่พรุ จังหวัดนราธิวาสซึ่งทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ 5 อย่าง ได้แก่ ฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส (รักษาความผิดปกติของเม็ดสี) ฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟา กลูโคซิเดส (รักษาเบาหวาน) ฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะซิติลคอลีนเอสเตอเรส (รักษาโรคสมองเสื่อม, Alzheimer's disease) ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (รักษาโรคมะเร็งเต้านม) และฤทธิ์ต้านการอักเสบ (รักษาอาการอักเสบต่าง ๆ) โดยทำการทดสอบทั้งหมดจำนวน 104 ตัวอย่าง พบว่ามี 4 ตัวอย่างที่น่าสนใจ คือ SPSF318BE, SPSF318CE, SPSF224BE และ SPSF224CE โดยตัวอย่างทั้ง 4 ตัว มาจากเชื้อ 2 ชนิด คือ SPSF318 และ SPSF224 ซึ่งการศึกษาลักษณะเบื้องต้น (morphology) คาดว่าเชื้อราทั้งสองเป็นเชื้อราสกุล *Penicillium* sp. เหมือนกัน โดยเชื้อราทั้งสองแยกเป็น 2 ตัวอย่างคือ ส่วนที่เป็นสารสกัดชั้น ethyl acetate ของอาหารเลี้ยงเชื้อ (broth, BE) และ ส่วนของสารสกัดชั้น ethyl acetate ของเซลล์ (cell, CE)

เนื่องจากตัวอย่างจากสารสกัดจากเชื้อราสกุล *Penicillium* sp. (SPSF318) มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส ที่ดี ซึ่งในปัจจุบันการศึกษาเพื่อหาสารสกัดที่มีฤทธิ์ที่ดีในการต้านเอนไซม์ดังกล่าวค่อนข้างหาได้ยาก นอกจากนั้นตัวอย่างจากส่วนของสารสกัดชั้น ethyl acetate ของเซลล์ (SPSF318CE) ยังมีฤทธิ์ที่ดีในการต้านการอักเสบและฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม ดังนั้น *Penicillium* sp. (SPSF318) จึงน่าสนใจในการนำมาเลี้ยงเพิ่มปริมาณ เพื่อใช้ในการแยกสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ (active compound) ต่อไป

นอกจากนี้ยังมีสารตัวอย่างที่น่าสนใจอีก 2 ตัวอย่าง คือ SPSF224BE และ SPSF224CE เนื่องจากมีฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟา กลูโคซิเดสที่ดีและตัวอย่างทั้งสองได้จากเชื้อเดียวกัน คือ *Penicillium* sp. (SPSF224) และตัวอย่างทั้งสองยังมีฤทธิ์ที่ดีในการต้านการอักเสบ โดยไม่เป็นพิษกับเซลล์ที่ใช้ทดสอบ นอกจากนั้น SPSF224CE ยังมีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมปานกลาง โดยไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติ ดังนั้น *Penicillium* sp. (SPSF224) จึงเป็นอีกหนึ่งตัวอย่างที่น่าสนใจ ในการนำมาเลี้ยงเพิ่มปริมาณ เพื่อใช้ในการแยกสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ (active compound) ต่อไป เพราะฉะนั้นในการศึกษาครั้งนี้เราสามารถพบสารสกัดที่น่าสนใจ จากเชื้อรา 2 ชนิด คือ SPSF318 และ SPSF224 ที่จะนำไปเลี้ยงเพิ่มปริมาณ เพื่อใช้ในการแยกสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ (active compounds) ทางชีวภาพในลำดับต่อไป

จากผลการวิจัยในปีที่ 1 (ปีงบประมาณ 2560) ซึ่งได้ส่งตัวอย่างเชื้อราทั้งสองไปจำแนกชนิดของเชื้อรา โดยใช้เทคนิคทางพันธุกรรม (Molecular method; nucleotide sequence(s), sequence similarity) ที่ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) เพื่อจำแนกเชื้อราทั้งสองในระดับชนิด (species) เนื่องจากในเบื้องต้นผู้วิจัยมีข้อมูลการศึกษาเฉพาะลักษณะภายนอกของเชื้อรา (morphology) เท่านั้น จึงไม่สามารถยืนยันชนิดของเชื้อราได้ถูกต้อง ซึ่งผลจาก BIOTEC พบว่า SPSF318 เป็นเชื้อราชนิด *Aspergillus flavus* แต่สำหรับ SPSF224 ในการศึกษาครั้งแรก (PCR: ITS) สามารถระบุได้เพียงว่าเป็นเชื้อราในสกุล *Penicillium* แต่ไม่สามารถจำแนกเชื้อราในระดับชนิดได้ จึงส่งจำแนกอีกครั้งโดยใช้เทคนิคเพื่อเพิ่มลำดับเบส (PCR: Beta-tubulin) แต่สามารถระบุได้เพียงว่า SPSF224 มีความใกล้เคียงกับราสกุล *Penicillium* แต่ยังไม่สามารถจำแนกถึงระดับชนิด (species) เนื่องจากมีความแตกต่างของลำดับระดับเบส nucleotides มากเกินกว่าค่าที่ยอมรับได้จึงมีความเป็นไปได้ที่ราชนิดนี้อาจเป็นราชนิดใหม่ (new species) ซึ่งผู้วิจัยได้ส่งตัวอย่างเชื้อราชนิดนี้ไปจำแนกเพื่อยืนยันว่าเป็นเชื้อราชนิดใหม่หรือไม่ที่ Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstraße 7B, 38124

Braunschweig, Germany โดยผลการจำแนกพบว่าเป็นเชื้อราชนิด *Penicillium maximae* ซึ่งเป็นเชื้อราที่ค้นพบเมื่อประมาณ 8 ปีที่แล้ว (ค้นพบปี พ.ศ.2556) (รายละเอียดตามภาคผนวก)

งานในปีที่ 2 และ 3 จะเกี่ยวข้องกับการแยกองค์ประกอบทางเคมีและการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดของ SPSF318 และ SPSF224 ซึ่งผลการวิจัยมีดังนี้:

### การศึกษาของค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของ SPSF318

เนื่องจากได้ทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส จากสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อรา จำนวนทั้งหมด 114 ตัวอย่าง พบว่าสารสกัดจากเชื้อรา SPSF318 มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ดี จากการพิสูจน์เอกลักษณ์แล้วพบว่าเป็นเชื้อรา *Aspergillus flavus*

#### (1) ปริมาณของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *A. flavus* (SPSF318)

ในการทดลองเริ่มจากการเลี้ยงเพื่อเพิ่มสารสกัดหยาบทั้ง 5 ส่วนของเชื้อรา *A. flavus* (รูปที่ 6) ได้แก่ สารสกัดหยาบที่สกัดได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ (broth extraction) ได้แก่ broth ethyl acetate (BE) และ broth water (BW) โดยสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 7.5 ลิตร ส่วนสารสกัดที่ได้จากเซลล์เชื้อรา (fungal extraction) ได้แก่ cell acetate (CE), cell hexane (CH) และ cell methanol (CM) โดยมีเซลล์เชื้อราน้ำหนักเริ่มต้น 143.15 กรัม ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดและปริมาณสารสกัดที่ได้ทั้งหมด ดังแสดงในตารางที่ 3 หลังจากนั้นนำมาศึกษาองค์ประกอบทางเคมีโดยใช้วิธีการทาง chromatography ต่าง ๆ



รูปที่ 6 การเลี้ยงเพื่อเพิ่มสารสกัดหยาบของเชื้อรา *A. flavus*

ตารางที่ 3 สารสกัดหยาบทั้ง 5 ส่วนของเชื้อรา *A. flavus* ลักษณะทางกายภาพ น้ำหนักและ Percent yield ของสารสกัดเมื่อเทียบกับเชื้อราที่นำมาสกัด

ลำดับที่	สารสกัดหยาบ	ลักษณะทางกายภาพ	น้ำหนัก (g)	% yield
1.	Broth ethyl acetate (BE)	ผงแห้ง สีส้มเข้ม	6.4400 g	4.50 % (W/V)
2.	Broth water (BW)	ของเหลวหนืด สีน้ำตาลเข้ม	18.7600 g	13.11 % (W/V)
3.	Cell acetate (CE)	ผงแห้ง สีน้ำตาล	0.0427 g	0.03 % (W/W)
4.	Cell hexane (CH)	ของเหลวสีส้ม	0.0865 g	0.06 % (W/W)
5.	Cell methanol (CM)	ผงแห้ง สีน้ำตาลเข้ม	0.6505 g	0.45 % (W/W)

(2) ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบทั้ง 5 ส่วนของเชื้อรา *A. flavus* สารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าวได้ดีเป็นสารสกัดชั้นเอธิลอะซิเตท (ethyl acetate, EtOAc) จากน้ำเลี้ยงเชื้อและเซลล์ของเชื้อรา โดยมีค่าการยับยั้งเท่ากับ  $78.83 \pm 2.72$  % และ  $72.45 \pm 3.55$  % ตามลำดับ ซึ่งเป็นผลที่น่าสนใจเมื่อเทียบกับสารมาตรฐานที่ใช้ในการทดลองได้แก่ ปวกหาด และ kojic acid โดยมีค่าการยับยั้งเท่ากับ  $94.26 \pm 0.65$  % และ  $80.18 \pm 0.84$  % ตามลำดับ ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ที่ความเข้มข้น 20 µg/ml ของสารสกัดหยาบทั้ง 5 ส่วนของเชื้อรา *A. flavus*

ลำดับที่	สารสกัดหยาบทั้ง 5 ส่วน	ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (% Tyrosinase inhibition) ที่ความเข้มข้น 20 µg/ml
1.	Broth ethyl acetate (BE)	$78.83 \pm 2.72$
2.	Broth water (BW)	$48.33 \pm 2.32$
3.	Cell acetate (CE)	$72.45 \pm 3.55$
4.	Cell hexane (CH)	$-11.98 \pm 1.23$
5.	Cell methanol (CM)	$-9.10 \pm 1.28$
Positive Std.	ปวกหาด(สารสกัดชั้นน้ำจากแก่นมะหาด)	$94.26 \pm 0.65$
Positive Std.	Kojic acid	$80.18 \pm 0.84$

### (3) ผลการแยกสารบริสุทธิ์

ในการทดลองเริ่มจากการเลี้ยงเพื่อเพิ่มสารสกัดหยาบทั้ง 5 ส่วนของเชื้อรา *A. flavus* ได้แก่ broth ethyl acetate (BE), cell acetate (CE), cell hexane (CH), cell methanol (CM) และ broth water (BW) หลังจากนั้น นำมาศึกษาองค์ประกอบทางเคมีโดยใช้วิธีการทาง chromatography ต่างๆ

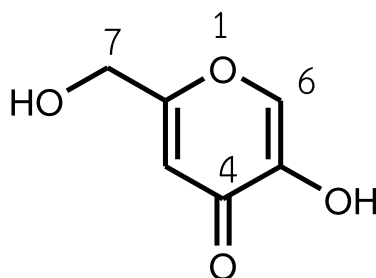
สามารถแยกสารได้ทั้งหมด 4 ชนิด คือ BE1, CE1, CE2 และ CM1 เมื่อพิสูจน์เอกลักษณ์โดยใช้เทคนิคทาง spectroscopy ได้แก่ UV, IR NMR และ MS ของสารทั้ง 5 ชนิด ได้ผล คือ kojic acid (BE1) ซึ่งเป็นสารที่พบมากที่สุดในการสกัดที่แยกได้ ditryptophenaline (CE1), 2,3,5-trihydroxybenzamide (CE2) และ diglycerol (CM1). The

โดยข้อมูลลักษณะทางกายภาพ คุณสมบัติทางเคมี และ spectroscopy data ของสารแต่ละชนิดมีดังนี้

#### 1. สาร BE1 (Kojic acid):

- มีลักษณะเป็นคริสตัลสีขาว ละลายได้ใน methanol และ ethyl acetate พบเป็นจุดสีน้ำตาลบนแผ่น TLC เมื่อพ่นด้วย 50 % sulphuric acid และให้ความร้อน
- ในการทำ TLC โดยใช้ mobile phase ที่ประกอบด้วย chloroform และ methanol ในอัตราส่วน 9:1 v/v, มีค่า  $R_f = 0.46$
- UV spectrum ใน methanol มี maximum absorption ที่  $\lambda_{max}$  217 nm และ 269 nm
- IR spectrum มี peaks ประกอบด้วย  $3429 \text{ cm}^{-1}$ (-OH),  $1650 \text{ cm}^{-1}$ (C=O),  $1613 \text{ cm}^{-1}$ (C=C),  $1212 \text{ cm}^{-1}$ (C-O-C)

- Groups of protons สามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ โดยใช้  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) ผลที่ได้คือ methylene protons resonated at  $\delta$  4.39 (s, 2H), two olefinic protons of pyrone resonated at  $\delta$  7.93 (s, 1H) และ 6.48 (s, 1H). Hydroxyl group resonated at  $\delta$  3.35 (s, OH)
- สาร BE1, เมื่อนำข้อมูล UV, IR,  $^1\text{H-NMR}$  spectra และเปรียบเทียบกับสารที่มีรายงานแล้ว (Sun *et al.* 2014) (ตารางที่ 5) จึงสรุปว่าสาร BE1 คือ Kojic acid (รูปที่ 7)



รูปที่ 7 โครงสร้างทางเคมีของ BE1 (Kojic acid)

ตารางที่ 5  $^1\text{H-NMR}$  spectrum data ของ compound BE1 และ kojic acid (Sun *et al.*, 2014)

Position	$^1\text{H-NMR}$ of BE1 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )		$^1\text{H-NMR}$ of kojic acid ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )	
	$\delta$ (ppm)	pattern	$\delta$ (ppm)	pattern
3	6.48	s	6.50	s
6	7.93	s	7.95	s
7	4.39	s	4.41	s
7-OH	3.35	s	3.35	s

## 2. สาร CE1 (Ditryptophenaline):

- มีลักษณะเป็นผงสีขาว ละลายได้ใน methanol
- ในการทำ TLC โดยใช้ mobile phase ที่ประกอบด้วย chloroform และ methanol ในอัตราส่วน 98:2 v/v จะเห็นเป็นจุดสีน้ำตาลเมื่อดูภายใต้ UV 254 nm และมีค่า  $R_f = 0.54$
- UV spectrum ใน methanol มี maximum absorption ที่  $\lambda_{\text{max}}$  204, 245 และ 303 nm
- FT-IR มี peaks ประกอบด้วย  $3412\text{ cm}^{-1}$ (N-H),  $2928\text{ cm}^{-1}$ (C-H),  $1649\text{ cm}^{-1}$ (-C=O),  $1455\text{ cm}^{-1}$ (aromatic) และ  $1208\text{ cm}^{-1}$ (C-N)
- $^1\text{H-NMR}$  spectrum of compound CE1 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) แสดง signal of methyl groups and appeared at  $\delta$  2.96 ( $2 \times 3\text{H}$ , s), the signals of methylene groups at  $\delta$  1.51 ( $2 \times 1\text{H}$ , t,  $J = 12.5\text{ Hz}$ ), 1.95 ( $2 \times 1\text{H}$ , dd,  $J = 4.5, 12.5\text{ Hz}$ ), 3.21-3.17 ( $2 \times 1\text{H}$ , dd,  $J = 4.5, 14.0\text{ Hz}$ ), and 3.46-3.42 ( $2 \times 1\text{H}$ , dd,  $J = 3.5, 14.0\text{ Hz}$ ), three signals of methine protons at  $\delta$  3.65 ( $2 \times 1\text{H}$ , m), 4.22-4.20 ( $2 \times 1\text{H}$ , m), and 4.80 ( $2 \times 1\text{H}$ , s). Moreover, it showed chemical shift of pyrrolidine proton at  $\delta$  4.75 ( $2 \times 1\text{H}$ , s), aromatic protons of benzene appeared at  $\delta$  6.49 ( $2 \times 1\text{H}$ , d,  $J = 8\text{ Hz}$ ), 6.65-6.62 ( $2 \times 1\text{H}$ , dt,  $J = 1.0, 7.5\text{ Hz}$ ), 6.96 ( $2 \times 1\text{H}$ , d,  $J = 7.6\text{ Hz}$ ), and 7.02-6.99 ( $2 \times 1\text{H}$ , dt,  $J = 1.0, 7.5\text{ Hz}$ ). In addition, it showed aromatic protons of phenyl

ring appeared at  $\delta$  7.07 (2  $\times$  2H, *d*, *J* = 6.5 Hz), 7.45 (2  $\times$  1H, *t*, *J* = 7.25 Hz) and 7.50 (2  $\times$  2H, *t*, *J* = 7.25 Hz).

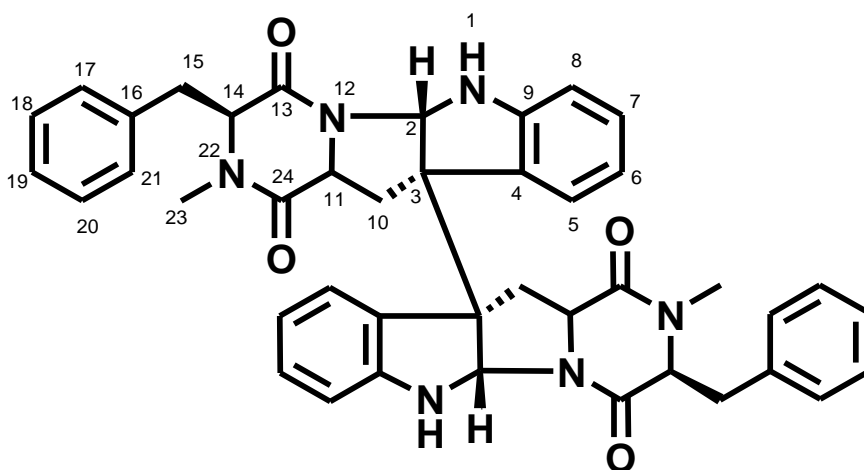
- $^{13}\text{C}$  NMR spectrum (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) แสดง nineteen carbons appeared at  $\delta$  165.43 (x2), 164.00 (x2), 150.03 (x2), 134.33 (x2), 129.60 (x2), 129.29 (x4), 129.22 (x4), 127.90 (x2), 126.33 (x2), 125.61 (x2), 118.89 (x2), 109.57 (x2), 78.55 (x2), 63.05 (x2), 58.85 (x2), 58.49 (x2), 36.11 (x2), 35.85 (x2), and 32.52 (x2) ppm.
- HMBC spectrum ใช้เพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนว่า linkage bonds ต่อเชื่อมโครงสร้างเข้าด้วยกัน และจาก HMBC spectrum, the proton at  $\delta$  3.46 (H-10a) showed a correlation to the carbons at  $\delta$  58.80, 134.33 and 164.00, which were C-3', C-4 and C-24 of ditryptophenaline structure.
- CE1 มี chemical formula as  $\text{C}_{42}\text{H}_{40}\text{N}_6\text{O}_4$ , molecular ion peak, on the ESI-MS instrument, at 715 *m/z*, which was the deduced molecular mass as  $[\text{M}+\text{Na}^+]$  peak
- จากข้อมูลทาง spectroscopy และการเปรียบเทียบข้อมูลที่มีรายงานแล้ว (Shen *et al.*, 2016) ดังแสดงในตารางที่ 6 สามารถสรุปได้ว่าสาร CE1 คือ ditryptophenaline

ตารางที่ 6  $^1\text{H}$ -NMR and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum data ของ compound CE1 และ ditryptophenaline

Position	Compound CE1 (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ )		Ditryptophenaline (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) (Shen <i>et al.</i> , 2016)	
	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) (multiplicity, <i>J</i> in Hz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) (multiplicity, <i>J</i> in Hz)
1, 1'	-	4.75 (2 $\times$ 1H, <i>s</i> )	-	4.68 (2 $\times$ 1H, <i>s</i> )
2, 2'	78.5	4.80 (2 $\times$ 1H, <i>s</i> )	78.0	4.80 (2 $\times$ 1H, <i>s</i> )
3, 3'	58.8	-	59.09	-
4, 4'	134.33	-	134.64	-
5, 5'	125.61	7.02-6.99 (2 $\times$ 1H, <i>dt</i> , <i>J</i> = 1.0, 7.5 Hz)	125.89	7.06 (2 $\times$ 1H, <i>dt</i> , <i>J</i> = 0.8, 7.6 Hz)
6, 6'	118.89	6.65-6.62 (2 $\times$ 1H, <i>dt</i> , <i>J</i> = 1.0, 7.5 Hz)	119.08	6.69 (2 $\times$ 1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 7.2 Hz)
7, 7'	129.60	6.96 (2 $\times$ 1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7.6 Hz)	129.78	6.96 (2 $\times$ 1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7.6 Hz)
8, 8'	109.57	6.49 (2 $\times$ 1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7.6 Hz)	109.78	6.54 (2 $\times$ 1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7.6 Hz)
9, 9'	150.03	-	150.30	-
10, 10'	36.1	1.51 (2 $\times$ 1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 12.5 Hz)	36.14	1.56 (2 $\times$ 1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 12.4 Hz)
		3.46-3.42 (2 $\times$ 1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 3.5, 14.0 Hz)		3.52 (2 $\times$ 1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 3.0, 14.4 Hz)

ตารางที่ 6  $^1\text{H-NMR}$  and  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum data ของ compound CE1 และ ditryptophenaline (ต่อ)

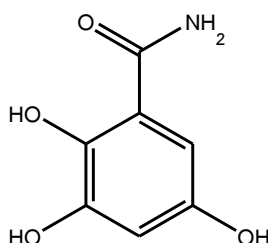
Position	Compound CE1 (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ )		Ditryptophenaline (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) (Shen <i>et al.</i> , 2016)	
	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) (multiplicity, $J$ in Hz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) (multiplicity, $J$ in Hz)
11, 11'	58.49	4.22-4.20 (2 × 1H, <i>m</i> )	58.70	4.27-4.22 (2 × 1H, <i>m</i> )
12, 12'	-	-	-	-
13, 13'	165.43	-	165.55	-
14, 14'	63.05	3.65 (2 × 1H, <i>m</i> )	63.27	3.65 (2 × 1H, <i>dd</i> , $J = 4.8$ , 12.0 Hz)
15, 15'	35.85	1.95 (2 × 1H, <i>dd</i> , $J = 4.5$ , 12.5 Hz)	36.14	2.01 (2 × 1H, <i>dd</i> , $J = 4.8$ , 12.4 Hz)
		3.21-3.17 (2 × 1H, <i>dd</i> , $J = 4.5$ , 14.0 Hz)		3.24 (2 × 1H, <i>dd</i> , $J = 4.4$ , 14.4 Hz)
16, 16'	127.9	-	128.07	-
17, 17', 21, 21'	129.22	7.45 (2 × 1H, <i>t</i> , $J = 7.2$ Hz)	129.46	7.50 (2 × 1H, <i>t</i> , $J = 7.2$ Hz)
18, 18' 20, 20'	129.29	7.50 (2 × 2H, <i>t</i> , $J = 7.6$ Hz)	129.46	7.55 (2 × 2H, <i>t</i> , $J = 7.6$ Hz)
19, 19'	126.33	7.07 (2 × 2H, <i>d</i> , $J = 7.2$ Hz)	126.62	7.13 (2 × 2H, <i>d</i> , $J = 7.2$ Hz)
23, 23'	32.5	2.96 (2 × 3H, <i>s</i> )	32.69	3.02 (2 × 3H, <i>s</i> )



รูปที่ 8 โครงสร้างทางเคมีของ CE1 (Dityryptophenaline)

### 3. สาร CE2 (2,3,5-Trihydroxybenzamide):

- มีลักษณะเป็นผลึกเข็มสีเหลือง ละลายได้ใน methanol
- ในการทำ TLC โดยใช้ mobile phase ที่ประกอบด้วย hexane: ethyl acetate ในอัตราส่วน 6:4 v/v จะเห็นเป็นจุดสีเขียวย และมีค่า  $R_f = 0.31$
- UV spectrum ใน methanol มี maximum absorption ที่  $\lambda_{max}$  204, 220, 258, 292 และ 463 nm IR มี peaks ประกอบด้วย hydroxyl group ( $3430\text{ cm}^{-1}$ ), C-H stretch of alkyl ( $2921\text{ cm}^{-1}$ ), overtones ( $2307\text{-}2357\text{ cm}^{-1}$ ) และ carbonyl group of primary amides showing two spikes ( $1628\text{ cm}^{-1}$ ).
- $^1\text{H}$  NMR spectrum ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) revealed two signals of olefinic protons at  $\delta_{\text{H}}$  7.19 ( $d$ ,  $J = 2.5\text{ Hz}$ ) และ 6.5 ( $d$ ,  $J = 2.5\text{ Hz}$ ).
- การพิสูจน์เอกลักษณ์ของ CE2 ใช้ LC-MS using electrospray (ESI) positive mode ซึ่ง peak แสดง a dominant fragment ion of  $m/z$  150  $[\text{M}+\text{H}]^+$  by electrospray ionization จากผลของ LC-MS ทำให้สรุปได้ว่าสาร CE2 คือ 2,3,5-trihydroxybenzamide ( $\text{C}_7\text{H}_7\text{NO}_4$ ) (รูปที่ 9) โดยมีน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) เท่ากับ 169
- จากรายงานก่อนหน้าพบว่าสาร 2,3,5-trihydroxybenzamide ซึ่งเป็น benzamide derivatives มีรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น anti-tyrosinase activity และ anti-melanogenic activity (Lee *et al.*, 2019), anti-proliferative activities against the human cell lines of colon adenocarcinoma (HTC-116) (Chan *et al.*, 2018) ดังนั้น CE2 จึงเป็นสารที่น่าสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ต่อไป แต่เนื่องจากในงานวิจัยนี้ สามารถแยกสารดังกล่าวได้ในปริมาณน้อย ไม่เพียงพอต่อการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพได้ ดังนั้นในอนาคตควรแยกสาร CE2 เพิ่มเติม เพื่อใช้ในการศึกษาอื่นๆ ต่อไป



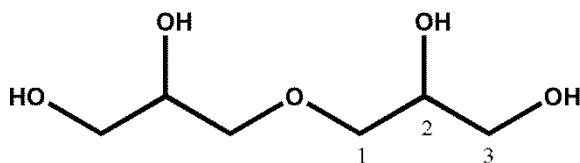
รูปที่ 9 โครงสร้างทางเคมีของ CE2 (2,3,5-Trihydroxybenzamide)

### 4. สาร CM1 (Diglycerol):

- มีลักษณะเป็นผลึกเข็มสีขาว ละลายได้ใน DMSO
- IR มี peaks ประกอบด้วย  $3,399\text{ cm}^{-1}$  (OH stretching),  $2,944\text{ cm}^{-1}$  (CH stretching),  $2,902\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_2$  stretching), และ  $1,080\text{ cm}^{-1}$  (CO stretching).
- $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{DMSO-}d_6$ , 500 MHz), revealed signals at  $\delta$  4.37 (1H,  $d$ ,  $J = 5.3\text{ Hz}$ ), 4.29 (1H,  $t$ ,  $J = 5.6, 11.2\text{ Hz}$ ), 4.10 (1H,  $d$ ,  $J = 7.0\text{ Hz}$ ), 3.54 (1H,  $t$ ,  $J = 7.5, 14.8\text{ Hz}$ ), and 3.39 (1H,  $m$ ).
- $^{13}\text{C}$  NMR spectrum, three signals were obtained. All signals of  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum showed a correlation with the  $^1\text{H}$ -NMR spectrum. The methylene carbon, which connected with oxygen of ether was found at  $\delta$  71.5, which was a C-1 and C-1', signals of *methine* carbon

assigned as C-2 and C-2' at  $\delta$  69.9 and methylene carbon, which connected with hydroxyl group assigned as C-3 and C-3' at  $\delta$  64.0.

- จากข้อมูลทั้งหมด และการเปรียบเทียบ  $^1\text{H-NMR}$  and  $^{13}\text{C-NMR}$  data (ตารางที่ 7) กับโครงสร้างสารที่เคยมีรายงานก่อนหน้านี้ (Tryznowski et al., 2016) สามารถสรุปได้ว่า CM1 คือ diglycerol (รูปที่ 10)



รูปที่ 10 โครงสร้างทางเคมีของ CM1 (Diglycerol)

ตารางที่ 7  $^1\text{H-NMR}$  data of compound CM1 (in DMSO-*d*<sub>6</sub>; 500 MHz)

Position	Compound CM1	
	$\delta_c$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm) (multiplicity, J in Hz)
C-1a, C-1a'	71.5	4.37 (1H, d, J = 5.3 Hz)
C-1b, C-1b'		4.29 (1H, t, J = 5.6, 11.2 Hz)
C-2, C-2'	69.9	3.39 (1H, m)
C-3a, C-3a'	64.0	3.54 (1H, t, J = 7.5, 14.8 Hz)
C-3b, C-3b'		4.10 (1H, d, J = 7.0 Hz)

#### (4) ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากเชื้อรา *A. flavus*

นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากเชื้อรา *A. flavus* ได้แก่ kojic acid (BE1), ditryptophenaline (CE1) และ diglycerol (CM1) ซึ่งเป็นสารที่มีปริมาณมากพอ มาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยจะหาค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ 50 % ( $\text{IC}_{50}$ ) ด้วยวิธี Dopachrome method พบว่า BE1 ซึ่งพิสูจน์เอกลักษณ์แล้วเป็น kojic acid มีฤทธิ์การยับยั้งใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน kojic acid ดังนั้นคาดว่า BE1 จะเป็นสารหลักที่ทำให้สารสกัดของ *A. flavus* ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส อนึ่ง ditryptophenaline (CE1) และ diglycerol (CM1) ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ( $\text{IC}_{50} > 200$   $\mu\text{g/ml}$ ) ดังแสดงในตารางที่ 8

จากรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่า kojic acid มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยการจับกับ dicopper complex ในขั้นตอนแรก และขัดขวางการจับกันของ catechol substrate ซึ่งทำให้ kojic acid แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและต้านอนุมูลอิสระได้ดี เป็นที่น่าเสียดายที่ในงานวิจัยชิ้นนี้แยกสาร 2,3,5-trihydroxybenzamide (CE2) ได้น้อยเกินไป ไม่สามารถนำมาทดสอบฤทธิ์ใดๆได้

ตารางที่ 8 IC<sub>50</sub> of isolated compounds on tyrosinase inhibitory activity

Compounds name	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
Kojic acid (BE1)	8.73
Ditryptophenaline (CE1)	>200
2,3,5-trihydroxybenzamide (CE2)	NT
Diglycerol (CM1)	>200
Kojic acid <sup>P</sup>	3.48
Water extract of <i>Artocarpus lakoocha</i> <sup>P</sup>	0.78

<sup>P</sup> = Positive control, NT = Not tested due to trace amount of compounds.

(5) ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานิน  
ในเซลล์เมลานोไซท์ชนิด B16F1

จากการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานิน ในเซลล์เมลานोไซท์ชนิด B16F1 ของสารสกัดที่มี kojic acid ปริมาณสูง (Kojic acid rich extract; KARE) และสารสกัดหยาบทั้ง 5 ส่วน พบว่า KARE ที่ความเข้มข้น 200 µg/ml สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยมีค่ายับยั้งการสร้างเม็ดสีในเซลล์เม็ดสีเมลานิน ในเซลล์เมลานोไซท์ เท่ากับ 70.85±2.33 และ 71.49±1.09 ตามลำดับ (ตารางที่ 9)

นอกจากนี้สารสกัด CH มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและยับยั้งการสร้างเม็ดสีในเซลล์เม็ดสีเมลานิน ในเซลล์เมลานोไซท์ได้ ซึ่งเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและศึกษากลไกในระดับยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเมลานินต่อไป ทั้งนี้เพื่อข้อมูลที่จะค้นพบสารใหม่ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสต่อไป

(6) ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดและสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากเชื้อรา *A. flavus*

สารสกัดหยาบทั้ง 5 ตัวอย่าง มาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ โดยวิธี Agar disc diffusion method (Lorian, 1996) โดยทำการทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย จำนวนทั้งหมด 6 สายพันธุ์ ได้แก่ Gram positive bacteria 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, Methicillin resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) และ *Propionibacterium acnes*; Gram negative bacteria 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa*; ยีสต์ 1 สายพันธุ์ ได้แก่ *Candida albicans* โดยทดสอบที่ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 2 mg/disc ผลการทดสอบพบว่า

สารสกัดชั้น BE และ BW มีฤทธิ์ที่ดียับยั้งเชื้อที่ทดสอบได้เป็นส่วนใหญ่ (5 สายพันธุ์) ผลดังแสดงในตารางที่ 10 รองลงมาเป็นสารสกัด CE มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อที่ทดสอบได้ 4 สายพันธุ์ ส่วนสารสกัด CM มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อที่ทดสอบได้เพียง 1 สายพันธุ์ แต่สารสกัด CH ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อที่ทดสอบได้เลย

Kojic acid ซึ่งเป็นสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ สามารถยับยั้งเชื้อที่ใช้ทดสอบได้ทั้งหมด ยกเว้น *P. acnes* และ *C. albicans* นอกจากนั้นสารสกัดทั้งหมดไม่มียับยั้งเชื้อราทั้งหมดที่นำมาทดสอบ

ตารางที่ 9 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสและการยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานิน  
ในเซลล์เมลานोไซท์ชนิด B16F1 จากสารสกัดหยาบของเชื้อรา *A. flavus*

ตัวอย่าง	ความเข้มข้น ( $\mu\text{g/mL}$ )	% Tyrosinase inhibition	% Inhibition of melanin production
arbutin	100	98.83 $\pm$ 1.35	76.63 $\pm$ 0.07
	50	65.01 $\pm$ 1.90	54.40 $\pm$ 1.04
kojic acid	100	43.25 $\pm$ 1.35	61.58 $\pm$ 0.37
	50	13.12 $\pm$ 1.17	33.39 $\pm$ 0.33
KARE	200	70.85 $\pm$ 2.33	71.49 $\pm$ 1.09
	100	30.61 $\pm$ 2.23	35.71 $\pm$ 0.65
	50	12.15 $\pm$ 2.69	29.58 $\pm$ 0.09
BE	200	66.18 $\pm$ 1.35	81.38 $\pm$ 0.43
	100	13.70 $\pm$ 2.33	53.58 $\pm$ 0.67
	50	3.21 $\pm$ 1.35	42.54 $\pm$ 0.55
CE	200	เซลล์ตาย	เซลล์ตาย
	100	เซลล์ตาย	เซลล์ตาย
	50	เซลล์ตาย	เซลล์ตาย
CH	200	เซลล์ตาย	เซลล์ตาย
	100	100.00 $\pm$ 4.04	87.81 $\pm$ 1.10
	50	52.19 $\pm$ 1.35	74.67 $\pm$ 0.16
CM	200	34.69 $\pm$ 2.69	67.08 $\pm$ 0.86
	100	26.53 $\pm$ 4.47	43.21 $\pm$ 0.17
	50	8.26 $\pm$ 1.35	20.75 $\pm$ 0.33
BW	200	19.18 $\pm$ 1.35	53.89 $\pm$ 1.38
	100	20.12 $\pm$ 2.23	34.26 $\pm$ 2.41
	50	14.87 $\pm$ 2.33	20.63 $\pm$ 2.11

ตารางที่ 10ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากเชื้อรา *A. flavus* (SPSF318)

Microbes	Inhibition zone (mm)						
	Standard drugs*	BE**	CE**	CH**	CM**	BW**	Kojic acid***
<b>Gram positive</b>							
<i>S. aureus</i>	23.05±0.85	13.75±0.70	8.45±0.86	-	-	13.50±0.85	10.20±0.50
MRSA	22.35±0.40	10.85±2.00	10.65±0.90	-	-	11.85±1.48	9.40±0.60
<i>S. epidermidis</i>	22.35±0.40	15.10±0.74	-	-	11.55±0.98	14.60±1.08	16.65±1.76
<i>C. acnes</i>	38.80±0.35	-	-	-	-	9.40±0.60	-
<b>Gram negative</b>							
<i>P. aeruginosa</i>	29.55±0.40	18.50±0.10	8.30±0.75	-	-	-	15.40±0.98
<i>E. coli</i>	23.30±0.45	14.65±0.29	8.15±0.75	-	-	19.20±0.10	16.65±1.76
<b>Yeast</b>							
<i>C. albicans</i>	38.60±0.35	-	-	-	-	-	-
<b>Fungi</b>							
<i>T. rubrum</i>	43.05±0.85	-	-	-	-	-	-
<i>T. mentagrophytes</i>	45.35±0.40	-	-	-	-	-	-
<i>M. gypseum</i>	22.35±0.40	-	-	-	-	-	-

\* Standard drugs: Norfloxacin: สำหรับเชื้อ *P. aeruginosa* และ *E. coli* โดยใช้ 10 µg/disc  
 Oxacillin: สำหรับเชื้อ *S. aureus*, *S. epidermidis* และ *C. acnes* โดยใช้ 1 µg/disc  
 Vancomycin: สำหรับเชื้อ MRSA โดยใช้ 30 µg/disc  
 Amphotericin B: สำหรับเชื้อ *C. albicans* โดยใช้ 25 µg/disc  
 Ketoconazole: *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* และ *M. gypseum* โดยใช้ 25 µg/disc

\*\* Crude extracts: BE: Broth Ethyl acetate; CE: Cell Ethyl acetate  
 CH: Cell Hexane CM: Cell Methanol  
 BW: Broth Water

\*\*\*Isolated compound: Kojic acid

- คือ inactive

### (6.1) การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (MIC)

เนื่องจากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบทั้ง 5 ส่วน โดยวิธี Agar disc diffusion method พบว่าสารสกัดชั้น BE CE และ BW สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. acne* และ MRSA) และยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (*E. coli* และ *P. aeruginosa*) ได้

จึงนำสกัดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ดี ได้แก่ สารสกัด BE, CE และ BW รวมทั้งสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ทั้ง 3 ชนิด มาทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (minimum inhibitory concentration, MIC) และฆ่าเชื้อ (minimum bactericidal concentration, MBC) ทั้ง 6 สายพันธุ์ ด้วยวิธี broth dilution method โดยเตรียมสารที่ต้องการทดสอบที่ความเข้มข้น 2.56 mg/ml นำมาเจือจางลงครึ่งละ 2 เท่า ด้วยอาหาร MHB ใน 96 well plate ซึ่งความเข้มข้นสุดท้ายของสารตัวอย่างจะมีค่าความเข้มข้นระหว่าง 4-256 µg/ml จากนั้นเติมเชื้อที่ปรับความเข้มข้นให้เท่ากับ 10<sup>6</sup> CFU/ml ลงในแต่ละหลุมปริมาตร

100 µl บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง และยาปฏิชีวนะที่ใช้เป็น positive control เตรียมที่ความเข้มข้น 32 µg/ml เจือจางลงครึ่งละ 2 เท่า และเติมเชื้อลงไป ความเข้มข้นสุดท้ายของยาจะมีค่าความเข้มข้นระหว่าง 0.125-8 µg/ml

จากการทดสอบพบว่า BE และ CE สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis*, *S. aureus* และ *E. coli* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 256 (µg/ml) นอกจากนี้ KARE ก็ยังสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 256 (µg/ml) (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 MIC และ MBC ของสารสกัดและสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จาก *A. flavus*

Sample	MIC and MBC (µg/ml)											
	<i>S. epidermidis</i>		<i>S. aureus</i>		MRSA		<i>P. acne</i>		<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
BE <sup>c</sup>	256	>256	256	>256	-	-	-	-	256	>256	-	-
CE <sup>c</sup>	256	>256	256	>256	-	-	-	-	-	-	-	-
BW <sup>c</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KARE <sup>p</sup>	-	-	256	>256	-	-	-	-	-	-	-	-
Ditryptophenaline <sup>p</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Diglycerol <sup>p</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxacillin <sup>s</sup>	0.12	1.00	0.25	1.00	-	-	1.00	>8.00	-	-	-	-
Norfloxacin <sup>s</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	0.50	1.00	8.00	>8.00
Vancomycin <sup>s</sup>	-	-	-	-	0.50	>8.00	-	-	-	-	-	-

<sup>c</sup> = crude extracts, <sup>p</sup> = isolated compounds และ <sup>s</sup> = standard drugs,  
MIC = minimum inhibitory concentration; MBC = minimum bactericidal concentration

### การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของ SPSF224

#### (1) การพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อรา SPSF224

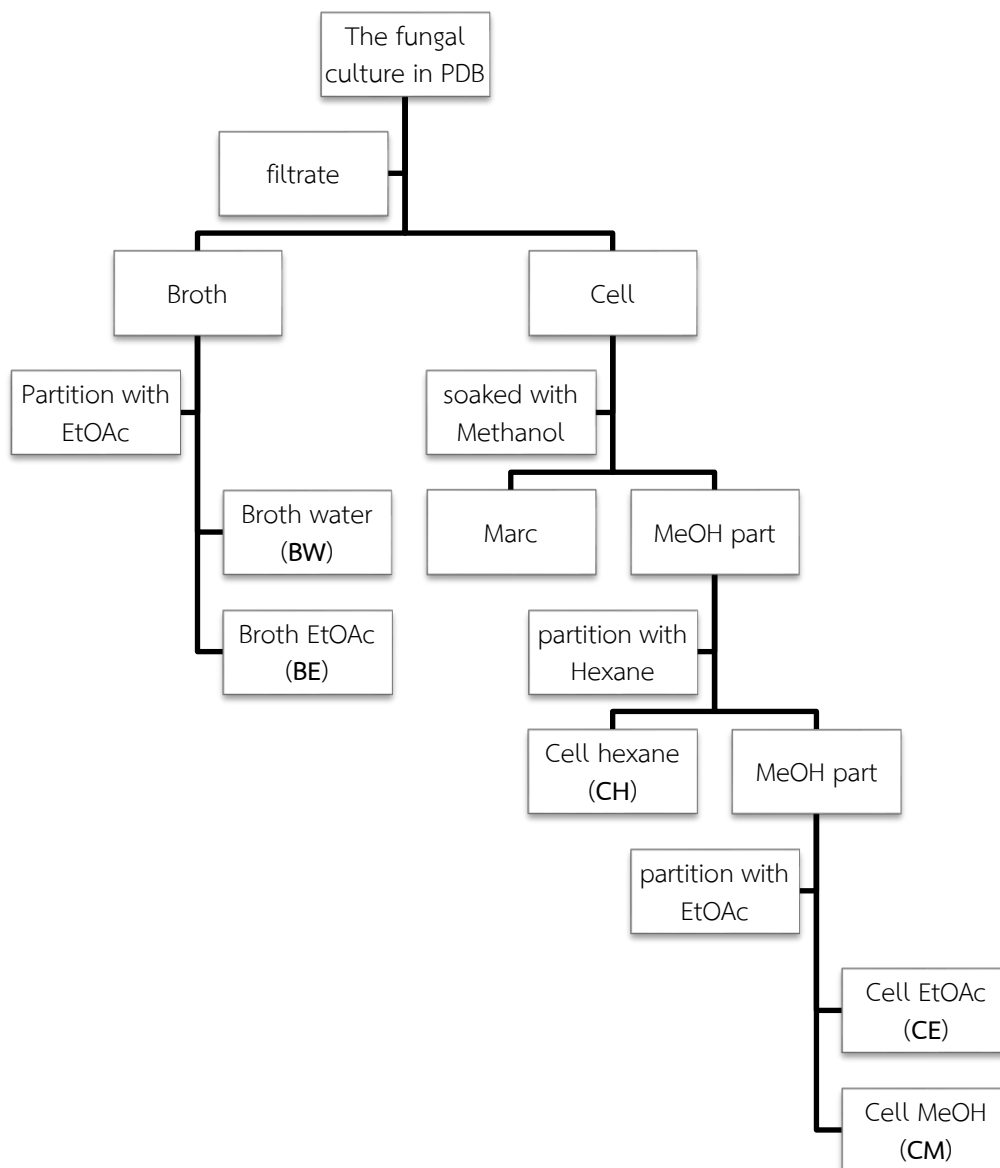
สำหรับ SPSF224 ซึ่งพิสูจน์เอกลักษณ์โดย Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Germany ได้ข้อมูลดังนี้

Species: *Penicillium maximae*  
Gene: CALM  
GenBank Accession: KC773821  
Strain: NRRL2060  
Length (basepairs): 427/435  
Sequence Similarity(%): 98

จากข้อมูลที่ได้ สรุปว่า SPSF224 เป็นเชื้อราชนิด *Penicillium maximae* ที่ถูกค้นพบเมื่อปี พ.ศ. 2556 (Visagie et al., 2013, 2014)

#### (2) การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี

ผู้วิจัยได้เลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อ และแยกสกัดสาร (รูปที่ 11) ได้ปริมาณสารสกัดดังแสดงในตารางที่ 12



รูปที่ 11 แผนภาพการสกัดสารของเชื้อรา SPSF224

ตารางที่ 12 สารสกัดจากเชื้อราชนิด *Penicillium maximae* (SPSF224)

Part of extracts	Weight (g)	Physical appearance
Broth ethyl acetate (BE)	5.767	Red-brown gum
Broth water (BW)	10.532	Black gum
Cell ethyl acetate (CE)	10.532	Black gum
Cell hexane (CH)	10.532	Black gum
Cell methanol (CM)	10.532	Black gum

สารสกัดจากเชื้อรา SPSF224 มีองค์ประกอบทางเคมีค่อนข้างมาก จึงทำให้แยกสารได้ยาก ขั้นตอนแรกในการศึกษาองค์ประกอบทางเคมี ผู้วิจัยได้ศึกษาพิษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical screening) เพื่อดูกลุ่มสารเคมีที่สามารถพบได้ในสารสกัดแต่ละชนิด ดังแสดงในตารางที่ 13 ซึ่งพบว่าสารสกัดทั้งหมดตรวจพบสาร

กลุ่ม Tannins และ Alkaloids ในขณะที่ Cardiac glycoside, Steroids และ Saponins ตรวจไม่พบในทุกสารสกัด นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ศึกษาหาปริมาณสารกลุ่ม Phenolics (Total phenolic content) และปริมาณ Flavonoids (Total flavonoids content) ดังแสดงในตารางที่ 14

**ตารางที่ 13** การศึกษาพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดจากเชื้อราชนิด *Penicillium maximae* (SPSF224)

Phytochemicals	CE	BE	BW	CM	CH
Tannins	/	/	/	/	/
Alkaloid	/	/	/	/	/
Cardiac glycosides	X	X	X	X	X
Steroids	X	X	X	X	X
Saponins	X	X	X	X	X
Flavonoids	/	/	X	X	/
Terpenoids	X	X	X	X	X
Coumarins	/	X	X	X	X
Anthraquinones	/	X	X	X	X

/ = Present, X = Absent

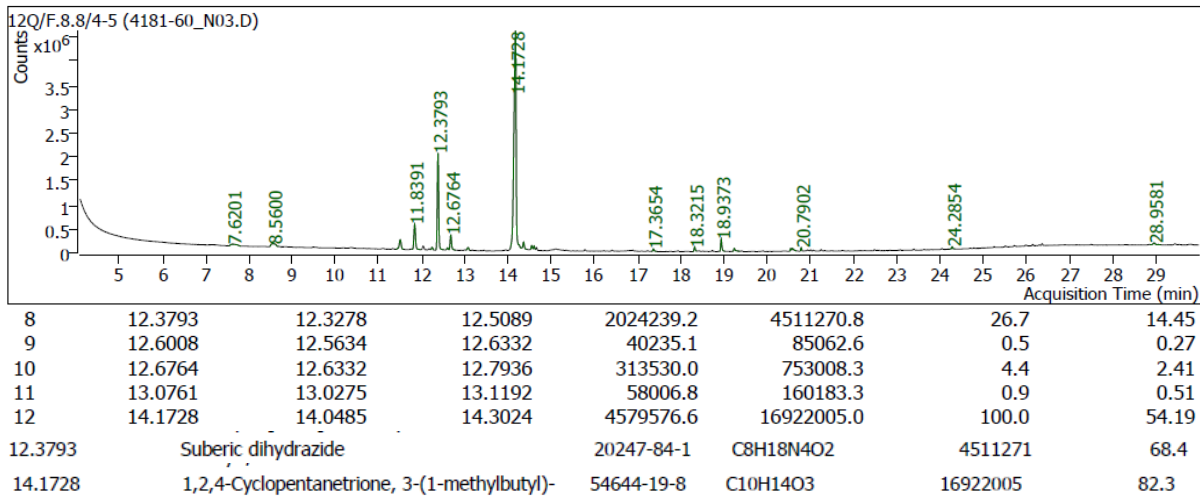
**ตารางที่ 14** Total phenolic content และ Total flavonoids content ของสารสกัดจากเชื้อราชนิด *Penicillium maximae* (SPSF224)

Extract	Total phenolic content (mg GAE/g of sample)		Total flavonoid content (mg QE/g of sample)	
	Mean	SD	Mean	SD
CE	8.891	0.396	7.726	0.186
BE	6.119	0.198	2.235	0.149
BW	1.828	0.412	-0.021	0.009
CM	0.970	0.198	-0.036	0.003
CH	5.327	0.396	1.358	0.176

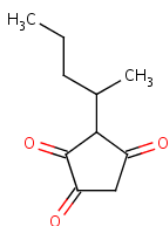
เมื่อทำการแยกสาร พบว่าสารที่แยกได้มีปริมาณน้อยมาก จนไม่สามารถนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารโดยใช้เทคนิคทาง spectroscopy ได้ ดังนั้นจึงศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัด และ fraction ต่างๆ ที่น่าสนใจ โดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี แมสสเปคโตรเมตรี (Gas chromatography-Mass spectroscopy; GC-MS)

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัด CH ด้วย GC-MS พบว่ามีสาร *n*-hexadecanoic acid, 2,6-dimethyl-N-(2-methyl- $\alpha$ -phenylbenzyl) aniline และ 3 $\beta$ -acetoxy-6-nitroandrost-5-en-17-one เป็นส่วนประกอบหลักของสารสกัด

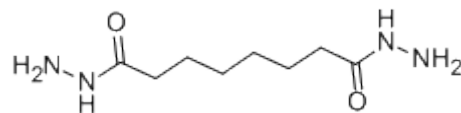
นอกจากนั้นเมื่อทำการแยกสาร จากสารสกัด BE ได้สารกึ่งบริสุทธิ์ PM1 ซึ่งเมื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค GC-MS (รูปที่ 12) พบว่ามี 3-(1-methylbutyl)-1,2,4-cyclopentanetrione ( $C_{10}H_{14}O_3$ ) และ suberic dihydrazide ( $C_8H_{18}N_4O_2$ ) เป็นส่วนประกอบหลัก (รูปที่ 13)



รูปที่ 12 GC-MS ของสารกึ่งบริสุทธิ์ PM1



3-(1-methylbutyl)-1,2,4-cyclopentanetrione



Suberic dihydrazide

รูปที่ 13 องค์ประกอบหลักทางเคมีของ PM1

นอกจาก สารกึ่งบริสุทธิ์ PM1 แล้ว สามารถแยกสารกึ่งบริสุทธิ์ PM2 ซึ่งแยกได้จาก CE เนื่องจาก PM2 ที่แยกได้ มีปริมาณน้อยมาก ไม่สามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ โดยใช้ข้อมูลทาง spectroscopy ได้ ครบถ้วน แต่สามารถคาดการณ์จากข้อมูลของ H-NMR และ LC-MS ว่ามีความเป็นไปได้ที่จะเป็นสารกลุ่มอนุพันธ์ของแคโรทีนอยด์และสารสีกลุ่มโพลีอิน

### (3) การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ

ในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเชื้อรา SPSF224 โดยทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดแต่ละชั้น ซึ่งฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสดังแสดงในตารางที่ 15 พบว่าสารสกัดในส่วนของเซลล์มีฤทธิ์ที่ดีมากที่สุด BE, CE และ CH นอกจากนี้สารกึ่งบริสุทธิ์ PM1 ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสได้ดี ถึงร้อยละ  $91.83 \pm 1.59$

นักวิจัยได้ศึกษาเพิ่มเติม โดยทดสอบการกระตุ้นการหลั่ง insulin ใน cell line (INS-1E) จากตับอ่อนของสารสกัดในชั้นต่างๆ ผลดังแสดงในตารางที่ 16 ซึ่งพบว่าสารสกัดเซลล์ในชั้นเมทานอล (cell methanol, CM) กระตุ้นการหลั่ง insulin ได้ดีที่สุด

ตารางที่ 15 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสของสารสกัดต่าง ๆ จากเชื้อรา SPSF224

Extracts / Compound	Anti-alpha-glucosidase activity (% inhibition at 2 mg/ml)	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
Broth ethyl acetate (BE)	97.12±1.01	1008
Broth water (BW)	45.63±0.21	-
Cell ethyl acetate (CE)	118.59±2.71	1080
Cell hexane (CH)	104.03±0.42	490
Cell methanol (CM)	27.77±0.11	-
Semi-purified PM1	91.83±1.59	_*
Acarbose <sup>P</sup>	87.66±0.21	205

Data were expressed as mean±SD

<sup>P</sup> = Positive control

\* = insufficient amount

ตารางที่ 16 ผลการทดสอบการกระตุ้นการหลั่ง insulin ใน cell line (INS-1E) ของสารสกัดต่าง ๆ จากเชื้อรา SPSF224

Sample	Insulin secretion (µg/L)
Control 2.5 mM	42.95
Glucose 10 mM	50.63
Glibenclamide* 50 µg/ml	57.10
CE 10 µg/ml	51.62
CH 10 µg/ml	40.79
BE 10 µg/ml	57.63
BW 10 µg/ml	53.27
CM 10 µg/ml	<b>66.43</b>

\* Positive standard

นอกจากนี้นักวิจัยได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระประกอบในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ ผลดังแสดงในตารางที่ 17 ซึ่งผลที่ได้พบว่าสารสกัดทุกชั้นมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำมาก ชั้นที่มีฤทธิ์ดีที่สุดคือ สารสกัดจาก cell ethyl acetate, CE

**ตารางที่ 17** Percent inhibition of DPPH radical scavenging activity at 200 µg/ml of *P. maximae* extracts.

Sample*	% inhibition at 200 µg/ml**	SD
CE	31.25	5.89
BE	28.40	2.39
BW	2.66	0.33
CM	1.47	0.26
CH	11.69	2.14
Positive standard, quercetin	93.44	1.54

\*CE: cell ethyl acetate extract; BE: broth ethyl acetate extract; BW: broth water extract; CM: cell methanol extract; CH: cell hexane extract.

\*\*Values were represented with mean ± standard deviation of three replication (n=3).

จากการทดสอบพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical screening) ในสารสกัดของ SPSF224 ทุกชั้น ผลดังแสดงในตารางที่ 13 จะพบสารกลุ่ม tannin และ alkaloids ได้ทุกชั้น แต่ไม่พบสารกลุ่ม cardiac glycosides, sterods และ saponins สำหรับสารกลุ่ม flavonoids พบในชั้น CE, BE และ CH เมื่อทราบกลุ่มสารคร่าวๆ จึงทดลองหาค่า flavonoids content เพื่อดูความสอดคล้องของข้อมูล (ตารางที่ 14) และเพื่อนำไปศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด เนื่องจากเป็นฤทธิ์ที่มักพบในสารกลุ่ม flavonoids ซึ่งพบว่าสารสกัดในชั้น CE, BE และ CH ที่ตรวจพบว่ามีสารกลุ่ม flavonoids เมื่อหาปริมาณสารกลุ่มนี้ พบสูงสุดในสารสกัดชั้น CE และพบน้อยสุดในชั้น CH และตรวจไม่พบในชั้น BW และ CM สอดคล้องกับการทดสอบพฤกษเคมีเบื้องต้นที่ไม่พบ flavonoids ในสารสกัดทั้งสอง เมื่อดูฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidant) ซึ่งทดสอบด้วยวิธี DPPH (ตารางที่ 17) พบว่า CE ซึ่งมีปริมาณ flavonoids และ phenolic compounds มากที่สุด มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดเช่นกัน

เมื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์เช่นเดียวกับสารสกัด SPSF318 พบว่าสารสกัดจากชั้น Broth ethyl acetate extract (BE) มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum* โดยมีค่า clear zone เท่ากับ 8.1±0.1, 6.4±0.5 และ 11.2±2.6 mm ตามลำดับ และ Cell methanol extract (CM) มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *T. rubrum* โดยมีค่า clear zone เท่ากับ 12.6±3.5 mm. ดังแสดงในตารางที่ 18

ตารางที่ 18 ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจาก เชื้อรา *P. maxima* (SPSF224)

Microbes	Zone of inhibition (Diameter, mm)					
	Standard drug*	CE**	BE**	BW**	CM**	CH**
<i>P. aeruginosa</i>	32.7±0.7	0	0	0	0	0
<i>E. Coli</i>	23.1±0.1	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i>	22.0±1.8	0	8.1±0.1	0	0	0
<i>S. epidermis</i>	30.6±0.1	0	0	0	0	0
MRSA	21.3±1.0	0	0	0	0	0
<i>P. acnes</i>	25.4±1.1	0	0	0	0	0
<i>C. albicans</i>	13.5±0.4	0	0	0	0	0
<i>T. mentagrophytes</i>	42.4±1.5	0	6.4±0.5	0	0	0
<i>T. rubrum</i>	50.3±2.1	0	11.2±2.6	0	12.6 ±3.5	0
<i>M. gypseum</i>	27.0±1.0	0	0	0	0	0

\* Standard drugs: Norfloxacin: สำหรับเชื้อ *P. aeruginosa* และ *E. coli* โดยใช้ 10 µg/disc  
 Oxacillin: สำหรับเชื้อ *S. aureus*, *S. epidermidis* และ *C. acnes* โดยใช้ 1 µg/disc  
 Vancomycin: สำหรับเชื้อ MRSA โดยใช้ 30 µg/disc  
 Amphotericin B: สำหรับเชื้อ *C. albicans* โดยใช้ 25 µg/disc  
 Ketoconazole: *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* และ *M. gypseum* โดยใช้ 25 µg/disc

\*\* Crude extracts: BE: Broth Ethyl acetate; CE: Cell Ethyl acetate  
 CH: Cell Hexane CM: Cell Methanol  
 BW: Broth Water

\*\* Concentration at 200 mg/ml; 10 µl/ disc (final conc. 2 mg/disc)

- คือ inactive

## สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของจุลินทรีย์ในดินอินทรีย์ในพื้นที่พรุ จังหวัดนราธิวาส จำนวน 104 ตัวอย่าง ซึ่งประกอบด้วยสารสกัดจากเชื้อ *Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp., *Gongronella* sp., *Penicillium* sp. จำนวน 4, 12, 2 และ 83 ตัวอย่าง ตามลำดับ และอีก 3 ตัวอย่างที่ ขณะนี้ยังไม่สามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อเราได้ (unidentified) ว่าเป็นเชื้อชนิดใด โดยนำตัวอย่าง ทั้งหมดมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ 5 อย่าง ได้แก่ ฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส (รักษาความผิดปกติของเม็ดสี) ฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟา กลูโคซิเดส (รักษาเบาหวาน) ฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะซิติลคอลินเอสเตอเรส (รักษาโรคสมองเสื่อม, Alzheimer's disease) ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (รักษาโรคมะเร็ง) และฤทธิ์ต้านการอักเสบ (รักษาอาการอักเสบต่างๆ)

จากผลการทดลอง พบว่ามี 3 ตัวอย่าง ซึ่งได้จากเชื้อ *Penicillium* sp. มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ดี (มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส > 50% ที่ความเข้มข้น 20 µg/ml) ได้แก่ SPSF0318BE, SPSF0318CE และ SPSF045BE (สารมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบนี้คือ ปวกหาด (water extract of *Artocarpus lakoocha*) และ kojic acid โดยมีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสเท่ากับ  $98.82 \pm 3.97$  และ  $75.46 \pm 1.80\%$  ตามลำดับ)

และพบ 1 ตัวอย่างมีฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะซิติลคอลินเอสเตอเรสที่ดี (มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะซิติลคอลินเอสเตอเรส > 80% ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml) ได้แก่ SPSF013BE (*Trichoderma* sp.) (สารมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบนี้คือ Galantamine มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะซิติลคอลินเอสเตอเรส  $97.69 \pm 0.95\%$ )

พบ 14 ตัวอย่างมีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ที่ดี (มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมที่ความเข้มข้น 25 µg/ml > 80%) โดยเป็นตัวอย่างจากสารสกัดเชื้อราในกลุ่ม *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. และ *Trichoderma* sp. จำนวน 10, 3 และ 1 ตัวอย่าง ตามลำดับ เมื่อนำตัวอย่าง ที่มีพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (Human gingival fibroblast (HGF)) พบว่า ทุกตัวอย่างมีพิษต่อเซลล์ปกติมากกว่า 20% (สารมาตรฐานในการทดสอบนี้ คือ Camptothecin โดยมีพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมเท่ากับ  $94.01 \pm 0.17\%$  และพิษต่อเซลล์ปกติ (HGF)  $73.14 \pm 3.63\%$ )

สำหรับฤทธิ์ต้านการอักเสบ ผลการทดสอบพบ 39 ตัวอย่าง มีฤทธิ์ต้านการอักเสบที่ดี (ยับยั้งการหลั่ง nitric oxide จาก macrophage cell (RAW 264.7) ที่ความเข้มข้น 25 µg/ml > 60%) โดยเป็นตัวอย่างจากสารสกัดจากเชื้อราในกลุ่ม *Penicillium* sp. และ *Aspergillus* sp. จำนวน 34 และ 5 ตัวอย่าง ตามลำดับ โดยมี 18 ตัวอย่าง ที่มีพิษต่อเซลล์ที่ใช้ทดสอบมากกว่า 20% ในการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ ใช้ Indomethacin เป็นสารมาตรฐาน โดยมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ  $61.08 \pm 0.68 \%$  และมีพิษต่อเซลล์ที่ใช้ทดสอบ  $25.42 \pm 2.99 \%$

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟา กลูโคซิเดส พบ 62 ตัวอย่าง ที่มีฤทธิ์ต้าน เอนไซม์แอลฟา กลูโคซิเดสที่ดี (มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟา กลูโคซิเดส ที่ความเข้มข้น 2 mg/ml > 70%) โดยเป็นตัวอย่างจากสารสกัดจากเชื้อรา กลุ่ม *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp. และ

*Gongronella* sp. จำนวน 54, 4, 2 และ 2 ตัวอย่าง ตามลำดับ ในการทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส ใช้ Acarbose เป็นสารมาตรฐาน โดยมีฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส  $86.87 \pm 0.66\%$

จากผลการทดลองทั้งหมด พบว่ามี 4 ตัวอย่างที่น่าสนใจ คือ SPSF318BE, SPSF318CE, SPSF224BE และ SPSF224CE โดยตัวอย่างทั้ง 4 ตัว มาจากเชื้อ 2 ชนิด คือ SPSF318 และ SPSF224 ซึ่งเชื้อราทั้งสองเป็นเชื้อราในกลุ่ม *Penicillium* sp. เหมือนกัน โดยเชื้อราทั้งสอง แยกเป็น 2 ตัวอย่าง คือ ส่วนที่เป็นสารสกัดชั้น ethyl acetate ของอาหารเลี้ยงเชื้อ (broth, BE) และ ส่วนของสารสกัดชั้น ethyl acetate ของเซลล์ (cell, CE)

เนื่องจากตัวอย่างจากสารสกัดจากเชื้อราในกลุ่ม *Penicillium* sp. (SPSF318) มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ดี ซึ่งในปัจจุบันการศึกษาเพื่อหาสารสกัดที่มีฤทธิ์ที่ดีในการต้านเอนไซม์ดังกล่าวค่อนข้างหาได้ยาก นอกจากนั้นตัวอย่างจากส่วนของสารสกัดชั้น ethyl acetate ของเซลล์ (SPSF318CE) ยังมี ฤทธิ์ที่ดีในการต้านการอักเสบ และฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม ดังนั้น *Penicillium* sp. (SPSF318) จึงน่าสนใจในการนำมาเลี้ยงเพิ่มปริมาณ เพื่อใช้ในการแยกสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ (active compound) ต่อไป

นอกจากนั้นยังมีสารตัวอย่างที่น่าสนใจอีก 2 ตัวอย่าง คือ SPSF224BE และ SPSF224CE เนื่องจากมีฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสที่ดี และตัวอย่างทั้งสองได้จากเชื้อเดียวกัน คือ *Penicillium* sp. (SPSF224) และตัวอย่างทั้งสองยังมีฤทธิ์ที่ดีในการต้านการอักเสบ โดยไม่เป็นพิษกับเซลล์ที่ใช้ทดสอบ นอกจากนั้น SPSF224CE ยังมีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมปานกลาง โดยไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ปกติ ดังนั้น *Penicillium* sp. (SPSF224) จึงเป็นอีกหนึ่งตัวอย่างที่น่าสนใจ ในการนำมาเลี้ยงเพิ่มปริมาณ เพื่อใช้ในการแยกสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ (active compound) ต่อไป

เพราะฉะนั้นในการศึกษาครั้งนี้เราสามารถพบสารสกัดที่น่าสนใจ จากเชื้อ *Penicillium* sp. 2 ชนิด คือ SPSF318 และ SPSF224 ที่จะนำไปเลี้ยงเพิ่มปริมาณ เพื่อใช้ในการแยกสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ (active compounds) ทางชีวภาพใน ลำดับต่อไป

เมื่อนำ SPSF318 ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ดี และ SPSF224 ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส ที่ดี ส่งจำแนกชนิดจุลินทรีย์ โดยใช้ Molecular method พบว่า SPSF318 เป็นเชื้อราชนิด *Aspergillus flavus* สำหรับ SPSF224 เป็นเชื้อราชนิด *Penicillium maximae*

ในการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อรา SPSF318 (*Aspergillus flavus*) โดยมุ่งเน้นการทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส เริ่มด้วยการแยกสารสกัดเป็น 5 ชนิด ได้แก่ สารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตทของน้ำเลี้ยงเชื้อรา (BE), สารสกัดชั้นน้ำของน้ำเลี้ยงเชื้อรา (BW), สารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตทจากเส้นใยเชื้อรา (CE), สารสกัดชั้นเฮกเซนจากเส้นใยเชื้อรา (CH) และสารสกัดชั้นเมทานอลจากเส้นใยเชื้อรา (CM) สารสกัด BE และ BW มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในเซลล์เมลานोไซท์ชนิด B16F1 อย่างมีนัยสำคัญ จึงสามารถลดกระบวนการสังเคราะห์เมลานินได้ นอกจากนั้นจากการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพ พบว่า BE, CE และ BW มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) และ *S. epidermidis* และต้านแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* และ *Escherichia coli*

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมี สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ 4 ชนิด ได้แก่ kojic acid, ditryptophenaline และ 2,3,5-trihydroxybenzamide ซึ่งแยกได้จาก BE และ CE ส่วนสาร diglycerol

แยกได้จาก CM ซึ่งสาร 2,3,5-trihydroxybenzamide (CE2) และ diglycerol ยังไม่เคยมีรายงานสารที่แยกได้จากเชื้อราชนิดนี้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จัดเป็นรายงานวิจัยแรกในการรายงานการพบสารดังกล่าวในเชื้อราชนิดนี้ และจากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่แยกได้ พบว่า kojic acid มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ที่ดี โดยมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 8.73 µg/ml

ในการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อรา SPSF224 (*Penicillium maximae*) โดยมุ่งทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสของสารสกัดจากเชื้อราดังกล่าว โดยเริ่มจากการเตรียมสารสกัดเป็น 5 ชนิด กล่าวคือ ชั้นเอทิลอะซิเตทของเซลล์ (CE) ชั้นเอทิลอะซิเตทของน้ำเลี้ยงเชื้อรา (BE) ชั้นเฮกเซนของเซลล์ (CH) ชั้นเมทานอลของเซลล์ (CM) และชั้นน้ำของน้ำเลี้ยงเชื้อรา (BW) โดยทั้งหมดพบสารกลุ่มแทนนินและอัลคาลอยด์ เมื่อเปรียบเทียบผลของสารสกัดเชื้อรา SPSF224 ทั้งห้าชนิดพบว่า CE มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการกำจัดอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่าร้อยละ 31.25±5.89 และมีปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกและสารกลุ่มฟลาโวนอยด์สูงที่สุดคือ 8.89±0.40 มิลลิกรัมแกลลิกแอซิดต่อกรัมน้ำหนักแห้งและ 7.73±0.19 มิลลิกรัมเคอควิทินต่อกรัมน้ำหนักแห้งตามลำดับ

ผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีววิทยาพบว่า CH มีฤทธิ์ดีที่สุดในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส โดยมีค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งร้อยละ 50 เท่ากับ 490 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ BE มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus*

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของ CH ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี แมสสเปคโตรเมตรีพบว่า มีสาร *n*-hexadecanoic acid, 2,6-dimethyl-N-(2-methyl-alpha-phenylbenzyl) aniline และ 3beta-acetoxy-6-nitroandrost-5-en-17-one เป็นส่วนประกอบหลักของสารสกัด นอกจากนี้สารกึ่งบริสุทธิ์ PM1 ซึ่งแยกได้จาก BE พบว่ามี 3-(1-methylbutyl)-1,2,4-cyclopentanetrione และ suberic dihydrazide เป็นส่วนประกอบหลัก ซึ่งสารกึ่งบริสุทธิ์ PM1 ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสได้ดี ถึงร้อยละ 91.83±1.59 และสารกึ่งบริสุทธิ์ PM2 ซึ่งสามารถแยกได้จาก CE พบว่ามีความเป็นไปได้ที่จะเป็นสารกลุ่มอนุพันธ์ของแคโรทีนอยด์และสารสีกลุ่มโพลีอิน อย่างไรก็ตาม

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาแรกเกี่ยวกับการศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ทางชีววิทยาของสารสกัดจากเชื้อรา *P. maximae* ซึ่งองค์ความรู้ที่ได้สามารถใช้เป็นข้อมูลอ้างอิง ในการค้นหาหรือสารต้นแบบจากเชื้อรา เพื่อนำมาใช้พัฒนาเป็นยาหรือผลิตภัณฑ์สุขภาพในการดูแลสุขภาพผู้ป่วยเบาหวานต่อไป

โดยสรุปนอกจากเชื้อราทั้งสองชนิดที่นำมาศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่า พื้นที่พรุจังหวัดนราธิวาสยังเป็นแหล่งที่ตรวจพบเชื้อราที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี ดังนั้นพื้นที่ดังกล่าวจึงมีความน่าสนใจที่จะใช้เป็นแหล่งศึกษาเกี่ยวกับสารจากธรรมชาติ โดยเฉพาะการหาสารใหม่ที่สามารถนำมาพัฒนาเป็นยาต้นแบบ (lead compound) ในการรักษาโรคต่างๆต่อไป

อุปสรรคสำคัญในการศึกษาสารจากกลุ่มเชื้อราคือ การมีสารสกัดปริมาณน้อยถึงแม้จะเลี้ยงเพิ่มปริมาณมากแล้วก็ตาม ทำให้ประสบปัญหาในการแยก ดังนั้นสามารถแก้ปัญหาได้โดยการเลี้ยงปริมาณมากๆ เพื่อให้ได้สารสกัดเริ่มต้นก่อนแยกสารบริสุทธิ์ในปริมาณที่เพียงพอในการแยกในลำดับถัดๆไป จนได้สารบริสุทธิ์หรือการใช้เครื่องมือที่ทันสมัยในการแยกสารปริมาณน้อยๆ ในอนาคต

อนึ่งงานวิจัยชิ้นนี้ได้ตีพิมพ์เผยแพร่ผลงานทางวิชาการในวารสารระดับนานาชาติ ในฐานข้อมูล Web of Science 2 ฉบับ (ภาคผนวก) ดังนี้:

- **Dej-adisai, S.\***, Basow, N., Wattanapiromsakul, C., Nuankaew, W., Kang, T.H. (2021) Effect of isolated soil fungi from Sirindhorn Peat Swamp Forest Narathiwat province, Thailand on tyrosinase enzyme and melanin content. *Chiang Mai Journal of Science*, 48(1): 27-41.
- **Dej-adisai, S.\***, Kaewchutima, N., Wattanapiromsakul, C. & Phoopha, S. (2021) Biological activities and chemical profiles of selected soil fungi isolated from Sirindhorn Peat Swamp Forest of Narathiwat, Thailand. *Sains Malaysiana*. 50(9): 2563-2577.

## เอกสารอ้างอิง

- Battaini G., Monzani E., Casella L., Santagostini L., and Pagliarin R. 2000. Inhibition of the catecholase activity of biomimetic dinuclear copper complexes by kojic acid. **J. Biol. Inorg. Chem.** 5 (2): 262-268
- Chan J.O.T., Arsianti A., Marcelia M., Wijoyo S.J., Fadilah F., and Putrianingsih R. 2018. Synthesis and anticancer effect of 3, 4, 5-N-alkyl-benzamides on colon carcinoma HCT-116 cells. **Orient. J. Chem.** 34 (3): 1362-1367.
- Choudhary M.I., Shah S.A.A., Khan S.N., and Khan M.T.H. 2010. Alpha-glucosidase and tyrosinase inhibitors from fungal hydroxylation of tibolone and hydroxytibolones. **Steroids.** 75 (12): 956-966.
- Cui H., Liu Y., Nie Y., Liu Z., Chen S., Zhang Z., Lu Y., He L., Huang X. and She Z. 2016. Polyketides from the mangrove-derived endophytic fungus *Nectria* sp. HN001 and their  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity. **Mar. Drugs**, 14(5): 86-94.
- Dej-adisai S. and Pitakbut T. 2015. Determination of  $\alpha$  -glucosidase inhibitory activity from selected Fabaceae plants. **Pak. J. Pharm. Sci.** 8 (5):1679-1683.
- Dewi R.T., Tachibana S. and Darmawan A. 2014. Effect on  $\alpha$  -glucosidase inhibition and antioxidant activities of butyrolactone derivatives from *Aspergillus terreus* MC751. **Med. Chem. Res.**, 23(1): 454-460.
- Fatmawati S., Shimizu K. and Kondo R. 2011. Ganoderol B: A potent  $\alpha$  -glucosidase inhibitor isolated from the fruiting body of *Ganoderma lucidum*. **Phytomed.**, 18(12): 1053-1055.
- Huang H., Feng X., Xiao Z., Liu L., Li H., Ma L., Lu Y., Ju J., She Z. and Lin Y. 2011. Azaphilones and *p*-terphenyls from the mangrove endophytic fungus *Penicillium chermesinum* (ZH4-E2) isolated from the South China Sea. **J. Nat. Prod.**, 74(5): 997-1002.
- IDF Diabetes Atlas update, 2013 [cited 2014 Nov 1]. Available from: <http://www.idf.org/diabetesatlas/introduction/summary>
- Ingavat N., Dobereiner J., Wiyakrutta S., Mahidol C., Ruchirawat S. and Kittakoop P. 2009. Aspergillusol A, an alpha-glucosidase inhibitor from the marine-derived fungus *Aspergillus aculeatus*. **J. Nat. Prod.**, 72(11): 2049-2052.
- Kang H.S., Jin H.C., Won K.C., Jong C.P., and Jae S.C. 2004. A sphingolipid and tyrosinase inhibitors from the fruiting body of *Phellinus linteus*. **Arch. Pharm. Res.** 27 (7): 742–750.
- Kim Y.J. and Uyama H. 2005. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. **Cell. Mol. Life Sci.** 62 (15): 1707–1723.
- Kim Y.K., Nam A.K., Kurihara H. and Kim M.S. 2008. Potent  $\alpha$ -glucosidase inhibitors purified from the red algae *Grateloupia elliptica*. **Phytochem.** 60. 2820–2825.

- Kim Y.K., Nam A.K., Kurihara H. and Kim M.S. 2008. Potent  $\alpha$ -glucosidase inhibitors purified from the red alga *Grateloupia elliptica*. **Phytochem.**, 60: 2820–2825.
- Kim Y.J. and Uyama H. 2005. Review tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future, **Cell. Mol. Life Sci.**, 62: 1707-1723.
- Lee S., Ullah S., Park C., Lee H.W., Kang D., Yang J. and Moon H.R. 2019. Inhibitory effects of N-(acryloyl) benzamide derivatives on tyrosinase and melanogenesis. **Bioorg. Med. Chem.** 27 (17): 3929-3937.
- Lee S.H., Choi S.H., Kim H., Hwang J.S., Lee B.G., Gao J.J. and Kim, S.Y. 2002. Mulberroside F isolated from the leaves of *Morus alba* inhibits melanin biosynthesis, **Biol. Pharm. Bull.**, 25(8): 1045-1048.
- Likhitwitayawuid, K. 2008. Stilbenes with tyrosinase inhibitory activity, **Curr. Sci.**, 94(1): 44-52.
- Likhitwitayawuid K. and Sritularak, B. 2001. A new dimeric stilbene with tyrosinase inhibitory activity from *Artocarpus gomezianus*, **J. Nat. Prod.**, 64: 1457-1459.
- Liu Y., Chen S., Liu Z., Lu Y., Xia G., Liu H., He L. and She Z. 2015. Bioactive metabolites from mangrove endophytic fungus *Aspergillus* sp. 16-5B. **Mar. Drugs**, 13(5): 3091-3102.
- Lorian V. 2005. *Antibiotics in Laboratory Medicine*, Lippincott Williams & Wilkins.
- Lu R., Liu X., Gao S., Zhang W., Peng F., Hu F. and Li, Z. 2014. New tyrosinase inhibitors from *Paecilomyces gunnii*. **J. Agric. Food Chem.** 62 (49): 11917–11923.
- Radhakrishnan N., Phil M., Gnanamani A. and Sadulla S. 2005. Effect of licorice (*Glycyhrriza glabra* Linn.), a skin-whitening agent on black molly (*Poecilia latipinna*), **J. of Appl. Cosmetol.**, 23(4):149-158.
- Riley P.A. 1993. Mechanistic aspects of the control of tyrosinase activity, **Pigment Cell Res.**, 6: 182-185.
- Rungprom W., Siripornvisal S. and Lianthong S. 2009. Alpha-glucosidase inhibitor from *Morina oleifera* Lamk. **Thai J. Agric. Sci.** 40(Suppl.): 49-52.
- Rungprom W., Siripornvisal, S., and Lianthong, S. 2009.  $\alpha$ -glucosidase inhibitor from *Moringa oleifera* Lamk. **Thai J. Agri. Sci.**, 40 (Suppl.): 49-52.
- Sasaki K. and Yoshizaki F. 2002. Nobiletin as a tyrosinase inhibitor from the peel of *Citrus* fruit. **Biol. Pharm. Bull.** 25 (6): 806-808.
- Sasaki, K. and Yoshizaki, F. 2002. Nobiletin as tyrosinase inhibitor from the peel of *Citrus* fruit, **Biol. Pharm. Bull.**, 25(6): 806-808.
- Sharma V.K., Jinsuk C., Niti S., Miyoung C. and Sung-Yum S. 2004. *In vitro* anti-tyrosinase activity of 5-(hydroxymethyl)-2-furfural isolated from *Dictyophora indusiata*. **Phytother. Res.** 18 (10): 841–844.
- Shen X., Yongyun Z., Yongkai X., Jingfeng Z. and Hongbin Z. 2016. Total synthesis of dimeric HPI alkaloids. **Nat. Prod. Bioprospect.** 6 (2): 117–139.

- Sritularak B., De-eknamkul W. and Likhitwitayawuid K. 1998. Tyrosinase inhibitors from *Artocarpus lakoocha*. **Thai J. Pharm. Sci.**, 22(4): 149-155.
- Sun K., Ye L., Lei G., Yi W., Peipei L. and Weiming Z. 2014. Indole diterpenoids and isocoumarin from the fungus, *Aspergillus flavus*, isolated from the prawn, *Penaeus vannamei*. **Mar. Drugs** 12 (7): 3970–3981.
- Tengamnuay, P., Pengrungruangwong, K., Pheansri, I., and Likhitwitayawuid, K. 2006. *Artocarpus lakoocha* heartwood extract as a novel cosmetic ingredient: evaluation of the *in vitro* anti-tyrosinase and *in vivo* skin whitening activities. **Int. J. Cosmet. Sci.**, 28: 269–276.
- Tryznowski M., Żółtek-Tryznowska Z., Świdarska A. and Parzuchowski P.G. 2016. Synthesis, characterization and reactivity of a six-membered cyclic glycerol carbonate bearing a free hydroxyl group. **Green Chem.** 18 (3): 802-807.
- Uchida R., Seiko I. and Hiroshi T. 2014. Inhibition of tyrosinase activity and melanine pigmentation by 2-hydroxytyrosol. **Acta Pharm. Sin. B.** 4 (2): 141–145.
- Visagie C.M., Houbraken J., Frisvad J.C., Hong S.B., Klaassen C.H.W., Perrone G., Seifert K.A., Varga J., Yaguchi T. and Samson R.A. 2014. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. **Stud. Mycol.** 78: 343-371.
- Visagie C.M., Houbraken J., Rodrigues C., Silva P.C., Dijksterhuis J., Seifert K.A., Jacobs K., Samson R.A. 2013. Five new *Penicillium* species in section *Sclerotiora*: a tribute to the Dutch Royal family. **Persoonia.** 31:42-62.
- Walker J.M., Winder J.S. and Kellam S.J. 1995. High-throughput microtiter plate-based chromogenic assays for glycosidase inhibitors. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 38. 141-146.
- Walker, J.M., Winder, J.S., and Kellam, S.J. 1995. High-Throughput Microtiter Plate-Based Chromogenic Assays for Glycosidase Inhibitors. **App. Biochem. and Biotech.**, 38. 141-146.
- Wang K., Bao L., Xiong W., Ma K., Han J., Wang W., Yin W. and Liu H. 2015. Lanostane triterpenes from the Tibetan medicinal mushroom *Ganoderma leucocontextum* and their Inhibitory effects on HMG-CoA reductase and  $\alpha$ -glucosidase. **J. Nat. Prod.**, 78(8): 1977-1989.
- Xia X., Qi J., Liu Y., Jia A., Zhang Y., Liu C., Gao C. and She Z. 2015. Bioactive isopimarane diterpenes from the fungus, *Epicoccum* sp. HS-1, associated with *Apostichopus japonicus*. **Mar. Drugs**, 13(3): 1124-1132.
- Ying Y.M., Zhang L.Y., Zhang X., Bai H.B., Liang D.E., Ma L.F., Shan W.G. and Zhan Z.J. 2014. Terpenoids with alpha-glucosidase inhibitory activity from the submerged culture of *Inonotus obliquus*. **Phytochem.**, 108: 171-176.

- You Q., Chen F., Wang X., Luo P.G. and Jiang Y. 2011. Inhibitory effects of muscadine anthocyanins on  $\alpha$ -glucosidase and pancreatic lipase activities. **J. Agric. Food Chem.** 59. 9506–9511.
- You Q., Chen F., Wang X., Luo P.G. and Jiang Y. 2011. Inhibitory Effects of muscadine anthocyanins on  $\alpha$ -Glucosidase and pancreatic lipase activities. **J. Agri. And Food Chem.** 59: 9506–9511.

## ประวัติและผลงานวิจัยที่สำคัญของนักวิจัย

### 1. หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อ-สกุล: ผศ.ดร. สุกัญญา เดชอดิศัย  
(Assist.Prof.Dr. Sukanya Dej-adisai)

หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน: 3 9005 00045 35 2

### ประวัติการศึกษา

วุฒิ	สาขา	สถาบัน	ประเทศ	ปีที่จบ
Dr.rer.nat	Pharmaceutical Biology	Ruprecht-Karls- Universitaet Heidelberg	สหพันธ์สาธารณรัฐ เยอรมนี	2548
ภ.ม.	เภสัชเวช	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ไทย	2541
ภ.บ.	เภสัชศาสตร์ (เกียรตินิยมอันดับ 2)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	ไทย	2539

ตำแหน่งบริหาร: หัวหน้าภาควิชาเภสัชเวชและเภสัชพฤกษศาสตร์ (พฤศจิกายน 2550 - สิงหาคม 2559)

กรกฎาคม 2563) หัวหน้าภาควิชาเภสัชเวชและเภสัชพฤกษศาสตร์ (พฤศจิกายน 2560 - 17

ปัจจุบัน) หัวหน้าสาขาวิชาเภสัชเวชและเภสัชพฤกษศาสตร์ (18 กรกฎาคม 2563 -

ตำแหน่งปัจจุบัน: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สาขาวิชาเภสัชเวชและเภสัชพฤกษศาสตร์  
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

### ภาควิชา/คณะ/หน่วยงาน

สาขาวิชาเภสัชเวชและเภสัชพฤกษศาสตร์  
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์  
อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา 90112

### โทรศัพท์/โทรสาร/e-mail

โทรศัพท์ 074-288888, 086-9687822  
โทรสาร 074-288891  
E-mail: sukanya.d@psu.ac.th

### Publications:

- Itharat, A., Sungkarak, S., **Dej-adisai, S.**, and Eng, S. (1997) Stability of *Aloe Vera* powder and *Aloe Vera* powder with diluent by hemagglutination titration. . *Songklanakarinn Journal of Science and Technology*, 19:437-443.

- **Dej-adisai, S. \* (1997)** Quinone from roots of *Prismatomeris sessiliflora* and *Diospyros montana* (Master thesis, Master of Science in Pharmacy (Pharmacognosy)), Graduate School, Chulalongkorn University.
- Likhitwitayawuid, K., **Dej-adisai, S.**, Jongbunprasert, V., Krungkrai, J. (1999) Antimalarials from *Stephania venosa*, *Prismatomeris sessiliflora*, *Diospyros montana* and *Murraya siamensis*. *Planta Medica*, 65:754-756.
- Tewtrakul, S., Miyashiro, H., Nakamura, N., Hattori, M., Kawahata, T., Otake, T., Yoshinaga, T., Fujiwara, T., Supavita, T., Yuenyongsawad, S., Rattanasuwon, P., **Dej-adisai, S. (2001)** HIV-1 integrase inhibitory substances from *Coleus parvifolius*. *Phytotherapy Research*, 17:232-239.
- Keawpradub, N., **Dej-adisai, S.**, and Yuenyongsawad, S. (2005) Antioxidant and cytotoxic activities of Thai medicinal plants named Khaminkhruea: *Arcangelisia flava*, *Coscinium blumeum* and *Fibraurea tinctoria*. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 27 (Suppl. 2): 455-467.
- ดวงทิพย์ อรัญดร สร้อย แซ่ลิ้ม สิรินทิพย์ วิชญวรนนท์ อภิญัฐ คล้ายสถิต และ **สุกัญญา เดชอดิศจัย** การศึกษาการปนปลอมของสารสเตียรอยด์ เพรดนิโซโลนและเด็กซ่าเมทธาโซนในยาแผนโบราณ ในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา (Study on adulteration of steroids, prednisolone and dexamethasone in Traditional Thai medicines in Hat-Yai, Songkhla) **วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ** ปีที่13 ฉบับที่ 1 (มกราคม – มิถุนายน 2553). หน้า 20-30.  
(Dounghthip Arandorn, Sareeya Saelim, Sirinthip Vitchayavoranan, Apinat Klaysatit, **Sukanya Dej-adisai\***. (2010) Study on adulteration of steroids, prednisolone and dexamethasone in Traditional Thai medicines in Hat-Yai, Songkhla. *Thaksin University Journal*, 13(1): 20-30.)
- ดาเรศ พรหมสวัสดิ์ นงลักษณ์ มหาวิจิตร พรพิมล นิลบวร และ **สุกัญญา เดชอดิศจัย**ฤทธิ์ต้านเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเตอเรสของพิกัดยาในการแพทย์แผนไทย **วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ** ปีที่15 ฉบับที่ 2 (กรกฎาคม – ธันวาคม 2555). หน้า 34-43.  
(Daret Phromswat, Nongluck Mahawijit, Pornpimon Nilborworn and **Sukanya Dej-adisai\***. (2012) Anti-acetylcholinesterase activity of traditional Thai herbal combination medicines. *Thaksin University Journal*, 15(2): 34-43.)
- นุรฮายานา โต๊ะเก็ง มาริณี ปลาปง อารีนา ดาราบากอ อัสมัน ดือลอง และ**สุกัญญา เดชอดิศจัย\*** ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของผลิตภัณฑ์สมุนไพรทำให้ผิวขาว **วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ** ปีที่15 ฉบับที่ 2 (กรกฎาคม – ธันวาคม 2555). หน้า 44-51.  
(Nurhayana Tohkeng, Marinee Plapong, Arina Darabakor, Azman Delong and **Sukanya Dej-adisai\***. (2012) Anti-tyrosinase activity of herbal whitening products. *Thaksin University Journal*, 15(2): 44-51.)
- Joycharat, N., Thammavong, S., Limsuwan, S., Homlaead, S., Voravuthikunchai, S.P., Yingyongnarongkul, B., **Dej-adisai, S.**, Subhadhirasakul, S. (2013) Antibacterial

- substances from *Albizia myriophylla* wood against cariogenic *Streptococcus mutans*. *Archives of Pharmacal Research*, 36(6): 723-730.
- **Dej-adisai, S.\***, Meechai, I., Puripattavong, J., and Kummee, S. (2014) Antityrosinase and antimicrobial activities from Thai medicinal plants. *Archives of Pharmacal Research*, 37(4): 473-483.
  - **Dej-adisai, S.\***, Tinpun, K., Wattanapiromsakul, C., Keawpradub, N. (2015) Bio-activities and Phytochemical investigation of *Cnestis palala* (Lour.) Merr. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines*, 12(3): 27-37. (<http://dx.doi.org/10.4314/ajtcam.v12i3.3>)
  - **Dej-adisai, S.\***, Pitakbut, T. (2015) Determination of  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity from selected Fabaceae plants. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28(5): 1679-1683.
  - **Dej-adisai, S.\***, Parndaeng, K. and Wattanapiromsakul, C. (2016) Determination of phytochemical compounds, and tyrosinase inhibitory and antimicrobial activities of bioactive compounds from *Streblus ilicifolius* (S Vidal) Corner. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 15 (3): 497-506.
  - **Dej-adisai, S.\***, Pitakbut, T. and Wattanapiromsakul, C. (2017) Alpha–glucosidase inhibitory activity and phytochemical investigation of *Borassus flabellifer* Linn. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 11(3): 45-52.
  - **Dej-adisai, S.\***, Phoopha, S., Puripattavong, J. (2018) Phytochemical investigation and bioactivities of *Alternanthera ramosissima* (Mart.) Chodat and Hassl. *Pharmacognosy Magazine*, 14(57): S346-S351.
  - **Dej-adisai, S.\***, Parndaeng, K., and Wattanapiromsakul, C., Nuankaew, W., Kang, T.H. (2019) Effects of selected Moraceae plants on tyrosinase enzyme and melanin content. *Pharmacognosy Magazine*, 15(65): 708-714.
  - Ruanglertboon, W., Kumarnsit, E., **Dej-adisai, S.**, Vongvatcharanon, U., Udomuksorn, W.\* (2019) The neuroprotective effect of *Nasturtium officinale* on learning ability and density of parvalbumin neurons in the hippocampus of neurodegenerative-induced mice model. *Sains Malaysiana*. 48(10): 2191-2199. (<http://dx.doi.org/10.17576/jsm-2019-4810-15>).
  - Phoopha, S., Wattanapiromsakul, C., Pitakbut, T, **Dej-adisai, S.\*** (2020) A new stilbene derivative and isolated compounds from *Bauhinia pottsii* var. *pottsii* with their anti-alpha-glucosidase activity. *Pharmacognosy Magazine*. 16(68): S161-S167  
DOI: 10.4103/pm.pm\_433\_19
  - Phoopha, S., Wattanapiromsakul, C., Pitakbut, T, **Dej-adisai, S.\*** (2020) Chemical constituents of *Litsea elliptica* and their alpha-glucosidase inhibition with molecular docking. *Pharmacognosy Magazine*. 16(70): S327-S334.

- **Dej-adisai, S.\***, Basow, N., Wattanapiromsakul, C., Nuankaew, W., Kang, T.H. (2021) Effect of isolated soil fungi from Sirindhorn Peat Swamp Forest Narathiwat province, Thailand on tyrosinase enzyme and melanin content. *Chiang Mai Journal of Science*, 48(1): 27-41.
- Nuankaew, W., Heemman, A., Wattanapiromsakul, C., Shim, J.H., Kim N.W., Yasmin, T., Jeong, S.Y., Nam, Y.H., Hong, B.N., **Dej-adisai, S.**, Kang, T.H. (2021) Anti-insulin resistance effect of constituents from *Senna siamea* on zebrafish model, its molecular docking, and structure-activity relationships. *Journal of Natural Medicines*. (2021) 75:520–531.  
<https://doi.org/10.1007/s11418-021-01490-5>, Q3, IF 2.343
- **Dej-adisai, S.\***, Kaewchutima, N., Wattanapiromsakul, C. & Phoopha, S. (2021) Biological activities and chemical profiles of selected soil fungi isolated from Sirindhorn Peat Swamp Forest of Narathiwat, Thailand. *Sains Malaysiana*. 50(9): 2563-2577.
- **Dej-adisai, S.\***, Rais, I.R., Wattanapiromsakul, C., Pitakbut, T. (2021) Alpha-glucosidase inhibitory assay-screened isolation and molecular docking model from *Bauhinia pulla* active compounds. *Molecules*. 26, 5970. <https://doi.org/10.3390/molecules26195970>
- **Dej-adisai, S.\***, Rais, I.R., Wattanapiromsakul, C., Pitakbut, T. (2021) Phytochemical investigation of *Bauhinia winitii* based on alpha-glucosidase inhibitory effect and molecular docking affirmation. *Pharmacognosy Magazine*. (Accepted).

\* Corresponding author

#### Poster presentation:

- The wound-induced effects of methyjasmonate on quinolizidine alkaloids accumulation in Fabaceous species. **The fifth Princess Chulabhorn international science congress: Evolving genetics and its global impact**, August 16-20, 2004 Bangkok, Thailand.
- Anti-tyrosinase and anti-microbial activities from the root of *Artocarpus integer*. **การนำเสนอผลงานวิจัยแห่งชาติ 2553** (Thailand Research Expo 2010 ), 26-30 สิงหาคม 2553 ณ ศูนย์ประชุมบางกอกคอนเวนชันเซ็นเตอร์ เซ็นทรัลเวิลด์ ราชประสงค์ กรุงเทพมหานคร.
- Monographs of *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle and citronella oil. **การนำเสนอผลงานวิจัยแห่งชาติ 2553** (Thailand Research Expo 2010 ), 26-30 สิงหาคม 2553 ณ ศูนย์ประชุมบางกอกคอนเวนชันเซ็นเตอร์ เซ็นทรัลเวิลด์ ราชประสงค์ กรุงเทพมหานคร.
- Screening of cytotoxic activity against human cancer cells from *Alternanthera* sp. (Amaranthaceae) extract. **The 2<sup>nd</sup> Current Drug Development 2012 (CDD2012)**, 2<sup>nd</sup> – 4<sup>th</sup> May 2012. at the Phuket Graceland Resort & Spa, Phuket, Thailand.
- Screening of anti-tyrosinase and anti-microbial activities of Thai Plants from Rajjaprabha Dam in Surat Thani Province. **The 2<sup>nd</sup> Current Drug Development 2012 (CDD2012)**, 2<sup>nd</sup> – 4<sup>th</sup> May 2012. at the Phuket Graceland Resort & Spa, Phuket, Thailand.

- Screening of anti-tyrosinase and anti-microbial activities of Fabaceae plants. **The 3<sup>rd</sup> Current Drug Development 2014 (CDD2014)**, 1<sup>st</sup>-3<sup>rd</sup> May 2014. At the Pavilion Queen's Bay Krabi, Ao Nang Beach, Krabi, Thailand.
- Screening of selected Thai medicinal plants in anti- $\alpha$ -glucosidase activity. **The 3<sup>rd</sup> Current Drug Development 2014 (CDD2014)**, 1<sup>st</sup>-3<sup>rd</sup> May 2014. At the Pavilion Queen's Bay Krabi, Ao Nang Beach, Krabi, Thailand.
- Investigation of alpha-glucosidase inhibitory activity of isolated soil fungi from Sirindhorn peat swamp forest, Narathiwat, Thailand. **The 6<sup>th</sup> Current Drug Development International Conference (CDD 2020)**, 10<sup>th</sup>-12<sup>th</sup> September 2020 At Lee Gardens Plaza Hotel, Hat-Yai, Songkhla, Thailand.
- Investigation of tyrosinase inhibitory activity of isolated soil fungi from Sirindhorn swamp forest Narathiwat Thailand. **The 6<sup>th</sup> Current Drug Development International Conference (CDD 2020)**, 10<sup>th</sup>-12<sup>th</sup> September 2020 At Lee Gardens Plaza Hotel, Hat-Yai, Songkhla, Thailand.
- Phytochemical investigation and alpha glucosidase inhibitory activity of *Lepionurus sylvestris* Blume leaves extract. **The 6<sup>th</sup> Current Drug Development International Conference (CDD 2020)**, 10<sup>th</sup>-12<sup>th</sup> September 2020 At Lee Gardens Plaza Hotel, Hat-Yai, Songkhla, Thailand.

#### Oral presentation:

- **Antityrosinase and antimicrobial activities from Thai medicinal plants.** Aceh International Pharmacy Conference 2013 in Banda Aceh, Indonesia (September, 12<sup>th</sup>-16<sup>th</sup>, 2013), invited speaker.
- Determination of  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity from selected Fabaceae plants **The 8th International Seminar of the Asian Network of Research on Antidiabetes Plants (ANRAP 2015)**, Shah Alan, Selangor, Malaysia, November, 23-25<sup>th</sup> 2015
- **Alpha-glucosidase inhibitory activity and phytochemical investigation of *Borassus flabellifer* Linn.** International Conference on Contemporary Science and Clinical Pharmacy (ICCSCP 2017) at Grand Inna Hotel, Padang-Indonesia and the guest of Andalas University, Padang, Indonesia, 9-14 November 2017, **keynote speaker (international conference)**.
- **Production of herbal medicine in Thailand: from research to market.** 54<sup>th</sup> National Seminar on Working group on Traditional Medicines and medicines in 2018 at Hotel Polonia, Medan -Indonesia, 26<sup>th</sup>-27<sup>th</sup> April 2018, **plenary lecture**, (guest of Faculty of Pharmacy, Sumatera Utara).
- **Bioactivity of Thai Traditional Medicine (TTM).** Summer Course on "Translating Jamu, Indonesian Herbal Medicine: from Ancient Knowledge to Evidence - Based Medicine". 5<sup>th</sup> -

18<sup>th</sup> August 2018, **giving lecture**, (7<sup>th</sup> August 2018), Faculty of Pharmacy, Universitas Gadjah Mada Indonesia.

- **Determination of alpha-glucosidase inhibitory activity from Korean ginseng-Thai herbal mixture tea.** 12<sup>th</sup> International Symposium on Ginseng, 2018; “Ginseng, A Super Nutraceutical”. Seoul, Korea, October 23-26, 2018 (<http://www.ginsengsymposium.org/>), hosted by The Korean Ginseng Society, **invited speaker (international conference)**.
- **Herbal medicines used for Covid-19 in Thailand.** Virtual Course on Herbal Medicines as Supportive Therapies for COVID-19 in Various Countries. March 6<sup>th</sup>-7<sup>th</sup>, 2021; hosted by Faculty of Pharmacy Universitas Ahmad Dahlan, Indonesia, **invited speaker (international conference)**.

**Research area:** Phytochemistry, Bioassay, Plant defense mechanism, Toxic plant, Biological activities of natural products (เช่น Anti-tyrosinase activity, Anti-microbial activity, Anti-alpha glucosidase activity เป็นต้น)

## 2. ผู้ร่วมวิจัย

ชื่อ – นามสกุล (ภาษาไทย) นายฉัตรชัย วัฒนากิริมย์สกุล  
(ภาษาอังกฤษ) Mr. Chatchai Wattanapiromsakul

ตำแหน่งทางวิชาการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์

เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3841500073234

หน่วยงานที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก

สาขาวิชาเภสัชเวชและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

จังหวัดสงขลา รหัสไปรษณีย์ 90112

โทรศัพท์ - โทรสาร 074-288891

e-mail: chatchai.w@psu.ac.th

## ประวัติการศึกษา

พ.ศ.	วุฒิปริญญา	สาขาวิชา	สถาบัน
2545	Doctor of Philosophy	Phytochemistry	Southern Cross U., Australia
2538	เภสัชศาสตรมหาบัณฑิต	เภสัชเวช	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2535	เภสัชศาสตรบัณฑิต	เภสัชศาสตร์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สาขาวิชาที่เชี่ยวชาญ Phytochemistry

## ผลงานวิจัย

- (1) Tungcharoen P, **Wattanapiromsakul C**, Tansakul P, Nakamura S. Matsuda H, Tewtrakul S. Anti-inflammatory effect of isopimarane diterpenoids from *Kaempferia galanga*. *Phytother Res* 2020; 34(3):612–623.
- (2) Kara J, Suwanhom P, **Wattanapiromsakul C**, Nualnoi T, Puripattanavong J, Khongkow P, Lee VS, Gaurav A, Lomlim L. Synthesis of 2-(2-oxo-2H-chromen-4-yl)acetamides as

- potent acetylcholinesterase inhibitors and molecular insights into binding interactions. Arch Pharm Chem Life Sci. 2019; 352(7):1800310.
- (3) Surapanthanakorn S, **Wattanapiromsakul C**, Reanmongkol W. Assessment of the anti-inflammatory activity of piceatannol-rich extract from *Senna garrettiana* heartwood. Chiang Mai J Sci 2018; 45(7):2691-2702.
  - (4) Tungcharoen P, **Wattanapiromsakul C**, Tansakul P, Nakamura S, Matsuda H, Tewtrakul S. Antiinflammation constituents from *Curcuma zedoaroides*. Phytother Res 2018; 32(11):2313-2320.
  - (5) Surapanthanakorn S, Phadoongsombut N, **Wattanapiromsakul C**, Reanmongkol W. In vivo evaluation of analgesic and antipyretic activities of piceatannol-rich extract from *Senna garrettiana* heartwood. Songklanakarin J Sci Technol 2017; 39(5):589-599.
  - (6) Amad S, Yuenyongsawad S, **Wattanapiromsakul C**. Investigation of antitubercular and cytotoxic activities of fruit extract and isolated compounds from *Piper retrofractum* Vahl. Walailak J Sci Technol 2017; 14(9):731-739.
  - (7) Petrat W, **Wattanapiromsakul C**, Nualnoi T, Sabri NH, Lee, VS, Lomlim L. Cholinesterase inhibitory activity, kinetic and molecular docking studies of N-(1-substituted-1H-1,2,3-triazole-4-yl)-aralkylamide derivatives. Walailak J Sci Technol 2017; 14(9):687-701.
  - (8) Kaewkroek K, **Wattanapiromsakul C**, Matsuda H, Nakamura S, Tewtrakul, S. Anti-inflammatory activity of compounds from *Kaempferia marginata* rhizomes. Songklanakarin J Sci Technol 2017; 39(1):91-99.
  - (9) Bunluepuech K, Tewtrakul S, **Wattanapiromsakul C**. Anti-HIV-1 protease activity of compounds from *Cassia garrettiana*. Walailak J Sci Technol 2016; 13(10):827-835.
  - (10) Bunkrongcheap R, Inafuku M, Oku H, Hutadilok-Towatana N, **Wattanapiromsakul C**, Sermwittayawong D. Lipid-lowering effects of hexane fraction of ivy gourd (*Coccinia grandis* L. Voigt) root in mice fed a high-fat diet. Walailak J Sci Technol 2016; 13(10):815-825.
  - (11) Chaniad P, **Wattanapiromsakul C**, Pianwanit S, Tewtrakul S. Anti-HIV-1 integrase compounds from *Dioscorea bulbifera* and molecular docking study. Pharm Biol 2016; 54(6):1077-1085.
  - (12) Sudsai T, **Wattanapiromsakul C**, Tewtrakul S. Wound healing property of isolated compounds from *Boesenbergia kingii* rhizomes. J Ethnopharmacol 2016; 184:42-48.
  - (13) Chaniad P, **Wattanapiromsakul C**, Pianwanit S, Tewtrakul S. Inhibitors of HIV-1 integrase from *Dioscorea bulbifera*. Songklanakarin J Sci Technol 2016; 38(3):229-236.
  - (14) Dej-adisai S, Parndaeng K, **Wattanapiromsakul C**. Determination of phytochemical compounds, and tyrosinase inhibitory and antimicrobial activities of bioactive compounds from *Streblus ilicifolius* (S. Vidal) Corner. Trop J Pharm Res 2016; 15(3):497-506.

- (15) Tungcharoen P, Sudsai T, Leejae S, **Wattanapiromsakul C**, Tansakul P, Tewtrakul S. Wound healing activity of *Curcuma zedoaroides*. Songklanakarin J Sci Technol 2016; 38(6):621-630.
- (16) Panthong P, Bunluepuech K, Boonnak N, Chaniad P, Pianwanit S, **Wattanapiromsakul C**, et al. Anti-HIV-1 integrase activity and molecular docking of compounds from *Albizia procera* bark. Pharm Biol 2015; 53(12):1861-1866.
- (17) Dej-adisai S, Tinpun K, **Wattanapiromsakul C**, Keawpradub N. Bio-activities and phytochemical investigation of *Cnestis palala* (Lour.) merr. Afr J Trad Complement Altern Med 2015; 12(3):27-37.
- (18) Issuriya A, Kumarnsit E, **Wattanapiromsakul C**, Vongvatcharanon U. Histological studies of neuroprotective effects of *Curcuma longa* Linn. on neuronal loss induced by dexamethasone treatment in the rat hippocampus. Acta Histochem 2014; 116(8):1443-1453.
- (20) Sudsai T, Prabpai S, Kongsaree P, **Wattanapiromsakul C**, Tewtrakul S. Anti-inflammatory activity of compounds from *Boesenbergia longiflora* rhizomes. J Ethnopharmacol 2014; 154(2):453-461.
- (21) Bunkrongcheap R, Hutadilok-Towatana N, Noipha K, **Wattanapiromsakul C**, Inafuku M, Oku H. Ivy gourd (*Coccinia grandis* L. Voigt) root suppresses adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. Lipids Health Dis 2014; 13(1):88.
- (22) Yuenyongsawad S, Bunluepuech K, **Wattanapiromsakul C**, Tewtrakul S. Anti-cancer activity of compounds from *Cassia garrettiana* heartwood. Songklanakarin J Sci Technol 2014; 36(2):189-194.
- (23) Bunluepuech K, **Wattanapiromsakul C**, Tewtrakul S. Anti-HIV-1 integrase activity of compounds from *Cassia garrettiana* heartwood. Songklanakarin J Sci Technol 2013; 35(6):665-669.
- (24) Bunluepuech K, **Wattanapiromsakul C**, Madaka F, Tewtrakul S. Anti-HIV-1 integrase and anti-allergic activities of *Bauhinia strychnifolia*. Songklanakarin J Sci Technol 2013; 35(6):659-664.
- (25) Yuenyongsawad S, Bunluepuech K, **Wattanapiromsakul C**, Tewtrakul S. Anti-cancer activity of compounds from *Bauhinia strychnifolia* stem. J Ethnopharmacol 2013; 150(2):765-769.
- (26) Sudsai T, **Wattanapiromsakul C**, Nakpheng T, Tewtrakul S. Evaluation of the wound healing property of *Boesenbergia longiflora* rhizomes. J Ethnopharmacol 2013; 150(1):223-231.
- (27) Sudsai T, **Wattanapiromsakul C**, Tewtrakul S. Inhibition of nitric oxide production by compounds from *Boesenbergia longiflora* using lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophage cells. Songklanakarin J Sci Technol 2013; 35(3):317-323.

- (28) Madaka F, **Wattanapiromsakul C**, Sudsai T, Tewtrakul S. Anti-allergic activity of compounds from *Boesenbergia thorelii*. Songklanakarin J Sci Technol 2013; 35(2):197-201.
- (29) Kaewkroek K, **Wattanapiromsakul C**, Kongsaree P, Tewtrakul S. Nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha inhibitory substances from the rhizomes of *Kaempferia marginata*. Nat Pro Comm 2013; 8(9):1205-1208.
- (30) Amnuakit T, Phadungkarn T, **Wattanapiromsakul C**, Boonme P. Formulation development of antibacterial films containing mangosteen peel extract. Res J Pharm Technol 2012; 5(8):1058-1065.
- (31) Chanthathamrongsiri N, Yuenyongsawad S, **Wattanapiromsakul C**, Plubrukarn A. Bifunctionalized amphilectane diterpenes from the sponge *Stylissa* cf. *massa*. J Nat Prod 2012; 75(4):789-792.
- (32) Bunluepuech K, Sudsai T, **Wattanapiromsakul C**, Tewtrakul S. Inhibition on HIV-1 integrase activity and nitric oxide production of compounds from *Ficus glomerata*. Nat Pro Comm 2011; 6(8):1095-1098.
- (33) Tantithanaporn S, **Wattanapiromsakul C**, Itharat A, Keawpradub N. Cytotoxic activity of acetogenins and styryl lactones isolated from *Goniothalamus undulatus* Ridl. Root extracts against a lung cancer cell line (COR-L23). Phytomedicine 2011; 18(6):486-490.
- (34) Kaewkroek K, **Wattanapiromsakul C**, Tewtrakul S. Anti-inflammatory mechanisms of compounds from *Curcuma mangga* rhizomes using RAW264.7 macrophage cells. Nat Pro Comm 2010; 5(10):1547-1550.
- (35) Hutadilok-Towatana N, Reanmongkol W, **Wattanapiromsakul C**, Bunkrongcheap R. Acute and subchronic toxicity evaluation of the hydroethanolic extract of mangosteen pericarp. J Med Plant Res 2010;4(10):969-974.
- (36) Kaewkroek K, **Wattanapiromsakul C**, Tewtrakul S. Nitric oxide inhibitory substances from *Curcuma mangga* rhizomes. Songklanakarin J Sci Technol 2009; 31(3):293-297.
- (37) **Wattanapiromsakul C**, Chanthathamrongsiri N, Bussarawit S, Yuenyongsawad S, Plubrukarn A, Suwanborirux K. 8-Isocyanoamphilecta-11(20),15-diene, a new antimalarial isonitrile diterpene from the sponge *Ciocalapata* sp. Can J Chem 2009; 87(5):612-618.
- (38) Yodhnu S, Sirikatitham A, **Wattanapiromsakul C**. Validation of LC for the Determination of  $\alpha$ -Mangostin in mangosteen peel extract: A tool for quality assessment of *Garcinia mangostana* L. J Chromatogr Sci 2009; 47(3):185-189.
- (39) Tewtrakul S, **Wattanapiromsakul C**, Mahabusarakam W. Effects of compounds from *Garcinia mangostana* on inflammatory mediators in RAW264.7 macrophage cells. J Ethnopharmacol 2009; 121(3):379-382.

- (40) Reanmongkol W, **Wattanapiromsakul C**. Evaluation of the analgesic, antipyretic and anti-inflammatory activities of the extracts from the pericarp of *Garcinia mangostana* Linn. in experimental animals. *Songklanakarin J Sci Technol* 2008; 30(6):739-745.
- (41) Phongpaichit S, Uddhakul V, Subhadhirasakul S, **Wattanapiromsakul C**. Evaluation of the antimycobacterial activity of extracts from plants used as self-medication by AIDS patients in Thailand. *Pharm Biol* 2006; 44(1):71-75.
- (42) Phongpaichit S, Subhadhirasakul S, **Wattanapiromsakul C**. Antifungal activities of extracts from Thai medicinal plants against opportunistic fungal pathogens associated with AIDS patients. *Mycoses* 2005; 48(5):333-338.
- (43) **Wattanapiromsakul C**, Forster PI, Waterman PG. Alkaloids and limonoids from *Bouchardatia neurococca*: Systematic significance. *Phytochemistry* 2003; 64(2):609-615.
- (44) **Wattanapiromsakul C**, Waterman PG. Flavanone, triterpene and chromene derivatives from the stems of *Paramignya griffithii*. *Phytochemistry* 2000; 55(3):269-273.

# ภาคผนวก



# Effect of Isolated Soil Fungi from Sirindhorn Peat Swamp Forest Narathiwat Province, Thailand on Tyrosinase Enzyme and Melanin Content

Sukanya Dej-adisai\*[a], Nasrin Basow [a], Chatchai Wattanapiromsakul [a], Wanlapa Nuankaew [b] and Tong Ho Kang [b]

[a] Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Prince of Songkla University, Hat-Yai, Songkhla 90112, Thailand.

[b] Graduate School of Biotechnology, Department of Oriental Medicinal Biotechnology, College of Life Sciences, Kyung Hee University, Gyeonggi-do, 17104, Republic of Korea.

\*Author for correspondence; e-mail: sukanya.d@psu.ac.th

Received: 28 May 2020

Revised: 7 July 2020

Accepted: 8 July 2020

## ABSTRACT

Tyrosinase is the most important enzyme that can approach towards controlling melanin production for hyperpigmentation treatment. The 104 samples were extracted from 54 fungi which were isolated from organic soil at Sirindhorn peat swamp forest, Narathiwat province, Thailand. They were screened on tyrosinase inhibition. From the results, four samples as SPSF318BE, SPSF011BE, SPSF318CE and SPSF045BE showed the potent tyrosinase inhibitory activity with more than 50% at 20 µg/ml. Their tyrosinase inhibitions were  $78.83 \pm 2.72\%$ ,  $75.80 \pm 2.65\%$ ,  $72.45 \pm 3.55\%$  and  $58.04 \pm 1.46\%$ , respectively. While positive controls as the water extract of *Artocarpus lakoocha* wood and kojic acid could inhibit this enzyme with  $94.26 \pm 0.65\%$  and  $80.18 \pm 0.84\%$ , respectively. The most active sample was selected for further study, the fungus SPSF318 was identified by using molecular method as *Aspergillus flavus*. The crude extracts of *A. flavus* were evaluated for inhibition of cellular tyrosinase, melanin synthesis on B16F1 melanoma cells, pigmentation inhibitory effects on zebrafish, antioxidant and anti-microbial activities against *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. In addition, *A. flavus* has to further study of chemical constituents in order to figure out the active compound which might be the lead compound for whitening agent. Therefore, isolated soil fungi in this area could be considered as good sources of various bioactive natural products, especially, to identify new inhibitor with drug-like properties on tyrosinase enzyme activity.

**Keywords:** fungal extracts, biological activities, anti-tyrosinase activity, *Aspergillus flavus*, Sirindhorn Peat Swamp Forest

## 1. INTRODUCTION

Human skin color occurs from the epidermis where the pigment producing cells, melanocytes, produce melanin [1]. Melanin plays a crucial role

in protecting the skin against harmful effects from ultraviolet (UV) and oxidative stress from various environmental pollutants [2]. However, the

accumulation of melanin in keratinocyte due to the overexpression of tyrosinase leads to various dermatological disorders such as melasma, age spots, and sites of actinic damage [3]. Fungi are universal sources of various bioactive metabolites. A number of these fungal metabolites have found significant commercial medicinal success, such as penicillin, cyclosporine, and lovastatin [4-5]. During recent years, many new secondary metabolites have been reported, and several compounds exhibited interesting biological activities such as anti-bacterial, anti-malarial, anti-oxidant, and anti-proliferation against NCI-H187 and KB cells, COX-2 inhibitory, cytotoxic against HL-60, BEL-7402 and A-549 cell lines, and HMG-CoA reductase inhibitory activities [6-7]. In addition, many tyrosinase inhibitors were isolated from fungi for example kojic acid. This compound could be produced by species of *Penicillium* and *Aspergillus* [8]. 6 $\beta$ -Hydroxytibolone and 10 $\beta$ -hydroxy-4-tibolone were isolated from *Rhizopus stolonifer* while paecilomyces A, B and C were isolated from *Paecilomyces gunnii* [9]. Thus, to seek the anti-tyrosinase inhibitor from fungi is interesting to provide a new source of active compounds from nature to treat pigmentation disorder. This study was initiated to screen the anti-tyrosinase, anti-inflammatory, and cytotoxic activity against human breast adenocarcinoma, human gingival fibroblasts cells and anti-acetylcholinesterase of 104 crude extracts from fifty-four isolate cultures which classified into two genera based on their morphology. The crude extracts which showed potential effects were selected for further study in B16F1 melanoma cells, intracellular anti-tyrosinase activity and melanin content. In addition, their pigmentation inhibitory effects on zebrafish were studied.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Fungal Material

Soil fungi were isolated from Sirindhorn peat swamp forest's organic soil in Narathiwat Province, Thailand. The genus of these fungi was identified

by morphological characteristics and deposited at the Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University. The most effective sample on anti-tyrosinase activity screening tests was further identified the species by molecular method appertaining to an analysis of their ITS sequences by BIOTEC, Thailand.

### 2.2 Culture Conditions and Extractions

The soil fungi were cultured on potato dextrose agar incubated at 25 °C for 5 days. Five pieces of mycelial agar plugs were inoculated into flasks that contained 250 ml potato dextrose broth (PDB; per liter involved potato water, 200 ml, distilled water, 800 ml, and glucose, 20 g) incubated for 3 weeks. Broth media were filtered to divide the broth media and mycelia cell and most of them were extracted with ethyl acetate [Table 1]. All broth media from selected fungus were extracted with ethyl acetate and were divided into two parts which were broth ethyl acetate (BE) and broth water (BW) after evaporation until they were dried using a rotary evaporator. The mycelia cells were macerated with methanol for two days, after that the methanol layer was partition with hexane to obtained hexane extract (CH). Then the remaining methanol layer after discharged the hexane part was further partition with ethyl acetate to obtain two extracts as methanol extract (CM) and ethyl acetate extract (CE). Finally, all extracts were evaporated until dried and were kept at 4°C until examination.

### 2.3 Biological Activity Assays

#### 2.3.1 Determination of tyrosinase inhibition and melanin content

##### 2.3.1.1 Extracellular experiment: anti-tyrosinase activity

The anti-tyrosinase activity was evaluated according to Dej-adisai *et al.* 2014 [10] using the dopachrome method with L-Dopa as a substrate. All samples were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO). The reaction mixture (200  $\mu$ l) contained with 140  $\mu$ l of phosphate buffer (20 mM, pH 6.8),

**Table 1.** Tyrosinase inhibitory activity at concentration 20 µg/ml of fungal extracts from Sirindhorn Peat Swamp Forest Nature Research and Study Center Narathiwat province, Thailand.

No.	Fungal isolate number	Sample code*	Fungal identification by morphological characteristics	% Tyrosinase inhibition ± SD at concentration 20 µg/ml
1.	SPSF001	SPSF001BE	<i>Trichoderma</i> sp.	9.23±2.81
2.	SPSF002	SPSF002BE	Unidentified species	41.42±3.61
3.	SPSF003	SPSF003BE	<i>Aspergillus</i> sp.	-2.80±3.44
4.	SPSF004	SPSF004BE	Unidentified species	13.57±4.95
5.	SPSF005	SPSF005BE	<i>Aspergillus</i> sp.	7.00±6.84
6.	SPSF006	SPSF006BE	Unidentified species	8.41±8.41
7.	SPSF007	SPSF007BE	<i>Gongronella</i> sp.	2.95±3.24
8.	SPSF008	SPSF008BE	<i>Gongronella</i> sp.	-2.99±5.53
9.	SPSF009	SPSF009BE	<i>Aspergillus</i> sp.	45.91±7.53
10.	SPSF010	SPSF010BE	<i>Trichoderma</i> sp.	30.14±2.16
<b>11.</b>	<b>SPSF011</b>	<b>SPSF011BE</b>	<b><i>Penicillium</i> sp.</b>	<b>75.80±2.65</b>
12.	SPSF012	SPSF012BE	<i>Trichoderma</i> sp.	5.86±6.54
13.	SPSF013	SPSF013BE	<i>Trichoderma</i> sp.	11.64±1.62
14.	SPSF028	SPSF028BE	<i>Penicillium</i> sp.	-2.21±6.37
15.	SPSF029	SPSF029BE	<i>Penicillium</i> sp.	5.5±4.50
16.	SPSF030	SPSF030BE	<i>Penicillium</i> sp.	10.00±3.96
17.	SPSF031	SPSF031BE	<i>Penicillium</i> sp.	15.04±5.29
18.	SPSF032	SPSF032BE	<i>Penicillium</i> sp.	13.65±1.57
19.	SPSF033	SPSF033BE	<i>Penicillium</i> sp.	5.64±4.71
20.	SPSF034	SPSF034BE	<i>Penicillium</i> sp.	3.50±1.26
21.	SPSF035	SPSF035BE	<i>Penicillium</i> sp.	-4.26±3.93
22.	SPSF037	SPSF037BE	<i>Penicillium</i> sp.	-18.95±2.99
23.	SPSF038	SPSF038BE	<i>Penicillium</i> sp.	23.12±4.82
24.	SPSF039	SPSF039BE	<i>Penicillium</i> sp.	5.5±4.60
25.	SPSF040	SPSF040BE	<i>Penicillium</i> sp.	-13.86±4.03
26.	SPSF042	SPSF042BE	<i>Penicillium</i> sp.	24.47±1.91
27.	SPSF043	SPSF043BE	<i>Penicillium</i> sp.	24.49±2.73
28.	SPSF044	SPSF044BE	<i>Penicillium</i> sp.	18.04±2.63
<b>29.</b>	<b>SPSF045</b>	<b>SPSF045BE</b>	<b><i>Penicillium</i> sp.</b>	<b>58.04±1.46</b>
30.	SPSF046	SPSF046BE	<i>Penicillium</i> sp.	14.65±1.78
31.	SPSF047	SPSF047BE	<i>Penicillium</i> sp.	14.94±2.83
32.	SPSF048	SPSF048CE	<i>Penicillium</i> sp.	5.05±0.22

\* BE = Broth ethyl acetate extract; BW = Broth water extract;  
CE = Cell ethyl acetate extract; CH = Cell hexane extract; CM = Cell methanol extract.

**Table 1.** (Continued).

No.	Fungal isolate number	Sample code*	Fungal identification by morphological characteristics	% Tyrosinase inhibition $\pm$ SD at concentration 20 $\mu$ g/ml
33.	SPSF049	SPSF049BW	<i>Penicillium</i> sp.	4.51 $\pm$ 2.35
34.	SPSF051	SPSF051BW	<i>Penicillium</i> sp.	6.24 $\pm$ 3.40
35.	SPSF206	SPSF206CM	<i>Penicillium</i> sp.	10.48 $\pm$ 4.53
36.	SPSF206	SPSF206BE	<i>Penicillium</i> sp.	27.18 $\pm$ 2.53
37.	SPSF208	SPSF208BE	<i>Aspergillus</i> sp.	7.39 $\pm$ 4.50
38.	SPSF208	SPSF208CE	<i>Aspergillus</i> sp.	-3.78 $\pm$ 2.84
39.	SPSF208	SPSF208CH	<i>Aspergillus</i> sp.	-3.25 $\pm$ 3.56
40.	SPSF209	SPSF209CE	<i>Penicillium</i> sp.	-13.64 $\pm$ 1.26
41.	SPSF209	SPSF209BE	<i>Penicillium</i> sp.	6.51 $\pm$ 1.71
42.	SPSF209	SPSF209BW	<i>Penicillium</i> sp.	-24.20 $\pm$ 1.87
43.	SPSF211	SPSF211CE	<i>Penicillium</i> sp.	5.62 $\pm$ 3.89
44.	SPSF211	SPSF211BE	<i>Penicillium</i> sp.	6.45 $\pm$ 2.87
45.	SPSF213	SPSF213BE	<i>Penicillium</i> sp.	22.09 $\pm$ 3.88
46.	SPSF219	SPSF219BE	<i>Penicillium</i> sp.	-32.06 $\pm$ 2.45
47.	SPSF221	SPSF221CE	<i>Penicillium</i> sp.	18.95 $\pm$ 5.54
48.	SPSF221	SPSF221CH	<i>Penicillium</i> sp.	30.18 $\pm$ 3.91
49.	SPSF221	SPSF221BE	<i>Penicillium</i> sp.	22.19 $\pm$ 3.03
50.	SPSF224	SPSF224BE	<i>Penicillium</i> sp.	22.17 $\pm$ 1.54
51.	SPSF224	SPSF224CE	<i>Penicillium</i> sp.	-3.75 $\pm$ 1.68
52.	SPSF225	SPSF225CE	<i>Penicillium</i> sp.	19.55 $\pm$ 1.45
53.	SPSF225	SPSF225BE	<i>Penicillium</i> sp.	8.10 $\pm$ 4.19
54.	SPSF226	SPSF226BE	<i>Penicillium</i> sp.	0.46 $\pm$ 4.19
55.	SPSF226	SPSF226CE	<i>Penicillium</i> sp.	4.10 $\pm$ 1.13
56.	SPSF226	SPSF226CH	<i>Penicillium</i> sp.	30.88 $\pm$ 1.27
57.	SPSF227	SPSF227BE	<i>Penicillium</i> sp.	11.61 $\pm$ 2.77
58.	SPSF227	SPSF227CE	<i>Penicillium</i> sp.	5.07 $\pm$ 1.52
59.	SPSF227	SPSF227BW	<i>Penicillium</i> sp.	-7.96 $\pm$ 1.62
60.	SPSF243	SPSF234CE	<i>Penicillium</i> sp.	8.10 $\pm$ 4.19
61.	SPSF234	SPSF234BE	<i>Penicillium</i> sp.	-1.22 $\pm$ 3.08
62.	SPSF234	SPSF234BW	<i>Penicillium</i> sp.	-47.56 $\pm$ 2.36
63.	SPSF236	SPSF236BE	<i>Penicillium</i> sp.	24.43 $\pm$ 5.01
64.	SPSF236	SPSF236CE	<i>Penicillium</i> sp.	11.55 $\pm$ 1.39
65.	SPSF238	SPSF238CE	<i>Penicillium</i> sp.	1.11 $\pm$ 0.89

\* BE = Broth ethyl acetate extract; BW = Broth water extract;  
CE = Cell ethyl acetate extract; CH = Cell hexane extract; CM = Cell methanol extract.

Table 1. (Continued).

No.	Fungal isolate number	Sample code*	Fungal identification by morphological characteristics	% Tyrosinase inhibition $\pm$ SD at concentration 20 $\mu$ g/ml
66.	SPSF240	SPSF240BE	<i>Penicillium</i> sp.	36.63 $\pm$ 1.88
67.	SPSF240	SPSF240CE	<i>Penicillium</i> sp.	17.83 $\pm$ 4.89
68.	SPSF240	SPSF240CH	<i>Penicillium</i> sp.	11.70 $\pm$ 3.53
69.	SPSF241	SPSF241BE	<i>Penicillium</i> sp.	-2.47 $\pm$ 1.79
70.	SPSF244	SPSF244CE	<i>Penicillium</i> sp.	13.92 $\pm$ 4.20
71.	SPSF244	SPSF244BE	<i>Penicillium</i> sp.	12.51 $\pm$ 1.55
72.	SPSF248	SPSF248CH	<i>Penicillium</i> sp.	17.78 $\pm$ 4.13
73.	SPSF248	SPSF248CE	<i>Penicillium</i> sp.	6.23 $\pm$ 3.60
74.	SPSF248	SPSF248BE	<i>Penicillium</i> sp.	4.15 $\pm$ 2.98
75.	SPSF250	SPSF250BE	<i>Penicillium</i> sp.	-4.19 $\pm$ 2.30
76.	SPSF304	SPSF304BE	<i>Penicillium</i> sp.	22.76 $\pm$ 2.35
77.	SPSF304	SPSF304CH	<i>Penicillium</i> sp.	-9.09 $\pm$ 1.49
78.	SPSF304	SPSF304BW	<i>Penicillium</i> sp.	-3.05 $\pm$ 1.46
79.	SPSF310	SPSF310BE	<i>Penicillium</i> sp.	0.29 $\pm$ 3.10
80.	SPSF310	SPSF310CE	<i>Penicillium</i> sp.	4.57 $\pm$ 2.92
81.	SPSF310	SPSF310BW	<i>Penicillium</i> sp.	10.21 $\pm$ 1.15
82.	SPSF312	SPSF312BE	<i>Penicillium</i> sp.	35.05 $\pm$ 2.55
83.	SPSF312	SPSF312CE	<i>Penicillium</i> sp.	-22.36 $\pm$ 3.58
<b>84.</b>	<b>SPSF318</b>	<b>SPSF318BE</b>	<b><i>Aspergillus</i> sp.</b>	<b>78.83<math>\pm</math>2.72</b>
<b>85.</b>	<b>SPSF318</b>	<b>SPSF318CE</b>	<b><i>Aspergillus</i> sp.</b>	<b>72.45<math>\pm</math>3.55</b>
86.	SPSF325	SPSF325BE	<i>Penicillium</i> sp.	26.81 $\pm$ 4.71
87.	SPSF325	SPSF325CE	<i>Penicillium</i> sp.	7.31 $\pm$ 3.17
88.	SPSF325	SPSF325CH	<i>Penicillium</i> sp.	0.06 $\pm$ 4.45
89.	SPSF328	SPSF328BE	<i>Penicillium</i> sp.	27.41 $\pm$ 3.50
90.	SPSF329	SPSF329BE	<i>Penicillium</i> sp.	12.26 $\pm$ 3.79
91.	SPSF329	SPSF329CE	<i>Penicillium</i> sp.	5.28 $\pm$ 1.96
92.	SPSF329	SPSF329CH	<i>Penicillium</i> sp.	2.02 $\pm$ 4.68
93.	SPSF330	SPSF330BE	<i>Aspergillus</i> sp.	16.57 $\pm$ 4.92
94.	SPSF330	SPSF330CE	<i>Aspergillus</i> sp.	3.29 $\pm$ 2.62
95.	SPSF339	SPSF339BE	<i>Penicillium</i> sp.	9.96 $\pm$ 2.36
96.	SPSF339	SPSF339CE	<i>Penicillium</i> sp.	2.90 $\pm$ 1.79
97.	SPSF339	SPSF339BW	<i>Penicillium</i> sp.	4.58 $\pm$ 2.58
98.	SPSF347	SPSF347BE	<i>Penicillium</i> sp.	-1.02 $\pm$ 4.21

\* BE = Broth ethyl acetate extract; BW = Broth water extract;  
CE = Cell ethyl acetate extract; CH = Cell hexane extract; CM = Cell methanol extract.

**Table 1.** (Continued).

No.	Fungal isolate number	Sample code*	Fungal identification by morphological characteristics	% Tyrosinase inhibition $\pm$ SD at concentration 20 $\mu$ g/ml
99.	SPSF358	SPSF358BW	<i>Penicillium</i> sp.	6.21 $\pm$ 0.95
100.	SPSF358	SPSF358BE	<i>Penicillium</i> sp.	-5.49 $\pm$ 1.99
101.	SPSF358	SPSF358CE	<i>Penicillium</i> sp.	1.55 $\pm$ 0.82
102.	SPSF360	SPSF360BE	<i>Aspergillus</i> sp.	31.11 $\pm$ 2.97
103.	SPSF360	SPSF360CH	<i>Aspergillus</i> sp.	24.38 $\pm$ 1.71
104.	SPSF360	SPSF360BW	<i>Aspergillus</i> sp.	-34.93 $\pm$ 2.96
Std.	-	<i>A. lakoocha</i>	Positive standard	80.18 $\pm$ 0.84
Std.	-	Kojic acid	Positive standard	94.26 $\pm$ 0.65

\* BE = Broth ethyl acetate extract; BW = Broth water extract; CE = Cell ethyl acetate extract; CH = Cell hexane extract; CM = Cell methanol extract.

20  $\mu$ l of 20  $\mu$ g/ml fungal extract solution, 20  $\mu$ l of tyrosinase solution (Sigma-Aldrich, Germany; 203.30 units/ml) and 20  $\mu$ l of L-Dopa solution (0.85 mM). After the addition of L-Dopa, the reaction was immediately monitored at 492 nm by microplate reader for dopachrome formation in the reaction. Kojic acid (Fluka, Sigma-Aldrich, Germany) and water extract of *Artocarpus lakoocha* wood were utilized as an anti-tyrosinase standards for comparison.

### 2.3.1.2 Cell culture experiments

B16F1 murine melanoma cells were cultured in DMEM with 10% w/v fetal bovine serum in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> in air at 37°C. When cells obtained 70-80% confluence, cell viability, cellular tyrosinase activity and melanin content were measured [11-13].

#### 2.3.1.2.1 Determination of cell viability

Cell viability was evaluated by sulforhodamine B (SRB) assay [14-15] with slight modification. The B16F1 melanoma cells ( $5 \times 10^3$  cells/well) were seeded in a 96-well plate for 24 h. On the next day, the cells were treated with test samples. After 48 h incubation, cells were fixed with 10% trichloroacetic acid and kept at 4°C. After 1 h, cells

were stained with 0.45% SRB. Then, 10 mM Tris base was added onto the strained cells, and after that the SRB color was dissolved by shaking. The absorbance was determined at 492 nm. DMSO 0.5% was used as a negative control in this study.

#### 2.3.1.2.2 Intracellular anti-tyrosinase activity and melanin content assays

B16F1 melanoma cells were seeded in 12 well plates ( $3 \times 10^5$  cells/well) and incubated at 37°C for 12 h. Then, cells were treated with test samples, after 48 h incubation, cells were lysed with radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA buffer) and centrifuged 14,000 rpm for 20 min (4°C) to separate the supernatant.

#### Intracellular anti-tyrosinase activity

Cellular tyrosinase activity was determined by the Bradford method using bovine serum albumin as standard. The supernatant of lysate cells and 2 mg/ml L-Dopa in phosphate-buffered saline were added to 96-well plate. The mixture was incubated at 25°C for 1 h, and the absorbance was measured at 492 nm.

#### Melanin content

Cells were dissolved with 1 M NaOH and

incubated at 55°C for 1 h. and the absorbance was determined at 475 nm using microplate reader. Anti-melanin activity was expressed by the percentage of melanin content in crude extracts to that of untreated melanoma cells. Arbutin and kojic acid, a widely used whitening agent, were used as references.

### 2.3.1.3 *In vivo* study: Pigmentation inhibitory activity on zebrafish

Zebrafish was used to evaluate the pigmentation inhibitory effect. Briefly, embryos at 9 h postfertilization (hpf) were collected in 96-well plates, 20 embryos/well, filled with 0.03% sea salt solution 100 µl/well and each sample solution. 25 µM 1-phenyl-2-thiourea (PTU) was used as a positive control. Phenotype-based evaluations of body pigmentation were carried out at 72 hpf, after embryos hatched, the larvae were put on glass slides and embedded using 2% low melting agarose. The dorsal view of the zebrafish fry was photographed, and the size of black spots in the head-dorsal region at 81 hpf was measured [16-17].

### 2.3.2 Anti-microbial assay

The agar disc diffusion method was used to determine the anti-microbial activity [18-19]. The samples were dissolved in DMSO and diluted to achieve a concentration of 200 mg/mL (2 mg/disc). The positive controls (antibiotics) included oxacillin (1 µg/disc) for testing of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Propionibacterium acnes*, norfloxacin (10 µg/disc) for *Pseudomonas aeruginosa*, vancomycin (30 µg/disc) for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), amphotericin B (25 µg/disc) for *Candida albicans* and ketoconazole (25 µg/disc) for testing of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes* and *Microsporium gypseum*.

### 2.3.3 Antioxidant activity (DPPH radical scavenging assay)

DPPH is a consistent free radical which has a blue color that could measure the absorbance at 515 nm. In the presence of antioxidant, it was

reduced to diphenyl-β-picrylhydrazine which is yellow in color. The DPPH radical scavenging assay estimates the capability of samples to donate hydrogen or scavenge free radicals by evaluating the absorption change spectrophotometrically [20-21]. 2 ml of stock solution was added into a vial, mixed well with 2 ml of 6x10<sup>-5</sup> M DPPH and incubated for 20 min. 2 ml of stock solution and ethanol were mixed and used as blank. 2 ml of 6x10<sup>-5</sup> M DPPH and ethanol were mixed and used as control. Measurement of absorbance at 520 nm using UV-vis spectrophotometers and the percentage of antioxidant activity was calculated by following equation 1:

$$\% \text{ inhibition} = \left[ \frac{\text{OD blank} - \text{OD control}}{\text{OD blank}} \right] \times 100$$

Equation 1

## 2.4 Determination of Chemical Contents

### 2.4.1 Determination of total phenolic content

Total phenolic content was evaluated using Folin-Ciocalteu method with some modifications [22]. The different concentrations of gallic acid (4 - 80 µg/ml) were used to provide the standard curve. 100 µl of each sample concentration was added into the vial. Then it was oxidized with 500 µl Folin-Ciocalteu reagent, and incubated for 3 minutes. The reaction was started by adding sodium carbonate (400 µl, 75 g/l) and the mixture was incubated in the dark at room temperature for 30 min until it was measured the absorbance at 765 nm. Total phenolic content was expressed as gallic acid equivalent (GAE)/g dry weight of sample by extrapolation of the gallic acid standard curve. The total phenolic content (mg/g) could be calculated by the following equation 2:

$$T = C \times DF \times (V/W)$$

Equation 2

T : Total phenolic content (mg/g)

C : The concentration of sample by

extrapolation from the gallic acid standard curve ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

DF : Dilution factor (50)

V : Volume of the extract solution ( $\mu\text{l}$ )

W : Weight of sample (mg)

#### 2.4.2 Determination of total flavonoid content

Total flavonoid was evaluated by Aluminum Chloride Colorimetric method [23]. 5 mg of quercetin was dissolved in 80 % ethanol and then diluted to 20, 40, 50, 80 and 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . The diluted standard solutions 500  $\mu\text{l}$  were separately mixed with 1,500  $\mu\text{l}$  of 95 % ethanol, 100  $\mu\text{l}$  of 10% aluminum chloride, 100  $\mu\text{l}$  of 1M potassium acetate and 2,800  $\mu\text{l}$  of distilled water. After 30 minutes, the absorbance was measured at 415 nm against a blank. The total flavonoid content was evaluated by using a standard curve from quercetin (20 - 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). The results showed in mg quercetin equivalent (QE)/g dry weight of sample.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1 Bioactivities of Soil Fungal Extracts

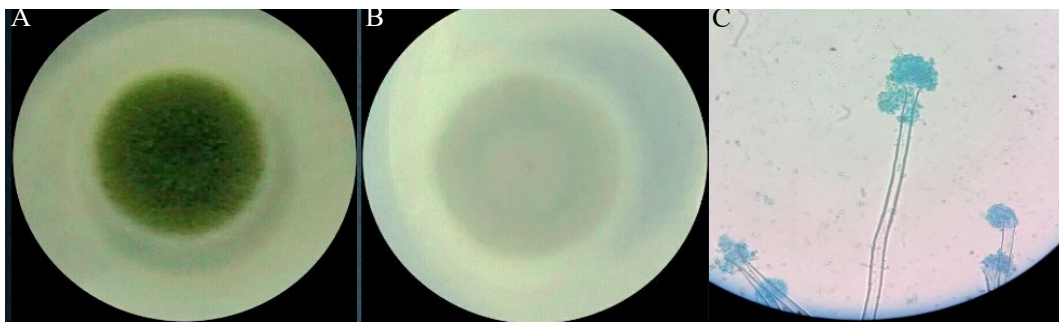
104 crude extracts from 54 fungi, consisting of *Penicillium* sp. (38 isolates), *Aspergillus* sp. (7 isolates), *Trichoderma* sp. (4 isolates), *Gongronella* sp. (2 isolates) and unidentified species (3 isolates) of fungi were screened on tyrosinase inhibition. From the results, four samples as SPSF318BE,

SPSF011BE, SPSF318CE and SPSF045BE showed the potent tyrosinase inhibition with more than 50% at 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Their tyrosinase inhibitions were as  $78.83 \pm 2.72\%$ ,  $75.80 \pm 2.65\%$ ,  $72.45 \pm 3.55\%$  and  $58.04 \pm 1.46\%$ , respectively. The ethyl acetate extracts from broth (BE) and mycelia (CE) of isolate SPSF318 displayed strong anti-tyrosinase activity (as shown in Table 1). Thus, the crude extracts of SPSF318 were selected for further study on biological activities for anti-hyperpigmentation by determination of tyrosinase inhibition and melanin content via *in vitro* and *in vivo* studies.

#### 3.2 Identification of the Selected Fungus

The fungus SPSF318 was isolated in pure culture from organic soil. The colony was green, granular, velvety, and had a white peripheral apron. The microscopic observation of the isolate revealed unbranched conidiophores arising from foot cells. The conidiophores were enlarged at the tip forming vesicle, and the vesicle was completely covered with phialides [Figure 1]. Based on these morphological and microscopic observations such as the color and margin of the colonies, structure of hyphae, and conidiophores, the isolate SPSF318 was as species of *Aspergillus*.

The fungus SPSF 318 was further identified based on an analysis of their ITS sequences by BIOTEC, Thailand. The genomic DNA was extracted from mycelia and sequencing of the



**Figure 1.** Morphological characteristics of the selected fungus, SFSF318, on PDA (A. Dorsal view, B. Ventral view, C. Microscopic characteristics).

ACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGTAGGGTTCCTAGCGAGCCCAACCTCCCACCCGTGTTTACTGTACCTTAGTTG  
 CTTCGGCGGGCCGCCATTCTGGCCGCGGGGGCTCTCAGCCCCGGCCCGCCGCGGAGACACCACGAACTCT  
 GTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCAT  
 CGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGTGAATTGCAGAATCCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACAT  
 TGCGCCCTTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTC  
 GTCGTCCCCTCCGGGGGGGACGGCCCAAAGGCAGCGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTG  
 TCACCCGCTCTGTAGGCCGCGCGCTTGCCGAACGCAAATCAATCTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG  
 GATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAG

**Figure 2.** Nucleotide region of ITS rDNA; Nucleotide sequence (5' -> 3') of SPSF318.

**Table 2.** Tyrosinase inhibitory activity of SPSF318 crude extracts at 20 µg/ml.

No.	Crude extracts	Sample code	% Tyrosinase inhibition ± SD
1.	Broth ethyl acetate	BE	78.83 ± 2.72
2.	Broth water	BW	48.33 ± 2.32
3.	Cell ethyl acetate	CE	72.45 ± 3.55
4.	Cell hexane	CH	-11.98 ± 1.23
5.	Cell methanol	CM	-9.10 ± 1.28
Std.	<i>A. lakoocha</i>	Positive standard	80.18 ± 0.84
Std.	Kojic acid	Positive standard	94.26 ± 0.65

rDNA ITS fragment, it showed 100 % similarity with the members of the genus *Aspergillus*. The nucleotide sequence data of SPSF318 [Figure 2], belongs to *Aspergillus flavus*.

### 3.3 Anti-tyrosinase Activity of SPSF318 Crude Extracts

Inhibitory effects of five crude extracts; BE, CE, CH, CM and BW on mushroom tyrosinase activity is illustrated in Table 2. At a concentration of 20 µg/ml, BE could inhibit tyrosinase enzyme as 78.83 ± 2.72% while the positive controls, kojic acid and water extract of *Artocarpus lakoocha* wood, could inhibit this enzyme with 80.18 ± 0.84% and 94.26 ± 0.65%, respectively.

### 3.4 Cytotoxicity Effect of SPSF318 Crude Extracts

The cell viability was determined by SRB assay. The results showed that BE, BW and CM crude extracts of *A. flavus* were not considered

cytotoxic after incubation of pigmented B16F1 melanoma cells. More than 80% of the cells were still viable at a dose 200 µg/ml. While CE and CH cell viability was more than 80% at concentrations of 50 µg/ml. At the same time, viable cells were decreased at 0.50% of DMSO which was used as a negative control.

### 3.5 Intracellular Anti-tyrosinase Activity and Melanin Content

The inhibitory effect of crude extracts was evaluated at nontoxic doses; 200 µg/ml excluding CE and CH were prepared at 50 µg/ml. After the incubation of pigmented melanoma B16F1 cells with all sample extracts, the supernatant was measured anti-tyrosinase activity. The results showed that the extracts from SPSF318 exhibited the significant reduction in cellular tyrosinase activity; furthermore, CH at 50 µg/ml showed tyrosinase inhibition as 52.15 ± 1.88 % while BE showed 66.18 ± 1.35% at 200 µg/ml. The

inhibition of tyrosinase enzyme led to a reduction in the number of melanin content as the results showed when they were compared with control that was without tyrosinase inhibition [Figure 3].

### 3.6 Pigmentation Inhibitory Activity on Zebrafish

Depigmentation effect of crude extracts from SPSF318 was observed on zebrafish embryos by measuring the size of the black spots. The results showed that at a concentration of 200 µg/ml crude extracts appeared significantly reduced pigmentation comparing with the untreated group [Figure 4a-4b] except CE and CH which showed toxicity to zebrafish embryos by the detection of coagulation of fertilize eggs, lack of somite formation, lack of detachment of the tail, and lack of heartbeat.

### 3.7 Anti-microbial Activity

Five crude extracts from SPSF318 were evaluated for their anti-microbial activity. The

results found that BE, CE and BW had anti-bacterial effect against gram-positive bacteria as shown in Table 3. The BE showed strong inhibitory effect against *S. aureus*, MRSA, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* and *E. coli* with inhibition zone  $13.75 \pm 0.70$ ,  $10.85 \pm 2.00$ ,  $15.10 \pm 0.74$ ,  $18.50 \pm 0.10$  and  $14.65 \pm 0.29$  mm, respectively.

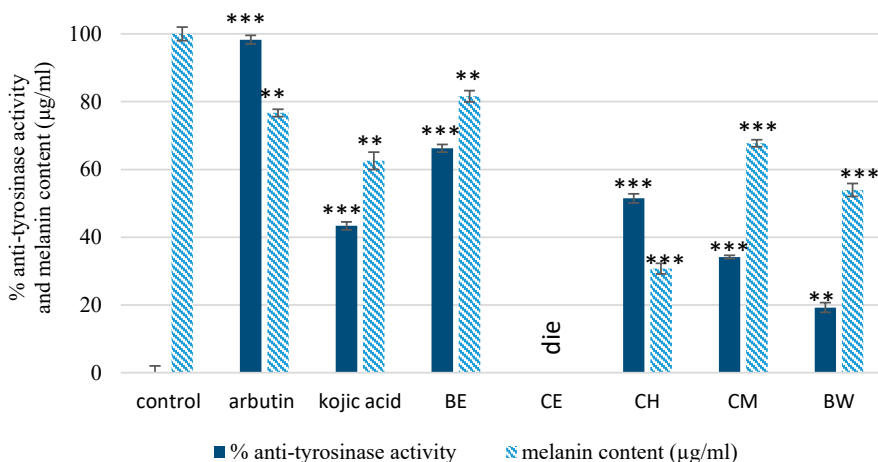
### 3.8 Antioxidant Activity

All five crude extracts showed some degree of antioxidant activity [Table 4]. The percentages of DPPH radical scavenging effect of each sample ranged from 2.40 % to 97.30 %. The BW showed the highest scavenging effect (97.30 %), followed by BE, CE, CH, and CM, respectively.

### 3.9 Chemical Contents

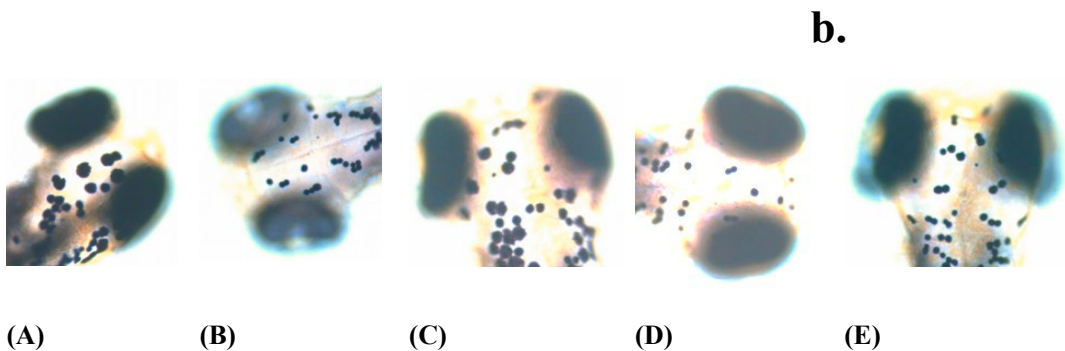
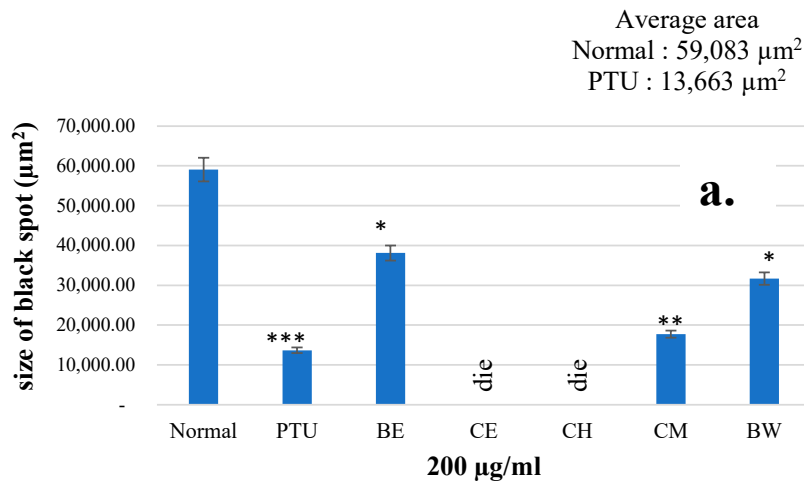
#### 3.9.1 Total phenolic content

In this study, total phenolic content in SPSF318 crude extracts was evaluated by the Folin-Ciocalteu procedure, quantified using a standard curve of gallic acid. Total phenolic content of SPSF318



**Figure 3.** The effects of SPSF318 crude extracts on intracellular anti-tyrosinase activity and melanin content on B16F1 melanoma cells. BE = Broth ethyl acetate extract; CE = Cell ethyl acetate extract; CH = Cell hexane extract; CM = Cell methanol extract; BW = Broth water extract. Arbutin and Kojic acid = positive controls.

Data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation from three independent experiments. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$  compared to the untreated control.



**Figure 4.** Pigmentation inhibitory effects on Zebrafish.

**a.** PTU (phenylthiourea) was used as positive control. Crude extracts from SPSF318: BE = Broth ethyl acetate extract; CE = Cell ethyl acetate extract; CH = Cell hexane extract; CM = Cell methanol extract; BW = Broth water extract. Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation from three independent experiments. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$  indicate a significant difference from the control group

**b.** Effect of melanogenic inhibitors on pigmentation in zebrafish embryos. Zebrafish pigmentation was evaluated using a microscope. (A) = A control group; untreated zebrafish embryos; (B) = PTU (phenylthiourea) as a positive control; (C, D, and E) = BE, CM and BW extracts of SPSF318, respectively.

**Table 3.** Anti-microbial activity of SPSF318 crude extracts at 2 mg/disc by agar disc diffusion method.

Microbes	Inhibition zone (mm)					
	Standard drugs*	BE	BW	CE	CH	CM
<b>Gram positive bacteria</b>						
<i>S. aureus</i>	23.05±0.85	13.75±0.70	13.50±0.85	8.45±0.86	-	-
MRSA	22.35±0.40	10.85±2.00	11.85±1.48	10.65±0.90	-	-
<i>S. epidermidis</i>	22.35±0.40	15.10±0.74	14.60±1.08	-	-	11.55±0.98
<i>P. acnes</i>	38.80±0.35	-	9.40±0.60	-	-	-
<b>Gram negative bacteria</b>						
<i>P. aeruginosa</i>	29.55±0.40	18.50±0.10	-	8.30±0.75	-	-
<i>E. coli</i>	23.30±0.45	14.65±0.29	19.20±0.10	8.15±0.75	-	-

\* Standard drugs: Norfloxacin for *P. aeruginosa* and *E. coli*, concentration 10 µg/disc. Oxacillin for *S. aureus*, *S. epidermidis* and *P. acnes*, concentration 1 µg/disc. Vancomycin for MRSA, concentration 30 µg/disc. BE = Broth ethyl acetate extract; BW = Broth water extract; CE = Cell ethyl acetate extract; CH = Cell hexane extract; CM = Cell methanol extract.

**Table 4.** DPPH radical scavenging activity of SPSF318 crude extracts.

No.	Sample	Scavenging effect (%) at 100 µg/ml
1.	BE	35.28±3.65
2.	BW	97.37±1.88
3.	CE	28.45±5.92
4.	CH	6.47±3.61
5.	CM	2.40±14.65
Positive standard	Ascorbic acid	116.14 ± 0.76

BE = Broth ethyl acetate extract; BW = Broth water extract; CE = Cell ethyl acetate extract; CH = Cell hexane extract; CM = Cell methanol extract.

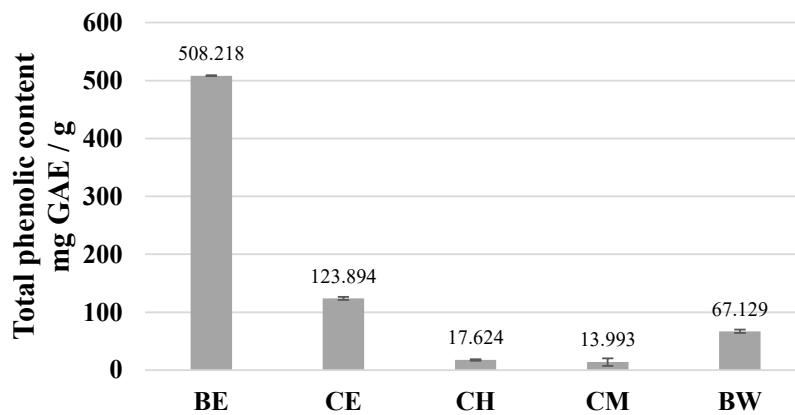
crude extracts was shown in Figure 5 which ranged from 508.46 mg GAE/g to 12.88 mg GAE/g. The maximum value of total phenolic content was observed to be 508.46 mg GAE/g of broth ethyl acetate (BE) and minimum value was demonstrated in the methanol extract of cell (CM) as 12.88 mg GAE/g.

### 3.9.2 Total flavonoid content

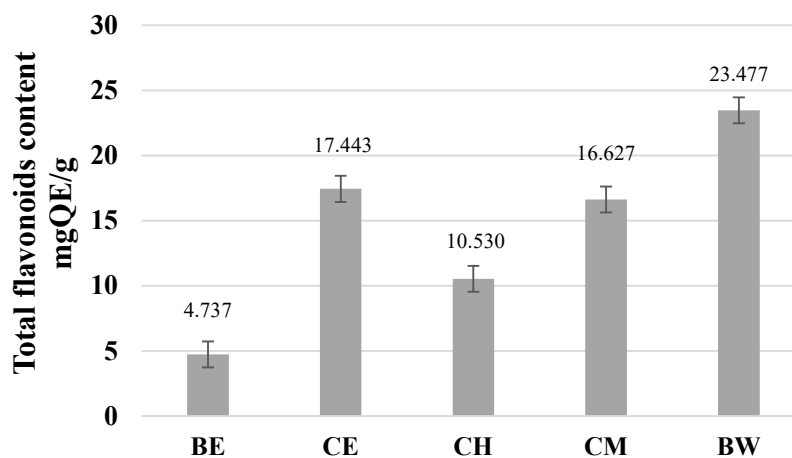
In this study, total flavonoid content was quantified by the aluminum chloride colorimetric assay; the total flavonoid content of the extracts was calculated using a quercetin standard curve.

The flavonoid content of BW was observed to be highest, that is 23.40 mg QE/g [Figure 6] whereas the flavonoid content in CE, CM, CH and BE was  $17.44 \pm 1.18$ ,  $16.62 \pm 1.00$ ,  $10.53 \pm 1.26$ , and  $4.73 \pm 0.84$ , respectively.

Since, crude extracts of *A. flavus* SPSF318 showed the potent tyrosinase inhibitory activity against tyrosinase enzyme both enzymatic and cellular assays. They also exhibited the inhibition of melanin synthesis on B16F1 melanoma cells. Incidentally, they also significantly reduced pigmentation on zebrafish. *Aspergillus* sp. is the fungal genus of greatest interesting for study



**Figure 5.** Total phenolic content (mg GAE/g) of five crude extracts from SPSF318. BE = Broth ethyl acetate extract; CE = Cell ethyl acetate extract; CH = Cell hexane extract; CM = Cell methanol extract; BW = Broth water extract.



**Figure 6.** Total flavonoids content (mg QE/g) of five crude extracts from SPSF318. BE = Broth ethyl acetate extract; CE = Cell ethyl acetate extract; CH = Cell hexane extract; CM = Cell methanol extract; BW = Broth water extract.

on biological activities, especially anti-tyrosinase activity because the members of this family have long been known to produce phenolic compounds of various structural types [15]. Since various reports have shown a close relationship between anti-tyrosinase activity and total phenolic content [24] then *Aspergillus* sp. will be the good choice for further study in order to figure out the active compound to be the anti-hyperpigment agent.

#### 4. CONCLUSIONS

A total of 104 crude extracts from 54 fungi, consisting of *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp., *Gongronella* sp. and unidentified fungal species were evaluated the biological activity on tyrosinase inhibition. The most active sample as SPSF318 was selected for further study. Then, the SPSF318 was identified by molecular method as *Aspergillus flavus*. *A. flavus* extracts showed high potential activity against tyrosinase enzyme on both intracellular and extracellular enzymatic assays by significantly reduced pigmentation on zebrafish. Furthermore, they showed moderate potential effect on antioxidant and antibacterial activities. Thus, *A. flavus* is potential fungus for further study of chemical constituents in order to figure out the active compound which might be the lead compound for whitening agent.

In addition, SPSF011BE and SPSF045BE which were identified by morphology as *Penicillium* sp. also exhibited tyrosinase inhibition. So, they are interesting for further study to seek the bioactive compounds from these species deeply. Therefore, fungal extracts isolated from organic soil in this area could be considered as good sources of various bioactive natural products, especially, to identify new inhibitor with drug-like properties on tyrosinase enzyme activity.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Prof. Dr. Souwalak Phongpaichit, Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University for supporting and identification of isolated

fungal samples in this study. The authors also would like to thank the financial support from the office of the Royal Development Projects Board (ORDPB) under The Royal Initiative of Her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn (RSPG project). The research was also supported by scholarship which supported tuition fees issued by the Discipline of Excellence in Pharmacy Project, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Prince of Songkla University.

#### CONFLICT OF INTEREST

There are no conflicts of interest.

#### REFERENCES

- [1] Chang T.S., *Materials*, 2012; **5**: 1661-1685. DOI 10.3390/ma5091661.
- [2] Chang T.S., *Int. J. Mol. Sci.*, 2009; **10**: 2440-2475. DOI 10.3390/ijms10104257.
- [3] Kim Y.J. and Uyama H., *Cell. Mol. Life Sci.*, 2005; **62**: 1707-1723. DOI 10.1007/s00018-005-5054-y.
- [4] Adrio J.L. and Demain A.L., *Int. Microbiol.*, 2003; **6(3)**: 191-199. DOI 10.1007/s10123-003-0133-0.
- [5] Raina S., De Vizio D., Palonen E.K., Odell M., Brandt A.M., Soini J.T. and Keshavarz T., *Process Biochem.*, 2012; **47(5)**: 843-852. DOI 10.1016/j.procbio.2012.02.021.
- [6] Phainuphong P., Rukachaisirikul V., Phongpaichit S., Sakayaroj J., Kanjanasirirat P., Borwornpinyo S. and Muanprasat C., *Tetrahedron*, 2018; **74**: 5691-5699. DOI 5691-99. 10.1016/j.tet.2018.07.059.
- [7] Phongpaichit S., Nikom J., Rungjindamai N., Sakayaroj J., Hutadilok-Towatana N., Rukachaisirikul V. and Kirtikara K., *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2007; **51**: 517-525. DOI 10.1111/j.1574-695X.2007.00331.x.
- [8] Loizzo M.R., Tundis R. and Menichini F., *Compr. Rev. Food. Sci. F.*, 2012; **11(4)**: 378-398.

- DOI 10.1111/j.1541-4337.2012.00191.x.
- [9] Zolghadri S., Bahrami A., Hassan Khan M.T., Munoz-Munoz J., Garcia-Molina F., Garcia-Canovas F. and Saboury A.A., *J. Enzym. Inhib. Med. Ch.*, 2019; **34(1)**: 279-309. DOI 10.1080/14756366.2018.1545767.
- [10] Dej-adisai S., Meechai I., Puripattanavong J. and Kummee S., *Arch. Pharm. Res.*, 2014; **37**: 473-483. DOI 10.1007/s12272-013-0198-z.
- [11] Lajis A., Basri M., Mohamad R., Hamid M., Ashari S., Ishak N. and Ariff A., *Chem Pap.*, 2013; **67**: 573-585. DOI 10.2478/s11696-013-0336-6.
- [12] Chang M.S., Choi M.J., Park S.Y. and Park S.K., *Phytother. Res.*, 2010; **24(9)**: 1359-1364. DOI 10.1002/ptr.3123.
- [13] Ye Y., Chou G.X., Mu D.D., Wang H., Chu J.H., Leung A.K., Fong W. and Yu Z., *J. Ethnopharmacol.*, 2010; **129**: 387-390. DOI 10.1016/j.jep.2010.04.009.
- [14] Skehan P., Storeng R., Scudiero D., Monks A., McMahon J., Vistica D., Warren J.T., Bpkesch H., Kenney S. and Boyd M.R., *J. Natl. Cancer Inst.*, 1990; **82**: 1107-1112. DOI 10.1093/jnci/82.13.1107.
- [15] Vanicha V. and Kanyawim K., *Nat. Protoc.*, 2006; **1(3)**: 1112-1116. DOI 10.1038/nprot.2006.179.
- [16] Lee Y.R., Park J.H., Molina R.C., Nam Y.H., Lee Y.G., Hong B.N., Baek N.I. and Kang T.H., *Arch. Dermatol. Res.*, 2018; **310**: 245-253. DOI 10.1007/s00403-018-1804-1.
- [17] Le H.T., Hong B.N., Lee Y.R., Cheon J.H., Kang T.H. and Kim T.W., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2016; **26**: 699-705. DOI 10.1016/j.bmcl.2015.09.059.
- [18] Lorian V., *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 5<sup>th</sup> Edn., Lippincott Williams and Wilkins, USA, 2005.
- [19] Dej-adisai S., Parndaeng K. and Wattanapiromsakul C., *Trop. J. Pharm. Res.*, 2016; **15**: 497-506. DOI 10.4314/tjpr.v15i3.10.
- [20] Ramamoorthy P.K. and Bono A., *J. Eng. Sci. Technol.*, 2007; **2(1)**: 70-80.
- [21] Ebrahimzadeh M.A., Pourmorad F. and Bekhradnia A.R., *Afr. J. Biotechnol.*, 2008; **7(18)**: 3188-3192.
- [22] Baba S.A. and Malik S.A., *J. Taibab Univ. Sci.*, 2005; **9**: 449-454. DOI 10.1016/j.jtusci.2014.11.001.
- [23] Chang C.C., Yang M.H., Wen H.M. and Chern J.C., *J. Food Drug Anal.*, 2002; **10(3)**: 178-182.
- [24] Prasad K.N., Yang B., Yang S., Chen Y., Zhao M., Ashraf M. and Jiang Y., *Food Chem.*, 2009; **116(1)**: 1-7. DOI 10.1016/j.foodchem.2009.01.079.

## Biological Activities and Chemical Profiles of Selected Soil Fungi Isolated from Sirindhorn Peat Swamp Forest of Narathiwat, Thailand

(Aktiviti Biologi dan Profil Kimia Kulat Tanah Terpilih yang Dipencilkan dari Hutan Paya Gambut Sirindhorn di Narathiwat, Thailand)

SUKANYA DEJ-ADISAI\*, NARISORN KAEWCHUTIMA, CHATCHAI WATTANAPIROMSAKUL & SATHIANPONG PHOOPHA

### ABSTRACT

*A total of 54 soil fungi were collected from Sirindhorn peat swamp forest in Narathiwat Province which is the last peat swamp forests in Thailand. They were extracted using four different solvents and 104 crude extracts were obtained. The bioactivity screening of these samples was done employing alpha-glucosidase inhibition, anti-inflammation using nitric oxide inhibition and cytotoxicity using cancer cell line (MCF-7). The results showed that SPSF224 crude extract had the best biological activities in the screening tests and was then selected for further study. The SPSF224 was identified as *Penicillium maximae*. The crude extracts of *P. maximae* were determined for chemical profile,  $IC_{50}$  value of alpha-glucosidase inhibition, antioxidant and antimicrobial activities against *Staphylococcus aureus*, *Trichophyton mentagrophytes*, and *T. rubrum*. This was the first report of chemical investigation and biological activity evaluation of *P. maximae*.*

*Keywords: Alpha-glucosidase inhibition; antidiabetic; anti-microbial; antioxidant; Penicillium maximae*

### ABSTRAK

*Sebanyak 54 kulat tanah telah dikumpulkan daripada hutan paya gambut Sirindhorn di Wilayah Narathiwat yang merupakan hutan paya gambut terakhir di Thailand. Kesemuanya diekstrak menggunakan empat pelarut yang berbeza dan 104 ekstrak kasar diperolehi. Penyaringan bioaktiviti sampel ini dilakukan dengan menggunakan aktiviti perencatan alfa-glukosidase, anti-radang menggunakan perencatan nitrik oksida dan sitotoksitas menggunakan titisan sel kanser (MCF-7). Hasil kajian menunjukkan bahawa ekstrak kasar SPSF224 mempunyai aktiviti biologi terbaik dalam ujian saringan dan kemudian dipilih untuk kajian lebih lanjut. SPSF224 dikenal pasti sebagai *Penicillium maximae*. Ekstrak kasar *P. maximae* ditentukan untuk profil kimia, nilai  $IC_{50}$  perencatan alfa-glukosidase, aktiviti antioksidan dan antimikrob terhadap *Staphylococcus aureus*, *Trichophyton mentagrophytes* dan *T. rubrum*. Ini adalah laporan pertama penyelidikan kimia dan penilaian aktiviti biologi *P. maximae*.*

*Kata kunci: Antidiabetik; antimikrob; antioksidan; Penicillium maximae; perencatan alfa-glukosidase*

### INTRODUCTION

Diabetes mellitus (DM) is a group of metabolic diseases characterised by hyperglycemia due to the lack of insulin secretion, action or both. DM is a major non-communicable disease or NCDs in the world. The number of people with diabetes worldwide between the ages of 20 and 79 in 2017 was 425 million peoples and will

be increased to 629 million by 2045 (WHO 2019). The Bureau of Non-Communicable Diseases, Ministry of Public Health, Thailand showed the statistics of diabetic patients per 100,000 population per year in Thailand in 2007 and 2015 were 500,347 and 802,017, respectively (Bureau of NCD 2019).

A defect in insulin production is the primary cause of rising blood sugar levels. Alpha-glucosidase enzyme is a key enzyme located at the brush border of the small intestine used for delaying blood glucose absorption which hydrolyses 1, 4 alpha-glycosidase bonds in the terminal position of the polysaccharide chain (Gao et al. 2008). The complex carbohydrates in the lumen of the small intestine have to be broken up by alpha-glucosidase before the resulting glucose molecules can be taken up and finally reach the bloodstream. Postprandial hyperglycemia can be improved by inhibition of small intestinal alpha-glucosidase activity (Hakamata et al. 2009). The drugs currently being used for hyperglycemia treatment by alpha-glucosidase inhibitory mechanism include miglitol (Kalra 2014), voglibose (Horii et al. 1986) and acarbose (Bischoff 1994) which have been initially isolated from microorganisms.

It is well known that long term DM is often associated with secondary complications due to over production of free radicals and malfunction of antioxidant process giving rise to increasing oxidative stress. From previous clinical studies, the results of antioxidant treatments showed that they could improve symptoms of diabetic polyneuropathy and increased glucose transport in skeletal muscle cells. The report also presented that the intake of antioxidant could reduce the risk of development on type 2 DM (Scott & King 2004).

Moreover, DM patients are susceptible to be infected with pathogens such as *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Mycobacterium tuberculosis*, and *Streptococcus pneumoniae* because their immune systems are weak (Casqueiro & Alves 2012). Therefore, combination treatment with antioxidant and antibacterial agents could help to improve DM treatment effectively (Fuchs et al. 2013). The antimicrobial effects of some of active ingredients of *Penicillium* species including griseofulvin, is one of antifungal antibiotics currently used for systematic fungal infection treatment which was isolated from *P. griseofulvum* (MacMillan 1954).

Fungi are found in a variety of habitats such as soil, associated with plants, water, associated with other fungi and ruminant guts (Dighton & White 2017). Secondary metabolites produced by fungi usually show inhibitory or toxicity effects on other organisms. Accordingly, fungal metabolites have been developed to be used in pharmaceuticals (Shwab & Keller 2008) due to their antibacterial, antifungal, anticancer (Zhao et al. 2013), anti-inflammatory (Deshmukh et al. 2009), antioxidant

(Sadananda et al. 2014) and cytotoxic activities (Turbyville et al. 2006).

Peat swamp forests are tropical moist forests and they create a thick layer of acid soil (Thawai 2004) with high relative biodiversity and humidity (Boonyuen et al. 2012). The microbes living in this area can survive in this harsh environment. The Sirindhorn Peat Swamp Forest Nature Research and Study Centre is located in one of the last remaining peat swamp forests in Thailand. This forest area is reported to spread over 224 square kilometers (ORDPB 2019). Preliminary study showed that various fungi such as *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Trichoderma* sp., and *Gongronella* sp. have been isolated from soil obtained from Sirindhorn peat swamp forest. Pharmacological activities of these fungi such as antifungal (Wang et al. 2012), cytotoxic, insecticide (Rukachaisirikul et al. 2013), antibacterial (Cazar et al. 2005), antioxidant (Trisuwan et al. 2011), antimalarial and anticancer (Trisuwan et al. 2014) have been reported. This study aimed to search for the active substances for antidiabetic activity from fungi isolated from the soil of Sirindhorn peat swamp forest by assessing alpha-glucosidase inhibitory efficacy. The effective compound or extract could serve as a lead substance for further development of anti-diabetic drug. Additionally, bioactivity screening of alpha-glucosidase inhibition, antiinflammation and cytotoxicity of the fungal crude extracts from Sirindhorn peat swamp forest are herewith reported.

## MATERIALS AND METHODS

### FUNGAL MATERIALS

The 54 soil fungi were collected from Sirindhorn peat swamp forest, Narathiwat, Thailand. They were isolated by the researchers from Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Songkhla, Thailand. The isolated fungi were cultivated and extracted using four different solvents to obtain 104 sample extracts which were then screened for bioactivity determination. The bioactivity screening performed on these samples were alpha-glucosidase inhibition, anti-inflammation (nitric oxide inhibition) and cytotoxicity using cancer cell line (MCF-7).

### DETERMINATION OF ALPHA-GLUCOSIDASE INHIBITORY ACTIVITY

This assay was modified from previously reported

protocol using colorimetric method in 96-well plate (Dej-adisai & Pitakbut 2015). Samples (2 mg/mL) were added to 50  $\mu$ L of 10 mM phosphate buffer solution (pH7), which contained 2 mg/mL of bovine serum albumin and 0.2 mg/mL of sodium azide, and then incubated at 37 °C for 2 min with 50  $\mu$ L of  $\alpha$ -glucosidase enzyme (1 unit/mL). The result of  $\alpha$ -glucosidase inhibition activity was processed using the following equations:

$$\text{Velocity} = \frac{\Delta \text{Absorbance at 405 nm}}{\Delta \text{Time}}$$

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{V \text{ control} - V \text{ sample}}{V \text{ control}} \times 100$$

#### DETERMINATION OF ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY

Inhibitory effect on nitric oxide (NO) production by the 104 fungal extracts (25  $\mu$ g/mL) were carried out using RAW264.7 cells following Dej-adisai et al. (2018). NO production was determined by measuring the accumulation of nitrite in the culture supernatant using the Griess reagent. The reagent consisted of *N*-(1-naphthalenediamine) and sulfanilic acid. Under acidic conditions, sulfanilic acid (sulfanilamide) was converted by nitrite to a diazonium salt. *N*-(1-naphthalenediamine) was added into diazonium salt to form a colored azo dye (red-pink color). The optical density was measured with a 570 nm using microplate reader. L-nitroarginine (L-NA), indomethacin and caffeic acid phenethyl ester (CAPE) were used as positive controls.

#### DETERMINATION OF CYTOTOXIC ACTIVITY

Cytotoxic activity against human cancer cells for 104 fungal extract samples (25  $\mu$ g/mL) were determined by performing sulforhodamine B (SRB) colorimetric assay. SRB assay was used for measuring the cellular protein content using two of the sulfonic groups to bind to basic amino acid in the cell under mild acid condition, which show pink color. Human cancer cells (human breast carcinoma cell line (MCF-7)) and a human normal cell (human gingival fibroblast cell line (HGF)) were used for cytotoxicity test. Camptothecin was used as a positive control. The experiment was tested in 96 well plates and detected using microplate reader at wavelength 492 nm (Dej-adisai et al. 2018).

#### FUNGAL IDENTIFICATION

Fifty-four soiled fungi were collected from Sirindhorn peat swamp forest in Narathiwat Province which is the last peat swamp forests in Thailand. They were extracted by 4 different solvents and obtained 104 crude extracts. The bioactivity screening of the 104 crude extracts showed that SPSF224 crude extract had the best biological activities. SPSF224 was selected for further species identification which was performed by Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Germany. The fungus was subjected to DNA extraction and sequencing of the rDNA ITS fragment (Schoch et al. 2012). Additionally, we amplified and sequenced the large subunit of rDNA (LSU) and partial calmodulin gene (Visagie et al. 2013). The fungus rDNA-ITS fragment showed two different operons and was therefore not useful for identification. Comparison of assembled calmodulin sequences was performed with GenBank, Myco ID and various databases as well as with the type species of *Penicillium maximae* (GenBank Accession: KC773821). *P. maximae* belongs to the section Sclerotiora within the genus *Penicillium* (Visagie et al. 2014).

#### FUNGAL FERMENTATION AND EXTRACTION OF SPSF224

SPSF224 was grown on potato dextrose agar (PDA) at 25 °C for five days. Five pieces of 0.5  $\times$  0.5 cm<sup>2</sup> mycelial agar plugs were inoculated into 500 mL Erlenmeyer flasks containing 300 mL of PDA at room temperature for 21 days. The fungal culture (60 L) was filtered to separate into wet mycelia and the filtrate. The filtrated broth was transferred to a separatory funnel and the same volume of ethyl acetate was added each time. The organic layer was evaporated to dry under reduced pressure to provide broth ethyl acetate extract, BE (red-brown paste, 5.77 g). The fungal mycelium was soaked for 3 days in methanol. The MeOH layer was concentrated by an evaporator and added to 150 mL of distilled water. The mixture was then shaken with 500 mL of hexane. The aqueous layer was extracted three times with an equal volume of ethyl acetate and then evaporated to obtain cell hexane extract, CH (yellow-brown paste, 1.35 g), cell ethyl acetate extract, CE (red-brown paste, 2.47 g) and cell methanol extract, CM (black-brown paste, 3.59 g). Then these extracts from SPSF224 were further studied for chemical profiling and biological activities.

## FUNGAL PURIFICATION

The extract from SPSF224 BE (5.767 g) was loaded onto the quick column by dry-loading technique. Then, a gradient solvent system as a mobile phase was eluted through the column with a mixture of hexane, ethyl acetate, methanol and water from 100:0:0:0 to 0:50:40:10 to yield 19 subfractions F1 to F19. F12 (0.972 g) was further purified using classical column chromatographic technique. The separation was carried out using a mixture of chloroform and methanol from 100:0 to 50:50 to obtain 11 subfractions. F12-8 (0.121 g) was loaded on the surface of Sephadex® LH-20 column chromatography using methanol as eluent to produce 8 fractions. F12-8-8 (68 mg) was purified by Sephadex® LH-20 column chromatography. The same elution protocol was repeated giving 7 subfractions. Fraction F12-8-8-4 was isolated and determined as semi-purified PM1 (30.2 mg).

## GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY

Gas Chromatography-Mass Spectrometer (GC-MS) (5977A Series GC/MSD System, Agilent Technologies, USA) was used to analyse the crude extracts. The samples were chromatographed on capillary columns, size 30 m × 250 μm × 0.25 μm. One microliter of extract was injected into an injector at 70 °C and held for 3 min. The temperature was increased by 15 °C/min until it reached 200 °C without holding. It was then increased with a program rate of 3 °C/min to 300 °C and was held for 10 min. The identification of the components in the extract was carried out by comparison of their retention time and mass spectral fragmentation pattern with those stored in the computer library.

## CHEMICAL SCREENING

The extracts from SPSF224 were further studied for its chemical profile by identification of the presence of tannin, alkaloids, steroid, triterpenoid, cardiac glycoside, saponin, anthraquinone, coumarin, and flavonoid. The chemical screening tests were performed according to previously reported methods (Farnsworth 1966; Harborne 1984; Trease & Evans 1983) with some modifications.

## DETERMINATION OF TOTAL PHENOLIC CONTENT (TPC)

Total phenolic content of *P. maximae* extracts was estimated using the Folin-Ciocalteu colorimetric assay according to the method of Singleton and Rossi (1965) with some modifications. Stock solutions of samples and

standard (gallic acid) at the concentration of 5 mg/mL were dissolved in absolute ethanol. Total phenolic contents were obtained from regression equation  $Y = 0.0101X + 0.0111$  with  $R^2$  value of 0.999 and expressed as mg/g gallic acid equivalent using the equation below:

$$\text{Total phenolic content (mg/g)} = \frac{c \times DF \times V}{W}$$

where C is the concentration of gallic acid (μg/mL); DF is the dilution factor; V is the volume of fungal extract (mL); and W is the weight of fungal extract (mg).

## DETERMINATION OF TOTAL FLAVONOID CONTENT

The total flavonoid content of *P. maximae* extracts was determined by aluminum chloride colorimetric method as described by Chang et al. (2002) with some modifications. The sample (500 μL of 1 mg/mL) was mixed well with 1.5 mL of 95% ethanol, 100 μL of 10% AlCl<sub>3</sub>, 100 μL of 1M CH<sub>3</sub>COOK and 2.8 mL of distilled water. Five varying concentrations of quercetin were used in preparing the standard curve. Regression equation of the curve,  $Y = 0.0033X + 0.0072$  with  $R^2$  value of 0.999 was obtained. The equation was used to calculate the quercetin content in 1 g of sample (mg quercetin equivalence (QE)/g of sample).

## DETERMINATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY

The radical scavenging activity of the various extracts of *P. maximae* were determined using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil free radical scavenging assay. The samples (200 μg/mL) or 2 mL of 200 μg/mL quercetin were mixed well with 2 mL of 6 × 10<sup>-5</sup> M DPPH. Ethanol was used as blank. The mixtures were incubated for 20 min in the dark. Measurement of absorbance at 520 nm was done using UV-vis spectrometers and percentage of antioxidant activity was calculated using the following equation:

$$\% \text{ inhibition} = \left( \frac{OD_{\text{control}} - OD_{\text{sample}}}{OD_{\text{control}}} \right) \times 100$$

## DETERMINATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY

The preliminary screening of antimicrobial activity was carried out using the agar disc diffusion assay (Lorian 2005). *Staphylococcus aureus* (ATTC 25923), *S. epidermis* (TISTR 517), *Propionibacterium acnes* (DMTS 14916) and Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA 1350II06) were selected for Gram positive bacteria. *Escherichia*

*coli* (ATCC35218) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC10145) were selected for Gram negative bacteria. *Candida albicans* (TISTR 5779) was selected for yeast and *Microsporium gypseum*, *Trichophyton rubrum*, and *T. mentagrophytes* were selected for fungi. Five fungal extracts of SPSF224 were dissolved in DMSO and diluted to achieve a concentration of 200 µg/mL and then 10 µL of samples were dropped on the sterile paper disc. All test plates were incubated for 24 h at 37 °C for bacteria, 24 to 48 h at 35 °C for yeast and 7 days at 30 °C for fungi. The appearance of zone of inhibition on the plates was measured in diameter (mm).

## RESULTS AND DISCUSSION

### BIOACTIVITY DETERMINATION OF FUNGAL EXTRACTS

A total of 104 crude extract samples from 54 fungi collected from Sirindhorn peat swamp forest were determined for their biological activities as anti-alpha-glucosidase, anti-inflammatory and cytotoxic (Table 1). Thirty-eight samples showed anti-alpha-glucosidase activity of over 90% inhibition. Only two samples showed potential effects of anti-inflammatory and cytotoxic activities at 25 µg/mL which SPSF224BE and SPSF224CE. Hence, SPSF224 was selected for further studies.

TABLE 1. Bioactivity determination of 104 fungal extracts

No.	Extract	Anti-alpha-glucosidase activity (% inhibition)	Anti-inflammation (% inhibition)		Cytotoxicity on MCF-7 (% inhibition)
			Nitric oxide inhibition	Cytotoxic effect	
1.	SPSF001BE	43.95±3.65	35.39±3.57	-2.13±3.78	18.88±5.36
2.	SPSF002BE	27.80±3.73	43.63±2.78	0.94±1.30	59.42±4.08
3.	SPSF003BE	99.71±0.29	37.73±2.22	1.26±4.89	11.24±5.36
4.	SPSF004BE	63.98±3.62	32.22±4.55	0.46±3.48	9.90±5.97
5.	SPSF005BE	18.19±4.00	108.64±2.04	85.23±1.71	99.32±0.22
6.	SPSF006BE	50.07±4.29	56.57±3.43	-2.94±2.90	38.63±2.57
7.	SPSF007BE	100.20±0.24	26.24±2.80	2.69±3.39	39.10±1.30
8.	SPSF008BE	99.55±0.08	23.42±3.15	1.12±1.04	11.78±5.60
9.	SPSF009BE	99.75±0.27	33.71±2.37	3.56±1.95	-3.90±5.39
10.	SPSF010BE	7.18±5.33	22.95±1.21	3.86±0.92	66.00±4.00
11.	SPSF001BE	43.95±3.65	35.39±3.57	-2.13±3.78	18.88±5.36
12.	SPSF012BE	100.56±2.86	51.01±4.30	2.24±2.13	0.85±4.99
13.	SPSF013BE	70.74±2.30	30.45±3.31	1.08±2.93	85.14±2.70
14.	SPSF028BE	99.71±0.29	123.29±2.13	87.81±0.76	92.18±0.15
15.	SPSF029BE	83.63±1.89	123.37±2.04	78.21±0.78	97.10±0.18
16.	SPSF030BE	68.62±7.05*	47.42±3.37	10.07±1.76	10.31±2.43
17.	SPSF031BE	98.55±2.69	35.87±1.76	11.89±1.02	34.92±2.62
18.	SPSF032BE	98.05±0.63	21.25±0.86	11.99±1.75	12.00±4.68
19.	SPSF033BE	99.50±0.09	124.72± 2.27	76.14±1.16	87.49±1.15
20.	SPSF034BE	91.26±0.65	28.02±2.88	14.27±2.50	4.43±1.57
21.	SPSF035BE	99.27±0.34	35.93±3.06	14.53±2.47	7.98±0.22
22.	SPSF037BE	97.61±2.82**	19.86±2.06	22.80±2.69	74.12±1.64
23.	SPSF038BE	36.72±1.52	29.12±2.91	15.58±1.68	3.40±3.60

24.	SPSF039BE	76.91±0.55	31.88±2.13	15.02±3.12	5.48±1.90
25.	SPSF040BE	96.72±0.82	36.10±4.11	18.17±0.53	5.27±2.84
26.	SPSF042BE	66.24±4.05	91.71±5.17	11.45±2.89	64.38±4.08
27.	SPSF043BE	96.87±0.34	81.32±1.14	7.58±2.08	24.63±1.65
28.	SPSF044BE	61.11±0.51	101.08±1.85	47.26±2.26	75.90±0.76
29.	SPSF045BE	82.56±0.96	47.38±2.42	14.09±3.07	19.99±2.34
30.	SPSF046BE	82.54±2.91	36.26±2.46	17.26±0.64	2.76±4.27
31.	SPSF047BE	91.51±0.68	67.22±1.75	15.86±2.28	17.17±2.44
32.	SPSF048CE	88.92±1.42	45.87±2.66	15.37±1.10	1.48±1.96
33.	SPSF049BW	54.69±3.32	100.73±2.93	16.54±0.58	73.93±0.94
34.	SPSF051BW	91.44±2.23	95.85±3.58	47.76±2.91	95.54±3.12
35.	SPSF206CM	17.98±2.89	29.19±3.30	20.58±2.08	10.60±1.28
36.	SPSF206BE	79.43±1.19	66.72±1.47	12.77±2.51	47.12±1.08
37.	SPSF208BE	98.31±1.19	49.56±1.84	3.63±3.35	30.30±3.79
38.	SPSF208CE	56.45± 2.57	87.78±4.80	47.18±0.96	69.91±2.07
39.	SPSF208CH	69.61±0.79	53.48±0.87	8.58±5.15	31.94±1.39
40.	SPSF209CE	60.34±1.41	56.99±0.99	4.97±5.9	25.51±1.83
41.	SPSF209BE	84.76±2.89	30.29±5.10	14.50±2.98	19.36±1.96
42.	SPSF209BW	27.98±3.35	23.05±2.55	15.63±2.04	3.10±2.20
43.	SPSF211CE	81.43±3.26	43.32±5.68	17.42±2.90	7.63±1.68
44.	SPSF211BE	101.26±1.73	-26.87±3.20	11.987±4.55	9.84±3.43
45.	SPSF213BE	64.55±0.98	32.73±2.66	11.35±1.45	1.12±2.28
46.	SPSF219BE	98.29±3.64	72.42±1.29	8.92±1.74	61.34±0.95
47.	SPSF221CE	27.00±2.80	69.44±2.22	54.79±1.63	86.15±1.03
48.	SPSF221CH	18.90±1.20	78.33±1.48	59.95±3.02	89.21±1.18
49.	SPSF221BE	89.86±4.55	81.60±1.59	41.67±1.99	34.61±1.29
50.	SPSF224BE	104.83±3.40	76.13±2.25	15.84±1.85	46.84±2.28
51.	SPSF224CE	100.00±00	91.07±2.32	22.83±1.79	76.62±1.39
52.	SPSF225CE	51.23±1.28	52.13±4.25	16.59±3.59	53.98±0.97
53.	SPSF225BE	88.02±1.71	-2.74±2.57	6.72±2.72	19.33±1.50
54.	SPSF226BE	86.91±1.94	55.37±1.36	18.10±1.13	40.49±2.47
55.	SPSF226CE	54.70±4.90	55.82±2.54	5.38±2.55	28.49±1.82
56.	SPSF226CH	29.86±3.83	47.69±1.43	16.99±1.99	30.81±1.64
57.	SPSF227BE	57.93±1.11	59.60±2.51	9.87±3.11	35.95±2.81
58.	SPSF227CE	18.55±0.16	79.97±1.55	3.58±0.07	43.53±1.70
59.	SPSF227BW	91.04±0.19	21.39±3.31	17.16±2.36	0.29±1.10
60.	SPSF234CE	100.32±0.36	17.71±2.50	18.94±2.47	33.28±1.01
61.	SPSF234BE	99.97±1.33	7.83±2.73	13..57±3.93	21.58±3.44
62.	SPSF234BW	74.81±2.17	21.58±3.09	18.51±2.54	-5.90±1.40
63.	SPSF236BE	61.00±2.34	45.59±1.35	16.54±5.70	27.39±1.34
64.	SPSF236CE	52.05±2.73	55.46±4.41	15.75±2.32	31.16±2.54
65.	SPSF238CE	54.05±1.68	48.16±1.83	22.35±2.05	51.68±1.10
66.	SPSF240BE	93.63±2.19	37.60±0.75	3.44±2.64	14.99±2.80
67.	SPSF240CE	62.57±3.85	68.24±1.09	7.45±3.44	60.05±2.44

68.	SPSF240CH	77.42±4.69	84.38±2.40	16.16±2.69	67.47±1.55
69.	SPSF241BE	85.43±0.48	65.92±1.54	11.48±4.19	22.65±2.12
70.	SPSF244CE	44.84±1.14	88.40±2.66	22.00±5.72	74.00±0.80
71.	SPSF244BE	51.29±1.87	27.26±2.09	7.28±0.22	16.22±3.81
72.	SPSF248CH	82.27±2.24	41.81±1.89	0.01±5.91	19.57±3.80
73.	SPSF248CE	69.61±0.79	95.63±2.32	-4.28±5.95	61.16±1.78
74.	SPSF248BE	86.91±1.94	103.34±1.94	35.60±0.45	81.46±1.08
75.	SPSF250BE	103.70±2.01	56.98±4.65	55.96±0.61	3.42±1.73
76.	SPSF304BE	84.80±0.74	82.98±1.31	8.60±3.55	59.79±4.21
77.	SPSF304CH	100.00±00	92.93±2.39	17.96±2.27	69.50±1.85
78.	SPSF304BW	52.97±1.23	51.44±3.15	20.26±1.69	6.56±3.73
79.	SPSF310BE	119.00±2.91	40.05±2.46	-24.76±6.66	15.08±2.77
80.	SPSF310CE	67.96±2.27	71.33±3.08	-7.60±7.98	20.42±1.30
81.	SPSF310BW	84.37±2.21	62.61±1.34	20.82±3.09	11.83±4.56
82.	SPSF312BE	85.73±1.09	85.23±2.13	15.40±2.22	86.36±0.88
83.	SPSF312CE	79.36±1.75	80.29±5.31	26.00±2.61	64.01±2.36
84.	SPSF318BE	53.42±1.51	53.16±1.44	2.73±2.20	21.58±2.80
85.	SPSF318CE	53.04±1.44	84.00±2.30	18.05±1.50	84.27±1.10
86.	SPSF325BE	100.00±00	25.83±1.72	4.16±1.89	70.96±4.20
87.	SPSF325CE	100.00±00	25.98±3.36	17.27±2.27	34.52±2.06
88.	SPSF325CH	100.00±00	31.76±6.15	22.57±1.83	17.53±3.26
89.	SPSF328BE	100.00±00	38.77±2.39	4.96±3.75	31.69±4.20
90.	SPSF329BE	86.27±3.19	27.53±2.42	13.96±3.06	-2.60±1.63
91.	SPSF329CE	100.00±00	-0.92±2.54	20.46±5.41	78.68±1.47
92.	SPSF329CH	100.00±00	10.69±1.47	35.15±4.35	55.29±2.21
93.	SPSF330BE	55.29±2.57	61.32±1.49	16.57±1.97	36.87±4.10
94.	SPSF330CE	98.49±1.23	37.64±1.56	11.59±1.39	15.18±1.16
95.	SPSF339BE	94.35±0.69	105.03±0.62	57.78±2.05	85.23±0.23
96.	SPSF339CE	96.87±0.60	98.44±0.57	16.25±3.11	24.43±2.10
97.	SPSF339BW	51.24±0.25	70.23±1.10	3.53±2.59	78.80±1.50
98.	SPSF347BE	77.16±2.57	39.60±3.54	16.07±1.66	24.57±3.57
99.	SPSF358BW	83.21±3.35	23.88±2.73	10.81±1.03	-2.36±1.44
100.	SPSF358BE	59.77±3.95	9.41±1.05	9.31±0.86	10.20±1.39
101.	SPSF358CE	98.90±3.72	28.65±1.01	5.22±4.23	16.98±2.24
102.	SPSF360BE	32.08±0.15	105.04±0.89	72.32±0.71	97.33±0.10
103.	SPSF360CH	13.12±4.26	105.22±1.07	89.32±0.29	98.90±0.20
104.	SPSF360BW	64.63±1.57	30.96±1.57	27.93±1.43	6.74±1.61
	Acarbose	86.87±0.66	-	-	-
	Camptothecin				94.01±0.17
	Indomethacin		61.08±0.68	25.42±2.99	

Values are mean±standard deviation of three replication (n=3); \*0.5 mg/mL; \*\*1 mg/mL; P= Positive control

PRELIMINARY QUALITATIVE CHEMICAL SCREENING OF  
*P. maximae* EXTRACTS

The qualitative metabolite analysis of *P. maximae* extracts was obtained as shown in Table 2. The results showed that tannin and alkaloid were present in all the crude extracts while cardiac glycoside, steroid, saponin, and terpenoid were absent. Flavonoid was found in cell ethyl acetate extract (CE), broth ethyl acetate extract (BE), and cell hexane extract (CH). Coumarin and anthraquinone were absent in cell ethyl acetate extract (CE).

This result showed that *P. maximae* produced various types of secondary metabolites. Moreover, the data were in accordance with previous reports that alkaloids, tannins, flavonoids, coumarins and anthraquinones had been found in *Penicillium* genus. Alkaloids were found in *P. aurantiogriseum*, *P. terlikowskii*, and *P. citrinum*, respectively (Kalinina et al. 2018; Lai et al. 2013; Waring et al. 1987). Tannins were found in *P. frequentans* (Bhardwaj et al. 2015). Flavonoids, coumarins and anthraquinones were obtained from *P. setosum* (George et al. 2019), *P. oxalicum* (Wang et al. 2014), and *P. chrysogenum* (Brunati et al. 2009).

TABLE 2. Chemical screening of *P. maximae*

Chemicals	Extracts*				
	CE	BE	BW	CM	CH
Tannin	/	/	/	/	/
Alkaloid	/	/	/	/	/
Cardiac glycoside	X	X	X	X	X
Steroid	X	X	X	X	X
Saponin	X	X	X	X	X
Flavonoid	/	/	X	X	/
Triterpenoid	X	X	X	X	X
Coumarin	/	X	X	X	X
Anthraquinone	/	X	X	X	X

/ = Present, X = Absent

\*CE: cell ethyl acetate extract; BE: broth ethyl acetate extract; BW: broth water extract; CM: cell methanol extract; CH: cell hexane extract

SECONDARY QUANTITATIVE CHEMICAL SCREENING OF  
*P. maximae* EXTRACTS

DETERMINATION OF TOTAL PHENOLIC CONTENT

The total phenolic content of *P. maximae* extracts were shown in Table 3. Broth water extract (BW) and cell methanol extract (CM) showed low amounts of total phenolic content at  $1.83 \pm 0.41$  and  $0.97 \pm 0.20$  mg GAE/g dry weight of sample, respectively. Meanwhile, cell ethyl acetate extract (CE) contained the highest amount of

phenolic content up to  $8.89 \pm 0.40$  mg GAE/g dry weight of sample.

DETERMINATION OF TOTAL PHENOLIC CONTENT

Total flavonoid content of *P. maximae* extracts quantified using the aluminum chloride colorimetric method showed that the total flavonoid content was highest in CE (7.73 mg QE/g dry w.), while flavonoid was absent in BW and CM (Table 3). The maximum phenolic and flavonoid

content were found in CE at  $8.89 \pm 0.40$  mg GAE/g and 7.73 mg QE/g, respectively. The results suggested that ethyl acetate was the most suitable solvent to isolate *P. maximae* secondary metabolites. This may be due to the low polarity property of ethyl acetate which selectively extracts low molecular weight phenol and flavonoid (Bhardwaj et al. 2015). Phenolic and flavonoid are major secondary metabolites of fungi and have been associated

with antioxidative action in biological systems (Devi et al. 2012). The presence of phenolic and flavonoid compounds has been reported in *Penicillium* species including *P. chrysogenum* (Sikandar et al. 2020), *P. granulatum* (Chandra & Arora 2012), and *P. fusiculosum* (Jakovljević et al. 2014). Therefore, the phenolic and flavonoid compounds found in this study possibly possess antioxidant activity.

TABLE 3. Total phenolic and flavonoid contents of *P. maximae* extracts

Extracts*	Total phenolic content (mg GAE/g)	SD	Total flavonoid content (mg QE/g)	SD
CE	8.89	0.40	7.73	0.19
BE	6.12	0.20	2.24	0.15
BW	1.83	0.41	n/d**	n/d**
CM	0.97	0.20	n/d**	n/d**
CH	5.33	0.40	1.36	0.18

\*CE: cell ethyl acetate extract; BE: broth ethyl acetate extract; BW: broth water extract; CM: cell methanol extract; CH: cell hexane extract

#### CHEMICAL PROFILING OF CELL HEXANE EXTRACT OF *P. maximae*

From this investigation, CH of *P. maximae* showed the highest activity of alpha-glucosidase inhibition. Thus, CH was selected for further analysis. The GC-MS chromatogram showed three dominant peaks at retention times of 15.9212, 26.6168, and 37.8967 min, respectively (Figure 1; Table 4). These peaks represented the *n*-Hexadecanoic acid ( $C_{16}H_{32}O_2$ ), 2,6-dimethyl-N-(2-methyl-alpha-phenylbenzyl) aniline ( $C_{22}H_{23}N$ ) and 3Beta-acetoxy-6-nitroandrost-5-en-17-one ( $C_{21}H_{29}NO_5$ ),

respectively. From the previous report (Artanti et al. 2012), *n*-Hexadecanoic acid had a low activity of alpha-glucosidase inhibition. Therefore, alpha-glucosidase inhibition potency of CH might be from 2,6-dimethyl-N-(2-methyl-alpha-phenylbenzyl) aniline ( $C_{22}H_{23}N$ ) and 3Beta-acetoxy-6-nitroandrost-5-en-17-one ( $C_{21}H_{29}NO_5$ ). However, the anti-alpha-glucosidase efficacy of these two compounds should be further studied to determine whether the anti-alpha-glucosidase capacity of CH possibly was due to the effect of each individual constituent or the synergistic action of the components in the extract.

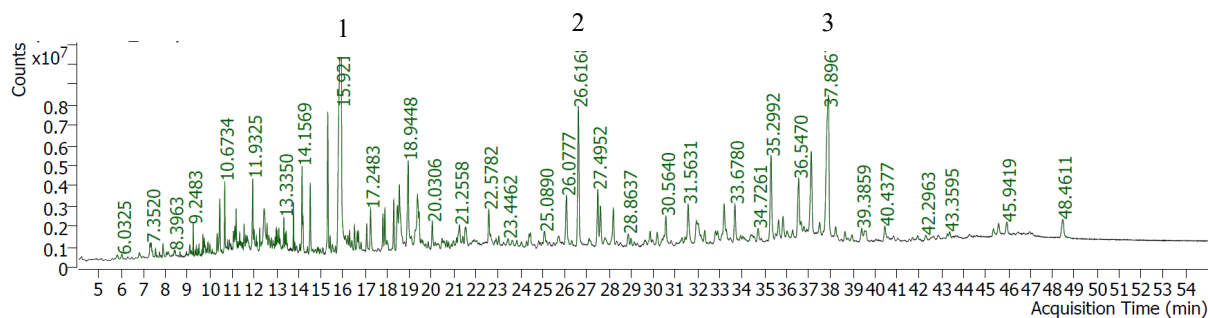


FIGURE 1. GC-MS chromatogram of cell hexane extract of *P. maximae*

TABLE 4. Dominant peaks from GC-MS chromatogram of cell hexane extract of *P. maximae*

No.	Component RT	Compound name	CAS#	Formula	Component Area	Match factor
1	15.9212	n-Hexadecanoic acid	57-10-3	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	99116607.0	96.4
2	26.6168	2,6 dimethyl-N-(2 methyl-alpha.- phenylbenzyl)aniline	119971-00-5	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> N	31006746.8	81.4
3	37.8967	3Beta-acetoxy-6-nitroandrost-5-en-17-one	31559-86-1	C <sub>21</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>5</sub>	54667640.7	71.4

## CHEMICAL PROFILING OF SEMI-PURIFIED PM1

GC-MS analysis of semi-purified PM1 was shown in Figure 2. The chromatogram illustrated two dominant peaks at retention times (RT) of 14.1728 and 12.3793 min, respectively (Table 5). The highest peak (RT 14.1728) represented 3-(1-methylbutyl)-1,2,4-

cyclopentanetrione (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub>) and the other (RT 12.3793) represented suberic dihydrazide (C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>). Their alpha-glucosidase inhibitory efficacies have not been reported yet. To the best of our knowledge, the exact active substances of semi-purified PM1 on anti-alpha-glucosidase are still undefined. Thus, anti-alpha-glucosidase efficacy of these two ingredients should be further evaluated.

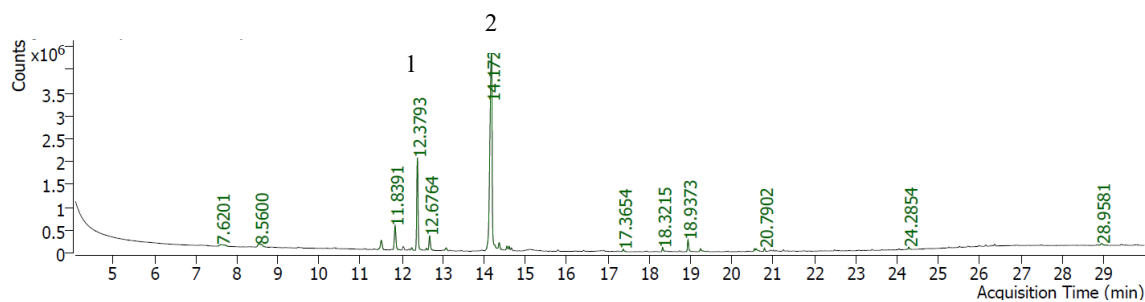


FIGURE 2. GC-MS chromatogram of semi-purified PM1

TABLE 5. Dominant peaks from GC-MS chromatogram of semi-purified PM1

No.	Component RT	Compound name	CAS#	Formula	Component area	Match factor
1	12.3793	Suberic dihydrazide	20247-84-1	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	4511271	68.4
2	14.1728	3-(1-methylbutyl)-1,2,4-cyclopentanetrione	54644-19-8	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	16922005	82.3

BIOACTIVITIES OF *P. maximae*  
ALPHA-GLUCOSIDASE INHIBITORY ACTIVITY

*P. maximae* extracts were determined for alpha-glucosidase inhibition and the half maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>). The results showed that CH was the most active extract for alpha-glucosidase inhibition with IC<sub>50</sub> of 490 µg/mL whereas acarbose as standard drug showed the IC<sub>50</sub> value at 205 µg/mL (Table 6). The comparison of alpha-glucosidase inhibition from

all SPSF224 extracts, CH, CE, and BE showed that their alpha-glucosidase inhibitory activities were higher than the others. Previous studies have reported that phenolic and flavonoid compounds could act as alpha-glucosidase inhibitors and regulators of hyperglycemia (Montefusco-Pereira et al. 2013). Therefore, phenolic and flavonoid compounds present in CH, CE, and BE could be the chemical groups in these extracts that exhibited the alpha-glucosidase inhibition.

TABLE 6. The alpha-glucosidase inhibitory activity of *P. maximae* extracts

Extracts/Compound	Anti-alpha-glucosidase activity (% inhibition)	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
Broth ethyl acetate (BE)	97.12±1.01	1008
Broth water (BW)	45.63±0.21	-
Cell ethyl acetate (CE)	118.59±2.71	1080
Cell hexane (CH)	104.03±0.42	490
Cell methanol (CM)	27.77±0.11	-
Semi-purified PM1	91.83±1.59	-*
Acarbose <sup>P</sup>	87.66±0.21	205

Data were expressed as mean±SD

<sup>P</sup> = Positive control

\* = insufficient amount

ANTIOXIDANT ACTIVITY

Antioxidant activities of *P. maximae* extracts were determined by the DPPH radical scavenging activity. The highest activity of antioxidant was found in CE. However, its ability was less than a standard quercetin (Table 7). Huang et al. (2005) reported that phenolic compounds were the major antioxidant constituents of

the endophytes. In addition, previous report showed the correlation between the phenolic and flavonoid contents with antioxidant activity (Shweta et al. 2010). In this study, CE exerted highest DPPH radical scavenging activity. Hence, it was possibly due to the highest level of phenolic and flavonoid contents in the extract.

TABLE 7. Inhibition of DPPH radical scavenging activity for *P. maximae* extracts

Samples*	% inhibition at 200 µg/mL**	SD
CE	31.25	5.89
BE	28.40	2.39
BW	2.66	0.33
CM	1.47	0.26
CH	11.69	2.14
quercetin	93.44	1.54

\*CE: cell ethyl acetate extract; BE: broth ethyl acetate extract; BW: broth water extract; CM: cell methanol extract; CH: cell hexane extract.

\*\*Values were represented with mean±standard deviation of three replications (n=3)

## ANTIMICROBIAL ACTIVITY

Crude extracts of *P. maximae* were tested for antimicrobial activity using the disc diffusion method. Broth ethyl acetate extract (BE) showed inhibition zone against *S. aureus*, *T. mentagrophytes*, and *T. rubrum* at  $8.1\pm 0.1$ ,  $6.4\pm 0.5$ , and  $11.2\pm 2.6$  mm, respectively. Cell methanol extract (CM) also exhibited inhibition against *T. rubrum* at  $12.6\pm 3.5$  mm. However, all extracts did not inhibit the Gram-negative bacteria, *E. coli*, *P. aeruginosa*, and yeast (*C. albicans*) (Table 8). This study was consistent with

previous report that the extracts from *Penicillium* species also have the antibacterial potency on Gram positive bacteria including griseofulvin from *P. brasilianum* (Tang et al. 2015) and scleroderolide from *Penicillium* sp. FO-5637 (Tomoda et al. 1998). The result suggested that the extracts were potent in killing Gram-positive bacteria. Nevertheless, the extracts from other *Penicillium* species such as *P. Janthinellum* (Do Rosário Marinho et al. 2005) and *P. herquei* (Marinho et al. 2013) possessed bactericidal activity on Gram negative bacteria.

TABLE 8. Anti-microbial activity of *P. maximae*

Organisms	Zone of inhibition (Diameter, mm)					
	Standard drug*	CE**	BE**	BW**	CM**	CH**
<i>P. aeruginosa</i>	32.7±0.7	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i>	23.1±0.1	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i>	22.0±1.8	0	8.1±0.1	0	0	0
<i>S. epidermis</i>	30.6±0.1	0	0	0	0	0
MRSA	21.3±1.0	0	0	0	0	0
<i>P. acnes</i>	25.4±1.1	0	0	0	0	0
<i>C. albicans</i>	13.5±0.4	0	0	0	0	0
<i>T. mentagrophytes</i>	42.4±1.5	0	6.4±0.5	0	0	0
<i>T. rubrum</i>	50.3±2.1	0	11.2±2.6	0	12.6 ±3.5	0
<i>M. gypseum</i>	27.0±1.0	0	0	0	0	0

\* Standard drugs:

Norfloxacin : *P. aeruginosa*, *E. coli* 10 µg/disc

Oxacillin : *S. aureus*, *S. epidermidis* and *P. acnes* 1 µg/disc

Vancomycin : MRSA 30 µg/disc

Amphotericin B : *C. albicans* 25 µg/disc

\*\* Concentration at 200 mg/mL

CE: cell ethyl acetate extract; BE: broth ethyl acetate extract; BW: broth water extract; CM: cell methanol extract; CH: cell hexane extract

## CONCLUSION

Fifty-four soil fungi were collected from Sirindhorn peat swamp forest in Narathiwat Province, Thailand and 104 crude extracts were obtained from them. SPSF224 was

selected for further study because of the potential effects on biological activities. SPSF224 was identified by molecular method as *P. maximae*. From phytochemical investigation, its crude extracts contained a variety of

secondary metabolites including tannins, alkaloids, flavonoids, coumarins and anthraquinones. *P. maximae* extracts also showed high potential effect on alpha-glucosidase inhibition and moderate potential effect on antimicrobial, anti-inflammation, and antioxidant activities. This study was the first report of chemical investigation and biological activities of the isolated fungus, *P. maximae*. Hence, this information could be used as database for further study of the lead compound for antidiabetic drug from fungi in the future.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the financial support from the office of the Royal Development Projects Board (ORDPB) under The Royal Initiative of Her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn (RSPG project). The research was also supported by scholarship which supported tuition fees issued by the Discipline of Excellence in Pharmacy Project, The Faculty of Pharmaceutical Sciences, Prince of Songkla University.

#### REFERENCES

- Artanti, N., Tachibana, S., Kardono, L.B. & Sukiman, H. 2012. Isolation of alpha-glucosidase inhibitors produced by an endophytic fungus, *Colletotrichum* sp. TSC13 from *Taxus sumatrana*. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 15(14): 673-679.
- Bischoff, H. 1994. Pharmacology of a-glucosidase inhibition. *European Journal of Clinical Investigation* 24(3): 3-10.
- Bhardwaj, A., Sharma, D., Jadon, N. & Agrawal, P.K. 2015. Antimicrobial and phytochemical screening of endophytic fungi isolated from spikes of *Pinus roxburghii*. *Archives of Clinical Microbiology* 6(3): 1-9.
- Boonyuen, N., Sri-Indrasutdhi, V., Suetrong, S., Sivichai, S. & Jones, E.G. 2012. *Annulatascus aquatorba* sp. nov., a lignicolous freshwater ascomycete from Sirindhorn peat swamp forest, Narathiwat, Thailand. *Mycologia* 104(3): 746-757.
- Brunati, M., Rojas, J.L., Sponga, F., Ciciliato, I., Losi, D., Göttlich, E. & Marinelli, F. 2009. Diversity and pharmaceutical screening of fungi from benthic mats of Antarctic lakes. *Marine Genomics* 2(1): 43-50.
- Bureau of Non Communicable Disease (NCD). 2019. *The Number of Thais with Diagnosed Diabetes*. [www.thaincd.com/2016/mission/documents.php](http://www.thaincd.com/2016/mission/documents.php). Accessed on December 24, 2019.
- Casqueiro, J. & Alves, C. 2012. Infections in patients with diabetes mellitus: A review of pathogenesis. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism* 16(Suppl1): S27.
- Cazar, M., Schmeda-Hirschmann, G. & Astudillo, L. 2005. Antimicrobial butyrolactone I derivatives from the Ecuadorian soil fungus *Aspergillus terreus* Thorn. var *terreus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21(6-7): 1067-1075.
- Chandra, P. & Arora, D.S. 2012. Optimization of antioxidant potential of *Penicillium granulatum* Bainier by statistical approaches. *International Scholarly Research Notices Microbiology* 2012(1): 452024.
- Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M. & Chern, J.C. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis* 10(3): 178-182.
- Dej-adisai, S. & Pitakbut, T. 2015. Determination of a-glucosidase inhibitory activity from selected Fabaceae plants. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 28(5): 1679-1683.
- Dej-adisai, S., Phoopha, S. & Puripattavong, J. 2018. Phytochemical investigation and bioactivities of *Alternanthera ramosissima* (Mart.) Chodat and Hassl. *Pharmacognosy Magazine* 14(57): 346-351.
- Deshmukh, S.K., Mishra, P.D., Kulkarni-Almeida, A., Verekar, S., Sahoo, M.R., Periyasamy, G., Goswami, H., Khanna, A., Balakrishnan, A. & Vishwakarma, R. 2009. Anti-inflammatory and anticancer activity of ergoflavin isolated from an endophytic fungus. *Chemistry & Biodiversity* 6(5): 784-789.
- Devi, N.N., Prabakaran, J.J. & Wahab, F. 2012. Phytochemical analysis and enzyme analysis of endophytic fungi from *Centella asiatica*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2(3): 1280-1284.
- Dighton, J. & White, J.F. 2017. *The Fungal Community: Its Organization and Role in the Ecosystem*. Boca Raton: CRC Press.
- Do Rosário Marinho, A.M., Rodrigues-Filho, E., Maria da Luz, R.M. & Santos, L.S. 2005. Biologically active polyketides produced by *Penicillium janthinellum* isolated as an endophytic fungus from fruits of *Melia azedarach*. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 16(2): 280-283.
- Farnsworth, N.R. 1966. Biological and phytochemical screening of plants. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 55(3): 225-276.
- Fuchs, P., Perez-Pinzon, M.A. & Dave, K.R. 2013. Cerebral ischemia in diabetics and oxidative stress. In *Diabetes: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants*. Elsevier Inc. pp. 15-23.
- Gao, H., Huang, Y.N., Gao, B., Xu, P.Y., Inagaki, C. & Kawabata, J. 2008. A-glucosidase inhibitory effect by the flower buds of *Tussilago farfara* L. *Food Chemistry* 106(3): 1195-1201.
- George, T.K., Devadasan, D. & Jisha, M.S. 2019. Chemotaxonomic profiling of *Penicillium setosum* using high-resolution mass spectrometry (LC-Q-ToF-MS). *Heliyon* 5(9): e02484.
- Hakamata, W., Kurihara, M., Okuda, H., Nishio, T. & Oku, T. 2009. Design and screening strategies for a-glucosidase

- inhibitors based on enzymological information. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 9(1): 3-12.
- Harborne, J.B. 1984. Methods of plant analysis. *Phytochemical Methods*. Dordrecht: Springer. Dordrecht pp. 1-36.
- Horii, S., Fukase, H., Matsuo, T., Kameda, Y., Asano, N. & Matsui, K. 1986. Synthesis and  $\alpha$ -D-glucosidase inhibitory activity of N-substituted valiolamine derivatives as potential oral antidiabetic agents. *Journal of Medicinal Chemistry* 29(6): 1038-1046.
- Huang, D., Ou, B. & Prior, R.L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(6): 1841-1856.
- Jakovljević, V.D., Milićević, J.M., Stojanović, J.D., Solujić, S.R. & Vrvic, M.M. 2014. Antioxidant activity of ethanolic extract of *Penicillium chrysogenum* and *Penicillium funiculosum*. *Hemijaska Industrija* 68(1): 43-49.
- Kalinina, S.A., Kalinin, D.V., Hövelmann, Y., Daniliuc, C.G., Mück-Lichtenfeld, C., Cramer, B. & Humpf, H.U. 2018. Auranthine, a benzodiazepinone from *Penicillium aurantiogriseum*: Refined structure, absolute configuration, and cytotoxicity. *Journal of Natural Products* 81(10): 2177-2186.
- Kalra, S. 2014. Alpha glucosidase inhibitors. *The Journal of the Pakistan Medical Association* 64(4): 474-476.
- Lai, D., Brötz-Oesterhelt, H., Müller, W.E., Wray, V. & Proksch, P. 2013. Bioactive polyketides and alkaloids from *Penicillium citrinum*, a fungal endophyte isolated from *Ocimum tenuiflorum*. *Fitoterapia* 91: 100-106.
- Lorian, V. 2005. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- MacMillan, J. 1954. Griseofulvin. Part IX. Isolation of the bromo-analogue from *Penicillium griseofulvum* and *Penicillium nigricans*. *Journal of the Chemical Society (Resumed)* 1954: 2585-2587.
- Marinho, A.M., Marinho, P.S., Santos, L.S., Rodrigues Filho, E. & Ferreira, I.C. 2013. Active polyketides isolated from *Penicillium herquei*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 85(3): 909-912.
- Montefusco-Pereira, C.V., de Carvalho, M.J., de Araújo Boleti, A.P., Teixeira, L.S., Matos, H.R. & Lima, E.S. 2013. Antioxidant, anti-inflammatory, and hypoglycemic effects of the leaf extract from *Passiflora nitida* Kunth. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 170(6): 1367-1378.
- Office of the Royal Development Projects Board (ORDPB) 2019. *Pa Phru to Daeng*. www.rdpb.go.th. Accessed on September 15, 2019.
- Rukachaisirikul, V., Rungsaiwattana, N., Klaiklay, S., Pakawatchai, C., Saithong, S., Phongpaichit, S., Borwornwiriyan, K. & Sakayaroj, J. 2013. Indole-benzodiazepine-2, 5-dione derivatives from a soil fungus *Aspergillus* sp. PSU-RSPG185. *Tetrahedron* 69(52): 11116-11121.
- Sadananda, T., Govindappa, M., Vinay Dutt, G., Bhat, B., Baishya, P. & Chandrappa, C. 2014. Isolation and characterization of antiviral and ribosome inactivating protein from the endophytic fungi *Alternaria* sp. from *Viscum album* using MADLI-TOF-MS and their antibacterial activity. *Drug Invention Today* 6(2): 105-112.
- Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., Chen, W. & Consortium, F.B. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(16): 6241-6246.
- Scott, J.A. & King, G.L. 2004. Oxidative stress and antioxidant treatment in diabetes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1031(1): 204-213.
- Shwab, E.K. & Keller, N.P. 2008. Regulation of secondary metabolite production in filamentous ascomycetes. *Mycological Research* 112(2): 225-230.
- Shweta, S., Ritesh, T., Khadabadi, S.S. & Deokate, U.A. 2010. *In vitro* antioxidant activity and total phenolic, flavonoid contents of the crude extracts of *Pterospermum acerifolium* Willd leaves (Sterculiaceae). *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 2(3): 417-423.
- Sikandar, A., Zhang, M., Wang, Y., Zhu, X., Liu, X., Fan, H. & Duan, Y. 2020. Mycochemical screening and analysis, antioxidant activity, and biochemical composition of fermentation strain Snef1216 (*Penicillium chrysogenum*). *Journal of Analytical Methods in Chemistry* 2020(2): 1-8.
- Singleton, V.L. & Rossi, J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16(3): 144-158.
- Tang, H.Y., Zhang, Q., Li, H. & Gao, J.M. 2015. Antimicrobial and allelopathic metabolites produced by *Penicillium brasilianum*. *Natural Product Research* 29(4): 345-348.
- Thawai, C. 2004. Taxonomy of *Micromonospora* strains from Thai peat swamp forest soils and secondary metabolites of a selected isolate. PhD. Thesis. Chulalongkorn University (Unpublished).
- Tomoda, H., Tabata, N., Masuma, R., Si, S.Y. & Omura, S. 1998. Erabulenols, inhibitors of cholesteryl ester transfer protein produced by *Penicillium* sp. FO-5637. *The Journal of Antibiotics* 51(7): 618-623.
- Trease, G.E. & Evans, W.C. 1983. *Textbook of Pharmacognosy*. 12th ed. London: Balliers Tindall. pp. 343-384.
- Trisuwan, K., Rukachaisirikul, V., Borwornwiriyan, K., Phongpaichit, S. & Sakayaroj, J. 2014. Benzopyranone, benzophenone, and xanthone derivatives from the soil fungus *Penicillium citrinum* PSU-RSPG95. *Tetrahedron Letters* 55(7): 1336-1338.
- Trisuwan, K., Rukachaisirikul, V., Kaewpet, M., Phongpaichit, S., Hutadilok-Tawatana, N., Preedanon, S. & Sakayaroj, J. 2011. Sesquiterpene and xanthone derivatives from the sea fan-derived fungus *Aspergillus sydowii* PSU-F154. *Journal of Natural Products* 74(7): 1663-1667.

- Turbyville, T.J., Wijeratne, E.K., Liu, M.X., Burns, A.M., Seliga, C.J., Luevano, L.A., David, C.L., Faeth, S.H., Whitesell, L. & Gunatilaka, A.L. 2006. Search for Hsp90 inhibitors with potential anticancer activity: Isolation and SAR studies of radicicol and monocillin I from two plant-associated fungi of the Sonoran desert. *Journal of Natural Products* 69(2): 178-184.
- Visagie, C.M., Houbraeken, J., Frisvad, J.C., Hong, S.B., Klaassen, C.H.W., Perrone, G., Seifert, K.A., Varga, J., Yaguchi, T. & Samson, R.A. 2014. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology* 78: 343-371.
- Visagie, C.M., Houbraeken, J., Rodrigues, C., Pereira, C.S., Dijksterhuis, J., Seifert, K.A., Jacobs, K. & Samson, R.A. 2013. Five new *Penicillium* species in section *Sclerotiora*: A tribute to the Dutch Royal family. *Persoonia* 31: 42-62.
- Wang, P.L., Li, D.Y., Xie, L.R., Wu, X., Hua, H.M. & Li, Z.L. 2014. Two new compounds from a marine-derived fungus *Penicillium oxalicum*. *Natural Product Research* 28(5): 290-293.
- Wang, X., You, J., King, J.B., Powell, D.R. & Cichewicz, R.H. 2012. Waikialoid a suppresses hyphal morphogenesis and inhibits biofilm development in pathogenic *Candida albicans*. *Journal of Natural Products* 75(4): 707-715.
- Waring, P., Eichner, R.D., Tiwari-Palni, U. & Mullbacher, A. 1987. Gliotoxin-E: A new biologically-active epipolythiodioxopiperazine isolated from *Penicillium terlikowskii*. *Australian Journal of Chemistry* 40(5): 991-997.
- World Health Organization (WHO). 2019. *Guidelines on Second-and Third-Line Medicines and Type of Insulin for the Control of Blood Glucose Levels in Non-Pregnant Adults with Diabetes Mellitus*. <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/272433>. Accessed July 7, 2019.
- Zhao, J., Li, C., Wang, W., Zhao, C., Luo, M., Mu, F., Fu, Y., Zu, Y. & Yao, M. 2013. Hypocrea lixii, novel endophytic fungi producing anticancer agent cajanol, isolated from pigeon pea (*Cajanus cajan* [L.] Millsp.). *Journal of Applied Microbiology* 115(1): 102-113.

Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany  
Faculty of Pharmaceutical Sciences  
Prince of Songkla University  
Songkhla 90112  
Thailand

\*Corresponding author; email: sukanya.d@psu.ac.th

Received: 3 February 2020

Accepted: 6 January 2021

รายงานผลการจำแนกจุลินทรีย์ / IDENTIFICATION'S REPORT

ชื่อผู้ขอรับบริการ / Customer's name:	ผศ.ดร.สุกัญญา เดชอดิษฐ์	เลขที่ / No. :	TBRC2017 - 051
หน่วยงานและที่อยู่ / Institute and address:	ภาควิชาเภสัชเวท และเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112	วันที่ได้รับตัวอย่าง / Sample receive date :	04 - Nov - 2016
		วันที่รายงานผล/ Report date:	01 - Dec - 2016

ผู้ขอรับบริการส่งตัวอย่างเป็นเชื้อบริสุทธิ์เพื่อจำแนกชนิด/The customer sent pure isolate for identification

ผู้ขอรับบริการส่งเป็นตัวอย่างเพื่อคัดแยกจุลินทรีย์และได้คัดเลือกมาจำแนกชนิด/The customer sent specimen for isolation and chose isolate(s) identification

ลำดับที่ No.	รหัสตัวอย่าง Code	วิธีการจำแนกชนิด Method of identification	มีความใกล้เคียงกับ Closely related with	% ความเหมือน % similarity	หมายเหตุ Note
1	SPSF 224	Molecular method	<i>Penicillium</i> sp.	100%	
2	SPSF 318	Molecular method	<i>Aspergillus flavus</i>	100%	

เอกสารแนบ / Attachment:

(1) วิธีการวิเคราะห์ / Analytical method

(2) ลำดับนิวคลีโอไทด์ / nucleotide sequence (s)

(3) ข้อมูลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ / Sequence similarity

(4) ภาพความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ / Phylogenetic relationship

(5) เอกสารแนบอื่นๆ / other document

ผู้จัดทำรายงาน

Report by: .....

(นางสาวสลิลภาพร นวลแก้ว)  
(Ms.Salilaporn Nuankaew)

ผู้ตรวจรายงาน

Approve by: .....

(ดร.นัฐวุฒิ บุญยีน)  
(Dr.Nattawut Boonyuen)

**Disclaimer:**

ผลการตรวจสอบจากงานบริการนี้เป็นผลการตรวจสอบสำหรับชิ้นตัวอย่างที่ได้รับภายใต้สภาวะที่ระบุไว้เท่านั้นไม่สามารถใช้คาดคะเนผลที่นอกเหนือจากนี้ได้ ทั้งนี้ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) จะไม่รับผิดชอบต่อผลแห่งการกระทำหรือความเสียหายใดๆที่เกิดจากข้อมูลผลการวิเคราะห์ และโปรดทราบว่าศูนย์ฯไม่ใช่นักวิทยาศาสตร์ที่มีอำนาจในการรับรองผลการตรวจสอบใดๆ ทั้งสิ้นตลอดจนไม่อนุญาตให้ใช้ชื่อ ตราหรือสัญลักษณ์ของศูนย์ฯในการกล่าวอ้างใดๆเว้นแต่ได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจากศูนย์ฯ ก่อน  
The results obtained from the service are for the test specimens and specified condition only and cannot be used to certify the goods not tested. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC) will not take any responsibility for any consequence or damage, which may result from information obtained from the service. Please note that BIOTEC is not a certification body. Use of the Center name or symbol (Logo) in any case without written permission from BIOTEC is prohibited.

## วิธีการจำแนกชนิดรา

### Method of fungi identification

#### 1. DNA extraction

Genomic DNA was extracted from fresh mycelia using E.Z.N.A. Forensic DNA Isolation Kit (Omega Bio-Tek), following the manufacturer's manual.

#### 2. PCR: ITS

The internal transcribed spacer (ITS) region was amplified in a 50-ml reaction volume containing 1X buffer, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTPs, 0.2 μM of each primer (ITS1 and ITS4), and 1 U Taq DNA polymerase. The PCR temperature profile began with an initial denaturation at 96°C for 2 min, followed by 35 cycles of 96°C for 1 min, 53°C for 1 min and 72°C for 1:30 min. The final extension was carried out for 10 min at 72°C.

#### 3. Gel Electrophoresis and Sequencing

PCR product was checked by 1% agarose gel electrophoresis, stained with ethidium bromide, and visualized under ultraviolet (UV) transilluminator. The PCR product was sent to be sequenced for both directions on an automated DNA sequencer (Macrogen Inc., Korea).

#### 4. Sequence analyses

The nucleotide sequences obtained from all primers were assembled using Cap contig assembly program, an accessory application in BioEdit (Biological sequence alignment editor) Program (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html>). The sequences were compared with nucleotide sequences databases on Genbank, CBS or suitable databases.

#### References

- Doyle JJ and Doyle JL (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytoch. Bull.* 19: 11-15.
- Hall TA (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* 41: 95-98. Available at [<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>]. Accessed July 25, 2008.
- Omega Bio-Tek, Inc. (2013). E.Z.N.A. Forensic DNA Kit: Standard protocol.: 6-9.
- Techaprasarn J. (2010). Genetic variation of *Kaempferia* (Zingiberaceae) in Thailand based on chloroplast DNA (psbA-trnH and petA-psbJ) sequences. *Genetics and Molecular Research* 9 (4): 1957-1973.

#### Disclaimer:

ผลการตรวจสอบจากงานบริการนี้เป็นผลจากการตรวจสอบสำหรับชิ้นตัวอย่างที่ได้รับภายใต้สภาวะที่ระบุไว้เท่านั้นไม่สามารถใช้คาดคะเนผลที่นอกเหนือจากนี้ได้ ทั้งนี้ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) จะไม่รับผิดชอบต่อผลแห่งการกระทำหรือความเสียหายใดๆที่เกิดจากข้อมูลผลการวิเคราะห์ และโปรดทราบว่าศูนย์ฯไม่ใช่นิติหน่วยงานที่มีอำนาจในการรับรองผลการตรวจสอบใดๆ ทั้งสิ้นตลอดจนไม่อนุญาตให้ใช้ชื่อ ตราหรือสัญลักษณ์ของศูนย์ฯในการกล่าวอ้างใดๆเว้นแต่ได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจากศูนย์ฯ ก่อน The results obtained from the service are for the test specimens and specified condition only and cannot be used to certify the goods not tested. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC) will not take any responsibility for any consequence or damage, which may result from information obtained from the service. Please note that BIOTEC is not a certification body. Use of the Center name or symbol (Logo) in any case without written permission from BIOTEC is prohibited.

ลำดับนิวคลีโอไทด์  
Nucleotide sequence(s)

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	บริเวณของลำดับนิวคลีโอไทด์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' -> 3')
No.	Sample No.	Nucleotide region of	Nucleotide sequence (5' -> 3')
1	SPSF 224	ITS rDNA	GTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCAATTTACAGCGGACTTCGGTCTGTCTGCACCCTT GTCTTTTGCGTACTATATGTTTCCTCGGTAGGCTTGCCTGCCGATAGGACACTTATAAACTCTTTTGTAAATTGCAATC AGCGTCAGAAAAACTATAATAGTTACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA ATGCGAAAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTCGCCCCCTTGGTATTCCA TGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAATTTGTACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGTGTTTGTCCCCTATTGCCTG GACTCGCCTTAAAGCAATTGGCAGCCGGCATATTGGCCTGGAGCGCAGCACAAATTTGCACTTCTTGCCCTTGAATGTC GAGCATCCAGAAGCAACTCTTTTGGCTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGATAACCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAA ACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGTAGGGTTCCCTAGCGAGCCCAACCTCCCACCCGTGTTTACTGTACCTTAGTTG CTTCGGCGGGCCCGCCATTTCGTGGCCGCGGGGGCTCTCAGCCCCGGGCCCGCGCCCGCGGAGACACCAGAACTCT GTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAAACCTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCAT CGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGTGAATTGCAGAATTCGGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACAT TGGCCCCCTGGTATTCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCAATGCTGCCCATCAAGCACGGCTTGTGTGGGTC GTCGTCCCCTCTCCGGGGGGGACGGGCCCAAGGACGCGGGCCACCCGCTCCGATCTCGAGCGTATGGGGCTTTG TCACCCGCTCTGTAGGCCCGCGCGCTTGCCGAACGCAATCAATCTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG GATACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAG
2	SPSF 318	ITS rDNA	ACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGTAGGGTTCCCTAGCGAGCCCAACCTCCCACCCGTGTTTACTGTACCTTAGTTG CTTCGGCGGGCCCGCCATTTCGTGGCCGCGGGGGCTCTCAGCCCCGGGCCCGCGCCCGCGGAGACACCAGAACTCT GTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAAACCTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCAT CGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGTGAATTGCAGAATTCGGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACAT TGGCCCCCTGGTATTCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCAATGCTGCCCATCAAGCACGGCTTGTGTGGGTC GTCGTCCCCTCTCCGGGGGGGACGGGCCCAAGGACGCGGGCCACCCGCTCCGATCTCGAGCGTATGGGGCTTTG TCACCCGCTCTGTAGGCCCGCGCGCTTGCCGAACGCAATCAATCTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG GATACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAG

**Disclaimer:**

ผลการตรวจสอบจากงานบริการนี้เป็นผลจากการตรวจสอบสำหรับชิ้นตัวอย่างที่ได้รับภายใต้สภาวะที่ระบุไว้เท่านั้นไม่สามารถใช้คาดคะเนผลที่นอกเหนือจากนี้ได้ ทั้งนี้ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) จะไม่รับผิดชอบต่อผลแห่งการกระทำหรือความเสียหายใดๆที่เกิดจากข้อมูลผลการวิเคราะห์ และโปรดทราบว่าศูนย์ฯไม่ใช่นักวิจัยที่มีอำนาจในการรับรองผลการตรวจสอบใดๆ ทั้งสิ้นตลอดจนไม่อนุญาตให้ใช้ชื่อ ตราหรือสัญลักษณ์ของศูนย์ฯในการกล่าวอ้างใดๆเว้นแต่ได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจากศูนย์ฯ ก่อน

The results obtained from the service are for the test specimens and specified condition only and cannot be used to certify the goods not tested. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC) will not take any responsibility for any consequence or damage, which may result from information obtained from the service. Please note that BIOTEC is not a certification body. Use of the Center name or symbol (Logo) in any case without written permission from BIOTEC is prohibited.

ข้อมูลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์  
Comparison of nucleotide sequences with reference strain(s)

Strain: SPSF 224

	Description	Max score	Total score	Query cover	Ident	Accession
1	<i>Penicillium multicolor</i> strain KUC1626 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1031	1031	100%	100%	HM469407.1
2	<i>Penicillium sclerotiorum</i> isolate 113 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1016	1016	99%	99%	KU847877.1
3	<i>Penicillium</i> sp. H11-2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1011	1011	100%	99%	KT189507.1
4	<i>Penicillium maximae</i> strain LMB-HP33 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1007	1007	100%	99%	KP979776.1
5	<i>Penicillium</i> sp. MS-2011-F37 genomic DNA containing ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2, strain F37	1007	1007	100%	99%	HE608803.1
6	<i>Penicillium</i> sp. NFML_CH28_3C 40 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1005	1005	100%	99%	KM458805.1
7	<i>Penicillium glabrum</i> isolate NA-69 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1005	1005	100%	99%	JN180489.1
8	<i>Penicillium</i> sp. F03 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1005	1005	100%	99%	JF439497.1
9	<i>Penicillium multicolor</i> isolate M2 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1003	1003	99%	99%	HM595496.1
10	<i>Penicillium maximae</i> NRRL 2060 ITS region; from TYPE material	992	992	97%	99%	NR_121343.1

**หมายเหตุ** เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ ITS ของตัวอย่างรหัส SFSP 224 กับฐานข้อมูล GenBank แล้วพบว่ามีความใกล้เคียงกับราในสกุล *Penicillium* แต่ไม่สามารถจำแนกถึงระดับชนิด (species) ได้ เนื่องจากลำดับเบสนิวคลีโอไทด์มีความใกล้เคียงกับราหลายชนิด ไม่สามารถจัดจำแนกโดยใช้ลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ ITS เพียงตำแหน่งเดียวได้

**Disclaimer:**

ผลการตรวจสอบจากงานบริการนี้เป็นผลจากการตรวจสอบสำหรับชิ้นตัวอย่างที่ได้รับภายใต้สภาวะที่ระบุไว้เท่านั้นไม่สามารถใช้คาดคะเนผลที่นอกเหนือจากนี้ได้ ทั้งนี้ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) จะไม่รับผิดชอบต่อผลแห่งการกระทำหรือความเสียหายใดๆที่เกิดจากข้อมูลผลการวิเคราะห์ และโปรดทราบว่าศูนย์ฯไม่มีหน่วยงานที่มีอำนาจในการรับรองผลการตรวจสอบใดๆ ทั้งสิ้นตลอดจนไม่อนุญาตให้ใช้ชื่อ ตราหรือสัญลักษณ์ของศูนย์ฯในการกล่าวอ้างใดๆเว้นแต่ได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจากศูนย์ฯ ก่อน The results obtained from the service are for the test specimens and specified condition only and cannot be used to certify the goods not tested. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC) will not take any responsibility for any consequence or damage, which may result from information obtained from the service. Please note that BIOTEC is not a certification body. Use of the Center name or symbol (Logo) in any case without written permission from BIOTEC is prohibited.

ข้อมูลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์  
Comparison of nucleotide sequences with reference strain(s)

Strain: SPSF 318

	Description	Max score	Total score	Query cover	Ident	Accession
1	<i>Aspergillus flavus</i> strain CS08 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1066	1066	100%	100%	KX015986.1
2	<i>Aspergillus</i> sp. BAB-5910 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1066	1066	100%	100%	KX378864.1
3	<i>Aspergillus</i> sp. BAB-3401 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1066	1066	100%	100%	KM066565.2
4	<i>Aspergillus oryzae</i> strain KVCET7 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1066	1066	100%	100%	KJ941129.1
5	<i>Aspergillus flavus</i> strain USMG09 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1066	1066	100%	100%	KF434090.1
6	<i>Aspergillus flavus</i> strain USMC19 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1066	1066	100%	100%	KF434089.1
7	<i>Aspergillus flavus</i> strain USMK12 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1066	1066	100%	100%	KF434087.1
8	<i>Aspergillus flavus</i> strain USMJ03 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1066	1066	100%	100%	KF434086.1
9	<i>Aspergillus flavus</i> isolate A4S3_12 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1066	1066	100%	100%	JX501409.1
10	<i>Aspergillus flavus</i> isolate A1S4_D2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1066	1066	100%	100%	JX501360.1

**Disclaimer:**

ผลการตรวจสอบจากงานบริการนี้เป็นผลจากการตรวจสอบสำหรับชิ้นตัวอย่างที่ได้รับภายใต้สภาวะที่ระบุไว้เท่านั้นไม่สามารถใช้คาดคะเนผลที่นอกเหนือจากนี้ได้ ทั้งนี้ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) จะไม่รับผิดชอบต่อผลแห่งการกระทำหรือความเสียหายใดๆที่เกิดจากข้อมูลผลการวิเคราะห์ และโปรดทราบว่าศูนย์ฯ ไม่ใช่หน่วยงานที่มีอำนาจในการรับรองผลการตรวจสอบใดๆ ทั้งสิ้นตลอดจนไม่อนุญาตให้ใช้ชื่อ ตราหรือสัญลักษณ์ของศูนย์ฯ ในการกล่าวอ้างใดๆ เว้นแต่ได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจากศูนย์ฯ ก่อน  
The results obtained from the service are for the test specimens and specified condition only and cannot be used to certify the goods not tested. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC) will not take any responsibility for any consequence or damage, which may result from information obtained from the service. Please note that BIOTEC is not a certification body. Use of the Center name or symbol (Logo) in any case without written permission from BIOTEC is prohibited.

รายงานผลการจำแนกจุลินทรีย์ / IDENTIFICATION'S REPORT

ชื่อผู้ขอรับบริการ / Customer's name:	ผศ.ดร.สุกัญญา เดชอดิษฐ์	เลขที่ / No. :	TBRC2017 - 081
หน่วยงานและที่อยู่ / Institute and address:	ภาควิชาเภสัชเวท และเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112	วันที่ได้รับตัวอย่าง / Sample receive date :	02 - Dec - 2016
		วันที่รายงานผล/ Report date:	01 - Feb - 2017

ผู้ขอรับบริการส่งตัวอย่างเป็นเชื้อบริสุทธิ์เพื่อจำแนกชนิด/The customer sent pure isolate for identification

ผู้ขอรับบริการส่งเป็นตัวอย่างเพื่อคัดแยกจุลินทรีย์และได้คัดเลือกมาจำแนกชนิด/The customer sent specimen for isolation and chose isolate(s) identification

ลำดับที่ No.	รหัสตัวอย่าง Code	วิธีการจำแนกชนิด Method of identification	มีความใกล้เคียงกับ Closely related with	% ความเหมือน % similarity	หมายเหตุ Note
1	SPSF 224	Molecular method	<i>Penicillium</i> sp.	96%	

เอกสารแนบ / Attachment:

(1) วิธีการวิเคราะห์ / Analytical method

(2) ลำดับนิวคลีโอไทด์ / nucleotide sequence (s)

(3) ข้อมูลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ / Sequence similarity

(4) ภาพความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ / Phylogenetic relationship

(5) เอกสารแนบอื่นๆ / other document

ผู้จัดทำรายงาน

Report by: .....

(นางสาวทักษพร ธรรมรักษ์เจริญ)  
(Ms.Tuksaporn Thummarukcharoen)

ผู้ตรวจรายงาน

Approve by: .....

(ดร.นัฐวุฒิ บุญยีน)  
(Dr.Nattawut Boonyuen)

**Disclaimer:**

ผลการตรวจสอบจากงานบริการนี้เป็นผลจากการตรวจสอบสำหรับชิ้นตัวอย่างที่ได้รับภายใต้สภาวะที่ระบุไว้เท่านั้นไม่สามารถใช้คาดคะเนผลที่นอกเหนือจากนี้ได้ ทั้งนี้ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) จะไม่รับผิดชอบต่อผลแห่งการกระทำหรือความเสียหายใดๆที่เกิดจากข้อมูลผลการวิเคราะห์ และโปรดทราบว่าศูนย์ฯไม่ใช่นักวิจัยที่มีอำนาจในการรับรองผลการตรวจสอบใดๆ ทั้งสิ้นตลอดจนไม่อนุญาตให้ใช้ชื่อ ตราหรือสัญลักษณ์ของศูนย์ฯในการกล่าวอ้างใดๆเว้นแต่ได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจากศูนย์ฯ ก่อน  
The results obtained from the service are for the test specimens and specified condition only and cannot be used to certify the goods not tested. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC) will not take any responsibility for any consequence or damage, which may result from information obtained from the service. Please note that BIOTEC is not a certification body. Use of the Center name or symbol (Logo) in any case without written permission from BIOTEC is prohibited.

วิธีการจำแนกชนิดรา

Method of fungi identification

1. DNA extraction

Genomic DNA was extracted from fresh mycelia using E.Z.N.A. Forensic DNA Isolation Kit (Omega Bio-Tek), following the manufacturer's manual.

2. PCR: Beta-tubulin

Beta-tubulin region was amplified in a 50-ml reaction volume containing 1X buffer, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTPs, 0.2 μM of each primer (Bt2a and Bt2b), and 1 U Taq DNA polymerase. The PCR temperature profile began with an initial denaturation at 96°C for 2 min, followed by 35 cycles of 96°C for 1 min, 53°C for 1 min and 72°C for 1:30 min. The final extension was carried out for 10 min at 72°C.

3. Gel Electrophoresis and Sequencing

PCR product was checked by 1% agarose gel electrophoresis, stained with ethidium bromide, and visualized under ultraviolet (UV) transilluminator. The PCR product was sent to be sequenced for both directions on an automated DNA sequencer (Macrogen Inc., Korea).

4. Sequence analyses

The nucleotide sequences obtained from all primers were assembled using Cap contig assembly program, an accessory application in BioEdit (Biological sequence alignment editor) Program (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html>). The sequences were compared with nucleotide sequences databases on Genbank, CBS or suitable databases.

**References**

- Doyle JJ and Doyle JL (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytoch. Bull.* 19: 11-15.
- Hall TA (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* 41: 95-98. Available at [<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>]. Accessed July 25, 2008.
- Omega Bio-Tek, Inc. (2013). E.Z.N.A. Forensic DNA Kit: Standard protocol.: 6-9.
- Techaprasarn J. (2010). Genetic variation of *Kaempferia* (Zingiberaceae) in Thailand based on chloroplast DNA (psbA-trnH and petA-psbJ) sequences. *Genetics and Molecular Research* 9 (4): 1957-1973.

**Disclaimer:**

ผลการตรวจสอบจากงานบริการนี้เป็นผลจากการตรวจสอบสำหรับชิ้นตัวอย่างที่ได้รับภายใต้สภาวะที่ระบุไว้เท่านั้นไม่สามารถใช้คาดคะเนผลที่นอกเหนือจากนี้ได้ ทั้งนี้ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) จะไม่รับผิดชอบต่อผลแห่งการกระทำหรือความเสียหายใดๆที่เกิดจากข้อมูลผลการวิเคราะห์ และโปรดทราบว่าศูนย์ฯ ไม่ใช่หน่วยงานที่มีอำนาจในการรับรองผลการตรวจสอบใดๆ ทั้งสิ้นตลอดจนไม่อนุญาตให้ใช้ชื่อ ตราหรือสัญลักษณ์ของศูนย์ฯ ในการกล่าวอ้างใดๆ เว้นแต่ได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจากศูนย์ฯ ก่อน The results obtained from the service are for the test specimens and specified condition only and cannot be used to certify the goods not tested. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC) will not take any responsibility for any consequence or damage, which may result from information obtained from the service. Please note that BIOTEC is not a certification body. Use of the Center name or symbol (Logo) in any case without written permission from BIOTEC is prohibited.

ลำดับนิวคลีโอไทด์  
Nucleotide sequence(s)

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	บริเวณของลำดับนิวคลีโอไทด์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' -> 3')
No.	Sample No.	Nucleotide region of	Nucleotide sequence (5' -> 3')
1	SPSF 224	beta-tubulin gene	GGTGCTGCTTTCTGGTACGTGTGGTACCCGACTCACTCCCGGTCAATCATCAATTGTTGAACCCAGGGGCATGATG CTAACTCTGATTACAGGCAGAACATTGCTAGCGAGCATGGCCTCGATGGCGAGGGCCAGTAAGTATCGATTTCAGTTGG AATTGGACGTGATGAGAATGGCGGTTTGATGTGTTTTTTTTTCTTAGCTTCAGTGGCCAGTCCGACCTCCAGCTCGA GCGCATGAACGTCTACTTCAACCACGTAAGTGTGGATTGACACTCGATATGCAACTTCATCTAACATAATGGATTCT CATAGGCCAGCGGTGACCGTTACGTTCCCGTGCCGTCCTCGTTCGACTTGGAGCCCGGTACCATGGACGCTGTCCGTG CCGGTCCTTTCGGCAAGCTTTCCGTCCCGACAACCTTCGCTTCGGTCAGTCTGGTGTGGTAAACAACCTGGGCCAAGG GTCAC

**Disclaimer:**

ผลการตรวจสอบจากงานบริการนี้เป็นผลจากการตรวจสอบสำหรับชิ้นตัวอย่างที่ได้รับภายใต้สภาวะที่ระบุไว้เท่านั้นไม่สามารถใช้คาดคะเนผลที่นอกเหนือจากนี้ได้ ทั้งนี้ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) จะไม่รับผิดชอบต่อผลแห่งการกระทำหรือความเสียหายใดๆที่เกิดจากข้อมูลผลการวิเคราะห์ และโปรดทราบว่าศูนย์ฯ ไม่ใช่หน่วยงานที่มีอำนาจในการรับรองผลการตรวจสอบใดๆ ทั้งสิ้นตลอดจนไม่อนุญาตให้ใช้ชื่อ ตราหรือสัญลักษณ์ของศูนย์ฯ ในการกล่าวอ้างใดๆ เว้นแต่ได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจากศูนย์ฯ ก่อน

The results obtained from the service are for the test specimens and specified condition only and cannot be used to certify the goods not tested. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC) will not take any responsibility for any consequence or damage, which may result from information obtained from the service. Please note that BIOTEC is not a certification body. Use of the Center name or symbol (Logo) in any case without written permission from BIOTEC is prohibited.

ข้อมูลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์  
Comparison of nucleotide sequences with reference strain(s)

Strain: SPSF 224

	Description	Max score	Total score	Query cover	Ident	Accession
1	<i>Penicillium multicolor</i> beta tubulin (BT) gene, partial cds	737	737	94%	96%	EU427265.1
2	<i>Penicillium maximae</i> strain NRRL2060 beta-tubulin gene, partial cds	671	671	86%	96%	KC773795.1
3	<i>Penicillium viticola</i> strain DAOM 239934 beta-tubulin (benA) gene, partial cds	628	628	100%	91%	JN686371.1
4	<i>Penicillium sclerotiorum</i> BT2 gene for beta-tubulin, partial sequence	621	621	100%	90%	AB540176.1
5	<i>Penicillium sclerotiorum</i> strain NRRL 2074 beta-tubulin (benA) gene, partial cds	617	617	99%	90%	JN626001.1
6	<i>Penicillium sclerotiorum</i> strain DAOM 239930 beta-tubulin (benA) gene, partial cds	612	612	99%	90%	JN625998.1
7	<i>Penicillium</i> sp. CNU 100148 beta-tubulin (benA) gene, partial cds	610	610	99%	90%	JX436494.1
8	<i>Penicillium</i> sp. CNU 100097 beta-tubulin (benA) gene, partial cds	610	610	99%	90%	JX436493.1
9	<i>Penicillium viticola</i> strain DAOM 239933 beta-tubulin (benA) gene, partial cds	610	610	100%	90%	JN686370.1
10	<i>Penicillium sclerotiorum</i> strain NRRL 32583 beta-tubulin (benA) gene, partial cds	606	606	99%	90%	JN626002.1

หมายเหตุ เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ beta tubulin gene ของตัวอย่างรหัส SPSF 224 กับฐานข้อมูล GenBank แล้วพบว่ามีความใกล้เคียงกับราในสกุล *Penicillium* แต่ไม่สามารถจำแนกถึงระดับชนิด (species) เนื่องจากมีความแตกต่างของลำดับเบสนิวคลีโอไทด์มากเกินไปกว่าที่ยอมรับได้

จากข้อมูลการเปรียบเทียบลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ ITS และ Beta-tubulin gene กับฐานข้อมูลสากล พบว่ายังไม่สามารถจัดจำแนกให้มีความใกล้เคียงกับราชนิดใดในสกุล *Penicillium* ได้ จึงมีความเป็นไปได้ที่ราตัวอย่าง SPSF 224 นี้ อาจจะเป็น new species ของราสกุล *Penicillium* แต่ทั้งนี้ต้องอาศัยการศึกษาเพิ่มเติม เช่น (1) การเพิ่มยีนในการวิเคราะห์ (RPB2 และ Calmodulin gene) (2) การใช้ Phylogenetic tree ในการวิเคราะห์ผล (3) การพิจารณาลักษณะทางสัณฐานวิทยาประกอบกัน เป็นต้น จึงจะสามารถตอบได้ว่า ตัวอย่างรหัส SPSF 224 เป็น new species จริงหรือไม่

**Disclaimer:**

ผลการตรวจสอบจากงานบริการนี้เป็นผลจากการตรวจสอบสำหรับชิ้นตัวอย่างที่ได้รับภายใต้สภาวะที่ระบุไว้เท่านั้นไม่สามารถใช้คาดคะเนผลที่นอกเหนือจากนี้ได้ ทั้งนี้ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) จะไม่รับผิดชอบต่อผลแห่งการกระทำหรือความเสียหายใดๆที่เกิดจากข้อมูลผลการวิเคราะห์ และโปรดทราบว่าศูนย์ฯ ไม่ใช่นักวิทยาศาสตร์ที่มีอำนาจในการรับรองผลการตรวจสอบใดๆ ทั้งสิ้นตลอดจนไม่อนุญาตให้ใช้ชื่อ ตราหรือสัญลักษณ์ของศูนย์ฯ ในการกล่าวอ้างใดๆ เว้นแต่ได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจากศูนย์ฯ ก่อน The results obtained from the service are for the test specimens and specified condition only and cannot be used to certify the goods not tested. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC) will not take any responsibility for any consequence or damage, which may result from information obtained from the service. Please note that BIOTEC is not a certification body. Use of the Center name or symbol (Logo) in any case without written permission from BIOTEC is prohibited.



**Culture ID: 17-492**

Sent by Asst. Prof. Dr. Sukanya Dej-adisai,  
Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany,  
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Prince of Songkla University,  
Hat-Yai District, Songkhla Province, Thailand, 90110.  
Pure culture, Strain designation: SPSF 224

Identification approach:

We have performed DNA extraction and sequencing of the rDNA ITS fragment, which is the first common DNA-barcode for Fungi (Schoch *et al.* 2012). Additionally, we amplified and sequenced the large subunit of rDNA (LSU) and partial Calmodulin gene (e.g. Visagie *et al.* 2013). The fungus rDNA-ITS fragment showed two different operons and was therefore not useful for identification. Comparison of assembled Calmodulin sequences was performed with GenBank, MycoID and various databases as well as with the Type species of *Penicillium maximae*.

Sequence matches:

Species	Gene	GenBank Accession	Strain	Length (basepairs)	Sequence similarity (%)
<i>Penicillium maximae</i>	CALM	KC773821	NRRL2060	427/435	98

Identification result:

***Penicillium maximae*** C.M. Visagie, J. Houbraken & R.A. Samson, *Persoonia* 31: 52 (2013) [MB#803783]

*P. maximae* belongs to the Section Sclerotiora within the genus *Penicillium*.

References:

Schoch CL *et al.* (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *PNAS* 109: 6241-6246.

Visagie C.M.; Houbraken J.; Rodrigues C.; Silva Pereira, C.; Dijksterhuis J.; Seifert K.A.; Jacobs K.; Samson R.A. 2013. Five new *Penicillium* species in section Sclerotiora: a tribute to the Dutch Royal family. *Persoonia*. 31:42-62

PD Dr. Christiane Baschien

Curator

Braunschweig, 17. August 2017

