บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ valencene ด้วย *Aspergillus niger*

จากการทดลองทำการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ valencene พบว่าเมื่อตรวจสอบผลด้วยเทคนิค TLC จะเห็นว่าในชุดทดลองไม่ปรากฏจุดของสารอื่นเกิดขึ้นนอกเหนือจากจุดของสารตั้งต้น แสดงว่าไม่มีผลิตภัณฑ์เกิดขึ้น และเมื่อตรวจสอบอีกครั้งด้วยเทคนิค GC ปรากฏว่าไม่มีผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นเนื่องจากในส่วนของชุดทดลองทุกชุดไม่ปรากฏพีคอื่นนอกเหนือจากพีคในชุดควบคุมทั้งสอง คือในชุดควบคุมที่ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อและ valencene ก็มีพีคปรากฏที่เวลาประมาณ 7.2 และในชุดควบคุมที่ประกอบด้วยอาหารและเชื้อรา ปรากฏว่ามีพีคปรากฏขึ้นที่เวลา ประมาณ 8.2 และเมื่อดูจากกราฟแสดงการเจริญเติบโตของ *A. niger* ปรกติกับเมื่อใส่ valencene จะเห็นว่ามีการเจริญเติบโตเหมือนกัน คือ valenceneไม่มีผลให้การเจริญเติบโตของ *A. niger* เปลี่ยนแปลง แสดงว่าทั้ง *A. niger* และ valencene ไม่มีปฏิกิริยาต่อกัน

การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ pterocarpol ด้วย *Aspergillus niger*

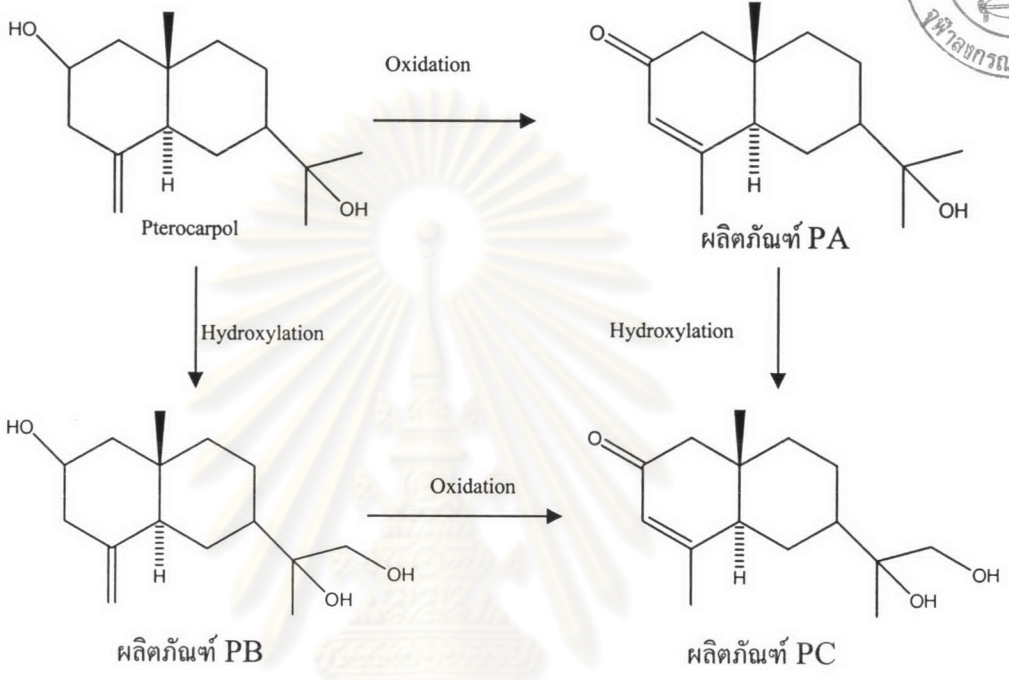
จากการทดลองทำการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ pterocarpol พบว่าเมื่อตรวจสอบผลด้วยเทคนิค TLC จะเห็นว่าในชุดทดลองปรากฏจุดของสารในโครมาโทแกรมบนแผ่นธินเลเยอร์โครมาโทกราฟฟี 4 จุดด้วยกัน คือ จุดที่อยู่บนสุดมีค่า $R_f = 0.697$ ซึ่งเป็นจุดของสารตั้งต้นที่ยังเหลืออยู่ จุดที่สอง (PA) อยู่ที่ $R_f = 0.629$ จุดที่สาม (PB) อยู่ที่ $R_f = 0.455$ และจุดที่สี่ (PC) อยู่ที่ $R_f = 0.318$ โดยสามจุดหลังเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น จากค่า R_f สามารถเรียงลำดับสภาพขั้วของสารทั้ง 3 ชนิดโดยผลิตภัณฑ์ PC มีสภาพขั้วสูงที่สุด รองลงมาคือ ผลิตภัณฑ์ PB และ ผลิตภัณฑ์ PA ตามลำดับ

ภายหลังจากการพิสูจน์โครงสร้างของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธีทางเคมีของผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 พบว่า ผลิตภัณฑ์ PA ที่ได้ต่างจากสารตั้งต้น คือมีการเติมหมู่คีโตนลงในโครงสร้างตรงตำแหน่งคาร์บอนที่ 2 ในโมเลกุล คือมีการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันขึ้น โดยอาศัยเอนไซม์ออกซิเดสจาก *A. niger* ทำให้จากเดิมที่เคยเป็นหมู่ไฮดรอกซิลถูกออกซิไดซ์เกิดเป็นคีโทนแทน และเกิดการเคลื่อนย้ายของพันธะคู่เข้าไปในวง พบว่าเหมือนกับ Bahl และคณะในปี 1968 ที่ได้ทำการออกซิไดซ์

pterocarpol ด้วย dichromate ในสภาวะที่เป็นกรด ได้เป็นโครงสร้างที่เหมือนกับผลิตภัณฑ์ PA นอกจากนี้ ยังมีรายงานการพบสารที่มี โครงสร้างที่เหมือนกับผลิตภัณฑ์ PA มีชื่อว่า isopterocarpolone ซึ่งสกัดได้จาก *Pterocarpus santalinus* (Narendra และคณะ, 1974) และ *Eremophila scoparia* (Peter และคณะ, 1984) ในส่วนของผลิตภัณฑ์ PB ที่ได้จากปฏิกิริยาไบโอทรานส์ฟอร์เมชันด้วย *A. niger* พบว่า ผลิตภัณฑ์ PB ที่ได้มีการเติมหมู่ไฮดรอกซิลลงในตำแหน่งคาร์บอนที่ 12 ของโมเลกุลซึ่งแต่เดิมเป็นหมู่เมทิล ทำให้มีหมู่ไฮดรอกซิลเมทิลเกิดขึ้น โดยอาศัยเอนไซม์ไฮดรอกซิเลสเกิดเป็นปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชั่นขึ้น และจากการค้นคว้าไม่พบรายงานเกี่ยวกับสารนี้จึงคาดว่าเป็นสารใหม่ และในส่วนของผลิตภัณฑ์ PC ที่ได้มีโครงสร้างเหมือนกับผลิตภัณฑ์ PA และ PB รวมกัน แสดงว่ามีการเกิดทั้งปฏิกิริยาออกซิเดชั่นและไฮดรอกซิเลชัน และจากการค้นคว้าไม่พบรายงานเกี่ยวกับสารนี้จึงคาดว่าเป็นสารใหม่ จะเห็นว่า *A .niger* สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่และไฮดรอกซิเลชัน ซึ่งที่ผ่านมาก็มีรายงานว่า *A. niger* มีความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาดังกล่าว เช่นเปลี่ยน α-pinene เป็น verbenol โดยปฏิกิริยาออกซิเดชั่น และเปลี่ยนเป็น verbenone ต่อโดยปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชั่น (Agrawal และ Joseph, 2000) โดย *A. niger* สามารถเปลี่ยนสารเทอร์พีนอยด์โดยเกิดปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชั่นดังนี้ เปลี่ยน drimenol (Hector และ Manuel. 1993) เปลี่ยน stemodin (Avril และ Paul, 2002) เปลี่ยน acyclic isoprenoids (Madyastha และ Gururaja, 1993) และเปลี่ยน germacrane (Yoshinori, Hironobu และ Masao, 1991)

เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างของผลิตภัณฑ์ทั้งสามชนิดที่ได้จากการวิเคราะห์ผลทางเคมี และผลจากการตรวจสอบด้วยเทคนิคธินเลเยอร์โครมาโทกราฟฟี อาจคาดได้ว่าผลิตภัณฑ์ชนิดแรกที่เกิดขึ้นในกระบวนการไบโอทรานส์ฟอร์เมชันน่าจะเริ่มจากเชื้อ *A. niger* เกิดปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชันขึ้นที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 12 ในโครงสร้างของ pterocarpol ได้ผลิตภัณฑ์ PB เกิดขึ้น และเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นโดยเติมหมู่คีโทนที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 2 ในโครงสร้างของ pterocarpol ได้ผลิตภัณฑ์ PA จากนั้นก็เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นโดยเติมหมู่คีโทนที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ในโครงสร้างของผลิตภัณฑ์ PB ได้เป็นผลิตภัณฑ์ PC หรือเกิดปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชันขึ้นที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 12 ในโครงสร้างของ ผลิตภัณฑ์ PA ได้เป็นผลิตภัณฑ์ PC โดยสามารถเขียนเป็นปฏิกิริยาการเกิด ไบโอทรานส์ฟอร์เมชันของ pterocarpol ดังแสดงในรูปที่ 42

จากผลิตภัณฑ์ทั้งหมดที่ได้จากการเปลี่ยนโครงสร้างของ pterocarpol สามารถเขียนปฏิกิริยาการเกิดได้ดังนี้



รูปที่ 42 ปฏิกิริยาไบโอทรานส์ฟอร์เมชันของ pterocarpol ด้วย *A. niger*

ในส่วนของความเข้มข้นของสารตั้งต้นจากโครมาโทแกรมบนแผ่นธินเลเยอร์โครมาโทกราฟฟีพบว่า ยิ่งความเข้มข้นของสารตั้งต้นมากก็จะยิ่งมีสารตั้งต้นเหลือมาก แสดงว่ามีสารตั้งต้นมากเกินพอเกินกว่าจะเกิดปฏิกิริยาไบโอทรานส์ฟอร์เมชันจึงเลือกที่ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดในการศึกษาคือ ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมมาทำการศึกษาต่อ ในส่วนของระยะเวลาพบว่าในวันที่ 3 5 และ 7 ไม่มีความต่างกันของความเข้มสีของผลิตภัณฑ์ จากการตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC นี้ไม่สามารถระบุเป็นค่าที่แน่นอนได้จึงทำการตรวจสอบปริมาณของผลิตภัณฑ์หลักที่เกิดขึ้นด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทรกราฟฟี พบว่าที่ความเข้มข้นของสารตั้งต้น 5 มิลลิกรัม เมื่อเวลาผ่านไปพบว่าวันที่ 7 ให้ปริมาณของผลิตภัณฑ์ PB มากที่สุดจึงถือว่าเป็นผลิตภัณฑ์หลัก แต่ก็ไม่มีความแตกต่างมากนักเมื่อเทียบกับวันที่ 3 และวันที่ 5 แสดงว่าวันที่ 3 อัตราการเกิดปฏิกิริยาไบโอทรานส์ฟอร์ เมชันเริ่มคงที่แล้ว และเมื่อเทียบกับปริมาณของสารตั้งต้นที่หายไปพบว่ามีความสัมพันธ์กันคือปริมาณสารตั้งต้นเริ่มลดลงจนเกือบคงที่ในวันที่ 3 5 และ 7 เช่นเดียวกัน

จากรูปที่ 19 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญของเชื้อเมื่อใส่และไม่ใส่ pterocarpol พบว่าเชื้อรา *A. niger* มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นและเมื่อนำมาเทียบกับผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจะเห็นว่าอัตราการเจริญของเชื้อกับผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นมีแนวโน้มไปในทางเดียวกันคือ เมื่อเวลาเพิ่มขึ้นการเจริญเติบโตของเชื้อกับผลิตภัณฑ์ก็เพิ่มขึ้นด้วยแต่เมื่อถึงจุดหนึ่งคือเมื่อการเจริญเติบโตลดลงการสร้างผลิตภัณฑ์ก็เริ่มคงที่ เป็นไปได้ว่าเชื้อมีการเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้นเพื่อที่จะเปลี่ยนสารตั้งต้นและเมื่อได้ผลิตภัณฑ์แล้วเชื้อก็กลับมาเจริญปกติ และถึงแม้ว่าการเจริญของ *A. niger* จะเริ่มคงที่แต่ก็ยังมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสารอยู่สังเกตจากผลิตภัณฑ์ PC ที่เกิดขึ้นจึงคาดว่าการคงที่ของผลิตภัณฑ์ PB น่าจะเกิดจากการลงกิจกรรมของเอนไซม์ลง ซึ่งสอดคล้องกับผลการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ limonene โดย *Pseudononas putida* (Chatterjee และ Bhattacharyya, 2001) และเมื่อดูจากผลการทดสอบการต้าน *A. niger* ของสารตั้งต้นพบว่า สารตั้งต้นมีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อมากกว่าผลิตภัณฑ์ คาดว่าเชื้อราเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารตั้งต้นให้เป็นสารที่มีความเป็นพิษต่อตัวมันเองลดลง ซึ่งสอดคล้องผลการรายงานของ Hassane และคณะในปี 2000 ที่ทำการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ dehydropinguisenol โดย *A. niger* ด้วยการเร่งการเจริญเติบโตขึ้นให้มีปริมาณเอนไซม์มากพอที่จะเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสารเพื่อดำรงชีวิตรอด ในสภาพแวดล้อมนั้น

ศึกษาฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ของ pterocarpol และ PB

จากการเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ของ pterocarpol กับ PB พบว่า PB ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ pterocarpol มีฤทธิ์การต้านเชื้อราลดลงเมื่อเทียบกับ pterocarpol ในทุกเชื้อทดสอบ โดยเริ่มจากเชื้อ *A. niger* ซึ่งเป็นเชื้อราที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ pterocarpol แสดงว่าการที่ ผลิตภัณฑ์ PB ที่เกิดขึ้นอาจเนื่องมาจากการที่ *A. niger* ลดพิษของ pterocarpol ลงให้เป็นสารที่เป็นพิษกับตัวมันเองน้อยลงเพื่อการดำรงชีวิตรอด ซึ่งก็ให้ผลในแนวเดียวกันนี้กับเชื้อราตัวอื่นที่นำมาทดสอบแต่จะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อราเอง และเมื่อดูจากโครงสร้างทางเคมีของPB ซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซิลเพิ่มขึ้นจากสารตั้งต้นแสดงว่าการมีหมู่ไฮดรอกซิลเกิดขึ้นทำให้ฤทธิ์การต้านเชื้อราลดลงซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Maatooq และคณะในปี 1996 ที่พบว่าการมีหมู่ไฮดรอกซิลเพิ่มขึ้นทำให้ฤทธิ์การต้าน *A. niger* และ *A. fumigatus* ของ eudesmanoidsลดลง ในส่วนของฤทธิ์การต้านแบคทีเรียพบว่า จากผลการต้านแบคทีเรียของ pterocarpol เทียบกับ PB พบว่า PB มีฤทธิ์การต้านแบคทีเรียมากกว่า pterocarpol ในทุกเชื้อทดสอบโดยแสดงฤทธิ์ยับยั้งได้มากที่สุดในเชื้อ *Staphylococcus aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก แสดงว่า PB ที่เกิดขึ้นมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแต่ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ในด้านต่างๆต่อไป และการที่ PB มีหมู่ไฮดรอกซิลเพิ่มขึ้นจาก

pterocarpol ส่งผลให้ PB มีฤทธิ์ในการมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์แตกต่างกัน ซึ่งเป็นประโยชน์ในการใช้เป็นแนวทางการศึกษาเกี่ยวกับโครงสร้างกับการออกฤทธิ์ของสาร

เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ valencene และ pterocarpol ด้วย *A. niger*

จากการที่ *A. niger* สามารถเปลี่ยน pterocarpol ได้แต่ไม่สามารถเปลี่ยน valencene ได้อาจเนื่องมาจากการที่เอนไซม์มีความจำเพาะต่อตำแหน่งที่จะเกิดปฏิกิริยา คือ เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่หมู่ไฮดรอกซิลได้เป็นคีโทน แต่ valencene ไม่มีหมู่ไฮดรอกซิล จากการค้นคว้าพบว่า valencene สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นได้แต่ต้องผ่านการเกิด ไฮดรอกซิเลชันให้หมู่ไฮดรอกซิลก่อน จึงจะเกิดออกซิเดชั่นได้เป็นคีโทน ส่วนปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชั่นพบว่าเกิดตรงหมู่เมทิล ที่ใกล้กับหมู่ไฮดรอกซิล โดยที่หมู่เมทิลตรงอื่นไม่เกิดปฏิกิริยา ทำให้ไม่เกิดปฏิกิริยานี้กับ valencene เช่นเดียวกัน และเมื่อเทียบกับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารเทอร์พีนอยด์ตัวอื่นแต่ใช้ *A. niger* สายพันธุ์เดียวกัน (จรัสลักษณ์, 2543) พบว่าสามารถเกิดปฏิกิริยาทั้ง ไฮดรอกซิเลชันและออกซิเดชันที่หมู่เมทิลลีนได้เป็นไฮดรอกซิลและคีโทนตามลำดับ แสดงว่านอกจากเอนไซม์มีความจำเพาะต่อตำแหน่งที่จะเกิดปฏิกิริยาแล้วยังมีความจำเพาะกับโครงสร้างสารตั้งต้นด้วย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย