บทที่ 5
สรุปและอภิปรายผล

สรุปผลการทดลอง

จากการทดสอบยืนยันประสิทธิภาพของราจากป่าชายเลนในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช บนอาหารทดสอบ PDA/DW และ PDA/SW ด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อร่วมกัน (Dual culture technique) แสดงให้เห็นว่าราจากป่าชายเลนแต่ละสายพันธุ์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช และราจากป่าชายเลนแต่ละสายพันธุ์สามารถยับยั้งราสาเหตุโรคพืชแต่ละชนิดได้ต่างกัน เมื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากราป่าชายเลนโดยใช้สภาวะตั้งต้นสองสภาวะ ได้แก่ สภาวะตั้งต้นที่ตั้งทิ้งไว้ (Static) และสภาวะตั้งต้นที่เขย่า (Shaking) ด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที พบว่าสารสกัดจากราทะเลสายพันธุ์ BUSK 55-1 ให้ผลของสารสกัดในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทุกชนิดสูงสุด และเมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ของสารสกัดที่ได้จากการศึกษาสภาวะตั้งทิ้งไว้ กับสภาวะตั้งต้นที่เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที พบว่าสารสกัดจากราจากป่าชายเลนส่วนใหญ่มีฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชเพิ่มขึ้น

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงราจากป่าชายเลนให้ผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืช โดยใช้สภาวะทางกายภาพต่าง ๆ ได้แก่ ความเค็มของอาหารเหลว ชนิดของอาหารเหลว ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลว ความเร็วรอบในการเขย่า อุณหภูมิ และระยะเวลาที่เหมาะสม ตามลำดับ พบว่าความเค็มที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งของราจากป่าชายเลนแต่ละสายพันธุ์แตกต่างกัน โดยราทะเลใช้ความเค็มที่เหมาะสม 15-20 ppt และราเอนโดไฟท์ใช้ความเค็มที่เหมาะสมอยู่ในช่วงต่ำ ๆ ระหว่าง 0-10 ppt ส่วนสภาวะทางกายภาพอื่น ๆ มีสภาวะเหมาะสมไม่แตกต่างกัน ชนิดของอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชเป็นอาหารที่มีสารอาหารสมบูรณ์ (Rich nutrient media) ได้แก่ PDB, YMB และ SDB ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมเท่ากับ 6 ความเร็วในการเขย่าที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 100-150 รอบ/นาที อุณหภูมิที่เหมาะสม 22- 28 องศาเซลเซียส และระยะเวลาที่เหมาะสมคือ 7 วัน ยกเว้นราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 ใช้ระยะเวลาที่เหมาะสมเท่ากับ 4 วัน เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดที่ได้กับสารสกัดจากการศึกษาสภาวะตั้งต้น พบว่าสภาวะทางกายภาพที่เหมาะสมส่งผลให้ราจากป่าชายเลนผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเพิ่มขึ้น พบฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชเพิ่มขึ้นสูงสุดถึง 10 เท่า จากสารสกัดของราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 ภายหลังการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมพบว่าสารสกัดจาก

ราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 และราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 มีฤทธิ์ยับยั้งสูงสุดสองอันดับแรก

เมื่อใช้สภาวะที่เหมาะสมเลี้ยงราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 และราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 ในอาหารเหลวปริมาตร 50 มิลลิลิตร (ก่อนการขยายขนาดการหมัก) และ 1000 มิลลิลิตร (ภายหลังการขยายขนาดการหมัก) พบว่าผลผลิต และฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดที่ได้ภายหลังการขยายการหมักราจากป่าชายเลนให้ผลแตกต่างกัน จากค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของผลผลิตสารสกัดภายหลังขยายขนาดการหมักสูงกว่าผลผลิตที่ได้ก่อนขยายขนาดการหมัก และสารสกัดจากราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 มีฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทุกชนิดเพิ่มขึ้นประมาณ 0.2-0.4 เท่า ยกเว้นฤทธิ์ยับยั้ง *Pestalotiopsis* sp. ที่ไม่แตกต่างกันกับฤทธิ์ของสารสกัดก่อนขยายขนาดการหมัก ส่วนฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดจากราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 ของสารสกัดก่อนขยายขนาดการหมักไม่แตกต่างกับฤทธิ์ของสารสกัดภายหลังการขยายการหมักฤทธิ์ยับยั้ง

เมื่อแยกสารองค์ประกอบของสารสกัด ด้วยวิธี Thin-layer chromatography (TLC) พบว่าตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม: เอธิลอะซิเตต: เมทานอล ในอัตราส่วน 8: 1.5: 0.5 เป็นตัวทำละลายที่แยกสารองค์ประกอบจากสารสกัดของราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 ได้ชัดเจน และคลอโรฟอร์ม: เอธิลอะซิเตต ในอัตราส่วน 8.5: 1.5 เป็นตัวทำละลายที่แยกสารองค์ประกอบจากสารสกัดของราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 ได้ชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบจำนวนชนิดของสารองค์ประกอบที่ได้จากสารสกัดในการศึกษาสภาวะตั้งต้นที่ตั้งทิ้งไว้ สภาวะตั้งต้นที่เขย่า 150 รอบ/นาที สารสกัดจากการศึกษาสภาวะเหมาะสมก่อนขยายขนาดการหมัก และหลังขยายการหมัก พบจำนวนสารองค์ประกอบจากสารสกัดราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 เป็น 1, 5, 8 และ 9 ชนิด ตามลำดับ และจำนวนสารองค์ประกอบจากสารสกัดราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 เป็น 2, 1, 5 และ 7 ชนิด ตามลำดับ ในการเลี้ยงราป่าชายเลนในสภาวะเหมาะสมนอกจากจะพบความแตกต่างของสารองค์ประกอบแล้วยังพบว่าความเข้มข้นของสารองค์ประกอบที่ได้เพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับสภาวะตั้งต้นที่ตั้งทิ้งไว้ และสภาวะตั้งต้นที่เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที และเมื่อนำสารองค์ประกอบจากสารสกัดของราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 ที่แยกได้บนแผ่น TLC ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืชด้วยวิธี TLC Disc diffusion พบว่าสารองค์ประกอบที่ 8 (Rf 0.78) มีฤทธิ์ยับยั้ง *A. brassicicola* และสารองค์ประกอบที่ 2 (Rf 0.43), 3(Rf 0.48), 5-6 (Rf 0.64, Rf 0.68) และ 7 (Rf 0.71) มีฤทธิ์ยับยั้ง *C. gloeosporioides* ส่วนสารองค์ประกอบที่ 4 (Rf 0.58) มีฤทธิ์ยับยั้ง *Pestalotiopsis* sp.

อภิปรายผลการทดลอง

ราจากป่าชายเลนเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพขนาดใหญ่ (Lin et al., 2001; Sridhar, 2004; Bugni & Ireland, 2004) และเป็นรากลุ่มหนึ่งที่ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการเกษตรเพื่อควบคุมราสาเหตุโรคพืช (Elavarasi, Sathiya, Rathna, & Kalaiselvam, 2012) การยับยั้งราสาเหตุโรคพืชอาจเกิดจาก 2 กลไก ได้แก่ การผลิตเอนไซม์ออกมายับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืช หรือการผลิตสารทุติยภูมิเพื่อยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืช (Pal & Gardemer, 2006; Mishra et al., 2011) ซึ่งราจากป่าชายเลน และราในระบบนิเวศทางทะเลอื่น ๆ จะขับสารทุติยภูมิออกมานอกเซลล์ (Secondary metabolite) เพื่อป้องกันตนเองจากสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงหรือป้องกันตนเองจากสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ในระบบนิเวศนั้น (Rodrigues et al., 2011; Kansoh et al., 2010; Singh, Mentel, & Lindequist, 2011; Li, Lan, Lam, Yang, & Zhu, 2011)

สภาวะทางกายภาพของสภาพแวดล้อมที่มีผลต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของระบบนิเวศทางทะเล ได้แก่ ความเค็ม ค่าความเป็นกรด-ด่าง ความเข้มข้นของโซเดียมไอออน อุณหภูมิที่ต่ำ และอาหารที่จำกัด (Georgiou, Patsoukis, Papapostolou, & Zervoudakis, 2006; Huang et al., 2011b) และสภาวะดังกล่าวมีผลต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ในห้องปฏิบัติการเช่นกัน (Phattanawasin, Pojohanakom, Sotanaphun, Piyapolrungroj, & Zungsontiporn, 2007)

จากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากราป่าชายเลนที่เลี้ยงโดยใช้สภาวะตั้งต้นที่ตั้งทิ้งไว้ (Static) และสภาวะตั้งต้นที่เขย่า (Shaking) ด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที พบว่าสารสกัดของราจากป่าชายเลนส่วนใหญ่มีฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชเพิ่มขึ้นเมื่อเลี้ยงในสภาวะตั้งต้นที่เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที ปัจจัยที่แตกต่างระหว่างสองสภาวะตั้งต้นนี้คือ ความเร็วรอบในการเขย่าทำให้ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเหลวแตกต่างกัน อาหารเหลวที่มีปริมาณออกซิเจนละลายอยู่เพียงพอส่งผลให้ราจากระบบนิเวศทางทะเลผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชเพิ่มขึ้น ซึ่งในกระบวนการหมักเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นสารปฏิชีวนะนั้นจุลินทรีย์ต้องการออกซิเจนในปริมาณสูง (Stanbury, Whitaker & Hall, 1995) ส่วนใหญ่รามีกระบวนการหายใจแบบใช้ออกซิเจน (Aerobic respiration) (Walker & White, 2011) ซึ่งราจากระบบนิเวศทางทะเลก็เช่นกัน เนื่องจากการแยกเชื้อจากสิ่งแวดล้อมมักทำในสภาวะที่มีออกซิเจน (Cathrine & Raghukumar, 2009) ในเซลล์ราทั่วไปออกซิเจนทำหน้าที่ร่วมกับ Oxidative enzymes ในกระบวนการ Oxidation ของแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ โดยเฉพาะ Glucose ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนหลัก (Walker & White, 2011) ทำให้เซลล์ได้รับพลังงาน ได้สารตั้งต้นเพื่อใช้ในการสังเคราะห์สารปฐมภูมิ (Primary metabolite) ที่จำเป็นต่อการเจริญ รวมทั้งสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ (Secondary metabolite) (Stanbury et al., 1995) ในกลุ่มของราทะเล

ไม่พบการรายงานปริมาณออกซิเจนในอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการเจริญ หรือการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ พบเพียงข้อมูลทั่วไปที่กล่าวถึงปริมาณออกซิเจนที่เหมาะสมในกระบวนการหมักที่ส่งผลดีต่อการผลิตสารทุติยภูมิของจุลินทรีย์ในห้องปฏิบัติการ คือการเลี้ยงจุลินทรีย์ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250-500 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวปริมาตร 50-100 มิลลิลิตร และบ่มด้วยเครื่องเขย่า (Incubator shaker) (Stanbury et al., 1995)

จากการศึกษาสภาวะทางกายภาพที่เหมาะสม โดยเริ่มต้นจากการศึกษาความเค็มของอาหารเหลว สามารถแบ่งกลุ่มของราจากป่าชายเลนในการใช้ความเค็มที่เหมาะสมต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ของราจากป่าชายเลนออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ผลิตสารออกฤทธิ์ได้ดีเมื่อไม่มีความเค็ม กลุ่มที่ผลิตสารออกฤทธิ์ดีเมื่อมีความเค็มและกลุ่มที่ผลิตสารออกฤทธิ์ดีไม่แตกต่างกันเมื่อไม่มีความเค็ม หรือมีความเค็ม จากการศึกษาพบว่าราจากป่าชายเลนที่ศึกษาใช้ความเค็มที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 10-20 ppt ราเอนโดไฟท์จากป่าชายเลนใช้ความเค็มที่เหมาะสมในช่วง 0-10 ppt ยกเว้นราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 เป็นราเพียงสายพันธุ์เดียวในการศึกษาครั้งนี้ที่ผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชได้ดีในอาหารเหลวที่ไม่มีความเค็ม ราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 สามารถผลิตสารยับยั้งประสิทธิภาพสูงในอาหารที่ไม่มีความเค็ม และอาหารที่มีความเค็ม 15 ppt ได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ สอดคล้องกับรายงานค่าความเค็มที่ส่งผลให้ราทะเลผลิตสารออกฤทธิ์ที่มีประสิทธิภาพสูง เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ผสมน้ำทะเล 20-60 เปอร์เซ็นต์ (Masuma et al., 2001; Bugni & Ireland, 2004) นอกจากนี้ยังพบการรายงานของราจากระบบนิเวศทางทะเลส่วนใหญ่ (คิดเป็น 61.7 เปอร์เซ็นต์ จากราทะเลที่ถูกศึกษาทั้งหมด 47 สายพันธุ์) สามารถผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีในอาหารที่ไม่มีความเค็ม (Huang et al., 2011b) และราในระบบนิเวศทางทะเล *Emericella niduland* ผลิต Unguinol ที่มีประสิทธิภาพสูงต่อการยับยั้ง Pyruvate phosphate dikinase ของพืช C4 ในอาหารที่ไม่มีความเค็ม (Motti et al., 2007) อย่างไรก็ตามผลที่ได้แตกต่างจากการศึกษาความเค็มที่เหมาะสมของราในระบบนิเวศทางทะเล *Aspergillus fumigatus* ในการผลิต Gliotoxin ปริมาณสูงจากการเลี้ยงด้วยอาหารเหลวที่เตรียมด้วยน้ำทะเล (30 ppt) (Kerzaon et al., 2007) และการผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียของราในระบบนิเวศทางทะเล *Arthrinium* c. f. *saccharicola* ในอาหารที่มีความเค็ม 34 ppt (Miao et al., 2006) การที่ราในระบบนิเวศทางทะเลผลิตสารออกฤทธิ์ได้ดีในอาหารที่ไม่มีความเค็ม อาจเนื่องจากในสภาพแวดล้อมทางทะเลราต้องใช้พลังงานส่วนหนึ่งไปควบคุมแรงดันออสโมซีส ทำให้ประสิทธิภาพในการผลิตสารทุติยภูมิลดลง หรือมีอัตราการผลิตช้าลง (Bugni & Ireland, 2004)

จากการศึกษาพบว่าอาหารเหลวที่มีสารอาหารสมบูรณ์ (Rich nutrient media) เป็นอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืช สอดคล้องกับการผลิต Unguinol ประสิทธิภาพสูงจากการเลี้ยงราในระบบนิเวศทางทะเล *Emericella niduland* ในอาหารที่มีสารอาหารสมบูรณ์ (Motti et al., 2007) ราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 และราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 ใช้อาหาร PDB เป็นอาหารที่เหมาะสม ราทะเลสายพันธุ์ BUCS 004 และราเอนไฟท์สายพันธุ์ BUEN 834 ใช้อาหาร YMB เป็นอาหารที่เหมาะสม ส่วนราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 เป็นราสายพันธุ์เดียวจากการศึกษาในครั้งนี้ที่ใช้อาหาร SDB เป็นอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืช อัตราส่วนของ C: N ในอาหารเหลวมีผลโดยตรงต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ของราในแง่ของประสิทธิภาพ จำนวนชนิด หรือปริมาณของสารออกฤทธิ์ที่ได้ (Kumar et al., 2000; Casas López et al., 2003; Miao et al., 2006) อาหารเหลวที่เหมาะสมทั้ง 3 ชนิด มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาล Glucose ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Gogoi et al., 2008) เมื่อพิจารณาจากสูตรอาหารพบว่าอาหารเหลวแต่ละชนิดมีปริมาณแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน คือ อาหารเหลว PDB และ SDB มีปริมาณ Glucose เท่ากับ 20 กรัม/ลิตร และอาหารเหลว YMB มีปริมาณ Glucose เท่ากับ 10 กรัม/ลิตร จากปริมาณของแหล่งคาร์บอนข้างต้นน่าจะมีมากพอต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราจากป่าชายเลน จากรายงานการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราในระบบนิเวศทางทะเลพบข้อมูลเกี่ยวกับปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม ส่งผลให้ราจากระบบนิเวศทางทะเลผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้มากกว่าหนึ่งชนิด และถ้าปริมาณของแหล่งคาร์บอนต่ำจะส่งผลให้ราจากระบบนิเวศทางทะเลผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้น้อยชนิด หรือทำให้อัตราการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพลดลง (Miao et al., 2006; Xiong et al., 2009) เป็นไปได้ว่าการใช้ปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม ทำให้กระบวนการเมแทบอลิซึมของ Glucose ได้ปริมาณ ATP เพียงพอต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Xiong et al., 2009)

อาหารเหลวที่มีสารอาหารสมบูรณ์ทั้ง 3 ชนิด คือ PDB, YMB และ SDB มีแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ (Organic nitrogen) แตกต่างกัน อาหาร YMB มีแหล่งไนโตรเจนเป็น Yeast extracts ปริมาณ 4 กรัม/ลิตร และ Malt extracts ปริมาณ 10 กรัม/ลิตร ในอาหาร SDB มีแหล่งไนโตรเจนเป็น Peptone ปริมาณ 5 กรัม/ลิตร และ Tryptone ปริมาณ 5 กรัม/ลิตร อาหาร PDB มีแหล่งไนโตรเจนเป็น Potato starch ปริมาณ 4 กรัม/ลิตร เนื่องจากชนิดของแหล่งไนโตรเจนในอาหารทั้ง 3 ชนิด แตกต่างกันทำให้ไม่สามารถระบุได้ว่ามีปริมาณมากน้อยกว่ากันเพียงใด อย่างไรก็ตามปริมาณไนโตรเจนที่มีน่าจะเพียงพอต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราจากป่าชายเลน มีรายงานว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ (Organic nitrogen) ชนิดของ

แหล่งไนโตรเจน และอัตราส่วนของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมส่งผลดีต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยตรง ทำให้ราผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้มากกว่าหนึ่งชนิด (Xiong et al., 2009; Kiran et al., 2009) นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงการใช้ Peptone หรือ Yeast extracts ในปริมาณ 5 กรัม/ลิตร ซึ่งใกล้เคียงกับปริมาณแหล่งไนโตรเจนของอาหารเหลว YMB และ SDB ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ เหมาะสมต่อการผลิต 3-Methyl-N-(2-Phenylethyl)-Butanamide และ Cyclo (D-Pro-D-Phe) ของราจากระบบนิเวศทางทะเล *Letendraea helminthicola* และส่งผลให้ราสายพันธุ์ดังกล่าวมีการเจริญสูงสุดอีกด้วย (Yang et al., 2007)

ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น (Initial pH) ของอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นปัจจัยสำคัญอีกประการหนึ่งที่ส่งผลต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Singh, 2003; Chen, Zhao, Chen, & Li, 2008) ซึ่งค่า pH เริ่มต้นมีผลโดยตรงต่อหน้าที่ของเซลล์เมมเบรน รวมถึงรูปร่างและโครงสร้างของเซลล์เมมเบรน การขนส่งไอออน โดยเฉพาะการขนส่งสารอาหารผ่านเซลล์ รวมถึงสารตั้งต้นของการผลิตสารชีวโมเลกุลของเซลล์ (Shu & Lung, 2004; Arora & Chandra, 2010) นอกจากนี้ยังพบว่าค่า pH ที่จำเป็นต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของรามีค่าอยู่ระหว่าง 5-6 (Walker & White, 2011) สอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้พบว่าค่า pH ของอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืช ของราจากป่าชายเลนส่วนใหญ่เท่ากับ 6 และมีรายงานการผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงจากการเลี้ยงราในระบบนิเวศทางทะเล *Penicillium viridicatum* ด้วยอาหารเหลวที่มีค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 6 (Kansoh et al., 2010) เช่นเดียวกับการผลิตสาร Betulone ของราจากระบบนิเวศทางทะเล *Dothideomycete* sp. HQ 316564 ที่พบว่าค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 6 ส่งผลให้ราทะเลสายพันธุ์นี้ผลิตสารในปริมาณสูง (Liu, Lei, & Li, 2013) การศึกษาผลของค่า pH เริ่มต้นต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ของราในระบบนิเวศทางทะเล *Arthinium* c. f. *saccharicola* พบว่าค่า pH เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียเท่ากับ 4.5, 5.5 และ 7.5 ส่วนค่า pH เริ่มต้นของอาหารเหลวที่ส่งผลให้ราทะเลสายพันธุ์นี้มีการเจริญสูงสุด เท่ากับ 6.5 (Miao et al., 2006) พบการผลิตสารออกฤทธิ์ในปริมาณสูงจากราเอนโดไฟท์ในพืชบก *Fusarium* sp. DF2 โดยการเลี้ยงด้วยอาหารที่มีค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 6 เช่นกัน และยังพบการเจริญของราเอนโดไฟท์สายพันธุ์นี้สูงสุดที่ค่า pH ดังกล่าวอีกด้วย (Gogoi et al., 2008) จากรายงานส่วนใหญ่จะเห็นว่าอาหารเหลวที่มีค่า pH เริ่มต้น เท่ากับ 6 หรือใกล้เคียงกับ 6 นอกจากจะพบการผลิตสารออกฤทธิ์ในปริมาณสูงยังสามารถพบอัตราการเจริญของราที่สูงในสภาวะดังกล่าวเช่นกัน การที่ค่า pH เริ่มต้นของอาหารเหลวใกล้เคียง 6 ส่งผลดีต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพนั้นอาจเกี่ยวข้องกับสมดุลของโปรตรอนในเซลล์ และเป็นค่า pH ที่เหมาะสมต่อการดำเนินกิจกรรมของเอนไซม์ในกระบวนการ

เมแทบอลิซึม ดังการศึกษากิจกรรมของกลุ่มเอนไซม์ที่ย่อยเซลลูโลส (Cellulolytic Enzymatic) ได้แก่ Exoglucanase, Endoglucanase และ β-Glucosidase จากราบก *Paecilomyces variotii* โดยศึกษาผลของค่า pH เริ่มต้น (pH 3-8) ของอาหารเหลวเลี้ยงรา *P. variotii* ต่อการดำเนินกิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าว พบว่าค่า pH เริ่มต้นของอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการดำเนินกิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด อยู่ระหว่าง 5-6 พบกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเมื่อค่า pH เริ่มต้นอยู่ระหว่าง 7-8 และไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์เมื่อค่า pH เริ่มต้นอยู่ระหว่าง 3-4 (Hussaina et al., 2012) และค่า pH เริ่มต้นที่เหมาะสมดังกล่าวมีค่าใกล้เคียงกับสภาวะที่เป็นกลาง (Neutral pH) สอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้และรายงานการผลิตสารออกฤทธิ์ที่มีประสิทธิภาพ หรือการผลิตสารในปริมาณสูง เมื่อเลี้ยงราในสภาวะที่มีค่า pH ใกล้เคียงกับสภาวะที่เป็นกลาง (Rubini et al., 2005; Kiran et al., 2009)

ความเร็วรอบที่เหมาะสมในการเขย่า เป็นปัจจัยสำคัญประการหนึ่งในการเลี้ยงราจากระบบนิเวศทางทะเลให้ผลิตสารทุติยภูมิ (Cai et al., 2011) มีรายงานว่าการละลายของออกซิเจนที่เหมาะสมในอาหารเหลว และอัตราการขนส่งออกซิเจนเข้าสู่เซลล์นอกจากจะส่งผลต่อการเจริญแล้วยังส่งผลต่อการผลิตสารทุติยภูมิของราอีกด้วย (Garcia-Ochoa & Gomez, 2009) พบว่าราจากป่าชายเลนที่ศึกษาใช้ความเร็วรอบของการเขย่าที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 100-150 รอบ/นาที นอกจากนี้ยังพบว่าความเร็วรอบส่วนใหญ่ที่มีรายงานใช้ความเร็วอยู่ระหว่าง 100-150 รอบ/นาที ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราจากระบบนิเวศทางทะเลสายพันธุ์อื่น ๆ (Maria et al., 2005; Lin et al., 2005; Miao et al., 2006; Malpure, Shah, & Juvekar, 2006; Yang et al., 2007; Huang, Cai, Hyde, Corke, & Sun, 2007b; Chen et al., 2008; Xiong et al., 2009; Rocha et al., 2012; Jeon et al., 2013; Wijesekara et al., 2013) อย่างไรก็ตามมีรายงานส่วนน้อยที่แสดงผลการศึกษาของความเร็วรอบที่ต่ำได้แก่ การศึกษาความเร็วในการเขย่าที่เหมาะสมของราในระบบนิเวศทางทะเล *Varicosporina ramulosa* ที่ 65 รอบ/นาที ส่งผลให้ราสายพันธุ์นี้ผลิตสารออกฤทธิ์บางชนิดสูงสุด (Mabrouk et al., 2008)

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของราจากป่าชายเลนส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 22-28 องศาเซลเซียส ราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 และราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 ใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับ 25 องศาเซลเซียส สอดคล้องกับการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียของราจากระบบนิเวศทางทะเล *Arthinium* c. f. *saccharicola* ที่พบว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ส่งผลให้ราสายพันธุ์นี้ผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงสุด (Miao et al., 2006) และที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เหมาะสมต่อการผลิต 3-Methyl-N-(2-phenylethyl)-butanamide ในปริมาณสูงของราจากระบบนิเวศทางทะเล *Letendraea*

helminthicola และไม่พบการเจริญของราสายพันธุ์นี้เมื่อเลี้ยงด้วยอุณหภูมิสูงกว่า 35 องศาเซลเซียส (Yang et al., 2007) เมื่อเลี้ยงด้วยอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ยังส่งผลให้ราเอนโดไฟท์จากพืชบก *Fusarium* sp. DF2 ผลิตสารออกฤทธิ์ในปริมาณสูง แตกต่างจากการบ่มราเอนโดไฟท์ที่อุณหภูมิอื่น ๆ (Gogoi et al., 2008) ราทะเลสายพันธุ์ BUCS 004 และราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 834 ใช้อุณหภูมิที่เหมาะสม 28 องศาเซลเซียส จากการศึกษาของ Huang et al. (2011b) ไม่ได้ทำการศึกษาผลของอุณหภูมิโดยตรง แต่ใช้อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในการศึกษาผลของความเค็มที่เหมาะสมต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราทะเล จากผลการศึกษาที่ได้ในครั้งนี้ที่พบว่าราเอนโดไฟท์จากพืชป่าชายเลนสายพันธุ์ BUEN 121 ใช้อุณหภูมิที่เหมาะสม 22 องศาเซลเซียส ค่อนข้างแตกต่างจากการศึกษาในราจากระบบนิเวศทางทะเลส่วนใหญ่ แต่สอดคล้องกับการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของราจากระบบนิเวศทางทะเล *Aspergillus ustus* MSF23 ที่รายงานว่าอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ส่งผลให้ราทะเลสายพันธุ์นี้ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในปริมาณสูง (Kiran et al., 2009) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราจากป่าชายเลนน่ามีผลต่อการดำเนินกิจกรรมของเอนไซม์เช่นเดียวกับค่า pH จากการศึกษาผลของอุณหภูมิ (15, 20, 25, 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส) ในการบ่มรา *P. variotii* ต่อการดำเนินกิจกรรมของกลุ่มเอนไซม์ย่อยเซลลูโลส พบกิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าวสูงเมื่อบ่มรา *P. variotii* ที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส และพบกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ส่วนอุณหภูมิ 15-20 องศาเซลเซียส ไม่พบกิจกรรมของกลุ่มเอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลส (Hussaina et al., 2012)

จากการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของราจากป่าชายเลน พบว่าราจากป่าชายเลนส่วนใหญ่ใช้ระยะเวลาที่เหมาะสมเท่ากับ 7 วัน สอดคล้องกับการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตสาร Betulonc ของราในระบบนิเวศทางทะเล *Dothideomycete* sp. HQ 316564 พบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิต Betulone เท่ากับ 6 วัน (Liu et al., 2013) ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของราจากป่าชายเลนส่วนใหญ่จากการศึกษาในครั้งนี้ และยังพบว่าราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 ใช้ระยะเวลาที่เหมาะสมเท่ากับ 4 วัน ใกล้เคียงกับระยะเวลาที่เหมาะสม (5 วัน) ของราในระบบนิเวศทางทะเล *Penicillium viridicatum* ต่อการผลิตสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ (Kansoh et al., 2010)

ฤทธิ์ของสารสกัดจากราป่าชายเลนในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืชจากการศึกษาสภาวะเหมาะสม เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาในสภาวะตั้งต้นพบว่าสภาวะเหมาะสมส่งผลให้ราจากป่าชายเลนทุกสายพันธุ์ผลิตสารยับยั้งที่มีฤทธิ์เพิ่มขึ้น พบฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดจากราเอนโดไฟท์

สายพันธุ์ BUEN 834 เพิ่มขึ้นสูงสุดถึง 10 เท่า และสารสกัดจากราทะเลสายพันธุ์ BUCS 004 มีฤทธิ์ยับยั้ง *Pestalotiopsis* sp. ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาในสภาวะตั้งต้นที่ไม่พบฤทธิ์ยับยั้ง ส่วนกรณีของราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 121 ที่พบว่าสารสกัดจากการเลี้ยงในสภาวะเหมาะสมมีฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชทุกชนิดได้ไม่แตกต่างกับสภาวะตั้งต้นที่เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที อาจเนื่องมาจากสภาวะเหมาะสมที่ได้ใกล้เคียงกับสภาวะตั้งต้นที่เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที ยกเว้นการยับยั้ง *F. oxysporum* ที่พบฤทธิ์ยับยั้งเพิ่มขึ้นประมาณ 0.3 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับผลของสารสกัดในสภาวะตั้งต้นที่เขย่า 150 รอบ/นาที อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบผลของสารสกัดที่ได้จากการศึกษาสภาวะเหมาะสม กับผลของสารสกัดในสภาวะตั้งต้นที่ตั้งทิ้งไว้พบว่าส่วนใหญ่มีระยะยับยั้งราสาเหตุโรคพืชเพิ่มขึ้น

จากการศึกษารูปแบบการเจริญ (Growth curve) ของราจากป่าชายเลน ต่อการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชพบว่าระยะเวลาที่ราจากป่าชายเลนมีการเจริญสูง (มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด) เป็นระยะเวลาเดียวกันกับระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชที่มีประสิทธิภาพสูงของราจากป่าชายเลน โดยราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 มีน้ำหนักแห้ง และฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดต่อราสาเหตุโรคพืชสูงสุด จากการเลี้ยงราทะเลเป็นเวลา 10 วัน และราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 มีน้ำหนักแห้ง และประสิทธิภาพของสารยับยั้งราสาเหตุโรคพืชสูงสุด เมื่อเลี้ยงราเอนโดไฟท์เป็นเวลา 7 วัน สอดคล้องกับการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราจากระบบนิเวศทางทะเล *Penicillium viridicatum* ราจากระบบนิเวศทางทะเล *Dothideomycete* sp. HQ 316564 และราจากระบบนิเวศทางทะเล *Letendraea helminthicola* ที่พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ เป็นสภาวะเดียวกันกับสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ (Yang et al., 2007; Kansoh et al., 2010; Liu et al., 2013) การเลี้ยงราในสภาวะที่เหมาะสมมีผลโดยตรงต่อการเจริญของเส้นใย (Mycelium growth) และการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในปริมาณสูง (Xiong et al., 2004; Miao et al., 2006) นอกจากจำนวนชนิดของสารออกฤทธิ์ที่เพิ่มขึ้นจากการเลี้ยงราป่าชายเลนในสภาวะที่เหมาะสมแล้ว เป็นไปได้ว่าสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวส่งผลให้รามีอัตราการเจริญสูง พื้นที่ผิวของเส้นใยราเพิ่มขึ้น ส่งผลให้การผลิตสารทุติยภูมิเพิ่มขึ้น ผลผลิตที่ได้จึงมีความเข้มข้นสูง ทำสารออกฤทธิ์ที่ได้มีฤทธิ์ยับยั้งเพิ่มขึ้น

จากผลผลิตสารสกัดของราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าผลผลิตสารสกัดที่ได้ประกอบด้วยสารออกฤทธิ์เป็นส่วนใหญ่ เห็นได้จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของสารองค์ประกอบที่ผ่านการแยกสารบริสุทธิ์บนแผ่น TLC (Bioautography) พบว่าแถบสารที่แยกได้บนแผ่น TLC ส่วนใหญ่มีฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืช มีเพียงแถบสารส่วนน้อยเท่านั้นที่ไม่พบฤทธิ์ยับยั้ง ซึ่งการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธี TLC และ

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของสารองค์ประกอบของการศึกษานี้เป็นการทดสอบสารในเบื้องต้นเท่านั้น ควรมีการทำบริสุทธิ์สารโดยใช้เทคนิคขั้นสูง และทดสอบสารบริสุทธิ์ที่ได้ด้วยวิธีมาตรฐานต่อไป

จากการศึกษาผลผลิตของสารสกัดจากราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 ที่เลี้ยงในสภาวะเหมาะสม (ความเค็ม 15 ppt, อาหารเหลว PDB, pH เริ่มต้นเท่ากับ 6, เขย่าที่ 150 รอบ/นาที, อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส, เวลา 7 วัน) สกัดสารด้วยเอธิลอะซิเตต พบผลผลิตของสารสกัดเท่ากับ 274 mg/L และราเอนโดไฟท์จากพืชป่าชายเลนสายพันธุ์ BUEN 830 ที่เลี้ยงในสภาวะเหมาะสม (ความเค็ม 10 ppt, อาหารเหลว SDB, pH เริ่มต้นเท่ากับ 6, เขย่าที่ 150 รอบ/นาที, อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส, เวลา 7 วัน) สกัดสารด้วยเอธิลอะซิเตต พบผลผลิตสารสกัดเท่ากับ 236 mg/L ผลผลิตจากราทะเลและราเอนโดไฟท์ที่ได้จากการศึกษาสูงกว่าผลผลิตของสารสกัดจากราในระบบนิเวศทางทะเล *Helimeda monile* แยกได้จากสาหร่ายทะเล และเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีส่วนประกอบของ Yeast extracts (5 g/L), Peptone (10 g/L), Glucose (10 g/L) และ Crab meal (2 g/L) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 27 วัน สกัดสารด้วยเอธิลอะซิเตต พบผลผลิตของสารสกัดเท่ากับ 50 mg/L (Jenkins, Toske, Jensen, & Fenical, 1998) และผลผลิตของสารสกัดจากราทะเล *Fasciatispora nypae* ที่แยกจากเศษของต้นจาก (*Nypa fruticans*) เลี้ยงในอาหาร PDB เขย่าที่ 200 รอบ/นาที บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน สกัดสารด้วยเอธิลอะซิเตต พบผลผลิตของสารสกัด 150 mg/L (Zainuddin et al., 2010) แต่ผลผลิตที่ได้ในครั้งนี้ยังต่ำกว่าผลผลิตสารสกัดจากราเอนโดไฟท์ของพืชบก *Fusarium* sp. DF2 ที่เลี้ยงในอาหาร PDB เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน สกัดสารด้วยเอธิลอะซิเตต พบผลผลิตสารสกัด 500 mg/L (Gogoi et al., 2008) แม้ว่าผลผลิตสารสกัดที่ได้จากราทะเล และราเอนโดไฟท์ในการศึกษาครั้งนี้ต่ำกว่าผลผลิตของราเอนโดไฟท์จากพืชบก แต่ผลผลิตสารสกัดที่ได้ยังสูงกว่าผลผลิตของราทะเลที่แยกจากสาหร่ายทะเล และราจากเศษต้นจาก หรืออาจกล่าวได้ว่านอกจากราป่าชายเลนเป็นกลุ่มราทะเลขนาดใหญ่ และเป็นแหล่งของผลิตภัณฑ์ทางทะเลชนิดใหม่ ๆ แล้ว (Sridhar, 2004) ยังเป็นกลุ่มราที่ให้ผลลิตสารสกัดในปริมาณสูงอีกด้วย อย่างไรก็ตามการเปรียบเทียบผลผลิตที่ได้ดังกล่าวเป็นเพียงการเปรียบเทียบเบื้องต้นเท่านั้นเนื่องจากการใช้สภาวะในการเลี้ยงราที่แตกต่างกัน และไม่ได้เปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพเพราะใช้การทดสอบฤทธิ์ที่แตกต่างกัน

การใช้สภาวะที่เหมาะสมในการขยายขนาดการหมัก (Scale up) ประสบผลสำเร็จ ไม่พบว่าผลผลิตหรือฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงในสภาวะเหมาะสมก่อนขยายขนาดการหมักในอาหารเหลวปริมาตรน้อย (Small scale) พบผลผลิตของสารสกัดที่ได้สูงกว่าผลผลิตก่อนขยายขนาดการหมัก และยังพบว่าจำนวนสารองค์ประกอบเพิ่มขึ้น

เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาสภาวะเหมาะสมก่อนขยายขนาดการหมัก โดยพบว่าสารองค์ประกอบจากสารสกัดราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 เพิ่มขึ้นจาก 8 ชนิด ในการศึกษาสภาวะเหมาะสมก่อนขยายขนาดการหมักเป็น 9 ชนิด ภายหลังขยายขนาดการหมัก และจำนวนสารองค์ประกอบจากสารสกัดราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 เพิ่มขึ้นจาก 5 ชนิด ในการศึกษาสภาวะเหมาะสมก่อนขยายขนาดการหมักเป็น 7 ชนิด ภายหลังขยายขนาดการหมัก จากการที่สารองค์ประกอบเพิ่มขึ้นระหว่างการศึกษาสภาวะเหมาะสมก่อนขยายขนาดการหมัก และภายหลังขยายขนาดการหมักอาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้น สังเกตจากการหยดลงบนแผ่น TLC ทำให้แถบของสารองค์ประกอบที่แยกได้มีขนาดของแถบสารที่ใหญ่ คมชัด และมองเห็นได้ชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับแถบของสารองค์ประกอบจากการศึกษาสภาวะเหมาะสมก่อนขยายขนาดการหมัก และเมื่อเปรียบเทียบจำนวนสารองค์ประกอบจากการศึกษาสภาวะตั้งต้นที่ตั้งทิ้งไว้และสภาวะตั้งต้นที่เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที พบว่าสารองค์ประกอบจากสารสกัดราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 เป็น 1 ชนิด และ 5 ชนิด ตามลำดับ แตกต่างจากสารองค์ประกอบที่พบภายหลังขยายขนาดการหมัก (Scale up) ที่พบสารองค์ประกอบ 9 ชนิด และสารองค์ประกอบจากสารสกัดราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ BUEN 830 ที่ได้จากจากการศึกษาสภาวะตั้งต้นที่ตั้งทิ้งไว้ และสภาวะตั้งต้นที่เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที พบสารองค์ประกอบ 2 ชนิด และ 1 ชนิด ตามลำดับ แตกต่างจากสารองค์ประกอบที่ได้ภายหลังขยายขนาดการหมัก (Scale up) ที่พบสารองค์ประกอบ 7 ชนิด ชนิดของสารองค์ประกอบที่เพิ่มขึ้นจากการใช้สภาวะเหมาะสม ไม่ว่าจะเป็นก่อนหรือหลังขยายขนาดการหมัก ยืนยันถึงสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงรามีผลโดยตรงต่อการผลิตสารทุติยภูมิในแง่ของการผลิตสารที่หลากหลาย (Xiong et al., 2004; Papagianni, 2004; Dobretsov et al., 2006; Miao et al., 2006; Liu et al., 2013)

การแยกสารองค์ประกอบบนแผ่น TLC เป็นวิธีที่นิยมใช้ศึกษาสารออกฤทธิ์จากราในระบบนิเวศทางทะเล (Marine-derived fungi) มีการใช้ตัวทำละลายของเฟสเคลื่อนที่แตกต่างกัน ได้แก่ Iso-octane: Ethyl acetate, Petroleum ether: Ethyl acetate, Chloroform: Methanol และ Dichloromethane: Methanol เป็นต้น (Jenkins et al., 1998; Xu et al., 2009b; Yan, Gao, Li, Li, & Wang, 2010; Silva, Almeida, Arruda, & Gusmão, 2011) แต่การศึกษาสารองค์ประกอบชนิดใหม่ ๆ จากสารสกัด อาจเริ่มต้นใช้สารละลายของเฟสเคลื่อนในอัตราส่วนแตกต่างกัน ได้แก่ การใช้สารละลาย Chloroform: Methanol ในอัตราส่วน 20: 1 ถึง 0:1 (Yan et al., 2010) หรือการใช้สารละลาย Petroleum ether: Ethyl acetate ในอัตราส่วน 30: 1 ถึง 1: 30 (Gogoi et al., 2008) เพื่อหาว่าอัตราส่วนใดเหมาะสมต่อการแยกสารองค์ประกอบบนแผ่น TLC สอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ที่พบว่าสารสกัดต่างชนิดกันใช้เฟสเคลื่อนที่แตกต่างกัน โดยราทะเลสายพันธุ์

BUSK 055-1 ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น Chloroform: Ethyl acetate: Methanol ในอัตราส่วน 8: 1.5: 0.5 และสารสกัดของราเอนโดไฟท์จากใบพืชป่าชายเลนสายพันธุ์ BUEN 830 ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น Chloroform: Methanol ในอัตราส่วน 8.5: 1.5 ที่ต้องใช้เฟสเคลื่อนที่ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน เนื่องจากสารองค์ประกอบแต่ละชนิดมีความสามารถในการเคลื่อนที่บนเฟสคงที่ได้แตกต่างกัน เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่แตกต่างกัน สารองค์ประกอบที่ถูกดูดซับบนเฟสคงที่น้อย (ขั้วต่ำ) จะเคลื่อนที่ได้เร็ว ส่วนสารองค์ประกอบที่ถูกดูดซับบนเฟสคงที่มาก (ขั้วสูง) จะเคลื่อนที่บนเฟสคงที่ได้ช้า การเคลื่อนที่ของสารองค์ประกอบขึ้นอยู่กับความมีขั้วของเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ ซึ่งสารละลายที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เรียงลำดับจากขั้วต่ำไปหาขั้วสูงได้ดังนี้ Chloroform, Ethyl acetate และ Methanol การใช้เฟสเคลื่อนที่ในอัตราส่วนที่แตกต่างกันเพื่อหาว่าอัตราส่วนใดส่งผลให้สารองค์ประกอบแยกออกจากกันได้ชัดเจนบนเฟสคงที่ การศึกษาในครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่าสารองค์ประกอบของราจากป่าชายเลนสายพันธุ์ BUSK 055-1 และราเอนโดไฟท์จากพืชป่าชายเลนสายพันธุ์ BUEN 830 เป็นสารต่างชนิดกัน เนื่องจากค่า Rf ที่ได้แตกต่างกัน เฟสเคลื่อนที่ และอัตราส่วนที่ใช้แตกต่างกัน การแยกสารองค์ประกอบของสารสกัดจากราที่มีรายงาน ได้แก่ การแยกสารสกัดจากราเอนโดไฟท์ของพืชบก *Fusarium* sp. DF2 บนแผ่น TLC ใช้ Petroleum ether และ Ethyl acetate พบสารองค์ประกอบ 6 ชนิด และสารองค์ประกอบเพียงชนิดเดียวเท่านั้นที่ยับยั้ง *F. oxysporum* และ *F. semitectum* ได้ และค่า MIC ของสารองค์ประกอบชนิดนี้เท่ากับ 20 µg/ml (Gogoi et al., 2008) ชนิดของสารองค์ประกอบของราเอนโดไฟท์ของพืชบก *Fusarium* sp. DF2 ใกล้เคียงกับชนิดของสารองค์ประกอบจากสารสกัดของราเอนโดไฟท์ในพืชป่าชายเลนสายพันธุ์ BUEN 830 ที่ได้จากการศึกษา

การทดสอบฤทธิ์ของสารองค์ประกอบของสารสกัดจากราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 ที่แยกได้บนแผ่น TLC ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืชด้วยวิธี TLC Disc diffusion พบว่าสารองค์ประกอบที่ 8 (Rf 0.78) มีฤทธิ์ยับยั้ง *A. brassicicola* และสารองค์ประกอบชนิดที่ 2 (Rf 0.43), 3 (Rf 0.48), 5-6 (Rf 0.64, Rf 0.68) และ 7 (Rf 0.71) มีฤทธิ์ยับยั้ง *C. gloeosporioides* ส่วนสารองค์ประกอบชนิดที่ 4 (Rf 0.58) มีฤทธิ์ยับยั้ง *Pestalotiopsis* sp. จะเห็นได้ว่าสารองค์ประกอบแต่ละชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งราสาเหตุโรคพืชได้แตกต่างกัน ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากการออกฤทธิ์ของสารองค์ประกอบ ที่ขึ้นกับคุณสมบัติทางเคมี ฤทธิ์ทางชีวภาพ ความเข้มข้น และกลไกการยับยั้งที่แตกต่างกัน

กลไกในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคจากยาต้านราที่มีรายงาน ได้แก่ การออกฤทธิ์ยับยั้งที่ผนังเซลล์ (Active against cell wall component) โดยส่วนใหญ่จะออกฤทธิ์รบกวนการสังเคราะห์กลูแคน (Glucan) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ยีสต์ เช่น ยา Echinocandins

มีความจำเพาะในการเข้ายับยั้งการทำงานของ 3β-Glucan synthase ส่งผลให้กระบวนการสังเคราะห์กลูแคนถูกยับยั้ง ปริมาณไคตินที่ผนังเซลล์เพิ่มขึ้น และส่งผลโดยอ้อมต่อองค์ประกอบต่าง ๆ ในเซลล์ยีสต์ ทำให้ปริมาณของ Ergosterol และ Lanosterol ที่เยื่อหุ้มเซลล์ลดลง เกิดการเจริญแบบ Pseudohyphae และจากการที่ผนังเซลล์หนาขึ้นทำให้การแตกหน่อของเซลล์ยีสต์ไม่สามารถหลุดจากเซลล์แม่ได้อย่างสมบูรณ์ และส่งผลให้เกิดการ Lysis ของปลายเซลล์ที่แตกหน่อใหม่ (Ghannoum & Rice, 1999; Abu-Elteen & Hamad, 2011) การออกฤทธิ์ยับยั้งที่เยื่อหุ้มเซลล์ หรือยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์เยื่อหุ้มเซลล์ (Active against plasma membrane integrity or synthesis) การออกฤทธิ์ส่วนใหญ่จะเกี่ยวข้องกับ Ergosterols ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยสารออกฤทธิ์จะเข้าไปจับกับ Ergosterols ทำให้เซลล์เมมเบรนเกิดรูพรุนส่งผลให้ Permeability ของเซลล์เมมเบรนเพิ่มขึ้น โมเลกุล และไอออนต่าง ๆ ผ่านเข้า-ออกเซลล์ได้มากกว่าปกติ เกิดการเพิ่มขึ้นของ Osmotic pressure ภายในเซลล์ และทำให้เซลล์ตายในที่สุด หรือสารออกฤทธิ์เข้าไปรบกวนกระบวนการสังเคราะห์ Ergosterol เช่น การเข้ายับยั้งการทำงานของ Cytochrome P450-dependent sterol 14-α-demethylase ทำให้การสังเคราะห์ Ergosterols ลดลง ส่งผลให้เยื่อหุ้มเซลล์ราไม่แข็งแรง เกิดการรั่วของ K^+ รวมทั้งสารอื่น ๆ ออกจากเซลล์ (Ghannoum & Rice, 1999; Odds, Brown & Gow, 2003) การหยุดการสังเคราะห์ Ergosterols ของสารต้านราในกลุ่ม Allylamines โดยจะเข้าขัดขวางในช่วงต้นของการสังเคราะห์ Ergosterols โดยยับยั้งการรวมตัวกันของ Squalene (สารตั้งต้นในกระบวนการผลิต Sterols) กับ Sterol intermediate ชนิดอื่น ๆ (Ghannoum & Rice, 1999; Carrillo-Muñoz, Giusiano, Ezkurra, & Quindós, 2006) และการออกฤทธิ์ยับยั้งในระดับเซลล์ (Active against cellular anabolism) ส่วนใหญ่สารออกฤทธิ์จะเข้ายับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน และกรดนิวคลีอิก เช่นการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Thymidylate synthetase ของยาต้านรา Flucytosine เป็นผลให้การสังเคราะห์ DNA ถูกยับยั้ง นอกจากนี้ Flucytosine สามารถเข้ารบกวนการสังเคราะห์ RNA ทำให้ราก่อโรคเกิดความผิดปกติบนสาย RNA (Abu-Elteen & Hamad, 2011) หรือเข้ายับยั้งการแบ่งเซลล์ของราก่อโรค เช่นยา Griseofulvin เข้ายับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์รา (Fungal mitosis) โดยยับยั้งทำงานของ Microtubules ใน Mitotic spindle (Brown & Gow, 2003) อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ศึกษาถึงระดับกลไกการออกฤทธิ์เนื่องจากสารออกฤทธิ์ที่ได้เป็นสารสกัดหยาบ (Crude extract)

นอกจากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพแล้ว ชนิดของราทดสอบมีผลต่อการออกฤทธิ์ยับยั้งเช่นกัน โดยปกติราสาเหตุโรคพืชจะมีกลไกการป้องกันตนเอง ส่งผลให้สารองค์ประกอบแต่ละชนิดเข้ายับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคพืชได้ไม่เต็มประสิทธิภาพอาจเนื่องมาจากราสาเหตุโรคพืช

สามารถผลิตสารทุติยภูมิออกมายับยั้งการออกฤทธิ์ของสารองค์ประกอบ มีรายงานความสามารถในการผลิตสารทุติยภูมิของราสกุลเดียวกับราสาเหตุโรคพืชที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้ ได้แก่ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากรา *A. brassicicola* มีฤทธิ์ยับยั้ง *Microsporium canis* and *Trichophyton rubrum* (Jung, Na, & Ryu, 2002) สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟท์ *A. brassicicola* ML-P08 ที่แยกจากพืชบก *Malus halliana* มีฤทธิ์ยับยั้ง *Candida albicans* และ *T. rubrum* (Gu, 2009) สารยับยั้งแบคทีเรีย *Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus* และ *Sarcina lutea* จาก *C. gloeosporioides* ที่แยกจากพืชบก *Artemisia mongolica* (Zou et al., 2000) สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟท์ *C. gloeosporioides* ที่แยกจากพืชสมุนไพร *Vitex negundo* L. มีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาหลายชนิด (Multi drugs resistance) ได้แก่ ยา Methicillin, Penicillin และ Vancomycin (Arivudainambi, Anand, Shanmugaiah, Karunakaran, & Rajendran, 2011) สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟท์ *F. oxysporum* ที่แยกจากพืชบก *Acorus calamus* มีฤทธิ์ยับยั้ง *C. albicans* และ *C. tropicalis* (Barik, Tayung, Jagadev, & Dutta, 2010) และจากกการศึกษาครั้งนี้พบว่าราสาเหตุโรคพืช *Pestalotiopsis* sp. มีความไวต่อสารทดสอบค่อนข้างน้อย สอดคล้องกับรายงานที่กล่าวถึงราในกลุ่ม *Pestalotiopsis* ว่าเป็นรากลุ่มใหญ่ที่ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย (Ding et al., 2008; Xu et al., 2011; Yang, Zhang, & Luo, 2012)

การทดสอบค่า MIC ของสารสกัดจากราทะเลสายพันธุ์ BUSK 055-1 ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าค่า MIC ที่ยับยั้ง *C. gloeosporioides*, *A. brassicicola* และ *F. oxysporum* เท่ากับ 1024, 2048 และ 4096 µg/ml ตามลำดับ ระดับ MIC ที่พบเทียบกับการศึกษาอื่น ๆ ได้ยาก เนื่องจากราในระบบนิเวศทางทะเล รวมถึงราเอนโดไฟท์มีรายงานการศึกษาค่า MIC ของสารสกัดในการยับยั้งราสาย (Filamentous fungi) ค่อนข้างน้อย หากมีจะเป็นการรายงานค่า MIC ของสารบริสุทธิ์ ได้แก่ สาร Cytosporone จากราเอนโดไฟท์ในพืชป่าชายเลน *Phomopsis* sp. ZSU-H76 มีค่า MIC ในการยับยั้ง *F. oxysporum* เท่ากับ 32 µg/ml สารบริสุทธิ์ที่ได้จากราเอนโดไฟท์สายพันธุ์ ZZF36 แยกจากสาหร่ายทะเล มีค่า MIC ของสารองค์ประกอบชนิดที่ 3 ในการยับยั้ง *F. oxysporum* เท่ากับ 100 µg/ml (Yang et al., 2006a) นอกจากนี้ยังมีการรายงานค่า MIC ของสารบริสุทธิ์ของราจากระบบนิเวศทางทะเลในการยับยั้งราชนิดอื่น ๆ ได้แก่ สารกลุ่ม Lactone จากราในระบบนิเวศทางทะเล *Diaporthe* sp. มีค่า MIC เท่ากับ 50 µg/ml ในการยับยั้ง *Aspergillus niger* และสารกลุ่ม Benzofuran มีค่า MIC ในการยับยั้ง *Alternaria lternate* เท่ากับ 100 µg/ml (Lin et al., 2005)

เมื่อเปรียบเทียบค่า MIC ของยา Fluconazole พบว่าค่าที่ได้สูงกว่า 100 µg/ml ซึ่งสูงกว่าค่าที่มีรายงานทั่ว ๆ ไป อาจเนื่องมากจากวิธีการทดสอบ และสารสกัดที่ใช้ทดสอบแตกต่างจาก

การศึกษาของผู้วิจัยอื่น รายงานการทดสอบสารต้านรา (Antifungal) กับราสาเหตุโรคพืชชนิดอื่นมีค่อนข้างน้อย ส่วนใหญ่ที่พบไม่ใช้ยาปฏิชีวนะเป็นชุดควบคุมเชิงบวก แต่ใช้ชุดควบคุมเป็นสารเคมี ได้แก่ Benomyl หรือ Mancozeb (Ambang et al., 2011; Bahraminejad, Abbasi, & Fazlali, 2011) หรือใช้ยา Ketoconazole, Itraconazole หรือ Nystatin เป็นชุดควบคุมเชิงบวก ได้แก่ การใช้ Nystatin เป็นชุดควบคุม ในการยับยั้ง *F. oxysporum* f. sp. *cubense* พบค่า MIC เท่ากับ 3.125-4 μg/ml (Yang, et al. 2006b; Huang et al., 2008) การทดสอบ MIC ในการยับยั้งราสาย ส่วนใหญ่มักพบในรายงานทางการแพทย์ใช้ราทดสอบเป็นราสายพันธุ์มาตรฐาน หรือเป็นสายพันธุ์ที่แยกจากผู้ป่วย (Clinical isolate; CI) ได้แก่ การทดสอบยา Ketoconazole กับ *Penicillium* sp. (CI), *Rhizopus* sp. (CI) และ *Aspergillus fumigatus* (ATCC 1022) นอกจากการใช้ชุดควบคุมเชิงบวกที่เหมาะสมแล้ว วิธีการทดสอบควรใช้วิธีมาตรฐาน ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ดัดแปลงจากวิธีของ Liu et al. (2002) โดยดัดแปลงในส่วนของการเตรียมเชื้อทดสอบ จากเดิมใช้สารละลายสปอร์แขวนลอย เป็นการใช้ชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของราสาเหตุโรคพืชเจริญ เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดกับราสาเหตุโรคพืช 4 ชนิด ซึ่ง *Pestalotiopsis* sp. สร้างสปอร์ค่อนข้างยากเมื่อเลี้ยงในห้องปฏิบัติการและ *C. gloeosporioides* สร้างสปอร์ไม่สม่ำเสมอ

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาการใช้ของเสียจากกระบวนการผลิตต่าง ๆ ได้แก่ หางนม หรือกากน้ำตาล หรือหาวิธีการลดต้นทุนการผลิตจากวัตถุดิบเหลือใช้จากกระบวนการต่าง ๆ

2. นี้ควรมีการทำบริสุทธิ์สารสกัดที่ได้จากการขยายการหมักของราทะเล BUSK 055-1 เพื่อศึกษาว่ามีสารองค์ประกอบชนิดใดเป็นสารชนิดใหม่ และนำสารบริสุทธิ์ที่ได้ไปใช้ประโยชน์ในด้านอื่น ๆ ต่อไป