

# สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟต์

## Bioactive Compounds from Endophytic Fungi

ประไพพิศ อินเสน

Praphaiphit Insain

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอีสเทิร์นเอเซีย  
Faculty of Pharmacy, Eastern Asia University

### บทคัดย่อ

ราเอนโดไฟต์เป็นราที่อาศัยอยู่ในต้นพืชโดยไม่ก่อให้เกิดอาการของโรคใด ๆ กับพืช โดยอย่างน้อยที่สุดในช่วงหนึ่งของวงจรชีวิตอยู่ในลักษณะค้ำพึ่งพาอาศัยกันแบบภาวะสมชีพ ปัจจุบันราเอนโดไฟต์จัดเป็นอีกหนึ่งแหล่งทางเลือกที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพและให้ผลผลิตค่อนข้างสูงในช่วงระยะเวลาสั้น โดยราเอนโดไฟต์สามารถคัดแยกได้จากส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น ลำต้น ใบ ดอก ราก และส่วนอื่น และสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิที่ได้จากราเอนโดไฟต์มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย ได้แก่ ด้านอนุมูลอิสระ ด้านแบคทีเรีย ด้านราต้านไวรัส และต้านมะเร็ง ซึ่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเหล่านี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ เครื่องสำอาง และอุตสาหกรรมการผลิตยาได้

**คำสำคัญ:** ราเอนโดไฟต์, สารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิ, สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

### Abstract

Endophytic fungi are microorganisms that internally infect living plant tissues without causing any visible symptoms of infection and live in symbiotic relationship with plants for at least a part of their life cycle. Nowadays, endophytic fungi are used as alternative sources for making novel bioactive compounds with high efficiency and for producing high yields in a short period. When fungal endophytes were isolated from any other parts of healthy plants such as stems, leaves, flowers, roots and others, their secondary metabolites exhibited various bioactivities including antioxidant, antibacterial, antifungal, antiviral and anticancer properties. Moreover, a huge number of bioactive compounds are beneficial and have potential applications in the medicine, cosmetic and pharmaceutical industries.

**Keywords:** endophytic fungi, secondary metabolite, bioactive compound



## บทนำ

ปัจจุบันสารสกัดจากธรรมชาติได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์และงานวิจัยมากมาย โดยสารสกัดธรรมชาตินั้นสามารถสกัดได้จากส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น ลำต้น ก้าน ใบ ดอก ราก และส่วนอื่น และมีฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลาย ได้แก่ ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการติดเชื้อ ต้านมะเร็ง เป็นต้น โดยหลักของการสกัดสารจากธรรมชาตินั้น มีวัตถุประสงค์เพื่อหาสารใหม่หรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compound) รวมไปถึงสารที่มีฤทธิ์ในทางเภสัชวิทยา โดยจะนำพืชมาสกัดแยกและทำให้บริสุทธิ์ และนำไปพัฒนาเป็นยาหรือสารออกฤทธิ์ชนิดใหม่ เป็นสารต้นแบบที่ใช้ในการสังเคราะห์หรือดัดแปลงให้เป็นสารออกฤทธิ์ที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้น แต่เนื่องด้วยสารสกัดที่ได้จากพืชโดยตรงนั้นมีปริมาณน้อย ต้องใช้ตัวอย่างพืชปริมาณมาก ต้นทุนสูงและใช้เวลาค่อนข้างนานในการให้ผลผลิต ด้วยเหตุผลนี้จึงได้มีการค้นหาแหล่งให้สารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) จากธรรมชาติอย่างเช่นจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิได้ รวมถึงการค้นหาจุลินทรีย์จากพืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณทางยา ป้องกันโรค และจากพืชที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์สุขภาพได้ ด้วยเหตุนี้การศึกษาเอนโดไฟต์ในพืชสมุนไพรจึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการหาจุลินทรีย์จากธรรมชาติที่สามารถให้สารออกฤทธิ์ในปริมาณมาก สามารถนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ อุตสาหกรรม และการเกษตร เอนโดไฟต์เป็นจุลินทรีย์ซึ่งเป็นแบคทีเรียหรือราที่อาศัยอยู่ในพืช ซึ่งในบทความนี้จะกล่าวถึงราเอนโดไฟต์ ราที่อาศัยอยู่ในช่องว่างระหว่างเซลล์ของลำต้น ก้าน ใบ ราก และใบของพืชที่มีความสมบูรณ์ โดยไม่ก่อให้เกิดอาการของโรคใด ๆ กับพืช เรียกว่า ราเอนโดไฟต์ (endophytic fungi) ราเอนโดไฟต์สามารถพบได้ทุกส่วนของพืช เนื้อเยื่อของพืชที่มีราเอนโดไฟต์สามารถทำงานได้ตามปกติ โดยที่ราเอนโดไฟต์อาศัยอยู่ในภาวะเกื้อกูลกัน (mutualism) (Joseph & Priya, 2011) พืชที่เป็นเจ้าบ้านจะให้สารอาหารแก่ราเอนโดไฟต์ และราเอนโดไฟต์จะสร้างสารเมแทบอไลต์มาเพื่อป้องกันการเกิดโรคในพืชเจ้าบ้าน ปัจจุบันมีงานวิจัยศึกษาเกี่ยวกับราเอนโดไฟต์เป็นจำนวน

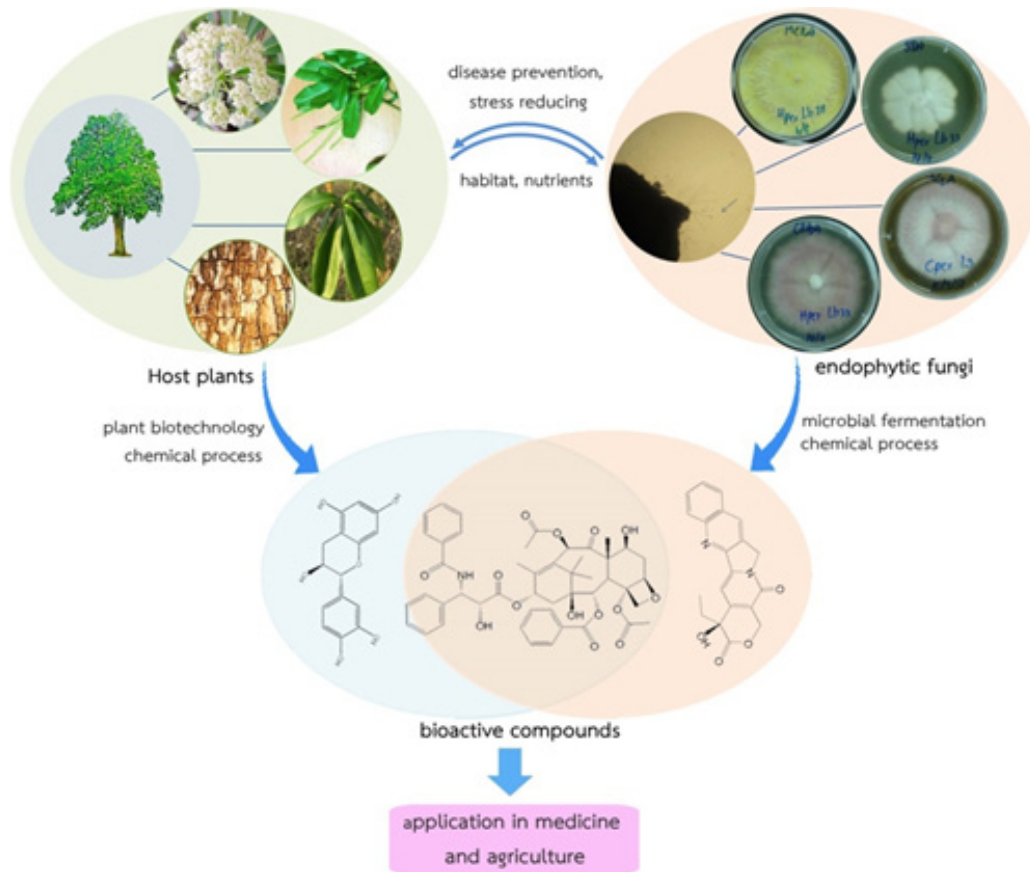
มาก จากรายงานการวิจัยหลายชิ้นงานพบว่าราเอนโดไฟต์บางชนิดเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ มีลักษณะโครงสร้างที่เป็นเอกลักษณ์รวมถึงเป็นสารประกอบจำพวกแอลคาลอยด์ (alkaloids) เบนโซไพราโนน (benzopyranones) ไคโนน (chinones) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) ควิโนน (quinones) สเตียรอยด์ (steroids) เทอร์ปีน (terpenes) เพปไทด์ (peptides) แซนโทน (xanthenes) (Tan & Zou, 2001; Joseph & Priya, 2011; Zhang, et al., 2012; Chandra, 2012; Sadananda, Govindappa & Ramachandra, 2014; Prabpai, et al., 2015) ราเอนโดไฟต์บางชนิดสามารถสร้างสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการป้องกันเชื้อก่อโรคในคนและบางชนิดนำไปใช้ในการรักษาโรคหรือความผิดปกติทางพยาธิสภาพ ซึ่งสารประกอบเหล่านี้จะถูกนำไปผลิตเป็นยาใหม่ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย ได้แก่ สารต้านมะเร็งและเนื้องอก (anticancer and anti-tumor) สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) สารต้านเบาหวาน (antidiabetic) สารต้านไวรัส (antiviral) สารกดระบบภูมิคุ้มกัน (immune suppressive compounds) สารต้านเชื้อมาลาเรีย (antimalarial) เป็นต้น (Wiyakrutta, et al., 2004)

## ลักษณะทั่วไปของราเอนโดไฟต์

ในระบบนิเวศวิทยา การอาศัยอยู่ร่วมกันระหว่างราเอนโดไฟต์และพืชเจ้าบ้าน (host plant) อยู่ในลักษณะต่างพึ่งพาอาศัยกันแบบภาวะสมชีพ (symbiosis) ความสัมพันธ์ระหว่างราเอนโดไฟต์กับพืชเจ้าบ้านจึงเป็นแบบภาวะพึ่งพากัน โดยที่ต่างฝ่ายต่างได้ประโยชน์ร่วมกัน พืชเจ้าบ้านที่มีราเอนโดไฟต์อาศัยอยู่นั้นจะให้สารอาหารและที่อยู่อาศัยแก่ราเอนโดไฟต์ ส่วนราจะสร้างสารเมแทบอไลต์ที่สำคัญบางอย่างที่ช่วยปกป้องพืชเจ้าบ้านไม่ให้ได้รับอันตรายจากสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม มีความทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ดีขึ้น รวมถึงแมลงและโรคทำลายพืช (Bacon & White, 2000) ดังภาพ 1 ราเอนโดไฟต์จะอาศัยอยู่บริเวณช่องว่างระหว่างเซลล์ของพืช (intercellular space) โดยจะมีการสร้างเส้นใยแทรกเข้าไปบริเวณช่องว่างในชั้นมีโซฟิลล์ (mesophyll) และชั้นพาราเอนไคมา (parenchyma) ของพืชเจ้าบ้านที่รานั้นอาศัยอยู่ ราเอนโดไฟต์สามารถพบได้ใน

ทุกส่วนของพืชเจ้าบ้าน โดยที่ราไม่ทำให้พืชแสดงอาการของโรคจากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าราในกลุ่ม *Ascomycetes*, *Basidiomycetes*, *Deuteromycetes* และ *Oomycetes* (Panphut, 1997) บางชนิดสามารถเป็นราเอนโดไฟต์ของ

พืชต่างๆ ได้ราเอนโดไฟต์จะมีการถ่ายทอดจากรุ่นหนึ่งไปสู่อีกรุ่นหนึ่ง โดยการแทงเส้นใยเข้าไปในส่วนของ ovule เมื่อเมล็ดพืชนั้นเจริญเป็นต้นอ่อน ราที่อาศัยอยู่ภายในก็จะเจริญเติบโตไปพร้อมกัน



ภาพ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างราเอนโดไฟต์และพืชเจ้าบ้าน

### การคัดแยกราเอนโดไฟต์ การเพาะเลี้ยง และการสกัดแยกเมแทบอลิต์ทุติยภูมิ

เริ่มต้นจากการเก็บตัวอย่างพืชที่น่าสนใจซึ่งอาจจะมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหรือมีสรรพคุณทางยา ควรเป็นพืชที่มีลักษณะสมบูรณ์ ไม่มีโรคพืชหรือแสดงอาการโรคของพืช นำชิ้นส่วนของพืชซึ่งอาจจะเลือกใช้ได้ทั้งที่เป็นกิ่ง ก้าน ใบ ลำต้น ราก มาทำความสะอาดด้วยวิธี surface sterilization (Verma, et al., 2009) และควรคัดแยกภายใน 24 ชั่วโมงหลังการเก็บ หากจำเป็นจริง ๆ ให้เก็บตัวอย่างไว้ในตู้เย็นเพื่อรักษาสภาพของตัวอย่างให้ยังคงสดใหม่ (Coombs & Franco, 2003) การทำ surface sterilization จะใช้เอทานอลและโซเดียมไฮโปคลอไรต์เพื่อกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ภายนอกพืชตัวอย่าง โดยความเข้มข้นของ

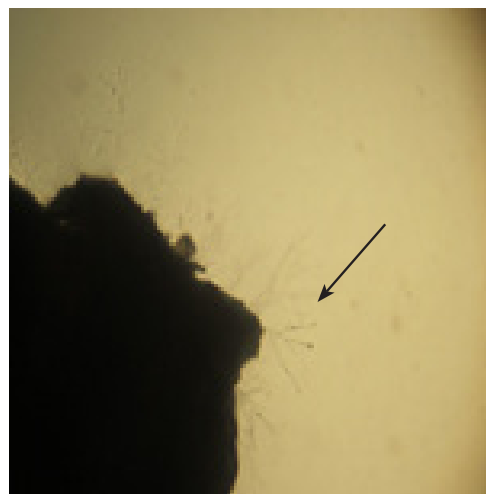
สารและระยะเวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อด้วยตัวทำลายจะขึ้นกับชนิดของเนื้อเยื่อพืช ความหนาของเนื้อเยื่อ อายุของพืช และความไวต่อสารของตัวพืชเอง ซึ่งสิ่งสำคัญในการฆ่าเชื้อคือจะต้องไม่ทำลายเนื้อเยื่อพืชที่เราจะนำมาคัดแยกราเอนโดไฟต์ (Greenfield, et al., 2015) โดยนำชิ้นส่วนต่าง ๆ มาทำความสะอาดผ่านน้ำก๊อกเพื่อล้างสิ่งสกปรกออกเสียก่อน แล้วจึงล้างด้วย 99% เอทานอล เป็นเวลา 1 นาที และแช่ใน 3.125% โซเดียมไฮโปคลอไรต์ นาน 6 นาที ตามด้วย 99% เอทานอล เป็นเวลา 30 วินาทีอีกครั้ง แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (Verma, et al., 2009) ดังที่กล่าวไว้ว่าสิ่งสำคัญในการฆ่าเชื้อคือจะต้องไม่ทำลายเนื้อเยื่อพืชที่เราจะนำมาคัดแยกราเอนโดไฟต์โดยส่วนใหญ่การใช้ความเข้มข้นของสารทำลายเชื้อจะใช้ความเข้มข้น

เท่าใดนั้นขึ้นกับเทคนิคที่ผู้ทำงานวิจัยจะเลือกใช้ตามความเหมาะสม สัมกับเนื้อเยื่อพืชชนิดนั้น หากใช้ความเข้มข้นสูงๆ และเป็นเวลานาน อาจส่งผลให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อที่มีราเอนโดไฟต์อยู่ และนอกจากนี้ยังพบว่าการใช้เอทานอลที่ความเข้มข้น 70% มีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อดีกว่าที่ความเข้มข้น 95% หรือ 99% ดังนั้นจึงมีบางงานวิจัยที่มีการปรับปรุงเทคนิคที่ใช้ในการคัดแยกราเอนโดไฟต์ตามความเหมาะสมของเนื้อเยื่อพืช อายุของพืช และชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อเพิ่มผลผลิตของราเอนโดไฟต์ ตัวอย่างเช่น การใช้ triton X-100 (0.05%) ซึ่งเป็นดีเทอร์เจนต์ที่ไม่มีพิษทำหน้าที่ชะล้างสิ่งสกปรกภายนอก โดยล้างเป็นเวลา 3 นาที ก่อนที่จะทำ surface sterilization จากนั้นจึงเริ่มล้างด้วย 0.5% โซเดียมไฮโปคลอไรต์เป็นเวลา 3 นาที ตามด้วย 70% เอทานอล 1 นาที และสุดท้ายล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 15 วินาที 3 ครั้ง (Greenfield, et al., 2015) หลังจากทำ surface sterilization แล้ว ตัดตัวอย่างพืชเป็นชิ้นเล็ก ๆ ด้วยใบมีดผ่าตัดที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วนำมาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) ที่มีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะเตตราไซคลิน (tetracycline) หรือแอมพิซิลลิน (ampicillin) หรือคลอแรมฟินิโคล (chloramphenicol) ซึ่งมีความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน คอยสังเกตการสร้างเส้นใยของรา เมื่อรามีการเจริญเติบโตให้ตัดเส้นใย (hyphae tip) โดยส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอ (stereo microscope) ดังภาพ 2 มาวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ไม่มีการเติมยาปฏิชีวนะ บ่มอีกครั้งเป็นเวลา 7-14 วัน แยกความแตกต่างของราเอนโดไฟต์แต่ละชนิดด้วยการสังเกตลักษณะโคโลนี ทั้งสีและรูปร่างของโคโลนี การเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน เชื้อราที่แยกได้จะเก็บไว้ใน 15% กลีเซอรอล แล้วนำไปแช่ในตู้เย็น freezer อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นำราเอนโดไฟต์ที่คัดแยกได้แต่ละชนิดมาตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 1x1 ตารางเซนติเมตรด้วยใบมีดผ่าตัดที่จุ่มแอลกอฮอล์และผ่านไฟเพื่อฆ่าเชื้อ นำชิ้นวุ้นที่มีราเอนโดไฟต์มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวในขวดรูปชมพู่ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 3 สัปดาห์ ซึ่งขั้นตอนนี้เป็นกระบวนการหมัก (fermentation) จะได้ผลผลิตออกมา 2 ส่วนคือ ส่วนที่เป็นน้ำเลี้ยงเชื้อรา (culture filtrate) และ

ส่วนที่เป็นเส้นใยราเพื่อนำไปทดสอบหาฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

นำส่วนที่เป็นน้ำเลี้ยงเชื้อราและส่วนที่เป็นเส้นใยรามาสกัดด้วยวิธีทางเคมีโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์แล้วระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออก จะได้สารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงเชื้อราและส่วนเส้นใยรา จากนั้นนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านจุลชีพ ฤทธิ์ต้านมะเร็ง เป็นต้น หากต้องการทำให้สารสกัดที่ได้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น ต้องนำไปแยกโดยเทคนิคโครมาโทกราฟี (chromatography) และศึกษาเอกลักษณ์โครงสร้างเคมีของสาร โดยเทคนิคสเปกโตรสโคปี (spectroscopy) แล้วจึงนำไปศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

สำหรับการจำแนกสายพันธุ์ของราแต่ละชนิดที่คัดแยกได้ จะอาศัย (1) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของของราที่มีลักษณะจำเพาะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และ (2) อาศัยวิธีการทางโมเลกุล โดยการตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ribosomal RNA (rRNA) gene โดยเฉพาะเลี้ยงราในอาหารเลี้ยงเชื้อราแยก genomic DNA และเพิ่มปริมาณ ribosomal DNA ในส่วนของ ITS1-5.8S-ITS2 โดยใช้เทคนิค PCR ด้วย primer ITS4 และ ITS5 และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกันในฐานข้อมูลของ GenBank (NCBI) ด้วยโปรแกรม BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) สร้าง phylogenetic tree วิเคราะห์ผลที่ได้และจัดจำแนกรา



ภาพ 2 ลักษณะของเส้นใยราที่ออกมาจากเนื้อเยื่อพืช ซึ่งส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอ



## สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟต์ (Bioactive compounds from endophytic fungi)

ราเอนโดไฟต์มีศักยภาพในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหรือทางเภสัชวิทยาที่น่าสนใจที่หลากหลาย ดังนี้

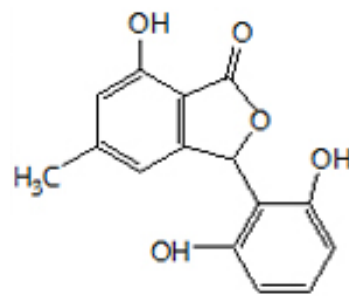
### 1. สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)

สารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีความสำคัญในการกำจัดอนุมูลอิสระพวก reactive oxygen species (ROS) ได้แก่ ไฮดรอกซิลเรดิคัล ( $\text{OH}^\bullet$ ) ซูเปอร์ออกไซด์เรดิคัล ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) เป็นต้น ซึ่งอนุมูลอิสระเหล่านี้จะไปทำลายเซลล์ก่อให้เกิดผลทางพยาธิสภาพต่อร่างกาย ได้แก่ การทำลายดีเอ็นเอ การเกิดมะเร็ง และการเสื่อมสภาพของเซลล์ (cellular degeneration) ดังนั้นหน้าที่ที่สำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระคือ การปกป้องการทำลายเนื้อเยื่อ เซลล์และดีเอ็นเอที่เกิดจากอนุมูลอิสระเหล่านี้ เพื่อไม่ให้เกิดโรคต่าง ๆ เช่น โรคมะเร็ง (cancer) โรคหัวใจและหลอดเลือด (cardiovascular disease) ภาวะหลอดเลือดตีตัน (atherosclerosis) ความดันโลหิตสูง (hypertension) โรคเบาหวาน (diabetes mellitus) โรคที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาทถูกการทำลาย เช่น อัลไซเมอร์ และพาร์กินสัน (neurodegenerative disease: Alzheimer and Parkinson disease) โรคข้อเสื่อมรูมาตอยด์ (rheumatoid arthritis) และการเสื่อมชรา (aging)

สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติพบได้ทั้งในผักผลไม้และพืชสมุนไพร เช่นเดียวกับงานวิจัยหลายงานที่ค้นพบสารต้านอนุมูลอิสระที่สร้างจากราเอนโดไฟต์ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เช่น ต้นแปะก๊วย (*Ginkgo biloba*) มีราเอนโดไฟต์ *Xylaria* sp. ให้สารพวกฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งกระบวนการเกิดไลปิดเปอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคและความชรา (Liu, et al., 2007)

Isopestacin เป็นสารในกลุ่ม isobenzofuranone ได้จากราเอนโดไฟต์ *Pestalotiopsis microspore* คัดแยกได้จากพืช *Terminalia morobensis* ที่พบในประเทศ Papua New Guinea (Strobel, et al., 2002) มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้เป็นอย่างดี เนื่องจากมีโครงสร้าง

ใกล้เคียงกับสารฟลาโวนอยด์ สามารถดักจับซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนและไฮดรอกซิลเรดิคัลได้



ภาพ 3 isopestacin

มีงานวิจัยคัดแยกราเอนโดไฟต์จากใบบัวบก (*Centella asiatica*) เพื่อวิเคราะห์หาไฟโตเคมีคอล (phytochemicals) และทดสอบฤทธิ์ทางเอนไซม์ โดยใช้วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต (ethyl acetate) และนำมาทดสอบหาฤทธิ์ทางชีวภาพโดยใช้ HP-TLC ไฟโตเคมีคอลที่ได้เป็นสารในกลุ่มฟีนอล ฟลาโวนอยด์ แอลคาลอยด์แทนนิน และไกลโคไซด์ จากงานวิจัยพบว่าราเอนโดไฟต์ที่ได้จากใบบัวบก *Centella asiatica* เมื่อนำมาจำแนกโดยวิธี 18S rRNA sequencing ได้ราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ *Penicillium* sp. nirjan22 (HK068965) และพบว่าราเอนโดไฟต์ชนิดนี้ให้สารประกอบฟีนอล 2.76 กรัม และให้ฟลาโวนอยด์ 0.275 กรัม อีกทั้งราชนิดนี้ยังสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) ได้ด้วย ซึ่งเมื่อนำผลที่ได้ไปทดสอบประสิทธิภาพผลอีกครั้งในหลอดทดลอง (in vitro) และในสิ่งมีชีวิต (in vivo) จะสามารถนำไปใช้ในการรักษาโรคในมนุษย์และใช้ในทางอุตสาหกรรมได้ (Devi, Prabakaran & Wahab, 2012) ซึ่งจะพบว่าปัจจุบันมีการนำสารสกัดจากใบบัวบกไปใช้ในผลิตภัณฑ์ช่วยสมานแผล ลบรอยแผลเป็นและจุดด่างดำ โดยใช้คุณสมบัติของความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและด้านการอักเสบ ซึ่งหากราเอนโดไฟต์ที่พบนี้สามารถสร้างสารที่มีคุณสมบัติได้ในผลผลิตที่สูงขึ้นก็จะสามารถนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์อื่นได้อีกมากมาย

Khiralla, Mohamed and Thomas (2015) ศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารที่ได้จากราเอนโดไฟต์ที่สกัดได้จากพืชสมุนไพรทางยาใน

ประเทศชูดาน โดยหาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดทดสอบด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric และหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical scavenging method จากการทำในหลอดทดลอง พบว่า ราเอนโดไฟต์ที่คัดแยกได้ 21 ไอโซเลต จากพืชที่มีสรรพคุณทางยาทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ *Calotropis procera* Ait. (Asclepiadaceae) (ก้านและใบ), *Catharanthus roseus* L. (Apocynaceae) (ก้านและใบ), *Euphorbia prostrata* Ait. (Euphorbiaceae) (ก้านและใบ), *Vernonia amygdalina* Del. (Asteraceae) (ก้านและใบ) และ *Trigonella foenum-graecum* L. (Fabaceae) (เมล็ด) จากงานวิจัยพบว่า ราเอนโดไฟต์ในกลุ่ม *Aspergillus* sp. จากเมล็ดลูกชัด (*Trigonella foenum-graecum* seeds) ให้สารฟีนอลิกปริมาณมากที่สุด  $89.9 \pm 7.1$  มิลลิกรัมเทียบเท่ากรดแกลลิกต่อกรัม (GAE/g) และมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยมีค่าความเข้มข้นที่สารมีประสิทธิภาพในการยับยั้งได้ที่ 50% (Inhibitory Concentration--IC<sub>50</sub>) เท่ากับ  $18.0 \pm 0.1$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีความสัมพันธ์เชิงเส้นในทางบวก  $R^2 = 0.999$  เมื่อเทียบกับสารสกัดจากราเอนโดไฟต์ที่ได้จากใบ bitter (*V. amygdalina* Del., Asteraceae) ในทางเภสัชวิทยาใบ bitter มีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลและไขมันในเลือดในผู้ป่วยเบาหวาน ส่วนเมล็ดลูกชัดมีฤทธิ์ลดระดับคอเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ในผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจ (Coonary Artery Disease--CAD) ซึ่งจะประกอบไปด้วยสารประกอบโพลีฟีนอล รวมถึง อะพิจินิน (apigenin) เคมเฟอรอล (kaempferol) และเคอซิติน ไกลโคไซด์ (quercetin glycosides) (Bordia, Verma & Srivastava, 1997; Sindhu, et al., 2012; Kenny, et al., 2013)

โพลีแซคคาไรด์ ได้แก่ exopolysaccharide (EPS), water-extracted mycelial polysaccharide (WPS) และ sodium hydroxide-extracted mycelial polysaccharide (SPS) ได้แก่ pullulan, scleroglucan, และ botryosphaeran เป็นสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิที่ได้จากราเอนโดไฟต์เช่นกัน พบว่า WPS ที่คัดแยกมารากรากของพืช *Dioscorea zingiberensis* (Dioscoreaceae) ซึ่งเป็นพืชที่ให้ diosgenin

ในปริมาณที่สูง และสามารถนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สเตียรอยด์แบบกึ่งสังเคราะห์ในอุตสาหกรรมทางยา ได้แก่ คอร์ติโคสเตียรอยด์ (corticosteroids) ฮอร์โมนเพศ (sexual hormones) ยาเม็ดคุมกำเนิด (oral contraceptives) (Liu, et al., 2010) diosgenin เป็นสารประกอบซาโปนิน ไกลโคไซด์ สกัดได้จากหัวมันเทศป่า (wild yams; *Dioscorea villosa* Linn.) และเมล็ดลูกชัด (fenugreek; *Trigonella foenum graecum* Linn.) นำไปใช้ประโยชน์ในการรักษาผู้ป่วยที่มีกลุ่มอาการผิดปกติ เช่น ปริมาณคอเลสเตอรอลในเลือดสูง (hypercholesterolemia) ระดับของไขมันในเลือดผิดปกติ (dyslipidemia) เบาหวานและโรคอ้วน (diabetes and obesity) การอักเสบ (inflammation) และโรคมะเร็ง (cancer) diosgenin สามารถลดระดับไตรกลีเซอไรด์ในพลาสมาและตับได้ รวมทั้งช่วยทำให้เกิดภาวะสมดุลของน้ำตาลกลูโคส (glucose homeostasis) ดีขึ้นเพื่อไปลดการสร้างไขมันมากเกินไป และยังยับยั้งกระบวนการอักเสบในเนื้อเยื่อไขมัน นอกจากนี้ diosgenin ยังสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งผ่านกระบวนการต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนและการเจริญของเซลล์ (proliferation) การแบ่งเซลล์ (differentiation) การตายแบบอะพอพโทซิส (apoptosis) การอักเสบ (inflammation) และการเกิดมะเร็ง (oncogenesis) นอกจากนี้จะมีประโยชน์ในการนำไปสังเคราะห์สเตียรอยด์แล้ว ยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในเครื่องสำอางได้อีกโดยมีผลให้ความชุ่มชื้นแก่ผิว การศึกษานี้ นำไปสู่สมมติฐานว่า โพลีแซคคาไรด์เหล่านี้ น่าจะสนับสนุนการสร้างสารสำคัญในพืชโดยทำหน้าที่ร่วมกันอย่างมีประสิทธิภาพระหว่างพืชเจ้าบ้านและราเอนโดไฟต์ โดยทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้น (polysaccharide elicitors) ให้พืชเจ้าบ้านสร้างสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิ ก่อนหน้านี้ได้มีงานวิจัยซึ่งทำการสกัดตัวกระตุ้นเหล่านี้จากราเอนโดไฟต์ *F. oxysporum* Dzf17 พบว่า WPS ทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นหรือเหนี่ยวนำให้เนื้อเยื่อของพืช *D. zingiberensis* ที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีการผลิต diosgenin ในปริมาณที่สูงขึ้น (Li, et al., 2011) แต่อย่างไรก็ตามผลผลิตที่ได้ยังคงมีปริมาณน้อย กลุ่มนักวิจัยจึงพัฒนา

เทคนิคการคัดแยกและสกัดโพลีแซคคาไรด์รวมถึงการหาแหล่งของราเอนโดไฟต์ที่ให้สารเหล่านี้ในปริมาณที่สูงขึ้นและมีฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างอื่นนอกเหนือจากเป็นตัวกระตุ้นการสร้างสารสำคัญในพืช นอกจากราเอนโดไฟต์ *F. oxysporum* Dzf17 จากรากของพืช *Dioscorea zingiberensis* (Dioscoreaceae) ดังที่กล่าวไปแล้วที่สามารถให้โพลีแซคคาไรด์ได้ ยังมีราเอนโดไฟต์ *Fusarium oxysporum* Fat9 จากต้นอ่อนของบัควีท (Tartary buckwheat sprout; *Fagopyrum tataricum* L., Gaertn, Polygonaceae) ที่ให้สาร WPS ได้เช่นกัน (Zhong, et al., 2016)

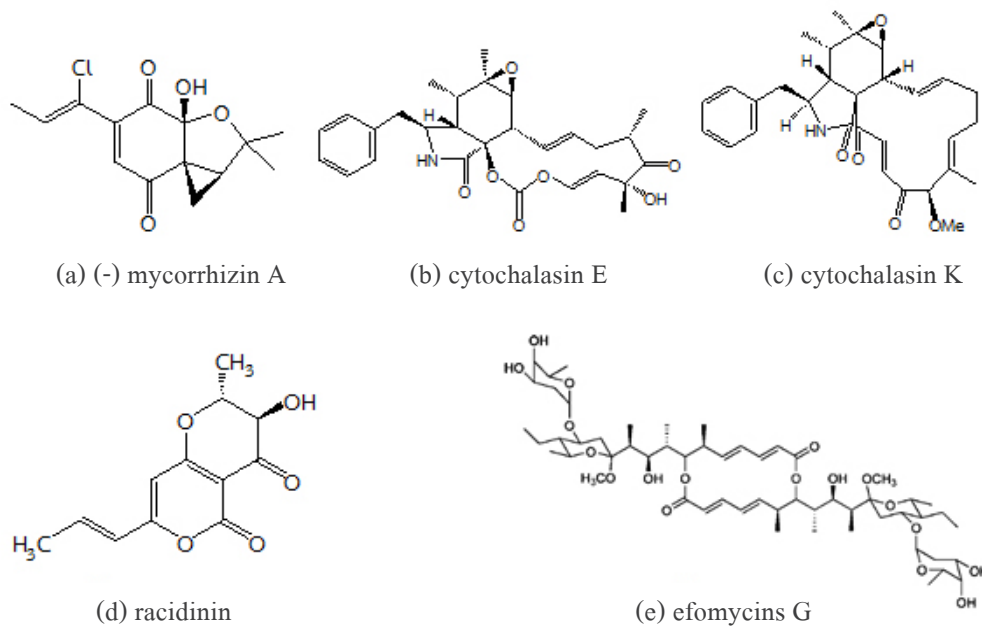
นอกจากเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการสร้างสำคัญในพืชแล้ว โพลีแซคคาไรด์บางชนิดยังทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง EPS, SPS และ WPS ที่สร้างจากราเอนโดไฟต์ *Berkleasmium* sp. Dzf12 ที่คัดแยกได้จากรากของพืช *Dioscorea zingiberensis* พบว่า EPS และ SPS ที่ความเข้มข้น ( $EC_{50}$ ) 61.60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 91.51 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH radicals ได้ ที่ความเข้มข้น 53.37 and 51.27 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออน ( $Fe^{3+}$ ) ได้ และที่ความเข้มข้น 461.23 และ 598.75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ในการกำจัดไฮดรอกซิลเรดิคัลได้อย่างมีนัยสำคัญ ตามลำดับ จากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า การสกัด EPS และ SPS จากราเอนโดไฟต์ *Berkleasmium* sp. Dzf12 น่าจะเป็นแหล่งทางชีวภาพที่มีศักยภาพพอที่จะให้สารเมแทบอลิซึมที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติและสามารถนำไปพัฒนาต่อได้ เนื่องจากคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของโพลีแซคคาไรด์ทั้งสองชนิดนี้ ทำหน้าที่รีดิวซ์เฟอร์ริก ( $Fe^{3+}$ ) ให้เป็นเฟอร์รัส ( $Fe^{2+}$ ) แต่ทั้งนี้  $Fe^{2+}$  เป็นโลหะทรานซิชันที่กระตุ้นให้เกิด reactive oxygen species จำพวกไฮดรอกซิลเรดิคัลและซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนได้จากปฏิกิริยา Fenton reaction ดังนั้นโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากราเอนโดไฟต์จึงทำหน้าที่ไปจับหรือคีเลต (chelate)  $Fe^{2+}$  ซึ่งเป็นผลให้ลดการเกิดอนุมูลอิสระ ดังนั้นประโยชน์จากการค้นพบสารโพลีแซคคาไรด์จาก

ราเอนโดไฟต์และการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระนี้สามารถนำไปต่อยอดศึกษาหาฤทธิ์ทางชีวภาพเพิ่มเติมได้อีก เช่น คุณสมบัติในการต้านมะเร็งและระบบภูมิคุ้มกัน รวมถึงการหาโครงสร้างและกลไกในการออกฤทธิ์ของสารประกอบที่ได้และนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและยา (Li, et al., 2012)

## 2. สารต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial)

เชื่อว่าราเอนโดไฟต์มีกลไกในการต้านจุลินทรีย์ก่อโรคเพื่อเป็นการปกป้องตัวมันเองและพืชเจ้าบ้านไม่ให้ถูกคุกคาม โดยราจะสร้างสารเมแทบอลิซึมซึ่งเป็นพิษต่อเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคเหล่านั้น และสารเมแทบอลิซึมที่ได้จากราเอนโดไฟต์มีโครงสร้างหลากหลาย ได้แก่ แอลคาลอยด์ เพปไทด์ สเตียรอยด์ เทอร์ปีนอยด์ ฟีนอลควินิน และ ฟลาโวนอยด์ (Yu, et al., 2010)

สาร (-) Mycorrhizin A, cytochalasin E, cytochalasin K และ racidinin (ภาพ 4) คัดแยกจากราเอนโดไฟต์ 3 ชนิด ได้แก่ รา *Plectophomella* sp., *Physalospora* sp. และ *Crataegus monogyna* (Hussan, et al., 2014) จากงานวิจัยพบว่า เมื่อนำสารสกัดหยาบและสารที่คัดแยกได้จากราเอนโดไฟต์ทั้ง 3 ชนิดมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์โดยวิธี agar well diffusion และนำสารสกัดหยาบนั้นมาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) และพิสูจน์เอกลักษณ์ทางโครงสร้างเคมีโดยวิธีนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัม (nuclear magnetic resonance spectra) ของสารเมแทบอลิซึมที่คัดแยกได้จากรา เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่า สาร (-) Mycorrhizin A ที่แยกได้จากรา *Plectophomella* sp. มีฤทธิ์ในการต้านราและแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* อย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ cytochalasin E และ K แยกได้จากรา *Physalospora* sp. มีฤทธิ์ต้านราและแบคทีเรีย *Chlorella fusca*, *Ustilago violacea*, *Escherichia coli*, *Bacillus megaterium* ส่วนราเอนโดไฟต์ *Crataegus monogyna* ให้สาร racidinin มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อรา *Eurotium repens* และ *Mycotypha microspora* ได้เป็นอย่างดี



ภาพ 4 สารต้านจุลินทรีย์

efomycins M, G และ oxohydrogrolidin เป็นสารในกลุ่ม macrolides ส่วน abierixin และ 29-O-methylabierixin เป็นสาร polyether ได้จากรา *Streptomyces* sp. BCC72023 ที่คัดแยกมาจากดินข้าว *Oryza sativa* ในประเทศไทย มีฤทธิ์ต้าน *Plasmodium falciparum* ซึ่งเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคมาลาเรียโดยมียุงเป็นพาหะ เป็นโรคติดต่อที่แพร่หลายในประเทศเขตร้อนรวมถึงประเทศไทย ในงานวิจัยพบว่า efomycin G, oxohydrogrolidin และ 29-O-methylabierixin สามารถต้าน *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคระบบทางเดินหายใจและเป็นสาเหตุของวัณโรคได้อีกด้วย นอกจากนี้ยังพบว่า efomycin G สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus cereus* และ 29-O-methylabierixin มีฤทธิ์ต้าน *Colletotrichum capsici* (Supong, et al., 2016)

### 3. สารต้านมะเร็ง (anticancer) และต้านเนื้องอก (antitumor)

paclitaxel (Taxol) และอนุพันธ์เป็นสารที่ผลิตจากราเอนโดไฟต์และใช้ในการต้านมะเร็ง paclitaxel เป็นสารในกลุ่ม diterpenoid ที่พบในพืชตระกูลยิว (Taxus) ในครั้งแรกได้นำมาใช้ในการรักษามะเร็งปากมดลูกและมะเร็งเต้านม แต่ปัจจุบันถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคที่เกิดจากเนื้อเยื่อแบ่งตัวผิดปกติได้ดี เชื้อราที่เจริญอยู่ในดินยิว

สามารถผลิตสาร paclitaxel ได้และเป็นสารชนิดเดียวกับกับพืชเจ้าบ้านที่ราอาศัยอยู่ โดยคาดว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สร้างขึ้นโดยสมุนไพรร่า อาจถูกสร้างโดยเชื้อราที่อาศัยอยู่ในพืชสมุนไพรร่าด้วย ตัวอย่างเช่น ราเอนโดไฟต์ *Paecilomyces* sp. ที่แยกจากราพืชสมุนไพรร่า *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei* และ *Torreya grandis* ในประเทศจีน สามารถผลิตสาร paclitaxel (Taxol) ซึ่งออกฤทธิ์ต้านเนื้องอกและต้านมะเร็งได้ (Huang, et al., 2001)

ราเอนโดไฟต์ *Taxomyces andreanae* ซึ่งคัดแยกมาจากเปลือกของต้น northwest Pacific yew (*Taxus brevifolia*) (Taxaceae) ให้สาร paclitaxel มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง (Stierle, Strobel & Stierle, 1993) paclitaxel จะไปจับกับ  $\beta$ -subunit ของ tubulin ใน microtubule เพิ่มการ polymerization ของ tubulin ให้กลายเป็น stable tubulin มากขึ้น และยับยั้งขบวนการ depolymerization ในกระบวนการแบ่งเซลล์ (cell division) นอกจากนี้ยังมีราเอนโดไฟต์ชนิดอื่นที่สามารถสร้าง paclitaxel ได้เช่นกัน ได้แก่ *Taxodium distichum* (Li, et al., 1996), *Wollemia nobilis* (Strobel, et al., 1997), *Phyllosticta spinarum* (Kumaran, Muthumary & Hur, 2008), *Bartalinia robillardoides* (Gangadevi & Muthumary, 2008), *Pestalotiopsis terminaliae* (Gangadevi & Muthumary, 2009), *Botryodiplodia theobromae* (Pandi, Manikandan & Muthumary, 2010)



สำหรับในประเทศไทย มีราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรหลายชนิด ได้แก่ กระดังใบดอกแดง เสน บุนนาค ทองแมว กุหลาบขาว ไชหิน กระเบาใหญ่ กระเช้าฝี คัดแยกราได้ 23 ชนิด ตรวจสอบสารสกัดหยาบพบว่าราหลายชนิดให้ผลน่าสนใจโดยคาดว่าจะสามารถพัฒนาไปเป็นยารักษาโรคมะเร็งได้ จึงนำไปเพาะเลี้ยงแยกสารบริสุทธิ์พิสูจน์โครงสร้างทางเคมี ในงานวิจัยพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากรา Lrub20 จากกระดังใบดอกแดงและรา *Phomopsis* sp. Usia5 จากสนซึ่งเป็น neurotoxin เช่น pyrone derivatives, dothideopyrones, questin, asterric acid, methyl asterrate, sulochrin, eugenitin, 6-hydroxymethyleugenitin, *cis*-, *trans*-muconic acid, dothideopyrone D, และอนุพันธ์อะซีเตทของ Dothideopyrone มีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคและแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม มะเร็งช่องปาก และมะเร็งปอด (Chomcheon, et al., 2009)

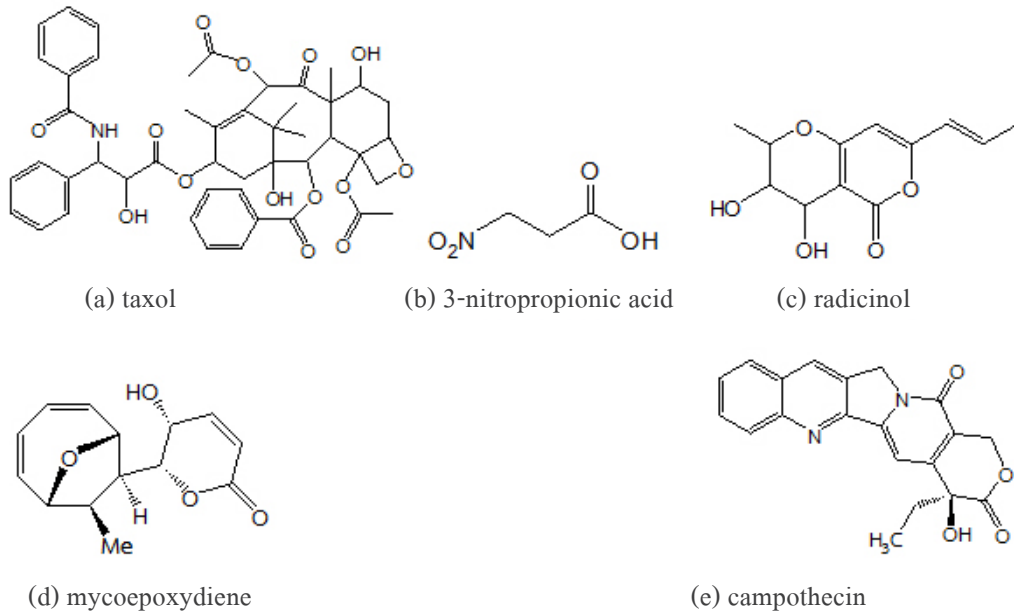
3-nitropropionic acid (3-NPA) เป็นสารพิษที่พบได้ทั่วไปในราเอนโดไฟต์หลายชนิดมีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคต้านเซลล์มะเร็ง โดยราเหล่านี้ได้แก่ รา *Phomopsis* sp. Mfer5 แยกจากบุนนาค รา *Fusicoccum* sp. Gell14 จากทองแมว รา *Diaporthe* sp. Grsp11 และรา *Phomopsis* sp. Grsp19 จาก *Grewia* sp. รา *Phomopsis* Rlyi1 จากกุหลาบขาว และรา *Fusarium* sp. Tasp15 จากไชหิน (Chomcheon, et al., 2005)

รา *Bipolaris* sp. Ctom12 แยกได้จากต้นแคดสร้างสาร radicinin และ radicinol ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น phytotoxin มีฤทธิ์ที่ดีในการฆ่าเซลล์มะเร็งหลายชนิด ได้แก่ มะเร็งเยื่อหุ้มช่องปาก มะเร็งปากมดลูก มะเร็งเต้านม มะเร็งปอด และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว และสาร radicinol ยังมีฤทธิ์ต้าน *P. falciparum* ซึ่งเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคมาลาเรีย

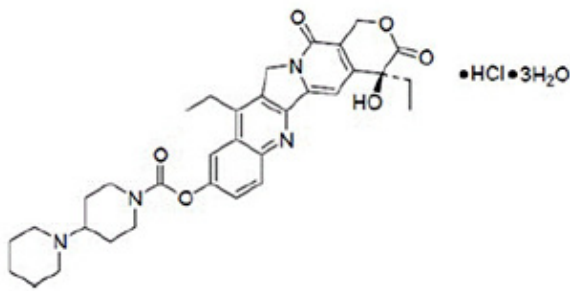
ส่วนในกระเบาใหญ่มีรา *Phomopsis* sp. Hant25 สร้างสาร mycoepoxydiene ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม polyketide มีฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี มะเร็งเยื่อหุ้มช่องปาก มะเร็งปากมดลูก มะเร็งเต้านม มะเร็งปอด และยังมีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค ส่วนรา Atag5 แยกได้จากกระเช้าฝีมด สามารถสร้างสารในกลุ่ม quinone และรา Gspe11 แยกจากพุทธรักษา สร้างสารในกลุ่ม lactone และ cytochalasins เป็นพิษต่อเซลล์ KB cells สามารถฆ่าเซลล์มะเร็งช่องปาก

มะเร็งเต้านม และมะเร็งปอด (Prachya, et al., 2007)

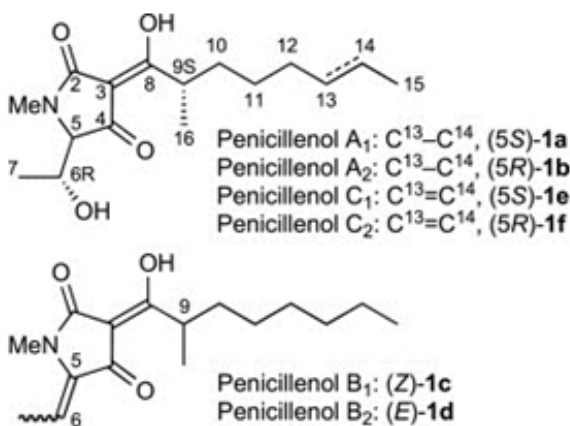
นอกจากนี้ยังมีสาร camptothecin, 10-OH camptothecin และ 9-MeO camptothecin ซึ่งเป็นสารในกลุ่มแอลคาลอยด์ (quinoline indole alkaloid) สร้างจากราเอนโดไฟต์จาก *Miquelia dentata* Bedd. (Shweta, et al., 2012) มีฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งรังไข่ โดยทำหน้าที่ไปยับยั้งเอนไซม์ eukaryotic topoisomerase I ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการคลายเกลียวในบริเวณที่เกิดเป็นเกลียวซ้อนเกลียว (super coiling) ของ DNA โดยทำการตัดในส่วนของ phosphate backbone ของ DNA เพื่อลดการพันกันที่ยุ่งเหยิงและการขมวดปมของสาย DNA ในระหว่างที่มีการจำลองสายดีเอ็นเอ (DNA replication) และถอดรหัสดีเอ็นเอ (DNA transcription) เหนี่ยวนำไปเกิดการตายผ่าน apoptosis ทำให้ double-strand DNA เกิดความเสียหายและทำให้เซลล์ตาย นอกจากนี้ยังมี camptothecin และอนุพันธ์ที่สกัดแยกได้จากราเอนโดไฟต์ *Fomitopsis* sp. (MTCC 10177), *Alternaria alternate* (MTCC 5477), และ *Phomopsis* sp. จากพืชหลาย ๆ ชนิด ได้แก่ *Asterid clade*, *Camptotheca acuminata* (Cornaceae), *Apocynaceae*, *Rubiaceae*, *Gelsemiaceae*,  *Icacinaceae* พบว่า camptothecin และอนุพันธ์มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ และเซลล์มะเร็งเต้านม ซึ่งปัจจุบันได้มีการนำเอา camptothecin ไปพัฒนาเป็นยารักษามะเร็งทั้งแบบกึ่งสังเคราะห์และสังเคราะห์เองทั้งหมด ได้แก่ Irinotecan (ONIVYDE, Merrimack Pharmaceuticals, Inc.) และ Topotecan เป็นยารักษามะเร็งในกลุ่ม topoisomerase I inhibitors ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ camptothecin มีฤทธิ์ในการยับยั้ง topoisomerase I อย่างจำเพาะเจาะจงเพื่อรักษามะเร็งลำไส้ใหญ่ระยะแพร่กระจายโดยใช้เป็นยาเดี่ยวหรือใช้ร่วมกับ 5-fluorouracil (5-FU) และ leucovorin ในบางประเทศยังได้รับอนุมัติในข้อบ่งใช้สำหรับรักษามะเร็งปอด (non-small-cell lung cancer และ small-cell lung cancer) มะเร็งปากมดลูก มะเร็งรังไข่ มะเร็งกระเพาะอาหาร มะเร็งหลอดอาหาร และเนื้องอกเกลียว (glioma) นอกจากนี้ยังพัฒนารูปแบบของยาในรูปแบบเกลียวของ Irinotecan ในรูปแบบ liposomal dispersion สำหรับให้ทางหลอดเลือดดำอย่างช้า ๆ และออกฤทธิ์ในการรักษาได้ดีกว่า (U.S. Food and Drug Administration, 2015)



ภาพ 5 สารต้านมะเร็ง



ภาพ 6 irinotecan (ONIVYDE)



ภาพ 7 สาร penicillenols ที่ได้จากรา Penicillium sp.

สาร penicillenols A1 และ B1 ที่ได้จากรา *Penicillium* sp. GQ-7 จากต้น *Aegiceras corniculatum* มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการแบ่งเซลล์และเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว HL-60 cell lines โดยมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 0.76 μM และ 3.20 μM ตามลำดับ (Lin, et al., 2008) หากเปรียบเทียบ penicillenols A1 กับยาต้านมะเร็งในปัจจุบันเช่น cisplatin (IC<sub>50</sub> เท่ากับ 2.13 μM) (Kwon, Park & Kim, 2007) พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ดีกว่า

สารต้านมะเร็งจากราเอนโดไฟต์อีกชนิด ได้แก่ terrein ที่ได้จากรา *A. terreus* เป็นสาร polyketide มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งเต้านม โดยการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis โดยมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 1.1 nM ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งได้สูงมากเมื่อเทียบกับ Taxol® (ซึ่งมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 0.005-5 μM) (Bladt, et al., 2013) และ 5-fluorouracil (IC<sub>50</sub> เท่ากับ 10 μM) ซึ่งคาดว่าสารนี้น่าจะนำไปใช้เป็นสารต้นแบบในการผลิตเป็นยาต้านมะเร็งได้ในอนาคต

จะเห็นว่างานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากราเอนโดไฟต์ค่อนข้างมีประโยชน์เนื่องจากเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ทำให้ได้สารสำคัญ

จากธรรมชาติ เช่นเดียวกัน kojic acid ที่แยกได้จาก ราเอนโดไฟต์ *Aspergillus*, *Petromyces*, *Penicillium*, *Chaetomium globosum*, *Emericella nidulans*, และ *Pleospora allii* ซึ่งคัดแยกจากใบสดของพืชสมุนไพรในประเทศอียิปต์ ได้แก่ *Datura stramonium* L. (Solanaceae), *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae), โดยสาร kojic acid นี้ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์ดูแลสุขภาพประเภทผลิตภัณฑ์ให้ความกระจ่างใสทั้งชนิดครีม โลชัน สบู่ ผลิตภัณฑ์ภายในช่องปากและฟัน และผลิตภัณฑ์ปกป้องผิว เนื่องจากสาร kojic acid มีคุณสมบัติในการป้องกันรังสียูวี และสามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานินซึ่งเป็นสาเหตุของการสร้างเม็ดสีมากเกินไป (hyperpigmentation) นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ในการต้านจุลชีพ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เพื่อรักษา

ความคงตัวของผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางและยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระซึ่งสามารถนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์สครับรอยและชะลอวัยได้ (Moharram, Zohri & Seddek, 2015)

## บทสรุป

ราเอนโดไฟต์เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถคัดแยกได้จากส่วนต่าง ๆ ของพืชทั้งในส่วนราก ใบ ลำต้น และกิ่งก้าน โดยไม่ก่อให้เกิดอาการของโรคใด ๆ ในพืชที่ราอาศัยอยู่ ราเอนโดไฟต์จัดเป็นแหล่งทางชีวภาพจากธรรมชาติที่ให้สารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิที่สำคัญและมีฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ มากมายรวมถึงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ การต้านจุลินทรีย์ การต้านมะเร็ง ซึ่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากรานี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ได้ทั้งทางการแพทย์และทางอุตสาหกรรม



## References

- Bacon, C. W., & White, J. F. (2000). *An overview of endophytic microbes: Endophytism defined*. New York: Marcel Dekker.
- Bladt, T. T., Frisvad, J. C., Knudsen, P. B., & Larsen, T. O. (2013). Anticancer and antifungal compounds from *Aspergillus*, *Penicillium* and other filamentous fungi. *Molecules*, 18(9), 11338-11376.
- Bordia, A., Verma, S. K., & Srivastava, K. C. (1997). Effect of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) and fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) on blood lipids, blood sugar and platelet aggregation in patients with coronary artery disease. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 56(5), 379-384.
- Chandra, S. (2012). Endophytic fungi: Novel sources of anticancer lead molecules. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95(1), 47-59.
- Chomcheon, P., Wiyakrutta, S., Sriubolmas, N., Ngamrojanavanich, N., Mahidol, C., Ruchirawat, S., & Kittakoop, P. (2009). Metabolites from the endophytic mitosporic Dothideomycete sp. LRUB20. *Phytochemistry*, 70(1), 121-127.
- Chomcheon, P., Wiyakrutta, S., Sriubolmas, N., Ngamrojanavanich, N., Isarangkul, D., & Kittakoop, P. (2005). 3-Nitropropionic acid (3-NPA), a potent antimycobacterial agent from endophytic fungi: is 3-NPA in some plants produced by endophytes?. *Journal of National Products*, 68(7), 1103-1105.
- Coombs, J. T., & Franco, C. M. M. (2003). Isolation and identification of Actinobacteria from surface-sterilized wheat roots. *Applied Environmental Microbiology*, 69(9), 5603-5608.

- 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.
- Gangadevi, V., & Muthumary, J. (2008). Taxol, an anticancer drug produced by an endophytic fungus *Bartalinia robillardoides* Tassi, isolated from a medicinal plant, *Aegle marmelos* Correa ex Roxb. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(5), 717-724.
- Gangadevi, V., & Muthumary, J. (2009). Taxol production by *Pestalotiopsis terminaliae*, an endophytic fungus of *Terminalia arjuna* (arjun tree). *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 52(1), 9-15.
- Greenfield, M., Pareja, R., Ortiz, V., Gómez-Jiménez, M. I., Vega, F. E., & Parsa, S. (2015). A novel method to scale up fungal endophyte isolations. *Biocontrol Science and Technology*, 25(10), 1208-1212.
- Huang, Y., Wang, J., Li, G., Zheng, Z., & Su, W. (2001). Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei* and *Torreya grandis*. *FEMS Immunology and Medicinal Microbiology*, 31(2), 163-167.
- Hussan, H., Kliche-Spory, C., Al-Harrasi, A., Al-Rawahi, A., Abbas, G., Green, I. R., . . . Shah, A. (2014). Antimicrobial constituents from three endophytic fungi. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7 (Special), 224-227.
- Joseph, B., & Priya, R. M., (2011). Bioactive compounds from endophytes and their potential in pharmaceutical effect: A review. *American Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 1(3), 291-309.
- Kenny, O., Smyth, T. J., Hewage, C. M., & Brunton, N. P. (2013). Antioxidant properties and quantitative UPLC-MS analysis of phenolic compounds from extracts of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds and bitter melon (*Momordica charantia*) fruit. *Food Chemistry*, 141(4), 4295-4302.
- Khiralla, A., Mohamed, I., & Thomas, J. (2015). A pilot study of antioxidant potential of endophytic fungi from some Sudanese medicinal plants. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 8(9), 701-703.
- Kumaran, R. S., Muthumary, J., & Hur, B. K. (2008). Production of taxol from *Phyllosticta spinarum*, an endophytic fungus of *Cupressus* sp. *Engineering in Life Sciences*, 8(4), 438-446.
- Kwon, Y. E., Park, J. Y. & Kim, W. K. (2007). In vitro histoculture drug response assay and in vivo blood chemistry of a novel Pt (IV) compound, K104. *Anticancer Research*, 27(1A), 321-326.
- Li, J. Y., Strobel, G., Sidhu, R., Hess, W. M., & Ford, E. J. (1996). Endophytic taxol-producing fungi from bald cypress, *Taxodium distichum*. *Microbiology*, 142(8), 2223-2226.
- Li, P., Mou, Y., Shan, T., Xu, J., Li, Y., Lu, S., & Zhou, L. (2011). Effects of polysaccharide elicitors from endophytic *Fusarium oxysporium* Dzf17 on the growth and diosgenin production in cell suspension culture of *Dioscorea zingiberensis*. *Molecules*, 16(11), 9003-9016.
- Li, P., Sun, W., Luo, C., Shan, T., Mou, Y., Lu, S., . . . Zhou, L. (2012). In vitro evaluation of antioxidant activities of polysaccharides from the endophytic fungus *Berkleasium* sp. Dzf12. *African Journal of Microbiology Research*, 6(2), 471-477.



- Lin, Z. J., Lu, Z. Y., Zhu, T. J., Fang, Y. C., Gu, Q. Q., & Zhu, W. M. (2008). Penicillenols from *Penicillium* sp. GQ-7, an endophytic fungus associated with *Aegiceras corniculatum*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)*, *56*(2), 217-221.
- Liu, W., Huang, W., Sun, W., Zhu, Y., & Ni, J. (2010). Production of diosgenin from yellow ginger (*Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright) saponins by commercial cellulase. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *26*(7), 1171-1180.
- Liu, X., Dong, M., Chen, X., Jiang, M., Lv, X., & Yan, G. (2007). Antioxidant activity and phenolics of an endophytic *Xylaria* sp. from *Ginkgo biloba*. *Food Chemistry*, *105*(2), 548-554.
- Moharram, A. M., Zohri, A. A. & Seddek, N. H. (2015). Production of kojic acid by endophytic fungi isolated from medicinal plant in Egypt. *International Invention Journal of Biochemistry and Bioinformatics*, *3*(3), 28-31.
- Pandi, M., Manikandan, R., & Muthumary, J. (2010). Anticancer activity of fungal taxol derived from *Botryodiplodia theobromae* Pat., an endophytic fungus, against 7, 12 dimethyl benz(a)anthracene (DMBA)-induced mammary gland carcinogenesis in Sprague dawley rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *64*(1), 48-53.
- Panphut, W. (1997). *Bioactive compounds from endophytic fungi of Thai medicinal plants*. Master of Science (Microbiology) Thesis, Mahidol University. (in Thai)
- Prabpai, S., Wiyakrutta S., Sriubolmas, N., & Kongsaree, P. (2015). Antimycobacterial dihydronaphthalenone from the endophytic fungus *Nodulisporium* sp. of *Antidesma ghaesembilla*. *Phytochemistry Letters*, *13*(2015), 375-378.
- Prachya, S., Wiyakrutta, S., Sriubolmas, N., Ngamrojanavanich, N., Mahidol, C., Ruchirawat, S., & Kittakoop, P. (2007). Cytotoxic mycoepoxydiene derivatives from an endophytic fungus *Phomopsis* sp. isolated from *Hydnocarpus anthelminthicus*. *Planta Medica*, *73*(13), 1418-1420.
- Sadananda, T. S., Govindappa, M., & Ramachandra, Y. L. (2014). In vitro antioxidant activity of lectin from different endophytic fungi of *Viscum album* L. *British Journal of Pharmaceutical Research*, *4*(5), 626-643.
- Shweta, S., Gurumrthy, B. R., Ravikanth, G., Ramanan, U. S., & Shivanna, M. B. (2012). Endophytic fungi from *Miquelia dentate* Bedd., produce the anti-cancer alkaloid, camptothecine. *Phytomedicine*, *20*(3-4), 337-342.
- Sindhu, G., Ratheesh, M., Shyni, G. L., Nambisan, B., & Helen, A. (2012). Antiinflammatory and antioxidative effects of mucilage of *Trigonella foenum graecum* (fenugreek) on adjuvant induced arthritic rats. *International Immunopharmacology*, *12*(1), 205-211.
- Stierle, A., Strobel, G., & Stierle, D. (1993). Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of pacific yew. *Science*, *260*(5105), 214-216.
- Strobel, G. A., Hess, W. M., Li, J. Y., Ford, E., Sears, J., Sidhu, R. S. & Summerell, B. (1997). *Pestalotiopsis guepinii*, a taxol-producing endophyte of the wollemi pine, *Wollemia nobilis*. *Australian Journal of Botany*, *45*(6), 1073-1082.

- Strobel, G., Ford, E., Worapong, J., Harper, J. K., Arif, A. M., Grant, D. M., . . . Ming-Wah-Chau, R. (2002). Isopestacin, an isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities. *Phytochemistry*, *60*(2), 179-183.
- Supong, K., Thawai, C., Choowong, W., Kittiwongwattana, C., Thanaboripat, D., Laosinwattana, C., . . . Pittayakhajonwut, P. (2016). Antimicrobial compounds from endophytic *Streptomyces* sp. BCC72023 isolated from rice (*Oryza sativa* L.). *Research in Microbiology*, *167*(4), 290-298.
- Tan, R. X., & Zou, W. X. (2001). Endophytes: A rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports*, *18*(4), 448-459.
- U.S. Food and Drug Administration. (2015). *Highlights of prescribing information: ONIVYDE™* (irinotecan liposome injection), for intravenous use. initial U.S. approval 1996. Retrieved from [http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2015/207793lbl.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2015/207793lbl.pdf)
- Verma, V. C., Gond, S. K., Mishra, A., Kharwar, R. N., & Gange, A. C. (2009). Endophytic actinomycetes from *Azadirachta indica* A. Juss: Isolation, diversity and anti-microbial activity. *Microbial Ecology*, *57*(4), 749-756.
- Wiyakrutta, S., Sriubolmas, N., Panphut, W., Thongon, N., Danwisetkanjana, K., Ruangrunsi, N., & Meevootisom, V. (2004). Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *20*(3), 265-272.
- Yu, H., Zhang, L., Li, L. Zheng, C., Guo, L., Li, W., . . . Qin, L. (2010). Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microbiological Research*, *165*(6), 437-449.
- Zhang, Y., Han, T., Ming, Q., Wu, L., Rahman, K., & Qin, L. (2012). Alkaloids produced by endophytic fungi: A review. *Natural Product Communications*, *7*(7), 963-968.
- Zhong, L., Niu, B., Tang, L., Chen, F., Zhao, G., & Zhao, J. (2016). Effects of Polysaccharide elicitors from endophytic *Fusarium oxysporum* Fat9 on the growth, flavonoid accumulation and antioxidant property of *Fagopyrum tataricum* sprout cultures. *Molecules*, *21*(12), 1590-1601.

