สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การสร้างสารรงควัตถุโพรดิจิโอซินของแอคติโนมัยซีทที่แยกจากดินป่าชายเลน

Prodigiosin pigment production of Actinomycetes isolated from mangrove soils

รัตนาภรณ์ ศรีวิบูลย์

- 7 มิ.ย. 2556
ว.01 5 5 0 4 8
316469

สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

12 มีนาคม 2555

บริการ
14 มิ.ย. 2556

อภินันทนาการ

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง "การสร้างสารรงควัตถุโพรดิจิโอซินของแอคติโนมัยซีทที่แยกจากดินป่าชายเลน" นี้ ได้รับการสนับสนุนงบประมาณการวิจัยจาก สำนักงานบริหารโครงการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนา มหาวิทยาลัยแห่งชาติ สำนักคณะกรรมการอุดมศึกษา ประจำปีงบประมาณ_2554 เป็นระยะเวลา 1 ปี และได้รับการอนุเคราะห์ด้านการทดสอบเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว พร้อมทั้งการตรวจสอบ เอกลักษณ์ทางเคมีบางประการของสาร จาก มหาวิทยาลัย Kochi University of Technology จึงใคร่ขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ห้องปฏิบัติการชีวเคมี สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเลที่ได้อนุเคราะห์ ครื่องมือวิจัย รวมทั้งคำแนะนำด้านเทคนิคการทำสารให้บริสุทธิ์ ขอบคุณ นางสาวนิภาพร พานทอง และนางสาวเนาวรัตน์ ละออเอี่ยม นิสิตภาควิชาไบโอเทคโนโลยี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ผู้ช่วยงานวิจัยมา ณ โอกาสนี้

บทคัดย่อ

จากการคัดเลือกแอคติโนมัยซีท ที่สามารถสร้างสารรงควัตถุสีแดงจำนวน 7 ไอโซเลต นำมาเลี้ยงด้วยอาหารต่าง ๆกันคือ อาหาร ISP2 อาหาร Soybean meal อาหาร Oatmeal อาหาร ISP2+น้ำมันงา และ อาหาร ISP2+ น้ำมันปลา และตรวจสอบการสร้างสารรงควัตถุและฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ในขณะเดียวกัน พบว่าอาหาร ISP2 ที่ไม่เติมอาหารธรรมชาติอื่น ๆ ให้ผลการสร้างสารรงควัตถุและให้ฤทธิ์ยับยั้งที่ดีกว่า และเลือกแอคติโนมัยซีทที่สามารถสร้างสารรงควัตถุที่สร้างรงควัตถุสีแดง หรือ แดงคล้ำ มาเลี้ยงในอาหาร ISP2 เพื่อสกัดสารรงควัตถุให้ได้ปริมาณมาก พบว่าแอคติโนมัยซีท 54-4 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหาร ISP2 สามารถสร้างรงควัตถุสีแดง ได้ปริมาณ 0.15 0 กรัม / อาหาร 1 ลิตร จากการสกัดด้วย Ethyl acetate เมื่อนำสารสกัดหยาบของแอคติโนมัยซีท 54-4 มาทำให้บริสุทธิ์บางส่วน ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี พบว่ามีสารสีแดง สีส้ม และสีชมพู จำนวนมาก ไม่ต่ำกว่า 40 ชนิด แต่ไม่พบว่าแอคติโนมัยซีท 54-4 สร้างสารโพรดิจิโอซิน แต่อาจสร้างสารที่คล้ายโพรดิจิโอซินหลายชนิด สารสกัดหยาบของ แอคติโนมัยซีท A16-1 ให้สารรงควัคถุสีแดงจำนวนมากเช่นกัน และมี spectrum peak ที่ใกล้เคียงกัน คือ A16-1 ให้ spectrum pea k สูงสุด ที่ 480 nm ในขณะที่สารจาก แอคติโนมัยซีท 54-4 ให้ spectrum peak สูงสุด ที่ 520 nm และ 560 ผลจากการตรวจสอบสารที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนของแอคติโนมัยซีท 54-4 พบว่าสารใน fraction ที่ 8-15พบว่ามี peak ที่ชัดเจนอยู่ 2 peak ที่ค่า Rt ที่ 23 และ Rt ที่ 27 นาที และที่ Rt 23 นาทีจะพบ 2 peaks ระหว่าง 220-270 nm และพบ 3 peaks อยู่ระหว่าง 450-550 nm ซึ่ง peaks เหล่านี้คล้ายคลึงกับ peak ที่พบในสารสกัดหยาบ แอคติโนมัยซีท A1-3 และ A3-3 ให้สารสีแดงม่วงน้ำตาล และสีม่วงน้ำเงิน ตามลำดับ และสารสกัดหยาบของแอคติโนมัยซีท 54-5 ไม่ให้ฤทธิ์ยับยั้งต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) สารสกัดหยาบจากเชื้อทุกตัวให้ฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ แต่เฉพาะแอคติโนมัยซีท 54-4 และ A16-1 ให้ฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งด้วย สารจาก *Streptomyces* 54-4 ยับยั้งเซลล์มะเร็งปากมดลูก ด้วยค่า IC_{50}เท่ากับ 8.50 µg/ ml ขณะที่สารที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนจาก *Streptomyces* A16-1 fraction ที่ *5, 6, 7-9* และ fraction ที่10-12 ให้ค่า IC_{50} ที่ 1.72, 1.56, 3.10 และ 2.61 µg/ml ซึ่งเป็นค่าที่น้อยกว่ายา Doxorubicine (8.66µg/ml) และ Tamoxifen (8.33µg/ml)จากการหาลำดับเบสของ 16S rDNA ยีน พบว่าแอคติโนมัยซีททั้ง 2 ชนิดเป็นแอคติโนมัยซีทในจีนัส *Streptomyces*

สารบัญเรื่อง(Table of Contents)

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญเรื่อง (Table of Contents)	ง
สารบัญตาราง (List of tables)	จ
สารบัญภาพ (List of Illustrations)	ฉ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations)	ช
บทที่ 1 บทนำ (Introduction)	1
- งานวิจัยที่เกี่ยวข้องและมีมาก่อน	3
บทที่ 2 เนื้อเรื่อง (Main body)	11
- อุปกรณ์และวิธีการวิจัย	11
บทที่ 3 ผลการวิจัย (Results) และ อภิปราย(Discussion)	14
บทที่ 4 สรุปและ ข้อเสนอแนะ	26
บทที่ 5 ผลผลิต (Output)	27
บรรณานุกรม (Bibliography)	28
รายงานการเงิน	
ภาคผนวก	33
ประวัตินักวิจัย	

สารบัญภาพ(List of Illustrations)

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างทางเคมีของสารโพรดิจิโอซิน และสารในกลุ่มเดียวกัน (Venil and Lakshmanaperumalsamy, 2009)	6
2	a .แอคติโนมัยซีท ที่สามารถสร้างรงควัตถุบนจาน เพาะเชื้อ b.ในอาหารเหลว	14
3	แสดงปริมาณสารแอนติไบโอติกเมตาโบท์ที่สกัดได้ จากการเลี้ยงเชื้อที่สร้างรงควัตถุด้วยอาหาร ISP2 และอาหารข้าวโอ๊ต	
4	การทำ fractionation ด้วย column chromatography ของแอคติโนมัยซีท 54-4	18
5	จากการรวมสารจาก fraction ที่มีสารกลุ่ม เดียวกันเข้าด้วยกัน ได้สารดังในภาพ ก่อนส่งไปวิเคราะห์ที่มหาวิทยาลัยโคจิ	18
6	แสดงองค์ประกอบของสารทั้ง 56 Fractions บนแผ่นโครมาโทแกรม	18
7	แสดงโครมาโทแกรม ของการตรวจสอบองค์ประกอบของสาร ของ Actinomycete A1-3ที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วย column chromatography (หลังจากรวม fraction แล้ว)	20
8	แสดงโครมาโทแกรม ของการตรวจสอบองค์ประกอบของสารจากทุก fraction ของ Actinomycete A3-3 ที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วย column chromatography	21
9	แสดงค่าดูดกลืนแสงของสารสกัดหยาบของสารสีแดงของแอคติโนมัยซีท 54-4 ซึ่งให้ค่าดูดกลืนแสงสูงสุด ที่ 520 nm. (ทดสอบที่มหาวิทยาลัย Kochi University of Technology)	21
10	แสดงฤทธ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของสารสกัดหยาบ A 16-1 และ 54-4 (ทดสอบที่มหาวิทยาลัย Kochi University of Technology)	22
11	กราฟแสดง ผลการยับยั้ง เซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa cells) ให้ค่า IC 50 เท่ากับ 8.50 µg/ ml	22
12	ภาพจาก Scanning Electron Micrograph ของ *Streptomyces* 54-4 บนอาหาร Soil Extract Agar กำลังขยาย 3,000 X	25
13	ภาพจาก Scanning Electron Micrograph ของ *Streptomyces* 16-1 บนอาหาร Soil Extract Agar กำลังขยาย 2,000 X	25

คำอธิบายสัญญลักษณ์และคำย่อ (List of Abbreviations)

BC cell	Breast cancer cell
BCC	BIOTEC Culture Collection
BEL 7402	Human liver cancer BEL-7402
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
cm	centrimetre
°C	degree Celceus
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IC_{50}	The half maximal inhibitory concentration
ID	Identity
ISP2	International *Streptomyces* Project 2
KB	Human nasopharyngeal epidermoid carcinoma
kg	kilogram
KV	Kilovolt
LH-60	Promyelocytic Leukemia LH-60
MCF 7	Breast cancer cell (Michigan Cancer Foundation-7)
MRSA	Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*
ml	milliliter
µl	microlitre
MAG	Magnification
min	minute
MTT	3-(4,5-Dimethyl thiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
nM	nano Mole
ng	nanogram
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
nm	nanometer
No	number
ODS Columns	Standard type of columns (Silica-based Columns)
PDA	Potato Dextrose Agar
PDB	Ptato Dextrose Broth
16S rDNA	16S (sub-unit) ribosomal Deoxyribonucleic acid
Rt	Retention time
TLC	Thin-Layer Chromatography
TSB	Trypticase Soy Broth

1 บทนำ (Introduction)

สารโพรดิจิโอซินจัดเป็นสารเมตาโบไลท์อันดับที่ 2 ชนิดหนึ่ง เป็นสารที่มีสีแดง สามารถสร้างได้จากแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Serratia marcesscence, Pseudomonas magneslorubra, Vivrio psychroerythrous, S. rubidaea, V. gazogenes, Alteromonas rubra, Rugamonas rubra* รวมทั้งแบคทีเรียแกรมบวกในกลุ่ม Actiinomycetes เช่น *Strepoverticillium rubrireticuli S. longisporusruber* รวมทั้ง *Streptomyces* และ *Actinomadura* หลายชนิด (Khanafari et al., 2006; Venil and Lakshmanaperumalsamy, 2009) โดยสารจะถูกสร้างขึ้นก็ต่อเมื่อพ้นจากระยะการเจริญ ในช่วง Log phase ไปแล้ว และมีปัจจัยหลายอย่างที่มีอิทธิพลต่อการสร้าง เช่น องค์ประกอบที่มีในอาหาร อุณหภูมิ pH (Venil *et al*, 2009: Venil and Lakshmanaperumalsamy, 2009; Williamson *et al*., 2005) สารโพรดิจิโอซินนั้นนอกจากจะมีสีแดงสวยงาม ยังมีคุณสมบัติ เป็นสารแอนติไบโอติก สารยับยั้งเซลล์มะเร็ง แล้วยังเป็นสารที่สามารถกดระบบภูมิคุ้มกันอีกด้วย (Immunosuppressive agent) (Han *et al*., 2001) นับเป็นสารเมตาโบไลท์จากแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์และควรค่าแก่การศึกษาวิจัย เพื่อให้ได้สารที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้

แอคติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียที่นอกจากมีความหลากหลายของรูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาแล้วยังมีความหลากหลายของยีน รวมทั้งชนิดของสารเมตาโบไลท์ที่สร้าง ผู้วิจัยจึงเชื่อว่าแบคทีเรียในกลุ่มนี้นอกจากจะสามารถสร้างรงควัตถุสีต่าง ๆ ได้หลายสีตั้งแต่ สีเหลือง ส้ม แดง ชมพู น้ำตาล ม่วง เขียว และสีดำ แล้ว น่าจะสามารถสร้างสี โพรดิจิโอซิน ที่มีความหลากหลายของโครงสร้าง และน่าจะพบแอคติโนมัยซีทใหม่ ๆที่สามารถสร้างสีโพรดิจิโอซิน หรือสารที่มีโครงสร้างคล้าย ๆ (prodigiosin-like) ที่ให้ฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ ๆด้วย

แอคติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีลักษณะเป็นเส้นใย พบได้ในสิ่งแวดล้อมทั่วไป และเป็นแบคทีเรียที่มีศักยภาพสูงในการสร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่มีความหลากหลายของสารออกฤทธิ์อย่างมาก มีทั้งสารยับยั้งจุลินทรีย์ สารยับยั้งเชื้อรา สารยับยั้งเซลล์มะเร็ง สารกระตุ้นภูมิต้านทาน รวมทั้งสารลดระดับโคเลสเตอรอล เป็นต้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารออกฤทธิ์ประเภทสารปฏิชีวนะซึ่งเป็นสารที่มีคุณค่าและความสำคัญทางการแพทย์และเภสัชวิทยาเป็นอย่างมาก ในการวิจัยครั้งนี้แม้จะพบแอคติโนมัยซีทที่สร้างรงควัตถุสีแดงหลายเฉดสี ซึ่งเป็นไปได้ว่านอกจากสารโพรดิจิโอซิน หรือสารที่มีโครงสร้างคล้ายโพรดิจิโอซินแล้วยังอาจมีสารออกฤทธิ์ชนิดอื่น ๆ ที่มีคุณค่าทางการศึกษาวิจัยไม่น้อยไปกว่ากันในอีกส่วนหนึ่งด้วย

เนื่องจากป่าชายเลนเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่สำคัญยิ่งของระบบนิเวศบริเวณชายฝั่งทะเล และมีความหลากหลายทางชีวภาพสูง และนับเป็นสิ่งแวดล้อมทางทะเลที่มีความอุดมสมบูรณ์ของแร่ธาตุต่าง ๆในดิน เนื่องจากเป็นแหล่งรวมของแร่ธาตุ บริเวณปากแม่น้ำที่ไหลออกสู่ทะเล นอกจากนี้ยังมีซากอินทรีย์ทับถมของส่วนก้าน ใบ และดอกของพืชไม้ชายเลนเอง ที่ถูกย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ในดินในบริเวณของป่าชายเลนนั้นเอง และโดยปกติแล้ว แอคติโนมัยซีท ก็เป็นจุลินทรีย์กลุ่มใหญ่ที่พบในดิน ดังจะเห็นได้ว่ามีงานวิจัยจำนวนมากมักค้นหาแอคติโนมัยซีทชนิดใหม่ ๆ หรือที่สร้างสารออกฤทธ์ชนิดใหม่ ๆจากดิน หรือดินตะกอนของป่าชายเลนเป็นจำนวนมาก (Hong,*et al*., 2009; Jongrungruangchok, *et al*., 2008; Tamura and Sakane, 2005; Xiao, 2008) ความอุดมสมบูรณ์ของพื้นป่าและความร้อนของอากาศบริเวณใกล้เขตเส้นศูนย์สูตรของประเทศไทย ทำให้ความอุดมสมบูรณ์ของแร่ธาตุหมุนเวียนอยู่ตลอดเวลา ดังนั้นการเลือกป่าชายเลนเป็นแหล่งของการค้นหาแอคติโนมัยซีทของงานวิจัยนี้

จึงน่าจะเป็นแหล่งที่เหมาะสมที่สุดของการหาสารออกฤทธิ์ใหม่ ๆ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อค้นหาแอคติโนมัยซีทที่สามารถสร้างสีโพรดิจิโอซิน หรือสารที่คล้ายโพรดิจิโอซินชนิดใหม่ ๆ ที่มีคุณสมบัติเป็นสารแอนติไบโอติกยับยั้งจุลินทรีย์ หรือเซลล์มะเร็งด้วย รวมทั้งมีวัตถุประสงค์เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของการสร้างสาร เพื่อการสกัดในปริมาณมากของงานวิจัยในขณะเดียวกัน

ในการศึกษาในเรื่องของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ที่สร้างจากจุลินทรีย์นั้น ต้องมีความเข้าใจในเรื่องของธรรมชาติของเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการให้สร้างสารที่ต้องการที่ดีมากพอสมควร ว่าเจริญได้ดี และสร้างสารออกฤทธิ์ได้ดีในอาหารชนิดใด ต้องการ growth factor หรือสารอาหารพิเศษอื่นใดด้วยหรือไม่ เจริญดีที่อุณหภูมิเท่าใด สร้างสารออกฤทธิ์ได้มาก เมื่อเลี้ยงได้นานเท่าใด ที่อุณหภูมิใด ด้วยอาหารประเภทไหน หรือแม้แต่ถ้าจะต้องมีการสร้างสูตรอาหารขึ้นมาเอง เพื่อให้สร้างสารออกฤทธิ์ได้มากตามต้องการก็ต้องทำ นอกจากนั้นจุลินทรีย์มีขนาดเล็ก ต้องเลี้ยงปริมาณมากเท่าใด จึงจะสามารถสกัดได้สารในปริมาณที่ต้องการ และยังต้องทราบว่าสารออกฤทธิ์ที่แต่ละเชื้อจุลินทรีย์สร้างขึ้นนั้นละลายได้ดีในตัวทำละลายชนิดใด เพื่อจะได้สกัดสารออกมาให้ได้มากที่สุด ดังนั้นการวิจัยนี้จึงต้องทดสอบเบื้องต้นเป็นอันดับแรกก่อนว่า เชื้อแอคติโนมัยซีทที่นำมาศึกษานั้นเจริญ และสร้างสารออกฤทธิ์ได้ดีในอาหารอะไร แล้วจึงเลี้ยงในปริมาณมากขึ้นในอาหารที่สร้างสารออกฤทธิ์ที่ดีที่สุดนั้น

ขณะเดียวกันก็ต้องเข้าใจด้วยว่า ระหว่างขั้นตอนการสกัด และทำสารให้บริสุทธิ์ หรือต้องทดสอบสารนั้น ก็จะพบว่าปริมาณสารออกฤทธิ์ที่ได้ก็จะมีการสูญหายไปกับแต่ละขั้นตอนของขบวนการวิเคราะห์ และเมื่อต้องการศึกษาเกี่ยวกับองค์ประกอบของสารสกัด การออกฤทธิ์ของสาร คุณสมบัติของสาร หรือเกี่ยวกับโครงสร้างของสาร นั้นจำเป็นที่จะต้องมีสารให้ทดสอบในปริมาณมากพอในแต่ละการทดสอบ และควรเป็นการสร้างที่มาจากรอบของการเลี้ยงรอบเดียวกัน ไม่เช่นนั้น ถ้าปริมาณสารไม่พอ และต้องเลี้ยงใหม่ ก็จะยากที่จะพิสูจน์คุณสมบัติขององค์ประกอบย่อยของสารด้วย เพราะการสกัดใหม่ และต้องทำให้สารบริสุทธิ์ใหม่จะไม่มีอะไรที่เหมือนเดิมทุกประการ ดังนั้นในการวิจัยนี้จะเลี้ยงเชื้อในปริมาณ และ สกัดสารด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆที่เหมาะสมหลายครั้ง ทดสอบองค์ประกอบของสาร และพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography โดยใช้ความยาวคลื่น 2 ช่วงคลื่น คือที่ 220 และ 535 nm โดยมีมีสารสกัดจาก bacteria ที่ให้สาร Prodigiosin เป็น standard และแอคติโนมัยซีทที่สร้างสารโพรดิจิโอซิน หรือสารที่มีโครงสร้างคล้ายโพรดิจิโอซิน ที่ดี จะนำมาจำแนกชนิด ด้วยการศึกษาลำดับเบสของ 16S DNA ยีน เพื่อจะได้ทราบว่าเป็นแอคติโนมัยซีทชนิดใด

ผู้วิจัยคาดว่าจะได้พบแอคติโนมัยซีทที่สร้างสารโพริจิโอซิน หรือสารออกฤทธิ์ที่มีโครงสร้างคล้ายโพรดิจิโอซิน (prodigiosin analogues) และออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ และหรือเซลล์มะเร็งที่ดี จากโครงการวิจัยนี้

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องและมีมาก่อน

1. แอคติโนมัยซีท

แอคติโนมัยซีท จัดเป็นแบคทีเรียที่มีคุณค่าและมีคุณประโยชน์มหาศาลต่อเศรษฐกิจ ต่องานด้านไบโอเทคโนโลยี เนื่องจากเป็นแหล่งของการผลิตสารออกฤทธิ์ชีวภาพจำนวนมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารแอนติไบโอติก นอกจากนั้นในหลาย ๆรายงานของนักวิจัยในช่วงเวลา 10 กว่าปีที่ผ่านมา ยังมีการค้นพบว่าแอคติโนมัยซีทสามารถสร้าง สารยับยั้งเซลล์มะเร็ง และสารยับยั้งระบบภูมิคุ้มกันชนิดใหม่ ๆ รวมทั้งเป็นแหล่งของเอ็นไซม์ที่มีคุณค่ามากมาย (Lam, 2006) และเนื่องจากป่าชายเลนเป็นแหล่งที่อยู่ทางทะเลที่มีความแตกต่างกันของสภาวะแวดล้อมที่ค่อนข้างมาก แอคติโนมัยซีทที่พบจึงค่อนข้างหลากหลาย ที่สำคัญของในความหลากหลาย ก็คือเราพบว่าสารที่สร้างขึ้นก็มีความหลากหลายด้วยเช่นกัน รวมทั้งหากพบว่าเป็นแอคติโนมัยซีทชนิดใหม่ ก็ยังมีแนวโน้มเป็นอย่างมากว่าสารที่สร้างขึ้นจะเป็นชนิดใหม่ด้วย และสารแอนติไบโอติกที่เรามีใช้อยู่ในปัจจุบัน จากหลักฐานข้อมูลแอนติไบโอติก (Antibiotic Literature Database) และฐานข้อมูลการวิจัยทางชีวภาพของประเทศอิตาลี (Bioresearch Italia Database) พบว่าส่วนใหญ่ก็ได้มาจากการสร้างของแอคติโนมัยซีท (Lazzarini, et al., 2000) ดังตัวอย่างยาแอนติไบโอติกจากแอคติโนมัยซีทที่แสดงในตารางที่ 1 (Borgos, 2006)

ตารางที่ 1 ตัวอย่างของสารปฏิชีวนะที่เป็นยารักษาโรคและสร้างขึ้นโดยแอคติโนมัยซีท (Borgos, 2006)

Antibiotic class	Example drug	Producing actinomycete
Glycopeptides	Vancomycin	*Amycolatopsis orientalis*
Aminoglycosides	Streptomycin	*Streptomyces griseus*
Macrolides	Erythromycin	*Saccharopolyspora erythraea*
Tetracyclins	Chlortetracycline	*Streptomyces aureofaciens*
Chloramphenicol	Chloramphenicol	*Streptomyces venezuelae*
Lipopeptides	Daptomycin	*Streptomyces roseosporus*
Rifamycins	Rifampicin	*Amycolatopsis mediterranei*
Polyenes	Nystatin	*Streptomyces noursei*

จากรายงานการวิจัยของ Srivibool และ Sukchotiratana (2006) พบว่าจากดินตัวอย่างบริเวณชายฝั่งในจังหวัดชลบุรี ระยอง และจันทบุรี ซึ่งเป็นจังหวัดในภาคตะวันออกของไทยนั้น พบแอคติโนมัยซีทมีสร้างรงควัตถุในอาหารเลี้ยงเชื้อสีต่าง ๆ ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ทั้งชนิดที่เป็นแกรมบวก และแกรมลบ รวมทั้งเชื้อยีสต์แคนดิดาด้วยเป็นจำนวนมาก จากจำนวน 179 ไอโซเลตของแอคติโนมัยซีท พบแอคติโนมัยซีทที่

สร้างสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ถึง 122 ไอโซเลต ซึ่งส่วนใหญ่แล้วเป็นแอคติโนมัยซีทที่มีรงควัตถุสีต่าง ๆ รวมทั้งสีแดงด้วย และพบว่าแอคติโนมัยซีทที่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆได้นั้น เป็นแอคติโนมัยซีทในจีนัส *Streptomyces* เป็นส่วนมาก รองลงมาได้แก่ *Actinomadura*, *Streptoalloteichus*, *Nocardiopsis* และ *Streptosporangium* ตามลำดับ นับว่าบริเวณดินป่าชายเลนในเขตร้อนของไทย พบแอคติโนมัยซีทที่สร้างสารออกฤทธิ์จำนวนมาก

2. แอคติโนมัยซีทจากป่าชายเลนที่ให้สารออกฤทธิ์

โดยปกติแล้วแอคติโนมัยซีท ที่อาศัยอยู่ดินในป่าชายเลนได้นั้น นับว่าเป็นชนิดที่ต้องทนต่อสภาพแวดล้อมได้หลาย ๆ แบบ เช่นต้องสามารถทนได้ในสภาวะแห้งแล้งได้ในยามที่น้ำทะเลลดลง และต้องทนในสภาวะที่ออกซิเจนเหลือน้อย ความชื้นมาก เมื่อน้ำทะเลขึ้น รวมทั้งสภาพความเค็มสูงของน้ำและดินที่เท่า ๆกับความเค็มของน้ำทะเล นักวิจัยส่วนมากแล้วจะสนใจศึกษาแบคทีเรียที่อยู่ ในสิ่งแวดล้อมทางทะเลมากกว่า เนื่องจากมีคุณสมบัติที่แตกต่างจากสิ่งแวดล้อมบนบก เนื่องจากมีปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมหลายอย่างที่ส่งอิทธิพลถึง ถ้าเป็นสิ่งแวดล้อมในทะเลแบคทีเรียที่จะทนอยู่ได้นั้นก็ต้องสามารถเผชิญกับภาวะของสารอาหารปริมาณต่ำ ความเค็มสูง และความดันบรรยากาศสูง เป็นต้น

ในประเทศจีน มีรายงานของ Xiao และคณะ (2008) ได้ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งของแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากป่าชายเลนในเมือง Zhangzhou และ เมือง Fujian ของประเทศจีน พบว่ามีแอคติโนมัยซีทที่ให้สารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์จำนวนมากรวมทั้งยับยั้งเซลล์เนื้องอกด้วย และพบ *Streptomyces* ถึง 89% และพบว่าเป็น *Streptomyces* ชนิดใหม่ถึง 3 isolates โดยใช้จุลินทรีย์ทดสอบ 5 ชนิด คือ *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Esherichia coli*, *Candida albicans* และ *Rhizoctonia solani* รวมทั้งเซลล์เนื้องอก 3 ชนิด คือ BEL 7402, A549 และ HL 60 cell ines พบว่า 42.3% ของแอคติโนมัยซีทที่แยกได้มีสารแอนติไบโอติกยับยั้งจุลินทรีย์ 37.4% ของแอคติโนมัยซีทพบว่ามีสารยับยั้งเซลล์เนื้องอก (anti-tumor activities) และจากการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rDNA ของแอคติโนมัยซีทเหล่านี้ นอกจากนั้นพบ *Microomonospora* 6.1% *Saccharomonospora* 0.6% *Actinomadura* 3.7% และ *Nocardiopsis* 0.6%

จากการศึกษาของ Hong และคณะ (2009) ซึ่งได้ค้นหาแอคติโนมัยซีทจากดินบริเวณป่าชายเลนรวมทั้งจากชิ้นส่วนของพืชป่าชายเลนชนิดต่างๆในประเทศจีน พบว่าในจำนวนเชื้อมากกว่า 2000 ไอโซเลต และแอคติโนมัยซีทที่แยกได้นั้น มีประมาณ 20% ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเซลล์เนื้องอกบริเวณลำไส้ใหญ่ของคน (Human Colon Tumor 116) มี 5% สามารถยับยั้ง *Candida albicans* และอีก 10% สามารถยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ในขณะที่อีก 3% สามารถยับยั้งโปรตีน Tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีความสัมพันธ์กับอาการโรคเบาหวาน อีก 3 ไอโซเลตสามารถยับยั้ง aurorakinase A ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีความสัมพันธ์กับอาการโรคการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาท (neurodegenerative desease) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารออกฤทธิ์ที่แอคติโนมัยซีทสร้างขึ้น นอกจากจะมีสารยับยั้งแบคทีเรีย สารยับยั้งเชื้อรา สารยับยั้งเซลล์มะเร็งแล้ว ยังมีสารที่สามารถยับยั้งอาการของเบาหวาน รวมทั้งสารที่สามารถยับยั้งอาการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทอีกด้วย ซึ่งนับเป็นข้อมูลองค์ความรู้ใหม่สำหรับทศวรรษนี้

3. สารโพรดิจิโอซิน สารที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกันและแบคทีเรียที่สร้างได้

มีหลายรายงานการวิจัยที่ได้กล่าวถึงสาร Prodiginine และได้ศึกษาถึงคุณสมบัติทางชีวภาพของ สารชนิดนี้ ทั้งที่สร้างได้จาก *Streptomyces, Actinomadura,* และจาก *Seratia, Pseudomonas* และแบคทีเรียในจีนัสอื่น ๆ นอกเหนือจากที่ได้กล่าวถึงนี้ ซึ่งมีทั้งสารโพรดิจิโอซินและสารที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกัน

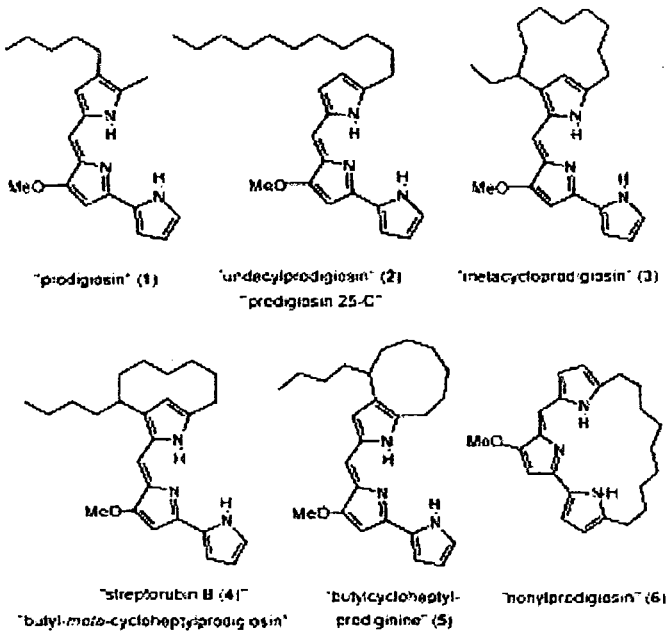
แอคติโนมัยซีท ในจีนัส *Streptomyces* และ *Actinomadura* ก็เป็นอีกกลุ่มหนึ่งที่เป็นพวกที่สร้างสาร Prodiginines และสารที่มีโครงสร้างคล้าย ๆกัน รวมทั้งที่มีคุณสมบัติทางชีวภาพที่น่าสนใจ (Gerber, 1975, 1969

สาร Cycloprodigiosin เป็นสารที่สร้างจาก *Pseudoalteromonas denitrificans* (Hugenholtz and Pace, 1996) มีรายงานว่าสารชนิดนี้มีคุณสมบัติเป็น ทั้งสารกดระบบภูมิต้านทาน (immunosuppressive) สารยับยั้งมาลาเรีย และสารที่สามารถกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็ง (Yamamoto et al., 1999; Kawauchi, et al., 1999; Kim, et al., 1999) นอกจากนี้ *Pseudoalteromonas rubra* ที่แยกได้จากชายฝั่งทะเลเมดิเตอเรเนียน (Gauthier, 1976) ก็สามารถา มารถสร้างได้ทั้งสาร Cycloprodigiosin และ สาร Prodigiosins (Gerber and Gauthier, 1979; Feher et al, 2008)

จากการศึกษาของ Kawasaki และคณะ (2008) ซึ่งพบโพรดิจิโอซินชนิดใหม่สร้างจาก *Streptomyces griseoviridis 2464-S5* ซึ่งปกติสร้างสาร roseophilin ซึ่งเป็นสารที่มี Pyrrole 2 group และมี 1 furan ring สาร โพรดิจิโอซินซึ่งเป็นสารแอนติไบโอติกที่มี pyrrole 3 group (tripyrrole) นั้นมีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกับ roseophilin ซึ่งเป็นสารสีม่วงแดง จากการศึกษายีนที่ homologous กับยีน *redH, redM* และ *redW* ที่มีความเกี่ยวข้องกับการสร้างสาร โพรดิจิโอซินพบว่า *Streptomyces griseoviridis 2464-S5* ที่สร้างสาร roseophilin ก็สามารถสร้างสารโพรดิจิโอซินได้เช่นกัน

นอกจากนี้รงควัตถุสีแดงของ Prodigiosins ยังสามารถถูกสร้างได้จากแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ที่ไม่ใช่ Actinomycetes หรือ*Pseudoalteromonas* ด้วย เช่น สามารถสร้างได้จากแบคทีเรีย *Hahella chejuensis* (Kim et al, 2007) และยังมีรายงานของ Nakashima et al ก็ได้ศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพของสาร Prodiginines ที่คล้าย ๆกันนี้ซึ่งสร้างได้จากแบคทีเรีย ในจีนัส *Hahella* (Nakashima et al., 2005) ในปัจจุบันมีสารอนุพันธ์ของ Prodiginines ที่กำลังอยู่ในขั้นการทดสอบทางคลินิกเพื่อผลิตเป็นยารักษาโรคมะเร็งชนิดต่าง ๆ (Williamson et al., 2007) ดังนั้นนับว่าสารในกลุ่ม Prodiginines, Prodigiosins และสารอนุพันธ์ เป็นสารแอนติไบโอติกเมตาโบไลท์ที่มีความสำคัญและทรงคุณค่าเป็นอย่างยิ่ง

สารโพรดิจิโอซิน เป็นสารในกลุ่มเดียวกับ สาร Prodiginine มีสูตรโครงสร้างดังในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของสารโพรดิจิโอซิน และสารในกลุ่มเดียวกัน (Venil and Lakshmanaperumalsamy, 2009)

สารโพรดิจิโอซินจัดเป็นสารเมตาโบไลท์อันดับที่ 2 ชนิดหนึ่งของแบคทีเรียที จะถูกสร้างขึ้นก็ต่อเมื่อพ้นจากระยะการเจริญ ในช่วง Log phase ไปแล้ว และมีปัจจัยหลายอย่างที่มีอิทธิพลต่อการสร้าง เช่น องค์ประกอบที่มีในอาหาร อุณหภูมิ pH (Venil *et al*, 2009: Venil and Lakshmanaperumalsamy, 2009; Williamson *et al.*, 2005) สารโพรดิจิโอซินนั้นนอกจากจะมีสีแดงสวยงาม ยังมีคุณสมบัติ เป็นสารแอนติไบโอติก สารยับยั้งเซลล์มะเร็ง แล้วยังเป็นสารที่สามารถกดระบบภูมิคุ้มกันอีกด้วย (Inmmunosuppressive agent) (Han *et al.*, 2001)

สารโพรดิจินีน (prodiginine) เป็น โพรดิจิโอซินที่มีสีแดง เป็นสารเมตาโบไลท์อันดับสองที่พบครั้งแรกในแบคทีเรีย *Serratia marcescens* โดยโครงสร้างของรงควัตถุสีแดงถูกเรียกชื่อครั้งแรกว่า Prodiginine ใน Gerber (1969) สารโพรดิจิโอซิน นับเป็นสารโพรดิจินีนตัวแรกที่ได้มีการศึกษาโครงสร้างทางเคมี (Rapoport and Holden, 1962) และคำว่า 'Prodigiosin' ก็ได้ถูกตั้งขึ้นจากการที่ได้มีการแยกสารนี้ครั้งแรกจากแบคทีเรียชื่อ *Bacillus prodigiosus* (ภายหลังชื่อถูกเปลี่ยนเป็น *Serratia marcescens*) (Gerber, 1975) สาร Prodiginines เป็นสารที่มี pyrrolyldipyrromethane เป็นโครงสร้างหลัก และมีคุณสมบัติทางชีวภาพที่หลากหลายรูปแบบ ตั้งแต่เป็นสารยับยั้งแบคทีเรีย ยับยั้งเชื้อรา ยับยั้งมาลาเรีย เป็นสารแอนติไบโอติก สารกดภูมิต้านทาน และเป็นสารยับยั้งเซลล์มะเร็ง (Williamson *et al., 2007* และ Montaner and Tomas, 2003) ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้เองที่ทำให้แบคทีเรียที่สามารถสร้างสารนี้ได้เป็นเครื่องมือในการทำวิจัยที่ทรงพลังอย่างมากในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา

มีการเจริญที่เร็วกว่ามาก และนอกจากนี้ยังสามารถนำมาผลิตโดยตรงได้ง่าย (Mapari *et al.*, 2005) ดังนั้นไม่ว่าจะเป็นการผลิตสีโพรดิจิโอซิน หรือสีธรรมชาติใด ๆ จากจุลินทรีย์ นับว่าเป็นเทคโนโลยีการผลิตที่น่าสนใจในปัจจุบัน

4. แอคติโนมัยซีทชนิดที่สร้างสารโพรดิจิโอซิน และสารคล้ายโพรดิจิโอซิน

จากรายงานของ Gerber (1969) ซึ่งได้ศึกษาสารสีแดงที่สร้างจาก *Actinomadura pelletier* จำนวน 13 สายพันธุ์ พบว่ามี *Actinomadura* จำนวน 3 สายพันธุ์ที่สร้างสารรงควัตถุสีแดงที่มีโครงสร้างคล้าย โพรดิจิโอซิน โดยพบว่าสารสีแดงหลักที่พบนั้นให้ค่า Rf ที่สูงกว่าค่า Rf ของสารโพรดิจิโอซิน บนแผ่นโครมาโทแกรม จากการศึกษาสารด้วย Thin-layer chromatography ส่วนสารสีแดงหลัก ของ *A. madurae 953* ที่สร้างขึ้นนั้น เมื่อศึกษาด้วยเทคนิค Mass spectroscopy และ Nuclear magnetic resonance แล้วพบว่าโครงสร้างของสารสีแดงนั้น เป็น nonylprodigiosin ส่วนสารสีแดงหลัก ๆที่ *A. pelletieri* สร้างขึ้นนั้นมีลักษณะโครงสร้างสารเป็นวงแหวน (ring-form) และมี side chain เป็น $C_{11}H_{22}$ ซึ่งแตกต่างจากโครงสร้างของ metacycloprodigiosin จึงตั้งชื่อใหม่ว่า 'prodigiosin' ตั้งแต่นั้นมา

จากรายงานของ Kuznetsov และคณะ (1987) ซึ่งได้แยกเชื้อ Actinomycetes จากบริเวณเขตไบคาล ของรัสเซีย และพบว่าเป็นแอคติโนมัยซีทชนิด ที่เป็น neotype strain *Streptomyces ruber* จากการเปรียบเทียบคุณลักษณะต่าง ๆกับ Type strain แต่ก็พบว่าลักษณะของเชื้อ *Streptomyces ruber* ที่พบนี้ ไม่ค่อยจะเหมือนกับ original type strain เท่าใดนัก โดยพบว่ามี wall chemotype I ก้านชูสปอร์มีลักษณะเป็นเกลียว และมีสายโซ่สปอร์ลักษณะบิดเป็นเกลียวต่อขึ้นไปอีก 2-3 รอบ สปอร์รูปไข่ ผิวเรียบ เส้นใยเหนือผิวอาหารมีสีเทาชมพู เส้นใยใต้ผิวอาหารมีสีแดงเข้มที่ไม่ละลายลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ สลายเจลาติน และเปปโตนจากนมได้ช้า ๆ ไฮโดรไลซ์แป้งได้เล็กน้อย สามารถใช้น้ำตาลกลูโคส ไซโลส แรมโนส ฟรุกโทส อินโนซิทอล แต่ใช้อะราบิโนส ราฟฟิโนส และแมนนิทอลได้เล็กน้อย และไม่เจริญในซูโครส ไม่สร้างเมลานอยด์ สามารถสร้าง riboflavin และ prodigiosin สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก และพวก mycobacterium ที่เจริญได้ใน pH กรด ไม่ยับยั้งการเจริญของยีสต์และรา เชื้อจะ sensitive ต่อยา streptomycin, neomycin, gentamycin, monomycin, tetracycline, erythromycin oleandomycin, lincomycin, ristomycin, levomycetin, polymyxin และ fusidin แต่ resistant ต่อยา penicillin และในการเจริญของเชื้อ จะประกอบไปด้วย 6 ระยะการเปลี่ยนแปลง คือ ระยะที่เชื้อส่วนใหญ่เป็น ระยะสีขีด ระยะสีแดงแต่ไม่สร้างสปอร์ ระยะสีเหลืองแต่ไม่สร้างสปอร์ ระยะสีขาวไม่สร้างสปแอร์ และระยะที่คล้าย *Nocardia* ระยะที่เซลล์เป็นสีเหลือง และไม่สร้างสปอร์จะสามารถสร้างไรโบฟลาวิน แต่ไม่สร้างโพรดิจิโอซิน

จะเห็นได้ว่าในช่วงระยะเวลา 20 กว่า ปีที่ผ่านมานี้พบว่ามีการค้นพบสารแอนติไบโอติกทั้งที่เป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ ยับยั้งเซลล์มะเร็ง และเมตาโบไลท์อื่น ๆที่เป็นสารใหม่ ๆ จำนวนมากตลอดมา จาก Actinomycetes ในป่าชายเลน และในสิ่งแวดล้อมอื่น ๆ เชื่อได้ว่าในบรรดาแอคติโนมัยซีทเหล่านั้นน่าจะมี *Streptomyces* ที่สร้างสาร prodigiosins หรือสาร prodigiosin analogue อยู่บ้าง เนื่องจากพบเป็น dominant species และ *Streptomyces* นี้จะเป็นแหล่งค้นหา prodigiosin ชนิดใหม่ ๆ ผู้วิจัยจึงมีความคาดหวังว่า น่าจะได้พบ *Streptomyces* หรือ actinomycetes ใหม่ ๆ ได้หลายชนิดจากป่าชายเลน ที่สามารถสร้างสาร prodigiosin หรือ prodigiosin analogue ที่หลากหลายชนิด เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ต่อไป

5. ฤทธิ์ยับยั้งของสารในกลุ่มโพรดิจิโอซิน

เป็นเวลาหลายสิบปีมาแล้วที่เป็นที่ทราบกันดีว่าสารโพรดิจิโอซินเป็นสารธรรมชาติที่ให้ฤทธิ์มีความเป็นพิษต่อเซลล์ในวงกว้าง (Fursner, A., 2003) สารโพรดิจิโอซิน รวมทั้งสารที่มีโครงสร้างคล้าย ๆกัน มีคุณสมบัติในการเป็นสารกดระบบภูมิต้านทาน (immunosuppressive) สารยับยั้งมาลาเรีย และสารที่สามารถกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็ง (Yamamoto et al., 1999; Kawauchi, et al., 199) ระยะ 10 กว่าปีที่ผ่านมานี้ พบว่าสารโพรดิจิโอซิน ได้ถูกนำมาวิจัยทางด้านการแพทย์ ทั้งในด้านคุณสมบัติที่เป็นสาร immunosuppresants และเป็น antitumour agents เนื่องจากคุณสมบัติที่เป็นสารแอนติไบโอติก และเป็นสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ นอกจากนี้ยังพบอีกว่า สารโพรดิจิโอซินที่สร้างมาจากแบคทีเรียทะเล *Hahella chejuensis* KCTC 2396 (ซึ่งแยกได้จากชายฝั่งประเทศเกาหลี) สามารถที่จะสร้างสารสีแดง ซึ่งจากการตรวจสอบภายหลังว่าเป็นสารประเภทอัลคาลอยด์ โพรดิจิโอซิน ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของแพลงก์ตอนทะเลที่มีความเป็นพิษ *Cocholodinium polykrilkoides* ซึ่งเป็นหนึ่งในหลาย ๆชนิดที่เป็นสาเหตุของการเกิด res tide หรือในปรากฏการณ์ Harmful algal bloom โดยสามารถฆ่าตายได้ในความเข้มข้นเพียง 1 ppb ทำให้แบคทีเรียที่สามารถสร้างโพรดิจิโอซิน ได้ตัวนี้เป็นคู่แข่งที่สำคัญของชนิดอื่น ๆที่สร้างได้

จากรายงานของ Han และคณะ (1997) ได้พบว่าโพรดิจิโอซินที่สร้างจาก *Serratia marcescens*B-1231 นั้นสามารถยับยั้งสารสื่อที่ตอบสนองต่อระบบภูมิต้านทานของ T-cell อย่างเช่น สาร concanavalin-A ที่กระตุ้นให้เกิด proliferation ของเซลล์ หรือการตอบสนองรวมกันของ lymphocyte ปฏิกิริยาของ host กับรอยเชื่อมต่อเฉพาะที่บริเวณผิวหนัง รวมทั้งการตอบสนองของ T-dependent antibody เมื่อสารแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายนั้นยังมีความเข้มข้นไม่ถึงระดับที่เป็นพิษต่อร่างกาย อย่างไรก็ตาม สารโพรดิจิโอซินนี้ไม่มีผลต่อการทำงานของสารสื่อระบบภูมิต้านทานของ B-cell อย่างเช่น สาร lipopolysaccharide ที่กระตุ้นให้เกิด proliferation ของเซลล์ และกระตุ้นให้เกิดการสร้าง polyclonal antibody ที่ระดับความเข้มข้นเท่า ๆกัน prodigiosin ไม่ได้เป็นสาเหตุของการตายของ lymphocyte cell ที่ระดับความเข้มข้นที่มีผลให้เซลล์ตายได้ (<100 nM) และก็ไม่ได้แสดงความเป็นพิษต่อ lyphoid organs ต่าง ๆ ที่ปริมาณความเข้มข้นของสาร (dosage) ที่สามารถส่งผลได้ (10 และ 30 ng/kg) และฤทธิ์ของยา (ในทางเภสัชวิทยา) สามารถเปรียบเทียบได้กับปฏิกิริยาของสาร กดภูมิต้านทาน (immunosuppressants) ที่มีความจำเพาะต่อ T-cell อื่น ๆ เช่น cyclosporine A และ FK-506 ดังนั้นสาร prodigiosin นี้ก็สามารถที่จะใช้เป็นสารกดภูมิต้านทานในการศึกษาทางคลินิก และการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันวิทยาได้

จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* K1 ของ Isaka และคณะ (2002) ของสาร metacycloprodigiosin hydrochloride ที่สกัดจาก *Streptomyce spectabilis* BCC4785 ที่แยกได้จากดินของประเทศไทย โดยใช้ microculture radioisotope technique และคำนวณค่า IC_{50} และได้เปรียบเทียบกับฤทธิ์ยับยั้งของเซลล์มะเร็งช่องปากของคน (human epidermoid carcinoma cells, KB cells) และมะเร็งเต้านม (human breast cancer cell, BC-1 cells) และเซลล์ fibroblasts ที่ไตของลิง African green monkey (Vero cells) โดยใช้วิธี colorimetric method พบว่า สาร metacycloprodigiosin hydrochloride และสาร bafilomycin A1

ให้ทธิ์ยับยั้งเชื้อไข้มาลาเรียได้ดีมาก ขณะที่สาร spectinabilin ให้ผลปานกลางต่อเชื้อ *P. falciparum* K1 (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อมาลาเรีย (*P. falciparum*) และความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดที่ได้จากเชื้อแอคติโนมัยซีท *S. spectabilis* (Isaka, M. et al.(2002)

Compound	IC_{50}(IC_{50} μg/ml) against *P. falciparum*	Cytotoxicity (IC_{50} μg/ml)		
		KB cells	BC cells	Vero cells
Metacycloprodigiosin Hydrochloride	0.0050± 0.0010	0.36 ± 0.02	0.27 ± 0.01	1.35± 0.28
Bafilomycin A1	0.0041 ± 0.010	0.27 ±0.03	0.20 ±0.04	1.14 ± 0.04
Spectinabilin	7.8	0.10	0.80	20
Chloroquine Diphosphate	0.16	16	>20	>20
Artemisinin	0.0011	>20	>20	>20

นับว่าสารสกัดจากแอคติโนมัยซีท นั้นมีความแรงของฤทธิ์ตัวยามากที่เดียวที่สามารถยับยั้งทั้งเซลล์ของเชื้อมาลาเรีย และเซลล์มะเร็งหลาย ๆ ชนิด

2 เนื้อเรื่อง (Main body)

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย (Materials and Methods)

2.1 การสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากแอคติโนมัยซีท

1. คัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สร้างสารรงควัตถุสีแดงได้ จำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ A16-1, A3-1, A3-3, A54-4 และ A 54-5 นำมาทดลองเลี้ยงในอาหารที่แตกต่างกันเพื่อศึกษา การสร้างสารรงควัตถุ

โดยเลี้ยงในอาหาร ISP2 (International *Streptomyces* Project 2), อาหาร Soybean meal, อาหาร Oatmeal, ISP2+น้ำมันงา และ ISP2+ น้ำมันปลาโดยตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย *E. coli*, *Candida albicans*, MRSA sp37, MRSA p39 และ MRSA sp22 ในขณะเดียวกัน โดยเลี้ยงให้เจริญบทจานเพาะเชื้อก่อน นำมาเลี้ยงในอาหารเหลวที่เหมาะสม ที่เติมอาหารพิเศษชนิดต่าง ๆ เพื่อให้มีการสร้างรงควัตถุสีแดงมากขึ้น แล้วจึงเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทด้วยอาหารชนิดที่สร้างสารสีแดง และออกฤทธิ์ชีวภาพมากกว่า อาหารชนิดอื่น ๆ ก่อนสกัดด้วย ethyl acetate และด้วย solvent อื่นที่เหมาะสม

2. ทำการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทที่เลือกไว้บนจานเพาะเชื้อจนเชื้อสร้างสปอร์และ เจริญเต็มที่ ตรวจดูความบริสุทธิ์ของเชื้อก่อนที่จะเขี่ยเชื้อลงใน flask ขนาด 250 ml เลี้ยงเชื้อให้เจริญบนเครื่องเขย่า ที่ 30 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 สัปดาห์ แล้วจึงถ่ายเชื้อลงใน อาหารเหลว ใน Flask ขนาด 1 ลิตร เขย่าด้วยเครื่อง Bio- shaker (ซ้าย-ขวา) ที่ 105 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 28 วัน

3. แยกเซลล์ออกจาก medium ด้วยเครื่อง Centrifuge ถ่ายเซลล์ และอาหารเลี้ยงเชื้อในข้อ 2 ลงใน Separating funnel ขนาด 500 ml และขนาด 2000 ml เติม Ethyl acetate/solvent ที่เหมาะสมอื่น ๆ ใน อัตราส่วน 1:1 ระเหย Ethyl acetate/solvent ให้แห้งด้วยเครื่อง Vacuum Evaporator ที่ 32 $^{\circ}$ C

4. ละลายสาร ใน flask ออกมาด้วย methanol แล้วใช้ Pasteur pipette ที่ sterile ดูดออกมาชั่งใน vial ที่ทราบน้ำหนัก ตรวจสอบการออกฤทธิ์ของเชื้อด้วยวิธี Bioautography assay แล้วจึงเป่าสารด้วยก๊าซไนโตรเจน เพื่อให้ได้สารแห้ง แล้วนำ vial ไปชั่งน้ำหนักอีกครั้งเพื่อทราบน้ำหนักสาร (สารปริมาณมาก นำไป freeze dry เพื่อให้ได้น้ำหนักแห้ง)

5. หากสารที่เป็นองค์ประกอบที่สกัดได้จากเซลล์ และจาก medium ไม่ค่อยแตกต่างกัน จะรวมสารที่สกัดได้เข้าด้วยกัน ก่อนนำไปทำให้บริสุทธิ์เบื้องต้นด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

2.2 การทำให้สารบริสุทธิ์เบื้องต้นด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column Chromatography)

1. ชั่งสารรงควัตถุ ด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง เพื่อให้ทราบน้ำหนัก ก่อนเลือกใช้ขนาดของคอลัมน์ให้เหมาะสม (2x30 cm) ผสมสารกับซิลิกาเจลปริมาณพอเหมาะ ก่อนเติมลงในคอลัมน์

2. เตรียมแพคคอลัมน์ด้วยซิลิกาเจล อุดปลายคอลัมน์ ด้วยสำลี เติม คลอโรฟอร์มลงให้เต็มคอลัมน์ ผสมซิลิกาเจลปริมาณ 7.5-10 กรัม (ขึ้นกับปริมาณสารที่จะแยกความบริสุทธิ์) กับคลอโรฟอร์มในบีคเกอร์ขนาด 250 ml คนให้เข้ากันดี ก่อนแพคลงในคลอลัมน์ เมื่อแพคคอลัมน์เสร็จแล้วควรทิ้งไว้ 18-20 ชั่วโมงให้คอลัมน์ set ตัวดี

3. ใส่สำลีปริมาณเล็กน้อยด้านบนซิลิกาเจลในคอลัมน์เพื่อให้สารถูกเติมลงในคอลัมน์ในระดับเท่า ๆกัน เติมสารรงควัตถุที่ผสมด้วยซิลิกาเจลในข้อ 1 ลงในคอลัมน์

4. เก็บ fraction ของสาร fraction ละ 10-50 ml (ขึ้นกับปริมาณสาร) โดยเปลี่ยนสารละลาย phase เคลื่อนที่ที่เพิ่ม polarity มากขึ้นตามลำดับ โดยเริ่มจาก chloroform, chloroform: methanol=95:5, chloroform: methanol=90:10, chloroform: methanol= chloroform: methanol= 80:20, chloroform: methanol= 70:30 และ methanol

5. นำแต่ละ fraction ของสารไประเหยด้วยเครื่องระเหยสาร ให้เข้มข้นทุก fraction และตรวจดูองค์ประกอบของสารด้วย Thin-layer chromatography, TLC (silica gel 60- Merck) โดยใช้ phase เคลื่อนที่ตาม fraction ของสารที่ได้นั้น fraction ใดที่มีองค์ประกอบของสารเหมือนกัน นำมารวมกัน ระเหยให้แห้งแล้ว spot ลงบนแผ่น TLC เพื่อตรวจสอบองค์ประกอบของสารอีกครั้ง

6. ตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งของแต่ละองค์ประกอบของสาร อีกครั้งเพื่อทราบว่าองค์ประกอบต่าง ๆของสารสกัดนั้นมีองค์ประกอบใดที่เป็นสารออกฤทธิ์ หรือยังคงสภาพของสารออกฤทธิ์อยู่หรือไม่ด้วยการทำ Bioautography assay

2.3 การทำ Bioautography Assay

1. เลี้ยงเชื้อทดสอบ เช่น *Staphylococcus aureus, Candida albicans* (หรือเชื้ออื่นใดที่ได้เคยทดสอบกับสารสกัดหยาบแล้วให้ผล positive) ในอาหารเหลว Trypticase Soy Broth, TSB และ Potato dextrose Broth, PDB ตามลำดับ บ่มเชื้อที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง
2. ใช้สำลีพันปลายไม้ที่ปราศจากเชื้อชุบเชื้อทดสอบ แล้ว swab ลงบนจานอาหาร TSA กรณีแบคทีเรียและบนจานอาการ PDA กรณีเชื้อทดสอบเป็นยีสต์ *Candida*
3. นำแผ่นโครมาโทแกรมที่มี spot ของสารแต่ละ fraction ที่จะตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งมาวางคว่ำลงบนจานเพาะเชื้อที่ เพิ่ง swab เชื้อไว้ ในข้อ 2 ใช้ปลาย คีมคีบที่ปราศจากเชื้อ กดแผ่นโครมาโทแกรมเบา ๆ ให้แผ่นแนบสนิทบนผิวหน้าอาหาร
4. Label ตำแหน่งของสาร และชื่อสาร แต่ละ fraction นำไปไว้ในตู้เย็น 4 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง
5. ใช้คีมคีบ แผ่นโครมาโทแกรม ออกจากจานเพาะเชื้อ แล้วนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่ 35 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แล้วตรวจดูผล หากเกิดวงใสรอบ ๆ spot ของสารใด แสดงว่าสารตำแหน่งนั้นให้สารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทดสอบได้

2.4 ตรวจเอกลักษณ์ของสารรงควัตถุที่ทำให้บริสุทธิ์เบื้องต้นแล้ว ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography, HPLC **และการวิเคราะห์โครงสร้างสาร ด้วยเทคนิค** Nuclear Magnetic Resonance ,

NMR *(ขั้นตอนนี้ จะได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Keiichi Enomoto จากมหาวิทยาลัย Kochi University of Technology)*

นำสารแต่ละ fraction มาตรวจสอบเบื้องต้นว่าใช่สารโพรดิจิโอซิน หรือไม่ ด้วยเครื่อง HPLC หากพบว่าสาร fraction ใดให้ peak ที่อยู่ในช่วงของ สาร prodigiosin หรือ สารที่มีโครงสร้างใกล้เคียง จะได้นำตัวอย่างสารมาตรวจสอบโครงสร้างสาร ด้วยเทคนิค Nuclear Magnetic Resonance (NMR) ต่อไป โดยมีสารสกัดจากแบคทีเรียที่สร้างสารโพรดิจิโอซิน เป็น standard

2.5 ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง ด้วย MTT Assay

นำสารสกัดหยาบมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งบางชนิด เช่น มะเร็งปากมดลูก (HeLa cell lines) และ/หรือมะเร็งเม็ดเลือด อย่างใดอย่างหนึ่ง (ทั้งนี้ขึ้นกับปริมาณสารที่ได้) ด้วยวิธี MTT assay ตามวิธีของ Skehan (Skehan et al. 1990) โดยเซลล์มะเร็งในระยะ exponential growth จะถูกนำมาทดสอบ cytotoxic assay ด้วยการบ่มเซลล์กับสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนับเซลล์ที่รอดชีวิต (ทำ 3 ซ้ำ) แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์ เซลล์ที่มีชีวิตดังนี้

$$\%\ \text{เซลล์ที่มีชีวิต} = \frac{\text{Absorbance at 570 nm of treated cells}}{\text{Absorbance at 570 nm of control cells}} \times 100$$

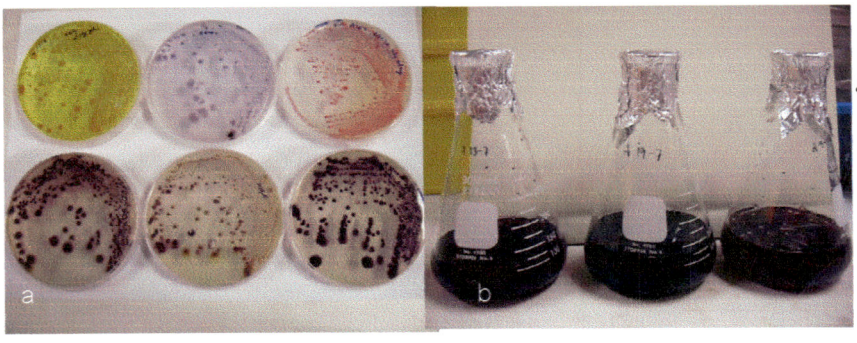
2.6 การศึกษาลำดับเบสของ 16S rDNA ยีน ของแอคติโนมัยซีทที่สร้างสารโพรดิจิโอซิน

ทำการสกัด DNA ของแอคติโนมัยซีทที่ให้สารรงควัตถุสีแดง ที่มีผลปรากฏแน่ชัดว่าสร้างสารโพรดิจิโอซิน เพิ่มปริมาณ DNA และทำ DNA ให้บริสุทธิ์ ตาม Protocol ของชุดสกัด /เพิ่มปริมาณ/ ทำให้บริสุทธิ์ เพื่อหาลำดับเบสของ 16S rRNA gene เปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับ Data base ที่มีใน GenBank หากพบว่ามีลำดับเบสมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน น้อยเกินกว่าที่จะบอกได้ว่าเป็น species ใด จะทำการตรวจสอบ gene เพิ่มขึ้นและนำข้อมูลทางยีนมาประกอบการศึกษาคุณสมบัติทางทางเคมี (วิเคราะห์ Diaminopimelic acid, DAP ที่ผนังเซลล์และน้ำตาลใน whole-cell hydrolysates ตามวิธีของ Ruan, 1994) และทางสัณฐานวิทยา เพื่อให้สามารถบอกได้ว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทนั้น ๆ เป็นชนิดใด หรือเป็นชนิดใหม่หรือไม่

3 ผลการวิจัยและอภิปรายผล (Results and Discussion)

1. ผลทดสอบการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารชนิดต่าง ๆ เพื่อศึกษาปริมาณรงควัตถุ และฤทธิ์ยับยั้ง

จากการคัดเลือกแอคติโนมัยซีท ที่สามารถสร้างสารรงควัตถุสีแดงจำนวน 7 ไอโซเลตบนอาหาร ISP2, อาหาร Soybean meal, อาหาร Oatmeal, ISP2+น้ำมันงา และ ISP2+ น้ำมันปลา และตรวจสอบการสร้างสารรงควัตถุและฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ในขณะเดียวกัน ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4



ภาพที่2 a .แอคติโนมัยซีทที่สามารถสร้างรงควัตถุบนจานเพาะเชื้อ b.ในอาหารเหลว

ตารางที่ 4 แสดงฤทธิ์ยับยั้งของแอคติโนมัยซีทที่สร้างสารรงควัตถุสีแดง ในอาหารชนิดต่าง ๆ

Isolate ID	Medium	Inhibition zone distance			
		E. coli	*C. albicans*	MRSA sp37	MRSA p39
54-4	ISP2+oatmeal	0.5	-	0.7	0.5
	ISP2+soybean meal	ND	ND	ND	ND
	ISP2 + sesami	ND	ND	ND	ND
	ISP2+ fishoil	ND	ND	ND	ND
	ISP2	ND	ND	ND	ND
A1-3	ISP2+oatmeal	0.6	-	4.3	5
	ISP2+soybean meal	0.5	-	4.5	5.5
	ISP2 + sesami	-	-	-	-
	ISP2+ fishoil	-	-	-	-
	ISP2	1.2	0.2	1	1.2
				MRSA sp22	MRSA p39
A3-3	ISP2+oatmeal	1.3	0.2	1.2	1.5
	ISP2+soybean meal	1.5	-	1.2	1.5
	ISP2 + sesami	1.8	d	1.5	1.8
	ISP2+ fishoil	1	0.6	>4.0	>4.0
	ISP2	1.8	0.3	2.1	1.9
A16-1	ISP2+oatmeal	0.7	-	0.6	0.6
	ISP2+soybean meal	1.2	-	1	1
	ISP2 + sesami	0.9	-	0.8	0.8
	ISP2+ fishoil	1	-	0.5	1
	ISP2	3.5	-	1	2.5

A16-2	ISP2+oatmeal	0.7	-	0.6	0.6
	ISP2+soybean meal	1	-	0.9	0.9
	ISP2 + sesami	0.8	-	0.6	0.7
	ISP2+ fishoil	-	-	-	-
	ISP2	2.3	1.2	1.8	>3.0
		-	-	-	-
A11-9	ISP2+oatmeal	0.8	-	0.6	0.6
	ISP2+soybean meal	1	-	-	0
	ISP2 + sesami	0.8	-	1	0.8
	ISP2+ fishoil	0.2	-	0.2	0.2
	ISP2	1.7	0.2	1.2	2
			-		
A3-3	ISP2+oatmeal	1.3	0.2	1.2	1.5
	ISP2+soybean meal	1.5	-	1.2	1.5
	ISP2 + sesami	1.8	d	1.5	1.8
	ISP2+ fishoil	1	0.6	>4.0	>4.1
	ISP2	1.8	0.2	2.1	1.9

แอคติโนมัยซีทที่สร้างสีแดงสายพันธุ์ 54-4 สามารถแสดงผลจากการเลี้ยงด้วยอาหาร ISP2+ Oatmeal ได้อย่างเดียวเนื่องจากการเลี้ยงด้วยอาหารอื่น ๆ ไม่สร้างรงควัตถุ และไม่เกิดฤทธิ์ยับยั้ง การเลี้ยงด้วยอาหาร ISP2 นั้นเหมาะสมสำหรับแอคติโนมัยซีททุกสายพันธุ์ที่เลือกมาทดสอบ ในการสร้างรงควัตถุ ที่เป็นสารออกฤทธิ์ชีวภาพเชื้อยิ่งสร้างรงควัตถุมากก็จะสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งได้มากด้วย การเพิ่มเติมสารอาหารธรรมชาติเข้าไปในอาหาร ISP2 อาจเป็นการเพิ่มความเข้มข้นของสารอาหารที่อยู่โดยรอบเซลล์ ทั้งยังเป็นการเพิ่ม Osmolarity ทำให้การสร้างรงควัตถุ ไม่เกิดผลดี

ดังนั้น จึงนำบางสายพันธุ์มา ทดลองเลี้ยงใหม่ด้วยอาหาร ISP2 เปรียบเทียบกับ การเลี้ยงด้วยอาหารที่มาจากวัสดุธรรมชาติที่หาได้ง่าย และราคาถูก โดยเลี้ยงในอาหารเหลว บ่มเชื้อที่ 30°C เขย่าซ้าย-ขวา ความเร็วรอบ 110/นาที เป็นเวลา 10 วัน ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 5 แสดงการสร้างสารรงควัตถุที่แตกต่างกันของแอคติโนมัยซีท ตามความแตกต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ

Isolate ID	A19-5		A1-3		54-4	
Medium	Broth color	Cell color	Broth color	Cell color	Broth color	Cell color
Oatmeal	pinkish red	Yellow-red	Pink-purple	yellow	Orange-red	Pink
ISP2	yellow	pink	yellow	yellow	bright red	Red
Wheat bran	brown	purple	Brown	purple	Purple-brown	Purple
Kidney bean	reddish brown	purple	Reddish-brown	purple	Reddish-brown	Brown
Soy bean	brown	purple	brown	purple	Purple brown	purple

จากการเลือกแอคติโนมัยซีทบางสายพันธุ์มาเลี้ยงในอาหารธรรมชาติ เปรียบเทียบกับการเลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จ ISP2 จะเห็นความแตกต่างของรงควัตถุที่แอคติโนมัยซีทสร้างขึ้น ทั้งที่ตัวเซลล์ และที่ละลายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เหมือนกัน ซึ่งตามข้อมูลที่ได้จาก Williams *et al.* .(1989) นั้นได้บรรยายถึงสีของรงควัตถุที่

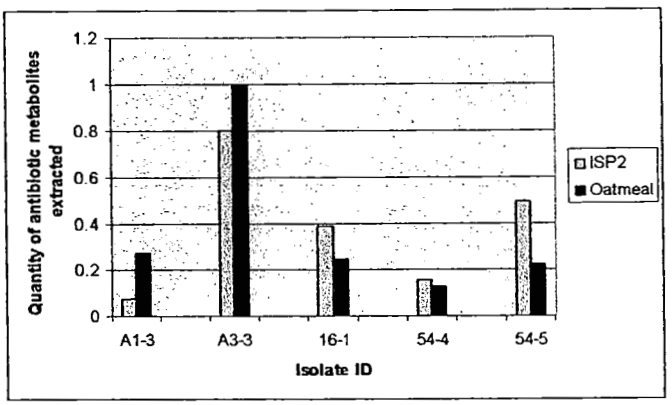
แอคติโนมัยซีทในจีนัส *Streptomyces* ที่สร้างขึ้นนั้นสามารถเปลี่ยนไปตามชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ pH ของอาหาร รวมทั้งอายุของเชื้อ หรือระยะของการเจริญด้วย ดังนั้นการที่จะเลี้ยงเชื้อให้ได้สารรงควัตถุ หรือสีที่ต้องการในปริมาณที่ต้องการจึงต้องคำนึงถึงปัจจัยต่าง ๆเหล่านี้ด้วย ขณะเดียวกันรงควัตถุที่กำลังศึกษาอยู่นี้มีคุณสมบัติในการเป็นสารออกฤทธิ์ชีวภาพด้วย ดังนั้นการเลี้ยงที่ อุณหภูมิ 30 °C ระยะเวลาที่ใช้เลี้ยงตั้งแต่ 2 สัปดาห์ถึง 1 เดือน รวมระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดที่อุณหภูมิห้อง การทำให้สารบริสุทธิ์บางส่วนด้วยการทำ Fractionation ใน Column Chromatography จนกระทั่งถึงขั้นที่ต้องทดสอบ Bioautography นั้นใช้เวลามาก

จากการคัดเลือกแอคติโนมัยซีทที่สร้างรงควัตถุสีแดง หรือม่วงแดงคือ 54-4, A16-1, 54-5, A1-3, และ A3-3 มาเลี้ยงในอาหารเหลว เพื่อการสกัดสารรงควัตถุปริมาณมากสำหรับการทดสอบขั้นต่อไป โดยเลือกเลี้ยงในอาหาร ISP2 และในอาหารข้าวโอ๊ต ซึ่งเชื้อทุกสายพันธุ์สร้างรงควัตถุได้ดี กว่าอ าหารชนิดอื่น ๆ โดยบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เขย่า ที่ 105 รอบ/ นาที เป็นเวลา 14-28 ขึ้นกับการเจริญของเชื้อ สกัดสารรงควัตถุด้วย ethyl acetate และ Chloroform: methanol ซึ่งได้ผลดังตารางที่ 5

ตารางที่ 6 แสดงผลการสร้างสารรงควัตถุ ของแอคติโนมัยซีท ที่เลี้ยงด้วยอาหาร ISP2 และอาหาร Oatmeal

Isolate ID	Medium	Extraction solvent	Culture volume	Dry weight/g	Dry weight/ l
A1-3	ISP2	Chloroform:Metanol 5:5	500	0.0378	0.0756
	Oatmeal	Chloroform:Metanol 5:5	500	0.1355	0.2710
A3-3	ISP2	Ethyl acetate	500	0.3989	0.7977
	Oatmeal	Ethyl acetate	500	0.4760	0.9520
A16-1	ISP2	Chloroform:Metanol 7:3	500	0.1950	0.3900
	Oatmeal	Chloroform:Metanol 7:3	500	o.1226	0.2452
54-4	ISP2	Ethyl acetate	500	0.0782	0.1564
	Oatmeal	Ethyl acetate	500	0.0651	0.1302
54-5	ISP2	Ethyl acetate	500	0.2460	0.4920
	Oatmeal	Ethyl acetate	500	0.111	0.2220

จะเห็นได้ว่า สารแอนติไบโอติกที่เชื้อแอคติโนมัยซีทแต่ละชนิดสร้างขึ้น ละลายได้ดีในตัวทำละลายที่ต่างๆ ชนิดกัน ทำให้ต้องเลือกระบบของสารละลายที่ใช้สกัดที่แตกต่างกันออกไป



ภาพที่ 3 แสดงปริมาณสารแอนติไบโอติกเมตาโบท์ที่สกัดได้ จากการเลี้ยงเชื้อที่สร้างรงควัตถุด้วยอาหาร ISP2 และอาหารข้าวโอ๊ต

ตามผลการทดลองเลี้ยงทั้งในอาหาร ISP2 และ อาหาร Oatmeal medium ที่ได้ จะเห็นว่า เชื้อแอคติโนมัยซีท A16-1, 54-4 และ 54-5 นั้นจะสร้างสารรงควัตถุในอาหาร ISP2 ได้ดีกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหาร Oatmeal และดูเหมือนเชื้อแอคติโนมัยซีท A1-3 และ A3-3 จะสร้างในอาหาร Oatmeal ได้ดีกว่า ขณะเดียวกันเมื่อสังเกตที่เซลล์ หรือ medium ที่สกัดแล้วจะพบว่า ยังเหลือรงควัตถุที่เซลล์และ medium อีกมาก จึงเชื่อว่าเป็นการสกัดสารรงควัตถุ ออกไม่หมดมากกว่า (รงควัตถุจากเชื้อ ทั้ง 2 ละลายใน ethyl acetate ไม่ดี) ดังนั้นต่อจากนี้ไป การเลี้ยงเชื้อปริมาณมาก จะเลี้ยงอาหาร ISP2 ทั้งหมด เริ่มต้นจาก การเลี้ยง เชื้อแอคติโนมัยซีท 54-4

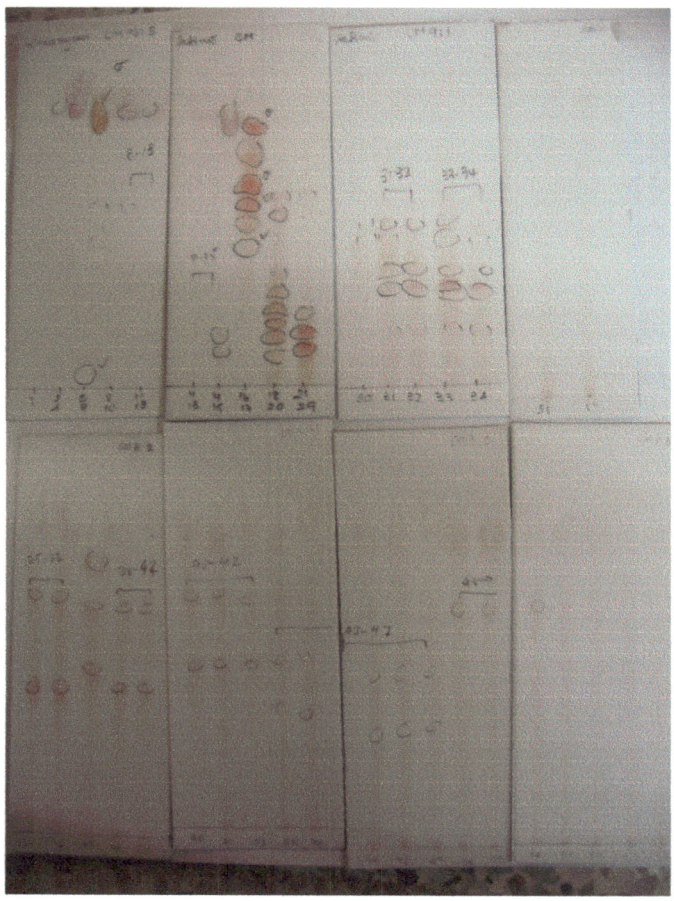
2. ผลการทำให้สารบริสุทธิ์บางส่วนด้วย Column Chromatography

2.1 การทำให้สารรงควัตถุบริสุทธิ์บางส่วน ด้วย Column Chromatography และตรวจสอบสารด้วย TLC

สกัดด้วยสารรงควัตถุสีแดงออกจากทั้งเซลล์ และ medium ของเชื้อแอคติโนมัยซีท 54-4 แล้วนำมาทำให้สารบริสุทธิ์บางส่วนด้วย Column chromatography ได้ผลทั้งหมด 56 fraction จากสารสกัดหยาบ 0.150 กรัม (โดยเก็บสาร fractionละ 10 ml) นำแต่ละ fraction มาตรวจสอบองค์ประกอบของสาร ด้วย วิธี TLC พบว่า fraction 2-4, 5-7, 8-15, 16-17, 18-20, 21-30, 31-32, 33-34, 35-36,38-42, 43-47, 48-56 มีสารกลุ่มเดียวกัน จึงรวม fraction เข้าด้วยกัน ทำสารให้เข้มข้นขึ้นด้วยเครื่องระเหยสาร เป่าสารให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจนจนแห้ง และตรวจสอบสารด้วย TLC อีกครั้ง ว่าสารยังคงมีฤทธิ์ยับยั้งอยู่หรือไม่ โดยการทำ autobiography ก่อนส่งไปวิเคราะห์ต่อที่มหาวิทยาลัยโคจิ

ภาพที่ 4 การทำ fractionation ด้วย column chromatography ของแอคติโนมัยซีท 54-4

ภาพที่ 5 จากการรวมสารจาก fraction ที่มีสารกลุ่มเดียวกันเข้าด้วยกัน ได้สารดังในภาพ ก่อนส่งไปวิเคราะห์ที่มหาวิทยาลัยโคจิ



ภาพที่ 6 แสดงองค์ประกอบของสารทั้ง 56 Fractions บนแผ่นโครมาโทแกรม

2.2 การวิเคราะห์คุณสมบัติสารทางเคมี ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography

สารรงควัตถุสีแดงที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนถูกนำไปวิเคราะห์ทางเคมีต่อไป ที่มหาวิทยาลัย Kochi University of Technology โดย Prof. Keiichi Enomoto ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography, HPLC (Shiseido SI-2) โดยใช้ ODS Column, Capcell Pak C-18 MG11 ขนาด 1.5 mm X 150 mm. Phase เคลื่อนที่ เป็น Methanol:H_2O = 55:44 (v/v) + 0.2 % acetic acid อุณหภูมิของ column ที่ 40 °C Flow rate ที่ 100 µl / min โดยใช้ความยาวคลื่น 2 ช่วง คือที่ 220 nm และ 535 nm ได้ผลดังตารางที่ 7 และผลโครมาโทแกรมทั้งหมดได้แสดงไว้ในภาคผนวก

ตารางที่ 7 ผลจากการวิเคราะห์ รงควัตถุ fraction ต่าง ๆ ของแอคติโนมัยซีท 54-4 ด้วย HPLC พบว่ามี spectrum ของสารจำนวนมาก (ดูโครมาโทแกรมที่ภาคผนวก)

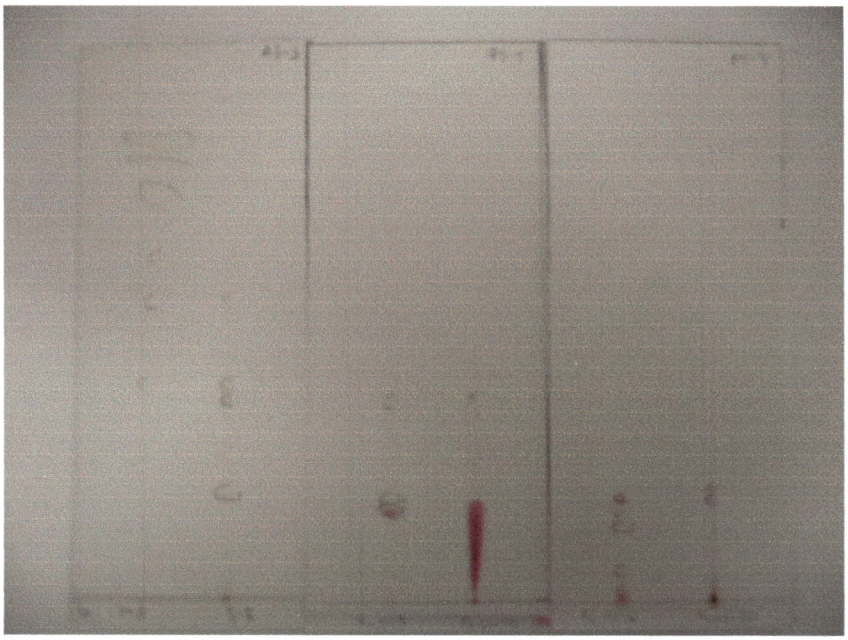
Fraction	Wave length 220 nm	Wave length 535 nm	No. of Spectrum	Retention time
2-4	/	/	12	5.74, 7.42, 11.72, 16.2, 21.2, 27.8, 30.8, 42.7, 58, 76.9, 105, 136.9
5-7		/	7	22.9,26.7, 33.8, 56.6, 88.3, 117.8, 149.9
8-15		/	5	23.0, 26.8, 32.8, 56.6, 180
	/		11	2.4, 3.2, 3.7, 7.5, 7.7, 17.5, 23.0, 26.8, 32.9, 57.2, 77.6
16-17	/	/	10	2.6, 3.9, 5.3, 7.0, 8.5, 10.2, 12.4, 18.2, 22.9, 48.9
18-20	/		9	1.8, 2.5, 5.0, 6.4, 7.0, 7.4, 10.1, 13.3, 19.7,
21-30	/	/	4	2.5, 4.16, 6.0, 77.6
31-32		/	8	1.7, 4.5, 4.9, 5.6, 6.2, 7.6, 10.7, 12.4
33-34	/	/	8	2.5, 3.0, 5.1, 7.1, 11.8, 13.3
35-36		/	7	2.1, 2.4, 5.2, 5.9, 7.2, 13.4, 23.1
37		/	5	2.1, 4.5, 5.5, 7.5, 25.0
38-42	/	/	8	1.7, 5.5, 6.4, 12.0, 14.5, 23.0
43-47	/	/	9	1.7, 4.9, 5.4, 7.3, 11.2, 18.1, 20.4, 23.1, 27.9
48-56	/	/	7	1.5, 1.7, 4.8, 5.4, 7.3, 20.0, 22.8

จากตารางที่ 6 ภาพที่ 6 และภาพ spectrum peak ในภาคผนวก จะเห็นว่าในแต่ละ fraction นั้นก็ยังมีสารหลายองค์ประกอบอยู่รวมกัน ซึ่งโดยปกติแล้ว สาร Prodigiosin จะให้ค่า Absorption สูงสุดที่ความยาวคลื่น 535 nm และสาร prodigiosin จะให้ค่า Rt (retention time) ที่ 39 นาที และสารที่เป็น Prodigiosin analogue จะมีค่า retention time ที่ 22-159 นาที เมื่อพิจารณาดูจากค่า retention time ของสารแล้ว มีความเป็นไปได้ที่จะมีสารที่เป็น Prodigiosin analogue อยู่บ้าง (ตั้งแต่ fraction ที่ 5-56 มี spectrum ของสารมากถึง 27 peak ที่ ให้ค่า retention time ระหว่าง 22-159 นาที) และจาก spectrum ของ สารใน fraction ที่ 8-15 ของ

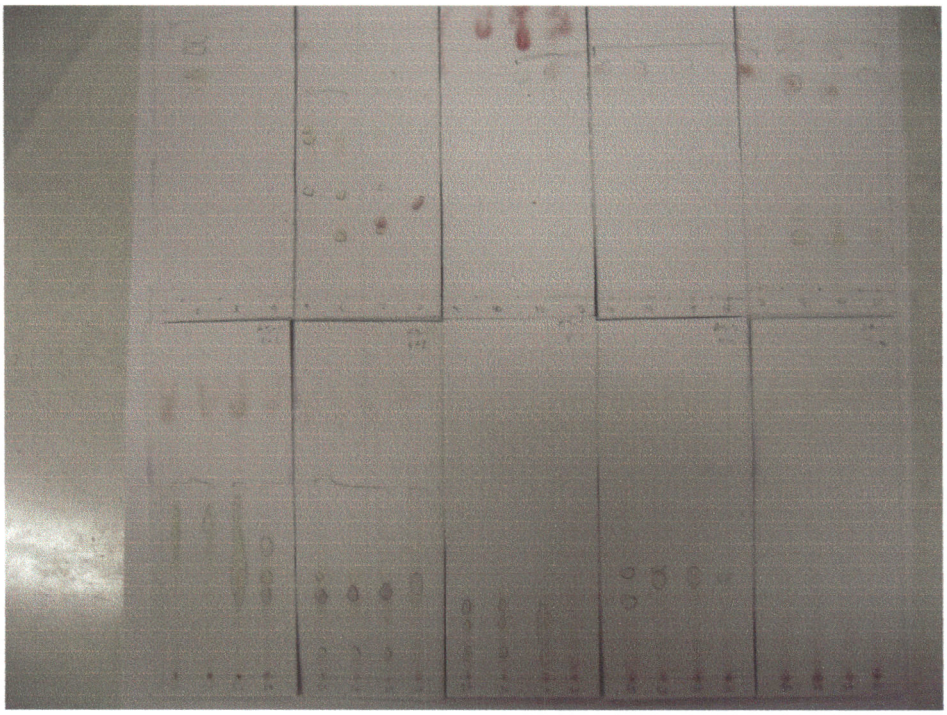
แอคติโนมัยซีท 54-4 จะพบว่ามี peak ที่ชัดเจนอยู่ 2 peak ที่ค่า Rt ที่ 23 และ Rt ที่ 27 นาที และที่ Rt 23 นาทีจะพบ 2 peak ระหว่าง 220-270 nm และพบ 3 peak อยู่ระหว่าง 450-550 nm ซึ่ง spectrum เหล่านี้คล้ายคลึงกับ spectrum ที่พบใน crude extract ของ แอคติโนมัยซีท 54-4 ที่ยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน และเป็น peak ที่น่าสนใจ และนอกจากนั้นจากการทำ Photo Diode Array (PDA) ของสาร ก็พบว่ามี spectrum ของสารขึ้นที่ 535 nm ชัดเจน ถึง แม้ว่า แอคติโนมัยซีท 54-4 จะสร้างสารได้หลายชนิดมาก จนยากที่จะ แยกออกมาศึกษาที่ละ component แต่ก็พอจะเห็นสารที่มีลักษณะ ที่ unique ที่บอกว่าเป็น Prodigiosin หรือ สารที่คล้าย prodigiosin อยู่บ้าง ดังนั้นจึงต้อง นำเอา สารสกัดหยาบและสารที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนแต่ละ fraction มาตรวจหาว่ามีฤทธิ์กระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งเสียก่อน จึงจะเป็นการง่ายและสะดวกขึ้นในการตรวจสอบขั้นต่อไป (อย่างไรก็ดี ในการเลี้ยงเซลล์ปริมาณมากนั้น มีปัญหาอยู่บ้างที่บางครั้งเซลล์ไม่สร้างสีแดง แต่จะได้สีครีมขาว หรือปนเหลือง หรือปนสีแดง ทำให้ได้สารน้อย ต้องเลี้ยงใหม่ หรือเลี้ยงนานขึ้น)

อย่างไรก็ตามก็ได้เตรียม crude extract ของแอคติโนมัยซีท 54-4 ใหม่ และทำ partial purification ด้วย column chromatography อีกครั้ง ได้สารทั้งหมด 17 fractions (หลังจากรวม fraction ที่มีสารกลุ่มเดียวกันแล้ว) เมื่อนำแต่ละ fraction ที่ได้มาตรวจสอบฤทธิ์การกระตุ้นให้เกิด การตาย (apoptosis) ของเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) พบว่า fraction ที่ 5 ออกฤทธิ์กระตุ้นให้เกิด การตาย (apoptosis) จึงได้ทดสอบต่อไป ว่ากลไกการทำให้เกิดการตายของเซลล์นั้นเป็นอย่างไร (ขั้นตอนนี้ ไม่อยู่ในแผนการวิจัย)

ได้ทำการเลี้ยง Actinomycete A1-3 และ A 3-3 ในอาหารเหลว และ ทำสารสกัดหยาบให้บริสุทธิ์บางส่วน แต่สารส่วนใหญ่เป็นสารสีม่วงหลังจากการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วย Column chromatography จึงได้ทดสอบต่อไปกับ Actinomycete A16-1 และ 54-5 ซึ่งสร้างรงควัตถุสีแดง ที่ชัดเจนกว่า



ภาพที่ 7 แสดงโครมาโทแกรม ของการตรวจสอบองค์ประกอบของสาร ของ Actinomycete A1-3ที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วย column chromatography (หลังจากรวม fraction แล้ว)



ภาพที่ 8 แสดงโครมาโทแกรม ของการตรวจสอบองค์ประกอบของสารจากทุก fraction ของ Actinomycete A3-3 ที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วย column chromatography

3. ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง

3.1 การทดสอบกับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว

เมื่อได้สารสกัดหยาบ (crude extract) ที่มีสีแดงสด จากแอคติโนมัยซีท 54-4 นำไปตรวจสอบการดูดกลืนแสงสูงสุด และทดสอบเบื้องต้นว่ามี ฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa cells) และมะเร็งเม็ดเลือดขาวหรือไม่ ผลปรากฏว่าสามารถยับยั้งได้ทั้ง 2 ชนิด ทั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (ทดสอบที่มหาวิทยาลัยโคจิ เทคโนโลยี) และเซลล์มะเร็งปากมดลูก (ทดสอบที่มหาวิทยาลัยบูรพา) ดังภาพที่ 4, 5 และ 5

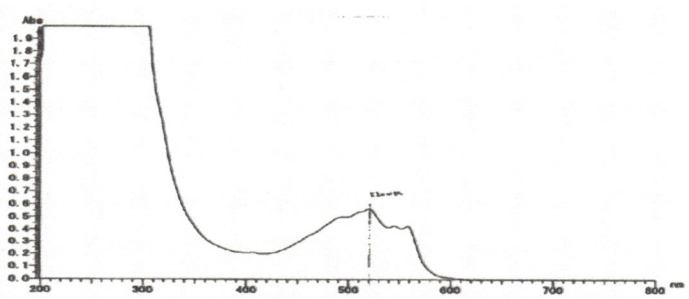
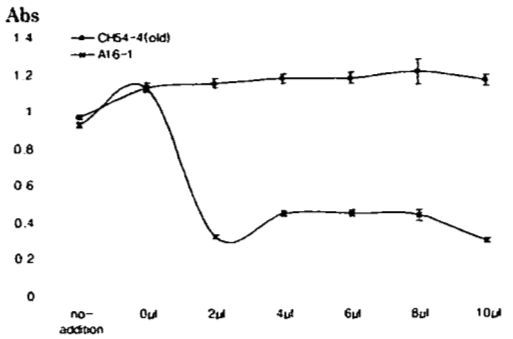


Fig .3 CH54-4 色素のスペクトル

この色素はスペクトル測定した結果、複数のピークが得られた。

520nm と 560nm のピークが見られる。

ภาพที่ 9 แสดงค่าดูดกลืนแสงของสารสกัดหยาบของสารสีแดงของแอคติโนมัยซีท 54-4 ซึ่งให้ค่าดูดกลืนแสงสูงสุด ที่ 520 nm. (ทดสอบที่มหาวิทยาลัย Kochi University of Technology)



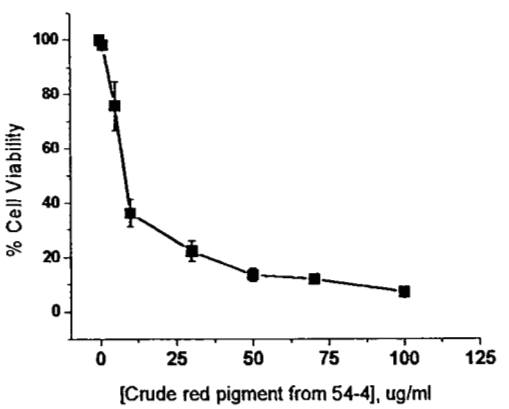
	No addition	0μl	2μl	4μl	6μl	8μl	10μl
CH54-4(old)	100%	117%	119%	122%	122%	125%	120%
A16-1	100%	122%	35%	48%	48%	47%	32%

Fig. 4, Table. 1 白血病細胞に対する赤色色素の細胞毒性

ภาพที่ 10 แสดงฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของสารสกัดหยาบ A 16-1 และ 54-4 (ทดสอบที่มหาวิทยาลัย Kochi University of Technology)

3.2 การทดสอบกับเซลล์มะเร็งปากมดลูก

ผลจากการนำสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยซีท 54-4 มาทดสอบ ฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa cells) พบว่ามีค่า IC 50 เท่ากับ 8.50 μg/ ml (ภาพที่ 5) โดยมีค่าใกล้เคียงกับ ยา doxorubicin ซึ่งเป็นยารักษาโรคมะเร็งในปัจจุบัน ซึ่งมีค่า IC 50 เท่ากับ 1.41 μ g/ ml นับว่ามีค่าที่ใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 11 กราฟแสดง ผลการยับยั้ง เซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa cells) ให้ค่า IC 50 เท่ากับ 8.50 μg/ ml

3.3 การทดสอบกับเซลล์มะเร็งเต้านม

สารสกัดหยาบ (crude) ของทั้ง Actinomycete A16-1 และ 54-5 ได้นำไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม (BC) และมะเร็งช่องปาก (KB) ตามลำดับ โดยเลือก fraction ที่มีสีแดง ของ A16-1 ตั้งแต่ fraction ที่ 5 - 16 ผลปรากฏว่าแอคติโนมัยซีท A16-1 ให้ฤทธิ์ยับเซลล์มะเร็งเต้านมยั้งตั้งแต่ fraction5, fraction6, fraction7-8, และ fraction 9-12 และที่สำคัญให้ฤทธิ์ที่แรงมากกว่ายารักษาโรคมะเร็ง Doxorubicine และ Tamoxifen ที่ใช้เป็น control (ตารางที่ 8) แต่แอคติโนมัยซีท 54-5 ไม่ออกฤทธิ์ยับยั้ง

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131
579.37
ร๓377ก
ค.1

ตารางที่ 8 ผลของการตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งต่อ เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF7-breast cancer cells) ของ fraction 5-16 ของ Actinomycetes A16-1

Fraction no./drug	% Inhibition	Activity	IC_{50} (µg/ml)
Tamoxifen	67.11	Active	
	51.39	Active	8.33
	33.65	Inactive	-
	4.39	Inactive	-
	-0.07	Inactive	-
	2.48	Inactive	-
Doxorubicine	67.23	Active	
	55.41	Active	8.33
	35.22	Inactive	-
	25.67	Inactive	-
	9.92	Inactive	-
	-3.95	Inactive	-
Fraction 5	90.69	Active	
	86.44	Active	
	68.79	Active	
	56.07	Active	1.72
	22.41	Inactive	-
	2.62	Inactive	-
Tamoxifen	91.04	Active	
	89.71	Active	
	73.88	Active	
	53.05	Active	1.56
	29.64	Inactive	
	8.31	Inactive	
Tamoxifen	90.04	Active	
	74.61	Active	
	62.70	Active	3.10
	35.60	Inactive	
	25.57	Inactive	
	-2.42	Inactive	

316469

Fraction 10-12	90.04	Active	
	71.57	Active	
	57.53	Active	2.61
	47.02	Inactive	
	34.97	Inactive	
	15.03	Inactive	

4. ผลจากการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rDNA ยีน เพื่อการจัดจำแนกชนิด (ดูภาคผนวก)

จากการสกัด DNA ของ แอคติโนมัยซีท 54-4 มาวิเคราะห์หาลำดับเบสของ 16S rDNA เพื่อการจำแนกชนิด เมื่อได้เปรียบเทียบลำดับเบสที่มีอยู่ใน GenBank พบว่า แอคติโนมัยซีท 54-4 นั้น มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces thermocarboxydus* มากที่สุด (98.8% similarity level) มี 30 nucleotides จากตำแหน่งต่าง ๆ ที่แตกต่างกัน จากความยาวของเบสทั้งหมด 1,479 เบส (ดู ภาคผนวก) อย่างไรก็ตาม แม้ว่าจะมีลำดับเบสที่มีความใกล้เคียงกับ *S. thermocarboxydus* มากที่สุด ก็ยังมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันอยู่ เช่น แอคติโนมัยซีท 54-4 มีการสร้างสารสีแดงคล้ายโพรดิจิโอซิน มีผิวสปอร์แบบขรุขระ (warty) ที่ aerial mycelium และต่อกันสั้น ๆ และสีของ aerial spore mass เป็นสีชมพู-ขาว แทนที่จะเป็นสีเทา เหมือน *Streptomyces thermocarboxydus* จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rDNA ของ A16-1 พบว่าเป็น *Streptomyces* เช่นกัน (ดูลำดับเบส ที่ภาคผนวก) แม้ว่าจะมีเปอร์เซ็นต์ similarity ที่ใกล้เคียง *Stretomyces indiaensis* มากที่สุด แต่ก็ ยังไม่สูงมากพอที่จะบอกได้ว่าเป็นสปีชีส์เดียวกัน จึงคาดว่าน่าจะเป็นสปีชีส์ใหม่ด้วยเช่นกัน

ตารางที่ 9 แสดงผลจากการ ทำ BLAST matching ลำดับเบส ของ Actinomycete A16-1 ได้ผลคล้ายคลึงกับ *Streptomyces indiaensis* มากที่สุด มีเบสที่แตกต่างกัน 13 เบส และมีความเป็นไปได้มากที่จะเป็นสปีชีส์ใหม่

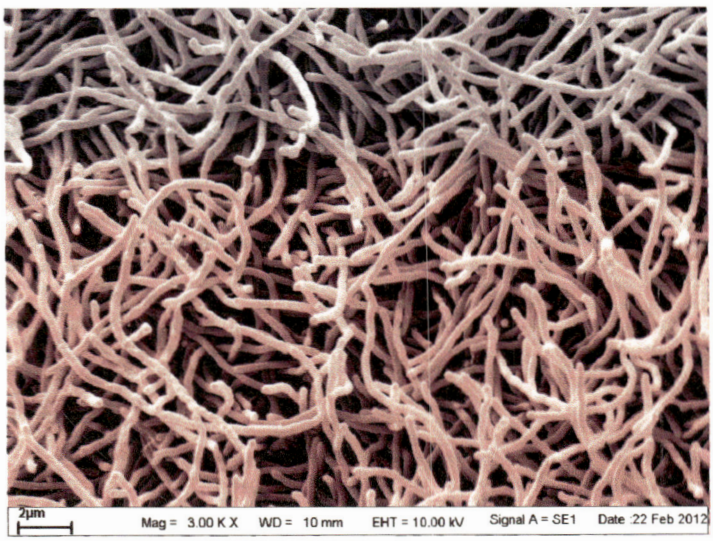
	Name/Title	Authors	Strain	Accession	Pairwise Similarity	Diff/Total nt	megaBLAST score	BLASTN score
1	*Streptomyces indiaensis*	(Gupta 1965) Kudo and Seino 1987	NBRC 13964(T)	AB184553	99.101	13/1446	2739	2692
2	*Streptomyces thermocarboxydus*	Kim et al. 1998	DSM 44293(T)	U94490	98.964	15/1448	2720	2680
3	*Streptomyces purpurascens*	Lindenbein 1952	NBRC 13077(T)	AB184859	98.963	15/1446	2716	2676
4	*Streptomyces spinoverrucosus*	Diab and Al-Gounaim 1982	NBRC 14228(T)	AB184578	98.961	15/1444	2696	2650
5	*Streptomyces lusitanus*	Villax 1963	NBRC 13464(T)	AB184424	98.948	15/1426	2676	2637

เมื่อพิจารณาทั้งผลจากลำดับเบสของ 16S rDNA ยีน และรูปร่างลักษณะของเส้นใย สปอร์ ผิวสปอร์ ของทั้ง แอคติโนมัยซีท 54-4 และ A16-1 จะเห็นได้ว่า % similarity ไม่สูงมากพอที่จะบอกได้ว่าเป็นสปีชีส์เดียวกันกับ *Streptomyces thermocarboxidus* และ *Streptomyces indiaensis* ตามที่ได้เปรียบเทียบความเหมือนของ

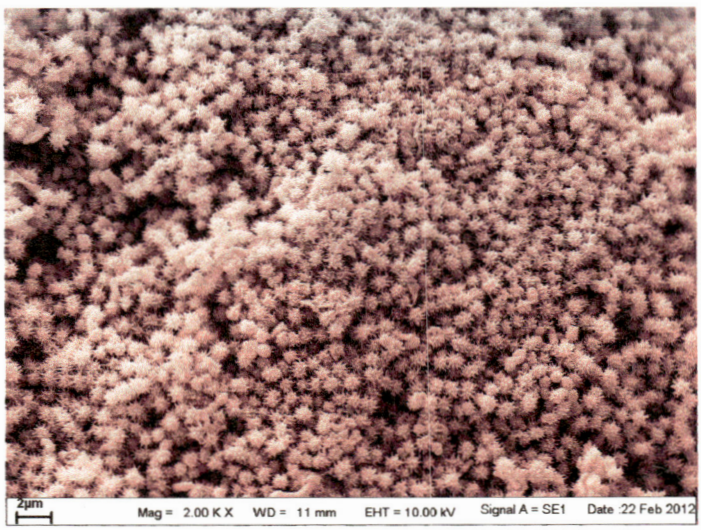
ลำดับเบส และลักษณะรูปร่างของเส้นใยและสปอร์ที่แปลกออกไปจาก *Streptomyces* ที่เคยพบแล้ว ดังนั้นแอคติโนมัยซีททั้ง 2 นี้น่าจะเป็นสปีชีส์ที่พบใหม่ด้วย

5. การศึกษาลักษณะรูปร่างทางสัณฐานวิทยา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

เมื่อได้นำเอา แอคติโนมัยซีท 54-4 และ A16-1 มาศึกษาลักษณะรูปร่างของสปอร์ และเส้นใย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด (Scanning Electron Microscope) ก็พบว่า สปอร์ของ strain 54-4 นั้นเกิดขึ้นสั้น ๆ ที่ปลายเส้นใย ส่วนของ strain A16-1 สปอร์เป็นสายยาว ผิวสปอร์มีหนามโดยรอบเมื่อสปอร์เจริญเต็มที่ ซึ่งเป็นลักษณะที่ค่อนข้างหายาก



ภาพที่ 12 ภาพจาก Scanning Electron Micrograph ของ *Streptomyces* 54-4 อายุ 5 วัน บนอาหาร Soil Extract Agar กำลังขยาย 3,000 X



ภาพที่ 13 ภาพจาก Scanning Electron Micrograph ของ *Streptomyces* 16-1 อายุ 5 วัน บนอาหาร Soil Extract Agar กำลังขยาย 2,000 X

4 สรุปและข้อเสนอแนะ

สารรงควัตถุสีแดง ที่ Actinomycete strain 54-4 (*Streptomyces thermocarboxydus*) สร้างขึ้นนั้น มีจำนวนมากมายหลาย ชนิด ไม่พบสารที่โครงสร้างเป็นโพรดิจิโอซิน แต่อาจมีสารที่คล้ายกับโพรดิจิโอซินถูกสร้างขึ้นขณะเดียวกันอยู่หลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อพิจารณาจาก spectrum peak ที่มีค่า Rt ที่ 23 และ 27 นาที นอกจากนี้ยังมีสารรงควัตถุสีแดง สีส้ม อื่น ๆ ที่ถูกสร้างอยู่รวมกัน ซึ่งอาจนำมาใช้ประโยชน์ได้เช่นกัน เนื่องจากหลายชนิดให้ฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ กรณีที่จุลินทรีย์สร้างสารหลายชนิดหากจะต้องแยกให้บริสุทธิ์ก่อนนำมาใช้ ก็จะมีความยุ่งยากมากกว่า แอคติโนมัยซีทชนิดที่สร้างสารรงควัตถุ น้อยชนิด ที่สำคัญ Actinomyces strain 54-4 ให้สารออกฤทธิ์ที่สามารถยับยั้งได้ทั้งเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ รวมทั้งให้สารที่สามารถกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa cells) และการตายของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Leukemia) ได้ และที่สำคัญก็มีความเป็นไปได้ที่ สารหลาย ๆชนิดที่ Actinomycete strain 54-4 สร้างขึ้นนี้ ออกฤทธิ์ร่วมกันในการให้ฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ หรือทำให้เกิดการตาย (apoptosis) ของเซลล์มะเร็ง เนื่องจากการทดสอบจาก สารสกัดหยาบ ให้ค่า IC_{50} ที่น้อยกว่าค่าที่ได้เมื่อทำให้สารบริสุทธิ์บางส่วน

สารรงควัตถุสีแดง (crude)ของ *Streptomyces* A16-1 ให้ spectrum peak ลักษณะเดียวกันกับ peak ของ *Streptomyces* 54-4 และประกอบด้วยสารสีแดงหลายชนิด แต่มี maximum absorption ที่ 490 nm และในfraction m 5, 6, 7-9 และ 10-12 เป็น fractions ที่มีสารออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม ด้วยค่า IC_{50} 1.72, 1.56, 3.10 และ 2.61 μg/ml ซึ่งเป็นค่าที่ต่ำกว่ายา Tamoxifen และ Doxorubicine ที่ใช้ในการรักษา นับว่าสารที่ *Streptomyces*A16-1 สร้างขึ้นนี้ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านมที่แรงมาก และอาจเป็นได้ที่มีสารออกฤทธิ์ที่มากกว่า 1 ชนิดออกฤทธิ์ไปพร้อม ๆกัน และก็เป็นไปได้ที่ *Streptomyces* A16-1 จะมีการสร้างสารที่คล้ายโพรดิจิโอซินอยู่ด้วยเช่นกัน นอกจากนี้ ยังมีความเป็นไปได้ที่ ทั้ง *Streptomyces* 54-4 และ *Streptomyces* A16-1 จะเป็นสปีชีส์ใหม่ด้วย

แอคติโนมัยซีท A1-3 และ A3-3 เมื่อสกัดแล้วให้สารสีม่วงแดง และสีม่วงเป็นส่วนใหญ่ ให้สารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ที่น่าสนใจ การทำให้สารบริสุทธิ์บางส่วนด้วย Column chromatography พบว่ามีสารหลายชนิดเช่นกัน แต่ไม่มากเท่า *Streptomyces* 54-4 จะได้มีการศึกษาสารรงควัตถุต่อในโครงการต่อไป

แอคติโนมัยซีททั้งหมดที่นำมาศึกษาทั้งหมด ครั้งนี้ ไม่ว่าจะสามรถสร้างสารรงควัตถุ โพรดิจิโอซิน สารคล้ายโพรดิจิโอซิน หรือไม่ สร้าง ล้วนแล้วแต่มีคุณสมบัติเฉพาะตัวที่มีคุณประโยชน์ และควรค่าแก่การศึกษาวิจัยในขั้นต่อไป

ข้อเสนอแนะ

การศึกษาวิจัยลักษณะนี้ไม่น่าจะมีความจำกัดในเรื่องของเวลาและ งบประมาณ เพราะการศึกษาสารออกฤทธิ์มีหลายขั้นตอน มีรายละเอียดที่ต้องพิจารณาตรวจสอบให้รอบคอบก่อนดำเนินการขั้นต่อไป และโครงสร้างสารออกฤทธิ์ในแอคติโนมัยซีทค่อนข้างซับซ้อน การเปิดใช้เครื่องมือแต่ละครั้งมีค่าใช้จ่ายสูง และนักเคมีก็ต้องการเวลาในการวิเคราะห์เช่นกัน อย่างไรก็ดีหากมีหน่วยงานที่ตั้งขึ้นโดยตรง เพื่อนำผลงานของนักวิจัยไปใช้ประโยชน์ทั้งการประยุกต์ใช้ หรือเชิงพาณิชย์ สิ่งที่ท่านคาดหวังก็จะเป็นจริงเร็วขึ้น

5 ผลผลิต (Output)

ผลผลิตของโครงการวิจัยนี้ คาดว่าจะได้เขียนบทความเพื่อลงพิมพ์ในวารสารต่อไป ในปี 2555 นี้ และจะได้นำผลงานไปเสนอในงานประชุม Asia Pacific Marine Biotechnology Conference ที่จะจัดขึ้นระหว่างวันที่ 13-16 กรกฎาคม 2555 ที่เมือง Kochi ประเทศญี่ปุ่น

การจดสิทธิบัตรนั้น ในประเทศไทยของเรา ไม่สามารถจดสิทธิบัตรของจุลินทรีย์ได้ แต่ถ้าพบสารใหม่สามารถ จดสิทธิบัตรของสารได้ และสิ่งหนึ่งที่นักวิจัยส่วนมากไม่ทราบคือ ผลงานที่พบใหม่นั้นถ้าได้พิมพ์เผยแพร่ไปก่อนแล้ว ก็ไม่สามารถจดสิทธิบัตรได้ ดังนั้นการลงพิมพ์เผยแพร่ ในวารสารอาจจะต้องรอคอยก่อน

งานวิจัยที่พบสารออกฤทธิ์ที่จะต้องนำมาใช้ในทางการแพทย์ ทางคลินิก มีหลายขั้นตอนที่ต้องศึกษา เช่น อย่างในกรณีงานวิจัยนี้ที่พบว่า สารสกัดจากเชื้อ *Streptomyces* 54-4 และ *Streptomyces* A16-1 นั้นให้ฤทธิ์ทั้งยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค และยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม มะเร็งปากมดลูก และมะเร็งเม็ดเลือดขาว อย่างน้อยสารที่บริสุทธิ์แล้วต้องถูกนำมาศึกษา ความเป็นพิษที่เฉพาะเจาะจง (Selective toxicity) เพราะสารแอนติไบโอติกที่มีความเป็นพิษที่เฉพาะเจาะจงเท่านั้น ที่จะถูกนำไปใช้ได้ นอกจากนั้นยังต้องมีค่าดัชนีของการบำบัดรักษา (therapeutic index) ที่ต้องทดสอบ คืออัตราส่วนของปริมาณที่มีความเป็นพิษ (toxic dose) ต่อปริมาณที่ให้ผลในการบำบัดรักษา (therapeutic dose) ถ้าสารที่พบยิ่งมีค่าดัชนีการรักษามากเท่าใด ก็ยิ่งมีคุณค่าต่อการรักษา (therapeutic value) มากเท่านั้น ขั้นตอนเหล่านี้จำเป็นต้องรอคอยเช่นกัน

ดังนั้นการคาดหวังของงานวิจัยในลักษณะนี้ จะใช้ระยะเวลามากำหนดให้ได้สิทธิบัตรหรือพิมพ์เผยแพร่ผลงานในปีที่กำลังทำงานวิจัย เหมือนงานวิจัยด้านการเกษตร หรือสังคมศาสตร์อาจเป็นไปได้ยาก เนื่องจากการจดสิทธิบัตรและการนำผลงานไปใช้ประโยชน์ต้องการเวลาเช่นกัน เฉพาะการจดสิทธิบัตรต้องใช้เวลารอคอยนานหลายเดือน หรือเป็นปี หรือมากกว่า 1 ปี หรือแม้แต่การคาดหวังผลงานเชิงพาณิชย์ ก็ต้องมีการวิจัยขั้นต่อไปก่อนและคงต้องมีการประสานงานกับหน่วยงานอื่นด้วย และที่สำคัญต้องแน่ใจว่าสามารถมีเทคโนโลยีในการผลิตที่คุ้มค่าการลงทุน เหมาะสมกับธรรมชาติของเชื้อด้วย แต่ส่วนมากแล้วนักวิจัย ก็จะมีหน้าที่ทำวิจัยเพียงอย่างเดียว หากมีการคาดหวังหลาย ๆอย่างที่นอกเหนือจากหน้าที่หลัก คงต้องอาศัยหลายหน่วยงานที่เกี่ยวข้องช่วยกัน เพื่อให้ผลงานถูกนำออกมาใช้ประโยชน์ได้เร็วขึ้น

บรรณานุกรม

1. Franks, A., Haywood, P., Holmstrom, C., Egan, S., Kjelleberg, S. and Kumar, N. 2005. Isolation and structure elucidation of a novel yellow pigment from the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*,"*Molecules.* 10: 1286–1291.
2. Fuqua, W. C. and Weiner, R. M. 1993. The *melA* gene is essential formelanin biosynthesis in the marine bacterium *Shewanella colwelliana*," *Journal of General Microbiology.* 139: 1105–1114
3. Gauthier, M. J. 1976. Morphological, physiological, and biochemical characteristics of some violet-pigmented bacteria isolated from seawater. *Canadian Journal of Microbiology.* 22: 138–149.
4. Gerber, N. N.1975. Prodigiosin-like pigments, *CRC Critical Reviews in Microbiology*, vol. 3: 469–485,
5. Gerber, N. N. and Gauthier, M. J. 1979. New prodigiosin-like pigment from *Alteromonas rubra*," *Applied and Environmental Microbiology.* 37:1176–1179.
6. Hakv°ag, S., Fjærvik, E., Klinkenberg, G. et al. 2009. Violaceinproducing *Collimonas* sp. from the sea surface microlayer of costal waters in Trøndelag, Norway. *Marine Drugs.* 7: 576–588.
7. Han, S.B., Kim, H.M., Kim, Y. H., Lee, C.W., Jang, E.S., Son, K.H., Kim, S.U., Kim, Y.K., 1998. T-cell Specific immunosuppression by prodigiosin isolated from *Serratia marcescens. Intl J. Immunopharmacol.* 1998: 1-13
8. Han S.B., Park S.H., Jeon Y.J., Kim Y.K., Kim H.M., Yang K.H. 2001. Prodigiosin blocks T cell activation by inhibiting interleukin - 2R α- expression and delays progression of autoimmune diabetes and collagen induced arthritis. *J Pharm Exp Ther,* 299: 415-425
9. Hong, K., Gao, A-H., Xie, Q-Y., Gao, H., Zhuang, L., Lin, H-P., Yu, H-P., Yao, S-H., Goodfellow, M., and Ruan, J-S. 2009. Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China. *Marine Drugs.* 7: 24-44.
10.. Isaka, M., Jaturapat, A., Kramyu, J., Tanticharoen, M., and Thebtaranonth, Y. 2002. Potent *in vitro* Antimalarial activity of metacycloprodigiosin isolated from *Streptomyces spectabilis* BCC4785
11. Ivanova, E. P., Kiprianova, E. A., Mikhailov, V. V. et al. 1996. Characterization and identification of marine *Alteromonas nigrifaciens* strains and emendation of the description. *International Journal of Systematic Bacteriology.* 46: 223–228.
12. Jongrungruangchok, S., Tanasupawat, S. and Kudo, T. (2008). *Micromonospora krabiensis* sp. nov., isolated from marine soil in Thailand. *Journal of General and Applied Microbiology*

54(2): 127-33)

13. Kahng,H. Y., Chung, B. S., Lee, D. H., Jung, J. S., Park, J. H. and Jeon, C. O. 2009. *Cellulophaga tyrosinoxydans* sp. nov., a tyrosinase-producing bacterium isolated from seawater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 59: 654–657.
14. Kawauchi, K., Shibutani, K., Yagisawa, H. et al. 1997. A possible immunosuppressant, cycloprodigios in hydrochloride, obtained from *Pseudoalteromonas denitrificans*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 237: 543–547
15. Khanafari, A., Assadi M. M. and Fakhr F. A. 2006. Review of Prodigiosin, Pigmentatio in *Serratia marcescens*. Online J. of Biological Science. 6: 1-13
16. Kim, D. Lee, J. S., Park, Y. K. et al. 2007. Biosynthesis of antibiotic prodiginines in the marine bacterium *Hahella chejuensis* KCTC 2396," *Journal of Applied Microbiology*. 102: 937–944
17. Kim, H. S., Hayashi, M., Shibata. Y.. et al. 1999. Cycloprodigiosin hydrochloride obtained from*Pseudoalteromonas denitrificans* is a potent antimalarial agent," *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 22: 532–534,
18. Kotob, S. I., Coon, S. L., Quintero, E. J. and Weiner, R. M.1995. Homogentisic acid is the primary precursor of melanin synthesis in *Vibrio cholerae*, a *Hyphomonas* strain, and *Shewanella colwelliana*," *Applied and Environmental Microbiology*. 61: 1620–1622.
19. Lam, K. S. 2006. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Current Openion in Microbiology*. 9: 245-251
20. Lazaro, J. E., Nitcheu, J., Predicala, R. Z.. et al. 2002. Heptyl prodigiosin, a bacterial metabolite, is antimalarial in vivo and nonmutagenic in vitro. *Journal of Natural Toxins*. 11: 367–377.
21. Li, D., Wang, F., Xiao, X., Zeng, X., Gu, Q. Q. and Zhu, W. 2007. A new cytotoxic phenazine derivative from a deep sea bacterium *Bacillus* sp. *Archives of Pharmacal Research*. 30: 552–555.
22. Li, F., Maskey, R. P., Qin, S. et al., 2005. Chinikomycin A and B: isolation, structure elucidation and biological activity of novel antibiotics from a marine *Streptomyces* sp. isolate M045," *Journal of Natural Products*. 68: 349–353.
23. MacCarthy, S. A., Sakata, T., Kakimoto, D. and Johnson, R. M. 1985. Production and isolation of purple pigment. by *Alteromonas luteoviolacea*. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. 51: 479–484,
24. Maskey, R. P., Helmke, E. and Laatsch, H. 2003. Himalomycin A and B: isolation and structure elucidation of new fridamycin type antibiotics from a marine *Streptomyces* isolate. *Journal*

of Antibiotics. 56: 942–949.

25 .Maskey, R. P., Kock, I., Helmke, E. and Laatsch, H. 2003. Isolation and structure determination of phenazostatin D, a new phenazine from a marine actinomycete isolate *Pseudonocardia* sp. B6273. *Zeitschrift f□ur Naturforschung*. 58b: 692–694.

26 .Matz, C., Deines, P., Boenigk, J. et al. 2004. Impact of violaceinproducing bacteria on survival and feeding of bacterivorous nanoflagellates. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 1593–1599.

27. Misawa, N., Satomi, Y.m Kondo, K. et al. 1995. Structure and functional analysis of a marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthetic pathway proposed at the gene level," *Journal of Bacteriology*. 177: 6575–6584.

28. Nansathit, A., Apipattarakul, S., Phaosiri, C., Pongdontri, P., Chanthai, S. and Ruangviriyachai, C. 2009. Synthesis, isolation of phenazine derivatives and their antimicrobial activities, *Walailak Journal of Science and Techology*. 6: 79–91.

29. Novick , N. J. and Tyler, M. E. 1985. Isolation and characterization of *Pseudoalteromonas luteoviolacea* strains with sheathed flagella, *International Journal of Systematic Bacteriology*. 35: 111–113.

30. Pinkerton, D. M., Banwell, M. G., Garson, M. J. et al. 2010. Antimicrobial and cytotoxic activities of synthetically derived tambjamines C and E-J, BE-18591, and a related alkaloid from the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*," *Chemistry & Biodiversity*. 7: 1311–1324.

31. Pusecker, K., Laatsch, H., Helmke, E. and Weyland, H. 1997. Dihydrophencomycin methyl ester, a new phenazine derivative from a marine streptomycete," *Journal of Antibiotics*. 50: 479–483.

32. Saha, S., Thavasi, R. and Jayalakshmi, S. 2008. Phenazine pigments from *Pseudomonas aeruginosa* and their application as antibacterial agent and food colourants *Research. Journal of Microbiology*. 3: 122–128.

33. Srivibool, R., and Sukchotiratana, M. 2006. Pigmented actinomycetes from coastal areas and their bioactive secondary metabolites. *Journal of Science, Technology and Humanities*. 4: 11-18

34. Stevenson, C.S., Capper, E. A., Roshak, A. K. et al. 2002. Scytonemin— a marine natural product inhibitor of kinases key in hyperproliferative inflammatory diseases. *Inflammation Research*. 51: 112–114.

35. Tamura, T. and Sakane, T. 2005. . *Asanoa iriomotensis* sp. nov., isolated from mangrove soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55: 725—727.

36. Venil, C. K. , Velmurugan, P., and Lakshmanaperumalsamy, P. 2009. Genomic environment of *cue*R and *cop*A genes for prodigiosin biosynthesis by *Serratia marcescens* SB08

Romanian Biotechnological Letters 14: , 4812-4819 .

37. Wagner-D¨obler, I., Beil, ,W. , Lang, S., Meiners, M. and Laatsch, H. 2002. Integrated approach to explore the potential of marine microorganisms for the production of bioactive metabolites. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 74: 207–238.

38. Williamson N.R., Simonsen H.T., Ahmed R.A., Goldet G., Slater H., Woodley L., Leeper F.J., Salmond P.C. 2005. Biosynthesis of the red antibiotic, prodigiosin, in *Serratia*: identification of a novel 2-methyl-3-n-amyl-pyrrole (MAP) assembly pathway, definition of the terminal condensing enzyme, and implications for undecylprodigiosin biosynthesis in Streptomyces. *Mol Microbiol,* 56: 971-989.

39. Williams, S.T., Sharpe, M.E., and Holt, J.G. (eds.). (1989). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 4, Williams and Wilkins co., Baltimore. 2648 p.

40. Xiao, J., Xu, J., Xie, S., Zhang, X., Yu, Z., and Xu, J. 2008. Isolation of mangrove actinomycetes and their antagonistic activities. *Chinese Journal of Applied Environmental Biology*. 14: 244-248

41. Yada, S., Wang, Y., Zou, Y. et al.2008. Isolation and characterization of two groups of novel Marine bacteria producing violacein. *Marine Biotechnology*. 10:128–132.

42. Yamamoto, C., Takemoto, H., Kuno, K. et al.,1999. Cycloprodigiosin hydrochloride, a new H^+/Cl^- symporter, induces apoptosis in human and rat hepatocellular cancer cell lines *in vitro* and inhibits the growth of hepatocellular carcinoma xenografts in nude mice. *Hepatology*, 30:. 894–902

ภาคผนวก

16S rDNA gene Sequence ของ *Streptomyces* 54-4

```
DEFINITION  Streptomyces sp. 54-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION   DQ417205
VERSION     DQ417205
KEYWORDS    .
SOURCE      Streptomyces sp. 54-4
  ORGANISM  Streptomyces sp. 54-4
            Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales;
            Streptomycineae; Streptomycetaceae; Streptomyces.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1501)
  AUTHORS   Srivibool,R., Sukchotiratana,M.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (25-FEB-2006) Institute of Marine Science, Burapha
            University, Longhad -Bangsaen Rd., Chonburi 20131, Thailand
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1501
                     /organism="Streptomyces sp. 54-4"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="54.4"
                     /isolate="red spore mass"
                     /db_xref="taxon:375916"
                     /note="antibiotic producer
                     PCR_primers=fwd_name: 9F, rev_name: 1115R;
                     PCR_primers=fwd_name: 339F, rev_name: 802R;
                     PCR_primers=fwd_name: 785F, rev_name: 357R;
                     PCR_primers=fwd_name: 1099F, rev_name: 154R"
     rRNA            <1..>1501
                     /product="16S ribosomal RNA"
ORIGIN
        1 cctttgaagg ggggcttggg aggaatgcaa cagctcctta aagatgaagc ccttcggggt
       61 ggattagtgg cgaacgggtg agtaacacgt gggcaatctg ccctgcactc tgggacaagc
      121 cctggaaacg gggtctaata ccggatactg accatcttgg gcatccttga tggtggaaag
      181 ctccggcggt gcaggatgag cccgcggcct atcagctagt tggtgaggta atggctcacc
      241 aaggcgacga cgggtagccg gcctgagagg gcgaccggcc acactgggac tgaaacacgg
      301 cccagactcc tacgggaggc agcagtgggg aatattgcac aatgggcgaa agcctgatgc
      361 atcgacgccg cgtgagggat gacggccttc gggttgtaaa cctctttcag cagggaagaa
      421 gcgaaagtga cggtacctgc agaagaagcg ccggctaact acgtgccagc agccgcggta
      481 atacgtaggg cgcgagcgtt gtccggaatt attgggcgta aagagctcgt aggcggcttg
      541 tcgcgtcggt tgtgaaagcc cggggcttaa ccccgggtct gcagtcgata cgggcaggct
      601 agagttcggt aggggagatc ggaattcctg gtgtagcggt gaaatgcgca gatatcagga
      661 ggaacaccgg tggcgaaggc ggatctctgg gccgatactg acgctgagga gcgaaagcgt
      721 ggggagcgaa caggattaga taccctggta gtccacgccg taaacggtgg gcactaggtg
      781 tgggcaacat tccacggttg tccgtgccgc agctaacgca ttaagtgccc cgcctgggga
      841 gtacggccgc aaggctaaaa ctcaaaggaa ttgacggggg cccgcacaag cggcggagca
      901 tgtggcttaa ttcgacgcaa cgcgaagaac cttaccaagg cttgacatac accggaaacg
      961 tccagagatg ggcgcccccc tgtggtcggt gtacaggtgg tgcatggctg tcgtcagctc
     1021 gtgtcgtgag atgttgggtt aagtcccgca acgagcgcaa cccttgtccc gtgttgccag
     1081 caggcccttg tggtgctggg gactcacggg agaccgccgg ggtcaactcg gaggaaggtg
     1141 gggacgacgt caagtcatca tgcccccttat gtcttgggct gcacgtgcta caatggccgg
     1201 tacaatgagc tgcgataccg cgaggtggag cgaatctcaa aaagccggtc tcagttcgga
     1261 ttggggtctg caactcgacc ccatgaagtc ggagtcgcta gtaatcgcag atcagcattg
     1321 ctgcggtgaa tacgttcccg ggccttgtac acaccgcccg tcacgtcacg aaagtcggta
     1381 acacccgaag ccggtggccc aacccccttgt gggagggagc tgtcgaaggt gggactggcg
     1441 attgggacga agtcgtaaca aggtagccgt accggaaggt gcggctggat cacctcctta
     1501 a
```

>A16-1
16S rDNA sequence
CGTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCTTCG
GGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGAC
AAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATACTGACCATCTTGGGCATCCTTGATGGTGG
AAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCT
CACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGAC
ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTG
ATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGA
AGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC
GGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGG
CTTGTCGCGTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCA
GGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATC
AGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAA
GCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGCACTA
GGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCCTGG
GG-AGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGG
AGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGA
AACGTCCAGAGATGGGCGCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCA
GCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCGTGTTG
CCAGCAGGCCCTTGTGGTGCTGGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAA
GGTGGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAA
TGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCA
GTTCGGAATTGGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGA
TCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGA
AAAGTCGGTAACACCCGAAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAAAGGAGCTGTCGAAA
GTGGGACTGGCGATTGGACA

A16-1 99.101 % similarity

>gi|90960374|dbj|AB184553.1| Streptomyces indiaensis gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 13964

ACGAACGCTG GCGGCGTGCT TAACACATGC AAGTCGAACG ATGAAGCCCT TCGGGGTGGA TTAGTGGCGA
ACGGGTGAGT AACACGTGGG CAATCTGCCC TGCACTCTGG GACAAGCCCT GGAAACGGGG TCTAATACCG
GATACTGACC ACTGAGGGCA TCCTCGGTGG TCGAAAGCTC CGGCGGTGCA GGATGAGCCC GCGGCCTATC
AGCTTGTTGG TGAGGTAGTG GCTCACCAAG GCGACGACGG GTAGCCGGCC TGAGAGGGCG ACCGGCCACA
CTGGGACTGA GACACGGCCC AGACTCCTAC GGGAGGCAGC AGTGGGGAAT ATTGCACAAT GGGCGAAAGC
CTGATGCAGC GACGCCGCGT GAGGGATGAC GGCCTTCGGG TTGTAAACCT CTTTCAGCAG GGAAGAAGCG
AAAGTGACGG TACCTGCAGA AGAAGCGCCG GCTAACTACG TGCCAGCAGC CGCGGTAATA CGTAGGGCGC
GAGCGTTGTC CGGAATTATT GGGCGTAAAG AGCTCGTAGG CGGCTTGTCG CGTCGGTTGT GAAAGCCCGG
GGCTTAACCC CGGGTCTGCA GTCGATACGG GCAGGCTAGA GTTCGGTAGG GGAGATCGGA ATTCCTGGTG
TAGCGGTGAA ATGCGCAGAT ATCAGGAGGA ACACCGGTGG CGAAGGCGGA TCTCTGGGCC GATACTGACG
CTGAGGAGCG AAAGCGTGGG GAGCGAACAG GATTAGATAC CCTGGTAGTC CACGCCGTAA ACGGTGGGCA
CTAGGTGTGG GCAACATTCC ACGTTGTCCG TGCCGCAGCT AACGCATTAA GTGCCCCGCC TGGGGAGTAC
GGCCGCAAGG CTAAAACTCA AAGGAATTGA CGGGGGCCCG CACAAGCGGC GGAGCATGTG GCTTAATTCG
ACGCAACGCG AAGAACCTTA CCAAGGCTTG ACATACACCG GAAACGTCCA GAGATGGGCG CCCCCTTGTG
GTCGGTGTAC AGGTGGTGCA TGGCTGTCGT CAGCTCGTGT CGTGAGATGT TGGGTTAAGT CCCGCAACGA
GCGCAACCCT TGTCCCGTGT TGCCAGCAGG CCCTTGTGGT GCTGGGGACT CACGGGAGAC CGCCGGGGTC
AACTCGGAGG AAGGTGGGGA CGACGTCAAG TCATCATGCC CCTTATGTCT TGGGCTGCAC ACGTGCTACA
ATGGCCGGTA CAATGAGCTG CGATACCGCG AGGTGGAGCG AATCTCAAAA AGCCGGTCTC AGTTCGGATT
GGGGTCTGCA ACTCGACCCC ATGAAGTCGG AGTCGCTAGT AATCGCAGAT CAGCATTGCT GCGGTGAATA
CGTTCCCGGG CCTTGTACAC ACCGCCCGTC ACGTCACGAA AGTCGGTAAC ACCCGAAGCC GGTGGCCCAA
CCCCTTGTGG GAGGGAGCTG TCGAAGGTGG GACTGGCGAT TGGGACGAAG TCGTAACAAG GTAGCCGTAC
C

A16-1 เหมือนกัน ด้วย 98.964 % similarity

```
LOCUS       STU94490                1500 bp    DNA     linear   BCT 02-APR-
1998
DEFINITION  Streptomyces thermocarboxydus DSM 44293 16S ribosomal RNA gene,
            complete sequence.
ACCESSION   U94490
VERSION     U94490.1  GI:2228756
KEYWORDS    .
SOURCE      Streptomyces thermocarboxydus
  ORGANISM  Streptomyces thermocarboxydus
            Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales;
            Streptomycineae; Streptomycetaceae; Streptomyces.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1500)
  AUTHORS   Kim,S.B., Falconer,C., Williams,E. and Goodfellow,M.
  TITLE     Streptomyces thermocarboxydovorans sp. nov. and Streptomyces
            thermocarboxydus sp. nov., two moderately thermophilic
            carboxydotrophic species from soil
  JOURNAL   Int. J. Syst. Bacteriol. 48 Pt 1, 59-68 (1998)
   PUBMED   9542077
REFERENCE   2  (bases 1 to 1500)
  AUTHORS   Kim,S.B., Falconer,C., Williams,E. and Goodfellow,M.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (19-MAR-1997) Microbiology, University of Newcastle
upon
            Tyne, Framlington Place, Newcastle upon Tyne NE2 4HH, UK
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1500
                     /organism="Streptomyces thermocarboxydus"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="DSM 44293"
                     /db_xref="taxon:59299"
                     /note="type strain"
     rRNA            1..1500
                     /product="16S ribosomal RNA"
ORIGIN
```

```
     1 gacgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac gatgaagccc ttcggggtgg
    61 attagtggcg aacgggtgag taacacgtgg gcaatctgcc ctgcactctg ggacaagccc
   121 tggaaacggg gtctaatacc ggatactgat cgccttgggc atccttggtg atcgaaagct
   181 ccggcggtgc aggatgagcc cgcggcctat cagcttgttg gtgaggtaat ggctcaccaa
   241 ggcgacgacg ggtagccggc ctgagagggc gaccggccac actgggactg agacacggcc
   301 cagactccta cgggaggcag cagtggggaa tattgcacaa tgggcgaaag cctgatgcag
   361 cgacgccgcg tgagggatga cggccttcgg gttgtaaacc tctttcagca gggaagaagc
   421 gaaagtgacg gtacctgcag aagaagcgcc ggctaactac gtgccagcag ccgcggtaat
   481 acgtagggcg cgagcgttgt ccggaattat tgggcgtaaa gagctcgtag gcggcttgtc
   541 gcgtcggttg tgaaagcccg gggcttaacc ccgggtctgc agtcgatacg ggcaggctag
   601 agttccgtag gggagatcgg aattcctggt gtagcggtga aatgcgcaga tatcaggagg
   661 aacaccggtg gcgaaggcgg atctctgggc cgatactgac gctgaggagc gaaagcgtgg
   721 ggagcgaaca ggattagata ccctggtagt ccacgccgta aacggtgggc actaggtgtg
   781 ggcgacattc cacgtcgtcc gtgccgcagc taacgcatta agtgccccgc ctggggagta
   841 cggccgcaag gctaaaactc aaaggaattg acgggggccc gcacaagcgg cggagcatgt
   901 ggcttaattc gacgcaacgc gaagaacctt accaaggctt gacatacacc ggaaacgtcc
   961 agagatgggc gccccttgt ggtcggtgta caggtggtgc atggctgtcg tcagctcgtg
  1021 tcgtgagatg ttgggttaag tcccgcaacg agcgcaaccc ttgtcccgtg ttgccagcag
  1081 gcccttgtgg tgctggggac tcacgggaga ccgccggggt caactcggag gaaggtgggg
  1141 acgacgtcaa gtcatcatgc cccttatgtc ttgggctgca cacgtgctac aatggccggt
  1201 acaatgagct gcgataccgc gaggtggagc gaatctcaaa aagccggtct cagttcggat
  1261 tggggtctgc aactcgaccc catgaagtcg gagtcgctag taatcgcaga tcagcattgc
  1321 tgcggtgaat acgttcccgg gccttgtaca caccgcccgt cacgtcacga aagtcggtaa
  1381 cacccgaagc cggtggccca acccccttgt ggggagggag ctgtcgaagg tgggactggc
  1441 gattgggacg aagtcgtaac aaggtagccg taccggaagg tgcggctgga tcacctcctt
```

A16-1 เหมือนกันด้วย % similarity 98.963

```
LOCUS       AB184859                1473 bp    DNA     linear   BCT 01-APR-
2006
DEFINITION  Streptomyces purpurascens gene for 16S rRNA, partial sequence,
            strain: NBRC 13077.
ACCESSION   AB184859
VERSION     AB184859.1  GI:90960680
KEYWORDS    .
SOURCE      Streptomyces purpurascens
  ORGANISM  Streptomyces purpurascens
            Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales;
            Streptomycineae; Streptomycetaceae; Streptomyces.
REFERENCE   1
  AUTHORS   Tamura,T., Oguchi,A., Kikuchi,T., Kikuchi,H., Nishii,T.,
Tsuji,K.,
            Yamaguchi,Y., Tase,A., Takahashi,M., Sakane,T., Suzuki,K. and
            Hatano,K.
  TITLE     Phylogenic analysis of the genus Streptomyces
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1473)
  AUTHORS   Tamura,T., Oguchi,A., Kikuchi,T., Kikuchi,H., Nishii,T.,
Tsuji,K.,
            Yamaguchi,Y., Tase,A., Takahashi,M., Sakane,T., Suzuki,K. and
            Hatano,K.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (14-JUL-2004) Tomohiko Tamura, National Institute of
            Technology and Evaluation, Department of Biotechnology; 2-5-8,
            Kazusakamatari, Kisarazu, Chiba 292-0818, Japan
            (E-mail:tamura-tomohiko@nite.go.jp, Tel:81-438-20-5763,
            Fax:81-438-52-2329)
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1473
                     /organism="Streptomyces purpurascens"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="NBRC 13077"
                     /db_xref="taxon:1924"
                     /note="type strain of Streptomyces purpurascens"
     rRNA            <1..>1473
                     /product="16S ribosomal RNA"
ORIGIN
```

```
       1 acgaacgctg gcggcgtgct taacacatgc aagtcgaacg atgaaccact tcggtgggga
      61 ttagtggcga acgggtgagt aacacgtggg caatctgccc tgcactctgg gacaagccct
     121 ggaaacgggg tctaataccg gatattgacc atcttgggca tctttgatgg tggaaagctc
     181 cggcggtgca ggatgagccc gcggcctatc agctagttgg tgaggtaatg gctcaccaag
     241 gcgacgacgg gtagccggcc tgagagggcg accggccaca ctgggactga gacacggccc
     301 agactcctac gggaggcagc agtggggaat attgcacaat gggcgaaagc ctgatgcagc
     361 gacgccgcgt gagggatgac ggccttcggg ttgtaaacct ctttcagcag ggaagaagcg
     421 aaagtgacgg tacctgcaga agaagcgccg gctaactacg tgccagcagc cgcggtaata
     481 cgtagggcgc gagcgttgtc cggaattatt gggcgtaaag agctcgtagg cggcttgtca
     541 cgtcggttgt gaaagcccgg ggcttaaccc cgggtctgca gtcgatacgg gcaggctaga
     601 gttcggtagg ggagatcgga attcctggtg tagcggtgaa atgcgcagat atcaggagga
     661 acaccggtgg cgaaggcgga tctctgggcc gatactgacg ctgaggagcg aaagcgtggg
     721 gagcgaacag gattagatac cctggtagtc cacgccgtaa acggtgggca ctaggtgtgg
     781 gcaacattcc acgttgtccg tgccgcagct aacgcattaa gtgccccgcc tggggagtac
     841 ggccgcaagg ctaaaactca aaggaattga cgggggcccg cacaagcggc ggagcatgtg
     901 gcttaattcg acgcaacgcg aagaacctta ccaaggcttg acatacaccg gaaacgtctg
     961 gagacaggcg ccccccttgtg gtcggtgtac aggtggtgca tggctgtcgt cagctcgtgt
    1021 cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga gcgcaaccct tgtcccgtgt tgccagcagg
    1081 cccttgtggt gctggggact cacgggagac cgccggggtc aactcggagg aaggtgggga
    1141 cgacgtcaag tcatcatgcc ccttatgtct tgggctgcac acgtgctaca atggccggta
    1201 caatgagctg cgataccgcg aggtggagcg aatctcaaaa agccggtctc agttcggatt
    1261 ggggtctgca actcgacccc atgaagtcgg agtcgctagt aatcgcagat cagcattgct
    1321 gcggtgaata cgttcccggg ccttgtacac accgcccgtc acgtcacgaa agtcggtaac
    1381 acccgaagcc ggtggcccaa ccccttgtgg gagggagctg tcgaaggtgg gactggcgat
    1441 tgggacgaag tcgtaacaag gtagccgtac cga
//
```

A16-1 เหมือนกับ *Streptomyces spinoverrucosus* ด้วย % similarity 98-961%

GenBank: AB184578.1

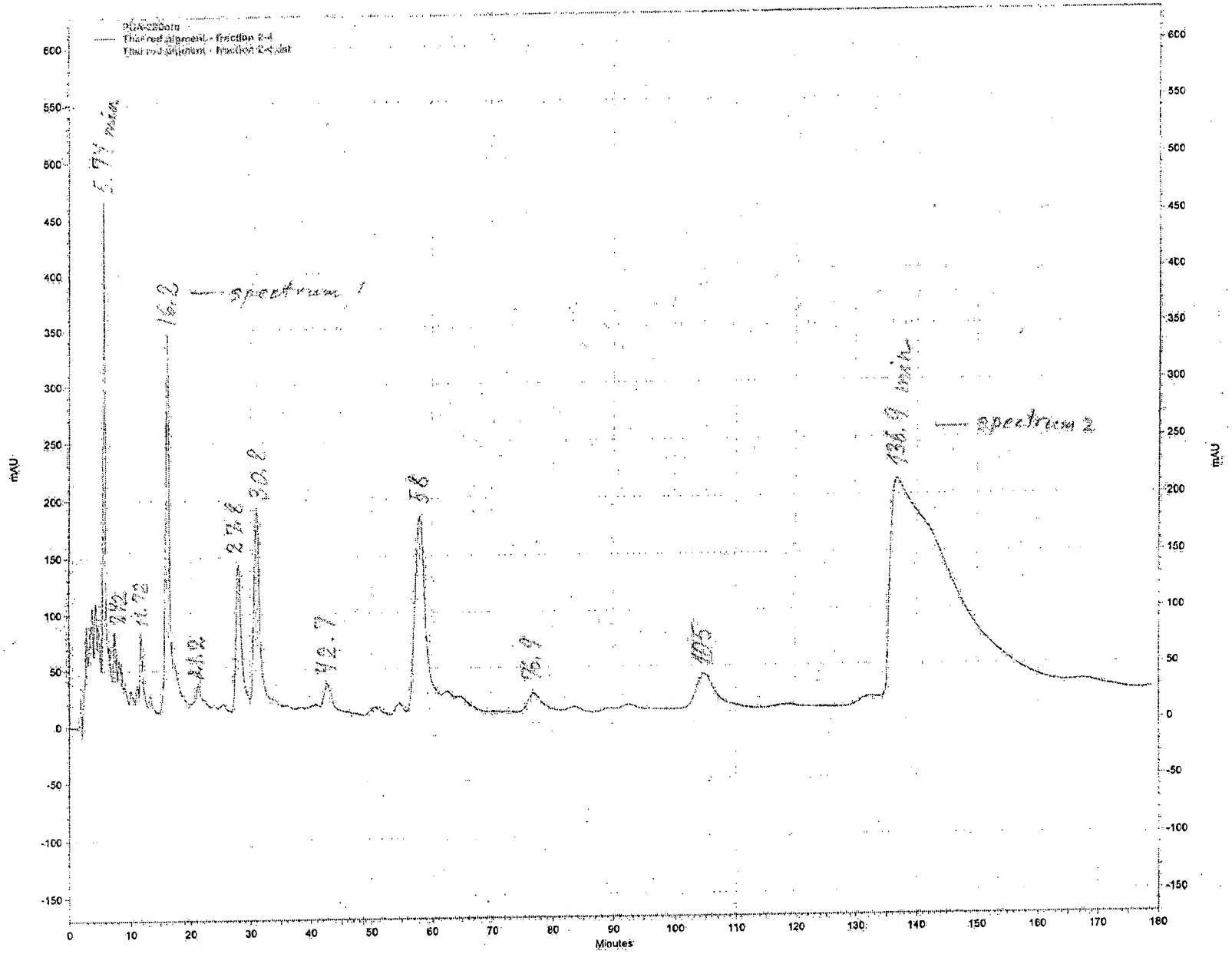
FASTA Graphics

Go to:

```
LOCUS       AB184578               1458 bp    DNA     linear   BCT 01-APR-
2006
DEFINITION  Streptomyces spinoverrucosus gene for 16S rRNA, partial
sequence,
            strain: NBRC 14228.
ACCESSION   AB184578
VERSION     AB184578.1  GI:90960399
KEYWORDS    .
SOURCE      Streptomyces spinoverrucosus
  ORGANISM  Streptomyces spinoverrucosus
            Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales;
            Streptomycineae; Streptomycetaceae; Streptomyces.
REFERENCE   1
  AUTHORS   Tamura,T., Oguchi,A., Kikuchi,T., Kikuchi,H., Nishii,T.,
Tsuji,K.,
            Yamaguchi,Y., Tase,A., Takahashi,M., Sakane,T., Suzuki,K. and
            Hatano,K.
  TITLE     Phylogenic analysis of the genus Streptomyces
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1458)
  AUTHORS   Tamura,T., Oguchi,A., Kikuchi,T., Kikuchi,H., Nishii,T.,
Tsuji,K.,
            Yamaguchi,Y., Tase,A., Takahashi,M., Sakane,T., Suzuki,K. and
            Hatano,K.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (14-JUL-2004) Tomohiko Tamura, National Institute of
            Technology and Evaluation, Department of Biotechnology; 2-5-8,
            Kazusakamatari, Kisarazu, Chiba 292-0818, Japan
            (E-mail:tamura-tomohiko@nite.go.jp, Tel:81-438-20-5763,
            Fax:81-438-52-2329)
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1458
                     /organism="Streptomyces spinoverrucosus"
```

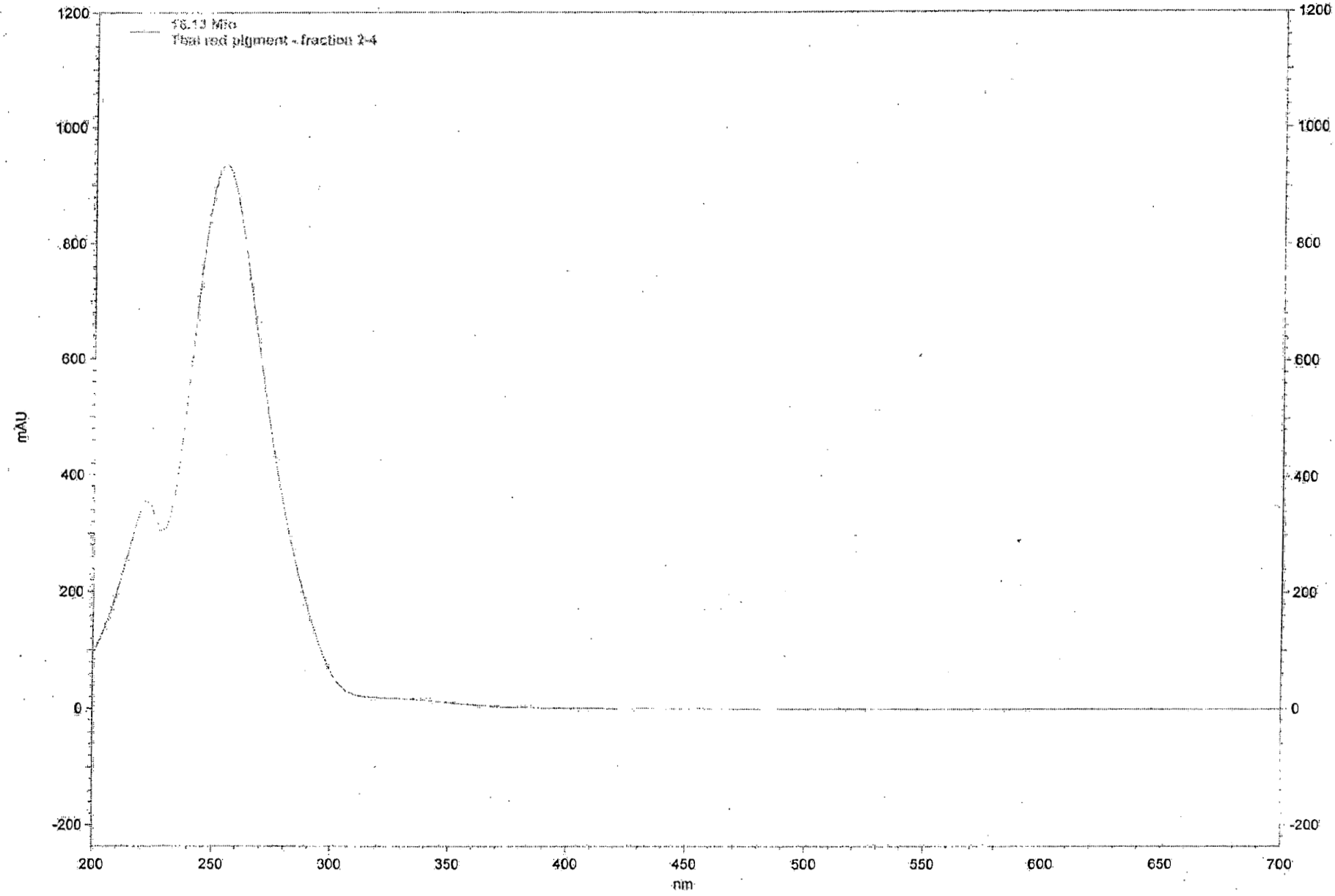
```
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="NBRC 14228"
                     /db_xref="taxon:284043"
                     /note="type strain of Streptomyces spinoverrucosus"
     rRNA            <1..>1458
                     /product="16S ribosomal RNA"
ORIGIN
        1 ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac gatgaaccac ttcggtgggg attagtggcg
       61 aacgggtgag taacacgtgg gcaatctgcc ctgcactctg ggacaagccc tggaaacggg
      121 gtctaatacc ggatacgacc atcttgngca tccttgatgn tggaaagctc cggcggtgca
      181 ggatgagccc gcggcctatc agcttgttgg tgaggtaacg gctcaccaag gcgacgacgg
      241 gtagccggcc tgagagggcg accggccaca ctgggactga gacacggccc agactcctac
      301 gggaggcagc agtggggaat attgcacaat gggcgaaagc ctgatgcagc gacgccgcgt
      361 gagggatgac ggccttcggg ttgtaaacct ctttcagcag ggaagaagcg aaagtgacgg
      421 tacctgcaga agaagcgccg gctaactacg tgccagcagc cgcggtaata cgtagggcgc
      481 aagcgttgtc cggaattatt gggcgtaaag agctcgtagg cggcttgtcg cgtcggttgt
      541 gaaagcccgg ggcttaaccc cgggtctgca gtcgatacgg gcaggctaga gttcggtagg
      601 ggagatcgga attcctggtg tagcggtgaa atgcgcagat atcaggagga acaccggtgg
      661 cgaaggcgga tctctgggcc gatactgacg ctgaggagcg aaagcgtggg gagcgaacag
      721 gattagatac cctggtagtc cacgccgtaa acggtgggca ctaggtgtgg gcaacattcc
      781 acgttgtccg tgccgcagct aacgcattaa gtgccccgcc tggggagtac ggccgcaagg
      841 ctaaaactca aaggaattga cgggggcccg cacaagcggc ggagcatgtg gcttaattcg
      901 acgcaacgcg aagaacctta ccaaggcttg acatacaccg gaaacggccg gagacggtcg
      961 ccccccttgtg gtcggtgtac aggtggtgca tggctgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt
     1021 tgggttaagt cccgcaacga gcgcaaccct tgtcccgtgt tgccagcagg cccttgtggt
     1081 gctggggact cacgggagac cgccggggtc aactcggagg aaggtgggga cgacgtcaag
     1141 tcatcatgcc ccttatgtct tgggctgcac acgtgctaca atggccggta caatgagctg
     1201 cgataccgcg aggtggagcg aatctcaaaa agccggtctc agttcggatt ggggtctgca
     1261 actcgacccc atgaagtcgg agtcgctagt aatcgcagat cagcattgct gcggtgaata
     1321 cgttcccggg ccttgtacac accgcccgtc acgtcacgaa agtcggtaac acccgaagcc
     1381 ggtggcccaa ccccttgtgg gagggagctg tcgaaggtgg gactggcgat tgggacgaag
     1441 tcgtaacaag gtagccgt
//
```

ภาคผนวก

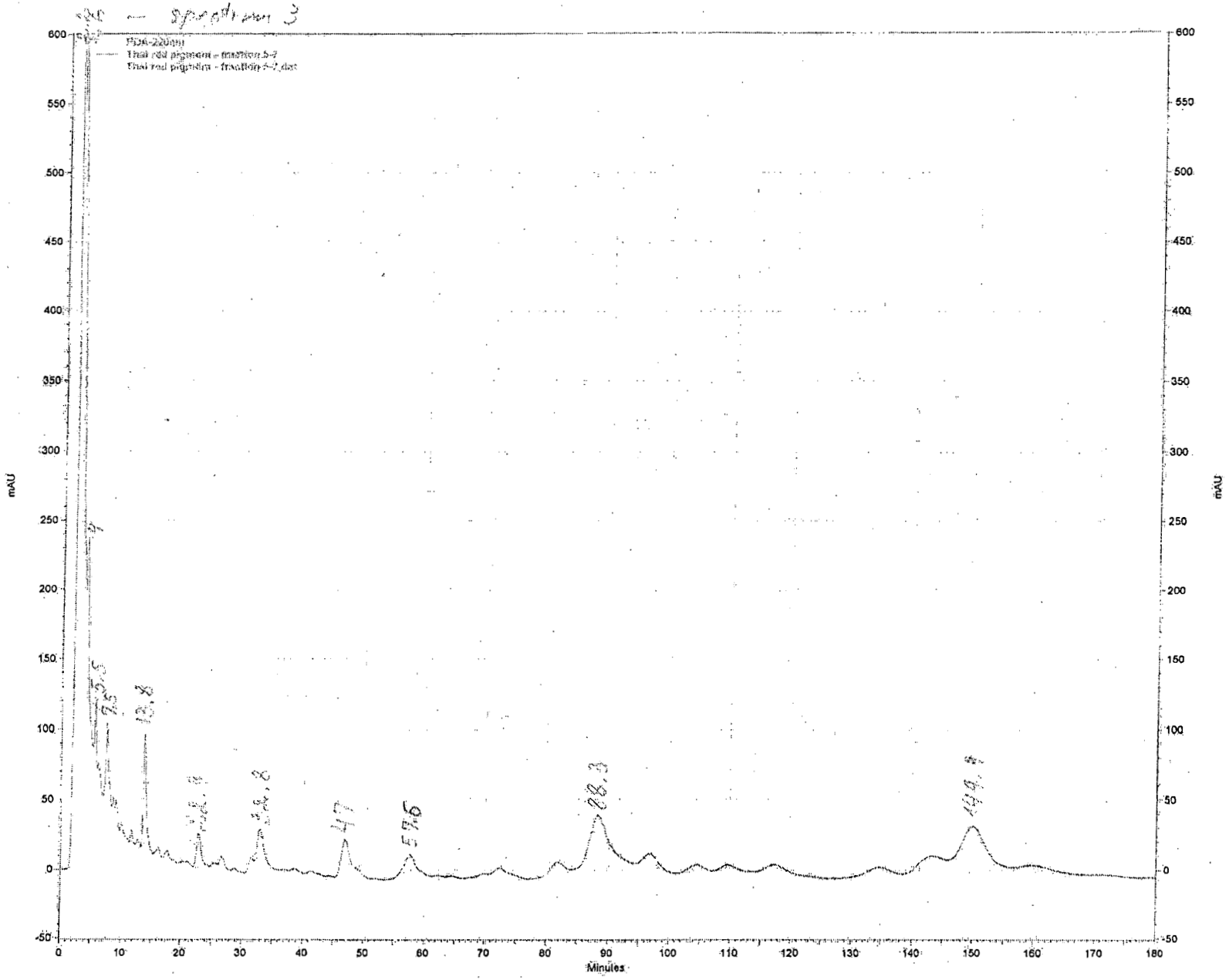


C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\shiseido\install\Prodigiosin\Thai red pigment\Thai red pigment - fraction 2-4.dat, PDA-220nm

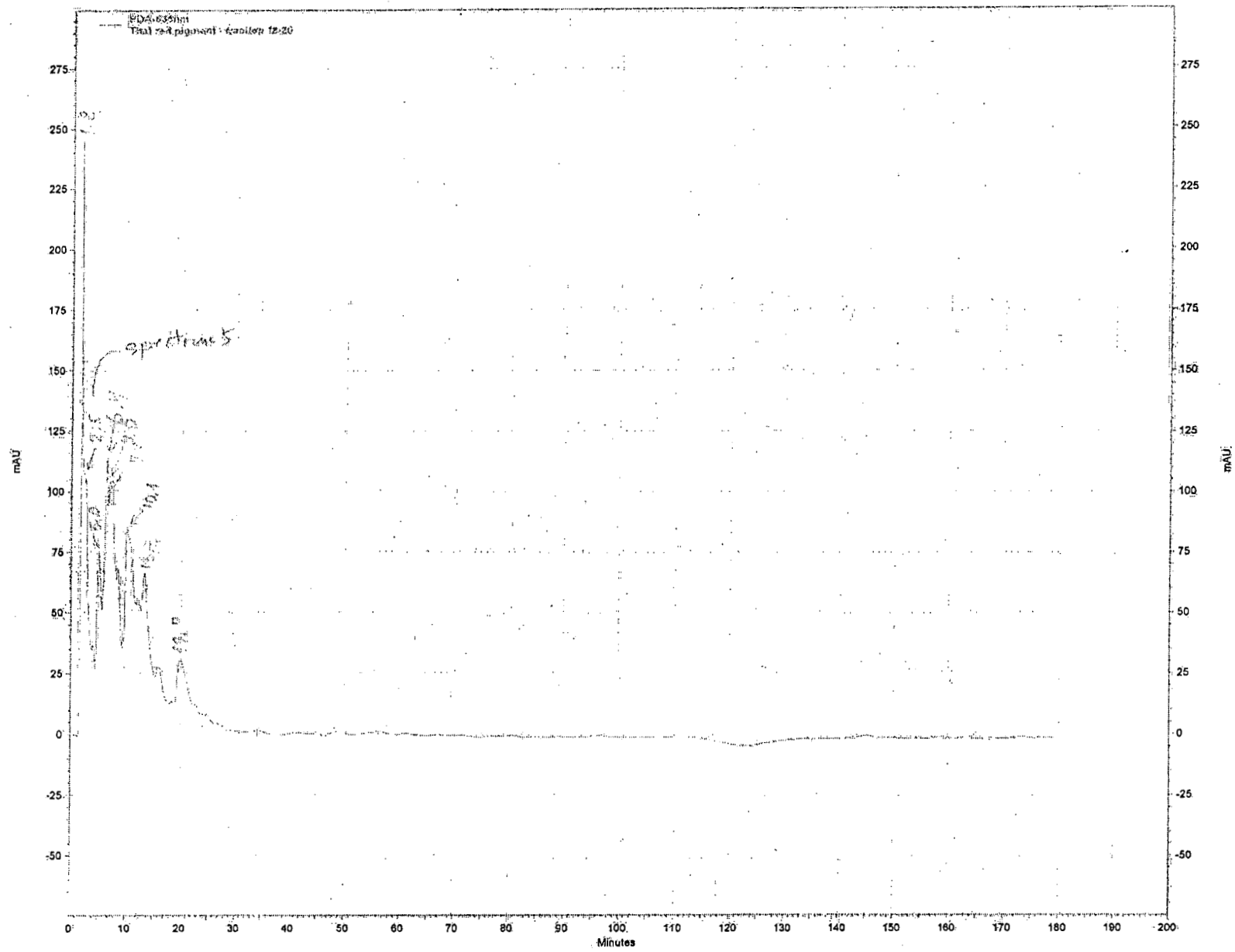
Spectrum 1



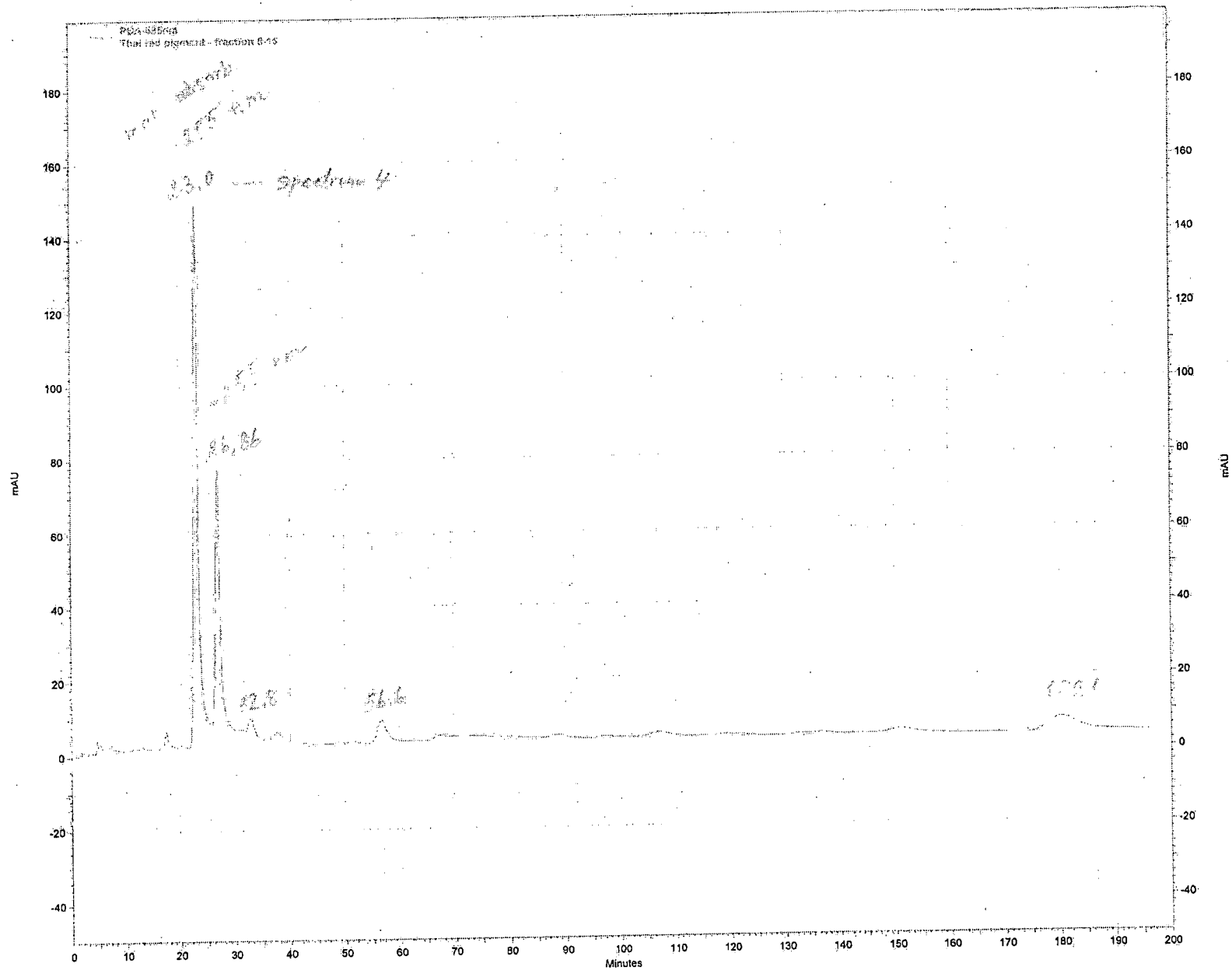
C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\shiseido\install\Prodigiosin\Thai red pigment\Thai red pigment - fraction 2-4.dat, 16.13 Min

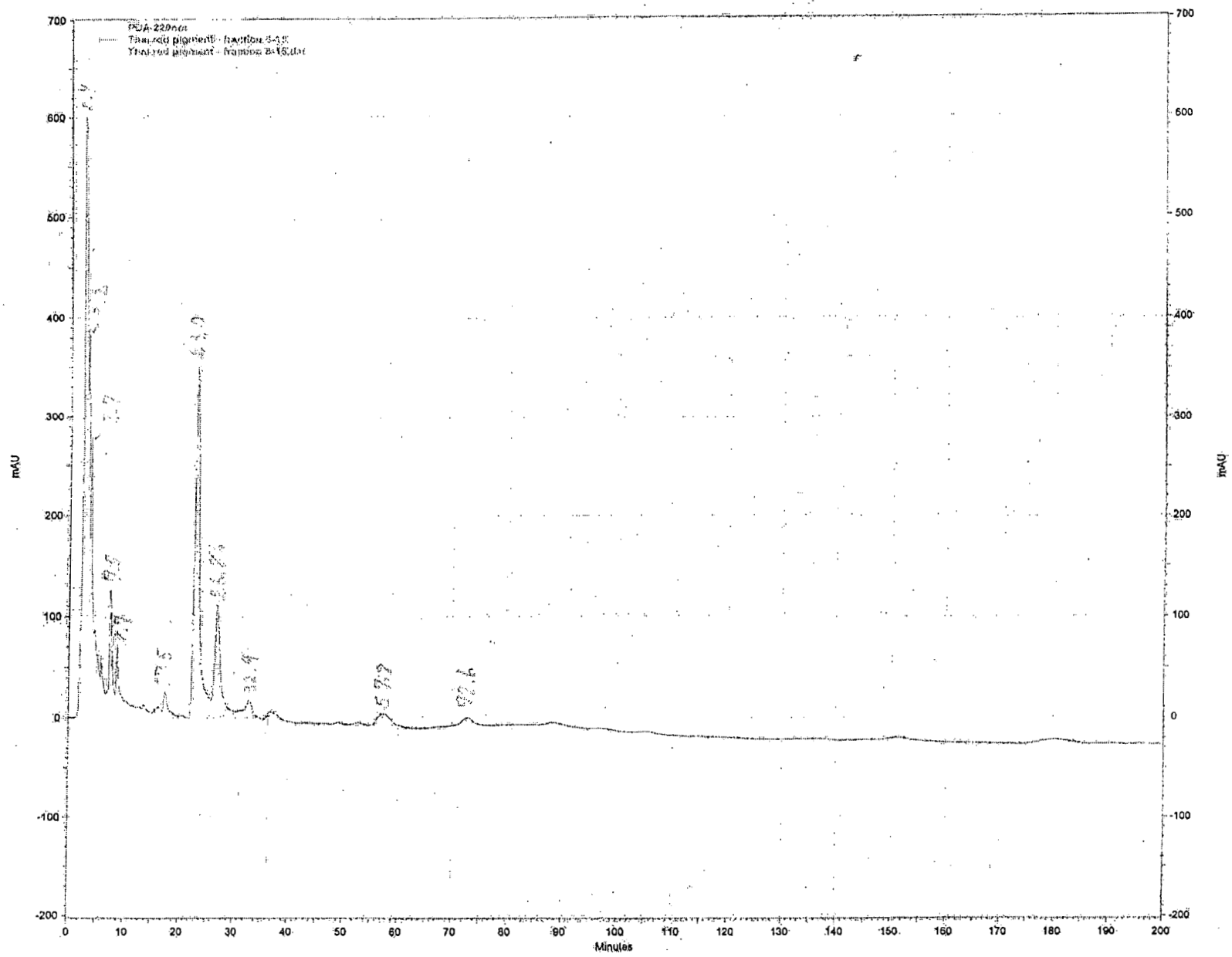


C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\shiseido\install\Prodigiosin\Thai red pigment\Thai red pigment - fraction 5-7.dat, PDA-220nm

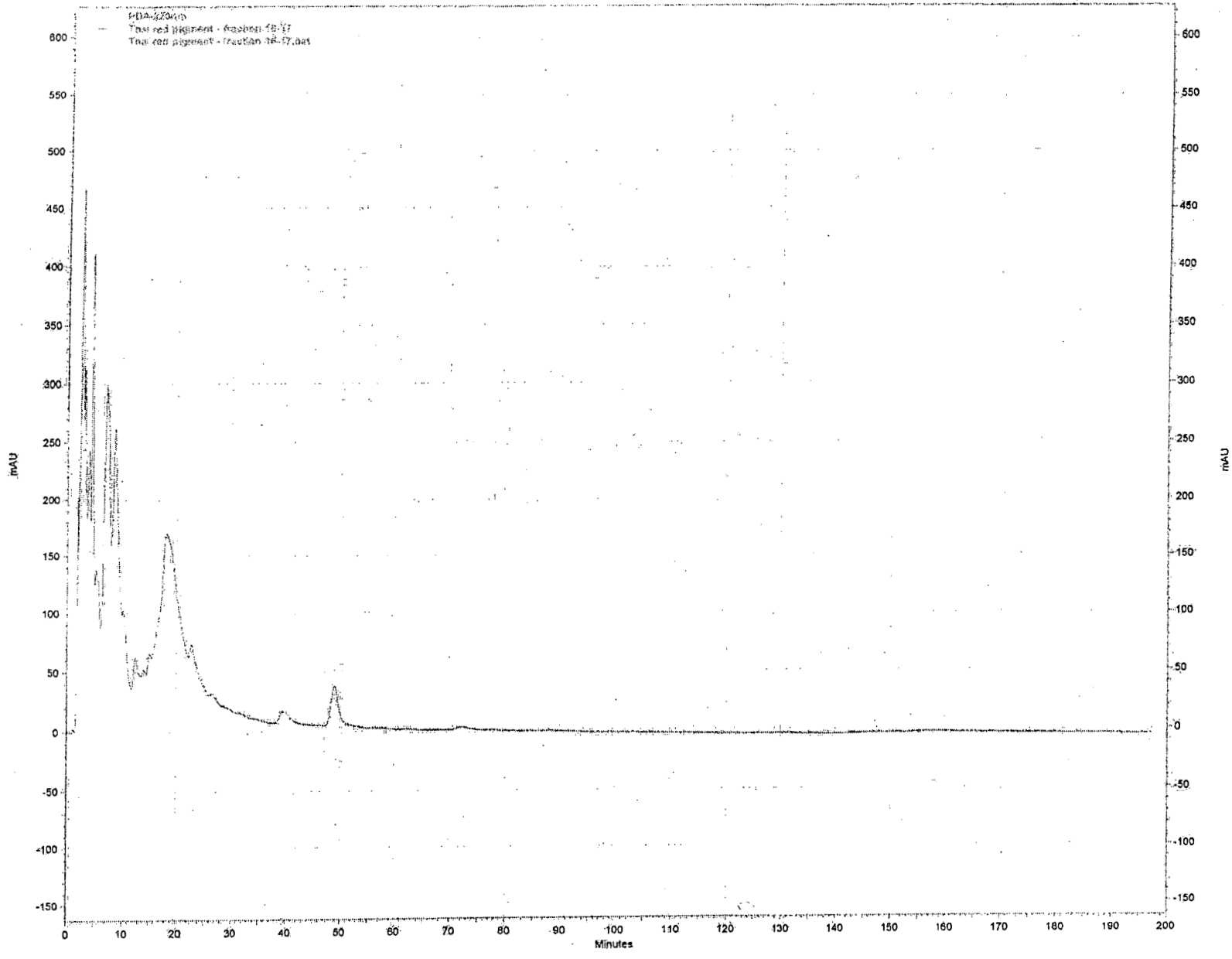


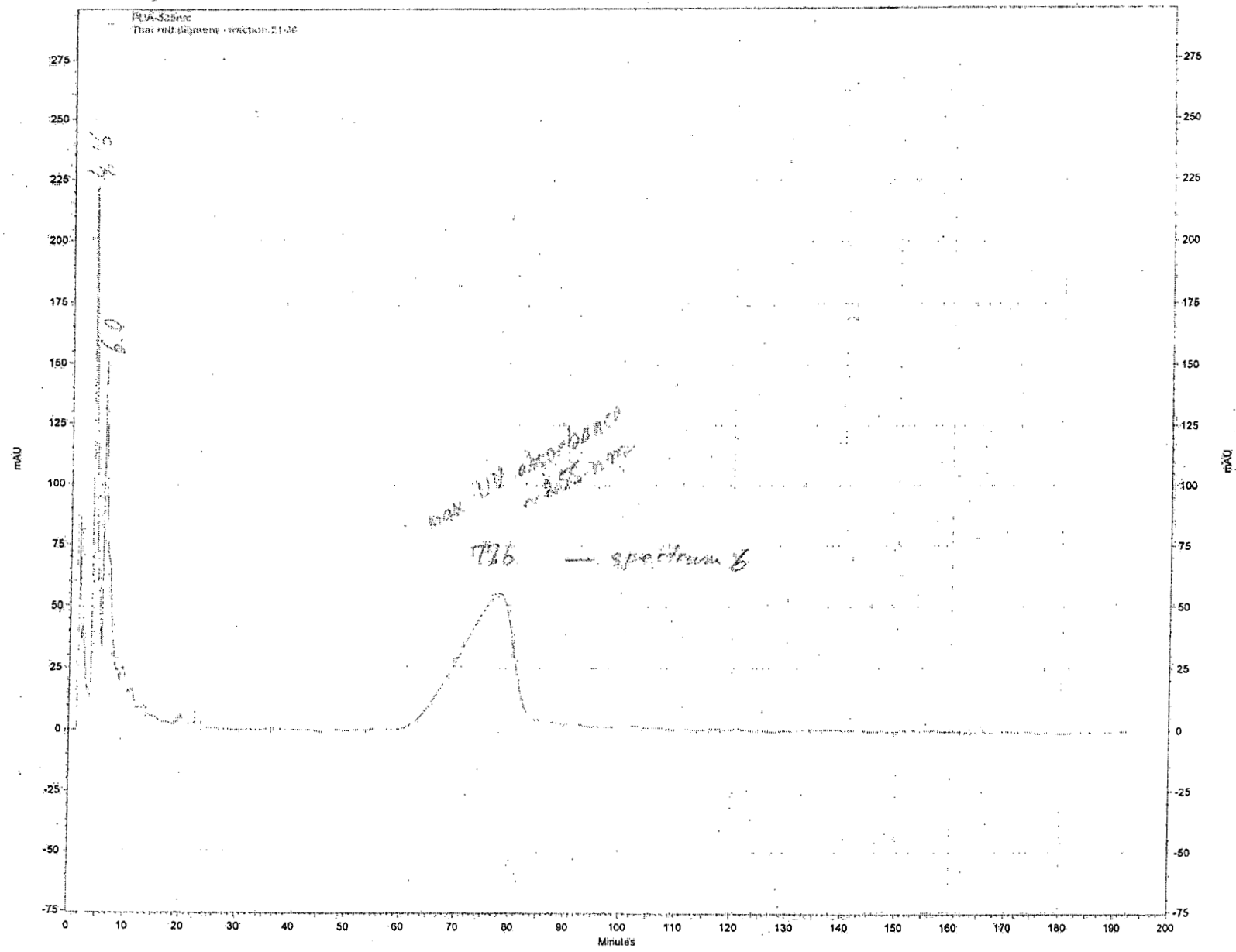
C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\shiseido\install\Prodigiosin\Thai red pigment\Thai red pigment - fraction 18-20.dat, PDA-535nm


PDA-535nm
Thai red pigment - fraction 8-15
mAU
Minutes
C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\shiseido\install\Prodigiosin\Thai red pigment\Thai red pigment - fraction 8-15.dat, PDA-535nm

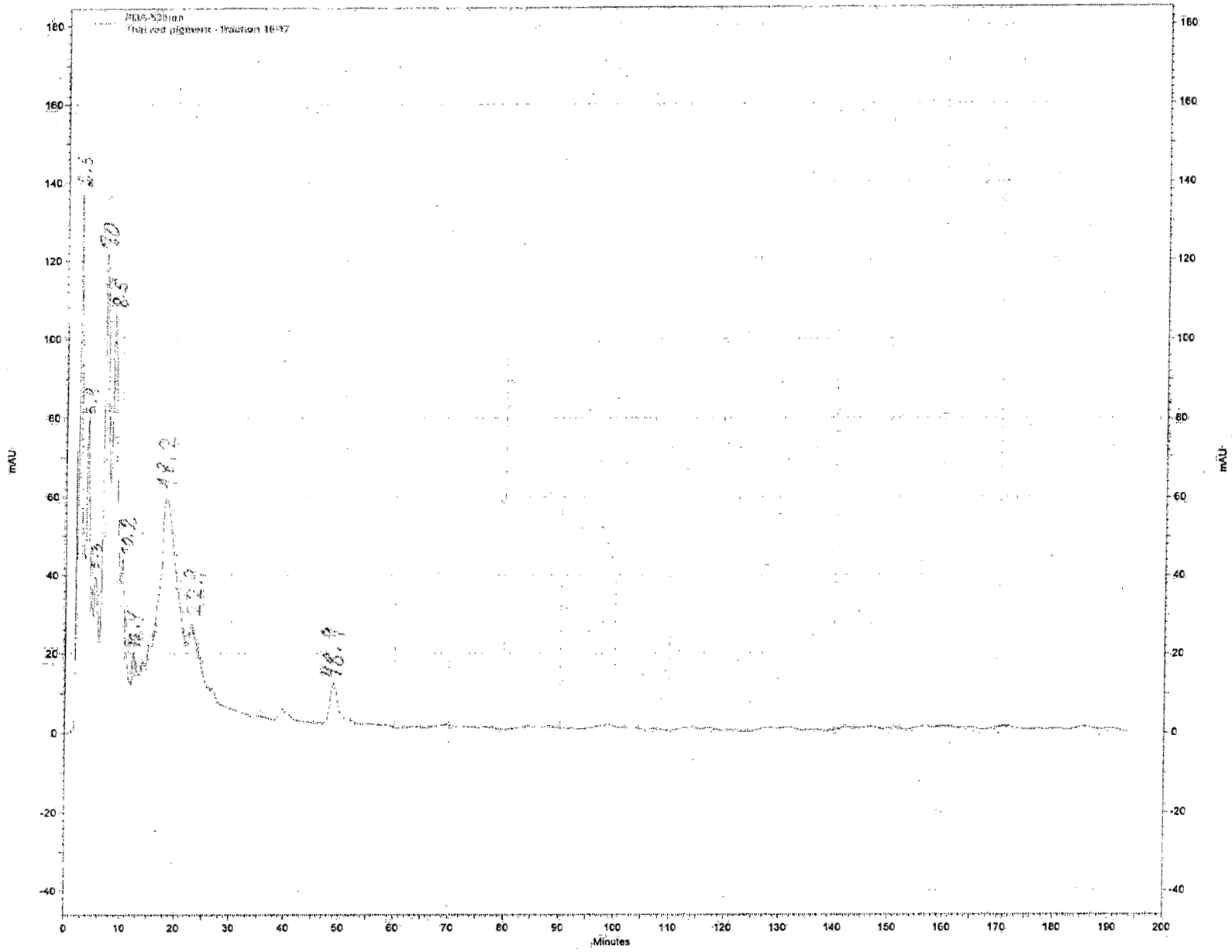


C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\shiseido\install\Prodigiosin\Thai red pigment\Thai red pigment - fraction 8-15.dat, PDA-220nm

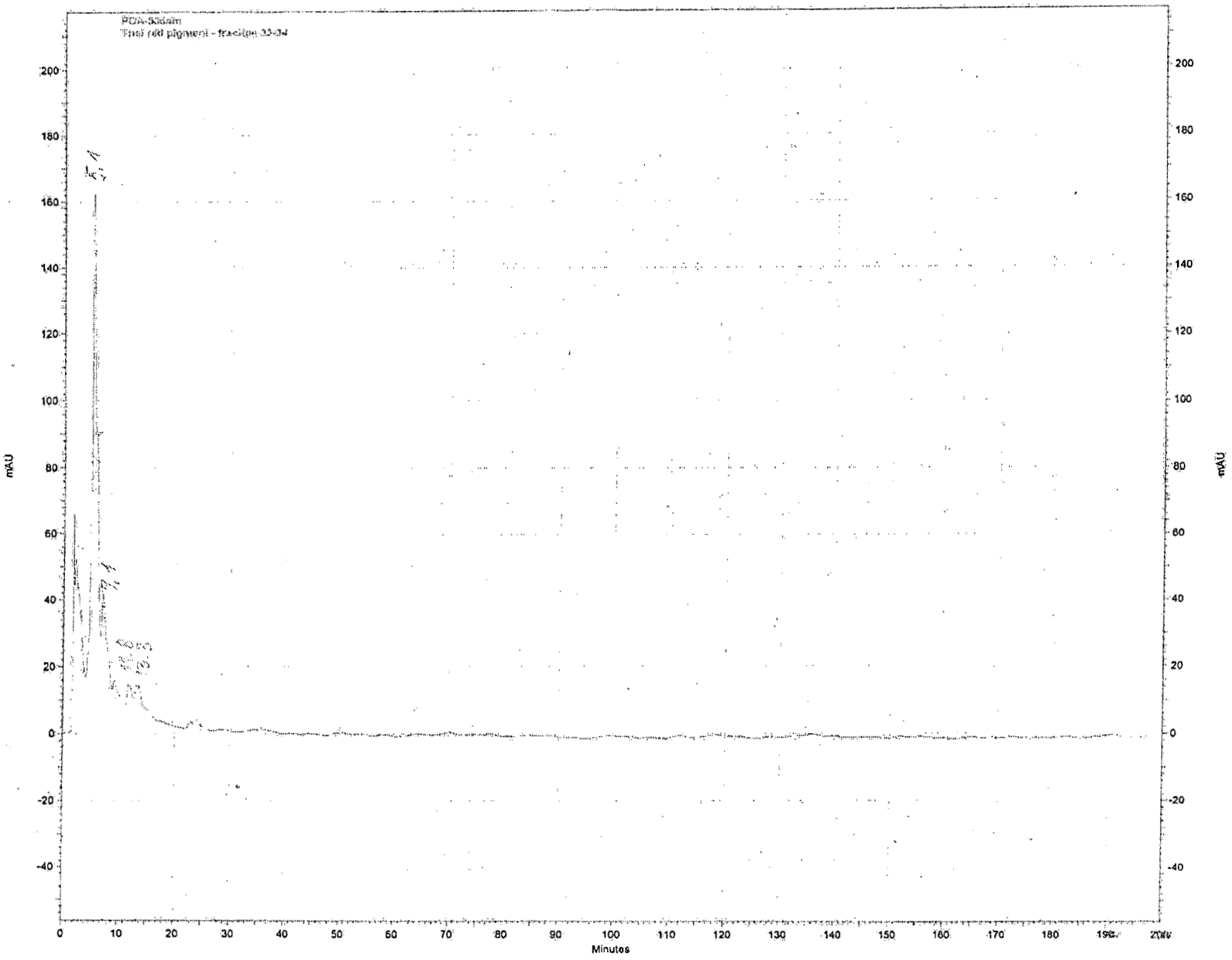

PDA-220nm
Thai red pigment - fraction 16-17
Thai red pigment - fraction 16-17.dat
mAU
Minutes
C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\shiseido\Install\Prodigiosin\Thai red pigment\Thai red pigment - fraction 16-17.dat, PDA-220nm



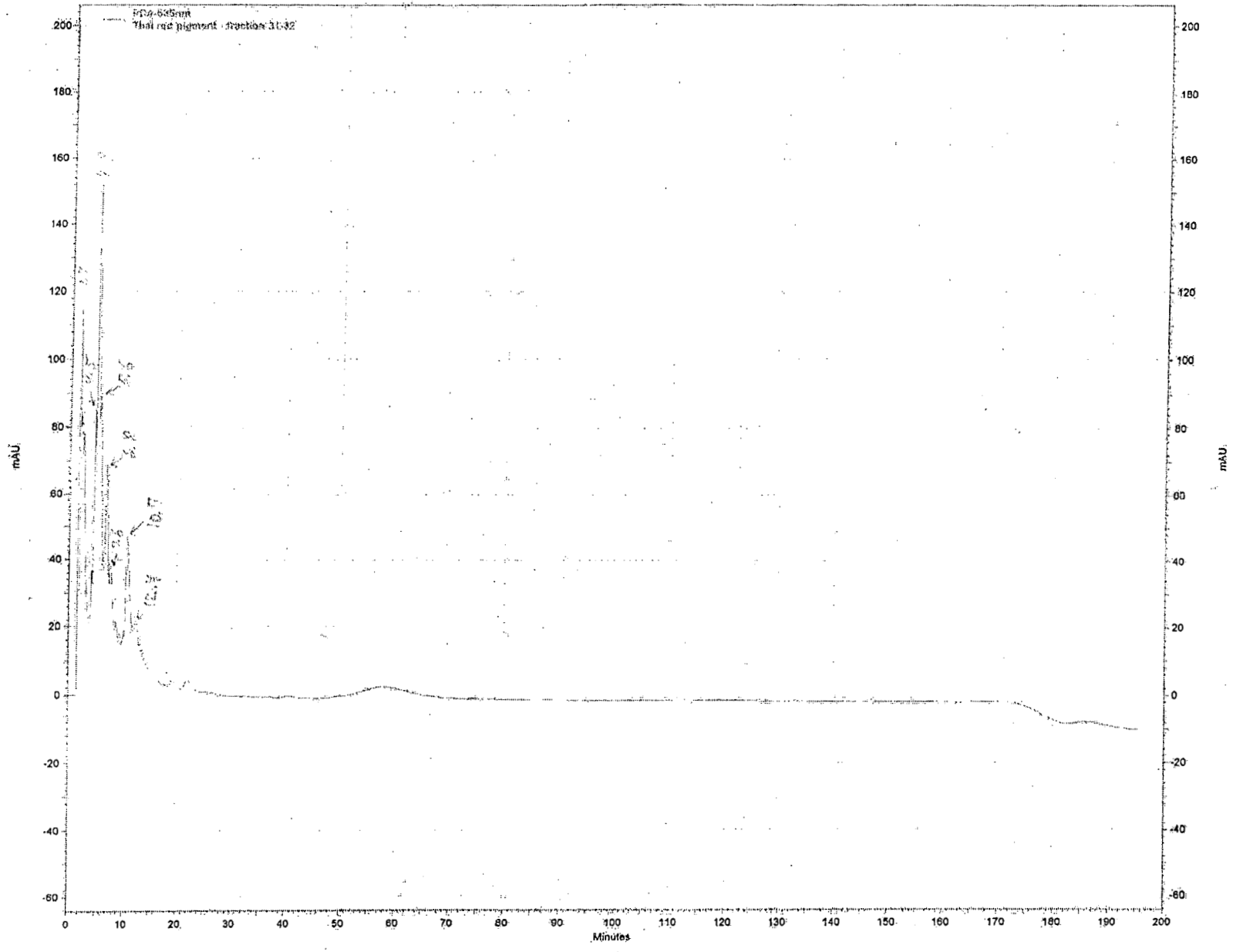
C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\shiseido\install\Prodigiosin\Thai red pigment\Thai red pigment - fraction 21-30.dat, PDA-535nm



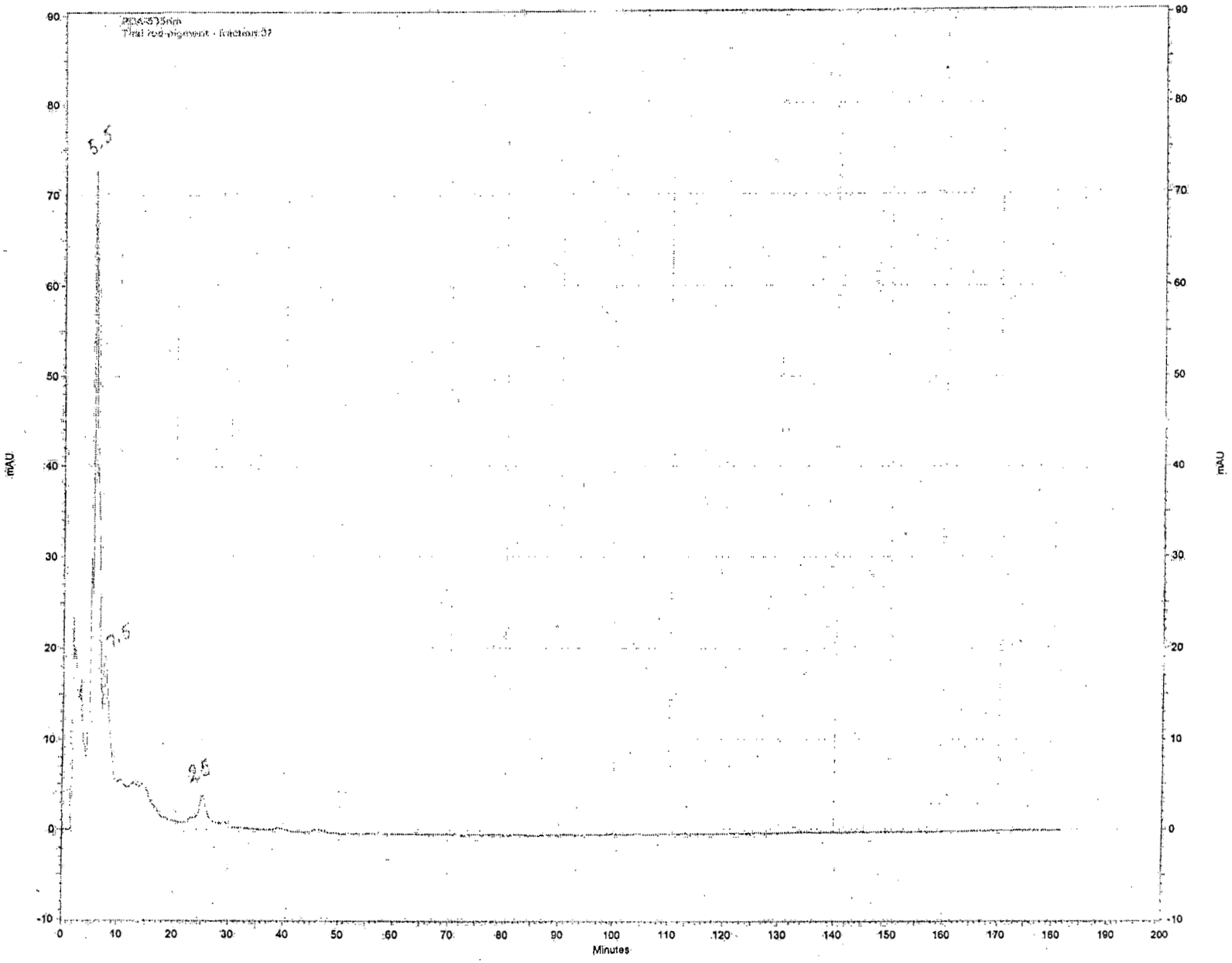
C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\shiseido\install\Prodigiosin\Thai red pigment\Thai red pigment - fraction 16-17.dat, PDA-535nm



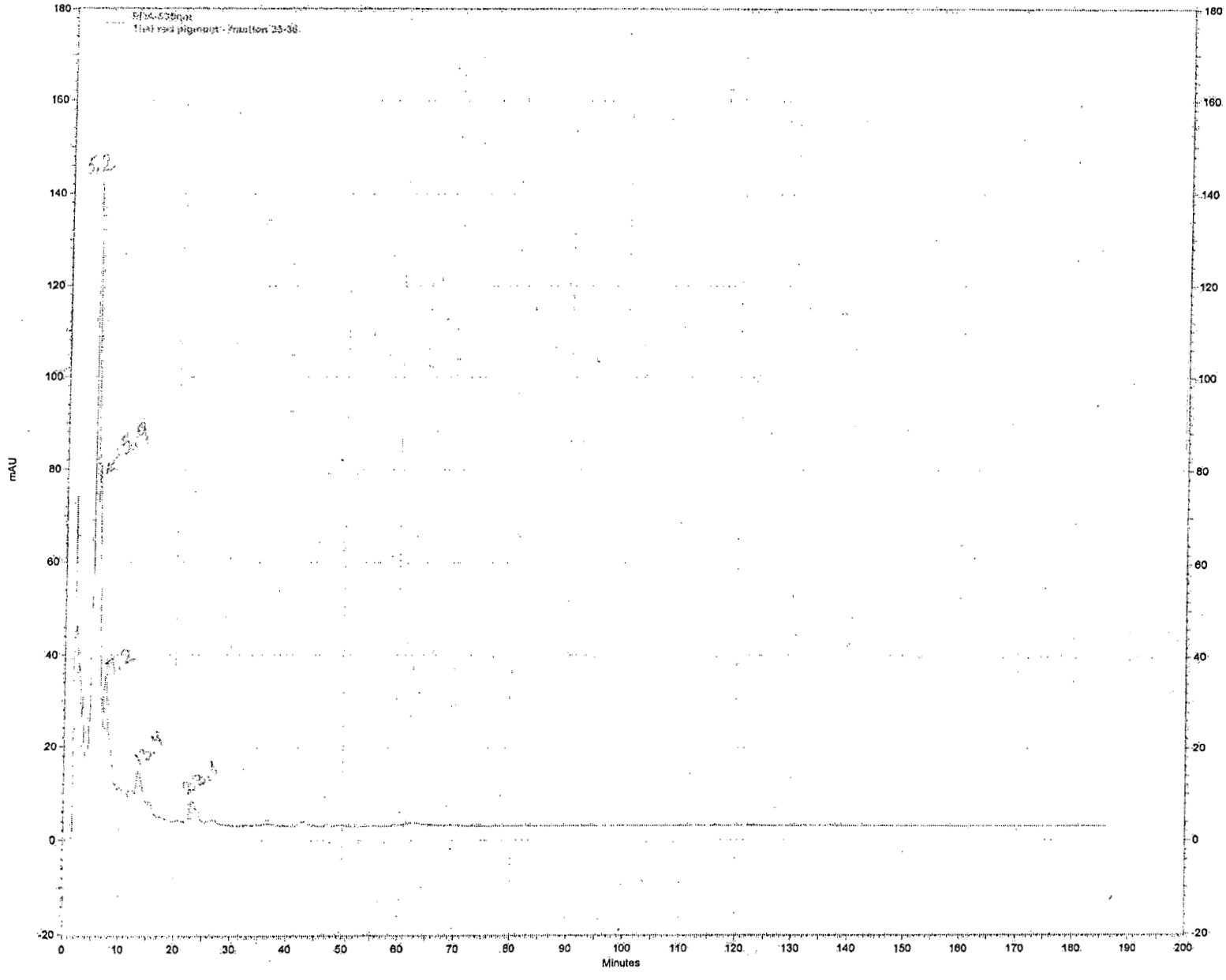
C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\shiseido\install\Prodigiosin\Thai red pigment\Thai red pigment - fraction 33-34.dat, PDA, 535nm



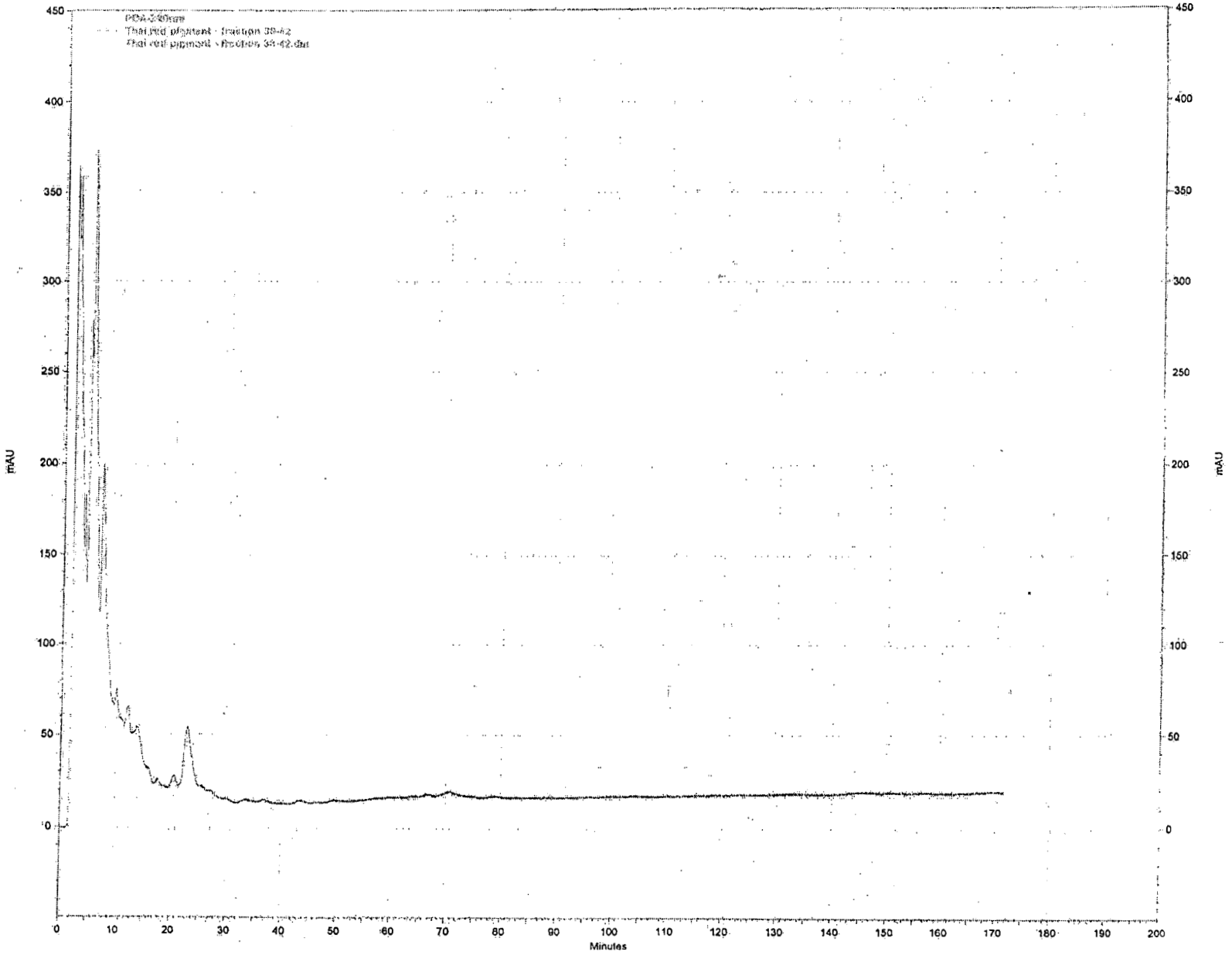
C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\shiseido\install\Prodigiosin\Thai red pigment\Thai red pigment - fraction 31-32.dat, PDA-535nm



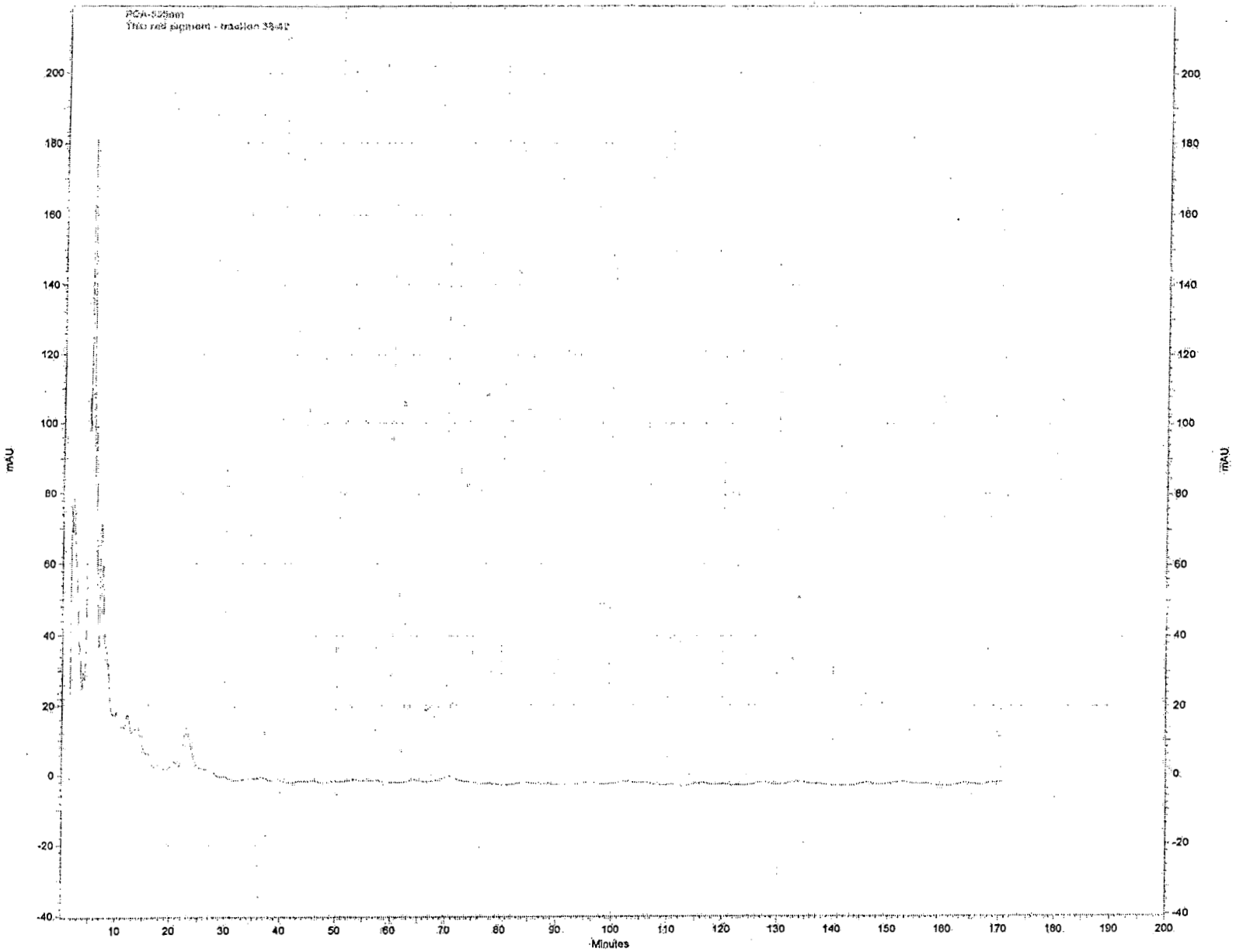
C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\shiseido\install\Prodigiosin\Thai red pigment\Thai red pigment - fraction 37.dat, PDA-535nm



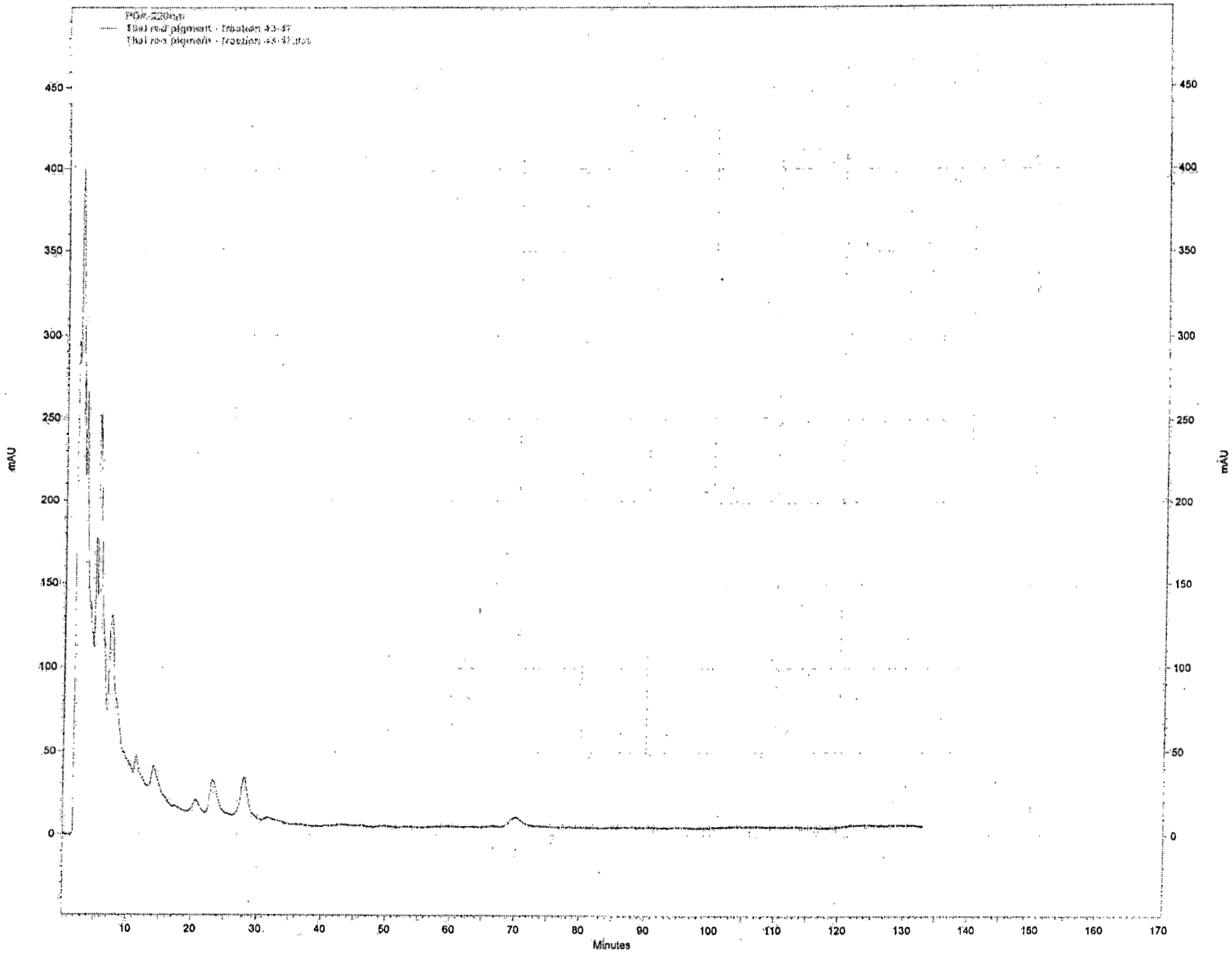
C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\shiseido\install\Prodigiosin\Thai red pigment\Thai red pigment - fraction 35-36.dat, PDA-535nm



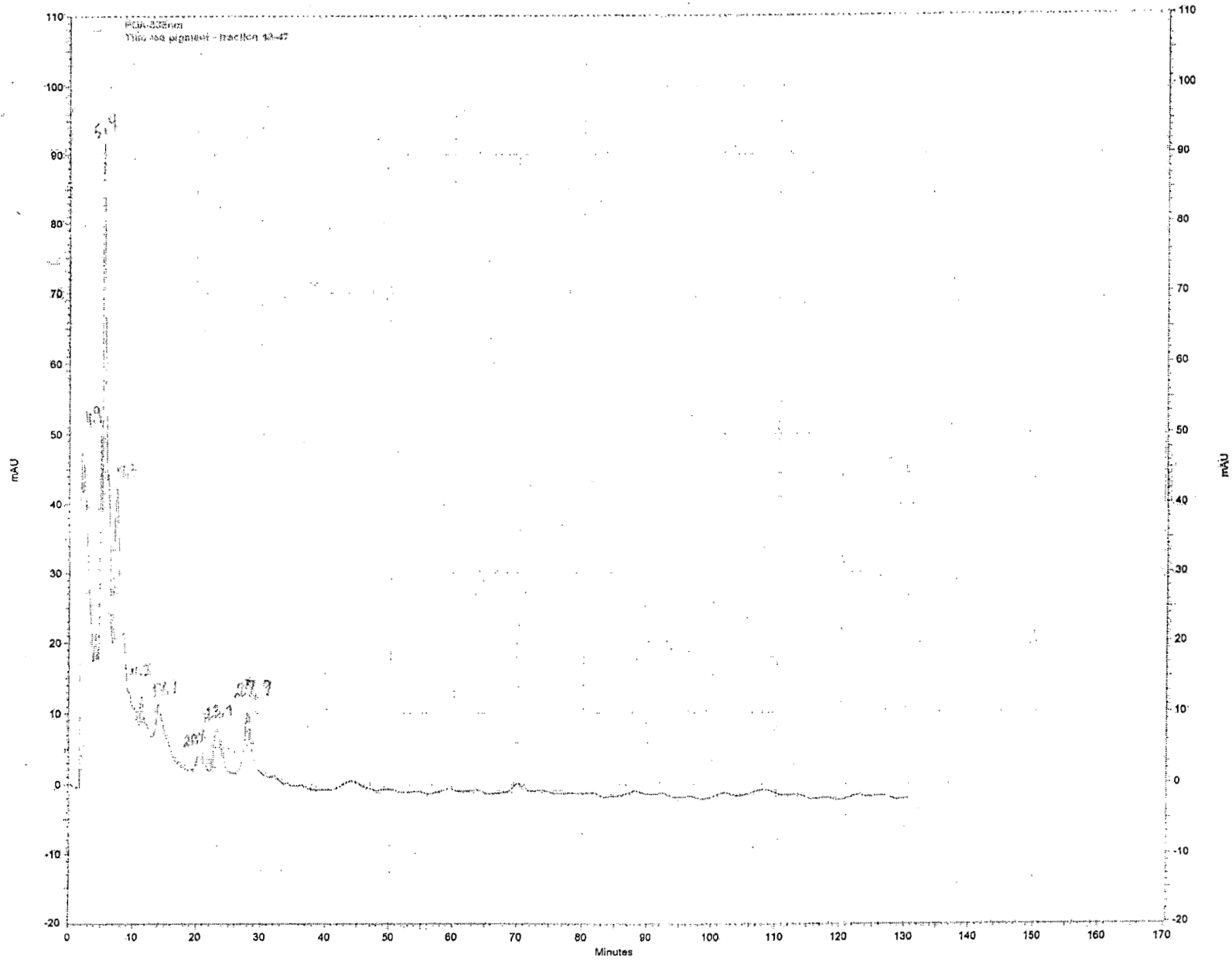
C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\shiseido\install\Prodigiosin\Thai red pigment\Thai red pigment - fraction 38-42.dat, PDA-220nm



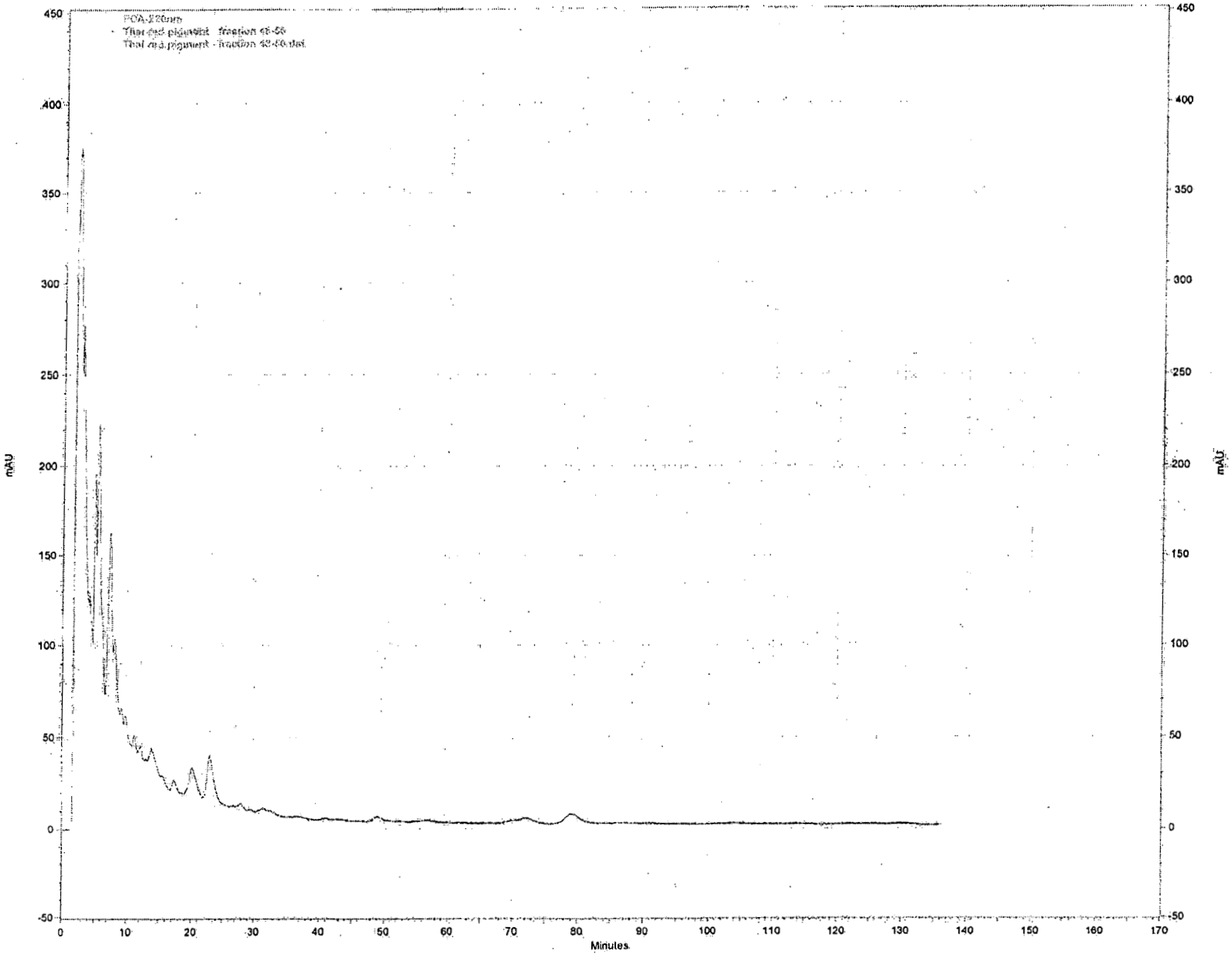
C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\shiseido\install\Prodigiosin\Thai red pigment\Thai red pigment - fraction 38-42.dat, PDA-535nm



C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\shiseido\install\Prodigiosin\Thai red pigment\Thai red pigment - fraction 43-47.dat, PDA-220nm



C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\shiseido\install\Prodigiosin\Thai red pigment\Thai red pigment - fraction 43-47.dat, PDA-535nm



C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\shiseido\install\Prodigiosin\Thai red pigment\Thai red pigment - fraction 48-56.dat, PDA-220nm