



# รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

## โครงการวิจัย

การค้นหารงควัตถุที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์ทะเล

Discovery of Bioactive Pigments from Marine Microorganisms

รวิวรรณ	วัฒนติลก
ปาริชาติ	นารีบุญ
สมรัฐ	ทวีเดช

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557

มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2557A10803046

สัญญาเลขที่ 144/2557

# รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

## โครงการวิจัย

การค้นหารงควัตถุที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์ทะเล

Discovery of Bioactive Pigments from Marine Microorganisms

รวิวรรณ วัฒนติลภ

ปาริชาติ นารีนุญ

สมรัฐ ทวีเดช

สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

กันยายน พ.ศ. 2558

## การค้นหารงควัตถุที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์ทะเล

รวิวรรณ วัฒนดิถก<sup>1</sup> สมรัฐ ทวีเดช<sup>1</sup> ปารีชาติ นารีบุญ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา อ. เมือง จ. ชลบุรี 20131

<sup>2</sup>คณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยรังสิต อ. เมืองปทุมธานี จ. ปทุมธานี 12000

### บทคัดย่อ

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตท ชั้นเซลล์และชั้นน้ำเลี้ยงจากแอคติโนมัยซีท 10 ไอโซเลท ที่แยกจากดินตะกอนป่าชายเลนในเขต จังหวัดชุมพร และ 3 ไอโซเลท แยกจากดินตะกอนชายฝั่งจังหวัดชลบุรี ระยองและจันทบุรี ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH) และเอบีทีเอส (ABTS) พบว่าสารสกัดจากชั้นน้ำเลี้ยงมีค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ( $IC_{50}$ ) ในช่วง  $133.07 \pm 4.0 - 313.3 \pm 7.2$  และ  $55.21 \pm 1.3 - 248.72 \pm 10.4$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยสารสกัดแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ CP-PH3-2 และ RY2-20 มีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุดมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $133.07 \pm 4.0$  และ  $158.59 \pm 0.39$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่แอคติโนมัยซีท 4 สายพันธุ์ ได้แก่ CP8-4B, CP-PH3-2, RY2-20 และ CP-PH3-22 แสดงฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ ABTS ที่รุนแรงโดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $55.21 \pm 1.3$ ,  $63.3 \pm 6.9$ ,  $66.12 \pm 5.4$  และ  $74.04 \pm 2.1$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์กับสารสกัดหยาบแอคติโนมัยซีท พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีท CP8-4A, CP8-4B, CH54-5 และ A1-3 แสดงฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ต่อเชื้อมาตรฐาน *Staphylococcus aureus* และ *Candida albicans* ที่น่าสนใจ ทำการแยกสารประกอบที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ จากเชื้อ A1-3 และ CH54-5 อยู่ในขั้นตอนการแปลโครงสร้าง

## Discovery of Bioactive Pigments from Marine Microorganisms

Rawiwan Watanadilok<sup>1</sup> Somrat Taweedes<sup>1</sup> Parichat Nareeboon<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Marine Science, Burapha University, Bangsaen, Chonburi 20131

<sup>2</sup>Rangsit University, Chemistry, Faculty of Science, Thailand 12000

---

### Abstract

The present study was carried out to investigate the antioxidant activity and antimicrobial activity of ethyl acetate crude extracts of thirteen actinomycete strains were isolated from soil samples collected at the coastal and mangrove stations in Chonburi, Rayong, Chantaburi and Chumporn provinces. All extracted samples were evaluated for antioxidant activities with TLC-DPPH, DPPH radical scavenging assay and ABTS radical scavenging assay. The results showed that the DPPH and ABTS radical scavenging activities of the extracellular extracts were observed with an IC<sub>50</sub> in a range of 133.07±4.0 to 313.3±7.2 µg/mL and 55.21±1.3 to 248.72±10.4 µg/mL, respectively. The strains CP-PH3-2 and RY2-20 showed the highest DPPH activity at IC<sub>50</sub> value of 133.07±4.0 and 158.59±0.39 µg/mL whereas four potent strains (CP8-4B, CP-PH3-2, RY2-20 and CP-PH3-22) exhibited the strongest ABTS activity with an IC<sub>50</sub> value of 55.21±1.3, 63.3±6.9, 66.12±5.4 and 74.04±2.1 µg/mL, respectively. On primary screening for antimicrobial activity, four strains including CP8-4A, CP8-4B, CH54-5 and A1-3 showed the activity against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. The bioactive compounds from A1-3 and CH54-5 are in proceed for purification and structure interpretation.

## กิตติกรรมประกาศ

รายงานวิจัยฉบับนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยบูรพา ประจำปี 2556 ผู้วิจัยใคร่ขอขอบพระคุณเป็นอย่างมาก และขอขอบคุณผู้บริหารและเจ้าหน้าที่สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล และเพื่อนๆที่ให้การสนับสนุน ความช่วยเหลือ และให้คำปรึกษา ทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัย

สิงหาคม 2557

## สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
บทนำ	1
การทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง	4
อุปกรณ์และวิธีการ	12
ผลและวิจารณ์ผล	18
สรุปผล	32
เอกสารอ้างอิง	33
ภาคผนวก	39

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า	
1	ศึกษาภาพของฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆของรงควัตถุจากจุลินทรีย์	10
2	ข้อมูลตัวอย่างแอคติโนมัยซีทและน้ำหนักรังสีสกัดหยาบ	20
3	ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH• และ ABTS ของ สารสกัดหยาบจาก แอคติโนมัยซีท	24
4	ผลการยับยั้งเชื้อมาตรฐานของสารสกัดเชื้อแอคติโนมัยซีท	29

## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 แสดงตำแหน่งจุดเก็บตัวอย่างดิน ก) จุดเก็บที่ 1 ข) จุดเก็บที่ 2 และ ค) จุดเก็บที่ 3	18
2 แสดงลักษณะการแยกชนิดสารสกัดหยาบและทดสอบฤทธิ์ด้วยเทคนิค TLC-DPPH เชื้อภาคตะวันออก	21
3 แสดงลักษณะการแยกชนิดสารสกัดหยาบ และทดสอบฤทธิ์ด้วยเทคนิค TLC-DPPH เชื้อ จ.ชุมพร C = สารสกัดชั้นเซล; M = สารสกัดชั้นน้ำเลี้ยง	22
4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูล DPPH กับความเข้มข้นสารสกัดหยาบของแอคติโนมัยซีทจากชั้นน้ำเลี้ยง (M)	23
5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูล ABTS กับความเข้มข้นสารสกัดหยาบของแอคติโนมัยซีทจากชั้นเซลล์ (C)	25
6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูล ABTS กับความเข้มข้นสารสกัดหยาบของแอคติโนมัยซีทจากชั้นน้ำเลี้ยง (M)	26
7 บริเวณยับยั้งของสารสกัดจากแอคติโนมัยซีท ต่อเชื้อ (ก) <i>Candida albicans</i> และ (ข) <i>Staphylococcus aureus</i> (ค) NV คือ Novobiocin และ (ง) P คือ Penicillin เป็น positive control	28
8 แสดงตำแหน่งของสารออกฤทธิ์ชีวภาพด้วยวิธี autobiography (ก) เชื้อ <i>C. albicans</i> (ข) เชื้อ <i>S. aureus</i>	30
9 แสดงตำแหน่งการแยกของสารประกอบบนแผ่น TLC	30
10 <sup>1</sup> H-NMR ของสารประกอบ A1-3M/1	31
11 <sup>13</sup> C-NMR ของสารประกอบ A1-3M/1	31



## บทนำ

แอกติโนมัยซีททะเลได้รับการจับตาว่าเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีศักยภาพ และงานวิจัยที่ทำก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์เหล่านี้เป็นแหล่งของสารทุติยภูมิที่อุดมสมบูรณ์ที่สุด นับจากการค้นพบสาร actinomycin ทำให้พบว่าแอกติโนมัยซีทสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ชีวภาพทางการค้าได้มากมาย ประมาณสองในสามของยาปฏิชีวนะที่ได้จากธรรมชาติถูกแยกมาจากแบคทีเรียเหล่านี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งจาก *Streptomyces* ซึ่งสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเหล่านี้ใช้เป็นสาร โครงสร้างนำ (lead structure) ในการพัฒนาเป็นยาชนิดใหม่ จุลชีววิทยาทางทะเลมีการพัฒนาอย่างมากในหลายประเทศโดยมุ่งเน้นไปที่สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ความต้องการยารักษาโรคร้ายแรงทั้งที่ยังไม่สามารถรักษาได้และโรคที่มีอาการคือยา โรคติดเชื้อต่างๆ รวมถึงยาปฏิชีวนะใหม่ๆยังคงเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง

ถึงจะประสบความสำเร็จในการค้นพบยาปฏิชีวนะและพัฒนาไปถึงกระบวนการผลิต แต่โรคติดเชื้อยังคงเป็นสาเหตุการตายเป็นอันดับสองของโลก ถึงแม้จะมียาหรือสารสังเคราะห์ของยาต้านจุลชีพ แต่ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติยังคงเป็นแหล่งที่อุดมสมบูรณ์ และมีประโยชน์สำหรับการพัฒนาเป็นยาต้านจุลินทรีย์ใหม่ๆ (Bull and Stach, 2007) จึงทำให้นักวิจัยเริ่มมองหาแหล่งของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติแหล่งใหม่ที่จะสามารถนำไปพัฒนาทำเป็นยารักษาโรคได้ พบว่าแบคทีเรียทะเลเป็นแหล่งที่มีศักยภาพ เนื่องจากแบคทีเรียพวกนี้ต้องแข่งขันกันเองภายใต้สภาวะที่รุนแรงต่างๆ เช่น ความเค็ม ออกซิเจน ความเป็นกรด อุณหภูมิ แร่ธาตุ พวกแอกติโนมัยซีทผลิตสารปฏิชีวนะชนิดต่างๆที่แตกต่างกัน สารประกอบที่ผลิตแสดงฤทธิ์ที่รุนแรงและเป็นที่น่าสนใจของนักวิจัย โดยที่สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเหล่านี้หลายตัวแสดงคุณสมบัติทางยาที่โดดเด่น

สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ออกฤทธิ์ชีวภาพประมาณ 32,500 ชนิด มาจากแหล่งจุลินทรีย์ (Antibase data base) ซึ่งรวมถึงสารที่ได้จากจุลินทรีย์ทะเลด้วย (Singh and Pelaez, 2008) และมีสารต้านจุลชีพหลายตัวได้มาจาก marine actinomycetes (Batzl, 2008) ในปัจจุบันสองในสามของยาปฏิชีวนะจากธรรมชาติได้มาจาก actinomycetes ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นแหล่งทางเลือกของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆอีกด้วย (Behal, 2003) แอกติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียแกรมบวกมีลักษณะเป็นเส้นสาย พบมีการแพร่กระจายอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะในดิน ปุ๋ยหมัก น้ำโคลนตม และบริเวณรากพืช มีความสามารถในการผลิตสารเมตาบอไลต์ได้หลายชนิด เช่น สารสี วิตามิน และผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดี โดยเฉพาะฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ แอกติโนมัยซีทมีวงจรชีวิตที่ซับซ้อนอยู่ในไฟลัม *Actinobacteria* แอกติโนมัยซีททะเลเป็นแหล่งผู้ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ๆ โดยเฉพาะในกลุ่ม *Streptomyces* spp. ที่ผลิตสารต้านจุลชีพมากถึงร้อยละ 85 ประมาณ 10,000 ของยาปฏิชีวนะที่ผลิตจากเชื้อกลุ่มนี้ (Lazzarini *et al.*, 2000) โดยเริ่มจากการค้นพบ

streptothricin จาก *Streptomyces* ในปี ค.ศ.1942 อีกสองปีต่อมาค้นพบ streptomycin นอกจากนี้ยังพบ natamycin หรือที่รู้จักในชื่อ pimaricin เป็นยาปฏิชีวนะพวก polyene macrolide ที่ได้จากเชื้อ *S. natalensis*, *S. chattanoogensis*, และ *S. lydicus* (Aparicio *et al.*, 2003) ความสำคัญของยาปฏิชีวนะชนิดนี้อยู่ที่ออกฤทธิ์ได้ต้านเชื้อจุลินทรีย์หลากหลายสายพันธุ์และมีความเป็นพิษต่ำกับเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Fisher *et al.*, 1978) Natamycin ถูกใช้ในการรักษาเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา keratitis (Malecha, 2004) มันมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Candida*, *Aspergillus*, *Cephalosporium*, *Fusarium* และ *Penicillium* (Prajna *et al.*, 2002) ยังพบมีการค้นพบสารออกฤทธิ์ตัวใหม่ๆ เช่น สารต้านเชื้อรา สารต้านไวรัส และยาปฏิชีวนะ อยู่จนถึงปัจจุบัน

แอคติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียที่มีศักยภาพภาพในการสร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่หลากหลายชนิดนอกจากสารปฏิชีวนะแล้ว ยังรวมถึงสามารถผลิตสารสีที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Pseudoalteromonas*, *Bacillus*, *Vibrio*, และ *Cytophaga* ซึ่งแยกได้จากดินตะกอน น้ำทะเล สาหร่าย และสัตว์ทะเล ซึ่งสารรงควัตถุที่ถูกสร้างมีหลายกลุ่ม ได้แก่ อนุพันธ์ของ indole (quinones และ violacein), alkaloids (prodiginines และ tambjamins), polyenes, macrolides, peptides และ terpenoids แอคติโนมัยซีทเป็นกลุ่มหนึ่งที่เป็นผู้ผลิตสารทุติภูมิที่มีประสิทธิภาพที่สุด และยังมีความสำคัญในอุตสาหกรรมด้วย จากแอคติโนมัยซีทหลายๆชนิดพบว่า *Streptomyces*, *Saccharopolyspora*, *Amycolatopsis*, *Micromonospora* และ *Actinoplanes* เป็นผู้ผลิตหลักของสาร biomolecule ที่สำคัญทางการค้า หลายๆรายงานพบว่าสารต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรามาจาก marine actinomycetes ทั้งที่อยู่ในดินตะกอนและที่อาศัยร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ เช่น ฟองน้ำทะเล (Dharmaraj & Sumantha, 2009) และสารที่ได้จากกลุ่ม Streptomyces ถูกนำไปใช้ในการรักษา มะเร็ง เช่น anthracyclines (aclerubicin, daunomycin และ doxorubicin), peptides (bleomycin และ actinomycin D), aureolic acids (mithramycin), enediynes (neocarzinostatin), antimetabolites (pentostatin), carzinophilin, mitomycins (Olano *et al.*, 2009) เชื้อแอคติโนมัยซีทหลายสายพันธุ์มีรายงานว่ามิฤทธิ์เป็น antioxidant ที่ดี สารต้านอนุมูลอิสระเป็นสารที่อาจมาจากอาหารหรือจากการสังเคราะห์ทางเคมีจำเป็นต้องคำนึงถึงความปลอดภัยในการนำไปใช้ เนื่องจากมักมีความเป็นพิษ ดังนั้นความต้องการสารต้านอนุมูลอิสระที่มาจากธรรมชาติ ที่มีความปลอดภัยและไม่เป็นพิษจึงมีเพิ่มมากขึ้น การศึกษาในปัจจุบันกำลังให้ความสนใจกับระบบการต้านอนุมูลอิสระของแบคทีเรีย ซึ่งมีความสำคัญทางเทคโนโลยีชีวภาพ มีรายงานของสารประกอบ 2 ชนิดที่แยกจากเชื้อ *Streptomyces* (2-allyloxyphenol และ streptopyrolidine) ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและไม่มีความเป็นพิษ (Shin, *et al.*, 2008; Arumugam, *et al.*, 2010)

อย่างไรก็ตามสารรงควัตถุที่ได้จากแอคติโนมัยซีททะเลในประเทศไทยยังมีรายงานอยู่ในจำนวนไม่มากนัก และจากการที่แบคทีเรียจะผลิตสารมาเพื่อความอยู่รอดและป้องกันตัวเองในแต่

ละสภาวะนั้น ทำให้คณะผู้วิจัยสนใจทำการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียที่แยกจากดินตะกอนป่าชายเลน ซึ่งอยู่ในเขตที่นับว่ามีความอุดมสมบูรณ์ของแหล่งทรัพยากร

### วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยในปีที่ 2

1. เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของสารสกัดจากเชื้อแบคทีเรียทะเล
2. เพื่อค้นหารงควัตถุที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพของแบคทีเรียทะเลที่เก็บจากอ่าวไทย และดินป่าชายเลน โดยรวมถึงการแยกสารสีให้บริสุทธิ์ และการแปลโครงสร้างสารประกอบ
3. เพื่อประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพของรงควัตถุที่แยกได้จากแบคทีเรียทะเล
4. เพื่อถ่ายทอดความรู้ในการศึกษาด้านรงควัตถุที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียทะเล

### ขอบเขตของโครงการวิจัย

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหาสารรงควัตถุที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดของแบคทีเรียทะเล โดยใช้เทคนิคทางเคมีและชีวเคมี

1. ตัวอย่างเชื้อแอคติโนมัยซีท ที่จะทำการศึกษาจะมุ่งเน้นที่คัดแยกจากดินตะกอนป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทยตอนกลาง ได้แก่ จังหวัดชุมพร และสุราษฎร์ธานี รวมถึงบริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทยฝั่งตะวันออกหรือดินป่าชายเลน
2. ตัวอย่างเชื้อแอคติโนมัยซีท ที่จะทำการศึกษาในโครงการนี้ประมาณ 5-10 ตัวอย่าง
3. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยซีท จะทำการทดสอบทางด้าน antimicrobial และ antioxidation activities
4. การแยกสารให้บริสุทธิ์จะใช้วิธี recrystallization หรือวิธีทางโครมาโตกราฟีต่างๆ เช่น Column Chromatography, Preparative Thin Layer Chromatography (PTLC) และ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) คั่วย
5. การแปลโครงสร้างของสารประกอบที่แยกได้จะวิเคราะห์ข้อมูลทาง spectroscopy ได้แก่ UV-Vis, 1D-NMR และ 2D-NMR, Mass Spectrometry (EIMS/HRMS) และ X-Ray Crystallography

### กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

แบคทีเรียสามารถผลิตรงควัตถุได้หลากหลาย ซึ่งรวมถึงแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในทะเลด้วย รงควัตถุนี้มีความสำคัญต่อสรีรวิทยาของเซลล์และการอยู่รอด สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเหล่านี้หลายตัวพบว่ามีคุณสมบัติเป็นยาต้านจุลชีพ ต้านมะเร็งและกดภูมิคุ้มกัน (immunosuppressive) ส่วนใหญ่ จุลินทรีย์ผลิตสารทุติยภูมิผ่านกลไก quorum sensing ซึ่งสารรงควัตถุเหล่านี้สามารถยับยั้งหรือฆ่าเชื้อแบคทีเรียและจุลินทรีย์อื่นๆ ได้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำๆ จากความหลากหลายของสารเหล่านี้ และยังมีแนวโน้มที่ดีในการออกฤทธิ์ยับยั้งโรคต่างๆ ได้หลายโรค จึงมีบทบาทสำคัญทั้งในงานวิจัย

ทางการแพทย์และทางการเกษตร มันยังคงมีความไม่แน่นอนว่าทำไมสารรงควัตถุจากแบคทีเรียจึงมีฤทธิ์ต้านจุลชีพ และหรือต้านเซลล์มะเร็ง ถึงแม้ว่าบทบาททางสรีระที่แท้จริงยังไม่ถูกค้นพบ

จากข้อมูลที่ผ่านมาได้มีการกล่าวถึงหน้าที่ทางชีววิทยาสำหรับการผลิตรงควัตถุของแบคทีเรียที่เป็นไปได้ โดยที่แบคทีเรียที่แยกจากทะเลที่ผลิตรงควัตถุเหมือนจะมีบทบาทสำคัญๆ 2 ประการ 1) พวกเขาผลิตสีเพื่อปรับตัวให้เข้ากับสภาวะแวดล้อม และ 2) เพื่อป้องกันตัวจากผู้ล่าอื่นๆ (Bhatnagar and Kim, 2010) เช่น รงควัตถุที่เป็นสีน้ำตาลของสารเมลานิน (melanin) ที่ผลิตโดยแบคทีเรียในหลายๆชนิด เช่นเดียวกับรงควัตถุสีเหลืองเขียวของ scytonemin ที่แยกได้จาก cyanobacteria เหล่านี้เพื่อปกป้องเซลล์จากรังสี UV และป้องกันไม่ให้ผิวแห้ง (Margalith, 1992 ; Stevenson, *et al.*, 2002) ดังนั้นเพื่อปรับตัวต่อแสงแดดที่มากเกินไป และเพื่อความอยู่รอดภายใต้อันตรายจากรังสี แบคทีเรียจะต้องผลิตสารประกอบเหล่านี้ที่ขาดไม่ได้ ในปี ค.ศ. 1955 Griffiths *et al.* พบว่าคาโรทีนอยด์เป็นส่วนประกอบสำคัญของชั้นเมมเบรนของจุลินทรีย์ และอาจจะปกป้องเซลล์ของแบคทีเรียจากการเกิด photo-oxidation หรือความเสียหายที่เกิดจากรังสีอัลตราไวโอเล็ต จากที่กล่าวมาข้างต้นถึงการปรับตัวและต้องอดทนในสภาวะต่างๆของแบคทีเรียทำให้สามารถแสดงคุณสมบัติต่างๆมากมาย จากการที่แบคทีเรียทะเล (ทั้งแบบ free-living และ symbiotic) สามารถผลิตรงควัตถุและสารเคมีที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกันออกไปตามปัจจัยต่างๆทางสภาวะแวดล้อมและแหล่งที่อยู่ที่แตกต่างกัน

## การทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง

### ลักษณะโดยทั่วไปของแอกติโนมัยซีท (Actinomycete)

แอกติโนมัยซีทเป็นกลุ่มของจุลินทรีย์เซลล์เดียวเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ที่มีปริมาณเบสกวานีน (guanine) และไซโตซีน (cytosine) ในสารพันธุกรรมสูงกว่า 55 % (ประมาณ 55-78%) ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต มีเส้นใยคล้ายราสามารถสร้างเส้นใย (hyphae) เป็นสายยาว หรือเส้นสายที่แตกแขนงมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ และมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับแบคทีเรียทั้งขนาดและรูปร่าง มีเซลล์แบบ prokaryotes (ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส) อัตราการเจริญของแอกติโนมัยซีทจะช้ากว่าแบคทีเรียและเชื้อรา (Waksman, *et al.*, 1967) แอกติโนมัยซีทพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ในดิน น้ำ อากาศ อาหาร และในพืช แหล่งที่พบมาก ได้แก่ บริเวณที่มีการสะสมสารอินทรีย์ เช่น ดินที่เพาะปลูก วัตถุเน่าเปื่อย โคลน ตะกอนในแม่น้ำ ใต้ทะเล ดินบริเวณน้ำพุร้อน หรือป่าชายเลน แอกติโนมัยซีทจะพบมากในดินชั้นบนและลดจำนวนลงในชั้นดินที่ลึกลง พบแอกติโนมัยซีทในดินที่มีสภาวะค่อนข้างเป็นกลาง หรือเป็นกรด-ด่าง ระหว่าง 6.5-8.0 (Holt *et al.*, 1994)

แอกติโนมัยซีทจัดอยู่ในอันดับ (Order) *Actinomycetales* ซึ่งประกอบด้วย 8 วงศ์ ได้แก่ *Actinomycetaceae*, *Mycobacteriaceae*, *Frankiaceae*, *Actinoplanaceae*, *Dermatophilaceae*, *Nocardiaceae*, *Streptomyetaceae* และ *Micromonosporaceae* ซึ่งส่วนใหญ่สามารถสร้างได้ทั้งเส้น

ใยอาหาร (substrate mycelium) และเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) หรืออาจพบเฉพาะเส้นใยอาหารมีลักษณะพอมบางยาวแตกกิ่งก้านสาขา ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะในวงศ์ *Streptomycetaceae* โคลินีของแอกติโนมัยซีทมีลักษณะที่แตกต่างจากโคลินีของแบคทีเรียอื่นๆ คือ มีลักษณะทึบแสง ลักษณะของโคลินีอาจจะมีแบบยกตัวขึ้น (raised) หรือแบนเรียบ เส้นใยเหนือผิวอาหารแห้งและมีลักษณะเป็นผง เมื่อมองด้วยตาเปล่าสามารถสังเกตเห็นได้ชัดเจน หรือผิวโคลินีอาจเรียบคล้ายหนังสัตว์ หรืออาจเป็นรอยขุ่นเป็นเส้นใยสั้นๆ สังเกตด้วยตาเปล่าคล้ายกำมะยี่ สีของโคลินีมีตั้งแต่สีขาว เหลือง ส้ม แดง กุหลาบ แดง ม่วง น้ำเงิน เขียว น้ำตาล และดำ (รัตนภรณ์ ศรีวิบูลย์, 2549) ขนาดของโคลินีขึ้นอยู่กับสปีชีส์ อายุ และสภาวะการเจริญเติบโต สามารถพบแอกติโนมัยซีทในดินซึ่งประมาณว่าในดินที่อุดมสมบูรณ์ 1 กรัม สามารถพบแอกติโนมัยซีทได้มากกว่า 1 ล้านเซลล์ โดยมันสามารถมีชีวิตอยู่ได้ด้วยการใช้สารอินทรีย์เพียงเล็กน้อยที่มีอยู่ในดินนั้น สมาชิกในกลุ่มแอกติโนมัยซีทที่มีจำนวนมากที่สุดคือ *Streptomyces* ประมาณ 70-90% รองลงมาคือ *Nocardia* ประมาณ 10-30% และ *Micromonospora* ประมาณ 1-15% แอกติโนมัยซีทเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส พบว่าส่วนใหญ่เป็นพวก saprophyte สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 25-40 องศาเซลเซียส (Alexander, 1977) ปัจจัยที่มีผลต่อการควบคุมปริมาณของแอกติโนมัยซีท คือ สภาพและปริมาณอินทรีย์วัตถุ ความเป็นกรด ด่าง และระดับความชื้นอุณหภูมิ (Porter, 1971) แอกติโนมัยซีทผลิตสารปฏิชีวนะมากมาย สารเหล่านี้ได้ถูกนำมาใช้ในทางการแพทย์อย่างกว้างขวาง เนื่องจากเป็นสารประกอบที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ มีความเป็นพิษน้อย ย่อยสลายได้ง่ายกว่า และราคาถูกกว่าสารประกอบที่สร้างขึ้นจากปฏิกิริยาเคมี

### ลักษณะทั่วไปของเชื้อ *Streptomyces* spp.

เชื้อ *Streptomyces* spp. เป็นเชื้อแบคทีเรียจัดอยู่ใน phylum และ class Actinobacteria ใน order Actinomycetales วงศ์ Streptomycetaceae เป็นแบคทีเรียในกลุ่มกรัมบวก *Streptomyces* เป็นสกุลที่มีจำนวนมาก และสำคัญที่สุดในแบคทีเรียกลุ่มแอกติโนมัยซีทเป็นเชื้อแบคทีเรียที่มี G+C content สูงมาก ใน order Actinomycetales มีแบคทีเรียทั้งที่มีประโยชน์และก่อโรคแก่มนุษย์และสัตว์ แบ่งกลุ่มใหญ่ๆ ดังนี้

- กลุ่ม Coryneform (*Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Arthrobacter*, *Cellulomonas*)
- กลุ่ม Propionic acid bacteria (*Propionibacterium*, *Eubacterium*)
- กลุ่ม Obligate anaerobes (*Bifidobacterium*, *Acetobacterium*)
- กลุ่ม Actinomycetes ซึ่งเป็นกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่อยู่เป็นสายยาวและมีเชื้อหลายชนิดในกลุ่มนี้สร้าง mycelium คล้ายเชื้อราและอาจแตกกิ่ง (branching)

เชื้อ Streptomycetes เป็นเชื้อกลุ่มใหญ่ที่สร้างสายใยที่แตกแขนงได้แบบเดียวกับเชื้อรา โดยเราเรียกเส้นใยนี้ว่า mycelium เหมือนกับในเชื้อรา อาศัยอยู่ทั่วไปในดิน ปุ๋ยหมัก น้ำ ละอองฝุ่น อากาศ โดยเชื้อจะสร้างเส้นใยที่เจริญลงไปในอาหารที่เรียกว่า substrate mycelium และเส้นใยที่ผิวของโคโลนีที่เรียกว่า aerial mycelium เชื้อที่สำคัญในกลุ่มนี้ ได้แก่ เชื้อ *Streptomyces* ลักษณะเส้นใยไม่มีผนังกัน เมื่อเชื้อเจริญเต็มทีเส้นใยอากาศจะสร้างสปอร์ที่ไม่เคลื่อนที่ ซึ่งมีรูปแบบต่าง ๆ ได้แก่ แบบเส้นตรง (rectiflexibile) แบบลูป (retinaculiaperti) และแบบเวียนเกลียว (spiral) ลักษณะผิวสปอร์มี 5 แบบ คือผิวเรียบ (smooth) ผิวเป็นหนาม (spiny) ผิวเป็นขน (hairy) ผิวเป็นปุ่มปม (warty) และผิวขุ่น (rugose) (Tresner, Davies and Backus, 1961 ; Dietz and Methews, 1971) เชื้อส่วนใหญ่ใน Genus นี้สร้างสปอร์ ซึ่งลักษณะโคโลนีในระยะแรกผิวโคโลนีเรียบ เมื่ออายุมากขึ้นเส้นใยอากาศจะพัฒนาเป็นสปอร์ที่จะมี nuclei หลายอัน และเกิดการสร้างผนังกัน ทำให้แต่ละเซลล์พัฒนาไปเป็น conidia ซึ่งมักเป็นสายโซ่ยาว (polysporous) มีมากกว่า 50 สปอร์ (Cross, 1970) และมีลักษณะหลากหลาย ทั้งสปอร์และ conidia มักมีสีต่างๆกัน ทำให้สามารถแยกสายพันธุ์ของเชื้อ โดยอาศัยจากทั้งลักษณะและสีของสปอร์ และ conidia ร่วมกับคุณสมบัติด้านอื่นๆ เชื้อ *Streptomyces* มีมากกว่า 500 species แม้ว่าจะได้มีการจัดระบบต่างๆเพื่อจำแนก species แต่ก็ยังเป็นที่ยากที่จะจำแนกเชื้อในกลุ่มนี้ *Streptomyces* spp. สร้างรงควัตถุหลายชนิด และใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโตเป็นพวก chemo-organotrophic เมตาบอลิซึม เป็นแบบ oxidative สามารถรีดิวซ์ไนเตรทให้เป็นไนโตรท ย่อยอะดีนีน (adenine) เอสคูลิน (esculin) เคซีน (casein) เจลาติน (gelatin) ไฮโปแซนทีน (hypoxanthine) แป้ง และไทโรซีน (L-tyrosine) เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส pH 6.5-8.0 ส่วนใหญ่เป็นพวก mesophile มีบางชนิดที่เป็นพวก psychrophile และ thermophile (Lechevalier and Lechevalier, 1970) ใช้แหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนเป็นแหล่งพลังงาน เช่น กลูโคส กลีเซอรอล และเปปโตน เป็นต้น ทนเค็มได้ดีที่ 3 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ของเกลือโซเดียมคลอไรด์ บางชนิดทนได้ถึง 13 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการสร้างสารปฏิชีวนะ *Streptomyces* spp. จำเป็นต้องใช้แร่ธาตุบางชนิด ได้แก่ โซเดียม แมกนีเซียม แคลเซียม และ ฟอสเฟต เป็นต้น (Williams, Goodfellow and Alderson, 1989)

เชื้อใน genus *Streptomyces* ส่วนใหญ่เป็นเชื้อที่ไม่ก่อโรค มีบาง species ที่ก่อให้เกิดโรคในพืชและในดิน ลักษณะที่สำคัญที่ใช้แยกเชื้อใน genus *Streptomyces* คือการมี LL isomer ของ diaminopimelic acid (LL-DAP) ซึ่งเป็น diamino acid ที่เป็นส่วนประกอบของ peptidoglycan ในผนังเซลล์ และ glycine บน aerial mycelium (Lechevalier and Lechevalier, 1970) อย่างไรก็ตามพบว่าบางสายพันธุ์ มี DL-DAP เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ (Kieser *et al*, 2000)

เนื่องจากเชื้อนี้มีความสามารถในการสร้างยาปฏิชีวนะ และสารออกฤทธิ์ชีวภาพอื่นๆ ที่พัฒนาสู่อุตสาหกรรมได้ ทำให้มีการดำเนินการจดสิทธิบัตรการปิดกั้นข้อมูล ทำให้มีความ

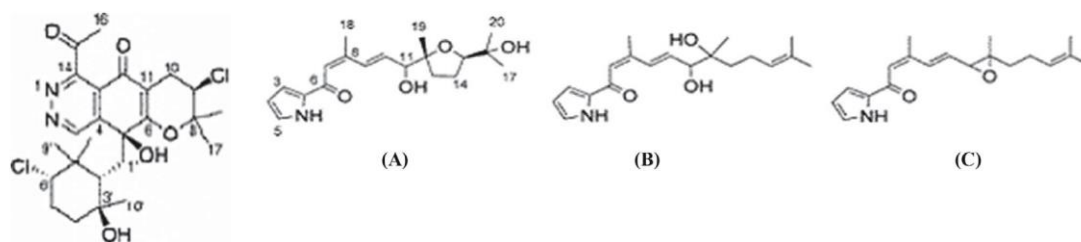
ยากลำบากในการนำเชื้อมาเปรียบเทียบกัน เชื้อในกลุ่มนี้เป็นเชื้อที่น่าสนใจ เพราะ *Streptomyces* spp. สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลายชนิด โดยเฉพาะยาปฏิชีวนะ ได้แก่ สารต่อต้านแบคทีเรีย (anti-bacterial agent) เช่น ampicillin, penicillin-N มีคุณสมบัติยับยั้งการสร้างเปปติโดไกลแคนที่ผนังเซลล์แบคทีเรีย ผลิตโดย *S. antibioticus* (Swan, Rodriguez, Vilches, Mendez and Salas, 1994) สารต่อต้านเชื้อรา (anti-fungal agent) เช่น แคนดิซิดิน (candicidin) เป็นสารพวกโพลีอินแมค โครไลด์ (polyene macrolide) ผลิตโดย *S. griseus* มีฤทธิ์ต่อผนังเซลล์ของเชื้อรา (Lechevalier, Acker, Corke, Haenseler and Waksman, 1953) จากสารออกฤทธิ์ชีวภาพ 22,500 ชนิด ที่สร้างโดยเชื้อจุลินทรีย์ประมาณ 10,100 ชนิด สร้างโดยเชื้อใน order Actinomycetales โดยมีการคาดการณ์ว่า 7,630 ชนิด สร้างโดยเชื้อใน Genus *Streptomyces* สารส่วนใหญ่ (~ 6,550 ชนิด) จะเป็นยาปฏิชีวนะ (Berdy, 1995) ซึ่งในความเป็นจริง อาจมีสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่สร้างโดยจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ที่ยังไม่ถูกค้นพบอีกมาก มียาปฏิชีวนะมากกว่า 60 ชนิด ที่ผลิตโดยเชื้อในกลุ่ม *Streptomyces* สามารถนำมาผลิตและประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้ ตัวอย่างยาปฏิชีวนะที่มีขายในท้องตลาด ทั้งยามาเชื้อแบคทีเรียและรา หลายชนิดที่รู้จักกันอย่างแพร่หลาย และเป็นยาที่ผลิตจากเชื้อใน genus *Streptomyces* ได้แก่ streptomycin, spectinomycin, neomycin, tetracycline, chlorotetracycline, erythromycin, clindamycin, nystatin, amphotericin B และ chloramphenicol เป็นต้น (Madigan *et al.*, 2009) นอกจากนี้ยังมีสารที่แสดงฤทธิ์ชีวภาพอื่นๆที่ได้จากเชื้อใน genus *Streptomyces* เช่น สารต้านอนุมูลอิสระ

### สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แยกได้จากแอคติโนมัยซีท

แอคติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่ผลิตสารที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ โดยเฉพาะในสกุล *Streptomyces* ซึ่งเป็นชนิดที่มีมากที่สุดและประมาณ 75 เปอร์เซ็นต์ของสารทุติยภูมิที่พบในจีนัสนี้มีรายงานการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นจำนวนมาก สารเมตาบอไลต์จากแอคติโนมัยซีทอาจจะมีรูปแบบที่ใช้เป็นพื้นฐานในการสังเคราะห์ตัวยาเพื่อใช้รักษาโรคและต่อสู้กับเชื้อดื้อยาได้ โดยมีฤทธิ์ค่อนข้างกว้างสามารถยับยั้งเชื้อรา ยับยั้งเซลล์มะเร็ง ต้านจุลชีพ กดภูมิคุ้มกัน และต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสารออกฤทธิ์เหล่านี้โดยรวมถึงสารสกัดจากแบคทีเรียด้วย ส่วนมากประกอบไปด้วยสารหลายประเภท ได้แก่ terpene, alkaloid, polyketide เป็นต้น

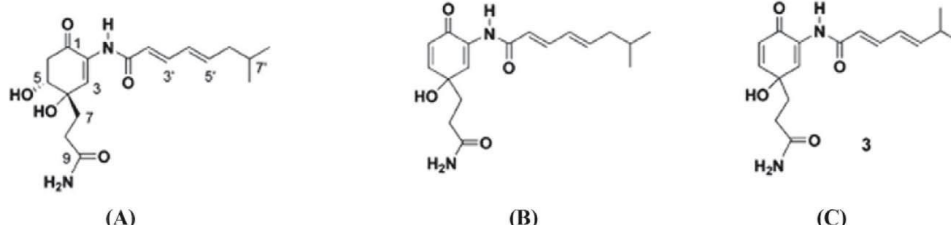
จากรายงานการแยกแอคติโนมัยซีท 27 สายพันธุ์จากดิน ของประเทศอัลจีเรีย พบว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Candida albicans* (Boudemagh *et al.*, 2005) ในปีเดียวกัน Kitouni และคณะ รายงานผลการแยกแอคติโนมัยซีท 25 สายพันธุ์จากน้ำ ดิน และเปลือกต้นพีชพบว่า มีฤทธิ์ต้านจุลชีพทั้งแบคทีเรียแกรมลบและบวก รวมถึงยีสต์และราเส้นใยด้วย

ในปี ค.ศ. 2014 Kumar และคณะ ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ชีวภาพของเชื้อ *Streptomyces lavendulae* strain SCA5 พบว่ามีฤทธิ์ต้านจุลชีพ ต้านอนุมูลอิสระและต้านเซลล์มะเร็ง มีรายงานการค้นพบสารออกฤทธิ์ชีวภาพมากมายจากเชื้อ *Streptomyces* เช่น ในปี ค.ศ. 2005 Macherla และคณะ แยกสาร glaciapyrroles A, B และ C จากเชื้อ *Streptomyces* (NPSOO 8187) ที่แยกจากดินตะกอน ซึ่งสารเหล่านี้แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ในปีต่อมา (2006) รายงานการค้นพบสาร meroterpenoid Azamerone แยกจากแบคทีเรียทะเล (Cho *et al.*, 2006) นอกจากนี้ในปี 2006 Asolkar และคณะ ได้แยกสาร Daryamides A, B และ C ที่แยกได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อของสายพันธุ์ *Streptomyces* เป็นสารพวก cytotoxic polyketides มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง colon carcinoma cell line HCT-116 ที่ระดับปานกลางและยับยั้งเชื้อรา *Candida albicans* ในระดับไม่รุนแรง



Azamerone

glaciapyrroles A, B และ C

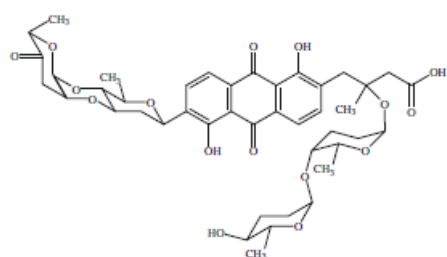


Daryamides A, B และ C

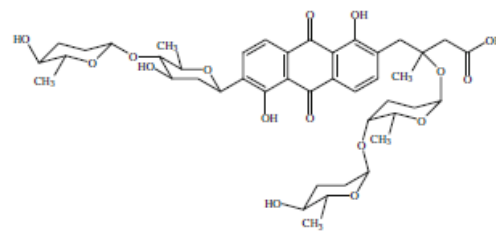
โดยทั่วไปสารประกอบพวก quinone จะเป็นกลุ่มที่มีโมเลกุลที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ และสารที่ได้จากแบคทีเรียทะเล *Streptomyces* จะมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สูง เช่น สารประกอบเชิงซ้อนของ C-glycosides himalomyocins A และ B, พวกสารกลุ่ม anthraquinones fridamycin E สารเหล่านี้ได้มาจากแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. 6921 ที่ได้จากดินตะกอนเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพที่รุนแรง (Maskey *et al.*, 2002) นอกจากนี้ยังมีสาร tetracenomycin D ซึ่งเป็นสารต้านจุลชีพพวก anthraquinone ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *S. corchorusii* AUBN (1)/7 ซึ่งสารนี้สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็ง HMO2 (gastric adenocarcinoma) และ HepG2 (hepatic carcinoma) และยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและลบ (Adinarayana *et al.* 2006) สารกลุ่ม isoquinoline quinones ที่แยกจากชั้น ethyl acetate extract ของเชื้อแบคทีเรียทะเล *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ Mei37 ได้แก่ สาร Mansouramycin A-D พบว่าสารเหล่านี้มีความเฉพาะเจาะจงกับเซลล์มะเร็งจำนวนมาก เช่น เซลล์



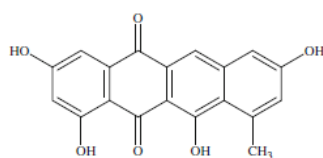
มะเร็งปอด มะเร็งเต้านม melanoma และ prostate cancer cells (Hawas *et al.*, 2009) และสาร Lucentamycins A และ B ที่แยกจากแอคติโนมัยซีททะเล *Nocardopsis lucentensis* (strain CNR-712) ซึ่งแสดงฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง HCT-116 human colon carcinoma (Cho *et al.*, 2007) นอกจากนี้ยังมีรายงานการผลิตสารที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียทะเลที่อาศัยร่วมกับสัตว์ชนิดอื่น เช่น เชื้อแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำและผลิตสารที่ยับยั้งจุลชีพ เช่น เชื้อ *Streptomyces* อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำ *Callyspongia diffusa* ให้ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรียและเชื้อรา (Gandhimathi *et al.* 2008)



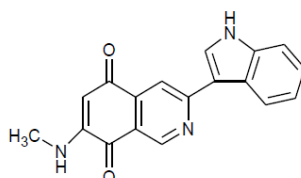
Himalomycins A



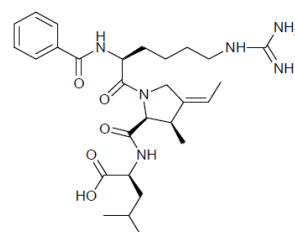
Himalomycins B



Tetracenomycin D

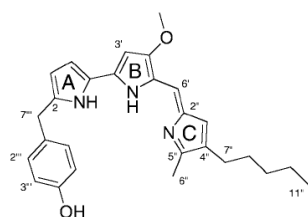
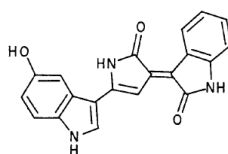


Mansouramycin

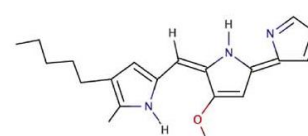


Lucentamycin A

Feher *et al.* (2008) ได้แยกสารสีกลุ่ม prodiginine-type จากแบคทีเรียทะเล *Pseudoalteromonas rubra* ซึ่งสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็ง SKOV-3, a human ovarian adenocarcinoma cell line ชื่อ 2-(*p*-hydroxybenzyl)prodigiosin จากการรวบรวมข้อมูลคุณสมบัติทางชีวภาพของสารสีม่วง violacein ที่แยกได้จากแบคทีเรีย *Chromobacterium violaceum* พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ยับยั้งเซลล์มะเร็ง และยับยั้งเชื้อไวรัส (Lichstein & Van de Sand 1945; Durân *et al.* 1983; Durân *et al.* 1996; May *et al.* 1991) นอกจากสารสีที่กล่าวมาซึ่งมีการรวบรวมสารสีจากจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆที่น่าสนใจ ดังแสดงในตาราง 1 (Liu & Nizet, 2009)

2-(*p*-hydroxybenzyl)prodigiosin

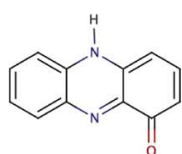
Violacein



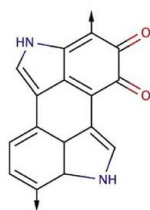
Prodigiosin

ตารางที่ 1 สักยภาพของฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆของรงควัตถุจากจุลินทรีย์

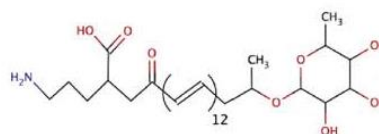
Pigment	Chemistry	Color	Human pathogens	Virulence functions
Staphyloxanthin	Carotenoid	Golden	<i>Staphylococcus aureus</i>	Antioxidant, detoxify ROS [4,5]
Pyocyanin	Phenazine-derived zwitterion	Blue-green	<i>Pseudomonas</i> spp.	Cytotoxicity [36,37,39] Neutrophil apoptosis [50] Ciliary dysmotility [43] Proinflammatory [49]
Melanin	Polyacetylene or polypyrrole polymers	Dark-brown, black	<i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Aspergillus</i> spp., <i>Wangiella dermatitidis</i> , <i>Sporothrix schenckii</i> , <i>Burkholderia cepacia</i>	Antioxidant [11,30,31,32] Antiphagocytic [16] Block antimicrobials [18,19]
Porphyrin	Heteromacrocycle	Black	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Antioxidant, detoxify ROS [74]
Granadaene	Ornithine rhamnopolylene	Orange-red	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Antioxidant, detoxify ROS [64]
Violacein	Rearranged pyrrolidone scaffold	Purple	<i>Chromobacterium violaceum</i>	Antioxidant, detoxify ROS [69]
Prodigiosin	Linear tripyrrole	Red	<i>Serratia marcescens</i>	Immunosuppressant [79]
Hemozoin	$\beta$ -hematin aggregates	Brown-black	<i>Plasmodium</i> spp.	Detoxification [53] Macrophage suppression [56] Pro-inflammatory [58]



Pyocyanin



Melanin



Granadaene

Saurav และ Kannabiran (2012) แยกสารต้านอนุมูลอิสระ และประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ของสาร 5-(2,4-dimethylbenzyl) pyrrolidin-2-one (DMBPO) ซึ่งแยกได้จากเชื้อแอสเพอร์จิลลินสายพันธุ์ *Streptomyces VITSVK5* spp. สายพันธุ์นี้แยกได้จากตัวอย่าง ตะกอนดิน เชื้อแอสเพอร์จิลลินที่แยกได้แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ *Aspergillus* ได้ดี จากการสกัดและแยกสารให้บริสุทธิ์โดยวิธี bioactivity guided ซึ่งสาร DMBPO แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง HEP 2 และ Hep G2 ที่ค่า  $IC_{50}$  2.8  $\mu\text{g/ml}$  และ 8.3  $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ โดยเปรียบเทียบกับ Vero cell (ที่ค่า  $IC_{50}$  22.6  $\mu\text{g/ml}$ ) นอกจากนี้ยังแสดงค่า hemolytic  $EC_{50}$  (ความเข้มข้นของสารที่ออกฤทธิ์กระตุ้น ได้ 50%) ที่มีต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงของมนุษย์ที่ระดับความเข้มข้น 288  $\mu\text{g/ml}$  สาร DMBPO ยังแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH radical scavenging ที่ 44.13% ที่ความเข้มข้น 5  $\mu\text{g/ml}$  และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระรวมทั้งหมดที่ร้อยละ 50.10 ระดับความเข้มข้น 5  $\mu\text{g/ml}$  ผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า DMBPO เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

Revathy และคณะ (2013) ได้ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์จากเชื้อ *Streptomyces* SP สายพันธุ์ VITMSS05 พบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า  $IC_{50}$  92.49 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และแสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ alpha amylase ที่ร้อยละ 64.1 ขณะที่ขณะที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ alpha glucosidase ที่ร้อยละ 91.5 โดยมีค่า  $IC_{50}$  คือ 42.89 และ 385.97

ไมโครกรัมมิลลิลิตร/ ตามลำดับ ปีเดียวกัน Aizuddin *et al.*, (2013) ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของแอลดีโนมายซีท 100 สายพันธุ์ ซึ่งถูกแยกจากฟองน้ำทะเล ที่เก็บมาจาก Sipadan Island ในซาบাহ์ แอลดีโนมายซีททะเลมีศักยภาพสูงและยังผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เนื่องจากการปรับตัวพิเศษในสภาพแวดล้อมที่รุนแรงในมหาสมุทรได้ดี พบเชื้อ 22 สายพันธุ์ แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay โดยมีค่า  $IC_{50}$  ระหว่าง 99.1 - 56.3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

## อุปกรณ์และวิธีการ

### อุปกรณ์

1. อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับการเตรียมตัวอย่างแอสคิตินัยซีท
  - 1.1 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Tomysseiko ประเทศญี่ปุ่น)
  - 1.2 เครื่องชั่งความละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius ประเทศเยอรมัน)
  - 1.3 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ
  - 1.4 ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (Yamato Scientific Co. Ltd., ประเทศญี่ปุ่น)
  - 1.5 ตู้ดูดควัน (Yamato Scientific Co. Ltd., ประเทศญี่ปุ่น)
  - 1.6 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Bio-Shaker; TAITEC ประเทศญี่ปุ่น)
  - 1.7 ขวดรูปชมพู่ขนาด 250, 1,000 และ 2,000 มิลลิลิตร
2. อุปกรณ์สำหรับการสกัดสารสกัดหยาบ
  - 2.1 เครื่อง Ultrasonic bath บริษัท Elma ประเทศเยอรมัน
  - 2.2 เครื่องระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator; BUCHI ประเทศสมาพันธรัฐสวิส)
  - 2.3 vial สำหรับใส่สารสกัดหยาบ
  - 2.4 ขวดกั้นกลม
  - 2.5 กรวยแยก ขนาด 250, 1000 มิลลิลิตร
3. อุปกรณ์สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
  - 3.1 ไมโครเพลทขนาด 96 หลุม
  - 3.2 micropipett ขนาด 200, 1000 และ 5000 ไมโครลิตร (Biohit, ประเทศเยอรมัน)
  - 3.3 เครื่อง UV lamp (Spectroline ประเทศสหรัฐอเมริกา)
  - 3.4 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์แบบ UV-Vis (Analytik Jena, ประเทศเยอรมัน)
  - 3.5 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบ Microtiter plate reader (Thermo Fisher Scientific ประเทศฟินแลนด์)
  - 3.6 ขวดปริมาตร ขนาด 50 มิลลิลิตร
  - 3.7 โครมาโตกราฟีแบบผิวบาง (Thin-layer chromatography)
4. อุปกรณ์สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์
  - 4.1 เครื่องปั่นผสม โฮโมจีไนเซอร์ (homogenizer)
  - 4.2 เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer)
  - 4.3 ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow)
  - 4.4 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (autoclave)
  - 4.5 ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (incubator)

4.6 ไมโครปิเปต ขนาด 20, 200, 1000 ไมโครลิตร

4.7 จานเพาะเชื้อ (sterilized Petri dish)

4.8 antibiotic assay disc (AA disc)

4.9 เข็มเขี่ยเชื้อ

4.10 แท่งแก้วคนสาร

4.11 แท่งแก้วสามเหลี่ยมปากเชื้อ (Spreader)

#### สารเคมีที่ใช้ในการสกัดสารสกัดหยาบ

1. Acetone (Rcllabscan Ltd., ประเทศไทย)
2. n-butanol (n-BuOH) (Rcllabscan Ltd., ประเทศไทย)
3. chloroform (CHCl<sub>3</sub>) (Rcllabscan Ltd., ประเทศไทย)
4. 95% ethanol & ethanol (commercial grade) (EtOH)
5. ethyl acetate (EtOAc) (Rcllabscan Ltd., ประเทศไทย)
6. methanol (MeOH) (Rcllabscan Ltd., ประเทศไทย)

#### สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS

1. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) (Sigma-Aldrich, ประเทศเยอรมัน)
2. 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid(ABTS) (Sigma-Aldrich, ประเทศเยอรมัน)
3. L(+)-Ascorbic acid, (Riedel-de-Haen, ประเทศจีน)
4. Potassium persulphate (Ajax Finechem, ประเทศนิวซีแลนด์)

#### เชื้อแบคทีเรียและอาหารเลี้ยงเชื้อ

##### 1.1 เชื้อแอสคิตินอมัยซีท

เชื้อแอสคิตินอมัยซีทได้รับจากโครงการวิจัยที่ 5 จำนวนทั้งสิ้น 13 ไอโซเลต ได้แก่

- เชื้อแอสคิตินอมัยซีท แยกจากดินตะกอนชายฝั่งทะเล ภาคตะวันออก จังหวัดชลบุรี 2 ไอโซเลต
- เชื้อแอสคิตินอมัยซีทที่แยกจากดินตะกอนป่าชายเลน จังหวัดชุมพร 11 ไอโซเลต

ตัวอย่างเชื้อแอสคิตินอมัยซีทถูกตรวจเอกลักษณ์โดย คุณรัตนภรณ์ ศรีวิบูลย์ นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการพิเศษ และเก็บตัวอย่างเชื้อแอสคิตินอมัยซีท ไว้ที่ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

##### 1.2 อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อแอสคิตินอมัยซีท

อาหารที่ใช้เลี้ยงแอสคิตินอมัยซีทในการศึกษาครั้งนี้ ได้แก่ yeast extract malt extract agar ISP2 (International Streptomyces Project2) ซึ่งวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแสดงในภาคผนวก ก

- Bacto™ Agar (Bacton Dickinson and Company, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- Bacto™ Malt Extract (Bacton Dickinson and Company, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- Bacto™ Yeast Extract (Bacton Dickinson and Company, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- Glucose (MERCK, ประเทศเยอรมัน)

**เชื้อแบคทีเรียมาตรฐานสำหรับทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ อาหารเลี้ยงเชื้อ และยาด้านจุลินทรีย์**

เชื้อมาตรฐานที่นำมาใช้ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ ได้แก่ *Staphylococcus aureus*

TISTR No.517 และ *Candida albicans* TISTR 5239

อาหารที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรียในการศึกษาครั้งนี้ ได้แก่ TSA และ TSB วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ แสดงในภาคผนวก ก

ยาด้านจุลินทรีย์ ได้แก่ Tetracycline 30 ไมโครกรัม Neomycin 30 ไมโครกรัม

### **ขั้นตอนและวิธีการวิจัย**

#### **1. การเพาะเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีท**

เก็บเชื้อแอกติโนมัยซีทที่เก็บไว้บนอาหาร ฐานเลี้ยงมาบ่มลงในอาหาร yeast extract malt extract agar - ISP2 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-7 วัน หรือกระทั่งเชื้อเจริญเต็มที่

#### **2. การเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีทเพื่อสกัดสารสกัดหยาบ**

2.1 เลือกโคโลนีเดี่ยวๆของเชื้อแอกติโนมัยซีทถ่ายลงในอาหารเหลวสูตร ISP2 ปริมาตร 250 และ 500 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 1000 และ 2000 มิลลิลิตร ตามลำดับ นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 110 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน

2.2 ปั่นเหยียงอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเร็วรอบ 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยง ส่วนของเซลล์ล้างด้วย Normal saline ได้ตัวอย่าง ซึ่งน้ำหนักสดของเซลล์

#### **3. การเตรียมตัวอย่างสารสกัดหยาบ**

3.1 นำส่วนของเซลล์มาสกัดด้วยเมทานอลครั้งละ 50 มิลลิลิตร ทำการ homogenize โดยใช้เครื่องอัลตราโซนิก เป็นเวลา 30 นาที ตั้งทิ้งไว้ 24 ชม .กรองเซลล์ผ่านกระดาษกรอง ทำการสกัดส่วนของเซลล์ซ้ำ 3 ครั้ง รวมชั้นสารละลายเมทานอล นำไประเหยตัวทำละลายออกให้เข้มข้นขึ้นด้วยเครื่องระเหยสารสุญญากาศแบบหมุน

3.2 จากนั้นทำการสกัดแยกส่วน (partition) ระหว่างน้ำ-เอธิลอะซิเตท อัตราส่วน 1:1 v/v ทำการสกัดซ้ำ 3 ครั้ง รวมชั้นเอธิลอะซิเตทแล้วนำไประเหยแห้ง ถ่ายใส่ขวดเก็บตัวอย่าง ทำให้แห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน ซึ่งน้ำหนักสารสกัดหยาบที่ได้ จะได้ สารสกัดหยาบชั้น EtOAc (C)

3.3 นำส่วนของน้ำเลี้ยงมาสกัดด้วยเอธิลอะซิเตท อัตราส่วน 1:1 (v/v) (ทำการสกัด 3 ครั้ง) ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น รวมชั้นเอธิลอะซิเตทแล้วนำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสารถ่ายใส่ขวดเก็บ ตัวอย่างทำให้แห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน ชั่งน้ำหนักสารสกัดหยาบที่ได้ จะได้ สารสกัดหยาบชั้น

#### **EtOAc (M)**

#### **4. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นของสารสกัดหยาบ**

สารสกัดหยาบทั้ง 2 ชั้น ชั้น EtOAc (C) และ EtOAc (M) ไปตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ใช้ในการทดสอบ มี 3 วิธี ดังนี้

4.1 ตรวจสอบความสามารถเบื้องต้นสารที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดหยาบด้วยวิธี Rapid TLC screening method ด้วย DPPH radical

โดยทำการตรวจสอบด้วยวิธีโครมาโทกราฟีผิวบางด้วยระบบตัวชะ (elute) ที่เหมาะสม เช่น คลอโรฟอร์ม:เมทานอล 98:2, 95:5 หรือ 90:10 สังเกตตำแหน่งการเคลื่อนที่ของสารบนแผ่น TLC ภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร จากนั้นฉีดพ่นโครมาโทแกรมด้วยสารละลาย DPPH (0.2% ในเมทานอล) สารประกอบที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระจะปรากฏเป็นจุดสีเหลืองอยู่บนพื้นหลังสีม่วงบนแผ่น TLC (Alessandra, *et al.*, 2002)

#### **4.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ DPPH<sup>•</sup> (DPPH radical scavenging assay)**

ทดสอบความสามารถในการดักจับอนุมูล DPPH<sup>•</sup> ในสารสกัดตามวิธีของ Cotelle *et al.*, 1996 ดัดแปลงตามวิธีของ Fenglin (2004) โดยนำสารสกัดหยาบที่เจือจางในเมทานอลที่ช่วงความเข้มข้น 400–3.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ascorbic acid ที่ความเข้มข้น 0.781–100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเมทานอลเป็นการทดลองชุดควบคุม ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ในไมโครเพลท 96 หลุม แต่ละหลุมแยกกันแล้วเติมสารละลาย 0.2 มิลลิโมลาร์ DPPH<sup>•</sup> ในเมทานอลปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันในไมโครเพลท ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ในที่มีเวลานาน 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ค่าความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microtiter plate reader โดยมีสารสกัดที่ช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบของสารสกัดแต่ละชนิด 100 ไมโครลิตร ผสมกับเมทานอล 100 ไมโครลิตร เป็น blank ของสารละลายตัวอย่าง และมีเมทานอล 100 ไมโครลิตร ผสมกับ DPPH<sup>•</sup> 100 ไมโครลิตร เป็น control ในแต่ละความเข้มข้นทำการทดลอง ซ้ำ นำค่าที่วัดได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การดักจับอนุมูล 3 DPPH<sup>•</sup> (% DPPH radical scavenging) จากสมการ

$$\% \text{ scavenging} = ((\text{Absorbance control} - \text{Absorbance sample}) / \text{Absorbance control}) \times 100$$

จากนั้นคำนวณหาค่า IC<sub>50</sub> (ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถดักจับอนุมูล DPPH<sup>•</sup> ได้ที่ 50 เปอร์เซ็นต์) จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดกับ % inhibition

#### 4.3 การวิเคราะห์ฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ ABTS<sup>•+</sup> (ABTS radical scavenging assay)

การทดสอบฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ ABTS ทำผ่าน ABTS cation radical decolorization (ABTS<sup>•+</sup>) (Yang, *et al.*, 2011) เตรียมสารละลาย ABTS<sup>•+</sup> โดยการผสมสารละลาย 7 mM ABTS 2 มิลลิลิตร (ในน้ำกลั่น) และ 140 mM potassium persulphate (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) ในน้ำกลั่น 35.5 ไมโครลิตร (ซึ่งทำให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ potassium persulphate ประมาณ 2.45 mM) ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง สารละลายอนุมูล ABTS<sup>•+</sup> เมื่อเตรียมแล้วสามารถเก็บได้ประมาณ 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ทำการเจือจางสารละลาย ABTS<sup>•+</sup> ก่อนนำไปใช้ด้วยเมธานอล ให้มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง  $0.700 \pm 0.020$  ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร (โดยผสมสารละลายอนุมูล ABTS<sup>•+</sup> 1 มิลลิลิตร กับเมธานอล 89 มิลลิลิตร)

เตรียมสารละลายมาตรฐานของ Trolox ให้มีความเข้มข้น 0.781 – 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นปีเปตสารละลาย ABTS<sup>•+</sup> 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารสกัดแอคติโนมายซีทหรือสารมาตรฐานแต่ละความเข้มข้น 50 ไมโครลิตร โดยใช้เมธานอลเป็น blank ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microtitre plate reader นำค่าที่ได้ไปคำนวณหา % scavenging ตามสมการ ดังนี้

$$\% \text{ scavenging} = ((\text{Absorbance control} - \text{Absorbance sample}) / \text{Absorbance control}) \times 100$$

ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระแสดงในรูป IC<sub>50</sub> โดยที่ค่า IC<sub>50</sub> ถูกคำนวณจากกราฟระหว่าง % scavenging กับความเข้มข้น

#### 5. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย (antimicrobial activity)

5.1 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากส่วนของเซลล์และน้ำเลี้ยง โดยใช้ Disc diffusion method (Lorian, 1991) สำหรับสารกลุ่มผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่สกัดด้วยตัวทำละลาย

- การเตรียมแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ ทำการ streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และใช้เชื้อปริมาณ 10<sup>5</sup>-10<sup>7</sup> เซลล์ต่อมิลลิลิตร

- ทำการปีเปตสารสกัดและหุดควบคุมปริมาตร 10 ไมโครลิตร แล้วหยดลงบนกระดาษกรองที่ปราศจากเชื้อ (paper disc) เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร การทดสอบวิธีนี้ใช้หลักการแพร่ของสารออกฤทธิ์บนกระดาษกรองในปริมาณทดสอบที่กำหนด นำเชื้อที่เตรียมไว้มาป้ายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งไว้ 3-5 นาที นำแผ่นกระดาษกรองวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่จากนั้นนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และวัดผลการยับยั้งจุลินทรีย์ได้จากการหาบริเวณยับยั้งเชื้อ (Inhibition zone) ที่เกิดขึ้นรอบๆแผ่น disc ในหน่วยมิลลิเมตร บันทึกผลและวิเคราะห์ผลการทดลอง



## 6. การแยกสารประกอบให้บริสุทธิ์

การแยกสารประกอบให้บริสุทธิ์ของแอกติโนมายซีท A1-3 M (ชั้นน้ำเลี้ยง)

นำสารสกัดหยาบบางส่วนของ A1-3 M (28.4 กรัม) มาแยกสารด้วยวิธี Preparative TLC โดยใช้ระบบตัวพา  $\text{CHCl}_3$ :formic acid 1% (x2) จะได้สารบริสุทธิ์ของ “A1-3M/1” และ “A1-3M/2” นำไปหาโครงสร้างสารและทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียต่อไป

การแยกสารประกอบให้บริสุทธิ์ของแอกติโนมายซีท CH54-5/C (ชั้นเซลล์)

นำสารสกัดหยาบของ CH54-5/C (0.2886 กรัม) มาแยกสารด้วยวิธี  $\text{SiO}_2$  Column chromatography โดยใช้ระบบ gradient: Petroleum ether:Chloroform,  $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3$ :acetone, MeOH โดยเก็บ fraction ละ 10 mL ทำการรวม fraction นำแต่ละ fraction ไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

## 7. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS โดยทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ครั้ง (n=3) และหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ( $\pm$ S.D.)

## ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

### 1. ข้อมูลตัวอย่างและการสกัดสารสกัดหยาบของตัวอย่างแอกติโนมัซซีท

ตัวอย่างแอกติโนมัซซีทที่ใช้ในการศึกษาปีที่ 2 จำนวนทั้งสิ้น 13 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 2 ได้มาจาก 2 ส่วน ดังนี้

1. เชื้อแอกติโนมัซซีทที่แยกจากดินตะกอนชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก และดินตะกอนป่าชายเลนของจังหวัดชลบุรี ระยอง และจันทบุรี จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ A1-3, RY2-20, CH54-5

2. เชื้อแอกติโนมัซซีทที่แยกจากดินตะกอนป่าชายเลน อำเภอเมือง จังหวัดชุมพร ซึ่งทำการเก็บตัวอย่างช่วงเดือนเมษายน 2557 จำนวน 3 จุดเก็บตัวอย่าง ดังแสดงในภาพที่ 1 เชื้อแอกติโนมัซซีทเลี้ยงด้วยอาหารเหลว ISP-2 จำนวนทั้งสิ้น 11 สายพันธุ์

จุดเก็บตัวอย่างดินตะกอนป่าชายเลน จ. ชุมพร วันที่ 20 เมษายน 2557 แบ่งเป็น 3 จุด ดังนี้

จุดเก็บที่ 1 บริเวณบ้านนาทป อ. เมือง จ. ชุมพร ( $10^{\circ} 29' 50.2''$  N และ  $99^{\circ} 14' 02.9''$  E)

ลักษณะเป็นพื้นที่ทรายนโคลน มีต้นแสมทะเลและโกงกางใบเล็ก

จุดเก็บที่ 2 บริเวณบ้านนาชะอัง ต. นาทุ่ง อ. เมือง จ. ชุมพร ( $10^{\circ} 30' 22.3''$  N และ  $99^{\circ} 14'$

$52.3''$  E) ลักษณะเป็นพื้นที่ทรายนโคลน บริเวณปากคลองออกทะเล มีต้นแสมทะเล

จุดเก็บที่ 3 บริเวณปากคลองอุทธยานฯ หมู่เกาะทะเลชุมพร อ. เมือง จ. ชุมพร ( $10^{\circ} 21' 26.1''$

N และ  $99^{\circ} 13' 49.3''$  E) ลักษณะเป็นโคลน มีต้นโกงกางใบเล็ก



ก)



ข)



ค)

ภาพที่ 1 แสดงตำแหน่งจุดเก็บตัวอย่างดิน ก) จุดเก็บที่ 1 ข) จุดเก็บที่ 2 และ ค) จุดเก็บที่ 3

จากผลการแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทบริเวณตำแหน่งต่างๆและทำการตรวจสอบคุณสมบัติบางประการทางชีวเคมี รวมถึงการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของเชื้อที่แยกได้ ด้วยเทคนิค cross streak จากโครงการวิจัยที่ 5 ทำให้ได้เชื้อแอกติโนมัยซีทที่น่าสนใจจำนวน 10 ไอโซเลท นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาเชื้อแอกติโนมัยซีทที่แยกจากดินตะกอนชายฝั่ง จ. ชลบุรี (A1-3) และดินป่าชายเลนบริเวณปากแม่น้ำพังราด จังหวัดระยอง (RY2-20) และดินป่าชายเลน จ. จันทบุรี (CH54-5) ข้อมูลแอกติโนมัยซีทที่แยกจากดินตะกอนป่าชายเลน 13 สายพันธุ์และน้ำหนักรสชาติกดหยาบ ดังแสดงในตารางที่ 2

จากการตรวจเอกลักษณ์เบื้องต้นด้วยวิธีทางชีวเคมี, colony morphology และการหาลำดับเบส 16s rRNA gene พิสูจน์เอกลักษณ์โดยคุณรัตนาภรณ์ ศรีวิบูลย์ นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการพิเศษ สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา พบว่า

แอกติโนมัยซีท A1-3 มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces massaporeus* ที่ 99.88% similarity

ส่วนแอกติโนมัยซีท CH54-5 มีความใกล้เคียง *Streptomyces indiaensis* ที่ 99.24 % similarity

แอกติโนมัยซีท RY2-20 ผลจากการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของผนังเซลล์ และการตรวจคุณลักษณะรูปร่างของโครงสร้างของแอกติโนมัยซีท พบว่าเป็นแอกติโนมัยซีทในกลุ่ม Family *Micromonosporaceae* genus *Virgisporangium*

ขณะที่แอกติโนมัยซีทที่ได้จากดินป่าชายเลน จ. ชุมพร พบว่าส่วนใหญ่จะเป็นกลุ่ม Family *Micromonosporaceae* และ *Streptomyces* จากการหาลำดับเบส 16s rRNA gene โดยที่แอกติโนมัยซีท CP8-4A และ B พบว่าเป็น *Streptomyces lannensis* 100%

สกัดสารสกัดหยาบตัวอย่างแอกติโนมัยซีทในส่วนของเซลล์ (intracellular) และน้ำเลี้ยง (extracellular) ด้วยสารละลายเอธิลอะซิเตท เพื่อนำส่วนสกัดทั้งสองชั้นไปทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีต่างๆ และฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์

## 2. การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบผิวนาง (TLC-DPPH)

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพเป็นการทดสอบเพื่อแสดงชนิดของสารประกอบที่ต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในตัวอย่าง ซึ่งวิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่นิยมได้แก่ โครมาโตกราฟีแบบผิวนาง (TLC) โดยสารที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะให้จุดสีเหลืองบนพื้นหลังสีม่วงของสารละลาย DPPH จำนวนของสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบชั้นเอธิลอะซิเตทในส่วนของเซลล์และน้ำเลี้ยงขึ้นกับ mobile phase ที่ใช้ในการพัฒนาให้เกิดการแยก

สารบนแผ่น (development of TLC plate) ซึ่งระบบที่ใช้ เช่น Chloroform, Chloroform : Methanol 98:2

ตารางที่ 2 ข้อมูลตัวอย่างแอกติโนมัซซีทและน้ำหนักรสารสกัดหยาบ

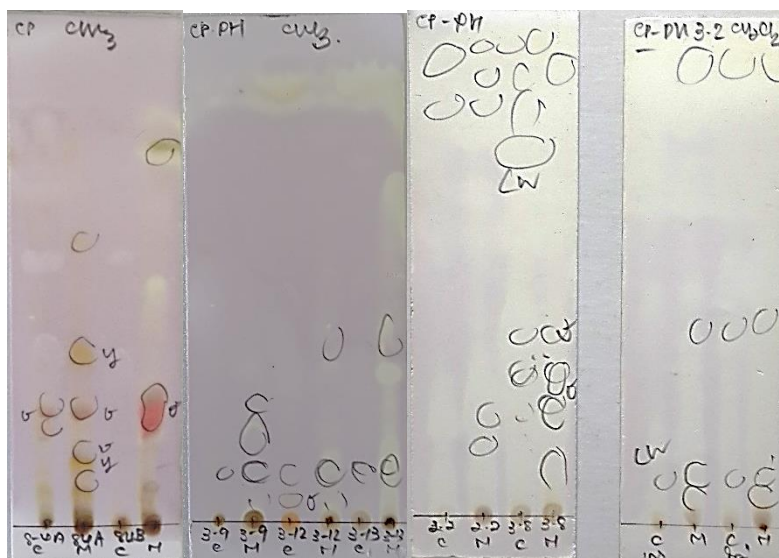
รหัส	สถานที่เก็บ	สี / ลักษณะ cell	นน. ไซล(g) / ปริมาตร medium (ml)	crude extract EtOAc (mg)	
				cell	medium
CP 8-4-A	ดินปากคลองอุทธาน หมู่เกาะทะเลชุมพร จ.ชุมพร	สีน้ำตาลแดงส้ม/เม็ดเล็กละเอียด	28.1 / 700	173.10	54.60
CP 8-4-B	ดินปากคลองอุทธาน หมู่เกาะทะเลชุมพร จ.ชุมพร	สีน้ำตาลแดงส้ม/เม็ดเล็กละเอียด	13.2 / 500	11.10	105.00
CP3-1	บ้านนาทอ อ. เมือง จ. ชุมพร	สีน้ำตาลแดงส้ม/เม็ดเล็กละเอียด	0.2 / 200	7.10	5.90
CP-PH3-2	บ้านนาทอ อ. เมือง จ. ชุมพร	สีส้ม / เม็ดเล็กละเอียด	5.7 / 500	31.20	20.30
CP-PH3-8	บ้านนาทอ อ. เมือง จ. ชุมพร	สีส้ม / เม็ดเล็กละเอียด	18.46 / 500	29	55.9
CP-PH3-9	บ้านนาทอ อ. เมือง จ. ชุมพร	สีน้ำตาลเหลือง/เม็ดเล็กละเอียด	6.57 / 500	29.4	39.3
CP-PH3-12	บ้านนาทอ อ. เมือง จ. ชุมพร	สีส้มสะท้อนแสง/เม็ดเล็กละเอียด	2.5 / 250	15	11.1
CP-PH3-13	บ้านนาทอ อ. เมือง จ. ชุมพร	สีน้ำตาลเหลือง/เม็ดเล็กละเอียด	13.0 / 500	21.8	34
CP-PH3-22	บ้านนาทอ อ. เมือง จ. ชุมพร	สีน้ำตาลเหลือง/เม็ดเล็กละเอียด	1.2 / 250	10.9	12.7
A 1-3	ดินชายฝั่ง หาดวอนนภา ชลบุรี	น้ำตาลส้ม/เม็ดเล็กละเอียด	26.6 / 2.75	245.80	449.28
CH 54-5	ดินป่าชายเลน จันทบุรี	สีแดง/เม็ดเล็กละเอียด	116.4/2500	283.60	137.00
RY2-20	ดินป่าชายเลน ระยอง	สีส้ม / เม็ดเล็กละเอียด	8.4 / 500	45.80	48.00

## 2.1 การแยกสารบนแผ่น TLC ของสารสกัดหยาบจากแอกติโนมัซซีทที่แยกจากดินตะกอนภาคตะวันออกเฉียงใต้แก่ เชื้อ A1-3, CH54-5 และ RY2-20

จากการแยกสารสกัดหยาบจากแอกติโนมัซซีท 3 สายพันธุ์ ที่แยกจากดินตะกอนภาคตะวันออกเฉียงใต้ ด้วยเทคนิค TLC-DPPH พบว่าตัวอย่างสารสกัดของเชื้อแอกติโนมัซซีทจากชั้นน้ำเลี้ยง จะทำปฏิกิริยาด้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้รวดเร็วและดีกว่าชั้นเซลล์ โดยสารสกัดจาก A1-3 M และ RY2-20 M หลังจาก 30 นาที พบสารประกอบหลายตัวจากสารสกัดในชั้นน้ำเลี้ยง (M) แสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น แต่พบว่าสารรงควัตถุที่ได้จากเชื้อ A1-3M ปรากฏตำแหน่งของสารประกอบหลายตัวทั้งที่มีขั้วสูงและขั้วต่ำที่ออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ (ดังแสดงในภาพที่ 2) ขณะที่สารของเชื้อ CH54-5 และ RY2-20 ตำแหน่งที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งไม่ใช่สารรงควัตถุ จึงได้ทำการทดสอบเชิงปริมาณวิเคราะห์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระต่อไป



ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีที่ต่างกัน ได้แก่ DPPH<sup>•</sup> และ ABTS<sup>•+</sup> ซึ่งความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต้องทำการวิเคราะห์มากกว่าหนึ่งวิธีเพื่อให้ทราบกลไกของสารต้านอนุมูลอิสระ



ภาพที่ 3 แสดงลักษณะการแยกชนิดสารสกัดหยาบ และทดสอบฤทธิ์ด้วยเทคนิค TLC-DPPH ของเชื้อ จ.นครศรีธรรมราช C = สารสกัดชั้นเซล; M = สารสกัดชั้นน้ำเลี้ยง

### 3. การทดสอบเชิงปริมาณวิเคราะห์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

#### 3.1 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH<sup>•</sup> (DPPH radical scavenging assay)

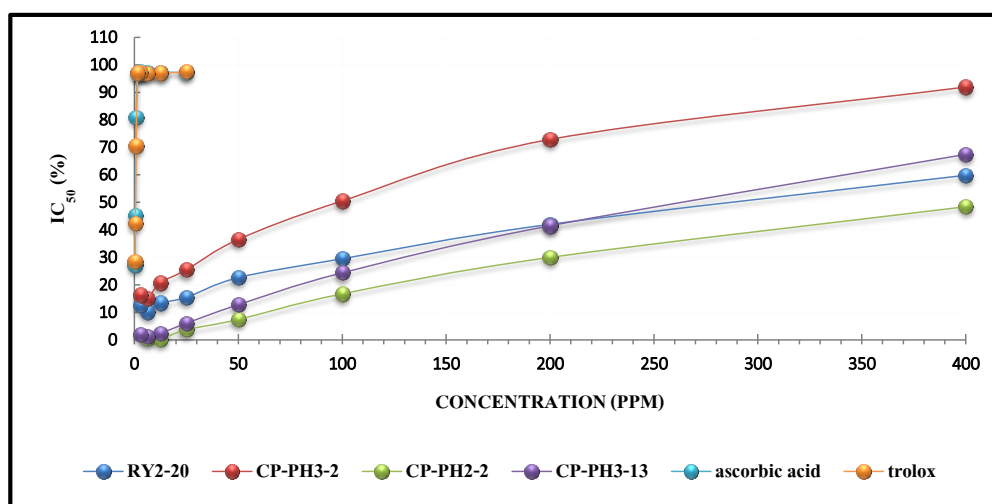
เป็นการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดในการรวมตัวกับ DPPH ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่เสถียรที่อยู่ในสารละลาย โดย DPPH คือ อนุภาคอิสระที่เสถียรและสามารถรับอิเล็กตรอนได้ เมื่อได้รับอะตอมไฮโดรเจนจากโมเลกุลอื่นจะทำให้เปลี่ยนเป็นโมเลกุลที่ไม่เป็นอนุมูลอิสระ โดยอิเล็กตรอนที่ไม่ได้จับกับโมเลกุลของอนุมูล DPPH<sup>•</sup> สามารถดูดกลืนพลังงานแสงได้ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ทำให้มองเห็นเป็นสีม่วง และเมื่ออนุมูล DPPH<sup>•</sup> ถูกรีดิวซ์โดยสารต้านอนุมูลอิสระที่มีคุณสมบัติเป็น hydrogen donor เมื่อได้รับอะตอมไฮโดรเจนจากโมเลกุลอื่น จะทำให้เปลี่ยนเป็นโมเลกุลที่ไม่เป็นอนุมูลอิสระ DPPH-H ซึ่งการสูญเสียอิเล็กตรอนดังกล่าวทำให้อนุมูล DPPH<sup>•</sup> ดูดกลืนพลังงานแสงได้น้อยลง สารดังกล่าวจึงเปลี่ยนเป็นสีเหลือง (Brand-William *et al.*, 1995) ในการศึกษาได้วิเคราะห์ความสามารถของสารสกัดในการทำให้ความเข้มข้นของ DPPH<sup>•</sup> ลดลง 50% (IC<sub>50</sub>) โดยมี ascorbic acid และ trolox เป็นตัวควบคุม

จากผลของการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นด้วยเทคนิค TLC-DPPH พบว่าสารสกัดของแอกติโนมัซท์ที่แยกจากดินตะกอนป่าชายเลนทั้งของภาคตะวันออกเฉียงเหนือและจังหวัดชุมพรที่แสดง

คุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ DPPH<sup>•</sup> ใน 30 นาที ได้แก่ RY2-20, CP8-4B, CP-PH3-2 และ CP-PH3-13

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากเซลล์และน้ำเลี้ยงจากตัวอย่าง แอคติโนมัยซีทจำนวน 11 สายพันธุ์ ได้แก่ RY2-20, CP3-1, CP8-4A, CP8-4B, CP-PH2-2, CP-PH3-2, CP-PH3-8, CP-PH3-9, CP-PH3-12, CP-PH3-13 และ CP-PH3-22 ด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay โดยมี ascorbic acid และ trolox เป็นสารมาตรฐาน แล้วหาค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC<sub>50</sub>) โดยทำการศึกษาที่ความเข้มข้นในช่วง 6.25 - 400 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบว่าสารสกัดจากแอคติโนมัยซีทออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH<sup>•</sup> ได้แตกต่างกัน แสดงผลการทดลองดังตารางที่ 3 และภาพที่ 4 พบว่าสารสกัดหยาบของเชื้อแอคติโนมัยซีทใน ส่วนน้ำเลี้ยง มีค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH<sup>•</sup> ได้ดีกว่าในส่วนของเซลล์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Thenmozhi และคณะ (2010) ได้รายงานผลการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของเชื้อ *Streptomyces* sp. VITTK3 ว่าในชั้นเลี้ยงสามารถยับยั้งได้ 96 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ชั้นเซลล์ยับยั้งได้เพียง 22 เปอร์เซ็นต์ โดยสารสกัดหยาบของเชื้อ CP-PH3-2 และ RY2-20 มีค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุด ซึ่งมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 133.07± 4.0 และ 158.59±24.7 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้สารสกัดของแอคติโนมัยซีท CP8-4B และ CP-PH3-13 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ในระดับปานกลาง (205.55±19.4, 277±2.8 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ขณะที่สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ascorbic acid และ Trolox มีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 1.91±0.1 และ 2.15±0.2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH<sup>•</sup> ของสารสกัดหยาบชั้นน้ำเลี้ยงสามารถเรียงลำดับจากมากไปหาน้อยได้ดังนี้

CP-PH3-2 > RY2-20 > CP8-4B > CP-PH3-13 > CP3-1 ≥ CP-PH2-2



ภาพที่ 4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูล DPPH กับความเข้มข้นสารสกัดหยาบของแอคติโนมัยซีทจากชั้นน้ำเลี้ยง (M)

ตารางที่ 3 ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH<sup>•</sup> และ ABTS ของสารสกัดหยาบจาก แอคติโนมัซซีท

Sample	% IC <sub>50</sub> ABTS scavenging		% IC <sub>50</sub> DPPH scavenging	
	cell	medium	cell	medium
CP 3-1	202.47±36.1	203.94 ± 8.7	>400	393.3±7.2
CP-PH2-2	392.13±23.5	110.33±9.1	>400	393.3±7.2
CP-PH3-2	>400	63.3±6.9	>400	133.07±4.0
CP-PH3-8	305.5±23.7	116.8±7.1	>401	>400
CP-PH3-9	>400	248.72±10.4	>400	>400
CP-PH3-12	147.47±26.9	177.46±14.4	>400	>400
CP-PH3-13	64.04±3.3	55.21±1.3	>400	277±2.8
CP-PH3-22	79.63±4.7	74.04±2.1	>400	>400
CP8-4 A	>400	>400	>400	>400
CP8-4 B	>400	413.88±35.8	>400	205.55±19.4
RY2-20	>400	66.12±5.4	>400	158.59±24.7
Trolox	2.19±0.06		2.15±0.2	
ascorbic acid	3.15±0.1		1.91±0.1	

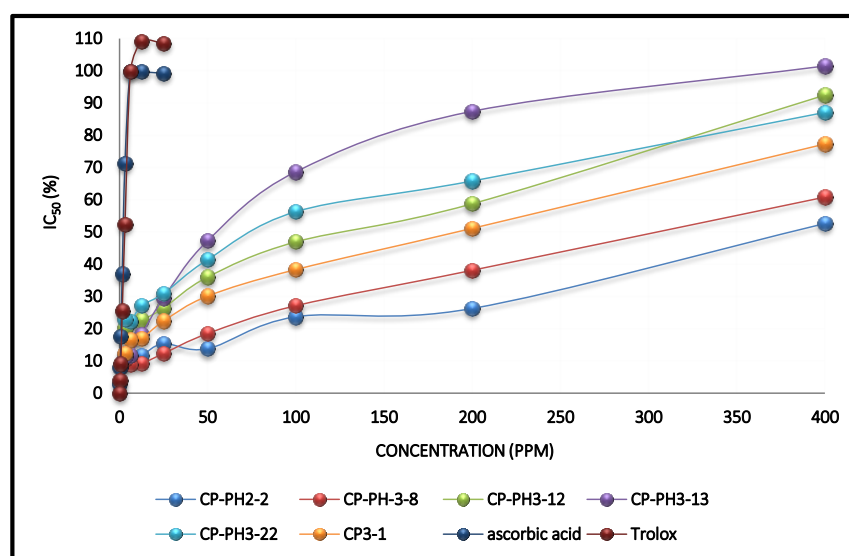
### 3.2 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS<sup>•+</sup> (ABTS radical scavenging assay)

เป็นวิธีการวัดความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระ ABTS<sup>•+</sup> ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์สีเขียวปนน้ำเงินสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร จากนั้นนำ ABTS<sup>•+</sup> ที่เจือจางแล้วทำปฏิกิริยากับสารสกัดตัวอย่างและตั้งทิ้งไว้ เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาสามารถหาความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้ จากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS<sup>•+</sup> โดยเทียบกับสารมาตรฐาน trolox หรือ ascorbic acid ข้อดีของวิธีการนี้คือ ABTS<sup>•+</sup> ละลายได้ดีในน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ จึงทำปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็วและทำปฏิกิริยาได้ดีในช่วง pH กว้างส่วนข้อเสียคือ ABTS<sup>•+</sup> ไม่เป็นสารธรรมชาติที่พบในร่างกายหรือในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตและต้องมีการทำปฏิกิริยากับสารอื่นก่อนถึงจะเกิดเป็นอนุมูลอิสระ

จากการศึกษาความสามารถการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS<sup>•+</sup> ของสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัซซีท พบว่าแอคติโนมัซซีทเกือบทุกสายพันธุ์ที่แสดงฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS<sup>•+</sup> ได้แตกต่างกัน ยกเว้นสารสกัดของเชื้อ CP8-4A และ B โดยที่สารสกัดจากชิ้นน้ำเลี้ยงสามารถกำจัด



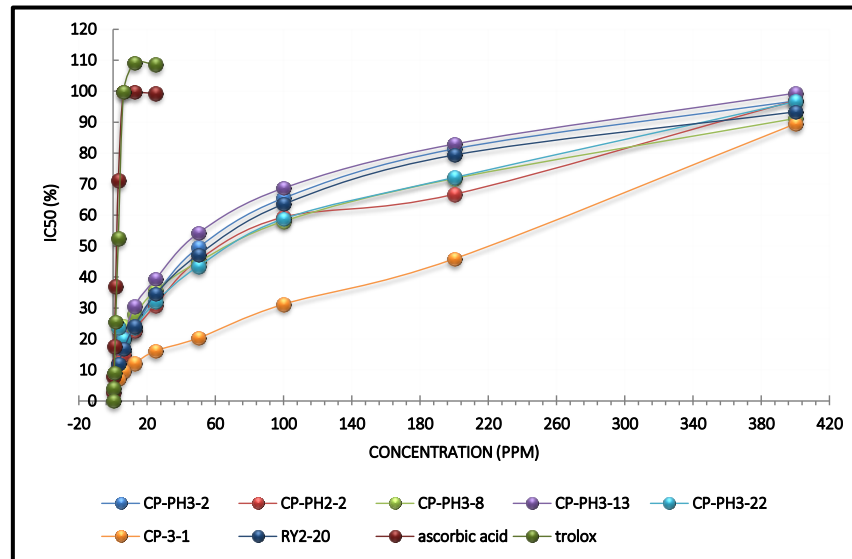
อนุมูลอิสระ ABTS ได้ดีกว่า โดยพบว่าในชั้นน้ำเลี้ยงเชื้อ CP-PH3-13, CP-PH3-2, RY2-20 และ CP-PH3-22 มีฤทธิ์กำจัดอนุมูล ABTS<sup>+</sup> ได้ดีที่สุด โดยมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 55.21±1.3, 63.3±6.9, 66.12±5.4 และ 74.04±2.1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ขณะที่สารสกัดจากชั้นเซลล์ CP-PH3-13, CP-PH3-22 แสดงฤทธิ์กำจัดอนุมูล ABTS<sup>+</sup> ได้ดีที่สุดมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 64.04±3.3 และ 79.63±4.7 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ จากการทดลองค่า IC<sub>50</sub> ของสารมาตรฐาน ascorbic acid คือ 3.15±0.1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และสารมาตรฐาน Trolox มีค่า IC<sub>50</sub> คือ 2.19±0.06 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 3 และภาพที่ 5 และ 6 ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS<sup>+</sup> ของสารสกัดหยาบชั้นเซลล์และชั้นน้ำเลี้ยง



ภาพที่ 5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูล ABTS กับความเข้มข้นสารสกัดหยาบของแอคติโนมัยซีทจากชั้นเซลล์ (C)

ความสามารถในการรีดิวซ์อนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระประกอบด้วย 2 กลไกหลัก ได้แก่ single electron transfer (SET) และ hydrogen atom transfer (HAT) ซึ่งวิธีวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่เกี่ยวข้องกับกลไกดังกล่าว ได้แก่ วิธี ABTS, DPPH และ FRAP กลไกการถ่ายเทอิเล็กตรอน (ET) เป็นการเปลี่ยนสีเมื่อสารอนุมูลอิสระถูกรีดิวซ์ โดยที่สีที่เปลี่ยนไปสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างที่ทดสอบ นอกจากนี้ฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH จะแปรผันตรงกับความเข้มข้นของตัวอย่างที่ทดสอบ สำหรับกลไกการต้านอนุมูลอิสระ DPPH คือ อิเล็กตรอนที่ไม่ได้จับคู่ในโมเลกุลของอนุมูลอิสระ DPPH ถูกกลืนพลังงานแสงทำให้มองเห็นเป็นสีม่วงเมื่ออนุมูลอิสระ DPPH ถูกรีดิวซ์ โดยสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งมีคุณสมบัติเป็น hydrogen donor จะเปลี่ยนเป็นสารสีเหลือง DPPH-H ซึ่งการสูญเสียอิเล็กตรอน

ดังกล่าวจะทำให้อนุมูลอิสระ DPPH สามารถดูดกลืนพลังงานแสงได้น้อยลง (ปิยาภัทร, 2549, William *et al.*, 1995)



ภาพที่ 6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูล ABTS กับความเข้มข้นสารสกัดหยาบของแอคติโนมัยซีทจากชั้นน้ำเลี้ยง (M)

จากทดลองพบว่าสารสกัดหยาบที่มีค่าการดักจับอนุมูลอิสระที่ดีที่สุดของทั้งสองการทดลอง (DPPH และ ABTS) ได้แก่ สายพันธุ์ CP-PH3-2 M, CP-PH3-13 M และ RY2-20 M สารสกัดหยาบทุกสายพันธุ์มีค่าการดักจับอนุมูลอิสระสูงกว่าสารมาตรฐานแอสคอร์บิก ผลดังแสดงในตารางที่ 3 นั้นแสดงว่าสารสกัดของเชื้อ CP-PH3-2 M, CP-PH3-13 M และ RY2-20 M มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีคุณสมบัติในการให้ไฮโดรเจนอะตอมที่ดี ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารประกอบที่แยกได้จากเชื้อ *Streptomyces* sp. ในหลายรายงานพบว่า มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่รุนแรง เช่น สาร 2-allyloxyphenol ที่แยกจากเชื้อ *Streptomyces* sp. MS1/7 (Arumugam และคณะ, 2012, Revathy และคณะ, 2013, Zhong และคณะ, 2011) เนื่องจากอนุมูลอิสระ DPPH<sup>•</sup> มีความคงตัวไม่ไวต่อปฏิกิริยา ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่สามารถลำดับหรือจัดอันดับความไวของอนุมูลได้ วิธี DPPH เป็นวิธีที่เกี่ยวข้องกับขั้นตอนการให้ไฮโดรเจนอะตอม ประกอบกับโครงสร้างทางเคมีของ DPPH<sup>•</sup> ที่ประกอบด้วยวงเบนซีน 3 วง จะไปบดบังอิเล็กตรอนเดี่ยวของอนุมูลอิสระและหมู่ไนโตรเจนทำให้สารต้านอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์รุนแรงแต่อาจจะมีขนาดโครงสร้างทางเคมีใหญ่บางสารไม่สามารถเข้าไปทำปฏิกิริยาจับอนุมูลอิสระได้หรือเกิดปฏิกิริยาช้ากว่าความเป็นจริง จากข้อมูลที่ได้ TLC-DPPH ทำให้ทราบว่าเชื้อ CP-PH3-2 M, CP-PH3-13 M

และ RY2-20 M แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี แต่สารที่แสดงฤทธิ์ของทั้ง 3 สายพันธุ์ไม่ใช่สารรงควัตถุจึงไม่ได้ทำการค้นหาสารออกฤทธิ์

สำหรับการทดสอบด้วยวิธี ABTS<sup>•+</sup> radical scavenging assay เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถของสารสกัดในการต้านออกซิเดชันโดยใช้สารคงตัว ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) ทำปฏิกิริยาออกซิเดชันทำให้เกิดสีกับสารโพแทสเซียมเพอร์ซัลเฟต ซึ่งออกซิไดซ์ ABTS ให้เป็นอนุมูลอิสระ ABTS<sup>•+</sup> เกิดเป็นสารละลายสีน้ำเงินเขียว จากนั้นสารต้านอนุมูลอิสระจะรีดิวซ์ ABTS<sup>•+</sup> ให้กลับเป็น ABTS ทำให้เกิดสีน้อยลงหรือไม่เกิดสีเลย โดยมี trolox เป็นสารมาตรฐาน จากการทดลองพบว่าสารสกัดจากแอกติโนมัซิทที่ชั้นน้ำเลี้ยงและชั้นเซลล์ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ได้ดีกว่า การออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ซึ่งอาจมาจากการละลายของสารสกัดได้ดีขึ้นจึงเข้าทำปฏิกิริยาได้มากขึ้น โดยพบว่าสารสกัดหยาบแอกติโนมัซิทจากชั้นน้ำเลี้ยงและเซลล์ CP-PH3-13 มีค่าการกำจัดอนุมูล ABTS<sup>•+</sup> ดีที่สุดซึ่งมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 55.21 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามด้วยสารสกัดจากเชื้อ CP-PH3-2 > RY2-20 > CP-PH3-22 >.... (ตารางที่ 3) สารสกัดหยาบทุกสายพันธุ์มีประสิทธิภาพการดักจับอนุมูลอิสระต่ำกว่าสารมาตรฐาน trolox (IC<sub>50</sub> เท่ากับ 2.19 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ผลการทดลองแสดงว่าสารสกัดจากเชื้อ CP-PH3-13, CP-PH3-2, RY2-20 และ CP-PH3-22 มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนได้เป็นอย่างดี

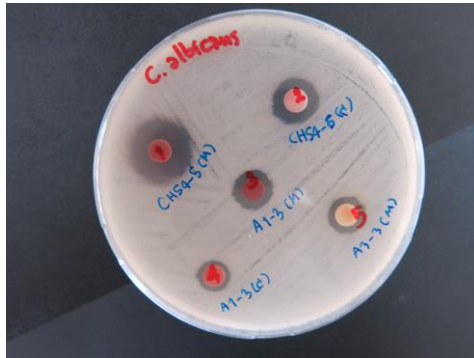
จากผลความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระทั้งวิธี (DPPH และ ABTS) ทำให้ทราบว่าสารสกัดจากเชื้อ CP-PH3-2, RY2-20 และ CP-PH3-13 มีความสามารถกำจัดอนุมูลอิสระ โดยมีคุณสมบัติเป็นผู้ให้อิเล็กตรอนที่ดี

#### 4. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบ

##### การตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยใช้วิธี cross streak และ disc diffusion

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้นของแอกติโนมัซิททั้งหมดจากชั้นน้ำเลี้ยง ด้วยเทคนิค cross streak พบว่าเชื้อ CP8-4A และ CP8-4 B จาก จ. ชุมพร และ A1-3 และ CH54-5 ที่แสดงคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Candida albicans* จึงทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัด ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี disc diffusion บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ซึ่งพบว่าสารสกัดจากเชื้อ A1-3 และ CH54-5 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งทั้ง เชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Candida albicans* ได้ดีโดยสังเกตจากการพบบริเวณการยับยั้งได้อย่างชัดเจน (ภาพที่ 7) และให้ค่าเฉลี่ยบริเวณยับยั้งของเชื้อทั้ง 2 ชนิด ในตารางที่ 4 จากผลการทดลองพบว่า CH54-5 สามารถยับยั้งเชื้อทั้ง 2 ชนิดได้ดีที่สุด มีค่าเฉลี่ยบริเวณยับยั้งมีค่าเท่ากับ

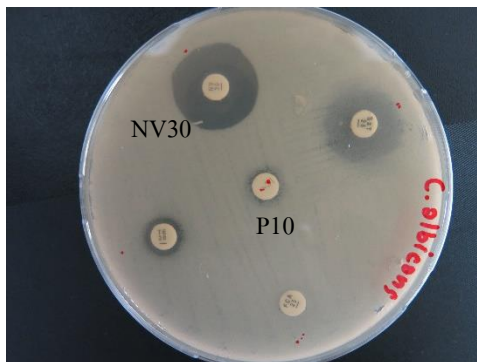
19.25 และ 19.64 มม. ขณะที่ A1-3 สามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ได้ดี โดยเปรียบเทียบกับ Positive control ที่เป็นยาปฏิชีวนะ คือ Novobiocin และ Penicillin



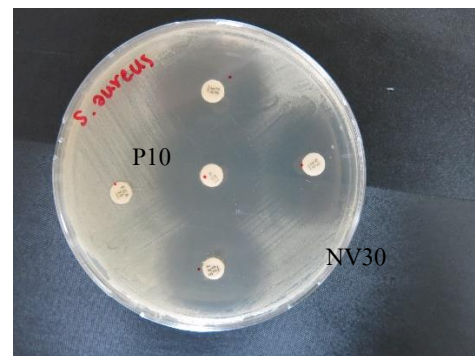
(ก)



(ข)



(ค)



(ง)

ภาพที่ 7 บริเวณยับยั้งของสารสกัดจากแอคติโนมัยซีท ต่อเชื้อ (ก) *Candida albicans* และ (ข) *Staphylococcus aureus* (ค) NV คือ Novobiocin และ (ง) P คือ Penicillin เป็น positive control

จากผลการยับยั้งเชื้อของเชื้อ A1-3 และ CH54-5 ซึ่งได้ตรวจเอกลักษณ์ว่าเป็น *Streptomyces massaporeus* และ *Streptomyces indiaensis* ที่ผ่านมามีการค้นพบสารปฏิชีวนะจำนวนมาก ที่ผลิตโดยเชื้อกลุ่ม *Streptomyces* ซึ่งสอดคล้องกับ Boudemagh และคณะ (2005) แยกแอคติโนมัยซีท 27 สายพันธุ์จากดิน โดยพบว่า มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Candida albicans* นอกจากนี้ในปี ค.ศ. 2005 Macherla และคณะ แยกสาร glaciapyrroles A, B และ C จากเชื้อ *Streptomyces* (NPSOO 8187) ที่แยกจากดินตะกอน ซึ่งสารเหล่านี้แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย มีการแยกสาร Tunicamycin ซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะที่แยกได้จาก *Streptomyces* strain No. T-4 มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อมากมาย ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus lutea*, *Bacillus subtilis*, *B. pumilus*, *Klebsiella pneumonia*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Aspergillus flavus* (Atta,

2015) จากผลพบว่าค่า inhibition zone ของสารสกัด A1-3 และ CH54-5 มีฤทธิ์ในการยับยั้งที่ดีเมื่อเทียบกับยามาตรฐาน จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะนำไปทำการแยกสารประกอบปฏิชีวนะต่อไป

ตารางที่ 4 ผลการยับยั้งเชื้อมาตรฐานของสารสกัดเชื้อแอคติโนมัยซีท

Actinomycetes / ยามาตรฐาน	ผลการยับยั้งเชื้อทดสอบ		ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลาง บริเวณยับยั้งของเชื้อที่ใช้ ทดสอบ (มม.)	
	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
CP 3-1	-	-	-	-
CP-PH2-2	-	-	-	-
CP-PH3-2	-	-	-	-
CP-PH3-8	-	-	-	-
CP-PH3-9	-	-	-	-
CP-PH3-12	-	-	-	-
CP-PH3-13	-	-	-	-
CP-PH3-22	-	-	-	-
CP8-4 A	+	+	NT	NT
CP8-4 B	+	+	NT	NT
RY2-20	-	-	-	-
A1-3	+	+	13.75	7.07
CH54-5	+	+	19.25	19.64
NV30			33	22
P10			36.1	3.14

## 5. การแยกสารประกอบให้บริสุทธิ์ของแอคติโนมัยซีท

### 5.1 เชื้อแอคติโนมัยซีท A1-3 M

จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจึงทำการแยกหาสารออกฤทธิ์ชีวภาพของ A1-3 ด้วยวิธีทางเคมี โดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟี พร้อม

กับการทำ bioassay guidance หรือ autobiography ของสารประกอบดังแสดงในภาพที่ 8 จะพบว่า ที่ตำแหน่งสารสีแดงเกิดการยับยั้งเชื้อทั้ง 2 ชนิด จึงทำการแยกสารรงควัตถุ ที่เป็นสารปฏิชีวนะ โดย



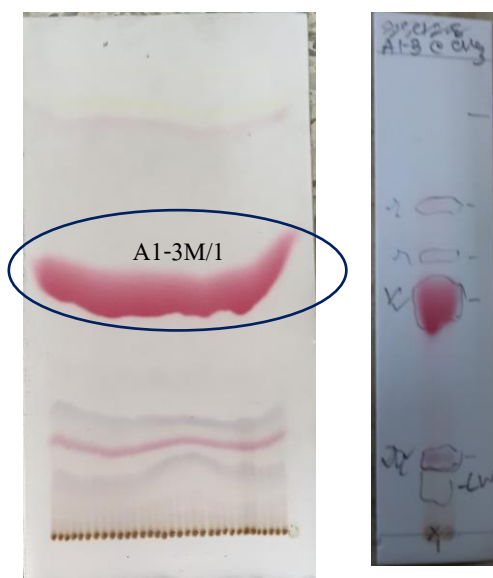
(ก)



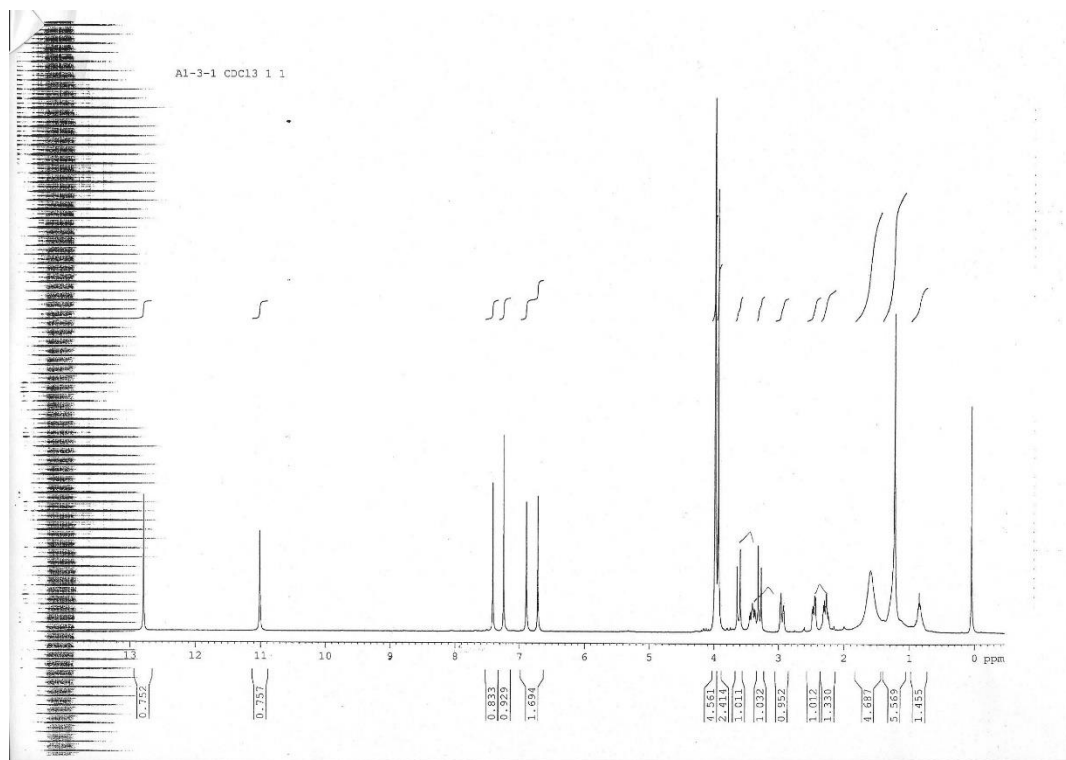
(ข)

ภาพที่ 8 แสดงตำแหน่งของสารออกฤทธิ์ชีวภาพด้วยวิธี autobiography (ก) เชื้อ *C. albicans* (ข) เชื้อ *S. aureus*

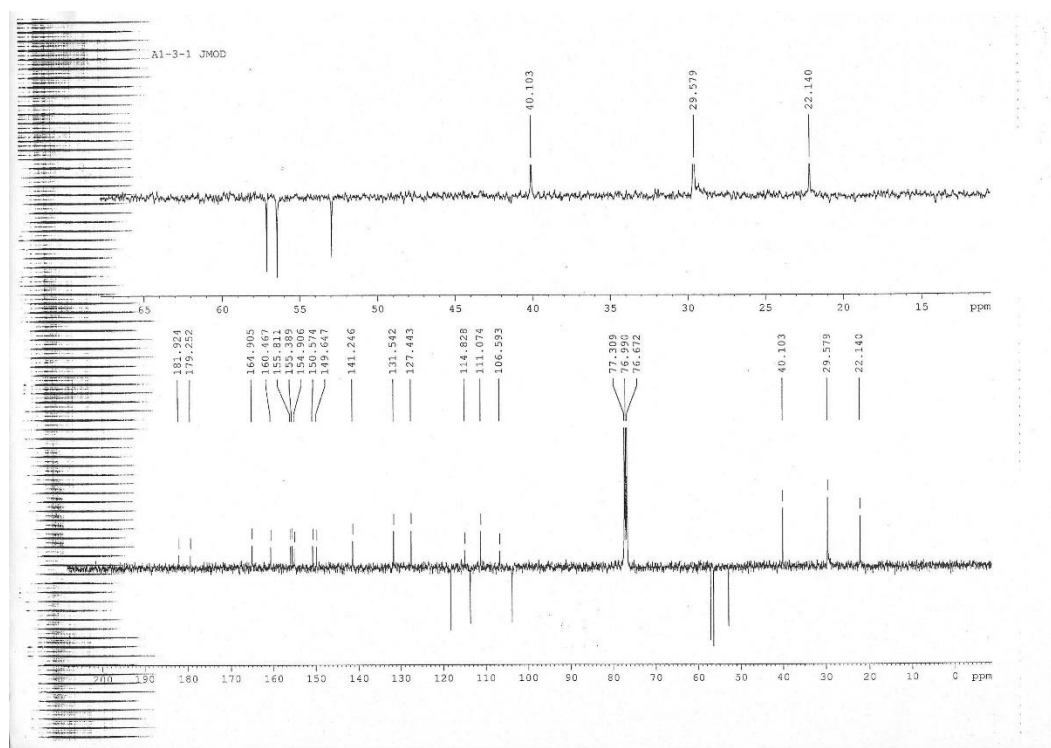
วิธี Preparative Thin Layer Chromatography (PTLC) จะได้สารบริสุทธิ์ A1-3M/1 สีแดงมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* (ดังแสดงภาพที่ 9) นำไปหาโครงสร้างและน้ำหนักโมเลกุลด้วยเทคนิคสเปกโตรสโคปี (ดังภาพที่ 10 และ 11) ซึ่งข้อมูลยังอยู่ในขั้นตอนการแปลโครงสร้าง



ภาพที่ 9 แสดงตำแหน่งการแยกของสารประกอบบนแผ่น TLC



ภาพที่ 10  $^1\text{H-NMR}$  ของสารประกอบ A1-3M/1



ภาพที่ 11  $^{13}\text{C-NMR}$  ของสารประกอบ A1-3M/1

## สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตตทั้ง 2 ชั้น ได้แก่ ชั้น เซลล์และชั้นน้ำเลี้ยงจากแอคติโนมัยซีท 13 ไอโซเลท ที่แยกจากดินตะกอนชายฝั่งและดินป่าชายเลนในเขตจังหวัดชลบุรี ระยะเวลาของ จันทบุรี และชุมพร ในปีที่ 2 สรุปได้ดังนี้

1. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ของสารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยซีท พบว่าสารสกัดหยาบชั้นน้ำเลี้ยงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าชั้นเซลล์

- ชั้นน้ำเลี้ยง มีค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ ( $IC_{50}$ ) ในช่วง  $133.07 \pm 4.0$  ถึง  $400.00 \mu\text{g/mL}$  สายพันธุ์ CP-PH3-2 มีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุด ( $IC_{50}$  เท่ากับ  $133.07 \pm 4.0 \mu\text{g/mL}$ )

- ชั้นน้ำเลี้ยง มีค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ ( $IC_{50}$ ) ในช่วง  $55.21 \pm 1.3$  ถึง  $400.00 \mu\text{g/mL}$  สายพันธุ์ CP-PH3-13, CP-PH3-2, RY2-20 และ CP-PH3-22 ออกฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ ABTS ดีที่สุด ( $IC_{50}$  เท่ากับ  $55.21 \pm 1.3$ ,  $63.3 \pm 6.9$ ,  $66.12 \pm 5.4$  และ  $74.04 \pm 2.1 \mu\text{g/mL}$  ตามลำดับ)

- ชั้นเซลล์ พบสารสกัดจากเชื้อ CP-PH3-13, CP-PH3-22 แสดงฤทธิ์กำจัดอนุมูล ABTS<sup>+</sup> ได้ดีที่สุดมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $64.04 \pm 3.3$  และ  $79.63 \pm 4.7$  ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

## ข้อเสนอแนะ

ตัวอย่างเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้ควรหาสภาวะในการเลี้ยงที่สามารถให้ผลผลิตที่มีปริมาณพอที่มากในครั้งเดียวในการดำเนินการแยกสารบริสุทธิ์ เพราะทำให้เกิดการยุ่งยากในการแปรรูปผลผลิต เพราะการเลี้ยงที่สภาวะต่างกัน อาจผลิตสารประกอบที่แตกต่างกันได้



## เอกสารอ้างอิง

- รัตนกรณั ศรีวิบูลย์. 2549. แอคติโนมัซซีท. ชลบุรี: สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา. 100 หน้า
- Adinarayana, G., Venkateshan, M.R., Bpiraju, V.V., Sujatha, P., Premkumar, J., Ellaiah, P., Zeeck, A. 2006. Cytotoxic compounds from the marine actinobacterium. *Bio Org Khim.*, 32, 328–334.
- Aizuddin, M.A.B., Athena, N.T. and Kui, W.N. 2013. Antioxidant and antimicrobial properties of marine Actinomycetes from Sipadan Island, Sabah. *Int J Biol Chem Sci.*, 7(2):750-759.
- Alessandra, B., Chandra, S., Matteo, P., Ivano, M, Jeannette, M. 2002. Antioxidant activity of flavonoids from *Licania licaniaeflora*. *Journal of Ethnopharmacology*, 79:379-381.
- Aparicio, J.F., Caffrey, P., Gil, J.A., Zotchev, S.B., 2003. Polyene antibiotic biosynthesis gene clusters. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61, 179–188.
- Arumugam, M., Mitra, A., Jaisankar, P., Dasgupta, S., Sen, T., Gachhui, R., Mukhopadhyay, U.K., Mukherjee, J. 2010. Isolation of an unusual metabolite 2-allyloxyphenol from a marine actinobacterium, its biological activities and applications. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 86: 109–117.
- Asolkar, R.N., Jensen, P.R., Kauffman, C.A. and Fenical, W. 2006. Daryamides A-C weakly cytotoxic polyketides from a marine derived actinomycete of the genus *Streptomyces* strain CNQ-085. *J Nat Prod.*, 69, 1756–1759.
- Atta, H.M. 2015. Biochemical studies on antibiotic production from *Streptomyces* sp.: Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties. *Journal of Saudi Chemical Society* (2015) 19, 12–22.
- Behal, V. 2003. Alternative sources of biologically active substance. *Folia. Microbiol* (Paraha). 48(5): 563-571.
- Berdy, JC. 1995. Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot.* 58:1-28
- Bhatnagar, I. and Kim, S-K. 2010. Immence essence of excellence: Marine microbial bioactive compounds. *Marine Drugs*, 8(10), 2673-2701.
- Boudemagh, A., Kitouni, M., Boughachiche, F., Hamdiken, H., Oulmi, L., Reghioia, S., Zerizer, H., Couble, A., Mouniee, D., Boulahrouf, A. and Boiron, P. 2005. Isolation and molecular identification of actinomycete microflora, of some saharian soils of south east

- Algeria (Biskra, EL-Oued and Ourgla) study of antifungal activity of isolated strains. *J. Med. Mycol.* 15:39-44.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *LebensmittelWissenschaft und Technologie* 28: 25–30.
- Bull, A.T. and Stach, J.E.K. 2007. Marine actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery. *Trend. Microbiol.*, 15: 491-499.
- Cho, J.Y., Kwon, H.C., Williams, P.G., Jensen, P.R. and Fenical, W. 2006. Azamerone, a terpenoid phthalazinone from a marine derived bacterium related to the genus *Streptomyces* (Actinomycetales). *Org. Lett.*, 8, 2471–2474.
- Cho, J.Y.; Williams, P.G.; Kwon, H.C.; Jensen, P.R.; Fenical, W. 2007. Lucentamycins A–D, cytotoxic peptides from the marine-derived actinomycete *Nocardioopsis lucentensis*. *J. Nat. Prod.*, 70, 1321–1328.
- Cotelle, J.A., Bernier, J.L. Catteau, J.B., Pommery, J., Wallet, J.C. and Gaydou, E.M. 1996. Free radical. *Bio. Med.*, 20:35.
- Cross, T. 1970. The diversity of bacterial spores. *J. App. Bacteriol.* 33:36-63.
- Dharmaraj, S., Sumantha, A. 2009. Bioactive potential of *Streptomyces* associated with marine sponges. *World J. Microbiol Biotechnol.*, 25, 1971–1979.
- Dietz A and Mathews J. 1971. Classification of *Streptomyces* spore surface into five groups. *Appl. Microbiol.* 21: 527-533.
- Durân, N., Erazo, S. and Campos, V. 1983. Bacterial chemistry-II: antimicrobial photoproduct from pigment of *Chromobacterium violaceum*. *Anais da Academia Brasileira de Cieñcias* 55, 231-234.
- Durân, N., Melo, P.S. and Haun, M. 1996. *In vitro* evaluation of violacein on AIDS-related lymphoma and human tumor cell lines. In XXV Annual Meetings of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology, pp. 150. Caxambu: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq).
- Fang, Y.Z., Yang, S., Wu, G. 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition, *Nutrition*, 18: 872-879.
- Feher, D., Barlow, R.S., Lorenzo, P.S. and Hemscheidt, T.K. 2008. A 2-Substituted Prodiginine, 2-(*p*-Hydroxybenzyl)prodigiosin, from *Pseudoalteromonas rubra*. *J. Nat. Prod.*, 71, 1970–1972.

- Fenglin, H., Ruili, L., Bao, H., and Liang, M. 2004. Free radical scavenging activity of extracts prepared from fresh leaves of selected Chinese medicinal plants. *Fitoterapia*, 75: 14-23.
- Fisher, P.B., Bryson, V., Schaffner, C.P., 1978. Polyene macrolide antibiotic cytotoxicity and membrane permeability alterations. I. Comparative effects of four classes of polyene macrolides on mammalian cells. *J. Cell Physiol.* 97 (3), 345–351.
- Gandhimathi R, Arunkumar M, Selvin J, Thangavelu T, Sivaramakrishnan S, Kiran GS, Shanmughapriya S, Natarajaseenivasan K. 2008. Antimicrobial potential of sponge associated marine Actinobacteria. *J Mycol Med.*, 18,16–22.
- Griffiths, M., Sistrom, W.R., Cohen–Battire, G. and Stanier, R.Y. 1955. Function of carotenoids in photosynthesis. *Nature*, 176 (4495), 1211–1214.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 1999. Free radicals in biology and medicine, 3<sup>rd</sup> ed., Oxford University Press, Oxford, 1-21.
- Hawas, U.W., Shaaban, M., Shaaban, K.A., Speitling, M., Maier, A., Kelter, G., *et al.* 2009. Mansouramycins A-D, cytotoxic isoquinolinequinones from a marine Streptomyce. *J Nat Prod*, 72:12, 2120–2124.
- Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley and S.T. Williams, 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9<sup>th</sup> Edn., Williams and Wilkins, Baltimore, pp: 518-537.
- Kieser, T., Bibb, M.J., Battner, M.J., Chater, K.F., Hopwood, D.A. (2007) In "Practical Streptomyces Genetics" John Innes Centre, Norwick, England.
- Kitouni M, Boudemagh A, Oulmi L, Reghioia S, Boughachiche F, Zerizer H, Hamdiken H, Couble A, Mouniee D, Boulahrouf A, Boiron P (2005). Isolation of actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of the north–east of Algeria. *J. Med. Mycol.* 15:45-51.
- Kumar, P.S., Al-Dhabi, N.A., Veeramuthu Duraipandiyar, V., Balachandran, C., Kumar, P.P. and Ignacimuthu, S. 2014. In vitro antimicrobial, antioxidant and cytotoxic properties of *Streptomyces lavendulae* strain SCA5. *BMC Microbiology*, 14:291
- Lazzarini, A., Cavaletti, L., Toppo, G., Marinelli, F., 2000. Rare genera of Actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek* 78, 399–405.
- Lechevalier, H.A., Acker, R.F., Corke, C.T., Haenseler, C.M., Waksman, S.A. (1953). Candicidin, a new antifungal antibiotic. *Mycologia*, 45, 155.

- Lechevalier, M.P., Lechevalier, H.A. 1970. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomyceta. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 20, 435-444.
- Lichstein, H.C. & Van de Sand, V.F. 1945. Violacein, an antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*. *Journal of Infectious Diseases*, 76, 47-51.
- Liu, G.Y. and Nizet, V. 2009. Color me bad: microbial pigments as virulence factors. *Trends in Microbiology*, 17 (9), 406-413.
- Macherla VR, Liu J, Bellows C, Teisan S, Nicholson B, Lam KS and Potts BCM. 2005. Glaciapyrroles A, B and C pyrrolsesquiterpenes from a *Streptomyces* sp. isolated from an Alaskan marine sediment. *J Nat Prod* 68:780–783.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V. and Clark, D.P. 2009. In “Brock Biology of Microorganism” Twelfth edition. Pearson, Benjamin Cummings, Pearson Education, Inc.
- Malecha, M.A., 2004. Fungal keratitis caused by *Scopulariopsis brevicaulis* treated successfully with natamycin. *Cornea*. 23 (2), 201–203.
- Margalith, P.Z. 1992. *Pigment Microbiology*, Chapman & Hall Publ., London, GB.
- Maskey, R.P., Puseckera, K., Speitlinga, M., Moneckea, P., Helmkeb, E, Laatscha, H. 2002. 200-Chartreusin-monoacetate, a new natural product with unusual anisotropy effects from the marine isolate *Streptomyces* sp. B5525, and its 400-isomer. *Z Naturforsch.*, 57, 823–829.
- May, G., BruÈmmer, B. and Ott, H. 1991. Verfahren zur isolierung von violacein und seine verwendung zur prophylaxe und therapie von viruserkrankungen. Deutsches Patentamt Offenlegungsschrift DE 3,935,066 (CL.C12P17/16), 25 April 1991, Application. 20 October 1989, 5pp.
- Olano, C, Méndez, C., Salas, J.A. 2009. Antitumor compounds from actinomycetes: from gene clusters to new derivatives by combinatorial biosynthesis. *Nat. Prod. Rep.*, 26, 628-660.
- Piel, J: Metabolites from symbiotic bacteria. *Nat Prod Rep* 2009, 26:338-362.
- Porter, J.N. 1971. Prevalence and distribution of antibiotic-producing actinomycetes. *Advances in Applied Microbiology*, 14: 73–92.

- Prajna, N.V., Rao, R.A., Mathen, M.M., Prajna, L., George, C., Srinivasan, M., 2002. Simultaneous bilateral fungal keratitis caused by different fungi. *Indian J. Ophthalmol.* 50 (3), 213–214.
- Revathy, T., Jayasri, M.A.; Suthindhiran, K. 2013. Antioxidant and enzyme inhibitory potential of marine streptomycetes. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 9(3): 282-290.
- Roberfroid, M. B. and Calderon, P. B. 1995. Free radicals and oxidation phenomena in biological systems. Marcel Dekker. Inc. New York., U.S.A.
- Saurav, K; Kannabiran, K. 2012. Cytotoxicity and antioxidant activity of 5-(2,4 dimethylbenzyl) pyrrolidin-2-one extracted from marine *Streptomyces* VITSVK5 spp. *Saudi Journal of Biological Science*, 19: 81-86.
- Shin, H.J., Kim, T.S., Lee, H.S., Park, J.Y., Choi, I.K., Kwon, H.J. 2008. Streptopyrrolidine, an angiogenesis inhibitor from a marinederived *Streptomyces* spp. KORDI-3973. *Phytochemi*, 69: 2363–2366.
- Sies, H., Stahl, W. and Sundquist, A. 1992. Antioxidant functions of vitamins, vitamin E and C, beta-carotene and other carotenoids. *Annals of the New York Academy of sciences*. 368: 7-19.
- 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(2), 112-114.
- Swan, D. G., A. M. Rodriguez, C. Vilches, C. Me´ndez, and J. A. Salas. 1994. Characterisation of a *Streptomyces antibioticus* gene encoding a type I polyketide synthase which has an unusual coding sequence. *Mol. Gen. Genet.* 242:358–362.
- Thenmozhi, M. and Kannabiran, K. 2012. Antimicrobial and antioxidant properties of marine actinomycetes *Streptomyces* sp VITSTK7. *Oxid Antioxid Med Sci* 2012; 1(1):51-57.
- Tresner, H.D., Davies, M.C., Backus, E.J. 1961. Electron microscopy of *Streptomyces* spore morphology and its role in species differentiation. *J. Bact.* 81, 70.
- Valacchi, G. *et al.* 2004. In vivo ozone exposure induces antioxidant stress-related responses in murine lung and skin. *Free Radical Biology and Medicine* 36: 673-681.
- Waksman, S.A. 1967. The actinomycetes. A summary of current knowledge. Ronald Press Co., New York.

Williams, S.T., Goodfellow, M., Alderson, G. 1989. Genus *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943, 339AL. In: Williams ST, Sharpe ME, Holt JG (eds.) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 4, Williams and Wilkins, Baltimore, 2452-2492.

## ภาคผนวก ก

### อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

#### 1. อาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-2 (yeast extract – malt extract agar )

Bacto – yeast extract 4.0 กรัม

Bacto – malt extract 10.0 กรัม

Bacto – glucose 4.0 กรัม

น้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร      สำหรับเลี้ยงเชื้อ รหัส CP-PH

Bacto – yeast extract 4.0 กรัม

Bacto – malt extract 10.0 กรัม

Bacto – Glucose 4.0 กรัม

น้ำทะเล+น้ำกลั่น 200+800 มิลลิลิตร      สำหรับเลี้ยงเชื้อ รหัส CH , A

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำ 1000 มิลลิลิตร ละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 1000 และ 2000 มิลลิลิตร ตามลำดับ และส่วนที่ทำเป็นอาหารแข็งเติม 1.5 % Agar ทำการเทอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ขวดที่เตรียมไว้ แล้วนำไปใส่หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

## 2. วิเคราะห์ฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ DPPH<sup>•</sup>

### 2.1 วิธีเตรียมสารละลาย

0.2 mM DPPH ในเมทานอล ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (DPPH; M.W. = 394.323 g/mol)

- ชั่งน้ำหนักสาร DPPH 0.00394 กรัม ละลายด้วยเมทานอล ในขวดปรับปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร เก็บไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 4.0 องศาเซลเซียส สารละลายที่เตรียมเก็บได้ไม่เกิน 3 วัน

### 2.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Ascorbic acid

ชั่งน้ำหนัก Ascorbic acid 0.002 กรัม (จุดบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน) ละลายด้วยเมทานอล 1000 ไมโครลิตร สารละลายที่ได้เป็นสารละลายมาตรฐาน stock ความเข้มข้น 2000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เจือจางสารละลายมาตรฐาน stock ที่เตรียมไว้ด้วยเมทานอล ให้ได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ทำการทดสอบช่วง 0.781 – 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

### 2.3 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่างแอสคิโนมายซ์ 0.008 กรัม (จุดบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน) ละลายด้วยเมทานอล 1000 ไมโครลิตร สารละลายที่ได้เป็นสารละลาย stock ความเข้มข้น 8000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เจือจางสารละลายมาตรฐาน stock ที่เตรียมไว้ด้วยเมทานอล ให้ได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 800 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ทำการทดสอบช่วง 3.13 – 400 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

## 3. วิเคราะห์ฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ ABTS<sup>+•</sup>

### 3.1 วิธีเตรียมสารละลายอนุมูล ABTS<sup>+•</sup>

- เตรียมสารละลาย ABTS<sup>+•</sup> ให้มีความเข้มข้น 7 mM โดยชั่ง ABTS 0.0192 กรัม ละลายและปรับปริมาตรให้เป็น 5 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

- เตรียมสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ( $K_2S_2O_8$ ) ความเข้มข้น 140 mM โดยชั่งโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต 0.3784 กรัม ละลายและปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

- ผสมสารละลาย 7 mM ABTS 2 มิลลิลิตร และสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต 140 mM ( $K_2S_2O_8$ ) 35.5 ไมโครลิตร (ซึ่งทำให้ความเข้มข้นสุดท้ายของโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟตประมาณ 2.45 mM) ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมงก่อนนำไปใช้งาน

- เจือจางสารละลายอนุมูล ABTS<sup>+•</sup> ด้วยเมทานอล โดยเปิดสารละลาย ABTS<sup>+•</sup> stock มา 140 ไมโครลิตร กับเมทานอล 7 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง  $0.70 \pm 0.02$  ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร (วัดค่าได้ 0.714 นาโนเมตร)



### 3.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Trolox

- ชั่งน้ำหนัก Trolox 0.002 กรัม (จดบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน) ละลายด้วยเมทานอล 1000 ไมโครลิตร สารละลายที่ได้เป็นสารละลายมาตรฐาน stock ความเข้มข้น 2000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เจือจางสารละลายมาตรฐาน stock ที่เตรียมไว้ด้วยเมทานอล ให้ได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 0.195 – 25.00 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

### 3.3 การเตรียมสารตัวอย่าง

- ชั่งตัวอย่างแอสคิโนมายซีท 0.002 กรัม (จดบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน) ละลายด้วยเมทานอล 1000 ไมโครลิตร สารละลายที่ได้เป็นสารละลาย stock ความเข้มข้น 2000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เจือจางสารละลายตัวอย่าง stock ที่เตรียมไว้ด้วยเมทานอล ให้ได้สารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 3.13 – 400 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

## ภาคผนวก ข

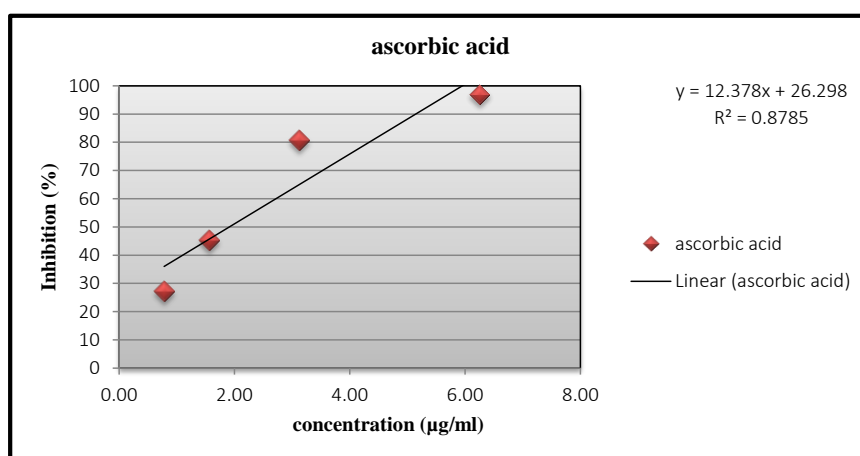
### การหาค่า $IC_{50}$ ในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH

#### 1. การหาค่า $IC_{50}$ ของ ascorbic acid

จากสมการ  $y = 12.378x + 26.298$  ;  $R^2 = 0.8785$

แทนค่า  $y = 50$ ;  $x = (50 - 26.298) / 12.378$   
 $= 1.915$

ดังนั้น ความเข้มข้นสารที่  $IC_{50} = 1.915$  ไมโครกรัม/มิลลิลิตร



ภาพที่ ข-1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า IC กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน

#### 2. การหาค่า $IC_{50}$ ของสารสกัดหยาบของแอคติโนมัซซีท

ตัวอย่าง สารสกัดหยาบของแอคติโนมัซซีทชั้นน้ำเลี้ยง CP-PH3-2 M

จากสมการ  $Y = 0.182x + 25.759$  ;  $R^2 = 0.9283$

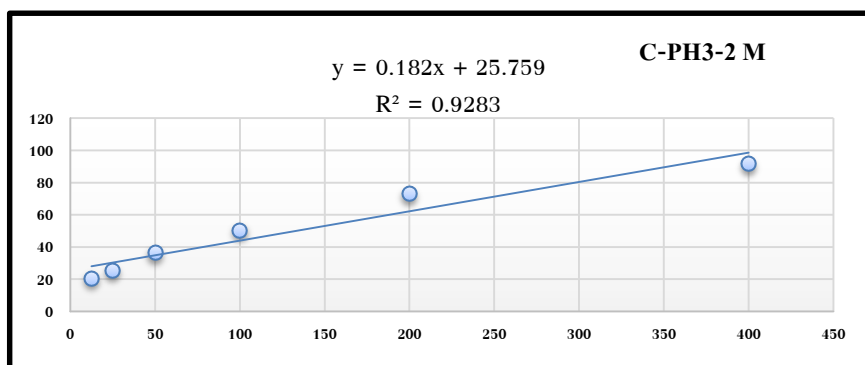
โดยที่  $y =$  ค่า IC มีค่า = 50

$x =$  ค่าความเข้มข้น ( $\mu\text{g/mL}$ )

แทนค่าลงในสมการจะได้  $x = (50 - 25.759) / 0.182$

$x = 133.19$  ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ดังนั้น ความเข้มข้นสารที่  $IC_{50}$  ของ CP-PH3-2 M = 133.19 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร



ภาพที่ ข-2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า IC กับความเข้มข้นสารสกัดของ CP-PH3-2 M

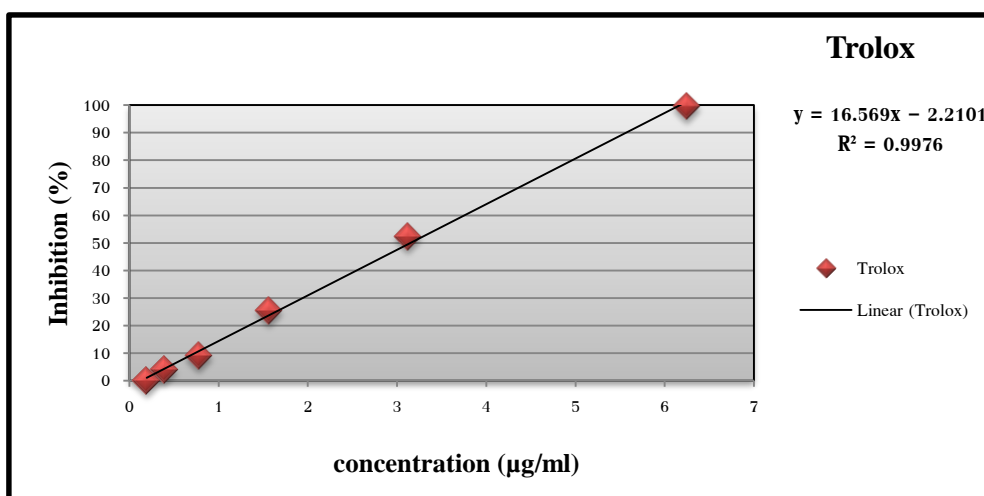
**ภาคผนวก ค**  
**การหาค่า IC<sub>50</sub> ในการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS<sup>+</sup>**

**1. การหาค่า IC<sub>50</sub> ของ Trolox**

จากสมการ  $y = 16.569x - 2.2101$  ;  $R^2 = 0.9976$

$$\begin{aligned} \text{แทนค่า } y = 50; \quad x &= (50 + 2.2101) / 16.569 \\ &= 3.15 \end{aligned}$$

ดังนั้น ความเข้มข้นสารที่ IC<sub>50</sub> = 3.15 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร



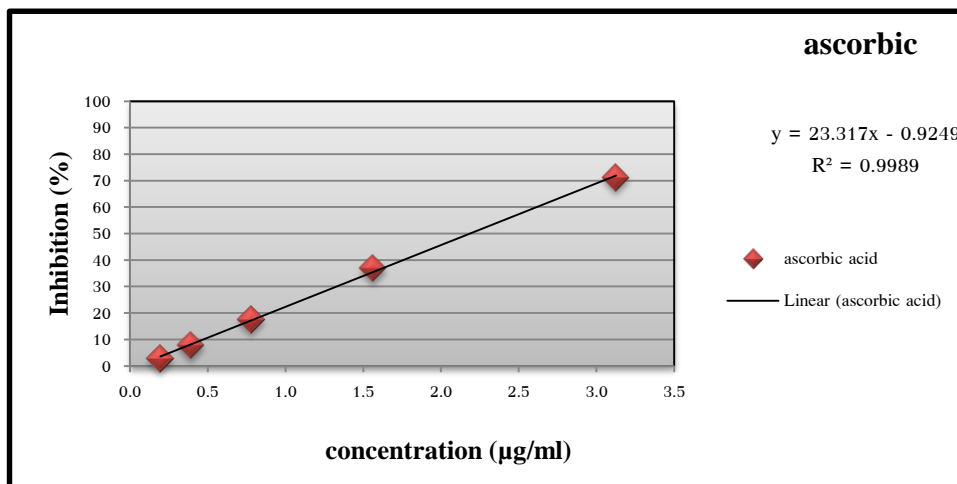
ภาพที่ ค-1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า IC กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน

**2. การหาค่า IC<sub>50</sub> ของ ascorbic acid**

จากสมการ  $y = 23.317x - 0.9249$  ;  $R^2 = 0.9989$

$$\begin{aligned} \text{แทนค่า } y = 50; \quad x &= (50 + 0.9249) / 23.317 \\ &= 2.18 \end{aligned}$$

ดังนั้น ความเข้มข้นสารที่ IC<sub>50</sub> = 2.18 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร



ภาพที่ ค-2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า IC กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน

### 3. การหาค่า $IC_{50}$ ของส่วนสกัดหยาบของแอกติโนมัชชีท

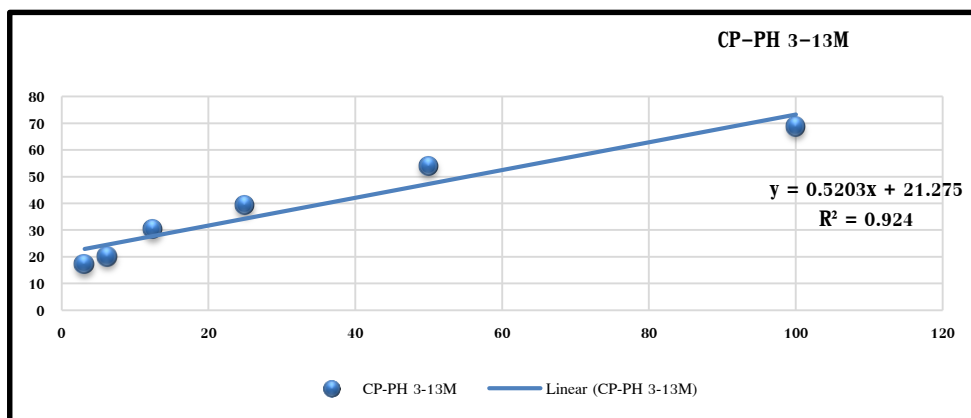
ตัวอย่าง สารสกัดหยาบของแอกติโนมัชชีทเข้มข้นน้ำเลี้ยง CP-PH3-13 M

จากสมการ  $Y = 0.5203x + 21.275$ ;  $R^2 = 0.924$

แทนค่า  $y = 50$ ;  $x = (50 - 21.275) / 0.5203$

$x = 55.21$  ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ดังนั้น ความเข้มข้นสารที่  $IC_{50}$  ของ CP-PH3-13 M = 55.21 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร



ภาพที่ ค-3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า IC กับความเข้มข้นสารสกัดของ CP-PH3-13 M