รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาการเพิ่มผลผลิตสารสี และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ของเชื้อแอคติโนมัยซีท

Development for the enhanced production of pigments and bioactive compounds from actinomycetes

จันทร์จรัส วัฒนะโชติ

รวิวรรณ วัฒนดิลก

ณิษา สิรนนท์ธนา

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้

จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559

มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ
สัญญาเพิ่มเติม 57/2559

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาการเพิ่มผลผลิตสารสี และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีท

Development for the enhanced production of pigments and bioactive compounds from actinomycetes

จันทร์จรัส วัฒนะโชติ
รวิวรรณ วัฒนดิลก
ณิษา สิรนนท์ธนา

สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุดรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ สัญญาเพิ่มเติมที่ 57/2559

การพัฒนาการเพิ่มผลผลิตสารสี และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ
ของเชื้อแอคติโนมัยซีท

จันทร์จรัส วัฒนะโชติ รวิวรรณ วัฒนดิลก และณิษา สิรนนท์ธนา
สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา อ. เมือง ชลบุรี

บทคัดย่อ

จากการนำเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากดินตะกอนป่าชายเลนจำนวน 4 ไอโซเลท ศึกษาการผลิตสารสี ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ โดยเลี้ยงในอาหารแตกต่างกัน 3 สูตร ได้แก่ ISP2 ISP3 และ OYG (oatmeal yeast extract และ glycerol) ที่ความเค็มแตกต่างกัน พบว่าเชื้อแต่ละไอโซเลทให้ปริมาณมวลชีวภาพ และการออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกัน การทดลองเพิ่มปริมาณผลผลิตสารสีจากการเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces parvulus* (CP58-4-21) พบว่าอาหารสูตร ISP3 และ OYG ที่มีข้าวโอ๊ตเป็นแหล่งคาร์บอนให้น้ำหนักของสารสกัดหยาบมากที่สุดจากส่วนของเซลล์คือ 0.1331 และ 0.1049 กรัม ตามลำดับ และพบว่าสารสกัดหยาบจากส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหารทั้ง 2 สูตร ให้สารสีเหลือง สารสีเมื่อตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 4000 ลักซ์ เป็นเวลา 60 วัน มีการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงร้อยละ 33

ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบของเชื้อแอคติโนมัยซีทในกลุ่ม Streptomyces ได้แก่ A1-3, A3-3 และ A16-1 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและผลิตสารทุติยภูมิของเชื้อ คือ เลี้ยงด้วยอาหาร ISP3 ที่ความเค็ม 25 พีพีที ในขณะที่เชื้อ *S. parvulus* ควรเลี้ยงในอาหาร ISP2 ที่ความเค็ม 17 พีพีที โดยมีน้ำตาลเด็กโตรสเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเลี้ยงเชื้อนาน 10 วัน จะให้ปริมาณมวลชีวภาพมากที่สุด สารทุติยภูมิที่ผลิตได้จะถูกปล่อยไปในน้ำเลี้ยงเมื่อเลี้ยงเชื้อ14 วัน ทำให้ปริมาณสารสกัดในน้ำเลี้ยงมากเพิ่มขึ้น จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด พบว่าเชื้อ A1-3 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร ISP3 ความเค็ม 17 พีพีที นาน 7 วัน สามารถผลิตสารทุติยภูมิในชั้นน้ำเลี้ยง ได้ 0.0138 มิลลิกรัม และแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ที่ IC50 58.07+2.09 พีพีเอ็ม

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์เมื่อเลี้ยงเชื้อ *S. parvulus* ในอาหารเหลว ISP2 ที่ความเค็ม 7 ระดับ แล้วทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย 3 ชนิด *Escherichia coli, Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus* และเชื้อรา *Candida albicans* พบว่าความเค็มของน้ำทะเลที่ใช้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ 35 พีพีที ให้ปริมาณสารสกัดหยาบมากที่สุดจากส่วนของน้ำเลี้ยง และการเลี้ยงเชื้อที่ความเค็ม 40 พีพีที สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้ดีที่สุด (20±1มิลลิเมตร) แต่ไม่แตกต่างจากความเค็มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่าอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อต่างชนิดกันมีผลต่อการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราอย่างชัดเจน โดยเชื้อที่เลี้ยงในอาหารสูตร ข้าวโอ๊ต ยีสต์สกัด และกลีเซอรอล ผลิตสารที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราดังกล่าวได้ดีที่สุด และแตกต่างจากการเลี้ยงเชื้อในอาหาร ISP2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

Development for the enhanced production of pigments and bioactive compounds from actinomycetes

Janjarus Watanachote Rawiwan Watanadilok and Nisa Siranonthana

Abstract

Four isolates of marine actinomycetes were separated from sediment which collected form mangrove areas. These isolates were then screened for pigment production antioxidant and antibacterial activity. The actinomycetes were cultured in ISP2 ISP3 or OYG (oatmeal, yeast extract and glycerol) medium at different salinity levels. *Streptomyces parvulus* (CP58-4-21) gave high crude extract from cells at 0.1331 and 0.1049 g when cultured in ISP3 and OYG medium respectively which oatmeal is major component. However, absorption of yellow pigment of crude extract was reduced 33% at light intensity 4000 lux 25^{O}C for 60 days.

The enrichment of an actinomycete, Streptomyces A1-3, A3-3 and A16-1 in different types of culture media were further investigated for antioxidant activities. The result indicated that the most suitable media for A1-3, A3-3 and A16-1 was ISP3 and salinity at 25 ppt while *S. pavulus* medium was ISP2 salinity at 17 ppt. The results of antioxidant activity from crude extract of A1-3 which cultured in ISP3 salinity 17 ppt for 7 days exhibited high ABTS radical scavenging activity with IC50 value of 58.07+2.09 ppm. The cultivation of actinomycetes gave high biomass for 10 days while secondary metabolite secrete from cells to medium after cultured for 14 days.

This research was to study the influence of salinity and culture media on growth of marine actinomycete, *S. parvulus,* to produce high yield of crude extract and their antimicrobial activities. Antibacterial and antifungal activities were observed against *Escherichia coli, Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* and fungus *Candida albicans*. *S. parvulus* was cultured in seven levels of salinity of natural sea water and using ISP2 as culture medium. It was found that salinity at 35 ppt gave the highest yield of crude extracts from supernatant. In addition, crude extract from cells which cultured at salinity 40 ppt showed the highest inhibition zone against *E. coli* at 20±1mm not significant difference with other salinity (P>0.05). Cultivation of actinomycete with different medium fomulas affected for the bioactive metabolites production. The actinomycete cultured in formula, Oatmeal Yeast Extract and Glycerol medium produced substances that inhibited those bacteria and fungus higher than ISP2 statistically significant (P<0.05).

สารบัญ

	หน้า
บทนำ	1
การทบทวนวรรณกรรม/ สารสนเทศ (Information)ที่เกี่ยวข้อง	6
วิธีการทดลอง	28
ผลการศึกษา	39
อภิปราย และสรุปผลการทดลอง	66
สรุปผลการศึกษา	71
เอกสารอ้างอิง	74
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	85
ภาคผนวก ข สัณฐานและภาพ SEM ของเชื้อแอคติโนมัยซีท	89
ภาคผนวก ค ลำดับเบสของเชื้อแอคติโนมัยซีท 16S rRNA gene	94
ภาคผนวก ง กราฟการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS•+ ของสารละลายมาตรฐาน Ascorbic acid และ Trolox	99
ภาคผนวก จ ข้อมูลการตายของอาร์ทีเมียตาม ณ เวลาต่างๆ	101

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การทดสอบความเป็นพิษของ DMSO ต่ออาร์ทีเมีย	36
2	การเตรียมอาร์ทีเมียสำหรับทดสอบความเป็นพิษ	37
3	การเตรียมสารสกัดหยาบแอคติโนมัยซีทสำหรับทดสอบความเป็นพิษ	38
4	น้ำหนักของเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารแตกต่างกัน 4 สูตร	40
5	น้ำหนักสารสกัดหยาบจากส่วนสารละลายน้ำเลี้ยงเชื้อและส่วนของเซลล์จากการเลี้ยงเชื้อ *S. parvulus* ด้วยอาหารแตกต่างกัน 3 สูตร	40
6	ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหยาบที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทเข้มข้น 500 ppm	41
7	ผลของความเค็มต่อน้ำหนักสารสกัดหยาบจากส่วนของสารละลายน้ำเลี้ยงเชื้อและปริมาณสารสีที่ได้ จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร	42
8	ผลของความเค็มต่อน้ำหนักสารสกัดหยาบจากส่วนของเซลล์ และปริมาณสารสีที่ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร	43
9	การทดสอบความคงตัวของสีที่ความยาวคลื่น 410 nm ของสารสกัดแอคติโนมัยซีท *S. indiaensis* (A1-3) ในส่วน supernatant	45
10	การทดสอบความคงตัวของสีที่ความยาวคลื่น 495 nm ของสารสกัดแอคติโนมัยซีท *S. coelicoflavu* ในส่วน supernatant	45
11	การทดสอบความคงตัวของสีที่ความยาวคลื่น 530 nm ของสารสกัดแอคติโนมัยซีท *S. parvulus* ในส่วน supernatant	46
12	การทดสอบความคงตัวของสีที่ความยาวคลื่น 450 nm ของสารสกัดแอคติโนมัยซีท *S. parvulus* ในส่วน supernatant	46
13	การหลุดของโปรตีนทั้ง 4 ชนิด ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต	47
14	การหลุดของสารสีจากแอคติโนมัยซีททั้ง 4 ชนิด ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต	48
15	ข้อมูลตัวอย่างแอคติโนมัยซีทและน้ำหนักสารสกัดหยาบสำหรับศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	50
16	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ(Antioxidant activity) ในสารสกัดหยาบส่วนเซลล์เชื้อแอคติโนมัยซีทที่เลี้ยงด้วยอาหารและความเค็มที่ต่างกัน	54

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

ตารางที่		หน้า
17	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ(Antioxidant activity) ของสารสกัดส่วน supernatant A1-3 ISP3 ความเค็ม 17ppt	56
18	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ(Antioxidant activity) ของสารสกัดหยาบส่วน supernatant *S. coelicoflavu* อาหาร ISP2ความเค็ม 17ppt	57
19	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ(Antioxidant activity) ของสารสกัดหยาบส่วน supernatant CP58-4-21 เลี้ยงด้วยอาหาร ISP2 ความเค็ม 17ppt เป็นระยะเวลา 7 วัน	58
20	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดส่วนน้ำเลี้ยงของแอคติโนมัยซีท *S. indiaensis* (A1-3) อาหาร ISP3 ที่ความเค็มแตกต่างกัน 3 ระดับ	60
21	ผลของอาหารและความเค็มต่อน้ำหนักสารสกัดหยาบของเชื้อแอคติโนมัยซีท *S. parvulus*	62
22	ผลของความเป็นพิษของ Dimethyl Sulfoxide (DMSO) ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันต่ออาร์ทีเมีย	64
23	ผลของสารสกัดจากแอคคติโนมัยซีทต่อร้อยละการตายของอาร์ทีเมีย	65
จ-1	การทดสอบผลของความเป็นพิษของ Dimethyl Sulfoxide (DMSO) ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันต่อการตายของอาร์ทีเมียจำนวน 10 ตัว	102
จ-2	ผลของสารสกัดจากแอคคติโนมัยซีท A1-3 ต่อการตายของอาร์ทีเมียจำนวน 10 ตัว	103
จ-3	ผลของสารสกัดจากแอคคติโนมัยซีท A3-3 ต่อการตายของอาร์ทีเมียจำนวน 10 ตัว	105
จ-4	ผลของสารสกัดจากแอคคติโนมัยซีท A16-1 ต่อการตายของอาร์ทีเมียจำนวน 10 ตัว	106
จ-5	ผลของสารสกัดจากแอคคติโนมัยซีท CP58-4-21 ต่อการตายของอาร์ทีเมียจำนวน 10 ตัว	107

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	การเปรียบเทียบลำดับที่คล้ายคลึงกันของยีน *16S rRNA* และ DNA-DNAbinding	8
2	โครงสร้างทางเคมีของกรดแกลลิก	18
3	โครงสร้างทางเคมีของโทรลอกซ์	19
4	โครงสร้างทางเคมีของบีเอชเอ	19
5	โครงสร้างคลอโรฟิลล์	24
6	โครงสร้างแอนโทไซยานิน	25
7	โครงสร้างหลักของฟลาโวนอยด์กลุ่มต่าง ๆ	25
8	โครงสร้างของสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์	26
9	น้ำหนักเซลล์จากการเลี้ยงเชื้อ *S. parvulus* ด้วยอาหาร ISP2 ที่ความเป็นกรด-ด่าง และความเค็มแตกต่างกัน	39
10	โครมาโทแกรมค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหยาบจากสารละลายน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2, ISP 3 และ OYG	41
11	โครมาโทแกรมค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหยาบจาก Supernatant และ จาก เซลล์จากการเลี้ยงเชื้อ *S. parvulus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ OYG	42
12	น้ำหนักเซลล์จากการเลี้ยงเชื้อ *S. indiaensis* (A1-3) ด้วยอาหาร ISP2 ที่ความเป็นกรด-ด่าง และความเค็มแตกต่างกัน	44
13	ผลการทดสอบเบื้องต้นของสารสกัดหยาบเชื้อแอคติโนมัยซีท *S. indiaensis* (A1-3)	49
14	ความคงตัวของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดส่วน supernatant *S. indiaensis* (A1-3) ISP3 ความเค็ม 17ppt	57
15	แสดงความคงตัวของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบส่วน supernatant *S. coelicoflavu* อาหาร ISP2 ความเค็ม 17ppt	58
16	แสดงความคงตัวของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบส่วน supernatant *S. parvulus* เลี้ยงด้วยอาหาร ISP2 ความเค็ม 17ppt เป็นระยะเวลา 7 วัน	59
17	ผลของความเค็มและอาหารต่อความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของเชื้อแอคติโนมัยซีท *S. parvulus*	63
ข-1	สัณฐานของเชื้อแอคติโนมัยซีท *Streptomyces indiaensis* (A1-3)	90
ข-2	สัณฐานของเชื้อแอคติโนมัยซีท *Streptomyces indiaensis* (A3-3)	91

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
ข-3	สัณฐานของเชื้อแอคติโนมัยซีท *Streptomyces coelicoflavu*	92
ข-4	สัณฐานของเชื้อแอคติโนมัยซีท *Streptomyces parvulus*	93
ง-1	กราฟการยับยั้งอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet +}$ ของสารละลายมาตรฐาน Ascorbic acid	100
ง-2	กราฟการยับยั้งอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet +}$ ของสารละลายมาตรฐาน Trolox	100

บทนำ

การค้นหาสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีฤทธิ์ทางยาตัวใหม่ๆ มักจะรวมสารจากเชื้อแอคติโนมัยซีท เช่น สายพันธุ์ *Streptomyces* จากตัวอย่างดิน เชื้อแอคติโนมัยซีทได้ถูกนำไปใช้ประโยชน์โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับอุตสาหกรรมยา โดยสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลายและมีมูลค่าทางการค้าสูง นอกจากนี้ยังมุ่งเน้นการผลิตสารทุติยภูมิที่มีการนำไปประยุกต์ใช้ทางเภสัชวิทยาและเทคโนโลยีชีวภาพด้านอื่นๆ (Takahashi, 2004) เชื้อ *Streptomyces* ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวางว่าเป็นสิ่งมีชีวิตที่สำคัญในอุตสาหกรรม และสามารถผลิตสารทุติยภูมิตัวใหม่ๆที่ซับซ้อนที่มีความแตกต่างกันได้ อีกทั้งยังเป็นผู้ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประโยชน์ (Tanaka และ Omura, 1990) เช่น สารยับยั้งจุลินทรีย์ หรือสารที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของพืช หรือสารที่ยับยั้งเอนไซม์ ยับยั้งปรสิต ต้านเซลล์มะเร็ง เป็นต้น (Bonjar, 2004) สารผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติหลายชนิดทั้งจากการสังเคราะห์หรือที่หลั่งมาจากสิ่งมีชีวิตล้วนแล้วแต่เป็นแหล่งที่สำคัญของตัวยาที่มีศักยภาพที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเหล่านี้เป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลเล็กที่หลั่งมาจากสิ่งมีชีวิตซึ่งไม่แสดงการทำงานให้เห็นภายในเซลล์และรู้จักในฐานะสารทุติยภูมิซึ่งรวมถึงสารสีหรือที่รู้จักในนามชีวรงควัตถุ (biopigments) สารเหล่านี้มีผลสำคัญต่อสุขภาพ คุณค่าอาหาร และทางเศรษฐกิจ ในปัจจุบันสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติเป็นส่วนหนึ่งของตลาดโภชนเภสัช (nutraceutical) เนื่องจากความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสารอนุมูลอิสระนี้มีส่วนเกี่ยวข้องในสาเหตุของโรคร้ายแรงของมนุษย์รวมถึงการเกิดเนื้องอก หรือมะเร็ง ในอดีตที่ผ่านมางานวิจัยในการค้นหาตัวยา และ nutraceutical ความต้องการในด้านโภชนเภสัช หรือสารในอาหารที่ทำหน้าที่ในร่างกาย (functional foods) ได้รับความสนใจจากทั่วโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในปัจจุบันมีหลายประเทศเข้าสู่สังคมผู้สูงวัย หรือกำลังจะเข้าสู่สังคมผู้สูงวัย ในอีก 10 ปีข้างหน้า ซึ่งมีความต้องการสารเสริมอาหารนอกเหนือจากคุณค่าทางโภชนาการ และความต้องการพลังงานพื้นฐานที่มนุษย์ได้รับจากอาหาร เพื่อประโยชน์ทางสรีรวิทยา ป้องกันโรค รักษาโรค และชะลอความชรา เป็นต้น

แอคติโนมัยซีทเป็นสิ่งมีชีวิตกลุ่มหนึ่งที่เป็นผู้ผลิตสารทุติภูมิที่มีประสิทธิภาพที่สุด และยังมีความสำคัญในอุตสาหกรรมด้วย จากการศึกษาพบว่าแอคติโนมัยซีทหลายๆชนิด เช่น*Streptomyces, Saccharopolyspora, Amycolatopsis, Micromonospora* และ *Actinoplanes* เป็นผู้ผลิตหลักของสารชีวโมเลกุลที่สำคัญทางการค้า ข้อจำกัดของสารอาหารหรือโอกาสที่การเติบโต มักจะเป็นปัญหาในส่วนของการสร้างสารทุติยภูมิ ซึ่งได้รับอิทธิพลจาก carbon catabolic, nitrogen metabolite และphosphateregulation (Martin และ Demain, 1980) สารทุติยภูมิของจุลินทรีย์มีผลสำคัญต่อสุขภาพโภชนาการและเศรษฐกิจของสังคมมนุษย์ สารทุติยภูมิเหล่านี้รวมถึงยาปฏิชีวนะ ยาต้านไวรัส สารสี สารต้านอนุมูลอิสระ ฟีโรโมน สารยับยั้งเอนไซม์ สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ตัวยาต้านเนื้องอก และสารส่งเสริมการเจริญเติบโต จะแสดงสเปกตรัมของฤทธิ์ทางชีวภาพนั้นๆ เช่น สารสีม่วง

น้ำเงินของ Violacein (3-[1,2-dihydro-5-(5-hydroxy-1H-indol-3-yl)-2-oxo-3H-pyrrol-3-ilydene]-1,- 3-dihydro-2H-indol-2-one) ซึ่งเป็นสารกลุ่มอนุพันธุ์อินโดล (indole derivative) แยกได้จากแบคทีเรีย *Chromobacterium* สาร Violacein มีฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลากหลาย มีความสำคัญในการประยุกต์ทางอุตสาหกรรมยา ได้แก่ สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็ง ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ยับยั้งเชื้อไวรัส มีความเป็นพิษ ยับยั้งโปรโตซัว และป้องกันอนุภาครังสี (Durán *et al*., 2007) เชื้อ *Streptomyces* ทะเลเป็นเชื้อชนิดหนึ่งที่นำไปสู่การค้นพบอย่างกว้างขวางของสารสีที่มีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์ เช่น ผลึกสีเหลืองของสาร streptochlorin แยกจาก *Streptomyces* sp. 04DH110 (Shin *et al*., 2007) สีน้ำเงินและสีแดง ammosamides A และ B แยกจาก *Streptomyces* strain CNR-698 (Hughes *et al*., 2009), สีเหลือง N-carboxamidostaurosporine แยกจาก *Streptomyces* sp. (Wu *et al*., 2006) มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง นอกจากนี้เชื้อ *Streptomyces* sp. USF-319 สามารถผลิตสารต้านอนุมูลอิสระ 3 ชนิด ซึ่งยับยั้งเอนไซน์ 5-lipoxygenase สารทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ mycotrienin II, trienomycinA and trienomycin B สารพวกคาโรทีนอยด์ก็แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเช่นกัน ตัวอย่างเช่น astaxanthin, beta carotene, lycopene เป็นต้น (Lee and Min, 1990) พบว่าการผลิต carotenoids จากเชื้อ*B. trispora* and *Xanthophyllomyces dendrorhous* เมื่อเติมสาร Span 20 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ *B. Trispora* และปรับ pH ให้มีค่า 10 จะได้สาร â-carotene เพิ่มขึ้นจาก 0.15 g/L เป็น 2.16g/L (Kim *et al*., 1997) การผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพให้มีปริมาณสูงขึ้นเป็นปัจจัยสำคัญในอุตสาหกรรมยา การเพิ่มผลผลิตสายพันธุ์ที่เตรียมไว้โดยใช้ผลของการกลายพันธุ์ (mutagen) แสดงให้เห็นหลายครั้งว่าวิธีนี้สามารถเพิ่มปริมาณผลผลิตได้เพื่อตอบสนองความต้องการที่เพิ่มขึ้นในอุตสาหกรรมยาที่มีความจำเป็นในการปรับปรุงประสิทธิภาพการทำงานของระบบเพิ่มผลผลิต การเจริญเติบโตและการผลิตผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากสิ่งมีชีวิตมีอิทธิพลอย่างมากจากองค์ประกอบของอาหาร (medium) จึงเพิ่มประสิทธิภาพขององค์ประกอบและพารามิเตอร์ของการเพาะเลี้ยง เป็นงานหลักในกระบวนการทางชีวภาพ

เชื้อแบคทีเรียทางทะเลเป็นที่สนใจของนักวิจัยในยุคปัจจุบัน เพราะสามารถผลิตสารที่มีคุณสมบัติทางชีวภาพที่ไม่ซ้ำกันได้ (Fenical, 1993) จนถึงขณะนี้เชื้อ *Streptomyces, Pseudomonas, Pseudoalteromonas, Bacillus*, *Vibrio* และ *Cytophaga* ที่แยกได้จากน้ำทะเล ตะกอนดิน สาหร่ายและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเล สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมากมาย สารเหล่านี้ได้แก่ อนุพันธ์อินโดล (Quinones และ violacein), อัลคาลอยด์ (prodiginines และ tambjamines) พวก polyenes, macrolides, เปปไทด์ เทอร์พีน และคาโรทีนอยด์ สารสีจากธรรมชาติบางตัวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย ปัจจุบันมีอุตสาหกรรมหลายประเภทที่ผลิตสีจากจุลินทรีย์เพื่อใช้ในอาหาร เครื่องสำอาง และสิ่งทอ ชีวรงควัตถุ (biopigments) ถูกผลิตโดยสิ่งมีชีวิตหลายชนิด สารเหล่านี้สามารถหาได้จากสองแหล่งที่สำคัญ ได้แก่ พืช และจุลินทรีย์ โดยสารชีวรงควัตถุที่ได้จากจุลินทรีย์เป็นที่ต้องการมากกว่าพืชเพราะความคงตัวของสาร (Raisainen

et al.,2002) และยังสามารถเพาะเลี้ยงได้ตลอดทั้งปี ใช้พื้นที่ในการเพาะเลี้ยงน้อย (Kim *et al.*,1999; Parekh *et al.*, 2000) ในทางตรงกันข้ามสารชีวรงควัตถุจากพืชมีข้อเสียมากมาย เช่น ความไม่คงตัวกับแสง ความร้อนหรือความเป็นกรด-ด่าง การละลายน้ำได้น้อย และมักจะไม่สามารถจัดหาได้ตลอดทั้งปี สารทุติยภูมิจากแหล่งเชื้อแบคทีเรียรวมถึงเอนไซม์ต่างๆ สารสี ยาปฏิชีวนะ อาจมีความสำคัญกับมนุษย์ในหลายๆทาง อย่างไรก็ตามในหลักการเบื้องต้นเชื้อจุลินทรีย์ต้องไม่เป็นพิษ สารที่สนใจสามารถนำไปใช้ในอาหารสัตว์ และอาหารของมนุษย์ได้ ปัจจุบันสารสีหรือคาโรทีนอยด์ถูกนำไปใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารเสริม หรือวิตามินกันอย่างกว้างขวาง

เนื่องจากสีสังเคราะห์ในอาหารส่งผลกระทบโดยตรงต่อมนุษย์ เช่น โรคภูมิแพ้ สมาธิสั้นในเด็ก เป็นต้น จึงทำให้มีการศึกษาการผลิตสารสีจากสิ่งมีชีวิตเพิ่มมากขึ้น เช่น astaxanthin จาก *Haematococcus pluvialis* (Boussiba, 2000), *Chlorella zofingiensis* (Pelah *et al.*, 2003) แต่พบว่ามีการปนเปื้อนได้ง่าย และทำการสกัดสารสียาก ดังนั้นการผลิตสารสีจากแบคทีเรียจึงเป็นแหล่งใหม่ที่น่าสนใจ อุตสาหกรรมการผลิตสารสีจากธรรมชาติโดยการหมักของจุลินทรีย์มีข้อดีหลายประการ เช่น สามารถควบคุมการผลิตได้ ใช้พื้นที่ในการผลิตน้อย การสกัดง่ายขึ้น น้ำหนักสารที่ได้สูงขึ้นเมื่อผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ ไม่มีการขาดวัตถุดิบ และไม่มีการเปลี่ยนแปลงตามฤดูกาล

ปัญหาอย่างหนึ่งของการผลิตสาร คือการเก็บรักษาและวิธีการเพาะเลี้ยงที่ซับซ้อนซึ่งบ่อยครั้งต้องการสภาวะที่เฉพาะเจาะจงและไม่ปกติ แต่หนึ่งในปัญหาหลักที่เกี่ยวข้องกับแอคติโนมัยซีททะเล คือความยากในการเพาะเลี้ยงเชื้อ เพราะความต้องการที่เฉพาะเจาะจง อย่างเช่นเกลือทะเล ซึ่งบางสายพันธุ์เหล่านี้ต้องการความเข้มข้นของเกลือสูงมาก (halophiles) (Tsueng *et al.*, 2008) ในกรณีแอคติโนมัยซีททะเลเริ่มศึกษาและพยายามที่จะเพิ่มประสิทธิภาพการแยกและการเจริญเติบโตจากหลายๆแหล่ง (Piel, 2004;Bull ; Bull *et al.*, 2005) เช่นเดียวกับการพัฒนากระบวนการหมักสำหรับการผลิตสารประกอบที่มีความเฉพาะ (Tsueng *et al.*, 2008;Lam *et al.*, 2007; Selvin *et al.*, 2009) จากสารประกอบที่มีศักยภาพ การพัฒนาวิธีการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทจึงเป็นสาขาของการวิจัยที่น่าสนใจที่สุดสำหรับการค้นหาสารตัวยาใหม่ๆ นักวิทยาศาสตร์ยังคงค้นหาสารประกอบเคมีและความหลากหลายทางชีวภาพจากเชื้อแอคติมัยซีทที่หลากหลายสายพันธุ์ ซึ่งอาจเป็นไปได้ที่จะประสบความสำเร็จในการค้นพบสายพันธุ์ใหม่ๆ จากคุณลักษณะของเชื้อแอคติมัยซีทและความหลากหลายของสารเคมีที่เชื้อผลิตขึ้น จึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับเทคโนโลยีชีวภาพของพืช เทคโนโลยีชีวภาพด้านสิ่งแวดล้อม การบริหารจัดการของเสียในเมืองและการใช้ประโยชน์อย่างอื่นๆ ซึ่งยังไม่ได้ถูกดำเนินการ จำนวนของสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากเชื้อ actinomycetes อาจจะถูกค้นพบในอนาคต รวมทั้งการหา สภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมไปพร้อมกัน ในทิศทางนี้ เทคโนโลยีชีวภาพจะมีบทบาทสำคัญสำหรับการหมักขนาดใหญ่

สารสำคัญๆเหล่านี้ได้มาในปริมาณที่ไม่เพียงพอในการนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ รวมถึงการแยกสารประกอบที่ออกฤทธิ์ชีวภาพด้วย จากเหตุผลต่างๆที่กล่าวมาจึงมีความจำเป็นเร่งด่วน

สำหรับทางเลือกในการเพิ่มปริมาณของสารสี สารออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย และสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ โดยใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเร็วขึ้น และให้มีผลผลิตเพิ่มมากขึ้น เพียงพอที่จะใช้เป็นแหล่งทางเลือกของสารสีที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร nutraceuticals เครื่องสำอาง การแพทย์ การใช้สารสีชีวภาพในวัสดุ อุปกรณ์สำหรับเด็กเล็ก ซึ่งคณะผู้วิจัยกำลังดำเนินการแยกสารสีที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และพบว่าแหล่งแอคติโนมัยซีททะเลของไทยมีความหลากหลาย และมีฤทธิ์ที่รุนแรงที่น่าสนใจ คณะผู้วิจัยจึงมีความเห็นว่าต้องมีการพัฒนาการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทให้ได้ปริมาณมาก และให้ได้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์เพิ่มขึ้นในเบื้องต้น เพื่อจะได้เป็นต้นแบบในการพัฒนาการเลี้ยงระดับถังหมัก และนำไปต่อยอดในอุตสาหกรรมทางการแพทย์ การเกษตร รวมถึงเครื่องสำอางต่อไป

วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย

1. เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทที่เพิ่มผลผลิตสารสี สารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย และสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
2. เพื่อวิเคราะห์โครงสร้างของสารสี และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์สูง
3. เพื่อตรวจสอบความคงตัวของสารสี และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตได้

ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. ตัวอย่างเชื้อแอคติโนมัยซีททะเล ที่ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มผลผลิตสารสี สารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย และสารต้านอนุมูลอิสระ ได้คัดเลือกตัวอย่างเชื้อที่ให้สารดังกล่าว ได้แก่ *Streptomyces indiaensis* (A1-3), *Streptomyces indiaensis* (A3-3), *Streptomyces coelicoflavu* และ *Streptomyces parvulus* จากโครงการ “การค้นหารงควัตถุที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์ทะเล” ซึ่งได้ดำเนินการวิจัยในปี 2556-2558 แยกจากดินตะกอนบริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทยฝั่งตะวันออกหรือดินป่าชายเลน
2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมทางกายภาพ ของเชื้อแอคติโนมัยซีท ได้แก่ แหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน โลหะไอออน pH และความเค็ม
3. การตรวจสอบผลผลิตสารสีที่ได้ ด้วย UV-Vis spectrophotometer ขณะที่การตรวจสอบผลผลิตสารต้านอนุมูลอิสระโดยการหาปริมาณและทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS
4. ทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียด้วยเทคนิคดิสดิฟฟิวชั่น
5. ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) โดยใช้อาร์ทีเมีย
6. การทดสอบความคงตัวของสารสี สารต้านแบคทีเรีย และสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้ ที่อุณหภูมิต่างๆ และทดสอบความคงตัวต่อแสง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้เทคนิคการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทเพื่อผลิตสารสีให้ได้ปริมาณมาก และการผลิตเพื่อให้ได้สารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ให้ฤทธิ์สูง ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยจะได้นำไปจัดทำฐานข้อมูลและเปิดโอกาสให้นักวิจัยที่สนใจนำไปใช้เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุด

การทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง

ลักษณะทั่วไปของแอคติโนมัยซีท (Actinomycetes)

แอคติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่ผลิตสารที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ โดยเฉพาะชนิด *Streptomyces* ซึ่งเป็นชนิดที่มีมากที่สุดและเป็นชนิดที่มีรายงานการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นจำนวนมาก สารเมตาบอไลท์จากแอคติโนมัยซีทอาจจะมีรูปแบบที่ใช้เป็นพื้นฐานในการสังเคราะห์ตัวยาเพื่อใช้รักษาโรคและต่อสู้กับเชื้อดื้อยาได้ โดยมีฤทธิ์ค่อนข้างกว้างสามารถยับยั้งเชื้อรา ยับยั้งเซลล์มะเร็ง ต้านจุลชีพ กดภูมิคุ้มกัน และยับยั้งเอนไซม์ ซึ่งสารออกฤทธิ์เหล่านี้รวมถึงสารสีจากแบคทีเรียด้วยเช่นกัน สารสีและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแหล่งจุลินทรีย์จึงเป็นทางเลือกที่ดีทางหนึ่งในการนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรม จุลินทรีย์ที่เป็นที่รู้จักกันในการผลิตสารสีและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย (Aberoumand, 2011) ในกระบวนการหมักสารเหล่านี้แพร่อยู่ในอาหารเหลวในปริมาณน้อย ดังนั้นการผลิตสารสีและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจึงมีตัวแปรมากมายขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างเช่นชนิดของสายพันธุ์ สภาวะที่เลี้ยงเช่น ระยะเวลาในการบ่ม อุณหภูมิ และองค์ประกอบของอาหาร เป็นต้น

Streptomyces spp. เป็นสิ่งมีชีวิตที่อยู่อาศัยในดิน มีสปอร์เป็นแบบกึ่งพักตัว (semi-dormant) (Mayfield *et al.*,1972) เป็นกลุ่มที่สำคัญที่สุดของแอคติโนมัยซีทที่มีค่า G+C ของดีเอ็นเอสูง ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Streptomyces* รวมถึงการเจริญเติบโตโดยการวัดเส้นใยไฮฟา (hypha) เส้นผ่านศูนยก์ลางระหว่าง 0.5-2.0 ไมโครเมตร แอคติโนมัยซีทสามารถผลิตสารประกอบ 130-140 ชนิด ที่มีประโยชน์อยู่ในทุกวันนี้และจำนวนใกล้เคียงกันของสารอนุพันธ์ (รวมทั้งยาปฏิชีวนะกึ่งสังเคราะห์) ถูกนำมาใช้ในทางการแพทย์กับมนุษย์ส่วนใหญ่ใช้ในยาเคมีบำบัดและสัตวแพทยศาสตร์ นอกจากนี้บางส่วนของสารประกอบ 15-20 ชนิดถูกใช้ในการเกษตร ส่วนใหญ่เป็นสารกำจัดศัตรูพืชและตัวเติมในอาหาร สารเหล่านี้ส่วนใหญ่จะถูกผลิตขึ้นโดยเชื้อแอคติโนมัยซีท เช่น cephalosporins และเปปไทด์จากเชื้อแบคทีเรีย ยกเว้น penicillins ที่ผลิตจากเชื้อรา

แหล่งของแอคติโนมัยซีท

แอคติโนมัยซีทพบได้ทั่วไปทั้งในดิน และน้ำ มีรายงานการวิจัยที่คัดแยกแอคติโนมัยซีทจากดินรอบราก และจากรากหน่อไม้ฝรั่งในแปลงเกษตรอินทรีย์ในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์และเพชรบุรี (ลลิดา วชังเงิน, 2554) การคัดแยกแอคติโนมัยซีทจากมูลสัตว์เพื่อใช้ในการย่อยสลายวัสดุทางการเกษตรเบื้องต้น (จามจุรี เกตุบัวขาว et al., 2555) แอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากดินบริเวณเกาะชายฝั่งภาคตะวันออกของไทย คือเกาะช้าง เกาะหวาย เกาะเหลายาในจังหวัดตราด และเกาะไผ่ในจังหวัดชลบุรี (Srivibool and Sukchotiratana, 2006) , (Srivibool and Watanadilok, 2015) สามารถแยกแอคติโนมัยซีทจากดินตะกอนบริเวณป่าชาย

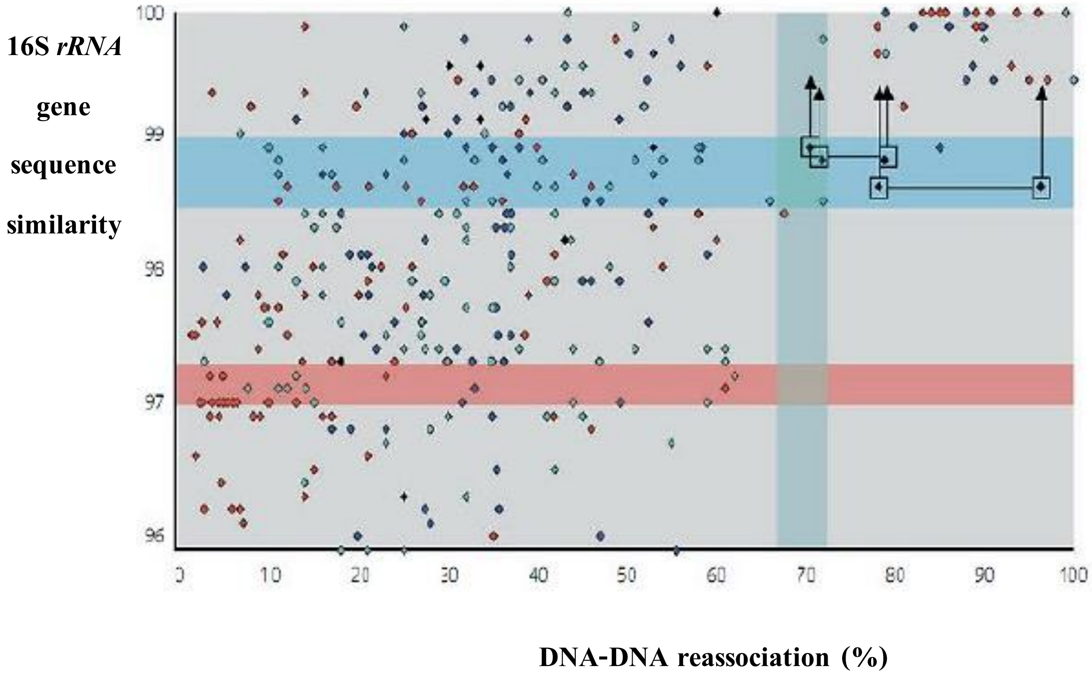
เลน ในจังหวัดนครศรีธรรมราช ชุมพร และระยอง ได้ทั้งหมด 83 ไอโซเลต โดย 55 ไอโซเลต แยกได้จากดินตะกอนในบริเวณป่าชายเลนฝั่งอ่าวไทยจังหวัดนครศรีธรรมราชเป็นสมาชิกของเชื้อสกุล *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Nocardiopsis* และ *Streptoalloteichus* เป็นต้น โดยพบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทมากกว่าร้อยละ 50 สามารถยับยั้งเชื้อแบซิลลัสได้

การจัดจำแนกและพิสูจน์เอกลักษณ์แอคติโนมัยซีท

การจัดจำแนกแอคติโนมัยซีทเบื้องต้นจะใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ลักษณะการเรียงตัวของสปอร์ ลักษณะของเส้นใยที่เจริญว่าเจริญอยู่ใต้ผิวอาหาร หรือชูขึ้นเหนือผิวอาหาร ลักษณะผิวโคนี ความนูนของโคโลนี ขนาดของโคโลนี เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการนำลักษณะทางชีวเคมี เช่น วิเคราะห์การใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ความสามารถในการใช้สารเคมีต่างๆ มาร่วมในการจัดจำแนก อย่างไรก็ตามปัจจุบันมีการค้นพบแบคทีเรียแอคติโนมัยซีทชนิดใหม่ๆเพิ่มมากขึ้น ทำให้การใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางชีวเคมีเพื่อระบุชนิดยากขึ้นและอาจมีมีความสับสน เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางชีวเคมีมักมีความผันแปรตามสภาพแวดล้อมในขณะนั้นได้ ดังนั้นในยุคปัจจุบันการอธิบายลักษณะ ระบุจีนัสและสปีชีส์ของแบคทีเรียแอคติโนมัยซีทนั้น จำเป็นต้องศึกษาอนุกรมวิธาน*แบบโพลีฟาสิก* (polyphasic taxonomy) ซึ่งอนุกรมวิธาน*แบบโพลีฟาสิก*นั้นประกอบด้วยการใช้ข้อมูลค่าความคล้ายคลึงของลำดับเบสของยีน 16S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (*16S rRNA*) มาทำการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งจะแสดงผลในรูปตารางเปรียบเทียบความคล้ายคลึงและผังแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนการ (phylogenetic tree) เมื่อทราบความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแล้วจึงใช้การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาลักษณะทางชีวเคมีและการศึกษาเคมีอนุกรมวิธาน (Chemotaxonomy) ซึ่งใช้การวิเคราะห์ลักษณะทางเคมี เช่น ชนิดของ diaminopimelic acid ที่ผนังเซลล์ล์ ชนิดของน้ำตาลภายในเซลล์ล์ ฟอสโฟลิปิด และ menaquinone เป็นต้น มาร่วมในการจัดจำแนก และสุดท้ายในการระบุสปีชีส์ของแบคทีเรียแอคติโนมัยซีทนั้นต้องใช้ดีเอ็นเอทั้งจีโนมมาเปรียบเทียบความสัมพันธ์หรือเปรียบเทียบความคล้ายคลึงระหว่างสปีชีส์ การเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของดีเอ็นเอทั้งจีโนมมักใช้เทคนิค DNA-DNA hybridization (DDH) (Murray *et al.*, 1990; Stackebrandt and Liesack, 1993; Vandamme *et al.*, 1996)

DNA-DNA hybridization ถือเป็น gold standard สำหรับการเสนอแบคทีเรียชนิดใหม่ โดยเปอร์เซ็นต์การจับกันของดีเอ็นเอ (DNA-DNA binding) คือค่าร้อยละความเหมือนของลำดับเบสในจีโนมทั้งหมด หรืออัตราการจับกันเป็นลักษณะพิเศษของลำดับเบสที่คล้ายคลึงกันระหว่างสองจีโนม วิธีนี้จะบ่งบอกถึงมีความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมโดยรวมของสปีชีส์ การประเมินค่าที่ระดับจีโนมภายใต้สภาวะมาตรฐานสามารถแปรผลได้คือ สปีชีส์ที่แสดงค่า DNA-DNA-binding น้อยกว่า 70% ในอุณหภูมิที่หลอมละลาย (Melting Temperature: ΔTm) จะได้รับการพิจารณาให้เป็นสปีชีส์ใหม่ และเมื่อการเปรียบเทียบค่าความคล้ายคลึงกันของยีน *16S*

rRNA และ ค่า DNA-DNA binding สายพันธุ์ที่แสดงค่าความคล้ายคลึงของลำดับเบสของยีน *16S rRNA* น้อยกว่า 97 % มักจะมีค่า DNA-DNA binding น้อยกว่า 70 % ด้วย ส่วนสายพันธุ์ที่มีค่าความคล้ายคลึงของลำดับเบสยีน *16S rRNA* มากกว่า 98 % จะมีค่า DNA-DNA-binding น้อยกว่าหรือเท่ากับ 70 % ดังภาพที่1 (Vandamme *et al.*, 1996; Stackebrandt and Goebel, 1994; Stackebrandt *et al*, 2002; Gevers *et al.*, 2005)



ภาพที่ 1 การเปรียบเทียบลำดับที่คล้ายคลึงกันของยีน *16S rRNA* และค่า DNA-DNA binding
ที่มา: Stackebrandt and Eber. (2006)

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแอคติโนมัยซีท

แอคติโนมัยซีทนอกจากจะมีความสำคัญต่อระบบนิเวศแล้วยังเป็นแหล่งที่สำคัญของสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive Compound) ซึ่งมีความสำคัญทั้งทางการแพทย์ และมีคุณค่าทางเศรษฐกิจ โดยเฉพาะทางเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น สารปฏิชีวนะ สารต้านมะเร็ง อาหารเสริม และรงควัตถุ เป็นต้น (Manivasagan et al., 2014) โดยเมตาบอไลต์ทุติยภูมิที่มีการศึกษา 22,000 ชนิดนั้นได้จากจุลินทรีย์ และพบว่ามาจากแอคติโนมัยซีทถึงร้อยละ 70 จากเชื้อราร้อยละ 20 จากแบซิลัส ร้อยละ 7 และร้อยละ 1-2 ได้จากแบคทีเรียชนิดอื่น ในกลุ่มของแอคติโนมัยซีทนั้นเชื้อ Streptomycetes เป็นเชื้อกลุ่มใหญ่ที่มีความสำคัญทางเศรษฐศาสตร์ในการผลิตเป็นยาปฏิชีวนะ ประมาณการณ์ว่าสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ 10,000 ชนิด เป็นสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดย Genus Streptomyces ร้อยละ 50-55 (Subramani and Aalbersberg, 2012) สารเมตาบอไลท์จากแอคติโนมัยซีทอาจจะมีรูปแบบที่ใช้เป็นพื้นฐานในการสังเคราะห์ตัว

ยาเพื่อใช้รักษาโรคและต่อสู้กับเชื้อดื้อยาได้ โดยมีฤทธิ์ค่อนข้างกว้างสามารถยับยั้งเชื้อรา ยับยั้งเซลล์มะเร็ง ต้านจุลชีพ กดภูมิคุ้มกัน และยับยั้งเอนไซม์ ซึ่งสารออกฤทธิ์เหล่านี้ส่วนมากประกอบไปด้วยสารหลายประเภท เช่น สาร Azamerone เป็นสารพวก meroterpenoid ซึ่งได้จากแบคทีเรียทะเลชนิด *Streptomyces* (Cho et al., 2006) และสาร glaciapyrroles A, B และ C แยกได้จากสายพันธุ์ *Streptomyces* (NPSOO 8187) ที่แยกจากดินตะกอน ซึ่งสารเหล่านี้แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (Macherla et al., 2005) สารที่ได้จากแบคทีเรียทะเล Streptomyces จะมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สูง เช่น สารประกอบเชิงซ้อนของ C-glycosides himalomycins A และ B, พวกสารกลุ่ม anthraquinones fridamycin E สารเหล่านี้ได้มาจากแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. 6921 ที่ได้จากดินตะกอนเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพที่รุนแรง (Maskey et al. 2003)

ในประเทศไทยมีงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการออกฤทิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยซีทที่หลากหลาย เช่น การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากแอคติโนมัยซีทที่แยกจากดินตะกอนป่าชายเลน (ทิพอร อุ้ยเหง่า และกานดา เอี่ยมคด, 2556) สำหรับการศึกษาเชื้อแอคติโนมัยซีทหายากได้มีการแยกเชื้อจากดินบริเวณป่าชายเลนและป่าพรุแถบฝั่งทะเลอันดามัน สามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทหายากได้ 64 ไอโซเลต ซึ่งเป็นสมาชิกของเชื้อสกุล *Micromonospora*, *Agromyces*, *Catellatospora, Streptosporanginum, Pseudonocardia, Microbispora, Microtrtraspora, Actinomadura, Nonomuraea, Dactylosporangium* และค้นพบเชื้อแอนติโนมัยซีทสกุลใหม่คือ *Actinocatenispora* เมื่อสกัดสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยเอทิลอะซีเตต พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทมากกว่าร้อยละ 50 แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างใดอย่างหนึ่งของการทดสอบ (จิตติ และ สมบูรณ์, 2550)

การผลิตสารสีของเชื้อแบคทีเรีย

สีจากแบคทีเรียมีทั้งที่ละลายน้ำและไม่ละลาย พวกที่ละลายน้ำได้จะแพร่ออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ โมเลกุลสารสีถูกสังเคราะห์อยู่ในผนังเซลหรือช่องว่าง periplasmic space มีรายงานว่าแบคทีเรียที่ใช้ออกซิเจน และแบคทีเรียมีอากาศ หรือไม่มีอากาศก็เจริญได้ (*Facultative bacteria*) สามารถผลิตสีได้ เพราะโมเลกุลออกซิเจนมีความจำเป็นสำหรับการผลิตสารสี ดังนั้นพวกที่ไม่ใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโตจึงไม่มีสี การสังเคราะห์สารสีขึ้นกับแสงสว่าง ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ และส่วนประกอบในอาหาร สารสีที่ผลิตโดยแบคทีเรียสามารถดูดกลืนรังสีแสง UV หรือกำจัดอนุมูลออกซิเจน ทั้งสองกรณีสารสีจากแบคทีเรียจะทำหน้าที่ปกป้องเซลล์ บางชนิดเป็น antibiotic ที่สามารถยับยั้งโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียแกรมบวกและลบ รวมถึงเชื้อราด้วยที่เกิดกับมนุษย์ เช่น prodigiosin, erythromycin, pyocyanin เป็นต้น นอกจากนี้สารสียังช่วยในการดำรงชีวิตที่สภาวะเครียด การประยุกต์ใช้ที่สำคัญของสารสีจากแบคทีเรีย ได้แก่ การต้านการจับกินสิ่งแปลกปลอมของฟาโกรซัยท์มีความคงตัวต่อแสง ความร้อน และกรด (Joshi *et al.*, 2003) ยับยั้งเซลล์มะเร็ง สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกกรรม สีเติม

อาหาร แหล่งของวิตามิน A ทางการแพทย์ ต้านอนุมูลอิสระ และอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง (Tibor, 2007; Sardaryan *et al*., 2004) เป็นต้น

การผลิตสารทุติยภูมิโดยจุลินทรีย์แตกต่างกันทั้งคุณภาพและปริมาณขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ เช่นเดียวกับสภาวะของสารอาหารและการเพาะเลี้ยง (Lam*et al*., 1989) ในปี ค.ศ. 2004 Giri ได้รายงานสภาวะที่ใช้ในการผลิตสารสีแดง prodigiosin ที่ถูกแยกครั้งแรกจากเชื้อแบคทีเรีย *Serratia marcescens* (Gerber, 1969) มีคุณสมบัติทางชีวภาพมากมาย เช่น ต้านแบคทีเรีย ต้านเชื้อรา ต้านมาลาเรีย กดภูมิคุ้มกัน และต้านเซลล์มะเร็ง (Williamson *et al*., 2007; Montaner and Tomas, 2003) นอกเหนือจากเชื้อแบคทีเรียนี้ ยังพบการแยกสารชนิดนี้จาก *Streptomyces* (Gerber, 1975), *Actinomadura* (Gerber, 1975) เป็นต้น มีการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณเซลล์และการผลิตสารสี prodigiosin พบว่ามีหลายปัจจัย เช่น รูปแบบกรดไขมันของแหล่งคาร์บอนโดยเมื่อใช้ peanut broth และ seasame broth เชื้อจะเจริญได้ดีกว่าและได้ปริมาณสาร prodigiosin มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเดิม nutrientbroth และ peptone glycerol broth (Giri*et al*., 2004) โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 28 °C และ pH 7 (Samrot *et al.,* 2011) น้ำตาลมีผลต่อการผลิตสารสีเพียงเล็กน้อยใน nutrient broth

ขณะที่การผลิตสารคาโรทีนอยด์จากเชื้อ *Streptomyces* ยังคลุมเครือ โดยขึ้นกับแสง แต่ Wang, 2012 ได้ทำการหาสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมของการผลิตสาร β-carotene โดยเชื้อ *S. marcescens* RB3 โดยใช้ 2.0% lactose, 2.0% peptone, 0.3% beef extract, 1.0% NaCl supplemented ด้วย 0.05% Fe^{2+}, pH 6.0 และ 30°C ได้ปริมาณ β-carotene 2.45 μg/mL โดยที่ผ่านมา Choudhari และ Singhal (2008) พบว่าเชื้อ *Blakeslea trispora* ไม่สามารถผลิต β-carotene โดยปราศจากแหล่งคาร์บอน ซึ่งได้มีการทดลองเลี้ยงเชื้อด้วยแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันในการผลิตสารสีโดยใช้น้ำตาลซูโครส แลคโตส มอลโตส และแป้งที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2% ในหลาย ๆสารทดสอบ พบว่าแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดทำให้ได้สารสี 1.209 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร อาจเป็นเพราะแลคโตสสามารถถูกใช้ในกระบวนการเมตาบอลิสมสำหรับการสังเคราะห์ β-carotene ของเชื้อรา *Blakeslea trispora* และมีรายงานว่ากลูโคสจะให้ปริมาณ β-carotene สูงสุดและโลหะไอออนมีผลต่อความเข้มข้นของ β-carotene โดยพบว่าโลหะ Fe^{2+} and Fe^{3+} สามารถเพิ่มการผลิตสารสีได้ อีกปัจจัยหนึ่งคือ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความสำคัญต่อ metabolite production ในเซลล์ ค่า ความเป็นกรด-ด่าง 6 สามารถผลิตสารสี beta-carotene สูงสุด เช่นเดียวกับอุณหภูมิที่ต้องทำการควบคุมในกระบวนการหมักที่ 30°C จะได้ yield มากที่สุด และเมื่ออุณหภูมิยิ่งสูงขึ้นการผลิตสารสีก็จะลดลง โดยสรุปสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตสาร beta-carotene ได้แก่ 2.0% lactose, 2.0% peptone, 0.3% beef extract, 1.0% NaCl supplemented ด้วย 0.05% Fe^{2+}, pH 6.0, และบ่มที่ 30°C ทำให้การผลิตเพิ่มขึ้น 69.2% (Wang *et al*., 2012)

กรณีของสารสีที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสี lycopene พบว่าการเพิ่มการผลิตสี lycopene ทำโดยการเติม tobacco dust ซึ่งจะป้องกันการเกิดปฏิกิริยา cyclization ของ lycopeneไปเป็น â-carotene (Tereshina*et al.*, 1996) การผลิตสารคาโรทีนอยด์เพิ่มขึ้นเมื่อผสม corn wet milling ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Hayman *et al.*, 1995) เมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงเดิมด้วย yeast-malt extracts ระดับของ total carotenoid และ astaxanthin เพิ่มขึ้นสี่เท่าในปี ค.ศ. 2012 Mandelli et al.ได้หาสภาวะการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Thermus filiformis* เพื่อเพิ่มผลผลิตสารคาโรทีนอยด์ thermozeaxanthins พบว่าอุณหภูมิไม่มีผลต่อการเพิ่มมวลคาโรทีนอยด์ แต่มีผลต่อ carotenoid content และสามารถป้องกันการเกิด singlet oxygen นอกจากนี้การใช้ระดับค่าความเป็นกรด-ด่าง และความเข้มข้นของ yeast extract and tryptone สูงๆมีผลต่อการเพิ่มผลผลิตที่อุณหภูมิต่ำๆ

ในปี พ.ศ. 2556 รวิวรรณ et al.ได้รายงานผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดที่แยกจากเชื้อแอคติโนมัยซีทจากดินตะกอนภาคตะวันออก และดินป่าชายเลน เชื้อที่ให้สารสีที่น่าสนใจหลายสายพันธุ์ ได้แก่ สีแดงของ A1-3, A3-3, A16-1 สีเหลืองของ CH54-8 และสีส้มของ RY20

ความสำคัญของสารสี

รงควัตถุมีความสำคัญต่อสรีรวิทยาของเซลล์และการอยู่รอด สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเหล่านี้หลายตัวพบว่ามีคุณสมบัติเป็นยาต้านจุลชีพต้านมะเร็งและกดภูมิคุ้มกัน (immunosuppressive) ส่วนใหญ่จุลินทรีย์ผลิตสารทุติยภูมิผ่านกลไก quorum sensing ซึ่งสารรงควัตถุเหล่านี้สามารถยับยั้งหรือฆ่าเชื้อแบคทีเรียและจุลินทรีย์อื่นๆได้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำๆ จากความหลากหลายของสารเหล่านี้และยังมีแนวโน้มที่ดีในการออกฤทธิ์ยับยั้งโรคต่างๆได้หลายโรค จึงมีบทบาทสำคัญทั้งในงานวิจัยทางการแพทย์และทางการเกษตร แบคทีเรียที่แยกจากทะเลที่ผลิตรงควัตถุดูเหมือนจะมีบทบาทสำคัญๆ 2 ประการ คือ 1) การผลิตสีเพื่อปรับตัวให้เข้ากับสภาวะแวดล้อม และ 2) เพื่อป้องกันตัวจากผู้ล่าอื่นๆ (Bhatnagar and Kim, 2010) เช่น รงควัตถุที่เป็นสีน้ำตาลของสารเมลานิน (melanin) ที่ผลิตโดยแบคทีเรียในหลายๆชนิด เช่นเดียวกับรงควัตถุสีเหลืองเขียวของ scytonemin ที่แยกได้จาก cyanobacteria เหล่านี้มีไว้เพื่อปกป้องเซลล์จากรังสี UV และป้องกันไม่ให้ผิวแห้ง (desiccation) ดังนั้นเพื่อปรับตัวต่อแสงแดดที่มากเกินไป และเพื่อความอยู่รอดภายใต้อันตรายจากรังสี UV แบคทีเรียจะต้องผลิตสารประกอบเหล่านี้ ในปี ค.ศ. 1955 Griffiths *et al.* พบว่าคาโรทีนอยด์เป็นส่วนประกอบสำคัญของชั้นเมมเบรนของจุลินทรีย์ และอาจจะปกป้องเซลล์ของแบคทีเรียจากการเกิด photo-oxidation หรือความเสียหายที่เกิดจากรังสีวิซิเบล จากที่กล่าวมาข้างต้นถึงการปรับตัวและต้องอดทนในสภาวะต่างๆของแบคทีเรียทำให้สามารถแสดงคุณสมบัติต่างๆมากมาย

การพัฒนาการเพาะเลี้ยงสำหรับการคัดกรองสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

การพัฒนาการเพาะเลี้ยงเน้นการเพิ่มประสิทธิภาพของอาหารเหลวและการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากแหล่งต่าง ๆเช่นเชื้อราและเชื้อแอคติโนมัยซีทสำหรับการปรับปรุงการเจริญเติบโตของเซลล์และการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์จากการเพาะเลี้ยง ให้ได้สารปริมาณมากสำหรับการวิเคราะห์โครงสร้างของสารประกอบที่น่าสนใจ ซึ่งการผลิตสารทุติยภูมิโดยจุลินทรีย์แตกต่างกันทั้งคุณภาพและปริมาณขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ ชนิดของจุลินทรีย์ อาหาร และสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง (Lam*et al.*, 1989) ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อจะทำให้กระบวนการหมักมีต้นทุนที่ต่ำ จึงกลายแป็นความจำเป็นในการเพิ่มประสิทธิภาพและลดค่าใช้จ่าย เพื่อให้กระบวนการสมบูรณ์มีประสิทธิภาพ (John *et al.*,2007)

อนุมูลอิสระ (free radical)

อนุมูลอิสระ คืออะตอม โมเลกุล หรือสารประกอบที่มีอิเล็คตรอนโดดเดี่ยว (unpaired electrons) อยู่ในออร์บิทัลวงนอกสุดที่มีระดับพลังงานสูงและมีอายุสั้นมาก จึงจัดว่าเป็นโมเลกุลที่มาเสถียรและว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมี (มาลัยพร ดวงบาล, 2552)โดยสามารถพบได้ทุกที่ทั้งในสิ่งแวดล้อม ในสิ่งมีชีวิตหรือแม่กระทั่งในเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกระบวนการเมตาบอลิซึม โดยมีการเคลื่อนย้ายอิเล็คตรอนออกจากโมลเลกุลของออกซิเจนทำให้อิเล็กตรอยในโมเลกุลออกซิเจนไม่สมดุล กลายเป็นอนุมูลอิสระและว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยามาก และสามารถดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นมาแทนที่อิเล็กตรอนที่หายไป เพื่อให้ตัวเองสมดุลหรือเสถียร ซึ่งปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องโดยเกิดแบบปฏิกิริยาลูกโซ่ (บุหรัน พันธุ์สวรรค์, 2556) อนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้องกับอนุมูลที่มีบทบาทในทางชีววิทยา แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ ๆ ด้วยกัน คือ กลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ (reactive oxygen specieds, ROS) กลุ่มที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ (reactive nitrogen species, RNS) และกลุ่มที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบ (reactive chlorine, RCS) ตัวอย่างของอนุมูลอิสระที่มีความสำคัญทางชีวภาพ ได้แก่ อนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์แอนอิออน ($O_2^{-\bullet}$) อนุมูลไฮดรอกซี (${}^{\bullet}OH$) อนุมูลอัลคอกซี ($RO^{\bullet}$) และอนุมูลเปอร์ไฮดรอกซี ($HO_2^{\bullet}$) อนุมูลอิสระเหล่านี้จัดเป็นอนุมูลที่มีความไวต่อการเกิดปฏิกิริยาสูง ในขณะที่ไนตริกออกไซด์ (NO) หรืออนุมูลไนตริก ออกไซด์ (${}^{\bullet}NO$) อนุมูลวิตามินอี และอนุมูลวิตามินซีเป็นอนุมูลอิสระที่มีความไวสูงรองลงมา (มาลัยพร ดวงบาล, 2552)

นอกจากนี้อนมูลอิสระสามารถทำลายชีวโมเลกุลทุกประเภท ทั้งในเซลล์และส่วนประกอบของเซลล์สิ่งมีชีวิต เช่น ลิพิด โปรตีน คาร์โบไฮเดรต เอนไซม์ ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ เซลล์เมมเบรน คอลลาเจน ไมโทคอนเดรีย และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เป็นต้น ซึ่งเป็นสาเหตุให้เซลล์ตาย (บุหรัน พันธุ์สวรรค์, 2556) โดยพบว่า ROS จะทำลายดีเอ็นเอทำให้เกิดการกลายของดีเอ็นเอในเซลล์ ซึ่งนำไปสู่การเกิดโรคมะเร็ง โรคความจำเสื่อม (มาลัยพร ดวงบาล, 2552) อีกทั้งยังก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ ได้แก่ โรคหัวใจขาดเลือด โรคข้ออักเสบ โรคภูมิแพ้ โรคความดันโลหิต

โรคเหงือก โรคเกี่ยวกับสายตา ความผิดปกติของปอดและระบบประสาท โรคเกี่ยวกับทางเดินหายใจ โรคเกี่ยวกับความผิดปกติของผิวหนัง และโรคลำไส้อักเสบ เป็นต้น (Ames et al., 1993)

แหล่งกำเนิดอนุมูลอิสระ (Sources of free radical)

ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดที่ใช้ออกซิเจนในการดำรงชีวิตจะมีอนุมูลอิสระของออกซิเจน เกิดขึ้นอยู่ตลอดเวลา การเกิดอนุมูลอิสระเหล่านี้ มีสาเหตุมาจากปัจจัย ทั้งภายในและภายนอกร่างกายดังนี้ (เจนจิรา จิรัมย์ และประสงค์ สีหานาม, 2554)

1. ปัจจัยภายในร่างกาย (เจนจิรา จิรัมย์ และประสงค์ สีหานาม, 2554)

ในร่างกายของสิ่งมีชีวิตจะมีปฏิกิริยามากมายที่เกี่ยวข้องกับทั้งการสร้างและการสลายโมเลกุลของสารที่เรียกว่ากระบวนการเมทาบอลิซึม ซึ่งถือเป็นสาเหตุหลักอย่างหนึ่งที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ ตัวอย่างปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระได้แก่

- ปฏิกิริยาออกซิเดชั่นที่เกิดขึ้นเอง (autooxidation) (Nawar, 1996) เช่น การเกิดออกซิเดชั่นของไขมัน โดยแบ่งออกเป็น 3 ระยะ ดังนี้

1. ระยะเหนี่ยวนำเริ่มต้น (initiation) เป็นระยะที่กรดไขมันแตกตัวเป็นอนุมูลอิสระโดยมีแสงหรืออุณหภูมิเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ดังสมการ

$$\text{RH + initiation} \xrightarrow[\text{Temperature}]{\text{light}} \text{R}^{\bullet} + \text{H}^{\bullet}$$

2. ระยะเพิ่มจำนวน (propagation) เป็นระยะที่อนุมูลอิสระทำปฏิริยากับออกซิเจนเกิดเป็นอนุมูลเปอร์ออกซี่ (peroxy radical) แล้วทำปฏิกิริยาต่อกับกรดไขมันเกิดเป็นไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (hydro peroxide) และอนุมูลอิสระซึ่งถ้ามีแสงและความร้อนเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาต่อทำให้อนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น แล้วอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นก็สามารถทำปฏิริยากับออกซิเจนใหม่ได้ต่อเนื่องไปเรื่อย ๆ ดังสมการ

$$\text{R}^{\bullet} + \text{O}_2 \longrightarrow \text{ROO}^{\bullet}$$

$$\text{ROO}^{\bullet} + \text{RH} \longrightarrow \text{ROOH} + \text{R}^{\bullet}$$

3. ระยะสิ้นสุด (Termination) เป็นระยะที่อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นรวมตัวกันกลายเป็นโมเลกุลที่เสถียร ดังสมการ

$$R^{\bullet} + R^{\bullet} \longrightarrow RR$$

$$ROO^{\bullet} + ROO^{\bullet} \longrightarrow ROOR + O_2$$

- ปฏิกิริยาออกซิเดชั่นที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง (Halliwell et al., 1995) การทำงานของเอนไซม์สำคัญ 2 ชนิดที่มีผลกระตุ้นการสร้างอนุมูลอิสระภายในร่างกายได้แก่

1. เอนไซม์ แซนธีนออกซิเดส (xanthine oxidase: XO) ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการสลายเบสพิวรีน (purine) โดยเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนไฮโพแซนธีน (hypoxanthine) เป็นแซนธีน (xanthine) และแซนธีนเป็น กรดยูริก (uric acid) พร้อมๆกับเคลื่อนย้ายอิเล็คตรอนให้ออกซิเจนเป็นอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\bullet-}$) ดังสมการ

$$\text{Hypoxanthine} + O_2 + H_2O \xrightarrow{XO} \text{Xanthine} + H_2O_2 + O_2^{\bullet-}$$

$$\text{Xanthine} + O_2 + H_2O \xrightarrow{XO} \text{Uric acid} + H_2O_2 + O_2^{\bullet-}$$

2. เอนไซม์ไลโพออกซีจีเนส (lipoxygenase: LOX) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (polyunsaturated fatty acid) ภายในโมเลกุลของเอนไซม์นี้มีเหล็ก (Fe^{2+}) เป็นส่วนประกอบอยู่ทำหน้าที่ดึงอะตอมไฮโดรเจนจากกรดไขมันและเติมออกซิเจนให้กับกรดไขมันเกิดเป็นไฮโดรเพอรอกไซด์ ซึ่งจะสลายตัวเป็นอนุมูลของกรดไขมัน

- กระบวนการกำจัดสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาว (Konstan and Berger, 1993) ในขั้นตอนการทำลายสิ่งแปลกปลอมโดยเฉพาะเชื้อโรคที่ถูกกลืนกินเข้ามาภายในร่างกาย เซลล์เม็ดเลือดขาวจะมีการดึงโมเลกุลออกซิเจน มาใช้เป็นจำนวนมากเพื่อผลิตเป็นอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ โดยการทำงานของเอนไซมี NADPH ออกซิเดส (NADPH oxidase) ของเม็ดเลือดขาวดังสมการ

$$2O_2 + \text{NADPH} \longrightarrow 2O_2^{\bullet-} + \text{NADP}^+ + H^+$$

นอกจากนี้ในเม็ดสี (granule) ของเม็ดเลือดขาวยังมีเอนไซม์ไมอีโลเทอรอกซิเดส (myeloperoxidase) ทำให้เกิดอนุมูลไฮโปคลอรัส (hypochlorous, $HOCl^-$) ซึ่งเป็นสารที่ทำลายจุลชีพได้ดังสมการ

$$H_2O_2 + Cl^- \longrightarrow HOCl^{\bullet} + OH^-$$

- โลหะทรานสิชั่น (transition metal) (Helliwell, 1999) โลหะทรานสิชัน 2 ชนิด คือ เหล็ก (Fe^{2+}) และทองแดง (Cu^{2+}) ที่มีอยู่ทั่วไปในร่างกายสามารถเร่งการสร้างอนุมูลไฮดรอกซิลจากซูเปอร์ออกไซด์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide, H_2O_2) ในปฏิกิริยา Fenton (Fenton's reaction) ดังสมการ

$$H_2O_2 + O_2^{\bullet-} + Fe^{2+} + / Cu^{2+} \longrightarrow OH^{\bullet} + OH^- + O_2$$

2. ปัจจัยภายนอกร่างกาย (เจนจิรา จิรัมย์ และประสงค์ สีหานาม, 2554)

1.ยารักษาโรค ยาบางชนิดที่รับประทานเข้าไปในร่างกายสามารถก่อให้เกิดอนุมูลอิสระได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ยาในกลุ่มต้านจุลชีพและต่านมะเร็ง เช่น บลีโอไมซิน (bleomycin), แอนทราไซคลินส์ (antracyclines) (Voest et al., 1994) และเมโธทรีเสต (methotrexate) (Gressier et al., 1994) เนื่องจากมีฤทธิ์เสริมปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (prooxidation)

2.รังสี การใช้รังสีรักษาโรค เช่น รังสีเอกซ์ (X-ray) รังสีแกมมา (γ-ray) อาจเป็นสาเหตุทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นในร่างกายจากการถ่ายทอดพลังงานให้กับน้ำ ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเซลล์แล้วก่อให้เกิดปฏิกิริยาขั้นต่อไป (secondary reaction) กับออกซิเจนที่ละลายอยู่ในเซลล์นั้นได้อนุมูลอิสระเกิดขึ้น (Halliwell et al., 1995)

3.ควันบุหรี่ ในควันบุหรี่มีส่วนประกอบของไนตริกออกไซด์ (NO), ไนโตรเจนออกไซด์ (NO_2) และเพอรอกซีไนไตรท์ ($ONOO^-$) รวมทั้งสารมลพิษได้แก่ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO_2) และคาร์บอนเตรตตะคลอไรด์ (CCl_4) ซึ่งจะถูกกำจัดออกจากร่างกายโดยการทำงานจองเอนไซม์ ไซโทโครม P-450 ไฮดรอกซีเจส (cytochrome P-450 hydroxylase) ที่มีอยู่มากในเซลล์ตับและพบได้บ้างในเซลล์ ปอดและลำไส้เล็ก ทำให้เป็นสาเหตุของการสร้างอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ภายในเซลล์ดังกล่าว (Bast et al., 1991)

4.โอโซน ไม่ได้เป็นอนุมูลอิสระแต่จัดเป็นสารออกซิไดส์ที่รุนแรงชนิดหนึ่งที่สามาระเปลี่ยนรูปเป็นอนุมูลไฮดรอกซิลได้จากการกระตุ้นของคลื่นแสง (Valacchi et al.. 2004)

สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) (เจนจิรา จิรัมย์ และประสงค์ สีหานาม, 2554)

สารต้านอนุมูลอสระคือสารปริมาณน้อยที่สามารถป้องกัน หรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของอนุมูลอิสระได้ สารเหล่านี้มีกลไกในการต้านอนุมูลอิสระหลายแบบ เช่น ดักจับ (scavenge) อนุมูลอิสระโดยตรง ยับยั้งการสร้าอนุมูลอิสระหรือเข้าจับ (chelate) กับโลหะเพื่อป้องกันการสร้างอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระเป็นสารกอบที่ทนต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นในเซลล์ โดยทั่วไปสารต้านอนุมูลอิสระสามารถพบได้ในธรรมชาติจากสารหลายชนิด เช่น สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) สารประกอบไนโตรเจน (nitrogen compound) และแคโรทีนอยด์ (carotenoid) เป็นต้น บทบาทสำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระคือ ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นในร่ายกาย ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่างๆ ของมนุษย์ ป้องกันการเกิดปฏิกริยาออกซิเดชั่นของไขมัน ซึ่งเป็นสาเหตุของการเสื่อมคุณภาพในอาหาร ปัจจุบันองค์กรที่เกี่ยวข้องในอุตสาหกรรมอาหารและยา ได้พยายามพัฒนาสารต้านอนุมูลอิสระที่มาจากธรรมชาติ เช่น สาหร่ายทะเล แบคทีเรีย เชื้อรา และพืช อย่างไรก็ตามในภาวะปกติร่างกายของคนเราจะมีการป้องกันการสะสมอนุมูลอิสระอยู่แล้ว ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ปัจจัย คือ ปัจจัยแรกเกิดจากร่างกายสร้างเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระขึ้นมาควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในภาวะที่สมดุล และปัจจัยที่สองคือ กลุ่มของสารต้านอนุมูลอิสระที่มาจากวิตามินเอ วิตามินซี วิตามินอี หรือเบต้าแคโรทีน รวมทั้งสารประกอบโพลีฟีนอล ซึ่งเป็นสารเคมีที่สามารถพบได้ในผักและผลไม้ เพื่อเข้าไปช่วยเสริมสร้างระบบการต่อต้านอนุมูลอิสระที่พบในร่างกาย เช่น เอนไซม์คะตะเลส กลูตาไธโอนเพอรอกซิเดส และซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส หรือสารประกอบโปรตีนบางอย่าง เช่น อัลบูมิน บิลิรูบิน เซอรูโลพลาสมิน กลูตาไธโอน ทรานสเฟอริน ยูบิควินอล และยูเรต เป็นต้น สารเหล่านี้มีหน้าที่คอยควบคุมอนุมูลอิสระต่างๆ ให้อยู่ในระดับพอเหมาะ แต่ถ้าเมื่อใดที่มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นในปริมาณมากเกินกว่าที่ระบบป้องกันจะยับยั้งได้หมด จะทำให้เกิดสภาวะที่เรียกว่า Oxidative stress ขึ้นภายใต้สภาวะดังกล่าวอนุมูลอิสระจะทำอันตรายต่ออวัยวะและเนื้อเยื่อต่างๆ ของร่างกาย ซึ่งถ้าสะสมมากๆ อาจนำไปสู่ความผิดปกติ โดยทั่วไปสารต้านอนุมูลอิสระแบ่งเป็น 5 ประเภทใหญ่ๆ ดังนี้

1. Primary antioxidant สารในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิกทำหน้าที่หยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระในปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน นอกจากนี้ยังรวมถึงสารโทโคฟีรอลธรรมชาติและสังเคราะห์ (Natural and synthetic tocopherol) เช่น alkylgallate, BHA, BHT, TBHQ และอื่นๆ ซึ่งสารในกลุ่มดังกล่าวทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็คตรอน

2. Oxygen scavenger สารในกลุ่มนี้ ได้แก่ กรดแอสคอร์บิค หรือวิตามินซี เป็นต้น สารในกลุ่มนี้จะเข้าทำปฏิกิริยากับออกซิเจนจึงเป็นการช่วยกำจัดออกซิเจนจึงเป็นการช่วยกำจัดออกซอเจนในระบบปิดได้

3. Secondary antioxidant สารในกลุ่มนี้ ได้แก่ สาร dilauryl thiopropionate และสาร thiopropionic acid ทำหน้าที่สลายโมเลกุลของ lipid hydroperoxide ให้เป็นสารที่มีความเสถียร

4. Enzymic antioxidant สารในกลุ่มนี้ได้แก่ เอนไซม์ต่างๆ ซึ่งแบ่งเป็นสารสองกลุ่ม คือ primary antioxidant enzyme และ auxiliary antioxidant enzyme สารในกลุ่มนี้ทำหน้าที่กำจัดออกซิเจนหรืออนุพันธ์ของออกซิเจน โดยเฉพาะไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

5. Chelating agent หรือ sequestrant สารในกลุ่มนี้ เช่น กรดซิตริก กรดอะมิโน เป็นต้น สารในกลุ่มนี้ทำหน้าที่ไปจับกับไอออนของโลหะ เช่น เหล็กและทองแดง ซึ่งไอออนเหล่านี้เป็นไอออนที่ส่งเสริมและเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของไขมัน ทำให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่เสถียร

สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (Natural antioxidants) (ปรียานุช อินทร์รอด, 2551)

1. สารประกอบฟีนอลิกสารประกอบฟีนอลิกจัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้รับจากภายนอก และพบได้มากในธรมมชาติ ได้แก่ พืช ผัก ผลไม้ ชาเขียว ชาดำ ช็อกโกแลต และไวน์แดง เป็นต้น ในปัจจุบันพบสารประกอบฟีนอลิกมากกว่า 8,000 ชนิดในธรรมชาติ ตั้งแต่เลกุลอย่างง่าย เช่น กรดฟีนอลิก ฟีนิลโปรพานอยด์ และฟลาโวนอยด์ ไปจนถึงโครงสร้างโพลิเมอร์ที่ซับซ้อน เช่น ลิกนิน เมลานิน และแทนนิน เป็นต้น แม้ว่าปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกในธรรมชาติจะมีปริมาณที่แตกต่างกัน แต่พบว่าปริมาณโดยเฉลี่ยที่คนได้รับต่อวันจะอยู่ในช่วง 0.02 – 1 กรัม ซึ่งเป็นปริมาณที่สูงกว่าปริมาณวิตามินอีที่ได้รับต่อวัน สารโพลีฟีนอลเป็นสารที่มีบทบาทสำคัญ เนื่องจากมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ไวรัส การอักเสบ การแพ้ การเกิดมะเร็ง และมีคุณสมบัติในการสลายลิ่มเลือด อีกทั้งสามารถลดความดันโลหิต เป็นต้น ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

2.วิตามินเอ ในธรรมชาติวิตามินเอจะพบได้ในเฉพาะสัตว์เท่านั้น แต่ในพืชจะมีสารประกอบแคโรทีนอยด์ที่สามารถเปลี่ยนเป็นวิตามินเอ ได้ จัดเป็นสารตั้งต้นของวิตามินเอาที่รียกว่า โปรวิตามินเอ มักพบในพืชผักใบเขียวและผลไม้ที่มีสีเหลืองหรือสีส้มแดง

3. วิตามินซี มีชื่อทางเคมีว่า Ascorbic acid เป็นวิตามินที่ละลายได้ในน้ำจะสลายตัวเมื่อถูกความร้อนหรือทิ้งไว้ในอากาศที่มีความชื้น วิตามินซีมีสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชันโดยจะเข้าทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ อนุมูล huydroxyl และอนุมูล peroxyl นอกจากวิตามินซี จะสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระแล้วยังทำหน้าที่เป็นตัวส่งเสริมประสิทธิภาพของสารต้านออกซิเดชันของวิตามินอี โดยทำให้อนุมูล α-tocopherol$^{\bullet}$ (TO$^{\bullet}$) เปลี่ยนกลับไปเป็น α-tocopherol (TOH) ดังเดิมตามสมการ

$$TO^{\bullet} + AH^{-} \longrightarrow TOH + A^{\bullet}$$

4. วิตามินอี เป็นวิตามินที่ละลายในไขมันเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันที่สำคัญโดยวิตามินอีจะทำงานร่วมกับสารต้านออกซิเดชันตัวอื่นๆ เช่น วิตามินซี และซิลิเนียม เป็นต้น

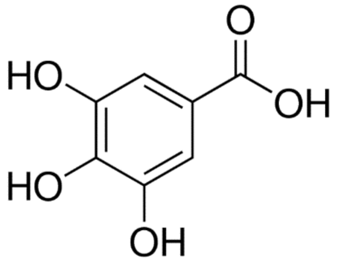
วิตามินอีจะช่วยปรับให้ร่างกายสามารถนำเอาวิตามินเอมาใช้ ซึ่งจะช่วยในการป้องกันสารพิษที่มีผลมาจากโลหะหนัก เช่น ตะกั่วในธรรมชาติ วิตามินอีปัจจุบันแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือโทโคฟีรอล และโทโคไทอินอล ซึ่งแต่ละกลุ่มยังแยกเป็นวิตามินย่อยๆอีก 4 ชนิด ได้แก่ อัลฟา เบต้า แกมมา และเดลต้า วิตามินอีทำหน้าที่เป็นตัวให้ไฮโดรเจนแก่อนุมูล peroxyl ดังสมการ

$$\alpha\text{-tocopherol} + LOO^{\bullet} \longrightarrow \alpha\text{-tocopherol}^{\bullet} + LOOH$$

อนุมูล α-tocopherol• ที่เกิดขึ้นสามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูล peroxyl ตัวอื่นทำให้ได้สารที่มีความเสถียร (LOO- α-tocopherol) ดังสมการ เป็นผลให้ปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันหยุดลง ดังสมการ

$$\alpha\text{-tocopherol}^{\bullet} + LOO \longrightarrow LOO\text{-}\alpha\text{-tocopherol}^{\bullet}$$

5. กรดแกลลิก เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีสูตรโมเลกุลทางเคมี คือ $C_7H_6O_5$ (ภาพที่ 2) อีกทั้งยังเป็นส่วนประกอบของสารแทนนิน โดยจะพบมากในองุ่น ใบชา เปลือกไม้โอ๊ค โดยทั่วไปจะใช้เกี่ยวกับอุตสาหกรรมทางยาคุณสมบัติของกรดแกลลิกคือสามารถยับยั้งเชื้อรา เชื้อไวรัส และมีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชันได้ดี



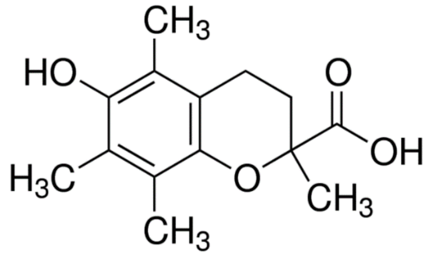
ภาพที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของกรดแกลลิก
ที่มา: http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/g7384?lang=en&region=TH

6. ซิลิเนียม ทองแดง และสังกะสี เป็นสารต้านออกซิเดชันทางอ้อม เนื่องจากเป็นส่วนประกอบของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เป็นสารต้านออกซิเดชัน มีการศึกษาวิจัยที่แสดงว่าการใช้ซิลิเนียมและวิตามินอีร่วมกันช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการป้องกันการเกิดโรคมะเร็งบ้างชนิด ซึ่งพบได้ในอาหารตามธรรมชาติ เนื่องจากสารต้านออกซิเดชันมีหน้าที่หลายอย่าง เช่น ทำหน้าที่เป็นสารรีดิวซ์ (reducing agent) เป็นตัวขับไล่ให้อนุมูลอิสระจับกับไอออนโลหะเร่งให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยหน้าที่ต่างๆ เหล่านี้ จึงทำให้มีผลต่อการชะลอหรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือสามารถเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ และทำให้เป็นสารที่มีความเสถียรหรือเป็นสารที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกซิเดชันอีกต่อไปหรือเป็นสารที่ไม่ใช่อนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (synthetic antioxidant) (โอภา วัชระคุปต์ และคณะ, 2549)

สารต้านอนุมูลอิสระที่พัฒนาสังเคราะห์ขึ้นส่วนใหญ่จะออกแบบให้มีโมเลกุลขนาดเล็ก และใช้โครงสร้างของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีในธรรมชาติ นำมาดัดแปลงให้มีคุณสมบัติทางเคมีและฤทธิ์ที่ดีขึ้น เช่น สารต้านอนุมูลอิสระที่พัฒนาจากสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในธรรมชาติ เช่น โทรลอกซ์ เป็นต้น

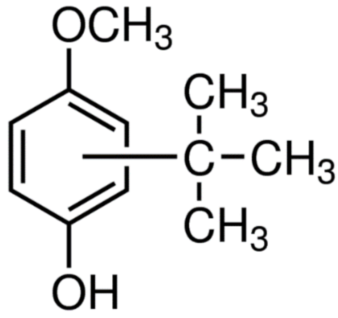
1.โทรลอกซ์ มีสูตรโมเลกุลทางเคมี คือ $C_{14}H_{18}O_4$ (ภาพที่3) เป็นอนุพันธ์ของวิตามินอีที่ดัดแปลงโครงสร้าง โดยการเปลี่ยนสายอัลเคนเป็นหมู่คาร์บอกซิลิก มีสูตรโครงสร้างทำให้มีความสามารถละลายในน้ำได้ดี แต่เนื่องจากความสามารถดังกล่าวจึงทำให้ออกฤทธิ์ได้เร็วกว่าวิตามินอี โดยวิตามินอีต้องใช้เวลานานเป็นชั่วโมงหรือเป็นวัน ในขณะที่โทรลอกซ์ออกฤทธิ์เกือบจะทันที



ภาพที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของโทรลอกซ์

ที่มา: http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/238813?lang=en&region=TH

2. บีเอชเอ (BHA, butylatedhydroxyanisole) บีเอชเอเป็นสารกันหืนที่นิยมใช้กันมากชนิดหนึ่ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผลิตภัณฑ์อาหารที่มีไขมันและน้ำมันเป็นส่วนประกอบ บีเอชเอเป็นสารที่มีผลึกสีขาวหรือสีเหลืองอ่อน มีกลิ่นฉุน ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายในแอกอฮอล์ โครงสร้างของบีเอชเอดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 4 โครงสร้างทางเคมีของบีเอชเอ

ที่มา: http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/b1253?lang=en&region=TH

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity determination) (บุหรัน พันธุ์สวรรค์, 2556)

วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณ ในแต่ละประเภทจะมีหลายวิธีด้วยกัน ซึ่งแต่ละวิธีมีความจำเพาะแตกต่างกัน โดยปกติมักใช้หลายวิธีร่วมกันในการตรวจสอบและสรุปผล

1. วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพ

วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพเป็นการทดสอบเพื่อหาชนิดของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในตัวอย่าง โดยอาศัยหลักการต่างๆ เช่น การทำให้เกิด การทำให้เกิดตะกอน ความสามารถของการละลายในตัวทำละลาย และการถูกดูดซับโดยตัวดูดซับ วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่นิยมได้แก่ การตรวจวัดสารโพลีฟีนอลชนิดต่างๆ เช่น Shinoda test และ Pew test โครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง (thin layaer chromatography, TLC) และการตรวจหาสารต้านอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ โดยใช้เครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC) (บุหรัน พันธุ์สวรรค์, 2556)

- การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารโพลีฟีนอลชนิดต่างๆ โดยการทำให้เกิดสี (colorimetric assay) เป็นวิธีการนำสารเคมีชนิดต่างๆ มาทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างและดูสีที่เกิดขึ้นหลังจากการเกิดปฏิกิริยา ตัวอย่างของวิธีนี้ ได้แก่

1. วิธี Shinoda test เป็นการทดสอบปฏิกิริยากับไซยานิดินส์ (cyanidins reaction) โดยการทำปฏิกิริยาของสารตัวอย่างกับผงแมกนีเซียมหรือวงแหวนแมกนีเซียม (magnesium ribbon) กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น และออกทิลแอลกอฮอล์ (octyl alcohol) ซึ่งจะเกิดการแยกชั้น ถ้าเกิดสีแดงแสดงว่ามีสารจำพวกฟลาโวนอล (flavonol) ฟลาวาโนน (flavanone) ฟลาวาโนนอล (flavanonol) หรือแซนโทน (xanthone) หรือถ้าเกิดสีแดงแสดงว่ามีสารจำพวกฟลาโวน (flavones) ชาลโคน (chalcone) หรือ ออโรน (ourone)

2. วิธี Pew test หรือการทดสอบของพิว เป็นการทำปฏิกิริยาระหว่างสารตัวอย่างกับผงสังกะสี (zinc dust) และไฮโดรคลอริก ถ้าเกิดสีแดงเข้มภายใน 2-5 นาที แสดงว่ามรสารฟลาวาโนนอล (flavanonol) และฟลาโวนอล-3-ไกลโคไซด์ (flavonol-3-glycoside) แต่ถ้าเป็นสีจางๆ แสดงว่ามีสารฟลาวาโนน (flavanone) และฟลาโวนอล (flavonol)

วิธีการทั้งสองมีข้อดี คือ ทำให้หลายตัวอย่างพร้อมกัน ขั้นตอนไม่ยุ่งยาก ไม่ซับซ้อน และใช้ต้นทุนต่ำในการวิเคราะห์สารตัวอย่าง แต่มีข้อเสีย คือมีความไว และความแม่นยำต่ำ และเหมาะสมสำหรับวิเคราะห์สารตัวอย่างที่บริสุทธิ์ เพราะสารหลายๆชนิดอยู่ด้วยกันสีที่เกิดขึ้นสามารถรบกวนกันได้ วิธีการดังกล่าวข้างต้นได้ถูกนำมาวิเคราะห์หารสารโพลีฟีนอลตัวอย่าง

เช่น เกสรตัวผู้ของบัวหลวง และย่านางพบว่ามีสารฟลาโวนอยด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (บุหรัน พันธุ์สวรรค์, 2556)

- การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารโพลีฟีนอลด้วยวิธีโครมาฟีแบบชั้นบาง (thin layaer chromatography, TLC) (บุหรัน พันธุ์สวรรค์, 2556)

เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกสารและวิเคราะห์สารโพลีฟีนอลในเชิงคุณภาพ โดยอาศัยหลักการเคลื่อนที่ของสารด้วยตัวทำละลายหรือตัวพา (mobile phase) กับการถูกดูดซับโดยตัวดูดซับ (stationary phase) ซึ่งอัตราการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่างบนตัวดูดซับขึ้นอยู่กับความสามารถในการละลายของสารตัวอย่างกับตัวทำละลาย และความสามารถในการดูดซับของตัวดูดซับที่มีต่อสารตัวอย่างในแต่ละชนิด สารตัวอย่างที่แตกต่างกันจะถูกละลายและถูกดูดซับได้ไม่เท่ากัน โดยสารที่ละลายในตัวทำละลายได้ดีและถูกดูดซับน้อยจะเคลื่อนที่เร็วกว่า ค่า R_f เข้าใกล้ 1.0 (R_f = ระยะทางที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่/ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่) ส่วนสารที่ละลายในตัวทำละลายได้น้อยและถูกดูดซับได้ดีจะเคลื่อนที่ช้า ค่า R_f จะเข้าใกล้ 0 ซึ่งตัวดูดซับที่นิยมใช้ คือ ซิลิกาเจล และตัวทำละลายหรือตัวพาที่นำมาใช้ในการแยกสารมีหลายชนิด ทั้งนี้อาจมีการใช้ตัวพาที่นำมาใช้ในการแยกสารมีหลายชนิด ผสมกันเพื่อให้เกิดการแยกที่ดีที่สุด ตัวอย่างของตัวทำละลาย เช่น น้ำ เอทานอล เมทานอล เอทิลอะซิเทต กรดฟอร์มิก คลอโรฟอร์ม สารตัวอย่างบางชนิดสามารถแยกโดยใช้ TLC แล้วสามารถมองเห็นสีได้ด้วยตาเปล่า ได้แก่ แอนโทไซยานิน (anthocyanin) ชาลโคน (chalcone) และออโรน (ourone) แต่บางชนิดต้องนำแผ่น TLC ไปทำปฏิกิริยาต่อไอของแอมโมเนีย หรือส่องด้วยแสงอัลตราไวโอแลต (UV) หรือฉีดพ่นด้วยสารต่าง ๆ เช่น สารละลายโฟลิน สารละลายวานิลลินในกรดซัลฟูริก สารละลายวานิลลินในกรดไฮโดรคลอริก สารละลายโพแทสเซียมไอโอเดต สารละลายกิบบส์ (Gibbs reagent) และสารละลาย DPPH ข้อดีของวิธีนี้คือใช้สารตัวอย่างในปริมาณน้อย วิเคราะห์สารหลายชนิดได้พร้อมกัน ใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้น ขั้นตอนไม่ยุ่งยากซับซ้อน ใช้ต้นทุนต่ำในการวิเคราะห์ตัวอย่างสามารถแยกองค์ประกอบต่าง ๆ ในสารตัวอย่างได้ทั้งที่มีสีและไม่มีสี แต่มีข้อเสีย คือ ไม่ความไวและความแม่นยำต่ำ และในกรณีที่องค์ประกอบต่าง ๆ ในตัวอย่างมีค่า R_f ใกล้เคียงกันมาก จะไม่สามารถแยกองค์ประกอบต่าง ๆ เหล่านั้นออกจากกันหรือได้แต่ไม่บริสุทธิ์ ซึ่งตัวอย่างของการวิเคราะห์สารโพลีฟีนอลพบในย่านาง และผักช้าเลือด โดยการใช้สารละลาย DPPH ฉีดพ่นบนแผ่นโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง

- การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระชนิดต่าง ๆ โดยใช้เครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC) ใช้หลักการคล้ายกับเทคนิคของ HPLC มีส่วนของปั๊มมาช่วยทำให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ และตัวดูดซับอยู่กับที่ บรรจุเป็นทรงกลมเล็ก ๆ หรือที่เรียกว่าคอลัมน์ได้แตกต่างกัน ซึ่งสารที่ถูกดูดซับได้น้อยจะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ออกมาก่อน ส่วนสารที่ถูกดูดซับได้ดีจะเคลื่อนที่ออกมาทีหลัง องค์ประกอบอีกส่วนที่สำคัญ คือ ส่วน

ตรวจวัดสัญญาณ (detector) มีหน้าที่ตรวจวัดสัญญาณของสารตัวอย่างที่แยกออกมาแต่ละชนิด ซึ่งสัญญาณที่ตรวจวัดจะมีลักษณะเป็นพีค (peak) เรียกว่าโครมาโตแกรม (chromatogram) โดยส่วนตรวจวัดสัญญาณสามารถตรวจวัดได้ด้วย UV, fluorescence, IR เป็นต้น ซึ่งแต่ละชนิดจะมีความจำเพาะจงกับสารแตกต่างกัน การแยกสารต้านอนุมูลอิสระโดยใช้เครื่อง HPLC สามารถตรวจหาสารได้ทั้งในเชิงคุณภาพ และปริมาณในเวลาเดียวกัน อีกทั้งสามารถหาสารหลายชนิดไปพร้อมๆกัน ทั้งนี้ต้องมีสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบโดยสารชนิดเดียวกันจะมีพีคออกมาในระยะเวลา (retention time) เดียวกันเสมอ ข้อดีของวิธีนี้ คือ สามารถวิเคราะห์ได้ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณวิเคราะห์สารหลายชนิดได้พร้อมกัน และวิเคราะห์สารได้ในปริมาณต่ำๆ แต่มีข้อเสีย คือ มีค่าใช้จ่ายสูงเนื่องจากเครื่อง HPLC มาราคาค่อนข้างแพง และ mobile phase ต้องใช้ประเภท HPLC grade ตัวอย่างในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (carechin, gallic acid และ rutin) โดยใช้เครื่อง HPLC ในพืชผัก (บุหรัน พันธุ์สวรรค์, 2556)

2. วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณ

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณเป็นการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างประเภทต่างๆ วิธีที่นิยมได้แก่ การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ วิธีการฟอกสีอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ และการวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ (FRAP assay) ซึ่งวิธีการดังกล่าวข้างต้นจะมีการสร้างอนุมูลอิสระที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนและวิเคราะห์และวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งหรือกำจัดอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างที่สนใจ โดยวัดปริมาณอนุมูลอิสระที่ลดลงหรือที่เหลือจากค่าการดูดกลืนแสง สารอนุมูลอิสระที่นิยมใช้ เช่น $ABTS^{\bullet+}$ และ $DPPH^{\bullet}$ การคำนวณหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระหาได้จากอัตราส่วนของการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างกับสารมาตรฐาน หน่วยของการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณแสดงได้ 2 แบบ คือ แบบปริมาณความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีในตัวอย่าง ซึ่งค่าตัวเลขสูงจะแสดงว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง และแบบปริมาณความเข้มข้นจองสารตัวอย่างที่ทำให้สารอนุมูลอิสระลดลง 50% (IC50, 50% of inhibitory concentration) โดยค่าตัวเลขต่ำแสดงว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง (บุหรัน พันธุ์สวรรค์, 2556)

- การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH radical scavenging assay) (Brand-Williams *et al.*, 1995) เป็นการทดสอบด้วยวิธีทางเคมีโดยใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระในที่นี้ก็คืออนุมูลอิสระ DPPH ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัวและมีสีม่วงสามารถดูดกลียแสงได้สูงสุดโดยใช้เครื่องสเปกโตโฟโตรมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร เมื่อ $DPPH^{\bullet}$ ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระที่ละลายด้วยเอทานอล (สารที่ให้อิเล็กตรอน) จะทำให้สีม่วงจางลงจนเป็นสีเหลือง ซึ่งก่อนนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงต้องทิ้งไว้ที่มืดเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา ทำให้

สามารถหาการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้จากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH สูตรคำนวณได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงจากการใส่ตัวอย่างเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น

$$DPPH^{\bullet} + AH \longrightarrow DPPH\text{-}H + A^{\bullet}$$

$$\text{DPPH radical scavenging (\%)} = [(A_0\text{-}A_s)/A] \times 100$$

A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น

A_s = ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเติมสารตัวอย่าง

ข้อดีของวิธีนี้ คือ ง่าย สะดวก และรวดเร็ว ส่วนข้อเสีย คือ $DPPH^{\bullet}$ ค่อนข้างเสถียรไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกายจริง จึงทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ช้า ทำให้ค่าการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่วัดได้น้อยกว่าความเป็นจริง และต้องวัดในปฏิกิริย์ที่เป็นแอลกอฮอล์ ซึ่งทำให้โปรตีนตกตะกอนจึงไม่สามารถวิเคราะห์ในตัวอย่างที่เป็นเลือดได้ อีกทั้งสารปนเปื้อนและโลหะจะรบกวน (interfere) ซึ่งสามารถเป็นตัวรีดิวซ์แล้วทำให้สีของอนุมูลอิสระ DPPH จางลงได้เช่นกัน

- การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS radical cation decolorization assay) (Re *et al.*, 1999) เป็นวิธีการวัดความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ เป็นสารสังเคราะห์ที่มีสีเขียวปนน้ำเงินสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เนื่องจากสีของ $ABTS^{\bullet+}$ ปกติจะมีค่าการดูดกลืนแสงสูงจึงทำให้ต้องเจือจาง $ABTS^{\bullet+}$ ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จากนั้นนำ $ABTS^{\bullet+}$ ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างที่ละลายด้วยเอทานอลเจือจางซึ่งจะทำให้สีจางลง และตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา จึงสามารถหาความเป็นสารต้านทานอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้จากการคำนวณสีที่จางลง และการเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox กระทำเช่นเดียวกับวิธี DPPH ข้อดีของวิธีการนี้ คือ $ABTS^{\bullet+}$ ละลายน้ำได้ดีในน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์จึงทำให้เกิดปฏิกิริยาได้รวดเร็ว และตัวทำละลายอินทรีย์จึงทำปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็ว และทำปฏิกิริยาได้ดีในช่วง pH ที่กว้าง ส่วนข้อเสีย คือ $ABTS^{\bullet+}$ ไม่เป็นสารธรรมชาติที่พบในร่างกายหรือในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตและต้องมีการทำปฏิกิริยากับสารอื่นก่อนถึงจะเกิดเป็นอนุมูลอิสระ

- การตรวจหาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด (Singleton *et al.*, 1999)

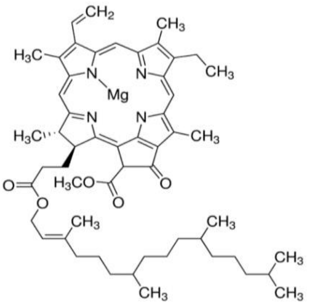
การตรวจหาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัด โดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu อาศัยหลักการ คือ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดทำปฏิกิริยากับ Folin-Ciocalteu reagent ซึ่งประกอบด้วย phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents สารดังกล่าวจะถูกรีดิวซ์โดย

กลุ่ม phenolic hydroxyl ของสารประกอบฟีนอกลิกทั้งหมดเกิดเป็น tungsten และ molybdenum blue ซึ่งให้สีน้ำเงินและดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปวัดหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก จากกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของกรดแกลลิกและค่าการดูดกลืนแสงในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักกรัมแห้ง

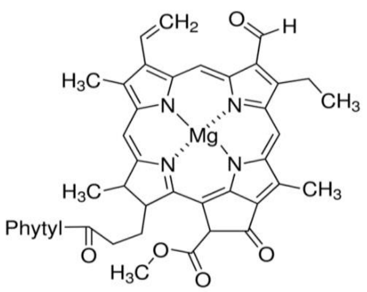
ชนิดและแหล่งของสารสารสี (pigment)

คลอโรฟิลล์ (chlorophyll)

คลอโรฟิลล์ เป็นรงควัตถุสีเขียวที่พบอยู่ในคลอโรพลาสต์ (chloroplast) มีหลายชนิด ได้แก่ คลอโรฟิลล์ เอ, คลอโรฟิลล์ บี, คลอโรฟิลล์ ซี และคลอโรฟิลล์ ดี เป็นต้น ซึ่งคลอโรฟิลล์แต่ละชนิดมีโครงสร้างและคุณสมบัติแตกต่างกันไป ภาพที่ 5 ทำให้สามารถดูดกลืนแสงในช่วงคลื่นต่าง ๆได้หลากหลายความยาวคลื่น ในพืชชั้นสูงจะพบคลอโรฟิลล์เอ และคลอโรฟิลล์บี ในอัตราส่วย 3:1 คลอโรฟิลล์ไม่ละลายน้ำแต่ละลายได้ดีในไขมันหรือตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น แอลกอฮอล์ อะซิโตน และอีเธอร์ เป็นต้น (ชลธิชา อินทรโกศล, 2543)



(A)



(B)

ภาพที่ 5 โครงสร้างคลอโรฟิลล์ (A) คลอโรฟิลล์ เอ และ (B) คือ คลอโรฟิลล์ บี

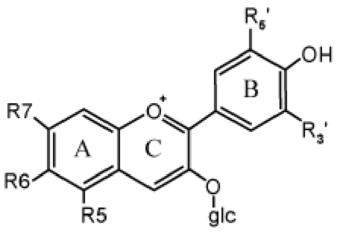
ที่มา : http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c5753?lang=en&region=TH

http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/25740?lang=en&region=TH

แอนโทไซยานิน (Anthocyanin)

แอนโทไซยานินเป็นรงควัตถุที่พบอยู่ใน cell sap ของพืช อยู่ในรูปของไกลโคไซด์ ให้สีแดง น้ำเงิน และม่วง ในผักผลไม้ และดอกไม้ชนิดต่าง ๆ สีของแอนโทไซยานินถูกควบคุมด้วยปัจจัย 2 อย่าง คือ โครงสร้าง และพีเอช หากในโครงสร้างวงแหวนฟีนิลมีจำนวนหมู่ไฮดรอกซิลหรือหมู่เมทอกซิลเพิ่มขึ้นจะมีผลต่อสีแอนโทไซยานิน (ภาพที่ 6) เช่น การเพิ่มหมู่ไฮดรอกซิลให้มากขึ้นจะทำให้มีสีเข้มขึ้น และสีจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินมากขึ้น ส่วนค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายที่แอนโทไซยานินละลายอยู่มีผลต่อการสลายตัวของแอนโทไซยานิน ทำให้เปลี่ยนสีได้ เช่น ไซยานินซึ่งเป็นสีแดงของเชอรี่ และแครนเบอรี่ จะเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีน้ำเงิน เมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างเปลี่ยนจาก 3 เป็น 11 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างยังอาจเกิดขึ้น

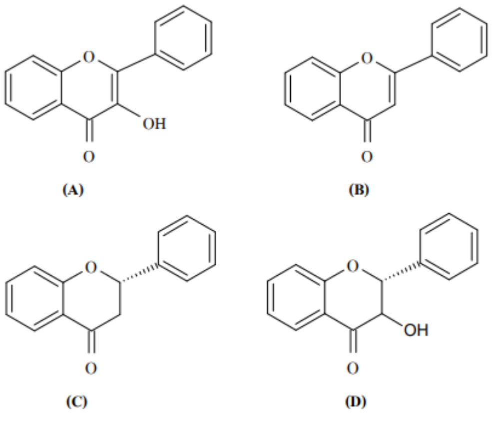
เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงทางสรีระของผักและผลไม้ เช่น ระหว่างการสุกของผลไม้จะมีการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-ด่างมีผลทำให้สีของผลไม้เปลี่ยนแปลงไปได้โดยเฉพาะผลไม้ตระกูลเบอรี่ (สุวรรณา พิชัยยงค์วงศ์ดี และคณะ, 2554)



ภาพที่ 6 โครงสร้างแอนโทไซยานิน
ที่มา: http://www.micro-ox.com/chem_antho.html

ฟลาโวนอยด์ (flavonoid)

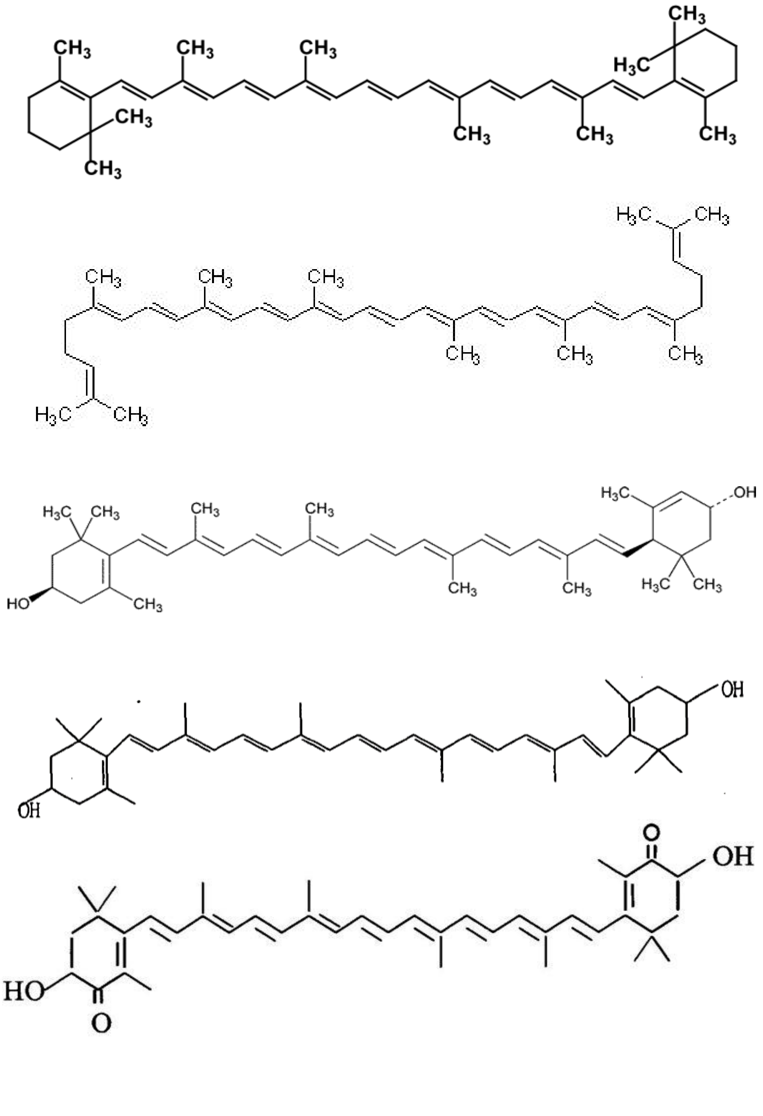
ฟลาโวนอยด์เป็นกลุ่มของรงควัตถุที่พบในพืช มีสีเหลือง และมีโครงสร้างทางเคมีคล้ายแอนโทไซยานิน และเป็นสารประกอบประเภทไกลโคไซด์เช่นเดียวกัน สารประกอบฟลาโวนอยด์มีความคงตัวต่อความร้อน และปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดีกว่าแอนโทไซยานิน แต่สามารถเปลี่ยนสีได้ง่ายเมื่อรวมตัวกับโลหะ เช่น เมื่อรวมตัวกับเหล็กจะให้สีน้ำเงินหรือเขียว นอกจากนี้สารประกอบ ฟลาโวนอยด์ยังเป็นสารตั้งต้นในการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลที่เร่งด้วยเอนไซม์ได้ จึงทำให้เกิดสีที่ไม่พึ่งประสงค์ในอาหาร (สุวรรณา พิชัยยงค์วงศ์ดี และคณะ, 2554) สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ แบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้หลายกลุ่ม ตามความแตกต่างของสูตรโครงสร้างโดยเฉพาะที่วงซึ่งเป็นวงที่มีอะตอมออกซิเจนอยู่ในรูปแบบต่างๆ เช่น อีเทอร์ คีโตน รวมทั้งการมีหมู่ไฮดรอกซีแทนที่วงอะโรมาติกในโมเลกุล ตัวอย่างของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ได้แก้ Flavan, Flavanone, Flavanol, Flavone, Isoflavane, Isoflavonone, Isofavonol, Isoflavone, chalcone, Dihydrochalcone และ Coumarin (ขวัญยืน เลี่ยมสำโรง, 2552) ดังแสดงในภาพที่ 7



ภาพที่ 7 โครงสร้างหลักของฟลาโวนอยด์กลุ่มต่างๆ (A) คือ Flavonol, (B) คือ Flavones, (C) คือ Flavanone และ (D) คือ Flavononol (ขวัญยืน เลี่ยมสำโรง, 2552)

แคโรทีนอยด์ (carotenoid)

แคโรทีนอยด์เป็นสารสีที่พบได้ทั้งในพืช และสัตว์ รวมทั้งสาหร่ายทะเล แบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ ยีสต์ และเชื้อรา เป็นต้น สารประกอบของแคโรทีนอยด์ส่วนใหญ่มีสีแดง ส้ม และเหลือง ละลายได้ในไขมัน พบมากในใบพืช ผลไม้ ดอกไม้ แมลง ปลาแซลมอน นกที่มีสีบางชนิด (นกฟลามิงโก้) และสัตว์น้ำที่มีเปลือก สารประกอบกลุ่มนี้มากกว่า 600 ชนิด โดยบางชนิดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ แต่มีเพียง 50 ชนิดเท่านั้นที่มีคุณสมบัติเป็นโปรวิตามินเอ แคโรทีนอยด์สามารถแยกได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มแคโรทีน (carotene) เช่น เบต้าแคโรทีน (Beta-carotene) และไลโคปีน (lycopene) และกลุ่มแซนโทฟิล (xanthophyll) เช่น ลูทีน (lutein) ซีแซนทิน (zeaxanthin) และแอสตาแซนทิน (astaxanthin) (ศิริพร จันทรคีรี, 2551) ดังแสดงในภาพที่ 8



(A)

(B)

(C)

(D)

(E)

ภาพที่ 8 โครงสร้างของสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ (A) เบต้าแคโรทีน, (B) ไลโคปีน, (C) ลูทีน, (D) ซีแซนทิน และ (E) แอสตาแซนทิน

วิธีการทดลอง

1. ตัวอย่างเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ใช้ศึกษา

เชื้อแอคติโนมัยซีท

เชื้อแอคติโนมัยซีทได้จากแผนงานวิจัย “จุลินทรีย์ทะเล: แหล่งใหม่ของสารตัวยาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร” ที่มีการศึกษาเบื้องต้นพบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทสามารถผลิตสารสีและมีคุณสมบัติทางชีวภาพที่น่าสนใจ ได้แก่ เชื้อ *Streptomyces indiaensis* (A1-3), *Streptomyces indiaensis* (A3-3), *Streptomyces coelicoflavus* (A16-1) และ *Streptomyces parvulus* (CP58-4-21) ภาพ SEM ของเชื้อที่นำมาศึกษา และลำดับเบสของ 16S rRNA ยีน หรือ DNA แสดงในภาคผนวก ข และภาคผนวก ค

การเก็บตัวอย่าง

เชื้อ *Streptomyces indiaensis* (A1-3), *Streptomyces indiaensis* (A3-3) และ *Streptomyces coelicoflavu* ได้จากการเก็บตัวอย่างดินตะกอนบริเวณชายฝั่งจังหวัดชลบุรี ในเดือนมีนาคม 2556 ส่วนเชื้อ *Streptomyces parvulus* เก็บตัวอย่างดินตะกอนบริเวณป่าชายเลนจังหวัดชุมพร โดยเก็บเฉพาะส่วนผิวหน้าดินใส่ในถุงพลาสติกที่ปลอดเชื้อ จากนั้นแช่เย็นและนำกลับมาที่ห้องปฏิบัติการสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา เพื่อคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทต่อไป

การคัดแยกและการเลี้ยงแอคติโนมัยซีท

นำตัวอย่างดินมาปรับสภาพ (Pretreated) โดยอบที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เจือจางตัวอย่างลำดับส่วนแบบ 10 เท่า ด้วยน้ำทะเลธรรมชาติแบบปลอดเชื้อจนถึงระดับความเจือจางที่ 10^{-1} และ 10^{-2} ปิเปตตัวอย่างมาเกลี่ยลงบนอาหารแข็ง 3 ชนิด ได้แก่ Actinomycete isolation agar (AIA), Starch-Casein Agar (SCA) และ Malt extract-yeast extract medium (ISP2) เติม 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร Novobiocin และ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร Nystatin เพื่อป้องกันการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบและเชื้อรา นำตัวอย่างไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จนกระทั่งปรากฏโคโลนีเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ นำโคโลนีดังกล่าวมาทำให้บริสุทธิ์ และเลี้ยงให้เจริญบนจานเพาะเชื้อ การเลี้ยงในอาหารเหลวเบื้องต้นทดลองใน ISP2 ความเค็มที่สนใจศึกษาได้แก่ 17, 25 และ 35 ppt บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 110 รอบ/นาที เป็นเวลา 7 วัน (Williams *et al*.,1989) จากนั้นเก็บเซลล์แอคติโนมัยซีทด้วยวิธีปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 7000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ รวบรวมเซลล์ที่ได้เพื่อรอการสกัดสารสกัดหยาบ

การจำแนกชนิดแอคติโนมัยซีท

จำแนกชนิดแอคติโนมัยซีทจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscrope) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบบส่องกราด (scanning electron microscope) โดยพิจารณาจาก เส้นใยอาหาร เส้นใยอากาศ รูปทรงสปอร์ และพื้นผิวสปอร์ (Williams *et al.*,1989) และการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ โดยพิจารณาลักษณะของกรดไดอะมิโน พิเมลิกในผนังเซลล์ (diaminopimelic acid, DAP) และการวิเคราะห์น้ำตาลภายในเซลล์ที่ถูกย่อย โดยโครมาโทรกราฟีแบบผิวบาง (Ruan,1994)

2. การเพิ่มปริมาณผลผลิตสารสี การทดสอบความคงตัวของสารสี และโครงสร้างของสารสี

การเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารชนิดต่างๆ

นำเชื้อแอคติโนมัยซีทเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแตกต่างกัน 3 สูตร ได้แก่ ISP2 (ส่วนผสมหลักคือ Yeast Extract และ Malt Extract) , ISP3 (ส่วนผสมหลักคือข้าวโอ๊ต) และ OYG (ส่วนผสมหลักคือข้าวโอ๊ต Yeast Extract และกลีเซอรอล) ซึ่งมีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนแตกต่างกัน โดยใช้ Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 มิลลิเมตร เจาะชิ้นวุ้นที่มีเชื้อเจริญอยู่ ใส่ในอาหารเหลวปริมาตร 250 มิลลิลิตร บ่มอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 100 รอบ/นาที เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดแยกส่วนของเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยงโดยการกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 ตากให้แห้งแล้วชั่งน้ำหนักเซลล์ และวัดปริมาตรสารละลายน้ำเลี้ยงเชื้อ (Supernatant) ที่กรองได้ เพื่อนำไปสกัดในขั้นตอนต่อไป

การศึกษาผลของความเค็มต่อการเพิ่มปริมาณผลผลิตสารสี

การศึกษาผลของความเค็มต่อปริมาณเซลล์และปริมาณสารสีจากเชื้อแอคติโนมัยซีท ใช้อาหาร ISP2 ที่ความเค็มแตกต่างกัน 7 ระดับคือ 5, 10, 20, 25, 30, 35 และ 40 ppt

การสกัดสารสีจากแอคติโนมัยซีท

สกัดส่วนสารละลายจากการเลี้ยงเชื้อ (Supernatant) ด้วย Ethyl acetate ในอัตราส่วน 1:1 แยกชั้น Ethyl acetate สกัดประมาณสองครั้ง นำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง Vacuum Evaporator เติมคลอโรฟอร์ม 1 ส่วน และ เมทานอล 1 ส่วน จะได้ “สารสกัดหยาบส่วนของ Supernatant เก็บใส่ Vial เปิดฝาทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ชั่งน้ำหนักสารสกัดหยาบ

การสกัดสารจากส่วนของเซลล์ โดยนำเซลล์ที่แยกได้จากการกรองไปตากแห้ง จากนั้นนำไปชั่งน้ำหนักแห้งอีกครั้งแล้วนำเซลล์ที่อยู่บนกระดาษกรองใส่ลงในบีกเกอร์พร้อมทั้งกระดาษ เติมเมทานอลให้ท่วม ปิดฝาบีกเกอร์ด้วยอะลูมิเนียมฟอยด์ จากนั้นนำไป sonicate ประมาณ 10-20 นาที ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง ทำการสกัดส่วน residue อีกครั้งด้วยเมทานอล นำไป sonicate 20 นาที แล้วนำไประเหยเมทานอล ออกด้วยเครื่อง rotary evaporator

จากนั้นนำไปแยกส่วนด้วยสารละลาย ethyl acetate อัตราส่วน 1:1 (v/v) เก็บชั้น ethyl acetate ทำสารสกัดให้แห้ง แล้วเติมคลอโรฟอร์ม 1 ส่วน และ เมทานอล 1ส่วน จะได้ “สารสกัดหยาบส่วนของเซลล์” เก็บใส่ Vial เปิดฝาทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ชั่งน้ำหนักสารสกัดหยาบ

การวิเคราะห์ปริมาณสารสี

วัดปริมาณของสารสีที่เกิดขึ้นโดยใช้เทคนิค spectroscopic technique ด้วย UV-Vis spectrophotometer ที่ความเข้มข้นสาร 500 หรือ 1000 ppm

การทดสอบความคงตัวของสารสี

เตรียมสารสกัดหยาบแอคติโนมัยซีท ดังนี้

- เชื้อ *Streptomyces indiaensis* (A1-3) เลี้ยงในอาหาร ISP3 ความเค็ม 17 และ 35 ppt เก็บส่วนของเซลล์มาสกัดสาร เตรียมสารสกัดให้ได้ความเข้มข้น 10,000 ppm
- เชื้อ *Streptomyces coelicoflavu* ในอาหาร ISP3 ความเค็ม 17 25 และ 35 ppt เก็บส่วนของเซลล์มาสกัดสาร เตรียมสารสกัดให้ได้ความเข้มข้น 1,200 ppm
- เชื้อ *Streptomyces parvulus* เลี้ยงในอาหาร OYG ความเค็ม 40 ppt เก็บส่วนของเซลล์มาสกัดสารเตรียมสารสกัดให้ได้ความเข้มข้น 10,000 ppm

นำสารสกัดที่ได้ใส่ในขวด Vial ใส วางไว้ที่ความเข้มแสง 5,000 ลักซ์ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วัน เก็บตัวอย่างวันที่ 0, 7, 14, 21, 31, และ 60 วัน นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง ณ วันที่ 0 ให้ทำการแสกนค่าการดูดกลืนแสง (spectral scan) เพื่อที่จะได้ทราบค่าความยาวคลื่นที่เหมาะสมกับตัวอย่างนั้นๆ และใช้ค่าความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงมากที่สุดสำหรับใช้วัดตัวอย่างต่อไป

3. การตรึงตัวอย่างด้วยแคลเซียมอัลจิเนต

การตรึงโปรตีน

1. ชั่งตัวอย่าง ปาเปน (Papain), ทริปซิน (Trypsin), อัลบูมิน (Albumin) และ บลูเดกซ์แตรน (Blue dextran) 0.1 กรัม เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร
2. นำสารละลายโปรตีนที่ได้ผสมกับสารละลายโซเดียมอัลจิเนต (Na-Alginate) ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ได้เป็นสารละลายโปรตีนโซเดียมอัลจิเนต
3. นำสารละลายโปรตีนโซเดียมอัลจิเนตหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ด้วยกระบอกฉีดยาขนาด 10 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง
4. เทสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ออกจากเม็ดเจลที่ได้ แล้วล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร

5. ชั่งน้ำหนักและนับเม็ดเจล

การวัดโปรตีนที่หลุดออกมา

1. นำเม็ดเจลที่ได้ใส่ในหลุมไมโครเวล 6 หลุม หลุมละ 10 เม็ด เติมน้ำทะเลเทียม ค่าความเป็นกรด-ด่าง 8 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

2. ปิเปตน้ำตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ณ เวลาที่ 0 นาที 10 นาที 20 นาที 30 นาที 1 ชั่วโมง 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ

3. ปาเปน ทริปซิน อัลบูมิน การทำวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยวิธีของ (Bradfrod, 1976) ที่ความยาวคลื่น 595 nm และบลูเดกซ์แตรนวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm

การตรึงสารสีจากเชื้อแอคติโนมัยซีท

1. นำตัวอย่างสารสีจากเชื้อแอคติโนมัยซีท *S. indiaensis* (A1-3), *S. indiaensis* (A3-3), *S. coelicoflavu* และ *S. parvulus* ละลายด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

2. นำสารละลายสารสีที่ได้ผสมกับสารละลายโซเดียมอัลจิเนต (Na-Alginate) ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ได้เป็นสารละลายสารสีโซเดียมอัลจิเนต

3. นำสารละลายสารสีโซเดียมอัลจิเนตหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง

4. เทสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ออกจากเม็ดเจลที่ได้ แล้วล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร

5. ชั่งน้ำหนักและนับเม็ดเจล

การวัดสารสีที่หลุดออกมา

1. นำเม็ดเจลที่ได้ใส่ในหลุมไมโครเวล 6 หลุม หลุมละ 10 เม็ด เติมนำทะเลธรรมชาติ (Natural Seawater) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

2. ปิเปตน้ำตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ณ เวลาที่ 0 นาที 10 นาที 20 นาที 1 ชั่วโมง 3ชั่วโมง 6 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ

3. ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410, 410, 495 และ 450 nm ตามลำดับ

4. การศึกษาสภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากดินตะกอนป่าชายเลน

การสกัดสารจากส่วนของเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีท

นำตัวอย่างเซลล์แอคติโนมัยซีท 5 กรัม ทำการสกัดสารสกัดหยาบ โดยการ homogenize ด้วยเมทานอล 50 มล. ทำการเขย่าแรงๆ 30 นาที จากนั้นนำไปกรองด้วยกระดาษกรอง และนำส่วนของสารละลายแอลกอฮอล์ที่กรองได้ไประเหยด้วยเครื่องระเหยระบบสุญญากาศ สกัดส่วน solid residue ด้วยเมทานอลอีก 2 ครั้ง กรองและรวมในส่วนของสารละลายเมทานอล จากนั้นนำไประเหยให้เข้มข้นขึ้น ทำการสกัดแยกส่วน (partition) สารที่ระเหยข้างต้นด้วย Ethyl acetate:H_2O อัตราส่วน 1:1 (v/v) ทำซ้ำ 3 ครั้ง ในส่วนของน้ำเลี้ยงทำการสกัดด้วยเอทธิลอะซิเตท จำนวน 3 รอบ เช่นกัน รวมชั้นเอทธิลอะซิเตทนำไประเหยแห้งจะได้ **"สารสกัดหยาบ"** ชั่งน้ำหนักสารสกัดหยาบ และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำไปศึกษาต่อไป

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

วิธี DPPH ความเป็นกรด-ด่าง free radical scavenging activity (Fenglin et al., 2004)

นำสารสกัดหยาบแอคติโนมัยซีทที่ความเข้มข้น 800 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มา 200 ไมโครลิตร ใส่ลงใน microtiter plate 96-well เจือจางให้มีความเข้มข้น 400 - 3.125 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เติมสารละลาย 0.2 มิลลิโมลาร์ DPความเป็นกรด-ด่าง˙ (1,1-diความเป็นกรด-ด่าง enyl-2-picrylhydrazyl) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้ว ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตรโดยเครื่อง Microplate reader (Multiskan Go, Thermo; Finland) ทำการทดสอบอย่างละ 3 ซ้ำ บันทึกค่าการดูดกลืนแสงและนำไปคำนวณหาเปอร์เซนต์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้วิตามินซี และ อนุพันธ์ของวิตามินอี (Trolox) เป็นสารมาตรฐาน

วิธี ABTS free radical-scavenging activity (Yang, et al., 2011)

การเตรียมสาร ABTS โดยผสมสารละลาย 2, 2'-azino-bis 3-ethylbenzthiazoline -6-sulfonic acid (ABTS) ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร กับสารละลาย $K_2S_2O_8$ ความเข้มข้น 140 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 35.5 ไมโครลิตร (ในน้ำกลั่น) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 16 ชั่วโมง จะได้ stock ABTS radical cation ก่อนการทดสอบเจือจาง stock ABTS radical cation ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสง ในช่วง 0.700 ± 0.02 ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร นำสารสกัดหยาบแอคติโนมัยซีทที่ความเข็มข้น 1,200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มา 100 ไมโครลิตร ใส่ลง

ใน microtiter plate 96-well เจือจางให้มีความเข้มข้น 400-3.125 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เติม $ABTS^{+\bullet}$ 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader (Multiskan GO, Thermo; Finland) ทำการทดสอบอย่างละ 3 ซ้ำ บันทึกค่าการดูดกลืนแสงและนำไปคำนวณหาเปอร์เซนต์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS โดยใช้วิตามินซี และTrolox เป็นสารละลายมาตรฐาน คำนวณร้อยละของการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (% inhibition) จากสูตร

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

$A_{control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดสอบ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำผลฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan’s multiple rang test ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ใช้โปรแกรม R version 3.3.1 (Ihaka and Gentleman, 1996)

5. การศึกษาสภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์จากเชื้อ *Streptomyces parvulus* ที่แยกได้จากดินตะกอนป่าชายเลน

เชื้อแอคติโนมัยซีท

เชื้อแอคติโนมัยซีททะเล *Streptomyces parvulus* แยกได้จากดินตะกอนป่าชายเลน จังหวัดชุมพร พิสูจน์เอกลักษณ์ และศึกษาลำดับเบสของ 16S rRNA ยีน โดย คุณรัตนาภรณ์ ศรีวิบูลย์ นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการพิเศษ สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล ตัวอย่างเชื้อเก็บไว้ที่ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา โดยเก็บแช่แข็งในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสม 20% glycerol ที่ –40 °C

การเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ความเค็มแตกต่างกัน 7 ระดับ

อาหารเลี้ยงเชื้อใช้สูตร ISP2 มีส่วนผสมหลักเป็น yeast extract และ malt extract (Atlas, R.M., 2010) ผสมกับน้ำทะเลธรรมชาติที่มีความเค็มแตกต่างกัน 7 ระดับ ได้แก่ 5, 10, 20, 25, 30, 35 และ 40 ppt ค่าความเป็นกรด-ด่างประมาณ 6.2± 0.5 ทำการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งแรงดันไอน้ำเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 มิลลิเมตร เจาะชิ้นวุ้นที่มีเชื้อเจริญอยู่ 1 ชิ้น ใส่ในอาหารเหลวปริมาตร 250 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 110 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดแยกส่วนของเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยงด้วยกระดาษกรอง ตากกระดาษให้แห้งแล้วชั่งน้ำหนักเซลล์ และวัดปริมาตรน้ำเลี้ยง (supernatant) ที่กรองได้ เพื่อนำไปสกัดในขั้นตอนต่อไป

การเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทในอาหารเหลวแตกต่างกัน 3 สูตร

นำเชื้อแอคติโนมัยซีทเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแตกต่างกัน 3 สูตร ได้แก่ ISP2 , ISP3 (มีส่วนผสมหลักเป็นข้าวโอ๊ต) และ OYG (มีส่วนผสมหลักเป็นข้าวโอ๊ต ยีสต์สกัด และกลีเซอรอล) ผสมกับน้ำทะเลธรรมชาติที่มีความเค็ม 17 ppt ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วโดยการนึ่ง โดยมีค่าความเป็นกรด-ด่าง ประมาณ 6.2± 0.5 (พัฒน, 2559) จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 มิลลิเมตร เจาะชิ้นวุ้นที่มีเชื้อเจริญอยู่ 1 ชิ้น ใส่ในอาหารเหลวปริมาตร 250 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 110 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดแยกส่วนของเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยงด้วยกระดาษกรอง ตากกระดาษให้แห้งแล้วชั่งน้ำหนักเซลล์ และวัดปริมาตรน้ำเลี้ยง (supernatant) ที่กรองได้ เพื่อนำไปสกัดในขั้นตอนต่อไป

การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

การสกัดสารจากส่วนของเซลล์ที่นำไปตากแห้ง ทำได้โดยนำกระดาษกรองที่มีเซลล์อยู่ใส่ลงในบีกเกอร์พร้อมทั้งเติมเมทานอลให้ท่วม จากนั้นนำบีกเกอร์แช่ในอ่างคลื่นเสียงความถี่สูงประมาณ 10-20 นาที แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน กรองสารละลายที่สกัดได้ด้วยกระดาษกรอง ทำการสกัดส่วนที่เหลือซ้ำอีกครั้งด้วยเมทานอล แล้วนำสารสกัดไปประเหยเมทานอลออกด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ สารสกัดหยาบที่ได้จากส่วนของเซลล์นำไปสกัดแบบแยกส่วนด้วยสารละลายเอทิลอะซิเตตใช้อัตราส่วน 1:1 (v/v) แยกเก็บส่วนของชั้นเอทิลอะซิเตต แล้วสกัดซ้ำอีกสองครั้ง รวมสารที่ได้ไปทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ ใช้คลอโรฟอร์มต่อเมทานอลอัตราส่วน 1:1 (v/v) ละลายสารที่ได้เก็บใส่ขวด และเปิดฝาทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องจากนั้นชั่งน้ำหนักได้เป็นสารสกัดหยาบจากส่วนของเซลล์

การสกัดสารจากสารละลายส่วนของน้ำเลี้ยงสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตในอัตราส่วน 1:1 (v/v) แยกเก็บส่วนของชั้นเอทิลอะซิเตต แล้วสกัดซ้ำอีกสองครั้ง นำไปทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ จากนั้นละลายสารที่ได้ด้วยสารละลายที่มีคลอโรฟอร์มต่อเมทานอลอัตราส่วน 1:1 (v/v) เก็บใส่ขวด และเปิดฝาทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นชั่งน้ำหนักสารได้เป็นสารสกัดหยาบจากส่วนของน้ำเลี้ยง

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากส่วนของเซลล์และน้ำเลี้ยงใช้เทคนิคดิสก์ดิฟฟิวชัน (Lorian,V. 1980) เชื้อที่นำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ ได้แก่ เชื้อแบคทีเรีย *E. coli, B. subtilis*, *S. aureus* TISTR 517 และเชื้อรา *C. albicans* TISTR 5239 ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่ใช้ทดสอบคือ 40,000 ppm การทดสอบทำโดยปิเปตสารสกัดหยาบและเมทา

นอล (ชุดควบคุม) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนกระดาษกรองที่ปราศจากเชื้อ (paper disc) เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร มีปริมาณสารที่ใช้ทดสอบ 400 ไมโครกรัมต่อแผ่นดิสก์ สำหรับเชื้อที่นำมาทดสอบเตรียมได้โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว วัดค่าความหนาแน่นของเชื้อด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ให้ได้ประมาณ 0.2± 0.05 ใช้ไม้สำลีจุ่มเชื้อป้ายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อให้ทั่วผิวหน้าอาหารแข็ง แบคทีเรียใช้อาหารแข็ง Mueller hinton agar ส่วนเชื้อราใช้อาหาร Potato dextrose agar ทิ้งไว้ 3-5 นาที นำแผ่นดิสก์วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลล์เซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และวัดผลการยับยั้งจุลินทรีย์ได้จากการหาบริเวณยับยั้งเชื้อ (Inhibition zone) ที่เกิดขึ้นรอบๆแผ่นดิสก์ในหน่วยมิลลิเมตร บันทึกผลเป็นเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเชื้อลบด้วยเส้นผ่านศูนย์กลางของแผ่นดิสก์ และวิเคราะห์ผลการทดลอง

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan’s multiple rang test ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ใช้โปรแกรม R version 3.3.1 (Ihaka and Gentleman, 1996)

6. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity)

การทดสอบผลของ DMSO ต่อร้อยละการตายของอาร์ทีเมีย

1.1. การเตรียมอาร์ทีเมีย

1) ชั่งไข่อาร์ทีเมีย 1 กรัมต่อน้ำทะเล 1 ลิตร (ชั่งไข่อาร์ทีเมีย 0.05 กรัม/น้ำทะเล 50 มล.)

2) เป่าไข่ในที่ที่มีแสง ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

การทดสอบความเป็นพิษของ Dimethyl Sulfoxide (DMSO) ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันต่ออาร์ทีเมีย

การทดสอบความเป็นพิษของ DMSO ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันต่ออาร์ทีเมีย ทดสอบในแผ่นไมโครเพลทขนาด 6 หลุมต่อแผ่น การทดสอบโดยใช้อาร์ทีเมียอายุ 16 ชั่วโมง จำนวน 10 ตัวต่อหลุมในน้ำทะเลธรรมชาติ (SW) ปริมาตร 4.5 มล. ปริมาตรของ DMSO แสดงในตารางที่ 1นับจำนวนอาร์ทีเมียที่เวลา 1, 2, 4, 6, 8, 16 และ 24 ชั่วโมง บันทึกจำนวนอาร์ทีเมียที่ตายตามเวลาดังกล่าว คำนวณเป็นร้อยละการตายของอาร์ทีเมีย และคำนวณความเป็นพิษของสารสกัดหยาบต่อการตายของอาร์ทีเมียด้วยโปรแกรม StatPlus 2009

การทดลอง (DMSO:SW)	DMSO (ไมโครลิตร)	SW (ไมโครลิตร)	อาร์ทีเมีย 10 ตัว ใน SW (มล.)	ปริมาตรสุดท้าย (ไมโครลิตร)
T1 (100:400) / 2%(v/v)	100	400	4.5	500
T2 (200:300) / 4%(v/v)	200	300	4.5	500
T3 (300:200) / 6%(v/v)	300	200	4.5	500
T4 (400:100) / 8%(v/v)	400	100	4.5	500
T5 (500:0) / 10%(v/v)	500	0	4.5	500
Positive control (0:500)	0	-	4.5	500

ตารางที่ 1 การทดสอบความเป็นพิษของ DMSO ต่ออาร์ทีเมีย

การทดสอบผลของสารสกัดจากแอคคติโนมัยซีทต่อร้อยละการตายของอาร์ทีเมีย

การเตรียมตัวอย่างสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

1. เตรียมตัวอย่างความเข้มข้น 10,000 ppm ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ทำได้โดยปิเปตสารสกัดหยาบเข้มข้น 40,000 ppm ปริมาตร 125 ไมโครลิตร ใส่ในสารละลาย DMSO 375 ไมโครลิตร

2. เตรียมตัวอย่างความเข้มข้น 1,000 ppm ปริมาตร 3,000 ไมโครลิตร ทำได้โดยปิเปตสารสกัดหยาบเข้มข้น 10,000 ppm ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ใส่ในสารละลาย DMSO 2,700 ไมโครลิตร

3. นำสารสารสกัดหยาบความเข้มข้น 10,000 หรือ 1,000 ppm นำมาเตรียมให้ได้ความเข้มข้น 1,000 2,500 3,000 3,500 4,000 และ 5,000 ppm

การเตรียมอาร์ทีเมีย

1. ชั่งไข่อาร์ทีเมีย 1 กรัมต่อน้ำทะเล 1 ลิตร (ชั่งไข่อาร์ทีเมีย 0.05 กรัม/น้ำทะเล 50 มล.)

2. เป่าไข่ในที่ที่มีแสง ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

การทดสอบความเป็นพิษ

การเตรียมตัวอย่างสารที่ต้องการทดสอบความเป็นพิษแบ่งเป็น 3 ชุดการทดลอง ได้แก่ Positive Control เป็นชุดที่ไม่ได้ใส่ Dimethyl Sulfoxide (DMSO) , Negative Control เป็นชุดที่ใส่ DMSO และชุดการทดสอบ เป็นชุดที่ใส่สารสกัดหยาบที่ละลายใน DMSO มีปริมาณเนื้อสาร 20, 50, 100 และ 200 ppm ในปริมาตรสารสกัดหยาบสุทธิ 500 ไมโครลิตร ดังแสดงในตารางที่ 3 สารสกัดหยาบที่ใช้ทดสอบได้จากเชื้อแอคติโนมัยซีท เป็นเวลา 7 วัน

การทดสอบความเป็นพิษของสารต่ออาร์ทีเมีย ทดสอบในแผ่นไมโครเพลทขนาด 6 หลุมต่อแผ่น การทดสอบโดยใช้อาร์ทีเมียอายุ 16 ชั่วโมง จำนวน 10 ตัวต่อหลุมในน้ำทะเลธรรมชาติ (SW) ปริมาตร 4.5 มล. ปริมาตรสารสกัดในตารางที่ 2500 ไมโครลิตร ชุดการทดสอบแสดงในตารางที่ 2 นับจำนวนอาร์ทีเมียที่เวลา 1, 2, 4, 6, 8, 16 และ 24 ชั่วโมง บันทึกจำนวนอาร์ทีเมียที่ตายตามเวลาดังกล่าว คำนวณเป็นร้อยละการตายของอาร์ทีเมีย และคำนวณความเป็นพิษของสารสกัดหยาบต่อการตายของอาร์ทีเมียด้วยโปรแกรม StatPlus 2009

ตารางที่ 2 การเตรียมอาร์ทีเมียสำหรับทดสอบความเป็นพิษ

การทดลอง	**อาร์ทีเมีย 10 ตัว (มล.)**	**สารสกัดหยาบ (มล.)**
T1 (20 ไมโครกรัม)	4.5	0.5
T2 (40 ไมโครกรัม)	4.5	0.5
T3 (60 ไมโครกรัม)	4.5	0.5
T4 (80 ไมโครกรัม)	4.5	0.5
Positive control	4.5	0.5
Negative control	4.5	0.5

ตารางที่ 3 การเตรียมสารสกัดหยาบแอคติโนมัยซีทสำหรับทดสอบความเป็นพิษ

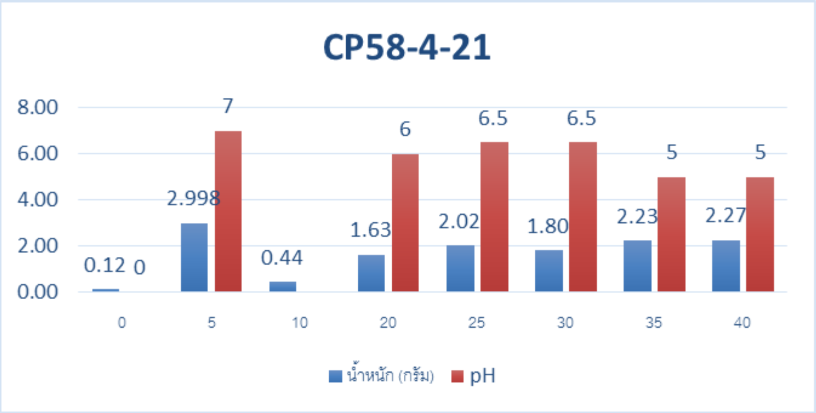
การทดลอง	สารสกัดหยาบ 1,000 ppm (ไมโครลิตร)	สารสกัดหยาบ 2,500 ppm (ไมโครลิตร)	สารสกัดหยาบ 5,000 ppm (ไมโครลิตร)	สารสกัดหยาบ 10,000 ppm (ไมโครลิตร)	DMSO (ไมโครลิตร)	SW (ไมโครลิตร)	ปริมาตรสุดท้าย (ไมโครลิตร)
T1 (20ppm)	100	-	-	-	-	400	500
T2 (50ppm)	-	100	-	-	-	400	500
T3 (100ppm)	-	-	100	-	-	400	500
T4 (200ppm)	-	-	-	100	-	400	500
Positive control	-	-	-		-	500	500
Negative control	-	-	-		100	400	500

ผลการทดลอง

1. การเพิ่มปริมาณผลผลิตสารสีจากการเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces parvulus*

1.1 ผลน้ำหนักเซลล์จากการเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces parvulus* ด้วยอาหาร ISP2 ที่ความเค็มและความเป็นกรด-ด่างแตกต่างกัน

จากการเลี้ยงเชื้อ *S. parvulus* ในอาหารเหลวสูตร ISP2 ปริมาตร 150 มล. เขย่าที่ความเร็ว 100 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5 5.5 6 และ 7 ทดลองเลี้ยงที่ความเค็ม 0, 5, 10, 20, 25, 30, 35 และ 40 ppt เป็นเวลา 7 วัน พบว่าได้น้ำหนักเซลล์มากที่สุด 2.99 กรัม เมื่อเลี้ยงที่ความเค็ม 5 ppt ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7 เมื่อความเค็มเพิ่มขึ้นน้ำหนักเซลล์ที่ได้อยู่ในช่วง 2.02-2.27 กรัม และได้น้ำหนักเซลล์น้อยที่สุดที่ไม่มีความเค็ม ดังแสดงในภาพที่ 9



ภาพที่ 9 น้ำหนักเซลล์จากการเลี้ยงเชื้อ *S. parvulus* ด้วยอาหาร ISP2 ที่ความเป็นกรด-ด่าง และความเค็มแตกต่างกัน

1.2 ผลน้ำหนักของสารสกัดหยาบจากส่วนของสารละลายน้ำเลี้ยงเชื้อ และส่วนของเซลล์ จากการเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces parvulus* ด้วยอาหารแตกต่างกัน 3 สูตร

จากการทดลองการเลี้ยงเชื้อ *S. parvulus* ด้วยอาหารชนิดต่างๆ ได้แก่ ISP2 ISP3 และ OYG ปริมาตร 250 มล. ที่ความเค็ม 17 ppt อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่าอาหารมีผลต่อการเจริญของเชื้อ โดยพบว่าอาหาร ISP3 และ OYG ได้น้ำหนักเซลล์มากกว่า ISP 2 ดังแสดงในตารางที่ 4 และปริมาณสารสกัดหยาบ (crude extract) ที่สกัดได้มีปริมาณแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยเชื้อที่เลี้ยงในอาหาร ISP 3 และ OYG ให้น้ำหนักของสารสกัดหยาบจากส่วนของเซลล์ปริมาณมาก 0.1331 และ 0.1049 กรัม ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 4 น้ำหนักของเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารแตกต่างกัน 4 สูตร

Characteristic of culture	Medium		Cell	
	Group1	Group2	Group1	Group2
ISP2	200mL/orange yellow	210mL/orange yellow	2.6082g/brown gray	1.9435g/brown gray
ISP3	155mL/yellow	200mL/yellow	3.0491g/yellow	4.1622g/yellow
ISP5	210mL/deep yellow	240mL/yellow green	No data/gray	0.8673g/gray
OYG	180mL/orange	190mL/orange	9.5738g/yellow	8.3408g/yellow

ตารางที่ 5 น้ำหนักสารสกัดหยาบจากส่วนสารละลายน้ำเลี้ยงเชื้อและส่วนของเซลล์จากการเลี้ยงเชื้อ *S. parvulus* ด้วยอาหารแตกต่างกัน 3 สูตร

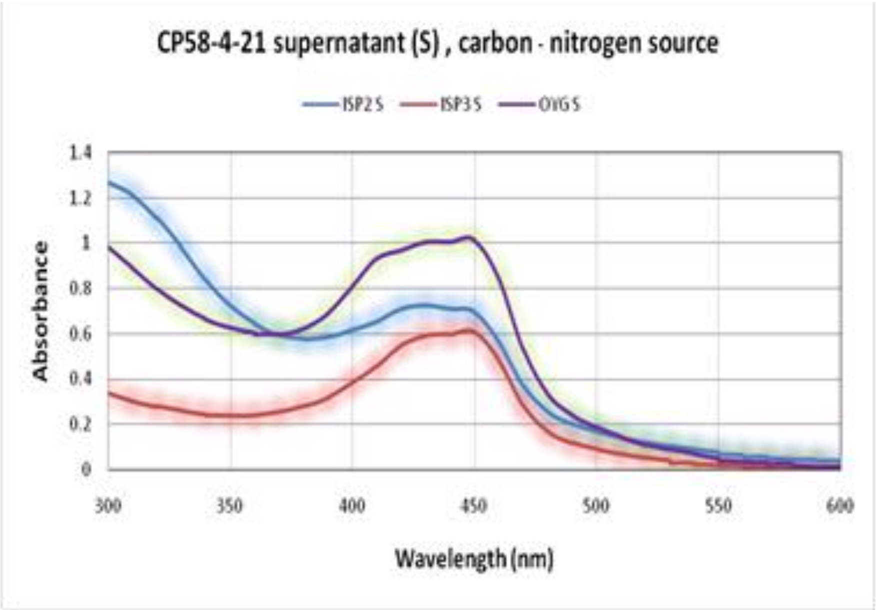
Condition	Weight of vial	Weight of vial and crude extract	Weight of crude extract
ISP2 Supernatant	2.0019g	2.0317g	0.0298g
ISP3 Supernatant	2.0403g	2.0718g	0.0315g
OYG Supernatant	2.0549g	2.0907g	0.0358g
ISP2 Cell	2.0484g	2.1017g	0.0533g
ISP3 Cell	2.0434g	2.1765g	0.1331g
OYG Cell	2.0611g	2.1660g	0.1049g
ISP2 Control	2.0582g	2.0680g	0.0098g
ISP3 Control	2.0496g	2.0685g	0.0189g
OYG Control	2.0720g	2.0991g	0.0271g

1.2 ปริมาณสารสีที่ได้จากเชื้อแอคติโนมัยซีท

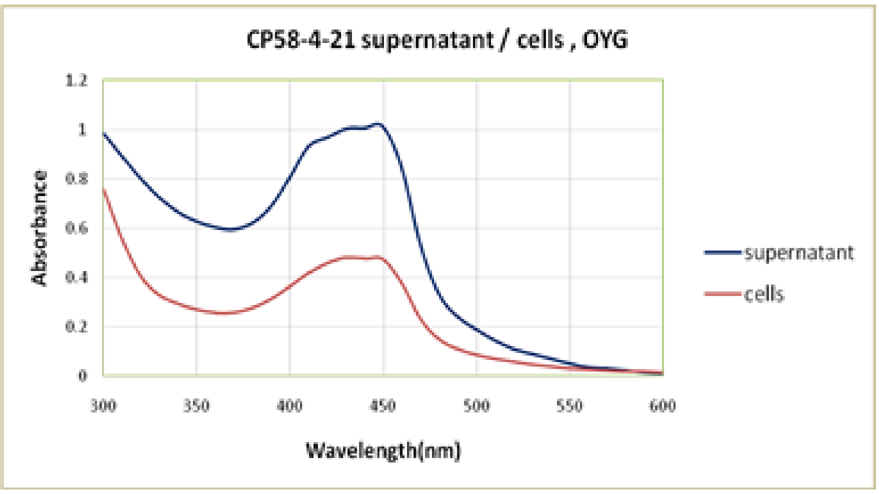
จากการเลี้ยงเชื้อ *S. parvulus* และนำสารสกัดหยาบจากส่วนของสารละลายน้ำเลี้ยงเชื้อและเซลล์ ความเข้มข้น 500 ppm นำไปสแกนค่าการดูดกลืนแสง พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทที่เลี้ยงในอาหาร OYG ที่ความยาวคลื่น 450 nm มีค่าการดูดกลืนแสงมากที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 6 และภาพที่ 10 และเมื่อเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหยาบส่วนของสารละลายน้ำเลี้ยงเชื้อและเซลล์ พบว่าส่วนของสารละลายน้ำเลี้ยงเชื้อ ให้ค่าการดูดกลืนแสงมากกว่าสารสกัดที่ได้จากเซลล์ ดังแสดงในภาพที่ 11

ตารางที่ 6 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหยาบที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีท เข้มข้น 500 ppm

Condition	Wavelength	Absorbance Unit
ISP2 Supernatant	430nm	0.7227
ISP3 Supernatant	450nm	0.6066
OYG Supernatant	450nm	1.0105
ISP2 Cells	430nm	0.1604
ISP3 Cells	450nm	0.1701
OYG Cells	450nm	0.4742



ภาพที่ 10 โครมาโทแกรมค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหยาบจากสารละลายน้ำเลี้ยงเชื้อ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2, ISP 3 และ OYG



ภาพที่ 11 โครมาโทแกรมค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหยาบจาก Supernatant และจากเซลล์ จากการเลี้ยงเชื้อ *S. parvulus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ OYG

1.3 ผลของความเค็มต่อน้ำหนักสารสกัดหยาบ และปริมาณสารสี

จากการเลี้ยงเชื้อ *S. parvulus* ในอาหารเหลว ISP2 ที่ใช้ความเค็มน้ำทะเลธรรมชาติในการเตรียมแตกต่างกัน 7 ระดับ ปริมาตร 150 มล. เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 100 รอบ/นาที พบว่าความเค็มของน้ำทะเลที่ใช้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ 40 ppt ให้ปริมาณสารสีมากที่สุดในส่วนของสารละลายน้ำเลี้ยงเชื้อและเซลล์ ดังแสดงในตารางที่ 7 และตารางที่ 8

ตารางที่ 7 ผลของความเค็มต่อน้ำหนักสารสกัดหยาบจากส่วนของสารละลายน้ำเลี้ยงเชื้อและปริมาณสารสีที่ได้ จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

Salinity (ppt)	Weight of Crude extract (mg)	Absorbance 450 (nm)	Total Pigment Yield
5	20.7	1.5155	31.37
10	26.4	0.1592	4.20
20	30.1	1.2816	38.58
25	32.3	1.0473	33.83
30	37.2	1.4750	54.87
35	74.5	0.7582	56.49
40	43.5	1.7483	76.05

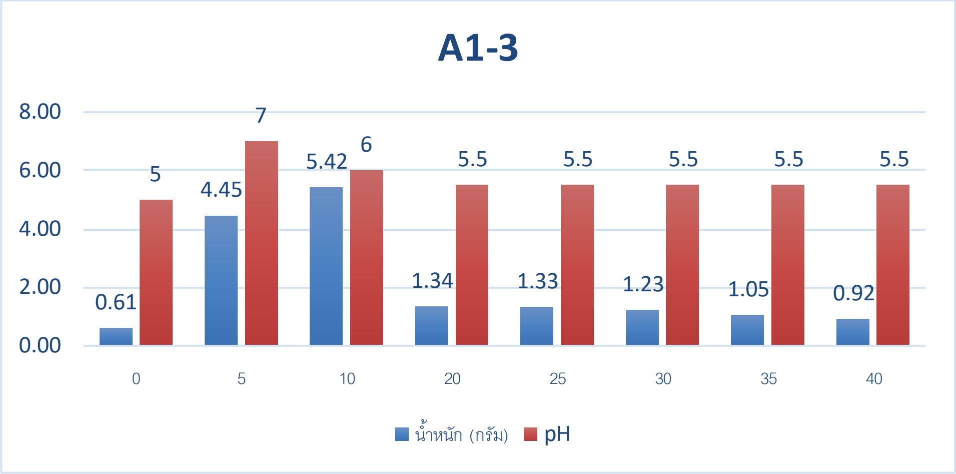
ตารางที่ 8 ผลของความเค็มต่อน้ำหนักสารสกัดหยาบจากส่วนของเซลล์ และปริมาณสารสีที่ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

Salinity (ppt)	Weight of crude extract (mg)	Absorbance 450 (nm)	Total Pigment Yield
5	22.4	0.0389	0.87
10	30.7	0.0135	0.41
20	62.2	0.019	1.18
25	31.6	0.1596	5.04
30	29.7	0.4391	13.04
35	61.1	0.1786	10.91
40	41.7	0.6514	27.16

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงเชื้อ *S. parvulus* เพื่อให้ได้สารสีปริมาณมาก คือ OYG ความเค็มของน้ำทะเลธรรมชาติที่ใช้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อคือ 35 หรือ 40 ppt

2. การเพิ่มปริมาณผลผลิตสารสีจากการเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces indiaensis* (A1-3) ด้วยอาหารแตกต่างกัน 3 สูตร

จากการเลี้ยงเชื้อ *S. indiaensis* (A1-3) ในอาหารเหลวสูตร ISP2 ปริมาตร 150 มล. เขย่าที่ความเร็ว 100 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5 5.5 6 และ 7 ทดลองเลี้ยงที่ความเค็ม 0, 5, 10, 20, 25, 30, 35 และ 40 ppt เป็นเวลา 10 วัน พบว่าได้น้ำหนักเซลล์มากที่สุด 5.42 กรัม เมื่อเลี้ยงที่ความเค็ม 10 ppt ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6 เมื่อความเค็มเพิ่มขึ้นน้ำหนักเซลล์ที่ได้ลดลง และได้น้ำหนักเซลล์น้อยที่สุดที่ไม่มีความเค็ม ดังแสดงในภาพที่ 12



ภาพที่ 12 น้ำหนักเซลล์จากการเลี้ยงเชื้อ *S. indiaensis* (A1-3) ด้วยอาหาร ISP2 ที่ความเป็นกรด-ด่าง และความเค็มแตกต่างกัน

3. การทดสอบความคงตัวของสารสี

จากผลการทดสอบการคงตัวของสารสีพบว่า สารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยซีท *S. indiaensis* (A1-3) ที่เลี้ยงด้วยอาหาร ISP3 ความเค็ม 17 และ 35 ppt ณ เวลา 60 วัน ของการทดสอบพบว่า %การลดลงการสารสี คือร้อยละ 67.3 และ 84.9 ตามลำดับ (ตารางที่ 9) สารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยซีท *S. coelicoflavu* ที่เลี้ยงด้วยอาหาร ISP3 ความเค็ม 17, 25 และ 35 ppt ณ เวลา 60 วัน ของการทดสอบพบว่า %การลดลงการสารสี คือร้อยละ 32.6, 91.8 และ 84.9 ตามลำดับ (ตารางที่ 10) และสารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยซีท *S. parvulus* ที่เลี้ยงด้วยอาหาร OYG ความเค็ม 35 และ 40 ppt ณ เวลา 60 วัน ของการทดสอบพบว่า %การลดลงการสารสี ที่ความยาวคลื่น 530 nm คือร้อยละ 49.2 และ 49.1 ตามลำดับ (ตารางที่ 11) และที่ความยาวคลื่น 450 nm คือ ร้อยละ 33.1 และ 68.4 ตามลำดับ (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 9 การทดสอบความคงตัวของสีที่ความยาวคลื่น 410 nm ของสารสกัดแอคติโนมัยซีท *S. indiaensis* (A1-3) ในส่วน supernatant

แอคติโนมัยซีท	**สภาวะการเลี้ยง**			**%การลดลงการสารสีที่ความยาวคลื่น 410 nm ตามระยะเวลา (วัน)**				
	อาหาร	**ความเค็ม (ppt)**	**เวลา (วัน)**	**7**	**14**	**21**	**31**	**60**
S. indiaensis	ISP3	17	7	27.1	38.8	39.9	51.0	67.3
S. indiaensis	ISP3	35	7	40.7	44.0	45.2	59.6	84.9

ตารางที่ 10 การทดสอบความคงตัวของสีที่ความยาวคลื่น 495 nm ของสารสกัดแอคติโนมัยซีท *S. coelicoflavu* ในส่วน supernatant

แอคติโนมัยซีท	**สภาวะการเลี้ยง**			**%การลดลงการสารสีที่ความยาวคลื่น 495 nm ตามระยะเวลา (วัน)**				
	อาหาร	**ความเค็ม (ppt)**	**เวลา (วัน)**	**7**	**14**	**21**	**31**	**60**
S. coelicoflavu	ISP3	17	7	35.3	35.1	38.1	38.1	32.6
S. coelicoflavu	ISP3	25	7	23.9	45.8	44.2	66.4	91.8
S. coelicoflavu	ISP3	35	7	10.9	19.4	19.9	27.1	43.1

ตารางที่ 11 การทดสอบความคงตัวของสีที่ความยาวคลื่น 530 nm ของสารสกัดแอคติโนมัยซีท *S. parvulus* ในส่วน supernatant

แอคติโนมัยซีท	สภาวะการเลี้ยง			%การลดลงการสารสีที่ความยาวคลื่น 530 nm ตามระยะเวลา (วัน)				
	อาหาร	ความเค็ม (ppt)	เวลา (วัน)	7	14	21	31	60
S. parvulus	OYG	35	7	1.2	5.5	10.6	25.4	49.2
S. parvulus	OYG	40	7	2.7	5.6	10.2	27.0	49.1

ตารางที่ 12 การทดสอบความคงตัวของสีที่ความยาวคลื่น 450 nm ของสารสกัดแอคติโนมัยซีท *S. parvulus* ในส่วน supernatant

แอคติโนมัยซีท	สภาวะการเลี้ยง			%การลดลงการสารสีที่ความยาวคลื่น 450 nm ตามระยะเวลา (วัน)				
	อาหาร	ความเค็ม (ppt)	เวลา (วัน)	7	14	21	31	60
S. parvulus	OYG	35	7	23.4	25.3	26.2	26.6	33.1
S. parvulus	OYG	40	7	12.5	20.5	19.5	28.8	68.4

4. โครงสร้างสารสี

S. parvulus

จากผลการแยกสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ เทียบกับข้อมูลของสารที่แยกจาก Ajijur et al., (2010) ได้แก่ actinomycin D ของแข็งสีเหลือง

S. indiaensis (A1-3)

ผลของสารประกอบรงควัตถุ มีสีแดงม่วงเป็นสารกลุ่ม quinone มีน้ำหนักโมเลกุล 559.08 ซึ่งโครงสร้างของสารสีแดงต้องทำการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยเทคนิค 2D-NMR เพื่อให้ได้ความชัดเจนมากขึ้น

5. การตรึงตัวอย่างด้วยแคลเซียมอัลจิเนต

การตรึงโปรตีน

การตรึงโปรตีน 4 ชนิด ได้แก่ ปาเปน (Papain), ทริปซิน (Trypsin), อัลบูมิน (Albumin) และ บลูเดกซ์แตรน (Blue dextran) ด้วยแคลเซียมอัลจิเนตที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 ในน้ำทะเลเทียม ค่าความเป็นกรด-ด่าง 8 พบว่าโปรตีนทั้ง 4 ชนิดที่เวลา 48 ชั่วโมง ไม่พบการหลุดของโปรตีน ดังแสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 การหลุดของโปรตีนทั้ง 4 ชนิด ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต

เวลา	ค่าการดูดกลืนแสง			
	595 nm			280 nm
	ปาเปน ($2.3x\ 10^4$ kDa)	ทริปซิน ($2.33x10^4$ kDa)	อัลบูมิน ($6.7x10^4$ kDa)	บลูเดกซ์แตรน ($2x10^6$ kDa)
0 นาที	0	0	0.016	0
10 นาที	0.011	0.009	0.004	0
20 นาที	0	0	0.033	0
30 นาที	0.014	0.010	0.048	0
1 ชั่วโมง	0.052	0.013	0.050	0
24 ชั่วโมง	0.010	0.011	0.074	0.003
48 ชั่วโมง	0.005	0.070	0.005	0.002

การตรึงสารสีจากแอคติโนมัยซีท

การตรึงสารสีจากเชื้อแอคติโนมัยซีททั้ง 4 ชนิด คือ *S. indiaensis* (A1-3), *S. indiaensis* (A3-3), *S. coelicoflavu* และ *S. parvulus* ด้วยแคลเซียมอัลจิเนตที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 ในน้ำทะเลธรรมชาติ พบว่าสารสีทั้ง 4 ชนิดที่เวลา 24 ชั่วโมง พบการหลุดของสีในเชื้อ *S. parvulus* มากที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 14

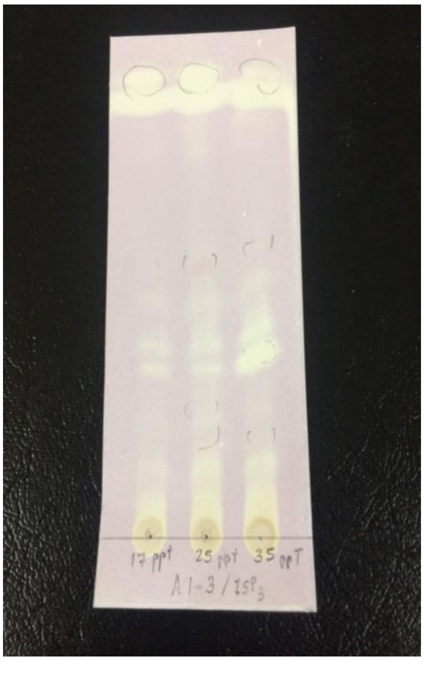
ตารางที่ 14 การหลุดของสารสีจากแอคติโนมัยซีททั้ง 4 ชนิด ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต

เวลา	**ค่าการดูดกลืนแสง**			
	410nm	**410 nm**	**495 nm**	**450 nm**
	***S. indiaensis* (A1-3)**	***S. indiaensis* (A3-3)**	***S. coelicoflavu***	***S. parvulus***
0 นาที	0.0042	0.0053	0.0001	0.0065
10 นาที	-	-	-	0.0149
20 นาที	0.0066	0.0077	0.0018	0.0178
1 ชั่วโมง	0.0106	0.112	0.0011	0.0293
3 ชั่วโมง	0.0147	0.0132	0.0044	0.0456
6 ชั่วโมง	0.0137	0.0140	0.0107	0.0621
24 ชั่วโมง	0.0115	0.0130	0.0040	0.1083

6. ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเชื้อแอคติโนมัยซีท

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้น

จากการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นของสารสกัดหยาบเชื้อแอคติโนมัยซีท *Streptomyces indiaensis* (A1-3), *Streptomyces indiaensis* (A3-3) , *Streptomyces coelicoflavu* และ *Streptomyces parvulus* ที่เลี้ยงด้วยอาหาร ISP2, ISP3 ,ISP5 และ OYG และในความเค็มที่แตกต่างกัน 3 ระดับ 17,25,35 ppt ในส่วนของสารสกัดหยาบเมทานอลจากเซลล์ และสารสกัดหยาบเอทธิลอะซิเตทในส่วน supernatant (ตารางที่ 15) โดยวิธี TLC – DPPH ที่สามารถต้านสารอนุมูลอิสระได้ โดยอาศัยหลักการการเปลี่ยนสีของ DPPH ซึ่งเป็นสารอนุมูลอิสระที่เสถียรและสีม่วง เมื่อได้รับอิเลกตรอนจากสารต้านอนุมูลอิสระ สาร DPPH นั้นจะกลายเป็น DPPH:H ทำให้ได้สารผลิตภัณฑ์ที่มีสีจางลงหรือเป็นสีเหลือง ผลการทดสอบเบื้องต้นของสารสกัดหยาบเชื้อแอคติโนมัยซีท *S. indiaensis* (A1-3),
S. indiaensis (A3-3), *S. coelicoflavu* และ *S. parvulus* สามารถต้านสารอนุมูลอิสระได้ (ภาพที่ 13)



ภาพที่ 13 ผลการทดสอบเบื้องต้นของสารสกัดหยาบเชื้อแอคติโนมัยซีท *S. indiaensis* (A1-3)

ตารางที่ 15 ข้อมูลตัวอย่างแอคติโนมัยซีทและน้ำหนักสารสกัดหยาบสำหรับศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

รหัส	ชนิดของแอคติโนมัยซีท	สถานที่เก็บตัวอย่าง	สภาวะการเลี้ยง			น้ำหนักเซลล์ (กรัม)	ปริมาตรน้ำเลี้ยง (มล.)	น้ำหนักสารสกัดหยาบ (มก.)	
			อาหาร	ความเค็ม (ppt)	เวลา (วัน)			เซลล์ (C)	น้ำเลี้ยง (M)
A1-3	*Streptomyces indiaensis*	ดินชายฝั่ง หาดวอนนภา จ. ชลบุรี	ISP2	25	7	2.3806	220	0.0439	0.0162
A1-3	*Streptomyces indiaensis*	ดินชายฝั่ง หาดวอนนภา จ. ชลบุรี	ISP2	35	7	3.8826	220	0.037	0.0087
A1-3	*Streptomyces indiaensis*	ดินชายฝั่ง หาดวอนนภา จ. ชลบุรี	ISP3	17	7	1.6212	300	0.111	0.0138
A1-3	*Streptomyces indiaensis*	ดินชายฝั่ง หาดวอนนภา จ. ชลบุรี	ISP3	25	7	2.0615	300	0.1374	0.0096
A1-3	*Streptomyces indiaensis*	ดินชายฝั่ง หาดวอนนภา จ. ชลบุรี	ISP3	35	7	3.2877	300	0.1115	0.0086

ตารางที่ 15 ข้อมูลตัวอย่างแอคติโนมัยซีทและน้ำหนักสารสกัดหยาบสำหรับศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (ต่อ)

รหัส	ชนิดของแอคติโนมัยซีท	สถานที่เก็บตัวอย่าง	สภาวะการเลี้ยง			น้ำหนักเซลล์ (กรัม)	ปริมาตรน้ำเลี้ยง (มล.)	น้ำหนักสารสกัดหยาบ (มก.)	
			อาหาร	ความเค็ม (ppt)	เวลา (วัน)			เซลล์ (C)	น้ำเลี้ยง (M)
A3-3	*Streptomyces indiaensis*	ดินชายฝั่ง หาดวอนนภา จ. ชลบุรี	ISP2	17	7	7.2972	200	0.0280	0.0398
A3-3	*Streptomyces indiaensis*	ดินชายฝั่ง หาดวอนนภา จ. ชลบุรี	ISP3	17	7	7.1307	200	0.1869	0.0462
A3-3	*Streptomyces indiaensis*	ดินชายฝั่ง หาดวอนนภา จ. ชลบุรี	ISP5	17	7	1.0572	200	0.028	0.0396
A3-3	*Streptomyces indiaensis*	ดินชายฝั่ง หาดวอนนภา จ. ชลบุรี	OYG	17	7	10.5214	200	0.0367	0.0521
A16-1	*Streptomyces coelicoflavus*	ดินชายฝั่ง หาดวอนนภา จ. ชลบุรี	ISP2	17	7	3.2993	250	0.0247	0.0237
A16-1	*Streptomyces coelicoflavus*	ดินชายฝั่ง หาดวอนนภา จ. ชลบุรี	ISP2	25	7	1.3570	220	0.0146	0.0431
A16-1	*Streptomyces coelicoflavus*	ดินชายฝั่ง หาดวอนนภา จ. ชลบุรี	ISP2	35	7	1.5275	220	0.0213	0.0975

ตารางที่ 15 ข้อมูลตัวอย่างแอคติโนมัยซีทและน้ำหนักสารสกัดหยาบสำหรับศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (ต่อ)

รหัส	ชนิดของแอคติโนมัยซีท	สถานที่เก็บตัวอย่าง	สภาวะการเลี้ยง			น้ำหนักเซลล์ (กรัม)	ปริมาตรน้ำเลี้ยง (มล.)	น้ำหนักสารสกัดหยาบ (มก.)	
			อาหาร	ความเค็ม (ppt)	เวลา (วัน)			เซลล์ (C)	น้ำเลี้ยง (M)
A16-1	*Streptomyces coelicoflavus*	ดินชายฝั่ง หาดวอนนภา จ. ชลบุรี	ISP3	17	7	0.9066	250	0.1013	0.0297
A16-1	*Streptomyces coelicoflavus*	ดินชายฝั่ง หาดวอนนภา จ. ชลบุรี	ISP3	25	7	2.0050	220	0.1554	0.0126
A16-1	*Streptomyces coelicoflavus*	ดินชายฝั่ง หาดวอนนภา จ. ชลบุรี	ISP3	35	7	2.9678	220	0.154	0.0213
A16-1	*Streptomyces coelicoflavus*	ดินชายฝั่ง หาดวอนนภา จ. ชลบุรี	OYG	17	7	3.2481	250	0.0878	0.0372
CP58-4-21	*Streptomyces parvulus*	ดินป่าชายเลนจังหวัดชุมพร	ISP2	17	7	1.7046	1000	0.0281	0.0253
CP58-4-21	*Streptomyces parvulus*	ดินป่าชายเลนจังหวัดชุมพร	ISP2	17	10	2.0520	450	0.0343	0.0403
CP58-4-21	*Streptomyces parvulus*	ดินป่าชายเลนจังหวัดชุมพร	ISP2	17	14	1.4720	450	0.0745	0.0332

7. การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Capacity Assay

นำสารสกัดหยาบจากเชื้อแอคติโนมัยซีท มาตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ(radical scavenging activity) ซึ่งจะรายงานเป็นค่าความเข้มข้น ug/ml ที่ให้ผลต้านออกซิเดชั่นครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) ในการศึกษานี้ใช้ DPPH เป็นอนุมูลอิสระใช้วิตามินซี และ Trolox เป็น positive control จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างสารสกัดหยาบเมทานอล ในส่วนเซลล์และสารสกัดหยาบเอทธิลอะซิเตทในส่วน supernatant ของเชื้อแอคติโนมัยซีท จำนวน 4 ไอโซเลท ที่เลี้ยงด้วยอาหาร ISP2, ISP3 ,ISP5 และ OYG และในความเค็มที่แตกต่างกัน 3 ระดับ 17, 25 และ 35 ppt. ผลการศึกษาพบว่าในสารสกัดหยาบในส่วนของเซลล์ *S. indiaensis* (A1-3) ที่เลี้ยงด้วยอาหาร ISP2 ความเค็ม 25 ppt แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีที่สุดมีค่า IC_{50}167.85±5.82µg/ml ส่วนสารสกัดหยาบจากsupernatant พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีท *S. coelicoflavu* ที่เลี้ยงด้วยอาหาร ISP3 ความเค็ม 25 ppt แสดงฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH สูงสุดเช่นกัน โดยมีค่า IC_{50}= 61.94±15.64 µg/ml และค่า IC_{50} ของ Ascorbic acid และ Trolox มีค่า IC_{50}=4.29, 3.79 µg/ml ตามลำดับ ผลแสดงในตารางที่ 16

8. การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS Radical Scavenging Capacity Assay

นำสารสกัดหยาบจากเชื้อแอคติโนมัยซีท มาตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ผลการศึกษาพบว่าในสารสกัดหยาบในเซลล์ *S. coelicoflavu* เลี้ยงด้วยอาหาร ISP2 ความเค็ม 25 ppt แสดงฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS สูงสุดโดยมีค่า IC_{50}=336.13± 8.97 µg/ml ในส่วนสารสกัดหยาบจาก supernatant พบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS สูงสุดในสารสกัดหยาบเชื้อแอคติโนมัยซีท *S. coeliflavu* เลี้ยงด้วยอาหาร ISP3 ที่ความเค็ม 25 ppt. มีค่า IC50=61.94 ± 15.64 µg/ml ตามลำดับโดย Ascorbic acid และ Trolox มีค่า IC_{50}=13.43, 8.24 µg/ml ตามลำดับ ผลแสดงในตารางที่ 16

ตารางที่ 16 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ(Antioxidant activity) ในสารสกัดหยาบส่วนเซลล์เชื้อแอคติโนมัยซีทที่เลี้ยงด้วยอาหารและความเค็มที่ต่างกัน

แอคติโนมัยซีท	สภาวะการเลี้ยง			IC50 DPPH (ppm)		IC50 ABTS (ppm)	
	อาหาร	ความเค็ม (ppt)	เวลา (วัน)	เซลล์ (C)	น้ำเลี้ยง (M)	เซลล์ (C)	น้ำเลี้ยง (M)
S. indiaensis (A1-3)	ISP2	25	7	167.85±5.82 [c]	>400	>400	194.10±2.00 [de]
S. indiaensis (A1-3)	ISP2	35	7	>400	>400	>400	159.28±2.97 [f]
S. indiaensis (A1-3)	ISP3	17	7	>400	223.19±3.94 [e]	>400	58.07±2.09 [h]
S. indiaensis (A1-3)	ISP3	25	7	>400	208.32±8.33 [ef]	>400	62.12±2.56 [gh]
S. indiaensis (A1-3)	ISP3	35	7	274.47±4.30 [a]	>400	>400	183.59±2.56 [e]
S. indiaensis (A3-3)	ISP2	17	7	>400	349.04±16.16 [b]	>400	>400
S. indiaensis (A3-3)	ISP3	17	7	>400	209.77±6.09 [ef]	>400	164.94±2.85 [f]
S. indiaensis (A3-3)	ISP5	17	7	>400	>400	>400	>400
S. indiaensis (A3-3)	OYG	17	7	>400	>400	>400	>400
S. coelicoflavu	ISP2	17	7	>400	269.47±4.85 [d]	>400	168.81±5.98 [f]
S. coelicoflavu	ISP2	25	7	>400	290.01±7.94 [c]	336.13±8.97 [a]	168.92±2.80 [f]
S. coelicoflavu	ISP2	35	7	>400	>400	>400	>400
S. coelicoflavu	ISP3	17	7	>400	>400	>400	302.75±21.27 [b]
S. coelicoflavu	ISP3	25	7	175.36±7.26 [bc]	61.94±15.64 [g]	>400	76.56±6.46 [g]
S. coelicoflavu	ISP3	35	7	180.17±5.80 [b]	199.26±1.30 [f]	346.06±9.43 [a]	199.35±2.03 [d]
S. coelicoflavu	OYG	17	7	>400	367.40±18.48 [a]	>400	367.40±18.48 [a]

ตารางที่ 16 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ(Antioxidant activity) ในสารสกัดหยาบส่วนเซลล์เชื้อแอคติโนมัยซีทที่เลี้ยงด้วยอาหารและความเค็มที่ต่างกัน (ต่อ)

แอคติโนมัยซีท	**สภาวะการเลี้ยง**			**IC50 DPPH (ppm)**		**IC50 ABTS (ppm)**	
	อาหาร	**ความเค็ม (ppt)**	**เวลา (วัน)**	**เซลล์ (C)**	**น้ำเลี้ยง (M)**	**เซลล์ (C)**	**น้ำเลี้ยง (M)**
S. parvulus	ISP2	17	7	>400	219.98±6.59^{e}	>400	219.68±6.59^{c}
S. parvulus	ISP2	17	10	>400	>400	>400	>400
S. parvulus	ISP2	17	14	>400	>400	>400	>400
Ascorbic acid	-	-	-	3.87±0.22		13.27±0.23	
Trolox	-	-	-	4.04±0.35		8.37±0.30	

9. การทดสอบความคงตัวของสารต้านอนุมูลอิสระ

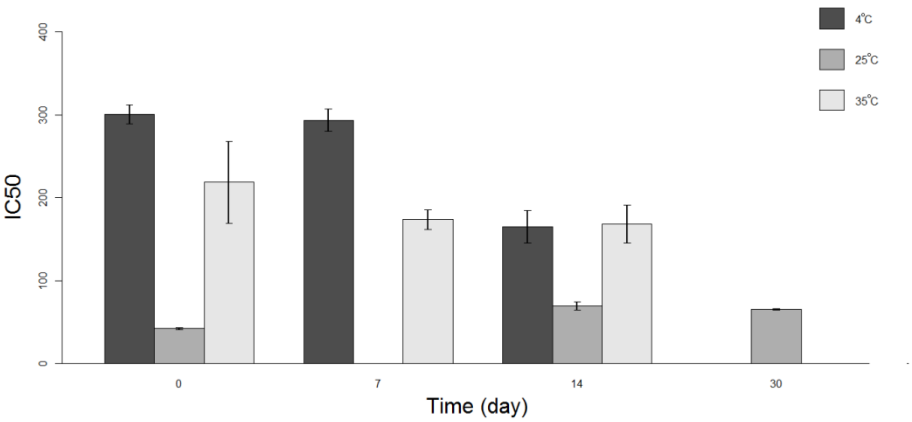
นำสารสกัดหยาบในส่วน supernatant (medium) ของเชื้อแอคติโนมัยซีท *S. indiaensis* (A1-3) เลี้ยงด้วยอาหาร ISP3 ความเค็ม 17ppt, *S. coelicoflavu* เลี้ยงด้วยอาหาร ISP2 ความเค็ม 17ppt และ *S. parvulus* เลี้ยงด้วยอาหาร ISP2 ความเค็ม 17ppt ระยะเวลาเลี้ยง7 วัน มาทดสอบความคงตัวของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และสภาวะที่เหมาะสมในการเก็บรักษา โดยนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4, 25 องศาเซลเซียล และที่อุณหภูมิห้อง (35 องศาเซลเซียล) จากนั้นทำการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ณ เวลาเริ่มต้น 0 วัน 7 วัน 14 วัน และ 30 วัน ผลการศึกษาพบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีความแตกต่างกันในแต่ละตัวอย่าง

9.1 สภาวะที่เหมาะสมของสารสกัดหยาบ supernatant (medium) A1-3

ผลการศึกษาพบว่าสภาวะที่เหมาะสมของสารสกัดหยาบ supernatant *S. indiaensis* (A1-3) ที่เลี้ยงด้วยอาหาร ISP3 ความเค็ม 17ppt เมื่อเปรียบเทียบกับค่า IC_{50}ของวันเริ่มการทดสอบ (ระยะเวลา 0 วัน) คืออุณหภูมิที่ใช้เก็บรักษาตัวอย่าง 25 องศาเซลเซียส ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด มีค่า IC_{50}= 42.22ug/ml ระยะเวลา14 วันที่อุณหภูมิที่ใช้เก็บรักษาตัวอย่าง 25 องศาเซลเซียส ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดเช่นกัน มีค่า IC_{50}= 69.70±5.14ug/ml พบว่าเมื่อระยะเวลาผ่านไป ประสิทธิภาพของสารสกัดลดลงตามระยะเวลาที่เก็บ โดยในเวลาการเก็บ 30 วันการเก็บที่25 องศาเซลเซียส สารสกัดยังคงสภาพของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS โดยมีค่า IC_{50}=65.79±0.79 ug/ml เมื่อทำการเปรียบเทียบกับ Ascorbic acid และ Trolox ซึ่งเป็นสาร antioxidant มาตรฐานบริสุทธิ์ พบว่ามีประสิทธิภาพต่ำกว่า 5 เท่า และ 7 เท่า ตามลำดับ ผลแสดงในตารางที่ 17 และภาพที่ 14

ตารางที่ 17 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ(Antioxidant activity) ของสารสกัดส่วน supernatant A1-3 ISP3 ความเค็ม 17ppt

Temperature (°C)	ABTS scavenging activity (µg/ml)			
	Time (day)			
	0	7	14	30
4	300.31±11.38	293.59±13.13	165.07±19.97	NA
25	42.22±1.45	NA	69.70±5.14	65.79±0.79
35	218.58±49.57	173.63±11.46	168.28±23.11	NA



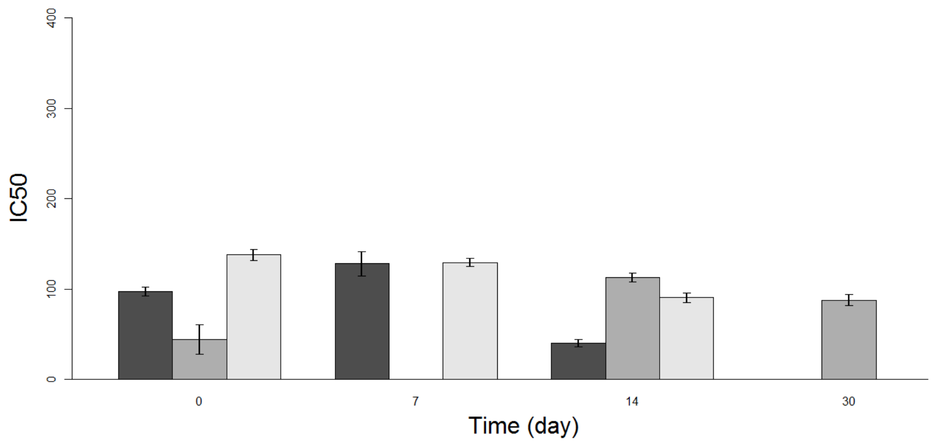
ภาพที่ 14 ความคงตัวของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดส่วน supernatant *S. indiaensis* (A1-3) ISP3 ความเค็ม 17ppt

9.2 สภาวะที่เหมาะสมของสารสกัดหยาบ supernatant (medium) *S. coelicoflavu*

สภาวะที่เหมาะสมของสารสกัดหยาบ supernatant (medium) *S. coelicoflavu* เลี้ยงด้วยอาหาร ISP2 ความเค็ม 17ppt คือ ระยะเวลา 0 วัน อุณหภูมิที่ใช้เก็บตัวอย่าง 25 องศาเซลเซียส ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} = 44.23±16.53 ug/ml เมื่อระยะเวลาผ่านไปพบว่าประสิทธิภาพของสารสกัดมีการเปลี่ยนแปลง โดยระยะเวลา 14 วัน การเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียล ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} = 40.03±4.32ug/ml แต่การเก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระลดลง โดยมีค่า IC_{50}= 112.75±4.79 ug/ml เมื่อทำการเปรียบเทียบกับ Ascorbic acid และ Trolox ซึ่งเป็นสาร antioxidant มาตรฐานบริสุทธิ์ พบว่ามีประสิทธิภาพต่ำกว่า 5 เท่า และ 7 เท่า ตามลำดับผลแสดงในตารางที่ 18 และภาพที่ 15

ตารางที่ 18 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ(Antioxidant activity) ของสารสกัดหยาบส่วน supernatant *S. coelicoflavu* อาหาร ISP2ความเค็ม 17ppt

Temperature (°C)	ABTS scavenging activity (µg/ml)			
	Time (day)			
	0	7	14	30
4	97.47±4.79	128.30±13.48	40.03±4.32	NA
25	44.23±16.53	NA	112.75±4.79	87.78±6.35
35	137.86±6.37	129.46±4.49	90.37±5.15	NA



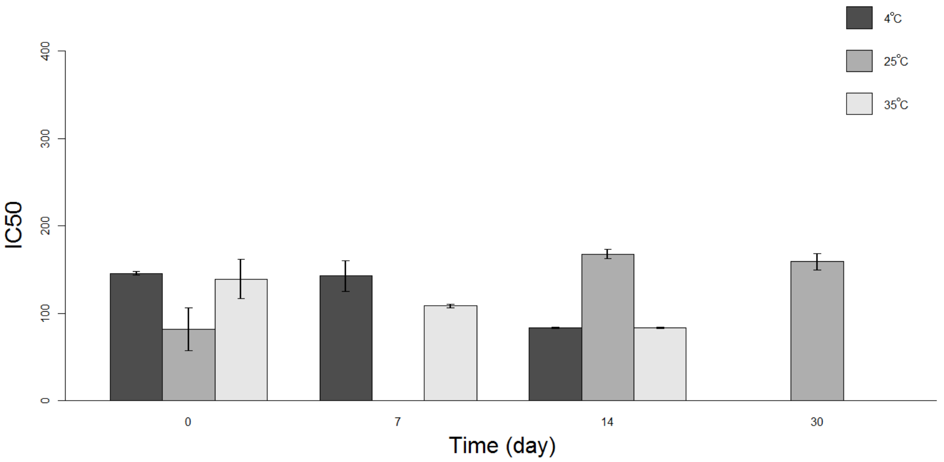
ภาพที่ 15 แสดงความคงตัวของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบส่วน supernatant *S. coelicoflavu* อาหาร ISP2 ความเค็ม 17ppt

9.3 สภาวะที่เหมาะสมของสารสกัดหยาบ supernatant (medium) *S. parvulus*

สภาวะที่เหมาะสมของสารสกัดหยาบ supernatant (medium) *S. parvulus* เลี้ยงด้วยอาหาร ISP2 ความเค็ม 17pptเป็นระยะเวลา 7 วัน คือ ระยะเวลา 0 วัน อุณหภูมิที่ใช้เก็บตัวอย่าง 25 องศาเซลเซียส ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด โดยให้ค่า IC_{50}=81.65±24.73ug/ml โดยเมื่อระยะเวลาผ่านไปณ เวลา 14 วัน การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด โดยให้ค่า IC_{50} =83.13±0.86ug/ml แต่การเก็บที่ 25 องศาเซลเซียสมีค่า IC_{50} =167.72±5.39ug/ml เมื่อทำการเปรียบเทียบกับ Ascorbic acid และ Trolox ซึ่งเป็นสาร antioxidant มาตรฐานบริสุทธิ์ พบว่ามีประสิทธิภาพต่ำกว่า 9.9 เท่า และ 13.67 เท่า ตามลำดับผลแสดงในตารางที่ 19 และภาพที่ 16

ตารางที่ 19 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ(Antioxidant activity) ของสารสกัดหยาบส่วน supernatant CP58-4-21 เลี้ยงด้วยอาหาร ISP2 ความเค็ม 17ppt เป็นระยะเวลา 7 วัน

Temperature (°C)	**ABTS scavenging activity (µg/ml)**			
	Time (day)			
	0	7	14	30
4	145.75±2.12	142.83±17.57	83.13±0.86	NA
25	81.65±24.73	NA	167.72±5.39	159.05±9.29
35	139.06±22.37	108.34±2.15	83.13±0.86	NA



ภาพที่ 16 แสดงความคงตัวของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบส่วน supernatant *S. parvulus* เลี้ยงด้วยอาหาร ISP2 ความเค็ม 17ppt เป็นระยะเวลา 7 วัน

10. เปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเชื้อแอคติโนมัยซีท *S. indiaensis* (A1-3)

จากการเปรียบเทียบผลของความเค็มต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระDPPH และ ABTS ของสารสกัดหยาบเชื้อแอคติโนมัยซีท *S. indiaensis* (A1-3) ที่เลี้ยงด้วยอาหาร ISP3 ด้วยความเค็ม 3 ระดับ 17, 25 และ 35ppt ผลการศึกษาพบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p< 0.05$) โดยสารสกัดหยาบที่ความเค็มที่ 17 และ 25 ppt แสดงฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS มากที่สุด โดยมีค่า IC_{50}เท่ากับ 223.19±3.93, 208.32±8.33 µg/ml; 58.07±2.09 and 62.12±2.56 µg/ml ตามลำดับและพบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเมทานอลเชื้อแอคติโนมัยซีท *S. indiaensis* (A1-3) ในความเค็ม17 และ 25 ppt ไม่แตกต่างกัน และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีแนวโน้มลดลงที่ความเค็ม 35pptดังนั้นสารสกัดหยาบเชื้อแอคติโนมัยซีท *S. indiaensis* (A1-3) ที่เลี้ยงด้วยอาหาร ISP3 ความเค็ม 17 และ 25ppt.มีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระและอาจนำไปพัฒนาในอุตสาหกรรมอาหาร เวชสำอาง และเภสัชกรรมผลแสดงในตารางที่ 20

ตารางที่ 20 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดส่วนน้ำเลี้ยงของแอคติโนมัยซีท *S. indiaensis* (A1-3) อาหาร ISP3 ที่ความเค็มแตกต่างกัน 3 ระดับ

	(IC50) Antioxidant scavenging activity	
Salinity (ppt)	**DPPH scavenging activity (µg/ml)**	**ABTS scavenging activity (µg/ml)**
17 ppt	223.19±3.93	58.07±2.09
25ppt	208.32±8.33	62.12±2.56
35ppt	>400	183.59±4.71
Trolox	3.79	8.24

4. ผลของความเค็มต่อน้ำหนักสารสกัดหยาบ และความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ของเชื้อ แอคติโนมัยซีท *Streptomyces parvulus*

จากการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีท *Streptomyces parvulus* ในอาหารเหลว ISP2 โดยใช้ความเค็มน้ำทะเลธรรมชาติในการเตรียมแตกต่างกัน 7 ระดับ พบว่าที่ความเค็ม 35 ppt ได้น้ำหนักสารสกัดหยาบจากส่วนน้ำเลี้ยงมากที่สุด 74.5 มิลลิกรัม และจากส่วนของเซลล์ 61.1 มิลลิกรัม รองลงมาคือที่ความเค็ม 40 ppt ได้น้ำหนักสารจากส่วนน้ำเลี้ยง 43.5 มิลลิกรัม และจากส่วนของเซลล์ 41.7 มิลลิกรัม (ตารางที่ 21) และเมื่อนำสารสกัดหยาบจากส่วนของเซลล์และส่วนของน้ำเลี้ยงทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ พบว่าสารสกัดหยาบจากเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อที่ความเค็ม 40 ppt สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้ดีที่สุด มีบริเวณยับยั้ง 20±1 มิลลิเมตร แต่ไม่แตกต่างจากความเค็มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ในขณะที่สารสกัดหยาบจากส่วนของน้ำเลี้ยงยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุด มีบริเวณยับยั้ง 20±1 มิลลิเมตร แตกต่างจากความเค็ม 10 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แต่ไม่แตกต่างจากความเค็มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) (ภาพที่ 17) สารสกัดหยาบจากส่วนของเซลล์และน้ำเลี้ยงที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อทุกระดับความเค็มสามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* *B. subtilis* และ *S. aureus* ได้สูงกว่า *C. albicans* เชื้อที่เลี้ยงในอาหาร ISP2 และใช้น้ำทะเลธรรมชาติความเค็ม 35-40 ppt ให้สารสกัดหยาบในปริมาณสูงกว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในความเค็มต่ำอย่างชัดเจน แต่ให้ผลของฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ไม่แตกต่างกันมากนักในแต่ละความเค็ม ดังนั้นความเค็มที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อ *S. parvulus* เพื่อให้ได้สารสกัดหยาบจากเซลล์และน้ำเลี้ยงปริมาณมากรวมทั้งให้ฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli* *B. subtilis* และ *S. aureus* ได้ดีคือเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 ด้วยน้ำทะเลธรรมชาติความเค็ม 35 ppt

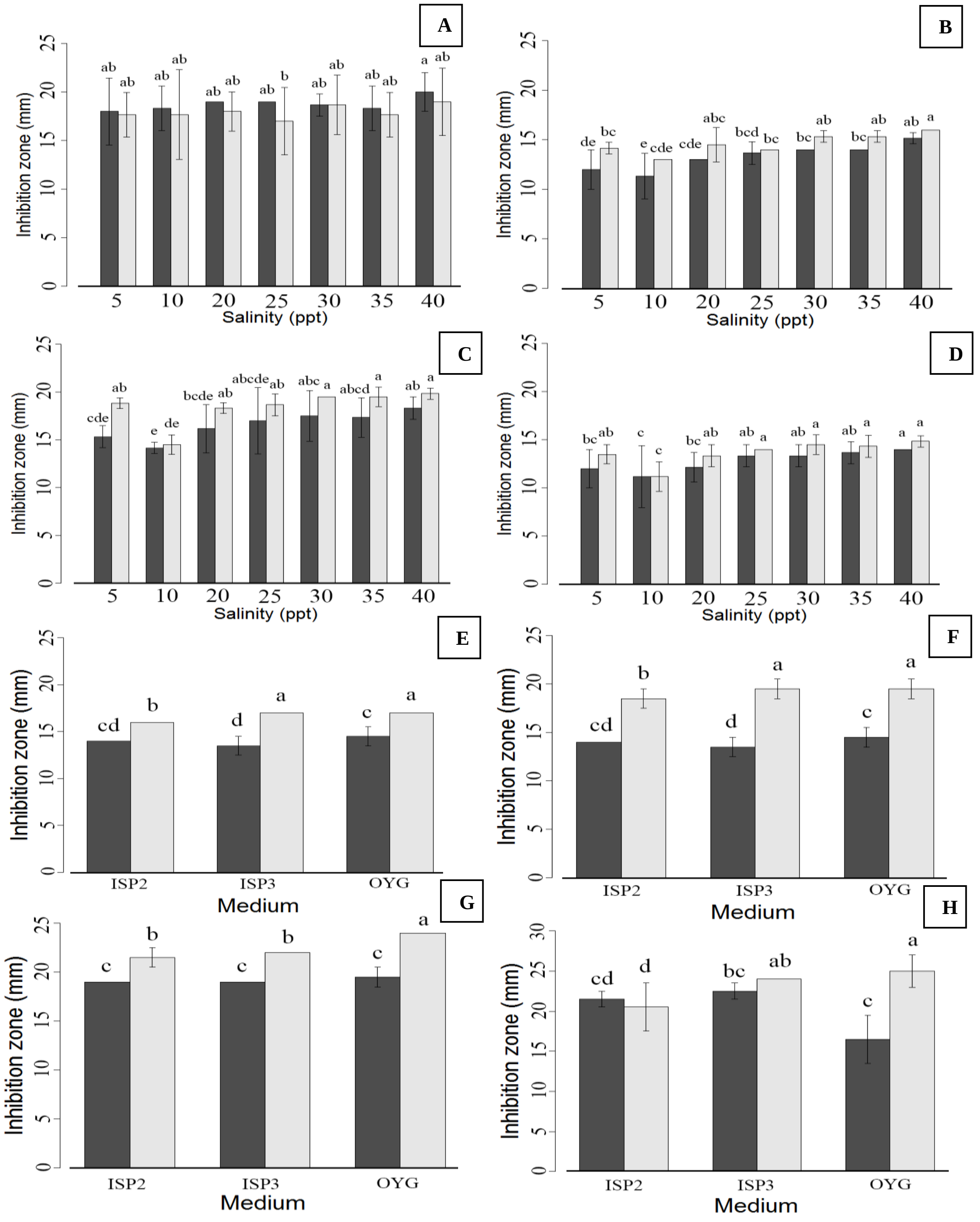
5. ผลของอาหารต่อน้ำหนักสารสกัดหยาบ และความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ของเชื้อแอคติโนมัยซีท *Streptomyces parvulus*

จากการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทในอาหารเหลวแตกต่างกัน 3 สูตร พบว่าเชื้อที่เลี้ยงในอาหาร OYG ความเค็ม 17 ppt สารสกัดหยาบจากส่วนของน้ำเลี้ยงสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ได้ดีที่สุดมีบริเวณยับยั้ง 24 มิลลิเมตร และแตกต่างจากการเลี้ยงเชื้อในอาหาร ISP2 และ ISP3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ในขณะที่สารสกัดหยาบจากเซลล์ที่เลี้ยงในอาหาร ISP2 และ ISP3 สามารถยับยั้ง *C. albicans* ได้ดีที่สุดมีบริเวณยับยั้ง 21.5±0.7 และ 22.5±0.7 มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากการเลี้ยงในอาหาร OYG ที่ให้ผลการยับยั้งน้อยที่สุด ($P>0.05$) (ภาพที่ 17) ซึ่งการเลี้ยงเชื้อในอาหาร ISP3 และ OYG ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นข้าวโอ๊ตเหมือนกัน ที่ความเค็ม 17 ppt สามารถผลิตสารยับยั้งจุลชีพที่ออกฤทธิ์ได้ดีเช่นเดียวกัน แต่มีความแตกต่างกันบ้างในแต่ละเชื้อที่นำมาทดสอบ โดยสารสกัดหยาบจากส่วนของเซลล์ที่เลี้ยงในอาหาร OYG ยับยั้งเชื้อ *E. coli* และ *B.*

subtilis ได้ดีกว่าอาหาร ISP3 แต่สารสกัดจากส่วนน้ำเลี้ยงให้ผลไม่แตกต่างกัน ดังนั้นการเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ได้สารสกัดหยาบจากส่วนน้ำเลี้ยงในปริมาณมากจะได้ทดลองเลี้ยงเชื้อด้วยอาหาร OYG และใช้น้ำทะเลธรรมชาติความเค็ม 35 ppt

ตารางที่ 21 ผลของอาหารและความเค็มต่อน้ำหนักสารสกัดหยาบของเชื้อแอคติโนมัยซีท *S. parvulus*

Crude extracts	Weight of crude extracts (mg)						
	Salinity of natural sea water (ppt) / ISP2						
	5	10	20	25	30	35	40
Crude extract from cells	22.4	30.7	62.2	31.6	29.7	61.1	41.7
Crude extract from	20.7	26.4	30.1	32.3	37.2	74.5	43.5
Crude extracts	**Medium (salinity 17 ppt)**						
		ISP2		**ISP3**		**OYG**	
Crude extract from cells		53.3		133.1		104.9	
Crude extract from		29.8		31.5		35.8	



ภาพที่ 17 ผลของความเค็มและอาหารต่อความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของเชื้อแอคติโนมัยซีท *S. parvulus* ; A) และ E) = *E. coli,* B) และ F) = *B. subtilis*, C) และ G) = *S. aureus*, D) และ H) = *C. albican* ■ = crude extract from cells □ = crude extract from supernatant

11. การทดสอบผลของความเป็นพิษของ Dimethyl Sulfoxide (DMSO) ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันต่อการตายของอาร์ทีเมีย

จากผลการทดสอบความเป็นพิษของ Dimethyl sulfoxide (DMSO) ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันต่อการตายของอาร์ทีเมีย พบว่า ที่ความเป็นเข้มข้นของ DMSO 100 ไมโครลิตร ต่อน้ำทะเล 400 ไมโครลิตร หรือ 2%(v/v) ไม่ส่งผลต่อการตายของอาร์ทีเมีย และจากการทดลองพบว่า LD_{50} ของ DMSO คือ 9.89%(v/v) ดังแสดงในตารางที่ 22

ตารางที่ 22 ผลของความเป็นพิษของ Dimethyl Sulfoxide (DMSO) ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันต่ออาร์ทีเมีย

การทดลอง DMSO: SW (500ไมโครลิตร)	ร้อยละการตายของอาร์ทีเมีย ณ เวลา 24 ชั่วโมง
T1 (100:400) / 2%(v/v)	0
T2 (200:300) / 4%(v/v)	3.3
T3 (300:200) / 6%(v/v)	3.3
T4 (400:100) / 8%(v/v)	36.7
T5 (500:0) / 10%(v/v)	100
Positive control (0:500)	0
LD_{50}	9.89%(v/v)

12. การทดสอบผลของสารสกัดจากแอคคติโนมัยซีทต่อร้อยละการตายของอาร์ทีเมีย

จากผลการทดสอบผลของสารสกัดจากแอคติโนมัยซีท *S. indiaensis* (A1-3), *S. indiaensis* (A3-3), *S. coelicoflavu* และ *S. parvulus* ต่อการตายของอาร์ทีเมีย ณ เวลา 24 ชั่วโมง พบว่า สารสกัดจากแอคติโนมัยซีท *S. indiaensis* (A1-3) ที่เลี้ยงด้วยอาหาร ISP3 ความเค็ม 17 ppt เป็นเวลา 7 วัน ณ ระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่ระดับต่างๆ ไม่พบการตายของอาร์ทีเมีย ในทำนองเดียวกัน สารสกัดจากแอคติโนมัยซีท *S. indiaensis* (A3-3) ที่เลี้ยงด้วยอาหาร ISP2 ความเค็ม 17 ppt เป็นเวลา 7 วัน ที่ค่าความเข้มข้นสูงสุด 200 ppm พบการตายของอาร์ทีเมียอยู่ที่ร้อยละ 6.7 จึงสรุปได้ว่าค่าความเป็นพิษของสารสกัดจากแอคติโนมัยซีททั้งสองชนิดนี้ ไม่มีความเป็นพิษ ในทางตรงกันข้ามสารสกัดจากแอคติโนมัยซีท *S. coelicoflavu* และ *S. parvulus* ที่เลี้ยงด้วยอาหาร ISP2 ความเค็ม 17 ppt เป็นเวลา 7 วัน มีพิษต่ออาร์ทีเมีย โดยค่า LD_{50} ของสารสกัดจากแอคติโนมัยซีททั้งสองชนิด คือ 215.47 และ 172.78 ppm ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 23

ตารางที่ 23 ผลของสารสกัดจากแอคคติโนมัยซีทต่อร้อยละการตายของอาร์ทีเมีย

รหัส	**ชนิดของ แอคติโนมัยซีท**	**ระดับความเข้มข้นของตัวอย่างต่อร้อยละการตายของอาร์ทีเมีย ณ เวลา 24 ชั่วโมง (ppm)**														**LD_{50} (ppm)**
		4	**8**	**10**	**12**	**16**	**20**	**50**	**60**	**70**	**80**	**100**	**140**	**160**	**200**	
A1-3	*Streptomyces indiaensis*	0	0	-	7	3.7	0	0	-	-	-	3.7	-	-	0	>200
A3-3	*Streptomyces indiaensis*	-	-	-	-	-	0	6.7	-	-	-	10	-	-	6.7	>200
A16-1	*Streptomyces coelicoflavus*	-	-	-	-	-	0	3.3	-	-	-	0	20	50	70	215.47
CP58-4-21	*Streptomyces parvulus*	-	-	0	-	-	6.7	0	10	50	46.7	80	-	-	90	172.78

อภิปรายผลการทดลอง

การเพิ่มผลผลิตสารสี

จากการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 3 ไอโซเลท พบว่า เชื้อแอคติโนมัยซีท *Streptomyces parvulus* สามารถให้ผลผลิตสารสีมากที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหาร OYG ความเค็ม 35 หรือ 40 ppt ระยะเวลาในการเลี้ยง 7 วัน โดยได้ปริมาณสารสกัดหยาบ 61.1 และ 41.7 มิลลิกรัม ตามลำดับ ต่อปริมาตรน้ำเลี้ยง 150 มิลลิลิตร ที่ความยาวคลื่น 450 nm มี ผลรวมสารสี (total pigment yield) คือ 10.91 และ 27.16 และเมื่อตรวจสอบความคงทนของสารสีพบว่า ที่ความยาวคลื่น 530 nm ความเค็ม 35 และ 40 ppt พบว่ามีการลดลง ร้อยละ 49.2 และ 49.1 ตามลำดับ ที่ 60 วัน และความยาวคลื่น 450 nm ความเค็ม 35 และ 40 ppt พบว่ามีการลดลง ร้อยละ 33.1 และ 68.1 ตามลำดับ ที่ 60 วัน โดยที่สารสีที่สกัดได้มีสีเหลืองซึ่งอยู่ในกลุ่ม ฟลาโวนอยด์ หรือแคโรทีนอยด์ และ เชื้อแอคติโนมัยซีท *Streptomyces indiaensis* (A1-3) พบว่าได้น้ำหนักเซลล์มากที่สุด 5.42 กรัม เมื่อเลี้ยงที่ความเค็ม 10 ppt ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6 ในอาหาร ISP2 และเมื่อตรวจสอบความคงทนของสารสีพบว่า ที่ความยาวคลื่น 410 nm ความเค็ม 17 และ 35 ppt พบว่ามีการลดลง ร้อยละ 67.3 และ 84.9ตามลำดับ ที่ 60 วัน เชื้อแอคติโนมัยซีท *S. coelicoflavu* เมื่อเลี้ยงในอาหาร ISP3 ความเค็ม 17, 25 และ 35 ppt เป็นเวลา 7 วัน พบว่าเมื่อตรวจสอบความคงทนของสารสีที่ความยาวคลื่น 495 nm พบว่ามีการลดลง ร้อยละ 32.6, 91.8 และ 43.1 ตามลำดับ ที่ 60 วัน

เมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อการตายของอาร์ทีเมียพบว่าสารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยซีท *Streptomyces indiaensis* (A1-3), *Streptomyces indiaensis* (A3-3) มีค่า LD_{50} มากกว่า 200 ppm ส่วนเชื้อแอคติโนมัยซีท *Streptomyces coelicoflavu* และ *Streptomyces parvulus* มีค่า LD_{50} คือ 215.47 และ 172.78 ppm ตามลำดับ โดยที่สารกสัดจากเชื้อ *S. indiaensis* (A1-3) และ *S. indiaensis* (A3-3) มีความเป็นพิษน้อยที่สุด ซึ่งสารสกัดที่ได้มีสีม่วงแดง อยู่ในกลุ่มสารสีแอนโทไซยานิน (Anthocyanin) ส่วนสารสีที่ได้จากเชื้อ *Streptomyces coelicoflavu* มีสีม่วงอมน้ำเงิน โดยอยู่ในกลุ่มสารสีแอนโทไซยานินเช่นเดียวกัน และ *Streptomyces parvulus* สารสีที่ได้มีสีเหลืองอยู่ในกลุ่ม ฟลาโวนอยด์ หรือแคโรทีนอยด์

สารสีในกลุ่มแคโนทีนอยด์สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในด้านการเพาะเลี้ยงปลาสวยงาม เนื่องจากในสีของตัวปลาเป็นปัจจัยสำคัญที่จะต้องควบคุมให้ได้ตรงกับความต้องการของตลาด โดยปัญหาที่สำคัญในการควบคุมสีของตัวปลาคือแคโรทีนอยด์เนื่องจากสัตว์น้ำทั้งกุ้งและปลาไม่สามารถสร้างแคโรทีนอยด์ขึ้นเองได้ จำเป็นต้องรับจากการกินอาหารเท่านั้น (Lastcha, 1991) จากงานวิจัย

ของ จิตรา สิมาวัน และคณะ (2559) ที่ศึกษาผลของการเสริมไรน้ำนางฟ้าไทยชนิดผงต่อตวามเข้มสีผิวและอัตราการเจริญเติบโตของลูกปลาคาร์ฟพบว่า อาหารที่ผสมไรน้ำนางฟ้าที่ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ 100 มิลลิกรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ส่งผลให้ลูกปลาคาร์ฟมีความเข้มของสีผิงสูงสุด โดยพบค่าสีแดง (14.66±1.77) และค่าสีเหลือง (30.58±1.21) และจากงานวิจัยของ ประภาศิริ ใจผ่อง และคณะ (2560) ที่ได้ศึกษาผลของสารสกัดแคโรทีนอยด์ในแครอทและมะเขือเทศต่อความเข้มสีของปลาสอดแดงหางดาบ พบว่าปลาที่ได้รับสารสกัดแคโรทีนอด์ในมะเขือเทศและแครอทมีความเข้มสีมากกว่าชุดควบคุม

ในด้านการประยุกต์ใช้สารสีที่สกัดจากเชื้อแอคติโนมัยซีทในอนาคตอาจมีการนำมาประยุกต์ในของใช้ในชีวิตประจำวันที่มาจากธรรมชาติไม่ได้เกิดจากการสังเคราะห์ ได้แก่ ใช้เป็นสีย้อม หมึกพิมพ์ อาหาร เครื่องนุ่งห่ม เป็นต้น ดังเช่นงานวิจัยของ ทิวา เขียนวงษ์ และนฤมล เถื่อนกูล (2557) ซึ่งได้ใช้สีย้อม *Streptomyces* sp. P2 ในการย้อมเส้นใยไหม เส้นใยขนแกะ และเส้นใยฝ้าย ซึ่งพบว่าเส้นใยไหม เส้นใยขนแกะและเส้นใยฝ้ายมีการติดสีม่วงที่แตกต่างกัน โดยให้ค่าตามลำดับดังนี้ ค่าความสว่าง (L*) มีค่าเท่ากับ 40.88, 46.06 และ 50.98, ค่าเฉดสี (C*) มีค่าเท่ากับ 12.72, 11.44 และ 17.36 และ ค่ามุมของสี (h*) มีค่าเท่ากับ 23.38, 29.88 และ 35.70

ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยซีท

อนุมูลอิสระ (free radicals) เกิดขึ้นได้ภายในร่างกายของสิ่งมีชีวิตจากกระบวนการต่างๆในร่างกาย แต่ถ้ามีในปริมาณมากเกินไป สามารถก่อให้เกิดการอักเสบและทำลายเนื้อเยื่อ มีผลต่อความเสื่อมหรือการแก่ของเซลล์อันเป็นต้นเหตุของการเกิดโรคต่าง ๆ (Ames *et al*.,1993; Wang, *et al*., 2010) นอกจากนี้อนุมูลอิสระยังมีแหล่งที่มาจากภายนอก ได้แก่ มลพิษในอากาศ ไนโตรเจนไดออกไซด์ ฝุ่น ควันบุหรี่ อาหารที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัว แสงแดด ความร้อน เป็นต้น สิ่งมีชีวิตมีกลไกในการกำจัดอนุมูลอิสระเหล่านี้หลายรูปแบบ ได้แก่ ใช้เอนไซม์ในร่างกาย เช่น superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) เป็นต้น และการไม่ใช้เอนไซม์ ได้แก่ สารประกอบหรือโปรตีนบางชนิด เช่น albumin, bilirubin, transferrin เป็นต้น หรือวิตามินชนิดต่าง ๆ ได้แก่วิตามินอี เบต้าคาโรทีน และวิตามินซี สารเหล่านี้ทำหน้าที่ในการต่อต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) สารต้านอนุมูลอิสระสามารถป้องกันหรือชะลอกระบวนการเกิดอนุมูลอิสระโดยทั่วไปสารต้านอนุมูลอิสระในธรรมชาติประกอบด้วยกลุ่มสารหลายชนิด เช่น สารประกอบฟินอลิค สารประกอบไนโตรเจน และแคโรทีนอยด์ (Velioglu *et al*., 1998) อาจมาจากอาหารหรือมาจากการสังเคราะห์ทางเคมี ในการสังเคราะห์ทางเคมีจำเป็นต้องคำนึงถึงความปลอดภัยในการนำมาใช้ เพราะอาจมีการตกค้างของสารเคมี ปัจจุบันอุตสาหกรรมอาหาร และยามีการพัฒนาสารต้านอนุมูลอิสระที่มาจากธรรมชาติ เช่น สาหร่ายทะเล แบคทีเรีย เชื้อรา และพืชชั้นสูง (Chattopadhyay *et al*., 2008) ซึ่งสารสกัดจากเชื้อ

แอคติโนมัยซีทเป็นแหล่งหนึ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากแอคติโนมัยซีท (Actinomycetes) เป็นกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกที่พบได้ทั่วไป โดยเฉพาะในดินมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายเชื้อรา ลักษณะของโคโลนีที่พบบนอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่า โคโลนีเกาะแน่นและมีลักษณะจมอยู่ในอาหารบางชนิดอาจมีการสร้างรงค์วัตถุสีต่างๆ เช่น ส้ม เหลือง ม่วง น้ำตาล เป็นต้น และมีความสามารถในการผลิตสารเมตาบอไลท์ได้หลายชนิด เช่น สารสี วิตามิน และสารปฏิชีวนะที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา แบคทีเรียและ ไวรัส เป็นต้น (กิ่งจันทน์ มะลิซ้อน, 2555) ปัจจุบันแบคทีเรียหลายชนิดในกลุ่มแอคติโนมัยซีทกำลังเป็นที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากเพราะนอกจากมีการสร้างสารทุติยภูมิที่สำคัญหลายชนิด มีลักษณะโครงสร้างและมีพันธุกรรมที่หลากหลายแล้ว แอคติโนมัยซีทสามารถสร้างเอนไซม์ออกมาภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) ได้หลายชนิด ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ได้หลายด้านจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าสารสกัดหยาบจากส่วนน้ำเลี้ยงของเชื้อแอคติโนมัยซีท A1-3 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร ISP3 ที่ความเค็ม 17 และ25 ppt.มีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ได้ดีที่สุด มีค่าIC_{50} = 58.07±2.09 และ 62.12±2.56ug/ml ตามลำดับ

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH, NO, ของสารสกัดเอทธิลอะซิเตท ของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกจากดิน Kanathur of Chennai, Indiaด้วยอาหาร starch casein agar (SCA) และเลี้ยงด้วยอาหาร ISP2 และปัจจัยด้านต่าง ๆ เช่น การ pretreatment, selective medium สภาวะในการเลี้ยง และการคัดเลือกโคโลนีจาก plate เริ่มต้น ที่มีประสิทธิภาพ ผู้วิจัยกล่าวว่าสิ่งเหล่านี้เป็นปัจจัยต่อ ผลสำเร็จของการคัดแยกแอคติโนมัยซีท (Mohan et al., 2010)

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH, FRAP ของสารสกัดเอทธิลอะซิเตท *Streptomyces* ที่คัดแยกจากดินป่าชายเลน Visakhapatnam ประเทศอินเดียจำนวน 20 ไอโซเลต พบ 4 ไอโซเลต BC 01, BC 02, BC 03 และ BC 04 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีโดยไอโซเลต BC 01 (*Streptomyces coelicoflavus*) มีค่า DPPH IC_{50} = 68.91 ± 21.00ug/ml (Kothagorla Venkata et al., 2013)

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของแอคติโนมัยซีททะเล ที่คัดแยกจากน้ำทะเลและดินตะกอน จาก Andhra Pradesh และ Tamil Nadu อินเดีย จำนวน 58 isolates พบ 2 isolates (PWS 3/1 และ53) แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ Inhibition activity 4.09-61.55% ที่ระดับความเข้มข้น 10-1500 μg/0.1mL (Crude extract of isolate 53) (Bhushan et al., 2016) และจากการศึกษาของวสุ ปฐมอารีย์ กับคณะในปี 2558 ทำการศึกษาแอคติโนมัยซีทจากตะกอนชายฝั่งทะเลและป่าชายเลนภาคตะวันออกของไทยและความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จากการศึกษาสามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีศักยภาพสูงในการสร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพได้ 137 ไอโซเลทส่วนใหญ่จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* มีเชื้อใหม่ 2 สปีชีส์ คือ *Streptomyces ferrugineus*และ *Jiangella mangrovi*มีแอคติโนมัยซีท 89 ไอโซเลท (65 เปอร์เซ็นต์) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้อย่างน้อย 1 ชนิด ที่สามารถยับยั้ง

การเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคได้ การทำ bioautography พบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *staphylococcus aureus*และ *Candida albicans* ฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และจากรายงานของรัตนาภรณ์ ศรีวิบูลย์ 2558 ที่ศึกษาความเหมาะสมของอาหารชนิดต่าง ๆ ต่อการเจริญ และ สารรงควัตถุของแอคติโนมัยซีท โดยเลี้ยงในอาหาร Glucose-Yeast, ISP2, ISP3 (Oat meal agar), ISP4 (Inorganic Salt Starch), ISP5 (Glycerol-Asparagine), ISP7 (Tyrosine Agar) และ ISP8 จะเห็นได้ชัดเจนว่า ชนิดของอาหาร หรืออีกนัยหนึ่งองค์ประกอบของธาตุอาหารที่มีในอาหารแต่ละชนิด มีผลต่อการเจริญเติบโตและการสร้างรงควัตถุของแอคติโนมัยซีท แต่จากการวิจัยได้ใช้อุณหภูมิ และ pHที่แอคติโนมัยซีทส่วนใหญ่เจริญ และสร้างสารทุติยภูมิได้ดี คือที่อุณหภูมิ 30°C และค่าความเป็นกรด-เบส ที่ 7.5-8.0สามารถสร้างสารได้ดี

โดยปกติแล้วการสร้างสารทุติยภูมิหรือสารออกฤทธิ์ชีวภาพของแอคติโนมัยซีทนั้นอาหารเลี้ยงเชื้อและปัจจัยสภาวะแวดล้อมของการเลี้ยงมีอิทธิพลอย่างมากต่อการจะสร้างสารได้มากหรือได้น้อย (Karuppiah, et al., 2013; Jung, HM., et al., 2007) และเชื้อแอคติโนมัยซีทแต่ละชนิด แต่ละจีนีส แต่ละสายพันธุ์ ก็มีความต้องการอาหารและสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมในการสร้างสารที่แตกต่างกัน (Kiranmayi et al., 2011; Kavitha and Vijayalakshmi, 2009) ไม่ว่าจะเป็นแหล่งของคาร์บอน หรือแหล่งของไนโตรเจน ค่าของ pH อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยง ระยะเวลาที่ใช้เลี้ยง ชนิดของอาหาร รวมทั้งชนิดของเกลือแร่ที่เป็นสาร inorganic ที่เติมลงในอาหาร ไม่ว่าจะเป็น สารที่ต้องการมาก หรือต้องการเป็นพียง trace elements (รัตนาภรณ์ และจันทร์จรัส2558)ในการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีททะเลองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และปัจจัยทางกายภาพ เช่น ความเค็ม อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง หรือการเติมอากาศ มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากแอคติโนมัยซีทเป็นอย่างมาก แอคติโนมัยซีททะเลในบางสายพันธุ์ต้องการความเข้มข้นของเกลือสูงมาก (halophiles) (Tsueng et al., 2008) ด้วยเหตุนี้จึงมีงานวิจัยจำนวนมากที่ศึกษาการพัฒนากระบวนการหมักเพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตสารประกอบที่มีศักยภาพในการนำไปใช้ประโยชน์ (Tsueng et al., 2008; Lam et al., 2007; Selvin et al., 2009) การพัฒนาวิธีการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทจึงเป็นส่วนสำคัญของการวิจัยสำหรับการค้นหาสารตัวยาใหม่ๆ การเพิ่มประสิทธิภาพขององค์ประกอบและพารามิเตอร์ของการเพาะเลี้ยง (จันทร์จรัส และคณะ 2560)

ฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยซีท

ในงานวิจัยได้เลือกใช้ความเค็มน้ำทะเล 17 ppt ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 สูตร เนื่องจากเป็นความเค็มที่ใช้ในการคัดเลือกเชื้อ ซึ่งเชื้อแอคติโนมัยซีททะเล *S. parvulus* ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ ได้คัดเลือกมาจากงานวิจัยการพัฒนาการผลิตสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากแอคติโนมัยซีทและการผลิตเซลล์ปริมาณมาก ผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์เบื้องต้นให้ผลการทดสอบที่ดี (รัตนาภรณ์ และ

จันทร์จรัส, 2558) ในงานวิจัยดังกล่าวได้มีการแยกเชื้อจากดินตะกอนป่าชายเลนในจังหวัดนครศรีธรรมราช ชุมพร และระยอง ได้ทั้งหมด 83 ไอโซเลต โดย 55 ไอโซเลตแยกได้จากดินตะกอนในบริเวณป่าชายเลนฝั่งอ่าวไทยจังหวัดนครศรีธรรมราชเป็นสมาชิกของเชื้อสกุล *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Nocardiopsis* และ *Streptoalloteichus* เป็นต้น โดยพบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทมากกว่าร้อยละ 50 สามารถยับยั้งเชื้อแบซิลลัสได้ (Srivibool and Watanadilok, 2015) ในการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีททะเลองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และปัจจัยทางกายภาพ เช่น ความเค็ม อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง หรือการเติมอากาศ มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากแอคติโนมัยซีทเป็นอย่างมาก แอคติโนมัยซีททะเลในบางสายพันธุ์ต้องการความเข้มข้นของเกลือสูงมาก (halophiles) (Tsueng et al., 2008) ด้วยเหตุนี้จึงมีงานวิจัยจำนวนมากที่ศึกษาการพัฒนากระบวนการหมักเพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตสารประกอบที่มีศักยภาพในการนำไปใช้ประโยชน์ (Tsueng et al., 2008; Lam et al., 2007; Selvin et al., 2009) การพัฒนาวิธีการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทจึงเป็นส่วนสำคัญของการวิจัยสำหรับการค้นหาสารตัวยาใหม่ๆ การเพิ่มประสิทธิภาพขององค์ประกอบและพารามิเตอร์ของการเพาะเลี้ยง

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การเพิ่มผลผลิตสารสีและความคงตัวของสารสี

จากผลการทดลองการเพิ่มปริมาณผลผลิตสารสีจากการเลี้ยงเชื้อ *S. parvulus* พบว่าผลของน้ำหนักเซลล์จากการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหาร ISP2 ความเค็ม 5 ppt ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7 ได้ปริมาณน้ำหนักเซลล์มากที่สุดคือ 2.02-2.27 กรัม และผลของน้ำหนักสารสกัดหยาบส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อและเซลล์ ด้วยอาหารที่แตกต่างกัน 3 สูตร พบว่าอาหารที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อคือ ISP3 และ OYG โดยให้น้ำหนักของสารสกัดหยาบในส่วนของเซลล์คือ 0.1331 และ 0.1049 กรัม มากที่สุดตามลำดับ และพบว่าสารสกัดหยาบส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหาร OYG ความเข้มข้น 500 ppm มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm มากที่สุดคือ 1.0105 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารสกัดที่ได้จากส่วนนี้มีปริมาณสารสีมาก ในส่วนความเค็มที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อคือ 40 ppt จากผลการทดสอบการคงตัวของสารสีสารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยซีท *S. parvulus* ที่เลี้ยงด้วยอาหาร OYG ความเค็ม 35 มีความคงตัวของสีมากที่สุดที่ 60 วัน โดยมีร้อยละการลดลงของสีคือ 33.1 ที่ความยาวคลื่น 450 nm

ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเชื้อแอคติโนมัยซีท

จากผลแสดงอิทธิพลของการเลี้ยงเชื้อที่สภาวะต่าง ๆ ได้แก่ ความเค็ม อุณหภูมิ และระยะเวลา ที่มีต่อน้ำหนักแห้งของเซลล์แอคติโนมัยซีท (Biomass) และน้ำหนักแห้งของสารสกัด โดยทั่วไปพบว่าการเลี้ยงเชื้อที่ความเค็มเพิ่มขึ้นจะทำให้เชื้อแอคติโนมัยซีทเจริญได้มากขึ้น จากผลของแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน มีผลต่อการผลิต biomass และการผลิตสารทุติยภูมิซึ่งจะพบว่าสารจะอยู่ในชั้นเซลล์มากกว่าที่จะถูกปล่อยมาในน้ำเลี้ยง โดยทั่วไปเชื้อแอคติโนมัยซีทที่เลี้ยงด้วยอาหาร ISP3 ซึ่งมี oat meal เป็นแหล่งคาร์บอน ทำให้มีผลผลิตของ biomass และการผลิตสารทุติยภูมิปริมาณมาก ซึ่งสภาวะที่เหมาะในการเจริญเติบโตและผลิตสารทุติยภูมิของเชื้อ A1-3, A16-1 และ A3-3 คือ เลี้ยงด้วยอาหาร ISP3 ที่ความเค็ม 25 ppt ขณะที่เชื้อ CP58-4-21 ได้นำผลการศึกษาในเบื้องต้นของอาหารและความเค็มที่ใช้เลี้ยง พบว่าอาหาร ISP2 ที่ความเค็ม 17 ppt เหมาะกับการเลี้ยงโดยมี dextrose เป็นแหล่งคาร์บอน และจากผลการศึกษาผลของระยะเวลาต่อการผลิต biomass และการผลิตสารทุติยภูมิ (ตาราง..) พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อนาน 10 วัน จะให้ปริมาณ biomass มากที่สุดและจากนั้นเมื่อเลี้ยงจนถึงเวลา 14 วัน จะพบว่าสารทุติยภูมิที่ผลิตได้จะถูกปล่อยไปในน้ำเลี้ยง ทำให้ปริมาณสารสกัดในน้ำเลี้ยงมากเพิ่มขึ้น สภาวะที่เหมาะในการเลี้ยงเชื้อ CP58-4-21 คือใช้อาหาร ISP2 เลี้ยงที่ความเค็ม 17 ppt เป็นระยะเวลา 14 วัน เพื่อให้ได้สารทุติยภูมิปริมาณมาก จากการประเมินบทบาทของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่แตกต่างกัน ที่มีต่อการเจริญเติบโตของเชื้อและการผลิตสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ผลการศึกษาพบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทผลิตสารต้านอนุมูลอิสระและปล่อยไปในน้ำเลี้ยง เพราะฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดที่ได้ในชั้นน้ำเลี้ยงจะแสดงฤทธิ์ที่ดีกว่าในเซลล์ จากการ

ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบว่าเชื้อ A16-1 ในน้ำเลี้ยงแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดที่ค่า IC50 61.94+15.64 ppm ขณะที่การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS พบว่าเชื้อ A1-3 และ A16-1 มีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระที่รุนแรงที่ค่า 58.07+2.09 และ 76.56+6.46 ppm ตามลำดับ เมื่อเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอบิคที่มีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระทั้ง DPPH และ ABTS ที่ IC50 3.87+0.22 และ 13.27+0.23 ppm

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด พบว่าเชื้อ A1-3 เลี้ยงด้วยอาหาร ISP3 ซึ่งมี oat meal เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเค็ม 17 ppt นาน 7 วัน สามารถผลิตสารทุติยภูมิในชั้นน้ำเลี้ยงได้ปริมาณ 0.0138 มิลลิกรัม และแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ที่ IC50 58.07+2.09 ppm ขณะที่เชื้อ A16-1 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร ISP3 ความเค็ม 25 ppt นาน 7 วัน ผลิตสารทุติยภูมิในชั้นน้ำเลี้ยงได้ปริมาณ 0.0126 มิลลิกรัม และแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และABTS ที่ IC50 61.94+15.64, 76.56+6.46 ppm ตามลำดับ กรณีการศึกษาระยะเวลาในการผลิตสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเชื้อ CH58-4-21 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร ISP2 ที่ความเค็ม 17 ppt พบว่าเลี้ยงเชื้อนาน 7 วัน จะได้สารสกัดที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระปานกลาง ที่ IC50 219.68+6.59 ppm และพบว่ายิ่งใช้เวลาในการเลี้ยงนานขึ้นการผลิตสารออกฤทธิ์จะน้อยลง

จากผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่าง ๆดังกล่าว การเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทจะให้ปริมาณ biomass มากกว่าการสร้างสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากการเผาผลาญของเซลล์ Actinomycete ภายใต้สภาวะที่มีโภชนาการมากเกินไป จะถูกนำไปสู่การสร้างเซลล์มากกว่าการผลิตสารทุติยภูมิ

ผลของความเค็มและอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาณสารสกัดหยาบและการออกฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของเชื้อแอคติโนมัยซีททะเล *Streptomyces parvulus*

จากการเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces parvulus* ในอาหารเหลว ISP2 ที่ความเค็ม 7 ระดับ แล้วทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย 3 ชนิด *Escherichia coli, Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus* และเชื้อรา *Candida albicans* พบว่าความเค็มของน้ำทะเลที่ใช้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ 35 ppt ให้ปริมาณสารสกัดหยาบมากที่สุดจากส่วนของน้ำเลี้ยง และการเลี้ยงเชื้อที่ความเค็ม 40 ppt สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้ดีที่สุด (20±1มิลลิเมตร) แต่ไม่แตกต่างจากความเค็มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่าอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อต่างชนิดกันมีผลต่อการออกฤทธิ์ยังยั้บเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราอย่างชัดเจน โดยเชื้อที่เลี้ยงในอาหารสูตร ข้าวโอ๊ต ยีสต์สกัด และกลีเซอรอล ผลิตสารที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราดังกล่าวได้ดีที่สุด และแตกต่างจากการเลี้ยงเชื้อในอาหาร ISP2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

จากการศึกษาสภาวะในการเลี้ยงเชื้อ *S. parvulus* พบว่าความเค็มและอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อปริมาณสารสกัดหยาบทั้งจากส่วนของเซลล์และน้ำเลี้ยง โดยที่ความเค็มมีผลต่อปริมาณ

สารสกัดหยาบจากส่วนของเซลล์และน้ำเลี้ยงมากกว่าความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์อย่างชัดเจน ในขณะที่ชนิดของอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อมีผลต่อปริมาณสารสกัดหยาบและความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ นอกจากนี้ผลการทดลองยังพบว่าความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ส่วนใหญ่อยู่ในน้ำเลี้ยงมากกว่าอยู่ในเซลล์ ดังนั้นการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากทะเลหรือดินตะกอนป่าชายเลน ต้องคำนึงถึงความเค็มของน้ำทะเลที่ใช้เตรียมอาหาร ชนิดของอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อชนิดของเชื้อที่สนใจศึกษา ผลการออกฤทธิ์ และต้นทุนของอาหาร ในงานวิจัยต่อไปจะได้มีการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในสัตว์น้ำ การแยกสารให้บริสุทธิ์การศึกษาโครงสร้างทางเคมี และการประยุกต์ใช้ในด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำต่อไป

การทดสอบผลของสารสกัดจากแอคคติโนมัยซีทต่อร้อยละการตายของอาร์ทีเมีย

จากการทดลองพบว่าผลของตัวทำละลาย Dimethyl sulfoxide (DMSO) ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันต่อการตายของอาร์ทีเมีย พบว่าที่ความเป็นเข้มข้นของ DMSO 100 ไมโครลิตร ต่อน้ำทะเล 400 ไมโครลิตร หรือ 2% DMSO (%V/V) ส่งผลต่อร้อยละการตายของอาร์ทีเมียน้อยที่สุด จึงได้เลือกใช้ความเข้มข้นของ DMSO เพื่อเป็นตัวทำละลายสารสกัดแอคติโนมัยซีทในการทดลองผลของสารสกัดจากแอคคติโนมัยซีทต่อร้อยละการตายของอาร์ทีเมียต่อไป และพบว่าค่า LD_{50} ของ DMSO คือ 9.89%(v/v) และจากผลการทดลองของสารสกัดแอคติโนมัยซีทพบว่า สารสกัดจากแอคติโนมัยซีท *S. indiaensis* (A1-3) ไม่พบการตายของอาร์ทีเมีย และสารสกัดจากแอคติโนมัยซีท *S. indiaensis* (A3-3) ที่ค่าความเข้มข้นสูงสุด 200 ppm พบการตายของอาร์ทีเมียอยู่ที่ร้อยละ 6.7 จึงสรุปได้ว่าค่าความเป็นพิษของสารสกัดจากแอคติโนมัยซีททั้งสองชนิดนี้ ไม่มีความเป็นพิษ ในทางตรงกันข้ามสารสกัดจากแอคติโนมัยซีท *S. coelicoflavu* และ *S. parvulus* มีพิษต่ออาร์ทีเมีย โดยค่า LD_{50} ของสารสกัดจากแอคติโนมัยซีททั้งสองชนิด คือ 215.47 และ 172.78 ppm ตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

กิ่งจันทน์ มะลิซ้อน. 2555. ความหลากหลายของแอคติโนแบคทีเรียในดิน. รายงานการวิจัย. สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี

ขวัญยืน เลี่ยมสำโรง. 2552. การหาปริมาณสารโพลิฟีนอลและฟลาโวนอยด์โดยวิธีโฟลอินเจคชันอะนาซีส. ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

จันทร์จรัส วัฒนะโชติ, ณิษา สิรนนท์ธนา , รวิวรรณ วัฒนดิลกและ ภูมิภัทร ภักดี 2560. สภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์จากเชื้อ *Streptomyces parvulus*ที่แยกได้จากดินตะกอนป่าชายเลน. แก่นเกษตร 45 ฉบับพิเศษ 1. 45 หน้า 865-871.

จามจุรี เกตุบัวขาว ณิชาภา ชมพู และสุพัตรา ชาวสวน 2555. การคัดแยกแอคติโนมัยซีทจากมูลสัตว์เพื่อใช้ในการย่อยสลายวัสดุทางการเกษตรเบื้องต้น. รายงานปัญหาพิเศษหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี.

จิตรา สิมาวัน, นิศาชล ฤาแก้วมา และ โฆษิต ศรีภูธร. 2559. ผลของการใช้ไรน้ำนางฟ้าไทยในอาหารต่อความเข้มของสีผิวปริมาณแคโรทีนอยด์รวมและการเจริญเติบโตของปลาทอง. วารสารแก่นเกษตร 44 (1) ฉบับพิเศษ :682-687.

จิตติ ท่าไว และ สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์ 2550. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ความหลากหลายทางชีวภาพและฤทธิ์ทางชีวภาพของแอคติโนมัยซีทส์ที่หายากจากดินป่าชายเลนฝั่งทะเลอันดามัน. เสนอต่อคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย. 105 หน้า.

เจนจิรา จิรัมย์ และประสงค์ สีหานาม. 2554. อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ แหล่งที่มาและกลไกการ เกิดปฏิกิริยา. วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยราชภัฏกาฬสินธุ์. ฉบับที่1. หน้า 59-70.

ชลธิชา อินทรโกศล. 2543. ผลของความร้อยและสภาพบรรยากาศดัดแปลงต่อการสุญเสียคลอโรฟิลล์และคุณภาพของบรอคโคลีระหว่างการเก็บรักษา. วิทยานิพนธ์หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. 117 หน้า.

ทิวา เขียนวงษ์ และนฤมล เถื่อนมล. 2558. การใช้สีย้อม *Streptomyces* sp. P2 ในการย้อมเส้นใยไหม เส้นใยขนแกะและเส้นใยฝ้าย. การประชุมวิชาการเกษตรนเรศวร ครั้งที่ 12. หน้า 215-129.

ทิพอร อุ้ยเหง่า และกานดา เอี่ยมคด 2556. การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากแอคติโนมัยซีทที่ แยกจากดินตะกอน. รายงานปัญหาพิเศษหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.49 หน้า.

บุหรัน พันธุ์สวรรค์. 2556. อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. ปีที่21. 3: 275-286.

ปริยานุช อินทร์รอด. 2551. ฤทธิ์ต้านออกซิเดชนั และปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของส่วนสกัดจากต้นเร่วหอมและว่านสาวหลง. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต. สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

พัฒน ศิลปชัย. 2559. ประสิทธิภาพของแอคติโนมัยซีททะเลในการผลิตไฮโดรไลติกเอนไซม์เพื่อบำบัดน้ำเสียจากโรงงานแป้งมัน. ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต. สาขาเทคโนโลยีทางทะเล. คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา,จันทบุรี.

มาลัยพร ดวงบาล. 2552. การผลิตสารต้านอนุมูลอิสระกรดแกลลิกจากกากกาแฟที่เหลือใช้โดยใช้เอนไซม์แทนเนส. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์. 59 หน้า.

รัตนาภรณ์ ศรีวิบูลย์ และ จันทร์จรัส วัฒนะโชติ. 2558. การพัฒนาการผลิตสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากแอคติโนมัยซีทและการผลิตเซลล์ปริมาณมาก. สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล. มหาวิทยาลัยบูรพา, ชลบุรี

ลลิดา วชังเงิน 2554. การคัดกรองและการพิสูจน์เอกลักษณ์แอคติโนมัยซีทหายากที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ. วิทยานิพนธ์หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร. 127 หน้า.

วสุ ปฐมอารีย์ กรรณิการ์ ดวงมาลย์, รัตนาภรณ์ ศรีวิบูลย์.2558. แอคติโนมัยซีทจากตะกอนชายฝั่งทะเลและป่าชายเลนภาคตะวันออกของไทยและความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ กรุงเทพฯ : สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, 163 หน้า

ศิริพร จันทรศีรี. 2551. รายงานวิจัยการวิเคราะห์สารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ในพืชบางชนิดและศึกษาผลการเตรียมสารตัวอย่างต่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ.

สุวรรณา พิชัยยงค์วงศ์ดี, นันทพร รุจิขจร และ ศวรรญา ปั่นดลสุข. 2554. วิทยาศาสตร์ประกอบอาหาร. (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพฯ: ห้างหุ้นส่วนจำกัด เอ็ม แอนด์ เอ็ม เลเซอร์พริ้นต์.

โอภา วัชระคุปต์. 2549. สารต้านอนุมูลอิสระ. พิมพ์ครั้งที่2. กรุงเทพฯ : นิวไทยมิตรการพิมพ์.

Aberoumand, A. 2011. A Review Articleon Edible Pigments Properties and Sources as Natural Biocolorants in Foodstuff and Food Industry. *World J. Dairy Food Sci.*, 6(1): 71-78.

Ajijur RMD, Zahidul IMD, Khondkar P, Anwar, UIMD (2010) Characterization and antimicrobial activities of a polypeptide antibiotic isolated from a new strain of *Streptomyces parvulus*. Bangladesh Pharm J. 13:14-16.

Ames, B.N., Shigenaga, M.K. and Hagen, T.M. 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative disease of aging. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90: 7915-7922.

Atlas, R. M. (2010). Handbook of microbiological media fourth edition. Taylor and Francis Group, LLC.

Bast, A., Haeren, G. and Doelmen, C. (1991). “Oxidants and antioxidants: state of art”. **American Journal of Medicine** 91: 2-13.

Bhatnagar, I. and Kim, S-K. 2010. Immence essence of excellence: Marine microbial bioactive compounds. *Marine Drugs,* 8(10): 2673-2701.

Bhushan, G. V., Sankar, G. G., Prabhaker, T. and Kumari, P. V. K. 2016. Antioxidant Acitivity of Actinomycetes Isolates From Marine Sample. World Journal of Phamacy and Phamaceutical Sciences. 5: 1037-1044.

Bonjar, S. 2004. Broadspectrin, a novel antibacterialfrom *Streptomyces* sp. *Biotechnol.*, 3: 126-130.

Boussiba, S. 2000. Carotenogenesis in the green algaHaematococcus pluvialis: cellular physiology and stressresponse. *Physiol Plant,* 108: 111–117.

Bradford, M. M. (1976). A dye binding assay for protein. Anal. Biochem. 72, 248-254.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of free radicalmethod to evaluate antioxidant activity.LebensmittelWissenschaftund Technologie 28: 25–30.

Bull, A.T., J.E. Stach, A.C. Ward, M. Goodfellow. 2005. Marine actinobacteria: perspectives, challenges,
future directions. J. Antonie van Leeuwenhoek. 87: 65-79.

Chattopadhyay, K. and Chattopadhyay, B. D. (2008).” Effect of nicotine on lipid profile, peroxidation & antioxidant enzymes in female rats with restricted dietary protein”. Journal of research and education in indian medicine. 127: 571-576.

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.

CHOUDHARI, S. and SINGHAL, R. (2008). Media optimization for the production of β-carotene by *Blakeslea trispora*: A statistical approach. *Bioresource Technology*, vol. 99, no. 4, p. 722-730.

Durán, N., Marcato, P. D., Souza, G. I. H., Alves, O. L. and Esposito, E. 2007. Antibacterial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on textile fabrics and their effluent treatment. Journal of Biomedical Nanotechnology. 3:203-208.

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.

Fenical, W. 1993.Chemical studies of marine bacteria: developinga new resource.*Chemical Reviews*, 3(5): 1673–1683.

Gerber, N.N. 1969. Prodigiosin-like pigments from*Actinomadura(Nocardia) pelletieri* and *Actinomadura madurae*.*AppliedMicrobiology*, 18 (1): 1–3.

Gerber, N.N. 1975. Prodigiosin-like pigments.*CRC CriticalReviews in Microbiology*, 3(4): 469–485.

Gevers, D., F. M. Cohan, J. G. Lawrence, B. G. Spratt, T. Coenye, E. J. Feil, E. Stackebrandt, Y. V. de Peer, P. Vandamme, F. L. Thompson and J. Swings. 2005. Re-evaluating prokaryotic species. *Nature Rev***.** 3: 733-739.

Giri, A.V., Anandkumar, N., Muthukumaran, G. and Pennathur, G. 2004. A novel medium for the enhanced cell growth and production ofprodigiosin from *Serratia marcescens* isolated from soil. *BMC Microbiology*, 4: 1-10.

Gressier, B., Lebegue, S. and Brunet, C. (1994). “Proxidant properties of methotrexate evatuation and prevention by an antioxidant drug”. **Archiv der Pharmazie-Chemistry in Life Science**.
49: 679-681.

Griffiths, M., W. R. Sistrom, G. Cohen-Bazire, R. Y. Stanier et al. 1955. Function of carotenoid in photosynthesis. Nature 176:1211-1214.

Halliwell, B. 2009. The wanderings of a free radical. Free Radical Biology and Medicine 46: 531-542.

Hayman, G.T., Mannarelli, B.M., Leathers, T.D. 1995. J. Ind. Microbiol. 14, 389–95.

Ihaka, R. and R. Gentleman. 1996. R: A Language for Data Analysis and Graphics. J Comput Graph Stat. 5: 299–314.

John, R.P., Nampoothiri, K.M. and Pandey, A. 2007.Fermentativeproduction of lactic acid from biomass: an overviewon process developments and future perspectives.*AppliedMicrobiology and Biotechnology*, 74(3): 524–534.

Jung, HM, Kim, SY., Moon, HJ., Oh, DK., and Lee, JK. 2007. Optimization of culture conditions and scale-up to pilot and plant scales for vancomycin production by Amycolatopsis orientalis. APpl Microbiol Biotechnol. 77: 789-795.

Karuppiah, V., Aarthi, C., Sivakumar, K., and Kannan, L. 2013. Statistical optimization and anticancer activity of a red pigment isolated from Streptomyces sp. PM4. Asian Pac. J. Biomed.3: 650-656.

Kavitha, A. and Vijayalakshmi, M. 2009. Cultural parameters affecting the production of bioactive metabolites by Nocardia levis MK-VL_113. Journal of Applied Sciences Research, 5: 2138-2147

Kim, C. H., Kim, S. W., Hong, S. I. 1999. An integrated fermentation separation process for the production of red pigment by *Serratia* sp. KH-95.*Process Biochemistry*. 35: 485-490.

Kiranmayi, M. U., Sudhakar, P., Sreenivasulu, K.,and Vijayalakshmi, M. 2011. Optimization of Culturing Conditions for Improved Production of Bioactive Metabolites by PSEUDONOCARDIAsp. VUK-10. Microbiology. 39: 174-181.

Konstan, M.W., and Berger, M. 1993. Infection and inflammation of the lung in cystic fibrosis. In Cystic Fibrosis, P.B. Davis, ed. (New York: Marcel Dekker, Inc.), pp. 219–276.

Kothagorla Venkata Raghava Rao and Tamanam Raghava Rao.2013. Molecular characterization and its antioxidant activity of a newly isolated *Streptomyces coelicoflavus* BC 01 from mangrove soil. J Young Pharm. 5(4): 121–126.

Lam, K.S., G. Tsueng, K.A. McArthur, S.S. Mitchell, B.C. Potts, and J. Xu. 2007. Effects of halogens on theproduction of salinosporamides by the obligatemarine actinomycete Salinispora tropica. J. Antibiot. 60: 13-19.

Lam, K.S., Mattei, J. and Forenza, S. 1989. Carbon cataboliteregulation of rebeccamycin production in *Saccharothrix aerocolonigenes*.*Journal of Industrial Microbiology*, 4(2): 105–108.

Lastcha, T. 1991. Carotenoids in aquatic animal nutrition. Proceeding of the Aquaculture Feed Processing and Nutrition Workshop, Bangkok, Thailand, sep. 19-25.

Lee, S. and D. Min, 1990. Effects, quenching mechanisms and kinetics of carotenoids in chlorophyll-sensitized photo-oxidation of soybeanoil. *J. Agric. Food Chem.*, 38: 1630-1634.

Lorian, V. 1991. Laboratory methods used to assess the activity of antimicrobial combinations. In *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 3rd edn (Lorian, V., Ed.), pp. 434–44. Williams & Wilkins Co., Baltimore, MD, USA.

Macherla VR, Liu J, Bellows C, Teisan S, Nicholson B, Lam KS and Potts BCM. 2005. Glaciapyrroles A, B and C pyrrolosesquiterpenes from a *Streptomyces* sp. isolated from an Alaskan marine sediment. *J Nat Prod* 68:780–783.

Mandelli F, Miranda VS, Rodrigues E, Mercadante AZ. Identification of carotenoids with high antioxidant capacity produced by extremophile microorganisms. World J Microbiol Biotechnol. 2012;28(4):1781–90.

Manivasagan, P., Venkatesan, J., Sivakumar, K. and Kim, S. 2014. Marine actinobacterial metabolites: Current status and future perspectives. Microbiological Research. 168: 311-332.

Martin, J.F. and Demain, A.L. 1980. Control of antibiotic synthesis. *Microbiol. Rev.*,44: 230– 251.

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.

Mayfield, C.I., Williams, S.T., Ruddick, S.M., and Hatfield, H.L. 1972. Studies on the ecology of actinomycetes in soil IV. Observation on the form and growth of streptomycetes in soil. *Soil Boil. Biochem.*,4:79-91.

Mohan kumar Thenmozhi, Siva Sindhura, Krishnan Kannabiran. 2010. Characterization of Antioxidant activity of Streptomyces species VITTK3 isolated from Puducherry Coast, India, Journal of Advanced Scientific Research, 1(2), 46-52.

Montaner, B. and P´erez-Tomas, R. 2003. The prodigiosins: a newfamily of anticancer drugs. *Current Cancer Drug Targets*, 3 (1): 57–65.

Murray, R. G. E., D. J. Brenner, R. R. Colwell, P. De Vos, M. Goodfellow, P. A. D. Grimont, N. Pfennig, E. Stackebrandt, and G. A. Zavarzin. 1990. Report of the ad hoc committee on approaches to taxonomy within the *Proteobacteria*. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 40: 213-215.

Nawar, W.W. 1996. Lipid. In O. R. Fennema. Food Chemistry. 210-243. New York.

Parekh, S., Vinci, V. A. and Strobel, R. J. 2000. Improvement of microbial strains and fermentation processes.*Applied Microbiology and Biotechnology,* 54: 287-301.

Pelah, D., Stinov, A. and Cohen, E. 2004. The effect of salt stress on the production of canthaxanthin and astaxanthin by *Chlorella zofingiesis* grown under limited light intensity. *J. Micro. Biotech*., 20: 483-486.

Piel, J. 2004. Metabolites from symbiotic bacteria.*Nat. Prod.Rep*., 21: 519-538.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C., 1999, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, Free Radical Biol. Med. 26: 1231-1237.

Ruan, J. S. 1994. Rapid isolation and identification of actinomycetes in UNESCO Southest Asia Regional Trainning Workshop "Rapid Method in microbio;ogy and Biotechnology" Dept of microbiology.

Samrot, V. Chadana, K. Senthil kumar, P and Narendra kumar,G. 2011.Optimization of prodigiosin production by *Serratia marcescens* SU- 10and evalution of its bioactivity.*International research journal ofBiotechnology.,*2(5):128-133.

Sardaryan, H., Zihlova, R., Strnad, Z. andCermakoya, C. 2004. Arpink Red– Meet a new natural red food colorant of microbial origin. In: Pigments in Food, More than Colours. L. Dufossé (ed) Université de Bretagne Occidentale, Quimper France, pp207-208.

Selvin, J., S. Shanmughapriya, R. Gandhimathi, G. Seghal Kiran, T. Rajeetha Ravji, K. Natarajaseenivasan, and T.A. Hema. 2009. Optimizationand production of novel antimicrobial agents fromsponge associated marine actinomycetesNo cardiopsis dassonvillei MAD08. Appl. Microbiol. Biotechnol., 83: 435-445.

Shin J.H., Jeong H.S., Lee H.S., Park S.K., Kim H.M., Kwon H.J. 2007. Isolationand structure determination of streptochlorin, an antiproliferativeagent from a marine-derived *Streptomyces*sp. 04DH110.*J. Microbiol. Biotechnol*.,17(8): 1403-1406.

SINGLETON, V.L., ORTHOFER, R., LAMUELA-RAVENTOS, R.M. (1999): Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Methods Enzymol. 299, 152-178.

Srivibool, R. and Watanadilok, R. 2015. Distribution of actinomycetes in Thai mangrove sediments. In the proceeding of Burapha University International Conference 2015.

Srivibool R. and Sukchotiratana, M. 2006. Bioperspective of actinomycetes isolates from coastal soils : A new source of antimicrobial producers. Songklanakarin *J. Sci. Technol.* 28(3) : 493-499.

S.R., Maenhaut-Michel, G., Yamada, M., Yamamoto, Y., Matsui, K., Sofuni, T., Nohmi, T. and Ohmori, H. 1997. Multiple pathways for SOS-induced mutagenesis in *Escherichia coli*: an overexpression of *dinB*/*dinP* results in strongly enhancing mutagenesis in the absence of any exogenous treatment to damage DNA. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 94, 13792–13797.

Stackebrandt, E. and B. M. Goebel. 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in Bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol***.** 44: 846-849.

Stackebrandt, E. and W. Liesack. 1993. Nucleic acids and classification, pp.151-194. *In* M. Goodfellow and A. G. O' Donnell eds., **Handbook of New Bacterial Systematics.** Academic Press Ltd., London.

Stackebrandt E, Ebers J. 2006. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. Microbiol Today 33:152–155.

Stackebrandt, E., W. Frederiksen, G. M. Garrity, P. A. D. Grimont, P. Kampfer, M. C. J. Maiden, X. Nesme, R. Rossello-Mora, J. Swings, H. G. Truper, L. Vauterin, A. C. Ward and W.B. Whitman. 2002. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol***.** 52: 1043-1047.

Subramani, R. and Avalbersberg, W. 2012. Marine actinomycetes: An ongoing source of novel bioactive metabolites. *Microbiological Research*. 167 : 571-580.

Takahashi, Y. 2004. Exploitation of new microbialresources for bioactive compounds and discovery ofnewactinomycetes.*Actinomycetologica*, 18: 54-61.

Tanaka, Y. and Omura, S. 1990. Metabolism andproducts of actinomycetes-anintroduction.*Actinomycetologica*, 4: 13-14. 23.

Tereshina, V., Feofilova, E., Memorskaya, A., Vakulova, L. and Terent'ev, P. 1996.Effects of azines on lycopene formation in the mycelial fungus *Blakeslea trispora*.*App. Biochem. Microbiol*., 32: 388-390.

Tibor, C. 2007. Liquid chromatography of natural pigments and synthetic dyes. *J. ChromatographyLibrary*, 71: 11-19.

Tsueng, G., S. Teisan, and K.S. Lam. 2008. Defined saltformulations for the growth of Salinispora tropica strain NPS21184 and the production of salinosporamide A (NPI-0052) and relatedanalogs. Appl. Microbiol. Biotechnol. 78: 827-832.

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.

Vandamme, P., B. Pot, M. Gillis, P. De Vos, K. Kersters and J. Swing. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev***.** 60: 407-438.

Velioglu, Y. S., Mazza, G., Gao, L. and Oomah, B. D. 1998. Antixoidant Acitivity and Total Phenolic in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products. J. Agric Food Chem. 46"4113-4117.

Voest, E.E., Vreugdenhil, G. and Marx, J. (1994). "Iron- chelating agents in non-iron overloadconditions." **Annals of Internal Medicine** 120: 490-499.

Wang, B., Lin, L., Lu, L., Chen, W. 2012. Optimization of β- carotene production by a newly isolated *Serratia marcescens* strain. *Electronic Journal of Biotechnology,* 15(6)-fulltext-4.

Wang, X. Huang, L., Buchenauer, H. and Gao, X. 2010. Optimization of the Fermentation Process of Actinomycete Strain Hhs.015^{T}. Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2010.

Williamson, N.R., Fineran, P.C., Gristwood, T., Chawrai, S.R., Leeper, F.J. and Salmond, G. P. C. 2007. Anticancer and immunosuppressive properties of bacterial prodiginines.*Future Microbiology*, 2 (6): 605–618.

Wu, S.J., Fotso, S., Li, F., Qin, S., Kelter, G., Fiebig, H.H., *et al*. 2006. N-carboxamido-staurosporine and selina-4(14), 7(11)-diene- 8,9-diol, new metabolites from a marine *Streptomyces*sp. *J Antibiot*., 59(6): 331-337.

Yang, B., Yang, H., Li, J., Li, Z. and Jiang, Y. 2011. Amino acid composition, molecular weight distribution and antioxidant activity of protein hydrolysates of soy sauce lees. Food Chemistry 124: 551-555.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. ISP2 (Atlas, 2010) มีส่วนประกอบดังนี้

Yeast extract	4	กรัม
Dextrose	4	กรัม
Malt extract	10	กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำทะเลธรรมชาติความเค็ม 17 ppt ปริมาตร 1 ลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. ISP3 (Atlas, 2010) มีส่วนประกอบดังนี้

Oatmeal	10	กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำทะเลธรรมชาติความเค็ม 17 ppt ปริมาตร 1 ลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. ISP5 (Atlas, 2010) มีส่วนประกอบดังนี้

Glycerol	10	กรัม
L- Asparagine	1	กรัม
K_2HPO_4	1	กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำทะเลธรรมชาติความเค็ม 17 ppt ปริมาตร 1 ลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. Oatmeal Yeast extract Carboxymethyl cellulose (OYG) มีส่วนประกอบดังนี้

Oatmeal	10	กรัม
Yeast extract	4	กรัม
Glycerol	10	กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำทะเลธรรมชาติความเค็ม 17 ppt ปริมาตร 1 ลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. Actinomycete Isolation Agar (AIA) มีส่วนประกอบดังนี้

Agar	15.0	กรัม
Glycerol	5.0	กรัม
Sodium propionate	4.0	กรัม
Sodium caseinate	2.0	กรัม
K_2HPO_4	0.5	กรัม
Asparagine	0.1	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1	กรัม
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	1.0	มิลลิกรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 1 ลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6. Starch Casein Agar (SCA)

Soluble Starch	10.0	กรัม
Casein	1.0	กรัม
K_2HPO_4	0.5	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Trace salt solution	1	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 1 ลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

7. วิธีเตรียมสารละลาย 0.2 mM DPPH ในเมทานอล ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

- ชั่ง DPPH 0.00394 กรัม ละลายด้วยเมทานอล ในขวดปรับปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร เก็บไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 4.0 องศาเซลเซียส สารละลายที่ได้เก็บได้ไม่เกิน 3 วัน

8. วิธีเตรียมสารละลาย 7 mM ABTS$^{\bullet+}$

- ชั่ง 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 และสารละลายโพแทสเซียมเปอร์วัลเฟต 140 mM 35.5 ไมโครลิตร (ซึ่งทำให้ความเข้มข้นสุดท้ายของโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟตประมาณ 2.45 mM) ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมงก่อนนำไปใช้งาน

- เจืองจางสารละลายอนุมูล ABTS$^{\bullet+}$ ด้วยเมทานอล โดยปิเปตสารละลาย ABTS$^{\bullet+}$ ตั้งต้นมา 140 ไมโครลิตร กับเมทานอล 7 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.07±0.02 ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร

9. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Ascorbic acid

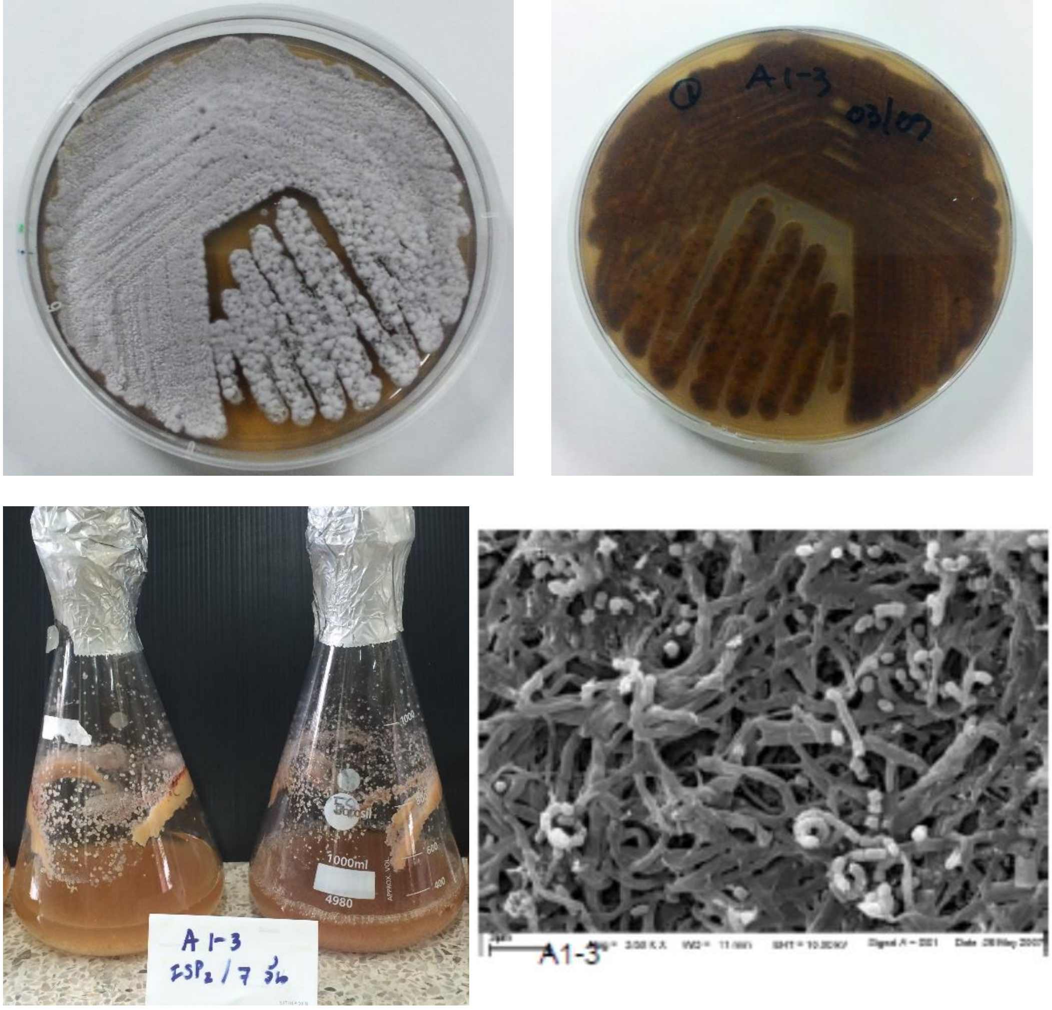
- ชั่ง Ascorbic acid 0.001 กรัม (จดบันทึกที่แน่นอน) ละลายด้วยเมทานอล 1000 ไมโครลิตร สารละลายที่ได้เป็นสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

10. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Trolox

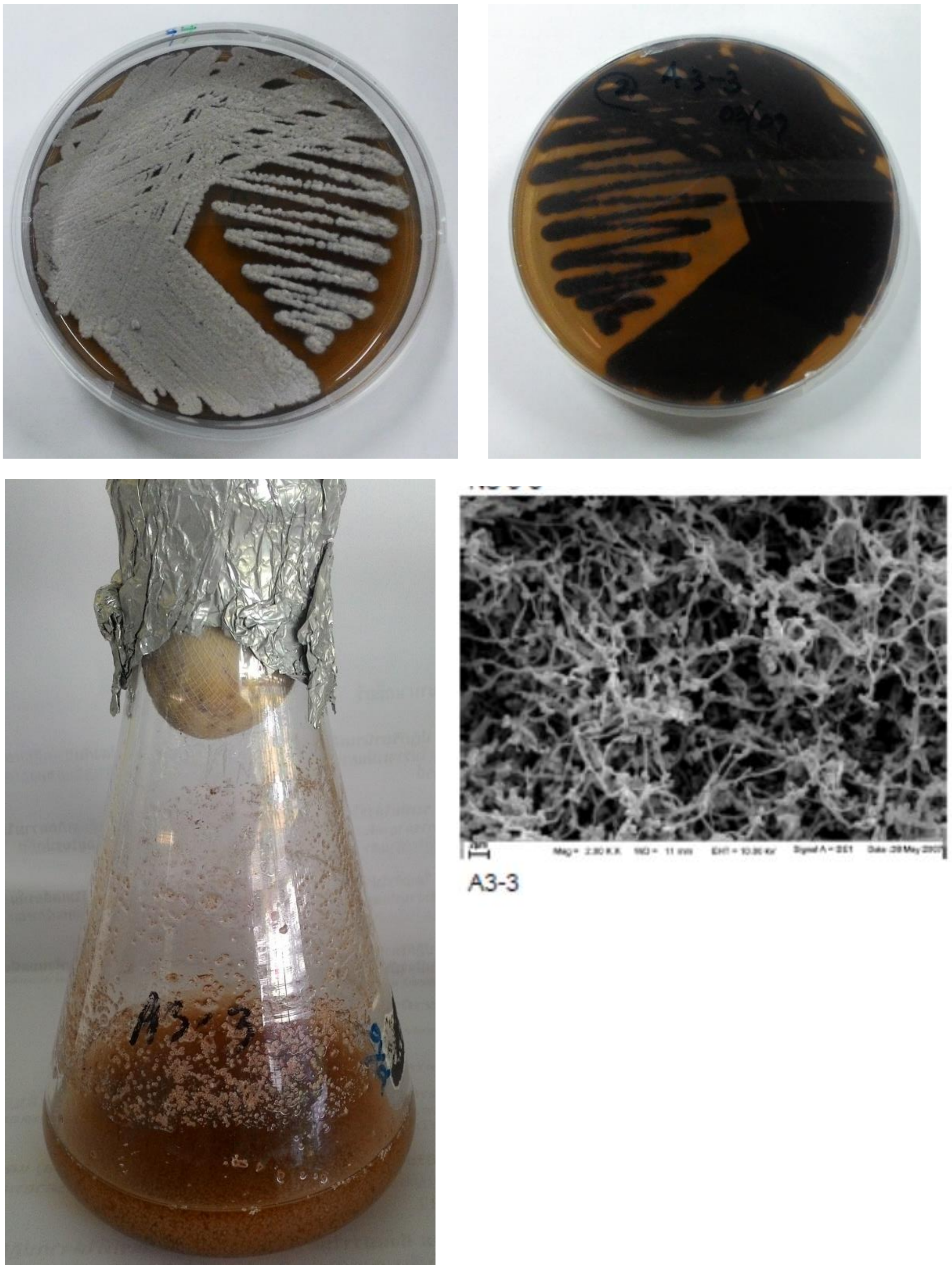
- ชั่ง trolox 0.001 กรัม (จดบันทึกที่แน่นอน) ละลายด้วยเมทานอล 1000 ไมโครลิตร สารละลายที่ได้เป็นสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

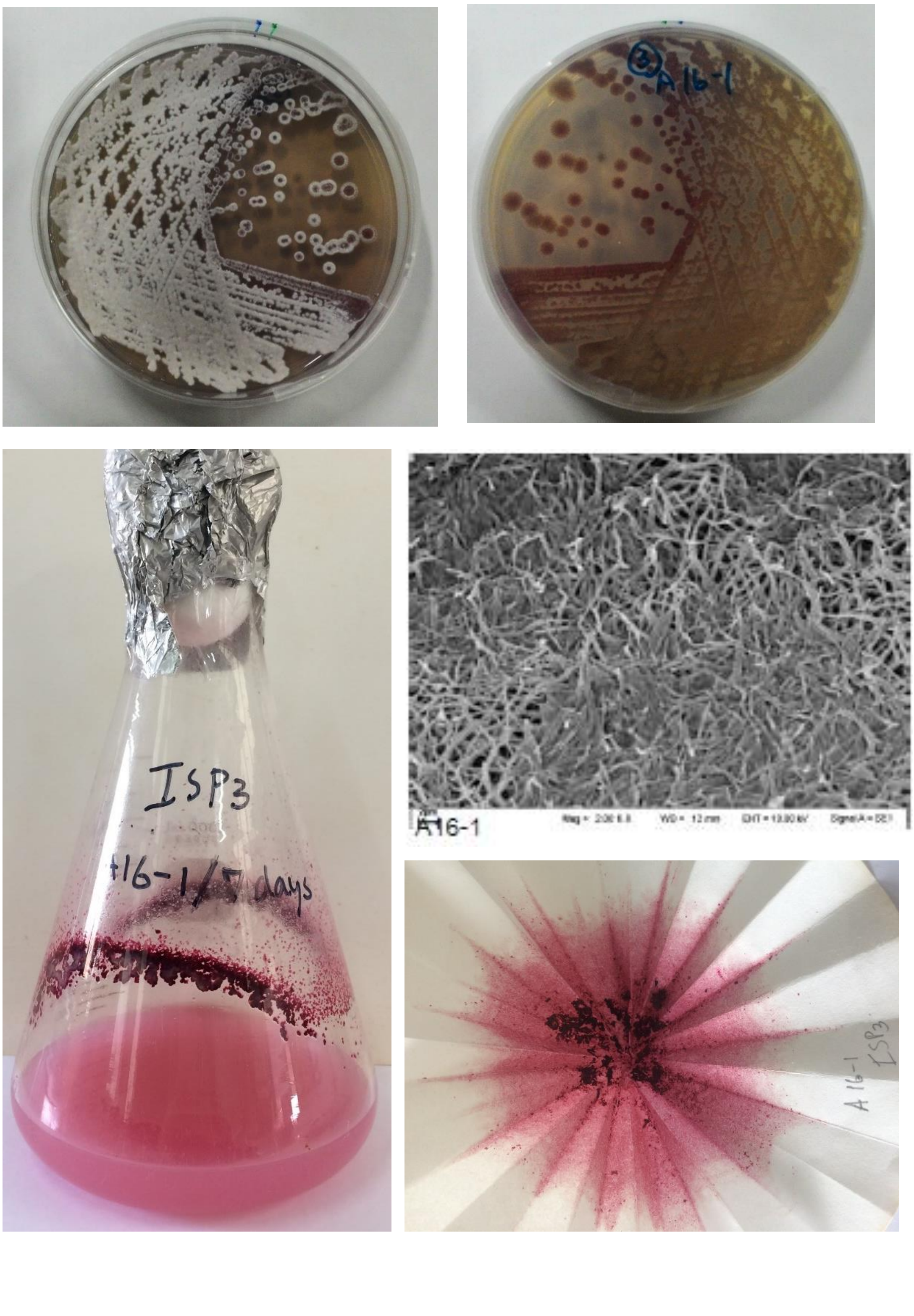
สัณฐานและภาพ SEM ของเชื้อแอคติโนมัยซีท



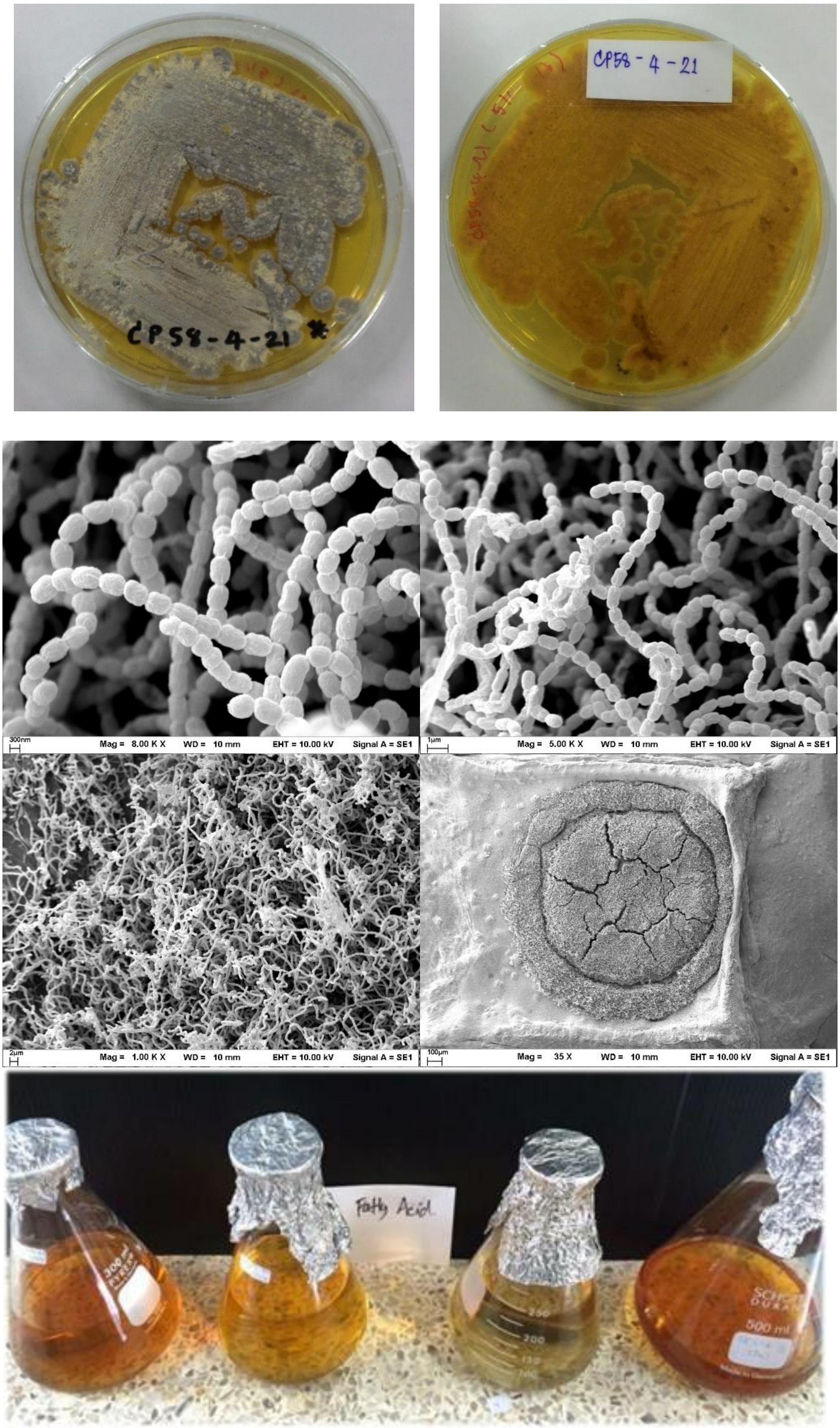
ภาพที่ ข-1 สัณฐานของเชื้อแอคติโนมัยซีท *Streptomyces indiaensis* (A1-3)



ภาพที่ ข-2 สัณฐานของเชื้อแอคติโนมัยซีท *Streptomyces indiaensis* (A3-3)



ภาพที่ ข-3 สัณฐานของเชื้อแอคติโนมัยซีท *Streptomyces coelicoflavu*



ภาพที่ ข-4 สัณฐานของเชื้อแอคติโนมัยซีท *Streptomyces parvulus*

ภาคผนวก ค

ลำดับเบสของเชื้อแอคติโนมัยซีท 16S rRNA gene

ลำดับเบสของเชื้อแอคติโนมัยซีท *Streptomyces indiaensis* (A1-3)

TCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCTTCGGGGTG
GATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTG
GAAACGGGGTCTAATACCGGATACTGACCACTGGGGGCATCCTTGGTGGTCGAAAGCTCCGGC
GGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAGTGGCTCACCAAGGCGACGA
CGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTAC
GGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAG
GGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGC
AGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTC
CGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCACGTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGC
TTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCT
GGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGC
CGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA
CGCCGTAAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCAGCTAACGC
ATTAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC
CGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGAC
ATACACCGGAAACGTCCAGAGATGGGCGCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCT
GTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCGTG
TTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGCTGGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAA
GGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCC
GGTACAATGAGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATT
GGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGG
TGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAG
CCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGA

ลำดับเบสของเชื้อแอคติโนมัยซีท *Streptomyces indiaensis* (A3-3)

ACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCTTCGGGGTGGATTA

GTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAAC

GGGGTCTAATACCGGATACTGACCACTGGGGGCATCCTCGGTGGTCGAAAGCTCCGGCGGTGC

AGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAGTGGCTCACCAAGGCGACGACGGGT

AGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAG

GCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATG

ACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAG

AAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAA

TTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCGCGTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACC

CCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTA

GCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATAC

TGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT

AAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGT

GCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAA

GCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACC

GGAAACGTCCAGAGATGGGCGCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCA

GCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCGTGTTGCCAG

CAGGCCCTTGTGGTGCTGGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGG

ACGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAA

TGAGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCT

GCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATAC

GTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGGAAGCCGGT

GGCCCAACCCCTTGTGGGAGGGAGCTGTCGAAGGTGGGACTGGCGTTGGAC

ลำดับเบสของเชื้อแอคติโนมัยซีท *Streptomyces coelicoflavu*

CGTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCTTCGGGG

TGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCT

GGAAACGGGGTCTAATACCGGATACTGACCATCTTGGGCATCCTTGATGGTGGAAAGCTCCGGC

GGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGA

CGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTAC

GGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAG

GGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGC

AGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTC

CGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCGCGTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGC

TTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCT

GGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGC

CGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA

CGCCGTAAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCAGCTAACGC

ATTAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC

CGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGAC

ATACACCGGAAACGTCCAGAGATGGGCGCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCT

GTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCGTT

TGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGCTGGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAG

GTGGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCC

GGTACAATGAGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGAAT

TGGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGC

GGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCG

AAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAAAGGAGCTGTCGAAAGTGGGACTGGCGATTGGACA

ลำดับเบสของเชื้อแอคติโนมัยซีท *Streptomyces parvulus*

>151116-55_G05_CP58-4-21_907R.ab1 886

ACCAGTGGCTCTCCAGGCGGGGCACTTAATGCGTTAGCTGCGGCACGGACAACGTGGAATGTT

GCCCACACCTAGTGCCCACCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTCGCTCCC

CACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTATCGGCCCAGAGATCCGCCTTCGCCACCGGTGTTCCTCC

TGATATCTGCGCATTTCACCGCTACACCAGGAATTCCGATCTCCCCTACCGAACTCTAGCCTGC
CCGTATCGACTGCAGACCCGGGGTTAAGCCCCGGGCTTTCACAACCGACGTGACAAGCCGCCTA
CGAGCTCTTTACGCCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCGCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGG
CACGTAGTTAGCCGGCGCTTCTTCTGCAGGTACCGTCACTTTCGCTTCTTCCCTGCTGAAAGAG
GTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCCCTCACGCGGCGTCGCTGCATCAGGCTTTCGCCCATTGTG
CAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGT
CGCCCTCTCAGGCCGGCTACCCGTCGTCGCCTTGGTGAGCCATTACCTCACCAACAAGCTGATA
GGCCGCGGGCTCATCCTGCACCGCCGGAGCTTTCGACCTTCACAGATGCCCGTGAAGGTCAGTA
TCCGGTATTAGACCCCGTTTCCAGGGCTTGTCCCAGAGTGCAGGGCAGATTGCCCACGTGTTAC
TCACCCGTTCGCCACTAATCCCCACCGAAGTGGTTCATCGTTCGACTTGCATGTGTTAAGCACG
CCGCCAGCGTTCGTCCTGAGCGGTAAAAAAATCTAAAAAGGTCGGGGGTTTCGGC

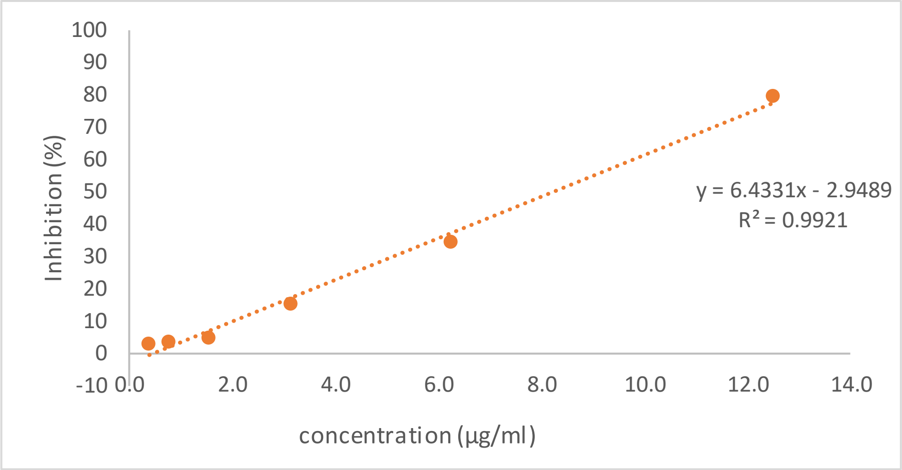
>151116-55_E05_CP58-4-21_785F.ab1 737

GGCCGACTGTGGGATAGGGTGTGGGCACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCAGCTAACGCATTAAG
TGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACA
AGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACAC
CGGAAACGTCCAGAGATGGGCGCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTC
AGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCGTGTTGCCA
GCAGGCCCTTGTGGTGCTGGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGG
GACGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACA
ATGAGCTGCGATACCGCAAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTC
TGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATA
CGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGT
GGCCCAACCCCTTGTGGGAGGGAGCTGTCGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAGTCGTAA
CAGGTAAAACCCGTAAAAAAGGGGGGGCGGGTTGATTT

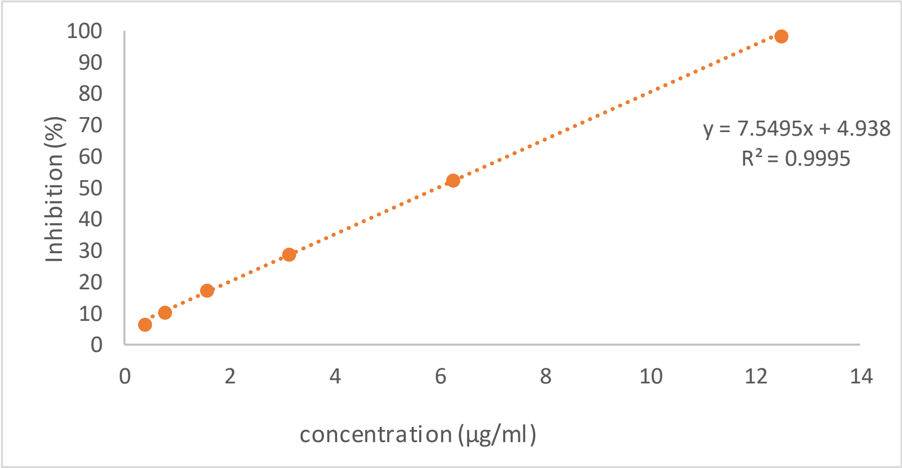
ภาคผนวก ง

กราฟการยับยั้งอนุมูลอิสระ $ABTS^{\cdot+}$ ของสารละลายมาตรฐาน

Ascorbic acid และ Trolox



ภาพที่ ง-1 กราฟการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS$^{\bullet +}$ ของสารละลายมาตรฐาน Ascorbic acid



ภาพที่ ง-2 กราฟการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS$^{\bullet +}$ ของสารละลายมาตรฐาน Trolox

ภาคผนวก จ

ข้อมูลการตายของอาร์ทีเมียตาม ณ เวลาต่างๆ

ตารางที่ จ-1 การทดสอบผลของความเป็นพิษของ Dimethyl Sulfoxide (DMSO) ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันต่อการตายของอาร์ทีเมียจำนวน 10 ตัว

DMSO: Seawater	**ช่อง/ซ้ำ**	**การตายของอาร์ทีเมียตาม ณ เวลาต่างๆ (ชั่วโมง)**									
		1	**2**	**4**	**6**	**8**	**16**	**24**	**30**	**42**	**48**
Positive control	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Positive control	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Positive control	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
100:400	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2
	2	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4
200:300	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	4
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
300:200	1	0	0	0	0	0	0	1	1	10	10
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	10	10
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	10	10
400:100	1	0	0	0	0	0	0	0	10	10	10
	2	0	0	0	0	0	0	5	10	10	10

ตารางที่ จ-2 ผลของสารสกัดจากแอคคติโนมัยซีท A1-3 ต่อการตายของอาร์ทีเมียจำนวน 10 ตัว

ความเข้มข้นของสารสกัดแอคติโนมัยซีท (ppm)	ช่อง/ซ้ำ	การตายของอาร์ทีเมียตาม ณ เวลาต่างๆ (ชั่วโมง)									
		1	2	4	6	8	16	24	30	42	48
4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3
	2	0	0	0	0	0	0	0	1	4	5
	3	0	0	0	0	0	0	0	2	7	7
8	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
	2	0	1	1	1	1	1	1	1	2	3
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2
12	1	0	0	0	0	0	0	2	2	2	5
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3
	3	0	0	0	0	0	0	1	1	1	2
16	1	0	0	0	0	0	2	2	2	2	3
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	4
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2
20	1	0	0	0	0	0	0	0	1	5	5
	2	0	0	0	0	0	1	1	1	2	2
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	4	6
50	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
100	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
	2	0	0	0	0	0	0	1	1	2	4
	3	0	0	0	0	0	1	1	1	1	6

ตารางที่ จ-2 ผลของสารสกัดจากแอคคติโนมัยซีท A1-3 ต่อการตายของอาร์ทีเมียจำนวน 10 ตัว (ต่อ)

ความเข้มข้นของสารสกัดแอคติโนมัยซีท (ppm)	ช่อง/ซ้ำ	การตายของอาร์ทีเมียตาม ณ เวลาต่างๆ (ชั่วโมง)									
		1	2	4	6	8	16	24	30	42	48
200	1	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2
	3	0	0	0	0	0	0	1	0	2	2
Positive Control	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Negative Control	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	2	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ตารางที่ จ-3 ผลของสารสกัดจากแอคคติโนมัยซีท A3-3 ต่อการตายของอาร์ทีเมียจำนวน 10 ตัว

ความเข้มข้นของสารสกัดแอคติโนมัยซีท (ppm)	ช่อง/ซ้ำ	การตายของอาร์ทีเมียตาม ณ เวลาต่างๆ (ชั่วโมง)									
		1	2	4	6	8	16	24	30	42	48
20	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	3	8
	3	0	0	0	0	0	1	0	0	0	7
50	1	0	0	0	0	0	0	0	2	3	9
	2	0	0	0	0	0	0	0	2	3	8
	3	0	0	0	0	0	0	2	0	0	7
100	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	7
	2	0	0	0	1	1	1	2	2	3	6
	3	0	0	0	0	0	0	1	2	2	7
200	1	0	0	0	0	0	0	1	2	2	9
	2	0	0	0	0	0	0	0	1	2	8
	3	0	0	0	0	0	0	1	2	2	8
Positive Control	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Negative Control	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	6
	2	0	0	0	0	0	0	0	2	5	8
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	3	6

ตารางที่ จ-4 ผลของสารสกัดจากแอคคติโนมัยซีท A16-1 ต่อการตายของอาร์ทีเมียจำนวน 10 ตัว

ความเข้มข้นของสารสกัดแอคติโนมัยซีท (ppm)	ช่อง/ซ้ำ	การตายของอาร์ทีเมียตาม ณ เวลาต่างๆ (ชั่วโมง)									
		1	2	4	6	8	16	24	30	42	48
20	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	6
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	5
	3	0	0	0	0	0	0	0	1	1	7
50	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	8
	2	0	0	0	0	0	0	0	4	3	9
	3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	4
100	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2
140	1	0	0	0	0	0	1	3	3	3	5
	2	0	0	0	0	0	0	2	3	3	6
	3	0	0	0	0	0	0	1	3	3	4
160	1	0	0	0	0	0	1	5	6	7	9
	2	0	0	0	0	0	2	5	8	9	10
	3	0	0	0	0	0	1	5	5	7	9
200	1	0	0	0	0	0	2	7	7	8	9
	2	0	0	0	0	0	3	7	10	10	10
	3	0	0	0	0	0	2	7	7	9	9
Positive Control	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
Negative Control	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4

ตารางที่ จ-5 ผลของสารสกัดจากแอคคติโนมัยซีท CP58-4-21 ต่อการตายของอาร์ทีเมียจำนวน 10 ตัว

ความเข้มข้นของสารสกัดแอคติโนมัยซีท (ppm)	ช่อง/ซ้ำ	การตายของอาร์ทีเมียตาม ณ เวลาต่างๆ (ชั่วโมง)									
		1	2	4	6	8	16	24	30	42	48
10	1	0	0	0	0	0	0	0	0	3	9
	2	0	0	0	0	0	0	0	2	3	5
	3	0	0	0	0	0	0	0	2	3	5
20	1	0	1	1	1	1	1	1	0	3	5
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4
	3	0	0	0	0	0	0	1	1	5	5
50	1	0	0	0	0	0	0	0	1	6	9
	2	0	0	0	0	0	0	0	1	6	9
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	7	9
60	1	0	0	0	0	0	0	1	3	7	10
	2	0	0	0	0	0	1	1	1	9	9
	3	0	0	0	0	0	0	1	4	8	10
70	1	0	0	0	0	0	0	3	5	9	10
	2	0	0	0	0	0	1	5	6	9	10
	3	0	0	0	0	0	0	6	6	8	10
80	1	0	0	0	0	0	0	4	7	9	10
	2	0	0	0	0	0	0	5	6	10	10
	3	0	0	0	0	0	0	5	6	10	10
100	1	0	1	1	1	1	2	8	10	10	10
	2	0	0	0	0	0	2	7	10	10	10
	3	0	0	0	0	0	0	9	10	10	10

ตารางที่ จ-5 ผลของสารสกัดจากแอคคติโนมัยซีท CP58-4-21 ต่อการตายของอาร์ทีเมียจำนวน 10 ตัว (ต่อ)

ความเข้มข้นของสารสกัดแอคติโนมัยซีท (ppm)	ช่อง/ซ้ำ	การตายของอาร์ทีเมียตาม ณ เวลาต่างๆ (ชั่วโมง)									
		1	2	4	6	8	16	24	30	42	48
200	1	0	0	0	0	0	0	9	10	10	10
	2	0	0	0	1	1	1	9	10	10	10
	3	0	0	0	0	0	0	9	10	10	10
Positive Control	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4
	3	0	0	0	0	0	0	0	2	3	3
Negative Control	1	0	0	0	0	0	0	0	1	3	8
	2	0	0	0	0	0	0	0	1	3	9
	3	0	0	0	0	0	0	0	2	1	7

ผลผลิต

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับชาติ

จันทร์จรัส วัฒนะโชติ, ณิษา สิรนนท์ธนา, รวิวรรณ วัฒนดิลก และ ภูมิภัทร ภักดี. 2560. สภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์จากเชื้อ *Streptomyces parvulus* ที่แยกได้จากดินตะกอนป่าชายเลน. แก่นเกษตร 45 ฉบับพิเศษ 1. หน้า 865-871.

การนำเสนอผลงานรูปแบบโปสเตอร์ในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

Janjarus Watanachote, Nisa Siranonthana and Rawiwan Watanadilok. 2017. Biological Activity of Crude Extract from *Streptomyces parvulus* Isolated from Mangrove sediment. The 6th Burapha University International Conference 2017.

Nisa Siranonthana, Janjarus Watanachote and Rawiwan Watanadilok. 2017**.** The effect of salinity of culture media for antioxidant activity of *Streptomyces indiaensis* isolated from mangrove sediment. The 6th Burapha University International Conference 2017.

สภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ จากเชื้อ *Streptomyces parvulus* ที่แยกได้จากดินตะกอนป่าชายเลน

Optimization of culture conditions for antimicrobial compounds from *Streptomyces parvulus* isolated from mangrove sediment

จันทร์จรัส วัฒนะโชติ[1*], นิสา สิรนนท์ธนา[1], รวิวรรณ วัฒนดิลก[1] และ ภูมิภัทร ภักดี[1]

Janjarus Watanachote[1*], Nisa Siranonthana[1], Rawiwan Watanadilok[1] and Phummiphat Phakdee[1]

บทคัดย่อ: งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของความเค็มและอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาณสารสกัดหยาบและการออกฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของเชื้อแอคติโนมัยซีททะเล *Streptomyces parvulus* จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว ISP2 ที่ความเค็ม 7 ระดับ แล้วทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย 3 ชนิด *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* และเชื้อรา *Candida albicans* พบว่าความเค็มของน้ำทะเลที่ใช้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ 35 ppt ให้ปริมาณสารสกัดหยาบมากที่สุดจากส่วนของน้ำเลี้ยง และการเลี้ยงเชื้อที่ความเค็ม 40 ppt สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้ดีที่สุด (20±1มิลลิเมตร) แต่ไม่แตกต่างจากความเค็มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) นอกจากนี้ยังพบว่าอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อต่างชนิดกันมีผลต่อการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราอย่างชัดเจน โดยเชื้อที่เลี้ยงในอาหารสูตร ข้าวโอ๊ต ยีสต์สกัด และกลีเซอรอล ผลิตสารที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราดังกล่าวได้ดีที่สุด และแตกต่างจากการเลี้ยงเชื้อในอาหาร ISP2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

คำสำคัญ: แอคติโนมัยซีททะเล, *Streptomyces parvulus*, สารยับยั้งแบคทีเรีย

ABSTRACT: The aim of this research was to study the influence of salinity and culture media on growth of marine actinomycete, *Streptomyces parvulus*, to produce high yield of crude extract and their antimicrobial activities. Antibacterial and antifungal activities were observed against *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* and fungus *Candida albicans*. *S. parvulus* was cultured in seven levels of salinity of natural sea water and using ISP2 as culture medium. It was found that salinity at 35 ppt gave the highest yield of crude extracts from supernatant. In addition, crude extract from cells which cultured at salinity 40 ppt showed the highest inhibition zone against *E. coli* at 20±1mm not significant difference with other salinity (P>0.05). Cultivation of actinomycete with different medium fomulas affected for the bioactive metabolites production. The actinomycete cultured in formula, Oatmeal Yeast Extract and Glycerol medium produced substances that inhibited those bacteria and fungus higher than ISP2

statistically significant (P<0.05).

Keywords: marine actinomycete, *Streptomyces parvulus*, antibacterial compounds

[1] สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา อ. เมือง ชลบุรี
Institute of Marine Science, Burapha University, Chonburi

* Corresponding author: janjarus@buu.ac.th

สภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์จากเชื้อ *Streptomyces parvulus* ที่แยกได้จากดินตะกอนป่าชายเลน

Optimization of culture conditions for antimicrobial compounds from *Streptomyces parvulus* isolated from mangrove sediment

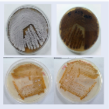
จันทร์จรัส วัฒนะโชติ*, ณิษา สิรนนท์ธนา, รวิวรรณ วัฒนดิลก และ ภูมิภัทร ภักดี

Janjarus Watanachote*, Nisa Siranonthana, Rawiwan Watanadilok and Phummiphat Phakdee

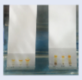
สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา อ.เมือง ชลบุรี Institute of Marine Science, Burapha University, Chonburi

* Corresponding author: janjarus@buu.ac.th

บทนำ



แอคติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่สามารถสร้างเส้นใยเป็นสายยาว โคโลนีของแอคติโนมัยซีทมีลักษณะทึบแสง เส้นใยเหนือผิวอาหารแห้ง และสามารถสร้าง รงควัตถุสีต่างๆได้



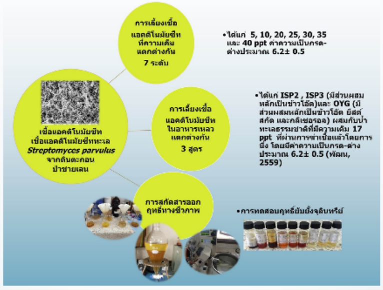
แอคติโนมัยซีทเป็นแหล่งสำคัญของการสร้างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive Compound) เช่น สารปฏิชีวนะ สารต้านมะเร็ง อาหารเสริม และรงควัตถุ เป็นต้น (Manivasagan et al., 2014)

ด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีการวิจัยที่แยกและคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีศักยภาพสำหรับประยุกต์ใช้เป็นโพรไบโอติกเพื่อป้องกันโรค เสริมภูมิคุ้มกัน หรือควบคุมคุณภาพน้ำในบ่อเพาะเลี้ยง (Bernal et al., 2015)

วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาการเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากทะเล โดยศึกษาผลของความเค็มและชนิดของอาหาร เพื่อเพิ่มปริมาณสารสกัดหยาบและการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

วิธีทดลอง



การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์

ได้แก่ เชื้อแบคทีเรีย *E. coli, B. subtilis, S. aureus* TISTR 517 และเชื้อรา *C. albicans* TISTR 5239

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's multiple rang test ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ใช้โปรแกรม R version 3.3.1 (Ihaka and Gentleman, 1996)

ผลการทดลอง

ผลของความเค็มต่อน้ำหนักสารสกัดหยาบ และความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

จากการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทในอาหารเหลว ISP2 โดยใช้ความเค็มน้ำทะเลธรรมชาติในการเตรียมแตกต่างกัน 7 ระดับ พบว่าที่ความเค็ม 35 ppt ได้น้ำหนักสารสกัดหยาบจากส่วนน้ำเลี้ยงมากที่สุด 74.5 มิลลิกรัม และจากส่วนของเซลล์ 61.1 มิลลิกรัม รองลงมาคือที่ความเค็ม 40 ppt ได้น้ำหนักสารจากส่วนน้ำเลี้ยง 43.5 มิลลิกรัม และจากส่วนของเซลล์ 41.7 มิลลิกรัม (Table 1) ผลของความเค็มต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ แสดงใน Figure 1A-1D พบว่าสารสกัดหยาบจากเซลล์ที่ได้จาก การเลี้ยงเชื้อที่ความเค็ม 40 ppt สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้ดีที่สุด มีบริเวณยับยั้ง 20±1 มิลลิเมตร แต่ไม่แตกต่างจากความเค็มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

Table 1 The effect of salinity and media for weight of crude extracts from cells and supernatant of *S. parvulus* cultivation.

Crude extracts	Weight of crude extracts (mg)						
	Salinity of natural sea water (ppt) / ISP2						
	5	10	20	25	30	35	40
Crude extract from cells	22.4	30.7	62.2	31.6	29.7	61.1	41.7
Crude extract from supernatant	20.7	26.4	30.1	32.3	37.2	74.5	43.5
	Medium (salinity 17 ppt)						
		ISP2		ISP3		OYG	
Crude extract from cells		53.3		133.1		104.9	
Crude extract from supernatant		29.8		31.5		35.8	

ผลของอาหารต่อน้ำหนักสารสกัดหยาบและความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

จากการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทในอาหารเหลวแตกต่างกัน 3 สูตร พบว่าเชื้อที่เลี้ยงในอาหาร OYG ความเค็ม 17 ppt สารสกัดหยาบจากส่วนของน้ำเลี้ยงสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ได้ดีที่สุดมีบริเวณยับยั้ง 24 มิลลิเมตรและแตกต่างจากการเลี้ยงเชื้อในอาหาร ISP2 และ ISP3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

สารสกัดหยาบจากเซลล์ที่เลี้ยงในอาหาร ISP2 และ ISP3 สามารถยับยั้ง *C. albicans* ได้ดีที่สุดมีบริเวณยับยั้ง 21.5±0.7 และ 22.5±0.7 มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากการเลี้ยงในอาหารOYG ที่ให้ผลการยับยั้งน้อยที่สุด (P>0.05) (Figure 1E-1H)

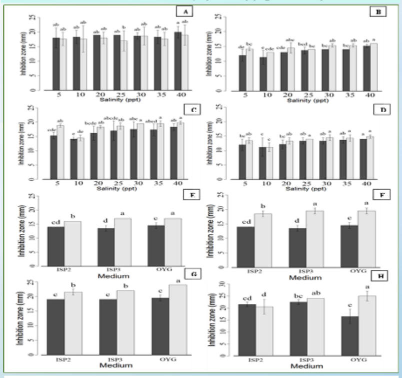


Figure 1 Optimization of salinity and media for antibacterial and antifungal activities against *E. coli, B. subtilis, S. aureus* and *C. albicans* ; A) and E) *E. coli,* B) and F) *B. subtilis,* C) and G) *S. aureus,* D) and H) *C. albican*
■ crude extract from cells □ crude extract from supernatant

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

* จากการศึกษาสภาวะในการเลี้ยงเชื้อ *S. parvulus* พบว่าความเค็มและอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อปริมาณสารสกัดหยาบทั้งจากส่วนของเซลล์และน้ำเลี้ยง โดยที่ความเค็มมีผลต่อปริมาณสารสกัดหยาบจากส่วนของเซลล์และน้ำเลี้ยงมากกว่าความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์อย่างชัดเจน
* ชนิดของอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อมีผลต่อปริมาณสารสกัดหยาบและความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์
* ความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ส่วนใหญ่อยู่ในน้ำเลี้ยงมากกว่าอยู่ในเซลล์
* การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากทะเลหรือดินตะกอนป่าชายเลน ต้องคำนึงถึงความเค็มของน้ำทะเลที่ใช้เตรียมอาหาร ชนิดของอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ ชนิดของเชื้อที่สนใจศึกษา ผลการออกฤทธิ์ และต้นทุนของอาหาร

เอกสารอ้างอิง

พัฒน ศิลปขัน. 2559. ประสิทธิภาพของแอคติโนมัยซีททะเลในการผลิตไฮโดรไลติกเอนไซม์เพื่อบำบัดน้ำเสียจากโรงงานแป้งมัน. ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต. สาขาเทคโนโลยีทางทะเล. คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา.

Bernal, M.G., A.I. Campa-CÓrdova, P. E. Saucedo, M.C. González, R.M. Marrero and J.M. MazÓn-Suástegul, 2015. Isolation and *in vitro* selection of actinomycetes strains as potential probiotics for aquaculture. Vet. World. 8(2):170-176.

Manivasagan, P., J. Venkatesan, K. Sivakumar and S. Kim. 2014. Marine actinobacterial metabolites: Current status and future perspectives. Microbiol. Res. 168: 311-332.

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2559

IMSP-109-6

Available online at www.buuconference.buu.ac.th

The 6th Burapha University International Conference 2017

"Creativity, Innovation, and Smart Culture for the Better Society"

Biological Activities of Crude Extract from *Streptomyces parvulus* Isolated from Mangrove sediment

50% 40% 10%

Janjarus Watanachote*, Nisa Siranonthana and Rawiwan Watanadilok

Institute of Marine Science, Burapha University, Chonburi

Abstract

Actinomycetes are known for the production of metabolites with diverse biological activities. The aim of this research was to study the antibacterial activity hydrolytic enzyme activity and antioxidant activity of crude extract from actinomycete, *Streptomyces parvulus* from sediment, Chumporn province. *S. parvulus* was cultured in ISP2 medium and salinity 17 ppt for 7 days . The results showed that the crude extract from cells inhibited *Straphylococcus epidermidis* which isolated from sea bass with clear zone of 2.35±1.35 millimeter. Crude extract from supernatant gave cellulase and amylase activities were 27.48 and 33.53 mg reducing sugar / mg protein while protease present by decrease of absorbance of skim milk was 0.68%. The antioxidant activity of crude extract from both cells and supernatant exhibited DPPH radical scavenging activities with IC_{50} value of 219.68±6.59 µg/ml. Therefore, *S. parvulus* can be applied in pharmaceutics cosmetics or wastewater treatment.

© 2017 Published by Burapha University.

Keywords: actinomycete, antibacterial activity, hydrolytic enzyme activity, antioxidant activity

* Corresponding author. Tel.: +66-38-391-671; fax: +66-38-391-674.
E-mail address: janjarus@buu.ac.th.

Biological Activities of Crude Extract from *Streptomyces parvulus* Isolated from Mangrove Sediment

Janjarus Watanachote*, Nisa Siranonthana and Rawiwan Watanadilok

Institute of Marine Science, Burapha University, Chonburi THAILAND

Abstract

Actinomycetes are known for the production of metabolites with diverse biological activities. The aim of this research was to study the antibacterial activity hydrolytic enzyme activity and antioxidant activity of crude extract from actinomycete, ***Streptomyces parvulus*** from sediment, Chumporn province. ***S. parvulus*** was cultured in ISP2 medium and salinity 17 ppt for 7 days . The results showed that the crude extract from cells inhibited ***Straphylococcus aureus*** which isolated from sea bass with clear zone dimeter of 27.5 millimeter. Crude extract from supernatant gave cellulase and amylase activities were 27.48 and 33.53 mg reducing sugar / mg protein while protease Present by decrease of absorbance of skim milk was 0.68%. The antioxidant activity of crude extract from both cells and Supernatant exhibited DPPH radical scavenging activities with IC_{50} value of 219.68±6.59 μg/ml. Therefore, *S. parvulus* can be applied in pharmaceutics cosmetics or wastewater treatment.

Introduction

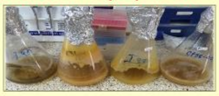
Actinomycetes is a phylum of Gram-positive bacteria with high guanine and cytosine content in their DNA. Nowadays, they are recognized as the producers of many bioactive metabolites that are useful to humans in medicine, such as antibacterials, antifungals, antivirals, antithrombotics, immunomodifiers, anti-tumor drugs and enzyme inhibitors; and in agriculture [1]. The purpose of this study was to investigate the biological properties of culture media of actinomycete, ***Streptomyces parvulus*** isolated from mangrove sediment.

Methods

Actinomycete identification

16S rDNA, SEM

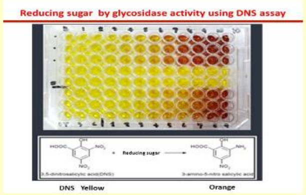
Crude extract preparation

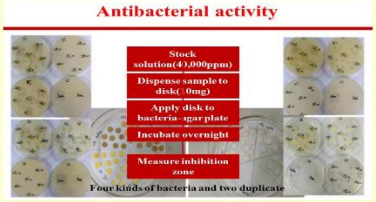


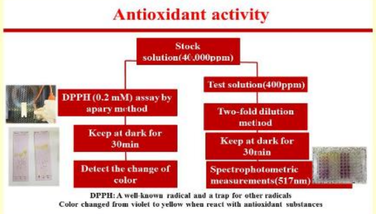
S. parvulus was cultured in ISP2 medium salinity 17 ppt for 7 days. Intracellular and extracellular were extracted by ethyl acetate.

Thin Layer Chromatography

Chloroform:Methanol=19:1







DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) at 517 nm DPPH free radical scavenging activity (Fenglin, 2004)

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

Results and Discussion

Hydrolytic Enzyme

S. parvulus was isolated from mangrove sediment in Chumporn province. The extracts from extracellular was screening for hydrolytic enzyme activity. The result shown that the actinomycete can produce hydrolytic enzymes when used carboxymethyl cellulose (CMC) soluble starch and skim milk as substrate.

The amylase activity higher than cellulase activity, 33.53 and 27.48 mg reducing sugar / mg protein. The results indicated that *S. parvulus* can be study for wastewater treatment. Especially wastewater from the production line of casava starch factory have high organic matter. It requierd to treatment before discharge into water resource or turnover in the factory [2].

Antibacterial Activity

Antibacterial and antifungal activities were observed against *Escherichia coli, Bacillus subtilis, Staphylococcus epidermidis S. aureus* and fungus *Candida albicans*. crude extract from cells which cultured at salinity 40 ppt showed the highest inhibition zone against *S. aureus* and *C. albicans.*

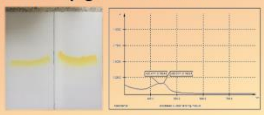
Microorganism test strains	Diameter (mm)	
	Cell	Medium
E. coli	20	22
Bacillus subtilis	20	24.5
S. epidimidis	0	2.35
S. aureus	25	27.5
Candida albican	27.5	26.5

Further study, cocultivation tecnique and optimaization of medium carbon source salinity will use to enhance growth and antibacterial Activity [3].

Antioxidant Activity

From experiment, Both extracts from intracellular and extracellular of *S. parvulus* were inhibited DPPH 50% at concentrate 219.68 ±6.59 ppm. while ascorbic acid was at 48.25±1.98 ppm. So the extract from *S. parvulus* both intracellular and extracellular part can inhibit radical less than ascorbic acid.

The antioxidant activity from the extract of *S. parvulus* lower than other actinomycetes PL3-6 and PL 7-4 which isolated from Nakhon Si Thammarat province showed DPPH activity at IC50 value of 50.62 and 51.5 ppm respectively. However, the amount of pigment extract is very interesting.



Conclusion

S. parvulus *gave* the hydrolytic enzyme activity at salinity 17 ppt may useful for wastewater treatment at high salinity.

All pigments extracted from medium and cell of *S. parvulus* show high antibacterial activity and antioxidant activity which valuable for pharmaceutical investigation.

References

1. Bull, A.T., J.E. Stach, A.C. Ward, M. Goodfellow. 2005. Marine actinobacteria: perspectives, challenges, future directions. J. Antonie van Leeuwenhoek. 87: 65-79.
2. Tosungnoen. S., K. Chookietwattana. And S. Dararat. 2014. Lactic acid production from repeated-batch and simultaneous saccharification and Fermentation of cassava starch wastewater by amylolytic *Lactobacillus plantarum* MSUL 702. APCBEE procedia. 8: 204 – 209.
3. Selvin, J., Shanmughapriya, S., Gandhimathi, R., Seghal Kiran, G., Rajeetha Ravji, T., Natarajaseenivasan, K., Hema, T.A. 2009. Optimizationand production of novel antimicrobial agents from sponge associated marine actinomycetes *Nocardiopsis dassonvillei* MAD08. *Appl.Microbiol. Biotechnol.*, 83: 435-445.

Acknowledgements

This research was supported by the National Research Council of Thailand (NRCT) through the Burapha University(2016). Thanks are due to Ms. Rattanaporn Sriviboon for actinomycete strains.

* Contact: janjarus@buu.ac.th

IMSP-108-5

Available online at www.buuconference.buu.ac.th

The 6th Burapha University International Conference 2017

"Creativity, Innovation, and Smart Culture for the Better Society"

The effect of salinity of culture media for antioxidant activity of *Streptomyces indiaensis* isolated from mangrove sediment.

50% 40% 10%

Nisa Siranonthana*, Janjarus Watanachote and Rawiwan Watanadilok

Institute of Marine Science, Burapha University

Abstract

Streptomyces are potential of bioactive metabolites such as antioxidant activity that may be developed into therapeutic drugs. The objective of this research was to study the influence of salinity on antioxidant activity of crude extracts from *Streptomyces indiaensis* isolated from mangrove sediments collected at the coast of Chon-buri, Thailand. *S. indiaensis* was cultured in three levels of salinity (17, 25 and 35ppt.) of natural sea water and using ISP3 as culture medium. The antioxidant potential of the extract was assessed by DPPH and ABTS scavenging activity. The crude extract from17and25 ppt. exhibited high DPPH radical scavenging activities with IC_{50} value 223.19 ±3.93 and 208.32±8.33 µg/ml respectively and ABTS radical scavenging activities with IC_{50} value of 58.07±2.09 and 62.12±2.56 µg/ml respectively. The results indicated that ABTS radical scavenging activities of the crude extracts from 17 and 25 ppt. were significantly difference from 35 ppt. ($p<0.05$) Therefore, the crude extracts from *S. indiaensis* at 17 and 25 ppt. could be further developed as a natural antioxidant for pharmaceutics.

© 2017 Published by Burapha University.

Keywords: Type your keywords here, separated by semicolons ;

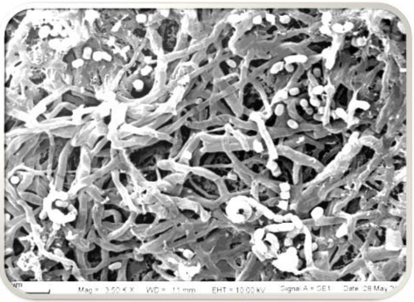
The effect of salinity of culture media for antioxidant activity of *Streptomyces indiaensis* isolated from mangrove sediment

Nisa Siranonthana*, Janjarus Watanachote and Rawiwan Watanadilok

Institute of Marine Science, Burapha University, Chonburi 20131 Thailand.

Abstract

This research was to study the influence of salinity on antioxidant activity of crude extracts from *Streptomyces indiaensis* isolated from mangrove sediments collected at the coast of Chonburi, Thailand. *S. indiaensis* was cultured in three levels of salinity (17, 25 and 35ppt.) of natural sea water and using ISP3 as culture medium. The antioxidant potential of the extract was assessed by DPPH and ABTS scavenging activity. The crude extract from 17 and 25 ppt. exhibited high DPPH radical scavenging activities with IC_{50} value 223.19 ± 3.93 and 208.32 ± 8.33 µg/ml respectively while ABTS radical scavenging activities exhibited with IC_{50} value 58.07 ± 2.09 and 62.12 ± 2.56 µg/ml respectively.



Streptomyces indiaensis (A1-3)

Introduction

Actinomycetes are gram positive bacteria in which many bioactive compounds are generally produced and a virtually source of novel chemical structures with many potential therapeutic applications. Their property that most excites the interest of biotechnologists and microbiologists are the ability to produce a very diverse range of metabolic products, some of which have important roles in medicine. The genus *Streptomyces* is known to produce a large number of bioactive molecules. (Bhushan et al., 2016)

Mangrove forest is an ecosystem connected the estuary to the sea and is one of invaluable natural resources in marine ecosystems with high diversity. (Srivibool and Watanadilok; 2015)

The purpose of this study was to investigate the effect of salinity of culture media for antioxidant activity of *Streptomyces indiaensis* isolated from mangrove sediments ,where as the antioxidant producing ones were valuable for pharmaceutical.

Free radical and diseases:

Cancer, Aging, Inflammation/Infection, cardiovascular diseases, Neurodegenerative diseases, etc

Antioxidants

-Antioxidants are the compounds that prevent oxidation

-They delay autoxidation by inhibiting formation of free radicals

-They prevent oxidation by donating electrons from their hydroxyl group [-OH]

Future trend: Develop new antioxidant from natural sources

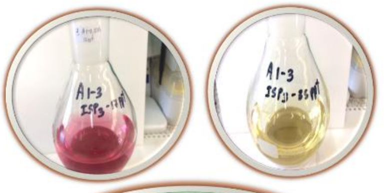
Materials and Methods

Isolation of actinomycetes

- The sediment samples were pre-treated with dry heat at 100° C for 1 h before dilution and spreading on selective medium plates, incubated at 30° C for 4 weeks.
- cultured in ISP3 medium for at least 3 L at 30° C and shaken at 110 rpm for 7-10 d.
- Adjust the salinity to 17,25, 35 ppt.
- After a 7 days incubation period, the mycelium and culture broth were separated by centrifugation.

ISP3 = Oat 20 g, Trace salt solution 1 ml ($FeSO_4$ .7 H_2O 0.1 g, $MnCl_2$. 4H_2O 0.1 g, $ZnSO_4$. 7H_2O 0.1 g), Agar 15 g distilled water1000 ml

- Actinomycete cultured was extracted by ethyl acetate, in separating funnel, shaken for a few minutes, and then the solvent layers were evaporated under vacuum

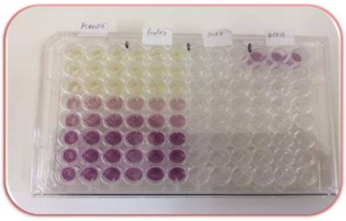


Screening Antioxidant activity by TLC-DPPH

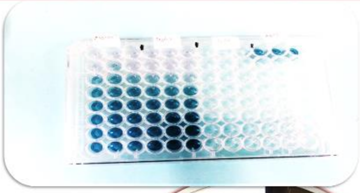
spray with 0.2% DPPH in MeOH) (Alessandra, et al., 2002)

Free radical Scavenging Assay

DPPH free radical scavenging activity at 517 nm (Fenglin, 2004)



ABTS(2,2'-azino-bis3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) free radical scavenging activity at 734 nm Yang, et al., 2011)



Microplate reader (MultiskanGO, Thermo; Finland)

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

Results and Discussion

The crude extract from 17 and 25 ppt. exhibited high DPPH radical scavenging activities with IC_{50} value 223.19 ± 3.93 and 208.32 ± 8.33 µg/ml respectively while ABTS radical scavenging activities exhibited with IC_{50} value 58.07 ± 2.09 and 62.12 ± 2.56 µg/ml respectively. (Table 1)

There are several reports about optimization of cultivation conditions of secondary metabolite production by actinobacteria. (Sivakumar et al 2007; Olano et al., 2009); such as the effect of temperature, minerals and culture media on biomass and bioactive the result was found that 30°C showed optimum levels and the effect of minerals on the yield of biomass and bioactive metabolites of *Nocardia levis* was found that K_2HPO_4 slightly increase the production but drop sharply with FeSO4 and ZnSO4 and maltose tryptone broth favored high rates of bioactive metabolites. (Rizk et al.,2007; Bhattacharyya et al., 1998; Paul&Banerjee, 1983; Chattopadhyay and Sen, 1997; Gupte and Kulkarni, 2003; Kavitha and Vijayalakshmi, 2009).

Table 1. Antioxidant activity of crude extracts of *Streptomyces indiaensis*

Salinity	(IC_{50}) Antioxidant scavenging activity	
	ISP3	
	DPPH scavenging activity (µg/ml)	ABTS scavenging activity (µg/ml)
17 ppt	223.19±3.93	58.07±2.09
25ppt	208.32±8.33	62.12±2.56
35ppt	>400	183.59±4.71
Trolox	3.79	8.24

Conclusion

In summary, this study demonstrated the potential of crude extracts from *Streptomyces indiaensis* as an antioxidant substance.Therefore the crude extracts 17 and 25 ppt. could be further developed as a natural antioxidant for pharmaceutics. However, further studies are needed investigation in order to purify and identify active molecules for the better of the sensitivity.

References

-Bhattacharyya, B.K., S.C. Pal and S.K. Sen, 1998. Anti biotic pro duc tion by *S tre p tomyces hygroscopicus* D1.5: cultural effect. Revista de Microbiologia, 29: 49-52.

.Bhushan, Phani G. V. G. Girija Sankar, T. Prabhakar, P. V. Kamala Kumari.2016. ANTIOXIDANT ACTIVITY OF ACTINOMYCETE ISOLATES FROM MARINE SAMPLES. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences Vol 5, Issue 6, p.1037-1045.

-Kavitha, A. and Vijayalakshmi, M. 2009. Cultural parameters affecting the production of bioactive metabolites by Nocardia levis MK-VL_113. Journal of Applied Sciences Research, 5: 2138-2147.

-Rattanaporn Srivibool and Rawiwan Watanadilok. Distribution of actinomycetes in Thai mangrove sediments.2015. Burapha University International Conference, The Herritage. Bangsaen Chonburi.

-Paul, A.K. and A.K. Banerjee, 1983. Determination of optimum conditions for antibiotic production by*Streptomyces galbus*. Folia Microbiol. (Praha), 28:397-405.

Acknowledgements This research was supported by the National Research Council of Thailand (NRCT) through the Burapha University (2016).

Contact: nisas@buu.ac.th