



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การแยกสารต้านจุลินทรีย์จากเชื้อแอคติโนมัยซีสในพืชสมุนไพร

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธงชัย เตโชวิศาล และคณะ

กันยายน 2557

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การแยกสารต้านจุลินทรีย์จากเชื้อแอคติโนมัยซีส์ในพืชสมุนไพร

คณะผู้วิจัย

1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธงชัย เตโชวิศาล
2. นางสาวศรีสกุล ชนะพันธุ์
3. นางสาววันวิการ์ เรือนสำราญ
4. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วยา พุทธรังศรี

สังกัด

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
และมหาวิทยาลัยศิลปากร

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Abstract

Project Code : RMU54_005
 Project Title : Isolation of Antimicrobial compounds from endophytic actinomycetes in Medicinal plants
 Investigator : Asst. Prof. Dr. Thongchai Taechowisan, Silpakorn University
 E-mail Address : tewson84@hotmail.com, tthongch@su.ac.th
 Project Period : June 15, 2011 - June 14, 2014

The isolation of endophytic actinomycetes from surface-sterilized tissues of 11 plant species was made using humic acid-vitamin (HV) agar as a selection medium. Of the 530 isolates recovered, 299 were from roots, 118 from stems and 113 from leaves with a prevalence of 3.02, 1.19 and 1.14%, respectively. Twenty isolates strong inhibited tested microorganisms and were classified as *Streptomyces* sp. based on their morphology and the amino acid composition of the whole-cell extract. Thirteen isolates were selected and cultured for secondary metabolite extraction.

Strain LJK109 was isolated from the root tissues of *Alpinia galangal* (L.) Willd. It was an antagonist of phytopathogenic fungi; *Alternaria porri*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum musae*, *Curvularia* sp., *Drechslera* sp., *Exserohilum* sp., *Fusarium oxysporum*, *Verticillium* sp. and *Sclerotium rolfsii*. The major active ingredients from the crude extract were purified by silica gel column chromatography, thin-layer chromatography and identified to be 3-methylcarbazole and 1-methoxy-3-methylcarbazole by NMR and mass spectral data, respectively. Bioassay studies showed that these compounds had antifungal activities against tested fungi, and its minimum inhibitory concentrations were found to be within the range of 30 to 240 µg/ml. Conidia germination was also inhibited by these compounds as determined by microscopy.

The immunomodulatory activity of 3-methylcarbazole and 1-methoxy-3-methylcarbazole in toll like receptor (TLR)-activated RAW 264.7 macrophages induced by lipopolysaccharide (LPS), Poly (I:C), and pam3CSK was investigated by assessing nitric oxide (NO) and pro-inflammatory cytokines. These 3-methylcarbazoles dose-dependently suppressed the release of NO, PGE₂, TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10 in LPS- and pam3CSK-activated macrophages but not in Poly (I:C)-activated macrophages. Our results

suggest that 3-methylcarbazoles can be further developed as a promising anti-inflammatory remedy.

Strain BRM10 was isolated from the root tissues of *Alpinia galanga* Swartz. It was an antagonist of some bacteria, *Staphylococcus aureus* ATCC25932, *Bacillus cereus* ATCC6633, *Escherichia coli* ATCC10536 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853. The major active ingredients from the crude extract were purified by silica gel column chromatography, thin-layer chromatography and identified to be 1-methyl ester-nigericin and nigericin by NMR and mass spectral data, respectively. Bioassay studies showed that 1-methyl ester-nigericin had antibacterial activity against Gram positive bacteria lower than nigericin, and its minimum inhibitory concentrations against *S. aureus* and *B. cereus* were 0.5 µg/ml and 1.0 µg/ml, respectively and no inhibitory activity was observed against *E. coli* and *P. aeruginosa*, at a concentration of 64 µg/ml.

Strain GMT-8 was isolated from the root tissue of *Zingiber officinale* Rosc. It was an antagonist of Gram positive bacteria; *Staphylococcus aureus* ATCC25932, *Bacillus cereus* ATCC7064 and *Bacillus subtilis* ATCC6633. The major active ingredient from the crude extract was purified by silica gel column chromatography, thin-layer chromatography and identified to be decursin by NMR and mass spectral data, respectively. Bioassay studies showed that decursin had antibacterial activities against Gram positive bacteria with the minimum inhibitory concentrations within the range of 32 to 256 µg/ml.

Strain BT01 was isolated from the root tissue of *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. It was an antagonist of Gram positive bacteria; *Staphylococcus aureus* ATCC25932, *Bacillus cereus* ATCC7064 and *Bacillus subtilis* ATCC6633. The major active ingredients from the crude extract were purified by silica gel column chromatography, thin-layer chromatography and identified to be two new flavonoids, 7-methoxy-3, 3',4',6-tetrahydroxyflavone and 2',7-dihydroxy-4',5'-dimethoxyisoflavone, together with four known compounds, fisetin, naringenin, 3'-hydroxydaidzein and xenognosin B. Bioassay studies showed that these compounds had antibacterial activity with the minimum inhibitory concentrations within the range of 32 to 256 µg/ml.

The new flavonoids, 7-methoxy-3,3',4',6-tetrahydroxyflavone and 2',7-dihydroxy-4'5'-dimethoxyisoflavone isolated from *Streptomyces* sp. BT01 inhibited the pro-inflammatory mediators including cytokines by blocking nuclear factor-kappa B (NF-KB) signalling in

lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 cells. These flavonoids suppressed mRNA and protein expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. These results suggest that these flavonoids have anti-inflammatory effects.

Strain HK17 was isolated from the root tissue of *Curcuma longa* Linn. The major active ingredients from the crude extract of this strain were purified by silica gel column chromatography, thin-layer chromatography. Extraction of the culture medium of this strain was purified and identified as flavonoids; 2(S)-5,7-dihydroxy-8,2'-dimethoxyflavanone, 2(S)-5,7,2'-trihydroxy-8-methoxyflavanone, 2(S)-5,2',5'-trihydroxy-7,8-dimethoxy flavanone and 2(S)-7,2'-Dihydroxy-5,8-dimethoxyflavanone which displayed strong antibacterial and anticandidal properties. The crude extract showed the highest activity against *S. aureus* and *C. albicans*, with MIC values of 32 µg/ml. The purified 2(S)-5,2',5'-trihydroxy-7,8-dimethoxy flavanone showed the lowest MIC (32 µg/ml) and MMC (128 µg/ml) against *S. aureus* and *C. albicans* with corresponding large diameter of the zone of inhibitions (25.5 and 25.2 mm respectively). This study has shown that the new flavonoids which were isolated from *Streptomyces* sp. HK17 have potential in antibacterial and anticandidal activities.

Keywords : Antimicrobial compounds, Anti-inflammatory activity, Endophytic actinomycetes, *Streptomyces* sp.

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : RMU54_005

ชื่อโครงการ : การแยกสารต้านจุลินทรีย์จากเชื้อแอคติโนมัยซีสในพืชสมุนไพร

ชื่อนักวิจัย : ผศ.ดร.ธงชัย เตโชวิศาล

E-mail Address : tewson84@hotmail.com, tthongch@su.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 15 มิถุนายน 2554 - 14 มิถุนายน 2557

การแยกเชื้อแอคติโนมัยซีสจากเนื้อเยื่อพืช 11 สปีชีส์ ด้วยการฆ่าเชื้อที่พื้นผิวแล้วบ่มลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ humic acid-vitamin (HV) agar สามารถแยกเชื้อได้ 530 สายพันธุ์ ซึ่งแบ่งเป็นแยกจากราก 299 สายพันธุ์ แยกจากลำต้น 118 สายพันธุ์ และแยกจากใบ 113 สายพันธุ์ คิดเป็นความชุก 3.02, 1.19 และ 1.14%, ตามลำดับ พบว่า 20 สายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ และถูกจำแนกเป็น *Streptomyces* sp. โดยฐานฐานวิทยาและองค์ประกอบของกรดอะมิโนจากสารสกัดเซลล์ ได้คัดเลือกเชื้อ 13 สายพันธุ์มาเลี้ยงเชื้อเพื่อสกัดสารเมแทบอลิซึมทุติยภูมิ

สายพันธุ์ LJK109 แยกได้จากรากข่า (*Alpinia galanga* (L.) Willd) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืชหลายชนิด เช่น *Alternaria porri*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum musae*, *Curvularia* sp., *Drechslera* sp., *Exserohilum* sp., *Fusarium oxysporum*, *Verticillium* sp. และ *Sclerotium rolfsii* จากการแยกสารที่เป็นองค์ประกอบหลักในสารสกัดหยาบโดยวิธี silica gel column chromatography และ thin-layer chromatography พบว่าเป็นสาร 3-methylcarbazole และ 1-methoxy-3-methylcarbazole ซึ่งมีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อราทดสอบต่าง ๆ โดยให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญ (MIC) 30-240 µg/ml และสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วย

คุณสมบัติปรับภูมิคุ้มกันของสาร 3-methylcarbazole และ 1-methoxy-3-methylcarbazole โดยผ่านทาง toll like receptor (TLR) ในเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide (LPS), Poly (I:C), และ pam3CSK โดยการวัด nitric oxide (NO) และไซโตไคน์หลายชนิด พบว่าสารเหล่านี้สามารถยับยั้งการหลั่ง NO, PGE₂, TNF-α, IL-1β, IL-6 และ IL-10 ในเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ pam3CSK ขณะที่การกระตุ้นด้วย Poly (I:C) ไม่สามารถยับยั้ง ดังนั้นสาร 3-methylcarbazoles จึงน่าจะสามารถพัฒนาเป็นสารยับยั้งการอักเสบได้ในอนาคต

สายพันธุ์ BRM10 แยกจากรากข่า (*Alpinia galanga* Swartz) สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบหลายชนิด เช่น *Staphylococcus aureus* ATCC25932, *Bacillus cereus* ATCC6633, *Escherichia coli* ATCC10536 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 จากการแยกสารที่เป็นองค์ประกอบหลักในสารสกัดหยาบโดยวิธี silica gel column chromatography

และ thin-layer chromatography พบว่าเป็นสาร 1-methyl ester-nigericin และ nigericin ซึ่งพบว่า 1-methyl ester-nigericin มีคุณสมบัติยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่า nigericin และให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญ (MIC) ต่อ *S. aureus* และ *B. cereus* เป็น 0.5 และ 1.0 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ และพบว่าไม่สามารถยับยั้ง *E. coli* และ *P. aeruginosa* ที่ระดับความเข้มข้น 64 $\mu\text{g/ml}$

สายพันธุ์ GMT-8 แยกจากรากขิง (*Zingiber officinale* Rosc) สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิด เช่น *Staphylococcus aureus* ATCC25932, *Bacillus cereus* ATCC7064 และ *Bacillus subtilis* ATCC6633 จากการแยกสารที่เป็นองค์ประกอบหลักในสารสกัดหยาบโดยวิธี silica gel column chromatography และ thin-layer chromatography พบว่าเป็นสาร decursin ซึ่งมีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ และให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญ (MIC) ในช่วง 32-256 $\mu\text{g/ml}$

สายพันธุ์ BT01 แยกจากรากกระชาย (*Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf) สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิด เช่น *Staphylococcus aureus* ATCC25932, *Bacillus cereus* ATCC7064 และ *Bacillus subtilis* ATCC6633 จากการแยกสารที่เป็นองค์ประกอบหลักในสารสกัดหยาบโดยวิธี silica gel column chromatography และ thin-layer chromatography พบว่าเป็นสารฟลาโวนอยด์ชนิดใหม่ 2 สาร คือ 7-methoxy-3, 3',4',6-tetrahydroxyflavone และ 2',7-dihydroxy-4',5'-dimethoxyisoflavone และเป็นสารฟลาโวนอยด์ที่รู้จักแล้ว 4 สาร คือ fisetin, naringenin, 3'-hydroxydaidzein และ xenognosin B พบว่าเป็นสารเหล่านี้มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ และให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญ (MIC) ในช่วง 32-256 $\mu\text{g/ml}$

สารฟลาโวนอยด์ชนิดใหม่ 2 สาร คือ 7-methoxy-3, 3',4',6-tetrahydroxyflavone และ 2',7-dihydroxy-4',5'-dimethoxyisoflavone ที่แยกได้จาก *Streptomyces* sp. BT01 สามารถยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบในเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS โดยมีกลไกการยับยั้งการกระตุ้น nuclear factor-kappa B (NF- κ B) ซึ่งพบว่าสารฟลาโวนอยด์นี้ยับยั้งการแสดงออกระดับ mRNA และโปรตีนของ inducible nitric oxide synthase (iNOS) และ cyclooxygenase-2 (COX-2) สารฟลาโวนอยด์นี้จึงมีคุณสมบัติต้านการอักเสบได้

สายพันธุ์ HK17 แยกจากรากขมิ้น (*Curcuma longa* Linn) จากการแยกสารที่เป็นองค์ประกอบหลักในสารสกัดหยาบโดยวิธี silica gel column chromatography และ thin-layer chromatography พบว่าเป็นสารฟลาโวนอยด์ชนิดใหม่ 4 สาร คือ 2(S)-5,7-dihydroxy-8,2'-dimethoxyflavanone, 2(S)-5,7,2'-trihydroxy-8-methoxyflavanone, 2(S)-5,2',5'-trihydroxy-7,8-dimethoxy flavanone และ 2(S)-7,2'-Dihydroxy-5,8-dimethoxyflavanone ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและยีสต์ พบว่าสารสกัดหยาบยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* และ *C. albicans*

ที่ระดับค่า MIC 32 $\mu\text{g/ml}$ และพบว่าสาร 2(S)-5,2',5'-trihydroxy-7,8-dimethoxy flavanone ให้ค่า MIC (32 $\mu\text{g/ml}$) และ MMC (128 $\mu\text{g/ml}$) ต่อ *S. aureus* และ *C. albicans* ซึ่งสอดคล้องกับค่าแนวการยับยั้งการเจริญ (25.5 และ 25.2 mm ตามลำดับ) การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารฟลาโวนอยด์ชนิดใหม่จาก *Streptomyces* sp. HK17 มีคุณสมบัติต้านการเจริญของแบคทีเรียและยีสต์ได้

คำหลัก : สารต้านจุลินทรีย์, คุณสมบัติต้านการอักเสบ, แอคติโนมัชีสในพืช, สเตริบโทมัชีส

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ดีด้วยความอุดหนุนของผู้ร่วมโครงการฯ ซึ่งเป็นงานวิจัยต่อยอดจากงานวิจัยที่ได้ร่วมโครงการกันมาเป็นระยะเวลา 2 ปี เรื่องการแยกเอ็นโดไฟติกแอคติโนมัยซีสในพืชสมุนไพรและการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จึงได้ขอรับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2549 และได้ดำเนินการอย่างต่อเนื่องมาตลอด โดยได้รับความช่วยเหลือจากทีมนักวิจัยฝ่ายจีน ได้แก่ Prof. Dr. Yuemao Shen จาก Kunming Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Kunming, P.R. China และ Dr. Chunhua Lu จาก School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, P.R. China เป็นอย่างดี ผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณ Prof. Dr. Yuemao Shen และ Dr. Chunhua Lu ในที่นี้ด้วย นอกจากนี้ ผู้วิจัย ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.สายสมร ล้ายอง จากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้ความกรุณาเป็นที่ปรึกษาโครงการและให้คำแนะนำในการทำงานวิจัย ครั้งนี้เป็นอย่างดี และขอขอบพระคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา ที่ได้อนุมัติทุนอุดหนุนการวิจัยสำหรับอาจารย์รุ่นใหม่ ในการดำเนินงานวิจัยนี้จนประสบความสำเร็จด้วยดี

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธงชัย เตโชวิศาล

กันยายน 2557

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ.....	ก
กิตติกรรมประกาศ.....	๗
สารบัญ.....	๗
สารบัญรูปภาพ.....	๘
สารบัญตาราง.....	๙
บทที่ 1 บทนำ.....	1
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
ผลที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 บทตรวจสอบเอกสาร.....	3
บทที่ 3 วิธีการทดลอง.....	7
การแยกเชื้อแอคติโนมัยซีสในพืชสมุนไพร.....	7
การตรวจกรองหาเชื้อแอคติโนมัยซีสที่สร้างสารต้านการเจริญเชื้อทดสอบ.....	7
การเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสเพื่อสกัดสารสกัดหยาบ.....	8
การทดสอบคุณสมบัติต้านการเจริญของเชื้อทดสอบของสารสกัดหยาบและสารที่แยกได้.....	8
การแยกสารองค์ประกอบหลักจากสารสกัดหยาบ.....	9
การทดสอบคุณสมบัติทางเคมีและโครงสร้างทางเคมีของสารองค์ประกอบหลักที่แยกได้.....	9
การทดสอบความสามารถด้านการอักเสบ.....	10
บทที่ 4 ผลการทดลอง	18
การแยกเชื้อแอคติโนมัยซีสในพืช.....	18
การตรวจกรองคุณสมบัติต้านการเจริญจุลินทรีย์ของแอคติโนมัยซีส.....	19
การแยกสารจาก LJK109.....	22
การแยกสารจาก BRM10.....	25
การแยกสารจาก GMT-8.....	33
การแยกสารจาก BT01.....	38
การแยกสารจาก HK17.....	59

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	68
เอกสารอ้างอิง	77
Output.....	92
ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ	93
ภาคผนวก ข งานตีพิมพ์เผยแพร่	97

สารบัญรูปภาพ

รูปที่	หน้า
1	รูปแบบที่แตกต่างกันบน thin-layer chromatography ด้วยระบบ hexane/EtOAc (2:1) ของ crude extract (C) และ fractions ต่าง ๆ (F4, F5 and F6) ทดสอบด้วย vanillin reagent..... 26
2	การทดสอบเบื้องต้นเกี่ยวกับคุณสมบัติด้านการเจริญของแบคทีเรียบางชนิดโดยวิธี disk diffusion assay ของ compound 1 และ compound 2 ต่อ <i>B. cereus</i> ATCC6633 ที่ปริมาณ 30 mg/disc..... 26
3	โครงสร้างโมเลกุลของ nigericins 28
4	ลักษณะโคโลนีของ BRM10 ที่เจริญบนอาหาร ISP-2 medium บ่มที่ 30 °C เป็นเวลา 14 วัน..... 30
5	ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงลักษณะสายสปอร์และรูปร่างสปอร์ของ BRM10 ที่เจริญบนอาหาร ISP-2 medium บ่มที่ 30 °C เป็นเวลา 14 วัน.. 30
6	Neighbor-joining phylogenetic tree ของ BRM10 กับเชื้อ <i>Streptomyces</i> spp. ที่เกี่ยวข้อง จากฐานข้อมูล GenBank สร้างด้วยโปรแกรม MEGA 4.0..... 31
7	ระดับ Nitrile ที่ RAW 264.7 cells สร้างขึ้น หลังจากถูกกระตุ้นด้วย LPS ในสภาวะที่มีและไม่มี 1-methoxy-nigericin ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ 32
8	โครงสร้าง decursin 33
9	ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงลักษณะสายสปอร์และรูปร่างสปอร์ของ GMT-8 ที่เจริญบนอาหาร ISP-2 medium บ่มที่ 30 °C เป็นเวลา 14 วัน... 35
10	Neighbor-joining phylogenetic tree ของ GMT-8 กับเชื้อ <i>Streptomyces</i> spp. ที่เกี่ยวข้อง จากฐานข้อมูล GenBank สร้างด้วยโปรแกรม MEGA 4.0..... 36
11	ระดับ Nitrile ที่ RAW 264.7 cells สร้างขึ้น หลังจากถูกกระตุ้นด้วย LPS ในสภาวะที่มีและไม่มี decursin ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ 37
12	โครงสร้างสารที่แยกได้จาก BT01: 7-methoxy-3, 3',4',6-tetrahydroxyflavone (1), 3,3',4',7-tetrahydroxyflavone (fisetin 2), 4',5,7-trihydroxyflavanone (naringenin 3), 2',7-dihydroxy-4',5'-dimethoxyisoflavone (4), 3'-hydroxydaidzein (5) และ xenognosin B (6)..... 39

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
13	ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงลักษณะสายสปอร์และรูปร่างสปอร์ของ BT01 ที่เจริญบนอาหาร ISP-2 medium บ่มที่ 30 °C เป็นเวลา 14 วัน..... 41
14	Neighbor-joining phylogenetic tree ของ BT01 กับเชื้อ <i>Streptomyces</i> spp. ที่เกี่ยวข้อง จากฐานข้อมูล GenBank สร้างด้วยโปรแกรม MEGA 4.0..... 42
15	ระดับ Nitrile ที่ RAW 264.7 cells สร้างขึ้น หลังจากถูกกระตุ้นด้วย LPS ในสภาวะที่มีและไม่มีสารสกัดยับยั้งจาก BT01 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ 44
16	ผลการทดสอบความเป็นพิษของสาร 3,3',4',6-tetrahydroxy-7-methoxyflavone (1) และ 2',7-dihydroxy-4',5'-dimethoxyisoflavone (2) ใน RAW 264.7 cells ที่ระดับความเข้มข้น 5-40 µg/ml โดยวิธี MTT assay * $P < 0.05$ 45
17	ผลการยับยั้งการสร้าง inflammatory intermediate และ pro-inflammatory cytokine ของสาร 3,3',4',6-tetrahydroxy-7-methoxyflavone (1) และ 2',7-dihydroxy-4',5'-dimethoxyisoflavone (2) ใน RAW 264.7 cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS 1 µg/ml: NO (a), PGE ₂ (b), TNF- α (c), IL-1 β (d), และ IL-6 (e), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 48
18	ผลการยับยั้งระดับ mRNA ของสาร 3,3',4',6-tetrahydroxy-7-methoxyflavone (1) และ 2',7-dihydroxy-4',5'-dimethoxyisoflavone (2) ที่ระดับความเข้มข้น 20 µg/ml ใน RAW 264.7 cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS 1 µg/ml ทดสอบโดยวิธี RT-PCR ในช่วงระยะเวลา 0 - 24 ชั่วโมง : TNF- α (a1), IL-1 β (a2), IL-6 (a3), iNOS (a4), และ COX-2 (a5), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 51
19	ผลการยับยั้งระดับ mRNA ของสาร 3,3',4',6-tetrahydroxy-7-methoxyflavone (1) และ 2',7-dihydroxy-4',5'-dimethoxyisoflavone (2) ที่ระดับความเข้มข้น 5 - 20 µg/ml ใน RAW 264.7 cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS 1 µg/ml ในระยะเวลา 6 ชั่วโมง ทดสอบโดยวิธี RT-PCR: TNF- α (b1), IL-1 β (b2), IL-6 (b3), iNOS (b4), และ COX-2 (b5), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 54
20	ผลการยับยั้งระดับ mRNA ของสาร 3,3',4',6-tetrahydroxy-7-methoxyflavone (1) และ 2',7-dihydroxy-4',5'-dimethoxyisoflavone (2) ที่ระดับความเข้มข้น 5 - 20 µg/ml ใน RAW 264.7 cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS 1 µg/ml ในระยะเวลา 6 ชั่วโมง 55

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
21	ผลการยับยั้งการสร้างเอนไซม์ iNOS และ COX-2 ของสาร 3,3',4',6-tetrahydroxy-7-methoxyflavone (1) และ 2',7-dihydroxy-4',5'-dimethoxyisoflavone (2) ที่ระดับความเข้มข้น 5 - 20 $\mu\text{g/ml}$ ใน RAW 264.7 cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ โดยวิธี Western blot analysis..... 56
22	Western blot analysis แสดงผลการยับยั้งการสร้างเอนไซม์ iNOS และ COX-2 ของสาร 3,3',4',6-tetrahydroxy-7-methoxyflavone (1) ที่ระดับความเข้มข้น 5 - 20 $\mu\text{g/ml}$ ใน RAW 264.7 cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ 57
23	ผลการยับยั้งการกระตุ้น p65 ของสาร 3,3',4',6-tetrahydroxy-7-methoxyflavone (1) และ 2',7-dihydroxy-4',5'-dimethoxyisoflavone (2) ที่ระดับความเข้มข้น 20 $\mu\text{g/ml}$ ใน RAW 264.7 cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ ในช่วงระยะเวลา 0.25 - 2 ชั่วโมง ทดสอบโดยวิธี ELISA 58
24	ผลการยับยั้งการกระตุ้น p65 ของสาร 3,3',4',6-tetrahydroxy-7-methoxyflavone (1) และ 2',7-dihydroxy-4',5'-dimethoxyisoflavone (2) ที่ระดับความเข้มข้น 5 - 20 $\mu\text{g/ml}$ ใน RAW 264.7 cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ ทดสอบโดยวิธี ELISA..... 58
25	การตรวจกรองคุณสมบัติต้านการเจริญของจุลินทรีย์ ด้วยวิธี over-layer culture plate ของ <i>Streptomyces</i> sp. HK17 ต่อแบคทีเรียทดสอบ <i>Bacillus cereus</i> ATCC7064 (A), <i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633 (B) และ <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25932 (C), บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-2 บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... 59
26	รูปร่างสปอร์ที่เรียงตัวเป็นสายยาวตรงและโค้งงอได้ของ <i>Streptomyces</i> sp. HK17 เมื่อเจริญบนอาหาร ISP-2 อายุ 21 วัน 60
27	Neighbor-joining phylogenetic tree ของ HK17 กับเชื้อ <i>Streptomyces</i> spp. ที่เกี่ยวข้อง จากฐานข้อมูล GenBank สร้างด้วยโปรแกรม MEGA 4.0..... 61
28	สารองค์ประกอบหลักในสารสกัดหยาบ จากการทดสอบโดยวิธี Thin-layer Chromatography (TLC) ด้วย chloroform : ethyl acetate (3.5:1), TLC (A), UV-light (B) และ Vanillin-sulfuric acid (C) และผล Bioautography ต่อเชื้อทดสอบ <i>Bacillus cereus</i> ATCC7064 (D) และ <i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633 (E) 62

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
29	โครงสร้างทางเคมีของ 2(S)-5,7-dihydroxy-8,2'-dimethoxyflavanone (1), 2(S)-5,7,2'-trihydroxy-8-methoxyflavanone (2), 2(S)-5,2',5'-trihydroxy-7,8-dimethoxyflavanone (3), และ 2(S)-7,2'-Dihydroxy-5,8-dimethoxyflavanone (4).....
	64

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การแยกเชื้อแอคติโนมัยซีสในพืช.....	18
2	การตรวจกรองหาเชื้อแอคติโนมัยซีสที่สร้างสารต้านการเจริญเชื้อแบคทีเรียและยีสต์	19
3	การตรวจกรองหาเชื้อแอคติโนมัยซีสที่สร้างสารต้านการเจริญเชื้อราทดสอบ.....	20
4	เชื้อแอคติโนมัยซีสสายพันธุ์ที่คัดเลือกมาสกัดสารสกัดหยาบ.....	21
5	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญเชื้อราทดสอบของสารสกัดหยาบและสารที่แยกได้.....	23
6	ระดับ nitrile ที่ 3-methylcarbazole และ 1-methoxy-3-methylcarbazole ยับยั้งจากการกระตุ้น RAW 264.7 cells ด้วยตัวกระตุ้นต่าง ๆ	24
7	ระดับ prostaglandin E ₂ ที่ 3-methylcarbazole และ 1-methoxy-3-methylcarbazole ยับยั้ง จากการกระตุ้น RAW 264.7 cells ด้วยตัวกระตุ้นต่าง ๆ	24
8	ระดับ tumor necrosis factor- α ที่ 3-methylcarbazole และ 1-methoxy-3-methylcarbazole ยับยั้ง จากการกระตุ้น RAW 264.7 cells ด้วยตัวกระตุ้นต่าง ๆ	24
9	ระดับ interleukin (IL)-1 β , IL-6 และ IL-10 ที่ 3-methylcarbazole และ 1-methoxy-3-methylcarbazole ยับยั้ง จากการกระตุ้น RAW 264.7 cells ด้วย LPS (1 μ g/ml)	25
10	การเปรียบเทียบ ¹ H NMR and ¹³ C NMR Spectra ของ nigericin, 1,29-O-dimethyl-30-acetyl nigericin และ 1-methoxy-nigericin ใน CDCl ₃ (mult, J/Hz)	27
11	Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Bactericidal Concentration (MBC) ของ 1-methoxy-nigericin ต่อแบคทีเรียบางชนิด.....	29
12	ระดับ nitrile ที่ RAW 264.7 cells สร้างขึ้นหลังจากถูกกระตุ้นด้วย LPS ที่ทดสอบด้วย 1-methoxy-nigericin ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	32
13	Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Bactericidal Concentration (MBC) ของ decursin ต่อแบคทีเรียบางชนิด.....	34
14	ระดับ nitrile ที่ RAW 264.7 cells สร้างขึ้นหลังจากถูกกระตุ้นด้วย LPS ที่ทดสอบด้วย decurcin ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	37
15	Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ของสารสกัดหยาบและสารต่าง ๆ ที่แยกได้จาก BT01 ต่อแบคทีเรียบางชนิด.....	40

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
16	ระดับ nitrile ที่ RAW 264.7 cells สร้างขึ้นหลังจากถูกกระตุ้นด้วย LPS ที่ทดสอบด้วยสารสกัดหยาบจาก BT01 ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	43
17	¹ H-NMR (400 MHz) spectroscopic data ของ compounds 1-3.....	64
18	¹³ C-NMR (100 MHz) spectroscopic data ของ compounds 1-3.....	65
19	Inhibition zones ของสารสกัดหยาบและสารที่แยกได้ต่อจุลินทรีย์ทดสอบ (mm).....	66
20	Minimum inhibitory concentrations(μg/ml)ของสารสกัดหยาบและสารที่แยกได้	67
21	Minimum microbicidal concentrations(μg/ml)ของสารสกัดหยาบและสารที่แยกได้	67

บทที่ 1

บทนำ

จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้นั้นมีหลายชนิดทั้งแบคทีเรีย รา และแอคติโนมัยซีส แอคติโนมัยซีสเป็นกลุ่มที่มีความสำคัญมากที่สุด เพราะสามารถสร้างสารที่ต่อต้านจุลินทรีย์ได้มากมายและมีโครงสร้างทางเคมีแตกต่างกัน กลไกการทำงานแตกต่างกัน และมีผลต่อจุลินทรีย์ในระดับต่าง ๆ กันด้วย แหล่งที่พบแอคติโนมัยซีสส่วนใหญ่พบในดิน โดยเฉพาะดินร่วนที่มีสารอินทรีย์มาก ส่วนดินเหนียวและดินทรายพบน้อย แหล่งน้ำตามธรรมชาติสามารถตรวจพบแอคติโนมัยซีสได้ เช่น น้ำตามคูดอง หนอง บึง รวมไปถึงจนถึงแหล่งน้ำในมหาสมุทร แอคติโนมัยซีสในธรรมชาติมีบทบาทในการย่อยสลายอินทรีย์สารและเกี่ยวข้องกับการหมุนเวียนวัฏจักรคาร์บอนและไนโตรเจน เนื่องจากสามารถสร้างเอ็นไซม์ย่อยสลายและเปลี่ยนแปลงสารได้มากมายหลายชนิด รวมไปถึงคุณสมบัติการสร้างสารปฏิชีวนะด้านการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ด้วย นอกจากนี้แหล่งดินและน้ำที่สามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยซีสได้ เนื้อเยื่อพืชเป็นอีกแหล่งหนึ่งที่สามารถแยกแอคติโนมัยซีสได้ด้วย และเรียกแอคติโนมัยซีสที่สามารถอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชได้ว่า แอคติโนมัยซีสในพืช (endophytic actinomycetes) นับว่าเป็นจุลินทรีย์แหล่งใหม่ที่มีผู้สนใจศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมากขึ้น นอกเหนือจากสมุนไพร เชื้อรา และแอคติโนมัยซีสที่แยกได้จากดิน เนื่องจากแอคติโนมัยซีสในพืชเป็นแหล่งใหม่ที่นิยมศึกษามากขึ้น นอกจากจะมีโอกาสค้นพบแอคติโนมัยซีสชนิดใหม่แล้ว แอคติโนมัยซีสเหล่านั้นยังสามารถสร้างสารที่มีโครงสร้างที่แตกต่างจากสารเดิมที่ได้จากแอคติโนมัยซีสที่แยกได้จากแหล่งดินและแหล่งน้ำ หรือเชื้อรา หรือสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ ดังนั้นโอกาสในการค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ ๆ จึงน่าพบได้ในแอคติโนมัยซีสในพืชสูง ซึ่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพบางชนิดอาจมีประสิทธิภาพดีกว่าสารที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากแอคติโนมัยซีสในพืช จัดเป็นสารเคมีปลอดภัยชนิดใหม่ (Novel Green Chemistry) สามารถนำมาใช้ประโยชน์หลายทาง เช่น นำมาใช้ด้านการเจริญจุลินทรีย์ก่อโรคที่ดื้อยาต่อสารปฏิชีวนะที่ใช้อยู่ในปัจจุบันมากขึ้นทุกวัน หรือนำโครงสร้างสารที่แยกได้นี้มาเป็นข้อมูลพื้นฐานในการสังเคราะห์ใหม่ให้มีฤทธิ์เพิ่มมากขึ้น และสามารถผลิตในปริมาณมากเชิงพาณิชย์ได้

การแยกเชื้อแอคติโนมัยซีสในพืช จำเป็นต้องคัดเลือกพืชที่มีโอกาสแยกเชื้อได้สูง และพืชนั้นควรมีสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่น่าสนใจ ซึ่งพืชที่นิยมนำใช้ในการแยกเชื้อในงานวิจัยนี้ เป็นพืชสมุนไพรที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ หรือเคยมีรายงานการพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจจากพืชชนิดนั้น ๆ ส่วนของพืชตัวอย่างที่นิยมใช้ในการแยกเชื้อ ได้แก่ ใบ ลำต้น และราก ที่เก็บใส่ไว้ในถุงพลาสติกที่สะอาด หลังจากผ่านการทำความสะอาดด้วยน้ำก๊อก เพื่อนำเศษดินและเศษขยะออก หั่นตัวอย่างเป็นชิ้นเล็ก ๆ นำไปฆ่าเชื้อที่ผิวหน้าด้วย 70% แอลกอฮอล์

แล้วฝังให้แห้งในสภาพไร้เชื้อ เป็นการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่พื้นผิวพืช (epiphytes) ที่มีอยู่กับตัวอย่าง หากชิ้นตัวอย่างยังมีขนาดใหญ่ให้ใช้มีดหรือกรรไกรปลอดเชื้อตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วนำไปวางลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งอาจใช้ water agar หรือ selective medium เช่น Humic acid - Vitamin agar เป็นต้น เมื่อเชื้อมีการเจริญแล้ว ก็ทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์อีกครั้ง จากนั้นจะทำการศึกษาทางอนุกรมวิธาน (taxonomy) ทั้งทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา องค์ประกอบทางเคมี ตลอดจนลำดับกรดนิวคลีอิกของ 16SrDNA จากนั้นจะทำการตรวจรอกหาคุณสมบัติการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และหาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างสารนั้น ๆ เพื่อผลิตสารและแยกบริสุทธิ์สาร รวมถึงการหาโครงสร้างทางเคมีของสารนั้น ๆ และทดสอบยืนยันคุณสมบัติทางชีวภาพของสารที่แยกได้ต่อไป ซึ่งทั้งหมดนี้จะได้กล่าวอย่างละเอียดในบทต่อ ๆ ไป

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. สามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยซิสในพืชได้
2. ตรวจรอกหาคุณสมบัติด้านการเจริญจุลินทรีย์ทดสอบของเชื้อแอคติโนมัยซิสที่แยกได้
3. จำแนกเชื้อแอคติโนมัยซิสที่สนใจได้
4. เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซิสที่สนใจเพื่อสกัดสารสกัดหยาบที่เชื้อสร้างขึ้นได้
5. แยกสารองค์ประกอบหลักในสารสกัดหยาบได้
6. ทดสอบคุณสมบัติด้านการเจริญจุลินทรีย์ทดสอบของสารสกัดหยาบและสารที่แยกได้
7. ทดสอบคุณสมบัติทางชีวภาพอื่น ๆ ของสารสกัดหยาบและสารที่แยกได้ตามโครงสร้างสาร

ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้เชื้อแอคติโนมัยซิสในพืชที่ใช่แยกเชื้อ และ/หรืออาจเป็นเชื้อชนิดใหม่ และ/หรือมีคุณสมบัติด้านการเจริญจุลินทรีย์ทดสอบ
2. แยกสารองค์ประกอบหลักจากสารสกัดหยาบจากเชื้อแอคติโนมัยซิสที่น่าสนใจ และทราบคุณสมบัติด้านการเจริญจุลินทรีย์ของสารที่แยกได้
3. ทราบโครงสร้างทางเคมีของสารที่แยกได้ และคุณสมบัติทางชีวภาพของสารนั้น ๆ
4. เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเชื้อแอคติโนมัยซิสในพืช
5. ได้องค์ความรู้ใหม่และสามารถตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

บทที่ 2

บทตรวจสอบเอกสาร

ลักษณะทั่วไปของแอกติโนมัยซีส

แอกติโนมัยซีสเป็นแบคทีเรียแกรมบวกจัดอยู่ในอันดับ (order) Actinomycetales ส่วนใหญ่เป็นพวกที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต ยกเว้นบางชนิดที่ไม่ต้องการหรือต้องการออกซิเจนเพียงเล็กน้อยในการเจริญเติบโต แอกติโนมัยซีสเป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่มีความหลากหลาย มีตั้งแต่กลุ่มที่มีลักษณะเป็นทรงกลม ท่อนและเป็นเส้นสายคล้ายเชือก ที่มีการแตกแขนงและมีการแตกหักของเส้นใยเพื่อสร้างสปอร์แบบไม่มีเพศ หรือการสร้างสปอร์บนเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) ซึ่งเป็นลักษณะที่พบในแอกติโนมัยซีสส่วนใหญ่ มีทั้งแบบที่เป็นสปอร์ที่ไม่มีถุงหุ้ม (conidia) เป็นเม็ดเดี่ยว ๆ และเรียงต่อกันเป็นสาย นอกจากนี้ยังมีแบบที่สร้างสปอร์อยู่ในอับสปอร์ (sporangium) สำหรับลักษณะที่บ่งชี้ชัดว่าแอกติโนมัยซีสไม่ใช่เชื้อรา คือ ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส และไม่มีไมโทคอนเดรีย และที่สำคัญแอกติโนมัยซีสถูกยับยั้งการเจริญได้ด้วยสารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย แต่ไม่ถูกยับยั้งการเจริญโดยสารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการเจริญเชื้อรา โดยมากพบในดินซึ่งแอกติโนมัยซีสมีบทบาทในการย่อยสลายอินทรีย์สารในดินและเกี่ยวข้องกับกระบวนการหมุนเวียนวัฏจักรคาร์บอนและไนโตรเจน แอกติโนมัยซีสบางสายพันธุ์ยังมีคุณสมบัติสร้างสารปฏิชีวนะด้านการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นซึ่งมีประโยชน์ในการแพทย์ ด้วยเหตุนี้ จึงทำให้มีการศึกษาและค้นหาแอกติโนมัยซีสสายพันธุ์ใหม่เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งส่วนใหญ่ยังแยกแอกติโนมัยซีสจากแหล่งดิน จนกระทั่งในปี ค.ศ. 1980 Baker และคณะ ได้แยกแอกติโนมัยซีสจากรากพืช (*Elaeagnus umbellata*) ได้เป็นครั้งแรก (Baker *et al.*, 1980) ทำให้การศึกษาและการแยกแอกติโนมัยซีสจากแหล่งใหม่เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตัวอย่างเช่น ในปี ค.ศ. 1992 Sardi และคณะ ได้แยกแอกติโนมัยซีสจากรากพืช จำนวน 28 สปีชีส์ ซึ่งบางสายพันธุ์ของแอกติโนมัยซีสที่แยกได้มีคุณสมบัติด้านการเจริญเชื้อราและเชื้อแบคทีเรียบางชนิดด้วย (Sardi *et al.*, 1992) ต่อมาในปี ค.ศ. 1995 Okazaki และคณะ ได้เปรียบเทียบการแยกแอกติโนมัยซีสจากใบพืชชนิดต่างๆ กับการแยกแอกติโนมัยซีสจากดิน พบว่าแอกติโนมัยซีสจากทั้งสองแหล่งมีความแตกต่างกันทั้งชนิดและคุณสมบัติการสร้างสารเมตาบอไลต์ (Okazaki *et al.*, 1995) จึงทำให้การศึกษาแอกติโนมัยซีสจากรากมีความสำคัญมากขึ้น ในปี ค.ศ. 2000 Shimizu และคณะ ได้แยกแอกติโนมัยซีสจาก ใบ ลำต้นและรากของ *Rhododendron* sp. และพบว่าบางสายพันธุ์ของแอกติโนมัยซีสที่แยกได้มีคุณสมบัติด้านการเจริญของเชื้อรา *Phytophthora cinnamomi* และ *Pestalotiopsis sydowiana* ซึ่งเป็นเชื้อราก่อโรคใน *Rhododendron* sp. ได้ด้วย (Shimizu *et al.*, 2000) ในปี ค.ศ. 2003 Coombs และคณะ ได้พิสูจน์การเข้าอยู่อาศัยของแอกติโนมัยซีสที่แยกได้จากธัญพืช (*Triticum aestivum* L.) และพบว่าการอยู่อาศัยของแอกติโนมัยซีสชนิดนี้มีความสำคัญต่อพืชด้วย (Coombs *et al.*, 2003a, Coombs *et al.*,

2003b) และในปี ค.ศ. 2003 คณะผู้วิจัยได้ทำการแยกแอคติโนมัยซีส์จากพืช 36 สปีชีส์ จากตัวอย่างราก ลำต้น และใบ จำนวนตัวอย่างละ 5400 ตัวอย่าง พบว่า สามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยซีส์จากตัวอย่างรากได้มากที่สุด คิดเป็น 3.9% รองมาคือตัวอย่างใบ คิดเป็น 1.8% และน้อยที่สุดคือตัวอย่างลำต้น คิดเป็น 0.3% จากการแยกเชื้อในครั้งนี้ พบว่าพืชในตระกูล Zingiberaceae สามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยซีส์ได้มากที่สุด และรองลงมาคือพืชในตระกูล Cyperaceae จากการจัดกลุ่มแอคติโนมัยซีส์ที่แยกเชื้อได้ทั้งหมด 330 สายพันธุ์ พบว่าเป็น *Streptomyces* sp. 277 สายพันธุ์, *Microbispora* sp. 14 สายพันธุ์, *Nocardia* sp. 8 สายพันธุ์, *Micromonospora* sp. 4 สายพันธุ์, ไม่สามารถจำแนกได้ 4 สายพันธุ์ และมี 23 สายพันธุ์ ตายระหว่างถ่ายเชื้อ (subculture) นอกจากนี้เมื่อนำเชื้อที่แยกได้มาทำการทดสอบความสามารถด้านการเจริญเชื้อราก่อโรคพืช 2 ชนิด คือ *Colletotrichum musae* และ *Fusarium oxysporum* พบว่า มีเชื้อ 3 สายพันธุ์ คิดเป็น 0.9% ที่สามารถต้านการเจริญ *Colletotrichum musae* และมีเชื้อ 5 สายพันธุ์ คิดเป็น 1.5% ที่สามารถต้านการเจริญ *Fusarium oxysporum* ในระดับที่ดีมาก (Taechowisan *et al.*, 2003), ในปี ค.ศ. 2005 Cao และคณะ ได้แยกแอคติโนมัยซีส์จากรากกล้วยทั้งสิ้น 131 สายพันธุ์ ประกอบด้วย *Streptomyces* 99 สายพันธุ์ *Streptoverticillium* 28 สายพันธุ์ *Streptosporangium* 2 สายพันธุ์ และไม่สามารถจำแนกได้ 2 สายพันธุ์ ในจำนวนนี้ 18.3% สามารถยับยั้งการเจริญของ *Fusarium oxysporum* f. sp. โดย *Streptomyces* sp. stain S96 ให้ผลการยับยั้งได้ดีที่สุดสามารถนำมาใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพได้ (Cao *et al.*, 2005) ด้วยเหตุนี้จึงทำให้มีผู้สนใจในการค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ ๆ จากแอคติโนมัยซีส์เพิ่มมากขึ้น ตัวอย่างเช่น ในปี 2003 Mellouli และคณะ ได้แยกเชื้อ *Streptomyces* sp. US24 จาก Tunisian soil จากการศึกษาลำดับ 16S rRNA พบว่าเชื้อนี้มี ความใกล้เคียงกับ *Streptomyces caelestis* ซึ่งสามารถสร้าง niddamycin และ celesticetin ได้ แต่จากการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แยกได้ พบว่ามีความแตกต่างกัน (Mellouli *et al.*, 2003) ในปี ค.ศ. 2005 Fguira และคณะ ได้แยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ irumamycin, X-14952B และ 17-hydroxy-venturicidin A จากเชื้อ *Streptomyces* sp. US80 ที่แยกจาก Tunisian soil จากการศึกษาลำดับ 16S rRNA พบว่าเชื้อนี้มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces roseoflavus* (Fguira *et al.*, 2005) สำหรับการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแอคติโนมัยซีส์ที่แยกได้จากพืช ได้มีการศึกษา มากมาย ตัวอย่างต่อไปนี้

ในปี ค.ศ. 2002 Parshikov และคณะ ได้แยกสาร cyclopentenone ชนิดใหม่ 4 ชนิด ได้แก่ (5R) 3-amino-5-hydroxy-5-vinyl-2-cyclopenten-1-one, (5R) 5-hydroxy-3-[9methoxycarbonyl]amino]-5-vinyl-2-cyclopenten-1-one, (5R) 5-hydroxy-3-[[2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]amino]-5-vinyl-2-cyclopenten-1-one และ 3-isobutylpropanamide-2-cyclopenten-1-one จาก *Streptomyces* sp. GT20026114 ที่แยกได้จากพืชป่าชายเลนชนิด *Aegiceras corniculatum* (Parshikov *et al.*, 2002) และในปี ค.ศ. 2002 เช่นกัน Castillo และคณะ

ได้แยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและให้ชื่อว่า Munumbicins จาก *Streptomyces* NRRL 30562 ที่แยกได้จากพืชไม้เลื้อย (*Kennedia nigricans*) ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืชและแบคทีเรียได้หลายชนิด รวมถึง *Plasmodium* sp. ด้วย (Castillo *et al.*, 2002),

ในปีต่อมา (2003) Castillo และคณะ ยังได้แยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่และให้ชื่อว่า Kakadumycins จาก *Streptomyces* NRRL 30566 ที่แยกได้จากพืชไม้ยืนต้น (*Grevillea pteridifolia*) ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้หลายชนิด (Castillo *et al.*, 2003), ในปี ค.ศ. 2003 Gil และ Campelo-Diez ได้แยกสาร p-aminoacetophenonic acids 2 ชนิดที่มีโครงสร้างคล้ายกับ candididin จาก *Streptomyces griseus* ซึ่ง polyketide chain ที่แตกต่างกัน (Gil and Campelo-Diez, 2003), และในปี ค.ศ. 2003 เช่นกัน Aremu และคณะ ได้แยกสาร Fistupyrone จาก *Streptomyces* sp. TP-A0569 ซึ่งมีฤทธิ์ต้านการเจริญเชื้อรา (Aremu *et al.*, 2003),

ในปี ค.ศ. 2004 Ezra และคณะ ได้แยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและให้ชื่อว่า Coronamycins จาก *Streptomyces* sp. (MSU-2110) ที่แยกได้จากพืชไม้เลื้อย (*Monstera* sp.) ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืชและเชื้อราก่อโรคคนได้หลายชนิด (Ezra *et al.*, 2004),

ในปี ค.ศ. 2005 Guan และคณะ ได้แยกสารกลุ่ม sesquiterpenes ชนิดใหม่ 3 ชนิดจาก *Streptomyces griseus* ที่แยกได้จากพืช *Kandelia candel* ซึ่งมีฤทธิ์ต้านการเจริญจุลินทรีย์ได้ (Guan *et al.*, 2005),

ในปี ค.ศ. 2006 Yasuhiro และคณะ ได้แยกสาร pterocidin ชนิดใหม่จาก *Streptomyces hygroscopicus* TP-A0451 ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้ง human cancer cell lines ที่ความเข้มข้น IC₅₀ 2.9 - 7.1 μ M (Yasuhiro *et al.*, 2006), และในปี ค.ศ. 2006 เช่นเดียวกัน Kim และคณะ ได้แยกสาร 6-alkylsalicylic acids ชนิด โดยให้ชื่อว่า salaceyins A และ B จาก *Streptomyces laceyi* MS53 ซึ่งมีฤทธิ์ฆ่าเซลล์ human breast cancer cells (Kim *et al.*, 2006),

ในปี ค.ศ. 2009 Vollmar และคณะ ได้แยกสารประเภท alkaloid ชนิด 4-methyl-2-quinazolinamines จาก *Streptomyces* sp. GS DV232 ที่แยกได้จาก Traditional Chinese Medicinal plants ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ (anti-proliferative bioactivity) (Vollmar *et al.*, 2009),

ในปี ค.ศ. 2010 Yan และคณะ ได้แยก Antimycin A18 จาก *Streptomyces albidoflavus* ซึ่งแยกได้จากพืชป่าชายเลน (mangrove plants) ซึ่งมีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญจุลินทรีย์ก่อโรคได้อย่างกว้างขวาง (Yan *et al.*, 2010), และในปี ค.ศ. 2010 เช่นกัน Fangfang และคณะ ได้แยกสาร p-aminoacetophenonic acid ชนิดใหม่ 4 ชนิด ได้แก่ (2E)-11-(4-aminophenyl)-5,9-dihydroxy-4,6,8-trimethyl-11-oxo-undec-2-enoic acid, 9-(4-aminophenyl)-3,7-dihydroxy-4,6-trimethyl-9-oxo-nonoic acid, (2E)-11-(4-aminophenyl)-5,9-O-cyclo-4,6,8-trimethyl-11-oxo-undec-2-enoic acid และ 9-(4-aminophenyl)-3,7-O-cyclo-2,4,6-trimethyl-9-oxo-nonoic acid ซึ่งแยกได้จาก

Streptomyces sp. HK10552 ซึ่งเป็นแอคติโนมัยซิสในพืช *Aegiceras corniculatum* (Fangfang *et al.*, 2010)

สำหรับในประเทศไทย คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แยกได้จากแอคติโนมัยซิสในพืชชนิดต่าง ๆ พบว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แยกได้มีฤทธิ์ต่าง ๆ มากมาย เช่น ต้านการเจริญของเชื้อราและแบคทีเรีย ต้านการอักเสบ ต้านภูมิแพ้ และต้านการเจริญของเนื้อร้าย (Taechowisan *et al.*, 2005a, 2005b, 2006a, 2006b, 2007a, 2007b, 2007c, 2008a, 2008b, 2008c และ 2008d) ดังนั้นแอคติโนมัยซิสที่แยกได้จากพืชจึงเป็นอีกแหล่งหนึ่งที่สมควรศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ ๆ

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

การแยกเชื้อแอคติโนมัยซิสในพืชสมุนไพร

1. เก็บตัวอย่างพืชสมุนไพรที่ไม่เป็นโรคพืช โดยเลือกจากต้นที่มีการเจริญดีสวยงามและมีสุขภาพดีได้แก่ ข่า (*Alpinia galanga* Swartz.), ขิง (*Zingiber officinale* Rosc.), กระชาย (*Boesenbergia pandurata*), โพล (*Zingiber cassumunar*), ขมิ้นชัน (*Curcuma longa*), พูล (*Piper betle*), เหงือกปลาหมอ (*Acanthus ebracteatus* Wall.), ฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Wall.), พญาายอ (*Clinacanthus nutans* (Burm.f.) Lindau.), รางจืด (*Thunbergia laurifolia* Linn.), และย่านาง (*Tiliacora triandra* Diels.) ชนิดละ 300 ตัวอย่าง
2. นำตัวอย่างพืชสมุนไพรในส่วน ใบ ลำต้น และรากมาล้างในน้ำประปาไหล นาน 10 นาที แล้วตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาด 1x1 cm²
3. นำมาแช่ใน 0.1% Tween 20 นาน 30 วินาที
4. นำมาแช่ใน 1% sodium hypochlorite นาน 5 นาที
5. นำมาล้างในน้ำกลั่น นาน 5 นาที
6. นำมาแช่ใน 70% ethanol นาน 5 นาที
7. ทิ้งให้แห้งใน laminar flow chamber
8. นำมาวางบน humic acid-vitamin (HV) agar ที่มี nystatin และ cycloheximide 100 µg/ml
9. บ่มไว้ที่ 30 °C นาน 1 เดือน สังเกตโคโลนีของแอคติโนมัยซิสที่ขึ้น
10. แยกเชื้อแอคติโนมัยซิสให้บริสุทธิ์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ International *Streptomyces* Project medium 2 (ISP-2)

การตรวจกรองหาเชื้อแอคติโนมัยซิสที่สร้างสารต้านการเจริญเชื้อทดสอบ*

สำหรับเชื้อยีสต์และแบคทีเรีย

1. เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซิสบนอาหาร ISP-2 ที่ 30 °C นาน 7 วัน
2. เจาะโคโลนีที่ขึ้นให้ได้เป็น agar disk แล้วนำไปวางลงบน nutrient agar (NA)
3. เท top agar 5 ml ที่มีเชื้อทดสอบจำนวน 10⁵ cells/ml ให้ top agar คลุมผิวหน้า NA
4. บ่มที่ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง
5. เก็บข้อมูลและบันทึกความสามารถในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ

สำหรับเชื้อราเส้นใย

1. เลี้ยงเชื้อแอสโคดิโนไมซีสบนอาหาร ISP-2 ที่ 30 °C นาน 7 วัน
2. เจาะโคโลนีที่ขึ้นให้ได้เป็น agar disk แล้วนำไปวางลงบน potato dextrose agar (PDA)
3. เจาะโคโลนีเส้นใยเชื้อราที่เจริญบน PDA แล้วนำไปวางลงบน potato dextrose agar (PDA) ให้ห่างจาก agar disk ของเชื้อแอสโคดิโนไมซีส 6 cm
4. บ่มที่ 30 °C นาน 5 วัน
5. เก็บข้อมูลและบันทึกความสามารถในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ

หมายเหตุ * เชื้อทดสอบได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC 25932, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Streptococcus mutans* ATCC25175, *Candida albicans* ATCC 90028, *Alternaria porri*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Collectotrichum musae*, *Curvularia* sp., *Drechslera* sp., *Exserohilum* sp. *Fusarium oxysporum*, *Verticillium* sp. และ *Sclerotium rolfsii*.

การเลี้ยงเชื้อแอสโคดิโนไมซีสเพื่อสกัดสารสกัดหยาบ

1. เลี้ยงเชื้อแอสโคดิโนไมซีสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม เช่น ISP-2, ISP-3, ISP-4, ISP-5 หรือ ISP-7 จำนวน 3 L (ประมาณ 150 – 200 plates) ที่ 30 °C นาน 10 วัน
2. ตัดอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วสกัดด้วย ethyl acetate ประมาณ 5 ครั้ง
3. แต่ละครั้งที่สกัดนำไประเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator แล้วชั่งน้ำหนักสารสกัดหยาบที่ได้

การทดสอบคุณสมบัติด้านการเจริญของเชื้อทดสอบของสารสกัดหยาบและสารที่แยกได้

1.1 การทดสอบเบื้องต้นโดยวิธี disk diffusion assay

1. นำมาละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสม (ส่วนใหญ่ใช้ methanol) ให้ได้ความเข้มข้น 1 mg/ml
2. นำมาเจือจางแบบเท่าตัว แล้วใช้สารละลายปริมาตร 50 µl load ลงบน paper disk ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 mm
3. วางลงบน Sabouraud agar (สำหรับยีสต์) หรือ nutrient agar (สำหรับแบคทีเรีย) ที่ spread plate ด้วยเชื้อทดสอบแล้ว หรือ PDA (สำหรับเชื้อราเส้นใย) แล้ววาง mycelium disk ห่างจาก paper disk 2.2 cm
4. บ่มที่ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง (สำหรับยีสต์และแบคทีเรีย) และบ่มที่ 30 °C นาน 4 วัน (สำหรับเชื้อราเส้นใย)
5. เก็บข้อมูลและบันทึกความสามารถในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ

1.2 การทดสอบด้วยวิธี growth inhibition method (สำหรับเชื้อราเส้นใย)

1. เจือจางสารสกัดหยาบหรือสารบริสุทธิ์ใน melt PDA ให้ได้ความเข้มข้น 480 – 15 µg/ml (480, 240, 120, 60, 30 และ 15 µg/ml) เท plate แล้วทิ้งให้อาหารแข็งตัว
2. เจาะโคโลนีเส้นใยเชื้อราที่เจริญบน PDA แล้วนำไปวางลงบน PDA ที่มีสารสกัดหยาบหรือสารบริสุทธิ์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ
3. อ่านผลหาค่า minimum inhibitory concentrations (MICs) คือระดับความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา

1.3 การทดสอบด้วยวิธี microbroth dilution method (สำหรับยีสต์และแบคทีเรีย)

1. เจือจางสารสกัดหยาบหรือสารบริสุทธิ์ใน nutrient broth ที่เติม 10% glucose (สำหรับแบคทีเรีย) หรือ Sabouraud broth (สำหรับยีสต์) ให้ได้ความเข้มข้น 256 – 0.50 µg/ml ใน 96-well microplate
2. เติมเชื้อทดสอบให้ได้ final concentration 1×10^5 cells/ml นำไปบ่มที่ 37 °C นาน 48 ชั่วโมง
3. อ่านผลหาค่า minimum inhibitory concentrations (MICs) และหาค่า minimum microbicidal concentrations (MMCs) โดยนำหลุมที่ไม่ขึ้นมาทำการ spread plate เพื่อหาความเข้มข้นของสารที่ทำให้เชื้อทดสอบตาย

การแยกสารองค์ประกอบหลักจากสารสกัดหยาบ

1. นำสารสกัดหยาบมาแยกกลุ่มสารเบื้องต้นด้วยวิธี flash column chromatography โดยใช้ silica gel 60 (Merck, 0.015 – 0.040 mm), ขนาด column 4.4 x 3.5 cm (diameter x height) ด้วยการ elute ด้วย hexane, hexane/ethyl acetate, ethyl acetate และ dichloromethane/methanol/H₂O (ในสัดส่วน 50:3:1, 30:3:1, 20:3:1, 10:3:1, 7:3:1 และ 6:4:1)
2. นำ fraction ต่าง ๆ มาแยกให้บริสุทธิ์ด้วย silica gel 60 (Merck, 0.063 – 0.200 mm) โดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมในการ elute
3. ตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี thin layer chromatography
4. รวบรวมสารที่แยกบริสุทธิ์ แล้วชั่งน้ำหนักที่ได้

การทดสอบคุณสมบัติทางเคมีและโครงสร้างทางเคมีของสารองค์ประกอบหลักที่แยกได้

1. หา melting points
2. หา optical rotations ด้วยเครื่อง Jasco digital polarimeter
3. UV spectra ด้วยเครื่อง Shimadzu UV-240 spectrophotometer
4. IR spectra ด้วยเครื่อง Jasco A-302 spectrophotometer

5. ^1H และ ^{13}C -NMR spectra ด้วยเครื่อง Bruker 300 (300 MHz สำหรับ ^1H และ 75 MHz สำหรับ ^{13}C)
6. วิเคราะห์โครงสร้างทางเคมี ตามข้อมูลทีวิเคราะห์ได้

การทดสอบความสามารถด้านการอักเสบ

RAW 264.7 murine macrophage cell line ได้ถูกนำมาใช้ในการทดสอบคุณสมบัติการด้านการอักเสบ โดยเลี้ยง RAW 264.7 murine macrophage cell line ในอาหาร DMEM ที่เติม 10% FBS เลี้ยงในสภาวะ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 °C RAW 264.7 cells ได้ถูกขูดโดยใช้ scraped rubber แล้วเจือจางในอาหาร DMEM ที่เติม 10% FBS และใส่ลงไปใน 96-well plate โดยใส่หลุมละ 2×10^5 cells ในอาหาร DMEM ที่เติม 10% FBS 100 ไมโครลิตร เลี้ยงในสภาวะ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง เตรียม สารสกัดหยาบหรือสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ในตัวทำละลายที่เหมาะสม (DMSO หรือ methanol) ให้ได้ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (stock solution) แล้วนำมาเจือจางใน DMEM ที่ไม่มี FBS ให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม (0.5, 1, 1.5, 2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) เติม สารสกัดหยาบหรือสารบริสุทธิ์ หรือ DMEM (negative control) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงไปใน RAW 264.7 cells (ดูดอาหาร DMEM เก่าทิ้ง) เลี้ยงในสภาวะ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง แล้วทำการกระตุ้นด้วย LPS (1 $\mu\text{g/ml}$), Poly (I:C) (1 $\mu\text{g/ml}$), and pam3CSK (10 $\mu\text{g/ml}$) เลี้ยงในสภาวะ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง แล้วเก็บ supernatant ที่เลี้ยงเซลล์ไว้เพื่อรอการทดสอบต่อไป ได้แก่ Nitrite assay, proinflammatory cytokine ได้แก่ PGE_2 , $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 และ IL-10

การตรวจวิเคราะห์ Nitric Oxide (total) Detection Kit (Stressgen, USA)

1. เตรียม Nitrate Standard ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ โดย ดูด 1X Reaction buffer ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่ 1 และดูด 1X Reaction buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่ 2 – 6 เติม Nitrate Standard solution ความเข้มข้น 1,000 $\mu\text{mole/L}$ ลงในหลอดที่ 1 ผสมให้เข้ากันดี แล้วดูดสารละลายจากหลอดที่ 1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เจือจางลงในหลอดที่ 2 แล้วทำการเจือจางเช่นนี้ในหลอดที่ 3 – 6 จะได้ความเข้มข้นของ Nitrate Standard solution หลอดที่ 1 – 6 ดังนี้ 100, 50, 25, 12.5, 6.25 และ 3.125 $\mu\text{mole/L}$
2. เติม 1X Reaction buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงใน Microtiter plate หลุม A1 (Blank well)

3. เติมนitrate Standard solution หลอดที่ 1 – 6 ลงในหลุม B1, C1, D1, E1, F1 และ G1 หลุมละ 50 ไมโครลิตร (Standards # 1 - # 6)
4. เติมนitrate Reaction buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในหลุม H1 (Zero Standard)
5. เติมนitrate Samples ลงไปในแต่ละหลุม ตั้งแต่หลุม A2 เป็นต้นไป หลุมละ 50 ไมโครลิตร
6. เติมนitrate Final NADH dilution (ละลาย NADH ใน vial ด้วย deionized water ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ -20 °C, เติมนitrate Final NADH dilution โดยผสม NADH solution ปริมาตร 0.9 มิลลิลิตร กับ deionized water ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร แช่น้ำแข็ง) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ในหลุม Standards, Zero Standard และ Samples
7. เติมนitrate Reductase Final Enzyme dilution (ละลาย Nitrate Reductase ใน vial ด้วย Nitrate Reductase Storage Buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที เก็บไว้ -20 °C (เรียกสารละลายนี้ว่า Enzyme Dilution I), เติมนitrate Final Enzyme dilution โดยผสม Enzyme Dilution I ปริมาตร X ไมโครลิตร กับ Reaction Buffer ปริมาตร 1.5X ไมโครลิตร แช่น้ำแข็ง) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ในหลุม Standards, Zero Standard และ Samples ผสมให้เข้ากันดีโดยเขย่าเบา ๆ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 30 นาที
8. เติมนitrate Griess Reagent I ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ในแต่ละหลุม ยกเว้นหลุม Bank (A1)
9. เติมนitrate Griess Reagent II ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ในแต่ละหลุม ยกเว้นหลุม Bank (A1)
10. ผสมให้เข้ากันดีโดยเขย่าเบา ๆ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที
11. นำไปอ่านค่า optical density ในแต่ละหลุม ที่ความยาวคลื่น 540 nm ด้วยเครื่อง ELISA reader เขียนกราฟ Nitrate Standard แล้วเปรียบเทียบ Samples กับกราฟมาตรฐาน

การตรวจวิเคราะห์ PGE₂ EIA Kit (Stressgen, USA)

ชุดตรวจ Assay Designs' Correlate-EIATM Prostaglandin E₂ (PGE₂) kit อาศัยหลักการ Competitive immunoassay ซึ่งมีวิธีการ ดังต่อไปนี้

1. เติมนitrate PGE₂ standards ดูด standard diluent หรือ tissue culture media ลงในหลอดทดลอง หลอดที่ 1 ปริมาตร 950 ไมโครลิตร และดูด standard diluent หรือ tissue culture media ลงในหลอดทดลอง หลอดที่ 2 – 7 หลอดละ 500 ไมโครลิตร ดูด PGE₂ standard solution เข้มข้น 50,000 พิโคกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่ 1 ผสมให้เข้ากันดี ดูดสารละลายจากหลอดที่ 1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เจือจางลงในหลอดที่ 2 และเจือจางเช่นเดียวกัน ลงในหลอดที่ 3 – 7 จะได้ PGE₂ standards ที่มีความเข้มข้น 2,500, 1,250, 625, 313, 156, 78.1, และ 39.1 พิโคกรัม/มิลลิลิตร ในหลอดที่ 1 – 7 ตามลำดับ

2. นำ microtiter plate ที่ coated ด้วย goat anti-mouse IgG ไว้แล้ว มาเติม standard diluent หรือ tissue culture media ในหลุม NSB (หลุม A1) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร
3. เติม PGE₂ standards ที่เตรียมไว้ในหลอดที่ 1 – 7 ลงในหลุม B1 – H1 ตามลำดับ หลุมละ 100 ไมโครลิตร
4. เติม Samples ลงไปในแต่ละหลุม ตั้งแต่หลุม A2 เป็นต้นไป หลุมละ 100 ไมโครลิตร
5. เติม Assay Buffer ลงในหลุม NSB (หลุม A1) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร
6. เติม blue Conjugate (alkaline phosphatase conjugated with PGE₂) ลงในหลุม PGE₂ standards และ samples หลุมละ 50 ไมโครลิตร
7. เติม yellow Antibody (monoclonal antibody to PGE₂) ลงในทุกหลุม (หลุม NSB, PGE₂ standards และ samples) หลุมละ 50 ไมโครลิตร
8. บ่ม microtiter plate ไว้ที่อุณหภูมิห้อง เขย่าเบา ๆ นาน 2 ชั่วโมง
9. นำ microtiter plate มาล้างด้วย 1X wash solution ครั้งละ 400 ไมโครลิตร 3 ครั้ง
10. ดูด pNpp (p-nitrophenyl phosphatase) substrate solution ลงในทุกหลุม ๆ ละ 200 ไมโครลิตร บ่ม microtiter plate ไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 45 นาที ไม่ต้องเขย่า
11. ดูด Stop solution (trisodium phosphate solution) ลงในทุกหลุม ๆ ละ 50 ไมโครลิตร
12. นำ microtiter plate ไปอ่านค่า optical density ที่ความยาวคลื่น 405 nm
13. คำนวณหา Net OD โดยนำค่า OD ของแต่ละหลุม – จาก OD ของหลุม NSB (A1) นำค่า Net OD ของ PGE₂ standards มาสร้างกราฟ แล้วนำค่า Net OD ของ samples มาคำนวณหาปริมาณ PGE₂

การตรวจวิเคราะห์ mouse TNF- α EIA Kit (Stressgen, USA)

1. เตรียม TNF- α standards ดูด Assay buffer 16 ลงในหลอดทดลอง หลอดที่ 1 ปริมาตร 450 ไมโครลิตร และดูด Assay buffer 16 ลงในหลอดทดลอง หลอดที่ 2 – 8 หลอดละ 250 ไมโครลิตร ดูด mouse TNF- α standard เข้มข้น 20,000 พิโคกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่ 1 ผสมให้เข้ากันดี ดูดสารละลายจากหลอดที่ 1 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร เจือจางลงในหลอดที่ 2 และเจือจางเช่นเดียวกัน ลงในหลอดที่ 3 – 8 จะได้ TNF- α standards ที่มีความเข้มข้น 2,000, 1,000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, และ 15.63 พิโคกรัม/มิลลิลิตร ในหลอดที่ 1 – 8 ตามลำดับ
2. นำ microtiter plate ที่ coated ด้วย monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อ mouse TNF- α ไว้แล้ว มาเติม TNF- α standards ที่เตรียมไว้ในหลอดที่ 1 – 8 ลงในหลุม A1 – H1 ตามลำดับ หลุมละ 50 ไมโครลิตร

3. ดูด standard diluent (Assay buffer 16 หรือ tissue culture media) ลงในหลุม A2 (Blank) หลุมละ 50 ไมโครลิตร
4. ดูด Samples ลงไปในแต่ละหลุม ตั้งแต่หลุม B2 เป็นต้นไป หลุมละ 50 ไมโครลิตร
5. ปุ่ม microtiter plate ไว้ที่อุณหภูมิห้อง เขย่าเบา ๆ นาน 2 ชั่วโมง
6. นำ microtiter plate มาล้างด้วย 1X wash solution ครั้งละ 400 ไมโครลิตร 4 ครั้ง
7. ดูด yellow antibody (rabbit polyclonal antibody ต่อ mouse TNF- α) ลงในทุกหลุม ๆ ละ 50 ไมโครลิตร ปุ่ม microtiter plate ไว้ที่อุณหภูมิห้อง เขย่าเบา ๆ นาน 2 ชั่วโมง
8. นำ microtiter plate มาล้างด้วย 1X wash solution ครั้งละ 400 ไมโครลิตร 4 ครั้ง
9. ดูด blue conjugate (donkey anti-rabbit antibody conjugated to Horseradish peroxidase) ลงในทุกหลุม ๆ ละ 50 ไมโครลิตร ปุ่ม microtiter plate ไว้ที่อุณหภูมิห้อง เขย่าเบา ๆ นาน 30 นาที
10. นำ microtiter plate มาล้างด้วย 1X wash solution ครั้งละ 400 ไมโครลิตร 4 ครั้ง
11. ดูด TMB (3,3',5,5' tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide) substrate solution ลงในทุกหลุม ๆ ละ 50 ไมโครลิตร ปุ่ม microtiter plate ไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที ไม่ต้องเขย่า
12. ดูด Stop solution (1 N hydrochloric acid) ลงในทุกหลุม ๆ ละ 50 ไมโครลิตร
13. นำ microtiter plate ไปอ่านค่า optical density ที่ความยาวคลื่น 450 nm
14. คำนวณหา Net OD โดยนำค่า OD ของแต่ละหลุม – จาก OD ของหลุม Blank (A2) นำค่า Net OD ของ TNF- α standards มาสร้างกราฟ แล้วนำค่า Net OD ของ samples มาคำนวณหาปริมาณ TNF- α

การตรวจวิเคราะห์ mouse IL-1 β EIA Kit (Stressgen, USA)

1. เตรียม IL-1 β standards ดูด standard diluent หรือ tissue culture media ลงในหลอดทดลอง หลอดที่ 1 – 4 หลอดละ 300 ไมโครลิตร ดูด mouse IL-1 β standard (recombinant mouse IL-1 β) เข้มข้น 4,000 พิกोगرام/มิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่ 1 ผสมให้เข้ากันดี ดูดสารละลายจากหลอดที่ 1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เจือจางลงในหลอดที่ 2 และเจือจางเช่นเดียวกัน ลงในหลอดที่ 3 – 4 จะได้ IL-1 β standards ที่มีความเข้มข้น 1,000, 250, 62.5 และ 15.63 พิกोगرام/มิลลิลิตร ในหลอดที่ 1 – 4 ตามลำดับ

2. นำ microtiter plate ที่ coated ด้วย monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อ mouse IL-1 β ไว้แล้ว มาเติม IL-1 β standards ที่เตรียมไว้ในหลอดที่ 1 – 4 ลงในหลุม A1 – D1 ตามลำดับหลุมละ 50 ไมโครลิตร
3. ดูด standard diluent หรือ tissue culture media ลงในหลุม E1 (Blank) หลุมละ 50 ไมโครลิตร
4. ดูด Samples ลงไปในแต่ละหลุม ตั้งแต่หลุม F1 เป็นต้นไป หลุมละ 50 ไมโครลิตร
5. ดูด Antibody (biotinylated antibody ต่อ mouse IL-1 β) ลงในทุกหลุม ๆ ละ 50 ไมโครลิตร
6. บ่ม microtiter plate ไว้ที่อุณหภูมิห้อง เขย่าเบา ๆ นาน 2 ชั่วโมง
7. นำ microtiter plate มาล้างด้วย 1X wash solution ครั้งละ 400 ไมโครลิตร 3 ครั้ง
8. ดูด Streptavidin-HRP Conjugate (เตรียมใหม่ทุกครั้ง, ดูด Streptavidin-HRP Conjugate ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร ผสมลงใน Streptavidin-HRP Dilution Buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร) ลงในทุกหลุม ๆ ละ 50 ไมโครลิตร บ่ม microtiter plate ไว้ที่อุณหภูมิห้อง เขย่าเบา ๆ นาน 30 นาที
9. นำ microtiter plate มาล้างด้วย 1X wash solution ครั้งละ 400 ไมโครลิตร 3 ครั้ง
10. ดูด TMB (3,3',5,5' tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide) substrate solution ลงในทุกหลุม ๆ ละ 50 ไมโครลิตร บ่ม microtiter plate ไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที ไม่ต้องเขย่า
11. ดูด Stop solution (0.18 M sulfuric acid) ลงในทุกหลุม ๆ ละ 50 ไมโครลิตร
12. นำ microtiter plate ไปอ่านค่า optical density ที่ความยาวคลื่น 450 nm
13. คำนวณหา Net OD โดยนำค่า OD ของแต่ละหลุม – จาก OD ของหลุม Blank (E1) นำค่า Net OD ของ IL-1 β standards มาสร้างกราฟ แล้วนำค่า Net OD ของ samples มาคำนวณหาปริมาณ IL-1 β

การตรวจวิเคราะห์ mouse IL-6 EIA Kit (Stressgen, USA)

1. เตรียม IL-6 standards ดูด standard diluent (Assay Buffer 13 หรือ tissue culture media) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงใน mouse IL-6 (2000 พิโคกรัม) ใน vial จะได้ IL-6 เข้มข้น 1000 พิโคกรัม/มิลลิลิตร ดูด standard diluent (Assay Buffer 13 หรือ tissue culture media) ลงในหลอดที่ 2 – 8 หลอดละ 500 ไมโครลิตร ดูด mouse IL-6 standard ที่เตรียมไว้ ความเข้มข้น 1000 พิโคกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่ 2 ผสมให้เข้ากันดี ดูดสารละลายจากหลอดที่ 2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เจือจางลงในหลอด

- ที่ 3 และเจือจางเช่นเดียวกัน ลงในหลอดที่ 4 – 8 จะได้ IL-6 standards ที่มีความเข้มข้น 1,000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63 และ 7.81 พิโคกรัม/มิลลิลิตร ในหลอดที่ 1 – 8 ตามลำดับ
2. นำ microtiter plate ที่ coated ด้วย monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อ mouse IL-6 ไว้แล้ว มาเติม IL-6 standards ที่เตรียมไว้ในหลอดที่ 1 – 8 ลงในหลุม A1 – H1 ตามลำดับ หลุมละ 50 ไมโครลิตร
 3. ดูด standard diluent (Assay Buffer 13 หรือ tissue culture media) ลงในหลุม A2 (Blank) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร
 4. ดูด Samples ลงไปในแต่ละหลุม ตั้งแต่หลุม B2 เป็นต้นไป หลุมละ 50 ไมโครลิตร
 5. บ่ม microtiter plate ไว้ที่อุณหภูมิห้อง เขย่าเบา ๆ นาน 1 ชั่วโมง
 6. นำ microtiter plate มาล้างด้วย 1X wash solution ครั้งละ 400 ไมโครลิตร 4 ครั้ง
 7. ดูด yellow Antibody (biotinylated rat monoclonal antibody ต่อ mouse IL-6) ลงในทุกหลุม ๆ ละ 50 ไมโครลิตร
 8. บ่ม microtiter plate ไว้ที่อุณหภูมิห้อง เขย่าเบา ๆ นาน 1 ชั่วโมง
 9. นำ microtiter plate มาล้างด้วย 1X wash solution ครั้งละ 400 ไมโครลิตร 4 ครั้ง
 10. ดูด blue Conjugate (Streptavidin Conjugated กับ Horseradish peroxidase) ลงในทุกหลุม ๆ ละ 50 ไมโครลิตร บ่ม microtiter plate ไว้ที่อุณหภูมิห้อง เขย่าเบา ๆ นาน 30 นาที
 11. นำ microtiter plate มาล้างด้วย 1X wash solution ครั้งละ 400 ไมโครลิตร 4 ครั้ง
 12. ดูด TMB (3,3',5,5' tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide) substrate solution ลงในทุกหลุม ๆ ละ 50 ไมโครลิตร บ่ม microtiter plate ไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที ไม่ต้องเขย่า
 13. ดูด Stop solution (1 N hydrochloric acid) ลงในทุกหลุม ๆ ละ 50 ไมโครลิตร
 14. นำ microtiter plate ไปอ่านค่า optical density ที่ความยาวคลื่น 450 nm
 15. คำนวณหา Net OD โดยนำค่า OD ของแต่ละหลุม – จาก OD ของหลุม Blank (A2) นำค่า Net OD ของ IL-6 standards มาสร้างกราฟ แล้วนำค่า Net OD ของ samples มาคำนวณหาปริมาณ IL-6

การตรวจวิเคราะห์ mouse IL-10 EIA Kit (Stressgen, USA)

1. เตรียม IL-10 standards ดูด standard diluent (Assay Buffer 13 หรือ tissue culture media) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงใน mouse IL-6 (2000 พิโคกรัม) ใน vial จะได้ IL-10 เข้มข้น 1000 พิโคกรัม/มิลลิลิตร ดูด standard diluent (Assay Buffer 13 หรือ tissue

- culture media) ลงในหลอดที่ 2 – 8 หลอดละ 500 ไมโครลิตร ดูด mouse IL-10 standard ที่เตรียมไว้ ความเข้มข้น 1000 พิโคกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่ 2 ผสมให้เข้ากันดี ดูดสารละลายจากหลอดที่ 2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เจือจางลงในหลอดที่ 3 และเจือจางเช่นเดียวกัน ลงในหลอดที่ 4 – 8 จะได้ IL-6 standards ที่มีความเข้มข้น 1,000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63 และ 7.81 พิโคกรัม/มิลลิลิตร ในหลอดที่ 1 – 8 ตามลำดับ
2. นำ microtiter plate ที่ coated ด้วย monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อ mouse IL-10 ไว้แล้ว มาเติม IL-10 standards ที่เตรียมไว้ในหลอดที่ 1 – 8 ลงในหลุม A1 – H1 ตามลำดับ หลุมละ 50 ไมโครลิตร
 3. ดูด standard diluent (Assay Buffer 13 หรือ tissue culture media) ลงในหลุม A2 (Blank) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร
 4. ดูด Samples ลงไปในแต่ละหลุม ตั้งแต่หลุม B2 เป็นต้นไป หลุมละ 50 ไมโครลิตร
 5. บ่ม microtiter plate ไว้ที่อุณหภูมิห้อง เขย่าเบา ๆ นาน 1 ชั่วโมง
 6. นำ microtiter plate มาล้างด้วย 1X wash solution ครั้งละ 400 ไมโครลิตร 4 ครั้ง
 7. ดูด yellow Antibody (biotinylated rat monoclonal antibody ต่อ mouse IL-10) ลงในทุกหลุม ๆ ละ 50 ไมโครลิตร
 8. บ่ม microtiter plate ไว้ที่อุณหภูมิห้อง เขย่าเบา ๆ นาน 1 ชั่วโมง
 9. นำ microtiter plate มาล้างด้วย 1X wash solution ครั้งละ 400 ไมโครลิตร 4 ครั้ง
 10. ดูด blue Conjugate (Streptavidin Conjugated กับ Horseradish peroxidase) ลงในทุกหลุม ๆ ละ 50 ไมโครลิตร บ่ม microtiter plate ไว้ที่อุณหภูมิห้อง เขย่าเบา ๆ นาน 30 นาที
 11. นำ microtiter plate มาล้างด้วย 1X wash solution ครั้งละ 400 ไมโครลิตร 4 ครั้ง
 12. ดูด TMB (3,3',5,5' tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide) substrate solution ลงในทุกหลุม ๆ ละ 50 ไมโครลิตร บ่ม microtiter plate ไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที ไม่ต้องเขย่า
 13. ดูด Stop solution (1 N hydrochloric acid) ลงในทุกหลุม ๆ ละ 50 ไมโครลิตร
 14. นำ microtiter plate ไปอ่านค่า optical density ที่ความยาวคลื่น 450 nm
 15. คำนวณหา Net OD โดยนำค่า OD ของแต่ละหลุม – จาก OD ของหลุม Blank (A2) นำค่า Net OD ของ IL-10 standards มาสร้างกราฟ แล้วนำค่า Net OD ของ samples มาคำนวณหาปริมาณ IL-10

ค่าต่าง ๆ ที่วัดได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ จะถูกนำคำนวณหาค่าเฉลี่ย และรายงานเป็นค่าเฉลี่ย ส่วนการวิเคราะห์หาความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วย One way ANOVA ด้วยโปรแกรม SPSS for Windows 11.01

บทที่ 4

ผลการทดลอง

การแยกเชื้อแอคติโนมัยซีสในพืช

จากการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีสในพืชสมุนไพรบางชนิด จำนวน 11 ชนิด โดยใช้ตัวอย่างเนื้อเยื่อส่วน ใบ ลำต้น และราก ตัวอย่างละ 900 ตัวอย่าง ทำความสะอาดผิวหน้าด้วยน้ำก๊อก เพื่อล้างเศษดินและเศษขยะออก แล้วทำการฆ่าเชื้อที่ผิวหน้าด้วย 1% sodium hypochlorite เป็นเวลา 5 นาที และ 70% ethanol เป็นเวลา 5 นาที ผึ่งให้แห้งในตู้ปลอดเชื้อ แล้วบ่มลงบนอาหาร Humic acid-vitamin agar ที่มี nystatin และ cycloheximide 100 µg/ml ที่ 30 °C เป็นเวลา 1 เดือน สังเกตขึ้นเนื้อเยื่อที่มีการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีส แล้วทำการ sub-culture ให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ บนอาหาร ISP-2 ซึ่งจากงานวิจัยในครั้งนี้ สามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยซีสได้จำนวนทั้งสิ้น 530 สายพันธุ์ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การแยกเชื้อแอคติโนมัยซีสในพืช

พืช	จำนวนเชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกได้จากส่วนต่าง ๆ			รวม
	ใบ	ลำต้น	ราก	
<i>Alpinia galanga</i> Swartz.	15	9	34	58
<i>Zingiber officinale</i> Rosc.	19	24	39	82
<i>Boesenbergia pandurata</i>	20	13	36	69
<i>Zingiber cassumunar</i>	14	26	46	86
<i>Curcuma longa</i>	11	11	26	48
<i>Piper betle</i>	9	13	22	44
<i>Acanthus ebracteatus</i> Wall.	5	4	14	23
<i>Andrographis paniculata</i> Wall.	3	3	17	23
<i>Clinacanthus nutans</i> Lindau.	4	5	25	34
<i>Thunbergia laurifolia</i> Linn.	6	4	19	29
<i>Tiliacora triandra</i> Diels.	7	6	21	34
รวม	113	118	299	530

จากผลการทดลองนี้ พบว่าตัวอย่างจากเนื้อเยื่อส่วนรากมีโอกาสดังแยกเชื้อได้มากที่สุด สามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยซีสได้ 299 สายพันธุ์ จากตัวอย่างทั้งสิ้น 9,900 ตัวอย่าง คิดเป็น 3.02% ขณะที่ตัวอย่างใบและลำต้น สามารถแยกเชื้อได้ 113 และ 118 สายพันธุ์ หรือคิดเป็น

1.14% และ 1.19% ตามลำดับ จากการแยกเชื้อในครั้งนี้ พบว่าพืชที่สามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยซิสได้มากที่สุด คือ *Zingiber cassumunar* และ *Zingiber officinale* Rosc. ซึ่งเป็นพืชที่จัดอยู่ในตระกูล Zingiberaceae

การตรวจกรองคุณสมบัติด้านการเจริญจุลินทรีย์ของแอคติโนมัยซิส

จากการตรวจกรองเชื้อแอคติโนมัยซิสที่แยกเชื้อได้จำนวนทั้งสิ้น 530 สายพันธุ์ เพื่อหาคุณสมบัติด้านการเจริญจุลินทรีย์ทดสอบทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ และเชื้อรา เพื่อจำแนกกลุ่มแอคติโนมัยซิสที่มีศักยภาพในการสร้างสารต้านจุลินทรีย์ต่าง ๆ ได้ผลดังตารางที่ 2 และตารางที่ 3

ตารางที่ 2 การตรวจกรองหาเชื้อแอคติโนมัยซิสที่สร้างสารต้านการเจริญเชื้อแบคทีเรียและยีสต์

ระดับต้าน การเจริญ	เชื้อทดสอบ*					
	Sa	Ec	Pa	Bs	Sm	Ca
4+**	30	20	17	29	28	32
3+	47	45	31	51	52	58
2+	64	77	60	69	58	64
1+	98	89	98	82	78	72
±	114	94	103	99	88	88
0	177	205	221	200	226	216

*Sa: *Staphylococcus aureus* ATCC 25932, Ec: *Escherichia coli* ATCC 10536, Pa:

Pseudomonas aeruginosa ATCC27853, Bs: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, Sm: *Streptococcus mutans* ATCC25175, และ Ca: *Candida albicans* ATCC 90028

**4+: inhibition zone > 2 cm, 3+: inhibition zone 1.5 – 2 cm, 2+: inhibition zone 1 – 1.5 cm, 1+: inhibition zone 0.5 – 1 cm, ±: inhibition zone < 0.5 cm, 0: ไม่เกิด inhibition zone

ตารางที่ 3 การตรวจกรองหาเชื้อแอคติโนมัยซีส์ที่สร้างสารต้านการเจริญเชื้อราทดสอบ

ระดับต้าน การเจริญ	เชื้อทดสอบ*								
	Ap	Cg	Cm	Cu	Dr	Ex	Fu	Ve	Sr
4+**	17	19	18	26	24	27	21	25	25
3+	34	37	38	49	45	39	47	48	40
2+	48	67	49	46	52	44	50	47	42
1+	68	76	71	81	68	72	64	78	72
±	85	81	93	89	98	88	89	88	92
0	278	250	261	293	243	260	259	244	259

*Ap: *Alternaria porri*, Cg: *Colletotrichum gloeosporioides*, Cm: *Collectotrichum musae*, Cu:

Curvularia sp., Dr: *Drechslera* sp., Ex: *Exserohilum* sp., Fu: *Fusarium oxysporum*, Ve:

Verticillium sp. และ Sr: *Sclerotium rolfsii*.

**4+: inhibition zone > 2 cm, 3+: inhibition zone 1.5 – 2 cm, 2+: inhibition zone 1 – 1.5 cm,

1+: inhibition zone 0.5 – 1 cm, ±: inhibition zone < 0.5 cm, 0: ไม่เกิด inhibition zone

จากการตรวจกรองคุณสมบัติต้านการเจริญเชื้อจุลินทรีย์ ของเชื้อแอคติโนมัยซีส์ที่แยกได้จากพืชในครั้งนี้ พบว่ามีเพียง 20 สายพันธุ์ จากทั้งหมด 530 สายพันธุ์ ที่สามารถสร้างสารต้านการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดี คิดเป็น 3.77% จึงคัดเลือกมา 13 สายพันธุ์ ได้แก่ LJK109, BRM10, TL-19, GMT-8, WP-100, WP-107, BT01, TG-02, TG-03, TG-04, TG-05, TG-06R และ ZR-01R มาทำการเลี้ยงเชื้อเพื่อสกัดสารสกัดหยาบ จากการทดลองพบว่า ISP-2 เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดีที่สุดในการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีส์เพื่อสกัดสารสกัดหยาบ ซึ่งจากการสกัดสารสกัดหยาบของจากการเลี้ยงเชื้อนี้ พบว่าเชื้อแต่ละสายพันธุ์ให้ปริมาณสารสกัดหยาบแตกต่างกัน ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 เชื้อแอคติโนมัยซีสสายพันธุ์ที่คัดเลือกมาสกัดสารสกัดหยาบ

เชื้อแอคติโนมัยซีส	น้ำหนักสารสกัดหยาบ (g/L)
LJK109	5.72
BRM10	2.54
TL-19	3.56
GMT-8	2.38
WP-100	3.72
WP-107	4.37
BT01	4.63
BT11	3.82
HK17	2.71
HK35	2.65
TG-02	2.66
TG-03	2.84
TG-04	3.24
TG-05	3.72
TG-06R	2.63
ZR-01R	2.31

ผลการแยกสารสกัดหยาบให้บริสุทธิ์

1. LJK109 ดำเนินการเสร็จสิ้นแล้ว
2. BRM10 ดำเนินการเสร็จสิ้นแล้ว
3. TL-19 ดำเนินการเสร็จสิ้นแล้ว
4. GMT-8 ดำเนินการเสร็จสิ้นแล้ว
5. WP-100 ดำเนินการเสร็จสิ้นแล้ว
6. WP-107 ดำเนินการเสร็จสิ้นแล้ว
7. BT01 ดำเนินการเสร็จสิ้นแล้ว
8. BT11 ดำเนินการเสร็จสิ้นแล้ว
9. HK17 ดำเนินการเสร็จสิ้นแล้ว
10. HK 35 ดำเนินการเสร็จสิ้นแล้ว
11. TG-02 ดำเนินการเสร็จสิ้นแล้ว
12. TG-03 ดำเนินการเสร็จสิ้นแล้ว
13. TG-04 ดำเนินการเสร็จสิ้นแล้ว

14. TG-05 ดำเนินการเสร็จสิ้นแล้ว
15. TG-06R ดำเนินการเสร็จสิ้นแล้ว
16. ZR-01R ดำเนินการเสร็จสิ้นแล้ว

การแยกสารจาก LJK109

LJK109 แยกสารที่เป็นองค์ประกอบหลักได้ 2 ชนิด คือ 3-methylcarbazole (compound 1) และ 1-methoxy-3-methylcarbazole (compound 2) ซึ่งเป็นสารที่เคยมีผู้รายงานมาก่อนแล้ว โดยมีข้อมูลทาง spectral data ดังนี้

Compound **1**, identified by NMR and mass spectral data as 3-methylcarbazole ($C_{13}H_{11}N$), was a colorless prisms having: mp 207-208 °C (from acetone). UV λ_{max} nm: 216 sh, 230 sh, 236, 246 sh, 260, 290 sh, 296, 328, 342. IR ν_{max} cm^{-1} : 3380, 1600, 1490, 1450. MS m/z : 181 (M^+ , 100%), 180, 152. 1H -NMR (acetone- d_6) δ : 2.45 (3H, s, aryl CH_3), 6.96-7.50 (5H, m, 1-, 2-, 6-, 7-, 8-H), 7.82 (1H, s, 4-H), 7.99 (1H, d, $J=8$ Hz, 5-H), 10.10 (1H, br s, NH).

Compound **2**, identified by NMR and mass spectral data as 1-methoxy-3-methylcarbazole ($C_{14}H_{13}NO$), was a colorless plates having: mp 53-55 °C (from hexane). Picrate: brown needles, mp 189-191 °C (from benzene). UV λ_{max} nm (log ϵ): 225 (4.47), 243 (4.58), 251 sh (4.44), 283 sh (3.83), 292 (4.01), 330 (3.53), 344inf (3.49). IR ν_{max} cm^{-1} : 3480, 1640, 1610, 1590, 1505. MS m/z : 211 (M^+ , 100%), 196 (89), 180 (10), 168 (54), 167 (33). ^{13}C -NMR δ : 145.2 (s), 139.5 (s), 129.2 (s), 128.0 (s), 125.4 (d), 124.3 (s), 120.3 (d), 119.1 (d), 112.5 (d), 110.9 (d), 107.7 (d), 55.1 (q), 21.8 (q).

การทดสอบการต้านเชื้อจุลินทรีย์ พบว่า 3-methylcarbazole และ 1-methoxy-3-methylcarbazole มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดี เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดหยาด ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญเชื้อราทดสอบของสารสกัดหยาบและสารที่แยกได้

สารทดสอบ	MIC against tested fungi ($\mu\text{g/ml}$)								
	Ap.	Cg.	Cm.	Cu.	Dr.	Ex.	Fo.	Ve.	Sr.
Crude extract	120	120	>480	120	240	480	>480	480	240
Compound 1	60	30	120	60	60	120	240	60	120
Compound 2	60	60	120	60	60	120	240	60	60

Ap.; *Alternaria porri*, Cg.; *Colletotrichum gloeosporioides*, Cm.; *Colletotrichum musae*, Cu.; *Curvularia* sp., Dr.; *Drechslera* sp., Ex.; *Exserohilum* sp., Fo.; *Fusarium oxysporum*, Ve.; *Verticillium* sp. and Sr.; *Sclerotium rolfsii*.

เนื่องจากสารในกลุ่ม carbazoles มีรายงานเป็นสารต้านการอักเสบด้วย ดังนั้นจึงทำให้มีความสนใจนำ 3-methylcarbazole และ 1-methoxy-3-methylcarbazole มาทดสอบการต้านการอักเสบแบบ *in vitro* โดยใช้ murine macrophage RAW 264.7 cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS (1 $\mu\text{g/ml}$), Poly (I:C) (1 $\mu\text{g/ml}$), and pam3CSK (10 $\mu\text{g/ml}$) ซึ่งการกระตุ้นด้วยสารต่าง ๆ ดังกล่าวมีกลไกกระตุ้นผ่านทาง toll like receptor ที่แตกต่างกัน เช่น LPS กระตุ้นผ่านทาง TLR4 ligand, polyinosinic-polycytidylic acid (Poly(I:C)) กระตุ้นผ่านทาง TLR3 ligand และ *N*-palmitoyl-S-[2,3-bis(palmitoloxyl)-(2*RS*)-propyl]-Cys-Ser-Lys₄ (pam3CSK) กระตุ้นผ่านทาง TLR2 ligand โดยการวัด nitric oxide (NO), prostaglandin E₂ (PGE₂), tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β , IL-6 และ IL-10 หาก 3-methylcarbazole และ 1-methoxy-3-methylcarbazole สามารถยับยั้งการกระตุ้น RAW 264.7 cells ได้ การวัดปริมาณสารดังกล่าวก็จะลดลง ซึ่งจากการทดลองพบว่า 3-methylcarbazole และ 1-methoxy-3-methylcarbazole สามารถยับยั้งการกระตุ้น RAW 264.7 cells ด้วย LPS และ pam3CSK แต่ 3-methylcarbazole และ 1-methoxy-3-methylcarbazole ไม่สามารถยับยั้งการกระตุ้น RAW264.7 cells ด้วย Poly (I:C) ได้ ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ระดับ nitrile ที่ 3-methylcarbazole และ 1-methoxy-3-methylcarbazole ยับยั้ง จากการกระตุ้น RAW 264.7 cells ด้วยตัวกระตุ้นต่าง ๆ

สารกระตุ้น	ระดับ nitrile (μM) ที่ถูกสารยับยั้ง*								
	3-methylcarbazole ($\mu\text{g/ml}$)				1-methoxy-3-methylcarbazole ($\mu\text{g/ml}$)				control
	2.5	5	10	20	2.5	5	10	20	-
LPS	46.67	37.86	19.13	12.32	48.74	39.67	17.87	14.26	52.64
Poly (I:C)	16.67	15.86	19.13	14.32	18.74	14.67	17.87	14.26	14.64
pam3CSK	38.67	32.86	22.13	12.32	36.47	29.67	19.87	11.26	42.64

*ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

ตารางที่ 7 ระดับ prostaglandin E_2 ที่ 3-methylcarbazole และ 1-methoxy-3-methylcarbazole ยับยั้ง จากการกระตุ้น RAW 264.7 cells ด้วยตัวกระตุ้นต่าง ๆ

สารกระตุ้น	ระดับ prostaglandin E_2 (ng/ml) ที่ถูกสารยับยั้ง*								
	3-methylcarbazole ($\mu\text{g/ml}$)				1-methoxy-3-methylcarbazole ($\mu\text{g/ml}$)				control
	2.5	5	10	20	2.5	5	10	20	-
LPS	34.15	24.65	12.82	10.62	33.36	22.24	11.86	9.86	30.66
Poly (I:C)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pam3CSK	34.15	24.65	12.82	10.62	33.36	22.24	11.86	9.86	30.66

*ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

ตารางที่ 8 ระดับ tumor necrosis factor- α ที่ 3-methylcarbazole และ 1-methoxy-3-methylcarbazole ยับยั้ง จากการกระตุ้น RAW 264.7 cells ด้วยตัวกระตุ้นต่าง ๆ

สารกระตุ้น	ระดับ tumor necrosis factor- α , (ng/ml) ที่ถูกสารยับยั้ง*								
	3-methylcarbazole ($\mu\text{g/ml}$)				1-methoxy-3-methylcarbazole ($\mu\text{g/ml}$)				control
	2.5	5	10	20	2.5	5	10	20	-
LPS	31.75	22.09	9.85	7.65	32.56	25.87	11.97	8.67	35.73
Poly (I:C)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pam3CSK	31.75	22.09	9.85	7.65	32.56	25.87	11.97	8.67	35.73

*ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

ตารางที่ 9 ระดับ interleukin (IL)-1 β , IL-6 และ IL-10 ที่ 3-methylcarbazole และ 1-methoxy-3-methylcarbazole ยับยั้ง จากการกระตุ้น RAW 264.7 cells ด้วย LPS (1 μ g/ml)

Pro-inflammatory cytokine	ระดับ Pro-inflammatory cytokine (ng/ml) ที่ถูกสารยับยั้ง*								
	3-methylcarbazole (μ g/ml)				1-methoxy-3-methylcarbazole (μ g/ml)				control
	2.5	5	10	20	2.5	5	10	20	-
IL-1 β	28.03	22.60	13.58	9.35	26.58	20.86	11.56	8.05	32.39
IL-6	26.01	16.61	8.86	6.01	24.68	18.01	10.42	5.22	29.77
IL-10	18.01	11.61	7.86	5.46	16.81	10.61	6.32	4.25	19.77

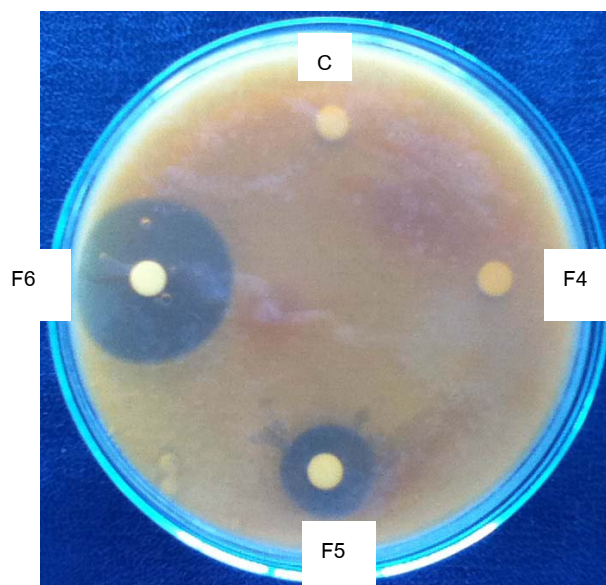
*ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

การแยกสารจาก BRM10

จากการแยกสารจาก BRM10 ซึ่งพบว่าสามารถแยกสารที่เป็นองค์ประกอบหลักได้ 2 ชนิด คือ compound 1 (fraction 5) และ compound 2 (fraction 6) ตามรูปแบบที่แตกต่างกันบน thin-layer chromatography ดังรูปที่ 1 และจากการทดสอบเบื้องต้นเกี่ยวกับคุณสมบัติด้านการเจริญของแบคทีเรียบางชนิดโดยวิธี disk diffusion assay ของ compound 1 และ compound 2 ที่แยกได้พบว่าสารทั้ง 2 มีคุณสมบัติด้านการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้ ดังรูปที่ 2 และจากการเปรียบเทียบ ^1H NMR and ^{13}C NMR Spectra กับรายงานที่มีผู้ศึกษาไว้แล้ว Wu *et al.* (2009) พบว่า compound 1 คือ 1-methoxy-nigericin และ compound 2 คือ nigericin ดังตารางที่ 10 และมีโครงสร้าง ดังรูปที่ 3



รูปที่ 1 รูปแบบที่แตกต่างกันบน thin-layer chromatography ด้วยระบบ hexane/EtOAc (2:1) ของ crude extract (C) และ fractions ต่าง ๆ (F4, F5 and F6) ทดสอบด้วย vanillin reagent.



รูปที่ 2 การทดสอบเบื้องต้นเกี่ยวกับคุณสมบัติต้านการเจริญของแบคทีเรียบางชนิดโดยวิธี disk diffusion assay ของ compound 1 และ compound 2 ต่อ *B. cereus* ATCC6633 ที่ปริมาณ 30 mg/disc.

ตารางที่ 10. การเปรียบเทียบ ^1H NMR and ^{13}C NMR Spectra ของ nigericin, 1,29-O-dimethyl-30-acetyl nigericin และ 1-methoxy-nigericin ใน CDCl_3 (mult, J/Hz).

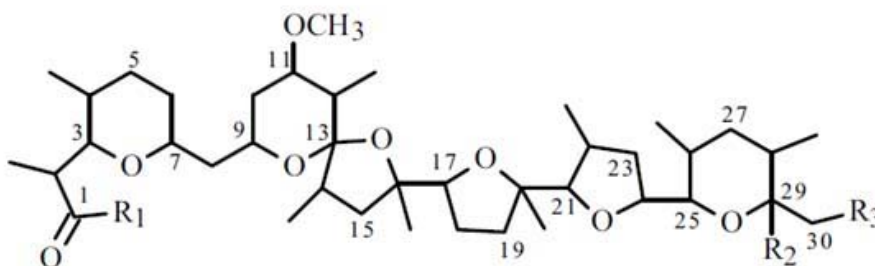
C atom position	C atom group	nigericin ^a		1,29-O-dimethyl-30-acetyl nigericin ^a		1-methoxy-nigericin	
		δ_{C} (125 MHz)	δ_{H} (500 MHz)	δ_{C} (125 MHz)	δ_{H} (500 MHz)	δ_{C} (75 MHz)	δ_{H} (300 MHz)
1	C=O	177.5 s	-	176.4 s	-	176.5	-
MeO-1	OCH ₃	-	-	51.7 q	3.74 (s)	51.7	3.71 (s)
2	CH	44.2 d	2.22 (m)	43.1 d	2.65 (m)	43.0	2.53 (m)
2a	CH ₃	13.06 q	1.24 (m)	12.7 q	1.05 (m)	12.9	1.04 (m)
3	CH	73.0 d	3.63 (m)	73.6 d	3.77 (m)	73.7	3.76 (m)
4	CH	27.5 d	1.49 (m)	27.7 d	1.81 (m)	27.6	1.78 (m)
4a	CH ₃	10.8 q	1.05 (m)	10.9 d	0.97 (d, J = 8.40)	10.5	0.93 (m)
5	CH ₂	25.7 t	1.42 (m)	25.0 t	1.66 (m)	25.8	1.50 (m)
			1.49 (m)		1.96 (m)		1.90 (m)
6	CH ₂	23.1 t	1.74 (m)	21.5 t	2.06 (m)	21.9	2.04 (m)
7	CH	69.0 d	3.84 (m)	69.6 d	4.10 (m)	69.5	4.12 (m)
8	CH ₂	35.2 t	1.13 (m)	36.6 t	0.97 (m)	36.5	0.96 (m)
			2.50 (m)		2.50 (m)		2.53 (m)
9	CH	60.3 d	4.03 (m)	60.4 d	4.19 (m)	60.4	4.14 (m)
10	CH ₂	31.7 t	1.90 (m)	36.4 t	2.31 (m)	33.0	2.24 (m)
11	CH	78.0 d	3.27 (m)	78.8 d	3.40 (m)	78.6	3.29 (m)
MeO-11	OCH ₃	57.4 q	3.34 (s)	58.2 q	3.31 (s)	57.8	3.34 (s)
12	CH	37.1 d	1.49 (m)	36.5 d	1.81 (m)	36.9	1.73 (m)
12a	CH ₃	13.13 q	1.12 (m)	12.93 q	1.03 (m)	13.10	1.02 (m)
13	C	108.2 s	-	107.3 s	-	107.9	-
14	CH	39.0 d	1.74 (m)	39.5 d	2.07 (m)	39.5	2.11 (m)
14a	CH ₃	13.3 q	0.88 (m)	12.99 q	0.90 (d, J = 8.54)	13.13	0.95 (m)
15	CH ₂	43.2 t	1.49 (m)	43.2 t	1.60 (m)	41.4	1.55 (m)
			1.42 (m)		1.78 (m)		1.85 (m)
16	C	81.5 s	-	83.6 s	-	82.6	-
16a	CH ₃	28.0 q	2.18 (s)	23.9 q	1.25 (s)	26.2	1.23 (s)
17	CH	82.4 d	3.36 (m)	80.0 d	3.40 (m)	82.1	3.59 (m)
18	CH ₂	26.1 t	1.49 (m)	27.6 t	1.49 (m)	26.6	1.51 (m)
			1.42 (m)		1.81 (m)		1.79 (m)
19	CH ₂	31.0 t	1.35 (m)	33.0 t	1.37 (m)	32.1	1.37 (m)
			1.75 (m)		2.20 (m)		2.17 (m)
20	C	83.5 s	-	83.7 s	-	83.8	-
20a	CH ₃	22.7 q	2.11 (s)	23.0 q	1.15 (s)	22.9	1.12 (s)
21	CH	85.8 q	3.76 (m)	86.1 d	3.87 (m)	86.2	3.90 (m)
22	CH	35.1 d	1.80 (m)	35.7 d	2.20 (m)	34.6	1.81 (m)
22a	CH ₃	15.6 q	0.87 (m)	15.8 q	0.87 (d, J = 7.12)	15.6	0.91 (m)
23	CH ₂	32.3 t	1.35 (m)	36.4 t	1.35 (m)	33.9	1.31 (m)
			1.80 (m)		2.20 (m)		1.82 (m)

^a รายงานโดย Wu *et al.* (2009).

ตารางที่ 10. การเปรียบเทียบ ^1H NMR and ^{13}C NMR Spectra ของ nigericin, 1,29-O-dimethyl-30-acetyl nigericin และ 1-methoxy-nigericin ใน CDCl_3 (mult, J/Hz) (ต่อ).

C atom position	C atom group	nigericin ^a		1,29-O-dimethyl-30-acetyl nigericin ^a		1-methoxy-nigericin	
		δ_{C} (125 MHz)	δ_{H} (500 MHz)	δ_{C} (125 MHz)	δ_{H} (500 MHz)	δ_{C} (75 MHz)	δ_{H} (300 MHz)
24	CH	76.7 d	4.20 (m)	77.3 d	4.25 (m)	76.9	4.29 (m)
25	CH	74.4 d	3.74 (m)	76.8 d	4.07 (m)	75.8	3.80 (m)
26	CH	32.5 d	1.35 (m)	32.6 d	1.37 (m)	32.7	1.37 (m)
26a	CH_3	17.3 q	0.86 (m)	17.5 q	0.84 (d, J = 8.34)	17.3	0.88 (m)
27	CH_2	37.2 t	1.35 (m)	39.6 t	1.46 (m)	37.1	1.37 (m)
28	CH	35.7 d	1.42 (m)	35.8 d	1.40 (m)	35.4	1.70 (m)
28a	CH_3	16.3 q	0.92 (m)	16.0 q	1.66 (m)	16.1	0.91 (m)
29	C	97.0 s	-	98.1 s	-	97.2	-
MeO-29	OCH_3	-	-	48.3 q	3.27 (s)	-	-
30	CH_2	68.3 t	3.73 (m)	64.9 t	3.27 (s)	67.7	3.58 (m)
			4.25 (m)	21.0 q	4.25 (m)		4.30 (m)
AcO-30	CH_3COO			171.1 s	-		
	CH_2COO			48.3 q	2.09 (s)		

^a รายงานโดย Wu *et al.* (2009).



รูปที่ 3 โครงสร้างโมเลกุลของ nigericins

nigericin : $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{R}_3 = \text{OH}$

1,29-O-dimethyl-30-acetyl nigericin : $\text{R}_1 = \text{OCH}_3$, $\text{R}_2 = \text{R}_3 = \text{OH}$

1-methoxy-nigericin : $\text{R}_1 = \text{OCH}_3$, $\text{R}_2 = \text{OH}$, $\text{R}_3 = \text{CH}_3\text{COO}$

การศึกษาคุณสมบัติการต้านการเจริญของแบคทีเรียบางชนิดของ 1-methoxy-nigericin พบว่า 1-methoxy-nigericin สามารถยับยั้งการเจริญ *Staphylococcus aureus* ATCC25932 และ *Bacillus cereus* ATCC6633 โดยให้ค่า MIC 0.5 $\mu\text{g/ml}$ และ 1.0 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม

1-methoxy-nigericin ไม่ยับยั้งการเจริญ *Escherichia coli* ATCC10536 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 ที่ระดับความเข้มข้น 64 µg/ml นอกจากนี้ 1-methoxy-nigericin ยังให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าแบคทีเรีย (Minimum Bactericidal Concentration: MBC) ต่อ *S. aureus* ATCC25932 และ *B. cereus* ATCC6633 ที่ระดับความเข้มข้น 32 µg/ml และ 64 µg/ml ตามลำดับ ดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Bactericidal Concentration (MBC) ของ 1-methoxy-nigericin ต่อแบคทีเรียบางชนิด

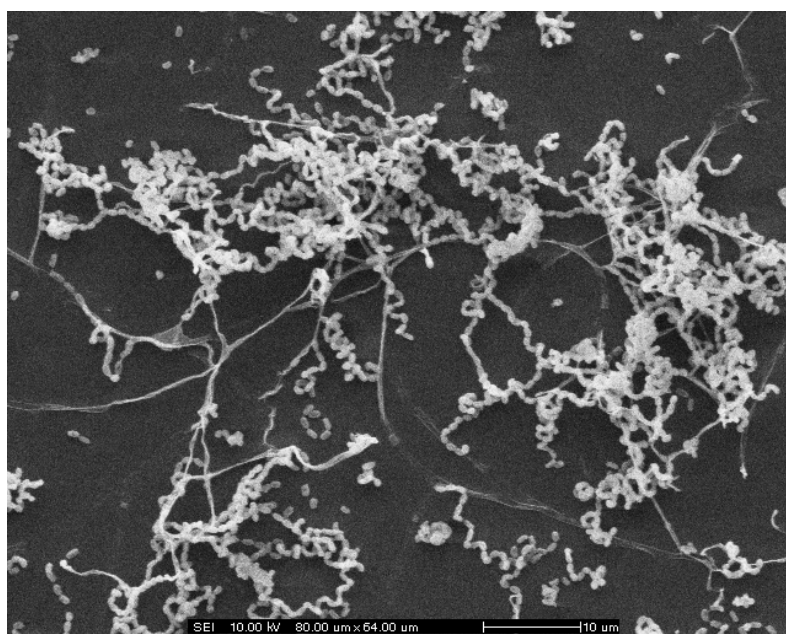
แบคทีเรียทดสอบ	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25932	0.5	32
<i>Bacillus cereus</i> ATCC6633	1.0	64
<i>Escherichia coli</i> ATCC10536	>64	ND *
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	>64	ND

* Not done

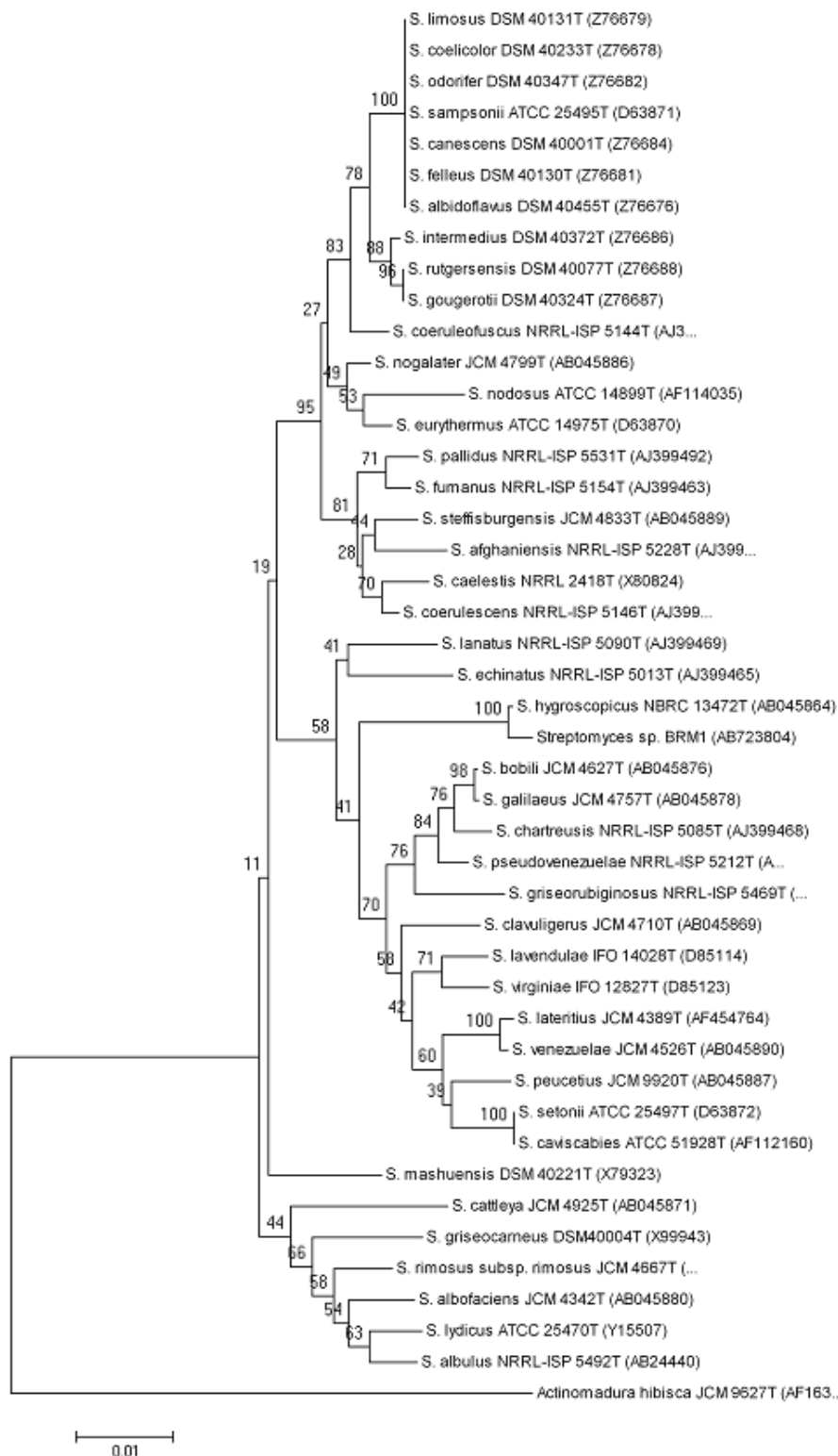
จากการศึกษาเทียบเคียงเชื้อแอคติโนมัยซีส พบว่า สายพันธุ์ BRM10 มีสัณฐานวิทยา ดังนี้ สายของสปอร์มีลักษณะเป็นเกลียว สปอร์มีผิวเรียบ ดังรูปที่ 4 และ รูปที่ 5 สีของสปอร์บนโคโลนีมีสีเทาและเปลี่ยนเป็นสีดำเมื่อเจริญเต็มที่ สีของด้านหลังโคโลนีเป็นสีเหลืองแก่และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเมื่อเจริญเต็มที่ ไม่สร้างเมลานิน ไม่สร้าง soluble pigments สามารถใช้ carbohydrates เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญหลายชนิด ได้แก่ D-fructose, D-glucose, D-mannitol, D-xylose, L-arabinose, *D*-inositol และ rhamnose แต่ไม่สามารถใช้ raffinose และ sucrose เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญได้ จากการศึกษาคีมาแทกซ์โนมี พบว่า มี LL-type diaminopimelic acid ใน whole-cell extracts นอกจากนี้ จากการศึกษาลำดับ 16S rDNA sequence ของ endophytic actinomycetes BRM10 และเปรียบเทียบความคล้ายในฐานข้อมูล GenBank และสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA4.0 พบว่า มีความคล้ายกับ *Streptomyces hygrosopicus* subsp. *hygrosopicus* (accession number: AB045864) ดังรูปที่ 6 พบว่า 16S rDNA sequence ของ BRM10 ใกล้เคียงกับ *Streptomyces hygrosopicus* ถึง 99% (99% sequence similarity) และรายงานลำดับ 16S rDNA sequence ของ endophytic actinomycetes BRM10 ในฐานข้อมูล GenBank, EMBL และ DDBJ ภายใต้อccession number AB723804.



รูปที่ 4 ลักษณะโคโลนีของ BRM10 ที่เจริญบนอาหาร ISP-2 medium บ่มที่ 30 °C เป็นเวลา 14 วัน



รูปที่ 5 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงลักษณะสายสปอร์และรูปร่างสปอร์ของ BRM10 ที่เจริญบนอาหาร ISP-2 medium บ่มที่ 30 °C เป็นเวลา 14 วัน



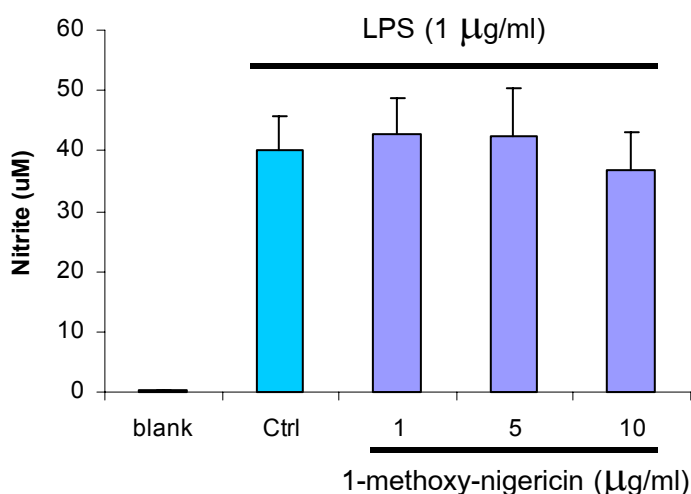
รูปที่ 6 Neighbor-joining phylogenetic tree ของ BRM10 กับเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่เกี่ยวข้อง จากฐานข้อมูล GenBank สร้างด้วยโปรแกรม MEGA 4.0.

จากการทดสอบความสามารถสร้างสารต้านการอักเสบของ 1-methoxy-nigericin ชนิด *in vitro* anti-inflammatory โดยใช้ RAW 264.7 murine macrophage cell line พบว่า 1-methoxy-nigericin ที่ระดับความเข้มข้น 1, 5 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ ไม่สามารถยับยั้งการสร้าง Nitric Oxide (NO) (วัดในรูป Nitrite) หลังจากกระตุ้นด้วย LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) ดังตารางที่ 12 และรูปที่ 7 ในกรณีที่ 1-methoxy-nigericin ที่ระดับความเข้มข้นสูงสุด (10 $\mu\text{g/ml}$) ไม่สามารถยับยั้งการสร้าง NO หลังจากกระตุ้นด้วย LPS ดังนั้น pro-inflammatory cytokine ได้แก่ PGE_2 , $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 และ IL-10 จึงไม่จำเป็นต้องวิเคราะห์

ตารางที่ 12 ระดับ nitrite ที่ RAW 264.7 cells สร้างขึ้นหลังจากถูกกระตุ้นด้วย LPS ที่ทดสอบด้วย 1-methoxy-nigericin ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ระดับ nitrile (μM) ที่วัดได้ (mean ± SD)*				
กระตุ้นด้วย LPS (1 μg/ml)				Blank
1-methoxy-nigericin (μg/ml)			-	
1	5	10		
42.67 ± 6.04	42.33 ± 8.02	38.84 ± 6.26	40.24 ± 5.43	0.40 ± 0.05

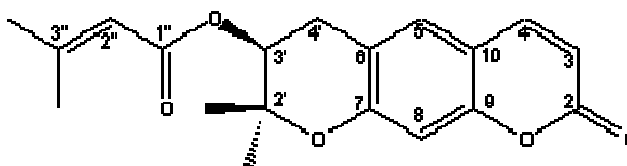
*ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ



รูปที่ 7 ระดับ Nitrite ที่ RAW 264.7 cells สร้างขึ้น หลังจากถูกกระตุ้นด้วย LPS ในสถานะที่มีและไม่มี 1-methoxy-nigericin ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

การแยกสารจาก GMT-8

จากการแยกสารจาก GMT-8 พบว่าสามารถแยกสารที่เป็นองค์ประกอบหลักได้ 1 ชนิด และจากการเปรียบเทียบ ^1H NMR and ^{13}C NMR Spectra กับรายงานที่มีผู้ศึกษาไว้แล้ว Hata, K. และ Sano, K. (1966) พบว่า สารที่แยกได้มีโครงสร้างคล้าย decursin ดังรูปที่ 8 ดังนี้ เป็นผลึกขนาดเล็กสีขาว จุดหลอมเหลว $111-112^\circ\text{C}$; UV $\lambda_{\text{max}}(\text{MeOH})(\text{nm})$: 220, 328; IR $\nu_{\text{max}}(\text{KBr})(\text{cm}^{-1})$: 2960 (CH), 1725 (C=O), 1630, 1653, 1495 (aromatic ring), 1390, 1380 $((\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{C})$; MS: m/e (%) = 328 (M^+ , 0.7), 228 (21.4), 213 (100.0), 83 (24.7), 55 (20.1); ^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 1.36 (3H, s, Me-2'), 1.39 (3H, s, Me-2'), 1.88 (3H, d, $J = 1.2$ Hz, Me-4''), 2.15 (3H, d, $J = 1.2$ Hz, Me-3''), 2.87 (2H, dd, $J = 17.6, 4.8$ Hz, H-4'), 3.20 (2H, dd, $J = 17.6, 4.8$ Hz, H-4'), 5.09 (1H, t, $J = 4.8$ Hz, H-3'), 5.67 (1H, m, H-2''), 6.23 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-3), 6.80 (1H, s, H-5), 7.16 (1H, s, H-8), 7.59 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-4); ^{13}C -NMR (75.5 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 20.3 (3''-Me), 23.2 (2'-Me), 25.0 (2'-Me), 27.5 (C-4''), 27.6 (C-2''), 69.0 (C-4'), 76.6 (C-3'); 104.6 (C-8), 112.8 (C-10), 113.2 (C-3), 115.5 (C-2''), 115.9 (C-6), 128.7 (C-5), 143.2 (C-4), 154.1 (C-9), 156.4 (C-7), 158.5 (C-3''), 161.3 (C-2), 165.7 (C-1'').



รูปที่ 8 โครงสร้าง decursin

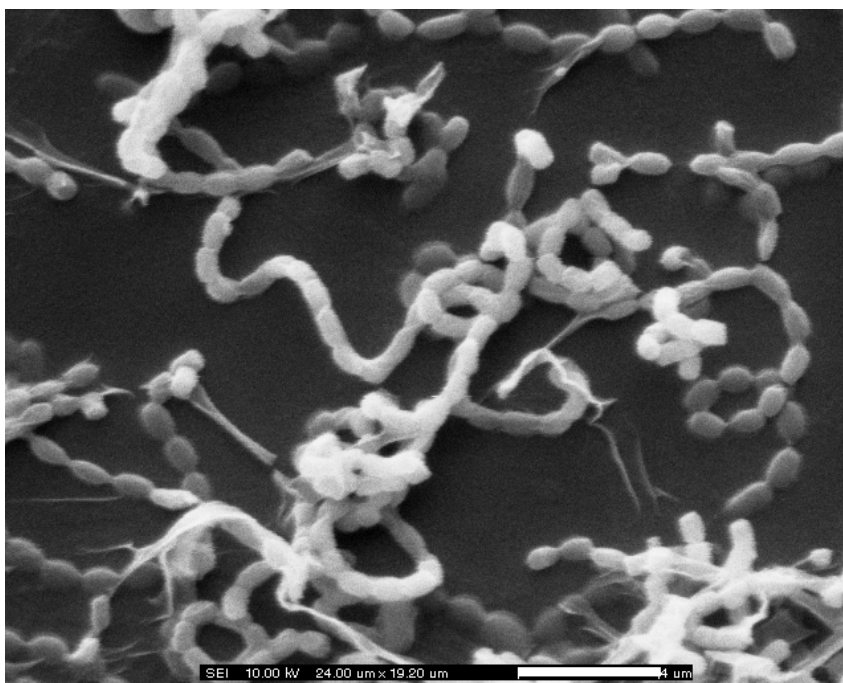
การศึกษาคุณสมบัติการต้านการเจริญของแบคทีเรียบางชนิดของ decursin พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ เช่น *Staphylococcus aureus* ATCC25932, *Bacillus cereus* ATCC7064 และ *Bacillus subtilis* ATCC6633 โดยให้ค่า MIC ในช่วง 32 - 256 $\mu\text{g/ml}$ นอกจากนี้ decursin ยังให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าแบคทีเรีย (Minimum Bactericidal Concentration: MBC) ต่ำ *S. aureus* ATCC25932 และ *B. subtilis* ATCC6633 ที่ระดับความเข้มข้น 128 $\mu\text{g/ml}$ และ 256 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ แต่ไม่สามารถฆ่า *Bacillus cereus* ATCC7064 ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ 512 $\mu\text{g/ml}$ อย่างไรก็ตามจากการทดลองพบว่า decursin ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Escherichia coli* ATCC10536 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 ดังตารางที่ 13

ตารางที่ 13. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Bactericidal Concentration (MBC) ของ decursin ต่อแบคทีเรียบางชนิด

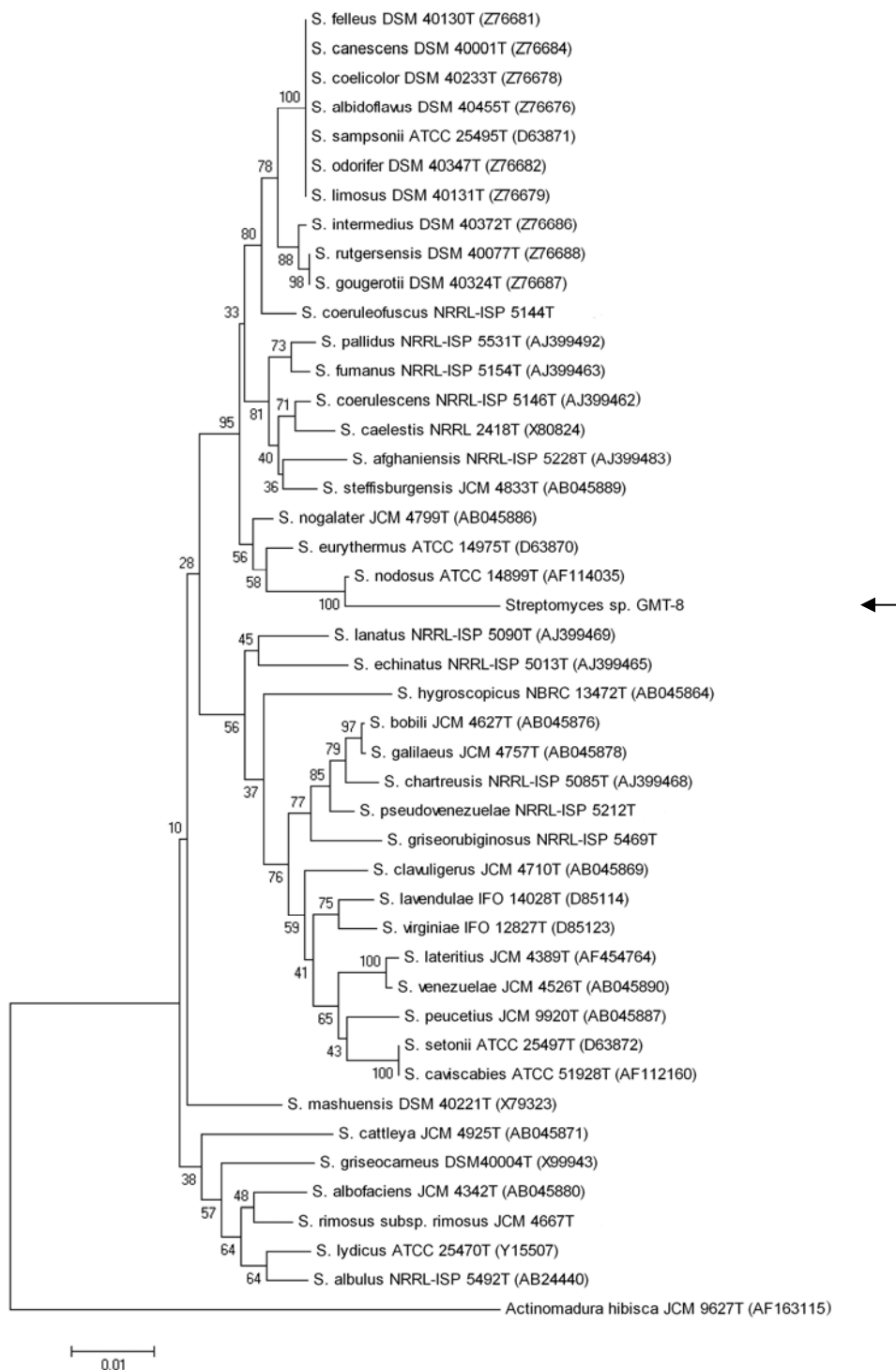
แบคทีเรียทดสอบ	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25932	32	128
<i>Bacillus cereus</i> ATCC7064	256	>512
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	64	256
<i>Escherichia coli</i> ATCC10536	>512	ND*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	>512	ND*

* Not done

จากการศึกษาเทียบเคียงเชื้อแอคติโนมัยซีส พบว่า สายพันธุ์ GMT-8 มีฐานวิธาน ดังนี้ สายของสปอร์มีลักษณะเป็นเกลียว สปอร์มีผิวเรียบ ดังรูปที่ 9 สีของสปอร์บนโคโลนีมีสีส้ม และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเมื่อเจริญเต็มที่ สีของด้านหลังโคโลนีเป็นสีเหลืองและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อนเมื่อเจริญเต็มที่ ไม่สร้างเมลานิน สร้าง soluble pigments สีเหลืองอ่อน จากการศึกษา chemotaxonomy พบว่า มี LL-type diaminopimelic acid ใน whole-cell extracts นอกจากนี้ จากการศึกษา 16SrDNA sequence ของ endophytic actinomycetes GMT-8 และเปรียบเทียบความคล้ายในฐานข้อมูล GenBank และสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA4.0 พบว่า มีความคล้ายกับ *Streptomyces nodosus* ATCC14899 (accession number: AF114035) ดังรูปที่ 10 พบว่า 16S rDNA sequence ของ GMT-8 ใกล้เคียงกับ *Streptomyces nodosus* ถึง 98% (98% sequence similarity) และรายงานลำดับ 16SrDNA sequence ของ endophytic actinomycetes GMT-8 ในฐานข้อมูล GenBank, EMBL และ DDBJ ภายใต้อccession number AB723804.



รูปที่ 9 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงลักษณะสายสปอร์และรูปร่างสปอร์ของ GMT-8 ที่เจริญบนอาหาร ISP-2 medium บ่มที่ 30 °C เป็นเวลา 14 วัน, Bar = 4 μm



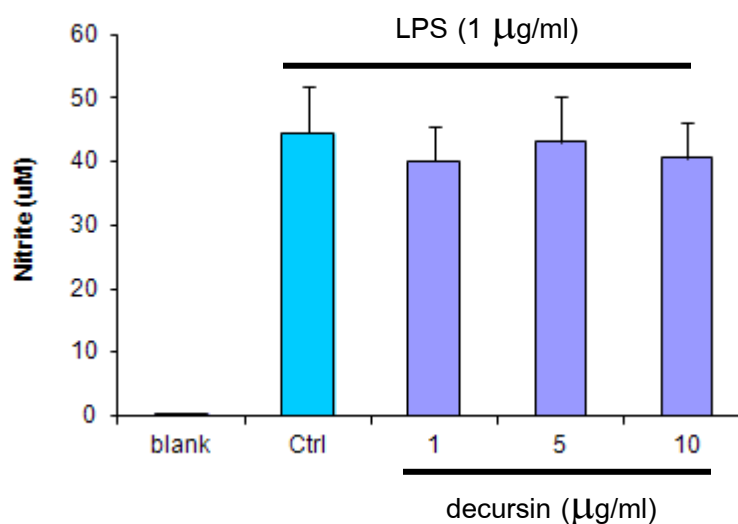
รูปที่ 10 Neighbor-joining phylogenetic tree ของ GMT-8 กับเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่เกี่ยวข้อง จากฐานข้อมูล GenBank สร้างด้วยโปรแกรม MEGA 4.0.

จากการทดสอบความสามารถสร้างสารต้านการอักเสบของ decursin ชนิด *in vitro* anti-inflammatory โดยใช้ RAW 264.7 murine macrophage cell line พบว่า decursin ที่ระดับความเข้มข้น 1, 5 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ ไม่สามารถยับยั้งการสร้าง Nitric Oxide (NO) (วัดในรูป Nitrite) หลังจากกระตุ้นด้วย LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) ดังตารางที่ 14 และรูปที่ 11 ในกรณีที่ decursin ที่ระดับความเข้มข้นสูงสุด (10 $\mu\text{g/ml}$) ไม่สามารถยับยั้งการสร้าง NO หลังจากกระตุ้นด้วย LPS ดังนั้น pro-inflammatory cytokine ได้แก่ PGE_2 , $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 และ IL-10 จึงไม่จำเป็นต้องวิเคราะห์

ตารางที่ 14 ระดับ nitrite ที่ RAW 264.7 cells สร้างขึ้นหลังจากถูกกระตุ้นด้วย LPS ที่ทดสอบด้วย decursin ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ระดับ nitrile (μM) ที่วัดได้ (mean ± SD)*				
กระตุ้นด้วย LPS (1 μg/ml)				Blank
decursin (μg/ml)			-	
1	5	10		
40.17 ± 5.25	43.15 ± 7.02	40.58 ± 5.64	44.62 ± 7.32	0.38 ± 0.17

*ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ



รูปที่ 11 ระดับ Nitrite ที่ RAW 264.7 cells สร้างขึ้น หลังจากถูกกระตุ้นด้วย LPS ในสภาวะที่มีและไม่มี decursin ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

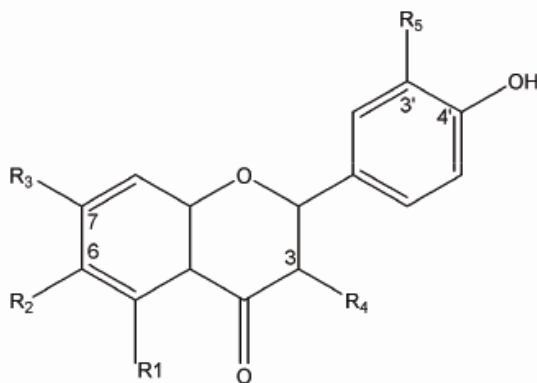
การแยกสารจาก BT01

จากการแยกสารจาก BT01 ซึ่งพบว่าสามารถแยกสารที่เป็นองค์ประกอบหลักได้ 6 ชนิด คือ สาร **1-6** และจากการเปรียบเทียบ ^1H NMR and ^{13}C NMR Spectra กับรายงานที่มีผู้ศึกษาไว้แล้ว พบว่า สาร **2, 3, 5** และ **6** เป็นสารที่เคยมีผู้แยกได้ไว้แล้ว ดังนั้น Fisetin (**2**) (Forbes and Clement, 2010), Naringenin (**3**) (Olsen et al., 2008), 3'-hydroxydaidzein (**5**) (Shi et al., 2012) และ Xenognosin (**6**) (Du et al., 2006) ส่วนสาร **1** และ **4** เป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ชนิดใหม่ ดังนั้น 3,3',4',6-tetrahydroxy-7-methoxyflavone (**1**) และ 2',7-dihydroxy-4',5'-dimethoxyisoflavone (**4**) ดังรูปที่ 12 ซึ่งสารทั้งสอง มี ^1H NMR and ^{13}C NMR Spectra ดังต่อไปนี้

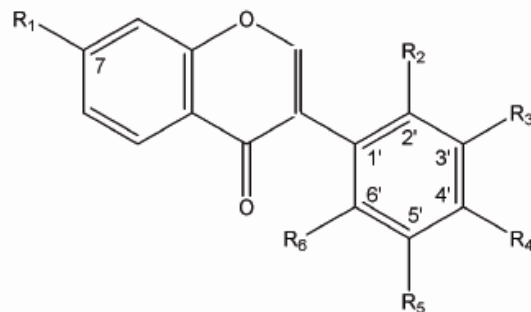
Compound **1**, identified by NMR and mass spectral data as 3,3',4',6-tetrahydroxy-7-methoxyflavone ($\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_7$), was yellow crystals having: mp 315-317 °C (from methanol), UV: λ_{max} nm (log ϵ) = 239 (4.290), 257 sh (4.262), 349 (4.454). λ_{max} nm (+ AlCl_3) (log ϵ) = 235 (4.586), 276 (4.179), 360 (3.93), 431 (4.394). λ_{max} nm (+ AlCl_3/HCl) (log ϵ) = 228 sh (4.269), 267 (4.257), 357 sh (3.973), 419 (4.454). IR ν_{max} cm^{-1} : 3596, 3511, 3333, 3117, 1636, 1609, 1551, 1508, 1497, 1435, 1393, 1289, 1223, 1169, 1123, 1038. EI-MS m/z : 316 (M^+ , 100%), 301 (22), 273 (35), 167 (13), 150 (16), 149 (24), 137 (39), 135 (21), 128 (14), 123 (16), 120 (13), 95 (18), 69 (42), 63 (17), 53 (31), 51 (26). HR-MS: $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_7$, found: 316.0580, calcd: 316.0588. ^1H -NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 200 MHz) δ : 3.91 (3H, s, 7-OCH₃), 6.86 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5'), 7.20 (1H, s, 8-H), 7.29 (1H, s, 5-H), 7.54 (1H, dd, $J=8.4, 2.2$ Hz, 6'-H), 7.70 (1H, d, $J=2.2$ Hz, 2'-H), 9.00 (1H, s, 3-OH), 9.24 (1H, s, 3'-OH), 9.53 (1H, s, 4'-OH), 9.72 (1H, s, 6-OH). ^{13}C -NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 75.4 MHz) δ : 56.54 (7-OCH₃), 100.46 (C-8), 106.9 (C-5), 115.00 (C-10), 115.33 (C-2'), 115.86 (C-5'), 119.94 (C-6'), 123.01 (C-1'), 137.39 (C-3), 145.04 (C-6), 145.36 (C-3'), 145.45 (C-2), 147.48 (C-4'), 150.22 (C-9), 153.96 (C-7), 171.91 (C-4).

Compound **4**, identified by NMR and mass spectral data as 2',7-dihydroxy-4',5'-dimethoxyisoflavone ($\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_6$), was yellow crystals having: mp 237-239 °C (from

methanol), UV: $\lambda_{\max}$ nm ($\log \epsilon$) = 248 sh (4.312), 264 sh (4.211), 301 (4.256). IR $\nu_{\max}$ cm^{-1} : 3414, 2940, 1705, 1616, 1562, 1512, 1458, 1343, 1300, 1246, 1188, 1103. EI-MS m/z : 314 (M^+ , 100%), 299 (85), 271 (19), 239 (22), 200 (20), 187 (28), 137 (30), 107 (24), 92 (22), 69 (57), 63 (36), 53 (25), 51 (33). HR-MS: $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_6$, found: 314.0799, calcd: 314.0730. $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 200 MHz) δ : 3.66 (3H, s, 5'- OCH_3), 3.72 (3H, s, 4'- OCH_3), 6.52 (1H, s, 3'-H), 6.81 (1H, s, 6'-H), 6.87 (1H, d, $J=2.1$ Hz, 8-H), 6.92 (1H, dd, $J=8.7$, 2.1 Hz, 6-H), 7.94 (1H, d, $J=8.7$ Hz, 5-H), 8.22 (1H, s, 2-H), 8.99 (1H, s, 7-OH), 10.80 (1H, br, 2'-OH). $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 50 MHz) δ : 55.65 (4'- OCH_3), 56.66 (5'- OCH_3), 101.53 (C-3'), 102.27 (C-8), 110.08 (C-1'), 115.42 (C-6), 116.02 (C-6'), 116.70 (C-10), 121.64 (C-3), 127.44 (C-5), 141.70 (C-5'), 149.81 (C-2'), 149.90 (C-4'), 155.24 (C-9), 157.64 (C-9), 162.79 (C-7), 175.42 (C-4).



- 1 $R_1 = \text{H}$, $R_2 = R_4 = R_5 = \text{OH}$, $R_3 = \text{OCH}_3$
- 2 $R_1 = R_2 = \text{H}$, $R_3 = R_4 = R_5 = \text{OH}$
- 3 $R_1 = R_3 = \text{OH}$, $R_2 = R_4 = R_5 = \text{H}$



- 4 $R_1 = R_2 = \text{OH}$, $R_3 = R_6 = \text{H}$, $R_4 = R_5 = \text{OCH}_3$
- 5 $R_1 = R_3 = R_4 = \text{OH}$, $R_2 = R_5 = R_6 = \text{H}$
- 6 $R_1 = R_2 = \text{OH}$, $R_3 = R_5 = R_6 = \text{H}$, $R_4 = \text{OCH}_3$

รูปที่ 12 โครงสร้างสารที่แยกได้จาก BT01: 7-methoxy-3, 3',4',6-tetrahydroxyflavone (**1**), 3,3',4',7-tetrahydroxyflavone (fisetin **2**), 4',5,7-trihydroxyflavanone (naringenin **3**), 2',7-dihydroxy-4',5'-dimethoxyisoflavone (**4**), 3'-hydroxydaidzein (**5**) และ xenognosin B (**6**).

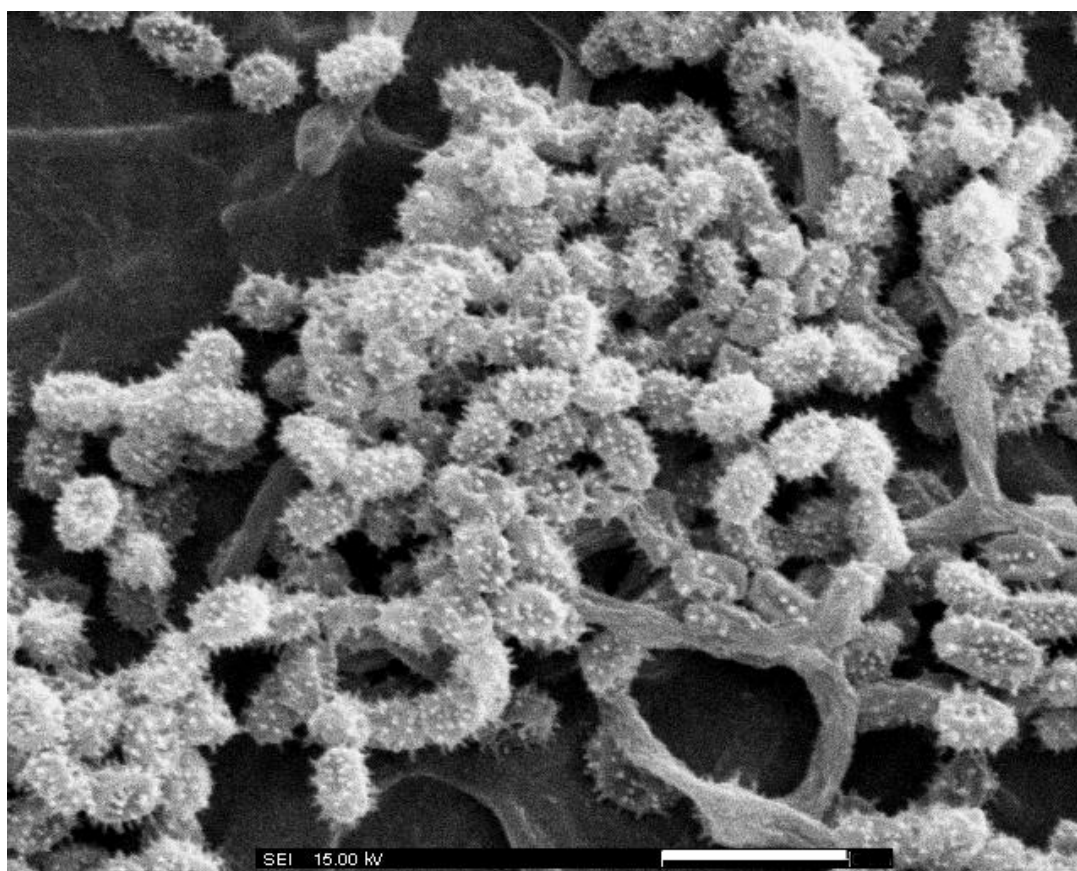
การศึกษาคุณสมบัติการต้านการเจริญของแบคทีเรียบางชนิดของสารที่แยกได้ทั้ง 6 ชนิด พบว่าสารทั้ง 6 ชนิดนี้ สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Staphylococcus aureus* ATCC25932, *Bacillus cereus* ATCC7064 และ *Bacillus subtilis* ATCC6633 โดยให้ค่า MIC ในช่วง 32 - 128 µg/ml ขณะเดียวกันสารทั้ง 6 ชนิดนี้ สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Escherichia coli* ATCC10536 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 โดยให้ค่า MIC ในช่วง 1282 - >512 µg/ml ดังตารางที่ 15

ตารางที่ 15. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ของสารสกัดหยาบและสารต่าง ๆ ที่แยกได้จาก BT01 ต่อแบคทีเรียบางชนิด

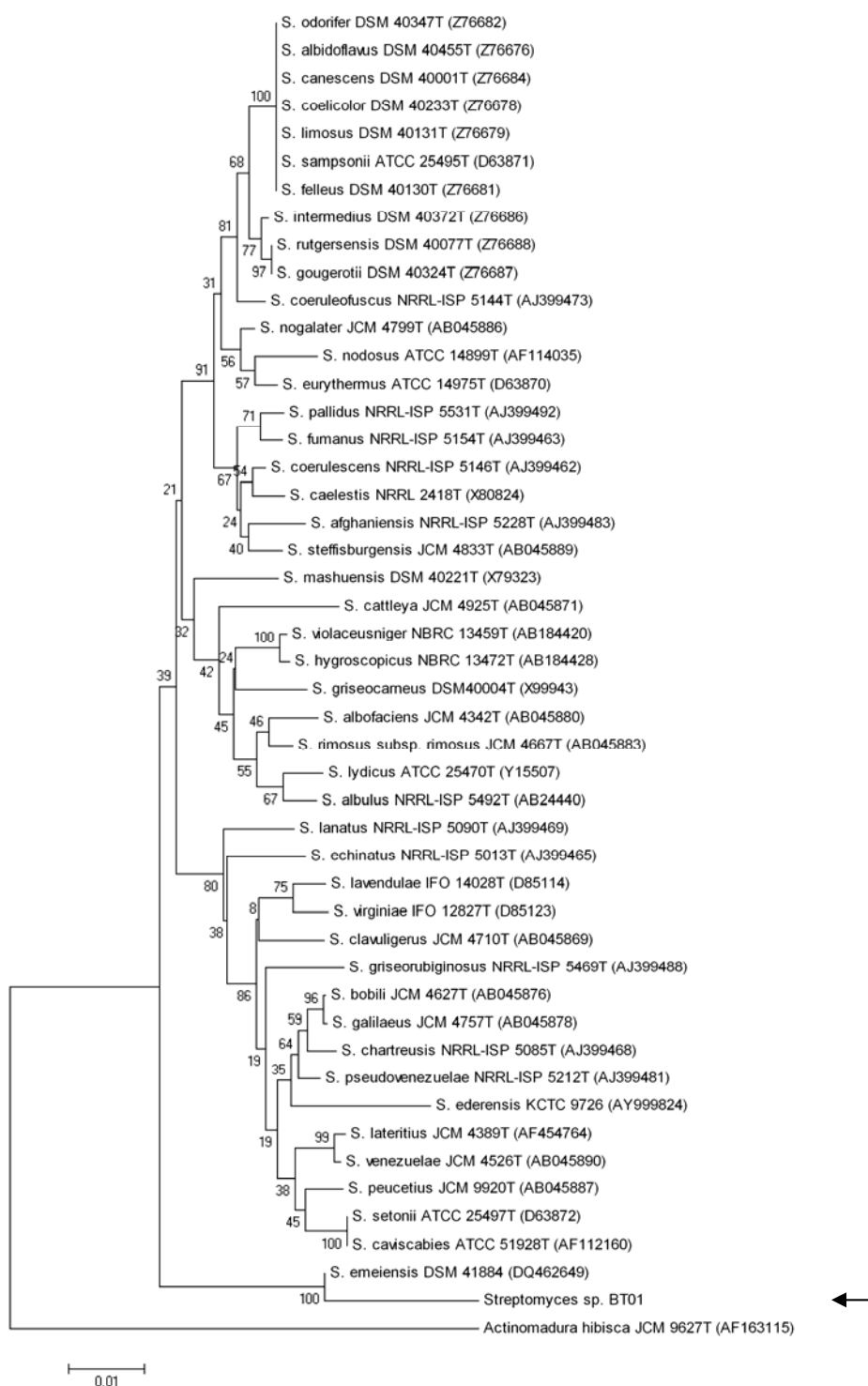
Test agents	Microorganisms				
	S.a. ^a	B.c.	B.s.	E.c.	P.a.
Crude extract	32	64	64	128	256
Compound 1	32	64	64	128	256
Compound 2	32	32	32	128	256
Compound 3	32	64	64	256	512
Compound 4	64	128	128	256	>512
Compound 5	64	64	64	256	512
Compound 6	128	128	128	512	>512

^aS.a.; *Staphylococcus aureus* ATCC25932, B.c.; *Bacillus cereus* ATCC7064, B.s., *Bacillus subtilis* ATCC6633, E.c., *Escherichia coli* ATCC10536 and P.a., *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853

จากการศึกษาเทียบเคียงเชื้อแอคติโนมัยซีส พบว่า สายพันธุ์ BT01 มีฐานวิธาน ดังนี้ สายของสปอร์มีลักษณะเป็นเกลียว สปอร์มีผิวเป็นหนามแหลม ดังรูปที่ 13 สีของสปอร์บนโคโลนีมีสีขาวครีม และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเมื่อเจริญเต็มที่ สีของด้านหลังโคโลนีเป็นสีเหลืองและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อนเมื่อเจริญเต็มที่ ไม่สร้างเมลานิน สร้าง soluble pigments สีเหลืองอ่อน จากการศึกษา chemotaxonomy พบว่า มี LL-type diaminopimelic acid ใน whole-cell extracts นอกจากนี้ จากการศึกษา 16SrDNA sequence ของ endophytic actinomycetes BT01 และเปรียบเทียบความคล้ายในฐานข้อมูล GenBank และสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA4.0 พบว่า มีความคล้ายกับ *Streptomyces emeiensis* DSM41884 (accession number: DQ462649) ดังรูปที่ 14 พบว่า 16S rDNA sequence ของ BT01 ใกล้เคียงกับ *Streptomyces emeiensis* ถึง 98% (98% sequence similarity) และรายงานลำดับ 16SrDNA sequence ของ endophytic actinomycetes BT01 ในฐานข้อมูล GenBank, EMBL และ DDBJ ภายใต้ accession number AB898037.



รูปที่ 13 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงลักษณะสายสปอร์และรูปร่างสปอร์ของ BT01 ที่เจริญบนอาหาร ISP-2 medium บ่มที่ 30 °C เป็นเวลา 14 วัน, Bar = 3 μ m



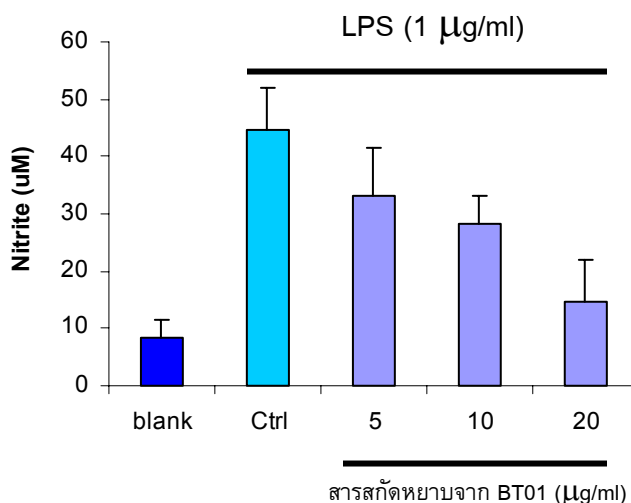
รูปที่ 14 Neighbor-joining phylogenetic tree ของ BT01 กับเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่เกี่ยวข้อง จากฐานข้อมูล GenBank สร้างด้วยโปรแกรม MEGA 4.0.

เนื่องจากสารต่าง ๆ ที่แยกได้จาก BT01 เป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ซึ่งสารกลุ่มนี้เคยมีผู้รายงานว่า นอกจากมีฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์แล้ว ยังมีฤทธิ์ต้านการอักเสบอีกด้วย ซึ่งในห้องปฏิบัติการของพวกเราสามารถทดสอบได้ จึงทำการทดสอบฤทธิ์การต้านการอักเสบของสารสกัดหยาบจาก BT01 จากการทดสอบความสามารถสร้างสารต้านการอักเสบของสารสกัดหยาบจาก BT01 ชนิด *in vitro* anti-inflammatory โดยใช้ RAW 264.7 murine macrophage cell line พบว่า สารสกัดหยาบที่ระดับความเข้มข้น 5, 10 และ 20 $\mu\text{g/ml}$ สามารถยับยั้งการสร้าง Nitric Oxide (NO) (วัดในรูป Nitrite) หลังจากกระตุ้นด้วย LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) ดังตารางที่ 16 และรูปที่ 15 ดังนั้นสารต่าง ๆ ที่แยกได้จาก BT01 จึงควรนำมาศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบต่อไป ไม่เฉพาะแต่ความสามารถยับยั้งการสร้าง Nitric Oxide (NO) หลังจากกระตุ้นด้วย LPS สารอื่นๆ เช่น pro-inflammatory cytokine ได้แก่ PGE_2 , $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 และ IL-10 และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง เช่น Cyclo-oxygenase-2 (COX-2) ก็จำเป็นต้องวิเคราะห์ต่อไปด้วย

ตารางที่ 16 ระดับ nitrite ที่ RAW 264.7 cells สร้างขึ้นหลังจากถูกกระตุ้นด้วย LPS ที่ทดสอบด้วยสารสกัดหยาบจาก BT01 ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ระดับ nitrite (µM) ที่วัดได้ (mean ± SD)*				
กระตุ้นด้วย LPS (1 µg/ml)				Blank
สารสกัดหยาบจาก BT01 (µg/ml)			Control	
5	10	20		
33.17 ± 8.25	28.18 ± 5.06	14.68 ± 7.34	44.62 ± 7.32	8.32 ± 3.17

*ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

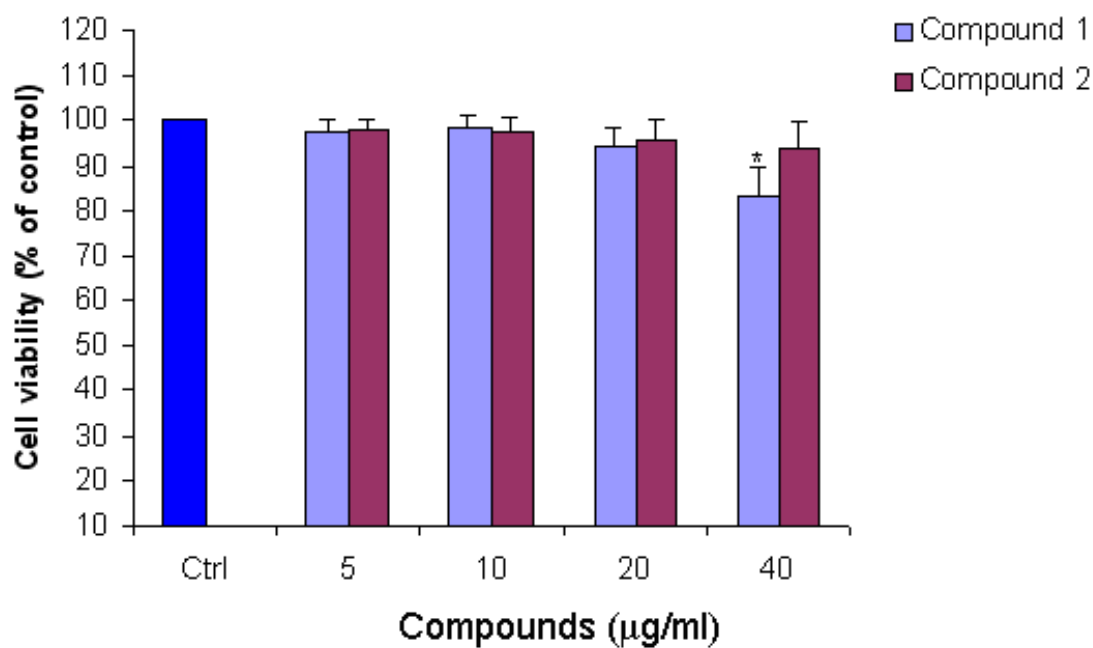


รูปที่ 15 ระดับ Nitrite ที่ RAW 264.7 cells สร้างขึ้น หลังจากถูกกระตุ้นด้วย LPS ในสถานะที่มีและไม่มีสารสกัดหยาดจาก BT01 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

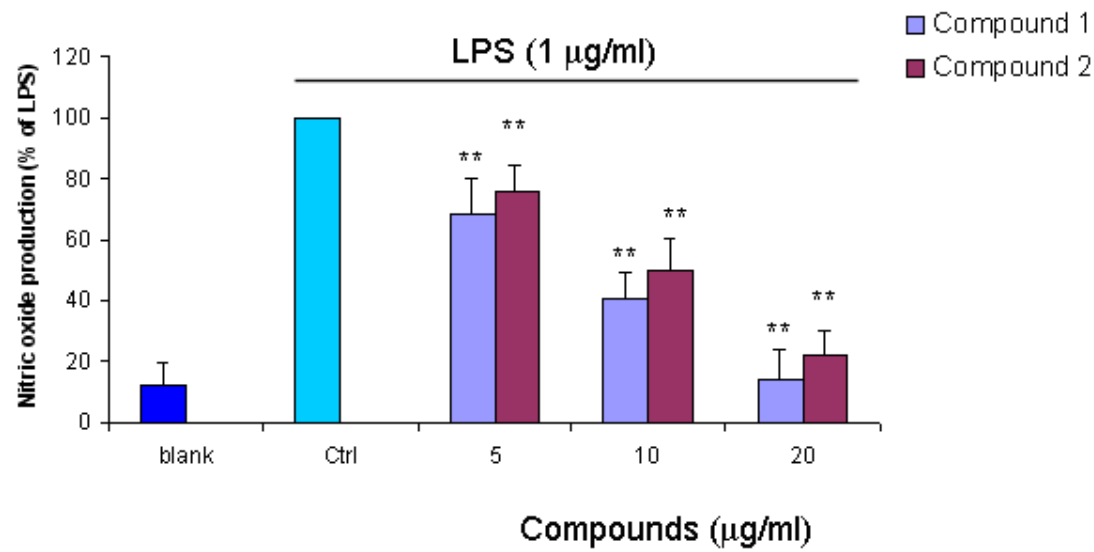
จากการทดสอบกรอง (screening test) เพื่อตรวจหาคุณสมบัติด้านการอักเสบของสารสกัดหยาดจาก BT01 ที่ระดับความเข้มข้น 5 - 20 $\mu\text{g/ml}$ โดยทดสอบกับ RAW 264.7 cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ โดยวัดจาก Nitric Oxide (NO) (วัดในรูป Nitrite) พบว่าสารสกัดหยาดจาก BT01 นี้ มีแนวโน้มในการยับยั้งการอักเสบได้ โดยดูจากความสามารถในการยับยั้งการสร้าง NO ที่ลดลงตามความเข้มข้นของสารสกัดหยาด หลังจากกระตุ้น RAW 264.7 cells ด้วย LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ ดังนั้นสารที่แยกได้จากสารสกัดหยาดนี้ จึงควรนำมาศึกษาคุณสมบัติด้านการอักเสบต่อไป

จากการแยกสารจาก BT01 พบว่าเป็นสารชนิดใหม่ 2 ชนิด คือ 3,3',4',6-tetrahydroxy-7-methoxyflavone และ 2',7-dihydroxy-4',5'-dimethoxyisoflavone จากการศึกษาความเป็นพิษของสารทั้งสองชนิดใน RAW 264.7 cells ที่ระดับความเข้มข้น 5 - 40 $\mu\text{g/ml}$ โดยทดสอบด้วยวิธี MTT assay พบว่าสารทั้งสองไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ดังรูปที่ 16 และเนื่องจากสารสกัดหยาดจาก BT01 นี้ มีคุณสมบัติด้านการอักเสบด้วย ดังนั้นจึงนำสารใหม่ 2 ชนิดนี้มาศึกษาคุณสมบัติด้านการอักเสบ ที่ระดับความเข้มข้น 5 - 20 $\mu\text{g/ml}$ โดยทดสอบกับ RAW 264.7 cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ โดยวัดจาก NO, PGE₂, TNF- α , IL-1 β และ IL-6 ซึ่งพบว่าสารทั้ง 2 ชนิดนี้ มี

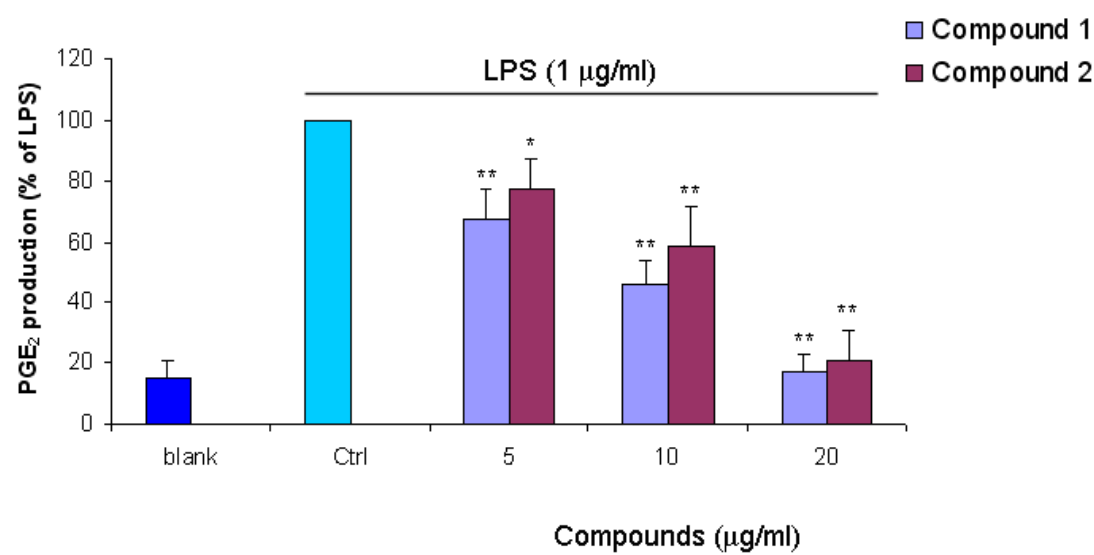
แนวโน้มนำการลดการผลิตสาร NO, PGE₂, TNF- α , IL-1 β และ IL-6 ใน RAW 264.7 cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS 1 μ g/ml ตามปริมาณความเข้มข้นของสารทั้ง 2 ดังรูปที่ 17



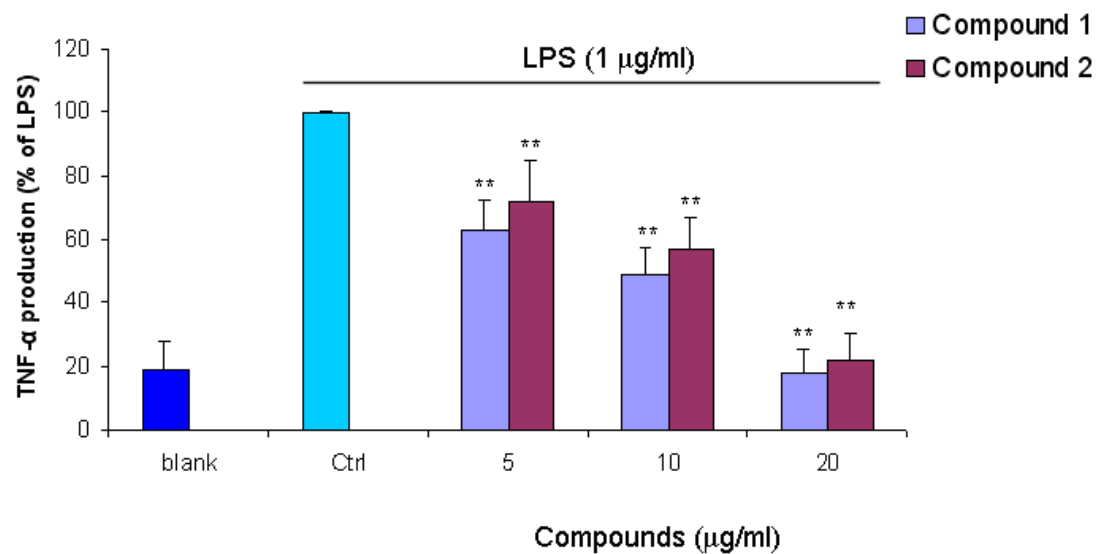
รูปที่ 16 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสาร 3,3',4',6-tetrahydroxy-7-methoxyflavone (**1**) และ 2',7-dihydroxy-4',5'-dimethoxyisoflavone (**2**) ใน RAW 264.7 cells ที่ระดับความเข้มข้น 5-40 μ g/ml โดยวิธี MTT assay * $P < 0.05$



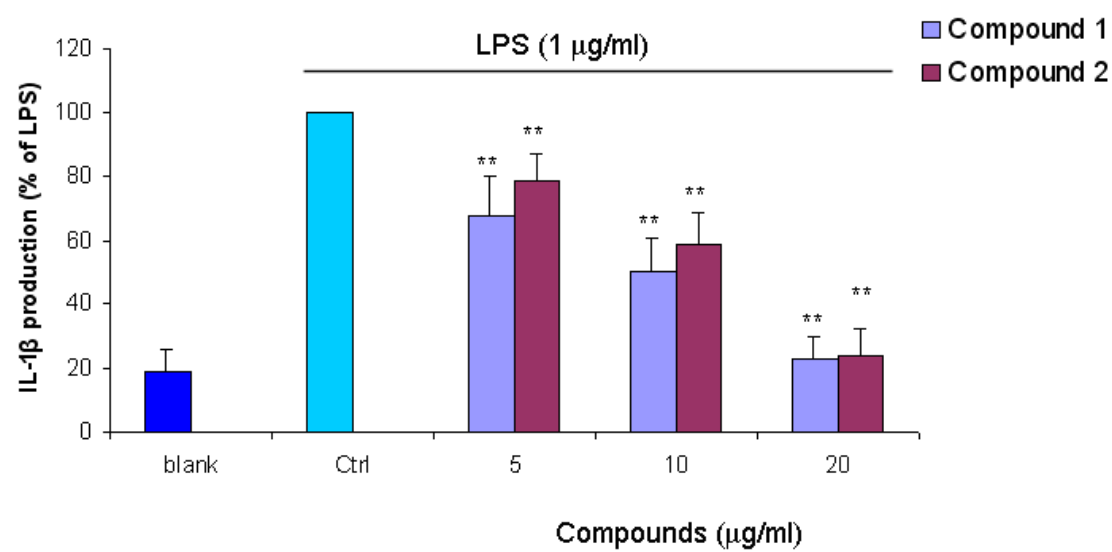
a



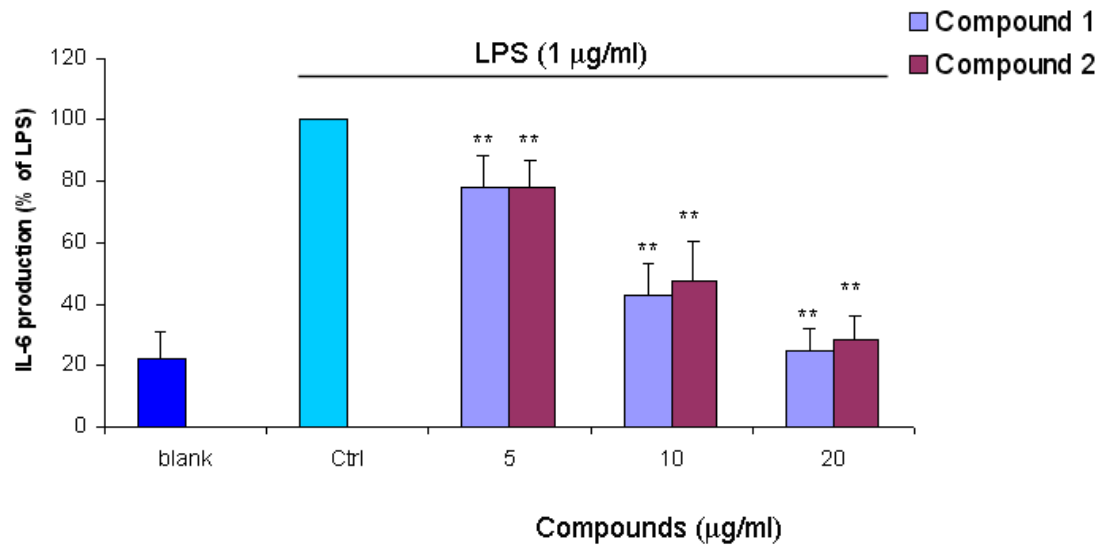
b



c



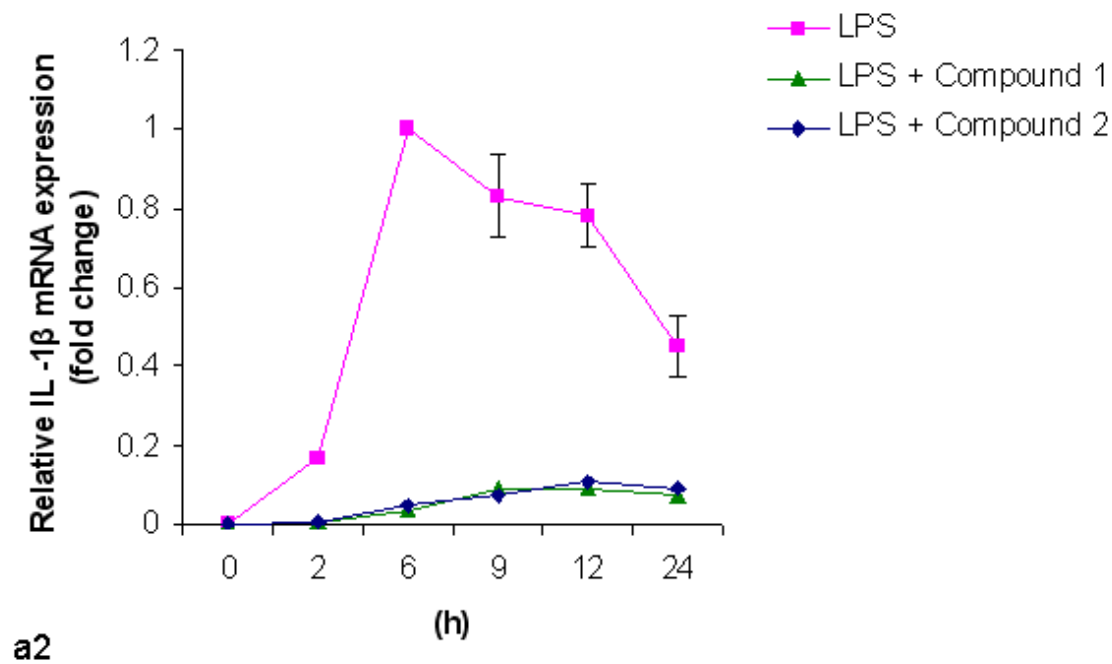
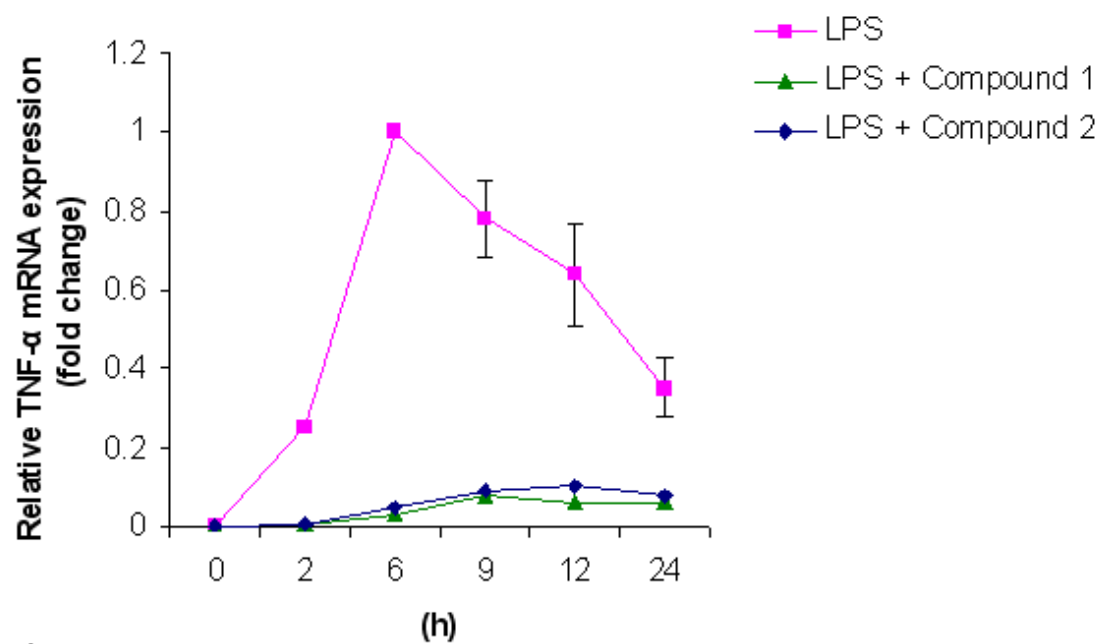
d

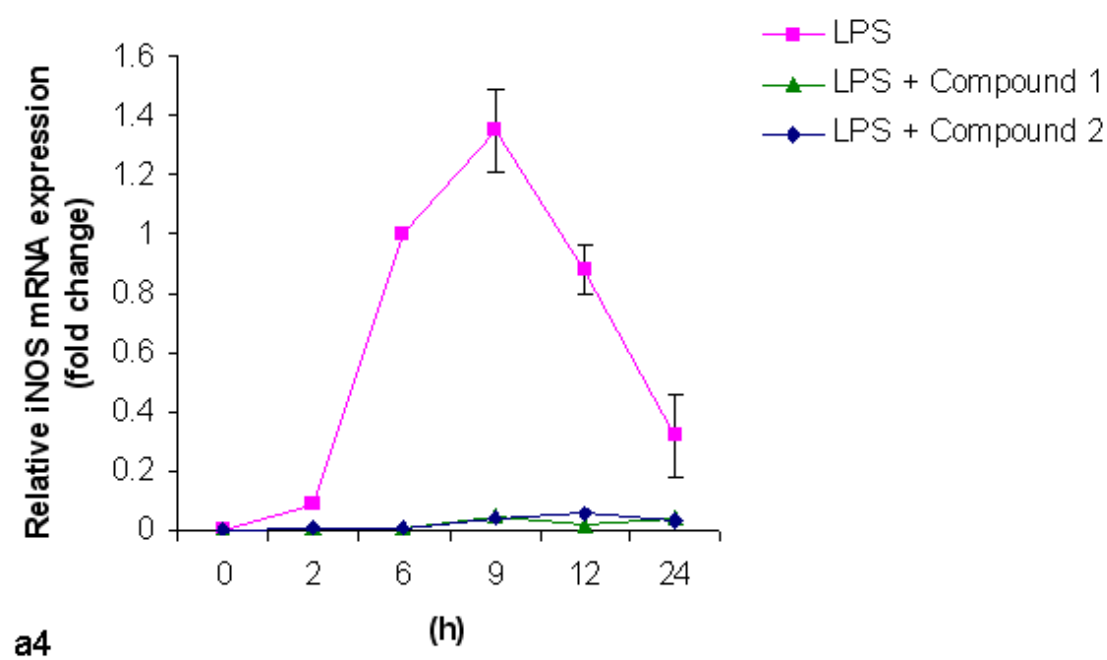
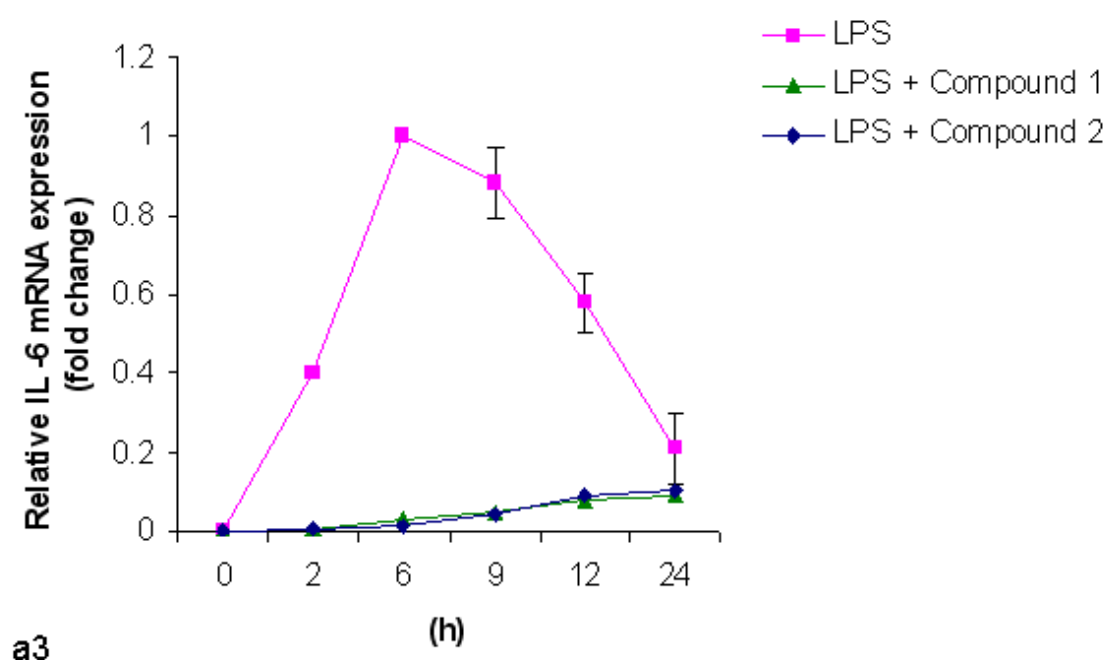


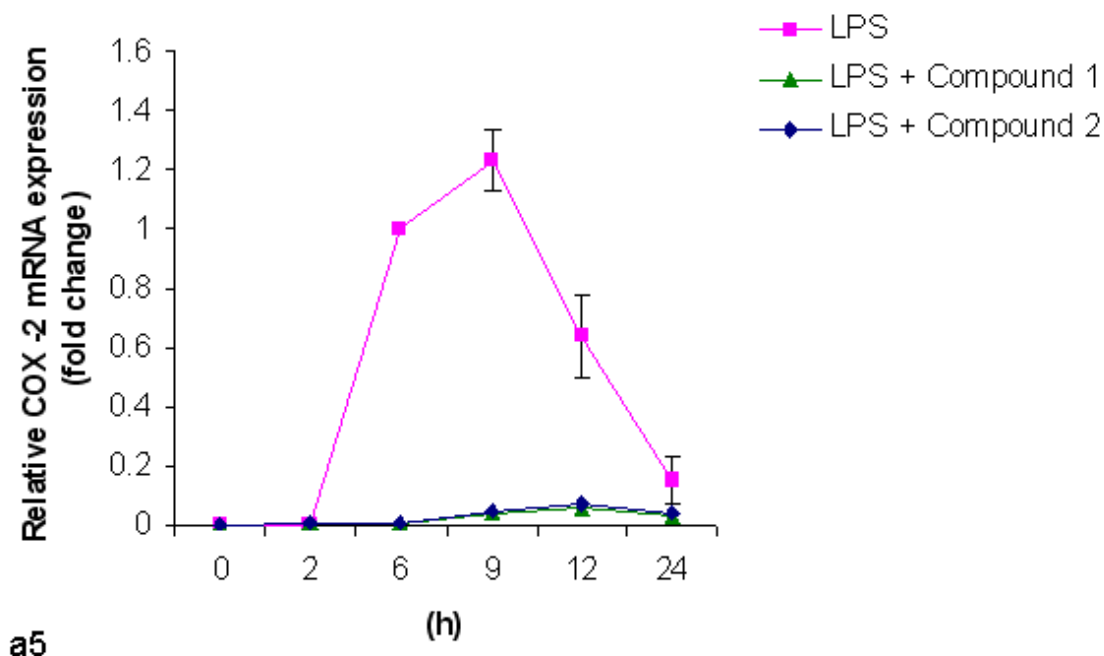
e

รูปที่ 17 ผลการยับยั้งการสร้าง inflammatory intermediate และ pro-inflammatory cytokine ของสาร 3,3',4',6-tetrahydroxy-7-methoxyflavone (1) และ 2',7-dihydroxy-4',5'-dimethoxyisoflavone (2) ใน RAW 264.7 cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS 1 µg/ml: NO (a), PGE₂ (b), TNF-α (c), IL-1β (d), และ IL-6 (e), **P* < 0.05, ***P* < 0.01

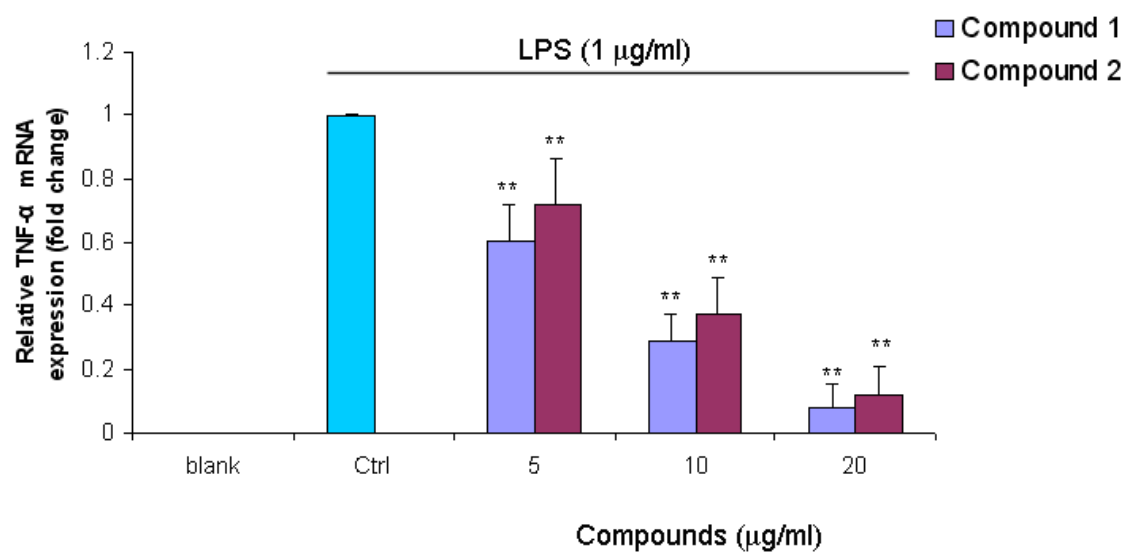
เมื่อศึกษาการต้านการอักเสบโดยทดสอบการยับยั้งการแสดงออกระดับ mRNA ของยีนส์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น เอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ได้แก่ iNOS และ COX-2 และ pro-inflammatory cytokine ได้แก่ TNF-α, IL-1β และ IL-6 โดยการทำ RT-PCR ในระยะเวลาต่าง ๆ 0 - 24 ชั่วโมง พบว่าการแสดงออกระดับ mRNA ของ TNF-α, IL-1β และ IL-6 สูงสุดที่ 6 ชั่วโมง ขณะที่การแสดงออกระดับ mRNA ของ iNOS และ COX-2 สูงสุดที่ 9 ชั่วโมง และพบว่า 3,3',4',6-tetrahydroxy-7-methoxyflavone (1) และ 2',7-dihydroxy-4',5'-dimethoxyisoflavone (2) ที่ระดับความเข้มข้น 20 µg/ml สามารถยับยั้งการแสดงออกระดับ mRNA ของ TNF-α, IL-1β, IL-6, iNOS และ COX-2 ได้ ดังรูปที่ 18 และสารทั้งสองนี้ยังสามารถยับยั้งการแสดงออกระดับ mRNA ตามความเข้มข้นของสารทั้งสองด้วย ดังรูปที่ 19 ซึ่งพบว่าสาร 3,3',4',6-tetrahydroxy-7-methoxyflavone (1) สามารถยับยั้งได้ดีกว่าสาร 2',7-dihydroxy-4',5'-dimethoxyisoflavone (2) และที่ระดับความเข้มข้น 5 µg/ml สารทั้งสองสามารถยับยั้งได้ 30 - 40 % ขณะที่ระดับความเข้มข้น 20 µg/ml สารทั้งสองสามารถยับยั้งได้ 80 - 90 %



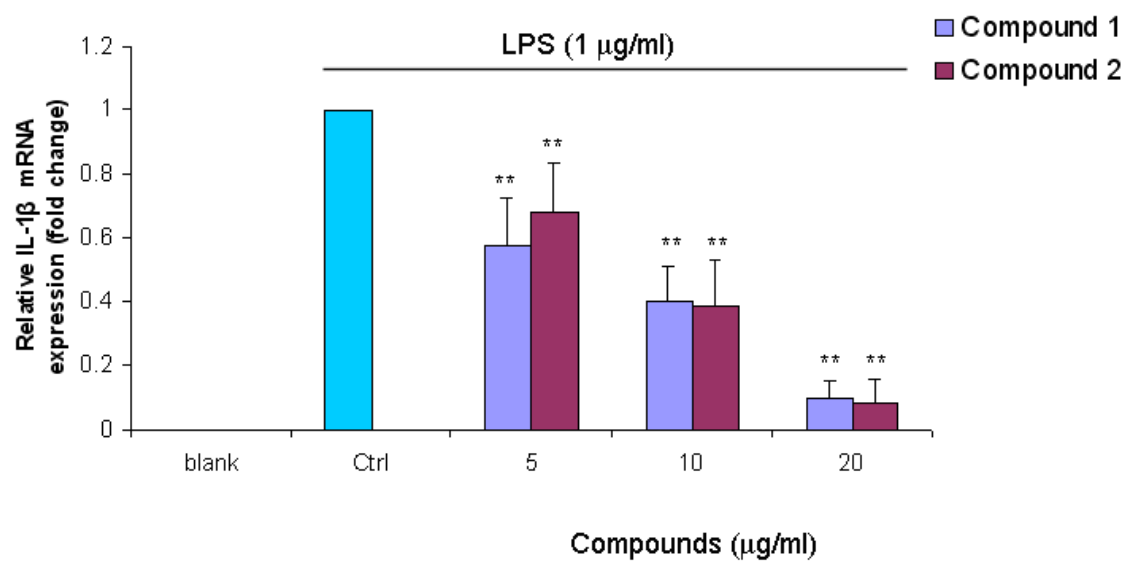




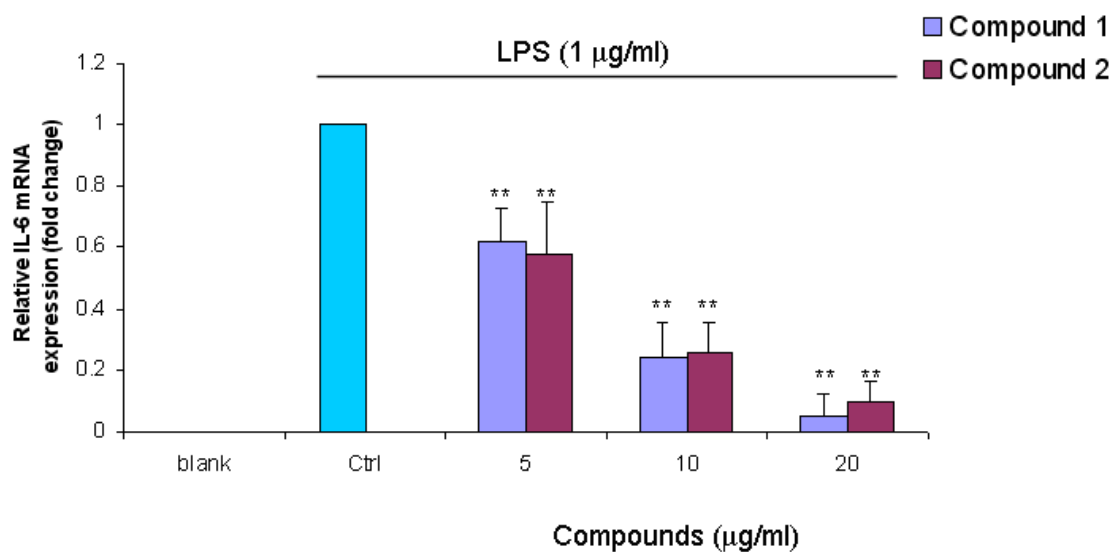
รูปที่ 18 ผลการยับยั้งระดับ mRNA ของสาร 3,3',4',6-tetrahydroxy-7-methoxyflavone (**1**) และ 2',7-dihydroxy-4',5'-dimethoxyisoflavone (**2**) ที่ระดับความเข้มข้น 20 $\mu\text{g/ml}$ ใน RAW 264.7 cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ ทดสอบโดยวิธี RT-PCR ในช่วงระยะเวลา 0 - 24 ชั่วโมง : TNF- α (a1), IL-1 β (a2), IL-6 (a3), iNOS (a4), และ COX-2 (a5), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$



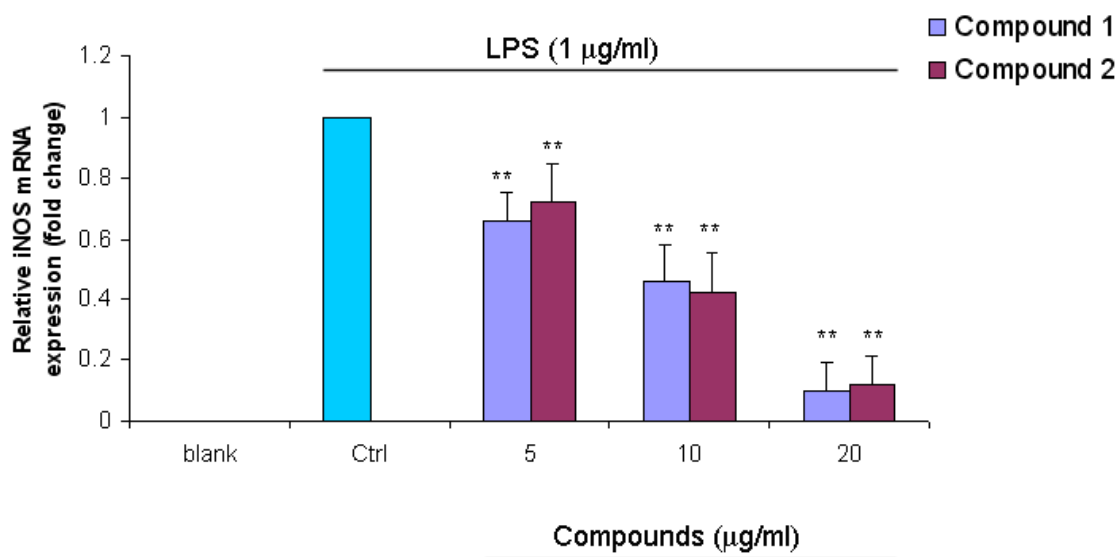
b1



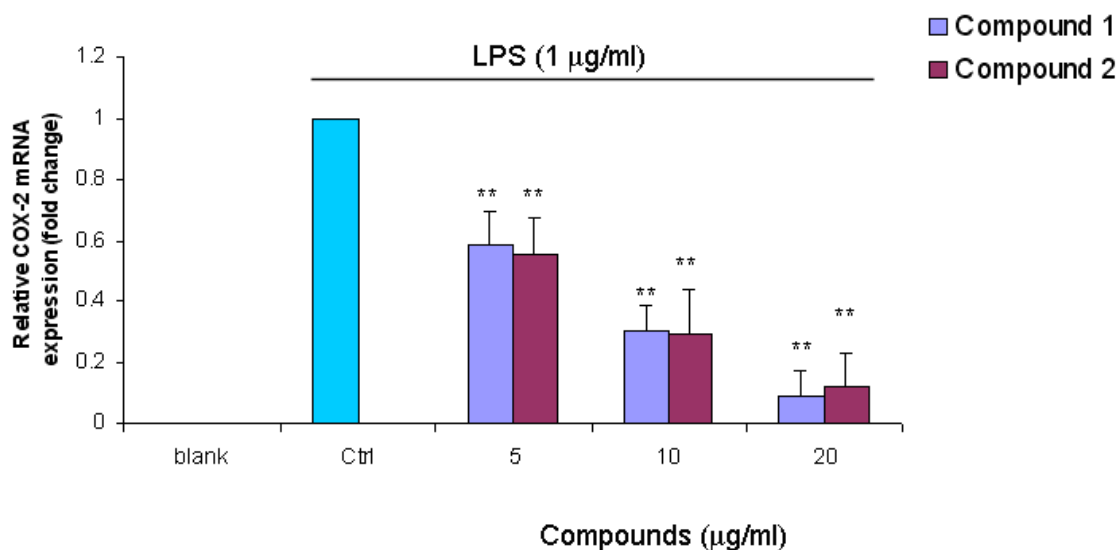
b2



b3



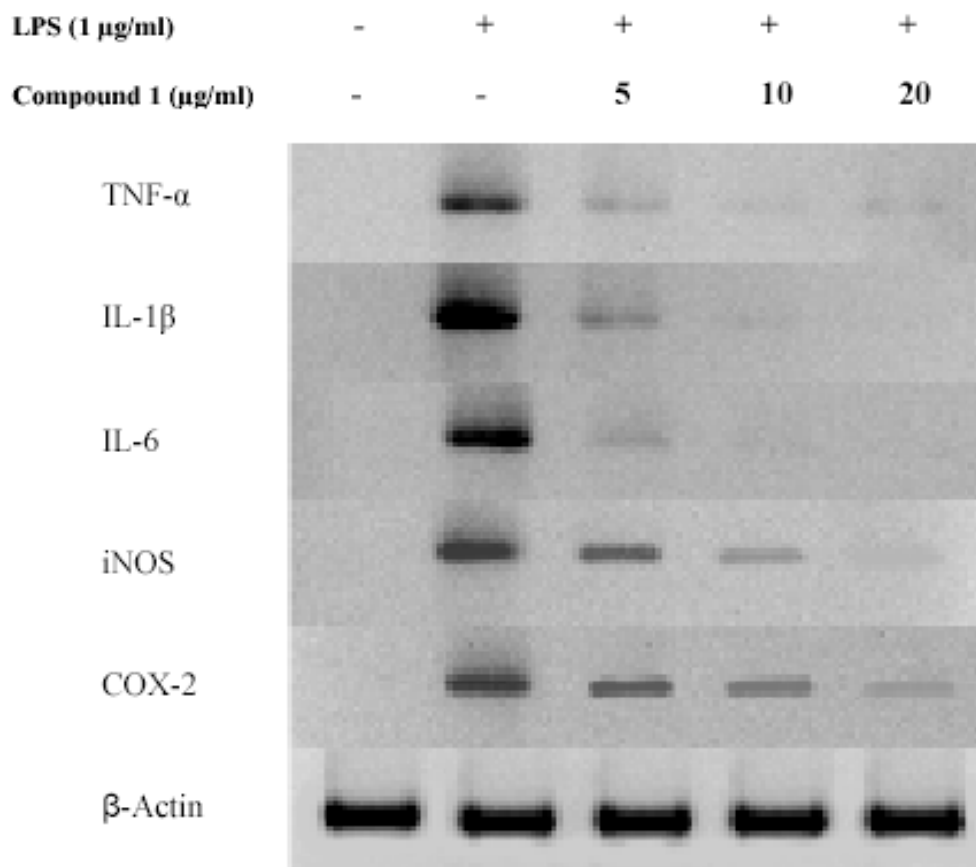
b4



b5

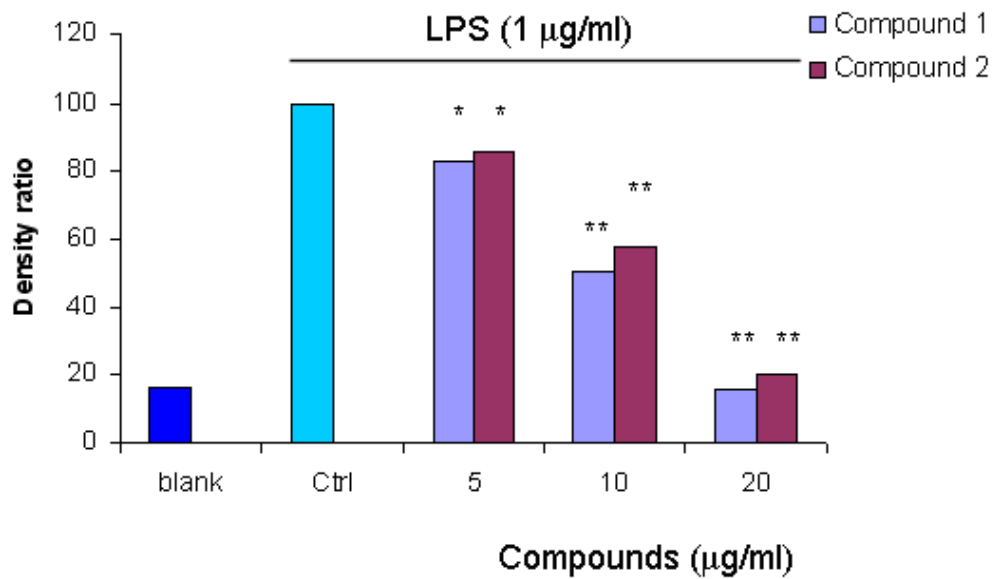
รูปที่ 19 ผลการยับยั้งระดับ mRNA ของสาร 3,3',4',6-tetrahydroxy-7-methoxyflavone (1) และ 2',7-dihydroxy-4',5'-dimethoxyisoflavone (2) ที่ระดับความเข้มข้น 5 - 20 µg/ml ใน RAW 264.7 cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS 1 µg/ml ในระยะเวลา 6 ชั่วโมง ทดสอบโดยวิธี RT-PCR: TNF- α (b1), IL-1 β (b2), IL-6 (b3), iNOS (b4), และ COX-2 (b5), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

จากการทดสอบการยับยั้งการแสดงออกระดับ mRNA ของยีนส์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบของสาร 3,3',4',6-tetrahydroxy-7-methoxyflavone (1) และ 2',7-dihydroxy-4',5'-dimethoxyisoflavone (2) ที่ระดับความเข้มข้น 5 - 20 µg/ml ใน RAW 264.7 cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS 1 µg/ml ในระยะเวลา 6 ชั่วโมง ทดสอบโดยวิธี RT-PCR ผลการทดสอบ ดังรูปที่ 20

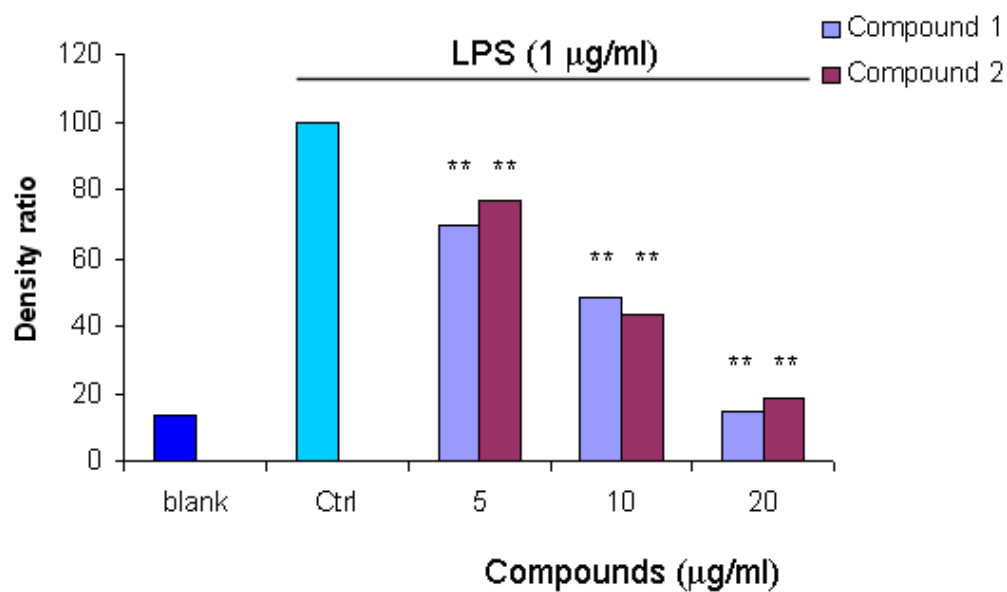


รูปที่ 20 ผลการยับยั้งระดับ mRNA ของสาร 3,3',4',6-tetrahydroxy-7-methoxyflavone (1) และ 2',7-dihydroxy-4',5'-dimethoxyisoflavone (2) ที่ระดับความเข้มข้น 5 - 20 $\mu\text{g/ml}$ ใน RAW 264.7 cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ ในระยะเวลา 6 ชั่วโมง ทดสอบโดยวิธี RT-PCR ภาพแสดงเป็น Grayscale ด้วยโปรแกรม ImageJ

การตรวจหาเอ็นไซม์ iNOS และ COX-2 ใน RAW 264.7 cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ ด้วยวิธี Western blot analysis จากการศึกษผลการยับยั้งการสร้างเอ็นไซม์ทั้งสองด้วยสาร 3,3',4',6-tetrahydroxy-7-methoxyflavone (1) และ 2',7-dihydroxy-4',5'-dimethoxyisoflavone (2) ที่ระดับความเข้มข้น 5 - 20 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าสารทั้งสองนี้สามารถยับยั้งการสร้างเอ็นไซม์ iNOS และ COX-2 ใน RAW 264.7 cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ ได้ ดังรูปที่ 21 และผลการทดสอบด้วยวิธี Western blot analysis แสดงดังรูปที่ 22

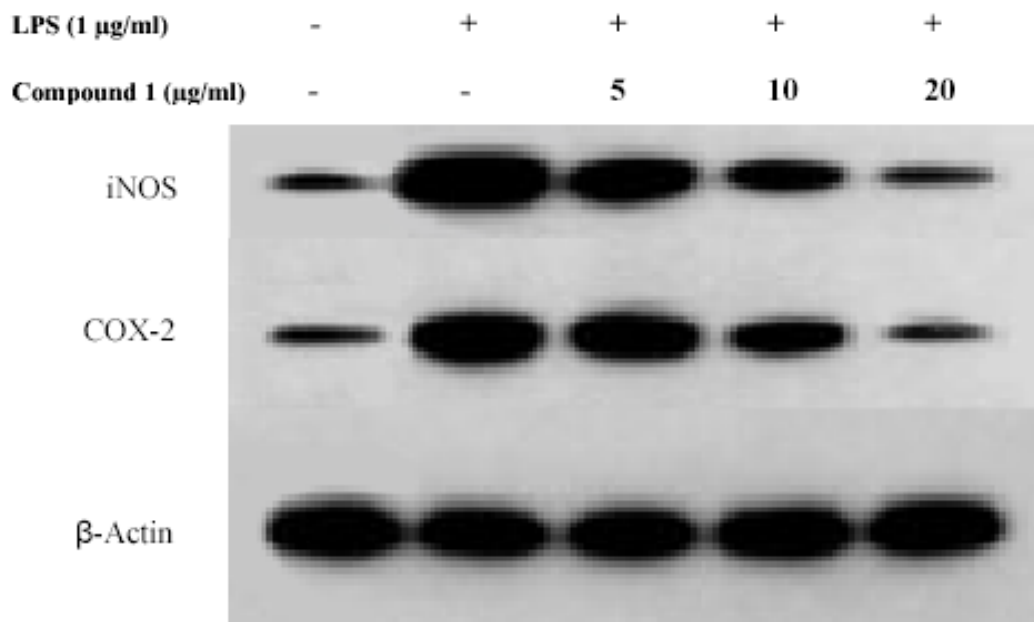


a



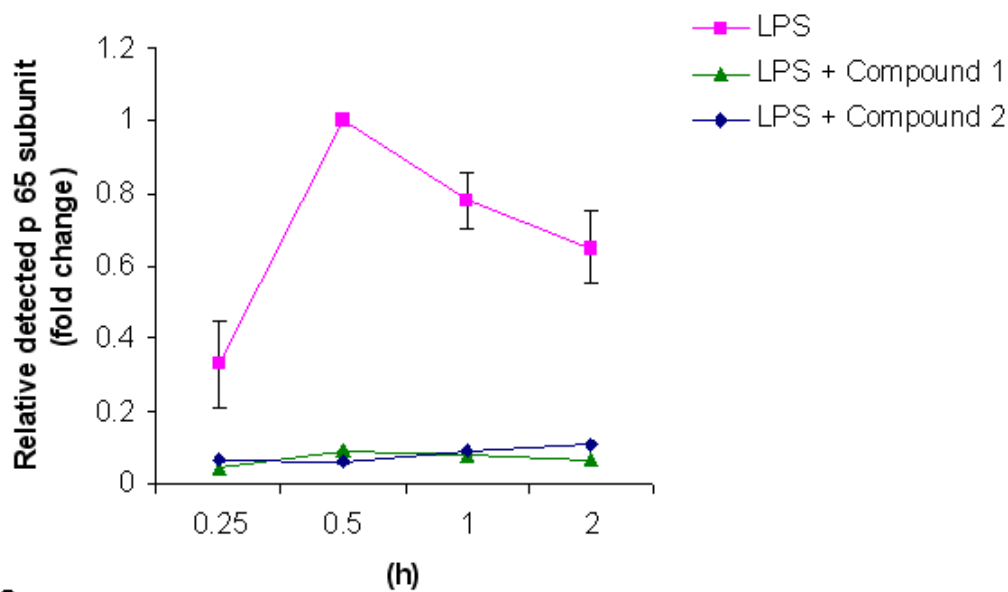
b

รูปที่ 21 ผลการยับยั้งการสร้างเอ็นไซม์ iNOS และ COX-2 ของสาร 3,3',4',6-tetrahydroxy-7-methoxyflavone (1) และ 2',7-dihydroxy-4',5'-dimethoxyisoflavone (2) ที่ระดับความเข้มข้น 5 - 20 µg/ml ใน RAW 264.7 cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS 1 µg/ml โดยวิธี Western blot analysis ผลการทดสอบแสดงเป็น density ratio ด้วยโปรแกรม ImageJ



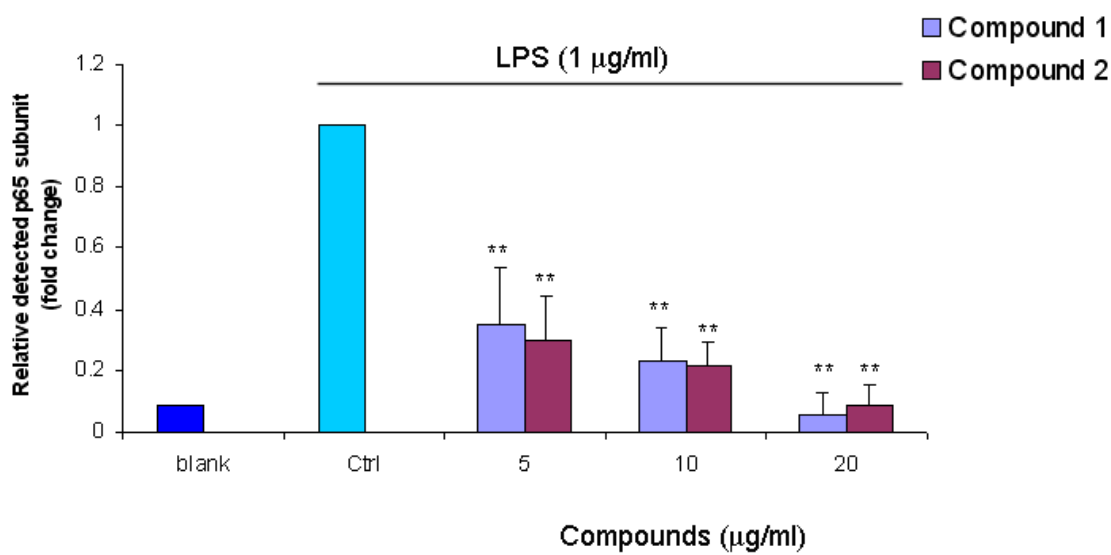
รูปที่ 22 Western blot analysis แสดงผลการยับยั้งการสร้างเอ็นไซม์ iNOS และ COX-2 ของสาร 3,3',4',6-tetrahydroxy-7-methoxyflavone (**1**) ที่ระดับความเข้มข้น 5 - 20 $\mu\text{g/ml}$ ใน RAW 264.7 cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS 1 $\mu\text{g/ml}$

จากการทดสอบกลไกการกระตุ้นการอักเสบใน RAW 264.7 cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ โดยผ่านทาง NF-KB pathway โดยวัดโปรตีนจำเพาะ p65 ด้วยวิธี ELISA จากการทดลองพบว่า ผลการกระตุ้นผ่านทาง NF-KB pathway โดยมีระยะเวลาในการกระตุ้นสูงสุดในช่วง 0.5 ชั่วโมง ดังรูปที่ 23 และสาร 3,3',4',6-tetrahydroxy-7-methoxyflavone (**1**) และ 2',7-dihydroxy-4',5'-dimethoxyisoflavone (**2**) สามารถยับยั้งการกระตุ้นโดยผ่านทาง NF-KB pathway ด้วย และนอกจากนี้ ยังพบว่าสารทั้งสองชนิดนี้ ยังสามารถยับยั้งการกระตุ้นโดยผ่านทาง NF-KB pathway ตามปริมาณความเข้มข้นของสารด้วย ดังรูปที่ 24



a

รูปที่ 23 ผลการยับยั้งการกระตุ้น p65 ของสาร 3,3',4',6-tetrahydroxy-7-methoxyflavone (1) และ 2',7-dihydroxy-4',5'-dimethoxyisoflavone (2) ที่ระดับความเข้มข้น 20 $\mu\text{g/ml}$ ใน RAW 264.7 cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ ในช่วงระยะเวลา 0.25 - 2 ชั่วโมง ทดสอบโดยวิธี ELISA

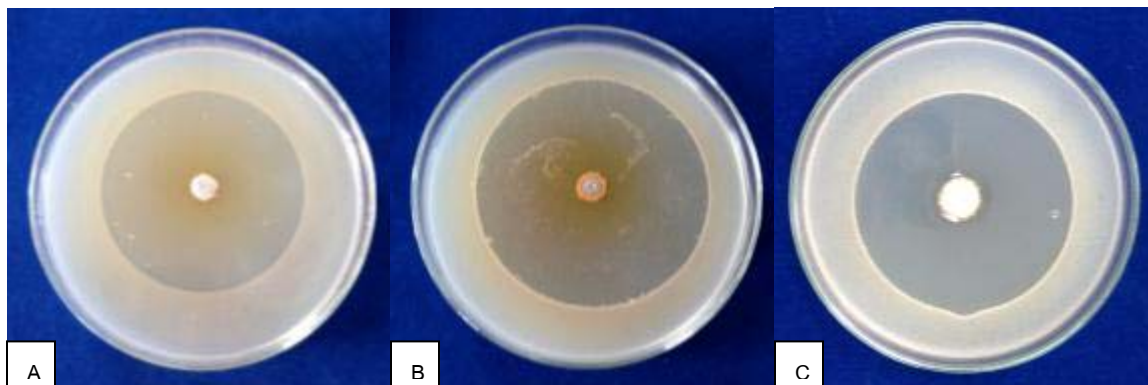


b

รูปที่ 24 ผลการยับยั้งการกระตุ้น p65 ของสาร 3,3',4',6-tetrahydroxy-7-methoxyflavone (1) และ 2',7-dihydroxy-4',5'-dimethoxyisoflavone (2) ที่ระดับความเข้มข้น 5 - 20 $\mu\text{g/ml}$ ใน RAW 264.7 cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ ทดสอบโดยวิธี ELISA

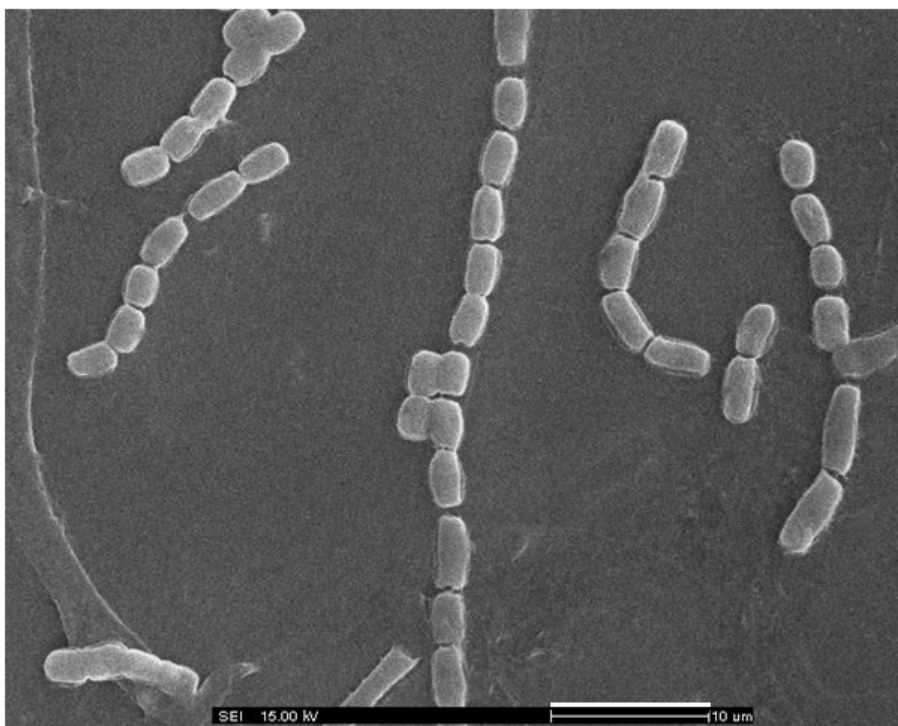
การแยกสารจาก HK17

Streptomyces sp. HK17 แยกได้จากรากขมิ้นชัน *Curcuma longa* Linn. จากการตรวจกรองคุณสมบัติด้านการเจริญของจุลินทรีย์ ด้วยวิธี over-layer culture plate พบว่า *Streptomyces* sp. HK17 มีคุณสมบัติด้านการเจริญจุลินทรีย์หลายชนิดทั้งแบคทีเรียและยีสต์ ดังรูปที่ 25



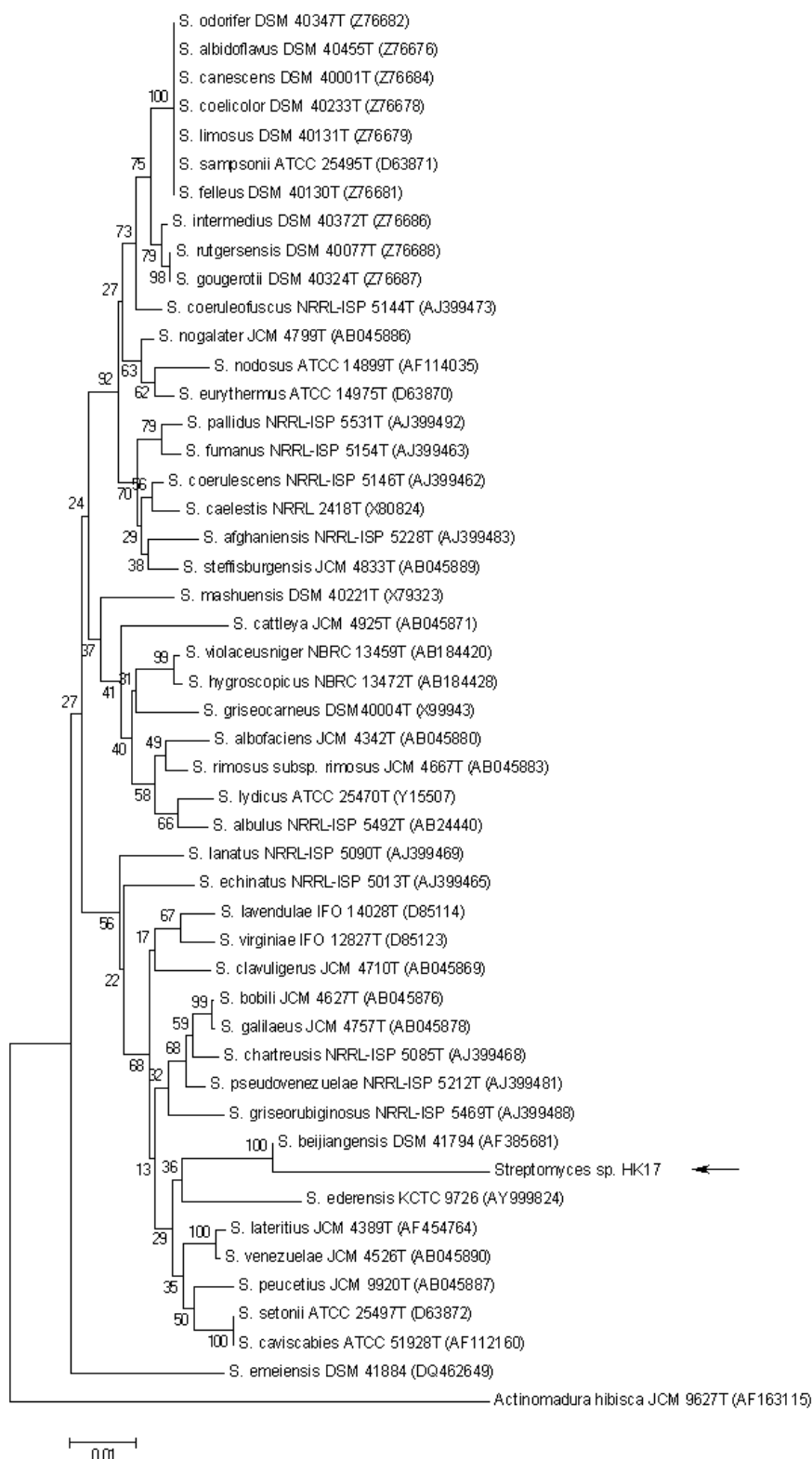
รูปที่ 25 การตรวจกรองคุณสมบัติด้านการเจริญของจุลินทรีย์ ด้วยวิธี over-layer culture plate ของ *Streptomyces* sp. HK17 ต่อแบคทีเรียทดสอบ *Bacillus cereus* ATCC7064 (A), *Bacillus subtilis* ATCC6633 (B) และ *Staphylococcus aureus* ATCC25932 (C), บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-2 บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จากการศึกษาฐานวิทยาศาสตร์ เมื่อเจริญบนอาหาร ISP-2 อายุ 21 วัน พบว่า HK17 มีการสร้างสปอร์บนเส้นใยอากาศที่มีการเรียงตัวเป็นสายยาวตรงหรือโค้งงอได้ สปอร์มีขนาด $1 \times 1.5 \mu\text{m}$ ผิวเรียบ ดังรูปที่ 26 HK17 สร้างเส้นใยอาหารที่ไม่มีการแตกหักของเส้นใย เส้นใยอากาศมีสีขาวครีมและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเมื่ออายุ 21 วัน และสามารถสร้างรงควัตถุสีเหลืองแพร่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ



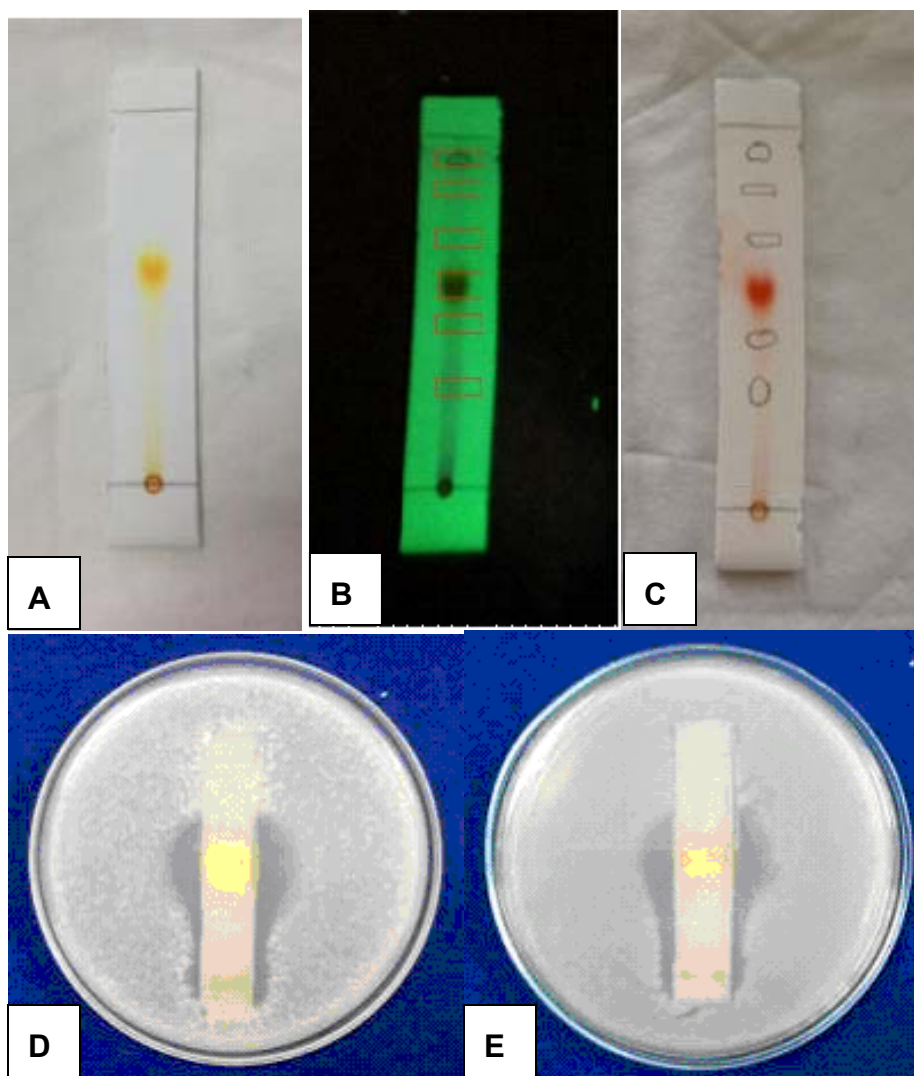
รูปที่ 26 รูปร่างสปอร์ที่เรียงตัวเป็นสายยาวตรงและโค้งงอได้ของ *Streptomyces* sp. HK17 เมื่อเจริญบนอาหาร ISP-2 อายุ 21 วัน

จากการศึกษาอนุกรมวิธานทางเคมี (Chemotaxonomy) พบว่า HK17 มี diaminopimelic acid ชนิด LL-diaminopimelic acid ใน whole-cell hydrolysates และจากการศึกษาลำดับกรดนิวคลีอิกของ 16SrDNA พบว่า HK17 มีความคล้ายกับ *Streptomyces beijingensis* DSM 41794T (accession number: AF385681) ถึง 97% ดังรูปที่ 27 จึงทำการฝากลำดับกรดนิวคลีอิก 16SrDNA ของ HK17 ใน Genbank, EMBL และ DDBJ ได้ accession number AB981191



รูปที่ 27 Neighbor-joining phylogenetic tree ของ HK17 กับเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่เกี่ยวข้อง จากฐานข้อมูล GenBank สร้างด้วยโปรแกรม MEGA 4.0.

จากการสกัดสารสกัดหยาบ HK17 และทำการตรวจยืนยันคุณสมบัติการต้านการอักเสบโดยวิธี paper disc diffusion พบว่าสารสกัดหยาบจาก HK17 ยังคงมีฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ เช่นเดียวกับขั้นตอนการตรวจกรอง นอกจากนี้ เมื่อนำสารสกัดหยาบมาศึกษาองค์ประกอบหลักของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยวิธี Thin-layer Chromatography และศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพขององค์ประกอบเหล่านั้น โดยวิธี Bioautography พบว่าองค์ประกอบหลักของสารยังคงออกฤทธิ์ต้านการเจริญเชื้อทดสอบ ดังรูปที่ 28



รูปที่ 28 สารองค์ประกอบหลักในสารสกัดหยาบ จากการทดสอบโดยวิธี Thin-layer Chromatography (TLC) ด้วย chloroform : ethyl acetate (3.5:1), TLC (A), UV-light (B) และ Vanillin-sulfuric acid (C) และผล Bioautography ต่อเชื้อทดสอบ *Bacillus cereus* ATCC7064 (D) และ *Bacillus subtilis* ATCC6633 (E) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-2 บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

และจากการนำสารสกัดหยาบมาทำการแยกสารโดยวิธี Column Chromatography และ Thin-layer Chromatography ซึ่งจากการแยกสารในครั้งนี้ ได้สารใหม่ 4 ชนิดในกลุ่มฟลาโวนอยด์ คือ 2(S)-5,7-dihydroxy-8,2'-dimethoxyflavanone (**1**), 2(S)-5,7,2'-trihydroxy-8-methoxyflavanone (**2**), 2(S)-5,2',5'-trihydroxy-7,8-dimethoxyflavanone (**3**) และ 2(S)-7,2'-Dihydroxy-5,8-dimethoxyflavanone (**4**) ซึ่งมีค่า spectrum data ดังต่อไปนี้

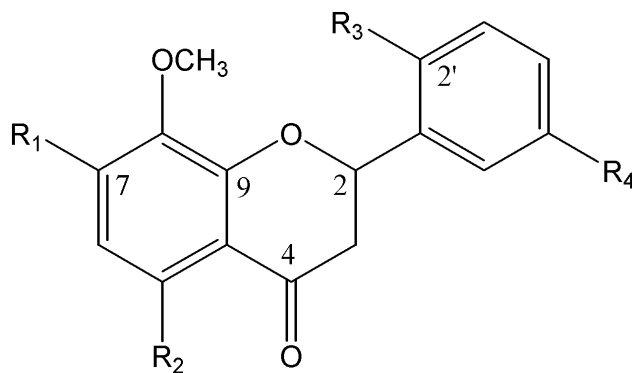
Compound **1**; 2(S)-5,7-dihydroxy-8,2'-dimethoxyflavanone (**1**), pale yellowish white needle, $[\alpha]_D^{20} -19.2$ (c 0.022, MeOH). UV (MeOH): $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 210 (3.87), 302 (3.09) nm.; mp 190-192 °C; IR (KBr): $\nu_{\max}$ 3287, 1625, 1598, 1518, 1461, 1419, 1372, 1273, 1102, 998, 750 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO) and $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO) ดังตารางที่ 17 และ ตารางที่ 18 HRMS [(+)-ESI]: m/z 317.1023 (calcd. 317.1025 for $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{O}_6$, $[\text{M} + \text{H}^+]$).

Compound **2**; 2(S)-5,7,2'-trihydroxy-8-methoxyflavanone (**2**), white needle, $[\alpha]_D^{20} -19.0$ (c 0.020, MeOH). UV (MeOH): $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 210 (3.87), 302 (3.09) nm.; mp 190-192 °C; IR (KBr): $\nu_{\max}$ 3270, 1612, 1601, 1588, 1444, 1403, 1332, 1243, 1072, 976, 712 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO) and $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO) ดังตารางที่ 17 และ ตารางที่ 18 HRMS [(+)-ESI]: m/z 302.0675 (calcd. 302.0677 for $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_6$, $[\text{M} + \text{H}^+]$).

Compound **3**; 2(S)-5,2',5'-trihydroxy-7,8-dimethoxyflavanone (**3**), white needle; $[\alpha]_D^{20} -19.7$ (c 0.026, MeOH). UV (MeOH): $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 209 (3.78), 295 (3.01) nm.; mp 194-196 °C; IR (KBr): $\nu_{\max}$ 3280, 1620, 1605, 1590, 1448, 1406, 1347, 1250, 1089, 982, 728 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO) and $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO) ดังตารางที่ 17 และ ตารางที่ 18 HRMS [(+)-ESI]: m/z 332.0941 (calcd. 332.0942 for $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_7$, $[\text{M} + \text{H}^+]$).

Compound **4**; 2(S)-7,2'-Dihydroxy-5,8-dimethoxyflavanone (**4**), white powder; $[\alpha]_D^{20} -19.1$ (c 0.021, MeOH). UV (MeOH): $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 207 (3.76), 285 (3.02) nm.; mp 190-192 °C; IR (KBr): $\nu_{\max}$ 3266, 1614, 1583, 1510, 1458, 1416, 1367, 1270, 1099, 992, 748 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO) and $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO) ดังตารางที่ 17 และ ตารางที่ 18 HRMS [(+)-ESI]: m/z 317.1024 (calcd. 317.1025 for $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{O}_6$, $[\text{M} + \text{H}^+]$).

สารที่แยกได้ทั้ง 4 ชนิด มีโครงสร้างทางเคมี ดังรูปที่ 29



- 1** $R_1 = R_2 = \text{OH}, R_3 = \text{OCH}_3, R_4 = \text{H}$
2 $R_1 = R_2 = R_3 = \text{OH}, R_4 = \text{H}$
3 $R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = R_3 = R_4 = \text{OH}$
4 $R_1 = R_3 = \text{OH}, R_2 = \text{OCH}_3, R_4 = \text{H}$

รูปที่ 29 โครงสร้างทางเคมีของ 2(S)-5,7-dihydroxy-8,2'-dimethoxyflavanone (**1**), 2(S)-5,7,2'-trihydroxy-8-methoxyflavanone (**2**), 2(S)-5,2',5'-trihydroxy-7,8-dimethoxy flavanone (**3**), และ 2(S)-7,2'-Dihydroxy-5,8-dimethoxyflavanone (**4**).

ตารางที่ 17 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz) spectroscopic data ของ compounds **1-3**.

H	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a
2	5.69 dd (2.8, 13.0)	5.65 dd (2.8, 13.0)	5.63 dd (2.8, 12.8)	5.61 dd (2.8, 12.8)
3a	2.63 dd (2.8, 16.4)	2.60 dd (2.8, 16.4)	2.59 dd (2.8, 16.4)	2.58 dd (2.8, 16.4)
3b	3.16 dd (13.0, 16.4)	3.18 dd (13.2, 16.4)	3.11 dd (12.8, 16.4)	2.92 dd (12.8, 16.4)
6	6.13 s	6.13 s	6.15 s	6.13 s
3'	6.85 d (7.6)	6.87 d (7.5)	6.88 d (7.4)	6.86 d (7.7)
4'	7.34 td (1.2, 7.6)	7.18 td (1.2, 7.6)	6.57 dd (1.2, 8.4)	7.18 m
5'	6.87 m	6.85 m		6.87 m
6'	7.41 d (7.6)	7.43 d (7.6)	7.44 d (1.2)	7.43 d (7.0)
OCH ₃	3.67 s (C-8)	3.66 s (C-8)	3.68 s (C-8)	3.62 s (C-8)
	3.77 s (C-2')		3.82 s (C-7)	3.69 s (C-5)
OH	10.43 s (C-7)	10.42 s (C-7)	9.98 s (C-5')	10.45 s (C-7)
	10.26 s (C-5)	10.30 s (C-5)	10.28 s (C-5)	9.91 s (C-2')
		9.94 s (C-2')	9.93 s (C-2')	

^a DMSO -*d*₆. δ values in ppm and coupling constant (in parentheses) in Hz.

ตารางที่ 18 ^{13}C -NMR (100 MHz) spectroscopic data ของ compounds **1-3**.

H	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a
2	74.2 (-CH)	74.4 (-CH)	74.3 (-CH)	74.1 (-CH)
3	43.7 (-CH ₂)	43.6 (-CH ₂)	43.9 (-CH ₂)	43.8 (-CH ₂)
4	188.6 (-C-)	188.8 (-C-)	189.0 (-C-)	188.5 (-C-)
4a	104.6 (-C-)	104.5 (-C-)	104.3 (-C-)	104.7 (-C-)
5	157.2 (-C-)	157.3 (-C-)	157.6 (-C-)	157.3 (-C-)
6	93.4 (-CH)	93.6 (-CH)	93.6 (-CH)	93.3 (-CH)
7	156.8 (-C-)	157.0 (-C-)	157.4 (-C-)	157.1 (-C-)
8	129.1 (-C-)	129.2 (-C-)	129.1 (-C-)	129.2 (-C-)
8a	156.4 (-C-)	156.8 (-C-)	156.5 (-C-)	156.9 (-C-)
1'	125.8 (-C-)	125.5 (-C-)	126.1 (-C-)	125.4 (-C-)
2'	154.6 (-C-)	155.0 (-C-)	154.8 (-C-)	154.4 (-C-)
3'	115.0 (-CH)	115.4 (-CH)	115.9 (-CH)	115.5 (-CH)
4'	129.5 (-CH)	130.1 (-CH)	129.8 (-CH)	129.4 (-CH)
5'	121.1 (-CH)	120.8 (-CH)	138.6 (-CH)	119.4 (-CH)
6'	127.4 (-CH)	127.5 (-CH)	127.2 (-CH)	126.8 (-CH)
OCH ₃	56.3 (C-2')(-CH ₃)	61.0 (C-8)	57.0 (C-7)	55.8 (C-5)(-CH ₃)
	61.1 (C-8)(-CH ₃)		61.1 (C-8)	60.6 (C-8)(-CH ₃)

^aDMSO -d₆.

การศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบและสารที่แยกได้ โดยวิธี paper disc diffusion โดยโหลดสารสกัดหยาบหรือสารที่แยกได้ลงใน paper disc ปริมาณ 50 µg/disc พบว่าสารสกัดหยาบสามารถยับยั้ง *S. aureus* และ *C. albicans* โดยให้ inhibition zone ขนาด 25.5 mm ตามด้วย *B. cereus* และ *B. subtilis* ขณะที่ให้ผลการยับยั้ง *E. coli* และ *P. aeruginosa* น้อยกว่าแบคทีเรียแกรมบวก โดยให้ inhibition zone ขนาด 18.4 mm และ 15.6 mm ตามลำดับ ส่วนสารที่แยกได้ พบว่า 2(S)-5,2',5'-trihydroxy-7,8-dimethoxyflavanone (**3**) ให้ผลการต้านจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด ซึ่งให้ผลต้านแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ดังตารางที่ 19

ตารางที่ 19 Inhibition zones ของสารสกัดหยาบและสารที่แยกได้ต่อจุลินทรีย์ทดสอบ (mm).

Test agents	Microorganisms					
	S.a. ^a	B.c.	B.s.	E.c.	P.a.	C.a.
Crude extract	25.5 ± 0.58	24.0 ± 0.45	24.5 ± 0.53	18.4 ± 1.53	15.6 ± 1.00	25.5 ± 0.41
Compound 1	18.5 ± 1.00	16.0 ± 0.53	16.5 ± 1.44	11.0 ± 1.04	8.5 ± 1.46	19.6 ± 1.30
Compound 2	20.0 ± 1.55	18.4 ± 0.82	17.6 ± 1.58	14.8 ± 1.00	10.0 ± 1.24	20.6 ± 1.25
Compound 3	25.5 ± 0.53	22.0 ± 1.53	23.5 ± 1.00	16.8 ± 0.48	14.6 ± 0.58	25.2 ± 0.84
Compound 4	19.5 ± 0.56	20.0 ± 1.23	18.5 ± 1.35	13.8 ± 0.78	9.6 ± 1.12	20.2 ± 1.24
Ampicillin	30.6 ± 0.42	27.6 ± 1.35	28.1 ± 1.14	24.4 ± 1.23	20.2 ± 1.56	-
Ketoconazole	-	-	-	-	-	30.8 ± 1.01

^aS.a.; *Staphylococcus aureus* ATCC25932, B.c.; *Bacillus cereus* ATCC7064, B.s., *Bacillus subtilis*

ATCC6633, E.c., *Escherichia coli* ATCC10536, P.a., *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853,

and C.a., *Candida albicans* ATCC. - : no tested.

การทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (MIC) ของสารสกัดหยาบและสารที่แยกได้ พบว่าสารสกัดหยาบและ 2(S)-5,2',5'-trihydroxy-7,8-dimethoxyflavanone (**3**) ให้ผล MIC ที่มีค่าต่ำที่สุด คือ 32 µg/ml ต่อ *S. aureus* และ *C. albicans* ถัดมา คือ 2(S)-5,7,2'-trihydroxy-8-methoxyflavanone (**2**) และ 2(S)-5,7-dihydroxy-8,2'-dimethoxyflavanone (**1**) ที่ให้ผลต้านการเจริญ *S. aureus*, *B. cereus*, *B. subtilis* และ *C. albicans* อย่างไรก็ดีตาม สาร **1**, **2** และ **4** ให้ค่า MIC ต่อ *P. aeruginosa* ก่อนข้างสูง คือ 512 µg/ml ดังตารางที่ 20 และจากการทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าจุลินทรีย์ (MMC) ของสารสกัดหยาบและสารที่แยกได้ พบว่า 2(S)-5,2',5'-trihydroxy-7,8-dimethoxyflavanone (**3**) ให้ผล MMC ที่มีค่าต่ำที่สุด คือ 128 µg/ml ต่อ *S. aureus* และ *C. albicans* ไปในทางเดียวกันกับค่า MIC ดังตารางที่ 21

ตารางที่ 20 Minimum inhibitory concentrations ($\mu\text{g/ml}$) ของสารสกัดหยาบและสารที่แยกได้

Test agents	Microorganisms					
	S.a. ^a	B.c.	B.s.	E.c.	P.a.	C.a.
Crude extract	32	64	64	128	256	32
Compound 1	128	128	128	256	512	256
Compound 2	64	64	128	256	512	256
Compound 3	32	64	64	128	128	32
Compound 4	64	64	128	256	512	256
Ampicillin	4	4	4	4	4	-
Ketoconazole	-	-	-	-	-	2

^aS.a.; *Staphylococcus aureus* ATCC25932, B.c.; *Bacillus cereus* ATCC7064, B.s., *Bacillus subtilis* ATCC6633, E.c., *Escherichia coli* ATCC10536, P.a., *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, and C.a., *Candida albicans* ATCC. - : no tested.

ตารางที่ 21 Minimum microbicidal concentrations ($\mu\text{g/ml}$) ของสารสกัดหยาบและสารที่แยกได้

Test agents	Microorganisms					
	S.a. ^a	B.c.	B.s.	E.c.	P.a.	C.a.
Crude extract	256	512	512	>512	>512	512
Compound 1	512	512	512	>512	>512	>512
Compound 2	512	512	512	>512	>512	>512
Compound 3	128	256	256	512	512	128
Compound 4	512	512	512	>512	>512	>512
Ampicillin	16	16	16	32	32	-
Ketoconazole	-	-	-	-	-	16

^aS.a.; *Staphylococcus aureus* ATCC25932, B.c.; *Bacillus cereus* ATCC7064, B.s., *Bacillus subtilis* ATCC6633, E.c., *Escherichia coli* ATCC10536, P.a., *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, and C.a., *Candida albicans* ATCC. - : no tested.

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

จากผลการทดลองการแยกเชื้อแอคติโนมัยซิสในพืชสมุนไพรบางชนิด พบว่าเนื้อเยื่อพืชที่มีโอกาสพบมากที่สุดคือ ราก ซึ่งเป็นส่วนที่สัมผัสกับดิน โอกาสที่ได้รับเชื้อจากดินหรือเชื้อปนเปื้อนจากดินมีสูง อย่างไรก็ตาม จากการทำ surface sterilization ของเนื้อเยื่อพืช โดยการทำให้ critical surface sterilization ทำให้ทราบว่า condition นี้ สามารถฆ่าเชื้อที่ปนเปื้อนที่ผิวหน้าได้ถึง 95% ดังนั้น การทำ surface sterilization ด้วยวิธีนี้ จึงมีโอกาสแยกเชื้อที่เป็น endophyte ได้ อย่างไรก็ตาม บางตัวอย่างมี *Bacillus* sp. ขึ้น ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า การทำ surface sterilization ด้วยวิธีนี้ ไม่สามารถฆ่าเชื้อ spore forming bacteria ได้ จากการแยกเชื้อจากพืชสมุนไพร 11 ชนิด ๆ ละ 900 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 9900 ตัวอย่าง แยกเชื้อแอคติโนมัยซิสได้ 530 สายพันธุ์ ซึ่งพบว่าเนื้อเยื่อจากรากเป็นเนื้อเยื่อที่แยกเชื้อได้มากที่สุด จำนวน 299 สายพันธุ์ คิดเป็น 56.41% และจากการตรวจสอบการคุณสมบัติการต้านเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ พบว่า มีเพียง 20 สายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารต้านการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดี คิดเป็น 3.77% ได้แก่ พืชที่สามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยซิสได้มากที่สุดคือ *Zingiber cassumunar* และ *Zingiber officinale* Rosc. ซึ่งเป็นพืชที่จัดอยู่ในตระกูล Zingiberaceae และจากการหาอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ เพื่อสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมคือ ISP-2 ในการบ่มที่ 30°C นาน 14 วัน เพื่อสกัดสารสกัดหยาบด้วย ethyl acetate ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่นิยมใช้ในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์ และจากการแยกสารให้บริสุทธิ์จากการสกัดหยาบ พบว่า LJK109 แยกสารที่เป็นองค์ประกอบหลักได้ 2 ชนิด ซึ่งเป็นสารที่เคยมีการรายงานมาก่อน คือ 3-methylcarbazole และ 1-methoxy-3-methylcarbazole (28-30) จากการทดสอบต้านเชื้อจุลินทรีย์ พบว่าสารนี้ไม่มีฤทธิ์หรือมีฤทธิ์ต่ำในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและยีสต์ แต่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเชื้อรา ซึ่งจากผลการทดลองสามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชได้ โดย 3-methylcarbazole ให้ค่า MIC กับเชื้อราทดสอบ 30-240 µg/ml ส่วน 1-methoxy-3-methylcarbazole ให้ค่า MIC กับเชื้อราทดสอบ 60-240 µg/ml เนื่องจาก carbazole และอนุพันธ์ของ carbazoles มีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบ (31) ซึ่งสามารถทดสอบแบบ *in vitro* ได้ โดยใช้ murine macrophage RAW 264.7 cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS (1 µg/ml), Poly (I:C) (1 µg/ml), and pam3CSK (10 µg/ml) ซึ่งการกระตุ้นด้วยสารต่าง ๆ ดังกล่าวนี้อาจกระตุ้นผ่านทาง toll like receptor ที่แตกต่างกัน เช่น LPS กระตุ้นผ่านทาง TLR4 ligand, polyinosinic-polycytidylic acid (Poly(I:C)) กระตุ้นผ่านทาง TLR3 ligand และ *N*-palmitoyl-S-[2,3-bis(palmitoloxyl)-(2*RS*)-propyl]-Cys-Ser-Lys₄ (pam3CSK) กระตุ้นผ่านทาง TLR2 ligand โดยการวัด nitric oxide (วัดในรูป nitrite), prostaglandin E₂ (PGE₂), tumor

necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β , IL-6 และ IL-10 ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า 3-methylcarbazoles และ 1-methoxy-3-methylcarbazole ที่ระดับความเข้มข้น 2.5 – 20 $\mu\text{g/ml}$ สามารถยับยั้งการสร้าง pro-inflammatory cytokine ใน RAW 264.7 cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ pam3CSK ตามสัดส่วนของ 3-methylcarbazoles และ 1-methoxy-3-methylcarbazole ขณะที่ 3-methylcarbazoles และ 1-methoxy-3-methylcarbazole ไม่สามารถยับยั้งการสร้าง pro-inflammatory cytokine ใน RAW 264.7 cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย Poly(I:C) จากการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่า 3-methylcarbazoles และ 1-methoxy-3-methylcarbazole ยับยั้งการกระตุ้น RAW 264.7 cells ผ่าน TLR4 และ TLR2 ligands และไม่เกี่ยวข้องกับ TLR3 ligand

การแยกสารให้บริสุทธิ์จากการสกัดหยาบจาก BRM10 สามารถแยกสารที่เป็นองค์ประกอบหลักได้ 2 ชนิด ซึ่งเป็นสารที่เคยมีการรายงานมาก่อน คือ 1-methoxy-nigericin และ nigericin โดยที่ 1-methoxy-nigericin เป็นสารใหม่ ขณะที่ nigericin เป็นสารที่เคยมีรายงานไว้แล้ว (Deboer and Dietz, 1976; Grabley, *et. al.*, 1990; Heisey and Putnam, 1986) จากการทดสอบต้านเชื้อจุลินทรีย์ พบว่า สารนี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียบางชนิด แต่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ซึ่งจากผลการทดลอง พบว่า 1-methoxy-nigericin สามารถสามารถยับยั้งการเจริญ *Staphylococcus aureus* ATCC25932 และ *Bacillus cereus* ATCC6633 โดยให้ค่า MIC 0.5 $\mu\text{g/ml}$ และ 1.0 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม 1-methoxy-nigericin ไม่ยับยั้งการเจริญ *Escherichia coli* ATCC10536 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 ที่ระดับความเข้มข้น 64 $\mu\text{g/ml}$ นอกจากนี้ 1-methoxy-nigericin ยังให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าแบคทีเรีย (Minimum Bactericidal Concentration: MBC) ต่อ *S. aureus* ATCC25932 และ *B. cereus* ATCC6633 ที่ระดับความเข้มข้น 32 $\mu\text{g/ml}$ และ 64 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ เนื่องจาก nigericin และอนุพันธ์ของ nigericins จัดเป็นยาปฏิชีวนะที่อยู่ในกลุ่ม polyether ionophore ซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพกว้างขวาง เช่น antibacterial, antifungal, antiparasitic, antiviral, antineoplastic activities และ anti-inflammatory (Kevin *et al.*, 2009) ดังนั้น 1-methoxy-nigericin จึงควรนำมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ ด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง anti-inflammatory ซึ่งสามารถทดสอบแบบ *in vitro* ได้ โดยใช้ murine macrophage RAW 264.7 cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) แล้ววัด nitric oxide (วัดในรูป nitrite), prostaglandin E₂ (PGE₂), tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β , IL-6 และ IL-10 แต่จากการตรวจกรองเบื้องต้นจะตรวจหาเฉพาะ ฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้าง nitric oxide ก่อน หากสารทดสอบสามารถยับยั้งการสร้าง nitric oxide จาก RAW 264.7 cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ได้ จึงจะทดสอบการยับยั้งการสร้าง pro-inflammatory cytokine ชนิดอื่น ๆ ต่อไป และจากการทดลองพบว่า 1-methoxy-nigericin ที่ระดับความเข้มข้น 1 – 10 $\mu\text{g/ml}$ ไม่สามารถยับยั้งการสร้าง nitric oxide ใน RAW 264.7 cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ดังนั้น จึงไม่จำเป็นต้องวัด

ปริมาณ pro-inflammatory cytokine ชนิดอื่น ๆ จากการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่า 1-methoxy-nigericin สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียบางชนิดที่เป็นแกรมบวก เช่น *S. aureus* และ *B. cereus* แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *E. coli* และ *P. aeruginosa* นอกจากนี้ยังพบว่า 1-methoxy-nigericin ยังไม่มีฤทธิ์ anti-inflammatory ด้วย

การแยกสารองค์ประกอบหลักจากสกัดหยาบจาก GMT-8 สามารถแยกสารที่เป็นองค์ประกอบหลักได้ 1 ชนิด ซึ่งเป็นสารที่เคยมีการรายงานมาก่อน ซึ่งเป็นสารที่แยกได้จากส่วนรากของ *Angelica gigas* Nakai (Umbelliferae) (Konoshima *et al.*, 1968). และจากการเปรียบเทียบข้อมูล $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ spectra และน้ำหนักโมเลกุล พบว่า decursin ที่แยกได้จาก *Streptomyces* sp. GMT-8 คล้ายกับ decursin ที่เคยมีรายงานไว้แล้ว และแยกได้จากพืช *Angelica gigas* Nakai (Hata and Sano, 1966, Ryu *et al.*, 1990). จากการทดสอบด้านเชื้อจุลินทรีย์ พบว่า สารนี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียบางชนิด แต่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ซึ่งจากผลการทดลอง พบว่า decursin สามารถยับยั้งการเจริญ *Staphylococcus aureus* ATCC25932, *Bacillus cereus* ATCC7064 และ *Bacillus subtilis* ATCC6633 โดยให้ค่า MIC 32 $\mu\text{g/ml}$, 256 $\mu\text{g/ml}$ และ 64 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม decursin ไม่ยับยั้งการเจริญ *Escherichia coli* ATCC10536 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 ที่ระดับความเข้มข้น 512 $\mu\text{g/ml}$ นอกจากนี้ decursin ยังให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าแบคทีเรีย (Minimum Bactericidal Concentration: MBC) ต่อ *S. aureus* ATCC25932 และ *B. subtilis* ATCC6633 ที่ระดับความเข้มข้น 128 $\mu\text{g/ml}$ และ 256 $\mu\text{g/ml}$ แต่ไม่สามารถฆ่าเชื้อ *B. cereus* ATCC7064 ที่ระดับความเข้มข้น 512 $\mu\text{g/ml}$ เนื่องจาก decursin จัดอยู่ในกลุ่ม pyranocoumarin เป็นสารในกลุ่ม coumarins ซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพกว้างขวาง เช่น มีฤทธิ์ป้องกันการทำลายของเซลล์ประสาท (neuroprotection) (Kang and Kim, 2007), anticancer activity (Ahn *et al.*, 1996, Lee *et al.*, 2003a, Jiang *et al.* 2007) และ anti-inflammatory properties (Kim *et al.*, 2006). ดังนั้น decursin จึงควรนำมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ ด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง anti-inflammatory ซึ่งสามารถทดสอบแบบ *in vitro* ได้ โดยใช้ murine macrophage RAW 264.7 cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) แล้ววัด nitric oxide (วัดในรูป nitrite), prostaglandin E_2 (PGE_2), tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β , IL-6 และ IL-10 แต่จากการตรวจกรองเบื้องต้นจะตรวจหาเฉพาะฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้าง nitric oxide ก่อน หากสารทดสอบสามารถยับยั้งการสร้าง nitric oxide จาก RAW 264.7 cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ได้ ก็จะทดสอบการยับยั้งการสร้าง pro-inflammatory cytokine ชนิดอื่น ๆ ต่อไป และจากการทดลองพบว่า decursin ที่ระดับความเข้มข้น 1 – 10 $\mu\text{g/ml}$ ไม่สามารถยับยั้งการสร้าง nitric oxide ใน RAW 264.7 cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ดังนั้น จึงไม่จำเป็นต้องวัดปริมาณ pro-inflammatory cytokine ชนิดอื่น ๆ จากการทดลองนี้ สามารถสรุปได้ว่า decursin สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียบางชนิดที่เป็นแกรมบวก เช่น

S. aureus, *B. cereus* และ *B. subtilis* แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *E. coli* และ *P. aeruginosa* นอกจากนี้ยังพบว่า decursin ยังไม่มีฤทธิ์ anti-inflammatory ที่ระดับความเข้มข้น 1 – 10 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งแตกต่างจากการรายงานของ Kim และคณะ ในปี ค.ศ. 2006 ที่รายงานไว้ว่า decursin มีคุณสมบัติ anti-inflammatory โดยทดสอบใน murine macrophage RAW 264.7 cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) ที่ระดับความเข้มข้นที่ 20 – 60 μM สามารถยับยั้งการหลั่ง pro-inflammatory cytokine ต่าง ๆ ได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้ ต้องมีการทดสอบอีกครั้ง โดยเพิ่มปริมาณ ความเข้มข้นของ decursin ให้มากขึ้น

การแยกสารองค์ประกอบหลักจาก BT01 ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากเนื้อเยื่อส่วนรากของกระชาย (*Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. และจากการแยกสารให้บริสุทธิ์จากการสกัดหยาบของ BT01 พบว่า สามารถแยกสารที่เป็นองค์ประกอบหลักได้ 6 ชนิด ซึ่งเป็นสารที่เคยมีการรายงานมาก่อน 4 ชนิด คือ สาร 2, 3, 5 และ 6 ดังนี้ Fisetin (2) เป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่แยกได้จากพืชหลายชนิด เช่น *Quebracho Colorado* และ *Rhus cotinus* (Family Anacardiaceae) (Gábor and Eperjessy, 1966), *Dalbergia odorifera* (Family Leguminosae) (Chan *et al.*, 1998), *Tanacetum parthenium* (Family Compositae) (Shafaghat and Salimi, 2008), *Acacia greggii* และ *Acacia berlandieri* (Family Fabaceae) (Forbes and Clement, 2010) จากการทดสอบในครั้งนี้ Fisetin มีคุณสมบัติต้านการเจริญแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *S. aureus*, *B. cereus* และ *B. subtilis* โดยมีค่า MIC 32 $\mu\text{g/ml}$ ขณะที่คุณสมบัติต้านแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *E. coli* และ *P. aeruginosa* มีน้อยกว่า โดยมีค่า MIC 128 และ 256 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ naringenin (3) เป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่แยกได้จากพืชหลายชนิดเช่นเดียวกัน ได้แก่ *Tanacetum parthenium* (Family Compositae) (Shafaghat and Salimi, 2008), *Choerospondias axillaries* (Family Anacardiaceae) (Lü *et al.*, 1983), *Citrus aurantium* (Family Rutaceae) (Liu *et al.*, 2008), *Mentha aquatica* (Family Limaceae) (Olsen *et al.*, 2008) จากการทดสอบพบว่า naringenin มีคุณสมบัติต้านการเจริญแบคทีเรียได้น้อยกว่า fisetin อย่างไรก็ตาม naringenin มีคุณสมบัติต้านการเจริญแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบเช่นเดียวกัน 3'-hydroxydaidzein (5) เป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่แยกได้จากพืชหลายชนิดเช่นเดียวกัน ได้แก่ *Pueraria lobata* (Family Leguminosae) (Shi *et al.*, 2012) นอกจากนี้ยังเคยมีรายงานว่า เป็นสารเมแทบอลิท์ของ daidzein ในปัสสาวะมนุษย์ (Kulling *et al.*, 2001, Heinonen *et al.*, 2004) ใน microsome ตับของหนู rat ที่ถูกกระตุ้นด้วย Aroclor (Kulling *et al.*, 2000) และยังสามารถแยกได้จาก dou-chi ซึ่งเป็น soybean food ที่ถูกหมักด้วย *Aspergillus oryzae* (Chen *et al.*, 2005) และยังมีรายงานว่า เป็นสารที่มีคุณสมบัติทางชีวภาพมากมาย เช่น antioxidant activity (Shi *et al.*, 2012) และ anti-inflammatory activity (Jiang *et al.*, 2005) เป็นต้น และจากการทดลองในครั้งนี้ พบว่า 3'-hydroxydaidzein มีคุณสมบัติต้านการเจริญแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *S. aureus*, *B. cereus* และ *B. subtilis* โดยมีค่า

MIC 64 $\mu\text{g/ml}$ และมีคุณสมบัติต้านแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *E. coli* และ *P. aeruginosa* ที่น้อยกว่า โดยมีค่า MIC 256 และ 512 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ Xenognosin (6) เป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่แยกได้จากพืชหลายชนิดเช่นเดียวกัน ได้แก่ *Astragalus membranaceus* (Family Fabaceae) (Du *et al.*, 2006) และ *Dalbergia odorifera* (Family Leguminosae) (Leung *et al.*, 1991) Xenognosin มีคุณสมบัติต้านการเจริญแบคทีเรียได้น้อยกว่า 3'-hydroxydaidzein และมีคุณสมบัติต้านการเจริญแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบเช่นเดียวกัน ส่วนสารชนิดใหม่ที่แยกได้จาก *Streptomyces* sp. BT01 มี 2 ชนิด คือ สาร 1 และ 4 ดังนี้ 3,3',4',6-tetrahydroxy-7-methoxyflavone (1) และ 2',7-dihydroxy-4',5'-dimethoxyisoflavone (4) สารที่แยกได้จาก *Streptomyces* sp. BT01 ทั้ง 6 ชนิดนี้ เมื่อนำมาทดสอบคุณสมบัติต้านการเจริญของแบคทีเรียพบว่าสาร 1, 2 และ 3 มีคุณสมบัติต้านการเจริญของแบคทีเรียได้ดีกว่าสาร 4, 5 and 6 และจากการเปรียบเทียบโครงสร้างและคุณสมบัติต้านการเจริญของแบคทีเรียของสาร 1, 2 และ 3 พบว่าคุณสมบัติต้านการเจริญของแบคทีเรียของสารสาร 2 > 1 > 3 ซึ่งสอดคล้องกับจำนวนหมู่ -OH ในหมู่ phenyl อย่างไรก็ตามสาร 4, 5 และ 6 แม้ว่าจะมีหมู่ free phenolic OH group แต่มีฤทธิ์ต้านการเจริญแบคทีเรียปานกลาง อาจเนื่องมาจากการเติมหมู่ methyl เข้าไปในหมู่ -OH ซึ่งทำให้เกิดหมู่ methoxy แทนที่หมู่ -OH unmethyalted form ของสารเหล่านี้จะทำให้มีคุณสมบัติต้านการเจริญของแบคทีเรียได้ดีกว่า methylated form และจำนวนหมู่ -OH ในหมู่ phenyl ทำให้คุณสมบัติต้านการเจริญของแบคทีเรียได้ดีขึ้นด้วย

จากการศึกษาการแยกสารชีวภาพจาก *Streptomyces* sp. BT01 ซึ่งเป็น endophyte ใน *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. สารที่แยกได้ที่เป็นองค์ประกอบหลักเป็นสารกลุ่ม flavonoids ที่มีคุณสมบัติต้านการเจริญของแบคทีเรีย จากรายงานที่มีผู้ศึกษามาก่อนพบว่าสารกลุ่ม flavonoids นอกจากจะออกฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียแล้ว ยังมีคุณสมบัติทางชีวภาพอื่น ๆ เช่น คุณสมบัติต้านการอักเสบ ต้านอนุมูลอิสระ และต้านการแข็งตัวของเลือด เป็นต้น (García-Lafuente *et al.*, 2009, Jiang *et al.*, 2005, Shi *et al.*, 2012) ดังนั้นคุณสมบัติเหล่านี้ของสารที่แยกได้นี้จึงควรศึกษาต่อไป โดยเฉพาะคุณสมบัติต้านการอักเสบ ซึ่งสามารถทดสอบได้ในห้องปฏิบัติการของเรา อย่างไรก็ตาม การศึกษาคุณสมบัติต้านการอักเสบนี้ จำเป็นต้องเริ่มจากการทดสอบเบื้องต้นในสารสกัดหยาบก่อน หากสารสกัดหยาบมีคุณสมบัติต้านการอักเสบนี้ จึงสมควรศึกษาสารที่แยกได้ต่อไป เมื่อนำสารสกัดหยาบมาทดสอบคุณสมบัติต้านการอักเสบ ด้วยวิธี *in vitro* โดยใช้ murine macrophage RAW 264.7 cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) แล้ววัด nitric oxide (วัดในรูป nitrite) , prostaglandin E_2 (PGE_2), tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β , IL-6 และ IL-10 แต่จากการตรวจกรองเบื้องต้นจะตรวจหาเฉพาะ ฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้าง nitric oxide ก่อน หากสารทดสอบสามารถยับยั้งการสร้าง nitric oxide จาก RAW 264.7 cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย

LPS ได้ จึงจะทดสอบการยับยั้งการสร้าง pro-inflammatory cytokine ชนิดอื่น ๆ ต่อไป และจากการทดลองพบว่า สารสกัดหยาบที่ระดับความเข้มข้น 5 – 20 $\mu\text{g/ml}$ สามารถยับยั้งการสร้าง nitric oxide ใน RAW 264.7 cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ตามระดับความเข้มข้นของสารสกัด แสดงให้เห็นว่ามีแนวโน้มและมีคุณสมบัติต้านการอักเสบด้วย ดังนั้นสารที่เป็นองค์ประกอบหลักแยกได้จากสารสกัดนี้ โดยเฉพาะ สารใหม่ 2 ชนิด คือ 3,3',4',6-tetrahydroxy-7-methoxyflavone (1) และ 2',7-dihydroxy-4',5'-dimethoxyisoflavone (4) จึงควรนำมาศึกษาคุณสมบัติต้านการอักเสบอย่างละเอียดต่อไป

เนื่องจาก macrophage มีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันและเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ โดย activated macrophages สามารถหลั่งสารตัวกลางและไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น NO, PGE_2 , $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ และ IL-6 (Walsh, 2003) นอกจากการอักเสบแบบเฉียบพลันแล้ว การอักเสบแบบเรื้อรังในโรคบางชนิด เช่น multiple sclerosis, Parkinson's disease, Alzheimer's disease และ colon cancer (Heiss, 2001) ก็ยังมีการหลั่งสารตัวกลางและไซโตไคน์เหล่านี้ด้วย NO เป็นสารตัวกลางหนึ่งที่เกิดขึ้นในกระบวนการอักเสบสร้างโดยเอ็นไซม์ nitric oxide synthetase (NOS) ซึ่งตามธรรมชาติมี 3 ชนิด คือ neuronal NOS (nNOS), endothelial NOS (eNOS) และ inducible NOS (iNOS) แต่ iNOS สร้างจาก macrophages ที่ถูกกระตุ้น ซึ่งในการทดลองนี้จะใช้ LPS เป็นสารกระตุ้น macrophages (MacMicking, 1997) ส่วน Prostaglandins (PGs) ก็เป็นสารตัวกลางอีกตัวหนึ่งในกระบวนการอักเสบสร้างโดย cyclooxygenase (COX) ซึ่งมี 2 ชนิด คือ COX-1 และ COX-2 แต่ COX-2 สร้างจาก macrophages ที่ถูกกระตุ้น ซึ่งในการทดลองนี้จะใช้ LPS เป็นสารกระตุ้น macrophages (Herschman, 1996) จากการศึกษาที่เคยมีการรายงานมาก่อน พบว่าฟลาโวนอยด์หลายชนิด เช่น 4-methoxyhonokiol, poncirin, genistein และ apigenin สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนส์ iNOS, COX-2 และไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบหลายชนิด โดยยับยั้งการกระตุ้น NF-KB ใน RAW 264.7 cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ได้ (Zhou et al., 2008; Kim et al., 2007; Li, 2002; Davis, 1999; Rahman, 2004; Shuka, 2004) และในการทดลองนี้ก็ให้ผลในทำนองเดียวกัน คือ 3,3',4',6-tetrahydroxy-7-methoxyflavone และ 2',7-dihydroxy-4',5'-dimethoxyisoflavone สามารถยับยั้งการแสดงออกของ iNOS และ COX-2 ทั้งระดับ mRNA และระดับโปรตีนได้ โดยยับยั้งผ่านทางการกระตุ้น NF-KB นอกจากนี้สารทั้งสองนี้ยังยับยั้งการสร้าง $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ และ IL-6 ด้วยกลไกการยับยั้งการกระตุ้น NF-KB เช่นกันด้วย ดังนั้นสารที่สามารถยับยั้งการกระตุ้น NF-KB เพื่อยับยั้งการกระตุ้นโปรโมเตอร์ของยีนส์เหล่านี้ จึงเป็นแนวทางการใช้รักษาการอักเสบทั้งแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรังซึ่งในธรรมชาติมีสารมากมายที่สามารถยับยั้งในกระบวนการเหล่านี้ได้ เช่น curcumin, green tea polyphenols, resveratrol และ lactones (Pan, 2000, Holmes-McNary, 2000) นอกจากนี้สารสกัดจากราก *Panax notogingeng*

ก็สามารถยับยั้งการสร้าง iNOS และ COX-2 โดยขัดขวางการย่อยสลาย I-KB ในไซโตพลาสซึม และยับยั้งการกระตุ้น p65 subunit ของ NF-KB ใน RAW 264.7 cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ด้วย (Jung, 2009) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานต่าง ๆ ที่กล่าวถึงการยับยั้งการกระตุ้น NF-KB เป็นกลไกสำคัญในการยับยั้งการสร้าง TNF- α , IL-1 β , IL-6, iNOS และ COX-2 (Cogswell et al., 1994; Guha, 2001; Lim, 2004) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าฟลาโวนอยด์สามารถควบคุมเอ็นไซม์ protein kinases หลายชนิด เช่น protein kinase C (PKC) และ mitogen-activated protein kinase (MAPK) ซึ่งเอ็นไซม์ทั้งสองนี้เกี่ยวข้องกับ signal transduction ในการกระตุ้น NF-KB หรือ activator protein-1 (AP-1) เพื่อให้สร้างสารตัวกลางและไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบด้วย (García-Lafuente, 2009) ดังนั้นบทบาทของ 7-methoxy-3,3',4',6-tetrahydroxyflavone และ 2',7-dihydroxy-4'5'-dimethoxyisoflavone ในการยับยั้งเอ็นไซม์ protein kinases เหล่านี้จึงควรศึกษาต่อไปในอนาคต

สายพันธุ์ HK17 แยกเชื้อได้จากรากขมิ้น (*Curcuma longa* Linn.) ซึ่งโดยปกติแล้วรากขมิ้นมีสารกลุ่ม curcuminoids, anthraquinones, flavonoids และน้ำมันหอมระเหย แต่ในการทดลองนี้ สามารถแยกสารองค์ประกอบหลักจากสกัดหยาบของ HK17 ได้สารใหม่ 4 ชนิดในกลุ่มฟลาโวนอยด์ คือ 2(S)-5,7-dihydroxy-8,2'-dimethoxyflavanone, 2(S)-5,7,2'-trihydroxy-8-methoxyflavanone, 2(S)-5,2',5'-trihydroxy-7,8-dimethoxyflavanone และ 2(S)-7,2'-Dihydroxy-5,8-dimethoxyflavanone ซึ่งสารที่แยกได้นี้ มีคุณสมบัติต้านการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละชนิดแตกต่างกัน และเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบก็มีความแตกต่างกันด้วย พบว่าสารสกัดหยาบจาก HK17 ให้ค่า MIC ต่อ *S. aureus* และ *C. albicans* ที่ระดับ 32 $\mu\text{g/ml}$ และค่า MIC ต่อ *B. cereus* และ *B. subtilis* ที่ระดับ 64 $\mu\text{g/ml}$ และค่า MIC ต่อ *E. coli* ที่ระดับ 128 $\mu\text{g/ml}$ แต่ไม่มีฤทธิ์ต้านการเจริญต่อ *P. aeruginosa* ขณะที่สารที่แยกได้ 2(S)-5,7-dihydroxy-8,2'-dimethoxyflavanone, 2(S)-5,7,2'-trihydroxy-8-methoxyflavanone และ 2(S)-7,2'-Dihydroxy-5,8-dimethoxyflavanone ให้ค่า MIC ต่อเชื้อทดสอบเหล่านี้ที่ระดับที่สูงกว่าสารสกัดหยาบ ยกเว้น 2(S)-5,2',5'-trihydroxy-7,8-dimethoxyflavanone ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบมีประสิทธิภาพในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบได้ดีกว่า นั่นหมายความว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเหล่านี้จะออกฤทธิ์ส่งเสริมกันในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตาม ทั้งสารสกัดหยาบและสารที่แยกได้มีความสามารถต้านจุลินทรีย์ได้ต่ำกว่า ampicillin และ ketoconazole

จากรายงานของ Bylka และคณะ ปี ค.ศ. 2004 กล่าวว่าไว้วสารกลุ่มฟลาโวนมีคุณสมบัติต้านการเจริญแบคทีเรียแกรมลบได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก ขณะที่สารกลุ่มฟลาโวนอยด์มีคุณสมบัติต้านการเจริญแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองนี้ สารกลุ่มฟลาโวนอยด์นี้มักจะมีหมู่ -OH 2-3 หมู่ บน ring A และ B ของฟลาโวนอยด์ เมื่อพิจารณาสาร

2(S)-5,7-dihydroxy-8,2'-dimethoxyflavanone ซึ่งมีหมู่ -OH 2 หมู่ บน ring A แต่ไม่มีหมู่ -OH บน ring B จึงทำให้สารนี้มีคุณสมบัติต้านการเจริญของจุลินทรีย์ได้น้อยที่สุด ดังนั้น หมู่ -OH บน ring B จึงมีความสำคัญต่อคุณสมบัติต้านการเจริญของจุลินทรีย์ และจากการเปรียบเทียบโครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติต้านการเจริญของจุลินทรีย์ของสารทั้งสี่ชนิดนี้ พบว่า 2(S)-5,7,2'-trihydroxy-8-methoxyflavanone, 2(S)-5,2',5'-trihydroxy-7,8-dimethoxyflavanone และ 2(S)-7,2'-Dihydroxy-5,8-dimethoxyflavanone มีหมู่ -OH ที่ตำแหน่ง C2' ขณะที่สาร 2(S)-5,7-dihydroxy-8,2'-dimethoxyflavanone ที่ตำแหน่ง C2' จะเป็นหมู่ -OCH₃ แทนที่ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Tsuchiya และคณะ ในปี ค.ศ. 1996 ที่ว่าหมู่ -OH ที่ตำแหน่ง C2' ของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์มีความสำคัญในการออกฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังพบว่าสาร 2(S)-5,2',5'-trihydroxy-7,8-dimethoxyflavanone มีหมู่ -OH ที่ตำแหน่ง C5' ที่ทำให้สารนี้ให้ค่า MIC ระดับต่ำที่สุด และให้แนวการยับยั้งกว้างที่สุดด้วย ดังนั้น หมู่ -OH ที่ตำแหน่ง C5 จึงมีความสำคัญในการออกฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ด้วย อย่างไรก็ตามตำแหน่ง C7 ของสารนี้เป็นหมู่ -OCH₃ แทนที่หมู่ -OH ดังนั้น หมู่ -OH ที่ตำแหน่ง C7 จึงไม่มีความสำคัญต่อการออกฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์มากนัก ขณะที่ตำแหน่ง C5 สาร 2(S)-7,2'-Dihydroxy-5,8-dimethoxyflavanone เป็นหมู่ -OCH₃ ซึ่งทำให้คุณสมบัติต้านการเจริญของจุลินทรีย์ลดลง สอดคล้องกับการทดลองของ Osawa และคณะ ในปี ค.ศ. 1992 และเมื่อเปรียบเทียบสาร 2(S)-5,7,2'-trihydroxy-8-methoxyflavanone และ 2(S)-7,2'-Dihydroxy-5,8-dimethoxyflavanone พบว่ามีโครงสร้าง ring B เหมือนกัน และมีคุณสมบัติต้านการเจริญของจุลินทรีย์ที่ใกล้เคียงกัน คลาดว่าน่าจะมีกลไกการออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ที่เหมือนกันด้วย Mori และคณะ ในปี ค.ศ. 1987 ได้รายงานไว้ว่า ring B ของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์มีคุณสมบัติการยับยั้งหรือสร้างพันธะไฮโดรเจนกับกรดนิวคลีอิก ซึ่งจะขัดขวางกระบวนการสังเคราะห์ DNA และ RNA และยังขัดขวางการทำงานของ DNA gyrase (Ohemeng *et al.*, 1993; Hilliard *et al.*, 1995) อย่างไรก็ตามกลไกที่แท้จริงของสารเหล่านี้ ยังคงต้องศึกษาให้ชัดเจนยิ่งขึ้นต่อไปในอนาคต

จากการศึกษาการแยกเชื้อแอคติโนมัยซิสในพืชสมุนไพรในครั้งนี้ และค้นหาเชื้อแอคติโนมัยซิสที่มีคุณสมบัติสร้างสารต้านการเจริญของจุลินทรีย์ และทำการแยกสารที่เป็นองค์ประกอบหลักที่สำคัญที่มีคุณสมบัติต้านการเจริญของจุลินทรีย์ ค้นพบว่าสารที่แยกได้มีทั้งสารที่รู้จักซึ่งเคยมีรายงานไว้แล้วและสารชนิดใหม่ และนอกจากสารนี้ที่มีคุณสมบัติต้านการเจริญของจุลินทรีย์แล้วสารเหล่านี้บางชนิดยังมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ และต้านอนุมูลอิสระ (ไม่ได้แสดงผลการศึกษาไว้ในครั้งนี้) สารเหล่านี้บางชนิดมีคุณสมบัติความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ จึงเป็นความรู้พื้นฐานและเป็นแนวทางในการพัฒนาสารเหล่านี้ให้มีคุณสมบัติที่ดีขึ้น สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ในอนาคต อย่างไรก็ตามการแสวงหาสารชนิดใหม่ ๆ ในธรรมชาติ และที่มาของสารใหม่ ๆ ยังคงเป็นสิ่งท้าทาย ที่มาของสารใหม่นี้อาจจะมาจากจุลินทรีย์จากแหล่งใหม่หรือจุลินทรีย์สายพันธุ์ใหม่ ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือก

ศึกษาจุลินทรีย์ในพืชสมุนไพร แต่ในธรรมชาติยังมีจุลินทรีย์อีกหลาย ๆ แหล่งในสิ่งแวดล้อมที่น่าสนใจและควรทำการศึกษา เช่น จุลินทรีย์ในน้ำหมักชีวภาพ จุลินทรีย์ในพืชและจุลินทรีย์ประจำถิ่น และจุลินทรีย์ที่อยู่ในสภาวะแวดล้อมอย่างยิ่งยวด (extreme microorganisms) ซึ่งมีโอกาสค้นพบจุลินทรีย์ชนิดใหม่ ๆ และหรือบางสายพันธุ์ที่ค้นพบอาจจะสร้างสารชนิดใหม่ ๆ ซึ่งอาจจะมีประโยชน์และมีคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ด้วย ดังนั้นแนวทางการศึกษานี้จึงควรมีต่อไป และต้องพัฒนาวิธีการและเทคนิคในการแยกเชื้อและการค้นคว้าหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- Abdel Salam, N. A., Mahmoud, Z. F. and Kassem, F. K. (1986). Sesquiterpene lactones, coumarins and flavonoids of *Launnaea tenuiloba* Boiss. grown in Egypt. J. Pharm. Sci., 27: 275-282.
- Ahmad K., Thomas N.F., Hadi A.H., Mukhtar M.R., Mohamad K., Nafiah M.A., Takeya K., Morita H., Litaudon M., Arai H. and Awang K. (2010). Oppositinines A and B: new vasorelaxant beta-carboline alkaloids from *Neisosperma oppositifolia*. Chem. Pharm. Bull., 58: 1085-1087.
- Ahn, K.S., Sim, W.S. and Kim, I.H. (1996). Decursin: a cytotoxic agent and protein kinase C activator from the root of *Angelica gigas*. Planta Medica, 62: 7-9.
- Algiannis, N., Kalpotzakis, E., Mitaku, S. and Chinou, I.B. (2001). Composition and antimicrobial activity of essential oils of two *Origanum* species. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40: 4168-4170.
- Bacon, C.W. and White, J.F. (2000). Microbial endophytes. Marcel Dekker Inc., New York.
- Baker, D., Newcomb, W. and Torrey, J.G. (1980). Characterization of an ineffective actinorhizal microsymbiont, *Frankia* sp. Eu11 (Actinomycetes). Can. J. Microbiol., 26: 1072-1089.
- Bartold, P.M. and Haynes, D.R. (1991). Interleukin-6 production by human gingival fibroblasts. J. Periodontal Res., 26: 339-345.
- Becker, B., Lechevalier, M.P., Gordon, R.E. and Lechevalier, H.A. (1964). Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole-cell hydrolysates. Appl. Microbiol., 12: 421-423.
- Braz Fo, R., Gottlieb, O.R., Moraes, A.A. de, Pedreira, G., Pinho, S.L.V., Magalhães, M.T. and Ribeiro, M.N. de S. (1977). Isoflavonoids from *Amazonian* species. Lloydia 40: 236-238.
- Bringmann G., Ledermann A., Holenz J., Kao M.T., Busse U., Wu H.G. and François G. (1998). Antiplasmodial activity of mono- and dimeric carbazoles. Planta Med., 64: 54-57.
- Bylka, W., Matlawska, I. and Pilewski, N.A. (2004). Natural flavonoids as antimicrobial agents. Journal of the American Nutraceutical Association, 7: 24-31.
- Cao, L., Qiu, Z., You, J., Tan, H. and Zhou, S. (2005). Isolation and characterization of

- endophytic streptomycete antagonists of fusarium wilt pathogen from surface-sterilized banana roots. FEMS Microbiol. Lett. 247: 147-152.
- Castillo, U.F., Strobel, G.A., Ford, E.J., Hess, W.M., Porter, H., Jensen, J.B. Albert, H., Robison, R., Condrón, M.A.M., Teplow, D.B., Stevens, D. and Yaver, D. (2002). Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigriscans*. Microbiol. 148: 2675-2685.
- Castillo, U.F., Harper, J.K., Strobel, G.A., Sears, J., Alesi, K., Ford, E.J., Lin, J., Hunter, M., Maranta, M., Ge, H., Yaver, D., Jensen, J.B., Porter, H., Robison, R., Millar, D., Hess, W.M., Condrón, M.A.M. and Teplow, D.B. (2003). Kakadumycins, novel antibiotics from *Streptomyces* NRRL 30566, an endophytic of *Grevillea pteridifolia*. FEMS Microbiol. Lett. 224: 183-190.
- Chakraborty D.P., Das K.C. and Basak S.P. (1968). New synthesis of isomeric methylcarbazoles. J. Indian Chem. Soc., 45: 84–86.
- Chakrabarty M. and Batabyal A. (1992). Indolisation of cyclohexanone phenylhydrazones using phosphorous trichloride. Indian J. Chem., 31B: 199–201.
- Chakrabarty M., Nath A.C., Khasnobis S., Chakrabarty M., Konda Y., Harigaya Y. and Komiyama K. (1997). Carbazole alkaloids from *Murraya koengii*. Phytochemistry, 46: 751-755.
- Chang L.C., Tsao L.T., Chang C.S., Chen C.J., Huang L.J., Kuo S.C., Lin R.H., and Wang J.P. (2008). Inhibition of nitric oxide production by the carbazole compound LCY-2-CHO via blockade of activator protein-1 and CCAAT/enhancer-binding protein activation in microglia. Biochem. Pharmacol., 76: 507-519.
- Chen, Y.C., Sugiyama, Y., Abe, N., Kuruto-Niwa, R., Nozawa, R. and Hirota, A. (2005). DPPH radical-scavenging compounds from dou-chi, a soybean fermented food. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 69: 999-1006.
- Cogswell, J.P., Godlevski, M.M., Wisely, G.B., Clay, W.C., Leesnitzer, L.M., Ways, J.P. and Gray, J.G. (1994). NF-kappa B regulates IL-1 beta transcription through a consensus NF-kappa B binding site and a nonconsensus CRE-like site. J. Immunol., 153: 712-723.
- Coombs, J.T. and Franco, C.M.M. (2003a). Visualization of an endophytic *Streptomyces* species in wheat seed. Appl. Envi. Microbiol. 69: 4260-4262.
- Coombs, J.T. and Franco, C.M.M. (2003b). Isolation and Identification of Actinobacteria

- from surface-sterilized wheat roots. *Appl. Envi. Microbiol.* 69: 5603-5608.
- Cui C.B., Yan S.Y., Cai B. and Yao X.S. (2002). Carbazole alkaloids as new cell cycle inhibitor and apoptosis inducers from *Clausena dunniana* Levl. *J. Asian Nat. Prod. Res.* 4: 233-241.
- Cuong, N.M., Hung, T.Q., Sung, T.V. and Taylor, W.C. (2004). A new dimeric carbazole alkaloid from *Glycosmis stenocarpa* roots. *Chem. Pharm. Bull.*, 52: 1175-1178.
- Cushnie, T.P. and Lamb, A.J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 26: 343-356.
- Das, S. and Rosazza, J.P.N. (2006). Microbial and enzymatic transformations of flavonoids. *Journal of Natural Products.* 69: 499-508.
- Davis, J.N., Kucuk, O. and Sarkar, F.H. (1999). Genistein inhibits NF-kappaB activation in prostate cancer cells. *Nutr. Cancer*, 35: 167-174.
- Deboer, C. and Dietz, A. (1976). The description and antibiotic peoduction of *Streptomyces hygrosopicus* var. *geldanus*. *J. Antibiotics*, XXIX: 1182-1188.
- Du, X., Bai, Y., Liang, H., Wang, Z., Zhao, Y. and Huang, L. (2006). Solvent effect in ^1H NMR spectra of 3'-hydroxy-4'-methoxyisoflavonoids from *Astragalus membranaceus* var. *monggholicus*. *Magn. Reson. Chem.*, 44: 708-712.
- Erlund, I. (2004). Review of the flavonoids quercetin, hesperidin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research*, 24: 851-874.
- Ezra, D., Castillo, U.F., Strobel, G.A., Hess, W.M., Porter, H., Jensen, J.B., Condrón, M.A.M., Teplow, D.B., Sears, J., Maranta, M., Hunter, M., Weber, B. and Yaver, D. (2002). Coronamycins, peptide antibiotics produced by a verticillate *Streptomyces* sp. (MSU-2110) endophytic on *Monstera* sp. *Microbiol.* 150: 785-793.
- Fangfang, W., Minjuan, X., Li, Q., Sattler, I. and Lin, W. (2010). P-aminoacetophenonic acids produced by a mangrove endophyte *Streptomyces* sp. (strain HK10552). *Molecules*, 15: 2782-2790.
- Fguira, L.F., Fotso, S., Ameur-Mehdi, R.B., Mellouli, L. and Laastsch, H. (2005). Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated *Streptomyces* sp. US80. *Res. Microbiol.* 156: 341-347.
- Fiebig, M., Pezzuto, J.M., Soejarto, D.D. and Kinghorn, A.D. (1985). Koenoline, a further cytotoxic carbazole alkaloid from *Murraya koengii*. *Phytochemistry*, 24: 3041-3043.
- Fletcher, J.R. (1993). Eicosanoids. Critical agents in the physiological process and cellular

- injury. Arch. Surg., 128: 1192-1196.
- Forbes, T.D.A. and Clement, B.A. (2010). Chemistry of Acacia's from South Texas., Texas A&M Agricultural Research and Extension Center.
- Funayama, S., Anraku, Y., Mita, A., Komiyama, K. and Omura, S. (1989). Structural study of isoflavonoids possessing antioxidant activity isolated from the fermentation broth of *Streptomyces* sp. Journal of Antibiotics, 42: 1350-1355.
- Furukawa H., Wu T.S., Ohta T. and Kuoh C.S. (1985). Chemical constituents of *Murraya euchrestifolia* HAYATA. Structures of novel carbazolequinones and other new carbazole alkaloids. Chem. Pharm. Bull., 33: 4132-4138.
- Gábor, M. and Eperjessy, E. (1966). Antibacterial effect of fisetin and fisetinidin. Nature, 5067: 1273.
- García-Lafuente, A., Guilmón, E., Villares, A., Rostagno, M.A. and Martínez, J.A. (2009). Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. Inflamm. Res., 58: 537-552.
- Gilliet, M. and Lande, R. (2008). Antimicrobial peptides and self-DNA in autoimmune skin inflammation. *Current Opinion in Immunology*, 20: 401-407.
- Grabley, S., Hammann, P., Raether, W. and Wink, J. (1990). Secondary metabolites by chemical screening II – amycins A and B, two novel niphimycin analogs isolated from a high producer strain of elaiophylin and nigericin. J. Antibiotics, XLIII: 639-647.
- Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S. and Tannenbaum, S.R. (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. Anal. Biochem., 126: 131-138.
- Guan, S., Grabley, S., Groth, I., Lin, W., Christner, A., Guo, D. and Sattler, I. (2005). Structure determination of germacrane-type sesquiterpene alcohols from an endophyte *Streptomyces griseus* subsp. Magnetic Resonance in Chemistry, 43: 1028-1031.
- Guha, M. and Mackman, N. (2001). LPS induction of gene expression in human monocytes. Cell Signal., 13: 85-94.
- Gupta, R.A. and Dubois, R.N. (2001). Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. Nat. Rev. Cancer, 1: 11-21.
- Harborne, J.B. and Baxter, H. (1999). The handbook of natural flavonoids, Vols 1 and 2. Chichester, UK: John Wiley and Sons.
- Harborne, J.B. and Williams, C.A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992.

- Phytochemistry, 55: 481-504.
- Hata, K. and Sano, K. (1966). The constitution of decursin, a new coumarin isolated from the root of *Angelica decursiva*. Tetrahedron Letters, 14: 1461-1465.
- Havsteen, B. (1983). Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. Biochemical Pharmacology, 32: 1141-1148.
- Heinonen, S.M., Wähälä, K., Liukkonen, K.H., Aura, A.M., Poutanen, K. and Adlercreutz, H. (2004). Studies of the *in vitro* intestinal metabolism of isoflavones aid in the identification of their urinary metabolites. Journal of Agricultural Food Chemistry, 52: 2640-2646.
- Heisey, R.M. and Putnam, A.R. (1986). Herbicidal effects of geldanamycin and nigericin, antibiotics from *Streptomyces hygroscopicus*. J. Nat. Prod., 49: 859-865.
- Heiss, E., Herhaus, C., Klimo, K., Bartsch, H. and Gerhauser, C. (2001). Nuclear factor kappa B is a molecular target for sulforaphane-mediated anti-inflammatory mechanisms. J. Biol. Chem., 276: 32008-32015.
- Herschman, H.R. (1996). Prostaglandin synthase 2. Biochim. Biophys. Acta, 1299: 125-140.
- Hilliard, J.J., Krause, H.M., Bernstein, J.I., Fernandez, J.A., Nguyen, V., Ohemeng, K.A. and Barrett, J.F. (1995). A comparison of active site binding of 4-quinolones and novel flavones gyrase inhibitors to DNA gyrase. Advances in Experimental Medicine and Biology, 390: 59-69.
- Ho, F.M., Lai, C.C., Huang, L.J., Kuo, T.C., Chao, C.M. and Lin, W.W. (2004). The anti-inflammatory carbazole, LCY-2-CHO, inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory mediator expression through inhibition of the p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway in macrophages. British Journal of Pharmacology, 141: 1037-1047.
- Holmes-McNary, M. and Baldwin, A.S. (2000). Chemopreventive properties of trans-reveratrol are associated with inhibition of activation of the IkappaB kinase. Cancer Res., 60: 3477-3483.
- Hopwood, D.A., Bibb, M.J. and Chater, K.F. (1985). Genetic manipulation of *Streptomyces*: A Laboratory Manual. Norwich: F. Crowe and Sons.
- Hosny, M., Dhar, K. and Rosazza, J.P.N. (2001). Hydroxylations and methylations of quercetin, fisetin, and catechin by *Streptomyces griseus*. Journal of Natural Products, 64: 462-465.

- Ialenti, A., Iannaro, A., Moncada, S. and Di Rosa, M. (1992). Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide. *Eur. J. Pharmacol.*, 211: 177-182.
- Ito, C., Thoyama, Y., Omura, M., Kajira, I. and Furukawa, H. (1993). Alkaloidal constituents of *Murraya koengii*. Isolation and structural elucidation of novel binary carbazolequinones and carbazole alkaloids. *Chem. Pharm. Bull.*, 41: 2096-2100.
- Jay, M. and Gonnet, J. F. (1973). Isoscutellareine isolée de *Pinguicula vulgaris*. *Phytochemistry*, 12: 953-954.
- Jiang, C., Guo, J., Wang, Z., Xiao, B., Lee, H.J., Lee, E.O., Kim, S.H. and Lu, J. (2007). Decursin and decursinol angelate inhibit estrogen-stimulated and estrogen-independent growth and survival of breast cancer cells. *Breast Cancer Research*, 9: 1-12.
- Jiang, R., Lau, K., Lam, H., Yam, W., Leung, L., Choi, K., Waye, M., Mak, T.C.W., Woo, K. and Fung, K. (2005). A comparative study on aqueous root extracts of *Pueraria thomsonii* and *Pueraria lobata* by antioxidant assay and HPLC fingerprint analysis. *Journal of Ethnopharmacology*, 96: 133-138.
- Jung, H.W., Seo, U.K., Kim, J.H., Leem, K.H. and Park, Y.K. (2009). Flower extract of *Panax notoginseng* attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory response via blocking of NF-kappaB signalling pathway in murine macrophages. *J. Ethnopharmacol.*, 122: 313-319.
- Kang, S.Y. and Kim, Y.C. (2007). Decursin protect primary cultured rat cortical cells from glutamate-induced neurotoxicity. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 59: 863-870.
- Kao, T.H. and Chen, B.H. (2006). Functional components in soybean cake and their effects on antioxidant activity. *J. Agri. Food Chem.*, 54: 7544-7555.
- Kevin, D.A., Meujo, D.A.F. and Hamann, M.T. (2009). Polyether ionophores: broad-spectrum and promising biologically active molecules for the control of drug-resistant bacteria and parasites. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 4: 109-146.
- Khan, M.T.H., Ather, A., Thompson, K.D. and Gambari, R. (2005). Extracts and molecules from medicinal plants against Herpes simplex viruses. *Antiviral Research*, 67: 107-119.
- Khuntia, T.K. and Panda, D.S. (2011). Evaluation of antibacterial, antifungal and anthelmintic activity of *Murraya koenigii* Spreng. *Pharma. Sci. Monit.*, 2: 105-110.
- Kielian, T., Bearden, E.D., Baldwin, A.C. and Esen, N. (2004). IL-1 and TNF-alpha play a pivotal role in the host immune response in a mouse model of *Staphylococcus aureus*-

- induced experimental brain abscess. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 63: 381-396.
- Kieslich, K. (1976). *Microbial Transformation of non-steroid cyclic compounds*; John Wiley & Sons; Georg Thieme Publishers: Germany.
- Kim, H.P., Son, K.H., Chang, H.W. and Kang, S.S. (2004). Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *J. Pharmacol. Sci.*, 96: 229-245.
- Kim, J.B., Han, A.R., Park, E.Y., et al. (2007). Inhibition of LPS-induced iNOS, COX-2 and cytokines expression by poncirin through the NF-kappa B inactivation in RAW 264.7 macrophage cells. *Biol. Pharm. Bull.*, 30: 2345-2351.
- Kim, J.H., Jeong, J.H., Jeon, S.T., Kim, H. Ock, J., Suk, K., Kim, S.I., Song, K.S. and Lee, W.H. (2006). Decursin inhibits induction of inflammatory mediators by blocking nuclear factor-KB activation in macrophages. *Molecular Pharmacology*, 69: 1783-1790.
- Kim, N., Shin, J.C., Kim, W., Hwang, B.Y., Kim, B.S., Hong, Y.S. and Lee, D. (2006). Cytotoxic 6-alkylsalicylic acids from the endophytic *Streptomyces laceyi*. *Journal of Antibiotics*, 59: 797-800.
- Konoshima, M., Chi, H.J. and Hata, K. (1968). Coumarins from the root of *Angelica gigas* Nakai. *Chem. Pharm. Bull.*, 16: 1139-1140.
- Kulling, S.E., Honig, D.M. and Metzler, M. (2001). Oxidative metabolism of the soy isoflavones daidzein and genistein in humans *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 49: 3024-3033.
- Kulling, S.E., Honig, D.M., Simat, T.J. and Metzler, M. (2000). Oxidative *in vitro* metabolism the soy phytoestrogens daidzein and genistein *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 48: 4963-4972.
- Lawrence, T., Gilroy, D.W., Colville-Nash, P.R. and Willoughby, D.A. (2001). Possible new role for NF-kappaB in the resolution of inflammation. *Nat. Med.*, 7: 1291-1297.
- Lee, S., Lee, Y.S., Jung, S.H., Shin, K.H., Kim, B.K. and Kang, S.S. (2003a). Antitumor activities of decursinol angelate and decursin from *Angelica gigas*. *Archives of Pharmacal Research*, 26: 727-730.
- Lee, S., Shin, D.S., Kim, J.S., Oh, K.B. and Kang, S.S. (2003b). Antibacterial coumarins from *Angelica gigas* roots. *Archives of Pharmacal Research* 26: 449-452.
- Leung, A.W., Mo, Z.X. and Zheng, Y.S. (1991). Reduction of cellular damage induced by cerebral ischemia in rats. *Neurochem. Res.*, 16: 687-692.
- Levine, B., Kalman, J., Mayer, L., Fillit, H.M. and Packer, M. (1990). Elevated circulating

- levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N. Engl. J. Med.*, 323: 236-241.
- Li, Y. and Sarkar, F.H. (2002). Inhibition of nuclear factor kappa B activation in PC3 cells by genistenin is mediated via Akt signalling pathway. *Clin. Cancer Res.*, 8: 2369-2377.
- Lim, S., Kang, K.W., Park, S.Y., et al. (2004). Inhibition of lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase expression by a novel compound, mercaptopyrazine, through suppression of nuclear factor-kappaB binding to DNA. *Biochem. Pharmacol.*, 68: 719-728.
- Lin, W., Li, L., Fu, H., Sattler, I., Huang, X. and Grabley, S. (2005). New cyclopentenone derivatives from an endophytic *Streptomyces* sp. isolated from the mangrove plant *Aegiceras comiculatum*. *Journal of Antibiotics*, 58: 594-598.
- Liu, L., Shan, S., Zhang, K., Ning, Z.Q., Lu, X.P. and Cheng, Y.Y. (2008). Naringenin and hesperetin, two flavonoids derived from *Citrus aurantium* up-regulate transcription of adiponectin. *Phytother. Res.*, 22:1400-1403.
- Lodewyckx, C., Vangronsveld, J., Porteous, F., Moore, E.R.B., Safieh, T., Max, M. and van der Daniel, L. (2002). Endophytic bacteria and their potential applications. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21: 583-606.
- Lu, X.Y., Wang, Z.C. and Yang, G.Z. (1995). The relationships between IL-1, IL-6 and tumor. *Guowai Yixue Shengli Bingli Kexue Yu Linchuang Fence*, 15: 159-163.
- Lü, Y.Z., Wang, Y.L., Lou, Z.X., Zu, J.Y., Liang, H.Q. and Zhou, Z.L. (1983). The isolation and structural determination of naringenin and choerospondin from the bark of *Choerospondias axillaris*. *Yao Xue Xue Bao*. 18: 199-202.
- Ma C., Case R.J., Wang Y., Zhang H.J., Tan G.T., Van Hung N., Cuong N.M., Franzblau S.G., Soejarto D.D., Fong H.H. and Pauli G.F. (2005). Anti-tuberculosis constituents from the stem bark of *Micromelum hirsutum*. *Planta Med.*, 71: 261-267.
- MacMicking, J., Xie, Q.W. and Nathan, C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.*, 15: 323-350.
- Mandal S., Nayak A., Kar M., Banerjee S.K., Das A., Upadhyay S.N., Singh R.K., Banerji A. and Banerji J. (2010). Antidiarrhoeal activity of carbazole alkaloids from *Murraya koenigii* Spreng (Rutaceae) seeds. *Fitoterapia*, 81: 72-74.
- Markham, K. R., Ternal, B., Stanij, R., Geigerand, H. and Mabry, T.J. (1978). Carbon-13

- NMR studies of flavonoids-III. Naturally occurring flavonoid glycosides and their acetylated derivatives, *Tetrahedron*, 34: 1389-1397.
- Mellouli, L., Ameer-Mehdi, R.B., Sioud, S. Salem, M. and Bejar, S. (2003). Isolation, purification and partial characterization of antibacterial activities produced by a newly isolated *Streptomyces* sp. US24 strain. *Res. Microbiol.* 154: 345-352.
- Meng, F. and Lowell, C.A. (1997). Lipopolysaccharide (LPS)-induced macrophage activation and signal transduction in the absence of Src-family kinases Hck, Fgr, and Lyn. *J. Exp. Med.*, 185: 1661-1670.
- Middleton, Jr. E. and Chithan, K. (1993). The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. In: Harborne JB, editor. *The flavonoids: advances in research since 1986*. London, UK: Chapman and Hall.
- Mori, A., Nishino, C., Enoki, N. and Tawata, S. (1987). Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*, 26: 2231-2234.
- Morrison, D.C., Danner, R.L., Dinarello, C.A., et al. (1994). Bacterial endotoxins and pathogenesis of Gram-negative infections: Current status and future direction. *Innate Immun.*, 1: 71-83.
- Morrissey, P.J. and Charrier, K. (1994). Treatment of mice with IL-1 before infection increases resistance to a lethal challenge with *Salmonella typhimurium*. The effect correlates with the resistance allele at the *Ity* locus. *J. Immunol.*, 153: 212-219.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 65: 55-63.
- Murad, J.M., Calvi, S.A., Soares, A.M.V.C., Bankova, V. and Sforcin, J.M. (2002). Effects of propolis from Brazil and Bulgaria on fungicidal activity of macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Ethnopharmacol.*, 79: 331-334.
- Muthumani, P., Venkatraman, S., Ramseshu, K.V., Meera, R., Devi, P. and Kameswari B. (2009). Pharmacological studies of anticancer, anti-inflammatory activities of *Murraya koenigii* (Linn) Spreng in experimental animals. *J. Pharm. Sci. & Res.*, 1: 137-141.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards, (1997). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard M2- A6. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
- Ohemeng, K.A., Schwender, C.F., Fu, K.P. and Barrett, J.F. (1993). DNA gyrase inhibitory

- and antibacterial activity of some flavones (1). *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 3: 225-230.
- Okazaki, T., Takahashi, K., Kizuka, M., and Enokita, R. (1995). Studies on Actinomycetes isolated from plant leaves. *Annu. Rep. Sankyo Res. Lab.* 47: 97-106.
- Olsen, H.T., Stafford, G.I., van Staden, J., Christensen, S.B. and Jäger, A.K. (2008). Isolation of the MAO-inhibitor naringenin from *Mentha aquatica* L. *J. Ethnopharmacol.*, 117: 500-502.
- Osawa, K., Yasuda, H., Maruyama, T., Morita, H., Takeya, K. and Itokawa, H. (1992). Isoflavanones from the heartwood of *Swartzia polyphylla* and their antibacterial activity against cariogenic bacteria. *Chem. Pharm. Bull.*, 40: 2970-2974.
- Pan, M.H., Lin-Shiau, S.Y. and Lin, J.K. (2000). Comparative studies on the suppression of nitric oxide synthase by curcumin and its hydrogenated metabolites through down-regulation of IkappaB kinase and NFkappaB activation in macrophages. *Biochem. Pharmacol.*, 60: 1665-1676.
- Pandey S., Sah S.P., Sah M.L. and Mishra D. (2010). An antioxidant potential of hydromethanolic extract of *Urtica parviflora* Roxb. *J. Basic Clin. Pharm.*, 1: 191-195.
- Parmar S., Gangwal A. and Shethh N. (2010). Evaluation of anti-asthmatic activity of a polyherbal formulation containing four plant extracts. *J. Curr. Pharm. Res.*, 2: 40-44.
- Perez, R.M. (2003). Antiviral activity of compounds isolated from plants. *Pharmaceutical Biology*, 41: 107-157.
- Prasad S.K., Kulshreshtha A. and Qureshi T.N. (2009). Antidiabetic activity of some herbal plants in streptozotocin induced diabetic albino rats. *Pak. J. Nutr.*, 8: 551-557.
- Rahman, K.W., Li, Y. and Sarkar, F.H. (2004). Inactivation of Akt and NF-kappaB play important roles during indole-3-carbinol-induced apoptosis in breast cancer cells. *Nutr. Cancer*, 48: 84-94.
- Ramsewak R.S., Nair M.G., Strasburg G.M., DeWitt D.L. and Nitiss J.L. (1999). Biologically active carbazole alkaloids from *Murraya koenigii*. *J. Agric. Food Chem.*, 47: 444-447.
- Rauha, J.P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kähkönen, M., Kujala, T., Pihlaja, K., Vuorela, H. and Vuorela, P. (2000). Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology*. 56: 3-12.
- Rawat M. and Wulff W.D. (2004). Total synthesis of carbazoquinocin C: application of

- the o-benzannulation of Fischer carbene complexes to carbazole-3,4-quinone alkaloids. *Org. Lett.*, 6: 329-332.
- Reisch, J., Goj, O., Wickramasinghe, A., Bandara, H.M.T. and Henkel, G. (1992). Carbazole alkaloids from seeds of *Murraya koengii*. *Phytochemistry*, 31: 2877-2879.
- Rinetti, M., Ugolotti, G., Calbiani, B., Colombi-Zinelli, L., Cisternino, M. and Papa, N. (1982). Antiinflammatory drugs and gastric emptying. A comparison between acetylsalicylic acid and carprofen. *Arzneimittelforschung*, 32: 1561-1563.
- Rios, J.L. and Recio, M.C. (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 100: 80-84.
- Rubio, F., Seawall, S., Pocelinko, R., DeBarbieri, B., Benz, W., Berger, L., Morgan, L., Pao, J., Williams, T.H. and Koechlin, B. (1980). Metabolism of carprofen, a nonsteroid anti-inflammatory agent, in rats, dogs, and humans. *J. Pharm. Sci.*, 69: 1245-1253.
- Ryu, K.S., Hong, N.J. and Kong, Y.Y. (1990). Studies on the coumarin constituents of the root of *Angelicae gigas* Nakai. *Korean Journal of Pharmacognosy*, 21: 64-68.
- Sachiko, H., Akane, M., Masafumi, S., Tomio, N. and Hitoshi, K. (2006). Endophytic actinomycetes and their interactions with host plants. *Actinomycetologica*, 20: 72-81.
- Samuel, R., Ehrendorfer, F., Chase, M.W. and Greger, H. (2001) Phylogenetic analyses of Aurantioideae (Rutaceae) based on non-coding plastid DNA sequences and phytochemical features. *Plant Biol.*, 3: 77-87.
- Sardi, P., Saracchi, M., Ouaroni, S., Petrolini, B., Borgonovoli, G.E. and Merli, S. (1992). Isolation of endophytic *Streptomyces* from surface-sterilized roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2691-2693.
- Sathaye S., Bagul Y., Gupta S., Kaur H. and Redkar R. (2011). Hepatoprotective effects of aqueous leaf extract and crude isolates of *Murraya koenigii* against *in vitro* ethanol-induced hepatotoxicity model. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 63: 587-591.
- Seto H. and Otake, N. (1982). The ¹³C-NMR spectra of polyether antibiotics and some empirical rules for structure studies of polyether antibiotics. *Heterocycles*, 17: 555-580.
- Shafaghat, A. and Salimi, F. (2008). Extraction and determining of chemical structure of flavonoids in *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz. Bip. from Iran. *Journal of Science I.A.U.*, 18: 39-42.
- Shan, J., Fu, J., Zhao, Z., et al. (2009). Chlorogenic acid inhibits lipopolysaccharide-

- induced cyclooxygenase-2 expression in RAW 264.7 cells through suppressing NF-KB and JNK/AP-1 activation. *Int. Immunopharmacol.*, 9: 1042-1048.
- Shi, S., Ma., Y., Zhang, Y., Liu, L., Liu, Q., Peng, M. and Xiong, X. (2012;). Systematic separation and purification of 18 antioxidants from *Pueraria lobata* flower using HSCCC target-guided by DPPH-HPLC experiment. *Separation and Purification Technology*, 89: 225-233.
- Shimizu, M., Nakagawa, Y., Sato, Y., Furumai, T., Igarashi, Y., Onaka, H., Yoshida, R. and Kunoh, H. (2000). Studies on endophytic actinomycetes (I) *Streptomyces* sp. isolated from *Rhododendron* and its antifungal activity. *J. Gen. Plant Pathol.* 66, 66:360-366.
- Shirling, E.B. and Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 16: 313-340.
- Shuka, S. and Gupta, S. (2004). Suppression of constitutive and tumor necrosis factor alpha-induced nuclear factor (NF) -kappaB activation and induction of apoptosis by apigenin in human prostate carcinoma PC-3 cells: correlation with down-regulation of NF-kappaB-responsive genes. *Clin. Cancer Res.*, 10: 3169-3178.
- Silver, L. and Bostian, K. (1990). Screening of natural products for antimicrobial agents. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 9: 455-461.
- Steinrauf, L.K., Pinkerton, M., and Chamberlin, J.W. (1968). The structure of nigericin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 33: 29–31.
- Stichtenoth, D.O. and Frolich, J.C. (1998). Nitric oxide and inflammatory joint diseases. *Br. J. Rheumatol.*, 37: 246-257.
- Strobel, GA. (2002). Rainforest endophytes and bioactive products. *Crit. Rev. Biotechnol.* 22: 315-333.
- Taechowisan, T., Lu, C., Shen, Y. and Lumyong, S. (2005a). 4-Arylcoumarins from Endophytes *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 and their antifungal activity. *Ann. Microbiol.* 55: 63-66.
- Taechowisan, T., Lu, C., Shen, Y. and Lumyong, S. (2005b). Secondary metabolites from Endophytes *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 and their antifungal activity. *Microbiol.* 151: 1691-1695.
- Taechowisan, T., Lu, C., Shen, Y. and Lumyong, S. (2006a). Anti-inflammatory effects of 4-Arylcoumarins in LPS-induced murine macrophage RAW264.7 cells. *Pharm. Biol.*, 44: 576-580.

- Taechowisan, T., Wanbanjob, A., Tuntiwachwuttikul, P., Taylor, W.C. (2006b). Identification of *Streptomyces* sp. Tc022, an endophyte in *Alpinia galanga*, and the isolation of actinomycin D. *Ann. Microbiol.*, 56: 113-117.
- Taechowisan, T., Tuntiwachwuttikul, P., Lu, C., Shen, Y., Lumyong, S. and Taylor, W.C. (2007a). Anti-inflammatory activity of 4-Arylcoumarins from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 in murine macrophage RAW264.7 cells. *Immunol. Invest.*, 36: 203-211.
- Taechowisan, T., Lu, C., Shen, Y. and Lumyong, S. (2007b). In vitro anti-inflammatory activity of 4-arylcoumarins from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 in murine macrophage RAW 264.7 cells. *Nat. Prod. Res.*, 21: 1104-1113.
- Taechowisan, T., Lu, C., Shen, Y. and Lumyong, S. (2007c). Antitumor activity of 4-Arylcoumarins from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130. *J. Cancer Res. Ther.* 3: 86-91.
- Taechowisan, T., Lu, C., Shen, Y. and Lumyong, S. (2008a). Synergistic activities of 4-Arylcoumarins against phytopathogenic fungi. *Res. J. Microbiol.* 3: 237-245.
- Taechowisan, T., Sitthipanya, A., Wanbanjob, A., Tuntiwachwuttikul, P. (2008b). Inhibitory effects of endophytic *Streptomyces* sp. ST8 on the growth, adherence, and glucosyltransferase of *Streptococcus mutans*. *J. Biol. Sci.*, 8: 43-51.
- Taechowisan, T., Lu, C., Shen, Y. and Lumyong, S. (2008c). Inhibition of immediate-type allergic reaction by 4-Arylcoumarin. *Res. J. Immunol.*, 1: 1-9.
- Taechowisan, T., Lu, C., Shen, Y. and Lumyong, S. (2008d). 4-Arylcoumarin inhibits immediate-type allergy. *Food Agri. Immunol.*, 18: 203 - 211.
- Taechowisan, T., Chanaphat, S., Ruensamran W. and Phutdhawong W.S., (2012). Antifungal activity of 3-methylcarbazoles from *Streptomyces* sp. LJK109; an endophyte in *Alpinia galangal*. *J. App. Pharm. Sci.*, 2: 124-128.
- Taechowisan, T., Chanaphat, S., Ruensamran W. and Phutdhawong W.S., (2012). Anti-Inflammatory Effect of 3-Methylcarbazoles on RAW 264.7 Cells Stimulated with LPS, Polyinosinic-Polycytidylic Acid and Pam3CSK. *Adv. Microbiol.*, 2: 98-103.
- Taechowisan, T., Chanaphat, S., Ruensamran, W., Phutdhawong, W.S. (2014). Antibacterial activity of new flavonoids from *Streptomyces* sp. BT01; an endophyte in *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. *J. App. Pharm. Sci.*, 4: 8-13.
- Taechowisan, T., Wanbanjob, A., Tuntiwachwuttikul, P. and Liu, J. (2009). Anti-

- inflammatory activity of linsangs from endophyte *Streptomyces* sp. SUC1 in LPS-induced RAW 264.7 cells. Food Agri. Immunol., 20: 67-77.
- Taechowisan, T., Wanbanjob, A., Tuntiwachwuttikul, P. and Liu, J. (2010). Anti-inflammatory effects of linsang C and D cause inhibition of STAT-1 and NF- κ B activation in LPS-induced RAW 264.7 cells. Food Agri. Immunol., 21: 57-64.
- Takeuchi, O. and Akira, S. (2001). Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. International Immunopharmacology, 1: 625-635.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol., 24: 1596-1599.
- Tembhurne S.V. and Sakarkar D.M. (2010). Protective effect of *Murraya koenigii* (L) leaves extract in streptozotocin induced diabetics rats involving possible antioxidant mechanism. J. Med. Plant. Res., 4: 2418–2423.
- Tharek, M., Dzulaikha, K., Salwani, S., Amir, H.G. and Najimudin, N. (2011). Ascending endophytic migration of locally isolated diazotroph, *Enterobacter* sp. Strain USML2 in rice. Biotechnology, 10: 521-527.
- Tsuchiya, H., Sato, M., Miyazaki, T., Fujiwara, S., Tanigaki, S., Ohyama, M., Tanaka, T. and Iinuma, M. (1996). Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Journal of Ethnopharmacology, 50: 27-34.
- van Meir, E., Sawamura, Y., Diserens, A.C., Hamou, M.F. and Triboulet, N. (1990). Human glioblastoma cells release interleukin 6 *in vivo* and *in vitro*. Cancer Res., 50: 6683-6688.
- Vollmar, D., Thorn, A., Schuberth, I. and Grond, S. (2009). A comprehensive view on 4-methyl-2-quinazolinamine, a new microbial alkaloid from *Streptomyces* of TCM plant origin. Journal of Antibiotics, 62: 439-444.
- Walsh, L.J. (2003). Mast cells and oral inflammation. Crit. Rev. Oral Biol. Med., 14: 188-198.
- Wang, F., Xu, M., Li, Q., Sattler, I. and Lin, W. (2010). P-aminoacetophenonic acids produced by a mangrove endophyte *Streptomyces* sp. (strain HK10552). Molecules, 15: 2782-2790.
- Wietrzyk, J., Gryniewicz, G. and Opolski, A. (2005). Phytoestrogens in cancer prevention and therapy - mechanisms of their biological activity. Anticancer Res., 25: 2357-2366.

- Wu, Z., Bai, L., Wang, M. and Shen. Y. (2009). Structure – Antibacterial relationship of nigericin derivatives. *Chem. Nat. Comp.*, 45: 333-337.
- Xu, H.X. and Lee, S.F. (2001). Activity of plant flavonoids against antibiotic-resistant bacteria. *Phytotherapy Research*, 15: 39-43.
- Yamoguchi, K., (1970). *Spectral Data of Natural Products*, Vol. 1, Elsevier publishing Co. Amsterdam, London, New York.
- Yildirim, A., Mavi, A., Oktay, M., Kara, A.A., Algur, O.F. and Bilaloglu, V. (2000). Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of Tilia (*Tilia argentea* Desf. ex DC), sage (*Salvia trioba* L.), and black tea (*Camellia sinensis*) extracts. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48: 5030-5034.
- Zhou, H.Y., Shin, E.M., Guo, L.Y., et al. (2008). Anti-inflammatory activity of 4-methoxyhonokiol is a function of the inhibition of iNOS and COX-2 expression in RAW 264.7 macrophages via NF-kappa B, JNK and p38 MAPK inactivation. *Eur. J. Pharmacol.*, 586: 340-349.

Output

Taechowisan, T., Chanaphat, S., Ruensamran W. and Phutdhawong W.S., (2012).

Antifungal activity of 3-methylcarbazoles from *Streptomyces* sp. LJK109; an endophyte in *Alpinia galanga*. *J. App. Pharm. Sci.*, 2(3): 104-109.

Taechowisan, T., Chanaphat, S., Ruensamran W. and Phutdhawong W.S., (2012).

Anti-inflammatory effect of 3-methylcarbazoles on RAW 264.7 cells stimulated with LPS, Polyinosinic-Polycytidylic acid and Pam3CSK. *Adv. in Microbiol.*, 2: 98-103.

Taechowisan, T., Chanaphat, S., Ruensamran W. and Phutdhawong W.S., (2013).

Antibacterial activity of 1-methoxy-nigericin isolated from *Streptomyces hygroscopicus* BRM10; an endophyte in *Alpinia galanga*. *J. App. Pharm. Sci.*, 3(5): 104-109.

Taechowisan, T., Chanaphat, S., Ruensamran W. and Phutdhawong W.S., (2013).

Antibacterial activity of Decursin isolated from *Streptomyces* sp. GMT-8, an endophyte in *Zingiber officinale* Rosc. *J. App. Pharm. Sci.*, 3(10): 74-78.

Taechowisan, T., Chanaphat, S., Ruensamran W. and Phutdhawong W.S., (2014).

Antibacterial activity of new flavonoids from *Streptomyces* sp. BT01; an endophyte in *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. *J. App. Pharm. Sci.*, 4(4): 8-13.

Taechowisan, T., Chanaphat, S., Ruensamran W. and Phutdhawong W.S., (2014).

Anti-inflammatory effects of new flavonoids from *Streptomyces* sp. BT01 in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 murine macrophages via inhibition of NF-kappaB activation. *British J. App. Sci. Technol.*, 4(29): 4201-4222.

Taechowisan, T., Chanaphat, S., Ruensamran W. and Phutdhawong W.S., (2014).

Antibacterial and anticandidal activities of new flavonoids from *Streptomyces* sp. HK17; an endophyte in *Curcuma longa* Linn. *British J. Pharm. Res.*, (In press).

ภาคผนวก ก.
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Humic acid vitamin agar (HV agar)

Humic acid	1.0	g
Na ₂ HPO ₄	0.5	g
KCl	1.71	g
CaCO ₃	0.02	g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01	g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.01	g
Agar	15	g
pH	7.2	

Resolved humic acid in 2.5 ml of 1N NaOH and sterilized 990 ml humic acid salt in the autoclave at 121⁰ C for 15 minutes. Let it cool to 55-60⁰ C. Added 10 ml of 100x vitamin sterile solution and mixed well.

100x vitamins

Thiamine hydrochlorid	0.5	g
Riboflavin	0.5	g
Niacin	0.5	g
Pyridoxin	0.5	g
Inositol	0.5	g
Calcium Pantothenate	0.5	g
P-Aminobenzoic acid	0.5	g
Biotin	0.25	g

Suspended the vitamins in 10 ml of distilled water and sterilized by 0.22 µm filtration and kept at 4⁰ C

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

International Streptomyces Project-2 (ISP-2)

Yeast extract	4	g
Malt extract	10	g
Glucose	4	g
Agar	15	g
Distilled water	1000	ml
pH	7.0	

International Streptomyces Project-3 (ISP-3)

Oatmeal	20	g
Agar	15	g
Distilled water	1000	ml
pH	7.0	

International Streptomyces Project-4 (ISP-4)

Soluble starch	10	g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.0	g
NaCl	1.0	g
K ₂ HPO ₄	1.0	g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.0	g
CaCO ₃	2.0	g
Trace salts solution	1.0	ml
Agar	15	g
Distilled water	1000	ml
pH	7.0	

Trace salts solution

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1	g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.1	g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1	g
Distilled water	100	ml