245681

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

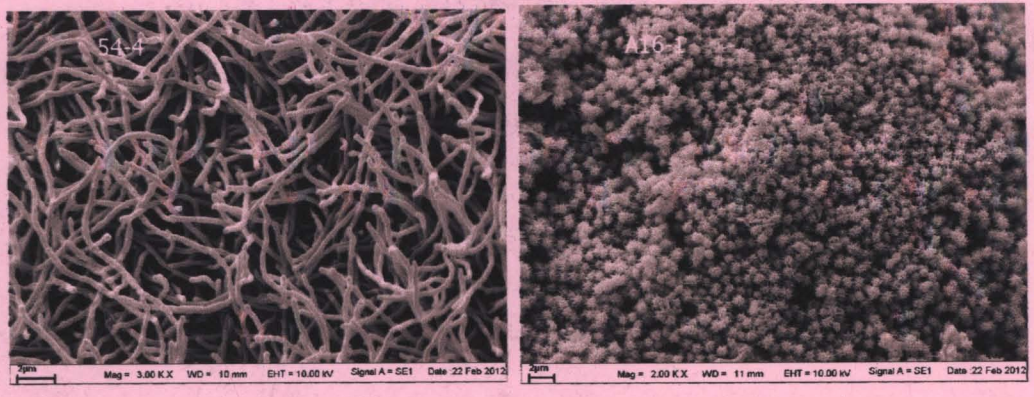
245681

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างสารแอนติไบโอติกจากราที่เป็นเอ็นโดไฟท์และแอคติโนมัยซีทบริเวณรากพืชป่าชายเลน

Optimization of Antimicrobial Compounds Production from Endophytic Fungi and Actinomycetes surrounding mangrove plant roots

รัตนาภรณ์ ศรีวิบูลย์

อภิรดี ปิลันธนภาคย์



โครงการวิจัยนี้ได้รับงบประมาณสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน

ประจำปีงบประมาณ 2554

600250602

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
245681

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างสารแอนติไบโอติกจากราที่เป็นเอ็นโดไฟท์และแอคติโนมัยซีทบริเวณรากพืชป่าชายเลน

Optimization of Antimicrobial Compound Production from Endophytic Fungi and Actinomycetes Surrounding Mangrove Plant Roots

รัตนาภรณ์ ศรีวิบูลย์
อภิรดี ปิลันธนภาคย์

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี
งบประมาณ 2554

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง "การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างสารแอนติไบโอติกจากราที่เป็นเอ็นโดไฟท์ และแอคติโนมัยซีทบริเวณรากพืชป่าชายเลน" นี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ 2554 เป็นระยะเวลา 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2553 – 30 กันยายน 2554 จึงใคร่ขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณนางสาวเนาวรัตน์ ละออเอี่ยม นางสาวนิภาพร พานทอง ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ นางสาวสุพรรษา พันธุ์ธรรม นางสาวพิราวรรณ แสงสง่า นักศึกษาปริญญาตรี นางสาวจิราภรณ์ ธนากุลปกรณ์ และนางสาวดวงนภา เครืออยู่ นักศึกษาปริญญาโท ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ผู้ช่วยวิจัยในโครงการ

ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่อนุเคราะห์สารเคมี วัสดุอุปกรณ์ เครื่องมือและครุภัณฑ์ต่างๆ บางส่วน ขอขอบคุณโครงการบัณฑิตศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความอนุเคราะห์การใช้เครื่องมือและครุภัณฑ์ต่างๆ ตลอดจนสถานที่ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณ คุณสุติรัตน์ ปุ่นประเสริฐ นักวิทยาศาสตร์โครงการบัณฑิตศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ ที่ให้คำแนะนำและอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือและสถานที่ในการทำวิจัย

บทคัดย่อ

245681

จากการคัดเลือกแอคติโนมัยซีท ที่สามารถสร้างสารรงควัตถุสีแดงจำนวน 7 ไอโซเลต นำมาเลี้ยงด้วยอาหารต่าง ๆกันคือ อาหาร ISP2 อาหาร Soybean meal อาหาร Oatmeal อาหาร ISP2+น้ำมันงา และ อาหาร ISP2+ น้ำมันปลา และตรวจสอบการสร้างสารรงควัตถุและฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ในขณะเดียวกัน พบว่าอาหาร ISP2 ที่ไม่เติมอาหารธรรมชาติอื่น ๆ ให้ผลการสร้างสารรงควัตถุและให้ฤทธิ์ยับยั้งที่ดีกว่า และเลือกแอคติโนมัยซีทที่สามารถสร้างสารรงควัตถุที่สร้างรงควัตถุสีแดง หรือ แดงคล้ำ มาเลี้ยงในอาหาร ISP2 เพื่อสกัดสารรงควัตถุให้ได้ปริมาณมาก พบว่าแอคติโนมัยซีท 54-4 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหาร ISP2 สามารถสร้างรงควัตถุสีแดง ได้ปริมาณ 0.15 0 กรัม / อาหาร 1 ลิตร จากการสกัดด้วย Ethyl acetate เมื่อนำสารสกัดหยาบของแอคติโนมัยซีท 54-4 มาทำให้บริสุทธิ์บางส่วน ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี พบว่ามีสารสีแดง สีส้ม และสีชมพู จำนวนมาก ไม่ต่ำกว่า 40 ชนิด แต่ไม่พบว่าแอคติโนมัยซีท 54-4 สร้างสารโพรดิจิโอซิน แต่อาจสร้างสารที่คล้ายโพรดิจิโอซินหลายชนิด สารสกัดหยาบของ แอคติโนมัยซีท A16-1 ให้สารรงควัคถุสีแดงจำนวนมากเช่นกัน และมี spectrum peak ที่ใกล้เคียงกัน คือ A16-1 ให้ spectrum peak สูงสุด ที่ 480 nm ในขณะที่สารจาก แอคติโนมัยซีท 54-4 ให้ spectrum peak สูงสุด ที่ 520 nm และ 560 ผลจากการตรวจสอบสารที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนของแอคติโนมัยซีท 54-4 ด้วย HPLC พบว่าสารใน fraction ที่ 8-15 พบว่ามี peak ที่ชัดเจนอยู่ 2 peak ที่ค่า Rt ที่ 23 และ Rt ที่ 27 นาที และที่ Rt 23 นาทีจะพบ 2 peaks ระหว่าง 220-270 nm และพบ 3 peaks อยู่ระหว่าง 450-550 nm ซึ่ง peaks เหล่านี้คล้ายคลึงกับ peak ที่พบในสารสกัดหยาบ ส่วน แอคติโนมัยซีทA1-3 และ A3-3 ให้สารสีแดงม่วงน้ำตาล และสีม่วงน้ำเงิน ตามลำดับ และสารสกัดหยาบของแอคติโนมัยซีท 54-5 ไม่ให้ฤทธิ์ยับยั้งต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) สารสกัดหยาบจากเชื้อทุกตัวให้ฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ แต่เฉพาะแอคติโนมัยซีท 54-4 และ A16-1 ให้ฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งด้วย โดย แอคติโนมัยซีท 54-4 ยับยั้งเซลล์มะเร็งปากมดลูก มีค่า IC_{50}=8.50 µg/ml ส่วนสารจาก A16-1 ออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม มีค่าIC_{50}=1.72, 1.56, 3.10 และ 2.61 µg/ml ใน fraction ที่ 5, 6,7-8 และ 9-12 ตามลำดับ ซึ่งนับว่าออกฤทธิ์แรงมากกว่า doxorubicine ซึ่งเป็นยารักษาโรคมะเร็งในปัจจุบัน นอกจากนี้ สารสกัดหยาบของแอคติโนมัยซีท ทั้ง 54-4และ A16-1 สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวด้วยเช่นกัน จากการหาลำดับเบสของ 16S rDNA ยีน พบว่าแอคติโนมัยซีททั้ง 2 ชนิดเป็นแอคติโนมัยซีทในจีนัส *Streptomyces* ซึ่งมีแนวโน้มที่จะเป็นสปีชีส์ใหม่

Abstract

245681

Seven isolates of actinomycetes pigment producing strains were selected and cultured on various types of media: ISP2, soybean meal, oatmeal, ISP2+sesami oil and ISP2+ fish oil, in which pigment and antimicrobial production were investigated at the same time. The result revealed that on ISP2 without any other natural substrate supplement gave better pigment and antimicrobial production. Strains giving red or dark red pigment production were selected to culture in ISP2 for extraction the red pigment. It was found that ethyl acetate extraction of Actinomycete 54-4 in ISP2 medium could yield 0.150 g crude pigment per litre medium. Partial purification of the crude pigment by column chromatography revealed more than 40 components of the substances in red, orange, and pink, but real prodigiosin substance was not found from Actinomycete 54-4, but analogue substances of prodigiosin may be mixed. Crude extract of Actinomycete A16-1 gave various components of red pigments as same as strain 54-4 with the highest spectrum peaks at 480 nm, while Actinomycete 54-4 gave the highest peaks at 520 and 560 nm. The result of HPLC analyses of 54-4 partial purification of the red pigments gave 2 unique peaks at Rt 23 and Rt 27. At Rt 23 found 2 peaks between 220-270 and 3 peaks between 450-550 nm in which resemble to those found in the crude extract. Actinomycetes A1-3 and A3-3 gave dark purplish-brown red and puplish-blue in color when purification, respectively. The crude extract of Actinomycete 54-5 did not give apoptosis of KB cell lines. All of the crude pigments in every strain gave antimicrobial activity, but only the pigments of Actinomycete 54-4 and A16-1 gave inducing apoptosis of HeLa cell lines and breast cancer cell lines with IC_{50} =8.50 µg/ml for crude extract of Actinomycetes 54-4 and IC_{50}=1.72, 1.56, 3.10 และ 2.61 µg/ml , for fraction 5, 6, 7-8, and 9-12 of A16-1, respectively, which stronger than the IC_{50} of doxorubicine . The crude extract of Actinomycete 54-4 and A16-1 could induce apoptosis of leukemia cell lines as well. The analysis of 16S rDNA base sequences, revealed that both of the actinomycetes are members of genus *Streptomyces* which has a tendency to be new species.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการวิจัย	9
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	16
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย	40
เอกสารอ้างอิง	43

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงสารเมตาโบไลท์ใหม่ ๆที่สร้างจาก marine actinomycetes ระหว่างปี 2003-2005 (Lam, 2006)	6
2	ตัวอย่างของสารปฏิชีวนะที่เป็นยารักษาโรคและสร้างขึ้นโดยแอคติโนมัยซีท (Borgos, 2006)	7
3.	เชื้อราเอนโดไฟท์ที่ใช้ในการศึกษา แยกได้จากพืชป่าชายเลนต่าง ๆชนิด และการจำแนกชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์	9
4	แอคติโนมัยซีทที่คัดเลือกมาศึกษา แยกได้จาก ตะกอนชนิดต่าง ๆ	10
5	สภาวะการเลี้ยงราในอาหารเหลวที่ศึกษา	11
6	ผล antibiosis ระหว่างราเอ็นโดไฟท์กับราสาเหตุโรคพืช *A. brassicicola*, *C. gloeosporioides* และ *F. oxysporum* เมื่อทดสอบเป็นเวลา 4 วัน	17
7	ผลของสารสกัดจากราเอ็นโดไฟท์ที่เลี้ยงบนอาหารต่างกัน ต่อการยับยั้งการเจริญราสาเหตุโรคพืช *A. brassicicola*, *C. gloeosporioides* และ *F. oxysporum* เมื่อทดสอบเป็นเวลา 4 วัน	19
8	ระยะเวลาที่เหมาะสมของการเตรียมสารสกัดจากราที่หมักใน 0.5xPDB ต่อการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช	20
9	ระยะเวลาที่เหมาะสมของการเตรียมสารสกัดจากราที่หมักใน SDB ต่อการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช	21
10.	ความเค็มที่เหมาะสมของอาหารเหลวในการเตรียมสารสกัดยับยั้งราโรคพืชจากน้ำหมักราที่เลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน ในอาหาร 0.5xPDB	22
11	ผลของสารสกัดจากราเอ็นโดไฟท์ที่เลี้ยงบนอาหาร 0.5xPDB ที่ความเค็มต่างกัน เป็นเวลา 3 วัน ต่อการยับยั้งการเจริญราสาเหตุโรคพืช เมื่อทดสอบเป็นเวลา 4 วัน	23
12	ผลของสารสกัดจากราเอ็นโดไฟท์ที่เลี้ยงบนอาหารต่างกัน ต่อการยับยั้งการเจริญราสาเหตุโรคพืช *A. brassicicola*, *C. gloeosporioides* และ *F. oxysporum* เมื่อทดสอบเป็นเวลา 4 วัน	24
13	ผลของสารสกัดจากราเอ็นโดไฟท์ Br834 ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการยับยั้งการเจริญราสาเหตุโรคพืช *A. brassicicola* ในอาหารรำข้าวผสมกับข้าวฟ่าง	26
14	จำนวนชนิดและรูปแบบสารองค์ประกอบในสารสกัดหยาบของราเอ็นโดไฟท์ สายพันธุ์ Th121	27
15	จำนวนชนิดและสารประกอบในสารสกัดเตรียมจากรา Th121 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวชนิดต่างๆที่เตรียมด้วยน้ำกลั่น	27
16	การออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารต่าง ๆ ของแอคติโนมัยซีทที่แยกขากป่าชายเลน	29
17	การออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารชนิดต่าง ๆ ของแอคติโนมัยซีทที่แยกจากป่าชายเลน	30

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

18 แสดงจำนวนองค์ประกอบของสาร ที่เห็นได้ บนแผ่นโครมาโทแกรม สารเมตาโบไลท์ที่สร้างได้ของแอคติโนมัยซีทที่เลี้ยงในอาหารเหลว GY, SCA, AB2, TSA และ ISP2 31

19 แสดงปริมาณการสร้างสารแอนติไบโอติกยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์อาหารเหลวธรรมชาติ (กรัม/100 ml) 32

20 แสดงผลของการศึกษา Bioautography assay ของแอคติโนมัยซีท A1-3, A3-3, A16-1, 54-4, 54-5 ต่อเชื้อ MRSA 22 33

21 แสดงผลการแยกสารสกัดหยาบของเชื้อแอคติโนมัยซีท รหัส A1-3 ด้วย Column Chromatography 35

22 แสดงผลการแยกสารสกัดหยาบของเชื้อแอคติโนมัยซีท รหัส A3-3 ด้วย Column Chromatography 36

23 แสดงผลการแยกสารสกัดหยาบของเชื้อแอคติโนมัยซีท รหัส A16-1 ด้วย Column Chromatography 37

24 แสดงผลการทดสอบไบโอออโตกราฟีของเชื้อ A1-3 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ MRSA P86 38

25 แสดงผล การทดสอบไบโอออโตกราฟีของเชื้อ A3-3 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ MRSA H78 38

26 แสดงผลการทดสอบไบโอออโตกราฟีของเชื้อ A16-1 ในการยับยั้งเชื้อทดสอบ MRSA P45 39

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

1 ระดับ antibiosis ในวันที่ 4 ของการเจริญ Th121 (โคโลนีด้านซ้ายของจานอาหาร) เมื่อเลี้ยงร่วมกับราสาเหตุโรคพืช *A. brassicicola* (โคโลนีด้านขวาของจานอาหาร), ก: ระดับความแรง 3+ บนอาหาร 0.5xPDA; ข: ระดับความแรง 3+ บนอาหาร SDA; ค: ไม่พบ antibiosis บนอาหาร LNA 17

2 ระดับ antibiosis ของ SC15A3 (โคโลนีด้านซ้ายของจานอาหาร) เมื่อเลี้ยงร่วมกับราสาเหตุโรคพืช *F. oxysporum* (โคโลนีด้านขวาของจานอาหาร) บนอาหารที่เตรียมด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 4 วัน, ก: ระดับความแรง 2+ บนอาหาร 0.5xPDA; ข: ระดับความแรง 2+ บนอาหาร SDA;ค: ไม่ยับยั้งการเจริญบนอาหาร LNA 18

3. ระดับ antibiosis เมื่อเลี้ยงราเอนโดไฟท์ Br830 (โคโลนีด้านซ้ายของจานอาหาร เมื่อเลี้ยงร่วมกับราสาเหตุโรคพืช *F. oxysporum* (โคโลนีด้านขวาของจานอาหาร) บนอาหารที่เตรียมด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 4 วัน, ก: ระดับความแรง 4+ บนอาหาร 0.5xPDA; ข: ระดับความแรง 3+ บนอาหาร SDA; ค: ระดับความแรง 1+ บนอาหาร LNA 18

4 การยับยั้งราสาเหตุโรคพืชของสารสกัดที่เตรียมจากน้ำหมักราเอ็นโดไฟท์ที่เลี้ยงในอาหารชนิดต่างๆ ในวันที่ 4 ของการเจริญ, ก: สารสกัดจาก Th111 บนแผ่น disc เมื่อวางร่วมกับราสาเหตุโรคพืช *A. brassicicola;* ข: สารสกัดจาก Br830 บนแผ่น disc เมื่อวางร่วมกับราสาเหตุโรคพืช *C. gloeosporioides*; 1= PDB, 2 = 0.5xPDB, 3 = YMB, 4 = LNB, 5 = SDB, CT- = แผ่น disc ชุบสารละลาย 0.5%DMSO ใช้เป็นตัวควบคุมผลลบ 24

5 การเจริญราเอ็นโดไฟท์ *A. brassicicola* ที่เลี้ยงในอาหารเตรียมจากธัญพืชชนิดต่างๆ ในวันที่ 4 ของการเจริญ, ก: รำข้าวผสมกับน้ำกลั่น อัตราส่วน 60 กรัม: 40 มิลลิลิตร; ข: ปลายข้าวหุงสุก 100 กรัม; ค: ข้าวฟ่างหุงสุก 100 กรัม 25

6 การเจริญ *A. brassicicola* เมื่อทดสอบกับสารสกัดจากราเอนโดไฟท์ Br834 ที่เลี้ยงในอาหารเตรียมจากธัญพืชรำข้าวผสมกับข้าวฟ่าง ความเข้มข้นสารสกัด 4,000 µg/ml (40 µg /diac), ก: สารสกัดจากรำข้าวผสมกับข้าวฟ่างอัตราส่วน 1:1; ข: สารสกัดจาก Br834 ที่เลี้ยงบนอาหารรำข้าวผสมกับข้าวฟ่างอัตราส่วน 1:1; ค: สารสกัดจาก Br834 ที่เลี้ยงบนอาหารรำข้าวผสมกับข้าวฟ่างอัตราส่วน 1:2; ง: สารละลาย 10%DMSO 26

7 สารประกอบที่ได้จากการวิเคราะห์ TLC ของสารสกัดจากราเอนโดไฟท์ Th121 ในอาหารเหลวชนิดต่าง ๆ ที่ เตรียมจากน้ำกลั่น; ก: 0.5 PDB, ข: PDB, ค :YMB, ง: LNB, จ: SDB 28

8 แสดง จำนวนสารที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในสารออกฤทธิ์ บนแผ่นโครมาโทแกรม เมื่อนำสารสกัดหยาบ จากเชื้อแอคติโนมัยซีท เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารต่างกัน จะพบว่าจำนวนองค์ประกอบของสารจะแตกต่างออกไป 32

9 โครมาโทแกรมแสดงสารที่เป็นองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ใน แต่ละfraction ของแอคติโนมัยซีท 54- 4 34

10 โครมาโทแกรมแสดง สารที่เป็นองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ใน แต่ละ fraction ของ แอคติโนมัยซีท A1-3 34

11 โครมาโทแกรมแสดง สารที่เป็นองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ใน แต่ละ fractionของ แอคติโนมัยซีท A3-3 35