

บทนำ

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

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

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

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

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

อย่างไรก็ตามสารรงควัตถุที่ได้จากแอคติโนมัยซีททะเลในประเทศไทยยังมีรายงานอยู่ในจำนวนไม่มากนัก และจากการที่แบคทีเรียจะผลิตสารมาเพื่อความอยู่รอดและป้องกันตัวเองในแต่

ละสภาวะนั้น ทำให้คณะผู้วิจัยสนใจทำการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียที่แยกจากดินตะกอนป่าชายเลน ซึ่งอยู่ในเขตที่นับว่ามีความอุดมสมบูรณ์ของแหล่งทรัพยากร

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยในปีที่ 2

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

ขอบเขตของโครงการวิจัย

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหาสารรงควัตถุที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดของแบคทีเรียทะเล โดยใช้เทคนิคทางเคมีและชีวเคมี

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

กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

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

ทางการแพทย์และทางการเกษตร มันยังคงมีความไม่แน่นอนว่าทำไมสารรงควัตถุจากแบคทีเรียจึงมีฤทธิ์ต้านจุลชีพ และหรือต้านเซลล์มะเร็ง ถึงแม้ว่าบทบาททางสรีระที่แท้จริงยังไม่ถูกค้นพบ

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

การทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง

ลักษณะโดยทั่วไปของแอกติโนมัยซีท (Actinomycete)

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

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

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

ลักษณะทั่วไปของเชื้อ *Streptomyces* spp.

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

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

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

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

เนื่องจากเชื้อนี้มีความสามารถในการสร้างยาปฏิชีวนะ และสารออกฤทธิ์ชีวภาพอื่นๆ ที่พัฒนาสู่อุตสาหกรรมได้ ทำให้มีการดำเนินการจดสิทธิบัตรการปิดข้อมูล ทำให้มีความ

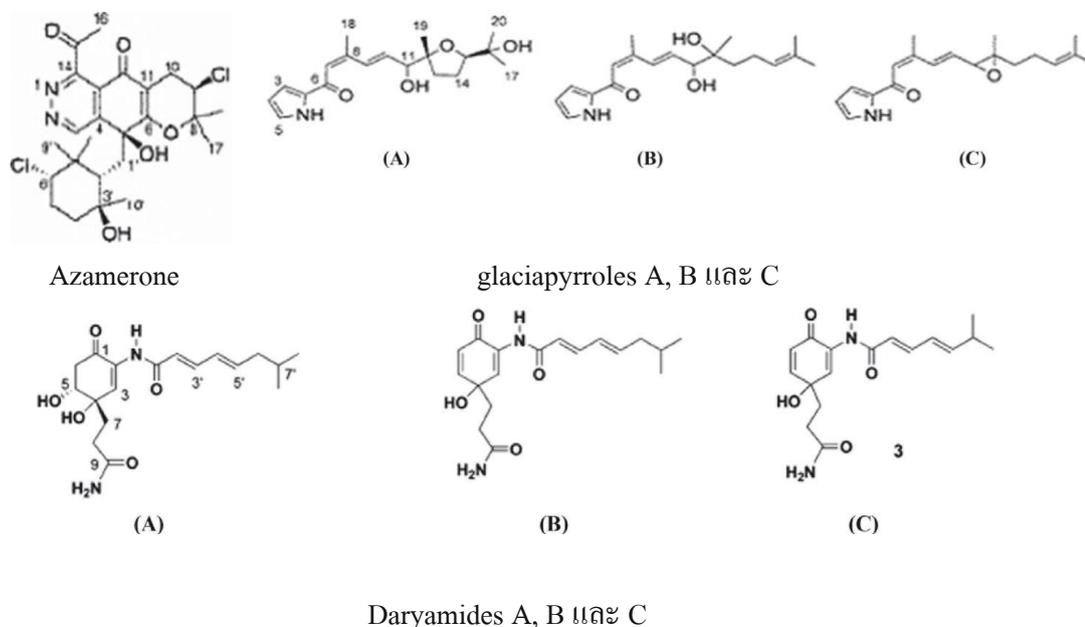
ยากลำบากในการนำเชื้อมาเปรียบเทียบกัน เชื้อในกลุ่มนี้เป็นเชื้อที่น่าสนใจ เพราะ *Streptomyces* spp. สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลายชนิด โดยเฉพาะยาปฏิชีวนะ ได้แก่ สารต่อต้านแบคทีเรีย (anti-bacterial agent) เช่น ampicillin, penicillin-N มีคุณสมบัติยับยั้งการสร้างเปปติโดไกลแคนที่ผนังเซลล์แบคทีเรีย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

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แยกได้จากแอคติโนมัยซีท

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

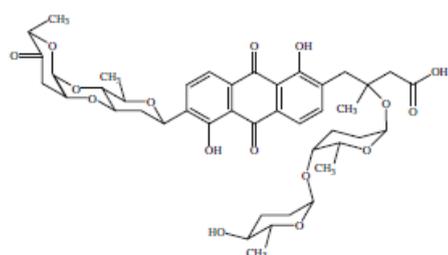
จากรายงานการแยกแอคติโนมัยซีท 27 สายพันธุ์จากดิน ของประเทศอัลจีเรีย พบว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Candida albicans* (Boudemagh *et al.*, 2005) ในปีเดียวกัน Kitouni และคณะ รายงานผลการแยกแอคติโนมัยซีท 25 สายพันธุ์จากน้ำ ดิน และเปลือกต้นพีชพบว่า มีฤทธิ์ต้านจุลชีพทั้งแบคทีเรียแกรมลบและบวก รวมถึงยีสต์และราเส้นใยด้วย

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

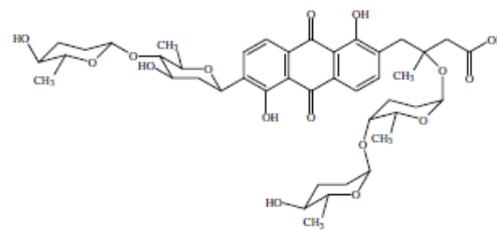


โดยทั่วไปสารประกอบพวก quinone จะเป็นกลุ่มที่มีโมเลกุลที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ และสารที่ได้จากแบคทีเรียทะเล *Streptomyces* จะมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สูง เช่น สารประกอบเชิงซ้อนของ C-glycosides himalomyocins A และ B, พวกสารกลุ่ม anthraquinones fridamycin E สารเหล่านี้ได้มาจากแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. 6921 ที่ได้จากดินตะกอนเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพที่รุนแรง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

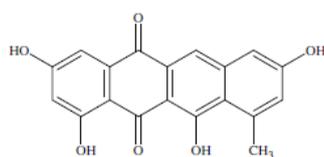
มะเร็งปอด มะเร็งเต้านม melanoma และ prostate cancer cells (Hawas *et al.*, 2009) และสาร Lucentamycins A และ B ที่แยกจากแอคติโนมัยซีททะเล *Nocardiosis lucentensis* (strain CNR-712) ซึ่งแสดงฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง HCT-116 human colon carcinoma (Cho *et al.*, 2007) นอกจากนี้ยังมีรายงานการผลิตสารที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียทะเลที่อาศัยร่วมกับสัตว์ชนิดอื่น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



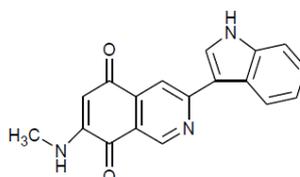
Himalomycins A



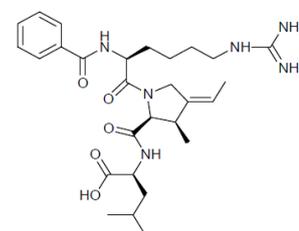
Himalomycins B



Tetracenomycin D

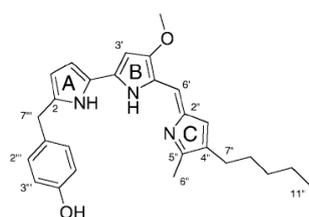
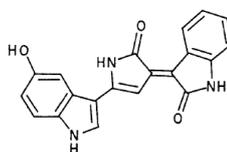


Mansouramycin

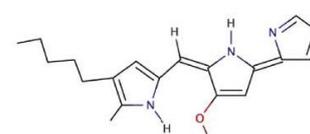


Lucentamycin A

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

2-(*p*-hydroxybenzyl)prodigiosin

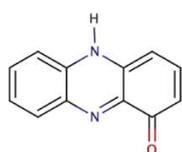
Violacein



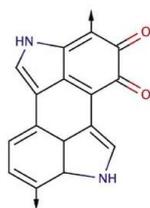
Prodigiosin

ตารางที่ 1 สักยภาพของฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆของรงควัตถุจากจุลินทรีย์

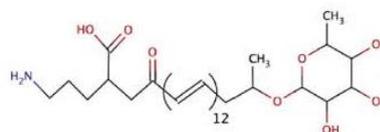
Pigment	Chemistry	Color	Human pathogens	Virulence functions
Staphyloxanthin	Carotenoid	Golden	<i>Staphylococcus aureus</i>	Antioxidant, detoxify ROS [4,5]
Pyocyanin	Phenazine-derived zwitterion	Blue-green	<i>Pseudomonas</i> spp.	Cytotoxicity [36,37,39] Neutrophil apoptosis [50] Ciliary dysmotility [43]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



Pyocyanin



Melanin



Granadaene

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

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

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

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

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

4.6 ไมโครปิเปต ขนาด 20, 200, 1000 ไมโครลิตร

4.7 จานเพาะเชื้อ (sterilized Petri dish)

4.8 antibiotic assay disc (AA disc)

4.9 เข็มเขี่ยเชื้อ

4.10 แท่งแก้วคนสาร

4.11 แท่งแก้วสามเหลี่ยมปากเชื้อ (Spreader)

สารเคมีที่ใช้ในการสกัดสารสกัดหยาบ

1. Acetone (Rcllabscan Ltd., ประเทศไทย)
2. n-butanol (n-BuOH) (Rcllabscan Ltd., ประเทศไทย)
3. chloroform (CHCl₃) (Rcllabscan Ltd., ประเทศไทย)
4. 95% ethanol & ethanol (commercial grade) (EtOH)
5. ethyl acetate (EtOAc) (Rcllabscan Ltd., ประเทศไทย)
6. methanol (MeOH) (Rcllabscan Ltd., ประเทศไทย)

สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS

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

เชื้อแบคทีเรียและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 เชื้อแอสคิโนมัยซีท

เชื้อแอสคิโนมัยซีทได้รับจากโครงการวิจัยที่ 5 จำนวนทั้งสิ้น 13 ไอโซเลต ได้แก่

- เชื้อแอสคิโนมัยซีท แยกจากดินตะกอนชายฝั่งทะเล ภาคตะวันออก จังหวัดชลบุรี 2 ไอโซเลต
- เชื้อแอสคิโนมัยซีทที่แยกจากดินตะกอนป่าชายเลน จังหวัดชุมพร 11 ไอโซเลต

ตัวอย่างเชื้อแอสคิโนมัยซีทถูกตรวจเอกลักษณ์โดย คุณรัตนภรณ์ ศรีวิบูลย์ นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการพิเศษ และเก็บตัวอย่างเชื้อแอสคิโนมัยซีท ไว้ที่ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

1.2 อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อแอสคิโนมัยซีท

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

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

เชื้อแบคทีเรียมาตรฐานสำหรับทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ อาหารเลี้ยงเชื้อ และยาด้านจุลินทรีย์

เชื้อมาตรฐานที่นำมาใช้ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ ได้แก่ *Staphylococcus aureus*

TISTR No.517 และ *Candida albicans* TISTR 5239

อาหารที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรียในการศึกษาครั้งนี้ ได้แก่ TSA และ TSB วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ แสดงในภาคผนวก ก

ยาด้านจุลินทรีย์ ได้แก่ Tetracycline 30 ไมโครกรัม Neomycin 30 ไมโครกรัม

ขั้นตอนและวิธีการวิจัย

1. การเพาะเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีท

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

2. การเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีทเพื่อสกัดสารสกัดหยาบ

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

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

3. การเตรียมตัวอย่างสารสกัดหยาบ

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

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

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

EtOAc (M)

4. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นของสารสกัดหยาบ

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

4.1 ตรวจสอบความสามารถเบื้องต้นสารที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดหยาบด้วยวิธี Rapid TLC screening method ด้วย DPPH radical

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

4.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ DPPH[•] (DPPH radical scavenging assay)

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

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

จากนั้นคำนวณหาค่า IC₅₀ (ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถดักจับอนุมูล DPPH[•] ได้ที่ 50 เปอร์เซ็นต์) จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดกับ % inhibition

4.3 การวิเคราะห์ฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} (ABTS radical scavenging assay)

การทดสอบฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ ABTS ทำผ่าน ABTS cation radical decolorization (ABTS^{•+}) (Yang, *et al.*, 2011) เตรียมสารละลาย ABTS^{•+} โดยการผสมสารละลาย 7 mM ABTS 2 มิลลิลิตร (ในน้ำกลั่น) และ 140 mM potassium persulphate (K₂S₂O₈) ในน้ำกลั่น 35.5 ไมโครลิตร (ซึ่งทำให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ potassium persulphate ประมาณ 2.45 mM) ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง สารละลายอนุมูล ABTS^{•+} เมื่อเตรียมแล้วสามารถเก็บได้ประมาณ 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ทำการเจือจางสารละลาย ABTS^{•+} ก่อนนำไปใช้ด้วยเมธานอล ให้มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.700 ± 0.020 ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร (โดยผสมสารละลายอนุมูล ABTS^{•+} 1 มิลลิลิตร กับเมธานอล 89 มิลลิลิตร)

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

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

ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระแสดงในรูป IC₅₀ โดยที่ค่า IC₅₀ ถูกคำนวณจากกราฟระหว่าง % scavenging กับความเข้มข้น

5. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย (antimicrobial activity)

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

- การเตรียมแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ ทำการ streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และใช้เชื้อปริมาณ 10⁵-10⁷ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

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

6. การแยกสารประกอบให้บริสุทธิ์

การแยกสารประกอบให้บริสุทธิ์ของแอกติโนมายซีท A1-3 M (ชั้นน้ำเลี้ยง)

นำสารสกัดหยาบบางส่วนของ A1-3 M (28.4 กรัม) มาแยกสารด้วยวิธี Preparative TLC โดยใช้ระบบตัวพา CHCl_3 :formic acid 1% (x2) จะได้สารบริสุทธิ์ของ “A1-3M/1” และ “A1-3M/2” นำไปหาโครงสร้างสารและทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียต่อไป

การแยกสารประกอบให้บริสุทธิ์ของแอกติโนมายซีท CH54-5/C (ชั้นเซลล์)

นำสารสกัดหยาบของ CH54-5/C (0.2886 กรัม) มาแยกสารด้วยวิธี SiO_2 Column chromatography โดยใช้ระบบ gradient: Petroleum ether:Chloroform, CHCl_3 , CHCl_3 :acetone, MeOH โดยเก็บ fraction ละ 10 mL ทำการรวม fraction นำแต่ละ fraction ไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

7. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

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