ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

1. ข้อมูลตัวอย่างและการสกัดสารสกัดหยาบของตัวอย่างแอคติโนมัยซีท

ตัวอย่างแอคติโนมัยซีทที่ใช้ในการศึกษาปีที่ 2 จำนวนทั้งสิ้น 13 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 2 ได้มาจาก 2 ส่วน ดังนี้

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

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

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

จุดเก็บที่ 1 บริเวณบ้านนาทบ อ. เมือง จ. ชุมพร (10º 29' 50.2" N และ 99º 14' 02.9" E) ลักษณะเป็นพื้นทรายปนโคลน มีต้นแสมทะเลและโกงกางใบเล็ก

จุดเก็บที่ 2 บริเวณบ้านนาชะอัง ต. นาทุ่ง อ. เมือง จ. ชุมพร (10º 30' 22.3" N และ 99º 14' 52.3" E) ลักษณะเป็นพื้นทรายปนโคลน บริเวณปากคลองออกทะเล มีต้นแสมทะเล

จุดเก็บที่ 3 บริเวณปากคลองอุทธยานฯหมู่เกาะทะเลชุมพร อ. เมือง จ. ชุมพร (10º 21' 26.1" N และ 99º 13' 49.3" E) ลักษณะเป็นโคลน มีต้นโกงกางใบเล็ก

ก)

ข)

ค)

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

จากผลการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทบริเวณตำแหน่งต่างๆและทำการตรวจสอบคุณสมบัติบางประการทางชีวเคมี รวมถึงการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของเชื้อที่แยกได้ ด้วยเทคนิค cross streak จากโครงการวิจัยที่ 5 ทำให้ได้เชื้อแอคติโนมัยซีทที่น่าสนใจจำนวน 10 ไอโซเลท นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกจากดินตะกอนชายฝั่ง จ. ชลบุรี (A1-3) และดินป่าชายเลนบริเวณปากแม่น้ำพังราด จังหวัดระยอง (RY2-20) และดินป่าชายเลน จ. จันทบุรี (CH54-5) ข้อมูลแอคติโนมัยซีทที่แยกจากดินตะกอนป่าชายเลน 13 สายพันธุ์และน้ำหนักสารสกัดหยาบ ดังแสดงในตารางที่ 2

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

แอคติโนมัยซีท A1-3 มีความใกล้เคียงกับ *Streptpmyces massasporeus* ที่ 99.88% similarity

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

แอคติโนมัยซีท RY2-20 ผลจากการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของผนังเซลล์ และการตรวจดูลักษณะรูปร่างของโครงสร้างของแอคติโนมัยซีท พบว่าเป็นแอคติโนมัยซีทในกลุ่ม Family *Micromonosporaceae* genus *Virgisporangium*

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

สกัดสารสกัดหยาบตัวอย่างแอคติโนมัยซีทในส่วนของเซล (intracellular) และน้ำเลี้ยง (extracellular) ด้วยสารละลายเอธิลอะซิเตท เพื่อนำส่วนสกัดทั้งสองชั้นไปทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีต่างๆ และฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์

2. การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง (TLC-DPPH)

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

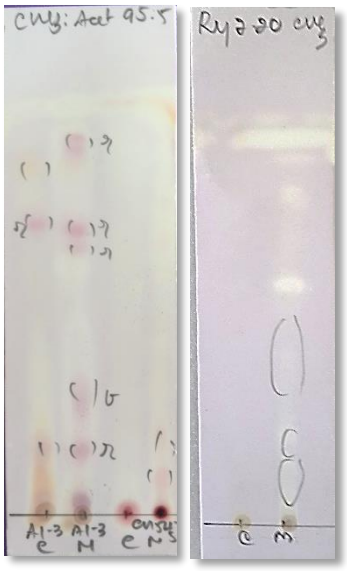
สารบนแผ่น (development of TLC plate) ซึ่งระบบที่ใช้ เช่น Chloroform, Chloroform : Methanol 98:2

ตารางที่ 2 ข้อมูลตัวอย่างแอคติโนมัยซีทและน้ำหนักสารสกัดหยาบ

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

2.1 การแยกสารบนแผ่น TLC ของสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยซีทที่แยกจากดินตะกอนภาคตะวันออก ได้แก่ เชื้อ A1-3, CH54-5 และ RY2-20

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

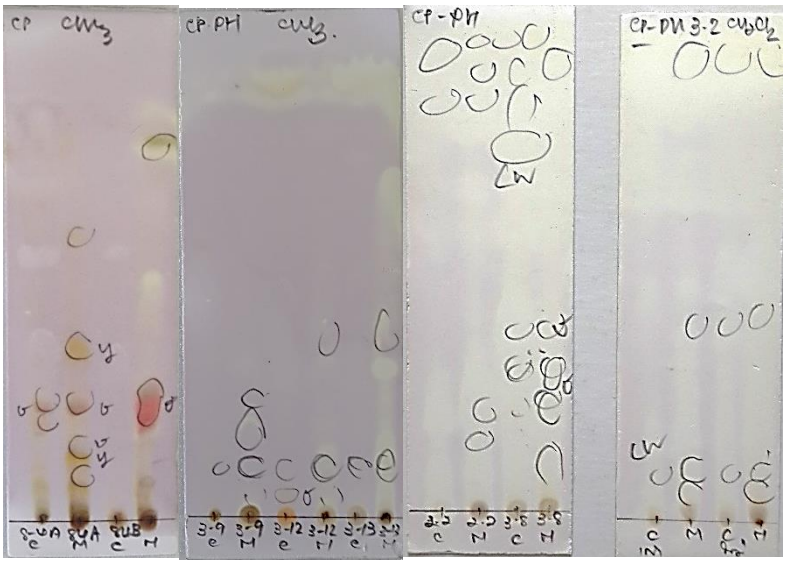


ภาพที่ 2 แสดงลักษณะการแยกชนิดสารสกัดหยาบ และทดสอบฤทธิ์ด้วยเทคนิค TLC-DPPH เชื้อภาคตะวันออก

2.2 การแยกสารบนแผ่น TLC ของสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยซีทที่แยกจากดินตะกอนป่าชายเลน จังหวัดชุมพร

การตรวจสอบฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นของสารสกัดหยาบของเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 10 สายพันธุ์ที่แยกจากดินตะกอนป่าชายเลน จ. ชุมพรด้วยเทคนิค TLC-DPPH พบว่าตัวอย่างสารสกัดของเชื้อแอคติโนมัยซีทชั้นน้ำเลี้ยงแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีกว่าชั้นเซลล์ พบสารประกอบหลายตัวจากสารสกัดในชั้นน้ำเลี้ยง (M) แสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยเฉพาะสารสกัดจาก CP-PH3-2, CP-PH3-13, CP-PH3-8, และ CP8-4B แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในชั้นน้ำเลี้ยง (M) ค่อนข้างชัดเจน จากผลที่ได้จะพบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทจาก จ. ชุมพร ที่ผลิตสารรงควัตถุที่เด่นชัด ได้แก่ เชื้อ CP8-4A,B แต่ผลที่ได้ไม่พบสารรงควัตถุที่กำจัดอนุมูลอิสระ แต่ละเชื้อสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้หลายชนิดทั้งที่มีขั้วสูงและต่ำ (ดังแสดงภาพที่ 3) โดยสังเกตจากตำแหน่งของสารประกอบที่ออกฤทธิ์บนแผ่น TLC จึงทำการหาค่า IC_{50} ของสารสกัดหยาบที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ ความเข้มของจุดสีเหลืองและความเร็วของการทำปฏิกิริยาบนแผ่น TLC ขึ้นกับปริมาณและลักษณะทางเคมีของสารประกอบ จลนศาสตร์ของปฏิกิริยาระหว่าง $DPPH^{\bullet}$ และสารออกฤทธิ์ กลไกการเกิดปฏิกิริยาของสารประกอบแต่ละตัวก็แตกต่างกัน เช่น บางตัวเป็นพวก hydrogen donor และบางตัวอาจเป็น electron donor ในปฏิกิริยาของการกำจัดอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ เป็นกลไกพวก hydrogen donor ที่โดดเด่น ทำการประเมินฤทธิ์

ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีที่ต่างกัน ได้แก่ DPPH$^{\bullet}$ และ ABTS$^{\bullet+}$ ซึ่งความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต้องทำการวิเคราะห์มากกว่าหนึ่งวิธีเพื่อให้ทราบกลไกของสารต้านอนุมูลอิสระ



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

3. การทดสอบเชิงปริมาณวิเคราะห์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

3.1 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH$^{\bullet}$ (DPPH radical scavenging assay)

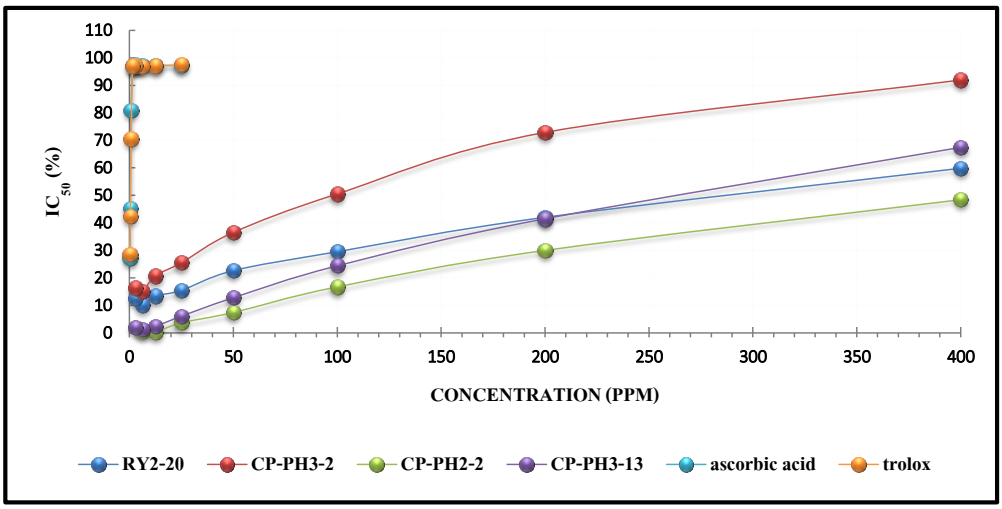
เป็นการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดในการรวมตัวกับ DPPH ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่เสถียรที่อยู่ในสารละลาย โดย DPPH คือ อนุภาคอิสระที่เสถียรและสามารถรับอิเล็กตรอนได้ เมื่อได้รับอะตอมไฮโดรเจนจากโมเลกุลอื่นจะทำให้เปลี่ยนเป็นโมเลกุลที่ไม่เป็นอนุมูลอิสระ โดยอิเล็กตรอนที่ไม่ได้จับคู่ในโมเลกุลของอนุมูล DPPH$^{\bullet}$ สามารถดูดกลืนพลังงานแสงได้ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ทำให้มองเห็นเป็นสีม่วง และเมื่ออนุมูล DPPH$^{\bullet}$ ถูกรีดิวซ์โดยสารต้านอนุมูลอิสระที่มีคุณสมบัติเป็น hydrogen donor เมื่อได้รับอะตอมไฮโดรเจนจากโมเลกุลอื่น จะทำให้เปลี่ยนเป็นโมเลกุลที่ไม่เป็นอนุมูลอิสระ DPPH-H ซึ่งการสูญเสียอิเล็กตรอนดังกล่าวทำให้อนุมูล DPPH$^{\bullet}$ ดูดกลืนพลังงานแสงได้น้อยลง สารดังกล่าวจึงเปลี่ยนเป็นสีเหลือง (Brand-William *et al.*, 1995) ในการศึกษาได้วิเคราะห์ความสามารถของสารสกัดในการทำให้ความเข้มข้นของ DPPH$^{\bullet}$ ลดลง 50% (IC_{50}) โดยมีascorbic acid และ trolox เป็นตัวควบคุม

จากผลของการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นด้วยเทคนิค TLC-DPPH พบว่าสารสกัดของแอคติโนมัยซทที่แยกจากดินตะกอนป่าชายเลนทั้งของภาคตะวันออกและจังหวัดชุมพรที่แสดง

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

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

CP-PH3-2> RY2-20 > CP8-4B > CP-PH3-13 >CP3-1$\geq$ CP-PH2-2



ภาพที่ 4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูล DPPH กับความเข้มข้นสารสกัดหยาบของแอคติโนมัยซีทจากชั้นน้ำเลี้ยง (M)

ตารางที่ 3 ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH• และ ABTS ของสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยซีท

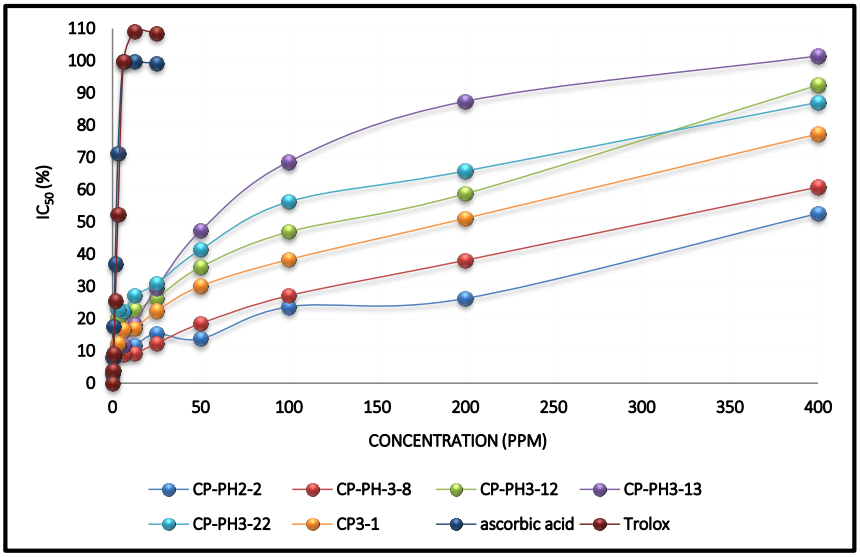
Sample	% IC_{50} ABTS scavenging		% IC_{50} DPPH scavenging	
	cell	medium	cell	medium
CP 3-1	202.47±36.1	203.94 ± 8.7	>400	393.3±7.2
CP-PH2-2	392.13±23.5	110.33±9.1	>400	393.3±7.2
CP-PH3-2	>400	63.3±6.9	>400	133.07±4.0
CP-PH3-8	305.5±23.7	116.8±7.1	>401	>400
CP-PH3-9	>400	248.72±10.4	>400	>400
CP-PH3-12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

3.2 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$(ABTS radical scavenging assay)

เป็นวิธีการวัดความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์สีเขียวปนน้ำเงินสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร จากนั้นนำ $ABTS^{\bullet+}$ ที่เจือจางแล้วทำปฏิกิริยากับสารสกัดตัวอย่างและตั้งทิ้งไว้ เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาสามารถหาความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้ จากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ โดยเทียบกับสารมาตรฐาน trolox หรือ ascorbic acid ข้อดีของวิธีการนี้คือ $ABTS^{\bullet+}$ละลายได้ดีในน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ จึงทำปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็วและทำปฏิกิริยาได้ดีในช่วง pH กว้างส่วนข้อเสียคือ $ABTS^{\bullet+}$ ไม่เป็นสารธรรมชาติที่พบในร่างกายหรือในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตและต้องมีการทำปฏิกิริยากับสารอื่นก่อนถึงจะเกิดเป็นอนุมูลอิสระ

จากการศึกษาความสามารถการกำจัดอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ของสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยซีท พบว่าแอคติโนมัยซีทเกือบทุกสายพันธุ์ที่แสดงฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ได้แตกต่างกัน ยกเว้นสารสกัดของเชื้อ CP8-4A และ B โดยที่สารสกัดจากชั้นน้ำเลี้ยงสามารถกำจัด

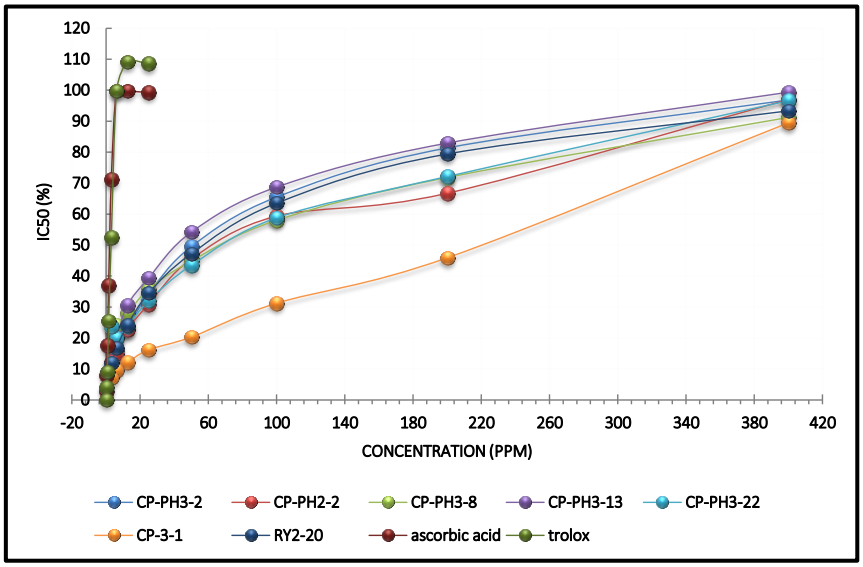
อนุมูลอิสระ ABTS ได้ดีกว่า โดยพบว่าในชั้นน้ำเลี้ยงเชื้อ CP-PH3-13, CP-PH3-2, RY2-20 และ CP-PH3-22 มีฤทธิ์กำจัดอนุมูล $ABTS^{+\cdot}$ ได้ดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 55.21±1.3, 63.3±6.9, 66.12±5.4 และ 74.04±2.1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ขณะที่สารสกัดจากชั้นเซลล์ CP-PH3-13, CP-PH3-22 แสดงฤทธิ์กำจัดอนุมูล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



ภาพที่ 5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูล ABTS กับความเข้มข้นสารสกัดหยาบของแอคติโนมัยซีทจากชั้นเซลล์ (C)

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

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



ภาพที่ 6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูล ABTS กับความเข้มข้นสารสกัดหยาบของแอคติโนมัยซีทจากชั้นน้ำเลี้ยง (M)

จากทดลองพบว่าสารสกัดหยาบที่มีค่าการดักจับอนุมูลอิสระที่ดีที่สุดของทั้งสองการทดลอง (DPPH และ ABTS) ได้แก่ สายพันธุ์ CP-PH3-2 M, CP-PH3-13 M และ RY2-20 M สารสกัดหยาบทุกสายพันธุ์มีค่าการดักจับอนุมูลอิสระสูงกว่าสารมาตรฐานแอสคอร์บิก ผลดังแสดงในตารางที่ 3 นั่นแสดงว่าสารสกัดของเชื้อ CP-PH3-2 M, CP-PH3-13 M และ RY2-20 M มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีคุณสมบัติในการให้ไฮโดรเจนอะตอมที่ดี ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารประกอบที่แยกได้จากเชื้อ *Streptomyces* sp. ในหลายรายงานพบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่รุนแรง เช่น สาร 2-allyloxyphenol ที่แยกจากเชื้อ *Streptomyces* sp. MS1/7 (Arumugam และคณะ, 2012, Revathy และคณะ, 2013, Zhong และคณะ, 2011) เนื่องจากอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ มีความคงตัวไม่ไวต่อปฏิกิริยา ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่สามารถลำดับหรือจัดอันดับความไวของอนุมูลได้ วิธี DPPH เป็นวิธที่เกี่ยวข้องกับขั้นตอนการให้ไฮโดรเจนอะตอม ประกอบกับโครงสร้างทางเคมีของ $DPPH^{\bullet}$ ที่ประกอบด้วยวงเบนซีน 3 วง จะไปบดบังอิเลคตรอนเดี่ยวของอนุมูลอิสระและหมู่ไนโตรเจนทำให้สารต้านอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์รุนแรงแต่อาจจะมีขนาดโครงสร้างทางเคมีใหญ่บางสารไม่สามารถเข้าไปทำปฏิกิริยาขจัดอนุมูลอิสระได้หรือเกิดปฏิกิริยาช้ากว่าความเป็นจริง จากข้อมูลที่ได้ TLC-DPPH ทำให้ทราบว่าเชื้อ CP-PH3-2 M, CP-PH3-13 M

และ RY2-20 M แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี แต่สารที่แสดงฤทธิ์ของทั้ง 3 สายพันธุ์ไม่ใช้สารรงควัตถุจึงไม่ได้ทำการค้นหาสารออกฤทธิ์

สำหรับการทดสอบด้วยวิธี $ABTS^{+\bullet}$ radical scavenging assay เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถของสารสกัดในการต้านออกซิเดชันโดยใช้สารคงตัว ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) ทำปฏิกิริยาออกซิเดชันทำให้เกิดสีกับสารโพแทสเซียมเพอร์ซัลเฟต ซึ่งออกซิไดซ์ ABTS ให้เป็นอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ เกิดเป็นสารละลายสีน้ำเงินเขียว จากนั้นสารต้านอนุมูลอิสระจะรีดิวซ์ $ABTS^{\bullet+}$ ให้กลับเป็น ABTS ทำให้เกิดสีน้อยลงหรือไม่เกิดสีเลย โดยมี trolox เป็นสารมาตรฐาน จากการทดลองพบว่าสารสกัดจากแอคติโนมัยซีทชั้นน้ำเลี้ยงและชั้นเซลล์ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ได้ดีกว่า การออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ซึ่งอาจมาจากการละลายของสารสกัดได้ดีขึ้นจึงเข้าทำปฏิกิริยาได้มากขึ้น โดยพบว่าสารสกัดหยาบแอคติโนมัยซีทจากชั้นน้ำเลี้ยงและเซลล์ CP-PH3-13 มีค่าการกำจัดอนุมูล $ABTS^{+\bullet}$ ดีที่สุดซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 55.21 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามด้วยสารสกัดจากเชื้อ CP-PH3-2 > RY2-20 > CP-PH3-22 >…. (ตารางที่ 3) สารสกัดหยาบทุกสายพันธุ์มีประสิทธิภาพการดักจับอนุมูลอิสระต่ำกว่าสารมาตรฐาน trolox (IC_{50} เท่ากับ 2.19 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ผลการทดลองแสดงว่าสารสกัดจากเชื้อ CP-PH3-13, CP-PH3-2, RY2-20 และ CP-PH3-22 มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีความสามารถในการให้อิเลคตรอนได้เป็นอย่างดี

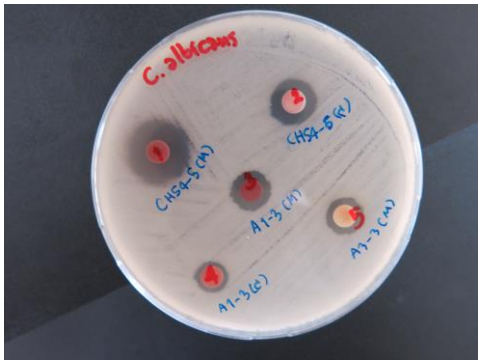
จากผลความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระทั้งวิธี (DPPH และ ABTS) ทำให้ทราบว่าสารสกัดจากเชื้อ CP-PH3-2, RY2-20 และ CP-PH3-13 มีความสามารถกำจัดอนุมูลอิสระ โดยมีคุณสมบัติเป็นผู้ให้อิเลคตรอนที่ดี

4. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบ

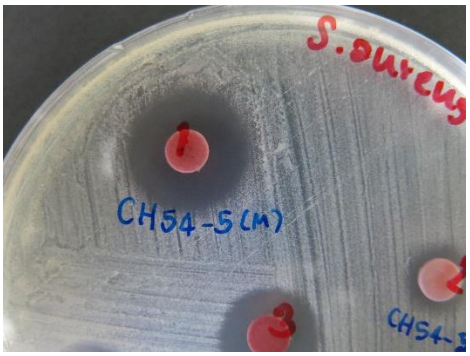
การตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยใช้วิธี cross streak และ disc diffusion

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

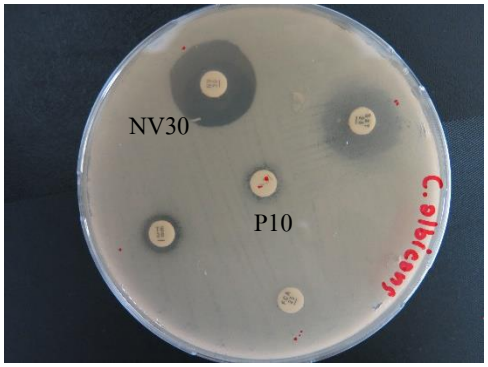
19.25 และ 19.64 มม. ขณะที่ A1-3 สามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aure*us ได้ดี โดยเปรียบเทียบกับ Positive control ที่เป็นยาปฏิชีวนะ คือ Novobiocin และ Pennicillin



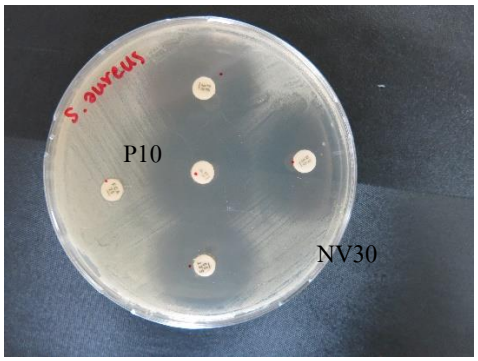
(ก)



(ข)



(ค)



(ง)

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

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

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

ตารางที่ 4 ผลการยับยั้งเชื้อมาตรฐานของสารสกัดเชื้อแอคติโนมัยซีท

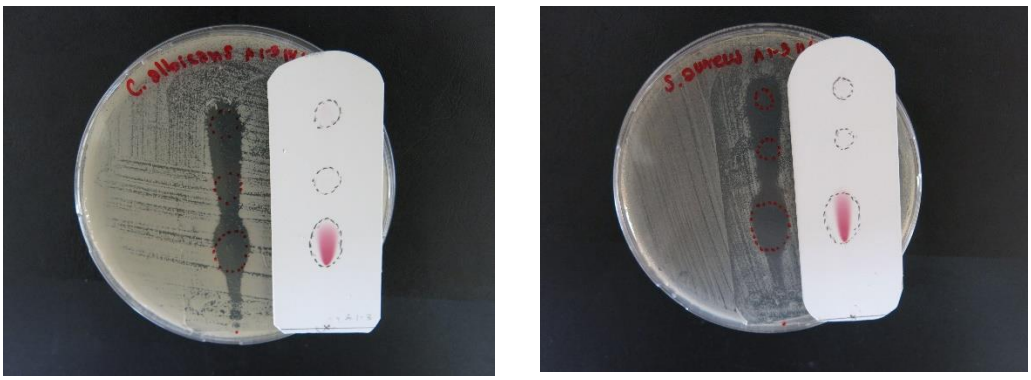
Actinomycetes / ยามาตรฐาน	**ผลการยับยั้งเชื้อทดสอบ**		**ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้งของเชื้อที่ใช้ทดสอบ (มม.)**	
	S. aureus	***C. albicans***	***S. aureus***	***C. albicans***
CP 3-1	-	-	-	-
CP-PH2-2	-	-	-	-
CP-PH3-2	-	-	-	-
CP-PH3-8	-	-	-	-
CP-PH3-9	-	-	-	-
CP-PH3-12	-	-	-	-
CP-PH3-13	-	-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

5. การแยกสารประกอบให้บริสุทธิ์ของแอคติโนมัยซีท

5.1 เชื้อแอคติโนมัยซีท A1-3 M

จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aure*us และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจึงทำการแยกหาสารออกฤทธิ์ชีวภาพของ A1-3 ด้วยวิธีทางเคมี โดยใช้เทคนิคโครมาโตรกราฟฟี พร้อม

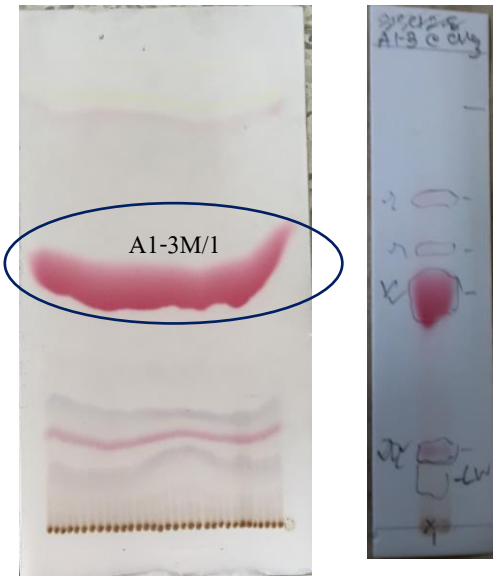
กับการทำ bioassay guidance หรือ autobiography ของสารประกอบดังแสดงในภาพที่ 8 จะพบว่าที่ตำแหน่งสารสีแดงเกิดการยับยั้งเชื้อทั้ง 2 ชนิด จึงทำการแยกสารรงควัตถุ ที่เป็นสารปฏิชีวนะ โดย



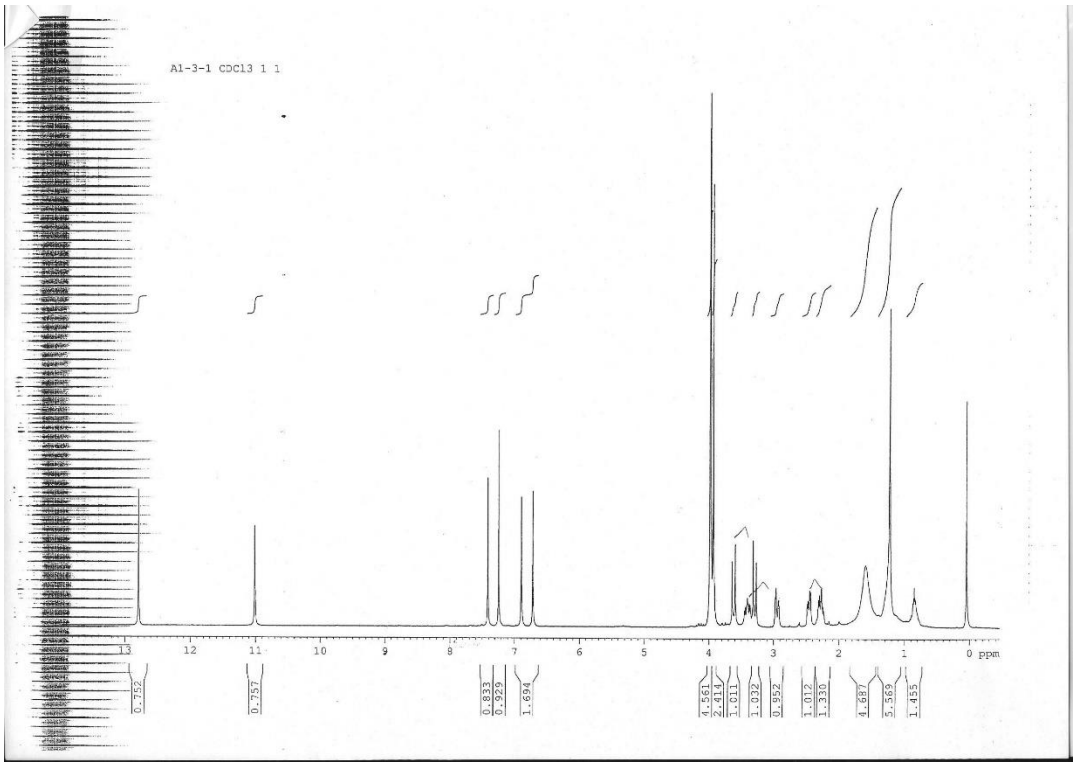
(ก) (ข)

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

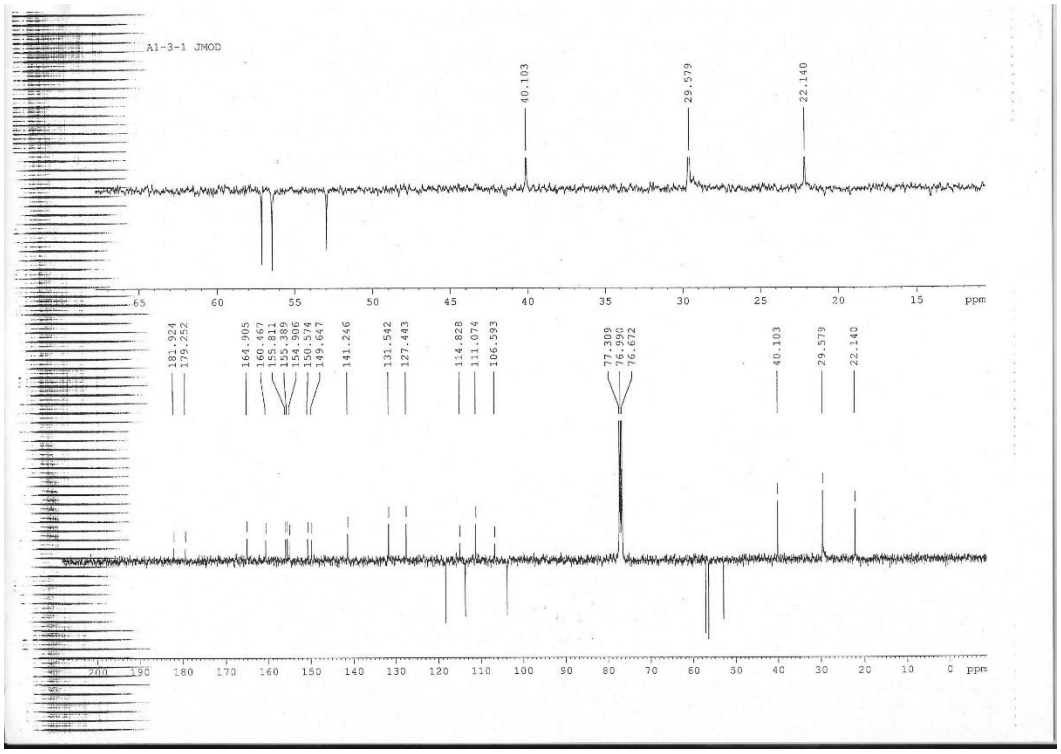
วิธี Preparative Thin Layer Chromatography (PTLC) จะได้สารบริสุทธิ์ A1-3M/1 สีแดงมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* (ดังแสดงภาพที่ 9) นำไปหาโครงสร้างและน้ำหนักโมเลกุลด้วยเทคนิคสเปคโตรสโคปี (ดังภาพที่ 10 และ 11) ซึ่งข้อมูลยังอยู่ในขั้นตอนการแปลโครงสร้าง



ภาพที่ 9 แสดงตำแหน่งการแยกของสารประกอบบนแผ่น TLC



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



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