

## บทนำ

จุลินทรีย์ทางทะเลส่วนใหญ่จะกระจายอยู่ทั่วไปในมหาสมุทรประมาณ  $3.6 \times 10^{30}$  เซลล์ โดยมากกว่าร้อยละ 90 ของมวลชีวภาพในมหาสมุทรทั้งหมด จุลินทรีย์เป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า มีขนาดน้อยกว่า 1 ไมครอน นอกจากนี้ยังมีความสำคัญยิ่งต่อการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมและการเผาผลาญของชีวิต แต่ความเข้าใจของเราต่อความหลากหลายของเชื้อจุลินทรีย์และวิวัฒนาการของโครงสร้างประชากรในมหาสมุทรเป็นเพียงบางส่วนเท่านั้น แต่ละชนิดมีคุณสมบัติแตกต่างกัน แบคทีเรียทะเลรวมถึงส่วนที่อาศัยร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆเป็นแหล่งที่มีศักยภาพ เนื่องจากแบคทีเรียต้องแข่งขันกันเองภายใต้สภาวะที่รุนแรงต่างๆ เช่น ความเค็ม ออกซิเจน ความเป็นกรด-ด่าง แสงสว่าง ธาตุอาหาร อุณหภูมิ กระแสน้ำ และรวมไปถึงการแย่งถิ่นที่อยู่ของจุลินทรีย์ทะเลเหล่านี้ด้วย จึงพบว่าแบคทีเรียเป็นกลุ่มที่มีการสร้างสารไบโอแอคทีฟเมตาโบไลต์ที่มีความหลากหลายเพื่อความอยู่รอด ซึ่งอาจจะเป็นประโยชน์ต่อทางการแพทย์และเภสัชวิทยา

จุลินทรีย์ทะเลเป็นแหล่งที่มาสำหรับสาร metabolites ที่ได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้นและมีจำนวนผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเลที่มีศักยภาพที่น่าสนใจ ซึ่งอยู่ในขั้นการทดลองทางคลินิกเพิ่มมากขึ้น ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเลที่ได้จากแบคทีเรียจะถูกศึกษาในสองส่วน ส่วนแรกเกี่ยวกับแบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่น (symbiotic bacteria) และอีกส่วนหนึ่งคือจุลินทรีย์ทะเลที่ป็นสารด้วยาโดยทั่วไป (Piel, 2009; Gulder & Moore, 2009) เมื่อเปรียบเทียบสารทุติยภูมิที่ได้สิ่งมีชีวิตในทะเลกับสิ่งมีชีวิตบนบก พบว่าสารที่ได้จากสิ่งมีชีวิตในทะเลมีโครงสร้างที่หลากหลายและมีเพียงหนึ่งเดียวเนื่องจากสัตว์ทะเลมีหลากหลายและยังมีความเป็นอยู่ที่ซับซ้อน ทำให้สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ที่มีฤทธิ์ได้รุนแรงกว่า (Carte, 1996; Rinehart, 2000; Schwartsmann และคณะ, 2001) นอกจากนี้ยังพบว่าสารออกฤทธิ์หลายตัวถูกสร้างมาจากจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ร่วมกัน (Schupp และคณะ, 1999; Proksch และคณะ, 2002) การวิจัยค้นคว้าสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการเป็นยารักษาโรคและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารอย่างมากมาย ส่วนใหญ่เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสัตว์ ฟัน และจุลินทรีย์ แบคทีเรีย (แอคติโนมัยซีท ยีสต์ และรา บนพื้นดิน การพัฒนาและการค้นพบผลิตภัณฑ์ใหม่ลดลงไปเรื่อยๆ เมื่อเทียบกับการเพิ่มขึ้นและการเปลี่ยนแปลงของโรค เกิดโรคอุบัติใหม่ต่างๆ ประกอบกับการดื้อยาของโรคทำให้เกิดภาวะคุกคามจนถึงแก่ชีวิตต่อคนไทยและประชากรโลก โดยเฉพาะโรคมะเร็ง โรคติดเชื้อรุนแรง (เช่น มาลาเรีย) และโรคเอดส์ นอกจากนี้สุขภาพของประชากรโลกยังถูกคุกคามด้วยโรคต่างๆ เช่น โรคติดเชื้อ โรคไขข้ออักเสบ ตลอดจนความแก่ที่เป็นไปตามธรรมชาติและแก่ก่อนวัยเนื่องจากสภาวะแวดล้อม นักวิทยาศาสตร์ในหลายประเทศจึงมีความพยายามที่จะค้นหาสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากแหล่งใหม่ ก็คือมหาสมุทรจะเป็นแหล่งของผลิตภัณฑ์ใหม่ที่ยิ่งใหญ่ เนื่องจากความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตในทะเลโดยนักวิทยาศาสตร์ประมาณการว่าสิ่งมีชีวิตขนาดใหญ่มีมากถึง 5 แสน ถึง 30 ล้านชนิด อีกทั้งจุลินทรีย์ที่ยังไม่สามารถประมาณการได้ ทำให้ในช่วงหลายทศวรรษ ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1950 ที่

ผ่านมา นักวิทยาศาสตร์ทั่วโลกจึงได้พยายามศึกษาเพื่อหาสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ด้วยาใหม่ๆจากสิ่งมีชีวิตในทะเล

กลุ่มสิ่งมีชีวิตที่พบว่าเป็นแหล่งของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมากที่สุดคือ ฟองน้ำ จำนวนหนึ่งในสามของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเลจำนวนกว่า 10,000 สารประกอบได้มาจากฟองน้ำ ซึ่งแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพมีหลายหลายได้แก่ antiinflammatory, antifeedant, antimicrobial, cytotoxic, anticancer, antioxidant, antiviral, enzyme-inhibitory, immunosuppressive ichthyotoxic ฯลฯ นักวิทยาศาสตร์ทั่วโลกตระหนักดีว่าฟองน้ำและสิ่งมีชีวิตในทะเล เป็นแหล่งของสารประกอบธรรมชาติที่ยิ่งใหญ่และแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าจะนำมาผลิตด้วยาได้ แต่มักจะประสบปัญหาในการพัฒนา เนื่องจากการเก็บฟองน้ำและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง ตลอดจนการเพาะเลี้ยงให้ได้จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น ซึ่งนักวิทยาศาสตร์สามารถนำไปพัฒนาเป็นด้วยาโดยใช้สารประกอบที่สกัดได้เป็นสารต้นแบบในการสังเคราะห์ด้วยา นอกจากนี้มีการค้นพบอีกแนวทางหนึ่งเมื่อเร็วๆนี้คือ จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง ทั้งในแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกันกับเจ้าบ้าน หรืออยู่แบบให้ประโยชน์กับเจ้าบ้าน ตลอดจนสิ่งแวดล้อมในทะเลไม่ว่าจะเป็นน้ำทะเล หรือตะกอนดินก็มีจุลินทรีย์อาศัยอยู่

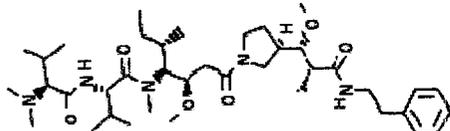
ฟองน้ำทะเลเป็นสัตว์ทะเลไม่มีกระดูกสันหลัง แบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ตามการจำแนกชนิด กลุ่ม demosponges เป็นกลุ่มที่มีความหลากหลายทางชีวภาพมากที่สุด ประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ของฟองน้ำทั้งหมด และคาดว่ายังไม่ได้มีการจำแนกชนิดหรือค้นพบอีกถึง 10,000 ชนิด โดยจำแนกออกเป็น 13 orders 71 families 507 สกุล ในจำนวนนี้เป็นฟองน้ำทะเล 481 สกุล และฟองน้ำน้ำจืดอีก 26 สกุล ดังนั้นฟองน้ำทะเลจึงเป็นสัตว์ทะเลกลุ่มหนึ่งที่มีความหลากหลายสูงกลุ่มหนึ่ง ฟองน้ำเป็นแหล่งของสารสกัดผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เนื่องจากฟองน้ำเป็นสัตว์ที่เกาะติดอยู่กับที่ (sessile animals) ทำให้ถูกรบกวนได้โดยง่าย ฟองน้ำจึงจำเป็นต้องหาทางในการป้องกันตัวเอง ระบบที่ได้ผลคืออย่างหนึ่ง ได้แก่ การสร้างสารเคมีเพื่อป้องกันตัวจากศัตรู จึงก่อให้เกิดความหลากหลายของสารสกัดทางธรรมชาติที่อาจจะส่งผลต่อการใช้ประโยชน์ของมนุษย์ ประเทศไทยจัดอยู่ในเขต Indo-Malayan ซึ่งเป็นเขตชีวภูมิศาสตร์ย่อยของเขต Indo-west Pacific เขตนี้ถือได้ว่าเป็นจุดศูนย์กลางการแพร่กระจายของสัตว์ทะเลทั้งหลายในโลกนี้ ฟองน้ำทะเลในเขตชีวภูมิศาสตร์ย่อยนี้น่าจะมีไม่ต่ำกว่า 1,200 ชนิด สำหรับการศึกษาชนิดของฟองน้ำในประเทศไทย ยังไม่ได้มีผู้ทำการศึกษามากนัก ฟองน้ำทะเลมีความหลากหลายทางชีวภาพสูงในประเทศไทย รวมทั้งยังมีบทบาทสำคัญต่อระบบนิเวศทางทะเล และเป็นแหล่งจุลินทรีย์เพื่อใช้ผลิตสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติด้วยาและอาหารเสริมที่สำคัญ จากการสำรวจข้อมูลเบื้องต้นพบว่าบริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทยตอนกลางหลายพื้นที่ยังไม่ได้มีการสำรวจฟองน้ำทะเล ซึ่งบริเวณนี้คาดว่าจะมีความหลากหลายทางชนิดของฟองน้ำทะเลค่อนข้างสูงและน่าจะมีการพบฟองน้ำชนิดใหม่เพิ่มขึ้น เนื่องจากเป็นพื้นที่ที่มีการสำรวจและการรบกวนจากกิจกรรมของมนุษย์มีค่อนข้างน้อย แต่มีความหลากหลายของถิ่นอาศัยอยู่มาก ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องทำการศึกษาความหลากหลายของชนิดฟองน้ำทะเลที่อาศัย

อยู่ในบริเวณนี้เพื่อรวบรวมองค์ความรู้ความหลากหลายทางชีวภาพของฟองน้ำทะเล และการวิจัยที่ต่อยอดขึ้นไปในการใช้ประโยชน์จากฟองน้ำเป็นแหล่งสะสมจุลินทรีย์ในทะเล และนำจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำมาใช้ประโยชน์ทางสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ยารักษาโรค และการพัฒนาผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์อื่นๆ

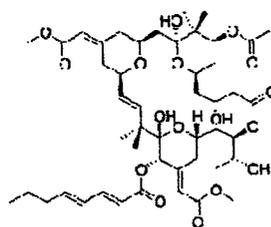
จากการศึกษานำมาสู่การค้นพบความสัมพันธ์ระหว่างเคโมออสโตรฟิคแบคทีเรีย และสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง การค้นพบนี้ได้ชี้ไปสู่ความสำคัญของแบคทีเรียต่อสารอาหาร การแพร่กระจาย และการผลิตของสิ่งมีชีวิต (host organisms) และสังคมของมัน (Canvannah, และคณะ 1983) ได้นำไปสู่การศึกษายุทธศาสตร์ของการแยกและการค้นพบสารประกอบใหม่ ที่ประสบความสำเร็จของโปรแกรมผลิตภัณฑ์ธรรมชาติถูกพัฒนาไปสู่จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่กับสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อมในทะเล เมื่อศึกษาฟองน้ำเพิ่มเติมพบว่าภายในประกอบด้วยแบคทีเรียหลายชนิดเป็นปริมาณถึง 40% ของสิ่งมีชีวิตที่ตรวจพบ (Vacelet, 1975; Wilkinson, 1978 a;b; Berthold, และคณะ 1982) Xin-Qing Zhao (2011) ได้รายงานถึงศักยภาพของจุลินทรีย์ที่เป็นแหล่งของสารตัวยาที่จะนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ที่อยู่ในระหว่างการทดสอบทางคลินิกดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากจุลินทรีย์ทะเลที่อยู่ในระหว่างการทดลองใช้รักษาทางการแพทย์

Metabolites	Source	Activity	Clinical status
Soblidotin(TZT1027) Peptide	Synthetic derivative of dolastatin 10 Isolated from marine cyanobacterium <i>Symploca</i> sp. VP642	Anticancer	Phase III
Plinabulin	Synthetic analog of halimide isolated from the marine fungus <i>Aspergillus</i> sp. CNC-139	Anticancer	Phase II
Bryostatin 1	Identified from bryozoan and also marine symbiotic bacteria <i>Candidatus Endobuluga sertula</i>	Anticancer Anti-Alzheimer	Phase I
Marizomib(salinosporamide A, NPI-0052): Beta-lactone-gamma lactam	Marine actinobacteria <i>Salinispora arnicola</i>	Anticancer	Phase I
Compound 4 (curacin A synthetic derivative	Curacin A was isolated from the marine cyanobacterium <i>Lygbya majuscula</i>	Anticancer	Preclinical



Soblidotin(TZT1027) Peptide



Bryostatin 1

สารปฏิชีวนะที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นในช่วงที่เริ่มหยุดการเจริญจะมีประโยชน์ เพราะยับยั้งการสร้างโมเลกุลขนาดใหญ่บางชนิดในเซลล์ได้ จึงช่วยรักษาพลังงานส่วนหนึ่งไว้ นอกจากนี้ถ้าอยู่ร่วมกับจุลินทรีย์อื่นในสภาวะแวดล้อมที่ต้องแก่งแย่งอาหาร สารที่สร้างขึ้นนี้จะช่วยยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ที่อยู่รอบข้างบางชนิดลงได้ ประโยชน์ของยาปฏิชีวนะที่คัดแปลงมาจากสารเมตาบอไลต์ที่จุลินทรีย์บางชนิดผลิตขึ้นนั้นจะมีอาการแพ้ยาหรือเป็นอันตรายต่อมนุษย์น้อยมาก สารเมตาบอไลต์เหล่านี้มีประโยชน์ในด้านต่างๆ มากมายทั้งด้านอุปโภค บริโภค และอุตสาหกรรม ในการผลิตยาปฏิชีวนะที่จะนำมาใช้ได้นั้น จำเป็นต้องมีคุณสมบัติหลายประการ เช่น ไม่ควรมีพิษ ไม่ตกตะกอนโปรตีนในซีรัม ไม่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกตัว ไม่ควรมีฤทธิ์ข้างเคียงหรือมีน้อยที่สุด ในปัจจุบันยังไม่มียาปฏิชีวนะใดที่มีคุณสมบัติดีทุกด้าน ทำให้งานการค้นหายาใหม่ๆ ยังมีความจำเป็น จากการค้นคว้าจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาบทบาทของแบคทีเรียหรือแอคติโนมัยซีทที่ผลิตสารปฏิชีวนะที่แยกได้จากสิ่งมีชีวิตที่ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเล และคุณประโยชน์ทางการแพทย์ของสารที่ต่อต้านจุลินทรีย์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำ ตลอดจนแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่อาศัยอยู่ในทะเลเพื่อใช้ในการพัฒนาปรับปรุงทำเป็นยารักษาโรคในชั้นสูงต่อไป

สำหรับสารออกฤทธิ์ที่ได้จากธรรมชาตินั้นสิ่งที่สำคัญคือ ก่อนทำการตรวจสอบชนิดของสารว่าเป็นสารกลุ่มไหน มีโครงสร้างทางเคมีอย่างไร ต้องการสารสำหรับการทดสอบเป็นปริมาณมากพอสำหรับการทำให้สารบริสุทธิ์ สำหรับการนำมาวิเคราะห์โครงสร้างและน้ำหนักโมเลกุล แอคติโนมัยซีทแต่ละชนิดส่วนมากสร้างสารได้หลายชนิด จึงต้องนำสารแต่ละองค์ประกอบที่แยกได้จากสารสกัดหยาบมาทดสอบว่า องค์ประกอบใดคือสารที่ออกฤทธิ์ และออกฤทธิ์กับอะไรบ้าง จุลินทรีย์ หรือเซลล์มะเร็ง สารแต่ละองค์ประกอบที่ได้ต้องมากพอสำหรับการทดสอบการออกฤทธิ์แต่ละชนิด เนื่องจากในแต่ละขั้นตอนนั้นก็จะมียาหนักมวลสารที่หายไปในแต่ละขบวนการของการวิเคราะห์ จึงต้องการเทคโนโลยีในการเลี้ยงเซลล์เพื่อการสร้างสารออกฤทธิ์ให้ได้ปริมาณมากพอสำหรับการวิเคราะห์ในแต่ละขั้นตอน

เนื่องจากเซลล์แบคทีเรียมีขนาดเล็ก ดังนั้นสารเมตาโบไลต์ที่สร้างขึ้นภายในเซลล์แต่ละเซลล์จึงมีปริมาณน้อยตามขนาดเซลล์ การจะวิเคราะห์โครงสร้างสารแต่ละชนิดอาจต้องใช้สารประมาณ 1-3 กรัม ขึ้นกับความสามารถของเครื่องมือวิเคราะห์ที่ใช้ นั้นหมายความว่าต้องใช้ปริมาณสารสกัดหยาบต่อชนิดเชื้อ ที่อาจมากถึง 2-10 ลิ้นเท่าของน้ำหนักเซลล์โดยประมาณหากจะคิดว่า 1 เซลล์ หนัก 1  $\mu\text{g}$  ในแบคทีเรียอาจต้องเลี้ยงเชื้อ ถึง 20-25 ลิตร เพื่อให้ได้สารสกัดหยาบ 1 กรัม ในเชื้อบางชนิดสำหรับมารีนีสต์เป็นราในกลุ่ม Ascomycetes หรือบางชนิดอยู่ในกลุ่ม Basidiomycetes ซึ่งมีคุณค่าอาหารภายในเซลล์ และองค์ประกอบของเซลล์สูง มีทั้งโปรตีน กรดไขมันไม่อิ่มตัว วิตามินบีหลายชนิด นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ยีสต์ยังประกอบไปด้วยคาร์โบไฮเดรต กรดนิวคลีอิก รวมทั้งไขมันอื่น ๆ ดังนั้นจึงเหมาะสมที่จะใช้สำหรับเป็นอาหารเสริม และในการเลี้ยงเซลล์ยีสต์นั้นใช้เวลาสั้น และสามารถเลี้ยงได้ โดยใช้วัตถุดิบที่อาจหาได้ง่าย เช่น กากน้ำตาล มันสำปะหลัง หางนม (Whey) มารีนีสต์หลายชนิดมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง เช่น (Polyunsaturated fatty acids, PUFAs) ซึ่งกรดไขมันเหล่านี้ เป็นกรด

ไขมันที่มีบทบาทสำคัญต่อสุขภาพของมนุษย์ โดยถูกนำมาใช้เป็นอาหารเสริม และใช้ในทางการแพทย์ โดยเฉพาะกลุ่มไขมัน โอเมกา 3 ควบคุมการทำงานในร่างกายรวมทั้งความดันโลหิต ป้องกันเลือดแข็งตัว การทำงานของระบบสมองและประสาท รวมทั้งยังนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารสัตว์ ปัจจุบันเรามีการผลิตยีสต์ทั้งที่เป็นอาหารคนและอาหารสัตว์ ซึ่งผลิตได้โดยใช้ยีสต์หลายชนิด เช่น *Candida utilis* หรือ *Saccharomyces* sp. การใช้ยีสต์ในอาหารของคนนั้นมักใช้เพื่อปรุงแต่ง เพิ่มกลิ่นรสของอาหาร เช่น ใช้เติมในอาหารประเภทซูป หรืออาจใช้เป็นสารสกัดจากยีสต์ใช้ทาขนมอบ ส่วนการใช้ยีสต์ในอาหารสัตว์นั้นส่วนใหญ่ใช้ในรูปอาหารเสริม โปรตีน และหากจะใช้เป็นอาหารของสัตว์ทะเลวัยอ่อน จะเลือกยีสต์ที่แยกได้จากทะเล หรือมารีนยีสต์ ซึ่งเป็นยีสต์ที่มีกรดไขมันที่มี PUFA สูง และไม่ทำให้คุณภาพน้ำเสีย (เหมือนการใช้ยีสต์ทำงานมบ่ง) เพื่อให้สัตว์น้ำวัยอ่อนเจริญเติบโตได้ดี เพื่อเป็นแหล่งของอาหารที่มีคุณภาพ ประโยชน์และมีคุณค่าอาหารสูงต่อสัตว์ทะเลที่เป็นห่วงโซ่อาหารลำดับต่อไป และเช่นเดียวกันการใช้ประโยชน์เพื่อการนี้ก็ต้องผลิตยีสต์เพื่อให้ได้เซลล์เป็นปริมาณมากอย่างเพียงพอ

จากแหล่งของตัวอย่างทั้งฟองน้ำทะเลและจุลินทรีย์ทะเลที่น่าสนใจ คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพบางประการ เช่น ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เป็นต้น นอกจากนี้มีการศึกษาองค์ประกอบของอาหาร และองค์ประกอบกรดไขมันในตัวอย่างเชื้อยีสต์ หรือแบคทีเรียทะเล/ แอคติโนมัยซีท สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติประมาณ 32,500 ชนิดมาจากแหล่งจุลินทรีย์ (Antibase data base) ซึ่งรวมถึงสารที่ได้จากจุลินทรีย์ทะเลด้วยประมาณ 100 ชนิด (Singh and Pelaez, 2008) และมีสารต้านจุลินทรีย์หลายตัวได้มาจาก marine actinomycetes (Batzl, 2008) ในปัจจุบันสองในสามของยาปฏิชีวนะจากธรรมชาติได้มาจากแบคทีเรียทะเล actinomycetes ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นแหล่งทางเลือกของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ อีกด้วย แอคติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียแกรมบวกมีลักษณะเป็นเส้นสาย พบมีการแพร่กระจายอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม แอคติโนมัยซีทมีวงจรชีวิตที่ซับซ้อนอยู่ในไฟลัม *Actinobacteria* แอคติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการสร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่หลากหลายชนิด และสารหลายชนิดที่ถูกสร้างขึ้นสามารถพัฒนาเป็นยาปฏิชีวนะที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และเซลล์มะเร็ง ซึ่งรวมทั้งสารที่เป็นแอนติไบโอติกที่มีสีด้วย สารสีที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายๆ ชนิดถูกสร้างมาจากแบคทีเรียทะเลหลายชนิด ได้แก่ *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Pseudoalteromonas*, *Bacillus*, *Vibrio*, และ *Cytophaga* ซึ่งแยกได้จากดินตะกอน น้ำทะเล สาหร่าย และสัตว์ทะเล จากแอคติโนมัยซีทหลายๆชนิดพบว่า *Streptomyces*, *Saccharopolyspora*, *Amycolatopsis*, *Micromonospora* และ *Actinoplanes* เป็นผู้ผลิตหลักของสาร biomolecule ที่สำคัญทางการค้า หลายๆ รายงานพบว่าสารต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรามาจาก marine actinomycetes ทั้งที่อยู่ในดินตะกอนและที่อาศัยร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ เช่น ฟองน้ำทะเล (Dharmaraj & Sumantha, 2009) อย่างไรก็ตามสารรงควัตถุที่ได้จากแบคทีเรียทะเลในประเทศไทยยังมีรายงานอยู่ในจำนวนไม่มากนัก และจากการที่แบคทีเรียจะผลิตสารมาเพื่อความอยู่รอดและป้องกันตัวเองในแต่ละสภาวะนั้น ทำให้คณะผู้วิจัยสนใจทำการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียที่แยกจากดินตะกอน และฟองน้ำทะเลจากอ่าวไทย

จุลินทรีย์ถูกนำมาใช้เป็นตัวกลางในการผลิตสารที่จำเป็นบางอย่างที่เกี่ยวข้องกับทางการแพทย์ และการรักษาโรค ด้านอุตสาหกรรม ด้านการเกษตร เป็นต้น ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในทางการแพทย์ เช่น ยีสต์ *Saccharomyces Cerevisiae* และแบคทีเรีย *E.coli* ใช้ผลิตสารอินซูลินซึ่งเป็นสารที่มีความสำคัญในการควบคุมปริมาณน้ำตาลในเลือด แบคทีเรีย *E.coli* ใช้ในการผลิตฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโตในคน ยีสต์มีการศึกษาถึงคุณสมบัติพบว่าเป็นจุลินทรีย์ที่มีปริมาณโปรตีนในเซลล์สูงและยังประกอบไปด้วยไขมัน วิตามินแร่ธาตุหลายชนิด ยีสต์ต้องการแหล่งที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูง ที่ทำให้ยีสต์เจริญเติบโตได้รวดเร็ว สามารถให้จำนวนปริมาณเซลล์ได้จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น เนื่องจากยีสต์ไม่กลายพันธุ์ มีความคงตัวทางพันธุกรรมสูงและไม่ก่อให้เกิดโรค (สาวิตรี ลิมทอง, 2549) ทำให้ยีสต์มีความสำคัญทางด้านอุตสาหกรรมในปัจจุบันเป็นอย่างมากในการเป็นตัวกลางในการผลิต โดยยีสต์จะเปลี่ยนวัตถุดิบให้เป็นผลิตภัณฑ์ชนิดใหม่ นอกจากนี้ยีสต์ยังมีปริมาณกรดไขมันที่เป็นประโยชน์มากสำหรับมนุษย์และสัตว์ รวมทั้งสัตว์น้ำ ดังนั้น จึงมีการศึกษาเพื่อหาแนวทางในการเพิ่มปริมาณกรดไขมันจากยีสต์ให้สูงขึ้น จากคุณสมบัติของยีสต์ ที่มีช่วงชีวิตสั้น และมีการใช้พื้นที่ในการเพาะเลี้ยงน้อย สิ่งที่สำคัญคือ ยีสต์สามารถผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีองค์ประกอบคล้ายคลึงกันกับพืชเช่น กรดไขมันโอเลอิก (Oleic Acid, C18:1n9) และกรดไขมันไลโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2n6) ซึ่งเป็นกรดไขมันจำเป็นที่ร่างกายมนุษย์เรานั้นไม่สามารถสร้างขึ้นเองได้ (สมถวิล จิตรควร และคณะ, 2551)

ปัจจุบันพบว่ามีจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถนำมาใช้เป็นอาหารสำหรับสัตว์ และยีสต์ก็เป็นจุลินทรีย์อีกชนิดที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากยีสต์บางชนิดมีคุณสมบัติของการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และบางชนิดเป็นแหล่งสารอาหาร โปรตีน ไขมัน และวิตามิน (Kutty และ Phillip, 2008) การนำยีสต์มาเป็นส่วนผสมของอาหารสัตว์ โดยใช้เป็นแหล่งโปรตีนที่เราเรียกว่า โปรตีนเซลล์เดี่ยว (single cell protein) หรือใช้เป็นโปรไบโอติก (probiotic) ช่วยเสริมสุขภาพให้กับสัตว์เลี้ยง ทำให้สัตว์แข็งแรง และมีภูมิต้านทานโรคสูงขึ้น ยีสต์สามารถเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ในปริมาณมากโดยใช้แหล่งคาร์บอนได้หลากหลายชนิดอย่างรวดเร็ว ทำให้มีต้นทุนในการผลิตต่ำ วัสดุที่เหลือทิ้งจากการเกษตร เช่น กากชานอ้อยนับว่าเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญและการสร้างพลังงานที่ดี ทั้งยังลดต้นทุนและเป็นการใช้ทรัพยากรอย่างคุ้มค่า ในการนำยีสต์ทะเลหรือปรสิติที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันมาใช้เสริมในอาหารสัตว์น้ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำมาผลิตอาหารโดยวิธีการตรึงเซลล์ การใช้ประโยชน์จากเทคนิควิธีการตรึงโดยทั่วไป เพื่อตรึงเซลล์หรือสารปริมาณน้อยที่สำคัญไว้ภายในให้อยู่ในบริเวณที่ต้องการและไม่สูญเสียความสามารถในการเป็นตัวเร่ง สามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้หลายครั้ง หรือใช้ได้อย่างต่อเนื่องในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ มีความพยายามใช้เทคนิคการตรึงในการผลิตอาหารสำเร็จรูป เพื่อลดปริมาณการใช้อาหารมีชีวิตในการอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อนในรูปแบบต่างๆ กระบวนการที่จะตรึงสารอาหารไว้ภายในให้ได้มากที่สุดและให้ถูกปล่อยออกมาในระยะเวลาที่เหมาะสม รวมถึงการนำวัสดุที่ใช้เป็นอาหารสัตว์น้ำมาทำการตรึงจะต้องมีการศึกษาทั้งเทคนิคในการตรึงและวัสดุที่จะนำมาตรึง

### วัตถุประสงค์หลักของแผนงานวิจัย

1. เพื่อค้นหาและพัฒนาสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ พัฒนาด้านผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ คือ กรดไขมัน และชีวรงควัตถุ พัฒนาการผลิตวัคซีนสำหรับสัตว์น้ำ ตลอดจนการพัฒนาเพิ่มผลผลิตเซลล์จุลินทรีย์
2. เพื่อดำเนินการสนับสนุนติดตาม โครงการวิจัยภายใต้แผนงานวิจัยฯ ให้สามารถดำเนินงานไปตามวัตถุประสงค์ รวมถึงการเผยแพร่ผลงาน และถ่ายทอดองค์ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยไปสู่กลุ่มเป้าหมาย

### วัตถุประสงค์รอง

1. เพื่อศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของฟองน้ำและแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมฟองน้ำ ตลอดจนจุลินทรีย์อื่นๆ เช่น แอคติโนมัยซีทีส และยีสต์ จากสภาพแวดล้อมทางทะเลในน้ำและดินตะกอน
2. เพื่อศึกษาและตรวจหาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ คือ กรดไขมัน และชีวรงควัตถุ
3. เพื่อพัฒนาเครือข่ายห้องปฏิบัติการเฉพาะทางในการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ชีวรงควัตถุ และผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจากทรัพยากรชีวภาพจากทะเล
4. เพื่อถ่ายทอดองค์ความรู้ในการศึกษาและแนวทางการผลิตผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเล

### เป้าหมายเชิงยุทธศาสตร์ของแผนงานวิจัย

1. พัฒนาองค์ความรู้ในการพัฒนาบนฐานความหลากหลายทางชีวภาพและการสร้างความมั่นคงของฐานทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม
2. พัฒนาการบริหารจัดการและการพัฒนาคุณค่าความหลากหลายทางชีวภาพการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนและเพิ่มมูลค่าความหลากหลายทางชีวภาพ
3. การนำเทคโนโลยีใหม่เพื่ออุตสาหกรรม การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีด้านอาหารและยา เพื่อเพิ่มคุณค่าและมูลค่าของผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพและความงาม
4. การผลิตวัคซีนและอาหารเสริมสำหรับสัตว์น้ำด้วยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากจุลินทรีย์ทะเลทดแทนการใช้สารเคมี
5. สามารถเผยแพร่ผลงาน และถ่ายทอดองค์ความรู้ วิจัยและพัฒนาสารตัวยาตั้งต้นไปใช้ประโยชน์ ผ่านการฝึกอบรม สัมมนาวิชาการและในรูปแบบของเอกสารตีพิมพ์ระดับชาติและนานาชาติ

### เป้าหมายของผลผลิต (output) และตัวชี้วัด

เป้าหมายของผลผลิตของชุด โครงการในปีที่ 1 โดยมีผลผลิตและตัวชี้วัดเป็น ข้อมูลเบื้องต้นทางด้าน การค้นหาสารออกฤทธิ์ ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร สารสีชีวรงควัตถุ และการตีพิมพ์และเผยแพร่

ผลงานวิจัยระดับชาติและระดับนานาชาติ ตลอดจนการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการและแลกเปลี่ยนความรู้ทางวิชาการ สร้างนักวิจัยรุ่นใหม่ที่มีความชำนาญเฉพาะทาง

1. การเพิ่มความสามารถและพัฒนาองค์ความรู้ในการค้นหาประโยชน์ทางเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทรัพยากรชีวภาพจุลินทรีย์จากทะเลที่ยั่งยืน
2. การตรวจหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ สารสีชีวรงควัตถุ และผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร จากฟองน้ำ ยีสต์ และแบคทีเรียที่อาศัยอยู่เช่น สารต้านอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ กรดไขมัน รงควัตถุชีวภาพ
3. การถ่ายทอดองค์ความรู้จากวิจัยและพัฒนา ไปสู่เยาวชนและประชาชนผู้สนใจ

**เป้าหมายของผลลัพธ์ (outcome) และตัวชี้วัด**

เป้าหมายของผลลัพธ์และตัวชี้วัดของชุดโครงการคือ พบสารตัวยาคั้งต้นที่มีฤทธิ์ชีวภาพ สารสีชีวรงควัตถุที่ใช้ประโยชน์ ได้ต้นแบบผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ได้วัคซีน และอาหารเสริมสำหรับสัตว์น้ำ นำไปพัฒนาหรือสังเคราะห์ใช้ประโยชน์ ผ่านเครือข่ายการวิจัย หน่วยงานและองค์กรต่างๆ ตลอดจนถ่ายทอดองค์ความรู้ผ่านการฝึกอบรม สัมมนาวิชาการและในรูปของเอกสารตีพิมพ์ระดับชาติและระดับนานาชาติ และพัฒนาศักยภาพของคุณค่าความหลากหลายทางชีวภาพ โดยเป้าหมายในปีที่ 1

1. สร้างเครือข่ายการศึกษาทางด้านผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ โดยใช้ทรัพยากรที่มีอยู่ในแต่ละหน่วยงานให้เกิดประโยชน์สูงสุด
2. สร้างนักวิจัยรุ่นใหม่ บุคลากรในระดับโรงเรียนและอุดมศึกษาที่มีความชำนาญในการศึกษาวิจัยการใช้ประโยชน์จากทรัพยากรธรรมชาติทางทะเลควบคู่กับการอนุรักษ์อย่างยั่งยืน

**กรอบแนวความคิดของแผนงานวิจัย**

จากการที่จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ร่วมกัน บางพวกอยู่อย่างเสริมกัน (Benevolent interaction) ขณะที่บางพวกอาจอยู่อย่างต่อต้านกัน (Antagonistic interaction) ส่วนอีกหลายพวกอยู่อย่างอิสระไม่เกี่ยวข้องกัน การที่จุลินทรีย์บางสายพันธุ์สามารถสร้างสารที่ด้านการเจริญของจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่นๆ ได้ เพื่อการแก่งแย่งอาหารและที่อยู่อาศัย เพื่อการดำรงชีวิต ทำให้มนุษย์นำปรากฏการณ์นี้มาใช้ประโยชน์ สารปฏิชีวนะที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นในช่วงที่เริ่มหยุดการเจริญจะมีประโยชน์ เพราะยับยั้งการสร้างโมเลกุลขนาดใหญ่บางชนิดในเซลล์ได้จึงช่วยรักษาพลังงานส่วนหนึ่งไว้ นอกจากนี้ถ้าอยู่ร่วมกับจุลินทรีย์อื่นในสภาวะแวดล้อมที่ต้องแก่งแย่งอาหาร สารที่สร้างขึ้นนี้จะช่วยยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ที่อยู่รอบข้างบางชนิดลงได้ ประโยชน์ของยาปฏิชีวนะที่คิดแปลงมาจากสารเมตาบอไลต์ที่จุลินทรีย์บางชนิดผลิตขึ้นนั้น จะมีอาการแพ้ยาหรือเป็นอันตรายต่อมนุษย์น้อยมาก สารเมตาบอไลต์เหล่านี้มีประโยชน์ในด้านต่างๆ มากมายทั้งด้านอุปโภค บริโภค และอุตสาหกรรม โดยเฉพาะอย่างยิ่งทางการแพทย์อาจใช้รักษาโรค

ติดเชื้อ หรือรักษาโรคอื่น เช่น เพื่อรักษาโรคมะเร็ง หรือใช้ในงานวิจัยเพราะมีพิษสูงเกินกว่าที่จะใช้ในร่างกาย (มาลิน, 2540) ในการผลิตยาปฏิชีวนะที่จะนำมาใช้ได้นั้น จำเป็นต้องมีคุณสมบัติหลายประการ เช่น ไม่ควรมีพิษ ไม่ตกตะกอน โปรตีนในซีรัม ไม่ทำให้เกิดเลือดแดงแตกตัว ไม่ควรมีฤทธิ์ข้างเคียงหรือมีน้อยที่สุด ในปัจจุบันยังไม่มียาปฏิชีวนะใดที่มีคุณสมบัติทุกด้าน ทำให้งานการค้นหายาใหม่ๆยังมีความจำเป็น อย่างไรก็ตามการผลิตยาปฏิชีวนะจากจุลินทรีย์มีข้อดี คือ 1. สามารถปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตให้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตได้ 2. สามารถปรับปรุงสภาพแวดล้อมในการเจริญของจุลินทรีย์ 3. สามารถปรับปรุงและควบคุมสภาวะในการผลิตสารของจุลินทรีย์ เป็นต้น (มาลิน, 2540)

ตัวยาใหม่จากทะเลกว่า 10 ชนิด ได้เข้าสู่การทดลองใช้จริงทางการแพทย์ในชั้นคลินิก มีหลายบริษัทสนใจซึ่งมีกิจกรรมหลักจะเน้นไปทางวิจัยพัฒนา การจัดหาวัตถุดิบ และส่วนผสมใหม่จากทะเลอยู่บนหลักการของการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนของทรัพยากรธรรมชาติทางทะเล เครือข่ายการวิจัยของสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล ได้แสดงผลให้เห็นถึงศักยภาพของการสร้างนวัตกรรมทางเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติของทรัพยากรชีวภาพโดยเฉพาะอย่างยิ่ง ฟองน้ำ และแบคทีเรียทะเลในอ่าวไทย อาทิเช่น Kijjoa และคณะ (2007) ได้รายงานถึงศักยภาพของสารประกอบที่สกัดจากฟองน้ำจากอ่าวไทยแสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดี และเมื่อเร็ว ๆ นี้ Watanadilok, R. และคณะ (2007) ค้นพบสารประกอบ 2 ชนิดแยกได้จากฟองน้ำที่เก็บจากอ่าวไทยแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราและจุลินทรีย์อื่นได้ดีเช่นกัน นอกจากนี้ Rungprom และคณะ (2008) ได้รายงานถึงการค้นพบสารไซคลิกเปปไทด์ ชนิดใหม่ที่สกัดได้จากแบคทีเรียทะเล *Pseudoalteromonas* sp. ที่คัดแยกจากฟองน้ำ *Halisarca ectofibrosa* ที่เก็บจากอ่าวไทยเช่นกัน

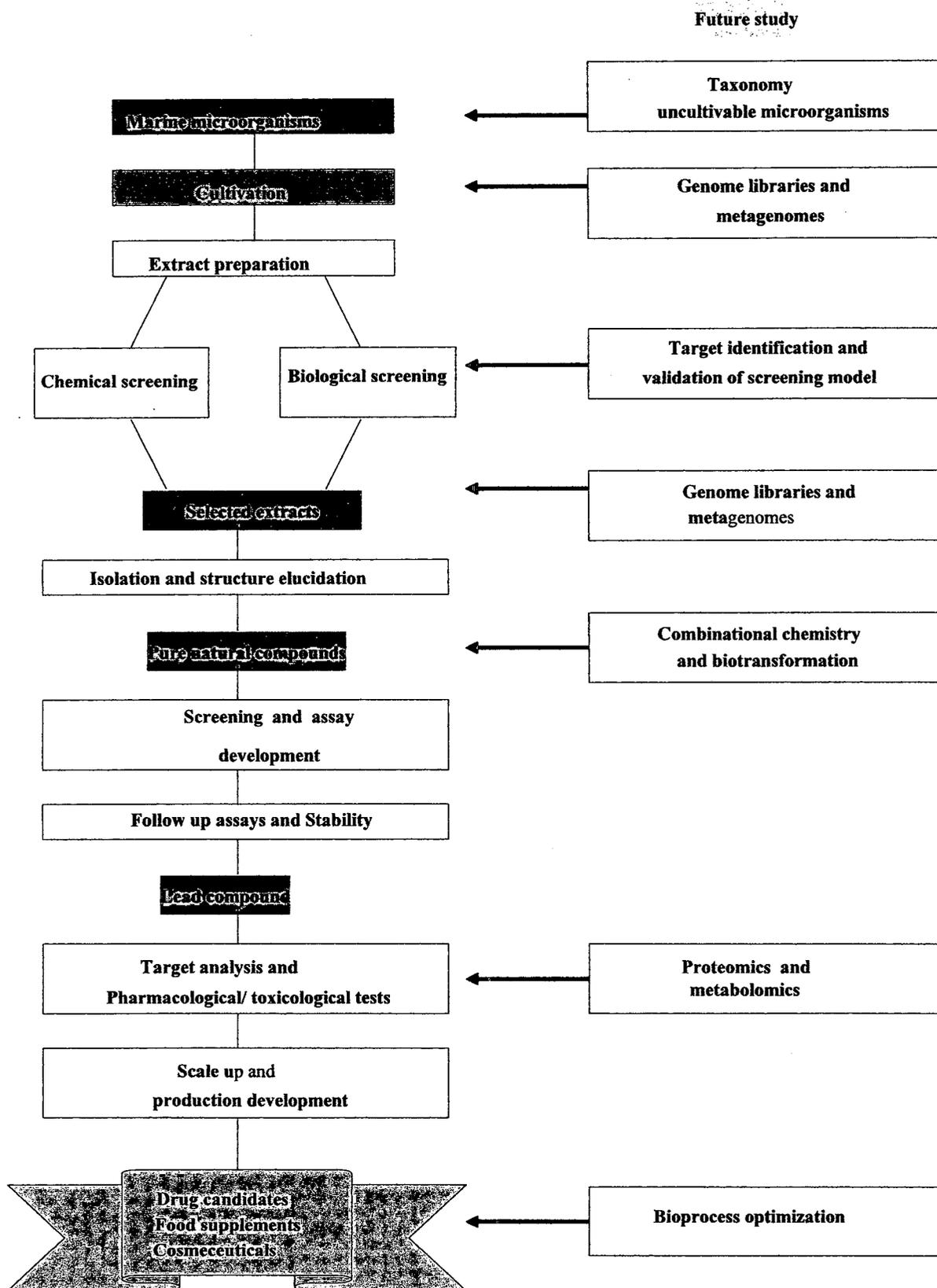
จากการศึกษาสารปฏิชีวนะในประเทศไทยส่วนใหญ่ที่ผ่านมาเป็นการศึกษาในกลุ่มของสารผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติเป็นส่วนใหญ่ มีเป็นส่วนน้อยที่ศึกษาสารกลุ่มชีวโมเลกุลที่เป็นโปรตีน ไกลโคโปรตีน โพลีแซคคาไรด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคทั้งในคน พืช และสัตว์ (นันทวัน และคณะ 2544; และจากบทความของสตาพร (2544) สรุปว่ามีการศึกษาการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียของสาหร่ายคลอเรลลา (*Chlorella* sp.) พบว่าคลอเรลลาสามารถสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในกุ้งกุลาดำ เช่น *Vibrio harveyi*, *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio penaeicida* ปี 1998 มีรายงานว่าแบคทีเรียในสกุลลิวรีโอที่พบทั่วไปในบ่ออนุบาลลูกกุ้งสามารถสร้างสารในการยับยั้งไวรัสที่ทำให้เกิดโรคในปลาได้

ดังนั้นเพื่อเป็นการศึกษาสารปฏิชีวนะจากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง ซึ่งชุดวิวัฒนาการ และคณะ (2541) ได้ศึกษาไว้ในส่วนของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่เน้นในกลุ่มของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติโดยใช้กระบวนการทางเคมี และพบแบคทีเรียจากทะเลหลายสายพันธุ์มีแนวโน้มสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในสัตว์น้ำได้คือ *Vibrio anguillarum* จึงน่าที่จะได้มีการทดลองสกัดสารและกระบวนการทดสอบสารที่ได้โดยวิธีทางชีวเคมีควบคู่กันไปกับการศึกษาที่ผ่านมาด้วย ซึ่งเป็นการใช้

วิธีการสกัดที่แตกต่างกันเพื่อให้ได้สารกลุ่มใหม่ที่เป็น โปรตีนหรือ ไกลโคโปรตีน แล้วทดสอบการออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์โดยใช้แบคทีเรียมาตรฐานและแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในสัตว์น้ำ อันจะทำให้ได้ข้อมูลใหม่หรือสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้นหรือมีคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ยับยั้งแตกต่างจากข้อมูลที่ผ่านมา

นอกจากนี้แบคทีเรียสามารถผลิตตรงควัดได้หลากหลาย ซึ่งรวมถึงแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในทะเลด้วย รงควัดนี้มีความสำคัญต่อสรีรวิทยาของเซลล์และการอยู่รอด สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเหล่านี้หลายตัวพบว่ามีคุณสมบัติเป็นยาต้านจุลชีพ ต้านมะเร็งและกดภูมิคุ้มกัน ส่วนใหญ่จุลินทรีย์ผลิตสารทุติยภูมิผ่านกลไก quorum sensing ซึ่งสารรงควัดเหล่านี้สามารถยับยั้งหรือฆ่าเชื้อแบคทีเรียและจุลินทรีย์อื่นๆ ได้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำๆ จากความหลากหลายของสารเหล่านี้และยังมีแนวโน้มที่ดีในการออกฤทธิ์ยับยั้งโรคต่างๆ ได้หลายโรค จึงมีบทบาทสำคัญทั้งในงานวิจัยทางการแพทย์และทางการเกษตร

ห่มผลการวิจัยจากโครงการนี้จะเป็นการวิจัยประยุกต์หาสารตัวยา ได้สารตั้งต้นและนำไปสู่การพัฒนาการรักษาโรคและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารต่างๆ ที่มีความเป็นไปได้สูง เป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับทรัพยากรชีวภาพจากทะเลที่มีอยู่ในประเทศ นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดความก้าวหน้าทางวิชาการในเรื่องการศึกษาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเลอย่างกว้างขวาง อีกทั้งส่งเสริมให้มีการค้นคว้าด้วยรักษาโรค ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารใหม่ๆ สารระสำคัญในเครื่องสำอาง จากการที่สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล ได้ทำการศึกษาวิจัยเรื่องผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากสิ่งมีชีวิตในทะเลมาอย่างต่อเนื่องนับตั้งแต่ปี 2529 เป็นต้นมา โดยในระยะแรกเน้นเฉพาะในเขตพื้นที่ชายฝั่งทะเลในบริเวณชายฝั่งทะเลตะวันออก เขตจังหวัดชลบุรี และจังหวัดระยอง และเน้นเฉพาะในเรื่องของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ สารปฏิชีวนะ และความเป็นพิษต่อเซลล์จากฟองน้ำและสาหร่ายทะเลต่อมาได้เพิ่มขอบเขตที่ศึกษาให้ครอบคลุมทั้งชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกและฝั่งอันดามัน และขยายขอบเขตการศึกษาในเรื่องของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วย เช่น สารยับยั้งเนื้องอก สารยับยั้งเซลล์มะเร็ง อีกทั้งแหล่งของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติใหม่โดยเฉพาะแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับสัตว์น้ำตามธรรมชาติ จึงน่าที่จะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการใช้จุลินทรีย์ที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมควบคุมหรือป้องกันโรคสัตว์น้ำที่เกิดจากจุลินทรีย์ด้วยเช่นกัน ประกอบกับช่วยลดปัญหาสารพิษตกค้าง ลดการใช้ยาและเคมีภัณฑ์ เพื่อศึกษาถึงศักยภาพของสิ่งมีชีวิตในทะเลและแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วม ศึกษาถึงความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตกับแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วม และปัจจัยต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าวซึ่งจะมีจะมีความสัมพันธ์กันอย่างมาก เพื่อเสริมสร้างศักยภาพของประเทศไทยในการพึ่งพาตนเองให้มีทางเลือกใหม่ในการ ลดการนำเข้าตัวยา เคมีภัณฑ์และสารปฏิชีวนะ โดยอาศัยการผลิตจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ จะสามารถบ่งชี้หรือเป็นแนวต่อการนำทรัพยากรและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในท้องถิ่นมาใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน



ภาพที่ 1 กรอบแนวความคิดของความสัมพันธ์การศึกษาวจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเล

## บททวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง

ฟองน้ำทะเลจัดเป็นสัตว์หลายเซลล์โบราณกลุ่มหนึ่งปรากฏขึ้นบนโลกเมื่อประมาณ 500 ล้านปีมาแล้ว ฟองน้ำทะเลในเขตร้อนมักจะมีหลากหลายทางชีวภาพสูง มีรูปทรงที่แปลกตาและสีสันที่สวยงาม สีของฟองน้ำจะมีความแตกต่างกันตั้งแต่สีดำไปจนถึงสีสด เช่น เขียว เหลือง ส้ม แดง หรือ ม่วง เป็นต้น นอกจากนี้ฟองน้ำยังเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยย่อย (Micro-habitat) ของสิ่งมีชีวิตอื่นๆ จึงเป็นสัตว์ที่มีคุณค่าทั้งทางด้านวิชาการและด้านการท่องเที่ยวทางธรรมชาติ ฟองน้ำสามารถพบได้ทั่วไปตามชายฝั่งทะเล ทั้งหาดหิน หาดทราย แหล่งหญ้าทะเลและแนวปะการัง ในช่วง 2-3 ทศวรรษที่ผ่านมา ฟองน้ำทะเลเริ่มเป็นสัตว์ที่มีผู้ให้ความสนใจในฐานะที่เป็นแหล่งสารผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติที่น่าสนใจหลายชนิดทั้งทางเคมีและการประยุกต์ใช้ทางการแพทย์และเภสัชกรรม เช่น สารต้านจุลชีพ (Amade et al., 1982; Amade et al., 1987; Nair & Simidu, 1987; McCaffrey & Endean, 1985) สารต่อต้านโรคเอดส์ (Hooper, 1997) งานวิจัยหลายชิ้นมีการค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากตัวอย่างฟองน้ำในน่านน้ำของประเทศไทย เช่น ในปี ค.ศ. 1994 Lohsiri และคณะ ได้ทำการศึกษาฟองน้ำที่เก็บรวบรวมได้ทั้งจากอ่าวไทยและทะเลอันดามัน พบว่า ในจำนวนฟองน้ำทั้งหมด 73 ตัวอย่าง มีฟองน้ำ 30 ชนิดที่สามารถยับยั้งการพัฒนารวมของไข่เม่นทะเลที่ได้รับการผสมและยับยั้งเชื้อรา และแบคทีเรียอีกหลายชนิด อย่างไรก็ตาม ทางคณะผู้วิจัยไม่สามารถทำการจำแนกชนิดฟองน้ำได้มากนักเนื่องจากขาดเอกสารและนักวิชาการที่สามารถจำแนกชนิดฟองน้ำได้ และในปี ค.ศ. 2003 Kijjao และคณะได้ค้นพบสารประกอบอนุพันธ์ชนิดใหม่ของ bromotyrosine จำนวน 2 ชนิดจากฟองน้ำทะเล, *Suberea cf. praetensa* จากอ่าวไทย

จากการศึกษาเอกสารงานวิจัยเกี่ยวกับการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของฟองน้ำในประเทศไทยพบว่า การศึกษาฟองน้ำทะเลจากประเทศไทยเริ่มปรากฏขึ้นในปี พ.ศ. 2468 โดย Dr. E. Topsent ได้พบฟองน้ำชนิดใหม่จากอ่าวไทยคือ *Prostylissa siamensis* Topsent, 1925 ปัจจุบันได้มีการแก้ไขเป็น *Amorphenopsis siamensis* (Topsent, 1925) (Hooper & van Soest, 2002) จากการรวบรวมผลวิจัยที่กล่าวมาข้างต้นคาดว่าในน่านน้ำไทยมีความหลากหลายทางชนิดของฟองน้ำทะเลประมาณ 170 ชนิดซึ่งยังพบน้อยกว่าที่คาดการณ์ไว้ทั้งหมดประมาณ 700 ชนิดค่อนข้างมาก (วิสุทธิ ไบไม้, 2538)

นอกจากฟองน้ำทะเลที่มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจแล้ว แบคทีเรียทะเลก็มีคุณสมบัติที่โดดเด่นเช่นกัน จากการศึกษาของ Nair และ Simidu (1987) พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำทะเล ตะกอน แผลงก่ตอนพืชและแผลงก่ตอนสัตว์ ที่เก็บจากอ่าว Suruga, Sagami และ Tokyo ประเทศญี่ปุ่น รวมทั้งปะการังอ่อนและฟองน้ำที่เก็บจากชายฝั่งประเทศไต้หวัน จำนวนรวมทั้งสิ้น 726 สายพันธุ์ ในจำนวนนี้ 37 สายพันธุ์ แสดงผลการยับยั้งแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC17802) หรือ *Staphylococcus aureus* (P 209) ในปี 1992 Shigemori และคณะได้อธิบายถึงยุทธศาสตร์ที่สร้างการค้นพบสาร tetracyclic alkaloid, Alteramide A จากแบคทีเรีย *Alteromonas* sp. ที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำ

*Halichondria okadai* จากนั้นในปีต่อมา Imamura และคณะ (1993) ค้นพบสารปฏิชีวนะที่ชื่อว่า urauchimycins A,B จาก *Streptomyces* sp. ซึ่งแยกได้จากฟองน้ำเช่นกัน สำหรับการศึกษาศาสตร์ปฏิชีวนะจากแบคทีเรียในประเทศไทย ชุติวรรณ และคณะ (2541, 2550) ได้ศึกษาไว้ในส่วนของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่เน้นในกลุ่มของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติโดยใช้กระบวนการทางเคมี ได้ค้นพบสารสำคัญจากแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำหลายชนิดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์อื่น ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง และยังมีศักยภาพในการสร้างสารสี (รงควัตถุชีวภาพ) เช่น สารสีม่วง Violacein แล สารสีแดง Prodigiosin และจากการวิจัยของ Thawornwiriyannun และคณะ (2009) ได้วิจัยพบแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำที่เก็บจากอ่าวไทย สายพันธุ์ *Methylobacterium mesophilicum* MAKB 08-4 สร้างรงควัตถุชีวภาพ Astaxanthin เป็นตัวหลักใน Carotenoids ที่มีสีเหลืองส้มที่นิยมใช้เป็นสีผสมอาหาร เป็นสารที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ สารเหล่านี้มีศักยภาพที่ควรจะพัฒนานำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมเวชภัณฑ์และเวชสำอางได้ และพบแบคทีเรียจากทะเลหลายสายพันธุ์ที่มีแนวโน้มสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในคน และสัตว์น้ำได้ คือ *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus*, และ *Vibrio anguillarum* นอกจากนี้ Rungprom และคณะ (2008) ได้รายงานถึงการค้นพบสาร cyclic peptide ชนิดใหม่จากแบคทีเรียทะเล *Pseudoalteromonas* sp. ที่คัดแยกจากฟองน้ำของไทย *Halisarca ectofibrosa*

แบคทีเรียอีกกลุ่มที่นักวิจัยให้ความสนใจ ได้แก่ แอคติโนมัยซีท ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่ผลิตสารที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ โดยเฉพาะชนิด *Streptomyces* ซึ่งเป็นชนิดที่มีมากที่สุดและเป็นชนิดที่มีรายงานการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นจำนวนมาก เช่น สาร Azamerone เป็นสารพวก meroterpenoid ซึ่งได้จากแบคทีเรียทะเลชนิด *Streptomyces* (Cho และคณะ, 2006) และสาร glaciapyrroles A, B และ C แยกได้จากสายพันธุ์ *Streptomyces* (NPSOO 8187) ที่แยกจากดินตะกอน ซึ่งสารเหล่านี้แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (Macherla และคณะ, 2005) นอกจากนี้ในปี ค.ศ. 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 นอกจากนี้ยังมีรายงานการผลิตสารที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียทะเลที่อาศัยร่วมกับสัตว์ชนิดอื่น เช่น เชื้อแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำและผลิตสารที่ยับยั้งจุลชีพ เช่น เชื้อ *Streptomyces* อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำ *Callyspongia diffusa* ให้ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรียและเชื้อรา (Gandhimathi และคณะ, 2008) ที่ผ่านมานักวิจัยจากสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเลได้ทำการศึกษาต่อเนื่องเกี่ยวกับความหลากหลายทางชีวภาพ และคุณสมบัติทางชีวภาพบางประการจากแบคทีเรียทะเลและแอคติโนมัยซีท โดยพบว่าแอคติโนมัยซีทจากดินตะกอน บริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกทั้งหมด 495 ไอโซเลท เป็นสายพันธุ์ *Streptomyces* sp. และ *Actinomadura* sp. ประมาณ 58 สายพันธุ์ ซึ่งหลายสายพันธุ์สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบได้ (Srivibool & Sukchotiratana, 2006 )

นอกจากจุลินทรีย์จะมีความสมบัติที่ดีในการเป็นสารตัวยาแล้ว อีกหนึ่งคุณสมบัติที่สามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ซึ่งมีการศึกษาแหล่งกรดไขมันจากจุลินทรีย์ พบว่าจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีกรดไขมันที่แตกต่างกัน ในสาหร่ายเซลล์เดียวส่วนใหญ่จะเป็นพวก even-chain saturated หรือพวก monounsaturated fatty acids ที่ใช้ในการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัว กรดไขมันส่วนใหญ่จะไม่อยู่ในรูปกรดไขมันอิสระแต่จะมีโครงสร้างอยู่ในรูปของโมเลกุลเชิงซ้อน กรดไขมันจากจุลินทรีย์มีทั้งในจุลินทรีย์กลุ่มโปรคาริโอตและจุลินทรีย์กลุ่มยูคาริโอต ดังเช่น แบคทีเรียและไซยาโนแบคทีเรีย อะมีบา โปรโตซัว จุลสาหร่าย ตลอดจนจุลินทรีย์ต่างๆ ส่วนแล้วแต่มีกรดไขมันที่มีสายอะตอมคาร์บอนยาว มีความไม่อิ่มตัวสูงมีพันธะคู่หลายตำแหน่ง เป็นองค์ประกอบของเซลล์ทั้งสิ้น โดยมีปริมาณมากหรือน้อยแตกต่างกันไปตามชนิดและแหล่งที่อยู่ของจุลินทรีย์นั้นๆ (สาวิตรี ลิ้มทอง, 2549) ที่มีรายงานส่วนใหญ่จะเป็นกรดไขมัน 7 ชนิด คือ myristic (C14:0), palmitic (C16:0), palmitoleic (C16:1n7), stearic (C18:0), oleic (C18:1n9), linoleic (C18:2n6) และ linolenic โดยพบอยู่ประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด (Harwood และ Russell, 1984) ในส่วนของยีสต์และรามีองค์ประกอบของกรดไขมันที่คล้ายคลึงกับพืช ถือเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตกรดไขมันสูง ในจุลินทรีย์กลุ่มยูคาริโอตนี้ ยีสต์มีประสิทธิภาพการผลิตกรดไขมันสูงกว่ารา ซึ่งยีสต์แต่ละชนิดสามารถสะสมลิปิดได้สูงสุดถึง 40-70 ของชีวมวล โดยปริมาณลิปิดที่สร้างขึ้นจะแตกต่างกันตามสายพันธุ์และสภาวะการเลี้ยง (ปาริชาติ สักกะทำนุ, 2544) ยีสต์ผลิตกรดไขมันตั้งแต่คาร์บอน 8 อะตอม จนถึงคาร์บอน 24 อะตอม ซึ่งกรดไขมันส่วนใหญ่ที่พบในยีสต์จะพบกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว สำหรับกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนที่พบจะเป็นกรดไขมันไลโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2n6) และกรดไขมันไลโนเลนิก (Linolenic acid, C18:3n3) ตัวอย่างเช่น *Canida* sp., *Cryptococcus* sp., *Hansenula* sp., *Lipomyces* sp. และ *Rhodotorula* sp. (Zelles, 1997) นอกจากนี้ยังพบกรดไขมันที่จำเป็นกลุ่มโอเมก้า 3 ที่ผลิตได้จากยีสต์ คือ กรดไขมันอีพื่อ (Eicosapentaenoic acid, C20:5n3) และกรดไขมันดีเอชเอ (Docosahexaenoic acid, C22:6n3) (สมศักดิ์ วรคามิน, 2552) Anamnart และคณะ (1998) ได้รายงานผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันในยีสต์ *Hansenula polymorpha* สายพันธุ์ CBS 1976 พบว่าประกอบไปด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัว oleic acid (C18:1n9), GLA(C18:3n6) และ ALA(C18:3n3) ส่วนกรดไขมันในแบคทีเรียพบว่าเป็นสารประกอบพวก short-chain polyunsaturated fatty acid และบางส่วนเป็น linoleic acid (GLA) (Russell และ Nichols, 1999) Martina et al., 2004 ทำการเลี้ยงยีสต์ชนิดชอบความเค็ม (Halophilic) กลุ่ม *Hortaea werneckii* และ *Phaeothea triangularis* และชนิดทนความเค็ม (halotolerant) *Aureobasidium pullulans* ที่ระดับความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0, 0.5, 10, 17, 25 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ YNB ที่มียีสต์สกัด 1.7 กรัม ไนโตรเจน 0.8 กรัม (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 กรัม และกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร และพื้เชื้ออาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 การบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ผลการศึกษาพบว่ายีสต์กลุ่ม *H. werneckii* และ *P. triangularis* มีการเจริญที่ดี และมีกรดไขมันปาล์มติก (Palmitic acid, C16:0), กรดไขมันสเตียริก (Stearic acid, C18:0) กรดไขมันโอเลอิก (Oleic acid, C18:1n9) และ กรดไขมันไล

โนเลอิก (Linoleic acid, C18:2n6) โดยพบกรดไขมันสเตียริก (Stearic acid, C18:0) และกรดไขมันโอเลอิก (Oleic acid, C18:1n9) สูงสุด ร้อยละ 24 และ 25 ของกรดไขมันทั้งหมด ในยีสต์ *H. werneckii* และ *P. triangularis* ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ระดับความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 25 ส่วนยีสต์กลุ่ม *A. pullulans* มีการเจริญที่ดี และมีกรดไขมันปาล์มิติก (Palmitic acid, C16:0), กรดไขมันสเตียริก (Stearic acid, C18:0), กรดไขมันโอเลอิก (Oleic acid, C18:1n9) และกรดไขมันไลโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2n6) โดยพบกรดไขมันไลโนเลอิก (Linoleic acid, C18:2n6) สูงสุด ร้อยละ 50 ของกรดไขมันทั้งหมด เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 10 รูปแบบของไขมันและกรดไขมันที่ได้จะเป็นข้อมูลพื้นฐาน เพื่อนำไปพัฒนารูปแบบการเพาะเลี้ยงให้ได้ปริมาณมาก และใช้เป็นองค์ประกอบในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อเสริมสุขภาพสำหรับมนุษย์ ตลอดจนพัฒนาเป็นสารกระตุ้นภูมิสำหรับสัตว์น้ำ

จากการศึกษาข้อมูลที่ได้จากกรดไขมัน ทำให้มีการนำเซลล์แบคทีเรียหรือยีสต์มาประยุกต์ใช้ทางการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำนั้น ได้หาวิธีการเตรียมหรือเทคนิคใหม่ๆ เพื่อให้คุ้มค่าและมีประสิทธิภาพ ซึ่งการพัฒนาเทคนิคการตรึงในเริ่มแรกนั้นได้มีการใช้อย่างกว้างขวางด้านเอนไซม์เทคโนโลยี เป็นการนำเอนไซม์ที่มีความสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดี และมีความเสถียรสูงมาตรึงแทนการใช้เอนไซม์อย่างอิสระ เพื่อให้ง่ายต่อการนำไปใช้ในอุตสาหกรรม เพราะเอนไซม์ถูกยึดไว้จึงสามารถใช้ได้ในรูปของของแข็ง และสามารถแยกผลิตภัณฑ์ออกได้ง่าย การตรึงเซลล์ คือ การจำกัดขอบเขตของจุลินทรีย์ให้อยู่ที่บริเวณใดบริเวณหนึ่ง โดยจุลินทรีย์ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ และเซลล์จุลินทรีย์ไม่สูญเสียคุณสมบัติการทำงาน และยังสามารถนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่ได้อย่างต่อเนื่อง สภาพของเซลล์ที่ถูกตรึงนั้นอาจจะกำลังเจริญ กำลังพักตัวหรือตายก็ได้ ในกรณีที่นำเซลล์มีชีวิตมาตรึงนั้น ถ้าเซลล์ผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิดจะทำให้ได้เซลล์ตรึงที่ประกอบด้วยเอนไซม์ผสม ซึ่งมีประโยชน์ในกระบวนการหมักที่ต้องอาศัยเอนไซม์หลายชนิด และสามารถประยุกต์ใช้การตรึงเซลล์หลายชนิดไว้ด้วยกันได้ (ภาวิณี, 2531; สมใจ, 2550) การใช้เทคนิคการตรึงสารไวท์ภายในเม็ดแคปซูลในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ถูกนำมาใช้ในกระบวนการผลิตอาหาร เพื่อที่จะตรึงสารที่สำคัญไว้ภายในแคปซูลและไม่ให้สารเหล่านั้นรั่วไหลออกจากเม็ดอาหารและละลายในน้ำก่อนเวลาที่ต้องการ ในการอนุบาลลูกสัตว์น้ำวัยอ่อนใช้เทคนิคการตรึงในการผลิตอาหารสำเร็จรูปขนาดเล็ก เพื่อให้สารอาหารคงสภาพเมื่ออยู่ในน้ำในระยะเวลาอันสั้น โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อทดแทนหรือลดปริมาณการใช้อาหารมีชีวิตวัยอ่อนได้ในระยะเวลาที่เร็วขึ้น การใช้เทคนิคการตรึงสารในการพัฒนาวัคซีนรักษาโรคโดยวิธีการให้กินเพื่อลดการใช้สารเคมีในการรักษาโรค ซึ่งเทคนิคการให้ปลากินยาเพื่อเป็นการป้องกันโรคนั้นเป็นเทคนิคที่ดีในการเพาะเลี้ยง แต่อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพของยาที่ให้อาจลดลงได้เนื่องมาจากยาถูกย่อยเมื่ออยู่ในระบบทางเดินอาหารก่อนเวลาอันควร ดังนั้นเทคนิคการตรึงด้วยยาหรือวัคซีน เพื่อห่อหุ้มตัวยาไว้ภายในเม็ดแคปซูล (อาหาร) สามารถแก้ปัญหาเหล่านี้ได้ (Polk และคณะ, 1994) ซึ่งในขั้นตอนการผลิตอาหารสัตว์น้ำมีวัตถุดิบหลายชนิดที่นำมาใช้ในกระบวนการ

ตรึงสาร เช่น คาราจีแนน สารผสมระหว่างโซเดียมอัลจิเนตและไคโตแซน (Polk และคณะ, 1994) ซึ่ง การตรึงสารโดยการใช้โซเดียมอัลจิเนต หรือของผสมระหว่างโซเดียมอัลจิเนตและไคโตแซนเป็นสาร ตรึง เป็นเทคนิคการผลิตที่ง่าย รวดเร็วและราคาไม่แพง

### การดำเนินการแผนงานวิจัย

#### การดำเนินการแผนงานวิจัยในปีที่ 1

ในการศึกษาวิจัย เรื่อง จุลินทรีย์ทะเล: แหล่งใหม่ของสารตัวยาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร เป็น ชุดโครงการวิจัย ที่มีโครงการวิจัยย่อย 6 โครงการ มีคณะผู้วิจัยรับผิดชอบแต่ละโครงการย่อย วิธีการ ดำเนินการวิจัยแต่ละ โครงการแตกต่างกันไป แต่ทุกโครงการทำการวิจัยแบบมีส่วนร่วม วิธีการ ดำเนินการวิจัย ดังรายละเอียดดังนี้

#### 1. การติดตามสนับสนุนเสริมนักวิจัย

- จัดประชุมคณะนักวิจัย เพื่อทำความเข้าใจวัตถุประสงค์ เป้าหมายและวางแผนการดำเนินการ วิจัยให้บรรลุเป้าหมายที่วางไว้

- ติดตามการดำเนินงานของนักวิจัยในแต่ละโครงการย่อยทั้ง 6 โครงการ จัดประชุมรายงาน ความก้าวหน้าของแต่ละโครงการ เพื่อให้เกิดการแลกเปลี่ยนเรียนรู้ วิเคราะห์ปัญหาและหาแนวทางใน การแก้ไขร่วมกัน เพื่อสรุปผลการดำเนินงานวิจัย และรวมถึงการสร้างนักวิจัยรุ่นใหม่ของแต่ละ โครงการวิจัย

- จัดเผยแพร่งานวิจัยให้การสนับสนุนการเผยแพร่ผลงานวิจัยทั้งในระดับชาติและนานาชาติ

#### 2. การวางแผนกำหนดพื้นที่สำรวจและเก็บตัวอย่าง

วางแผนร่วมกันทั้ง 6 โครงการย่อยในการกำหนดพื้นที่เก็บตัวอย่าง คิดต่อประสานงานกับ องค์กรต่างๆที่เกี่ยวข้อง และดำเนินการเก็บตัวอย่างฟองน้ำทะเลและดินตะกอนป่าชายเลนบริเวณชายฝั่ง ทะเลอ่าวไทยตอนล่าง ครอบคลุมพื้นที่บริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทยตอนกลาง บริเวณอำเภอขนอม จังหวัดนครศรีธรรมราช

#### 3. รวบรวมข้อมูลในการจัดทำรายงาน

## ผลการดำเนินงานแผนงานวิจัยและอภิปรายผล

### การดำเนินงานของแผนงานฯในปีที่ 1

ผลการวิจัย เรื่อง จุลินทรีย์ทะเล: แหล่งใหม่ของสารด้วยาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ประกอบด้วยโครงการวิจัยย่อยทั้งหมด 6 โครงการ ได้ดำเนินการวิจัยเพื่อให้ได้ข้อมูลเป็นไปตามวัตถุประสงค์ ปรากฏผลการวิจัยดังนี้

#### ข้อมูลการเก็บตัวอย่างฟองน้ำและดินตะกอน

##### 1. วางแผนกำหนดพื้นที่เก็บตัวอย่าง

ดำเนินการประชุมวางแผนกำหนดพื้นที่การสำรวจและเก็บตัวอย่างฟองน้ำทะเล บริเวณหมู่เกาะทะเลใต้ ทั้งสิ้น 4 จุดสำรวจ ได้แก่ บริเวณเกาะราบ เกาะวังนอก เกาะวังใน และเกาะท่าไร่ ในเขตอำเภอขนอมและพื้นที่ตำบลท้องเนียน จังหวัดนครศรีธรรมราช รวมถึงพื้นที่ป่าชายเลนในการเก็บดินตะกอนป่าชายเลน (ดังแสดงภาพที่ 2) ระหว่างวันที่ 1-6 มีนาคม 2556 โดยได้ดำเนินการประสานงานด้านต่างๆ ดังนี้

- ประสานกับสถาบันวิจัยและพัฒนาทรัพยากรทางทะเล ชายฝั่งทะเลและป่าชายเลน จังหวัดชุมพร ในการขออนุญาตให้บุคลากรตำแหน่งนักวิชาการประมงที่มีความรู้ความสามารถในการทำวิจัยเกี่ยวกับฟองน้ำทะเล มาร่วมสำรวจและเก็บตัวอย่าง จำนวน 2 คน ได้แก่ นางสาวอรอนงค์ บัณฑิต และนายภราดร เพชรกำเนิด (เอกสารแนบใน ภาคผนวก)
- ดำเนินการติดต่อกับองค์กรในพื้นที่ในการเข้าสำรวจและเก็บตัวอย่างร่วมกับชุมชนในพื้นที่เพื่อทำงานวิจัย ในพื้นที่อำเภอขนอม ได้แก่ เทศบาลตำบลท้องเนียน และเทศบาลตำบลอำเภอขนอม (ดังเอกสารแนบ ในภาคผนวก)



ภาพที่ 2 แสดงจุดเก็บตัวอย่างในเขตพื้นที่อำเภอขนอม จังหวัดนครศรีธรรมราช

2. ดำเนินการจัดประชุม โครงการวิจัย เพื่อติดตามผลการดำเนินงานในโครงการวิจัยทั้ง 6 โครงการ ซึ่งสามารถสรุปผลการดำเนินการวิจัย และความเชื่อมโยงในปีที่ 1 ได้ดังนี้

จากโครงการวิจัยที่ 1 “ความหลากหลายทางชนิดของฟองน้ำทะเลบริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทยตอนกลาง” ได้สำรวจและเก็บตัวอย่างความหลากหลายทางชนิดของฟองน้ำทะเลที่อาศัยอยู่ในระบบนิเวศทางทะเล เช่น แนวปะการัง พื้นที่อ่าวทะเล และบริเวณพื้นที่ชายฝั่งทะเลของหมู่เกาะทะเลใต้ อำเภอขนอม จังหวัดนครศรีธรรมราช โดยการดำน้ำแบบเครื่องช่วยหายใจใต้น้ำ (Scuba diving) ตั้งแต่ชายฝั่งทะเลออกไปจนถึงขอบนอกแนวในแต่ระบบนิเวศ รวมทั้งสิ้น 4 จุดสำรวจ ได้แก่

- RAB56-A เกาะราบ ทิศเหนือ
- WNOK56-A เกาะวังนอก ทิศเหนือ
- WNAI56-A เกาะวังใน ทิศเหนือ
- TARAI56-A เกาะท่าไร่ อ่าวทิศใต้

จากการสำรวจตัวอย่างได้บันทึกผล

1. บันทึกภาพใต้น้ำ
2. ตำแหน่ง Latitude/Longitude ที่เก็บ
3. ความลึก

การเก็บรักษาตัวอย่าง

ตัวอย่างฟองน้ำทะเลที่เก็บแช่ด้วยเอธานอล 70 % เพื่อจำแนกชนิด ตรวจสอบลักษณะและขนาดของสปิคูล (Spicules) โดยประยุกต์จากวิธีของ Putschakarn และคณะ (2004) รวบรวมข้อมูลรายละเอียดลักษณะของตัวอย่างฟองน้ำที่ได้จากการสำรวจภาคสนามและห้องปฏิบัติการ วิเคราะห์ข้อมูล และวินิจฉัยชื่อวิทยาศาสตร์ตัวอย่างฟองน้ำโดยการเปรียบเทียบเอกสารอ้างอิง จาก Hooper & Soest (2000) Systema Porifera และ เอกสารอ้างอิงต่างๆที่ได้เก็บรวบรวมไว้

ผลการสำรวจและเก็บตัวอย่าง

1. รวบรวมตัวอย่างและข้อมูลฟองน้ำทะเลได้ทั้งหมด 94 ข้อมูล และตัวอย่างที่นำมาทำการจำแนกชนิดเป็นหลักฐานอ้างอิง 74 ตัวอย่าง จำแนกชนิดได้ 45 ชนิด จาก 35 สกุล 25 วงศ์ 10 อันดับ
2. ฟองน้ำทะเลจำนวน 52 ตัวอย่าง แบ่งไปเพื่อศึกษาต่อในทางจุลินทรีย์
3. การสำรวจพบฟองน้ำทะเลที่ยังไม่เคยรายงานว่าพบในพื้นที่หมู่เกาะทะเลใต้อย่างน้อย 3 ชนิด ตัวอย่างเช่น *Cladocroce* sp. “grey”, *Haliclona* (*Reniera*) sp. “white” และ *Suberea praetensa* (Row, 1911) เป็นต้น โครงสร้างประชากรของชนิดฟองน้ำทะเลที่พบในแต่ละจุดสำรวจมีลักษณะคล้ายคลึงกัน

ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากโครงสร้างของแนวปะการังที่คล้ายกันและได้รับอิทธิพลจากชายฝั่งทะเลและคลองน้ำจืดที่ไหลผ่านชุมชนลงสู่ทะเล

4. รูปทรงการเจริญเติบโตของฟองน้ำทะเลมีความหลากหลายมากและค่อนข้างแตกต่างจากที่อื่นๆ พบรูปทรงการเจริญแบบเคลือบเป็นกลุ่มเด่น กลุ่มของฟองน้ำที่พบมากที่สุดคือ Order Haplosclerida (15 ชนิด) รองลงมาคือ Order Poecilosclerida (8 ชนิด) สอดคล้องกับ Hooper & Wiedenmayer, (1994) ที่กล่าวว่าฟองน้ำทั้งสองมักพบเป็นชนิดเด่นในระบบนิเวศทางทะเลน้ำตื้นเขตร้อน

5. ความมากชนิด (Species richness) ของฟองน้ำทะเลในพื้นที่ศึกษา พบว่า

- RAB56-A เกาะราบ ทิศเหนือ มีความมากชนิดของฟองน้ำมากที่สุด 33 ชนิด
- WNOK56-A เกาะวังนอก ทิศเหนือ 33 ชนิด
- WNAI56-A เกาะวังใน ทิศเหนือ 25 ชนิด
- TARA56-A เกาะท่าไร่ อ่าวทิศใต้ พบ 3 ชนิด

ทั้งนี้จากการสังเกตพบว่าจุดสำรวจในพื้นที่นี้มีลักษณะของแนวปะการังคล้ายคลึงกันคือเป็นแนวปะการังริมชายฝั่งที่แคบ ลาดชันมาก และมีตะกอนตกทับถมค่อนข้างสูง ปะการังชนิดเด่นเป็นปะการังรูปทรงแบบก้อน ส่วนบริเวณเกาะท่าไร่ที่พบฟองน้ำทะเลน้อย เนื่องจากจุดสำรวจเป็นหาดหินและน้ำทะเลขุ่นมากจากการที่ฝนตกหนักและคลื่นลมแรง

เมื่อพิจารณารูปทรงการเจริญเติบโตของฟองน้ำทะเลในบริเวณพื้นที่ศึกษาพบว่า ฟองน้ำที่มีรูปทรงการเจริญแบบเคลือบ (Encrusting) เป็นกลุ่มเด่นมีสัดส่วน 36% ของฟองน้ำที่พบทั้งหมด รองลงมาเป็นรูปทรงการเจริญแบบกึ่งก้อน (Submassive) 27% และแบบกิ่งก้าน (Branching) 15% ตามลำดับ รูปทรงการเจริญเติบโตของฟองน้ำในพื้นที่ศึกษาสอดคล้องกับสภาพถิ่นที่อยู่อาศัยที่มีปะการังเป็นรูปทรงแบบก้อนและมีตะกอนในน้ำทะเลสูง

โครงการวิจัยที่ 2 ศักยภาพของแบคทีเรียทะเล: แหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ในปี 1 ได้ดำเนินการเสร็จสิ้นในส่วนของการศึกษาเบื้องต้นของสารต้านจุลชีพจากแบคทีเรียทะเลที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเล

การคัดแยกสายพันธุ์แบคทีเรียทะเลจากฟองน้ำ

- ดำเนินการคัดแยกแบคทีเรียได้ 210 สายพันธุ์ จากฟองน้ำ 52 ตัวอย่าง จากหมู่เกาะทะเลใต้ อำเภอนนทบุรี จังหวัดนครศรีธรรมราช พบแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในฟองน้ำแต่ละตัวอย่างแตกต่างกัน โดยพบมีแบคทีเรียอาศัยอยู่จำนวนน้อยที่สุดใน ฟองน้ำครกแข็งสีเหลือง RAB56-A-8 (*Petrosia* sp.) จำนวน  $1.1 \times 10^5$  โคโลนีต่อกรัม และมากที่สุดฟองน้ำถั่วตัวสีน้ำตาลเขียว *Spongia* sp. "yellow" (RAB56-A-19) จำนวน  $4.58 \times 10^7$  โคโลนีต่อกรัม

### การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย

- นำแบคทีเรียทะเล จำนวน 210 สายพันธุ์ มาทำการเพาะเลี้ยง เพื่อทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ โดยวิธี Disc Diffusion Agar Assay แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก คือ *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* แบคทีเรียแกรมลบ คือ *Vibrio alginolyticus*, และ *Escherichia coli* พบว่า ฟองน้ำ 38 สายพันธุ์ มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบ

- ทำการสกัดแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำที่มีออกฤทธิ์ชีวภาพจำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ WNAI56-1 จากฟองน้ำท่อสีเทา (*Cladocroce* sp. "grey") สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus aureus* ได้ ส่วนสายพันธุ์ RAB56-A-28 จากฟองน้ำสีม่วง (*Petrosia hoeksemai*) สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบที่ทดสอบ *E. coli* ได้ดี

### โครงการวิจัยที่ 3 การค้นหารงควัตถุที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์ทะเล

โครงการวิจัยนี้ในปีที่ 1 ทำการตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของสารสกัดจากเชื้อแอกติโนมัยซีทที่แยกได้จากฟองน้ำทะเลและดินตะกอนป่าชายเลน จากฝั่งภาคตะวันออก (จังหวัดจันทบุรี และชลบุรี) และอำเภอขนอม จังหวัดนครศรีธรรมราช โดยมีผลการดำเนินงานดังนี้

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตทชั้นเซลล์และชั้นน้ำเลี้ยงจากแอกติโนมัยซีท 21 สายพันธุ์ ที่แยกจากดินตะกอนชายฝั่งและดินป่าชายเลนในเขตจังหวัดชลบุรี จันทบุรี และนครศรีธรรมราช จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีโครมาโทกราฟฟีคิวบาง, DPPH และ ABTS พบว่าสารสกัดหยาบชั้นน้ำเลี้ยงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าชั้นเซลล์

1. โดยในชั้นน้ำเลี้ยงมีการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ ( $IC_{50}$ ) ในช่วง  $49.11 \pm 2.37 - 400$  และ  $14.25 \pm 2.82 - 243.94 \pm 14.38$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยสารสกัดแอกติโนมัยซีทสายพันธุ์ PL7-4, PL2-3 และ PL2-5 มีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุดมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $49.11 \pm 2.37$ ,  $56.63 \pm 0.39$  และ  $64.79 \pm 1.18$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ขณะที่สายพันธุ์ PL4-6 และ PL2-3 ออกฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ ABTS ดีที่สุด โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $14.25 \pm 2.82$  และ  $22.17 \pm 0.72$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

2. ขณะที่สารสกัดหยาบชั้นเซลล์ของเชื้อราสายพันธุ์ RB-POR2-1 ที่แยกจากฟองน้ำทะเล ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ดีที่สุดมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $100.78 \pm 1.71$  และ  $41.26 \pm 0.4$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

### โครงการวิจัยที่ 4 ศึกษาของจุลินทรีย์ทะเล: แหล่งกรดไขมันชนิดจำเป็น

ในปีที่ 1 เป็นการศึกษาชนิดและปริมาณกรดไขมันที่จำเป็นสำหรับสัตว์น้ำจากยีสต์ 6 ชนิดที่คัดแยกจากน้ำทะเลบริเวณชายหาดบางแสน จังหวัดชลบุรี และจากเชื้อแอกติโนมัยซีท 20 ชนิด คัดแยกจากดินตะกอนในจังหวัดจันทบุรีชลบุรี นครศรีธรรมราช และคัดแยกจากฟองน้ำทะเลในจังหวัด

นครศรีธรรมราช 2 ชนิด เพื่อเป็นข้อมูลในการพัฒนาการเลี้ยงเชื้อสำหรับนำไปใช้ในการเตรียมสูตรอาหารสัตว์น้ำ

#### กรดไขมันจากยีสต์

1. เลี้ยงยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM และอาหารกากขานอ้อย ที่ความเค็ม 30 พีพีที เป็นระยะเวลา 120 ชม. พบว่ายีสต์ทุกชนิดมีการผลิตกรดไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัว โดยเฉพาะยีสต์สายพันธุ์ BS6-2 ที่เลี้ยงในอาหารกากขานอ้อยมีการสะสมกรดไขมันที่จำเป็นชนิด linoleic acid; C18:2n6 และ  $\alpha$ -linolenic acid; C18:3n3 มากที่สุด โดยการเลี้ยงด้วยอาหารกากขานอ้อยมีปริมาณกรดไขมันชนิด C18:3n3 สูงกว่าการเลี้ยงด้วยอาหาร YM ( $7.63 \pm 0.05\%$  และ  $5.92 \pm 0.05\%$ ) ตามลำดับ แต่มีปริมาณกรดไขมันชนิด C18:2n6 น้อยกว่า ( $19.91 \pm 0.21\%$  และ  $23.90 \pm 0.94\%$ ) ตามลำดับ

2. เมื่อทำการเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์ BS 6-2 ในอาหารกากขานอ้อยที่มีความเค็ม 25, 30 และ 35 พีพีที เป็นเวลา 216 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างยีสต์วิเคราะห์กรดไขมันทุก 24 ชั่วโมง พบว่าการเลี้ยงในทุกระดับความเค็มเป็นระยะเวลา 72 และ 120 ชั่วโมง มีปริมาณกรดไขมัน C18:2n6 สูงสุดและไม่แตกต่างกันทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) โดยยีสต์ที่เลี้ยงที่ความเค็ม 25 พีพีที มีปริมาณกรดไขมันชนิด C18:2n6 สูงสุด ( $22.58 \pm 1.24\%$ ) แสดงว่าระดับความเค็มต่ำมีผลให้ยีสต์สายพันธุ์ BS 6-2 ที่เลี้ยงในอาหารกากขานอ้อยผลิตกรดไขมันที่จำเป็นชนิด C18:2n6 ได้ดีขึ้น

#### กรดไขมันจากแอกทีโนมัยซีท

1. เมื่อทำการเลี้ยงแอกทีโนมัยซีทในอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-2 เป็นระยะเวลา 7-14 วัน พบว่าแอกทีโนมัยซีททุกชนิด ยกเว้น PL 2-2, PL 4-6 และ WN- POR-02-1 มีกรดไขมันอิ่มตัวชนิด palmitic acid; C16:0 เป็นองค์ประกอบหลักโดยพบในปริมาณสูงสุดประมาณ 22.92%

2. แอกทีโนมัยซีทที่คัดแยกจากดินตะกอน PL 2-2, PL 4-6 และ WN- POR-02-1 มีกรดไขมันที่จำเป็นชนิดไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนชนิด C18:2n6 ในปริมาณสูงสุด โดยแอกทีโนมัยซีท PL 2-2 มีปริมาณของกรดไขมันที่จำเป็นชนิด C18:2n6 และ C18:3n3 สูงสุดเท่ากับ  $37.38 \pm 0.27\%$  และ  $4.07 \pm 0.09\%$  ตามลำดับ รองลงมาคือแอกทีโนมัยซีท PL 4-6 พบกรดไขมันชนิด C18:2n6 และ C18:3n3 เท่ากับ  $36.26 \pm 0.88\%$  และ  $2.75 \pm 0.14\%$  ตามลำดับ

3. แอกทีโนมัยซีทที่คัดแยกจากฟองน้ำ พบกรดไขมันที่จำเป็นชนิด C18:2n6 และ C18:3n3 เฉพาะในตัวอย่าง WN POR 02-1 ปริมาณ  $28.61 \pm 0.17\%$  และ  $2.02 \pm 0.32\%$  ตามลำดับ

โครงการวิจัยที่ 5 การพัฒนาการผลิตสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากแอกทีโนมัยซีทและการผลิตเซลล์ปริมาณมาก

โครงการวิจัยที่ 5 ดำเนินการวิจัย เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเซลล์แอกทีโนมัยซีทที่แยกจากดินตะกอนป่าชายเลนให้มีปริมาณมาก ในการส่งให้กับโครงการที่ทำการค้นหาสารออกฤทธิ์และสารเสริมอาหาร มีผลการวิจัยดังนี้

## เชื้อแอกติโนมัยซีท

### 1. แยกเชื้อแอกติโนมัยซีทจากฟองน้ำทะเล และดินตะกอนป่าชายเลน อำเภอนนอม จังหวัด นครศรีธรรมราช

1. ทำการแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทจากฟองน้ำทะเลและจากตะกอนป่าชายเลนชายฝั่งของ อ. นนอม จังหวัดนครศรีธรรมราช โดยแยกจากฟองน้ำจากเกาะราบ 23 ตัวอย่าง เกาะวังนอก 16 ตัวอย่าง และจากป่าชายเลน อ. นนอม 7 ตัวอย่าง บนอาหาร 3 ชนิด คือ ISP2, SCA และ Actinomycete Isolation Agar พบ แอกติโนมัยซีทจากฟองน้ำเกาะราบ 2 ไอโซเลต จากเกาะวังนอกพบ 2 ไอโซเลต และป่าชายเลนพบแอกติโนมัยซีท 52 ไอโซเลต

จากนั้นทำเชื้อให้บริสุทธิ์ และเก็บรักษาเชื้อทั้งใน slant culture และที่  $-40^{\circ}\text{C}$  ฟองน้ำจากเกาะราบที่พบแอกติโนมัยซีท คือ ฟองน้ำครกทอสีม่วง และฟองน้ำสีแดง ส่วนฟองน้ำจากเกาะวังนอกที่พบแอกติโนมัยซีท คือฟองน้ำกิ่งสีม่วง และฟองน้ำหนามสีเทา นอกจากนี้ยังพบราทะเลด้วยอีก 1 ชนิด จากฟองน้ำสีแดงของเกาะราบ

#### 2. ศึกษาการสังเคราะห์ออกฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของเชื้อที่แยกได้

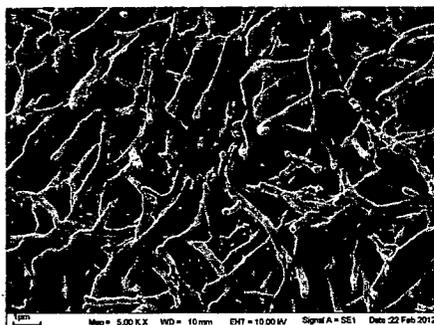
เชื้อแอกติโนมัยซีททุกไอโซเลตที่พบ รวมทั้งเชื้อรา นำมาทดสอบการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (MRSA, *B. subtilis*, *C. albicans*) พบแอกติโนมัยซีทที่สังเคราะห์ยับยั้งจุลินทรีย์ 27 ไอโซเลต ที่แยกได้จากป่าชายเลน จ. นครศรีธรรมราช และพบ *Micromonospora* อีก 2 ไอโซเลตที่แยกจากฟองน้ำของเกาะวังนอก

3. เลี้ยงเชื้อปริมาณมาก โดยคัดเลือกจากเชื้อที่สังเคราะห์ออกฤทธิ์จำนวน 25 ไอโซเลต เพื่อส่งต่อให้กับ โครงการที่ 3 เพื่อสกัดสารทดสอบฤทธิ์ชีวภาพอื่นๆ (antioxidant)

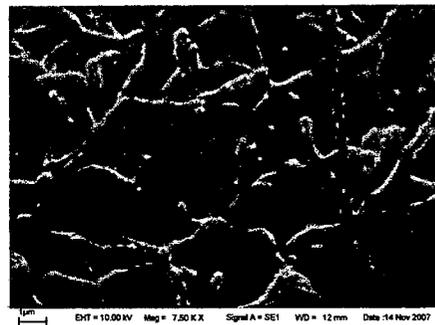
### 2. การศึกษาสารออกฤทธิ์จากแอกติโนมัยซีท และการเลี้ยงในอาหารเหลวของเชื้อที่ได้จากจังหวัดภาค ตะวันออก (เป็น โครงการนำร่องดำเนินการมาก่อนหน้าแล้ว)

1. คัดเลือกแอกติโนมัยซีทที่แยกได้จากตะกอนชายฝั่ง (ชายเลน) ในจังหวัดจันทบุรี และชลบุรี ที่สังเคราะห์ออกฤทธิ์ และสร้างรงควัตถุด้วยในขณะเดียวกันมาเลี้ยงเพื่อสกัดสารเบื้องต้น 5 สายพันธุ์ คือ แอกติโนมัยซีท CH54-5, CH54-8, A1-3, A3-3 และ A 16-1 ซึ่งสังเคราะห์ออกฤทธิ์สีแดง สีเหลือง สีม่วง เข้ม สีม่วงและสีแดงตามลำดับ

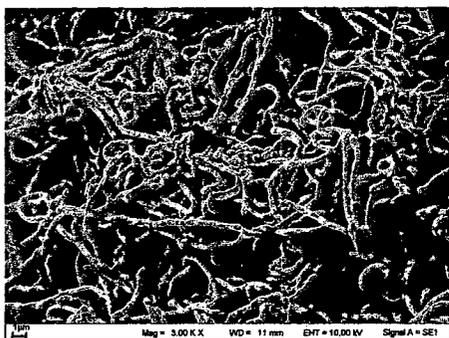
2. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และด้วย Scanning electron microscope ในบางสายพันธุ์ เช่น A16-1, CH54-5, CH54-8, PL3-3, PL3-7, PL4-3, PL4-6 และ PL6-2



CH54-5



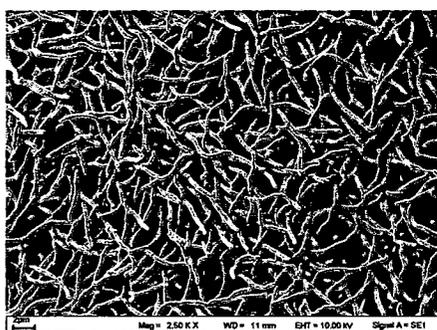
CH54-8



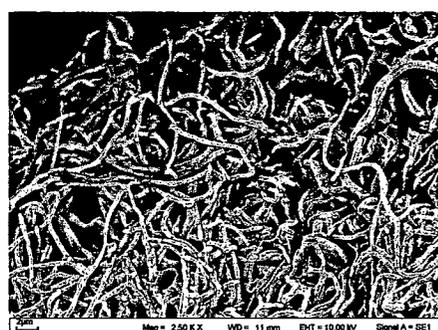
PL3-3



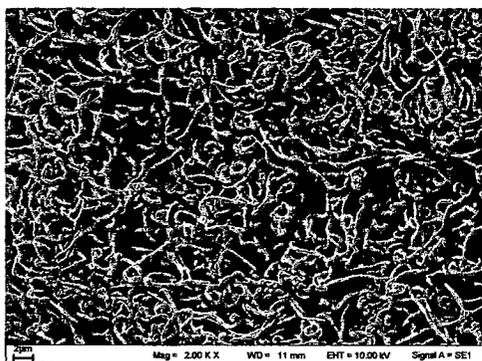
PL3-7



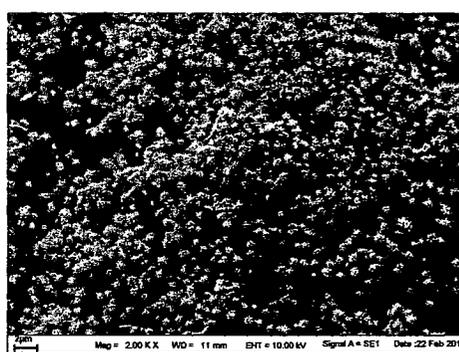
PL4-3



PL4-6



PL6-2



A16-1

ภาพที่ 3 ภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีทภายใต้กล้อง Scanning electron microscope CH54-5, A16-1, PL3-3, PL-7, PL4-3, PL4-6, PL6-2 และ A16-1

### 3. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมกับการเลี้ยงแอกติโนมัยซีท

1. ศึกษาการเจริญของแอกติโนมัยซีทที่ให้สารออกฤทธิ์ชีวภาพในอาหารชนิดต่างๆ คือ Glucose – Yeast Extract, ISP2, ISP3, ISP4, ISP5 (Glucose-Asparagine), ISP7 (Tyrosine Agar) และ ISP8 อาหาร Glucose- yeast Extract และ อาหาร ISP2 เป็นอาหารที่แอกติโนมัยซีทส่วนใหญ่ที่นำมาทดสอบเจริญได้ดี โดยมี PL5-1 และ 5-3 ที่เจริญได้ไม่ดีใน ISP2 และ CH54-8 กับ WN-POR-06-1 ที่เจริญได้ไม่ดีใน Glucose-Yeast Extract เท่านั้น

2. ศึกษาการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบในอาหารที่มี pH ต่าง ๆ กันคือ pH 7.0, pH 7.5, pH 8.0 และ pH 9.0 แอกติโนมัยซีทส่วนใหญ่สร้างสารออกฤทธิ์มากที่สุดที่ pH 7-5 และ pH 8.0 บางชนิด เช่น PL4-6 สร้างได้ดีระหว่างช่วง pH 7.0- pH 9.0

3. นำแอกติโนมัยซีททั้ง 25 สายพันธุ์มาเลี้ยงในอาหารเหลว ISP2 เป็นเวลา 10-14 วัน ที่ 30 องศาเซลเซียส 110 rpm แยกเซลล์จากอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อสกัดสารทั้งจากเซลล์และอาหารเลี้ยงเชื้อ

4. ศึกษา Bioautography ของ A1-3, A3-3, A16-1, 54-5 ต่อเชื้อ MRSA บางสายพันธุ์ เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารที่สกัดได้ ทุกไอโซเลตมีสารออกฤทธิ์หลายตัว เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการคัดเลือกสายพันธุ์เพื่อทำการค้นหาสารออกฤทธิ์

### 4. การศึกษา ลำดับเบสของ 16S rRNA gene ของแอกติโนมัยซีทที่เลือกไว้

ไอโซเลตที่เลือกไว้ศึกษาลำดับเบสของ 16S rRNA gene คือ A1-3, A3-3, A16-1 และ 54-5 ทุกไอโซเลตอยู่ในจีโนม *Streptomyces*

### ยีสต์

#### 1. ศึกษาการเจริญของเซลล์ยีสต์ และการจำแนกชนิดยีสต์

คัดเลือกยีสต์ สายพันธุ์ BS6-2 ซึ่งแยกได้จากชายฝั่งทะเล (บางแสน) เป็นต้นแบบในการเริ่มศึกษาการเลี้ยงเซลล์โดยนำมาเลี้ยงในอาหารที่แตกต่างกัน โดยเลี้ยงทั้งในอาหาร Synthetic (YM) และอาหารธรรมชาติ (อาหารข้าวโอ๊ต และกากชานอ้อย) โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงทั้งจำนวนเซลล์ pH และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ลดลง (หรือเพิ่มขึ้น)

- ศึกษาลำดับเบสของบริเวณ D1/D2 region ของยีสต์ BS6-2 และเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้ใน GenBank พบว่าใกล้เคียงที่สุดกับยีสต์ในจีโนม *Pichia jadinii* Type strain CBS 1600<sup>T</sup> (Accession no. U73570) ด้วยเปอร์เซ็นต์ similarity 99.13% (ซึ่งยังมีความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ ถึง 5 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งมีความน่าจะเป็นยีสต์สายพันธุ์ใหม่ได้ด้วยเช่นกัน)

- การเจริญของเชื้อ BS 6-2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM



ภาพที่ 4 ภาพยีสต์ BS6-2 ภายใต้กล้อง Inverted Microscope เซลล์มีลักษณะกลม/รูปไข่ขนาดใหญ่

จากการศึกษาการเจริญของเชื้อ BS 6-2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM โดยติดตามการเจริญเติบโตของเชื้อเป็นเวลา 120 ชั่วโมง และวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณแอลกอฮอล์นับจำนวนเซลล์ พร้อมทั้งติดตามการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดค่า พบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มลดลงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 เป็นต้นไป เมื่อระยะเวลาการเลี้ยงเพิ่มขึ้น โดยลดลงสูงที่สุดชั่วโมงที่ 120 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ  $2.536 \pm 0.02$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในช่วงระยะเวลาที่น้ำตาลรีดิวซ์ลดลงนั้นเป็นระยะเวลาที่มีจำนวนเซลล์เริ่มเพิ่มขึ้นโดยจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นเรื่อยๆเมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงเพิ่มขึ้น ซึ่งเพิ่มขึ้นสูงสุดชั่วโมงที่ 120 โดยมีจำนวนเซลล์เท่ากับ  $2.025 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร สำหรับค่าความเป็นกรดค่าเริ่มลดลงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 และยิ่งลดลงเมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงเพิ่มขึ้น โดยค่าความเป็นกรดค่าลดลงต่ำสุดชั่วโมงที่ 96-120 ซึ่งมีค่าความเป็นกรดค่าที่ 5 ส่วนปริมาณแอลกอฮอล์นั้น พบว่ามีปริมาณสูงสุดชั่วโมงที่ 120 โดยมีปริมาณแอลกอฮอล์เท่ากับร้อยละ  $2.13 \pm 0.01$

## 2. การเจริญของเชื้อ BS 6-2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อกากขานอ้อยใน SM30

จากการศึกษาการเจริญของเชื้อ BS 6-2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อกากขานอ้อยใน SM30 โดยติดตามการเจริญเติบโตของเชื้อเป็นเวลา 120 ชั่วโมง และทำการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณแอลกอฮอล์ นับจำนวนเซลล์ พร้อมทั้งติดตามการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดค่า พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงเพิ่มขึ้น โดยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงสูงที่สุดชั่วโมงที่ 72 ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ  $1.343 \pm 0.01$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ก่อนจะเริ่มเพิ่มขึ้นในระยะเวลาต่อมา โดยระยะเวลาที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงต่ำสุดนั้นเป็นระยะเวลาเดียวกันกับจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นสูงสุด ซึ่งเพิ่มขึ้นถึง  $6.35 \times 10^6$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นจำนวนเซลล์เริ่มลดลงเมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงเพิ่มขึ้น สำหรับค่าความเป็นกรดค่าเริ่มลดลงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 และยิ่งลดลงเมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงเพิ่มขึ้น โดยค่าความเป็นกรดค่าลดลงต่ำสุดชั่วโมงที่ 48-120 ซึ่งมีค่าความเป็นกรดค่าที่ 4 ส่วนปริมาณแอลกอฮอล์ของเชื้อ BS 6-2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อกากขานอ้อยใน SM30 นั้นไม่พบปริมาณแอลกอฮอล์ตั้งแต่ชั่วโมงแรกถึงชั่วโมงที่ 120

### 3. การเจริญของเชื้อ BS 6-2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อกากขานอ้อยใน SM30 ที่ทำการกรอกก่อนนำเข้าเครื่องหม้อนึ่งความดันอัตโนมัติ

จากการศึกษาการเจริญของเชื้อ BS 6-2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อกากขานอ้อยใน SM30 ที่ทำการกรอกเอากากขานอ้อยออกก่อนนำเข้าเครื่องหม้อนึ่งความดันอัตโนมัติ โดยติดตามการเจริญเติบโตของเชื้อเป็นเวลา 120 ชั่วโมง และทำการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณแอลกอฮอล์ นับจำนวนเซลล์ พร้อมทั้งติดตามการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดต่าง พบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นสูงสุดชั่วโมงที่ 48 โดยมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ  $2.486 \pm 0.09$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ก่อนที่จะเริ่มลดลงในชั่วโมงที่ 72 ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงต่ำสุดถึง  $1.434 \pm 0.03$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นระยะเวลาเดียวกันที่จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นสูงสุด โดยมีจำนวนเซลล์เท่ากับ  $2.4 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นจำนวนเซลล์ค่อยๆ ลดลงเมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงเพิ่มขึ้น สำหรับค่าความเป็นกรดต่างเริ่มลดลงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 และยังคงลดลงเมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงเพิ่มขึ้น โดยค่าความเป็นกรดต่างลดลงต่ำสุดชั่วโมงที่ 120 ซึ่งมีค่าความเป็นกรดต่างที่ 5 ส่วนปริมาณแอลกอฮอล์ของเชื้อ BS 6-2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อกากขานอ้อยใน SM30 ที่ทำการกรอกก่อนนำเข้าเครื่องหม้อนึ่งความดันอัตโนมัติ นั้นไม่พบปริมาณแอลกอฮอล์ตั้งแต่ชั่วโมงแรกถึงชั่วโมงที่ 120

จากความแตกต่างขององค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลให้การเจริญของเซลล์แตกต่างกัน โดยเชื้อ BS 6-2 มีจำนวนเซลล์สูงที่สุดชั่วโมงที่ 72 ซึ่งเป็นระยะเวลาเดียวกันกับที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงต่ำ และเมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงเพิ่มขึ้นค่าความเป็นกรดต่างเริ่มลดลง จากการเลี้ยงเชื้อ เมื่อครบ 120 ชั่วโมง พบว่าจำนวนเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อกากขานอ้อยใน SM30 ที่ทำการกรอกกากขานอ้อยออกก่อนนำเข้าเครื่องหม้อนึ่งความดันอัตโนมัติให้จำนวนเซลล์สูงสุด โดยเชื้อ BS 6-2 มีจำนวนเซลล์  $2.06 \times 10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อกากขานอ้อยทั้ง 2 สูตรและอาหารเลี้ยงเชื้อ YM มีจำนวนเซลล์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) และกากขานอ้อยเป็นอาหารที่ให้ปริมาณเซลล์สูงสุดในวันที่ 3 ของการเลี้ยง

### โครงการวิจัยที่ 6 การพัฒนาการผลิตวัคซีนและสารเสริมอาหารโดยเทคนิคการตรึงเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลาทะเลต่อปรสิตสัตว์น้ำหรือแบคทีเรีย

โครงการวิจัยนี้เพื่อศึกษาชนิดของวัสดุและวิธีในการตรึงเซลล์ยีสต์และปรสิต *Cryptocaryon irritans* เชื้อตายไม่ให้หลุดออกมาในน้ำ โดยศึกษากระบวนการที่จะตรึงสารอาหารไว้ภายในให้ได้มากที่สุดและให้ถูกปล่อยออกมาในระยะเวลาที่เหมาะสม รวมถึงการนำวัสดุที่ใช้เป็นอาหารสัตว์น้ำมาทำการตรึงจะต้องมีการศึกษาทั้งเทคนิคในการตรึงและวัสดุที่จะนำมาตรึง โดยในปีที่ 1 ทำการศึกษาวิธีการตรึงเซลล์และประสิทธิภาพของสารที่นำมาใช้ในการตรึงเซลล์ มีผลการวิจัยดังนี้

การเลี้ยงยีสต์ *Pichia* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อกากขานอ้อยที่ความเค็ม 25 พีพีที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง มีการเจริญสูงสุดในระยะเวลาการเลี้ยงที่ 72 ชั่วโมง และมีจำนวนเซลล์เท่ากับ  $2.45 \times 10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดไขมันจากเมล็ดเจลที่ตรึงยีสต์ *Pichia* sp. ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต พบกรดปาล์มิติกเป็นองค์ประกอบหลักมากที่สุดร้อยละ  $21.20 \pm 0.57$  กรดโอเลอิกและกรดไลโนเลอิกร้อยละ  $17.83 \pm 0.35$  และ  $3.14 \pm 0.10$  ตามลำดับ ในขณะที่พบกรดไขมันอิ่มตัวและกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยวทั้งหมดในเมล็ดเจลแห้งร้อยละ 32.61 และ 20.36 ตามลำดับ ในการตรึงเซลล์ยีสต์พบว่าโซเดียมอัลจิเนตที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.2 และแคลเซียมคลอไรด์ร้อยละ 1.5 มีความเหมาะสมมากที่สุด

## การถ่ายทอดองค์ความรู้และการนำผลงานไปเผยแพร่

### 1. การถ่ายทอดองค์ความรู้และการสร้างนักวิจัยรุ่นใหม่

จากการดำเนินการวิจัยของโครงการย่อย 6 โครงการในปีที่ 1 ได้ใช้องค์ความรู้จากการศึกษาในการทำปัญหาพิเศษ ได้ผลิตบัณฑิตและนักวิจัยรุ่นใหม่และบุคลากรที่อยู่ในโครงการได้เป็นที่ปรึกษา และที่ปรึกษาร่วมในระดับอุดมศึกษาทั้งสิ้น 5 เรื่องจาก 4 โครงการวิจัย ดังแสดงในตารางที่ 2 (เอกสารบทความย่อ แสดงในภาคผนวก)

ตารางที่ 2 ข้อมูลการใช้องค์ความรู้จากการศึกษาในปีที่ 1 ในการทำปัญหาพิเศษ ได้ผลิตบัณฑิตและนักวิจัยรุ่นใหม่

โครงการวิจัย	คณะ/สาขา	ระดับ/จำนวน (คน)	เรื่องปัญหาพิเศษ
2	วิทยาศาสตร์/ชีวเคมี	ป. ตรี / 2	การตรวจหาฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับฟองน้ำจากเกาะวังนอก จังหวัดสุราษฎร์ธานี
3	วิทยาศาสตร์/ เทคโนโลยีชีวภาพ	ป. ตรี / 2	การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากแอคติโนไมซีทที่แยกจากดินตะกอน
4	วิทยาศาสตร์/ เทคโนโลยีชีวภาพ	ป. ตรี / 2	การศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันในยีสต์ (BS1-2 และ BS6-2) ที่แยกได้จากน้ำทะเลในอาหารเลี้ยงเชื้อจากกากชานอ้อย
4	วิทยาศาสตร์/ เทคโนโลยีชีวภาพ	ป. ตรี / 2	การศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันในยีสต์ BS6-2 ที่แยกได้จากน้ำทะเลในอาหารเลี้ยงเชื้อจากกากชานอ้อยที่มีความเค็มแตกต่างกัน 3 ระดับ
5	สหเวชศาสตร์/ วิทยาศาสตร์การแพทย์	ป. ตรี / 2	สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จาก <i>Streptomyces indiacensis</i> สายพันธุ์ 16-1 เหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งหลังโพรงจมูก (KB cells) ตายแบบ apoptosis

### การนำผลงานไปเผยแพร่

จากการดำเนินการวิจัยของโครงการย่อย 6 โครงการในปีที่ 1 ได้นำผลจากการศึกษาวิจัยในเบื้องต้นไปร่วมประชุมทางวิชาการและเข้าร่วมเสนอผลงานในรูปแบบโปสเตอร์ ทั้งสิ้น 3 เรื่องจาก 2 โครงการวิจัย ดังแสดงในตารางที่ 3 (เอกสารบทความย่อ แสดงในภาคผนวก)

ตารางที่ 3 ข้อมูลการเข้าร่วมประชุมทางวิชาการและเสนอผลงานในรูปแบบโปสเตอร์/proceedings

โครงการวิจัย	การประชุม	สถานที่/ประเทศ	ชื่อเรื่อง
4	10 <sup>th</sup> Ais-Pacific Marine Biotechnology Conference, May 4-8, 2014	Taipei, Taiwan	Fatty acid compositions of <i>Pichia</i> sp. Isolated from seawater, cultured in sugarcane bagasse media at three different salinities
4	International Conference on Microbial Taxonomy, Basic and Applied Microbiology	Kosa Hotel Khon Kaen, Thailand	PUFAs in Marine Yeast Isolated from Coastal Water, Thailand (Proceedings)
5	10 <sup>th</sup> International Marine Biotechnology Conference, November 11-15, 2013,	Brisbane, Queensland, Australia	Anti-MRSA and antioxidant activities of actinomycetes isolated from marine sponges