

# รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

## เรื่อง

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับฟองน้ำทะเล  
ในประเทศไทยที่ผลิตรงควัตถุชีวภาพและการศึกษาคุณสมบัติ  
ของรงควัตถุชีวภาพ

(Identification of biopigment-producing bacteria associated with  
sponges in Thailand and characterization of their biopigment)

## โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. วรพจน์ สุนทรสุข

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

ศาสตราจารย์ ดร. ถิณา สุนทรสุข

ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์

มหาวิทยาลัยมหิดล

## กิติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณรัฐบาลไทยที่ให้การสนับสนุนงบประมาณประจำปี 2552-53 สำหรับงานวิจัยนี้ และขอขอบคุณ นางสาวพัชรี ถาวรวิริยะนันท์ที่ช่วยเหลืองานวิจัยนี้ให้สำเร็จได้ด้วยดี

ผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ที่สนับสนุนเครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิจัย รวมทั้ง ดร. ชุติวรรณ เดชสกุลวัฒนา แห่งสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้การอนุเคราะห์สายพันธุ์แบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับฟองน้ำทะเล และน้ำทะเลที่ใช้ศึกษาวิจัยในครั้งนี้ รศ. ดร. สมบูรณ์ ธนาสุภวัฒน์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และดร. สมเกียรติ เดชกาญจนรักษ์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ ที่ให้คำแนะนำและอนุเคราะห์การใช้เครื่องมือสำหรับการจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรีย และ Assoc.Prof. Hajime Tamaki คณะเกษตร มหาวิทยาลัยแห่งริวกิว จังหวัด โอกินาวา ประเทศญี่ปุ่น ที่ให้คำแนะนำในการศึกษาโครงสร้างของรงควัตถุสีม่วง

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่ผลิตรงควัตถุชีวภาพซึ่งอาศัยร่วมกับฟองน้ำทะเลในอ่าวไทย ศึกษาการผลิตและชนิดของรงควัตถุชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรียดังกล่าว ผลการศึกษาพบว่าแบคทีเรียที่สามารถผลิตรงควัตถุชีวภาพได้ดีบนอาหาร modified Zobell medium จำนวน 3 สายพันธุ์จากแบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับฟองน้ำทะเลทั้งหมด 8 สายพันธุ์ แบคทีเรียดังกล่าว ได้แก่ สายพันธุ์ CHOB06-6, KODA19-6 และ MAKB08-4 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวด้วยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA พบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์อยู่ในกลุ่ม  $\alpha$ -Proteobacteria โดยที่สายพันธุ์ CHOB06-6 และสายพันธุ์ MAKB08-4 จัดเป็นแบคทีเรีย *Sphingomonas phyllosphaerae* และ สายพันธุ์ KODA19-6 จัดเป็นแบคทีเรีย *Sphingomonas natatoria* ทั้งนี้แบคทีเรีย *S. natatoria* KODA19-6 มีความสามารถในการผลิตรงควัตถุชีวภาพได้ดีที่สุดภายใต้สภาวะที่เหมาะสมคือ pH 7.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน โดยแบคทีเรียมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด 0.06 ต่อชั่วโมง และมีอัตราการผลิตรงควัตถุชีวภาพ 6.27 ไมโครกรัมต่อลิตรชั่วโมง สำหรับการวิเคราะห์รงควัตถุชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ด้วยเทคนิค HPLC โดยเทียบเวลาคงค้างและ UV-visible Spectrum ของรงควัตถุชีวภาพ พบว่ารงควัตถุชีวภาพจัดอยู่ในกลุ่มคาโรทีนอยด์ชนิดซีแซนทีนและอนุพันธ์ของสารสีซีแซนทีน

คำสำคัญ : แบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับฟองน้ำทะเล/รงควัตถุชีวภาพ/การพิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรีย

### Abstract

The investigation was aimed at identifying biopigment-producing sponge-associated bacteria from the Gulf of Thailand, studying biopigment production and determining biopigment type. The results showed that 3 isolates, CHOB06-6, KODA19-6 and MAKB08-4, out of 8 sponge-associated bacteria were able to produce biopigment on a modified Zobell medium. According to their 16S rRNA gene sequence analyses, they were member of  $\alpha$ -Proteobacteria in which CHOB06-6 and MAKB08-4 were closely related to *Sphingomonas phyllosphaerae* and KODA19-6 was related to *Sphingomonas natatoria*. *S. natatoria* KODA19-6 was the best biopigment producer at the optimal condition of pH 7.0 at 30°C and shaking at 150 rev/min for 4 days. Biopigment production kinetics in flask fermentation showed that its specific growth rate ( $\mu_{\max}$ ) was 0.06 h<sup>-1</sup> and biopigment productivity was 6.27  $\mu\text{g}/\text{l}\cdot\text{h}$ . Biopigment analysis by HPLC comparing their retention times and UV-Spectra to standard pigments indicated that the biopigments were zeaxanthin and its derivatives.

**Keywords** : Sponge-associated bacteria/Biopigments/ Bacterial identification

## สารบัญ

หัวข้อ	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	2
บทคัดย่อ	3
สารบัญ	5
สารบัญตาราง	6
สารบัญรูป	7
บทนำ	8
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	9
การตรวจเอกสาร	9
วิธีการทดลอง	11
ผลการทดลองและวิจารณ์ผล	11
สรุปผลการทดลอง	22
ข้อเสนอแนะ	22
เอกสารอ้างอิง	23
ผลงานตีพิมพ์และสิ่งตีพิมพ์เพื่อเผยแพร่	28
ภาคผนวก	29

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ลักษณะสัณฐานของแบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับฟองน้ำทะเล	12
2	การใช้น้ำตาลของแบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับฟองน้ำทะเล	13
3	การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับฟองน้ำทะเล โดยชุดทดสอบทางการค้า	13
4	การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับฟองน้ำทะเล โดยการศึกษาลำดับเบสของยีน 16S rRNA	14
5	ระยะทางในการเคลื่อนที่ของรงควัตถุสีภาพที่สกัดจากแบคทีเรีย และรงควัตถุมาตรฐาน	20
6	การอ่านผลการทดสอบ	31
7	สถานะการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR	32

## สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	Phylogenetic tree ของแบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับฟองน้ำทะเล โดยการศึกษาลำดับเบสของยีน 16s rRNA	14
2	การเจริญเติบโตและการผลิตซีแซนทีนของแบคทีเรียทะเลที่อาศัยร่วมกับฟองน้ำ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Modified Zobell medium	15
3	ผลของความเป็นกรด-ด่าง (pH) ต่อการเจริญเติบโตและการผลิตซีแซนทีนของแบคทีเรีย <i>S. natatoria</i> KODA 19-6	16
4	ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตและการผลิตซีแซนทีนของแบคทีเรีย <i>S. natatoria</i> KODA 19-6	18
5	จลนศาสตร์การผลิตซีแซนทีนจากแบคทีเรีย <i>S. natatoria</i> KODA 19-6	19
6	TLC chromatogram ของรงควัตถุมาตรฐานและรงควัตถุชีวภาพที่สกัดจากแบคทีเรีย	19
7	HPLC โครมาโตแกรมของรงควัตถุมาตรฐานและรงควัตถุชีวภาพที่สกัดจากแบคทีเรีย	21

## บทนำ

แบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับฟองน้ำทะเลมีความหลากหลายโดยมีลักษณะการอาศัยร่วมกันค่อนข้างจำเพาะ อาทิ ฟองน้ำสายพันธุ์ *Spongia officinalis* Linnaeus, 1759 พบแบคทีเรียสายพันธุ์ *Escherichia*, *Morganella*, *Proteus*, *Pasteurella*, *Aeromonas*, *Pseudomonas* และ *Acinetobacter* (Kefalas et al., 2003) ฟองน้ำสายพันธุ์ *Rhopaloeides odorabile* พบ *Actinobacteria*,  $\beta$ -Proteobacteria,  $\gamma$ -Proteobacteria, *Cytophaga*, *Flavobacterium*, green sulfur bacteria และ green non-sulfur bacteria (Webster et al., 2001) นอกจากนี้ยังมีผู้พบแบคทีเรียในกลุ่ม Cyanobacteria 3 สายพันธุ์คือ *Cyanobacterium stanieri*, *Prochloron* sp. และ *Synechocystis* sp. จากฟองน้ำ *Mycale (Carmia) hentscheli* (Webb et al., 2002) แบคทีเรียเหล่านี้มีความสำคัญต่อฟองน้ำทะเลอย่างมากโดยช่วยในการดูดซึมสารอาหาร การย่อยหรือการขนส่งสารเมตาบอไลต์ (Metabolite) นอกจากนี้ฟองน้ำทะเลยังได้รับสารที่เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมในเซลล์แบคทีเรียเช่นการตรึงไนโตรเจน หรือกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงอีกด้วย แบคทีเรียหลายชนิดเกี่ยวข้องกับกระบวนการป้องกันอันตรายที่จะเกิดจากสิ่งมีชีวิตอื่น (Defense mechanism) โดยการสร้างสารต่อต้านจุลินทรีย์ (Antimicrobial agent) เช่น แบคทีเรียสายพันธุ์  $\alpha$ -Proteobacteria,  $\gamma$ -Proteobacteria, *Corynebacterium* และ *Rhodococcus* (Thiel and Imhoff, 2003; Chelossi et al., 2004) และสารต่อต้านการเกาะติด (Antifouling agent) เช่น แบคทีเรียสายพันธุ์ *Pseudoalteromonas* (Holmström et al., 2002) สารอื่นๆที่แบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำทะเลสามารถผลิตได้เช่น Cyclic peptide (Rosa et al., 2003), neuroactive compound (Perovic et al., 1998) รวมถึง รังควัตถุชีวภาพหรือ biopigment (Osinga et al., 2001) จะเห็นได้ว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากฟองน้ำทะเลเป็นแหล่งหนึ่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพ ทั้งนี้ยังไม่มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียทะเลที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำและผลิตรงควัตถุชีวภาพในประเทศไทย

รงควัตถุชีวภาพ (Biopigments) คือสารสีตามธรรมชาติที่ถูกผลิตโดยสิ่งมีชีวิต ได้แก่พืช สัตว์ หรือจุลินทรีย์ สารสีเหล่านี้ถูกนำมาใช้ประโยชน์โดยเป็นสารปรุงแต่งสีในอาหาร สารเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการในอาหารสัตว์ สีในเครื่องสำอางและใช้ในทางเภสัชกรรม รวมทั้งเป็นสารป้องกันมะเร็ง และสารป้องกันโรคผิวหนังที่เกิดจากการรับแสงแดด ปัจจุบันการนำเข้าสารสีจากต่างประเทศมีเป็นจำนวนมากซึ่งส่วนใหญ่สารสีในอุตสาหกรรมมักจะได้มาจากพืชหรือการสังเคราะห์

ปัจจุบันมีผู้สนใจศึกษาการผลิตรงควัตถุชีวภาพจากจุลินทรีย์เนื่องจากสามารถเพาะเลี้ยงได้ง่ายและเจริญเติบโตรวดเร็ว จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถผลิตรงควัตถุชีวภาพ เช่น เชื้อรา *Monascus* sp., ยีสต์ *Rhodotorula* sp. และ *Phaffia rhodozyma*, สาหร่าย *Dunaliella* sp., และแบคทีเรีย *Flavobacterium multivorum* (Margalith, 1992; Hejazi and Wijffels, 2003; Buzzini and Martini, 1999) เป็นต้น ซึ่งสามารถผลิตรงควัตถุชีวภาพในอุตสาหกรรมได้แก่ *Monascus* pigment,  $\beta$ -carotene, astaxanthin, zeaxanthin, canthaxanthin, lycopene, torulene, torularhodin และ lutein เป็นต้น

สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา อนุเคราะห์แบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับฟองน้ำทะเลบริเวณอ่าวไทยจำนวนหนึ่งซึ่งน่าจะมีศักยภาพในการผลิตรงควัตถุทางชีวภาพ อย่างไรก็ตามแบคทีเรียเหล่านี้

ยังมีได้ถูกพิสูจน์เอกลักษณ์ นอกจากนี้คาดว่าอาจมีความเป็นไปได้ในการค้นพบรงควัตถุชีวภาพใหม่ ๆ ขึ้นได้จากแบคทีเรียดังกล่าว

### วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. พิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับฟองน้ำทะเลบริเวณอ่าวไทยซึ่งมีความสามารถในการผลิตรงควัตถุชีวภาพ
2. ศึกษาชนิดและคุณสมบัติของรงควัตถุชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับฟองน้ำทะเลบริเวณอ่าวไทย

ทั้งนี้ มีขอบเขตของโครงการวิจัย ดังนี้ ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่ผลิตรงควัตถุชีวภาพได้สูง จำนวน 3 – 5 สายพันธุ์ พร้อมทั้งทำการแยกรงควัตถุชีวภาพให้บริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติรงควัตถุชีวภาพ 1 ชนิดโดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีและสเปกโตรสโกปีแบบต่าง ๆ

### การตรวจเอกสาร

รงควัตถุชีวภาพที่สามารถผลิตได้ในอุตสาหกรรมโดยจุลินทรีย์มีหลายชนิด ได้แก่  $\beta$ -carotene, astaxanthin, lycopene, zeaxanthin และ Monascus pigment

$\beta$ -carotene เป็นรงควัตถุชีวภาพในกลุ่มคาโรทีนอยด์ มีสีส้ม เป็นสารประเภทเตตระเทอร์ปีนส์ มีสูตรโครงสร้างทางเคมีคือ  $C_{40}H_{56}$  สารนี้มีความสำคัญทางอุตสาหกรรมอย่างมาก เนื่องจากถูกนำมาใช้เป็นสีผสมอาหาร เครื่องสำอาง สารเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการในอาหารสัตว์ นอกจากนี้ยังใช้ในทางเภสัชกรรมเช่น เป็น provitamin A เป็นสารป้องกันมะเร็ง เป็นต้น จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถผลิต  $\beta$ -carotene ได้ เช่น สาหร่าย *Dunaliella* sp. (Hejazi and Wijffels, 2003) ยีสต์ *Rhodotorula glutinis* (Buzzini and Martini, 1999) และ เชื้อรา *Blakeslea trispora* (Kim et al., 1997) เป็นต้น

Astaxanthin เป็นรงควัตถุชีวภาพในกลุ่มคีโตคาโรทีนอยด์ มีสีแดง อยู่ในจำพวก Xanthophylls มีสูตรโครงสร้างทางเคมีคือ  $C_{40}H_{52}O_4$  สารนี้ถูกใช้เพื่อเป็นอาหารเสริมในการเลี้ยงปลาแซลมอน ปู กุ้ง และไก่ ช่วยในการเกิดสีในอาหาร เช่น ไข่ไก่ ใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ป้องกันโรคหัวใจ โรคทางภูมิคุ้มกัน สารต่อต้านการอักเสบ ป้องกันการเกิดโรคอัลไซเมอร์ จุลินทรีย์ที่สามารถผลิต astaxanthin ได้ เช่น สาหร่าย *Haematococcus pluvialis* (Dufosse et al., 2005) ยีสต์ *Xanthophyllomyces dendrorhous* หรือ *Phaffia rhodozyma* (Parajo et al., 1997) และแบคทีเรีย *Agrobacterium aurantiacum* (Yokohama and Miki, 1995) เป็นต้น

Lycopene เป็นสารในกลุ่มคาโรทีนอยด์ที่มีสีแดงสด มีสูตรโครงสร้างทางเคมีคือ  $C_{40}H_{56}$  มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดโรคหัวใจ มะเร็ง โรคเบาหวาน ภาวะกระดูกพรุน และการเป็นหมันในผู้ชาย นอกจากนี้ยังใช้เป็นสารให้สีในอาหารอีกด้วย โดยส่วนมากจะพบ lycopene ในพืช โดยเฉพาะมะเขือเทศ แต่ปัจจุบันมีการตัดแต่งพันธุกรรมเพื่อให้แบคทีเรียสามารถผลิต lycopene ได้ แบคทีเรียที่ถูกนำมาศึกษาได้แก่ *Escherichia coli* (Lee et al., 2003)

Monascus pigment เป็นกลุ่มของรงควัตถุชีวภาพจากเชื้อรา *Monascus* sp. ที่เรียกว่า azophilones สารในรงควัตถุกลุ่มนี้มีโครงสร้างและคุณสมบัติทางเคมีที่คล้ายคลึงกัน ประกอบด้วยรงควัตถุสีเหลืองคือ ankaflavine และ monascine สีส้มคือ rubropunctatine และ monascorubrine และสีม่วงคือ rubropunctamine และ monascorubramine สารในกลุ่มนี้มีประโยชน์ทางการแพทย์ เช่น ยับยั้งการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลในตับ ช่วยลดไขมันในน้ำเลือด เพิ่มปริมาณ HDL ลดความเสี่ยงการเกิดโรคหัวใจ นอกจากนี้สารในกลุ่มนี้ยังใช้เป็นสีผสมอาหารอีกด้วย (Erdogrul and Azirak, 2005)

Zeaxanthin เป็นรงควัตถุชีวภาพในกลุ่ม Xanthophylls มีสีเหลือง มีสูตรโครงสร้างทางเคมีคือ  $C_{40}H_{56}O_2$  ซึ่งเป็นไอโซเมอร์กับรงควัตถุชีวภาพ lutein โดยที่หมู่แอลกอฮอล์ (-OH) สองหมู่ แตกต่างจากกันที่ การเคลื่อนที่ของพันธะคู่เพียงหนึ่งพันธะ ทำให้พันธะคู่ของ zeaxanthin ทั้งหมดเป็น conjugated double bond พบ zeaxanthin ได้ทั่วไปในข้าวโพดสีเหลือง ไข่แดง และผักผลไม้ที่มีสีเหลืองหรือส้ม ไม่แสดงสมบัติเป็นวิตามินเอ มีบทบาทสำคัญในการป้องกันโรคจอประสาทตาเสื่อม (AMD) ซึ่งเป็นสาเหตุของอาการตาบอด และมีคุณสมบัติในการป้องกันโรคมะเร็งเช่นเดียวกับรงควัตถุที่อยู่ในกลุ่มคาโรทีนอยด์อื่น ๆ (Nishino *et al.*, 2002) สารนี้ถูกใช้เป็นอาหารเสริมและสารให้สีในอุตสาหกรรมอาหารสำหรับนก สุนัขและปลา มีผลในการให้สีเหลืองกับผิวและไข่แดงของนก และให้สีผิวสีเหลืองกับสุนัขและปลา (Sajilata *et al.*, 2008) จุลินทรีย์สามารถผลิต zeaxanthin ได้ เช่น แบคทีเรีย *Flavobacterium* sp. (Alcantara and Sanchez, 1999; Bhosale and Bernstein, 2005) *Zeaxanthinibacter enoshimensis* (Asker *et al.* 2007a), *Mesoflavibacter zeaxanthinifaciens* (Asker *et al.* 2007b), *Synechocystis* sp. (Lagarde *et al.* 2000), *Erwinia herbicola* (Hundle *et al.* 1993), *Paracoccus zeaxanthinifaciens* (Berry *et al.* 2003), *Sphingobacterium multivorum* (Alcantara and Sanchez 1999) and *Leeuwenhoekiella* sp. (Stafsnes *et al.* 2010). สำหรับขนาดเล็ก *Dunaliella salina* (Jin *et al.*, 2003) และยีสต์สีแดง *Phaffia rhodozyma* (Hoshino *et al.*, 2004) เป็นต้น

สำหรับแบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับฟองน้ำทะเลมีหลายสายพันธุ์ อาทิ แบคทีเรียสายพันธุ์ *Escherichia*, *Morganella*, *Proteus*, *Pasteurella*, *Aeromonas*, *Pseudomonas* และ *Acinetobacter* พบในฟองน้ำสายพันธุ์ *Spongia officinalis* Linnaeus, 1759 (Kefalas *et al.*, 2003) แบคทีเรียสายพันธุ์ *Actinobacteria*,  $\beta$ -Proteobacteria,  $\gamma$ -Proteobacteria, *Cytophaga*, *Flavobacterium*, green sulfur bacteria และ green non-sulfur bacteria พบในฟองน้ำสายพันธุ์ *Rhopaloeides odorabile* (Webster *et al.*, 2000) แบคทีเรียสายพันธุ์ในกลุ่ม Cyanobacteria, *Cyanobacterium stanieri*, *Prochloron* sp. and *Synechocystis*, พบในฟองน้ำ *Mycale (Carmia) hentscheli* (Webb *et al.*, 2002) เป็นต้น แบคทีเรียเหล่านี้ช่วยในการดูดซึมสารอาหาร การย่อย การให้และการขนส่งสารเมตาบอไลต์ (Metabolite) ที่เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมในเซลล์แบคทีเรียให้กับฟองน้ำทะเล แบคทีเรียหลายชนิดเกี่ยวข้องกับกระบวนการป้องกันอันตรายที่จะเกิดจากสิ่งมีชีวิตอื่น (Defense mechanism) โดยการสร้างสารต่อต้านจุลินทรีย์ (Antimicrobial agent) สารต่อต้านการเกาะติด (Antifouling agent) cyclic peptide (Rosa *et al.*, 2003) neuroactive compound (Perovic *et al.*, 1998) และรงควัตถุชีวภาพหรือ biopigment (Osinga *et al.*, 2001)

## วิธีการทดลอง

แบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับฟองน้ำทะเล 8 สายพันธุ์ และน้ำทะเลได้รับการอนุเคราะห์จากสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้คือ Modified Zobell medium (องค์ประกอบแสดงในภาคผนวก)

1. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับฟองน้ำทะเลโดยใช้วิธีการศึกษาทางสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์ ข้อมแกรม การศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียในการใช้น้ำตาล การศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียโดยใช้ชุดทดสอบทางการค้า (API test kit) และการศึกษาลำดับเบสของ 16s rDNA ด้วยเทคนิคด้าน DNA (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก)
2. การศึกษาการผลิตรงควัตถุชีวภาพจากแบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับฟองน้ำทะเล และปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตรงควัตถุชีวภาพ (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก)
3. การศึกษาชนิดและปริมาณของรงควัตถุชีวภาพที่ผลิตขึ้นจากแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์โดยใช้ Thin-layer chromatography (TLC) และ High performance liquid chromatography (HPLC) โดยใช้คอลัมน์แบบ C-18 (reverse phase column) (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก)
4. การศึกษาการแยกรงควัตถุเพื่อให้ได้รงควัตถุบริสุทธิ์โดยเทคนิค semi-preparative HPLC และวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสารรงควัตถุชีวภาพที่แยกได้โดยใช้เทคนิค Liquid chromatography-Mass spectrometry (LC-MS) และศึกษาคุณสมบัติของรงควัตถุชีวภาพ เช่น คุณสมบัติการละลาย การทนต่อกรดและด่าง และการทนต่อความร้อน เป็นต้น (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก)
5. การศึกษาโครงสร้างของรงควัตถุชีวภาพที่แยกได้โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ต่างๆ เช่น Nuclear Magnetic Resonance (NMR) (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก)

## ผลการทดลองและการวิจารณ์ผล

### 1. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับฟองน้ำทะเล

การศึกษาลักษณะของแบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับฟองน้ำทะเล ซึ่งได้แก่ สี การเคลื่อนที่ การติดสีแกรม การเจริญในอาหารกึ่งเหลว รูปร่างและขนาด แสดงในตารางที่ 1 แบคทีเรียมีสีเหลืองถึงส้ม แบคทีเรียติดสีแกรมลบทั้งหมด สำหรับรูปร่างของแบคทีเรียมีทั้งแบบกลม แบบแท่งสั้นและแบบแท่ง โดยมีขนาดแตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการพบแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่งในถิ่นที่อยู่อื่น (Olson *et al.* 2002; Chelossi *et al.* 2004) โดยพบว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากฟองน้ำ *Petrosia ficiformis* ประมาณ 58% เป็นแบคทีเรียแกรมลบแบบแท่งสั้นและแท่งยาว ไม่สร้างสปอร์และมีสีเหลือง ส้ม แดง หรือน้ำตาล ใดๆก็ตามมีรายงานการพบแบคทีเรีย แกรมบวกแบบกลม *Micrococcus luteus* ที่แยกได้จากฟองน้ำ *Xestospongia* sp. บริเวณ New Caledonia และแบคทีเรียแกรมบวกแบบแท่ง *Bacillus* sp. ที่แยกได้จากฟองน้ำ *Sigmadocia fibulatus* บริเวณชายฝั่ง Tuticorin ในอินเดียตะวันออกเฉียงใต้ (Bultel-Poncé *et al.* 1998; Anand *et al.* 2006)

ตารางที่ 1 ลักษณะพื้นฐานของแบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับฟองน้ำทะเล

Strain	Color	Mobility	Gram stain	Growth*	Shape	Size (µm)	
						Length	Width
CHOB 06-6	Yellow	-	Negative	++	Short rod	2.2-2.3	0.9-1.1
CHOB 09-1	Brown	-	Negative	++	Rod	4.2-4.6	1.4
CHOB 14-2	Brown	-	Negative	++	Cocci	1.1-1.5	
MAKB 07-1	Brown	-	Negative	+++	Rod	5.2-6.2	1.1-1.2
MAKB 08-4	Yellow	+	Negative	+++	Short rod	2.1-2.4	1.0-1.2
MAKB 13-3	Pale orange	+	Negative	+++	Rod	3.4-3.6	1.1-1.9
KODA 19-6	Yellow	+	Negative	++	Short rod/cocci	1.3-1.5	1.3-1.7
SAMD 03-1	White	-	Negative	+	Rod	4.0-4.6	0.9-1.1

\*on Modified Zobell semi solid medium

ผลการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการใช้น้ำตาล 9 ชนิด แสดงในตารางที่ 2 แบคทีเรียบางสายพันธุ์ที่ไม่สามารถใช้น้ำตาลทุกชนิด แต่สามารถเจริญเติบโตได้ เช่น MAKB 13-3 แสดงว่าน้ำตาลเหล่านี้ถูกใช้ในการเจริญ แต่ผลผลิตที่ได้ไม่มีกรด ทำให้เปลี่ยนสีอาหารทดสอบ หรือแบคทีเรียสามารถผลิตกรดจากน้ำตาล และสามารถใช้กรดที่ผลิตขึ้นอย่างรวดเร็ว ทำให้ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในอาหารทดสอบ นอกจากนี้ยังพบว่าไม่มีสายพันธุ์ใดใช้น้ำตาลแลคโตสและเมลิไบโอส แสดงว่าทั้ง 8 สายพันธุ์ไม่ใช่ Enteric bacteria ที่มีความสามารถในการใช้น้ำตาลแลคโตส ทำให้ในการทดลองต่อไป ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ชุดทดสอบแบคทีเรียชนิด API 20 NE ซึ่งเป็นชุดทดสอบสำหรับแบคทีเรียแกรมลบที่ไม่ใช่ Enteric bacteria ในการพิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรียทางชีวเคมีกับแบคทีเรียที่มีสีเด่นชัด ได้แก่ แบคทีเรียสายพันธุ์ KODA 19-6, CHOB 06-6 และ MAKB 08-4

ผลการทดสอบแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ด้วยชุดทดสอบ API 20 NE แสดงในตารางที่ 3 แบคทีเรียสายพันธุ์ KODA 19-6 จัดเป็น *Chryseomonas luteola* โดยมีความเหมือน (Identity) ถึง 99.9% ขณะที่แบคทีเรียสายพันธุ์ CHOB 06-6 จัดเป็น *Moraxella* spp. โดยมีความเหมือนเพียง 82.2% และแบคทีเรียสายพันธุ์ MAKB 08-4 จัดเป็น *Methylobacterium mesophilicum* โดยมีความเหมือนเพียง 81% นอกจากนี้มีรายงานเกี่ยวกับแบคทีเรีย *Chryseomonas luteola* หรือ *Pseudomonas luteola* เป็นแบคทีเรียก่อโรคในคนทำให้เกิดอาการ Septicemia, Meningitis และ Endocarditis (Chihab et al., 2003) ดังนั้นการพิสูจน์เอกลักษณ์โดยการศึกษาลำดับเบสของ 16s rDNA ด้วยเทคนิคด้าน DNA มีความจำเป็นในการบ่งชี้ถึงสายพันธุ์ของแบคทีเรีย

## ตารางที่ 2 การใช้น้ำตาลของแบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับฟองน้ำทะเล

Strain	Lactose	Sucrose	Mannitol	Mannose	Maltose	Galactose	Glucose	Fructose	Melbiose
CHOB 06-6	-	-*	-*	+	-*	-*	+	+	-*
CHOB 09-1	-	-	-	+/-	-*	-	+	+	-
CHOB 14-2	-	-	-	+	-	-	-	-	-
MAKB 07-1	-	-	+	+	-	-	-	+	-*
MAKB 08-4	-	-	+/-	-	-	-	-	-	-
MAKB 13-3	-*	-*	-*	-*	-*	-*	-*	-*	-*
KODA 19-6	-*	-*	-*	-*	-*	-*	-*	-*	-*
SAMD 03-1	-	-	+	+	-	+	+	+	-

หมายเหตุ

- + สามารถใช้น้ำตาลแล้วสร้างกรด
- ไม่สามารถสร้างกรด
- +/- ไม่สามารถสรุปได้
- \* มีการเจริญ แต่ไม่เปลี่ยนน้ำตาลเป็นกรด

## ตารางที่ 3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับฟองน้ำทะเลโดยชุดทดสอบทางการค้า (API 20 NE test kit)

Strain	Identification	%ID
KODA 19-6	<i>Chryseomonas luteola</i>	99.9
CHOB 06-6	<i>Moraxella</i> spp.	82.2
MAKB 08-4	<i>Methylobacterium mesophilicum</i>	81

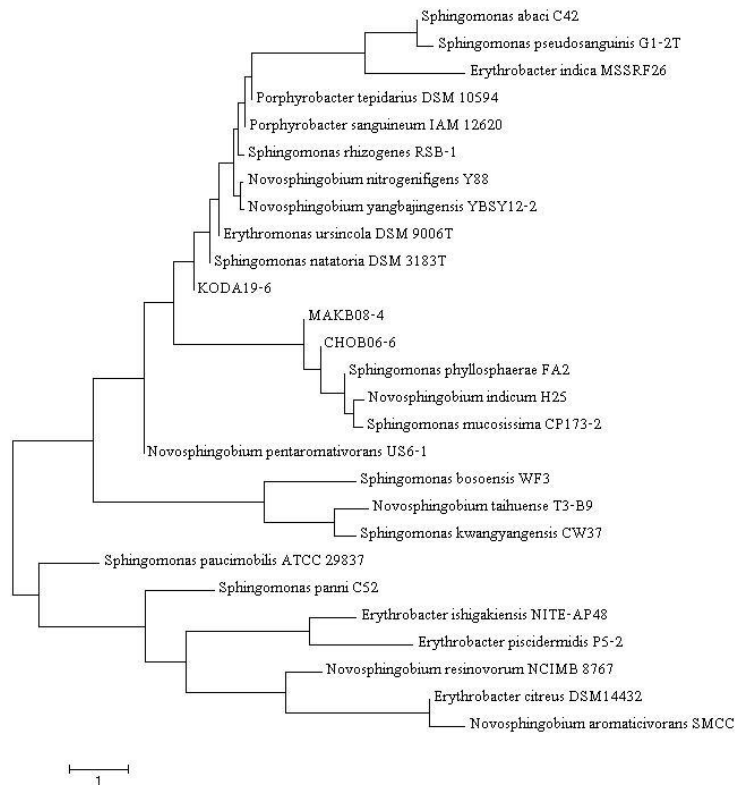
ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียทะเลที่อาศัยร่วมกับฟองน้ำ 3 สายพันธุ์ (CHOB 06-6, KODA 19-6 และ MAKB 08-4) ด้วยลำดับเบสของยีน 16S rRNA โดยใช้ความยาวของลำดับเบสของแบคทีเรียสายพันธุ์ CHOB 06-6, KODA 19-6 และ MAKB 08-4 คือ 1450, 1450 และ 1448 คู่เบส ตามลำดับ และวิเคราะห์ลำดับเบสของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ในฐานข้อมูลของ EMBOSS pairwise alignment algorithms option และ EMBOSS needle method พบว่า ลำดับเบสของ CHOB 06-6 มีความใกล้เคียงกับ *Sphingomonas phyllosphaerae* FA2<sup>T</sup> 88.8% (1334 bp/1502 bp) ลำดับเบสของ KODA 19-6 มีความใกล้เคียงกับ *Sphingomonas (Blastomonas) natatoria* DSM 3183<sup>T</sup> 98.0% (1447 bp/1477 bp) และลำดับเบสของ MAKB 08-4 มีความใกล้เคียงกับ *Sphingomonas phyllosphaerae* FA2<sup>T</sup> 89.0% (1322 bp/1485 bp) (ตารางที่ 4) ด้วย GenBank accession number ได้แก่ FJ999661, FJ999662 และ FJ843590 ตามลำดับ ทั้งนี้รูปที่ 1 แสดง

ตารางที่ 4 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับพองน้ำทะเล โดยการศึกษาลำดับเบสของยีน 16S rRNA

Strain	Identification
KODA 19-6	<i>Springomonas natatoria</i>
CHOB 06-6	<i>Springomonas phyllosphaerae</i>
MAKB 08-4	<i>Springomonas phyllosphaerae</i>

Phylogenetic tree ของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ที่ถูกสร้างด้วยวิธี neighbor-joining method จะเห็นได้ว่าแบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์มีความเกี่ยวข้องกับแบคทีเรียในกลุ่ม  $\alpha$ -Proteobacteria

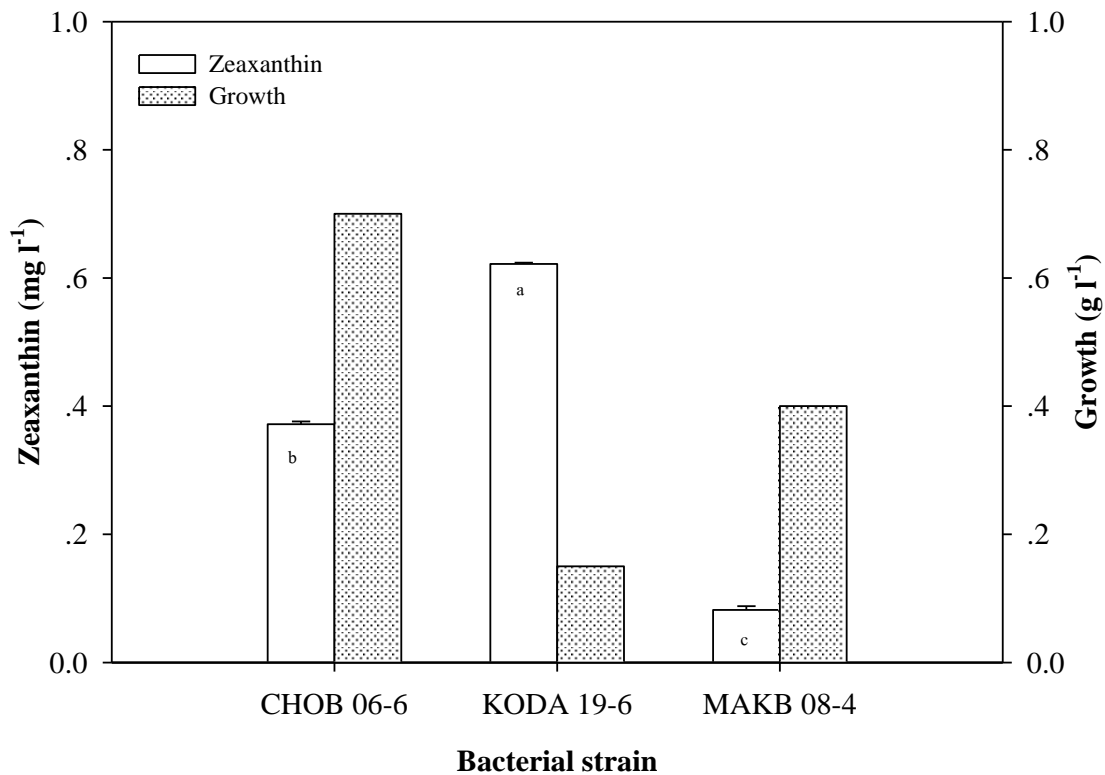
แบคทีเรีย *S. phyllosphaerae* FA2<sup>T</sup> ถูกค้นพบครั้งแรกในการแยกได้จากบริเวณ phyllosphere ของพืชตระกูลถั่ว (legumous tree) ในประเทศอาร์เจนตินาในปี 2004 (Rivas *et al.*, 2004) แบคทีเรียนี้สร้างโคโลนีสีเหลืองบนอาหาร nutrient agar ซึ่งสอดคล้องกับแบคทีเรียสายพันธุ์ CHOB 06-6 และ MAKB 08-4 ที่สร้างโคโลนีสีเหลืองบนอาหาร modified Zobell agar เช่นกัน อย่างไรก็ตาม ถิ่นที่อยู่ของแบคทีเรียสายพันธุ์ CHOB 06-6 และ MAKB 08-4 มีความแตกต่างกับแบคทีเรีย *S. phyllosphaerae* FA2<sup>T</sup> สำหรับแบคทีเรียสายพันธุ์ KODA 19-6 มีถิ่นที่อยู่แตกต่างจาก *S. (Blastomonas) natatoria* DSM 3183<sup>T</sup> ซึ่งถูกรายงานการค้นพบครั้งแรกในตัวอย่างน้ำจากสระว่ายน้ำ (Sly and Hargreaves, 1984) แต่มีผู้พบว่า แบคทีเรีย *S. (Blastomonas) natatoria* DSM 3183<sup>T</sup> สร้างโคโลนีสีเหลืองและส้มซึ่งเป็นรงควัตถุในกลุ่มคาโรทีนอยด์ (Hiraishi *et al.*, 2000)



รูปที่ 1 Phylogenetic treeของแบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับพองน้ำทะเล โดยการศึกษาลำดับเบสของยีน 16s rRNA

## 2. การศึกษาการผลิตรงควัตถุสีจากแบคทีเรีย

ผลการทดสอบเบื้องต้นและข้อมูลที่จะกล่าวต่อไปในหัวข้อที่ 5 พบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 สามารถผลิตสารสีซีแซนทีนอย่างน้อย 1 ชนิดจากรงควัตถุสีที่ผลิตขึ้น จึงแสดงผลของการผลิตสารสีซีแซนทีนจากแบคทีเรีย ซึ่งพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ CHOB 06-6, KODA 19-6 และ MAKB 08-4 ผลิตสารสีซีแซนทีนดังแสดงในรูปที่ 2 แบคทีเรียสามารถผลิตสารสีซีแซนทีนได้ประมาณ 0.08 – 0.62 มิลลิกรัมต่อลิตร และพบว่าแบคทีเรีย *S. natatoria* KODA 19-6 สามารถผลิตสารสีซีแซนทีนได้ดีที่สุดที่ 0.62 มิลลิกรัมต่อลิตร และให้ปริมาณมวลเซลล์น้อยที่สุดที่ 0.15 กรัมต่อลิตร จุลินทรีย์ที่ถูกค้นพบที่สามารถผลิตคาโรทีนอยด์โดยเฉพาะสารสีซีแซนทีน ได้แก่ สาหร่าย (*Neosporangium excentricum* และ *Spirulina* sp.) สาหร่ายขนาดเล็ก (*Dunaliella salina* และ *Microcystis aeruginosa*) ยีสต์สีแดง (*Xanthophyllomyces dendrohous* หรือ *Phaffia rhodozyma*) และ แบคทีเรีย (*Flavobacterium* sp., *Erwinia herbicola*, *Synechocystis* sp., *Zeaxanthinibacter enoshimensis* and *Mesoflavibacter zeaxanthinifaciens*) สำหรับแบคทีเรีย *Flavobacterium* sp. สามารถผลิตสารสีซีแซนทีนเป็นรงควัตถุหลัก (Sajilata *et al.*, 2008) โดยในอาหารที่มี yeast extract เป็นแหล่งคาร์บอนชนิดเดียวกัน *Flavobacterium* sp. สามารถผลิตสารสีซีแซนทีนได้ถึง 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตรในเวลา 32 ชั่วโมง



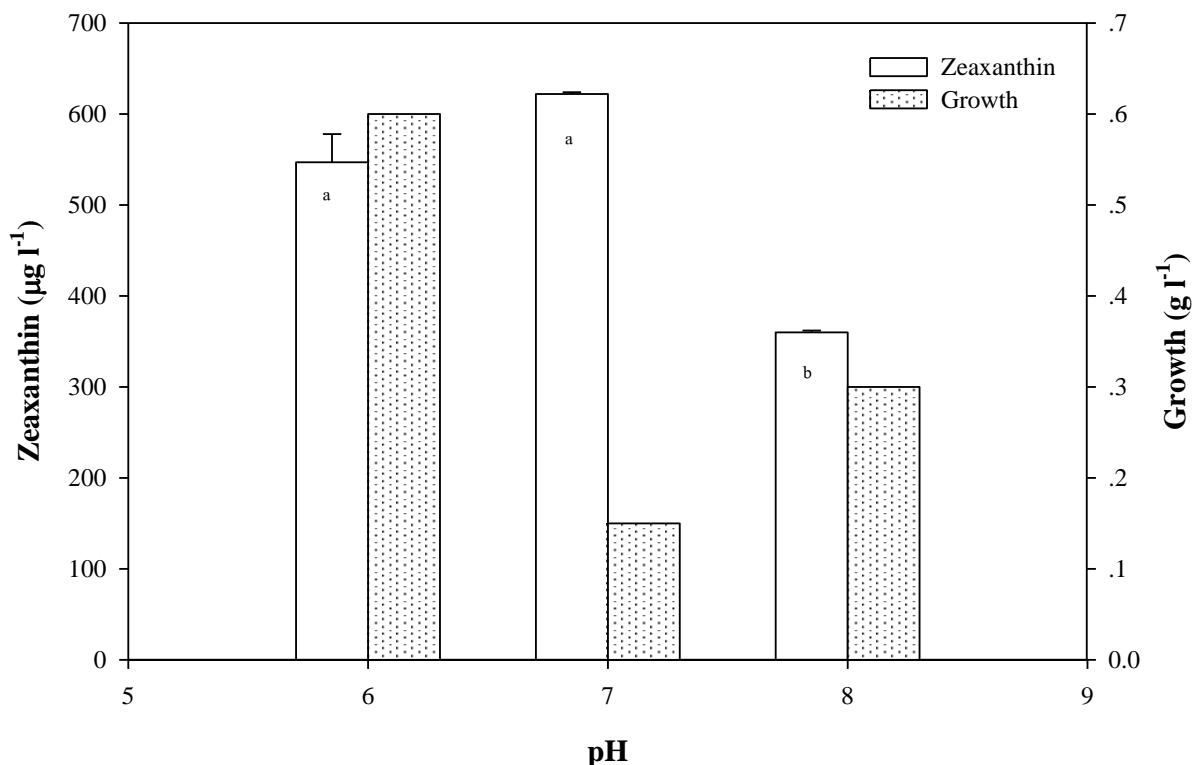
**รูปที่ 2** การเจริญเติบโตและการผลิตซีแซนทีนของแบคทีเรียทะเลที่อาศัยร่วมกับฟองน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อ Modified Zobell medium ที่ pH 7.6, อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 120 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 4 วัน

ตัวอักษร a, b และ c แทนข้อมูลที่แสดงความแตกต่างของตัวเลขอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $p < 0.05$ )

(Alcantara and Sanchez, 1999) นอกจากนี้ Bhosale and Bernstein (2005) ยังพบว่า *Flavobacterium multivorum* ผลิตสารสีซีแซนทีนได้ถึง 1.6 มิลลิกรัมต่อกรัม อย่างไรก็ตาม มีการพัฒนาสายพันธุ์จุลินทรีย์โดยการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutation) และการตัดแต่งพันธุกรรม (genetic recombination) เพื่อให้จุลินทรีย์มีความสามารถในการผลิตสารสีซีแซนทีนเพิ่มมากขึ้น เช่น สายพันธุ์ขนาดเล็ก *Dunaliella salina* ที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี ethylmethyl sulfonate สามารถผลิตสารสีซีแซนทีนได้ถึง 6 มิลลิกรัมต่อกรัม (Jin et al., 2003) ในยีสต์สีแดง *Phaffia rhodozyma* ที่ผ่านการตัดแต่งพันธุกรรมสามารถผลิตสารสีซีแซนทีนได้สูงถึง 2.2 – 5.7 มิลลิกรัมต่อลิตร (Hoshino et al., 2004) นอกจากนี้แบคทีเรีย *Pseudomonas putida* ที่ผ่านการตัดแต่งพันธุกรรม สามารถผลิตสารสีซีแซนทีนได้สูงถึง 51 มิลลิกรัมต่อลิตร และหลังจากมีการเติม lecitin ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ แบคทีเรียสามารถผลิตสารสีซีแซนทีนได้มากถึง 239 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนั้นแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ในงานวิจัยนี้ มีความสามารถในการผลิตสารสีซีแซนทีนต่ำกว่างานวิจัยข้างต้น เนื่องจากสายพันธุ์ของแบคทีเรีย สภาวะการเลี้ยง องค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อและความต้องการสารอาหารของแบคทีเรีย

### 3. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตตรงควัตถุสีของแบคทีเรีย *Sphingomonas natatoria* KODA 19-6

ผลการศึกษาพบว่า ความเป็นกรด-ด่างมีผลต่อการเจริญและการผลิตสีซีแซนทีนของแบคทีเรีย *S. natatoria* KODA 19-6 ดังแสดงในรูปที่ 3 โดยแบคทีเรียสามารถผลิตสารสีซีแซนทีน



**รูปที่ 3** ผลของความเป็นกรด-ด่าง (pH) ต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสีซีแซนทีนของแบคทีเรีย *S. natatoria* KODA 19-6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Modified Zobell medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 4 วัน

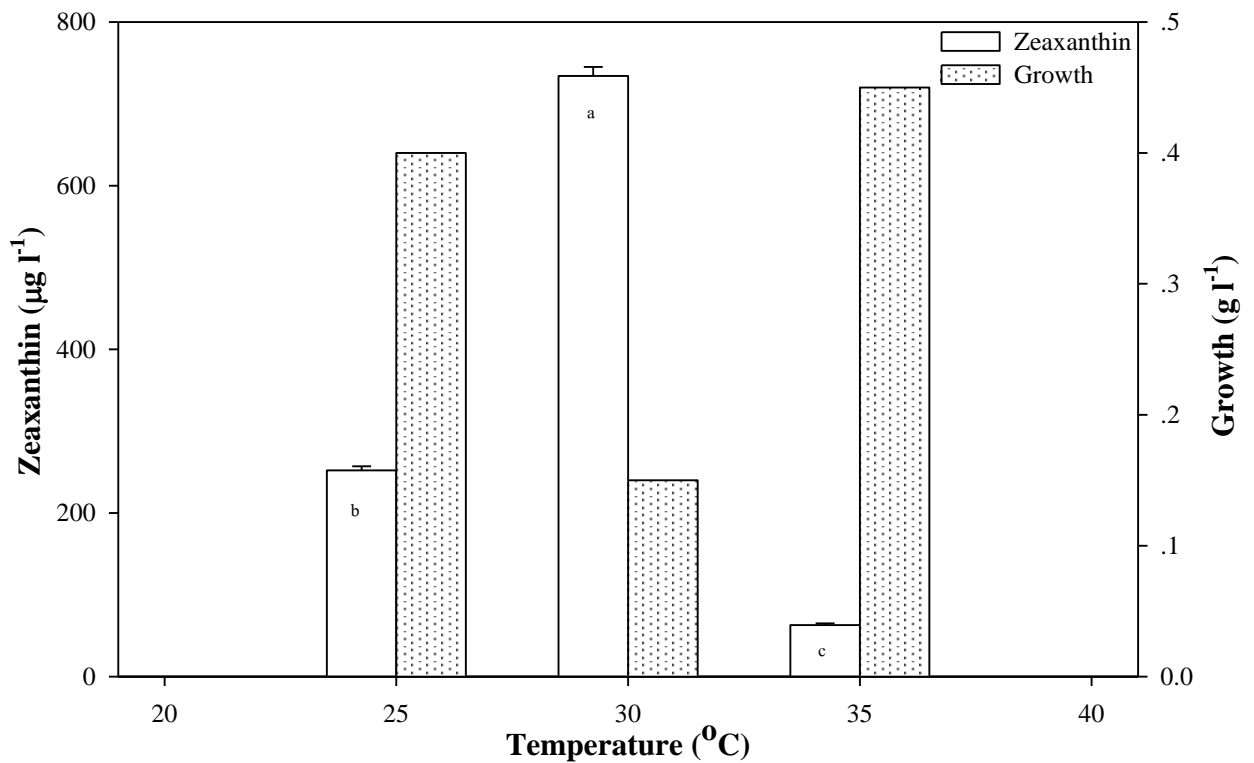
ตัวอักษร a และ b แทนข้อมูลที่แสดงความแตกต่างของตัวเลขอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $p < 0.05$ )

สูงสุด (0.62 มิลลิกรัมต่อลิตรหรือ 4.1 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง) ที่ pH 7.0 ในขณะที่แบคทีเรียผลิตมวลเซลล์สูงสุด (0.6 กรัมต่อลิตร) ที่ pH 6.0 ผลการทดลองมีความสอดคล้องกับรายงานของ Sarada และคณะ (2002) ที่พบว่า สาหร่ายขนาดเล็ก *Haematococcus pluvialis* สามารถผลิตสารสีแอสตาแซนทีนและมวลเซลล์สูงสุดที่ pH 7.0 และยีสต์สีแดง *Rhodotorula glutinis* สามารถผลิตคาโรทีนอยด์สูงสุดที่ pH 6.0 และผลิตมวลเซลล์สูงสุดที่ pH 6.5 (Aksu and Eren, 2007) สำหรับยีสต์สีแดง *Xanthophyllomyces dendrorhous* ที่สามารถผลิตสารสีแอสตาแซนทีนและมวลเซลล์ได้สูงสุดที่ pH 5.0 และ pH 6.0 ตามลำดับ (Hu *et al.*, 2006) โดยทั่วไป pH มีผลต่อการสังเคราะห์คาโรทีนอยด์ในเซลล์จุลินทรีย์เนื่องจากมีความเกี่ยวข้องในการทำงานของเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการ carotenogenesis และการเจริญของจุลินทรีย์

อุณหภูมิมีผลต่อการผลิตสารสีซีแซนทีนและการเจริญของแบคทีเรีย *S. natatoria* KODA 19-6 ดังแสดงในรูปที่ 4 แบคทีเรียสามารถผลิตซีแซนทีนได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยสามารถผลิตสารสีได้ถึง 0.73 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือคิดเป็น 4.9 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง และผลิตมวลเซลล์ต่ำสุดที่ 0.15 กรัมต่อลิตร ซึ่งคาดว่าอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียสมีความเหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์  $\beta$ -carotene hydroxylase ที่ทำหน้าที่เปลี่ยนเบต้าแคโรทีนไปเป็นสารสีซีแซนทีน โดยพบว่าสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* ผลิตสารสีแอสตาแซนทีนสูงสุดที่อุณหภูมินี้ (Tjahjono *et al.*, 1994) อย่างไรก็ตามยีสต์สีแดง *Phaffia rhodozyma* สามารถผลิตสารสีแอสตาแซนทีนสูงสุดที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส และเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น การผลิตสารสีแอสตาแซนทีนของยีสต์จะลดลงอย่างรวดเร็ว (Johnson and Lewis, 1979)

#### 4. การศึกษาจลนศาสตร์การผลิตสารสีซีแซนทีนของแบคทีเรีย *S. natatoria* KODA 19-6

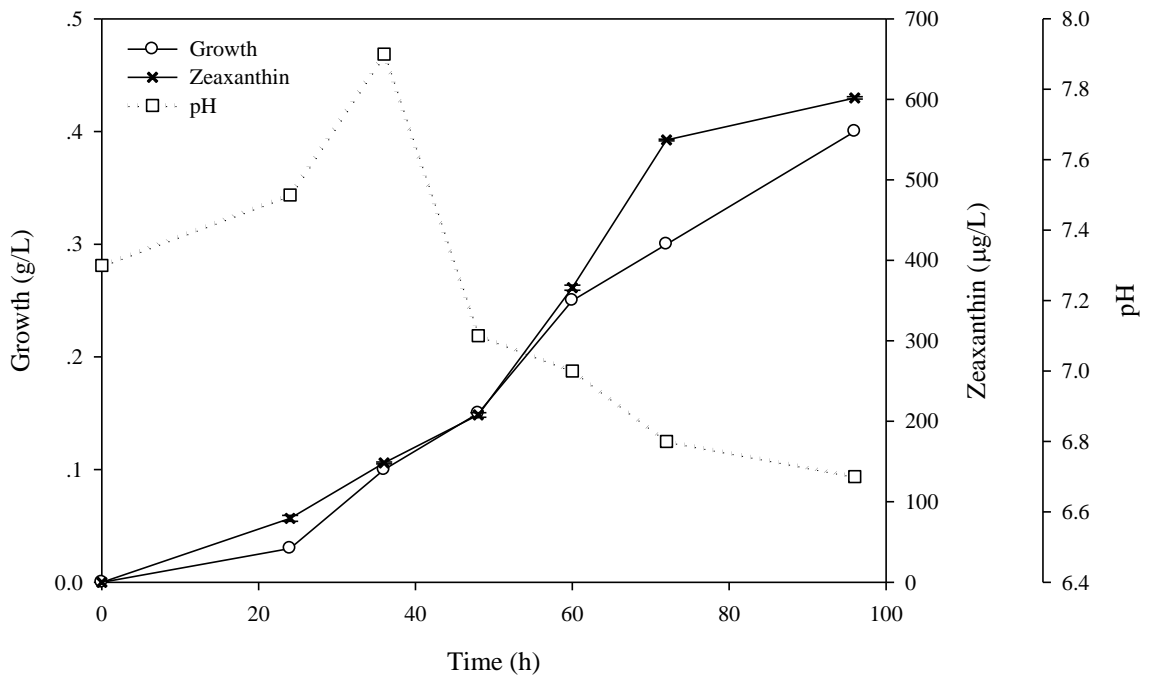
ผลการศึกษาจลนศาสตร์การผลิตสารสีซีแซนทีนของแบคทีเรีย *S. natatoria* KODA 19-6 แสดงในรูปที่ 5 แบคทีเรียผลิตสารสีซีแซนทีนค่อนข้างช้า 2 วันแรกของการหมักและเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 72 ของการหมัก หลังจากครบ 96 ชั่วโมงปริมาณสารสีซีแซนทีนที่ผลิตขึ้น 602 ไมโครกรัมต่อลิตร โดยมีอัตราการผลิตสารสีซีแซนทีน (Zeaxanthin productivity;  $Q_p$ ) 6.27 ไมโครกรัมต่อลิตร-ชั่วโมง ( $\mu\text{g/l}\cdot\text{h}$ ) สำหรับการเจริญของแบคทีเรีย พบว่า แบคทีเรียเข้าสู่ log phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 จนถึงชั่วโมงที่ 60 โดยมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (Maximum specific growth rate;  $\mu_{\text{max}}$ ) ที่ 0.06 ต่อชั่วโมง ( $\text{h}^{-1}$ ) ผลการศึกษาแสดงว่าแบคทีเรีย *S. natatoria* KODA19-6 ผลิตสารสีซีแซนทีนแบบ growth associated ซึ่งสอดคล้องกับแบคทีเรีย *Flavobacterium multivorum* ผลิตสารสีซีแซนทีนควบคู่ไปกับการเจริญจากรายงานของ Bhosale and Bernstein (2004) เช่นเดียวกับสาหร่าย *Chlorella zofingiensis* ที่เจริญภายใต้สภาวะ heterotrophic condition ในที่มืดและผลิตสารสีแอสตาแซนทีนแบบ growth associated (Wang and Peng, 2008) อย่างไรก็ตาม Fang และ Cheng (1993) รายงานว่า ยีสต์สีแดง *Phaffia rhodozyma* NCHU-FS301 ผลิตสารสีแอสตาแซนทีนได้ทั้งแบบ growth associated และ non-growth associated เมื่อเลี้ยงในอุณหภูมิที่ต่างกัน นอกจากนี้รายงานของ Margalith (1999) และ Boussiba (2000) แสดงว่าสาหร่าย *Haematococcus pluvialis* ผลิตสารสีแอสตาแซนทีนแบบ non-growth associated



รูปที่ 4 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตและการผลิตซีแซนทีนของแบคทีเรีย *S. natatoria* KODA 19-6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Modified Zobell medium ที่ pH 7.0 เขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 4 วัน

ตัวอักษร a, b และ c แทนข้อมูลที่แสดงความแตกต่างของตัวเลขอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $p < 0.05$ )

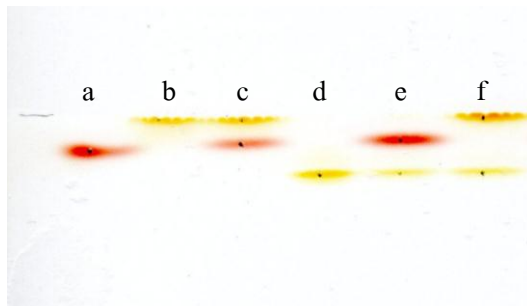
ปัจจุบันการตัดแต่งเมตาบอลิซึม (Metabolic engineering) ในแบคทีเรียเป็นที่นิยมใช้เป็นเครื่องมือในการผลิตเพิ่มผลผลิตของคาโรทีนอยด์ อาทิ แบคทีเรีย *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  ที่ผ่านการตัดแต่งพันธุกรรมสามารถให้ผลผลิตเบต้าแคโรทีนได้ในอัตรา ( $\beta$ -carotene productivity;  $Q_p$ ) 9.8 มิลลิกรัมต่อลิตร-ชั่วโมง ( $\mu\text{g/l}\cdot\text{h}$ ) และมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (Maximum specific growth rate;  $\mu_{\text{max}}$ ) 0.48 ต่อชั่วโมง ( $\text{h}^{-1}$ ) เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติมกลีเซอรอล ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Kim *et al.*, 2009a) นอกจากนี้ *E.coli* ที่ผ่านการตัดแปลงเมตาบอลิซึมสามารถผลิตไลโคปีนได้สูงถึง 260 มิลลิกรัมต่อลิตรภายในเวลา 60 ชั่วโมง (Kim *et al.*, 2009b)



รูปที่ 5 จลนศาสตร์การผลิตซีแซนทีนจากแบคทีเรีย *S.natatoria* KODA 19-6 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (pH 7.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 150 รอบต่อนาที)

5. การศึกษาชนิดของรงควัตถุชีวภาพจากแบคทีเรีย

ผลการทดสอบรงควัตถุชีวภาพเบื้องต้น โดย TLC แสดงดังรูปที่ 6 จะเห็นว่าสารสกัดจากแบคทีเรีย *S.natatoria* KODA 19-6 ไม่สามารถแยกได้โดยใช้เทคนิคนี้ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสภาวะแยกไม่เหมาะสม อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่า สารสกัดที่ได้ ไม่ใช่สารสีแอสตาแซนทีน เนื่องจากมีสีที่แตกต่างกัน และไม่ใช้เบต้าแคโรทีน เนื่องจากระยะเคลื่อนที่ได้ไม่เท่ากัน (ตารางที่ 5) การแยกโดยใช้เทคนิค HPLC จึงมีความจำเป็นเพื่อนำมาใช้ในการแยกและวิเคราะห์รงควัตถุชีวภาพ



รูปที่ 6 TLC chromatogram ของ (a) รงควัตถุมาตรฐานแอสตาแซนทีน (b) เบต้าแคโรทีน (c) รงควัตถุมาตรฐานผสมของแอสตาแซนทีนและเบต้าแคโรทีน (d) รงควัตถุชีวภาพที่สกัดจากแบคทีเรีย *S.natatoria* KODA 19-6 (e) รงควัตถุมาตรฐานแอสตาแซนทีนผสมกับรงควัตถุชีวภาพที่สกัดจากแบคทีเรีย และ (f) รงควัตถุมาตรฐานเบต้าแคโรทีนผสมกับรงควัตถุชีวภาพที่สกัดจากแบคทีเรีย

ตารางที่ 5 ระยะทางในการเคลื่อนที่ของรงควัตถุชีวภาพที่สกัดจากแบคทีเรียและรงควัตถุมาตรฐาน

Solution	Distance (cm)	R <sub>f</sub>
Solvent	11	1
Astaxanthin	10.5	0.95
β-carotene	10.9	0.99
KODA 19-6 extract	10.2	0.93

รูปที่ 7 แสดงผลการวิเคราะห์รงควัตถุชีวภาพโดยใช้เทคนิค HPLC จะเห็นได้ว่าแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ผลิตรงควัตถุชีวภาพได้อย่างน้อย 3 ชนิดโดยมีเวลาคงค้างที่ประมาณ 2.70, 3.10 และ 3.30 นาที อย่างไรก็ตามแบคทีเรีย MAKB08-4 สามารถผลิตรงควัตถุชีวภาพชนิดอื่นที่นอกเหนือจาก 3 ชนิดดังกล่าวซึ่งมีเวลาคงค้างที่ประมาณ 2.00 นาที

เมื่อเปรียบเทียบเวลาคงค้างของรงควัตถุชีวภาพจากแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดเทียบกับรงควัตถุมาตรฐาน แอสตาแซนทีนและซีแซนทีนพบว่าเวลาคงค้างของรงควัตถุชีวภาพที่ 2.70 และ 3.30 นาที มีความใกล้เคียงกับเวลาคงค้างของรงควัตถุมาตรฐานแอสตาแซนทีนและซีแซนทีน ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเมื่อทำการวิเคราะห์ UV-Visible Spectrum (190-800 nm) ของรงควัตถุชีวภาพจากแบคทีเรียทุกชนิด พบว่ารงควัตถุชีวภาพที่เวลาคงค้าง 2.70 นาที มี Spectrum แตกต่างไปจาก Spectrum ของสารสีแอสตาแซนทีนอย่างสิ้นเชิง สำหรับรงควัตถุชีวภาพที่เวลาคงค้าง 3.30 นาที มีความคล้ายกับ Spectrum ของสารสีซีแซนทีน สำหรับรงควัตถุชีวภาพอื่น ๆ ของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์คาดว่าน่าจะเป็นอนุพันธ์ของสารสีซีแซนทีน

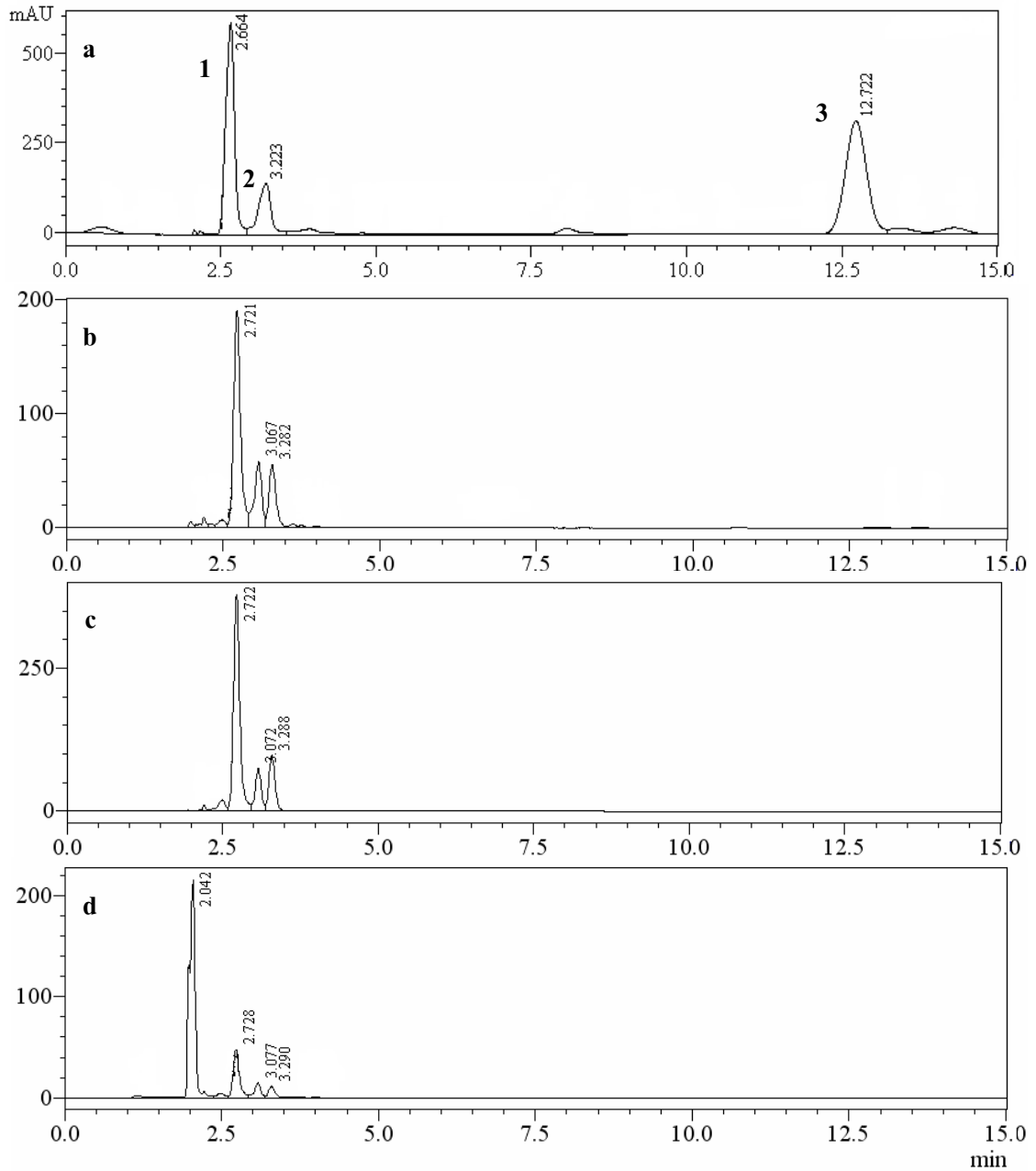
#### 6. การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลและโครงสร้างโมเลกุลของรงควัตถุชีวภาพ

เนื่องจากรงควัตถุชีวภาพที่ผลิตขึ้นจากแบคทีเรีย *S.natatoria* KODA 19-6 มีปริมาณไม่มากและสูญเสียรงควัตถุชีวภาพอย่างมากในระหว่างการทำให้บริสุทธิ์ จึงไม่สามารถวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลและโครงสร้างโมเลกุลของสารสีซีแซนทีนและสารสีอื่น ๆ ที่แยกได้จากรงควัตถุชีวภาพของแบคทีเรีย (รูปที่ 7c) โดยใช้เทคนิค Mass Spectrometry (MS) และ Nuclear Magnetic Resonance (NMR) ตามลำดับ อย่างไรก็ตามสารสีซีแซนทีนมีสูตรโมเลกุล  $C_{40}H_{56}O_2$  และมีมวลโมเลกุล 568.88 ดาลตัน (Aman *et al*, 2005; Dachtler *et al*, 2001)

#### 7. การศึกษาคุณสมบัติของรงควัตถุชีวภาพ

เนื่องจากสารสีซีแซนทีนจากแบคทีเรีย *S.natatoria* KODA 19-6 ยังไม่สามารถทำให้บริสุทธิ์ จึงไม่สามารถศึกษาคุณสมบัติของสารสีซีแซนทีน อย่างไรก็ตามสารนี้ไม่สามารถละลายในน้ำ แต่ละลายได้ดีในตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ อาทิ methanol, ethanol, chloroform, DMSO, dichloromethane, acetone, ethyl ether และ tetrahydrofuran และละลายได้น้อยในตัวทำละลาย อาทิ hexane และ petroleum ether (Craft and Soares, 1992) นอกจากนี้สารสีซีแซนทีนไม่สามารถทนกรดและด่างได้ดึ้นัก และมีการเปลี่ยนสีเมื่อ pH เปลี่ยนแปลง (Sajilata *et al*, 2008) สำหรับการคงตัวต่ออนุมูลจากรายงานของ Hurst *et al* (2004) พบว่าสารสี

ซีแซนทีนมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 37°C แต่ไม่สามารถคงตัวที่อุณหภูมิสูงและอุณหภูมิมิผลต่อปริมาณสารซีแซนทีนและการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารซีแซนทีน (isomerization) และแสงมีผลต่อการออกซิเดชันของสารสี



**รูปที่ 7** HPLC โครมาโตแกรมของ (a) รงควัตถุมาตรฐาน: 1 astaxanthin, 2 zeaxanthin, 3  $\beta$ -carotene และ รงควัตถุชีวภาพที่สกัดจาก (b) แบคทีเรีย CHOB 06-6 (c) แบคทีเรีย KODA 19-6 (d) แบคทีเรีย MAKB08-4

### สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้เป็นงานแรกในการค้นพบแบคทีเรีย *Sphingomonas phyllosphaerae* และแบคทีเรีย *Sphingomonas natatoria* อาศัยร่วมกับฟองน้ำทะเลและผลิตตรงควัตถุชีวภาพในกลุ่มคาร์โบนินอยด์ที่ประกอบด้วยสารสีซีแซนทีนและอนุพันธ์ของสารสีซีแซนทีน ทั้งนี้แบคทีเรีย *Sphingomonas natatoria* KODA 19-6 สามารถในการผลิตสารสีซีแซนทีนสูงสุด 4.1 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Modified Zobell medium นอกจากนี้ความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิมีผลต่อการผลิตสารสีซีแซนทีนของแบคทีเรียดังกล่าว โดยแบคทีเรียผลิตสารสีซีแซนทีนได้ดีที่ pH 7.0 (0.62 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 4.1 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง) และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (0.73 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 4.9 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง) และแบคทีเรียมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด ( $\mu_{max}$ ) ที่ 0.06 ต่อชั่วโมง ( $h^{-1}$ ) และมีอัตราการผลิตสารสีซีแซนทีน ( $Q_p$ ) ที่ 6.27 ไมโครกรัมต่อลิตรชั่วโมง ( $\mu g/l-h$ )

### ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ยังคงมีเรื่องที่ควรศึกษาเพิ่มเติม ดังนี้

1. การพัฒนาประสิทธิภาพการผลิตตรงควัตถุชีวภาพด้วยวิธีการตัดแต่งพันธุกรรมของแบคทีเรียหรือการปรับปรุงสภาวะการเลี้ยงและอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความเหมาะสมสำหรับการผลิตตรงควัตถุชีวภาพ
2. การศึกษาการใช้วัสดุเหลือทิ้งที่มีประสิทธิภาพในการเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อผลิตตรงควัตถุชีวภาพ
3. การศึกษาโครงสร้างและขนาดโมเลกุลของรงควัตถุชีวภาพอื่น ๆ ที่แบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ผลิตขึ้น
4. การศึกษาความปลอดภัยและการประยุกต์ใช้รงควัตถุชีวภาพที่ผลิตได้ในผลิตภัณฑ์อาหารคนและอาหารสัตว์ รวมถึงเครื่องสำอางต่างๆ

## เอกสารอ้างอิง

- Aksu, Z. and Eren, A.T. (2007) Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. *Biochemical Engineering Journal* 35: 107 – 113.
- Alcantara, S. and Sanchez, S. (1999) Influence of carbon and nitrogen sources on *Flavobacterium* growth and zeaxanthin biosynthesis. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 23: 697 – 700.
- Aman R., Biehl J., Carle R., Conrad J., Beifuss and Schieber A. (2005) Application of HPLC coupled with DAD, APci-MS and NMR to the analysis of lutein and zeaxanthin stereoisomers in thermally processed vegetables. *Food Chemistry* 92:753-763.
- Anand, T.P., Bhat, A.W., Shouche, Y.S., Roy, U., Siddharth, J. and Sarma, S.P. (2006) Antimicrobial activity of marine bacteria associated with sponges from the waters off the coast of South East India. *Microbiological Research* 161: 252 – 262.
- Asker, D., Beppu, T. and Ueda, K. (2007a) *Zeaxanthinibacter enoshimensis* gen. nov., sp. nov., a novel zeaxanthin-producing marine bacterium of the family Flavobacteriaceae, isolated from seawater off Enoshima Island, Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 837 – 843.
- Asker, D., Beppu, T. and Ueda, K. (2007b) *Mesoflavibacter zeaxanthinifaciens* gen. nov., sp. nov., a novel zeaxanthin-producing marine bacterium of the family Flavobacteriaceae. *Systematic and Applied Microbiology* 30: 291 – 296.
- Berry, A., Janssens, D., Humbelin, M., Jore, J.P., Hoste, B., Cleenwerck, I., Vancanneyt, M., Bretzel, W., Mayer, A.F., Lopes-Ulibarri, R., Shanmugam, B., Swings, J. and Pasamontes, L. (2003) *Paracoccus zeaxanthinifaciens* sp. nov., a zeaxanthinproducing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 231 – 238.
- Bhosale, P. and Bernstein, P. (2004)  $\beta$ -Carotene production by *Flavobacterium multivorum* in the presence of inorganic salts and urea. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 31: 565 – 571.
- Bhosale, P. and Bernstein, P. (2005) Microbial xanthophylls. *Applied Microbiology and Biotechnology* 68: 445 – 455.
- Boussiba, S. (2000) Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus phувialis*: Cellular physiology and stress response. *Physiologia Plantarum* 108: 111 – 117.
- Bultel-Poncé, V., Cécile, D., Jean-Pascal, B., Claude, C. and Michèle, G. (1998) Metabolites from the sponge-associated bacterium *Micrococcus luteus*. *Journal of Marine Biotechnology* 6: 233 – 236.

- Buzzini, P. and Martini, A. (1999) Production of Carotenoids by Strains of *Rhodotorula glutinis* Cultured in Raw Materials of Agro-Industrial Origin. *Bioresource Technology* 71: 41-44.
- Chelossi, E., Milanese, M., Milano, A., Pronzato, R. and Riccardi, G. (2004) Characterisation and antimicrobial activity of epibiotic bacteria from *Petrosia ficiformis* (Porifera, Demospongiae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 309: 21 - 33.
- Chihab, W., Alaoui, A.S. and Amar, M. (2004) *Chryseomonas luteola* identified as the source of serious infections in a Moroccan University Hospital. *Journal of Clinical Microbiology* 42(4): 1837 – 1839.
- Craft N.E. and Soares J.H. (1992) Relative solubility, stability and absorptivity of lutein and  $\alpha$ -carotene in organic solvent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 431-434.
- Dachtler M., Glaser T., Kohler K. and Albert K. (2001) Combined HPLC-MS and HPLC-NMR on-line coupling for the separation and determination of lutein and zeaxanthin stereoisomers in spinach and in retina. *Analytical Chemistry* 73:667-674.
- Dufosse, L., Galaup, P., Yaron, A., Arad, S.M., Blanc, N., Murthy, K.N.C. and Ravishankar, G.A. (2005) Microorganisms and Microalgae as Sources of Pigments for Food Use: A Scientific Oddity or an Industrial Reality. *Trends in Food Science and Technology* 16: 389 – 406.
- Erdogrul, O. and Azirak, S. (2005) A Review on the Red Yeast Rice (*Monascus purpureus*). *KSU Journal of Science and Engineering* 8: 10-15.
- Fang, T.J. and Cheng, Y.S. (1993) Improvement of astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* through mutation and optimization of culture conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 75: 466 – 469.
- Goodwin, T.W. (1984) *The Biochemistry of the Carotenoids*, 2nd ed., London, Richard Clay, 224p.
- Hejazi, M.A. and Wijffels, R.H. (2003) Effect of Light Intensity on  $\beta$ -carotene Production and Extraction by *Dunaliella salina* in Two-phase Bioreactors. *Biomolecular Engineering* 20: 171 – 175.
- Hiraishi, A., Kuraishi, H. and Kawahara, K. (2000) Emendation of the description of *Blastomonas natatoria* (Sly 1985) Sly and Cahill 1997 as an aerobic photosynthetic bacterium and reclassification of *Erythromonas ursincola* Yurkov *et al.* 1997 as *Blastomonas ursincola* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 1113 – 1118.
- Holmström, C., Egan, S., Franks, A., McCloy, S. and Kjelleberg, S. (2002) Antifouling activities expressed by marine surface associated *Pseudoalteromonas* species. *FEMS Microbiology Ecology* 41: 47 – 58.
- Hoshino, T., Ojima, K. and Setoguchi, Y. (2004) Production of zeaxanthin by recombinant *Phaffia rhodozyma* strain. WO Patent 2004/029275

- Hu, Z.C., Zheng, Y.G., Wang, Z. and Shen, Y.C. (2006) pH control strategy in astaxanthin fermentation bioprocess by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Enzyme and Microbial Technology* 39: 586 – 590.
- Hundle, B.S., O'Brien, D.A., Beyer, P., Kleinig, H. and Hearst, J.E. (1993) *In vitro* expression and activity of lycopene cyclase and beta-carotene hydroxylase from *Erwinia herbicola*. *FEBS Letters* 315: 329 – 334.
- Hurst J.S., Contreras J.E., Siems W.G. and Van Kujik F.J. (2004) Oxidation of carotenoids by heat and tobacco smoke. *Biofactors* 20: 23-35.
- Jin, E.S., Feth, B. and Melis, A. (2003) A mutant of the green alga *Dunaliella salina* constitutively accumulates zeaxanthin under all growth conditions. *Biotechnology and Bioengineering* 81: 115 – 124.
- Johnson, E.A. and Lewis, M.J. (1979) Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Journal of General Microbiology* 115: 173 – 183.
- Jyonouchi, H., Sun, S., Mizokami, M., and Gross, M.D. (1996) Effect of Various Carotenoids on Clone, Effectorstage T-helper Cell Activity. *Nutrition and Cancer* 26: 313 – 324.
- Kefalas, E., Catharios, J.C. and Miliou, H. (2003) Bacteria Associated with the Sponge *Spongia officinalis* as Indicators of Contaminations. *Ecological Indicators* 2: 339-343.
- Kim, J.H., Kim, S.W., Nguyen, D.Q.A., Li, H., Kim, S.B., Seo, Y.G., Yang, J.K., Chung, I.Y., Kim, D.H. and Kim, C.J. (2009a) Production of  $\beta$ -carotene by recombinant *Escherichia coli* with engineered whole mevalonate pathway in batch and fed-batch cultures. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 14: 559 – 564.
- Kim, S.W., Kim, J.B., Ryu, J.M., Jung, J.K. and Kim, J.H. (2009b) High-level production of lycopene in Kimmetabolically engineered *E.coli*. *Process Biochemistry* 44: 899 – 905.
- Kim, S.W., Seo, W.T. and Park, Y.H. (1997) Enhanced Synthesis of Trisporic Acid and  $\beta$ -carotene Production in *Blakeslea trispora* by Addition of a Non – Ionic Surfactant, Span 20. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 84: 330 – 332.
- Lagarde, D., Beuf, L. and Vermaas, W. (2000). Increased production of zeaxanthin and other pigments by application of genetic engineering techniques to *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 64 – 72.
- Lee, P.C., Momen, A.Z.R., Mijts, B.N. and Dannert, C.S. (2003) Biosynthesis of Structurally Novel Carotenoids in *Escherichia coli*. *Chemistry and Biology*. 10: 453 – 462.
- Macrae, R., Robinson. R.K., and Sandler, M.J. (1993) *Encyclopedia of Food Science Food Technology and Nutrition : Carotenoids*, London, Alden Press, pp. 707 – 718.

- Margalith, P.Z. (1992) Pigment Microbiology : The Carotenoid Pigment. Chapman and Hall, London.
- Margalith, P.Z. (1999) Production of ketocarotenoids by microalgae. Applied Microbiology and Biotechnology 51: 431 – 438.
- Nishino, H., Murakoshi, M., Ii, T., Takemura, M., Kuchide, M., Kanazawa, M., Mou, X.Y., Wada, S., Masuda, M., Ohsaka, Y., Yogosawa, S., Satomi, Y. and Jinno, K. (2002) Carotenoids in cancer chemoprevention. Cancer and Metastasis Reviews 21: 257 – 264.
- Olson, J.B., Harmody, D.K. and McCarthy, P.J. (2002)  $\alpha$ -Proteobacteria cultivated from marine sponges display branching rod morphology. FEMS Microbiology Letters 211: 169 – 173.
- Osinga, R., Armstrong, E., Burgess, J.G., Hoffmann, F., Reitner, J. and Kindel, G.S. (2001) Sponge–microbe associations and their importance for sponge bioprocess engineering. Hydrobiologia 461: 55 – 62.
- Parajo, J.C., Santos, V., Vazquez M. and Cruz J.M. (1997) Production of Carotenoids by *Xanthophyllomyces dendrorhous* Growing on Enzymatic Hydrolysates of Prehydrolysed Wood. Food Chemistry 60: 347-355.
- Perovic, S., Wichels, A., Schutt, C., Gerdt, G., Pahler, S., Steffen, R. and Muller, W.E.G. (1998) Neuroactive compounds produced by bacteria from the marine sponge *Halichondria panicea*: activation of the neuronal NMDA receptor. Environmental Toxicology and Pharmacology 6: 125 – 133.
- Rivas, R., Abril, A., Trujillo, M.E., Velázquez, E. (2004) *Sphingomonas phyllosphaerae* sp. nov., from the phyllosphere of *Acacia caven* in Argentina. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 54: 2147 – 2150.
- Rosa, S.D., Mitova, M. and Tommonaro, G. (2003) Marine bacteria associated with sponge as source of cyclic peptides. Biomolecular Engineering 20: 311 – 316.
- Sajilata, M.G., Singhal, R.S. and Kamat, M.Y. (2008) The carotenoid pigment zeaxanthin-A review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 7: 29 – 49.
- Sarada, R., Tripathi, U. and Ravishankar, G.A. (2002) Influence of stress on astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* grown under different culture conditions. Process Biochemistry 37: 623 – 627.
- Sly, L.I. and Hargreaves, M.H. (1984) Two unusual budding bacteria isolated from a swimming pool. Journal of Applied Bacteriology 56: 479 – 786.
- Stafsnes, M.H., Josefsen, K.D., Kildahl-Andersen, G., Valla, S., Ellingsen, T.E. and Bruheim, P. (2010) Isolation and characterization of marine pigmented bacteria from Norwegian coastal waters

- and screening for carotenoids with UVA-blue light absorbing properties. *Journal of Microbiology* 48: 16 – 23.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596 – 1599.
- Thiel, V. and Imhoff, J.F. (2003) Phylogenetic identification of bacteria with antimicrobial activities isolated from Mediterranean sponges. *Biomolecular Engineering* 20: 421 – 423.
- Tjahjono, A.E., Hayama, Y., Kakizono, T., Terada, Y., Nishio, N., Nagai, S. (1994) Hyper-accumulation of astaxanthin in green alga *Haematococcus pluvialis* at elevated temperatures. *Biotechnology Letters* 16: 133 – 138.
- Wang, Y. and Peng, J. (2008) Growth-associated biosynthesis of astaxanthin in heterotrophic *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24: 1915 – 1922.
- Webb, V.L. and Maas, E.W. (2002) Sequence analysis of 16S rRNA gene of cyanobacteria associated with the marine sponge *Mycale (Carmia) hentscheli*. *FEMS Microbiology Letters* 207: 43 – 47.
- Webster, N.S., Wilson, K.J., Blackall, L.L. and Hill, R.T. (2001) Phylogenetic diversity of bacteria associated with the marine sponge *Rhopaloeides odorabile*. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 434 – 444.
- Yokohama, A. and Miki, W (1995) Composition and Presumed Biosynthetic Pathway of Carotenoids in the Astaxanthin-Producing Bacterium *Agrobacterium aurantiacum*. *FEMS Microbiology Letters*. 128: 139-144.

### ผลงานตีพิมพ์และสิ่งตีพิมพ์เพื่อเผยแพร่

Thawornwiriyanun, P., S. Tanasupawat, C. Dechsakulwatana, S. Techakarnjanarak and W. Suntornsuk (2012) Identification of newly zeaxanthin-producing bacteria isolated from sponges in the Gulf of Thailand and their zeaxanthin production. *Applied Biochemistry and Biotechnology* DOI 10.1007/s12010-012-9760-2

Thawornwiriyanun, P., C. Dechasakulwattana, L. Suntornsuk and W. Suntornsuk (2009) Carotenoid production from sponge-associated bacteria isolated in the gulf of Thailand. *Journal of Science, Technology and Humanities* 7: 11-18.

Thawornwiriyanun, P., S. Techakarnjanarak and W. Suntornsuk (2009) Identification of Pigment-Producing Sponge-Associated Bacteria and Their Pigments. *The Commemorative International Conference of the Occasion of the 4<sup>th</sup> Cycle Anniversary of KMUTT Sustainable Development to Save the Earth: Technologies and Strategies Vision 2050: (SDSE2008)*, Bangkok, Thailand, 7-9 April 2009.

## ภาคผนวก

## อาหารเลี้ยงเชื้อ Modified Zobell medium

Proteose peptone	1	กรัม
Phytone peptone	0.5	กรัม
Yeast extract	1	กรัม
Sodium thiosulfate	0.2	กรัม
Sodium sulfite	0.05	กรัม
Ferric citrate	0.002%	(เตรียมจากสารละลาย 2% ที่ละลายโดยใช้ความร้อน)
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร
น้ำทะเล	900	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดมาละลายในน้ำทะเลผสมน้ำกลั่น นำเชื้อในหม้อนิ่งความดันที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที สำหรับอาหารแข็ง ให้ละลายผงวุ้น 1.5% ด้วยความร้อน แล้วจึงนำไปฆ่าเชื้อ

## การเตรียมแบคทีเรีย

1. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Modified Zobell broth 100 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปนิ่งฆ่าเชื้อ ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

2. เชื้อโคโลนีเดี่ยวจากอาหารแข็งไปเลี้ยงในอาหารเหลวที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า ด้วยอัตราเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมงสำหรับเตรียมเป็นหัวเชื้อสำหรับศึกษา

## การศึกษาลักษณะภายนอกโดยใช้กล้องจุลทรรศน์

ทำการศึกษาลักษณะภายนอก (รูปร่าง ขนาดและการติดสีแกรม) ของแบคทีเรียทั้ง 29 สายพันธุ์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope) และ Image analyzer รวมทั้งศึกษาลักษณะสี การเจริญและการเคลื่อนที่ของแบคทีเรียที่เลี้ยงบนอาหาร Modified Zobell agar ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน

## การศึกษาความสามารถในการใช้น้ำตาลของแบคทีเรีย

ทดสอบแบคทีเรียในอาหารทดสอบซึ่งประกอบด้วย yeast extract 5 กรัม bromocresol purple 0.02 กรัม น้ำตาล (Lactose, Sucrose, Mannitol, Mannose, Maltose, Galactose, Glucose, Fructose และ Melibiose) 5 – 10% ปรับ พีเอช ที่ 6.4 บ่มที่อุณหภูมิห้อง สังเกตผลการใช้น้ำตาลและการเจริญภายใน 7 วัน ถ้าสีของอาหารทดสอบเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง เป็นผลบวก แสดงว่าแบคทีเรียสามารถเปลี่ยนน้ำตาลชนิดนั้นๆ เป็นกรดได้ หากอาหารทดสอบไม่เกิดการเปลี่ยนสี เป็นผลลบ

## การจำแนกแบคทีเรียโดยตรวจสอบทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ API 20 NE

- หลักการ เป็นชุดทดสอบมาตรฐานใช้ในการจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบ รูปแท่ง ไม่เป็นเชื้อในระบบทางเดินอาหาร (non-enteric) และเจริญง่าย (non-fastidious) ได้แก่ *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio* และ *Aeromonas*, etc.

- การทดสอบ เชียโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียบริสุทธิ์ 1-4 โคโลนี ลงในหลอดทดลองที่มี 0.85% NaCl ปราศจากเชื้อ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วทำการปรับความเข้มข้นให้มีความขุ่นประมาณ 0.5 McFarland แล้วดูใส่อาหาร API AUX Medium ปริมาตร 200 ไมโครลิตร หลังจากนั้นทำการหยดสารละลายเชื้อใน 0.85% NaCl ที่มีความขุ่น 0.5 McFarland ลงหลุมในชุดตรวจสอบตั้งแต่การทดสอบ NO<sub>3</sub> ถึง PNPg ให้พอดีกับส่วนเว้าของหลุม ส่วนเชื้อในอาหาร API AUX Medium หยดลงในหลุม การทดสอบ GLU ถึง PAC หลังจากนั้นทำการหยด mineral oil ที่ปราศจากเชื้อลงในหลุม การทดสอบ GLU ADH และ URE นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การอ่านผลการทดสอบแสดงในตารางที่ 5 นำผลที่อ่านได้ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Apweb

การจัดจำแนกแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA

- วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย (Promega, 2002)

1. เลี้ยงแบคทีเรียใน Modified Zobell broth บนเครื่องเขย่า 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 27 – 30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำสารละลายเชื้อ 1 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอด microcentrifuge แล้วปั่นแยกเซลล์ที่ 13,000 – 16,000 × g เป็นเวลา 2 นาที แล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง
2. ละลายเชื้อแบคทีเรียโดยเติม 50 mM EDTA 480 ไมโครลิตร
3. เติม 10 mg/ml lysozyme 100 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาหนึ่งชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 – 16,000 × g เป็นเวลา 2 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง
4. เติมสารละลาย Nuclei Lysis Solution 600 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน บ่มในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
5. เติมสารละลาย RNase Solution 3 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอด microcentrifuge เบาๆ นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลาหนึ่งชั่วโมง
6. เติมสารละลาย Protein Precipitate Solution 200 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน โดยใช้เครื่อง vortex ที่ความเร็วสูงเป็นเวลา 20 วินาที จากนั้นนำไปบ่มในถังน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 – 16,000 × g เป็นเวลา 3 นาที
7. ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ที่บรรจุ isopropanol 600 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน จนกระทั่งมองเห็นสาย DNA สีขาว จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 – 16,000 × g เป็นเวลา 2 นาที ค่อยๆเทสารละลายส่วนใสทิ้ง
8. ล้าง DNA ที่ตกตะกอนด้วย 70% ethanol 600 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 – 16,000 × g เป็นเวลา 2 นาที เท ethanol ทิ้ง แล้วทิ้งให้แห้งเป็นเวลา 10 นาที
9. ละลาย DNA โดยเติมสารละลาย DNA Rehydrate Solution 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลาหนึ่งชั่วโมง
10. เก็บสารละลาย DNA ไว้ที่อุณหภูมิ 2 – 8 องศาเซลเซียสเพื่อนำมาทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) ในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 6 การอ่านผลการทดสอบ

TEST	ACTIVE INGREDIENTS	RESULTS	
		NEGATIVE	POSITIVE
NO <sub>3</sub>	Potassium nitrate	ไม่มีสี * สีชมพู	สีชมพู-แดง ไม่มีสี
TRP	L-tryptophane	ไม่มีสี/เหลือง/เขียวซีด	สีชมพู
<u>GLU</u>	D-glucose	สีน้ำตาล ถึง สีเขียว	สีเหลือง
<u>ADH</u>	L-arginine	สีเหลือง	สีส้ม/ชมพู/แดง
<u>URE</u>	Urea	สีเหลือง	สีส้ม/ชมพู/แดง
ESC	Esculin ferric citrate	สีเหลือง	เทา/น้ำตาล/ดำ
GEL	Gelatin (bovine origin)	No pigment diffusion	Diffusion of black pigment
PNPG	4-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside	ไม่มีสี	สีเหลือง
<u>GLU</u>	D-glucose	ใส	ขุ่น
<u>ARA</u>	L-arabinose	ใส	ขุ่น
<u>MNE</u>	D-mannose	ใส	ขุ่น
<u>MAN</u>	D-mannitol	ใส	ขุ่น
<u>NAG</u>	N-acetyl-glucosamine	ใส	ขุ่น
<u>MAL</u>	D-maltose	ใส	ขุ่น
<u>GNT</u>	Potassium gluconate	ใส	ขุ่น
<u>CAP</u>	Capric acid	ใส	ขุ่น
<u>ADI</u>	Adipic acid	ใส	ขุ่น
<u>MLT</u>	Malic acid	ใส	ขุ่น
<u>CIT</u>	Trisodium citrate	ใส	ขุ่น
<u>PAC</u>	Phenylacetic acid	ใส	ขุ่น

- การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction

1. เตรียม PCR reaction mixture (ยกเว้น DNA template) ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหนึ่งปฏิกิริยา ใส่ในหลอด microcentrifuge แล้วบรรจุลงในถังน้ำแข็ง ดังนี้

10x Qiagen PCR buffer	5 ไมโครลิตร
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2 ไมโครลิตร
25 mM dNTP mix	1 ไมโครลิตร
20 pmol/μl 8F Primer (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')	1 ไมโครลิตร
20 pmol/μl 1492R Primer (5'-GGGTTACCTTGTTACGACTT-3')	1 ไมโครลิตร
Taq DNA Polymerase	0.25 ไมโครลิตร
Distilled water	39.75 ไมโครลิตร

2. เจือจางสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ ดังนี้

KODA19-6	10 <sup>-1</sup>
CHOB06-6	10 <sup>-2</sup>
MAKB08-4	10 <sup>-2</sup>

4. คูดสารละลายดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดใส่ลงใน PCR tube ที่บรรจุ PCR reaction mixture ปริมาตรหลอดละ 1.5 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงหลอด PCR tube นาน 30 วินาที เพื่อให้สารละลายผสมกันดีและไม่ติดค้างหลอด

5. จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง thermal cycler (GeneAmp, PCR system 9700) โดยให้เกิดปฏิกิริยาจำนวน 25 รอบ โดยแต่ละรอบเครื่องจะทำงานที่เวลาและอุณหภูมิดังตารางที่ 6

ตารางที่ 7 สภาวะการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

ขั้นตอน	เวลา	อุณหภูมิ (°C)
- Initial denaturation	5 นาที	95
- 3-step cycling		
Denaturation	50 วินาที	95
Annealing	30 วินาที	55
Extension	2 นาที	72
- Final extension	7 นาที	72

- การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพื่อการอ่านลำดับเบส

1. ผสม ligation solution reaction ดังส่วนผสมต่อไปนี้

2X T4 DBA ligase buffer	5 ไมโครลิตร
-------------------------	-------------

pGEM-T	1 ไมโครลิตร
PCR product	variable
T4 DNA ligase	1 ไมโครลิตร
dH <sub>2</sub> O	variable
Total	10 ไมโครลิตร

บ่มสารละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง หรือบ่มข้ามคืนที่ 4 องศาเซลเซียส

2. ผสมสารละลาย ligation reaction solution 2 ไมโครลิตร ลงในหลอดบรรจุ competent cell *E. coli* ที่อยู่ในถังน้ำแข็ง แล้วบ่มเป็นเวลา 30 นาที

3. ให้ความร้อน (Heat shock) ที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที แล้วย้ายไปที่ถังน้ำแข็งเพื่อบ่มเป็นเวลา 2 นาที

4. เติม LB medium 500 ไมโครลิตรแล้วเขย่าให้เข้ากันที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาหนึ่งชั่วโมง

5. นำสารละลายเชื้อแบคทีเรีย 100 ไมโครลิตรมาเกลี่ย (Spread) ลงบนอาหารแข็ง LB medium ที่เติม ampicillin และ x-gal แล้วนำไปบ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

6. เก็บเซลล์และสกัดพลาสมิดโดยวิธี Alkaline-lysis Miniprep Protocol ดังนี้

6.1 เชื้อโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *E. coli* ที่มีพลาสมิดลงในอาหาร LB medium 5 มิลลิลิตร ที่มี ampicillin 5 ไมโครลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

6.2 ผสมสารละลายเชื้อ 1.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอด microcentrifuge แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 วินาที ที่ 4 องศาเซลเซียส

6.3 ค่อยๆดูดอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง และปล่อยให้ก้อนเชื้อแบคทีเรียแห้ง

6.4 ละลายก้อนเชื้อแบคทีเรียด้วย Solution I\* ที่เย็นจัด ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex

6.5 เตรียม Solution II\* และเติมลงในสารละลายเชื้อแบคทีเรียจากข้อ 6.4 จำนวน 200 ไมโครลิตร ผสมโดยการพลิกหลอดกลับไปมา แล้ววางในถังน้ำแข็ง

6.6 เติมสารละลาย Solution III\* ที่เย็นจัด 150 ไมโครลิตร ค่อยๆผสมให้เข้ากัน แล้ววางทิ้งไว้ในถังน้ำแข็ง 3 – 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาทีที่ 4 องศาเซลเซียส

6.7 ผสมสารละลายใส่ส่วนบนลงในหลอดใหม่ แล้วตกตะกอน DNA สายคู่ (dsDNA) ที่อุณหภูมิห้อง โดยการเติม ethanol 1 เท่าของสารละลายส่วนใส (1 Volume) หรือ เติม isopropanol 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง vortex เป็นเวลา 2 นาที

6.8 นำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาทีที่ 4 องศาเซลเซียส ผสมสารละลายส่วนใสออกแล้วคว่ำหลอด ปล่อยให้แห้ง

6.9 ล้าง dsDNA ด้วย 70% ethanol ที่ 4 องศาเซลเซียส เทสารละลายส่วนใสออก ปล่อยให้แห้ง

6.10 ละลาย dsDNA ด้วย สารละลาย TE buffer (pH 8.0) ที่มีเอนไซม์ pancreatic RNase ที่ปราศจาก DNase (20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

**\*การเตรียมสารละลาย Solution I, Solution II และ Solution III**

**Solution I**

50 mM glucose  
 25 mM Tris-HCl (pH 8.0):  
 - 20% glucose 5 ml  
 - 1M Tris-HCl 2.5 ml  
 - 0.5 mM EDTA 0.2 ml  
 - dH<sub>2</sub>O to final volume 100 ml  
 10 mM EDTA (pH 8.0)  
 Autoclaved

**Solution II**

0.2 N NaOH (freshly diluted from 10 N NaOH):  
 - 10 N NaOH 2 ml  
 - 20% SDS 5 ml  
 - dH<sub>2</sub>O to final volume 100 ml

1% SDS

**Solution III (100 ml)**

5 M Potassium acetate	60	ml
Glacial acetic acid	11.5	ml
H <sub>2</sub> O	28.5	ml

- การอ่านลำดับเบสของดีเอเอที่สกัดได้และการแปลผล

- วิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rDNA บนพลาสมิดโดยวิธี Sanger deoxy method ด้วยเครื่อง DNA sequencer (ABI PRISM 3730 Genetic analyzer, CA, USA) และ ABI BigDye Terminator version 3.1 chemistry kit (CA, USA).

- แปลผลโดยเปรียบเทียบลำดับเบสกับแบคทีเรียอื่นใน GenBank database ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) โดยใช้โปรแกรม BLAST และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการ (Phylogenetic analysis) และสร้างแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) โดยใช้ซอฟต์แวร์ molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 (Tamura *et al.*, 2007)

### การศึกษาการผลิตรงควัตถุสีม่วงจากแบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับฟองน้ำทะเล

ทำการเลี้ยงแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ในอาหาร Modified Zobell broth 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน วัดการเจริญเติบโตของแบคทีเรียด้วยการวิเคราะห์น้ำหนักแห้งและเก็บเซลล์เพื่อสกัดรงควัตถุสีม่วงและวิเคราะห์ด้วย HPLC

### การศึกษาปัจจัยที่มีผลการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและการผลิตรงควัตถุสีม่วงจากแบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับฟองน้ำทะเล

ทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและการผลิตรงควัตถุสีม่วง ได้แก่ พีเอช และ อุณหภูมิ โดยเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สร้างรงควัตถุสีม่วงสูงสุดใน Modified Zobell broth 100 มิลลิลิตร โดยใช้สภาวะการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน และเปลี่ยนแปลงปัจจัยที่ศึกษา คือ ปรับพีเอชที่ 6, 7 และ 8 (ทำ 3 ซ้ำ) และใช้สภาวะการเลี้ยงที่พีเอช 7 อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน อุณหภูมิที่ 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส ทำการวิเคราะห์การเจริญเติบโตของแบคทีเรียด้วยน้ำหนักแห้งและวิเคราะห์รงควัตถุสีม่วงด้วย HPLC

### การศึกษากลศาสตร์การผลิตรงควัตถุสีม่วงจากแบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับฟองน้ำทะเล

ทำการเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สร้างรงควัตถุสีม่วงสูงสุดในอาหาร Modified Zobell broth 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 7 อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน เก็บตัวอย่างทุกวันเพื่อวัดการเจริญเติบโตของแบคทีเรียด้วยการวิเคราะห์น้ำหนักแห้งและเก็บเซลล์เพื่อสกัดรงควัตถุสีม่วงและวิเคราะห์ด้วย HPLC

### การสกัดรงควัตถุจากแบคทีเรีย

1. นำเซลล์แบคทีเรียมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสด้านบนทิ้ง ย้ายเซลล์แบคทีเรียใส่ลงในขวดรูปชมพู่
2. เติม 95% ethanol 10 มิลลิลิตร ปิดฝาขวดให้มิดชิดแล้วนำไปสกัดโดยการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซ้ำมึน
3. นำสารสกัดที่ได้จากการสกัดซ้ำมึนมาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนเซลล์ที่ 7000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสด้านบนที่มีสีเหลือง
4. ทำให้สารละลายเข้มข้นขึ้นโดยการระเหย ethanol ด้วยเครื่อง Vacuum Evaporator ให้หมดแล้วละลายตะกอนรงควัตถุกลับด้วย methanol 2 มิลลิลิตร นำสารละลายสกัดเข้มข้นส่วนนี้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC และ HPLC รวมทั้งวิธีการอื่น ๆ

### การวิเคราะห์สารสกัดจากแบคทีเรียด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี

#### - Thin Layer Chromatography (TLC)

1. นำสารสกัดเข้มข้นมาจุดลงบนแผ่น C-18 TLC โดยหลอด Capillary ให้ห่างกันจุดละประมาณ 2 เซนติเมตร แล้วรอให้แห้ง
2. นำแผ่น TLC ไปวางในโถที่บรรจุวัฏภาคเคลื่อนที่คือ Hexane:Acetone 90:10 โดยปริมาตร และอบอวลไปด้วยไอของวัฏภาคเคลื่อนที่

3. ตั้งไว้ในที่มีด ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตการเคลื่อนที่ของรงควัตถุตัวอย่างเทียบกับรงควัตถุมาตรฐาน ได้แก่  $\beta$ -carotene และ astaxanthin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

#### - High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

นำสารสกัดเข้มข้นมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC โดยมีสภาวะดังนี้

<b>Column</b>	A Polaris C <sub>18</sub> HPLC column (Varian) 150 × 4.6 mm combined with MetaGuard column (Varian)
<b>Mobile phase</b>	Acetonitrile: Methanol: Tetrahydrofuran (58:35:7, v/v)
<b>Flow rate</b>	1 ml/min
<b>Temperature</b>	Room Temperature
<b>Detector</b>	Photodiode array detector
<b>Wavelength</b>	450 nm
<b>Injection volume</b>	20 $\mu$ l

เปรียบเทียบเวลาคงค้าง (retention time) ของรงควัตถุตัวอย่างกับรงควัตถุมาตรฐาน ได้แก่  $\beta$ -carotene, zeaxanthin และ astaxanthin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

การแยกรงควัตถุให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค semi-preparative HPLC

ประกอบด้วย

#### - Solid phase extraction (SPE)

1. ปรับสภาพ sorbent ในแท่ง Solid phase extraction โดยใส่ 10% methanol, 50% methanol, 80% methanol และ 100% methanol
2. นำสารสกัดเข้มข้นมาหยอดใส่ Solid phase extraction cartridge ปล่อยให้ดูดซับใน sorbent
3. ล้างสารสกัดที่จับกับ sorbent ด้วยน้ำกลั่น และ 10% methanol
4. ชะรงควัตถุทั้งหมดออกโดยใช้ 100% methanol
5. นำสารละลายที่ได้ไปทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการระเหย methanol ด้วยเครื่อง Vacuum Evaporator จนมีปริมาตรเหลือประมาณ 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปแยกรงควัตถุให้บริสุทธิ์ด้วย HPLC

#### - High Performance Liquid Chromatography

1. นำสารละลายรงควัตถุเข้มข้นมาแยกให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค HPLC โดยมีสภาวะดังนี้

<b>Column</b>	C18-AR-II (Waters) 20 × 250 mm
<b>Mobile phase</b>	Isocratic, 100% MeOH
<b>Flow rate</b>	4 ml/min
<b>Injection volume</b>	25-200 $\mu$ l
<b>Temperature</b>	30°C
<b>Detector</b>	UV-VIS detector
<b>Wavelength</b>	450 nm

2. เก็บรงควัตถุที่แยกได้โดยดูจากโครมาโทแกรมการแยกสาร แล้วนำไปทำให้เข้มข้นขึ้น โดยเครื่อง Rotary evaporator และ Vacuum evaporator จนมีปริมาตรเหลือประมาณ 2 มิลลิลิตร
3. นำรงควัตถุแต่ละส่วน (fraction) ไปทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งด้วยเทคนิค HPLC ข้างต้น เก็บรงควัตถุบริสุทธิ์ที่ได้ไประเหยตัวทำละลาย methanol ออกจนแห้ง
4. นำตะกอนรงควัตถุมาล้างอีกครั้งโดยแช่ใน methanol ข้น (ห้ามเขย่า) เท methanol ส่วนบนออก แล้วระเหย methanol ที่เหลือติดตะกอนรงควัตถุออกให้แห้งด้วยเครื่อง vacuum evaporator แล้วนำตะกอนสีไปวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเครื่อง Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy

#### การวิเคราะห์โครงสร้างรงควัตถุด้วยเทคนิค NMR

1. ละลายตะกอนรงควัตถุบริสุทธิ์ด้วยตัวทำละลาย  $\text{CDCl}_3$  0.75 มิลลิลิตร ให้ตะกอนละลายจนหมด
2. ดูสารละลายรงควัตถุลงในหลอด NMR ให้มีความสูงประมาณ 4 เซนติเมตร ปิดฝาหลอดแล้วพันด้วยพาราฟินให้มิดชิด
3. ทำความสะอาดหลอดแล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง NMR spectroscopy ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT135, HH-COSY, HMQC และ HMBC)
4. วิเคราะห์โครงสร้างของสารจาก NMR spectrum

#### การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของรงควัตถุด้วย Mass spectrometry

เทคนิค Liquid chromatography-Mass spectrometry (LC-MS) ทำตามวิธีการของ Dachtler *et al* (2001)

#### การศึกษาคุณสมบัติของรงควัตถุชีวภาพ

##### - คุณสมบัติการละลาย

1. ละลายตะกอนรงควัตถุบริสุทธิ์ด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ อาทิ น้ำ methanol, ethanol, hexane, chloroform และ dichloromethane เป็นต้น
2. สังเกตการละลายของรงควัตถุในตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

##### - การทนต่อกรดและด่าง

1. ละลายตะกอนรงควัตถุบริสุทธิ์ด้วยตัวทำละลาย methanol ให้ได้ความเข้มข้นที่ 0.1 mg/ml
2. ปรับ pH ของสารละลายรงควัตถุเป็นค่าต่างๆ ตั้งแต่ 4-7 ด้วย 1 N HCl หรือ 1 N NaOH ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง จากนั้นวัดการเปลี่ยนแปลงสีและความเข้มข้นของรงควัตถุ

##### - การทนต่อความร้อน

1. ละลายตะกอนรงควัตถุบริสุทธิ์ด้วยตัวทำละลาย methanol ให้ได้ความเข้มข้นที่ 0.1 mg/ml
2. ตั้งสารละลายรงควัตถุทิ้งไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ ( $30-60^\circ\text{C}$ ) นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นวัดการเปลี่ยนแปลงสีและความเข้มข้นของรงควัตถุ