247546

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

247546

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาจุลินทรีย์จากเปลือกผลไม้ทุเรียนและมังคุดที่มีศักยภาพในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

The Study of Durian-Peeled and Mangosteen-Peeled Microorganisms Producing Bioactive Compounds

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ดร. ดวงฤทัย นิคมรัฐ

สาขาวิทยาการสิ่งแวดล้อมและการจัดการทรัพยากรธรรมชาติ

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

ผู้ร่วมวิจัย

ดร. ไพศาล การถาง

น.ส. กนกอร สุดโต

ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร ปีงบประมาณ 2553

b00252805

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
247546

บทคัดย่อ

247546

เนื่องด้วยงานวิจัยในปัจจุบันเกี่ยวกับการการพัฒนาหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพตัวใหม่เป็นงานที่ได้รับความสนใจ เนื่องจากปัจจุบันมีความต้องการในด้านยาตัวใหม่ เพื่อการรักษาโรคระบาดที่มีความรุนแรง ที่มีการติดเชื้อซ้ำซ้อน หรือมีการดื้อต่อยา ด้วยแนวทางการวิจัยที่ทีมผู้วิจัยที่เน้นการศึกษาหาเชื้อจุลินทรีย์ในธรรมชาติที่เจริญเติบโตบนเปลือกทุเรียนและมังคุดที่มีคุณสมบัติในการสร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพ ได้ถูกพัฒนาขึ้นมา เพื่อประโยชน์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อโรคทั่วไปที่มักก่อปัญหาดังกล่าว จากงานวิจัยที่คณะผู้วิจัยคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ธรรมชาติที่เจริญบนเปลือกผลไม้ทั้งสองชนิดนี้มาทดสอบอย่างละ 300 clones หรือสายพันธุ์ ได้พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียที่บริสุทธิ์แล้วอย่างน้อย 20 เปอร์เซ็นต์ของทั้งสองกลุ่มจากเปลือกทุเรียนและเปลือกมังคุด ที่มีศักยภาพในการออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรค เช่น *Stapphylococcus Bacillus* และ *E. coli* โดยให้ผลบวกของการทดสอบด้วยวิธี disc diffusion test ในระดับตั้งแต่ +2 เมื่อเทียบกับการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อเหล่านี้ด้วยยาปฏิชีวนะ Amphicillin, Chloramphinical และ erythromycin ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 10-200 mg/ml และจากเชื้อแบคทีเรียที่ได้มีเชื้อแบคทีเรียที่สร้างสารออกฤทธิ์ต่อเชื้อก่อโรคดังกล่าวได้สูง (+4) คือ clone DU4 DU16 DU34 DU160 MS3 MS33 และ MS54 โดยที่เชื้อเหล่านี้เมื่อทำการตรวจสอบลำดับดีเอนเอจาก 16SrDNA gene พบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ *Lactobacillus casei* ATCC 334, *Lactobacillus gasseri* ATCC 9857, *Lactobacillus cremoris* ATCC 19257, *Lactobacillus* sp. ATCC 53103, Enterobacter amnigenus JCM1237, *Pseudomonas mosselii* strain CIP 105259, และ *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4962 ตามลำดับ เชื้อแบคทีเรียเหล่านี้สามารถออกฤทธิ์ชีวภาพโดยสร้างสารได้ในปริมาณสูงสุด (>+5) เมื่อถูกเลี้ยงในสภาวะปรกติเป็นเวลานานมากกว่า 24-28 ชั่วโมง หรือที่เชื้อมีการเจริญเติบโตจนให้ค่าการดูดกลืนของแสงที่ 600 nm ประมาณ 0.9-1.2 ซึ่งเป็นระยะการเจริญเติบโตของช่วง late log phase จนถึง early stationary phase สารเหล่านี้เป็นสารประเภท extracellular substance ละลายน้ำได้ดีและคงทนเมื่อทดสอบด้วย disc diffusion test พบว่าให้ผลการออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้เมื่อมีการบ่มเชื้อเหล่านี้บนแผ่น disc เป็นเวลานาน 3-5 วัน

จากการวิจัยดังกล่าวเหล่านี้ที่ได้ ทีมผู้วิจัยมีความคาดหวังที่จะทำการทดสอบดูค่า MIC ของเชื้อเหล่านี้และทำการขยายขนาดการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ พร้อมทั้งปรับปรุงคุณภาพการสร้างสารออกฤทธิ์ในระดับนี้ให้คงที่ พร้อมทั้งยังหาแนวทางสกัด และศึกษาดูโครงสร้างทางเคมีของสารที่ได้ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ในการทำวิจัยเรื่องนี้ ทีมคณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำหรับทุนจากงบประมาณผลประโยชน์จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล ที่ได้สนับสนุนงานวิจัยนี้ ให้สามารถทำลุล่วงไปได้จนสำเร็จ และขอขอบคุณนางสาวสมปรารถนา วินิจฉัย นักศึกษาคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สาขาวิทยาการสิ่งแวดล้อมและการจัดการทรัพยากรธรรมชาติชั้นปีที่ 2 และ นายณัฐพล สัตถาผล นักศึกษาคณะสถาปัตย์กรรมศาสตร์และการออกแบบที่ได้มาช่วยในขั้นตอนการเตรียมเชื้อ ทดสอบเชื้อ และคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ ที่มีคุณสมบัติการสร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพ

นอกจากนี้ในระหว่างงานวิจัยที่ขาดอุปกรณ์เครื่องมือที่สำคัญในงานวิจัย ทัมงานวิจัยต้องขอขอบคุณอย่างยิ่งในความเอื้อในด้านอุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีในขั้นตอนการสกัดดีเอนเอ จนถึงขั้นตอนการตรวจสอบลำดับดีเอนเอ ของทีมงานวิจัยของ ดร. สมเกียรติ เตชกาญจนารักษ์ จากศูนย์พันธุวิศวกรรมศาสตร์ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ และท้ายสุดต้องขอขอบคุณ ดร. ทวีรัตน์ วิจิตรสุนทรกุล อาจารย์ คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยี พระจอมเกล้าธนบุรี ที่ได้เอื้อเฟื้อให้เชื้อจุลินทรีย์ต่างๆที่ใช้ในการทดสอบการออกฤทธิ์ชีวภาพ

สารบัญ

เรื่อง **หน้า**

บทคัดย่อ

กิติกรรมประกาศ

บทที่

1. บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย 1

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย 2

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย 3

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 4

2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สารปฏิชีวนะจากเชื้อจุลินทรีย์ 5

2.2 การดื้อยาของเชื้อจุลินทรีย์กับแนวโน้มการพัฒนายา 6

2.2 สารปฏิชีวนะจากเชื้อจุลินทรีย์ 7

2.3 งานวิจัยเกี่ยวข้องกับเปลือกทุเรียนและมังคุด 9

3 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1. คัดเลือกหาจุลินทรีย์ที่สามารถขึ้นในเปลือกทุเรียน และเปลือกมังคุด 13

3.2. ดูความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะต่างๆของเชื้อจุลินทรีย์ 13

3.3. คัดเลือก จำแนก ศึกษาคุณลักษณะทางสรีรวิทยา กายภาพของเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้ 14

3.4. ศึกษาความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้คัดเลือกไว้ 15

3.5. ศึกษา พัฒนาขั้นตอนกระบวนการผลิตออกฤทธิ์สารชีวภาพ 15

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
4. ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	
4.1 การคัดเลือกหาจุลินทรีย์จากเปลือกทุเรียน และเปลือกมังคุด	16
4.2. ความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะต่างๆของเชื้อจุลินทรีย์	17
4.3. การคัดเลือก จำแนก ศึกษาคุณลักษณะทางสรีรวิทยา กายภาพของเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้	24
4.4. ศึกษาความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้คัดเลือกไว้	27
4.5. การศึกษาพัฒนาขั้นตอนกระบวนการผลิตออกฤทธิ์สารชีวภาพ	28
5. สรุปและข้อเสนอแนะ	
5.1. กลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่พบจากเปลือกทุเรียนและเปลือกมังคุด	34
5.2. คุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้บริสุทธิ์	34
5.3. ความคงตัวของสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่ได้	35
บรรณานุกรม	36

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

ภาพที่ 4.1 แสดงตัวอย่าง ภาพจาก Compound Microscopy ที่ 100x ของเชื้อแบคทีเรีย ที่พบได้จากผิวเปลือกทุเรียน (ภาพบน) และจากผิวเปลือกมังตุด (ภาพล่าง) 16

ภาพที่ 4.2 แสดงตัวอย่างการเกิด clear zone ของการยับยั้งที่เชื้อที่ได้จากเชื้อที่ได้จาก เปลือกทุเรียน 18

ภาพที่ 4.3 แสดงตัวอย่างการเกิด clear zone of inhibition จากเชื้อทุเรียนที่สร้าง วงใส clear zone 18

ภาพที่ 4.4 แสดงตัวอย่างซองเชื้อจุลินทรีย์จากเปลือกทุเรียนที่ให้ผลบวก 19

ภาพที่ 4.5 แสดงตัวอย่างของเชื้อจุลินทรีย์ clone DU22 จากเปลือกทุเรียน ที่ทำการเลี้ยง ให้บริสุทธิ์ 25

ภาพที่ 4.6 แสดงตัวอย่างการเกิด clear zone ของเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ clone MS 3 จากเปลือกมังคุด 26

ภาพที่ 4.7 แสดงตัวอย่างความคงทนของสารที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโต ของเชื้อจุลินทรีย์ clone DU4 26

ภาพที่ 4.8 แสดงgenomic DNA ของเชื้อแบคทีเรียที่บริสุทธิ์ 5 ตัวอย่าง 27

ภาพที่ 4.9 แสดงตัวอย่างของ 16S rDNA ที่ได้จากการทำ PCR 27

ภาพที่ 4.10 แสดงตัวอย่างของเชื้อ DU4 ที่มีการเลี้ยงเพื่อพัฒนาการเจริญเติบโต ดูระยะการสร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพ 29

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

ภาพที่ 4.11 แสดงตัวอย่างการศึกษาความสัมพันธ์ของจำนวนเซลล์ของแบคทีเรีย DU4 และค่า absorbance 29

ภาพที่ 4.12 แสดงความสัมพันธ์ของการเจริญของเชื้อแบคที่เรีย DU4 กับการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ 30

ภาพที่ 4.13 แสดงตัวอย่างความสามารถในการสร้าง clear zone จากวิธี disc diffusion ของเชื้อ DU4 31

ภาพที่ 4.14 แสดงตัวอย่างของการทำ disc diffusion test ที่มีการบ่มไว้นาน 6 วัน 31

ภาพที่ 4.15 แสดงการศึกษาการพัฒนาความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพของเชื้อทั้งหมด 7isolates ที่ได้จากเปลือกทุเรียน (ก) และจากเปลือกมังคุด (ข) 32

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

ตารางที่ 2.1 คุณค่าทางโภชนาการของทุเรียน ต่อ 100 กรัม 10

ตารางที่ 2.2 คุณค่าทางโภชนาการของมังคุด ต่อ 100 กรัม 11

ตารางที่ 2.3 แสดงโครงสร้างของสาร α-mangostin, γ-mangostin และ β-mangostin 12

ตารางที่ 4.1 แสดงคุณลักษณะทางกายภาพของเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้จากเปลือกทุเรียน และ 17
จากเปลือกมังคุด

ตารางที่ 4.2 แสดงตัวอย่างผลการวัดขนาด clear zone เพื่อกำหนดค่า positive ของเชื้อ 20
จากเปลือกทุเรียน

ตารางที่ 4.3 แสดงตัวอย่างผลการวัดขนาด clear zone เพื่อกำหนดค่า positive ของเชื้อ 21
จากเปลือกมังคุด

ตารางที่ 4.4 แสดงคุณสมบัติการต้านจุลินทรีย์ต่างๆของเชื้อ isolates ที่ได้จากเปลือกทุเรียน 24
และเปลือกมังคุด

ตารางที่ 4.5 แสดงคุณสมบัติทางกายภาพของเชื้อจุลินทรีย์ isolate ต่างๆ 25

ตารางที่ 4.6 ชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการทดสอบตรวจดู 16S rDNA gene sequence 28