# รายงานการวิจัย

## เรื่อง

# การผลิตสารเจลดานามัยซินจากเชื้อแอคติโนมัยซีทป่าชายเลนและตำแหน่งอนุกรมวิธานของเชื้อนั้น

# Production of geldanamycin from mangrove actinomycete and its taxonomic position


โดย

ผศ.ดร. จิตติ ท่าไว



ทอ ๙๖ 12-17



ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน

ประจำปีงบประมาณ 2554

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง



RCH
OR
82
.A35
จA19ก

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 130302
วัน เดือน ปี 3 เมย. 2557

b.12598562
i.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) เงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2554 คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยงานดังกล่าวที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยตลอดการวิจัยในครั้งนี้

ผศ.ดร. จิตติ ท่าไว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การผลิตสารเจลดานามัยซินจากเชื้อแอคติโนมัยซีทป่าชายเลนและตำแหน่งอนุกรมวิธานของเชื้อนั้น

(ภาษาอังกฤษ) Production of geldanamycin from mangrove actinomycete and its taxonomic position

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) เงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2554 คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ประจำปี 2554 จำนวนเงิน 200,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี เดือนตุลาคม 2553 ถึง กันยายน 2554

ผู้ดำเนินการวิจัย ผศ.ดร. จิตติ ท่าไว
สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

โทรศัพท์ 02-3298400 ต่อ 235

## บทคัดย่อ

เชื้อแอคติโนมัยสีท จำนวน ๑๘ ไอโซเลต แยกจากตัวอย่างดินบริเวณป่าชายเลนและตะกอนดินใต้ทะเลบริเวณจังหวัดเพชรบุรีและตรัง จากการคัดเลือกเชื้อที่สร้างสารปฏิชีวนะเบื้องต้นพบเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลตทีแปดขีดหนึ่ง แสดงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ที่ดีและสามารถผลิตสารเจลดานามัยซินได้ ตำแหน่งอนุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนมัยสีทไอโซเลตทีแปดขีดหนึ่งที่สามารถผลิตสารเจลดานามัยซินได้ถูกกำหนดโดยลักษณะทางอนุกรมวิธานหลายส่วน เชื้อไอโซเลตนี้แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางเคมีทั่วไปของเชื้อในสกุล*สเตรปโตมัยเซส* การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงยีนสิบหกเอส อาร์ อาร์เอ็นเอ สนับสนุนว่าเชื้อไอโซเลตนี้เป็นเชื้อแอคติโนมัยสีทในสกุล*สเตรปโตมัยเซส*ซึ่งมีค่าร้อยละความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายกับเชื้อ*สเตรปโตมัยเซส มาเลชิเอ็นซิส* มากที่สุดที่ค่าความคล้ายคลึงร้อยละ ๙๙.๕ น้ำหมักเชื้อของเชื้อไอโซเลตนี้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ*แคนดิดา อัลบิแคน* เอทีซีซี ๑๐๒๓๑ และเชื้อ*สแตปฟิโลคอกคัส ออเรียส* เอทีซีซี ๒๕๙๒๓ได้อย่างมีนัยสำคัญ การศึกษาแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจนรวมทั้งความเข้มเข้นของเกลือและระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารเจลดานามัยซินได้มากที่สุดแสดงให้เห็นว่าแป้งที่ละลายน้ำได้ (ความเข้มข้นร้อยละ ๑ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) น้ำต้มถั่วเหลือง (ความเข้มข้นร้อยละ ๑ โดยปริมาตรต่อปริมาตร) และ เกลือที่ความเข้มข้นร้อยละ ๔

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารเจดานามัยซินของเชื้อไอโซเลตนี้เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา ๑๔ วัน ที่อุณหภูมิ ๓๐ องศาเซลเซียส

**คำสำคัญ** : เจลดานามัยซิน *สเตรปโตมัยเซส* ป่าชายเลน แอคติโนมัยสีท

**Abstract**

Eighteen actinomycete strains were isolated from mangrove forest soil and marine sediment of Petburi and Trang provinces, Thailand. Preliminary screening for antibiotic-producing actinomycete, we found the actinomycete isolate T8-1 showing well antimicrobial activity and it could produce geldanamycin, an important antibiotic. The taxonomic position of a geldanamycin producing actinomycete, which was designated T8-1, was determined using a polyphasic taxonomic approach. This isolate was shown to have morphological and chemical properties typical of the genus *Streptomyces*. 16S rRNA gene sequence analysis for the isolate supported the assignment of the isolate to the genus *Streptomyces* and the similarity value of the nucleotide sequence between this isolate and the closely related species, *Streptomyces malaysiensis* was 99.5%. The fermentation broth of this isolate significantly inhibited the growth of *Candida albicans* ATCC 10231 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Studies on carbon and nitrogen sources including the optimum concentration of sodium chloride and the period of the cultivation for highest geldanamycin production revealed that the soluble starch (1% w/v), soybean steep liquor (1% v/v) and the concentration of sodium chloride of 4 % w/v for fourteen days of inoculation at 30 °C were found to be the optimum conditions for geldanamycin production by this isolate.

**Keyword**: Geldanamycin , *Streptomyces*, Mangrove forest, Actinomycetes

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ


| | หน้า |
|---|---|
| กิตติกรรมประกาศ | ก |
| บทคัดย่อภาษาไทย | ข |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ | ค |
| สารบัญ | ง |
| สารบัญตาราง | ฉ |
| สารบัญรูป | ช |
| คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ | ซ |
| บทที่ 1 บทนำ | 1 |
| 1.1 ปัญหาที่ทำวิจัยและความสำคัญของปัญหา | 1 |
| 1.2 วัตถุประสงค์ | 2 |
| 1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย | 2 |
| 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ | 2 |
| 1.5 แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย | 2 |
| บทที่ 2 ทฤษฎีหรือกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย | 3 |
| บทที่ 3 ระเบียบวิธีการดำเนินงานวิจัย | 8 |
| 3.1 การเก็บตัวอย่าง การแยกและการคัดเลือกเชื้อ | 8 |
| 3.1.1 การเก็บตัวอย่าง | 8 |
| 3.1.2 การแยกเชื้อ | 8 |
| 3.2 การศึกษาอนุกรมวิธานเบื้องต้นของเชื้อ | 9 |
| 3.2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมี | 9 |
| 3.2.2 การศึกษาคุณสมบัติทางอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อ | 9 |
| 3.2.3 การวิเคราะห์ลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอในช่วง 16S rRNA gene และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ | 10 |
| 3.3 การศึกษาปัจจัยการผลิตสารและการสกัดแยกสาร | 12 |
| 3.4 การสกัดและแยกสารเจลดานามัยซินให้บริสุทธิ์ | 12 |
| 3.5 การพิสูจน์สูตรโครงสร้างทางเคมี | 13 |


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ (ต่อ)


| | หน้า |
|---|---|
| บทที่ 4 ผลการทดลอง | 14 |
| 4.1 การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อ | 14 |
| 4.2 การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนมัยสีท | 14 |
| 4.3 การแยกเชื้อและการคัดเลือกเชื้อที่ผลิตสารเจลดานามัยซินได้ | 24 |
| 4.4 การศึกษาปัจจัยการผลิตสารและการสกัดแยกสาร | 24 |
| 4.5 การสกัดและแยกสารเจลดานามัยซินให้บริสุทธิ์ การพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีและกำหนดเอกลักษณ์สารบริสุทธิ์ที่แยกได้ | 31 |
| บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ | 33 |
| เอกสารอ้างอิง | 35 |


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญตาราง


| ตารางที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | ลักษณะความแตกต่างระดับสกุลของเชื้อแอคติโนมัยซีท | 5 |
| 2 | สารปฏิชีวนะจากเชื้อแอคติโนมัยซีทกุล *Streptomyces* | 6 |
| 3 | แสดงรายละเอียดลักษณะของดินตัวอย่าง และรหัสเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้แต่ละไอโซเลต | 14 |
| 4 | ลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยสีท | 21 |
| 5 | แสดงความสัมพันธ์ของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและการผลิตสารเจลดานามัยซิน | 25 |
| 6 | แสดงความสัมพันธ์ของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและการผลิตสารเจลดานามัยซิน | 26 |
| 7 | แสดงความสัมพันธ์ของความเข้มข้นเกลือต่อการเจริญและการผลิตสารเจลดานามัยซิน | 27 |
| 8 | แสดงความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญและการผลิตสารเจลดานามัยซิน | 30 |
| 9 | เปรียบเทียบข้อมูลของ $^{1}H$ และ $^{13}C$-NMR ระหว่างสาร T8-1-1A และสารมาตรฐานเจลดานามัยซิน | 32 |


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญภาพ


| รูปที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | แสดงลักษณะและสีโคโลนีของเชื้อไอโซเลต P1-1 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 21 วัน | 15 |
| 2 | แสดงตำแหน่งของเชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์พีหนึ่งขีดหนึ่ง (*Streptomyces* sp. P1-1) บนต้นไม้สายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree, NJ method) | 16 |
| 3 | แสดงลักษณะและสีโคโลนีของเชื้อไอโซเลต T8-1 บนอาหาร ISP2 ระยะเวลา 21 วัน | 17 |
| 4 | แสดงตำแหน่งของเชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์พีทีแปด (*Streptomyces* sp. T8-1) บนต้นไม้สายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree, NJ method) | 18 |
| 5 | แสดงลักษณะและสีโคโลนีของเชื้อไอโซเลต T2-1 บนอาหารISP2 ระยะเวลา 21 วัน | 20 |
| 6 | แสดงตำแหน่งของเชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์ทีสองขีดหนึ่ง (*Streptomyces* sp. T2-1) บนต้นไม้สายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree, NJ method) | 20 |
| 7 | ความสัมพันธ์ของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตสารเจลดานามัยซินและน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อ *Streptomyces* sp. T8-1 | 25 |
| 8 | ความสัมพันธ์ของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตสารเจลดานามัยซินและน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อ *Streptomyces* sp. T8-1 | 26 |
| 9 | ความสัมพันธ์ของความเข้มข้นเกลือต่อการผลิตสารเจลดานามัยซินและน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อ *Streptomyces* sp. T8-1 | 27 |
| 10 | ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารเจลดานามัยซินและน้ำหนักเซลล์แห้งตามแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นของเกลือ | 29 |
| 11 | ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการผลิตสารเจลดานามัยซินและน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อ *Streptomyces* sp. T8-1 | 30 |
| 12 | โครงสร้างของสาร T8-1-1A | 31 |


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ATCC = American Type Culture Collection

*B. subtilis* = *Bacillus subtilis*

*C. albicans* = *Candida albicans*

DSM = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen

*E. coli* = *Escherichia coli*

EtOAc = ethyl acetate

ISP = International *Streptomyces* Project

*M. luteus* = *Micrococcus luteus*

MHA = Mueller-Hinton Agar

nm = nanometer

NSA = Non-Streptomycete Actinomycetes

*Ps. Aeruginosa* = *Pseudomonas aeruginosa*

SDA = Sabouraud Dextrose Agar

*S. aureus* = *Staphylococcus aureus*

TSB = Triptic soya broth

UV = Ultraviolet

μL = microlitre

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1
# บทนำ

## 1.1 ปัญหาที่ทำวิจัยและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันอุบัติการณ์การดื้อยาของเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ มีมากขึ้นทั้งนี้อาจเกิดจากการใช้ยาปฏิชีวนะไม่ถูกวิธี ตลอดจนสภาพแวดล้อมของโลกเปลี่ยนแปลงไปซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ ดังที่ปรากฏในข่าวจากสื่อต่างๆ ของการค้นพบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคชนิดใหม่ยังผลให้เกิดการเสียหายต่อชีวิตทรัพย์สิน และเศรษฐกิจทางการเกษตรโดยรวม แนวทางแก้ปัญหาแนวทางหนึ่ง คือเร่งหาสารปฏิชีวนะชนิดใหม่และพัฒนา lead compound จากแหล่งทรัพยากรธรรมชาติทั้งพืช สัตว์และจุลินทรีย์เพื่อนำมาใช้ยับยั้งและกำจัดเชื้อโรคดื้อยาเหล่านั้น จุลินทรีย์จัดเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่สำคัญแหล่งหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลายด้าน การผลิตสารปฏิชีวนะเป็นประโยชน์ด้านหนึ่งที่สำคัญเนื่องจากจุลินทรีย์สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้หลากหลายทั้งโครงสร้างและการออกฤทธิ์ รวมทั้งสามารถเพิ่มผลผลิตได้ง่าย แอคติโนมัยซีทส์เป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างเส้นใยคล้ายเชื้อรา เชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้มีประโยชน์หลายด้าน โดยเฉพาะเป็นผู้ผลิตสารปฏิชีวนะที่สำคัญ ยาปฏิชีวนะหลายตัวที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน เช่น gentamicin erythromycin streptomycin actinomycin D ล้วนพัฒนามาจาก Lead compound ที่สร้างจากเชื้อแอคติโนมัยซีททั้งสิ้น สาร geldanamycin เป็น lead compound ที่น่าสนใจอีกสารหนึ่งเนื่องจากมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา โปรโตซัว ตลอดจนมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ และล่าสุดมีรายงานว่าสาร geldanamycin ที่ระดับความเข้มข้นต่ำๆ (micromolar-nanomolar) สามารถแสดงฤทธิ์กระตุ้นการเจริญของเซลล์ประสาทได้ สาร geldanamycin มีรายงานครั้งแรกว่าผลิตได้จากเชื้อแอคติโนมัยซีทในสกุล *Streptomyces* ที่พบในดินบนบก ด้วยประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความหลากหลายทางชีวภาพในเชิงประชากรของเชื้อแอคติโนมัยซีทค่อนข้างสูงโอกาสค้นพบเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถผลิตสาร geldanamycin จึงมีอยู่มากและอาจเป็นเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่มีความสามารถในการสร้างสาร geldanamycin ได้ดีกว่าสายพันธุ์ที่มีการายงานไว้แต่เดิม การศึกษาเพื่อค้นหาเชื้อที่สามารถผลิต lead compound ได้ดี ทำให้เกิดการได้เปรียบต่อการศึกษาด้านเภสัชศาสตร์ในการพัฒนาเป็นยาปฏิชีวนะตัวใหม่ เนื่องจากการมีทรัพยากรหรือวัตถุดิบอยู่ในมือย่อมง่ายต่อการพัฒนาในด้านต่างๆ จัดเป็นการใช้ทรัพยากรธรรมชาติอย่างคุ้มค่า ดังนั้นจึงสนใจที่จะค้นหาเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถผลิตสาร geldanamycin เพื่อเก็บเป็นวัตถุดิบหรือต้นทุนในการใช้ประโยชน์จากสารสำคัญนี้ ตลอดจนศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารดังกล่าวนี้ให้ได้มากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย**

12.1 เพื่อแยกแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีทจากดินป่าชายเลนจังหวัดเพชรบุรีและตรัง

12.2 เพื่อคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถผลิตสารเจลดานามัยซินได้

12.3 เพื่อศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารเจลดานามัยซิน เช่น อาหารและสภาวะในการเลี้ยงเชื้อ

12.4 เพื่อศึกษาคุณลักษณะทางอนุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่สามารถผลิตสารเจลดานามัยซิน

**1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย**

การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารเจลดานามัยซินจากเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่แยกจากป่าชายเลน ศึกษาเพื่อยืนยันโครงสร้างสารเจลดานามัยซิน และศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานระดับสกุลของเชื้อดังกล่าว หากข้อมูลเบื้องต้นพบว่าเป็นเชื้อที่มีแนวโน้มเป็นสปีชีส์ใหม่จะทำการศึกษาอนุกรมวิธานถึงระดับสปีชีส์

**1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่จะนำไปใช้ประโยชน์**

การศึกษาในครั้งนี้อาจค้นพบเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถสร้างสารเจลดานามัยซินได้ดี ตลอดจนทราบปัจจัยที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตสารเจลดานามัยซินของเชื้อดังกล่าวและทราบลักษณะทางอนุกรมวิธานของเชื้อ ซึ่งทำให้ได้ทรัพยากรจุลินทรีย์ที่สำคัญเป็นวัตถุดิบในการผลิตสารเจลดานามัยซิน นอกจากนี้ ข้อมูลที่ได้จะเป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อใช้ในการพัฒนาสารเจลดานามัยซินในระดับต่อไป หากผลการวิจัยทางด้านอนุกรมวิธานของเชื้อบ่งบอกว่าเชื้อเป็นสปีชีส์ใหม่รวมทั้งทราบปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตสารจะสามารถนำข้อมูลนี้ไปตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติหรือนานาชาติได้

**1.5 แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย**

เมื่อได้รับทราบผลการวิจัยในครั้งนี้จะส่งต่อไปยังหน่วยงานที่ศึกษาสารเจลดานามัยซินอยู่เพื่อให้รับทราบสภาวะและปัจจัยในการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมเพื่อต่อการผลิตสารเจลดานามัยซินได้ดียิ่งขึ้น ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้สามารถนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ในการพัฒนาทางวิทยาศาสตร์สาธารณสุขด้านการค้นคว้าวิจัยพัฒนาสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเป็นยาปฏิชีวนะเพื่อรองรับปัญหาการระบาดของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 2

# ทฤษฎีหรือกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

สารปฏิชีวนะที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันส่วนมากพัฒนามาจาก lead compound ที่ผลิตจากเชื้อแอคติโนมัยซีท สาร geldanamycin เป็น lead compound สารหนึ่งที่มีรายงานว่าสามารถผลิตได้จากเชื้อแอคติโนมัยซีทในสกุล Streptomyces hygroscopicus var. geldanus ซึ่งเชื้อนี้ถูกแยกครั้งแรกจากดินบก สาร geldanamycin จัดเป็นสารที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย หลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา โปรโตซัว ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง ตลอดจนสามารถกระตุ้นการเจริญของเซลล์ประสาทในระดับความเข้มข้นที่ต่ำระดับไมโครถึงนาโนโมลาร์

เชื้อแอคติโนมัยซีทมีหลายสกุลและสามารถค้นพบได้มากขึ้นเนื่องจากมีเทคนิคใหม่ในการแยกเชื้อที่จำเพาะ ยังผลให้การค้นพบสารปฏิชีวนะจากเชื้อแอคติโนมัยซีทส์เพิ่มสูงขึ้น โดยจุลินทรีย์กลุ่มแอคติโนมัยซีท
ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้มากที่สุด คือเชื้อในสกุล *Streptomyces* ซึ่งผลิตสารปฏิชีวนะได้ 70% (ประมาณ 8,000 ชนิด) ของสารปฏิชีวนะที่สร้างจากแอคติโนมัยซีทส์ทั้งหมด เชื้อสกุล *Micromonospora* ผลิตได้ 5% (740 ชนิด) นอกเหนือจากนี้ผลิตได้จากเชื้อในสกุลอื่น

จากการศึกษาทางด้านการกระจายตัวของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่ผ่านมานั้นทำให้ทราบถึงว่าประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความหลากหลายทางชีวภาพในเชิงประชากรของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ค่อนข้างสูง เนื่องจากได้ทำการค้นพบเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ในสกุลและสปีชีส์ใหม่หลายชนิด เช่น *Actinocatenispora thailandica* (Thawai et al., 2006), *Micromonospora eburnea* (Thawai et al., 2004), *Micromonospora aurantinigra* (Thawai et al., 2004), *Micromonospora siamensis* (Thawai et al., 2005) เป็นต้น นอกจากนั้นแล้วยังมีการพบสารทุติยภูมิชนิดใหม่ (Micromonosporin A) จากเชื้อ *Micromonospora aurantinigra* (Thawai et al., 2004) ด้วย ซึ่งในการรายงานการค้นพบเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ชนิดใหม่ในประเทศไทยถือว่าค่อนข้างน้อยเนื่องจากยังคงมีการทำการวิจัยในวงจำกัด เมื่อทราบข้อมูลเบื้องต้นที่น่าสนใจดังนั้นแล้วการศึกษาเพื่อค้นหาเชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีประสิทธิภาพในการผลิต lead compound ได้สูงและหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้เชื้อนั้นสาร lead compound ได้มากที่สุด ตลอดจนการศึกษาอนุกรมวิธานของชื้อแอคติโนมัยซีทนั้นจึงเป็นงานวิจัยอีกชิ้นหนึ่งที่ควรได้รับการสนับสนุนอย่างยิ่งเพื่อเป็นการดึงเอาทรัพยากรจุลินทรีย์ที่สำคัญมาใช้ประโยชน์ให้ได้มากที่สุด

แบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีท (Actinomycetes) เป็นแบคทีเรียแกรมบวกมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายเชื้อรา คือมีไมซีเลียมแตกกิ่งก้าน และสามารถสร้างสปอร์ไม่อาศัยเพศที่เรียกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

conidiospore หรือ conidia ที่ไม่มีสิ่งห่อหุ้ม แต่ถ้าสปอร์ที่สร้างมีถุงหุ้มเรียก sporangiospore อยู่ใน sporangium สปอร์ที่สร้างนี้ทนความร้อนได้ไม่มาก (ขึ้นอยู่กับแต่ละสกุล) แต่ทนความแห้งได้ดีจึงสามารถรอดชีวิตอยู่ได้ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมเป็นเวลานาน ประโยชน์ของแอคติโนมัยซีทส์ที่รู้จักกันดีคือ สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้ จากข้อมูลล่าสุดพบว่าสารปฏิชีวนะส่วนใหญ่สร้างมาจากแอคติโนมัยซีทส์ (45%) เชื้อรา (38%) และแบคทีเรียชนิดอื่น (17%) โดยจุลินทรีย์กลุ่มแอคติโนมัยซีทส์ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้มากที่สุดเป็นเชื้อในสกุล *Streptomyces* ซึ่งผลิตสารปฏิชีวนะได้ 70% (ประมาณ 8,000 ชนิด) ของสารปฏิชีวนะที่สร้างจากแอคติโนมัยซีทส์ทั้งหมด เชื้อสกุล *Micromonospora* ผลิตได้ 5% (740 ชนิด) นอกเหนือจากนี้ผลิตได้จากเชื้อในสกุลอื่น เช่น *Streptoverticillium*, *Kitasatospora*, *Actinomadura*, *Saccharothrix*, *Microbispora*, *Microtetraspora*, *Nonomuria*, *Actinoplanes*, *Dactylosporangium*, *Thermomonospora*, *Thermoactinomyces*, *Nocardia*, *Saccharopolyspora*, *Amycalotopsis*, *Kibdellosporangium*, *Pseudonocardia*, *Actinosporangium*, *Streptosporangium*, *Spirillospora*, *Planobispora*, *Planomonospora* เป็นต้น (Bérdy, 2005) แอคติโนมัยซีทส์สามารถพบได้ตามสิ่งแวดล้อมทั่วไป โดยเฉพาะในดินบนบก สิ่งมีชีวิตชนิดนี้ส่วนใหญ่ดำรงชีวิตด้วยการย่อยสลายซากพืชและสัตว์เพื่อเปลี่ยนเป็นสารอาหารในการดำรงชีพ

เชื้อแอคติโนมัยซีทสกุล Streptomyces จัดเป็นเชื้อแอคติโนมัยซีททั่วไป (common actinomycetes) เนื่องจากมีการกระจายตัวสูง เชื้อกลุ่มนี้แสดงมีไอโซเมอร์ของกรดไดอะมิโนพิเมลิกของผนังเซลล์แบบ LL ซึ่งใช้แยกความแตกต่างจากเชื้อแอคติโนมัยซีทหายาก (rare actinomycetes) ซึ่งแสดงไอโซเมอร์แบบ meso (DL) (ตารางที่ 1) เชื้อสกุล Streptomyces เป็นเชื้อกลุ่มที่โดดเด่น เนื่องจากมีศักยภาพทางชีวภาพที่หลากหลายโดยเฉพาะการสร้างสารปฏิชีวนะ ดังแสดงในตารางที่ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่** 1 ลักษณะความแตกต่างระดับสกุลของเชื้อแอคติโนมัยซีท

| Genus | Typical morphology | Wall chemotype | Sugar pattern | Phospholipid type |
|---|---|---|---|---|
| *Streptomyces* | Chains of spores on aerial hyphae | I | - | PII |
| *Micromonospora* | Branched, non-fragmenting hyphae, aerial hyphae scanty or absent | II | D | PII |
| *Actinoplanes* | Branched, non-fragmenting hyphae, aerial hyphae scanty or absent | II | D | PII |
| *Nocardia* | Unbranched-branched fragmenting susstrate and aerial hyphae | IV | A | PII |
| *Actinomyces* | Cocci-irregular rods-branching | V, VI | - | PII |
| *Thermomonospora* | Single spores often in cluster | III | C | PIV |
| *Actinomadura* | Short chains of arthrospores | III | B | PI |
| *Streptosporangium and Microtetraspora* | Stable substrate and aerial mycelium | III | B and C | PIV |
| *Frankia* | Multilocular sporangia | III | B ,C and E | PI |
| *Nocardioides* | Branching, fragmenting mycelium with aerial hyphae | I | - | PI |
| *Actinobiapora* | Pairs of spores on substrate | IV | * | PIV |
| *Glycomyces* | Short spore chains on aerial hyphae | II | D | PI |
| *Intrasporangium* | Fragmenting, branching mycelium | I | - | PI |
| *Kibdelosporangium* | Aerial sporangium-like structures | IV | A | PII |
| *Kineosporia* | Substrate mycelium | I | - | PIII |
| *Nocardiopsis* | Fragmenting hypae | III | C | PIII |
| *Sporichthya* | Aerial mycelium, motile spores | I | - | ND |

* Novel sugar pattern comprising arabinose, galactose and xylose
ND, not determined

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 2** สารปฏิชีวนะจากเชื้อแอคติโนมัยซีทกุล *Streptomyces*

| Compound | Source | Activity | References |
|---|---|---|---|
| Aureoverticillactam | *Streptomyces aureoverticillatus* | Anticancer | Mitchell *et al.*, 2004 |
| 3,6-disubstitutedindoles | *Streptomyces* sp. | Anticancer | Sanchez Lopez *et al.*, 2003 |
| Frigocyclinone | *Streptomyces griseus* | Antibacterial | Bruntner *et al.*, 2005 |
| Glaciapyrroles | *Streptomyces* sp. | Antibacterial | Macherla *et al.*, 2005 |
| Gutingimycin | *Streptomyces* sp. | Antibacterial | Maskey *et al.*, 2004 |
| Caprolactones | *Streptomyces* sp. | Anticancer | Stritzke *et al.*, 2004 |
| 8-amino-[1,4]diazonane-2,5-dione | *Sreptomyces acrimycini* | Antitumour | HernÃ¡ndez *et al.*, 2004 |
| Komodoquinone A | *Streptomyces* sp. | Neuritogenic activity | Itoh *et al.*, 2003 |
| Lajollamycin | *Streptomyces nodosus* | Antibacterial | Manam *et al.*, 2005 |
| Geldanamycin | *Streptomyces* sp. | Antibacterial | Suchada *et al.*, 2006 |
| leucyl-4-hydroxyproline | *Sreptomyces* sp. | Antitumour | HernÃ¡ndez *et al.*, 2004 |
| Trioxacarcins | *Streptomyces* sp. | Antibacterial; Anticancer; Antimalarial | Maskey *et al.*, 2004 |

การจัดจำแนกและการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ในระดับสกุลและสปีชีส์ อาศัยลักษณะทางฟีโนไทป์และจีโนไทป์ เช่น ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์ ลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมี(Chemotaxonomic characteristics) (ตารางที่1) เช่น Cell wall chemotype, Whole-cell sugar, Phospholipid type ตลอดจน diaminopemilic acid type ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อนั้นๆ (Holt, 1989) ลักษณะความคล้ายคลึงทาง DNA (DNA-DNA hybridization) และในปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิคในระดับโมเลกุล ได้แก่ การศึกษาวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rDNA และ RFLP (Restriction fragment length polymorphism) ตลอดจนการนำระบบ Bioinformatic มาเพื่อช่วยตัดสินการจัดอนุกรมวิธานให้ถูกต้องและแม่นยำขึ้น

การค้นพบยาชนิดต่างๆ ที่ได้จากสิ่งมีชีวิตหลายชนิดมีประวัติความเป็นมายาวนาน ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติส่วนใหญ่เป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่ได้จากเชื้อจุลินทรีย์และพืชซึ่งอาจได้จากการผ่าเหล่า(mutation) หรือจากวิวัฒนาการ หรือได้จากกระบวนการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

detoxification การมีแหล่งจุลินทรย์ที่ไม่จำกัดจะเพิ่มโอกาสในการค้นพบสารทุติยภูมิที่มีโครงสร้างหลากหลาย หรือสารทุติยภูมิชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ปัจจุบันมีการค้นพบสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพมากมายหลายชนิดจากเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่หายากหลายสกุล ดังนั้นการแยกและคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทส์ที่สามารถสร้างสารทีมีฤทธิ์ทางชีวภาพจากดินป่าชายเลนอาจจะมีโอกาสพบเชื้อสายพันธุ์ใหม่หรือเชื้อที่ผลิตสารที่แตกต่างไปจากสารที่มีอยู่เดิม และคาดว่าข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์สำหรับการศึกษาทางด้านอนุกรมวิธานของเชื้อและและวิทยาศาสตร์สาธารณสุขได้ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 3
# ระเบียบวิธีการดำเนินงานวิจัย

## 3.1 การเก็บตัวอย่าง การแยกและการคัดเลือกเชื้อ

### 3.1.1 การเก็บตัวอย่าง

ตัวอย่างที่เก็บ ได้แก่ ดินบริเวณเขตป่าชายเลนทั้งทางด้านอ่าวไทยจังหวัดเพชรบุรีและฝั่งทะเลอันดามันจังหวัดตรัง ทำการเก็บตัวอย่างดินปริมาณ 500 กรัม และรักษาตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส จนกระทั่งถึงกระบวนการแยกเชื้อ และทำการวัด pH ของดินตามวิธีของ Enokita *et al.* (1986)

### 3.1.2 การแยกเชื้อและคัดเลือกเชื้อที่ผลิตสารเจลดานามัยซินได้

การแยกเชื้อทำโดยวิธี Spread plate (Tortora *et al.*, 1995) โดยนำตัวอย่างดินมาตากให้แห้งในอุณหภูมิห้องและอบที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่าง 0.5 กรัม ใส่ในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาณ 4.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและเจือจางถึงระดับ 100 และ 1000 เท่า ดูดสารละลายตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร และเกลี่ยบนอาหาร humic acid-vitamin agar ที่ผสมสารปฏิชีวนะ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน เลือกเก็บโคโลนีที่เป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อแต่ละสกุล ทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหาร Yeast extract – Malt extract agar จากนั้นทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเอียง (slant) เพื่อใช้ทดสอบต่อไป

สำหรับการคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถสร้างสารเจลดานามัยซินได้ ทำการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร yeast extract – malt extract agar โดยการขีดเป็นเส้นตรงเดี่ยวยาวตามแนวนอนจากขอบหนึ่งถึงอีกขอบหนึ่ง บ่มเลี้ยงที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน เพื่อให้เชื้อผลิตสารและแพร่สารนั้นเข้าในเนื้อวุ้น จากนั้นตรวจสอบการผลิตสารที่มีฤทธิ์ด้วยจุลินทรีย์ทดสอบ 5 ชนิด ได้*แก่* *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Micrococcus luteus* ATCC 9341 *และ Candida albicans* ATCC 10231 โดยลากจุลินทรีย์ทดสอบให้ชิดและเป็นเส้นตรงตั้งฉากกับแนวของเชื้อมากที่สุด แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 วัน ตรวจสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยวัดระยะทางจากแนวของเชื้อจนถึงระยะที่จุลินทรีย์ทดสอบสามารถเจริญได้ จากนั้นนำเชื้อที่แสดงฤทธิ์ดังกล่าวมาเลี้ยงในอาหารเหลว นำน้ำหมักเชื้อมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 เพื่อแยกเอาส่วนน้ำใสและเซลล์ออกจากกัน จากนั้นนำส่วนน้ำใสมาทำการ partition กับ ethyl acetate แล้วนำไประเหยให้แห้งภายใต้การลดความดัน จะได้สารสกัดหยาบในส่วน ethyl acetate (crude EtOAc extract) นำสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สกัดที่ได้จุดลงบนแผ่น Silica gel TLC แล้วนำมา develop ด้วยระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมโดยใช้สารเจลดานามัยซินมาตรฐานเปรียบเทียบ

**3.2. การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อ**

ทำโดยอาศัยการศึกษาลักษณะต่าง ๆของเชื้อดังนี้

**3.2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีรวิทยาและชีวเคมี**

ตรวจสอบลักษณะทางการเจริญโดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารที่กำหนดอยู่ใน International *Streptomyces* Project (ISP) ชนิดต่าง ๆ โดยวิธี Crosshatch streak (Shiring and Gottlied, 1966) ตรวจผลโดยดูการเจริญ เนื้อและสีของโคโลนีด้านบน สีของโคโลนีด้านล่างและรงควัตถุที่ละลายน้ำได้เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (The Jacal Color Card L2200, Japan Color Research Institute) ตรวจดูลักษณะของเส้นใยและการสร้างสปอร์ด้วยเทคนิค Simple inclined coverslip (Williams and Cross, 1977) ตรวจดูลักษณะของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์และตรวจสอบลักษณะสปอร์ของเชื้อด้วย Scanning Electron Microscope (SEM) โดยวิธีการของศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีทำการตรวจสอบการสลายแป้ง การสลายไคติน การสลายเซลลูโลส การสลายโปรตีนในนม (Williams and Cross, 1971) การสลายเจลาติน การรีดิวซ์ไนเตรท (Arai, 1975) การผลิตไฮโดรเจนซัลไฟล์ การผลิตเมลานิน การทนอุณหภูมิ การทนเกลือ การทนความเป็นกรด-ด่าง และการใช้แหล่งคาร์บอน (Shiring and Gottlieb, 1966) จากการศึกษานี้จะสามารถจัดกลุ่มเชื้อเป็นกลุ่มต่างๆ และนำตัวแทนของเชื้อแต่ละกลุ่มมาศึกษาในขั้นต่อไป

**3.2.2 ศึกษาคุณสมบัติทางอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อ (Komagata and Suzuki, 1987)**

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแต่ละไอโซเลตในอาหารเหลว Yeast extract – Malt extract บนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน ทำการเก็บเกี่ยวเชื้อโดยการ centrifuge และทำให้เซลล์แห้งภายใต้ความเย็น (Freeze drying) นำเซลล์แห้งไปทดสอบทางอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อดังนี้

**3.2.2.1 การวิเคราะห์ผนังเซลล์**

ตรวจสอบ Diaminopimelic acid ของเชื้อ โดยสลายเซลล์แห้งด้วย 6N HCl ที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วนำไป spot บนแผ่น TLC (Merck No. 5716) Develop ด้วย methnol - water - 6N HCl - pyridine(80:26:4:10) ใช้ 0.5% ninhydrin solution ใน n-butanol พ่นแล้วให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส 2-3 นาที เพื่อดู spot ที่เกิดขึ้นเทียบกับ standard

**3.2.2.2 การวิเคราะห์ Whole cell sugar**

นำเซลล์แห้งมาไฮโดรไลส์ด้วย 1N $H_2SO_4$ ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นแล้วจึงเติม $Ba(OH)_2$ และปรับ pH อยู่ในช่วง 5.2-5.5 นำไปปั่นเหวี่ยง ดูดเอา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

supernatant มาทำให้แห้ง ละลายซ้ำด้วยน้ำ จากนั้น spot ลงบน cellulose TLC plate develop ด้วย butanol - water - pyridine - toluene (10:6:6:1) พ่นด้วย acid aniline phthalate อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที เทียบ spot ที่เกิดกับ standard

**3.2.2.3 การวิเคราะห์ Polar lipid**

เตรียม polar lipid จากการสกัดเซลล์แห้งด้วย methanol ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งให้เย็นแล้วสกัดต่อด้วยchloroform กรองกากเซลล์(debris) ออก ทำการ partition ด้วย chloroform และ saline นำชั้น chloroform ไประเหยให้แห้ง ละลายซ้ำด้วย chloroform - methanol และดูดสารตัวอย่าง spot ลงบน HPTLC (Merck Kieselgel 60 $F_{254}$, 10x10 cm) ทำการ develop 2 ทิศทาง (two-dimensional development) ด้วย solvent system 2 ชนิด คือ chloroform - methanol - water (65:25:4) และ chloroform – acetic acid - methanol - water (80:18:12:5) แล้วพ่นด้วย50% sulfuric acid อบที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที สังเกต spot ที่เกิดขึ้น

**3.2.2.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมัน (Cellular fatty acid)**

เตรียม methyl ester ของกรดไขมัน จากเซลล์แห้งโดยไฮโดรไลส์ด้วยสารละลาย methanolic hydrochloric acid ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วสกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ แล้ววิเคราะห์ด้วย gas liquid chromatography

**3.2.2.5 การวิเคราะห์ Isoprenoid quinone**

นำเซลล์แห้งสกัดด้วย chloroform - methanol อัตราส่วน 2:1 บนเครื่องเขย่า 1 คืน จากนั้นกรองและทำให้แห้ง ละลายซ้ำด้วย acetone แล้วทำให้บริสุทธิ์บนแผ่น TLC (Merck. No. 1.05715 Kieselgel 60 $F_{254}$, 20x20 cm) แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วย HPLC

**3.2.3 การวิเคราะห์ลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอในช่วง 16S rRNA gene และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ**

นำ DNA ที่แยกได้ (Tamaoka, 1994) มาเพิ่มปริมาณ DNA ในช่วง 16S rDNA โดยใช้ Universal primer ทำปฏิกิริยาในเครื่อง DNA Thermal cycler (GeneAmp PCR System 9700; Applied Biosystems) 16S rDNA ที่เพิ่มปริมาณได้จะถูกทำให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์ลำดับเบสโดยใช้ ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystem) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะถูกทำการเปรียบเทียบ และalignment กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ Genbank/EMBL/DDBJ โดยใช้BLAST n program และ alignment software (ในกรณีนี้ใช้ CLUSTAL W program package) จำลองข้อมูลเป็น multi-data set และสร้าง phylogenetic trees ใน MEGA software program version 2.1 และวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**3.2.4 การวิเคราะห์ DNA base composition (Tamaoka, J., 1994.)**

**3.2.4.1 การแยก DNAและทำให้บริสุทธิ์**

เลี้ยงเชื้อใน Yeast extract – Malt extract broth เป็นเวลา 3 วัน ทำการเก็บเกี่ยวเชื้อและล้างด้วย saline-EDTA ทำให้เซลล์แตกด้วย lysozyme และ Tris-SDS solution จากนั้นสกัดด้วย phenol และ chloroform ตกตะกอน DNA ด้วย cool ethanol กำจัด RNA และโปรตีน ด้วยการเติม RNase solution และproteinase K และเก็บ DNA ที่ได้ไว้ที่ –20 องศาเซลเซียส ใน ethanol

**3.2.4.2 การวิเคราะห์**

เตรียม nucleoside ของ DNA แต่ละไอโซเลต จากการไฮโดรไลส์ 10 μl heated DNA (1 mg/ml) ด้วย 10 μl nuclease $P_1$ บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และไฮโดรไลส์ต่อด้วย 10 μl alkaline phosphatase ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC

**3.2.5 Photobiotin labeling DNA-DNA Hybridization**

**3.2.5.1 Immobilization of DNA in microtiter plate**

หยด 100 μl ของสารละลาย heat – denatured DNA (1 μg DNA / well) ของ type strain, control DNA (calf thymus หรือ *E. coli*) และ DNA ของเชื้อ unknown บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง แล้วเทสารละลาย DNA นั้นทิ้ง ล้างด้วย PBS ปล่อยให้แห้งที่ 45-60 องศาเซลเซียส

**3.2.5.2 DNA labeling with photobiotin ( DNA probe )**

เตรียมสารละลาย DNA ของ type strain ในหลอด eppendrot เติมสารละลาย photobiotin ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวางในน้ำแข็ง เปิดฝาไว้แล้วส่องด้วยแสงจากหลอด sunlamp เติม 0.1M Tris-HCl buffer (pH 9.0) และ n-butanol ปั่นด้วย vortex ปั่นเหวี่ยงที่ 12000 rpm นาน 20 นาที นำสารละลายชั้นบนทิ้ง เติม n-butanol และปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง ทิ้งสารละลายชั้นบน นำ DNA ที่ติดฉลากแล้วไปต้มในน้ำเดือด 15 นาที ทำให้เย็นอย่างรวดเร็วและนำไป sonicate แล้วนำไปผสมกับ hybridization solution

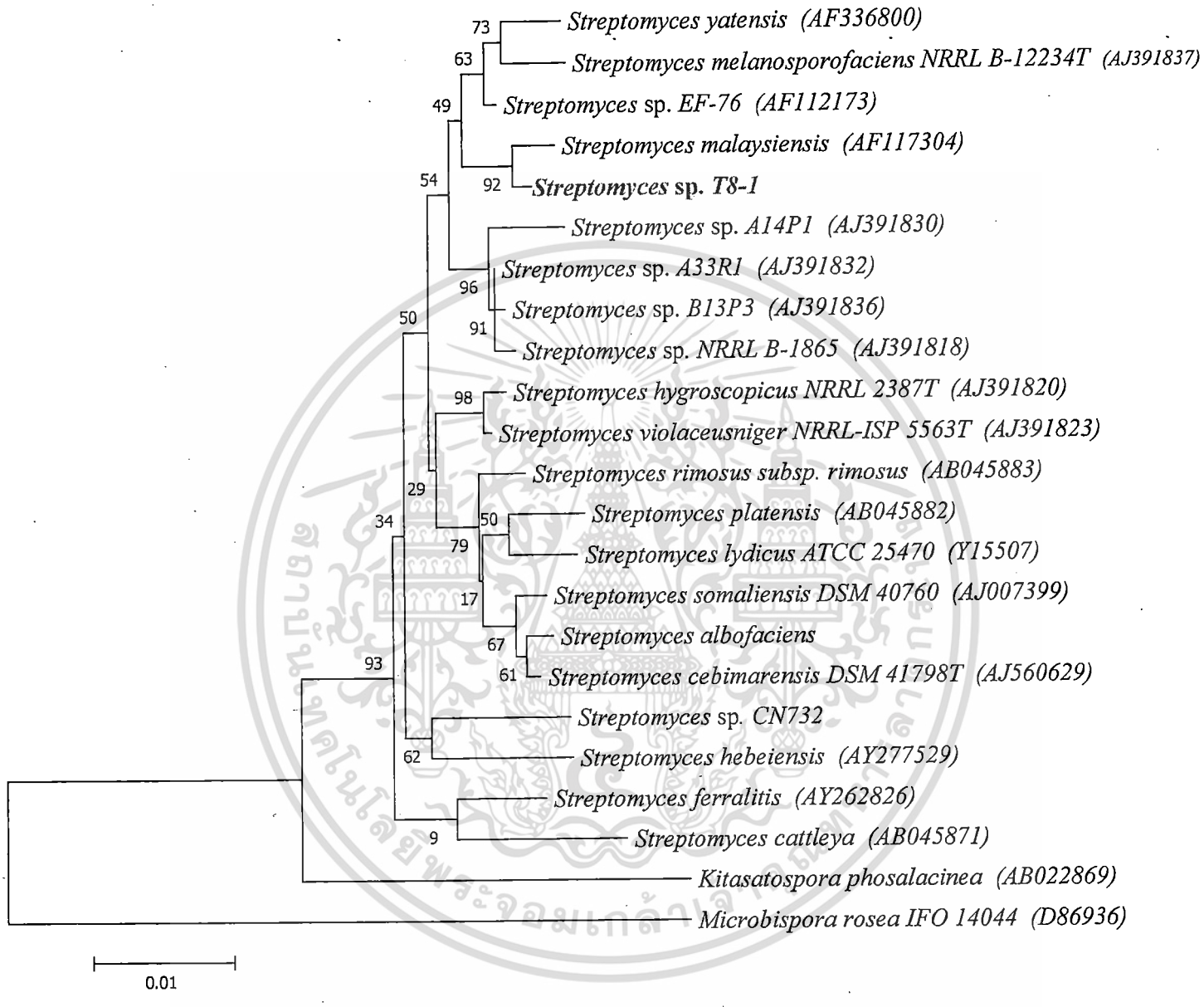
**3.2.5.3 Prehybridization**

หยดสารละลาย prehybridization ลงแต่ละหลุมของ plate บ่มไว้นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิสำหรับ hybridize แล้วเทสารละลายนี้ทิ้ง

**3.2.5.4 Hybridization**

หยดสารละลายที่ผสม DNA probe ของ type strain ลงแต่ละหลุม ปิด plate ด้วยแผ่นพลาสติก บ่มไว้ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม 12 ชั่วโมง แล้วทิ้งสารละลายนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




รูปที่ 4 แสดงตำแหน่งของเชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์พีทีแปด (*Streptomyces* sp. T8-1) บนต้นไม้สายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree, NJ method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

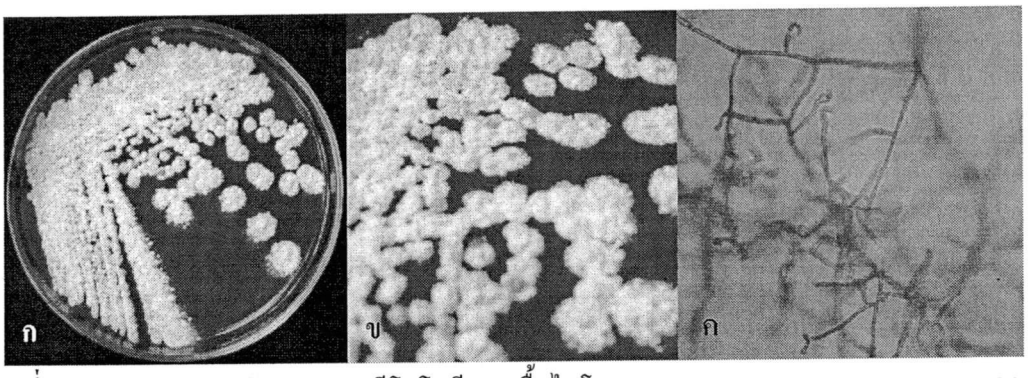
**กลุ่มที่ 3** เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่เจริญได้ดีในอาหาร ISP2 สร้างเส้นใยอากาศสีขาวอมเทา (grayish white) เส้นใยอาหารสีเหลืองอมเทา (yellowish gray) ไม่มีการสร้างรงควัตถุ และลักษณะของสปอร์เป็นแบบสายโซ่ยาวปลายโค้งงอ จากข้อมูลทางสัณฐานวิทยาพบว่ามีลักษณะคล้ายกับเชื้อแอคติโนมัยสีทในสกุล *Streptomyces* (รูปที่ 5) มีสมาชิก 2 ไอโซเลต ได้แก่ T2-1 และ T2-2

สมาชิกในกลุ่มนี้สามารถเจริญบนอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดได้ที่ร้อยละ 5 ช่วงความเป็นกรด-ด่างที่ 6-9 อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 40 องศาเซลเซียส และสามารถย่อยสลายโปรตีนในนม ตกตะกอนโปรตีนในนม รวมทั้งสามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ แต่ไม่สามารถย่อยสลายเจลาตินและแป้งได้ เชื้อสมาชิกในกลุ่มนี้สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเจริญของเชื้อ *S. aureus* ได้ (ตารางที่ 4)

ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยกรดกลูตามิก อะลานีน และกรดไดอะมิโนพิมีลิกแบบ LL (cell wall type 1) พบน้ำตาลกลูโคส แมนโนส แรมโนส ไรโบส และกาแลคโตส เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) พบฟอสฟาติดิลเอทาโนลามีน (phosphatidylethanolamine) ไดฟอสฟาติดิลกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) ฟอสฟาติดิลอินโนซิทอล (phosphatidylinositol) ฟอสฟาติดิลกลีเซอรอล (phosphatidylglycerol) ฟอสฟาติดิลโคลีน (phosphatidylcholine) เป็นฟอสโฟไลปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Streptomyces*

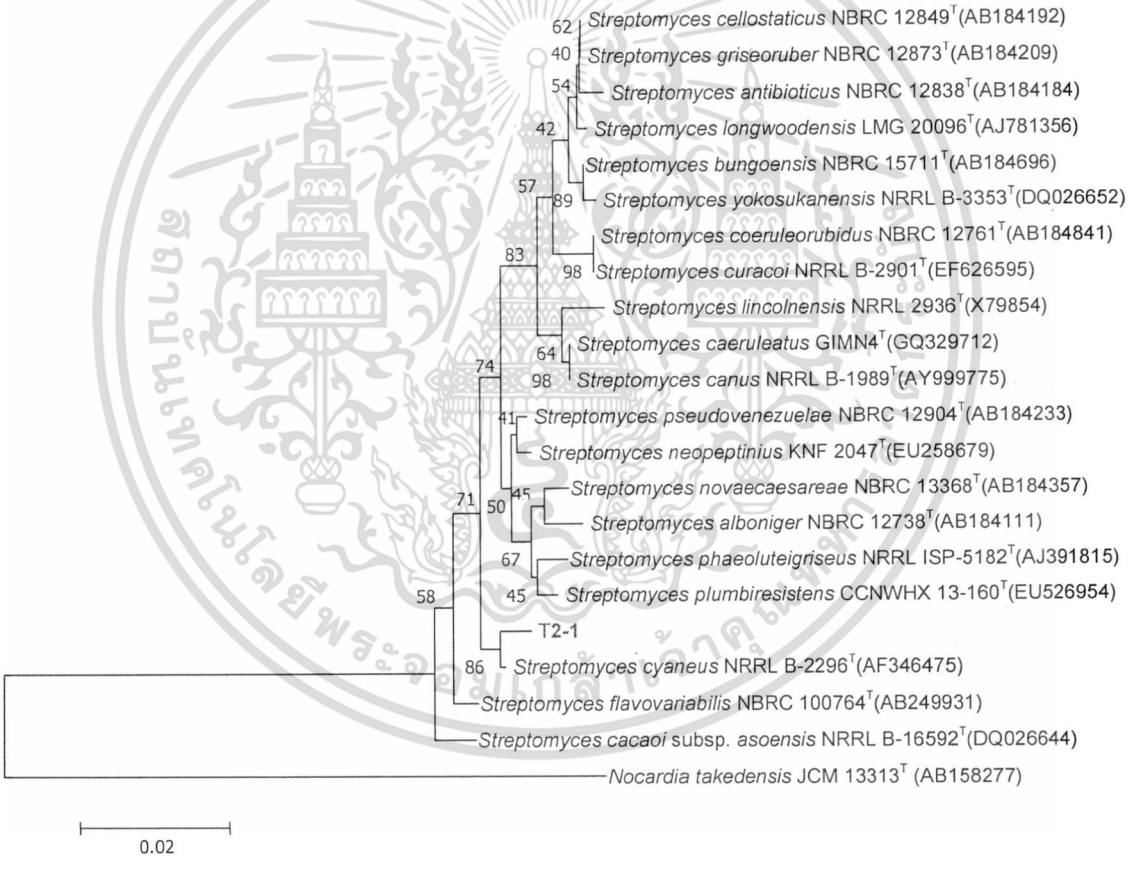
เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces cyaneus* NRRL B-2296$^{T}$ มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ร้อยละ99.61 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ การทำซ้ำ (bootstap values) บนสายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ร้อยละ86 (รูปที่ 6)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 5** ก. และ ข. แสดงลักษณะและสีโคโลนีของเชื้อไอโซเลต T2-1 บนอาหารISP2 ระยะเวลา 21 วัน

ค. แสดงลักษณะเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์วัตถุ Long-working distance




รูปที่ 6 แสดงตำแหน่งของเชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์ทีสองขีดหนึ่ง (*Streptomyces* sp. T2-1) บนต้นไม้สายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree, NJ method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4** ลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยสีท

| กลุ่มที่ | รหัสเชื้อ | ความเข้มข้นของเกลือ(%) | | | | | | | พีเอช | | | | | อุณหภูมิ (°C) | | | | | Skim milk | | Gelatin liquefaction | Nitrate reduction | Starch hydrolysis | Antimicrobial activities (Inhibition zone, mm) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1.5 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 4 | 4.5 | 5 | 7 | 9 | 20 | 37 | 40 | 45 | 50 | Peptonization | Coagulation | | | | *B.subtilis* | *M.luteus* | *S.aureus* | *E.coli* | *Ps.aeruginosa* | *C.albicans* |
| 1 | P1-1 | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | + | + | + | + | - | - | - | + | + | + | + | + | - | 21 | 14 | - | - | - |
| | P1-2 | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | + | + | + | + | - | - | - | + | + | + | + | + | - | 17 | 11 | - | - | - |
| | P1-3 | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | + | + | + | + | - | - | - | + | + | + | + | + | - | 21 | 14 | - | - | - |
| | P1-4 | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | + | + | + | + | - | - | - | + | + | + | + | + | - | 24 | 18 | - | - | - |
| | P1-5 | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | + | + | + | + | - | - | - | + | + | + | + | + | - | 22 | 11 | - | - | - |
| | P1-6 | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | + | + | + | + | - | - | - | + | + | + | + | + | - | 21 | 18 | - | - | - |
| | P1-7 | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | + | + | + | + | - | - | - | + | + | + | + | + | - | 22 | 18 | - | - | - |
| | P1-8 | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | + | + | + | + | - | - | - | + | + | + | + | + | - | 22 | 12 | - | - | - |
| | P8-5 | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | + | + | + | + | - | - | - | + | + | + | + | + | - | 23 | 18 | - | - | - |
| | P8-6 | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | + | + | + | + | - | - | - | + | + | + | + | + | - | 21 | 12 | - | - | - |

**ตารางที่ 4** ลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยสีท (ต่อ)

| กลุ่มที่ | รหัสเชื้อ | ความเข้มข้นของเกลือ(%) | | | | | | | พีเอช | | | | | อุณหภูมิ (°C) | | | | | Skim milk | | Gelatin liquefaction | Nitrate reduction | Starch hydrolysis | Antimicrobial activities (Inhibition zone, mm) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1.5 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 4 | 4.5 | 5 | 7 | 9 | 20 | 37 | 40 | 45 | 50 | Peptonization | Coagulation | | | | *B.subtilis* | *M.luteus* | *S.aureus* | *E.coli* | *Ps.aeruginosa* | *C.albicans* |
| 2 | T8-1 | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | - | - | - | + | + | + | + | + | 14 | 17 | 16 | 12 | - | 14 |
| | T8-2 | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | - | - | - | + | + | + | + | + | 11 | 17 | 15 | 12 | - | 11 |
| | T8-3 | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | - | - | - | + | + | + | + | + | 12 | 15 | 16 | 18 | - | 13 |
| | T8-4 | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | - | - | - | + | + | + | + | + | 11 | 12 | 16 | 12 | - | 12 |
| | T2-3 | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | - | - | - | + | + | + | + | + | 12 | 17 | 18 | 12 | - | 12 |
| | T2-4 | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | - | - | - | + | + | + | + | + | 12 | 17 | 18 | 12 | - | 11 |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ตารางที่ 4** ลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยสีท (ต่อ)

| กลุ่มที่ | รหัสเชื้อ | ความเข้มข้นของเกลือ(%) | | | | | | | พีเอช | | | | | อุณหภูมิ (°C) | | | | | Skim milk | | Gelatin liquefaction | Nitrate reduction | Starch hydrolysis | Antimicrobial activities (Inhibition zone, mm) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1.5 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 4 | 4.5 | 5 | 6 | 9 | 20 | 37 | 40 | 45 | 50 | Peptonization | Coagulation | | | | *B.subtilis* | *M.luteus* | *S.aureus* | *E.coli* | *Ps.aeruginosa* | *C.albicans* |
| 3 | T2-1 | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | - | - | + | + | - | + | - | - | - | 15 | - | - | - |
| | T2-2 | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | - | - | + | + | - | + | - | - | - | 13 | - | - | - |

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

**4.3 การแยกเชื้อและคัดเลือกเชื้อที่ผลิตสารเจลดานามัยซินได้**

จากจำนวนเชื้อแอคติโนมัยสีทั้งหมด 18 ไอโซเลต พบว่า เชื้อแอคติโนมัยสีทในกลุ่มที่ 2 ซึ่งมีสมาชิกจำนวน 6 ไอโซเลต สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Micrococcus luteus* ATCC 9341 และ *Candida albicans* ATCC 10231 ได้สอดคล้องกับฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบของสารเจลดานามัยซิน รวมทั้งสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซีเตตของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 2 คือไอโซเลต T8-1 แสดงองค์ประกอบของสารที่มีค่า $R_f$ = 0.4 ซึ่งเท่ากันกับค่า $R_f$ ของสารมาตรฐานเจลดานามัยสิน เมื่อ develop ในระบบตัวทำละลายที่ประกอบด้วย ไดคลอโรมีนเทน ต่อ เมทานอล ในอัตราส่วน 9:1 ดังนั้นแสดงว่าสารดังกล่าวเป็นสารเจลดานามัยซิน

**4.4 การศึกษาปัจจัยการผลิตสารและการสกัดแยกสาร**

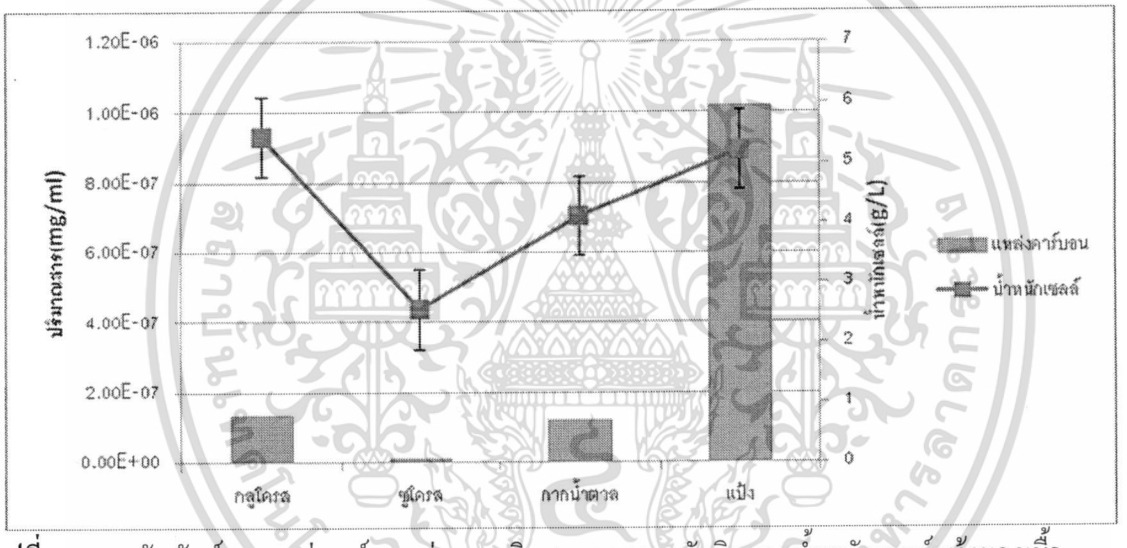
**4.4.1 การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารเจลดานามัยซินจากเชื้อสเตรปโตมัยเซส สายพันธุ์เอ็มเอ เก้า (*Streptomyces* sp. T8-1)**

เมื่อทำการผันแปรแหล่งคาร์บอนได้แก่ กลูโคส ซูโครส กากน้ำตาลและแป้ง พบว่าเชื้อมีการผลิตสารเจลดานามัยซินปริมาณมากที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนคือแป้งโดยสามารถผลิตสารเจลดานามัยซินได้ $1.02\times10^{-6}$ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีน้ำหนักเซลล์แห้ง 5.21กรัมต่อลิตร รองลงมาคืออาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคสโดยเชื้อสามารถผลิตสารเจลดานามัยซินได้ $1.4\times10^{-7}$ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีน้ำหนักเซลล์แห้ง 5.41 กรัมต่อลิตร ในขณะเดียวกันอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนคือกลูโคสพบว่าเชื้อมีอัตราการเจริญสูงสุดคือมีน้ำหนักเซลล์แห้ง5.41กรัมต่อลิตร จากการศึกษานี้พบว่าเชื้อ *Streptomyces* sp. T8-1 สามารถเจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส ซึ่งสอดคล้องกับ Singh และคณะ (2009) ที่พบว่าเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส ทำให้เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดเช่นกัน แต่การศึกษาในครั้งนี้พบว่าเชื้อ *Streptomyces* sp. T8-1 สามารถผลิตสารทุติยภูมิได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่มีแป้งเป็นส่วนประกอบ ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของนักวิทยาศาสตร์ในหลายๆบทความที่มักสรุปว่าเชื้อแอคติโนมัยสีทจะสามารถสร้างสารทุติยภูมิได้ดีเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 5** แสดงความสัมพันธ์ของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและการผลิตสารเจลดานามัยซิน

| แหล่งคาร์บอน | ปริมาณสาร (กรัมต่อลิตร) | น้ำหนักเซลล์แห้ง (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) |
|---|---|---|
| กลูโคส | $1.37\times10^{-7}$ | 5.44 |
| ซูโครส | $1.21\times10^{-8}$ | 2.54 |
| กากน้ำตาล | $1.21\times10^{-7}$ | 4.11 |
| แป้ง | $1.02\times10^{-6}$ | 5.21 |




**รูปที่ 7** ความสัมพันธ์ของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตสารเจลดานามัยซินและน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อ *Streptomyces* sp. T8-1

**4.4.2 การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารเจลดานามัยซินของเชื้อ *Streptomyces* sp. T8-1**

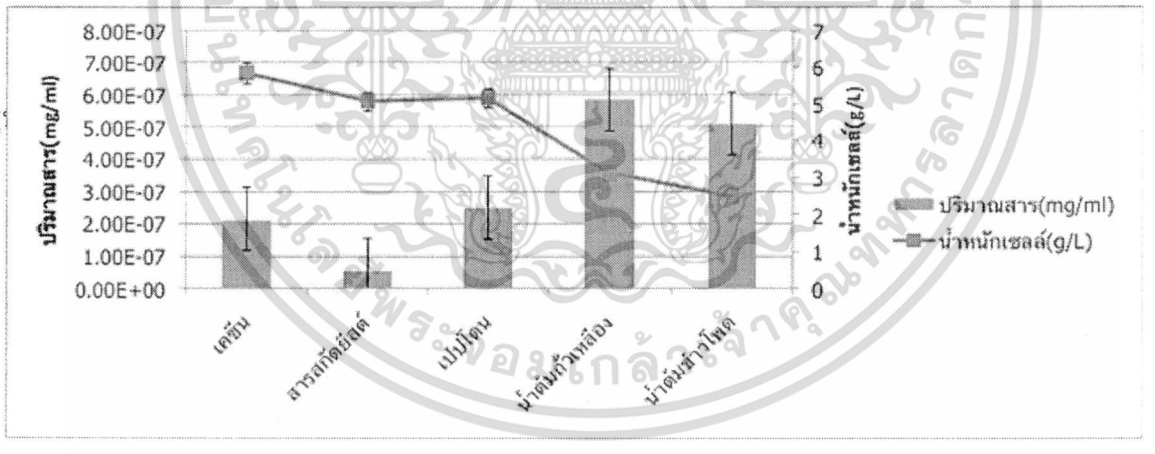
เมื่อทำการผันแปรแหล่งไนโตรเจนได้แก่ เคซีน สารสกัดจากยีสต์ เปปโตน น้ำต้มถั่วเหลือง และน้ำต้มข้าวโพด พบว่าเชื้อมีการผลิตสารเจลดานามัยซินปริมาณมากที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนคือน้ำต้มถั่วเหลือง โดยสามารถผลิตสารเจลดานามัยซินได้ $5.85\times10^{-7}$ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีน้ำหนักเซลล์แห้ง 3.08 กรัมต่อลิตร รองลงมาคืออาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจน เป็นน้ำต้มข้าวโพดโดยเชื้อสามารถผลิตสารเจลดานามัยซินได้ $5.10\times10^{-7}$ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีน้ำหนักเซลล์แห้ง 2.49 กรัมต่อลิตร ในขณะเดียวกันอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจน คือ เคซีน พบว่าเชื้อมีอัตราการเจริญสูงสุดคือมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำหนักเซลล์แห้ง 5.83 กรัมต่อลิตร จากการศึกษานี้พบว่าเชื้อ *Streptomyces* sp. T8-1 สามารถสารทุติยภูมิได้ดีที่สุดในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นน้ำต้มถั่วเหลืองซึ่งสอดคล้องกับ Singh และคณะ (2009) ที่พบว่าเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจน เป็นอาหารที่มีส่วนประกอบของถั่วเหลืองจะทำให้เชื้อสามารถผลิตสารทุติยภูมิได้ดีที่สุดเช่นกัน แต่การศึกษาในครั้งนี้พบว่าเชื้อ *Streptomyces* sp. T8-1 สามารถเจริญได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่มีเคซีนเป็นส่วนประกอบ ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ Singh และคณะ (2009) ที่สรุปว่าเชื้อแอคติโนมัยสีทจะสามารถเจริญได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีส่วนประกอบของถั่วเหลือง เป็นแหล่งไนโตรเจน

**ตารางที่ 6** แสดงความสัมพันธ์ของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและการผลิตสารเจลดานามัยซิน

| แหล่งไนโตรเจน | ปริมาณสาร (กรัมต่อลิตร) | น้ำหนักเซลล์(มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) |
|---|---|---|
| เคซีน | $2.15\times10^{-7}$ | 5.83 |
| สารสกัดยีสต์ | $5.68\times10^{-8}$ | 5.06 |
| เปปโตน | $2.50\times10^{-7}$ | 5.15 |
| น้ำต้มถั่วเหลือง | $5.85\times10^{-7}$ | 3.08 |
| น้ำต้มข้าวโพด | $5.10\times10^{-7}$ | 2.5 |




**รูปที่ 8** ความสัมพันธ์ของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตสารเจลดานามัยซินและน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อ *Streptomyces* sp. T8-1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

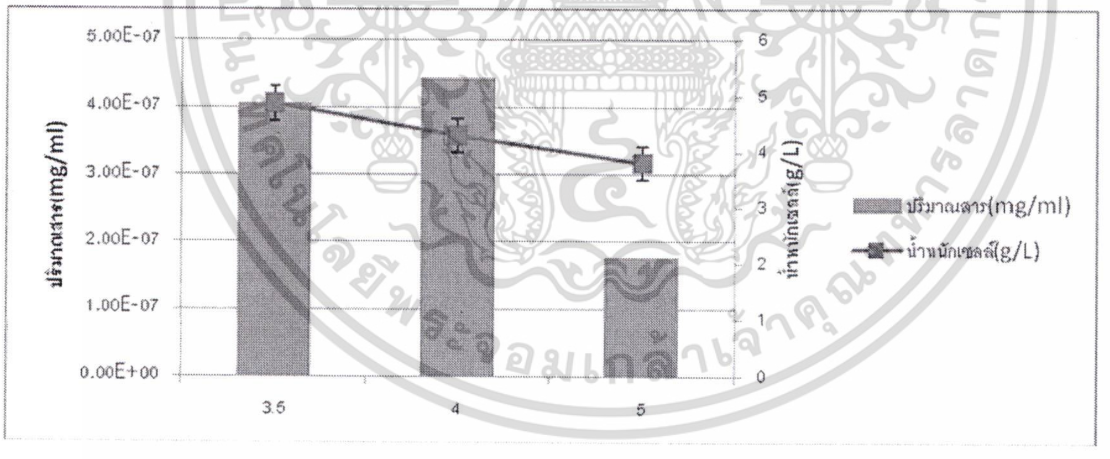


**4.4.3 การศึกษาความเข้มข้นของเกลือที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารเจลดานามัยซิจาก เชื้อ** *Streptomyces* sp. T8-1

เมื่อทำการผันแปรความเข้มข้นของเกลือ ในความเข้มข้นร้อยละ 3.5 4 และ 5 พบว่าเชื้อมีการผลิตสารเจลดานามัยซินปริมาณมากที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นเกลือร้อยละ 4 โดยสามารถผลิตสารเจลดานามัยซินได้ $4.4\times 10^{-7}$ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและมีน้ำหนักเซลล์แห้ง 4.30 กรัมต่อลิตร รองลงมาคืออาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นเกลือร้อยละ 3.5 โดยเชื้อสามารถผลิตสารเจลดานามัยซินได้ $4.06\times10^{-7}$ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและมีน้ำหนักเซลล์แห้ง 4.87 กรัมต่อลิตร ซึ่งไม่สอดคล้องกับการวิจัยของนักวิทยาศาสตร์ในหลายๆบทความทั้งนี้เนื่องจากเชื้อแอคติโนมัยสีทในแต่ละสายพันธุ์มีความต้องการความเข้มข้นของเกลือต่อการเจริญและการสร้างสารทุติยภูมิที่แตกต่างกัน

**ตารางที่** 7 แสดงความสัมพันธ์ของความเข้มข้นเกลือต่อการเจริญและการผลิตสารเจลดานามัยซิน

| ความเข้มข้นของเกลือร้อยละ | ปริมาณสาร (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) | น้ำหนักเซลล์ (กรัมต่อลิตร) |
|---|---|---|
| 3.5 | $4.06\times10^{-7}$ | 4.87 |
| 4 | $4.4\times 10^{-7}$ | 4.30 |
| 5 | $1.77\times10^{-7}$ | 3.81 |



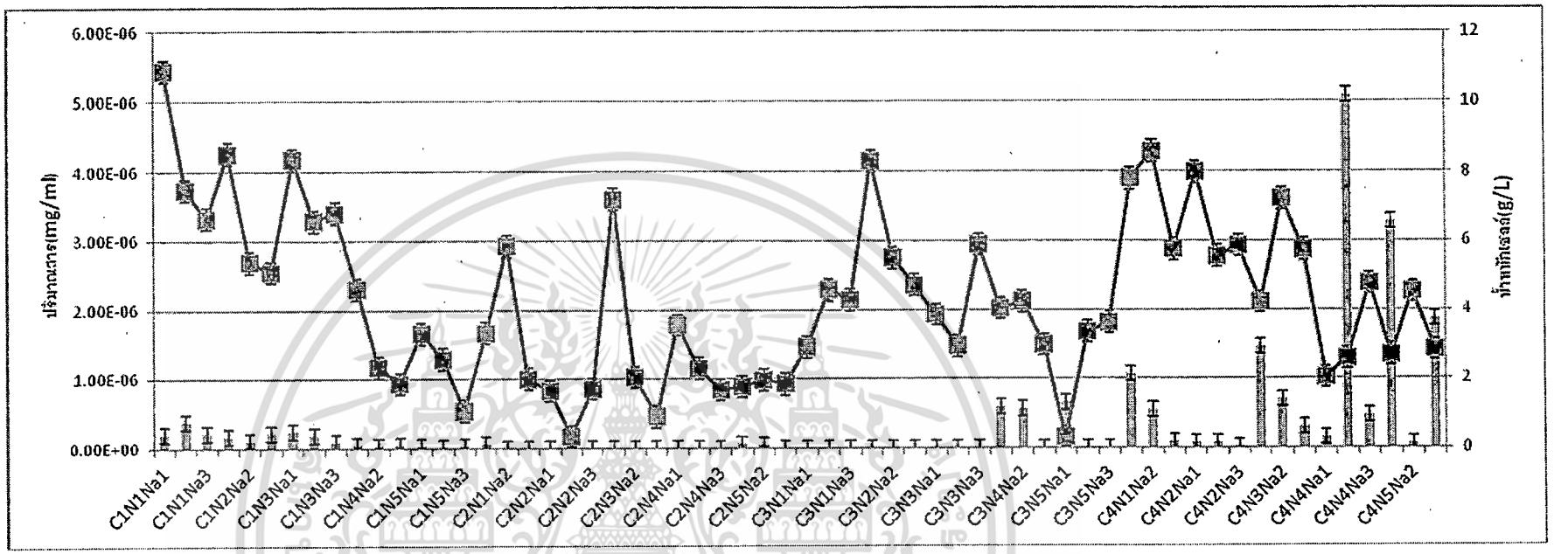

**รูปที่ 9** ความสัมพันธ์ของความเข้มข้นเกลือต่อการผลิตสารเจลดานามัยซินและน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อ *Streptomyces* sp. T8-1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

130302

ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารเจลดานามันซินจากเชื้อ *Streptomyces* sp. T8-1 จากแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และความเข้มข้นของเกลือ พบว่าอาหารสูตรซีสี่เอ็นสี่เอ็นเอสอง ($C_4N_4Na_2$) ซึ่งประกอบไปด้วย แป้ง น้ำต้มถั่วเหลือง และความเข้มข้นเกลือร้อยละ 4 เหมาะสมต่อการผลิตสารเจลดานามัยซินมากที่สุด โดยสามารถผลิตสารเจลดานามัยซิน $5.09\times10^{-6}$ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และน้ำหนักเซลล์แห้ง 2.6 กรัมต่อลิตร แต่อาหารสูตรซีหนึ่งเอ็นหนึ่งเอ็นเอหนึ่ง ($C_1N_1Na_1$) ที่ประกอบด้วย กลูโคส เคซีนและความเข้มข้นเกลือร้อยละ 3.5 เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อมากที่สุดโดยให้ปริมาณน้ำหนักแห้งของเซลล์มากที่สุดที่ 10.9 กรัมต่อลิตร แต่ผลิตสารเจลดานามัยซินได้น้อย จากการทดลองจะเห็นว่าการผลิตสารเจลดานามัยซินและการเจริญของเชื้อนี้ในอาหารสูตรต่างๆไม่มีความสัมพันธ์กัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**หมายเหตุ** แสดงปริมาณสารเจลดานามัยซิน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)

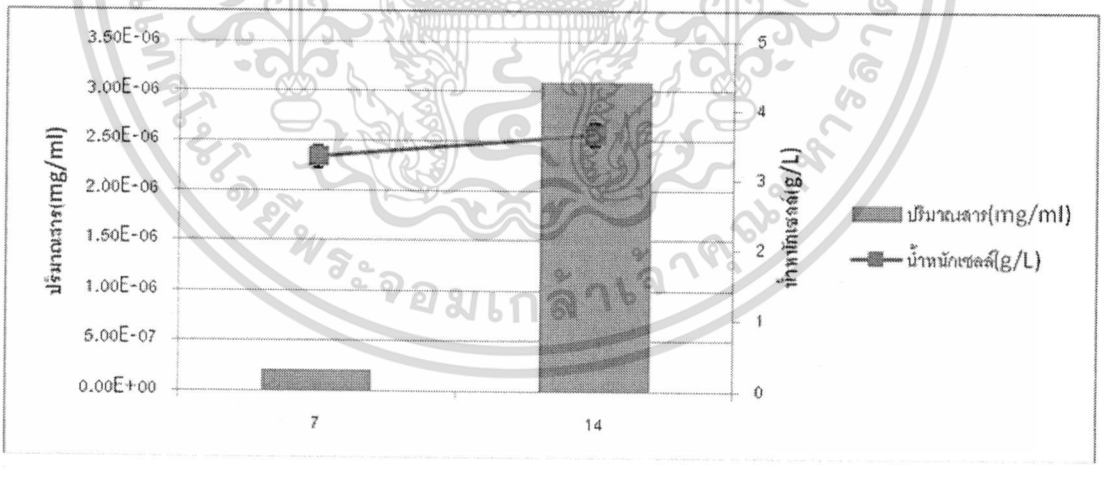
**รูปที่ 10** ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารเจลดานามัยซินและน้ำหนักเซลล์แห้งตามแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นของเกลือ

**4.4.4 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารเจลดานามัยซิน จากเชื้อ *Streptomyces* sp. T8-1**

เมื่อทำการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารเจลดานามันซินจากเชื้อ *Streptomyces* sp. T8-1ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรซีสี่เอ็นสี่เอ็นเอสอง ($C_4N_4Na_2$) พบว่าเชื้อมีการเจริญและผลิตสารเจลดานามัยซินสูงสุดเมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 14 วัน โดยสามารถผลิตสารเจลดานามัยซินได้ $3.09\times10^{-6}$ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและมีน้ำหนักเซลล์แห้ง 3.66 กรัมต่อลิตรซึ่งไม่สอดคล้องกับการวิจัยของ Singh และคณะ (2009) ที่รายงานว่าเชื้อแอคติโนมัยสีทที่ศึกษาสามารถเจริญและสร้างสารทุติยภูมิได้ดีเมื่อทำการเลี้ยงเป็นเวลา อย่างน้อยที่สุด 6 วัน ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อแอคติโนมัยสีทในแต่ละสายพันธุ์มีอัตราการเจริญและสร้างสารทุติยภูมิที่แตกต่างกัน

**ตารางที่ 8** แสดงความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการเจริญและการผลิตสารเจลดานามัยซิน

| วัน (เวลา) | ปริมาณสาร (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) | น้ำหนักเซลล์(กรัมต่อลิตร) |
|---|---|---|
| 7 | $2.03\times10^{-7}$ | 3.33 |
| 14 | $3.09\times10^{-6}$ | 3.66 |

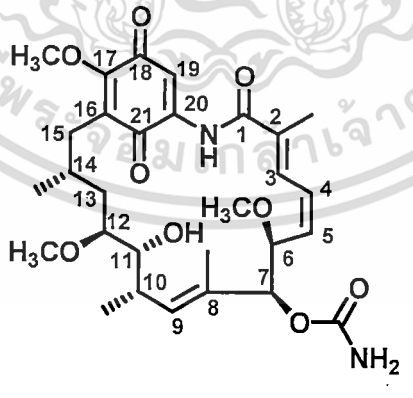



**รูปที่ 11**ความสัมพันธ์ของระยะเวลาต่อการผลิตสารเจลดานามัยซินและน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อ *Streptomyces* sp. T8-1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**4.5 การสกัดและแยกสารเจลดานามัยซินให้บริสุทธิ์ การพิสูจน์สูตรโครงสร้างทางเคมีและกำหนดเอกลักษณ์ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้**

**สาร T8-1-1A แยกได้จากสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซีเตตของน้ำหมักจากเชื้อตัวแทนกลุ่มที่ 2 คือ** *Streptomyces* sp. T8-1 **สารชนิดนี้มีลักษณะเป็นผงสีเหลือง มีค่าดูดกลืนรังสีอินฟราเรด (IR spectrum) ที่** 3,450 $cm^{-1}$ (O-H stretching), 1,689 $cm^{-1}$ (C=O stretching) and 1,649 $cm^{-1}$ (C=O stretching, amide I band) **จากการหาน้ำหนักโมเลกุลโดย** HRFABMS **พบซูโดไอออนพีก** [M+Na]+ **ที่** *m/z* 583.2667 (calculate for $C_{29}H_{40}N_2O_9Na$ at 583.2632) **จากผลของการวิเคราะห์ด้วย** $^1$NMR spectroscopic **พบว่า สารนี้ประกอบด้วยเมทิลโปรตอนจำนวน 4 โปรตอน มีหมู่เมทอกซี จำนวน 3 หมู่ เมทิลลีนโปรตอน จำนวน 2 โปรตอน มีไทล์โปรตอน จำนวน 11 โปรตอน และประกอบด้วย 3 โปรตอนแลกเปลี่ยน** (exchangeable protons) **จากการศึกา** $^{13}$C NMR **พบว่า สารนี้ประกอบไปด้วยคาร์บอน จำนวน 29 ตัว จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค** DEPT135 **ทำให้เราทราบว่าสารชนิดนี้ประกอบด้วย เมทิลคาร์บอน จำนวน 4 อะตอม เมทอกซีคาร์บอน จำนวน 3 อะตอม เมทิลลีนคาร์บอน จำนวน 2 อะตอม มีไทล์คาร์บอนจำนวน 11 อะตอม และ ควอเทอร์นารี คาร์บอน** (quaternary carbon) **จำนวน 9 อะตอม จากการวิเคราะห์** $^{13}$C NMR **ยังยืนยันได้ว่าสารนี้ประกอบไปด้วยหมู่คาร์บอนิลของควิโนน จำนวน 2 หมู่ เอไมด์คาร์บอนิลคาร์บอน จำนวน 1 หมู่ และ คาร์บาเมทคาร์บอน จำนวน 1 หมู่ จากการเปรียบเทียบสัญญาณของ** $^1$H **และ** $^{13}$C NMR **ดังกล่าว สรุปได้ว่าสาร T8-1-1A เป็นสารเจลดานามัยซิน (รูปที่ 12)**




**รูปที่ 12** โครงสร้างของสาร T8-1-1A

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบข้อมูลของ $^{1}H$ และ $^{13}C$-NMR ระหว่างสาร T8-1-1A และ สารมาตรฐานเจลดานามัยซิน

| ตำแหน่ง | สาร T8-1-1A [a] | | เจลดานามัยซิน | |
|---|---|---|---|---|
| | $\delta_C$ (ppm) | $\delta_H$ (ppm), mult, (*J* in Hz) | $\delta_C$ (ppm) | $\delta_H$ (ppm), mult[c] |
| 1 | 167.91 | - | 169.1 | - |
| 2 | 134.56 | - | 133.2 | - |
| 2-Me | 12.5 | 1.89, 3H, s | 12.2 | 1.91, 3H |
| 3 | 126.89 | 6.89, d, (12) | 128.4 | 6.95, d |
| 4 | 126.11 | 6.53, t, (12, 11) | 125.7 | 6.56, t |
| 5 | 136.2 | 5.83, t, (11, 10) | 137.8 | 5.80, t |
| 6 | 81.23 | 4.25, d, (10) | 81.6 | 4.34, d |
| 6-OMe | 57.3 | 3.25, 3H, s | 56 | 3.22, 3H, s* |
| 7 | 81.62 | 5.14, brs | 80.6 | 4.86, brs |
| 7-$OCONH_2$ | 155.75 | 4.80, $NH_2$, brs | 156 | 6.45, $NH_2$, brs |
| 8 | 133.1 | - | 132.6 | - |
| 8-Me | 13 | 1.75, 3H, s | 12.5 | 1.61, 3H, brs |
| 9 | 132.94 | 5.77, d, (10) | 131.9 | 5.51, d |
| 10 | 32.26 | 2.73, m | 32.1 | 3.61 |
| 10-Me | 12.66 | 0.93, 3H, d, (7) | 23.3 | 0.97, 3H, d[#] |
| 11 | 72.6 | 3.48, m | 71.9 | 3.29** |
| 11-OH | - | 3.01, OH, brs | - | - |
| 12 | 80.91 | 3.35, m | 80.2 | 3.07** |
| 12-OMe | 56.75 | 3.31, 3H, s | 56.5 | 3.23, 3 H, s* |
| 13 | 34.74 | 1.73, 2H, m | 31 | 1.45, 2H, brs |
| 14 | 27.97 | 1.63, brs | 26.6 | 1.91 |
| 14-Me | 23.04 | 0.92, 3H, d (6) | 13 | 0.76, 3H[#] |
| 15 | 32.83 | 2.41, 2H, m | 31.7 | 2.42, 2H, m |
| 16 | 127.39 | - | 128.1 | 2.42, m |
| 17 | 156.73 | - | 156.4 | - |
| 17-OMe | 61.68 | 4.08, 3H, s | 61 | 3.93, 3H, s |
| 18 | 183.85 | - | 183.6 | - |
| 19 | 111.6 | 7.22, s | 110.9 | 7.02, s |
| 20 | 137.84 | - | 139.6 | - |
| 21 | 184.68 | - | 183.1 | - |
| NH | - | 8.67, NH, brs | - | 9.14, NH, brs |

[a]observed in CDCl3 and recorded at 300 MHz (1H) and 75 MHz (13C).
[b]observed in DMSO-*d6* (Omura *et al.*, 1979)
[c]observed in DMSO-*d6* (Rinehart, Jr. And Shield, 1976)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 5
# สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทจากตัวอย่างดินบริเวณป่าชายเลนและดินตะกอนใต้ทะเล จังหวัดเพชรบุรีและตรัง สามารถทำการแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทได้ทั้งหมด 18 ไอโซเลต และได้ทำการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อพบว่า เชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้นั้น สามารถเจริญได้ดีในอาหาร Yeast extract - Malt extract agar และสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) ในโทนสีเทา ขาว และเหลือง สร้างเส้นใยอาหาร (substrate mycelium) ในโทนสี ขาว และเหลือง ลักษณะของสปอร์ที่ดูจากกล้องจุลทรรศน์ด้วยกำลังขยายของภาพ 1,000 เท่า มีลักษณะขดเป็นเกลียวเป็นส่วนใหญ่ ตรงปลายโค้ง ซึ่งลักษณะดังกล่าวสามารถจัดกลุ่มเชื้อแอคติโนมัยสีทออกเป็น 3 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่เจริญได้ดีในอาหาร yeast extract-malt extract (ISP2) สร้างเส้นใยอากาศสีเหลืองใส (Vivid Yellow) เส้นใยอาหารสีเหลืองอ่อน (pale yellow) ไม่มีการสร้างรงควัตถุ สร้างสปอร์เป็นแบบโค้งงอ มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces carpaticus* NBRC 15390$^{T}$ มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ร้อยละ 99.84

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอากาศขาวอมเทา (greyish white) เส้นใยอาหารสีเหลืองครีม ไม่มีการสร้างรงควัตถุ สร้างสปอร์เป็นแบบสายโซ่ยาวแบบเกลียว มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces malaysiensis* มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%similarity) ร้อยละ 99.5

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่เจริญได้ดีในอาหาร ISP2 สร้างเส้นใยอากาศสีขาวอมเทา (grayish white) เส้นใยอาหารสีเหลืองอมเทา (yellowish gray) ไม่มีการสร้างรงควัตถุและลักษณะของสปอร์เป็นแบบสายโซ่ยาวปลายโค้งงอ มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces cyaneus* NRRL B-2296$^{T}$ มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ร้อยละ99.61

จากการศึกษาปัจจัยการผลิตสารเจลดานามัยซินทั้งจากแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน ความเข้มข้นเกลือและระยะเวลาทำให้ทราบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอน คือ แป้งที่ละลายน้ำ (soluble starch) แหล่งไนโตรเจน คือ น้ำต้มถั่วเกลือง ความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 4 เลี้ยงเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระยะเวลา 14 วัน เป็นอาหารที่ดีที่สุดที่ทำให้เชื้อ *Streptomyces* sp. T8-1 สามารถผลิตสารเจลดานามัยซินได้ดีที่สุด ที่ปริมาณ 5.09 x 10-6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

**ข้อเสนอแนะ**

1. จากการวิจัยครั้งนี้สามารถค้นพบเชื้อแอคติโนมัยสีทที่มีความสามารถสร้างสารเจลดานามัยซินได้เป็นอย่างดี จึงควรมีการวิจัยต่อเพื่อทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อเหล่านี้ถึงระดับสกุลและสปีชีส์
2. จากการศึกษานี้พบสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารเจลดานามัยซินของเชื้อ *Streptomyces* sp. T8-1 ในระดับห้องปฏิบัติการ ดังนั้นควรทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# เอกสารอ้างอิง

Arai, T. 1975. Culture Media for Actinomycetes. *The Society for Actinomycetes*. Japan.

Bérdy, J. 2005. Bioactive Microbial Metabolites. *J. Antibiotics*. 58: 1-26

Bruntner C, Binder T, Pathom-aree W, Goodfellow M, Bull AT, Potterat O, Puder C, Horer S, Schmid A , Bolek W. 2005. Frigocyclinone,a novel angucyclinone antibiotic produced by a *Streptomyces griseus* strain from Antarctica. *J Antibiot* (Tokyo). 58:346-349.

Enokita, R., Okazaki, T., Torikata, A. and Arai, M. 1986. Personal communication. Sankyo fermentation Research Laboratories, Tokyo, Japan.

HernÃ¡ndez, I. L. C., Macedo, M. L., Berlinck , R. G. S., Ferreira, A. G. and Godinho,M. J. L. 2004. *J. Braz. Chem. Soc.*, **15**, 441

Holt, J. G. 1989. Filamentous Actinomycetes and Related Bacteria. *In* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 4, pp. 2333-2450. Edited by S. T. Williams, M. E. Sharpe & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.

Itoh T ,Kinoshita M, Aoki S, Kobayashi M. 2003. Komodoquinone A, a novel neutritogenic anthracycline, from marine *Streptomyces* sp. KS3. *J Nat Prod*. 66:1373-1377.

Komagata, K. and Suzuki, K.I. 1987. Lipid and Cell-Wall Analysis in Bacterial Systematics. *Methods in Microbiology*. 19: 161-207.

Macherla VR, LiuJ, Bellows C, Teisan S ,Lam KS ,Potts BCM. 2005. Glaciapyrroles A, B and C, pyrrolosesquiterpenes from *a Streptomyces* sp. Isolated from an Alaskan marine sediment. *J Nat Prod*. 68:780-783.

Maskey RP, Sevvana M, Uson I, Helmke E ,Laatsch H. 2004. Gutingimycin: a highly complex metabolite from a marine streptomycete. *Angew Chem Int Ed Engl*. 43:1281-1283.

Mitchell SS, Nicholson B, Teisan S ,Lam KS, Potts BCM. 2004. Aureoverticillactam, anovel 22-atommacrocycliclactam from the marine actinomycete Streptomyces aureoverticillatus. *J Nat Prod*. 67:1400-1402.

Sanchez Lopez JM, Martinez Insua M, Perez Baz J, Fernandez Puentes JL, CanedoHernandez L M. 2003. New Cytotoxic indolic metabolites from a marine *Streptomyces*. *J Nat Prod*. 66:863-864.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Schumacher RW,T almage SC ,Miller SA, Sarris KE, Davidson BS, Goldberg A. 2003. Isolation and structure determination of an antimicrobial ester from a marine-derived bacterium. *J Nat Prod.* 66:1291-1293.

Shiring, E.B. and Gottlieb, D. 1966. Methods for Characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 16: 313-340.

Stritzke K, Schulz, Laatsch H, Helmke E, Beil W. 2004. Novel Caprolactones from a marine streptomycete. *J Nat Prod.* 67:395-401.

Suchada J., Tanasupawat S., Kitakoop P., Bavovada R., Kobayashi H and Kudo T. 2006. Identification of *Streptomyces* and *Kitasatospora* strains from Thai soils with geldanamycin production strain . *Actinomycetologica.* 20:10–14.

Tamaoka, J. 1994. Determination of DNA Base Composition *In Chemical Methods in Prokaryotic Systematics.* Edited by M. Goodfellow and A.G. O'Donnell. John Wiley and Sons Ltd. pp. 463-470.

Thawai, C., Kittakoop, P., Tanasupawat, S., Suwanborirux, K., Sriklung, K., Thebtaranonth. 2004. Micromonosporin A, a Novel 24-Membered Polyene Lactam Macrolide from *Micromonospora* sp. isolated from Peat Swamp Forest. Chemistry and Biodiversity. vol. 1, 640-645.

Thawai, C., Tanasupawat, S., Itoh, T., Suwanborirux, K., and Kudo, T. 2004. *Micromonospora aurantinigra* sp. nov., isolated from a Peat Swamp Forest in Thailand. Actinomycetologica. vol. 18 no.1, 8-14.

Thawai, C., Tanasupawat, S., Itoh, T., Suwanborirux, K., Suzuki, K., and Kudo, T. 2005. *Micromonospora eburnea* sp. nov., isolated from Thai peat swamp forest. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55: 417-422

Thawai, C., Tanasupawat, S., Itoh, T., Suwanborirux, K., and Kudo, T. 2005. *Micromonospora siamensis* sp. nov., isolated from Thai peat swamp forest. J. Gen. Appl. Microbiol. 51: 229-234.

Thawai, C., Tanasupawat, S., Itoh, T. and Kudo, T. 2006. *Actinocatenispora* gen. nov., a new member of the family *Micromonosporaceae*, with description of *Actinocatenispora thailandica* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56: 1789-1794.

Tortora, G.J., Funke, B.R. and Case, C.L. 1995. *Microbiology, An Introduction.* 5th ed. Bridge Parkway: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Williams, S.T. and Cross, T. 1971. Actinomycetes : Slide and coverslip methods *In Method in Microbiology*, 4th edited by C. Booth, Academic Press Inc., London, p. 320.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้