

# รายงานการวิจัย

เรื่อง

ฤทธิ์การกระตุ้นการงอกของแขนงประสาทและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเชื้อแอคตินอมัยซีไทน์เนื้อเยื่อพืชที่แยกจากพืชสมุนไพรไทยและตำแหน่งอนุกรมวิธานของเชื่อนั้น

Neuritogenic and anti-oxidant activities of endophytic actinomycetes isolated from Thai medicinal plant and their taxonomic position



ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน  
ประจำปีงบประมาณ 2556  
คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

RCIT

QR

82

A35

เลขหมู่..... ๖๖๑๗

เลขทะเบียน..... 130283

เลขที่..... 2 ๒๕๕๖ 2557

b. ๒๕๕๖ ๒๕๕๗  
i. ....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) เงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2556 คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยงานดังกล่าวที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยตลอดการวิจัยในครั้งนี้

ผศ.ดร. จิตติ ท้าว



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย)      ฤทธิ์การกระตุ้นการงอกของแขนงประสาทและฤทธิ์ต้านอนุมูล  
อิสระของเชื้อแอคติโนมัยซีทในเนื้อเยื่อพืชที่แยกจากพืช  
สมุนไพรไทยและตำแหน่งอนุกรมวิธานของเชื้อนั้น

(ภาษาอังกฤษ)      Neuritogenic and anti-oxidant activities of endophytic  
actinomycetes isolated from Thai medicinal plant and their  
taxonomic position

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก      สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) เงินงบประมาณ  
แผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2556 คณะวิทยาศาสตร์ สถาบัน  
เทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
ประจำปี 2556      จำนวนเงิน 430,000 บาท  
ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี      เดือนตุลาคม 2555 ถึง กันยายน 2556  
ผู้ดำเนินการวิจัย      ผศ.ดร. จิตติ ท่าไผ่  
สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
โทรศัพท์      02-3298400 ต่อ 235

บทคัดย่อ

เชื้อแอคติโนมัยซีท จำนวน 27 ไอโซเลต แยกจากตัวอย่างต้นอัญชัน (*Clitoria ternatea* L.) และ  
ขมิ้น (*Curcuma longa* L.) เชื้อแอคติโนมัยซีทเหล่านี้สามารถถูกจัดกลุ่มโดยลักษณะทางสัณฐาน  
วิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมี รวมทั้งฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์เป็น 5 กลุ่ม เชื้อแอคติ  
โนมัยซีทกลุ่มที่ 1 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Micromonospora carbonacea* มากที่สุดด้วยระดับความ  
คล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ ร้อยละ 98.27 เชื้อแอคติโนมัยซีทกลุ่มที่ 2 มีความคล้ายคลึงกับ  
เชื้อ *Microbispora rosea* subsp. *rosea* มากที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์  
ร้อยละ 99.55 เชื้อแอคติโนมัยซีทกลุ่มที่ 3 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces avermitilis* มาก  
ที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ ร้อยละ 99.02 เชื้อแอคติโนมัยซีทกลุ่มที่ 4 มี  
ความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Micromonospora marina* ด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์  
ร้อยละ 99.8 เชื้อแอคติโนมัยซีทกลุ่มที่ 5 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Micromonospora coxensis* มาก  
ที่สุดด้วยระดับความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ ร้อยละ 99.77

จากการศึกษาครั้งนี้ พบเชื้อที่แสดงกิจกรรมกระตุ้นการแตกแขนงของระบบประสาททั้ง 27 ไอโซเลต ในจำนวนนี้มีเชื้อจำนวน 9 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 33.3 ที่แสดงฤทธิ์ได้ดีมากที่ระดับความเข้มข้น 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นการใช้ประโยชน์จากเชื้อแอคติโนมัยซีทจากเนื้อเยื่อพืชที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการแตกแขนงของระบบประสาทที่แยกได้ในครั้งนี้ควรมีศักยภาพต้องการการศึกษาเพื่อพัฒนาเป็นยาปฏิชีวนะต่อไป

#### Abstract

Twenty-seven actinomycete isolates were isolated from tissue of *Clitoria ternatea* L. and *Curcuma longa* L. These isolates could be grouped using morphological, physiological, biochemical characteristics including the antimicrobial activity into five groups. The actinomycetes in group I were closely related to *Micromonospora carbonacea* (98.27%). Group II were closed to *Microbispora rosea* subsp. *rosea* (99.55%). Group III were closely related to *Streptomyces avermitilis* (99.02%). Group IV were closed to *Micromonospora marina* (99.8%). Group V were most closely related to *Micromonospora coxensis* (99.77%). In this study, all twenty seven actinomycete isolates exhibited the neuritogenic and neuroprotective activities. Nine actinomycete isolates displayed the significant neuritogenic and neuroprotective activities (33.3%) at the concentration of 1 ng/ml. Potential use to these endophytic actinomycete isolates need further study for antibiotic development.

## สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทฤษฎีหรือกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	4
บทที่ 3 ระเบียบวิธีการดำเนินงานวิจัย	7
บทที่ 4 ผลการทดลอง	14
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	43
เอกสารอ้างอิง	45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงจำนวนของสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์ต่างๆ โดยประมาณ	1
2	แสดงรายละเอียดลักษณะของดินตัวอย่าง และรหัสเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้	14
3	ลักษณะการเจริญ และสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีทบนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ	30
4	แสดงลักษณะทางสรีระวิทยา และชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทในแต่ละไอโซเลต	33
5	แสดงผลการทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทเมื่อได้รับสารสกัดจากเชื้อ endophytic actinomycetes ตัวแทนในกลุ่มต่างๆ	38
6	แสดงผลการทดสอบ neuritogenic activity ของสารสกัดจากเชื้อ endophytic actinomycetes ตัวแทนในกลุ่มต่างๆ	39
7	แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ neuroprotective activity ของสารสกัดจากเชื้อ endophytic actinomycetes ตัวแทนในกลุ่มต่างๆ	41
8	แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidation) ของสารสกัดจากเชื้อ endophytic actinomycetes ตัวแทนในกลุ่มต่างๆ	42

## สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
1	เชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลต CT1-1	15
2	แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต CT1-1 บน phylogenetic tree (NJ method)	17
3	เชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลต CT2-1	18
4	แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต CT2-1 บน phylogenetic tree (NJ method)	20
5	เชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลต CT3-1	21
6	แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต CT3-1 บน phylogenetic tree (NJ method)	23
7	เชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลต CL4-4	24
8	แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต CL4-4 บน phylogenetic tree (NJ method)	26
9	เชื้อแอกติโนมัยสีทไอโซเลต CL5-1	27
10	แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต CL5-1 บน phylogenetic tree (NJ method)	29
11	แสดงลักษณะทางกายภาพของเซลล์ประสาทที่สืบเท้าภายใต้กล้องจุลทรรศน์	40

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

IAA = Indole acetic acid

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 = Tryptic soy broth

UV = Ultraviolet

μL = microlitre



## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ปัญหาที่ท้าทายและความสำคัญของปัญหา

จากแนวโน้มที่ประชากรกลุ่มผู้สูงอายุมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นปัญหาที่เกี่ยวกับโรคผู้สูงอายุ เช่น โรคอัลไซเมอร์ โรคพาร์กินสัน ย่อมมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเช่นกัน ซึ่งจากปัญหาดังกล่าว นำไปสู่ความพยายามที่จะค้นคว้าวิจัยหาชนิดใหม่ เพื่อให้ได้ผลการรักษาที่ดีมีประสิทธิภาพและปลอดภัยกว่าที่มีใช้อยู่ในปัจจุบัน โดยแนวทางการวิจัยแนวทางหนึ่ง คือการหาชนิดใหม่จากแหล่งทรัพยากรธรรมชาติทั้งจากพืช สัตว์หรือจุลินทรีย์ เพื่อนำมาใช้รักษาและบรรเทาโรคต่างๆ สำหรับจุลินทรีย์จัดเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่สำคัญชนิดหนึ่งที่ได้รับคามสนใจอย่างยิ่งในปัจจุบัน การผลิตสารปฏิชีวนะเป็นประโยชน์ด้านหนึ่งที่สำคัญดังแสดงในตารางที่ 1 สารสำคัญที่ผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์นอกจากแสดงฤทธิ์เป็นสารปฏิชีวนะแล้ว ยังมีรายงานว่ายังสามารถแสดงฤทธิ์ด้านต่างๆ ด้วยเช่น สารเจลดานามัยซินที่แยกจากเชื้อ *Streptomyces* sp. สามารถแสดงฤทธิ์การกระตุ้นการงอกของเซลล์ประสาทได้ที่มีความเข้มข้นระดับนาโนโมลาร์ (Tadtong et al. 2007) สารสำคัญที่ผลิตจากจุลินทรีย์มีความหลากหลายทั้งทางโครงสร้างและการออกฤทธิ์ รวมทั้งสามารถเพิ่มผลผลิตได้ง่ายโดยการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์หนึ่งในจุลินทรีย์ที่ได้รับความสนใจอย่างมากในปัจจุบันคือจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในเซลล์พืชหรือที่เรียกว่าเอนโดไฟต์

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนของสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์ต่างๆ โดยประมาณ (Bérdy, 2005)

Source	Antibiotics	"Other bioactive" metabolites	Total bioactive metabolites	Practically used (in human therapy)	Inactive metabolites
Bacteria	2900	900	3800	10~12(8~10)	3000 to 5000
Actinomycetales	8700	1400	10100	100~120(70~75)	5000 to 10000
Fungi	4900	3700	8600	30~35(13~15)	2000 to 15000
Total	16500	6000	22500	140~160 (~100)	20000to 25000

เอนโดไฟต์ เป็นจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในหรือช่องว่างของเซลล์พืชโดยไม่มีผลทำลายเซลล์ของพืช เอนโดไฟต์บางชนิดสามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ และเป็นประโยชน์ต่อพืชที่อาศัยอยู่ในธรรมชาติได้ ซึ่งสารบางชนิดก็สามารถนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ เกษตรกรรม และอุตสาหกรรม ปัจจุบันพบว่าเอนโดไฟต์มีบทบาทสำคัญในการสร้างสารที่ช่วยปกป้องพืชจากการถูกทำลายด้วยแมลง ช่วยให้พืชทนทานต่อโรคและสภาวะต่างๆ นอกจากพืชที่มีระบบท่อลำเลียงแล้วเรายังสามารถพบเอนโดไฟต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้ในสาหร่ายทะเล มอสและเฟิร์นอีกด้วย เอนโดไฟต์ถือว่าเป็นอีกแหล่งหนึ่งที่ทำให้สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีโครงสร้างและฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย มีการประมาณการณ์ว่าในพืชแต่ละชนิดจะมีเอนโดไฟต์อาศัยอยู่ไม่ต่ำกว่าหนึ่งชนิด ดังนั้นถ้ามีการศึกษาพืชทุกชนิดที่มีอยู่ในโลก คาดว่าน่าจะพบเชื้อเอนโดไฟต์ไม่ต่ำกว่าล้านสปีชีส์ โอกาสที่จะพบสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ๆ ก็จะมีมากขึ้น จากรายงานการเปรียบเทียบการแยกสารจากแบคทีเรียที่ได้จากดินกับเอนโดไฟต์จำนวน 135 สายพันธุ์ พบว่า สารที่ผลิตจากเอนโดไฟต์เป็นสารที่มีโครงสร้างใหม่ถึง 51% ขณะที่สารจากแบคทีเรียที่แยกจากดินเป็นสารใหม่ 38% นอกจากนี้ยังพบว่าสารสำคัญที่แยกได้จากเอนโดไฟต์กว่า 80% ที่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ (Barbara et al. 2002) ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่า เอนโดไฟต์เป็นแหล่งธรรมชาติอีกแหล่งหนึ่งที่มีศักยภาพในการจะนำมาศึกษาวิจัยเพื่อค้นคว้าหาสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อนำไปใช้เป็นสารต้นแบบในการพัฒนาใหม่ อันจะก่อให้เกิดประโยชน์มหาศาลทางด้านสาธารณสุขต่อไป นอกจากนี้ การที่ประเทศไทยมีความหลากหลายทางชีวภาพสูง พืชสมุนไพรที่มีในประเทศไทยจึงเป็นแหล่งสำคัญที่น่าจะมีศักยภาพสูงในการเป็นแหล่งของเชื้อเอนโดไฟต์ที่ผลิตสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

เชื้อแอคติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียกลุ่มหนึ่งที่สามารถเจริญอยู่ในเนื้อเยื่อพืชได้ คาดว่าการอาศัยในเนื้อเยื่อพืชของเชื้อแอคติโนมัยซีทเป็นการช่วยส่งเสริมให้พืชนั้นต้านทานต่อโรคพืชได้ เนื่องจากเชื้อแอคติโนมัยซีทสามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้หลากหลาย โดยปกติแล้วเชื้อแอคติโนมัยซีทมักกระจายตัวอยู่ในดิน น้ำ และสิ่งแวดล้อมทางธรรมชาติอื่นๆ ประชากรและชนิดของเชื้อแอคติโนมัยซีทในระบบนิเวศขึ้นอยู่กับปัจจัยทางกายภาพ เคมี และชีววิทยาของสิ่งแวดล้อมบริเวณนั้นๆ การเพิ่มโอกาสเพื่อค้นพบเชื้อแอคติโนมัยซีทชนิดใหม่จึงควรเริ่มจากการศึกษาแหล่งธรรมชาติแหล่งใหม่ที่มีลักษณะทางระบบนิเวศแตกต่างจากแหล่งธรรมชาติทั่วไป พืชสมุนไพรไทยที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีจัดเป็นแหล่งที่น่าสนใจต่อการค้นหาเชื้อแอคติโนมัยซีท ด้วยความหวังว่าจะพบเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แสดงลักษณะจำเพาะที่โดดเด่นต่างไปจากจุลินทรีย์ที่พบในสิ่งแวดล้อมทั่วไปและแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีและเหมือนกับสารที่พบในพืชสมุนไพรอื่นๆ เพื่อใช้เป็นแหล่งทดแทนในการสร้างสารที่มีศักยภาพในการบำบัดโรคเหมือนที่พบในพืชสมุนไพร ด้วยเหตุนี้จึงทำให้เกิดความสนใจที่จะทำการวิจัยทางด้านความหลากหลาย และอนุกรมวิธานหลายส่วน เพื่อศึกษาการกระจายตัว คัดเลือกเชื้อ และศึกษาฤทธิ์กระตุ้นการงอกของเซลล์ประสาทและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ตลอดจนเก็บรวบรวมสายพันธุ์เชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีประโยชน์จากแหล่งดังกล่าวในการนำไปใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบในการศึกษาและวิจัยเชิงพัฒนาต่อไป ดังนั้นการศึกษาวิจัยในโครงการนี้อาจทำให้เกิดการค้นพบเชื้อแอคติโนมัยซีทชนิดใหม่หรือสายพันธุ์ที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีเพื่อนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตสารต้นแบบต่อการพัฒนาเป็นยาชนิดใหม่ ตลอดจนช่วยพัฒนาองค์ความรู้เกี่ยวกับการคัดแยก เพาะเลี้ยง อนุกรมวิธานและทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีท อีกทั้งช่วยเพิ่มขีดความสามารถและเป็นทางเลือกของ

นักวิจัยไทย ในการเรียนรู้การวิจัยเกี่ยวกับการหาสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากแหล่งทรัพยากรในประเทศ เพื่อเป็นการบริหารจัดการสิ่งแวดล้อมและการพัฒนาคุณค่าความหลากหลายทางชีวภาพอีกทางหนึ่งด้วย

## 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.2.1 เพื่อแยก คัดเลือก และศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อแอคติโนมัยซีทในเนื้อเยื่อสมุนไพร ตลอดจนคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

1.2.2 เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์กระตุ้นการงอกของแขนงประสาทของสารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยซีทในเนื้อเยื่อพืช

## 1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้จะเริ่มจากการนำสมุนไพรที่มีรายงานว่าสามารถแสดงฤทธิ์การกระตุ้นการงอกของเซลล์ประสาทได้มาทำการแยก คัดเลือก ศึกษาอนุกรมวิธาน และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีทในเนื้อเยื่อพืชนั้น ขอบเขตของโครงการวิจัยนี้คือ สามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทในเนื้อเยื่อสมุนไพรได้อย่างน้อย 25 ไอโซเลต ทำการจัดกลุ่มเชื้อเหล่านั้นด้วยลักษณะทางฟีโนไทป์ และศึกษาเพื่อให้ทราบลักษณะทางอนุกรมวิธานในระดับสกุลของเชื้อในแต่ละกลุ่ม จากนั้นคัดเลือกเชื้อตัวแทนเชื้อในกลุ่มที่น่าสนใจคือมีแนวโน้มเป็นเชื้อชนิดใหม่มาศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานจนถึงระดับสปีชีส์ ตลอดจนนำเชื้อตัวแทนของแต่ละกลุ่มมาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ทำการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ เพื่อให้ได้สารสกัดหยาบ จากนั้นนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์การกระตุ้นการงอกของเซลล์ประสาท และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

## 1.4 แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

ผลการวิจัยในครั้งนี้สามารถนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ในการพัฒนาวิทยาศาสตร์สาธารณสุขด้านการค้นคว้าวิจัยหายาปฏิชีวนะชนิดใหม่ เพื่อรองรับการระบาดของเชื้อโรคดื้อยาที่เป็นปัญหาสาธารณสุขปัจจุบันและอนาคต เนื่องจากการวิจัยครั้งนี้เป็นงานวิจัยพื้นฐาน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาวิจัยต่อเนื่องเพื่อนำสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ยาในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

### ทฤษฎีหรือกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

มีรายงานว่าสารสำคัญที่สร้างจากเอนโดไฟต์มีความหลากหลายทั้งทางด้านโครงสร้างและฤทธิ์ชีวภาพ มีทั้งสารพวก steroids, xanthenes, phenols, isocoumarins, quinones, terpenoids, depsipeptides, furandiones, และ cytochalasins (Barbara et al., 2002) สารเหล่านี้แสดงฤทธิ์ชีวภาพที่หลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ ฤทธิ์ต้านเชื้อรา ฤทธิ์ต้านมะเร็ง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านแมลง ฤทธิ์ลดน้ำตาลและฤทธิ์อื่นๆ ซึ่งประเทศไทยมีทรัพยากรธรรมชาติที่อุดมสมบูรณ์และมีความหลากหลายทางชีวภาพสูง พืชสมุนไพรของไทยมีกระจายอยู่ในทุกภาคของประเทศและยังคงนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ จากการศึกษาเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ร่วมกับพืช (endophytic microorganisms) ตั้งแต่ 50 ปีที่แล้ว สามารถสรุปได้ว่าพืชเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยที่สำคัญแหล่งหนึ่งของจุลินทรีย์ทั้งราและแบคทีเรีย รวมถึงเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มแอคติโนมัยซีต ประเทศไทยเป็นประเทศที่อุดมไปด้วยทรัพยากรธรรมชาติทั้งป่าไม้ พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ด้วยความหลากหลายของทรัพยากรธรรมชาติจึงเป็นแหล่งสำคัญของวัตถุดิบที่มีประโยชน์ต่อการพัฒนาการเกษตร อุตสาหกรรม โดยเฉพาะทางการแพทย์ ยาหลายชนิดที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันไม่ว่าจะเป็นยาต้านมะเร็ง เอดส์ อัลไซเมอร์ ยาต้านการอักเสบ และยาปฏิชีวนะส่วนใหญ่คิดค้นมาจากสารตั้งต้น (lead compound) จากธรรมชาติโดยเฉพาะอย่างยิ่งสารตั้งต้นที่ได้มาจากทรัพยากรจุลินทรีย์และพืชทั้งสิ้น ข้อจำกัดของสารตั้งต้นที่ได้จากพืช คือ สารตั้งต้นบางชนิดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีมากแต่พบในพืชบางชนิดที่หายาก ใกล้เคียงสูญพันธุ์ และมีปริมาณน้อยในธรรมชาติ จึงทำให้ไม่เพียงพอต่อการศึกษาและพัฒนา ตรงกันข้ามกับทรัพยากรจุลินทรีย์ที่ซึ่งสามารถขยายจำนวนและเก็บรักษาได้ง่าย ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์ทั่วโลกจึงหันมามุ่งเน้นเพื่อเก็บรวบรวมและคัดกรองจุลินทรีย์กันอย่างกว้างขวาง ด้วยความได้เปรียบทางด้านทรัพยากรธรรมชาติของประเทศไทยที่ยังคงค่อนข้างสมบูรณ์ในปัจจุบัน การศึกษาความหลากหลายของทรัพยากรจุลินทรีย์และฤทธิ์ทางชีวภาพ ตลอดจนการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารตั้งต้นที่ได้มาจากจุลินทรีย์ จึงควรเร่งดำเนินการเพื่อเก็บรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในการใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบที่สำคัญต่อการแพทย์ เกษตร และอุตสาหกรรมในอนาคต

โรคที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาท (neurodegenerative disorders) เช่น โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) พบได้มากขึ้นในปัจจุบัน ส่งผลให้ผู้ป่วยประสบปัญหาทางด้านความรู้และความเข้าใจ (cognitive dysfunction) ซึ่งอุบัติการณ์การเกิดโรคที่สำคัญอย่างหนึ่งของโรคอัลไซเมอร์เกิดจากการที่เซลล์ประสาทถูกทำลายจากอนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้นจากกระบวนการเหนี่ยวนำของเบต้า-อไมลอยด์ ( $\beta$ -Amyloid ( $\beta$ -A)- induced oxidative stress) ดังนั้นการป้องกันการเกิดโรคจึงมุ่งไปที่การ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต้านอนุมูลอิสระที่จะเกิดขึ้น (Kim et al., 2001) ตัวอย่างสารที่มีการค้นพบว่ามีฤทธิ์ช่วยปกป้องเซลล์ประสาท เช่น สารกลุ่ม curcuminoids 3 ชนิด ที่พบในขมิ้นชัน ได้แก่ curcumin, demethoxycurcumin, และ bisdemethoxycurcumin แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay ได้ดีกว่าวิตามินอี หรือ  $\alpha$ -tocopherol และสามารถป้องกันเซลล์ PC12 และ HUVEC จากการกระตุ้นให้เกิดภาวะ oxidative stress ของ  $\beta$ A (1-42) โดยวิธี MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) reduction assay พบว่า ED50 ของ curcumin, demethoxycurcumin, และ bisdemethoxycurcumin ต่อ PC12 cell ได้แก่  $7.1 \pm 0.3$ ,  $4.7 \pm 0.1$ ,  $3.5 \pm 0.2$   $\mu$ g/ml และต่อ HUVEC cell ได้แก่  $6.8 \pm 0.4$ ,  $4.2 \pm 0.3$ , และ  $3.0 \pm 0.3$   $\mu$ g/ml ตามลำดับ ในขณะที่  $\alpha$ -tocopherol ที่ความเข้มข้น 50  $\mu$ g/ml ไม่สามารถป้องกันเซลล์ PC12 และ HUVEC จากการกระตุ้นให้เกิดภาวะ oxidative stress ของ  $\beta$ A (1-42) ได้ (Kim et al., 2001) สารที่มีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทมีความสอดคล้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่เกิดจากสภาวะ oxidative stress ซึ่งส่งผลให้เซลล์ประสาทถูกทำลาย ดังเช่นที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ดังนั้นการเลือกนำเอาสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สามารถจับอนุมูลอิสระได้ดี น่าจะส่งผลให้สารเหล่านั้นมีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทที่ดีด้วยเช่นกัน การออกและเพิ่มจำนวนของแขนงประสาท (neurite outgrowth) มีผลต่อการทำงานของระบบประสาท โดยจะช่วยเพิ่มการส่งสัญญาณประสาทได้ (Lin et al., 2009) โดยในร่างกายจะมีสาร nerve growth factor (NGF) ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติกระตุ้นให้มีการสร้าง microtubule และช่วยให้เกิดการงอกและเพิ่มจำนวนของแขนงประสาท (neurite outgrowth) (Yang et al., 2008) สารชนิดนี้จะทำให้เซลล์ประสาทมีแขนงประสาทเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ระบบประสาทสามารถเกิด synapse ได้มากขึ้น การส่งสัญญาณประสาทก็จะเกิดได้ดีขึ้น การค้นหาสารที่มีคุณสมบัติคล้ายคลึงกับ NGF นี้จะสามารถนำมาใช้ในการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาท (neurodegenerative disorders) ได้ การศึกษาเพื่อค้นหาสารที่มีฤทธิ์ช่วยให้เกิดการงอกและเพิ่มจำนวนของแขนงประสาท (neurite outgrowth) นั้นนิยมใช้เซลล์เพาะเลี้ยง เช่น PC12 (Zhang, 2007), PC12D (Wang et al., 2006) และ N2A (Mak et al., 2000) เป็นแบบจำลองในการทดสอบ โดยจะวัดผลจากการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์และการเกิดแขนงประสาทขึ้น นอกจากนี้ยังมีการรายงานถึงการนำเอาเซลล์เพาะเลี้ยง P19 ซึ่งเป็น murine embryonic carcinoma cell มากระตุ้นด้วยวิตามินเอให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ประสาทมาใช้เป็นแบบจำลองในการทดสอบฤทธิ์ ดังกล่าวได้อีกด้วย (Mak et al., 2000) ตัวอย่างสารที่มีการค้นพบว่ามีฤทธิ์ช่วยให้เกิดการงอกและเพิ่มจำนวนของแขนงประสาท (neurite outgrowth) เช่น scoparone เป็นสารที่แยกได้จากเปลือกของต้น Liriodendron tulipifera พบว่าสาร scoparone ความเข้มข้น 200  $\mu$ M สามารถทำให้เซลล์ PC12 เกิดการงอกและเพิ่มจำนวนของแขนงประสาท (neurite outgrowth) ได้ (Lin et al., 2009) สาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

panaxynol ที่แยกได้จาก *Panax notoginseng* ก็สามารถทำให้เซลล์ PC12D เกิดการงอกและเพิ่มจำนวนของแขนงประสาท (neurite outgrowth) ได้เช่นกัน โดยความเข้มข้นที่ให้ผลที่ดีที่สุดคือ 8  $\mu\text{M}$  เนื่องจากสามารถทำให้แขนงประสาทที่เกิดขึ้นมีความยาวมากที่สุดอีกด้วย (Zhang, 2007) สาร 1,4,5,6-tetrahydroxy-7,8-di(3-methylbut-2-enyl) xanthone ที่แยกได้จากเนื้อไม้ *Garcinia xanthochymus* ความเข้มข้น 10  $\mu\text{M}$  ก็สามารถทำให้เซลล์ PC12D เกิดการงอกและเพิ่มจำนวนของแขนงประสาท (neurite outgrowth) ได้เช่นกัน (Wang et al., 2006)

การค้นพบแอคติโนมัยซีทที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืช (endophytic actinomycetes) ถูกค้นพบมากขึ้นเรื่อยๆ ในปัจจุบัน และกระจายอยู่ในหลายสกุลหลายสปีชีส์ เชื้อส่วนใหญ่ที่ค้นพบเป็นเชื้อสายพันธุ์ใหม่ เช่น *Actinoallomurus acaciae* (Thamchaipenet et al., 2010), *Actinoallomurus oryzae* (Indananda et al., 2011), *Actinophytocola oryzae* (Indananda et al., 2010), *Amycolatopsis samaneae* (Duangmal et al., 2011), *Kineococcus gymurae* (Duangmal et al., 2008), *Leifsonia soli* (Madhaiyan et al., 2010), *Micromonospora tulbaghia* (Kirby and Meyers, 2010), *Nocardioides caricicola* (Song et al., 2011), *Pseudonocardia adelaidensis* (Kaewkla and Franco., 2010), *Rhodococcus cercidiphylli* (Li et al., 2008), *Saccharopolyspora endophytica* (Qin et al., 2008), *Streptomyces alni* (Liu et al., 2009), *Streptosporangium oxazolinicum* (Inahashi et al., 2011) การค้นพบเชื้อแอคติโนมัยซีทที่หลากหลายขึ้นอยู่กับชนิดของพืชที่เป็นแหล่งที่อยู่และความทนทานต่อสารทุติยภูมิที่พืชสร้างขึ้นในเซลล์ แอคติโนมัยซีทที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชที่ถูกค้นพบมีแนวโน้มเป็นเชื้อสกุลและสปีชีส์ใหม่สูง จึงเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการศึกษาเพื่อได้มาซึ่งสารทุติยภูมิชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูง จากการศึกษาเชื้อแอคติโนมัยซีทในเนื้อเยื่อพืช พบว่ามีเชื้อบางสกุลสามารถผลิตสารทุติยภูมิชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ และบางชนิดมีศักยภาพสูงที่จะนำมาพัฒนาต่อเพื่อใช้เป็นยารักษาโรคได้สารสำคัญที่ผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์นอกจากแสดงฤทธิ์เป็นสารปฏิชีวนะแล้ว ยังมีรายงานว่ายังสามารถแสดงฤทธิ์ด้านต่างๆ ด้วยเช่น สารเจลดานามัยซินที่แยกจากเชื้อ *Streptomyces* sp. สามารถแสดงฤทธิ์การกระตุ้นการงอกของเซลล์ประสาทได้ที่ความเข้มข้นระดับนาโนโมลาร์ (Tadtong et al. 2007)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 3

### ระเบียบวิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 การเก็บตัวอย่าง

การแยกและการคัดเลือกเชื้อ (สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล - คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง)

##### 3.1.1 การเก็บตัวอย่าง การแยกเชื้อ และการคัดเลือกเชื้อ

##### 3.1.1.1 ตัวอย่างพืชสมุนไพรที่ใช้ในการแยกเชื้อแอสคิตินัมยีส

พืชสมุนไพรที่ใช้ในการวิจัยได้แก่ อัญชัน และขมิ้น ซึ่งมีรายงานค้นพบสารที่มีฤทธิ์การกระตุ้นการงอกของเซลล์ประสาท โดยเลือกพืชสมุนไพรที่มีการปลูกโดยไม่ใช้สารเคมี เก็บตัวอย่างรากใต้ดิน ลำต้น และใบของพืชที่โตเต็มที่แล้วมาล้างด้วยน้ำสะอาด เก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกระทั่งถึงขั้นตอนการแยกเชื้อ

##### 3.1.1.2 การแยกเชื้อ

นำตัวอย่างพืชจากข้อ 3.1.1.1 มาตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 1 x 1 เซนติเมตร และแช่ในสารละลาย 0.1% Tween 20 เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 2 ครั้ง นำชิ้นส่วนพืชแช่ลงใน 95% (v/v) ethanol เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาย้ายตัวอย่างพืชมาแช่ในสารละลาย 1% sodium hypochlorite เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ชิ้นส่วนพืชที่ได้จะถูกนำมาบดในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร และเกลี่ยลงบนอาหาร starch casein agar ที่ผสมยาปฏิชีวนะ นำจานอาหารมาบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน เมื่อครบเวลาทำการเลือกเก็บโคโลนีที่มีลักษณะของเชื้อแอสคิตินัมยีส โดยตรวจลักษณะโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีเลนส์ระยะการทำงานสูง (Long working distance lens) จากนั้นแยกเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหาร Yeast extract-Malt extract agar และเก็บเชื้อไว้ในหลอดอาหารเลี้ยง (YM slant) เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

3.2 การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อ (สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล - คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง)

ทำโดยอาศัยการศึกษาลักษณะต่าง ๆ ของเชื้อดังนี้

### 3.2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีรวิทยาและชีวเคมี

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

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

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อตัวแทนแต่ละกลุ่มในอาหารเหลว Yeast extract – Malt extract บนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นทำการเก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงและทำให้เซลล์แห้งภายใต้ความเย็น (Freeze drying) นำเซลล์แห้งไปทดสอบทางอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อดังนี้

#### 3.2.2.1 การวิเคราะห์ผนังเซลล์

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

#### 3.2.2.2 การวิเคราะห์ Whole cell sugar

นำเซลล์แห้งมาไฮโดรไลสด้วย 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็น แล้วจึงเติม Ba(OH)<sub>2</sub> และปรับ pH อยู่ในช่วง 5.2-5.5 นำไปปั่นเหวี่ยง ดูดเอาสารละลายส่วนบน (supernatant) มาทำให้แห้ง ละลายซ้ำด้วยน้ำ จากนั้น spot ลงบน cellulose TLC plate develop ด้วย

butanol - water - pyridine - toluene (10:6:6:1) ฟันด้วย acid aniline phthalate อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที เทียบ spot ที่ได้กับ standard

### 3.2.2.3 การวิเคราะห์ Polar lipid

นำเซลล์แห้งที่ได้มาสกัด polar lipid ด้วย methanol ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งให้เย็นแล้วสกัดต่อด้วย chloroform กรองกากเซลล์ (debris) ออก ทำการ partition ด้วย chloroform และ saline นำชั้น chloroform ไประเหยให้แห้ง ละลายซ้ำด้วย chloroform - methanol และจุดสารตัวอย่าง spot ลงบน HPTLC (Merck Kieselgel 60 F254, 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) แล้วฟันด้วย 50% sulfuric acid อบที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที สังเกต spot ที่เกิดขึ้น

### 3.2.3 การวิเคราะห์ลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอในช่วง 16S rRNA gene และการ

วิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree)

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

### 3.2.4 การวิเคราะห์ DNA base composition (Tamaoka, 1994.)

#### 3.2.4.1 การแยก DNA และทำให้บริสุทธิ์

เลี้ยงเชื้อใน Yeast extract - Malt extract broth เป็นเวลา 4-5 วัน จากนั้นเก็บเกี่ยวเซลล์และล้างด้วย saline-EDTA ทำให้เซลล์แตกด้วย lysozyme และ Tris-SDS solution จากนั้นสกัดด้วย phenol และ chloroform ตกตะกอน DNA ด้วย cool ethanol กำจัด RNA และโปรตีน โดยการเติม RNase solution และ proteinase K และเก็บ DNA ที่ได้ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ใน ethanol

#### 3.2.4.2 การวิเคราะห์

เตรียม nucleoside ของ DNA แต่ละไอโซเลต จากการไฮโดรไลส 10  $\mu$ l heated DNA (1 mg/ml) ด้วย 10  $\mu$ l nuclease P1 บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และไฮโดรไลสต่อด้วย

10  $\mu$ l 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  $\mu$ l ของสารละลาย heat – denatured DNA (1  $\mu$ g 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 บั่นด้วย vortex บั่นเหยี่ยงที่ 12000 rpm นาน 20 นาที นำสารละลายชั้นบนทิ้ง เติม n-butanol และบั่นเหยี่ยงอีกครั้ง 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

#### 3.2.5.5 Detection of biotinylated–DNA annealing to immobilized–DNA

เมื่อเทสารละลาย hybridize ทิ้งแล้ว ล้างด้วย 0.2xSSC 3 ครั้ง เติมสารละลาย I (Bovine serum albumin (Fraction V) , Triton X – 100, PBS) บ่มไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทสารละลาย I ทิ้ง Colorimetric method : เติมสารละลาย streptavidin-peroxidase ใน PBS กับ 0.5 % BSA บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วเทสารละลายทิ้ง และล้างด้วย PBS 3 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลาย tetramethyl benzidine – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 5-10 นาที จะเกิดสารละลายสีฟ้า แล้ววัดความเข้มของสีด้วย microplate reader (630 nm) หยดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองแล้ววัดความเข้มที่ 450 nm จะได้ค่าที่ต้องการ

การคำนวณ Homology % =  $(V_{\text{sample}} - V_{\text{control}} / V_{\text{type strain}} - V_{\text{control}}) \times 100$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลจากการศึกษา DNA relatedness จะสามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อได้ หากเชื้อที่พบเป็นเชื้อที่แตกต่างจากที่เคยมีรายงานไว้จำเป็นต้องศึกษาเพื่อจัดจำแนกเชื้อใหม่ต่อไป โดยใช้วิธีการดังที่กล่าวมา

### 3.3 การหมักเชื้อเพิ่มปริมาณเพื่อผลิตสารและการสกัดแยกสาร (สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล - คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง)

ทำการเลี้ยงเชื้อแอสคิโนมัยซีทในเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรที่น่าสนใจ ซึ่งได้จากโครงการย่อยที่ 1 ใน Seed medium (Yeast extract – Malt extract broth; pH 7.3) บ่มเลี้ยงไว้บนเครื่องเขย่าความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 4 วัน แล้วเลี้ยงต่อในอาหาร Production medium (Yeast extract – Malt extract broth ที่เติม 0.1%  $\text{CaCO}_3$ ; pH 7.3) โดยเติม 1% inoculum ของ seed medium ลงใน production medium บ่มเลี้ยงไว้บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน นำน้ำหมักเชื้อมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 เพื่อแยกเอาส่วนน้ำใสและเซลล์ออกจากกัน จากนั้นนำส่วนน้ำใสมาทำการ partition กับ ethyl acetate 3 ครั้ง แล้วนำไประเหยให้แห้งภายใต้การลดความดัน จะได้สารสกัดหยาบในส่วน ethyl acetate (crude EtOAc extract) ในส่วนของเซลล์นำมาแช่ใน MeOH และ  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ตามลำดับ จากนั้นระเหยภายใต้ความดัน และนำส่วนที่เหลือมาทำการสกัดด้วย EtOAc 3 ครั้ง จะได้สารสกัดหยาบในส่วน of เซลล์ เปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบในส่วน of น้ำใสและส่วน of เซลล์ จากนั้นเลือกสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีที่สุดนำไปแยกให้บริสุทธิ์ต่อไป

### 3.4 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

#### 3.4.1 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ใช้วิธีการทดสอบ 2 วิธีควบคู่กันเพื่อยืนยันผลการทดลอง ได้แก่ วิธี DPPH radical scavenging assay และ วิธี ABTS radical scavenging assay โดยใช้สารมาตรฐาน gallic acid เป็นกลุ่มควบคุมทางบวก และเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระกับความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน Trolox ทำการทดสอบ 3 ครั้ง แต่ละครั้งทำการทดสอบซ้ำ 3 ซ้ำ แล้วรายงานเป็นค่าเฉลี่ย  $\text{IC}_{50}$  และ trolox equivalence

สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล - คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาวชิราลงกูรวิโรฒ

### 3.4.2 ฤทธิ์กระตุ้นการงอกของแขนงประสาท

#### 3.4.2.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทพีสิบแก้ว

งานวิจัยนี้จะนำเอาเซลล์ประสาทพีสิบแก้วมาใช้เป็นแบบจำลองในการทดสอบการเพาะเลี้ยงเซลล์พีสิบแก้ว

- เซลล์พีสิบแก้วจะถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด  $\alpha$ -MEM (alpha minimal essential medium) ที่ทำการเติม 7.5% newborn calf serum (NCS) และ 2.5% fetal bovine serum (FBS) ในบรรยากาศ 5% CO<sub>2</sub> ที่อุณหภูมิ 37°C ทำการ subculture ทุก 2-3 วัน (29)

การเหนี่ยวนำให้เซลล์พีสิบแก้วเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ประสาทพีสิบแก้ว

- นำเซลล์พีสิบแก้วที่เจริญเป็นผืนเดียวกันบนผิวภาชนะเพาะเลี้ยงมาเติม trypsin ให้กลายเป็นเซลล์เดี่ยว นำเซลล์มา  $2 \times 10^6$  cells/ml เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์  $\alpha$ -MEM ที่ทำการเติม 5% FBS และ 0.5  $\mu$ M RA ใน petridish ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 100-mm บรรยากาศ 5% CO<sub>2</sub> ที่อุณหภูมิ 37°C เซลล์จะรวมกลุ่มกันมีลักษณะเป็น embryoid bodies ทำการเปลี่ยนอาหารทุก 2 วัน (29)

- หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน ทำการกระจาย embryoid bodies ให้กลายเป็น เซลล์เดี่ยวด้วยไปเปิด แล้วนำเซลล์ที่ได้ไปเพาะเลี้ยงบน microtiter plate ที่ทำการเคลือบผิวภาชนะด้วย poly-L-lysine (ใช้ 50  $\mu$ g/mL poly-L-lysine ที่ละลายใน sterile phosphate buffer solution เติมลงในแต่ละหลุมของ plate เป็นเวลา 1 คืน แล้วค่อยนำสารละลายออกปล่อยให้แห้งภายใต้รังสี UV ใน laminar flow hood เป็นเวลา 30 นาที) โดยเพาะเลี้ยงที่ความหนาแน่น  $7 \times 10^4$  cells/mL (150  $\mu$ L/well สำหรับ 96-well plate ในการตรวจวัดอัตราการรอดชีวิตด้วย XTT และ 1.5 mL/well สำหรับ 6-well plate ในการตรวจดูแขนงประสาทภายใต้กล้องจุลทรรศน์) โดยใช้อาหารเพาะเลี้ยงเป็น  $\alpha$ -MEM ที่ทำการเติม 10% FBS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในบรรยากาศ 5% CO<sub>2</sub> ที่อุณหภูมิ 37°C

- เติม 10  $\mu$ M cytosine arabinoside (Ara-C) ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ และทำการเปลี่ยนอาหารทุก 2-3 วัน เซลล์จะเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ประสาท ที่สมบูรณ์พร้อมใช้ในการทดสอบในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง (29,30)

#### 13.4.2.2 การทดสอบฤทธิ์ในการงอกและเพิ่มจำนวนของแขนงประสาท

##### เตรียมสารทดสอบฤทธิ์ในการงอกและเพิ่มจำนวนของแขนงประสาท

- นำสารทดสอบแต่ละชนิดมาละลายด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม เพื่อเตรียม ความเข้มข้นตั้งต้น (stock concentration) ที่ 2 mg/ml และ 20 ng/ml สำหรับใช้ในการทดสอบต่อไป และใช้ตัวทำละลายเป็นกลุ่มควบคุม

ทดสอบหาฤทธิ์ในการงอกและเพิ่มจำนวนของแขนงประสาท

- นำสารละลายที่เตรียมขึ้นที่ความเข้มข้นดังกล่าว มาทดสอบกับเซลล์ประสาทฟิสิบแก้าที่เกิดขึ้นจากการเหนี่ยวนำเซลล์ฟิสิบแก้าซึ่งเป็น embryonic carcinoma cells ด้วย all trans-retinoic acid ให้เกิดการ differentiate ไปเป็น เซลล์ประสาทฟิสิบแก้าแล้วตรวจดูอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทด้วยวิธี XTT reduction assay โดยใช้ตัวทำละลายเป็นกลุ่มควบคุม ความเข้มข้นในการทดสอบคือ 100  $\mu\text{g/ml}$  เพื่อประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทในเบื้องต้นและที่ความเข้มข้น 1 ng/ml เพื่อประเมินอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาท ทำการทดสอบ 3 ครั้ง แต่แต่ละครั้งทำการทดสอบซ้ำ 3 ซ้ำ

- หากที่ความเข้มข้นที่ 1 ng/ml นี้สามารถทำให้เซลล์ประสาทมีอัตราการรอดชีวิต (% cell viability) มากกว่าหรือเท่ากับ 100% จะนำมาทดสอบต่อ โดยการสังเกตลักษณะทางกายภาพของเซลล์ โดยสังเกตการเพิ่มขึ้นของแขนงเซลล์ประสาท และ/หรือ ความยาวที่เพิ่มขึ้นของแขนงประสาทภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และนับจำนวนแขนงประสาท และ/หรือความยาวของแขนงประสาทจำนวน 30 เซลล์ จากการสุ่มบริเวณเพื่อตรวจวัดอย่างน้อย 3 บริเวณที่ไม่ซ้ำกัน แล้วนำมาเฉลี่ยรายงานเป็นจำนวนแขนงประสาทเฉลี่ย และความยาวเฉลี่ย เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้มีการเติมสารทดสอบ โดยใช้สาร geldanamycin ซึ่งเป็นสารที่เคยมีการรายงานว่าเป็นสารที่มีฤทธิ์ในการช่วยให้เกิดการงอกและเพิ่มจำนวนของแขนงประสาทเป็นชุดควบคุมทางบวก ผู้วิจัยมีสารมาตรฐานชนิดนี้อยู่แล้ว

- หากสารสกัดชนิดใดสามารถกระตุ้นให้เกิดการงอกของแขนงประสาทได้จะ นำมาทดสอบหาความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทต่อไป โดยทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ 5 ความเข้มข้น ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ครอบคลุมความเข้มข้นเดียวกับที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ในการงอกและเพิ่มจำนวนของแขนงประสาท ทำการทดสอบ 3 ครั้ง แต่แต่ละครั้งทำการทดสอบซ้ำ 3 ซ้ำ แล้วรายงานเป็นค่าเฉลี่ย IC50 เพื่อนำข้อมูลมาเปรียบเทียบกับ therapeutic index (TI)

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1 การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อ

ได้ทำการเก็บตัวอย่างต้นอัญชันและขมิ้น นำมาทำการแยกเชื้อแอกติโนมัยสียและนำพบว่าได้เชื้อแอกติโนมัยสียทั้งหมด 27 ไอโซเลต (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 แสดงรายละเอียดลักษณะของดินตัวอย่าง และรหัสเชื้อแอกติโนมัยสียที่แยกได้

ชนิดของตัวอย่าง	รหัสตัวอย่าง	รหัสเชื้อ
ลำต้นอัญชัน	CT 1	CT1-1, CT1-2, CT1-3, CT1-4, CT1-5, CT1-6, CT1-7
ใบอัญชัน	CT2	CT2-1, CT2-2, CT2-3, CT2-4, CT2-5
รากอัญชัน	CT3	CT3-1, CT3-2, CT3-3, CT3-4, CT3-5, CT3-6
เหง้าขมิ้น	CL4	CL4-1, CL4-2, CL4-3, CL4-4, CL4-5
ใบขมิ้น	CL5	CL5-1, CL5-2, CL5-3, CL5-4

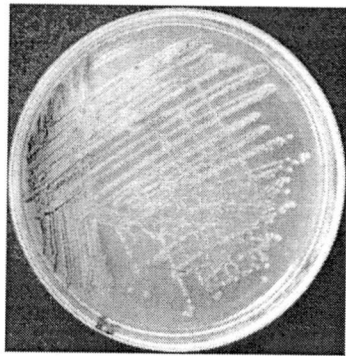
#### 4.2 การศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อแอกติโนมัยสีย

ในจำนวนเชื้อแอกติโนมัยสียทั้งหมด 27 ไอโซเลต เมื่อตรวจสอบลักษณะทางฟีโนไทป์ได้แก่ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี สามารถจัดกลุ่มเชื้อออกเป็น 5 กลุ่มดังนี้

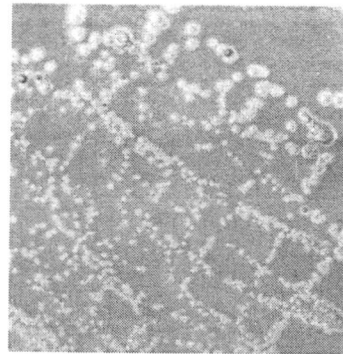
กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มของเชื้อแอกติโนมัยสียที่สร้างเส้นใยอาหารสีน้ำตาลที่บอมเทาอมเหลือง (dark grayish to yellowish brown) ไม่มีการสร้างรงควัตถุ สร้างสปอร์เป็นแบบสปอร์เดี่ยว ประกอบด้วยสมาชิกจำนวน 7 ไอโซเลต ได้แก่ CT1-1, CT1-2, CT1-3, CT1-4, CT1-5, CT1-6, CT1-7

เชื้อกลุ่มนี้สามารถเจริญบนอาหาร yeast extract-malt extract agar (ISP2) ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดได้ที่ร้อยละ 5 เจริญในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่พีเอช 5-9 อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 37 องศาเซลเซียส และสามารถย่อยสลายโปรตีนในนมรวมทั้งเจลาตินได้ สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้ และไม่สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. subtilis*, *M. luteus*, *S. aureus*, *E. coli*, และ *Ps. aeruginosa* ได้

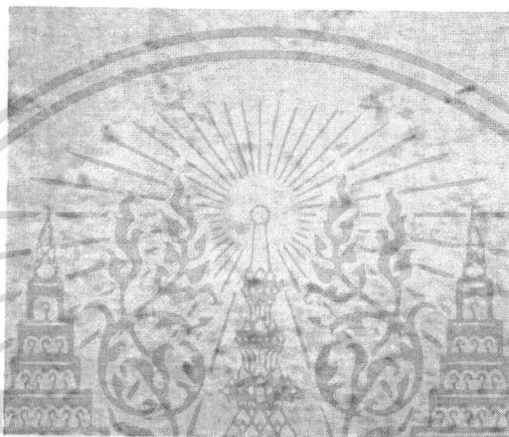
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก)



(ข)



(ค)

รูปที่ 1 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลต CT1-1  
 ก และ ข) ลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลต CT1-1  
 ค) สปอร์ (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

#### ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 1

ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยกรดกลูตามิก อะลานีน และกรดไดอะมิโนพิมิสิกแบบ *meso* (cell wall type II, peptidoglycan type A1γ) พบน้ำตาลกลูโคส ไซโลส อะราบิโนส กาแลคโตส และ ไรโบส (รูปแบบน้ำตาลชนิด D) เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) พบฟอสฟาติลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) ไดฟอสโฟติดิลกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) และฟอสฟาติลอินซิทอล (phosphatidylinositol) เป็นฟอสโฟไลปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ (ฟอสโฟไลปิดชนิดที่ 2) มีร้อยละของปริมาณเบส G+C อยู่ในช่วงร้อยละ 71.8-72.4 ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัตวศาสตร์สามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Micromonospora*

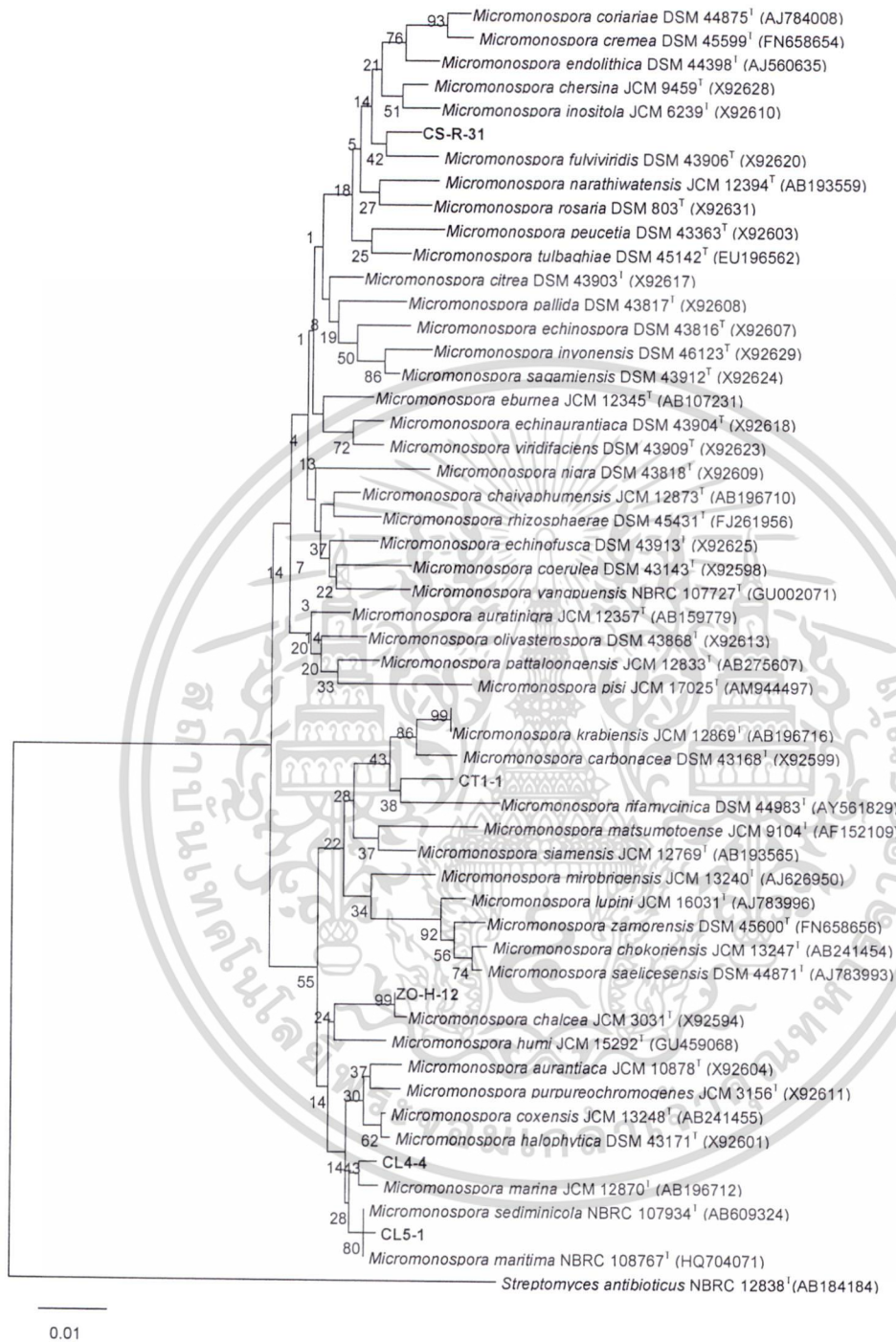
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต CT1-1

เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลต CT1-1 เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Micromonospora carbonacea* DSM 43815<sup>T</sup> มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ร้อยละ 98.27 ที่ระดับความเชื่อมั่นของการทำซ้ำ (bootstap values) บนสายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ร้อยละ 43



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

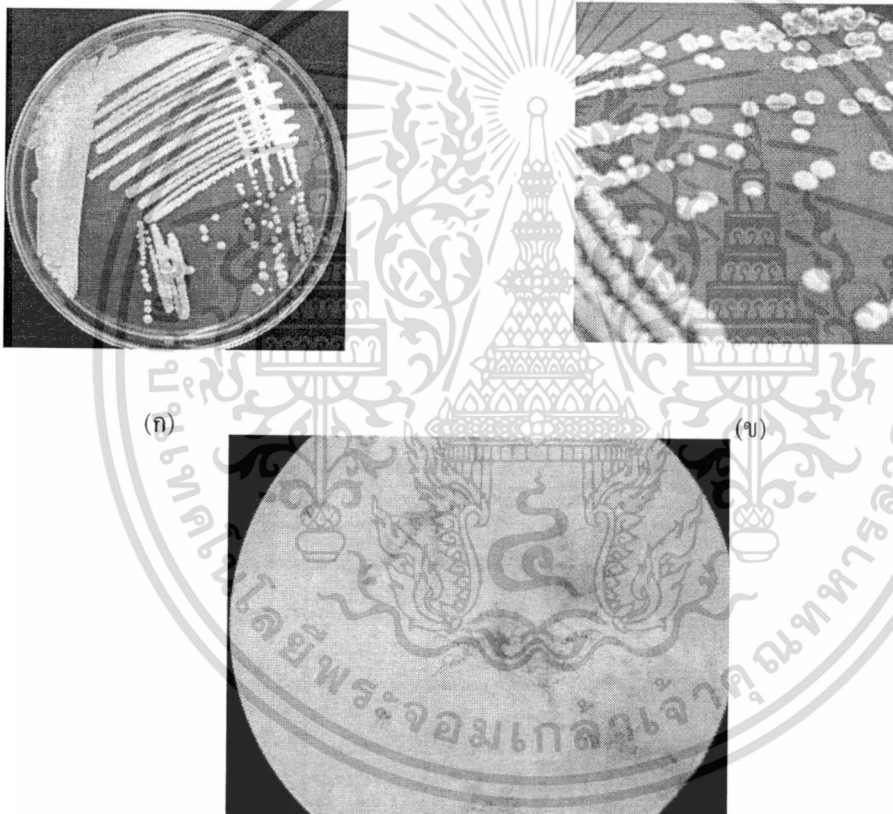


รูปที่ 2 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต CT1-1 บน phylogenetic tree (NJ method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มของเชื้อแอสกีโนมัยซีทส์ที่สร้างเส้นใยอากาศสีน้ำตาลค่อนข้างเข้มอมแดง (strong reddish brown) เส้นใยอาหารสีน้ำตาลกลางอมเหลือง (moderate yellowish brown) มีการสร้างรงควัตถุสีเหลืองสว่าง (brilliant yellow) สร้างสปอร์เป็นแบบสองสปอร์ มีสมาชิกจำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ CT2-1, CT2-2, CT2-3, CT2-4, CT2-5

เชื้อกลุ่มนี้สามารถเจริญบนอาหาร yeast extract-malt extract agar (ISP2) ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดได้ที่ร้อยละ 3 เจริญในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่พีเอช 5-9 อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 40 องศาเซลเซียส และสามารถย่อยสลายโปรตีนในนม เปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ รวมทั้งย่อยสลายเจลาตินและแป้งได้ และเชื้อในกลุ่มนี้ไม่สร้างสารทุติยภูมิที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบได้



(ก)

รูปที่ 3 เชื้อแอสกีโนมัยซีทไอโซเลต CT2-1

ก และ ข) ลักษณะโคโลนีของเชื้อแอสกีโนมัยซีทไอโซเลต CT2-1

ค) สปอร์ (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

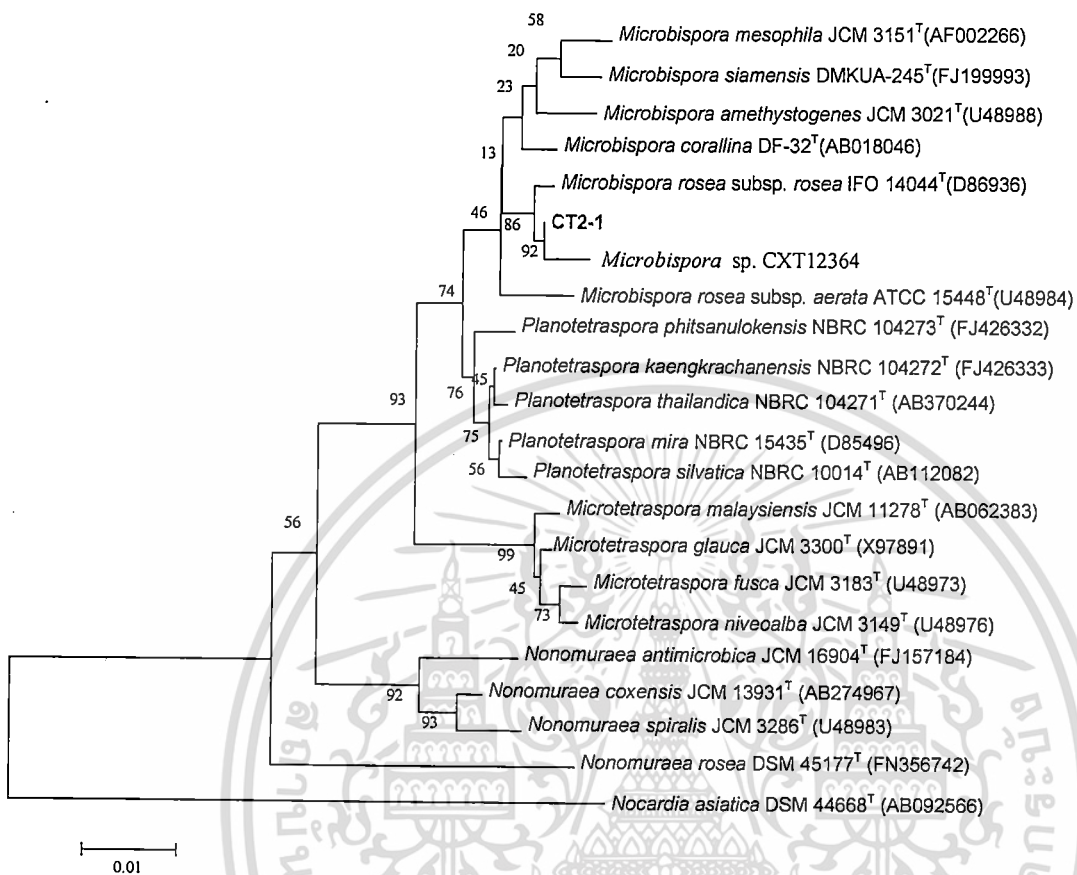
## ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 2

ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยไอโซเมอร์ของกรดไคอะมิ-โนพิเมติกแบบ meso พบน้ำตาลไรโบส แมนโนส ไฮโลส กลูโคส และมาดูโรส (รูปแบบน้ำตาลชนิด B) เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ พบ diphosphatidylglycerol (DPG), phosphatidylethanolamine (PE), acylphosphatidylglycerol (APG) และฟอสโฟลิปิดที่ยังไม่ทราบโครงสร้างที่ประกอบด้วยกลูโคซามีน (GluNu) เป็นฟอสโฟลิปิดในเซลล์ (โพลาริไลปิดชนิดที่ 4) ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่าเชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Microbispora*

## การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต CT2-1

เชื้อแอคติโนมัยซีท ไอโซเลต CT2-1 เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Microbispora rosea* subsp. *rosea* IFO 14044<sup>T</sup> มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ร้อยละ 99.55 ที่ระดับความเชื่อมั่นของการทำซ้ำ (bootstap values) บนสายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ร้อยละ 86

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

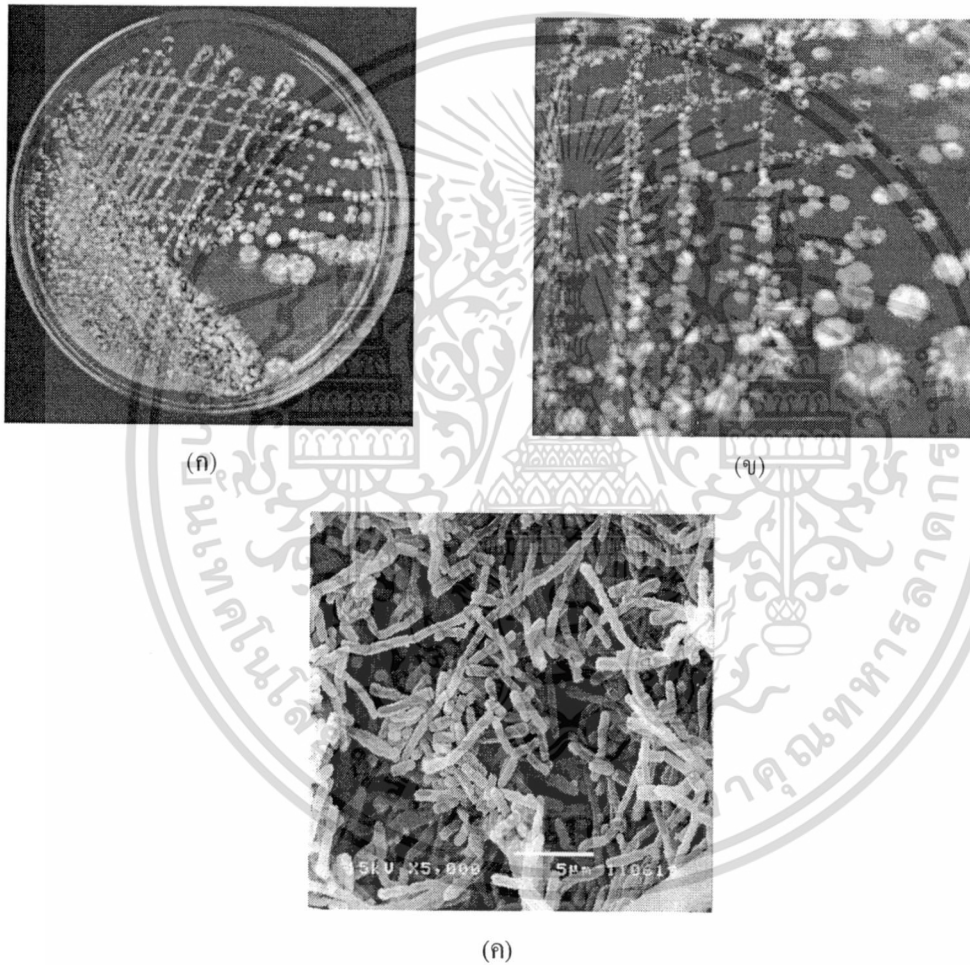


รูปที่ 4 แสดงตำแหน่งของเชื้อ ไอโซเลต CT2-1 บน phylogenetic tree (NJ method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มของเชื้อแอสคิโนมัยซีท์ที่สร้างเส้นใยอากาศสี เหลืองอมเทา (grayish yellow) เส้นใยอาหารสีน้ำตาลสว่างอมเขียวมะกอก (light olive brown) ไม่มีการสร้างรงควัตถุ สร้างสปอร์ เป็นแบบสายยาว มีสมาชิกจำนวน 6 ไอโซเลต ได้แก่ CT3-1, CT3-2, CT3-3, CT3-4, CT3-5, CT3-6

เชื้อกลุ่มนี้สามารถเจริญบนอาหาร yeast extract-malt extract agar (ISP2) ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดได้ที่ร้อยละ 3 เจริญในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่พีเอช 7-9 อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 37 องศาเซลเซียส แสดงความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนในนม แป้ง รวมทั้งเจลาติน แต่ไม่สามารถเปลี่ยนไนโตรเจนเป็นไนไตรท์ได้ และเชื้อในกลุ่มนี้ไม่สร้างสารทุติยภูมิที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้



รูปที่ 5 เชื้อแอสคิโนมัยซีท์ไอโซเลต CT3-1

ก) เส้นใยอากาศและเส้นใยอาหาร ข) สปอร์ (กำลังขยายภาพ 400 เท่า) ค) เส้นใยและสปอร์ที่ถ่ายด้วยกล้อง SEM

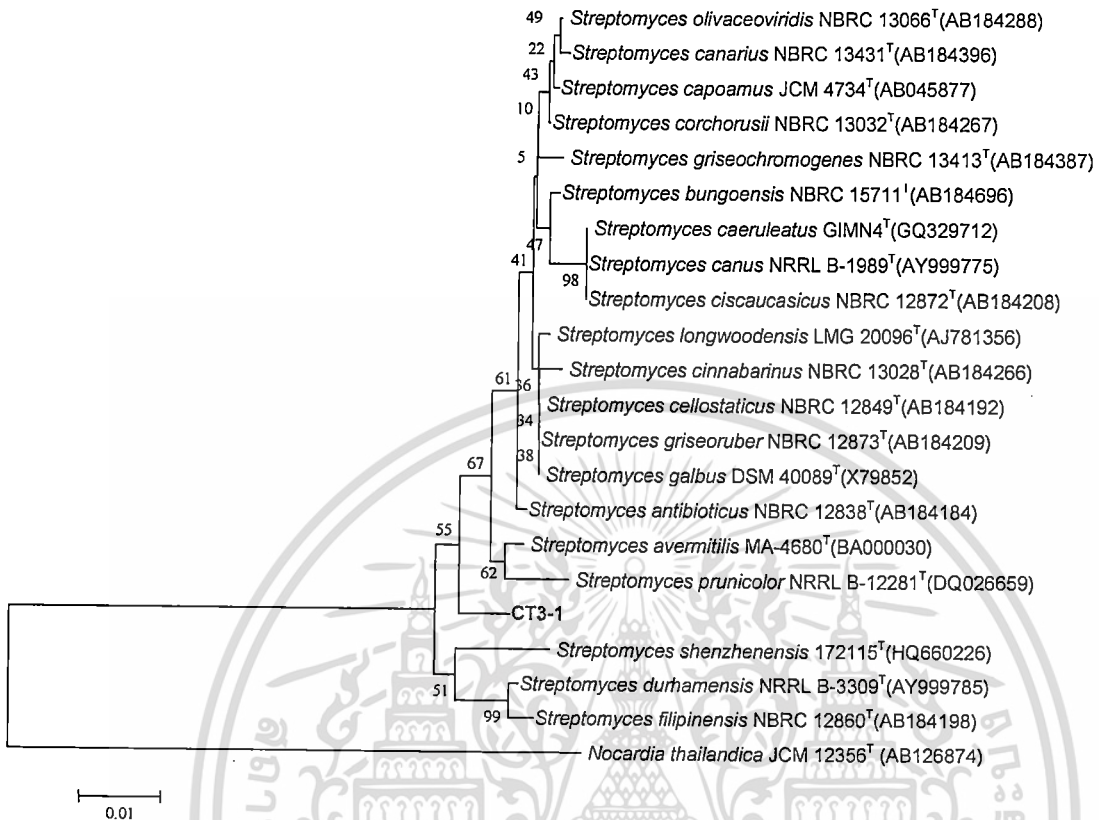
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 3

ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยกรดกลูตามิก อะลานีน และกรดไดอะมิโนพิมิ ลิกแบบ LL (cell wall type 1) พบน้ำตาลกลูโคส ไรโบส อะราบิโนส และกาแลคโตส เป็นน้ำตาล ทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) พบฟอสฟาติลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) ได ฟอสฟาติลกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) ฟอสฟาติลกลีเซอรอล (phosphatidylglycerol) เป็นฟอสโฟไลปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ มีร้อยละของปริมาณเบส G+C อยู่ในช่วงร้อยละ 70.9-71.7 ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ ในสกุล *Streptomyces*

### การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต CT3-1

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต CT3-1 พบว่ามีความ คล้ายคลึงกับ *Streptomyces avermitilis* MA-4680<sup>T</sup> มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอ ไทด์ (% similarity) ร้อยละ 99.02 ที่ระดับความเชื่อมั่นของ การทำซ้ำ (bootstap values) บนสาย วิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ร้อยละ 55

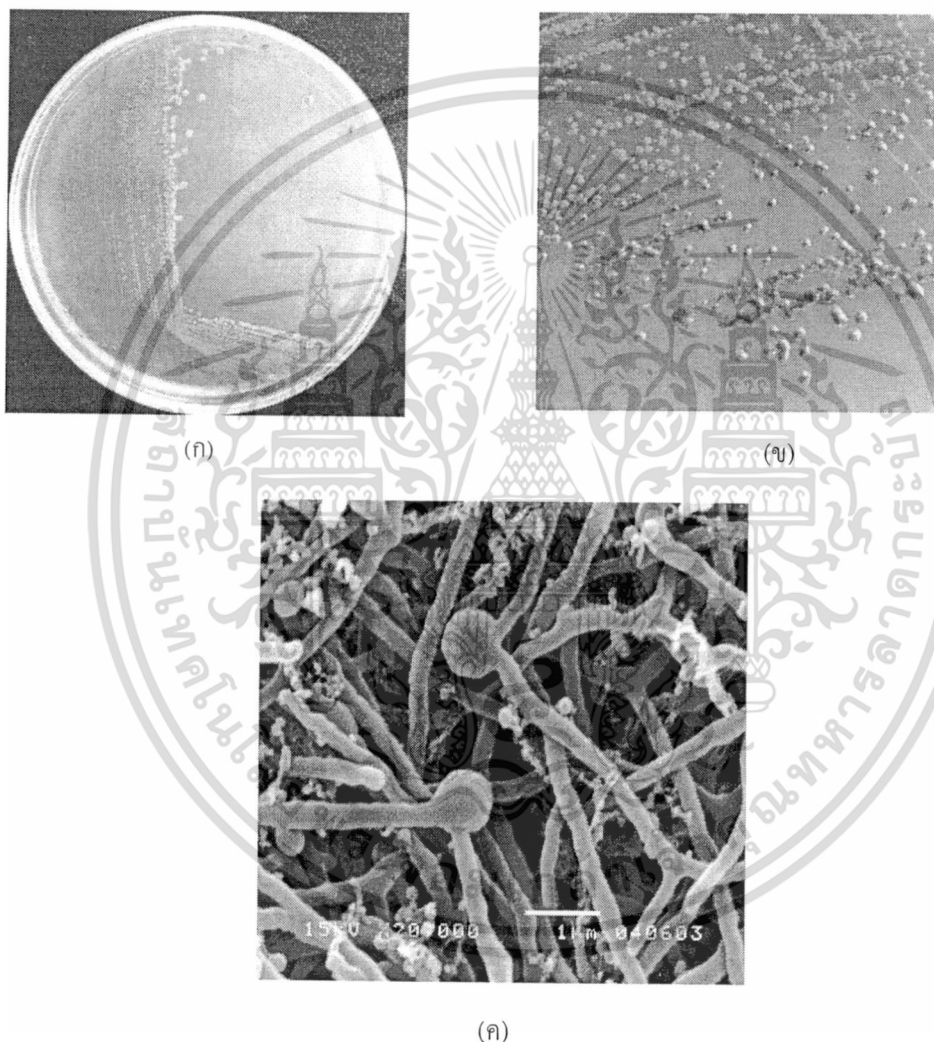


รูปที่ 6 แสดงตำแหน่งของเชื้อ ไอโซเลต CT3-1 บน phylogenetic tree (NJ method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มของเชื้อแอสโคดิโนมัยสีทที่สร้างเส้นใยอาหารสีน้ำตาลอมดำ (dark brown) มีการสร้างรงควัตถุสีน้ำตาลค่อนข้างเข้มอมเหลือง (strong yellowish brown) สร้างสปอร์เป็นแบบสปอร์เดี่ยวมีสมาชิกจำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ CL4-1, CL4-2, CL4-3, CL4-4, CL4-5

สมาชิกในกลุ่มนี้สามารถเจริญบนอาหาร yeast extract-malt extract agar (ISP2) ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดได้ที่ร้อยละ 2 ช่วงความเป็นกรด-ด่างที่ 5-9 อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 37 องศาเซลเซียส และสามารถย่อยสลายโปรตีนในนม คกตะกอน โปรตีนในนม ย่อยสลายแป้งและเจลาติน รวมทั้งสามารถเปลี่ยนไนโตรเจนเป็นไนไตรท์ได้ เชื้อสมาชิกในกลุ่มนี้สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเจริญของเชื้อ *M. luteus* ได้



รูปที่ 7 เชื้อแอสโคดิโนมัยสีทไอโซเลต CT4-4

ก) เส้นใยอาหาร ข) สปอร์ (กำลังขยายภาพ 400 เท่า) ค) เส้นใยและสปอร์ที่ถ่ายด้วยกล้อง SEM

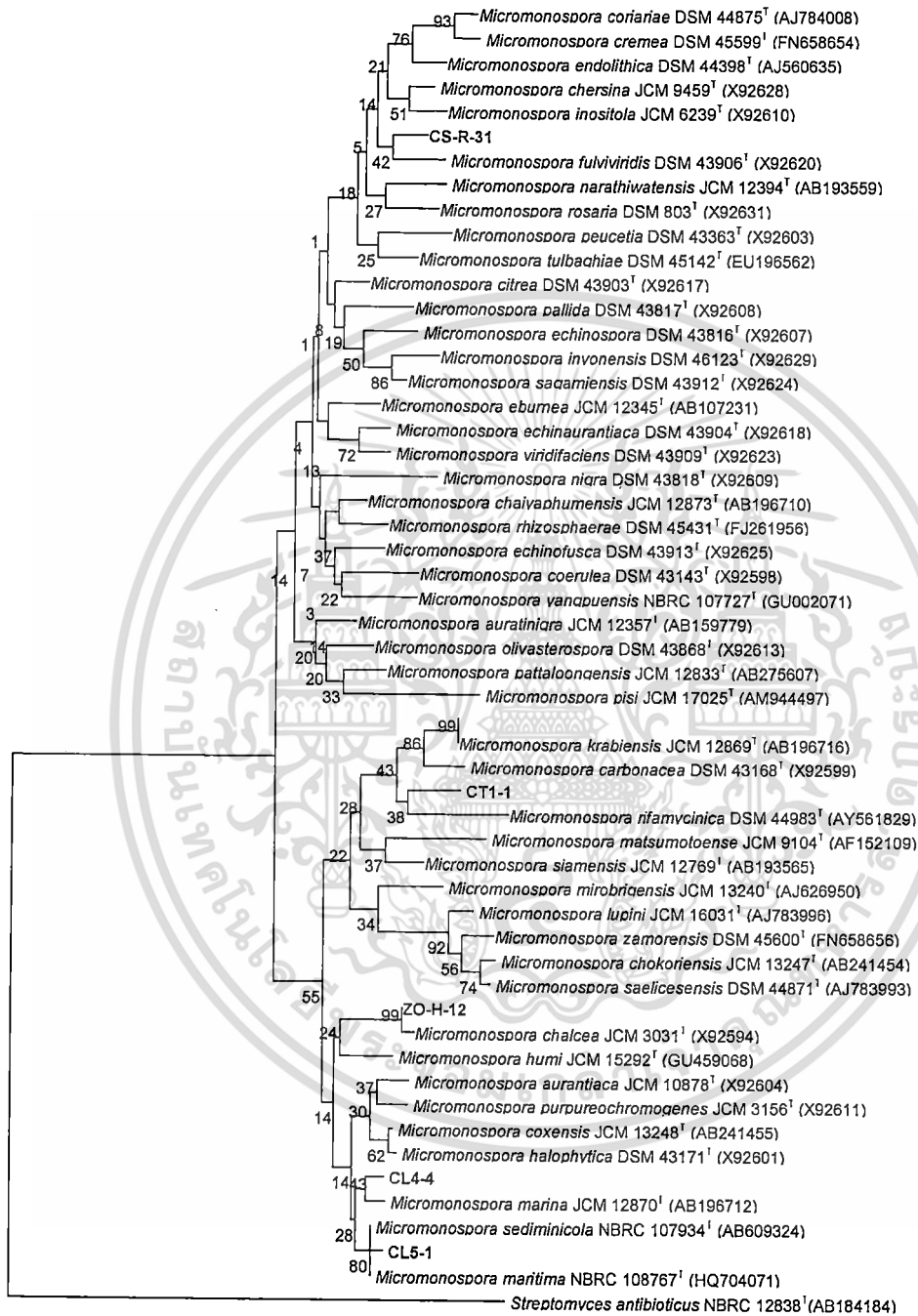
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 4

ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยกรดกลูตามิก อะลานีน และกรดไคอะมิโนพีมิดิกแบบ *meso* (cell wall type II, peptidoglycan type A1 $\gamma$ ) พบน้ำตาลกลูโคส แรมโนส ไฮโลส อะราบิโนส กาแลคโตส และ ไรโบส (รูปแบบน้ำตาลชนิด D) เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) พบฟอสฟาติดีลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) ไดฟอสโฟติดิกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) และฟอสฟาติดีลอินซิทอล (phosphatidylinositol) เป็นฟอสโฟไลปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ (ฟอสโฟไลปิดชนิดที่ 2) มีร้อยละของปริมาณเบส G+C อยู่ในช่วงร้อยละ 70.8-71.4 ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Micromonospora*

#### การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต CT4-4

ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต CT4-4 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Micromonospora marina* JSM1-1<sup>T</sup> มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ร้อยละ 99.8 ที่ระดับความเชื่อมั่นของการทำซ้ำ (bootstrap values) บนสายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ร้อยละ 43 ผลของ DNA-DNA hybridization ระหว่างไอโซเลต CT4-4 และเชื้อ type strain ของสกุล *Micromonospora* ที่อยู่ใกล้ที่สุดบน phylogenetic tree มีค่าเท่ากับ 82.1 %



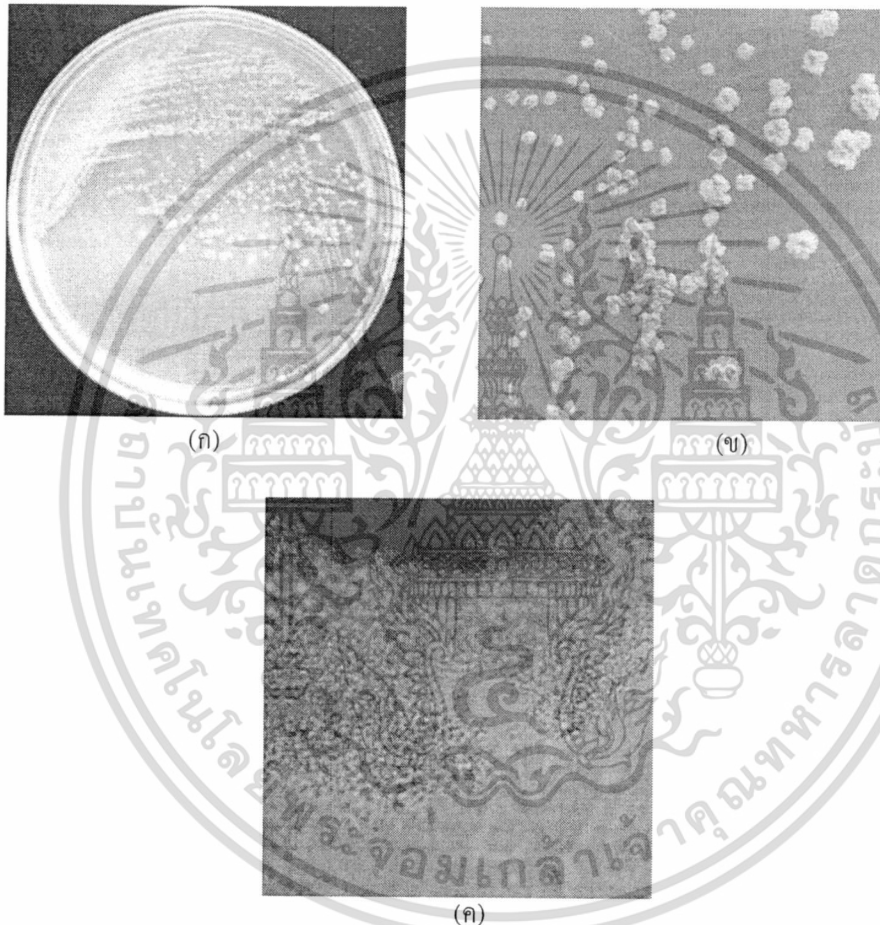
0.01

รูปที่ 8 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต CL4-4 บน phylogenetic tree (NJ method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 5 เป็นเชื้อแอคติโนมัยซีทที่เจริญได้ดี yeast extract-malt extract agar (ISP2) สามารถสร้างเส้นใยอาหารสีน้ำตาลที่บอมเทาอมแดง (dark grayish reddish brown) ไม่มีการสร้างรงควัตถุสร้างสปอร์เป็นแบบสปอร์เดี่ยว มีสมาชิก 4 ไอโซเลต ได้แก่ CL5-1, CL5-2, CL5-3, CL5-4

สมาชิกในกลุ่มนี้สามารถเจริญบนอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงสุดได้ที่ร้อยละ 4 ช่วงความเป็นกรด-ด่างที่ 5-8 อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 40 องศาเซลเซียส ไม่สามารถย่อยสลายโปรตีนในนม ตกตะกอนโปรตีนในนม ย่อยสลายแป้ง แต่สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ แต่สามารถย่อยสลายเจลาตินได้ เชื้อสมาชิกในกลุ่มนี้ไม่สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ในการด้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้



รูปที่ 9 เชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลต CL5-1

ก และ ข) ลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลต CL5-1

ค) สปอร์ (กำลังขยายภาพ 400 เท่า)

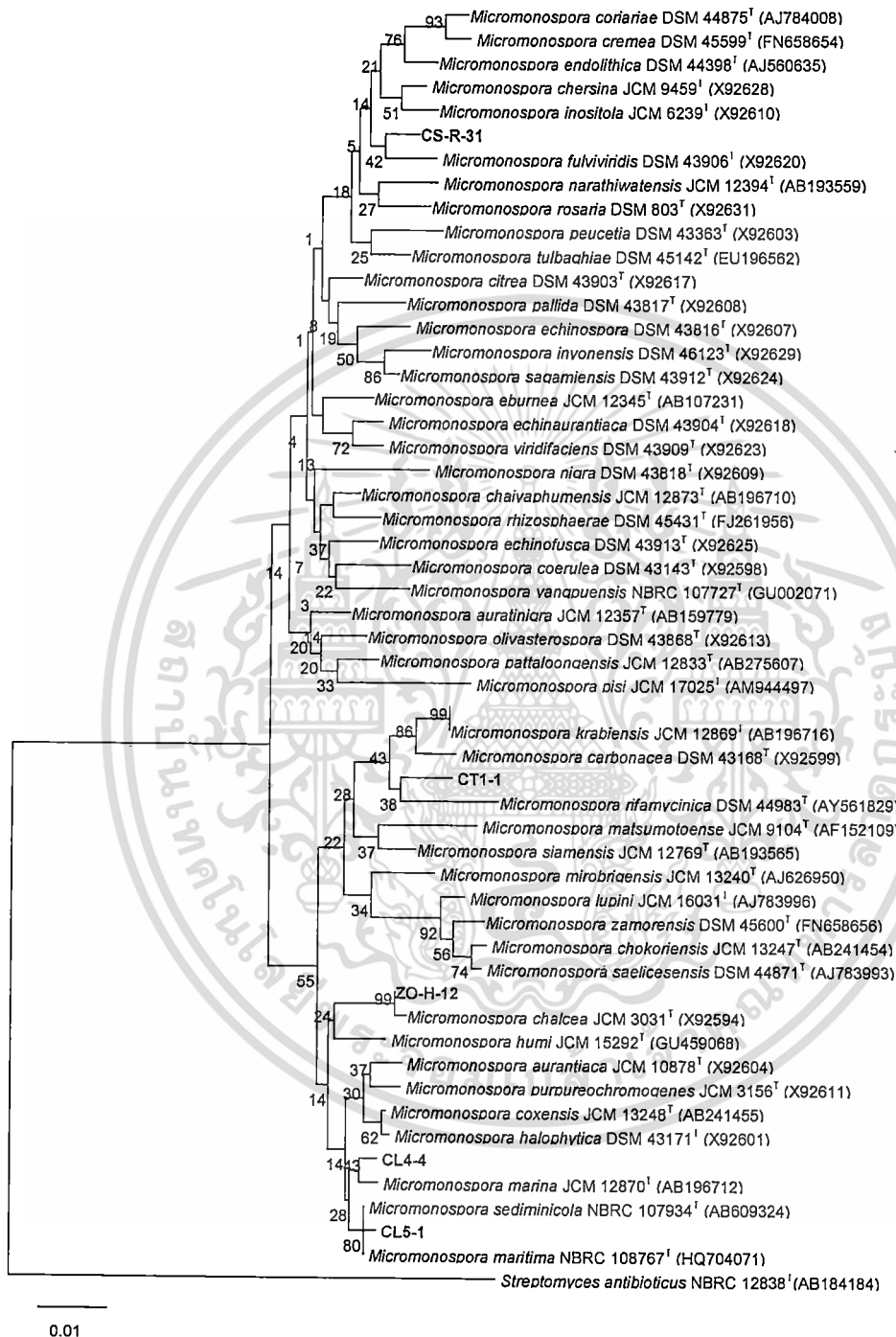
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีของเชื้อตัวแทนในกลุ่มที่ 5

ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ประกอบด้วยกรดกลูตามิก อะลานีน และกรดโคอะมิโนพีมิลิกแบบ meso (cell wall type II, peptidoglycan type A1 $\gamma$ ) พบน้ำตาลกลูโคส แรมโนส ไซโลส และ ไรโบส (รูปแบบน้ำตาลชนิด D) เป็นน้ำตาลทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell sugar) พบฟอสฟาติลเอทานอลามีน (phosphatidylethanolamine) ไดฟอสโฟติดิลกลีเซอรอล (diphosphatidylglycerol) และฟอสฟาติลอินซิทอล (phosphatidylinositol) เป็นฟอสโฟไลปิดเอกลักษณ์ในเซลล์ (ฟอสโฟไลปิดชนิดที่ 2) มีร้อยละของปริมาณเบส G+C อยู่ในช่วงร้อยละ 72.8-73.5 ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อกลุ่มนี้อยู่ในสกุล *Micromonospora*

### การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต CL5-1

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนช่วง 16S rRNA gene ของเชื้อไอโซเลต CL5-1 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Micromonospora coxensis* 2-30-b/28<sup>T</sup> มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ร้อยละ 99.77 ที่ระดับความเชื่อมั่นของการทำซ้ำ (bootstap values) บนสายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ร้อยละ 80



0.01

รูปที่ 10 แสดงตำแหน่งของเชื้อไอโซเลต CL5-1 บน phylogenetic tree (NJ method)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 ลักษณะการเจริญ และสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีทบนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ

รหัสเชื้อ ตัวแทน กลุ่ม	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
I/CT1-1	Y.M.	ดี	-	น้ำตาลอมเทา	-
	O.M.	ดี	-	น้ำตาลอมเทา	-
	I.S.	ปานกลาง	-	น้ำตาลอมเทา	-
	T.A.	น้อย	-	น้ำตาลอมเทา	-
	Gly.A.	น้อย	-	น้ำตาลอมเทา	-
	Glu.A.	ดี	-	น้ำตาลอมเทา	-
	Cz.sucrose	ดี	-	น้ำตาลอมเทา	-
	N.A.	ปานกลาง	-	น้ำตาลอมเทา	-
	P.I.A.	ดีมาก	-	น้ำตาลอมเทา	-
II/CT2-1	Y.M.	ดี	น้ำตาลแดง	น้ำตาลเหลือง	-
	O.M.	ดี	น้ำตาลแดง	น้ำตาลเหลือง	-
	I.S.	ปานกลาง	น้ำตาลแดง	น้ำตาลเหลือง	-
	T.A.	น้อย	น้ำตาลแดง	น้ำตาลเหลือง	-
	Gly.A.	น้อย	น้ำตาลแดง	น้ำตาลเหลือง	-
	Glu.A.	ดี	น้ำตาลแดง	น้ำตาลเหลือง	-
	Cz.sucrose	ดี	น้ำตาลแดง	น้ำตาลเหลือง	-
	N.A.	ปานกลาง	น้ำตาลแดง	น้ำตาลเหลือง	-
	P.I.A.	ดี	น้ำตาลแดง	น้ำตาลเหลือง	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 ลักษณะการเจริญ และลักษณะวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีทบนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ (ต่อ)

รหัสเชื้อ ตัวแทน กลุ่ม	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
III/CT3-1	Y.M.	ดี	เหลืองเทา	น้ำตาลอมเขียวมะกอก	-
	O.M.	ดี	เหลืองเทา	น้ำตาลอมเขียวมะกอก	-
	I.S.	ปานกลาง	เหลืองเทา	น้ำตาลอมเขียวมะกอก	-
	T.A.	น้อย	เหลืองเทา	น้ำตาลอมเขียวมะกอก	-
	Gly.A.	น้อย	เหลืองเทา	น้ำตาลอมเขียวมะกอก	-
	Glu.A.	ดี	เหลืองเทา	น้ำตาลอมเขียวมะกอก	-
	Cz.sucrose	ดี	เหลืองเทา	น้ำตาลอมเขียวมะกอก	-
	N.A.	ปานกลาง	เหลืองเทา	น้ำตาลอมเขียวมะกอก	-
	P.I.A.	ปานกลาง	เหลืองเทา	น้ำตาลอมเขียวมะกอก	-
IV/CL4-4	Y.M.	ดี	-	น้ำตาลดำ	น้ำตาล
	O.M.	ดี	-	น้ำตาลดำ	น้ำตาล
	I.S.	ปานกลาง	-	น้ำตาลดำ	น้ำตาล
	T.A.	น้อย	-	น้ำตาลดำ	น้ำตาล
	Gly.A.	น้อย	-	น้ำตาลดำ	น้ำตาล
	Glu.A.	ดี	-	น้ำตาลดำ	น้ำตาล
	Cz.sucrose	ดี	-	น้ำตาลดำ	น้ำตาล
	N.A.	ปานกลาง	-	น้ำตาลดำ	น้ำตาล
	P.I.A.	ดี	-	น้ำตาลดำ	น้ำตาล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 ลักษณะการเจริญ และสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยสีทบนอาหาร ISP ชนิดต่างๆ (ต่อ)

รหัสเชื้อ ตัวแทน กลุ่ม	สูตรอาหาร	การเจริญ	สีเส้นใยอากาศ	สีเส้นใยอาหาร	สีรงควัตถุ
V/CL5-1	Y.M.	ดี	-	น้ำตาลส้ม	-
	O.M.	ดี	-	น้ำตาลส้ม	-
	I.S.	ปานกลาง	-	น้ำตาลส้ม	-
	T.A.	น้อย	-	น้ำตาลส้ม	-
	Gly.A.	น้อย	-	น้ำตาลส้ม	-
	Glu.A.	ดี	-	น้ำตาลส้ม	-
	Cz.sucrose	ดี	-	น้ำตาลส้ม	-
	N.A.	ปานกลาง	-	น้ำตาลส้ม	-
	P.I.A.	ปานกลาง	-	น้ำตาลส้ม	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 แสดงลักษณะทางสรีระวิทยา และชีวเคมีของเชื้อแอสคิโนมัยซีทในแต่ละไอโซเลต

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				<i>B.subtilis</i>	<i>M.luteus</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>Pa.aeruginosa</i>	<i>C.albicans</i>
		1	CT1-1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-				+	+	+	+	+	-
	CT1-2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	CT1-3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	CT1-4	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	w	+	+	-	-	-	-	-	-
	CT1-5	+	+	w	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	w	+	+	-	-	-	-	-	-
	CT1-6	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	w	+	-	-	-	+	+	w	+	+	-	-	-	-	-	-
	CT1-7	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	w	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-





ตารางที่ 4 แสดงลักษณะทางสรีระวิทยา และชีวเคมีของเชื้อแอคติโนมัยซีทในแต่ละไอโซเลต(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	<i>B.subtilis</i>	<i>M.luteus</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>Ps.aeruginosa</i>	<i>C.albicans</i>
4	CL4-1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	8.3	-	-	-	-
	CL4-2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	8.7	-	-	-	-
	CL4-3	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	8.5	-	-	-	-
	CL4-4	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	8.7	-	-	-	-
	CL4-5	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	7.6	-	-	-	-



#### 4.3 ผลการทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทเมื่อได้รับสารสกัดจากเชื้อ endophytic actinomycetes

สารสกัดที่แสดงศักยภาพในการทำให้เซลล์ประสาทมีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 100% ได้แก่ CT3-1 (ที่ความเข้มข้น 10 ng/ml), CT1-1 (ที่ความเข้มข้น 10 ng/ml), CT2-1 (ที่ความเข้มข้น 1 ng/ml), CL4-4 (ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml), CL5-1 (ที่ความเข้มข้น 1 ng/ml) และเมื่อพิจารณาความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทพบว่าสารสกัด CT3-1, CT1-1, CT2-1, CL4-4, CL5-1 แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทที่ต่ำ ( $IC_{50} > 10$  µg/ml) ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบ therapeutic index (TI) ระหว่างความเข้มข้นที่สามารถทำให้เซลล์ประสาทมีอัตราการรอดชีวิตได้มากกว่า 100% กับความเข้มข้นที่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทแล้ว จึงเลือกเพียง CT2-1, CL5-1 มาทำการศึกษาความสามารถในการกระตุ้นการงอกของแขนงประสาทที่ความเข้มข้น 1 ng/ml ต่อไป

ตารางที่ 5 แสดงผลการทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทเมื่อได้รับสารสกัดจากเชื้อ endophytic actinomycetes ตัวแทนในกลุ่มต่างๆ

สารสกัด	ความเข้มข้น (ร้อยละการรอดชีวิต $\pm$ SEM)	
	เพิ่มอัตราการรอดชีวิต	ความเป็นพิษ
CT3-1 (กลุ่มที่ 3)	10 ng/ml (119.37 $\pm$ 5.03%)	> 10 µg/ml (91.90 $\pm$ 5.14%)
CT1-1 (กลุ่มที่ 1)	10 ng/ml (119.10 $\pm$ 1.07%)	> 10 µg/ml (103.75 $\pm$ 6.99%)
CT2-1 (กลุ่มที่ 2)	1 ng/ml (122.19 $\pm$ 3.96%)	> 10 µg/ml (87.30 $\pm$ 6.89%)
CL4-4 (กลุ่มที่ 4)	10 µg/ml (129.78 $\pm$ 6.44%)	> 10 µg/ml (129.78 $\pm$ 6.44%)
CL5-1 (กลุ่มที่ 5)	1 ng/ml (109.50 $\pm$ 4.82%)	> 10 µg/ml (74.42 $\pm$ 4.39%)

#### 4.3 ผลการทดสอบ neuritogenic activity ของสารสกัดจากเชื้อ endophytic actinomycetes

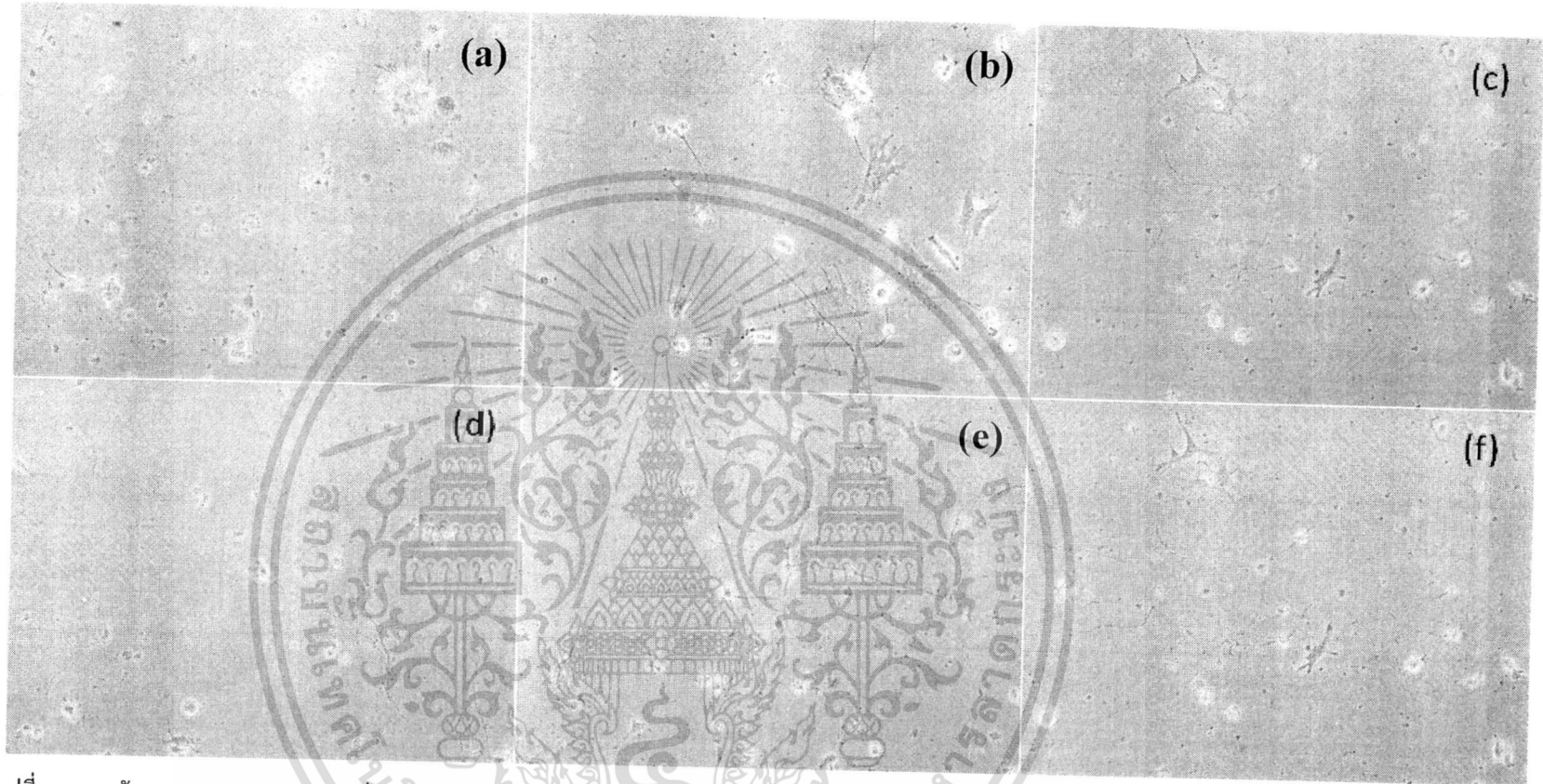
ตารางที่ 6 แสดงผลการทดสอบ neuritogenic activity ของสารสกัดจากเชื้อ endophytic actinomycetes ตัวแทนในกลุ่มต่างๆ

สารสกัด	neuritogenicity	
	ความยาวของแขนงประสาท ( $\mu\text{m}$ ) $\pm$ SEM	จำนวนของแขนงประสาท (เส้น) $\pm$ SEM
CT3-1 (10 ng/ml)	ไม่ทดสอบเพราะฤทธิ์ทางชีวภาพปานกลาง	
CT1-1 (10 ng/ml)	ไม่ทดสอบเพราะฤทธิ์ทางชีวภาพปานกลาง	
CT2-1 (1 ng/ml) <sup>†</sup>	82.60 $\pm$ 8.93*	4.07 $\pm$ 0.28***
CL4-4 (10 $\mu\text{g/ml}$ )	ไม่ทดสอบเพราะฤทธิ์ทางชีวภาพต่ำ	
CL5-1 (1 ng/ml) <sup>†</sup>	85.83 $\pm$ 8.35***	4.07 $\pm$ 0.24***
1 nM geldanamycin	109.33 $\pm$ 9.06***	3.57 $\pm$ 0.34***
0.5%DMSO in $\alpha$ -MEM + 10%FBS	61.43 $\pm$ 6.40	2.00 $\pm$ 0.17
Control ( $\alpha$ -MEM + 10%FBS)	47.89 $\pm$ 4.58	1.80 $\pm$ 0.14

\* $p < 0.05$  เปรียบเทียบกับ control; \*\* $p < 0.05$  เปรียบเทียบกับ 0.5%DMSO in  $\alpha$ -MEM + 10%FBS

<sup>†</sup> จะทำการทดสอบเนื่องจาก TI กว้าง; ใช้ geldanamycin เป็น positive control

จากข้อมูลพบว่า สารสกัด CT2-1, CL5-1 ที่ความเข้มข้น 1 ng/ml มีฤทธิ์กระตุ้นการงอกและเพิ่มจำนวนแขนงประสาท (neuritogenicity) โดยสารสกัดทั้งสองสามารถเพิ่มจำนวนของแขนงประสาทได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และกลุ่มตัวทำลายควบคุม และสามารถทำให้แขนงประสาทยาวมากกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารทดสอบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 11 แสดงลักษณะทางกายภาพของเซลล์ประสาทพิลีนที่เลี้ยงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 100 เท่า) ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในบรรยากาศ 5% CO<sub>2</sub> ที่อุณหภูมิ 37 °C เมื่อทดสอบด้วย (a) ไม่เติมสารทดสอบ [control] (b) 1 ng/mL CL3-1 (c) 1 ng/mL CT2-1 (d) 1 ng/mL CT1-1 (e) 1 ng/mL CL5-1 และ (f) 1 ng/mL CL4-4

#### 4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ neuroprotective activity ของสารสกัดจากเชื้อ endophytic actinomycetes

ตารางที่ 7 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ neuroprotective activity ของสารสกัดจากเชื้อ endophytic actinomycetes ตัวแทนในกลุ่มต่างๆ

สารสกัด	ร้อยละอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาท $\pm$ SEM
CT3-1 (กลุ่มที่ 3) (10 ng/ml)	ไม่ทดสอบเพราะฤทธิ์ทางชีวภาพปานกลาง
CT1-1 (กลุ่มที่ 1) (10 ng/ml)	ไม่ทดสอบเพราะฤทธิ์ทางชีวภาพปานกลาง
CT2-1 (กลุ่มที่ 2) (1 ng/ml)	62.37 $\pm$ 3.16 <sup>*,**</sup>
CL4-4 (กลุ่มที่ 4) (10 $\mu$ g/ml)	ไม่ทดสอบเพราะฤทธิ์ทางชีวภาพต่ำ
CL5-1 (กลุ่มที่ 5) (1 ng/ml)	56.56 $\pm$ 0.59 <sup>*,**</sup>
0.5% DMSO in $\alpha$ -MEM	34.26 $\pm$ 4.63 <sup>*</sup>
$\alpha$ -MEM	40.14 $\pm$ 3.75 <sup>*</sup>
0.5%DMSO in $\alpha$ -MEM + 10%FBS	101.73 $\pm$ 1.45 <sup>*</sup>
Control ( $\alpha$ -MEM + 10%FBS)	100.00 $\pm$ 0.00

จากข้อมูลสรุปได้ว่าสารสกัด CT2-1, CL5-1 ที่ความเข้มข้น 1 ng/ml มีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท (neuroprotective) โดยสารสกัดทุกชนิดสามารถป้องกันเซลล์ประสาทไม่ให้ตายจากการเกิดสภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) จากการเพาะเลี้ยงในสภาวะไม่มีซีรัม (serum deprivation) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมซีรัม และกลุ่มควบคุมที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมซีรัม และจากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสามารถยืนยันได้ว่ากลไกการเกิดฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัดทั้งหมดนี้ ไม่ได้เกิดมาจากฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด

#### 4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidation) ของสารสกัดจากเชื้อ endophytic actinomycetes

ตารางที่ 8 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidation) ของสารสกัดจากเชื้อ endophytic actinomycetes ตัวแทนในกลุ่มต่างๆ

สารสกัด	% Inhibition at 50 $\mu$ g/ml $\pm$ SD	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/ml)
CT3-1 (กลุ่มที่ 3)	7.51 $\pm$ 0.64	มากกว่า 50 $\mu$ g/ml
CT1-1 (กลุ่มที่ 1)	8.62 $\pm$ 1.09	มากกว่า 50 $\mu$ g/ml
CT2-1 (กลุ่มที่ 2)	17.32 $\pm$ 1.42	มากกว่า 50 $\mu$ g/ml
CL4-4 (กลุ่มที่ 4)	10.20 $\pm$ 3.69	มากกว่า 50 $\mu$ g/ml
CL5-1 (กลุ่มที่ 5)	16.28 $\pm$ 1.28	มากกว่า 50 $\mu$ g/ml
500 $\mu$ g/ml gallic acid	92.87 $\pm$ 0.11	ไม่ได้ทำการทดสอบ

จากข้อมูลสรุปได้ว่าสารสกัดของเชื้อตัวแทนทุกกลุ่มแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้น้อยมากเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน gallic acid จากข้อมูลพบว่าสารสกัดของเชื้อตัวแทนกลุ่มที่ 2 (CT2-1) นั้นแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด ตามด้วยสารสกัดของเชื้อตัวแทนกลุ่มที่ 5 (CL5-1) กลุ่มที่ 4 (CL4-4) กลุ่มที่ 1 (CT1-1) และกลุ่มที่ 3 (CT3-1) ตามลำดับ ดังนั้นแสดงว่าฤทธิ์การกระตุ้นการแตกแขนงและฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัดทั้งหมดนี้ ไม่ได้เกิดจากกลไกทางด้านการต้านอนุมูลอิสระแต่อย่างใด

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การคัดแยกเชื้อแอสโคไมซีตจากตัวอย่างดินอัญชันและขมิ้น สามารถทำการแยกเชื้อแอสโคไมซีตได้ทั้งหมด 27 ไอโซเลต และได้ทำการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อพบว่า เชื้อแอสโคไมซีตที่แยกได้นั้นสามารถเจริญได้ดีในอาหาร yeast extract malt extract agar และสร้างเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) ในโทนีสีเทา และขาวอมน้ำตาล สร้างเส้นใยอาหาร (substrate mycelium) ในโทนีสีส้ม เหลือง และน้ำตาล ลักษณะของสปอร์ที่ดูจากกล้องจุลทรรศน์ด้วยกำลังขยายของภาพ 1,000 เท่า มีลักษณะขดเป็นตรงเป็นส่วนใหญ่ บางชนิดเป็นสปอร์เดี่ยว ซึ่งลักษณะดังกล่าวสามารถจัดกลุ่มเชื้อแอสโคไมซีตออกเป็น 5 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มของเชื้อแอสโคไมซีตที่สร้างเส้นใยอาหารสีน้ำตาลที่บอมเทาอมเหลือง ไม่มีการสร้างรงควัตถุ สร้างสปอร์เป็นแบบสปอร์เดี่ยว พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Micromonospora carbonacea* DSM 43815<sup>T</sup> มากที่สุด ด้วยระดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ (% similarity) ร้อยละ 98.27

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มของเชื้อแอสโคไมซีตที่สร้างเส้นใยอากาศสีน้ำตาลค่อนข้างเข้มอมแดง เส้นใยอาหารสีน้ำตาลกลางอมเหลือง มีการสร้างรงควัตถุสีเหลืองสว่าง สร้างสปอร์เป็นแบบสองสปอร์ พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Microbispora rosea* subsp. *rosea* IFO 14044<sup>T</sup> มากที่สุด ด้วยระดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ ร้อยละ 99.55

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มของเชื้อแอสโคไมซีตที่สร้างเส้นใยอากาศสี เหลืองอมเทา เส้นใยอาหารสีน้ำตาลสว่างอมเขียวมะกอก ไม่มีการสร้างรงควัตถุ สร้างสปอร์เป็นแบบสายยาวพบว่ามี ความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces avermitilis* MA-4680<sup>T</sup> มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ ร้อยละ 99.02

กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มของเชื้อแอสโคไมซีตที่สร้างเส้นใยอาหารสีน้ำตาลอมดำ มีการสร้างรงควัตถุสีน้ำตาลค่อนข้างเข้มอมเหลือง สร้างสปอร์เป็นแบบสปอร์เดี่ยวพบว่ามี ความคล้ายคลึงกับ *Micromonospora marina* JSM1-1<sup>T</sup> มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ ร้อยละ 99.8

กลุ่มที่ 5 เป็นเชื้อแอสโคไมซีตที่เจริญได้ดีในอาหาร yeast extract-malt extract agar (ISP2) สามารถสร้างเส้นใยอาหารสีน้ำตาลที่บอมเทาอมแดง ไม่มีการสร้างรงควัตถุ สร้างสปอร์เป็นแบบสปอร์

เดี่ยพบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Micromonospora coxensis* 2-30-b/28<sup>T</sup> มากที่สุด ด้วยลำดับความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์ ร้อยละ 99.77

ในการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบจากเชื้อแอคติโนมัยซีทพบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทในกลุ่มที่ 4 เท่านั้นที่สามารถสร้างสารทุติยภูมิในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้

สำหรับฤทธิ์การกระตุ้นการแตกแขนงและการปกป้องของระบบประสาท พบว่า สารสกัดหยาบของเชื้อแอคติโนมัยซีททุกกลุ่มสามารถแสดงฤทธิ์ดังกล่าวได้ โดยเฉพาะเชื้อในกลุ่มที่ 2 (CT2-1) และ กลุ่มที่ 5 (CT5-1) ที่สามารถแสดงฤทธิ์ดังกล่าวได้ในระดับความเข้มข้นต่ำ (1 ng/ml) จากข้อมูลฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ต่ำ แสดงว่าฤทธิ์การกระตุ้นการแตกแขนงและฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัดทั้งหมดนี้ ไม่ได้เกิดจากกลไกทางด้านการต้านอนุมูลอิสระแต่อย่างใด

จากงานวิจัยนี้ทำให้เห็นความสำคัญของเชื้อแอคติโนมัยซีทจากเนื้อเยื่อต้นอัญชันและขมิ้น ถือเป็นทรัพยากรที่สำคัญและสามารถนำไปพัฒนาและประยุกต์ใช้เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ยาได้ต่อไปในอนาคต

#### ข้อเสนอแนะ

จากการวิจัยครั้งนี้สามารถค้นพบเชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีความสามารถกระตุ้นการแตกแขนงและปกป้องเซลล์ประสาทได้เป็นอย่างดี จึงควรมีการวิจัยต่อเพื่อทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อเหล่านี้ถึงระดับสกุลและสปีชีส์ ตลอดจนควรพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารบริสุทธิ์ด้วย

## เอกสารอ้างอิง

## เอกสารอ้างอิง

Barbara, S., Christine, B., Siegfried, D., Anne-Kartrin, R. 2002. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycol. Res.* 106, 996-1004.

Duangmal, K., Mingma, R., Pathom-aree, W., Thamchaipenet, A., Inahashi, Y., Matsumoto, A. and Takahashi, Y. 2011. *Amycolatopsis samanae* sp. nov., isolated from roots of *Samanea saman* (Jacq.) Merr. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 951-955.

Duangmal, K., Thamchaipenet, A., Ara, I., Matsumoto, A. and Takahashi, Y. 2008. *Kineococcus gymurae* sp. nov., isolated from a Thai medicinal plant. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 2493-2442.

Igarashi, Y., Trujillo, M. E., Molina, E. M., Yanase, S., Miyanaga, S., Obata, T., Sakurai, H., Saiki, I., Fujita, T. and Furumaia, T. 2007. Antitumor anthraquinones from an endophytic actinomycete *Micromonospora lupini* sp. nov. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17, 3702-3705.

Inahashi, Y., Matsumoto, A., Ōmura, S. and Takahashi, Y. 2011. *Streptosporangium oxazolinicum* sp. nov., a novel endophytic actinomycete producing new antitrypanosomal antibiotics, spoxazomicins. *J. antibiot.* 64, 297-302.

Indananda, C., Matsumoto, A., Inahashi, Y., Takahashi, Y., Duangmal, K. and Thamchaipenet, A. 2010. *Actinophytocola oryzae* gen. nov., sp. nov., isolated from the roots of Thai glutinous rice plants, a new member of the family *Pseudonocardiaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 1141-1146.

Indananda, C., Thamchaipenet, A., Matsumoto, A., Inahashi, Y., Duangmal, K. and Takahashi, Y. 2011. *Actinoallomurus oryzae* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from roots of a Thai jasmine rice plant. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 61, 737-741.

Kaewkla, O. and Franco, C. M. M. 2010. *Pseudonocardia adelaidensis* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from the surface-sterilized stem of a grey box tree (*Eucalyptus microcarpa*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 105-109.

Kim, D.S., Park, S.Y., and Kim, J.Y. 2001. Curcuminoids from *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae) that protect PC12 rat pheochromocytoma and normal human umbilical vein endothelial cells from  $\gamma$ A (1-42) insult. *Neurosci. Lett.* 303: 57-61.

Kirby, B. M. and Meyers, P. R.. 2010. *Micromonospora tulbaghia* sp. nov., isolated from the leaves of wild garlic, *Tulbaghia violacea*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 1328-1333.

- Li, J., Zhao, G. Z., Chena, H. H., Qin, S., Xu, L. H., Jiang, C. L. and Li, W. J. 2008. *Rhodococcus cercidiphylli* sp. nov., a new endophytic actinobacterium isolated from a *Cercidiphyllum japonicum* leaf. *Syst Appl Microbiol.* 31, 108–113.
- Lin, L., Lesnick, T.G., Maraganore, D.M., and Isacson, O. 2009. Axon guidance and synaptic maintenance: preclinical markers for neurodegenerative disease and therapeutics. *Trends Neurosci.* 32(3): 142-149.
- Liu, N., Wang, H., Liu, M., Gu, Q., Zheng, W., and Huang, Y. 2009. *Streptomyces alni* sp. nov., a daidzein-producing endophyte isolated from a root of *Alnus nepalensis* D. Don. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 254-258.
- Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Lee, J-S. Senthilkumar, M., Lee, K. C. and Sundaram, S. 2010. *Leifsonia soli* sp. nov., a yellow-pigmented actinobacterium isolated from teak rhizosphere soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 1322-1327.
- Mak, N.K., Li, W.K., Zhang, M., Wong, R.N.S., Tai, L.S., Yung, K.K.L., and Leung, H.W. 2000. Effect of euxanthone on neuronal differentiation. *Life Sci.* 66(4): 347-354.
- Qin, S., Li, J., Zhao, G. Z. Chen, H. H., Xu, L. H. and Li, W. J. 2008. *Saccharopolyspora endophytica* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the root of *Maytenus austroyunnanensis*. *Syst Appl Microbiol.* 31, 352-357.
- Song, G. C., Yasir, M., Bibi, F., Chung, E. J., Jeon, C. O. and Chung, Y. R. 2011. *Nocardioideis caricicola* sp. nov., an endophytic bacterium isolated from a halophyte, *Carex scabrifolia* Steud. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 105-109.
- Tadtong, S., Meksuriyen, D., Tanasupawat, S., Isobe, M., and Suwanborirux, K. 2007. Geldanamycin Derivatives and Neuroprotective Effect on Cultured P19-derived Neurons. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17(10): 2939-2943.
- Thamchaipenet, A., Indananda, C., Bunyoo, C., Duangmal, K., Matsumoto, A. and Takahashi, Y. 2010. *Actinoallomurus acaciae* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from *Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 60, 554–559
- Wang, Z.J., Nie, B.M., Chen, H.Z., and Lu, Y. 2006. Panaxynol induces neurite outgrowth in PC12D cells via cAMP- and MAP kinase-dependent mechanisms. *Chem. Biol. Interact.* 159:58-64.
- Yang, Y.J., Lee, H.J., Choi, D.H., Huang, H.S., Lim, S.C., and Lee, M.K. 2008. Effect of scoparone on neurite outgrowth in PC12 cells. *Neurosci. Lett.* 440: 14-18.
- Zhang, W.K., Xu, J.K., Zhang, X.Q., Yao, X.S., and Ye, W.C. 2007. Sphingolipids with neurotogenic activity from *Euphorbia sororia*. *Chem. Phys. Lipids* 148: 77-83.