จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย
เรื่อง

การศึกษาสารปฏิชีวนะของเชื้อ *Micromonospora*

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดย

สุรัตนา อำนวยผล
ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ
สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์

พฤษภาคม 2543

จท
ภ 15
010243

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

การศึกษาสารปฏิชีวนะของเชื้อ *Micromonospora*

โดย

สุรัตนา อำนวยผล

ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ

สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พฤษภาคม 2543

E 6 Sn. 243

I19111526

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้การสนับสนุนโครงการวิจัยนี้ โดยอนุมัติเงินทุนวิจัย กองทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช ประจำปีงบประมาณ 2542 เป็นเงินจำนวนทั้งสิ้น 224,000 บาท (สองแสนสองหมื่นสี่พันบาทถ้วน)

ผู้วิจัยขอขอบคุณ อาจารย์ ดร. คณิต สุวรรณบริรักษ์ ที่ให้ความช่วยเหลือในการตรวจสอบข้อมูลทาง spectroscopy

ผู้วิจัยขอขอบคุณ นางสาว สุชาดา สุนทรธัชเวช ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำข้อมูล NMR spectrum สารทั้งสี่ที่แยกได้

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ศูนย์เครื่องมือวิจัยทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือในการ ทำข้อมูล IR และ NMR spectrum

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการวิจัย	การศึกษาสารปฏิชีวนะจากเชื้อ *Micromonospora*
ชื่อผู้วิจัย	รศ. สุรัตนา อำนวยผล รศ. ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ
	รศ. ดร. สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์,
เดือนและปีที่ทำการวิจัยเสร็จ	พฤษภาคม 2543

บทคัดย่อ

จากการเก็บตัวอย่างดินจากหลายบริเวณจำนวน 25 ตัวอย่าง พบว่า แยกเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีชื้น สีคล้ำได้ 38 สายพันธุ์ นำเชื้อที่แยกได้มาทดสอบความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะด้วยวิธี agar disc diffusion พบว่าเชื้อทั้ง 38 สายพันธุ์มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก คือ *S. aureus* ATCC 25923 และ *B. subtilis* ATCC 6633 แต่มีผลเพียงเล็กน้อยในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ คือ *E. coli* ATCC 25922 จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าเชื้อทั้งหมด จัดอยู่ในสกุล *Micromonospora* นำเชื้อคัดเลือกที่ให้ผลดีต่อการยับยั้งเชื้อทดสอบ ได้แก่ สายพันธุ์ JSM 5-1, JSM 1-3 และ A-25 มาศึกษาการสร้างสารปฏิชีวนะในอาหารเหลวชนิดต่างๆ พบว่าการเลี้ยงในอาหาร Glucose Soybean (GS) Medium ที่มี pH 7.0 ณ อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส จะให้ผลในการสร้างสารปฏิชีวนะได้สูงสุด

จากการนำเชื้อ *Micromonospora* sp. JSM5-1 มาเลี้ยงในอาหาร GS medium ตามสภาวะที่เหมาะสมข้างต้น นำน้ำหมักมาสกัดด้วยตัวทำละลายหลายชนิด พบว่า สารสกัดด้วย ethyl acetate (F-001) มีฤทธิ์ดีที่สุด นำมาแยกด้วยวิธี column chromatography แยกได้สารบริสุทธิ์ 4 ชนิด เป็นสาร isoflavone 2 ชนิด คือ genistein และ daidzein ส่วนสารอีก 2 ชนิด คือ thymine และ uracil สารทั้งสี่ออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้น้อย ดังนั้น จึงได้นำเชื้อมาเลี้ยงในอาหาร Glycerol Peptone (GP) Medium มาใช้หมักเชื้อ JSM5-1 นำน้ำหมักของเชื้อ JSM5-1 มาสกัดด้วย ethyl acetate ได้สารสกัด M-001 และนำมาแยกได้ fraction M-004, M-005, M-010 และ M-011 ซึ่งออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้ดี

Project Title Study on Antibiotics from *Micromonospora*

Name of the Investigators Associate Professor Surattana Amnuoypol

Associate Professor Chaiyo Chaichantipyuth

Associate Professor Dr. Somboon Tanasupawat

Year May, 2000

Abstract

Twenty-five soil samples were collected from various areas and thirty-eight strains of dark hue and moist colonies were isolated. A screening for antibiotic-producing strains was carried out by agar disc diffusion method. All strains exhibited antimicrobial activities against gram-positive bacteria, *S. aureus* ATCC 25923 and *B. subtilis* ATCC 6633 but little or not inhibited gram-negtive bacteria, *E. coli* ATCC 25922. From morphological, cultural, physiological and biochemical characteristics studied , they were identified as *Micromonospora* sp.. The strains JSM 5-1, JSM 1-3 and A-25 which gave high antibiotic activity against test organisms were selected for further study in antibiotic production in various liquid media. Fermentation for antibiotic production in Glucose Soybean (GS) Medium, pH 7.0, at temperature 28°C was the optimum condition.

Micromonospora sp. JSM5-1 was fermented in GS medium in optimum condition mentioned above and the fermentation broth was extracted with several solvents. The ethyl acetate extract (F-001) with high activity, was isolated by column chromatography to yield four compounds, two were identified as isoflavones, genistein and daidzein, others were thymine and uracil. All the isolated compounds have low activities against test organisms. Then the other medium, Glycerol Peptone (GP) was selected for the fermentation. The fermentation broth of JSM5-1 was extracted with ethyl acetate to contain M-001. By means of column chromatography, four high antibacterial fractions, M-004, M-005, M-010 and M-011, were isolated.

สารบัญ

		หน้า
กิตติกรรมประกาศ		ii
บทคัดย่อภาษาไทย		iii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		iv
สารบัญ		v
รายการตาราง		vii
รายการรูปประกอบ		ix
รายการแผนภูมิประกอบ		xi
รายการสัญลักษณ์และคำย่อ		xii
บทที่ 1	บทนำ	1
บทที่ 2	การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
	สารปฏิชีวนะจากเชื้อ *Micromonospora*	3
	เชื้อแบคทีเรียสกุล *Micromonospora*	3
	การหมักสารปฏิชีวนะโดยเชื้อ *Micromonospora*	3
	การสกัดและแยกสารของเชื้อ *Micromonospora*	4
บทที่ 3	วิธีการวิจัย	17
	การเก็บตัวอย่าง การแยกและคัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะ	17
	การตรวจสอบเอกลักษณ์ของเชื้อ	17
	คัดเลือกเชื้อที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ	17
	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารปฏิชีวนะ	18
	การสกัดและแยกสารปฏิชีวนะให้บริสุทธิ์	18
	การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารปฏิชีวนะที่แยกได้	19
	Thin layer chromatography (TLC) :	19
	Column chromatography (CC)	19
	Spectroscopy	19

บทที่ 4	ผลการวิจัย	21
	ผลการแยกและคัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะ	21
	ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อ	21
	ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียขั้นต้น	21
	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารปฏิชีวนะ	21
	ผลการสกัดและแยกสารปฏิชีวนะให้บริสุทธิ์	40
	การเตรียมสารสกัดหยาบจากเชื้อ *Micromonospora* sp.JSM 5-1 โดยใช้ GS medium	41
	การแยกสารจากสารสกัดด้วย ethyl acetateจากเชื้อ *Micromonospora* sp. JSM 5-1 ในGS medium	41
	การเตรียมสารสกัดหยาบจากเชื้อ *Micromonospora* sp. JSM 5-1 โดยใช้ GP medium	46
	การแยกสารจากสารสกัดด้วย ethyl acetate (M-001)จากเชื้อ *Micromonospora* sp. JSM 5-1	46
	ข้อมูลทาง spectroscopy ของสารที่แยกได้	49
	J-1 (genistein)	49
	J-2 (daidzein)	50
	J-3 (thymine)	51
	J-4 (uracil)	51
บทที่ 5	การอภิปรายผล	52
	การกำหนดสูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้	52
	J-1 (Genistein)	52
	J-2 (daidzein)	54
	J-3 (thymine)	55
	J-4 (Uracil)	57
บทที่ 6	ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ	60
เอกสารอ้างอิง		62
ภาคผนวก		67

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการตารางประกอบ

ตารางที่		หน้า
1	ลักษณะเฉพาะที่แตกต่างกันของเชื้อ *Micromonospora* species	6
2	สารปฏิชีวนะจากเชื้อ *Micromonospora* species	9
3	ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ของสารปฏิชีวนะจากเชื้อ *Micromonospora* species	12
4	อาหารและสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารปฏิชีวนะจากเชื้อ genus *Micromonospora*	13
5	แหล่งของตัวอย่างดิน และรหัสเชื้อ	24
6	ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียโดยเชื้อgenus *Micromonospora* species	26
7	ลักษณะสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อ *Micromonospora* species บนอาหารYMA	28
8	ลักษณะ การเจริญของสายพันธุ์เชื้อ *Micromonospora* species บน อาหารต่างๆ (อายุ 10 วัน)	30
9	การใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อ *Micromonospora* species	31
10	ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อ *Micromonospora* species	33
11	คุณสมบัติทางสรีรวิทยาของเชื้อ *Micromonospora* sp.. JSM5-1, JSM1-3, และ A-25	35
12	ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจากน้ำหมักของเชื้อ *Micromonospora* สายพันธุ์ที่คัดเลือก เมื่อเลี้ยงในอาหารชนิดต่างๆ เป็นเวลา 5 วัน	36
13	ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจากน้ำหมักของชื้อ *Micromonospora* sp.JSM 5-1 เมื่อเลี้ยงในอาหาร GS ที่มีระดับ pHs ต่างๆ	37
14	ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจากน้ำหมักของเชื้อ *Micromonospora* sp.JSM 5-1 เมื่อเลี้ยงในอาหาร GS ที่บ่มไว้ ณ อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 5 วัน	37
15	ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจากสารสกัดที่ผลิตโดยเชื้อ *Micromonospora* sp. JSM 5-1 , A-25 และ JSM1-3 เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน	38
16	ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจากสารสกัดด้วย ethyl acetate ที่ผลิตโดยเชื้อ *Micromonospora* sp. JSM 5-1 , A-25 และ JSM1-3 เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน	39
17	รายละเอียดของ fraction ที่ได้จากการแยกสารสกัด F-001	42
18	ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัด fraction ต่างๆ	48

19	ข้อมูล NMR ของ ^{13}C (75 MHz) และ ^{1}H(500 MHz) ของสาร J-1ใน DMSO-d_6	53
20	ข้อมูล NMR ของ ^{13}C (75 MHz) และ ^{1}H(500 MHz) ของสาร J-2ใน DMSO-d_6	55
21	ข้อมูล NMR ของ ^{13}C (75 MHz) และ ^{1}H(300 MHz) ของสาร J-3 ใน DMSO-d_6	56
22	ข้อมูล NMR ของ ^{13}C (75 MHz) และ ^{1}H(300 MHz) ของสาร J-4 ใน DMSO-d_6	57
23	ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของสารที่แยกได้	58

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการรูปประกอบ

รูปที่		หน้า
1	ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Micromonospora* sp. JSM5-1 บนอาหาร YMA (อายุ 10 วัน) ภายใต้กล้อง Scanning electron microscope	22
2.	ลักษณะของโคโลนีของเชื้อ *Micromonospora* sp. JSM5-1บนอาหาร YMA. (อายุ 10 วัน)	23
3	TLC ของสารสกัด F-001, SS, GS medium, M-001, GP medium	59
4.	Mass spectrum (EIMS) ของสาร J-1 (genistein)	76
5.	^{1}H NMR spectrum (500 MHz) ของสาร J-1 (genistein) ใน DMSO-d_6	77
6.	^{1}H NMR spectrum (500 MHz) ของสาร J-1 (genistein) ใน DMSO-d_6 ภาพขยาย	78
7.	^{13}C NMR spectrum(75 MHz) ของสาร J-1 (genistein) ใน DMSO-d_6	79
8.	HMQC spectrum ของสาร J-1 (genistein)	80
9.	Mass spectrum (EIMS) ของสาร J-2 (daidzein)	81
10	^{1}H NMR spectrum (500 MHz) ของสาร J-2 (daidzein)ใน DMSO-d_6.	82
11	^{1}H NMR spectrum (500 MHz) ของสาร J-2 (daidzein)ใน DMSO-d_6. ภาพขยาย	83
12	^{13}C NMR spectrum(75 MHz) ของสาร J-2 (daidzein) ใน DMSO-d_6	84
13	^{13}C NMR spectrum(75 MHz) ของสาร J-2 (daidzein) ใน DMSO-. d_6 ภาพขยาย.	85
14	IR spectrum ของสาร J-3 (thymine)	86
15.	Mass spectrum (EIMS) ของสาร J-.3 (thymine).	87
16.	^{1}H NMR spectrum (300 MHz) ของสาร J-3 (thymine) ใน DMSO-d_6	88
17.	^{13}C NMR spectrum(75 MHz) ของสาร J-3 (thymine) ใน DMSO-d_6	89
18.	DEP-135 spectrum ของสาร J-3 (thymine) ใน DMSO-d_6	90
19.	HMQC spectrum ของสาร J-3 (thymine)	91
20.	HMBC spectrum ของสาร J-3 (thymine)	92
21.	IR spectrum ของสาร J-4 (uracil)	93
22.	Mass spectrum (EIMS) ของสาร J-4.. (uracil)	94

23. ^{1}H NMR spectrum (300 MHz) ของสาร J-4 (uracil) ใน DMSO-d_6 95

24. ^{1}H NMR spectrum (300 MHz) ของสาร J-4 (uracil) ใน DMSO-d_6 ภาพขยาย 96

25. ^{13}C NMR spectrum (75 MHz) ของสาร J-4 (uracil) ใน DMSO-d_6 97

26. DEP-135 spectrum ของสาร J-4 (uracil) ใน DMSO-d_6 98

27 HMQC spectrum ของสาร J-4 (uracil) 99

28 HMBC spectrum ของสาร J-4 (uracil) 100

29. HMBC spectrum ของสาร J-4 (uracil) ภาพขยาย 101

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการแผนภูมิประกอบ

แผนภูมิที่		หน้า
1.	การหมักเชื้อ *Micromonospora* sp. สายพันธุ์ JSM5-1	39
2.	การแยกสารสกัดจากเชื้อ *Micromonospora* sp. สายพันธุ์ JSM-1	40
3.	การแยกสาร J-1, J-2, J-3 และ J-4 จาก F-001	45
4.	การแยกสาร จาก M-001	49

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการสัญลักษณ์และคำย่อ

ATCC	=	American Type Culture Collection, Maryland, USA
^{o}C	=	degree celsius
cm, ซม.	=	centrimeter, เซนติเมตร
^{13}C nmr	=	carbon-13 nuclearmagnetic resonance
d	=	doublet
dd	=	doublet of doublets (for NMR spectra)
dt	=	doublet of triplets (for NMR spectra)
DMSO-*d6*	=	deuterated dimethysulfoxide
δ	=	chemical shift
EIMS	=	Electron Impact Mass Spectrum
EtOAc	=	Ethyl acetate
g., ก.	=	gram, กรัม
µg, มคก.	=	microgram, ไมโครกรัม
µl,มคล.	=	microliter, ไมโครลิตร
µm, มคม.	=	micrometer, ไมโครเมตร
^{1}H nmr	=	Proton Nuclear Magnetic Resonance
HMBC	=	^{1}H-detected Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HMQC	=	^{1}H-detected Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
Hz	=	Hertz
J	=	coupling constant
L	=	liter, ลิตร
λ_{max}	=	wave length at maximal absorption
M^{+}	=	molecular ion
Mg, มก.	=	milligram, มิลลิกรัม
min	=	minute, นาที
ml, มล.	=	milliliter, มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

MHz	=	megahertz
m/z	=	mass to charge ratio
MS	=	mass spectrometry
Mm, มม.	=	millimeter, มิลลิเมตร
Nm, นม.	=	nanometer, นาโนเมตร
NMR	=	Nuclear Magnetic Resonance
ppm	=	part per million
s	=	singlet (for NMR spectra)
uv	=	ultraviolet

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1
บทนำ

สารปฏิชีวนะเป็น secondary metabolites ส่วนใหญ่มากกว่า 6,000 ชนิด ผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม Actinomycetes (71.1%) เชื้อรา (18.2%) และเชื้อแบคทีเรีย (10.7%) โดยเฉพาะ เชื้อ*Streptomyces* ผลิตสารปฏิชีวนะได้ 80.2% (ประมาณ 3,500 ชนิด) เชื้อ *Micromonospora* ผลิตได้ 6% (258 ชนิด) และเชื้อ *Nocardia* ผลิตได้ 3.7% (156 ชนิด) นอกจากนี้พบว่าผลิตได้จากเชื้อ *Streptoverticillium, Actinoplanes, Actinomadura, Streptosporangium, Saccharopolyspora, Dactylosporangium, Chainia, Nocardiopsis, Ampullariella, Amycolatopsis, Kitasatosporia, Pseudonocardia, Saccharothrix, Microtetraspora, Microellobosporia, Streptoalloteichus, Actinosporangium, Kibdelosporangium, Actinosynema, Planobispora, Microbispora, Planomonospora* และ *Saccharomonospora* (Oki, 1994) มีการศึกษาสารปฏิชีวนะที่ผลิตจากจุลินทรีย์ดังกล่าวและนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ มากมาย เช่น ด้านการเกษตรโดยใช้ผสมในอาหารสัตว์เพื่อช่วยส่งเสริมการเจริญ ใช้ในการควบคุมโรคในพืชและสัตว์ รวมทั้งใช้ในการถนอมอาหารเพื่อช่วยป้องกันการเน่าเสียของผักและผลไม้ นอกจากนี้เชื้อที่น่าสนใจอีกสกุลหนึ่ง คือ *Micromonospora* ซึ่งแยกได้จากดิน พบว่าสามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้หลายชนิด โดยมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ราและยีสต์ เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ และมีฤทธิ์เป็นสารต้านมะเร็งได้อีกด้วย

ในปัจจุบันถึงแม้จะมีการค้นพบสารปฏิชีวนะเพิ่มมากขึ้น แต่พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อหลายชนิดมีความสามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะได้เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยาบางชนิดไม่สามารถนำไปใช้ในการรักษาโรคในคนและสัตว์ได้ เพราะมีความเป็นพิษต่อเซลล์สูง อีกทั้งสารปฏิชีวนะบางชนิดมีฤทธิ์ค่อนข้างต่ำ และเชื้อบางชนิดยังผลิตสารได้ในปริมาณน้อย ในประเทศไทยมีรายงานการผลิตสารปฏิชีวนะ streptothricin จากเชื้อ *Streptomyces* sp. ที่แยกได้จากดิน (Keeratipibul *et al.*, 1984) และพบ *Streptomyces* species ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ ยับยั้งจุลินทรีย์ (ณัฐดา, 2528 ; Naenna *et al.*, 1994) สารปฏิชีวนะที่ผลิตจากเชื้อสกุล *Streptomyces* มักเป็นที่รู้จักแล้ว (Goodfellow, 1988 ; Glasby, 1993) นอกจากนี้พบว่าเชื้อ *Micromonospora* ที่แยกได้จากดินสามารถผลิตสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ ๆ เพิ่มขึ้น (Glasby, 1993) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อกลุ่มนี้ในประเทศไทยยังมีการศึกษาและทำวิจัยกันเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (สมบูรณ์ และ คณะ, 2532) จึงสนใจที่จะศึกษาแยกเชื้อและเลี้ยงเชื้อที่ผลิตสารปฏิชีวนะเพื่อนำมาสกัดและแยกสารปฏิชีวนะนั้น

ดังที่กล่าวมาแล้วว่าเชื้อ *Micromonospora* สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้หลายชนิด และมีฤทธิ์ทางชีวภาพแตกต่างกันและในประเทศไทยมีการศึกษาสารปฏิชีวนะจากเชื้อนี้ในวงแคบ การแยกเชื้อกลุ่มนี้จากแหล่งธรรมชาติต่าง ๆ เพื่อต้องการทราบความหลากหลาย (diversity) ของเชื้อและสารที่ผลิตขึ้นรวมทั้งฤทธิ์ทางชีวภาพ จะทำให้เกิดองค์ความรู้พื้นฐานของสารปฏิชีวนะจากเชื้อสกุลนี้ การวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์คือ

1 เพื่อแยกและคัดเลือกเชื้อจากดินบริเวณรอบเกาะและชายฝั่งทะเลที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะรวมทั้งพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อนั้น
2 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารปฏิชีวนะและศึกษาฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ที่เชื้อสร้างขึ้น
3 เพื่อสกัดแยกสารปฏิชีวนะให้บริสุทธิ์
4. เพื่อศึกษาสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบที่แยกได้นั้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2
การสำรวจแนวคิดและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

<u>สารปฏิชีวนะจากเชื้อ *Micromonospora*</u>

เชื้อนี้พบได้ทั้งในบริเวณดินบกและดินทะเล รวมทั้งแหล่งน้ำต่างๆ (Kutzner, 1981) สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้หลายชนิด เช่น gentamicin dynemicin และ sagamicin โดยพบว่าสารปฏิชีวนะที่เชื้อสร้างขึ้นมีฤทธิ์เป็นทั้ง สารต้านแบคทีเรีย ราและยีสต์ สารต้านมะเร็ง รวมทั้งเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ได้อีกด้วย

<u>เชื้อแบคทีเรียสกุล *Micromonospora*</u>

เชื้อนี้จัดเป็น actinomycetes จำพวกหนึ่ง มีลักษณะสำคัญคือ สร้างสปอร์เดี่ยวก้านชูสปอร์สั้นหรือยาวแตกต่างกัน มักไม่สร้างสายใยอากาศ (aerial mycelium) ผนังเซลล์ประกอบด้วย *meso*-diaminopimelic acid และ glycine โคโลนีมีลักษณะหนาและชื้น โคโลนีอาจมีสีเหลืองส้ม ส้มแดง น้ำตาล น้ำตาลแดง หรือเขียวแกมน้ำเงินจนถึงดำ สปอร์มีสีน้ำตาลถึงดำ การแตกก้านของสปอร์เป็นได้ทั้ง monopodial หรือ sympodial สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 20-40 °C ส่วนใหญ่จะแยกเชื้อสกุลนี้ได้จากทั้งดินบกและดินทะเล โดยเฉพาะบริเวณที่มีความชื้น จาก Bergey's Manual of Systematic Bacteriology IV, Kawamoto ได้จำแนกเชื้อแบคทีเรียสกุล *Micromonospora* ออกเป็น 8 สปีชีส์ (ตารางที่ 1) คือ

M. carbonacea subsp. *carbonacea, M. carbonacea* subsp. *aurantiaca*, *M. halophytica* subsp. *halophytica*, *M. halophytica* subsp. *nigra*, *M. chalcea*, *M. inositola*, *M. coerulea*, *M. purpureochromogenes*, *M. olivasterospora*, *M. echinospora* subsp. *echinospora*, *M. echinospora* subsp. *ferruginea* and *M. echinospora* subsp. *pallida* (Holt, 1989) นอกจากนี้ยังพบเชื้อ *Micromonospora* ชนิดใหม่และสายพันธุ์ใหม่ที่ผลิตสารปฏิชีวนะซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2 และ 3

<u>การหมักสารปฏิชีวนะโดยเชื้อ *Micromonospora*</u>

การเลี้ยงเชื้อสกุลนี้ต้องเตรียมอาหารทั้ง seed medium และ production medium ที่มีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ได้แก่ dextrin, glucose, potato starch, soluble starch, maltose, lactose, molasses, beef extract, casein, pharmamedia, skim milk, NZ-amine, corn steep liquor,

รวมทั้ง $CaCO_3$, K_2HPO_4, $MgSO_4.7H_2O$, $(NH_4)_2SO_4$ และ NaCl หมักที่อุณหภูมิ 27-32°C, pH ประมาณ 7-8 ด้วยอัตราการเขย่า 200-350 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5-7 วัน (Weinstein *et al.*, 1969; Nelson *et al.*, 1986 : Omura *et al.*, 1985; Kase *et al,* 1986; Matsuda *et al,* 1987; Wu *et al,* 1988; Cooper *et al*, 1988 ; Funaishi *et al,* 1990; Carter *et al,* 1990; Konishi *et al,* 1991; Ishigami *et al*, 1994; and Jackson *et al*, 1995) (ตารางที่ 4)

<u>การสกัดและแยกสารของเชื้อ *Micromonospora*</u>

Nelson *et al.* (1986) ได้สกัดและแยกสาร crisamicin A จากเชื้อ *Micromonospora purpureochromogenes* subsp. *halotolerans* โดยปรับ pH ของน้ำหมักเป็น 7.0 แล้วเขย่าด้วย ethyl acetate ในปริมาณที่เท่ากัน จากนั้นนำสิ่งสกัดจากชั้นนี้ไประเหยแห้ง ได้สารข้นเหนียวสีน้ำตาล แล้วนำไปละลายใน chloroform แล้วผ่าน silica gel column จากนั้น ชะสารด้วย chloroform-methanol จะได้สารมีลักษณะเป็นผงสีส้ม จากนั้นนำไปตกผลึกซ้ำ ๆ ด้วย CH_3CN-H_2O จะได้สาร Crisamicin A มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มสีส้ม

Kase *et al.* (1987) ได้ทำการสกัด และแยกสาร K-13 จากเชื้อ *Micromonospora halophytica* subsp. *exilisia* โดยนำน้ำหมักเชื้อมาแยกเอาส่วนใส แล้วนำมาแยกต่อด้วยวิธี Ion exchange chromatography โดยใช้ Diaion HP-10, Wako gel C-200 และ Lichroprep RP-8 จะได้ผลึกเป็นผงสีขาวที่ชื่อ K-13

Wu *et al.* (1988) ได้ทำการวิจัยพบว่าเชื้อ *Micromonospora neihuensis* สามารถผลิตสาร neihumicin ซึ่งสกัดจากส่วนเส้นใย โดยสกัดด้วย methanol จะได้ตะกอนสีเหลือง แล้วนำตะกอนที่ได้ไปตกผลึกซ้ำ ๆ ด้วย methanol-acetone จะได้ผลึกสีเหลือง

Cooper *et al.* (1987) ได้สกัดและแยกสาร Sch 37137 มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา จากเชื้อ *Micromonospora* sp. SCC 1792 โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาแยกเอาส่วนใสแล้วใช้การแยกโดยวิธี Ion-exchange chromatography โดยนำส่วนใสมาผ่าน BioRad AG-50x8 (H^+) แล้ว eluted ด้วย 0.5 N NH_4OH แล้วผ่าน BioRad AG 50x8 (H^+) อีกครั้งโดย eluted ด้วย CO_2-Saturated water จากนั้น นำมาแยกบนผงถ่าน แล้ว eluted ด้วย methanol 0-20 % จะได้สาร Sch 37137

Funaishi *et al.* (1990) ได้สกัดและแยกสาร Rosaramicin จากเชื้อ *Micromonospora* 6108 A_1 โดยนำน้ำหมักเชื้อมาแยกเอาส่วนใส จากนั้นนำมาผ่าน Diaion HP-20 resin ล้างด้วย methanol, acetone ตามลำดับ จากนั้นสกัดต่อด้วย ethyl acetate แล้วนำสิ่งสกัดที่ได้ไปผ่าน silica gel column จากนั้นนำสิ่งสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์หาสารโดยใช้ HPLC

Konishi *et al.* (1991) ได้สกัดและแยกสาร Dynemicins จากเชื้อ *Micromonospora chersina* โดยนำน้ำหมักมาสกัดด้วย ethyl acetate แล้วผ่าน Diaion sp-800 column แล้ว eluted ด้วย 80%

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

methanol แยกได้ 3 fractions คือ fraction A, B and C โดย fraction A นำไปแยกต่อโดยผ่าน Diaion HP-20, silica gel column, Toyopearl Hw-40F แล้ววิเคราะห์หาสารโดยใช้ HPLC จะแยก dynemicin O ได้โดยสารมีลักษณะเป็นผงสีฟ้า ส่วน dynemicin P แยกได้มาจาก fraction B โดยผ่าน silica gel column และ sephadex LH-20 จะได้ของแข็งสีฟ้า แล้วนำไปฉีด HPLC จะได้ dynemicin P มีลักษณะเป็น oil สีน้ำตาล ส่วน dynemicin Q แยกได้โดยนำไปผ่าน Toyopearl Hw-40EC, Toyopearl Hw-40F แล้ววิเคราะห์หาสารโดยใช้ HPLC จะได้สารมีลักษณะเป็นผงสีฟ้า

Hayakawa *et al.* (1993) ได้สกัดและแยกสาร Quinolidomicin จากเชื้อ *Micromonospora* sp. JY 16 โดยนำน้ำหมักมาแยกเอาส่วนเส้นใย มาสกัดด้วย methanol แล้วล้างด้วย ethyl acetate และน้ำ จากนั้นนำสิ่งสกัดที่ได้ไปแยกต่อโดยผ่าน silica gel column แล้ว eluted ด้วย chloroform-methanol รวม fraction ที่ออกฤทธิ์แล้วฉีด HPLC จะได้สารมีลักษณะเป็นผงสีส้ม

Ishigami *et al.* (1994) ได้สกัดและแยกสาร Cororubicin จากเชื้อ *Micromonospora* sp. JY16 โดย นำน้ำหมักเชื้อมาแยกเอาส่วนเส้นใย แล้วสกัดด้วย acetone และ chloroform-methanol ตามลำดับ นำชั้นน้ำมาสกัดด้วย chloroform-methanol แล้วนำสิ่งสกัดที่ได้ไปแยกต่อโดยผ่าน silica gel column รวม fraction ที่ออกฤทธิ์ผ่าน sephadex LH-20 column แล้วนำแต่ละ fraction ที่ได้มาวิเคราะห์หาสารโดยใช้ HPLC แล้วรวม fraction ที่ออกฤทธิ์มาสกัดต่อด้วย chloroform-methanol จะได้สารมีลักษณะเป็นผงสีส้ม

Nakanishi *et al.* (1995) ได้สกัดและแยกสาร MS-444 จากเชื้อ *Micromonospora* sp. โดยนำน้ำหมักเชื้อมาแยกเอาส่วนเส้นใยและสกัดด้วย methanol จากนั้นสกัดด้วย ethyl acetate แล้วนำสิ่งสกัดที่ได้ผ่าน silica gel column โดย eluted ด้วย chloroform-acetone (95:5) รวม fraction ที่ออกฤทธิ์ แล้วผ่าน silica gel column อีกครั้ง รวมfraction ที่ออกฤทธิ์แล้วนำไปตกผลึกใน chloroform-acetone ได้ผลึกรูปเข็มสีเหลือง

Jackson *et al.* (1995) ได้สกัดและแยกสาร Macquarimicins จากเชื้อ *Micromonospora chalcea* โดยนำน้ำหมักเชื้อมาแยกเอาส่วนน้ำใส จากนั้นนำไปผ่าน XAD-4 resin แล้ว eluted ด้วย methanol จากนั้นนำสิ่งสกัดที่ได้ไปผ่าน sephadex LH-20 column รวม fraction ที่ออกฤทธิ์แล้วนำไปแยกต่อโดยใช้ Countercurrent Chromatography (CCC) จะได้สาร Macquarimicin A ส่วน Macquarimicin B แยกมาจากน้ำหมักเชื้อ โดยนำไปผ่าน XAD-4 resin ล้างด้วย methanol นำสารสกัด จากชั้น methanol มาสกัดด้วย ethyl acetate, ethanol และน้ำ นำส่วน low phase มา partition ด้วย n-propanol และ น้ำ จากนั้นแยกเอาส่วน upper phase มาผ่าน Counter-current chromatography จะได้สาร Macquarimicin B

ตารางที่ 1 ลักษณะเฉพาะที่แตกต่างกันของเชื้อ *Micromonospora* species

Characteristics	*M. carbonacea* subsp. *carbonacea*	*M. carbonacea* subsp. *aurantiacea*	*M. halophytica* subsp. *halophytica*	*M. halophytica* subsp. *nigra*	*M. chalcea*	*M. inositola*
colony colour	orange	orange-red	brown	orange-black	orange-black	-
spore colour	brown (0.7-1.0 μm)	brown (0.7-1.0 μm)	orange-black (1.2 μm)	-	dark brown (0.7-1.0 μm)	blight orange (0.8-1.0 μm)
diffusible pigment	-	pale yellow	reddish brown	-	pale yellow	-
nitrate reduction	+	-	+	+	Weak	-
NaCl tolerance (%)	3	3	4	4	5	1.5
melanin pigment	-	-	-	-	-	-
gelatin liquefaction	+	+	+	+	+	+
milk peptonization	+	+	+	+	-	-
growth temperature	27-37°C	27-37°C	18-40°C	18-40°C	27-37°C	25-40°C
main menaquinone	9	9	9	9	10	10

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Characteristics	*M. coerulea*	*M. purpureochromogenes*	*M. olivasterospora*	*M. echinospora* subsp. *echinospora*	*M. echinospora* subsp. *feruginea*	*M. echinospora* subsp. *pailida*
carbon utilization	raffinose, salicin	raffinose, melibiose	melibiose, raffinose	arabinose, galactose, β-lactose, galactose, fructose	D-galactose, fructose	D-galactose, fructose, lactone
colony colour	orange-black	dark brown	light-brown to dark yellow	orange-brown	orange	ivory
colony colour	orange-black	dark brown	light-brown to dark yellow	orange-brown	orange	ivory
spore colour	blue green (0.8-1.5 μm)	brown (0.8-1.2 μm)	dark green (1.0 μm)	purplish black (1.0-1.5 μm)	blue	blue
diffusible pigment	-	dark brown	olive green	maroon to purple	maroon-purple	-
nitrate reduction	-	-	-	weak	-	+
NaCl tolerance (%)	1.5	1.5	3	3	3	3
melanin pigment	-	-	-	-	-	-
gelatin liquefaction	+-	-	+	+	+	+

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Characteristics	*M. coerulea*	*M. purpureochromogenes*	*M. olivasterospora*	*M. echinospora* subsp. *echinospora*	*M. echinospora* subsp. *feruginea*	*M. echinospora* subsp. *pallida*
milk peptonization	+-	+-	+	+	+	+
growth temperature	24-37°C	27-37°C	28-38°C	27-37°C	27-37°C	27-37°C
main menaquinone	10	10	10	10	10	12
carbon utilization	D-galactose, fluctose, lactose	galactose, fructose	galactose, fructose	L-arabinose	fluctose	L-rhamnose

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 สารปฏิชีวนะจากเชื้อ *Micromonospora* species

Compounds	Strains	Activity	References
Micromonosporin	*Micromonospora* sp.	antibacterial	Glasby, 1993
Neomycin B	*Micromonospora* sp.69-683	antibacterial	Glasby, 1993
Microcin A	*Micromonospora* sp.	antibacterial antifungal	Glasby, 1993
Gentamicin A_1, A_2, A_3, A_4,B and B_1	*M. echinospora*, *M. purpurea*	Antibacterial	Glasby, 1993
Gentamicin C, C_1, C_2	*M. purpurea* (NRRl 2953)	antibacterial antipotozoal	Glasby, 1993
Gentamicin X	*M. echinospora*, *M. purpurea*	antibacterial, antiprotozoa	Glasby, 1993
Megalomicin A, B,C,$C_2\alpha$,$C_2\beta$	*M. inositola* MK-41	antibacterial, antifungal	Glasby, 1993
Antibiotic 67-694	*M. rosaria*	antibacterial	Glasby, 1993
Antibiotic G-52	*M. zionensis*	antibacterial	Glasby, 1993
Antibiotic Sch14342	*Micromonospora* spp.	antibacterial	Glasby, 1993
Mutamicin 1, 1a, 1b, 2 and 2a	*M. inyouensis*	antibacterial	Glasby, 1993
Antibiotic 66-40, 66-40D	*M. inyouensis*	antibacterial	Glasby, 1993
Fortimicin A and B	*Micromonospora* sp.	antibacterial	Glasby, 1993
Sagamicin	*M. sagamiensis*	antibacterial	Glasby, 1993
Verdamicin I	*M. grisea*	antibacterial	Glasby, 1993
Antibiotic LL-E33288, LL-E33288ε	*M. echinospora* subsp. *calichensis*	antibacterial antitumor	Glasby, 1993
Dapiramicin	*Micromonospora* sp.	antibacterial	Glasby, 1993
Antibiotic XK-62-6, XK-62-8	*M. sagamensis* subsp. *nonreductans*	antibacterial	Glasby, 1993
Clostomicin Antibiotic K-259-2	*M. echinospora* subsp.*ameniaca* *M. oligovasterospora*	antibacterial inhibitor Ca^{2+}	Omura *et al.*, 1986 Yuzuru *et al.*, 1987
Antibiotic G-418	*M. rhodoranges*	antibacterial	Glasby, 1993

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Compounds	Strains	Activity	References
Antibiotic K-13	*M. halophytica* subsp. exillisia	angiotensin I converting enzyme	Kase *et al.*, 1987
Antibiotic BU-3420T	*M. chersina*	Antibacterial, antifungal antitumour	Glasby, 1993
Antibiotic LL-E19085	*M. citrea*	antibacterial	Glasby, 1993
Mycinamicin VIII	*M. griseorubida*	antibacterial	Glasby, 1993
Antibiotic JI-20A, Ji-20B	*M. purpurea*	antibacterial	Glasby, 1993
MS-444	*Micromonospora* sp. KY7123	inhibitor of myosin light chain kinase	Nakamishi *et al.*, 1995
Dynemicin	*M. chersina* M9561	antibacterial antitumor	Konishi *et al.*, 1991
Macquarimicin	*M. chalcea*	antibacterial antitumor	Jackson *et al.*, 1995
Antibiotic I-SKA$_1$, I-SKB$_1$, I-SKB$_2$	*Micromonospora* sp.	antibacterial	Glasby, 1993
Antibiotic M-4365 A$_1$, A$_2$, A$_3$, G$_1$and G$_2$	*M. capillata*	antibacterial	Glasby, 1993
Halomicin A, B and C	*M. halophytica*	antibacterial, antifungal	Glasby, 1993
Quinolidomicins A$_1$, B$_1$ and A$_2$	*Micromonospora* sp. JY16	antitumor	Hayakawa *et al.*, 1991,1993
Cororubicin	*Micromonospora* sp. JY16	antitumor	Ishigami *et al.*, 1994
Everninomicin B ,C and D	*Micromonospora* sp.	antibacterial	Glasby, 1993
Antibiotic X-14847	*M. echinospora*	antibacterial	Glasby, 1993
Sibanomicin	*Micromonospora* sp. SF-2364	antibacterial antitumor	Glasby, 1993
Antibiotic SF-1854	*Micromonospora* sp. SF-1854	antibacterial	Glasby, 1993

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Compounds	Strains	Activity	References
Citreamicin α, β, γ, δ and γ	*M. citrea*	antibacterial	Carter *et al.*, 1990
Antibiotic 42752, 43038 and 43139	*M. saitamica*	antibacterial	Glasby, 1993
Antibiotic K-26	*Micromonospora* sp. K-26	antibacterial	Glasby, 1993
Antibiotic SF-2312	*Micromonospora* sp. SF-2312	antibacterial	Glasby, 1993
Neihumicin	*M. neihuensis*	against KBcell	Wu *et al.*, 1988
Antibiotic LL-D42067	*M. purpureochromogenes* subsp. *wuxiensis*	antibacterial antitumor	Glasby, 1993
Antibiotic SF 2448A, B and C	*Micromonospora* sp. SF 2448	antibacterial	Glasby, 1993
Antascomicins A,B, C,D and E	*Micromonospora* sp. A92-306401	immuno suppressive	Fehr *et al.*, 1996
Pyrrolosporin	*Micromonospora* sp.C39217-R109-7	antitumor	Lam *et al.*, 1996
Thiocoraline	*Micromonospora* sp.L13-ACM2-092	antitumor	Romero *et al.*,1997 Baz *et al.*, 1997
9-Hydroxycrisamicin A, 1-Hydroxycrisamicin A	*Micromonospora* sp. SA246	antitumor, antibacterial	Yeo *et al.*, 1997 Yeo, *et al.*, 1998
Cymbimicin A and B	*Micromonospora* sp.	cyclophilin-binding	Fehr *et al.*, 1997
Isonitrile, YM-47515	*M. echinospora* Y03559J	antibacterial	Sugawara *et al.*, 1997
Thiostrepton, Sch. 40832	*M. carbonacea* ATCC 39149	antibacterial	Puar *et al.*, 1998

ตารางที่ 3 ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ของสารปฏิชีวนะจากเชื้อ *Micromonospora* species

compounds	Activity	References
Gentamicin	*Enterobacter, E. coli, Krebsiella, Salmonella, Seratia, P. aeruginosa, S. aureus, Bacillus, Clostridium, Corynebacterium*	Glasby, 1993.
Antibiotic G-418	*S. aureus* 209P	Glasby, 1993.
Antibiotic G-52	*Escherichia, Pseudomonas,* and *Staphylococcus*	Glasby, 1993.
Antibiotic M-4365A_1	*Klebsiella pneumoniae, Mycoplasma* species	Glasby, 1993.
Crisamicin A	*S. aureus* 6538P, *Micrococcus luteus, B. subtilis* ATCC 7972, B16 murine melanoma cells	Ling *et al.*, 1986.
Clostomicin	*Clostridium perfringens*	Takasashi *et al.*, 1987.
Antibiotic K-259-2	Inhibitor of Ca^{2+} and calmodulin dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase	Yuzuru *et al.*, 1987.
Antibiotic K-13	Angiotensin I converting enzyme inhibitor	Kase *et al.*, 1987.
Antibiotic Sch 37137	*Candida* sp., dermatophytes	Cooper *et al.*, 1988.
Sibaminomicin	P-388 leukemia cells	Glasby, 1993.
Antibiotic BU-3420T	Inhibitor of mammalian tumors, P-388 leukemia cells	Glasby, 1993.
Mycinamicin VIII	*Streptococcus* species, *Micrococcus luteus* ,*Corynebacterium diphtheria*	Glasby, 1993.
Dynemicin	*B. subtilis* PCI 219, *S. aureus* Smith , *S. epidermidis* 11-1168, Mouse melanoma , P-388 leukemia cell	Konishi *et al.*, 1991.
Cororubicin	KB cells	Ishigami *et al.*, 1994.
MS-444	Inhibitor of myosin light chain kinase	Nakamishi *et al.*, 1995.
Maquarimicin	*Bacteroides* sp., leukemia P-388 cells	Jackson *et al.*, 1995.
Quinolidomicin	Human leukemia (K562), P-388 leukemia cells , HT-29 (Human colon cancer)	Hayakawa *et al.*, 1993.

ตารางที่ 4 อาหาร และสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารปฏิชีวนะจากเชื้อ genus *Micromonospora*

strains	antibiotics	seed		production		reference
		medium	condition	medium	condition	
M. megalomica	Megalomicin	beef extract,trytone, dextrose ,potato starch, yeast extract, $CaCO_3$,		yeast extract , starch, dextrose , casein, $CaCO_3$		Weinstein *et al.*, 1969: 253-258
M. purpureochomogenes subsp. *halotolerans.*	Crisamicin	glucose ,soluble starch, yeast extract, $CaCO_3$,	28°C, 250 rpm	glucose, potato, dextrin, $CaCO_3$	28°C	Nelson *et al.*, 1985
M. echinospora subsp.*armeniaca* .	Clostomicin	glucose, starch, peptone, yeast extract, , meet extract, $CaCO_3$	27°C	soluble starch, dry yeast , $CaCO_3$	27°C,	Omura *et al.*, 1985: 1407-1417
M. neihuensis	neihumicin	glucose, tryptone, yeast extract, KH_2PO_4, K_2HPO_4	pH 7.0, 28°C, 200 rpm	glucose, molasses, peptone, $CaCO_3$,	pH 7.0, 28°C, 200 rpm	Wu *et al.*, 1987: 481-486

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 (ต่อ)

Strains	antibiotics	seed		production		reference
		medium	condition	medium	condition	
M. halophytica subsp. *exillsia*	K - 13	Glucose, $CaCO_3$,soluble starch, beef extract,yeast extract,Bacto-tryptone	-	Dextrin, soybean meal, corn steep liquor, K_2HPO_4, $MgSO_4$, KCl, $CaCO_3$	28 °C,220 rpm	Kase *et al.*,1987:450 - 458
Micromonospora sp.	Sch 37137	beef extract, tryptone, yeast extract, potato starch, $CaCO_3$, Cerelose	30°C, 300 rpm	NZ-amine, yeast extract, $CoCl_2$ Cerelose, Soluble starch, $CaCO_3$, Dow Corning antifoam - B	30°C, 350 rpm	Cooper *et al.*, 1987: 13-24
M. fastidiosa.	Rosaramicin analog, 6108 A_1, B, C, D	glucose,maltose syrup, , yeast extract,pharma media, wheat germ meal, meat extract , Na Cl, KH_2PO_4 $CaCO_3$		glucose, yeast extract, soluble starch, skim milk, K_2HPO_4, , NaCl, $CaCl_2.2H_2O$ $MgSO_4.7H_2O$		Funaishi *et al.*, 1989: 938-947

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 (ต่อ)

Strains	antibiotics	seed		production		reference
		medium	condition	medium	condition	
Micromonospora sp.	Cororubicin	soluble stach, molasses, meatt extract, polypeptone	PH 7.2 ,27°C	Soluble starch, fish meal, soybean meal, $CaCO_3$	PH 7.3, 27°C	Ishigami *et al.*, 1994: 1219-1225
M. citrea	Citreamicin	glucose, dextrin, yeast extract, $CaCO_3$, NZ - Amine $_A$	32°C	dextrin, glucose, nutrisoy, cornsteep liquor, $CaCO_3$,	28°C, 110 rpm	Carter *et al.*, 1989: 504-512
M. chersina sp. nov. M956-1	Dynemicins	lactose, soluble starch , fish meal, $CaCO_3$, $CaSO_4$. $2H_2O$	pH 7.0, 32°C, 200 rpm	soluble starch, glucose, beet molasses, fish meal,$CaCo_3$	pH 7.0, 28°C, 250 rpm	Konishi *et al.*, 1991
Micromonospora sp.	M-444	glucose, soluble stach, yeast extract, beef extract, tryptone, KH_2PO_4, $MgSO_4.7H_2O$	28°C	glucose, corn steep liquor, soluble vegetative protein, cotton seed oil, $CoCl_2.6H_2O$	28°C	Ishigami *et al.*, 1994: 1219-1225

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 (ต่อ)

Strains	antibiotics	seed		production		reference
		medium	condition	medium	condition	
M. purpurea	Gentamicin	-	-	Sucrose, NaCl, $MgSO_4.7H_2O$, $FeSO_4.H_2O$, $CaCO_3$, $ZnSO_4.H_2O$),$MnSO_4.4H_2O$, $CoCl_2.6H_2O$, K_2HPO_4	PH6.8, 29°C, 175rpm	Gonzalez *et al.*, 1994 : 479-483
M. chalcea	macquarimicins	glucose, soluble starch, yeast extract, tryptone, beef extract, $CaCO_3$	pH 7.0, 30°C, 250 rpm	sucrose, cotton seed flour, yeast extract, K_2HPO_4, $CoCl_2.6H_2O$, $MgSO_4.7H_2O$	pH 7.3, 30°C, 200 rpm	Jackson *et al.*, 1995: 462-470
Micromonospora sp. KY 7123	MS-444	Glucose, soluble starch, beef extract, yeast extract, bactotryptone, $MgSO_4.7H_2O$, $Mg_3(PO_4)_2.8H_2O$, KH_2PO_4	PH 7.1 (before), 28°C	Glucose, $CoCl_2.6H_2O$,corn steep liquor, soluble vegetable protein, cotton seed oil, $Mg_3(PO_4)_2.7H_2O$	PH 7.1 (before), 28°C	Nakanishi *et al.*1994 : 948-951

บทที่ 3

วิธีการวิจัย

1 การเก็บตัวอย่าง การแยกและคัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะ

เก็บตัวอย่างดินชนิดต่างๆ จากหลายจังหวัดในประเทศไทย โดยเลือกเก็บบริเวณที่มีความชื้น เช่น ดินบริเวณรอบเกาะและชายฝั่งทะเล หรือดินบริเวณน้ำตกและดินที่อยู่ใกล้แหล่งน้ำ นำดิน 0.5 กรัมใส่ลงในหลอดที่มีน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (4.5 มล.) แล้ววางในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 55 °C 5 นาที และนำมาเจือจางในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อ เป็น 1: 100, 1:1000 และ 1:10,000 แล้วนำไป spread ลงบน Potato-carrot agar (PCA, ภาคผนวก) และ Sodium-caseinate agar (SCA, ภาคผนวก) ที่เติมสารปฏิชีวนะ แล้วบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7-14 วัน เลือกเก็บโคโลนีที่เป็นลักษณะเฉพาะของ *Micromonospora* คือ โคโลนีลักษณะหนาและชื้น

2 การตรวจสอบเอกลักษณ์ของเชื้อ

นำเชื้อที่แยกได้จากข้อ 1 มาศึกษาลักษณะต่าง ๆ ดังนี้

2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางการเจริญ โดยเลี้ยงเชื้อบน Yeast extract - Malt extract agar (YM, ภาคผนวก) โดยวิธี crosshatch streak (Shirling and Gottlieb, 1966) ตรวจผลโดยดูการเจริญ สังเกตเนื้อและสีโคโลนีด้านบน และสีโคโลนีด้านใต้ ตรวจสอบลักษณะของเส้นใยและการสร้างสปอร์ โดยใช้เทคนิค simple inclined coverslip (William and Cross, 1971) แล้วดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 1,000x) และตรวจสอบลักษณะสปอร์ของเชื้อโดยใช้ Scanning Electron Microscope (SEM)

2.2 ศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี โดยตรวจสอบการทนอุณหภูมิ, การทนเกลือ, การย่อยสลายแป้ง, การสร้างเมลานิน, การใช้แหล่งคาร์บอน, การรีดิวซ์ไนเตรต, การย่อยสลายเจลาติน, การสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ (Shirling and Gottlieb, 1966; Arai, 1975)

3 คัดเลือกเชื้อที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ

นำเชื้อที่แยกได้และตรวจสอบเอกลักษณ์จากข้อ 2.1 และ 2.2 แล้วมาเลี้ยงในอาหารเหลว Sucrose Soybean (SS medium, ภาคผนวก) บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ

28 °C เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อ (fermentation broth) มาปั่นแยกเอาส่วนใสไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ โดยวิธี agar diffusion test (Lorian, 1980) การทดสอบนี้ใช้เชื้อแบคทีเรีย 3 ชนิด คือ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Escherichia coli* ATCC 25922 โดยผสมเชื้อลงใน Mueller Hinton Agar (MHA, ภาคผนวก) แล้วนำ cup ที่ฆ่าเชื้อแล้ววางลงบนผิวหน้าอาหาร นำส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อหยอดลงใน cup บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ตรวจผลภายใน 24 ชั่วโมง โดยวัดขนาดของโซนใส (Inhibition zone) รอบ ๆ cup แล้วคัดเลือกเชื้อมา 3 ตัวอย่างที่ให้ผลในการยับยั้งดีที่สุดเพื่อนำไปศึกษาต่อไป

4 <u>การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารปฏิชีวนะ</u>

นำเชื้อที่คัดเลือกได้จากข้อ 3 มาเลี้ยงในอาหาร GMP (Seed medium, ภาคผนวก) เป็นเวลา 2-3 วัน เพื่อเตรียม inoculum จากนั้นนำไปเลี้ยงต่อใน production medium ชนิดต่างๆ ได้แก่ อาหาร GP, GM, GN, GS, SS, SY และ DS (ภาคผนวก) โดยนำ inoculum 5 % ใส่ลงในอาหารที่มีองค์ประกอบต่างกัน เพื่อเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมในการหมัก แล้วนำไปเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะของเชื้อในสภาวะของอาหารที่มีระดับ pH อุณหภูมิ และ เวลาแตกต่างกัน โดยนำไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย เช่นเดียวกับวิธีการที่อธิบายไว้ในข้อ 3 เลือกสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารปฏิชีวนะได้ดีที่สุดเพื่อนำไปสกัดแยกสารปฏิชีวนะให้บริสุทธิ์ต่อไป

5 <u>การสกัดและแยกสารปฏิชีวนะให้บริสุทธิ์</u>

เลี้ยงเชื้อในอาหารและสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 4 นำน้ำเลี้ยงเชื้อมาปั่นแยกเอาส่วนน้ำใสและเส้นใยออกจากกัน โดยนำส่วนที่เป็นน้ำใสมาทำการ partition กับ ethyl acetate และ iso-butanol ตามลำดับ นำแต่ละชั้นที่ได้ไประเหยแห้งจะได้ ethyl acetate extract และ iso-butanol extract และ water extract นำสิ่งสกัดในแต่ละส่วนไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์โดยวิธีการเดียวกับที่อธิบายไว้ในข้อ 3 เพื่อดูว่าส่วนไหนมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด โดยใช้เชื้อทดสอบเพิ่มเติมดังนี้คือ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. aureus* MRSA I (PCU), *S. aureus* MRSA II (PCU), *S. epidermidis* (PCU), *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Enterococcus faecalis* ATCC 25912, *Eschericia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhi* ATCC 14028, *Alcaligenes* sp. (PCU) และ *Candida albicans* ATCC 10231 แล้วนำส่วนนั้นมาสกัดและแยกสารให้บริสุทธิ์ โดยใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟี เช่น column chromatography และ gel filtration เป็นต้น

6 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารปฏิชีวนะที่แยกได้

นำสารปฏิชีวนะบริสุทธิ์ที่แยกได้มาพิสูจน์เอกลักษณ์ โดยนำไปวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้าง โดยใช้เทคนิคทาง spectroscopy ได้แก่ ข้อมูลจาก Infrared, Nuclear magnetic resonance และ Mass Spectroscopy เทคนิคทั่วไปที่ใช้ในการแยกสารให้บริสุทธิ์ และพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาร มีดังต่อไปนี้คือ

6.1 Thin layer chromatography (TLC) :

เทคนิค : 1 ทิศทาง จากล่างขึ้นบน

ตัวดูดซับ : ซิลิกาเจล 60 GF_{254} (E. Merck) หนา 200 มคม.
ขนาดของแผ่น 2 x 5 ซม. , 10 x 20 ซม.

ระยะทาง : 4.5 , 6 ซม.

การตรวจสอบ :- UV absorption ที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นม.
-พ่นด้วยน้ำยา 5 % anisaldehyde ในกรดกำมะถัน
ทำให้ร้อนที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ดูสีที่เกิดขึ้น
-พ่นด้วย 10 % กรดกำมะถันในเอทานอล ทำให้ร้อนที่
105 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ดูสีที่เกิดขึ้น

6.2 Column chromatography (CC)

ตัวดูดซับ : ซิลิกาเจล 60 (no. 9385) ขนาดอนุภาค 0.040 - 0.063 มม.
(230 - 400 mesh ASTM) (E.Merck)

การบรรจุ : แบบเปียก (wet- packing)

ตัวชะ : สารละลายผสมของ chloroform และ methanol, สารละลายผสมของ hexane และ ethyl acetate, methanol

การตรวจสอบ : ใช้ TLC UV absorption ที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นม.
Fractionที่มีpattern เหมือนกัน นำมารวมกัน

6.3 Spectroscopy

Mass spectra (MS); electron impact mass spectra

เครื่องมือ : VG platform II, Fisons Instrument mass spectrometer (ศูนย์เครื่องมือวิจัยทางเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย)

Infrared absorption spectra (IR)

เครื่องมือ :Shimadsu IR 440 infrared spectrometer (ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย)

เทคนิค : KBr disc

Nuclear magnetic resonance spectra (NMR)

เครื่องมือ : - Bruker DPX - 300 FT - NMR spectrometer (300 MHz ^{1}H - NMR และ 75 MHz ^{13}C - NMR)(ศูนย์เครื่องมือวิจัยทางเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย) และ

Jeol JMN-A-500 spectrometer (500 MHz ^{1}H – NMR) (ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย)

ตัวทำละลาย : deuterated dimethylsulfoxide (DMSO-d_6) ใช้ค่า chemical shift ของตัวทำละลาย เป็น internal reference

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิพิธภัณฑ์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
กระทรวงสาธารณสุข

บทที่ 4
ผลการวิจัย

1 ผลการแยกและคัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะ

ผลการแยกเชื้อจากดิน 25 ตัวอย่าง ซึ่งเก็บจากแหล่งต่างๆ ได้เชื้อที่มีลักษณะของสกุล *Micromonospora* จำนวน 38 สายพันธุ์ ดังตารางที่ 5

2 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อ

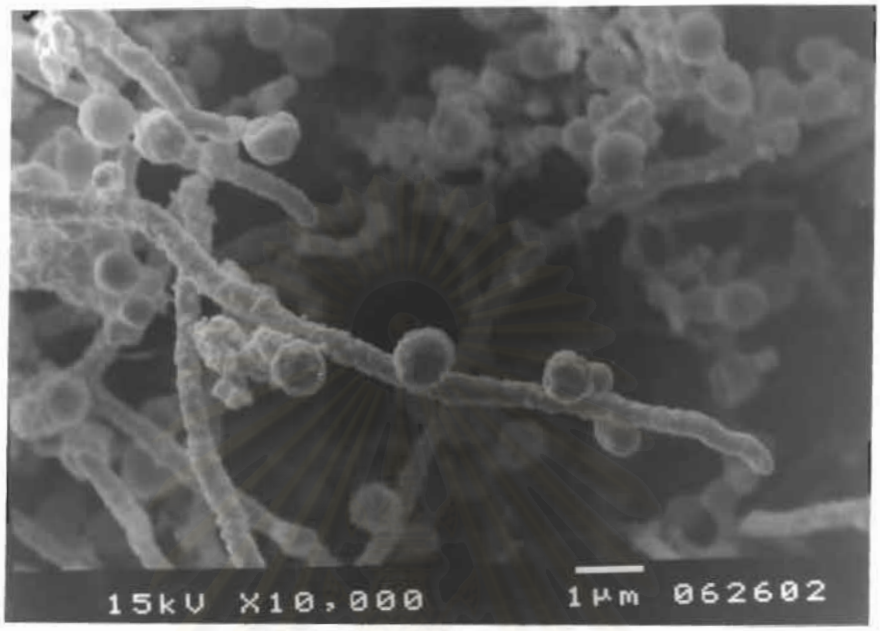
ผลการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา และการเจริญของเชื้อบนอาหาร Yeast extract - malt extract agar (YMA) พบว่าเชื้อที่แยกได้มีสปอร์เดี่ยว ๆ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6-1.5 มคม. (รูปที่ 1) โคโลนีมีลักษณะชื้น สีส้มจนถึงดำ สีของสปอร์แตกต่างกันดังตารางที่ 7 ผลการศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อตัวแทน บนอาหารต่างชนิดกันเปรียบเทียบกับเชื้อ *Micromonospora chalcea* KA579 (รูปที่ 2และตารางที่ 8) เชื้อที่แยกได้มีความสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้แตกต่างกัน ดังตารางที่ 9 และมีลักษณะทางชีวเคมีบางประการ ดังตารางที่ 10 รวมทั้งลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ JSM5-1, JSM1-3 และ A-25 ดังตารางที่ 11

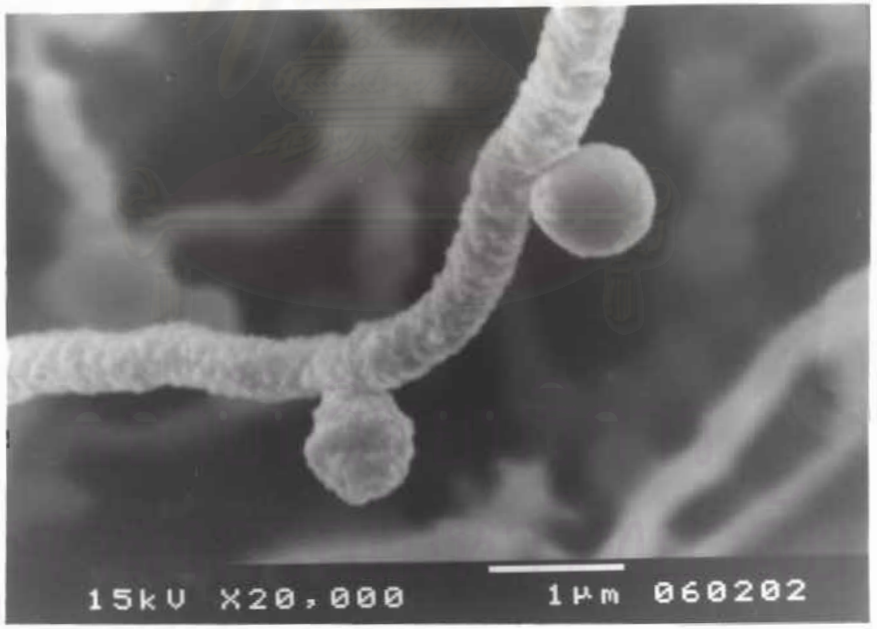
3 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียขั้นต้น

พบว่าเชื้อที่แยกได้สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย แกรมบวก *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และบางสายพันธุ์มีฤทธิ์ต่อเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ *Echerichia coli* ATCC 25922 (ตารางที่ 6) การทดลองขั้นต่อไปได้คัดเลือกเชื้อ 3 สายพันธุ์คือ JSM5-1, JSM1-3 และ A-25 เป็นตัวแทนเพื่อนำไปศึกษาสภาวะเหมาะสมในการหมัก

4. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารปฏิชีวนะ

ผลการศึกษาการหมักในอาหารที่แตกต่างกัน พบว่า น้ำหมักของเชื้อ JSM5-1, JSM1-3 และ A-25 มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทดสอบแตกต่างกัน ดังตารางที่ 12 สำหรับเชื้อ JSM5-1 เมื่อเลี้ยงในอาหาร GS (ภาคผนวก) ที่ระดับ pH 7.01 จะมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทดสอบดีกว่าเมื่อเลี้ยงที่ระดับ pH อื่น ดังตารางที่ 13 และเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 28°C ดังตารางที่ 14

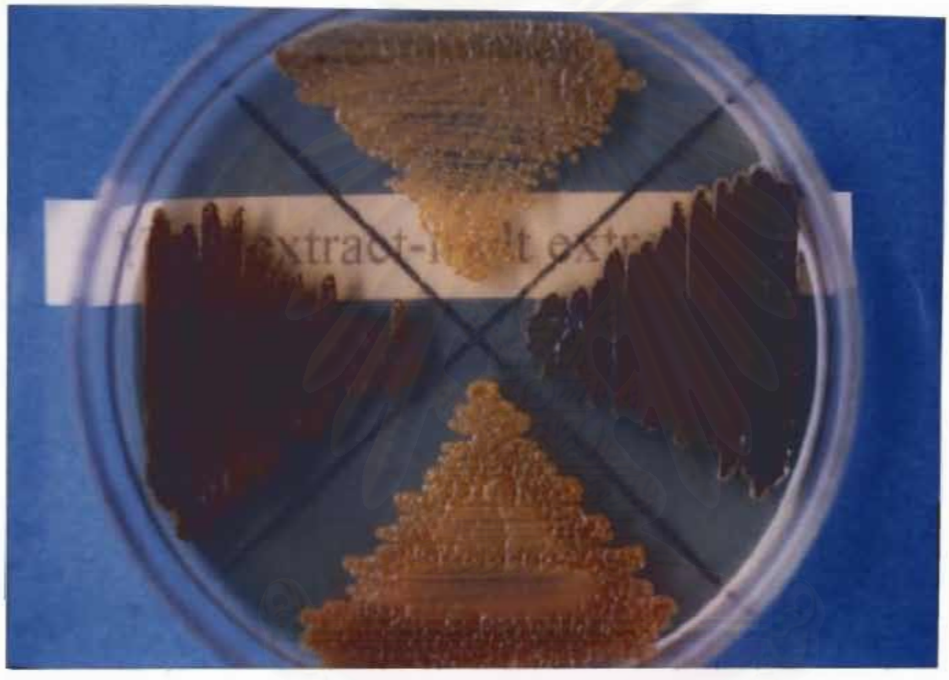




รูปที่ 1 ลักษณะสันฐานวิทยาของเชื้อ *Micromonospora* sp. JSM5-1 บนอาหาร YMA (อายุ 10 วัน) ภายใต้กล้อง Scanning electron microscope

(2)

(1)



(3)

(4)

รูปที่ 2 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Micromonospora* sp. JSM5-1 (1), JSM1-3 (2), A25 (3) และ*M. chalcea* KA 579 (4) บนอาหาร YMA

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 แหล่งของตัวอย่างดินและรหัสเชื้อ

Samples no.	Sources	Isolates no.
1. marine soil	Koa Pee-Pee, Krabi	MA-1
2. marine soil	Koa Pee-Pee, Krabi	MA-2
3. marine soil	Hua-Hin, Prajuabkirikhun	MB2-1, MB2-2, MB2-3
4. marine soil	Koa Seechung, Chonburi	029-2P
5. marine soil	Hua-Hin, Prajuabkirikhun	JSM1-1, JSM1-2, JSM1-3
6. marine soil	Chumporn	JSM2-1
7. marine soil	Chumporn	JSM3-1
8. marine soil	Chumporn	JSM5-1
9. marine soil	Koa Seechung, Chonburi	026-1P
10. marine soil	Koa-Seechung, Chonburi	028-2P
11. marine soil	Hua-Hin, Prajuabkirikhun	P1-1
12. soil	Tepsathit, Chaiyaphume	MC1-1
13. soil	Tepsathit, Chaiyaphume	MC2-2, MC2-3
14. soil	Tepsathit, Chaiyaphume	MC5-1
15. soil	Tepsathit, Chaiyaphume	MC7-1,MC7-2, MC7-3
16. soil	Tepsathit, Chaiyaphume	MC8-2, MC8-3
17. soil	Tepsathit, Chaiyaphume	MC10-1

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Samples no.	Sources	Isolates no.
18. soil	Tepsathit, Chaiyaphume	MC12-2
19. soil	Khao Kanjun, Ratchaburi	R1-1, R1-2, R1-3
20. soil	Na-yai-arm, Chantaburi	CB2-2
21. soil	Na-yai-arm, Chantaburi	CB5-1, CB5-2
22. soil	Chaiyapume	A-25
23. soil	Koa Sa-met, Rayong	S1-6
24. marine soil	Koa Sa-met, Rayong	S5-2,S5-3,S5-6
25. sand	Koa Sa-met, Rayong	S7-3

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียโดยเชื้อ *Micromonospora* species

Isolates	Inhibition zone (mm)		
	S. aureus ATCC 25923	*B. subtilis* ATCC 6633	*E. coli* ATCC 25922
MA-1	++	+++	++
MA-2	+++	+++	++
MB2-1	+	+++	++
MB2-2	++	++	++
MB2-3	++	+++	+
MC1-1	++	+++	++
MC2-2	++	++	++
MC2-3	++	++	++
MC5-1	+	+++	+
MC7-1	++	++	++
MC7-2	+++	+++	+
MC7-3	-	++	+
MC8-2	++	-	+
MC8-3	+++	-	+
MC10-1	+++	+++	++
MC12-2	+++	++	+
029-2P	++	++	++
A-25	+++	+++	++
JSM1-1	++	+	+

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Isolates no.	Inhibition zone (mm)		
	S. aureus ATCC 25923	*B. subtilis* ATCC 6633	*E. coli* ATCC 25922
JSM1-2	++	-	+
JSM1-3	+++	+++	++
JSM2-1	++	-	+
JSM3-1	+++	-	++
JSM5-1	+++	+++	++
R1-1	++	+++	-
R1-2	+	+-	+
R1-3	+	-	+
CB2-2	+	+-	+
CB5-1	++	+++	+
CB5-2	+	-	+
026-1P	++	-	++
028-2P	++	+	++
P1-1	++	+-	++
S1-6	+	+-	++
S5-2	+	-	+
S5-3	+	+-	++
S5-6	+	+-	++
S7-3	+	+	+

- , ไม่ออกฤทธิ์, +-, ออกฤทธิ์เล็กน้อย, < 9.0 mm; + , 9-10.5 mm.
++ , 10.6-16.5 mm. , +++ , > 16.6 mm.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 ลักษณะสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อ *Micromonospora* species บน อาหาร YMA

Isolates no.	Spore size (μm)	Spore color	Colony color	
			upper colony	reverse colony
MA-1	0.8-1.5	orange-black	orange-black	orange-black
MA-2	0.8-1.2	orange	orange	orange
MB2-1	0.8-1.0	green-gray	green-gray	green-gray
MB2-2	0.6-1.0	black-gray	green-black	green-black
MB2-3	0.8-1.0	dark brown	orange-brown	orange-brown
MC1-1	0.6-0.8	dark brown	dark brown	dark brown
MC2-2	0.8-1.0	dark brown	orange-black	orange-black
MC2-3	0.8-1.0	dark brown	dark brown	dark brown
MC5-1	0.8-1.0	dark brown	dark brown	dark brown
MC7-1	0.8-1.0	green-gray	black	black
MC7-2	0.8-1.0	yellow-orange	yellow-orange	yellow-orange
MC7-3	0.8-1.0	green-gray	green-gray	green-green
MC8-2	0.8-1.2	green-gray	dark brown	dark brown
MC8-3	0.8-1.2	yellow-orange	orange-brown	orange-brown
MC10-1	0.8-1.2	green-gray	orange brown	orange brown
MC12-2	0.8-1.0	green-black	black	black
029-2P	0.8-1.0	green-gray	green-black	green-black
A-25	0.8-1.2	dark brown	black	black
JSM1-1	0.6-1.0	black	brown	Brown
JSM1-2	0.8-1.5	green-black	dark brown	dark brown
JSM1-3	0.8-1.0	dark brown	dark brown	dark brown
JSM2-1	0.8-1.0	yellow-orange	yellow-orange	yellow-orange
JSM3-1	0.8-1.2	dark brown	brown	brown
JSM5-1	0.8-1.2	dark brown	dark brown	dark brown
R1-1	0.8-1.2	black-orange	orange	orange
R1-2	0.8-1.0	green-gray	green-gray	green-gray
R1-3	0.8-1.0	green-gray	green-gray	green-gray
CB2-2	0.8-1.2	green-black	green-black	green-black
CB5-1	0.8-1.2	dark brown	green-black	green-black

ตารางที่ 7 (ต่อ)

Isolates no.	Spore size (μm)	Spore color	Colony color	
			upper colony	reverse colony
CB5-2	0.8-1.2	orange brown	orange-brown	orange-brown
026-1P	0.8-1.2	dark brown	brown	brown
028-2P	0.8-1.2	brown	brown	brown
P1-1	0.8-1.0	dark brown	orange-brown	orange-brown
S1-6	0.8-1.0	dark brown	dark brown	dark brown
S5-2	0.8-1.0	dark brown	dark brown	dark brown
S5-3	0.8-1.0	dark brown	dark brown	dark brown
S5-6	0.8-1.0	dark brown	dark brown	dark brown
S7-3	0.6-0.8	black	dark brown	dark brown

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 ลักษณะ การเจริญของสายพันธุ์เชื้อ *Micromonospora* species บน อาหารต่างๆ (อายุ 10 วัน)

Isolates no.	Medium	Growth	Colony color	
			upper colony	lower colony
A-25	YM	++	green-black	green-black
	Tyrosine	+	orange-brown	orange-brown
	Oatmeal	+++	orange-brown	orange-brown
	Nutrient	+	green-black	green-black
	GA	-	-	-
JSM1-3	YM	+	pale-brown	pale-orange
	Tyrosine	+-	pale-brown	pale-orange
	Oatmeal	+++	orange	pale-orange
	Nutrient	+	orange-brown	pale-orange
	GA	-	-	-
JSM5-1	YM	++	dark-brown	brown
	Tyrosine	+-	-	-
	Oatmeal	+++	orange-brown	pale-orange
	Nutrient	+	orange-brown	brown
	GA	-	-	-
M. chalcea KA-579	YM	++	orange	orange
	Tyrosine	+	orange	orange
	Oatmeal	+++	orange	orange
	Nutrient	+	orange	orange
	GA	-	-	-

-. ไม่เติบโต, +. เติบโตน้อย, ++..เติบโตปานกลาง, +++. เติบโต

ตารางที่ 9 การใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อ *Micromonospora* species

Isolates no.	None	Glu	Rib	Rha	Raff	Mel	Man	Gly
MA-1	-	+	-	-	-	-	-	-
MA-2	-	+	-	-	-	-	-	-
MB2-1	-	+	-	+	+	+	-	-
MB2-2	-	+	-	-	-	-	-	-
MB2-3	-	+	+	+	+	+	+	-
MC1-1	-	+	-	-	-	-	-	-
MC2-2	-	+	-	-	-	-	-	-
MC2-3	-	+	-	-	-	+	+	-
MC5-1	-	+	-	-	+	-	+	-
MC7-1	-	+	-	-	-	-	-	-
MC7-2	-	+	-	-	-	-	-	-
MC7-3	-	+	-	-	-	-	-	-
MC8-2	-	+	-	-	+	+	-	-
MC8-3	-	+	-	-	-	-	-	-
MC10-1	-	+	-	-	-	-	-	-
MC12-2	-	+	-	-	-	-	-	-
029-2P	-	+	-	+	+	+	+	+
JSM1-1	-	+	-	-	-	-	-	-
A-25	-	+	-	-	+	+	+	-
JSM1-2	-	+	-	+	+	+	+	+
JSM1-3	-	+	-	-	-	-	-	-
JSM2-1	-	+	-	-	-	-	+	-
JSM3-1	-	+	-	+	+	+	-	-
JSM5-1	-	+	-	-	-	-	-	-
R1-1	-	+	-	-	-	-	-	-
R1-2	-	+	-	-	-	-	-	-
R1-3	-	+	-	-	-	-	-	-

Glu , Glucose, Rib , Ribose, Rha , Rhanose, Raff , Raffinose

Mel , Melibiose, Man , Mannitol, Gly , Glycerol

* -, not utilized , + , utilized

ตารางที่ 9 (ต่อ)

Isolates no.	None	Glu	Rib	Rha	Raff	Mel	Man	Gly
CB2-2	-	+	-	-	+	+	+	-
CB5-1	-	+	-	-	-	-	-	-
CB5-2	-	+	-	-	-	-	-	-
026-1P	-	+	-	-	-	-	-	-
028-2P	-	+	-	+	+	+	-	+
P1-1	-	+	-	-	+	-	-	-
S1-6	-	+	-	+	+	+	-	+
S5-2	-	+	-	-	-	-	+	-
S5-3	-	+	-	-	-	-	-	-
S5-6	-	+	-	+	+	-	-	+
S7-3	-	+	-	+	+	+	+	+

Glu , Glucose, Rib , Ribose, Rha , Rhanose, Raff , Raffinose

Mel , Melibiose, Man , Mannitol, Gly , Glycerol

* -, not utilized , + , utilized

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 10 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อ *Micromonospora* species

Isolates no.	reduce NO_3	Starch	H_2S	Melanin	Gelatin	Czape x	% NaCl
MC7-3	+	+	-	+	+	+	4
R1-2	+	+	-	+	+	+	4
R1-3	+	+	-	+	+	+	3
A-25	+	+	-	+-	+	+	4
MB2-1	+	+	-	+-	+	+	5
JSM1-2	+	+	-	+-	+	+	6
028-2P	+	+	-	+-	+	-	6
MB2-3	+	+	-	-	+	+	6
029-2P	+	+	-	-	+	+	6
MC12-2	+	+	-	-	+	+	2
CB5-1	+	+	-	-	+	+	4
MC7-1	+	w	-	-	+	+	4
MC5-1	+	w	-	-	+	+	4
CB2-2	+	w	-	-	+	+	4
MC2-2	+	w	-	-	+	+	3
026-1P	+	+	-	-	+	-	5
JSM1-1	+	w	-	-	-	-	4
MB2-2	-	+	-	+	+	+	4
MC7-2	-	w	-	+	+	+	4
MC10-1	-	+	-	+	+	+	3
MA-2	-	+	-	-	+	+	3
MC1-1	-	+	-	-	+	+	3
MC8-2	-	+	-	-	+	+	4
JSM3-1	-	+	-	-	+	+	4
MA-1	-	+	-	-	+	+	5
P1-1	-	w	-	-	+	+	5
MC2-3	-	w	-	-	+	+	4
JSM2-1	-	w	-	-	+	+	4
MC8-3	-	+	-	-	+	-	2

ตารางที่ 10 (ต่อ)

Isolates no.	reduce NO_3	Starch	H_2S	Melanin	Gelatin	Czapex	% NaCl
CB5-2	-	+	-	-	-	-	3
R1-1	-	-	-	-	+	+	4
JSM1-3	-	-	-	-	+	-	4
JSM5-1	-	-	-	-	+	-	4
S1-6	-	+	-	-	+	NT	3
S5-2	-	+	-	-	+	NT	3
S5-3	+	+	-	-	+	NT	3
S5-6	+	+	-	-	+	NT	3
S7-3	-	+	-	-	+	NT	3

+ , positive ,-, negative, w , weakly, NT , not test

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 คุณสมบัติทางสรีรวิทยาของเชื้อ *Micromonospora* species JSM5-1, JSM1-3, และ A-25

Reactions	Response		
	JSM5-1	JSM1-3	A-25
Growth on Czapex's agar	-	-	+
milk coagulation	+	-	-
milk peptonization	-	+	+
Carbon utilization :			
D-glucose	+	+	+
ribose	-	-	-
Rhamnose	-	-	-
Raffinose	-	-	+
melibiose	-	-	-
Mannitol	-	-	+
Glycerol	-	-	-
Xylose	+	-	+
Galactose	+	+	-
Arabinose	+	+	+
Trehalose	+	+	+
Cellobiose	-	+	+
Fructose	+	-	+

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I19111526

ตารางที่ 12 ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจากน้ำหมักของเชื้อ *Micromonospora* สายพันธุ์ที่คัดเลือก เมื่อเลี้ยงในอาหารชนิดต่างๆ เป็นเวลา 5 วัน

media	Inhibition zone (mm)*								
	S. aureus ATCC 25923			*B. subtilis* ATCC 6633			*E.coli* ATCC 25922		
	JSM5-1	A-25	JSM1-3	JSM5-1	A-25	JSM1-3	JSM5-1	A-25	JSM1-3
GP	17.2	33.1	28.0	18.7	31.7	30.1	-	-	-
GM	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GN	-	29.3	27.8	-	29.2	28.0	-	17.4	-
GS	32.75	-	+-	+-	-	+-	-	23.8	20.0
SY	-	25.3	25.9	-	25.2	26.1	-	-	+-
SS	16.5	27.0	+-	+-	25.5	+-	-	-	16.0
DS	-	21.0	-	-	19.6	-	-	-	-

*100 µl / disc

GP , Glycerol peptone medium

GM , Glucose molasses medium

GN , Glucose NaCl medium

GS , Glucose soybean medium

SY , Sucrose yeast extract medium

SS , Sucrose soybean medium

DS , Dextrin soybean medium

Disc diameter = 13 mm.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 13 ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบจากน้ำหมักของเชื้อ *Micromonospora* sp JSM 5-1 เมื่อเลี้ยงในอาหาร GS ที่มีระดับ pHs ต่างๆ

initial pH	final pH		Inhibition zone (mm)*	
	5 days	7 days	5 days	7 days
6.25	6.60	6.55	27.2	27.15
6.40	6.82	6.53	29.0	26.3
7.01	6.86	6.70	32.75	30.1
7.51	7.44	6.79	29.8	27.9
8.08	7.67	7.94	27.3	27.85

*100 µl / disc

ตารางที่ 14 ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบจากน้ำหมักของเชื้อ *Micromonospora* sp. JSM 5-1 เมื่อเลี้ยงในอาหาร GS ที่บ่มไว้ ณ อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 5 วัน

Temperature(°C)	Inhibition zone(mm)*	
	S. aureus ATCC 25923	*B.subtilis* ATCC 6633
28°C	28.1	+-
30°C	15.6	+-
33°C	+-	+-

*100 µl / disc

+- ; weak positive

Disc diameter = 13 mm.

ตารางที่ 15 ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจากสารสกัดที่ผลิตโดยเชื้อ *Micromonospora* sp. JSM 5-1 , A-25 และ JSM1-3 เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน

Isolates	Extracts	Inhibition zone (mm)*		
		S.aureus ATCC 25923	*B. subtilis* ATCC 6633	*E. coli* ATCC 25922
JSM5-1	Ethyl acetate	10.9	15.3	10.5
	Butanol	9.9	13.0	+-
	Meihanol	-	+-	+-
A-25	Ethyl acetate	9.5	9.2	8.0
	Butanol	-	9.0	-
	Methanol	-	-	-
JSM1-3	Ethyl acetate	9.0	9.2	+-
	Butanol	+-	-	-
	Methanol	-	-	-

*5 mg / disc

Disc diameter = 6 mm.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 16 ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจากสารสกัดด้วย ethyl acetate ที่ผลิตโดยเชื้อ *Micromonospora* sp. JSM 5-1 , A-25 และ JSM1-3 เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน

Test organisms	Inhibition zone (mm)					
	5 mg/disc			10 mg/disc		
	JSM5-1	A-25	JSM1-3	JSM5-1	A-25	JSM1-3
S. aureus ATCC 25923	11.3	11.2	+-	12.4	13.3	8.6
S. aureus MRSA I	14.5	12.7	+-	19.7	15.1	9.1
S. aureus MRSA II	13.5	14.3	7.2	14.9	17.9	9.9
S. epidermidis	14.3	14.5	11.8	16.9	20.1	15.5
Bacillus subtilis ATCC 6633	16.9	11.2	+-	18.1	10.5	8.8
Enterococcus faecalis ATCC 25912	11.8	-	+-	17.3	11.1	10.7
E. coli ATCC 25922	14.6	8.6	-	15.9	11.3	7.8
P. aeruginosa ATCC 27853	10.2	+-	+-	14.2	7.8	7.3
Samonella typhi ATCC 14028	10.1	+-	+-	13.0	8.6	8.2
Alcaligenes sp.	11.9	15.6	+-	15.1	17.8	11.0

Disc diameter = 6 mm.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

stock culture of *Micromonospora* sp. JSM5-1

↓ 1 loopful

seed medium (GMP)

↓ shaked at 28 °C, 200 rpm for 3 days

production medium (GS)

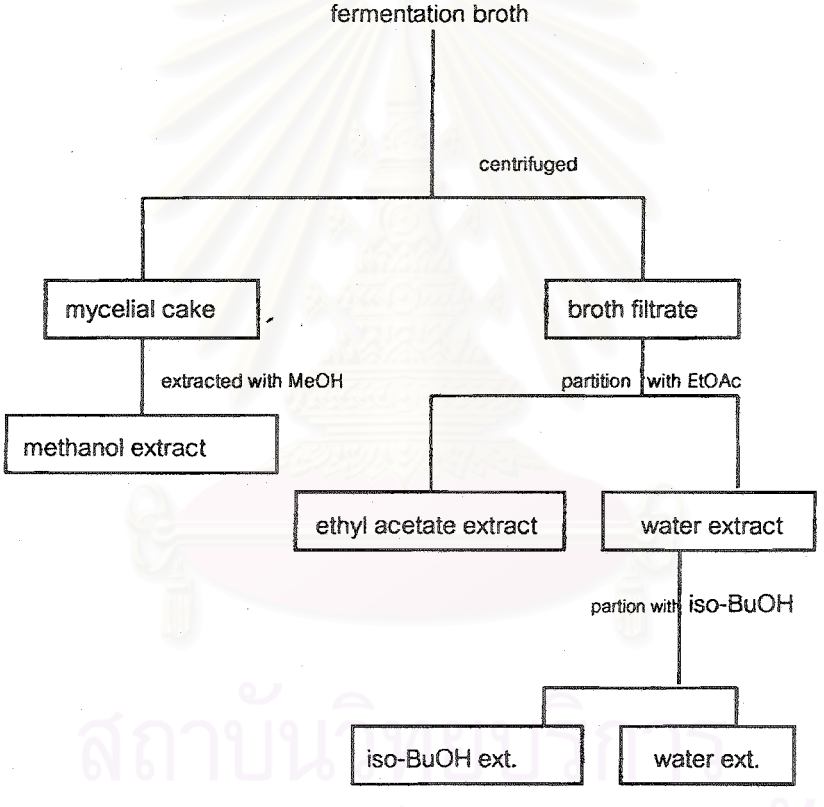
↓ shaked at 28°C, 200 rpm for 5 or 7 days

fermentation broth

แผนภูมิที่ 1 การหมักของเชื้อ *Micromonospora* sp. JSM5-1

5 ผลการสกัดและแยกสารปฏิชีวนะให้บริสุทธิ์

การเลี้ยงเชื้อ JSM5-1, JSM1-3 และ A-25 ดังใน แผนภูมิที่ 1 และนำมาสกัดดังในแผนภูมิที่ 2 พบว่า น้ำหมักของเชื้อทั้ง 3 มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทดสอบ ดังตารางที่ 15 และได้นำ Ethyl acetate extract จากทั้ง 3 เชื้อมาทดสอบฤทธิ์เพิ่มเติม ผลดังตารางที่ 16



แผนภูมิที่ 2 การสกัดสารจากเชื้อ *Micromonospora* sp. JSM5-1

<u>การเตรียมสารสกัดหยาบจากเชื้อ *Micromonospora* sp. JSM 5-1 โดยใช้ GS medium</u>

ทำการเลี้ยงเชื้อ *Micromonospora* sp. JSM 5-1ใน seed medium (GMP) ที่ปรับระดับ pH เป็น 7.01 บ่ม พร้อมเขย่า ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลา 3 วัน นำseed มา 5 % เลี้ยงต่อใน fermentation medium (GS) หมักที่อุณหภูมิ 28 °C บนเครื่องเขย่า ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5วัน ทำทั้งสิ้น 25 ลิตร นำมาเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง แยกส่วนใสและส่วนตะกอน (เป็น fermentation broth และเซลล์ของเชื้อ) ออกจากกัน นำส่วนใสมาทำการ partition กับ ethyl acetate โดยนำส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อครั้งละ 500 มล. มาสกัดด้วย ethyl acetate 250 มล. จำนวน 3 ครั้ง นำชั้น ethyl acetate มาระเหยแห้ง ภายใต้สูญญากาศ ได้สารสกัดด้วย ethyl acetate (F-001) สารละลายที่เหลือนำมา partition ต่อด้วย butanol ชั้น butanol นำมาระเหยแห้งภายใต้สูญญากาศ ได้สารสกัดด้วย butanol (F-002) ส่วนสารละลายที่เหลือทำให้แห้งด้วยการlyophilize ได้สารสกัดด้วยน้ำ(F-003)

ส่วนตะกอน นำมาสกัดด้วย methanol หมักไว้เป็นเวลา 1 วัน กรอง ระเหยให้แห้งภายใต้สูญญากาศ ได้สารสกัดด้วย methanol (F-004) นำสารสกัดทั้ง 4 ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ พบว่า F-001 มีฤทธิ์ดีที่สุด ดังตารางที่ 15

<u>การแยกสารจากสารสกัดด้วย ethyl acetateจากเชื้อ *Micromonospora* sp. JSM 5-1ในGS medium</u>

จากการเลี้ยงเชื้อ *Micromonospora* sp. JSM 5-1 ในอาหาร GS ทั้งหมด 25 ลิตร ได้สารสกัดด้วย ethyl acetate น้ำหนัก 17.1053 กรัม (F-001) นำมาแยกสารด้วยวิธี quick column chromatography ใช้ sintered-glass filter เป็น column ซิลิกาเจล เป็นตัวดูดซับ สารละลายที่ใช้เพื่อชะสารออกจาก column เริ่มจาก chloroform : methanol 9 : 1 , 8 : 2, 1 : 1 และ methanol เก็บ fraction ครั้งละ 50 มล. ได้ทั้งหมด 73 fraction fractionสุดท้าย ใช้ methanol (800 มล.) ชะสารจาก column จนคาดว่ามีสารเหลืออยู่น้อยที่สุด รายละเอียดดังแสดงไว้ในตารางที่ 17

ตารางที่ 17 รายละเอียดของ fraction ที่ได้จากการแยกสารสกัด F-001

ลำดับที่ของ fraction	ตัวทำละลาย	ปริมาตร(มล.)	ชื่อfraction	น้ำหนัก (กรัม)
1 - 10	$CHCl_3$:MeOH 9:1	500	F-005	11.303
11 -23	" "	650	F-006	1.577
24 - 35	" "	600	F-007	0.082
36 - 46	" "	550	F-008	0.205
47 - 62	$CHCl_3$:MeOH 8:2	800	F-009	0.337
63 - 73	$CHCl_3$:MeOH 1:1	550	F-010	0.379
74	MeOH	800	F-011	0.136

นำ fractions ที่ได้มาตรวจสอบโดยใช้ TLC silica gel 60 GF_{254} aluminium sheet สารชะเป็นสารละลายผสมของ chloroform : methanol 9 : 1 ตรวจสอบภายใต้แสงเหนือม่วง (UV $_{254}$) และพ่นด้วยน้ำยา anisaldehyde - sulfuric acid solution และทำให้ร้อนที่อุณหภูมิ 100- 110 °C เป็นเวลา 1-2 นาที ทำการรวมfraction ที่มีส่วนประกอบของสารเหมือนกัน หรือใกล้เคียงกัน แล้วระเหยให้แห้งภายใต้ความดันต่ำ และชั่งน้ำหนัก

จาก สารสกัด F-005 (11.303 กรัม) มีส่วนที่เป็นของเหลว ลักษณะคล้ายน้ำมัน และตะกอนสีน้ำตาล นำตะกอน (50 มก.) มาแยกด้วยวิธี preparative thin-layer chromatography ใช้ silica gel 60 GF_{254} aluminium sheet ส่วนสารชะเป็นสารละลายผสมของ chloroform : methanol 9 : 1 ทำซ้ำ 2 ครั้ง ตรวจสอบด้วยแสงเหนือม่วง ความยาวคลื่น 254 นม.ขูดตัวดูดซับเป็นแถบตามที่เห็นภายใต้แสงเหนือม่วง ได้สาร 3 fraction คือ F-012, F-013, F-014 ชะสารออกจากตัวดูดซับด้วย chloroform : methanol 1:1 จนคาดว่ามีสารหลงเหลืออยู่น้อยที่สุด ระเหยสารละลายเพื่อลดปริมาตร ตั้งทิ้งไว้ให้ตกผลึก พบว่า

fraction F - 012 มีสาร J-1 ตกผลึก

fraction F - 013 มีสาร J-2 ตกผลึก

fraction F - 014 มี สาร J-2 และ J-4 ปนกัน

นำ F-012 และ F-013 มาตกผลึกซ้ำ จนได้สาร J-1 (2 มก.) และ J-2 (2 มก.) ตามลำดับ

จาก สารสกัด F - 006 (1.5779 กรัม) พบว่ามีตะกอนเกิดขึ้น นำตะกอนมาตกผลึกซ้ำ ได้ผลึก J-4 (8.8 มก.) นำ สารละลายที่เหลือจากการกรองผลึกไปแล้ว มาระเหยให้แห้ง และแยกด้วยวิธี column chromatography ใช้ ซิลิกาเจล เป็นตัวดูดซับ และ chloroform : methanol เป็นสารชะ

โดยค่อยๆเพิ่มปริมาณ methanol ในสารละลายผสม เก็บ fraction ครั้งละ 25 มล. ตรวจสอบแต่ละ fraction โดยใช้ silica gel TLC และสารละลายผสมที่ใช้ชะชนิดเดียวกับที่ใช้ใน column chromatography fractionที่มีสารประกอบเหมือนกัน รวมเป็น fraction เดียวกัน ได้ดังต่อไปนี้

ชื่อFraction	Fraction	สารละลายผสม	น้ำหนักสาร (มก.)
F - 015	1 - 5	$CHCl_3$:MeOH 9:1	95
F - 016	6 - 7	$CHCl_3$:MeOH 9:1	153
F - 017	8 - 11	$CHCl_3$:MeOH 8:2	370
F - 018	12 - 18	$CHCl_3$:MeOH 1:1	115
F - 019	19 - 29	$CHCl_3$:MeOH 1:1	104

นำสารสกัด **F - 016** (153 มก.) นำมาแยกด้วยวิธี column chromatography ใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ และ chloroform : methanol 9 : 1 เป็นสารชะ ค่อยๆเพิ่มปริมาณ methanol ในสารละลายผสม เก็บ fraction ครั้งละ 25 มล. ตรวจสอบแต่ละ fraction โดยใช้ silica gel TLC และสารละลายผสมที่ใช้ชะชนิดเดียวกับที่ใช้ใน column chromatography fractionที่มีสารประกอบเหมือนกัน รวมเป็น fraction เดียวกัน ได้ดังต่อไปนี้

ชื่อFraction	Fraction	สารละลายผสม
F - 020	1 -6	$CHCl_3$:MeOH 9:1
F - 021	7 - 10	$CHCl_3$:MeOH 8:2, 1:1
F - 022	11 - 20	$CHCl_3$:MeOH 1:1, MeOH

จากสารสกัด **F - 017** (370 มก.) นำมาแยกด้วยวิธี column chromatography ใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ และ chloroform : methanol 9 : 1 เป็นสารชะ ค่อยๆเพิ่มปริมาณ methanol ในสารละลายผสม เช่นเดียวกัน แยกได้สาร 3 fraction ดังมีรายละเอียด ดังต่อไปนี้

ชื่อFraction	Fraction	สารละลายผสม
F - 023	1 - 3	$CHCl_3$:MeOH 9:1
F - 024	4 - 8	$CHCl_3$:MeOH 8:2
F - 025	9 - 13	$CHCl_3$:MeOH 1:1

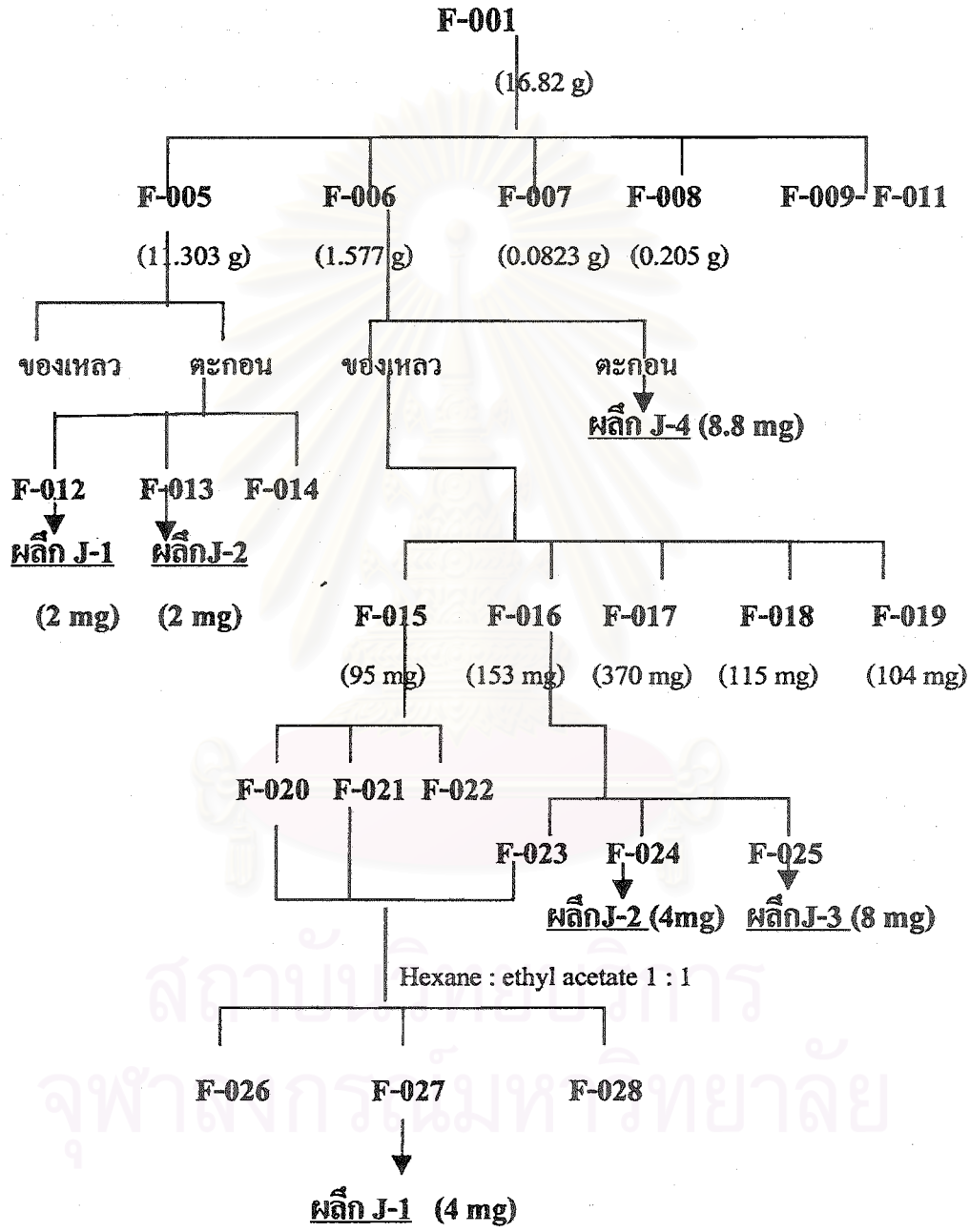
สารสกัด F - 024 เมื่อตั้งทิ้งไว้ จะตกผลึก ได้ผลึก J-2 (4 มก.) ส่วนสารสกัด F - 025 เมื่อตั้งทิ้งไว้ จะตกผลึกเช่นกัน ได้ผลึก J-3 หนัก 8 มก

นำสารสกัด F - 020, F - 021, F - 023 มารวมกัน นำมาแยกด้วยวิธี column chromatography ใช้ซิลิกาเจล เป็นตัวดูดซับ และ hexane : ethyl acetate 1 : 1 เป็นสารชะ มีรายละเอียดของการแยกได้เป็น fraction ต่างๆดังนี้

ชื่อFraction	Fraction	สารละลายผสม
F - 026	1 -3	Hexane:ethyl acetate 1:1
F - 027	4 - 5	Hexane:ethyl acetate 1:1
F - 028	6 - 18	Hexane:ethyl acetate 1:1

นำสารสกัด F - 027 ตั้งทิ้งไว้ รอให้ตกผลึก ได้ผลึกของสาร J-1 หนัก 4 มก.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



แผนภูมิที่ 3 การแยกสาร J-1, J-2, J-3 และ J-4 จาก F-001

การเตรียมสารสกัดหยาบจากเชื้อ *Micromonospora* sp. JSM 5-1 โดยใช้ GP medium

ทำการเลี้ยงเชื้อ *Micromonospora* sp. JSM 5-1ในอาหาร seed medium (GMP) ที่เหมาะสม ที่ระดับ pH 7.01 บ่ม พร้อมเขย่า ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลา 3 วัน นำseed มา 5 % เลี้ยงต่อใน production medium (GP) หมักที่อุณหภูมิ 28 °C บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200รอบต่อนาที เป็นเวลา 5วัน ทำทั้งสิ้น 7 ลิตร นำมาเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง แยกส่วนใสและส่วนตะกอน (เป็นmediumและเซลล์ของเชื้อ) ออกจากกัน นำส่วนใสมาทำการ partition กับ ethyl acetate โดยนำส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อครั้งละ 500 มล. มาสกัดด้วย ethyl acetate 250 มล. จำนวน 3 ครั้ง นำชั้น ethyl acetate มาระเหยแห้ง ภายใต้สูญญากาศ ได้สารสกัดด้วย ethyl acetate (M-001) เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* และ *B. subtilis* พบว่ามีโซนใส ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 14.0 และ 13.9 มม. ตามลำดับ

การแยกสารจากสารสกัดด้วย ethyl acetate (M-001)จากเชื้อ *Micromonospora* sp. JSM 5-1

จากการเลี้ยงเชื้อ *Micromonospora* sp. JSM 5-1 ด้วย production medium GP ทั้งหมด 7 ลิตร ได้สารสกัดด้วย ethyl acetate (M-001) (น้ำหนัก 2.1483 กรัม) นำมาแยกสารด้วยวิธี column chromatography ใช้ ซิลิกาเจล เป็นตัวดูดซับ สารละลายที่ใช้เพื่อชะสารออกจาก column เริ่มจาก chloroform : methanol 9 : 1 และค่อยๆเพิ่ม ปริมาณของ methanol จนถึง methanol 100 % เก็บ fraction ครั้งละ 50 มล. ได้ทั้งหมด 12 fractions รายละเอียดดังแสดงไว้ในตารางต่อไปนี้

ชื่อFraction	Fraction	สารละลายผสม
M-002	1	$CHCl_3$:MeOH 9:1
M-003	2	$CHCl_3$:MeOH 9:1
M-004	3-5	$CHCl_3$:MeOH 9:1
M-005	6-8	$CHCl_3$:MeOH 9:1
M-006	9-10	$CHCl_3$:MeOH 9:1
M-007	11	$CHCl_3$:MeOH 9:1
M-008	12-13	$CHCl_3$:MeOH 9:1
M-009	14-18	$CHCl_3$:MeOH 9:1
M-010	19-24	$CHCl_3$:MeOH 85:5
M-011	25-29	$CHCl_3$:MeOH 8:2
M-012	30-40	$CHCl_3$:MeOH 7:3, 1:1
M-013	41-45	MeOH

นำ fraction M-002 ถึง M-013 ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* และ *B. subtilis* ได้ผลตามตารางที่ 18 fractionที่ออกฤทธิ์ได้ดี ได้แก่ M-004, M-005 , M-010 และ M-011 ส่วนใน fraction M-006 เมื่อตั้งทิ้งไว้ได้ผลึกของ J-3 (6 มก.) และใน fraction M-007 เมื่อตั้งทิ้งไว้ได้ผลึกของ J-4 (10 มก.)

นำ M-011 ซึ่งพบว่าออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ดีที่สุด มาแยกด้วยวิธี column chromatography โดยใช้ซิลิกาเจล เป็นตัวดูดซับ และ chloroform : methanol 8 : 2 เป็นสารชะ เก็บ fraction ครั้งละ 20 มล. ได้ทั้งหมด 5 fractions ดังนี้

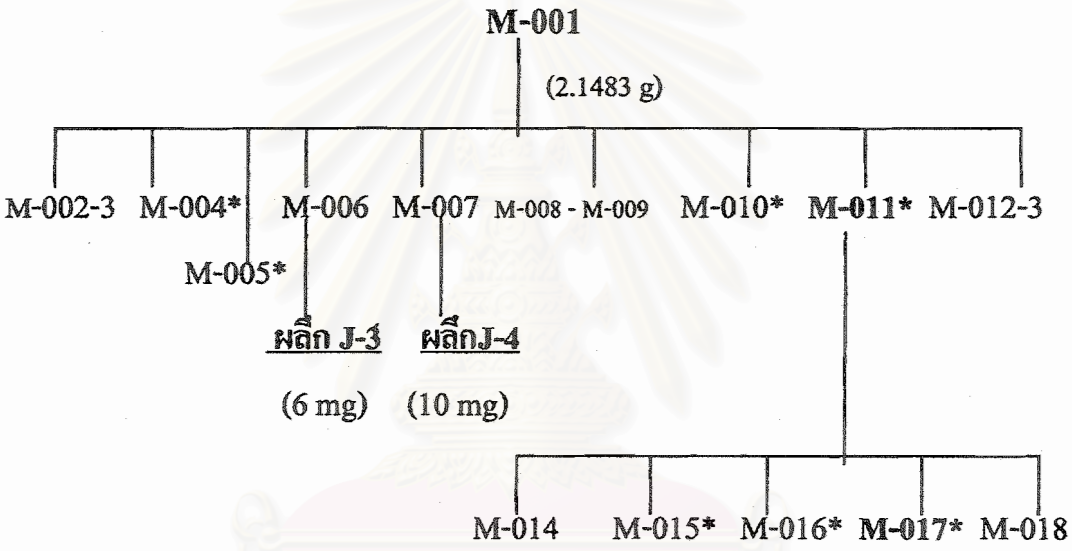
ชื่อFraction	Fraction	สารละลายผสม
M-014	1-2	$CHCl_3$:MeOH 8:2
M-015	3-4	$CHCl_3$:MeOH 8:2
M-016	5	$CHCl_3$:MeOH 8:2
M-017	6-7	$CHCl_3$:MeOH 1:1
M-018	8-9	MeOH

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 18 ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัด fraction ต่างๆ

Fractions	ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส (มม.)		
	S. aureus ATCC 25923	*B. subtilis* ATCC 6633	*E. coli* ATCC 25922
F-005	8.0	10.0	8.8
F-006	9.8	7.5	8.7
F-007	+,-	8.8	-
F-008	-	7.7	7.3
F-009	-	-	-
F-010	-	-	9.5
F-011	-	-	10.2
M-001	14.0	13.9	NT
M-002	+,-	7.5	NT
M-003	+,-	8.0	NT
M-004	15.4	15.2	NT
M-005	13.5	10.8	NT
M-006	+,-	7.5	NT
M-007	12.2	8.0	NT
M-008	-	+,-	NT
M-009	+,-	-	NT
M-010	12.3	8.0	NT
M-011	21.3	24.0	NT
M-012	-	+,-	NT
M-013	-	-	NT
M-014	-	-	NT
M-015	20.1	29.2	NT
M-016	20.3	24.0	NT
M-017	32.7	40.5	NT
M-018	-	-	NT

จากการนำ fraction M-014 ถึง M-018 ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* และ *B. subtilis* ได้ผลตามตารางที่ 18 fractionที่ออกฤทธิ์ได้ดี ได้แก่ M-015, M-016 และ M-017 โดยเฉพาะ M-017 มีฤทธิ์สูงมาก มีโซนใสขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางถึง 32.7 และ 40.5 มม. ตามลำดับ ซึ่งจัดว่าสูงมากและน่าสนใจมากด้วย แต่เนื่องจากได้ทำการเลี้ยงเชื้อ *Micromonospora* สายพันธุ์ JSM5-1 ใน GP medium ในปริมาณน้อย จึงไม่สามารถแยกสารได้ต่อไปอีก



แผนภูมิที่ 4 การแยกสาร จาก M-001

*= มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ดี

ข้อมูลทาง spectroscopy ของสารที่แยกได้

J-1 (genistein)

EIMS : m/z (% relative intensity) ($C_{15}H_{10}O_5$) (รูปที่ 4)

270(92), 153(100), 135(19), 124(32), 118(52), 96(14), 89 (25), 69(35), 51(17).

^{1}H-NMR : δ ppm 500 MHz, ใน DMSO-d_6 (รูปที่ 5, 6)

6.21 (1H,d, J = 2.1, H-6), 6.39 (1H, d, J = 2.1, H-8), 6.81 (2H, dt, J = 1.9, 8.5, H-3', H-5'), 7.37 (2H, dt, J = 1.9, 8.5, H-2', H-6'), 8.32 (1H, s, H-2), 9.59 (1H, s, OH) , 12.95 (1H, s, 5-OH)

^{13}C-NMR : δ ppm 75 MHz, ใน DMSO-d_6 (รูปที่ 7)

94.09 (C-8), 99.40 (C-6), 104.85 (C-10), 115.46 (C-3', C-5'), 121.64 (C-1'), 122.70 (C-3), 130.56 (C-2', C-6'), 154.36 (C-2), 157.81 (C-9), 158.02 (C-4'), 162.41 (C-5), 164.79 (C-7), 180.62 (C-4).

2. J-2 (daidzein)

EIMS : m/z (% relative intensity) ($C_{15}H_{10}O_4$) (รูปที่ 9)

254 (M^+, 52.53), 253 (M^+-1, 50), 137 (100), 118 (70.25), 108 (21.52), 89 (37.34), 63 (27.22)

^{1}H-NMR : δ ppm 500 MHz, ใน DMSO-d_6 (รูปที่ 10, 11)

6.79 (1H, dd, J = 2.1, 8.5, H-6), 6.85 (1H, d, J = 2.1, H-8), 6.92 (2H, dd, J = 2.5, 8.5, H-3', H-5'), 7.37 (2H, dd, J = 2.2, 8.5, H-2', H-6'), 7.95 (1H, d, J = 8.7, H-5), 8.28 (1H, s, H-2), 9.53 (1H, s, OH)

^{13}C-NMR : δ ppm 75 MHz, ใน DMSO-d_6 (รูปที่ 12, 13)

102 (C-8), 114.7 (C-3', C-5'), 114.9 (C-6), 116.4 (C-10), 122 (C-1'), 123.5 (C-3), 127 (C-5), 130. (C-2', C-6'), 152.5 (C-2), 156.8 (C-9), 157.2 (C-4'), 162.2 (C-7), 175 (C-4).

3. J-3 (thymine)

EIMS : m/z (% relative intensity) ($C_5H_6N_2O_2$) (รูปที่ 15)
126 (M^+, 100), 97 (2.65), 85 (15.71), 83 (34.55), 55 (92.67), 54 (46.6), 52 (16.62).

IR(KBr disc) : ν_{max} cm^{-1}, KBr disc (รูปที่ 14)
3432, 1733, 1674, 1453, 1425, 743-848.

^{1}H-NMR : δ ppm 300 MHz, ใน DMSO-d_6 (รูปที่ 16)
1.7 (3H, s,H-7, CH_3), 7.25 (1H, s, H-6), 10.6 (1H,s ,H-3, NH), 11.0 (1H, s, H-1,NH)

^{13}C-NMR : δ ppm 75 MHz, ใน DMSO-d_6 (รูปที่ 17)
12.04 (C-7,CH_3), 107.68 (C-5), 137.6 (C-6), 151.36 (C-2, C=O), 164.79 (C-4,C=O).

4.J-4 (uracil)

EIMS : m/z (% relative intensity) ($C_4H_4N_2O_2$) (รูปที่ 22)
112 (M^+, 100), 85 (23.25), 83 (31.75), 69 (49.5), 68 (13.44).

IR(KBr disc) : ν_{max} cm^{-1}, KBr disc (รูปที่ 21)
3423, 1717, 1669, 1453, 1419, 763-859.

^{1}H-NMR : δ ppm 300 MHz, ใน DMSO-d_6 (รูปที่ 23, 24)
5.43 (1H, d, J = 7.6, H-5), 7.38 (1H, d, J = 7.5, H-6), 10.8 (1H,s , H-3,NH), 11.0 (1H, s, H-1,NH)

^{13}C-NMR : δ ppm 75 MHz, ใน DMSO-d_6 (รูปที่ 25)
100.25 (C-5) , 142.06 (C-6), 151.37(C-2, C=O), 164.19 (C-4,C=O).

บทที่ 5
การอภิปราย

จากผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญ เชื้อ *Micromonospora* สายพันธุ์ต่างๆ ที่แยกได้จากตัวอย่างดิน ที่เก็บจากจังหวัด ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร ชลบุรี ราชบุรี และจันทบุรี ระยอง (ตารางที่ 5) พบว่าเชื้อทุกสายพันธุ์ มีโคโลนีชื้น และสร้างสปอร์สีคล้ำ (ตารางที่ 7-8) และพบว่าส่วนใหญ่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ (ตารางที่ 6) และจากการ ศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีเพิ่มเติม (ตารางที่ 9-10) พบว่าเชื้อทุกสายพันธุ์จัดอยู่ในสกุล *Micromonospora* (Holt, 1989) ได้คัดเลือกเชื้อสายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดี ได้แก่ สายพันธุ์ JSM 5-1, A-25 และ JSM 1-3 โดยเฉพาะ JSM5-1 ได้ศึกษาลักษณะของสปอร์และเส้นใยภายใต้กล้อง Scanning electron microscope พบว่ามีสปอร์เดี่ยวอยู่บนเส้นใย (ภาพที่ 1) และได้เปรียบเทียบ ลักษณะการเจริญของ เชื้อทั้งสามสายพันธุ์ กับเชื้อ *Micromonospora chalcea* KA 579 ซึ่งมีลักษณะแตกต่างกัน (ภาพที่ 2 และตารางที่ 8) และนำเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ไปศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในอาหารต่างๆ (ตารางที่ 12-14) พบว่า JSM5-1 มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 ได้ดี เมื่อเลี้ยงในอาหาร GS และเมื่อนำอาหารนี้ มาใช้ในการเลี้ยงเชื้อทั้งสามสายพันธุ์ แล้วนำมาสกัดด้วย ethyl acetate, butanol และ methanol พบว่า สารสกัดด้วย ethyl acetate ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดีที่สุด (ตารางที่ 15)

นำสารสกัดด้วย ethyl acetate ของเชื้อ สายพันธุ์ JSM 5-1 ซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus, S. epidermidis, Bacillus subtilis, Enterococcus faecalis, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhi* และ *Alcaligenes* sp. ได้ดีที่สุด มาทำการแยกโดยใช้เทคนิคทางchromatography หลายๆขั้นตอน จนแยกได้สารบริสุทธิ์ 4 สาร คือ สาร J-1, J-2, J-3 และ J-4

โครงสร้างของสารทั้ง 4 ถูกกำหนดโดยใช้ข้อมูลทาง spectroscopy ซึ่งได้แก่ IR., MS, NMR ทั้งชนิด ^{1}H และ ^{13}C

<u>การกำหนดสูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้</u>

<u>1. J-1 (Genistein)</u>

สาร J-1 เป็นผงสีนวล ได้จากการนำสารสกัด F-020, F-021, F-023 มารวมกัน

และแยกด้วยวิธี column chromatography ใช้ซิลิกา เจล เป็นตัวดูดซับ hexane : ethyl acetate 1 : 1 เป็นสารชะ แยกสาร J-1 ได้ 4 mg จาก fraction F-027 ผลึกที่ได้นำไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. subtilis* พบว่ามีโซนใสขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10.1 มม.

จาก mass spectra แบบ electron impact (EIMS) ตามรูปที่ 4 แสดงมวลของสารที่ m/z 270 (92%) มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{15}H_{10}O_5$

จากสเปคตรัม ^{1}H-NMR ของสาร J-1 พบว่ามี methine proton 7 protons ที่ δ 6.21, 6.39, 6.81, 6.81, 7.37, 7.37, 8.32 ppm และมี OH ที่ δ 12.95 ppm ซึ่งเป็น 5-OH เกิดปฏิกิริยา hydrogen bonding ภายในโมเลกุล กับ oxygen ของ C-4 carbonyl อยู่บริเวณ down field มาก พบ aromatic proton ของ ring B ที่ δ 6.81, 7.37 ppm ส่วน aromatic proton ที่ตำแหน่ง 6 และ 8 ของring A ได้รับอิทธิพลของ 5-OH และ 7-OH ทำให้เคลื่อนไปที่บริเวณ up field กว่า คือ ที่ δ6.21 และ6.39 ppm ตามลำดับ

จากสเปคตรัม ^{13}C –NMR พบว่ามีคาร์บอนทั้งสิ้น 15 อะตอม เป็น carbonyl 1 อะตอม , methine carbon 7 อะตอม และ quaternary carbon 7 อะตอม

ตารางที่ 19 ข้อมูล NMR ของ ^{13}C (75 MHz) และ ^{1}H(500 MHz) ของสาร J-1 ใน DMSO-d_6

ตำแหน่ง	δ C (ppm)	δ H(ppm) multiplicity (J, Hz)
2	154.36	8.32(s)
3	122.70	-
4	180.62	-
5	162.41	OH,12.95(s)
6	99.40	6.21(d, J = 2.1)
7	164.79	OH, 9.59(s)
8	94.09	6.39 (d, J = 2.1)
9	157.81	-
10	104.85	-
1'	121.64	-
2',6'	130.56	7.37(dt, J = 1.9, 8.5)
3',5'	115.46	6.81(dt, J = 1.9, 8.5)
4'	158.02	-

จากการเปรียบเทียบข้อมูลสเปคตรัมของ ^{13}C และ ^{1}H-NMR ของสาร J-1 กับข้อมูลสเปค ตรัมของสาร genistein ที่เคยรายงานไว้แล้ว (Harborne และ Mabry, 1982 และ Ganguly, 1970) พบว่ามีค่าใกล้เคียงกันมาก ทำให้สรุปได้ว่า สาร J-1 เป็นสารกลุ่ม isoflavone ที่ชื่อ genistein ซึ่งเคยมีรายงานการพบในเชื้อ *Micromonospora halophytica* (Ganguly , 1970) เคยพบใน culture filtrate ของเชื้อ *Aspergilli* และ *Streptomycetes griseus* (Goodfellow และคณะ , 1988; Kenichi และคณะ , 1981) นอกจากนี้ยังพบว่า genistein มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของรา แบคทีเรีย ฆ่ายุง และยับยั้งเอนไซม์ topoisomerase (Chang และคณะ , 1995)

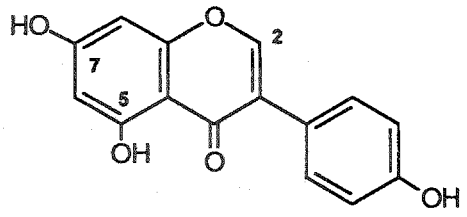
2.J-2 (daidzein)

สาร J-2 เป็นผงสีนวลแยกได้จาก F-016 โดยวิธี column chromatography ใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ และ chloroform : methanol 9 : 1 เป็นสารชะ แยกได้สาร 3 fractions F-023, F-024 และF-025 J-2 ตกผลึกจาก F-024 ได้สาร 4 mg สารนี้ เมื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. subtilis* พบว่า มีโซนใสขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9.1 มม.

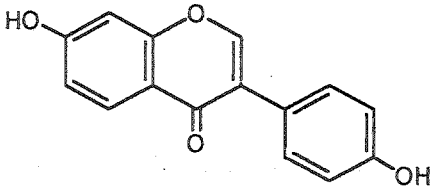
ข้อมูลจาก EIMS ตามรูปที่ 9 แสดงมวลของสารที่ m/z 254 (52.53%) มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{15}H_{10}O_4$

จาก ^{1}H – NMR (รูปที่ 10, 11) พบว่ามีสัญญาณของ OH ที่ δ 9.53 ppm และไม่มีสัญญาณ ที่ δ 12 ppm แสดงว่า ไม่มี 5-OH ซึ่งจะอยู่ down field มาก ดังได้กล่าวมาใน สเปคตรัมของ genistein ประกอบกับพบสัญญาณ proton ของ ring A 3 protons คือ ที่ δ 6.79 ppm (1H, dd, J = 2.1, 8.5, H-6), 6.85 (1H, d, J = 2.1, H-8), และ 7.95 (1H, d, J = 8.7, H-5) แสดงว่า ring A มี proton ที่ตำแหน่ง 5, 6, 8 และมี OH เข้าแทนที่ที่ตำแหน่ง 7 ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลของ ^{13}C-NMR

จากการเปรียบเทียบข้อมูลของสาร J-2 และสาร J-1 (genistein) พบว่ามีส่วนคล้ายคลึงกันมาก น่าจะมีสูตรโครงสร้างหลักเหมือนกัน มีความแตกต่างกันที่การแทนที่ proton ที่ตำแหน่งที่ 5 และเมื่อเปรียบเทียบข้อมูลสเปคตรัมกับ daidzein ที่เคยมีการรายงานไว้แล้ว (Ganguly , 1970) พบว่ามีค่าใกล้เคียงกันมาก ทำให้สรุปได้ว่า สาร J-2 เป็นสารกลุ่ม isoflavone ที่ชื่อ daidzein ซึ่งเคยมีรายงานการพบในเชื้อ *Micromonospora halophytica* (Ganguly, 1970), *Streptomyces xanthophaeus* (Hazoto และคณะ, 1979)



Genistein



daidzein

ตารางที่ 20 ข้อมูล NMR ของ ^{13}C (75 MHz) และ ^{1}H(500 MHz) ของสาร J-2 ใน DMSO-d_6

ตำแหน่ง	δ C (ppm)	δ H(ppm) multiplicity (J, Hz)
2	152.5	8.28(s)
3	123.5	-
4	175.0	-
5	127.0	7.95 (d, J = 8.7)
6	114.9	6.79(dd, J = 2.1, 8.5)
7	162.2	OH, 9.53(s)
8	102.0	6.85 (d, J = 2.1)
9	156.8	-
10	116.4	-
1'	122.0	-
2',6'	130.0	7.37(dd, J = 2.2, 8.5)
3',5'	114.7	6.92(dd, J = 2.5, 8.5)
4'	157.2	-

3.**J-3 (thymine)**

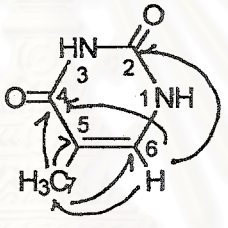
สาร J-3 เป็นผงสีนวลแยกได้จาก F-017 โดยวิธี column chromatography ใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ และ chloroform : methanol 9 : 1 เป็นสารชะ แยกได้สาร 3 fractions F-023, F-024 และ F-025 J-3 ตกผลึกจาก F-025 ได้สาร 8 mg สารนี้ เมื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. subtilis* พบว่า มีโซนใสขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8.0 มม.

ข้อมูลจาก EIMS ตามรูปที่ 15 แสดงมวลของสารที่ m/z 126(100%) มีสูตรโมเลกุล เป็น $C_5H_6N_2O_2$

จาก infrared spectra ตามรูปที่ 14 แสดงว่าสาร J-3 มี secondary amine (3432 cm^{-1} , 1 peak), carbonyl 2 หมู่ (1733, 1674 cm^{-1}) เป็น functional group

จาก ^1H – NMR ของสาร J-3 (รูปที่ 16) พบว่ามีสัญญาณของ methyl proton ที่ δ 1.7 ppm และมีสัญญาณ methine proton ที่ δ 7.25 ppm amine proton 2 proton ที่ δ 10.6 และ 11.0 ppm

จากสเปคตรัม ^{13}C –NMR ของสาร J-3 พบว่ามี carbonyl 2 หมู่ ที่ C-2 และ C-4 (δ 151.36, 164.79 ppm) มี methyl, methine และ quarternary carbon อย่างละ 1 อะตอม ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลของ ^1H – NMR จากการทำ HMQC และ HMBC (J = 8 Hz) (รูปที่ 19,20) พบความสัมพันธ์ของโปรตอนและคาร์บอนดังรูป



สรุปได้ว่า สาร J-3 เป็นอนุพันธ์ pyrimidine (5-methyl-2,4(1H, 3H)-pyrimidinedione หรือ thymine หรือ 5-methyluracil ซึ่งแยกได้ครั้งแรกจาก nucleic acid ในต่อม thymus (Levene, Z.; 1903)

ตารางที่ 21 ข้อมูล NMR ของ ^{13}C (75 MHz) และ ^1H(300 MHz) ของสาร J-3 ใน DMSO-d_6

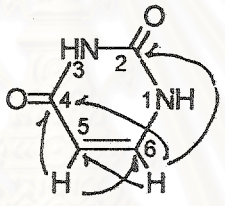
ตำแหน่ง	δ C (ppm)	δ H(ppm) multiplicity (J, Hz)
1	-	11.0 (s, NH)
2	151.36	-
3	-	10.6 (s, NH)
4	164.79	-
5	107.68	-
6	137.6	7.25 (s)
7	12.04	1.70 (CH_3, s)

4.J-4 (Uracil)

สาร J-4 เป็นผงสีนวล ได้จากตะกอนของสารสกัด F-006 ซึ่งนำมาตกผลึกอีกครั้งหนึ่ง ได้สารหนัก 8.8 มก. เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. subtilis* พบว่ามีโซนใส ขนาด 8.5 มม.

จาก mass spectra แบบ electron impact (EIMS) ตามรูปที่ 22. แสดงมวลของสารที่ m/z 112 (100%) มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_4H_4N_2O_2$ มีข้อมูล IR spectrum เช่นเดียวกับสาร J-3

จากสเปคตรัม ^{1}H-NMR ของสาร J-4 พบว่ามี methine carbon 2 อะตอม ซึ่ง coupling กันที่ δ 5.43 ppm (d, J=7.6) และ 7.38 (d, J=7.5) และ 2 proton ของ amine ที่ δ 10.8 และ 11.0 ppm. ส่วนสเปคตรัม ^{13}C-NMR สอดคล้องกันและ มีลักษณะคล้ายของสาร J-3 ต่างกันที่มี methine carbon 2 อะตอม ไม่มี methyl carbon จากการทำ HMQC และ HMBC (J=8 Hz) (รูปที่ 27-29) พบความสัมพันธ์ของโปรตอนและคาร์บอนดังรูป



สรุปได้ว่าสาร J-4 เป็นอนุพันธ์ของ pyrimidine เช่นเดียวกัน คือ เป็น 2,4 (1H, 3H)-pyrimidinedione หรือ uracil พบสารนี้ครั้งแรกจากปฏิกิริยา hydrolysis nucleic acid (Levene, Bass, Nucleic Acids. New York, 1931)

ตารางที่ 22 ข้อมูล NMR ของ^{13}C (75 MHz) และ^{1}H(300 MHz) ของสาร J-4 ใน DMSO-d_6

ตำแหน่ง	δ C (ppm)	δ H(ppm) multiplicity (J, Hz)
1	-	11.0
2	151.37	-
3	-	10.8
4	164.19	-
5	100.25	5.43 (d, J=7.6)
6	142.06	7.38 (d, J=7.5)

สารที่แยกได้ทั้งสี่สาร คือ สาร J-1, J-2, J-3 และ J-4 นำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย 3 ชนิด คือ *S. aureus, B. subtilis* และ *E. coli* พบว่าออกฤทธิ์ได้น้อยต่อเชื้อ *B. subtilis* และไม่ออกฤทธิ์ต่อเชื้อที่เหลือ ดังแสดงในตารางที่ 23

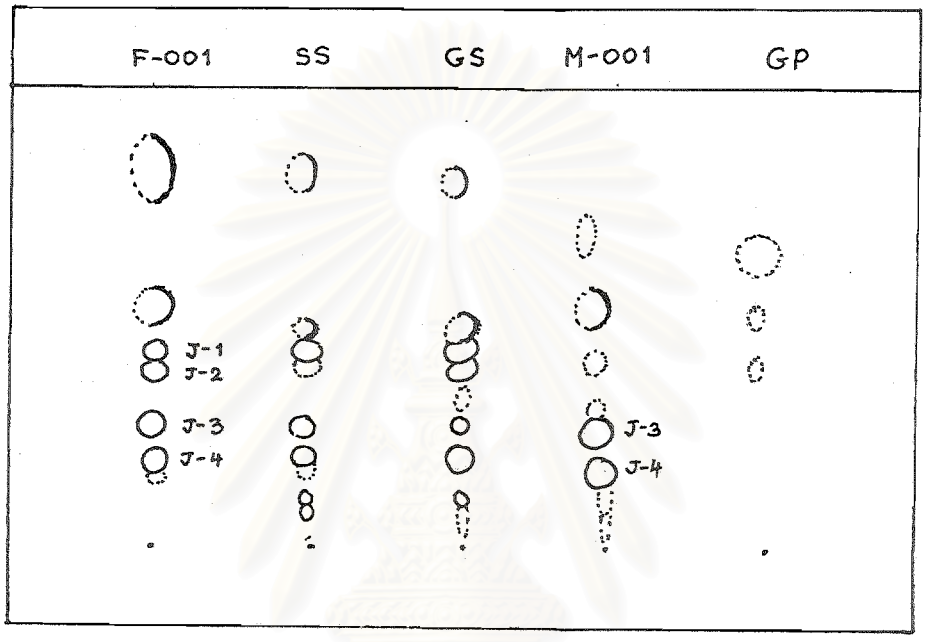
ตารางที่ 23 ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียของสารที่แยกได้

Fractions	ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส (มม.)		
	S. aureus ATCC 25923	*B. subtilis* ATCC 6633	*E. coli* ATCC 25922
J-1	+,-	10.1	NT
J-2	+,-	9.1	NT
J-3	+,-	8.0	NT
J-4	+,-	8.5	NT

สารที่แยกได้ J-1 และ J-2 ซึ่งจากการพิสูจน์สูตรโครงสร้าง พิสูจน์ได้ว่า เป็นสารกลุ่ม flavonoid ชนิด isoflavone ที่ชื่อ genistein และ daidzein ตามลำดับ สาร isoflavone ทั้งสอง พบอยู่ในถั่วเหลือง *Glycine max* หรือ *G. soja* ซึ่งเป็นส่วนประกอบของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ทั้ง GS และ SS ที่ใช้เลี้ยงเชื้อ *Micromonospora* sp. JSM5-1 จึงได้นำสารสกัดจาก GS medium , SS medium และสารสกัด F-001 มาตรวจสอบบน TLC ใช้ซิลิกาเจล ปั่นตัวดูดซับ และ chloroform : methanol 9 : 1 เป็นสารชะ พบว่าสารสกัดของ media และ F-001 มีสาร J-1 ถึง J-4 เป็นสารหลักคล้ายคลึงกัน ดังรูปที่ 3

ซึ่งแสดงว่า สาร genistein และ daidzein ที่แยกได้ อาจมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อ ฉะนั้น GS และ SS เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เหมาะสมกับเชื้อ *Micromonospora* สายพันธุ์นี้ ทำให้ไม่สามารถสร้างสารใหม่ๆได้ จึงเปลี่ยนเป็นสูตรอาหารอื่นที่ไม่มีถั่วเหลือง และยังเป็นสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อแล้ว เชื้อสร้างสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้ดี (ตามตารางที่ 12) ซึ่งได้คัดเลือกสูตรอาหาร GP มาใช้เลี้ยงเชื้อ และสกัดด้วย ethyl acetate จนได้สารสกัด M-001 นำสารสกัดของ GP medium และ M-001 มาตรวจสอบบน TLC แผ่นเดียวกับ GS, SS medium และ F-001 ดังได้กล่าวมาแล้ว พบว่าลักษณะบน TLC ของสารสกัดทั้งสองแตกต่างกัน โดยที่ M-001 ยังคงมีสาร J-3 และ J-4 แต่ GP medium ไม่มีสารทั้งสอง (ดังรูปที่ 3) จึงได้นำเชื้อ *Micromonospora* สายพันธุ์ JSM5-1 มาเลี้ยงใน GP medium ปริมาตร 7 ลิตร แต่ได้สารสกัด M-001 เพียง 2.1483 กรัม นำมาแยกตามวิธีที่ได้กล่าวไปแล้วในบทที่ 4 และนำแต่ละ fraction มาทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย พบว่า M-004, M-005, M-010, M-011 ออกฤทธิ์ได้ดี (ตามตารางที่ 18) แต่สารมีปริมาณน้อยมาก ทั้งสาร

สกัดหยาบและสารสกัดที่แยกได้ ส่วนสาร J-3, J-4 มีปริมาณมากกว่า ตกตะกอนแยกออกมาจาก M-006, M-007 ตามลำดับ คาดว่าสภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ ไม่ว่าอุณหภูมิ pH ความเร็วรอบ ฯลฯ ไม่เหมาะสมที่เชื้อจะสร้างสาร โดยเฉพาะสารที่ออกฤทธิ์ได้ดี ในปริมาณที่สูงได้ ซึ่งจะต้องทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสม โดยการปรับสูตรอาหาร และสภาวะการเลี้ยงต่อไป



○ สารมีปริมาณมาก ◌ สารมีปริมาณน้อย ◌ สารเรืองแสง

รูปที่ 3 TLC ของสารสกัด F-001, SS, GS medium, M-001, GP medium
Silica gel GF_{254} / chloroform : methanol 9:1

บทที่ 6

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

พบว่าจากผลการแยกเชื้อ 38 สายพันธุ์ จากดิน 25 ตัวอย่าง ที่เก็บจากหลายจังหวัดในประเทศไทย และจากผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีรวิทยา และชีวเคมีของเชื้อเหล่านั้น สามารถจัดทุกสายพันธุ์เป็นเชื้อในสกุล *Micromonospora* เชื้อเหล่านี้สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* ATCC 25923 และ *B. subtilis* ATCC 6633 และได้คัดเลือกตัวแทนที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดี ได้แก่ เชื้อ JSM5-1, JSM1-3 และ A-25 นำไปศึกษาการสร้างสารปฏิชีวนะในอาหารเหลวชนิดต่างๆ พบว่าสามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ดี เมื่อเลี้ยงในอาหาร GS ที่ pH 7.0 และอุณหภูมิ 28°C โดยเฉพาะสารสกัดด้วย ethyl acetate ที่ผลิตโดยเชื้อ JSM5-1 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 MRSA I และ MRSA II, *S. epidermidis* PCU , *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Enterococcus faecalis* ATCC25912, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhi* ATCC 14028 และ *Alcaligenes* sp. PCU

เมื่อนำสารสกัดด้วย ethyl acetate (F-001) ของเชื้อ JSM5-1 ไปแยกด้วยวิธี column chromatography ได้สารบริสุทธิ์ 4 ชนิด เป็นสาร isoflavone 2 ชนิด คือ genistein และ daidzein ซึ่งเคยมีรายงานการผลิตในเชื้อ *Micromonospora halophytica* และพบสาร thymine และ uracil สารทั้งสี่ ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้น้อย จึงได้นำเชื้อ JSM5-1 ไปเลี้ยงในอาหาร GP และพบว่าสารสกัดด้วย ethyl acetate (M-001) ที่แยกได้ โดยเฉพาะ fraction M-004, M-005, M-010 และ M-011 แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดี

จากการศึกษาและวิจัยครั้งนี้ พบเชื้อ *Micromonospora* sp. หลายสายพันธุ์ที่มีลักษณะที่แตกต่างกัน ผู้วิจัยได้ทำการสกัด แยกสาร และกำหนดสูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จากเชื้อเพียงสายพันธุ์เดียว รวมทั้งยังมีสารสกัดที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ JSM5-1 ที่เลี้ยงด้วย GP medium ที่แยกไปเพียงบางส่วน และจากการทดสอบฤทธิ์ พบว่ามีฤทธิ์ดีมาก ควรทำการแยกสารที่มีฤทธิ์ต่อไป นอกจากนี้ยังจำเป็นต้องมีการศึกษาในลักษณะเดียวกันกับเชื้อสายพันธุ์อื่นๆที่เหลืออยู่ โดยต้องปรับสูตรอาหารและสภาวะการเลี้ยงให้เหมาะสมเฉพาะเชื้อ รวมทั้งพัฒนาการสกัดแยกสารให้บริสุทธิ์ ให้ได้รวดเร็วขึ้น

จะทำให้ได้ข้อมูลการผลิตสารปฏิชีวนะของเชื้อ *Micromonospora* รวมทั้งองค์ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับเชื้อสายพันธุ์ต่างๆของเชื้อสกุลนี้ในประเทศไทยอีกด้วย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

ณัฐดา วิโรจน์แสงอรุณ, สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์, เพ็ญพรรณ แน่นหนา และสัตถาพร ศรีมหาสงคราม. 2528. "ฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียของเชื้อ *Streptomyces* species ที่แยกได้จากดินเขา : การคัดเลือกขั้นต้น วารสารบัณฑิตวิทยาลัย จุฬา ฯ ปีที่ 6 ธันวาคม หน้า 1-9.

สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์, กิตติศักดิ์ ลิขิตวิทยาวุฒิ และนิจศิริ เรืองรังษี. 2532. การศึกษาเปรียบเทียบการผลิตสารปฏิชีวนะโดยเชื้อ *Micromonospora* และเชื้อสกุลอื่นที่เกี่ยวข้อง. รายงานผลการวิจัย ทุนงบประมาณแผ่นดิน. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

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

Baz, J.P., Canedo, L.M., and Puentes, J.L.F. 1997. Thiocoraline, a novel depsipeptide with antitumor activity produced by a marine *Micromonospora* II: Physico-chemical properties and structure determination. J. Antibiotics. 50 : 738-741.

Carter, G.T., Nietsche, J.A., and Williams, D.R. 1990. Citreamicins, novel antibiotics from *M. citrea*. Isolation, characterization and structure determination. J. Antibiotics 43 : 504-512.

Cooper, R., Horan, A.C., Gentile, F., Guilo, V., Loebenberg, D., Marquey, J., and Patel, M. 1988. Sch. 37137, a novel antifungal compound produced by a *Micromonospora* sp. : Taxonomy, fermentation, isolation, structure and biological properties. J. Antibiotics 39 : 13-19.

Fehr, T., Sanglier, J-J., Schuler, W., Gschwind, L., Ponelle, M., Schilling, W., and Wioland, C. 1996. Antascomicins A, B, C, D and E novel FKBP12 binding compounds from a *Micromonospora* strain. J. Antibiotics 49 : 230-233.

Fehr, T., Quesniause, V.F.J., Sanglier, J-J., Oberer, L., Gschwind, L., Ponelle, M., Schilling W., Wehrli, S., Enz, A., Zenke, G., and Schuler, W. 1997. Cymbimicin A and B, two novel cyclophilin binding structures isolated from actinomycetes. J. Antibiotics 50 : 893-899.

Funaishi, K., Kawamura, K., Hagiwara, M., and Okanishi, M. 1990. New analogues of rosaramicin isolated from a *Micromonospora* strain I: Taxonomy, fermentation,

isolation and physico-chemical and biological properties. J. Antibiotics. 43 : 938-947.

Ganguly, A. K. and Zarre, O.Z. 1970. Genistein and daidzein, metabolites of *Micromonospora halophytica*. .Chem. and Ind. (London). : 201.

Goodfellow, M. 1988. Actinomycetes in Biotechnology . Academic Press Inc., San Diego.p. 1-30.

Glasby, J.S.1993: Encyclopedia of Antibiotic . 3rd ed, John Willy and Sons.

Hayakawa, M., T. Sadakata, T. Kajiura & H. Nonomura. 1991. New methods for the highly selective isolation of *Micromonospora* and *Microbispora* from soil. J. Ferment. Bioeng. 72: 320-326.

Hayakawa, Y., Matsuoka, M., and Seto, H. 1993. Quinolidomicins A_1, A_2 and B_1 ,Novel 60 Membered macrolide antibiotic I. Taxonomy, fermentation, isolation and physico-chemical and biological properties. J. Antibiotics. 46 : 1557-1569.

Hazato, T., Naganawa, H., Kumagai, M., Aoyaki, T., and Umezawa, H. 1979. J. Antibiot. Tokyo. 32 : 217.

Holt, J.G. (editor-in-chief).1989. Bergey's Manual of Systemic Bacteriology. Filamentous Actinomycetes and Related Bacteria . Vol. IV, The Williums and Wilkins Co. Baltimore.

Ishigami, K., Hayakawa, Y., and Seto, S. 1994. Cororubicin, a new anthracyclin antibiotic generating active oxygen in tumor cells. J. Antibiotics. 47 : 1219-1225.

Jackson, M., Karawowski, J.P., Hensey, D.M., Swanson, S., and Wardow, G.J. 1995. Macquarimicins, Microbial metabolites from *Micromonospora*. I. Discovery, taxonomy, fermentation and biological properties. J. Antibiotics . 48: 462-466.

Kase, H., Kaneko, M., and Yamada, K. 1987. K-13, a novel inhibitor of angiotensin I converting enzyme produced by *M. halophytica* subsp. *exilisia*. I. Fermentation, isolation and biological properties. J. Antibiotics. 40 :450-454.

Keeratipibul, S., Sugiyama, M., Nimi, O. and Nomi, R. (1984) streptothricin production by a new isolate of *Streptomyces* from Thailand soil. J. Ferment. Technol. 62: 19-31.

Kenichi, A., Ono, I., Kusakabe, H., Nakamura, G., and Isono, K., 1981. Studies on differentiation inducing substance of animal cells. I. Differenol A, a differentiation inducing substance against mouse leukemia cells. J. Antibiotics. 34(7):

919-920 (CA 96:128905c).

Kinoshita, K., Takenaka, S., Suzuki, K., and Hayashi, M. 1992. Mycinamicins, new macrolide antibiotic, Isolation and structure of novel fermentation products from *M. griseorubida*. J. Antibiotics. 45 : 1-9.

Konishi, M., Ohkuma, H., Matsumoto, K., Saitoh, K., and Oki, T. 1991. Dynemicins, new antitumor with the 1,5-diyn-3-ene and anthraquinone subunit. I. Production, isolation, physico-chemical and biological properties. J. Antibiotics. 44 :1300-1305.

Kutzner, H.J. 1981. The Family Streptomyces *In the Procaryotes* : A Handbook on Habitats Isolation and Identification of Bacteria. vol II. ed. by M.P. Starr *et al.*, Springer-Verlag, berlin. p.2028.

Lam, S.K., Hesler, G.A., Gustravson, D.R., Berry, R.L., Tomita, K., MacBeth, J.L., Ross J., Miller, D., and Forenza, S. 1996. Pyrrolosporin A, a new antitumor antibiotic from Micromonospora sp. C39217-R109-7. I. Taxonomy of producing organism., fermentation and biologieal activity. J. Antibiotics. 49 : 860-864.

Ling, D., Shield, L.S., and Rinchart, K.L., 1986. Isolation and structure determination of crisamicin A, a new antibiotic from *Micromonospora purpureochromogenes* subsp. *halotolerans*. J. Antibiotics. 39 : 345-353.

Lorian, V.1980. Antibiotics in laboratory Medicine, The Williams and Wilkins Company., Baltimore, p. 176.

Naenna, P., Virochsaengaroon, N. and Tanasupawat, S. 1994. Scanning electron micrograph and antimicrobial activity of *Streptomyces* species N28-1 and N97-1. Thai J. Pharm. Sci. 18(1) : 47-51.

Nakanishi, S., Chiba, S., Yano, H., and Matsuda, Y. 1995. MS-44, a new inhibitor of myosin light chain kinase from *Micromonospora* sp. KY 7123 J. Antibiotics. 48 : 948-951.

Nelson, R.A., Pope, J.A., Luedemann, J.M., Madaniel, L.E., and Schaffner, C.P. 1986. Crisamicin A, a new antibiotic from *Micromonospora*. Taxonomy of the producting strain, fermentation, isolation, physico-chemical characterization and antimicrobial properties. J. Antibiotics. 39 : 335-344.

Oki, T. 1994. S4-8 Recent Progress of Antibiotic Research in Application Control of Microorganisms in Asia . ed. by Komakata *et al.*, Japan : International Science

and Technology Exchange Center., pp. 285-294.

Omura, S., Imamura, N., Kuga, H., Masuma, R., and Iwai, Y. 1986. Clostomicins, new antibiotics produced by *Micromonospora echinospora* subsp. *armeniaca* subsp. nov. I. production, isolation, physico-chemical and biological properties. J. Antibiotics. 39 : 1407-1412.

Puar, M.S., Chan, T.M., Hegde, V., Patel, M., Bartner, P., Ng, K.J., and Pramanik, B.N. 1998. Sch 40832 : A novel thiostrepton from *Micromonospora carbonacea*, J. Antibiotics. 51 : 221-224.

Romero, F., Espliego, F., Baz, J.P., De Quesada, T.G., Gravalos, D., DeLa Calle, F., and Fernandes-Puentes, J.L. 1997. Thiocoraline, a new depsipeptide with antitumor activity produced by marine *Micromonospora*. I. Taxonomy, fermentation, isolation, and biological activities. J. Antibiotics. 50 : 734-737.

Shirling, E.B. and Gottlieb. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. Int. J. Syst.Bacteriol., 16, 313-340.

Sugawara, T., Tanaka, A., Imai, H., Nagai, K., and Suzuki, K. 1997. YM-47515, a novel isonitrile antibiotic from *Micromonospora echinospora* subsp. *echinospora*, J. Antibiotics. 50 : 944-948.

Takasashi, Y., Iwai, I., and Omura, S. 1986. Clostomicins, new antibiotics produced by *Micromonospora echinospora* subsp. *armeniaca* subsp. nov. II. Taxonomic study of the producing microorganism. J. Antibiotics. 39 : 1413-1418.

Weinstein, M.J., Wagman, G.H., Marquez, J.A.Testa, R.T., Oden, E. and Waitz, J.A.1969. Megalomicin, A new macrolide antibiotic complex produced by *Micromonospora*, J.Antibiotics. 22: 253-258.

Williams, S.T. and Cross, T. 1971. Actinomycetes : Slide and coverslip methods In Methods in Microbiology, vol 4, ed. by C. Booth, Academic Press Inc., London, p. 320.

Wu, R.-Y., Yang, L.-M., Kokoi, I., Lee, K.-H. 1988. Neihumicin, a new cytotoxic antibiotic from I. The producing organism, fermentation, isolation and biological properties. J.Antibiotics. 41: 481-489.

Yeo, W-H., Lee, O-K., Yun, B-S., Woo, J.S., Kim, Y-K., Park, E-K., Kim, S-S., Kim, Y-H., Kim, S-K., Yoo, I-D., Whang, K-S., and Yu, S-H. 1998 1-Hydroxycrisamicin A, a new isochromanquinone antibacterial antibiotic, produced by *Micromonospora* sp. SA246. J. Antibiotics. 51 : 82-84.

Yeo, W-H., Yun, B-S., Back, N-I., Kim, Y-H., Kim, S-S., Park, E-K, Whang, K-S., and Yu, S-H. 1997. 9-Hydroxycrisamicin A, a new cytotoxic isochromanquinone antibiotic produced by *Micromonospora* sp. SA246. J. Antibiotics. 50 : 546-550.

Yuzuru, M., Isao, K.A., and Hiroshi, K. 1987. K-259-2 , a new inhibitor of Ca^{2+} and calmodulin dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase. J. Antibiotics. 40 : 1092-1100.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

นำส่วนประกอบตามสูตร ผสมกับน้ำกลั่น 100 มล. นำไปฆ่าเชื้อในเครื่องอบไอน้ำเป็นเวลา 15 นาที ที่ความดัน 15 ปอนด์ ที่อุณหภูมิ 121°C

1. Potato-carrot Agar (PCA)

Potato	3.0	กรัม
Carrot	0.25	กรัม
Agar	1.5	กรัม

2. Sodium-caseinate Agar (SCA)

Sodium caseinate	0.2	กรัม
glucose	0.1	กรัม
K_2HPO_4	0.02	กรัม
$MgSO_4$	0.02	กรัม
$FeSO_4$	ปริมาณเล็กน้อย	
Agar	1.5	กรัม

3. Yeast extract-malt extract Agar (YMA), ISP-2

Yeast extract	0.4	กรัม
Malt extract	1.0	กรัม
glucose	0.4	กรัม
Agar	1.5	กรัม
	pH 7.0	

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. Tryptic soy Agar (Difco)

5. Mueller-Hinton Agar (Difco)

6. Tyrosine Agar, ISP-7

Glycerol	1.5	กรัม
L-tyrosine (Difco)	0.05	กรัม
L-asparagine (Difco)	0.1	กรัม
K_2HPO_4	0.05	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.05	กรัม
NaCl	0.05	กรัม
$FeSO_4.7H_2O$	0.01	กรัม
Trace salts solution (A)	0.1	มล.
Agar	2.0	กรัม
	pH 7.2-7.4	

Trace salt s solution(A)

$FeSO_4.7H_2O$	0.1	กรัม
$MnCl_2.4H_2O$	0.1	กรัม
$ZnSO_4.7H_2O$	0.1	กรัม
Distilled water	100.0	มล.

7. Oatmeal Agar, ISP-3

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

8. Glycerol-asparagine Agar, ISP-5

Glycerol	1.0	กรัม
L-Asparagine	0.1	กรัม
K_2HPO_4	0.1	กรัม
Trace salts soltion (A)	0.1	กรัม
Agar	2.0	กรัม

9. Carbon utilization medium, ISP-9

Carbohydrate	1.0	กรัม
$(NH_4)_2.SO_4$	0.264	กรัม
$K_2HPO_4.3H_2O$	0.565	กรัม
KH_2PO_4 anhydrous	0.238	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.1	กรัม
Pridham and gottlieb trace salts (B)	0.1	มล.
Agar	1.5	กรัม

pH 6.8-7.0

Trace salts solution (B)

$CuSO_4.5H_2O$	0.64	กรัม
$FeSO_4.7H_2O$	0.11	กรัม
$MnCl_2.4H_2O$	0.79	กรัม
$ZnSO_4.7H_2O$	0.15	กรัม
Distilled water	100.0	มล.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

10. Peptone KNO_2 broth

Peptone	1.0	กรัม
KNO_3	0.1	กรัม
NaCl	0.5	กรัม
	pH 7.0	

11. Inorganic salts-starch Agar

Soluble starch	1.0	กรัม
K_2HPO_4	0.1	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.1	กรัม
NaCl	0.1	กรัม
$(NH_4)_2.SO_4$	0.2	กรัม
$CaCO_3$	0.2	กรัม
Trace salts solution (A)	0.1	กรัม
Agar	2.0	กรัม
	pH 7.0-7.4	

12. Bouillon Gelatin broth

Peptone	1.0	กรัม
Meat extract	0.5	กรัม
NaCl	0.5	กรัม
Gelatin	15.0	กรัม
	pH 7.0-7.2	

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

13. Triple sugar iron agar (Difco)

14. Lismus milk (Difco)

Bacto-skim milk	10	กรัม
Bacto-lismus	0.075	กรัม

15. GMP medium

glucose	1.5	กรัม
Peptone	0.6	กรัม
Beef extract	0.3	กรัม
Yeast extrct	0.3	กรัม
NaCl	0.5	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.25	กรัม
	pH 7.0	

16. Sucrose soybean medium (SS)

Sucrose	1.5	กรัม
Soybean meal	1.5	กรัม
Glycerol	0.5	กรัม
Corn steep liquor	0.5	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.05	กรัม
$FeSO_4.7H_2O$	0.05	กรัม
$CoCl_2.6H_2O$	0.001	กรัม
$CaCO_3$	0.2	กรัม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

pH 6.5-7.0

17. Glucose soybean medium (GS)

glucose	5.0	กรัม
Soybean meal	1.0	กรัม
Yeast extract	0.1	กรัม
Peptone	0.4	กรัม
Meat extract	0.4	กรัม
NaCl	0.25	กรัม
$CaCO_3$	0.5	กรัม

pH 7.2

18. Glucose molasses medium (GM)

glucose	1.0	กรัม
Molasses	1.0	กรัม
Peptone	0.6	กรัม
$CaCO_3$	0.4	กรัม

pH 7.0

19. Glycerol peptone medium (GP)

Glycerol	2.0	กรัม
Molasses	1.0	กรัม
Meat extract	1.0	กรัม
Peptone	1.0	กรัม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

$CaCO_3$	0.4	กรัม
	pH 7.2	

20. Glucose NaCl medium (GN)

Glucose	2.4	กรัม
Glycerol	0.6	กรัม\
Soybean	1.8	กรัม
Corn steep liquor	0.6	กรัม
NaCl	0.36	กรัม
$CaCO_3$	0.3	กรัม

21. Sucrose yeast extract medium (SY)

Sucrose	2.0	กรัม
Glycerol	0.5	กรัม
Yeast extract	0.3	กรัม
Soybean	1.0	กรัม
Corn steep liquor	0.5	กรัม
$CoCl_2.6H_2O$	0.01	กรัม
pH 7.0		

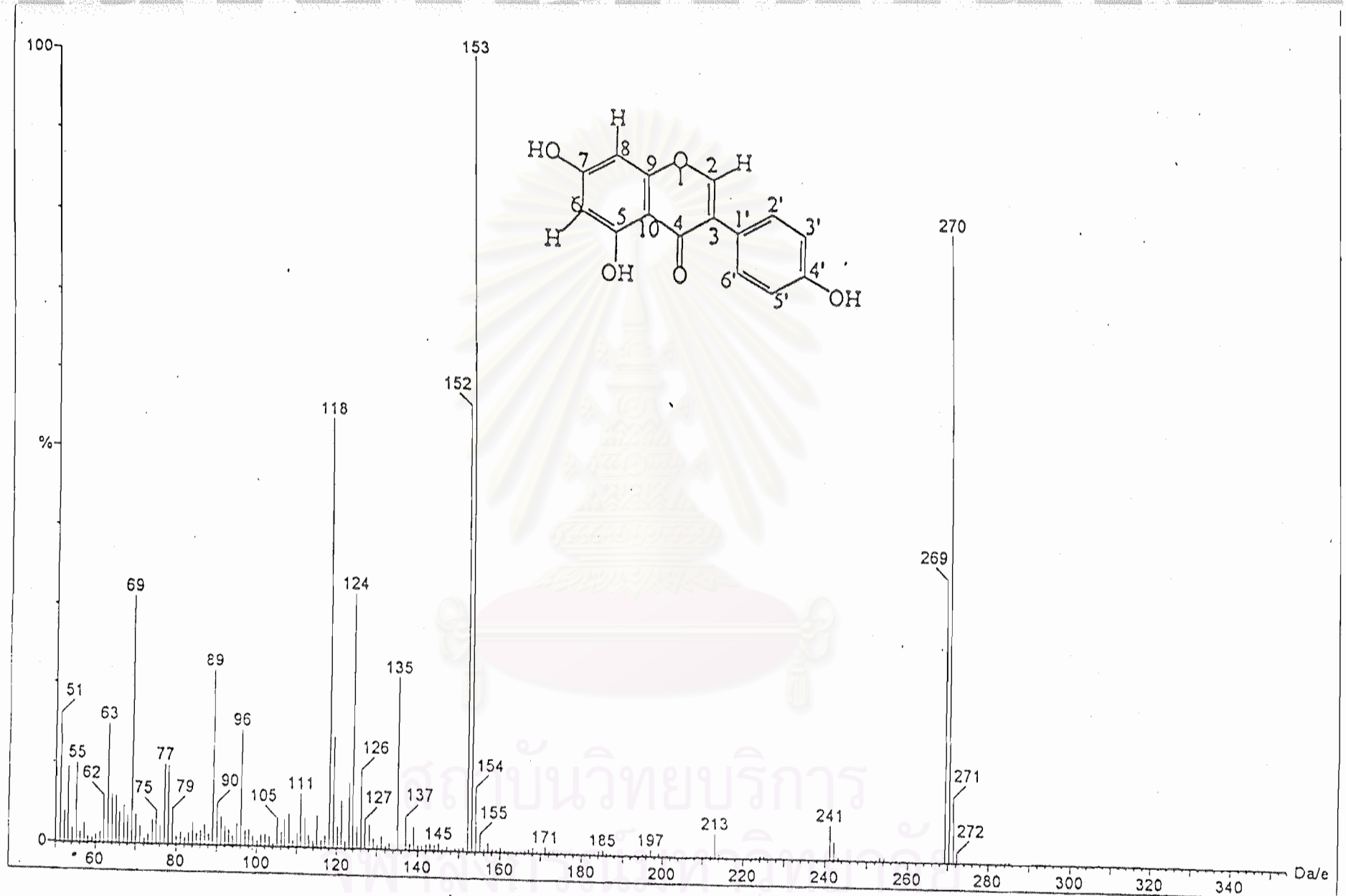
22. Dextrin soybean medium (DS)

Dextrin	3.0	กรัม
Soybean	2.0	กรัม
Corn steep liquor	0.25	กรัม

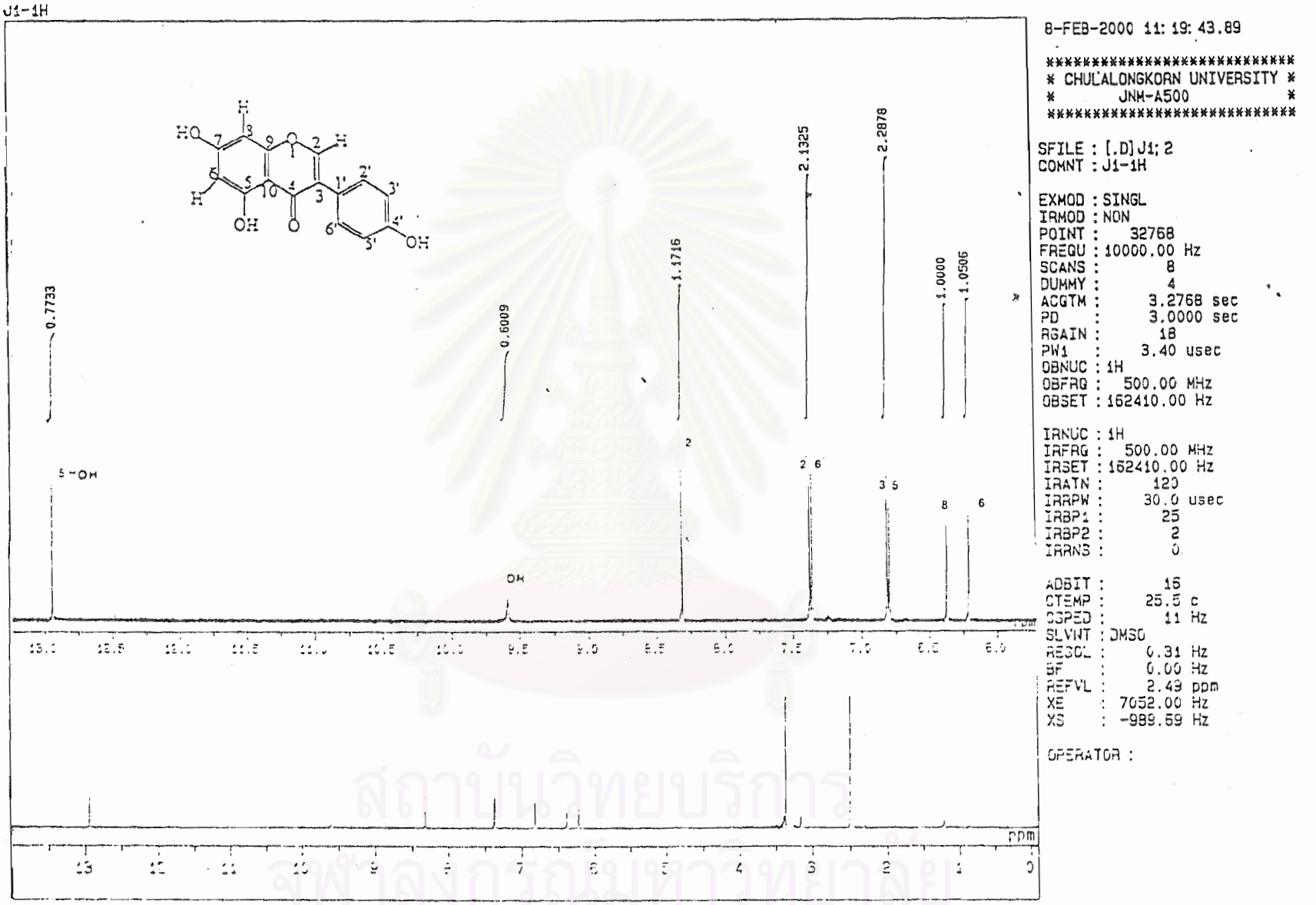
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

K_2HPO_4	0.05	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.05	กรัม
KCl	0.03	กรัม

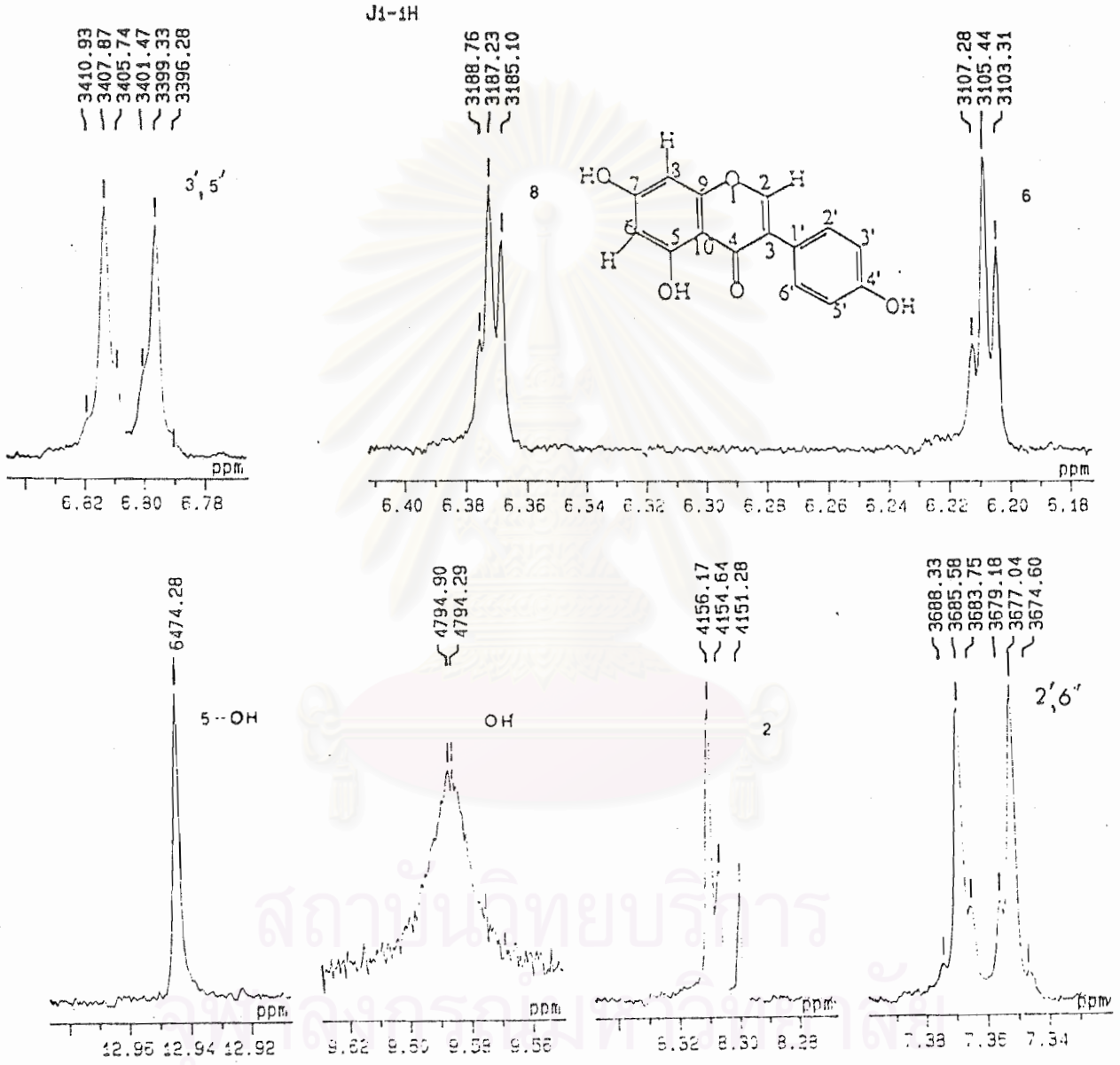
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



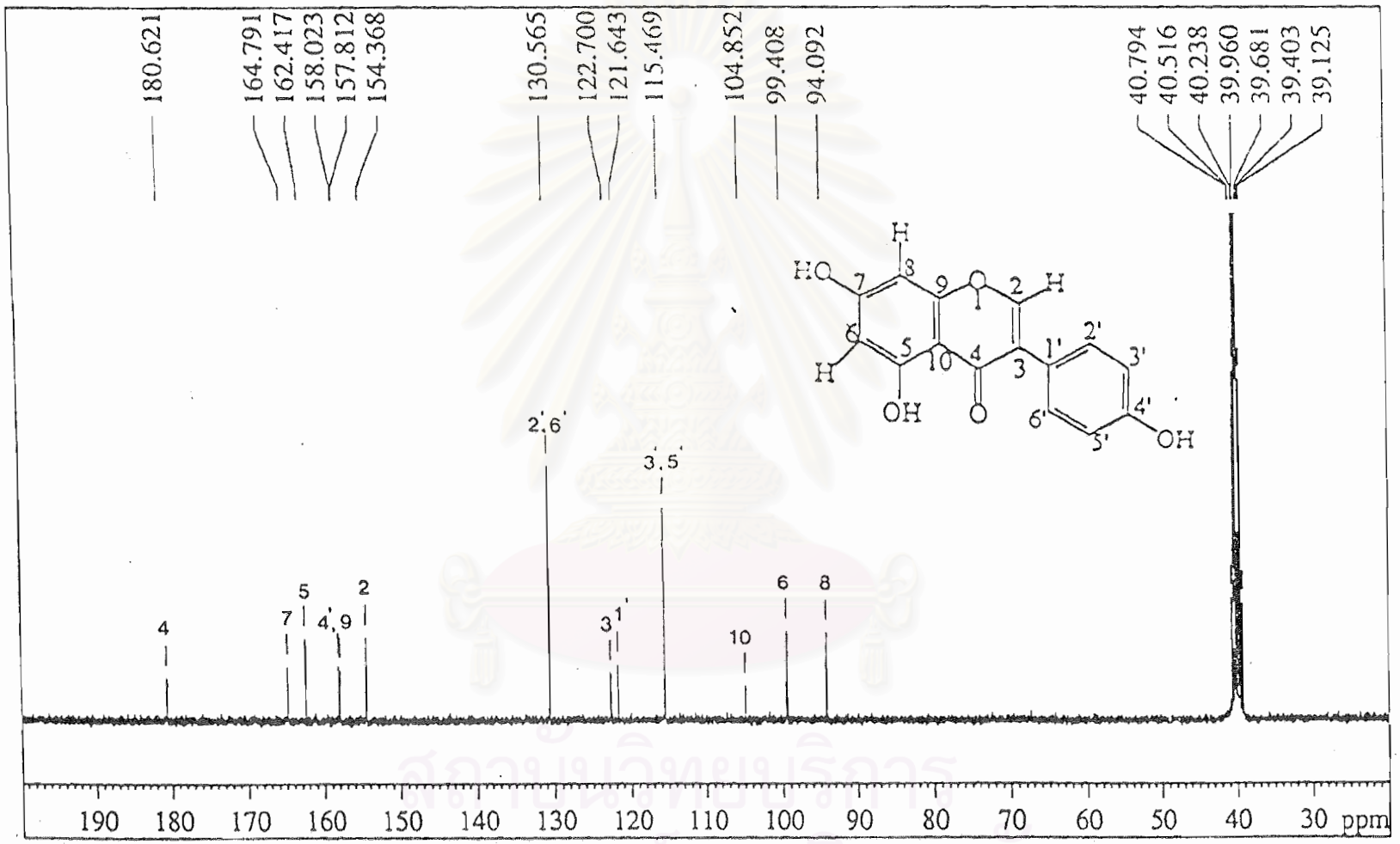
รูปที่ 4 Mass spectrum (EIMS) ของสาร J-1 (genistein)



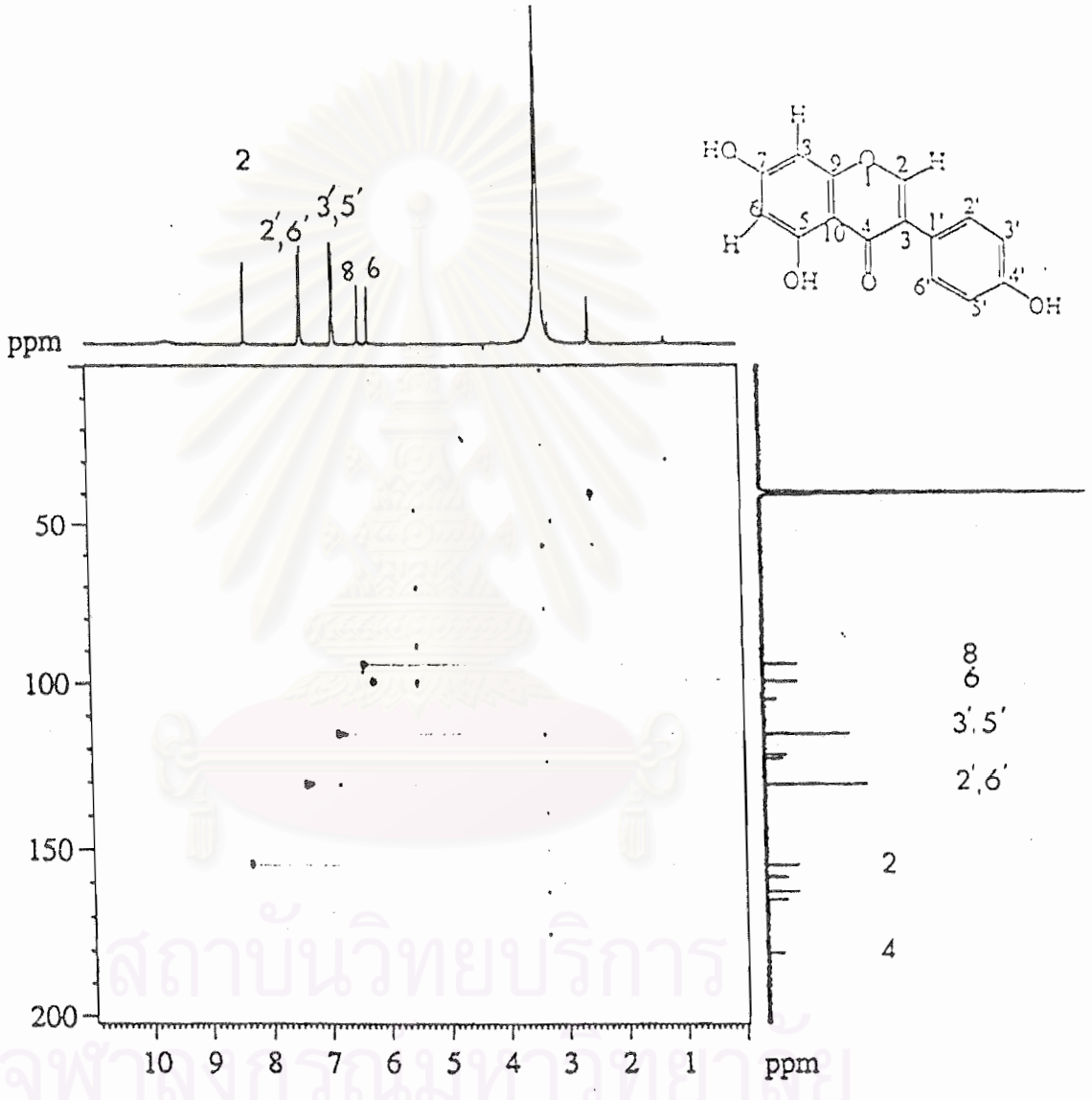
รูปที่ 5 ^{1}H-NMR spectrum (500 MHz) ของสาร J-1 (genistein) ใน DMSO-d_6



รูปที่ 6 ^{1}H-NMR spectrum (500 MHz) ของสาร J-1 (genistein) ใน DMSO-d_6 ภาพขยาย

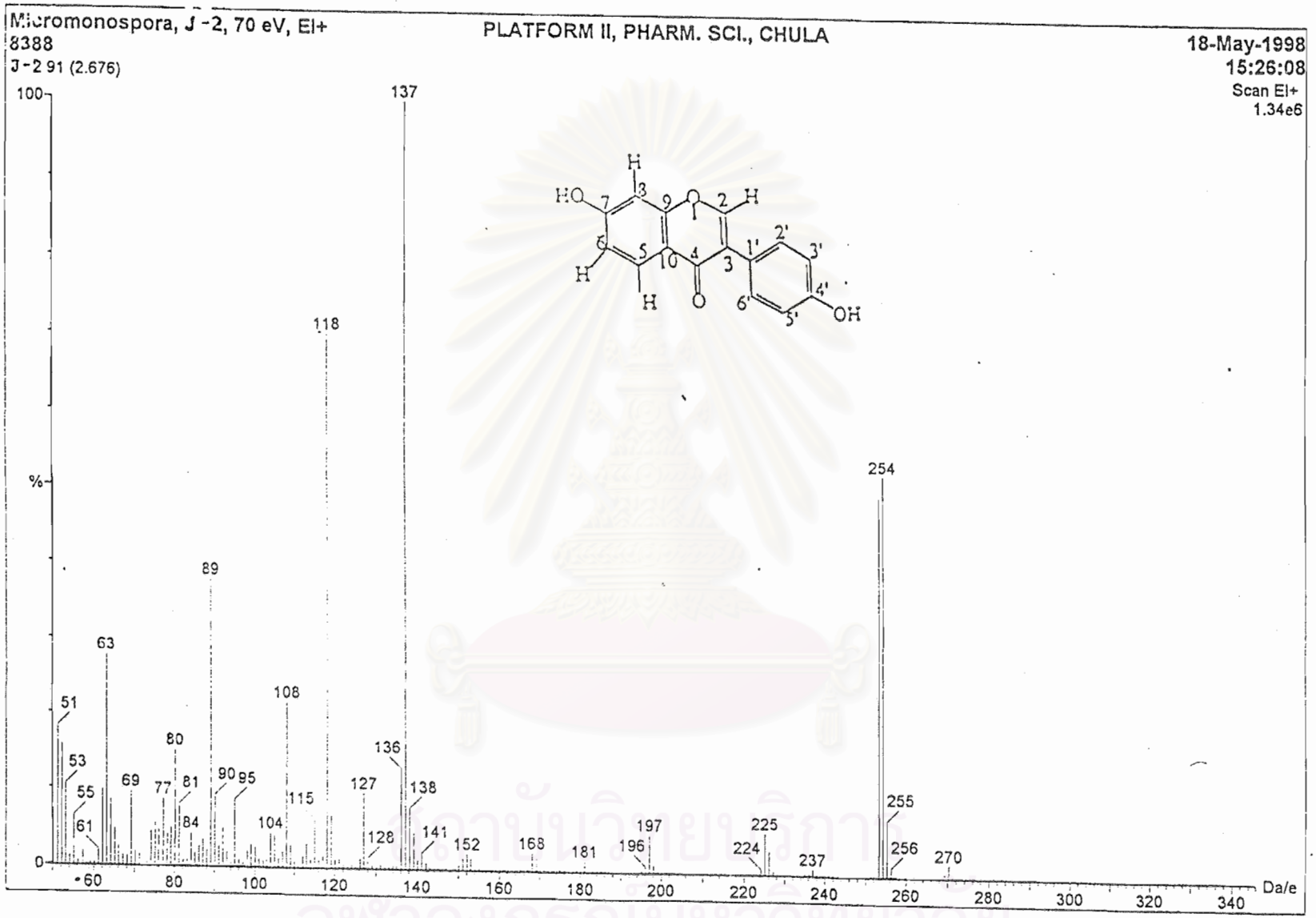


รูปที่ 7 ^{13}C-NMR spectrum (75 MHz) ของสาร J-1 (genistein) ใน DMSO-d_6

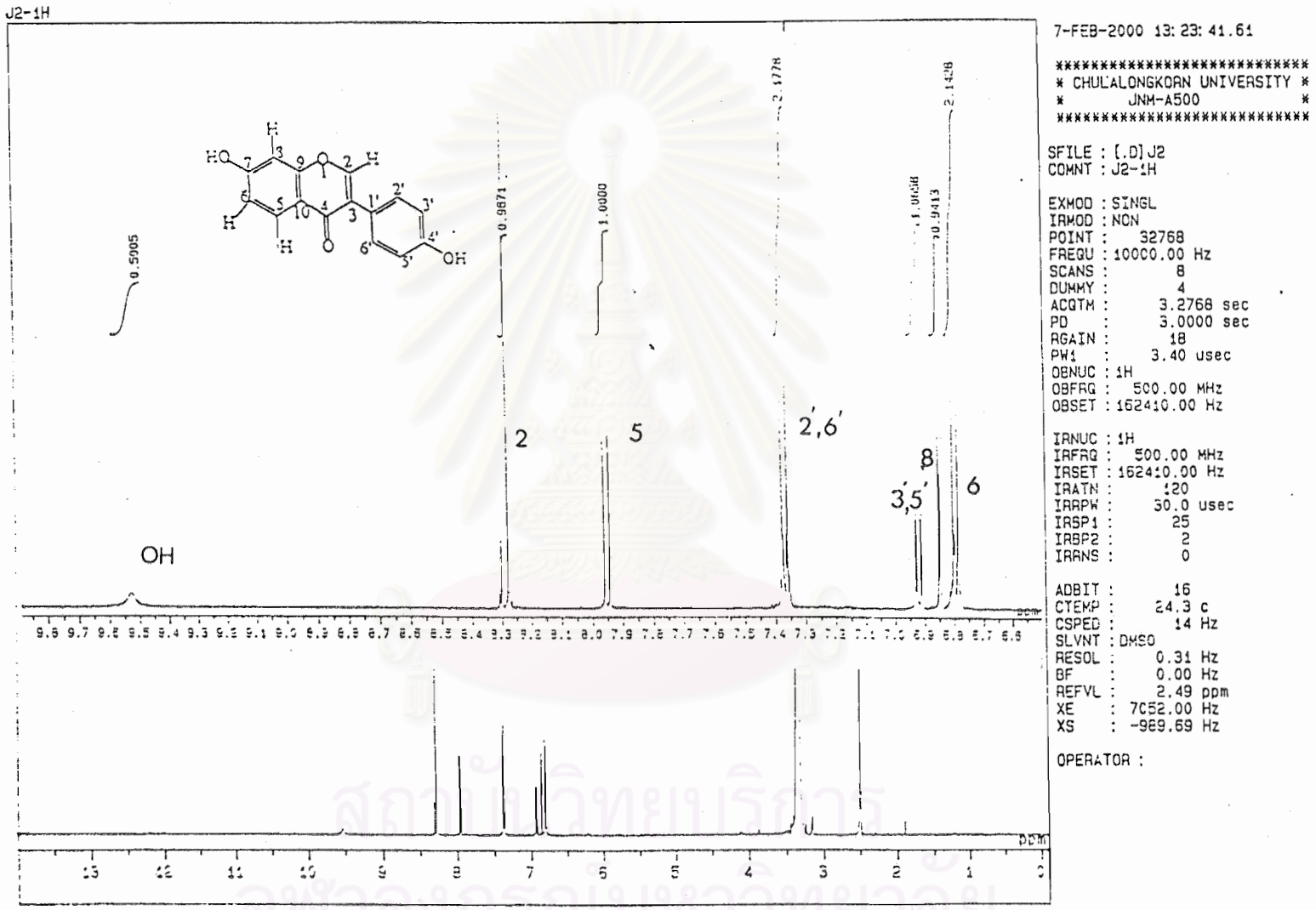


รูปที่ 8 HMQC spectrum ของสาร J-1 (genistein)

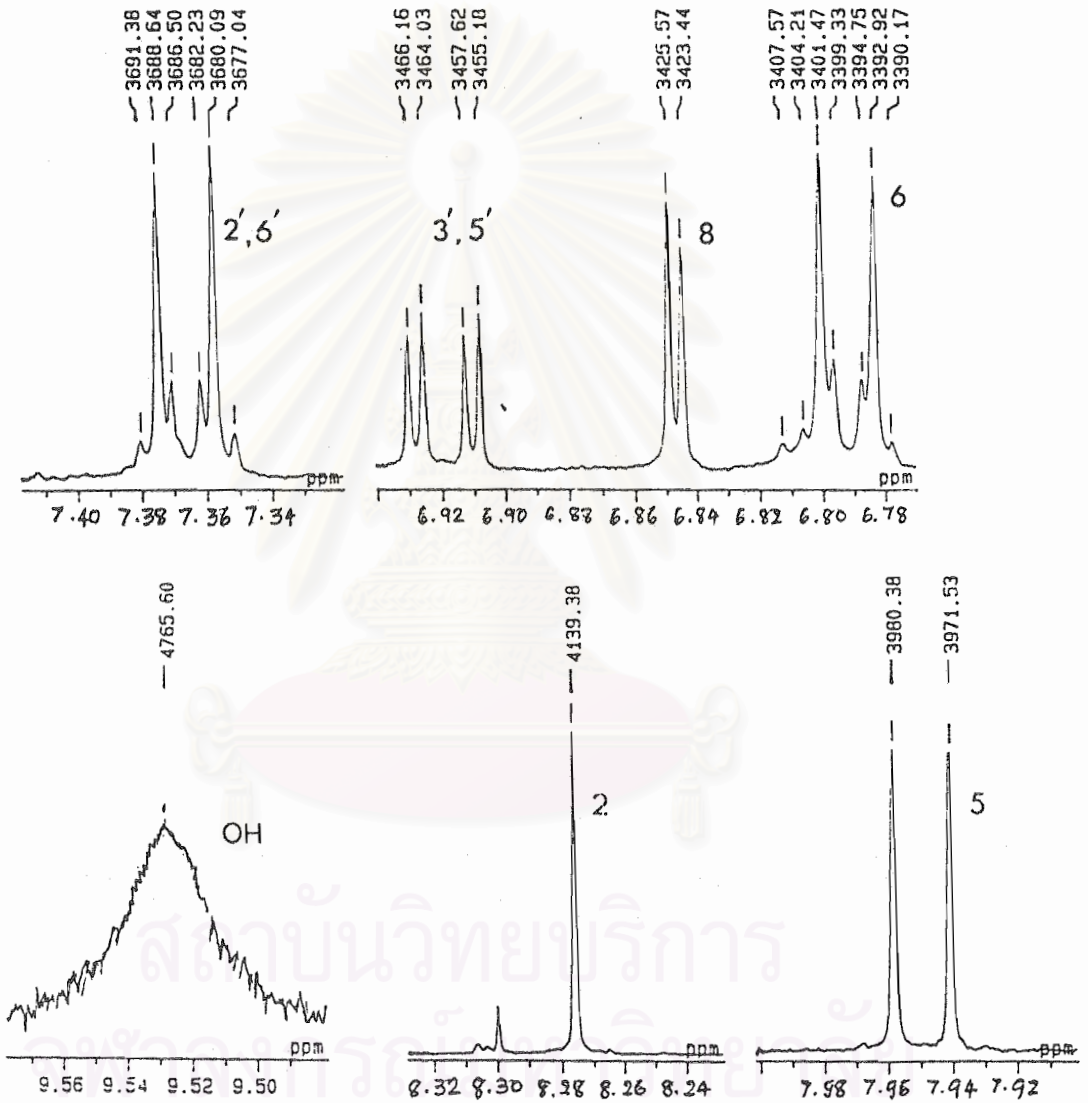
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



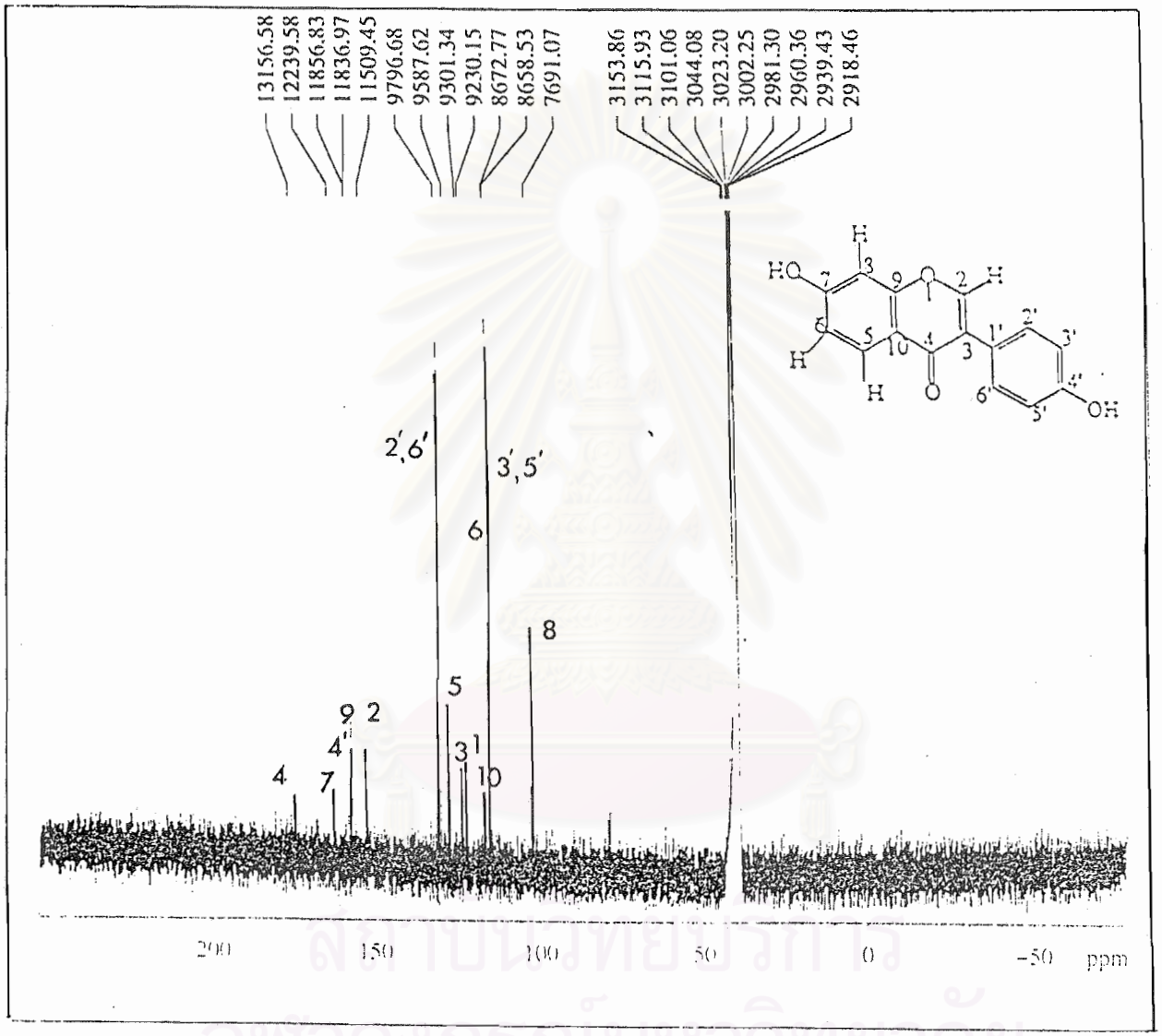
รูปที่ 9 Mass spectrum (EIMS) ของสาร J-2 (daidzein)



รูปที่ 10 ^{1}H-NMR spectrum (500 MHz) ของสาร J-2 (daidzein) ใน DMSO-d_6



รูปที่ 11 ^{1}H-NMR spectrum (500 MHz) ของสาร J-2 (daidzein) ใน DMSO-d_6 (ภาพขยาย)



J - 2
75 MHz Carbon NMR

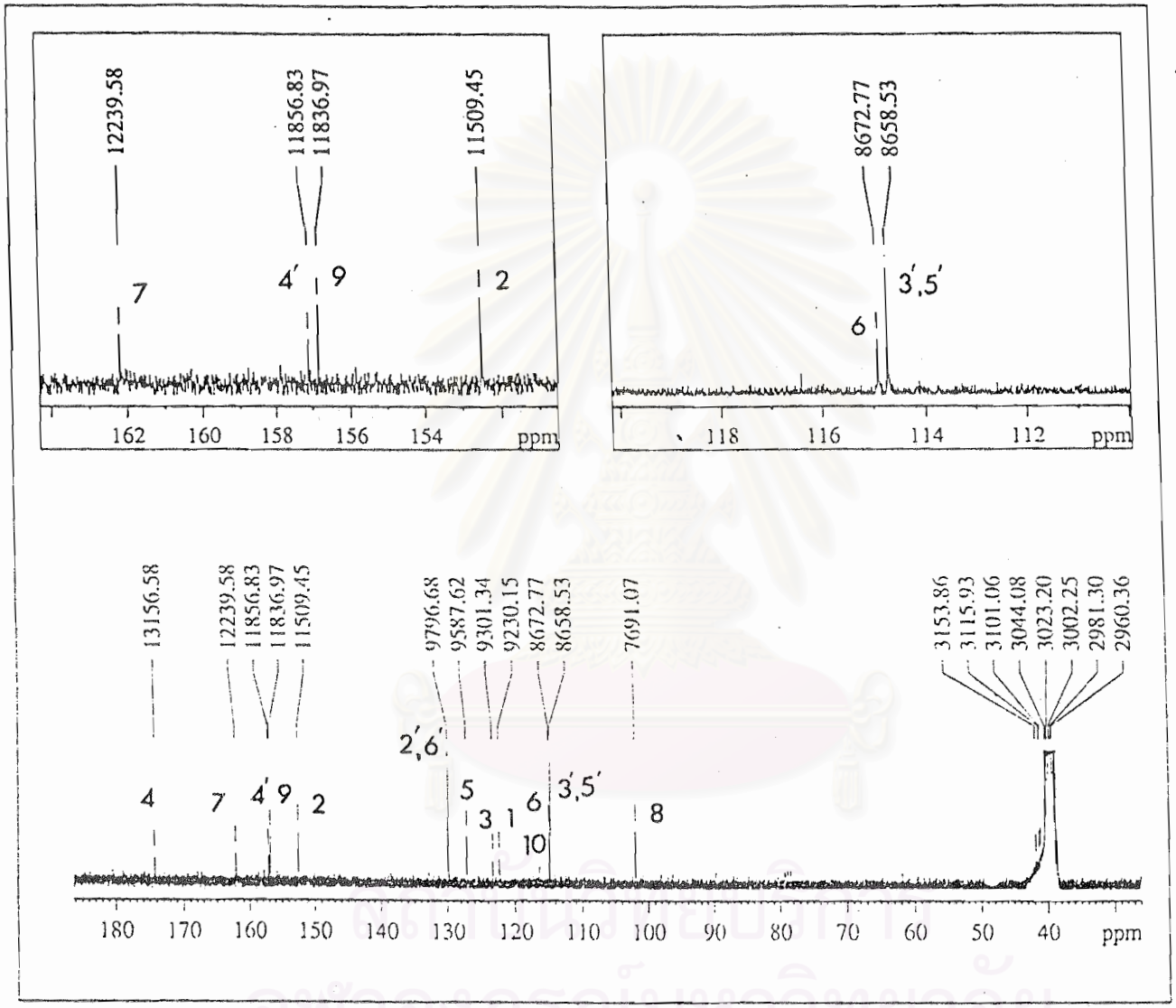
Current Data Parameters
NAME JMS
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 980710
Time 2 45
INSTRUM dpx300
PROBHD 5 mm Dual 13
PULPROG zgdc
TD 32768
SOLVENT CDCl3
NS 40417
DS 4
SWH 25000.000 Hz
FIDRES 0.762939 Hz
AQ 0.655360 sec
RG 9105.2
DW 20.000 usec
DE 45.15 usec
TE 300.0 K
D1 2.00000000 sec
PL12 19.00 dB
CPDPRG2 waltz16
PCPD2 100.00 usec
SFO2 300.1320005 MHz
NUC2 1H
PL2 -1.00 dB
PL12 20.00 dB
D11 0.03000000 sec
P1 5.50 usec
D0 3.00 usec
SFO1 75.4749650 MHz
NS 75
PL1 -1.00 dB

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 75.4750027 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

F1 - Processing parameters
SI 32768
SF 75.4750000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

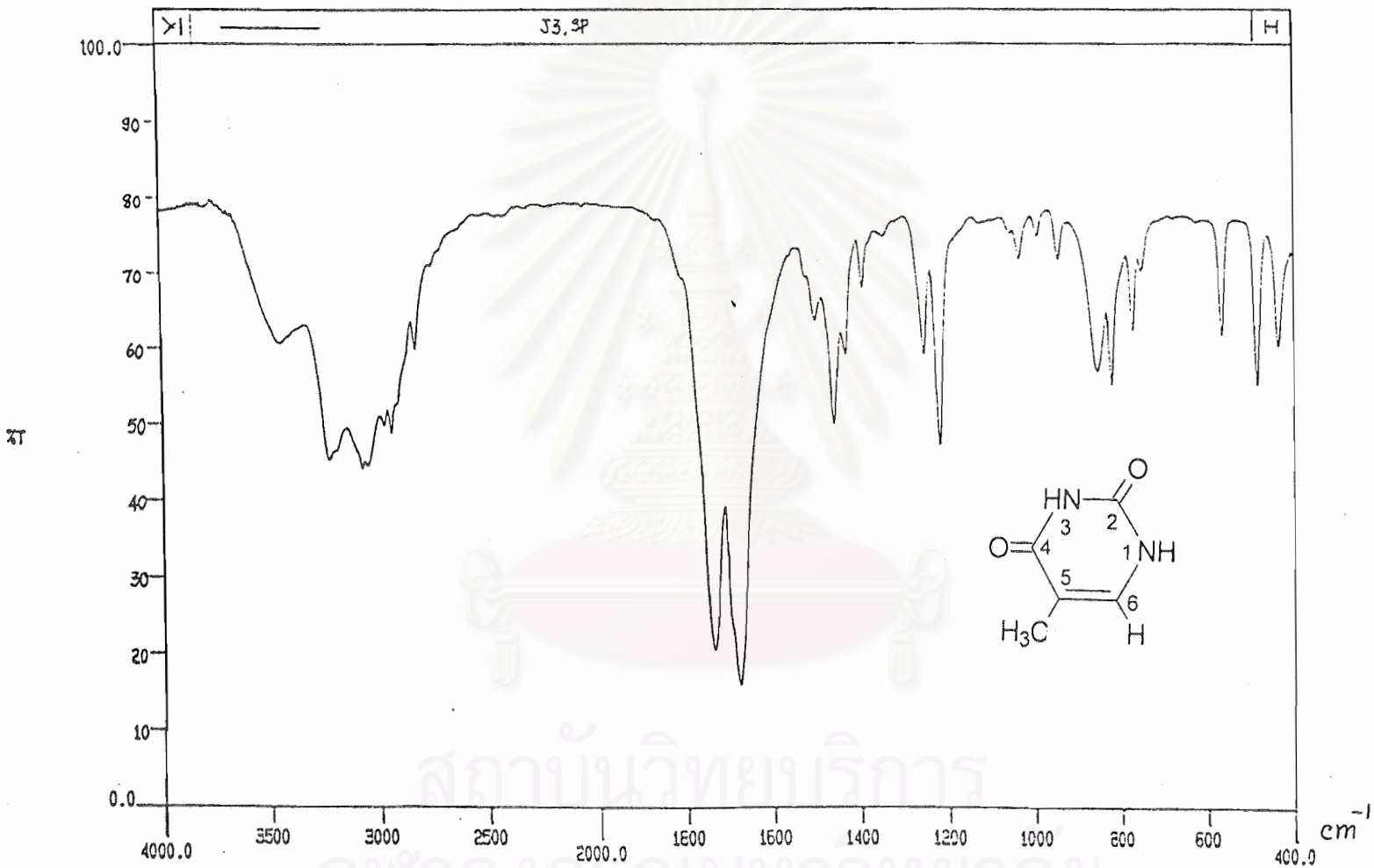
ปฏิกิริยาที่ 12 ^{13}C-NMR spectrum (75 MHz) ของสาร J-2 (daidzein) ใน DMSO-d_6



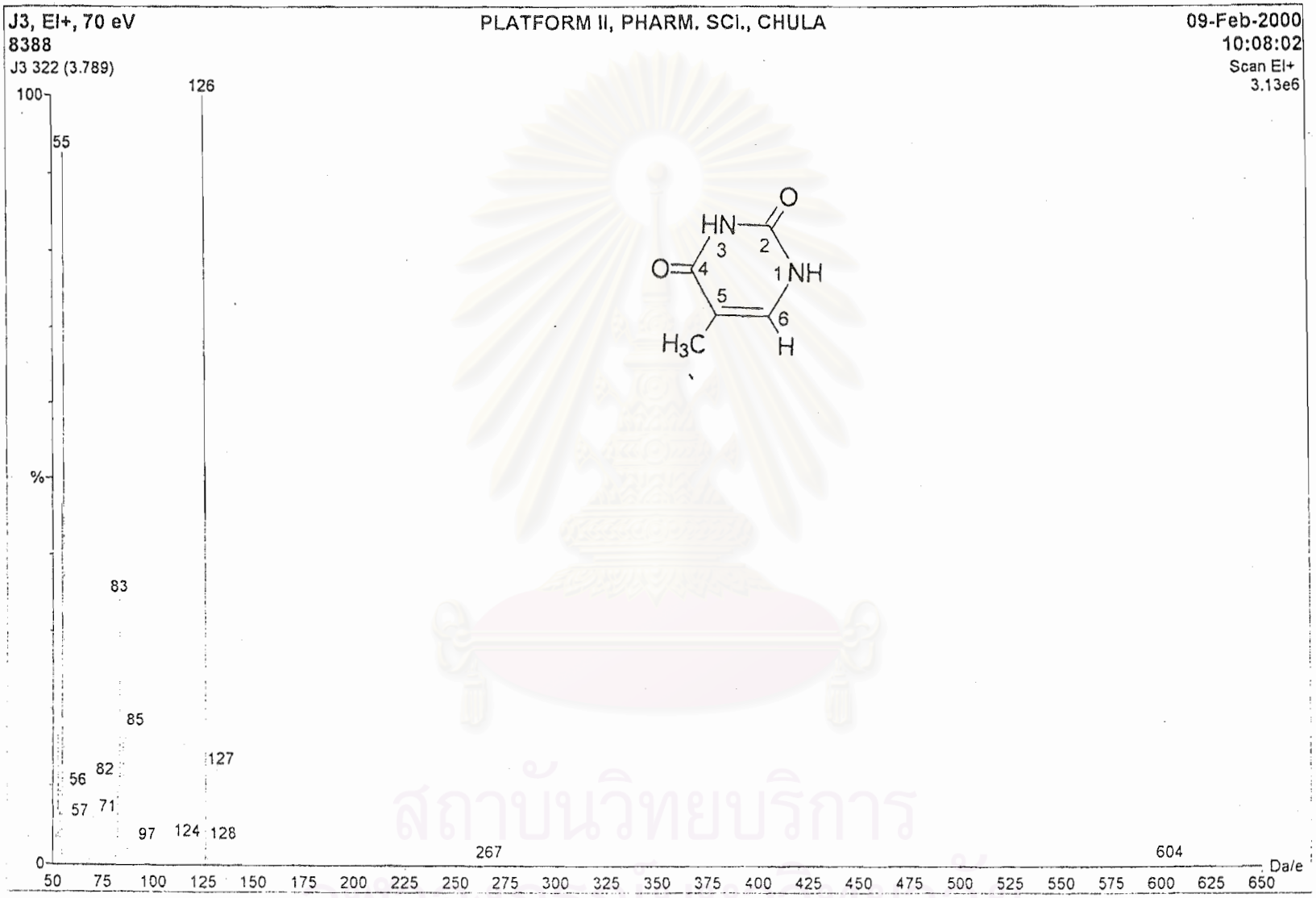
J-2
75 MHz C -- NMR

Current D	Parameters
NAME	JMN
EXPNO	2
PROCNO	1
F2 - Acq	uisition Parameters
Date_	980710
Time	2.45
INSTRU	M dpx300
PROBHD	I 5 mm Dual 13
PULPRG	G zgdc
TD	32768
SOLVEN	T CDCl3
NS	40417
DS	4
SWH	25000.000 Hz
FIDRES	0.762939 Hz
AQ	0.6554100 sec
RG	9195.2
DW	20.000 usec
DE	43.11 usec
TE	300.0 K
d11	0.0300000 sec
PL12	19.00 dB
CPDPRG	2 waltz16
PCPD2	100.00 usec
SFO2	300.1320000 MHz
NUC2	1H
PL2	120.00 dB
D1	2.00000000 sec
P1	5.50 usec
DE	43.11 usec
SFO1	75.4743650 MHz
NUC1	13C
PL1	-6.00 dB
F2 - Proc	essing parameters
SI	131072
SF	75.4677947 MHz
WDW	EM
SSB	0
LB	0.30 Hz
GB	0
PC	1.00
1D NMR	plot parameters
CX	20.00 cm
F1P	252.694 ppm
F1	19070.23 Hz
F2P	-78.574 ppm
F2	-5929.77 Hz
PPMCM	16.56336 ppm/cm
HZCM	1250.00012 Hz/cm

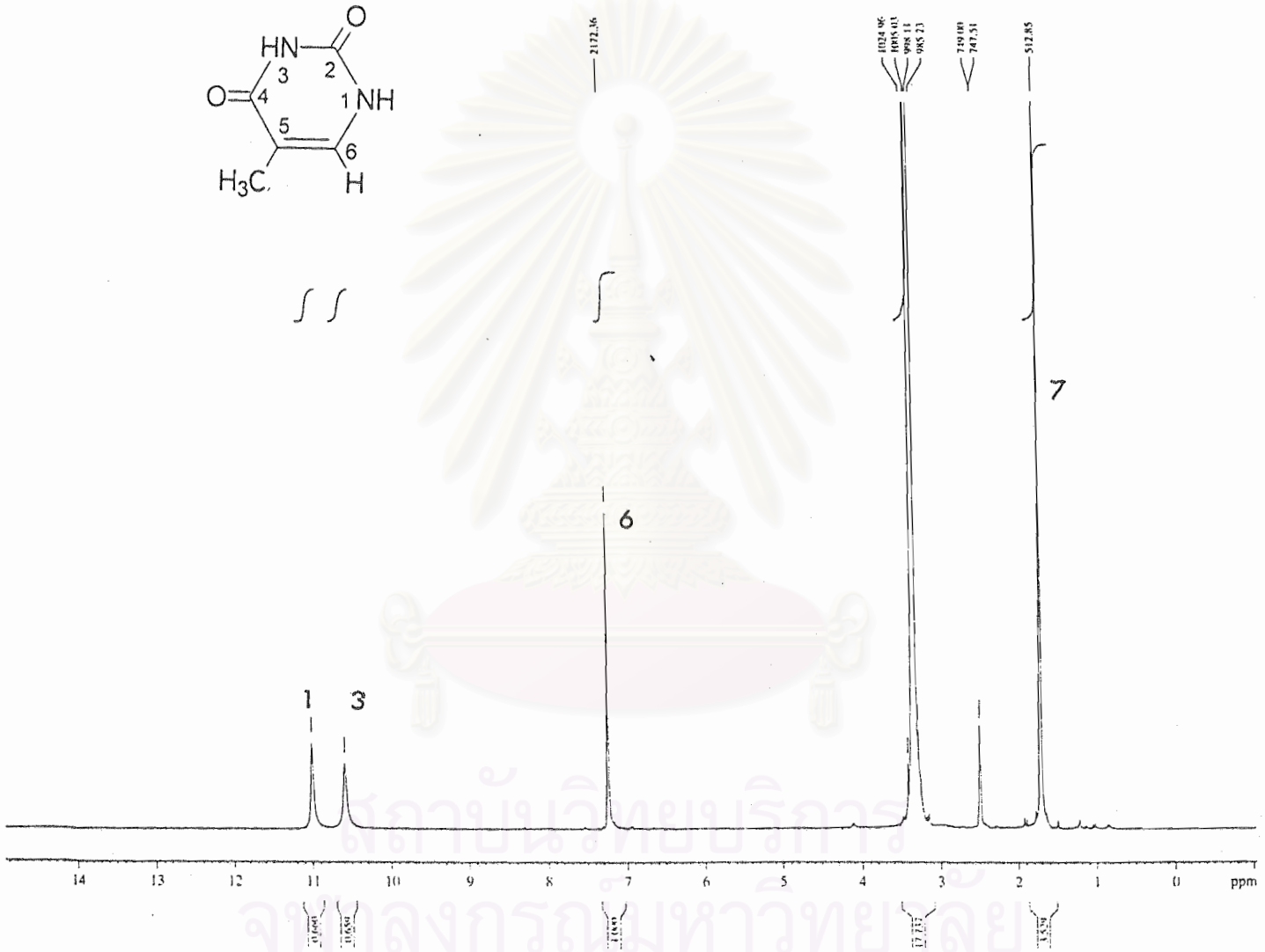
รูปที่ 13 ^{13}C-NMR spectrum (75 MHz) ของสาร J-2 (daidzein) ใน DMSO-d_6 (ภาพขยาย)



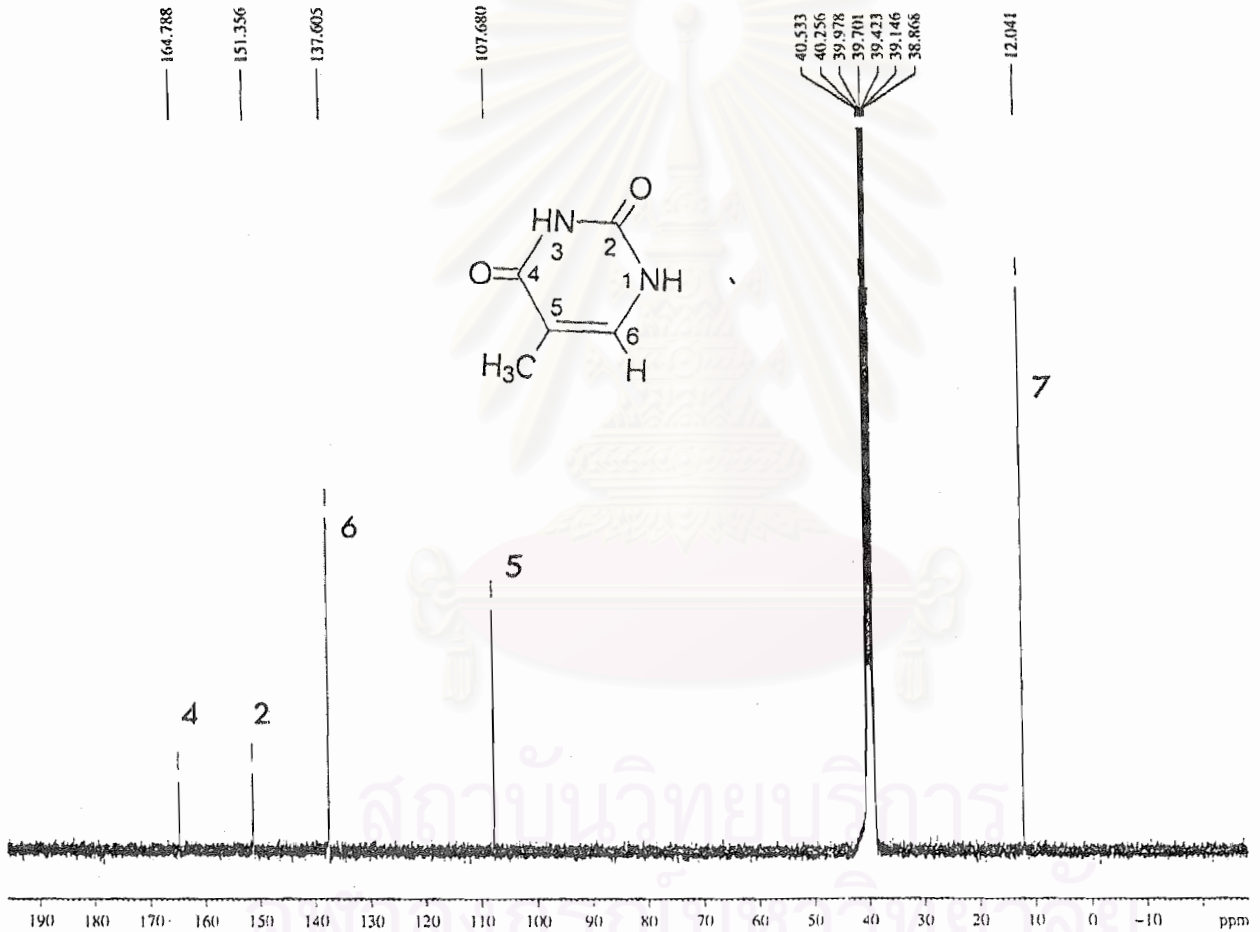
รูปที่ 14 Infrared spectrum ของสาร J-3 (thymine)



รูปที่ 15 Mass spectrum (EIMS) ของสาร J-3 (thymine)



รูปที่ 16 ^{1}H-NMR spectrum (300 MHz) ของสาร J-3 (thymine) ใน DMSO-d_6.



J3/DMSO-d6
13C-nmr spectrum

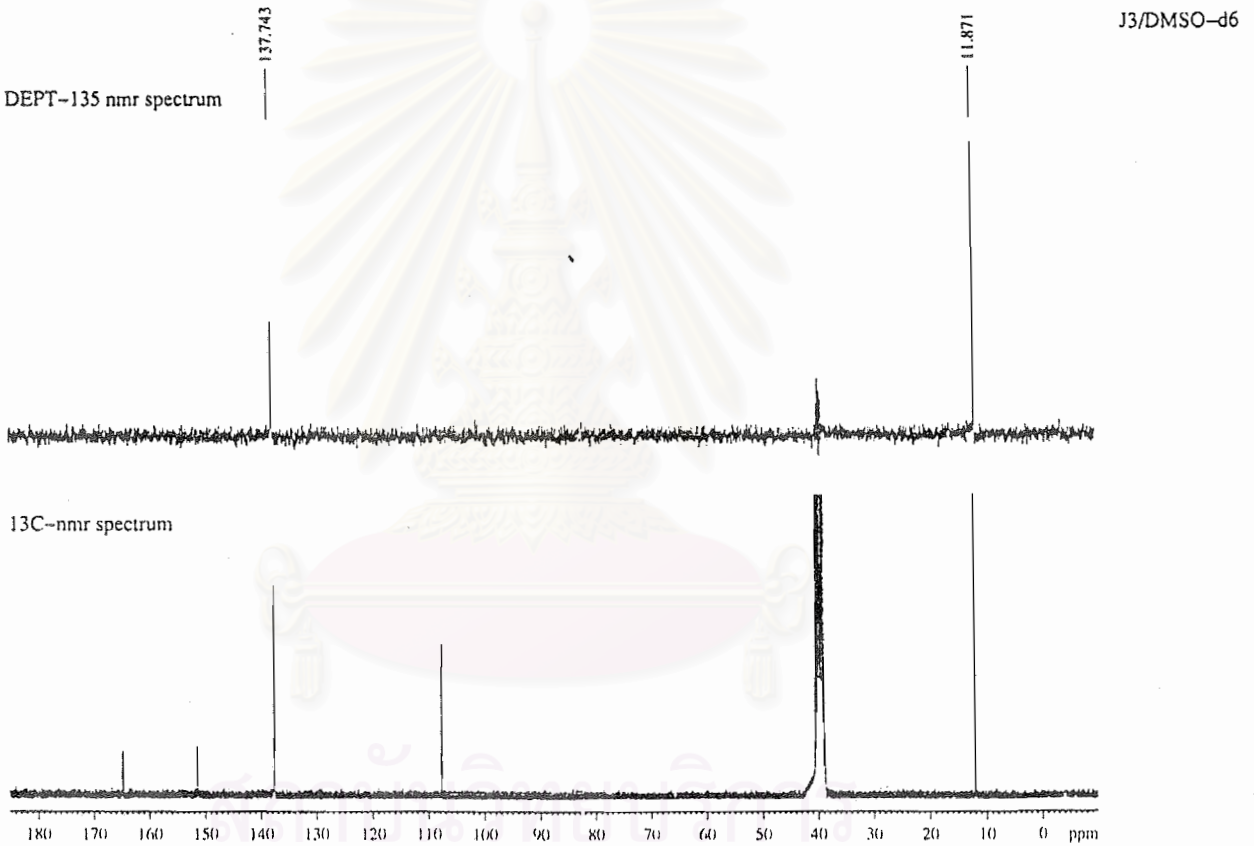
Current Data Parameters
NAME J3
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 500000
Time 8.35
INSTRUM dpx300
PROBHD 5 mm Dual 13
PULPROG zgdc
TD 32768
SOLVENT DMSO
NS 25445
DS 4
SWH 25000.000 Hz
FIDRES 0.762939 Hz
AQ 0.6554100 sec
RG 9195.2
DW 20.000 usec
DE 43.11 usec
TE 300.0 K
d11 0.0300000 sec
PL12 19.00 dB
CPDPRG2 waltz16
PCPD2 100.00 usec
SFO2 300.1320000 MHz
NUC2 1H
PL2 120.00 dB
D1 2.00000000 sec
P1 5.50 usec
DE 43.11 usec
SFO1 75.4743650 MHz
NUC1 13C
PL1 -6.00 dB

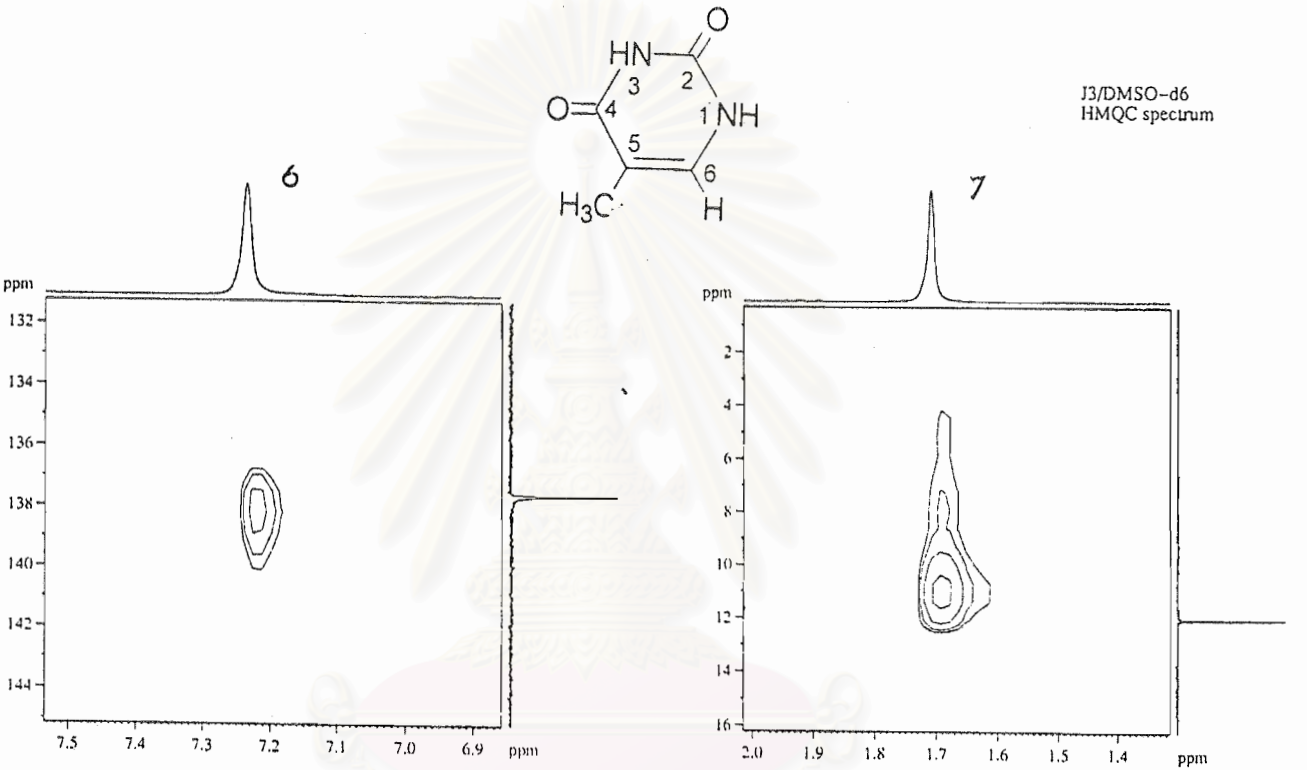
F2 - Processing parameters
SI 131072
SF 75.4677793 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

1D NMR plot parameters
CX 20.00 cm
F1P 252.899 ppm
F1 19085.70 Hz
F2P -78.369 ppm
F2 -5914.30 Hz
PPMCM 16.56336 ppm/cm
HZCM 1250.00000 Hz/cm

รูปที่ 17 ^{13}C-NMR spectrum (75 MHz) ของสาร J-3 (thymine) ใน DMSO-d_6

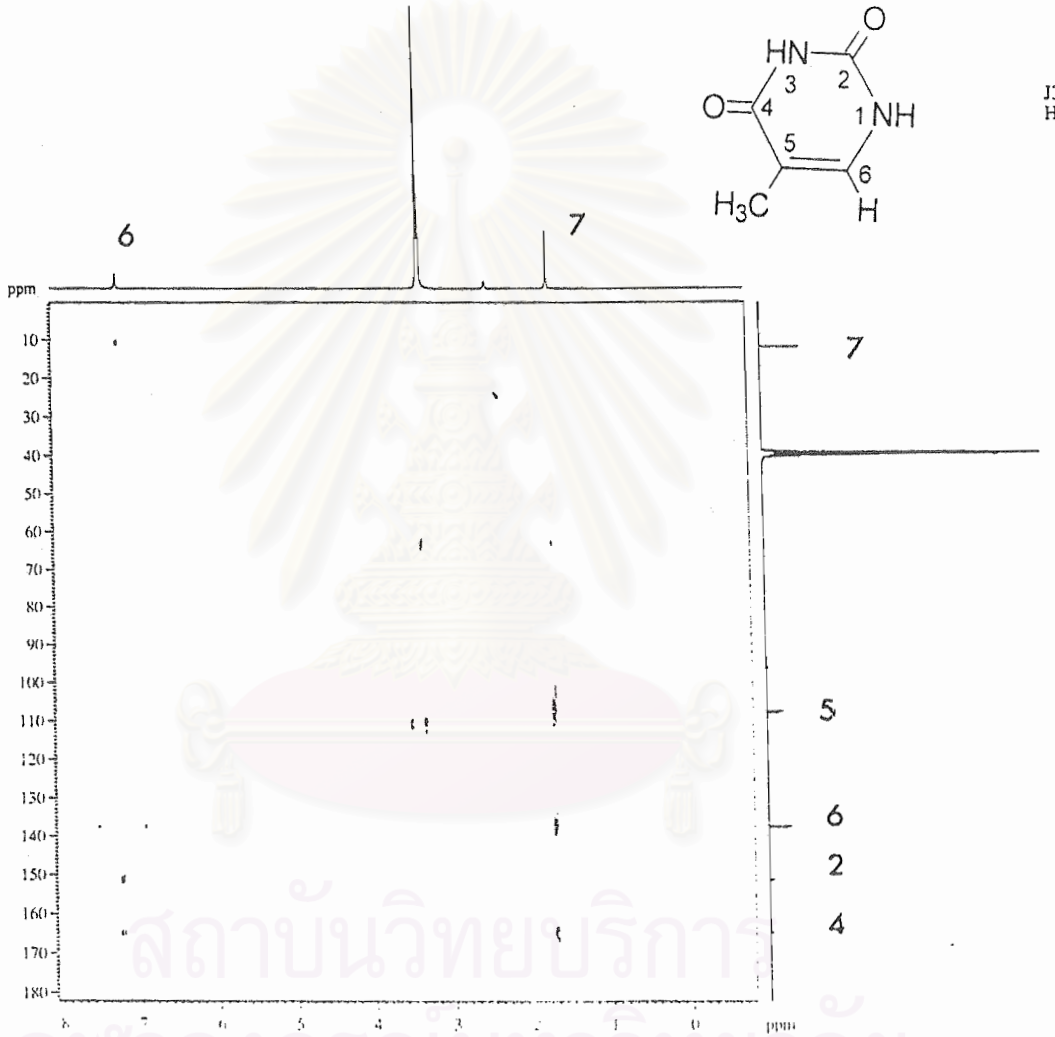


รูปที่ 18 DEP-135 spectrum (75 MHz) ของสาร J-3 (thymine) ใน DMSO-d_6



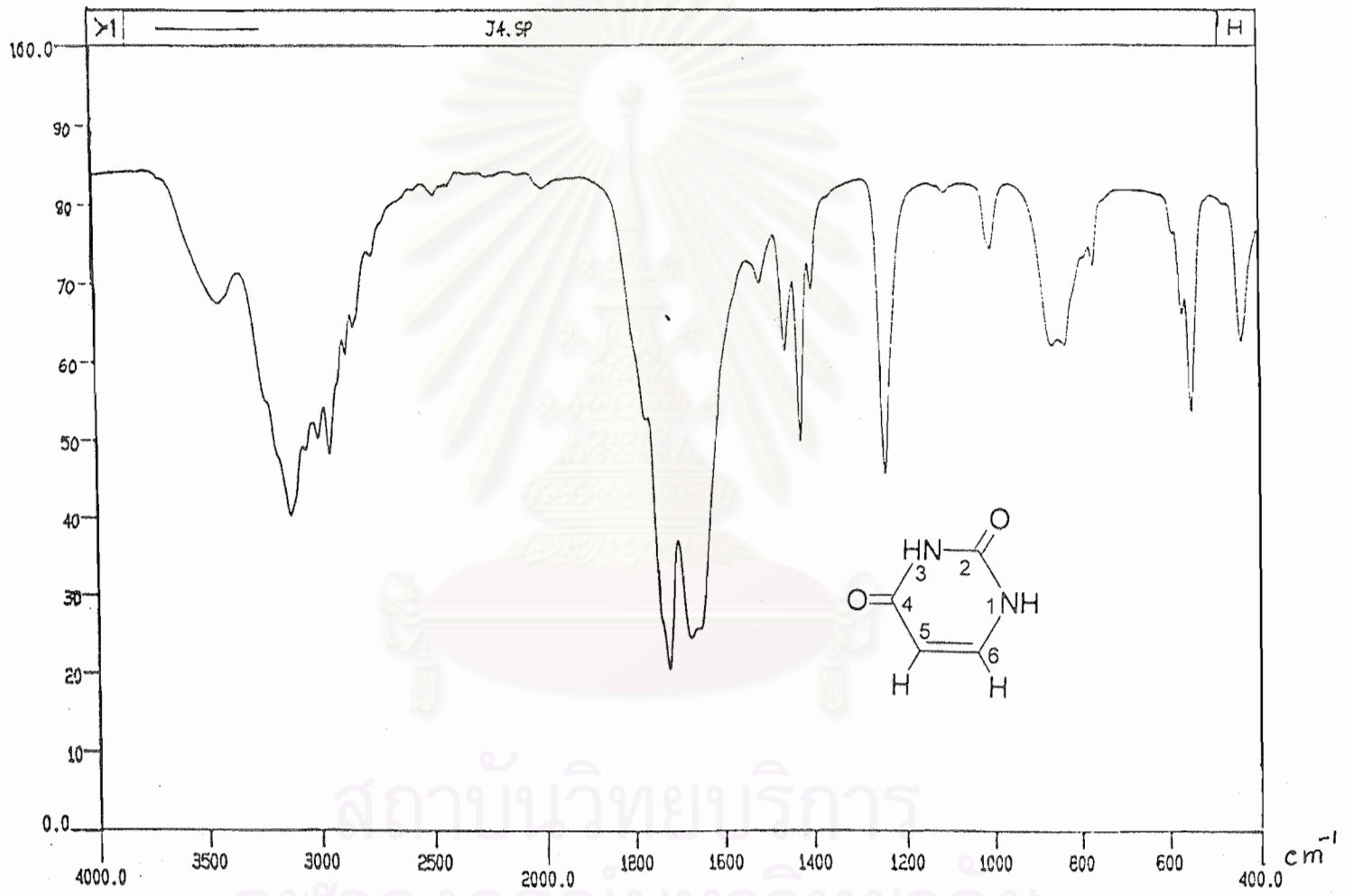
รูปที่ 19HMQC spectrum ของสาร J-3 (thymine)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



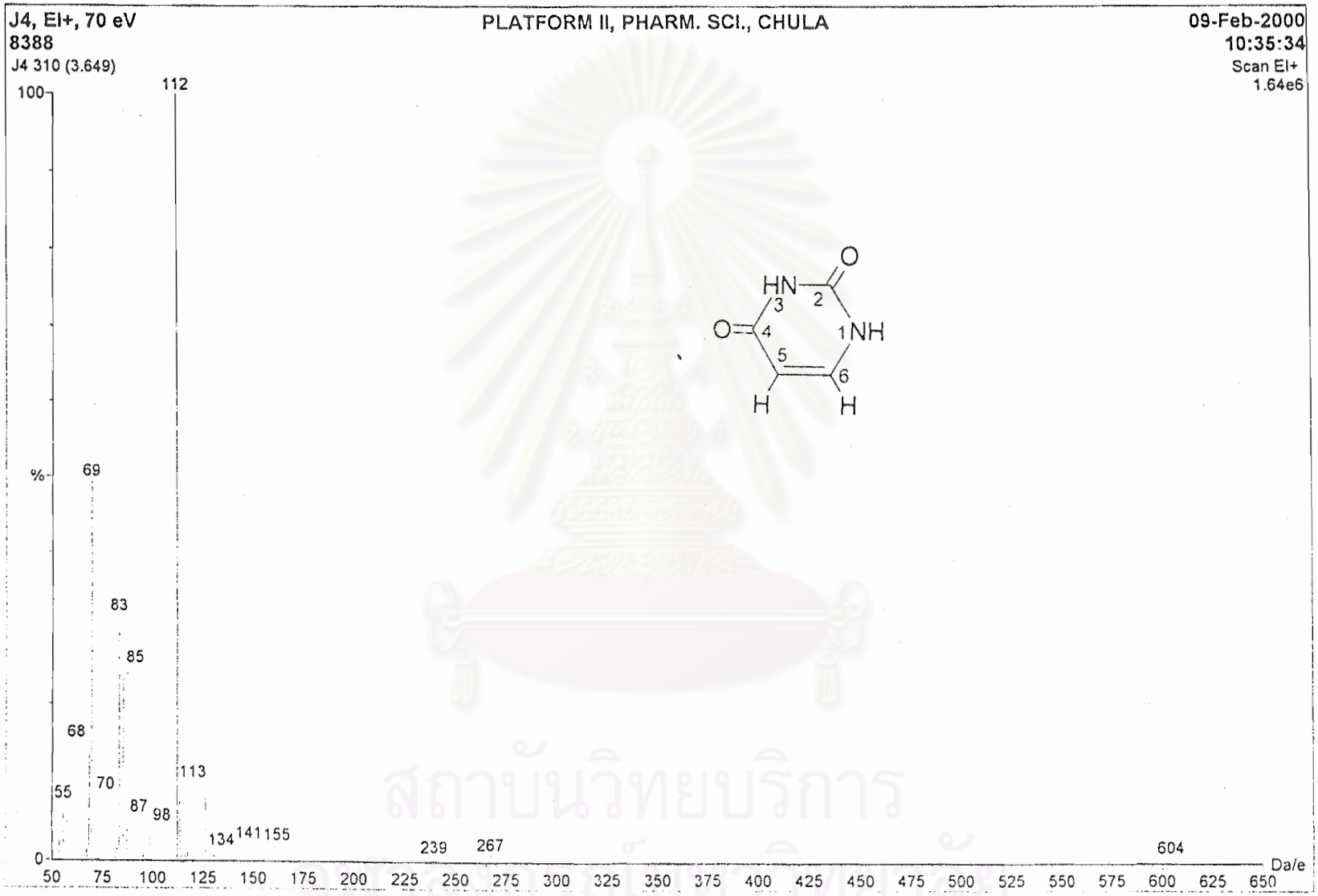
รูปที่ 20. HMBC spectrum(J = 8 Hz) ของสาร J-3 (thymine)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

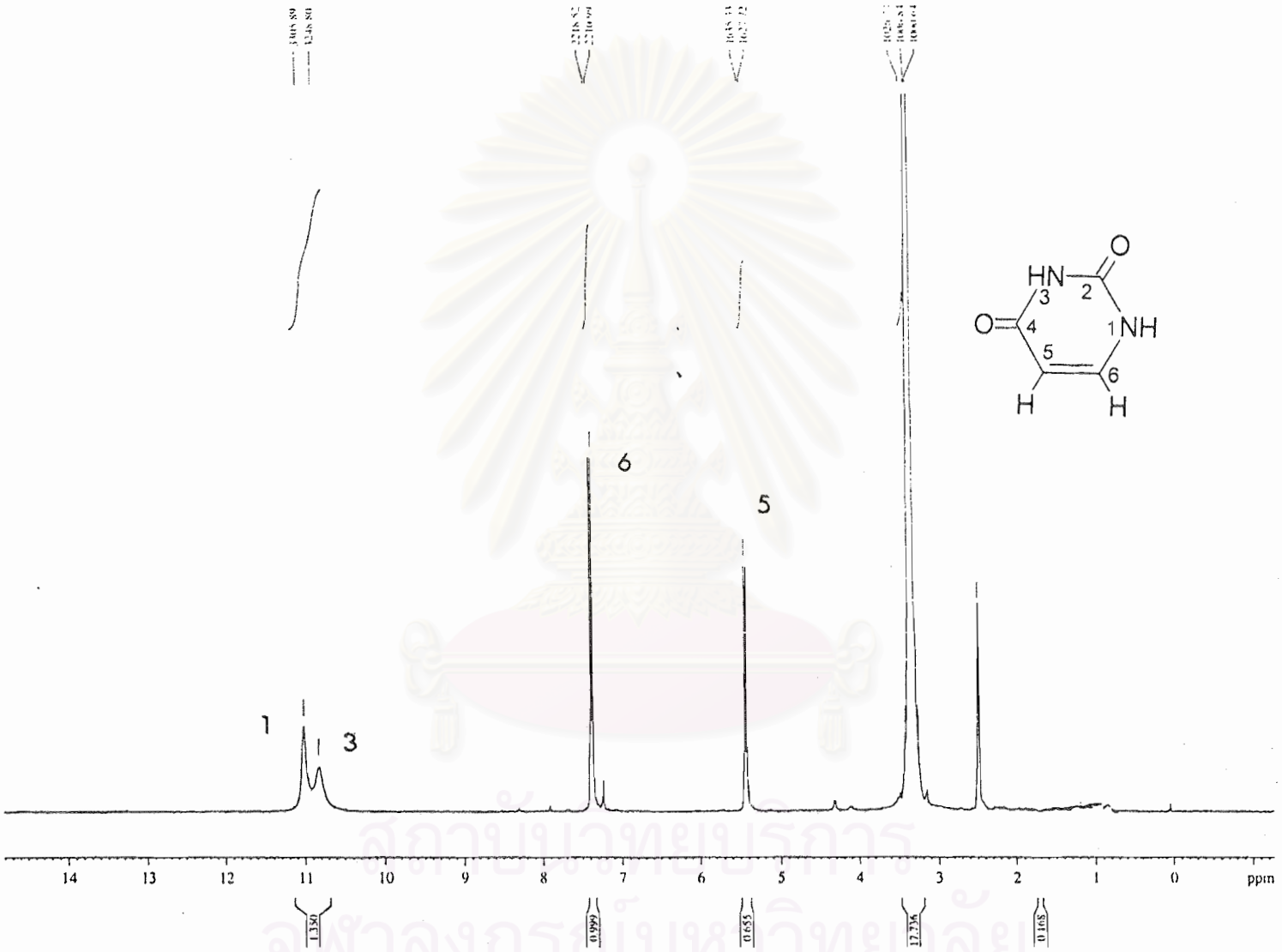


รูปที่ 21. IR spectrum ของสาร J-4 (uracil)

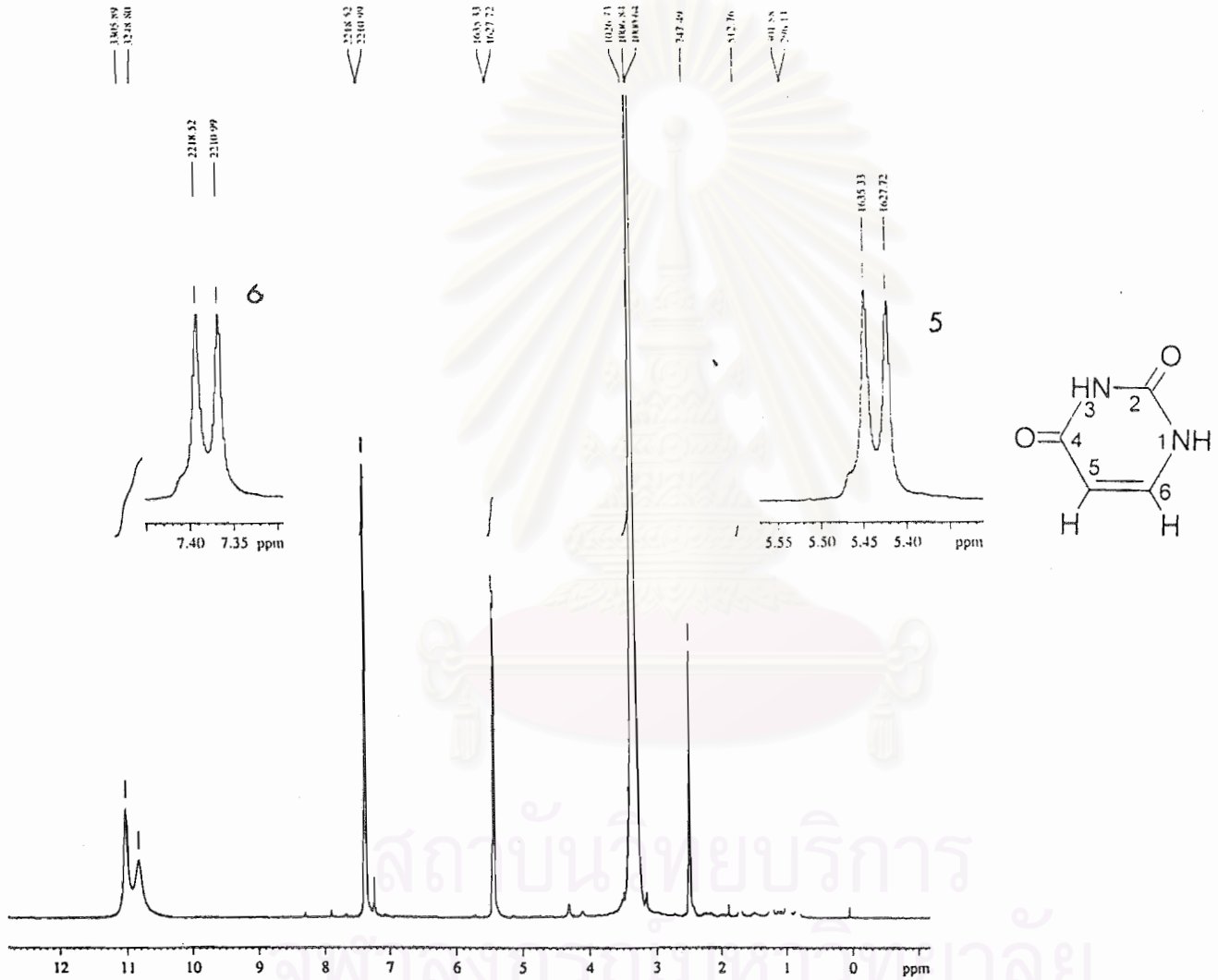
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



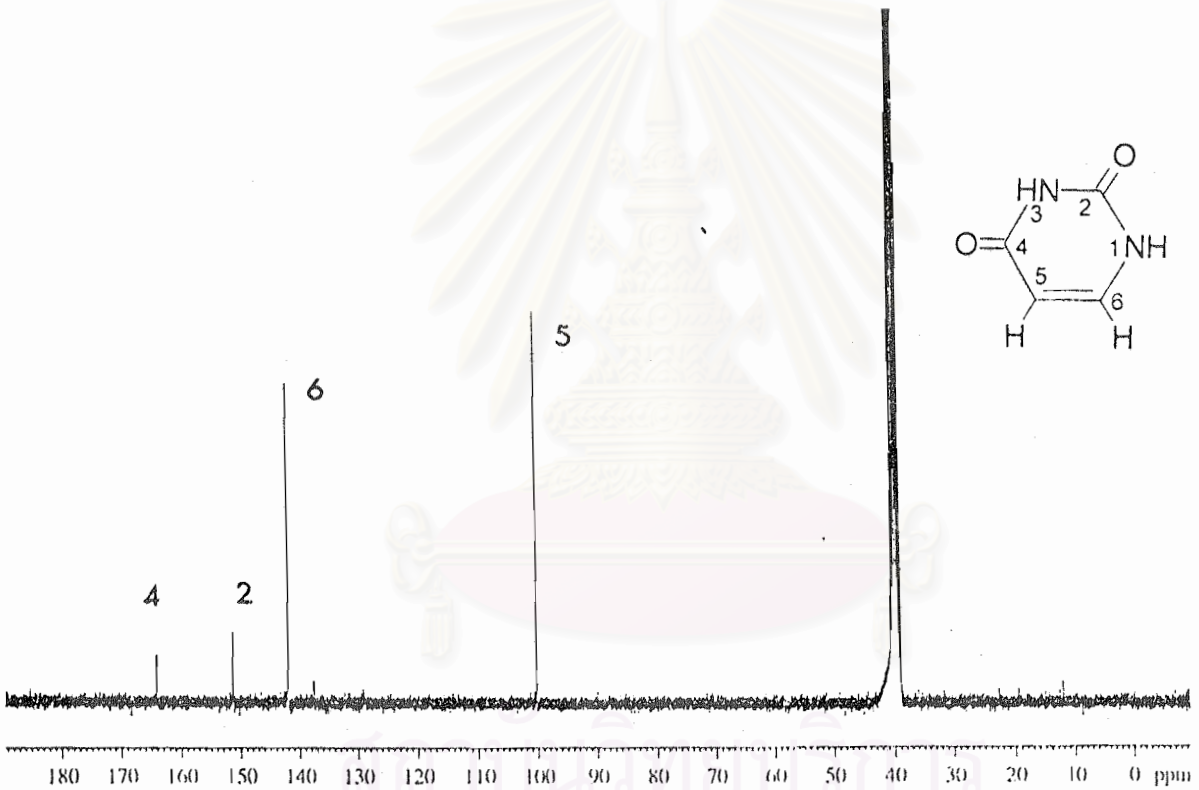
รูปที่ 22. Mass spectrum (EIMS) ของสาร J-4.. (uracil)



รูปที่ 23. ^{1}H NMR spectrum (300 MHz) ของสาร J-4 (uracil) ใน DMSO-d_6



รูปที่ 24. ^{1}H NMR spectrum (300 MHz) ของสาร J-4 (uracil) ใน DMSO-d_6 ภาพขยาย



J4/DMSO-d6

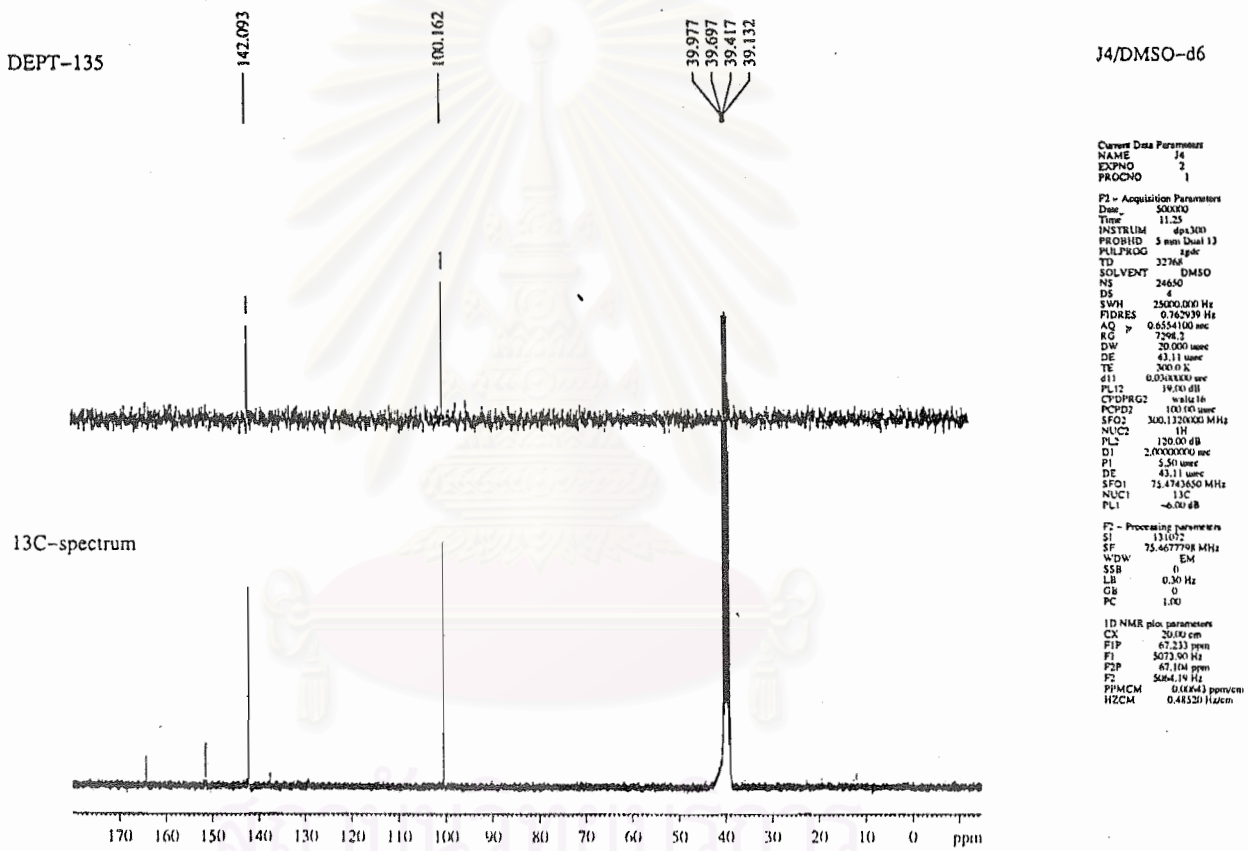
Current Data Parameters
NAME J4
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 500000
Time 11.25
INSTRUM dpx300
PROBHD 5 mm Dual 13
PULPROG zgdc
TD 32768
SOLVENT DMSO
NS 24650
DS 4
SWH 25000.000 Hz
FIDRES 0.762939 Hz
AQ 0.6554100 sec
RG 7298.2
DW 20.000 usec
DE 43.11 usec
TE 300.0 K
d11 0.03000000 sec
PL12 19.00 dB
CPDPRG2 waltz16
PCPD2 100.00 usec
SFO2 300.1320000 MHz
NUC2 1H
PL2 120.00 dB
D1 2.00000000 sec
P1 5.50 usec
DE 43.11 usec
SFO1 75.4743650 MHz
NUC1 13C
PL1 -6.00 dB

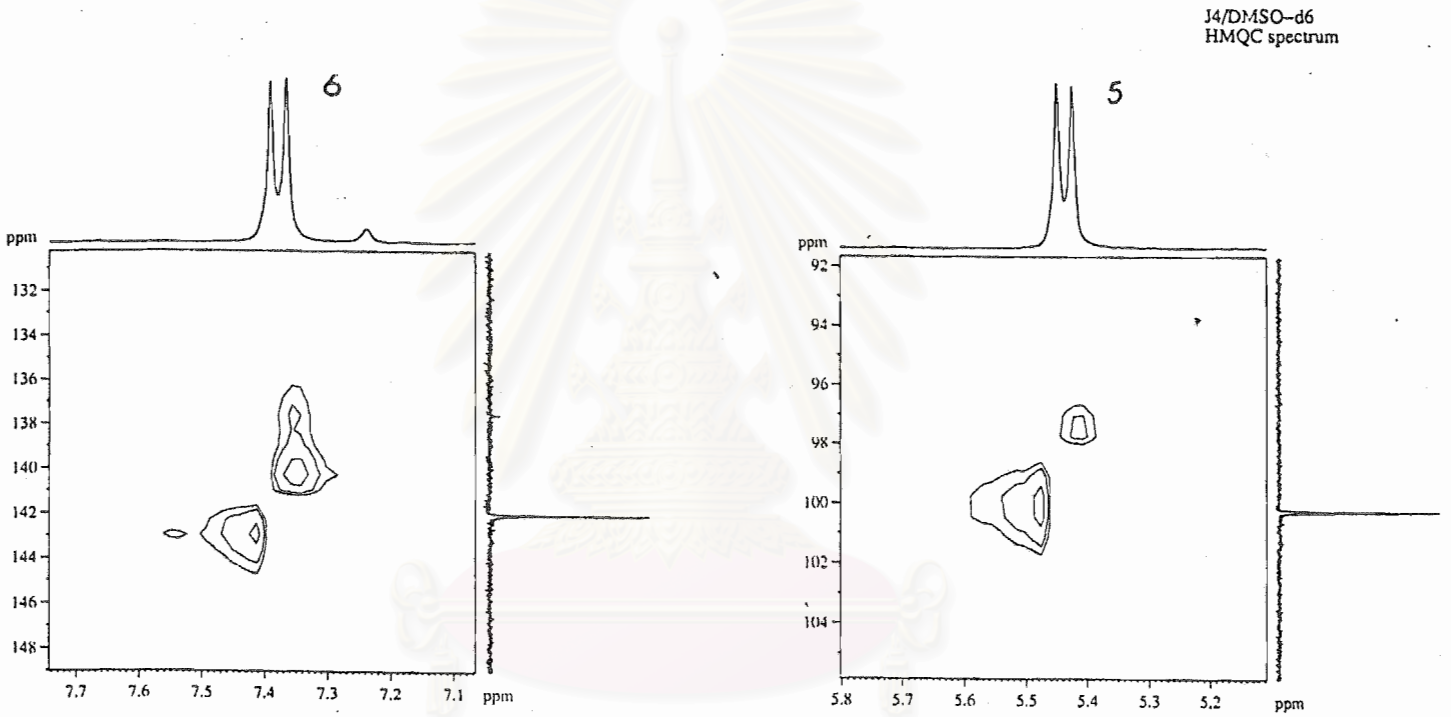
F2 - Processing parameters
SI 131072
SF 75.4677798 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

1D NMR plot parameters
CX 20.00 cm
F1P 67.235 ppm
F1 5073.90 Hz
F2P 67.104 ppm
F2 5064.19 Hz
PPMCM 0.00643 ppm/cm
HZCM 0.48520 Hz/cm

รูปที่ 25. ^{13}C NMR spectrum (75 MHz) ของสาร J-4 (uracil) ใน DMSO-d_6

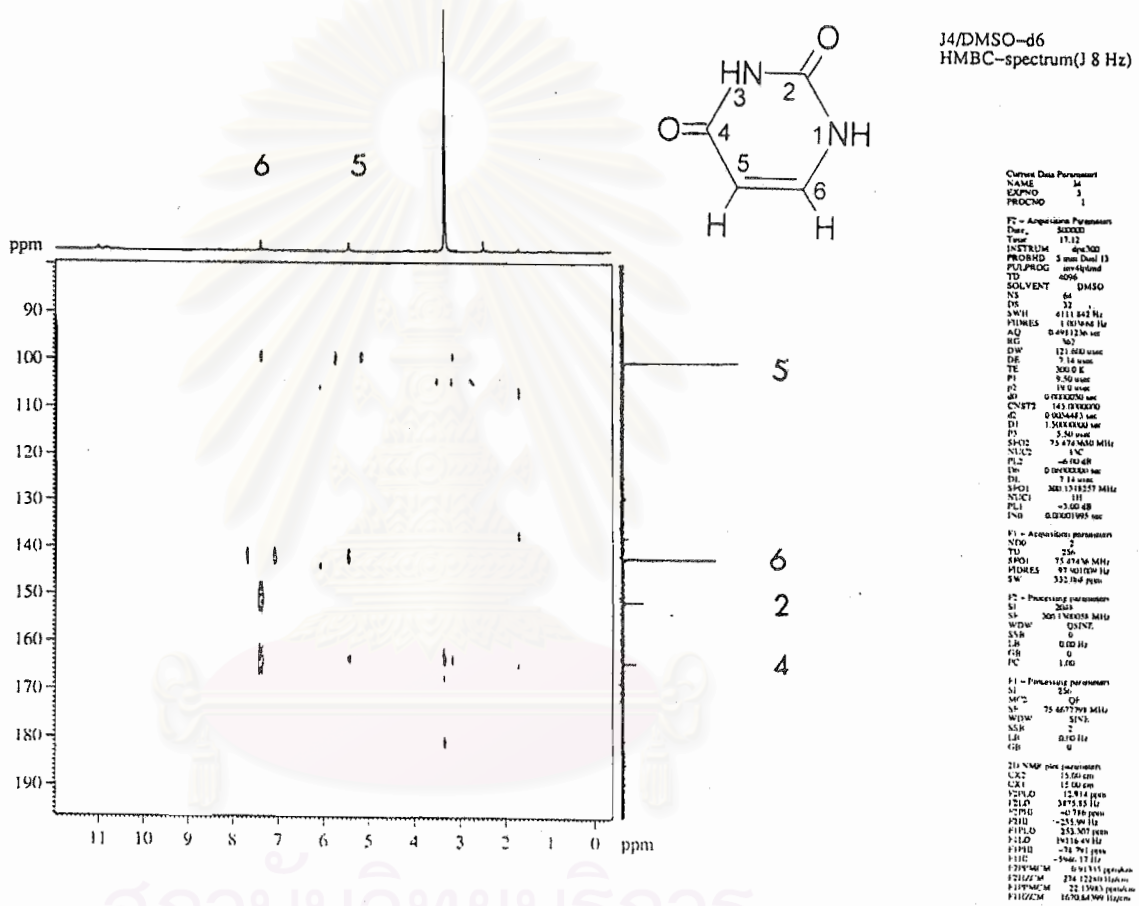


รูปที่ 26 DEP-135 spectrum ของสาร J-4 (uracil)ใน DMSO-d_6



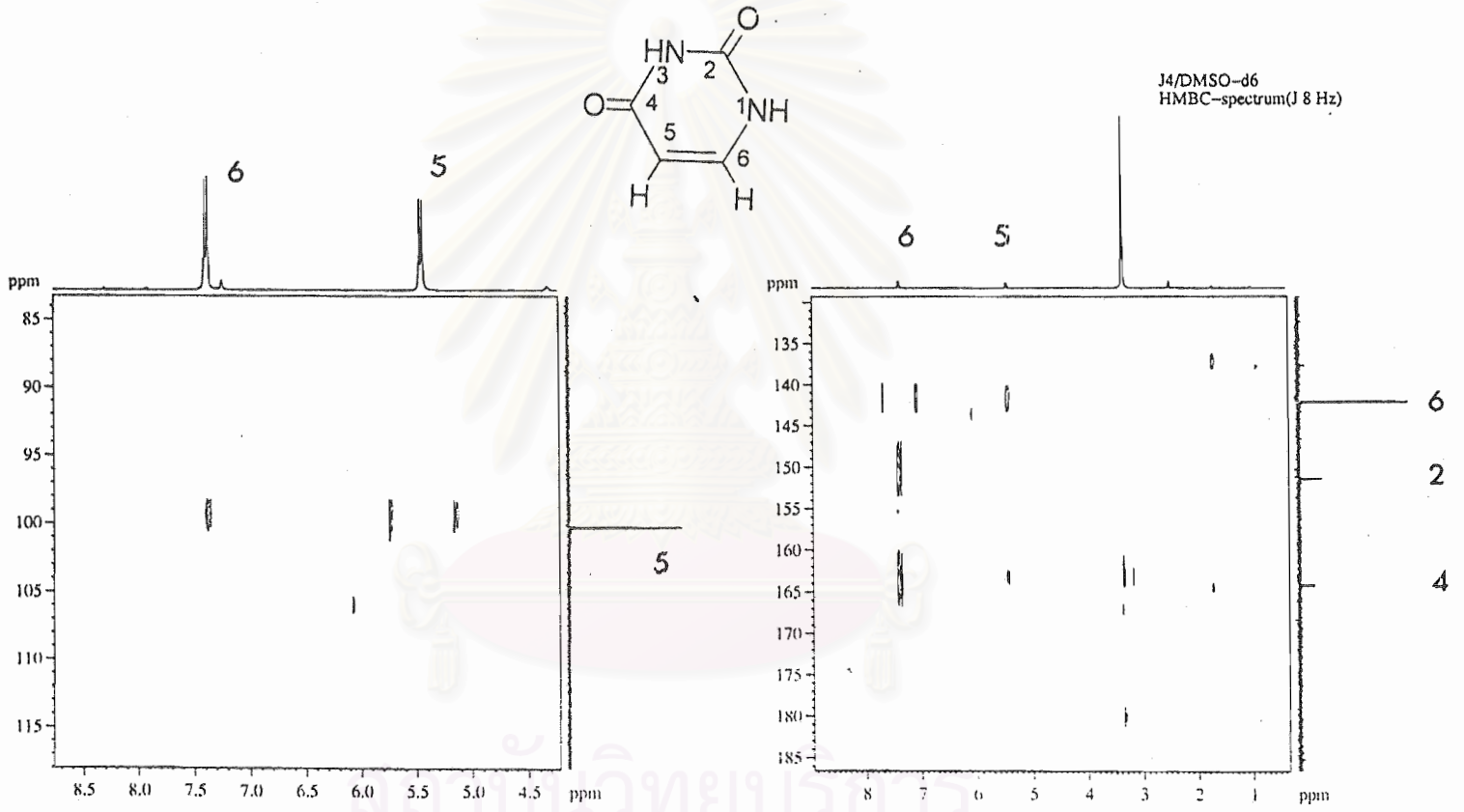
รูปที่ 27 HMQC spectrum ของสาร J-4 (uracil)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 28 HMBC spectrum (J = 8 Hz) ของสาร J-4 (uracil)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 29. HMBC spectrum(J = 8 Hz) ของสาร J-4 (uracil) ภาพขยาย