แบบรายงานความก้าวหน้าโครงการวิจัยฉบับสมบูรณ์ (ปีที่ 3)

ชื่อโครงการวิจัย

(ไทย) ความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียกลุ่ม *Streptomycetes* จากดินในอำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน

(อังกฤษ) Biodiversity of bacteria *Streptomycetes* in soil from Wiangsa district, Nan Province

ชื่อคณะผู้ทำวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ ผู้วิจัยร่วม

ภาควิชา จุลชีววิทยา **คณะ** วิทยาศาสตร์ **โทรศัพท์** 02-218-5070-1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แบบรายงานความก้าวหน้าโครงการวิจัย (ปีที่ 3)

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

ชื่อโครงการวิจัย

(ไทย) ความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียกลุ่ม *Streptomycetes* จากดินในอำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน

(อังกฤษ) Biodiversity of bacteria *Streptomycetes* in soil from Wiangsa district, Nan Province

ชื่อคณะผู้ทำวิจัย

(ไทย)	นายธนาภัทร ปาลกะ	หัวหน้าโครงการ
	นางไพเราะ ปิ่นพานิชการ	ผู้วิจัยร่วม
(อังกฤษ)	Dr. Tanapat Palaga	
	Dr. Pairoh Pinphanichakarn	

ภาควิชา จุลชีววิทยา **คณะ** วิทยาศาสตร์ **โทรศัพท์** 02-218-5070-1

ระยะเวลาของโครงการวิจัย 3 ปี

ได้รับอนุมัติงบประมาณปีที่ 3 จำนวน 363,000.00 บาท

รายงานครั้งนี้เป็นรายงานความก้าวหน้าซึ่งเป็นผลงานระหว่าง ตุลาคม 2549-กันยายน 2550

วันที่ส่งรายงาน 8 สิงหาคม 2551

ลงชื่อผู้วิจัยหลัก ______________

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เลขหมู่
เลขทะเบียน 014132
วัน, เดือน, ปี 13 พ.ค.52

1. *คำนำ*

สารเมแทบอไลท์ที่ผลิตได้จาก *Streptomyces* spp. โดยเฉพาะสารปฏิชีวนะ ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย และ รา ได้ถูกนำมาใช้ในทางการแพทย์ในการบำบัดรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้ออย่างแพร่หลาย นอกจากนี้ *Streptomyces* spp. ยังสามารถผลิตเอนไซม์หลายชนิดที่นำมาใช้ประโยชน์ด้านอุตสาหกรรมต่างๆ ได้ ปัจจุบันยังมีการค้นพบสารเมแทบอไลท์จากแบคทีเรียกลุ่มนี้อย่างต่อเนื่อง ซึ่งมีรายงาน เช่น การค้นพบสารโมเลกุลขนาดเล็กที่ผลิตจาก *Streptomyces* spp. ที่มีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัส HIV-1 ในเซลล์ที่ติดเชื้อเรื้อรังระยะสุดท้าย (Baba และคณะ,1999) และการค้นพบยาต้านเชื้อราชนิดใหม่ที่แยกได้จาก *Streptomyces* sp. 517-02 โดยเบื้องต้นพบว่าเป็นสารประกอบที่มีการแสดงออกคล้าย UK-2A สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Saccharomyces cerevisiae* IFO 0203 (Usuki และคณะ, 2006) เป็นต้น นอกจากจะมีการค้นพบ *Streptomyces* ที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นประโยชน์ทางการแพทย์แล้ว สารบางชนิดยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านอื่นๆ ได้อีก เช่น ในด้านการเกษตร เช่น Bordoloi และคณะ 2001 พบว่า *Streptomyces* sp. 201 สามารถสร้างสารประกอบชนิดใหม่ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคในพืชหลายชนิด นอกจากนั้น Streptomyces ยังสามารถสร้างเอนไซม์หลายชนิดที่มีประโยชน์ทางการแพทย์ เช่น *Streptomyces chromofuscus* PISC-2002 สร้าง protease PISC-2002 ซึ่งสามารถนำไปใช้ประยุกต์เป็นยาต้าน influenza virus A/Rostock/34 (H7N7) (Angelova และคณะ, 2006) ส่วนในด้านอุตสาหกรรม สามารถยกตัวอย่างได้ เช่น *Streptomyces griseus* HUT 6037 สามารถผลิตเอนไซม์ Chitosanases ซึ่งมีประโยชน์ในการเตรียม Chitooligosaccharides (Tanabe และคณะ, 2002) ดังนั้น Streptomyces จึงเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีศักยภาพสูงในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพกลุ่มสำคัญซึ่งนำไปประยุกต์ใช้ต่อไปได้

ในปีที่ 1 และ 2 โครงการวิจัยนี้ได้ดำเนินการแยก *Streptomyces spp.*จำนวนมากกว่า 160 ไอโซเลตจากตัวอย่างดินจากอำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน และได้ทำการศึกษาสมบัติเบื้องต้นทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีของเชื้อที่แยกได้ รวมทั้งได้ทำการจัดจำแนกกลุ่มของเชื้อโดยวิธีทางชีววิทยาโมเลกุล ทำให้สามารถจัดจำแนกกลุ่มเบื้องต้นได้ 22 กลุ่มและนอกจากนี้ยังมีอีกมากกว่า 15 ไอโซเลตที่ไม่จัดอยู่ในกลุ่มที่จัดได้กลุ่มใดเลย ผลที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่า *Streptomyces spp.*ที่แยกได้นั้นมีความหลากหลายสูงในระดับจีโนม ซึ่งมีความน่าจะเป็นที่จะได้ไอโซเลตใหม่ที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อนและอาจจะได้ไอโซเลตที่มีความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้

โดยในปีที่ 3 ของโครงการวิจัยนี้ ได้ทำการคัดกรองสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตได้โดย *Streptomyces* spp. ที่แยกได้ในปีที่ 1 และ 2 โดยเน้นคัดกรองสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรีย รา และยีสต์ ฤทธิ์ต้านแมลง และฤทธิ์ต้านการอักเสบ และได้

ทำการศึกษาถึงลักษณะสมบัติเบื้องต้นของสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าว ซึ่งคาดว่าจะเป็นประโยชน์ในการประยุกต์ใช้สารเหล่านี้ในด้านการแพทย์ เกษตรกรรมต่อไปได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. แผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย

กิจกรรม	ระยะที่ 1	ระยะที่ 2	ระยะที่ 3
	ต.ค.49-ม.ค.50	ก.พ.50-พ.ค.50	มิ.ย.50-ก.ย.50
1.คัดกรองเชื้อที่สร้างสารออกฤทธิ์	←→		
2.ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยวิธีทางเคมีและศึกษาสมบัติเบื้องต้น		←—	—→

3. *วิธีการดำเนินการวิจัย*

3.1 แบคทีเรียที่ใช้ในการคัดกรอง

Streptomyces spp ถูกเก็บรักษาไว้ในอาหารเอียงชนิด L ที่ 4 องศาเซลเซียส ในกรณีที่เป็นการเก็บระยะสั้น และในรูปของสารแขวนลอยสปอร์ในกลีเซอร์รอล 20% (v/v) ที่ -70 องศาเซลเซียส

3.2 การเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวและการสกัดสารเมแทบอไลต์สำหรับคัดกรองสารมีฤทธิ์ต้านจุลชีพและสารต้านการอักเสบ

นำ *Streptomyces* spp. ในรูปสปอร์ที่แยกได้มาเลี้ยงในอาหารเหลว C4 (กลูโคส 20 กรัม, soluble starch 10 กรัม, meat extract 0.1%, ยีสต์แห้ง 4 กรัม, Soy bean meal 25 กรัม, NaCl 2 กรัม, K_2HPO_4 0.005% (w/v) น้ำกลั่น 1 ลิตร pH 7.3) เป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นปั่นแยกส่วนที่เป็นน้ำใสแล้วเก็บเป็นตัวอย่างสำหรับทดสอบต่อไป หรือเติมอะซีโตนในอัตราส่วน 1:1 (v/v) แล้วทำการผสมเพื่อทำให้เซลล์แตก ตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เซลล์ตกตะกอนแล้วเก็บส่วนใสไว้เป็นตัวอย่างทดสอบต่อไป

3.3 การเลี้ยงเชื้อในอาหารวุ้นแข็งและการสกัดสารเมแทบอไลต์สำหรับคัดกรองสารมีฤทธิ์ต้านแมลง

นำ *Streptomyces* spp. ในรูปสปอร์ที่แยกได้มาเลี้ยงในอาหารวุ้นแข็ง (soluble starch 20 กรัม, KNO_3 1 กรัม, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.5 กรัม, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 กรัม, $FeSO_4$ 0.01 กรัม, agar 20 กรัม, น้ำกลั่น 1 ลิตร pH 7.0-7.4) โดยเลี้ยงเป็นเวลา 7-10 วันที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส จากนั้นตัดวุ้นที่มีโคโลนีขนาด 1 ตารางเซนติเมตร บดให้ละเอียดแล้วเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มิลลิลิตรเพื่อสกัดสาร เป็นเวลา 12 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ปั่นแยกส่วนน้ำใสเก็บไว้เป็นตัวอย่างเพื่อทดสอบต่อไป

3.4 การคัดกรองสารออกฤทธิ์ต้านจุลชีพ

นำเชื้อ indicator strains ได้แก่ *Escherichia coli* (ATCC25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* (ATCC70014) และ *Aspergillus niger* (ATCC6275) เลี้ยงบนอาหารวุ้นแข็ง จากนั้นวาง stainless cup บนอาหารที่มีเชื้อ indicator strains แล้วเติมสารสกัดที่เตรียมได้ตามข้อที่ 3.2 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงใน stainless cup ทิ้งไว้จนสารสกัดถูกดูดซับเข้าสู่อาหารวุ้น นำเชื้อไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ยกเว้น *Candida albicans* ที่เลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วสังเกตุดูส่วน clear zone ที่เกิดขึ้น

3.5 การคัดกรองสารออกฤทธิ์ต้านการอักเสบ

นำแมคโครฟาจเซลล์ไลน์ RAW264.7 (ATCC TIB-71) มาเลี้ยงในอาหาร RPMI1640 ที่เติม Fetal Bovine Serum 10% (v/v) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บรรยากาศ 5% คาร์บอนไดออกไซด์ จนได้จำนวนเซลล์ $5x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำแมคโครฟาจเซลล์ไลน์มาเลี้ยงในจานแบบ 96 หลุม ในอาหารปริมาตร100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ให้เซลล์เกาะผิวภาชนะเป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง เติมสารเมแทบอไลต์ที่สกัดในข้อ 3.2 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้าย 5%) ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง เติมไลโปพอลิแซคคาไรด์ (LPS) ที่ความเข้มข้น 100 ng/ml เลี้ยงต่อไปอีก 24 ชั่วโมง ปั่นแหว่งและเก็บส่วนน้ำใสมาทดสอบหาปริมาณไนตริคออกไซด์ที่เซลล์ผลิตโดยวิธี Griess Reaction แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm (Abs540) ด้วยเครื่อง Microplate Reader โดยคำนวณหาเปอร์เซนต์การยับยั้งการสังเคราะห์ไนตริคออกไซด์ด้วยสมการต่อไปนี้

เปอร์เซนต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ (%) =

$$\frac{\text{(Abs540 ของตัวควบคุมบวก – Abs540 ของเซลล์ที่ได้รับสารเมแทบอไลต์)}}{\text{(Abs540 ของตัวควบคุมบวก – Abs540 ของตัวควบคุมลบ)}} \times 100\ (\%)$$

3.6 การคัดกรองเชื้อที่มีความสามารถในการสร้างสารมีฤทธิ์ฆ่าแมลง

ทดสอบโดยใช้วิธี Brine Shrimp Bioassay ที่รายงานโดย Xiong และ Kong (2004) โดยนำ Brine shrimp (*Artemia salina*) ที่ทำการฟักเป็น nauplii มาทดสอบกับสารสกัดที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารวุ้นแข็งในข้อที่ 2.4 มาทดสอบข้างต้นใน 96 well microplate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นตรวจดูการอยู่รอดของ Brine shrimp ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ inverted โดยสังเกตุว่า Brine shrimp ยังมีการเคลื่อนไหวหรือไม่ และคำนวณหาเปอร์เซนต์การตายของ Brine shrimp โดยใช้สมการต่อไปนี้

เปอร์เซนต์การตาย (%) = (จำนวน Brine shrimp ที่ตาย) x 100

(จำนวน Brine shrimp ทั้งหมด)

3.7 การศึกษาสมบัติเบื้องต้นของสารออกฤทธิ์ต้านจุลชีพและสารต้านการอักเสบ

ก. การทดสอบสารออกฤทธิ์ต้านยีสต์ Candida albicans

เลี้ยงยีสต์ทดสอบ *Candida albicans* (ATTC 70014) บนอาหารแข็ง Sabouraud agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง นำโคโลนีมาเจือจางในน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้มีค่าความขุ่นเทียบเท่ากับ 0.5 McFarland Standard ใช้สำลีก้านจุ่มลงในยีสต์ทดสอบแขวนลอยที่ถูกปรับความเข้มข้นแล้วป้ายลงบนหน้าอาหารแข็ง Sabouraud agar ให้ทั่วในสองทิศทางที่ตรงข้ามกัน ทิ้งไว้ให้หน้าอาหารแห้ง แล้วจึงป้ายซ้ำอีกรอบในทิศทางที่กลับกัน เมื่อหน้าอาหารแห้งแล้วจึงวาง stainless cup บนหน้าอาหารแข็ง ดูดตัวอย่างที่ต้องการทดสอบใส่ลงใน stainless cup ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง โดยใช้ตัวควบคุมบวกเป็น Nystatin (250 mg/ml) และใช้ตัวควบคุมลบเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเจริญของเชื้อทดสอบ แล้วจึงวัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่เกิดขึ้นรอบๆ stainless cup

ข. ทดสอบชนิดของแหล่งไนโตรเจนในอาหารต่อการสร้างสารเมแทบอไลต์ที่มีฤทธิ์

ทดลองเปลี่ยนแหล่งไนโตรเจนในอาหารเหลว C4 จากถั่วเหลืองบดเป็น KNO_3 0.38% (w/v) เปบโตน 0.5% (w/v), NH_4Cl 0.2% (w/v) และ NH_4NO_3 0.14% (w/v) จากนั้นเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวเป็นเวลา 5 วันและสกัดสารเมแทบอไลต์โดยใช้อะซีโตน แล้วตรวจหาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของยีสต์และการต้านการอักเสบ

ค. การแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างหยาบโดยใช้ TLC

นำ *Streptomyces* spp. O245704 และ D230704 ในรูปสปอร์มาเลี้ยงในอาหารเหลว C4 ถั่วเหลือง หรือ C4 ถั่วเขียวปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 3 ขวด เป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเก็บส่วนในโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm ระยะเวลา 10 นาที จากนั้นแยกเอาส่วนน้ำใสไปสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตปริมาตร 100 มิลลิลิตร ทำการสกัดซ้ำ 3 ครั้ง นำเอาชั้นที่เป็นเอทิลอะซิเตตที่ได้ไปทำการระเหยแห้งโดยใช้เครื่อง Rotary vacuum evaporator จากนั้นละลายสารที่ได้ด้วยเอทานอลปริมาตร 5 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสเพื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC ต่อไป

เพื่อศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการแยกโดยวิธี TLC (TLC aluminium sheet รุ่น silica gel 60 F_{254}) จึงใช้ตัวทำละลายชนิดต่างๆ เช่น เมทานอล, เอทิลอะซิเตต และ เฮกเซน ในอัตราส่วนต่างๆ กันเป็นโมบายเฟส ตรวจสอบตำแหน่งของสารที่แยกได้บนแผ่น TLC หลังจาก develop โดยอบแผ่น TLC ในภาชนะที่อิ่มตัวด้วยไอของไอโอดีน หรือส่องภายใต้รังสีอัลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร จากนั้นทำการวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของสารและคำนวณหาค่า Retention factor (Rf) ด้วยสมการดังนี้

$$\text{Rf} = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ห่างจากจุดเริ่มต้น}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ห่างจากจุดเริ่มต้น}}$$

ง. การศึกษาตำแหน่งของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งยีสต์ทดสอบบนแผ่น TLC โดยวิธีไบโอออโตกราฟี (Bioautography) ตามวิธีที่มีรายงานโดย Zitouni และคณะ (2005)

นำยีสต์ทดสอบ *Candida albicans* ATTC 70014 มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง Sabouraud agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง นำโคโลนีมาเจือจางในน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ให้มีค่าความขุ่นเทียบเท่ากับ 0.5 McFarland Standard ใช้สำลีก้านจุ่มลงในยีสต์ทดสอบแขวนลอยที่ถูกปรับความเข้มข้นแล้วป้ายลงบนหน้าอาหารแข็ง Sabouraud agar ให้ทั่วในสองทิศทางที่ตรงข้ามกัน ทิ้งไว้ให้หน้าอาหารแห้ง แล้วจึงป้ายซ้ำอีกรอบในทิศทางที่กลับกัน เมื่อหน้าอาหารแห้งจึงนำแผ่น TLC ที่ได้ทำการแยกสารสกัดดังที่ระบุข้างต้นโดยตั้งทิ้งไว้ประมาณ 2 ชั่วโมง เพื่อให้โมบายเฟสระเหยออกไปจนหมด มาวางทาบบนหน้าอาหารโดยให้ด้านที่มีซิลิก้าแนบกับอาหาร แล้วจึงนำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นถอดแผ่น TLC ออก บ่มต่อที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบบริเวณใสที่เกิดขึ้นบนอาหารและวัดหาค่า Rf ของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งยีสต์ทดสอบแต่ละชนิด ในการทดสอบการยับยั้งยีสต์ทดสอบใช้แผ่น TLC ที่มี สารนีสแตตินเป็นชุดควบคุมบวก (positive control) เป็นและใช้แผ่น TLC ที่ไม่มีสารสกัดเป็นตัวควบคุมลบ (negative control)

<u>3.8 การศึกษาสมบัติเบื้องต้นของสารออกฤทธิ์ต้านแมลง</u>

ก. ผลของกลูโคสที่มีในอาหารต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ต้านแมลง

นำ *Streptomyces* spp. O145702 มาเลี้ยงในอาหาร LB ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนโดยเติมกลูโคสในปริมาณที่ต่างกัน (0.1%, 0.5% (w/v)) แล้วเก็บตัวอย่างโดยการสกัดสารออกฤทธิ์จากน้ำเลี้ยงเชื้อทุกวันเป็นเวลา 7 วัน นำสารสกัดที่ได้ไปตรวจหาแอคติวิตีใน Brine shrimp assay ดังที่ระบุข้างต้น

ข. ผลของแหล่งคาร์บอนที่มีในอาหารต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ต้านแมลง

นำ *Streptomyces* spp. O145702 มาเลี้ยงในอาหาร LB ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส ซูโครส เดกซ์ตริน soluble starch cassava starch และ corn strach ที่ปริมาณ 0.5% (w/v) แล้วเก็บตัวอย่างโดยการสกัดสารออกฤทธิ์จากน้ำเลี้ยงเชื้อในวันที่ 3 นำสารสกัดที่ได้ไปตรวจหาแอคติวิตีใน Brine shrimp assay ดังที่ระบุข้างต้น

ค. การแยกสารมีฤทธิ์อย่างหยาบโดยใช้ TLC และตรวจหามวลโมเลกุลโดยใช้ Mass Spectophotometry (MS)

วิเคราะห์สารสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างหยาบโดย TLC ดังที่ระบุข้างต้น การวิเคราะห์หามวลโมเลกุลโดยใช้ MS นั้น ใช้ระบบ HP1100 (Hewlett-Packard) ที่ต่อเข้ากับ Bruker Esquire

Ion-trap MS ที่มีแหล่งไอออน ESI ติดตั้งอยู่ด้วย ฉีดตัวอย่าง (10 μl) เพื่อวิเคราะห์และชะคอลัมน์ด้วย MeCN ที่อัตรา 0.2ml/min มีการตรวจหาไอออนในระดับ m/z 100-1500 ที่ความเร็ว 13,000 Da/s และตรวจหา 15 รอบต่อสเปคตรัมแต่ละตัว

3.9 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องกราด

เตรียมตัวอย่างเชื้อ *Streptomyces* spp. O145702 โดยเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง Bennet เพื่อให้สร้างสปอร์ จากนั้นนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องกราด โดยส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

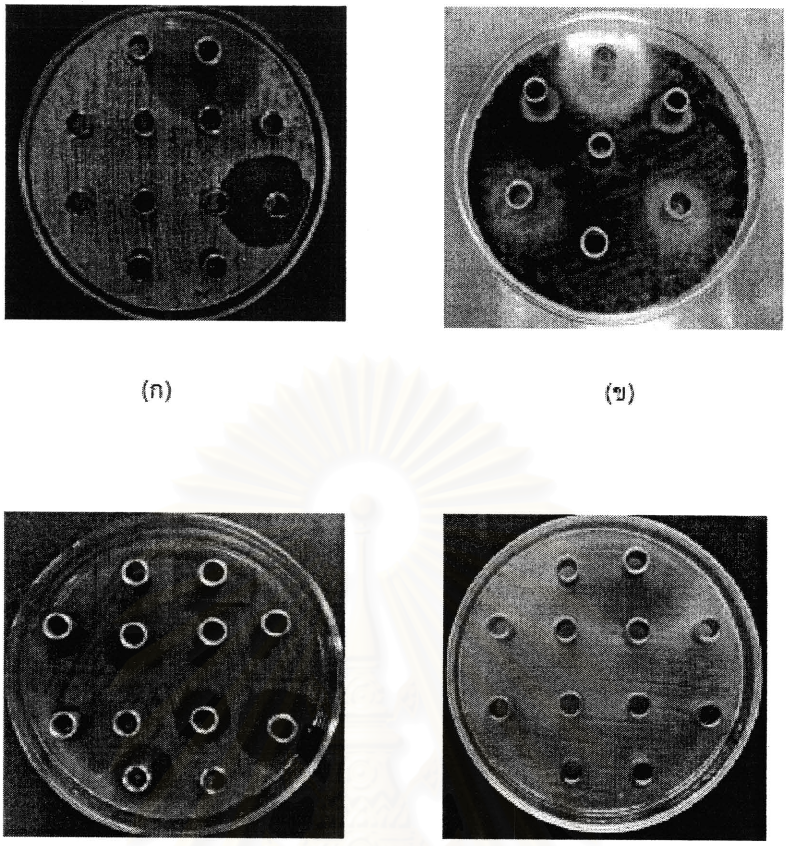
3.10 การศึกษาการแสดงออกของจีน iNOS โดยวิธี RT-PCR

สกัด RNA ของแมคโครฟาจที่ได้รับ LPS และ/หรือสารสกัดจากส่วนน้ำใสของไอโซเลตที่แยกได้โดยใช้ Trizol Reagent ใช้ RNA ไปสังเคราะห์ Cdna โดยใช้ random hexamer เพื่อทำ RT-PCR ในการเพิ่มปริมาณชิ้น mRNA ของจีน iNOS นั้น ใช้คู่ไพรเมอร์ iNOS forward 5' CCCttcCGAagtTTCtggCAGcagC 3' iNOS reverse 5' GGCtgtCAGagcCTC gtgGCTttgG 3' (Lee และคณะ, 2007) และคู่ไพรเมอร์ β actin forward 5' ACCAACTGGGAC GACATGGAGAA3' β actin reverse 5'GTGGTGGTGAAGCTGTAGCC3' (Palaga และคณะ, 2008) โดยทำการเพิ่มปริมาณ 30 รอบ โดยใช้สภาวะในการเพิ่มปริมาณ คือ Denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส Annealing ที่ 60 องศาเซลเซียส สำหรับ *iNOS* หรือ 55 องศาเซลเซียส สำหรับ β actin และ Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส ตรวจแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นโดยใช้ electrophoresis

4. ผลการวิจัย

4.1 การคัดกรองเชื้อที่มีความสามารถในการสร้างสารต้านจุลชีพ

จากการคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ต้านจุลชีพพบว่า *Streptomyces* spp. 18 ไอโซเลตมีความสามารถสร้างสารต้านจุลชีพกับสายพันธุ์ทดสอบได้แก่ แบคทีเรีย (แกรมบวก และแกรมลบ) ยีสต์ และรา และพบว่าเมื่อวัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่เกิดขึ้น *Streptomyces* sp. แต่ละไอโซเลตมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลชีพต่อสายพันธุ์ทดสอบนั้นแตกต่างกันหรือปริมาณสารมีฤทธิ์ต้านจุลชีพที่ผลิตในแต่ละไอโซเลตมีความแตกต่างกัน (ตารางที่ 1 และ รูปที่ 1)



(ก) (ข) (ค) (ง)

<u>รูปที่ 1</u> ตัวอย่างผลการทดสอบสารออกฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดเมแทบอไลท์ของ *Streptomyces* spp. ในการศึกษานี้โดยจุลชีพสายพันธุ์ทดสอบได้แก่ (ก) คือ *Candida albicans ATCC70014* (ข) คือ *Aspergillus niger* ATCC6275 (ค) คือ *Staphylococcus aureus* ATCC25923 (ง) คือ *Escherichia coli* ATCC25922 ตามลำดับ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

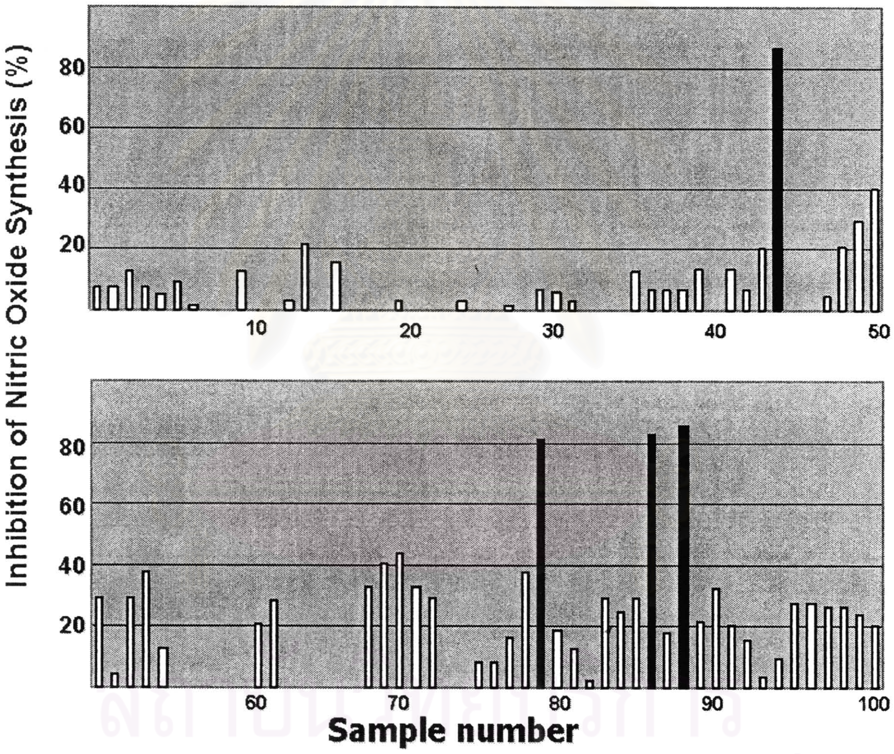
ตารางที่ 1 ผลการทดสอบความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ต้านจุลชีพของ *Streptomyces* spp. ทั้ง 19 ไอโซเลตต่อเชื้อสายพันธุ์ทดสอบ (ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยของผลการทดลองสามซ้ำ)

จุลชีพทดสอบ / รหัส	*C. albican*	*E. coli*	*S. aureus*	*A. niger*
	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใส (เซนติเมตร)			
G145708	0	0	1.6	0
G245901	0	0	0	2.0
O145702	3.0	0	1.5	0
O145904	0	0	2.0	0
O230701	0	0	1.2	0
O230704	1.5	0	0	1.2
O230901	0	0	1.5	0
O245704	1.8	0	0	0
O245706	1.5	0	0	1.2
D230704	2.5	0	0	0
D230904	0	0	1.6	0
D245904	0	0	0	1.2
D245909	3.0	0	0	1.7
D445705	2.5	0	0	0
D530901	1.7	0	0	0
D630903	1.5	0	0	2.5
D645901	0	0	1.0	0
DB30704	0	0	1.4	0
DC30711	1.5	0	1.8	0
รวม	10	0	9	6

4.2 การคัดกรองเชื้อที่มีความสามารถในการสร้างสารต้านการอักเสบ

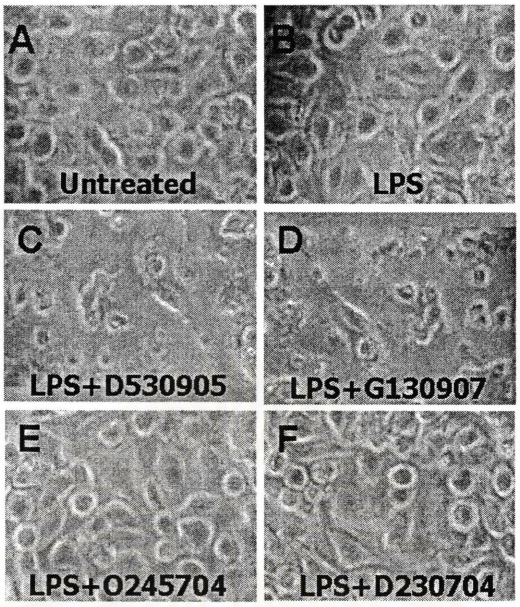
จากการคัดกรองสารเมแทบอไลต์ที่ได้จากการเลี้ยง *Streptomyces* spp. ที่แยกได้ในการวิจัยนี้ โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ C4 พบว่ามี 4 ไอโซเลตที่มีฤทธิ์กดการสังเคราะห์ไนตริกออกไซด์ในแมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ที่ให้ค่าความสามารถในการกดมากกว่า 50% (รูปที่ 2) ซึ่งเมื่อนำมาทำการทดลองซ้ำพบว่าทั้ง 4 ไอโซเลตยังคงให้ผลเหมือนกับผลของการคัดกรองปฐมภูมิ ซึ่งทั้งสี่ไอโซเลต ได้แก่ D530905 G130907 O245704 และ D230704 เพื่อคัดเลือกไอโซเลตที่ผลิตสารที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์เพื่อทำการศึกษาต่อไป จึงได้ทดสอบความเป็นพิษของสารเมแทบอ

ไลท์ โดยสังเกตุจากการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หลังจากได้รับสารเมแทบอไลต์แล้วเป็นเวลา 24 ชั่วโมงพร้อมกับ LPS โดยพบว่าสารเมแทบอไลต์ D530905 และ G130907 ทำให้เซลล์ตายทั้งหมด โดยเซลล์แสดงลักษณะเด่นต่างๆ ของเซลล์ที่ตาย เช่น การหดตัวของไซโตพลาสซึม การแตกตัวของนิวเคลียส เป็นต้น (รูปที่ 3) ในขณะที่สารเมแทบอไลต์จากไอโซเลตเลขที่ O245704 และ D230704 ไม่ทำให้เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาที่สังเกตุเห็นได้ชัดเจนแต่อย่างใด อีกทั้งเมื่อทำการวัดปริมาณการอยู่รอดของเซลล์โดยใช้สีย้อม trypan blue พบว่าให้ผลสอดคล้องกับการสังเกตุสัณฐานวิทยาของเซลล์ (ไม่ได้แสดงผล) ดังนั้น จึงสรุปได้ว่าสารเมแทบอไลต์จากไอโซเลตเลขที่ O245704 และ D230704 มีฤทธิ์กดการสังเคราะห์ไนตริกออกไซด์โดยไม่ทำให้เซลล์แมคโครฟาจตาย จึงคัดเลือดสองไอโซเลตนี้เพื่อทำการศึกษาทางเคมีเบื้องต้นต่อไป



รูปที่ 2 ผลการคัดกรองสารออกฤทธิ์กดการสังเคราะห์ไนตริกออกไซด์จากแมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS

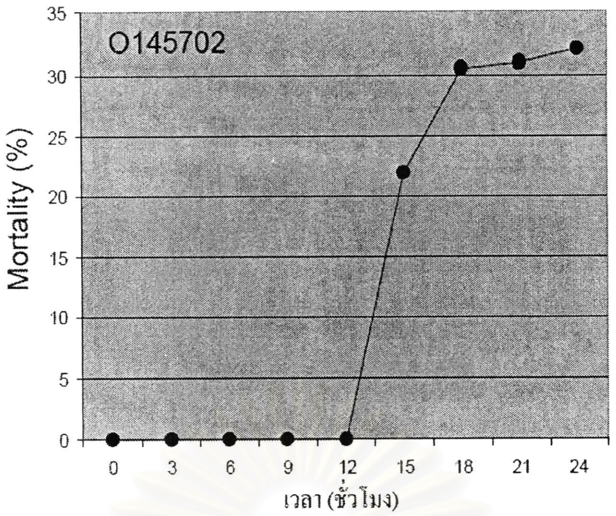
สารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิจาก *Streptomyces* spp. ทั้งหมด 100 ไอโซเลตที่ผ่านการคัดกรองสารที่ออกฤทธิ์กดการสังเคราะห์ไนตริกออกไซด์จากแมคโครฟาจ RAW264.7 ผลของไอโซเลตที่มีฤทธิ์การกดมากกว่า 50% จำนวน 4 ไอโซเลตแสดงด้วยแท่งสีดำ



<u>รูปที่ 3</u> สัณฐานวิทยาของแมคโครฟาจเซลล์ไลน์ RAW264.7 หลังจากที่ได้รับสารเมแทบอไลต์พร้อมกับ LPS
สารเมแทบอไลต์ที่ได้จากไอโซเลตเลขที่ D530905 และ G130907 (C และ D) ทำให้เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาที่เป็นลักษณะเด่นของการตายของเซลล์ ในขณะที่สารเมแทบอไลต์ที่ได้จากไอโซเลตเลขที่ O245704 และ D230704 (E และ F) นั้นไม่ทำให้เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาใดๆ ซึ่งคล้ายกับเซลล์ในการทดลองควบคุมลบและบวก (A และ B)

<u>4.3 การคัดกรองเชื้อที่มีความสามารถในการสร้างสารมีฤทธิ์ฆ่าแมลง</u>

จากการคัดกรองสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลง โดยใช้ Brine shrimp assay พบว่ามีเพียงหนึ่งไอโซเลตเท่านั้นที่ผลิตสารเมแทบอไลต์ที่ทำให้ Brine shrimp มีความอยู่รอดลดลงได้ ซึ่งได้แก่ O145702 ซึ่งสามารถเหนี่ยวนำให้ Brine shrimp ตายตั้งแต่ 12 ชั่วโมงหลังจากได้รับสารสกัด โดยให้ค่าสูงสุดในการฆ่า Brine shrimp ที่ 32% (รูปที่ 4)



<u>รูปที่ 4</u> ผลของสารสกัดเมแทบอไลท์ของ *Streptomyces* spp. O145702 ต่อการเหนี่ยวนำให้ Brine shrimp ตาย ที่เวลาต่างๆ

เลี้ยงไอโซเลตเลขที่ O145702 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มี KNO_3 ผสมอยู่เป็นแหล่งไนโตรเจนเป็นเวลา 20 ชั่วโมง แล้วสกัดสารเมแทบอไลต์โดยวิธีที่ระบุในวิธีการดำเนินการวิจัย เพื่อใช้ในการตรวจหาฤทธิ์ฆ่าแมลงโดย Brine Shrimp Assay

จากผลการทดลองข้างต้นในการคัดกรองสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น พบว่ามีสองไอโซเลตที่ผลิตสารออกฤทธิ์ต้านการอักเสบและต้านการเจริญของยีสต์ *Candida albicans* (O245704 D230704) และหนึ่งไอโซเลตที่ผลิตสารมีฤทธิ์ฆ่าแมลง (O145702) ดังนั้น จึงทำการศึกษาสารออกฤทธิ์ของสามไอโซเลตนี้ต่อไป

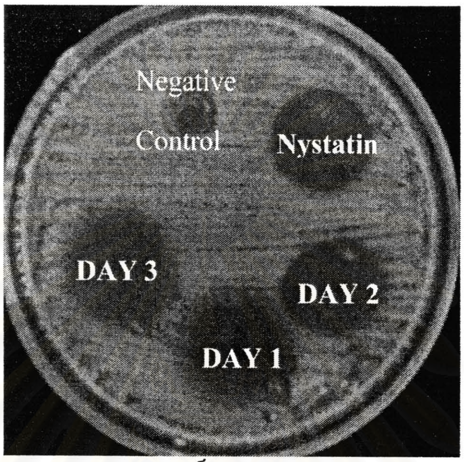
ซึ่งจากการจัดจำแนกกลุ่มไอโซเลตที่แยกได้ในงานวิจัยนี้โดยวิธีทางชีววิทยาโมเลกุล (ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA และ 16S-ITS RFLP) ในปีที่สองของโครงการวิจัยต่อเนื่องนี้พิสูจน์เอกลักษณ์ไอโซเลตทั้งสามได้ดังนี้

O245704	*Streptomyces lanatus*
D230704	*Streptomyces roseochromogenus*
O145702	*Streptomyces binchenggensis*

<u>4.4 ผลของการทดสอบสมบัติของสารออกฤทธิ์ชีวภาพเบื้องต้น</u>

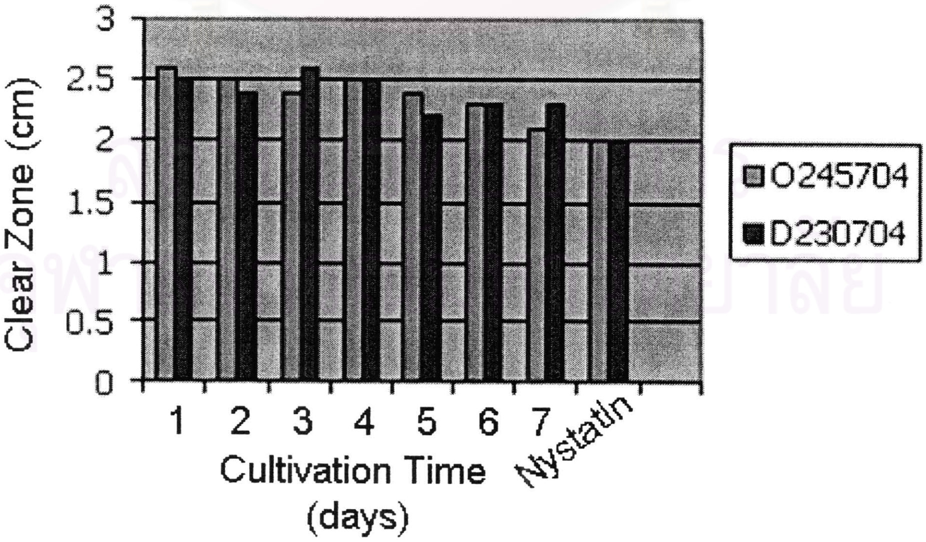
เพื่อศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารออกฤทธิ์ต้านการเจริญของยีสต์ของสารเมแทบอไลท์ที่สกัดได้ จึงทำการเลี้ยงเชื้อ O245704 D230704 ทั้งสองชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ C4 ซึ่งมีถั่วเหลืองบดเป็นส่วนผสมที่ระยะเวลาต่างๆ แล้วทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญต่อ *Candida albicans* จาก

สารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อ ซึ่งพบว่าสารออกฤทธิ์ต้านการเจริญที่สกัดได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อมีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของ *Candida albicans* ตั้งแต่วันแรกที่เริ่มเลี้ยง และขนาดของส่วนใสที่เกิดขึ้นก็ไม่เพิ่มขึ้นแม้จะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลานานถึง 7 วันก็ตาม ผลการทดลองนี้แสดงว่าไอโซเลตทั้งสองนี้ผลิตสารออกฤทธิ์ต้านการเจริญของยีสต์ตั้งแต่ระยะการเจริญใน log phase ซึ่งเป็นระยะที่สารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิมักจะยังไม่มีการผลิต ซึ่งสารที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของยีสต์ของสองไอโซเลตนี้อาจเป็นสารเมแทบอลไท์ปฐมภูมิซึ่งเกี่ยวข้องกับการเจริญในระยะ log phase (รูปที่ 5 และ 6)



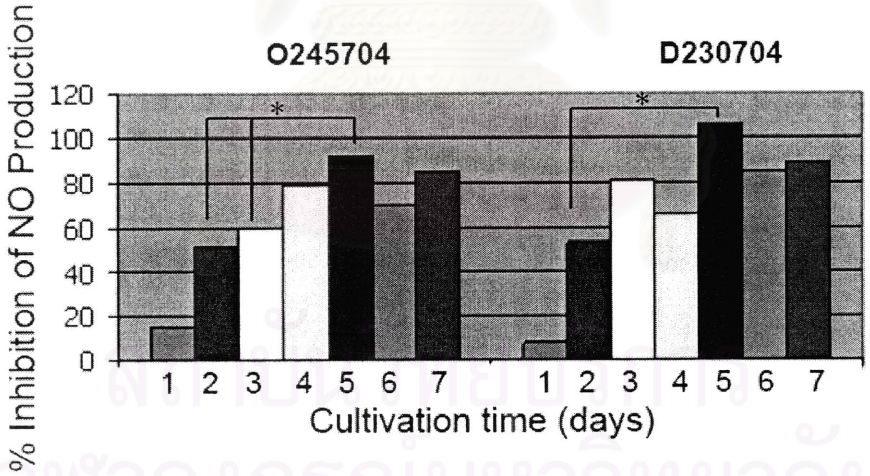
<u>รูปที่ 5</u> ตัวแทนผลการทดลองสกัดสารออกฤทธิ์ต้านการเจริญของ *Candida albicans* จากไอโซเลต O245704 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ C4 เป็นเวลา 1-3 วัน

สกัดอาหารเลี้ยงเชื้อ C4 ที่มีถั่วเหลืองบดผสมอยู่ที่ใช้เลี้ยงเชื้อที่ระยะเวลาต่างๆ กันโดยเอทิลอะซีเตท และทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของ *Candida albicans* โดยใช้อาหารที่ไม่มีเชื้อเป็นชุดควบคุมลบและ nystatin เป็นตัวควบคุมบวก



<u>รูปที่ 6</u> กราฟสรุปผลการทดสอบสารมีฤทธิ์ต้านการเจริญของ *Candida albicans* ของไอโซเลต O245704 และ D230704 ที่เลี้ยงที่ระยะเวลา 1-7 วัน
สกัดอาหารเลี้ยงเชื้อ C4 ที่มีถั่วเหลืองบดผสมอยู่ที่ใช้เลี้ยงเชื้อที่ระยะเวลาต่างๆ กันโดยเอทิลอะซีเตท ใช้อาหารที่ไม่มีเชื้อเป็นชุดควบคุมลบและ nystatin เป็นตัวควบคุมบวก วัดขนาดบริเวณใสที่เกิดขึ้น ผลการทดลองที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลองสองซ้ำ

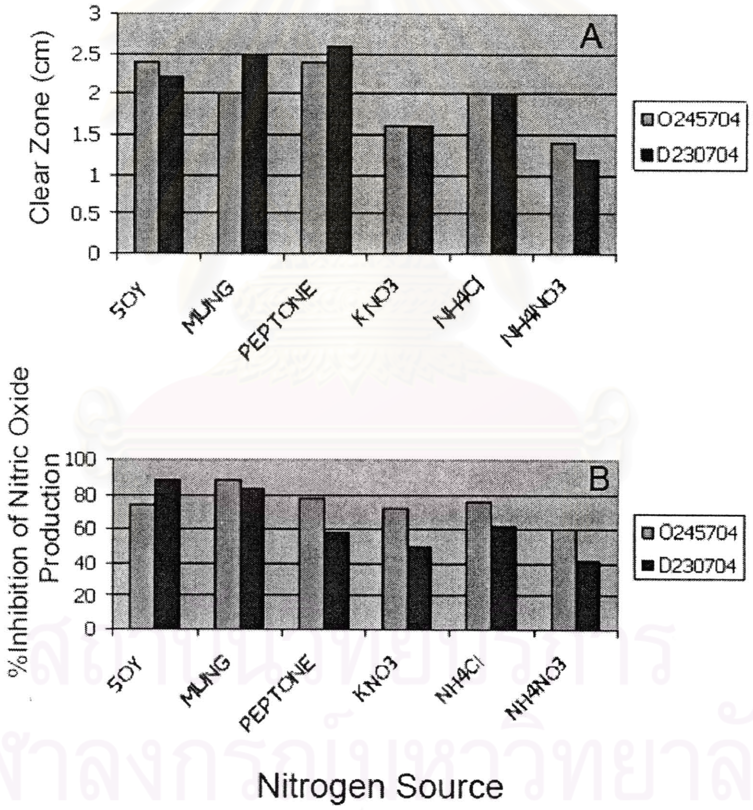
ในขณะที่เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ในการกดการสังเคราะห์ไนตริคออกไซด์จากแมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นโดย LPS โดยใช้ตัวอย่างชุดเดียวกันนั้น ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 7 โดยพบว่าฤทธิ์ในการกดการสังเคราะห์ไนตริคออกไซด์ของสารสกัดจากทั้งสองไอโซเลตให้ค่าสูงสุดในการกดเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 5 วัน ในขณะที่สารสกัดที่ได้จากเชื้อที่เลี้ยงเป็นเวลา 1 วัน นั้นให้ค่าในการกดที่ต่ำที่สุด ผลที่ได้จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าสารที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของยีสต์ *Candida albicans* และสารที่มีฤทธิ์กดการสังเคราะห์ไนตริคออกไซด์เป็นสารที่เชื้อแต่ละไอโซเลตผลิตในระยะการเจริญที่ต่างกัน โดยสารที่มีฤทธิ์กดการสังเคราะห์ไนตริคออกไซด์นี้มีสมบัติเป็นสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ เนื่องจากเชื้อจะเริ่มสังเคราะห์ขึ้นเมื่อการเจริญอยู่ในระยะ stationary แล้ว (ประมาณ 5 วัน) ส่วนสารมีฤทธิ์ต้านการเจริญของยีสต์ เป็นสารที่ผลิตในระยะตั้งแต่เริ่มต้นการเลี้ยงเชื้อ ดังนั้น สารที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของยีสต์และสารมีฤทธิ์กดการอักเสบน่าจะเป็นสารต่างชนิดกัน



<u>รูปที่ 7</u> ผลการทดสอบสารเมแทบอไลท์ที่สกัดได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อของไอโซเลต O245704 และ D230704 ที่ระยะเวลาต่างๆ ต่อการยับยั้งการผลิตไนตริคออกไซด์จาก RAW264.7 เซลล์ไลน์
สกัดอาหารเลี้ยงเชื้อ C4 ที่มีถั่วเหลืองบดผสมอยู่ที่ใช้เลี้ยงเชื้อที่ระยะเวลาต่างๆ กันโดยเอทิลอะซีเตท หลังจากทำให้แห้งโดยใช้ Rotary evaporator แล้วละลายใน DMSO แล้วทดสอบแอคติวิตีใน

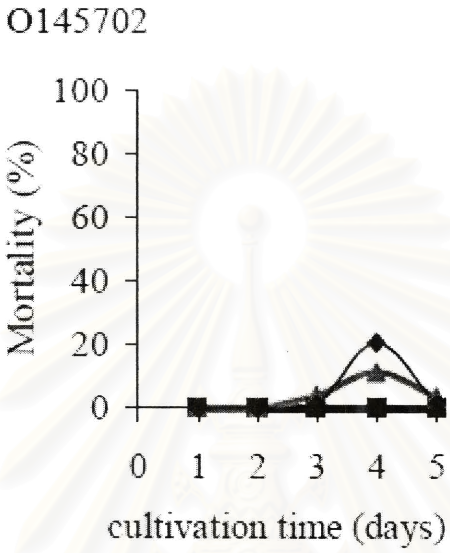
การกดการสังเคราะห์ไนตริคออกไซด์ในแมคโครฟาจเซลล์ไลน์ RAW264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นโดย LPS (* หมายถึง p<0.05)

เพื่อศึกษาภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตสารออกฤทธิ์ต้านการเจริญของยีสต์ *Candida albicans* และสารกดการอักเสบของไอโซเลต O245704 และ D230704 จึงได้ทำการเปลี่ยนแหล่งไนโตรเจนหลักในอาหารเลี้ยงเชื้อ C4 ชนิดเหลว แล้วทดสอบแอคติวิตีของสารทั้งสองประเภท ผลแสดงในรูปที่ 8 โดยพบว่าเมื่อใช้เปบโตนและถั่วเหลืองบดเป็นแหล่งไนโตรเจนหลัก เชื้อจะผลิตสารต้านการเจริญของยีสต์ *Candida albicans* และสารกดการอักเสบได้สูงสุดตามลำดับ ในกรณีของสารต้านการเจริญของยีสต์นั้น ค่าที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ยกเว้นเมื่อใช้โปแตสเซียมไนเตรท) ดังนั้น จึงจะใช้ถั่วเหลืองบดเป็นส่วนผสมของอาหารเลี้ยงเชื้อ C4 ในการทดลองต่อไป เนื่องจากมีราคาถูกกว่าเปบโตนในการเตรียม

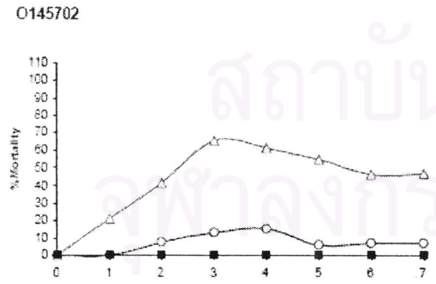


<u>รูปที่ 8</u> ผลของแหล่งไนโตรเจนที่ต่างกันในอาหารเลี้ยงเชื้อ C4 ต่อการผลิตสารมีฤทธิ์ต้านการเจริญของยีสต์ *Candida albicans* (A) และสารกดการอักเสบ (B) ของไอโซเลต O245704 และ D230704

เมื่อทำการศึกษาผลของระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตสารที่มีฤทธิ์ฆ่าแมลงของไอโซเลต O145702 พบว่ามีแอคติวิตีใน Brine shrimp assay ที่เวลาในการเลี้ยงเชื้อตั้งแต่ 4 วันขึ้นไป โดยพบแอคติวิตีสูงในส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเปรียบเทียบกับส่วนที่เป็นเส้นใย (รูปที่ 9) ดังนั้น สารที่มีฤทธิ์ฆ่าแมลงของไอโซเลต O145702 คาดว่าเป็นสารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิเช่นเดียวกัน ซึ่งจะใช้ส่วนใสในการเตรียมสารสกัดในการศึกษาสมบัติเบื้องต้นทางเคมีต่อไป



รูปที่ 9 ผลการทดสอบสารแมเทบอไลท์ที่สกัดได้จากส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อหรือเส้นใยของเชื้อไอโซเลต O145702 ที่เลี้ยงระยะเวลาต่างๆ โดย Brine shrimp assay
เลี้ยงเชื้อไอโซเลต ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่มี ผสมอยู่ ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน ปั่นแยกส่วนใสและเส้นใย แล้วสกัดส่วนต่างๆ ด้วยเอทิลอะซีเตท (■ ชุดควบคุม ▲ สารสกัดเส้นใย ◆สารสกัดส่วนใส)



0.5% Carbon Source	%Mortality from brine shrimp assay (24 hr)
Glucose	58.95±11.25
Sucrose	24.70±7.71
Dextrin	72.42±14.71
Soluble Starch	44.99±16.79
Cassava Starch	19.16±9.68
Corn Starch	7.95±1.03

รูปที่ 10 ผลของการเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ต่อการผลิตสารฆ่าแมลง

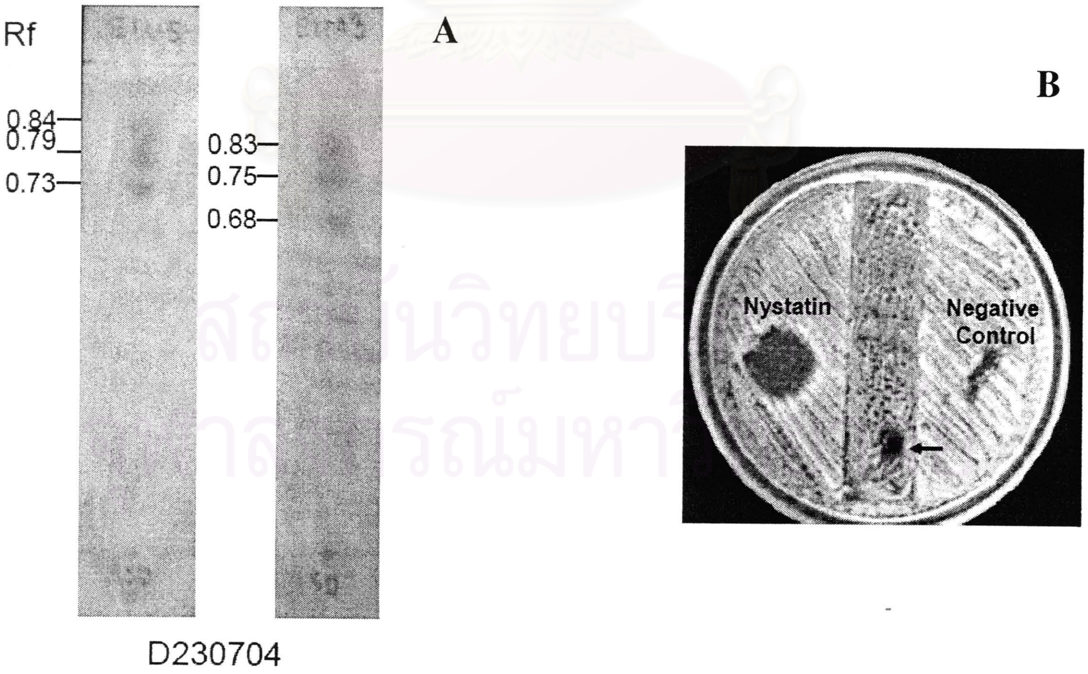
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กราฟแสดงผลของปริมาณกลูโคส (△ 0.5% glucose ○ 0.1% glucose ■ control) ต่อการผลิตสารมีฤทธิ์ฆ่าแมลงเมื่อเลี้ยงเชื้อในเวลาต่างๆ ตารางสรุปผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ต่อแอคติวิตีของสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลง เมื่อเติมแหล่งคาร์บอนที่ 0.5% (w/v)

เมื่อทำการศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงแล้ว พบว่าหากใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน กลูโคสที่ปริมาณ 0.5% (w/v) จะทำให้ได้แอคติวิตีที่สูงกว่ากลูโคสที่ 0.1% (w/v) (รูปที่ 10) ในขณะที่หากเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ที่ปริมาณเท่ากัน พบว่า dextrin จะให้ค่าแอคติวิตีสูงที่สุด โดยกลูโคสให้ผลรองลงมา ดังนั้นในการเตรียมสารสกัดต่อจากนี้ไป จะใช้ภาวะในการเลี้ยงที่ให้สารที่มีแอคติวิตีที่สูงที่สุด

<u>4.5 การแยกสารออกฤทธิ์ต้านยีสต์อย่างหยาบโดยใช้ TLC และการศึกษาตำแหน่งของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งยีสต์ทดสอบบนแผ่น TLC โดยวิธีไบโอออโตกราฟี (Bioautography)</u>

เพื่อศึกษาสมบัติเบื้องต้นของสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพของไอโซเลต D230704 จึงสกัดส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้เอทิลอะซีเตท แล้วนำสารสกัดที่ได้มาแยกอย่างหยาบโดยใช้ analytical TLC ซึ่งพบว่าที่โมไบล์เฟสผสมเอทิลอะซีเตทต่อเมทานอล (1:5) จะสามารถแยกสารสกัดออกจากกันได้เมื่อสังเกตุดูภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต (รูปที่ 11 A)

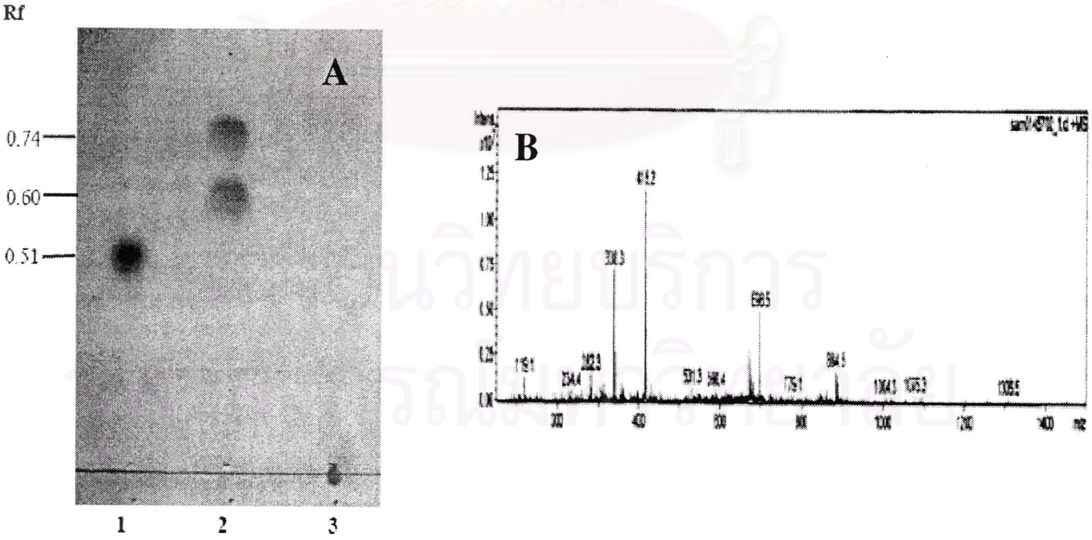


รูปที่ 11 ผลของการแยกสารสกัดของน้ำเลี้ยงเชื้อ D230704 อย่างหยาบโดย TLC และ Bioautography

เลี้ยงเชื้อไอโซเลต D230704 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่มีถั่วเหลืองผสมอยู่เป็นเวลา 5 วัน สกัดส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อโดยใช้เอทิลอะซีเตท จากนั้นทำการแยกสารอย่างหยาบโดย TLC (A) และตรวจหาตำแหน่งที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของยีสต์ *Candida albicans* โดย bioautography (B)

เพื่อศึกษาตำแหน่งของสารออกฤทธิ์ต้านการเจริญของยีสต์ *Candida albicans* จึงได้ทดสอบหาตำแหน่งที่ให้ส่วนใสเมื่อนำแผ่น ที่ได้นี้ไปวางทาบบนอาหารเลี้ยงเชื้อของ *Candida albicans* แต่พบว่าส่วนในนั้นยังอยู่ที่บริเวณจุดเริ่มต้นที่ใส่ตัวอย่างลงบนแผ่น TLC โดยไม่มีการเคลื่อนที่ (ไม่แสดงผล) ดังนั้น จึงทำการปรับโมไบล์เฟสใหม่เป็นสารผสมของเอทิลอะซีเตทและเมทานอลที่อัตราส่วน 1:10 พบว่าบริเวณที่เกิดส่วนใสให้ค่า Rf = 0.25 (รูปที่ 11B) ซึ่งในตำแหน่งนี้ไม่พบจุดใดๆ เมื่อส่องดูภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต

ในการทดสอบหาส่วนที่ออกฤทธิ์กดการสังเคราะห์ไนตริคออกไซด์นั้น ทำการแยกสารสกัดอย่างหยาบโดยใช้ preparative TLC แล้วขูดจุดต่างๆ ที่ตรวจพบภายใต้แสงอัลต้าไวโอเลต ทำการสกัดสารที่ได้จากผงซิลิก้าที่ขูดได้ แล้วทดสอบหาฤทธิ์กดการสังเคราะห์ไนตริคออกไซด์ โดยพบว่าที่ตำแหน่ง Rf=0.79 ให้ค่าการกดการผลิตไนตริคออกไซด์ที่ 75% จึงสรุปได้ว่าสารที่อยู่ในตำแหน่งนี้มีสารออกฤทธิ์กดการสังเคราะห์ไนตริคออกไซด์ ซึ่งจะใช้เป็นภาวะเบื้องต้นในการทำให้สารนี้บริสุทธิ์ต่อไป



<u>รูปที่ 12</u> ผลของการแยกสารสกัดของน้ำเลี้ยงเชื้อ O145702 หลังจากทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยผ่าน Silica Gel Column Chromatography โดย TLC (A) และผลของการวิเคราะห์สารสกัดอย่างหยาบโดย Mass-spectometry (B)
(A) เลี้ยงเชื้อไอโซเลต O145702 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มี KNO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจน สกัดส่วนที่เป็นน้ำใสโดยใช้เอทิลอะซีเตทและแยกสารสกัดโดยใช้ Silica Gel Column Chromatography แล้วแยกส่วนที่มีแอคติวิตีในการฆ่า Brine shrimp มาแยกโดยใช้ TLC (1) สารมาตรฐาน avermectins (2) ส่วนที่ชะโดยใช้เฮกเซน:เอทิลอะซีเตท=1:1 (3) ส่วนที่ชะโดยใช้เอทิลอะซีเตท:เมทานอล =1:1
(B) ผลการวิเคราะห์สารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อโดยใช้ Mass-spectometry

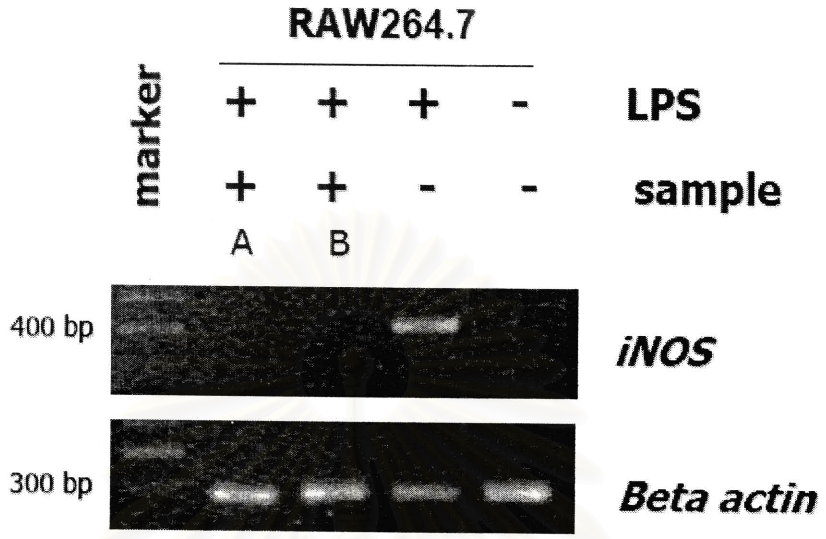
สำหรับไอโซเลต ซึ่งผลิตสารที่มีฤทธิ์ฆ่าแมลงใน Brine shrimp assay นั้น ทำการสกัดสารเมแทบอไลต์จากส่วนในของอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ซิลิกาเจลโครมาโตกราฟฟี จากนั้นทดสอบแอคติวิตีใน Brine shrimp assay พบว่าในส่วนที่ชะออกโดยใช้เฮกเซน:เอทิลอะซีเตท (1:1) และเอทิลอะซีเตท:เมทานอล (1:1) นั้นให้ค่าที่สูงที่สุดในการทำให้ Brine shrimp ตาย จึงนำทั้งสองส่วนมาแยกโดยใช้ TLC โดยมีสารผสม avermectins เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ (รูปที่ 12A) ซึ่งเมื่อตรวจดูภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลตพบจุดที่ปรากฏขึ้นในส่วนที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยคอลัมน์โครมาโตกราฟฟีแตกต่างไปจากสารมาตรฐาน อีกทั้ง เมื่อนำสารสกัดอย่างหยาบไปวิเคราะห์โดยใช้ Mass spectrometry เปรียบเทียบกับสารผสมมาตรฐานอะเวอร์เมคตินนั้น ไม่พบว่ามี peak ของมวลโมเลกุลที่ตรงกับสารอะเวอร์เมคติน ซึ่งจะมีมวลโมเลกุลที่ 858-872

<u>4.6 การศึกษากลไกในการกดการสังเคราะห์ไนตริคออกไซด์เบื้องต้น</u>

การสังเคราะห์ไนตริคออกไซด์ของแมคโครฟาจเมื่อถูกกระตุ้นโดยสารต่างๆ ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ เช่น LPS นั้น เกิดจากการเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของจีน inducible nitric oxide synthase (*iNOS*) ซึ่งเป็นจีนที่มีการแสดงออกในระยะแรกของการเกิดการอักเสบ ไนตริคออกไซด์เป็นสารที่มีฤทธิ์ทำลายจุลชีพต่างๆ พร้อมกับมีโทษต่อเจ้าบ้านด้วย ในกรณีที่มีการสังเคราะห์มาก เช่น ในกรณีที่มีการอักเสบเรื้อรัง

เพื่อศึกษากลไกเบื้องต้นของสารมีฤทธิ์ต้านการอักเสบที่คัดกรองได้ในงานวิจัยนี้ จึงได้ศึกษาการแสดงออกของจีน *iNOS* ในแมคโครฟาจเซลล์ไลน์ RAW264.7 โดยเมื่อเซลล์ได้รับ LPS การแสดงออกของ mRNA จีน *iNOS* สามารถตรวจหาได้ที่เวลาตั้งแต่ 2 ชั่วโมงขึ้นไป (รูปที่ 13) แต่เมื่อบำบัดเซลล์ล่วงหน้าโดยใช้สารสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อของไอโซเลต O245704 และ D230704 ปรากฏว่าการแสดงออกของ mRNA ของ *iNOS* ไม่เกิดขึ้น ดังนั้น สารออกฤทธิ์กดการสังเคราะห์ใน

ตริคออกไซด์ที่คัดกรองได้จากงานวิจัยนี้จึงใช้กลไกในระดับการควบคุมการแสดงออกของจีน *iNOS* ในการกดการสังเคราะห์ไนตริคออกไซด์

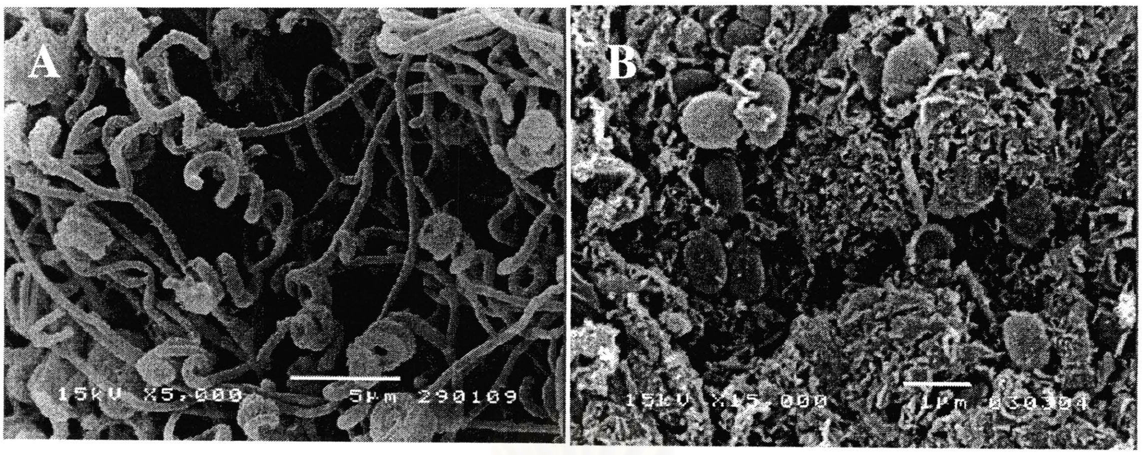


<u>รูปที่ 13</u> ผลของสารสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อไอโซเลต O245704 และ D230704 ต่อการแสดงออกของจีน *iNOS* โดยวิธี RT-PCR

ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ของจีน *iNOS* อยู่ที่ 430 bp สารสกัดตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ (A) คือ O245704 (B) คือ D230704 โดยใช้ β actin เป็น loading control

<u>4.7 รูปลักษณะเส้นใยและสายสปอร์ของไอโซเลต O145702</u>

เนื่องจากในการศึกษาในปีที่สอง ได้พิสูจน์เอกลักษณ์ไอโซเลตเลขที่ O145702 ว่าเป็น *Streptomyces bingchenggensis* ซึ่งยังไม่มีรายงานว่าสปีชีส์นี้มีความสามารถในการผลิตสารฆ่าแมลงมาก่อน จึงทำการศึกษาเพิ่มเติมถึงสัณฐานวิทยาของเส้นใยและสายสปอร์ของไอโซเลตนี้โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องกราด พบว่าเส้นใยอากาศมีการขดเป็นวงเกลียวซึ่งเป็นลักษณะเด่นของ *Streptomyces* ในขณะที่สปอร์มีรูปร่างเป็นแท่ง (รูปที่ 14)



<u>รูปที่ 14</u> ภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องกราดของ *Streptomyces* spp. O145702 (A) เส้นใยอากาศของเชื้อที่อายุ 3 วัน (B) สปอร์ของเชื้อที่อายุ 7 วัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. สรุปผลการวิจัย

ในปีที่สามของโครงการวิจัยต่อเนื่องนี้ได้มุ่งเน้นไปที่ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตโดยที่เชื้อที่แยกและศึกษาสมบัติในโครงการที่ดำเนินการสองปีที่ผ่านมา โดยทำการคัดกรองสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ สารออกฤทธิ์ต้านจุลชีพ สารกดการอักเสบและสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลง ซึ่งผลจากการคัดกรองดังกล่าวพบว่ามี 3 ไอโซเลตที่ให้ผลน่าสนใจ คือ O245704 และ D230704 ซึ่งผลิตสารมีฤทธิ์ต้านการเจริญของยีสส์ *Candida albicans* และสารต้านการสังเคราะห์ไนตริคออกไซด์จากแมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้น และ O145702 ซึ่งผลิตสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงใน Brine Shrimp Assay

โดยในส่วนของสองไอโวเลตแรกได้ทำการศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับผลของอาหารเลี้ยงเชื้อและระยะเวลาของการเลี้ยงเชื้อต่อสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่ผลิต โดยพบว่าสารที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของราและสารมีฤทธิ์กดการอักเสบนั้นน่าจะเป็นสารต่างชนิดกัน เนื่องจากสารมีฤทธิ์ต้ายการเจริญของราพบตั้งแต่วันแรกที่เริ่มเลี้ยงเชื้อ ในขณะที่สารที่มีฤทธิ์กดการอักเสบพบได้ตั้งแต่วันที่สี่ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไอโซเลตทั้งสองนี้สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลากหลายชนิด และเมื่อทำการแยกสารสกัดอย่างหยาบโดย TLC พบว่าสามารถแยกสารสกัดได้โดยใช้โมบายล์เฟสสารละลายอินทรีย์ผสมของเอทิลอะซีเตทและเมทานอล ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพอาจเป็นสารที่มีสมบัติเป็นขั้วสูง เมื่อพยายามหาตำแหน่งของสารที่ออกฤทธิ์ต้านการเจริญของยีสต์โดยวิธี autobiography ไบว่าตำแหน่งที่มีแอคติวิตีนั้นไม่สามารถตรวจพบภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลตหรือไอของไอโอดีนได้ จากการจัดจำแนกเชื้อโดยวิธีทางชีววิทยาโมเลกุลในการศึกษาในปีที่สองของโครงการวิจัยนี้พบว่า O245704 คือ *Streptomyces lanatus* และ D230704 คือ *Streptomyces roseochromogenus* ซึ่งทั้งสองสายพันธุ์ยังไม่มีการรายงานว่าสามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์กดการอักเสบได้ ดังนั้น จึงน่าจะเป็นไปได้ว่าสารที่สองไอโซเลตที่แยกได้นี้ผลิตอาจเป็นสารชนิดใหม่ที่ยังไม่มีการค้นพบมาก่อน เนื่องจากโครงการวิจัยนี้ไม่สามารถทำให้สารบริสุทธิ์เพียงพอที่จะตัดสินโครงสร้างทางเคมีได้ จึงได้ฝากเก็บเชื้อทั้งสองไอโซเลตไว้ในคลังจุลินทรีย์ของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อทำการศึกษาต่อไปในอนาคต เพื่อเป็นการศึกษากลไกของสารออกฤทธิ์กดการอักเสบที่คัดกรองได้ จึงทำการศึกษาผลของการให้สารสกัดนี้ต่อการแสดงออกของจีน *iNOS* ซึ่งประมวลรหัสเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไนตริคออกไซด์จาก L อาร์จินีน ซึ่งพบว่าสารสกัดที่ได้จากทั้งสองไอโซเลตกดการแสดงออกของจีนดังกล่าวในระดับการถอดรหัส ดังนั้น จึงคาดว่าสารที่มีฤทธิ์จากทั้งสองไอโซเลตน่าจะทำงานด้านต้นน้ำของการแสดงออกของจีน *iNOS* ซึ่งก็จะมีเป้าหมายที่สามารถยกตัวอย่างได้ เช่น วิถีสัญญาณสัญญาณ NFKB หรือ kinase ซึ่งเมื่อรู้ถึงโครงสร้างทางเคมีของสารที่ออกฤทธิ์ดังกล่าวแล้ว การศึกษากลไกในระดับโมเลกุลก็จะเป็นขั้นตอนต่อไป

ในส่วนของสารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงที่ไอโซเลต O145702 ผลิตนั้น ได้ทำการเปรียบเทียบกับสารเอเวอร์เมคตินซึ่งมีฤทธิ์เป็นสารต้านปรสิตที่ได้จากการหมัก *Streptomyces avermitilis* (Yong

and Byeon, 2005) ซึ่งมีการใช้เป็นสารฆ่าแมลงในเชิงพาณิชย์ในปัจจุบัน ซึ่งพบว่าเมื่อทำการทำให้สารสกัดบริสุทธิ์บางส่วนโดยใช้ซิลิกาคอลัมน์โครมาโตกราฟฟีแล้วแยกส่วนที่มีแอคติวิตีด้วย TLC แล้วพบว่าค่า Rf ของจุดที่เกิดขึ้นภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลตนั้นไม่ตรงกับค่าของสารเอเวอร์เมคตินมาตรฐานที่ใช้ อีกทั้งเมื่อทำการวิเคราะห์มวลโมเลกุลของสารสกัดที่ได้แล้วไม่พบ peak ของมวลโมเลกุลที่ตรงกับสารประกอบเอเวอร์เมคติน อีกทั้งจากการจัดจำแนกไอโซเลตโดยวิธีทางชีววิทยาโมเลกุลก็พบว่าไอโซเลตนี้เป็น *Streptomyces bingchenggensis* ซึ่งเป็นเชื้อที่มีรายงานเมื่อปี 2007 เป็นครั้งแรก (Xiang, et al., 2007) และยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับสารที่มีฤทธิ์ฆ่าแมลง ดังนั้น จึงน่าจะเป็นไปได้ว่าสารที่ไอโซเลตนี้ผลิตน่าจะเป็นสารที่ฤทธิ์ฆ่าแมลงชนิดใหม่ ซึ่งก็ได้ทำการฝากเก็บเชื้อไว้ในคลังจุลินทรีย์ของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อทำการศึกษาต่อไปในอนาคต

<u>ผลลัพธ์ที่ได้จากโครงการวิจัยต่อเนื่อง 3 ปี</u>

(1) ผลิตบัณฑิตระดับปริญญามหาบัณฑิต 1 คน นิสิตระดับปริญญาบัณฑิต 2 คน

(2) Tantithanagorngul et al. Effect of carbon sources on insecticidal activity of *Streptomyces* strains 442, 449 and O145702. (2007) Proceeding: The 19th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology (Bangkok, Thailand)

(3) Sujitwanit et al. Screening for insecticide-producing *Streptomyces* isolates from Thai soil. (2007) Proceeding: The 19th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology (Bangkok, Thailand)

(4) Pumkum, et al. Grouping of *Streptomyces* spp. Isolated from soil in Wiangsa District, Nan Province. (2007) Proceeding: The Biological Science and Technology Category at the 8th National Grad Research Conference (Nakorn Pathom, Thailand)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

Angelova L, Algalrrondo M, Inkov I, Anova S, Irilov N, Serkedjieva J, et al.2006. Purification and characterization of a protease inhibitor from Streptomyces chromofuscus 34-1 with an antiviral activity. Biochem Biophys Acta. 1760, 1210-1216.

Baba M, Okamoto M, Tankeuchi H. 1999. Inhibition of human immunodeficiency virus type I replication in acutely and chronically infected cells by EM2487, a novel substance produced by a Streptomyces species. Antimicrob Agents Chemother. 43, 2350-2355

Bordoloi GN, Kumari B, Guha A, Bordoloi M, Yadav RN, Roy MK, Bora TC. 2001. Isolation and structure elucidation of a new antifungal and antibacterial antibiotic produced by Streptomyces sp. 201. Biosci Biotech Biochem. 65, 1856-1858.

Lee YG, Kim JY, Lee JY, Byeon SE, Hong EK, Lee J, Rhee MH, Park HJ, Cho JY. 2007. Regulatory effects of Codonopsis lanceolata on macrophage-mediated immune responses. J Ethnopharmacol. 112, 180-188.

Palaga T, Buranaruk C, Rengpipat S, Fauq AH, Golde TE, Kaufmann SH, Osborne BA. (2008). Notch signaling is activated by TLR stimulation and regulates macrophage functions. Eur J Immunol. 38, 174-183.

Tanabe T, Morinaga K, Fukamizo T, Mitsutomi M. 2003. Noval Chitosanase from Streptomyces griseus HUT 6037 with transglycosylation activity. Biosci Biotechnol Biochem. 67(2):354-64.

Usuki Y, Adachi N, Fujita K, Ichimura A, Ito H, Taniguchi M. 2006. Structure-activity relationship studies on UK-2A,a novel antifungal antibiotic from *Streptomyces* sp. 517-02. Part 5:Role of the 9-membered dilactone-ring moiety in respiratory inhibition. Bioorg Med Chem Lett. 16(12):3319-22.

Xiang WS, Wang JD, Wang XJ, Zhang, J. 2007. Two new beta-class mibemycins from *Streptomyces bingchenggensis*: fermentation, isolation, structure elucidation and biological properties. J Antibiot (Tokyo), 608-613.

Xiong L, Li J, Kong E. 2004. *Streptomyces sp.173*, an insecticidal microorganism from marine. Lett in Appl Microbiol. 38, 32-37.

Yong JH, Byeon WH. 2005. Alternative production of avermectin components in *Streptomyces avermitilis* by gene replacement. J Microbiol. 43, 277-284.

Zitouni A, Boudjella H, Lamari L, Badji B,Mathieu F, Lebrihi A, Sabaou N. 2005. *Nocardiopsis* and *Saccharothrix* genera in Saharan soils in Algeria: Isolation,

biological activities and partial characterization of antibiotics. Res Microbiol. 156, 984–993.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย