สารกีดขวางช่องโซเดียมผลิตโดยแบคทีเรียที่แยกจากหอยแมลงภู่ (*Perna viridis* Linn.)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นางสาวศิริโฉม เหลืองอ่อน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2534

ISBN 974-579-487-2

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

017518

Sodium Channel Blocking Substances Produced by Bacteria Isolated from Green Mussels (*Perna viridis* Linn.)

Miss Sirichom Luangon

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the degree of Master of Science

Department of Microbiology

Graduate School

Chulalongkorn University

1991

ISBN 974-574-478-2

หัวข้อวิทยานิพนธ์	สารกีดขวางช่องโซเดียมผลิตโดยแบคทีเรียที่แยกจากหอยแมลงภู่ (Perna viridis Linn.)
โดย	นางสาวศิริโฉม เหลืองอ่อน
ภาควิชา	จุลชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ กาญจณา จันทองจีน

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..................................คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..................................ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน)

..................................อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ กาญจณา จันทองจีน)

..................................กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

..................................กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ วีระวุฒิ มหามนตรี)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สิริโฉม เหลืองอ่อน: สารกีดขวางช่องโซเดียมผลิตโดยแบคทีเรียที่แยกจากหอยแมลงภู่ (*Perna viridis* Linn.) (SODIUM CHANNEL BLOCKING SUBSTANCES PRODUCED BY BACTERIA ISOLATED FROM GREEN MUSSELS (*Perna viridis* Linn.)) อ.ที่ปรึกษา: รศ.กาญจนา จันทองจีน, 95 หน้า. ISBN 974-579-487-2

ในการคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมจากหอยแมลงภู่ พบว่าแบคทีเรีย *Vibrio* sp.หมายเลข 11 สามารถสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมได้สูง เมื่อใช้วิธี tissue culture assay ในการตรวจสอบ และผลจากการวิเคราะห์ชนิดของสารด้วยวิธีเคมี 3 วิธี ได้แก่วิธีโครมาโตกราฟีชนิดผิวบาง วิธีอิเลคโตรโฟรีซีส และวิธีไฮเพอร์ฟอมานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี โดยใช้ระบบการวิเคราะห์สารกีดขวางช่องโซเดียม 2 ระบบ ได้แก่ ระบบที่ใช้วิเคราะห์สารกลุ่ม tetrodotoxin และระบบที่ใช้วิเคราะห์สารกลุ่ม saxitoxin พบว่า แบคทีเรียที่คัดเลือกได้ สร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมกลุ่ม tetrodotoxin อนุพันธ์ tetrodotoxin และ anhydrotetrodotoxin ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ และการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมของแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ ในสภาวะการบ่มที่มีการเขย่าและไม่มีการเขย่า พบว่าแบคทีเรียดังกล่าวเจริญและสร้างสารนี้ได้ดีในสภาวะที่มีการเขย่าเมื่ออยู่ในระยะการเจริญลด และจากการวิเคราะห์โดยไฮเพอร์ฟอมานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟีพบว่า อัตราส่วนของปริมาณสารทั้งสองอนุพันธ์มีการเปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลา 264 ชม.ของการบ่ม

ภาควิชา ......จุลชีววิทยา......

สาขาวิชา ......จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม......

ปีการศึกษา ......2534......

ลายมือชื่อนิสิต ......[signature]......

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ......[signature]......

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ......

SIRICHOM LUANGON: SODIUM CHANNEL BLOCKING SUBSTANCES PRODUCED BY BACTERIA ISOLATED FROM GREEN MUSSELS (*Perna viridis* Linn.) THESIS ADVISOR: ASSO. PROF. KANCHANA JUNTONGJIN. 95 PP. ISBN 974-579-478-2

In the screening of sodium channel blocking substance producing bacteria from the strains isolated from green mussels by using the tissue culture assay, *Vibrio* sp. No.11 was found to produce high quantity of these substances. Results from the analyses: thin layer chromatography, electrophoresis and high performance liquid chromatography of two analytical systems : tetrodotoxins analysis system and saxitoxins analysis system revealed that the selected bacterial strain could produce both tetrodotoxin and anhydrotetrodotoxin derivatives. The study of growth characteristics in relative to the production of sodium channel blocking substances both with and without shaking incubation showed that this strain could grow and produce these substances better in the shaking condition during declined phase of growth. From the HPLC analyses, it was found that the proportion profile of the two derivatives are varied during the 264 hours of incubation.

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ลายมือชื่อนิสิต ....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม

ปีการศึกษา 2534

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของรองศาสตราจารย์ กาญจนา จันทองจีน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาเป็นที่ปรึกษาให้คำแนะนำแนวความคิด ตลอดจนช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ และรองศาสตราจารย์ วีระวุฒิ มหามนตรี ที่ได้กรุณารับเป็นประธานกรรมการและกรรมการสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยส่วนหนึ่ง ตลอดจนเจ้าหน้าที่บัณฑิตวิทยาลัยที่ได้ช่วยอำนวยความสะดวกต่างๆ

ท้ายนี้ผู้วิจัยใคร่ขอขอบพระคุณบิดา มารดา ซึ่งได้ให้กำลังใจเสมอมา และขอขอบคุณกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่อนุญาตให้ลาศึกษาต่อในครั้งนี้ ตลอดจนขอขอบคุณเพื่อนและน้องทุกคนที่ให้กำลังใจตลอดมาจนสำเร็จการศึกษา

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญรูป	ฌ
คำย่อ	ฎ
บทที่	
1 บทนำ	1
2 ตรวจเอกสาร	4
3 วิธีดำเนินการวิจัย	21
4 ผลและอภิปรายผล	39
5 สรุป	68
เอกสารอ้างอิง	70
ภาคผนวก ก	76
ภาคผนวก ข	83
ภาคผนวก ค	91
ประวัติผู้เขียน	95

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 แสดงสกุลของแบคทีเรียที่สร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมกลุ่ม TTXs หรือ STXsได้... 7

2 แสดงลักษณะโคโลนีและจำนวนของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากเนื้อหอยแมลงภู่ เมื่อคัดแยกโดยวิธี dilution spread plate และบ่มที่ 28° ซ เป็นเวลา 48 ชม... 39

3 แสดงปริมาณของสารกีดขวางช่องโซเดียมในสารสกัดจากเซลล์แบคทีเรียที่คัดแยกได้ เมื่อทดสอบโดยวิธี tissue culture assay.............. 41

4 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียหมายเลข 11 ที่คัดเลือกได้.................................. 42

5 แสดงขั้นตอนและผลการทำให้สารกีดขวางช่องโซเดียมจาก Vibrio sp. หมายเลข 11 ที่คัดเลือกได้ บริสุทธิ์บางส่วน....................... 44

6 แสดงจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตต่อ 1 หน่วยปริมาตร และความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วงเวลาต่างๆ ของการบ่มเชื้อ ในสภาวะที่มีการเขย่า และไม่มีการเขย่า ที่อุณหภูมิ 28° ซ เป็นเวลา 264 ชม.................. 57

7 แสดงปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมในสารสกัดจากเซลล์ และในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แยกเซลล์ออกแล้ว โดยคิดเป็นสาร TTX ในช่วงต่างๆของการบ่มที่ 28° ซ โดยมีการเขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที นาน 264 ชม.... 60

8 แสดงปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมในสารสกัดจากเซลล์ และในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แยกเซลล์ออกแล้ว โดยคิดเป็นสาร TTX ในช่วงเวลาต่างๆของการบ่มที่ 28° ซ โดยไม่มีการเขย่า นาน 264 ชม. 63

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	แสดงโครงสร้างโมเลกุลสารกีดขวางช่องโซเดียมอนุพันธ์ tetrodotoxin (TTX)..	8
2	แสดงโครงสร้างโมเลกุลของสารกีดขวางช่องโซเดียมอนุพันธ์ tetrodotoxin (TTX)ในสารละลาย............................	9
3	แสดงตัวอย่างโครงสร้างโมเลกุลของสารกีดขวางช่องโซเดียมกลุ่ม tetrodotoxin 6 อนุพันธ์..........................	10
4	แสดงโครงสร้างโมเลกุลของสารกีดขวางช่องโซเดียมอนุพันธ์ saxitoxin (STX)..	11
5	แสดงโครงสร้างโมเลกุลของสารกีดขวางช่องโซเดียมกลุ่ม saxitoxin อนุพันธ์ต่างๆ ที่พบในธรรมชาติ......................	12
6	แสดงผลการวิเคราะห์ชนิดของสารกีดขวางช่องโซเดียมด้วยวิธีโครมาโตกราฟีชนิดผิวบาง เมื่อใช้ระบบการวิเคราะห์สารกลุ่ม TTXs..............	47
7	แสดงผลการวิเคราะห์ชนิดของสารกีดขวางช่องโซเดียมด้วยวิธีโครมาโตกราฟีชนิดผิวบาง เมื่อใช้ระบบการวิเคราะห์สารกลุ่ม STXs..............	48
8	แสดงผลการวิเคราะห์ชนิดของสารกีดขวางช่องโซเดียมด้วยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีส เมื่อใช้ระบบการวิเคราะห์สารกลุ่ม TTXs........................	50
9	แสดงผลการวิเคราะห์ชนิดของสารกีดขวางช่องโซเดียมด้วยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีส เมื่อใช้ระบบการวิเคราะห์สารกลุ่ม STXs........................	51
10	แสดงโครมาโตแกรมของไฮเพอร์ฟอมานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี ในการวิเคราะห์สารกีดขวางช่องโซเดียม เมื่อใช้ระบบการวิเคราะห์สารกลุ่ม TTXs	53
11.	แสดงโครมาโตแกรมของไฮเพอร์ฟอมานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี ในการวิเคราะห์สารกีดขวางช่องโซเดียม เมื่อใช้ระบบการวิเคราะห์สารกลุ่ม STXs อนุพันธ์ GTX 1-4	54
12	แสดงโครมาโตแกรมของไฮเพอร์ฟอมานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี ในการวิเคราะห์สารกีดขวางช่องโซเดียม เมื่อใช้ระบบการวิเคราะห์สารกลุ่ม STXs อนุพันธ์ STX และ neoSTX	55

รูปที่ หน้า

13 เปรียบเทียบการเจริญของแบคทีเรีย Vibrio sp.หมายเลข 11 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่อุณหภูมิ 28° ซ นาน 264 ชม.................... 58
14 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมเมื่อคิดเป็นสาร TTX ของ Vibrio sp. หมายเลข 11 เมื่อบ่มเชื้อที่ 28° ซ ในสภาวะที่มีการเขย่าความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 264 ชม...... 62
15 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมเมื่อคิดเป็นสาร TTX ของ Vibrio sp. หมายเลข 11 เมื่อบ่มเชื้อที่ 28° ซ ในสภาวะที่ไม่มีการเขย่า เป็นเวลา 264 ชม.................... 65
16 แสดงโครมาโตแกรมของไฮเพอร์ฟอมานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟีในการวิเคราะห์สารกีดขวางช่องโซเดียม ในสารสกัดจากเซลล์ช่วงเวลาต่างๆของการบ่มเชื้อสภาวะที่มีการเขย่า โดยใช้ระบบการวิเคราะห์สารกลุ่ม TTXs 66
17 กราฟมาตรฐานระหว่าง ร้อยละของเซลล์เพาะเลี้ยงที่ยังมีชีวิต กับปริมาณ tetrodotoxin (นาโนกรัม) จากวิธี tissue culture assay....... 93
18 แสดงลักษณะของเซลล์เพาะเลี้ยง neuro 2A ATCC CCL 131 ที่ใช้ในการตรวจหาสารกีดขวางช่องโซเดียมด้วยวิธี tissue culture assay เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ phase contrast รุ่น ULWCD 0.30 ของบริษัท Olympus, Japan กำลังขยาย 500 เท่า 94

คำย่อ

ชม.	=	ชั่วโมง
มล.	=	มิลลิลิตร
มก.	=	มิลลิกรัม
°ซ	=	องศาเซลเซียส