



การคัดกรองสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งจากแอคติโนมัยซีท
ที่แยกได้จากทะเล

Screening for Cytotoxicity of Marine-Derived Actinomycetes Extracts

ศิริรัตน์ ทองอ่อน

Sirirat Thong-Oon

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of
Master of Science in Biotechnology

Prince of Songkla University

2552

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

(1)

ชื่อวิทยานิพนธ์ การคัดกรองสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งจากแอคติโนไมยีสที่แยกได้จากทะเล

ผู้เขียน นางสาวศิริรัตน์ ทองอ่อน

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัศววิทย์ กาญจนโอภาส)

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศุภศิลาปี มณีรัตน์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัศววิทย์ กาญจนโอภาส)

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนุชิต พลับรู้อการ)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนุชิต พลับรู้อการ)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.กรกนก อิงคนินันท์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยรับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.เกริกชัย ทองหนู)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	การคัดกรองสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งจาก แอสติโนไมด์ที่แยกได้จากทะเล
ชื่อผู้เขียน	นางสาวศิริรัตน์ ทองอ่อน
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา	2551

บทคัดย่อ

เชื้อแอสติโนไมด์ที่แยกได้จากทะเลเป็นแหล่งที่สำคัญของสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive compounds) อย่างไรก็ตามขั้นตอนของการคัดกรองสารที่ได้จากแอสติโนไมด์ซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพ ไม่ว่าจะเป็นขั้นตอนของการเลี้ยงแอสติโนไมด์ การสกัดสารเพื่อนำมาใช้ในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ จึงมีความจำเป็นอย่างมากในการหาวิธีการที่สามารถทุ่มแรงในการเลี้ยงแอสติโนไมด์จำนวนมาก รวมทั้งช่วยลดต้นทุนในการคัดกรองสาร ซึ่งการศึกษาครั้งนี้มุ่งเน้นในเรื่องของการลดปริมาณที่ใช้ในการเลี้ยงแอสติโนไมด์ และมีการดัดแปลงวิธีการสกัดสาร เพื่อช่วยให้สะดวกต่อการสกัดสารหยาบที่ได้จากแอสติโนไมด์ โดยทำการเปรียบเทียบภาชนะที่ใช้เลี้ยงแอสติโนไมด์จำนวน 5 สายพันธุ์เลี้ยงในอาหารที่แตกต่างกัน 4 สูตร โดยเลือกใช้พลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ขวดรูปทรงกระบอกปริมาตร 20 มิลลิลิตร และ 24-well plate ปริมาตรหลุมละ 5 มิลลิลิตร และมีการควบคุมอัตราส่วนของปริมาตรอาหารต่อปริมาตรภาชนะบรรจุ ในอัตราส่วน 1 ต่อ 2.5 จากนั้นนำส่วนของน้ำหมักที่ผ่านการเลี้ยงไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง freeze dry ต่อจากนั้นทำการสกัดสารหยาบด้วยตัวทำละลายเมทานอล พบว่าการเลี้ยงในขวดรูปทรงกระบอกมีความเหมาะสมต่อการนำมาใช้ในการคัดกรองสารสกัดหยาบที่ได้จากแอสติโนไมด์ จากนั้นเลี้ยงแอสติโนไมด์จำนวน 21 สายพันธุ์ ด้วยขวดรูปทรงกระบอก และทำการสกัดตามขั้นตอนที่กล่าวมาข้างต้น ผลจากการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งทั้ง 4 ชนิด (KB, MCF-7, HT-29 และ HeLa) ที่เตรียมจากสารสกัดหยาบมีความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากจำนวนสารสกัดหยาบทั้งหมด 84 ตัวอย่างพบว่ามีสารสกัดหยาบจำนวน 24 ตัวอย่างที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งทั้ง 4 ชนิดได้ และเมื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารที่เป็นองค์ประกอบ พบว่าสารสกัดหยาบทั้ง 24 ตัวอย่างมีสารในกลุ่มแอลคาลอยด์ สารกลุ่มเทอร์ปีนอยด์ และกลุ่มของกรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบของสารสกัดหยาบ

Thesis Title	Screening for cytotoxicity of marine derived Actinomycetes Extracts
Author	Miss Sirirat Thong-Oon
Major Program	Biotechnology
Academy Year	2008

ABSTRACT

Marine-derived actinomycetes are important sources of bioactive compounds. However, the screening of actinomycetes-derived bioactive compounds including cultivation, extraction and testing for biological activities is labor and cost intensive. The aim of this study was to reduce the volume of cultivation and to modify the extraction method in order to address these problems. Three sizes of containers i.e. 250 ml Erlenmeyer flask, 20 ml vial and 24-well plate, were used for cultivation with a fixed ratio of media:container volume at 1:2.5. Five strains of marine-derived actinomycetes were cultured in each container using four different media. The culture broth of each strain was freeze-dried, extracted and screened for cytotoxic activities by SRB assay against KB, MCF-7, HT-29 and HeLa cell lines. The result showed that 20 ml scintillation vial was considered to be the most appropriate cultivation container for screening of marine-derived actinomycetes for bioactive compounds. Twenty-one strains of marine-derived actinomycetes were cultivated in 20 ml scintillation vial which obtained 4 differences culture media, the result showed that 24 active crude extracts from 84 crude extracts of marine-derived actinomycetes had a potentially to cytotoxicity against in 4 difference human cell lines which obtained for all crude extracts at concentration of crude extract 25 mg/ml. Base on TLC analysis showed the chemical components of alkaloids, terpenoids and amino acid.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัศววิทย์ กาญจน โอภาส อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำในการทำวิจัย การค้นคว้าและการเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ รวมไปถึงแนวทางในการดำเนินชีวิตและ โอกาสดีๆ ที่อาจารย์มอบให้ ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนุชิต พลับรู้อการ กรรมการที่ปรึกษาร่วมที่ให้คำแนะนำต่างๆ ทำให้งานสำเร็จ ลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศุภศิลาณี มณีรัตน์ กรรมการผู้แทนคณะ อุตสาหกรรมเกษตร และรองศาสตราจารย์ ดร.กรกนก อิงคินันท์ ผู้แทนกรรมการจากบัณฑิต วิทยาลัย

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.สุปรียา ยืนยงสวัสดิ์ ภาควิชาเกษตรและเกษตรพันธุศาสตร์ คณะ เกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และคุณธีรศักดิ์ อนันตพงษ์ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ อุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่คอยให้ความรู้ และแนะนำ เทคนิคทางด้านการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็ง ทำให้งานสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ คณะอุตสาหกรรมเกษตร ที่ให้ทุนอุตสาหกรรมเกษตรสู่ความเป็นเลิศ ขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ คุณยาย ด้วยความเคารพยิ่งที่ให้กำลังใจและให้โอกาส ทางการศึกษาโดยตลอด ขอขอบคุณกำลังใจจากเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ อุตสาหกรรมทุกคน เจ้าหน้าที่ในคณะอุตสาหกรรมเกษตร รวมทั้งศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ตลอดจนจนทุกๆ ท่านที่มีได้กล่าวนามมา ณ ที่นี้ด้วย ที่มีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ ด้วยดี

ศิริรัตน์ ทองอุ่น

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(4)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบัญ	(6)
รายการตาราง	(8)
รายการภาพ	(10)
บทที่	
1. บทนำ	
บทนำต้นเรื่อง	1
บทตรวจเอกสาร	2
วัตถุประสงค์	46
2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ	
วัสดุ	47
อุปกรณ์	48
วิธีการ	49
3. ผลและวิจารณ์	
3.1 การเปรียบเทียบวิธีการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีท เพื่อผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง	56
3.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบของอาหารที่มีผลต่อการผลิตสารสกัดหยาบของเชื้อแอคติโนมัยสีท	65
3.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งโดยใช้เทคนิค Thin-Layer Chromatography (TLC)	77

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.4 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้ง การเจริญของเซลล์มะเร็ง (สารสกัดที่ได้จากการเลี้ยงแอกติโนมัยไซต์ จำนวน 21 สายพันธุ์)	88
4. สรุปผลการทดลอง	91
เอกสารอ้างอิง	93
ภาคผนวก ก	99
ภาคผนวก ข	103
ภาคผนวก ค	107
ภาคผนวก ง	116
ประวัติผู้เขียน	118

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1. องค์ประกอบทางเคมีผนังเซลล์ของแอกติโนมัยสีย	12
2. แบบแผนน้ำตาลของแอกติโนมัยสีย	12
3. ลักษณะที่สำคัญของแอกติโนมัยสียทั้ง 7 กลุ่ม	16
4. การจัดจำแนกกลุ่มของแอกติโนมัยสียใน Order Actinomycetales	16
5. แอกติโนมัยสียที่พบในทะเลที่ระดับความลึกต่างๆ	18
6. สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งจากแอกติโนมัยสียที่ได้จากทะเล	26
7. สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียจากแอกติโนมัยสียที่ได้จากทะเล	35
8. สารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากแอกติโนมัยสียที่ได้จากทะเล	38
9. อัตราส่วนปริมาณอาหารต่อปริมาณภาชนะบรรจุของภาชนะทั้ง 3 ชนิด	43
10. ร้อยละของการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งของสารสกัดหยาบที่ได้จากแอกติโนมัยสียที่แยกได้จากทะเลทั้ง 5 สายพันธุ์ที่เลี้ยงในฟลาस्कขนาด 250 มิลลิลิตร	45
11. ผลการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่ได้จากแอกติโนมัยสียที่แยกได้จากทะเลจำนวน 5 สายพันธุ์ ซึ่งเลี้ยงด้วยวิธีการต่างกัน	57
12. จำนวนสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งจากการเลี้ยงแอกติโนมัยสียทั้ง 5 สายพันธุ์ในอาหารที่แตกต่างกัน 4 สูตร	66
13. องค์ประกอบของสารสกัดหยาบที่ได้จากแอกติโนมัยสียทั้ง 5 สายพันธุ์	67
14. น้ำหนักสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดสารจากแอกติโนมัยสียทั้ง 5 สายพันธุ์	69
15. ผลของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง และองค์ประกอบของสารที่มีในสารสกัดหยาบที่ได้จากแอกติโนมัยสีย	86
16. จำนวนสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งจากการเลี้ยงแอกติโนมัยสียทั้ง 21 สายพันธุ์ในอาหารที่แตกต่างกัน 4 สูตร	88
17. ร้อยละของการยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารสกัดหยาบที่ได้จากการเลี้ยงแอกติโนมัยสียในฟลาस्कขนาด 250 มิลลิลิตร และสกัดสารหยาบด้วยเอทิลอะซีเตท	107
18. ร้อยละของการยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารสกัดหยาบที่ได้จากการเลี้ยงแอกติโนมัยสียในฟลาस्कขนาด 250 มิลลิลิตร และสกัดสารหยาบด้วยเมทานอล	109

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
19. ร้อยละของการยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารสกัดหยาบที่ได้จากการเลี้ยงแอกติโนมัยไซต์ ในขวดรูปทรงกระบอกขนาด 8 มิลลิลิตร และสกัดสารหยาบด้วยเมทานอล	110
20. ร้อยละของการยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารสกัดหยาบที่ได้จากการเลี้ยงแอกติโนมัยไซต์ ใน 24-well plate และสกัดสารหยาบด้วยเมทานอล	111
21. ร้อยละของการยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารสกัดหยาบที่ได้จากแอกติโนมัยไซต์ 21 สายพันธุ์	112

รายการภาพ

ภาพที่	หน้า
1. วัฏจักรชีวิตของแอกติโนมัยสีท	3
2. โครงสร้างของเส้นใยอากาศของแอกติโนมัยสีท	5
3. ขั้นตอนการสร้างโคโลนีของแอกติโนมัยสีท	6
4. การสร้างสปอร์เดี่ยวของแอกติโนมัยสีทในสกุลต่างๆ	7
5. การสร้างสปอร์รูปแบบต่างๆของแอกติโนมัยสีท	8
6. การสร้างสปอร์แบบสายยาวของ <i>Streptomyces</i>	9
7. รูปทรงของอับสปอร์ที่เจริญบนเส้นใยอาหาร	10
8. รูปทรงของอับสปอร์ที่เจริญบนเส้นใยอากาศ	11
9. สูตรโครงสร้าง pluramycin(a), rubiflavinone C-1 (b) และ β -indomycinone (c)	20
10. สูตรโครงสร้าง neomarinone (a), isomarinone (b), hydroxy- debromomarinone (c) และ methoxydebromomarinone (d)	21
11. สูตรโครงสร้าง lomaviticins A (a) และ B (b)	22
12. สูตรโครงสร้าง Brasilibactin A (a)	23
13. สูตรโครงสร้าง Lajollamycin (a)	24
14. สูตรโครงสร้าง Terpenoid Chloro-Dihydroquinone (a-e)	25
15. สูตรโครงสร้าง 4,10-dihydroxy-10-methyl-dodec-2-en-1,4-olide(a), สาร diastereomeric 4,11-dihydroxy -10-methyl-dodec-2-en-1,4-olides (b) และ สาร 4-hydroxy-10-methyl-11-oxo-dodec-2-en-1,4-olide (c)	32
16. สูตรโครงสร้าง lorneamides A (a) และ B (b)	33
17. สูตรโครงสร้าง Diazepinomycin (a)	33
18. สูตรโครงสร้าง Hygrocin A (a) และ Hygrocin B (b)	34
19. ไดอะแกรมสรุปการทดลองเลี้ยงแอกติโนมัยสีทในสภาวะต่างๆ และการทดสอบฤทธิ์ ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง	55
20. จำนวนสารสกัดหายาที่ได้จากการเลี้ยงแอกติโนมัยสีททั้ง 5 สายพันธุ์ที่ได้วิธีการ เลี้ยง 3 รูปแบบซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง	63

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
21. โครมาโตแกรมของ TLC ชนิด normal phase CNA053 วิเคราะห์ด้วย wagner's reagent	74
22. โครมาโตแกรมของ TLC ชนิด normal phase CNA053 วิเคราะห์ด้วย Ninhydrin reagent	75
23. โครมาโตแกรมของ TLC ชนิด normal phase CNA053 วิเคราะห์ด้วย vanillin in conc. H ₂ SO ₄	76
24. โครมาโตแกรมของ TLC ชนิด normal phase CNA097	77
25. โครมาโตแกรมของ TLC ชนิด normal phase CNA099	78
26. โครมาโตแกรมของ TLC ชนิด normal phase CNA102	79
27. โครมาโตแกรมของ TLC ชนิด normal phase CNA103	80
28. โครมาโตแกรมของ TLC ชนิด normal phase CNA104	81
29. โครมาโตแกรมของ TLC ชนิด normal phase CNA112	82
30. โครมาโตแกรมของ TLC ชนิด normal phase CNA145	83
31. โครมาโตแกรมของ TLC ชนิด normal phase CNA146	84
32. ร้อยละของสารกักตายนที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่ได้จากการเลี้ยง แอดิโนมายส์ทีทในขวดรูปทรงกระบอก	89
33. เซลล์มะเร็งเชื่อมช่องปาก	103
34. เซลล์มะเร็งเต้านม	103
35. เซลล์มะเร็งลำไส้	104
36. เซลล์มะเร็งปากมดลูก	104

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

เชื้อแอคติโนมัยสิทเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่พบทั่วไปตามธรรมชาติ ทั้งในดิน บนบก ทะเลลึก บริเวณพื้นดินใกล้ชายฝั่ง และบริเวณป่าชายเลน (Jensen *et al.*, 1991 and Takizawa *et al.*, 1993) แบคทีเรียในกลุ่มนี้มีการสร้างเส้นใย และมีการสร้างสปอร์ อาจเป็นสปอร์เดี่ยว สปอร์คู่ หรือ สร้างสายสปอร์ เช่น การสร้างสปอร์เดี่ยวใน *Micromonospora*, *Thermomonospora* และ *Saccharomonospora* เป็นต้นและมีการสร้างโคโลนีที่มีสีต่างๆ เช่น สีขาว, เทา, น้ำตาล, เหลือง, แดง, เขียว, ฟ้า, ม่วง และดำ (Vobis, 1997) แอคติโนมัยสิทมีความสำคัญต่อระบบนิเวศน์ เนื่องจากเป็นผู้ย่อยสลายอินทรีย์วัตถุที่มีโครงสร้างซับซ้อนได้ เช่น เฮมิเซลลูโลส, ลิกโนเซลลูโลส, เพคติน และไคติน เป็นต้น

แอคติโนมัยสิทเป็นแหล่งของสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive compounds) ซึ่งสารที่ผลิตได้เหล่านี้มีความสำคัญทางด้านการแพทย์ ทางด้านเภสัชกรรม และการนำไปใช้ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น สารปฏิชีวนะ รงควัตถุ และสารต้านมะเร็ง เป็นต้น (Mitchell *et al.*, 2004) เนื่องจากปัจจุบัน โรคคือยาและโรคฉายโอกาสมีเพิ่มมากขึ้น ได้แก่ โรคที่เกิดจากเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อต่อยา Methicillin (MRSA) โรคเอดส์ (AIDS) โรคไข้หวัดนก (Avian Influenza) และโรคมะเร็ง (Cancer) ดังนั้นความต้องการยาสำหรับยับยั้งโรคที่เกิดขึ้นเหล่านี้กำลังเป็นที่ต้องการสูง แต่ปัจจุบันอัตราการค้นพบแอคติโนมัยสิทและสารปฏิชีวนะชนิดใหม่จากแหล่งธรรมชาติที่อยู่บนพื้นดินมีแนวโน้มลดลง จนในที่สุดได้มีการศึกษาจนพบแหล่งของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติแห่งใหม่ นั่นก็คือ ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเล โดยเฉพาะภูมิภาคทางภาคใต้ของประเทศไทยที่มีพื้นที่ติดกับทะเลทั้งฝั่งทะเลอ่าวไทย และฝั่งทะเลอันดามัน จึงมีความเป็นไปได้ที่จะสามารถนำแบคทีเรียเหล่านี้มาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด ดังนั้นการคัดกรองสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแอคติโนมัยสิทเพื่อให้มีความรวดเร็วในการคัดกรองสารจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง

โดยทั่วไปการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสิท เพื่อทดสอบการสร้างสารทุติยภูมิของเชื้อแบคทีเรีย (Secondary metabolites) มักกระทำในอาหารเหลวที่บรรจุในขวดเขย่า (flasks) ขนาด 250 มิลลิลิตร (Stritzke *et al.*, 2004; Cai *et al.*, 2005) และอย่างไรก็ตามการเลี้ยงเชื้อเพื่อทดสอบหรือคัดกรอง (screening) ว่าเชื้อที่แยกได้มีความสามารถในการสร้างสารที่มีคุณสมบัติเป็นที่ต้องการนั้นมี

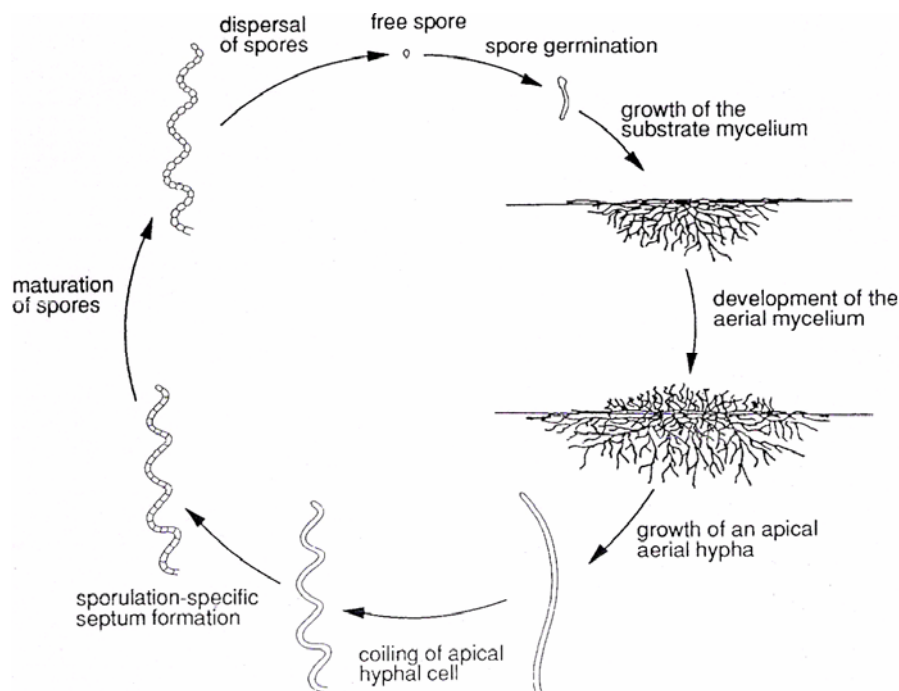
ข้อจำกัดอยู่หลายประการด้วยกัน เช่น ความยุ่งยากในการเตรียมอาหารหลายๆ สูตรที่มีความเหมาะสม ความสิ้นเปลืองทั้งในด้านค่าใช้จ่าย เวลา และวัสดุอุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องตลอดถึงปริมาณสารเคมีและตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดซึ่งขึ้นอยู่กับปริมาณของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเป็นอุปสรรคที่สำคัญในการทดสอบความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ในการสร้างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจำนวนมากพร้อมๆ กัน และการเลี้ยงเชื้อในระดับขวดเขย่าขนาด 250 มิลลิลิตร มักเป็นวิธีการที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการอย่างแพร่หลาย แต่ก็มีข้อจำกัดในเรื่องของอุปกรณ์ที่ต้องใช้ ในขณะที่ปัจจุบันวิธีการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด โดยเฉพาะการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง และจุลินทรีย์ได้พัฒนาไปมากจนถึงระดับที่สามารถทดสอบสารตัวอย่างที่มีปริมาณเพียงเล็กน้อยในระดับของหน่วยมิลลิกรัมและไมโครกรัม จึงไม่จำเป็นต้องใช้สารสกัดในปริมาณที่มากอีกต่อไป การศึกษาวิธีการเลี้ยงเชื้อที่มีขนาดเล็กลง (miniaturization) จึงมีความเป็นไปได้ที่จะใช้สำหรับการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสารสกัดหยาบสำหรับการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพที่ต้องการ ดังนั้นการศึกษาและเปรียบเทียบวิธีการเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีทในแบบต่างๆ คือ การเลี้ยงเชื้อใน 24-well plates และการเลี้ยงเชื้อใน scintillation vials โดยใช้สูตรอาหารที่แตกต่างกันเทียบกับการเลี้ยงเชื้อในระดับขวดเขย่าจึงมีความสำคัญในการพัฒนาวิธีการคัดกรองเชื้อซึ่งการเลี้ยงเชื้อใน 24-well plates และการเลี้ยงเชื้อใน scintillation vials เป็นการลดขนาดของการเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีทลง ทำให้สามารถเลี้ยงเชื้อได้พร้อมๆ กันเป็นจำนวนมาก รวมถึงการใช้สารเคมีและตัวทำละลายในปริมาณที่ลดลง อันจะนำไปสู่วิธีการคัดกรองสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

ตรวจเอกสาร

1. แอกติโนมัยซีท (Actinomycetes)

เชื้อแอกติโนมัยซีทเป็นกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกเป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ใน order Actinomycetales (Miyadoh, 1997) และได้รับการจัดให้อยู่ในกลุ่มของแบคทีเรีย เนื่องจากไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส และไมโทคอนเดรีย (Goodfellow and Brand, 1980) โดยถูกจัดได้ว่าเป็นแบคทีเรียที่แท้จริง เนื่องจากมีลักษณะที่สำคัญ คือ ผนังเซลล์ที่ประกอบด้วยชั้นของเปปทิโดไกลแคน (peptidoglycan) กรดมิวรามิก (muramic acid) กรดไดอะมิโนไพมิริก (diaminopimelic acid) แต่ไม่มีส่วนของไคติน (chitin) และเซลลูโลส (cellulose) เป็นองค์ประกอบ แอกติโนมัยซีทมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่หลากหลายตั้งแต่ลักษณะเป็นทรงกลม ท่อน และเป็นเส้นสายคล้ายเชื้อราที่มีการแตกแขนงและมีการแตกหักของเส้นใยเพื่อสร้างสปอร์บนเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) แอกติโนมัย

สีทส่วนใหญ่เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต ยกเว้นบางชนิดที่ไม่ต้องการหรือต้องการออกซิเจนเพียงเล็กน้อยในการเจริญเติบโต ลักษณะของแอกติโนมัยสีทจะมีความสำคัญต่อการจัดจำแนกแบคทีเรียกลุ่มนี้ในระดับ Family และ Genus นอกจากนี้วิธีการทาง Chemotaxonomy เช่น การวิเคราะห์กรดอะมิโนซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ และชนิดของน้ำตาลก็ยังมีผลสำคัญในการจัดจำแนกแอกติโนมัยสีทในระดับที่ละเอียดมากขึ้น นอกจากนี้ยังอาศัยความแตกต่างของลำดับเบสใน 16s และ 23s ribosomal RNA เพื่อช่วยจัดกลุ่มแบคทีเรียชนิดนี้ในระดับ species ได้อีกด้วย และลักษณะที่สำคัญอีกประการหนึ่งที่ทำให้แอกติโนมัยสีทต่างจากแบคทีเรียแกรมบวกอื่นๆ คือ มีเปอร์เซ็นต์เบสกวานีน (guanine) และไซโตซีน (cytosine) ในดีเอ็นเอมากกว่า 55 ในขณะที่แบคทีเรียแกรมบวกทั่วไปมีเปอร์เซ็นต์เบสกวานีนและไซโตซีนในดีเอ็นเอต่ำกว่า 50 เช่น *Bacillus*, *Clostridium*, *Staphylococcus* และ *Streptococcus* (Glazer and Nikaido, 1994) และวัฏจักรชีวิตของแอกติโนมัยสีทแสดงดังภาพที่ 1 ซึ่งวัฏจักรชีวิตของแอกติโนมัยสีทจะเริ่มต้นจากการสร้างเส้นใยใต้พื้นผิวอาหาร เพื่อใช้สารอาหารในการเจริญเติบโต และภายหลังจะมีการสร้างเส้นใยอากาศเพื่อใช้สืบพันธุ์ หรือในกรณีที่มีการขาดอาหาร การขาดน้ำ หรือการสะสมสารที่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์



ภาพที่ 1 วัฏจักรชีวิตของแอกติโนมัยสีท

Figure 1. The life cycle of actinomycetes.

ที่มา : Chater และคณะ (1997)

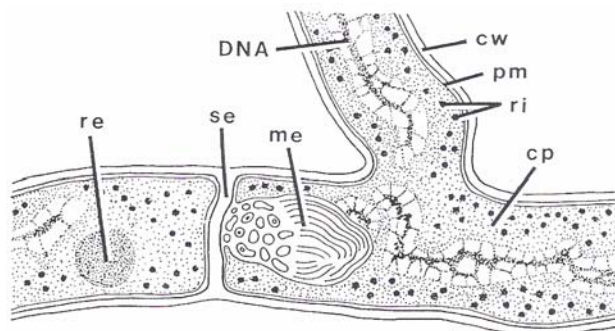
ลักษณะการเจริญของเชื้อบนอาหารแข็ง (surface culture) และในอาหารเหลว (submerge culture) มีลักษณะต่างกันคือ การเจริญของเชื้อในอาหารเหลวเซลล์จะจับกันเป็นกลุ่มของเส้นใยที่เรียกว่า pellets แต่สำหรับเชื้อบางชนิด เช่น *Norcadia coralline* เมื่อเจริญในอาหารเหลวที่มีการเขย่าเพื่อให้อากาศ พบว่าเชื้อจะมีลักษณะเป็นรูปแท่ง (rod) มีการแบ่งเซลล์แบบทวิคูณ (binary fission) และแบบแตกหักของเส้นใย (fragmentation) เมื่อหยุดการเจริญเติบโต ในขณะที่การเจริญบนอาหารแข็งที่มีส่วนประกอบของอาหารเช่นเดียวกับในอาหารเหลว เชื้อเจริญแบบสร้างเส้นใย (filamentous form) ในลักษณะที่ยึดติดแน่นกับผิวหน้าวุ้น และมีการแตกหักของเส้นใยเมื่อมีอายุมากขึ้น โดยทั่วไปลักษณะการเจริญของเชื้อบนอาหารแข็งจะมีลักษณะของโคโลนีที่แตกต่างขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อสามารถพบได้ 3 แบบ คือ

1. โคโลนีแบบหยาบหรือเรียบยึดเกาะกับผิวหน้าอาหารอย่างหลวมๆ เป็นการสร้างเส้นใยเหนือผิวอาหารปกคลุมผิวหน้าอาหารมักพบในแอคติโนมัยซีทที่มีการเจริญของเส้นใยที่ไม่แน่นอน
2. โคโลนีที่ไม่มีเส้นใยได้ผิวอาหารแต่มีเส้นใยเหนือผิวอาหารที่ยึดเกาะกับอาหารด้วยส่วนพิเศษที่เรียกว่า holdfast
3. โคโลนีที่มีลักษณะเกาะกันแน่นคล้ายแผ่นหนังจะมีเส้นใยเหนือผิวอาหารที่ค่อนข้างโป่งและยึดกับเส้นใยได้ผิวอาหาร

1.1 สัณฐานวิทยาแอคติโนมัยซีท

1.1.1 โครงสร้างภายในของโคโลนี

แอคติโนมัยซีทมีลักษณะเป็นเส้นใยคล้ายราแต่มีขนาดเล็กกว่า คือ มีขนาดประมาณ 0.4-1.2 ไมโครเมตร มีการสร้างผนังกันเส้นใยแบบต่างๆ ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อและมีการเจริญโดยสามารถแตกแขนงบริเวณปลาย สำหรับโครงสร้างหลักในเส้นใยพบว่าในไซโตพลาสซึมจะประกอบไปด้วย สายดีเอ็นเอ ไรโบโซม และสารต่างๆรวมอยู่ด้วยกัน เช่น ไขมัน หรือ polysaccharides, polyphosphates โดยส่วนของผนังเซลล์ที่อยู่ติดกับส่วนของไซโตพลาสซึม ทำให้เกิดเป็นมิโซโซม ซึ่งเป็นส่วนที่อยู่ติดกับโครงสร้างของผนังเซลล์ ผนังเซลล์ของเส้นใยมีคุณสมบัติเป็นผนังชั้นเดียว ความหนาประมาณ 10-20 นาโนเมตร และมีการสร้างผนังกัน หรือเรียกว่า septum ซึ่งสร้างในขณะที่เส้นใยมีการเจริญ แสดงดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 โครงสร้างของเส้นใยอากาศของแอกติโนมัยซีท

cp : ไซโตพลาสซึม

pm : ชั้นผนังพลาสมา

cw : ผนังเซลล์

me : มีโซโซม

se : ผนังกั้นเซลล์

ri : ไรโบโซม

DNA : บริเวณที่มีสารพันธุกรรม

re : บริเวณแหล่งพลังงาน

Figure 2. Cytological organization of aerial mycelium of actinomycetes.

cp : cytoplasm

pm : plasmamembrane

cw : cell wall

me : mesosome

se : septum

ri : ribosome

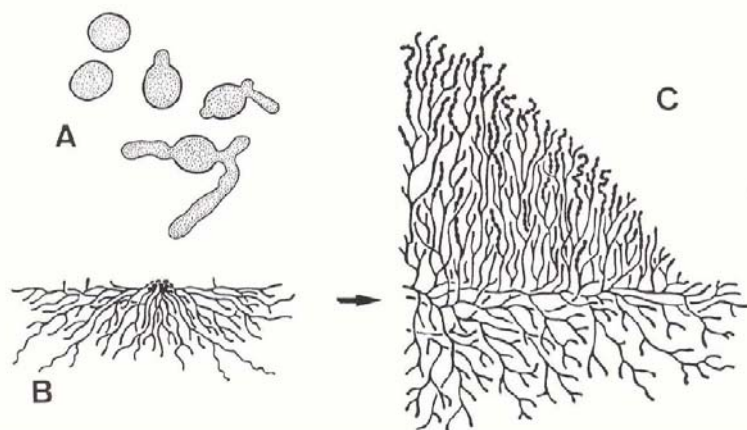
DNA : nucleoid region

re : reserve material

ที่มา : Vobis (1997)

1.1.2 การสร้างโคโลนี

โคโลนีของแอกติโนมัยซีทเกิดจากการรวมตัวกันของเส้นใย ทำให้เส้นใยมีความหนาแน่นเกิดเป็นโคโลนี สำหรับการสร้างโคโลนีนั้น เริ่มต้นจากการลงเชื้อในอาหารแข็ง โดยอาจเกิดจากสปอร์ อับสปอร์ ส่วนของเส้นใยที่หักหรือจากบางส่วนของโคโลนีเดิม (ภาพที่ 3A) หลังจากนั้นมีการพัฒนาเป็นเส้นใยอาหาร (substrate mycelium) (ภาพที่ 3B) และหลังจากนั้นเส้นใยอาหารเจริญโดยการแทงผ่านอาหารขึ้นมาเป็นเส้นใยอากาศ (aerial mycelium) (ภาพที่ 3C) ซึ่งเป็นส่วนที่สัมผัสกับอากาศโดยตรง ดังแสดงในภาพที่ 3 ต่อมาได้มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะโคโลนี เช่น การสร้างสปอร์



ภาพที่ 3 ขั้นตอนการสร้างโคโลนีของแอกติโนมัยซีท

Figure 3. Development of colony of actinomycetes

ที่มา : Vobis (1997)

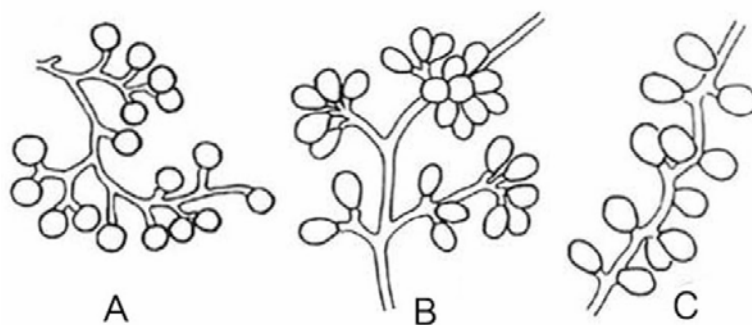
ลักษณะของโคโลนีมีความแตกต่างกันในแต่ละสปีชีส์ เช่นใน *Streptomyces* ที่มีทั้งเส้นใยอากาศ และเส้นใยอาหาร และในบางครั้งอาจไม่พบการสร้างเส้นใยอากาศในสายพันธุ์ *Micromonospora* หรือบางกรณีในระหว่างที่มีการสร้างเส้นใยอาหารมีความสมบูรณ์ เนื่องจากมีความเหมาะสมทางสภาพแวดล้อมเพื่อใช้ในการเจริญ จึงส่งผลให้การสร้างเส้นใยอากาศสั้นลง โดยพบว่าโครงสร้างหลักของโคโลนีขึ้นกับเส้นใยอากาศและเส้นใยอาหาร ถ้าหากเส้นใยถูกจำกัดทำให้มีเส้นใยอากาศสั้น โคโลนีอาจฟูหรือเรียบแบน ผิวของโคโลนีอาจมีลักษณะเรียบ ขรุขระ นูน หรือเป็นเกล็ด โคโลนีของแอกติโนมัยซีท สามารถสร้างสีได้ เช่น สีขาว สีเหลือง สีชมพู สีแดง สีน้ำตาลดำ เป็นต้น

1.1.3 ชนิดของสปอร์

แอกติโนมัยซีทสร้างสปอร์โดยสามารถแบ่งได้เป็น 3 แบบตามลักษณะโครงสร้างภายนอก คือ สปอร์เดี่ยว ลักษณะเป็นสาย และสร้างสปอร์ในอับสปอร์

(1.) การสร้างสปอร์แบบเดี่ยว

สำหรับการสร้างสปอร์ในลักษณะนี้ เรียกว่า monosporous พบในหลายสกุล ใน *Thermomonospora* สร้างสปอร์เดี่ยวบนเส้นใยอากาศที่ปลายก้านชูสปอร์ที่แตกแขนงหรือไม่แตกแขนง การแตกแขนงทำให้เกิดการสร้างเป็นกลุ่มของสปอร์ ในสกุลอื่นๆที่มีการสร้างสปอร์เดี่ยว ได้แก่ *Saccharomonospora* มีการสร้างสปอร์เดี่ยวรูปไข่ที่ปลายเส้นใยอากาศ ดังแสดงในภาพที่ 4 ลักษณะการสร้างสปอร์เดี่ยวของ *Micromonospora*, *Thermomonospora* และ *Saccharomonospora*



ภาพที่ 4 การสร้างสปอร์เดี่ยวของแอสคิโนมัยซีทในสกุลต่างๆ พบใน

A. *Micromonospora*

B. *Thermomonospora*

C. *Saccharomonospora*

Figure 4. Single spore production

A. *Micromonospora*

B. *Thermomonospora*

C. *Saccharomonospora*

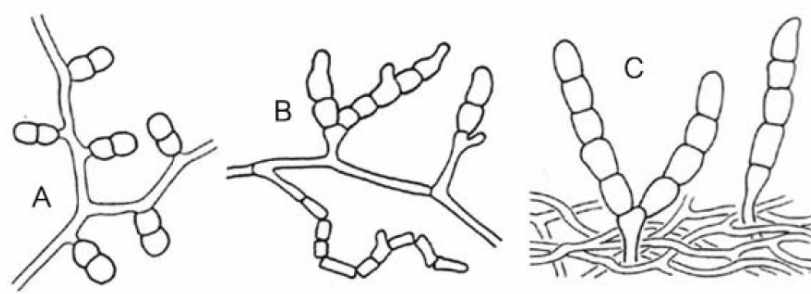
ที่มา : Vobis (1997)

(2.) การสร้างสปอร์แบบสาย

การสร้างสปอร์ของแอสคิโนมัยซีทจะสร้างในลักษณะนี้เป็นส่วนมาก สามารถแบ่งลักษณะของสายสปอร์ โดยพิจารณาจากความยาวหรือจำนวนสปอร์ เช่น disporous หรือ bisporous, oligosporous และ polysporous

(3.) การสร้างสปอร์จำนวนมาก

โดยพบว่าจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Streptomyces* มีการสร้างสปอร์ที่เป็นสายมากกว่า 50 สปอร์ ซึ่งสปอร์ของ *Streptomyces* และแอสคิโนมัยซีทชนิดอื่นที่สามารถสร้างสปอร์มาก เรียกสปอร์เหล่านี้ว่า arthospores โดย arthospores ดังกล่าวมีความสอดคล้องกับ arthospores ของเชื้อราในกลุ่ม Deuteromycota ที่สร้างสายของสปอร์และมีการแตกหักของเส้นใย ซึ่งความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสายสปอร์สามารถใช้เป็นมาตรฐานในการจัดหมวดหมู่ได้ การสร้างเส้นใยอากาศของ *Streptomyces* สามารถแบ่งได้เป็น 4 ลักษณะดังภาพที่ 6



ภาพที่ 5 การสร้างสปอร์รูปแบบต่างๆของแอกติโนมัยซีท

A: สปอร์แบบ disporous ของ *Microbiospora*

B: สปอร์แบบ Oligosporous ของ *Nocardia brevicatena*

C: สปอร์แบบ Oligosporous ของ *Catellatospora*

Figure 5. Dispore and oligosporous production of actinomycetes

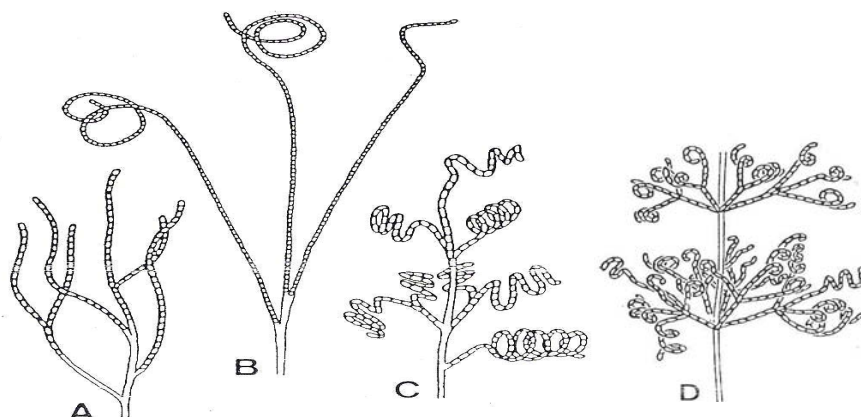
A: Disporous of *Microbiospora*

B: Oligosporous of *Nocardia brevicatena*

C: Oligosporous of *Catellatospora*

ที่มา : Vobis (1997)

จากการรายงานของ Krasil'nikov (1981) และ Williams (1989) พบว่า ในบางกรณีการขาดของสายสปอร์จนเป็นเกลียวแน่น และมีการแยกของสายสปอร์ ทำให้เกิดลักษณะที่คล้ายคลึงกับอับสปอร์ หรือ pycnidia เช่น *Actinosporangium* และ *Actinopynidium* ที่จัดอยู่ในกลุ่มของ *Streptomyces* และจากการรายงานของ Embley (1992) พบว่า เชื้อที่อยู่ในวงศ์ *Pseudonocardiaceae* มีการสร้างสปอร์แบบจำนวนมาก เชื้อสายพันธุ์ *Pseudonocardia* มีการสร้างสายสปอร์ได้ทั้งในสายใยอาหารและในสายใยอากาศ โดยมีการสร้างสายสปอร์แบบซิกแซก และในสายพันธุ์ *Actinokineospora* สร้างสปอร์จำนวนมากเช่นกัน และสปอร์ของเชื้อสายพันธุ์นี้สามารถเคลื่อนที่ได้



ภาพที่ 6 การสร้างสปอร์แบบสายยาวของ *Streptomyces*

A: ลักษณะสปอร์เป็นสายตรง

B: ลักษณะสปอร์เป็นสายคล้ายขอ (hook) เป็นวงเปิดเป็นเกลียวซ้อนทับกัน 1-3 ชั้น

C: ลักษณะสายสปอร์เป็นเกลียว แบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ เป็นเกลียววงปิด และเป็นเกลียววงเปิด เกลียวยาว และไม่ติดกันแน่น

D: ลักษณะสายสปอร์ขดเป็นเกลียวคล้ายกันหอย และแตกแขนงออกเป็นข้อ

Figure 6. Spore production in long chains of actinomycetes.

A: Rectiflexibiles

B: Retinaculiaperti

C: Spira

D: Verticillati

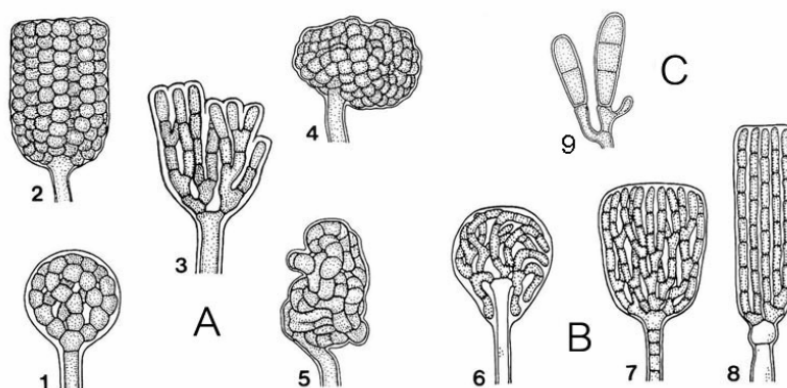
ที่มา : Vobis (1997)

1.1.4 การสร้างสปอร์ในอับสปอร์

การสร้างสปอร์ในอับสปอร์ (sporangia) มีหลายสายพันธุ์ สามารถแบ่งกลุ่มการสร้างสปอร์ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่สร้างอับสปอร์บนเส้นใยอาหาร และกลุ่มที่สร้างอับสปอร์บนเส้นใยที่ชูขึ้นในอากาศ

(1.) กลุ่มที่สร้างอับสปอร์บนเส้นใยอาหาร ได้แก่ *Actinoplanes* อับสปอร์มีลักษณะเป็นทรงกลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 5-15 ไมโครเมตร สปอร์ต่อกันเป็นสายและมีการแตกแขนงขดเป็นก้อนอยู่ภายในผนังโดยถูกห่อหุ้มไว้ โดยพบว่าสายพันธุ์ *Ampullariella* สามารถสร้างอับสปอร์บน

เส้นใยอาหารได้หลายรูปแบบ เช่น ทรงกลม ทรงกระบอก แบบเป็นพู เป็นต้น ดังแสดงในภาพที่ 7 ซึ่งโดยเฉลี่ยแล้วอับสปอร์มีความกว้าง 10 ไมโครเมตร และความยาว 15 ไมโครเมตร



ภาพที่ 7 รูปทรงของอับสปอร์ที่เจริญบนเส้นใยอาหาร

A. อับสปอร์ของสกุล *Actinoplanes* รวมทั้ง *Ampullariella*

1. ทรงกลม 2. ทรงกระบอก 3. เป็นพู 4. กึ่งทรงกลม 5. ไม่เป็นรูปทรง

B. อับสปอร์ของสกุล *Pilimelia*

6. ทรงรี 7. รูประฆัง 8. ทรงกระบอก

C. อับสปอร์ของสกุล *Dactylosporangium*

9. รูปทรงกระบอก

Figure 7. Spore production within sporangia

A. *Actinoplanes* (*Ampullariella*) : polysporous

1. globose 2. cylindrical 3. lobate 4. subglobose 5. irregular

B. *Pilimelia*

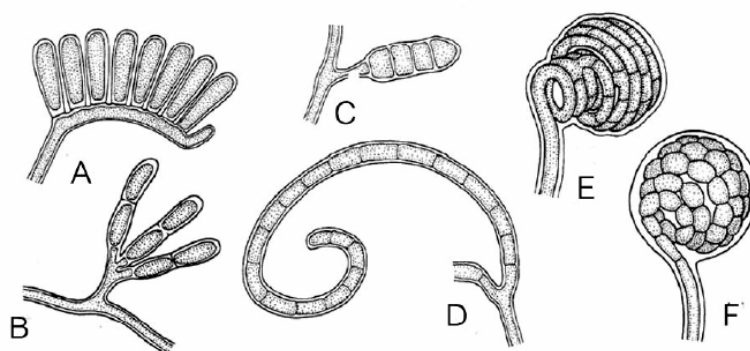
6. ovoid 7. campanulate 8. cylindrical

C. *Dactylosporangium* : oligosporous

9. claviform

ที่มา : Vobis (1997)

(2.) กลุ่มที่สร้างอับสปอร์บนสายใยที่ชูขึ้นในอากาศ ได้แก่ *Planomonospora* อับสปอร์มีลักษณะเป็นทรงกระบอก ภายในมีหนึ่งสปอร์ (Vebis, 1986) *Planobispora* มีสปอร์คู่กันอยู่ภายในอับสปอร์ (Thiemann และ Beretta, 1968) *Streptosporangium* โดยส่วนใหญ่อับสปอร์เป็นทรงกลมเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 ไมโครเมตร มีการสร้างผนังกันเป็นสปอร์เดี่ยวต่อกันเป็นสายยาวคอยู่ภายในอับสปอร์ (Williams และ Sharples, 1976 ; Petrolini *et al.*, 1992 อ้างโดย Vobis, 1997)



ภาพที่ 8 รูปทรงของอับสปอร์ที่เจริญบนเส้นใยอากาศ

- A. อับสปอร์ของสกุล *Planomonospora* แบบ monosporous สปอร์รูปทรงกระบอก
- B. อับสปอร์ของสกุล *Planobispora* แบบ disporous สปอร์รูปทรงกระบอก
- C. อับสปอร์ของสกุล *Planotatraspora* แบบ tetrasporous สปอร์รูปทรงกระบอก
- D. อับสปอร์ของสกุล *Planopolyspora* แบบ polysporous สปอร์รูปทรงคล้ายท่อ
- E. อับสปอร์ของสกุล *Spirillospora* แบบ polysporous สปอร์รูปทรงกลม
- F. อับสปอร์ของสกุล *Streptosporangium* แบบ polysporous สปอร์รูปทรงกลม

Figure 8. Sporangia developed on aerial mycelium

- A. *Planomonospora* : monosporous
- B. *Planobispora* : disporous รูปทรงกระบอก
- C. *Planotatraspora* : tetrasporous รูปทรงกระบอก
- D. *Planopolyspora* : polysporous รูปทรงคล้ายท่อ
- E. *Spirillospora* : polysporous รูปทรงกลม
- F. *Streptosporangium* : polysporous รูปทรงกลม

ที่มา : Vobis (1997)

1.1.5 องค์ประกอบของผนังเซลล์แอสคิโนมัยซีท

เมื่อพิจารณาองค์ประกอบทางเคมีของแอสคิโนมัยซีทจากกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ (major wall amino acid) และชนิดของน้ำตาลที่เป็นส่วนประกอบอยู่ในเซลล์ทั้งหมด (whole cell hydrolyzed) สามารถแบ่งผนังเซลล์ของแอสคิโนมัยซีทออกได้เป็น 4 ชนิด แสดงดังตารางที่ 1 และสามารถจัดแบบแผนน้ำตาลของแอสคิโนมัยซีทได้ดังแสดงในตารางที่

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีผนังเซลล์ของแอกติโนมัยซีท

Table 1. Chemotaxonomic characteristics of actinomycete cell wall.

Type	Major amino acids	Distinguishing major constituent
I	L-Diaminopimelic acid (L-DAP)	Glycine
II	<i>meso</i> -Diaminopimelic acid (<i>meso</i> -DAP)	Glycine
III	<i>meso</i> *-Diaminopimelic acid (<i>meso</i> -DAP or OH-DAP)	None
IV	<i>meso</i> -Diaminopimelic acid (<i>meso</i> -DAP)	None

หมายเหตุ *อาจพบในรูปของ 3-hydroxy aminopimelic acid

ที่มา: Bergey's Manual of systematic Bacteriology เล่ม 4 (William, 1989)

ตารางที่ 2 แบบแผนน้ำตาลของแอกติโนมัยซีท

Table 2. Whole cell sugar patterns of actinomycetes.

Pattern	Sugar			
	Arabinose	Galactose	Madurose*	Xylose
A	+	+		
B			+	
C		No diagnostic sugar		
D	+			+

หมายเหตุ *Madurose คือ 3-O-methyl-D-galactose

ที่มา: Bergey's Manual of systematic Bacteriology เล่ม 4 (William, 1989)

2. การจัดจำแนกแอกติโนมัยซีท (Classification of actinomycetes)

โดยทั่วไปการจัดจำแนกแอกติโนมัยซีทอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ลักษณะของเส้นใยอากาศ เส้นใยอาหาร โคนิเดีย สปอร์ และอับสปอร์ นอกจากนี้ที่ได้กล่าวมาข้างต้นนั้นสามารถจัดแบ่งกลุ่มโดยอาศัยการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี เช่นการวิเคราะห์องค์ประกอบของผนัง

เซลล์ การวิเคราะห์น้ำตาลซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ รูปแบบของฟอสโฟลิปิด และประเภทของเมนาควิโนน เป็นต้น เมื่อใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และองค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ในการพิจารณา ทำให้สามารถจัดกลุ่มแอกติโนมัยซีทได้เป็น 8 กลุ่ม ได้แก่ Nocardioform actinomycetes, Actinomycetes with multilocular sporangia, Actinoplanetes, Streptomycetes, Maduromycetes, Thermomonospora, Thermoactinomycetes และสกุลอื่นๆที่ไม่สามารถจัดอยู่ในกลุ่มที่กล่าวมาได้ โดยอาศัยการจัดจำแนกจาก Bergey's Manual of systematic Bacteriology เล่ม 4 (William, 1989)

2.1 Nocardioform actinomycetes

สำหรับแอกติโนมัยซีทในกลุ่มนี้มีลักษณะที่แตกต่างกัน ส่วนมากจะมีการแตกหักของเส้นใยเป็นแบบแท่งหรือกลม บางสายพันธุ์มีการสร้างเส้นใยอากาศ บางสายพันธุ์สามารถสร้างโคนิเดีย Nocardioforms เป็นกลุ่มที่เส้นใยมีการแตกหักเป็นแท่งหรือกลม บางชนิดสามารถสร้างโคนิเดียแอกติโนมัยซีทกลุ่มนี้ทุกสกุลเป็นพวกที่ต้องการอากาศในการเจริญ ยกเว้น *Oerskoviae* ซึ่งเป็นพวกที่ต้องการอากาศเล็กน้อยในการเจริญ เชื้อในกลุ่มนี้มีผนังเซลล์เป็นแบบ I (L – DAP และ glycine) ในสกุล *Nocardia* และ *Rhodococcus* ที่ผนังเซลล์จะมี mycolic acid และมีน้ำตาลในเซลล์เป็น type A (Arabinose และ Galactose) โดยสกุล *Nocardia* และ *Rhodococcus* มีเปอร์เซ็นต์ G+C ใน DNA อยู่ระหว่าง 64-72 เปอร์เซ็นต์ และ 60-69 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

2.2 Actinomycetes with multilocular sporangia

เชื้อในกลุ่มนี้มีโครงสร้างผนังกันแบบตามยาว และแบบตามขวาง สร้างสปอร์ขนาดใหญ่ แอกติโนมัยซีทในกลุ่มนี้มีทั้งหมด 3 สกุล ได้แก่ *Dermatophilus*, *Geodermatophilus* และ *Frankia* โดยมีลักษณะแตกต่างกันคือ เชื้อสกุล *Geodermatophilus* ซึ่งมีเส้นสายง่ายๆ ที่ยังไม่พัฒนามากนัก thallus ทั้งหมดสร้างเป็น sporangium ส่วนสกุล *Dermatophilus* เส้นสายจะมีการพัฒนามากขึ้นมีการสร้าง multilocular sporangium แบบยาว โดยทั้งสองสายพันธุ์ข้างต้น สร้างสปอร์ที่สามารถเคลื่อนที่ได้ และสกุล *Frankia* สามารถตรึงก๊าซไนโตรเจนได้ในสภาพไมโครแอโรฟิลิก มีการสร้าง sporangium และ filament ทั้งบริเวณ intercalary swelling ตอนปลายหรือบนกิ่ง lateral branches สร้างสปอร์ที่เคลื่อนที่ไม่ได้และทั้ง 3 สกุลจะไม่พบการสร้างเส้นใยที่ชูขึ้นมาในอากาศ (aerial mycelium)

2.3 Actinoplanetes

แอกติโนมัยซีทในกลุ่มนี้มีทั้งสิ้น 5 สกุล ได้แก่ *Actinoplanes*, *Ampullariella*, *Pilimelia*, *Dactylosporangium* และ *Micromonospora* โดยส่วนมากเชื้อในกลุ่มนี้อยู่ในน้ำ เพราะสร้างสปอร์ที่สามารถเคลื่อนที่ได้ในน้ำในช่วงหนึ่งของวงจรชีวิต ซึ่งเชื้อที่มีการสร้างเส้นใยที่แข็งแรง ไม่พบการ

สร้างเส้นใยอากาศหรือมีการสร้างน้อย สปอร์เคลื่อนที่ได้ภายในอับสปอร์ (sporangia หรือ vesicles) ซึ่งมีการพัฒนาให้ไปอยู่ที่ส่วนปลายของ sporangiophore มีทั้งขนาดสั้นและยาว สปอร์มักถูกสร้างอยู่ใน sporangium ที่ถูกปกคลุมไว้ด้วยกิ่งก้านที่แตกหัก หรืออาจเป็นเส้นใยของ sporogenous hyphae ตรงหรือขดเป็นเกลียว ส่วนของ multispore sporangia มีหลายรูปร่าง ได้แก่ เชื้อในสกุล *Actinoplanes*, *Ampullariella*, *Pilimelia* และ *Dactylosporangium* ยกเว้น *Micromonospora* ที่สร้างสปอร์ที่ไม่เคลื่อนที่ (nonmotile spore) สร้างสปอร์แบบเดี่ยวๆ ไม่มีก้านหรือมีเพียงสั้นๆ มักพบรวมเป็นกลุ่ม มีลักษณะกลม รูปไข่หรือวงรี ผนังหนบางบางครั้งพบตุ่มหรือหนามที่ผนัง และลักษณะสำคัญของเชื้อในกลุ่มนี้คือ เจริญโดยไม่มีการแตกหัก มีการแตกกิ่งก้านแล้วสร้างสปอร์เป็นสายอยู่บนเส้นใยที่มีผนังกั้น ผนังเซลล์เป็นแบบ III (meso – DAP และ OH – DAP) และมีน้ำตาลในเซลล์เป็น type D (Xylose และ Arabinose)

2.4 Streptomycetes และเชื้อในสกุลที่เกี่ยวข้อง

แอกติโนมัยซีทในกลุ่มนี้มีทั้งสิ้น 5 สกุล ได้แก่ *Streptomyces*, *Streptoverticillium*, *Kineosporia*, *Intrasporangium* และ *Sporichthya* ลักษณะที่สำคัญของเชื้อในกลุ่มนี้คือ เส้นใยอากาศเป็นแบบไม่มีผนังกั้น และเมื่อเจริญเต็มที่จะสร้างสปอร์เป็นลูกโซ่ มีจำนวนสปอร์ตั้งแต่ 3 ขึ้นไป เช่น *Streptomyces* และ *Streptoverticillium* ส่วนในสกุล *Kineosporia*, *Intrasporangium* และ *Sporichthya* มีการสร้างสายใยอากาศน้อย หรืออาจไม่สร้าง และสปอร์มีลักษณะที่แตกต่างกันออกไป ลักษณะบริเวณผิวของโคโลนีมีลักษณะขุ่นเมื่อมีอายุมาก สปอร์ที่สร้างขึ้นบริเวณผิวหน้าของเส้นใยมีลักษณะเป็นฝุ่นผง เชื้อในกลุ่มนี้มี L – DAP ผนังเซลล์เป็นแบบ I และมีไกลซีนเป็นองค์ประกอบ

2.5 Maduromycetes

แอกติโนมัยซีทในกลุ่มนี้มีทั้งสิ้น 7 สกุล ได้แก่ *Actinomadura*, *Microbispora*, *Microtetraspera*, *Planobispora*, *Planomonospora*, *Spirillospora* และ *Streptosporangium* กลุ่มนี้เป็นพวกที่ต้องการอากาศในการเจริญ สร้างเส้นใยราบที่มีการแตกแขนง ไม่มีสปอร์ แต่มีเส้นใยที่ชูขึ้นมาในอากาศซึ่งมีการสร้าง arthrospore ที่มีลักษณะเป็นสายสั้น หรือใน sporangia ที่มี 1 ถึงหลายสปอร์ โดยพบว่าในสกุล *Microbispora* มีการสร้างสปอร์สายสั้นๆ แบบสองสปอร์ (disporous) ในสกุล *Actinomadura* มีการสร้างสปอร์แบบหลากหลาย ในบางสายพันธุ์มีการสร้างสปอร์ในอับสปอร์แบบเคลื่อนที่ได้ ได้แก่ *Planobispora*, *Planomonospora* และ *Spirillospora* ส่วนสายพันธุ์ที่มีการสร้างสปอร์แบบเคลื่อนที่ไม่ได้ ได้แก่ *Streptosporangium* ผนังเซลล์ของเชื้อในกลุ่มนี้เป็นแบบ III (meso– DAP) น้ำตาลในเซลล์เป็นแบบ type B คือน้ำตาล 3-O-methyl-D-galactose (madurose)

2.6 Thermomonospora และสกุลใกล้เคียง

แอกติโนมัยสีทในกลุ่มนี้มีทั้งสิ้น 4 สกุล ได้แก่ *Thermomonospora*, *Actinosynema*, *Nocardiopsis* และ *Streptoalloterichus* โดยพบว่า *Thermomonospora* สร้างสปอร์แบบเดี่ยว ส่วนเชื้อ *Actinosynema* และ *Nocardiopsis* สร้างสปอร์เป็นสาย และเชื้อในกลุ่มของ *Streptoalloterichus* สร้างสปอร์ภายในอับสปอร์ โดยเชื้อในกลุ่มนี้เป็นเชื้อที่ต้องการอากาศในการเจริญ และสร้างสปอร์อยู่บนเส้นใยที่แตกกิ่งก้านชูขึ้นในอากาศผนังเซลล์เป็นแบบ III (meso-DAP) ไม่มี mycolic acid ในชั้นเปปทิโดไกลแคน แต่มี phospholipids, menaquinone และ fatty acids ซึ่งเป็นองค์ประกอบในเซลล์ที่แตกต่างกัน ทำให้สามารถจัดกลุ่มได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่มี MK-9 (H₄, H₆ และ H₈) เป็น isoprenologes เช่น *T. sensu stricto*, *T. curvata* เป็นต้น กลุ่มที่มี MK-9 (H₂) และ MK-9(III, VIII-H₄) เป็น isoprenologes เช่น *T. chromogena*, *T. mesophila* และกลุ่มสุดท้ายเป็นกลุ่มที่มี MK-10(H₆ และ H₈) เป็น isoprenologes เช่น *T. alba*, *T. fusa* และ *T. mesoviformis* เป็นต้น

2.7 Thermoactinomycetes

ในกลุ่มนี้มี *Thermoactinomyces* เพียงสกุลเดียว เป็นพวกที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง สร้างสปอร์เดี่ยวซึ่งเป็นเอ็นโดสปอร์อย่างแท้จริง ทนความร้อนได้ดี และมีคุณสมบัติของเอ็นโดสปอร์ของแบคทีเรียครบถ้วน มี G+C Content ต่ำกว่าพวกแอกติโนมัยสีททั่วไป แต่กลับมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับพวก *Bacillus* และมีการพัฒนาสร้างเส้นใยอย่างดี และมีสัณฐานวิทยาที่ต่างจากพวก *Bacillus*

นอกจากนี้กลุ่มนี้มีการสร้างเส้นใยชูขึ้นในอากาศพวก *T. dichotomus* มีสีเหลืองส่วนพวกอื่นจะมีสีขาวทุกสปีชีส์เป็นพวกที่ต้องการอากาศในการเจริญ และเป็นพวกที่ชอบย่อยสลายเศษซากและเกือบทั้งหมดเป็นพวกที่ชอบเจริญในที่ที่มีอุณหภูมิสูง เจริญได้ไม่ดีที่อุณหภูมิต่ำกว่า 45 องศาเซลเซียสผนังเซลล์กลุ่มนี้เป็นแบบที่ III (meso-DAP) แต่จะไม่มีลักษณะของน้ำตาลและ amino acid ส่วน menaquinone เป็นแบบไม่อิมิตัวเช่น MK-7 หรือ MK-9 ในสปอร์มี dipicolinic acid อยู่ด้วย

2.8 กลุ่มอื่นๆ

แอกติโนมัยสีทในกลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่ยังหาความสัมพันธ์กับแอกติโนมัยสีทกลุ่มอื่นๆไม่ได้ ทำให้ไม่สามารถจัดเข้าอยู่ในกลุ่มอื่นได้ มี 4 สกุล ประกอบด้วย *Glycomyces*, *Kibdelosporangium*, *Kitasatosporia* และ *Saccharothrix* โดยพบว่าทุกสกุลมีการสร้างสปอร์บนสายใยอากาศ ดังนั้นสามารถสรุปลักษณะที่สำคัญของแอกติโนมัยสีทดังแสดงในตารางที่ 3 และการจัดจำแนกแอกติโนมัยสีทดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 3 ลักษณะที่สำคัญของแอกติโนมัยสีททั้ง 7 กลุ่ม

Table 3. Characteristic of 7 groups of actinomycetes.

Group	Cell wall type	Cell sugar patterns	Mol % G+C	Sporangia
Nocardioforms	I	A	59-79	-
Multilocular sporangia	III	B,C,D	57-75	+ / -
Actinoplanetes	II	D	71-73	+
Streptomycetes	I	-	69-78	-
Maduromycetes	III	B,C	64-74	+ / -
Thermomonospora	III	major C	64-73	-
Thermoactinomycetes	III	C	52-55	-

ที่มา : Glazer และ Nikaido (1994)

ตารางที่ 4 การจัดจำแนกกลุ่มของแอกติโนมัยสีทใน Order Actinomycetales

Table 4. Classification of actinomycetes in Order Actinomycetales.

Order	Families	Genera
Actinomycetales	Actinomycetaceae	
	Micrococcaceae	
	Bogoriellaceae	<i>Bogoriella</i>
	Rarobateraceae	<i>Rarobacter</i>
	Sanguibacteraceae	<i>Sanguibacter</i>
	Brevibacteriaceae	<i>Brevibacterium</i>
	Cellulomonadeceae	<i>Cellulomonas</i> <i>Oerskovia</i>

ที่มา : Stackbrandt และคณะ (1997)

ตารางที่ 4 (ต่อ)

Table 4. (Cont.)

Order	Families	Genera
Actinomycetales	Dermabacteraceae	<i>Dermabacter</i>
		<i>Brachybacterium</i>
	Dermatophilaceae	<i>Dermatophilus</i>
	Dermacoccaceae	
	Intrasporangiaceae	
	Jonesiaceae	<i>Jonesia</i>
	Microbacteriaceae	
	Beutenbergiaceae	<i>Beutenbergia</i>
	Promicromonosporaceae	<i>Promicromonospora</i>
	Corynebacteriaceae	<i>Corynebacterium</i>
	Dietziaceae	<i>Dietzia</i>
	Gordoniaceae	<i>Gordonia</i>
		<i>Skermania</i>
	Nocardiaceae	<i>Nocardia</i>
		<i>Rhodococcus</i>
	Williamsiaceae	<i>Williamsia</i>
	Micromonosporaceae	
	Propionibacteriaceae	
	Nocardioidaceae	
	Pseudonocardiaceae	
Actinosynnemataceae		
Streptomycetaceae		
Streptosporangiaceae		

ที่มา : Stackbrandt และคณะ (1997)

ตารางที่ 4 (ต่อ)

Table 4. (Cont.)

Order	Families	Genera
Actinomycetales	Nocardiopsaceae	<i>Nocardiopsis</i> <i>Thermobifida</i>
	Thermomonosporaceae	
	Frankiaceae	<i>Frankia</i>
	Geodermatophilaceae	
	Microspheraceae	
	Sporichthyaceae	<i>Sporichthya</i>
	Acidothermaceae	<i>Acidothermus</i>
	Kineosporiaceae	
	Glycomycetaceae	<i>Glycomyces</i>

ที่มา : Stackbrandt และคณะ (1997)

3. แอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากทะเล

แอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากทะเลสามารถแยกได้จากความลึกในระดับที่แตกต่างกัน และแอคติโนมัยสีทที่แยกได้โดยส่วนใหญ่มาจากตะกอนดิน อาจเนื่องมาจากแอคติโนมัยสีทเป็น จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายอินทรีย์วัตถุได้ดี ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แอคติโนมัยสีทที่พบในทะเลที่ระดับความลึกต่างๆ

Table 5. Marine actinomycetes isolated at various depth.

Depth	Group of actinomycetes	Location	References
0-100 m.	<i>Streptomyces halstedii</i>	Christchurch, New Zealand	Jiang <i>et al.</i> , 1997
	<i>Streptomyces</i> sp.	Lorne, Australia	Capon <i>et al.</i> , 2000

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Table 5. (Cont.)

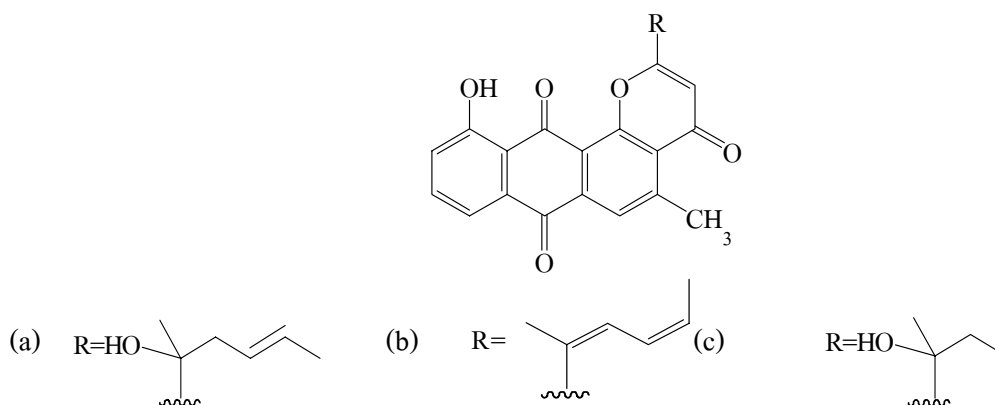
Depth	Group of actinomycetes	Location	References
0-100 m.	<i>Nocardiosis dasonvillei</i>	Kauai Island, USA	Schumacher <i>et al.</i> ,2001
	<i>Streptomyces</i> sp.	Oahu Island, USA	Schumacher <i>et al.</i> ,2003
	<i>Salinospora tropica</i>	Bahamas	Feling <i>et al.</i> ,2003
	<i>Streptomyces albogriseolus</i>	Papau New Guinea	Stritzke <i>et al.</i> ,2004
	Family Micromonosporaceae	Papau New Guinea	Magarvey <i>et al.</i> ,2004
	<i>Salinispora</i> sp.	Bahamas	Kim <i>et al.</i> ,2003
	<i>Streptomyces</i> sp.	Guam	Miller <i>et al.</i> ,2007
	<i>Salinispora arenicola</i>	Guam	Williams <i>et al.</i> ,2007
100-200 m.	<i>Verrucosispora</i> sp.	Japan	Riedlinger <i>et al.</i> , 2004
	<i>Streptomyces</i> sp.	California, USA	Soria-Mercado <i>et al.</i> ,2005
> 500 m.	<i>Streptomyces</i> sp.	Not report	Schumacher <i>et al.</i> ,1995
	<i>Streptomyces coelicolor</i>	New Zealand	Mukku <i>et al.</i> ,2000
	<i>Norcardioforms</i> sp.	Pacific Ocean	Shin <i>et al.</i> ,2003
	<i>Streptomyces</i> sp.	Bahamas	Cho <i>et al.</i> ,2006
	<i>Salinispora pacifica</i>	North Pacific Ocean	Oh <i>et al.</i> , 2006

4. สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งที่ได้จากแอคติโนมัยซีทที่ได้จากทะเล

สารในกลุ่มที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งจัดได้ว่าเป็นสารที่มีความสำคัญมากกลุ่มหนึ่ง เนื่องจากในปัจจุบันพบได้ว่าสาเหตุหลักของการตายของประชากรโลก นั้นคือโรคมะเร็ง และโรคมะเร็งก็เป็นอีกโรคหนึ่งที่มีความสามารถในการดื้อยา ทำให้ไม่สามารถที่จะรักษาโรคที่เกิดขึ้นให้หายขาดได้ และยารักษาโรคมะเร็งที่ใช้อยู่ในปัจจุบันมีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยสูง จึงได้มีความพยายามในการค้นหาสารชนิดใหม่ๆ เพื่อนำมาใช้ในการรักษาโรคเหล่านี้ ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากแอคติโนมัยซีทที่มาจากทะเล และมีรายงานเกี่ยวกับสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งจาก

แอกติโนมัยส์ที่ได้จากทะเลดังแสดงตามรายงานดังต่อไปนี้ และสามารถสรุปสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งจากแอกติโนมัยส์ที่ได้จากทะเลดังแสดงในตารางที่ 6

Schumacher และคณะ (1995) แยก *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ PC1/B2 จากตะกอนดินที่ระดับความลึก 4,680 เมตร โดยวิธี serial dilution จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าเชื้อที่แยกได้สามารถสร้างสปอร์สีเหลืองขาวบนเส้นใยที่ชูขึ้นในอากาศ และมี arthrospore แบบ sheathed chain สีเหลืองปานกลาง ที่มีจำนวน 20-30 สปอร์ต่อสายใน substrate mycelium เชื้อชนิดนี้สามารถสร้างสารได้ 3 ชนิด โดยเป็นสารชนิดใหม่ในกลุ่ม pluramycin ที่เรียกว่า γ -indomycinone (ภาพที่ 9a) และอีก 2 ชนิดคือสารที่มีรายงานก่อนหน้านี้คือ rubiflavinone C-1 (ภาพที่ 9b) และ β -indomycinone (ภาพที่ 9c) จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งพบว่า rubiflavinone C-1 มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (KB cell) โดยมีค่า MIC น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.001 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 9 สูตรโครงสร้าง pluramycin (a), rubiflavinone C-1 (b) และ β -indomycinone (c)

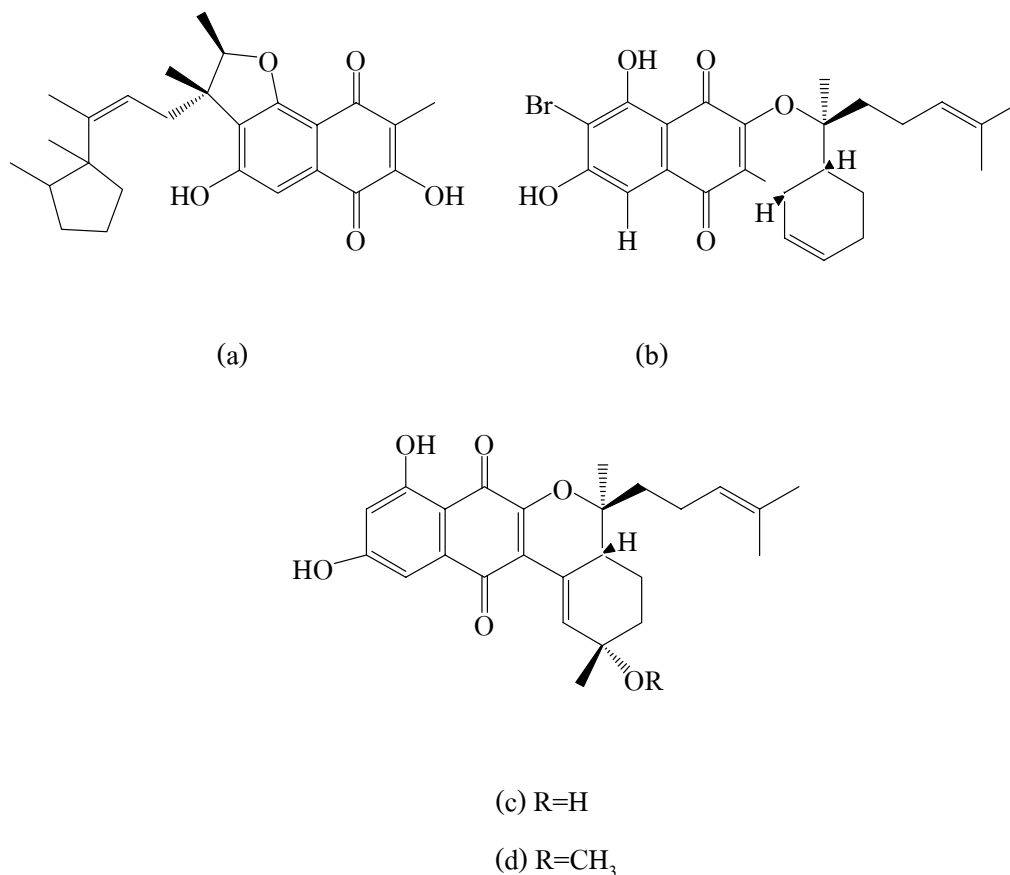
Figure 9. Chemical structures of pluramycin (a), rubiflavinone C-1 (b) and β -indomycinone

(c).

ที่มา: Schumacher และคณะ (1995)

Hardt และคณะ (2000) แยกแอกติโนมัยส์สายพันธุ์ CNH-099 จากตะกอนดินที่ระดับความลึก 1 เมตร บริเวณ Batiqitos Lagoon ทางตอนเหนือของเมืองซานดิเอโก รัฐแคลิฟอร์เนีย ประเทศสหรัฐอเมริกา เชื่อดังกล่าวสามารถสร้างสารชนิดใหม่คือ neomarinone (ภาพที่ 10a) และสารที่เป็นอนุพันธ์อีก 3 ชนิด คือ isomarinone (ภาพที่ 10b), hydroxy-debromomarinone (ภาพที่ 10c) และ methoxydebromomarinone (ภาพที่ 10d) โดยจัดอยู่ในกลุ่ม ses-qui-terpene ร่วมกับ polyketide-derived carbon skeleton สารดังกล่าวทั้งหมดมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของ

เซลล์มะเร็งได้ปานกลาง โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ (HCT-116 colon carcinoma) ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 8.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 10 สูตรโครงสร้าง neomarinone (a), isomarinone (b), hydroxy- debromomarinone (c) และ methoxydebromomarinone (d)

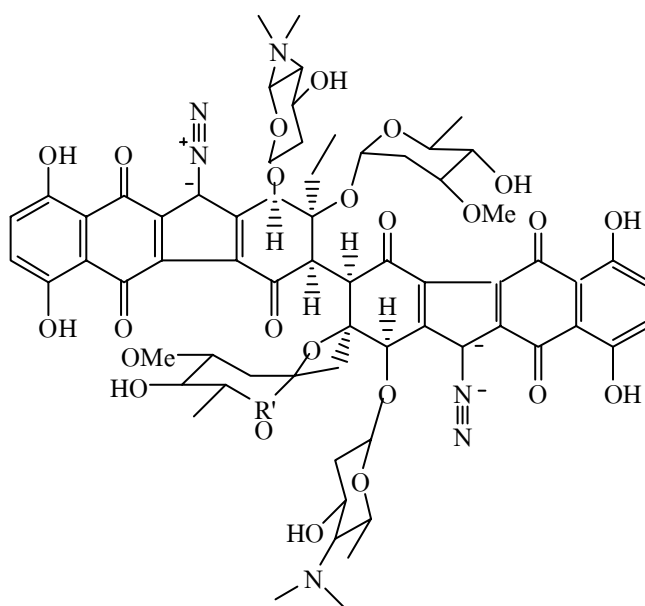
Figure 10. Chemical structures of neomarinone (a), isomarinone (b), hydroxy- debromomarinone (c) and methoxydebromomarinone (d).

ที่มา: Hardt และคณะ (2000)

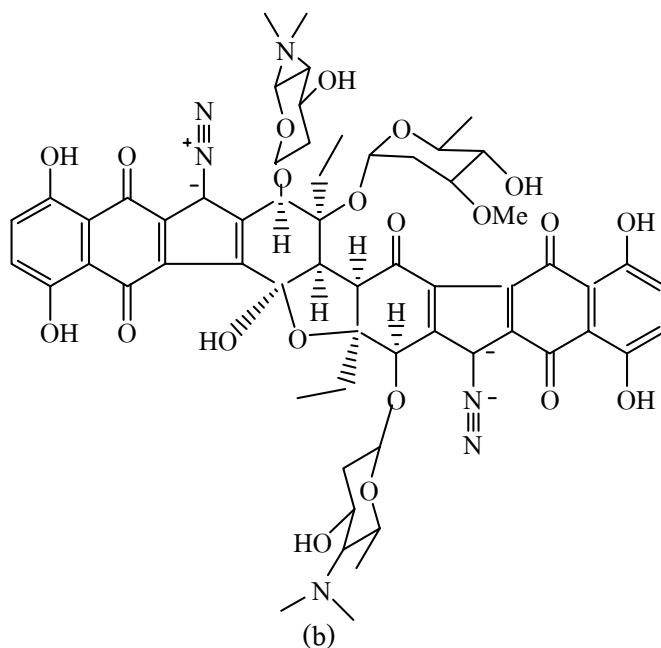
Zheng และคณะ (2000) ทำการแยกแอกติโนมัยสีทจากสัตว์ทะเลที่ไม่มีกระดูกสันหลัง เช่น sea hare, sea anemone และพืชทะเลชนิดอื่นๆ ซึ่งแอกติโนมัยสีทที่แยกได้ส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่ม *Streptomyces* sp. และ *Micromonospora* sp. โดยเลี้ยงแอกติโนมัยสีทในอาหารเหลวก่อนที่จะนำมาสกัดน้ำเลี้ยงรวมทั้งตัวเซลล์ จากนั้นสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทจะได้สารสกัดหยาบ เมื่อทดสอบฤทธิ์ชีวภาพของสารสกัดจากแอกติโนมัยสีทโดยเลือกแบบสุ่ม พบว่ามีสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ถึง 43.6% และเมื่อทดสอบคุณสมบัติ cytotoxic activity โดยวิธี MTT assay

และ DNA target activity ในเซลล์ P-388 lymphocytic leukemia และเซลล์มะเร็งลำไส้ (KB cells, HLF cells และ CNE cells) พบว่ามีสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์ดังกล่าว 20% และมีฤทธิ์ inducing ต่อเซลล์ดังกล่าวเพียง 3%

He และคณะ (2001) แยกแอดิโนมัคซีทสายพันธุ์ LL-371366 พบว่าเป็นเชื้อสายพันธุ์ *Micromonospora lomaivitiensis* จากการทดลองเลี้ยงเชื้อดังกล่าวในอาหารที่มีน้ำตาลและเรซิน HP20 สามารถแยกสาร lomaviticins A (ภาพที่ 11a) และ B (ภาพที่ 11b) ได้จากสารสกัดหยาบที่ถูกดูดซับไว้ด้วย เรซิน ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์พบว่า lomaviticins A และ B สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และ *Enterococcus faecium* ได้และจากการทดสอบการป้องกันการทำลาย DNA โดยวิธี Biochemical Induction Assay (BIA) พบว่า lomaviticins A และ B สามารถป้องกันการทำลาย DNA ได้ โดยมีค่า MIC น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร อีกทั้งพบว่า lomaviticins A ยังมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้อีกด้วย (IC_{50} เท่ากับ 0.01-98.0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)



(a)

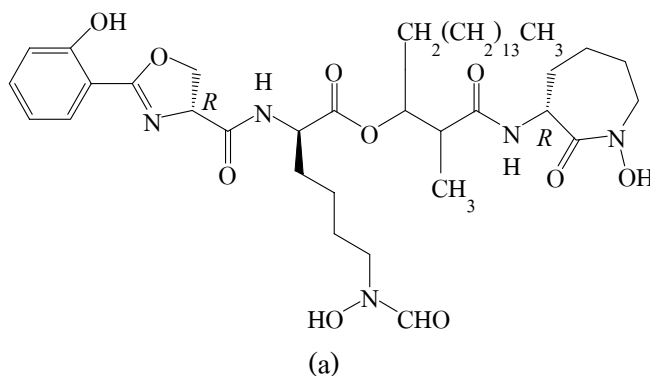


ภาพที่ 11 สูตรโครงสร้าง lomaviticins A (a) และ B (b)

Figure 11. Chemical structures of lomaviticins A (a) and B (b).

ที่มา: He และคณะ(2001)

Tsuda และคณะ (2005) ได้ทำการสกัดสารจากเชื้อ *Nocardia brasiliensis* สายพันธุ์ IFM 0995 ได้สารชนิดใหม่ คือ Brasilibactin A (ภาพที่ 12a) ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย ได้แก่ *Micrococcus luteus* และ *Staphylococcus aureus* ที่ MIC เท่ากับ 0.73 และ 4.5 mg/mL ตามลำดับ และสารชนิดนี้ยังมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด murine leukemia L1210 และ เซลล์มะเร็งชนิด epidermoid carcinoma KB cells ที่ IC_{50} เท่ากับ 0.02 และ 0.04 μ g/mL ตามลำดับ

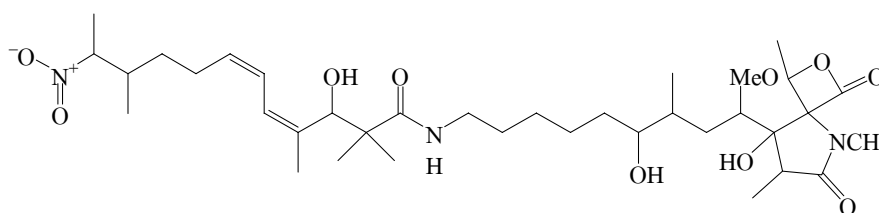


ภาพที่ 12 สูตรโครงสร้าง Brasilibactin A (a)

Figure 12. Chemical structure of Brasilibactin A (a).

ที่มา: Tsuda และคณะ (2005)

Manam และคณะ (2005) ได้ทำการแยกเชื้อสายพันธุ์ *Streptomyces nodosus* (NPS007994) จากตะกอนดินบริเวณ Scripps Canyon, La Jolla, California โดยพบว่าเชื้อสายพันธุ์นี้สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ สารนี้มีชื่อว่า Lajollamycin (ภาพที่ 13a) สามารถยับยั้งได้ทั้งกิจกรรมการคือยาของเชื้อแบคทีเรีย (*Staphylococcus aureus* - methicillin resistant, *Streptococcus pneumoniae* - penicillin resistant, *Enterococcus faecium* - vancomycin resistant โดยมีค่า MIC เท่ากับ 5, 1.5 และ 20 $\mu\text{g/mL}$) และความไวต่อยาของเชื้อแบคทีเรีย (*Staphylococcus aureus* - methicillin sensitive, *Streptococcus pneumoniae* - penicillin sensitive, *Enterococcus faecalis* - vancomycin sensitive โดยมีค่า MIC เท่ากับ 4, 2 และ 14 $\mu\text{g/mL}$) ซึ่งสารชนิดนี้จัดเป็นสารปฏิชีวนะในกลุ่มของ nitro-tetraene spiro- β -lactone- β -lactam antibiotic รวมทั้งยังสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิด Murine melanoma cell line B16-F10 ที่ EC_{50} เท่ากับ 9.6 μM .



(a)

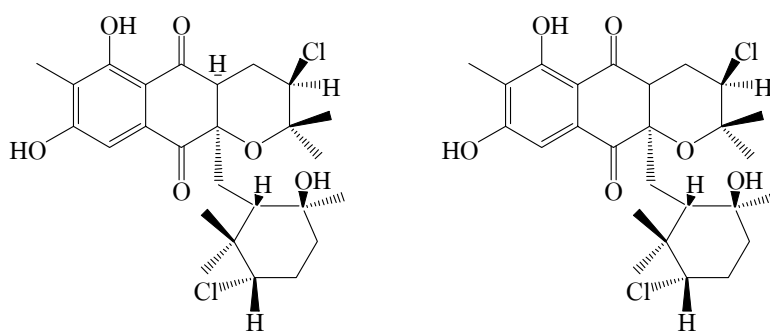
ภาพที่ 13 สูตรโครงสร้าง Lajollamycin (a)

Figure 13. Chemical structure of Lajollamycin (a).

ที่มา: Manam และคณะ (2005)

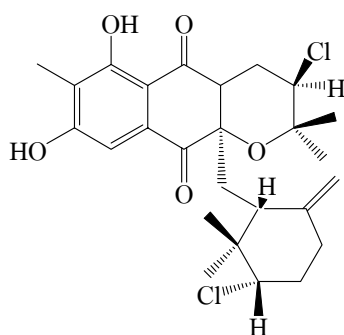
Soria-Mercado และคณะ (2005) ได้ทำการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากตะกอนดินที่เก็บบริเวณ Lajolla รัฐแคลิฟอร์เนีย ที่ระดับความลึก 152 เมตร เมื่อวิเคราะห์โดยใช้แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากทะเลสาบ CNQ-525 และพบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์นี้เป็นเชื้อ *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ใหม่ ที่อยู่ในกลุ่ม MAR4 เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อสารพันธุ์นี้ในอาหารเหลวที่มีเรซิน Amberlite XAD-7 บรรจุอยู่ โดยเลี้ยงเป็นระยะเวลา 9 วัน จากนั้นสกัดสารที่อยู่ในเรซินด้วยตัวทำละลายอะซีโตน พบสาร Terpenoid Chloro-Dihydroquinone ชนิดใหม่ 3 ชนิด (ภาพที่ 14a-c) และยังมีสารอีก 2 ชนิด (ภาพที่ 14d, e) ที่จัดได้ว่าเป็นสารชนิดนี้แต่มีคลอรีนเป็นสารประกอบอยู่ในโครงสร้างของสาร Terpenoid Chloro-Dihydroquinone นี้ด้วย สาร

Terpenoid Chloro-Dihydroquinone (ภาพที่ 14a-e) เมื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง ด้วยวิธีMTT assay ในการวิเคราะห์ พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ชนิด HCT-116 ที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 2.40, 0.97 และ 1.84 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และพบว่าสารดังกล่าวมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ที่มีค่า MIC เท่ากับ 1.95, 15.6, 1.95 และ 1.90 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (MRSA) ที่มีค่า MIC เท่ากับ 3.90, 15.6, 1.95 และ 3.90 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

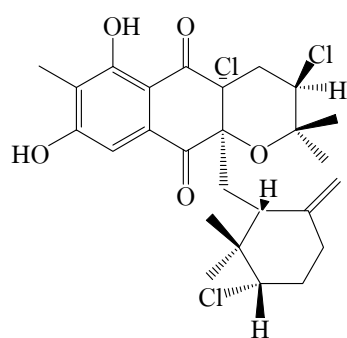


(a)

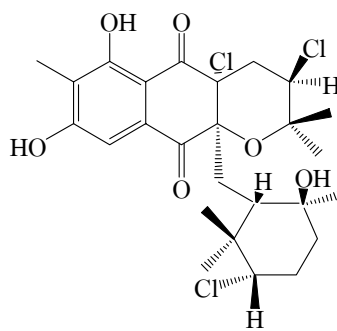
(b)



(c)



(d)



(e)

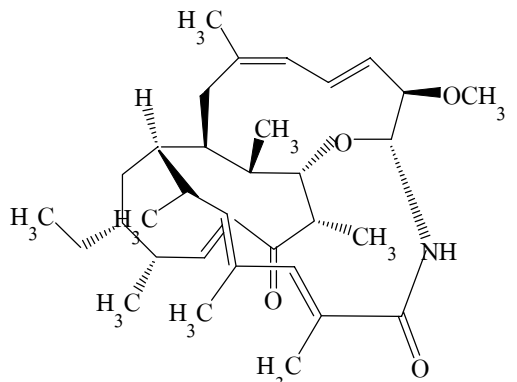
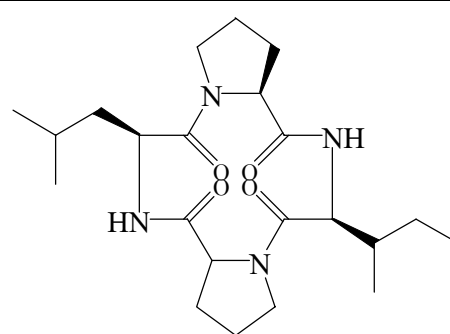
ภาพที่ 14 สูตรโครงสร้าง Terpenoid Chloro-Dihydroquinone (a-e)

Figure 14. Chemical structures of Terpenoid Chloro-Dihydroquinone (a-e).

ที่มา: Soria-Mercado และคณะ (2005)

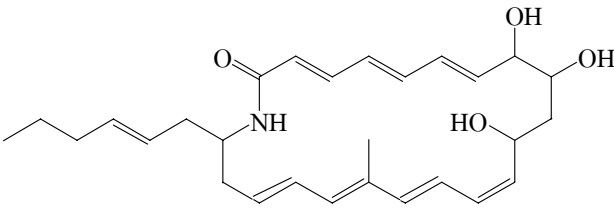
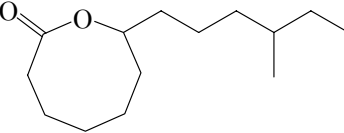
ตารางที่ 6. สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งจากแอคติโนมัยซีทที่ได้จากทะเล

Table 6. Cytotoxic compounds from marine derived actinomycetes.

Microorganism	Source	Structure	Application	Reference
<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	<i>Halichoeres bleekeri</i> (The gastro-intestinal tract of the marine fish)	 <p>Halichomycin</p>	Antitumor	Takahashi <i>et al.</i> , 1994
<i>Nocardioforms</i> sp.	Marine sediment	 <p>MKN-349A</p>	Anticancer	Chin <i>et al.</i> , 2003

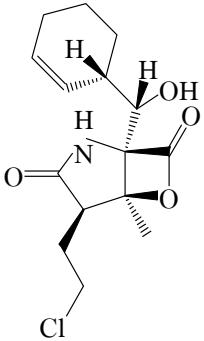
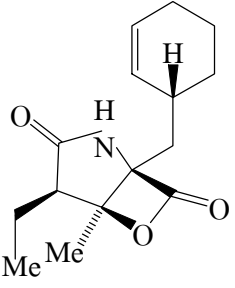
ตารางที่ 6. (ต่อ)

Table 6. (Cont.)

Microorganism	Source	Structure	Application	Reference
<i>Streptomyces aureovorticillatus</i>	Marine sediment		Anticancer	Mitchell <i>et al.</i> , 2004
Aureovorticillactam				
<i>Streptomyces albogriseolus</i>	Mangrove sediment, Papua New Guinea		Anticancer	Stritzke <i>et al.</i> , 2004
Caprolactones				

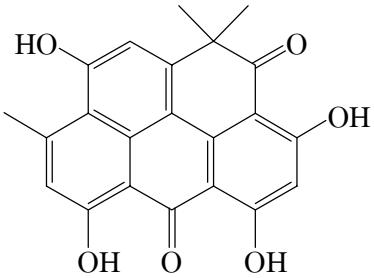
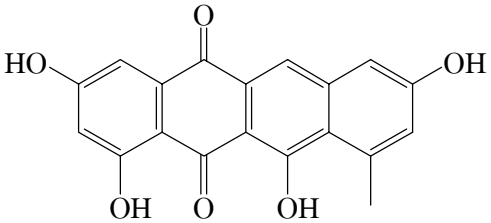
ตารางที่ 6. (ต่อ)

Table 6. (Cont.)

Microorganism	Source	Structure	Application	Reference
<i>Salinospora tropica</i>	Marine sediments	 <p>Salinosporamide A</p>	Antitumor (Proteasome Inhibitor)	Marcherla <i>et al.</i> , 2005
<i>Salinospora tropica</i> (strain CNB-392)	Marine sediments	 <p>Salinosporamide B</p>	Anticancer	Williams <i>et al.</i> , 2005

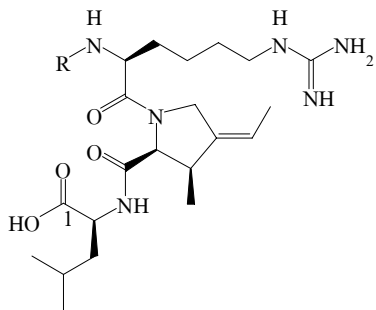
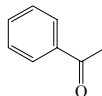
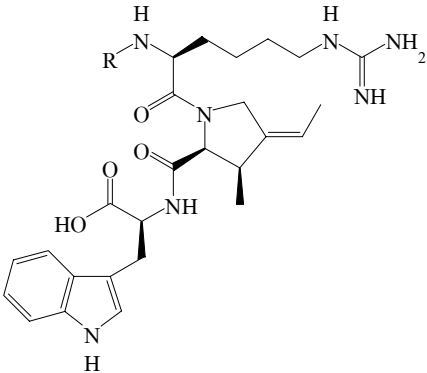
ตารางที่ 6. (ต่อ)

Table 6. (Cont.)

Microorganism	Source	Structure	Application	Reference
<i>Streptomyces corchorusii</i> AUBN ₁ /7	Marine sediment Bay of Bengal, India	 <p>Resistomycin</p>	Cytotoxic	Adinarayana <i>et al.</i> , 2006
		 <p>Tetracenomycin D</p>		

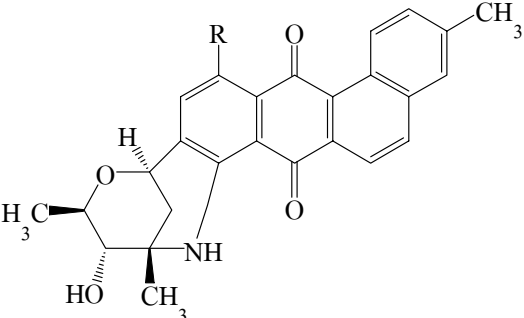
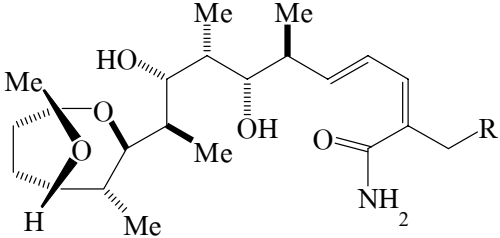
ตารางที่ 6 (ต่อ)

Table 6 (Cont.)

Microorganism	Source	Structure	Application	Reference
<i>Nocardiopsis lucentensis</i>	Marine sediment Little San Salvador island	 <p>Lucentamycin A (1) R= </p>  <p>Lucentamycin B</p>	Cytotoxic	Cho <i>et al.</i> , 2007

ตารางที่ 6 (ต่อ)

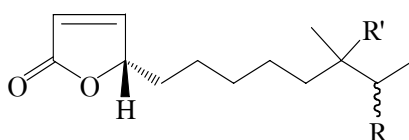
Table 6. (Cont.)

Microorganism	Source	Structure	Application	Reference
<i>Streptomyces</i> sp.	Marine-sediments	 <p data-bbox="1032 791 1279 817">Marmycin A (1) R=H</p> <p data-bbox="1032 847 1279 873">Marmycin B (2) R=Cl</p>	Cytotoxic	Martin <i>et al.</i> , 2007
<i>Streptomyces arenicola</i>	No report	 <p data-bbox="1032 1198 1279 1224">Saliniketal A (1) R=H</p> <p data-bbox="1032 1254 1279 1279">Saliniketal B (2) R=OH</p>	Cancer chemoprevention (Ornithine Decarboxylase)	Williams <i>et al.</i> , 2007

5. สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียซึ่งได้จากแอคติโนมัยสิทที่ได้จากทะเล

นอกเหนือจากสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆแล้วนั้น ยังพบว่าแอคติโนมัยสิทสามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้หลายชนิดรวมถึงสารชนิดใหม่หลายชนิดที่ซึ่งผลิตจากแอคติโนมัยสิทที่ได้จากทะเลดังรายงานต่อไปนี้ และสามารถสรุปสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียชนิดต่างดังแสดงในตารางที่ 7 รวมถึงสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ เช่น สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ Lanosterol, สารยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ chymase เป็นต้นดังแสดงในตารางที่ 8

Mukku และคณะ (2000) ค้นพบสารในกลุ่ม antimycin ทั้งหมด 8 ชนิด โดยเป็นสารที่รายงานแล้ว 4 ชนิด และเป็นสารกลุ่มบิวทิโนไลด์ชนิดใหม่อีก 3 ชนิด ได้แก่ 4,10-dihydroxy-10-methyl-dodec-2-en-1,4-olide (ภาพที่ 15a) และสาร diastereomeric 4,11-dihydroxy -10-methyl-dodec-2-en-1,4-olides (ภาพที่ 15b) จากน้ำหมักของ *Streptomyces coelicolor* สายพันธุ์ B5632 ในอาหารเหลว YMG และสารคีโตบิวทิโนไลด์คือ 4-hydroxy-10-methyl-11-oxo-dodec-2-en-1,4-olide (ภาพที่ 15c) จากน้ำหมักของ *Streptomyces coelicolor* สายพันธุ์ B3497 ในอาหารเหลว YMG โดยที่เชื้อทั้งสองสายพันธุ์ดังกล่าวแยกได้จากตะกอนดินโคลนบริเวณป่าชายเลน เมือง Auckland ประเทศนิวซีแลนด์ และจากการทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ พบว่า 4-hydroxy-10-methyl-11-oxo-dodec-2-en-1,4-olide ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Mucor miehei* (Tu284), *Streptomyces viridochromogenes* (Tu57) ได้



(a) R=H, R=OH

(b) R=OH, R=H (diastereometric structure)

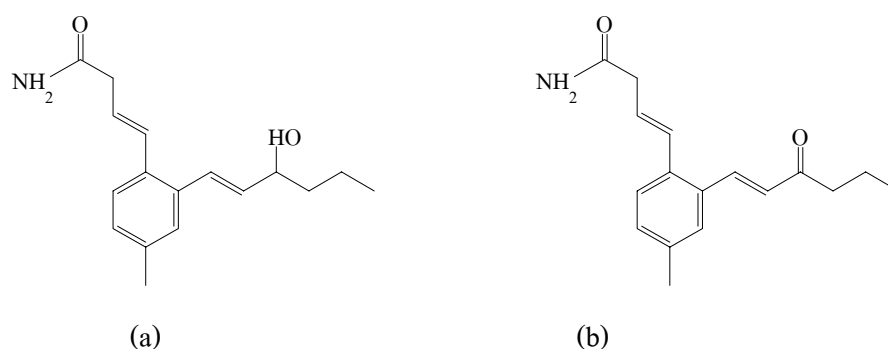
(c) R = $\begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} \end{matrix}$, R=H

ภาพที่ 15 สูตรโครงสร้าง 4,10-dihydroxy-10-methyl-dodec-2-en-1,4-olide(a), สาร diastereomeric 4,11-dihydroxy -10-methyl-dodec-2-en-1,4-olides (b) และสาร 4-hydroxy-10-methyl-11-oxo-dodec-2-en-1,4-olide (c)

Figure 15. Chemical structures of 4,10-dihydroxy-10-methyl-dodec-2-en-1,4-olide(a), diastereomeric 4,11-dihydroxy -10-methyl-dodec-2-en-1,4-olides (b) and 4-hydroxy-10-methyl-11-oxo-dodec-2-en-1,4-olide (c).

ที่มา: Mukku และคณะ (2000)

Capon และคณะ (2000) ได้ทำการแยกสาร lorneamides A (ภาพที่ 16a) และ B (ภาพที่ 16b) ซึ่งเป็นสารอะโรมาติก เอไมด์ชนิดใหม่ที่จัดอยู่ในกลุ่ม tri-alkyl-substituted benzenes ได้จากการเลี้ยงแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ MST-MA190 ที่แยกจากตัวอย่างทรายของชายหาดบริเวณเมือง Lorne รัฐวิกตอเรีย ประเทศออสเตรเลีย เมื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารดังกล่าวพบว่า lorneamides A สามารถยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* (LD₅₀ เท่ากับ 50.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

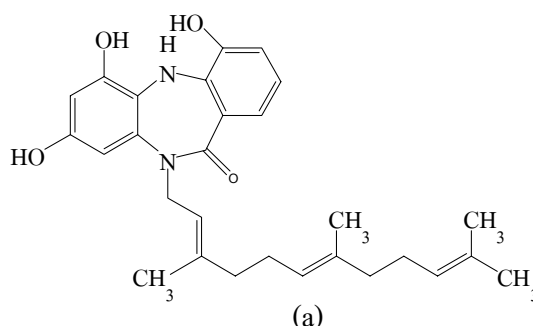


ภาพที่ 16 สูตรโครงสร้าง lorneamides A (a) และ B (b)

Figure 16. Chemical structures of lorneamides A (a) and B (b).

ที่มา: Capon และคณะ (2000)

Charan และคณะ (2004) ได้ทำการแยกเชื้อ *Micromonospora* sp. สายพันธุ์ DPJ12 จากเพรียงหัวหอม *Didemnum proliferum* ในบริเวณเกาะ Shishijima ประเทศญี่ปุ่น โดยเลี้ยงในอาหารเหลวที่บรรจุเรซินชนิด HP20 เลี้ยงเป็นระยะเวลา 9 วัน หลังจากนั้นสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล ได้สารในกลุ่ม Dibenzodiazepine alkaloid ซึ่งพบว่าเป็นสารกลุ่มใหม่ที่มีชื่อว่า Diazepinomycin (ภาพที่ 17a) มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียได้ดี

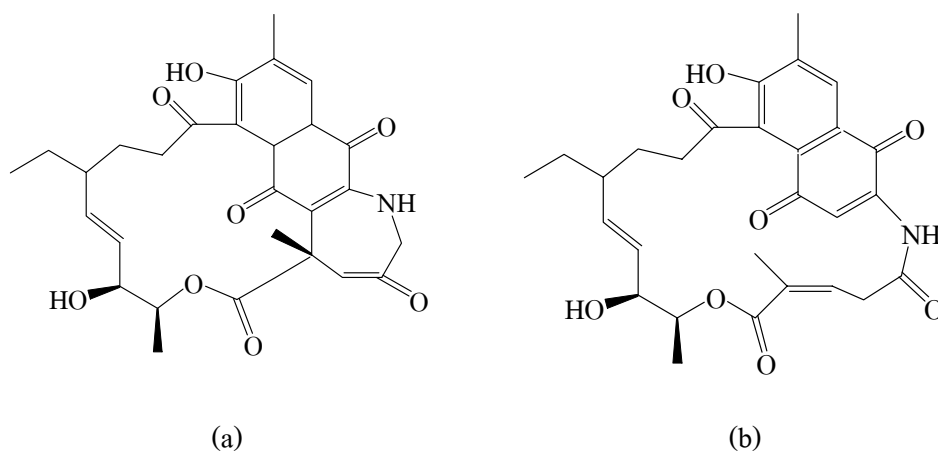


ภาพที่ 17 สูตรโครงสร้าง Diazepinomycin (a)

Figure 17. Chemical structure of Diazepinomycin (a).

ที่มา: Charan และคณะ (2004)

Cai และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษาเชื้อสายพันธุ์ *Streptomyces hygroscopicus* ATCC25293 เป็นเชื้อที่สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมการเจริญของแบคทีเรีย คือ Hygrocin A (ภาพที่ 18a) และ Hygrocin B (ภาพที่ 18b) ซึ่งสารทั้งสองชนิดนี้จัดว่าเป็นสารใหม่ที่จัดอยู่ในกลุ่มของ ansamycin macrolides ซึ่งเป็นสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีความน่าสนใจ เช่น Streptovaricins, Naphthomycins และ rafamycins ซึ่งสาร Hygrocin A มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus faecalis*1362/3, *Haemophilus influenzae*, *Niesseria gonorheae*, *Escherichia coli* 1074, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* และ *Aspergillus niger* ที่ค่า MIC เท่ากับ 128, 16, 128, 128, 64, 128, 128,16 และ 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนสาร Hygrocin B มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus faecalis*1362/3, *Haemophilus influenzae*, *Niesseria gonorheae*, *Escherichia coli* 1074, *Candida albicans* ซึ่งค่า MIC ของเชื้อทดสอบทุกตัวมีค่าเท่ากับ 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วน *Aspergillus fumigatus* และ *Aspergillus niger* มีค่า MIC เท่ากับ 32 และ 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ



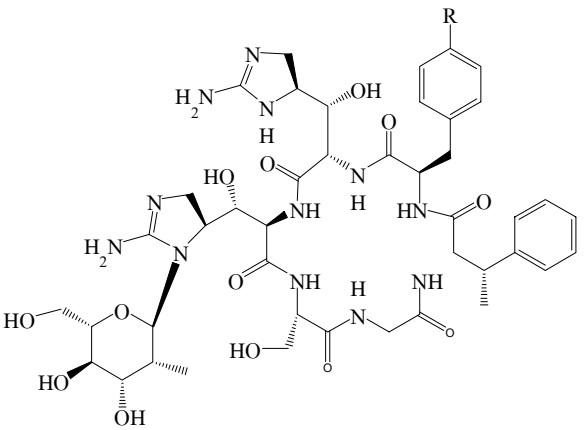
ภาพที่ 18. สูตรโครงสร้าง Hygrocin A (a) และ Hygrocin B (b)

Figure 18. Chemical structures of Hygrocin A (a) and Hygrocin B (b).

ที่มา: Cai และคณะ (2005)

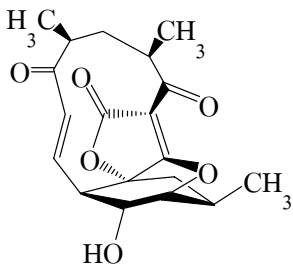
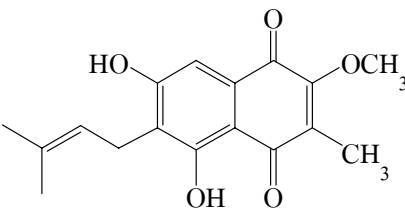
ตารางที่ 7 สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียจากแอคติโนมัยซีทที่ได้จากทะเล

Table 7. Antimicrobial compounds from marine derived actinomycetes.

Microorganism	Source	Structure	Activity	Reference
<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Not reported	 <p>R=Mannosyl disaccharide R=H R=Mannosyl disaccharide-2-isovaleryl R=Mannosyl disaccharide-3-isovaleryl R=Mannosyl disaccharide-4-isovaleryl</p> <p style="text-align: center;">Mannopeptimycins</p>	Antibacterial	Singh <i>et al.</i> , 2003

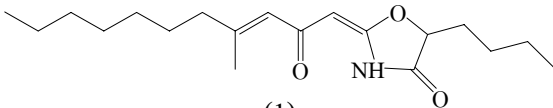
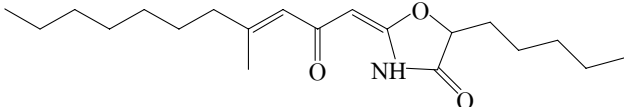
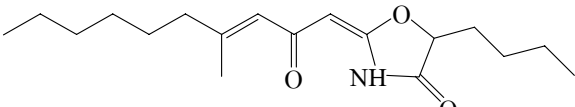
ตารางที่ 7 (ต่อ)

Table 7. (Cont.)

Microorganism	Source	Structure	Activity	Reference
<i>Verrucosispora</i> sp.	Marine sediment The Sea of Japan	 <p>Abyssomicin C</p>	Antibacterial	Riedlinger <i>et al.</i> , 2004
<i>Streptomyces fumanus</i>	Not reported	 <p>Fumaquinone</p>	Antimicrobial	Charan <i>et al.</i> , 2005

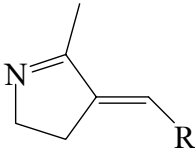
ตารางที่ 7 (ต่อ)

Table 7. (Cont.)

Microorganism	Source	Structure	Activity	Reference
<i>Marinispora</i> sp.	Marine sediments Cocos lagoon, Guam	 (1)	Antibacterial	Macherla <i>et al.</i> , 2007
		 (2)		
		 (3)		
		Lipoxazolidinones A(1), B(2), and C(3)		

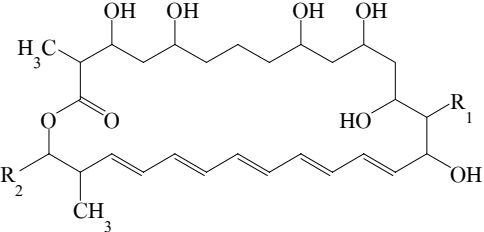
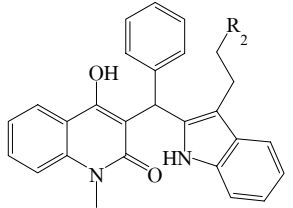
ตารางที่ 8 สารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากแอคติโนมัยสีทที่ได้จากทะเล

Table 8. Bioactive compounds from marine derived actinomycetes.

Microorganism	Source	Structure	Activity	Reference
<i>Streptomyces</i> sp.	Not reported	 <p>(A1) R=Isohexadecyl (A2) R=Isooctadecenyl (B1) R=Hexadecyl (B2) R=Octadecenyl</p> <p>Lanopylins A1, A2, B1 and B2</p>	Lanosterol synthase inhibitor	Sakano <i>et al.</i> , 2003

ตารางที่ 8 (ต่อ)

Table 8. (Cont.)

Microorganism	Source	Structure	Activity	Reference
<i>Streptomyces</i> sp. K99-5278	Soil sample Minato-ku, Tokyo	 <p>TakanawaeneA : R₁=H, R₂=CH₃ TakanawaeneB : R₁=CH₃, R₂= CH₂CH₃ TakanawaeneC : R₁= CH₃, R₂=CH(CH₃)₂ AB023a : R₁=H, R₂=CH₃</p>	Antifungal Antibiotics	Kim <i>et al.</i> , 2003
<i>Dactylosporangium</i> sp.	Not reported	 <p>(V) R=Acetylamino (VI) R=Hydroxy Alkaloid SF-2809 V-VI</p>	Chymase Inhibitors	Tani <i>et al.</i> , 2004 (a) and Tani <i>et al.</i> , 2004 (b)

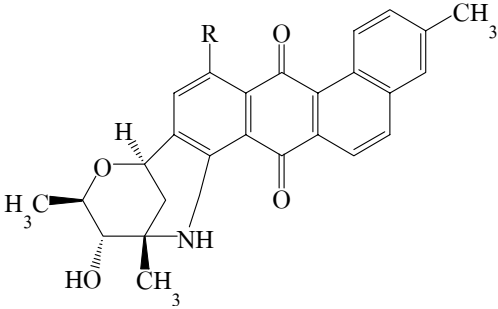
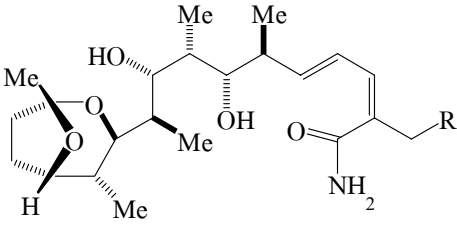
ตารางที่ 8 (ต่อ)

Table 8. (Cont.)

Microorganism	Source	Structure	Activity	Reference
<i>Dactyloporangium</i> sp.	Not reported		Chymase Inhibitors	Tani <i>et al.</i> , 2004 (a) and Tani <i>et al.</i> , 2004 (b)
		<p>(I) R=Acethylamino</p> <p>(III) R=Hydroxy</p>		
		<p>(II) R=Acethylamino</p> <p>(IV) R=Hydroxy</p>		
		Alkaloid SF-2809 I-IV		

ตารางที่ 8 (ต่อ)

Table 8. (Cont.)

Microorganism	Source	Structure	Activity	Reference
<i>Streptomyces</i> sp.	Marine-sediments	 <p data-bbox="1032 791 1279 817">Marmycin A (1) R=H</p> <p data-bbox="1032 850 1279 876">Marmycin B (2) R=Cl</p>	Cytotoxic	Martin <i>et al.</i> , 2007
<i>Streptomyces arenicola</i>	Not reported	 <p data-bbox="1032 1198 1279 1224">Saliniketal A (1) R=H</p> <p data-bbox="1032 1257 1279 1283">Saliniketal B (2) R=OH</p>	Antitumor (Ornithine Decarboxylase Induced Inhibitor)	Williams <i>et al.</i> , 2007

6. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพของแอคติโนมัยสีทที่ได้จากทะเล

6.1 ชนิดของเชื้อแอคติโนมัยสีท

แอคติโนมัยสีทสามารถผลิตสารได้มากมายหลายชนิดที่แตกต่างกันไปตามชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อตัวอย่างเช่น *Streptomyces* sp. สามารถผลิต Caprolactones, Chinikomycins, 3,6-disubstituted indoles และ Trioxacarcins ได้ ซึ่งสารดังกล่าวนอกจากจะสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ รวมถึงสามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียและยับยั้งการเกิดไข้มาลาเรียได้ และพบว่าแอคติโนมัยสีทในสกุลอื่นๆ สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดีเช่นกัน ตัวอย่างเช่น *Actinomadura* sp. สามารถผลิต IB-00208 และ *Salinispora tropica* สามารถผลิต Salinosporamide A เป็นต้น (Cascon *et al.*, 2003; Feling *et al.*, 2004) ซึ่งชนิดของเชื้อแอคติโนมัยสีทจะมีผลต่อการผลิตสารชนิดต่างๆที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง หรือสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

6.2 องค์ประกอบของอาหาร

เชื้อแอคติโนมัยสีทสามารถเจริญและสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ในอาหารที่แตกต่างกัน จากรายงานพบว่าแหล่งของสารอาหารที่เป็นที่นิยมใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสารที่มีฤทธิ์ดังกล่าว ได้แก่ แหล่งคาร์บอน อาทิเช่น glucose, starch, glycerol แหล่งไนโตรเจน อาทิเช่น asparagine, soybean meal, yeast extract, peptone แร่ธาตุ อาทิเช่น NaCl, CaCO₃, MgSO₄, K₂HPO₄ (Kala and Chandrika, 1993; Moore *et al.*, 1999)

Vasavada และคณะ (2006) ได้ทำการศึกษาเชื้อ *Streptomyces sannanensis* strain RJT-1 พบว่าเชื้อชนิดนี้สามารถผลิตเอนไซม์ออกนอกตัวเซลล์ (extracellular enzyme) ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับ amylase, protease, lipase และ cellulase สารที่ได้มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี เมื่อศึกษาองค์ประกอบของอาหารที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตสารปฏิชีวนะ ทดสอบโดยเปรียบเทียบการเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces sannanensis* strain RJT-1 บนอาหาร nutrient agar, starch agar, gelatin agar และ actinomycetes agar ที่มีร้อยละ 5 ของ NaCl พบว่าการเลี้ยงบน starch agar มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารของเชื้อชนิดนี้ได้ดี นอกจากนั้นได้ทำการศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม โดยทดสอบด้วยร้อยละ 1 ของ arabinose, xylose, glucose, sucrose และ lactose พบว่า glucose และ lactose เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารปฏิชีวนะ และทำการศึกษาแหล่งของไนโตรเจนที่เหมาะสม ทดสอบด้วยร้อยละ 1 ของ yeast extract, casaminoacid, peptone, casein, sodium sulphate, sodium nitrate และ ยูเรีย พบว่าพวก Inorganic nitrogen ได้แก่ sodium sulphate, sodium nitrate และ ยูเรีย จะให้ผลต่อการเจริญและผลิตสารได้

ดีกว่าพวก organic nitrogen จากข้อมูลข้างต้นสามารถนำมาเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่ทำให้ทราบถึงปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารปฏิชีวนะ

6.3 ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อและอัตราการให้อากาศ

เนื่องจากแอสคิโนมัลลิตเป็นแบคทีเรียที่มีความต้องการออกซิเจนเพื่อใช้ในกระบวนการเจริญของเซลล์ และการผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดต่างๆ ดังนั้นอัตราการให้อากาศจึงมีผลต่อการเจริญและการผลิตสารยับยั้งเซลล์มะเร็ง จากการรายงานพบว่าอัตราการให้อากาศจะขึ้นอยู่กับปัจจัยที่สำคัญ 2 ปัจจัย คือ อัตราส่วนอาหารต่อปริมาตรภาชนะบรรจุ โดยส่วนใหญ่แล้วอัตราส่วนนี้จะอยู่ระหว่าง 1:2.5 - 1:5 ดังแสดงในตารางที่ 9 และความเร็วรอบในการเขย่าโดยแตกต่างกันไปในแต่ละรายงาน โดยอยู่ในช่วงตั้งแต่ 90-400 รอบต่อนาที (Stritzke *et al.*, 2004; Cai *et al.*, 2005)

ตารางที่ 9 อัตราส่วนปริมาตรอาหารต่อปริมาตรภาชนะบรรจุของภาชนะทั้ง 3 ชนิด

Table 9. Ratios of cultivation medium volume per container volume.

	Containers		
	Flask	Scintillation vial	24 - well plate
Volume of media (ml)	100	8	2
Container volume (ml)	250	20	5
Ratio	1 : 2.5	1 : 2.5	1.: 2.5

ที่มา : คัดแปลงจาก Manam และคณะ (2005) และ Cai และคณะ (2005)

Katzer และคณะ (2001) ศึกษาการผลิตสารทุติยภูมิของเชื้อแอสคิโนมัลลิต 3 สายพันธุ์ โดยพบว่า *Streptomyces* sp. X01/4/100 ผลิตสารในกลุ่ม Diketopiperazine เชื้อ *Streptomyces colillmus* X5623 ผลิตสาร naphthomycin และเชื้อ *Streptomyces* sp. X18097 ผลิตสาร naphthopyranomycin โดยใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการผลิตสารคือ 7, 6 และ 7 วัน ตามลำดับ และจากกราฟการเจริญในช่วงวันที่ 4-5 ของการเลี้ยงเชื้อแอสคิโนมัลลิตจะให้ผลผลิตสูงสุด อัตราเร็วในการให้อากาศที่เหมาะสมต่อการผลิตสารของ *Streptomyces* sp. X01/4/100 คือ 240 รอบต่อนาที สำหรับเชื้อ *Streptomyces colillmus* X5623 คือ 180 และ 240 รอบต่อนาที และเชื้อ *Streptomyces* sp. X1809 คือ 240 รอบต่อนาที จากปัจจัยดังกล่าวทำให้สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพได้ในปริมาณที่สูงขึ้น

6.4 พีเอชและอุณหภูมิ

แอกติโนมัยสีทสามารถเจริญได้ที่พีเอชเป็นกลาง (neutrophilic) พีเอชที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ในช่วง 6.0-8.0 พบว่าเมื่อพีเอชลดต่ำกว่า 6.0 จะมีผลทำให้โคโลนีมีขนาดเล็กลง และจะไม่มี การสร้างเส้นใยที่ชูขึ้นในอากาศ (erial mycelium) เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง สำหรับพีเอชที่เหมาะสม ต่อการผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งของแอกติโนมัยสีท คือ 7.3- 7.8 (Goodfellow *et al.*, 1984; Charan *et al.*, 2004; Stritzke *et al.*, 2004)

จากรายงานพบว่าแอกติโนมัยสีทสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิในช่วง 10 – 60 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตสาร secondary metabolites คือ 26 – 28 องศาเซลเซียส (Stritzke *et al.*, 2004; Manam *et al.*, 2005)

Shik และคณะ (2000) ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของต่อการเจริญของเชื้อ *Streptomyces* sp. NS 13239 พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 28 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 และความเข้มข้นร้อยละ 3 ของโซเดียมคลอไรด์ จากสภาวะข้างต้นทำให้เชื้อ *Streptomyces* sp. NS 13239 สามารถผลิตสารที่มี ฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของจุลินทรีย์แกรมบวกได้ดี โดยเฉพาะ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) แต่ไม่สามารถยับยั้งกิจกรรมของจุลินทรีย์พวกยีสต์และราได้

6.5 ผลของไอออนและน้ำทะเลในอาหารเลี้ยงเชื้อ

Mincer และคณะ (2002) ศึกษาผลของน้ำทะเล และ โซเดียมคลอไรด์ที่มีผลต่อการเจริญของ แอกติโนมัยสีท โดยใช้อาหาร M1 ในการแยกเชื้อซึ่ง M1 มีส่วนประกอบของ starch, yeast extract และ peptone ทำการเติมน้ำทะเลในอาหาร M1 (M1/natural seawater), การเติมน้ำที่ไม่มีไอออนใน อาหาร M1 (M1/DI water), การเติมน้ำทะเลเทียมและ โซเดียมไอออนในอาหาร M1 (M1/artificial seawater Na⁺), การเติมน้ำทะเลเทียมและโพแทสเซียมไอออนในอาหาร M1 (M1/artificial seawater K⁺) และการเติมน้ำที่ไม่มีไอออน และ 1 M โซเดียมไอออนในอาหาร M1 (M1/DI+1M Na⁺) พบว่า แอกติโนมัยสีททุกสายพันธุ์สามารถเจริญได้ดีทั้งในอาหารที่มีส่วนประกอบของน้ำ ทะเล (M1/natural seawater) และน้ำทะเลเทียม (M1/artificial seawater Na⁺) ซึ่งแสดงว่าแอกติโนมัย สีทที่แยกจากทะเลในการศึกษานี้ มีความต้องการ โซเดียมไอออนเพื่อใช้ในการเจริญ

Imada และคณะ (1994) ทำการศึกษาการผลิตสารยับยั้งเอนไซม์ β -glucosidase จากเชื้อ แอกติโนมัยสีทที่แยกจากตะกอนดินบริเวณอ่าวโตเกียว อ่าว Sagami และ Ensyu nada ที่ความลึก 1,500 เมตร พบว่าเชื้อในกลุ่มของ *Streptomyces* sp. strain 62 สามารถผลิตสารยับยั้งเอนไซม์ β -glucosidase เพื่อใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง (antitumor) และ โรคเอดส์ (anti-HIV) ซึ่งเชื่อดังกล่าว สามารถเจริญได้ดีและสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงเมื่อเลี้ยงในสภาวะที่มีน้ำทะเลและเจริญได้ดีเมื่อม ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์สูงถึงร้อยละ 6 และสามารถเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 13.5-41

องศาเซลเซียสและเมื่อเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยสิทในกลุ่มนี้ในสถานะที่ไม่มีน้ำทะเลพบว่าเชื้อไม่สามารถเจริญได้

7. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบที่ได้จากแอกติโนมัยสิทที่แยกได้จากทะเลที่มีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

จากรายงานการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งของสารสกัดหยาบ เพื่อนำผลการทดลองที่ได้ใช้ในการพิจารณาคัดเลือกแอกติโนมัยสิทที่แยกได้จากทะเลจำนวนทั้งสิ้น 5 สายพันธุ์ ที่ได้การคัดกรองเบื้องต้นแล้วว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ ได้แก่ มะเร็งช่องปาก (KB), มะเร็งเต้านม (MCF-7), มะเร็งลำไส้ (HT-29) และมะเร็งปากมดลูก (HeLa) (สุภานันท์ แซ่ลิ่ม, 2548) ที่มีร้อยละของการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่สูงกว่า 70 ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ร้อยละของการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งของสารสกัดหยาบที่ได้จากแอกติโนมัยสิทที่แยกได้จากทะเลทั้ง 5 สายพันธุ์ที่เลี้ยงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร

Table 10. Cytotoxicity of selected marine derived actinomycetes crude extracts.

Strain	Cultivation media	Location	Source	Cytotoxicity (%)			
				MCF-7	HeLa	HT-29	KB
CNA002	A	Losin, Pattani	Algae	50.42	24.36	-13.07	17.32
	B			5.79	-15.64	5.85	-18.9
	C			-13.17	-5.79	9.3	-26.79
	D			92.53	58.32	72.73	53
CNA003	A	Tao Island, Surattani	Sponge	-4.35	-41.39	3.61	6.43
	B			57.27	6.93	74.52	24.35
	C			-2.97	-33.24	22.49	13.41
	D			85.7	95.75	84.33	94.66

ที่มา : สุภานันท์ แซ่ลิ่ม (2548)

ตารางที่ 10 (ต่อ)

Table 10. (Cont.)

Strain	Cultivation media	Location	Source	Cytotoxicity (%)			
				MCF-7	HeLa	HT-29	KB
CNA031	A	Losin, Pattani	Sponge	88.79	88.56	77.78	83.33
	B			90.21	88.66	42.3	78.46
	C			97.49	97.22	94.94	97.58
	D			84.65	79.91	33.22	65.37
CNA039	A	Toa Island, Surattani	Algae	85.87	72.62	93.11	96.02
	B			51.25	-11.01	16.64	-35.22
	C			93.56	44.73	95.76	97.89
	D			76.34	88.31	78.06	61.96
CNA053	A		Sponge	92.82	99.26	93.35	98.14
	B			90.87	97.75	92.76	97.58
	C			89	97.19	88.02	98.2
	D			91.09	97.17	91.27	97.62

ที่มา : สุภานันท์ แซ่ลิ้ม (2548)

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาแนวทางที่เหมาะสมในการเลือกภาชนะในการเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยสีทในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง
2. การคัดเลือกแบคทีเรียแอกติโนมัยสีทจากทะเลที่สามารถสร้างสารยับยั้งเซลล์มะเร็ง
3. การคัดเลือกสารสกัดหยาบที่ผ่านการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง และศึกษาองค์ประกอบเบื้องต้นของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่คัดเลือกได้

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

วัสดุ อุปกรณ์

1. เซลล์แอกติโนมัยไซต์ที่แยกได้จากทะเล

เซลล์แอกติโนมัยไซต์ที่แยกได้จากทะเลในประเทศไทย จากการศึกษาของสุภานันท์ แซ่ลิ้ม (2548) จำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ CNA002, CNA003, CNA031, CNA039 และ CNA053 ซึ่งผ่านการคัดเลือกแล้วว่าผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง 4 ชนิด คือ KB, HT-29, MCF-7 และ HeLa และเซลล์แอกติโนมัยไซต์ที่แยกได้จากทะเลในคลังเก็บรักษาของห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเลจำนวน 21 สายพันธุ์ ได้แก่ CNA083, 086, 088, 089, 090, 091, 092, 093, 095, 097, 098, 099, 100, 101, 102, 103, 104, 112, 113, 145 และ 146

2. เซลล์มะเร็ง

เซลล์มะเร็ง 4 ชนิด (ภาคผนวก ค) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร.สุปรียา ยืนยง สวัสดิ์ ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ได้แก่

- มะเร็งเยื่อช่องปาก (Human oral cancer; KB)
- มะเร็งเต้านม (Breast adenocarcinoma; MCF-7)
- มะเร็งลำไส้ (Human colon adenocarcinoma; HT-29)
- มะเร็งปากมดลูก (Human cervical cancer; HeLa)

3. อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยสัที่แยกได้จากทะเล

3.1 อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยสัที่

อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยสัที่ในการวิจัยนี้ส่วนใหญ่ดัดแปลงมาจากสูตรอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยสัที่ที่มีการรายงานมาก่อนหน้าจำนวนทั้งหมด 4 สูตร (A, B, C และ D) ซึ่งองค์ประกอบและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแสดงในภาคผนวก ก

3.2 น้ำทะเล

น้ำทะเลที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อในการวิจัยนี้ นำมาจากชายทะเลบริเวณสถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง อ.เมือง จ.สงขลา โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และกรองด้วยผ้าขาวบางก่อนนำมาใช้งาน

4. สารเคมี

- Dichloromethane (LAB-SCAN, IRELAND)
- Ethyl acetate (LAB-SCAN, IRELAND)
- Methanol (LAB-SCAN, IRELAND)

อุปกรณ์

- ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร
- ขวดรูปทรงกระบอก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร ความสูง 5.5 เซนติเมตร
- 24-well plate ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.55 เซนติเมตรความสูง 1.76 เซนติเมตร, ยี่ห้อ nuncTM, พลาสติกชนิด polystyrene
- เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Shaker incubation) รุ่น VS-8480SRN
- เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze dryer) รุ่น Dura Dry ยี่ห้อ FTS systems, USA
- เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporator) (Buchi)
- เครื่องวัดไมโครเพลท (Microplate reader) รุ่น Power Wave_x ยี่ห้อ Biotek, USA
- กล้องจุลทรรศน์แบบ Inverted microscope (Olympus, CKX41)
- ตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ (Thermo Forma 3111)
- TLC Alumina Sheets silica gel 60 F₂₅₄ (Fluka)

วิธีการทดลอง

1. การเปรียบเทียบวิธีการเลี้ยงแอกติโนมัยสีทเพื่อผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง

ในขั้นตอนนี้เป็นการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยสีทสายพันธุ์ที่ผ่านการทดสอบมาก่อนหน้านี้แล้วว่าสามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ ในระดับขวดเขย่าขนาด 250 มิลลิลิตร (ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร) จำนวน 5 สายพันธุ์ (CNA 002, CNA 003, CNA 031, CNA 039, CNA 053) (สุภานันท์ แซ่ลิ้ม, 2548) โดยทำการเปรียบเทียบวิธีการเลี้ยงเชื้อที่ต่างกัน 3 แบบ คือ

(1) การเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยสีทใน 24-well plate ปริมาตรหลุมละ 5 มิลลิลิตร โดยมีปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละหลุมเท่ากับ 2 มิลลิลิตร

(2) การเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยสีทในขวดรูปทรงกระบอก ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่มีปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 8 มิลลิลิตร

(3) การเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยสีทในฟลasks ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 100 มิลลิลิตร (ชุดควบคุม)

โดยควบคุมอัตราส่วนของปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรของภาชนะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อแต่ละแบบให้มีอัตราส่วนเท่ากันคือ 1:2.5 ดังแสดงในตารางที่ 9 เพื่อเปรียบเทียบว่าวิธีการเลี้ยงเชื้อวิธีใดที่ให้ผลใกล้เคียงกับการเลี้ยงเชื้อในระดับขวดเขย่าขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งเป็นที่นิยมใช้อยู่ในปัจจุบัน โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อลดปริมาณของตัวทำละลาย และพื้นที่ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ ตลอดจนการเพิ่มประสิทธิภาพในขั้นตอนของการเตรียมตัวอย่างสำหรับทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง ซึ่งสามารถสรุปได้ดังภาพที่ 19

1.1 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น

นำเชื้อแอกติโนมัยสีทที่แยกได้จากทะเลซึ่งเป็นเชื้อบริสุทธิ์ที่เก็บไว้ในสารละลายกลีเซอรอลร้อยละ 50 ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร NA/SW เป็นระยะเวลา 7 วันหรือจนมีการเจริญของโคโลนี ในกรณีที่เชื้อเจริญได้ช้ากว่า 7 วัน เชื้อแอกติโนมัยสีทที่บริสุทธิ์ 2 หลูบ ถ่ายใส่ขวดเขย่าขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารในแต่ละสูตร A, B, C และ D ตามภาคผนวก ก ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ก่อนนำไปเขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

1.2 การเลี้ยงแอกติโนมัยสีทในภาชนะบรรจุซึ่งมีขนาดแตกต่างกัน 3 แบบ

1.2.1 การเลี้ยงแอกติโนมัยสีทในขวดเขย่า (Shaked flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร

เตรียมอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงแอกติโนมัยสีทแต่ละสูตร A, B, C และ D บรรจุลงในขวดเขย่าขนาด 250 มิลลิลิตร โดยมีปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อในแต่ละขวดเขย่าเท่ากับ 100 มิลลิลิตร จากนั้นทำการถ่ายกล้าเชื้อที่ได้จากการเตรียมกล้าเชื้อในข้อ 1.1 ลงในขวดเขย่าที่มีอาหารเหลวสูตรเดียวกัน โดยใช้ปริมาตรของกล้าเชื้อที่เติมลงไปคิดเป็นร้อยละ 5 ของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อในขวดเขย่า จากนั้นนำไปเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่องเขย่าชนิดที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็ว 220 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วัน

1.2.2 การเลี้ยงแอกติโนมัยสีทใน scintillation vial

เตรียมอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงแอกติโนมัยสีทสูตร A, B, C และ D บรรจุลงใน scintillation vial ขนาด 20 มิลลิลิตร โดยมีปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อในแต่ละหลอดเท่ากับ 8.0 มิลลิลิตร จากนั้นทำการถ่ายกล้าเชื้อที่ได้จากการเตรียมกล้าเชื้อในข้อ 1.1 ลงในหลอดที่มีอาหารสูตรเดียวกัน โดยใช้ปริมาตรของกล้าเชื้อคิดเป็นร้อยละ 5 ของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อในหลอด จากนั้นนำไปเลี้ยงเชื้อในเครื่องเขย่าชนิดที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็ว 220 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วัน

1.2.3 การเลี้ยงแอกติโนมัยสีทใน 24-well plate

เตรียมอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงแอกติโนมัยสีทสูตร A, B, C และ D บรรจุลงในแต่ละหลุมของ 24-well plate โดยมีปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อหลุมละ 2.0 มิลลิลิตร จากนั้นทำการถ่ายกล้าเชื้อที่ได้จากการเตรียมกล้าเชื้อในข้อ 1.1 ลงใน 24-well plate ที่มีอาหารเหลวสูตรเดียวกัน โดยใช้ปริมาตรของกล้าเชื้อคิดเป็นร้อยละ 5 ของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อในแต่ละหลุม จากนั้นนำไปเลี้ยงในเครื่องเขย่าชนิดที่สามารถควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ความเร็ว 220 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วัน

1.3 การเตรียมสารสกัดหยาบจากแอกติโนมัยสีท

นำอาหารเหลวและเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงในขวดเขย่าขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และอาหารเหลวและเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อใน Scintillation vial ปริมาตร 8 มิลลิลิตร และ 24-well plate ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เพื่อทำแห้งโดยใช้เครื่อง Freeze dryer จากนั้นสกัดสารตัวอย่างที่ผ่านการทำแห้งแล้วทั้งหมดซ้ำ 2 ครั้งด้วยเมทานอล (อัตราส่วน 1:1) นำส่วนของเมทานอลมารวมกันแล้วระเหยเอาเมทานอลออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศจนได้สารสกัดหยาบ

แห้ง นำไปหาน้ำหนักแห้งของสารสกัดหยาบที่ได้ เพื่อเตรียมเป็นสารละลายของสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 25.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในตัวทำละลายชนิด DMSO เก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง

1.4 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็ง (Skehan *et al.*, 1990)

1.4.1 การเตรียมเซลล์มะเร็งเพื่อใช้ทดสอบสารสกัดหยาบ

1.4.1.1 เลี้ยงเซลล์มะเร็งทั้ง 4 ชนิด คือ HeLa, HT-29, KB และ MCF-7 ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์มะเร็งชนิด EMEM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (มีส่วนผสมของร้อยละ 10 ของ newborn calf serum, penicillin G sodium 50 หน่วยต่อมิลลิลิตร, streptomycin sulphate 50 หน่วยต่อมิลลิลิตร และ amphotericin B 0.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) นำไปเลี้ยงใน CO₂ incubator ที่มีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีปริมาณความชื้นร้อยละ 95

1.4.1.2 เตรียมเซลล์แขวนลอย (cell suspension) ของเซลล์มะเร็งแต่ละชนิด โดยถ่ายอาหาร EMEM ที่อยู่ในขวดเพาะเลี้ยงออก แล้วทำการล้างเซลล์ที่เกาะอยู่ที่ผิวของก้นขวดด้วยสารละลาย Phosphate buffer saline (pH 7.4) ย่อยเซลล์มะเร็งออกเป็นเซลล์เดี่ยวๆ ด้วยสารละลาย Trypsin-EDTA ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยดูดสารขึ้นลงเบาๆ ด้วยปิเปตประมาณ 2-3 ครั้ง จากนั้นถ่ายสารละลาย Trypsin-EDTA ออกประมาณ 0.5 มิลลิลิตร ก่อนนำไปบ่มใน CO₂ incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วเติมอาหาร EMEM ปริมาตร 2 มิลลิลิตรลงในขวดเพาะเลี้ยง

1.4.1.3 นับจำนวนเซลล์มะเร็งในขวดเพาะเลี้ยงที่รอดชีวิต (viable cell) ที่ติดสี Trypan blue (ในกรณีที่เซลล์มีชีวิตจะไม่ติดสีและสังเกตได้ว่าเซลล์มีลักษณะใส แต่ถ้าเซลล์ตายจะติดสีน้ำเงิน) นับจำนวนเซลล์ด้วย hemocytometer คำนวณความเข้มข้นของเซลล์มะเร็ง ในสารแขวนลอยที่ได้ และทำการเจือจางเซลล์มะเร็งด้วยอาหาร EMEM เพื่อให้ได้สารแขวนลอยของเซลล์มะเร็งที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 3.0×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ถ่ายเซลล์ลงใน 96-well microtiter plate ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร (โดยมีจำนวนเซลล์เท่ากับ 3,000 เซลล์ต่อหลุม) นำเซลล์ไปเลี้ยงใน CO₂ incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) ร้อยละ 5 และมีปริมาณความชื้นร้อยละ 95 นาน 18-24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะผิวกันหลุมเป็น monolayer

1.4.1.4 เติมสารสกัดหยาบที่ต้องการทดสอบกับเซลล์มะเร็งทั้ง 4 ชนิด โดยเติมสารสกัดหยาบที่ละลายใน DMSO ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ซึ่งจะมีเนื้อสารสกัดหยาบเท่ากับ 200 ไมโครกรัมในแต่ละหลุม จากนั้นทำการเจือจางสารละลายตัวอย่างด้วยอาหาร EMEM ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายของสารสกัดหยาบลงไปหลุมละ 100

ไมโครลิตร เพื่อให้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดหยาบเป็น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร (ในกรณีที่ใช้ DMSO เป็นตัวทำละลายเมื่อทำการเจือจางด้วยอาหารเพาะเลี้ยง แล้วจะมีความเข้มข้นของ DMSO สูงสุดไม่เกินร้อยละ 0.5 ซึ่งไม่มีผลต่อการเจริญของเซลล์มะเร็ง (สุภานันท์ แซ่ลิ้ม, 2548)) นำไปบ่มใน CO₂ incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) ร้อยละ 5 และมีปริมาณความชื้นร้อยละ 95 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

1.4.2 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งโดยวิธี sulphorodamine B (SRB assay)

1.4.2.1 ทำการถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์มะเร็ง EMEM ในข้อ 1.4.1.4 ออกจาก 96-well microtiter plate โดยค่อยๆ ดูดอาหารออกจากอาหาร EMEM ใหม่ลงในแต่ละหลุมปริมาตรหลุมละ 200 ไมโครลิตร ปิดฝาอาหารขึ้นลงเบาๆ 2-3 ครั้ง ทั้งนี้ต้องระวังไม่ให้ส่วนปลายฝาปิดโดนเซลล์ที่เกาะอยู่บริเวณก้นหลุม หลังจากนั้นถ่ายอาหาร EMEM ออกเพื่อล้างเซลล์มะเร็งที่ตายออกไป และเติมอาหาร EMEM ลงไปใหม่ในแต่ละหลุมของ 96-well microtiter plate ปริมาตรหลุมละ 200 ไมโครลิตร แล้วนำ 96-well microtiter plate ไปบ่มต่อใน CO₂ incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) ร้อยละ 5 และมีปริมาณความชื้นร้อยละ 95 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

1.4.2.2 กำหนดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งโดยเทียบกับชุดควบคุมซึ่งไม่มีการเติมสารสกัดหยาบ โดยตรงเซลล์มะเร็งที่ยังมีชีวิตอยู่ในแต่ละหลุม ด้วยการเติมสารละลาย trichloroacetic acid ความเข้มข้นร้อยละ 0.4 ลงไป หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่ม 96-well microtiter plate ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นให้นำ 96-well microtiter plate ไปล้างด้วยน้ำสะอาด โดยการผ่านน้ำลงในแต่ละหลุมของ 96-well microtiter plate จากนั้นเทน้ำออกจาก 96-well microtiter plate แล้วทำซ้ำจำนวน 5 ครั้ง ในขั้นตอนนี้เซลล์ที่ตายเนื่องจากการยับยั้งของสารที่ทดสอบจะถูกล้างออกไป ทิ้งให้ 96-well microtiter plate แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติมสารละลาย ของ Sulphorodamine B ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.4 ซึ่งเตรียมในกรดแอสซิติค ความเข้มข้นร้อยละ 1 ลงไปหลุมละ 50 ไมโครลิตร เพื่อย้อมเซลล์มะเร็งที่รอดชีวิตและติดอยู่บริเวณก้นหลุม โดยตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วนำมาล้างด้วยสารละลายกรดแอสซิติค ความเข้มข้นร้อยละ 1 จำนวน 5 ครั้ง แล้วตั้งทิ้งไว้ให้ 96-well microtiter plate แห้งที่อุณหภูมิห้อง

1.4.2.3 เติมสารละลาย 10 mM tris base ลงในแต่ละหลุมของ 96-well microtiter plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อละลายสีของ Sulphorodamine B ที่ติดอยู่ออกจากเซลล์มะเร็ง โดยนำไปเขย่าบน gyratory shaker ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 20 นาที นำ 96-well microtiter plate ที่ได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสง UV ด้วยเครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 492

นาโนเมตร ค่าการดูดแสงที่วัดได้จะแปรผันตรงกับจำนวนเซลล์ที่ถูกตรึงไว้ในแต่ละหลุม นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาทำการคำนวณหาร้อยละของการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งจากสูตร

$$\text{ร้อยละของการรอดชีวิต} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม} - \text{ค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดสอบ}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม}} \times 100$$

2. การคัดเลือกรูปแบบวิธีการเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยสิต

นำผลการทดลองที่ได้วิธีการทั้ง 3 วิธีมาวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS 14.00 ด้วยวิธี one-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 0.05 โดยจะคัดเลือกวิธีการเลี้ยงเชื้อที่ให้ผลใกล้เคียงกับการเลี้ยงเชื้อในขวดเขย่าปริมาตร 250 มิลลิลิตร มากที่สุดซึ่งการเลี้ยงเชื้อวิธีนี้เป็นชุดควบคุม ในกรณีที่ไม่สามารถคัดเลือกวิธีการใดที่ให้ผลดังกล่าวจะคงใช้วิธีการเลี้ยงเชื้อตามแบบของชุดควบคุมในการทดลองขั้นตอนต่อไป

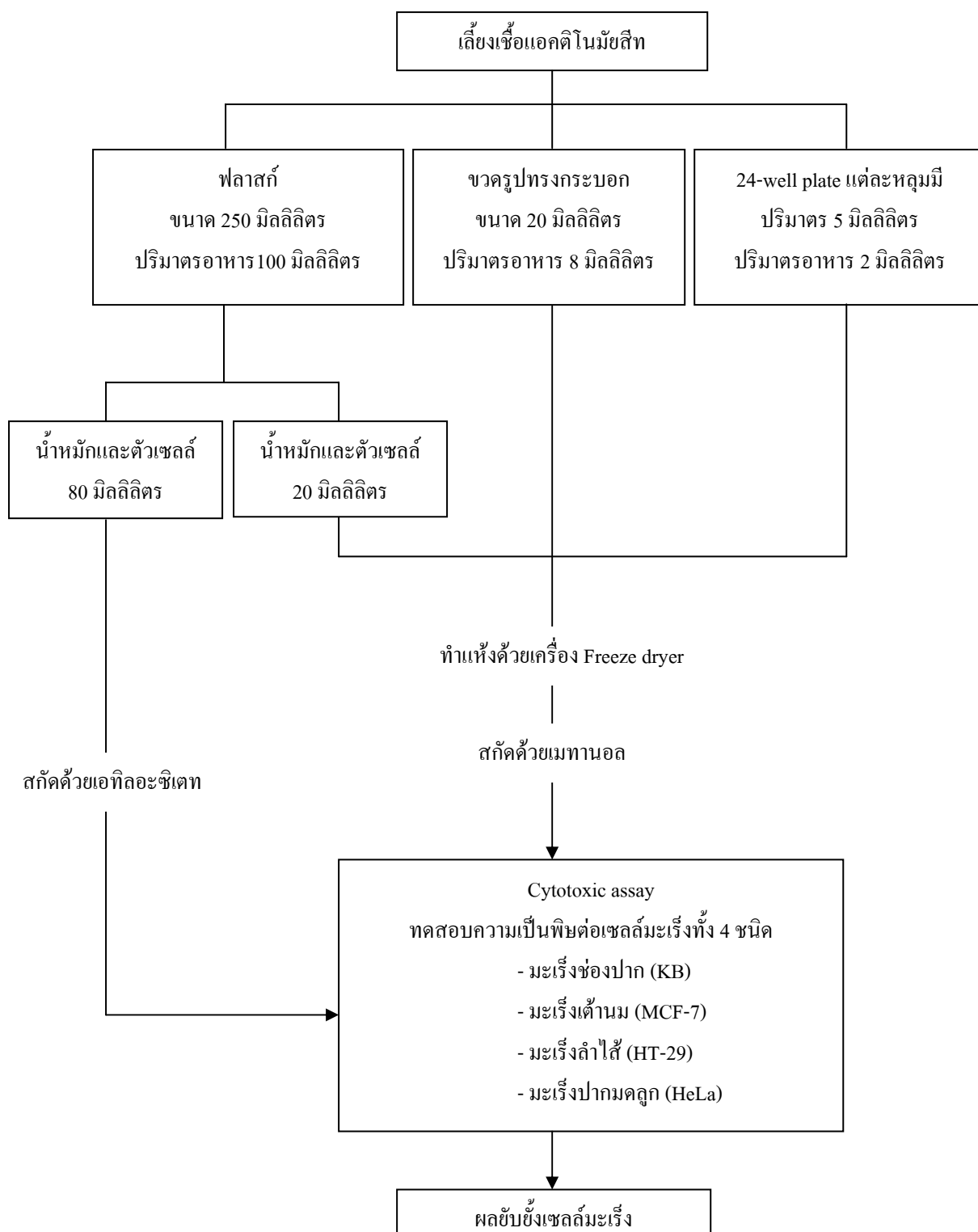
3. การเลี้ยงแอกติโนมัยสิตจำนวน 21 สายพันธุ์ ด้วยวิธีการที่คัดเลือกได้ข้างต้น

เมื่อคัดเลือกรูปแบบการเลี้ยงแอกติโนมัยสิตที่เหมาะสมได้แล้ว จึงนำเชื้อแอกติโนมัยสิตซึ่งเป็นเชื้อบริสุทธิ์ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล จำนวนทั้งหมด 21 สายพันธุ์ ได้แก่ CNA083, 086, 088, 089, 090, 091, 092, 093, 095, 097, 098, 099, 100, 101, 102, 103, 104, 112, 113, 145 และ 146 มาเลี้ยงเพื่อทดสอบการสังเคราะห์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งทั้ง 4 ชนิด ตามวิธีการที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น และขั้นตอนการทดลองเป็นไปตามไดอะแกรมสรุปการทดลองเลี้ยงแอกติโนมัยสิตในสภาวะต่างๆ และการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งดังแสดงในภาพที่ 19

4. การวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง โดยใช้เทคนิค Thin-Layer Chromatography (TLC)

คัดเลือกสารสกัดหยาบจากแอกติโนมัยสิตที่ให้ผลการยับยั้งเซลล์มะเร็งสูงกว่าร้อยละ 70 มาวิเคราะห์หาองค์ประกอบเบื้องต้นของสารสกัดหยาบ เพื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบของสารสกัดหยาบแต่ละตัวอย่าง โดยนำสารสกัดหยาบมาหยดลงบนแผ่น TLC ชนิด normal phase ที่มี silica gel 60 (MERCK) เป็น stationary phase และใช้ระบบตัวทำละลายที่มี dichloromethane และ methanol

ในอัตราส่วน 9 ต่อ 1 เป็นตัวทำละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) จากนั้นทำการตรวจสอบตำแหน่งของสารที่เป็นองค์ประกอบในแต่ละตัวอย่างบนแผ่น TLC ภายใต้รังสีอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และพิสูจน์เอกลักษณ์ขององค์ประกอบของสารสกัดหยาบโดยการใช้รีเอเจนต์ชนิดต่างๆที่มีความจำเพาะต่อหมู่ฟังก์ชันแต่ละชนิดในการทดสอบ เช่น การใช้สารละลาย vanillin ในกรดซัลฟิวริก เพื่อทดสอบสารในกลุ่ม terpenoids ซึ่งเมื่อนำแผ่น TLC ไปให้ความร้อนหากปรากฏสีม่วงแดงก็สามารถบอได้ว่ามีสารในกลุ่มนี้เป็นองค์ประกอบ สำหรับการพิสูจน์เอกลักษณ์ของกรดอะมิโน (amino acids) สามารถทำได้โดยใช้สารละลาย ninhydrin ในการทดสอบ ซึ่งหลังจากนำแผ่น TLC มาให้ความร้อนแล้วพบว่ามีสารกลุ่มดังกล่าวก็จะปรากฏสีม่วงแดง และการใช้ Wagner's reagent เพื่อทดสอบสารในกลุ่มแอลคาลอยด์ หลังจากนำแผ่น TLC ผ่านความร้อนหากมีสารกลุ่มนี้ก็จะปรากฏสีน้ำตาล (Jork *et al.*, 1990)



ภาพที่ 19 ไดอะแกรมสรุปการทดลองเลี้ยงแอคติโนมัยซีทในสภาวะต่างๆ และการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง

Figure 19. Diagram of actinomycetes cultivation and screening for cytotoxicity.

บทที่ 3

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเปรียบเทียบวิธีการเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยสีท เพื่อผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

ผลจากวิธีการเลี้ยงแอกติโนมัยสีททั้ง 3 รูปแบบ นั่นคือ การเลี้ยงในภาชนะย่อยส่วน ขวดรูปทรงกระบอก และ 24-well plate เพื่อผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง โดยเทียบกับชุดควบคุมที่เป็นการเลี้ยงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งจะนำเชื้อแอกติโนมัยสีทที่คัดเลือกแล้วจำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ CNA 002, CNA 003, CNA 031, CNA 039 และ CNA 053 (จากข้อมูลในตารางที่ 10) ทำการเลี้ยงในภาชนะทั้ง 3 รูปแบบ พบว่าสารสกัดหยาบที่ได้จากการเลี้ยงแอกติโนมัยสีทมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งทั้ง 4 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ผลการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่ได้จากแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากทะเลจำนวน 5 สายพันธุ์ ซึ่งเลี้ยงด้วยวิธีการต่างกัน

Table 11. Cytotoxicity against human cell lines of marine-derived actinomycetes extracts obtained from 3 different cultivation methods.

Actinomycetes	Method of cultivation	Media	Cytotoxicity (%)			
			MCF-7	HeLa	HT-29	KB
CNA002	Shake flask	A	97.22±1.72 ^{Aab}	NC	95.77 ^{Aa} ±2.00	NC
		B	84.82±5.84 ^{Aabc}	NC	89.70 ^{Aa} ±5.07	73.49±0.61 ^{Ac}
		C	100±0.00 ^{Aa}	NC	85.93 ^{Ba} ±1.77	85.67±0.33 ^{Bb}
		D	NC	NC	NC	NC
	Scintillation vial	A	NC	98.95±1.04 ^{Aa}	92.33 ^{Aa} ±5.26	NC
		B	NC	80.92±7.31 ^{Ab}	82.34 ^{Aa} ±7.04	NC
		C	NC	NC	79.84 ^{Aa} ±4.66	NC
		D	74.25±0.45 ^{Bc}	100±0.00 ^{Aa}	93.99 ^{ABa} ±4.89	NC
	24-well plate	A	NC	90.73±8.07 ^{Aab}	NC	88.26±4.91 ^{Ab}
		B	85.45±8.00 ^{Aabc}	83.47±7.93 ^{Aab}	NC	100±0.00 ^{Aa}
		C	77.73±3.12 ^{Cc}	100±0.00 ^{Aa}	NC	94.06±1.59 ^{Bab}
		D	83.12±7.95 ^{Bbc}	100±0.00 ^{Aa}	NC	94.78±2.30 ^{ABab}

ตารางที่ 11 (ต่อ)

Table 11. (Cont.)

Actinomycetes	Method of cultivation	Media	Cytotoxicity (%)			
			MCF-7	HeLa	HT-29	KB
CNA003	Shake flask	A	81.88±4.90 ^{Ab}	95.21±2.40 ^{Aab}	94.85±2.78 ^{Aa}	87.20±4.68 ^{Ab}
		B	NC	84.33±1.67 ^{Ac}	84.38±1.96 ^{Aa}	NC
		C	77.78±0.39 ^{Abc}	97.10±1.84 ^{Aa}	95.71±2.22 ^{Aa}	NC
		D	96.27±2.50 ^{Aa}	87.66±2.34 ^{Bc}	88.71±1.56 ^{Ba}	73.09±0.37 ^{Cc}
	Scintillation vial	A	72.47±1.51 ^{Bc}	97.66±1.40 ^{Aa}	93.73±2.63 ^{Aa}	NC
		B	NC	89.45±4.15 ^{Abc}	NC	NC
		C	NC	94.43±2.78 ^{Aac}	NC	NC
		D	83.51±1.19 ^{Bb}	100±0.00 ^{Aa}	NC	96.33±1.52 ^{Aa}
	24-well plate	A	78.89±4.57 ^{Bbc}	100±0.00 ^{Aa}	NC	99.56±0.43 ^{Aa}
		B	98.33±1.66 ^{Aa}	100±0.00 ^{Aa}	NC	100±0.00 ^{Aa}
		C	NC	NC	NC	NC
		D	NC	98.45±1.54 ^{Aa}	92.14±7.85 ^{Aa}	NC

ตารางที่ 11 (ต่อ)

Table 11. (Cont.)

Actinomycetes	Method of cultivation	Media	Cytotoxicity (%)			
			MCF-7	HeLa	HT-29	KB
CNA031	Shake flask	A	100±0.00 ^{Aa}	100±0.00 ^{Aa}	81.36±0.85 ^{Bb}	72.32±0.66 ^{Cd}
		B	100±0.00 ^{Aa}	100±0.00 ^{Aa}	78.29±5.78 ^{Bb}	79.03±0.57 ^{Bcd}
		C	100±0.00 ^{Aa}	77.94±0.57 ^{Cc}	78.34±4.57 ^{Cb}	87.16±0.59 ^{Babc}
		D	100±0.00 ^{Aa}	98.13±1.78 ^{ABab}	95.01±0.58 ^{Ba}	88.07±0.58 ^{Cabc}
	Scintillation vial	A	96.72±1.68 ^{Bab}	100±0.00 ^{Aa}	99.68±0.31 ^{Aa}	100±0.00 ^{Aa}
		B	79.75±4.72 ^{Bd}	91.39±6.81 ^{ABb}	97.13±3.43 ^{Aa}	100±0.00 ^{Aa}
		C	86.65±3.30 ^{Ac}	97.70±2.29 ^{Aab}	92.69±4.58 ^{Aa}	NC
		D	91.00±3.82 ^{Babc}	99.94±0.05 ^{Aa}	99.23±0.41 ^{Aa}	NC
	24-well plate	A	NC	97.93±2.06 ^{Aab}	NC	82.20±9.02 ^{Abcd}
		B	87.35±4.71 ^{Ac}	98.89±1.10 ^{Aa}	NC	94.32±5.67 ^{Aab}
		C	100±0.00 ^{Aa}	100±0.00 ^{Aa}	NC	91.56±4.42 ^{Aabc}
		D	88.59±4.54 ^{Abcd}	100±0.00 ^{Aa}	NC	92.94±7.05 ^{Aabc}

ตารางที่ 11 (ต่อ)

Table 11. (Cont.)

Actinomycetes	Method of cultivation	Media	Cytotoxicity (%)			
			MCF-7	HeLa	HT-29	KB
CNA039	Shake flask	A	96.53±1.07 ^{Ba}	99.14±0.85 ^{Aa}	98.94±0.53 ^{Aa}	100.00±0.00 ^{Aa}
		B	98.37±1.08 ^{Aa}	100.00±0.00 ^{Aa}	98.86±0.46 ^{Aa}	100.00±0.00 ^{Aa}
		C	98.72±0.85 ^{Aa}	100.00±0.00 ^{Aa}	100.00±0.00 ^{Aa}	99.52±0.47 ^{Aab}
		D	99.52±0.29 ^{Aa}	98.79±1.20 ^{Aa}	99.91±0.08 ^{Aa}	99.90±0.09 ^{Aa}
	Scintillation vial	A	99.91±0.07 ^{Aa}	99.10±0.57 ^{Aa}	100.00±0.00 ^{Aa}	99.22±0.24 ^{Aabc}
		B	96.94±0.35 ^{Aa}	73.10±2.38 ^{Bc}	96.49±0.48 ^{Aa}	98.90±0.56 ^{Abc}
		C	98.13±0.42 ^{Aa}	NC	91.63±1.25 ^{Ab}	98.56±0.32 ^{Ac}
		D	96.76±0.88 ^{Aa}	76.87±1.68 ^{Bc}	97.53±0.34 ^{Ab}	100.00±0.00 ^{Aa}
	24-well plate	A	98.60±0.09 ^{Ba}	100.00±0.00 ^{Aa}	100.00±0.00 ^{Aa}	100.00±0.00 ^{Aa}
		B	74.08±1.25 ^{Ab}	NC	71.07±0.82 ^{Aa}	NC
		C	77.40±3.70 ^{Ab}	82.64±2.56 ^{Ab}	79.55±4.09 ^{Ac}	NC
		D	NC	86.70±2.55 ^{Ab}	NC	NC

ตารางที่ 11 (ต่อ)

Table 11. (Cont.)

Actinomycetes	Method of cultivation	Media	Cytotoxicity (%)			
			MCF-7	HeLa	HT-29	KB
CNA053	Shake flask	A	98.25±1.71 ^{Aa}	100.00±0.00 ^{Aa}	99.22±0.39 ^{Aa}	100.00±0.00 ^{Aa}
		B	99.98±0.01 ^{Aa}	100.00±0.00 ^{Aa}	99.20±0.35 ^{Aa}	100.00±0.00 ^{Aa}
		C	99.82±0.10 ^{Aa}	99.16±0.46 ^{Aa}	98.91±0.33 ^{Aa}	99.70±0.17 ^{Aa}
		D	100.00±0.00 ^{Aa}	100.00±0.00 ^{Aa}	100.00±0.00 ^{Aa}	98.07±0.53 ^{Bb}
	Scintillation vial	A	99.35±0.64 ^{Aa}	100.00±0.00 ^{Aa}	98.93±0.51 ^{Aa}	100.00±0.00 ^{Aa}
		B	96.02±0.82 ^{Bab}	91.19±0.47 ^{Cb}	96.47±1.20 ^{Ba}	100.00±0.00 ^{Aa}
		C	93.81±2.51 ^{Bab}	84.84±1.09 ^{Cc}	97.22±0.61 ^{ABa}	100.00±0.00 ^{Aa}
		D	96.23±1.35 ^{Aab}	98.79±1.20 ^{Aa}	98.63±1.36 ^{Aa}	96.11±0.24 ^{Ac}
	24-well plate	A	86.43±7.59 ^{ABbc}	100.00±0.00 ^{Aa}	96.91±3.08 ^{Aa}	73.92±1.19 ^{Bd}
		B	NC	NC	NC	NC
		C	NC	100.00±0.00 ^{Aa}	NC	90.15±5.20 ^{Bc}
		D	80.00±0.00 ^{ABc}	100.00±0.00 ^{Aa}	NC	NC

*Significant different between type of cultivation and percent inhibition at $p<0.05$

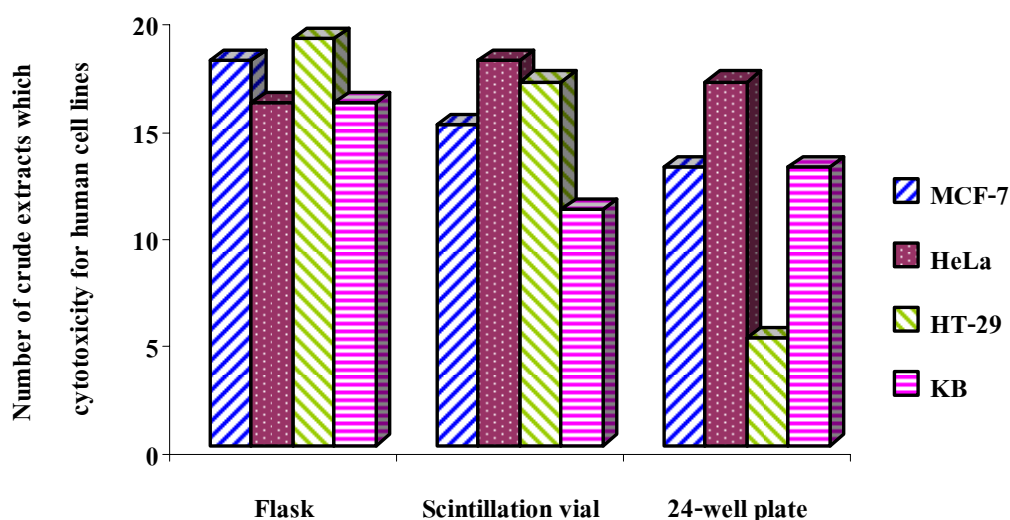
Different letters in the same column indicated the significant differences ($p<0.05$) of cultivation method and media.

Different letters in the same row indicated the significant differences ($p<0.05$) of cultivation method and percentage of cytotoxicity.

NC = Not cytotoxic

แอสกีโนไมซ์ทั้ง 5 สายพันธุ์ที่เลี้ยงในภาชนะทั้งสามชนิดซึ่งแต่ละวิธีของการเลี้ยงจะมีตัวอย่างสารสกัดตัวอย่าง 20 ตัวอย่าง เมื่อทดสอบด้วยเซลล์มะเร็งแต่ละชนิดจะให้ผลดังแสดงในภาพที่ 20 พบว่าการเลี้ยงแอสกีโนไมซ์ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ในภากรวมจะให้ผลการยับยั้งเซลล์มะเร็งทั้ง 4 ชนิดได้ดีที่สุด โดยพบว่าสารสกัดหยาบสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ (HT-29), เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7), เซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) ได้มากถึง 19, 18, 16 ตัวอย่างตามลำดับ แต่สารสกัดหยาบที่ได้จากการเลี้ยงแอสกีโนไมซ์ในขวดรูปทรงกระบอกสามารถผลิตสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) ได้มากถึง 18 ตัวอย่าง ในขณะที่สารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) ที่ได้จากการเลี้ยงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตรได้เพียง 16 ตัวอย่าง แต่เมื่อพิจารณาสารสกัดหยาบที่ได้จากการเลี้ยงในแบบย่อส่วน คือ ขวดรูปทรงกระบอก และ 24-well plate พบว่าการเลี้ยงแอสกีโนไมซ์ในขวดรูปทรงกระบอกให้จำนวนสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งมากกว่าการเลี้ยงใน 24-well plate อาจเนื่องมาจากชนิดของเชื้อแอสกีโนไมซ์แต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการผลิตสารได้แตกต่างกัน และแอสกีโนไมซ์โดยส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่ต้องการอากาศไปใช้ในกระบวนการเผาผลาญสารอาหารระดับเซลล์ ดังนั้นการเลี้ยงแอสกีโนไมซ์ในภาชนะที่มีพื้นที่ในการสัมผัสระหว่างอากาศและผิวอาหารที่เหมาะสม จึงส่งผลต่อการผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง ดังเช่นการเลี้ยงแอสกีโนไมซ์ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตรที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร คิดเป็นอัตราส่วนปริมาตรอาหารต่อปริมาตรภาชนะบรรจุเท่ากับ 1:2.5 ซึ่งสอดคล้องกับการเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces hygroscopicus* ซึ่งสามารถผลิตสาร hygrocins เมื่อใช้อัตราส่วนปริมาตรอาหารต่อปริมาตรภาชนะบรรจุเท่ากับ 1:2.5 (Cai *et al.*, 2005) และแอสกีโนไมซ์ที่ถูกเลี้ยงในขวดรูปทรงกระบอกสามารถผลิตจำนวนสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้มากกว่าแอสกีโนไมซ์ที่เลี้ยงใน 24-well plate อาจเนื่องมาจากอัตราส่วนปริมาตรอาหารต่อปริมาตรภาชนะบรรจุของภาชนะ 24-well plate มีพื้นที่ภายในของภาชนะเหลือน้อยกว่าพื้นที่ภายในของขวดรูปทรงกระบอก ทำให้การสัมผัสระหว่างอาหารและอากาศมีน้อยลง แม้จะมีอัตราส่วนปริมาตรอาหารต่อปริมาตรภาชนะบรรจุเท่ากันทุกชุดการทดลอง นั่นคือ 1:2.5 ก็ตาม แต่เนื่องจากภาชนะชนิดนี้มีลักษณะเป็นหลุมก้นแบนทำให้มีข้อจำกัดของการสัมผัสอากาศของอาหารที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรีย คือ เมื่อบรรจุอาหารปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทำให้เหลือพื้นที่ในการสัมผัสอากาศของอาหารเหลือน้อย จึงส่งผลต่อการสัมผัสระหว่างอากาศและอาหารเลี้ยงเชื้อที่น้อยลง เมื่อใช้ความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที ทำให้เชื้อแอสกีโนไมซ์มีการนำออกซิเจนไปใช้ในกระบวนการเผาผลาญระดับเซลล์ได้น้อยจึงส่งผลต่อการผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ดังนั้นอัตราการถ่ายเทอากาศจึงเป็นอีกตัวแปรหนึ่งที่สำคัญต่อการผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง (Betts and Baganz, 2006)

จากการศึกษาการเลี้ยงแบคทีเรียในภาชนะ 24-well plate พบว่าการบรรจุอาหารปริมาตร 1 มิลลิลิตร ต่อหลุม และมีการเขย่าที่ความเร็ว 300 รอบต่อนาที ทำให้เกิดการเขย่าในแนวระนาบ (shaking amplitude) ซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 5 เซนติเมตร มีผลให้เกิดอัตราการส่งถ่ายอากาศเท่ากับ 30 มิลลิเมตรต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งส่งผลให้มีความเหมาะสมต่อการเกิดอัตราการสัมผัสอากาศ และไม่เกิดแรงเฉือนที่เป็นอันตรายต่อตัวเซลล์ (shear sensitive) ดังนั้นสภาวะดังกล่าวจึงมีความเหมาะสมต่อการเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย (Duezt *et al.*, 2000)



ภาพที่ 20 จำนวนสารสกัดหายาที่ได้จากการเลี้ยงแอคติโนมัยซีททั้ง 5 สายพันธุ์ที่ได้จากวิธีการเลี้ยง 3 รูปแบบซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

Figure 20. Cytotoxic crude extracts from five strains of actinomycetes from three method of cultivation.

สำหรับการเลี้ยงแอคติโนมัยซีทแบบย่อยส่วนด้วยขวดรูปทรงกระบอก และ 24-well plate สามารถสรุปได้ว่าการเลี้ยงแอคติโนมัยซีทแบบย่อยส่วนควรเลือกเลี้ยงแอคติโนมัยซีทในขวดรูปทรงกระบอก และเมื่อพิจารณาการเลี้ยงแอคติโนมัยซีทในชุดควบคุมโดยเทียบกับการเลี้ยงแอคติโนมัยซีทในขวดรูปทรงกระบอก ถึงแม้ว่าจำนวนสารสกัดหายาที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่ได้จากการเลี้ยงแอคติโนมัยซีทในขวดรูปทรงกระบอกจะให้จำนวนสารสกัดหายาที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่น้อยกว่าการเลี้ยงในชุดควบคุม แต่หากพิจารณาในด้านความสะดวก ความรวดเร็วในการคัดกรองสารสกัดหายา การใช้พื้นที่ในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิให้ได้

ประโยชน์มากยิ่งขึ้น และการเลี้ยงแอกติโนมัยสีทเพื่อคัดกรองสารสกัดหยาบในแต่ละครั้งสามารถเลี้ยงแอกติโนมัยสีทได้จำนวนมากกว่าเมื่อเทียบกับการเลี้ยงแอกติโนมัยสีทในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร (ชุดควบคุม) พบว่าการเลี้ยงแอกติโนมัยสีทในขวดรูปทรงกระบอกสามารถใช้เลี้ยงให้มีจำนวนชนิดของเชื้อได้มากกว่าถึง 10 เท่าของการเลี้ยงแอกติโนมัยสีทในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร อีกทั้งยังสามารถลดค่าใช้จ่ายไม่ว่าจะเป็นในส่วนของสารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงแอกติโนมัยสีท รวมถึงการลดปริมาณตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารหยาบได้น้อยลง ซึ่งก่อนที่จะสกัดสารหยาบต้องนำน้ำหมักทำแห้งก่อน เนื่องจากง่ายต่อการสกัด และได้สารที่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายเมทานอลทั้งหมด โดยทั่วไปแล้วนั้นแอกติโนมัยสีทเป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเส้นสาย ซึ่งการเลี้ยงในระดับการเลี้ยงขนาดเล็กจะมีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกลุ่มนี้ แต่การเลี้ยงในระดับนี้สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ต้องการได้ (Minas *et al.*, 2000) และสำหรับการเลี้ยงใน 24-well plate นั้น คาดว่าหากมีการปรับปรุงในเรื่องของอัตราการสัมผัสอากาศก็สามารถนำมาใช้ในการผลิตสารสกัดหยาบซึ่งอาจใช้ในการผลิตสารสกัดหยาบได้ดี หรือเทียบเท่ากับการเลี้ยงในพลาสติก และในขวดรูปทรงกระบอก เนื่องจากการสัมผัสระหว่างอาหารและอากาศในการทดลองนี้นี้น้อยเนื่องจากฝาปิดของเพลทเป็นพลาสติกจึงมีผลต่อการส่งถ่ายอากาศในแต่ละหลุมของเพลท ดังนั้นจึงต้องมีการปรับปรุง และคิดแปลงโดยอาจใช้แผ่นสำลีใช้ปิดฝาเพลทแทนการใช้ฝาปิดพลาสติก เพื่อเพิ่มอัตราการสัมผัสระหว่างอากาศกับอาหาร ซึ่งจะส่งผลต่อการผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ ในการเลี้ยงแอกติโนมัยสีทในขนาดย่อยส่วนที่มีขนาดเล็กกว่า 24-well plate นั้นก็สามารถนำไปใช้ในการผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพได้ เช่นการเลี้ยงเชื้อใน 96-well plate แต่ในการวิเคราะห์ผลนั้นต้องมีเครื่องมือที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์สารในปริมาณน้อยๆได้ ซึ่งในการวิเคราะห์สารของการศึกษาในครั้งนี้ต้องมีปริมาณสารที่เพียงพอต่อการนำไปใช้ในการวิเคราะห์ด้วยวิธีต่างๆ เช่นการนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC การวิเคราะห์ด้วย TLC การนำไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง รวมถึงการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย เป็นต้น ซึ่งสามารถรายงานผลของปริมาณสารสกัดหยาบดังแสดงในตารางที่ 14

สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ พบว่ายังไม่มีรายงานการใช้ขวดรูปทรงกระบอกในการเลี้ยงแอกติโนมัยสีทเพื่อการคัดกรองสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งซึ่งรูปแบบวิธีการเลี้ยงด้วยภาชนะชนิดนี้สามารถใช้งานได้ง่าย เหมาะต่อการนำไปใช้เลี้ยงแอกติโนมัยสีทจำนวนมาก และเพื่อให้เกิดความรวดเร็วในการคัดกรองสารสกัดหยาบ เนื่องจากอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงแอกติโนมัยสีทนั้นมีถึง 4 สูตร ทำให้การเตรียมอาหารเลี้ยงแอกติโนมัยสีทสามารถใช้ในปริมาตรที่น้อยกว่า ดังนั้นการเลี้ยงแอกติโนมัยสีทในขวดรูปทรงกระบอก จึงมีความเหมาะสมต่อ

การนำไปประยุกต์ใช้ในการเลี้ยงแอกติโนมัยสีท เพื่อการคัดกรองสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งในขั้นตอนต่อไป

2. การวิเคราะห์องค์ประกอบของอาหารที่มีผลต่อการผลิตสารสกัดหยาบของเชื้อแอกติโนมัยสีท

เชื้อแอกติโนมัยสีทแต่ละสายพันธุ์สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ต่างกัน เนื่องจากความสามารถในการผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพของแอกติโนมัยสีทแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกัน ซึ่งอาจกล่าวได้อีกนัยหนึ่งว่า One Strain Many Compounds (OSMAC) (Bitzer *et al.*, 2006) จากตารางที่ 12 พบว่าแอกติโนมัยสีททั้ง 5 สายพันธุ์ สามารถใช้อาหารสูตร A ในการผลิตสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ดีที่สุด โดยสามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) ได้มากที่สุด คือ 14 สาร คิดเป็นร้อยละ 93.33 และผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7), เซลล์มะเร็งลำไส้ (HT-29) และเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) ได้จำนวนที่เท่ากันคือ 12 สาร คิดเป็นร้อยละ 80 จากข้อมูลที่แสดงพบว่าสารสกัดหยาบที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารสูตร A มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งทั้ง 4 ชนิด ซึ่งให้จำนวนสารสกัดหยาบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งมากที่สุด อาจเนื่องมาจากแอกติโนมัยสีทเป็นผู้ย่อยสลายอินทรีย์วัตถุที่มีโครงสร้างซับซ้อนได้ เช่น เฮมิเซลลูโลส, ลิกโนเซลลูโลส, เพคติน และไคติน เป็นต้น เมื่อพิจารณาถึงองค์ประกอบของอาหารสูตรนี้ พบว่ามีสาหร่าย เปลือกกุ้งบด และตะกอนดินเป็นองค์ประกอบ ซึ่งอาหารจากแหล่งนี้ได้มีการดัดแปลงให้เหมือนแหล่งอาหารที่มีอยู่ตามธรรมชาติ ทำให้แอกติโนมัยสีทต้องมีการสร้างเอนไซม์ เพื่อย่อยสลายองค์ประกอบของอาหารในสูตรดังกล่าวนี้ ซึ่งอาหารสูตรนี้เป็นอาหารเพียงสูตรเดียวที่มีความซับซ้อน และยากต่อการนำไปใช้ ส่งผลให้แอกติโนมัยสีทมีการปรับตัวทำให้มีการส่งเสริมให้มีการผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเกิดขึ้น

ตารางที่ 12 จำนวนสารสกัดหายาที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งจากการเลี้ยงแอกติโนมัย
 สัตว์ทั้ง 5 สายพันธุ์ในอาหารที่แตกต่างกัน 4 สูตร

Table 12. Number of crude extracts with cytotoxicity classified by cultivation media.

Cultivation media	Number of crude extract with cytotoxicity			
	MCF-7	HeLa	HT-29	KB
A	12	14	12	12
B	11	12	10	10
C	11	11	10	9
D	11	12	9	9

จากการทดสอบสารสกัดหายาด้วยการใช้รีเอเจนต์ที่มีความจำเพาะต่อการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารที่เป็นองค์ประกอบ เพื่อศึกษาองค์ประกอบเบื้องต้นของสารสกัดหายาอย่างคร่าวๆ ที่ได้จากการเลี้ยงแอกติโนมัยสัตว์ในแต่ละสายพันธุ์ สามารถแสดงผลดังตารางที่ 13 และตารางที่ 14 แสดงน้ำหนักของสารสกัดหายาที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีแตกต่างกัน พบว่าสารสกัดหายาที่ผ่านการเลี้ยงด้วยภาชนะในชนิดต่างๆ แล้ว จากนั้นทำการสกัดด้วยวิธีการที่แตกต่างกันเช่น การทำแห้งตัวอย่างก่อนการสกัดสารหายาทำให้สารสกัดหายาที่ได้มีองค์ประกอบของสารสกัดหายาในกลุ่มที่แตกต่างกัน โดยพบว่า การเลี้ยงแอกติโนมัยสัตว์ในอาหารสูตรเดียวกันภาชนะเดียวกัน เมื่อทำการสกัดสารหายาด้วยเอทิลอะซิเตท และเปรียบเทียบสารสกัดหายาที่ผ่านการทำแห้งตัวอย่างแล้วสกัดด้วยเมทานอลพบว่าสารสกัดหายาที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตทจะได้สาร โดยส่วนใหญ่เป็นกลุ่มของสารที่มีขั้วต่ำ และสารสกัดหายาที่ผ่านการทำแห้งตัวอย่างแล้วสกัดด้วยเมทานอลจะได้สารในกลุ่มที่เป็นสารที่มีขั้วสูง ซึ่งวิธีการสกัดสารมีผลต่อกลุ่มของสารสกัดหายาที่ได้จากการเลี้ยงแอกติโนมัยสัตว์ที่แตกต่างกัน พบว่าสารสกัดหายาที่ได้จากการทำแห้งก่อนแล้วจึงจะนำไปสกัดด้วยเมทานอลจะได้สาร โดยส่วนใหญ่เป็นสารในกลุ่มของสารที่มีความเป็นขั้วสูง และพบว่าโครมาโตแกรมที่เกิดขึ้นในแต่ละสายพันธุ์ของแอกติโนมัยสัตว์มีความคล้ายคลึงกัน จึงขอ ยกตัวอย่างดังแสดงในภาพที่ 21-23

ตารางที่ 13 (ต่อ)

Table 13. (Cont.)

Strains	Media	Composition of crude extracts											
		Cultivation in flask extracted with			Cultivation in flask extracted with			Scintillation vial			24-well plate		
		Ethyl acetate			Methanol								
		Amino			Amino			Amino			Amino		
Alkaloids	acids	Terpenoids	Alkaloids	acids	Terpenoids	Alkaloids	acids	Terpenoids	Alkaloids	acids	Terpenoids		
CNA039	A	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	C	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
	D	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
CNA053	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	B	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
	C	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
	D	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-

ตารางที่ 14 น้ำหนักสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดสารจากแอคติโนมัยซีททั้ง 5 สายพันธุ์

Table 14. Yield of crude extracts from 5 strains of actinomycetes.

Strain of Actinomycetes	Method of cultivation	Media	yield of crude extracts (mg/mL)
CNA002	Shake flask	A	23.03
		B	24.67
		C	26.66
		D	22.19
	Scintillation vial	A	12.07
		B	10.70
		C	8.95
		D	6.74
	24-well plate	A	7.69
		B	6.82
		C	6.04
		D	5.46

ตารางที่ 14 (ต่อ)

Table 14. (Cont.)

Strain of Actinomycetes	Method of cultivation	Media	yield of crude extracts (mg/mL)
CNA003	Shake flask	A	20.40
		B	24.67
		C	18.58
		D	22.25
	Scintillation vial	A	37.90
		B	26.50
		C	25.80
		D	25.48
	24-well plate	A	18.36
		B	24.88
		C	21.17
		D	12.74

ตารางที่ 14 (ต่อ)

Table 14. (Cont.)

Strain of Actinomycetes	Method of cultivation	Media	yield of crude extracts (mg/mL)
CNA031	Shake flask	A	26.64
		B	27.23
		C	26.83
		D	24.66
	Scintillation vial	A	33.13
		B	25.68
		C	28.61
		D	26.30
	24-well plate	A	25.13
		B	18.99
		C	18.17
		D	18.65

ตารางที่ 14 (ต่อ)

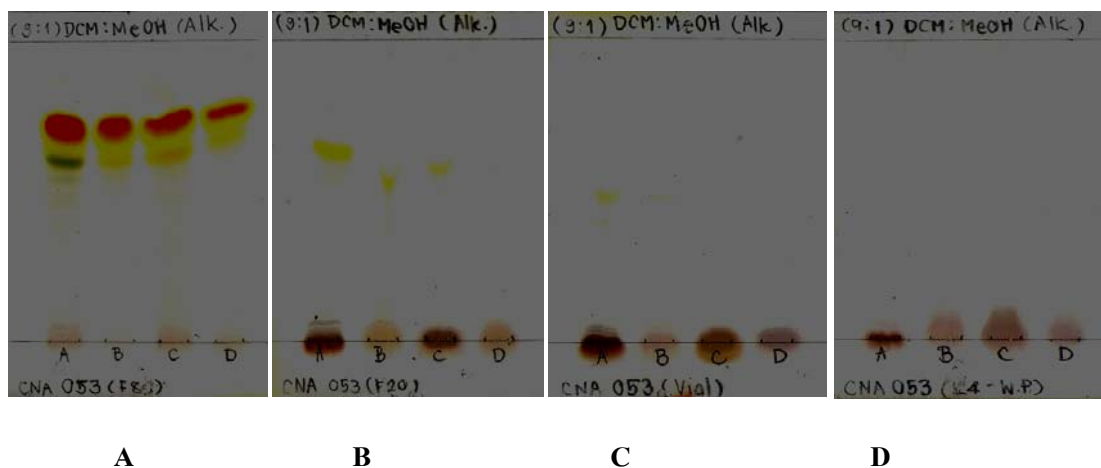
Table 14. (Cont.)

Strain of Actinomycetes	Method of cultivation	Media	yield of crude extracts (mg/mL)
CNA039	Shake flask	A	24.97
		B	26.50
		C	29.50
		D	24.87
	Scintillation vial	A	34.42
		B	23.87
		C	25.68
		D	25.69
	24-well plate	A	15.81
		B	18.91
		C	14.47
		D	15.03

ตารางที่ 14 (ต่อ)

Table 14. (Cont.)

Strain of Actinomycetes	Method of cultivation	Media	yield of crude extracts (mg/mL)
CNA053	Shake flask	A	25.24
		B	26.88
		C	24.38
		D	22.42
	Scintillation vial	A	35.86
		B	22.45
		C	30.09
		D	26.08
	24-well plate	A	18.35
		B	18.59
		C	18.59
		D	19.72



ภาพที่ 21 โครมาโตแกรมของ TLC ชนิด normal phase (มี mobile phase เป็น $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ ในอัตราส่วน 9:1) ของสารสกัดหยาบที่ได้จากแอกติโนมัยสีทสายพันธุ์ CNA053 เลี้ยงในอาหารสูตร A, B, C และ D วิเคราะห์ด้วยรีเอเจนต์ชนิด Wagner's reagent

A. สารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทที่เลี้ยงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร

B. สารสกัดหยาบที่ได้จากการทำแห้งและสกัดด้วยเมทานอลที่เลี้ยงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร

C. สารสกัดหยาบที่ได้จากการทำแห้งและสกัดด้วยเมทานอลที่เลี้ยงในขวดทรงกระบอก

D. สารสกัดหยาบที่ได้จากการทำแห้งและสกัดด้วยเมทานอลที่เลี้ยงใน 24-well plate

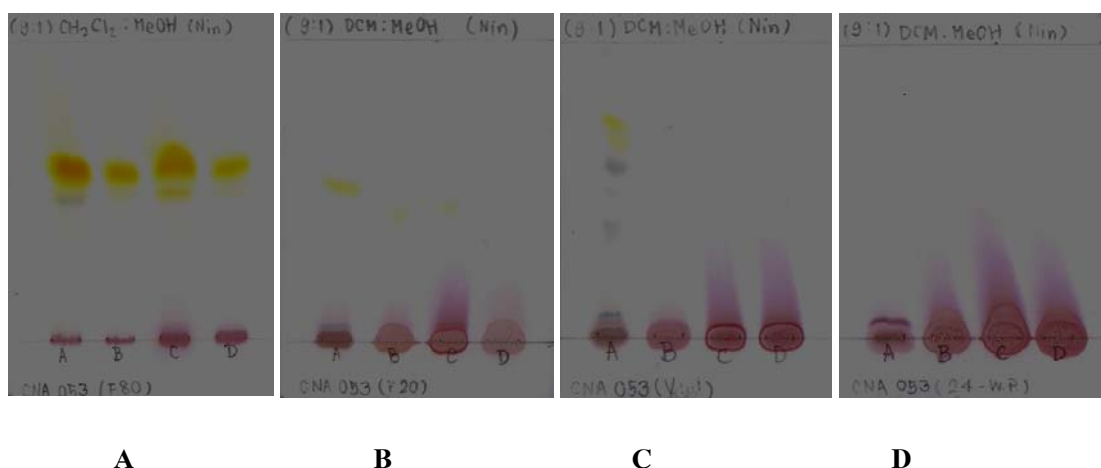
Figure 21. Normal phase TLC chromatogram of crude extract of CNA053 (9:1 $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$) in media A, B, C and D medium analyzed by Wagner's reagent

A. Crude extracts which cultivation in flask and extracted with ethylacetate.

B. Crude extracts which cultivation in flask and freeze dried then extracted with methanol.

C. Crude extracts which cultivation in scintillation vial and freeze dried then extracted with methanol.

D. Crude extracts which cultivation in 24-well plate and freeze dried then extracted with methanol.



ภาพที่ 22 โครมาโตแกรมของ TLC ชนิด normal phase (มี mobile phase เป็น $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ ในอัตราส่วน 9:1) ของสารสกัดหยาบที่ได้จากแอกติโนมัยสีทสายพันธุ์ CNA053 เลี้ยงในอาหารสูตร A, B, C และ D วิเคราะห์ด้วยรีเอเจนต์ชนิด ninhydrin reagent

A. สารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตที่เลี้ยงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร

B. สารสกัดหยาบที่ได้จากการทำแห้งและสกัดด้วยเมทานอลที่เลี้ยงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร

C. สารสกัดหยาบที่ได้จากการทำแห้งและสกัดด้วยเมทานอลที่เลี้ยงในขวดทรงกระบอก

D. สารสกัดหยาบที่ได้จากการทำแห้งและสกัดด้วยเมทานอลที่เลี้ยงใน 24-well plate

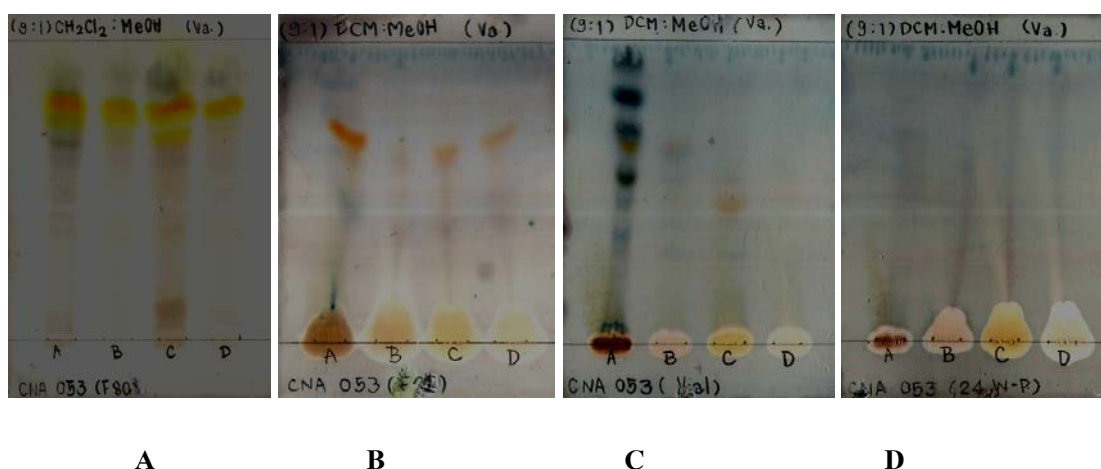
Figure 22. Normal phase TLC chromatogram of crude extract of CNA053 (9:1 $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$) in media A, B, C and D medium analyzed by ninhydrin reagent.

A. Crude extracts which cultivation in flask and extracted with ethylacetate.

B. Crude extracts which cultivation in flask and freeze dried then extracted with methanol.

C. Crude extracts which cultivation in scintillation vial and freeze dried then extracted with methanol.

D. Crude extracts which cultivation in 24-well plate and freeze dried then extracted with methanol.



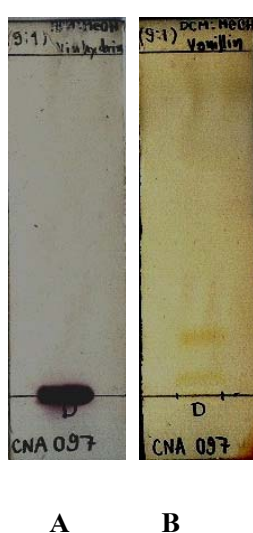
- ภาพที่ 23 โครมาโตแกรมของ TLC ชนิด normal phase (มี mobile phase เป็น $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ ในอัตราส่วน 9:1) ของสารสกัดหยาบที่ได้จากแอกติโนมัยสียีสสายพันธุ์ CNA053 เลี้ยงในอาหารสูตร A, B, C และ D วิเคราะห์ด้วยรีเอเจนท์ชนิด vanillin in conc. H_2SO_4
- สารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทที่เลี้ยงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร
 - สารสกัดหยาบที่ได้จากการทำแห้งและสกัดด้วยเมทานอลที่เลี้ยงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร
 - สารสกัดหยาบที่ได้จากการทำแห้งและสกัดด้วยเมทานอลที่เลี้ยงในขวดทรงกระบอก
 - สารสกัดหยาบที่ได้จากการทำแห้งและสกัดด้วยเมทานอลที่เลี้ยงใน 24-well plate

Figure 23. Normal phase TLC chromatogram of crude extract of CNA053 (9:1 $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$) in media A, B, C and D medium analyzed by vanillin in conc. H_2SO_4 .

- Crude extracts which cultivation in flask and extracted with ethylacetate.
- Crude extracts which cultivation in flask and freeze dried then extracted with methanol.
- Crude extracts which cultivation in scintillation vial and freeze dried then extracted with methanol.
- Crude extracts which cultivation in 24-well plate and freeze dried then extracted with methanol.

3. การวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง โดยใช้เทคนิค Thin-Layer Chromatography (TLC)

จากการเลี้ยงแอกติโนมัยสีททั้ง 21 สายพันธุ์โดยทำการเลี้ยงในขวดรูปทรงกระบอกซึ่งเลี้ยงในอาหาร 4 สูตร (A, B, C และ D) ได้สารสกัดหยาบทั้งหมด 84 สาร จากนั้นทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 4 ชนิด (KB, MCF-7, HT-29 และ HeLa) จากนั้นทำการคัดเลือกสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง เพื่อศึกษาองค์ประกอบเบื้องต้นของสารสกัดหยาบ โดยอาศัยเทคนิค Thin-Layer Chromatography (TLC) และเลือกใช้รีเอเจนต์ที่มีความจำเพาะต่อการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารที่เป็นองค์ประกอบซึ่งผลจากการศึกษาสามารถแสดงดังรูปภาพที่ 24-31

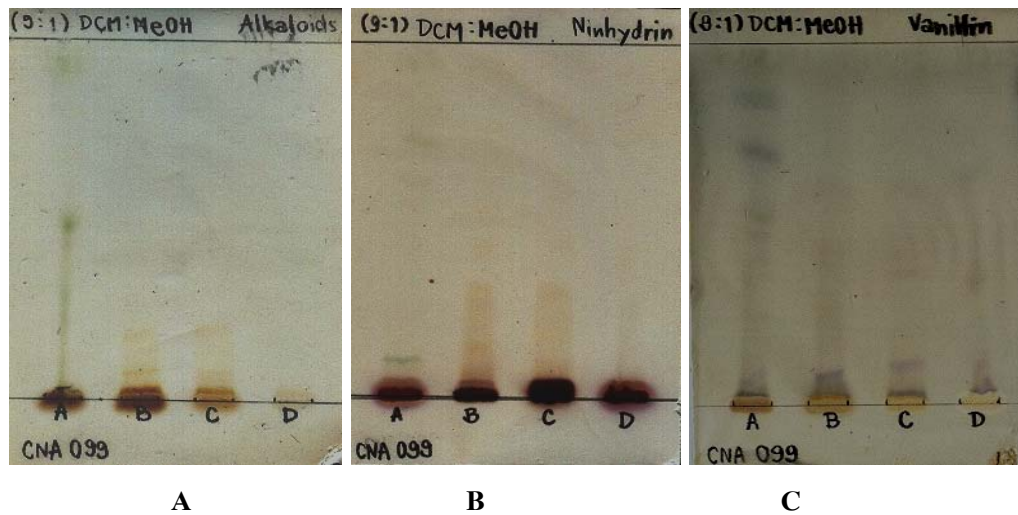


ภาพที่ 24 โครมาโตแกรมของ TLC ชนิด normal phase (มี mobile phase เป็น $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ ในอัตราส่วน 9:1)

- A. สารสกัดหยาบที่ได้จากแอกติโนมัยสีทสายพันธุ์ CNA097 เลี้ยงในอาหารสูตร D วิเคราะห์ด้วยรีเอเจนต์ชนิด ninhydrin
- B. สารสกัดหยาบที่ได้จากแอกติโนมัยสีทสายพันธุ์ CNA097 เลี้ยงในอาหารสูตร D วิเคราะห์ด้วยรีเอเจนต์ชนิด vanillin in conc. H_2SO_4

Figure 24. Normal phase TLC chromatogram of crude extract of CNA097 (9:1 $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$).

- A. Crude extract of CNA097 in D medium analyzed by ninhydrin reagent.
- B. Crude extract of CNA097 in D medium analyzed by vanillin in conc. H_2SO_4 reagent.

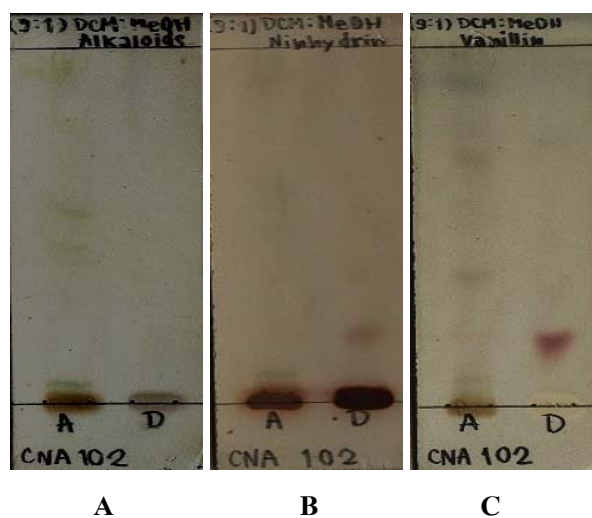


ภาพที่ 25 โครมาโตแกรมของ TLC ชนิด normal phase (มี mobile phase เป็น $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ ในอัตราส่วน 9:1)

- A. สารสกัดหยาบที่ได้จากแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ CNA099 เลี้ยงในอาหาร 4 สูตร วิเคราะห์ด้วย Wagner's reagent
- B. สารสกัดหยาบที่ได้จากแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ CNA099 เลี้ยงในอาหาร 4 สูตร วิเคราะห์ด้วยรีเอเจนท์ชนิด ninhydrin
- C. สารสกัดหยาบที่ได้จากแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ CNA099 เลี้ยงในอาหาร 4 สูตร วิเคราะห์ด้วยรีเอเจนท์ชนิด vanillin in conc. H_2SO_4

Figure 25. Normal phase TLC chromatogram of crude extracts of CNA099 (9:1 $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$).

- A. Crude extracts of CNA099 in 4 different medium analyzed by Wagner's reagent.
- B. Crude extracts of CNA099 in 4 different medium analyzed by ninhydrin reagent.
- C. Crude extracts of CNA099 in 4 different medium analyzed by vanillin in conc. H_2SO_4 reagent.

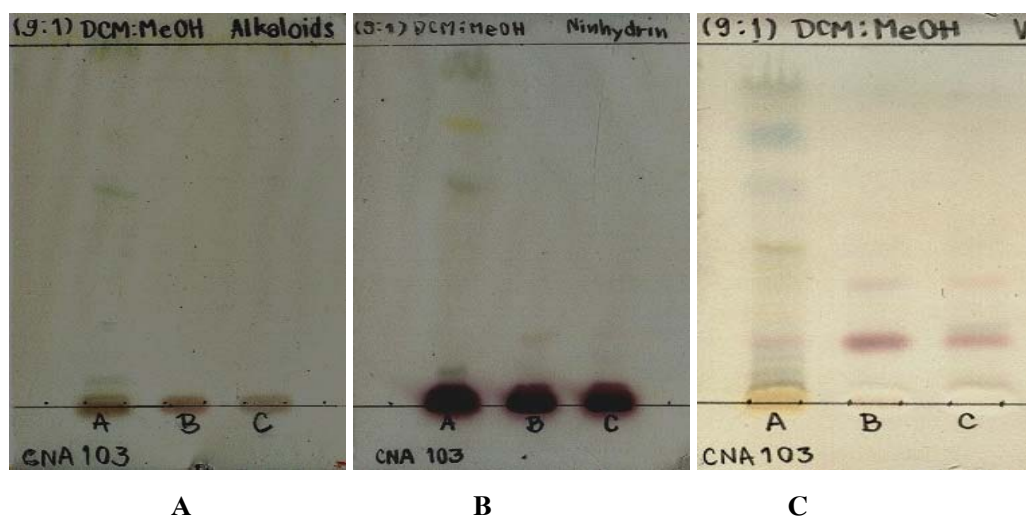


ภาพที่ 26 โครมาโตแกรมของ TLC ชนิด normal phase (มี mobile phase เป็น $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ ในอัตราส่วน 9:1)

- A. สารสกัดหยาบที่ได้จากแอกติโนมัยสียีสสายพันธุ์ CNA102 เลี้ยงในอาหารสูตร A และ D วิเคราะห์ด้วย Wagner's reagent
- B. สารสกัดหยาบที่ได้จากแอกติโนมัยสียีสสายพันธุ์ CNA102 เลี้ยงในอาหารสูตร A และ D วิเคราะห์ด้วยรีเอเจนต์ชนิด ninhydrin
- C. สารสกัดหยาบที่ได้จากแอกติโนมัยสียีสสายพันธุ์ CNA102 เลี้ยงในอาหารสูตร A และ D วิเคราะห์ด้วยรีเอเจนต์ชนิด vanillin in conc. H_2SO_4

Figure 26. Normal phase TLC chromatogram of crude extracts of CNA102 (9:1 $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$).

- A. Crude extracts of CNA102 in A and D medium analyzed by Wagner's reagent.
- B. Crude extracts of CNA102 in A and D medium analyzed by ninhydrin reagent.
- C. Crude extracts of CNA102 in A and D medium analyzed by vanillin in conc. H_2SO_4 reagent.

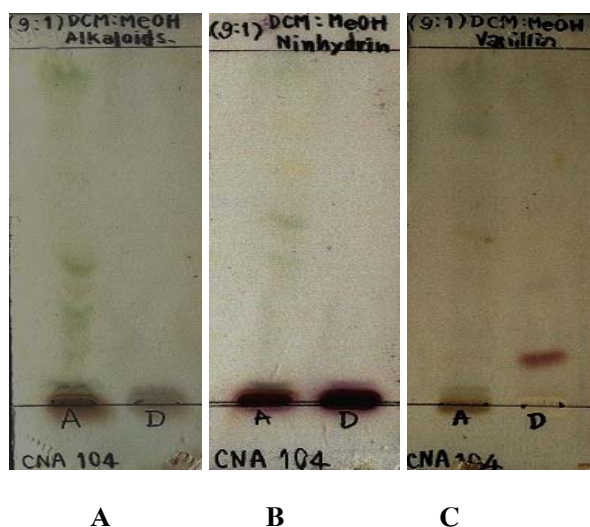


ภาพที่ 27 โครมาโตแกรมของ TLC ชนิด normal phase (มี mobile phase เป็น $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ ในอัตราส่วน 9:1)

- A. สารสกัดหยาบที่ได้จากแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ CNA103 เลี้ยงในอาหารสูตร A, B และ C วิเคราะห์ด้วย Wagner's reagent.
- B. สารสกัดหยาบที่ได้จากแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ CNA103 เลี้ยงในอาหารสูตร A, B และ C วิเคราะห์ด้วยรีเอเจนต์ชนิด ninhydrin.
- C. สารสกัดหยาบที่ได้จากแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ CNA103 เลี้ยงในอาหารสูตร A, B และ C วิเคราะห์ด้วยรีเอเจนต์ชนิด vanillin in conc. H_2SO_4 .

Figure 27. Normal phase TLC chromatogram of crude extracts of CNA103 (9:1 $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$).

- A. Crude extracts of CNA103 in A, B and D medium analyzed by Wagner's reagent.
- B. Crude extracts of CNA103 in A, B and D medium analyzed by ninhydrin reagent.
- C. Crude extracts of CNA103 in A, B and D medium analyzed by vanillin in conc. H_2SO_4 reagent.

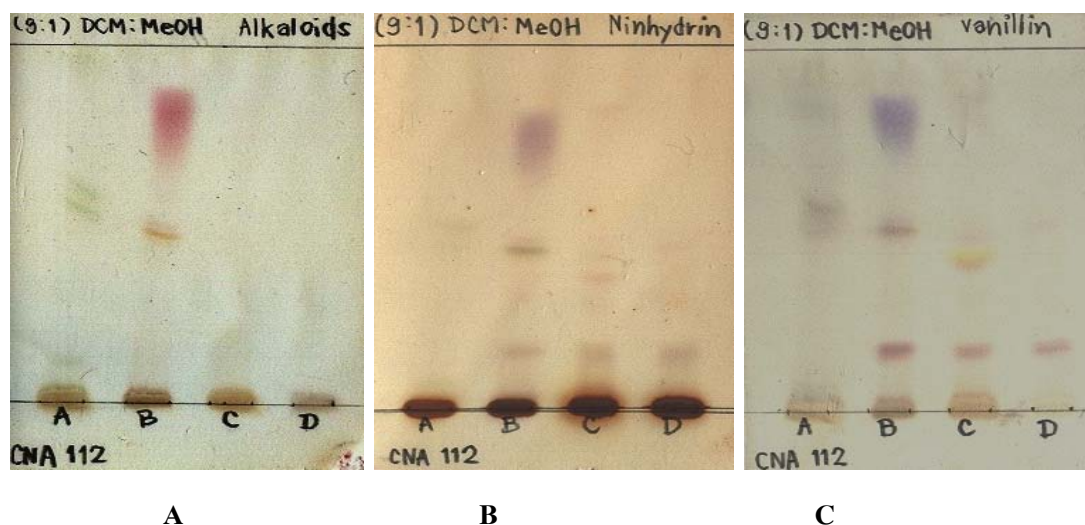


ภาพที่ 28 โครมาโตแกรมของ TLC ชนิด normal phase (มี mobile phase เป็น $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ ในอัตราส่วน 9:1)

- A. สารสกัดหยาบที่ได้จากแอกติโนมัซีสทาสายพันธุ์ CNA104 เลี้ยงในอาหารสูตร A และ D วิเคราะห์ด้วย Wagner's reagent
- B. สารสกัดหยาบที่ได้จากแอกติโนมัซีสทาสายพันธุ์ CNA104 เลี้ยงในอาหารสูตร A และ D วิเคราะห์ด้วยรีเอเจนต์ชนิด ninhydrin
- C. สารสกัดหยาบที่ได้จากแอกติโนมัซีสทาสายพันธุ์ CNA104 เลี้ยงในอาหารสูตร A และ D วิเคราะห์ด้วยรีเอเจนต์ชนิด vanillin in conc. H_2SO_4

Figure 28. Normal phase TLC chromatogram of crude extracts of CNA104 (9:1 $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$).

- A. Crude extracts of CNA104 in A and D medium analyzed by Wagner's reagent.
- B. Crude extracts of CNA104 in A and D medium analyzed by ninhydrin reagent.
- C. Crude extracts of CNA104 in A and D medium analyzed by vanillin in conc. H_2SO_4 reagent.

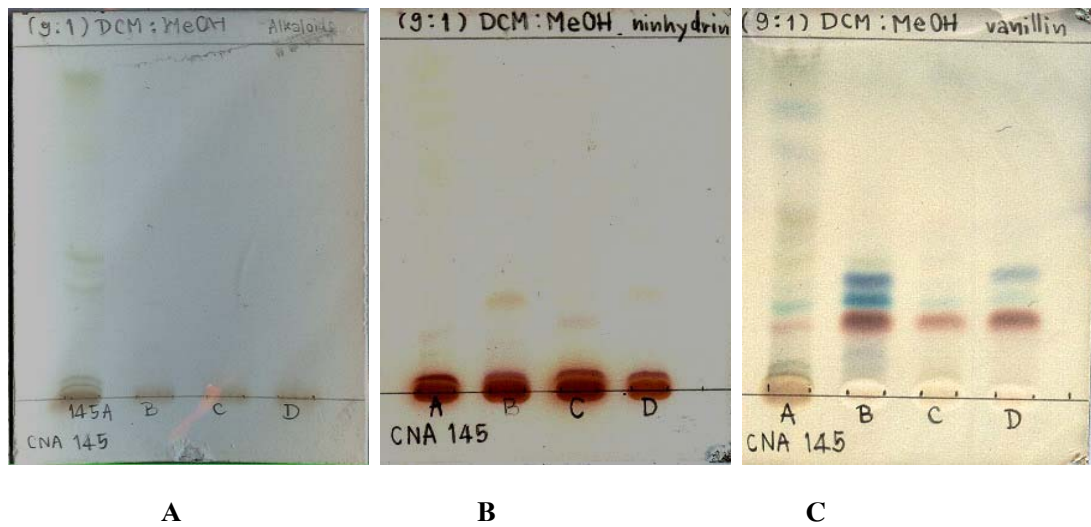


ภาพที่ 29 โครมาโตแกรมของ TLC ชนิด normal phase (มี mobile phase เป็น $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ ในอัตราส่วน 9:1)

- A. สารสกัดหยาบที่ได้จากแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ CNA112 เลี้ยงในอาหาร 4 สูตร วิเคราะห์ด้วย Wagner's reagent
- B. สารสกัดหยาบที่ได้จากแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ CNA112 เลี้ยงในอาหาร 4 สูตร วิเคราะห์ด้วยรีเอเจนต์ชนิด ninhydrin
- C. สารสกัดหยาบที่ได้จากแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ CNA112 เลี้ยงในอาหาร 4 สูตร วิเคราะห์ด้วยรีเอเจนต์ชนิด vanillin in conc. H_2SO_4

Figure 29. Normal phase TLC chromatogram of crude extracts of CNA112 (9:1 $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$).

- A. Crude extracts of CNA112 in 4 different medium analyzed by Wagner's reagent.
- B. Crude extracts of CNA112 in 4 different medium analyzed by ninhydrin reagent.
- C. Crude extracts of CNA112 in 4 different medium analyzed by vanillin in conc. H_2SO_4 reagent.

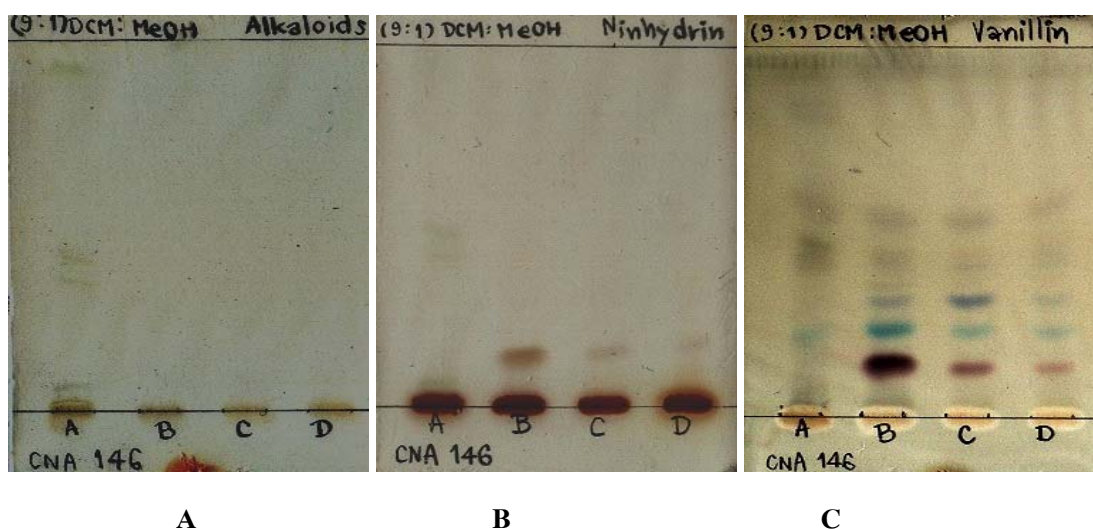


ภาพที่ 30 โครมาโตแกรมของ TLC ชนิด normal phase (มี mobile phase เป็น $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ ในอัตราส่วน 9:1)

- A. สารสกัดหยาบที่ได้จากแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ CNA145 เลี้ยงในอาหาร 4 สูตร วิเคราะห์ด้วย Wagner's reagent
- B. สารสกัดหยาบที่ได้จากแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ CNA145 เลี้ยงในอาหาร 4 สูตร วิเคราะห์ด้วยรีเอเจนต์ชนิด ninhydrin
- C. สารสกัดหยาบที่ได้จากแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ CNA145 เลี้ยงในอาหาร 4 สูตร วิเคราะห์ด้วยรีเอเจนต์ชนิด vanillin in H_2SO_4

Figure 30. Normal phase TLC chromatogram of crude extracts of CNA145 (9:1 $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$).

- A. Crude extracts of CNA145 in 4 different medium analyzed by Wagner's reagent.
- B. Crude extracts of CNA145 in 4 different medium analyzed by ninhydrin reagent.
- C. Crude extracts of CNA145 in 4 different medium analyzed by vanillin in conc. H_2SO_4 reagent.



ภาพที่ 31 โครมาโตแกรมของ TLC ชนิด normal phase (มี mobile phase เป็น $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ ในอัตราส่วน 9:1)

- A. สารสกัดหยาบที่ได้จากแอกติโนมัลลิตาสายพันธุ์ CNA146 เลี้ยงในอาหาร 4 สูตร วิเคราะห์ด้วย Wagner's reagent
- B. สารสกัดหยาบที่ได้จากแอกติโนมัลลิตาสายพันธุ์ CNA146 เลี้ยงในอาหาร 4 สูตร วิเคราะห์ด้วยรีเอเจนต์ชนิด ninhydrin
- C. สารสกัดหยาบที่ได้จากแอกติโนมัลลิตาสายพันธุ์ CNA146 เลี้ยงในอาหาร 4 สูตร วิเคราะห์ด้วยรีเอเจนต์ชนิด vanillin in conc. H_2SO_4

Figure 31. Normal phase TLC chromatogram of crude extracts of CNA146 (9:1 $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$).

- A. Crude extracts of CNA146 in 4 different medium analyzed by Wagner's reagent.
- B. Crude extracts of CNA146 in 4 different medium analyzed by ninhydrin reagent.
- C. Crude extracts of CNA146 in 4 different medium analyzed by vanillin in H_2SO_4 reagent.

ผลจากการศึกษาองค์ประกอบอย่างคร่าวๆ ของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งนั้น สามารถแสดงได้ดังตารางที่ 15 พบว่าแอกติโนมัลลิตาเกือบทุกสายพันธุ์มีสารในกลุ่มแอลคาลอยด์ สารในกลุ่มของกรดอะมิโน และสารกลุ่มเทอร์ปีนอยด์เป็นองค์ประกอบ ดังแสดงในโครมาโตแกรมของภาพที่ 24-31 ยกเว้นสายพันธุ์ CNA097 ที่เลี้ยงในอาหารสูตร A ที่ไม่พบสารในกลุ่มแอลคาลอยด์ ซึ่งในการนำองค์ประกอบที่เป็นส่วนผสมของแต่ละสูตรอาหาร เช่น สาหร่าย, soytone, polypeptone และ yeast extracts ที่มีการนำไปใช้ในกระบวนการเจริญของเชื้อ

โดยผ่านวิธีชีวสังเคราะห์ เพื่อให้ได้โมเลกุลของสารที่เชื้อสามารถนำไปใช้ได้ เนื่องจากการนำสารอาหารดังกล่าวเพื่อนำไปใช้ในวิธีชีวสังเคราะห์ของเชื้อแต่ละสายพันธุ์นั้นมีความสามารถแตกต่างกัน ทำให้สารสกัดหายาที่ถูกพิสูจน์ด้วยเทคนิค TLC อาจให้สารในกลุ่มเดียวกัน หรืออาจให้สารในกลุ่มที่แตกต่างกัน ดังปรากฏตามโครมาโตแกรมที่ได้แสดงไว้ข้างต้น และเป็นที่น่าสนใจคือ แอคติโนมัสิทธิ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งสามารถแยกได้จากตะกอนดินในทะเลทั้งหมด ดังนั้นตะกอนดินจึงน่าจะเป็นแหล่งของแอคติโนมัสิทธิ์ที่สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งที่ดี และเหมาะต่อการเก็บตัวอย่างเพื่อการศึกษาต่อไป

ตารางที่ 15 ผลของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง และองค์ประกอบของสารที่มีในสารสกัดหยาบที่ได้จากแอคติโนมัยซีท

Table 15. Cytotoxicity against four human cell lines and composition of marine-derived actinomycetes crude extracts.

Strains	Source	Media	% Cytotoxic activity				Composition of crude extracts		
			MCF-7	HeLa	HT-29	KB	Alkaloids	Amino acids	Terpenoids
CNA097	Sediment	D	85.60	89.45	95.55	75.47	-	+	+
CNA099	Sediment	A	100	94.04	97.38	89.78	+	+	+
		B	94.84	88.01	98.00	78.02	+	+	+
		C	100	87.53	96.53	74.96	+	+	+
		D	92.78	89.98	97.91	85.69	+	+	+
CNA102	Sediment	A	88.56	100	71.72	88.93	+	+	+
		D	92.79	100	94.22	89.68	+	+	+
CNA103	Sediment	A	100	100	94.04	97.66	+	+	+
		B	99.09	100	80.93	81.26	+	+	+
		C	96.85	100	86.97	83.43	+	+	+
CNA104	Sediment	A	96.76	85.33	92.61	79.05	+	+	+
		D	93.97	97.00	82.07	74.46	+	+	+

ตารางที่ 15 (ต่อ)

Table 15. (Cont.)

Strains	Sources	Media	% Cytotoxic activity				Composition of crude extracts		
			MCF-7	HeLa	HT-29	KB	Alkaloids	Amino acids	Terpenoids
CNA112	Sediment	A	100	100	100	100	+	+	+
		B	100	100	100	100	+	+	+
		C	100	100	100	100	+	+	+
		D	99.22	100	100	100	+	+	+
CNA145	Sediment	A	100	97.43	72.51	80.38	+	+	+
		B	99.87	97.64	90.66	80.47	+	+	+
		C	100	95.34	97.79	70.95	+	+	+
		D	100	94.43	92.56	79.80	+	+	+
CNA146	Sediment	A	100	100	78.55	98.18	+	+	+
		B	100	100	91.32	99.09	+	+	+
		C	99.07	100	98.02	87.24	+	+	+
		D	99.47	100	90.36	90.89	+	+	+

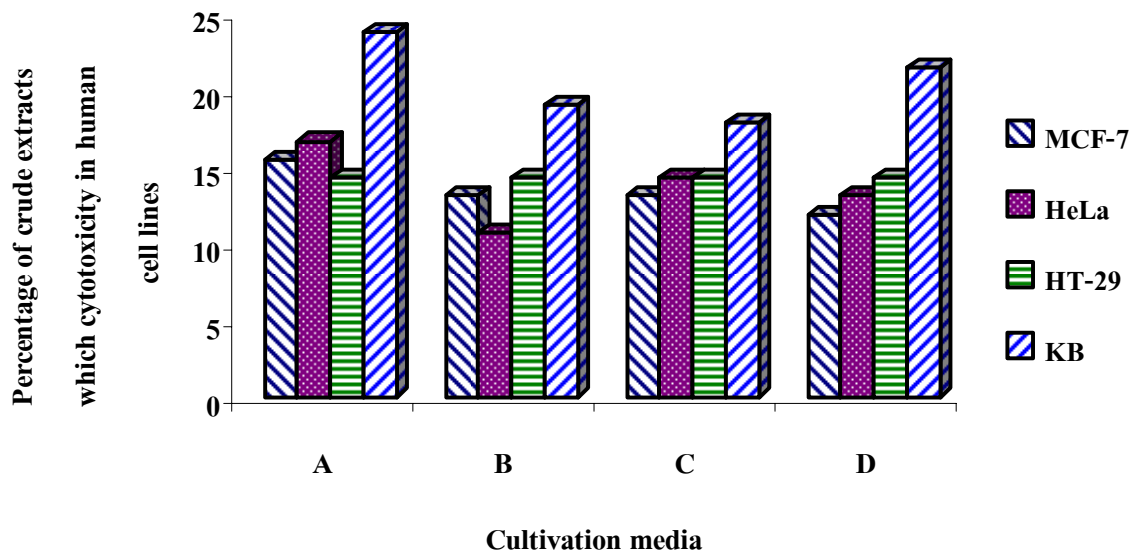
4. องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่ได้จากการเลี้ยงแอกติโนมัยสีทจำนวน 21 สายพันธุ์

จากการเลี้ยงแอกติโนมัยสีทที่แยกได้จากทะเลจำนวน 21 สายพันธุ์ ในขวดรูปทรงกระบอก ทำให้ได้สารสกัดหายทั้งหมด 84 สาร เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งทั้ง 4 ชนิด พบว่าสารสกัดที่ได้จากการเลี้ยงแอกติโนมัยสีทในอาหารเหลวสูตร A (มีองค์ประกอบของสาหร่าย เปลือกกุ้งบด และตะกอนดิน) สามารถผลิตจำนวนสารสกัดหายที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) ได้มากที่สุด รองลงมา คือ เซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) และเซลล์มะเร็งลำไส้ (HT-29) ซึ่งมีจำนวน 20, 14, 13 และ 12 สาร คิดเป็นร้อยละ 23.81, 16.67, 15.48 และ 14.29 ตามลำดับแสดงดังตารางที่ 16 และภาพที่ 32

ตารางที่ 16 จำนวนสารสกัดหายที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งจากการเลี้ยงแอกติโนมัยสีททั้ง 21 สายพันธุ์ในอาหารที่แตกต่างกัน 4 สูตร

Table 16. Number of crude extracts with cytotoxicity classified by cultivation media.

Cultivation media	Number of crude extract with cytotoxicity			
	MCF-7	HeLa	HT-29	KB
A	13	14	12	20
B	11	9	12	16
C	11	12	12	15
D	10	11	12	18



ภาพที่ 32 ร้อยละของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่ได้จากการเลี้ยง แอคติโนมัยสิทในขวดรูปทรงกระบอก

Figure 32. The percentage of crude extract with cytotoxicity classified by media.

เมื่อพิจารณาองค์ประกอบของอาหารสูตร A พบว่ามีสาหร่าย เปลือกกุ้งบด และตะกอนดิน ซึ่งองค์ประกอบของอาหารในสูตรนี้ได้มีการดัดแปลงให้เหมือนแหล่งอาหารที่มีอยู่ตามธรรมชาติ ทำให้ยากต่อการนำอาหารที่เป็นองค์ประกอบเหล่านี้ไปใช้ ทำให้เชื้อแอคติโนมัยสิทต้องมีการสร้าง เอนไซม์ เพื่อย่อยสลายองค์ประกอบของอาหารในสูตรดังกล่าว เพื่อให้เหมาะสมต่อการนำไปใช้ใน กระบวนการในระดับเซลล์ เช่นการสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยสาหร่าย เนื่องจากสาหร่ายมีโปรตีนเป็น องค์ประกอบที่สำคัญ ทำให้ได้สารตั้งต้นซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ สารในกลุ่มของ กรดอะมิโนที่ประกอบด้วย คือ Cysteine, Lysine, Aspartic, Glutamic, Proline, Methionine, Tryptophane, Arginine, และ Ornithine เป็นต้น ซึ่งสารในกลุ่มของกรดอะมิโนที่กล่าวมานั้นจะเป็น สารตั้งต้นในกระบวนการชีววิถีสังเคราะห์ทำให้ได้สารที่มีความหลากหลาย รวมถึงการปรับตัวของ แอคติโนมัยสิทอาจทำให้มีการส่งเสริมให้มีการผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง และพบว่าองค์ประกอบหลักในเปลือกกุ้ง นั่นคือ ไคติน ซึ่งแอคติโนมัยสิทสามารถใช้เป็นแหล่ง คาร์บอน รวมทั้งเป็นแหล่งไนโตรเจนได้อีกด้วย ไคตินเป็นสารจำพวกโพลีเมอร์ที่มีสายยาวมี องค์ประกอบของหน่วยย่อยเป็นอนุพันธ์ของน้ำตาลกลูโคสมีชื่อว่า N-acetyl glucosamine ซึ่งมีธาตุ ไนโตรเจนรวมอยู่ด้วย ทำให้สูตรอาหาร A มีความหลากหลายของสารตั้งต้นจึงส่งผลต่อการผลิต

สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง ไม่ว่าจะเป็นสารกลุ่มแอลคาลอยด์ สารในกลุ่มกรดอะมิโน รวมทั้ง สารในกลุ่มเทอร์ปีนอยด์

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยครั้งนี้มุ่งเน้นการศึกษาแนวทางที่เหมาะสมในการเลี้ยงแอกติโนมัยสีทที่แยกได้จากทะเล ซึ่งทำการคัดเลือกแอกติโนมัยสีทจำนวน 5 สายพันธุ์ที่ผ่านการคัดกรองเบื้องต้นแล้วว่า มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง 4 ชนิด ได้แก่ KB, MCF-7, HeLa และ HT-29 โดยมีรูปแบบของการเลี้ยงในแบบย่อส่วน คือ ขวดรูปทรงกระบอก และ 24-well plate แล้วเปรียบเทียบกับการเลี้ยงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร เพื่อพิจารณาผลของแต่ละวิธีในการผลิตสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง นำวิธีการเลี้ยงแอกติโนมัยสีทที่มีความเหมาะสมไปใช้ในการเลี้ยงแอกติโนมัยสีทจำนวน 21 สายพันธุ์ ทำการคัดเลือกสารสกัดหยาบที่ผ่านการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง และหาลำดับประกอบเบื้องต้นของสารสกัดหยาบ

จากการเลี้ยงแอกติโนมัยสีทจำนวน 5 สายพันธุ์ พบว่าการเลี้ยงแอกติโนมัยสีทในขวดรูปทรงกระบอกมีความเหมาะสมต่อการนำไปใช้ในการเลี้ยงแอกติโนมัยสีท และมีผลทำให้สามารถคัดกรองสารสกัดหยาบ เพื่อที่จะนำสารสกัดหยาบไปทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพได้อย่างรวดเร็ว และจากวิธีการสกัดสารหยาบโดยใช้เอทิลอะซิเตท และการทำแห้งก่อนการสกัดสารหยาบด้วยเมทานอล พบว่าจะให้สารสกัดหยาบในกลุ่มที่แตกต่างกัน คือ เมื่อสกัดสารหยาบด้วยเอทิลอะซิเตทจะให้สารในกลุ่มที่มีขี้ดำ แต่เมื่อทำแห้งตัวอย่างก่อนการสกัดด้วยเมทานอลจะได้สารในกลุ่มที่มีความเป็นขี้สูง

จากการใช้ขวดรูปทรงกระบอกเป็นภาชนะที่ใช้เลี้ยงแอกติโนมัยสีทที่แยกได้จากทะเลจำนวน 21 สายพันธุ์ ทำให้ได้สารสกัดหยาบจำนวน 84 สาร พบว่ามีสารสกัดหยาบจำนวน 24 สาร ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งทั้ง 4 ชนิด (KB, MCF-7, HeLa และ HT-29) ได้แก่ สาร CNA097D, CNA099A, CNA099B, CNA099C, CNA099D, CNA102A, CNA102D, CNA103A, CNA103B, CNA103C, CNA104A, CNA103D, CNA112A, CNA112B, CNA112C, CNA112D, CNA145A, CNA145B, CNA145C, CNA145D, CNA146A, CNA146B, CNA146C และ CNA146D เมื่อทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารที่เป็นองค์ประกอบอย่างคร่าวๆ ของสารสกัดหยาบ โดยการใช้รีเอเจนท์ที่มีความจำเพาะต่อกลุ่มสาร พบว่าสารสกัดหยาบที่ได้มีองค์ประกอบสารในกลุ่มแอลคาลอยด์ สารกลุ่มกรดอะมิโน และสารในกลุ่มเทอร์ปีนอยด์

เมื่อพิจารณาแหล่งที่มาของเชื้อแอกติโนมัยสีทที่สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง พบว่าเชื้อแอกติโนมัยสีททั้งหมดมีแหล่งที่มาจากตะกอนดิน ดังนั้นแหล่งตะกอน

ดินจึงเป็นแหล่งของแอกติโนมัยสีทอีกแหล่งหนึ่งที่น่าสนใจ เพื่อใช้เป็นแหล่งในการเก็บตัวอย่าง และการแยกตัวอย่างในการศึกษาในครั้งต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- สุภานันท์ แซ่ลี้ม. 2548. สารต้านแบคทีเรียจากแอคติโนมัยซีทในทะเลของประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- Adinarayana, G., Venkateshan, M. R., Bapiraju, V. V. S. N. K., Sujatha, P., Premkumar, J., Ellaiah, P. and Zeeck, A. 2006. Cytotoxic compounds from the marine actinobacterium *Streptomyces corchoruii* AUBN₁/7¹. *Russian J. Bioorg. Chem.* 32: 295-300.
- Betts, J. I. and Baganz, F. 2006. Review: miniature bioreactors: current practices and future opportunities. *Microb. Cell Factories.* 5: 1-14.
- Bitzer, J. Grobe, T., Wang, L. Lang, S. Biel, W. and Zeeck, A. 2006. New aminophenoxazinone from marine *Halomonas* sp.: fermentation, structure elucidation and biological activity. *J. Antibiot.* 59: 86-92.
- Blunt, J. W., Copp, W. P., Munro, M. H. G., Nothcote, P. T., and Prinsep, M. R. 2005. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 22: 15-61
- Cai, P., Kong, F., Ruppen, M. E., Glasier, G. and Carter, G. T. 2005. Hygrocins A and B, naphthoquinone macrolides from *Streptomyces hygroscopicus*. *J. Nat. Prod.* 68: 1736-1742.
- Capon, R. J., Skene, C., Lacey, E., Gill, J. H., Wicker, J., Heiland, K. and Friedel, T. 2000. Lorneamides A and B: two new aromatic amides from a southern Australian marine actinomycete. *J. Nat. Prod.* 63: 1682-1683.
- Cascon, L. M., Romero, F., Vazquez, F. E., Gravalos, D. and Puentes, J. L. F. 2003. IB-00208, A new cytotoxic polycyclic xanthone produced by a marine-derived *Actinomadura*. *J. Antibiot.* 3: 219-225.
- Charan, R. D., Schlingmann, G., Janson, J., Bernan, V., Feng, X. and Carter, G. T. 2004. Diazepinomicin, a new antimicrobial alkaloid from a marine *Micromonospora* sp. *J. Nat. Prod.* 67: 1431-1433.
- Cho, J. Y., Williams, P. G., Kwon, H. C., Jensen, P. R. and Fenical, W. 2007. Lucentamycins A-D, cytotoxic peptides from the marine-derived actinomycete *Nocardiopsis lucentensis*. *J. Nat. Prod.* 70: 1321-1328.

- Duezt, W. A., Rüedi, L., Hermann, R., O'Conner, K., Büchs, J. and Witholt, B. 2000. Method for intense aeration, growth, storage and replication of bacterial strains in microtiter plates. *Appl. Environ. Microbiol.* 2641-2646.
- Fenical, W. and Jensen, P. R. 2006. Perspective, developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. *Nature.* 2: 666-673.
- Feling, R. H., Buchanan, G. O., Mincer, T. J., Kauffman, C. A., Jensen, P. R. and Fenical, W. 2003. Salinosporamide A: a highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus *Salinospora*. *Angew. Chem. Int. Ed.* 42: 355-357.
- Glazer, A. N., and Nikaido, H. 1994. *Microbial Biotechnology*. W. H. Freeman. USA.
- Goodfellow, M., Mordarski, M. and William, S.T. 1984. *The biology of the actinomycetes*. Academic Press. London.
- Hardt, I. H., Jensen, P. R. and Fenical, W. 2000. Neomarinone, and new cytotoxic marinone derivatives, produced by a marine filamentous bacterium (Actinomycetales). *Tetrahedron Lett.* 41: 2073-2076.
- He, H., Ding, W. D., Berman, V. S., Richardson, A. D., Ireland, C. M., Greenstein, M., Ellestad, G. A. and Carter, G. T. 2001. Lomaviticins A and B, potent antitumor antibiotics from *Micromonospora lomavitiensis*. *J. Am. Chem. Soc.* 123: 5362-5363.
- Herbert, R. B. 2001. The biosynthesis of plant alkaloids and nitrogenous microbial metabolites. *Nat. Prod. Rep.* 18: 50-65.
- Imada, C. and Okami, Y. 1994. Characteristic of marine actinomycete isolated from a deep-sea sediment and production of β -glucosidase inhibitor. *J. Mar. Biotechnol.* 2: 109-113.
- Jensen, P. R., Dwight, R. and Fenical, W. 1991. Distribution of actinomycetes in near- Shore tropical marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1102-1108.
- Jiang, Z. D. Jensen, P. R. and Fenical, W. 1997. Actinoflavoside, a novel flavonoid-like glycoside produced by marine bacterium of genus *Streptomyces*. *Tetrahedron Lett.* 38: 5065-5068.
- Jork, H., Funk, W., Fischer, W. and Wimmer, H. 1990. Reagents and Detection Methods: Physical and Chemical Detection Methods. *In Thin-Layer Chromatography*. Vol 1. D-6940 Weinheim. Germany.

- Kala, R. R. and Chandrika, V. 1993. Effect of different media for isolation, growth and maintenance of actinomycetes from mangrove sediments. *J. Mar. Sci.* 2: 297-299.
- Katzer, W., Blackburn, M., Charman, K., Martin, S., Penn, J. and Wrigley, S. 2001. Scale-up of filamentous organisms from tubes and shake-flasks into stirred vessels. *J. Bio. Eng.* 7: 127-134.
- Kim, Y. P., Tomoda, H., Iizima, K., Fukuda, T., Matsumoto, A., Takahashi, Y. and Omura, S. 2003. Takanawaenes, novel antifungal antibiotics produced by *Streptomyces* sp. K99-5278, I. taxonomy, fermentation, isolation and biological properties. *J. Antibiot.* 56: 448-453.
- Macherla, V. R., Liu, J., Sunga, M., White, D. J., Grodberg, J., Teisan, S., Lam, K. S., and Potts, B. C. M. 2007. Lipoxazolidinones A, B, and C: antibacterial 4-oxazolidinones from a marine actinomycete isolated from a guam marine sediment. *J. Nat. Prod.* 70: 1454-1457.
- Magarvey, N. A., Keller, J. M., Bernan, V., Dworkin, M. and Sherman, D. H. 2004. Isolation and characterization of novel marine-derived actinomycete taxa rich in bioactive metabolites. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 7520-7529.
- Manam, R. R., Teisan, S., White, D. J., Nicholson, B., Grodberg, J., Neuteboom, S. T. C., Lam, K. S., Mosca, D. A., Lloyd, G. K. and Potts, B. C. M. 2005. Lajollamycin, a nitro-tetraene spiro-beta-lactone-gamma-lactam antibiotic from marine actinomycete *Streptomyces nodosus*. *J. Nat. Prod.* 68: 240-243.
- Martin, G. D. A., Tan, L. T., Jensen, P. R., Dimayuga R. E., Fairchild, C. R., Raventos-Suarez, C. and Fenical, W. 2007. Marmycins A and B, cytotoxic pentacyclic c-glycosides from a marine sediment-derived actinomycete related to the genus *Streptomyces*. *J. Nat. Prod.* 70: 1406-1409.
- Miller, E. D., Kauffman, C. A., Jensen, P. R. and Fenical, W. 2007. Piperazimycins: cytotoxic hexadepsipeptides from a marine-derived bacterium of the genus *Streptomyces*. *J. Org. Chem.* 72: 323-330.
- Minas, W., Bailey, J. E. and Duezt, W. 2000. Streptomycetes in micro-culture: growth, production of secondary metabolites, and storage and retrieval in the 96-well format. *Antonie van Leeuwenhoek.* 78: 297-305.

- Mincer, T. J., Jensen, P. R., Kauffman, C. A. and Fenical, W. 2002. Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5005-5011.
- Mitchell, S. S., Nicholson, B., Tiesan, S., Lam, S. K. and Potts, B. C. M. 2004. Aureoverticillactam, a novel 22 – atom macrocyclic lactam from the marine actinomycetes *Streptomyces aureoverticillatus*. *J. Nat. Prod.* 67: 1400-1402.
- Miyadoh, S. 1997. Atlas of Actinomycetes. The Society for Actinomycetes Japan. Japan.
- Moore, B. S., Trischman, J. A., Seng, D., Kho, D., Jensen, P. R., and Fenical, W. 1999. Salinamides, anti-inflammatory depsipeptides from a marine streptomycete. *J. Org. Chem.* 64: 1145-1150.
- Motohashi, K., Sue, M., Furihata, K., Ito, S. and Seto, H. 2008. Terpenoids produced by actinomycetes: napyradiomycins from *Streptomyces antimycoticus* NT17. *J. Nat. Prod.* 71: 595-601.
- Mukku, V. J. R. V., Speitling, M. Laatsch, H. and Helmke, E. 2000. New butenolides from two marine streptomycetes. *J. Nat. Prod.* 66: 1570-1572.
- Oh, D. C., Williams, P. G., Kauffman, C. A., Jensen, P. R., and Fenical, W. 2006. Cyanosporasides A and B, chloro- and cyano-cyclopenta[a]indene glycosides from the marine actinomycete "*Salinispora pacifica*". *American Chemical Society.* 8: 1021-1024.
- Riedlinger, J., Reicke, A., Zahner, H., Krismer, B., Bull, A. T., Maldonado, L. A., Ward, A. C., Goodfellow, M., Bister, B., Bischoff, D. 2004. Abyssomicins, inhibitors of the para-aminobenzoic acid pathway produced by the marine *Verrucosipora* strain AB-18-032. *J. Antibiot.* 57: 271-279.
- Sakano, Y., Shibuya, M., Matsumoto, A., Takahashi, Y., Tomoda, H., Omura, S., Ebizuka, Y. 2003. Lanopylins A1, B1, A2 and B2, novel lanosterol synthase inhibitors from *Streptomyces* sp. K99-5041. *J. Antibiot.* 56: 817-826.
- Shik, S. II., Mo, L. J. and Yeon, P. U. 2000. Optimum condition of marine actinomycetes, *Streptomyces* sp. NS 13239 for growth and producing antibiotics. *J. Fish. Sci. Technol.* 3: 217-221.

- Shin, J., Seo, Y., Lee, H. S., Rho, J. R. and Mo, S. J. 2003. A new cyclic peptide from a marine-derived bacterium of the genus *Nocardiopsis*. *J. Nat. Prod.* 66: 883-884.
- Shcumacher, R. W., Davidson, B. S., Montenergro, D. A. and Bernann, V. S. 1995. γ -Indomycinone, a new pluramycin metabolite from a deep-sea derived actinomycete. *J. Nat. Prod.* 58: 613-617.
- Shcumacher, R. W., Harrigan, B. L. and Davidson, B. S. 2001. Kahakamide A and B, new neosidomycin metabolites from a marine-derived actinomycete. *Tetrahedron Lett.* 42: 5133-5135.
- Shcumacher, R. W., Talmage, S. C., Miller, S. A., Sarris, K. E., Davidson, B. S. and Goldberg, A. 2003. Isolation and structure determination of an antimicrobial ester from a marine sediment-derived bacterium. *J. Nat. Prod.* 66: 1291-1293.
- Singh, M. P., Petersen, P. J., Weiss, W. J., Janso, J. E., Luckman, S. W., Lenoy, E. B., Bradford, P. A., Testa, R. T., Greenstein, M. 2003. Mannopeptimycins, new cyclic glycopeptide antibiotics produced by *Streptomyces hygrosopicus* LL-AC98: antibacterial and mechanistic activities. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 47: 62-69.
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S. and Boyd, M. R. 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer. Inst.* 82: 1107-1112.
- Soria-Mercado. I. E., Prieto-Davo, A., Jensen, P. R. and Fenical, W. 2006. Antibiotic terpenoid chloro-dihydroquinones from a new marine actinomycete. *J. Nat. Prod.* 68: 904-910.
- Stritzke, K., Schulz, S., Laatsch, H., Helmke, E. and Beil, W. 2004. Novel caprolactones from a marine Streptomyce. *J. Nat. Prod.* 67: 395-401.
- Stackbrandt, E., Rainey, F. A. and Ward-Rainey, N. L. 1997. Proposal of a new hierarchic classification system, actinobacteria classic. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 479-491.
- Takahashi, C., Takada, T., Yamada, T., Mlnoura, K., Uchlda, K., Mataumura, E. and Numata, A. 1994. Halichomycin, A new class of potent cytotoxic macrolide produced by an actinomycete from a marine fish. *Tetrahedron Lett.* 35: 5013-5014.

- Tani, M., Harimaya, K., Gyobu, Y., Sasaki, T., Takenouchi, O., Kawamura, T., Kamimura, T., Harada, T. 2004. SF2809 compounds, novel chymase inhibitors from *Dactylosporangium* sp. 1. taxonomy, fermentation, isolation and biological properties. *J. Antibiot.* 57: 83-88.
- Tani, M., Harimaya, K., Gyobu, Y., Sasaki, T., Takenouchi, O., Kawamura, T., Kamimura, T., Harada, T. 2004. SF2809 compounds, novel chymase inhibitors from *Dactylosporangium* sp. 2. structural elucidation. *J. Antibiot.* 57: 89-96.
- Takizawa, M., Colwell, R. R. and Hill, R. T. 1993. Isolation and diversity of actinomycetes in the Chesapeake Bay. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 997-1002.
- Tsuda, M., Yamakawa, M., Oka, S., Tanaka, Y., Hoshino, Y., Mikami, Y., Sato, A., Fujiwara, H., Ohizumi, Y., and Kobayashi, 2005. Brasilibactin A, a cytotoxic compound from actinomycete *Nocardia brasiliensis*. *J. Nat. Prod.* 68: 462-464.
- Vasavada, S. H., Thumar, J. T. and Singh, S. P. 2006. Secretion of a potent antibiotic by salt-tolerant and alkaliphilic actinomycete *Streptomyces sannanensis* strain RJT-1. *Curr. Sci.* 91: 1393-1397.
- Vobis, G. 1997. Morphology of Actinomycetes. *In Atlas of Actinomycetes.* (Miyado, S., ed.), p. 180-191. The Society for Actinomycetes Japan. Japan.
- William, R. H. 1989. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* Vol. 4. Baltimore. Williams & Wilkins. U.S.A.
- Williams, P. G., Asolkar, R. N., Kondratyuk, T., Pezzuto, J. M., Jensen, P. R. and Fenical W. 2007. Saliniketals A and B, bicyclic polyketides from the marine actinomycete *Salinispora arenicola*. *J. Nat. Prod.* 70: 83-88.
- Williams, P. G., Buchanan, G. O., Feling, R. H., Kauffman, C. A., Jensen, P. R. and Fenical, W. 2005. New cytotoxic salinosporamides from the marine actinomycete *Salinispora tropica*. *J. Org. Chem.* 70: 6196-6203.
- Zheng, Z., Zeng, W., Huang, Y., Yang, Z., Li, J., Cai, H. and Su, W. 2000. Detection of antitumor and antimicrobial activities in marine organism associated actinomycetes isolated from the Taiwan Strait China. *FEMS Microbiol. Lett.* 188: 87-91.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหาร และวิธีการเตรียมอาหารเพื่อใช้เลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยสีท

1. อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยสีท 4 สูตร

อาหารสูตร A (ดัดแปลงจาก Mitchell *et al.*, 2004)

องค์ประกอบของอาหาร

ตะกอนดินจากทะเล	1.0	กรัม
สาหร่าย	2.0	กรัม
เปลือกกุ้งป่น	1.0	กรัม
น้ำทะเล	100	มิลลิลิตร

อาหารสูตร A ที่มีองค์ประกอบของวัสดุมาจากธรรมชาติ ได้แก่ ตะกอนดิน สาหร่าย และเปลือกกุ้งบด วิธีการเตรียมตะกอนดินสามารถทำได้โดยการนำตะกอนดินที่เก็บมาจากทะเลที่ระดับความลึกประมาณ 1 เมตร นำมาล้างแดดให้แห้งสนิท จากนั้นจึงร่อนแยกขนาดคัดเลือกเฉพาะตะกอนดินที่มีขนาดกลางและขนาดเล็กประมาณ 500-1,000 ไมครอน อบตะกอนดินที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง การเตรียมสาหร่ายเลือกใช้สาหร่าย *Porphyra* sp. แบบแห้งที่มีจำหน่ายทั่วไป นำมาบดให้ละเอียด และสำหรับการเตรียมวัสดุที่มีไคติน จากเปลือกกุ้ง โดยการนำเปลือกกุ้งตากให้แห้งสนิท บดให้ละเอียด และเก็บรักษาไว้ในที่แห้ง นำส่วนประกอบของอาหารทั้งหมดละลายในน้ำทะเล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปริมาตร 8 มิลลิลิตร และปริมาตร 2 มิลลิลิตร สำหรับเลี้ยงในขวดเขย่าขนาด 250 มิลลิลิตร Scintillation vial และ 24-well plate ตามลำดับ โดยนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

อาหารสูตร B (ดัดแปลงจาก Capon *et al.*, 2000)

องค์ประกอบของอาหาร

กลีเซอรอล	2.0	กรัม
Soytone	1.0	กรัม
น้ำทะเล	100	มิลลิลิตร

นำส่วนประกอบของอาหารทั้งหมดละลายในน้ำทะเล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปริมาตร 8 มิลลิลิตร และปริมาตร 2 มิลลิลิตร สำหรับเลี้ยงในขวดเขย่าขนาด 250 มิลลิลิตร Scintillation vial และ 24-well plate ตามลำดับ โดยนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

อาหารสูตร C (ดัดแปลงจาก Moore *et al.*, 1999)

องค์ประกอบของอาหาร

Polypeptone	1.0	กรัม
Soluble starch	1.0	กรัม
Yeast extracts	1.0	กรัม
น้ำทะเล	100	มิลลิลิตร

นำส่วนประกอบของอาหารทั้งหมดละลายในน้ำทะเล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปริมาตร 8 มิลลิลิตร และปริมาตร 2 มิลลิลิตร สำหรับเลี้ยงในขวดเขย่าขนาด 250 มิลลิลิตร Scintillation vial และ 24-well plate ตามลำดับ โดยนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

อาหารสูตร D (ดัดแปลงจาก Imada and Okami, 1994)

องค์ประกอบของอาหาร

Peptone	0.5	กรัม
Yeast extracts	0.5	กรัม
น้ำทะเล	100	มิลลิลิตร

นำส่วนประกอบของอาหารทั้งหมดละลายในน้ำทะเล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปริมาตร 8 มิลลิลิตร และปริมาตร 2 มิลลิลิตร สำหรับเลี้ยงในขวดเขย่าขนาด 250 มิลลิลิตร Scintillation vial และ 24-well plate ตามลำดับ โดยนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

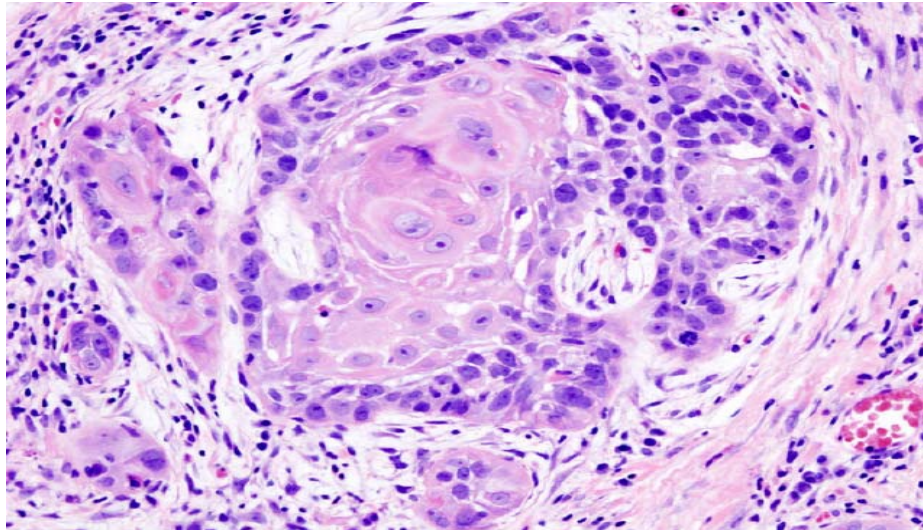
2. Nutrient agar

Nutrient broth	8.0	กรัม
Agar	20.0	กรัม
น้ำทะเล	1000	มิลลิลิตร

นำส่วนประกอบของอาหารทั้งหมดละลายในน้ำทะเล ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร โดยนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

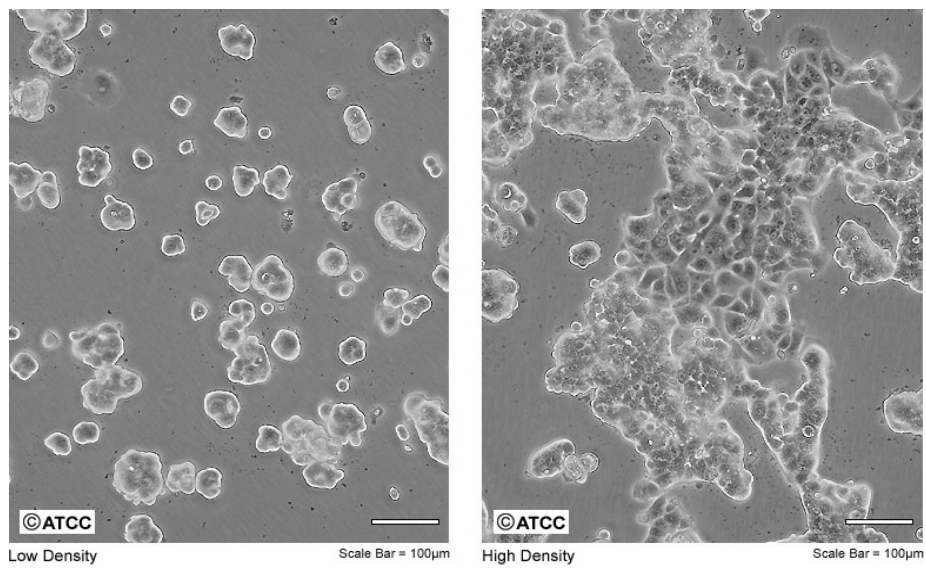
ภาคผนวก ข

1. เซลล์มะเร็งที่ใช้ในการทดสอบสารสกัดหยาบที่ได้จากแอคติโนมัยซีท



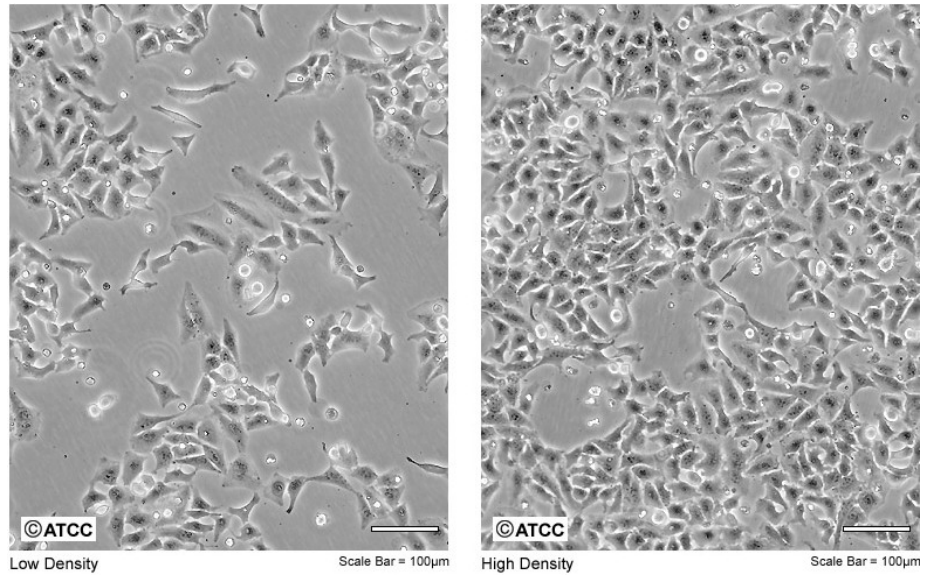
ภาพที่ 33 เซลล์มะเร็งเยื่อช่องปาก

Figure 33. Human oral cancer cell line (KB)



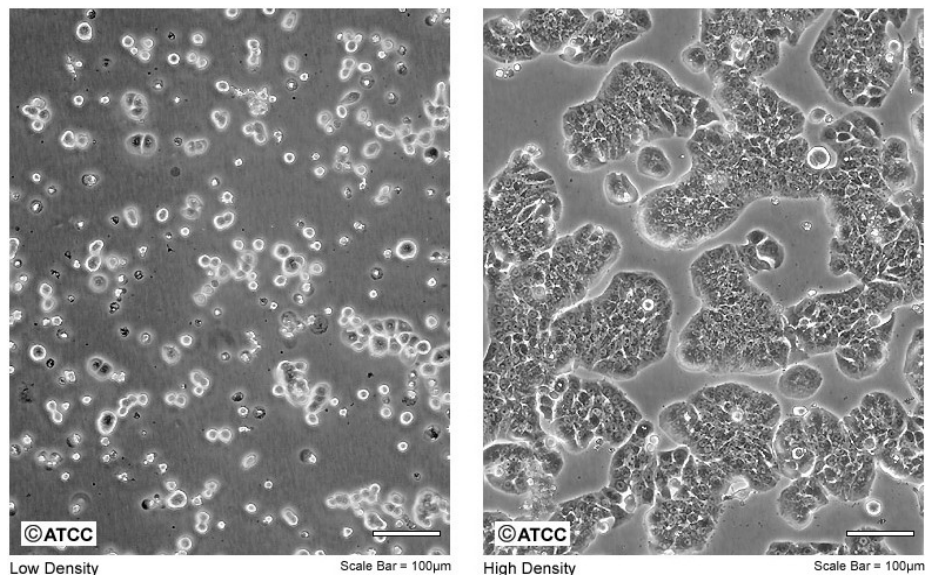
ภาพที่ 34 เซลล์มะเร็งเต้านม

Figure 34. Breast adenocarcinoma cell line (MCF-7)



ภาพที่ 35 เซลล์มะเร็งลำไส้

Figure 35. Human colon adenocarcinoma cell line (HT-29)



ภาพที่ 36 เซลล์มะเร็งปากมดลูก

Figure 36. Human cervical cancer cell line (HeLa)

2. การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์มะเร็ง

อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีจำหน่ายอาจจะอยู่ในรูปของผงแห้ง หรือเป็นของเหลว อาหารที่เป็นผงแห้งจะมีราคาถูกและเก็บไว้ได้นานกว่าแต่ต้องนำมาละลายน้ำทำการปรับ pH และทำให้ปราศจากเชื้อเอง โดยในสูตรอาหารอาจจะมี NaHCO_3 , glutamine หรือ pyruvate อยู่ใน ส่วนประกอบอยู่แล้ว แต่ถ้าไม่มีต้องทำการเติมสารอาหารเหล่านี้ภายหลังตามที่กำหนดไว้ (โดยดูได้จากรายละเอียดของส่วนประกอบให้ครบถ้วน เนื่องจากอาหารที่มีจำหน่ายมีสูตรแตกต่างกันหลายแบบ) น้ำที่ใช้เตรียมจะต้องเป็นน้ำบริสุทธิ์เป็นพิเศษ (ultrapure water) คือ มีกรรมวิธีที่ผ่านการกลั่นด้วยภาชนะที่เป็นแก้ว ผ่านการกรองด้วยคาร์บอนฟิลเตอร์ ผ่านการกำจัดไอออน (deionization) และผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองในขั้นตอนสุดท้ายของกระบวนการทำน้ำให้บริสุทธิ์ โดยเครื่องมือทุกอย่างที่สัมผัสกับอาหารต้องทำให้ปราศจากเชื้อมาก่อน ซึ่งกระบวนการกรองเพื่อให้ อาหารปราศจากเชื้อ และทำการแบ่งอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการกรองมาแล้วโดยต้องทำใน laminar air flow hood อาหารที่เตรียมได้ต้องทำการทดสอบความปราศจากเชื้อ และเก็บไว้ในตู้เย็น ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และควรรักษาให้หมดภายในเวลา 3 เดือน เมื่อต้องการใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ จะต้องทำการเติมสารที่จำเป็นต่อการเจริญของเซลล์ เช่น glutamine, non-essential amino acids หรือ ยาปฏิชีวนะ และ serum (fetal calf serum หรือ new born calf serum) อาหารที่มีการเติมสารที่ จำเป็นต่อการเจริญของเซลล์ควรรักษาให้หมดภายในเวลา 3 สัปดาห์

2.1 สารเคมีและอุปกรณ์

1. อาหารเลี้ยงเซลล์ Eagle's minimum essential media (EMEM) ชนิดผงที่มีส่วนประกอบของ Earle's salts, L-glutamine แต่ไม่มีส่วนประกอบของ โซเดียมไบคาร์บอเนต (NaHCO_3) โดย 1 ซอง สำหรับเตรียมอาหาร 1 ลิตร (โดยเก็บอาหารชนิดผงไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส)
2. น้ำบริสุทธิ์ ปริมาตร 1500 มิลลิลิตร ซึ่งสามารถใช้ Sterile water for injection ได้
3. 100x Antibiotics ประกอบด้วย 1,000 units/ml penicillin G sodium, 10,000 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin sulfate และ 25 $\mu\text{g/ml}$ amphotericin B as fungizone in 0.85% saline (สารเหล่านี้จะทำการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -5 หรือ -20 องศาเซลเซียส)
4. Heat Inactivated new born calf serum (เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -5 หรือ -20 องศาเซลเซียส)
5. Sodium bicarbonate (NaHCO_3)
6. ชุดเครื่องกรอง
7. แผ่นกรอง ขนาดรู 0.22 ไมครอน
8. เครื่อง Pump
9. ภาชนะสำหรับใส่อาหารเลี้ยงเซลล์

2.2 วิธีการเตรียมอาหาร

1. นำน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 900 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดปรับปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 1000 มิลลิลิตร
2. เทอาหารออกจากช่อง โดยทำการนำน้ำกลั้วภายในช่องเพื่อละลายอาหารออกมาให้หมด คนจนผงละลายน้ำหมด
3. เติมโซเดียมไบคาร์บอเนต (NaHCO_3) 3.7 กรัม ต่ออาหาร 1 ลิตร ผสมให้เข้ากัน เติม 100x Antibiotics solution 1 มิลลิลิตร แล้วทำการปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร
4. ทำการปรับ pH โดยการเติม 1N NaOH หรือ 1 N HCl ให้ได้ pH 7.2-7.3 (โดยทำการปรับ pH ให้ต่ำกว่าที่ต้องการอยู่ประมาณ 0.2-0.3 unit เมื่อทำการกรอง pH จะเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อยจนได้ค่า pH ที่ต้องการ) เมื่อทำการปรับ pH แล้วปิดฝาขวดให้สนิท
5. ทำการกรองอาหารเลี้ยงเซลล์ให้ปราศจากเชื้อทันที เนื่องจากหากมีการวางอาหารทิ้งไว้จะทำให้ pH ของอาหารมีการเปลี่ยนแปลง โดยทำการกรองซึ่งใช้แผ่นกรอง polycarbonate, cellulose acetate หรือ cellulose nitrate ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร ขนาดรูของกระดาษกรอง 0.22 ไมครอน
6. เมื่อทำการกรองเสร็จ จากนั้นทำการแบ่งอาหารใส่ภาชนะที่ปราศจากเชื้อ เพื่อนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการทดสอบอาหารว่ามีการปนเปื้อนหรือไม่ โดยการนำอาหารปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปลอดเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง หากมีความขุ่นเกิดขึ้นให้ทดลองกับขวดอื่น ถ้าให้ผลเหมือนเดิมให้กำจัดอาหารทิ้งทั้งหมด หากอาหารสามารถใช้ได้ควรใช้อาหารให้หมดภายในระยะเวลา 3 เดือน
7. ทำการแบ่งอาหารใส่ภาชนะปราศจากเชื้อขนาด 250 มิลลิลิตร บรรจุอาหารปริมาตร 180 มิลลิลิตร และทำการเติม New born calf serum (NCS) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร (คิดเป็น 10 % NCS) สำหรับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีการเติมเซรัมลงไป ควรใช้เลี้ยงเซลล์ให้หมดภายในระยะเวลา 2-3 สัปดาห์

ภาคผนวก ค

ผลการทดลอง

ตารางที่ 17 ร้อยละของการยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารสกัดหยาบที่ได้จากแอคติโนมัยซีทที่เลี้ยงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร และสกัดสารหยาบด้วยเอทิลอะซิเตท

Table 17. Percentage of cytotoxicity of marine-derived actinomycetes extracts were cultivated in shaken flasks that extracted with ethyl acetate.

Culture number	Cytotoxicity (%)			
	MCF-7 (Breast cancer)	HeLa (Cervical cancer)	HT-29 (Colon cancer)	KB (Oral cavity cancer)
CNA002A F80	74.06±6.85	87.45±7.32	87.96±6.86	81.42±4.13
CNA002B F80	82.59±13.39	84.24±21.14	78.29±19.93	81.19±11.69
CNA002C F80	36.27±7.36	22.63±5.24	27.63±7.79	-96.013±38.70
CNA002D F80	70.57±15.69	68.19±35.55	76.94±4.22	55.25±40.95
CNA003A F80	86.75±18.43	94.58±9.06	100	-17.44±26.33
CNA003B F80	96.93±2.94	91.46±13.04	100	-11±31.87
CNA003C F80	90.53±11.03	99.43±1.13	100	69.02±27.19
CNA003D F80	96.54±3.74	99.58±0.50	100	100
CNA031A F80	100	100	100	99.76±0.30
CNA031B F80	100	100	97.63±6.65	100
CNA031C F80	100	100	100	100
CNA031D F80	100	98.75±5.15	100	100
CNA039A F80	99.48±0.46	99.57±0.37	100	99.99±0.02
CNA039B F80	97.93±2.00	99.61±0.44	100	99.97±0.06
CNA039C F80	98.73±2.92	100	100	100
CNA039D F80	99.64±1.23	100	100	99.74±0.35
CNA053A F80	99.89±0.34	100	100	100

ตารางที่ 17 (ต่อ)

Table 17. (Cont.)

Culture number	Cytotoxicity (%)			
	MCF-7 (Breast cancer)	HeLa (Cervical cancer)	HT-29 (Colon cancer)	KB (Oral cavity cancer)
CNA053A F80	99.89±0.34	100	100	100
CNA053B F80	100	100	100	100
CNA053C F80	100	100	100	100
CNA053D F80	99.45±0.19	100	100	90.53±13.39

F80 หมายถึง น้ำหมักและตัวเซลล์ของแอกติโนมัลลิตราปริมาณ 80 มิลลิลิตรที่สกัดด้วยตัวทำละลาย เอทิลอะซิเตทในอัตราส่วน 1:1

ตารางที่ 18 ร้อยละของการยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารสกัดหยาบที่ได้จากแอคติโนมัยซีทซึ่ง
เลี้ยงในฟลาस्कขนาด 250 มิลลิลิตร และทำแห้งก่อนสกัดสารหยาบด้วยเมทานอล

Table 18. Percentage of cytotoxicity of marine-derived actinomycetes extracts were
cultivated in shaken flasks that extracted with methanol.

รหัสตัวอย่าง	Cytotoxic activity (%)			
	MCF-7 (Breast cancer)	HeLa (Cervical cancer)	HT-29 (Colon cancer)	KB (Oral cavity cancer)
CNA002A F20	97.22±1.72	32.46±12.29	95.77±2.00	29.09±1.01
CNA002B F20	84.82±5.54	40.22±20.41	89.70±5.07	73.49±0.61
CNA002C F20	100±0.00	33.07±13.54	85.93±1.77	85.67±0.33
CNA002D F20	59.28±28.07	61.10±0.07	33.97±1.78	56.61±0.73
CNA003A F20	81.88±4.90	95.21±2.40	94.85±2.78	87.20±4.68
CNA003B F20	56.89±5.26	84.33±1.67	84.38±1.96	4.13±0.54
CNA003C F20	77.78±0.39	97.10±1.84	95.71±2.22	42.60±5.61
CNA003D F20	96.27±2.50	87.66±2.34	88.71±1.56	73.09±0.37
CNA031A F20	100.00±0.00	100.00±0.00	81.36±0.85	72.32±0.66
CNA031B F20	100.00±0.00	100.00±0.00	78.29±5.78	79.03±0.57
CNA031C F20	100.00±0.00	77.94±0.57	78.34±4.57	87.16±0.59
CNA031D F20	100.00±0.00	98.13±1.78	95.01±0.58	88.07±0.58
CNA039A F20	96.53±1.07	99.14±0.85	98.94±0.53	100.00±0.00
CNA039B F20	98.37±1.08	100.00±0.00	98.86±0.46	100.00±0.00
CNA039C F20	98.72±0.85	100.00±0.00	100.00±0.00	99.52±0.47
CNA039D F20	99.52±0.29	98.79±1.20	99.91±0.08	99.90±0.09
CNA053A F20	98.25±1.71	100.00±0.00	99.22±0.39	100.00±0.00
CNA053B F20	99.98±0.01	100.00±0.00	99.20±0.35	100.00±0.00
CNA053C F20	99.82±0.10	99.16±0.46	98.91±0.33	99.70±0.17
CNA053D F20	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00	98.08±0.53

F20 หมายถึง น้ำหมักและตัวเซลล์ของแอคติโนมัยซีทปริมาตร 80 มิลลิลิตรที่ได้จากการเลี้ยงใน
ขวดเขย่า ที่ผ่านการทำแห้ง และสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลในอัตราส่วน 1:1

ตารางที่ 19 ร้อยละของการยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารสกัดหยาบที่ได้จากแอคติโนมัยซีทซึ่ง
เลี้ยงในขวดรูปทรงกระบอกขนาด 8 มิลลิลิตร และสกัดสารหยาบด้วยเมทานอล

Table 19. Percentage of cytotoxicity of marine-derived actinomycetes extracts were
cultivated in scintillation vial that extracted with methanol.

รหัสตัวอย่าง	Cytotoxic activity (%)			
	MCF-7 (Breast cancer)	HeLa (Cervical cancer)	HT-29 (Colon cancer)	KB (Oral cavity cancer)
CNA002A V	40.37±2.66	98.95±1.04	92.33±5.26	-9.41±7.60
CNA002B V	22.99±4.26	80.92±7.31	82.34±7.04	32.02±7.30
CNA002C V	21.22±5.81	44.42±5.32	79.84±4.66	46.57±4.79
CNA002D V	74.25±0.45	100.00±0.00	93.99±4.89	50.56±0.99
CNA003A V	72.47±1.51	97.66±1.40	93.73±2.63	27.17±1.24
CNA003B V	-100.00±0.00	89.45±4.15	-58.39±22.26	-100.00±0.00
CNA003C V	-100.00±0.00	94.43±2.78	-47.99±16.05	-100.00±0.00
CNA003D V	83.51±1.19	100.00±0.00	-25.77±17.06	96.33±1.52
CNA031A V	96.72±1.68	100.00±0.00	99.68±0.31	100.00±0.00
CNA031B V	79.75±4.72	91.39±6.81	97.13±3.43	100.00±0.00
CNA031C V	86.65±3.30	97.70±2.29	92.69±4.58	39.44±7.01
CNA031D V	91.00±3.82	99.94±0.05	99.23±0.41	26.74±1.99
CNA039A V	99.91±0.07	99.10±0.57	100.00±0.00	99.22±0.24
CNA039B V	96.94±0.35	73.10±2.38	96.49±0.48	98.90±0.56
CNA039C V	98.13±0.42	61.50±6.66	91.63±1.25	98.56±0.32
CNA039D V	96.76±0.88	76.87±1.68	97.53±0.34	100.00±0.00
CNA053A V	99.35±0.64	100.00±0.00	98.93±0.51	100.00±0.00
CNA053B V	96.02±0.82	91.19±0.47	96.47±1.20	100.00±0.00
CNA053C V	93.81±2.51	84.84±1.09	97.22±0.61	100.00±0.00
CNA053D V	96.23±1.35	98.79±1.20	98.63±1.36	96.11±0.24

V หมายถึง น้ำหมักและตัวเซลล์ของแอคติโนมัยซีทปริมาตร 8 มิลลิลิตรที่ได้จากการเลี้ยงใน
scintillation vial ที่ผ่านการทำแห้ง และสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลในอัตราส่วน 1:1

ตารางที่ 20 ร้อยละการยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารสกัดหยาบที่ได้จากแอคติโนมัยซีทซึ่ง
เลี้ยงใน 24-well plate และสกัดสารหยาบด้วยเมทานอล

Table 20. Percentage of cytotoxicity of marine-derived actinomycetes extracts were
cultivated in 24-well plate that extracted with methanol.

รหัสตัวอย่าง	Cytotoxic activity (%)			
	MCF-7 (Breast cancer)	HeLa (Cervical cancer)	HT-29 (Colon cancer)	KB (Oral cavity cancer)
CNA002A WP	61.77±5.21	90.73±8.07	4.56±0.62	88.26±4.91
CNA002B WP	85.45±8.00	83.47±7.93	8.51±0.71	100.00±0.00
CNA002C WP	77.73±3.12	100.00±0.00	11.50±0.71	94.06±1.59
CNA002D WP	83.12±7.95	100.00±0.00	15.00±1.34	94.78±2.30
CNA003A WP	78.89±4.57	100.00±0.00	31.65±0.57	99.56±0.43
CNA003B WP	93.33±1.66	100.00±0.00	14.44±0.83	100.00±0.00
CNA003C WP	15.47±0.84	17.02±1.00	17.02±1.00	-33.72±3.02
CNA003D WP	15.83±0.29	98.45±1.54	92.14±7.85	-33.62±9.93
CNA031A WP	-21.67±12.67	97.93±2.06	-55.76±31.64	82.20±9.02
CNA031B WP	87.35±4.71	98.89±1.10	-22.79±23.03	94.32±5.67
CNA031C WP	100.00±0.00	100.00±0.00	-70.65±16.00	91.56±4.42
CNA031D WP	88.59±4.54	100.00±0.00	-11.37±1.97	92.94±7.05
CNA039A WP	98.60±0.09	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00
CNA039B WP	74.08±1.25	-86.85±19.68	71.07±0.82	-68.62±3.13
CNA039C WP	77.40±3.70	82.64±2.56	79.55±4.09	63.52±13.52
CNA039D WP	-34.62±38.07	86.70±2.55	-18.14±2.96	64.36±3.25
CNA053A WP	86.43±7.59	100.00±0.00	96.91±3.08	73.92±1.19
CNA053B WP	-5.18±0.75	-8.57±0.51	-61.09±55.03	32.12±1.02
CNA053C WP	44±5.66	100.00±0.00	-22.39±2.51	90.15±5.20
CNA053D WP	80.00±0.00	100.00±0.00	35.75±2.14	66.54±3.72

WP หมายถึง น้ำหมักและตัวเซลล์ของแอคติโนมัยซีทปริมาตร 2 มิลลิเมตรที่ได้จากการเลี้ยงใน 24-well plate ที่ผ่านการทำแห้ง และสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลในอัตราส่วน 1:1

ตารางที่ 21 ร้อยละของการยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารสกัดหยาบที่ได้จากแอคติโนมัยซีท 21 สายพันธุ์
 Table 21. Percentage of cytotoxicity of marine-derived actinomycetes extracts from 21 strains.

รหัสตัวอย่าง	Cytotoxic activity (%)			
	MCF-7 (Breast cancer)	HeLa (Cervical cancer)	HT-29 (Colon cancer)	KB (Oral cavity cancer)
CNA083A	72.90	-8.31	100.00	100.00
CNA083B	86.25	0.29	47.60	-33.55
CNA083C	51.61	4.19	99.28	89.64
CNA083D	45.56	17.17	43.84	-48.68
CNA086A	91.34	80.73	59.35	-75.49
CNA086B	86.01	7.28	-0.43	-9.90
CNA086C	87.62	-19.88	43.53	-83.06
CNA086D	74.35	-20.69	58.64	-96.05
CNA088A	77.85	-15.52	75.94	-39.47
CNA088B	67.52	-14.05	79.39	-91.61
CNA088C	87.18	3.17	41.63	68.11
CNA088D	56.70	-3.89	-15.59	30.78
CNA089A	83.01	-14.05	49.75	69.94
CNA089B	72.35	6.14	57.60	67.40
CNA089C	100.00	17.88	66.29	93.07
CNA089D	100.00	41.70	7.61	81.62
CNA090A	88.84	ND	-18.02	ND
CNA090B	99.11	ND	-96.08	-4.58
CNA090C	64.29	ND	-97.87	-6.83
CNA090D	100.00	ND	-36.48	10.29
CNA091A	100.00	ND	66.45	78.63
CNA091B	87.05	ND	93.15	97.67
CNA091C	100.00	ND	16.96	77.75
CNA091D	82.59	ND	72.66	91.25

ตารางที่ 21 (ต่อ)

Table 21. (Cont.)

รหัสตัวอย่าง	Cytotoxic activity (%)			
	MCF-7 (Breast cancer)	HeLa (Cervical cancer)	HT-29 (Colon cancer)	KB (Oral cavity cancer)
CNA092A	100.00	ND	74.43	70.06
CNA092B	74.62	ND	99.34	95.59
CNA092C	91.63	ND	91.80	78.12
CNA092D	90.24	ND	71.92	67.22
CNA093A	99.70	ND	92.97	73.55
CNA093B	98.79	ND	54.69	58.95
CNA093C	100.00	ND	84.98	59.19
CNA093D	72.73	ND	88.32	82.42
CNA095A	94.40	ND	88.10	87.06
CNA095B	56.80	ND	44.47	38.16
CNA095C	68.53	ND	34.93	18.45
CNA095D	87.20	ND	-2.56	-20.37
CNA097A	80.53	61.54	96.00	61.67
CNA097B	71.73	78.09	93.42	68.31
CNA097C	61.51	95.61	95.37	72.40
CNA097D	85.60	89.45	95.55	75.47
CNA098A	85.33	100.00	ND	100.00
CNA098B	78.40	100.00	ND	90.89
CNA098C	87.12	91.69	33.61	27.83
CNA098D	84.87	74.78	15.93	-6.96
CNA099A	100.00	94.04	97.38	89.78
CNA099B	94.84	88.01	98.00	78.02
CNA099C	100.00	87.53	96.53	74.96
CNA099D	92.78	89.98	97.91	85.69

ตารางที่ 21 (ต่อ)

Table 21. (Cont.)

รหัสตัวอย่าง	Cytotoxic activity (%)			
	MCF-7 (Breast cancer)	HeLa (Cervical cancer)	HT-29 (Colon cancer)	KB (Oral cavity cancer)
CNA100A	97.34	82.34	13.44	-12.30
CNA100B	100.00	100.00	49.87	-13.30
CNA100C	100.00	100.00	36.09	-1.74
CNA100D	100.00	100.00	8.04	-42.61
CNA101A	94.30	93.77	22.75	-50.44
CNA101B	65.06	95.85	-4.24	-34.78
CNA101C	76.83	95.85	32.37	-24.35
CNA101D	96.58	100.00	-49.85	-32.17
CNA102A	88.56	100.00	71.72	88.93
CNA102B	87.39	100.00	67.43	61.98
CNA102C	93.51	97.76	56.37	50.64
CNA102D	92.79	100.00	94.22	89.68
CNA103A	100.00	100.00	94.04	97.66
CNA103B	99.09	100.00	80.93	81.26
CNA103C	96.85	100.00	86.97	83.43
CNA103D	97.12	100.00	65.23	61.12
CNA104A	96.76	85.33	92.62	79.05
CNA104B	63.93	98.36	97.02	81.09
CNA104C	18.02	96.73	98.84	94.99
CNA104D	93.97	97.00	82.07	74.46
CNA112A	100.00	100.00	100.00	100.00
CNA112B	100.00	100.00	100.00	100.00
CNA112C	100.00	100.00	100.00	100.00
CNA112D	99.22	100.00	100.00	100.00

ตารางที่ 22 (ต่อ)

Table 22. (Cont.)

รหัสตัวอย่าง	Cytotoxic activity (%)			
	MCF-7 (Breast cancer)	HeLa (Cervical cancer)	HT-29 (Colon cancer)	KB (Oral cavity cancer)
CNA113A	-5.74	98.51	24.97	78.66
CNA113B	-6.49	98.14	99.72	35.57
CNA113C	0.90	98.72	95.27	92.63
CNA113D	-1.54	96.08	65.70	74.98
CNA145A	100.00	97.43	72.51	80.38
CNA145B	99.87	97.64	90.66	80.47
CNA145C	100.00	95.34	97.79	70.95
CNA145D	100.00	94.43	92.56	79.80
CNA146A	100.00	100.00	78.55	98.18
CNA146B	100.00	100.00	91.32	99.09
CNA146C	99.07	100.00	98.02	87.24
CNA146D	99.47	100.00	90.36	90.89

เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเซลล์มะเร็งที่ติดลบ คือ สารสกัดหยาบมีฤทธิ์กระตุ้นการเจริญของเซลล์มะเร็ง

ND = Not Detect.

ภาคผนวก ง

องค์ประกอบของสารเคมี

การเตรียมสารเคมีสำหรับทดสอบองค์ประกอบทางเคมีโดยเทคนิค

Thin Layer Chromatography (TLC)

1. Vanillin reagent

องค์ประกอบของสาร

Vanillin	15.0	กรัม
เอทานอล	250.0	มิลลิลิตร
กรดซัลฟิวริก	2.5	มิลลิลิตร

รีเอเจนต์ที่ได้จากการเตรียม นำมาบรรจุใส่ในขวดที่หุ้มด้วยฟลอยด์ เพื่อป้องกันแสง โดยการทดสอบสารตัวอย่างหลังจากสเปรย์ด้วยรีเอเจนต์ชนิดนี้ และหลังผ่านความร้อนบนแผ่น TLC หากสารปรากฏเป็นสีม่วงแดง สามารถสรุปได้ว่าสารที่ทดสอบมีสารในกลุ่ม terpenes และ terpenoids เป็นองค์ประกอบ

2. Wagner's reagent

องค์ประกอบของสาร

Iodine	10.0	กรัม
เอทานอล	250	มิลลิลิตร
กรดซัลฟิวริก	2.5	มิลลิลิตร

รีเอเจนต์ที่ได้จากการเตรียม นำมาบรรจุใส่ในขวดที่หุ้มด้วยฟลอยด์ เพื่อป้องกันแสง โดยการทดสอบสารตัวอย่างหลังจากสเปรย์ด้วยรีเอเจนต์ชนิดนี้ และหลังผ่านความร้อนบนแผ่น TLC หากสารปรากฏเป็นสีน้ำตาลแดง สามารถสรุปได้ว่าสารที่ทดสอบมีสารในกลุ่มแอลคาลอยด์เป็นองค์ประกอบ

3. Ninhydrin reagent

องค์ประกอบของสาร

Ninhydrin	20.0	มิลลิกรัม
บิวทานอล	95	มิลลิลิตร
100% AcOH	5.0	มิลลิลิตร

รีเอเจนต์ที่ได้จากการเตรียม นำมาบรรจุใส่ในขวดที่หุ้มด้วยฟลอยด์ เพื่อป้องกันแสง โดยการทดสอบสารตัวอย่างหลังจากสเปรย์ด้วยรีเอเจนต์ชนิดนี้ และหลังผ่านความร้อนบนแผ่น TLC หากสารปรากฏเป็นสีม่วงแดง สามารถสรุปได้ว่าสารที่ทดสอบมีสารในกลุ่มกรดอะมิโน เป็นองค์ประกอบ

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล	นางสาวศิริรัตน์ ทองอุ่น	
รหัสประจำตัวนักศึกษา	4882026	
วุฒิการศึกษา		
วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (วิทยาศาสตร์ทั่วไป)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2547

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

- ทุนการพัฒนาอุตสาหกรรมเกษตรสู่ความเป็นเลิศ จากคณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ปีการศึกษา 2548

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

- Thong - Oon, S., Plubrukarn, A. and Kanjana - Opas, A. 2007. Screening for Cytotoxicity of Marine-Derived Actinomycetes Extracts. TSB Annual Meeting: The 19th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology; Biotechnology for Gross National Happiness. Thammasat University, Pathumthani, Thailand. P-104. (Poster Presentation)
- Thong - Oon, S., Plubrukarn, A. and Kanjana - Opas, A. 2008. Screening for Cytotoxicity of Marine-Derived Actinomycetes Extracts. 9th National Grad Research Conference. Burapha University, Bangsaen Chonburi, Thailand. P-008. (Proceeding)