



การผลิตและคุณลักษณะของสารไวโอลาซีนจากแบคทีเรีย

Chromobacterium violaceum VB.1

Production and Characterization of Violacein

from *Chromobacterium violaceum* VB.1

วีระศักดิ์ คงพันธ์ตระกูล

Wirasak Kongpuntara

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

2556

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การผลิตและคุณลักษณะของสารไวโอลาซีนจากแบคทีเรีย
 Chromobacterium violaceum VB.1

ผู้เขียน นายวีระศักดิ์ คงพันธ์ตระ

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	คณะกรรมการสอบ
..... (รองศาสตราจารย์ ดร.อรัญ หันพงษ์กิตติกุล)ประธานกรรมการ (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทิพรัตน์ หงษ์ทรี)
กรรมการ (รองศาสตราจารย์ ดร.อรัญ หันพงษ์กิตติกุล)
กรรมการ (รองศาสตราจารย์ ดร. วรณา ชูฤทธิ์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. ชีระพล ศรีชนะ)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้เป็นผลมาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.อรุณ หันพงษ์กิตติกุล)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....
(นายวีระศักดิ์ คงพันธ์พระ)
นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และ
ไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นายวีระศักดิ์ คงพันธ์ตระกูล)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	การผลิตและคุณลักษณะของสารไวโอลาซินจากแบคทีเรีย <i>Chromobacterium violaceum</i> VB.1
ผู้เขียน	นายวิระศักดิ์ คงพันธ์ตระกูล
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา	2556

บทคัดย่อ

ไวโอลาซินเป็นสารรงควัตถุสีม่วงที่ผลิตโดยแบคทีเรียแกรมลบบางชนิด สารรงควัตถุนี้มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ และยังใช้เป็นยารักษาโรคมะเร็งได้อีกด้วย ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการแยกเชื้อจากโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ พบเชื้อที่มีโคโลนีสีม่วงบนอาหาร NB ที่เติมทริปโตเฟน 0.025% เมื่อทำการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย VB.1 ที่แยกได้โดยวิธีการด้านชีวเคมีและ 16S rDNA พบว่า มีความเหมือนกับ *Chromobacterium violaceum* 99.7% เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว NB ที่เติมทริปโตเฟน 0.025% ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยการเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และสกัดสารไวโอลาซิน พบว่า สารที่ได้มีปริมาณเท่ากับ 0.131 กรัมต่อลิตร การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารไวโอลาซินของ *C. violaceum* VB.1 โดยใช้การออกแบบตามวิธี Response Surface Methodology 3 ปัจจัย 5 ระดับ พบว่า อาหารที่ประกอบด้วย น้ำตาลซูโครส 10.40 กรัมต่อลิตร เปปโตน 14.46 กรัมต่อลิตร และ ทริปโตเฟน 1.14 กรัมต่อลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ให้การเจริญและการผลิตสารไวโอลาซินได้สูงสุด เท่ากับ 9.12 กรัมต่อลิตรของเซลล์แห้งและ 0.51 กรัมต่อลิตรของสารไวโอลาซิน สารไวโอลาซินจากเชื้อ *C. violaceum* VB.1 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* และ *Pseudomonas* sp. ที่ความเข้มข้นของสารที่ต่ำที่สุดในการยับยั้งแบคทีเรีย(MIC) เท่ากับ 4.07, 8.13, 8.13 และ 8.13 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมตามลำดับ เมื่อนำสารไวโอลาซินมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา 6 สายพันธุ์ พบว่า สารไวโอลาซินมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *Aspergillus niger* และ *Fusarium* sp. ได้ดีที่สุดในค่า MIC เท่ากับ 65 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม การตรวจสอบการต้านอนุมูลอิสระของไวโอลาซินได้ทำในระบบ 2 ระบบคือ ซุปเปอร์ออกไซด์ และการจับเหล็ก (Fe^{2+}) พบว่า มีค่า IC_{50} เท่ากับ 20 และ 3.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า สารไวโอลาซินมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB 468 ที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.156 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมและเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ MCF-12A โดยให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.291 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม

Thesis title	Production and Characterization of Violacein from <i>Chromobacterium violaceum</i> VB.1
Author	Mister Wirasak Kongpantara
Major Program	Biotechnology
Academic Year	2013

Abstract

Violacein is a natural purple pigment produced by certain Gram-negative bacteria. This pigment has a potential as antibacterial, antitrypanocidal, antiulcerogenic and anticancer drugs. In this study, the isolate VB.1 was derived from the wastewater treatment pond of Songklanakarind hospital and possessed the purple pigmented-colony on nutrient agar. It was classified as *Chromobacterium violaceum* VB.1 by 16S rDNA analysis with 99.7% similarity. The obtained violacein (0.131 g/L) was produced in nutrient broth with 0.025% of tryptophan at 30°C 200 rpm for 24 h. The central composite designs with three factors (sucrose, peptone and tryptophan) at 5 levels were applied to optimize the violacein production by *C. violaceum* VB.1. The optimized medium was composed of 10.40 g/L sucrose, 14.76 g/L peptone and 1.14 g/L tryptophan. In this medium it produced 0.51 g/L violacein and 9.12 g/L dry cell mass at 30°C 200 rpm for 36 h. The violacein produced by *C. violaceum* VB.1 inhibited the growth of *Bacillus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas* sp. with the minimum inhibitory concentration (MIC) of 4.07, 8.13, 8.13 and 8.13 µg/ml, respectively. The antifungal activity of the violacein was tested with 6 strains of fungi. It was most effective against *Aspergillus niger* and *Fusarium* sp. with MIC of 65 µg/ml. When tested antioxidative properties of the violacein against reactive oxygen species – induced with superoxide radical and Fe²⁺ chelating, the IC₅₀ of it was 20 and 3.01 µg/ml, respectively. The violacein had cytotoxicity against human MCF-12A cell lines and human breast cancer cell MDA-MB-468 cell lines at IC₅₀ 0.291 and 0.156µg/ml, respectively.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.อริญ หันพงศ์กิตติกุล อาจารย์ที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำ เป็นที่ปรึกษาและชี้แนะแนวทางการทำวิจัย การค้นคว้าและการ เขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทิพรัตน์ หงษ์ทริสิรี ประธาน กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ รองศาสตราจารย์ ดร.วรรณ ชูฤทธิ์ กรรมการผู้แทนบัณฑิต วิทยาลัย ที่สละเวลาอันมีค่ายิ่งในการให้ข้อคิดเห็น ข้อเสนอแนะและตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้นและขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัยที่ให้ทุนอุดหนุนการทำวิจัย

ขอขอบคุณ โรงงานอาหารทะเลแช่แข็ง เอส เอส โพรสเซนฟูคส์ จำกัด และ บริษัท แมนเอ โพรสเซนฟูคส์ จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างดินและน้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมัน และตัวอย่าง ก้อนไขมันบริเวณบ่อดักไขมัน เพื่อใช้แยกแบคทีเรียที่ศึกษา และขอขอบคุณศาสตราจารย์ ดร. ศุภยงค์ วรุฒิกุลชัย ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์เชื้อ *Chromobacterium violaceum* ATCC12472 เพื่อ ใช้เป็นเชื้อเปรียบเทียบ

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ด้วยความเคารพอย่างยิ่ง ที่ให้โอกาส ข้อคิดดีๆ กำลังใจและด้านการเงินในการศึกษามาโดยตลอด ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ สมาชิก ห้องแล็บเอนไซม์และเจ้าหน้าที่ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่านสำหรับความช่วยเหลือ กำลังใจ และความอบอุ่นในการทำวิจัยในห้องปฏิบัติการ ตลอดจนทุกๆ ท่านที่ไม่ได้กล่าวนาม ณ ที่นี้ด้วย ที่มีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

วีระศักดิ์ คงพันธ์ตระ

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ.....	(8)
LIST OF TABLES	(9)
LIST OF FIGURES.....	(10)
LIST OF ABBREVIATION.....	(12)
บทที่	
1. บทนำ.....	1
บทนำตั้งเรื่อง.....	1
การตรวจเอกสาร.....	2
วัตถุประสงค์.....	21
2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการวิจัย.....	22
วัสดุ.....	22
อุปกรณ์.....	24
วิธีการวิเคราะห์.....	25
วิธีการวิจัย.....	28
3. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	37
4. บทสรุป.....	67
เอกสารอ้างอิง.....	69
ภาคผนวก.....	76
ประวัติผู้เขียน.....	89

LIST OF TABLES

Table	Page
1. Microbial sources of carotenoids	5
2. Main ORFs of <i>C. violaceum</i> involved in violacein expression and metabolism.....	10
3. In <i>vitro</i> testing results of violacein in several cell lines.....	14
4. Violacein production from various microorganisms.....	20
5. The coded levels and real values of the independent variables in the response surface methodology.....	31
6. The central composition design of the significant variables (in coded level).....	31
7. Total viable count and purple colony count from samples.....	38
8. Biochemical properties of selected bacteria comparison with reference strains.....	39
9. Effect of temperatures on growth and violacein production by <i>C. violaceum</i> VB.1...	41
10. Effect of agitation on growth and violacein production by <i>C. violaceum</i> VB.1.....	42
11. The Central Composition Design of the significant variables (in coded level) along with the responses (DCW and violacein yield) by culture of <i>C. violaceum</i> VB.1.....	45
12. Analysis of variance (ANOVA) for response surface linear, quadratic and cubic models of DCW and violacein yield by culture of <i>C. violaceum</i> VB.1.....	46
13. Analysis of variance (ANOVA) for response surface linear model for dry cell weight by culture of <i>C. violaceum</i> VB.1.....	47
14. Analysis of variance (ANOVA) for response surface linear model for violacein production by culture of <i>C. violaceum</i> VB.1.....	47
15. Purification step and productivity of violacein produced by <i>C. violaceum</i> VB.1.....	52
16. FT-IR data of violacein and deoxyviolacein from the extract of <i>C. violaceum</i> VB.1....	55
17. Antimicrobial activities of violacein from <i>C. violaceum</i> VB.1.....	61
18. Antifungal activities of violacein from <i>C. violaceum</i> VB.1.....	63

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1. Structure of violacein.....	8
2. Violacein biosynthesis.....	9
3. Phylogenetic tree of the isolate VB.1	40
4. Effect of sucrose and peptone on growth and violacein production by <i>C. violaceum</i> VB.1.....	48
5. Time courses of cell growth and substrate consumption (a) and violacein production (b) by <i>C. violaceum</i> VB.1 and <i>C. violaceum</i> ATCC 12472 cultivated in optimized medium.....	50
6. HPLC chromatograms of violaceins of <i>C. violaceum</i> VB.1. and <i>C. violaceum</i> ATCC 12472.....	53
7. The UV/vis spectrum of violacein, deoxyviolacein and crude extract of purple pigment produced by <i>C. violaceum</i> VB.1 and <i>C. violaceum</i> ATCC12472.....	54
8. The FT-IR spectrum of violacein (a) and deoxyviolacein (b) of extract from cells of <i>C. violaceum</i> VB.1.....	56
9. Mass spectrum of violacein from <i>C. violaceum</i> VB.1.....	57
10. Superoxide radical scavenging of different violaceins from <i>C. violaceum</i> VB.1....	59
11. Ferrous (Fe^{2+}) chelating activity of different violaceins from <i>C. violaceum</i> VB.1..	60
12. Growth inhibitory effects (a) and IC_{50} of crude violacein and pure violacein (b) on MDA-MB-468 cell lines.	65
13. Growth inhibitory effects (a) and IC_{50} of crude violacein and pure violacein (b) on MCF-12A cell lines.	66
14. Effect of crude violacein on superoxide radical.....	80
15. Effect of violacein on superoxide radical.....	80
16. Effect of deoxyviolacein on superoxide radical.....	81
17. Effect of crude violacein on ferrous (Fe^{2+}) chelating radical.....	81
18. Effect of violacein on ferrous (Fe^{2+}) chelating radical.....	82

LIST OF FIGURES (Cont.)

Figure	Page
19. Effect of deoxyviolacein on ferrous (Fe^{2+}) chelating radical.....	82
20. Standard curve of BHT.....	83
21. Standard curve of torlox.....	83
22. Standard curve of glucose.....	85

LIST OF ABBREVIATION

AHL	Acylhomoserine lactone
ATCC	American Type Culture Collection
BHT	Butylated hydroxytoluene
CCD	Central composite design
CDW	Cell dry weight
CPA	Chromopyrrolic acid
cviR	Transcriptional activator, LuxR family of regulators
cviI	<i>N</i> -acylhomoserine synthase
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
DPPH	1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
HHL	<i>N</i> -hexanoyl homoserine lactone
IC ₅₀	The 50% inhibitory concentration
IPA	2-imino-3-indolepropionic acid.
MIC	Minimal inhibition concentration
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NBT	Nitro blue tetrazolium dihydrochloride
ORF	Open reading frame
RSM	Response surface methodology
TMM	Tetramethyl murexide
<i>Al.</i>	<i>Alteromonas</i>
<i>D.</i>	<i>Duganella</i>
<i>Ps.</i>	<i>Pseudoalteromonas</i>
<i>Pseu.</i>	<i>Pseudomonas</i>

บทที่ 1

บทนำและการตรวจเอกสาร

บทนำสั้นเรื่อง

ปัจจุบันมีการนำจุลินทรีย์มาใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ มากยิ่งขึ้น นอกจากจุลินทรีย์จะสร้างสารที่มีประโยชน์ต่อมนุษย์โดยอาศัยกระบวนการเมแทบอลิซึมแล้ว การผลิตโดยอาศัยจุลินทรีย์ยังสามารถควบคุมการผลิตได้ง่าย ไม่เปลี่ยนแปลงตามฤดูกาล และสามารถขยายขนาดการผลิตได้ตามต้องการ ความสามารถในการผลิตสารรงควัตถุถือเป็นเอกลักษณ์อย่างหนึ่งของจุลินทรีย์ และสารรงควัตถุบางชนิดก็มีประโยชน์ต่อมนุษย์ เช่น แคโรทีนอยด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ซึ่งให้สารที่มีสีเหลือง ส้ม หรือ แดง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับโครงสร้างย่อยของแคโรทีนอยด์แต่ละชนิดซึ่งมีความสามารถต้านอนุมูลอิสระ (Paiva and Russell, 1999) สำหรับแบคทีเรียที่สร้างสารสีม่วง เมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง (plate count agar) แบคทีเรียนี้จะสร้างโคโลนีที่มีสีม่วงเข้ม โดย *Chromobacterium violaceum* (Riveros *et al.*, 1988) จะมีลักษณะที่มันแวว สะท้อนแสง และไม่มีคราบเมือกปกคลุมโคโลนี เมื่อนำเซลล์มาล้างและสกัดกับสารละลายเมทานอล 95% พบว่าสารสีภายในเซลล์มีสีน้ำเงินมากกว่าที่จะเป็นสีม่วง (Riveros *et al.*, 1988) เมื่อนำไปทดสอบการดูดกลืนแสงในช่วง UV/Vis พบว่าสารดังกล่าวสามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร

มีรายงานวิจัยเกี่ยวกับ การผลิตไวโอลาซินซึ่งเป็นสารสีม่วงนั้นสามารถผลิตได้โดยจุลินทรีย์ 6 ชนิด ได้แก่ *C. violaceum* (Riveros *et al.*, 1988), *Pseudoalteromonas tunicata* (Franks *et al.*, 2005), *Pseudoalteromonas luteoviolacea*, *Pseudomonas ulvae* และ *Janthinobacterium lividum* (Yang *et al.*, 2007) ทั้งนี้ ไวโอลาซินเป็นสารที่น่าสนใจในทางเภสัชศาสตร์เนื่องจากมีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สารยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ สารยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง และเนื้องอก (Carvalho *et al.*, 2006) และมีแนวโน้มที่จะนำไปใช้ประโยชน์ทั้งในด้านการแพทย์ การวิเคราะห์ อุตสาหกรรมอาหาร และสิ่งทอ เป็นต้น

เนื่องจากในประเทศไทยยังไม่มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตและการศึกษาสมบัติของสารไวโอลาซินจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ค้นพบในประเทศ และสารไวโอลาซินมีแนวโน้มที่จะใช้ประโยชน์ได้ในหลายด้าน จึงมีความสนใจที่จะศึกษาคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตสารไวโอลาซิน โดยจะทำการจำแนกเชื้อที่สามารถสร้างสารไวโอลาซิน และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารไวโอลาซินโดยเชื่อดังกล่าว รวมทั้งศึกษาสมบัติต่าง ๆ ของสารไวโอลาซินที่สกัดได้ในการต้านอนุมูลอิสระ การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและรา และยับยั้งเซลล์มะเร็ง

การตรวจเอกสาร

1. รงควัตถุ (Pigment)

รงควัตถุ หมายถึง สารสีที่ผลิตจากสิ่งมีชีวิต หรือสารเคมี มีหลักฐานยืนยันการใช้รงควัตถุตั้งแต่ดึกดำบรรพ์โดยพบการเขียนขีดภายในถ้ำ โดยใช้แร่ธาตุอื่นๆ มากกว่า 3,000 ปี

มีหลักฐานอย่างแน่นนอนว่าศิลปินจะใช้สารสีจากพืช และสัตว์ และยังมีการเลือกใช้สารสีที่เกิดจากสารอนินทรีย์ เมื่อ 100 ปีที่ผ่านมา (Daniel, 1986)

การจำแนกสารรงควัตถุ โดยส่วนมากจะจำแนกตามแหล่ง เพราะว่าคุณสมบัติของรงควัตถุ แต่ละกลุ่มจะมีคุณลักษณะและตำแหน่งที่แตกต่างกัน โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ รงควัตถุที่ได้จากธรรมชาติ (natural pigment) และรงควัตถุที่ได้จากการสังเคราะห์ รงควัตถุที่ได้จากธรรมชาติ จะได้จากสิ่งมีชีวิตที่มีสีจากการดูดซึมสารรงควัตถุที่ได้จากสิ่งมีชีวิต ประกอบด้วย รงควัตถุที่ได้จากพืช และรงควัตถุที่ได้จากสัตว์ โครงสร้างของสิ่งมีชีวิตโดยส่วนใหญ่ที่มีสีเช่น ผิวหนัง, ตา, ขน และผม จะประกอบด้วย รงควัตถุที่เป็น melanin ซึ่งมีชื่อเรียกเฉพาะว่า Chromatophore รงควัตถุที่ได้จากการสังเคราะห์แบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ รงควัตถุที่ได้จากสารอนินทรีย์ และ รงควัตถุที่ได้จากสารอนินทรีย์ (Daniel, 1986)

รงควัตถุที่ได้จากธรรมชาติ (Natural Pigment)

1.1 รงควัตถุจากพืช

รงควัตถุที่พบในพืชโดยส่วนใหญ่จะประกอบด้วย แคลโรทีน (สีแดงส้ม สีเหลือง) แอนโทไซยานิน (สีแดง, น้ำเงิน และม่วง) และคลอโรฟิลล์ (สีเขียว) สีแดงและสีเหลือง เกิดจากไบโม่ในฤดูใบไม้ร่วง ซึ่งจะมีแอนโทไซยานินที่ รงควัตถุที่ได้จากสิ่งมีชีวิต จะมีการดูดซับแสงในช่วงความยาวคลื่นที่แตกต่างกัน ซึ่งทำให้เห็นสีที่มองเห็นในรงควัตถุ โดยส่วนมากจะเป็นตัวล่อเพื่อให้แมลงเข้ามาใกล้ และถ่ายละอองเกสร

1.1.1 คลอโรฟิลล์ (Chlorophyll) เป็นกลุ่มของรงควัตถุที่มีสีเขียว มีหน้าที่จับพลังงานแสง (primary light-accepting pigments) เพื่อใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสงซึ่งเกิดขึ้นในคลอโรพลาสต์ คลอโรฟิลล์แบ่งออกเป็น 4 ชนิด คือ คลอโรฟิลล์เอมีสีเขียวแกมน้ำเงินพบในพืชชั้นสูงทุกชนิดที่ คลอโรฟิลล์บีมีสีเขียวแกมเหลือง พบในพืชชั้นสูงทุกชนิดและสาหร่ายสีเขียว (green algae) คลอโรฟิลล์ซี พบในสาหร่ายสีน้ำตาล (brown algae) และสาหร่ายสีทอง (golden algae) แต่ไม่พบในพืชชั้นสูง คลอโรฟิลล์ดี พบในสาหร่ายสีแดง (red algae) แต่ไม่พบในพืชชั้นสูง

โดยทั่วไปในพืชชั้นสูง จะพบทั้ง คลอโรฟิลล์เอ และ คลอโรฟิลล์บี อยู่ด้วยกัน และมีสัดส่วนประมาณ 2.5-3.5 ต่อ 1

โมเลกุลของ คลอโรฟิลล์ ประกอบด้วยส่วนหัวของ porphyrin ring ซึ่งมี Mg อยู่ตรงกลางและ ส่วนหางซึ่งเป็น long chain hydrocarbon เรียกว่า phytol ส่วนคลอโรฟิลล์บี แตกต่างจากคลอโรฟิลล์เอ ที่ aldehyde group (-CHO) ซึ่งจะแทนที่ methyl group (CH₃) ที่ตำแหน่งที่ 3 เท่านั้นคลอโรฟิลล์เป็นพวกที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) จึงไม่ละลายในน้ำสังเคราะห์แสงได้ (Goowin, 2002)

1.1.2 แคโรทีนอยด์ (Carotenoid) เป็นรงควัตถุกลุ่มใหญ่พบอยู่ร่วมกับคลอโรฟิลล์ใน chloroplasts และ chromoplasts ให้สีแดง ส้มและเหลือง และเป็นรงควัตถุในใบไม้ที่เปลี่ยนสีในฤดูใบไม้ร่วง (autumn leaf pigmentation) แคโรทีนอยด์จะประกอบด้วย แคโรทีน (มีรงควัตถุสีส้มและพบใน แครอท) ลูทีน (มีรงควัตถุสีเหลืองพบในผักและผลไม้) ไลโคปีน (มีรงควัตถุสีแดง มีมากในมะเขือเทศ) แคโรทีนอยด์มีคุณสมบัติเป็นสารต่อต้านอนุมูลอิสระ และส่งเสริมการมองเห็นของมนุษย์ (Ball, 2002)

1.1.3 แอนโทไซยานิน (Anthocyanin) เป็นสารที่มีสีตั้งแต่สีน้ำเงินเข้มในสภาพเป็นด่าง (pH>7) มีสีม่วงเมื่อเป็นกลาง (pH 7) และจะเปลี่ยนเป็นสีแดงถึงส้มได้ในสภาพเป็นกรด (pH<7) เป็นสารสีที่พบได้ทั่วไปในดอกไม้ ผลไม้บางชนิด ใบหรือลำต้นของพืชบางชนิดที่มีสีจัดในปริมาณเพียงน้อยนิดก็สามารถแสดงสีได้ในความเข้มสูง มนุษย์ในบางพื้นที่รู้จักใช้สารตัวนี้มาเป็นเวลานานแล้วในกิจกรรมต่างๆ เช่น ไทยใช้สีจากดอกอัญชันทำขนมจีนใช้สีของเปลือกไม้และใบไม้บางชนิดในการย้อมผ้าให้มีสีต่างๆด้วยการใช้ยางไม้และปูนขาวในการแต่งสี ยูโรปใช้ผลไม้ป่า (wild berry) ในการทำเครื่องสำอางและทำขนม ซึ่งส่วนใหญ่แล้วจะเป็นอนุพันธ์หนึ่งของแอนโทไซยานิน ที่พบได้ในธรรมชาติ

1.1.4 เบตาเลน (Betalain) เป็นรงควัตถุสีแดงและสีเหลือง คล้ายกับแอนโทไซยานินเป็นสารที่ละลายน้ำ ที่แตกต่างกับแอนโทไซยานิน ก็คือสารประกอบ indole derive ที่ได้จากการสังเคราะห์ของ tyrosine pigment ที่พบจะมีเฉพาะ Caryophyllales (ประกอบด้วย Caetus และ amaranth) และไม่ปรากฏร่วมกับพืชที่พบ แอนโทไซยานิน เบตาเลนจะมีสีแดงเข้ม และใช้เป็นสารเติมสีให้กับอาหาร

1.1.5 แซฟฟรอนหรือหญ้าฝรั่น (Saffron) เป็นสารที่มีรงควัตถุมีสีน้ำตาล สีแดง เหลืองได้จากสารของ *Crocus sativus* ซึ่งจะปลูกกันมากใน อเมริกาเหนือ สเปน อิหร่าน และ ฝรั่งเศส แซฟฟรอนจะเป็นสารที่มีประสิทธิภาพมากกว่าสารตัวอื่น โดยจะมีฤทธิ์การต่อต้านอนุมูลอิสระ ทำลายจุลินทรีย์ และสามารถนำไปใช้ในการย้อมสีได้โดยใช้ที่ระดับ 1-260 ppm (Daniel, 1986)

1.2 รังควัตถุจากสัตว์

สัตว์ที่อยู่ในสัตว์จะมีปริมาณที่น้อย มนุษย์ใช้สีของสัตว์ โดยสีของสัตว์แต่ละชนิดที่ได้จะได้จากเพศของสัตว์และบริเวณอื่นๆของสัตว์ ยกตัวอย่าง เช่น สีแดงที่แพงคอกของนกแสมมิ่งเบิร์ด เฉพาะเพศผู้เท่านั้นที่จะมีขนสีแดงที่แพงคอก ส่วนเพศเมียจะมีขนแพงคอกสีขาว (Martha, 2002) หน้าที่ในการสร้างสีจะแสดงให้เห็นชัดเจนในเอฟหรือตัวอ่อนของซาลาแมนเดอร์หรือการมีจุดแดงของตัว นิวทิงส์สีที่สร้างจะเป็นตัวล่อให้หนอนเข้ามาใกล้และจับกินเป็นอาหารในขณะเดียวกันสีที่โดดเด่นจะเป็นสัญญาณเตือนอันตรายให้แก่ผู้ที่มาล่าพวกมันเป็นอาหาร เพราะที่ผิวจะมีพิษด้วยเช่นกัน เมื่อโตเต็มวัยสีที่ผิวหนังก็จะเปลี่ยนไป

การสร้างสีของสัตว์บางชนิด มีไว้เพื่อป้องกันอันตรายต่างๆ จากสัตว์นักล่าอื่นที่จะมากินตัวมันเอง

1.3 รังควัตถุจากจุลินทรีย์

จุลินทรีย์เป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า มีทั้งพวกที่เป็นเซลล์เดียวและหลายเซลล์ พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมทั้งในดิน น้ำ อากาศ ทะเลลึก ปล่องภูเขาไฟ และทั้งในและนอกร่างกายมนุษย์และสัตว์ จุลินทรีย์มีอยู่มากมายหลายชนิดสามารถแบ่งเป็นกลุ่มๆได้คือ แบคทีเรีย, รา, สาหร่าย, โพรโตซัว และไวรัส ซึ่งโดยทั่วไปแล้วจุลินทรีย์ที่มีการสร้างรงควัตถุจะอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรีย เชื้อรา และ สาหร่าย

เมื่อวางอาหารเลี้ยงเชื้อ ไว้ในอากาศประมาณ 30 นาที หรือการนำน้ำจากแม่น้ำมาทำการเจือจางเพาะเลี้ยงลงในอาหารแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จะมีโคโลนีสีต่างๆมากมายปรากฏขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โคโลนีสีเหลืองและสีชมพูจากจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนมากจะเป็นจุลินทรีย์พวกแกรมบวก มีรูปร่างกลมเล็ก ในทางตรงกันข้ามสีของโคโลนีที่เพาะเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้จากแหล่งน้ำโดยส่วนมากจะเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง เช่น *Flavobacterium* sp., *Cytophaga* sp., *C. violaceum*, *Serratia* sp. และ *Pseudomonas* sp. (Logan, 1994)

จุลินทรีย์โดยทั่วไปที่มีการศึกษาการสร้างรงควัตถุพบว่า จะสร้างรงควัตถุในกลุ่มแคโรทีนอยด์ ซึ่งมีทั้งสารสีส้ม สีเหลือง และ สีแดง โดยส่วนใหญ่ซึ่งสามารถพบได้ทั้งแบคทีเรีย เชื้อรา และสาหร่ายดังแสดงใน Table 1

จุลินทรีย์ที่คุ้นเคยกันมากที่สุดที่พบได้ทั่วไปทั้ง ดิน น้ำ อากาศ และห้องปฏิบัติการทางการแพทย์คือ *Pseu. aeruginosa* จะมีสีเขียวออกน้ำเงินหรือสีเหลือง สารที่ผลิตจาก *Pseu. aeruginosa* คือ pyocyanine มีผลึกรูปเข็มสีน้ำเงิน (Austin and Moss, 1986)

รงควัตถุอีกหนึ่งชนิดที่ยังไม่รู้จักมากนัก คือสารประกอบที่มีสีเข้ม ซึ่งได้จากแบคทีเรีย *C. violaceum* และสารสีน้ำเงินเข้ม (ละลายในกรด) คือ pyocyanin ที่แยกได้จาก *Pseu. aeruginosa* ซึ่งสารสกัดดังกล่าวสามารถผลิตเพื่อเป็นการค้าได้

Table 1. Microbial sources of carotenoids.

Microorganism	Carotenoids
Carotene sources	
Fungi : <i>Blakeslea trispora</i>	Lycopene, β -carotene
<i>Phycomyces blakesleeanus</i>	β -carotene
Non-photosynthetic bacteria	
: <i>Streptomyces chrestomyceticus, subsp. rubescens</i>	Lycopene
Xanthophylls sources	
Green algae : <i>Spongiococcum excentricum</i>	Lutein
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Lutein
Fungi : <i>Dacrymyces deliquescens</i>	Lutein
Non-photosynthetic bacteria :	
<i>Flavobacterium sp.</i>	
<i>Streptomyces chrestomyceticus var. aurantioideus</i>	Unidentified xanthophylls
<i>Mycobacterium phlei</i>	Unidentified xanthophylls
Monocyclic ketocarotenoids sources	
Non-photosynthetic bacteria :	
<i>Deinococcus radiophilus</i>	Derivatives of 4-keto- γ -Carotene
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	Derivatives of 4-keto- γ -Carotene

ที่มา : Nelis และ De Leenheer (1989)

Table 1. (Cont.)

Microorganism	Carotenoids
Bicyclic ketocarotenoids sources	
Cyanobacteria : <i>Anabaena variabilis</i>	Cantaxanthin
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	Cantaxanthin
<i>Nostoc commune</i>	Cantaxanthin
Green algae (N-deficiency)	
<i>Dictococcus cinnabarinus</i>	Cantaxanthin
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Astaxanthin
Fungi/yeast : <i>Phaffia rhodozyma</i>	Astaxanthin
Non-photosynthetic bacteria :	
<i>Brevibacterium</i> KY-4313	Cantaxanthin
<i>Rhodococcus maris/Mycobacterium blavicale</i> 32-MCT	Cantaxanthin
<i>Mycobacterium lacticola</i>	Astaxanthin
<i>Brevibacterium</i> 103	Astaxanthin
Fungi/yeast : <i>Rhodotorula sp., Rhodosporidium sp.</i>	Torulene, torularhodin
Non-photosynthetic bacteria :	
<i>Methylotrophs</i>	Miscellaneous
Photosynthetic bacteria : <i>Rhodobacter capsulatus</i>	Spheroidene, Spheroidenone

ที่มา : Nelis และ De Leenheer (1989)

1.4 รงควัตถุที่ได้จากการสังเคราะห์

สารสีจำนวนมากโดยทั่วไปจะใช้ย้อมสิ่งทอ โดยสังเคราะห์จากสารเคมีซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่มคือ Azo, indigoid, azobenzene, phtalocyanine. ซึ่งใช้ในอุตสาหกรรมย้อมสิ่งทอ

1.4.1 Azo dyes สี Azo ประกอบด้วย กลุ่มใหญ่ซึ่งได้รับการพิสูจน์แล้วว่าเป็นสารมีสี สารประกอบจะมีหมู่ functional group $R-N=N-R'$ โดยที่ R และ R' เป็น arly หรือ alkyl หมู่ $N=N$ เรียกว่า Azo group Azo pigment มีความสำคัญมากในงานสี ซึ่งเป็นสีที่มีคุณสมบัติที่ดีเยี่ยม

1.4.2 Indigoid เป็นสารที่ละลายน้ำได้จากการเตรียม sulfonate indoxyl เป็นสีที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในอาหารและเครื่องสำอางมีสีน้ำเงินคราม

1.4.3 Azobenzene สาร Azobenzene เป็นสารสีเหลืองที่มีความสำคัญและหน้าที่หลายอย่าง มีคุณภาพในการย้อมสีผ้า

1.4.4 Phtalocyanine หรือ copper phtalocyanine มีสีน้ำเงิน

2. สารไวโอลาซีน (violacein)

ไวโอลาซีนเป็นสารรงควัตถุสีม่วงที่ได้จากการสังเคราะห์โดยเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งที่มีรายงานยืนยันการศึกษาใน *C. violaceum* (Riveros *et al.*, 1988), *Ps. tunicata* (Sanchez *et al.*, 2006), *Ps. luteoviolacea*, *Pseu. ulvae* และ *J. lividum* (Yang *et al.*, 2007)

ไวโอลาซีนจัดเป็นสาร secondary metabolites ที่ผลิตจากแบคทีเรียมีสูตรทางเคมีคือ $C_{20}H_{13}N_3O_3$ เป็นอนุพันธ์ของสารประกอบอินโดล (indole) เกิดจากการรวมตัวกันของ ทริปโตเฟน (tryptophan) 2 โมเลกุล (Hoshino *et al.*, 1987) มีน้ำหนักโมเลกุล 343.33 ไม่ละลายในน้ำหรือตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้ว แต่ละลายได้ดีในแอลกอฮอล์ เช่น เมทานอล เอทานอล และยังสามารถได้ในอะซิโตน โดยดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร (Blosser and Gray, 2000) มีความคงตัวในสภาวะพีเอชช่วง 5-9 อุณหภูมิ 25-100 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีแสงหรือโลหะหนักและสารอนุมูลอิสระ เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) แต่อย่างไรก็ตาม สารไวโอลาซีนจะถูกย่อยและสลายไปอย่างช้าเมื่อถูกแสง (Azlina *et al.*, 2012) ภายในโครงสร้างทางเคมีของไวโอลาซีนประกอบด้วย 3 หน่วยย่อย ได้แก่ 5-hydroxyindol, 2-oxoindol และ 2-pyrrolidone ดังแสดงใน Figure 1 โดยโครงสร้างดังกล่าวมาจากระบวนการสังเคราะห์โดยมีแอลทริปโตเฟนเป็นสารตั้งต้น

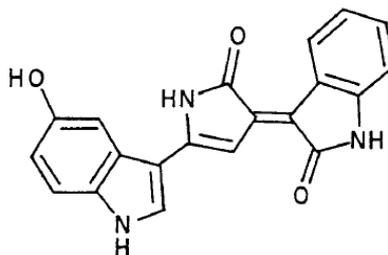


Figure 1. Structure of violacein.

Sources : Rettori และ Durán (1998)

อย่างไรก็ตามหน้าที่ของไวโอลาซีนในเชิงสรีรวิทยาของแบคทีเรียที่ยังไม่เป็นที่แน่ชัด แต่มีหลักฐานจากพฤติกรรมของแบคทีเรียกลุ่มนี้ทำให้เกิดข้อสมมติฐานที่ว่า แบคทีเรียน่าจะสร้างสารดังกล่าวมาเพื่อป้องกันการรบกวน หรือการถูกล่าโดยผู้ล่า เช่น โปรโตซัว หรือเชื้อรา (Bruker *et al.*, 2008; Matz *et al.*, 2008) นอกจากนี้พบว่า *J. lividum* ผลิตสารไวโอลาซีนควบคู่กับการสร้าง biofilm ด้วย โดยน่าจะใช้กลไกการผลิตร่วมกัน (Pantarella *et al.*, 2007)

3. การสังเคราะห์สารไวโอลาซีน

การสังเคราะห์สารไวโอลาซีนจะมีเอนไซม์ vioD – hydroxylase vioC – monooxygenase vioB – oligoketide synthase vioA – tryptophan 2-monooxygenase (VioA-E) ซึ่งเอนไซม์ VioA-B เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องโดยตรงในการสร้างกรด chromopyrrolic ในวิธีการสร้าง indole-o-carbazole แต่จะมีเอนไซม์ VioE เพียงตัวเดียวเท่านั้นที่จะเป็นตัวควบคุมทิศทางการสังเคราะห์สารไวโอลาซีน โดยเอนไซม์ VioA ทำงานร่วมกันกับเอนไซม์ VioB ในการออกซิไดซ์แอลทริปโตเฟนให้กลายเป็นผลิตภัณฑ์ เมื่อเอนไซม์ VioE เข้ามาในวิถีจะทำให้เกิดการจัดเรียงใหม่ของสาร 1,2 indole ให้กลายเป็น prodeoxy-violacein หลังจากนั้นก็มีเอนไซม์ 2 ชนิด คือ VioD-hydroxylase และ vioC - monooxygenase ตามลำดับทำให้ได้สารไวโอลาซีนที่สมบูรณ์ (Figure 2)

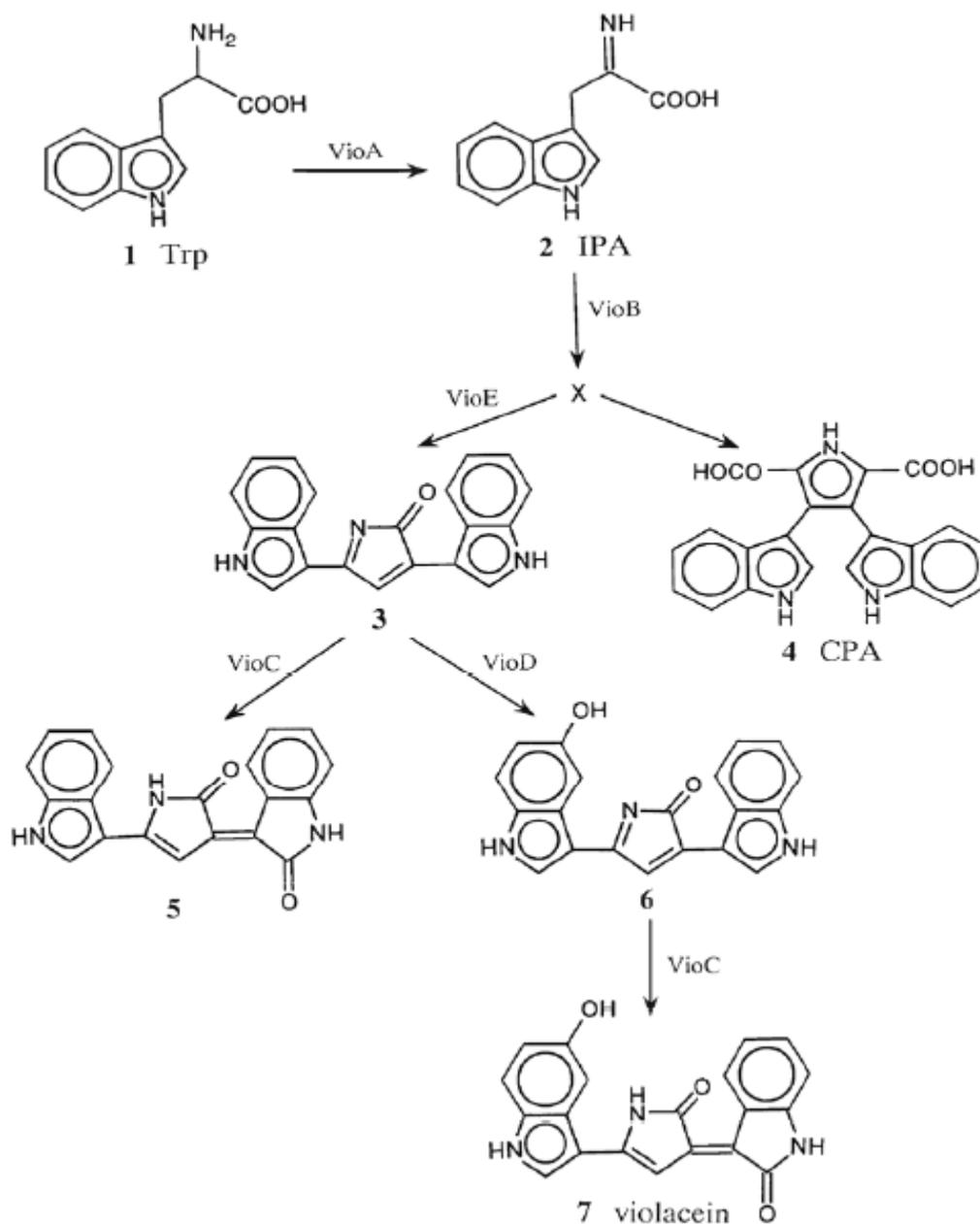


Figure 2. Violacein biosynthesis. (CPA -chromopyrrolic acid; IPA – 2-imino-3-indolepropionic acid; vioA = vioA – tryptophan 2-monooxygenase; vioB = vioB – oligoketide synthase; vioC = vioC – monooxygenase vioD = vioD – hydroxylase)

Sources: Durán และคณะ (2010)

C. violaceum จะผลิตไวโอลาซีนโดยใช้ทริปโตเฟนเป็นสารตั้งต้น ในการสังเคราะห์ไวโอลาซีน จะอยู่ภายใต้การควบคุมของสารสื่อสัญญาณระหว่างเซลล์ เรียกว่า Acylhomoserine lactone (AHL) ซึ่ง AHL เป็นตัวกลางในการตอบสนองในแบคทีเรียแกรมลบ AHL ที่พบใน *C. violaceum* มียีน 2 ตัวคือ *CviI* และ *CviR* ซึ่ง *CviR* จะผลิตเอนไซม์ N-hexanoyl homoserine lactone (HHL) synthase (Table 1) ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องในการควบคุม bioluminescence ในเชื้อ *Vibrio fischeri* ที่สามารถสร้าง AHL ได้ เมื่อ *C. violaceum* เจริญในช่วง stationary phase ความหนาแน่นของแบคทีเรียมากขึ้นก็จะมีการสะสมของ AHL เพิ่มขึ้นและ AHL จะแพร่กลับเข้ามาจับกับตัวรับภายในเซลล์แล้วไปกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีนที่อยู่ภายใต้การควบคุมของการสร้างสารไวโอลาซีน ทำให้สามารถยึดจับ transcriptional regulator site ของ violacein biosynthesis operon ทำให้มีการผลิตตรงควัดดูเพิ่มมากขึ้น (Figure 2) อย่างไรก็ตาม HHL ไม่ได้เป็นปัจจัยที่ควบคุมการผลิตไวโอลาซีนในเชื้อ *C. violaceum* เท่านั้นแต่ยังขึ้นกับความหนาแน่นของประชากรของเซลล์ ความเข้มข้นของระดับกลูโคส และออกซิเจนในระดับที่สูง และเมื่อทำการวิเคราะห์ยีนของเชื้อ *C. violaceum* พบว่า ยังมียีนอื่นๆอีกมากเช่น *TrpA-F* และ *pabA-B* (Table 2) ที่สามารถ encode กับยีนในการสร้าง anthranilate ในวิถีของทริปโตเฟนที่สามารถเปลี่ยน chrysmate เป็น anthranilate

Table 2. Main ORFs of *C. violaceum* involved in violacein expression and metabolism.

ORFs no.	Name	Product	EC no.
CV2173	<i>tryD</i>	anthranilate phosphoribosyltransferase	2.4.2.18
CV2179	<i>tryE</i>	anthranilate synthase component I	4.1.3.27
CV2712	<i>tryC</i>	indole-3-glycerol-phosphate synthase	-
CV2761	<i>tryA</i>	tryptophan synthase, α -subunit	4.2.1.20
CV2762	<i>tryB</i>	tryptophan synthase, β -subunit	4.2.1.20
CV2763	<i>tryF</i>	phosphoribosylanthranilate isomerase	5.3.1.24
CV3271	<i>vioD</i>	vioD – hydroxylase	-
CV3272	<i>vioC</i>	vioC – monooxygenase	-
CV3273	<i>vioB</i>	vioB – oligoketide synthase	-
CV3274	<i>vioA</i>	vioA – tryptophan 2-monooxygenase	-
CV4090	<i>cviR</i>	transcriptional activator, LuxR family of regulators	-
CV4091	<i>cviI</i>	N-acylhomoserine synthase	-

Sources: Durán และคณะ (2010)

4. การใช้ประโยชน์จากสารไวโอลาซิน

แบคทีเรียกลุ่มนี้อาศัยอยู่ในดินและน้ำ การป้องกันตัวเองจะทำได้โดยการสร้างคราบเมือก หรือฟิล์มบาง ๆ เพื่อรวมกันและจะสร้างสารไวโอลาซินไว้ที่บริเวณเซลล์เมมเบรนซึ่งเมื่อผู้ล่าเข้ามากินก็จะเกิดอาการเป็นพิษทำให้พวกที่เหลืออยู่รอดได้ (Matz *et al.*, 2008) เนื่องจากลักษณะการมีความเป็นพิษต่อผู้ล่า ทำให้สารสีม่วงดังกล่าวได้รับความสนใจ เมื่อมีการนำไปศึกษาเพิ่มเติมโดย Hoshino และคณะ (1995) พบว่าโครงสร้างทางเคมีของไวโอลาซินนั้นมีองค์ประกอบที่เป็นโครงสร้างวงแหวนถึง 5 วง ทำให้เกิดการดูดกลืนแสงในช่วง 550-600 นาโนเมตร (Rettori and Durán, 1998) ทำให้สารดังกล่าวมีสีน้ำเงิน-ม่วง นอกจากนี้ด้วยลักษณะโครงสร้างดังกล่าวทำให้ไวโอลาซินแสดงสมบัติเป็นสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในหลายด้าน เช่น

4.1 สารต้านอนุมูลอิสระ

สารไวโอลาซินแสดงสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยมีความเข้มข้นในการจับกับอนุมูล DPPH ที่ 50% (Inhibitory Concentration, IC₅₀) เท่ากับ 30 ไมโครโมลาร์ มีความสามารถในการยับยั้งการเกิดอนุมูลของไนตริกออกไซด์ในระดับ IC₅₀ เท่ากับ 21 ไมโครโมลาร์ มีความสามารถในการจับอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ที่ระดับ IC₅₀ เท่ากับ 125 ไมโครโมลาร์ และยังคงแสดงผลค่าสัญญาณจากการเกิดอนุมูลไฮดรอกซิลโดยการทดสอบ ERP (Electron paramagnetic resonance) เนื่องจากสมบัติในการละลายน้ำของไวโอลาซินนั้นต่ำมาก ทำให้การเข้าไปทำปฏิกิริยาของไวโอลาซินในเฟสไม่มีขั้วหรือมีขั้วน้อยได้ดี จึงเป็นจุดที่ทำให้ไวโอลาซินมีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Konzen *et al.*, 2006) สารไวโอลาซินจะมีหมู่ไฮดรอกซิล 1 หมู่และมีหมู่ N-H 3 หมู่ ซึ่งมีความสำคัญในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยไวโอลาซินจะมีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนหรือไฮโดรเจนอะตอมแก่สารอนุมูลอิสระ ทำให้สารอนุมูลอิสระมีความเสถียร

4.2 สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

สารไวโอลาซินสามารถยับยั้ง *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Bacillus* sp., *Mycobacterium* sp., *Neisseria* sp. และ *Pseudomonas* sp. (Durán and Menck., 2001) เนื่องจากแบคทีเรียผลิตสารไวโอลาซินไว้เพื่อป้องกันการล่าจากศัตรูและเชื้อราก็สามารถเป็นผู้ล่าของแบคทีเรียกลุ่มนี้ Brucker และคณะ (2008) รายงานว่า ไวโอลาซินที่มีอยู่ใน *J. lividum* นั้นมีสมบัติในการป้องกันเชื้อราก่อโรคสายพันธุ์ *Batrachochytrium dendrobatidis* ซึ่งจะเป็นเชื้อราที่อาศัยอยู่บนซาลาแมนเดอร์ (*Plethodon cinereus*) สารไวโอลาซินที่ผสมระหว่างสารไดออกซีไวโอลาซินกับสารไวโอลาซินของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ RT102 พบว่า สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *B.*

lichenniformis, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *S. aureus* และเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *Pseu. aeruginosa* สารไวโอลาซินสามารถทำให้เกิดการตายของเซลล์แบคทีเรียได้โดยอยู่ที่ความเข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Nakamura *et al.*, 2003)

4.3 สารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

จากการศึกษาของ Baretto และคณะ (2008) ได้ทำการศึกษาสารไวโอลาซินที่ผลิตจากเชื้อ *C. violaceum* สายพันธุ์ Brazilian Amazon และสายพันธุ์ ATCC 12472 โดยศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา 7 สายพันธุ์ พบว่ามีฤทธิ์ที่สูงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *Aspergillus sp.*, *Botryodiplodia sp.*, *Cercospora kikuchi*, *Colletotrichum sp.*, *Corynespora sp.*, *Fusarium sp.* และ *Phomopsis sp.*

ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราของสารไวโอลาซินอาจจะเกิดได้จาก 3 กลไกที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อราคือ ความเป็นพิษของสารไวโอลาซิน (violacein cytotoxicity) โดย Shirata และคณะ (2000) ได้ตรวจพบคุณสมบัติในการเป็นสารปฏิชีวนะของสารไวโอลาซินที่ผลิตจาก *J. lividum* ที่ต่อต้านเชื้อก่อโรคพืช *Colletotrichum dematium* และ *Rosellinia necatrix* ซึ่งเป็นเชื้อราที่ทำให้เกิดโรครากขาวในต้นมันเบอรรี่ กลไกที่สองในการยับยั้งเชื้อราอาจเกิดขึ้นจากลักษณะของเชื้อ *C. violaceum* ที่สามารถผลิตไฮโดรเจนไซยาไนด์ได้ (cyananide production) ซึ่งกระบวนการสังเคราะห์ไฮยาไนด์เกิดขึ้นและถูกควบคุมโดยยีน *henABC* ซึ่งอยู่ใน *C. violaceum* ไฮยาไนด์จะมีบทบาทในการควบคุมโรคพืช

อีกกลไกที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราคือ การผลิตเอนไซม์ย่อยไคติน (chitin) ซึ่งไคตินเป็นสารพอลิเมอร์เส้นตรงที่ไม่ละลายน้ำเป็นส่วนประกอบหลักของผนังเซลล์ของเชื้อราและแมลง *C. violaceum* สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยไคตินได้ (chitinolytic enzyme) จึงมีความสำคัญในการควบคุมโรคพืชและแมลงศัตรูพืช Park และคณะ (1995) ได้รายงานผลการยับยั้งและการฆ่า *Rhizoctonia sp.* มีความสัมพันธ์กับเอนไซม์ไคทิเนส ที่ผลิตจากเชื้อ *C. violaceum*

4.3 สารยับยั้งการเจริญของไวรัส

สมบัติที่น่าสนใจของไวโอลาซินคือ ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของไวรัสได้ โดยจากการศึกษาของ Andrighetti-Frohner และคณะ (2003) โดยใช้สารไวโอลาซินที่สกัดได้จากเชื้อ *C. violaceum* พบว่าระดับความสามารถในการทำลายเซลล์ไวรัสอยู่ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำต่อเชื้อไวรัสสายพันธุ์ HSV-1 (strain KOS) HSV-1 (strain ATCC/VR-733) (Andrighetti-Frohner *et al.*, 2003)

4.4 สารยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

จากการศึกษาโดย Ferreira และคณะ (2004) ในการเปรียบเทียบผลของไวโอลาซินต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว 3 สายพันธุ์ ได้แก่ HL60, U937 และ K562 พบว่า ไวโอลาซินสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ HL60 ได้ถึง 60% ของเซลล์ทั้งหมด แต่ไม่มีผลยับยั้งเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ U937 และ K562 (Ferreira *et al.*, 2004) ในขณะที่ Carvalho และคณะ (2006) ได้ศึกษาผลของสารไวโอลาซินต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ของมนุษย์สายพันธุ์ HT-29 พบว่า สารไวโอลาซินสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิดดังกล่าวได้ที่ 40% ซึ่งมีความเข้มข้นของไวโอลาซิน 10 ไมโครโมลาร์ โดยเซลล์ได้รับสารนาน 72 ชั่วโมง ลักษณะความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารไวโอลาซิน ซึ่งทำการทดลองโดยวิธี alkaline comet assay ไม่สามารถทำลายเซลล์ HEP-2 และ MA104 แต่อย่างไรก็ตามสารไวโอลาซินก็ให้ผลในการทำลาย DNA ในเซลล์ FRhK-4 และ VERO (Andrighetti-Frohner *et al.*, 2003) Durán และ Menk (2001) ได้ทำการศึกษาความเป็นพิษของสารไวโอลาซินต่อเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ พบว่า สารไวโอลาซินมีผลในการทำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายโดยวิธี apoptosis โดย cell line แต่ละชนิดจะถูกยับยั้งโดยสารไวโอลาซินในความเข้มข้นที่แตกต่างกันและผลการศึกษางานวิจัยอื่นสามารถสรุปดังแสดงใน Table 3

เนื่องจากมีเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดเท่านั้นที่สามารถสร้างสารไวโอลาซินได้ จากรายงานพบว่า มีเชื้อจุลินทรีย์เพียง 6 ชนิดเท่านั้นที่ผลิตสารไวโอลาซิน เนื่องจากเชื้อในกลุ่มนี้เป็นกลุ่มเฉพาะ ดังนั้น จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะศึกษา ซึ่งเป็นที่รู้กันดีว่าปัจจุบันผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งมีอัตราส่วนที่เพิ่มมากขึ้น ดังนั้นหากมีความเป็นไปได้ที่จะนำไปสู่การพัฒนาเป็นยารักษา มะเร็ง งานวิจัยนี้ก็จะมีความสำคัญเป็นอย่างมาก

อย่างไรก็ตามเนื่องจากสารไวโอลาซินยังคงมีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติอยู่จึงมีการนำเอาเอ็นไซม์ในกลุ่มเปอร์ออกซิเดส (peroxidase) และลิกนินเนส (ligninase) เข้ามาเปลี่ยนแปลงโครงสร้างบางส่วนของไวโอลาซิน (Bromberg and Durán, 2001)

Table 3. *In vitro* testing results of violacein in several cell lines.

Cell line	IC ₅₀ or IG ₅₀ (µg/ml)
V79	1.7–4.1
Hum. Lymph	>3.4
HL60	0.27
MOLT-4	0.01
NCI-H460	0.01
KM12	0.02
OCM-1	1.27
HT29	>3.4
Caco-2	0.68
SW480	0.68
DLD1	0.51
HCT116	0.51
RENCA	0.2
EAT	1.7
FRhK-4	1.08
VERO	1.02
MA104	1.22
Hep2	1.18
EOMA	0.17

Sources: Durán และคณะ (2007)

4.5 สารสีม่วงที่ใช้ย้อมผ้าไหม

เมื่อปลายปี พ.ศ. 2539 สถาบันวิจัยผ้าไหมและแมลงแห่งชาติของญี่ปุ่น สามารถสกัดสีม่วงน้ำเงินจากแหล่งกำเนิดตามธรรมชาติได้เป็นครั้งแรกโดย Atzushi Kochima ซึ่งเป็นช่างทอผ้าไหมในเขตกุนมาของญี่ปุ่น ได้พบว่าเส้นใยไหมที่ทิ้งไว้ในถัง เปลี่ยนเป็นสีม่วงน้ำเงิน เมื่อนำเส้นด้ายนั้นมาวิเคราะห์ที่สถาบันก็ได้พบแบคทีเรียชนิดหนึ่ง ชื่อว่า *J. lividum* ปะปนอยู่ สีนี้มาจากสารไวโอลาซินซึ่งอยู่ภายในตัวแบคทีเรีย แบคทีเรียชนิดนี้ไม่ก่อโรคใด ๆ และสารไวโอลาซินก็เป็นสารที่ไม่มีพิษด้วย สีที่ได้จากแบคทีเรียนี้สามารถนำมาใช้ย้อมเส้นใยธรรมชาติทำให้เกิดสีที่สวยงามทนต่อการซักล้าง และไม่ก่อให้เกิดปัญหาใด ๆ นอกจากนี้ การนำแบคทีเรียมาเพาะเป็นจำนวนมาก ๆ ก็ทำได้ง่าย จึงสามารถผลิตสีได้ในราคาถูก สีนี้มีชื่อทางการค้าว่า earth blue อยู่ในระหว่างการขอจดสิทธิบัตร และคาดว่าจะเป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย(Nomura, 1994)

4.6 เครื่องสำอาง

สารไวโอลาซินจากเชื้อ *C. violaceum* ที่เลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วยเกลือ, wood hydrolyzate, anthranilic acid และสารสกัดยีสต์ พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* และมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของกรดเลโนอิก (linoleic acid) ในเลือด ซึ่งสามารถนำไปทำเป็นโลชั่น (Aoki and Nomura, 1998) เครื่องสำอางที่มีส่วนผสมของสารไวโอลาซินและอนุพันธ์ุโดยเตรียมในรูปแบบต่างๆของกระบวนการผลิตสามารถนำไปทำเป็นเครื่องสำอางประเภท ลิปสติก และ eye makeup ได้ (Meiring *et al.*, 2007).

5. ข้อมูลด้านสิทธิบัตรของสารไวโอลาซิน

สารไวโอลาซินสามารถนำไปประยุกต์ในการเป็นสารต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ โดยจะใช้สารไวโอลาซินที่ละลายอยู่ใน dimethylsulfoxide จากสิทธิบัตรเลขที่ BR 200101346A

สิทธิบัตรเลขที่ WO/2006/074451 (US 20060263368) ใช้สารไวโอลาซินเป็นสารที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์หรือยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง เพื่อลดความเป็นพิษต่อเซลล์จึงมีการพัฒนาโดยการนำสารไวโอลาซินไปตรึงกับสารประกอบ beta-cyclodextrin ที่เชื่อมกับอนุภาคนาโนของทอง (สิทธิบัตรเลขที่ BR 200502657)

สิทธิบัตรเลขที่ KR 2007088150 ใช้สารไวโอลาซินที่ได้จากเชื้อ *C. violaceum* ในการเป็นสารควบคุมแมลงศัตรูพืช

สิทธิบัตรเลขที่ DE 102005051869 ได้นำสารไวโอลาซินไปใช้ในการเตรียมเป็นเครื่องสำอาง เนื่องจากสารไวโอลาซินมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย, ไวรัส และ ยั้งป้องกันผิวหนังและเยื่อหุ้มเซลล์

ไวโอลาซินจากเชื้อ *Pseudoalteromonas* sp. สายพันธุ์ DSM 13623 สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอาหาร, อุตสาหกรรมสิ่งทอ และของเล่นได้ ซึ่งรายงานไว้ในสิทธิบัตรเลขที่ US 2004053375

การผลิต การสกัด แล้วการทำบริสุทธิ์ของสารไวโอลาซินถูกพัฒนาขึ้นโดย Rettori และ Durán (1998) โดยใช้เชื้อ *C. violaceum* สายพันธุ์ CCT3496 จากสิทธิบัตรเลขที่ BR 702918A ได้เปิดเผยถึงกระบวนการสังเคราะห์สารไวโอลาซิน ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งโดยใช้ข้าวเป็นแหล่งของคาร์บอนในอาหาร NB

สารไวโอลาซินมีฤทธิ์ในการยับยั้งไวรัสโดยจะมีฤทธิ์ต้านไวรัส Polio virus และ Herpes virus ซึ่งสามารถเตรียมได้โดยเลี้ยงเชื้อ *C. violaceum* ในถังหมักที่มีการกวน ที่อุณหภูมิ 20-25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน ในอาหารที่ประกอบด้วย เปปโตน, กลูโคส และ เกลืออื่นๆ ที่ค่า pH ประมาณ 6-7 สกัดสารไวโอลาซินหยาบโดยใช้เอทานอลและทำการสกัดอีกครั้งโดย n-heptane (สิทธิบัตรเลขที่ DE 3935066)

มีข้อมูลสิทธิบัตรในประเทศบราซิล เกี่ยวกับเรื่องการผลิตการสกัดสารไวโอลาซินและใช้เป็นสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค (Brazilian Patent PI 97029866-6 และ PI 9702918 (1997)) ในประเทศเยอรมัน มีการศึกษาด้านการเป็น autoinducers (German Patent DE 19990928660 (2001) และ DE 3935066 (1991)) นอกจากนี้ในสหรัฐอเมริกา ก็มีการสกัดแยกสารที่ได้จาก *C. violaceum* เรียกว่าสาร HS-1 มีฤทธิ์ต้านเนื้องอก และแบคทีเรียก่อโรค (US Patent 5428175 (1955))

การใช้สายพันธุ์ recombinant ของแบคทีเรียถูกพัฒนาขึ้นเพื่อผลิตสารไวโอลาซินและอนุพันธ์ โดยทำการศึกษายีนที่มีความสัมพันธ์ในการสังเคราะห์สารไวโอลาซินและอนุพันธ์ โดยใช้แบคทีเรีย *Pseu. putida* สิทธิบัตรเลขที่ CN101386834 และ CN101368169 สำหรับ *B. coli* BL21-Codon Plus (DE3)-RIL ในสิทธิบัตรเลขที่ CN101319219 และ *E. coli* ถูกตีพิมพ์ในวารสาร WO/1999/020799

ในปัจจุบันสารไวโอลาซินที่ผลิตจาก *J. lividum* [98% (minimum 85% ของสารไวโอลาซิน) และ คีออกซีไวโอลาซิน, HPLCV9389-1] ได้ผลิตขึ้นเพื่อจำหน่ายซึ่งผลิตโดยบริษัท SIGMA ALDRICH (accessed in June 17, 2010).

6. จุลินทรีย์ที่ผลิตสารไวโอลาซิน

6.1 *C. violaceum*

C. violaceum เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่งสั้น หรือ coccobacilli เป็น facultative anaerobe ไม่สร้าง endospore เคลื่อนที่ด้วย single polar flagellum เป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในน้ำ เจริญได้ที่อุณหภูมิ 15-40 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ที่ 30-35 องศาเซลเซียส จะผลิตสารสีม่วงเข้มบน nutrient agar ลักษณะโคโลนี กลมมนูนเล็กน้อยสีม่วงดำ ผิวโคโลนีเรียบ (Durán et al, 2001)

C. violaceum จะผลิตกรดจากน้ำตาลกลูโคส, N-acetylglucosamine, gluconate แต่จะไม่หมัก L-arabinose, D-galactose และ D-maltose สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ ให้ผลบวกในการทดสอบออกซิเดสและคาทาเลส

C. violaceum ทำให้เกิดโรคในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและมนุษย์ ซึ่ง *C. violaceum* จะผลิต endotoxin ที่มีพิษรุนแรงและจะอยู่ที่ phagocytic cell โดยจะเพิ่มระดับของ superoxide dismutase และคาทาเลส การติดเชื้อเนื่องจากการปนเปื้อนจากดิน น้ำ จะทำให้เกิดอาการท้องเดิน *C. violaceum* เป็นเชื้อที่ไม่ค่อยก่อโรคในคน แต่เชื้อเข้าสู่บาดแผลทางผิวหนังอาจทำให้ถึงชีวิตได้ เช่น อาจทำให้เกิดฝีในปอด เกิดภาวะ sepsis

6.2. *J. lividum*

เป็นเชื้อแกรมลบมีรูปร่างแท่งขนาด $0.8-1.2 \times 2.5-6.0$ ไมโครเมตร บางครั้งมีรูปร่างเป็นแท่งโค้งหรืออยู่เป็นคู่ๆ การสร้างแคปซูลยังไม่ชัดเจน แม้บางครั้งจะเกิดการสร้างเมือก การเคลื่อนที่ที่ใช้แฟลกเจลล่าที่ด้านข้างของตัวเชื้อ ต้องการอากาศในการเจริญ มีการผลิตโคโลนีสีม่วงนูนกลมบนอาหารแข็ง ในอาหารเหลวจะมีการสร้างวงแหวนสีม่วงบนผิวหน้าของอาหาร และบริเวณรอบๆของภาชนะบรรจุ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญคือ 25 องศาเซลเซียส อุณหภูมิต่ำสุดที่สามารถเจริญคือ 2 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้คือ 32 องศาเซลเซียส ค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 7-8 และไม่สามารถเจริญได้ที่อาหารที่มีค่า pH ต่ำกว่า 5 หรือโซเดียมคลอไรด์ 6 เปอร์เซ็นต์ หรือมากกว่านั้น เป็น Chemorganotrophs มีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน ตัวสุดท้ายจึงทำให้ต้องการออกซิเจนในกระบวนการเมตาบอลิซึม พบได้ในน้ำและดิน บางครั้งก็เป็นสาเหตุของอาหารเน่าเสีย (Pantarella et al., 2007)

Shirata และคณะ (2002) พบว่า *J. lividum* ที่แยกได้จากเส้นใยของไหมที่มีสีฟ้าม่วง ซึ่งแบคทีเรียนี้ผลิตจำนวนมาก ซึ่งเจริญในอาหารบางชนิดที่มีกรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบเช่น ในอาหาร Wakimoto เม็ดสีถูกสกัดด้วยเมทานอล พบว่า เป็นส่วนผสมของดีออกซิไวโอลาซินและ

ไวโอลาซีน เม็ดสีนี้ไม่เพียงแต่นำไปใช้ย้อมเส้นใยธรรมชาติเช่นผ้าไหมผ้าฝ้ายและผ้าขนสัตว์เท่านั้น แต่สามารถใช้ย้อมเส้นใยสังเคราะห์เช่นไนลอนได้อีกด้วย

นอกจากนี้แบคทีเรียอื่นๆ ที่ถูกค้นพบว่า สามารถสร้างสารไวโอลาซีนได้แก่ *Alteromonas luteoviolacea*, *Duganella violaceinigua* (Wang et al., 2009), *Ps. tunicata* (Franks et al., 2005), *Ps. luteoviolacea* (Yang et al., 2007), *Pseu. ulvae* (Yada et al., 2008)

7. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารไวโอลาซีน

การผลิตสารไวโอลาซีน โดยแบคทีเรียขึ้นอยู่กับปัจจัยที่เกี่ยวข้อง เช่น อาหารและสิ่งแวดล้อม

7.1 แหล่งคาร์บอน

Pantarella และคณะ (2007) ได้ทำการศึกษาการผลิตสารไวโอลาซีนโดยเชื้อ *J. lividum* DSM 1522T พบว่าการผลิตสารไวโอลาซีนจะถูกควบคุมโดยแหล่งคาร์บอน โดยการสร้างสารสีม่วงถูกยับยั้งด้วยกลูโคสแต่จะถูกกระตุ้นด้วยกลีเซอรอล ในขณะที่การผลิตไวโอลาซีนโดย *J. lividum* (Lu et al., 2009) มีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมคือซูโครส ปริมาณการผลิตตรงควัดดูสีม่วงที่สูงสุดในการทดลองคือ 0.8 กรัมรงควัตถุ/กรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง Mendes และคณะ (2001) ทำการศึกษาการผลิตไวโอลาซีนโดยใช้เชื้อ *C. violaceum* พบว่าแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์คือ กลูโคสซึ่งจะทำให้เชื้อเจริญอย่างรวดเร็วแต่มีผลต่อการลดการผลิตสารไวโอลาซีน ในทางกลับกันถ้าต้องการผลิตสารไวโอลาซีนให้ได้ปริมาณสูงควรใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลซูโครส

7.2 แหล่งไนโตรเจน

จากการศึกษาของ Durán และคณะ (1989) พบว่า แบคทีเรียต้องการเมทไทโอนีน เพียงตัวเดียวเท่านั้นในการเจริญของเซลล์ ส่วน อะลานีน อาร์จินีน และทริปโตเฟน กระตุ้นการเจริญและการสร้างสารไวโอลาซีน Mendes และคณะ (2001) ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารไวโอลาซีนโดยใช้ Response Surface Methodology เป็นเครื่องมือในการหาสภาวะ พบว่า สารสกัดจากยีสต์มีบทบาทสำคัญต่อการผลิตสารไวโอลาซีน ในขณะที่ Riveros และคณะ (1989) พบว่า ทริปโตเฟนเป็นตัวกระตุ้นการสังเคราะห์รงควัตถุสีม่วงใน 9 สายพันธุ์ของ *Chromobacterium* sp. เมื่อเติมลงไปในการอาหารจะช่วยเพิ่มการผลิตของสารไวโอลาซีน Lu และคณะ (2009) ได้ทำการศึกษาหาแหล่งไนโตรเจนที่ดีในการเจริญและการสร้างไวโอลาซีนโดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *J. lividum* พบว่า casein 5 กรัม/ลิตร จะให้ผลผลิตที่สูงในการผลิตสารไวโอลาซีนซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Riveros และคณะ (1989) ที่รายงานว่าสารไวโอลาซีนสามารถสร้างได้

โดยการย่อยสลายของเคซีน Wang และคณะ (2009) รายงานว่า แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตสารสีม่วงจากเชื้อ *D.violaceinnigua* คือโปรตีนสกัดจากเนื้อวัว 1.53 กรัมต่อลิตรร่วมกับ ทริปโตเฟน 0.74 กรัมต่อลิตรซึ่งจะผลิตได้ไวโอลาซินได้ 1.62 กรัมต่อลิตร

7.3 แร่ธาตุ

Lu และคณะ (2009) ศึกษาชนิดของแร่ธาตุต่อการผลิตสารไวโอลาซินจากเชื้อแบคทีเรีย *J. lividum* พบว่า ปริมาณแร่ธาตุในอาหารที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มการผลิตไวโอลาซินคือ CaNO_3 0.6 กรัม/ลิตร MgSO_4 0.5 กรัม/ลิตร FeSO_4 0.01 กรัม/ลิตร riboflavin 0.078 มิลลิกรัม/ลิตร และ nicotinic acid 1.08 มิลลิกรัม/ลิตร และจากศึกษาของ Wang และคณะ (2009) ที่ได้ทำการศึกษาในเชื้อแบคทีเรีย *D. violaceinnigua* พบว่า ปริมาณของแมกนีเซียมไนเตรท แอมโมเนียมเฟอรัสซัลเฟต ไคโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต แมกนีเซียมซัลเฟต มีผลต่อการผลิตสารไวโอลาซินด้วยเช่นกัน

7.4 อุณหภูมิ, พีเอชและการให้อากาศ

จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตสารไวโอลาซินที่แตกต่างกันเช่น *Chromobacterium* sp. ที่แยกได้จากตะกอนดินในทะเลสาบ Ontario พบว่า อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เชื้อยังสามารถเจริญได้แต่จะไม่มีการผลิตสารสีม่วง ในขณะที่อุณหภูมิระหว่าง 15-25 องศาเซลเซียส เชื้อจะมีการเจริญและสร้างสารสีม่วง (Inmiss and Marfield, 2005) ส่วนการศึกษาของ Durán และคณะ(1989) พบว่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 จะให้ผลผลิตของสารไวโอลาซินที่สูง ในขณะที่การผลิตสารไวโอลาซินโดยเชื้อ *J. lividum* (Lu et al., 2009) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 4-20 องศาเซลเซียส ปริมาณของไวโอลาซินมีการผลิตที่สูงสุดที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ค่าพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตไวโอลาซินอยู่ในช่วง 7-8 Wang และคณะ (2009) รายงานว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารสีม่วงจากเชื้อ *D.violaceinnigua* พบว่า ค่าพีเอชของอาหารอยู่ที่พีเอช 6.71 จะผลิตไวโอลาซินได้ 1.62 กรัม/ลิตร ในชั่วโมงที่ 32 ส่วน *Ps. luteoviolacea* เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากฟองน้ำจะผลิตไวโอลาซินได้ในอาหารเหลวที่ไม่มีการกวน หากเพิ่มการกวนจะทำให้การผลิตสารสีม่วงลดลง (Yang et al., 2007)

การศึกษากการผลิตสารไวโอลาซินในสภาวะต่างๆ และจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารไวโอลาซิน ผลการทดลองจะแสดงใน Table 4.

Table 4. Violacein production from various microorganisms.

Strain	Comments	Yields
Psychotropic bacterium RT102	Close to <i>J. lividum</i>	20°C; 30 h; pH 6.0 3.5g/L
<i>J. lividum</i> strain DSM1522		25°C 0.016 g/L
<i>J. lividum</i> S9601		No data were found
Marine sediment bacterium		25°C; 96 h
<i>Pseudoalteromonas</i>		0.52 g/L
Psychrotrophic bacterium, XT1	Close to <i>J. lividum</i>	15°C pH 8 0.8 g/L
<i>C. violaceum</i>	<i>Bacillus violaceum</i>	27°C, 144 h pH 6.2 0.025 g/L
<i>Al. luteoviolacea</i>	Marine bacteria	22°C; 72 h 0.002 g/L 30°C; 24 h
<i>C. violaceum</i> CCT 3496		Semisolid fermentation 2.0 g/L
<i>C. violaceum</i> B78	From Amazon River, Manaus, Brazil	32°C; 36 h; pH 6.8; Semisolid fermentation 2.6 g/L
<i>C. violaceum</i> B78	From Amazon River, Manaus, Brazil	28°C; 24 h; pH 7.2 Liquid fermentation 3.4 g/L
<i>C. violaceum</i> ATCC 553		30°C; 72 h; pH 7.2 0.002 g/L
<i>C. violaceum</i> CCT 3496		30°C; 36 h; pH 7.2 0.43 g/L
<i>Ps. luteoviolacea</i>	From sponge A. cavernosa	20°C; 240 h 0.013 g/L
<i>Duganella</i> sp B2	From China	25°C; 40 h; pH 8.4 1.62 g/L

Soures: Durán and Kulkarni (2012)

วัตถุประสงค์

- 1 เพื่อแยกแบคทีเรียที่ผลิตสารไวโอลาซิน
- 2 เพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่ผลิตสารไวโอลาซินที่แยกได้
- 3 เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารไวโอลาซินของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้
- 4 เพื่อแยกสารสกัดสีม่วงที่ได้ให้บริสุทธิ์และพิสูจน์ลักษณะว่าเป็นสารไวโอลาซิน
- 5 เพื่อศึกษาสมบัติทางชีวภาพของสารไวโอลาซินที่สกัดได้

ขอบเขตของการศึกษา

คัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารสีม่วงจากตัวอย่างดินและแหล่งน้ำบริเวณต่างๆ ของพื้นที่หาดใหญ่ น้ำเสียที่เก็บจากบ่อบำบัดน้ำเสียจากโรงงานอาหารทะเลแช่แข็ง และน้ำเสียบริเวณต่างๆ ของพื้นที่หาดใหญ่ จำแนกแบคทีเรียที่ผลิตสารไวโอลาซินโดยใช้วิธีการทดสอบทางด้านชีวเคมีและการจัดจำแนกตาม 16S rDNA หาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารไวโอลาซิน และการแยกสารไวโอลาซินให้บริสุทธิ์ แล้วศึกษาสมบัติการดูดกลืนแสงและโครงสร้างโดยใช้เทคนิค FT-IR และ LC-MS แล้วจึงนำศึกษาสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารไวโอลาซินที่แยกได้

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

1. ตัวอย่างที่ใช้แยกเชื้อ

ตัวอย่างที่นำมาแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารไวโอลาซินมีทั้งตัวอย่างดิน และตัวอย่างน้ำ โดยเก็บตัวอย่างดิน น้ำ และน้ำเสีย จากแหล่งต่างๆ ดังนี้

ตัวอย่างดิน ดินบริเวณป่าชายเลนของตำบลเกาะขยงจังหวัดสงขลา, ดินบริเวณรอบๆอ่างเก็บน้ำศรีตรังมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์วิทยาเขตหาดใหญ่ ดินบริเวณรอบๆ สระน้ำมหาวิทยาลัยหาดใหญ่ ดินบริเวณบ่อตกตะกอน บ่อบำบัด และบ่อพักน้ำของโรงงานอาหารแช่แข็ง เอส เอส โพรสเซนฟูคส์ จำกัดและบริษัท แมนเอ โพรสเซนฟูคส์ จำกัด โดยตัวอย่างดินรอบๆ บ่อ และตะกอนที่ตกตะกอนอยู่ใต้ก้นบ่อ เก็บจุดละ 100 กรัม ใส่ภาชนะบรรจุตัวอย่างแล้วนำมาตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างสารไวโอลาซินและ total viable count

ตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติ น้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติจะถูกเก็บจากแหล่งน้ำต่างในพื้นที่ของอำเภอหาดใหญ่ ได้แก่ อ่างเก็บน้ำศรีตรัง มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ อ่างเก็บน้ำมหาวิทยาลัยหาดใหญ่ และ อ่างเก็บน้ำศรีภูวนาท โดยเก็บจุดละ 10 มิลลิลิตร ใส่ภาชนะบรรจุตัวอย่างแล้วนำมาตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างสารไวโอลาซินและ total viable count

ตัวอย่างน้ำเสีย น้ำเสียหรือน้ำทิ้งจากกระบวนการบำบัดน้ำเสีย น้ำบริเวณบ่อตกตะกอน บ่อบำบัด และบ่อพักน้ำของโรงงานอาหารแช่แข็ง เอส เอส โพรสเซนฟูคส์ จำกัดและบริษัท แมนเอ โพรสเซนฟูคส์ จำกัด ท่อรวมปล่อยน้ำเสียโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ปล่อยน้ำเสียตลาดคลองเรียน และ ปล่อยน้ำเสียตลาดทุ่งเสา โดยเก็บจุดละ 10 มิลลิลิตรใส่ภาชนะบรรจุตัวอย่างแล้วนำมาตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างสารไวโอลาซินและ total viable count

2. เชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบ เป็นเชื้อที่ได้รับจากห้องปฏิบัติการเอนไซม์และห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โดยเก็บเชื้อไว้ในอาหารวุ้นเยียง NB

2.1 *B. cereus* DMST5540

2.2 *B. subtilis*

2.3 *C. violaceam* ATCC 12472 รับผิดชอบต่อความอนุเคราะห์ ศ. ดร. ศุภยงค์ วรวิดิคุณชัย
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

2.4 *E. coli* DMST4212

2.5 *Listeria monocytogenes* DMST17303

2.6 *Proteus mobilis*

2.7 *Pseudomonas* sp.

2.8 *Salmonella* Typhimurium DMST16809

2.10 *S. aureus* DMST8840

3. เชื้อราที่ใช้ทดสอบ เป็นเชื้อราที่ได้รับจากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะอุตสาหกรรมเกษตร
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เก็บเชื้อไว้ในอาหารวุ้นเอียง PDA

3.1 *A. niger* ATCC6875

3.2 *Fusarium* sp.

3.3 *Mucor* sp.

3.4 *Penicillium* sp.

3.5 *Rhizopus* sp.

3.6 *Trichoderma reesei* QM9414

4. อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 Nutrient broth (NB) และ Nutrient broth (NA) ภาศผนวก ก

2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐาน (basal medium) (ดัดแปลงจาก Mendes, 2001) ซึ่งในอาหาร 1
ลิตรจะประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 5 กรัม ทริปโตเฟน 0.3 กรัม เปปโตน 5 กรัมและ น้ำกลั่น 1000
มิลลิลิตร

2.4 Mueller Hinton broth ภาศผนวก ก

2.5 PDA agar ภาศผนวก ก

5. สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองเป็นชนิดคุณภาพวิเคราะห์ (analytical grade) หรือเทียบเท่า

สารเคมี	บริษัทที่ผลิต
Butylated hydroxytoluene (BHT)	Sigma
Crystal violet	Sigma
Chloroform	Fluka
Diethyl ether	Fluka
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma
1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH)	Merck
Ethanol	J.T. Baker
Ethylene diamine tetraacetic acid disodium salt (EDTA)	Fluka
Ferric chloride	Sigma
D-glucose	Fluka
Hexamine ($C_6H_6Na.2H_2O$)	Sigma
Methanol	Fluka
L-methionine	Sigma
Nitro blue tetrazolium dihydrochloride (NBT)	Sigma
Potassium chloride	Fluka
Riboflavin	Sigma
Tetramethyl murexide (TMM)	Sigma
Triton X-100	Sigma
Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl chroman-2-carboxylic acid)	Aldrich

6. อุปกรณ์

- 6.1 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น HF-1200 บริษัท A&D
- 6.2 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น BP210s บริษัท Satorius
- 6.3 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow) รุ่น 5221044 บริษัท Hotpack
- 6.4 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น W350 บริษัท Memmert
- 6.5 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ (Autoclave) รุ่น SS-325 บริษัท Tomy Seiko
- 6.6 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 420A บริษัท Orion Research

- 6.7 กล้องจุลทรรศน์ รุ่น YS100 บริษัท Nikon
- 6.8 เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น U-200 บริษัท Hitachi
- 6.9 โถดูดความชื้น (Desiccator)
- 6.10 เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Centrifuge) รุ่น 5203 บริษัท Hitachi
- 6.11 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) ควบคุมอุณหภูมิ รุ่น Universal 32R บริษัท eppendroff
- 6.12 ตู้อบ (Hot air oven) รุ่น MOV 212 บริษัท Sanyo Eletric
- 6.13 เครื่องเขย่า รุ่น 3005 บริษัท Lab-Line
- 6.14 เครื่องทำให้เซลล์แตก (sonicator)
- 6.15 เครื่องระเหยสุญญากาศ (rotary evaporator)

วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์สารสกัดไวโอลาซินหยาบ

ทำการวิเคราะห์สารสกัดสีม่วง-น้ำเงินหยาบโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 575 นาโนเมตรของสารสกัดตามวิธีของ Wang และคณะ (2009) โดยนำน้ำเลี้ยงเซลล์ 1 มิลลิลิตรปั่นแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 10000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นแล้วปั่นที่ 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง เดิมเอทานอล 1 มิลลิลิตร แล้วทำให้เซลล์แตกโดยการ sonication โดยใช้ความถี่ 200 W เป็นเวลา 10 นาที แยกเซลล์ออกจากสารสกัดโดยปั่นที่ 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตรโดยใช้สูตรคำนวณความเข้มข้นของสารไวโอลาซิน (น้ำหนักโมเลกุล 343.33)

$$\epsilon_{575} = 2.97 \times 10^{-2} \text{ ml}/\mu\text{g per cm}$$

ซึ่งสมการนี้อ้างอิงจากกฎของเบียร์และแลมเบิร์ตที่แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มของแสงที่ถูกดูดกลืนกับความเข้มข้นของสารตัวอย่างดังนี้

$$\log I_0/I = A = \epsilon lc$$

กำหนดให้ I_0 คือ ความเข้มแสงเมื่อเริ่มตกกระทบสาร (intensity of incident light)

I คือ ความเข้มแสงหลังผ่านสารตัวกลาง (intensity of transmitted light)

A คือ ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance)

ϵ คือ ค่าสภาพดูดกลืน โมลาร์ (molar absorptivity) มีหน่วยเป็น $\text{dm}^3 \text{ cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$

l คือ ความหนาของตัวกลาง มีหน่วยเป็น 1 cm

c คือ ความเข้มข้นของสารละลาย มีหน่วยเป็น $\text{g}^{-1} \text{ dm}^3$ หรือ mol L^{-1} หรือ molar

2. การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

หาน้ำหนักแห้ง(AOAC, 1999) โดยนำหลอดทดลองขนาดเล็ก(microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ออบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ แล้วนำไปชั่งน้ำหนักที่แน่นอนด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ทำซ้ำจนน้ำหนักคงที่ นำตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็กที่ชั่งแล้ว ปั่นเหวี่ยงด้วยอัตราเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งและล้างตะกอนเซลล์ที่ได้ด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้งโดยใช้เครื่องหมุนเหวี่ยง แล้วนำเซลล์ที่บรรจุในหลอด ออบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสประมาณ 24 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์ แล้วชั่งน้ำหนักที่แน่นอนด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ทำซ้ำจนน้ำหนักคงที่ หลังจากนั้นคำนวณหาน้ำหนักของเซลล์ที่มีหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร โดยใช้สูตรคำนวณ

$$\text{น้ำหนักหลอดทดลองที่มีเซลล์หลังอบแห้ง} - \text{น้ำหนักหลอดทดลองเปล่า} \times 1000$$

3. การวัดการเจริญของเชื้อ

ตรวจวัดการเจริญของเชื้อโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร โดยเก็บตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนเซลล์ 2 ครั้งด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85% นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ละลายตะกอนก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85% เป็นแบลนด์

4. การวิเคราะห์หาสารไวโอลาซินโดยใช้ HPLC

นำตัวอย่างที่ได้จากการทำบริสุทธิ์จากการสกัดโดย soxhlet ในการละลายเอทานอล ใช้คอลัมน์ DELTA PAKC18 analytical column(30 มิลลิเมตรx 30 มิลลิเมตร) ที่มีขนาดรูพรุน 100 อังสตรอม เส้นผ่าศูนย์กลาง 15 ไมโครเมตร อุณหภูมิของคอลัมน์เท่ากับ 23 องศาเซลเซียส ใช้สารละลายเมทานอล 75% เป็นเฟสเคลื่อนที่ ตรวจสอบโดยใช้ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร โดยแต่ละครั้งจะทำการฉีดสารตัวอย่างใน HPLC เก็บ fraction ในการฉีดตัวอย่างแต่ละครั้ง โดยเปรียบเทียบกับสารไวโอลาซินมาตรฐานที่จากเชื้อ *C. violaceum* ATCC 12472 นำสารที่ได้มา

ระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้ระเหยสูญญากาศ จนเป็นผลึก บั่นเหวี่ยงและทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตามวิธีการศึกษาของ Rettori และ Durán (1998)

5. การวิเคราะห์หาสารไวโอลาซินโดยใช้ Fourier Transform Infrared Spectrometer

นำตัวอย่างสารไวโอลาซินที่ได้จากการทำบริสุทธิ์โดยการวิเคราะห์ HPLC มาตรวจสอบองค์ประกอบสารเบื้องต้นของสารไวโอลาซิน โดยใช้ FT-IR โดยส่งตรวจวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

6. การวิเคราะห์หาสารไวโอลาซินโดยใช้ Liquid chromatography Mass spectrometer

นำตัวอย่างสารไวโอลาซินที่ได้จากการทำบริสุทธิ์โดยการวิเคราะห์ HPLC มาตรวจสอบหาน้ำหนักของสารไวโอลาซิน โดยใช้ LC-MS โดยส่งตรวจวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

7. การตรวจหาการรอดชีวิตของเซลล์ (MTT assay)

สำหรับการทดลองการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ทำการวิเคราะห์ที่ภาควิชาชีวเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขต หาดใหญ่ MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) เป็นสีสังเคราะห์ประเภท tetrazolium salt เทคนิคนี้ใช้ทดสอบการทำงานของเอนไซม์ซักซิเนตดีไฮโดรจีเนส (succinate dehydrogenase) ในไมโทคอนเดรีย โดยเลี้ยงเซลล์ MDA-MB-468 และ MCF-12A จำนวน 2×10^4 เซลล์/หลุม ใน 96-well plate บ่มในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้มีจำนวนเซลล์ ประมาณ 70% ของจานเพาะเลี้ยง จากนั้นบ่มเซลล์ด้วยอาหารที่ผสมด้วยสารสกัดหยาบและสารสกัดบริสุทธิ์ของสารไวโอลาซิน ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อครบกำหนด คูดอาหารเก่าออก ล้างเซลล์ด้วย $1 \times$ PBS ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีในที่มืด จะเกิดผลึกสีม่วงของ formazan (MTT metabolites) จากนั้นละลายตะกอนด้วยไดเมทิลซัลฟอกไซด์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader spectrophotometer (Carvalho *et al.*, 2006) จากนั้นคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่รอดชีวิตดังสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์เซลล์ที่รอดชีวิต} = \frac{(\text{O.D. ของเซลล์ที่ไม่ได้บ่มด้วยสารสกัด} - \text{O.D. ของเซลล์ที่บ่มด้วยสกัด}) \times 100}{\text{O.D. ของเซลล์ที่ไม่ได้บ่มด้วยสารสกัด}}$$

7. การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ในแต่ละขั้นตอนของการศึกษาการตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งการต้านอนุมูลอิสระ การเจริญของแบคทีเรีย เชื้อรา และ เซลล์มะเร็ง โดยกำหนดให้จำนวนซ้ำ (Replication) ในการทดลองแต่ละครั้งเท่ากับ 3 ซ้ำ และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (Statistic Package for the Social Science) version 14.0 และใช้โปรแกรม Design- Expert version 7 ในการวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสม

วิธีการวิจัย

1. การคัดเลือก และแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารไวโอลาซิน

นำตัวอย่าง (ดินและน้ำเสีย) 1 กรัมหรือ 1 มิลลิลิตรเติมในสารละลายน้ำเกลือ 0.85% ปริมาตร 9 มิลลิลิตรเพื่อทำการเจือจางตามลำดับ (serials dilution) แล้วนำตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรมาเกลี่ยบนอาหาร NA ที่เติมทริปโตเฟน 0.74 กรัมต่อลิตรและอาหาร NA ชรรณคาเพื่อหา total viable count บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการนับเชื้อบนจานอาหารที่มีโคโลนีตั้งแต่ 30-300 โคโลนี และคัดเลือกเชื้อที่มีโคโลนีสีม่วง (Kuburger and May, 1982) นำโคโลนีสีม่วงไปเชยลงบนอาหารแข็ง NA และแยกจนกระทั่งได้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ ก่อนนำเชื้อไปเลี้ยงไว้บนอาหาร NB ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คูดเชื้อขึ้นมา 0.5 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดทดลองขนาดเล็กแล้วเติมกลีเซอรอล 60% ที่ฆ่าเชื้อแล้ว 0.5 มิลลิลิตร เก็บเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2. การจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ที่สร้างสารไวโอลาซิน

คัดเลือกแบคทีเรียที่มีโคโลนีสีม่วงแยกได้จากตอนที่ 1 อย่างน้อย 1 เชื้อ มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร NB ในสภาวะควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างเชื้อที่อยู่ในระยะ log phase แล้วเจือจางให้มีค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์

แขวนลอยที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรเท่ากับ 1 ซึ่งจะมีความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับ 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ก่อนนำไปวิเคราะห์ตามขั้นตอนดังนี้

2.1 การศึกษาสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือก

ทดสอบการย้อมติดสีแกรมตามวิธีการของ Sánchez และคณะ (2004) แล้วนำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1000 เท่า

2.2 การทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียที่ได้

การทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้โดยทำการทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิ 4 และการเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, egg yolk reaction, การผลิตกรดจากน้ำตาลทริฮาโลส, น้ำตาลอะราบินโนส และน้ำตาลไซโลส, การย่อยสลายเคซีน, การย่อยสลายเอสคูลิน, การหมักน้ำตาลกลูโคส (O/F test), และการสร้าง arginine decarboxylase ตามวิธีของ Moss และคณะ (1978)

2.3 การเทียบเคียงเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ด้วย 16S rDNA

การวิเคราะห์เชิงโมเลกุลของเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกโดยการสกัดยีน 16S rDNA โดยใช้ชุดสกัด DNA หลังจากนั้นนำมาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ primer 1492R (5'GGTTACCTTGTTACGACTT3') และ 8F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') หลังจากนั้นเตรียม agarose gel ความเข้มข้น 1% แล้วนำมาวางใน chamber ที่บรรจุ TAE buffer (Tris-acetate buffer) แล้วทำการหยดตัวอย่างดีเอ็นเอที่ผสมกับ loading dye แล้วลงไปในช่วงของแผ่น agarose gel ที่เตรียมไว้ หลังจากใส่ตัวอย่างเสร็จให้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 24 นาที เมื่อครบเวลานำแผ่น agarose gel แช่ในสารละลาย ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที ล้างน้ำ 2 ครั้ง เพื่อดึง ethidium bromide ส่วนที่เกินออกจาก agarose gel เนื่องจากสาร ethidium bromide สามารถก่อให้เกิดมะเร็งได้ หลังจากนั้นนำแผ่น agarose gel ส่องภายใต้แสง UV จะเห็นแถบดีเอ็นเอเรืองแสง เปรียบเทียบขนาดกับ molecular marker แล้วเปรียบเทียบลำดับเบสจากฐานข้อมูลยีนบน BLAST (Altschul *et al.*, 1997) และใช้โปรแกรม ClustalW Multalign software (Higgins *et al.*, 1994)

3. ผลของปัจจัยทางกายภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตสารไวโอลาซิน

3.1 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกจากข้อที่ 2 โดยนำเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเหลว NB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียใน ฟลาสก์ 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้นโดยให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรให้ได้เท่ากับ 1.0 (จำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร) ก่อนนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นในอัตราส่วน 10%

3.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตสารไวโอลาซิน

เติมเชื้อเริ่มต้น 10% ลงไปในอาหารเหลว NB 100 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ทำการศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมโดยนำไปบ่มที่ 25, 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้ว วิเคราะห์สารสกัดไวโอลาซินหยาบและน้ำหนักเซลล์แห้งด้วยวิธีการวิเคราะห์ในข้อที่ 1 และ 2

3.3 การศึกษาผลของการให้อากาศที่เหมาะสมต่อการผลิตสารไวโอลาซิน

เติมเชื้อเริ่มต้น 10% ลงไปในอาหารเหลว NB 100 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงในอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดที่ได้จากข้อที่ 3.1 นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100, 150, 200 และ 250 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้ว วิเคราะห์สารสกัดไวโอลาซินหยาบและน้ำหนักเซลล์แห้งด้วยวิธีการวิเคราะห์ในข้อที่ 1 และ 2

4. การศึกษาระดับที่เหมาะสมขององค์ประกอบอาหารที่มีผลต่อการผลิตสารไวโอลาซินของเชื้อแบคทีเรียที่ได้ ด้วยวิธี Response Surface Methods (RSM) โดยวางแผนการทดลองแบบ Central Composition Design (CCD)

เพื่อทำการศึกษาระดับที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน (ซูโครส) แหล่งไนโตรเจน(เปปโตน) และสารชักนำที่มีผลต่อการผลิตสารไวโอลาซิน (ทริปโตเฟน)ของเชื้อที่คัดเลือกได้ โดยมีการวางแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) โดยกำหนดค่าสูงสุดและค่าต่ำสุดเป็น 5 ระดับดังแสดงใน Table 5 และ 6 นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วิเคราะห์สารสกัดไวโอลาซินหยาบและน้ำหนักเซลล์แห้งด้วยวิธีการวิเคราะห์ในข้อที่ 1 และ 2

Table 5. The coded levels and real values of the independent variables in the response surface methodology.

Variable	Parameter (g/L)	Level coding				
		$-\alpha$	-1	0	1	$+\alpha$
X_1	Sucrose	7.40	8.40	10.40	12.40	13.76
X_2	Peptone	8.04	9.40	11.40	13.40	14.76
X_3	Tryptophan	0.80	0.94	1.14	1.34	1.48

Table 6. The central composition design of the significant variables (in coded level).

Run	X_1	X_2	X_3
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	0	0	0
13	$-\alpha$	0	0
14	α	0	0

Run	X ₁	X ₂	X ₃
15	0	- α	0
16	0	α	0
17	0	0	- α
18	0	0	α

5. การศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการผลิตสารไวโอลาซีน

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้มาเลี้ยงในอาหารเหลวที่ทำการหาค่าประกอบอาหารที่เหมาะสมจากข้อที่ 4 ปริมาณ 50 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างครั้งละ 1 มิลลิลิตรที่เวลา 0 3 6 12 24 36 48 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ นำไปหมუნเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นำตะกอนไปวิเคราะห์วิเคราะห์สารสกัดไวโอลาซีนหยาบและการเจริญของเชื้อดังวิธีการวิเคราะห์ในข้อที่ 1 และ 2 โดยทำ 3 ซ้ำ

6. การสกัดและการทำให้สารไวโอลาซีนและอนุพันธ์ให้บริสุทธิ์

การสกัดสารไวโอลาซีนให้บริสุทธิ์โดยคัดแปลงจากวิธีการของ Durán และคณะ (1994) โดยเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้ในอาหารที่เหมาะสมแล้วนำไปเหวี่ยงแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,500 รอบ ต่อ นาที นาน 20 นาที เพื่อแยกส่วนของเหลวออกจากเซลล์ของจุลินทรีย์ แล้วล้างเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85% สองครั้ง ก่อนนำเซลล์ไปสกัดด้วยสารละลายเอทานอลเข้มข้น 95% ในปริมาตร 5 เท่าของปริมาตรเซลล์เริ่มต้น ก่อนนำไปเหวี่ยงแยกด้วยความเร็ว 7,500 รอบต่อนาที นาน 20 นาที แล้วจึงสกัดด้วยเอทานอลอีกครั้ง เก็บสารละลายส่วนใสที่มีสีม่วงไประเหยเอาเอทานอลออก แล้วจึงนำไปทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยการใช้ชุดสกัดแบบ Soxhlet โดยใช้คลอโรฟอร์มเพื่อสกัดเอาไขมันออกนาน 3 ชั่วโมง แล้วจึงนำเอาส่วนนี้ออกแล้วเปลี่ยนตัวทำละลายเป็นไดเอทิลอีเทอร์ นาน 3 ชั่วโมง (สกัดสารคือออกซีไวโอลาซีน) แล้วเปลี่ยนเป็นเอทานอลเพื่อสกัดไวโอลาซีนที่เหลือนาน 3 ชั่วโมง แล้วจึงนำขวดก้นกลมที่รองรับเอทานอลและสารสกัดไประเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศจนกระทั่งแห้งและชั่งน้ำหนักเพื่อวัดปริมาณสารสกัดที่ได้ นำสารสกัดไปทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีการ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ตามวิธีการวิเคราะห์ที่ 4 แล้วนำไปวิเคราะห์เอกลักษณ์การดูดกลืนแสง FT-IR และ LC-MS

7. การตรวจสอบสมบัติการต้านออกซิเดชันของสารไวโอลาซีนที่สกัดได้

นำสารสกัดไวโอลาซีนที่ได้จากข้อ 6 มาทดสอบสมบัติต่าง ๆ โดยเตรียมสารที่มีความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรดังนี้

ชั่งสารไวโอลาซีน 0.1 กรัม นำสารชั่งได้ใส่ลงไปในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เติม DMSO ลงไปละลายไวโอลาซีนและปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายไวโอลาซีนความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรไปใช้ในการตรวจสอบสมบัติการต้านออกซิเดชันและการทดสอบสมบัติการออกฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของสารไวโอลาซีน

7.1 สมบัติการจับอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\cdot-}$)

การทดสอบสมบัติการจับอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ใช้วิธีการของ Bayer และ Fridovich (1987) โดยนำสารไวโอลาซีนมาที่เตรียมเป็นสารละลายความเข้มข้นต่างๆ (เตรียมจาก stock ที่มีความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมาเจือจางในสารละลายเมธานอลความเข้มข้น 95% ปริมาตร 20 ไมโครลิตรให้ได้ความเข้มข้น 10 20 30 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) แล้วนำไปผสมกับสารละลายผสมของ 9.9 mM L-methionine, 1.72 mM NBT, 1% (w/v) Triton X-100 และ 117 μ M riboflavin ใน 50 mM K_2HPO_4 , pH 7.8 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร หลังจากกั้นส่องด้วยแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent lamp) ความเข้ม 40 วัตต์ นาน 7 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับชุดควบคุมและใส่เมธานอลแทนสารไวโอลาซีน ซึ่งชุด sample blank ที่มีสารสกัดกับ reagent ต่างๆ ยกเว้น riboflavin โดยใส่ชุดควบคุมที่ไม่เติม riboflavin ลงไปเป็น blank นำค่าที่วัดได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การดักจับอนุมูล $O_2^{\cdot-}$ จากสูตร

$$\% \text{ scavenging} = [A_{\text{control}} (A_{\text{sample}} - A_{\text{sample blank}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดสอบ

$A_{\text{sample blank}}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของสารไวโอลาซีน

A_{control} = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

จากนั้นคำนวณหาค่า IC_{50} (ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถดักจับอนุมูล $O_2^{\cdot-}$ ได้ 50%) จากกราฟระหว่าง % การดักจับอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ กับความเข้มข้นของสารไวโอลาซีน

7.2 สมบัติในการจับเหล็ก Fe²⁺

การทดสอบสมบัติการจับเหล็ก Fe²⁺ ใช้วิธีการของ Shimada และ คณะ (1992) โดยนำสารละลายไวโอลาซีนที่เตรียมเป็นสารละลายความเข้มข้นความเข้มข้นต่างๆ (เตรียมจาก stock ที่มีความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมาเจือจางในในสารละลาย 10 mM hexamine, pH 5 โดยเตรียมจาก hexamine 1.4 กรัม ผสมกับ KCl 0.74 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตรให้ได้ความเข้มข้น 0.25 0.50 1 2 4 และ 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จากนั้นเติมสารละลาย 3 mM FeSO₄ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเติม 1 mM TMM ที่ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 200 ไมโครลิตร วางทิ้งไว้ 3 นาทีที่อุณหภูมิห้อง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 485 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้เฉพาะบัฟเฟอร์แทนสารสกัด นำค่าที่วัดได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การจับ Fe²⁺ จากสูตร

$$\% \text{ chelation} = [(A_{\text{sample}} - A_{\text{control}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดสอบ

A_{control} = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

จากนั้นคำนวณหาค่า IC₅₀ (ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถดักจับอนุมูล Fe²⁺ ได้ 50%) จากกราฟระหว่าง % การจับเหล็กกับความเข้มข้นของสารไวโอลาซีน

8. การทดสอบสมบัติการออกฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของสารไวโอลาซีน

8.1 ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

การทดสอบความสามารถของสารไวโอลาซีนในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียประกอบด้วยแบคทีเรียแกรมลบได้แก่ *E. coli*, *Pro. mobilis*, *Pseu. aeruginosa* และ *Salmonella Typhimurium*, แบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *B. cereus*, *B. subtilis*, *L. monocytogenes* และ *S. aureus*

8.1.1 การเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่ทดสอบมาเลี้ยงในอาหารเหลว NB ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง บั่นเหวียงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที เพื่อกำจัดส่วนของอาหารเหลวออก แล้วนำตะกอนเซลล์มาละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85% จนกระทั่งได้ความเข้มข้นสุดท้ายของเซลล์ที่ 10⁷ โคโลนีต่อมิลลิลิตร ตามวิธีการของ Richards และ คณะ (1993)

8.1.2 การทดสอบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรีย

เตรียมอาหาร Mueller Hinton Broth ที่มีความเข้มข้น 2 เท่า (Double strength) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรจำนวน 8 หลุมใส่ในหลุมของ 96 well microplate หลังจากนั้นใส่สารละลาย ไวโอลาซีน 0.5 มิลลิลิตร (เตรียมจาก stock ที่ได้จากวิธีการวิจัยข้อที่ 7 ให้ได้ความเข้มข้น 520 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรโดยนำมาเจือจางในสารละลาย DMSO เข้มข้น 0.2% ปริมาตร 5 มิลลิลิตร) ในหลุมที่ 1 ที่มีอาหารอยู่ ทำการเจือจางแบบ 2-fold serial dilution จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 260 130 65 32.5 16.25 8.13 4.07 2.03 1.01 และ 0.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วเติมเชื้อแบคทีเรีย ที่เตรียมไว้ตามข้อที่ 8.1.1 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมง สังเกตความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ เปรียบเทียบกับชุดทดลองควบคุมโดยชุดควบคุม positive จะทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเพียงอย่างเดียว เพื่อให้เชื้อเจริญ ส่วนชุดควบคุม negative จะไม่เติมเชื้อในอาหารแต่จะมีการเติมสารไวโอลาซีนลงไปในการอาหาร (Nakamura *et al.*, 2003) โดยให้หลุมที่มีความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อไม่ขุ่นเป็นค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ขุ่นทุกหลุมไปเพาะบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar สังเกตการณ์เจริญของเชื้อ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่พบการเจริญของเชื้อเป็นค่า Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

8.2 ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

การทดสอบความสามารถของสารไวโอลาซีนในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรานี้ จะทดสอบหาค่า MIC โดยดัดแปลงจากวิธี Broth dilution ของ NCCLS-M38-A (Chenielle *et al.*, 2009) โดยนำเชื้อราเชื้อราแต่ละชนิด (*A. niger*, *Fusarium sp.*, *Mucor sp.*, *Penicillium sp.*, *Rhizopus sp.* และ *T. reesei*) มาเพาะบนอาหารแข็ง PDA ที่เติมยาปฏิชีวนะ streptomycin เข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเพื่อป้องกันการเจริญของแบคทีเรีย บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-3 สัปดาห์ หลังจากนั้นเตรียมสารแขวนลอยสปอร์โดยใช้ Tween 80 ความเข้มข้น 0.1% มาเจือจางให้ ได้ความเข้มข้นของสปอร์ เท่ากับ 10^6 - 10^8 cfu/มิลลิลิตร นำสารสกัดไวโอลาซีนที่ละลายใน DMSO 0.2% มาเจือจางในอาหารเหลว PDB แบบ 2-fold dilution ใน 96-well microtiter plate (100 ไมโครลิตร) เติมน้ำแขวนลอยสปอร์ ลงไปหลุมละ 100 ไมโครลิตร ความเข้มข้นละ 2 หลุม จะได้ ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 260 130 65 32.5 16.25 8.13 4.07 2.03 1.01 และ 0.50 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตรนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72 ชั่วโมง อ่านค่า MIC ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้

8.3 ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติ

การทดสอบความสามารถของสารไวโอลาซินต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม (MDA-MB-468) โดยเลี้ยงในอาหารอาหาร DMEM ที่มี fetal bovine serum 10%, penicillin 50 หน่วย/มิลลิลิตร และ streptomycin 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับเซลล์เต้านมปกติ (MCF-12A) ซึ่งเลี้ยงในอาหาร DMEM และ Ham's F12 ในอัตราส่วน 1:1 (PAA Laboratories GmbH) ที่มี horse serum 5%, Human epidermal growth factor 20 นาโนกรัม/มิลลิลิตร, cholera toxin 100 นาโนกรัม/มิลลิลิตร, bovine insulin 0.01 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ hydrocortisone 95% ปริมาตร 500 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ภายหลังจากการเลี้ยงจึงนำเชื้อจากเซลล์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายที่ 2×10^5 เซลล์/มิลลิลิตร แล้วถ่ายลงในไมโครเพลทก่อนนำไปเลี้ยงไว้ในสภาวะที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยควบคุมปริมาณของแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เท่ากับ 5% และปริมาณของอากาศเท่ากับ 95% บ่มไว้นาน 24 ชั่วโมงก่อนที่จะเติมสารละลาย N-Acetyl cysteine เข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์แล้วบ่มไว้ในสภาวะเดิมนาน 1 ชั่วโมง แล้วจึงเติมสารละลายไวโอลาซินที่มีความเข้มข้นต่างๆกัน (0.25 0.5 1 2 และ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่ละลายใน DMSO เข้มข้น 0.1% หลังจากนั้นจึงนำตัวอย่างไปบ่มไว้ในสภาวะเดิมแล้วเก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของเซลล์ที่อยู่รอดโดยใช้วิธีการ MTT Assay (Carvalho *et al.*, 2006) ตามวิธีการวิเคราะห์ข้อที่ 7 นำค่าที่วัดได้มาพล็อตกราฟเปอร์เซ็นต์การรอดของเซลล์ (% survival) กับความเข้มข้นที่ทำการทดสอบ แล้วนำมาคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารที่ทำให้เซลล์ลดลง 50% (IC_{50})

บทที่ 3

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลการคัดเลือกและแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารไวโอลาซิน

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำจากธรรมชาติ (อ่างเก็บน้ำมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ่างเก็บน้ำมหาวิทยาลัยหาดใหญ่ และอ่างเก็บน้ำศรีภูวนาท) ตัวอย่างดินและน้ำเสียบริเวณพื้นที่รอบหาดใหญ่ (ท่อรวมปล่อยน้ำเสียโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ปล่อยน้ำเสียจากตลาดคลองเรียน และ ปล่อยน้ำเสียจากตลาดทุ่งเสา) โรงงานผลิตอาหารแปรรูปทะเล (เอส เอส โพรสเซนฟู๊ดส์ จำกัดและบริษัท แมนเอ โพรสเซนฟู๊ดส์ จำกัด) และตัวอย่างดินจากป่าชายเลนของตำบลเกาะยอ เพื่อคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารไวโอลาซิน โดยนำตัวอย่างมาทำการเจือจางในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% ก่อนนำตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรมาเกลี่ยบนอาหาร NA ที่เติมทริปโตเฟน 0.74 กรัมต่อลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมง ผลการทดลองดังแสดงใน Table 7 โดยตัวอย่างดินมีแบคทีเรียทั้งหมด $6.8 \times 10^7 - 8.9 \times 10^8$ โคโลนีต่อกรัม และตัวอย่างน้ำธรรมชาติและน้ำเสียมีแบคทีเรียทั้งหมด $5.7 \times 10^7 - 8.7 \times 10^9$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร และแบคทีเรียที่พบในตัวอย่างเกือบทั้งหมดไม่มีแบคทีเรียที่มีโคโลนีลักษณะสีม่วง มีเพียงตัวอย่างเดียวที่มีแบคทีเรียที่สามารถให้โคโลนีสีม่วง-น้ำเงิน 3.4×10^5 โคโลนีต่อมิลลิลิตร จากตัวอย่างน้ำที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์เท่านั้น ซึ่งจะตั้งชื่อว่าไอโซเลท VB.1

จากผลการทดลองการคัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิตที่ผลิตสารไวโอลาซินจากบริเวณหรือแหล่งที่พบเชื้อที่สามารถผลิตสารไวโอลาซินนั้นจะอยู่ตามแหล่งน้ำแถบร้อนชื้น (Balows *et al.* 1992) เมื่อทำการวัดอุณหภูมิของน้ำเสียโรงพยาบาลสงขลานครินทร์พบว่า มีอุณหภูมิอยู่ที่ประมาณ 25-30 องศาเซลเซียส ลักษณะโคโลนีของเชื้อที่พบมีลักษณะโคโลนีมีสีม่วงเข้มออกน้ำเงิน นูนเล็กน้อย มันวาวแต่ไม่มีเมือก เมื่อนำมาย้อมสีแกรมแล้วส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าเชื้อแบคทีเรียมีการติดสีแกรมลบ (สีแดง) มีรูปร่างเป็นแท่งสั้น ทำการแยกให้ได้เป็นเชื้อบริสุทธิ์แล้ว เก็บแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ไว้ในกลีเซอรอล 30% ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

Table 7. Total viable count and purple colony count from samples.

Sample types	No.	Area	Total cout (CFU/g or mL)	Purple colony (CFU/g or mL)
Soil	1	Mangrove forest	2.4×10^8	ND
	2	Mangrove forest (under Mangrove root)	5.5×10^8	ND
	3	Sediment tank (SS Frozen Food)	6.8×10^7	ND
	4	Treatment tank (SS Frozen Food)	7.7×10^8	ND
	5	Cesspool (SS Frozen Food)	8.9×10^8	ND
	6	Sediment tank (Man A Frozen Food)	8.2×10^7	ND
	7	Treatment pond (Man A Frozen Food)	8.8×10^7	ND
	8	Cesspool (Man A Frozen Food)	4.4×10^8	ND
	9	Sri-Trang pond	5.7×10^8	ND
	10	Hat-Yai University pond	8.2×10^8	ND
Water	11	Sri-Trang pond	6.4×10^7	ND
	12	Hat-Yai University pond	4.2×10^8	ND
	13	Sri-Po pond	5.4×10^8	ND
Waste water	14	Sediment tank (SS Frozen Food)	9.5×10^8	ND
	15	Treatment tank (SS Frozen Food)	9.8×10^8	ND
	16	Cesspool (SS Frozen Food)	8.7×10^9	ND
	17	Sediment tank (Man A Frozen Food)	9.4×10^8	ND
	18	Treatment pond (Man A Frozen Food)	6.5×10^8	ND
	19	Cesspool (Man A Frozen Food)	5.7×10^7	ND
	20	Prince of Songkla hospital	4.1×10^8	3.4×10^5
	21	Klong-Lrand market	2.2×10^8	ND
	22	Thong-Sao market	4.6×10^8	ND

Note: ND, Not detect

2. การเทียบเคียงแบคทีเรียที่จำแนกได้

2.1 การจำแนกเชื้อแบคทีเรียโดยการทดสอบทางชีวเคมี

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท VB.1 ซึ่งผลิตสารสีม่วงไปตรวจสอบทางชีวเคมีโดยเลี้ยงในอาหารทดสอบต่างๆ พบว่า เชื้อที่คัดเลือกได้สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถหมักน้ำตาลทรีฮาโลสและกลูโคสได้ แต่ไม่สามารถหมักน้ำตาลอะราบิโนสและน้ำตาลไซโลส สามารถย่อยเคซีนและอะจินีได้ (Table 8) จากผลการทดสอบทางชีวเคมีดังกล่าวสามารถจัดจำแนกแบคทีเรียไอโซเลท VB.1 ได้อย่างคร่าวๆว่าคล้ายคลึงกับ *C. violaceum* ซึ่งได้นำไปทดสอบด้วยวิธี 16S rDNA ต่อไป

Table 8. Biochemical properties of selected bacteria comparison with reference strains.

Test	Isolate VB.1	<i>C. lividum</i> ^a	<i>C. fluviatile</i> ^a	<i>C. violaceum</i>
Shape	Rod	Rod	Rod	Rod
Growth at 4°C	-	+	+	-
Growth at 37°C	+	-	-	+
Egg yolk reaction	+	-	-	+
Acid from trehalose	+	-	+ ^b	+
Acid from arabinose	-	+	+	-
Acid from xylose	-	+	-	-
Casein hydrolysis	+	- or (+)	-	+
Asculin hydrolysis	-	+	-	-
Glucose fermented (O/F test)	F	0	F	F
Arginine decarboxylase	+	-	-	+

a= Sources: Moss และคณะ (1978)

b= weak reaction

C. violaceum เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่งสั้น หรือ coccobacilli เป็น facultative anaerobe ไม่สร้าง endospore เคลื่อนที่ด้วย single polar flagellum เป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในน้ำ เจริญได้ที่อุณหภูมิ 15-40 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ที่ 30-35 องศาเซลเซียส จะผลิตสารสีม่วงเข้มบน NA ลักษณะโคโลนี กลมมนูนเล็กน้อย สีม่วงดำ ผิวโคโลนีเรียบ (Durán *et al*, 2001)

2.2. การเทียบเคียงเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ด้วย 16S rDNA

เมื่อนำแบคทีเรียไอโซเลท VB.1 ไปสกัดดีเอ็นเอด้วย Blood and Cell Culture DNA Mini Kit (QIAGEN, Inc.) เมื่อนำดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย ที่สกัดได้ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR และนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วย gel electrophoresis เพื่อวิเคราะห์หาขนาด โดยเปรียบเทียบกับ molecular marker จะเห็นแถบของดีเอ็นเอมีขนาดประมาณ 1,500 bp หลังจากนำดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนแล้วไปทำบริสุทธิ์ด้วย PCR purification kit (QIAGEN, Inc.) ส่งไปหาลำดับเบสด้วยเครื่อง DNA Sequencer และนำลำดับเบสที่ได้ไปเทียบเคียงกับข้อมูลที่มีอยู่ใน GenBank โดยวิธี BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) พบว่า เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท VB.1 มีลำดับเบสใกล้เคียงกับเชื้อ *C. violaceum* strain CV09 (Figure 3) โดยมีความคล้ายคลึงเท่ากับ 99.7% (ภาคผนวก ง) จึงให้ชื่อแบคทีเรียที่ได้ว่า *C. violaceum* VB.1

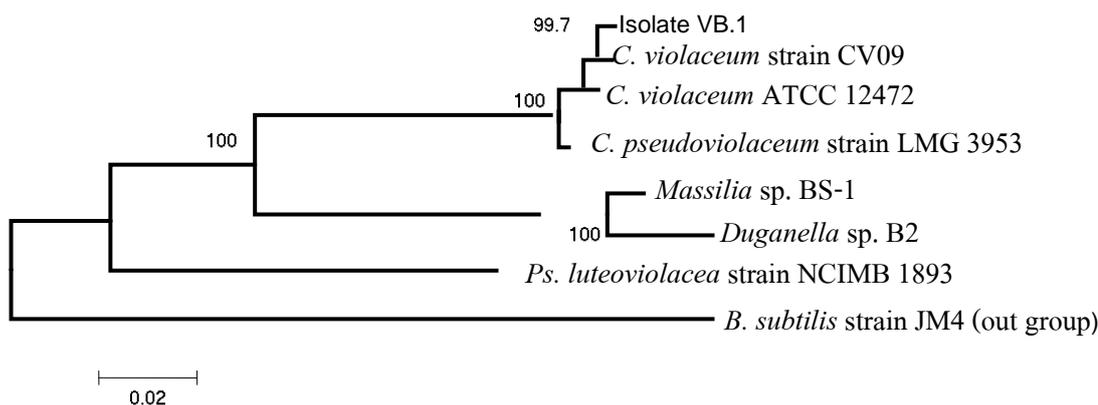


Figure 3. Phylogenetic tree of the isolate VB.1.

3. ผลของอุณหภูมิและการให้อากาศต่อการผลิตสารไวโอลาซีน

3.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตสารไวโอลาซีนของ *C. violaceum* VB.1

เมื่อทำการเลี้ยง *C. violaceum* VB.1 ในอาหาร NB โดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ซึ่งได้จากการปรับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ให้เท่ากับ 1.0 ปริมาณ 10 มิลลิลิตรต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อ นาทีและบ่มที่อุณหภูมิที่แตกต่างกันโดยนำไปบ่มที่ 25 30 37 และ 45 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่เวลา 24 ชั่วโมง พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อและการผลิตสารไวโอลาซีนคือ 30 องศาเซลเซียสซึ่งให้ปริมาณเซลล์และสารไวโอลาซีนเท่ากับ 7.28 กรัมต่อลิตรและ 0.21 กรัมต่อ ลิตรของสารไวโอลาซีนตาม รองลงมาคืออุณหภูมิ 37 และ 25 องศาเซลเซียส (Table 9) จากการ

ทดลองแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *C. violaceum* VB.1 เป็นเชื้อที่อยู่ในกลุ่มที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง (mesophilic bacteria) โดยจะเจริญในช่วงอุณหภูมิ 25-40 องศาเซลเซียสและเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อไอโซเลท VB.1 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อเจริญได้น้อยมากและไม่มีการสร้างสารไวโอลาซิน จากการศึกษาของ Durán และคณะ(1989) พบว่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 จะให้ผลผลิตของสารไวโอลาซินที่สูง ในขณะที่การผลิตสารไวโอลาซินโดยเชื้อ *J. lividum* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 4-20 องศาเซลเซียส และผลิตไวโอลาซินมีสูงสุดที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส (Lu *et al.*, 2009) ซึ่งจะเห็นได้ว่าการเจริญและการผลิตสารไวโอลาซินของเชื้อแต่ละชนิดจะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมแตกต่างกัน

Table 9. Effect of temperatures on growth and violacein production by *C.violaceum* VB.1.

Temperatures (C°)	Cell dry weight (g/L)	Violacein concentration (g/L)
25	5.94 ± 0.02 ^b	0.17 ± 0.02 ^b
30	7.28 ± 0.13 ^c	0.21 ± 0.01 ^c
37	5.14 ± 0.02 ^b	0.15 ± 0.01 ^b
45	0.22 ± 0.02 ^a	0 ^a

Mean ± standard deviations from triplicate samples

Difference superscripts in the same column indicate significant difference (P< 0.05)

3.2 ผลของการให้อากาศต่อการผลิตสารไวโอลาซินของ *C. violaceum* VB.1

เมื่อทำการเลี้ยง *C. violaceum* VB.1 ในอาหาร NB บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบที่แตกต่างกัน เก็บตัวอย่างที่เวลา 24 ชั่วโมง พบว่าอัตราเขย่าหรือการให้อากาศที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตสารไวโอลาซินเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ซึ่งให้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 7.28 กรัมต่อลิตรและผลิตสารไวโอลาซิน 0.21 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ ที่อัตราการเขย่า 250, 150 รอบต่อนาที ตามลำดับโดยให้ผลผลิตของสารไวโอลาซินเท่ากับ 0.19 และ 0.15 กรัมต่อลิตร เมื่อพิจารณาการให้อากาศที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที พบว่า การเจริญและการผลิตสารไวโอลาซินผลิตได้น้อยที่สุด โดยให้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 5.01 กรัมต่อลิตรและความเข้มข้นของไวโอลาซินเท่ากับ 0.12 กรัมต่อลิตร (Table 10) จากผลการทดลองพบว่า การให้อากาศจะมีผลต่อการเจริญและการผลิตสารไวโอลาซิน ซึ่งอากาศจะเป็นปัจจัยหนึ่งในการสังเคราะห์สารไวโอลาซิน โดยเอนไซม์ VioA และ VioC จะใช้ออกซิเจนในการออกซิโดซสารตั้งต้นให้กลายเป็นสารไวโอลาซิน (Durán and Menck., 2001) จากการศึกษาของ Bhaskaran และคณะ (2011) ได้ทำการศึกษากการให้

อากาศของเชื้อ *C. violaceum* สายพันธุ์ MTCC 5522 พบว่า การกวนที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อ นาทีจะทำให้อัตราการเจริญและการผลิตสารไวโอลาซีนที่สูง โดยให้ปริมาณสารไวโอลาซีน 0.6 กรัม ต่อลิตร

Table 10. Effect of agitation on growth and violacein production by *C.violaceum* VB.1.

Agitation (rpm)	Cell dry weight (g/L)	Violacein concentration (g/L)
100	5.01 ± 0.02 ^b	0.12 ± 0.02 ^a
150	5.68 ± 0.01 ^b	0.15 ± 0.01 ^b
200	7.28 ± 0.13 ^c	0.21 ± 0.01 ^d
250	6.14 ± 0.02 ^a	0.19 ± 0.04 ^c

Mean ± standard deviations from triplicate samples

Difference superscripts in the same column indicate significant difference (P < 0.05)

4. ระดับที่เหมาะสมขององค์ประกอบอาหารต่อการผลิตสารไวโอลาซีน ด้วยวิธี Response Surface Methods (RSM)

จากการศึกษาระดับที่เหมาะสมขององค์ประกอบอาหารที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตสารไวโอลาซีนของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *C. violaceum* VB.1 โดยออกแบบการทดลองแบบ CCD และประเมินผลด้วยวิธีการทดลองแบบพื้นผิว (RSM) โดยใช้ Design Expert software (trial version 7.1.5, Stat-Ease Inc., USA) ซึ่งปัจจัยที่ศึกษาประกอบด้วย ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส (7.40 8.40 10.40 12.40 และ 13.76 กรัมต่อลิตร) ความเข้มข้นของเปปโตน (8.40 9.40 11.40 13.40 และ 14.76 กรัมต่อลิตร) และความเข้มข้นของทริปโตเฟน (0.80 0.94 1.14 1.34 และ 1.48 กรัมต่อลิตร) สามารถออกแบบการทดลองได้ 18 ชุดการทดลองโดยศึกษาค่าการตอบสนองของการเจริญของเชื้อเป็นน้ำหนักเซลล์แห้งและการผลิตสารไวโอลาซีน ทำการทดลองในอาหารเหลว 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรและนำไปเลี้ยงโดยเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า การเจริญของเซลล์แบคทีเรียอยู่ระหว่าง 4.48-9.12 กรัมต่อลิตร และผลิตสารไวโอลาซีนอยู่ระหว่าง 0.31-0.46 กรัมต่อลิตร ดังแสดงใน Table 11 โดยชุดการทดลองที่ 16 ให้ปริมาณเซลล์แบคทีเรียและการผลิตสารไวโอลาซีนสูงสุด ซึ่งให้การทดลองจะประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 10.40 กรัมต่อลิตร เปปโตน 14.76 กรัมต่อลิตรและทริปโตเฟน 1.14 กรัมต่อลิตร ส่วนชุดการทดลองที่ให้ปริมาณแบคทีเรียการผลิตสารไวโอลาซีนได้น้อยที่สุดคือ ชุดการทดลองที่ 14 ซึ่งมีองค์ประกอบเป็นน้ำตาลซูโครส 10.40 กรัมต่อลิตร เปปโตน 8.40 กรัมต่อลิตร

และทริปโตเฟน 1.14 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบการทดลองทั้งสองชุดการทดลองนั้นพบว่า เมื่อให้ปริมาณของเปปโตินที่เพิ่มขึ้นการเจริญและผลิตสารไวโอลาซินของเชื้อ *C. violaceum* VB.1 ก็จะมีเพิ่มสูงขึ้นด้วย

เมื่อวิเคราะห์ผลการทดลองที่ได้โดยใช้ ANOVA ซึ่งคำนวณจากโปรแกรม Design Expert v.7.1.5 โดยวิเคราะห์ความแปรปรวนของน้ำหนักเซลล์แห้งและการผลิตสารไวโอลาซินที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 พบว่า P-value ของสมการเส้นตรง (linear model) เท่ากับ 0.0003 และ 0.0001 ตามลำดับ P-value ของสมการพหุนามกำลังสอง (quadratic model) เท่ากับ 0.0020 และ 0.0007 ตามลำดับ และของสมการพหุนามกำลังสาม (cubic model) เท่ากับ 0.01 และ 0.017 ดังแสดงใน Table 12 ซึ่งสมการเชิงเส้น (linear model) มีค่าน้อยกว่าค่านัยสำคัญทางสถิติที่กำหนด แต่ค่า R^2 มีค่าเท่ากับ 0.88 และ 0.87 ตามลำดับ ดังนั้นจึงพิจารณาเลือกสมการเส้นตรงในการทำนายปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งและการผลิตสารไวโอลาซินได้ ซึ่งสมการเส้นตรงที่ทำนายน้ำหนักเซลล์แห้งคือ

$$Y_{CDW} = -3.91678 + 0.18324X_1 - 0.57603X_2 - 1.9592X_3, \dots\dots\dots (1)$$

สูตรอาหารที่ทำการศึกษาให้ปริมาณเซลล์แห้งที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ซึ่งสมการทำนายความเชื่อมั่น (R^2) เท่ากับ 0.88 โดยปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *C. violaceum* VB.1 อย่างมีนัยสำคัญได้แก่ ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้นของเปปโติน และ ความเข้มข้นของทริปโตเฟน ซึ่งทั้ง 3 ปัจจัยมีผลต่อการเจริญของเชื้อ *C. violaceum* VB.1 ดังแสดงใน Table 13 ส่วนสมการเส้นตรงที่ทำนายการผลิตสารไวโอลาซินคือ

$$Y_{CV} = 0.20347 - 4.29351X_1 + 0.018389X_2 + 0.015976X_3, \dots\dots\dots(2)$$

สูตรอาหารที่ทำการศึกษา 18 สูตรอาหารให้ปริมาณการผลิตสารไวโอลาซินมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ซึ่งสมการทำนายมีความเชื่อมั่น (R^2) เท่ากับ 0.87 โดยปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารไวโอลาซินคือ ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสและความเข้มข้นของเปปโตินซึ่งผลการทดลองคล้ายกันกับการเจริญของเชื้อ แต่ความเข้มข้นของทริปโตเฟนไม่มีผลต่อการผลิตสารไวโอลาซิน ดังแสดงใน Table 14

จากการพลอตกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยหรือกราฟพื้นผิวของคำตอบสนอง (Respond surface plot) ผลแสดงใน Figure 4 พบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณเปปโตินในอาหารการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเพิ่มสูงขึ้นทำให้ได้น้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้น ในขณะที่การเพิ่มปริมาณ

น้ำตาลซูโครสทำให้ปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นเล็กน้อย การเพิ่มความเข้มข้นของเปปโตนนอกจากทำให้ปริมาณเซลล์แห้งเพิ่มแล้วยังทำให้มีการผลิตสารไวโอลาซินเพิ่มขึ้นด้วย

จากการศึกษาของ Mendes และคณะ (2001) โดยทำการศึกษาการผลิตสารไวโอลาซินโดยใช้เชื้อ *C. violaceum* สายพันธุ์ CCT 3496 ทำการทดลองเลี้ยงในอาหารที่ออกแบบการทดลองแบบ 3 ปัจจัย 5 ระดับของสารอาหาร (น้ำตาลกลูโคส, สารสกัดยีสต์ และทริปโตเฟน) ที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์และการผลิตสารไวโอลาซิน โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที พบว่าให้ปริมาณเซลล์แห้งเท่ากับ 21 กรัมต่อลิตรและการผลิตสารสกัดหยาบไวโอลาซินเท่ากับ 0.43 กรัมต่อลิตร ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบการทดลองครั้งนี้แล้วพบว่า ผลการผลิตสารไวโอลาซินจากเชื้อ *C. violaceum* VB.1 มีความใกล้เคียงกัน แต่ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้นั้นแตกต่างกัน อาจจะเป็นเนื่องมาจากแหล่งของคาร์บอนที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้คือ น้ำตาลซูโครส ซึ่งเป็นน้ำตาลที่ใช้ได้ยากกว่าน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคส จึงทำให้การผลิตเซลล์แห้งมีปริมาณน้อยกว่า อย่างไรก็ตาม Drew และ Demain (1977) และ Vicik และคณะ (1990) ได้อธิบายไว้ว่า การใช้แหล่งของคาร์บอนที่เชื้อสามารถนำไปใช้ได้ยาก เช่น ซูโครสและแลคโตส จะสามารถลดปริมาณน้ำหนักเซลล์ลดลงและสามารถเพิ่มการผลิตของสาร secondary metabolic ของเชื้อที่การทดสอบ

Table 11. The Central Composition Design of the significant variables (in code level), along with the responses (CDW and violacein yield) by culture of *C.violaceum* VB.1.

Run	X_1	X_2	X_3	CDW(g/L)		Violacein yield (g/L)	
				Actual	Predicted	Actual	Predicted
1	-1	-1	-1	5.18	5.24	0.37	0.36
2	1	-1	-1	5.94	5.97	0.37	0.36
3	-1	1	-1	7.18	7.54	0.41	0.42
4	1	1	-1	8.24	8.28	0.43	0.43
5	-1	-1	1	6.92	6.02	0.38	0.38
6	1	-1	1	6.58	6.75	0.34	0.33
7	-1	1	1	8.19	8.33	0.42	0.44
8	1	1	1	8.94	9.06	0.42	0.43
9	0	0	0	7.27	7.15	0.39	0.39
10	0	0	0	6.94	7.15	0.40	0.39
11	0	0	0	7.46	7.15	0.38	0.39
12	0	0	0	6.94	7.15	0.40	0.39
13	$-\alpha$	0	0	5.02	5.81	0.39	0.38
14	α	0	0	6.67	7.05	0.35	0.36
15	0	$-\alpha$	0	4.48	4.49	0.31	0.32
16	0	α	0	9.12	8.37	0.46	0.45
17	0	0	$-\alpha$	6.27	5.77	0.37	0.37
18	0	0	α	7.02	7.09	0.39	0.39

X_1 = sucrose, X_2 = peptone, X_3 = tryptophan

Table 12. Analysis of variance (ANOVA) for response surface linear, quadratic and cubic models of CDW and violacein yield by culture of *C. violaceum* VB.1.

Response	Model	Linear	Quadratic	Cubic
	Value			
CDW	SS ^a	48.74	60.97	63.52
	Df ^b	3	9	13
	MS ^c	16.26	4.01	4.88
	F-value	12.94	11.42	9.16
	P-value	0.0003	0.0020	0.01
	R ²	0.88	0.95	0.99
	Violacein yield	SS ^a	0.020	0.021
Df ^b		3	9	13
MS ^c		6.54	2.370	1.701
F-value		30.75	15.70	18.55
P-value		0.0001	0.0007	0.017
R ²		0.87	0.95	0.98

^aSS, Sum of square

^bDf, Degree of freedom

^cMS, Mean square

CDW, Dry Cell Weight

Table 13. Analysis of variance (ANOVA) of response surface linear model for cell dry weight by culture of *C. violaceum* VB.1.

Factor	Coefficient Estimate	Standard Error	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F
Model	0.38	0.12	22.06	3	7.35	34.17	<0.0001
X ₁ -Sucrose	0.37	0.13	1.83	1	1.83	8.52	0.0119
X ₂ -Peptone	1.15	0.13	18.83	1	18.13	84.24	<0.0001
X ₃ Tryptophan	0.39	0.13	2.10	1	2.10	9.75	0.0081
Residual			2.80	13	0.22		
R₂=	0.88						

Df, degree of freedom.

Table 14. Analysis of variance (ANOVA) for response surface linear model for violacein production by cell culture of *C. violaceum* VB.1.

Factor	Coefficient Estimate	Standard Error	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F
Model	0.39	3.646	0.020	3	65.40	30.75	0.0020
X ₁ -Sucrose	8.587	3.946	1.007	1	1.007	4.74	0.0486
X ₂ -Peptone	0.037	3.946	0.018	1	0.018	86.86	<0.0001
X ₃ Tryptophan	3.195	3.946	1.394	1	1.394	0.66	0.4327
Residual			2.765	13	2.127		
R₂=	0.87						

Df, degree of freedom.

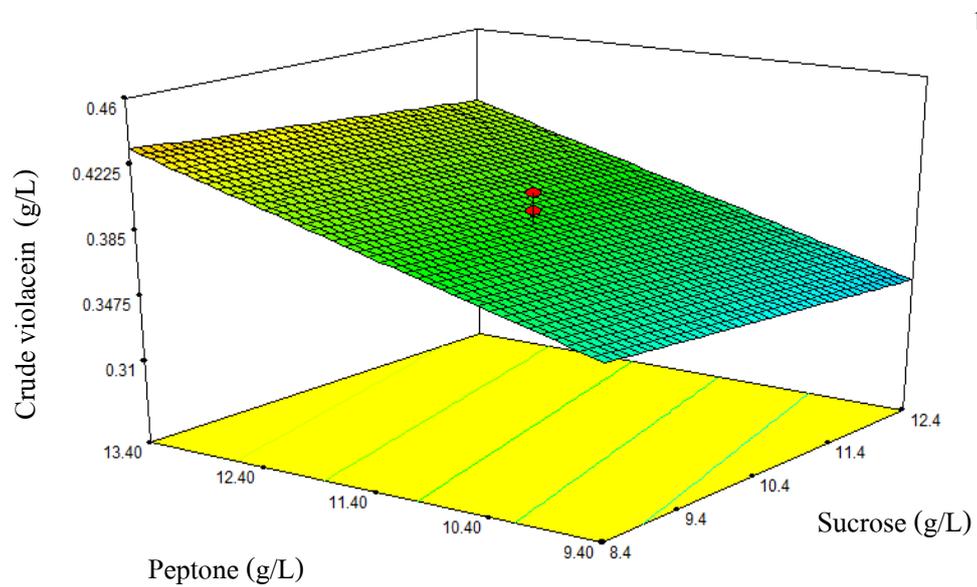
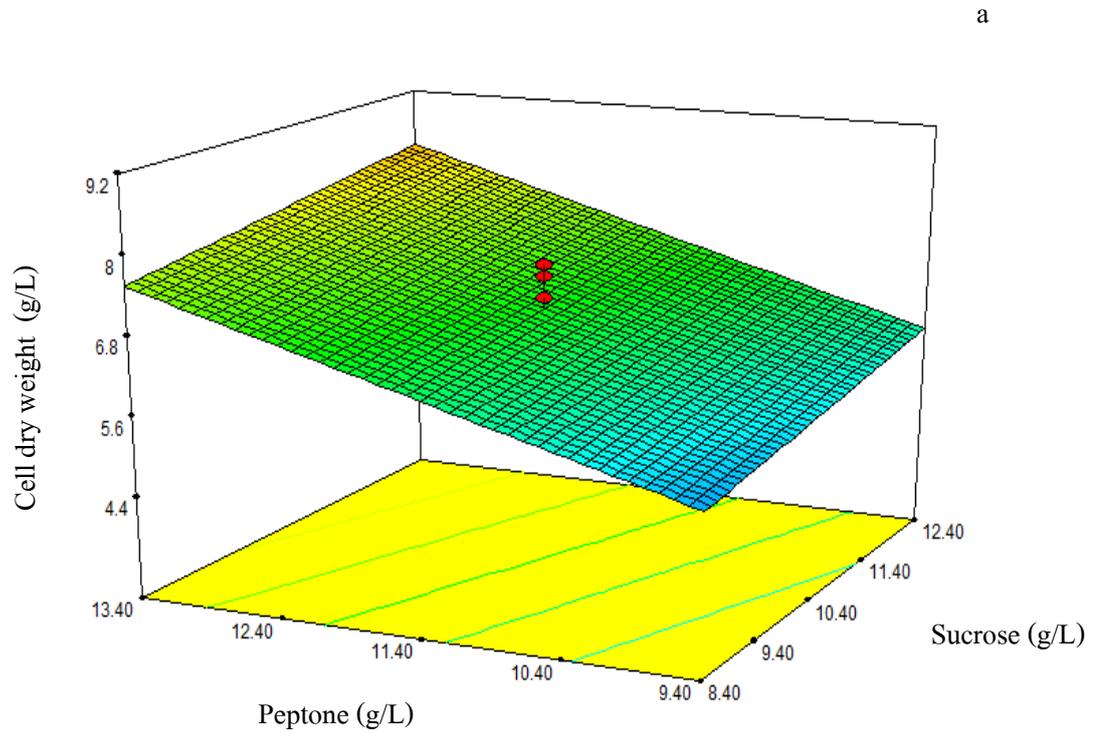


Figure 4. Effects of sucrose and peptone on growth and violacein production by *C. violaceum* VB.1. [(a) CDW and (b) crude violacein].

5. การศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการผลิตสารไวโอลาซิน

เมื่อทำการศึกษาค้นคว้าหาช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการเลี้ยง *C. violaceum* VB.1 โดยเปรียบเทียบกับเชื้อ *C. violaceum* ATCC 12472 ในอาหารที่หาสภาวะที่เหมาะสมแล้ว (น้ำตาลซูโครส 10.40 กรัมต่อลิตร เปปโตน 14.76 กรัมต่อลิตรและ ทริปโตเฟน 1.14 กรัมต่อลิตร) เดิมหัวเชื้อลงไป 10 เปอร์เซ็นต์ของอาหารทั้งหมด บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าเชื้อ *C. violaceum* VB.1 ที่เลี้ยงในอาหารที่เหมาะสมแล้วมีค่าอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อ (Specific growth rate) เท่ากับ 0.40 ชั่วโมงและเชื้อ *C. violaceum* ATCC 12472 มีอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.42 ชั่วโมง จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *C. violaceum* มาตรฐานมีอัตราการเจริญจำเพาะที่เร็วกว่าเชื้อ *C. violaceum* VB.1 แต่อย่างไรก็ตามความแตกต่างของค่าอัตราการเจริญจำเพาะก็ไม่มี ความแตกต่างมากนักเมื่อเปรียบเทียบกับกราฟความเข้มข้นของเซลล์ดัง Figure 5a และเมื่อพิจารณาปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลที่เซลล์ใช้ในการเจริญ พบว่า ค่าอัตราของน้ำตาลที่ลดลงของเชื้อ *C. violaceum* มาตรฐานมีอัตราการใช้น้ำตาลที่เร็วกว่าเชื้อ *C. violaceum* VB.1 2.5 เท่าโดยให้ค่าอัตราการใช้น้ำตาล เท่ากับ 0.24 และ 0.59 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ จาก Figure 5a และ 5b เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดมีการผลิตสารไวโอลาซินตั้งแต่เริ่มมีการเจริญและจะมีการผลิตสารไวโอลาซินสูงสุดเมื่อเชื้อเจริญอยู่ในระยะ stationary phase โดยอาหารจะเริ่มเปลี่ยนเป็นสีม่วงที่ชั่วโมงที่ 10 และจะให้สีม่วงเข้มมากๆ ที่ชั่วโมงที่ 36 เมื่อทำการหาปริมาณสารไวโอลาซิน พบว่า ให้ปริมาณของสารไวโอลาซินประมาณ 0.51 กรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Wang และคณะ (2009) ได้ศึกษาการผลิตสารไวโอลาซินของ *Duganella* sp. B2 ในอาหาร NB พบว่า เวลาที่ 32 ชั่วโมงจะให้ค่าการเจริญของเชื้อได้สูงที่สุด ส่วนการผลิตสารไวโอลาซินจะเริ่มมีการผลิตที่เวลาชั่วโมงที่ 10

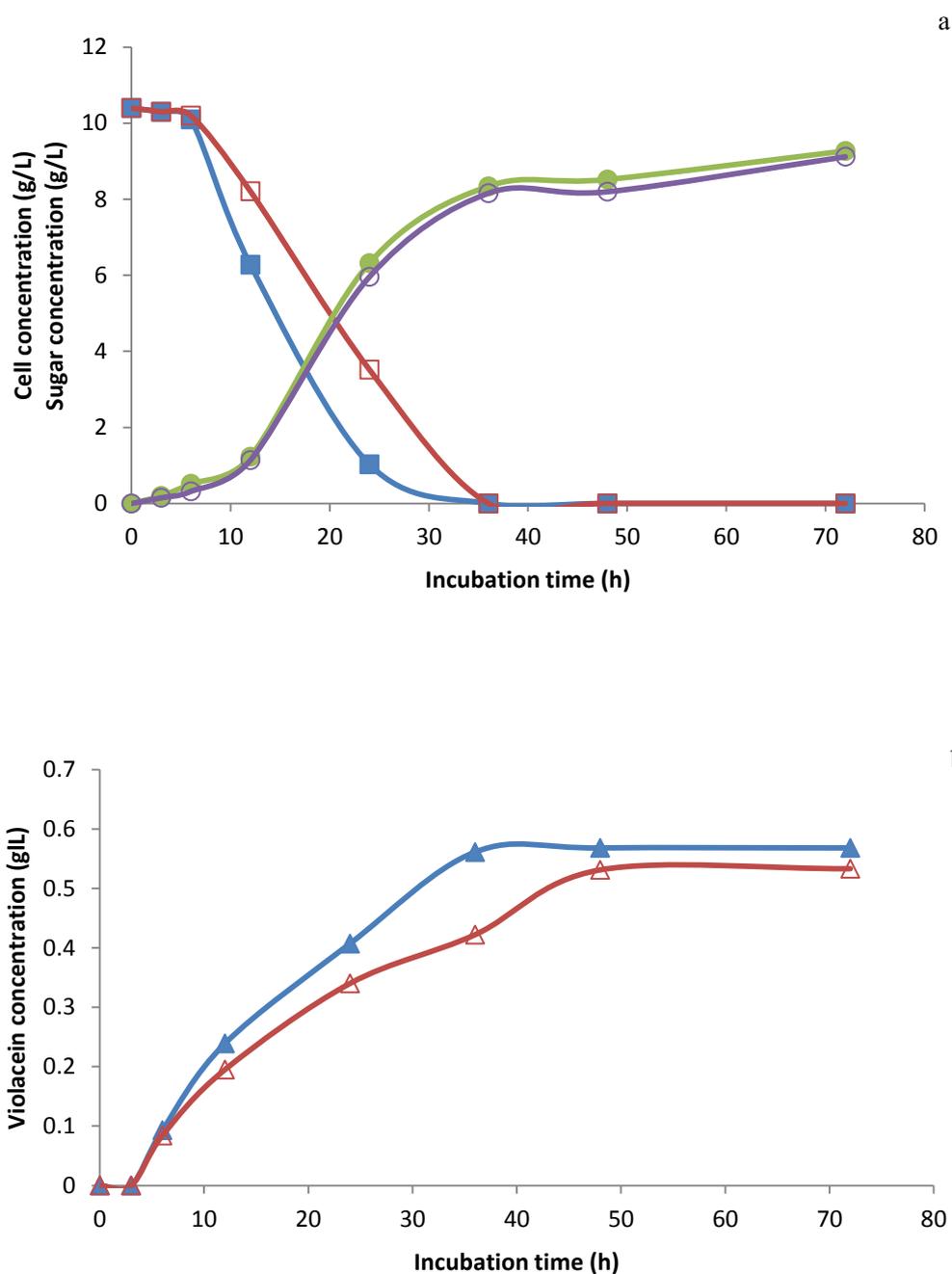


Figure 5. Time courses of cell growth and substrate consumption (a) and violacein production (b) using *C. violaceum* VB.1 and *C. violaceum* ATCC 12472 cultivated in optimized medium. (Sucrose 10.40 g/L peptone, 14.76 g/L and tryptophan 1.14 g/L) at 30^oC with shaking speed of 200 rpm. Symbols: ○, Cell concentration of *C. violaceum* VB.1; ● *C. violaceum* ATCC 12472; □, Sugar concentration of *C. violaceum* VB.1; ■ *C. violaceum* ATCC 12472; △, violacein production of *C. violaceum* VB.1; ▲, *C. violaceum* ATCC 12472.

6. การสกัดและการทำให้สารไวโอลาซีนและอนุพันธ์ให้บริสุทธิ์

เตรียมหัวเชื้อ *C. violaceum* VB.1 ในอาหาร NB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที หลังจากนั้นทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่หาสภาวะที่เหมาะสม (น้ำตาลซูโครส 10.40 กรัมต่อลิตร เปปโตน 14.76 กรัมต่อลิตร และ ทริปโตเฟน 1.14 กรัมต่อลิตร) โดยทำการเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 2 ลิตรและมีการอาหารอยู่ 1 ลิตร เติมหักเชื้อลงไป 10 % ของอาหารทั้งหมด บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อทำการสกัดสารไวโอลาซีนจากเซลล์แบคทีเรีย *C. violaceum* VB.1 ที่คัดแยกได้โดยทำการสกัดด้วยเอทานอล 95% สองครั้งแล้วนำสารสกัดไวโอลาซีนไประเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออก ซึ่งได้ปริมาณสารสกัดหยาบไวโอลาซีน (crude violacein) เท่ากับ 0.48 กรัมต่อลิตรซึ่งสารจะเป็นผงสีม่วงน้ำเงินเข้มและมีความไวต่ออากาศเมื่อตั้งทิ้งไว้โดยไม่ปิดฝาสารจะมีลักษณะเหนียวและเหนียว จึงทำให้ยากต่อการทำบริสุทธิ์ขั้นตอนต่อไปในขั้นตอนของการทำบริสุทธิ์สารไวโอลาซีนโดยใช้ชุดสกัดไขมัน soxhlet โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์สามชนิดในการสกัด ตัวทำละลายแรกใช้คลอโรฟอร์ม เป็นเวลา 3 ชั่วโมง สารละลายจะมีสีน้ำตาลออกเหลืองเข้มซึ่งในส่วนแรกนี้จะเป็นการสกัดส่วนที่เป็นไขมันออกจากสารไวโอลาซีน ซึ่งเป็นส่วนที่ไม่ต้องการออกไป เมื่อทำการสกัดด้วยตัวทำละลายไดเอทิลอีเทอร์ พบว่าสารที่สกัดได้จะมีสีม่วงอ่อนซึ่งในส่วนนี้จะเป็นการสกัดอนุพันธ์ของสารไวโอลาซีน (ดีออกซีไวโอลาซีน) ออกไป (Durán *et al.*, 1994) เมื่อทำการระเหยตัวทำละลายออกแล้วชั่งน้ำหนักจะได้ปริมาณสาร 0.018 กรัมต่อลิตร และเมื่อทำการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล พบว่าสารที่ได้จะมีลักษณะเป็นสีน้ำเงินเข้ม และเมื่อระเหยตัวทำละลายออกแล้วชั่งน้ำหนักจะได้ปริมาณสาร 0.131 กรัมต่อลิตร (Table 15) และเมื่อมาเปรียบเทียบการผลิตสารไวโอลาซีนโดยเชื้อ *C. violaceum* ATCC 12472 พบว่าปริมาณสารที่ได้หลังจากการสกัดเท่ากับ 0.10 กรัมต่อลิตร ซึ่งให้ปริมาณสารไวโอลาซีนที่น้อยกว่าการผลิตโดยเชื้อ *C. violaceum* VB.1 หลังจากนั้นทำการแยกด้วยเทคนิค HPLC ต่อไป จากการศึกษาของ Durán และคณะ (1997) ได้ศึกษาการทำบริสุทธิ์สารไวโอลาซีนจาก *C. violaceum* CCT3496 ในอาหาร 1 ลิตร พบว่าเมื่อทำการสกัดสารไวโอลาซีนจากเชื้อแล้ว และทำบริสุทธิ์โดยการสกัดด้วยสารละลายอินทรีย์แล้วจะได้สารไวโอลาซีนบริสุทธิ์ 1 มิลลิกรัม ในขณะที่ลิทธิบัตรเลขที่ JP7227290 ของประเทศญี่ปุ่น ได้รายงานผลผลิตของสารไวโอลาซีนที่ได้จากเชื้อ *C. violaceum* เท่ากับ 0.43 กรัมต่อลิตร

Table 15. Purification step and productivity of violacein produced by *C. violaceum* VB.1.

Purification step	Weight (g/L)	Productivity (%)
Extract with ethanol	0.481	100
Soxhlet purification		
Extract with di ethyl ether (deoxy violacein)	0.018	7.05
Extract with ethanol (violacein)	0.131	51.37

ในการทำสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค HPLC โดยจะนำสารที่ทำบริสุทธิ์ไวโอลาซีนที่ทำการสกัดตัวทำละลายอินทรีย์เอทานอลมาทำบริสุทธิ์ให้มากขึ้นโดยใช้เทคนิค HPLC (Figure 6) โดยนำตัวอย่างมาละลายกับเมทานอล พบว่า โครมาโทแกรม ของสารมี retention time ในช่วง 1.265 เป็นพีคแรกและพีคเดียวโดยให้ peak area เท่ากับ 3624.11 mAU/s เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับเชื้อมาตรฐาน *C. violaceum* ATCC 12472 ซึ่งเป็นเชื้อที่สามารถสร้างสารไวโอลาซีน พบว่า ค่า retention time ในช่วง 1.277 เป็นพีคแรกและพีคเดียวเช่นเดียวกับสารสกัดจากเชื้อ *C. violaceum* VB.1 แต่มีความคลาดเคลื่อนของ retention time เล็กน้อย ซึ่งจากผลการทดลองสามารถประมวลผลโดยเปรียบเทียบกับกราฟสารสกัดของเชื้อมาตรฐาน เมื่อได้สารที่บริสุทธิ์แล้วก็จะนำไปตรวจสอบเอกลักษณ์การดูดกลืนแสงในช่วง 400 – 750 นาโนเมตรและวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FT-IR

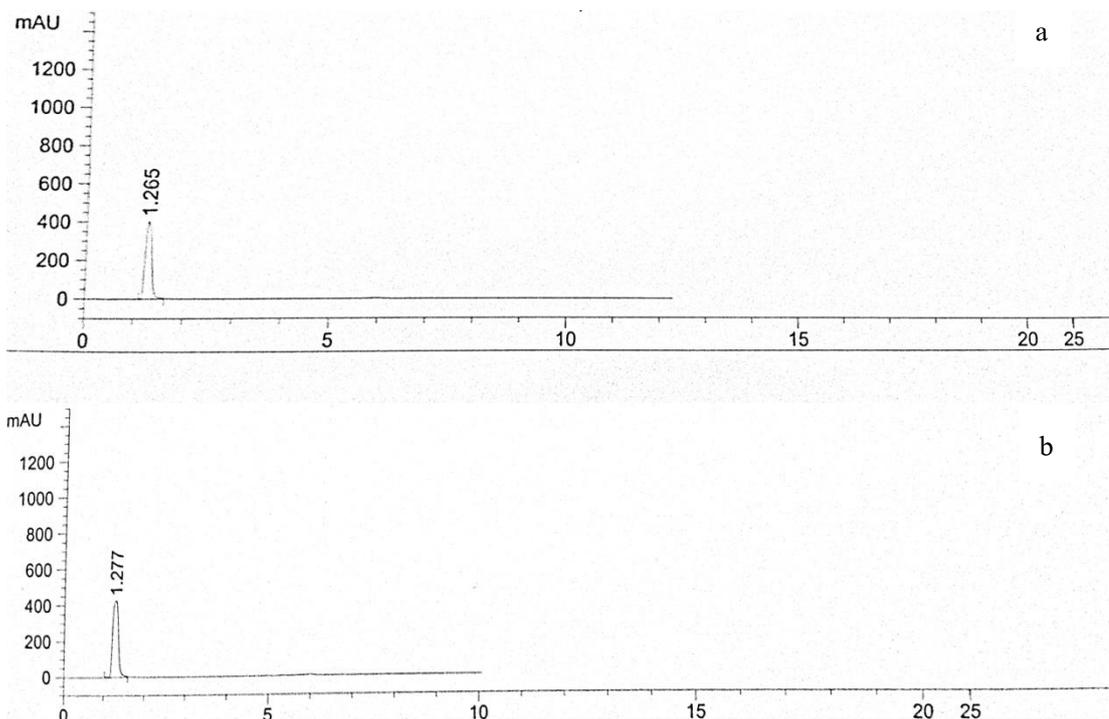


Figure 6. HPLC chromatograms of violaceins of (a) *C. violaceum* VB.1. and (b) *C. violaceum* ATCC 12472.

เมื่อนำสารสีม่วงทั้งในส่วนของสารสกัดหยาบ คือออกซิไวโอลาซิน และไวโอลาซินที่ละลายอยู่ในเอทานอลของ *C. violaceum* VB.1 ไปตรวจสอบเอกลักษณ์การดูดกลืนแสงในช่วง 400–750 นาโนเมตร (Figure 7) พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{\max}) ของสารตัวอย่างที่มีความแตกต่างกัน โดยไวโอลาซินมีค่า λ_{\max} ที่ 580 นาโนเมตร ซึ่งสารสกัดไวโอลาซินจากเชื้อ *C. violaceum* ATCC 12472 ก็มีการดูดกลืนแสงที่ 580 นาโนเมตรเช่นกัน (Figure 7) ในขณะที่ไดออกซิไวโอลาซินมีค่า λ_{\max} ที่ 575.3 นาโนเมตร เมื่อสารทั้งสองอยู่รวมกันสารสกัดหยาบจะปรากฏค่า λ_{\max} 576.5 นาโนเมตร การดูดกลืนแสงของสารประกอบอินทรีย์ในช่วงของรังสี UV-Vis จะขึ้นอยู่กับความสามารถในการดูดกลืนพลังงานของโครงสร้างของไวโอลาซินและอนุพันธ์มีส่วนประกอบของพันธะไพจึงทำให้สามารถดูดกลืนพลังงานช่วง 200-750 นาโนเมตรได้ แต่เนื่องจากไวโอลาซินมีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ทำให้มีค่า λ_{\max} สูงกว่าค่า λ_{\max} ของสารไดออกซิไวโอลาซินอยู่ที่ 4 ความยาวคลื่นและเมื่ออยู่รวมกันในสารสกัดหยาบทำให้เกิดการผสมกันของสารทั้งสองชนิดจึงมีผลทำให้ค่า λ_{\max} มากขึ้นปรากฏที่ 576.5 นาโนเมตร จากการรายงานต่างๆพบว่า ค่า λ_{\max} ของสารไวโอลาซินมีค่าที่แตกต่างกันดังนี้ 565 นาโนเมตร (Inmiss and Mayfield, 1979) 558 นาโนเมตร (Brinberg and Durán, 2001; Natalia and Nelson, 2001) 553 นาโนเมตร (Gregor and

Wolfgang, 2001) 576 นาโนเมตร (Lu *et al.*, 2007) 577 นาโนเมตร (Regina and Tania, 2004) และ 580 นาโนเมตร (Lara *et al.*, 2006) ซึ่งค่า λ_{max} อาจจะมีค่าแตกต่างกันเมื่อสภาวะที่ใช้ทดลองแตกต่างกัน เช่น ชนิดของสารตัวทำละลาย พีเอชและ อุณหภูมิ เป็นต้นส่งผลให้เกิด chemical shift ในรูปแบบต่างๆเช่น bathochromic shift, red shift, hypochromic shift และ hypsochromic shift เป็นต้น ทำให้ค่า λ_{max} ของสารไวโอลาซีนและอนุพันธ์จากการรายงานแตกต่างกัน (Lu *et al.*, 2009)

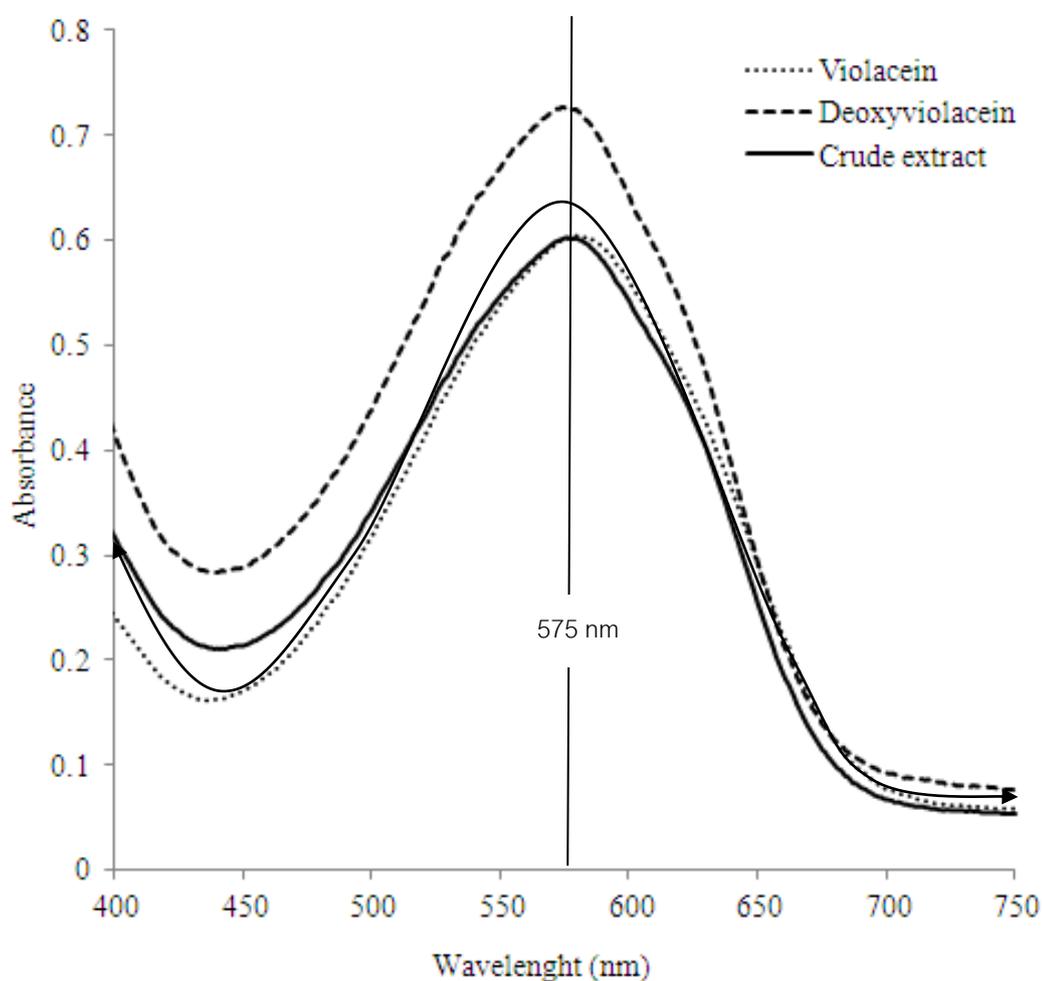


Figure 7. The UV/vis spectrum of violacein, deoxyviolacein and crude extract of purple pigment produced by *C. violaceum* VB.1. and *C. violaceum* ATCC 12472.

เมื่อนำสารไวโอลาซีนและดีออกซีไวโอลาซีนไปวิเคราะห์ด้วย FT-IR พบว่า เส้นสเปกตรัมของสารทั้งสองมีสัญญาณเลขคลื่นเอกลักษณ์ที่แตกต่างกันในบางตำแหน่งโดยไวโอลาซีนจาก *C. violaceum* VB.1 มีสัญญาณเลขคลื่น (ν) หลักที่ 3430, 3271, 1635, 1659 และ

591 cm^{-1} ดังแสดงใน Table 16 และ Figure 8 ในขณะที่คีโตนของสารไวโอลาซีนมีสัญญาณเลขคลื่น (ν) หลักที่ 3429, 3270, 1660, 1545, 1725 และ 591 cm^{-1} ซึ่งเป็นตำแหน่งเอกลักษณ์ของหมู่ไฮดรอกซิล (OH) หรือเอไมด์ (NH) ของฟีนอล การเหลื่อมล้ำของสัญญาณระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลกับเอไมด์ (NH), อัลคีน (C=C), คาร์บอกซิลิก (C=O) และ อะโรมาติก (aromatic) ตามลำดับซึ่งจากผลการทดลองพบว่า ตำแหน่งเลขคลื่น 3430 cm^{-1} ซึ่งเป็นตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซิลหรือเอไมด์ของฟีนอลของสารไวโอลาซีนซึ่งมีค่าความส่องผ่านของแสง (transmittance) ประมาณ 67% ซึ่งมีค่ามากกว่าค่าการส่องผ่านของแสงของสารคีโตนไวโอลาซีนซึ่งปรากฏสัญญาณเลขคลื่นที่ 3429 cm^{-1} และมีสัญญาณโอเวอร์โทน (overtone) ของหมู่เอไมด์และหมู่ไฮดรอกซิลที่เลขคลื่น 3270-3271 cm^{-1} ซึ่ง ณ ตำแหน่งนี้เกิดการโอเวอร์โทนระหว่างหมู่เอไมด์ของสารคีโตนไวโอลาซีนทำให้มีสัญญาณสูงกว่าสัญญาณของสารไวโอลาซีนเนื่องจาก การมีหมู่เอไมด์ต่อมวลโมเลกุลสูงกว่าทำให้มีผลในการดึงอิเล็กตรอนมากกว่าเมื่อมีหมู่ไฮดรอกซิลแทนที่โครงสร้างของสารไวโอลาซีน โดยหมู่ไฮดรอกซิลซึ่งส่งผลการเหนี่ยวนำการยึดของพันธะทำให้มุมและความยาวของ C=C, C=O เปลี่ยนแปลงส่งผลให้สัญญาณของสารคีโตนไวโอลาซีนปรากฏเลขคลื่นต่ำกว่าสารไวโอลาซีนเนื่องจากหมู่ไฮดรอกซิล (OH) มีผลเหนี่ยวนำการยึดของระนาบของอะโรมาติกทำให้สัญญาณเลขคลื่นลดลงและมีผลให้ความกว้างของพีคของอะโรมาติกเพิ่มมากขึ้น ซึ่งสามารถพบได้ในช่วงเลขคลื่นของฟีนอล (3430 cm^{-1}) และอะโรมาติก (729-556 cm^{-1}) จากผลการทดลองแสดงที่หมู่ฟังก์ชันที่เป็นองค์ประกอบของสารไวโอลาซีนและอนุพันธ์ได้แก่ OH, NH, C=C, C=O และอะโรมาติก

Table 16. FT-IR data of violacein and deoxyviolacein from the extract of *C. violaceum* VB.1.

Reference peak	Violacein	Deoxyviolacein	Peak assignments
3430	3430.19	3429.76	Alcohols O-H
3500	3271	3270	N-H overlapping with O-H stretching
1665	1642	1660.76	Amide (C=O)
1613	1635	1545.67	C=C
1723	1659	1725.07	C=O
765	591	591.27	Phenyl ring substitution bands (=C-H)

Sources: Gregor and Wolfgang (2001); Lara และคณะ (2005)

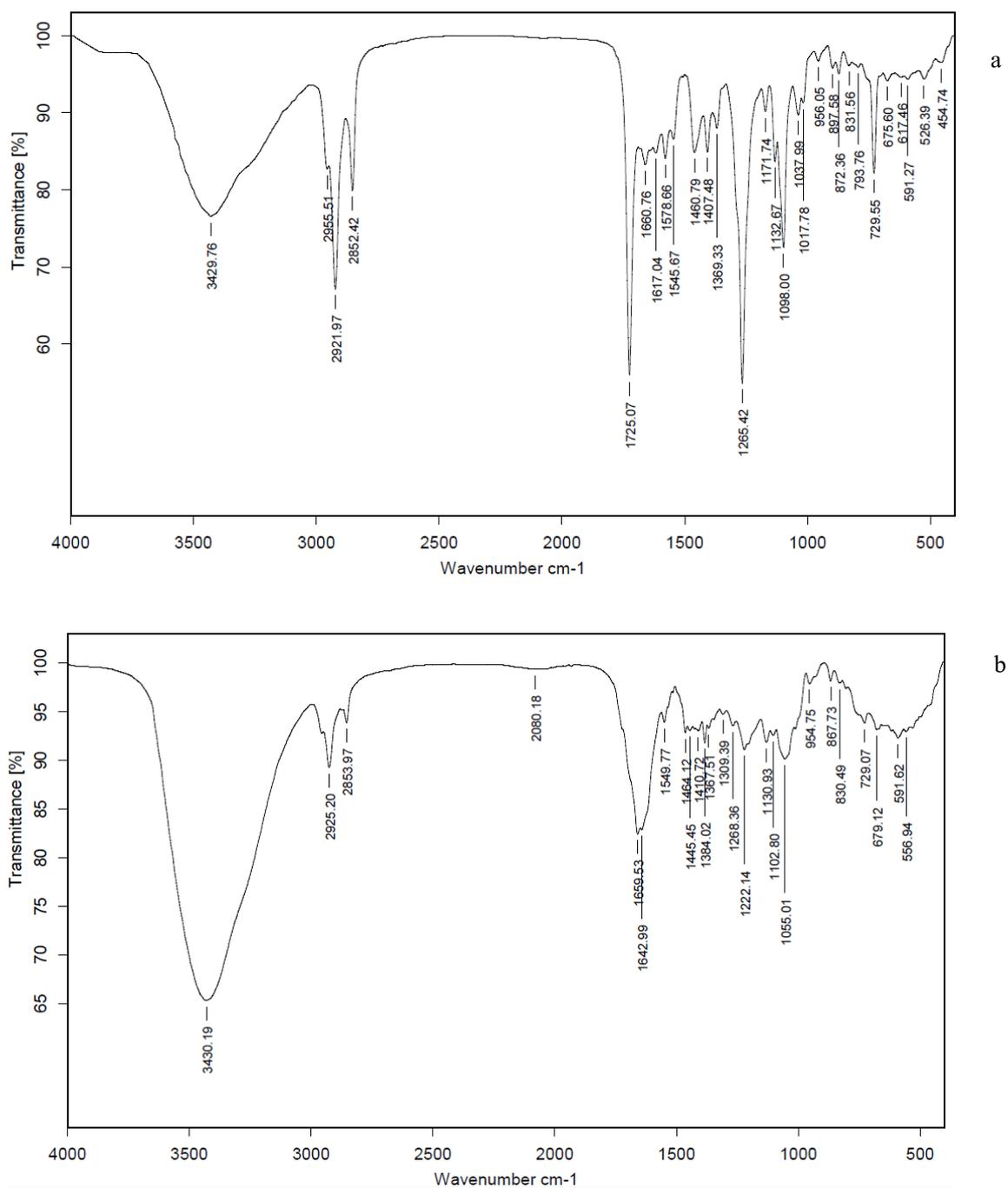


Figure 8. The FT-IR spectrum of violacein (a) and deoxyviolacein (b) of extract from cells of *C. violaceum* VB.1.

หลังจากนั้นก็ให้นำสารไวโอลาซีนที่ได้จากการมาตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลของสารโดยใช้เทคนิค Liquid chromatography Mass spectrometer (LC-MS) พบว่า สารไวโอลาซีนที่ได้จากเชื้อ *C. violaceum* VB.1. มีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 344.1 ในเส้นสัญญาณที่ 7 ของ Figure 9 มีความใกล้เคียงกับน้ำหนักโมเลกุลของสารไวโอลาซีนที่ได้รายงานคือ 343 และพิจารณาผลการทดลองแล้วพบว่าน้ำหนักของสารตัวอย่างที่ได้จาก *C. violaceum* VB.1. เกินมา 1 โมเลกุลซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่าเกิดจากโมเลกุลของ H^+ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่า 1 มารวมกับสารไวโอลาซีนตัวอย่างที่ทดสอบ จึงทำให้น้ำหนักโมเลกุลของสารไวโอลาซีนที่ทดสอบเท่ากับ 344.1 ส่วนสัญญาณอื่นที่ปรากฏนั้น อาจเกิดจากการแตกสลายของโมเลกุลของสารสัญญาณที่ 188.1-305.2 หรืออาจเกิดจากการรวมตัวของสาร (dimer) สัญญาณที่ 708.2 ในระบบของการทำ LC-MS จะเติมสารที่เพิ่มประจุเพื่อให้สารที่ทำการทดสอบสามารถแสดงสัญญาณได้ โดยจะเติม H^+ Na^+ และ K^+

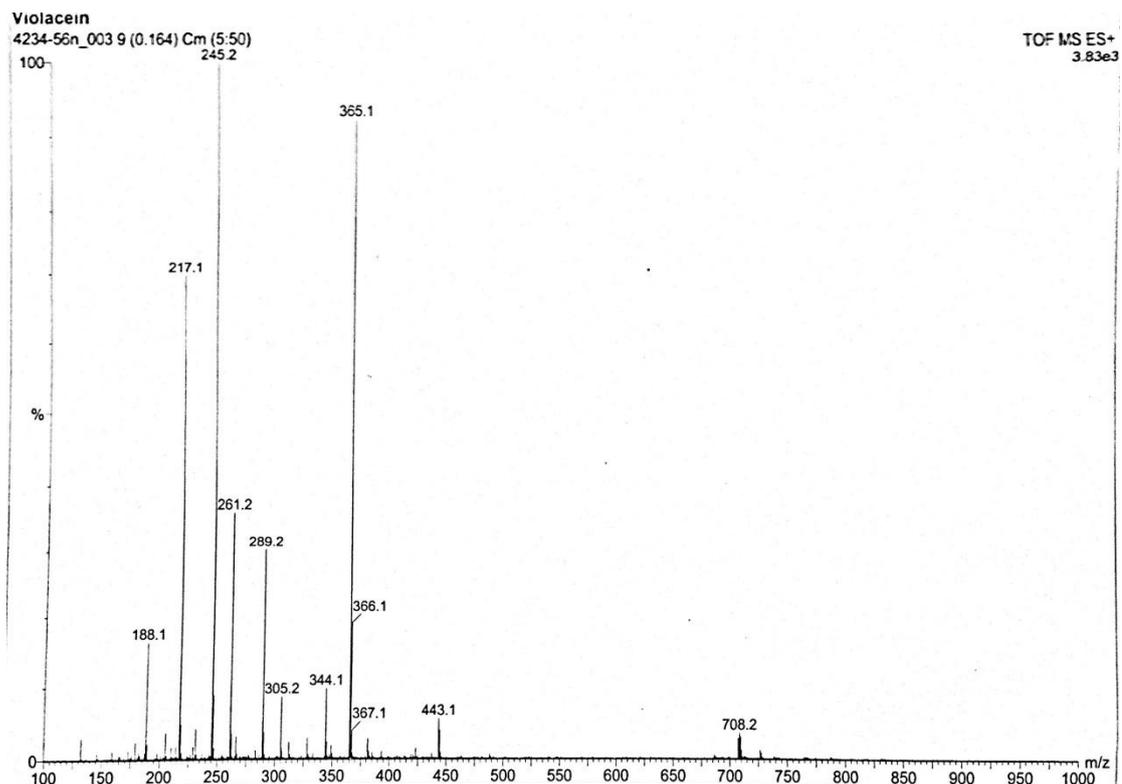


Figure 9. Mass spectrum of violacein from *C. violaceum* VB.1.

7. ผลการตรวจสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารไวโอลาซีน

7.1 ฤทธิ์การต้านการจับอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์

เมื่อนำสารไวโอลาซีนของ *C. violaceum* VB.1 มาทดสอบความสามารถในการดักจับอนุมูล O_2^- โดยเลียนแบบวิธีการตรวจสอบวัดแอกติวิตีของ superoxide dismutase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถสูงในการกำจัดอนุมูล O_2^- โดยทำหน้าที่เร่งการเปลี่ยน O_2^- เป็น H_2O_2 ในปฏิกิริยา dismutation วิธีการทดสอบที่ใช้มีหลักการคือ เมื่อ riboflavin ถูกกระตุ้นด้วยแสงจะสามารถรับอิเล็กตรอนจาก methionine แล้วเปลี่ยนโครงสร้างเป็น semiquinone ซึ่งให้อิเล็กตรอนต่อไปยังออกซิเจน (O_2) เปลี่ยนเป็น O_2^- แล้วไปรีดิวซ์ NBT ที่มีสีเหลืองเปลี่ยนเป็นสาร formazan ที่มีสีม่วงในที่สุด วัดความสามารถของสารไวโอลาซีนในการดักจับ O_2^- ได้จากการยับยั้งการเปลี่ยนสีของ NBT ดังกล่าว (Beyer and Fridovich, 1987) จากการทดลองพบว่าสารไวโอลาซีนของ *C. violaceum* VB.1 มีฤทธิ์ต้านอนุมูล O_2^- เนื่องจากสามารถยับยั้งการเปลี่ยนสีของ NBT ได้ (Figure 10) ได้ให้ค่า IC_{50} ที่ค่อนข้างต่ำโดยรูปแบบของสารไวโอลาซีนที่แสดงฤทธิ์การต้านอนุมูล O_2^- ได้ดีที่สุดคือ สารสกัดบริสุทธิ์ไวโอลาซีน มีค่า IC_{50} สูงถึง 20 ± 0.35 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรขณะที่อนุพันธ์คือออกซิไวโอลาซีนให้ความสามารถในการดักจับอนุมูล O_2^- ที่น้อยกว่าสารไวโอลาซีนถึง 2 เท่า (IC_{50} เท่ากับ 41.28 ± 0.55 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และเมื่อพิจารณาสารสกัดหยาบไวโอลาซีนก็ยังให้ค่าที่สูงกว่าสารอนุพันธ์คือออกซิไวโอลาซีน โดยให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 34.55 ± 0.28 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน trolox ซึ่งเป็นสารที่ออกฤทธิ์เกือบจะทันทีในวิธีการตรวจสอบหลายวิธีของกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ

จากการศึกษาของ Konzen และคณะ (2006) ได้ทำการศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ของสารไวโอลาซีน โดยทำการทดลองโดยใช้อะครีโนลีนในการทดสอบ พบว่า สารไวโอลาซีนสามารถยับยั้งการต้านอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ได้ในระดับไมโครโมล โดยให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 50 ไมโครโมล (17.24 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) นอกจากนี้สารไวโอลาซีนยังสามารถต้านการเกิดอนุมูลไนตริกออกไซด์ได้อีกด้วย (NO) โดยให้ค่าสามารถในการดักจับเท่ากับ 21 ไมโครโมล (7.24 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จากการทดสอบทั้งสองระบบนี้ทำให้สารไวโอลาซีนมีความสำคัญในการต้านป้องกันเชื้อหุ้มใน host

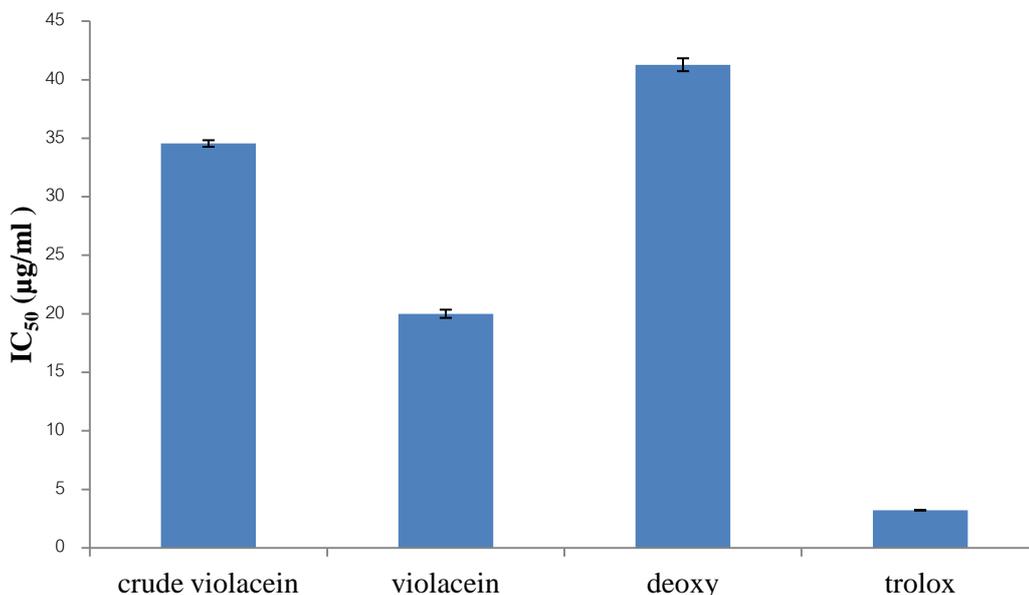


Figure 10. Superoxide radical scavenging of different violaceins from *C. violaceum* VB.1.

7.2 ฤทธิ์ในการจับ Fe^{2+}

เมื่อนำสารไวโอลาซีนมาทดสอบความสามารถในการจับ Fe^{2+} โดยการใช้ TMM ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยากับเหล็กอิสระ (Fe^{2+}) ในสารละลายจะเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีชมพู ดังนั้นเมื่อเหล็กเหล่านี้ถูกจับหมดไม่เหลือไปทำปฏิกิริยากับ TMM สีชมพูของสารละลายดังกล่าวจะหายไป ทำให้ตรวจสอบความสามารถในการจับเหล็กในรูป Fe^{2+} ของสารสกัดได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายสีชมพูที่ลดลง (Shimada, *et al.*, 1992) จากการทดลองพบว่า สารละลายไดออกซีไวโอลาซีนมีความสามารถในการจับเหล็กได้ดีกว่าสารไวโอลาซีนบริสุทธิ์ โดยมี 0.17 ± 0.12 และ 3.01 ± 0.36 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับซึ่งสามารถจับเหล็กได้เกือบหมด ในขณะที่สารสกัดหยาบมีความสามารถในการจับโลหะเหล็กได้ดีกว่าสารไวโอลาซีน (ค่า IC_{50} เท่ากับ 1.32 ± 0.48 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) (Figure 11) ทั้งนี้อาจจะเป็นเพราะความสามารถในการจับเหล็กของไดออกซีไวโอลาซีนในสารสกัดหยาบ ในการทดสอบความสามารถในการดักจับเหล็กยังไม่มีนักวิจัยท่านใดเคยศึกษามาก่อน ดังนั้นทางคณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการตรวจสอบฤทธิ์ในการจับเหล็กเนื่องจากเหล็กเป็นโลหะ ทรานสิชันที่มีอยู่ทั่วไปในร่างกายสามารถเร่งการสร้างอนุมูลอิสระได้ (Halliwell *et al.*, 1999)

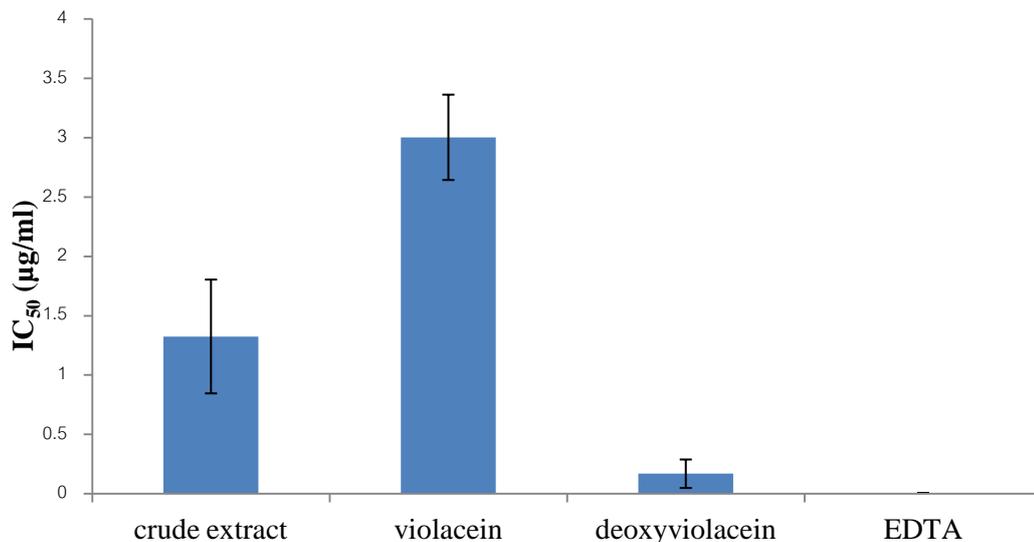


Figure 11. Ferrous (Fe^{2+}) chelating activity of different of violaceins from *C. violaceum* VB.1.

8. ผลการตรวจสอบสมบัติการออกฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพของสารไวโอลาซีน

8.1 ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

การศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของสารไวโอลาซีนที่สกัดได้จาก *C. violaceum* VB.1 ได้ทดสอบกับแบคทีเรีย *B. cereus* *B. subtilis* *L. monocytogens*. *S. aureus* *E. coli* *Pro. mobilis*, *Pseudomonas* sp. และ *Salmonella* Typhimurium โดยทำการศึกษเปรียบเทียบกันระหว่างฤทธิ์ของสกัดไวโอลาซีนหยาบและ สารสารสกัดไวโอลาซีนบริสุทธิ์ พบว่า สารไวโอลาซีนหยาบและสารไวโอลาซีนบริสุทธิ์มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ โดยมีค่า MIC และ MBC ดังแสดงใน Table 17

Table 17. Antimicrobial activities of violacein from *C. violaceum* VB.1.

Bacteria	Gram/shape	MIC µg/mL	
		Crude Violacein	Violacein
<i>B. cereus</i>	Positive/rod	4.07	8.13
<i>B. subtilis</i>	Positive/rod	4.07	8.13
<i>L. monocytogenes</i>	Positive/rod	8.13	16.25
<i>S. aureus</i>	Positive/cocci	8.13	16.25
<i>E. coli.</i>	Negative/rod	>130	>130
<i>Pro. mobilis</i>	Negative/rod	>130	>130
<i>Pseudomonas</i> sp.	Negative/rod	8.13	16.25
<i>Salmonella</i> Typhimurium	Negative/rod	>130	>130

All values are expressed as means derived from triplicate experiments

MIC = Minimal Inhibition Concentration

MBC= Minimal Bactericidal Concentration

จาก Table 17 พบว่า สารสกัดหยาบไวโอลาซีนของ *C. violaceum* VB.1 มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกโดยสามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis*, *B. cereus*, *L. monocytogenes* และ *S. aureus* และให้ค่า MIC เท่ากับ 4.07-8.13 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบคือ *Pseudomonas* sp. โดยให้ค่า MIC เท่ากับ 8.13 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดหยาบไวโอลาซีนไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบบางชนิดได้เช่น *E. coli*, *Pro. mobilis*, และ *Salmonella* Typhimurium และเมื่อพิจารณาสารสกัดไวโอลาซีนบริสุทธิ์ พบว่า การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเป็นไปในทิศทางเดียวกันสารสกัดหยาบไวโอลาซีนแต่จะให้ความเข้มข้นที่สูงกว่าสารสกัดไวโอลาซีนหยาบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียของสารไวโอลาซีนพบว่า ขึ้นอยู่กับโครงสร้างของสารและชนิดของแบคทีเรียที่ทดสอบ แต่สารไวโอลาซีนมีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ เมื่อพิจารณาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียได้ (MBC) พบว่าเป็นค่าเดียวกับค่า MIC แสดงว่าที่ความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญจะเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียอีกด้วย

Durán และคณะ(1983) พบว่า สารไวโอลาซีนบริสุทธิ์จากเชื้อ *C. violaceum* สายพันธุ์บราซิลเลียนมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ แต่มีความสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี สารไวโอลาซีนที่สกัดจากเชื้อแบคทีเรีย *J. lividum* เมื่อ

นำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ 21 สายพันธุ์ (18 species) พบว่า สารไวโอลาซินไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ 5 สายพันธุ์ (4 species) และอีกหนึ่งสายพันธุ์ของ *Bacillus* (*B. subtilis* sub.natto). ยิ่งไปกว่านั้นความเข้มข้นของสารไวโอลาซินในการยับยั้งแบคทีเรียอยู่ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 2-20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Natio *et.al*, 1986)

Nakamura และคณะ (2003) ได้ศึกษาสารไวโอลาซินที่ผสมระหว่างสารคือออกซิไวโอลาซินกับสารไวโอลาซินของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ RT102 พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *B. lichenniformis*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *S. aureus* และเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *P. aeruginosa* สารไวโอลาซินสามารถทำให้เกิดการตายของเซลล์แบคทีเรียได้โดยอยู่ที่ความเข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรแต่อย่างไรก็ตามสารไวโอลาซินไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Flavobacterium balustinum*, *Serratia marcescens* และ *E. coli* หรือการเจริญของยีสต์ในดิน *Trichosporon cutaneum*

ยังไม่มีการศึกษาถึงกลไกการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยสารไวโอลาซิน แต่ไวโอลาซินนอกจากจะยับยั้งการเจริญและยังทำให้แบคทีเรียตายด้วยและการยับยั้งของสารไวโอลาซินขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย (Nakamura *et al.*, 2002 และ 2003)

8.2 ความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา

สารไวโอลาซินที่ผลิตได้จากเชื้อ *C. violaceum* VB.1 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่แตกต่างกันดังแสดงใน Table 18 สารไวโอลาซินมีประสิทธิภาพมากที่สุดในการยับยั้งเชื้อรา *Fusarium* sp. และ *Aspergillus niger* โดยให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (MIC) เท่ากับ 65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรจากผลการทดลองที่ความเข้มข้นนี้ อาหาร PDB จะใส ไม่ขุ่นและไม่มีการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา ความสามารถของสารไวโอลาซินที่สามารถยับยั้ง เชื้อรารองลงมาคือ *Penicillium* sp. และ *Trichoderma reesei* โดยให้ค่า MIC เข้มข้น 260 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตามสารไวโอลาซินที่สกัดได้ที่มีความเข้มข้น 260 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Mucor* sp. และ *Rhizopus* sp.

จากการศึกษาของ Baretto และคณะ (2008) ได้ทำการศึกษาสารไวโอลาซินที่ผลิตจากเชื้อ *C. violaceum* สายพันธุ์ Brazilian Amazon และสายพันธุ์ ATCC 12472 โดยศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา 7 สายพันธุ์ พบว่ามีฤทธิ์ที่สูงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *Aspergillus* sp., *Botryodiplodia* sp., *Cercospora kikuchi*, *Colletotrichum* sp., *Corynespora* sp., *Fusarium* sp. และ *Phomopsis* sp.

Table 18. Antifungal activities of violacein from *C. violaceum* VB.1.

Fungi	MIC ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Aspergillus niger</i> ATCC6875	65
<i>Fusarium</i> sp.	65
<i>Penicillium</i> sp.	260
<i>Trichoderma reesei</i> QM9414	260
<i>Mucor</i> sp.	>260
<i>Rhizopus</i> sp.	>260

8.3 ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติ

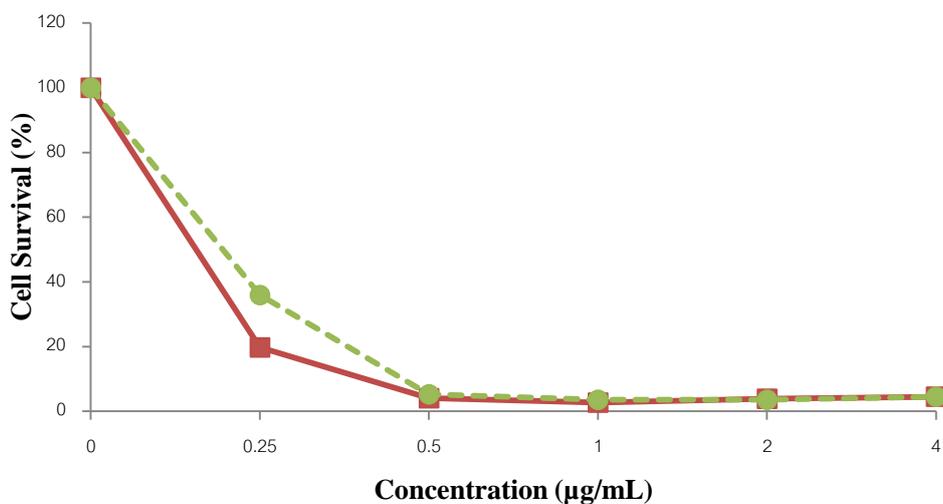
การตรวจสอบคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง โดยการทดสอบครั้งนี้ใช้เซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-468 ซึ่งทำการตรวจสอบฤทธิ์การยับยั้งโดยภาคชีวเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โดยใช้วิธีการ MTT assay โดยจะเปรียบเทียบการยับยั้งเซลล์มะเร็งระหว่างสารสกัดหยาบและสารสกัดบริสุทธิ์ของสารไวโอลาซิน โดยมีสาร Doxorubicin เป็น positive control ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า ทั้งสารสกัดหยาบและสารสกัดบริสุทธิ์ของสารไวโอลาซินมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งโดยให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.195 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร และ 0.156 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตรตามลำดับ (Figure 12 และ 13) ซึ่งจากการแปลผลการทดสอบของสารออกฤทธิ์ชีวภาพถ้าค่า IC_{50} ต่ำกว่า 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตรจะถือว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพนั้นมีประสิทธิภาพดีมาก ๆ และระยะเวลาในการยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารไวโอลาซินก็ต่ำมาก ซึ่งโดยปกติแล้วการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งใช้เวลา 72 ชั่วโมง ในกรณีการยับยั้งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทั่วไป แต่ในการทดลองครั้งนี้ใช้เวลาเพียงแค่ 24 ชั่วโมงเท่านั้นก็สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ จึงแสดงให้เห็นว่าสารไวโอลาซินที่ได้มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง แต่อย่างไรก็ตามเพื่อการใช้ประโยชน์ได้จริงหรือการประยุกต์ใช้ในอนาคต ก็จะมีการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติด้วย

ในการตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ MCF-12A ซึ่งเป็นเซลล์ปกติผลการทดลองพบว่า ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ปกติของสารสกัดหยาบและสารสกัดบริสุทธิ์ (IC_{50}) เท่ากับ 0.361 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตรและ 0.291 ไมโครกรัมต่อ

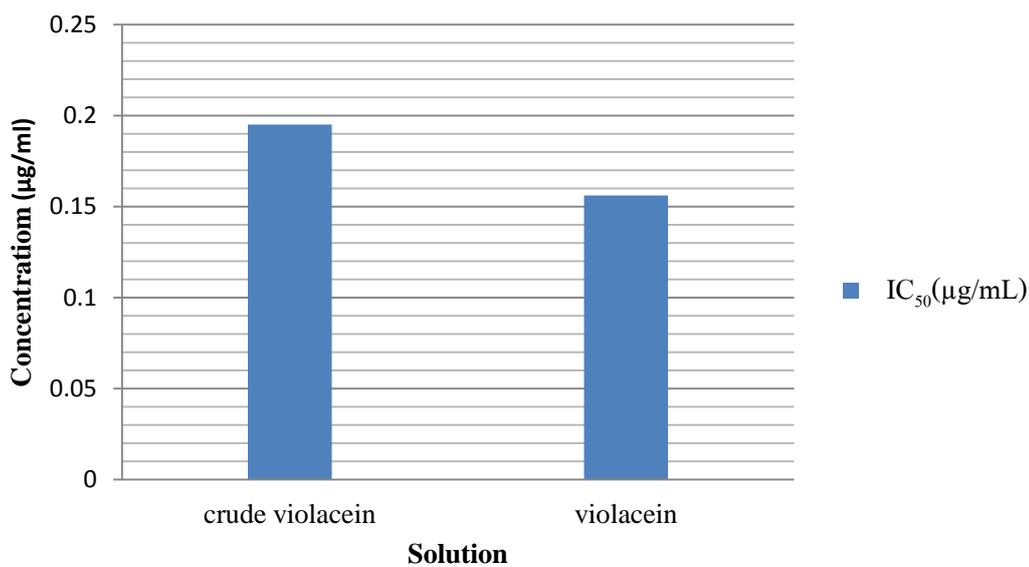
มิลลิลิตรซึ่งแสดงให้เห็นว่าเป็นสารที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ และเมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งกับเซลล์ปกติพบว่า ฤทธิ์การยับยั้งของเซลล์ปกติมีค่า IC_{50} ที่สูงกว่าเซลล์มะเร็งประมาณ 2 เท่าของฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็ง จากผลการทดลองนี้มีความเป็นไปได้ว่าสามารถนำเอาสารไวโอลาซินที่สกัดและทำบริสุทธิ์ได้ไปผลิตยาต้านมะเร็งในอนาคตโดยใช้ในรูปแบบของสารสกัดหยาบหรือสารบริสุทธิ์ก็ได้ เพราะเมื่อพิจารณาค่า IC_{50} แล้วสารทั้งสองรูปแบบมีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้ง แต่ข้อมูลนี้เป็นข้อมูลเบื้องต้นเท่านั้นว่าสารไวโอลาซินมีคุณสมบัติในการยับยั้งเซลล์มะเร็งซึ่งในการศึกษาระดับที่สูงต่อไปจะต้องมีการศึกษากลไกการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งด้วยว่ายับยั้งโดยกลไกใด และยับยั้งระดับไหนภายในเซลล์

ไวโอลาซินสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งโดยสารสกัดบริสุทธิ์สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งลูคีเมีย MOLT-4 เซลล์มะเร็งปอด NCI-H460 และมะเร็งลำไส้ใหญ่ KM12 โดยให้ค่าความสามารถในการยับยั้งเซลล์ให้เหลือรอด 50% (IC_{50}) อยู่ในช่วง 0.01-0.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรจากผลการทดลองดังกล่าวทำให้นักวิจัยที่จะศึกษาในการยับยั้งเซลล์มะเร็งบริเวณต่างๆ ของร่างกาย นอกจากนี้การศึกษาค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ยังทำให้เกิดการตายของเซลล์ (apoptosis) ซึ่งจะขึ้นอยู่กับสัญญาณที่จำเพาะในการเกิดการตายของเซลล์แต่ละเซลล์ (Riveros *et al.*, 1989; Saraiva *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2006; Kodach *et al.*, 2006; Melo *et al.*, 2009; Bromberg *et al.*, 2010)

ในการศึกษาความพิษของสารไวโอลาซินโดยทดสอบกับเซลล์ปกติ chinese hamster fibroblast (V79) ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 5 μ M และเมื่อนำมาทดสอบกับเซลล์มะเร็งลูคีเมีย HL60 สามารถยับยั้งได้ 0.8 μ M ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกันสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็ง HL60 ได้ดีกว่าเซลล์ปกติ V79 6.3 เท่า นอกจากนี้เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HT29, Caco-2, SW480, HCT116 และ DLD1 มีความไวต่อสารไวโอลาซิน ซึ่งค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 0.51 ถึง 7.34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Kodach *et al.*, 2006)

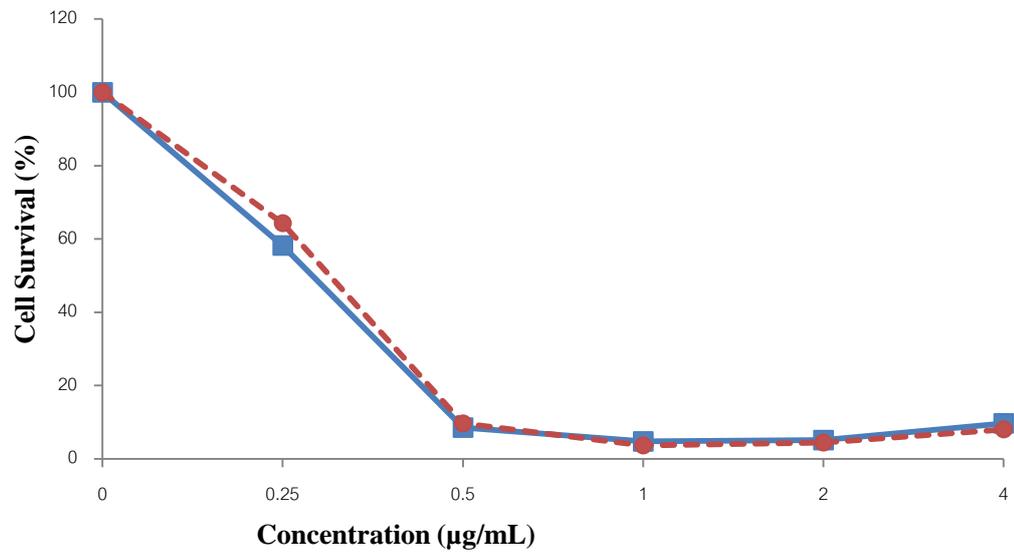


(a)

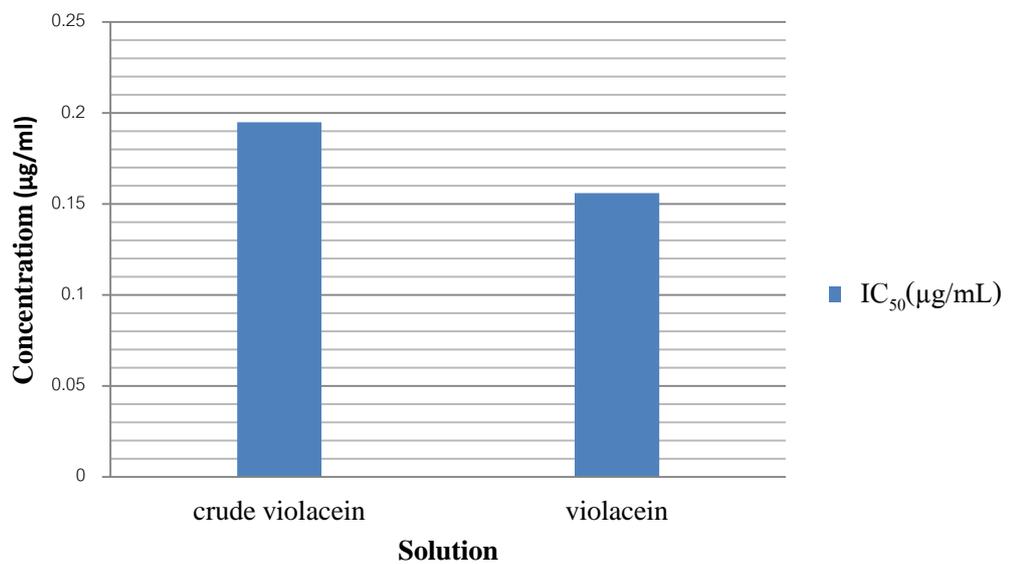


(b)

Figure 12. Growth inhibitory effects (a) and IC₅₀ of crude violacein and pure violacein (b) on MDA-MB-468 cell lines. Symbol: ●, crude violacein; ■, violacein (Cells were treated with different concentration of bolt solution for 24 h. Cell viability was determined by MTT assay.)



(a)



(b)

Figure 13. Growth inhibitory effects (a) and IC₅₀ of crude violacein and pure violacein (b) on MCF-12A cell lines. Symbol: ●, crude violacein; ■, violacein (Cells were treated with different concentration of bolt solution for 24 h. Cell viability was determined by MTT assay.)

บทที่ 4

บทสรุป

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารไวโอลาซินโดยคัดแยกจากดินและแหล่งน้ำต่างๆ พบว่า สามารถพบเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตสารไวโอลาซินได้ในบ่อบำบัดน้ำเสียของโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ซึ่งมีลักษณะของโคโลนีกลม หนูน และมีสีม่วง เมื่อนำไปตรวจสอบเบื้องต้นโดยการนำโคโลนีมาละลายกับเอทานอล พบว่า สามารถละลายและให้สารละลายสีม่วงออกมาซึ่งตรงกับคุณลักษณะเบื้องต้นของสารไวโอลาซินจึงนำโคโลนีสีม่วงที่สนใจทำการคัดแยกเชื้อให้บริสุทธิ์และนำไปศึกษาต่อไป โดยตั้งชื่อเชื้อที่คัดเลือกได้ว่า isolate VB.1

เมื่อทำการจำแนกเชื้อแบคทีเรีย isolate VB.1 โดยการทดสอบทางด้านชีวเคมีและ 16S rDNA พบว่าเชื้อแบคทีเรีย isolate VB.1 อยู่ในกลุ่มของเชื้อแบคทีเรีย *C.violaceum* โดยมีความคล้ายเท่ากับ 99.7% และให้ชื่อแบคทีเรียที่คัดเลือกและจำแนกได้ว่า *C. violaceum* VB.1

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารไวโอลาซินของเชื้อแบคทีเรีย *C.violaceum* VB.1 โดยกำหนดสภาวะการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการศึกษาองค์ประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อ (ซูโครส เปปโตน และ ทริปโตเฟน) โดยออกแบบการทดลองแบบ Central Composition Design (CCD) 3 ปัจจัย 5 ระดับ พบว่าองค์ประกอบของอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารไวโอลาซินของเชื้อ *C. violaceum* VB.1 คือสูตรอาหารที่ประกอบด้วยซูโครส 10.40 กรัมต่อลิตร เปปโตน 14.76 กรัมต่อลิตร และทริปโตเฟน 1.14 กรัมต่อลิตร โดยให้การเจริญเท่ากับ 9.12 กรัมต่อลิตรและการผลิตสารไวโอลาซินเท่ากับ 0.46 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการหาช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อผลิตสารไวโอลาซิน พบว่าที่เวลา 36 ชั่วโมงจะให้ปริมาณของสารไวโอลาซินมากที่สุดคือ 0.51 กรัมต่อลิตร

การทำบริสุทธิ์ของสารไวโอลาซินที่ได้จากแบคทีเรียโดยใช้เทคนิคการสกัดแบบ soxhlet พบว่า นอกจากสารไวโอลาซินที่ละลายอยู่ในเอทานอลแล้วยังมีอนุพันธ์ของสารสารไวโอลาซินที่เรียกว่า ไดออกซีไวโอลาซินอีกด้วย และทำให้สารไวโอลาซินมีบริสุทธิ์มากขึ้นโดยใช้เทคนิค HPLC และตรวจสอบความเป็นสารไวโอลาซินโดยใช้เทคนิคการตรวจสอบเอกลักษณ์การดูดกลืนแสงและ FT-IR และ LC-MS ซึ่งพบว่าสารสกัดที่ได้ตรงกับคุณลักษณะของสารไวโอลาซิน

เมื่อทำการตรวจสอบการต้านอนุมูลอิสระของสารไวโอลาซีน พบว่า สารไวโอลาซีนมีความสามารถในการดักจับอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ IC_{50} เท่ากับ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและฤทธิ์ในการจับเหล็ก IC_{50} เท่ากับ 3.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียของสารไวโอลาซีนพบว่า สารไวโอลาซีนที่ผลิตจากเชื้อ *C. violaceum* VB.1 สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ โดยให้ค่า MIC และ MBC ที่เท่ากันโดยอยู่ในช่วง 4.07-16.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (*B. subtilis*, *B. cereus*, *L. monocytogenes* และ *S. aureus*) และสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ 1 สายพันธุ์ คือ *Pseudomonas* sp.

ความสามารถของสารไวโอลาซีนต่อการยับยั้งของเชื้อรา พบว่า สามารถยับยั้งเชื้อรา *A. niger* ATCC6875 และ *Fusarium* sp ได้มากที่สุดโดยให้ค่า MIC เท่ากับ 65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ไม่ยับยั้ง *Mucor* sp. และ *Rhizopus* sp.

เมื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งซึ่งทำการทดสอบกับเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-468 พบว่าสารไวโอลาซีนมีประสิทธิภาพมาก ๆ ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง MDA-MB-468 โดยให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.156 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และยังสามารถทำให้เซลล์ตายหมดภายในเวลา 24 ชั่วโมง และผลการทดลองของไวโอลาซีนในการยับยั้งเซลล์เต้านมปกติ MCF-12A ก็เป็นไปในทิศทางเดียวกันคือ สามารถยับยั้งภายในเวลา 24 ชั่วโมง แต่มีค่า IC_{50} ที่สูงกว่าเซลล์มะเร็งคือ 0.291 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติของสารไวโอลาซีนจากเชื้อ *C. violaceum* VB.1 ที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและเชื้อรา รวมถึงการยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-468 สารไวโอลาซีนจึงมีศักยภาพที่จะนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ทางการแพทย์และเภสัชวิทยาภายในอนาคต

ข้อเสนอแนะ

การหาน้ำหนักเซลล์แห้งโดยคูดน้ำเลี้ยงเซลล์มาเพียง 1 มิลลิลิตร เป็นวิธีการที่ไม่เหมาะสมและนำมาสู่ความผิดพลาดได้ ซึ่งโดยปกติแล้วการหาน้ำหนักเซลล์แห้งจะต้องใช้น้ำเลี้ยงเซลล์ 10 มิลลิลิตร และใช้ภาชนะที่เป็นแก้วในการวิเคราะห์ แต่เนื่องจากทางภาควิชาไม่มีเครื่องปั่นเหวี่ยงที่สามารถปั่นเหวี่ยงปริมาณดังกล่าวได้ จึงต้องใช้วิธีการที่กล่าวมา

เอกสารอ้างอิง

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Mille, W. and Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLASTL: A new generation of protein data-base search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Andrighetti-Fronher, C. R., Antonio, R. V., Creczynsky, T. B., Barardi, C. R. and Simoes, C. M. 2003. Cytotoxicity and potential antiviral evaluation of violacein produced by *Chromobacterium violaceum*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 98: 843–848.
- Aoki, S., and Nomura, T. 1998. Violacein-containing natural bactericides their manufacture and cosmetics containing them. *Jpn Kokai Tokkyo Koho JP 10139612.*
- AOAC.1999, E., Official Methods of Analysis (19th ed.), Association of Official Analytical Chemists. Arlington. VA.
- Austin, D. A., and Moss, M. O. 1986. Numerical taxonomy of redpigmented bacteria isolated from a lowland river, with the description of a new taxon, *Rugamonas rubra* gen. nov., sp. nov. *J. Gen. Microbiol.* 132: 1899 - 1909.
- Azlina, A. W., Zulaikha, N. Y., Nordiana, N., Zainul, A. Z. and Rezali, M. F. 2012. Production and Characterization of Violacein by Locally Isolated *Chromobacterium violaceum* Grown in Agricultural Wastes. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 167: 1220-1234.
- Ball, P.2002. *Bright Earth: Art and the Invention of Color.* 120-163.
- Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K-H. 1992. *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identifications, Applications.* Springer-Verlag, New York. 4126.
- Barreto, E. S., Torres, A. R., Barreto, M. R., Vasconcelos, A. T. R., Filho, S. A. and Hungria, M. 2008. Diversity in antifungal activity of strains of *Chromobacterium violaceum* from the Brazilian Amazon *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35: 783–790.
- Beyer, W. F., and Fridovich, I. 1987. Assaying for superoxide dismutase activity:some large consequences of minor changes in condition. *Anal. Biochem.* 161: 559-566.

- Blosser, R. S. and Gray, K. M. 2000. Extraction of violacein from *Chromobacterium violaceum* provides a new quantitative bioassay for n-acyl homoserine lactone. *J. Microbiol. Meth.* 40: 47-55.
- Bromberg, N. and Durán, N. 2001. Violacein transformation by peroxidases and oxidases: implications on its biological properties. *J. Mol. B: Enzym.* 11: 463-467.
- Bromberg, N., Dreyfuss, J. L., Regatieri, C. V., Palladino, M. V., Durán, N., Nader, H. B., Haun, M. and Justo, G. Z. 2010 Growth inhibition and proapoptotic activity of violacein in Ehrlich ascites tumor. *Chem-Biol. Interact.* doi:10.1016/j.cbi.2010.04.016.
- Brucker, R. M., Harris, R. N., Schwantes, C. R., Gallaherm T. N., Flaherty, D. C., Lam, B. A. and Minbiole, K. P. C. 2008. Amphibian chemical defense: Antifungal metabolites of the microsymbiont *Janthinobacterium lividum* on salamander *Plethodon cinereus*. *J. Chem. Ecol.* 34: 1422-1429.
- Carvalho, D. D., Costa, F. T. M., Durán, N. and Huan, M. 2006. Cytotoxicity activity of violacein in human colon cancer cells. *Toxicol. In Vitro.* 20: 1514-1521.
- Chenielle, D., Lois, R., Alison, N., Sylvia, M. Lindo, J. and Mohammed, A. 2009. Antibacterial and antifungal analysis of crude extracts from the leaves of *Callistemon viminalis*. *J. Med. Sci .Res.* 27: 157-62.
- Daniel, M. M. 1986. Handbook of U.S. Colorant for Food, Drugs, and Cosmetics. (2nd). United State of America: Wiley-Interscience publications.
- Drew, S. W. and Demain, A. L. 1977. Effect of primary metabolites on secondary metabolism. *Annu. Rev. Microbiol.* 31: 343–56.
- Durán, N., Razo, S. and Campos, V. 1983. Bacterial Chemistry-II. Antimicrobial photoproduct from pigment of *Chromobacterium violaceum*. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 55: 231–234.
- Durán, N., Campos, V., Riveros, R., Joyas, A., Pereira, M. F. and Haun, M. 1989. Bacterial Chemistry-III. Preliminary studies on trypanosomal activities of *Chromobacterium violaceum* products. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 61: 31–36.
- Durán, N., Antonio, R.V., Haun, M. and Pilli, R.A. 1994. Biosynthesis of a trypanocide of *Chromobacterium violaceum*. *World J. Microb. Biot.* 10: 686-691.
- Durán, N. and Menck, C. F. M. 2001. *Chromobacterium violaceum*: a review of pharmacological and industrial perspective. *Crit. Rev. Microbiol.* 27: 201-222.

- Durán, N., Justo, G. Z., Melo, P. S., Martins, D. J. and Cordi, L. 2007. Violacein: properties and biological activities. *Biotechnol. Appl. Bioc.* 48: 127–133
- Durán, N., Faljoni-Alario, A. and Durán, N. 2010. *Chromobacterium violaceum* and its important metabolite review. *Folia. Microbiol.* 55: 535-547.
- Durán, M., Ponezi, A. N., Faljoni-Alario, A., Teixeira, F. S., Justo, G. Z. and Durán, N. 2012. Potential applications of violacein: a microbial pigment. *Med. Chem. Res.* 21: 1524–1532.
- Ferreira, C. V., Bos, C. L., Versteeg, H. H., Justo, G. Z., Durán, N. and Peppelenbosch, M. P. 2004. Molecular mechanism of violacein-mediated human leukemia cell death. *Blood.* 104: 1459-1464.
- Franks, A., Haywood, P., Holmström, C., Egan, S. and Kjelleberg, S. 2005. Isolation and structure elucidation of a novel yellow pigment from the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. *Molecules.* 10: 1286–1291.
- Goowin, T. W. 2002. *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. London, New York, Academic Press.
- Gregor, W., and Wolfgang, S. 2001. A short synthesis of the bacterial pigment violacein and deoxyviolacein. *Synthesis.* 5: 759-76
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. and Cross, C. E. 1999. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now. *J. Lab. Clin. Med.* 119: 598–620.
- Higgins, D. G. and Sharp, P. M. 1994. CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene.* 73: 237–244.
- Hoshino, T., Kondo, T., Uchiyama, T. and Ogasawara, N. 1987. Biosynthesis of violacein: A novel rearrangement in tryptophan metabolism with a 1,2-shift of the indole ring. *Agric. Biol. Chem.* 51: 965-968.
- Hoshino, T. and Ogasawara, N. 1995. Biosynthesis of violacein: Evidence for the intermediacy of 5-hydroxy-L-tryptophan and the structure of a new pigment, oxyviolacein, produced by the metabolism of 5-hydroxytryptophan. *Agric. Biol. Chem.* 54: 2339-2346.
- Inniss, W. E. and Mayfield, C. I. 1979. Seasonal variation of psychrotrophic bacteria in sediment from Lake Ontario. *Water. Res.* 3: 481-484.
- Koburger, J. A. and May, S. O. 1982. Isolation of *Chromobacterium* spp. from foods, soil, and water. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 1463-1465.

- Kodach, L. L., Bos, C. L., Durán, N., Peppelenbosh, M. P., Ferreira, C. V. and Hardwick, J. C.H. 2006. Inhibition of Akt-mediated signal transduction in human colorectal cancer cells by violacein abrogates 5-fluorouracil chemoresistance. *Carcinogenesis*. 27: 508–516.
- Konzen, M., Marco, D. D., Cordova, C. A. S., Viera, T. O., Antonio, R. V. and Creczynski-Pasa, T. B. 2006. Antioxidant properties of violacein: Possible relation on its biological function. *Bioorgan. Med. Chem.* 14: 8307-8313.
- Lara, F. G., Maristela, C. A., Patricia, C. M., Marcela, H., Marcelo, M. M., Nelsun, D., Osvaldo, L. A. 2005. *J. Biomed. Nanotechnol.* 1: 1-7.
- Logan, N. A. 1994. *Bacterial Systematics. Blackwell Scientific.* London. 61- 74.
- Lu, Y., Wang, L., Xue, Y., Zhang, C., Xing, X -H., Lou, K., Zhang, Z., Li, Y., Zhang, G., Bi, J. and Su, Z. 2009. Production of violet pigment by a newly isolated psychrophilic bacterium from glacier in Xinjiang, China. *Biochem. Eng. J.* 43: 135-141.
- Martha, R. W. 2002. Innate color preferences and flexible color learning in the pipevine swallowtail. *Animal. Behav.* 53: 1043-1052.
- Matz, C., Deines, P., Boenigk, J., Arndt, H., Eberl, L., Kjelleberg, S. and Jurgens, K. 2008. Impact of violacein-producing bacteria on survival and feeding of Bacterivorous nanoflagellates. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 1593–1599.
- McCarthy, S. A., Sakata, T., Kakimoto, D. and Johnson, R. M. 1985. Production and isolation of purple pigment by *Ateromonas luteoviolacea*. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 51: 479–484.
- Meiring, U., Lanzendoerfer, G., Riedel, H., Kallmayer, V., Viala, S., Mocigemba, N. and Schaefer, J. 2007. Cosmetic preparations containing violacein as dye. *Ger Offen DE 102005051869: A1*
- Melo, P. S., De Azevedo, M. M. M., Frungillo, L., Anazetti, M. C., Marcato, P. D. and Durán, N. 2009. Nanocytotoxicity: Violacein and violacein loaded poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles acting on human leukemic cells. *J. Biomed. Nanotechnol.* 5: 192–201.
- Mendes, A. S., Carvalho, J. E., Duarte, M. C. T., Durán, N., and Bruns, R. E. 2001. Factorial design and response surface optimization of crude violacein for *Chromobacterium violaceum* production. *J. Biol.* 23: 1963-1969.
- Mirsa, H. P. and Fridovich, I. 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 217: 3170-3175.

- Moss, M. O., Ryall, C. and Logan, N. A. 1978. The classification and characterization of *Chromobacterium* from a lowland river. J. Gen. Microbiol. 105: 11–21.
- Nakamura, Y., Sawada, T., Morita, Y., Tamiya, E. 2002. Isolation of a psychrotrophic bacterium from the organic residue of a water tank keeping rainbow trout and antibacterial effect of violet pigment produced from the strain. J. Biochem. Eng. 12: 79–86.
- Nakamura, Y., Asada, C. and Sawada, T. 2003. Production of antibacterial violet pigment by psychrotrophic bacterium RT102 strain. J. Biotechnol. Bioprocess. Eng. 8: 37–40.
- Natalia, B. and Nelson, D. 2001. Violacein transformation by peroxisomes and oxidases: implication on its biological properties. J. Molecular Catalysis. 11: 463–467.
- Naito, S., Shiga, I. and Yamaguchi, N. 1986. Antimicrobial activity of violet pigment produced by *Janthinobacterium lividum* isolated from Yudemmen. Nippon. Suisan. Gakk. 33: 759–763.
- Nelis, H. J. and De Leenheer, A. P. 1989. Microbial sources of carotenoid pigments used in foods and feeds. J. Appl. Bacteriol. 70:181.
- Nomura, T. 1994. Natural dye violacein manufacture with *Chromobacterium* and *Janthiobacterium*. Jpn Kokai. Tokkyo Koho. JP06253864 A
- Paiva, S. A. and Russell, R. M. 1999. Beta-carotene and carotenoids as antioxidants. J. Am. Coll. Nutr. 18 : 424–425.
- Pantarella, F., Berlutti, F., Passariello, C., Sarli, S., Morea, C. and Schippa, S. 2007. Violacein and biofilm production in *Janthinobacterium lividum*. J. Appl. Microbiol. 102: 992–999.
- Park, S. K., Lee, H. Y. and Kim, K. C. 1995. Role of chitinase produced by *Chromobacterium violaceum* in the suppression of *Rhizoctonia* damping-off Korean. J. Plant. Pathol. 11: 304–311.
- Regina, V. A., and Tania, B. C. P. 2004. Genetic analysis of violacein biosynthesis by *Chromobacterium*. Florianopolis, SC. Brasil. Genet. Mol. Res. 3: 85–91.
- Rettori, D. and Durán, N. 1998. Production, extraction and purification of violacein: an antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*. J. Biol. Tecnol. 14: 685–688.
- Richards, M. P. and Hultin, H. O. 2002. Contribution of blood and blood components to lipid oxidation in fish muscle. J. Agr. Food. Chem. 50: 555–564.

- Richards, R. M. E., Xing, J. Z., Gregory, D. W. and Marshall, D. 1993. An electron microscope study of the effect of sulphadiazine and trimethoprim on *Enterobacter cloacae*. J. Med. Microbiol. 38: 64-68.
- Riveros, R., Haun, M., Campos, V. and Durán, N. 1988. Complete characterization of violacein: an antibiotic and trypanocide pigment from *Chromobacterium violaceum*. J. Biol. Tecnol. 31: 475-487.
- Riveros, R., Haun, M. and Durán, N. 1989. Bacterial Chemistry-V: Effect of growth conditions on production of violacein by *Chromobacterium violaceum* BB-78 strain. Brazilian J. Biol. Med. Res. 22: 569-577.
- Sanchez, G., Pilcher, L., Roslander, C., Modig, T., Galbe, M. and Liden, G. 2006. Dilute-acid hydrolysis for fermentation of the Bolivian straw material. Bioresour. Technol. 93: 249-256.
- Saraiva, V. S., Marshall, J. C., Cools-Lartigue, J. and Burnier, M. N. 2004. Cytotoxic effects of violacein in human uveal melanoma cell lines. Melanoma. Res. 14: 421-424.
- Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K. and Nakamura, T. 1992. Antioxidative properties of xanthan on the anti-oxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. J. Agr. Food. Chem. 40: 945-948.
- Shirata, A., Tsukamoto, T., Yasui, H., Hata, T., Hayasaka, S., Kojima, A. and Kato, H. 2000. Isolation of bacteria producing bluish-purple pigment and use for dyeing. Jpn. Agric. Res. 34: 131-140.
- Tennesen, H. H. and Greenhill, J. V. 1992. Studies on curcumin and curcuminoids. XXII: Curcumin as a reducing agent and as a radical scavenger. Int. J. Pharma. 87: 79-87.
- Tan T. L., Montforts F. P and Meyer, D. 2002. Microbiological method for the biosynthesis of natural blue-violet colorants violacein and deoxyviolacein. PCT Int. Appl. WO 2002050299 A2
- Vicik, S. M., Fedor A. J. and Swartz, W. 1990. Defining an optimal carbon source/methionine feed strategy for growth and cephalosporin C formation by *Cephalosporium acremonium*. Biotechnol. Prog. 6: 333-340.
- Vivot, E., Munoz, J. D., Cruanes, M. C., Cruanes, M. J. Tapia, A., Hirschmann, G. S., Martinez, E., Sapio, O., Gattuso, M. and Zacchino, S. 2001. Inhibitory activity of xanthine-oxidase

- and superoxide scavenger properties. Its morphological and micrographic characteristics. *J. Ethnopharmacol.* 76: 65-71.
- Wang, H., Jiang, P., Lu, Y. , Ruan, Z., Jiang, R., Xing, X -H., Lou, K. and Wei, D. 2009. Optimization of culture conditions for violacein production by a new strain *Duganella* sp. B2. *J. Eng. Biochem.* 44: 119-124.
- Yada, S., Wang, Y., Zou, Y., Nagasaki, K., Hosokawa, K., Osaka, I., Arakawa, R. and Enomoto, K. 2008. Isolation and characterization of two groups of novel marine bacteria producing violacein. *J. Mar. Biotechnol.* 10: 128–132.
- Yang, L. H., Xiong, H., Lee, O. O., Qi, S. H. and Qian, P. Y. 2007. Effect of agitation on violacein production in *Pseudoalteromonas luteoviolacea* isolated from a marine sponge. *Lett. Appl. Microbiol.* 44: 625–630.
- Yoshida, M, Okamoto, H, Sone, N, Hirata, H and Kagawa, Y. 1977. Reconstitution of thermostable ATPase capable of energy coupling from its purified subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74 : 936–940.

ภาคผนวก ก

1. Nutrient broth

ในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย

เนื้อสกัด	3	กรัม
เปปโตน	5	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 (ในกรณีอาหารแข็ง Nutrient Agar จะเติมวุ้นในอัตรา 1.5% ลงในอาหาร NB)

2 อาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐาน (Basal medium) (ดัดแปลงจาก Mendes *et al.*, 2001)

ในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย

น้ำตาลซูโครส	5	กรัม
ทริปโตเฟน	0.3	กรัม
เปปโตน	5	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

3. Carbohydrate media for fermentation test (Atlas, 1993)

อาหารพื้นฐานที่ใช้ nutrient broth ประกอบด้วย

เนื้อสกัด	3	กรัม
เปปโตน	5	กรัม
Bromthymol blue	0.03	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน เทใส่หลอดพร้อมหลอดดักก๊าซ จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

น้ำตาลที่ต้องการทดสอบ ได้แก่ ทริฮาโลส, อะราบิโนส และ ซาโลส เตรียมสารละลายน้ำตาลให้เข้มข้น 5 หรือ 10% ขึ้นกับความสามารถในการละลายของน้ำตาล นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 10 นาที ก่อนนำไปใช้ให้นำน้ำตาลมาผสมลงในอาหารพื้นฐาน โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1%

วิธีทดสอบ

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียลงในอาหาร nutrient broth ที่มีปริมาณน้ำตาล 1% และมี bromthymol blue เป็นอินดิเคเตอร์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ้ามีการสร้างกรดอาหารจะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีเหลือง บางกรณียังเกิดก๊าซด้วยก๊าซที่เกิดขึ้นจะไปแทนที่ของเหลวในหลอดคดักก๊าซ

7 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อรา Potato Dextrose Agar (PDA)

มันฝรั่ง	200	กรัม
วุ้น	17	กรัม
น้ำตาล glucose	30	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ล้างมันฝรั่งให้สะอาด หั่นเป็นชิ้นขนาดเล็ก นำไปต้มจนสุก กรองเอาแต่น้ำ แล้วต้มวุ้นให้ละลาย เติมน้ำตาล glucose ผสมส่วนผสมทั้งสองเข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 1 ลิตร และนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ

8 Mueller Hinton broth

ส่วนประกอบต่อลิตร		
Beef extract powder	2	กรัม
Acid digest of casein	17.5	กรัม
Soluble starch	1.5	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ชั่ง Mueller Hinton broth 21 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มด้วยไฟอ่อนๆ นำไปเข้าหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

9 Egg Yolk Agar

ส่วนประกอบ		
Pancreatic digest of casien	40	กรัม
Disodium phosphate	5.0	กรัม
Monopotassium phosphate	1.0	กรัม
Sodium chloride	2.0	กรัม

Magnesium sulfate	0.1	กรัม
Dextrose	2.0	กรัม
Agar	25.0	กรัม
Distilled water	1000	ลิตร

วิธีการเตรียม

1. ละลายสารข้างต้น ปรับ pH 7.6
2. autoclave 121 องศาเซลเซียส 15 นาที
3. ทำอาหารให้เย็นลงเหลือ 50-55 องศาเซลเซียส
4. ขณะเดียวกันแช่ไข่และแซนใน 95% แอลกอฮอล์ นาน 1 ชั่วโมง
5. ตอกไข่และแยกไข่แดงโดยวิธี aseptic technique ใส่ใน media (ข้อ 3) (ไข่แดง 1 ฟอง

ต่อ media 500 มล.)

การทดสอบบน egg yolk agar บ่มที่ 35 °ซ หากเนื้อ agar รอบๆ โคลโลนีหรือใต้โคลโลนีชุ่มขาวแสดงว่าเชื้อสร้าง lecithinase ทำปฏิกิริยากับ lecithovitelin ซึ่งเป็น lipoprotein ในไข่แดง (egg yolk) ทำให้ความชุ่ม

10 การย่อยสลายเคซีน

ส่วนประกอบ

Casein	5	กรัม
Yeast extract	1.7	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Agar	20	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ชั่งเคซีน 5 กรัม แล้วละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และเติมน้ำกลั่น 500 ml ปรับ pH ให้ได้ pH 10 โดยเติม HCl (A), หลังจากนั้นชั่ง yeast extract และ dextrose ละลายในน้ำกลั่น 500 ml (B) นำทั้งสองส่วนมาผสมรวมกัน แล้วนำไปเข้าหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

11 Bile Escalin Agar (Himedia)

ส่วนประกอบ

Peptic digest of animal Aessue	5	กรัม
Bett extract	3	กรัม
Oragoll	40	กรัม
Ferric citrate	0.5	กรัม
Agar	5	กรัม
น้ำกลั่น	1.000	มิลลิลิตร

วิธีการ

ซึ่งส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น 1.000 ml แล้วนำไปเข้าหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

12 Arginine Carboxidase

ส่วนประกอบ

Peptic digest of animal Aessue	5	กรัม
Bett extract	5	กรัม
Bromq Ade	0.01	กรัม
Cresol Red	0.5	กรัม
Pextose	0.005	กรัม
Pyridoxal	0.005	กรัม
Arginine	10.912	กรัม

วิธีการเตรียม

ซึ่งส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น 1.000 ml แล้วนำไปเข้าหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

ภาคผนวก ข

1. กราฟการยับยั้งซูเปอร์ออกไซด์ของสารสกัดหยาบไวโอลาซีน

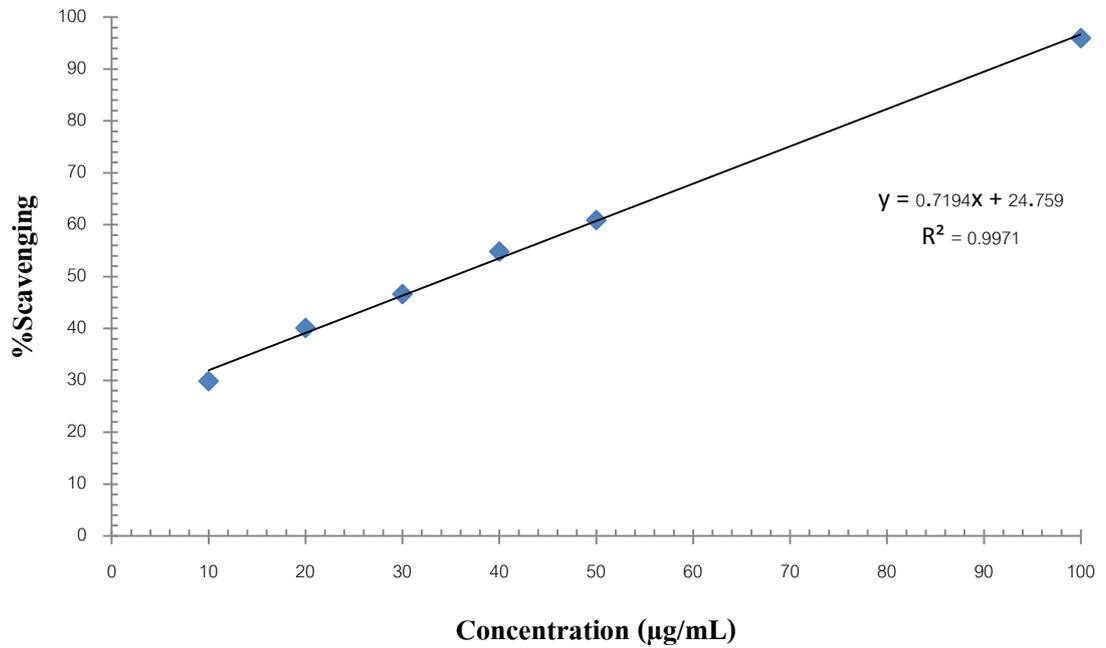


Figure 14. Effect of crude violacein on superoxide radical.

2. กราฟการยับยั้งซูเปอร์ออกไซด์ของสารสกัดไวโอลาซีน

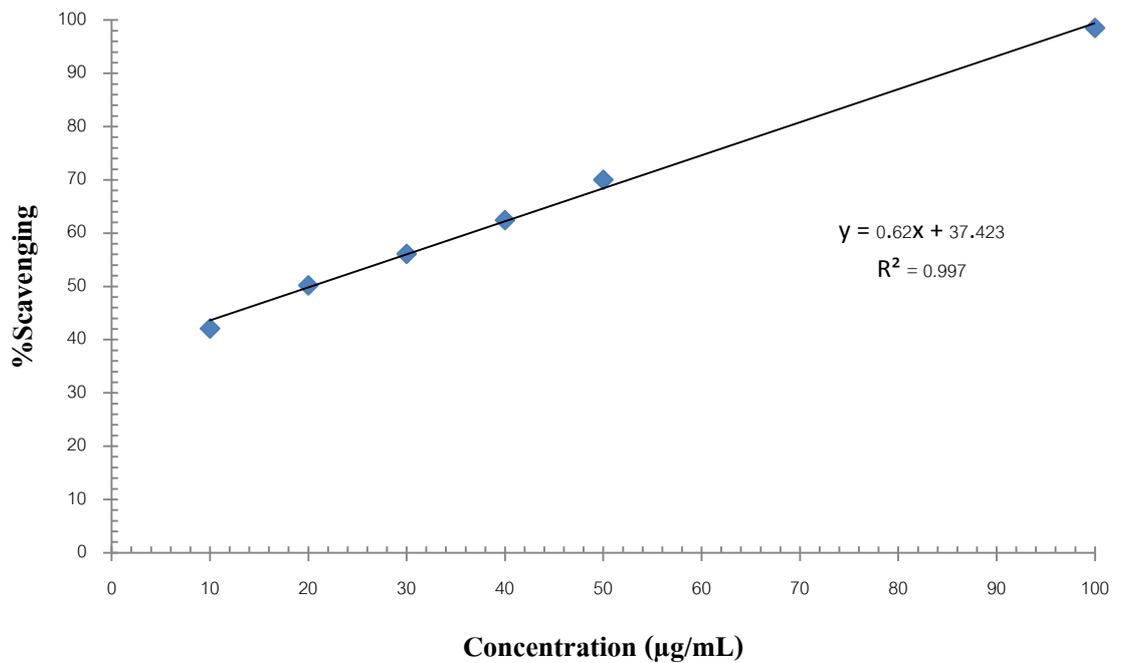


Figure 15. Effect of violacein on superoxide radical.

3. กราฟการยับยั้งซูเปอร์ออกไซด์ของสารสกัดคือออกซีไวโอลาซีน

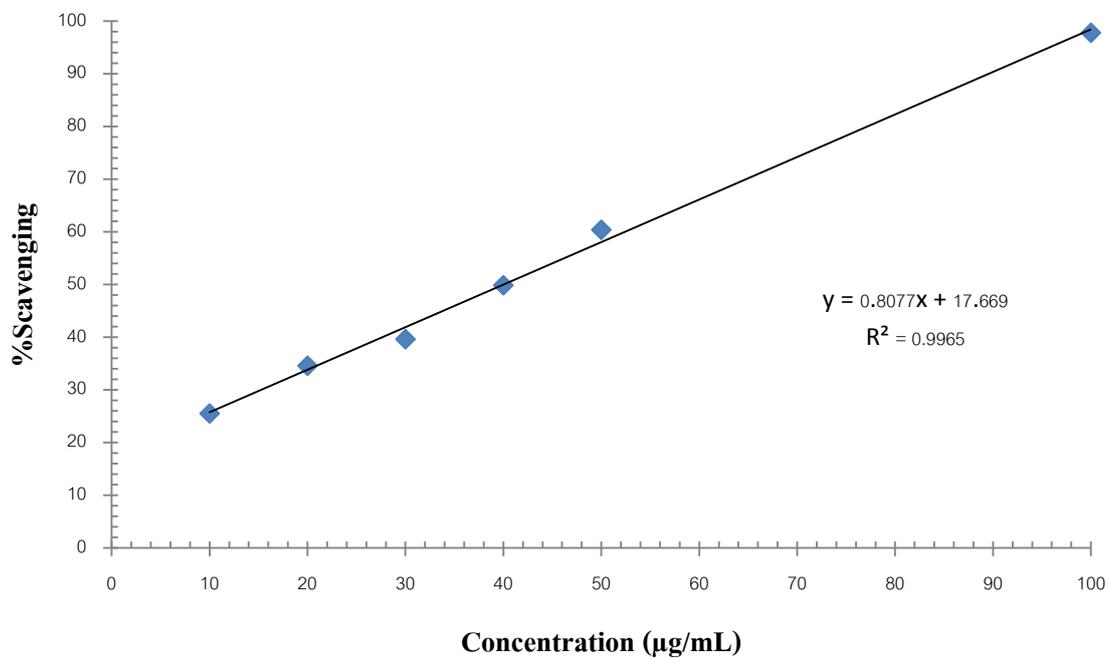


Figure 16. Effect of deoxyviolacein on superoxide radical.

4. กราฟการจับเหล็ก (Fe^{2+}) ของสารสกัดหยาบไวโอลาซีน

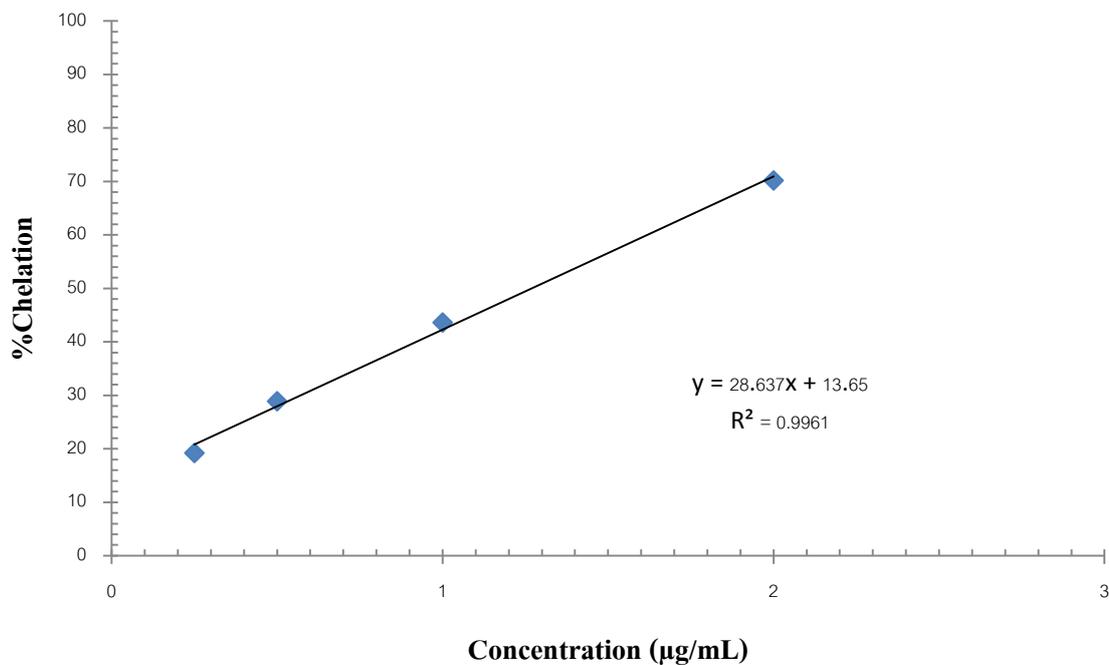


Figure 17. Effect of crude violacein on ferrous (Fe^{2+}) chelating radical.

5. กราฟการจับเหล็ก (Fe^{2+}) ของสารสกัดไวโอลาซีน

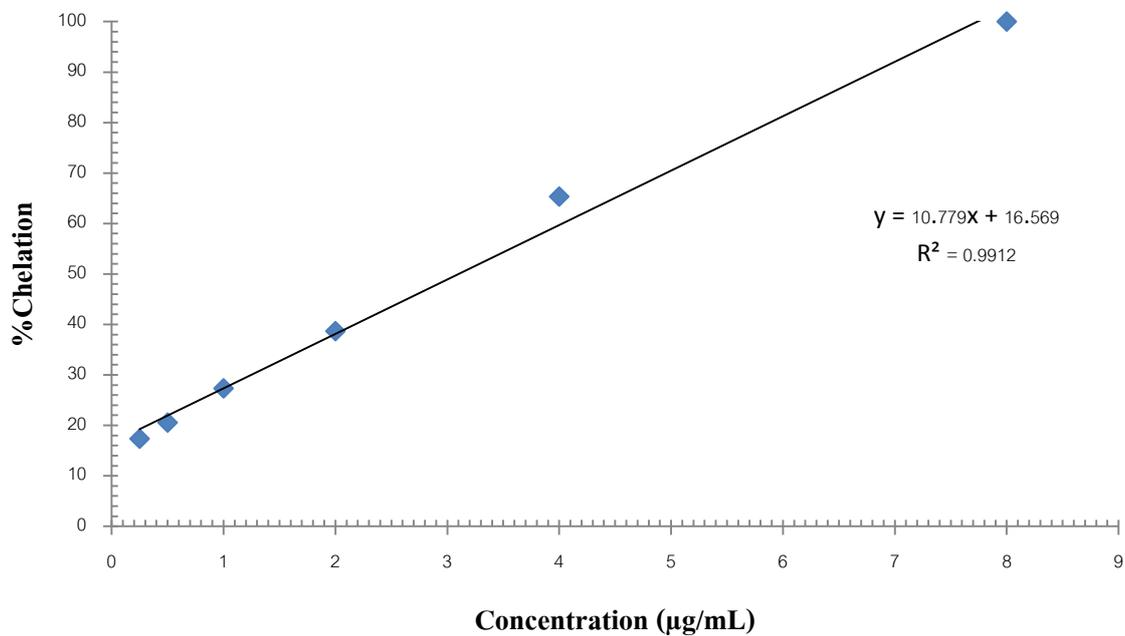


Figure 18. Effect of violacein on ferrous (Fe^{2+}) chelating radical.

6. กราฟการจับเหล็ก (Fe^{2+}) ของสารสกัดดีออกซีไวโอลาซีน

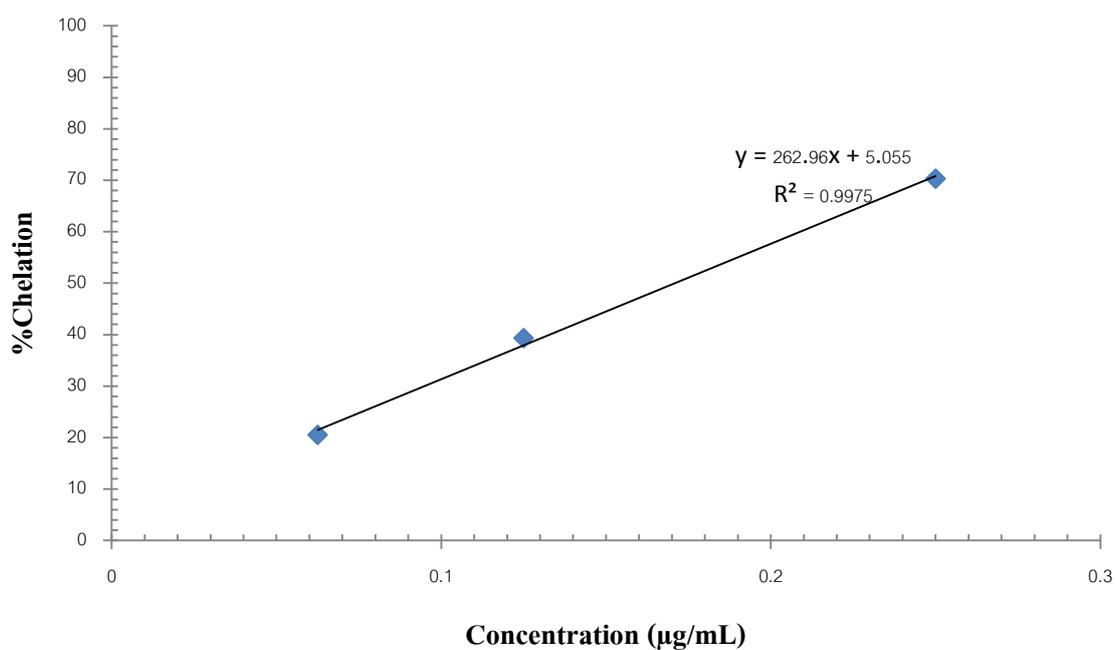


Figure 19. Effect of deoxyviolacein on ferrous (Fe^{2+}) chelating radical.

7. กราฟมาตรฐาน BHT

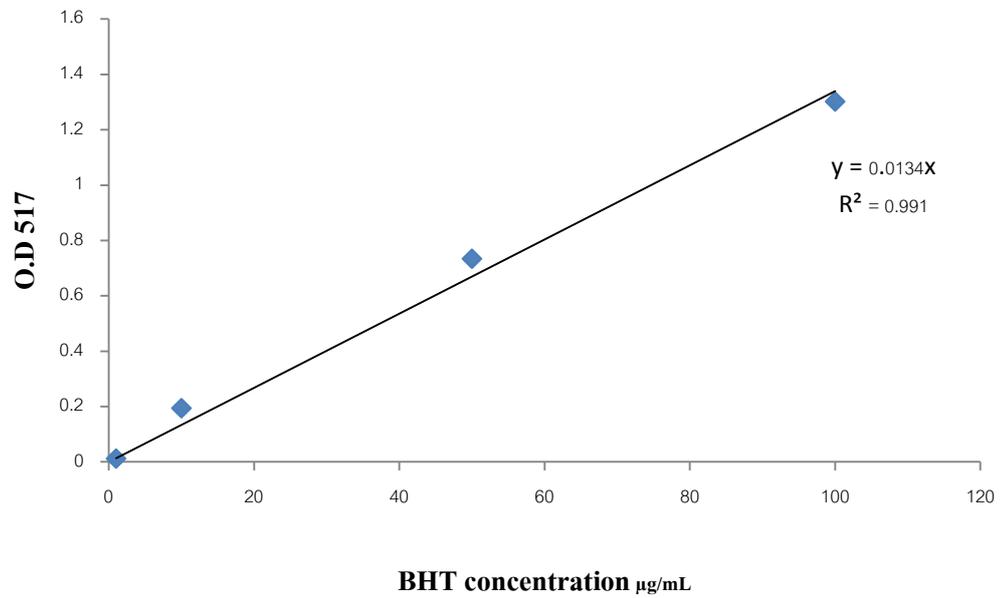


Figure 20. Standard curve of BHT

8. กราฟมาตรฐาน Trolox

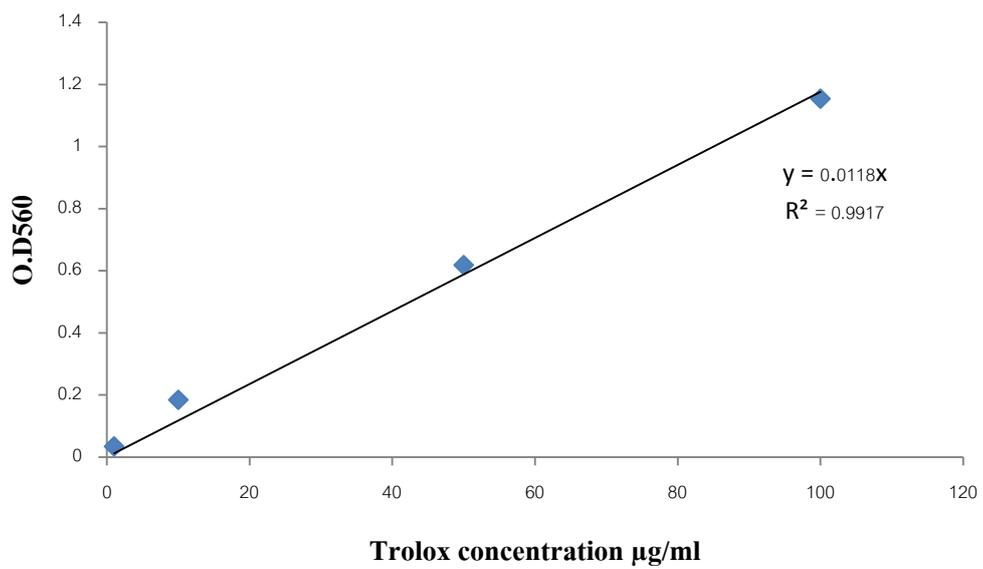


Figure 21. Standard curve of torlox

ภาคผนวก ก

1. การคำนวณค่า IC_{50}

สมการรูปที่ 14 ของ crude violacein คือ $y = 0.7194x + 24.759$

$y = \% \text{ scavenging}$

$x = \text{ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง}$

$$\begin{aligned} \text{จากสมการจะได้ว่า} \quad 50 &= 0.7194x + 24.759 \\ 50 - 24.759 &= 0.7194x \\ 25.241 &= 0.7194x \\ x &= 35.08 \end{aligned}$$

2. การหาอัตราการเจริญจำเพาะของจุลินทรีย์

เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหาร ระยะแรกเป็นระยะที่จุลินทรีย์กำลังปรับตัว เซลล์จะยังไม่มีการเพิ่มจำนวน เรียกระยะนี้ว่า lag phase หลังจากนั้นจุลินทรีย์จะมีอัตราการเจริญเพิ่มขึ้นตามลำดับจนกระทั่งเข้าสู่ exponential หรือ log phase ซึ่งเป็นระยะที่จุลินทรีย์มีอัตราการเจริญสูงสุดและคงที่ การเจริญของจุลินทรีย์ในระยะ log phase เขียนเป็นสมการได้ดังนี้

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \quad (1)$$

เมื่อ x = ปริมาณเซลล์ มีหน่วยเป็นเซลล์ต่อมิลลิลิตร

t = เวลา มีหน่วยเป็นชั่วโมง

μ = อัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) มีหน่วยเป็นต่อชั่วโมง

3. การวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยวิธี Phenol-sulfuric

การหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีนี้สามารถตรวจวัดปริมาณน้ำตาลได้ในช่วง 1 – 100 ไมโครกรัมกลูโคส และเป็นวิธีการที่รวดเร็วที่จะใช้วิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ไม่จำเพาะเจาะจง เพราะไม่ว่าน้ำตาลนั้นจะอยู่ในรูปน้ำตาลรีดิวซ์ หรือน้ำตาลในธรรมชาติที่พบอยู่ในรูป mono-, di-, tri-, oligo- และ polysaccharide ก็สามารดิวิเคราะห์หาปริมาณด้วยวิธีนี้ได้

3.1 สารเคมี

- สารละลายฟีนอล 5 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เตรียมได้โดยละลายผลึกของฟีนอล 5.0 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร
- กรดซัลฟิวริกเข้มข้น
-

3.2 วิธีการวิเคราะห์

- 1) ใส่สารตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง (ใช้น้ำกลั่นเป็น blank)
- 2) เติมสารละลายฟีนอล 1 มิลลิลิตร ลงในสารตัวอย่างและผสมให้เข้ากัน
- 3) เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ลงในสารผสมในข้อ 2 ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วเขย่าแรงๆ ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) (ระวังกรดผสมน้ำจะร้อนเดือด) ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 20 นาที
- 4) นำสารตัวอย่างในแต่ละหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร เทียบความเข้มข้นกับกราฟสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน (standard curve)

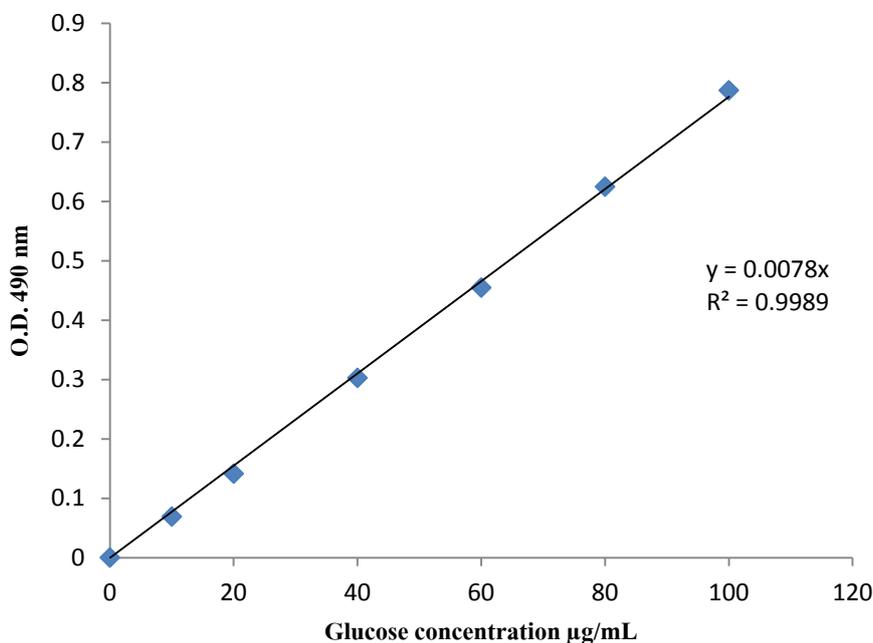


Figure 22. Standard curve of Glucose

ภาคผนวก ง.

1. การวิเคราะห์ลำดับเบสของเบคทีเรียสายพันธุ์ *Chromobacterium violaceum* VB.1 1500 คู่เบส

GGGAAAAGGGGGCTGCTTTACCATGCAGTCGACGGTAACAGGGTGCTTGACCCGCTGACGAGTG
 GCGAACGGGTGAGTAATGCGTCGGAATGTACCGTGTAATGGGGGATAGCTCGGGCAAAGCCGGA
 TTAATACCGCATACGCCCTGAGGGGGAAAGCGGGGGATCGAAAGACCTCGCGTTATACGAGCAGC
 CGACGTCTGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGAGCTCACCAAGGCGACGATCAGTAGCGGGTCTGA
 GAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG
 AATTTTGGACAATGGGGCAACCCTGATCCAAGCCATGCCGCGTGTCTGAAGAAGGCCTTTTCGGG
 TTGTAAAGGACTTTTGTGAGGGAGGAAATCCCGCTGGTTAATACCCGGCGGGGATGACAGTACCT
 GAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTAAT
 CGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTGTGCAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGGCTT
 AACCTGGGAACGGCATTGGGAGACTGCACAGCTAGAGTGCGTCAGAGGGGGGTAGAATTCCACGT
 GTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGATGAC
 ACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCT
 AAACGATGTCAACTAGCTGTTGGGGGTTTGAATCCTTGGTAGCGTAGCTAACGCGTGAAGTTGAC
 CGCCTGGGGGAGTACGGCCGCAAGGGTTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGC
 GGTGGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAAACCTTACCTGCTCTTTGACATGTACG
 GGAAGTTGCCAGAAGATGGGCTTGGTTGCCGAAAAGGGAAGCCGTAACCACAAGGTGCTGCATG
 GGCTGTCGTCCAGCTCCGTGTCCTTGAGAATGTTTGGGTTAAAGTCCCGCAACGAAGCGCCAACC
 CTTTGGCCATTAAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAG
 GAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTATGAGCAGGGCTTACACGTCATAACAATGG
 TCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCTCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGAT
 CGCACTCTGCAACTCGAGTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATGCTGCGGT
 GAATACGTTCCCGGTCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGAGTTTCACCAGAAGTG
 GGTAGGCTAACCGCAAGGAGGCCGCTACCACGGGGTCAGGGGGGGG

Primer 's 1492R and 8F

Program BLASTN 2.2.20 + Description
 All GenBank + EMBL + DDBJ + PDB sequence (bue no EST, STS,
 environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences) Query Length 1412

Sequence producing significant alignments:

<u>Accession</u>	<u>Description</u>	<u>Max</u> <u>score</u>	<u>Total</u> <u>score</u>	<u>Query</u> <u>coverage</u>	<u>E</u> <u>value</u>	<u>Max</u> <u>ident</u>
<u>JF734316.1</u>	<i>Chromobacterium</i> sp. HL-VL 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>2455</u>	2455	98%	0.0	98%
<u>FJ753568.1</u>	<i>Iodobacter fluviatilis</i> strain CV20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>2455</u>	2455	98%	0.0	98%
<u>FJ753567.1</u>	<i>Chromobacterium violaceum</i> strain CV09 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>2455</u>	2455	98%	0.0	98%
<u>AB680302.1</u>	<i>Chromobacterium violaceum</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 12614	<u>2449</u>	2449	98%	0.0	97%
<u>AB594767.1</u>	<i>Chromobacterium violaceum</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: JCM 1249	<u>2449</u>	2449	98%	0.0	97%
<u>AE016825.1</u>	<i>Chromobacterium violaceum</i> 3953T 3953T ATCC 12472, complete genome	<u>2449</u>	1.960e +04	98%	0.0	97%
<u>AY117554.1</u>	<i>Chromobacterium violaceum</i> strain 52 16S ribosomal RNA ribosomal RNA gene, complete sequence	<u>2447</u>	2447	98%	0.0	98%
<u>AJ871128.2</u>	<i>Chromobacterium</i> <i>pseudoviolaceum</i> partial 16S rRNA gene, type strain LMG	<u>2433</u>	2433	97%	0.0	97%

Accession	Description	<u>Max</u>	<u>Total</u>	<u>Query</u>	<u>E</u>	<u>Max</u>
		score	score	coverage	value	ident
<u>AY117557.1</u>	<i>Chromobacterium violaceum</i> strain 07 16S ribosomal RNA ribosomal RNA gene, complete sequence	<u>2431</u>	2431	98%	0.0	97%
<u>AM398481.1</u>	Chromobacterium pseudoviolaceum partial 16S rRNA gene, strain JS1	<u>2423</u>	2423	97%	0.0	97%

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นายวีระศักดิ์ คงพันธ์ตระ

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5310020056

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2552

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

ทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ บัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Kongpuntara, W., Bourneow, C., H-Kittikun, A. Screening and cultivation of purple – pigmented bacterium *Chromobacterium violaceum* VB.1, isolated from wastewater. International Conference on Microbial Taxonomy, Basic and Applied Microbiology, 4-6 October 2012 The Kosa Hotel, Khon Kaen, Thailand

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นายวีระศักดิ์ คงพันธ์ตระ
 รหัสประจำตัวนักศึกษา 5310020056

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2552

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

ทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ บัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Kongpuntara, W., Bourneow, C., H-Kittikun, A. Screening and cultivation of purple – pigmented bacterium *Chromobacterium violaceum* VB.1, isolated from wastewater. International Conference on Microbial Taxonomy, Basic and Applied Microbiology, 4-6 October 2012 The Kosa Hotel, Khon Kaen, Thailand