

การหาสูตรโครงสร้างของสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์จาก  
แอกติโนมัยซีทที่แยกได้จากทะเล

Structure Elucidation of Cytotoxic Compounds from Marine Derived  
Actinomycetes

ชญญลักษณ์ สุวรรณวรชาติ

Tanyalak Suwanworachat

๑

เลขที่	QR 82.035 762 2550	ร. 2
ปี	3013/16	
วันที่	11 มี.ค. 2000	

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

2550

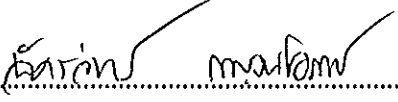
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

(1)

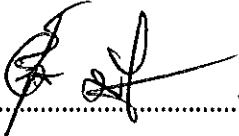
ชื่อวิทยานิพนธ์      การหาสูตรโครงสร้างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์จาก  
                                 แอคติโนไมซีตที่แยกได้จากทะเล  
ผู้เขียน                      นางสาวชญญลักษณ์ สุวรรณวรชาติ  
สาขาวิชา                    เทคโนโลยีชีวภาพ

---

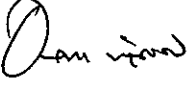
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

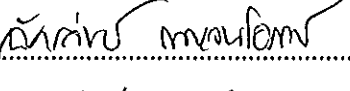
  
.....  
(ดร.อัครวิทย์ กาญจนโอภาส)

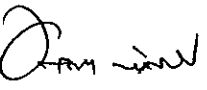
คณะกรรมการสอบ

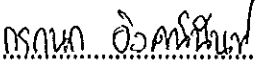
  
.....ประธานกรรมการ  
(ดร.ศุภศิลาปี มณีรัตน์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม


  
.....  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนุชิต พลับรู้งการ)

  
.....กรรมการ  
(ดร.อัครวิทย์ กาญจนโอภาส)

  
.....กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนุชิต พลับรู้งการ)

  
.....กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.กรกนก อิงคินันท์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยรับนี้เป็น  
ส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

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

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	การหาสูตร โครงสร้างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์จาก แอกติโนมัยซีทที่แยกได้จากทะเล
ผู้เขียน	นางสาวรัชฎญลักษณ์ สุวรรณวรชาติ
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา	2550

### บทคัดย่อ

แอกติโนมัยซีทที่แยกได้จากทะเลมีศักยภาพในการเป็นแหล่งของสารชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compound) มีรายงานการพบสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากแอกติโนมัยซีทที่แยกได้จากทะเลมากกว่า 10,000 สาร ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย จากการศึกษาพบว่าสามารถแยกแอกติโนมัยซีท สายพันธุ์ CNA039 ได้จากสาหร่ายทะเล ที่เก็บมาจากเกาะโลซิน ในทะเลอ่าวไทย จากการคัดกรองเบื้องต้นพบว่าแอกติโนมัยซีทสายพันธุ์นี้สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ และจากผลการจัดจำแนกสายพันธุ์โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ระบุว่าแอกติโนมัยซีทสายพันธุ์นี้มีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces parvulus* ถึงร้อยละ 99 เมื่อนำสารสกัดหยาบที่ได้จากแอกติโนมัยซีทที่แยกได้จากทะเล สายพันธุ์ CNA039 มาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี พบว่าได้สารบริสุทธิ์ 1 สาร ที่ให้ผลการวิเคราะห์โครงสร้างโดยใช้ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี พบว่าสารดังกล่าวคือ actinomycin D ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง 3 ชนิด คือ MCF-7, HT-29 และ Hela ได้สูงที่ความเข้มข้นของสารเท่ากับ 3 นาโนโมลาร์

<b>Thesis Title</b>	Structure Elucidation of Cytotoxic Compounds from Marine Derived Actinomycetes
<b>Author</b>	Miss Tanyalak Suwanworachat
<b>Major Program</b>	Biotechnology
<b>Academic Year</b>	2007

### ABSTRACT

Marine derived actinomycetes are potentially new sources of novel bioactive compounds. More than 10,000 bioactive compounds have been described from marine actinomycetes, with various biological activities. In this study, we isolated the marine derived actinomycete strain CNA039, obtained from alga collected from Losin Pinnacle, the Gulf of Thailand. The nucleotide sequence of the 16S rDNA gene of this strain exhibited close similarity (99%) with *Streptomyces parvulus*. Crude extract from marine derived actinomycete strain CNA039 was separated and purified by chromatographic techniques yielded one known compound as actinomycin D. Its structure was determined by multiple spectroscopy techniques including IR, MS and NMR and was shown strong cytotoxic activities against MCF-7, HT-29 and Hela cell lines at concentration level of 3 nM.

## กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ดร.อัครวิทย์ กาญจนโอภาส อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำในการทำวิจัย การค้นคว้าและการเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ รวมไปถึงแนวทางในการดำเนินชีวิตและโอกาสดีๆ ที่อาจารย์มอบให้ และขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนุชิต พลับรู้อกร กรรมการที่ปรึกษาร่วมที่ให้คำแนะนำต่างๆ ในการทำงานวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอขอบพระคุณ ดร.สุภศิลาปี มณีรัตน์ กรรมการผู้แทนคณะอุตสาหกรรมเกษตร และรองศาสตราจารย์ ดร.กรกนก อิงคนินันท์ กรรมการผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ ผศ.สุปรียา ยืนยงสวัสดิ์ ภาควิชาเกษตรเขตและเกษตรพฤษศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และ คุณธีรศักดิ์ อนันตพงศ์ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ อุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

ขอขอบคุณ คณะอุตสาหกรรมเกษตร ที่ให้ทุนอุตสาหกรรมเกษตรสู่ความเป็นเลิศ และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ทุนอุดหนุนการทำวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ด้วยความเคารพยิ่ง ที่ให้กำลังใจและโอกาสในการศึกษามาโดยตลอด นักศึกษาและเจ้าหน้าที่ในคณะอุตสาหกรรมเกษตร และคณะเกษตรศาสตร์ สำหรับกำลังใจและแรงบันดาลใจที่มีให้เสมอมา ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ตลอดจนทุกท่านที่มีได้กล่าวนามมา ณ ที่นี้ด้วย ที่มีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

ธัญญลักษณ์ สุวรรณวรชาติ

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(4)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบัญ	(6)
รายการตาราง	(7)
รายการภาพ	(9)
บทที่	
1. บทนำ	
บทนำต้นเรื่อง	1
บทตรวจเอกสาร	5
วัตถุประสงค์	58
2. อุปกรณ์ และวิธีการ	
วัสดุ	59
อุปกรณ์	60
วิธีการ	61
3. ผลและวิจารณ์	
3.1 การคัดกรองสารสกัดที่ผ่านการคัดเลือกแล้วว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้ง การเจริญของเซลล์มะเร็ง	71
3.2 การแยกและการทำบริสุทธิ์ของสารสกัด	82
3.3 การหาสูตร โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์	92
4. สรุปผลการทดลอง	102
เอกสารอ้างอิง	104
ภาคผนวก ก	117
ภาคผนวก ข	119
ภาคผนวก ค	120
ภาคผนวก ง	124
ประวัติผู้เขียน	131

## รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1. ชนิดของผนังเซลล์ของแอกติโนมัยซีท	15
2. แบบแผนน้ำตาลของแอกติโนมัยซีท	15
3. ชนิดของฟอสโฟลิปิดของแอกติโนมัยซีท	16
4. การจัดจำแนกกลุ่มของแอกติโนมัยซีท ใน Class Actinobacteria	17
5. ลักษณะที่สำคัญบางประการของแอกติโนมัยซีท	21
6. แอกติโนมัยซีทที่แยกได้จากทะเลที่ระดับความลึกต่างๆ	22
7. แอกติโนมัยซีทสายพันธุ์ใหม่ที่แยกได้จากทะเล	23
8. จำนวนของสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิที่ผลิตโดยจุลินทรีย์	25
9. สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จากแอกติโนมัยซีทที่แยกได้จากทะเล	36
10. สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งจากแอกติโนมัยซีทที่แยกได้จากทะเล	41
11. สารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ จากแอกติโนมัยซีทที่แยกได้จากทะเล	49
12. ตัวทำละลายที่นิยมใช้ และค่า Dielectric constant ของตัวทำละลายชนิดต่างๆ	51
13. รังสีแม่เหล็กไฟฟ้าในแต่ละช่วงความยาวคลื่นต่างๆ	56
14. ส่วนผสมของรีเอเจนต์ต่างๆ ในการทำ PCR	63
15. ผลการคัดกรองสารสกัดหายาจากแอกติโนมัยซีทที่แยกได้จากทะเลที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง	72
16. การจัดกลุ่มของสารสกัดหายาที่แยกได้จากแอกติโนมัยซีทที่แยกได้จากทะเลตามองค์ประกอบทางเคมี	73
17. ผลการคัดเลือกสารสกัดหายาที่มีองค์ประกอบทางเคมีแตกต่างกัน จำนวน 5 สารสกัด	74
18. การจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อแอกติโนมัยซีทที่แยกได้จากทะเล ด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rDNA	76
19. ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งของสารสกัดส่วนที่ละลายอยู่ในชั้นเมทานอลและเฮกเซน	84
20. การแยกสารจากส่วนที่ละลายอยู่ในชั้นเมทานอล (MeOH phase) และฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งทั้ง 4 ชนิด	86

## รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
21. การแยกสารจากส่วน F2 และฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งทั้ง 4 ชนิด	87
22. ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งของสาร A	89
23. ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งของสารส่วน F4	91
24. แถบการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสาร A	92
25. $^1\text{H}$ NMR และ $^{13}\text{C}$ NMR ของสาร A เทียบกับ Actinomycin D	99
26. สารในกลุ่ม actinomycin ที่แยกได้จากแอคติโนมัยซีท	101

## รายการภาพ

ภาพที่	หน้า
1. จำนวนสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่แยกได้จากสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในทะเลจําแนกตามปี 1965-2005	3
2. ชนิดของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่แยกได้จากทะเลจําแนกตามตามฤทธิ์ทางชีวภาพ	3
3. วิถีจักรชีวิตของแอกติโนมัยสีท	5
4. ขั้นตอนการสร้างโคโลนีของแอกติโนมัยสีท	7
5. ลักษณะของเส้นใยเหนือพื้นผิวอาหารของแอกติโนมัยสีท	8
6. การสร้างสปอร์เดี่ยวของแอกติโนมัยสีทในสกุลต่างๆ	9
7. การสร้างสปอร์แบบ disporous	10
8. การสร้างสปอร์แบบเป็นสายยาวของ <i>Streptomyces</i>	11
9. รูปทรงของสปอร์ที่สร้างอยู่ในอับสปอร์	12
10. รูปทรงของสปอร์ที่สร้างอยู่ในอับสปอร์	13
11. การสร้างสาร primary metabolite และสาร secondary metabolite ในจุลินทรีย์	24
12. สูตรโครงสร้างของ salinamides A-E (1-5)	26
13. สูตรโครงสร้างของ lorneamides A (6) และ B (7)	27
14. สูตรโครงสร้างของ lomaviticins A (8-9)	28
15. สูตรโครงสร้างของ Kahakamides A (10) และ B (11)	28
16. สูตรโครงสร้างของ Bonactin (12)	29
17. สูตรโครงสร้างของ (R)-10-methyl-6-undecanolide (13) และ (6R,10S)-10-methyl-6-dodecanolide (14)	30
18. สูตรโครงสร้างของ neomarinone (15), isomarinone (16), hydroxy-debromomarinone (17) และ methoxydebromomarinone (18)	31
19. สูตรโครงสร้างของ 6-prenyltryptophol (19), compound 20 และ compound 21	31
20. สูตรโครงสร้างของ MKN-349A (22)	32
21. สูตรโครงสร้าง ของ IB-00208 (23)	33

## รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
22. สูตรโครงสร้างของ lissoclinolide (24)	33
23. สูตรโครงสร้างของ aureoverticillactam (25)	34
24. สูตรโครงสร้างของ (1'R, 2S, 4S)-2-(1-hydroxyl-6-methyheptyl)-4-hydroxymethyl-butanolide (26)	34
25. สูตรโครงสร้างของ D-glucono-1,5-lactam (27) และ D-mannono-1,5-lactam (28)	35
26. สูตรโครงสร้างของ holorines A (29) และ B (30)	35
27. โครมาโตแกรมจากการทำ Diode Array Detector HPLC ที่ค่าการดูดกลืนแสง 210 นาโนเมตรของสารสกัดหยาบ โดย A, B, C, D และ E คือ โครมาโตแกรมของสารสกัดหยาบ CNA003D, CNA031B, CNA031C, CNA0339A และ CNA048C ตามลำดับ	75
28. แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากทะเล	77
29. ลักษณะโคโลนีของ <i>Providencia rustigianii</i> สายพันธุ์ CNA003 บนอาหาร NA	79
30. ลักษณะโคโลนีของ <i>Streptomyces parvulus</i> สายพันธุ์ CNA031 บนอาหาร NA	79
31. ลักษณะโคโลนีของ <i>Streptomyces parvulus</i> สายพันธุ์ CNA039 บนอาหาร NA	80
32. ลักษณะการเจริญของ <i>Streptomyces rochei</i> สายพันธุ์ CNA048 บนอาหาร NA	81
33. โครมาโตแกรมของ TLC ชนิด normal phase (มี mobile phase เป็น 9:1 DCM:MeOH) ของสารสกัดหยาบ CNA039A	82
34. ขั้นตอนการสกัด การแยก และการทำบริสุทธิ์สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งจากสารสกัดหยาบ CNA039A	83
35. โครมาโตแกรมของ TLC ชนิด normal phase (มี mobile phase เป็น 9:1 DCM:MeOH) ของสารสกัด	85
36. โครมาโตแกรมของ TLC ชนิด normal phase (มี mobile phase เป็น 9:1 DCM:MeOH) ของการแยกสารสกัด	86
37. โครมาโตแกรมของ TLC ชนิด normal phase ของส่วนสกัดที่ได้จากการแยกสารส่วน F2 (มี mobile phase เป็น 9:1 DCM:MeOH)	88

## รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
38. โครมาโตแกรม HPLC ของการแยกสารจากสารส่วน F2.7 ที่ค่าการดูดกลืนแสง 210 นาโนเมตร	89
39. โครมาโตแกรม HPLC ของการแยกสารจากส่วน F3 ที่ค่าการดูดกลืนแสง 210 นาโนเมตร	90
40. โครมาโตแกรมของ TLC ชนิด normal phase ของส่วนสกัดที่ได้จากการแยกสารส่วน F4 (มี mobile phase เป็น 9:1 DCM:MeOH)	91
41. หน่วยโครงสร้างที่ 1 (1,2,3,4-tetrasubstituted aromatic ring) ของสาร A	93
42. หน่วยโครงสร้างที่ 2 (Phenoxazinone chromophore) ของสาร A	94
43. หน่วยโครงสร้างที่ 3 และ 4 ของสาร A	94
44. หน่วยโครงสร้างที่ 5 และ 6 ของสาร A	95
45. หน่วยโครงสร้างที่ 7 และ 8 ของสาร A	96
46. หน่วยโครงสร้างที่ 9 และ 10 ของสาร A	96
47. หน่วยโครงสร้างที่ 11 และ 12 ของสาร A	97
48. โครงสร้างของสาร A	98
49. ความสัมพันธ์ของโปรตอนกับคาร์บอนจากข้อมูล HMBC ของสาร A	98
50. โครงสร้างของสาร A	103
51. แมสสเปกตรัมของสาร A (ESIMS)	125
52. อินฟราเรดสเปกตรัมของสาร A (thin film)	126
53. โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร A ( $C_6D_6$ , 500 MHz)	127
54. คาร์บอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร A ( $C_6D_6$ )	128
55. gHMBC สเปกตรัมของสาร A ( $C_6D_6$ )	129
56. gHMQC สเปกตรัมของสาร A ( $C_6D_6$ )	130

# บทที่ 1

## บทนำ

### บทนำต้นเรื่อง

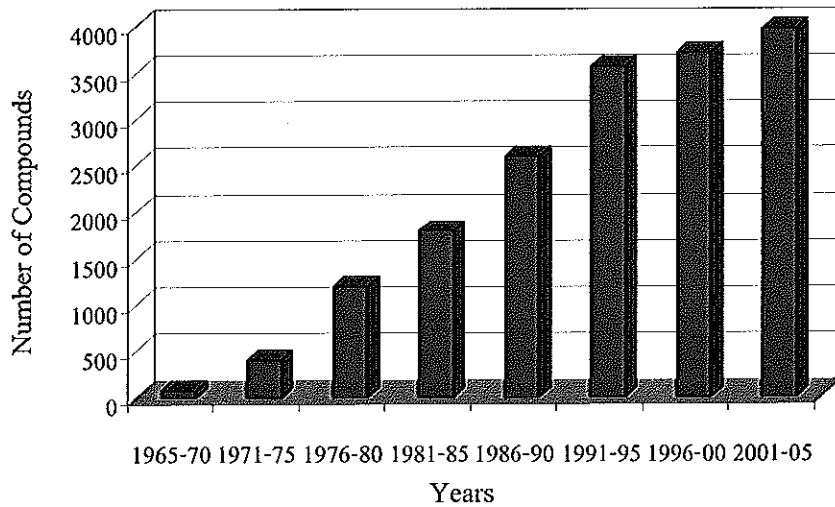
จุลินทรีย์หลายชนิดมีคุณสมบัติในการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compounds) เช่น เชื้อรา (Fungi) สาหร่าย (Algae) และแบคทีเรีย (Bacteria) โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มของแอกติโนมัยซีต (Actinomycetes) ในปี ค.ศ.1917 Greig Smith ได้รายงานไว้ว่า เชื้อแอกติโนมัยซีตที่แยกได้จากดินสามารถสร้างสารหลายชนิดที่มีผลต่อต้านเชื้อแบคทีเรียได้ ซึ่งจากรายงานดังกล่าว นับเป็นการเริ่มต้นการค้นคว้าเกี่ยวกับสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์ และทำให้แอกติโนมัยซีตเป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่มีความสำคัญและได้รับความสนใจจากนักวิจัยทางด้านสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเป็นอย่างมาก โดยประมาณกันว่าสารปฏิชีวนะที่ได้จากจุลินทรีย์ที่มีการค้นพบจนกระทั่งถึงปี 2002 มีมากกว่า 22,000 ชนิด และสารที่ผลิตโดยแอกติโนมัยซีตในกลุ่มของ *Streptomyces* มีสัดส่วนสูงถึงร้อยละ 34 และในกลุ่มแอกติโนมัยซีตที่ไม่ใช่ *Streptomyces* อีกร้อยละ 11 แบคทีเรียทั่วไปร้อยละ 17 และราที่สร้างเส้นใยร้อยละ 38 (Bérdy, 2005) นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิจัยหลายฉบับที่ศึกษาแอกติโนมัยซีตในด้านต่างๆ เช่น การก่อโรคในคนและสัตว์ การศึกษาโครงสร้างและองค์ประกอบต่างๆ ของเซลล์ และการจัดจำแนกประเภทของเชื้อแอกติโนมัยซีต (Glazer, 1994) สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากแอกติโนมัยซีตนั้นจัดเป็น ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (natural products) ที่ได้จากกระบวนการทางชีวเคมีที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ (metabolism) หรือที่รู้จักกันดีว่าเป็นสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites)

ทั้งนี้การผลิตสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิจะขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ อาหาร และสภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ โดยสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิเหล่านี้มีคุณสมบัติทางชีวภาพและทางเคมีที่แตกต่างกัน เช่น สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งเซลล์ที่ผิดปกติ ในกลุ่มของโพลีคีไทด์ (polyketides) ในชื่อเตตราไซคลิน (tetracyclin) และสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ (antimicrobial) ในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ (aminoglycosides) ในชื่อของ สเตรปโตมัยซิน (Streptomycin) เป็นต้น นอกจากนี้แอกติโนมัยซีตยังเป็นแหล่งผลิตเอ็นไซม์หลายชนิดที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรม เช่น โกลดิเนส โปรติเอส อะไมเลส และไลเปส เป็นต้น (Imada, 2005) แอกติโนมัยซีตบางชนิดยังสามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์

อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้จะสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลายชนิดแต่เป็นที่น่าสังเกตว่าอัตราการค้นพบสารชนิดใหม่เริ่มลดลง อีกทั้งยังมีการพัฒนาของจุลินทรีย์ก่อโรคที่มีความต้านทานสารปฏิชีวนะ เช่น เชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อยา methicilin (Noskin *et al.*, 2005) หรือการอุบัติของโรคใหม่ เช่น AIDS, Hanta virus, Ebola virus, *Cryptosporidium* (Dehghan *et al.*, 1997) และความเป็นพิษจากยาบางชนิดที่ใช้ในปัจจุบัน เช่น ยาฆ่าเชื้อรา Amphotericin B ที่ทำให้การไหลของเลือดที่ไต (nephrotoxicity) ลดลง คลื่นไส้ อาเจียน และเบื่ออาหาร (Harbarth *et al.*, 2001) และยาที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง ซึ่งเป็นสาเหตุหลักของการเสียชีวิตของประชากรโลก เช่น Paclitaxel (Taxol), Bleomycin และ Mitomycin C ซึ่งทำให้เกิดอาการอ่อนเพลีย การผลิตเซลล์เม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวลดลง ผม่วง คลื่นไส้ อาเจียน และท้องร่วง (Galm *et al.*, 2005) จึงมีความจำเป็นที่ต้องมีการค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ ซึ่งในระยะ 15 ปีที่ผ่านมา การค้นคว้าหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่จะมุ่งไปที่สิ่งมีชีวิตในทะเลมากยิ่งขึ้นเป็นลำดับ

เนื่องจากทะเลเป็นระบบนิเวศน์ขนาดใหญ่ มีพื้นที่ประมาณร้อยละ 70 ของพื้นผิวโลก (Haefer, 2003) และมีความหลากหลายทางชีวภาพสูงมากแห่งหนึ่ง หรืออาจเทียบได้กับป่าดงดิบเขตร้อนชื้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปัจจัยทางกายภาพ เช่น อุณหภูมิ ความดัน แสงสว่าง ความเค็ม ความขุ่น พีเอช และชนิดและปริมาณของสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ที่อยู่ในน้ำทะเล (Bull *et al.*, 2005) ซึ่งมีอิทธิพลต่อการปรับตัวและการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตในทะเลที่ต้องมีวิวัฒนาการทางสรีระและทางชีวเคมีเพื่อปรับตัวให้สามารถอยู่รอดได้ในระบบนิเวศน์ที่มีความหลากหลายดังกล่าว ทำให้สิ่งมีชีวิตเหล่านี้มีการสังเคราะห์หรือผลิตสารเมตาบอไลต์ชนิดใหม่ๆ ที่ต่างจากที่เคยมีรายงานไว้จากสิ่งมีชีวิตที่อยู่บนบก (Fenical *et al.*, 2003)

จากรายงานการวิจัยเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่แยกได้จากสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในทะเลที่เพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ ตั้งแต่ปี 1965-2005 ดังแสดงในภาพที่ 1 (Blunt *et al.*, 2007)

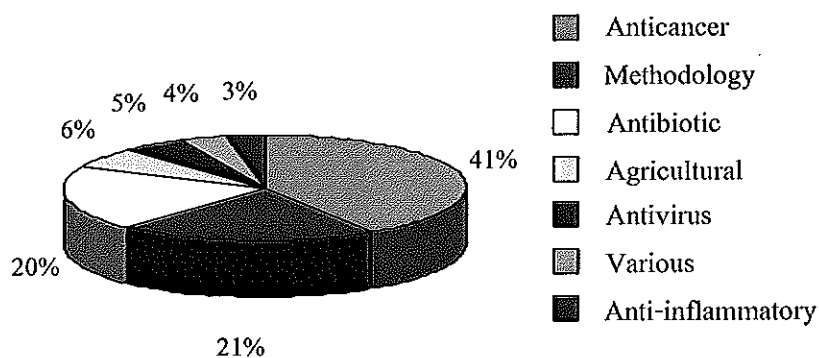


ภาพที่ 1 จำนวนสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่แยกได้จากสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในทะเล จำแนกตามปี 1965-2005

Figure 1. Number of marine natural products during 1965-2005.

ที่มา : คัดแปลงจาก Blunt (2007)

โดยพบว่าในปี 2003-2005 มีการรายงานการค้นพบผลิตภัณฑ์ธรรมชาติชนิดใหม่ที่มีสูตรโครงสร้างที่หลากหลายถึง 2,184 ชนิด และหากจัดจำแนกผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่แยกได้จากทะเลตามการออกฤทธิ์ทางชีวภาพนั้นสามารถ พบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งสูงถึงร้อยละ 41 ดังแสดงในภาพที่ 2 (Blunt *et al.* 2005; Blunt *et al.* 2006 และ Blunt *et al.* 2007)



ภาพที่ 2 ชนิดของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่แยกได้จากทะเลจำแนกตามตามฤทธิ์ทางชีวภาพ

Figure 2. Types of marine natural products classified by biological activities.

ที่มา : Blunt (2006)

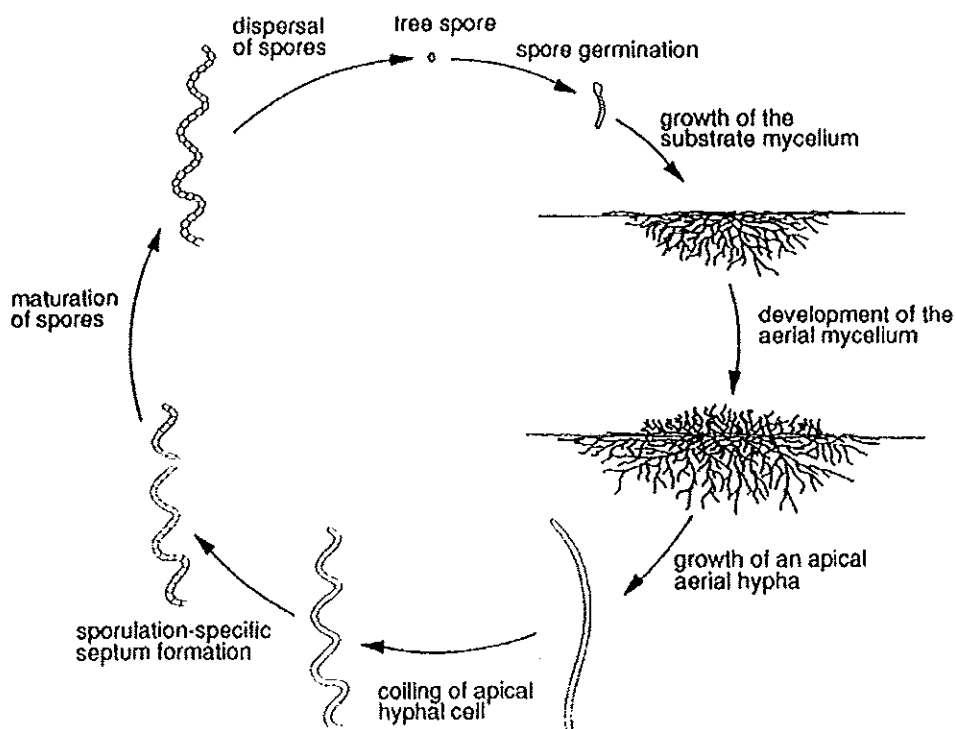
ดังนั้นในการทำวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งหวังที่จะทำการแยกและทำบริสุทธิ์สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งจากสารสกัดหยาบของแอคติโนไมด์ที่แยกได้จากทะเล ที่ผ่านการคัดกรองแล้วว่าสามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ และทำการศึกษาสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง โดยเชื่อว่าผลการวิจัยนี้จะนำไปสู่การค้นพบสารตัวใหม่ที่มีประโยชน์ที่สามารถนำไปสู่การพัฒนาเป็นยาต้านมะเร็งตัวใหม่ที่มีประสิทธิภาพได้ต่อไป

## บทตรวจเอกสาร

### แอกติโนมัยซีท (Actinomycetes)

#### 1. ลักษณะทั่วไปของแอกติโนมัยซีท

แอกติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่สร้างเส้นใยที่มีผนังกัน เป็นสายยาวคล้ายกับรา แต่มีขนาดเล็กกว่า คือ มีขนาดประมาณ 0.5-1.5 ไมโครเมตร ( $\mu\text{m}$ ) การสร้างเส้นใยของแอกติโนมัยซีท สามารถสร้างได้ทั้งเส้นใยใต้พื้นผิวอาหาร (substrate mycelium) และเส้นใยเหนือพื้นผิวอาหาร (aerial mycelium) โดยวัฏจักรชีวิตของแอกติโนมัยซีทจะเริ่มจากเส้นใยใต้พื้นผิวอาหาร เพื่อนำสารอาหารไปใช้ในการเจริญเติบโต ในขณะที่เส้นใยเหนือพื้นผิวอาหารจะเกิดขึ้นภายหลังเพื่อทำหน้าที่ในการสืบพันธุ์ ซึ่งพบได้ในสภาวะพิเศษ เช่น เมื่อเกิดการขาดน้ำ ขาดอาหาร หรือมีการสะสมของสารยับยั้งจุลินทรีย์ โดยวัฏจักรชีวิตของแอกติโนมัยซีทแสดงดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 วัฏจักรชีวิตของแอกติโนมัยซีท

Figure 3. The life cycle of actinomycetes.

ที่มา : Chater และคณะ (1997)

แอกติโนมัยสีทได้รับการจัดให้อยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียเนื่องจากไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส และไมโทคอนเดรีย (Goodfellow and Brard, 1980) และจัดว่าเป็นแบคทีเรียที่แท้จริง เพราะมีลักษณะที่สำคัญ คือ มีผนังเซลล์ที่ประกอบด้วยเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) กรดมิวรามิก (muramic acid) กรดไดอะมิโนไพมีริก (diaminopimelic acid) แต่ไม่มีไคติน (chitin) และเซลลูโลส (cellulose) เป็นองค์ประกอบ

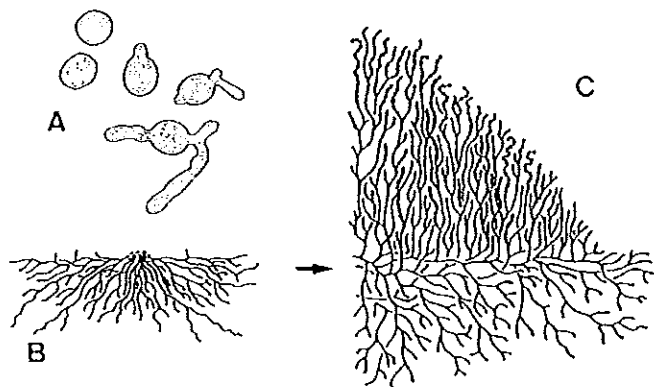
ลักษณะที่สำคัญอีกประการหนึ่งของแอกติโนมัยสีท คือ ปริมาณเบสกวานีน (guanine) และไซโตซีน (cytosine) ที่พบในเซลล์สูงกว่าร้อยละ 55 (Glazer and Nikaido, 1994) แอกติโนมัยสีท ส่วนใหญ่ต้องการออกซิเจนสำหรับการเจริญ ยกเว้นแอกติโนมัยสีทบางชนิดที่ไม่ต้องการหรือต้องการออกซิเจนเพียงเล็กน้อยสำหรับการเจริญ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอกติโนมัยสีทจะค่อนข้างหลากหลาย โดยมีตั้งแต่ลักษณะเซลล์ที่เป็นทรงกลม ท่อนและเป็นเส้นสายคล้ายเชื้อราที่มีการแตกแขนง การสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของแอกติโนมัยสีท โดยทั่วไปพบได้ 2 แบบ คือ มีการแตกหักของเส้นใยที่มีอายุมาก (mycelium fragmentation) และการสร้างสปอร์ (sporulation) โดยสปอร์มีทั้งแบบที่ไม่มีถุงหุ้ม (conidia) เป็นเม็ดเดี่ยวๆ และเรียงต่อกันเป็นสาย และที่สร้างอยู่ในอับสปอร์ (sporangium) แอกติโนมัยสีทบางสกุลสามารถสร้างสปอร์ที่เคลื่อนที่ได้ (Glazer and Nikaido, 1994)

ลักษณะการเจริญของเชื้อแอกติโนมัยสีทบนอาหารแข็งและอาหารเหลวจะมีลักษณะที่ต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ กล่าวคือในอาหารเหลวเชื้อส่วนใหญ่จะเจริญจับกันเป็นกลุ่มของเส้นใยที่เรียกว่า pellets แต่สำหรับเชื้อบางชนิด เช่น *Norcadia corallina* เมื่อเจริญในอาหารเหลวที่มีการเขย่าให้อากาศ เชื้อจะมีลักษณะเป็นรูปแท่ง มีการแบ่งเซลล์แบบ binary fission และการแตกหักของเส้นใยที่มีอายุมาก ส่วนลักษณะการเจริญของแอกติโนมัยสีทบนอาหารแข็ง โดยทั่วไปจะมีลักษณะของโคโลนีที่แตกต่างกันไปตามชนิดของเชื้อแอกติโนมัยสีท เชื้อแอกติโนมัยสีทส่วนใหญ่จะพบได้ทั่วไปในดิน แต่มีรายงานจำนวนหนึ่งที่พบว่า แอกติโนมัยสีทสามารถอาศัยอยู่ได้ในทะเล เช่นเดียวกัน (Jensen *et al.*, 1991; Takizawa *et al.*, 1993; Mincer *et al.*, 2002; Magarvey *et al.*, 2004)

## 2. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอกติโนมัยสีท

### 2.1 การสร้างโคโลนี

โคโลนีของแอกติโนมัยสีทเกิดจากการรวมกันของเส้นใย เป็นกลุ่มเส้นใยที่หนาแน่น การสร้างโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (ภาพที่ 4) เริ่มจากการงอกของสปอร์ ซึ่งอาจเป็นสปอร์เดี่ยว อับสปอร์ ส่วนของเส้นใยที่ได้จากการหักท่อน หรือจากชิ้นส่วนบางส่วนของโคโลนีเดิมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (ภาพที่ 4 A) จากนั้นสปอร์หรือส่วนของเส้นใยที่หักท่อนของแอกติโนมัยสีทจะมีการพัฒนาเป็นเส้นใยใต้พื้นผิวอาหารก่อน (ภาพที่ 4 B) และจะมีการเจริญของเส้นใยเหนือพื้นผิวอาหารเกิดขึ้น (ภาพที่ 4 C) ซึ่งเป็นส่วนที่สัมผัสกับอากาศโดยตรง จากนั้นจะมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะของโคโลนี เช่น การสร้างสปอร์ ซึ่งเกิดจากการแบ่งตัวของเส้นใยเหนือพื้นผิวอาหาร โดยเริ่มจากการสร้างผนังกันเพื่อความคงตัว และสร้างเป็นเส้นใยแข็ง (Kalakoutskii and Agre, 1976 อ้างโดย Vobis, 1997)



ภาพที่ 4 ขั้นตอนการสร้างโคโลนีของแอกติโนมัยสีท โดย

- A ส่วนของสปอร์เดี่ยว อับสปอร์ หรือชิ้นส่วนของเส้นใยที่หักของแอกติโนมัยสีท
- B การเจริญของเส้นใยใต้ผิวอาหารของแอกติโนมัยสีท
- C การเจริญของเส้นใยเหนือผิวอาหารของแอกติโนมัยสีท

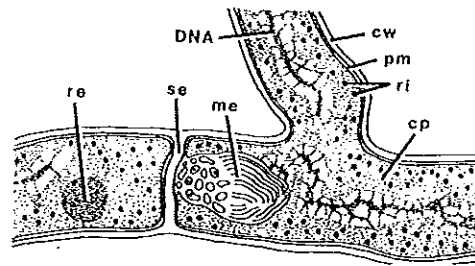
Figure 4. Development of mycelium in actinomycetes.

- A germination of spores
- B formation of substrate mycelium
- C formation of aerial mycelium

ที่มา : Vobis (1997)

## 2.2 โครงสร้างภายในเส้นใย

เส้นใยได้พื้นผิวอาหารของแอสโคไมซีตเป็นเส้นใยเดี่ยวที่มีความหนาประมาณ 0.4-1.2 ไมโครเมตร ( $\mu\text{m}$ ) มีผนังกัน (septum) มีการเจริญของเส้นใยออกทางด้านปลายและสามารถแตกแขนงได้ โครงสร้างหลักของเส้นใยของแอสโคไมซีตที่แสดงว่าเป็นโพรคาริโอต (prokaryote) คือในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ประกอบไปด้วยสายดีเอ็นเอ (DNA) ไรโบโซม (ribosome) และสารต่างๆ ที่รวมอยู่ด้วยกัน เช่น polyphosphate, lipids หรือ polysaccharides เยื่อหุ้มเซลล์ที่ติดกับไซโตพลาสซึมอาจเกิดเป็นมีโซโซม (mesosome) ซึ่งมักต่อกับโครงสร้างของผนังเซลล์ เส้นใยได้พื้นผิวอาหารของแอสโคไมซีตเป็นเส้นใยที่มีผนังเซลล์ชั้นเดียวที่มีความหนาประมาณ 10-20 นาโนเมตร (nm) ดังแสดงในภาพที่ 5 ส่วนเส้นใยเหนือพื้นผิวอาหารมีลักษณะคล้ายเส้นใยที่มีปลอกหุ้ม (fibrous sheath) ซึ่งเป็นส่วนที่พบว่ามีโครงสร้างสปอร์เกิดขึ้น (Locci and Sharples, 1984 อ้างโดย Vobis, 1997)



ภาพที่ 5 ลักษณะของเส้นใยเหนือพื้นผิวอาหารของแอสโคไมซีต

cp	cytoplasm	se	septum
cm	plasmamembrane	ri	ribosome
cw	cell wall	DNA	nucleoid region
me	mesosome	re	reverse material

Figure 5. Cytological organization of an aerial hypha.

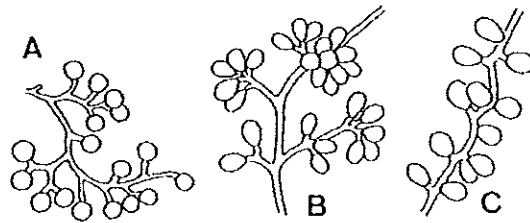
cp	cytoplasm	se	septum
cm	plasmamembrane	ri	ribosome
cw	cell wall	DNA	nucleoid region
me	mesosome	re	reverse material

ที่มา : Vobis (1997)

### 2.3 ชนิดของสปอร์

การสร้างสปอร์ของแอกติโนมัยซีท สามารถแบ่งได้เป็น 3 ประเภทตามลักษณะโครงสร้างภายนอกของสปอร์ คือ สปอร์เดี่ยว สปอร์เป็นสายยาว และสปอร์ที่อยู่ในอับสปอร์

2.3.1 สปอร์เดี่ยว (single spore production) หรือ monosporous การสร้างสปอร์เริ่มจากส่วนปลายของเส้นใยเหนือพื้นผิวอาหารมีการพองตัวเกิดขึ้น จากนั้นมีการสร้างผนังกัน และสร้างเป็นผนังสปอร์ เช่น สปอร์ของ *Micromonospora* *Thermomonospora* และ *Saccharomonospora* ดังแสดงในภาพที่ 6 (Cross, 1970; Kawamoto, 1989; McCarthy, 1989 อ้าง โดย Vobis, 1997)



ภาพที่ 6 การสร้างสปอร์เดี่ยวของแอกติโนมัยซีทในสกุลต่างๆ คือ

- A สปอร์เดี่ยวที่พบใน *Micromonospora*
- B สปอร์เดี่ยวที่พบใน *Thermomonospora*
- C สปอร์เดี่ยวที่พบใน *Saccharomonospora*

Figure 6. Single spore production of actinomycetes.

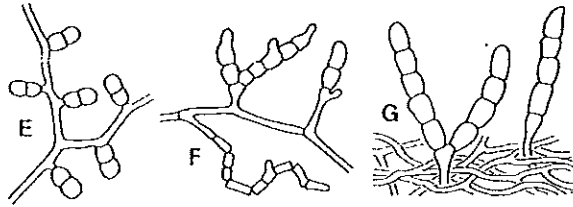
- A *Micromonospora*
- B *Thermomonospora*
- C *Saccharomonospora*

ที่มา : Vobis (1997)

2.3.2 สปอร์ที่มีลักษณะเป็นสาย (Spores formed in chains) ในแอกติโนมัยซีทมีการสร้างสปอร์แบบนี้เป็นส่วนมาก และเมื่อพิจารณาจากความยาวหรือจำนวนของสปอร์สามารถแบ่งลักษณะของสายสปอร์ได้เป็น di- หรือ bisporous, oligosporous และ polysporous ตามลำดับ

สาย disporous ประกอบด้วย สปอร์คู่ต่อกันตามยาว การสร้างสปอร์เริ่มจากเส้นใยเหนือพื้นผิวอาหารแตกหน่อออกมาทางด้านข้างเป็นกิ่งสั้นๆ จากนั้นจะมีการพองออกของเส้นใยและมีการสร้างผนังกันตรงกลาง เช่นสปอร์ของแอกติโนมัยซีทสกุล *Microbispora*, *Actinobispora*,

*Actinomadura echinospora* และ *Actinomadura rugatobispora* ดังแสดงในภาพที่ 7 (E) (Nonomura, 1989; Kroppenstedt *et al.*, 1990 and Miyadoh *et al.*, 1990 อ้างโดย Vobis, 1997)



ภาพที่ 7 การสร้างสปอร์แบบ disporous โดย

- E การสร้างสปอร์แบบ disporous ของ *Microbispora*
- F การสร้างสปอร์แบบ oligosporous ของ *Norcadia brevicatena*
- G การสร้างสปอร์แบบ oligosporous ของ *Catellatospora*

Figure 7. Dispore and oligosporous production of actinomycetes.

- E Disporous production of *Microbispora*
- F Oligosporous production of *Norcadia brevicatena*
- G Oligosporous production of *Catellatospora*

ที่มา : Vobis (1997)

แอกติโนมัยซีทที่สร้างสปอร์แบบ oligosporous เป็นการพัฒนาของสปอร์มาจากสปอร์สายสั้นๆ ส่วนมากพบ 7-10 สปอร์ต่อสาย จำนวนน้อยที่สุดที่พบได้ คือ 3 สปอร์ และบางสปีชีส์จะมีสปอร์มากถึง 30 สปอร์ เช่น *Norcadia brevicatena* มีการสร้างสปอร์สายสั้นๆ 2-7 สปอร์ และในสกุล *Catellatospora* ซึ่งสายสปอร์มีลักษณะตรงจนถึงโค้งงอ มีสปอร์ 5-10 สปอร์ ดังแสดงในภาพที่ 7 (Korn-Wendisch *et al.*, 1989; Asano and Kawamoto, 1986 อ้างโดย Vobis, 1997)

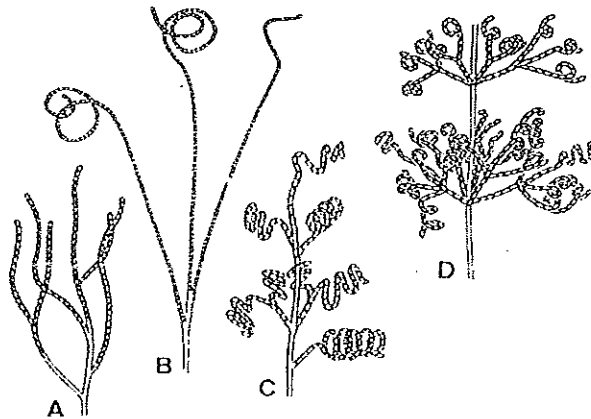
แอกติโนมัยซีทที่สร้างสปอร์แบบ polysporous เช่น แอกติโนมัยซีทในสกุล *Nocardiopsis* ซึ่งมีการสร้างสปอร์บนเส้นใยเหนือพื้นผิวอาหาร โดยสายสปอร์อาจเป็นสายตรง งอ หรือหยัก (Meyer, 1989) และ *Streptomyces* ซึ่งมีการสร้างสปอร์เป็นสายยาว โดยมีสปอร์มาต่อกันมากกว่า 50 สปอร์ (Korn-Wendisch and Kutzner, 1992 อ้างโดย Vobis, 1997) การสร้างสปอร์บนเส้นใยเหนือพื้นผิวอาหารของ *Streptomyces* สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ลักษณะ ดังแสดงในภาพที่ 8 คือ

1. Rectiflexibiles คือ ลักษณะของสายสปอร์ที่ตรงหรือโค้งงอ
2. Retinaculiaperti คือ ลักษณะของสายสปอร์ที่คล้ายตะขอ เป็นวงเปิด หรือเป็นเกลียวซ้อน

กัน 1-3 ชั้น

3. Spira คือ ลักษณะของสายสปอร์ที่เป็นเกลียว แบ่งได้ 2 แบบ คือ เป็นวงปิดเป็นเกลียว ติดกันแน่นและเป็นเกลียวแบบวงเปิด เกลียวยาวยืดอก ไม่ติดกันแน่น

4. Verticillati คือ ลักษณะของสายสปอร์ที่ขดคล้ายกันหอย และมีการแตกแขนงออกเป็นช่อ



ภาพที่ 8 การสร้างสปอร์แบบเป็นสายยาวของ *Streptomyces* คือ

- |                    |                |
|--------------------|----------------|
| A Rectiflexibiles  | C Spira        |
| B Retinaculiaperti | D Verticillati |

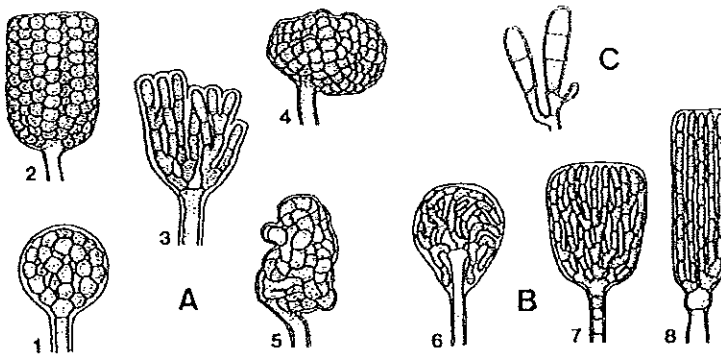
Figure 8. Spore production in long chain of *Streptomyces*.

- |                         |                     |
|-------------------------|---------------------|
| A Rectiflexibiles type  | C Spira type        |
| B Retinaculiaperti type | D Verticillati type |

ที่มา : Vobis (1997)

2.3.3 การสร้างสปอร์ในอับสปอร์ (Spore formed within sporangia) แบ่งได้ 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่สร้างอับสปอร์บนเส้นใยได้พื้นผิวอาหารและกลุ่มที่สร้างอับสปอร์บนเส้นใยเหนือพื้นผิวอาหาร

กลุ่มที่สร้างอับสปอร์บนเส้นใยได้พื้นผิวอาหาร ประกอบด้วยสกุล *Actinoplans* มีสปอร์ต่อกันเป็นสายและแตกแขนงซดกันเป็นก้อนอยู่ในอับสปอร์ (Couch, 1963; Vobis, 1987 อ้างโดย Vobis, 1997) สกุล *Pilimelia* มีอับสปอร์ที่สร้างขึ้นบนผิวของอาหาร มีรูปทรงกระบอก ทรงกลม มีขนาดประมาณ 10-15 ไมโครเมตร สปอร์เป็นรูปแท่ง มีการเรียงตัวกันเป็นแถวขนานกันหรือวนไปมาไม่เป็นระเบียบ (Vobis, 1984 อ้างโดย Vobis, 1997) และสกุล *Dactylosporangium* โดยมีสปอร์ประมาณ 2-5 สปอร์อยู่ในอับสปอร์ที่มีรูปร่างคล้ายนิ้ว (Vobis and Kothe, 1985 อ้างโดย Vobis, 1997) ดังแสดงในภาพที่ 9



ภาพที่ 9 รูปทรงของสปอร์ที่สร้างอยู่ในอับสปอร์ โดย

A อับสปอร์ของสกุล *Actinoplanes* รวมถึง *Ampullariella*

1. อับสปอร์ทรงกลม      3. อับสปอร์เป็นพู      5. อับสปอร์ที่ไม่เป็นรูปทรง  
2. อับสปอร์ทรงกระบอก      4. อับสปอร์กึ่งทรงกลม

B อับสปอร์ของสกุล *Pilimelia*

6. อับสปอร์ทรงรี      7. อับสปอร์รูปทรงระฆัง      8. อับสปอร์รูปทรงกระบอก

C อับสปอร์รูปทรงกระบอกของสกุล *Dactylosporangium*

Figure 9. Spore production within sporangia.

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

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

B *Pilimelia*

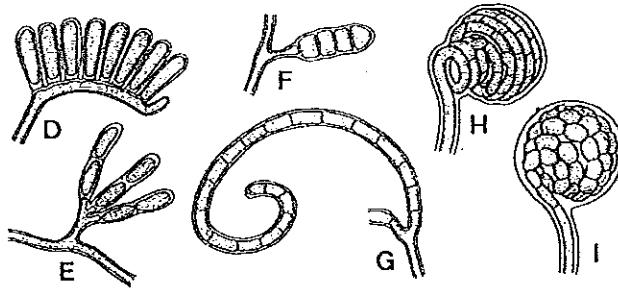
6. ovoid      7. campanulate      8. cylindrical

C *Dactylosporangium*: oligosporous, claviform

ที่มา : Vobis (1997)

กลุ่มที่มีการสร้างอับสปอร์บนเส้นใยเหนือพื้นผิวอาหาร ประกอบด้วยสกุล *Planomonospora* ซึ่งมีอับสปอร์รูปกระบอก ภายในมีเพียง 1 สปอร์ สกุล *Planobispora* มีสปอร์คู่ต่อกันอยู่ในอับสปอร์ (Thiemann and Beretta, 1968; Vobis, 1986 อ้างโดย Vobis, 1997) สกุล *Planotetraspora* มีอับสปอร์ทรงกระบอกยาว ภายในมี 4 สปอร์ ต่อกันเป็น 1 แถว (Runmao *et al.*, 1993) สกุล *Planopolyspora* มีสปอร์จำนวนมากภายในอับสปอร์ เมื่อโตเต็มที่อับสปอร์จะเป็นแผ่นแบนยาวประมาณ 30 ไมโครเมตร (Petrolini *et al.*, 1993) สกุล *Streptosporangium* ส่วนมากมีอับสปอร์เป็นทรงกลม มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 ไมโครเมตร มีการสร้างผนังกันเป็นสปอร์เดี่ยวต่อกัน

เป็นสายยาวขดเป็นวงอยู่ภายในอับสปอร์ (William and Sharples, 1976; Petrolini *et al.*, 1992 อ้างโดย Vobis, 1997) และสกุล *Spirillospora* มีอับสปอร์เป็นทรงกลม หรือมีรูปร่างเหมือนหนอน (vermiform) มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-24 ไมโครเมตร มีสปอร์เรียงตัวเป็นสาย แดกแขนง หรือเป็นวง มีสปอร์เป็นรูปแท่ง และโค้งงอ (Vobis, 1986 อ้างโดย Vobis, 1997) ดังแสดงในภาพที่ 10



ภาพที่ 10 รูปทรงของสปอร์ที่สร้างอยู่ในอับสปอร์ โดย

- D อับสปอร์ของสกุล *Planomonospora* มีสปอร์รูปกระบอก แบบ monosporous
- E อับสปอร์ของสกุล *Planobispora* มีสปอร์รูปทรงกระบอก แบบ disporous
- F อับสปอร์ของสกุล *Planotetraspora* มีสปอร์รูปทรงกระบอก แบบ tetrasporous
- G อับสปอร์ของสกุล *Planopolyspora* มีสปอร์รูปทรงคล้ายท่อ แบบ polysporous
- H อับสปอร์ของสกุล *Streptosporangium* มีสปอร์รูปทรงกลม แบบ polysporous
- I อับสปอร์ของสกุล *Spirillospora* มีสปอร์รูปทรงกลม แบบ polysporous

Figure 10. Spore production within sporangia.

- D *Planomonospora*: monosporous, clavate
- E *Planobispora*: disporous, cylindrical
- F *Planotetraspora*: tetrasporous, cylindrical
- G *Planopolyspora*: polysporous, tubular
- H *Streptosporangium*: polysporous, globose
- I *Spirillospora*: polysporous, spherical

ที่มา : Vobis (1997)

### 3. การจัดจำแนกแอกติโนมัยสีท (Classification of actinomycetes)

การจัดจำแนกแอกติโนมัยสีท ส่วนมากจะใช้การสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological characteristic) และใช้การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีภายในเซลล์ (chemotaxonomy) สำหรับการบ่งบอกถึงระดับสกุล (Labeda, 1987) และมีขั้นตอนโดยทั่วไปดังนี้

1. สังเกตลักษณะโดยรวมของโคโลนี
2. ตรวจสอบลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์
3. ตรวจสอบวิเคราะห์ทางเคมี ประกอบด้วย
  - 3.1 องค์ประกอบของผนังเซลล์ (cell wall type)
  - 3.2 น้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ (whole cell sugar pattern)
  - 3.3 รูปแบบของฟอสโฟลิปิด (phospholipid pattern)
  - 3.4 ประเภทของเมนาควิโนน (menaquinone type)

การสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยตรวจสอบการเจริญเติบโตบนอาหารชนิดต่างๆ การตรวจสอบลักษณะโดยรวมของโคโลนี เช่น อัตราการเจริญ สีของโคโลนี การมีหรือไม่มีเส้นใยเหนือผิวอาหาร สีของเส้นใย และสปอร์ รวมทั้งการสร้างสีที่แพร่กระจายไปในอาหาร

การตรวจสอบลักษณะการสร้างสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จำเป็นสำหรับการบ่งบอกถึงความแตกต่างระหว่าง Genus *Micromonospora* และ *Actinoplanes* บางสายพันธุ์อาจไม่สร้างสปอร์บนจานอาหารธรรมดา อาจต้องเลี้ยงบน minimal medium เช่น soil extract agar หรือ crude agar 2% ในน้ำประปาเพื่อกระตุ้นให้มีการสร้างสปอร์ สายพันธุ์ที่สร้างสปอร์บนเส้นใยเหนือพื้นผิวอาหารสามารถตรวจสอบได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน จะช่วยให้เห็นรายละเอียดได้ชัดเจนขึ้น เช่น เห็นลักษณะผิวของสปอร์ ก้านชูสปอร์ การเรียงตัวของสปอร์ และการมีปลอก (sheath) หรือถุงหุ้มสปอร์ (sporangium)

เมื่อพิจารณาองค์ประกอบทางเคมีของแอกติโนมัยสีท สามารถจำแนกชนิดของแอกติโนมัยสีทได้โดยดูจากกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ (major wall amino acid) ชนิดของน้ำตาลในเซลล์ทั้งหมด (whole cell hydrolysate) และชนิดของฟอสโฟลิปิดของแอกติโนมัยสีท ดังแสดงในตารางที่ 1, 2, 3 และการจัดจำแนกแอกติโนมัยสีทแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 1 องค์ประกอบของผนังเซลล์ของแอกติโนมัยซีท

Table 1. Major constituents of cell wall types of actinomycetes.

Major constituent	Chemotype							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
L-Diaminopimelic acid	+							
<i>meso</i> - Diaminopimelic acid		+	+	+				
Diaminopimelic acid							+	
Aspartic acid						v		
Glycine	+	+					+	
Lysine					+		v	
Ornithin					+			
Arabinose				+				
Galactose				+		v		

หมายเหตุ v คือ variable amount

ที่มา : Lechevalier และ Lechevalier (1970)

ตารางที่ 2 แบบแผนน้ำตาลของแอกติโนมัยซีท

Table 2. Whole cell sugar patterns of actinomycetes.

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

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

ที่มา : Lechevalier และ Lechevalier (1970)

ตารางที่ 3 ชนิดของฟอสโฟลิปิดของแอคติโนมัยซีท

Table 3. Actinomycete phospholipid types.

Phospholipid type	Diadnostic phospholipids
I	No nitrogenous phospholipids
II	Phosphatidyl ethanolamine
III	Phosphatidyl choline
IV	GluNu (unknown glucosamine-containing phospholipid)
V	GluNu and phosphatidyl glycerol

ที่มา : Lechevalier และคณะ (1977)

ตารางที่ 4 การจัดจำแนกกลุ่มของแอกติโนไมซีท ใน Class Actinobacteria

Table 4. Classification of actinomycetes in Class Actinobacteria.

Class	Order	Families	Genera	
Actinobacteria	Acidimicrobiales		<i>Acidimicrobium</i>	
	Rubrobacterales		<i>Rubrobacter</i>	
	Coriobacterales			
	Sphaerobacterales		<i>Sphaerobacter</i>	
	Actinomycetales	Actinomycetaceae		
		Micrococcaceae		
		Bogoriellaceae		<i>Bogoriella</i>
		Rarobacteraceae		<i>Rarobacter</i>
		Sanguibacteraceae		<i>Sanguibacter</i>
		Brevibacteriaceae		<i>Brevibacterium</i>
		Cellulomonadaceae		<i>Cellulomonas</i>
				<i>Oerskovia</i>
		Dermabacteraceae		<i>Dermabacter</i>
				<i>Brachybacterium</i>
		Dermatophilaceae		<i>Dermatophilus</i>
		Dermacoccaceae		
		Intrasporangiaceae		
		Jonesiaceae		<i>Jonesia</i>
		Microbacteriaceae		
		Beutenbergiaceae		<i>Beutenbergia</i>
Promicromonosporaceae		<i>Promicromonospora</i>		
Corynebacteriaceae		<i>Corynebacterium</i>		
Dietziaceae		<i>Dietzia</i>		

ที่มา : Stackbrandt และคณะ (1997)

## ตารางที่ 4 (ต่อ)

Table 4. (Cont.)

Class	Order	Families	Genera
Actinobacteria	Actinomycetales	Gordoniaceae	<i>Gordonia</i>
			<i>Skermania</i>
		Nocardiaceae	<i>Nocardia</i>
			<i>Rhodococcus</i>
		Tsukamurellaceae	<i>Tsukamurella</i>
		Williamsiaceae	<i>Williamsia</i>
		Micromonosporaceae	
		Propionibacteriaceae	
		Nocardioidaceae	
		Pseudonocardiaceae	
		Actinosynnemataceae	
		Streptomycetaceae	
		Streptosporangiaceae	
		Nocardiopsaceae	<i>Nocardiopsis</i>
			<i>Thermobifida</i>
		Thermomonosporaceae	
		Frankiaceae	<i>Frankia</i>
		Geodermatophilaceae	
		Microsphaeraceae	
		Sporichthyaceae	<i>Sporichthya</i>
Acidothermaceae	<i>Acidothermus</i>		
Kineosporiaceae			
Glycomycetaceae	<i>Glycomyces</i>		

ที่มา : Stackbrandt และคณะ (1997)

การจำแนกประเภทของแอกติโนมัยซีทโดยอาศัยแนวทางที่ระบุใน Bergey's Manual of Systematic Bacteriology เล่ม 4 (William, 1989) สามารถจำแนกประเภทของแอกติโนมัยซีทโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและองค์ประกอบทางเคมีของเซลล์เป็น 8 กลุ่มได้แก่ Nocardioforms, Multilocular sporangia, Actinoplanetes, Streptomycetes, Maduromycetes, Thermomonospora, Thermoactinomycetes และกลุ่มที่ไม่สามารถจัดอยู่ในกลุ่มต่างๆ ข้างต้นได้

### 1. Nocardioforms

Nocardioforms เป็นกลุ่มที่เส้นใยมีการแตกหักเป็นแท่งหรือกลม บางชนิดสามารถสร้างโคนิเดียได้ แอกติโนมัยซีทกลุ่มนี้ทุกสกุลเป็นพวกที่ต้องการอากาศในการเจริญ ยกเว้น *Oerskoviae* ซึ่งเป็นพวกที่ต้องการอากาศเล็กน้อยในการเจริญ เชื้อในกลุ่มนี้มีผนังเซลล์เป็นแบบ I (L – DAP และ glycine) ในสกุล *Nocardia* และ *Rhodococcus* ที่ผนังเซลล์จะมี mycolic acid และมีน้ำตาลในเซลล์เป็น type A (arabinose และ galactose) สามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้ดังนี้

- 1.1 แอกติโนมัยซีทที่พบ mycolic acid
- 1.2 *Pseudonocardia* และสกุลใกล้เคียง
- 1.3 *Nocardioides* และ *Terrabacter*
- 1.4 *Promicromonospora* และสกุลใกล้เคียง

### 2. Actinomycetes with multilocular sporangium

เชื้อในกลุ่มนี้ใช้ลักษณะของการสร้างอับสปอร์ขนาดใหญ่ (multilocular sporangium) เป็นหลักในการจำแนกประเภทแยกออกจากเชื้อแอกติโนมัยซีทกลุ่มอื่นๆ แอกติโนมัยซีทในกลุ่มนี้มีทั้งหมด 3 สกุล ดังนี้ *Dermatophilus*, *Geodermatophilus* และ *Frankia* โดยมีลักษณะแตกต่างกันคือ เชื้อสกุล *Geodermatophilus* ซึ่งมีเส้นสาวย่างๆ ที่ยังไม่พัฒนามากนัก และสกุล *Dermatophilus* เส้นสาวยจะมีการพัฒนามากขึ้น โดยทั้ง 2 สกุลดังกล่าวมีการสร้างอับสปอร์ที่มีสปอร์ที่เคลื่อนที่ได้ และสกุล *Frankia* มีการสร้างอับสปอร์ที่มีสปอร์ที่เคลื่อนที่ไม่ได้ โดยทั้ง 3 สกุลจะไม่พบการสร้างเส้นใยเหนือพื้นผิวอาหาร

### 3. Actinoplanetes

แอกติโนมัยซีทในกลุ่ม Actinoplanetes มี 5 สกุล ดังนี้ *Actinoplanes*, *Ampullariella*, *Pilimelia*, *Dactylosporangium* และ *Micromonospora* เชื้อในกลุ่มนี้ส่วนมากอยู่ในน้ำ เพราะเป็นกลุ่มที่มีสปอร์เคลื่อนที่ได้ในน้ำในช่วงหนึ่งของวงจรชีวิตยกเว้น *Micromonospora* ลักษณะสำคัญของเชื้อในกลุ่มนี้คือ เจริญโดยไม่มีการแตกหักของเส้นใย มีการแตกกิ่งก้านแล้วสร้างสปอร์อยู่บนเส้นใยที่มีผนังกัน เชื้อในกลุ่มนี้มีผนังเซลล์แบบ III (meso-DAP) และมีน้ำตาลในเซลล์เป็น type D (xylose และ arabinose)

*Micromonospora* สร้างสปอร์ที่ไม่เคลื่อนที่ (non-motile spore) เป็นสปอร์ที่เกิดขึ้นเดี่ยวๆ ไม่มีก้านชูหรือมีเพียงก้านชูสายสั้นๆ มักพบรวมเป็นกลุ่ม มีลักษณะกลม รูปไข่หรือวงรี ผนังหนา บางครั้งพบตุ่มหรือหนามที่ผนังสปอร์ พวกที่สร้างสปอร์ที่เคลื่อนที่ได้ (motile spore) ใน sporangia หรือ vesicles ซึ่งมีการพัฒนาให้ไปอยู่ที่ส่วนปลายของ sporangiophore มีทั้งขนาดสั้นและยาว สปอร์มักถูกสร้างอยู่ใน sporangium ที่ถูกปกคลุมไว้ด้วยกึ่งก้านที่แตกหัก หรือเป็นเส้นใยที่ตรงหรือขดเป็นเกลียว ส่วนของ multispore sporangia มีหลายรูปร่าง

#### 4. Streptomyces และเชื้อในสกุลที่เกี่ยวข้อง

แอกติโนมัยสีทในกลุ่มนี้มี 4 สกุล ดังนี้ *Streptomyces*, *Streptoverticillium*, *Kineo-sporia* และ *Sporichthya* ลักษณะที่สำคัญของเชื้อในกลุ่มนี้คือมีเส้นใยเป็นแบบ ไม่มีผนังกันเป็นเส้นใยเหนือพื้นผิวอาหาร และเมื่อเจริญเต็มที่จะสร้างสปอร์เป็นลูกโซ่ มีจำนวนสปอร์ตั้งแต่ 3 สปอร์ขึ้นไป ผิวของโคโลนีมีลักษณะขุ่นเมื่อมีอายุมาก ผิวหน้าของโคโลนีมีลักษณะเป็นฝุ่นผง ซึ่งก็คือสปอร์ที่สร้างขึ้นนั่นเอง เชื้อในกลุ่มนี้มีผนังเซลล์เป็นแบบ I (L-DAP)

#### 5. Maduromycetes

แอกติโนมัยสีทในกลุ่มนี้มี 7 สกุล ดังนี้ *Actinomadura*, *Microbispora*, *Spirillospora*, *Microtetraspora*, *Planobispora*, *Planomonospora*, และ *Streptosporangium* ซึ่งเป็นพวกที่ต้องการอากาศในการเจริญ สร้างเส้นใยได้พื้นผิวอาหารที่มีการแตกแขนง และมีเส้นใยเหนือพื้นผิวอาหารซึ่งมีการสร้าง arthrospore ที่มีลักษณะเป็นสายสั้น หรือใน sporangia ที่มี 1 ถึงหลายสปอร์ ผนังเซลล์เป็นแบบ III (meso-DAP) น้ำตาลในเซลล์เป็นแบบ type B คือมีน้ำตาล 3-O-methyl-D-galactose (madurose) อยู่ภายในเซลล์

#### 6. Thermomonospora and Related Genera

แอกติโนมัยสีทในกลุ่มนี้มีทั้งสิ้น 4 สกุล ดังนี้ *Thermomonospora*, *Actinosynema*, *Nocardioosis* และ *Streptoalloteichus* กลุ่มนี้เป็นเชื้อที่ต้องการอากาศในการเจริญ และสร้างสปอร์อยู่บนเส้นใยเหนือพื้นผิวอาหาร มีผนังเซลล์เป็นแบบ III (meso-DAP) ไม่มี mycolic acid แต่มี menaquinone ที่มี isoprenoid จำนวน 9-10 หน่วย (MK-9, MK-10) การเรียงตัวและลักษณะของสปอร์จะแตกต่างกันไปตามแต่ละสกุล

#### 7. Thermoactinomycetes

กลุ่มนี้มีเพียง 1 สกุลคือ *Thermoactinomyces* ซึ่งเป็นพวกที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง ซึ่งในกลุ่มนี้จะมีเอ็นโดสปอร์ (endospore) ทำให้ทนความร้อนได้ดี มี G+C content ต่ำกว่าพวกแอกติโนมัยสีททั่วไป ซึ่งมี G+C content มากกว่าร้อยละ 55 และมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *Bacillus* แต่มีการพัฒนาสร้างเส้นใย และมีสัณฐานวิทยาที่ต่างจาก *Bacillus*

นอกจากนั้นแอกติโนมัยสีทกลุ่มนี้มีการสร้างเส้นใยเหนือพื้นผิวอาหาร เช่น *T. dichotomous* ที่สร้างเส้นใยที่มีสีเหลือง ในขณะที่สายพันธุ์อื่นๆ เส้นใยจะมีสีขาว ทุกสปีชีส์ในสกุลนี้ต้องการอากาศในการเจริญ สามารถย่อยสลายเศษซาก เจริญได้ดีในที่ที่มีอุณหภูมิสูง และเจริญได้ไม่ดีที่อุณหภูมิต่ำกว่า 45 องศาเซลเซียส ผนังเซลล์ของแอกติโนมัยสีทในกลุ่มนี้เป็นแบบที่ III มี amino acid เป็น menaquinone แบบไม่อิ่มตัว เช่น MK-7 หรือ MK-9

#### 8. กลุ่มอื่นๆ

แอกติโนมัยสีทในกลุ่มนี้มีการสร้างสายสปอร์บนเส้นใยเหนือพื้นผิวอาหาร มี 4 สกุล ดังนี้ *Glycomyces*, *Kibdelosporangium*, *Kitasatosporia* และ *Saccharothrix* เป็นกลุ่มที่ไม่สามารถจัดเข้ากับแอกติโนมัยสีทกลุ่มอื่นๆ ได้

สรุปลักษณะที่สำคัญของแอกติโนมัยสีททั้ง 7 กลุ่ม (ไม่รวมกลุ่มที่ 8) ได้ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ลักษณะที่สำคัญบางประการของแอกติโนมัยสีท

Table 5. Some characteristic of major actinomycetes groups.

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

ที่มา : Glazer และ Nikaido (1994)

#### 4. แอคติโนมัยสีทจากทะเล

แอคติโนมัยสีทที่มีรายงานว่าแยกได้จากทะเลส่วนใหญ่มาจากตะกอนดินที่ระดับความลึกต่างๆ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากแอคติโนมัยสีทเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายอินทรีย์วัตถุได้ดี ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากทะเลที่ระดับความลึกต่างๆ

Table 6. Actinomycetes isolated from variant depth of marine.

Depth (m)	Strain	Reference
0-10	<i>Streptomyces</i> sp.	Sitachitta <i>et al.</i> ,1996
	<i>Streptomyces halstedii</i>	Jiang <i>et al.</i> ,1997
	<i>Streptomyces</i> sp.	Capon <i>et al.</i> ,2000
	<i>Nocardiosis dassonvillei</i>	Schumacher <i>et al.</i> ,2001
	<i>Streptomyces</i> sp.	Schumacher <i>et al.</i> ,2003
	<i>Salinospora tropica</i>	Feling <i>et al.</i> , 2003
	<i>Streptomyces albogriseolus</i>	Stritzke <i>et al.</i> ,2004
	<i>Actinopolyspora</i> sp.	Kokare <i>et al.</i> , 2004
11-30	<i>Actinoplanetes</i> sp.	Jensen <i>et al.</i> ,1991
	Un-identified	William <i>et al.</i> ,1999
	<i>Streptomyces</i> sp.	Miller <i>et al.</i> , 2007
	<i>Salinispora arenicola</i>	Williams <i>et al.</i> , 2007
> 500	<i>Streptomyces galbus</i>	Imada and Okami 1994
	<i>Streptomyces coelicolor</i>	Mukku <i>et al.</i> ,2000
	<i>Norcardioforms</i> sp.	Shin <i>et al.</i> ,2003
	<i>Streptomyces</i> sp.	Cho <i>et al.</i> , 2006

รายงานการแยกแอคติโนมัยสีทที่อาศัยอยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ในทะเล ได้แก่ *Streptomyces hygroscopicus* ที่แยกได้จากทางเดินอาหารของปลา *Halichoeres bleekeri* (Takahashi *et al.*, 1994) *Streptomyces* สายพันธุ์ CNB-091 แยกได้จากผิวของแมงกระพรุน *Cassiopeia xamachana* (Moore *et al.*, 1999) Woo และคณะ (2002) สามารถแยก *Streptomyces* sp. จากน้ำในบ่อ

เลี้ยงสาหร่าย *Porphyra* spp. ซึ่งเป็นแอคติโนมัยซีทที่อาศัยอยู่อย่างอิสระในน้ำ (free living) และ *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ BLT7 จากฟองน้ำ *Dendrilla nigra* (Selvin *et al.*, 2004) เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบรายงานการแยกแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ใหม่ได้จากทะเล ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ใหม่ที่แยกได้จากทะเล

Table 7. Novel actinomycetes isolated from marine.

Source	Strain	Reference
Dolphin	<i>Williamsia maris</i>	Stach <i>et al.</i> , 2004
Sea-water	<i>Serinicoccus marinus</i>	Yi <i>et al.</i> , 2004
Sediment	<i>Salinispora arenicola</i>	Maldonado <i>et al.</i> , 2005
	<i>Salinispora tropica</i>	
Sediment	<i>Actinoalloteichus hymeniacidonis</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2006
Sea-mud	<i>Dermacoccus barathri</i>	Pathom-aree <i>et al.</i> , 2006
Sediment	<i>Blastococcus jejuensis</i>	Lee, 2006
Sediment	<i>Kineococcus marinus</i>	Lee, 2006
Seaweed	<i>Phycococcus jejuensis</i>	Lee, 2006

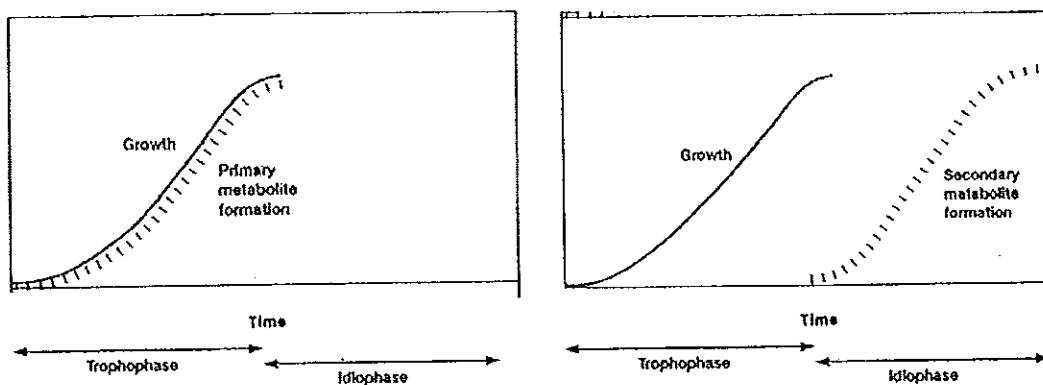
## 5. สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (Natural products)

ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเป็นสารประกอบหรือสารตัวกลางที่สร้างขึ้นโดยกระบวนการชีวเคมีที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ (metabolism) ของสิ่งมีชีวิต สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ได้จากจุลินทรีย์ที่สำคัญและเป็นที่ยอมรับกันดี ได้แก่ สารปฏิชีวนะต่างๆ เช่น เพนนิซิลิน และไซโคลสปอริน เป็นต้น (Yehuda, 2005)

โดยทั่วไปสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ได้จากจุลินทรีย์สามารถจัดจำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม (Kelecom, 2002) คือ

1. Primary metabolites เป็นสารเมตาบอไลต์ที่มีความจำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น โปรตีน กรดอะมิโน นิวคลีโอไทด์ กรดนิวคลีอิก กรดไขมัน และคาร์โบไฮเดรต เป็นต้น จุลินทรีย์จะผลิตสารกลุ่มนี้ในช่วง log phase ของการเจริญดังแสดงในภาพที่ 11

2. Secondary metabolites เป็นสารเมตาบอไลต์ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของสารมัธยันตร์ (intermediate) หรือผลผลิตจากกระบวนการผลิตสาร primary metabolite ซึ่งพบในจุลินทรีย์บางชนิดในช่วง stationary phase ของการเจริญ ดังแสดงในภาพที่ 11 และอาจพบในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่อง (continuous culture) ที่มีอัตราการเจริญต่ำ สาร secondary metabolite เป็นสารที่ไม่มีความจำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์ แต่จุลินทรีย์จะสร้างขึ้นเพื่อความอยู่รอด เช่น pheromones, toxins, pigments และสารปฏิชีวนะต่างๆ เป็นต้น จุลินทรีย์ที่พบว่ามีการผลิตสาร secondary metabolite ได้แก่ ยีสต์รา (fungi) แบคทีเรียที่สร้างสปอร์ได้ (spore forming bacteria) และแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเส้นสาย (filamentous bacteria) โดยเฉพาะแบคทีเรียในกลุ่มของแอกติโนมัยซีต



ภาพที่ 11 การสร้างสาร primary metabolite และสาร secondary metabolite ในจุลินทรีย์

Figure 11. Primary and secondary metabolites production in microorganism.

ที่มา : DeLong และ Pace (2001)

จนกระทั่งถึงปัจจุบันมีสารเมตาบอไลต์จากแอคติโนมัยซีทไม่น้อยกว่า 22,000 ชนิด และส่วนหนึ่งของสารเหล่านี้ได้รับการพัฒนาต่อมาเป็นยาปฏิชีวนะที่ใช้อยู่ทั่วไป และมีรายงานว่าร้อยละ 45 ของสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ทั้งหมดมาจากแอคติโนมัยซีท รองลงมา คือ เชื้อรา ร้อยละ 38 และแบคทีเรียอื่นๆ ร้อยละ 17 แสดงดังตารางที่ 8 โดยในกลุ่มของแอคติโนมัยซีทที่ผลิตสารปฏิชีวนะได้นั้นร้อยละ 75 มาจาก *Streptomyces* รองลงมา คือ *Micromonospora* และแอคติโนมัยซีทกลุ่มอื่นๆ อีกร้อยละ 25 (Bérdy, 2005)

ในบรรดาสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตได้จากแอคติโนมัยซีทนั้น สารในกลุ่มที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งจัดเป็นสารที่มีความสำคัญมากกลุ่มหนึ่ง เนื่องจากโรคมะเร็งเป็นโรคที่เป็นสาเหตุหลักของการตายของประชากรโลก ประกอบกับโรคมะเร็งมีความสามารถในการดื้อยา ทำให้ไม่สามารถรักษาโรคให้หายขาดได้ และยารักษาโรคมะเร็งที่มีอยู่ในปัจจุบันนั้นมีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยค่อนข้างสูง จึงได้มีความพยายามศึกษาค้นคว้าสารชนิดใหม่ๆ ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งจากแหล่งต่างๆ รวมทั้งแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากทะเล

ตารางที่ 8 จำนวนของสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิที่ผลิตโดยจุลินทรีย์

Table 8. Number of secondary metabolites from microorganisms.

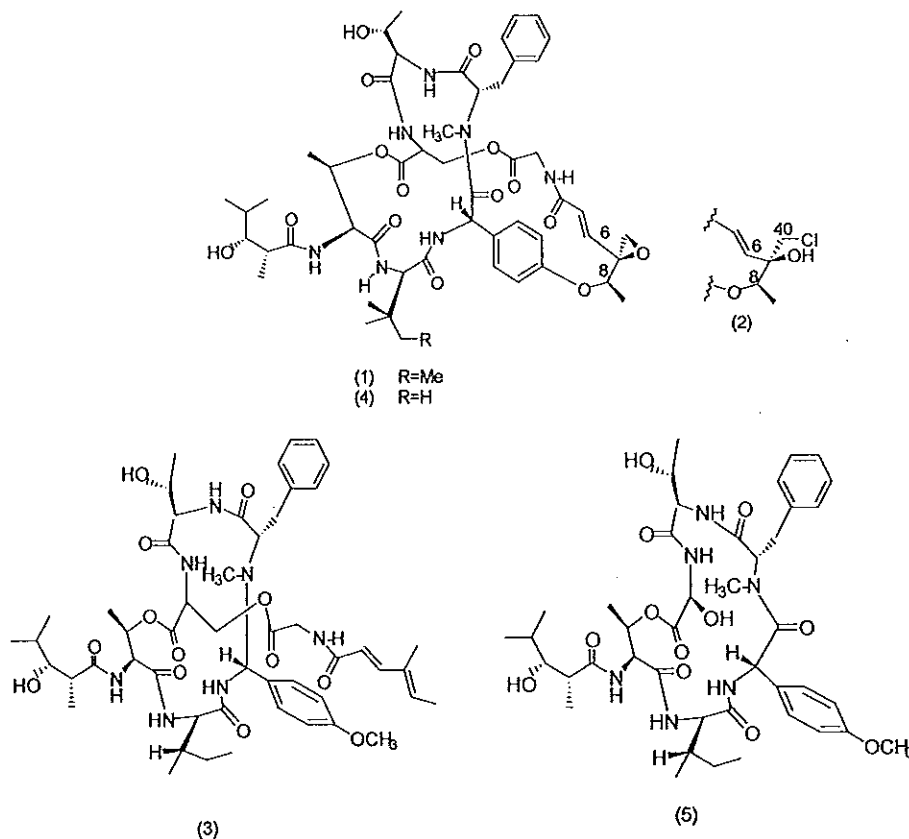
Sources	Metabolites					
	Antibiotics		Other bioactive metabolites		Total	
		%		%		%
Bacteria	2,900	18	900	15	3,800	17
Actinomycetes	8,700	52	1,400	23	10,100	45
Fungi	4,900	30	3,700	62	8,600	38
Total	16,500	100	3,000	100	22,500	100

ที่มา : Bérdy (2005)

## 6. สารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากแอคติโนมัยสีทในทะเล

### 6.1 สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

Moore และคณะ (1999) แยกเชื้อ *Streptomyces* sp. จากผิวด้านนอกของแมงกระพรุน *Cassiopeia xamachana* บริเวณอ่าวฟลอริดา ประเทศสหรัฐอเมริกา และเมื่อนำสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดน้ำหมักด้วยเอทิลอะซิเตท มาแยกด้วย reversed phase HPLC จะได้สาร salinamides โดยมีอนุพันธ์ของ salinamides ทั้งหมด 5 ชนิด คือ salinamides A-E (1-5) ซึ่งมีสูตร โครงสร้างดังแสดงในภาพที่ 12 โดยที่ salinamides A และ B ซึ่งเป็นสารหลักมีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบสูงกว่า 80 เปอร์เซ็นต์เมื่อทดสอบกับเซลล์ไขกระดูกของหนูที่ความเข้มข้น 50.0 ไมโครกรัมต่อ 1 ตัวอย่าง นอกจากนี้ salinamides A และ B ยังมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Streptococcus pneumoniae* และ *Staphylococcus pyrogenes* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 4.0 และ 2.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

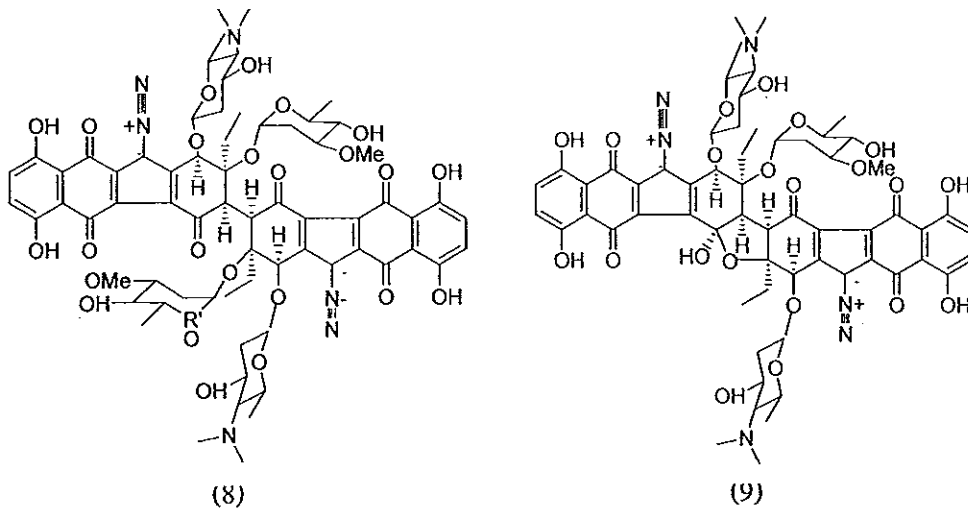


ภาพที่ 12 สูตร โครงสร้างของ salinamides A-E (1-5)

Figure 12. Structure of salinamides A-E (1-5).

ที่มา : Moore และคณะ (1999)



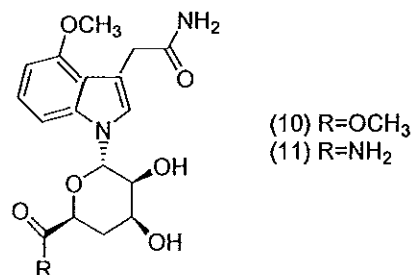


ภาพที่ 14 สูตรโครงสร้างของ lomaviticins A (8-9)

Figure 14. Structure of lomaviticins A (8-9).

ที่มา : He และคณะ(2001)

Schumacher และคณะ (2001) แยกเชื้อ *Nocardopsis dassonvillei* จากตะกอนดินบริเวณชายฝั่งเกาะ Kauai รัฐฮาวาย ประเทศสหรัฐอเมริกา และเมื่อทดลองเลี้ยงเชื้อดังกล่าวในอาหารเหลวสามารถแยกสาร Kahakamides A และ B (10-11) (ที่ซึ่งจัดเป็นสาร indole nucleosides ชนิดใหม่) ดังแสดงในภาพที่ 15 จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยวิธี disk-diffusion assay พบว่า kahakamide A สามารถยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* ได้

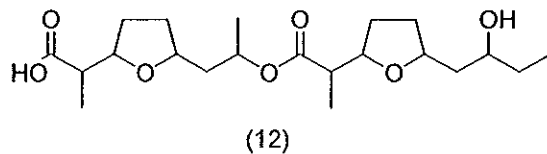


ภาพที่ 15 สูตรโครงสร้างของ Kahakamides A (10) และ B (11)

Figure 15. Structure of Kahakamides A (10) and B (11).

ที่มา : Schumacher และคณะ (2001)

Schumacher และคณะ (2003) แยก *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ BD21-2 จากตะกอนดินบริเวณชายหาด Kailua เกาะ Oahu รัฐฮาวาย เชื้อดังกล่าวสามารถผลิตสาร Bonactin (12) ที่มีสูตรโครงสร้างดังแสดงในภาพที่ 16 จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยวิธี paper disk diffusion assay ที่ระดับความเข้มข้นของ Bonactin เท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อดิสก์ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร พบว่า Bonactin มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Bacillus megaterium*, *Micrococcus luteus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Alicycobaculum* *faecalis*, *Escherichia coli* และ *Saccharomyces cerevisiae* โดยมีค่า inhibition zone ในช่วง 7-10 มิลลิเมตร

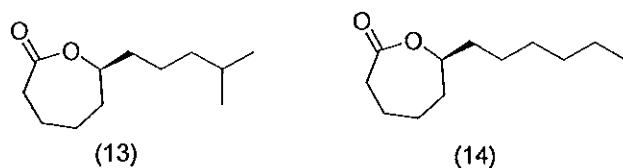


ภาพที่ 16 สูตรโครงสร้างของ Bonactin (12)

Figure 16. Structure of Bonactin (12).

ที่มา : Schumacher และคณะ (2003)

Stritzke และคณะ (2004) รายงานการแยก *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ B6007 จากตะกอนดินบริเวณป่าชายเลนในปาปัวนิวกินี และจากการวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rDNA ของเชื้อดังกล่าว พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces albogriseolus* ร้อยละ 99 และจากการทำปฏิกิริยาเพื่อเติมหมู่เมทิลในสารสกัดที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อดังกล่าว พบสาร caprolactones ชนิดใหม่ 2 ชนิด คือ (R)-10-methyl-6-undecanolide (13) และ (6R,10S)-10-methyl-6-dodecanolide (14) ที่มีสูตรโครงสร้างดังแสดงในภาพที่ 17 จากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่า caprolactones ทั้ง 2 ชนิด มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของ *Streptomyces olivaceus*, *Staphylococcus aureus*, *Mucor mihei* และ *Candida albicans* ได้ปานกลางแต่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* และ *Bacillus subtilis* นอกจากนี้ caprolactones ยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง HM0Z (gastric adenocarcinoma), HepG2 (hepatocellular carcinoma) และ MCF7 (breast adenocarcinoma) ตลอดจนไปถึงคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของสาหร่าย เช่น *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana* และ *Scenedemus subspicatus* ได้อีกด้วย



ภาพที่ 17 สูตรโครงสร้างของ (*R*)-10-methyl-6-undecanolide (13) และ (*6R,10S*)-10-methyl-6-dodecanolide (14)

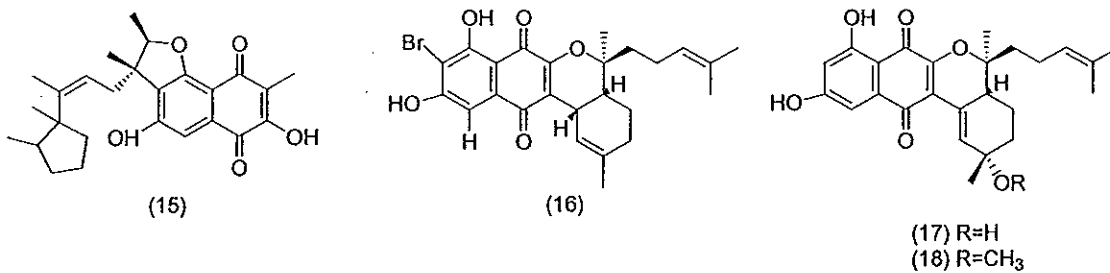
Figure 17. Structure of (*R*)-10-methyl-6-undecanolide (13) and (*6R,10S*)-10-methyl-6-dodecanolide (14).

ที่มา : Stritzke และคณะ (2004)

## 8.2 สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

นอกเหนือจากสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์แล้ว แอคติโนไมด์ที่แยกได้จากทะเลยังสามารถผลิตสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ ได้ดี จากรายงานพบว่า มีสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่เป็นสารชนิดใหม่หลายชนิดสร้างจากแอคติโนไมด์ในทะเล

Hardt และคณะ (2000) แยกแอคติโนไมด์สายพันธุ์ CNH-099 จากตะกอนดินที่ระดับความลึก 1 เมตร บริเวณ Batiqitos Lagoon ทางตอนเหนือของเมืองซานดิเอโก รัฐแคลิฟอร์เนีย ประเทศสหรัฐอเมริกา เชื่อกันว่าสามารถสร้างสารชนิดใหม่ คือ neomarinone (15) และสารที่เป็นอนุพันธ์อีก 3 ชนิดคือ isomarinone (16), hydroxy-debromomarinone (17) และ methoxydebromomarinone (18) มีสูตรโครงสร้างดังแสดงในภาพที่ 18 สารดังกล่าวมี polyketide-derived carbon skeleton ร่วมอยู่ด้วย และมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ปานกลาง โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ (HCT-116 colon carcinoma) ด้วยค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 8.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม

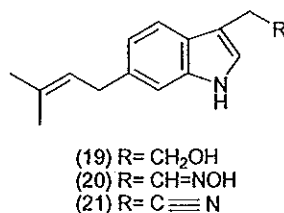


ภาพที่ 18 สูตรโครงสร้างของ neomarinone (15), isomarinone (16), hydroxy- debromomarinone (17) และ methoxydebromomarinone (18)

Figure 18. Structure of neomarinone (15), isomarinone (16), hydroxy- debromomarinone (17) and methoxydebromomarinone (18).

ที่มา : Hardt และคณะ (2000)

López และคณะ (2003) รายงานการแยก *Streptomyces* สายพันธุ์ BL-49-58-005 จากสัตว์ทะเลไม่มีกระดูกสันหลัง ในประเทศเม็กซิโก ที่สามารถสร้างสารในกลุ่ม indolic ชนิดใหม่ 3 ชนิด คือ 6-prenyltryptophol (19), compounds 20 และ 21 ที่มีสูตรโครงสร้างดังแสดงในภาพที่ 19 จาก การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง 14 ชนิด พบว่า 6-prenyltryptophol และ compound 20 สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ โดย 6-prenyltryptophol สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว ( leukemia cell line K-562 ) ได้ดีที่สุด โดยมีค่า GI<sub>50</sub> เท่ากับ 8.46 ไมโคร โมลาร์ และ compound 20 สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้หลายชนิด โดยมีค่า GI<sub>50</sub> ในระดับ ไมโคร โมลาร์ ในขณะที่ compound 21 ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งแต่อย่างใด

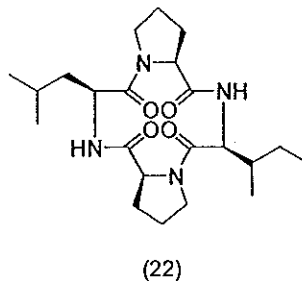


ภาพที่ 19 สูตรโครงสร้างของ 6-prenyltryptophol (19), compound 20 และ compound 21

Figure 19. Structure of 6-prenyltryptophol (19), compound 20 and compound 21.

ที่มา : López และคณะ (2003)

Shin และคณะ (2003) เก็บตัวอย่างตะกอนดินที่ระดับความลึก 3,000 เมตร บริเวณ Clarion Clipperton Fracture กลางมหาสมุทรแปซิฟิก และสามารถแยกแอสโคดิโนไมซีทในกลุ่ม *Nocardioforms* ซึ่งมีสปอร์บนเส้นใยเหนือพื้นผิวอาหารสีน้ำตาลและมีเส้นใยใต้พื้นผิวอาหารสีเทา และเมื่อเลี้ยงเชื้อดังกล่าวในอาหารเหลวสามารถแยกสาร MKN-349A (22) มีสูตรโครงสร้างดังแสดงในภาพที่ 20 โดยจัดอยู่ในกลุ่ม cyclic tetra peptide ชนิดใหม่ และจากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง พบว่าสารดังกล่าวมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (leukemia cell line K-562) โดยมีค่า  $LC_{50}$  น้อยกว่า 0.05 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

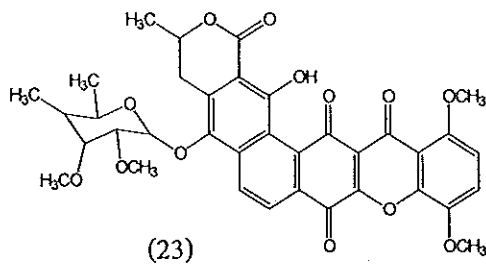


ภาพที่ 20 สูตรโครงสร้างของ MKN-349A (22)

Figure 20. Structure of MKN-349A (22).

ที่มา : Shin และคณะ (2003)

Cascon และคณะ (2003) ศึกษาเชื้อแอสโคดิโนไมซีทที่แยกได้จากชายฝั่งทะเลทางตอนเหนือของสเปน 427 สายพันธุ์ พบว่า มี 9 สายพันธุ์ที่สร้างสารที่เคยมีผู้รายงานก่อนหน้านี้แล้ว ซึ่งเป็นสารที่เป็นพิษต่อเซลล์ โดยมีการทดสอบกับเซลล์มะเร็ง 4 ชนิด คือ P-388, A-549, HT-29 และ SK-MEL-28 และพบว่ามีแอสโคดิโนไมซีทสายพันธุ์ *Actinomadura* sp. สามารถผลิตสารชนิดใหม่ คือ IB-00208 (23) (ภาพที่ 21) ซึ่งเป็นสารประกอบที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง และยังมีผลยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิดได้

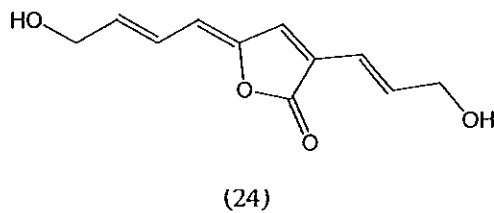


ภาพที่ 21 สูตรโครงสร้าง ของ IB-00208 (23)

Figure 21. Structure of IB-00208 (23).

ที่มา : Cascon และคณะ (2003)

Richardson และ Ireland (2004) รายงานการแยก lissoclinolide (24) จากน้ำหมักของแอสคิไดโนมัยซีท ที่แยกจากสัตว์ทะเลจำพวกเพรียงหัวหอม (Ascidacea) จากเกาะฟิจิ ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ (HCT 116) ได้ และมีสูตร โครงสร้างดังแสดงในภาพที่ 22

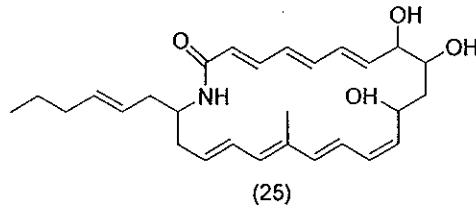


ภาพที่ 22 สูตรโครงสร้างของ lissoclinolide (24)

Figure 22. Structure of lissoclinolide (24).

ที่มา : Richardson และ Ireland (2004)

Mitchell และคณะ (2004) รายงานการแยก *Streptomyces aureovorticillatus* จากตะกอนดินในทะเล โดยพบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อดังกล่าวในอาหารเหลวที่มี soluble starch เป็นองค์ประกอบ สามารถแยกสาร aureovorticillactam (25) มีสูตร โครงสร้างดังแสดงในภาพที่ 23 ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง HT-29, B16-F10 และ Jurkat cells โดยมีค่า  $EC_{50}$  เท่ากับ  $3.6 \pm 2.6$ ,  $2.2 \pm 0.9$  และ  $2.3 \pm 1.1$  ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ และมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง colorectal adenocarcinoma, melanoma และ leukemia cell line ได้



ภาพที่ 23 สูตรโครงสร้างของ aureoverticillactam (25)

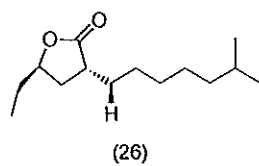
Figure 23. Structure of aureoverticillactam (25).

ที่มา : Mitchell และคณะ (2004)

### 8.3 สารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ

นอกเหนือจากสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ แล้ว แอคติโนไมด์ที่แยกได้จากทะเลยังสามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ อาทิเช่น สารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ สารยับยั้งการเจริญของสาหร่ายและสารต้านการอักเสบ (anti-inflammatory agent)

Pathirana และคณะ (1991) รายงานการแยกแอคติโนไมด์สายพันธุ์ CNB-228 จากตะกอนดินที่เกาะบาฮามา และเมื่อเลี้ยงแอคติโนไมด์ดังกล่าวในอาหารเหลวที่มี soluble starch เป็นองค์ประกอบหลัก เชื่อจะสร้างสารบิวทิโนไลด์ชนิดใหม่ได้แก่ (1'R, 2S, 4S)-2-(1-hydroxyl-6-methylheptyl)-4-hydroxymethyl-butanolide (26) ที่มีสูตรโครงสร้างดังแสดงในภาพที่ 24 คุณสมบัติทางชีวภาพของสารนี้จะมีผลในการยับยั้งกระบวนการเมตาบอลิซึมของแบคทีเรียในกลุ่ม actinomycetes ด้วยกัน



ภาพที่ 24 สูตรโครงสร้างของ (1'R, 2S, 4S)-2-(1-hydroxyl-6-methylheptyl)-4-hydroxymethyl-butanolide (26)

Figure 24. Structure of (1'R,2S,4S)-2-(1-hydroxyl-6-methylheptyl)-4-hydroxymethyl-butanolide

(26).

ที่มา : Pathirana และคณะ (1991)

Imada และ Okami (1994) รายงานการแยกเชื้อ *Streptomyces galbus* สายพันธุ์ ISP-5089 จากตะกอนดินที่ในระดับความลึก 1,500 เมตร บริเวณอ่าวซากามิ ประเทศญี่ปุ่น ที่สามารถสร้างสาร

ที่มีฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์  $\beta$ -glucosidase จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีองค์ประกอบของแป้งมันฝรั่ง จากการศึกษาทางเคมีพบว่าสารที่ออกฤทธิ์ดังกล่าวคือ D-glucono-1,5-lactam (27) และ D-mannono-1,5-lactam (28) ซึ่งเป็นสารที่มีสูตร โครงสร้างดังแสดงในภาพที่ 25

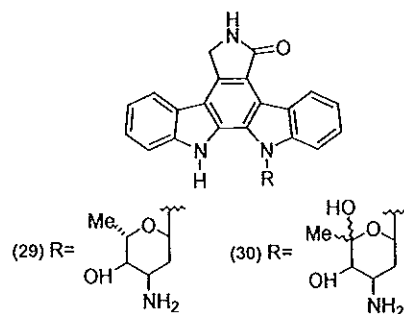


ภาพที่ 25 สูตร โครงสร้างของ D-glucono-1,5-lactam (27) และ D-mannono-1,5-lactam (28)

Figure 25. Structure of D-glucono-1,5-lactam (27) และ D-mannono-1,5-lactam (28).

ที่มา : Imada และ Okami (1994)

Williams และคณะ (1999) แยกแอกติโนไมซีตสายพันธุ์ N96C-47 จากดินที่ระดับความลึก 13 เมตร บริเวณชายฝั่งเมือง Holyrood รัฐ Newfoundland ประเทศแคนาดา จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าเชื้อดังกล่าวจัดอยู่ในกลุ่ม *Streptomyces* เนื่องจากสามารถสร้างสปอร์บนเส้นใยที่ชูขึ้นในอากาศสีเหลืองขาวและเส้นใยในอาหารเลี้ยงเชื้อ (substrate mycelium) โดยมี arthrospore ต่อกัน 20 -30 สปอร์ เชื้อดังกล่าวสามารถผลิตสารชนิดใหม่ที่จัดอยู่ในกลุ่ม indolocarbazole 2 ชนิด ได้แก่ holorines A (29) และ B (30) มีสูตร โครงสร้างดังแสดงในภาพที่ 26



ภาพที่ 26 สูตร โครงสร้างของ holorines A (29) และ B (30)

Figure 26. Structure of holorines A (29) and B (30).

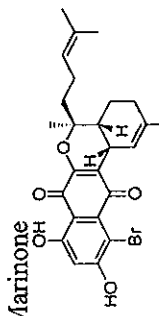
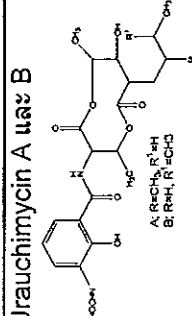
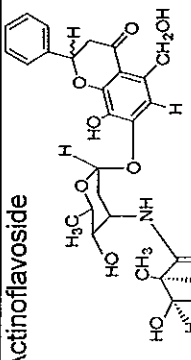
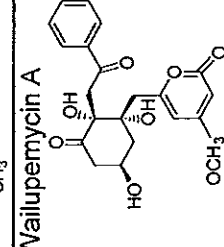
ที่มา : Williams และคณะ (1999)

นอกจากนี้ยังมีสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากแอกติโนไมซีตในทะเล ดังแสดงในตารางที่

9, 10 และ 11

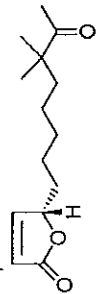
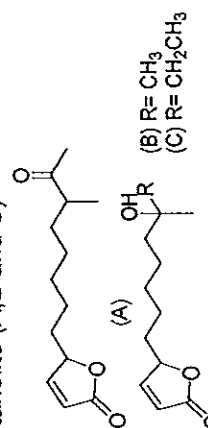
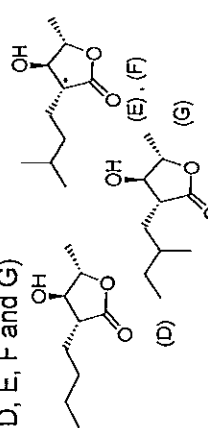
ตารางที่ 9 สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จากแอคติโนมัยซีตที่แยกได้จากทะเล

Table 9. Antimicrobial compounds from marine derived actinomycetes.

Compound	Organism	Properties	Source	Reference
	Actinomycetes CNB-632	Anti-Gram positive bacteria	Marine sediment in USA	Pathirana <i>et al.</i> , 1992
<p>Urauchimycin A และ B</p>  <p>A: R=CH<sub>3</sub>, R'<sup>1</sup>=H B: R=H, R'<sup>1</sup>=CHO</p>	<i>Streptomyces</i> sp. Ni-80	Antimicrobial ( <i>Candida albicans</i> )	Sponge	Imamura <i>et al.</i> , 1993
<p>Actinoflavoside</p> 	Actinomycetes CNB-689	Antibacterial	Marine sediment in Christchurch, New Zealand	Jiang <i>et al.</i> , 1997
<p>Wailupemycin A</p> 	<i>Streptomyces</i> sp. BD- 26T(20)	Antibacterial	Marine sediment in USA	Sitachitta <i>et al.</i> , 1996

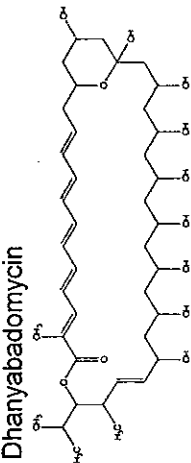
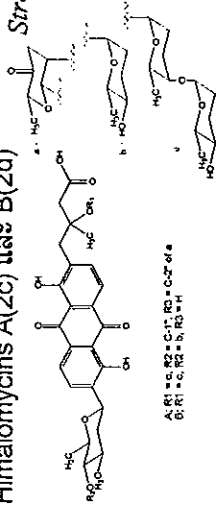
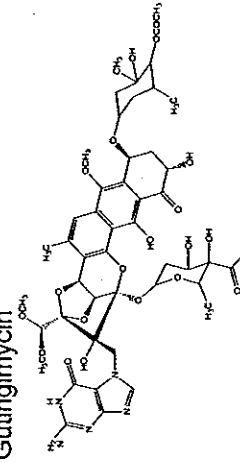
ตารางที่ 9 สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จากแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากทะเล

Table 9. Antimicrobial compounds from marine derived actinomycetes.

Compound	Organism	Properties	Source	Reference
4-hydroxy-10-methyl-11-oxo-dodec-2-en-1,4-olide 	<i>Streptomyces coelicolor</i> B5632	Antimicrobial	Marine mud in New Zealand	Mukku <i>et al.</i> , 2000
Lactone metabolites Butanolite (A, B and C) 	7.1 <i>Streptomyces</i> sp.	Antifungal	Marine mud in Korea	Cho <i>et al.</i> , 2001
7.2 3-hydroxy-γ-butyrolactones (D, E, F and G) 		Antifungal		

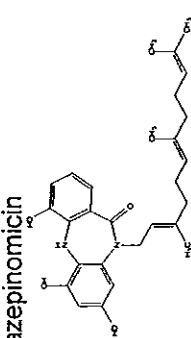
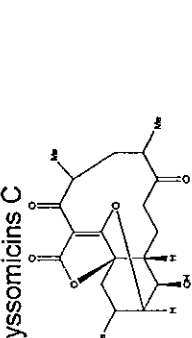
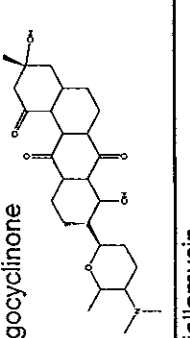
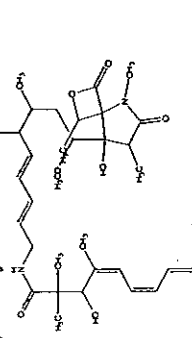
ตารางที่ 9 สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จากแอคติโนมัยซีตที่แยกได้จากทะเล

Table 9. Antimicrobial compounds from marine derived actinomycetes.

Compound	Organism	Properties	Source	Reference
 <p>Dhanyabadomycin</p>	<i>Streptomyces</i> sp. (B88905)	Antifungal	No reported	Maskey <i>et al.</i> , 2001
 <p>Himalomycins A(2c) และ B(2d)</p> <p>A: R1 = C, R2 = C-1', R3 = C-2' of 4 B: R1 = C, R2 = S, R3 = H</p>	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacterial	Marine sand in India	Maskey <i>et al.</i> , 2003
 <p>Gutingimycin</p>	<i>Streptomyces</i> sp.	Antimicrobial Anticancer	No reported	Maskey <i>et al.</i> , 2004

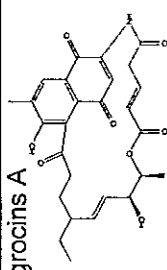
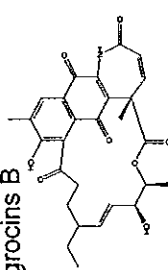
ตารางที่ 9 สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จากแอคติโนมัยซีท์ที่แยกได้จากทะเล

Table 9. Antimicrobial compounds from marine derived actinomycetes.

Compound	Organism	Properties	Source	Reference
<p>Diazepinomicin</p> 	<i>Micromonospora</i>	Antimicrobial Anticancer Anti-inflammatory	Shishijima island, Korea	Charan <i>et al.</i> , 2004
<p>Abyssomicins C</p> 	<i>Verrucosipora</i>	Anti-Gram positive bacteria	Not Report	Riedlinger <i>et al.</i> , 2004
<p>Frigocyclinone</p> 	<i>Streptomyces griseus</i>	Antibacterial	Antarctica	Brunmer <i>et al.</i> , 2005
<p>Lajollamycin</p> 	<i>Streptomyces nodosus</i>	Antibacterial	No reported	Manam <i>et al.</i> , 2005

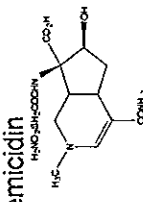
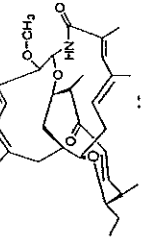
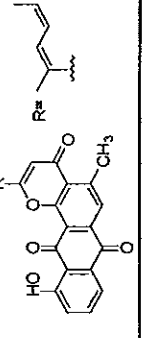
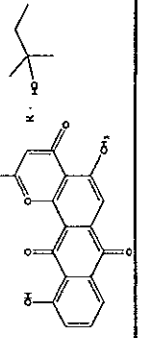
ตารางที่ 9 สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จากแอคติโนมัยซีตที่แยกได้จากทะเล

Table 9. Antimicrobial compounds from marine derived actinomycetes.

Compound	Organism	Properties	Source	Reference
Hygrocins A	<i>Streptomyces</i>	Antibacterial	No reported	Cai <i>et al.</i> , 2005
	<i>hygroscopicus</i>			
Hygrocins B	ATCC25293	Antibacterial		
				

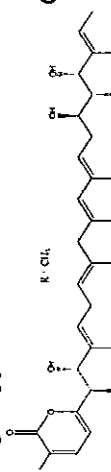
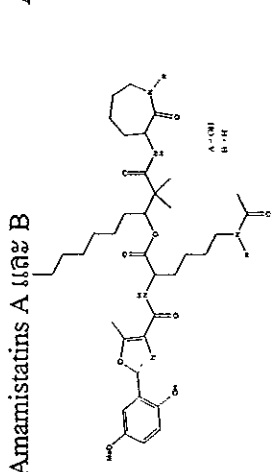
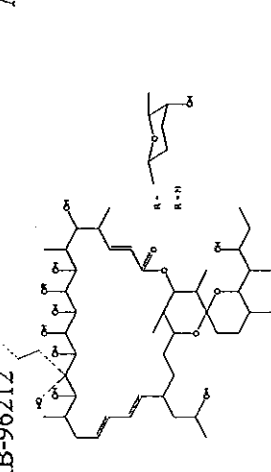
ตารางที่ 10 สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งจากแอคติโนมัยซีทีที่แยกได้จากทะเล

Table 10. Cytotoxic compounds from marine derived actinomycetes.

Compound	Organism	Properties	Source	Reference
 Altermicidin	<i>Streptomyces stroyensis</i>	Antitumor	No reported	Atsushi <i>et al.</i> , 1989
 Halichomycin	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Cytotoxic	Gastrointestinal tract of marine fish <i>Halichoeres hygroscopicus</i>	Takahashi <i>et al.</i> , 1994
 Rubiflavione C-1	<i>Streptomyces</i> sp. PCI/B2	Cytotoxic	Marine sediment	Schumacher <i>et al.</i> , 1995
 Gamma-Indomycinone	<i>Streptomyces</i> sp.	Cytotoxic	Marine sediment	Schumacher and Davidson, 1995

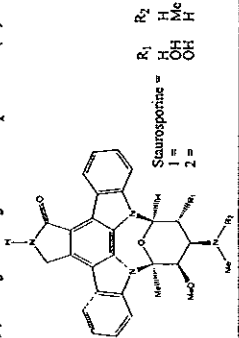
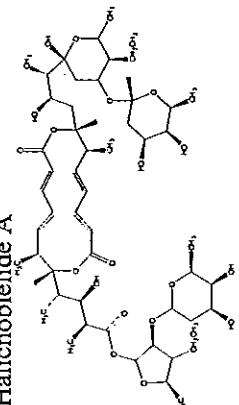
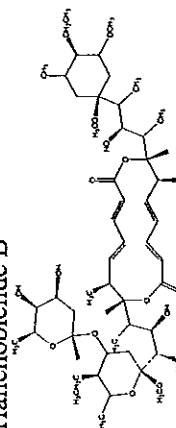
ตารางที่ 10 สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งจากแอคติโนไมซีทที่แยกได้จากทะเล

Table 10. Cytotoxic compounds from marine derived actinomycetes.

Compound	Organism	Properties	Source	Reference
<p>Lagunapyrones A</p> 	Actinomycete	Cytotoxic	Marine sediment in California	Urndel <i>et al.</i> , 1996
<p>Amamistatins A และ B</p> 	Actinomycete	Cytotoxic	Amami island, Japan	Suenaga <i>et al.</i> , 1999
<p>IB-96212</p> 	<i>Micromonospora</i> sp.	Cytotoxic	Sponge in India	Fernandez-chimeno <i>et al.</i> , 2000

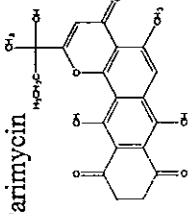
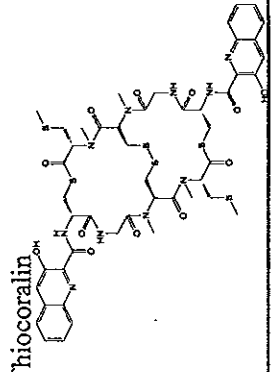
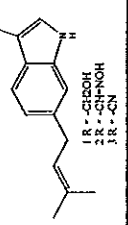
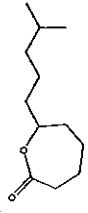
ตารางที่ 10 สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งจากแอคติโนไมซีตที่แยกได้จากทะเล

Table 10. Cytotoxic compounds from marine derived actinomycetes.

Compound	Organism	Properties	Source	Reference
4'-N-Methyl-5'-hydroxystaurosporine (1), 5'-hydroxystaurosporine(2)	<i>Micromonospora</i> sp.	Cytotoxic	Sponge in Fuerteventura island	Hernández <i>et al.</i> , 2000 อ้างโดย Faulkner, 2002
				
Halichobleide A	<i>Streptomyces hygroscopicus</i> OUPS-N92	Cytotoxic	Halichoeres marine fish	Yamada <i>et al.</i> , 2001
				
Halichobleide B		Cytotoxic		
				

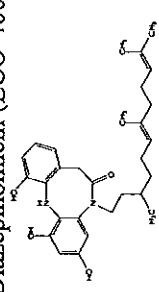
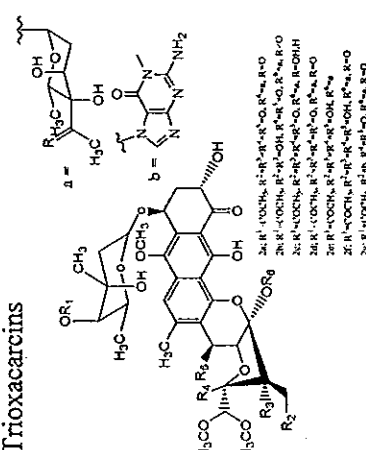
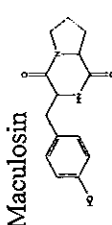
ตารางที่ 10 สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งจากแอคติโนไมซีตที่แยกได้จากทะเล

Table 10. Cytotoxic compounds from marine derived actinomycetes.

Compound	Organism	Properties	Source	Reference
 Parimycin	<i>Streptomyces</i> sp.(B8652)	Cytotoxic	No reported	Maskey <i>et al.</i> , 2002
 Thiocoralin	<i>Micromonospora marina</i>	Antitumor (Preclinical development) Antimicrobial	Soft coral in India	Yin <i>et al.</i> , 2003
3,6-disubstituted indoles (1-3)  1R-C6H9 2R-C6H9OH 3R-CN	<i>Streptomyces</i> sp.	Anticancer	Marine invertebrate in Mexico	Sanchez <i>et al.</i> , 2003
Caprolactones 	<i>Streptomyces</i> sp.	Anticancer	Marine sediment in Papua New Guinea	Stritzke <i>et al.</i> , 2004

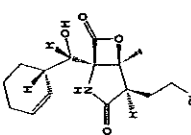
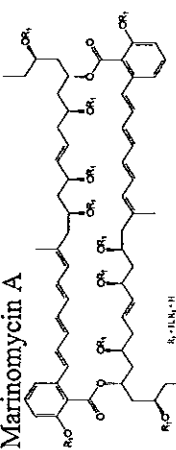
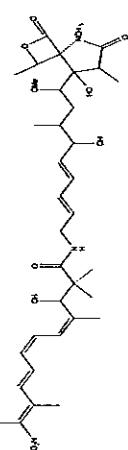
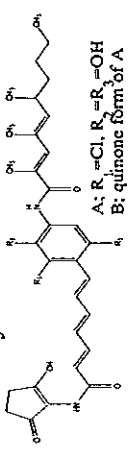
ตารางที่ 10 สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งจากแอคติโนไมซีตที่แยกได้จากทะเล

Table 10. Cytotoxic compounds from marine derived actinomycetes.

Compound	Organism	Properties	Source	Reference
<p>Diazepinomicin (ECO-4601)</p> 	<i>Micromonospora</i> sp.	Anticancer Antibacterial Anti-inflammatory	Shishijima island in Japan	Charan <i>et al.</i> , 2004
<p>Trioxacarcins</p> 	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacterial Anticancer Anti-malarial	No reported	Maskey <i>et al.</i> , 2004
<p>Maculosin</p> 	<i>Streptomyces albogriseolus</i>	Anticancer	Marine sediment in Jiaozhou Bay	Gu <i>et al.</i> , 2005

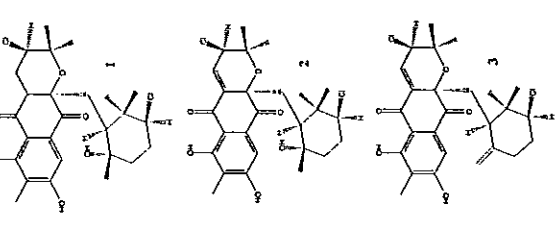
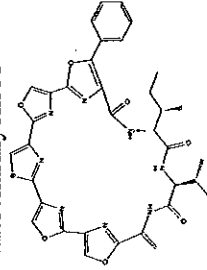
ตารางที่ 10 สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งจากแอคติโนไมซีตที่แยกได้จากทะเล

Table 10. Cytotoxic compounds from marine derived actinomycetes.

Compound	Organism	Properties	Source	Reference
<p>Salinosporamide A</p> 	<i>Salinospora tropica</i>	Cytotoxic (Proteasome inhibitor)	Marine sediment in Bahamas	Macherla <i>et al.</i> , 2005
<p>Marinomycin A</p> 	<i>Marinispora</i> sp.	Cytotoxic Antibacterial	Marine sediment in Papua New Guinea	Kwon <i>et al.</i> , 2005
<p>Lajollamycin</p> 	<i>Streptomyces nodosus</i>	Cytotoxic Antibacterial	Marine sediment in California	Manam <i>et al.</i> , 2005
<p>Chinikomycin A and B:</p>  <p>A: R<sub>1</sub>=Cl, R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=OH B: quinone form of A</p>	<i>Streptomyces</i> sp.	Cytotoxic	Marine sediment in Jiaozhou Bay, China	Li <i>et al.</i> , 2005

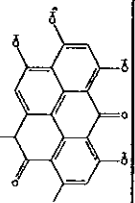
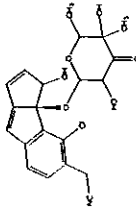
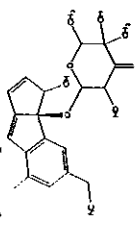
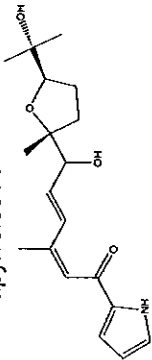
ตารางที่ 10 สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งจากแอคติโนไมซีตที่แยกได้จากทะเล

Table 10. Cytotoxic compounds from marine derived actinomycetes.

Compound	Organism	Properties	Source	Reference
<p>Chloro-Dihydroquinones (1-3)</p> 	Streptromycetaceae	Cytotoxic	Marine sediment in California	Soria-Mercado <i>et al.</i> , 2005
<p>Mechercharmycin A</p> 	<i>Thermoactinomyces</i> sp.	Anticancer	Marine mud in Papua New Guinea	Kanoh <i>et al.</i> , 2005

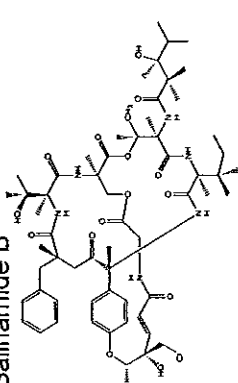
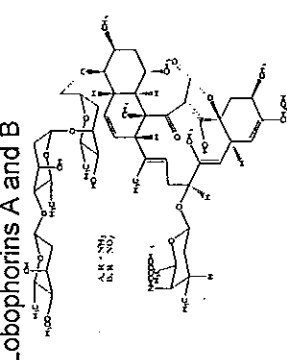
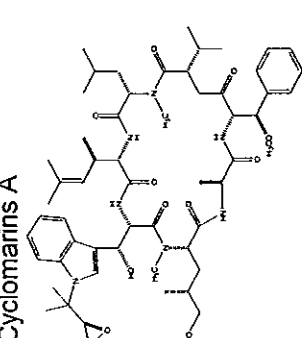
ตารางที่ 10 สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งจากแอคติโนไมซีตที่แยกได้จากทะเล

Table 10. Cytotoxic compounds from marine derived actinomycetes.

Compound	Organism	Properties	Source	Reference
<p>1-Hydroxy-1-norresistomycin</p> 	<p><i>Streptomyces chibaensis</i> (AUBN1/7)</p>	Cytotoxic	Marine sediment in India	Gorajana <i>et al.</i> , 2005
<p>Cyanosporasides A</p> 	<i>Sainispora pacifica</i>	Cytotoxic	No reported	Oh <i>et al.</i> , 2005
<p>Cyanosporasides B</p> 		Cytotoxic		
<p>Glaciapyrroles A</p> 	<i>Streptomyces</i> sp.	Cytotoxic	Marine sediment in Alaska	Macherla <i>et al.</i> , 2005

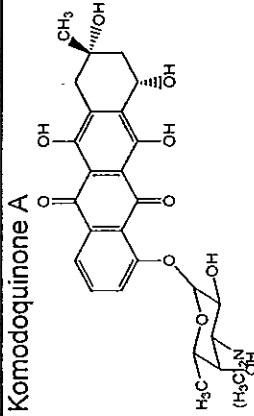
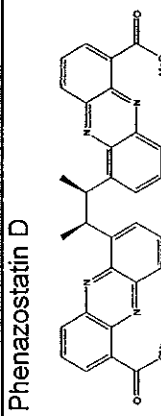
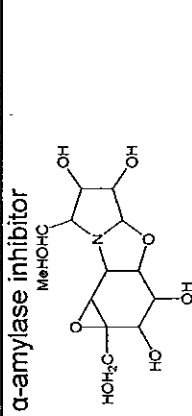
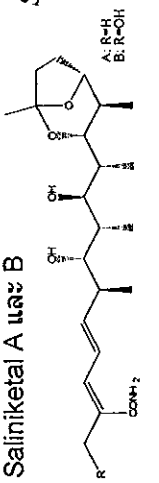
ตารางที่ 11 สารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ จากแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากทะเล

Table 11. Bioactive compounds from marine derived actinomycetes.

Compound	Organism	Properties	Source	Reference
<p><b>Salinamide B</b></p> 	Streptomycete	Anti-inflammatory	Florida Keys	Moore <i>et al.</i> , 1999
<p><b>Lobophorins A and B</b></p> 	Actinomycete CNB-837	Anti-inflammatory	Marine brown seaweed	Jiang <i>et al.</i> , 1999
<p><b>Cyclomarins A</b></p> 	Streptomycete CNB-982	Anti-inflammatory	Marine sediment in Mission Bay, California	Renner <i>et al.</i> , 1999

ตารางที่ 11 สารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ จากแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากทะเล

Table 11. Bioactive compounds from marine derived actinomycetes.

Compound	Organism	Properties	Source	Reference
<p>Komodoquinone A</p> 	<i>Streptomyces</i> sp.	Neurotogenic activity	Marine sediment	Itoh <i>et al.</i> , 2003
<p>Phenazostatin D</p> 	<i>Pseudonocardia</i> sp.	antimicrobial enzyme inhibitory neuroprotective effects	Marine sediment	Maskey <i>et al.</i> , 2003
<p><math>\alpha</math>-amylase inhibitor</p> 	<i>Streptomyces</i> sp.	$\alpha$ -amylase inhibition	No reported	Kunio <i>et al.</i> , 2006
<p>Saliniketal A และ B</p> 	<i>Streptomyces arenicola</i>	Inhibition of ornithine decarboxylase syntheses	No reported	Fenical and Jensen, 2006

## 7. การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างทางเคมีของสาร

### 7.1 การสกัดโดยใช้ตัวทำละลายที่เป็นของเหลว (Keese and Brandle, 2006)

การสกัดสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจะใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมโดยพิจารณาจากสภาพความมีขั้ว (polarity) ของโมเลกุลของสารที่จะทำการสกัด โดยทั่วไปจะเลือกใช้ตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วใกล้เคียงกับสารที่จะทำการสกัด และมีค่าการละลายน้ำ (dielectric constant) ที่ต่ำ สภาพความมีขั้วและค่าการละลายน้ำของตัวทำละลายแต่ละชนิด แสดงในตารางที่ 12 นอกจากนี้การเลือกชนิดของตัวทำละลายยังต้องพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว (partition coefficient,  $K$ ) ซึ่งหมายถึงอัตราส่วนของความเข้มข้นของสารที่ต้องการสกัดในตัวทำละลายต่อความเข้มข้นของสารที่ต้องการสกัดในน้ำ ถ้า  $K$  มีค่ามากแสดงว่าตัวทำละลายมีประสิทธิภาพในการสกัดสารที่ต้องการได้สูง แต่ถ้า  $K$  มีค่าน้อยแสดงว่าตัวทำละลายมีประสิทธิภาพในการสกัดสารที่ต้องการได้ต่ำ

ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการสกัดสารที่ต้องการโดยใช้ตัวทำละลายที่เป็นของเหลว นอกจากชนิดของตัวทำละลายแล้ว ยังขึ้นกับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ด้วย รวมทั้งสภาพแวดล้อมอื่นๆ ในการสกัดที่อาจมีผลต่อความคงตัวของผลิตภัณฑ์ เช่น อุณหภูมิ และแสง เป็นต้น

ตารางที่ 12 ตัวทำละลายที่นิยมใช้ และค่า Dielectric constant ของตัวทำละลายชนิดต่างๆ

Table 12. Universal solvents and their dielectric constant.

Solvents	Dielectric constant	Polarity Index
Hexane	1.90	0.0
Benzene	2.28	2.7
Chloroform	4.87	4.1
Ethyl acetate	6.02	4.4
Acetone	20.70	5.1
Ethanol	24.30	5.2
Methanol	32.60	5.1
Water	78.54	9.0

ที่มา : Stanbury และ Whitaker (1982 อ้างโดย สมใจ ศิริโชค, 2001)

## 7.2 การแยกและการทำบริสุทธิ์ของสารสกัด

วิธีทางโครมาโตกราฟี (chromatography) เป็นเทคนิคสำคัญที่ใช้ในการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารประกอบต่างๆ ทั้งในรูปที่เป็นสารบริสุทธิ์ และสารไม่บริสุทธิ์ และใช้ในการแยกสารประกอบออกจากกันเพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์ โดยอาศัยคุณสมบัติการกระจายตัวของสารในตัวทำละลายอยู่กับที่ (stationary phase) และ ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) โดยสารที่มีการกระจายตัวได้ดีใน mobile phase จะเคลื่อนที่ไปกับ mobile phase ได้เร็วกว่าสารที่กระจายตัวได้ดีใน stationary phase ทำให้เกิดการแยกของสารขึ้น วิธีทางโครมาโตกราฟีที่มีหลายวิธี แบ่งตามกลไกการแยกได้เป็น โครมาโตกราฟีแบบแบ่งละลาย (partition chromatography), โครมาโตกราฟีแบบดูดซับ (adsorption chromatography), โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน (ion-exchange chromatography) และ โครมาโตกราฟีแบบแยกตามขนาด (size-exclusion chromatography) หรือแบ่งตามเทคนิค ได้เป็น คอลัมน์โครมาโตกราฟี (column chromatography) และ โครมาโตกราฟีที่ทำเป็นแผ่นบาง (open-bed chromatography) (Keese and Brandle, 2006)

**Partition chromatography** เป็นการแยกสาร โดยอาศัยคุณสมบัติการกระจายตัว (partition) ของสารระหว่าง stationary phase และ mobile phase ซึ่งเป็นของเหลวที่ไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน โดย stationary phase จะเป็นของเหลวหรือของเหลวที่เคลือบอยู่บนอนุภาคของแข็ง (solid support) ส่วน mobile phase จะเป็นของเหลว สารจะเกิดการแยกออกจากกันโดยสารที่ละลายได้ดีใน stationary phase จะเคลื่อนที่ช้ากว่าสารที่ละลายได้ดีใน mobile phase ค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว (partition coefficient,  $K$ ) สามารถคำนวณได้จากสูตร

$$\text{Partition coefficient } (K) = \frac{\text{Conc. of solute in stationary phase}}{\text{Conc. of solute in mobile phase}}$$

Partition chromatography แบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ

**1. Normal-phase partition chromatography** เป็นเทคนิคที่มี stationary phase ที่มีขั้ว เช่น น้ำ หรือ แอลกอฮอล์ ซึ่งเคลือบอยู่บนอนุภาคของแข็งที่มีขั้วเช่นกัน เช่น silica gel, celite, cellulose powder และ cross-linked dextran (Sephacrose® LH20) เป็นต้น ส่วนสารที่ใช้เป็น mobile phase จะเป็นสารที่ไม่มีขั้ว เช่น เฮกเซน (hexane) เทคนิค normal-phase partition chromatography ใช้ในการแยกสารที่มีขั้วที่มีขนาดเล็กเช่น กรดอะมิโน (amino acid)

**2. Reversed-phase partition chromatography** เป็นเทคนิคที่ stationary phase เป็นสารที่ไม่มีขั้วซึ่งยึดอยู่กับอนุภาคของแข็งที่เป็นสาร chemically bonded support ด้วยไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon) เช่น octadecyl (C18), octyl (C8) group ส่วนสารที่ใช้เป็น mobile

phase จะเป็นสารที่มีขั้ว เช่น น้ำ, เมทานอล (methanol) และ อะซิโตไนไตรด์ (acetonitrile) เทคนิคนี้ใช้ในการแยกสารที่ไม่มีขั้ว เช่น สเตียรอยด์ (steroids) และวิตามินที่ไม่ละลายน้ำ

**Adsorption chromatography** เป็นการแยกสาร โดยอาศัยความแตกต่างของสารในการยึดเกาะอยู่กับผิวหน้าของ stationary phase โดยสารที่สามารถยึดเกาะอยู่กับ stationary phase ได้ดี จะเคลื่อนที่ไปบน stationary phase ได้ช้า

คุณสมบัติที่สำคัญของ stationary phase คือ ไม่ละลายในตัวทำละลายที่ใช้เป็น mobile phase เช่น silica, alumina, activated charcoal และ calcium phosphate ส่วน mobile phase นิยมใช้สารละลายที่ไม่มีขั้ว เช่น ปีโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether) หรือ เบนซีน (benzene)

**Ion-exchange chromatography** เป็นเทคนิคที่ใช้แยกสารที่มีประจุ โดยอาศัยหลักการดูดซับแบบผันกลับได้ คือ ไอออนในสารละลายจะถูกแทนที่ด้วยไอออนอื่นที่มีประจุชนิดเดียวกันที่จับกับหมู่ที่มีประจุ (charge group) บนตัวกลางแลกเปลี่ยนไอออน (ion-exchanger) ด้วยแรงทางไฟฟ้า โดยตัวแลกเปลี่ยนไอออนต้องเป็นตัวกลางที่ไม่ละลาย เหนียว และมีหมู่ที่มีประจุที่จับกันด้วยพันธะโควาเลนต์ (covalent bond) ตัวกลางนี้เป็นสารพวกเรซินสังเคราะห์หรือ polysaccharide เช่น dextran, agarose และ cellulose เป็นต้น ตัวกลางแลกเปลี่ยนไอออนแบ่งออกได้เป็น 2 แบบ คือ

- ตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ (anion-exchanger) จะมีหมู่ที่มีประจุเป็นประจุบวก จะจับกับไอออนที่มีประจุลบ เช่น DEAE-cellulose

- ตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก (cation-exchanger) จะมีหมู่ที่มีประจุเป็นประจุลบ จะจับกับไอออนที่มีประจุบวก เช่น CM-cellulose

ในการชะสารออกจากคอลัมน์จะเป็นการชะล้างสารแบบเกรเดียนต์ (gradient elution) ทำได้ 2 วิธี คือ การเปลี่ยนแปลง pH และการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเกลือ

**Affinity chromatography** เป็นเทคนิคที่ใช้แยกชีวโมเลกุล โดยอาศัยพื้นฐานเกี่ยวกับโครงสร้างทางเคมีหรือหน้าที่ของสาร ซึ่งทำให้เกิดปฏิกิริยาที่มีความจำเพาะสูง เช่น ปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์-สับสเตรท, เอนไซม์-ตัวยับยั้ง และแอนติเจน-แอนติบอดี ฯลฯ โดยสารที่ต้องการแยกจะถูกดูดซับด้วยสารที่มีความจำเพาะต่อกัน ซึ่งถูกตรึงอยู่บนตัวค้ำจุนที่ไม่ละลายน้ำ เช่น agarose, cellulose หรือ polyacrylamide

**Size-exclusion chromatography** หรือ Gel filtration chromatography เป็นการแยกสารโดยอาศัยความแตกต่างของขนาดโมเลกุล โดยผ่านสารที่ต้องการแยกลงไปบนคอลัมน์ที่บรรจุด้วยตัวกลาง หรือ stationary phase ที่มีรูพรุน เช่น dextran, polyacrylamide และ agarose ขนาดของรูพรุนเป็นตัวกำหนดขนาดของสารที่จะสามารถผ่านเข้าไปได้ เมื่อสารที่ต้องการแยกเคลื่อนที่ไปกับ

mobile phase สารที่มีขนาดใหญ่ไม่สามารถผ่านรูพรุนของเจลได้จึงเคลื่อนที่ไปตามช่องว่างระหว่างเม็ดเจลและถูกชะออกจากคอลัมน์ก่อน ในขณะที่สารที่มีขนาดเล็กเคลื่อนที่ผ่านเข้าไปในรูพรุนของเจลทำให้เคลื่อนที่ออกมาภายหลัง เทคนิคนี้มีประโยชน์ในการแยกสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เช่น โพลีเมอร์

**Paper chromatography (PC)** เป็นเทคนิคที่มีกลไกการแยกโดยอาศัยหลักการแบ่งละลาย (Partition chromatography) คือการที่สารแต่ละชนิดมีความสามารถไม่เท่ากันในการละลายในตัวทำละลาย 2 ชนิดที่ไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ทำให้อัตราการเคลื่อนที่ของสารแต่ละชนิดไม่เท่ากัน เทคนิค paper chromatography มี stationary phase เป็น โมเลกุลของน้ำที่ล้อมรอบเซลลูโลส (cellulose) และมี mobile phase เป็นตัวทำละลายอินทรีย์

สารที่มีความสามารถในการละลาย ใน mobile phase สูงจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าสารที่มีความสามารถในการละลายใน stationary phase สูง โดยความสัมพันธ์ของระยะทางการเคลื่อนที่ของสารแต่ละชนิดจากจุดเริ่มต้นกับระยะทางการเคลื่อนที่ของตัวทำละลายอยู่กับที่จากจุดเริ่มต้น กำหนดเป็นค่า  $R_f$

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่จากจุดเริ่มต้น}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่จากจุดเริ่มต้น}}$$

ค่า  $R_f$  ภายใต้สภาวะเดียวกันจะมีค่าคงที่ไม่เกิน 1 และเป็นลักษณะเฉพาะของสารแต่ละชนิด ดังนั้นสามารถวิเคราะห์ชนิดของสารได้โดยใช้สารอ้างอิงทำเปรียบเทียบลงไปด้วย

**Thin-layer chromatography (TLC)** อาศัยกลไกการแยกสาร 4 แบบ คือ partition chromatography, adsorption chromatography, ion-exchange chromatography, size-exclusion chromatography ทั้งนี้ขึ้นกับวัสดุที่เคลือบอยู่บนแผ่นแก้วหรืออลูมิเนียม (aluminium) เช่น ซิลิกาเจล (silica gel), เซฟาเดกซ์ (sephadex), เซลลูโลส (DEAE-cellulose) หรืออลูมิเนียมออกไซด์ (aluminium oxide) เป็นชั้นบางๆ อย่างสม่ำเสมอ ทำหน้าที่เป็น stationary phase โดยทั่วไปนิยมใช้เทคนิคนี้ในการวิเคราะห์สารที่ไม่ละลายน้ำ การแยกโดยใช้ TLC มีข้อดี คือ ใช้ปริมาณของสารที่ต้องการแยกน้อย และใช้เวลาในการแยกสารน้อย

**Gas chromatography (GC)** เป็นโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ชนิดหนึ่ง ซึ่งสามารถแยกสารที่สามารถเปลี่ยนให้อยู่ในรูปแก๊สได้ แบ่งได้เป็น 2 วิธี คือ

1. Gas-solid chromatography (GSC) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกสารที่มีจุดเดือดต่างกันได้ โดยอาศัยหลักการแบ่งละลายระหว่างของแข็งกับแก๊ส โดยใช้คอลัมน์ที่บรรจุด้วยของแข็ง เช่น ซิลิกาเจล หรืออลูมินาเจล ทำหน้าที่เป็น stationary phase และใช้แก๊ส เช่น ไนโตรเจน

หรือ อีเลียมบริสุทธิ ทำหน้าที่เป็น mobile phase วิธีนี้สามารถใช้แยกได้เฉพาะสารที่มีโมเลกุลเล็ก ๆ เท่านั้น

2. Gas-liquid chromatography (GLC) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกสารระเหยที่มีจุดเดือดต่างกันออกจากกันได้ โดยอาศัยหลักการแบ่งละลายระหว่างของเหลวกับแก๊ส วิธีนี้คล้ายกับ GSC แต่ของแข็งที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์จะเคลือบด้วยของเหลวที่ไม่ระเหยหรือของเหลวที่มีจุดเดือดสูง เช่น เอทิลีนไกลคอล (ethylene glycol) หรือ คาร์โบแว็กซ์ซิลิโคน (carbovax silicone) เพื่อใช้เป็น stationary phase ของเหลวเหล่านี้สามารถดูดและปล่อย โมเลกุลที่ผ่านเข้าไปในคอลัมน์โดยขึ้นกับคุณสมบัติทางโครงสร้างและประจุของแต่ละโมเลกุล วิธีนี้ได้รับความนิยมใช้กันมาก เนื่องจากสามารถใช้ในการแยกสารได้กว้างกว่า GSC

High performance liquid chromatography (HPLC) เป็นโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ ซึ่งอาศัยหลักการดูดซับ การแลกเปลี่ยนไอออน ขนาดโมเลกุล หรือความสามารถในการละลาย แตกต่างกันไปตามชนิดของวัสดุที่ใช้บรรจุในคอลัมน์ (packing material) มี mobile phase เป็นของเหลว HPLC มีประสิทธิภาพในการแยกสารสูง เนื่องจากการพัฒนาอนุภาคที่ใช้บรรจุในคอลัมน์ ให้มีขนาดเล็กสม่ำเสมอ มีประสิทธิภาพในการจับสารได้สูง และมีความทนทานต่อแรงดันได้ดี จึงสามารถใช้ปั๊มที่มีแรงดันสูง ทำให้แยกสารได้อย่างรวดเร็ว

### 7.3 การหาสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์

การกำหนดสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบอินทรีย์ ทำได้โดยอาศัยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี (spectroscopy) จากการที่โมเลกุลแต่ละชนิด โดยเฉพาะ ไฮโดรเจนและคาร์บอน ซึ่งเป็นองค์ประกอบของโครงสร้างสารเกือบทุกชนิด สามารถดูดกลืนรังสีต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 13 และถูกกระตุ้นได้ การเข้าสู่สถานะกระตุ้นของโมเลกุลเกิดจากหลายสาเหตุ เช่น การสั่น (vibration) และการหมุน (rotation) ของโมเลกุล การแทรนซิชันของอิเล็กตรอน (electron transition) หรือการหมุนกลับทิศของนิวเคลียส (nuclear spin inversion) การกระตุ้นแต่ละรูปแบบจะใช้พลังงานที่ต่างกัน และการที่โมเลกุลของสารมีสภาพแวดล้อมที่ต่างกันก็จะทำให้สเปกตรัมที่ได้มีลักษณะที่ต่างกัน การกำหนดโครงสร้างของสารอินทรีย์จำเป็นต้องใช้ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีหลายๆ เทคนิคประกอบกันในการพิจารณา

ตารางที่ 13 รังสีแม่เหล็กไฟฟ้าในแต่ละช่วงความยาวคลื่นต่างๆ

Table 13. Electromagnetic radiation.

Radiation	Wavelength	Energy (kcal)	Transition
Far UV	100-200 nm	286-143	Electronic transition
Near UV	200-350 nm	143-82	Electronic transition
Visible	350-800 nm	82-36	Electronic transition
Near IR	0.8-2.0 $\mu\text{m}$	36-14.3	Vibration and rotation
Middle IR	2-16 $\mu\text{m}$	14.3-1.8	Vibration and rotation
Far IR	16-300 $\mu\text{m}$	1.8-1	Vibration and rotation
Microwaves	$\sim 1$ cm	$\sim 10^4$	Vibration and rotation
Radiowaves	$\sim \text{m}$	$\sim 10^6$	Nuclear spin inversion

ที่มา : คัดแปลงจาก พิมพีจิต คามพวรรณ (2541)

Ultraviolet spectroscopy (UV Spectroscopy) (Crew *et al.*, 1998) เป็นเทคนิคที่ใช้รังสีอัลตราไวโอเล็ตผ่านเข้าสู่โมเลกุลของสารอินทรีย์ ส่วนหนึ่งของรังสีจะถูกดูดกลืนไว้ ทำให้อิเล็กตรอนในโมเลกุลนั้นเกิดทรานซิชัน คืออิเล็กตรอนที่สถานะพื้นจะถูกกระตุ้นให้ขึ้นไปสู่สถานะกระตุ้น ซึ่งการทรานซิชันของอิเล็กตรอนจะใช้พลังงานสูงกว่าการสั่น และการหมุนของโมเลกุล เมื่ออิเล็กตรอนในโมเลกุลถูกกระตุ้นจึงทำให้โมเลกุลนั้นเกิดการสั่น และการหมุนควบคู่ไปด้วยเสมอ โดยทั่วไป UV สเปกตรัมที่นิยมบันทึกอยู่ในช่วง 200-400 นาโนเมตร (nm)

สารอินทรีย์ที่มีโครโมฟอร์ (chromophore) หรือส่วนของโมเลกุลที่ทำหน้าที่ดูดกลืนรังสีต่างกันจะสามารถดูดกลืนรังสีอัลตราไวโอเล็ตในช่วงคลื่นที่ต่างกัน และการมีโครโมฟอร์หลายชนิดก็จะมีทรานซิชันของอิเล็กตรอนได้หลายแบบ คืออาจได้แถบดูดกลืนหลายแบบ

Infrared spectroscopy (IR) (Silverstein and Webster, 1998) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการพิสูจน์โครงสร้างของสารประกอบอินทรีย์ โดยศึกษาการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดของสาร ซึ่งเกิดจากอันตรกิริยาระหว่างคลื่นอินฟราเรดและโมเลกุลของสาร โดยเมื่อสารอินทรีย์ดูดกลืนรังสีอินฟราเรด รังสีจะถูกเปลี่ยนเป็นพลังงานของการสั่นของโมเลกุล (energy of molecular vibration) รังสีที่ถูกดูดกลืนจะมีค่าที่แน่นอน (quantized) ทำให้สเปกตรัมที่ได้จะปรากฏเป็นแถบดูดกลืนมากกว่าเป็นเส้น เพราะการเปลี่ยนแปลงพลังงานของการสั่นค่าเดียว มักตามด้วยการเปลี่ยนแปลงพลังงานของการหมุน (rotational energy) จำนวนมาก

**Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR)** (Silverstein and Webster, 1998) เป็นวิธีที่อาศัยการดูดกลืนพลังงานคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าของสารในสนามแม่เหล็ก โดยเกิดจากปฏิกิริยาระหว่างพลังงานในช่วงความถี่คลื่นวิทยุ ที่มีต่อนิวเคลียสของอะตอมในสนามแม่เหล็กที่มีความเข้มสูง ในโมเลกุลของสารซึ่งประกอบด้วยนิวเคลียสหลายตัวที่มีสภาพแวดล้อมทางเคมีที่ต่างกัน จึงตอบสนองต่อความถี่แตกต่างกัน

เทคนิคทาง NMR เกี่ยวข้องกับสมบัติแม่เหล็กของนิวเคลียสอะตอม (atomic nucleus) คือ นิวเคลียสที่มีเลขสปิน (spin number) มากกว่าศูนย์ จะมีประจุในนิวเคลียสสามารถหมุนรอบตัวเองได้ การหมุนของประจุนิวเคลียสทำให้เกิด โมเมนต์แม่เหล็กขึ้น นิวเคลียสเหล่านี้จึงมีสมบัติเหมือนเป็นแท่งแม่เหล็ก เรียกว่า แม่เหล็กนิวเคลียส (nuclear magnet) ทำให้ถ้ามีแรงจากสนามแม่เหล็กภายนอกมากระทำ แม่เหล็กนิวเคลียสจะวางตัวในทิศทางที่จำเพาะ โดยแกนหมุนของนิวเคลียสจะทำมุมกับแนวเส้นแรงของสนามแม่เหล็กนั้นทำให้การหมุนของนิวเคลียสมีลักษณะเหมือนการหมุนควงของลูกข่าง ในการกระตุ้นด้วยคลื่นความถี่วิทยุที่เหมาะสม ในทิศทางที่ตั้งฉากกับแนวเส้นแรงของสนามแม่เหล็กภายนอก ทำให้นิวเคลียสมีการเปลี่ยนสปินไปในทิศทางที่มีพลังงานสูงขึ้น เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า เรโซแนนซ์ (resonance) เนื่องจากเป็นเรโซแนนซ์ของแม่เหล็กนิวเคลียส จึงเรียกว่า Nuclear Magnetic Resonance หรือ NMR

**Mass spectrometry** (Silverstein and Webster, 1998) เป็นสเปกโทรสโกปีที่ใช้วิเคราะห์โครงสร้างของสารอินทรีย์ โดยอาศัยหลักการเมื่อโมเลกุลของสารอินทรีย์ถูกระดมยิงด้วยอิเล็กตรอนที่มีพลังงานสูง จะทำให้โมเลกุลสูญเสียอิเล็กตรอน และเกิดเป็นไอออนประจุบวกที่ไม่เสถียร ทำให้เกิดการแตกออกของโครงสร้าง ซึ่งการแตกออกของโครงสร้างจะมีลักษณะที่แน่นอน ทำให้โมเลกุลของสารแต่ละชนิดมีลักษณะการแตกออกของโมเลกุลที่เฉพาะตัว ทำให้มีลักษณะของสเปกตรัมเป็นแบบเส้นที่เกิดจากไอออนประจุบวก (positive ion) สเปกโทรสโกปีแบบนี้ต่างจากสเปกโทรสโกปีอื่นๆ ซึ่งเป็นประเภทดูดกลืน คือ จะทำสารให้กลายเป็นไอออน แล้วแยกไอออนต่างๆ ออกจากกันตามค่ามวลต่อประจุ ( $m/z$ ) ของไอออนเหล่านั้น ดังนั้น สเปกโทรสโกปีแบบนี้จึงมีการทำลายสารตัวอย่าง จะไม่ได้สารตัวอย่างกลับคืน แต่มีข้อดีคือ ใช้สารปริมาณเพียงเล็กน้อยเป็นไมโครกรัม

## วัตถุประสงค์

1. เพื่อแยกและทำบริสุทธิ์สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์จากสารสกัดหยาบของแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากทะเลที่ผ่านการคัดกรองแล้วว่าสามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้

2. เพื่อศึกษาสูตร โครงสร้างทางเคมีของสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์จากแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากทะเลที่คัดเลือกได้

## บทที่ 2

### วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

#### วัสดุ

##### 1. เชื้อแอกติโนมัยสีทที่แยกได้จากทะเล

เชื้อแอกติโนมัยสีทที่แยกได้จากทะเลในประเทศไทย โดยสุภานันท์ แซ่ลิ้ม (2548) ซึ่งผ่านการคัดกรองแล้วว่าสามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์ ทั้ง 4 ชนิด คือ KB, HT-29, MCF-7 และ HeLa โดย อัครวิทย์ กาญจนโอภาส (2548)

##### 2. เซลล์มะเร็ง

เซลล์มะเร็ง 4 ชนิด ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.สุปรียา ยืนยงสวัสดิ์ ภาควิชาเภสัชเวช และเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ คือ

- มะเร็งปากมดลูก (Human cervix carcinoma, KB)
- มะเร็งลำไส้ (Human colon adenocarcinoma, HT-29)
- มะเร็งเยื่อช่องปาก (Human cervix, HeLa)
- มะเร็งเต้านม (Breast adenocarcinoma, MCF-7)

##### 3. อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยสีทที่แยกได้จากทะเล (วิธีการเตรียมแสดงในภาคผนวก ก)

- อาหารสูตร A
- อาหารสูตร B
- อาหารสูตร C
- อาหารสูตร D
- Nutrient agar

#### 4. สารเคมี

- Acetone (LAB-SCAN, IRELAND)
- Acetonitrile (LAB-SCAN, IRELAND)
- Chloroform (LAB-SCAN, IRELAND)
- Dichloromethane (LAB-SCAN, IRELAND)
- Ethanol (LAB-SCAN, IRELAND)
- Ethyl acetate (LAB-SCAN, IRELAND)
- Hexane (LAB-SCAN, IRELAND)
- Isopropanol (LAB-SCAN, IRELAND)
- Methanol (LAB-SCAN, IRELAND)
- Water (LAB-SCAN, IRELAND)

#### อุปกรณ์

- เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Shaker incubation) รุ่น VS-8480SRN
- เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporator) (Buchi)
- เครื่อง Analytical High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ของ Hewlett Peckard<sup>®</sup> Agilent 1100, ChemStation software (version A8.01), quaternary pump (Agilent G1311A) ตรวจวัดด้วย diode array detector (Agilent G1315A) และมี auto sampler (Agilent G1313A) เป็น injector port
- เครื่อง Preparative High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ของบริษัท Water<sup>®</sup> 600E ตรวจวัดด้วย Water<sup>®</sup> 484 tunable detector และมี Rheodyne<sup>®</sup> 7125 เป็น injector port
- เครื่อง Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400
- คอลัมน์ชนิด reversed phase (Phenomenex<sup>®</sup>, 10 $\mu$ , 10 x 250 mm)
- คอลัมน์ชนิด normal phase (Econosil<sup>®</sup>, 10 $\mu$ , 7.0 x 250 mm)
- คอลัมน์ Kontes ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.8 และ 3 เซนติเมตร ยาว 30 เซนติเมตร สำหรับ flash column chromatography
- TLC Alumina Sheets silica gel 60 F<sub>254</sub> (Fluka)
- TLC Alumina Sheets silica gel RP-18 F<sub>254s</sub> (Fluka)

## วิธีการ

### 1. การคัดกรองสารสกัดที่ผ่านการคัดเลือกแล้วว่า มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

1.1 ทำการคัดเลือกสารสกัดหยาบของแอคติโนไมด์ที่แยกได้จากทะเล จากจำนวนสารสกัดหยาบทั้งหมด 212 สารสกัด (สุภานันท์ แซ่ถิ่ม, 2548) ที่ผ่านการคัดกรองเบื้องต้นแล้วว่า มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งต่างๆ คือ KB, HT-29, MCF-7 และ HeLa (อัครวิทย์ กาญจนโอภาส, 2548) พบว่ามีสารสกัดหยาบ 17 สารสกัด ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งทั้ง 4 ชนิดดังกล่าวอยู่ในเกณฑ์ที่สูง คือมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงกว่า 70 และสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้อย่างน้อย 1 ชนิดขึ้นไป

1.2 พิจารณาจากส่วนประกอบทางเคมีของสารสกัดทั้ง 17 สารสกัด โดยอาศัยข้อมูลจากโครมาโทแกรมจากการทำ Diode Array Detector HPLC ที่ทำการดูดกลืนแสง 254 และ 210 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) รุ่น Agilent 1100 โดยใช้คอลัมน์ชนิด reversed phase (Thermo Hypersil BDS, C18, 5 $\mu$ m, 4.5 x250 mm) มี mobile phase เป็นแบบเกรเดียนต์ (Gradient) เริ่มชะคอลัมน์จาก 45% ของเมทานอลในน้ำไปจนถึง 100% เมทานอล (สุภานันท์ แซ่ถิ่ม, 2548) ซึ่งสามารถตรวจวัดสารที่มีคุณสมบัติในการดูดกลืนแสง UV ได้ในกรณีที่มีสารสกัดมีพีค (peak) ซึ่งสามารถดูดกลืนแสง UV ได้ก็จะศึกษาลักษณะของสเปกตรัมการดูดกลืนแสง UV ในช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 210-660 นาโนเมตร ซึ่งจะช่วยให้การจัดจำแนกสารสกัดหยาบตามองค์ประกอบทางเคมีอย่างละเอียดมากขึ้น จากนั้นจึงจัดกลุ่มของสารสกัดที่มีลักษณะของโครมาโทแกรมที่คล้ายกันออกเป็น 5 กลุ่ม

1.3 ศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งทั้ง 4 ชนิดของสารสกัดในแต่ละกลุ่ม โดยอาจพิจารณาคัดเลือกสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้หลายชนิด หรือมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิดใดชนิดหนึ่งสูงเป็นพิเศษ ร่วมกับการพิจารณาคัดเลือกเชื้อแอคติโนไมด์ที่สามารถผลิตสารสกัดได้ในปริมาณสูง และเป็นสายพันธุ์ที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่มีการเจริญเติบโตดี เพื่อคัดเลือกรวมสารสกัดหยาบจากแต่ละกลุ่มให้ได้ 5 สารสกัด

1.4 พิจารณาจากสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ โดยการจำแนกเชื้อแอคติโนไมด์ที่สามารถสร้างสารสกัดที่ผ่านการคัดเลือกแล้วจากข้อ 1.3 โดยให้ความสำคัญกับแอคติโนไมด์ที่เป็นสายพันธุ์ใหม่หรือเป็นสายพันธุ์ที่ไม่เคยมีผู้รายงานองค์ประกอบทางเคมีไว้ก่อนหน้านี้ เพื่อคัดเลือกให้ได้สารสกัดหยาบ 1 สารสกัด

## 2. การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะที่แยกได้จากทะเล โดยวิธีชีววิทยาโมเลกุล

### 2.1 การสกัดแยกจีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA) จากเชื้อแบคทีเรีย

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร NB (nutrient broth) อยู่ 100 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน นำน้ำหมักที่มีตัวเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียอยู่มา 1.5 มิลลิลิตร ใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที (rpm) นาน 2 นาที เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นนำตะกอนเซลล์ที่ได้มาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ (Wizard Genomic DNA Purification Kit) โดยละลายตะกอนเซลล์ด้วย 50 mM EDTA buffer (pH 8.0) ปริมาตร 480 ไมโครลิตร เติมน้ำละลาย lytic enzyme (10 mg/ml lysozyme) ปริมาตร 120 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที เพื่อให้ผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีนนุ่มลงและเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของการย่อยผนังเซลล์ให้ดีขึ้น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 รอบต่อนาที นาน 2 นาที เก็บส่วนใสมาเติมน้ำละลาย Nuclei lysis ปริมาตร 600 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เพื่อย่อยผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมน้ำละลาย RNase ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องเพื่อย่อยสลาย RNA หลังจากนั้นทำการตกตะกอนโปรตีนโดยเติมน้ำละลาย protein precipitation ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex นาน 20 วินาที บ่มตัวอย่างในน้ำแข็งนาน 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 รอบต่อนาที นาน 3 นาที เก็บส่วนใสไว้แล้วเติม isopropanol ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เพื่อตกตะกอน DNA ปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง ทำการล้าง DNA ด้วยร้อยละ 70 ของเอทานอล (Ethanol) ปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10-15 นาที เพื่อระเหยเอาเอทานอลออก จากนั้นเติม DNA rehydration solution ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เก็บ DNA ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

### 2.2 การวิเคราะห์หาจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยวิธี agarose gel electrophoresis

วิเคราะห์หาจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 2.1 โดยเตรียมร้อยละ 0.8 ของอะกาโรสเจล (agarose gel) ในสารละลายบัฟเฟอร์ TAE เกล่งในแบบพิมพ์ซึ่งมีหวี (comb) เสียบอยู่ ปล่อยให้เจลแข็งตัวเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วดึงหวีออก จากนั้นผสมจีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 2.1 กับสีติดตาม (tracking dye) ในอัตราส่วน 5:2 แล้วหยอดตัวอย่างลงในหลุมบนอะกาโรสเจล นำไปทำอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลแชมเบอร์ (gel chamber) โดยใช้ความต่างศักย์ 80 โวลต์

(Volt) นาน 45-50 นาที ย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) เป็นเวลา 1 นาที ตรวจสอบการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต

### 2.3 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

การทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของยีน 16S rDNA ใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของแอคติโนมัยซีท ซึ่งสกัดได้จากวิธีในข้อ 2.1 เป็นแม่แบบ (DNA template) โดยทำการเติมส่วนผสมต่างๆ ที่ใช้ในการทำให้เกิดปฏิกิริยา PCR เรียงลำดับดังแสดงในตารางที่ 14

ตารางที่ 14 ส่วนผสมของรีเอเจนต์ต่างๆ ในการทำ PCR

Table 14. The PCR reaction mixtures.

Reagent	Volume ( $\mu$ l)
10xEx Takara buffer	5
2.5 mM dNTP	4
Primer 1 (Forward)	1
Primer 2 (Reverse)	1
H <sub>2</sub> O	36.75
DNA template	2
Ex Takara	0.25
Total	50

หมายเหตุ Forward primer คือ 27f (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')

Reverse primer คือ 1492r (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3')

กระบวนการ PCR ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ซึ่งมีการเกิดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิทั้งหมด 25 รอบปฏิกิริยา ขั้นตอนแรกคือ การทำ Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำ Annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ Extension ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที

จากนั้นหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการ PCR (PCR product) ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้งาน

## 2.4 การวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอโดยวิธี agarose gel electrophoresis

ทำการตรวจสอบยีนที่มีขนาด 1,500 เบส โดยเตรียมอะกาโรสเจลร้อยละ 1 ในสารละลายบัฟเฟอร์ TAE เทลงในแบบพิมพ์ซึ่งมีหัวเสียบอยู่ ปล่อยให้เจลแข็งตัวเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วดึงหัวออก จากนั้นผสม PCR product ที่ได้จากข้อ 2.3 กับสีติดตาม ในอัตราส่วน 5:2 แล้วหยอดตัวอย่างลงในหลุมบนอะกาโรสเจล นำไปทำอิเล็กโตรโฟรีซิส ในเจลแชนเบอร์ โดยใช้ความต่างศักย์ 80 โวลต์ นาน 45-50 นาที ย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์เป็นเวลา 1 นาที ตรวจสอบการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต เปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

## 2.5 การทำบริสุทธิ์และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน 16S rDNA

ภายหลังการทำ PCR แล้ว ทำบริสุทธิ์ชิ้นส่วนของยีน 16S rDNA ด้วยชุดทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอทางการค้า (GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit) โดยเติม PCR product ที่ได้จากข้อ 2.3 ลงในคอลัมน์ GFX ซึ่งประกอบอยู่กับ collection tube ที่มี capture buffer อยู่ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยการใช้ปิเปต (pipette) ดูดขึ้นลงประมาณ 4-6 ครั้ง เพื่อยึดชิ้นส่วนของยีน 16S rDNA ให้ติดอยู่กับคอลัมน์ GFX ปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ที่มีส่วนใส่ที่อยู่ในส่วน collection tube แล้วเติม wash buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เพื่อล้างชิ้นส่วนของยีน 16S rDNA จากนั้นนำคอลัมน์ GFX ใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม elution buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ก็จะได้ชิ้นส่วนของยีน 16S rDNA บริสุทธิ์ (ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของชิ้นส่วนยีน 16S rDNA โดยวิธี Agarose gel electrophoresis ตามวิธีในข้อ 2.4) จากนั้นทำการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน 16S rDNA ด้วยเครื่อง Perkin Elmer 377 sequencer (ส่งตัวอย่างชิ้นส่วนยีน 16S rDNA ไปวิเคราะห์หาลำดับเบสที่ Macrogen Incorporation ประเทศเกาหลี) แล้วนำลำดับเบสของชิ้นส่วนยีน 16S rDNA ที่ได้จากไพโรเมอ์ทั้ง 2 ไพโรเมอ์ มาต่อกันด้วยโปรแกรม BioEdit (Hall *et al.*, 1999) จากนั้นนำชิ้นส่วนยีน 16S rDNA ที่ได้มาเปรียบเทียบกับความเหมือนของลำดับเบส (Blast) ใน GeneBank DNA database จากเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>

### 3. การเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยสีทเพื่อเพิ่มปริมาณสารสกัด

3.1 เตรียมเชื้อตั้งต้น โดยเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยสีทที่แยกได้จากทะเล สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 1 ที่เป็นเชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร NA ที่เตรียมด้วยน้ำทะเล บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นทำการตัดชิ้นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโคโลนีของแอกติโนมัยสีทที่แยกได้จากทะเล เจริญอยู่ ขนาด 1x1 เซนติเมตร จำนวน 3-4 ชิ้น ถ่ายชิ้นอาหารลงในฟลasks ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวสูตรที่เหมาะสมต่อการผลิตสารของเชื้อแอกติโนมัยสีทที่เตรียมด้วยน้ำทะเล อยู่ 100 มิลลิลิตร ในฟลasks ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที (rpm) อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

3.2 ถ่ายเชื้อตั้งต้นมาร้อยละ 5 ใส่ลงในฟลasks ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวสูตรที่เหมาะสมต่อการผลิตสารของเชื้อแอกติโนมัยสีทที่เตรียมด้วยน้ำทะเล อยู่ 100 มิลลิลิตร จำนวน 80 ฟลasks นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้ได้ปริมาตรน้ำหมักรวม 8 ลิตร

### 4. การสกัดสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

การสกัดสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งจากแอกติโนมัยสีทที่แยกได้จากทะเล สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 1

4.1 สกัดสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งจากน้ำหมัก โดยเติมเอธิลอะซิเตท (Ethyl acetate) ลงไปผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ ในอัตราส่วน 1:1 ในกรวยแยก (separatory funnel) เขย่าแรงๆ จากนั้นตั้งทิ้งไว้ในตู้เย็นเพื่อให้เกิดการแยกชั้นของน้ำหมักและเอธิลอะซิเตท เก็บชั้นของเอธิลอะซิเตทไว้ ส่วนชั้นของน้ำหมัก นำมาสกัดซ้ำด้วยเอธิลอะซิเตท อีก 2 ครั้ง

4.4 รวบรวมชั้นของเอธิลอะซิเตท ที่สกัดได้จากส่วนของน้ำหมักเข้าด้วยกัน นำไปประเหยแห้งเพื่อเอาเอธิลอะซิเตทออกด้วยเครื่องทำระเหยภายใต้ความดันสูญญากาศ (Rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จนได้สารสกัดหยาบแห้ง

4.5 หาน้ำหนักแห้งของสารสกัดหยาบที่ได้ และเก็บสารสกัดหยาบไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

## 5. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (Skehan *et al.*, 1990)

5.1 เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง 4 ชนิด คือ HeLa, HT-29, KB และ MCF-7 ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร EMEM อยู่ 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใน CO<sub>2</sub> incubator ที่มีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO<sub>2</sub>) อยู่ร้อยละ 5 และมีปริมาณความชื้นอยู่ร้อยละ 95 เป็นเวลา 3-4 วัน

5.2 เตรียมเซลล์แขวนลอย (cell suspension) ของเซลล์มะเร็งแต่ละชนิด โดยถ่ายอาหาร EMEM ที่อยู่ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งออก แล้วล้างเซลล์มะเร็งที่เกาะอยู่ที่ผิวของขวดเพาะเลี้ยงด้วย phosphate buffered saline (pH 7.4) จากนั้นย่อยเซลล์มะเร็งออกเป็นเซลล์เดี่ยวๆ โดยเติมร้อยละ 0.1 ของ trypsin-EDTA ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไปในขวดเพาะเลี้ยง แล้วดูดขึ้นลงเบาๆ ประมาณ 2-3 ครั้ง ด้วยปิเปต จากนั้นถ่ายร้อยละ 0.1 ของ trypsin-EDTA ออกไป 0.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใน CO<sub>2</sub> incubator เป็นเวลา 5 นาที แล้วเติมอาหาร EMEM ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงไปในขวดเพาะเลี้ยง

5.3 คำนวณหาจำนวนเซลล์มะเร็งที่มีอยู่ในขวดเพาะเลี้ยง โดยการนับเซลล์ที่มีชีวิต (viable cells) โดยทำการย้อมเซลล์มะเร็งด้วยสี Trypan blue แล้วทำการนับจำนวนเซลล์มะเร็งโดยใช้ haemocytometer เมื่อทราบความเข้มข้นของเซลล์มะเร็งแล้ว จากนั้นทำการเจือจางเซลล์มะเร็งด้วยอาหาร EMEM ให้ได้เซลล์มะเร็งที่มีความเข้มข้น  $3 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ถ่ายเซลล์มะเร็งลงใน 96-well microtiter plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร (จะได้เซลล์มะเร็ง 3,000 เซลล์ต่อหลุม) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใน CO<sub>2</sub> incubator ที่มีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ อยู่ร้อยละ 5 และมีปริมาณความชื้นอยู่ร้อยละ 95 เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

5.4 เติมนสารละลายตัวอย่างที่ต้องการทดสอบสำหรับเซลล์มะเร็ง 4 ชนิด โดยทำการละลายสารตัวอย่างน้ำหนัก 200 ไมโครกรัม ด้วย DMSO ปริมาตร 10 ไมโครลิตร จากนั้นทำการเจือจางสารละลายตัวอย่างด้วยอาหาร EMEM ให้มีความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เติมนสารละลายตัวอย่างลงไปหลุมละ 100 ไมโครลิตร ทำให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายตัวอย่างเป็น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใน CO<sub>2</sub> incubator ที่มีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ อยู่ร้อยละ 5 และมีปริมาณความชื้นอยู่ร้อยละ 95 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

5.5 ถ่ายอาหาร EMEM เก่าออกจาก 96-well microtiter plate แล้วเติมอาหาร EMEM ใหม่ลงไป ใน 96-well microtiter plate หลุมละ 200 ไมโครลิตร ใช้ปิเปตดูดอาหาร EMEM ขึ้นลงเบาๆ ประมาณ 2-3 ครั้ง แล้วถ่ายอาหาร EMEM ออกจากนั้นเติมอาหาร EMEM ลงไปใหม่อีกหลุมละ

200 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใน CO<sub>2</sub> incubator ที่มีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ อยู่ร้อยละ 5 และมีปริมาณความชื้นอยู่ร้อยละ 95 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

5.6 วิเคราะห์หาอัตราการรอดชีวิต (percent survival) ของเซลล์มะเร็ง (เทียบกับชุดควบคุมซึ่งไม่มีการเติมสารตัวอย่าง) ด้วยวิธี Sulphorodamine B assay (SRB assay) โดยทำการตรึงเซลล์มะเร็งที่ยังมีชีวิตอยู่ให้ติดแน่นอยู่กับ 96-well microtiter plate ด้วยการเติมร้อยละ 40 ของ trichloroacetic acid ลงไปหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์มะเร็งมาล้างด้วยน้ำสะอาด 5 ครั้ง แล้วเติมร้อยละ 0.4 ของ Sulphorodamine B (เตรียมในร้อยละ 1 ของ acetic acid) ลงไปหลุมละ 50 ไมโครลิตร เพื่อทำการย้อมสีเซลล์มะเร็งที่เหลืออยู่ ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที นำมาล้างด้วย acetic acid ร้อยละ 1 จำนวน 5 ครั้ง แล้วตั้งทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

5.7 นำเพลทที่แห้งแล้วมาเติม 10 mM tris base ลงไปหลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อละลายสี Sulphorodamine B ออกจากเซลล์มะเร็ง โดยเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที บนเครื่องเขย่านาน 20 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง UV ด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จะแปรผันตรงกับจำนวนเซลล์ที่ถูกตรึงไว้ในแต่ละหลุม

5.8 นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตจากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงชุดควบคุม} - \text{ค่าการดูดกลืนแสงชุดทดสอบ}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงชุดควบคุม}} \times 100$$

## 6. การแยกและการทำบริสุทธิ์ของสารสกัด

### 6.1 วิธีโครมาโตกราฟีแผ่นบาง (Thin-layer chromatography, TLC)

วิธีโครมาโตกราฟีแผ่นบางใช้ในการเลือกกระบวนการทำละลายหรือ mobile phase ที่เหมาะสมที่ใช้ในการแยกและทำให้บริสุทธิ์ของสารสกัด โดยนำสารสกัดที่ต้องการแยกมาจุดลงบนแผ่น TLC (TLC aluminium sheet รุ่น silica gel 60 F<sub>254</sub>) แล้วใช้สารละลาย เช่น เมทานอล (MeOH), เอทิลอะซิเตท (EtOAc), ไดคลอโรมีเทน (Dichlorometane), คลอโรฟอร์ม (Chloroform) และเฮกเซน (Hexane) ในอัตราส่วนต่างๆ ที่เหมาะสมเป็นตัวชะ ซึ่งให้ค่า R<sub>f</sub> ของสารประมาณ 0.2-0.3 การตรวจสอบตำแหน่งของสารบนแผ่น TLC ทำได้โดยส่องภายใต้รังสีอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 หรือ 315 นาโนเมตร หรือพ่นด้วยสารละลาย phosphomolybdic acids (phosphomolybdic acids 250 มิลลิกรัม ละลายในเอทานอล 50 มิลลิลิตร) หลังจากให้ความร้อนกับแผ่น TLC จะปรากฏจุดสีน้ำเงินของสารบนพื้นสีเหลือง จากนั้นนำไปวัดค่า R<sub>f</sub>

## 6.2 การแยกสารด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี (Column chromatography)

### 6.2.1 วิธี Size-exclusion column chromatography

ใช้คอลัมน์ Kontes ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร ยึดคอลัมน์บนขาตั้งให้ตั้งฉากกับพื้น บรรจุคอลัมน์ที่ปิดปลายด้านล่างไว้ด้วย Sephadex LH-20 ที่อิมมัวอยู่ในเมทานอล ให้ Sephadex LH-20 มีความสูง 2 ใน 3 ของคอลัมน์ ทำการชะคอลัมน์ด้วยเมทานอลจนกระทั่ง Sephadex LH-20 อัดตัวกันแน่นในคอลัมน์และมีผิวหน้าเรียบ ปล่อยให้เมทานอลชะออกจากคอลัมน์จนกระทั่งระดับของเมทานอลอยู่สูงกว่าระดับของผิวหน้าของ Sephadex LH-20 เล็กน้อย ทำการปิดปลายด้านล่างของคอลัมน์ จากนั้นทำการเติมสารสกัดที่ต้องการแยก โดยละลายสารสกัดด้วยเมทานอลปริมาณน้อยที่สุด ค่อยๆ ใส่น้ำสารละลายตัวอย่าง ลงบนผิวหน้าของ Sephadex LH-20 ที่อยู่ในคอลัมน์อย่างช้าๆ โดยอาศัยหลอดหยด (pasteur pipette) โดยการแตะปลายของหลอดหยดไปรอบๆ ผนังด้านในของคอลัมน์จนสารละลายตัวอย่างหมด เปิดปลายด้านล่างของคอลัมน์ให้สารละลายตัวอย่างเคลื่อนที่ลงไป ในคอลัมน์จนกระทั่งเห็นผิวหน้าของ Sephadex LH-20 แห้งเพียงเล็กน้อย ทำการชะคอลัมน์ด้วยเมทานอล เก็บสารละลายที่ชะออกมาครั้งละ 15 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายแต่ละส่วนที่ได้มาตรวจสอบว่ามียอดรีเฟรคตอมิเตอร์เหมือนกันหรือไม่ โดยใช้วิธีโครมาโตกราฟีแผ่นบาง ทำการรวมส่วนของสารละลายที่มีค่า  $R_f$  เหมือนกันหรือใกล้เคียงกันเพื่อนำมาแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ต่อไป

### 6.2.2 วิธี Normal phase column chromatography

ซัง Silica gel 60 ที่มีขนาดอนุภาค 230-400 mesh (Merk) ซึ่งใช้เป็นตัวดูดซับ ให้ Silica gel 60 มีน้ำหนักมากกว่าน้ำหนักของสารตัวอย่างที่ต้องการแยกประมาณ 30 เท่า เติมตัวทำละลายที่ต้องการใช้เป็น mobile phase ที่ได้จากข้อ 6.1 ลงไปจน Silica gel 60 มีลักษณะเหนียวแล้ว ค่อยๆ เทสารละลาย Silica gel 60 ที่เตรียมไว้ลงไป ในคอลัมน์ (คอลัมน์ Kontes) ที่ปิดปลายด้านล่างไว้และยึดอยู่บนขาตั้งให้ตั้งฉากกับพื้น โดยให้มีสัปดาห์ระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของคอลัมน์และความสูงของ Silica gel 60 เป็น 1:10 (Toube, 2006) ทำการชะคอลัมน์ด้วย mobile phase จนกระทั่ง Silica gel 60 อัดตัวกันแน่นในคอลัมน์และมีผิวหน้าเรียบ ปล่อยให้ mobile phase ชะออกจากคอลัมน์จนกระทั่งระดับของ mobile phase อยู่สูงกว่าระดับของผิวหน้าของ Silica gel 60 เล็กน้อย ทำการปิดปลายด้านล่างของคอลัมน์ จากนั้นทำการเติมสารตัวอย่างที่ต้องการแยก โดยละลายสารตัวอย่างด้วย mobile phase ปริมาณน้อยที่สุด ค่อยๆ ใส่น้ำสารละลายตัวอย่าง ลงบนผิวหน้าของ Silica gel 60 ที่อยู่ในคอลัมน์อย่างช้าๆ เช่นเดียวกับข้อ 6.2.1 จนสารละลายตัวอย่างหมด เปิดปลายด้านล่างของคอลัมน์ให้สารละลายตัวอย่างเคลื่อนที่ลงไป ในคอลัมน์จนกระทั่งเห็นผิวหน้าของ Silica gel 60 แห้งเพียงเล็กน้อย ทำการชะคอลัมน์ด้วย mobile phase เก็บสารละลายที่ชะออกมา จากนั้นนำ

สารละลายแต่ละส่วนที่ได้มาตรวจสอบว่ามีองค์ประกอบทางเคมีเหมือนกันหรือไม่ โดยใช้วิธีโครมาโตกราฟีที่แผ่นบาง ทำการรวมส่วนของสารละลายที่มีค่า  $R_f$  เหมือนกันหรือใกล้เคียงกันเพื่อนำมาแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ต่อไป

### 6.2.3 วิธี Flash column chromatography

ชั่ง Silica gel 60 ที่มีขนาดอนุภาค 230-400 mesh (Merk) ซึ่งใช้เป็นตัวดูดซับ ให้มีน้ำหนักมากกว่าน้ำหนักของสารตัวอย่างที่ต้องการแยกประมาณ 100 เท่า เคี้ยวตัวทำละลายที่ต้องการใช้เป็น mobile phase ที่ได้จากข้อ 6.1 ลงไปจน Silica gel 60 มีลักษณะหนืด แล้วค่อยๆ เทสารละลาย Silica gel 60 ที่เตรียมไว้ลงไปในคอลัมน์ (คอลัมน์ Kontes) ที่ปิดปลายด้านล่างไว้และยึดอยู่บนขาตั้งให้ตั้งฉากกับพื้น เปิดปลายด้านล่างของคอลัมน์ แล้วอัดความดันที่ปลายด้านบนของคอลัมน์เป็นระยะๆ เพื่อให้ Silica gel 60 จัดเรียงตัวอย่างดีและกำจัด mobile phase ส่วนเกิน (ระวังไม่ให้ระดับของ mobile phase ต่ำกว่าระดับของผิวหน้า Silica gel 60) เมื่อทำการบรรจุ Silica gel 60 ทั้งหมดลงในคอลัมน์แล้ว ทำการอัดความดันจนกระทั่งระดับของ mobile phase อยู่สูงกว่าระดับของผิวหน้า Silica gel 60 เพียงเล็กน้อย ปิดปลายด้านล่างของคอลัมน์ จากนั้นทำการเติมสารตัวอย่างที่ต้องการแยก โดยละลายสารตัวอย่างด้วย mobile phase ปริมาณน้อยที่สุด ค่อยๆ ใส่น้ำสารละลายตัวอย่าง ลงบนผิวหน้าของ Silica gel 60 ที่อยู่ในคอลัมน์อย่างช้าๆ เช่นเดียวกับข้อ 6.2.1 จนสารละลายตัวอย่างหมด เปิดปลายด้านล่างของคอลัมน์ให้สารละลายตัวอย่างเคลื่อนที่ลงไป ในคอลัมน์จนกระทั่งเห็นผิวหน้าของ Silica gel 60 แห่งเพียงเล็กน้อย ปิดปลายด้านล่างของคอลัมน์ไว้แล้วค่อยๆ เติม mobile phase ลงไปในคอลัมน์จนเต็ม จากนั้นเปิดปลายด้านล่างของคอลัมน์ แล้วอัดความดันลงที่ปลายด้านบนของคอลัมน์ ทำการเก็บสารละลายที่ชะออกมา จากนั้นนำสารละลายแต่ละส่วนที่ได้มาตรวจสอบว่ามีองค์ประกอบทางเคมีเหมือนกันหรือไม่ โดยใช้วิธีโครมาโตกราฟีที่แผ่นบาง ทำการรวมส่วนของสารละลายที่มีค่า  $R_f$  เหมือนกันหรือใกล้เคียงกันเพื่อนำมาแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ต่อไป

### 6.2.4 วิธี High performance liquid column chromatography (HPLC)

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้เครื่อง Preparative HPLC ของ Water<sup>®</sup> 600E ตรวจวัดด้วย Water<sup>®</sup> 484 tunable detector ที่ค่าการดูดกลืนแสง 210 นาโนเมตร โดยมี Rheodyne<sup>®</sup> 7125 เป็น injector port

## 7. การหาสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์

การกำหนดสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบอินทรีย์ โดยอาศัยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี (Spectroscopy) หลายๆ เทคนิคประกอบกันในการพิจารณา คือ

### 7.1 NMR spectroscopy

บันทึกด้วยเครื่อง Varian Unity<sup>®</sup> Inova 500 spectrometer (Germany) ขนาด 500 MHz สำหรับหาโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัม และ 125 MHz สำหรับหาคาร์บอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัม โดยวัดค่าเคมีคัลชิฟท์ (Chemical shift) เป็นพีพีเอ็ม (ppm) อ้างอิงสัญญาณของตัวทำละลาย โดยสารตัวอย่างที่ใช้ตรวจวัดละลายใน  $\text{CDCl}_3$  (ให้สัญญาณที่  $\delta_{\text{H}}$  7.24 และ  $\delta_{\text{C}}$  77.2), Benzene- $d_6$  (ให้สัญญาณที่  $\delta_{\text{H}}$  7.16 และ  $\delta_{\text{C}}$  128.3) หรือ DMSO- $d_6$  (ให้สัญญาณที่  $\delta_{\text{H}}$  2.49 และ  $\delta_{\text{C}}$  39.5)

### 7.2 Infrared spectroscopy (IR)

บันทึกด้วยเครื่อง Jasco<sup>®</sup> IR-810 infrared spectrophotometer (Japan) ในการวัดอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร ทำการละลายสารตัวอย่างด้วยคลอโรฟอร์ม หยดสารตัวอย่างลงบนแผ่นโซเดียมคลอไรด์ แล้วนำไปวัดหาอินฟราเรดสเปกตรัม

### 7.3 Mass spectrometry (MS)

บันทึกด้วยเครื่อง Micromass<sup>®</sup> LCT mass spectrophotometer ใช้ Electrospray Ionization (ESI) เป็นแหล่งกำเนิดอิเล็กตรอน ทำการตรวจวัดโดยใช้ positive mode  $(\text{M}+\text{H})^+$

### บทที่ 3

#### ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

##### 1. การคัดกรองสารสกัดที่ผ่านการคัดเลือกแล้วว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

1.1 การคัดเลือกจากสารสกัดหยาบของแอคติโนไมด์ที่แยกได้จากทะเล จากจำนวนสารสกัดหยาบทั้งหมด 212 สารสกัด (สุภานันท์ แซ่ลิ้ม, 2548) ที่ผ่านการคัดกรองเบื้องต้นแล้วว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งต่างๆ คือ KB, HT-29, HeLa และ MCF-7 (อัครวิทย์ ภาณุจน โอบาย, 2548) พบว่ามีสารสกัดหยาบ 17 ตัวอย่าง ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งทั้ง 4 ชนิดดังกล่าวอยู่ในเกณฑ์ที่สูง คือ มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงกว่า 70 และสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้อย่างน้อย 1 ชนิดขึ้นไป ดังแสดงในตารางที่ 15

ตารางที่ 15 ผลการคัดกรองสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากทะเลที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

Table 15. Cytotoxic activity of crude extracts from marine derived actinomycetes.

Isolate	Extract code	Dry weight (mg)	Location	Source	Cytotoxic activity (%)			
					Hela	HT-29	KB	MCF-7
CNA002	CNA002D	26.8	Losin	Alga	58.32	72.73	53.00	92.53
CNA003	CNA003D	20.7	Tao Island	Sponge	95.75	84.33	94.66	85.70
CNA029	CNA029C	14.4	Losin	Sponge	88.93	67.30	86.96	86.47
CNA031	CNA031B	50.8	Losin	Sponge	88.66	42.30	78.46	90.21
	CNA031C	6.7			97.22	94.94	97.58	97.49
	CNA031D	6.8			79.91	33.22	65.37	84.65
CNA036	CNA036B	55	Losin	Sponge	92.49	69.13	61.19	58.23
CNA037	CNA037B	25.7	Losin	Sponge	64.51	22.42	67.57	86.86
CNA039	CNA039A	5.3	Losin	Alga	72.62	93.11	96.02	85.82
	CNA039C	11.6			44.73	95.76	97.89	93.56
	CNA039D	33.8			88.31	78.06	61.96	76.34
CNA040	CNA040C	13.2	Pak-Bara	Sediment	-13.85	-25.08	83.66	-30.69
CNA048	CNA048A	12.4	Losin	Alga	99.71	93.74	91.60	98.84
	CNA048C	12.4			99.79	93.87	96.40	99.35
	CNA048D	11.8			89.10	69.98	63.22	90.17
CNA050	CNA050D	15.6	Losin	Sponge	-22.13	-21.73	83.99	12.31
CNA051	CNA051B	53	Phuket	Sediment	20.43	85.50	69.70	46.91

หมายเหตุ เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงกว่า 70 คือ มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

1.2 จากการพิจารณาส่วนประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบทั้ง 17 สารสกัด โดยอาศัยข้อมูลจากโครมาโตแกรมจากการทำ Diode Array Detector HPLC ที่ค่าการดูดกลืนแสง 254 และ 210 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) รุ่น Agilent 1100 โดยใช้คอลัมน์ชนิด reversed phase (Thermo Hypersil BDS C18 5 $\mu$ m, 4.5 x250 mm) มี mobile phase เป็นแบบเกรเดียน (Gradient) เริ่มชะคอลัมน์จาก 45% ของเมทานอลในน้ำไปจนถึง 100% เมทานอล โดยสุภานันท์ แซ่ลิ้ม (2548) เพื่อจัดกลุ่มของสารสกัดหยาบที่มีส่วนประกอบทางเคมีที่คล้ายกัน พบว่าสามารถแบ่งสารสกัดหยาบออกเป็น 5 กลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 16

ตารางที่ 16 การจัดกลุ่มของสารสกัดหยาบที่แยกได้จากแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากทะเลตามองค์ประกอบทางเคมี

Table 16. Groups of crude extracts from marine derived actinomycetes based on chemical composition.

Group	1	2	3	4	5
Crude extract	CNA002D	CNA036B	CNA029C	CNA039A	CNA031B
	CNA003D	CNA039D	CNA031C		CNA037B
		CNA048A	CNA031D		CNA039C
		CNA048C	CNA040C		
			CNA048D		
			CNA050D		
			CNA051B		

1.3 จากการศึกษาลักษณะสมบัติการยับยั้งเซลล์มะเร็งทั้ง 4 ชนิดของสารสกัดหยาบในแต่ละกลุ่ม โดยพิจารณาคัดเลือกสารสกัดหยาบที่สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้หลายชนิด หรือมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดใดชนิดหนึ่งสูงเป็นพิเศษ ร่วมกับการพิจารณาคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถผลิตสารสกัดได้ในปริมาณสูง และเป็นสายพันธุ์ที่เลี้ยงในสูตรอาหารที่มีการเจริญเติบโตดี เพื่อคัดเลือกสารสกัดหยาบจากแต่ละกลุ่ม พบว่าสามารถคัดเลือกสารสกัดหยาบได้ 5 สารสกัด คือ CNA003D, CNA031B, CNA031C, CNA039A และ CNA048C ดังแสดงในตารางที่ 17

ตารางที่ 17 ผลการคัดเลือกลำตัวสายพันธุ์ของเชื้อแอคทีโนมัยซีทที่มียีนส์ประกอบทางเคมีแตกต่างกัน จำนวน 5 ลำตัว

Table 17. Selected crude extracts from marine derived actinomycetes.

Extract	CNA003D	CNA031B	CNA031C	CNA039A	CNA048C
Location	Tao Island	Losin	Losin	Losin	Losin
Source	Sponge	Sponge	Sponge	Alga	Alga
Crude extract (mg /100ml)	20.7	50.8	6.7	5.3	12.4
Cytotoxic activity (%)					
HeLa	95.75	88.66	97.22	72.68	99.79
HT-29	84.33	42.30	94.94	93.11	93.87
KB	94.06	78.46	97.58	96.02	96.40
MCF-7	85.70	90.21	97.49	85.82	99.35

หมายเหตุ เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงกว่า 70 คือ มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

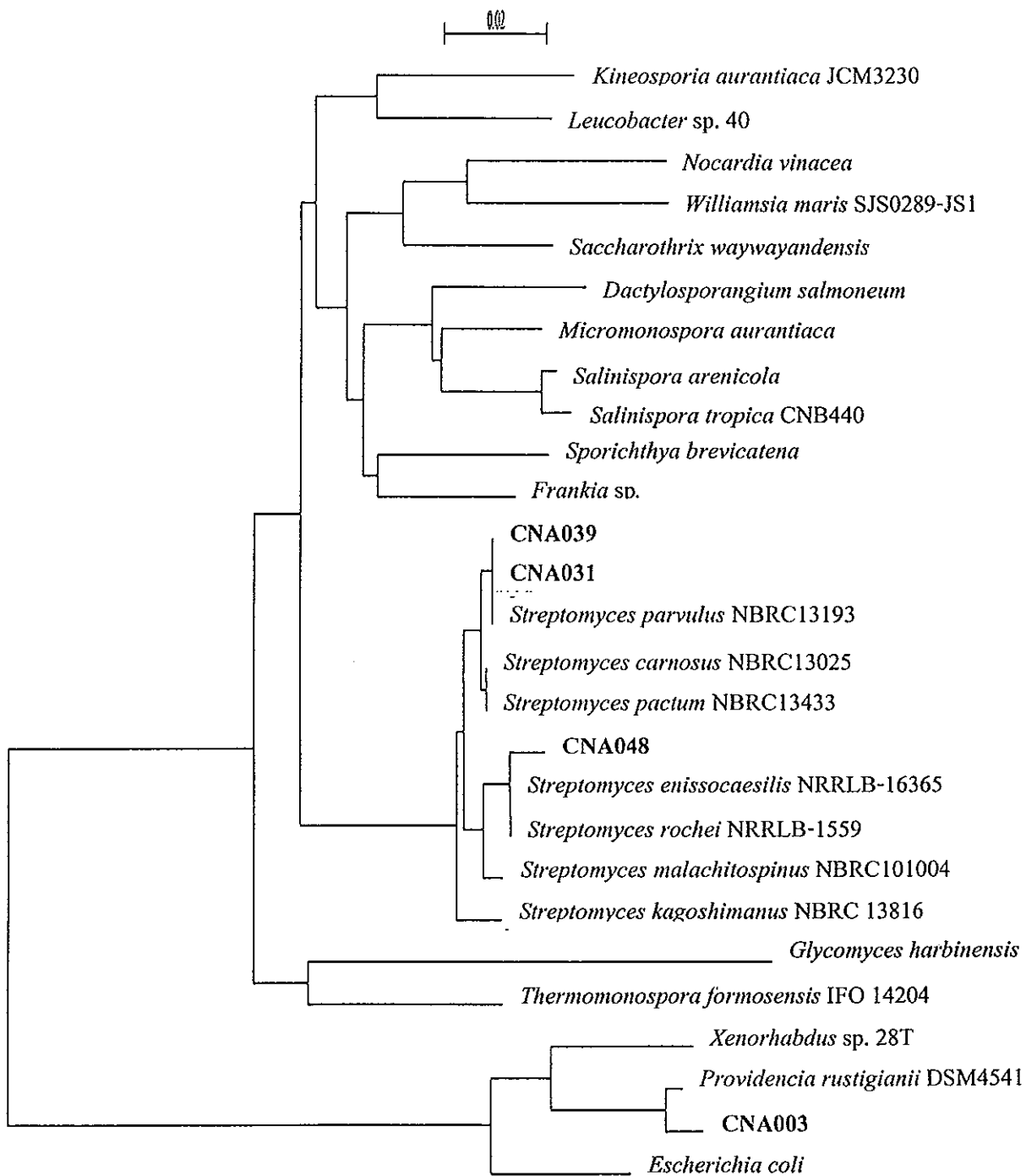
1.4 การจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อแอคทีโนมัยซีทที่แยกได้จากทะเลที่สามารถสร้างสารสกัดที่ผ่านการคัดเลือกแล้ว โดยการวิเคราะห์หาลำดับเบสของยีน 16S rDNA ด้วยเครื่อง Perkin Elmer 377 sequencer (ส่งตัวอย่างชิ้นส่วนยีน 16S rDNA ไปวิเคราะห์หาลำดับเบสที่ Macrogen Incorporation ประเทศเกาหลี)

ผลการวิเคราะห์หาลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของเชื้อแอคทีโนมัยซีทที่แยกได้จากทะเล (ภาคผนวก ค) ให้ผลดังแสดงในตารางที่ 18 และมีแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) ดังแสดงในภาพที่ 27

ตารางที่ 18 การจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อแอคทีโนมัยซีทที่แยกได้จากทะเล ด้วยการวิเคราะห์หาลำดับเบสของยีน 16S rDNA

Table 18. Identification of marine derived actinomycetes strains based on 16S rDNA sequence.

Isolate	Closest relative strain	Similarity value (%)
CNA003	<i>Providencia rustigianii</i>	99
CNA031	<i>Streptomyces parvulus</i>	99
CNA039	<i>Streptomyces parvulus</i>	99
CNA048	<i>Streptomyces rochei</i>	98



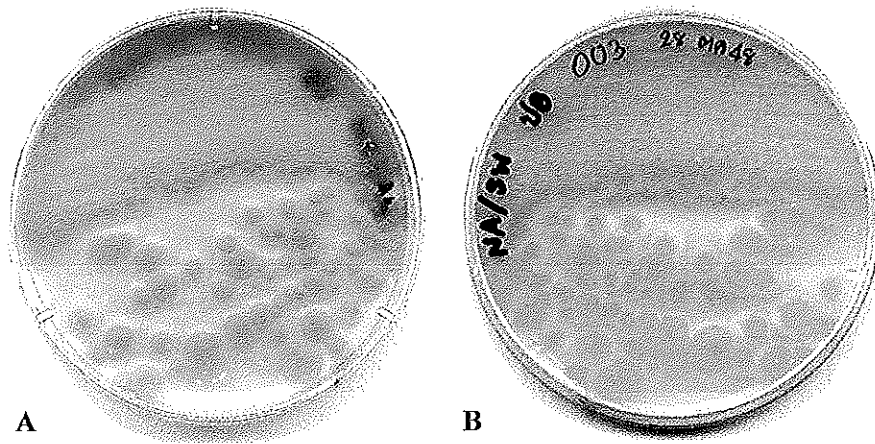
ภาพที่ 27 แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากทะเล

Figure 27. Phylogenetic tree of marine derived actinomycetes.

จากผลการจัดจำแนกสายพันธุ์เชื้อแอกติโนมัยสีทที่แยกได้จากทะเล พบว่าสายพันธุ์ CNA003 ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายกับเชื้อแอกติโนมัยสีท คือเป็นแบคทีเรียที่โคโลนีสมีผิวหน้าไม่มันวาวคล้ายกำมะหยี่ ดังแสดงในภาพที่ 28 แต่จากผลการจัดจำแนกสายพันธุ์ด้วย 16S rDNA พบว่าสายพันธุ์ CNA003 เป็นเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Providencia rustigianii* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ สามารถเคลื่อนที่ได้ จัดอยู่ในกลุ่มของ Enterobacteriaceae เนื่องจากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Providencia sp.* เป็นแบคทีเรียที่ก่อโรคท้องร่วง (Yoh *et al.*, 2005) และไม่ใช่แบคทีเรียในกลุ่มแอกติโนมัยสีท จึงไม่คัดเลือกสารสกัดขยายที่ผลิตโดยแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ไปใช้ในขั้นตอนการแยกและการทำบริสุทธิ์

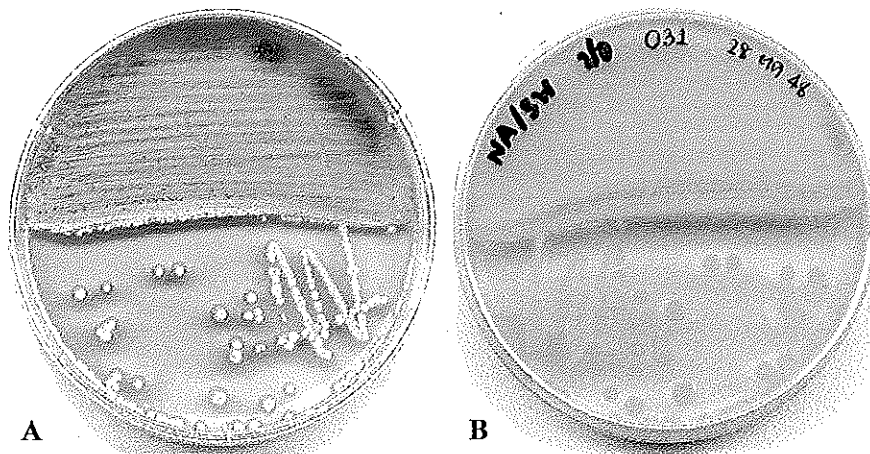
เชื้อแอกติโนมัยสีทสายพันธุ์ CNA031 และ CNA039 มีโคโลนีสที่มีผิวหน้าไม่มันวาวคล้ายกำมะหยี่ เส้นใยเหนือพื้นผิวอาหารมีสีเทา เส้นใยใต้พื้นผิวอาหารมีสีเหลือง และมีการสร้างสารสีเหลืองที่ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในภาพที่ 29 และ 30 ตามลำดับ จากผลการจัดจำแนกสายพันธุ์ด้วย 16S rDNA พบว่าสายพันธุ์ CNA031 และ CNA039 เป็นเชื้อแอกติโนมัยสีทสายพันธุ์เดียวกัน คือ *Streptomyces parvulus* ส่วนเชื้อแอกติโนมัยสีทสายพันธุ์ CNA048 เป็นแอกติโนมัยสีทสายพันธุ์ *Streptomyces rochei* มีลักษณะของโคโลนีสมีผิวหน้าไม่มันวาวคล้ายกำมะหยี่ มีเส้นใยเหนือพื้นผิวอาหารและเส้นใยใต้พื้นผิวอาหารสีเทา แต่ไม่มีการสร้างสารสีที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในภาพที่ 31

เนื่องจากเชื้อแอกติโนมัยสีทสายพันธุ์ CNA039 สามารถเจริญได้ดีในอาหารสูตร A และมีโครมาโตแกรมจากการทำ Diode Array Detector HPLC ของสารสกัดขยายที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 254 และ 210 นาโนเมตร ซึ่งมีองค์ประกอบของสารที่ซับซ้อนน้อยที่สุด จึงคาดว่าน่าจะง่ายต่อการแยกและการทำบริสุทธิ์ ดังแสดงในภาพที่ 32 และ 33 ดังนั้นจึงเลือกสารสกัดขยายที่ผลิตโดยแอกติโนมัยสีทสายพันธุ์นี้ เพื่อนำไปทำการแยกและทำบริสุทธิ์สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งต่อไป



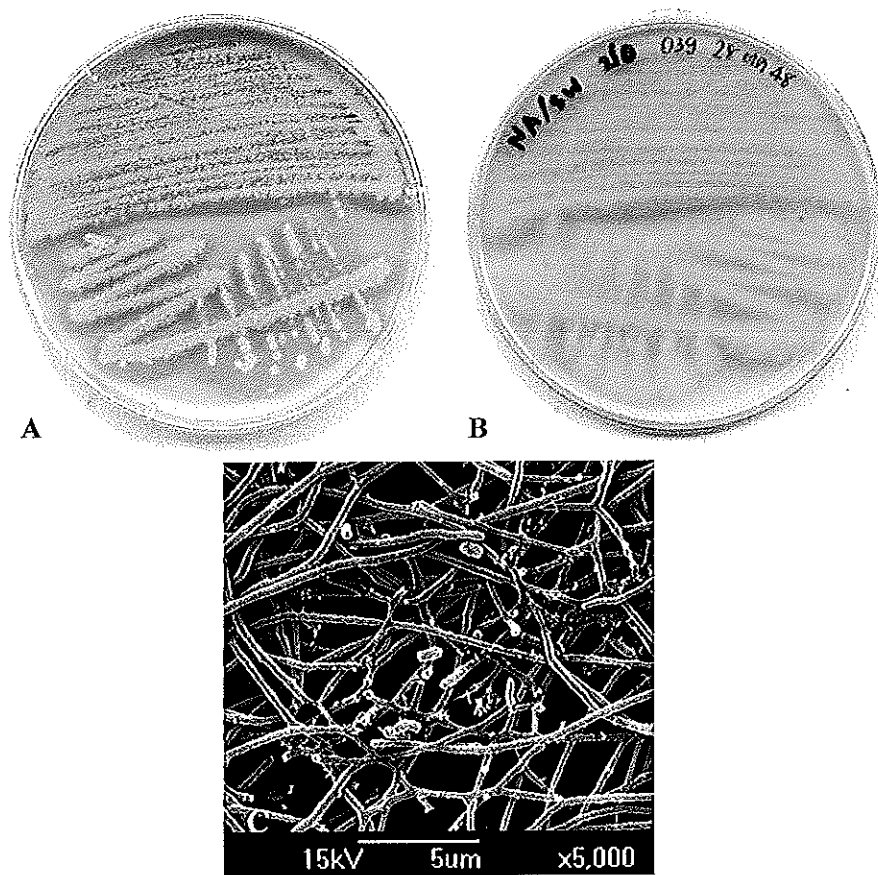
ภาพที่ 28 ลักษณะโคโลนีของ *Providencia rustigianii* สายพันธุ์ CNA003 บนอาหาร NA  
 A สีของเส้นใยเหนือพื้นผิวอาหาร B สีของเส้นใยใต้พื้นผิวอาหาร

Figure 28. Colony of *Providencia rustigianii* strain CNA003 on NA medium.  
 A Aerial mycelium B Substrate mycelium



ภาพที่ 29 ลักษณะโคโลนีของ *Streptomyces parvulus* สายพันธุ์ CNA031 บนอาหาร NA  
 A สีของเส้นใยเหนือพื้นผิวอาหาร B สีของเส้นใยใต้พื้นผิวอาหาร

Figure 29. Colony of *Streptomyces parvulus* strain CNA031 on NA medium.  
 A Aerial mycelium B Substrate mycelium

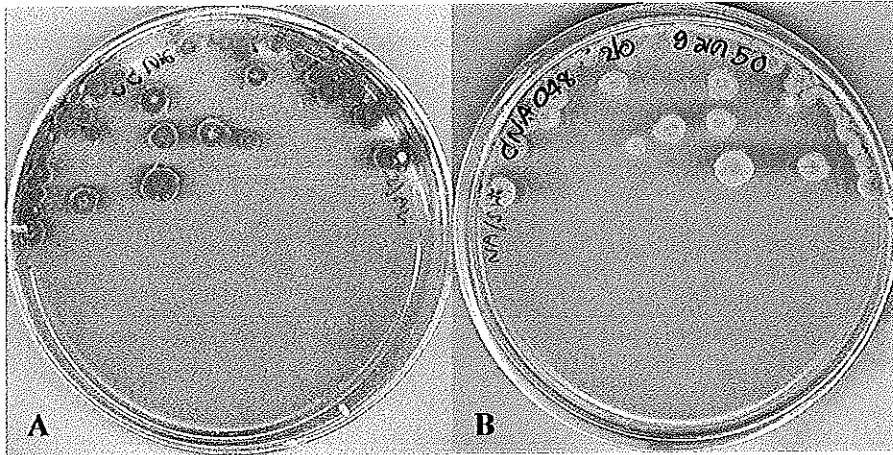


ภาพที่ 30 ลักษณะโคโลนีของ *Streptomyces parvulus* สายพันธุ์ CNA039 บนอาหาร NA

- A สีของเส้นใยเหนือพื้นผิวอาหาร
- B สีของเส้นใยใต้พื้นผิวอาหาร
- C ลักษณะเส้นใยของเชื้อแอกติโนมัยซีท สายพันธุ์ CNA039 ภายใต้อุปกรณ์จุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย 5,000 เท่า

Figure 30. Colony of *Streptomyces parvulus* strain CNA039 on NA medium.

- A Aerial mycelium
- B Substrate mycelium
- C Scanning Electron Micrograph of CNA039



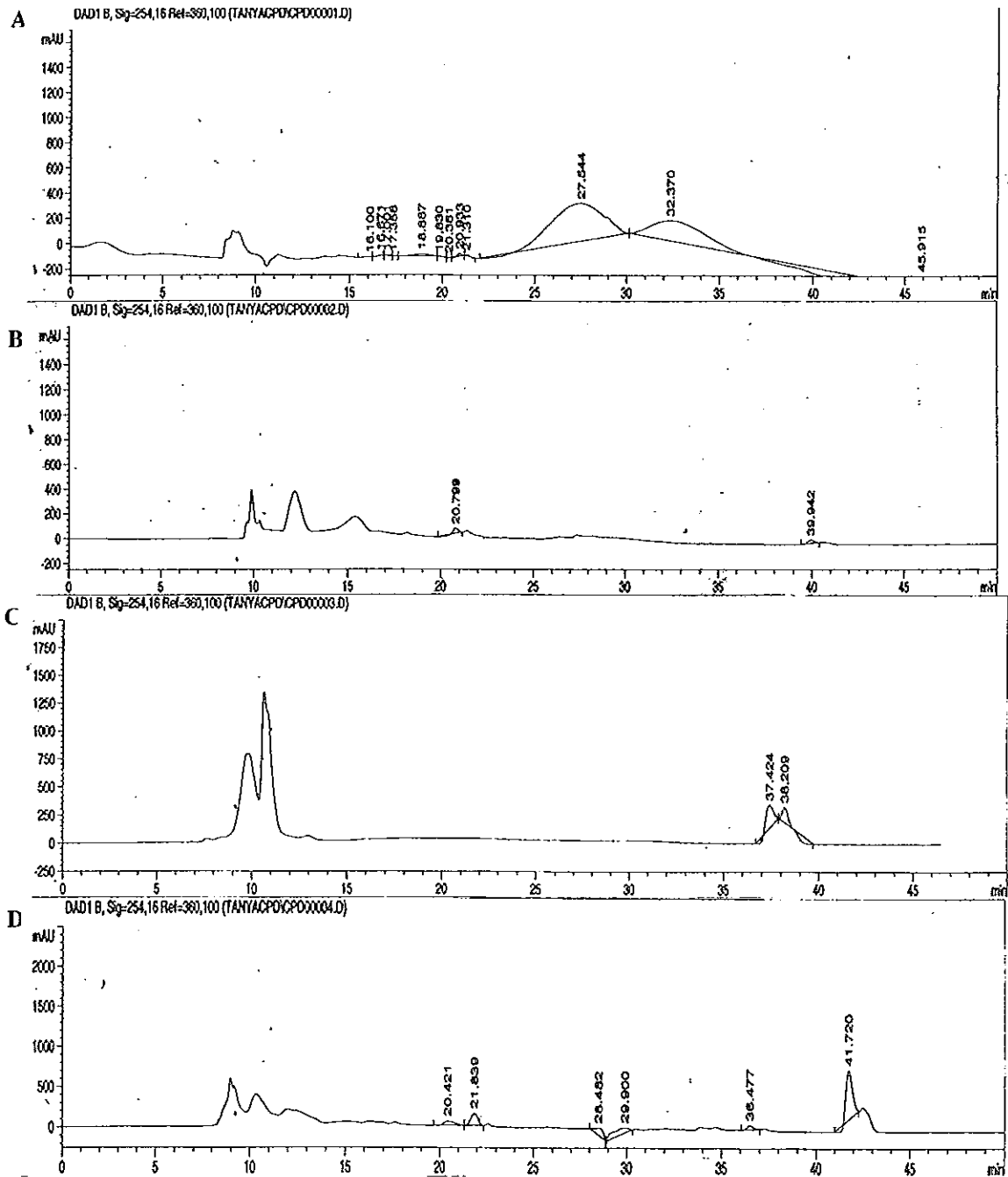
ภาพที่ 31 ลักษณะการเจริญของ *Streptomyces rochei* สายพันธุ์ CNA048 บนอาหาร NA

A สีของเส้นใยเหนือพื้นผิวอาหาร B สีของเส้นใยใต้พื้นผิวอาหาร

Figure 31. Colony of *Streptomyces rochei* strain CNA048 on NA medium.

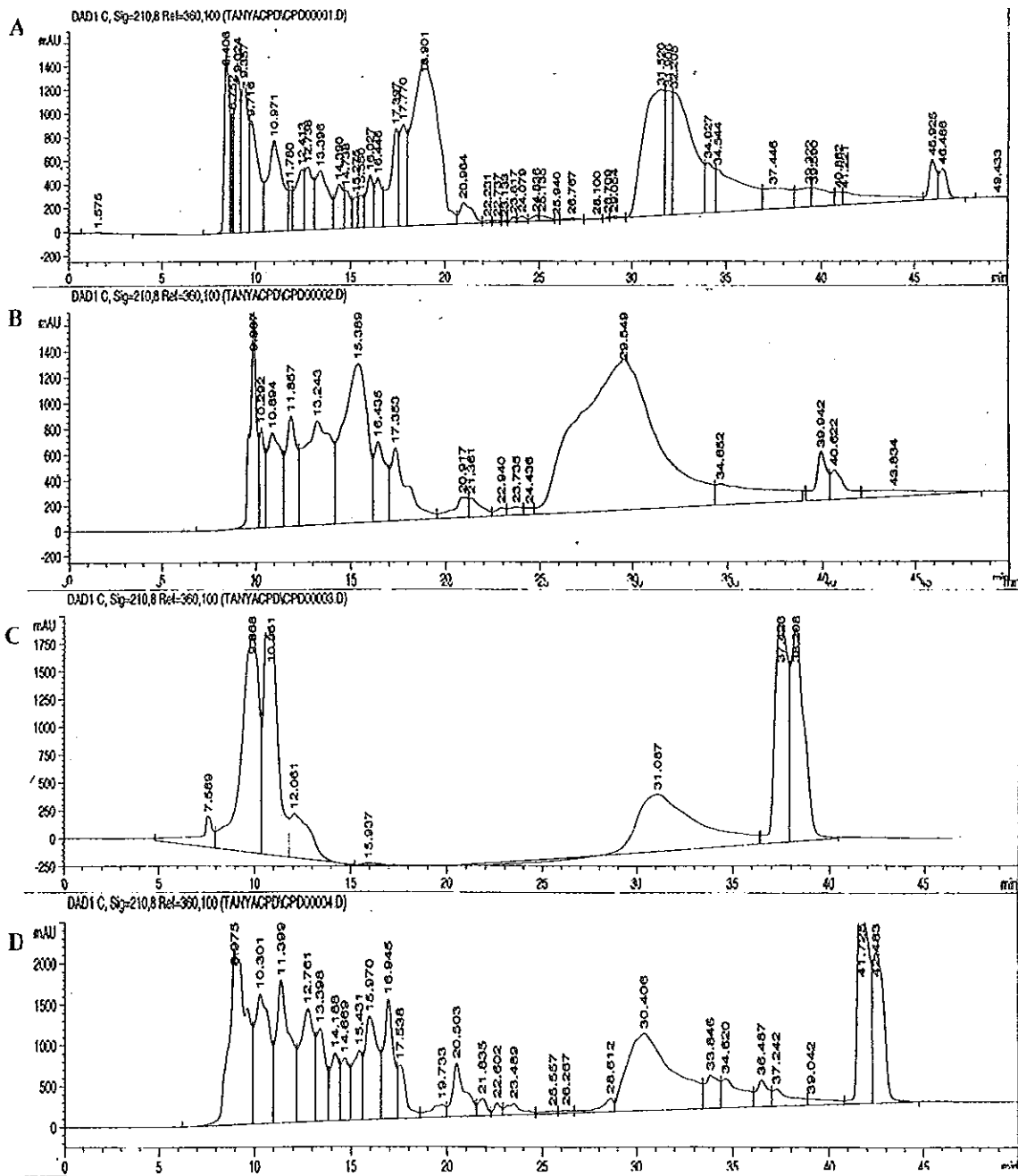
A Aerial mycelium

B Substrate mycelium



ภาพที่ 32 โครมาโตแกรมจากการทำ Diode Array Detector HPLC ที่ค่าการดูดกลืนแสง 254 นาโนเมตรของสารสกัดหยาบ โดย A, B, C และ D คือ โครมาโตแกรมของสารสกัดหยาบ CNA031B, CNA031C, CNA039A และ CNA048C ตามลำดับ

Figure 32. Diode Array Detector HPLC chromatograms of crude extracts (A, B, C and D are chromatograms of CNA031B, CNA031C, CNA039A and CNA048C, respectively).



ภาพที่ 33 โครมาโตแกรมจากการทำ Diode Array Detector HPLC ที่ค่าการดูดกลืนแสง 210 นาโนเมตรของสารสกัดหยาบ โดย A, B, C และ D คือ โครมาโตแกรมของสารสกัดหยาบ CNA031B, CNA031C, CNA039A และ CNA048C ตามลำดับ

Figure 33. Diode Array Detector HPLC chromatograms of crude extracts (A, B, C and D are chromatograms of CNA031B, CNA031C, CNA039A and CNA048C, respectively).

## 2. การแยกและการทำให้บริสุทธิ์ของสารสกัด

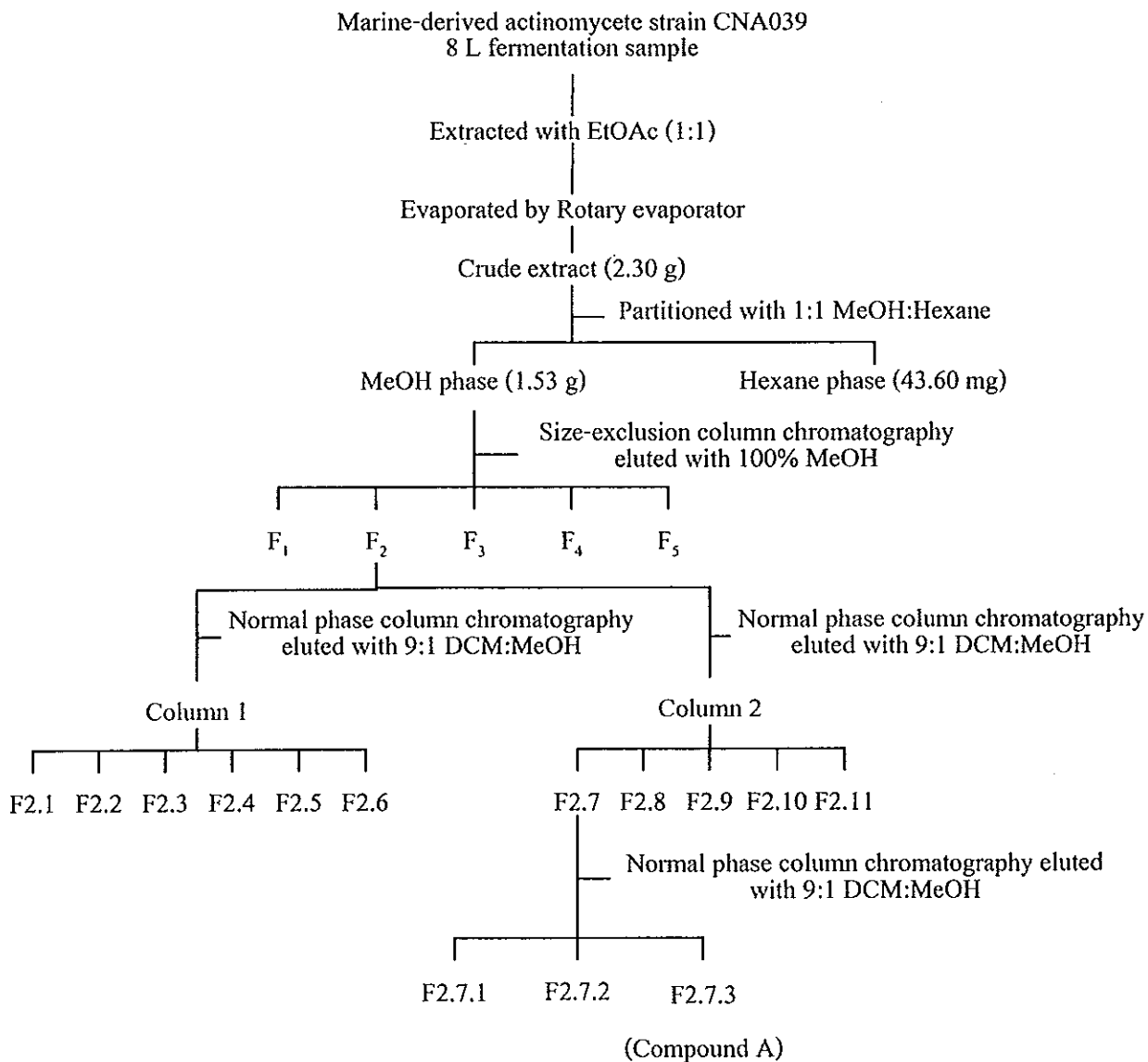
จากการเลี้ยงแอคติโนมัยซีท สายพันธุ์ CNA039 ในอาหารสูตร A เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยเครื่องเขย่า ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เพื่อให้ได้ปริมาณน้ำหมัก รวม 8 ลิตร จากนั้นนำส่วนของน้ำหมัก มาสกัดด้วยเอธิลอะซิเตต ตามวิธีข้อ 4 พบว่าได้สารสกัดหยาบที่มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาล มีน้ำหนัก 2.30 กรัม (คิดเป็นร้อยละ 28.85 ของน้ำหนักสารสกัดหยาบต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร) มีโครมาโตแกรมของ TLC แสดงส่วนประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบ ดังแสดงในภาพที่ 33

การแยกและการทำให้บริสุทธิ์ของสารสกัด ทำการติดตามผลจากฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง 4 ชนิด (Bioactive guided fractionation) มีขั้นตอนการดำเนินงานดังแสดงในภาพที่ 34



ภาพที่ 33 โครมาโตแกรมของ TLC ชนิด normal phase (มี mobile phase เป็น 9:1 DCM:MeOH) ของสารสกัดหยาบ CNA039A

Figure 33. Normal phase TLC chromatogram of CNA039A crude extract.



ภาพที่ 34 ขั้นตอนการสกัด การแยก และการทำบริสุทธิ์สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง  
จากสารสกัดหยาบ CNA039A

Figure 34. Isolation scheme of cytotoxic compounds from CNA039A crude extract.

## 2.1 การแยกสารสกัดหยาบส่วนที่ละลายอยู่ในชั้นเอธิลอะซิเตตโดยวิธี liquid liquid extraction

นำสารสกัดหยาบส่วนที่ละลายอยู่ในชั้นเอธิลอะซิเตต น้ำหนัก 2.30 กรัม มาทำ partition ระหว่างเมทานอลและเฮกเซน ในสัดส่วน 1:1 ในกรวยแยก เขย่าแรงๆ จากนั้นตั้งทิ้งไว้ในตู้เย็นเพื่อให้เกิดการแยกชั้น เพื่อแยกเอาส่วนที่เป็นไขมันซึ่งเป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยซีที่ปนเปื้อนออก นำส่วนเมทานอลมาทำ partition ซ้ำอีกครั้ง รวบรวมชั้นของเมทานอล และเฮกเซน นำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสูญญากาศ พบว่าได้สารสกัดส่วนที่ละลายอยู่ในชั้นเมทานอลมีน้ำหนัก 1,537.30 มิลลิกรัม และสารสกัดส่วนที่ละลายอยู่ในชั้นเฮกเซนมีน้ำหนัก 43.60 มิลลิกรัม โดยสารสกัดทั้ง 2 ส่วนมีโครมาโตแกรมของ TLC ดังแสดงในภาพที่ 35 น้ำหนักของสารสกัดหยาบส่วนที่หายไป 727.1 มิลลิกรัม เป็นน้ำหนักของตะกอนเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยซีที่ปนเปื้อนอยู่ในสารสกัดหยาบ หลังจากนำสารสกัดส่วนที่ละลายอยู่ในชั้นเมทานอลและสารสกัดส่วนที่ละลายอยู่ในชั้นเฮกเซน ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง 4 ชนิด ด้วยวิธีในข้อ 5 ให้ผลดังแสดงในตารางที่ 19 โดยพบว่าสารสกัดส่วนที่ละลายในชั้นเมทานอล มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง 2 ชนิดคือ KB และ HeLa ได้สูง ส่วนสารสกัดส่วนที่ละลายในชั้นเฮกเซน ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์ทั้ง 4 ชนิด จึงเลือกสารสกัดส่วนที่ละลายอยู่ในชั้นเมทานอลเพื่อนำไปแยกและทำให้บริสุทธิ์ในขั้นต่อไป

ตารางที่ 19 ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งของสารสกัดส่วนที่ละลายอยู่ในชั้นเมทานอลและเฮกเซน

Table 19. Cytotoxic activity of methanol and hexane phases.

Fraction	Dry weight (mg)	Cytotoxic activity (%)			
		MCF-7	HeLa	HT-29	KB
MeOH phase	1537.30	63.81	76.60	18.63	79.11
Hexane phase	43.60	12.16	10.72	-10.01	9.80

หมายเหตุ เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงกว่า 70 คือ มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง



ภาพที่ 35 โครมาโตแกรมของ TLC ชนิด normal phase (มี mobile phase เป็น 9:1 DCM:MeOH) ของสารสกัด โดย

A สารส่วนที่ละลายในชั้นเมทานอล B สารส่วนที่ละลายในชั้นเฮกเซน

Figure 35. Normal phase TLC chromatogram of partitioned fractions (9:1 DCM:MeOH).

A MeOH phase

B Hexane phase

## 2.2 การแยกสารจากส่วนที่ละลายอยู่ในชั้นเมทานอล (MeOH phase)

นำสารสกัดส่วนที่ละลายอยู่ในชั้นเมทานอล น้ำหนัก 1.53 กรัม มาทำการแยกโดยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ใช้ Sephadex LH-20 เป็นตัวดูดซับ ดังวิธีในข้อ 6.2.1 จะคอลัมน์ด้วยเมทานอล เก็บสารละลายที่ชะได้ครั้งละ 15 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายแต่ละส่วนมาตรวจสอบว่ามีองค์ประกอบทางเคมีเหมือนกันหรือไม่ โดยใช้วิธีโครมาโตกราฟีแผ่นบาง พบว่าสามารถแยกสารได้ 5 ส่วน โดยสารแต่ละส่วนมีน้ำหนักและฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง 4 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 20 และ โครมาโตแกรมของ TLC ของสารแต่ละส่วนดังแสดงในภาพที่ 36

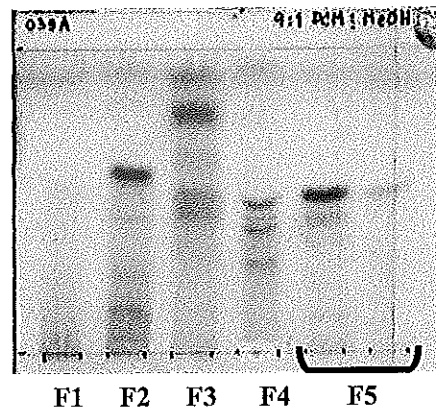
จากการแยกสารจากส่วนที่ละลายอยู่ในชั้นเมทานอล พบว่าสารส่วน F1, F2 และ F3 มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ 3-4 ชนิด อยู่ในเกณฑ์ที่สูง แต่เนื่องจากสารส่วน F1 มีองค์ประกอบทางเคมีที่ไม่น่าสนใจ และสารส่วน F5 ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง ดังนั้นจึงนำเฉพาะสารส่วน F2, F3 และ F4 ไปแยกและทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

ตารางที่ 20 การแยกสารจากส่วนที่ละลายอยู่ในชั้นเมทานอล (MeOH phase) และฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งทั้ง 4 ชนิด

Table 20. Cytotoxic activity of fractioned MeOH phase after separated with Sephadex LH-20 column chromatography.

Fraction	Dry weight (mg)	Cytotoxic activity (%)			
		MCF-7	HeLa	HT-29	KB
F1	88.9	85.59	102.61	94.26	92.13
F2	674.7	95.24	105.37	93.37	97.19
F3	129.6	79.42	90.44	44.60	88.36
F4	439.2	ND	ND	ND	ND
F5	26.2	63.05	94.24	66.35	51.06

หมายเหตุ เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงกว่า 70 คือ มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง  
ND คือ ไม่ได้ทำการทดสอบ



ภาพที่ 36 โครมาโตแกรมของ TLC ชนิด normal phase (มี mobile phase เป็น 9:1 DCM:MeOH) ของการแยกสารสกัด

Figure 36. Normal phase TLC chromatogram of fractioned MeOH phase (9:1 DCM:MeOH).

### 2.3 การแยกสารจากสารส่วน F2

นำสารจากส่วน F2 น้ำหนัก 674.70 มิลลิกรัม มาทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นโดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี ใช้ Silica gel 60 เป็นตัวดูดซับ ดังวิธีในข้อ 6.2.2 ซะคอลัมน์ด้วยสารละลายผสมระหว่างไดคลอโรมีเทนกับเมทานอล ในสัดส่วน 9:1 เก็บสารละลายที่ชะครั้งละ 10 มิลลิลิตร แต่เนื่องจากสารส่วน F2 มีน้ำหนักมากจึงใช้คอลัมน์ในการแยก 2 คอลัมน์ด้วยวิธีเดียวกันจากนั้นนำสารละลายแต่ละส่วนมาตรวจสอบว่ามีองค์ประกอบทางเคมีเหมือนกันหรือไม่ โดยใช้วิธีโครมาโตกราฟีแผ่นบาง พบว่าสามารถแยกสารได้จากคอลัมน์แรก 6 ส่วน และคอลัมน์ที่สอง 5 ส่วน โดยสารแต่ละส่วนมีน้ำหนักและฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง 4 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 21 และมีโครมาโตแกรมของ TLC ดังแสดงในภาพที่ 37

ตารางที่ 21 การแยกสารจากส่วน F2 และฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งทั้ง 4 ชนิด

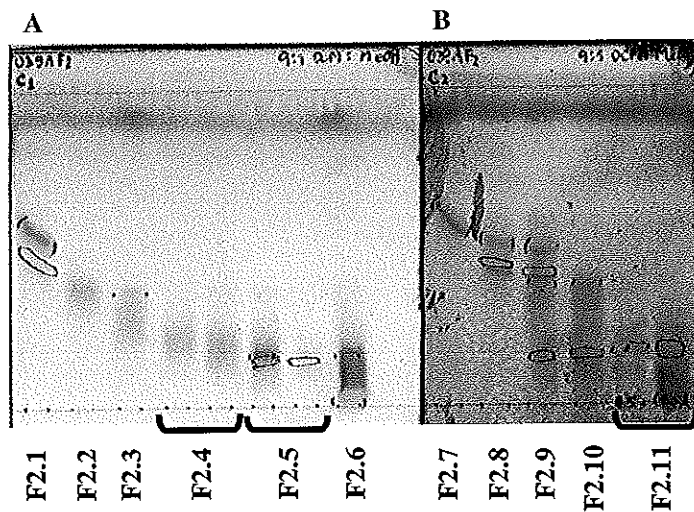
Table 21. Cytotoxic activity of fractioned F2 after separated with Silica gel 60 column chromatography.

Column	Fraction	Dry weight (mg)	Cytotoxic activity (%)			
			MCF-7	HeLa	HT-29	KB
1	F2.1	62.10	66.06	85.85	98.24	81.84
	F2.2	3.90	97.23	103.78	98.59	99.97
	F2.3	7.10	78.81	95.50	82.62	73.42
	F2.4	6.50	54.47	84.87	52.57	50.94
	F2.5	120.70	29.99	61.36	24.91	50.65
	F2.6*	85.20	100.84	109.26	-1.40	94.43
2	F2.7	46.00	99.18	108.63	96.93	98.25
	F2.8	50.40	99.90	110.93	99.21	94.97
	F2.9	70.20	100.36	108.00	ND	96.61
	F2.10	11.20	96.12	103.55	97.49	99.74
	F2.11*	223.20	46.66	59.38	ND	60.02

หมายเหตุ เปรี่เช่นต์การยับยั้งสูงกว่า 70 คือ มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

ND คือ ไม่ได้ทำการทดสอบ

\* ส่วนสกัดที่ได้จากการล้างคอลัมน์



ภาพที่ 37 โครมาโตแกรมของ TLC ชนิด normal phase ของส่วนสกัดที่ได้จากการแยกสารส่วน F2 (มี mobile phase เป็น 9:1 DCM:MeOH)

- A โครมาโตแกรมของ TLC ของส่วนสกัดที่แยกได้จากคอลัมน์ที่ 1  
 B โครมาโตกราฟฟีแผ่นบางของส่วนสกัดที่แยกได้จากคอลัมน์ที่ 2

Figure 37. Normal phase TLC chromatogram of fractionated F2.

- A TLC chromatogram of fractions from column 1  
 B TLC chromatogram of fractions from column 2

จากการแยกสารจากส่วน F2 โดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟฟี ที่มี Silica gel 60 เป็นตัวดูดซับ พบว่าสารส่วน F2.1, F2.2, F2.3, F2.6, F2.7, F2.8, F2.9 และ F2.10 มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ 3-4 ชนิด อยู่ในเกณฑ์ที่สูง จากโครมาโตแกรมของ TLC ดังแสดงในภาพที่ 37 แสดงให้เห็นว่าสารส่วน F2.1, F2.7, F2.8 และ F2.9 มีส่วนประกอบทางเคมีคล้ายคลึงกัน โดยสารส่วน F2.7 มีส่วนประกอบทางเคมีของสารน้อยที่สุด คือมีตำแหน่งของสารบนโครมาโตแกรม TLC เพียง 1 ตำแหน่งที่ตรวจสอบได้ จึงนำสารส่วน F2.7 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี High performance liquid column chromatography (HPLC) ด้วยเครื่อง Preparative HPLC (MILLIPORE รุ่น Water 600E) โดยใช้คอลัมน์ชนิด reverse phase (Phenomenex, Luna 10 $\mu$  C18(2), 10 x 250 mm) ๒๕๐ มิลลิเมตร คอลัมน์ด้วยสารละลายผสมระหว่างเมทานอลกับน้ำ สัดส่วน 85:15 ด้วยอัตราเร็ว 4.5 มิลลิิตรต่อนาที ฉีดสารตัวอย่างครั้งละ 200 ไมโครลิตร ตรวจวัดด้วย Tunable Absorbance detector (MILLIPORE รุ่น Water 484) ที่ค่าการดูดกลืนแสง 210 นาโนเมตร ทำให้ได้โครมาโตแกรม HPLC ดังแสดงในภาพที่ 38 พบว่าสามารถแยกได้สารบริสุทธิ์ คือสารส่วนที่มีพีคที่เวลา 5.99 นาที (สาร

ส่วน F2.7.3 หรือ สาร A) มีน้ำหนัก 17.30 มิลลิกรัม สาร A มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง 3 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 22

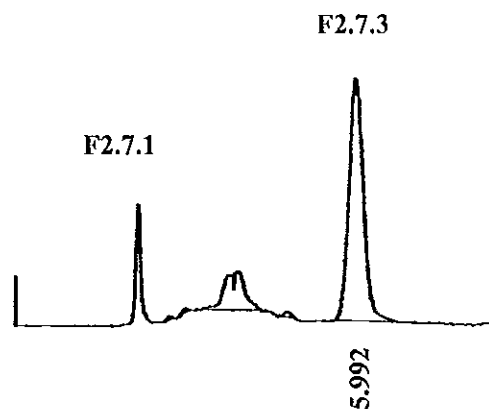
ตารางที่ 22 ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งของสาร A

Table 22. Cytotoxic activity of compound A.

Fraction	Dry weight (mg)	Cytotoxic activity* (%)			
		MCF-7	HeLa	HT-29	KB
F2.7.3 (Compound A)	17.30	87.54	104.07	99.16	-20.20

หมายเหตุ เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงกว่า 70 คือ มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

\* เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารตัวอย่างที่ความเข้มข้น 0.004 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



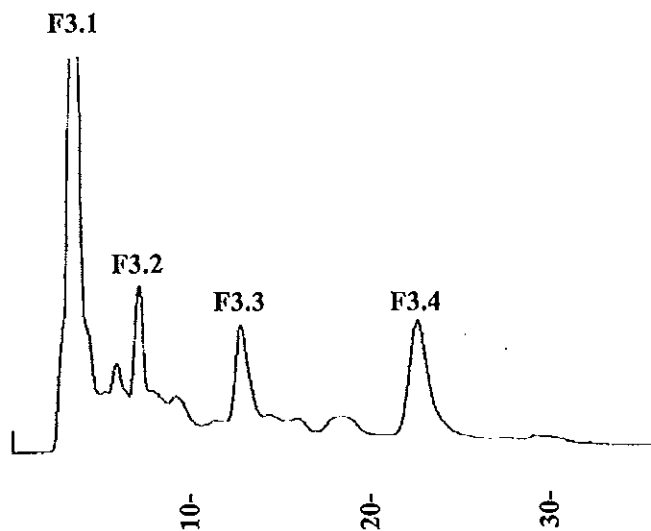
ภาพที่ 38 โครมาโตแกรม HPLC ของการแยกสารจากสารส่วน F2.7 ที่ค่าการดูดกลืนแสง 210 นาโนเมตร

Figure 38. HPLC chromatogram of F2.7 separation at wavelength of 210 nanometer.

สารส่วน F2.2 และ F2.3 พบว่าไม่สามารถหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารให้บริสุทธิ์ต่อไปได้ด้วยวิธีที่มีอยู่ ส่วนสารส่วน F2.6 ไม่ได้นำมาทำการแยกให้บริสุทธิ์เนื่องจากเป็นส่วนที่ได้จากการล้างคอลัมน์

#### 2.4 การแยกสารจากส่วน F3

นำสารจากส่วน F3 น้ำหนัก 129.60 มิลลิกรัม มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี HPLC ด้วยเครื่อง Preparative HPLC (MILLIPORE รุ่น Water 600E) โดยใช้คอลัมน์ชนิด normal phase (Econosil Silica 10 $\mu$ , 7.0 x250 mm) ะคอลัมน์นี้ด้วยสารละลายผสมระหว่างเฮกเซนกับไอโซโพรพานอล (Isopropanol) สัดส่วน 9:1 ด้วยอัตราเร็ว 2 มิลลิลิตรต่อนาที ฉีดสารตัวอย่างครั้งละ 50 ไมโครลิตร ตรวจวัดด้วย Tunable Absorbance detector (MILLIPORE รุ่น Water 484) ที่ค่าการดูดกลืนแสง 210 นาโนเมตร ทำให้ได้โครมาโตแกรม HPLC ดังแสดงในภาพที่ 39 พบว่าไม่สามารถแยกสารให้บริสุทธิ์ได้ ซึ่งอาจเกิดจากสภาวะที่ใช้ในการแยกไม่เหมาะสมต่อการแยกสารส่วน F3 หรือเกิดจากความไม่เสถียรของสารส่วน F3 ทำให้เกิดการสลายตัวในระหว่างขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์



ภาพที่ 39 โครมาโตแกรม HPLC ของการแยกสารจากส่วน F3 ที่ค่าการดูดกลืนแสง 210 นาโนเมตร

Figure 39. HPLC chromatogram of F3 separation at wavelength of 210 nanometer.

#### 2.5 การแยกสารจากส่วน F4

นำสารจากส่วน F4 น้ำหนัก 439.20 มิลลิกรัม มาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี ใช้ Silica gel 60 เป็นตัวดูดซับ ะคอลัมน์นี้ด้วยสารละลายผสมระหว่างไดคลอโรมีเทนกับเมทานอล ในสัดส่วน 9:1 เก็บสารละลายที่ชะครั้งละ 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายแต่ละส่วนมาตรวจสอบว่ามีองค์ประกอบทางเคมีเหมือนกันหรือไม่ โดยใช้วิธีโครมาโตกราฟีแผ่นบาง พบว่า

สามารถแยกสารได้ทั้งหมด 5 ส่วน ซึ่งมีน้ำหนักและฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง 4 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 23 และมีโครมาโตแกรมของ TLC ดังแสดงในภาพที่ 40

ตารางที่ 23 ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งของสารส่วน F4

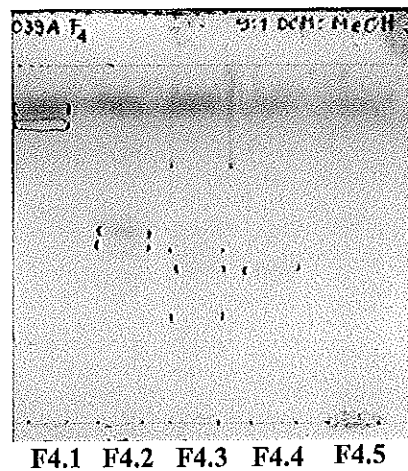
Table 23. Cytotoxic activity of fraction F4.

Fraction	Dry weight (mg)	Cytotoxic activity (%)			
		MCF-7	HeLa	HT-29	KB
F4.1	9.6	-18.96	73.12	-21.32	12.96
F4.2	13.6	99.73	103.11	ND	96.61
F4.3	30.2	63.67	87.70	ND	72.35
F4.4	8.1	6.57	31.60	6.90	24.52
F4.5*	62	77.45	95.58	ND	77.94

หมายเหตุ เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงกว่า 70 คือ มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

ND คือ ไม่ได้ทำการทดสอบ

\* ส่วนสกัดที่ได้จากการล้างคอลัมน์



ภาพที่ 40 โครมาโตแกรมของ TLC ชนิด normal phase ของส่วนสกัดที่ได้จากการแยกสารส่วน F4 (มี mobile phase เป็น 9:1 DCM:MeOH)

Figure 40. Normal phase TLC chromatogram of fraction F4.

จากการแยกสารจากสารส่วน F4 โดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี ที่มี Silica gel 60 เป็นตัวดูดซับ พบว่าสารส่วน F4.2, F4.3 และ F4.5 มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ 3-4 ชนิด อยู่ในเกณฑ์ที่สูง แต่เมื่อทำการแยกสารส่วน F4.2 และ F4.3 ด้วย HPLC พบว่าไม่สามารถทำการแยกสารจากส่วนสกัดดังกล่าวให้บริสุทธิ์ได้ ส่วนสารส่วน F4.5 ไม่ได้นำมาทำการแยกให้บริสุทธิ์เนื่องจากเป็นส่วนที่ได้จากการล้างคอลัมน์

### 3. การหาสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์

#### 3.1 ผลการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสาร A

สาร A มีน้ำหนัก 17.3 มิลลิกรัม มีลักษณะเป็นของแข็งสีส้ม ได้จากการแยกสารส่วน F2.7 โดยใช้ HPLC ตามวิธีข้อ 6.5

แมสสเปกตรัมของสาร A (ภาพที่ 51 ในภาคผนวก ง) แสดงไอออนโมเลกุลที่  $m/z$  เท่ากับ 1,278.4  $[M+Na]^+$  ซึ่งสอดคล้องกับสูตรโมเลกุล  $C_{62}H_{86}N_{12}O_{16}$  สามารถหาค่า double bond equivalent (D.B.E.) ได้เท่ากับ 26

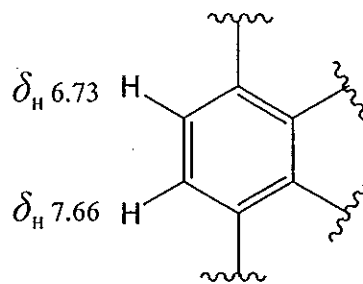
อินฟราเรดสเปกตรัมแสดงแถบการดูดกลืนแสงที่ความถี่ ( $V_{max}$ ): 3,350, 3,250, 2,950, 1,728, 1,650 และ 1,575  $cm^{-1}$  (ภาพที่ 52 ในภาคผนวก ง) ดังแสดงในตารางที่ 24

ตารางที่ 24 แถบการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสาร A

Table 24. Infrared spectrum of compound A.

Absorption ( $cm^{-1}$ )	Intensity	Substitution pattern
3,350-3,250	m	N-H stretching vibration
2,950	m	C-H stretching vibration
1,728	m	C=O stretching vibration
1,650	s	C=C stretching vibration
1,575	s	C=C stretching vibration
หมายเหตุ	m คือ	Medium
	s คือ	Strong

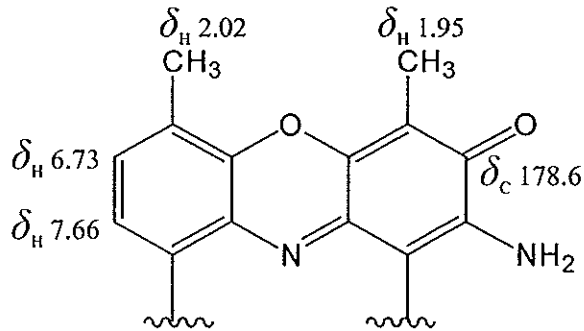
จากข้อมูล  $^1\text{H}$  NMR สเปกตรัมของสาร A ในสารละลาย  $\text{C}_6\text{D}_6$  (ภาพที่ 53 ในภาคผนวก ง) ให้สัญญาณ *doublet* 2 ชุดสัญญาณที่  $\delta_{\text{H}}$  7.66 ( $d, J = 7.7$  Hz) และ  $\delta_{\text{H}}$  6.73 ( $d, J = 7.7$  Hz) ซึ่งเป็นลักษณะพิเศษของ aromatic proton โดยโปรตอนที่มี  $\delta_{\text{H}}$  7.66 คู่ควบแบบ *ortho coupling* กับโปรตอนที่มี  $\delta_{\text{H}}$  6.73 ด้วยค่าคงที่การคู่ควบ 7.7 Hz จากข้อมูลคาดว่าสาร A ประกอบด้วยหน่วยโครงสร้างที่ 1 เป็น 1,2,3,4-tetrasubstituted aromatic ring ดังแสดงในภาพที่ 41



ภาพที่ 41 หน่วยโครงสร้างที่ 1 (1,2,3,4-tetrasubstituted aromatic ring) ของสาร A  
Figure 41. Unit 1 (1,2,3,4-tetrasubstituted aromatic ring) of compound A.

จาก  $^{13}\text{C}$  NMR ของสาร A ในสารละลาย  $\text{C}_6\text{D}_6$  (ภาพที่ 54 ในภาคผนวก ง) ปรากฏสัญญาณคาร์บอน 11 สัญญาณที่  $\delta_{\text{C}}$  100-150 ซึ่งบ่งบอกว่าเป็นสัญญาณของคาร์บอนของ alkene โดยจากข้อมูลของหน่วยโครงสร้างที่ 1 ประกอบกับข้อมูลของ HMBC (ภาพที่ 55 ในภาคผนวก ง) ทำให้ทราบว่าสัญญาณคาร์บอนที่  $\delta_{\text{C}}$  125.9, 126.8, 129.2, 129.7, 132.9 และ 140.3 เป็นสัญญาณคาร์บอนของ aromatic ring ซึ่งสัญญาณที่  $\delta_{\text{C}}$  132.9 และ 140.3 เป็นสัญญาณของคาร์บอนที่ต่ออยู่กับ heteroatom เนื่องจากมีค่า chemical shift ที่สูงกว่าค่าของคาร์บอนปกติใน aromatic ring (ค่า chemical shift ปกติของคาร์บอนของ aromatic ring เท่ากับ 128.5 ppm) ส่วนสัญญาณของ quaternary carbon ที่  $\delta_{\text{C}}$  101.5, 112.6, 144.4, 146.3, 148.1 และ 178.6 เป็นสัญญาณคาร์บอนของ cycloalkene โดยสัญญาณที่  $\delta_{\text{C}}$  144.4, 146.3 และ 148.1 เป็นสัญญาณคาร์บอนของ cycloalkene ที่ต่ออยู่กับ heteroatom เพราะมีค่า chemical shift ที่สูงกว่าค่าของคาร์บอนปกติใน cycloalkene (ค่า chemical shift ปกติของคาร์บอนของ cycloalkene เท่ากับ 124.5 ppm) และมีสัญญาณคาร์บอนที่  $\delta_{\text{C}}$  178.6 เป็นลักษณะสัญญาณของหมู่ carbonyl อยู่ใน cycloalkene จากข้อมูลข้างต้นประกอบกับข้อมูล HMBC ซึ่งพบความสัมพันธ์ของสัญญาณ *singlet* โปรตอนที่มี  $\delta_{\text{H}}$  2.02 (s) และ  $\delta_{\text{H}}$  1.95 (s) ที่ระบุว่าเป็นสัญญาณของหมู่ methyl 2 หมู่ กับสัญญาณคาร์บอนใน aromatic ring และ cycloalkene

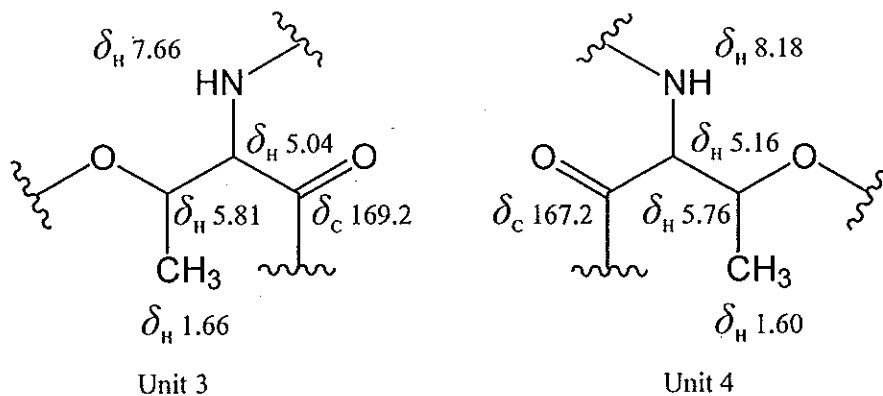
ตามลำดับ ดังนั้นคาดว่าหน่วยโครงสร้างที่ 1 เป็นส่วนหนึ่งของ phenoxazinone chromophore ในหน่วยโครงสร้างที่ 2 ดังแสดงในภาพที่ 42



ภาพที่ 42 หน่วยโครงสร้างที่ 2 (Phenoxazinone chromophore) ของสาร A

Figure 42. Unit 2 (Phenoxazinone chromophore) of compound A.

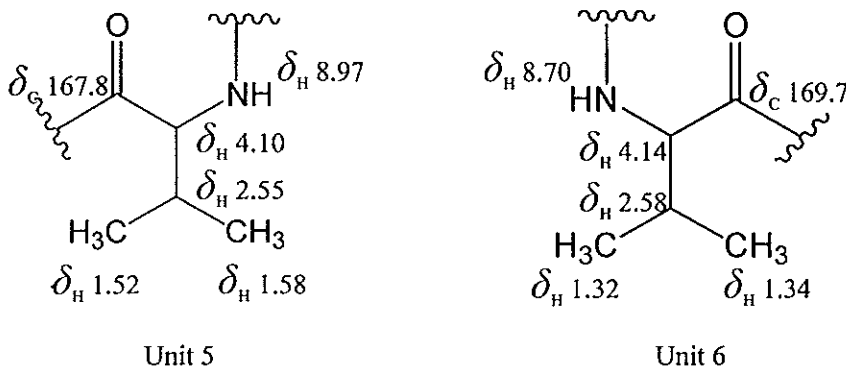
จากสัญญาณ  $^{13}\text{C}$  NMR ของ carbonyl ที่  $\delta_{\text{C}}$  169.2 และ  $\delta_{\text{C}}$  167.2 และสัญญาณ  $^1\text{H}$  NMR พบสัญญาณ methine proton 4 ชุดสัญญาณที่  $\delta_{\text{H}}$  5.81 (*dd*,  $J = 6.1$  และ  $2.5$  Hz) และ  $\delta_{\text{H}}$  5.76 (*dd*,  $J = 6.1$  และ  $2.5$  Hz) เป็นสัญญาณของ  $\beta$ -amino acid protons และสัญญาณที่  $\delta_{\text{H}}$  5.16 (*dd*,  $J = 6.3$  และ  $2.5$  Hz) และ  $\delta_{\text{H}}$  5.04 (*dd*,  $J = 6.4$  และ  $2.5$  Hz) เป็นสัญญาณของ  $\alpha$ -amino acid protons สัญญาณ *doublet* ของ methyl proton 2 ชุดสัญญาณที่  $\delta_{\text{H}}$  1.66 (*d*,  $J = 6.1$  Hz) และ  $\delta_{\text{H}}$  1.60 (*d*,  $J = 6.1$  Hz) เป็นสัญญาณของ  $\gamma$ -amino acid protons และสัญญาณ amide proton 2 ชุดสัญญาณที่  $\delta_{\text{H}}$  8.18 (*d*,  $J = 6.3$  Hz) และ  $\delta_{\text{H}}$  7.66 (*d*,  $J = 6.4$  Hz) เป็นลักษณะสัญญาณของ amino acid ชนิด Threonine 2 หมู่ ซึ่งเป็นหน่วยโครงสร้างย่อยที่ 3 และ 4 ของสาร A ดังแสดงในภาพที่ 43



ภาพที่ 43 หน่วยโครงสร้างที่ 3 และ 4 ของสาร A

Figure 43. Unit 3 and 4 of compound A.

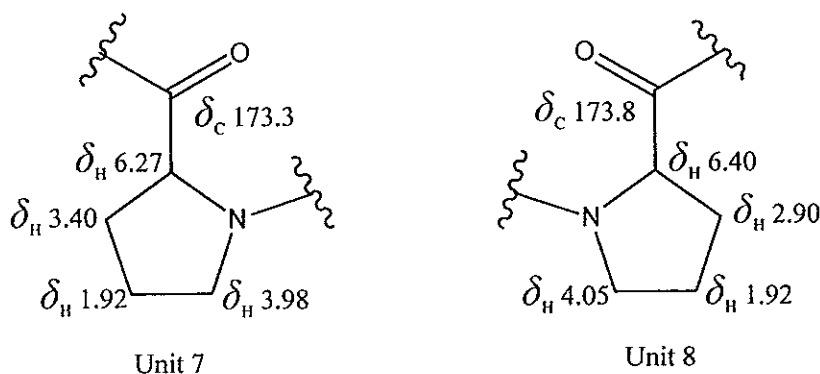
จากสัญญาณ  $^{13}\text{C}$  NMR ของ carbonyl ที่  $\delta_{\text{C}}$  169.7 และ  $\delta_{\text{C}}$  167.8 และสัญญาณ  $^1\text{H}$  NMR พบสัญญาณ methine proton 4 ชุดสัญญาณที่  $\delta_{\text{H}}$  4.14 (*dd*,  $J = 15.7$  และ  $5.9$  Hz) และ  $\delta_{\text{H}}$  4.10 (*dd*,  $J = 10.1$  และ  $5.7$  Hz) เป็นสัญญาณของ  $\alpha$ -amino acid protons และสัญญาณที่  $\delta_{\text{H}}$  2.58 และ  $\delta_{\text{H}}$  2.55 เป็นสัญญาณของ  $\beta$ -amino acid protons สัญญาณ *doublet* ของ methyl proton 4 ชุดสัญญาณที่  $\delta_{\text{H}}$  1.58 (*d*,  $J = 6.7$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  1.52 (*d*,  $J = 6.7$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  1.34 (*d*,  $J = 6.6$  Hz) และ  $\delta_{\text{H}}$  1.32 (*d*,  $J = 6.6$  Hz) เป็นสัญญาณของ  $\gamma$ -amino acid protons และสัญญาณ amide proton 2 ชุดสัญญาณที่  $\delta_{\text{H}}$  8.97 (*d*,  $J = 5.7$  Hz) และ  $\delta_{\text{H}}$  8.70 (*d*,  $J = 5.9$  Hz) เป็นลักษณะสัญญาณของ amino acid ชนิด Valine 2 หมู่ ซึ่งเป็นหน่วยโครงสร้างย่อยที่ 5 และ 6 ของสาร A ดังแสดงในภาพที่ 44



ภาพที่ 44 หน่วยโครงสร้างที่ 5 และ 6 ของสาร A

Figure 44. Unit 5 and 6 of compound A.

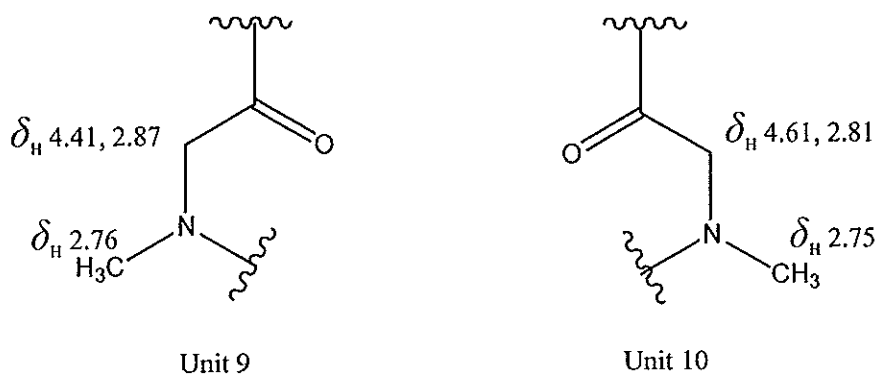
จากสัญญาณ  $^{13}\text{C}$  NMR ของ carbonyl ที่  $\delta_{\text{C}}$  173.8 และ  $\delta_{\text{C}}$  173.3 และสัญญาณ  $^1\text{H}$  NMR พบสัญญาณ methine proton 2 ชุดสัญญาณที่  $\delta_{\text{H}}$  6.40 (*dd*,  $J = 9.3$  และ  $<1$  Hz) และ  $\delta_{\text{H}}$  6.27 (*dd*,  $J = 9.1$  และ  $<1$  Hz) เป็นสัญญาณของ  $\alpha$ -amino acid protons สัญญาณ methylene proton 6 ชุดสัญญาณที่  $\delta_{\text{H}}$  2.90 (*m*) และ  $\delta_{\text{H}}$  3.40 (*m*) เป็นสัญญาณของ  $\beta$ -amino acid protons สัญญาณ 2 สัญญาณที่  $\delta_{\text{H}}$  1.92 (*m*) เป็นสัญญาณของ  $\gamma$ -amino acid protons และสัญญาณที่  $\delta_{\text{H}}$  4.05 (*m*) และ  $\delta_{\text{H}}$  3.98 (*m*) เป็นสัญญาณของ  $\delta$ -amino acid protons เป็นลักษณะสัญญาณของ amino acid ชนิด Proline 2 หมู่ ซึ่งเป็นหน่วยโครงสร้างย่อยที่ 7 และ 8 ของสาร A ดังแสดงในภาพที่ 45



ภาพที่ 45 หน่วยโครงสร้างที่ 7 และ 8 ของสาร A

Figure 45. Unit 7 and 8 of compound A.

จากสัญญาณ  $^{13}\text{C}$  NMR ของ carbonyl ที่  $\delta_{\text{C}}$  166.8 และ  $\delta_{\text{C}}$  166.7 และสัญญาณ  $^1\text{H}$  NMR พบสัญญาณ methylene proton 2 ชุดสัญญาณที่  $\delta_{\text{H}}$  4.41 และ 2.87 ( $d, J = 17.3$  Hz) และ  $\delta_{\text{H}}$  4.61 และ 2.81 ( $d, J = 17.3$  Hz) เป็นสัญญาณของ  $\alpha$ -amino acid protons และสัญญาณ *siglet* ของ N-methyl proton 2 ชุดสัญญาณที่  $\delta_{\text{H}}$  2.75 (*s*) และ  $\delta_{\text{H}}$  2.76 (*s*) เป็นลักษณะสัญญาณของ amino acid ชนิด Sarcosine 2 หมู่ ซึ่งเป็นหน่วยโครงสร้างย่อยที่ 9 และ 10 ของสาร A ดังแสดงในภาพที่ 46

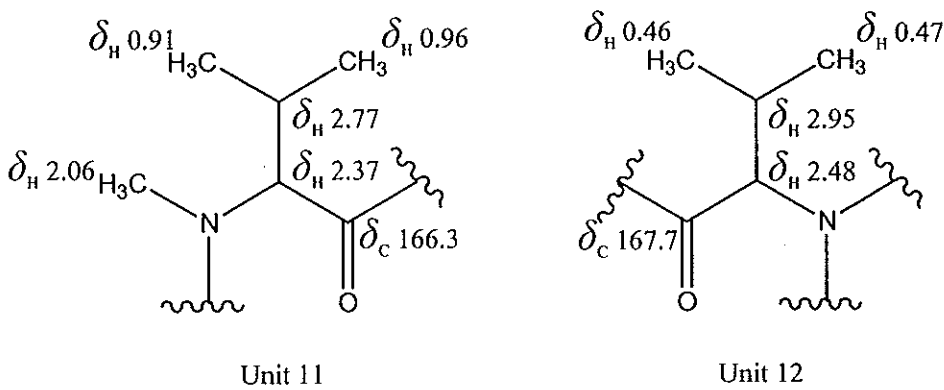


ภาพที่ 46 หน่วยโครงสร้างที่ 9 และ 10 ของสาร A

Figure 46. Unit 9 and 10 of compound A.

จากสัญญาณ  $^{13}\text{C}$  NMR ของ carbonyl ที่  $\delta_{\text{C}}$  167.7 และ  $\delta_{\text{C}}$  166.3 และสัญญาณ  $^1\text{H}$  NMR พบสัญญาณ methine proton 4 ชุดสัญญาณที่  $\delta_{\text{H}}$  2.48 ( $d, J = 8.4$  Hz) และ  $\delta_{\text{H}}$  2.37 ( $d, J = 8.9$  Hz)

เป็นสัญญาณของ  $\alpha$ -amino acid protons และสัญญาณที่  $\delta_H$  2.95 (m) และ  $\delta_H$  2.77 (m) เป็นสัญญาณของ  $\beta$ -amino acid protons สัญญาณ doublet ของ methyl proton 4 ชุดสัญญาณที่  $\delta_H$  0.96 (d,  $J = 6.4$  Hz),  $\delta_H$  0.91 (d,  $J = 6.6$  Hz),  $\delta_H$  0.47 (d,  $J = 6.8$  Hz) และ  $\delta_H$  0.46 (d,  $J = 6.6$  Hz) เป็นสัญญาณของ  $\gamma$ -amino acid protons และสัญญาณ N-methyl proton 2 ชุดสัญญาณที่  $\delta_H$  2.24 (s) และ  $\delta_H$  2.06 (s) เป็นลักษณะสัญญาณของ amino acid ชนิด Methylvaline 2 หมู่ ซึ่งเป็นหน่วยโครงสร้างย่อยที่ 11 และ 12 ของสาร A ดังแสดงในภาพที่ 47

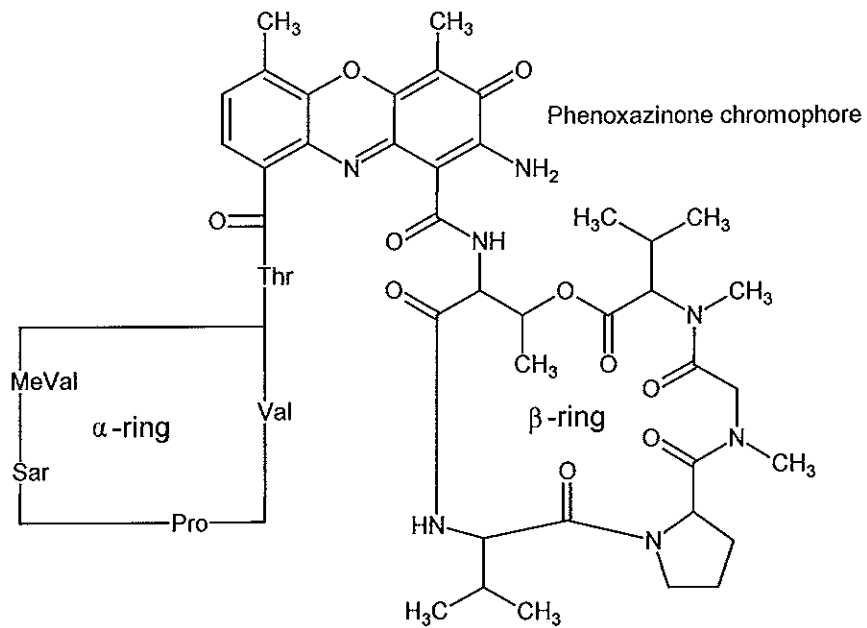


ภาพที่ 47 หน่วยโครงสร้างที่ 11 และ 12 ของสาร A

Figure 47. Unit 11 and 12 of compound A.

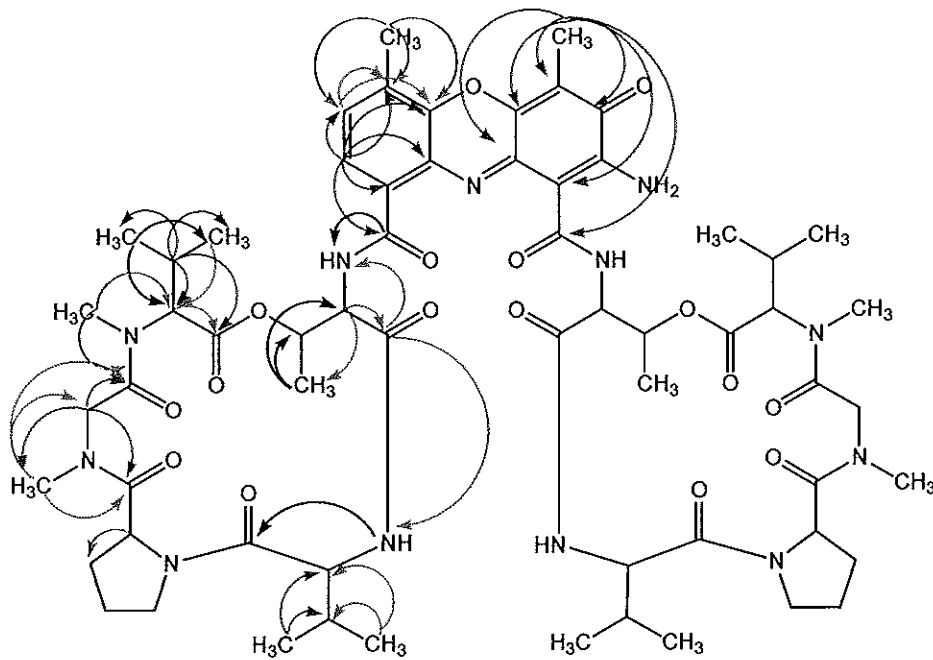
จากข้อมูลทั้งหมดสามารถต่อหน่วยโครงสร้างย่อยต่างๆ ทั้ง 12 หน่วยโครงสร้างได้โดยใช้เทคนิค HMBC (ภาพที่ 55 ในภาคผนวก ง) ซึ่งให้เห็นว่าสาร A มีโครงสร้างดังแสดงในภาพที่ 48 และมีความสัมพันธ์ของโปรตอนกับคาร์บอนภายในโครงสร้างของสาร A จากข้อมูล HMBC ดังแสดงในภาพที่ 49

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูล  $^1\text{H NMR}$  และ  $^{13}\text{C NMR}$  จากตารางที่ 25 ของสาร A กับข้อมูลในฐานข้อมูล SciFinder พบว่าสาร A คือ actinomycin D (Yu and Tseng, 1992)



ภาพที่ 48 โครงสร้างของสาร A

Figure 48. Structure of compound A.



ภาพที่ 49 ความสัมพันธ์ของโปรตอนกับคาร์บอนจากข้อมูล HMBC ของสาร A

Figure 49. HMBC correlations of compound A.

ตารางที่ 25  $^1\text{H}$  NMR และ  $^{13}\text{C}$  NMR ของสาร A เทียบกับ Actinomycin D

Table 25.  $^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compound A compared with Actinomycin D.

Residue	Function group	Chemical shift (ppm)			
		Actinomycin D ( $\text{C}_6\text{D}_6$ )			
		$\alpha$ -ring		$\beta$ -ring	
		$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
Threonine	C=O	-	169.2	-	167.2
	$\text{C}_\alpha\text{H}$	5.04	55.9	5.16	55.5
	$\text{C}_\beta\text{H}$	5.81	75.6	5.76	75.8
	$\text{C}_\gamma\text{H}_3$	1.66	18.0	1.60	19.4
	NH	7.66	-	8.18	-
Valine	C=O	-	167.8	-	169.7
	$\text{C}_\alpha\text{H}$	4.10	59.4	4.14	59.2
	$\text{C}_\beta\text{H}$	2.55	32.6	2.58	32.3
	$\text{C}_\gamma\text{H}_3$	1.52	21.9	1.32	19.6
	$\text{C}_\delta\text{H}_3$	1.58	19.4	1.34	18.9
	NH	8.97	-	8.70	-
Proline	C=O	-	173.3	-	173.8
	$\text{C}_\alpha\text{H}$	6.27	57.1	6.40	56.9
	$\text{C}_\beta\text{H}$	3.40	31.5	2.90	31.1
	$\text{C}_\gamma\text{H}_2$	1.92	23.4	1.92	23.2
	$\text{C}_\delta\text{H}_2$	2.59	48.1	2.55	47.8
Sarcosine	C=O	-	166.7	-	166.8
	$\text{C}_\alpha\text{H}_2$	4.41, 2.87	51.1	4.61, 2.81	51.0
	N- $\text{CH}_3$	2.75	34.6	2.75	34.6
MethylValine	C=O	-	166.3	-	167.7
	$\text{C}_\alpha\text{H}$	2.37	71.1	2.48	71.3
	$\text{C}_\beta\text{H}$	2.80	27.5	2.80	27.6
	$\text{C}_\gamma\text{H}_3$	0.91	21.6	0.46	18.4
	$\text{C}_\delta\text{H}_3$	0.96	19.7	0.47	19.0
	N- $\text{CH}_3$	2.06	38.8	2.24	38.8

ตารางที่ 25 ต่อ

Table 25. (Cont.)

Residue	Function group	Chemical shift (ppm)			
		Actinomycin D (C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> )			
		α-ring		β-ring	
		<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C
Phenoxazinone chromophore	1	-	101.5	-	-
	2	-	148.1	-	-
	3	-	178.6	-	-
	4	-	112.6	-	-
	4a	-	144.4	-	-
	5a	-	140.3	-	-
	6	-	126.8	-	-
	7	6.75	129.7	-	-
	8	7.65	125.9	-	-
	9	-	129.2	-	-
	9a	-	132.9	-	-
	10a	-	146.3	-	-
	4-CH <sub>3</sub>	1.95	7.4	-	-
	6-CH <sub>3</sub>	2.02	14.5	-	-
	1-CO	-	173.3	-	-
9-CO	-	174.3	-	-	

Waksman และ Woodruff (1940) รายงานการแยกสารในกลุ่ม actinomycin ชนิดแรก (actinomycin A) ได้จาก *Streptomyces antibioticus* ซึ่งเป็นเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากดิน ซึ่งเป็นสารที่มีสีส้มแดงและมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี หลังจากปี 1941 มีรายงานการค้นพบสารในกลุ่ม actinomycin จากเชื้อแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ต่างๆ (Waksman *et al.*, 1946) โดยมีรายงานการค้นพบจากแอคติโนมัยซีทในกลุ่ม *Strptomyces* sp. เป็นกลุ่มหลัก ดังแสดงในตารางที่ 26

ตารางที่ 26 สารในกลุ่ม actinomycin ที่แยกได้จากแอคติโนมัยซีท

Table 26. Actinomycin complex from actinomycetes strains.

Year	Strain	Actinomycin complex
1941	<i>Streptomyces antibioticus</i>	Actinomycin A
1947	<i>Streptomyces flavus</i>	Actinomycin J
1948	<i>Streptomyces parvus</i>	Actinomycin A
	<i>Streptomyces flavovirens</i>	
1949	<i>Streptomyces</i> sp.	Actinomycin B
	<i>Streptomyces chrysomallus</i>	Actinomycin C
1951	<i>Streptomyces flaveolus</i>	Actinomycin J
	<i>Micromonospora globosa</i>	
1952	<i>Streptomyces</i> sp.	Actinomycin X and I
1954	<i>Streptomyces flavus</i>	Actinomycin X
	<i>Streptomyces antibioticus</i>	Actinomycin I
	<i>Streptomyces flavus-parvus</i>	Actinomycin X
	<i>Streptomyces parvulus</i>	Actinomycin D
	<i>Streptomyces michiganensis</i>	Actinomycin X
	<i>Streptomyces antibioticus</i>	Actinomycin M
1956	<i>Streptomyces</i> sp.	Actinomycin E
	<i>Streptomyces</i> sp.	Actinomycin F
1958	<i>Streptomyces fradiae</i>	Actinomycin Z and X

ที่มา: Waksman (1946)

สารในกลุ่ม actinomycin มีองค์ประกอบพื้นฐานของโครงสร้างเหมือนกันคือ L-N-Methylvaline, Sarcosine, L-Threonine และ 2-Amino-4,6-dimethyl-3-oxophenoxazine-1,9-dicarboxylic acid แต่มีชนิดของ amino acid ที่เป็นองค์ประกอบในโครงสร้างที่แตกต่างกัน (Alekhova and Novozhilova, 2001) โดยโครงสร้างของสาร A หรือ actinomycin D มี amino acid ชนิด L-Proline และ D-Valine เป็นองค์ประกอบในโครงสร้าง

## บทที่ 4

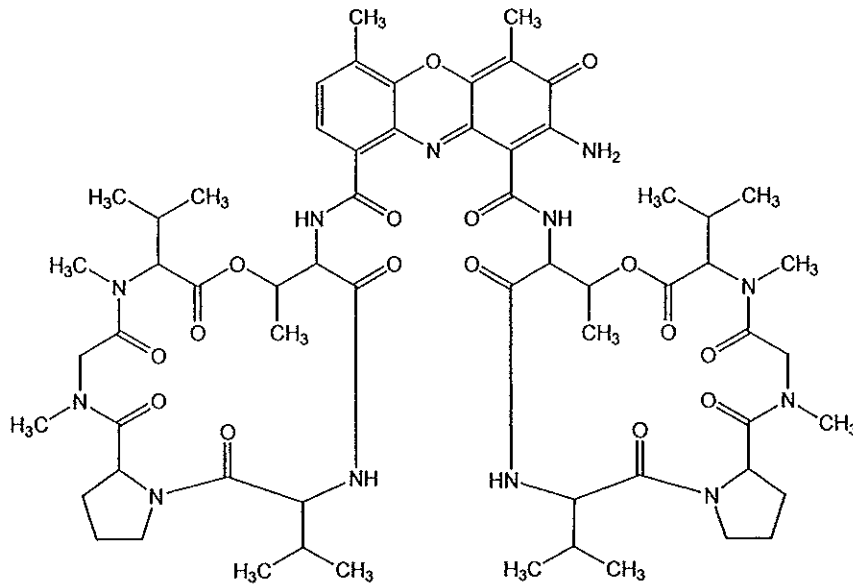
### สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะคัดเลือกสารสกัดหยาบของแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากทะเลในประเทศไทย ที่ผ่านการคัดกรองเบื้องต้นแล้วว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง 4 ชนิด คือ KB, HT-29, MCF-7 และ HeLa โดยทำการคัดเลือกจากองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งของสารสกัดหยาบ และพิจารณาจากสายพันธุ์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากทะเล เพื่อนำสารสกัดหยาบที่คัดเลือกได้มาทำการผลิต สกัดแยก ทำให้บริสุทธิ์ และวิเคราะห์สูตร โครงสร้างของสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

จากการคัดเลือกสารสกัดหยาบของแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากทะเล จากจำนวนสารสกัดหยาบทั้งหมด 212 สารสกัดที่ผ่านการคัดกรองเบื้องต้นแล้วว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง 4 ชนิด คือ KB, HT-29, MCF-7 และ HeLa โดยการคัดเลือกสารสกัดหยาบตามองค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง พบว่าสารสกัดหยาบ CNA039A ที่สกัดแยกได้จากแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากทะเลสายพันธุ์ CNA039 ที่เลี้ยงในอาหารสูตร A มีองค์ประกอบทางเคมีของสารที่น่าสนใจและมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่สูง จึงนำสารสกัดหยาบ CNA039A มาทำการผลิต สกัดแยก ทำให้บริสุทธิ์ และวิเคราะห์สูตร โครงสร้างของสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

จากการจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากทะเลด้วย 16S rDNA พบว่าลำดับเบสของ 16S rDNA ของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากทะเลสายพันธุ์ CNA039 มีความคล้ายกับลำดับเบสของ 16S rDNA ของ *Streptomyces parvulus* โดยมีความเหมือน (Similarity value, %) เท่ากับ 99%

จากการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากทะเลสายพันธุ์ CNA039 ในอาหารสูตร A ปริมาตร 8 ลิตร เพื่อเพิ่มปริมาณสารสกัด และนำสารสกัดหยาบที่ได้มาทำการแยกและทำให้บริสุทธิ์ของสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง โดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ 1 สารคือ สาร A จากนั้นนำสาร A มาทำการวิเคราะห์สูตร โครงสร้างทางเคมีโดยวิธีทาง สเปกโทรสโกปี พบว่าสาร A มีข้อมูล  $^1\text{H}$  NMR และ  $^{13}\text{C}$  NMR ตรงกับ actinomycin D ที่เคยมีรายงานไว้ก่อนหน้า (Yu and Tseng, 1992) โดยโครงสร้างของสาร A แสดงในภาพที่ 50



ภาพที่ 50 โครงสร้างของสาร A

Figure 50. Structure of compound A.

เมื่อนำสาร A ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง 4 ชนิด พบว่าสาร A ที่ระดับความเข้มข้น 3 นาโน โมลาร์ มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง 3 ชนิด คือ HeLa, MCF-7 และ HT-29 แต่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB

Actinomycin D เป็นสารปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็งที่มีชื่อทางการค้าว่า Dactinomycin ซึ่งใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง เช่น Rhabdomyosarcoma, Ewing's sarcoma และ Wilm's tumour (Green, 1997) โดยกลไกการออกฤทธิ์ของสารที่ระดับความเข้มข้นต่ำนั้นสามารถยับยั้งการสังเคราะห์ RNA ของเซลล์ โดยส่วนของ phenoxazinone chromophore ของ Dactinomycin จะสอดเข้าระหว่างกลางของสาย DNA ที่เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ RNA ตรงตำแหน่งของเบสกวานีน (Guanine) แต่ที่ระดับความเข้มข้นของสารสูงจะออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ DNA (Wadkins *et al.*, 1988)

ถึงแม้ว่า actinomycin D จะเป็นสารที่มีการค้นพบมานานและใช้เป็นยารักษาโรคมะเร็งแล้วในปัจจุบัน แต่การศึกษา actinomycin D ในด้านต่างๆ ก็ยังมีรายงานการศึกษาออกมาให้เห็นอย่างต่อเนื่อง เช่น การศึกษาศักยภาพในการยับยั้งเอนไซม์ reverse transcriptase ของเชื้อไวรัส HIV ที่ก่อให้เกิดโรคเอดส์ (Davis *et al.*, 1998) และการยับยั้งการเจริญของกล้ามเนื้อเรียบ (smooth muscle cell) ที่เกิดขึ้นหลังจากการผ่าตัดหลอดเลือดหัวใจ (Wu, 2005) เป็นต้น

## ข้อเสนอแนะในการวิจัย

1. ในการผลิตสารปฏิชีวนะยังมีปัจจัยอีกหลายประการเพื่อเพิ่มปริมาณของสารปฏิชีวนะ เช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน อุณหภูมิ และการให้อากาศ เป็นต้น ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาถึงปัจจัยที่เหมาะสมในการผลิตสารปฏิชีวนะเพื่อให้ได้สารปฏิชีวนะปริมาณมาก
2. ควรทดสอบความคงตัวของสารปฏิชีวนะก่อนการทำบริสุทธิ์ เนื่องจากเป็นการป้องกันการสลายตัวของสารปฏิชีวนะในระหว่างขั้นตอนการทำบริสุทธิ์
3. ในการทำบริสุทธิ์สารปฏิชีวนะ ควรเลือกใช้ stationary phase ให้เหมาะสมกับชนิดและปริมาณสารปฏิชีวนะ
4. จากผลการทดลองพบว่าสารส่วน F1, F3 และ F4 มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง ดังนั้นจึงควรนำมาทำให้บริสุทธิ์เพื่อวิเคราะห์สูตร โครงสร้างของสารปฏิชีวนะต่อไป

## เอกสารอ้างอิง

- พิมพ์จิต ตามพวรรณ. 2541. สเปกโทรสโกปีของสารอินทรีย์. พิมพ์ครั้งที่ 2. ภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา.
- สมใจ ศิริโชค. 2001. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ. กรุงเทพฯ.
- สุภานันท์ แซ่ลิ้ม. 2548. สารต้านแบคทีเรียจากแอคติโนมัยสีทในทะเลของประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- อัศววิทย์ กาญจนโอภาส. 2548. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์เรื่องสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์ในทะเลในประเทศไทย. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย.
- Alekhova, T.A. and Novozhilova, T.Y. 2001. Biosynthesis of polyketide antibiotics by various *Streptomyces* species that produce actinomycins. Appl. Biochem. Microbiol. 37: 309-316.
- Atsushi, T., Shogo, K., Daishiro, I., Yoshiro, O., Tomio, T. 1989. Altemicidin, a new acaricidal and antitumor substance. I. Taxonomy, fermentation, isolation and physico-chemical and biological properties. J. Antibiot. 42: 1556-61.
- Bérdy, J. 2005. Bioactive microbial metabolites. J. Antibiot. 58: 1-26.
- Blunt, J.W., Copp, W.P., Munro, M.H.G., Northcote, P.T. and Prinsep, M.R. 2005. Marine natural products. Nat. Prod. Rep. 22: 15-61.
- Blunt, J.W., Copp, B.R., Hu, W.P., Munro, M.H.G., Northcote, P.T. and Prinsep, M.R. 2006. Marine natural products. Nat. Prod. Rep. 23: 26-78.
- Blunt, J.W., Copp, B.R., Hu, W.P., Munro, M.H.G., Northcote, P.T. and Prinsep, M.R. 2007. Marine natural products. Nat. Prod. Rep. 24.
- Bruntner, C., Binder, T., Pathom-aree, W., Goodfellow, M., Bull, A.T., Potterat, O., Puder, C., Horer, S., Schmid, A. and Bolek, W. 2005. Frigocyclinone, a novel angucyclinone antibiotic produced by a *Streptomyces griseus* strain from Antarctica. J. Antibiot (Tokyo). 58: 346-349.
- Bull, A.T., Stach, J.E.M., Ward, A.C. and Goodfellow, M. 2005. Marine actinobacteria: perspectives, challenges, future directions. Antonie Leeuwenhoek. 87: 65-79.

- Cai, P., Kong, F., Ruppen, M.E., Glasier, G. and Carter, G.T. 2005. Hygrocins A and B, naphthoquinone macrolides from *Streptomyces hygroscopicus*. J. Nat. Prod. 68: 1736-1742.
- Capon, R.J., Skene, C., Lacey, E., Gill, J.H., Wicker, J., Heiland, K. and Friedel, T. 2000. Lorneamides A and B: two new aromatic amides from a southern Australian marine actinomycete. J. Nat. Prod. 63: 1682-1683.
- Cascon, L.M., Romero, F., Vazquez, F.E., Gravalos, D. and Puentes, J.L.F. 2003. IB-00208, A new cytotoxic polycyclic xanthon produced by a marine-derived *Actinomadura*. J. Antibiot. 3: 219-225.
- Charan, R.D., Schlingmann, G., Janso, J., Bernan, V., Feng, X. and Carter, G.T. 2004. Diazepinomicin, a new antimicrobial alkaloid from a marine *Micromonospora* sp. J. Nat. Prod. 67: 1431-143.
- Chater, K.F., Takano, E. and Ryding, N.J. 1997. The life cycle of *Streptomyces coelicolor* A3(2). In Atlas of Actinomycetes. (Miyadoh, S., ed.) p. 200. The Society for Actinomycetes Japan. Japan.
- Cho, J.Y., Kwon, H.C., Williams, P.G., Kauffman, C.A., Jensen, P.R. and Fenical, W. 2006. Actinofuranones A and B, polyketides from a marine-derived bacterium related to the genus *Streptomyces* (Actinomycetales). J. Nat. Prod. 69: 425-428.
- Cho, K.W., Lee, H.S., Rho, J.R., Kim, T.S., Mo, S.J. and Shin, J. 2001. New lactone-containing metabolites from a marine-derived bacterium of the genus *Streptomyces*. J. Nat. Prod. 64: 664-667.
- Crew, P., Rodríguez, J. and Jaspars, M. 1998. Organic Structure Analysis. Oxford University Press. New York.
- DeLong, E. and Pace, N. 2001. Environmental diversity of bacteria and archaea. Syst. Biol. 50: 470-8.
- Dehghan, M., Nasri, M. and Razvan, M.R. 2007. Global stability of a deterministic model for HIV infection in vivo. Chaos. Soliton. Fract. 34: 1225-1238.
- Faulkner, D.J. 2002. Marine natural products. Nat. Prod. Rep. 19: 1-48.
- Feling, R.H., Buchanan, G.O., Mincer, T.J., Kauffman, C.A., Jensen, P.R. and Fenical W. 2003. Salinosporamide A: A highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial

source, a marine bacterium of the new genus *Salinospora*. *Angew. Chem. Int. Ed.* 42: 355-357.

Fenical, W., Jensen, P.R., Kauffman, C., Mayhead, S.L., Faulkner, D.J., Sincich, C., Rao, M.R., Kantorowski, E.J., West, L.M., Strangman, W.K., Shimizu, Y., Li, B., Thammana, S., Drainville, K., Davies-Coleman, M.T., Kramer, R.A., Fairchild, C.R., Rose, W.C., Wild, R.C., Vite, G.D. and Peterson, R.W. 2003. New anticancer drugs from cultured and collected marine organisms. *Pharm. Biol.* 41: 6-14.

Fenical, W. and Jensen, P.R. 2006. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. *Nat. Chem. Biol.* 2: 666-673.

Fernández-Chimeno, R.I., Canedo, L., Espliego, F., Gravalos, D., Calle, F.D.E. and Fernández-Puentes. 2000. IB96212, a novel cytotoxic macrolide produced by a marine *Micromonospora*. *J. Antibiot.* 53: 474-478.

Galm, U., Hager, M.H., Lanen, S.G.V., Ju, J., Thorson, J.S. and Shen, B. 2005. Antitumor antibiotics: Bleomycin, Eneidyne, and Mitomycin. *Chem. Rev.* 105: 739-758.

Glazer, A.N., and Nikaido, H. 1994. *Microbial Biotechnology*. (Freeman, W. H., ed.). pp. 507-517. USA.

Goodfellow, M., Brard R.G. 1980. *Microbiological Classification and Identification*. 1<sup>st</sup> ed. Academic. Press. London. pp. 138-165.

Gorajana, A., Kurada, B.V.V.S.N., Peela, S., Jangam, P., Vinjamuri, S., Poluri, E. and Zeeck, A. 2005. 1-Hydroxy-1-norresistomycin, a new cytotoxic compound from a marine actinomycete, *Streptomyces chibaensis* AUBN1/7. *J. Antibiot.* 58: 526-529.

Green, D.M. 1997. Paediatric oncology update wilms' tumour. *Eur. J. Cancer.* 33: 409-418.

Gu, J.Y., Liu, H.B., Cui, C.B. and Gu, Q.Q. 2005. Isolation and identification of cyclic dipeptides from a marine-derived *Streptomyces albogriseolus*. *Zhongguo Haiyang Daxue Xuebao.* 35: 618-620.

Haefner, B. 2003. Drug from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug. Discov. Today.* 8: 536-544.

Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41: 95-98.

- Harbarth, S., Pestotnik, S.L., Lloyd, J.F., Burke, J.P. and Samore, M.H. 2001. The epidemiology of nephrotoxicity associated with conventional amphotericin B therapy. *Am. J. Med.* 111: 528-34.
- Hardt, I.H., Jensen, P.R. and Fenical, W. 2000. Neomarinone, and new cytotoxic marinone derivatives, produced by a marine filamentous bacterium (actinomycetales). *Tetrahedron Lett.* 41: 2073-2076.
- He, H., Ding, W.D., Berman, V.S., Richardson, A.D., Ireland, C.M., Greenstein, M., Ellestad, G.A. and Carter, G.T. 2001. Lomaiviticins A and B, potent antitumor antibiotics from *Micromonospora lomaivitiensis*. *J. Am. Chem. Soc.* 123: 5362-5363.
- Imada, C. 2005. Enzyme inhibitors and other bioactive compounds from marine actinomycetes. *Antonie Leeuwenhoek.* 87: 59-63.
- Imada, C. and Okami, Y. 1994. Characteristics of marine actinomycete isolated from deep-sea sediment and production of  $\beta$ -glucosidase inhibitor. *J. Mar. Biotechnol.* 2:109-113.
- Imamura, N., Nishijima, M., Adachi, K. and Sano, Hi. 1993. Novel antimycin antibiotics, urauchimycins A and B, produced by marine actinomycete. *J. Antibiot.* 46: 241-6.
- Itoh, T., Kinoshita, M., Aoki, S. and Kobayashi, M. 2003. Komodoquinone A, a novel neutritogenic anthracycline, from marine *Streptomyces* sp. KS3. *J. Nat. Prod.* 66: 1373-1377.
- Jensen, P.R., Dwight, R. and Fenical, W. 1991. Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments. *Appl. Environ. Microbio.* 57: 1102-1108.
- Jiang, Z.D., Jensen, P.R. and Fenical, W. 1997. Actinoflavoside, a novel flavonoid-like glycoside produced by a marine bacterium of the genus *Streptomyces*. *Tetrahedron Lett.* 38: 5065-5068.
- Jiang, Z.D., Jensen, P.R. and Fenical, W. 1999. Lobophorins A and B, new antiinflammatory macrolides produced by a tropical marine bacterium. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9: 2003-2006.
- Kanoh, K., Matsuo, Y., Adachi, K., Imagawa, H., Nishizawa, M. and Shizuri, Y. 2005. Mechercharmycins A and B, cytotoxic substances from marine-derived *Thermoactinomyces* sp. YM3-251. *J. Antibiot (Tokyo).* 58: 289-292.

- Keese, R. and Brandle, M.P. 2006. Practical Organic Synthesis: A Student's Guide. (Toube, T.P., ed.). pp. 55-61. University of London. London.
- Kelecom, A. 2002. Secondary metabolites from marine microorganisms. An. Acad. Bras. Cienc. 74: 151-170.
- Kokare, C. R., Mahadik, K. R., Kadam, S. S. and Chopade, B. A. 2004. Isolation, characterization and antimicrobial activity of marine halophilic *Actinopolyspora* species AH1 from the west coast of India. Curr. Sci. India. 86: 593-597.
- Kunio, S., Kota, N. and Ken, D. 2006. Structure of an  $\alpha$ -amylase inhibitor produced by marine actinomycete and its lowering effects in vivo of glucose and lipids in blood. Dep. Food. Sci. Technol. 42: 171-183.
- Kwon, H.C., Kauffman, C.A., Jensen, P.R. and Fenical W. 2005. Marinomycins A-D, antitumor-antibiotics of a new structure class from a marine actinomycete of the recently discovered genus "*Marinispora*". J. Am. Chem. Soc. 128: 1622-1632.
- Labeda, D.P. 1987. Actinomycete taxonomy: generic characterization. J. Indust. Microbiol. 28: 115-121.
- Lam, K.S. 2006. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. Curr. Opin. Microbiol. 9: 245-251.
- Lechevalier, M.P., DeBievre, C. and Lechevalier, H.A. 1977. Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipids composition. Biochem. Syst. Ecol. 5: 249-260.
- Lechevalier, M.P. and Lechevalier, H.A. 1970. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. Int. J. Syst. Bacteriol. 20: 435-443.
- Lee, S.D. 2006. *Blastococcus jejuensis* sp. nov., an actinomycete from beach sediment, and emended description of the genus *Blastococcus* Ahrens and Moll 1970. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56: 2391-2396.
- Lee, S.D. 2006. *Kineococcus marinus* sp. nov., isolated from marine sediment of the coast of Jeju, Korea. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56: 1279-1283.
- Lee, S.D. 2006. *Phycococcus jejuensis* gen. nov., sp. nov., an actinomycete isolated from seaweed. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56: 2369-2373.

- Li, F.C., Maskey, R.P., Qin, R.P. and Laatsch, H. 2005. Chinikomycin A and B: isolation, structure elucidation and biological activity of antibiotics with a novel carbon skeleton from a marine *Streptomyces* sp. Isolate M045. *J. Nat. Prod.* 68: 349-353.
- Lo'pez, J.M.S., Insua, M.M., Baz, J.P., Puentes, J.L.F. and Herna'ndez, L.M.C.H. 2003. New cytotoxic indolic metabolites from a marine *Streptomyces*. *J. Nat. Prod.* 66: 863-864.
- Macherla, V.R., Liu, J., Bellows, C., Teisan, S., Lam, K.S. and Potts, B.C.M. 2005. Glaciapyrroles A, B and C, pyrrolosesquiterpenes from a *Streptomyces* sp. isolated from an Alaskan marine sediment. *J. Nat. Prod.* 68: 780-783.
- Magarvey, N.A., Keller, J.M., Bernan, V., Dworkin, M. and Sherman, D.H. 2004. Isolation and characterization of novel marine-derived actinomycete taxa rich in bioactive metabolites. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 7520-7529.
- Maldonado, L.A., Fenical, W., Jensen, P.R., Kauffman, C.A., Mincer, T.J., Ward, A.C., Bull, A.T. and Goodfellow, M. 2005. *Salinispora arenicola* gen. nov., sp. nov. and *Salinispora tropica* sp. nov., obligate marine actinomycetes belonging to the family *Micromonosporaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 1759-1766.
- Manam, R.R., Teisan, S., White, D.J., Nicholson, B., Grodberg, J., Neuteboom, S.T.C., Lam K.S., Mosca, D.A., Lloyd, G.K. and Potts, B.C.M. 2005. Lajollamycin, a nitro-tetraene spiro- $\beta$ -lactone- $\gamma$ -lactam antibiotic from the marine Actinomycete *Streptomyces nodosus*. *J. Nat. Prod.* 68: 240-243.
- Maskey, R.P. 2001. Neuartige wirkstoffe aus marinen Streptomyceten: Sagunamycine, Parimycin, Himalomycin, Gottingamycin, Dhanyabodomycin, Akashine und stark cytotoxische Trioxacarcine mit hoher anti- malaria aktivität, Ph.D. Thesis, University of Goettingen.
- Maskey, R.P., Helmke, E., Fiebig, H.H. and Laatsch, H. 2002. Parimycin: isolation and structure elucidation of a novel cytotoxic 2,3-dihydroquinizarin analogue of  $\gamma$ -indomycinone from a marine streptomycete isolate. *J. Antibiot.* 55: 1031-1035.
- Maskey, R.P., Helmke, E., Kayser, O., Fiebig, H.H., Maier, A., Busche, A. and Laatsch, H. 2004. Anti-cancer and antibacterial trioxacarcins with high anti-malaria activity from a marine streptomycete and their absolute stereochemistry. *J. Antibiot (Tokyo).* 57: 771-779.

- Markey, R.P., Li, F.C., Qin, S., Fiebig H.H. and LAATSCH. 2003. Chandrananimysins A-C: production of novel anticancer antibiotics from marine *Actinomadura* sp. isolate M048 by variation of medium composition and growth conditions. *J Antibiot.* 56: 622-629.
- Miller, E.D., Kauffman, C.A., Jensen, P.R. and Fenical, W. 2007. Piperazimycins: cytotoxic hexadepsipeptides from a marine-derived bacterium of the genus *Streptomyces*. *J. Org. Chem.* 72: 323-330.
- Mincer, T.J., Jensen, P.R., Kauffman, C.A. and Fenical, W. 2002. Widespread and resistant populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediment. *Appl. Environ. Microbio.* 68: 5005-5011.
- Mitchell, S.S., Nicholson, B., Teisan, S., Lam, K.S., and Potts, B.C.M. 2004. Aureoverticillactam, a novel 22-atom macrocyclic lactam from the marine actinomycete *Streptomyces aureoverticillatus*. *J. Nat. Prod.* 67: 1400-1402.
- Miyadoh, S. 1997. Atlas of Actinomycetes. The Society for Actinomycetes Japan. Japan.
- Moore, B.S., Trischman, J.A., Seng, D., Kho, D., Jensen, P.R. and Fenical, W. 1999. Salinamides, anti-inflammatory depsipeptides from a marine streptomycete. *J. Org. Chem.* 64: 1145-1150.
- Mukku, V.J.R.V., Speitling, M., Laatsch, H. and Helmke, E. 2000. New butenolides from two marine streptomycetes. *J. Nat. Prod.* 66: 1570-1572.
- Noskin, G.A., Rubin, R.J., Schentag, J.J., Kluytmans, J., Hedblom, E.C., Smulders, M., Lapetina, E. and Gemmen, E. 2005. The burden of *Staphylococcus aureus* infections on hospitals in the United States: an analysis of the 2000 and 2001 Nationwide Inpatient Sample Database. *Arch. Intern. Med.* 165: 1756-1761.
- Oh, D.C., Williams, P.G., Kauffman, C.A., Jensen, P.R. and Fenical, W. 2006. Cyanosporasides A and B, chloro- and cyano-cyclopenta[a]indene glycosides from the marine actinomycete "*Salinispora pacifica*". *Org. Lett.* 8: 1021-1024.
- Pathirana, C., Jensen, P.R. and Fenical, W. 1992. Marinone and debromomarinone: antibiotic sesquiterpenoid naphthoquinones of a new structure class from a marine bacterium. *Tetrahedron Lett.* 33: 7663-7666.

- Pathirana, C., Dwight, R., Jensen, P.R., Fenical, W., Delgado, A., Brinen, L.S. and Clardy, J. 1991. Structure and synthesis of a new butanolide from marine Actinomycetes. *Tetrahedron Lett.* 32: 7001-7004.
- Pathom-aree, W., Nogi, Y., Ward, A.C., Horikoshi, K., Bull, A.T. and Goodfellow, M. 2006. *Dermacoccus barathri* sp. nov. and *Dermacoccus profundus* sp. nov., novel actinomycetes isolated from deep-sea mud of the Mariana Trench. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 2303-2307.
- Petrolini, B.S., Quaroni, S., Saracchi, M. and Sardi, P. 1993. A new genus of the madoromycetes : *Planopolyspora* gen. Nov. *Actinomycetes* 4: 8-18.
- Ranmao, H., Guizhen, W. and Junying, I. 1993. A new genus of the actinomycetes, *Planotetraspora* gen. Nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43: 468-470.
- Renner, M.K., Shen, Y.C., Cheng, X.C., Jensen, P.R., Frankmoelle, W., Kauffman, C.A., Fenical, W., Lobkovsky, E. and Clardy, J. 1999. Cyclomarins A-C, new antiinflammatory cyclic peptides produced by a marine bacterium (*Streptomyces* sp.). *J. Am. Chem. Soc.* 121: 11273-11276.
- Richardson, A.D. and Ireland, C.M. 2004. A profile of the in vitro antitumor activity of lissoclinolide. *Toxicol. App. Pharmacol.* 195: 55-61.
- Riedlinger, J., Reicke, A., Zaehner, H., Krismer, B., Bull, A.T., Maldonado, L.A., Ward, A.C., Goodfellow, M., Bister, B., Bischoff, D., Suessmuth, R.D. and Fiedler, H.P. 2004. Biosynthetic capacities of actinomycetes: Abyssomicins, inhibitors of the para-aminobenzoic acid pathway produced by the marine *Verrucosipora* strain AB-18-032. *J. Antibiot.* 54: 271-279.
- Sanchez, L.J.M., Martinez, I.M., Perez, B.J., Fernandez, P.J.L. and Canedo, H.L.M. 2003. New cytotoxic indolic metabolites from a marine *Streptomyces*. *J. Nat. Prod.* 66 : 863-864.
- Selvin, J., Joseph, S., Asha, K.R.T., Manjusha, W.A., Sangeetha, V.S., Jayaseema, D.M., Antony, M.C. and Vinitha, A.J.D. 2004. Antibacterium potential of antagonistic *Streptomyces* sp. isolated from marine sponge *Dendrilla nigra*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 50: 117-122.
- Shcumacher R.W., Davidson, B.S., Montenegro, D.A. and Berman, V.S. 1995.  $\gamma$ -Indomycinone, a new pluramycin metabolite from a deep-sea derived actinomycete. *J. Nat. Prod.* 58: 613-617.

- Shcumacher, R.W., Harrigan, B.L. and Davidson, B.S. 2001. Kahakamides A and B, new neosidomycin metabolites from a marine-derived actinomycete. *Tetrahedron Lett.* 42: 5133-5135.
- Shcumacher, R.W., Talmage, S.C., Miller, S.A., Sarris, K.E., Davidson, B.S. and Goldberg, A. 2003. Isolation and structure determination of an antimicrobial ester from a marine sediment-derived bacterium. *J. Nat. Prod.* 66: 1291-1293.
- Shin, J., Seo Y., Lee, H.S., Rho, J.R. and Mo, S.J. 2003. A new cyclic peptide from a marine-derived bacterium of the genus *Nocardiopsis*. *J. Nat. Prod.* 66: 883-884.
- Silverstein, R.M. and Webster, F.X. 1998. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. 6<sup>th</sup> Ed. United State of America. USA.
- Sitachitta, N., Gadepalli, M. and Davidson, B.S. 1996. New  $\alpha$ -pyrone-containing metabolites from a marine-derived actinomycete. *Tetrahedron.* 52: 8073-8080.
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenney, S. and Boyd, M.R. 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl Cancer Inst.* 82: 1107-1112.
- Soria-Mercado, I.E., Prieto-Davo, A., Jensen P.R. and Fenical, W. 2006. Antibiotic terpenoid chloro-dihydroquinones from a new marine Actinomycete. *J. Nat. Prod.* 68: 904-910.
- Stach, J.E.M., Maldonado, L.A., Ward, A.C., Bull, A.T. and Goodfellow, M. 2004. *Williamsia maris* sp. nov., a novel actinomycetes isolated from the Sea of Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 191-194.
- Stackbrandt, E., Rainey, F.A. and Ward-Rainey, N.L. 1997. Proposal of a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 479-491.
- Stritzke, K., Schulz, S., Laatsch, H., Helmke, E. and Beil, W. 2004. Novel caprolactones from a marine Streptomycete. *J. Nat. Prod.* 67: 395-401.
- Takahashi, C., Takada, T., Yamada, T., Mlnoura, K., Uchlda, K., Mataumura, E. and Numata, A. 1994. Malichomycin, a new class of potent cytotoxic macrolide produced by an actinomycete from a marine fish. *Tetrahedron Lett.* 35: 5013-5014.
- Takizawa, M., Colwell, R.R. and Hill, R.T. 1993. Isolation and diversity of Actinomycetes in the Chesapeake Bay. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 997-1002.

- Urndell, T., Jensen, P.R. and Fenical, W. 1996. Lagunapyrones A-C: Cytotoxic acetogenins of a new skeletal class from a marine sediment bacterium. *Tetrahedron Letters*. 37: 1327-1330.
- Vobis, G. 1997. Morphology of actinomycetes. *In Atlas of Actinomycetes*. (Miyadoh, S., ed.). pp. 180-191. The Society for Actinomycetes Japan. Japan.
- Wadkins, R.M., Vladu, B. and Tung, C.S. 1988. Actinomycin D binds to metastable hairpins in single-stranded DNA. *Biochemistry*. 37: 11915- 11923.
- Waksman, S.A., Geiger, W.B. and Reynolds, D.M. 1946. Strain specific and production of antibiotic substance. VII. production of actinomycin by difference actinomycetes. *PNAS*. 32: 117-120.
- Waksman, S.A. and Woodruff, H.B. 1940. Bacteriostatic and bactericidal substances produced by a soil actinomycetes. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 46: 609-614.
- William, R.H. 1989. *Bergey' Manual of Systematic Bacteriology*. U.S.A. Baltimore. Williams&Wilkins. Vol. 4.
- Williams, D.E., Bernan, V.S., Ritacco, F.V., Maiese, W.M., Greenstein, M. and Andersen, R.J. 1999. Holyrines A and B, possible intermediates in staurosporine biosynthesis produced in culture by a marine actinomycete obtained from the North Atlantic ocean. *Tetrahedron Lett.* 40: 7171-7174.
- Williams, P. G., Miller, E.D., Asolkar, R.N., Jensen, P.R. and Fenical, W. 2007. Arenicolides A-C, 26-membered ring macrolides from the marine actinomycete *Salinispora arenicola*. *J. Org. Chem.* 72: 5025-5034.
- Woo, J.H., Kitamura, E., Myouga, H. and Kamei, Y. 2002. An antifungal protein from the marine bacterium *Streptomyces* sp. strain AP77 Is specific for *Pythium porphyrae*, a causative agent of red rot disease in *Porphyra* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* p. 2666-2675.
- Yamada, T., Minoura, K. and Numata, A. 2001. Structures for cytotoxic substances produced by an actinomycete from a *Halichoeres* marine fish. *Tennen Yuki Kagobutsu Toronkai Koen Yoshishu.* 43: 455-460.
- Yamada, T., Minoura, K. and Numata, A. 2002. Halichoblelide, a potent cytotoxic macrolide from a *Streptomyces* species separated from a marine fish. *Tetrahedron Lett.* 43: 1721-1724.

- Yi, H., Schumann, P., Sohn K. and Chun J. 2004. *Serinicoccus marinus* gen. nov., sp. nov., a novel actinomycete with L-ornithine and L-serine in the peptidoglycan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 1585–1589.
- Yin, J., Aviles, P., Lee, W., Ly, C., Guillen, M.J., Calvo, P., Manzanares, I. and Faircloth, G. 2003. Validation of a sensitive assay for thiocoraline in mouse plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* 794: 89–98.
- Yoh, M., Matsuyama, J., Ohnishi, M., Takagi, K., Miyagi, H., Mori, K., Park, K.S., Ono, T. and Honda, T. 2005. Importance of *Providencia* species as a major cause of travellers' diarrhea. *J. Med. Microbiol.* 54: 1077–1082.
- Yu, C. and Tseng, Y.Y. 1992. NMR study of the solution conformation of actinomycin D. *Eur. J. Biochem.* 209: 181-187.
- Zhang, H., Zheng, W., Huang, J., Luo, H., Jin, Y., Zhang, W., Liu Z. and Huang. Y. 2006. *Actinoalloteichus hymeniacidonis* sp. nov., an actinomycete isolated from the marine sponge *Hymeniacidon perleve*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 2309-2312.
- Zheng, Z., Zeng, W., Huang, Y., Yang, Z., Li, J., Cai, H. and Su, W. 2000. Detection of antitumor and antimicrobial activities in marine organism associated actinomycetes isolated from the Taiwan Strait. *China. FEMS Microbiol. Lett.* 188: 87-91.

ภาคผนวก

## ภาคผนวก ก

## สูตรและการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารสูตร A (คัดแปลงจาก Mitchell *et al.*, 2004)

ตะกอนดิน	10.0	กรัม
สาหร่าย	20.0	กรัม
เปลือกกุ้งบด	10.0	กรัม
น้ำทะเล	1000.0	มิลลิลิตร

ตะกอนดินเก็บมาจากทะเลที่ระดับความลึกประมาณ 1 เมตร นำตะกอนดินมาผึ่งแดดให้แห้งสนิท ร้อนเพื่อคัดเลือกเฉพาะตะกอนดินที่มีขนาดประมาณ 500 - 1,000 ไมครอน อบตะกอนดินที่ผ่านการคัดเลือกที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง สาหร่ายเลือกใช้ *Porphyra* sp. แบบแห้งที่มีจำหน่ายทั่วไป นำมาบดให้ละเอียด และเปลือกกุ้งบด เตรียมโดยนำเปลือกกุ้งมาตากให้แห้งสนิท นำมาบดให้ละเอียด เก็บรักษาไว้ในที่แห้ง ชั่งอาหารให้ได้ตามสัดส่วน เติมน้ำทะเลที่ผ่านการกรองแล้วจนครบ 1000 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่ง (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารสูตร B (คัดแปลงจาก Capon *et al.*, 2000)

Glycerol	20.0	กรัม
Soytone	10.0	กรัม
น้ำทะเล	1000.0	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่ง ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

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

Polypeptone	10.0	กรัม
Soluble starch	10.0	กรัม
Yeast extracts	10.0	กรัม
น้ำทะเล	1000.0	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่ง ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

เป็นเวลา 15 นาที

### 4. อาหารสูตร D (ดัดแปลงจาก Imada and Okami, 1994)

Peptone	5.0	กรัม
Yeast extracts	5.0	กรัม
น้ำทะเล	1000.0	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่ง ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

เป็นเวลา 15 นาที

### 5. Nutrient broth

Beef extract	3.0	กรัม
Bacto peptone	5.0	กรัม
น้ำทะเล	1000.0	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่ง ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

เป็นเวลา 15 นาที

## ภาคผนวก ข

### วิธีการทดลอง

#### 1. การเตรียมตัวอย่างเพื่อการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope, SEM)

1.1 นำตัวอย่างที่ต้องการศึกษามาตัดเป็นชิ้นให้ได้ขนาดที่เหมาะสม นำไปแช่ในน้ำยาดองขั้นที่ 1 (primary fixation) ซึ่งประกอบด้วย 4 เปอร์เซ็นต์ ของ พาราฟอร์มัลดีไฮด์ (pformaldehyde) ใน 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7.4 จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที แล้วนำตัวอย่างไปแช่ยาดองขั้นที่ 2 (secondary fixation) ซึ่งประกอบด้วย 1 เปอร์เซ็นต์ ของ ออสเมียมเตตระออกไซด์ (osmium tetaoxide, OsO4) ใน 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH7.4 ที่ไว้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง ภายในตู้ควัน

1.2 การขจัดน้ำออก (dehydration) โคนเทน้ำยาดองขั้นที่ 2 ออก แล้วจุ่มตัวอย่างในเอทานอล ความเข้มข้น 25 50 70 90 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นตอนละ 10-20 นาทีตามลำดับ

1.3 การทำตัวอย่างให้แห้ง โดยการทำให้แห้ง ณ จุดวิกฤต (critical point drying) โคนการใช้เครื่องทำให้แห้ง (critical dryer model SAMDRI-780)

1.4 นำตัวอย่างไปติดขั้วแท่นทองเหลืองด้วยการติดตัวอย่างที่นำไฟฟ้าได้ (electroconductive adhesive)

1.5 นำตัวอย่างไปเคลือบผิวด้วยทองที่มีความหนาประมาณ 20 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Ion sputter coater รุ่น model JSC – 110112

1.6 นำตัวอย่างไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope รุ่น JSM – T220A)

ที่มา : ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ค

## ลำดับเบสของยีน 16S rDNA

## 1. ลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียชนิดที่แยกได้จากทะเล สายพันธุ์ CNA003

AATTACCGGAGCACAGCAAGATGATAATCGAGCGGTAAAGGAGAAGCTTGCTTCTCG  
CTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTATGGGGATCTGCCCGATAGAGGGGGATA  
ACTACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATAATCTCTTAGGAGCAAAGCAGGGGAACT  
TCGGTCCTTGCGCTATCGGATGAACCCATATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATGG  
CTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACT  
GAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGC  
GCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGTAC  
TTTCAGTCGGGAGGAAGGCGTTGATGCTAATATCATCAACGATTGACGTTACCGACA  
GAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGC  
GTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTGATTAAGTTAGATGTG  
AAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAATGGCATCTAAGACTGGTCAGCTAGAGTCTTGTA  
GAGGGGGGTAGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACC  
GGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGG  
AGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTCGATTTGGAGG  
TTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAG

## 2. ลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียชนิดที่แยกได้จากทะเล สายพันธุ์ CNA031

GGCATGGCGCTACCATGCAGTCGAAGATGAACACTTCGGTGGGGATTAGTGGCGAAC  
GGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGG  
GTCTAATAACCGGATACTGACCTTCACGGGCATCTGTGAAGGTCGAAAGCTCCGGCGG  
TGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCG  
ACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC  
CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATG  
CAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGA  
AGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAG  
CCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCG  
TAGGCGGCTTGTACGTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCG  
ATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAA  
TGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGA  
CGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGC  
CGTAAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCAGCTAA  
CGCATTAAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTG  
ACGGGGGCCCCGACAAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAA  
CCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAACGTCCAGAGATGGGCGCCCCCTTGTGGT  
CGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGT  
CCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCCGTGTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGCTGGGGA  
CTCACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATC  
ATGCCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGA  
TACCGCAAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCA  
ACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGA  
ATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCG  
AAGCCGGTGGCCCAACCCCTGGGAGGGAGCGTCAAGTGACGAGGA

### 3. ลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียชนิดที่แยกได้จากทะเล สายพันธุ์ CNA039

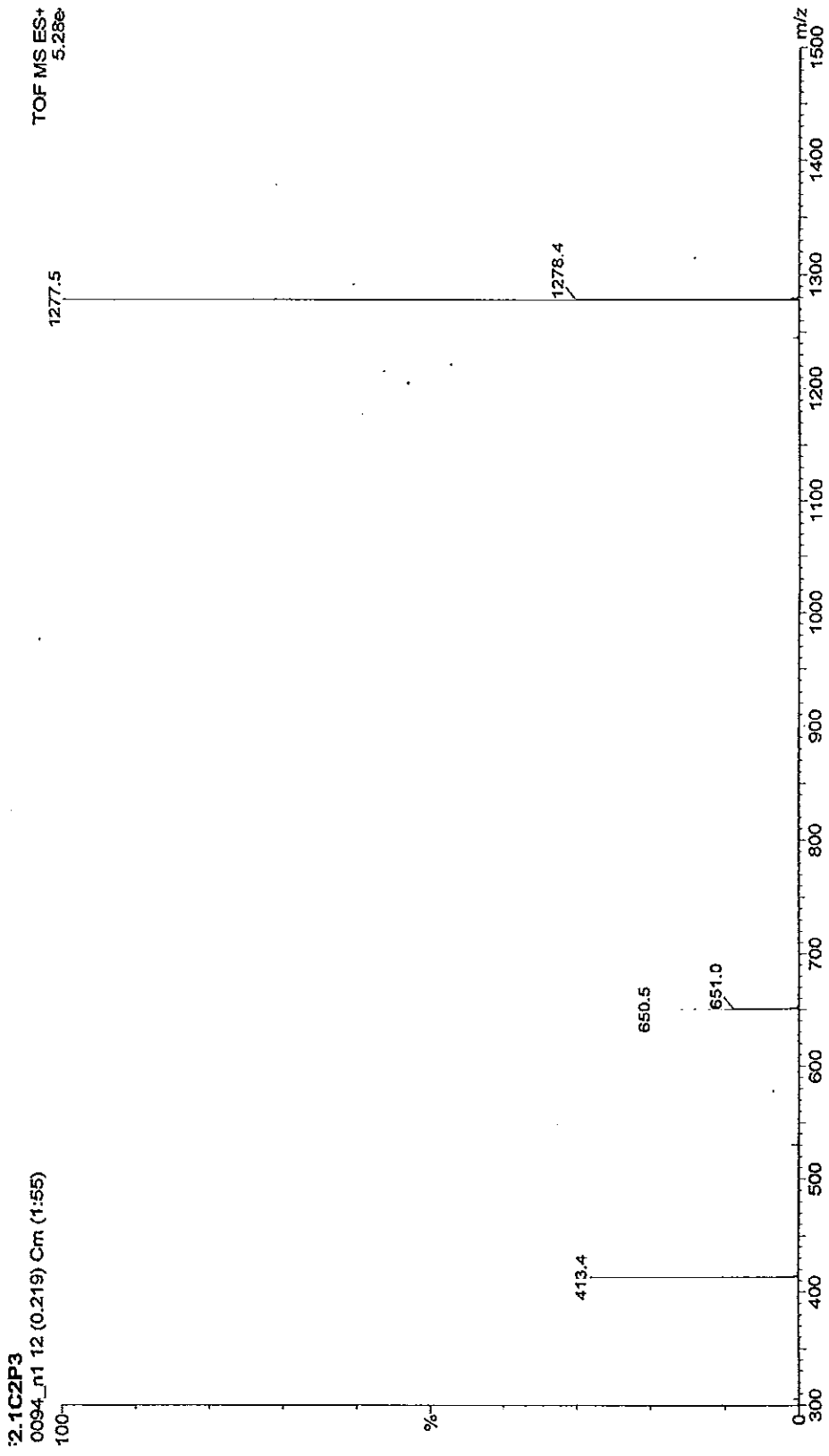
GGCAGGCGCTACCTGCAGTCGAAGATGAACCACTTCGGTGGGGATTAGTGGCGAACG  
GGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGG  
TCTAATACCGGATACTGACCTTCACGGGCATCTGTGAAGGTCGAAAGCTCCGGCGGT  
GCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGA  
CGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCC  
AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGC  
AGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAA  
GAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGC  
CGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGT  
AGGCGGCTTGTACGTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCG  
ATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAA  
TGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGA  
CGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGC  
CGTAAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCAGCTAA  
CGCATTAAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTG  
ACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAA  
CCTTACCAAGGCTTGACATAACCGGAAACGTCCAGAGATGGGCGCCCCCTTGTGGT  
CGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGT  
CCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCCGTGTGGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGCTGGGGA  
CTCACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATC  
ATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGA  
TACCGCAAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCA  
ACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGA  
ATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCG  
AAGCCGGGGCCCAACCCCTGGGGAGGAGCGTCAAGGGACGAGCC

4. ลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียชนิดที่แยกได้จากทะเล สายพันธุ์ CNA048

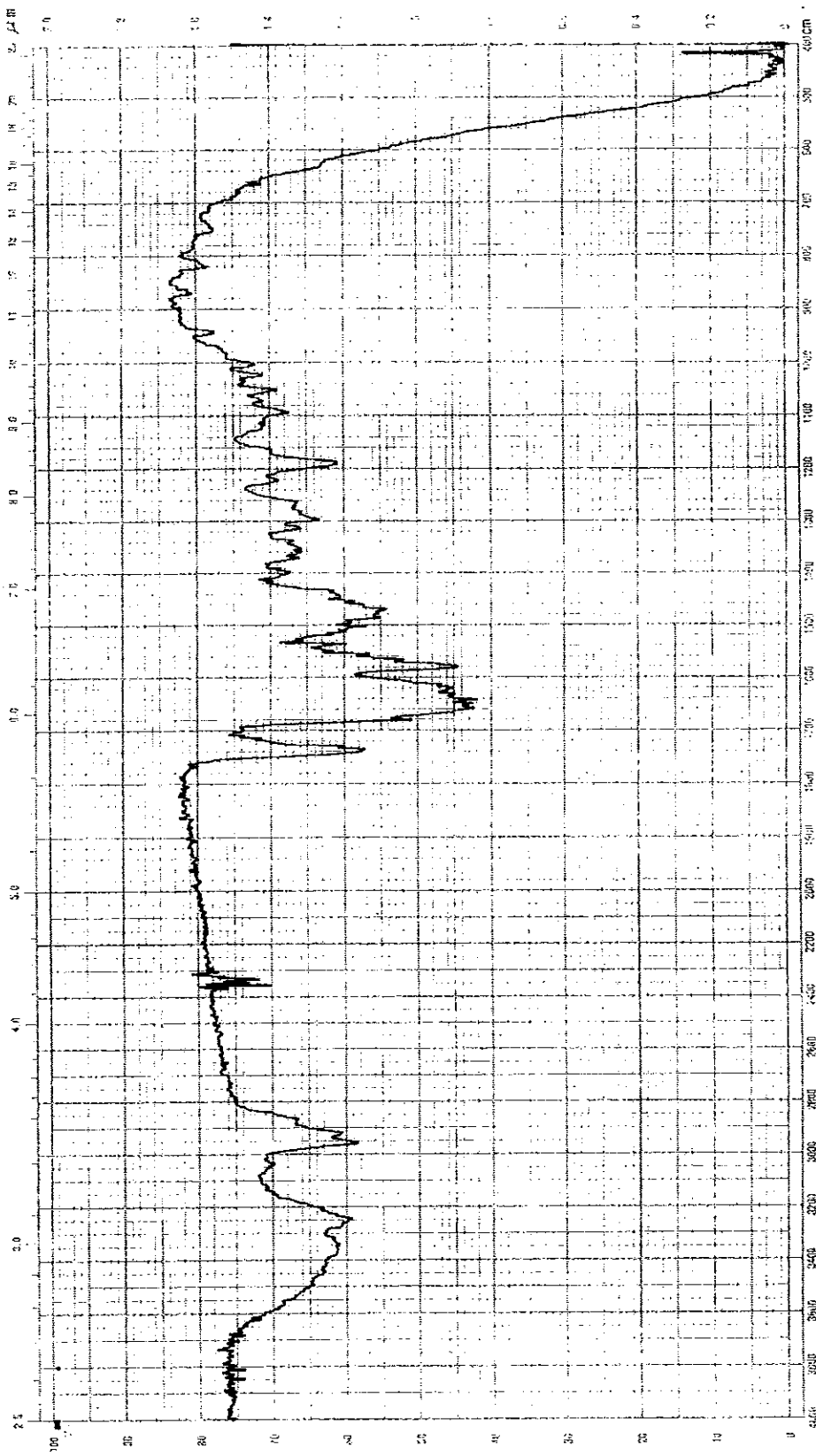
AACTAAGAACACATAGCATATTATTCGCTCCCCAAAACATTTACAGGGGACCATAG  
TATTTTTTTGTCCCCCCCCAAAATATATCCGCGCTGCCCTCTGGTATTTTTCTTGGACA  
CCGGGTCTATTACCGGATACTGATCCTCGTATGCATCTGCGAGGTTCGAAAGCTCCGG  
CGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTAGTTGGTGAGGTAACAGCTCACCAAG  
GCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACG  
GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTG  
ATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAG  
GGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAG  
CAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGC  
TCGTAGGCGGCTTGTACGTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAG  
TCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATCCTGGTGTAGCGGTG  
AAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATAC  
TGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGNGGAGCGAACAGGATFAAATACCCTGGTAGTCCA  
CGCCGTAAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCACGTTGTCCTTGCCGCAATTA  
ACACATTAATGGCCCCC

ภาคผนวก ง

ข้อมูลสรุปโทรศัพทของสาร A



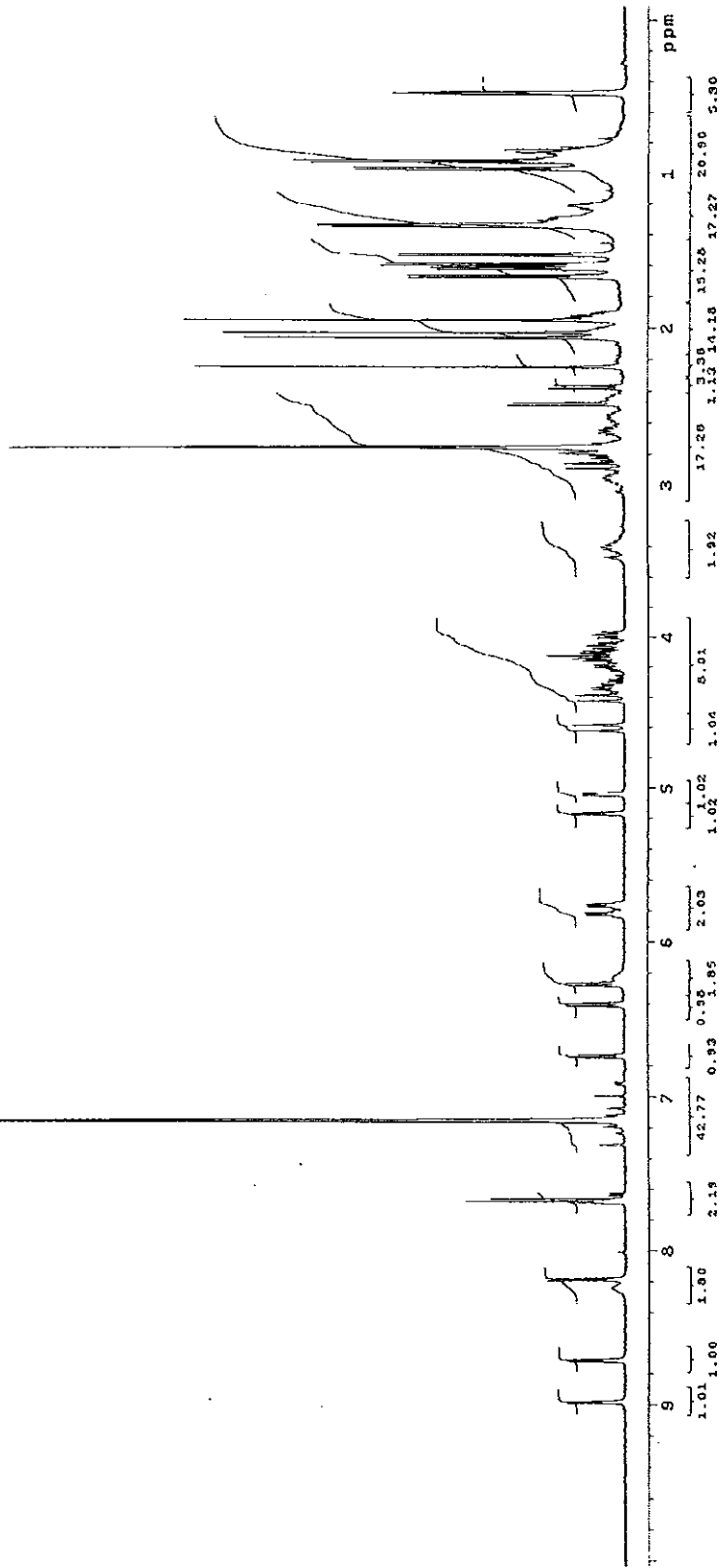
ภาพที่ 51 เมสสเปกตรัมของสาร A (ESIMS)  
Figure 51. ESIMS spectra of compound A (ESIMS).



ภาพที่ 52 อินฟราเรดสเปกตรัมของสาร A (thin film)

Figure 52. IR spectra of compound A (thin film).

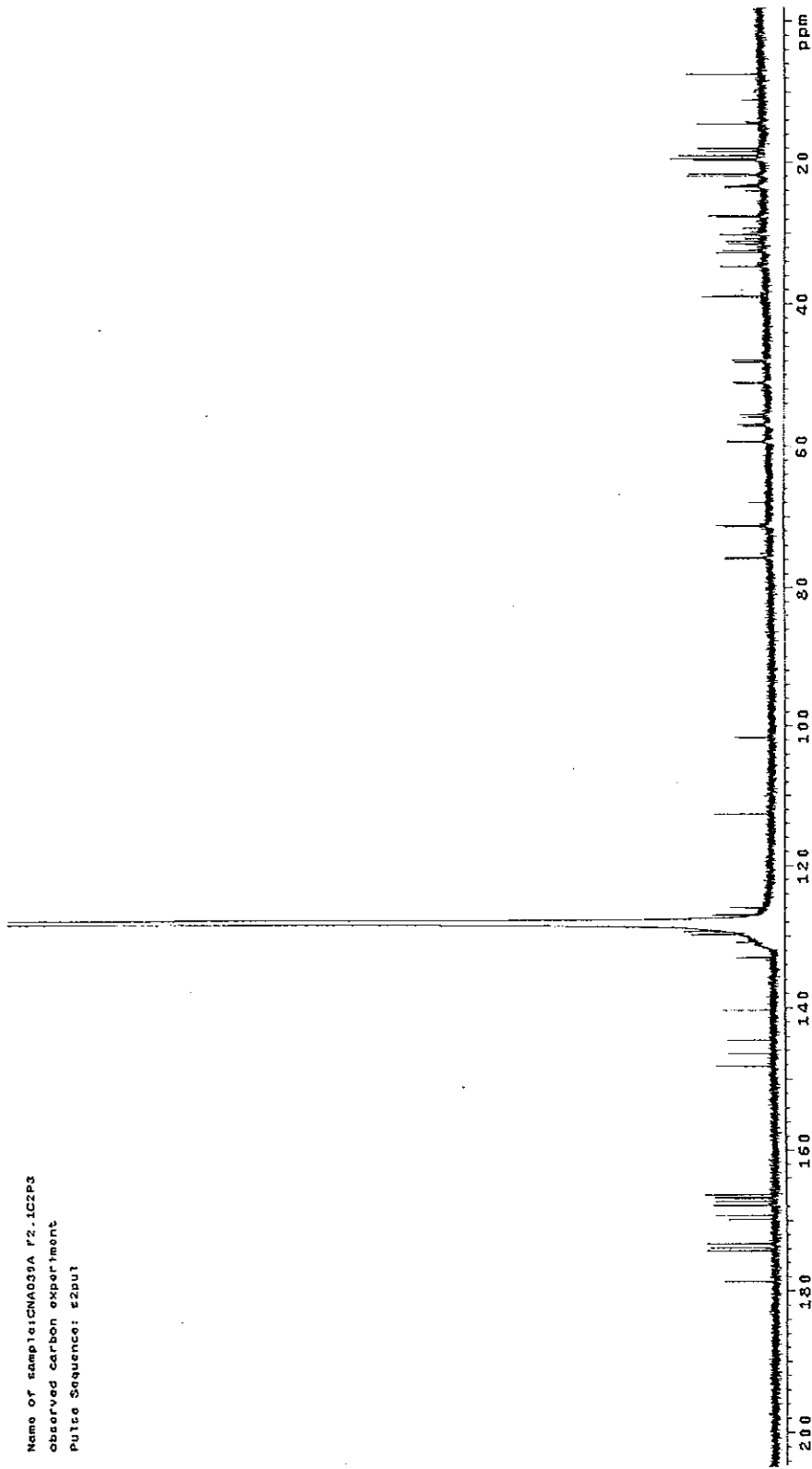
Name of sample: CNA039A F2.1C2P3  
Observed proton experiment  
Pulse Sequence: s2bu1



ภาพที่ 53 โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร A ( $C_6D_6$ , 500 MHz)

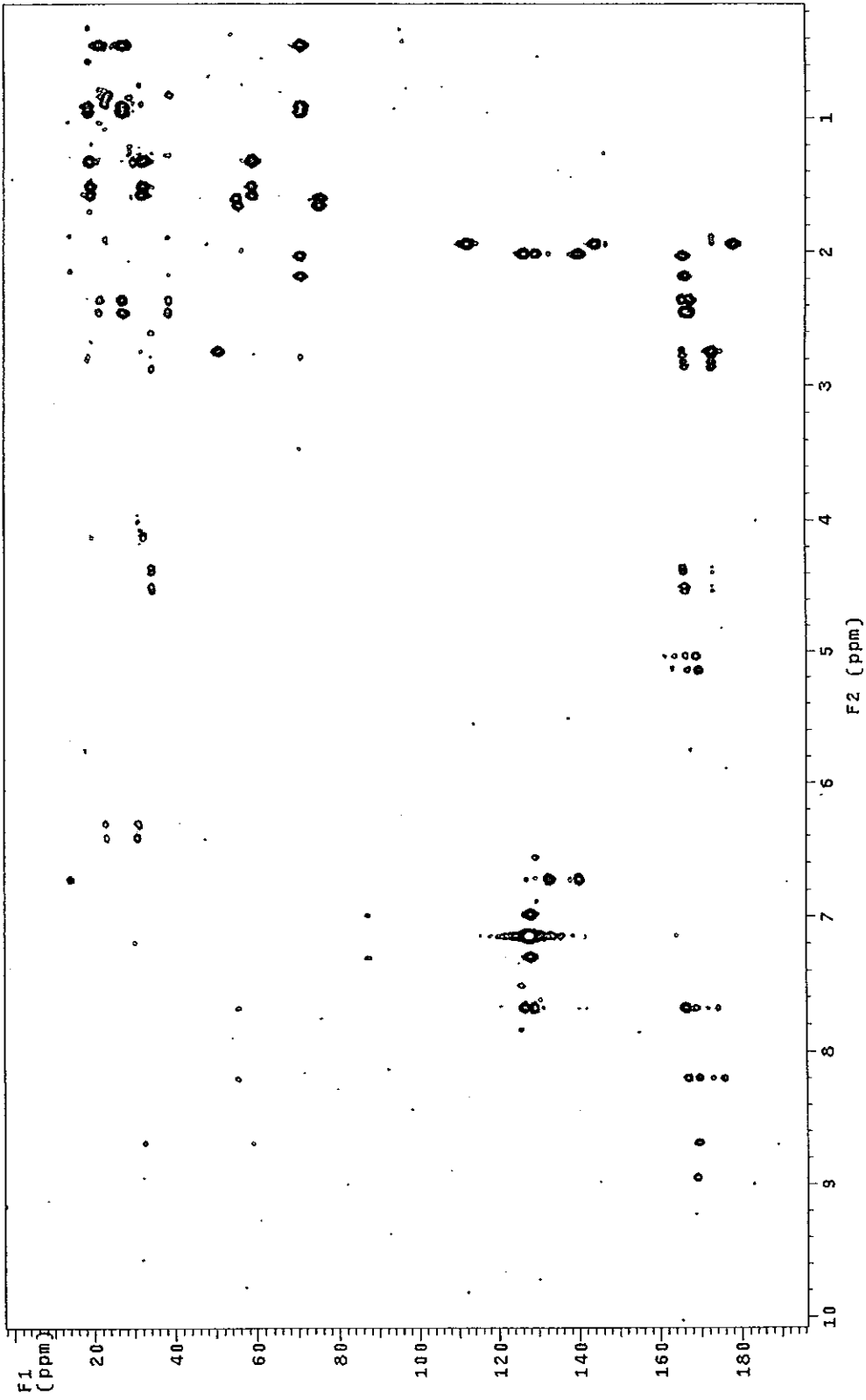
Figure 53.  $^1H$  NMR spectra of compound A ( $C_6D_6$ , 500 MHz).

NAME OF SAMPLE: CHA039A F2-1C2F3  
OBSERVED CARBON EXPERIMENT  
PULSE SEQUENCE: s2pu1



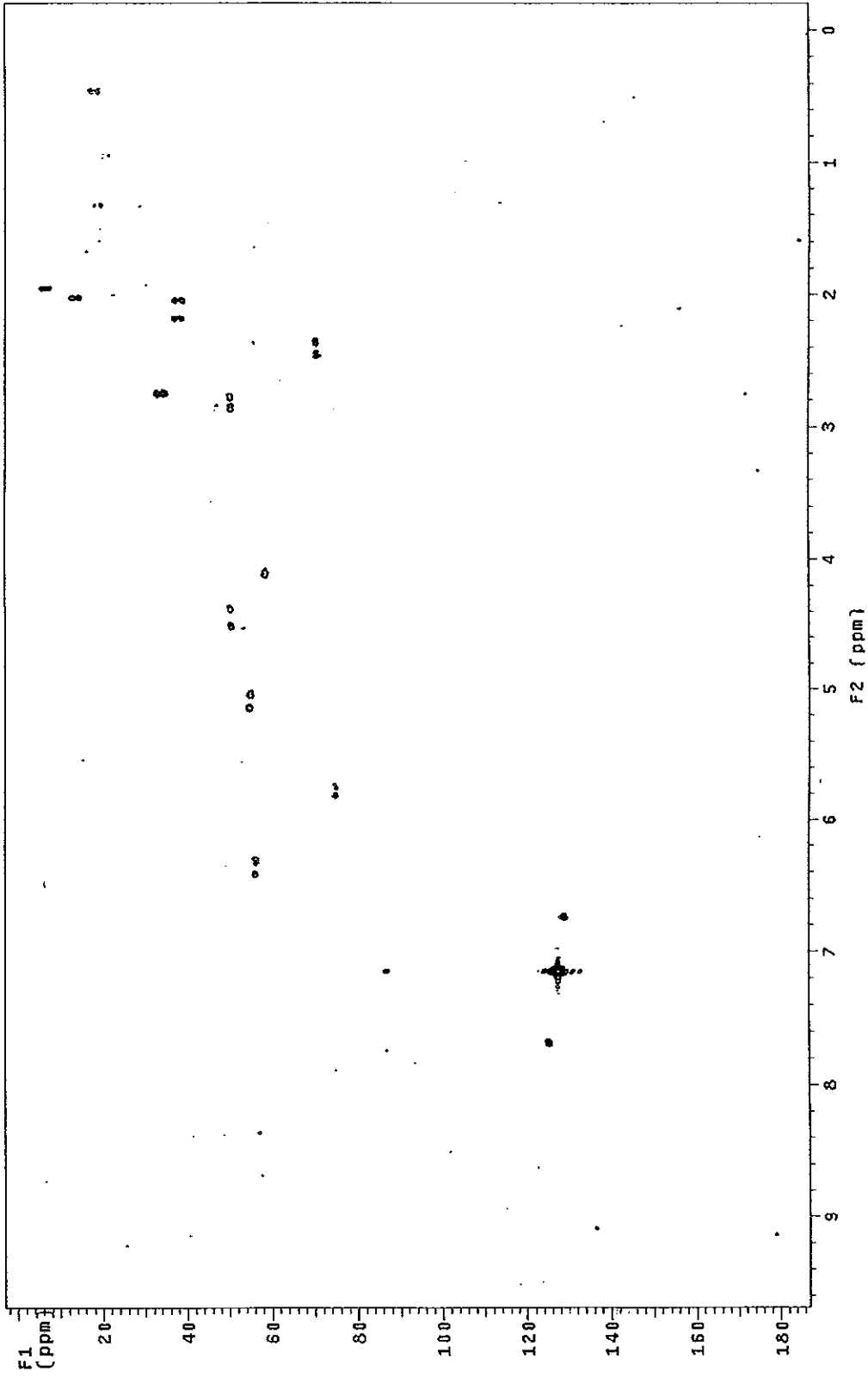
ภาพที่ 54 คาร์บอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร A ( $\text{C}_6\text{D}_6$ )

Figure 54.  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of compound A ( $\text{C}_6\text{D}_6$ ).



ภาพที่ 55 gHMBC สเปกตรัมของสาร A ( $C_6D_6$ )

Figure 55. gHMBC spectra of compound A ( $C_6D_6$ ).

ภาพที่ 56 gHMJC สเปกตรัมของสาร A ( $C_6D_6$ )Figure 56. gHMJC spectra of compound A ( $C_6D_6$ ).

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล                      นางสาวรัชฎญลักษณ์ สุวรรณวรชาติ

รหัสประจำตัวนักศึกษา      4882009

วุฒิการศึกษา

วุฒิ

ชื่อสถาบัน

ปีที่สำเร็จการศึกษา

วิทยาศาสตรบัณฑิต

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2547

(เทคโนโลยีชีวภาพ)

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

- ทุนอุตสาหกรรมเกษตรสู่ความเป็นเลิศ จากคณะอุตสาหกรรมเกษตร

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ปีการศึกษา 2548

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

- Suwanworachat, T., Plubrukarn, A. and Kanjana-Opas, A. 2006. Screening for Cytotoxic Compounds from Marine-Derived Actinomycetes. TSB Annual Meeting: The 18<sup>th</sup> Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology; Biotechnology Benefits & Bioethics on November 2-3, The Montien Hotel, Bangkok, Thailand. p 97. (Poster presentation)

