http://journal.rmutp.ac.th/

การสร้างเม็ดสีเมลานินและฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียโดยเมลานินที่ผลิตโดยแอคติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ PNST-01 และสายพันธุ์ PRBS-12

ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล* ภานุมาศ พรมลา และ สุภาภรณ์ ศรีจันทา

สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
เลขที่ 85 ถนนสถลมาร์ค ตำบลเมืองศรีไค อำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี 34190

รับบทความ 7 พฤษภาคม 2562 แก้ไขบทความ 29 สิงหาคม 2562 ตอบรับบทความ 8 พฤศจิกายน 2562

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเจริญ การสร้างเม็ดสีเมลานินของเชื้อแอคติโนมัยซีทีสบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ ผลของคอปเปอร์ไอออนและโคบอลต์ไอออนต่อการเจริญและการสร้างเม็ดสีเมลานิน และฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียทดสอบของสารสกัดเมลานินหยาบ ผลการวิจัยพบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ PNST-01 สามารถเจริญได้ดีที่สุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-7 medium ซึ่งเป็น synthetic medium สายพันธุ์ PRBS-12 สามารถเจริญได้ดีที่สุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-3 medium ซึ่งเป็น complex medium เชื้อแอคติโนมัยซีทีสทั้ง 2 สายพันธุ์ สามารถสร้างเม็ดสีเมลานินได้ดีที่สุดเมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-7 medium โคโลนีมีสีน้ำตาลเทาเข้ม แต่ไม่สามารถสร้างเม็ดสีเมลานินเมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-1 medium และ ISP-6 medium เชื้อทั้งสองสายพันธุ์มีการเจริญลดลงและไม่มีการสร้างเม็ดสีเมลานินบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-7 medium ที่ไม่เติมคอปเปอร์คลอไรด์และโคบอลต์คลอไรด์ สารสกัดเมลานินหยาบของเชื้อแอคติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ PNST-01 สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบได้ 3 ชนิด คือ *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบ 7 ชนิด คือ *Escherichia coli, Shigella dysenteriae, Salmonella typhi, Klebsiella pneumoniae, Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Streptococcus pyogenes* ส่วนสารสกัดเมลานินหยาบของเชื้อแอคติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ PRBS-12 สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบได้เพียง 2 ชนิด คือ *B. cereus* ATCC 11778 และ *B. subtilis* ATCC 6633 แต่ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบอีก 8 ชนิดได้ ผลการวิจัยนี้สามารถเป็นข้อมูลเพื่อการพิจารณาในการพัฒนาการผลิตเมลานินและการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ต่อไป

คำสำคัญ : สารสี; เมลานิน; การผลิตเมลานิน; ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย; แอคติโนมัยซีทีส

** ผู้นิพนธ์ประสานงาน โทร: +668 97219205, ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์: scpranpa@gmail.com*

http://journal.rmutp.ac.th/

Melanin Production and Antibacterial Activity by Melanin Produced by Actinomycetes Strain PNST-01 and PRBS-12

Pranee Pattanapipitpaisal Panumat Promla and Supaporn Srichantha

Division of Microbiology, Department of Biological Science, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University
85 Sathon Mak Road, Mueang Si Khai Subdistrict, Warinchamrab, Ubon Ratchathani 34190

Received 7 May 2019; Revised 29 August 2019 ; Accepted 8 November 2019

Abstract

The objectives of this research were to characterize growth and melanin production on different culture media, effect of copper ion and cobalt ion on growth and melanin production including antibacterial activity of crude melanin. The results revealed that actinomycetes strain PNST-01 have good growth on ISP-7 medium, synthetic medium, while strain PRBS-12 grow very well on ISP-3 medium, complex medium. Both strains produced high amount of melanin showing brownish colony on ISP-7 medium but there is no melanin pigment production on ISP-1 medium and ISP-6 medium. Moreover, the growth rate was reduced and both strains could not produce melanin pigment on ISP-7 medium without supplement with copper chloride and cobalt chloride. Crude melanin extract of strain PNST-01 showed antimicrobial activity against *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 but could not inhibit *Escherichia coli, Shigella dysenteriae, Salmonella typhi, Klebsiella pneumoniae, Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Streptococcus pyogenes*. While crude melanin extract of strain PRBS-12 gave antimicrobial activity only on *B. cereus* ATCC 11778 and *B. subtilis* ATCC 6633. Based on the study, the results can be used as key information for further development of melanin production and application in various industries.

Keywords : Pigment; Melanin; Melanin Production; Antibacterial Activity; Actinomycetes

**** Corresponding Author. Tel.: +668 97219205, E-mail Address: scpranpa@gmail.com***

1. บทนำ

แอคติโนมัยซีทีส (Actinomycetes) เป็นแบคทีเรียแกรมบวกมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายเชื้อราคือ มีเส้นใยแตกกิ่งก้านและสามารถสร้างสปอร์ไม่อาศัยเพศที่เรียกว่า conidiospore หรือ conidia และ sporangiospore อยู่ใน Sporangium ลักษณะของแอค ติโนมัยซีทีสที่แตกต่างจากราคือ ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียสซึ่งจัดเป็นเซลล์โปรคาริโอต และขนาดของเส้นใยมีขนาดเล็กกว่าราซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1.0 ไมโครเมตร ลักษณะของโคโลนีที่พบบนอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าโคโลนีเกาะแน่นและมีลักษณะจมอยู่ในอาหาร โคโลนีคล้ายผงหรือฝุ่นแป้ง หยาบขุรขระคล้ายหนังสัตว์ บางชนิดอาจมีการสร้างเม็ดสีสีต่าง ๆ เช่น สีส้ม สีครีม สีเทา สีน้ำตาลเข้มหรือสีดำ ส่วนการเจริญของเส้นใยสามารถเจริญไปเป็นเส้นใยที่สัมผัสกับอากาศเรียกว่า aerial mycelium และมีส่วนที่เป็นเส้นใยเจริญลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเรียกว่า substrate mycelium ช่วงระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญหรือช่วงอายุจะยาวนานกว่าแบคทีเรีย แอคติโนมัยซีทีสจึงเจริญได้อย่างช้า ๆ อันเป็นลักษณะสำคัญประการหนึ่งของแอคติโนมัยซีทีส จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถนามาใช้เป็นลักษณะสำคัญในการจำแนกหมวดหมู่ของแอคติโนมัยซีทีสได้ [1] แอคติโนมัยซีทีสสามารถผลิตเม็ดสีต่าง ๆ ทั้งในอาหารธรรมชาติหรืออาหารสังเคราะห์ สีเหล่านี้จะอยู่ในเฉดสีต่าง ๆ สีน้ำเงิน สีม่วง สีแดง สีแดงกุหลาบ สีเหลือง สีเขียว สีน้ำตาลและสีดำ เม็ดสีอาจจะละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อหรืออาจจะเก็บไว้ในเส้นใย การผลิตเม็ดสีโดยแอคติโนมัยซีทีสถูกนำมาใช้เป็นลักษณะการเพาะเลี้ยงที่สำคัญในการอธิบายแอคติโนมัยซีทีสชนิดนั้น ๆ อย่างไรก็ตามยังมีการศึกษาน้อยมากเกี่ยวกับลักษณะทางเคมีของเม็ดสี การสร้างเม็ดสีขึ้นอยู่กับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ การให้อากาศ อุณหภูมิในการเจริญ แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน [2] แอคติโนมัยซีทีสสามารถสังเคราะห์และขับเม็ดสีดำที่เรียกว่าเมลานินหรือเมลานอยด์ [3]-[4] ซึ่งเป็นที่การยอมรับในการใช้เป็นเกณฑ์สำหรับการศึกษาอนุกรมวิธานของแอคติโนมัยซีทีส

เมลานิน (Melanin) เป็นเม็ดสีหรือรงควัตถุธรรมชาติที่มีสีดำหรือน้ำตาลดำ เป็นสารพอลิเมอร์ที่พบทั่วไปในสัตว์ พืชและจุลินทรีย์ มีบทบาทสำคัญหลายประการเช่น การปกป้องแสงแดด (Photoprotection) การควบคุมอุณหภูมิ (Thermoregulation) การดักจับอนุมูลอิสระ (Free Radical Sinks) การดักจับแคทไอออน (Cation Chelators) และเป็นสารปฏิชีวนะ (Antibiotics) เมลานินในจุลินทรีย์มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการปกป้องเซลล์จากสภาวะกดดันหรือสภาวะไม่เหมาะสม ตัวอย่างเช่น แบคทีเรียที่สังเคราะห์เมลานินจะต้านทานต่อสารปฏิชีวนะมากขึ้น [5] เชื้อราที่สังเคราะห์เมลานินจะมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นในด้านความต้านทานต่อความแห้งแล้ง อุณหภูมิสูง รังสีอัลตร้าไวโอเลต ปกป้องเซลล์จากสารฆ่าเชื้อ และเอนไซม์ย่อยสลายต่าง ๆ และยังเกี่ยวข้องกับการก่อโรคในพืชอีกด้วย [6] เมลานินในพืชจะมีความสำคัญในการทำให้ผนังเซลล์มีความแข็งแรงมากขึ้นเช่นกับเมลานินของแมลงจะเกี่ยวข้องกับความแข็งแรงของเปลือกนอก [7] ในมนุษย์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมักพบเมลานินเป็นองค์ประกอบสำคัญของผิวหนังและเส้นผม โดยเมลานินมีหน้าที่หลักคือ จะช่วยดูดซับแสงที่มากเกินไปและช่วยปกป้องร่างกายจากการทำลายของรังสีอัลตร้าไวโอเลตจากแสงแดด [8] เมลานินในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมแบ่งตามเฉดสีได้ 2 ชนิด คือ 1) Pheomelanin เป็นเมลานินที่มีเฉดสีเหลืองถึงสีแดง และ 2) Eumelanin เป็นเมลานินเฉดสีดำหรือน้ำตาล เป็นชนิดที่พบมากที่สุดในร่างกายของมนุษย์ โดยเฉพาะที่เส้นผม [7] รวมทั้งที่ผิวหนัง ตา หูส่วนในและสมอง [9] เมลานินมีโมเลกุลขนาดใหญ่เกิดจากการปฏิกิริยาออกซิเดทีฟพอลิเมอร์ไรเซชันของฟีนอลและ/หรือสารประกอบอินโดล เมลานินออกฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพได้กว้างและหลากหลาย [10] แม้ว่าโครงสร้างของเมลานินยังไม่มีการศึกษาที่แน่ชัด Prota [11] รายงานว่าเมลานินเป็น

สารเฮตเทอโรจีนัสพอลิเมอร์ ประกอบด้วยสารอินโดล (Indole) ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะโควาเลนซ์ สารเหล่านี้ได้แก่ 5,6-dihydroxyindole, indole-5,6-quinone, 5-6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid, และ indole-5,6-quinone-2-carboxylic acid, Woo et al. [12] รายงานว่าเมลานินมีโครงสร้างคล้ายคลึงกับลิกนินซึ่งเป็นองค์ประกอบในเซลล์พืชและถ่านหิน เนื่องจากประกอบด้วยสารประกอบฟีนอลและอินโดลมาต่อกันเป็นพอลิเมอร์เช่นเดียวกัน การสังเคราะห์เมลานินทางชีวภาพเกิดขึ้นโดยเอนไซม์ tyrosinase เปลี่ยน tyrosine เป็น L-dopa (3,4-dihydroxy phenyl-L-alanin) ที่จะเปลี่ยนไปเป็น dopachrome และถูกออกซิไดซ์เป็น indol-5, 6-quinone จากนั้นจะถูกพอลิเมอร์ไรซ์เป็น DOPA-melanin ซึ่งเป็นเม็ดสีน้ำตาลดำ [13]-[14]

การสร้างเม็ดสีเมลานินพบในแอคติโนมัยซีทีสมากกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น Dastager et al. [14] รายงานว่าเชื้อ *Streptomyces* spp. 9 สายพันธุ์จากจำนวน 180 ไอโซเลท ผลิตเม็ดสีน้ำตาลดำซึ่งแพร่เข้าสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ peptone-yeast extract agar (ISP-6 medium) และ synthetic tyrosine agar (ISP-7 medium) เม็ดสีสีน้ำตาลที่สกัดได้เป็นเม็ดสีที่ละลายน้ำและได้รับการยืนยันว่าเป็นเมลานอยด์หรือเมลานิน Amal et al. [2] รายงานว่าเชื้อ *Streptomyces* 4 สายพันธุ์จาก 30 ไอโซเลทที่แยกได้สามารถผลิตเม็ดสีที่แตกต่างกันในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน 8 ชนิด *Streptomyces viriginiae* เป็นสายพันธุ์ที่ดีที่สุดที่สามารถผลิตเม็ดสีน้ำตาลเข้มในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 2 ชนิดคือ ISP-6 medium และ ISP-7 medium การเติมแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และฟอสฟอรัสมีผลต่อความเข้มข้นของเม็ดสี และพบว่า Co^{2+} Mg^{2+} และ Pb^{2+} ช่วยเพิ่มปริมาณการผลิตเม็ดสีเมลานิน Goncalves et al. [15] ทำการวิเคราะห์เม็ดสีที่สกัดจาก *Aspergillus nidulans* สายพันธุ์ที่ผลิต เมลานินมากที่สุด (MEL 1 และ MEL 2) ผลการศึกษาด้วย UV- and IR-spectra พบว่าเม็ดสีที่สร้างจากมิวแต้นท์ MEL 1 และ MEL 2 มีความใกล้เคียงกับสาร DOPA-melanin เมื่อทำการย่อยสลายเมลานินดังกล่าวพบว่าประกอบด้วยหน่วยย่อยของอินโดลเช่นเดียวกับที่พบในสาร DOPA-melanin เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบธาตุพบว่าเม็ดสีที่สกัดจากเชื้อมิวแตนท์ทั้งสองสายพันธุ์มีเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนสูง จึงไม่ใช่สาร DHN-melanin ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนเพียงเล็กน้อย และได้ยืนยันผลโดยทดสอบกับ Tricyclazole ซึ่งเป็นสารยับยั้งการสังเคราะห์ DHN-melanin แต่ไม่มีผลยับยั้งการผลิตเม็ดสีในเชื้อสายพันธุ์ MEL 1 และ MEL 2 นอกจากนี้ยังไม่พบโคโลนีสีดำบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Tropolone ซึ่งเป็นสารยับยั้งการสังเคราะห์ DOPA-melanin การศึกษานี้สรุปได้ว่าเมลานินที่ผลิตจากเชื้อมิวแต้นท์ทั้งสองสายพันธุ์เป็นชนิด DOPA-melanin Deshmukh [16] ทำการแยกจุลินทรีย์ที่สร้างเม็ดสีเมลานินจากตัวอย่างดินของอำเภอ Ahmednagar รัฐมหาราษฎระ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Tyrosine Casein Agar และได้ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การจัดเรียงตัวของสปอร์ และอ้างอิงถึงหนังสือ Bergey's เล่มที่ 4 พบว่าจุลินทรีย์ที่แยกได้จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* จะสร้างเม็ดสีน้ำตาลถึงดำแพร่ออกมานอกเซลล์และทำการทดสอบการสร้างเมลานินโดยใช้ L-DOPA เป็นซับ สเตรต สังเกตพบว่ามีสีแดงเกิดขึ้นและยืนยันได้ว่าเม็ดสีที่จุลินทรีย์สร้างเป็นเม็ดสีเมลานิน เชื้อจุลินทรีย์สร้างเม็ดสีเมลานินในอาหารเลี้ยงเชื้อ peptone-iron broth ได้ดีกว่าใน Tyrosine Casein Broth เล็กน้อย และพบว่าแป้งและแอล-ไกลซีนเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์เมื่อเทียบกับแหล่งอื่น ๆ ที่ใช้ในการทำการทดลอง Dharmik และ Gomashe [17] ทำการแยกแอคติโนมัยซีทีสที่สร้างเม็ดสีเมลานิน พบว่า 3 ไอโซเลตจาก 20 ไอโซเลตของสายพันธุ์ *Streptomyces* สร้างเม็ดสีสีน้ำตาลเข้มแพร่ทั้งบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-6 Medium และอาหารเลี้ยง

เชื้อ streptomyces isolation agar, Sharma et al. [18] รายงานว่า *Streptomycetes* sp. NL สร้างเม็ดสีเมลานินได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-6 medium และพบว่า Co^{2+} Cu^{2+} และ Pb^{2+} ช่วยเพิ่มปริมาณการผลิตเม็ดสีเมลานิน ในขณะที่ Mn^{2+} มีผลยับยั้งการผลิตสารสกัดเมลานินหยาบที่ผลิตโดยวิธี Cotton Method และ Submerged Fermentation มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบหลายชนิด เนื่องจากคุณสมบัติที่หลากหลายของเม็ดสีเมลานิน จึงมีการนำเมลานินมาประยุกต์ใช้ทางเภสัชกรรม เครื่องสำอาง สิ่งทอ อุตสาหกรรมทางการเกษตรและอาหารอย่างกว้างขวาง [14]

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเจริญการสร้างเม็ดสีเมลานินของเชื้อแอคติโนมัยซีทีจำนวน 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ PNST-01 และสายพันธุ์ PRBS-12 โดยเชื้อทั้งสองสายพันธุ์มีโคโลนีสีน้ำตาลเข้ม และสามารถสร้างเม็ดสีน้ำตาลเข้มแพร่เข้าสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ Tyrosine Medium (ISP-7 Medium) นอกจากนี้ยังศึกษาผลของไอออนโลหะต่อการสร้างเม็ดสีเมลานิน รวมทั้งฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดเมลานินหยาบต่อแบคทีเรียทดสอบ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการขยายขนาดการผลิตและการนำประยุกต์ใช้เพื่อเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางและอาหารต่อไป

2. ระเบียบวิธีวิจัย

2.1 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีทีส

นำชิ้นวุ้น Yeast-malt Extract Medium (ISP-2 Medium) วางบนสไลด์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ซึ่งอยู่บนแท่งแก้วงอรูปตัววีในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นใช้เข็มเขี่ยเชื้อแอคติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ PNST-01 และสายพันธุ์ PRBS-12 จากหลอดเลี้ยงเชื้อ แล้วกดลงในชิ้นวุ้นทั้งสี่ด้านปิดด้วย Cover Slip ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงในจานเลี้ยงเชื้อเพื่อให้มีความชื้นสูง บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 4-7 วัน เมื่อครบกำหนดแล้ว ให้นำแผ่นสไลด์ที่มีวุ้นการเจริญไปศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกลักษณะที่พบ จากนั้นให้นำแผ่นสไลด์มาอังบนน้ำร้อน 15-20 นาที เมื่อวุ้นอาหารแห้ง นำแผ่นสไลด์ไปย้อมด้วย Phenolic Rose Bengal อังบนน้ำร้อน 5 นาที ล้างซับน้ำให้แห้ง นำไปศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา

2.2 การเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทีสบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ

นำเชื้อแอคติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ PNST-01 และสายพันธุ์ PRBS-12 มาขีดแบบ Simple Streak ให้เต็มลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-2 Medium บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ Cork Borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร เจาะชิ้นวุ้นแบบปราศจากเชื้อและวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ (สั่งซื้อจากบริษัท Himedia) ดังนี้คือ Tryptone Yeast Extract Medium (ISP-1 Medium), Yeast-malt Extract Medium (ISP-2 Medium), Oat Meal Medium (ISP-3 Medium), Inorganic Salt Starch Medium (ISP-4 Medium), Glycerol Asparagine Medium (ISP-5 Medium), peptone Yeast Extract Iron Medium (ISP-6 Medium), และ Tyrosine Medium (ISP-7 Medium) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 14 วัน วัดขนาดโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด

2.3 การสร้างเม็ดสีเมลานินของเชื้อแอคติโนมัยซีทีสบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ

นำเชื้อแอคติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ PNST-01 และสายพันธุ์ PRBS-12 มาขีดแบบ Simple Streak ให้เต็มลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ ดังนี้ คือ ISP-1 Medium, ISP-2 Medium, ISP-3 Medium, ISP-4

Medium, ISP-5 Medium, ISP-6 Medium, และ ISP-7 Medium ทำการทดลองซ้ำ 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 14 วัน สังเกตการสร้างเม็ดสีของเชื้อที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด

2.4 ผลของคอปเปอร์ไอออนและโคบอลต์ไอออนต่อการเจริญ

นำเชื้อแอคติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ PNST-01 และสายพันธุ์ PRBS-12 มาขีดแบบ Simple Streak ให้เต็มลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-2 Medium บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ Cork Borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร เจาะชิ้นวุ้นแบบปราศจากเชื้อและวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-7 Medium ที่มีคอปเปอร์คลอไรด์และโคบอลต์คลอไรด์เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 0.027 และ 0.04 มิลลิกรัมต่อมิลิลิตร ตามลำดับ (การทดลองควบคุม) ISP-7 Medium ที่ไม่เติมคอปเปอร์คลอไรด์ และ ISP-7 Medium ที่ไม่เติมโคบอลต์คลอไรด์ ทำการทดลองซ้ำ 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 14 วัน สังเกตการเจริญและวัดขนาดโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.5 ผลของคอปเปอร์ไอออนและโคบอลต์ไอออนต่อการสร้างเม็ดสีเมลานิน

นำเชื้อแอคติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ PNST-01 และสายพันธุ์ PRBS-12 มาขีดแบบ Simple Streak ให้เต็มลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-7 Medium ที่มีคอปเปอร์คลอไรด์และโคบอลต์คลอไรด์เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 0.027 และ 0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (การทดลองควบคุม) ISP-7 Medium ที่ไม่เติมคอปเปอร์คลอไรด์ และ ISP-7 Medium ที่ไม่เติมโคบอลต์คลอไรด์ ทำการทดลองซ้ำ 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 14 วัน สังเกตการสร้างเม็ดสีของเชื้อที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด

2.6 การผลิตเมลานิน

เตรียมหัวเชื้อแอคติโนมัยซีทีสโดยการถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ISP-2 Medium บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) บนเครื่องบ่มเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับความเข้มข้นของหัวเชื้อที่ A_{600} = 0.5 จากนั้นเติมหัวเชื้อแอคติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ PNST-01 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ISP-7 Medium ที่มีเด็กทรินเป็นแหล่งคาร์บอน (7.5 กรัมต่อลิตร) และมีแอล-แอสพาราจีน (L-asparagine) เป็นแหล่งไนโตรเจน (1.0 กรัมต่อลิตร) พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 บ่มบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน [19] ส่วนหัวเชื้อแอคติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ PRBS-12 จะเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ISP-7 Medium ที่มีฟรักโทส (Fructose) เป็นแหล่งคาร์บอน (10.0 กรัมต่อลิตร) และมีแอล-แอสพาราจีนเป็นแหล่งไนโตรเจน (2.5 กรัมต่อลิตร) พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.0 บ่มบนเครื่องบ่มเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน [20] เมื่อครบกำหนดแล้วทำการแยกเซลล์โดยการกรองตามด้วยการหมุนเหวี่ยง 12,000 x g เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำสารสกัดเมลานินหยาบ (Crude Melanin) ที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียต่อไป

2.7 ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดเมลานินหยาบ

นำสารสกัดเมลานินหยาบมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ โดยวิธี Agar Well Diffusion Method แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบจำนวน 10 สายพันธุ์ คือ *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Serratia marcescens, Shigella dysenteriae, Streptococcus pyogenes*, *Salmonella typhi, Staphylococcus aureus,*

Klebsiella pneumonia, Escherichai coli และ *Pseudomonas aeruginosa* เชื้อเหล่านี้ได้รับความอนุเคราะห์ห้องเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี โดยนำแบคทีเรียทดสอบมาเกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Muller-Hinton Agar แล้วเจาะด้วยที่เจาะชิ้นวุ้นขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร จากนั้นนำสารสกัดเมลานินหยาบปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงไปในหลุมที่เจาะ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง

3. ผลการศึกษาและอภิปรายผล

3.1 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีทีส

เชื้อแอคติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ PNST-01 เป็นเชื้อแอคติโนมัยซีทีสที่สร้างเมลานินซึ่งคัดแยกได้จากดินจากชุมชนเศรษฐกิจพอเพียง มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tyrosine Agar โคโลนีสีน้ำตาลเข้มเป็นปุย ผิวนูน หลั่งสารสีแพร่เข้าสู่อาหารเลี้ยงเชื้อทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเทาเข้มถึงสีดำ [21] จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ PNST-01 โดยใช้วิธี Slide Culture บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ผลการวิจัยภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดาพบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ PNST-01 มีลักษณะเป็นเส้นใยแตกแขนง มีการสร้างสปอร์ต่อกันเป็นสายยาว สำหรับเชื้อแอคติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ PRBS-12 เป็นเชื้อแอคติโนมัยซีทีสที่สร้างเมลานินซึ่งคัดแยกได้จากดินรอบรากต้นทองกวาว คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาอุบลราชธานี บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Starch Casein Nitrate Agar โคโลนีลักษณะกลมนูน โคโลนีสีน้ำตาลเทาเข้ม ขอบเรียบ แห้งเป็นปุย ผิวนูน หลั่งสารสีแพร่เข้าสู่อาหารเลี้ยงเชื้อทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มอมเทา [22] จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ PRBS-12 โดยใช้วิธี Slide Culture บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ผลการวิจัยภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดาพบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ PRBS-12 มีลักษณะเป็นเส้นใยแตกแขนง มีการสร้างสปอร์ต่อกันเป็นสายยาว เช่นเดียวกับสายพันธุ์ PNST-01

3.2 การเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีทีสบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ

จากการนำชิ้นวุ้นของเชื้อแอคติโนมัยซีทีสขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร มาวางบริเวณตรงกลางของอาหารเลี้ยงเชื้อ 7 ชนิด นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14 วัน ผลการวิจัยพบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ PNST-01 สามารถเจริญได้ดีที่สุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-7 Medium (3.16±0.34 ซม.) รองลงมาคืออาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-2 Medium (3.10±0.15 ซม.) ISP-4 Medium (2.76±0.21 ซม.) ISP-3 Medium (2.36±0.39 ซม.) ISP-1 Medium (2.16±0.26 ซม.) ISP-5 Medium (2.16±0.28 ซม.) และ ISP-6 Medium (2.15±0.23 ซม.) เชื้อแอคติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ PRBS-12 สามารถเจริญได้ดีที่สุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-3 Medium (2.86±0.51 ซม.) รองลงมาคืออาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-7 Medium (2.75±0.37 ซม.) ISP-4 Medium (2.72±0.32 ซม.) ISP-2 Medium (2.59±0.15 ซม.) ISP-1 Medium (2.28±0.12 ซม.) ISP-5 Medium (2.22±0.36 ซม.) และ ISP-6 Medium (2.06±0.18 ซม.) จะเห็นได้ว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทีสทั้งสองสายพันธุ์สามารถเจริญได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างชนิดกัน แต่เจริญได้รองลงมาในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกัน

เชื้อแอคติโนมัยซีทีสเป็นแบคทีเรียสร้างเส้นใย ลักษณะของโคโลนีที่พบบนอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าโคโลนีเกาะแน่นและมีลักษณะจมอยู่ในอาหาร โคโลนีคล้ายผงหรือฝุ่นแป้ง หยาบขุรขระคล้ายหนังสัตว์ แอคติโนมัยซีทีสสามารถผลิตเม็ดสีต่าง ๆ ทั้งในอาหารธรรมชาติหรืออาหารสังเคราะห์ สีเหล่านี้จะอยู่ในเฉดสีต่างๆ สีน้ำเงิน สีม่วง สีแดง สีแดงกุหลาบ สีเหลือง

สีเขียว สีน้ำตาลและสีดำ เชื้อแอคติโนมัยซีทีสสายพันธุ์ PNST-01 และสายพันธุ์ PRBS-12 คัดแยกได้จากดิน สามารถสร้างเม็ดสีสีดำหรือเมลานินได้ โดยเม็ดสีอาจจะละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อและเก็บไว้ในเส้นใย เมื่อนำเชื้อแอคติโนมัยซีทีสทั้ง 2 สายพันธุ์ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP Medium (International Streptomyces Project) Medium [23] ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับการคัดแยก การเพาะเลี้ยงและการศึกษาลักษณะของ *Streptomyces* species มีทั้งชนิดที่เป็น Synthetic Media และ Complex Media เชื้อแอคติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ PNST-01 สามารถเจริญได้ดีที่สุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-7 Medium ซึ่งเป็น Synthetic Media เนื่องจากมีแหล่งสารอาหารที่สมบูรณ์เพื่อการเจริญ ซึ่งประกอบด้วยกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน แอล-แอสพาราจีนและแอล-ไทโรซีนเป็นแหล่งกรดอะมิโนสำหรับการเจริญของ *Streptomyces* species มีแร่ธาตุที่อยู่ในรูปของเกลือจำนวน 7 ชนิด คือ เหล็ก แมงกานีส สังกะสี คอปเปอร์ โคบอล โมลิบดินัม รวมทั้งกรดบอริก มีไดโพแทสเซียมฟอสเฟตเป็นสารบัฟเฟอร์ และมีโซเดียมคลอไรด์ช่วยรักษาสมดุลออสโมทิก สำหรับเชื้อแอคติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ PRBS-12 สามารถเจริญได้ดีที่สุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-3 Medium ซึ่งเป็น Complex Media ประกอบด้วยข้าวโอ๊ตบดหยาบเป็นแหล่งคาร์บอน แหล่งกรดอะมิโน วิตามินและแร่ธาตุหลายชนิด และมีแร่ธาตุที่อยู่ในรูปของเกลือจำนวน 3 ชนิดคือ เหล็ก แมงกานีส และสังกะสี สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-2 Medium และ ISP-4 Medium เป็น Complex Media โดย ISP-2 Medium ประกอบด้วย Peptic Digest of Animal Tissue และยีสต์สกัด เป็นแหล่งของไนโตรเจน คาร์บอน ซัลเฟอร์ วิตามินบีรวมและแร่ธาตุรองหลายชนิด มีมอลต์สกัดและเด็กโทส เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน สำหรับ ISP-4 Medium จะมีสต๊าชเป็นแหล่งคาร์บอน มีไดโพแทสเซียมฟอสเฟตและโซเดียมคลอไรด์เช่นเดียวกับ ISP-7 Medium และมีแร่ธาตุที่อยู่ในรูปของเกลือจำนวน 3 ชนิดคือ เหล็ก แมงกานีส และสังกะสีเช่นเดียวกับ ISP-3 Medium

อาหารเลี้ยงเชื้อที่เชื้อแอคติโนมัยซีทีสทั้งสองสายพันธุ์เจริญได้รองลงมาคือ อาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-1 Medium ISP-5 Medium และ ISP-6 Medium (ตามลำดับ) ISP-1 Medium เป็น Complex Media ประกอบด้วย Casein Enzymatic Hydrolysate และและยีสต์สกัด เป็นแหล่งของไนโตรเจน คาร์บอน ซัลเฟอร์ วิตามินบีรวมและแร่ธาตุรองหลายชนิด อาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-5 Medium ซึ่งเป็น Synthetic Media ประกอบด้วยกลีเซอรอล แอล-แอสพาราจีน ไดโพแทสเซียมฟอสเฟตและโซเดียมคลอไรด์เช่นเดียวกับ ISP-7 Medium และมีแร่ธาตุที่อยู่ในรูปของเกลือจำนวน 3 ชนิดคือ เหล็ก แมงกานีส และสังกะสีเช่นเดียวกับ ISP-3 Medium และ ISP-4 Medium อาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-6 Medium เป็น Complex Media ประกอบด้วย Peptic Digest of Animal Tissue และยีสต์สกัด เป็นแหล่งของไนโตรเจน คาร์บอน ซัลเฟอร์ วิตามินบีรวมและแร่ธาตุรองหลายชนิดเช่นเดียวกับ ISP-2 Medium และมี Proteose Peptone เป็นแหล่งของไนโตรเจน

3.3 การสร้างเม็ดสีเมลานินของเชื้อแอคติโนมัยซีทีส บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ

จากการนำเชื้อแอคติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ PNST-01 และสายพันธุ์ PRBS-12 มาขีดแบบ Simple Streak ให้เต็มบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 7 ชนิด นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน ผลการวิจัยพบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทีสทั้ง 2 สายพันธุ์ สามารถสร้างเม็ดสีเมลานินได้ดีที่สุด โคโลนีมีสีน้ำตาลเทาเข้มเมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-7 Medium และเชื้อจะสร้างโคโลนีสีเทาเข้มถึงเทาอ่อนเมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-2 Medium ISP-3 Medium ISP-4 Medium และ ISP-5 Medium ตามลำดับ เชื้อแอคติโนมัยซีทีสทั้ง 2 สายพันธุ์ไม่สามารถสร้างเม็ดสีเมลานินเมื่อเจริญบนอาหาร

เลี้ยงเชื้อ ISP-1 Medium และ ISP-6 Medium โดยเชื้อแอคติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ PNST-01 จะสร้างโคโลนีสีขาวอมเหลืองและสีเหลือง ตามลำดับ ส่วนเชื้อแอคติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ PRBS-12 จะสร้างโคโลนีสีขาวและสีเหลือง ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1 จะเห็นได้ว่าชนิดและส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการสร้างเม็ดสีเมลานิน อาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-7 Medium เป็น Synthetic Medium ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนและกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งไทโรซิน ซึ่งเป็นซับสเตรทสำคัญในการสังเคราะห์เมลานิน โดยอาศัยเอนไซม์ไทโรซิเนสในการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน และยังมีแร่ธาตุหลักและแร่ธาตุรองหลายชนิดที่จะช่วยในการผลิตเมลานิน ISP-7 Medium เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ส่งเสริมการเจริญและการสร้างเม็ดสีเมลานินได้ดีกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-medium ชนิดอื่นที่ศึกษาเปรียบเทียบในการวิจัยนี้ สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-1 Medium และ ISP-6 Medium เป็น Complex Media ประกอบด้วยเปปโทนและยีสต์สกัดที่อุดมสมบูรณ์ด้วยแหล่งไนโตรเจน แหล่งคาร์บอนและ Growth Factors ซึ่งจำเป็นต่อกระบวนการเมแทบอลิซึม แต่ไม่ได้ส่งเสริมการสร้างเม็ดสีเมลานินโดยเชื้อแอคติโนมัยซีทีสทั้ง 2 สายพันธุ์นี้ อย่างไรก็ตาม งานวิจัยของ Amal et al. [2] รายงานว่าเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการสร้างเม็ดสีเมลานินของ *Streptomyces virginiae* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 8 ชนิด ผลการวิจัยพบว่าเชื้อสามารถสร้างเม็ดสีเมลานินได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-6 Medium รองลงมาคือ ISP-7 medium เชื้อไม่สามารถสร้างเม็ดสีเมลานินในอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-3 Medium, ISP-5 Medium, Starch Nitrate Medium, Fish Meal Extract Medium Dox Medium และ Soy-bean Meal Extract Medium

ตารางที่ 1 ลักษณะการสร้างเมลานินของแอคติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ PNST-01 และสายพันธุ์ PRBS-12 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP Medium ชนิดต่างๆ เมื่อบ่มเป็นเวลา 14 วัน

อาหารเลี้ยงเชื้อ	การสร้างเม็ดสี	
	สายพันธุ์ PNST-01	สายพันธุ์ PRBS-12
ISP-1 Medium	สีขาวอมเหลือง	สีขาว
ISP-2 Medium	สีเทาเข้ม	สีเทาเข้ม
ISP-3 Medium	สีเทาอ่อน	สีเทาอ่อน
ISP-4 Medium	สีเทา	สีเทา
ISP-5 Medium	สีเทาอ่อน	สีเทาอ่อน
ISP-6 Medium	สีเหลือง	สีเหลือง
ISP-7 Medium	สีน้ำตาลเทาเข้ม	สีน้ำตาลเทาเข้ม

Manivasagan et al. [24] ทำการวิจัยโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-1 Medium และ ISP-7 Medium ในการคัดแยกหาเชื้อแอคติโนมัยซีทีสที่สร้างเม็ดสีเมลานิน และใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-7 Medium ในการผลิตเม็ดสีเมลานิน โดยพบว่าสต๊าชและเคซีนเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม ตามลำดับ Sharma et al. [18] รายงานว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-6 medium และ Glycerol Peptone Medium ส่งเสริมการสร้างเม็ดสีเมลานินโดยเชื้อแอคติโนแบคทีเรีย ไอโซเลท NL ได้ดีกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-7 Medium, Glutamate Medium, และ Czapeck Medium ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าชนิดและส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยสำคัญต่อการสร้างเม็ดสีเมลานินของเชื้อแอคติโนมัยซีทีสแต่ละสายพันธุ์

3.4 ผลของคอปเปอร์ไอออนและโคบอลต์ไอออนต่อการเจริญและการสร้างเม็ดสีเมลานิน

เมื่อทดสอบการเจริญและการสร้างเม็ดสีเมลานินของแอคติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ PNST-01 และสายพันธุ์ PRBS-12 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-7 Medium ที่ไม่

เติมคอปเปอร์คลอไรด์ และ ISP-7 Medium ที่ไม่ เติมโคบอลต์คลอไรด์ ผลการวิจัยพบว่าเชื้อทั้งสองสายพันธุ์มีการเจริญลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-7 Medium คือ เชื้อแอคติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ PNST-01 สามารถเจริญได้ดีที่สุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-7 Medium รองลงมาคืออาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-7 Medium ที่ไม่เติมโคบอลต์คลอไรด์ และ ISP-7 Medium ที่ไม่เติมคอปเปอร์คลอไรด์ ตามลำดับ ส่วนเชื้อแอคติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ PRBS-12 สามารถเจริญได้ดีที่สุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-7 Medium รองลงมาคืออาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-7 Medium ที่ไม่เติมคอปเปอร์คลอไรด์ และ ISP-7 Medium ที่ไม่เติมโคบอลต์คลอไรด์ ตามลำดับ ในสภาวะที่ไม่มีคอปเปอร์ไอออนและโคบอลต์ไอออนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-7 Medium พบว่าเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ไม่มีการสร้างเม็ดสีเมลานิน โดยเชื้อแอคติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ PNST-01 จะสร้างโคโลนีสีขาวบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิด ส่วนเชื้อแอคติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ PRBS-12 จะสร้างโคโลนีสีขาวแกมเทาอ่อนและสีขาวบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-7 Medium ที่ไม่เติมคอปเปอร์คลอไรด์ และ ISP-7 Medium ที่ไม่เติมโคบอลต์คลอไรด์ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2 ไอออนของโลหะมีความจำเป็นต่อการเจริญและการสร้างเม็ดสี คอปเปอร์และโคบอลต์เป็นธาตุอาหารรองที่จำเป็นต่อการเจริญ (Trace Element) หรือสารอาหารที่จุลินทรีย์ต้องการในปริมาณน้อย เป็นองค์ประกอบของสารต่าง ๆ รวมทั้งเอนไซม์และเป็นโคแฟลกเตอร์ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต่อการเจริญและปฏิกิริยาในวิถีกระบวนการเมแทบอลิซึมต่าง ๆ โดยคอปเปอร์จำเป็นต่อกระบวนการหายใจระดับเซลล์ ส่วนโคบอลต์เป็นองค์ประกอบสำคัญของวิตามินบี 12 ในสภาวะที่ไม่มีคอปเปอร์ไอออนและโคบอลต์ไอออนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-7 Medium พบว่าเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ไม่มีการสร้างเม็ดสีเมลานิน โดยเชื้อแอคติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ PNST-01 จะสร้างโคโลนีสีขาวบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิด ส่วนเชื้อแอคติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ PRBS-12 จะสร้างโคโลนีสีขาวแกมเทาอ่อนและสีขาวบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-7 Medium ที่ไม่เติมคอปเปอร์คลอไรด์ และ ISP-7 Medium ที่ไม่เติมโคบอลต์คลอไรด์ ตามลำดับ อธิบายได้ว่าการสร้างเม็ดสีเมลานินของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์เกี่ยวข้องกับการมีไอออนโลหะในอาหารเลี้ยงเชื้อ Giraudeau et al. [25] กล่าวว่าไอออนของโลหะมีบทบาทสำคัญในการสร้างเม็ดสี ทั้งนี้เพราะจะไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่เร่งปฏิกริยาการสังเคราะห์เมลานิน ในกรณีของคอปเปอร์ไอออน Caesar-Tonthat et al. [26] กล่าวว่าคอปเปอร์ไอออนจะช่วยเพิ่มปริมาณหรือเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ทำให้เกิดการเชื่อมประสานของ L-DOPA เพื่อการสร้างเมลานิน ในกรณีของโคบอลต์ไอออน จะช่วยกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ไทโรซิเนส ทำให้ผลผลิตเมลานินเพิ่มขึ้น เอนไซม์ที่มีโคบอลต์เป็นองค์ประกอบจะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการออกซิเดชันไทโนซีนไปเป็น Dopachrome ซึ่งจะเกิดพอลิเมอร์ไรเซชันเป็นเมลานินต่อไป Amal et al. [2] รายงานว่า *Streptomyces virginae* สามารถสร้างเม็ดสีเมลานินได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-6 Medium ที่เติมโคบอลต์ไอออน เมอร์คิวรีไอออนและเลทไอออน เชื้อจะสร้างเม็ดสีเมลานินในระดับปานกลางในอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-6 Medium ที่เติมนิเกิลไอออนและคอปเปอร์ไอออน เชื้อจะสร้างเม็ดสีเมลานินในระดับต่ำในอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-6 Medium ที่เติมแมงกานีสไอออน อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-7 Medium เป็นการทดลองควบคุม ซึ่งเป็น Synthetic Media หรืออาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่ทราบองค์ประกอบทางเคมีแน่นอน ดังนั้นในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้แต่ละครั้ง จะได้อาหารที่มีองค์ประกอบเหมือนกันทุกครั้ง จะทำให้การศึกษาปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการผลิตเมลานิน เช่น ปัจจัยทางด้านสารอาหาร แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน แร่ธาตุ ผลของไอออนของโลหะ รวมทั้งสารยับยั้งต่าง ๆ ได้ถูกต้องแม่นยำกว่าการใช้ Complex Media เพราะทราบชนิดและปริมาณสัดส่วนคงที่แน่นอน

ตารางที่ 2 การเจริญและการสร้างเม็ดสีเมลานินของเชื้อแอคติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ PNST-01 และ PRBS-12 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP Medium ชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 14 วัน

อาหารเลี้ยงเชื้อ	สายพันธุ์ PNST-01		สายพันธุ์ PRBS-12	
	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (ซม.)	การสร้างเม็ดสี	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (ซม.)	การสร้างเม็ดสี
ISP-7 Medium	3.16±0.08	สีน้ำตาลเทาเข้ม	2.75±0.32	สีน้ำตาลเทาเข้ม
ISP-7 Medium ที่ไม่เติมคอปเปอร์คลอไรด์	1.86±0.16	สีขาว	2.05±0.22	สีขาวแกมเทาอ่อน
ISP-7 Medium ที่ไม่เติมโคบอลต์คลอไรด์	2.00±0.7	สีขาว	1.47±0.15	สีขาว

ตารางที่ 3 ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียโดยเมลานินหยาบที่ผลิตโดยเชื้อแอคติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ PNST-01 และ PRBS-12

แบคทีเรียทดสอบ	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (เซนติเมตร)	
	สายพันธุ์ PNST-01	สายพันธุ์ PRBS-12
Bacillus cereus ATCC 11778	1.80±0.34	1.91±0.23
Bacillus subtilis ATCC 6633	1.76±0.29	1.72±0.18
Staphylococcus aureus	1.23±0.51	-
Escherichia coli	-	-
Klebsiella pneumoniae	-	-
Pseudomonas aeruginosa	-	-
Shigella dysenteriae	-	-
Salmonella typhi	-	-
Streptococcus pyogenes	-	-
Serratia marcescens	-	-

หมายเหตุ - คือ ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้

3.5 ฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดเมลานินหยาบ

เมื่อนำเมลานินหยาบที่สกัดได้มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์โดยวิธี Agar Well Diffusion ซึ่งจุลินทรีย์ทดสอบ 10 สายพันธุ์ ได้แก่ *B. cereus* ATCC 11778, *B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus, E. coli, K. pneumoniae, P. aeruginosa, S. dysenteriae, S. typhi, S. pyogenes* และ *S. marcescens* ผลการวิจัยพบว่าเมลานินหยาบที่ผลิตได้จากเชื้อแอคติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ PNST-01 สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้จำนวน 3 ชนิด คือกลุ่ม Gram Positive Bacilli (*B. cereus* ATCC 11778 และ *B. subtilis* ATCC 6633) และกลุ่ม Gram positive cocci (*S. aureus*) ยกเว้น *S. pyogenes* และไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบกลุ่ม Enterobacteriaceae และ *P. aeruginosa* เมลานินหยาบที่ผลิตได้จากเชื้อแอคติโนมัยซีทีส สายพันธุ์ PRBS-12 สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้เพียง 2 ชนิด คือกลุ่ม Gram Positive Bacilli

แต่ไม่สามารถยับยั้งกลุ่ม Gram Positive Cocci กลุ่ม Enterobacteriaceae และ *P. aeruginosa* ดังแสดงในตารางที่ 3

สำหรับงานวิจัยนี้เมลานินหยาบของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์มีประสิทธิภาพยับยั้งได้เฉพาะแบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่ง จึงควรทำการศึกษาเพิ่มเติมในการนำเมลานินบริสุทธิ์มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ จึงสรุปได้ว่าสารสกัดเมลานินหยาบจากจุลินทรีย์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์แตกต่างกันตามสายพันธุ์ ดังรายงานวิจัยฉบับอื่นที่สอดคล้องคือ สารสกัดเมลานินหยาบที่ผลิตจากเชื้อแอคติโนมัยซีทีสที่แยกจากทะเลในประเทศอินเดีย สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* และ *Lactobacillus vugaris* ได้ดีรองลงมาคือ *S. aureus, Proteus mirabilis, Vibrio cholera, S. typhi, Samonella paratyphi* และ *Klebsiella oxytoca* [27] Amal et al. [2] ทำการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดเมลานินที่ผลิตจาก *S. virginae* พบว่าสารสกัดเมลานินหยาบสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา 5 ชนิด ยับยั้งแบคทีเรีย *P. aeruginosa* และ *S. aureus* แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *B. subtilis* และยีสต์ 2 ชนิด คือ *C. albicans* และ *Saccharomyces cerevisiae* ส่วนสารสกัดเมลานินที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 40 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ศึกษาทั้ง 10 ชนิด Zerrad et al. [28] รายงานว่าสารสกัดเมลานินหยาบที่ผลิตจาก *Pseudomonas balearica* U7 สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus, E. coli, Candida albicans, Erwinia chrysanthemi,* และ *Erwinia carotovora*) ส่วนสารสกัดเมลานินหยาบที่ผลิตจากเชื้อแอคติโนมัยซีทีส ไอโซเลท NL สามารถยับยั้ง *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* และ *S. typhi* [18] แอคติโนมัยซีทีสเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารเมแทบอไลซ์ทุติยภูมิหลายชนิด ได้แก่ สารปฏิชีวะนะและสารสี และมีรายงานว่าสารสีที่ผลิตจากแอคติโนมัยซีทีสมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ [2] ทำให้มีคุณค่าในแง่ของเวชภัณฑ์ เครื่องสำอางและอาหาร

4. สรุป

เชื้อแอคติโนมัยซีทีสทั้ง 2 สายพันธุ์ (PNST-01 และ PRBS-12) เจริญได้ดีที่สุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อต่างชนิดกัน แต่สามารถสร้างเม็ดสีเมลานินได้ดีที่สุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกันคือ ISP-7 Medium และไม่สามารถสร้างเม็ดสีเมลานินเมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-1 Medium และ ISP-6 Medium เชื้อทั้งสองสายพันธุ์มีการเจริญลดลงและไม่มีการสร้างเม็ดสีเมลานินบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-7 Medium ที่ไม่เติมคอปเปอร์คลอไรด์และโคบอลต์คลอไรด์ สารสกัดเมลานินหยาบของเชื้อแอคติโนมัยซีสทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้แตกต่างกัน จึงสรุปได้ว่าส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการเจริญและการสร้างเม็ดสีของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ นอกจากนี้เมลานินหยาบจากแต่ละสายพันธุ์จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแตกต่างกัน

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานีที่ให้การสนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้

6. เอกสารอ้างอิง

[1] A. Martin, *Actinomycetes. In Introduction to Soil Microbiology,* New York: John Wiley and Sons, 1961.

[2] A. M. Amal, K. A. Abeer, H. M. Samia, A. El-N H. Nadia, K. A. Ahmed and H. M. El-Hennawi, "Selection of pigment (melanin) production in Streptomyces and their application in printing and dyeing of wool fabrics," *Research Journal*

of Chemical Science, vol. 1, pp. 22-28, 2011.

[3] G. Zenova, "Melanoid pigments of actinomycetes," *Mikrobiologiia,* vol. 34, pp. 278-283, 1965.

[4] T. Arai and Y. Mikami, "Chromagenicity of *Streptomyces*," *Applied Microbiology*, vol. 23, pp. 402-406, 1972.

[5] W. P. Lin, H. L. Lai, Y. L. Liu, Y. M. Chiung, C. Y. Shiau, J. M. Han, C. M. Yang and Y. T. Liu, "Effect of melanin produced by a recombinant *Escherichia coli* on antibacterial activity of antibiotics," *Journal of Microbiology Immunology and Infection,* vol. 38, pp. 320-326, 2005.

[6] M. Bulter and A. Day, "Fungal melanins: a review," *Canadian Journal of Microbiology,* vol. 44, pp. 1115-1136, 1998.

[7] P. Riley, "Melanin," *International Journal of Biochemistry and Cell Biology,* vol. 29, no. 11, pp. 1172-1239, Nov. 1997.

[8] J. M. Henson, *Lignin, Humic Substances and Coal*, New York: Wiley-VCH, 2001.

[9] C. M. Clancy and J. D. Simom, "Ultrastructural organization of eumelanin from Sepia officinalis measured by atomic force microscopy," *Biochemistry*, vol. 40, no. 44, pp. 13353-13360, Nov. 2001.

[10] P. Manivasagan, J. Venkatesan, K. Sivakumar, and S.-K. Kim, "Actinobacterial melanins: current status and perspective for the future," *World Journal of Microbiology and Biotechnology,* vol. 29, no. 10, pp. 1737-1750, Oct. 2013.

[11] G. Prota, "Melanins, melanogenesis and melanocytes: looking at their functional significance from the chemist's viewpoint," *Pigment Cell Research*, vol. 13, no. 4, pp. 283-293, Aug. 2000.

[12] S. H. Woo, J. S. Cho, B. S. Lee and E. K. Kim, "Decolorization of melanin by lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*," *Biotechnology and Bioprocess Engineering,* vol. 9, no. 4, pp. 256-260, 2004.

[13] J. R. Mencher and A. H. Heim, "Melanin biosynthesis by *Streptomyces lavendulae*," *Journal of General Microbiol*ogy, vol. 28, no. 4, pp. 665-670, Sep. 1962.

[14] S. G. Dastager et al., "Separation, identification and analysis of pigment (melanin) production in *Streptomyces*," *African Journal of Biotechnology*, vol. 5, no. 11, pp. 1131-1134, Jan. 2006.

[15] R. C. R. Goncalves, H. C. F. Lisboa and P. S. R. Sponchiado, "Characterization of melanin pigment produced by *Aspergillus nidulans*," *World Journal of Microbiology Biotechnology,* vol. 28, no. 4, pp. 1467-1474, Apr. 2012.

[16] K.R. Deshmukh, "Isolation, characterization of melanin producing organism and extraction of melanin." *International Journal of Scientific and Engineering Research,* vol. 3, no. 11, pp. 1-4. Nov. 2012.

[17] P. G. Dharmik and A. V. Gomashe, "Isolation, identification and antioxidant activity of melanin pigment from

Actinomycete (*Streptomyces Species*) isolated from garden soil, Nagpur District, India," *International Journal of Pure and Applied Sciences and Technology,* vol. 18, no. 1, pp. 69-72, 2013.

[18] P. Sharma, T. A. Singh, B. Bharat, S. Bhasin and H. A. Modi, "Approach towards different fermentative techniques for the production of bioactive actinobacterial melanin," *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Science,* vol. 7, no. 4, pp. 695-700, 2018.

[19] H. Chaiyason, "Factor effecting production of melanin by actinomycetes, strain PNST-01," B.S. Senior project, Dept. Bio. Sc., Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, Thailand, 2017.

[20] P. Chaiyaporn, "Factor effecting production of melanin by actinomycetes, strain PRBS-12," B.S. Senior project, Dept. Bio. Sc., Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, Thailand, 2017.

[21] N. Keree, "Isolation and screening of melanin-producing actinomycetes from soil and bark wood samples," B.S. Senior project, Dept. Bio. Sc., Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, Thailand, 2014.

[22] R. Wongkamkern, "Isolation and screening of melanin-producing actinomycetes from rhizosphere soils," B.S. Senior project, Dept. Bio. Sc., Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, Thailand, 2014.

[23] E.B. Shirling and D. Gottlieb, "Methods for characterization of *Streptomyces* species," *International Journal of Systematic Bacteriology,* vol. 16, no. 3, pp. 313-340, Jul. 1966.

[24] P. Manivasagan, J. Venkatesan, K. Sivakumar and K. Sivakumar, "Isolation and characterization of biologically active melanin from *Actinoalloteichus* sp. MA-32," *International Journal of Biological Macromolecules,* vol. 58, pp. 263-274, Jul. 2013.

[25] M. Giraudeau, F. Mateos-Gonzalez, J. Cotín, E. Pagani-Nuñez, A. Torné-Noguera and J. C. Senar, "Metal exposure influences the melanin and carotenoid based colorations in greattits," *Science of the Total Environment,* vol. 532, pp. 512-516, Nov. 2015.

[26] T. Caesar-Tonthat, K. F. Van Ommen, G. G. Geesey and J. M. Henson, "Melanin production by a filamentous soil fungus in response to copper and localization of copper sulfide by sulfide-silver staining," *Applied Environmental Microbiology,* vol. 61, no. 5, pp. 1968-1975, May 1995.

[27] V. Vasanthabharathi, R. Lakshminarayanan and S. Jayalakshmi, "Melanin production from marine *Streptomyces*," *African Journal of Biotechnology,* vol. 10, no. 54, pp. 11224-11234, Sep. 2011.

[28] A. Zerrad, J. Anissi, J. Ghanam, K. Sendide and EH. Mohammed, "Antioxidant and antimicrobial activities of melanin produced by a *Pseudomonas balearica* strain," *Journal of Biotechnology Letters,* vol. 5, pp. 87-94, 2014.