สารต่อต้านเชื้อราที่ผลิตโดย Streptomyces sp. CU 279 จากดินในประเทศไทย

นางสาวดารารัตน์ รอดพยาธิ์

005632

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2525

ISBN 974-561-490-4

I15591487

# Antifungal Antibiotics Produced by *Streptomyces* sp. CU 279 from Thai Soil

Miss Dararat Rodphaya

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Microbiology

Graduate School

Chulalongkorn University

1982

หัวข้อวิทยานิพนธ์ สารต่อต้านเชื้อราที่ผลิตโดย Streptomyces sp. CU 257 จากดินในประเทศไทย

โดย นางสาวดารารัตน์ รอดพยาธิ์

ภาควิชา จุลชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.นลิน นิลอุบล

---

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุประดิษฐ์ บุนนาค)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.นลิน นิลอุบล)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สังศรี กุลปรีชา)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์ สารต่อต้านเชื้อราที่ผลิตโดย Streptomyces sp. CU 279 จากดินในประเทศไทย

ชื่อนิสิต นางสาวดารารัตน์ รอดพยาธิ์

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.นลิน นิลอุบล

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2525

บทคัดย่อ

Streptomyces sp. CU 279 เป็นเชื้อ Streptomyces ที่แยกได้จากดินตัวอย่างจากสวนยางพารา อ.บ้านนาสาร จ.สุราษฎร์ธานี สามารถผลิตสารต่อต้านเชื้อราและยีสต์หลายชนิด จากการศึกษาลักษณะของเชื้อพบว่า Streptomyces sp. CU 279 จัดอยู่ในกลุ่ม Streptomyces ที่มีสปอร์สีเทา (grey series) แต่แตกต่างจากสมาชิกทุกตัวของกลุ่มนี้ ดังนั้นจึงสันนิษฐานว่าเชื้อดังกล่าวอาจจะเป็นเชื้อชนิดใหม่ของ genus Streptomyces.

จากการศึกษาคุณสมบัติการผลิตสารต่อต้านเชื้อราพบว่า สารดังกล่าวตรวจพบได้ในเซลและสกัดออกมาโดยใช้ 80% เมทธานอลในน้ำที่ระดับความเป็นกรดด่าง 6.5 สารดังกล่าวตรวจไม่พบในอาหารเลี้ยงเชื้อ (culture filtrate) Streptomyces sp. CU 279 ผลิตสารได้มากที่สุดเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นสารแหล่งคาร์บอน และมีกากถั่วเหลือง (จากประเทศญี่ปุ่น) เป็นสารแหล่งไนโตรเจน

จากการศึกษาคุณสมบัติของสารที่สกัดได้จากเซลพบว่า ละลายได้ดีในเมทธานอลและเอทธานอล ละลายได้เล็กน้อยในโพรพานอล, บิวทานอล, อะซิโตน และน้ำซึ่งปรับระดับความเป็นกรดด่างที่ 2, 3, 5, 7, 9 และ 11 แต่ไม่ละลายในเฮกเซน, เบนซีน และอีเธอร์ ที่อุณหภูมิห้องสารที่สกัดได้จะรักษาประสิทธิภาพของการทำลายเชื้อราได้ดีเมื่ออยู่ในรูปสารละลายที่เป็นกลางและด่างและประสิทธิภาพจะลดลงเรื่อย ๆ เมื่ออยู่ในสภาพสารละลายที่เป็นกรด ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส สารดังกล่าวจะรักษาประสิทธิภาพของการทำลายเชื้อราได้นาน

กว่า 3.5 ชั่วโมง เมื่ออยู่ในรูปสารละลายที่เป็นกลาง แต่ถ้าอยู่ในรูปสารละลายที่เป็นกรด (pH 2) หรือเป็นด่าง (pH 11) ประสิทธิภาพจะเสื่อมลงตามเวลา

สารต่อต้านเชื้อราที่สกัดได้สามารถแยกออกจากสิ่งเจือปน (impurity) โดยขบวนการทินน์แลเยอร์โครมาโตกราฟฟีเมื่อใช้สารละลายผสมของบิวทานอล : เมทธานอล : น้ำ ในอัตราส่วน 4 : 1 : 2 จากการตรวจหาสารต่อต้านเชื้อราโดยวิธีออโตไบโอกราฟพบว่าสารดังกล่าวปรากฏอยู่ที่ตำแหน่งเดียวซึ่งมีค่า $R_f$ ประมาณ 0.46 - 0.48 และสารที่แยกได้มีช่วงการดูดแสงมากที่สุด (maximum absorption) ที่ความยาวคลื่น 343, 363, 383 และ 406 นาโนเมตร ซึ่งตรงกับคุณสมบัติของสารกลุ่มเฮบตาอีน

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของสารต่อต้านเชื้อราที่มีต่อ Acrocylindrium oryzae ซึ่งเป็นราที่ทำให้เกิดโรครวงข้าวเน่า พบว่าสารดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ Acrocylindrium oryzae. ซึ่งเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของราชนิดนี้เป็น 2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และสามารถควบคุมโรครวงข้าวเน่าได้เมื่อใช้สารที่มีความเข้มข้นไม่ต่ำกว่า 400 ส่วนในล้านส่วน พ่นบนต้นข้าวก่อนฉีดเชื้อรา แต่ถ้าฉีดเชื้อราให้กับต้นข้าวก่อนพ่นสารจะต้องใช้ความเข้มข้นไม่ต่ำกว่า 600 ส่วนในล้านส่วนจึงจะสามารถยับยั้งการลุกลามของโรคได้ สารต่อต้านเชื้อราที่ศึกษานี้ไม่มีพิษต่อต้นข้าวเมื่อพ่นด้วยสารละลายที่มีความเข้มข้นถึง 800 ส่วนในล้านส่วน แต่สารนี้มีความเป็นพิษเมื่อฉีดเข้าไปในหนู (albino mice) โดยมีค่า $LD_{50}$ เท่ากับ 5.7 มิลลิกรัม/กิโลกรัมหนู เมื่อฉีดเข้าทางช่องท้อง

Thesis Title Antifungal Antibiotics Produced by Streptomyces sp. CU 279 from Thai Soil

Name Miss Dararat Rodphaya

Thesis Advisor Associate Professor Naline Nilubol, Ph.D.

Department Microbiology

Acadamic Year 1982

## Abstract

Streptomyces sp. CU 279, the strain which produced polyene antifungal antibiotic, was isolated from the soil collected from the rubber plantation in the southern part of Thailand. The organism belongs to the grey series of genus Streptomyces, but its several characteristics are distinquishable from the known members of the grey series. Therefore, the organism is proposed to be a new specie of the genus Streptomyces.

The antifungal antibiotic cannot be detected in culture filtrate but can be isolated from the cells by extracting with 80% methanol in water at pH 6.5. Casava strach and soy bean meal (from Japan) are found to be the best carbon and nitrogen sources for the production medium.

The antibiotic extracted from Streptomyces sp. CU 279 is soluble in methanol and ethanol, slightly soluble in propanol, butanol, acetone and water at pH 2, 3, 5, 7, 9 and 11 but it is insoluble in hexane, benzene and ether. At room temperature, the

antifungal activity of this antibiotic is stable when it is in neutral and alkaline solution but it is unstable in acidic solution. At 60°C, the antifungal acitivity is stable in neutral solution for more than 3.5 hours but in alkaline (pH 11) and acidic (pH 2) solution, the activity is unstable.

The antifungal antibiotic extracted from the cells contains some inactive substances. These substances can be detected and removed by using thin layer chromatography technique with butanol : methanol : water (4 : 1 : 2) as the solvent system. From the result of autobiography of antifungal substance on the thin layer chromatography plate, the active substance showes a single spot with the $R_f$ value of 0.46 - 0.48. The active substance showes the maximal absorption at the wavelength 343, 363, 383 and 406 nm. which is corresponse to the characteristic of heptaene.

The antifungal antibiotic extracted from Streptomyces sp. CU 279 inhibits growth of Acrocylindrium oryzae in vitro when at concentration 2 ug/ml. It can control the sheath rot disease of rice which caused by Acrocylindrium oryzae. The minimal concentration for prevention of the disease in rice is 400 ppm. and the minimal concentration which can terminate the disease distribution in rice is 600 ppm. This antibiotic is not toxic to rice when the concentration up to 800 ppm. was tested. However, it is toxic to albino mice and the $LD_{50}$ value is 5.7 mg./kg.

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าใคร่ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.นลิน นิลอุบล ที่ได้กรุณาให้ความช่วยเหลือแนะนำและให้แนวความคิดอย่างดียิ่งในการทำวิทยานิพนธ์นี้ ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์สังศรี กุลปรีชา ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำการจัดหมวดหมู่ของเชื้อที่นำมาศึกษา ตลอดจนช่วยเหลือแนะนำในด้านการเขียนเป็นอย่างดียิ่ง

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ เป็นอย่างสูง ที่ได้กรุณาแนะนำความคิดในด้านการเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นอย่างดียิ่ง นอกจากนี้ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์นาฏฉลวย หลายยูไท ที่ได้กรุณาช่วยเหลือในการปลูกพืชทดลอง และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ประพีร์ เศรษฐรักษ์ ที่ได้กรุณาแนะนำการใช้กล้องจุลทัศน์อิเลคตรอน

ขอกราบขอบพระคุณกองทุนสมเด็จพระมหิตลาธิเบศร อดุลยเดชวิกรม พระบรมราชชนก ที่ได้ให้ความช่วยเหลือด้านทุนวิจัย ตลอดจนขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่บัณฑิตวิทยาลัยทุกท่านที่ได้ให้ความสะดวกต่าง ๆ

ท้ายสุดนี้การทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้สำเร็จลงได้เนื่องจากแรงสนับสนุนและการให้กำลังใจจากบิดามารดาของข้าพเจ้าตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงปัจจุบัน.

สารบัญ

หน้า


บทคัดย่อภาษาไทย . . . . . ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ . . . . . จ

กิตติกรรมประกาศ . . . . . ช

สารบัญ . . . . . ฌ

รายการตารางประกอบ . . . . . ฎ

รายการรูปประกอบ . . . . . ฐ

คำย่อ . . . . . ฒ

บทที่

1 บทนำ . . . . . 1

2 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การแยกเชื้อ Streptomyces ที่สร้างสารต่อต้านเชื้อราจากดินตัวอย่าง . . . . . 5

2.2 การจัดหมวดหมู่ของ Streptomyces sp. CU 279 5

2.3 การสกัดสารต่อต้านเชื้อราออกจากเซลของ Streptomyces sp. CU 279 . . . . . 7

2.4 การทดสอบประสิทธิภาพของสารต่อต้านเชื้อราโดยวิธีไบโอแอสเซย์ (bioassay) . . . . . 8

2.5 การกำหนดหน่วยวัดปริมาณสารต่อต้านเชื้อรา . . . 8

2.6 การหาสารแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตสารต่อต้านเชื้อรา . . . . . 8

บทที่ หน้า

2.7 ผลของน้ำตาลมัลโทส (maltose) ที่มีต่อการผลิตสารต่อต้านเชื้อรา 10

2.8 ประสิทธิภาพการต่อต้านเชื้อราของสารที่ผลิตขึ้น 11

2.9 ความเป็นพิษต่อหนูของสารต่อต้านเชื้อรา (toxicity) 13

2.10 การศึกษาคุณสมบัติทางฟิสิกส์ของสารต่อต้านเชื้อรา 13

2.11 การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของสารต่อต้านเชื้อรา 14

3 ผลการวิจัย

3.1 การแยกเชื้อ Streptomyces ที่สร้างสารต่อต้านเชื้อราจากดินตัวอย่าง 18

3.2 ศึกษาการจัดหมวดหมู่ของ Streptomyces sp. CU 279 21

3.3 สารแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตสารต่อต้านเชื้อราของ 29

3.4 ผลของน้ำตาลมัลโทสที่มีต่อการผลิตสารต่อต้านเชื้อรา 33

3.5 ประสิทธิภาพของสารต่อต้านเชื้อราที่ผลิตโดย Streptomyces sp. CU 279 35

3.6 ความเป็นพิษของสารต่อต้านเชื้อราที่สกัดได้จาก Streptomyces sp. CU 279 40

3.7 คุณสมบัติทางฟิสิกส์ของสารต่อต้านเชื้อราที่สกัดจาก Streptomyces sp. CU 279 40

3.8 ศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของสารที่สกัดจาก Streptomyces sp. CU 279 42

4 การอภิปรายและสรุปผลการวิจัย 56

บรรณานุกรม 64

ภาคผนวก 68

ประวัติผู้เขียน 77

# รายการตารางประกอบ


| ตารางที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | ลักษณะของเชื้อ Streptomyces ที่ผลิตสารต่อต้านเชื้อรา ซึ่งแยกได้จากดินตัวอย่าง | 18 |
| 2 | ลักษณะสัณฐานวิทยา (Morphological characteristic) ของ Streptomyces sp. CU 279 | 22 |
| 3 | ลักษณะการเจริญ (Cultural characteristic) ของ Streptomyces sp. CU 279 | 23 |
| 4 | ลักษณะสรีระวิทยา (Physiological Characteristic) ของ Streptomyces sp. CU 279 | 25 |
| 5 | เปรียบเทียบลักษณะการเจริญ (Cultural characteristic) การใช้สารแหล่งคาร์บอนและการผลิตปฏิชีวนะสารของ Streptomyces sp. CU 279 และสายพันธุ์อื่นที่มีลักษณะใกล้เคียง | 26 |
| 6 | ปริมาณของสารต่อต้านเชื้อราที่ผลิตโดย Streptomyces sp. CU 279 เมื่อใช้สารแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ | 29 |
| 7 | ปริมาณสารต่อต้านเชื้อราที่ผลิตโดย Streptomyces sp. CU 279 เมื่อใช้สารแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ กัน | 31 |
| 8 | ปริมาณสารต่อต้านเชื้อราที่ผลิตโดย Streptomyces sp. CU 279 เมื่อมีการเติมมัลโทส์เพิ่มลงไปอีก 0.64% ในช่วงเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง ของการเพาะเชื้อ | 33 |
| 9 | ค่าความเข้มข้นของสารที่ผลิตโดย Streptomyces sp. CU 279 ที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบชนิดต่าง ๆ | 36 |

ตารางที่ หน้า


10 เปอร์เซ็นต์เมล็ดข้าวที่เป็นโรครวงข้าวเน่า ซึ่งเกิดจากเชื้อ Acrocylindrium oryzae เมื่อพ่นสารที่ผลิตโดย Streptomyces sp. CU 279 หลังจากฉีดเชื้อแก่ต้นข้าวแล้ว 2 วัน 37

11 เปอร์เซ็นต์เมล็ดข้าวที่เป็นโรคที่เพิ่มขึ้นจากวันแรกเมื่อพ่นสารความเข้มข้นต่าง ๆ กัน หลังจากฉีดเชื้อแก่ต้นข้าวแล้ว 2 วัน 37

12 เปอร์เซ็นต์เมล็ดข้าวที่เป็นโรครวงข้าวเน่าซึ่งเกิดจากเชื้อ Acrocylindrium oryzae เมื่อพ่นสารที่ผลิตโดย Streptomyces sp. CU 279 ก่อนฉีดสปอร์แก่ต้นข้าว 1 วัน 38

13 ความเป็นพิษของสารต่อต้านเชื้อราที่สกัดได้จาก Streptomyces sp. CU 279 เมื่อฉีดเข้าไปในช่องท้องของหนูขาว (albino mice) ที่มีน้ำหนักตัวประมาณ 25 กรัม 40

14 การละลายของสารต่อต้านเชื้อรา (ที่สกัดจาก Streptomyces sp. CU 279) ในตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ 42

15 ประสิทธิภาพในการยับยั้ง C.albicans ของสารต่อต้านเชื้อราที่สกัดจาก Streptomyces sp. CU 279 ในสภาพความเป็นกรดต่างต่าง ๆ 43

16 ความคงตัวของประสิทธิภาพของสารต่อต้านเชื้อราที่สกัดจากเชื้อ Streptomyces sp. CU 279 เมื่ออยู่ในอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ที่ระดับความเป็นกรดด่างที่ 2, 7 และ 11 44

17 ค่า $R_f$ ของสารส่วนที่มีประสิทธิภาพต่อต้านเชื้อราโดยใช้ระบบสารละลายชนิดต่าง ๆ เมื่อทำการแยกด้วยวิธีทินน์แลเยอร์โครมาโตกราฟฟี 46

ตารางที่ หน้า

18 เปรียบเทียบคุณสมบัติบางประการของปฏิชีวนะสารที่ผลิตโดย *Streptomyces* sp. CU 279 กับปฏิชีวนะสารชนิดอื่น ๆ 54

รายการรูปประกอบ


| รูปที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | บริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้นรอบ ๆ โคโลนีของ Streptomyces sp. CU 279 เมื่อใช้ C.albicans เป็นเชื้อทดสอบ | 20 |
| 2 | สายใยและสายสปอร์ของ Streptomyces sp. CU 279ที่เจริญบนอาหารสูตรหมายเลข 8 | 27 |
| 3 | ผิวสปอร์ของ Streptomyces sp. CU 279 | 28 |
| 4 | ปริมาณสารต่อต้านเชื้อราที่ Streptomyces sp. CU 279 ผลิตขึ้นเมื่อใช้สารแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ | 30 |
| 5 | ปริมาณสารต่อต้านเชื้อราที่ Streptomyces sp. CU 279 ผลิตขึ้นเมื่อใช้สารแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ | 32 |
| 6 | ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์(เทียบกับมัลโทส) ที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเลี้ยง Streptomyces sp. CU 279 ในอาหารสูตรหมายเลข 21 ในช่วงเวลาต่าง ๆ | 34 |
| 7 | ลักษณะเมล็ดข้าวพันธุ์ ก ข 3<br>ก. ลักษณะปกติ<br>ข. ลักษณะที่เป็นโรครวงข้าวเน่า | 39 |
| 8 | แสดงรูปแบบของการดูดแสงที่ช่วงความยาวคลื่นแสงต่าง ๆ ของสารต่อต้านเชื้อราที่สกัดจาก Streptomyces sp. CU 279 | 41 |
| 9 | ประสิทธิภาพของสารต่อต้านเชื้อราที่สกัดจาก Streptomyces sp. CU 279 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในลักษณะความเป็นกรดต่างที่ 2, 7 และ 11 | 45 |

| รูปที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 10 | แสดงแบบแผนของการแยกสารต่อต้านเชื้อราที่สกัดจาก *Streptomyces* sp. CU 279 โดยวิธีทินน์แลเยอร์โครมาโตกราฟฟี โดยใช้ระบบสารละลายชนิดต่าง ๆ | 47 |
| 11 | ความสัมพันธ์ระหว่างเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งกับค่าลอกค้อของความเข้มข้นของสาร (ใช้ *C.albicans* เป็นเชื้อทดสอบ) | 49 |
| 12 | แสดงค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 402 นาโนเมตร เทียบกับปริมาณของสารต่อต้านเชื้อรา (ไมโครกรัม/มล.) ในแฟรคชันต่าง ๆ ที่ผ่านออกมาจากซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟฟี | 50 |
| 13 ก | แสดงแบบแผนของการแยกสารต่อต้านเชื้อราแฟรคชันต่าง ๆ ในช่วงที่มีประสิทธิภาพสูงที่ได้จากซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟฟีเมื่อใช้สารละลายบิวทานอล : เมทธานอล : น้ำ (4:1:2) | 51 |
| ข | แสดงแบบแผนของการแยกของสารต่อต้านเชื้อรา เมื่อแยกสิ่งเจือปนออกแล้ว โดยใช้สารละลาย บิวทานอล : เมทธานอล : น้ำ (4 : 1 : 2) | 51 |
| 14 | แสดงรูปแบบของการดูดแสงที่ช่วงความยาวคลื่นแสงต่าง ๆ ของสารต่อต้านเชื้อราหลังจากที่แยกเอาสิ่งเจือปนออกโดยผ่านซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟฟีและซิลิกาเจลทินน์แลเยอร์โครมาโตกราฟฟี | 52 |

## คำย่อ

| | | |
|---|---|---|
| มล. | = | มิลลิลิตร |
| มม. | = | มิลลิเมตร |
| มก. | = | มิลลิกรัม |
| ชม. | = | ชั่วโมง |
| ซม. | = | เซนติเมตร |
| กก. | = | กิโลกรัม |