



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Antimicrobial compounds as side products from the agricultural processing industry

Sumthong, P.

Citation

Sumthong, P. (2007, June 19). *Antimicrobial compounds as side products from the agricultural processing industry*. Division of Pharmacognosy, Section of Metabolomics, Institute of Biology, Faculty of Science, Leiden University. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/12086>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/12086>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

บทสรุป

ปัจจุบันจุลินทรีย์ที่ต้านทานยาปฏิชีวนะได้ขยายวงกว้างขึ้นอย่างรวดเร็ว ด้วยเหตุนี้จึงมีความต้องการยาปฏิชีวนะชนิดใหม่อย่างเร่งด่วน อย่างไรก็ตามยาปฏิชีวนะพัฒนาขึ้นจากจุลินทรีย์ ในขณะที่พืชเป็นทรัพยากรที่ได้รับความสนใจเนื่องจากมีคุณสมบัติในการป้องกันจุลินทรีย์หลายชนิด โดยจะเห็นได้จากสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ค้นพบในพืชหรือสารที่พืชสังเคราะห์ขึ้นมาเมื่อถูกจุลินทรีย์เข้าทำลาย (Phytoalexin) ดังนั้นจึงชี้ให้เห็นว่าพืชเป็นทรัพยากรที่น่าสนใจในการค้นคว้าหาสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดใหม่

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มุ่งเน้นในการศึกษาพืชบางชนิดที่สามารถหาได้ง่าย ด้วยความคิดที่ว่าพืชดังกล่าวใช้เพื่อวัตถุประสงค์ในการผลิต ผลผลิตทางอุตสาหกรรมการเกษตร และด้วยเหตุนี้จึงเป็นการเพิ่มมูลค่าให้แก่พืชผลที่เก็บเกี่ยวได้ งานวิจัยฉบับนี้เป็นการศึกษากิจกรรมการต่อต้านเชื้อราของสารสกัดจากพืช เนื่องจากเป็นที่ทราบกันดีว่าพืชมีคุณสมบัติในการต่อต้านเชื้อราหลายชนิด และได้มุ่งเน้นศึกษาสารสกัดจากพืชที่มีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อราทำลายไม้ (wood rot fungi) โดยเริ่มต้นจากการคัดเลือกสารสกัดจากพืชบางชนิดที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทั่วไปบางชนิด

บทที่ 1 คือ บทนำ ซึ่งกล่าวถึงสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เกษตรกรรม ผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในบ้านเรือน และยาปฏิชีวนะที่ใช้ในทางปศุสัตว์ ซึ่งการบริโภคยาปฏิชีวนะเป็นสาเหตุให้จุลินทรีย์เกิดการพัฒนาการต่อต้านยาปฏิชีวนะ ดังนั้นจึงมีความต้องการสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดใหม่ โดยพืชสมุนไพรจัดเป็นทรัพยากรที่ได้รับความสนใจเพื่อใช้ในวัตถุประสงค์ดังกล่าว

บทที่ 2 กล่าวถึงกลไกโดยทั่วไปของของสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทำอันตรายต่อเซลล์จุลินทรีย์ เช่น มีผลกระทบต่อเยื่อหุ้มเซลล์ ผนังเซลล์ การสังเคราะห์และการซ่อมแซมดีเอ็นเอ (DNA) การยึดเกาะกับไรโบโซม และมีผลต่อเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นโดยจุลินทรีย์ ซึ่งสิ่งที่กล่าวมานี้สามารถใช้เป็นเป้าหมายของการค้นหาสารยับยั้งจุลินทรีย์เพื่อการพัฒนาชนิดใหม่ อย่างไรก็ตามในบทนี้ได้อธิบายวิธีการคัดเลือกสารยับยั้งจุลินทรีย์โดยทั่วไป ยกตัวอย่างเช่น วิธีการแพร่กระจายของสาร (diffusion assays) วิธีการเจือจางความ

เข้มข้นของสาร (dilution assays) วิธีการไบโอออโตกราฟฟิก (bioautographic assays) และนอกจากนี้ยังมีวิธีการที่ซับซ้อนมากขึ้น เช่น การทดสอบกับโมเดลกุineaหมายในเซลล์จุลินทรีย์

บทที่ 3 แสดงให้เห็นการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากดอกกัญชา (*Cannabis sativa*) ดอกฮอป (*Humulus lupulus*) และขี้เลื่อยไม้เนื้อแข็งบางชนิด ได้แก่ ไม้สัก (*Tectona grandis*) ไม้แดง (*Xylocopa xylocapa*) ไม้เต็ง (*Shorea obtusa*) ไม้อัลันบาดู (*Shorea albida*) และ ไม้ตะเคียนทอง (*Hopea odorata*) อย่างไรก็ตามมีรายงานการใช้สารสกัดจากดอกกัญชาและฮอปในทางเภสัชกรรมและสารสกัดจากพืชดังกล่าวมีผลยับยั้งจุลินทรีย์ ดังนั้นด้วยแนวคิดที่ต้องการศึกษาสารหรือวัสดุส่วนที่เหลือใช้จากกระบวนการผลิตทางอุตสาหกรรมเกษตร จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจในการค้นหาสารยับยั้งจุลินทรีย์เพื่อเพิ่มมูลค่าให้แก่วัตถุดิบดังกล่าว ขี้เลื่อยไม้เนื้อแข็งในเขตร้อนเป็นหนึ่งในแหล่งทรัพยากรที่น่าสนใจในการตรวจสอบหาสารยับยั้งจุลินทรีย์ เนื่องจากสามารถสร้างผลกำไรจากวัสดุเหลือใช้ที่หาได้ง่ายจากอุตสาหกรรมแปรรูปไม้ อย่างไรก็ตามเป็นที่ทราบกันดีว่าไม้เนื้อแข็งบางชนิดมีความทนทานต่อการเข้าทำลายของปลวกและเชื้อราทำลายไม้

ผลงานวิจัยในบทนี้ พบว่า สารสกัดจากดอกกัญชามีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* และ *Escherichia coli* ด้วยวิธีการแพร่กระจายของสาร ทั้งนี้สารสกัดดังกล่าวยับยั้ง *B. subtilis* ได้ดีกว่า *E. coli* ผลการยับยั้งสูงสุดของสารสกัดจากดอกกัญชาพบในสารสกัดที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม-เมธานอล อัตราส่วน 1:1 ดังนั้นจึงนำสารสกัดส่วนนี้มาเปรียบเทียบกับสารในกลุ่มคานาบินอยด์ (Cannabinoids) โดยวิธีไบโอแกรม (biogram assay) จึงพบว่าสารที่อยู่ในสารสกัดดังกล่าว ได้แก่ tetrahydrocannabinolic acid (THCA) cannabidiolic acid (CBDA) และ cannabigerolic acid (CBGA) มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย ในขณะที่สารสกัดจากดอกฮอปมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus niger* ที่ระดับความเข้มข้นในการยับยั้งต่ำสุด (MIC) เท่ากับ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยใช้วิธีการเจือจางความเข้มข้นของสารในการทดสอบ ส่วนสารสกัดจากขี้เลื่อยไม้เนื้อแข็งชนิดต่างๆ ทั้ง 5 ชนิดดังที่กล่าวข้างต้น ซึ่งใช้คลอโรฟอร์ม-เมธานอลอัตราส่วน 1:1 ในการสกัดนั้น พบว่าสารสกัดจากขี้เลื่อยไม้สักยับยั้งเชื้อรา *A. niger* ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเท่ากับ 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หลังจากที่พบผลการยับยั้งเชื้อรา *A. niger* ในสารสกัดจากขี้เลื่อยไม้

สักจึงได้แยกสารบริสุทธิ์ที่ออกฤทธิ์ในสารสกัดดังกล่าวซึ่งวิธีการแยกและตรวจสอบโครงสร้างสารบริสุทธิ์ที่ออกฤทธิ์ได้อธิบายอยู่ในบทที่ 4 โดยสารที่แยกได้จากสารสกัดจากขี้เลื่อยไม้สักซึ่งใช้คลอโรฟอร์ม-เมทานอลอัตราส่วน 1:1 ในการสกัด ได้แก่ deoxylapachol, tectoquinone, 2-hydroxymethylanthraquinone, hemitectol (2,2-dimethyl-2H-benzo[h]chromen-6-ol), tectol และ 3'-OH-deoxyisolapachol (2-[(1E)-3-hydroxy-3-methylbut-1-enyl]naphthoquinone) ซึ่งเครื่องมือที่ใช้แยกสารเหล่านี้คือซีพีซี (centrifugal partition chromatography) โดยการใช้ เฮกเซน-เมทานอล-น้ำ อัตราส่วน 50:47.5:2.5 ในการแยกสาร สารทั้งหมดที่แยกได้ข้างต้นมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราโดยวิธีไบโอแอสเมต

เพื่อศึกษากลไกการยับยั้งจุลินทรีย์จึงได้ทดสอบผลของสารสกัดจากดอกฮอพและขี้เลื่อยไม้สักต่อการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus niger* ที่ผ่านการตัดต่อพันธุกรรมเพื่อใช้เป็นต้นแบบในการศึกษาการถูกทำลายของผนังเซลล์เชื้อรา (บทที่ 5) โดยเชื้อราดังกล่าวได้ใส่จีเอฟพีมาร์คเกอร์ (GFP marker) ไปที่ยีนสังกลูแคนซินเทส (1,3- α -D-glucan synthase) ซึ่งผลการชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีนสังกลูแคนซินเทสจะแสดงให้เห็นเป็นสีเขียวฟลูออเรสเซนซึ่งสามารถสังเกตเห็นได้เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ ผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากขี้เลื่อยไม้สักและสารที่แยกได้จากสารสกัดดังกล่าว ได้แก่ deoxylapachol และ แพลกซัน 87 (hemitectol + tectol) มีผลทำให้ผนังเซลล์เชื้อราได้รับความกดดันซึ่งอาจมีผลให้ถูกทำลายได้ต่อไป

ในบทที่ 6 แสดงผลของการยับยั้งจุลินทรีย์ผ่านอีกกลไกหนึ่ง ได้แก่ การยับยั้งเอนไซม์แอนทรานิลเลทซินเทส (anthranilate synthase) ซึ่งเอนไซม์นี้ถือเป็นเอนไซม์ที่น่าสนใจในการใช้เป็นเอนไซม์เป้าหมายเพื่อค้นหาสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดใหม่ เอนไซม์แอนทรานิลเลทซินเทส เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการสังเคราะห์กรดอะมิโนทริปโตเฟน (tryptophan) เอนไซม์ดังกล่าวพบในจุลินทรีย์ พืช และ ปาราสิท แต่ไม่พบในมนุษย์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม การวัดค่าการยับยั้งเอนไซม์ แอนทรานิลเลทซินเทส โดยสารสกัดจากพืชใช้วิธี เอชพีแอลซี (high performance liquid chromatography) โดยวัดผลผลิตที่ได้จากการทำงานของเอนไซม์แอนทรานิลเลทซินเทส ซึ่งผลิตจากแบคทีเรีย *E. coli* ที่ผ่านการตัดต่อพันธุกรรม ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากดอกัญชายับยั้งการทำงานของเอนไซม์ แอนทรานิลเลทซินเทส ได้สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสาร

สกัดจากดอกฮอป ในจำนวน Canabinoids ที่ทดสอบ CBGA มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ แอนทรานิเลท ซินเทส สูงที่สุดรองลงมาคือ THCA อย่างไรก็ตาม hop bitter acids ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ แอนทรานิเลท ซินเทส โดย adhumulone มีฤทธิ์ยับยั้งสูงสุด รองลงมาคือ β -acids และ humulone ส่วนผลการทดสอบกับสารกึ่งสังเคราะห์ที่ได้จาก hop- α -acids พบว่า Iso-*trans*-adhumulone แสดงการยับยั้งเอนไซม์สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับ iso- α -acids และ iso-*cis*-adhumulone

จากการที่ได้ศึกษากลไกการยับยั้งจุลินทรีย์โดยศึกษาผลการเกิดความกดดันที่ผนังเซลล์เชื้อราและการยับยั้งเอนไซม์แอนทรานิเลท ซินเทส แล้วนั้น จึงได้ศึกษาผลของสารออกฤทธิ์ดังกล่าวต่อการยับยั้งเชื้อราทำลายไม้ในบทที่ 7 กิจกรรมการยับยั้งเชื้อราทำลายไม้โดยสารสกัดจากดอกกัญชา (*C. sativa*) และดอกฮอป (*H. lupulus*) รวมทั้งเชื้อไม้นื้อแข็ง ได้แก่ ไม้สัก (*T. grandis*) ไม้แดง (*X. xylocapa*) ไม้เต็ง (*S. obtusa*) ไม้อาลันบาดู (*S. albida*) และ ไม้ตะเคียนทอง (*H. odorata*) ได้ทดสอบโดยวิธีการแพร่กระจายของสารโดยใช้กระดาษกรอง (paper-disc diffusion assay) และวิธีการเจือจางความเข้มข้นของสารโดยใช้อาหารแข็ง (agar plate dilution assay) ผลการทดสอบปรากฏว่าสารสกัดจากเชื้อไม้นื้อแข็งและสารสกัดจากดอกฮอป ยับยั้งเชื้อรากลุ่มที่ทำลายไม้ได้จำนวนมากสายพันธุ์กว่าการใช้สารสกัดจากพืชชนิดอื่นๆ สาร deoxylapachol ที่แยกได้จากเชื้อไม้นื้อแข็งมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราทำลายไม้ในกลุ่ม brown rot fungi ได้แก่ *Gloeophyllum sepiarium* CBS 353.74 และ *Gloeophyllum trabeum* CBS 318.50 และเชื้อราทำลายไม้ในกลุ่ม white rot fungi ได้แก่ *Phlebia brevispora* CBS 509.92 และ *Merulius tremellosus* CBS 280.73 จากนั้นจึงศึกษากลไกการยับยั้งเชื้อราทำลายไม้โดยเลือกศึกษาการยับยั้งเอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เชื้อรากลุ่มนี้ผลิตขึ้นเพื่อย่อยสลายไม้ ผลการทดลองพบว่าแฟรคชัน 87 (hemitectol + tectol) ที่แยกได้จากเชื้อไม้นื้อแข็งมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับสารอื่น ๆ ที่แยกได้จากเชื้อไม้นื้อแข็งและดอกฮอป ส่วนสาร humulone ที่แยกได้จากดอกฮอปมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราทำลายไม้ในกลุ่ม brown rot fungi ได้แก่ *G. sepiarium* CBS 317.50 และ CBS 353.74, *G. trabeum* CBS 318.50 และ

CBS 335.49 และ *S. lacrymans* CBS 520.91 และ CBS 751.79 แต่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์เซลลูเลสในระดับต่ำ

การค้นพบสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดใหม่ต้องการทั้งวิธีทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์โดยทั่วไปและวิธีการที่จำเพาะเจาะจง ในการเข้าทำลายโมเลกุลเป้าหมายในเซลล์จุลินทรีย์หรือทำลายผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ และแม้ว่าการพิสูจน์โครงสร้างของสารภายหลังตรวจพบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์จะสามารถทำได้โดยใช้สารปริมาณไม่มาก แต่เพื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพจึงจำเป็นต้องใช้สารปริมาณมากขึ้น งานวิจัยฉบับนี้พิสูจน์ให้เห็นว่าเครื่องมือซีพีซีสามารถแยกสารเพื่อตอบสนองความต้องการนี้ได้ ในจำนวนสารที่แยกได้ทั้งหมด hemitocol จากเชื้อไมีสักมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *A. niger* ในระดับสูงและมีฤทธิ์สูงในการยับยั้งเอนไซม์เซลลูเลสแต่สารนี้กลับไม่เสถียร α -acids และ β -acids จากสารสกัดจากดอกฮอปเป็นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอนทรานิลิก ซินเทส แต่เป็นสารที่สลายตัวได้ง่าย สาร deoxylapachol ที่แยกได้จากเชื้อไมีสักมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีฤทธิ์ชักนำให้ผนังเซลล์เชื้อราเกิดความกดดัน อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าสารที่มีโครงสร้างคล้ายสารนี้ซึ่งได้แก่ lapachol มีฤทธิ์ยับยั้งมะเร็ง ดังนั้นจึงน่าจะมีการศึกษาความเป็นพิษของสารดังกล่าวต่อเซลล์มนุษย์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สารที่ค้นพบในพืชดังกล่าวข้างต้นนี้อาจนำไปสู่การวิจัย เพื่อให้ได้สารกึ่งสังเคราะห์ซึ่งมีพื้นฐานมาจากสารสกัดจากพืชที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง จุลินทรีย์ ส่วนในการประยุกต์ใช้สารสกัดจากธรรมชาติหรือสารกึ่งสังเคราะห์ที่มีพื้นฐานมาจากสารสกัดจากธรรมชาติ เพื่อการป้องกันเชื้อราทำลายไม้ ป้องกันเชื้อราขึ้นใยผ้าคอตตอน หรือการยับยั้งจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหารสำเร็จรูป อาจทำได้โดยการเชื่อมต่อสารออกฤทธิ์ดังกล่าวกับโพลีเมอร์หรือวัสดุต่าง ๆ เพื่อให้เกิดความทนถาวรในการออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์

งานวิจัยฉบับนี้พิสูจน์ให้เห็นถึงความน่าสนใจในการใช้วัตถุดิบหรือวัสดุเหลือใช้จากอุตสาหกรรมแปรรูปผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร เพื่อให้เกิดประโยชน์ในรูปแบบของผลผลิตใหม่ เช่น การผลิตสารยับยั้งเชื้อราจากเชื้อไมีสักเนื้อแข็ง ขั้นตอนต่อไปจึงน่าจะเป็นการพัฒนาวิธีการมาตรฐานสำหรับการคัดเลือกสารออกฤทธิ์ที่ได้จากวัสดุเหลือใช้ในอุตสาหกรรมเกษตร เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์ใหม่ๆ เช่น ยา อาหารเสริม อาหารเพื่อสุขภาพ

บทสรุป

สารป้องกันเชื้อโรคที่ปนเปื้อนในอาหาร และสารยับยั้งเชื้อโรคในอาหารสัตว์หรือในแปลงเกษตรกรรม
นอกจากนี้ยังรวมไปถึงสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในบ่อปลาและบ่อกุ้ง และสารป้องกันเชื้อราขึ้นไม้หรือวัสดุ
เครื่องใช้ในบ้าน ดังจะเห็นได้จากแผนผังโครงการซึ่งแสดงอยู่ใน**บทที่ 8**