การแยกและทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของไซเดอโรฟอร์จากไรโซเบียมที่คัดแยกจากปมรากถั่ว

Isolation and Biological Activities of Siderophore from Rhizobium Separate from Knot Root Beans

สมหมาย ปะติตังโข [1]
กิ่งแก้ว ปะติตังโข [2]

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้เป็นการผลิตและแยกสารไซเดอโรฟอร์จากแบคทีเรียชนิดไรโซเบียมจากปมรากถั่วฝักยาวที่เลี้ยงในอาหาร SA medium ในสภาวะที่มีธาตุเหล็กต่ำ ทำให้แบคทีเรียผลิตไซเดอโรฟอร์ แล้วแยกไซเดอโรฟอร์ออกจากเซลล์ของแบคทีเรีย จากการเลี้ยงแบคทีเรีย 4 ลักษณะ คือ R-ชมพู R-เขียว R-ขาวขุ่น และ R-ขาวใส พบว่าไซเดอโรฟอร์ที่สกัดได้ทั้งหมดเป็นชนิด *Hydroxamate Siderophore* สำหรับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH พบว่าไซเดอโรฟอร์แต่ละชนิดมีค่า IC_{50} เฉลี่ยเท่ากับ 3040.18, 6559.88, 10515.80 และ 0.00 ppm จากแบคทีเรีย R-ชมพู R-ขาวขุ่น R-เขียว และ R-ขาวใส ตามลำดับ และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP พบว่า ไซเดอโรฟอร์ที่ได้จากแบคทีเรีย R-เขียว มีความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} ไปเป็น Fe^{2+} ได้ 0.908 ± 0.00 mM เมื่อศึกษาความสามารถในการต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบางชนิด พบว่า ไซเดอโรฟอร์จาก R-ชมพู สามารถต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ 3 ชนิด คือ *Escherichia coli, Klebsiella spp*. และ *Citrobacter spp*. ส่วน R-เขียว มีความสามารถในการต้านการเจริญเติบโตของ *Escherichia coli* R-ขาวขุ่นสามารถต้านการเจริญเติบโตของ*Escherichia coli* และ *Klebsiella spp*. และ R-ขาวใสมีความสามารถในการต้านการเจริญเติบโตของ *Klebsiella spp*. เท่านั้น แต่ไม่มีไซเดอโรฟอร์จากแบคทีเรียชนิดใดที่มีความสามารถในการต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียชนิด *Enterobacter spp*.

คำสำคัญ : ไรโซเบียม ไซเดอโรฟอร์ การต้านอนุมูลอิสระ แบคทีเรีย

---

1 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์

2 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สาขาวิชาบรรณารักษศาสตร์และสารสนเทศศาสตร์ คณะมนุษยศาสตร์และสังคมศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์

Abstract

This project deals with isolation and biological evaluation of siderophore from Rhizobium by taking the Rhizobium from knot root beans and let's bacteria grown up in SA medium that iron deficiency condition for bacteria to produce siderophore. The kind of bacteria that take from knot root beans is R-pink, R-turbid, R-white and R-green. For the kind of siderophores that isolation from all bacteria was hydroxamate siderophore. The siderophores were analyzed for antioxidant and against microbacteria. The DPPH and FRAP assay were uses for determining siderophore as antioxidant activity. Total antioxidant capacity by DPPH assay has IC_{50} 3040.18, 6559.88, 10515.80 and 0.00 ppm respectively. For total antioxidant capacity by FRAP assay get the highest ferrous concentrations were 0.908±0.004 mM at 2500.00 ppm respectively for R-green. Some bacteria like *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., and *Citrobacter* spp. were uses for determination of all siderophore activities. The results have shown that R-pink inhibited *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., and *Citrobacter* spp. R-turbid and R-white inhibited *Klebsiella* spp. R-green and R-turbid inhibited *Escherichia coli*, but all of siderophores weren't inhibited *Enterobacter* spp.

Keyword: Rhizobium, Siderophore, Antioxidant Properties, Bacteria

บทนำ

ปัจจุบันความก้าวหน้าในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (Natural Products) ได้เจริญก้าวหน้าไปมาก เช่นเดียวกับเทคโนโลยีอื่น ๆ โดยมีการค้นพบ และศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบ หรือผลิตขึ้นจากสิ่งมีชีวิตมากมาย ทั้งจากพืช สัตว์ จุลินทรีย์ และสิ่งมีชีวิตจากทะเล (ปิยนุช ทองผาสุก. 2550; พรรณี เด่นรุ่งเรือง. 2550; โอภา วัชระคุปต์. 2549) เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ซึ่งสามารถพบได้ในชีวิตประจำวัน ตามสื่อโฆษณาต่าง ๆ โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์เสริมอาหารนานาชนิดที่จำหน่ายในท้องตลาด ได้อ้างถึงสรรพคุณของสารจากธรรมชาติที่มีในผลิตภัณฑ์ เช่น Hydroxyl Citric Acid (HCA) จากผลส้มแขก เติมเข้าไปในผลิตภัณฑ์เพื่อควบคุมน้ำหนัก หรือ Oligomeric Proanthocyanidin (OPC) จากเมล็ดองุ่น เติมในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชะลอความแก่ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ หรือแม้แต่

ผลิตภัณฑ์ที่ใช้ภายในบ้าน เช่น ผลิตภัณฑ์กำจัดแมลงบางยี่ห้อ มีการใช้สารสกัดจากดอก Pyrethrum ที่ให้สารจำพวก Monoterpene ที่ชื่อว่า Pyretrins เป็นสารที่มีพิษต่อแมลงที่สัมผัสสารนี้ (รัตนา อินทรานุปกรณ์. 2547)

การวิจัยทางด้านผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ส่วนมากมีจุดมุ่งหมายเพื่อค้นหาสารจากธรรมชาติที่จะพิชิตโรคร้ายไม่ว่าจะเป็นโรคเอดส์หรือโรคมะเร็ง เพื่อพัฒนาเป็นยา ตัวอย่างเช่น Vinblastine และ Vincristine ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม Indole Alkaloid ที่สกัดได้จากต้นแพงพวยฝรั่ง (*Catharanthus Roseus*) โดย Vinblastine (เกษร นันทจิต. 2546) ส่วนใหญ่จะใช้ในการรักษาโรค Non-Hodgkin lymphoma และ โรคมะเร็งอื่นๆ ส่วน Vincristine มีความสำคัญทางคลินิกมากในการรักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว (Leukemia) ตลอดจนใช้ในการรักษาโรคอื่น ๆ อีกด้วย (Colegate and Molyneux. 2008) นอกจากนี้ยังมีสารที่ได้จากจุลินทรีย์มากมายที่ใช้เป็นยาต้านโรคมะเร็ง และส่วนใหญ่มีฤทธิ์เป็นยาปฏิชีวนะ (Antibiotic Properties) เช่น Adriamycin, Bleomycin และ Dactinomycin เป็นต้น (Stevens. 2013) ยังมีผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติอีกมากมายที่รอคอยการค้นพบ และนำไปใช้ประโยชน์ทางยา อาหารเสริม และอื่น ๆ (Siddiqui and others. 2017)

เนื่องจากประเทศไทยอยู่ในเขตอบอุ่นจึงมีข้อได้เปรียบด้านความอุดมสมบูรณ์ของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ และความหลากหลายทางชีวภาพเป็นที่ประจักษ์ จากจุดเด่นดังกล่าวทำให้ผู้วิจัยสนใจที่จะค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากแบคทีเรียโดยต้องการค้นหาสารต้นแบบ (Lead Compounds) ในกลุ่มของไซเดอโรฟอร์ (Siderophore) เพื่อนำไปใช้ในการปรับเปลี่ยนโครงสร้างให้เป็นสารที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพสูงขึ้นหรือมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างออกไป หรือนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์สารชนิดอื่น ๆ ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

วิธีดำเนินงานวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

อุปกรณ์

UV-Vis Spectrophotometer, Autoclave, Hot Air Oven, Refrigerator Centrifuge, Laminar Flow, Hotplate & Stirrer, Incubator, Rotary Evaporator, Hot Plate

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

2,2 Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), Dimethyl Sulfoxide (DMSO), 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT), Iron (III) Chloride, Ascorbic Acid, Vitamin E, Potassium Persulfate, Methanol, Sucrose, Ammonium Sulphate, Potassium Dihydrogen Phosphate, L-Asparagine Monohydrate, Magnesium Sulfate, Acetone, และ Hydrochloric Acid ซื้อจากบริษัท Sigma-Aldrich, USA สารเคมีที่ใช้ทั้งหมดเป็น Analytical Grade

การเลี้ยงไรโซเบียม

เลือกปมรากถั่วที่มีขนาดใหญ่และสีชมพู ล้างดินออกให้สะอาดด้วยน้ำ ใช้ใบมีดที่คมและสะอาดตัดปมที่เลือกไว้ออกจากราก โดยให้เหลือชิ้นส่วนของรากติดอยู่กับปมถั่วเล็กน้อยแล้วนำไปแช่ในแอลกอฮอล์ 95 % นาน 3 นาที ล้างน้ำกลั่นหลายๆ ครั้ง ชั่งปมของรากถั่ว 10 g บีบให้แตก นำมาละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเลี้ยงในอาหาร CAS Agar บ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การแยกไรโซเบียมให้บริสุทธิ์

1. ทำการบันทึกลักษณะของไรโซเบียมที่เลี้ยงไว้

2. นำไรโซเบียมแต่ละลักษณะมาทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิค Streak Plate แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C

การผลิตไซเดอโรฟอร์

นำสารละลายทั้งหมดที่ผ่านการ Autoclave แล้วไปฆ่าเชื้ออีกครั้งภายใต้แสง UV เป็นเวลา 15 นาที แล้ว ปิเปตสารละลายแมกนีเซียม ซัลเฟต ลงในอาหาร SA 1.00 ml/100.00 ml นำไรโซเบียม โดยขูดเชื้อที่อยู่บน Plate ลงใน Erlenmeyer Flask ขนาด 250 ml ที่มีอาหารเหลว SA 100.00 ml ไปเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่ 150 rpm ณ อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำสารละลายใน Erlenmeyer Flask ขนาด 250 ml ไปถ่ายลงใน Erlenmeyer Flask ขนาด 3 L ภายใต้แสง UV คนด้วย Magnetic Stirrer ต่อไปอีก 24 ชั่วโมง ด้วยความเร็ว 300 rpm ที่

อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นเติมแอมโมเนียซัลเฟต 10.00 g/L เพื่อตกตะกอนโปรตีน แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อแยกโปรตีนและเซลล์ ได้สารละลายส่วนใสที่เรียกว่า Siderophore Supernatant (Bechet and Blondeau. 1998; สมหมาย ปะติตังโข. 2541; สมหมาย ปะติตังโข และกิ่งแก้ว ปะติตังโข. 2561)

วิธีการตรวจสอบไฮดรอกซาเมทไซเดอโรฟอร์

นำสารละลายของไซเดอโรฟอร์ที่แยกได้มาตรวจสอบไฮดรอกซาเมทไซเดอโรฟอร์ (Rioux and others. 1983) ด้วยวิธีการต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

Csaky Test

ปิเปตสารตัวอย่าง จำนวน 2.00 ml ลงในหลอดทดลองขนาด 15.00 ml เติมสารละลายกรดซัลฟิวริก 3.00 M จำนวน 2.00 ml แล้ว Hydrolyzed ในตู้อบเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 120 °C ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วถ่ายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50.00 ml และเติมสารละลาย 2.00 M ของโซเดียมอะซีเตต จำนวน 7.00 ml จากนั้นเติมสารละลายซัลฟานิลามีน จำนวน 2.00 ml ละลายในไอโอดีน จำนวน 2.00 ml เขย่าให้ผสมกัน และปล่อยให้ทำปฏิกิริยากันอย่างสมบูรณ์เป็นเวลา 5 นาที ไอโอดีนที่มีมากเกินพอกำจัดออกโดยเติมสารละลายโซเดียมอาร์ซีไนต์ 2.00 ml เติมสารละลายแนพธิลเอธิลลีนไดเอมีน จำนวน 2.00 ml ปล่อยไว้ 30 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ จะได้สารละลายสีคราม วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 543 nm

Berg และ Becker Test

เติมสารตัวอย่าง จำนวน 2.00 ml ลงในบีกเกอร์ขนาด 50.00 ml เติม 8-Hydroxy Quinoline จำนวน 2.00 ml และสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 1.00 M จำนวน 2.00 ml เขย่า 30 วินาที ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ แล้วเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 14.00 ml, 1.00 M และโซเดียมคาร์บอเนต 2.00 ml, 1.00 M เพื่อไฮโดรไลซีสสารผสม ปรับ pH ให้คงที่ ที่ 11.00 ± 0.50 จะได้สารละลายสีน้ำเงินอมเขียว วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 700 nm

Triphenyltetrazolium Chloride Test

เติมสารตัวอย่าง จำนวน 10.00 ml ลงใน Erlen Meryer Flask ขนาด 50.00 ml แช่อยู่ในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 80±1 °C เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.00 M 10.00 ml และสารละลาย Triphenyl Tetrazolium Chloride จำนวน 2.00 ml เขย่าให้ผสมกัน หลังจากนั้น 5 นาที เติมแอซิด-พิริดีน จำนวน 10.00 ml แล้วยกออกจากอ่างน้ำ ปล่อยให้เย็น ถ่ายลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50.00 ml ปรับให้ถึงขีดปริมาตรด้วย แอซิด-พิริดีน จะได้สารละลายสีส้มแดง ส่วนแบลงค์ (Blank) ใช้น้ำกลั่นจำนวน 10.00 ml ทดลองเหมือนข้างต้น วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 490 nm

การวิเคราะห์แคทีโคเลท ไซเดอโรฟอร์ (Catecholate Siderophore, Phenolate) โดยใช้วิธีของ Arnow

เติมสารละลายตัวอย่างไซเดอโรฟอร์ ลงในหลอดทดลองขนาด 5.00 ml เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 1.00 ml และเติมสารละลายไนไตรต์โมลิบเดท 1.00 ml เขย่าให้ผสมกัน จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.00 ml เขย่าให้เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 510 nm (Arnow. 1937)

การศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH

เตรียมสารละลายไซเดอโรฟอร์, Ascorbic Acid, BHT ให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ แล้วดูดสารละลายแต่ความเข้มข้นใส่ในขวดสีชาจำนวน 4 ขวด ขวดละ 1 ml จากนั้นเติม 2 ml ของสารละลาย 0.2 mM DPPH นำไปบ่มในที่มืดอุณหภูมิ 37 °C วัดค่าการดูดคลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm คำนวณเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูล DPPH

การศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP

1. ปิเปตสารตัวอย่างที่มีความเข้มข้นต่างๆปริมาตร 150 µl ใส่ในขวดสีชาขนาด 5 ml แล้วเติมสารละลาย FRAP ปริมาตร 3 ml เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 6 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลื่นแสงที่ความยาวกลื่น 593 nm

2. นำค่าการดูดกลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานที่สร้างจากความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Iron (II) Sulfate Solution กับค่าการดูดกลื่นแสง

การศึกษาความสามารถในการต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

เตรียมสารละลายความเข้มข้นต่าง ๆ แล้วนำไปทดสอบการต้านการเจริญเติบโตของแบคที่เรีย 4 ชนิด ได้แก่ *Escherichia Coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., และ *Citrobacter* spp. โดยวิธี Filter Paper Method ที่อุณหภูมิ 35 °C

ผลการวิจัย

ลักษณะของไรโซเบียม

ไรโซเบียมที่ได้จากปมรากถั่วมีลักษณะดัง ตารางที่ 1 และภาพประกอบ 1

ตารางที่ 1 ลักษณะของไรโซเบียมที่ได้จากปมรากถั่วฝักยาว

ตัวอย่าง	ลักษณะของไรโซเบียม*
ปมรากถั่ว	R-ชมพู
	R-เขียว
	R-ขาวขุ่น
	R-ขาวใส

*R = Rhizobium และ แบ่งตามสีของสารละลายส่วนใส (Supernatant) ที่ปรากฏในอาหาร SA Medium

ภาพประกอบ 1 ลักษณะของไซเดอโรฟอร์ที่ได้จากไรโซเบียม

หลังจากนำไรโซเบียมในตารางที่ 1 ไปเลี้ยงในอาหาร SA Medium เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องได้ ไซเดอโรฟอร์ที่มีลักษณะดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ลักษณะของไซเดอโรฟอร์ที่ได้จากไรโซเบียมที่เลี้ยงในอาหาร SA Medium เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ลักษณะของไรโซเบียม	ลักษณะของไซเดอโรฟอร์
R-ชมพู	สีเขียวอ่อน
R-เขียว	สีขาวใส
R-ขาวขุ่น	สีขาวขุ่น
R-ขาวใส	สีขาวใส

จากตารางจะเห็นว่าไรโซเบียมต่างชนิดกันจะผลิต ไซเดอโรฟอร์ได้แตกต่างกัน

ผลการศึกษาชนิดของไซเดอโรฟอร์ที่ได้จากไรโซเบียมแต่ละชนิด

ผลของการทดสอบไซเดอโรฟอร์ชนิดไฮดรอกซาเมทโดยวิธี Csaky Test

เมื่อนำไซเดอโรฟอร์มาทำการทดสอบหาชนิดของไซเดอโรฟอร์โดยวิธี Csaky Test ซึ่งเป็นวิธีที่อาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชันของ Hydroxamic Acid ด้วยไอโอดีนเกิดสารประกอบ เอ็น-ไนโตรโซ จะมีสีคราม และการทดสอบได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบชนิดของไฮดรอกซาเมทไซเดอโรฟอร์ โดยวิธี Csaky Test

Siderophores	สีของสารละลาย	ค่า λ_{max} (nm)
1. สีเขียวอ่อน	สีเหลือง	333
2. สีขาวใส	สีเหลือง	333
3. สีขาวขุ่น	สีเหลือง	325
4. สีขาวใส	สีเหลือง	330

จากตารางที่ 3 แสดงให้เห็นว่าไซเดอโรฟอร์ แต่ละตัวที่นำมาทดสอบไม่ใช่ไฮดรอกซาเมทไซเดอโรฟอร์ เพราะผลการทดสอบสารละลายเป็นสีเหลือง ไม่ใช่สีคราม

ผลของการทดสอบไฮดรอกซาเมทไซเดอโรฟอร์โดยวิธี Berg และ Becker Test

หลังจากนำไซเดอโรฟอร์มาทำการทดสอบหาชนิดของไซเดอโรฟอร์โดยวิธี Berg และ Becker Test ได้ผลดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลของการทดสอบไฮดรอกซาเมทไซเดอโรฟอร์ โดยวิธี Berg และ Becker Test

Siderophores	สีของสารละลาย	ค่า λ_{max} (nm)
1. สีเขียวอ่อน	สีเขียว	395
2. สีขาวใส	สีเขียว	390
3. สีขาวขุ่น	สีเหลือง	370
4. สีขาวใส	สีเหลือง	370

จากตารางที่ 4 พบว่า ไซเดอโรฟอร์สีเขียวอ่อน และสีขาวใส สามารถทำปฏิกิริยากับรีเอเจนต์ได้เป็นสารละลายสีเขียว แสดงว่าไซเดอโรฟอร์ทั้งสองนี้เป็น ไฮดรอกซาเมทไซเดอโรฟอร์ (Hydroxamate Siderophore) ส่วนไซเดอโรฟอร์สีขาวขุ่น และสีขาวใส ให้ผลการทดสอบกับรีเอเจนต์เป็นสีเหลือง จึงยังไม่สามารถที่จะบอกได้ทันทีว่าเป็นไฮดรอกซาเมทไซเดอโรฟอร์หรือไม่ต้องสังเกตผลจากวิธี Triphenyl Tetrazolium Chloride Test ต่อไป

ผลการทดสอบชนิดของไฮดรอกซาเมทไซเดอโรฟอร์ โดยวิธี Triphenyl Tetrazolium Chloride Test

จากการทดสอบชนิดของไฮดรอกซาเมทไซเดอโรฟอร์โดยวิธีนี้ได้ผลดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบชนิดไฮดรอกซาเมทไซเดอโรฟอร์โดยวิธี Triphenyl Tetrazolium Chloride Test

Siderophores	สีของสารละลาย	ค่า λ_{max} (nm)
1. สีเขียวอ่อน	สีเหลือง	340
2. สีขาวใส	สีเหลือง	340
3. สีขาวขุ่น	สีแดง	503
4. สีขาวใส	สีแดง	495

จากตารางที่ 5 พบว่าไซเดอโรฟอร์สีขาวขุ่นและสีขาวใสจะให้ผลกับรีเอเจนต์เป็นสีแดงซึ่งเป็น Positive ตามวิธี Triphenyl Tetrazolium Chloride Test แสดงว่า ไซเดอโรฟอร์ทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นไฮดรอกซาเมทไซเดอโรฟอร์

ผลการทดสอบชนิดแคทีโคเลทไซเดอโรฟอร์โดยวิธี Arnow Test

ผลการทดสอบชนิดของแคทีโคเลทไซเดอโรฟอร์โดยวิธี Arnow Test ได้ผลดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบชนิดของแคทีโคเลทไซเดอโรฟอร์โดยวิธี Arnow Test

Siderophores	Color of the solution	λ_{max} (nm)
1. สีเขียวอ่อน	yellow	370
2. สีขาวใส	yellow	375
3. สีขาวขุ่น	yellow	370
4. สีขาวใส	yellow	365

จากตารางที่ 6 พบว่าไซเดอโรฟอร์ทุกชนิดจะให้สารละลายสีเหลืองกับรีเอเจนต์ในการทดสอบโดยวิธี Arnow Test แสดงว่าไซเดอโรฟอร์จากไรโซเบียมไม่ใช่ แคทีโคเลทไซเดอโรฟอร์

ผลการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH

การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของไซเดอโรฟอร์โดยวิธี DPPH (Sharma and others. 2007) แสดงผลการทดลองเป็นเปอร์เซ็นต์การจับอนุมูลอิสระ (Free

Radical; % Scavenging Effect) เป็นผลมาจากการทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลาย DPPH กับไซเดอโรฟอร์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ λ_{max} 517 nm ซึ่งเป็นค่าความยาวคลื่นที่สารละลาย DPPH สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุด ดังนั้นค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH เปลี่ยนไปแสดงว่าสารแอนติออกซิแดนต์มาทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH โดยที่ DPPH Free Radical ได้รับอิเล็กตรอนหรืออนุมูลอิสระไฮโดรเจน จากไซเดอโรฟอร์ ทำให้เกิดการเสถียรโดยเปลี่ยนเป็นโมเลกุลอิสระ ซึ่งสามารถสังเกตได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ λ_{max} 517 nm ลดลง สามารถนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนไปซึ่งมีค่าเท่ากับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ได้ผลดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของไฮดรอกซาเมทไซเดอโรฟอร์ที่ผลิตโดยไรโซเบียม

Siderophores	Con-centra-tion (ppm)	Radical Scavenging Activity (%)				
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	x ± SD	95% CL for μ
1. สีเขียวอ่อน	2500.00	40.701	40.700	40.730	40.701±0.030	40.701±0.074
	1250.00	22.041	22.040	22.02	22.024±0.014	22.024±0.060
	625.00	7.910	7.910	7.900	7.910±0.010	7.910±0.025
	312.50	2.730	2.730	2.712	2.731±0.018	2.731±0.045
	156.25	1.710	1.710	1.740	1.708±0.033	1.708±0.082
2. สีขาวใส	2500.00	19.270	19.263	19.29	19.274±0.014	19.274±0.035
	1250.00	7.560	7.552	7.572	7.561±0.010	7.561±0.025
	625.00	2.280	2.273	2.287	2.280±0.007	2.280±0.017
	312.50	1.070	1.082	1.078	1.077±0.006	1.077±0.015
	156.25	0.000	0.000	0.000	0.000±0.000	0.000±0.000
3. สีขาวขุ่น	2500.00	10.628	10.642	10.608	10.626±0.017	10.626±0.042
	1250.00	4.213	4.224	4.219	4.219±0.006	4.219±0.015
	625.00	0.628	0.621	0.632	0.627±0.006	0.627±0.015
	312.50	0.000	0.000	0.000	0.000±0.000	0.000±0.000
	156.25	0.000	0.000	0.000	0.000±0.000	0.000±0.000

ตารางที่ 7 (ต่อ)

Siderophores	Con-centra-tion (ppm)	Radical Scavenging Activity (%)				
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	x ± SD	95% CL for μ
4. สีขาวใส (จาก R-ขาวใส)	Not show any antioxidant activity					

ผลของการคำนวณหาค่า IC_{50}

นำค่าการต้านอนุมูลอิสระที่ความเข้มข้นต่างๆ มาคำนวณหาค่า IC_{50} ซึ่งเป็นความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่มีความสามารถกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ลดลงได้ 50% ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ค่า IC_{50} ของไซเดอโรฟอร์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH

Siderophores	IC_{50} (ppm)
1. สีเขียวอ่อน	3040.176
2. สีขาวใส	10515.800
3. สีขาวขุ่น	6559.875
4. สีขาวใส	-
5. BHT	22.310

ผลการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP

การสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP (Sharma and others. 2007) นำสารละลาย Iron (II) Sulphate ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm จะได้ค่าการดูดกลืนแสงดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ของสารมาตรฐาน Fe^{2+} ที่ความยาวคลื่น 593 nm

Standard Concentration (mM)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 593 nm
0.00	0.000
0.10	0.060
0.20	0.111
0.40	0.202
0.60	0.311
0.80	0.403
1.00	0.503

จากการศึกษาค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างจะเห็นว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ได้อยู่ในช่วงของกราฟมาตรฐานและคำนวณหาค่าของ Fe^{2+} ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ปริมาณของ Fe^{2+} ที่ได้จากการรีดิวซ์ Fe^{3+} โดยไฮดรอกซาเมทไซเดอโรฟอร์เพื่อวิเคราะห์ความสามารถการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP

Siderophores	ความเข้มข้น (ppm)	ความเข้มข้นของ Fe^{2+} (mM)				
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	x ± SD	95% CL for μ
1. สีเขียวอ่อน	2500.00	-	-	-	-	-
	1250.00	-	-	-	-	-
	625.00	-	-	-	-	-
2. สีขาวใส	2500.00	0.907	0.905	0.913	0.908 ± 0.004	0.908 ± 0.010
	1250.00	0.257	0.243	0.235	0.245 ± 0.011	0.245 ± 0.027
	625.00	0.12	0.096	0.102	0.106 ± 0.012	0.106 ± 0.052
3. สีขาวขุ่น	2500.00	0.124	0.145	0.145	0.138 ± 0.012	0.138 ± 0.052
	1250.00	0.010	0.016	0.026	0.017± 0.008	0.017± 0.020
	625.00	-	-	-	-	-

ตารางที่ 10

Siderophores	ความเข้มข้น (ppm)	ความเข้มข้นของ Fe^{2+} (mM)				
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	x ± SD	95% CL for μ
4. สีขาวใส	2500.00	-	-	-	-	-
	1250.00	-	-	-	-	-
	625.00	-	-	-	-	-

ผลการทดสอบความสามารถในการต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

เมื่อนำไซเดอโรฟอร์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ไปทดสอบการฆ่าแบคทีเรีย 4 ชนิด แล้ววัด Clear Zone ได้ผลดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 Biological Activities of Hydroxamate Siderophore Against Some Bacteria

Siderophores	Concentration (μg/L)	Clear Zone (mean; mm)			
		Escherichia coli	*Klebsiella* spp.	*Enterobacter* spp.	*Citrobacter* spp.
1. สีเขียวอ่อน	1000	14.0	12.0	-	10.0
	500	12.0	10.0	-	8.0
	250	10.0	8.0	-	7.0
	Control	-	-	-	-
2. สีขาวใส	1000	10.0	-	-	-
	500	8.0	-	-	-
	250	7.0	-	-	-
	Control	-	-	-	-
3. สีขาวขุ่น	1000	13.0	18.0	-	-
	500	12.0	-	-	-
	250	8.0	-	-	-
	Control	-	-	-	-

ตารางที่ 11 (ต่อ)

Siderophores	Concen-tration (mg/L)	Clear Zone (mean; mm)			
		Escherichia coli	*Klebsiella* spp.	*Entero-bacter* spp.	*Citro-bacter* spp.
4. สีขาวใส	1000	-	9.0	-	-
	500	-	8.0	-	-
	250	-	7.0	-	-
	Control	-	-	-	-

สรุปผลการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการนำแบคทีเรียไรโซเบียม (Rhizobium) จากปมรากถั่วฝักยาวมาเลี้ยงในอาหาร CAS Agar บริเวณจังหวัดบุรีรัมย์ เพื่อแยกไรโซเบียมที่มีลักษณะต่าง ๆ แล้วนำแต่ละลักษณะมาผลิตไซเดอโรฟอร์ โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร SA Medium ซึ่งเป็นอาหารที่มีสภาวะของธาตุเหล็กต่ำ (Bechet & Blondeau. 1998; Ratledge and Dover. 2000) เมื่อผลิตไซเดอโรฟอร์แล้วทำการหมุนเหวี่ยง เพื่อแยกเอา Siderophore Supernatant มาทำให้บริสุทธิ์แล้วนำไปศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH และวิธี FRAP นอกจากนั้นยังนำไปทดสอบความสามารถในการต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *E.coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. และ *Citrobacter* spp. อีกด้วย

การเลี้ยงแบคทีเรียไรโซเบียมที่ได้จากตัวอย่างปมรากถั่วในอาหาร CAS Agar พบว่ามีไรโซเบียม 4 ลักษณะคือ R-ชมพู R-เขียว R-ขาวขุ่น และ R-ขาวใส เมื่อทำการผลิตไซเดอโรฟอร์จะได้ไซเดอโรฟอร์ 4 ชนิดตามลำดับ คือ สีเขียวอ่อน สีขาวใส สีขาวขุ่น และสีขาวใส เมื่อทำการทดสอบหาชนิดของไซเดอโรฟอร์ พบว่า ไซเดอโรฟอร์ที่ได้ทั้งหมดเป็นชนิดไฮดรอกซาเมทไซเดอโรฟอร์ (Hydroxamate Siderophore) เนื่องจากให้ผลการทดสอบเป็นบวกตามวิธีของ Berg และ Becker Test ส่วนผลการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ของไซเดอโรฟอร์พบว่า ไซเดอโรฟอร์สีเขียวอ่อน (R-ชมพู) มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้สูงสุดในกลุ่ม โดยมีค่า IC_{50} 3040.18 ppm ส่วนสีขาวใสจาก R-เขียว และสีขาวขุ่นจาก R-ขาวขุ่น มีค่า IC_{50} เท่ากับ 10515.80 และ 6559.88 ตามลำดับ และการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP พบว่าไซเดอโรฟอร์ที่ได้จาก ไรโซเบียม R-เขียว

และ R-ขาวขุ่น เท่านั้นที่มีความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} ไปเป็น Fe^{2+} โดยไซเดอโรฟอร์จาก R-เขียว สามารถรีดิวซ์ได้ 0.91 ± 0.00 mM ส่วน R-ขาวขุ่น 0.14 ± 0.01 mM ที่ความเข้มข้น 2,500.00 ppm ตามลำดับ ผลการต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค DPPH และ FRAP มีความสัมพันธ์กันน้อยทั้งนี้เนื่องจากสารที่มีฤทธิ์ในการรีดิวซ์เหล็กได้ดีอาจจะแสดงสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระด้วยการให้อะตอมไฮโดรเจนไม่ดี (โอภา วัชระคุปต์. 2549) นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับความสามารถในการละลายและขนาดของโมเลกุลของสารที่จะเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ (มัณฑนา ภาณุมาภรณ์. 2552) ดังนั้นการที่ไซเดอโรฟอร์มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH. ได้ดีเพราะมีความสามารถในการละลายน้ำได้ดีและโมเลกุลไม่เกะกะ (Steric Effect) แต่มีความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กได้น้อยในเทคนิค FRAP

ความสามารถในการต้านการเจริญเติบโตของของแบคทีเรีย พบว่า สารไซเดอโรฟอร์สีเขียวอ่อนจาก R-ชมพู สามารถต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ 3 ชนิดคือ *E.coli*, *Klebsiella* spp. และ *Citrobacter* spp. R-เขียวมีความสามารถในการต้านการเจริญเติบโตของ *E.coli* R-ขาวขุ่นมีความสามารถในการต้านการเจริญเติบโตของ *E.coli* และ *Klebsiella* spp. และ R-ขาวใสมีความสามารถในการต้านการเจริญเติบโตของ *Klebsiella* spp. กลไกการออกฤทธิ์ของไซเดอโรฟอร์เกี่ยวข้องกับความสามารถในการเกิดสารเชิงซ้อนกับเหล็กเนื่องจากไซเดอโรฟอร์มีสมบัติในการเป็นคีเลตที่ดีเยี่ยม (Chelating Activity of Siderophores) ทำให้แบคทีเรียก่อโรคไม่สามารถนำธาตุเหล็กไปใช้ได้จึงตายไปในที่สุด (Shinozaki. 2004; MØller and others. 2005) ผลจากงานวิจัยนี้จะเป็นแนวทางในการนำผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีราคาถูกหาได้ง่ายในเมืองไทยมาเป็นยารักษาโรคทาง Microbacterial in Infection Control โดยเฉพาะ Nosocomial Infection ที่เกิดจากแบคทีเรียพวก *E.coli*, *Klebsiella* spp. และ *Citrobacter* spp. นอกจากนี้ยังสามารถที่จะนำ Natural Product Siderophores ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม Iron Chelators ที่มีคุณสมบัติทางชีวภาพมากมาย เช่น ต้านมะเร็ง (Lovejoy and Richardson. 2003) ต้าน MMP-2 (Shinozaki. 2004) รักษาโรคของ Iron Overload (Chaston and Richardson. 2003) และอื่น ๆ

เอกสารอ้างอิง

เกษร นันทจิต. (2546). **เคมีของยา : ยาที่เกี่ยวข้องกับการรักษาโรคมะเร็ง**. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ปิยนุช ทองผาสุก. (2550). **ผลของรังสีแกรมมาต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและสารเคอร์คูมินอยด์ในขมิ้นชัน**. ในการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีนิวเคลียร์ครั้งที่ 10: 16-17 สิงหาคม 2550. กรุงเทพฯ

พรรณี เด่นรุ่งเรือง. (2550). **ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของเปลือกต้นวงศ์อบเชย**. กรุงเทพฯ : สำนักงานวิจัยการจัดการป่าไม้และผลิตผลป่าไม้

รัตนา อินทรานุปกรณ์. (2547). **การตรวดสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สมหมาย ปะติตังโข. (2541). **การแยก การทำให้บริสุทธิ์ และการประยุกต์ของไซเดอโรฟอร์ในการหาปริมาณของเหล็ก**. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (วิทยาศาสตร์). ขอนแก่น : มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สมหมาย ปะติตังโข และกิ่งแก้ว ปะติตังโข. (2561). “สารไซเดอโรฟอร์กำจัดเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคพืชในต้นหอม,” **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี** 2(1) : 47-58.

โอภา วัชระคุปต์. (2549). **สารต้านอนุมูลอิสระ**. กรุงเทพฯ : พี.เอส.พริ้นท์.

Arnow L.E. (1937). “Colorimetric determination of the component of 3,4-Dihydroxyphenylalanine tyrosine mixture,” **Journal of Biological Chemistry**. 118 : 531-537.

Bechet, M., and Blondeau, R. (1998). “Iron deficiency-induced tetracycline production in submergedcultures by Streptomyces aureofaciens,” **Journal Applied Microbiology**. 84 : 889-894.

Chaston, T.B., and Richardson, D.R. (2003). “Interactions of the pyridine-2-carboxaldehyde isonicotinoyl hydrazone class of chelators with iron and DNA: implications for toxicity in the treatment of iron overload disease,” **Journal Biological Inorganic Chemistry**. 8 : 427-438.

Colegate, S.M. and Molyneux, R.J. (2008). **Bioactive Natural Products Detection Isolation and Structural Determination**. 2nd ed. Boca Raton : Taylor & Francis Group LLC.

Graham, L. P. (2001). **An Introduction to Medicinal Chemistry**. Oxford Univerisity Press.

Lovejoy, D.B., and Richardson, D.R. (2003). “Iron chelators as anti-neoplastic agents: Current developments and promise of the PIH class of chelators,” **Current Medicinal Chemistry**. 10 : 1035-1049.

MØller, and others. (2005). “Iron acquisition Mechanisms of *Flavobacterium psychrophilum*,” **Journal of Fish Diseases**. 28 : 391-398.

Ratledge, C., and Dover, L. G. (2000). “Iron metabolism in pathogenic bacteria,” **Annual Review Microbiology**. 54 : 881-941.

Rioux, C., Jordan, D.C., and Rattray, J.B.M. (1983). “Colorimetric determination of catechol siderophore in microbial cultures,” **Analytical Biochemistry**. 133 : 163-169.

Sharma, N.K., Dey. S and Prasad, R. (2007). “In vitro antioxidant potential evaluation of Euphorbia hirta L,” **Phamacology online**. 1 : 91-98.

Shinozaki Y. (2004). “Inhibition of matrix metalloproteinase-2 activity by siderophores of Pseudomonas species,” **Applied Microbial and Cell physiology**. 64 : 840-847.

Siddiqui, M.W., Bansal, V. and Prasad, K. (2017). **Plant Secondary Metabolites V2**. New Jersey : Apple Academic Press, Inc.

Stevens, E. (2013). **Medicinal Chemistry the Modern Drug Discovery Process**. Boston : Pearson Education, Inc.