



การแยกเชื้อ Actinomycetes ที่มีศักยภาพสูงต่อการผลิตสารปฏิชีวนะ



นางสาวกิตติคุณ  
นายณรงค์ชัย  
นางสาววลีย์  
นางสาววิรวรรณ

แน่นอน  
ประกายกรวิริยะ  
จันทวิบูลย์  
ไชยรส

๒๐๙.

๓๖๗๓  
๒๕๓๕

612522296 /


เลขที่.....  
เลขทะเบียน.....  
วัน,เดือน,ปี.....

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต  
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์  
คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
ปีการศึกษา 2535 ✓

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Isolation of Actinomycetes for antibiotic product**

Miss Kittinut Nanna  
Mr. Narongchai Prapakornwiriya  
Miss Walee Juntaviboon  
Miss Weerawanna Chaiyarod



A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the  
Requirement for the Degree of Bachelor of Science  
Department of Applied Biology  
Faculty of Science  
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang  
1991

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีกรณีนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ การแยกเชื้อ Actinomyceles ที่มีศักยภาพสูงต่อการผลิตสารปฏิชีวนะ

โดย นางสาวกัตต์นุช แน่นหนา  
นายณรงค์ชัย ประภากรวิริยะ  
นางสาววีย์ จันทวิบูลย์  
นางสาววิรวรรณ ไชยรส  
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์  
อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์อรรถไพ สุขเจริญ

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
อนุมัติให้โครงการพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
วิทยาศาสตร์บัณฑิต  
ลายเซ็น


  
-----  
( ผศ.เนาวรัตน์ บานแยม ) หัวหน้าภาค

คณะกรรมการโครงการพิเศษ

  
-----  
( ผศ.เนาวรัตน์ บานแยม ) ประธานกรรมการ

  
-----  
( รศ.ดร.ดูนjai ชนะบริพัฒนา ) กรรมการ

  
-----  
( อ.สุนเรื้อน สิริวานิชกุล ) กรรมการ

  
-----  
( อ.อไรไพ สุขเจริญ ) กรรมการ

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

เอกสารนี้เป็นสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การแยกเชื้อ	Actinomycetes	ที่มีศักยภาพ
	สูงต่อการผลิตสารปฏิชีวนะ		
นักศึกษา	นางสาวกิตติณัฐ	แน่นอนนา	
	นายพรศักดิ์ชัย	ประภากรวิริยะ	
	นางสาววลัย	จันทวิบูลย์	
	นางสาววิจรรวณา	ไศยรส	
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์อรไท	สุขเจริญ	
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์		
ปีการศึกษา	2535 ✓		

## บทคัดย่อ

การศึกษานี้เป็นการแยกและคัดเลือกรหัสเชื้อแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตสารปฏิชีวนะซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและยีสต์จากดินในประเทศไทยได้จำนวน 80 สายพันธุ์ ซึ่งอาหารที่เชื้อแอคติโนมัยสิทเจริญได้ดีคือ Yeast - starch agar (YSA) เมื่อนำเชื้อทั้งหมดมาคัดเลือกรหัสที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้ในปริมาณสูงที่สุดคือเชื้อรหัส Z<sub>1</sub> ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากดินเขตเขาวังฝั่งแม่น้ำ ล. เมือง จ. ฉะเชิงเทรา เมื่อหมักเชื้อนี้ในอาหารเหลว Glucose soybean medium (GSM) ที่อุณหภูมิ 28° ซ. บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เชื้อรหัส Z<sub>1</sub> สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้สูงสุดในวันที่ 7

เชื้อแอคทีโนมัยสิตรัส  $Z_1$  สามารถจัดจำแนกอยู่ในสกุล Streptomyces โดยใช้การทำกิน์เลเยอร์โครมาโตกราฟี ตามวิธีของ Joseph, Stanek และ Glenn D. Roberts. โดยเชื้อรัส  $Z_1$  นี้จะมีทั้งเซลล์เป็นสารพวก L -diaminopimelic acid เช่นเดียวกับเชื้อในสกุล Streptomyces อื่น ๆ

สารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยเชื้อ  $Z_1$  มีผลต่อการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี โดยเฉพาะเชื้อ Staphylococcus aureus TISTR 118 และละลายได้ดีในน้ำกลั่น และมีความคงตัวที่พีเอช 2 - 8 ที่อุณหภูมิห้อง โดยเฉพาะที่พีเอช 4 สารปฏิชีวนะจากเชื้อรัส  $Z_1$  จะคงตัวได้มากที่สุด

จากการแยกสารปฏิชีวนะออกจากสิ่งเจือปนโดยวิธี ซิลิกาเจลกิน์เลเยอร์โครมาโตกราฟี พบว่า ตัวทำลายที่เหมาะสมต่อการแยกสารปฏิชีวนะจากเชื้อรัส  $Z_1$  คือสารละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรฟอสเฟตความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ โดยตำแหน่งของสารปฏิชีวนะดังกล่าวอยู่ที่ Rf 0.5 ซึ่งสารปฏิชีวนะที่ได้จากการแยกสิ่งเจือปนโดยวิธีซิลิกาเจลกิน์เลเยอร์โครมาโตกราฟี สามารถแยกออกมา และนำไปวิเคราะห์สูตรโมเลกุลโดยใช้เครื่อง Nuclear Magnetic Resonance (NMR) ซึ่งสูตรโมเลกุลที่ได้เป็นสารพวกอะมิโนกลัยโคไซด์ (aminoglycosides)

Special Project Title      Isolation of Antibiotics from  
Actinomycetes

Name                      Miss Kittinut      Nanna  
                                 Mr. Narongchai   Prapakornwiriya  
                                 Miss. Walee        Juntaviboon  
                                 Miss. Weerawanna   Chaiyarod

Special Project Advisor      Miss Oratai   Sukcharoen

Department                      Applied   Biology

Academic Year                      1992

ABSTRACT

Eighty six isolates of actinomycetes from soil in Thailand were found to be able to produce antibiotic on solid medium at room temperature. Solid media for obtimization growth is Yeast starch agar (YSA). All of the isolates were screened for antibiotic production in solid media by using Glucose peptone meat extract agar (GPMA). The isolate no. Z<sub>1</sub> could produce high quantity of antibiotic. This isolate was collected from black clay near the river of Muang district, Chachoengsao province. Actinomycetes no. Z<sub>1</sub> cultured in Glucose soybean media (GSM), with shaking speed of 200 rpm. at 28° C produced high yield of antibiotic after 7 days of incubation.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Actinomyces no. Z<sub>1</sub> classified as Streptomyces by thin layer Chromatography method of Joseph, Staneck and Glenn D. Roberts. The cell wall of Actinomycetes no. Z<sub>1</sub> was composed of L - diaminopimelic acid.

Antibiotic produced by Actinomycetes no. Z<sub>1</sub> inhibited grampositive bacteria especially Staphylococcus aureus TISTR 118. Soluble organic solvent for this antibiotic was butanol. This antibiotic was stable at pH. 2-8 (especially at pH 4).

Purification of antibiotic by Silica gel thin layer Chromatography revealed that the antibiotic of Z<sub>1</sub> showed one spot with Rf value 0.50 with 15%KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 4.4 Antibiotic at this Rf value was analyzed for molecular structure by Nuclear Magnetic Resonance (NMR). Molecular structure of antibiotic of Z<sub>1</sub> is aminoglycosides.

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษนี้ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต คณะผู้จัดทำ ขอขอบพระคุณ อาจารย์อรไท สุขเจริญ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษที่ให้คำแนะนำรวมทั้งให้ความรู้ในด้านต่าง ๆ รศ.ดร.ดุชนิ จนะบริพันธ์ ที่ได้กรุณาตรวจแก้ทางด้านภาษาและให้คำแนะนำต่าง ๆ ผศ. เนาวรัตน์ ปานแย้ม ที่ได้กรุณาเรื่องสถานที่และเครื่องมือการทดลอง อาจารย์อ่อนเรือน ศิริวานิชกุล กรรมการพิจารณาโครงการพิเศษ ดร.มาริสา อรัญชัยยะ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำเรื่อง Nuclear Magnetic Resonance คุณศุภลักษณ์ ตันทาทิชาติ ที่กรุณาอ่านสูตรโครงสร้างจากกราฟของ Nuclear Magnetic Resonance คุณประพนธ์ ศรีนวัตติวงศ์ และเพื่อน ๆ ที่ให้ความร่วมมือในระหว่างการจัดทำโครงการพิเศษนี้จนเสร็จสมบูรณ์

8 มีนาคม 2536

คณะผู้จัดทำ

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาไทย	ก
บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญรูป	จ
บทที่ 1 บทนำ	1
- วัตถุประสงค์	2
- ขอบเขต	2
- ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักเกณฑ์ที่เกี่ยวข้อง	4
- ลักษณะและธรรมชาติของ เชื้อแอกติโนมัยสิท	4
- การเจริญของ เซลล์และการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะ	11
- ปัจจัยในการคัดเลือกสิ่งมีชีวิตที่ผลิตสารปฏิชีวนะและการตรวจสอบหาสารปฏิชีวนะ	21
- ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารปฏิชีวนะ	23
- สภาพที่เหมาะสมของการเลี้ยง เชื้อจุลินทรีย์เพื่อการผลิตสารปฏิชีวนะ	29
บทที่ 3 การดำเนินการวิจัย	32
- อุปกรณ์ที่ใช้	32
- วิธีดำเนินการทดลอง	33
บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์	42
- การแยกและคัดเลือกเชื้อแอกติโนมัยสิทที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะบนอาหารแข็ง	42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	หน้า
- การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสิทธิ์ที่สามารถผลิตสาร ปฏิชีวนะบนอาหารแข็ง	49
- การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสิทธิ์ที่สามารถผลิตสาร ปฏิชีวนะในอาหารเหลว	51
- การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการ ผลิตสารปฏิชีวนะของเชื้อแอคติโนมัยสิทธิ์ที่คัดเลือกได้	54
- การจัดจำแนกเชื้อแอคติโนมัยสิทธิ์รหัส Z <sub>1</sub> ที่คัดเลือกได้	57
- การศึกษาเบื้องต้นในการแยกสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดย เชื้อแอคติโนมัยสิทธิ์รหัส Z <sub>1</sub> ออกจากสิ่งเจือปน	60
บทที่ 5 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ	66
ภาคผนวก ก	
เอกสารอ้างอิง	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงชนิดของสารปฏิชีวนะที่สังเคราะห์จากเชื้อในสกุล <u>Streptomyces</u> sp.	9
ตารางที่ 2 แสดงจำนวนเชื้อแอกติโนมัยลิตที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะ บนอาหารแข็งซึ่งแยกได้จากแหล่งต่าง ๆ	42
ตารางที่ 3 แสดงเปรียบเทียบจำนวนเชื้อแอกติโนมัยลิตกับจำนวนเชื้อ จุลินทรีย์ทั้งหมดที่เจริญบนอาหารแข็ง AGS, YSA และ GCA ในดินที่ลุ่มมา 10 ตัวอย่าง	44
ตารางที่ 4 แสดงการเปรียบเทียบความสามารถในการเจริญเติบโต ของเชื้อแอกติโนมัยลิต เมื่อเลี้ยงในอาหารแข็ง YSA ที่อุณหภูมิ 27° ซ, 45° ซ และอุณหภูมิห้อง	46
ตารางที่ 5 แสดงการเปรียบเทียบความสามารถของเชื้อแอกติโนมัยลิต ที่สามารถเกิดบริเวณยับยั้งการเจริญ (Inhibition zone) ของเชื้อทดสอบ เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง GPMA และบ่มที่ อุณหภูมิห้อง	50
ตารางที่ 6 แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิตสารปฏิชีวนะ ของเชื้อแอกติโนมัยลิตโดยวิธีไบโอแอสเซย์ เมื่อมี <u>Staphylococcus aureus</u> TISTR 118 เป็นเชื้อทดสอบ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว GSM เป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิห้อง	52

	หน้า
ตารางที่ 7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตสาร ปฏิชีวนะของเชื้อแอสคิโนมัลลิทรหัส $Z_1$ โดยวิธี ไบโอสเซย์ (bioassay) ซึ่งใช้เชื้อ <u>Staphylococcus aureus</u> TISTR 118 เป็น เชื้อทดสอบ	55
ตารางที่ 8 แสดงการจัดจำแนกเชื้อแอสคิโนมัลลิทรหัสโดยทินน์เลเยอร์ โครมาโตกราฟี	57
ตารางที่ 9 แสดงความสามารถในการละลายของสารปฏิชีวนะที่ผลิต โดยเชื้อแอสคิโนมัลลิทรหัส $Z_1$ ในตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ	60
ตารางที่ 10 แสดงความสามารถในการสกัดสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยเชื้อ แอสคิโนมัลลิทรหัส $Z_1$ ในระดับพีเอชต่าง ๆ กัน โดยใช้ บิวทานอลเป็นตัวสกัด	61
ตารางที่ 11 แสดงค่า RF สำหรับสารปฏิชีวนะมาตรฐานกับสารปฏิชีวนะ รหัส $Z_1$ ในระบบตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ	62

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตสารปฏิชีวนะของเชื้อแอคติโนมัยสิตรหัส Z <sub>1</sub>	56
รูปที่ 2 การแยกสาร DAP โดยทินน์เลเยอร์โครมาโตกราฟี	58
รูปที่ 3 แบบแผนของการแยกสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยเชื้อแอคติโนมัยสิตรหัส Z <sub>1</sub> ออกจากสิ่งเจือปนโดยวิธีซิลิกาเจล-ทินน์เลเยอร์โครมาโตกราฟี โดยใช้แบบตัวทำละลายที่เหมาะสม	64
รูปที่ 4 แสดงสูตรโครงสร้างของสารปฏิชีวนะที่ได้จากเชื้อรหัส Z <sub>1</sub>	65
รูปที่ 5 ลักษณะของเชื้อที่บริสุทธิ์แล้ว เมื่อเลี้ยงบนอาหารผิวเอียง	67
รูปที่ 6 วิธีคัดเลือกเชื้อโดยวิธี Cross streak plate	67
รูปที่ 7 การตรวจหาความสามารถของเชื้อแอคติโนมัยสิทในการยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่น ๆ	68
รูปที่ 8 วิธีการทำไบโอเอสเซย์	68

รูปที่ 9 ลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยสิทที่คัดเลือกได้เมื่อเลี้ยงในอาหาร GSM

68

รูปที่ 10 การแยกสารปฏิชีวนะที่ผลิตได้ออกจากสิ่งเจือปนโดยวิธีทินน์เลเยอร์โครมาโทกราฟี

69



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 1

### บทนำ

ปัจจุบันจุลินทรีย์มีบทบาทต่ออุตสาหกรรมทางชีวภาพ (bioindustry) ทั้งนี้เพราะมีผลิตภัณฑ์หลายชนิดที่ได้มาจากกระบวนการสังเคราะห์ของจุลินทรีย์ เช่น กรดอะมิโน เอนไซม์ ยาปฏิชีวนะ ออร์โมน เป็นต้น และในบรรดาจุลินทรีย์ทั้งหลาย Streptomyces sp. เป็นจุลินทรีย์ในกลุ่ม Actinomycetes ที่มีความสำคัญยิ่งในทางอุตสาหกรรม เนื่องจากเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารที่เป็นประโยชน์หลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ยาปฏิชีวนะ (antibiotics) ซึ่งพบว่า 70-80 % ของยาปฏิชีวนะในปัจจุบันนี้ผลิตมาจาก Streptomyces sp.(1) เช่น เตตราไซคลิน (tetracycline) กานามัยซิน (kanamycin) เป็นต้น ซึ่งเชื่อกันว่าพบอยู่ทั่วไปในธรรมชาติโดยเฉพาะในดิน แต่เนื่องจากการสำรวจหาและแยกเชื้อ Streptomyces sp. จากดินในประเทศไทยเพื่อนำมาศึกษาวิจัยและนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์นั้นยังมีน้อยมาก ดังนั้นในการวิจัยนี้มีจุดประสงค์ที่ว่า การแยกเชื้อ Streptomyces sp. จากตัวอย่างดินในประเทศไทย เพื่อหาสารปฏิชีวนะที่มีศักยภาพสูงเพื่อใช้ในประโยชน์ทางแพทย์ อีกทั้งยังเป็นฐานข้อมูลและแหล่งรวบรวมเชื้อ Streptomyces sp. สายพันธุ์อื่นๆ ที่แยกได้เพื่อนำไปใช้ในงานวิจัยทางด้านอื่นๆต่อไป

## วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดเลือกและแยก Actinomyces sp. ที่มีศักยภาพสูงต่อการผลิตสารปฏิชีวนะ
2. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารปฏิชีวนะที่เชื้อ Actinomyces sp. ผลิต
3. ศึกษาวิธีวิเคราะห์ชนิดและโครงสร้างตลอดจนคุณสมบัติบางประการของสารปฏิชีวนะตัวใหม่ที่ได้
4. จำแนกชนิดของ Actinomyces sp. ที่คัดเลือกได้

## ขอบเขต

เป็นการศึกษาหาเชื้อ Actinomyces sp. จากดินในประเทศไทยที่มีศักยภาพสูง ในการผลิตสารปฏิชีวนะ รวมถึงการแยกและศึกษาคุณสมบัติของสารปฏิชีวนะที่ผลิตได้ ตลอดจนการศึกษาถึงชนิด และลักษณะของสารดังกล่าวด้วย

## ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เป็นฐานข้อมูลสำหรับการนำ Actinomyces sp. สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่แยกได้ไปเลือกใช้ให้เกิดประโยชน์
2. สามารถหาสารปฏิชีวนะตัวใหม่ เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ขั้นตอนในการดำเนินการ

1. แยกเชื้อ Actinomycetee sp. จากตัวอย่างดินในประเทศไทย
2. แยกชนิดของ Actinomycetee sp. ตามอนุกรมวิธานที่เหมาะสมต่อการเจริญ
3. ทดสอบศักยภาพของการผลิตสารปฏิชีวนะของ Actinomycetee sp. ต่อเชื้อจุลินทรีย์ที่ทดสอบโดยมีเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบคือ
  - Staphylococcus aureus TISTR 118
  - Escherichia coli TISTR 527
  - Aspergillus niger TISTR 33349
  - Saccharomyces carlsbergensis TISTR 5203
  - Candida albicans TISTR 5239
4. คัดเลือกเชื้อ Streptomycetee sp. ที่มีศักยภาพสูงต่อการผลิตสารปฏิชีวนะมาศึกษาชนิดของสารปฏิชีวนะที่ผลิตได้
  - 4.1 ศึกษาชนิดของสารละลายอินทรีย์ (Organic solvent) คือ Chloroform , Butanol , Hexane , Benzene ความเป็นกรดเป็นด่างในช่วงที่เหมาะสมต่อการแยกและการสกัดสารปฏิชีวนะที่ผลิตได้
  - 4.2 แยกและทำให้สารปฏิชีวนะที่ได้ มีความบริสุทธิ์เพื่อศึกษาชนิดและโครงสร้างของสารปฏิชีวนะที่ได้ โดยวิธี Bioautography TLC NMR
5. ศึกษาคุณสมบัติต่างๆของ Actinomycetee sp. เช่น ศึกษาสัณฐานของเส้นใย สปอร์ และตรวจสอบโครงสร้างของ Actinomycetee sp.

## บทที่ 2

การตรวจเอกลักษณ์ที่เกี่ยวข้อง  
ลักษณะและธรรมชาติของเชื้อแอคทีโนมัยสิท

แอคทีโนมัยสิทเป็นแบคทีเรียที่อยู่ใน Order Actinomycetales ซึ่งประกอบด้วย 8 ตระกูล คือ Actinomycetaceae | Micromonosporaceae | Actinoplanaceae | Dermatophilaceae | Frankiaceae | Mycobacteriaceae | และ Streptomycetaceae (Buchanan and Gibbons, 1974)

โดยแบคทีเรียในกลุ่ม Actinomycetales นี้จะเป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างเส้นใยได้แต่ลักษณะจะบางกว่าเชื้อรา ในบางตระกูลพบว่า การสร้างสปอร์จะเกิดบนเส้นใยที่เจริญอยู่นอกอาหาร (aerial hypha) หรือ บางที่อาจสร้างสปอร์บนเส้นใยที่เจริญอยู่บนอาหาร (substrate hypha) อาจมีลักษณะเป็นคู่หรือต่อกันเป็นสายที่มีจำนวนสปอร์ต่างๆกัน สายสปอร์อาจมีลักษณะตรงเป็นวงหรือขดเป็นเกลียว และยังอาจพบสายสปอร์ที่เกิดเดี่ยวๆ นอกจากนี้ในบางตระกูลมีสปอร์เกิดใน sporangium (Buchanan and Gibbons, 1974) สำหรับตระกูล Streptomycetaceae สกุล Streptomyces sp. มีบางสายพันธุ์สามารถสร้าง sclerotia หรือ pyrenidia ที่คล้ายเชื้อรา โดยขึ้นอยู่กับส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะของการเจริญ (Cross and Goodfellow, 1973)

แอคทีโนมัยสิทโดยปกติแล้วจะเป็นแบคทีเรียแกรมบวก. แต่อาจเปลี่ยนแปลงไปตามอายุของเชื้อสมาชิกบางตัวของตระกูล Nocardiaceae เป็น (weakly acid-fast) แต่สำหรับพวก mycobacteria จะเป็น พวกทนครด แบคทีเรียใน order นี้จะเป็น aerobic ยกเว้นบางสกุลในตระกูล Actinomycetaceae ซึ่งอาจเป็น anaerobic | facultative anaerobic หรือ aerobic สำหรับเบสใน DNA ของแอคทีโนมัยสิทจะมีเปอร์เซ็นต์ของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Guanine และ Cytosine อยู่ในช่วงระหว่าง 63 ถึง 78 เปอร์เซ็นต์

ลักษณะที่บ่งชี้ว่าแอกทิโนมัยสิทไม่ใช่เชื้อรา คือไม่มี nuclear membrane และ mitochondria (Cross and Goodfellow , 1973) นอกจากนี้ผนังเซลล์ยังประกอบด้วย mucopeptide (N - acetylglucosamine) เชื่อมกับ (N-acetyl muramic acid ); L-2,6-diamino pimelic acid ; glutamic acid ; glycine และ alanine (Dris , 1959 ; Waskman and Henrici , 1974 ) ส่วนผนังเซลล์ของเชื้อราจะประกอบด้วย glucans ; mannans และ chitins (Cummins , 1984 ) นอกจากนี้ แล้วผนังเซลล์ ของแอกทิโนมัยสิท ยังมีแบบแผนของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ต่างกันซึ่งใช้ในการจำแนก genera ได้ด้วย ( Yamaguchi , 1965 ; Buchanan and Gibbons , 1974 ; Davis , 1959 ; Waskman and Henrici , 1974 )

ในกลุ่มของแอกทิโนมัยสิทนี้จะมี Streptomycetaceae เป็นตระกูลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมากที่สุด เนื่องจากสามารถผลิตสารปฏิชีวนะที่เป็นประโยชน์จำนวนมาก โดยเฉพาะ Streptomyces sp. ( Kurylowicz , 1967 ) นอกจากนี้แล้วยังสามารถผลิตวิตามิน เอนไซม์ รงควัตถุได้อีกด้วย แต่เชื่อนี้จะมีการเปลี่ยนแปลงได้ง่าย เนื่องมาจากการกลายพันธุ์หรือสภาพการเจริญซึ่งเกี่ยวข้องกับส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อ สภาพความเป็นกรดเป็นด่าง อุณหภูมิและอายุของเชื้อและสภาวะต่างๆเหล่านี้ ยังอาจมีอิทธิพลต่อสีของเส้นใย (Krasil' Nikor, 1960 ) , การสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ ( Kutzner and Wakeman , 1972 ) , ความสามารถในการสร้างสปอร์ รวมทั้งลักษณะวิทยาของผิวสปอร์ (Hedgkies , 1965 ) โดยเฉพาะอย่างยิ่งความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะ (Perlman and O' Brien , 1954 ) เชื้อในสกุล Streptomyces sp. สามารถสร้างเส้นใยแบบไม่มีผนังกัน ( coenocytic hyphae ) เจริญได้ทั้งในอาหาร และเหนืออาหารเลี้ยงเชื้อผนังเซลล์เป็นชนิดที่ 1 ( cell wall type 1 ) เปอร์เซ็นต์ Guanine และ Cytosine ใน DNA อยู่ระหว่าง 69-73 เปอร์เซ็นต์ เส้นใยโดยมากจะมีเส้นผ่าศูนย์กลางระหว่าง 0.5 ถึง 1 ไมโครเมตร โคลินิจจะมีขนาดเล็กเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1-10 มิลลิเมตร สร้างสปอร์แบบสายโซ่ pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 6.5-8.0 ถูกยับยั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเจริญ โดยสารต่อต้านแบคทีเรียบางชนิด เช่น penicillin ; tetracycline เป็นต้น (Davis et al., 1973) สำหรับการจำแนกชนิด (species) ของ Streptomyces sp. ตามลักษณะโดยละเอียดที่แตกต่างกัน ไปตามวิธีมาตรฐาน ในการศึกษาของ Shirling และ Gottlieb (1966, 1969) และ Buchanan และ Gibbons (1974) ซึ่งมีหลักทั่วไปดังนี้

### ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

1. สีของกลุ่มสปอร์ที่เจริญเต็มที่แล้ว จำแนกชื่อเป็น 7 กลุ่มตามสีของสปอร์ ซึ่งอยู่บนเส้นใยที่เจริญอยู่เหนืออาหารเมื่อเจริญเต็มที่แล้ว ได้แก่ สีขาว สีเทา สีเหลือง สีแดง สีนํ้าเงิน สีเขียว และสีม่วง
2. สัณฐานวิทยาของสายสปอร์ แบ่งเป็น 2 ลักษณะ คือ
  - 2.1 Rectus Flexibilis (RF) สายสปอร์มีลักษณะตรงหรือโค้งงอ
  - 2.2 Spiral (S) สายสปอร์มีลักษณะเป็นเกลียว แบ่งเป็น
    - 2.2.1 Rectinaculum Apertum ลักษณะของสายสปอร์เป็นรูปของวงกลมเปิดหรือขดเป็นวงซ้อนกัน ในลักษณะที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางกว้าง ( 5 - 10 ไมครอน )
    - 2.2.2 Spira เป็นสายสปอร์แบบสั้นๆ ที่ขดเป็นวงซ้อนกันขนาดเล็ก (compact coils) หรืออาจมีขนาดยาวก็ได้
3. ลักษณะผิวสปอร์เมื่อดูจากกล้องจุลทรรศน์ จำแนกได้ 4 ลักษณะคือ ผิวเรียบ (smooth) ผิวขรุขระ (warty) ผิวเป็นหนาม (spiny) และผิวมีขน (hairy)

## ลักษณะการเจริญและสรีรวิทยา

1. การสร้าง melanoid pigment เป็นรงควัตถุที่ละลายน้ำ สีน้ำตาล น้ำตาลเข้ม หรือดำ เชื่อสามารถสร้างสีขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อประเภทสารอินทรีย์ที่มีโปรตีน หรืออนุพันธ์ของโปรตีนเป็นส่วนประกอบอยู่ด้วย
2. การใช้แหล่งอาหารคาร์บอน สารประกอบคาร์บอน ได้แก่ D - glucose, D- xylose, L - Arabinose , D - fructose , D - galactose , D - manitol , Inositol และ Sucrose
3. การใช้แหล่งอาหารไนโตรเจน เช่น คีตาจากการรีดิวซ์ไนเตรต การย่อยโปรตีนในน้ำนม เป็นต้น
4. การสร้างสารประกอบเคมีที่จำเพาะ ได้แก่ ความสามารถในการสร้างวิตามิน เอนไซม์ และสารปฏิชีวนะ ซึ่งพบว่าเชื้อ Streptomyces sp. สามารถผลิตสารประกอบเคมีที่สำคัญหลายชนิดโดยเฉพาะสารปฏิชีวนะ

### นิเวศวิทยาและการแยก Streptomyces sp.

แม้ว่าจะมีเพียงบาง species ของ Streptomyces sp. ที่พบในพืชน้ำแต่โดยมากแล้วจะพบในดิน ซึ่งความจริงแล้วกลิ่นเฉพาะตัวในดินนั้นเกิดจากการผลิตสารของ Streptomyces sp. ในดิน ซึ่งสารนี้จะเป็นพวก terpenoid ซึ่งเป็นพวกสารประกอบคาร์บอนที่มีลักษณะไม่อิ่มตัว ( unsaturated ring ) ดินที่เป็นกลางและด่างจะเหมาะสมต่อการเจริญของ Streptomyces sp. มากกว่าดินที่เป็นกรด นอกจากนี้แล้ว Streptomyces sp. ยังใช้น้ำในการเจริญน้อยกว่าแบคทีเรียในดินชนิดอื่น สำหรับการแยก Streptomyces sp. จะใช้สารละลายของดินที่ใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้วทำการแยกเชื้อโดย เทคนิค spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ และบ่มที่ 25°ซ ซึ่งจะเห็นได้ว่ามีการสร้างเม็ดสีให้เห็นโดยเม็ดสีที่ผลิตจากสปอร์ไปยังอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเม็ดสีที่สร้างขึ้นจะมีมากมาย นอกจากนี้แล้วโคโลนิมีลักษณะค่อนข้างกลมแต่ขอบจะหยักเล็กน้อย (Waksman, 1959)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารปฏิชีวนะจาก Streptomyces sp.

การสร้างสารปฏิชีวนะของเชื้อจุลินทรีย์สามารถสังเกตได้จากการเกิดขอบเขตของการยับยั้ง ( Zone of inhibition ) ที่มีผลต่อแบคทีเรียอื่น . เชื้อจุลินทรีย์บางชนิดจะมีการผลิตสารปฏิชีวนะได้มากกว่าหนึ่งชนิด แต่สารปฏิชีวนะชนิดเดียวอาจมีหลาย species ที่สามารถสร้างได้เช่นเดียวกัน สำหรับชนิดของสารปฏิชีวนะที่สร้างจาก Streptomyces sp. สามารถสรุปได้ดังแสดงในตารางที่ 1



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 ชนิดของสารปฏิชีวนะที่สังเคราะห์จากเชื้อในสกุล

Streptomyces sp.

ลักษณะทางเคมี	ชื่อสารปฏิชีวนะ	ผลิตโดย	เชื้อจุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์ ในการยับยั้ง
Aminoglycoside	Streptomycin	<u>S. griseus</u>	แบคทีเรียแกรมลบ ส่วนมาก
	Spectinomycin		
	Neomycin	<u>S. fradiae</u>	
Tetracyclines	Tetracycline	<u>S. aureofaciens</u>	Board spectrum
	Chlortetracycline		
Macrolides	Erythromycin	<u>S. erythraeus</u>	Board spectrum
	Clindamycin	<u>S. lincolnensis</u>	
Polyenes	Nystatin	<u>S. noursei</u>	รา โดยเฉพาะ <u>Candida</u>
	Amphotericin B	<u>S. nodus</u>	รา
None	Chloramphenicol	<u>S. venezuelae</u>	Board spectrum

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ปฏิกิริยาการสร้างและสลายสารขึ้นปฐมภูมิ และ สารขึ้นทุติยภูมิ

Primary metabolism เป็นกระบวนการที่จำเป็นสำหรับสิ่งมีชีวิตทุกชนิดเนื่องจากเกี่ยวข้องกับ catabolic , amphibolic และ anaerobic pathway ซึ่งกระบวนการเหล่านี้ ทำให้เกิดการสังเคราะห์ตัวกลาง (biosynthetic intermediates ) พลังงานและการเปลี่ยนสารเริ่มต้น (precursors ) ไปเป็นโมเลกุลใหญ่ที่จำเป็น เช่น กรดนิวคลีอิก (deoxyribonucleic acid และ ribonucleic acid ) โปรตีน ไขมัน และ พอลิแซ็กคาไรด์ ( Martin and Demain , 1980 ) Secondary metabolism เป็นกระบวนการที่ไม่เกี่ยวข้องหรือจำเป็นสำหรับการเจริญของสิ่งมีชีวิตนั้น ถึงแม้จะช่วยในการอยู่รอดก็ตาม ( Bu'Lock , 1961 ) ผลผลิตที่ได้จาก Secondary metabolism เรียกว่า Secondary metabolites หรือ Idiobolites (Walker, 1974 ) มีหลายชนิดได้แก่ amino sugar , quinones , coumarins , epoxides , ergot alkaloids , glutarimides , glucosides , indole derivatives , lactones , macrolides , naphthalenes , nucleosides , peptides , phenazines , polyacetylenes , polyenes , pyrroles , quinolines , terpenoids , tetracyclines , และ Antibiotics เป็นต้นและ Secondary metabolites มักสร้างในช่วงการเจริญอย่างรวดเร็ว ( exponential phase ) ของสิ่งมีชีวิตเกือบสิ้นสุดลงซึ่งเป็นลักษณะสำคัญของ Secondary metabolism ( Martin and Demain , 1980 ) Secondary metabolites จะมีส่วนประกอบเป็นอย่างไรจะขึ้นอยู่กับเอนไซม์ และปัจจัยของสิ่งแวดล้อมที่เกี่ยวข้อง เนื่องจากเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับ Secondary metabolism มีความจำเพาะต่ำ ( low specificity ) ทำให้การสังเคราะห์ เป็นไปได้หลาย pathways จึงทำให้ผลผลิตสุดท้ายมีหลายชนิด แต่สำหรับ Primary metabolism แล้วจะมีความจำเพาะมากและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องก็จะจำเพาะต่อซับสเตรท (substrates) มากจึงเกิดผลผลิตเพียงชนิดเดียวซึ่งถ้ามีความผิดพลาด

ในการสังเคราะห์ส่วนประกอบของเซลล์ที่มีความสำคัญเกิดขึ้นเซลล์มักจะตาย แต่สำหรับ secondary metabolism แล้วจะไม่มีความสำคัญต่อเซลล์ แต่ได้สารเมตาโบไลต์ที่เปลี่ยนไป ( modified metabolites ) ซึ่งยังคงรักษาคุณสมบัติทางชีวภาพ ( biological activity ) ของสารนั้นไว้ได้

### การเจริญของเซลล์และการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะ

Bu Lock และคณะ ( 1975 ) ได้ใช้คำว่า Trophophase สำหรับเรียกกระยะการเจริญ ( growth phase ) และใช้ idiophase เรียกกระยะที่ผลิต Secondary metabolites หรือ idiolites เช่นสารปฏิชีวนะ การสังเคราะห์สารปฏิชีวนะ เริ่มขึ้นในช่วงสุดท้ายของระยะการเจริญที่มีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว ( exponential phase ) ของจุลินทรีย์ ในกรณีที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีธาตุอาหารเป็นส่วนประกอบอยู่น้อย ทำให้จุลินทรีย์เจริญช้าแต่ก็ยังสามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้บ้างและอัตราการเจริญ ( growth rate ) ของสิ่งมีชีวิตที่ผลิตสารปฏิชีวนะก็มีอิทธิพลบ้างเหมือนกันในแบบแผนของการผลิต เช่น ในการผลิตสารปฏิชีวนะหลายชนิด ได้แก่ chloramphenicol, colistin, penicillin และ bacitracin จะพบ trophophase idiophase dynamic เกิดขึ้นในการเจริญซึ่งจะช่วยสนับสนุนการเจริญ แต่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเจริญอย่างช้า ๆ พบว่า trophophase และ idiophase จะคาบเกี่ยวกัน ( overlap ) ( Haavik , 1974 a , 1974 b , Malik and Vinings , 1972 ) ในการเจริญของจุลินทรีย์ การสร้างสารปฏิชีวนะอาจจะเป็นประโยชน์ต่อการอยู่รอดเนื่องจากอาหารมีอย่างจำกัด ( Gottlieb , 1976 ) นอกจากนี้แล้วการสร้างสารปฏิชีวนะบางชนิด เช่น edeine , tyrocidines และ polymyxins จะเกิดในขณะที่มีการสร้างเอนโดสปอร์ในแบคทีเรียกลุ่มที่มีรูปร่างเป็นท่อน และสารบางชนิดที่เกิดขึ้นในขณะที่มีการสร้างโคินิเดีย ในพวกสเตรปโตมัยสิส ( Halvderson et al. 1972 , Demain and Pricet , 1972 )

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งสารเหล่านี้จะจำเป็นต่อการสร้างสปอร์หรืออาจเกี่ยวข้องกับการงอกของสปอร์ โดยสิ่งที่แสดงให้เห็น คือ การที่ Bacillus polymyxa สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสปอร์ ( asporogenic strain ) จะไม่ผลิต polymyxine และ สารที่ยับยั้งกระบวนการสร้างสปอร์สามารถยับยั้งการผลิตสารปฏิชีวนะในสายพันธุ์ ที่สร้างสปอร์ได้เหมือนกัน ( Paule , 1967 )

### การควบคุมการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะ

การควบคุมกระบวนการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ จุลินทรีย์นั้นสามารถเกิดขึ้นได้หลายรูปแบบ (Martin and Demain, 1980)

1. การควบคุมที่จุดเริ่มต้นของการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะ การสังเคราะห์สารปฏิชีวนะนั้นเกิดจากการแสดงออก ของสารพันธุกรรม (gene) ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ที่อยู่บนโครโมโซมและพลาสมิด (Hopwood, 1978) และการแสดงออกของสารพันธุกรรมนี้มักจะ ไม่เกิดขึ้นในขณะที่เซลล์มีอัตราการเจริญสูง โดยไม่มีการสร้างเอนไซม์ antibiotic synthetase หรือถ้าหากมีการสร้างเอนไซม์ก็มักจะมีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เกิดขึ้นด้วย สำหรับการควบคุมที่จุดเริ่มต้นของการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะ ได้แก่

1.1 Repression ของเอนไซม์ที่สังเคราะห์สารปฏิชีวนะเป็น การควบคุมการแสดงออกของสารพันธุกรรมโดยการขัดขวางการ Transcription ของ genetic information จาก deoxyribonucleic acid ไปยัง messenger ribonucleic acid หรือโดยการขัดขวางกระบวนการ translation ของข้อมูลจาก messenger ribonucleic acid ไปยัง antibiotic synthetase ทำให้ไม่เกิดการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะ ในปี ค.ศ. 1980 Martin และ Demain ได้พบว่าการสังเคราะห์ candicidin โดย Streptomyces griseus จะถูกกำหนด โดยปริมาณฟอสเฟต เนื่องจากฟอสเฟตสามารถยับยั้งการ Transcription ของ candicidin synthetase complex ในการผลิตสาร candicidin นั้นพบว่าจะเกิดสารนี้

ขึ้นภายในหลังจากการเลี้ยงเชื้อไปแล้ว 18 ชั่วโมง

1.2 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่สังเคราะห์สารปฏิชีวนะในกรณีการสร้างเอนไซม์นำหรับสังเคราะห์สารปฏิชีวนะเกิดขึ้นแล้ว แต่มีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ตัวอย่างเช่น การสังเคราะห์  $\beta$ -lactam antibiotics (penicillin N และ cephalosporin C) โดย Cephalosporium acremonium ซึ่งการสังเคราะห์จะเกิดขึ้นภายหลังการเจริญถึงขั้นสูงสุดแล้ว (Konnel and Demain, 1978) จากการศึกษา โดยใช้เซลล์ที่อยู่ในระยะพักตัว (resting cells) ในขณะที่มี cycloheximide อยู่ด้วยเพื่อป้องกันการสังเคราะห์โปรตีนของเซลล์ ผลปรากฏว่าในระยะ cephophase นั้นมีเอนไซม์ที่สังเคราะห์สารปฏิชีวนะ ( $\beta$ -lactam forming enzyme) อยู่ภายในเซลล์ในปริมาณสูงมากแต่การผลิตสารปฏิชีวนะเกิดขึ้นน้อยมากเนื่องจากการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (Konnel and Demain, 1978)

1.3 การยับยั้งใน branched pathway ที่นำไปสู่ primary metabolite และสารปฏิชีวนะ pathway ของการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะบางชนิดเป็น pathway ที่แตกแขนง โดยมี pathway เริ่มต้นแล้วแตกแขนงเป็น pathway ย่อย เพื่อสังเคราะห์ primary metabolite ในทางหนึ่ง และเพื่อสังเคราะห์ secondary metabolite ในอีกทางหนึ่ง ซึ่งในบางครั้งผลผลิตสุดท้ายที่เป็น primary metabolite จะย้อนกลับมายับยั้ง pathway เริ่มต้น จึงเป็นการยับยั้งการผลิตสารปฏิชีวนะซึ่งเป็น secondary metabolite ไปด้วย (Drew and Demain, 1977)

Masureker และ Demain (1972) รายงานว่าไลซีนจะยับยั้งกระบวนการผลิต penicillin ของ Penicillium chrysogenum เนื่องจากวิถีทางการสังเคราะห์ penicillin นั้นแตกแขนงมาจากวิถีทางการสังเคราะห์ไลซีนที่ขึ้น  $\alpha$ -aminoadipic (หรือ adenylyl- $\alpha$ -aminoadipic acid) Demain และ Masureker (1974) รายงานต่อไปอีกว่าไลซีนนั้นมีผลในการยับยั้งการทำงานของ homocitrate synthase ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัวแรกในวิถีทางการสังเคราะห์ไลซีนโดย Penicillium chrysogenum

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ตัวควบคุมภายในเซลล์ ( intracellular effectors ) ในการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะจะมีการควบคุมกระบวนการสังเคราะห์นั้นแบบหนึ่ง ซึ่งเกิดขึ้นโดยสารโมเลกุลเล็ก ๆ ที่มีบทบาทเป็น corepressor ที่หยุดยั้งการสร้างเอนไซม์ หรือเป็นสารยับยั้ง ซึ่งยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะ ดังนั้นต้องทำให้ corepressor หรือ inhibitor หดไปก่อนจึงจะมีการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะเกิดขึ้น การควบคุม โดยตัวควบคุมภายในเซลล์ ได้แก่

2.1 การควบคุมโดยคาร์บอนคาตาโบไลต์ ( carbon catabolite regulation ) โดยทั่วไปกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ แต่กลูโคสก็มีผลขัดขวางการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะหลายชนิด ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1 ( Martin and Demain , 1980 ) ในการศึกษาเกี่ยวกับอาหารที่ใช้สำหรับการผลิตสารปฏิชีวนะ มักจะพบว่าพอสิ้นชีพคาร์ไรต์ หรือออสโตรโคคคาร์ไรต์จะใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีกว่ากลูโคส ( Soltero and Johnson , 1959 ) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสและแหล่งคาร์บอนอื่นที่จุลินทรีย์นำมาใช้ได้ช้ากว่าอยู่ด้วยกัน พบว่าจะมีการใช้กลูโคสเกิดขึ้นก่อนในขณะที่ไม่มีการผลิตสารปฏิชีวนะ จากนั้นจึงมีการใช้แหล่งคาร์บอนอีกชนิดหนึ่งสำหรับการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะ ( Audhya and Russel , 1975 ; Gallo and Katz , 1972 ) การควบคุมโดยคาร์บอนคาตาโบไลต์ในจุลินทรีย์บางชนิดอาจเกิดขึ้นจากการใช้แหล่งคาร์บอนอื่นที่ใช้ได้รวดเร็วกว่ากลูโคส เช่น *Streptomyces niveus* ที่ผลิต novobioicin จะชอบใช้ซีเตไรท์มากกว่ากลูโคส และจะไม่มีการผลิต novobioicin ในระหว่างที่มีการใช้ซีเตไรท์ในการเจริญแต่ใน secondary phase ที่มีการใช้กลูโคสจะมีการผลิตเกิดขึ้น ( Kominek , 1972 )

กลไกในการควบคุมโดยคาร์บอนคาตาโบไลต์เป็นไปได้ 2 กรณี คือ

1) Carbon catabolite repression ทำให้ไม่มีการสร้างเอนไซม์ในการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะ เช่น การสังเคราะห์ actinomycin โดย *Streptomyces antibioticus* พบว่ากลูโคสทำให้เกิด catabolite repression ในการสร้าง phenoxazinone synthase ซึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์ phenoxazinone ring ของ actinomycin (Gallo and Katz, 1972) Satch และคณะ (1976) รายงานว่ากลูโคสก็ทำให้เกิด catabolite repression ในการสร้าง N-acetylkanamycin amidohydrolase ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกระบวนการสังเคราะห์ Kanamycin ของ Streptomyces kanamyceticus ด้วยเหมือนกัน

2) Carbon catabolite inhibition เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะ เช่น ผลเนื่องจากกลูโคสในการยับยั้งการสังเคราะห์ indolmycin ของ Streptomyces griseus ATCC 12648 (Hurley and Bialek, 1974)

2.2 การควบคุมโดยไนโตรเจนเมตาโบไลต์ (nitrogen metabolite regulation) แหล่งไนโตรเจนที่จุลินทรีย์นำไปใช้ได้อย่างรวดเร็วอาจจะเกี่ยวข้องกับการควบคุมการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะ แอมโมเนียไอออนที่ได้จากไนโตรเจนเมแทบอลิซึมนั้น โดยปกติจะสนับสนุนการเจริญของจุลินทรีย์ แต่ถ้ามีปริมาณมากเกินไปเกินความต้องการอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ก็จะมีผลควบคุมการทำงานของเอนไซม์หลาย ๆ ชนิด ที่เกี่ยวข้องในไนโตรเจนเมแทบอลิซึมในลักษณะ ammonium repression เอนไซม์ดังกล่าวที่พบในแบคทีเรียและเชื้อรา ได้แก่ glutamin synthetase (Meer et al., 1971; Hynes, 1974), niacinase (Prival et al., 1973) และ asparaginase (Resnick and Magasanik, 1976) เป็นต้น ทำให้ไม่เกิดผลผลิตสุดท้ายจากไนโตรเจนเมแทบอลิซึมเซลล์จะนำไปใช้ต่อไป และการสังเคราะห์สารบางชนิดต้องการสับสเตรทจากไนโตรเจนเมแทบอลิซึมด้วย เช่นการสังเคราะห์ Cephalosporin ของ Streptomyces clavuligerus การสร้าง Cephalosporine ส่วนใหญ่ได้มาจากกรดอะมิโน 3 ชนิด ได้แก่  $\alpha$ -aminoadipic acid, cysteine และ valine (Whitney et al., 1972) กรดอะมิโนเหล่านี้เป็นผลผลิตสุดท้ายจากไนโตรเจนเมแทบอลิซึมที่อาจจะเป็น pathway การสังเคราะห์ (biosynthetic pathway) หรือ pathway การทำลาย (degradative pathway) และ pathway เหล่านี้ก็มีการควบคุมได้โดยแอมโมเนีย ด้วยเหตุนี้จึงมีความเกี่ยว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อกั้นระหว่าง primary และ secondary metabolism ( Drew and Demain , 1977 ) Aharonowitz และ Demain (1977 ) พบว่าแอมโมเนียในปริมาณที่มากเกินความต้องการจะมีผลอย่างมากในการยับยั้งการสังเคราะห์ Cephalosporin โดย Streptomyces clavuligerus จึงอาจกล่าวได้ว่า การสังเคราะห์ cephalosporin นี้ มีการควบคุมโดยไนโตรเจนเมตาโบไลต์

จากการคัดเลือกแหล่งไนโตรเจนสำหรับการผลิตสารปฏิชีวนะใน chemically defined media มักพบว่าการใช้กรดอะมิโนที่ถูกลดได้อย่างช้า ๆ บนแหล่งไนโตรเจนจะทำให้การสังเคราะห์สารปฏิชีวนะดำเนินไปได้ดี ตัวอย่างเช่น L - proline เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิต streptomycin โดย Streptomyces griseus ( Dulancy , 1948 )

Smith และคณะ ( 1962 ) รายงานว่าการผลิต erythromycin โดย Streptomyces erythrus ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม จะเริ่มขึ้นเมื่อการเจริญของจุลินทรีย์เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ และกระบวนการสังเคราะห์ erythromycin จะดำเนินไปได้ตลอดเวลาที่มีแหล่งคาร์บอนอยู่ในปริมาณหนึ่ง แต่ถ้าเติมซูโครส กลูโคส มอลโทส หรือ ฟรักโทส ลงในกระบวนการหมักที่มีการใช้น้ำตาลหมดไปแล้ว จะมีผลกระตุ้นการผลิต erythromycin แต่ถ้าเติมแหล่ง ไนโตรเจนชนิดใดชนิดหนึ่ง ( เช่น กากถั่วเหลือง แอมโมเนียมคลอไรด์ หรือ glycine ) ลงไปจะทำให้การผลิต erythromycin ลดลง

2.3 การควบคุมโดยฟอสเฟต ( phosphate regulation ) โดยทั่วไปแล้วความเข้มข้นของฟอสเฟตในช่วง 0.3 - 300 มิลลิโมลาร์ จะสนับสนุนการเจริญของเซลล์ได้อย่างดี แต่ในช่วงความเข้มข้นเท่ากับหรือมากกว่า 10 มิลลิโมลาร์ จะยับยั้งการผลิตสารปฏิชีวนะหลายชนิด เช่น novobiocin ( Streptomyces niveus ) , oxytetracycline ( Streptomyces rimosus ) และ Streptomycin ( Streptomyces griseus ) เป็นต้น ( Martin , 1977 | Weinberg , 1973 ) การเติมฟอสเฟตไม่เพียงแต่ขัดขวางกระบวนการผลิตสารปฏิชีวนะเท่านั้น แต่ภายหลังจากการเติมหลาย ๆ ชั่วโมง ยังเป็นเหตุให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์ที่กำลังผลิตสารปฏิชีวนะซึ่งอยู่ในลักษณะไม่เจริญต่ออีกแล้ว ( nongrowing cells ) กลับมาเจริญได้อีก ทำให้เกิด catabolism ขึ้นและไม่มีการผลิตสารปฏิชีวนะ ( Liu et al., 1975 )

การควบคุมการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะโดยอินทรีย์ฟอสเฟตอาจเกิดขึ้นในลักษณะ inhibition หรือ repression ตัวอย่างเช่น การสังเคราะห์ streptomycin ของ Streptomyces griseus เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมแต่ประกอบด้วยอินทรีย์ฟอสเฟตในปริมาณมากเกินไปเกินความต้องการ ( 10 มิลลิโมลาร์ ) พบว่าการละลาย streptomycin - phosphate ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ streptomycin และเกิดการสูญเสียคุณสมบัติทางชีวภาพ ของ streptomycin - phosphatase ทั้งนี้เนื่องจากเกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ โดยอินทรีย์ฟอสเฟตที่มีความเข้มข้นสูง ( Miller and Walker , 1970 ) Pass และ Raczynska - Bojanowska ( 1968 ) พบว่าอินทรีย์ฟอสเฟตจะ repress การสร้าง alkaline phosphatase ซึ่งเกี่ยวข้องในการสังเคราะห์ neomycin ของ Streptomyces sp. ฉะนั้นผู้ที่ผลิต neomycin ได้ ในที่นั่นเองเดียวกันฟอสเฟตจะ repress การสร้าง alkaline phosphatase ที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์ neomycin ของ S. griseus ( Bandyopadhyay and Majumdar , 1974 )

3. การควบคุมการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะโดยสารปฏิชีวนะซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย เป็นการควบคุมแบบย้อนกลับ ( feedback inhibition ) ทำให้กระบวนการสังเคราะห์สิ้นสุดลง สารปฏิชีวนะหลายชนิดสามารถยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์ของสิ่งที่ผลิต เมื่อมีความเข้มข้นของสารสูงในระดับหนึ่ง เช่น chloramphenicol 100 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีผลยับยั้งการทำงานของ acrylamine synthetase ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัวแรกในกระบวนการสังเคราะห์ chloramphenicol และในความเข้มข้นนี้ chloramphenicol จะไม่มีผลทั้งต่อการเจริญของเซลล์และเอนไซม์อื่นๆ ใน aromatic amino acid pathway ( Jones and Westlake , 1974 ; Malik and Vining , 1972 )

Mycophenolic acid 25 มิลลิโมลาร์ มีผลในการยับยั้งการทำงานของ S - adenosylmethionine ; demethylmycophenolic O - methyltrans ferase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่คาตาไลต์ขั้นตอนสุดท้ายในการสังเคราะห์ mycophenolic acid ของ Penicillium stoloniferum ผลในการยับยั้งการทำงานนี้มีถึง 68 % ( Muth and Nash , 1975 )

โดยทั่วไปแล้วสิ่งมีชีวิตที่ผลิตสารปฏิชีวนะจะสามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้ในระดับสูงที่สุด ไกล่เคียงกับระดับซึ่งยับยั้งกระบวนการผลิตของตัวเอง Gordee และ Day ( 1972 ) รายงานว่า penicillin 15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะยับยั้งการผลิต penicillin ของ Penicillium chrysogenum mutans E - 15 การยับยั้งการผลิตนี้เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ ในขณะที่ penicillin 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพียงพอที่จะยับยั้งการผลิต penicillin ของสายพันธุ์ Q - 176 ซึ่งผลิตสารได้ 420 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ penicillin 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรจะยับยั้งการผลิต penicillin ของสายพันธุ์ NRRL 1951 ซึ่งผลิตสารได้ 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และการยับยั้งการผลิตนี้ก็เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์เช่นเดียวกัน

### ความสามารถในการทนต่อสารปฏิชีวนะของสิ่งมีชีวิตที่ผลิต

สิ่งมีชีวิตสามารถหลีกเลี่ยงผลของสารปฏิชีวนะที่ตัวเองผลิตขึ้นโดยกลไกต่างๆที่ขึ้นกับชนิดของสิ่งมีชีวิต และชนิดของสารปฏิชีวนะดังต่อไปนี้

1. Xenotoxic antibiotics เป็นสารที่ยับยั้งหรือทำลายสิ่งมีชีวิตอื่น แต่ไม่มีผลต่อสิ่งมีชีวิตที่ผลิต เช่น antimycin ที่ผลิตโดย Streptomyces antibioticus ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตพวก prokaryotes จะมีผลในการยับยั้งการเจริญของสิ่งมีชีวิตที่เป็น eukaryotes โดยมีผลกับ electron transport chain ที่ mitochondria เนื่องจาก antimycin จะยับยั้งการส่งผ่านของอิเล็กตรอน จาก cytochrome b ไปยัง cytochrome c ทำให้ไม่มีการสังเคราะห์ ATP ดังนั้นสารปฏิชีวนะชนิดนี้จะไม่ผลกับ prokaryotes (Slater, 1973 )

anibomycin ที่ผลิตโดย Streptomyces rooseochromogenes และ S. griseus เป็นสารยับยั้งการทำงานของ peptidyl - transferase ของ eukaryotes ribosomes โดยเฉพาะอย่างยิ่ง พวกเชื้อราและโปรโตซัว ทำให้ไม่มีการสร้าง peptide bond ในกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน (Barbacid and Vasquez , 1974 )

penicillin และ cephalosporin เป็นสารที่ผลิตจากเชื้อราและมีผลยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของ prokaryotes โดยเฉพาะอย่างยิ่งพวกแบคทีเรียแกรมบวก ( Spratt and Stromiser , 1976 ) ในทางตรงกันข้าม polymyxins ซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะพวก  $\beta$  - lactam ที่ผลิตจากแบคทีเรียจะมีผลยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของเชื้อรา โดยมีผลต่อ uridine diphosphoglucoseamine binding site ของเอนไซม์ chitin synthetase (Iseno et al., 1969) เนื่องจากสิ่งมีชีวิตที่ผลิตสารประเภท xenotoxic antibiotics มีความทนทานต่อเมตาโบไลต์ของตัวเอง จึงทำให้สิ่งมีชีวิตเหล่านี้ไม่จำเป็นต้องมีการสร้างกลไกการป้องกัน

2. Autotoxic antibiotics เป็นสารปฏิชีวนะที่ยับยั้งหรือทำลายสิ่งมีชีวิตอื่นและเป็นพิษกับสิ่งมีชีวิตที่ผลิตด้วย เช่น Streptomyces griseus ผลิต streptomycin และแอนติบอดีที่ผลิตเอง สิ่งมีชีวิตที่ผลิตสารประเภทนี้จะมีการป้องกันตัวเองโดยกลไกดังต่อไปนี้

2.1 Modification ของสารปฏิชีวนะโดยเอนไซม์ที่สร้างจากสิ่งมีชีวิตที่ผลิตตัวอย่าง เช่น streptomycin เป็นสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดย Streptomyces griseus ซึ่งเป็น prokaryotes เมื่อสารนี้เกาะกับ 30s ribosome และขัดขวางการเกาะของ aminoacyl - t - RNA ที่หน่วย 30s ทำให้ peptide chain ขาดไปไม่มี amino acid ใหม่มาต่อนอกจากนี้ streptomycin ยังสามารถรวมกับ 70s ribosome ทำให้ ribosome ไม่สามารถแยกตัวออกเป็นหน่วยย่อยคือ 30s และ 50s ได้อีก นั่นคือมีผลขัดขวางการสังเคราะห์โปรตีนในสิ่งมีชีวิตพวก prokaryotes หลายชนิดรวมทั้งจุลินทรีย์ที่ผลิตด้วย แต่จุลินทรีย์ที่ผลิตสามารถป้องกันตัวเองได้ด้วย inactivation ของ streptomycin โดยกระบวนการ phosphorylation ด้วย เอนไซม์

ที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นเอง และ เมื่อ phosphorylate streptomycin ถูกปล่อยออกนอกเซลล์แล้ว phosphate จะตัดหมู่ฟอสเฟตออกไปทำให้สารนั้นมี activity เกิดขึ้นใหม่อีกครั้ง ( Miller and Walker ,1969; Nimi et al.,1971; Cella and Vining , 1975 )

ในทำนองเดียวกัน chloramphenicol ที่ผลิตจาก Streptomyces sp. บางสายพันธุ์มีผลยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนใน prokaryotes โดยจะเกาะกับตำแหน่งหนึ่งของ 50s ribosome ทำให้เกิดการขัดขวางการทำงานของ peptidyl transferase จุลินทรีย์ที่ผลิต chloramphenicol สามารถป้องกันตัวเองได้ด้วย inactivation ของ chloramphenicol โดยกระบวนการ hydrolysis ด้วย constitutive inactivating enzyme ที่มีอยู่ภายใน cell

2.2 Alteration ของ target site สำหรับสารปฏิชีวนะในเซลล์ สิ่งมีชีวิตที่ผลิต ตัวอย่างเช่น erythromycin เป็นสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดย Streptomyces erythraeus และมีผลยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของแบคทีเรียแกรมบวกได้ ด้ erythromycin จะเกาะกับ 50s ribosome มีผลขัดขวางในกระบวนการ translocation สิ่งมีชีวิตที่ผลิต สามารถต้านทานเมตาโบไลต์ของตัวเองได้โดยเกิด alteration ที่ 23s rRNA โดยกระบวนการ methylation ทำให้ erythromycin ไม่สามารถเกาะกับ ribosome ( Yang - Graham and Weisblum , 1978 )

Thiostrepton เป็นสารปฏิชีวนะที่ผลิต โดย Streptomyces azureus และมีผลยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของแบคทีเรียแกรมบวก โดยเกาะกับหน่วย 50s ribosome และมีผลขัดขวางในขั้น translocation เช่นเดียวกับ erythromycin Streptomyces azureus สามารถต้านทานเมตาโบไลต์ของตัวเองโดยเกิด alteration ที่ 23s rRNA โดยกระบวนการ methylation ก่อนที่จะมีการรวมกันของ ribosomal protein อย่างสมบูรณ์ เช่นเดียวกับ Streptomyces erythraeus ( Vining , 1979 )

Streptomyces aureofaciens สามารถผลิต tetracycline ซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะที่มีผลยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนในสิ่งมีชีวิตทั้งที่มี 70s และ 80s ribosome tetracycline จะเกาะกับหน่วย 30s ของ prokaryotic ribosome และขัดขวางการจับของ aminoacyl - tRNA กับ acceptor site บน ribosome มีผลให้ peptide chain ขาดช่วงไป แต่จุลินทรีย์ที่ผลิตสามารถต้านทานสารนี้ได้โดยเกิด alteration ของหน่วย 30s ribosome ซึ่งเป็น target site ของ tetracycline ( Vinings , 1979 )

2.3 การลดการยอมรับสารปฏิชีวนะเข้าสู่เซลล์ ภายหลังจากปล่อยออกนอกเซลล์แล้ว กลไกในการป้องกันตัวเองแบบนี้จะเกิดร่วมกับกลไกแบบอื่น ๆ ด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในจุลินทรีย์ที่ผลิต autotoxic antibiotics จะมีการเปลี่ยนแปลงของ permeability เกิดขึ้นเสมอ ตัวอย่างเช่นใน Streptomyces griseus ที่ผลิต streptomycin ดังกล่าว ในข้อ 2.1 เมื่อ phosphorylated streptomycin ถูกปล่อยออกมาออก เซลล์ แล้วเซลล์ จะไม่ยอมรับสารนั้นเข้าสู่เซลล์อีก เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงของ permeability ในเซลล์ ( Vinings, 1979 )

### ปัจจัยในการคัดเลือกสิ่งมีชีวิตที่ผลิตสารปฏิชีวนะและทรรักษาสารปฏิชีวนะ

การตรวจสอบหาสารปฏิชีวนะ ได้กระทำกันอย่างกว้างขวางมาประมาณ 30 ปีแล้วและการค้นคว้าเกี่ยวกับสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ๆ ก็ยังคงดำเนินอยู่โดยมีการปรับปรุงวิธีการตรวจหาขึ้นเรื่อยๆ เพื่อให้การค้นคว้าเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพความสำเร็จในการค้นคว้าเกี่ยวกับสารปฏิชีวนะนั้น ต้องอาศัยปัจจัย 3 ประการ ได้แก่ วิธีการตรวจสอบหาสารปฏิชีวนะ การคัดเลือกสิ่งมีชีวิตที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะและวิธีการเลี้ยงสิ่งมีชีวิตที่ผลิตสารปฏิชีวนะ ( Iwai and Omura , 1982 )

1. วิธีการตรวจสอบหาสารปฏิชีวนะ มีสารปฏิชีวนะมากมายหลายชนิดที่มีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย รา โปรโตซัว ปรสิต ไวรัส และ เซลล์ ที่เจริญผิดปกติ ซึ่งสารเหล่านี้ได้จากการค้นคว้าโดยวิธีการตรวจหาต่างๆกัน เช่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การใช้เชื้อทดสอบซึ่งมีการเปลี่ยนแปลง เพื่อให้ได้สารที่มีผลต่อสิ่งมีชีวิตอื่นตาม  
ต้องการ ( Umezawa , 1967 , 1978; Laskin and Lechevalier; 1973)

2. การคัดเลือกสิ่งมีชีวิตที่ผลิตสารปฏิชีวนะ จุลินทรีย์เป็นสิ่งมีชีวิตที่  
สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้เป็นส่วนใหญ่ วิธีการคัดเลือกจุลินทรีย์เหล่านี้ ที่ใช้กัน  
มาก ในระยะแรกๆ คือ crowded plate techniques ( Waksman, 1959 ) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง วิธีนี้ใช้คัดเลือกจุลินทรีย์ใน  
ดินที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นในดิน โดยสังเกตจากบริเวณยับยั้ง  
ที่เกิดขึ้นและวิธีการคัดเลือกเชื้อบนอาหารแข็งที่ใช้กันมากอีกวิธีหนึ่ง คือ cross  
streak plate ( Waksman , 1959 ) ในวิธีนี้ทั้งเชื้อที่ผลิต และเชื้อที่  
ทดสอบจะเจริญบนอาหาร ชนิดเดียวกัน จึง จำเป็นต้องเลือกอาหารที่เหมาะสม  
กับการเจริญของเชื้อทั้งสองประเภท Weinstein และคณะ ( 1964 ) พยายามคัด  
เลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถสูงในการผลิตสารปฏิชีวนะ โดยสนใจ  
จุลินทรีย์พวกแอกติโนมัยสิท ในสกุล Micromonospora ซึ่งมีผู้ศึกษาน้อยมากและ  
พบสารปฏิชีวนะ ชนิดใหม่ ๆ หลายชนิดจากแอกติโนมัยสิทในสกุลนี้ได้แก่  
gentamicin ; everninomicin ; halomicin และ megalomicin  
( Weinstein et al., 1964, 1965, 1968, 1969 ) การค้นพบนี้ทำให้การศึกษา  
เกี่ยวกับการค้นหาสารปฏิชีวนะชนิดใหม่มุ่งไป ทางด้านวิธีที่มีประสิทธิภาพสำหรับ  
การแยก และ คัดเลือกจุลินทรีย์พวกแอกติโนมัยสิท ในสกุลอื่นนอกจาก  
Streptomyces sp. มากขึ้น ในดินจะพบแอกติโนมัยสิทใน สกุลอื่นได้น้อยกว่า  
Streptomyces sp. ( Nonomura and Ohara, 1969 ) แอกติโนมัยสิท  
ในสกุลที่พบได้ยากนี้ สามารถผลิตสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ ๆ เช่น สกุล  
Actinoplanes ( Parenti and Coronelli , 1979 ) แต่มักจะมีความ  
สามารถในการผลิตต่ำ และเจริญอย่างช้าๆ ฉะนั้นการค้นคว้าและ พัฒนาเกี่ยวกับ  
จุลินทรีย์พวกนี้จึงเป็นไปได้ยาก ( Iwai and Omura , 1982 )

3. วิธีการเลี้ยงสิ่งมีชีวิตที่ผลิตสารปฏิชีวนะ เพื่อให้ได้ผลผลิตตาม  
ต้องการ และได้ในปริมาณสูง วิธีการนี้สามารถทำได้โดย การปรับปรุง หรือ  
เปลี่ยนแปลงส่วนประกอบของอาหาร หรือปรับปรุงสภาพของการเลี้ยง ซึ่งการปรับ  
ปรุงเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ นอกจากจะมีผลต่อปริมาณของสารที่ได้แล้ว ยังมีผลต่อส่วน

ประกอบ ( Component ) ของสารที่ได้ด้วย

### ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารปฏิชีวนะ

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารปฏิชีวนะ ได้แก่ ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาพของการเลี้ยงเชื้อ

#### ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. แหล่งคาร์บอน โดยทั่วไปแล้วกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ และในขณะเดียวกัน กลูโคสก็เป็นคาร์บอนคาตาโบไลต์ชนิดหนึ่งที่ควบคุมการผลิตสารปฏิชีวนะหลายชนิด ( Marcin and Demain , 1980 ) แหล่งคาร์บอนชนิดอื่นนอกจากกลูโคสที่มีรายงานว่ามีส่วนในการยับยั้งการผลิตสารปฏิชีวนะ คือ กลิเซอรอล พบว่ามีผลต่อการผลิต surantin ของ Bacillus suranticus ( Nishikiori et al., 1978 ) และการผลิต cephalosporin ของ Streptomyces clavuligerus ( Aharonowicz and Demain , 1979 )

การหักล้างการควบคุมโดยคาร์บอนเมตาโบไลต์ กระทำได้โดยการเติมแหล่งคาร์บอนเป็นระยะๆ ( Davey and Johnson , 1959 ; Marcin and McDanile , 1974 ) หรือค่อยๆเติมทีละน้อย ( Metelova et al., 1972 ) ดารารัตน์ ( 2525 ) ศึกษาเกี่ยวกับแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตสารต่อต้านเชื้อราจาก Streptomyces sp. cu 279 โดยใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ คือ แป้งมันสำปะหลัง แป้งมันฝรั่ง และแป้งชนิดละลายน้ำ ( soluble starch ) พบว่าแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตสารต่อต้านเชื้อราบางชนิด Okabe และคณะ ( 1982 ) ใช้กลิเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตสารปฏิชีวนะพวก carbapenem จาก Streptomyces sp. OA - 6129 ซึ่งแยกได้จากดิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในปี ค.ศ. 1983 Chatterjee และ Vining ( 1983 ) ได้ศึกษาอิทธิพลของคาร์บอนในการผลิต Chloramphenicol โดย Streptomyces venezuelae โดยใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ กลูโคส แป้ง แมนโนส ฟร็กโทส เซลล์ไลโปโอส ไชโลสกลีเซอรอล มอลโทส แล็คโทส กาแล็คโทสและแอล - อาราบีโนส ในขณะที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนพบว่าแป้ง เซลล์ไลโปโอส แล็คโทส และกาแล็คโทส เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิต chloramphenicol

2. แหล่งไนโตรเจน การเปลี่ยนชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจน และสัดส่วนของแหล่งไนโตรเจนต่อแหล่งคาร์บอนที่มีอยู่อาจแสดงในรูปของสัดส่วน C/N ต่างมีผลต่อการผลิตสารปฏิชีวนะ ( Iwai and Omura , 1982 ) จากรายงานของ Ghoneim และคณะ ( 1980 ) พบว่าโพแทสเซียมไนเตรตแอมโมเนียมคลอไรด์และแอมโมเนียมไนเตรต เป็นแหล่งไนโตรเจนประเภทสารอนินทรีย์ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิต magnamycin โดย Streptomyces halstedii ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและการเติมกรดอะมิโนประเภท L - cysteine , β - alanine , L - leucine หรือ L - glutamic acid จะสามารถเพิ่มผลผลิต ในขณะที่ L - arginine จะยับยั้งกระบวนการผลิต magnamycin อย่างสมบูรณ์

Kanoksilapacham ( 1981 ) รายงานว่าการใช้ถั่วเหลืองบดละเอียด ( soy - bean powder ) เป็นแหล่งไนโตรเจนร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟตในปริมาณน้อยในอาหารที่ใช้ศึกษาการผลิตสารปฏิชีวนะจาก Streptomyces sp. จะให้ผลผลิตที่ดีกว่าการใช้อาหารที่ใส่เนเปโทนและสารสกัดจากเนื้อ เมื่อมีกลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารทั้งสองชนิด

3. อนินทรีย์ฟอสเฟต ถ้ามีอนินทรีย์ฟอสเฟตปริมาณสูงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะเร่งการใช้แหล่งคาร์บอนแหล่งไนโตรเจน และกระบวนการหายใจซึ่งเป็นผลทำให้เซลล์เจริญดี แต่การผลิตสารปฏิชีวนะจะลดลง ( Weinberg , 1973 )

Aharonowitz และ Demain ( 1977 ) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของอนินทรีย์ฟอสเฟตในอาหารและการผลิต cephalosporin ของ

เชื้อ Streptomyces claruligerus พบว่าการผลิตสารนี้จะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มฟอสเฟตจนถึงความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ แต่ถ้าเพิ่มปริมาณฟอสเฟตต่อไปอีกการผลิต cephalosporin จะลดลง

ปริมาณของอินทรีย์ฟอสเฟตมีอิทธิพลต่อการผลิตสารปฏิชีวนะแต่ยังไม่ทราบกลไก ( mechanism ) ที่แน่ชัดเพียงแต่สันนิษฐานกันว่าเกี่ยวข้องกับความเข้มข้นของ ATP ภายในของเซลล์ เนื่องจากความเป็นจริงที่ว่า การผลิตสารปฏิชีวนะมักจะเริ่มต้น ภายหลังจากที่มีการใช้อินทรีย์ฟอสเฟตเกือบหมดไปจากอาหารเลี้ยงเชื้อ ( Iwai and Omura , 1982 ) และจากการศึกษาของ Martin และคณะ ( 1978 ) เกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงของ ATP ในระหว่างที่มีการควบคุม การผลิตสารปฏิชีวนะ เกิดขึ้นในขณะที่มีฟอสเฟตอยู่ด้วยซึ่งเมื่อความเข้มข้นของอินทรีย์ฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อสูงพบว่า ความเข้มข้นของ ATP ภายในเซลล์จะเพิ่มขึ้นและจะเร่ง primary metabolism แต่จะยับยั้งการผลิตสารปฏิชีวนะ และถ้าปริมาณอินทรีย์ฟอสเฟตน้อยลง ความเข้มข้นของ ATP ก็ลดลงด้วย แต่จะทำให้การผลิตสารปฏิชีวนะดำเนินต่อไปได้อีก

Hall และ Hasell ( 1970 ) รายงานว่า Streptomyces jamaicensis สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้สองชนิด ซึ่งขึ้นกับความเข้มข้นของอินทรีย์ฟอสเฟต ถ้ามีอินทรีย์ฟอสเฟต 0.1 มิลลิโมลาร์ จะมีการสังเคราะห์ monamycin แต่ถ้ามีอินทรีย์ฟอสเฟต 0.4 มิลลิโมลาร์ จะมีการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะชนิดใหม่ที่แตกต่างจาก monamycin

การผลิต pycolnitrin ( Arima et al., 1965 ) , thiopeptin ( Miyairi et al., 1970 ) และ bicyclomycin ( Miyoshi et al., 1972 ) จะเกิดขึ้นเมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารแต่ละชนิดเมื่อมีอินทรีย์ฟอสเฟตในความเข้มข้นสูงกว่า 180 มิลลิโมลาร์ เป็นส่วนประกอบอยู่ด้วยซึ่งโดยปกติแล้วจะไม่มีการผลิตสารปฏิชีวนะในสภาพเช่นนี้ จะเห็นได้ว่าการเปลี่ยนแปลงปริมาณของอินทรีย์ฟอสเฟตในอาหารที่ใช้สำหรับผลิตสารปฏิชีวนะมีความสำคัญสำหรับการผลิตชนิดและปริมาณสารปฏิชีวนะ

4. เกลืออินทรีย์ สำหรับเกลืออินทรีย์ที่นิยมใช้กันทั่วไปเพื่อเพิ่มการผลิตสารปฏิชีวนะคือ โซเดียมคลอไรด์ Rake และ Donovick ( 1946 )

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รายงานว่าการผลิต streptomycin โดย Streptomyces griseus จะเพิ่มขึ้น ถ้าเติมโซเดียมคลอไรด์ 0.5 % ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ถ้าเติมในปริมาณสูงจะยับยั้งการผลิต Okami และคณะ ( 1976 ) พบว่าการผลิต actinomycin ของพวก Streptomyces จะดีที่สุดในเมื่อมีโซเดียมคลอไรด์สูงถึง 1.0 - 3.0 %

Ogata และคณะ ( 1977 ) รายงานว่าสารปฏิชีวนะ 9 - 60 ชนิดที่ผลิตจาก Streptomyces sp. นั้นสามารถเร่งอัตราการผลิตได้โดยการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตในความเข้มข้นสูง ซึ่งปริมาณที่เหมาะสมของแมกนีเซียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับสารปฏิชีวนะ จะสัมพันธ์กับปริมาณของกลีเซอรอลซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอน เช่น ถ้าใช้แมกนีเซียมซัลเฟตปริมาณร้อยละ 0.1 และกลีเซอรอลร้อยละ 2.0 หรือการใช้แมกนีเซียมซัลเฟตปริมาณร้อยละ 2.5 และกลีเซอรอลร้อยละ 0.5 จะพบว่าความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตที่ใช้จะเพิ่มขึ้น ถ้าใช้กลีเซอรอลในปริมาณน้อยลงซึ่งอาจเป็นผลของ ionic strength ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการผลิตสารปฏิชีวนะ ส่วนการเติมแมกนีเซียมคลอไรด์ แมกนีเซียมซัลเฟต หรือโซเดียมคลอไรด์หรือแบเรียมคลอไรด์ต่างมีผลต่อการผลิตสารปฏิชีวนะ

5. โลหะที่ต้องการในปริมาณน้อย โลหะหลายชนิดจำเป็นสำหรับสิ่งมีชีวิตเนื่องจากเป็นโคแฟกเตอร์ในปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยโลหะดังกล่าว ได้แก่ V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn และ Mo สำหรับ Mn, Fe และ Zn มักจะมีบทบาทในการผลิต Secondary metabolites ( Weinberg, 1970 )

ความต้องการโลหะเหล่านี้มีอยู่ในปริมาณน้อยมาก เช่น การสังเคราะห์ streptomycin โดย Streptomyces griseus จะมีได้สูงสุดเมื่อมี Fe และ Zn ในความเข้มข้น  $1 \times 10^{-5}$  โมลาร์ และ  $0.3 \times 10^{-5}$  โมลาร์ ตามลำดับ แต่ถ้ามี Zn  $20 \times 10^{-5}$  โมลาร์ จะยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์ streptomycin ( Weinberg, 1970 )

ปริมาณโลหะที่ต้องการสำหรับการผลิตสารปฏิชีวนะและการเจริญของจุลินทรีย์จะต่างกัน โดยปกติแล้วความเข้มข้นของโลหะที่ต้องการสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ประมาณ  $10^{-7}$  โมลาร์ ของ Mn และ Zn และ  $2 \times 10^{-7}$

โมลาร์ ของ Fe แต่ความต้องการสำหรับการผลิตสารปฏิชีวนะจะมากกว่าการเจริญ 10 ถึง 100 เท่า และถ้าเติมในปริมาณที่มากขึ้นจะยับยั้งการผลิตช่วงความเข้มข้นของโลหะที่มีผลต่อการผลิต Secondary metabolites เช่น สารปฏิชีวนะ จะแคบกว่าการผลิต primary metabolites และความเข้มข้นของโลหะในระดับที่ต้องการสำหรับการผลิตสารปฏิชีวนะ จะไม่มีผลยับยั้งการเจริญ (Iwai and Omura, 1982)

6. สารตั้งต้น การผลิต penicillin G ในปริมาณสูงโดย Penicillium chrysogenum จะเกิดขึ้นโดยการเติม phenylacetate เป็นสารตั้งต้นลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิต (Hisuuchi et al., 1946)

Arai และคณะ (1980) รายงานว่าเมื่อเติมโพแทสเซียมไฮยาไนด์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับผลิต saframycin พบว่าการผลิต saframycin ซึ่งมีหมู่ CN อยู่ในโมเลกุลจะเพิ่มขึ้นอย่างมาก

เอนไซม์เพื่อการสังเคราะห์ secondary metabolites ในสิ่งมีชีวิตมักจะมีควมจำเพาะต่อสับสเตรทต่ำด้วยเหตุนี้เมื่อเติม analogs เป็นสารตั้งต้น ในบางครั้งจะมีการใช้สารตั้งต้นนี้ ทำให้เกิดผลผลิตชนิดใหม่

7. สารยับยั้ง สารปฏิชีวนะหลายๆชนิดที่เป็นสารยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์ของสิ่งมีชีวิตที่ผลิตสารนั้นๆ ได้ตั้งกล่าวมาแล้ว Kominek (1975) รายงานว่า การหลีกเลี่ยงการยับยั้งโดยผลผลิตสุดท้ายกระทำได้โดย continuous dialysis - extraction ตั้งที่ทดลองในการผลิต cycloheximide โดย Streptomyces griseus และสามารถเพิ่มผลผลิตได้ถึงสองเท่า

นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงผลของการเติม Chloramphenicol ที่มีต่อการเพิ่มการผลิตของ actinomycin (Katz et al., 1965) และ polymyxine (Paulus, 1967) ซึ่งเป็น peptide antibiotics เนื่องจาก chloramphenicol เป็นสารขัดขวางกระบวนการ Translation ทำให้ไม่มีการสังเคราะห์โปรตีนเกิดขึ้น แต่สารนี้ไม่มีผลยับยั้งการสังเคราะห์ peptide antibiotics จึงทำให้มีการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะพวกนี้มากขึ้น

8. สารชักนำ ในปัจจุบันการศึกษาเกี่ยวกับสารชักนำยังไม่กว้างขวาง เนื่องจากกระทำได้ยาก แต่ก็มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับสารชักนำ

ได้แก่ การศึกษาเกี่ยวกับการผลิต Streptomycin โดย Streptomyces griseus พบว่า สายพันธ์ที่ผลิต Streptomycin ได้ จะสามารถผลิต A - factor ได้ และ A - factor นี้เองที่สามารถชักนำ หรือ กระตุ้นการสังเคราะห์ streptomycin ( Khokhlov and Toverova , 1979 ) ส่วน Methionine เป็นทั้งสารตั้งต้น และสารชักนำ ในการสังเคราะห์ cephalosporin โดย Cephalosporium acremonium ( Drew and Domain , 1975 )

9. ปัจจัยอื่นๆ บางครั้งสารที่เติมลงไปเป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลต่อการเปลี่ยนแปลง membrane permeability ของจุลินทรีย์ที่ผลิตสารปฏิชีวนะ ซึ่งทำให้การผลิตสารปฏิชีวนะ เพิ่มขึ้นหรือลดลง เนื่องจาก เซลล์แตกในกรณีที่ทำให้การผลิตสารปฏิชีวนะเพิ่มขึ้น มีตัวอย่างคือการผลิต alanin โดย Streptomyces noboritoensis KM - 2733 จะเพิ่มขึ้นถึง 16 เท่า เมื่อเติม lauric acid ในปริมาณ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการผลิต ( Iwai and Omura , 1982 ; Ohno et al., 1980 )

สภาพความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นของอาหารก็มีความสำคัญ เนื่องมาจากจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบของอาหาร ในระหว่างการทำให้อาหารปราศจากจุลินทรีย์โดยใช้ความร้อนภายใต้ความดันสูง ทำให้เกิดสารใหม่ซึ่งอาจมีผลต่อการเจริญและการสร้างเมตาโบไลต์ของจุลินทรีย์ที่นำมาเลี้ยง เช่น การเกิด aminocarbonyl reaction ของน้ำตาล และกรดอะมิโน เมื่อมีการให้ความร้อนสูงในสภาพเป็นด่าง ได้แก่ การสร้าง psicose จาก glucose ( Nara et al., 1966 ) การเกิดสารซึ่งเป็น growth factors ของแบคทีเรีย แลคติกจาก L - lysine และกลูโคส ( Furnkewa et al., 1968 ) เป็นต้น

สภาพที่เหมาะสมของการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อการผลิตสารปฏิชีวนะ

1. สภาพความเป็นกรดเป็นด่างของอาหาร มีผลต่อการเจริญและการผลิตสารปฏิชีวนะ ดังนั้นในกระบวนการผลิตสารปฏิชีวนะจึงมักมีการเติมสารละลายบัฟเฟอร์ เช่น แคลเซียมคาร์บอเนต ไดโพรแทลเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต หรือ โซเดียม - ไบคาร์บอเนต ( Iwai and Omura , 1982 )

2. อุณหภูมิ โดยทั่วไปอุณหภูมิที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารปฏิชีวนะค่อนข้างจะคงที่ที่อุณหภูมิหนึ่งตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสุด แต่อุณหภูมิที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์สามารถผลิตสารปฏิชีวนะจะผันแปรในช่วงกว้าง และอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญมักจะไม่ใช่อุณหภูมิเดียวกับอุณหภูมิที่ผลิต เช่น Penicillium chrysogenum จะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 ° ซ. แต่จะผลิตเพนนิซิลินได้ในปริมาณสูงที่อุณหภูมิ 20 ° ซ. ( Owen and Johnson , 1955 )

อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตสารปฏิชีวนะของพวก Thermophilic actinomycetes เช่น Thermoactinomyces อยู่ในช่วงอุณหภูมิที่สูงกว่า 40 ° ซ. แต่พวก mesophilic actinomycetes จะประมาณ 27 ° ซ. ( Weinberg , 1973 )

3. ปริมาณออกซิเจน จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะจำนวนมากต้องการออกซิเจนในการเจริญ แต่ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำนั้นมีปริมาณที่น้อยเกินไปจำเป็นต้องมีการให้อากาศ ในอาหารเหลวที่ใช้ในการผลิตสารปฏิชีวนะ (Brookers, 1969 ) นอกจากนั้นปริมาณออกซิเจนยังมีผลต่อชนิดของผลิตภัณฑ์ที่ได้ เช่น เชื้อ Streptomyces lavendulae No. 314 ที่สามารถผลิต Streptochricin เป็นผลผลิตหลักเมื่อใช้อัตราการกวน 250 รอบต่อนาทีใน Jar - fermentor และจะผลิต mimosamycin และ chlorocarcins เป็นผลผลิตย่อยขึ้นด้วยเมื่อมี dissolved oxygen ความเข้มข้นสูง เช่น เพิ่มอัตราการกวนเป็น 550 รอบ ต่อ นาที ( Arai et al. , 1976 )

ส่วนรายงานของ Plichon และคณะ , 1976 พบว่าในการผลิต oxytetracycline ในถังหมักโดย Streptomyces varsoviensis จะมีการผลิต Tetracycline เพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณออกซิเจนที่ให้เพิ่มขึ้น

การเพิ่มปริมาณออกซิเจนในกระบวนการหมักของ Cephalosporium acremonium จะทำให้การผลิต penicillin N ลดลงแต่ cephalosporin C จะเพิ่มขึ้นเนื่องจากการเร่งการเกิดออกซิเดชันในการเปลี่ยน penicillin N ไปเป็น cephalosporin C ( Stevens et al., 1962 )

4. ปัจจัยอื่น ๆ ได้แก่ ความดัน ผลของออกซิเดชัน - รีดักชัน และ แสง เป็นต้น

ในการศึกษาเกี่ยวกับความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะของจุลินทรีย์ โดยใช้อาหารแข็งและอาหารเหลว มักพบว่ามีการผลิตสารปฏิชีวนะบนอาหารแข็งแต่ไม่พบในอาหารเหลวซึ่งโดยแท้จริงแล้วจุลินทรีย์อาจจะผลิตสารปฏิชีวนะได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองสภาวะแต่การทำลายสารปฏิชีวนะบนอาหารแข็งเกิดขึ้นน้อยกว่าในอาหารเหลว เช่น Fumeramidmycin จะแพร่ไปได้ง่ายในอาหารวัน จึงหลีกเลี่ยงการสัมผัสกับเอนไซม์ที่สามารถสลายสารปฏิชีวนะนั้นได้ ( Muth et al., 1975 ; Suhara et al., 1975 )

Antibiotic SF-1993 (N-carbamoyl-D-glucosamine) ผลิตโดย filamentous hyphae ของ Streptomyces halstedii แต่จะไม่ผลิตจาก Fragmented hyphae ซึ่งมักพบใน shaking culture แต่ถ้าใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เจือจางหรือใช้เชื้อที่กลายพันธุ์ไปเป็นพวก non-fragmented hyphae ก็สามารถผลิตสารนี้ได้ ( Shomura et al., 1979 ; Omoto et al., 1979 )

Miyoshi และคณะ (1980) รายงานว่า Streptomyces saipronensis ซึ่งผลิต bicyclomycin นั้นสามารถทนต่อสภาพรีติวซ์ในการผลิตสารปฏิชีวนะได้โดยการเติมการควบคุมคู่กับการใช้จุลินทรีย์ที่สายพันธุ์ที่ไม่สร้าง aerial mycelium เพื่อป้องกันการสูญหายของพลาสมิดเมื่อเซลล์ถูกทำลายเนื่องจากการกวน สารละลายผสมที่ใช้คือ เมทานอล : น้ำกลั่น : 6 N HCE : ไพริดิน ( 80 : 26 : 4 : 10 ) ( vol / vol ) เมื่อสารละลายชิมมาถึงตำแหน่งที่ห่างจากปลายบนประมาณ 2 เซนติเมตร นำมาทำให้แห้งตรวจหาตำแหน่งของสารโดยสเปรย์ด้วยสารละลายของนินไฮดรินร้อยละ 0.2 ในอะซิโตน และอบที่อุณหภูมิ 100 ° ซ. เป็นเวลา 3 นาที ตำแหน่งของสาร DAP จะปรากฏเป็นสี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เขียนออกมา ถึงสี่เหลี่ยม โดย L isomer จะอยู่เหนือ meso isomer ส่วนตำแหน่งของสารไฮโดรไลเซตของกรดอะมิโน จะปรากฏเป็นลิ่มวง หรือสี่เหลี่ยมและอยู่ในตำแหน่งที่สูงกว่าตำแหน่งของสาร DAP

หมายเหตุ การ spot จะ spot เทียบกับสารมาตรฐานของ DAP ( DAP standard ) 1 ไมโครลิตร ของ 0.01 M DL - DAP (ประกอบด้วย meso และ L DAP isomer )



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### บทที่ 3

## ขั้นตอนการดำเนินงาน อุปกรณ์และวิธีการ

### อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำปัญหาพิเศษ

1. หลอดทดลอง
2. บีกเกอร์
3. ฟลากลัก
4. จานเพาะเชื้อ
5. บีเปตต์
6. ตะเกียงแอลกอฮอล์
7. แท่งแก้วรูปตัวแอล
8. แท่งแก้ว
9. ลูบเชื้อเชื้อ
10. กระจกฟอลส์
11. สำลี
12. ตูบมเชื้อ
13. หม้อนึ่งความดัน
14. rotary vacuum evaporator
15. เครื่องเขย่า
16. เครื่องปั่นแยก
17. กล้องจุลทรรศน์
18. แผ่นเคลือบซิลิกาเจล
19. เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## วิธีดำเนินการทดลอง

### 1. แหล่งเชื้อแอคติโนมัยสิท

ตัวอย่างที่นำมาแยกเชื้อแอคติโนมัยสิทคือ ตัวอย่างดินซึ่งเก็บจากสถานที่ต่างๆในประเทศไทย

### 2. การแยกเชื้อแอคติโนมัยสิท

เชื้อที่จะนำมาศึกษาเป็นเชื้อจุลินทรีย์ประเภท Actinomycetes sp. ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างดินโดยวิธี spread plate technique ซึ่งมีวิธีการดังนี้

2.1 ทำตัวอย่างดินให้อยู่ในสภาพแขวนลอย (suspension) โดยใส่ตัวอย่างดิน 1 กรัม ลงในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นทำให้เจือจาง 1:100 , 1:1000 , และ 1:10,000 ตามลำดับ

2.2 บีเบตต์ suspension ของดินที่เจือจางตามที่เตรียมไว้ความเจือจางละ 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร Arginine-glycerol - salt medium (AGS); Glycerol-cascin agar (GCA); Yeast-starch agar (YSA) (ภาคผนวก ก หมายเลข 3) เพื่อเป็นการเปรียบเทียบความสามารถในการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยสิทระหว่าง อาหารต่างชนิดกัน

2.3 ใช้แท่งแก้วรูปตัว L ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการจุ่มแอลกอฮอล์แล้วเผาไฟเปลี่ยนให้ suspension ของตัวอย่าง กระจายบนผิวอาหารให้ทั่วถึง แต่ละความเจือจาง ทำซ้ำ 3 ครั้ง

2.4 นำจานเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 27 ° ซ เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบเวลาที่บ่มเชื้อแล้ว นำมาคัดเลือกโคโลนีของแอคติโนมัยสิทที่มีลักษณะแตกต่างกันเก็บไว้บนอาหารผิวเอียง เพื่อนำไปทำให้เชื้อบริสุทธิ์โดยวิธี cross streak บนอาหารแข็ง แล้วจึงเก็บเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยวๆไว้

2.5 นำเชื้อที่บริสุทธิ์แล้วเลี้ยงบนอาหารผิวเอียง แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 27 ° ซ , 45 ° ซ และที่อุณหภูมิห้อง โดยทำอุณหภูมิละ 2 ซ้ำ เพื่อเปรียบเทียบว่าเชื้อตัวไหนเจริญได้ดีที่ 45 ° ซ แล้วจึงเก็บเชื้อนั้นมาคัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เลือกเชื้อที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียต่อไป

### ๘. การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสิทที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

๘.๑ การคัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะบนอาหารแข็ง ขึ้นตอนนี้เป็นารคัดเลือกเชื้อขั้นต้นซึ่งจะทำการทดสอบดังนี้

๘.๑.๑ อาหารเลี้ยงเชื้อใช้อาหาร Glucose peptone meat extract agar (GPMA) (ภาคผนวก ก หมายเลข ๔) เพื่อเป็นการศึกษาในเบื้องต้น สำหรับการแยกเชื้อที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะ

๘.๑.๒ จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นเชิงทดสอบ (test microorganism) ได้แก่ แบคทีเรีย Staphylococcus aureus ; Escherichia coli ; Aspergillus niger ; Saccharomyces carlsbergensis ; Candida albicans ซึ่งเชื้อเหล่านี้ได้มาจากสถาบันวิจัย วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย แบคทีเรียที่ใช้เป็นเชื้อทดสอบนี้จะเลี้ยงบนอาหารผิวเอียง nutrient agar (ภาคผนวก ก หมายเลข ๕) เป็นเวลา ๒๔ ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

๘.๑.๓ วิธีคัดเลือกเชื้อโดยวิธี cross streak plate (Wakeman, 1959) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

๘.๑.๓.๑ เทอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด GPMA (ข้อ ๘.๑.๑) ลงในจานเลี้ยงเชื้อจานละ ๒๐ มิลลิลิตร โดยประมาณ

๘.๑.๓.๒ ใช้ลูปเขี่ยเชื้อแอคติโนมัยสิทที่เจริญบนอาหารผิวเอียงอายุ ๕ วัน ชีต (streak) เป็นเส้นตรงบนผิวอาหารในแนวกึ่งกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา ๒ - ๗ วัน (ตามลักษณะการเจริญของเชื้อและอาหารที่ใช้)

๘.๑.๓.๓ ใช้ลูปเขี่ยเชื้อแบคทีเรียที่ใช้เป็นเชื้อทดสอบอายุ ๒๔ ชั่วโมง จากผิวอาหารเอียง nutrient agar มาขีดในจานอาหารเลี้ยงเชื้อใน

แนวตั้งฉากกับแนวของเชื้อแอคติโนมัยสิทที่ซัดไว้เดิม ( ข้อ 3.1.3.2 ) บ่มเชื้อ  
ต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจดูบริเวณที่มีการยับยั้งการเจริญ  
(inhibition zone) ของเชื้อทดสอบ

3.2 การคัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะในอาหารเหลวจาก  
เชื้อที่คัดเลือกได้ จะนำมาศึกษาความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะในอาหาร  
เหลวชนิด Glucose soybean medium (GSM) (ภาคผนวก ก หมายเลข 6)

3.2.1 การเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว เตรียมอาหารเหลว GSM  
ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ใน 96 well plate ขนาด 250 มิลลิลิตร ทำ 3  
ซ้ำ แล้วนำเชื้อแอคติโนมัยสิทที่แยกได้ ( ข้อ 2.4 ) เข้มมา 1 ลูบ ใส่ในอา  
หารเหลวแต่ละฟลากลบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบ  
ต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำมากรองแยกส่วนที่เป็นเส้นใยของเชื้อออก  
จากอาหาร แล้วเก็บเอาส่วนน้ำใส ( supernatant ) ไปตรวจหาความสา  
มารถในการยับยั้งการเจริญ ของแบคทีเรียโตยิวซีไบโอแอสเซนซี ( bioassay )

3.2.2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารในการยับยั้งการเจริญของ  
แบคทีเรียโตยิวซีไบโอแอสเซนซี (Antibiotic bioassay)

3.2.3 ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 มิลลิเมตร  
ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการจุ่มแอลกอฮอล์แล้วเผาไฟ

3.2.4 ตัวแทนของแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบคือ Staphylococcus  
aureus TISTR 118 ซึ่งได้จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี  
แห่งประเทศไทย (Thailand Institute of Scientific and  
Technological Research culture collection หรือ TISTR  
culture collection )

3.2.5 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบจะใช้ในรูปของ spore  
suspension โดยนำไปเลี้ยงในอาหารเหลว nutrient broth บนเครื่อง  
เขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาเจือจาง  
25 % ของการตายแสง 500 นาโนเมตร แล้วเจือจางอีก 20 เท่าด้วยน้ำกลั่น  
ที่ฆ่าเชื้อแล้ว

3.2.6 วิธีการทำไบโอเอสเชย์ (bioassay) โดยบีเปิดเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ (ข้อ 3.2.5) มา 0.4 มิลลิลิตร ใส่ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อแล้วเทอาหาร A-1 agar กับปริมาณ 20 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ ผลมาให้เชื้อกระจายทั่วอาหารอย่างสม่ำเสมอ แล้วปล่อยให้อาหารแข็งตัว หลังจากนั้นใช้ cork borer เจาะอาหารแข็งในจานเพาะเชื้อ จานละ 5 หลุม บีเปิดส่วนที่เป็นน้ำใส (supernatant) ที่เตรียมไว้ (ข้อ 3.2.1) ที่มีความเข้มข้น 1:10 , 1:100 , 1:1000 ใส่ลงในหลุมที่เจาะไว้ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เส้นผ่านศูนย์กลาง ของบริเวณที่มีการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ

#### 4. การศึกษากลุ่มสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตสารปฏิชีวนะของเชื้อที่คัดเลือกได้

เพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสิทที่คัดเลือกได้ (ข้อ 3.2) ในอาหาร glucose-cyclohex medium (GSM) ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร โดยเชื้อเชื้อ 1 ลูบ ใส่ลงในแต่ละพลาสติก ทำการทดสอบ 2 ขั้ว บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกวัน แล้วนำไปตรวจหาประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ใช้ทดสอบโดยวิธีไบโอเอสเชย์ (ข้อ 3.2.6) และวัดความสามารถในการยับยั้ง โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่มีการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ ทำเช่นนี้ทุกวันจนกระทั่งไม่สามารถตรวจพบว่ามีสารสร้างสารปฏิชีวนะขึ้นอีก

#### 5. การจัดจำแนกเชื้อแอคติโนมัยสิท

โดยยึดหลักการจัดจำแนก และวิธีดำเนินการตาม Gordon and Mihm (9,10) , Lechevalier and Lechevalier (11,12) , Becker et al. (3) , and Bird (4)

1. เทอาหาร Brain heart infusion (BHI agar) ลงในจานเพาะเชื้อที่ฝาเชื้อแล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. นำสายเชื้อที่แยกได้ไม่คืนัก ในอาหารครั้งแรก มา ขีด (streak) ลงบนอาหาร BHI agar (ข้อ 1) เมื่อเชื้อเจริญใช้ลูปเขี่ยเชื้อแบคทีเรีย ลงในอาหาร BHI broth ปริมาณ 2 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในหลอดแก้ว

3. นำสารละลายเชื้อที่ได้ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ บรรจุ 100 มิลลิลิตร ของ BHI broth จากนั้นนำไปเข้าเครื่องเขย่า (shaker) ที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ 30 องศาเซลเซียส เขย่าจนกระทั่งสารละลายเชื้อในฟลาสก์นั้น ขุ่น จากนั้นเติม สารละลายฟอร์มาลีน ร้อยละ 1 ลงไปในฟลาสก์นาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปเข้าเครื่องปั่นแยก (centrifuge) เพื่อแยกส่วนที่เป็น เซลล์ออกมา

4. ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น และล้างซ้ำอีกครั้งด้วย เอทิลอัลกอฮอล์ ร้อยละ 95 จากนั้นทำให้แห้งโดยนำมาใส่ในเดซิเคเตอรระบบสูญญากาศ หรือ ทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เซลล์แห้งที่ได้จะนำไปวิเคราะห์ Diaminopimelic acid (DAP) ต่อไป

#### 6. การวิเคราะห์ Diaminopimelic acid (DAP)

ยึดหลักการ และ วิธีดำเนินการตาม Becker et al. (3) เพื่อศึกษา ถึงการไฮโดรไลซิสเซลล์

1. นำเซลล์ที่หาค่าหนักแห้ง (dry weight) แล้ว จำนวน 3 มิลลิกรัม ใส่ลงในแอมพูล (ampoule) เล็กๆ จากนั้นเติมสารละลายของกรดไฮโดรคลอริก 6 นอร์มัล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทำให้เย็น (cooling)

2. กรองส่วนที่ถูกย่อยสลายออกด้วย กระดาษกรอง NO. 1 (whatman NO.1) แล้วนำส่วนที่กรองได้ (filtrate) ไประเหยให้แห้งใน อ่างอังไอน้ำ (water bath) ที่เดือด จากนั้นเติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร แล้วนำไประเหยให้แห้งอีกครั้ง

3. นำส่วนที่ได้จากการระเหย (residue) มาเติมน้ำกลั่น 0.3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำสารละลายที่ได้ปริมาณ 2 ไมโครลิตร มาหยด (spot) ลงบนแผ่นทินน์เลเยอร์โครมาโตกราฟี (thin layer chromatography, TLC) แล้วนำแผ่นไปตีเวลลอป (develop) ในภาชนะที่อ้อม

ตัวด้วยสารละลายผสม โดยให้ส่วนปลายล่างของแผ่นแช่อยู่ในตัวทำละลายสูงประมาณ 1 เซนติเมตร สารละลายผสมที่ใช้คือ เมทานอล : น้ำกลั่น : 6 N H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : ไพริดีน (80:26:4:10) (vol/vol) เมื่อสารละลายซึมมาถึงตำแหน่งที่ห่างจากปลายบนประมาณ 2 เซนติเมตร นำมาทำให้แห้ง ตรวจหาตำแหน่งของสาร โดยสเปรย์ ด้วยสารละลายของนินไฮดรินร้อยละ 0.2 ในอะซิโตน และอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที

ตำแหน่งของสาร DAP จะปรากฏเป็นสีเขียวอมเทา ถึง เหลืองโดย L isomer จะอยู่เหนือ mesoisomer ส่วนตำแหน่งของสารไฮโดรไลเซทของกรดอะมิโน จะปรากฏเป็นสีม่วง หรือ สีแดง และอยู่ในตำแหน่งที่สูงกว่าตำแหน่งของสาร DAP

หมายเหตุ การ spot จะ spot เทียบกับ สารมาตรฐานของ DAP (DAP standard) 1 ไมโครลิตร ของ 0.01 M DL-DAP (ประกอบด้วย meso และ L DAP isomer)

## 7. การศึกษาคคุณสมบัตินิเวศวิทยาของสารปฏิชีวนะที่ผลิตจากเชื้อที่คัดเลือกได้

7.1 ศึกษาความสามารถในการละลายของสารในตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ (solvent solubility)

7.1.1 ตัวทำละลายที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ คลอโรฟอร์ม (chloroform) , บิวทานอล (butanol) , เฮกเซน (hexane) , เอทิลอะซิเตต (ethylacetate) , เบนซีน (benzene)

7.1.2 วิธีการศึกษา ใช้ส่วนที่เป็นน้ำใสของอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งได้จากการเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้ (ข้อ 3.2) ในอาหารเหลวและสภาวะที่เหมาะสม และช่วงเวลาที่ให้ผลผลิตสูงสุดตามที่ได้ศึกษาไว้ในข้อ 4

7.1.2.1 ใช้ตัวทำละลายที่ไม่ผสม (immiscible) กับน้ำซึ่งได้แก่ คลอโรฟอร์ม เอทิลอะซิเตต เฮกเซน บิวทานอล เบนซีนโดยนำส่วนที่เป็นน้ำใสของอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 3 มิลลิลิตร และ ตัวทำละลาย ชนิดละ 3 มิลลิลิตร

มาเขย่าด้วยความเร็วสูงเป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำชั้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ และชั้นของตัวทำละลายมาทำการทดสอบประสิทธิภาพการสกัดของสารปฏิชีวนะ โดยการทดสอบ ตามข้อ 3.2.6

7.1.2.2 ศึกษาพีเอช ที่เหมาะสมต่อการสกัด โดยการนำส่วนใสที่เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ มาปรับพีเอชโดย 2 N HCl และ 2 N NaOH ให้ได้ พีเอชเป็น 2 4 6 8 ตามลำดับ แล้วทำการสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองตามข้อ 6.1.2.1 และทำการทดสอบ เช่นเดียวกับข้อ 6.1.2.1 เช่นกัน

### 8. การศึกษาเบื้องต้นในการแยกสารปฏิชีวนะที่ผลิตได้ออกจากสิ่งเจือปน (impurity) และ ศึกษาชนิดและโครงสร้างของสารปฏิชีวนะ

ใช้วิธีทินน์เลเยอร์โครมาโตกราฟี (thin layer chromatography) ในการแยกสารปฏิชีวนะออกจากสิ่งเจือปน

8.1 การเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารปฏิชีวนะออกจากสิ่งเจือปน โดยวิธี ทินน์เลเยอร์โครมาโตกราฟี ใช้น้ำส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ แอคติโนมัยลิตที่คัดเลือกได้ ในสภาพเหมาะสมที่สุดเช่นเดียวกับที่ใช้ศึกษาในข้อ 6 นำไปทำให้เข้มข้น โดยเครื่องระเหยภายใต้ภาวะสูญญากาศ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส หยด (spot) สารที่ทำให้เข้มข้นแล้ว ลงบนแผ่นซิลิกาเจล (Silica gel 60; E Merck, Germany) ที่หนา 0.25 มิลลิเมตร กว้าง 10 เซนติเมตร และยาว 10 เซนติเมตร โดยตำแหน่งที่หยด อยู่ห่างจากขอบล่างของแผ่นซิลิกาเจลประมาณ 1.5 เซนติเมตร โดยการหยด (spot) สารที่สกัดได้จะหยด (spot) คู่ไปกับสารปฏิชีวนะมาตรฐาน ได้แก่ Streptomycin Kanamycin Penicillin นำแต่ละแผ่นไปตีเวลลอป (develop) ในภาชนะที่อ้อมตัว ด้วยสารละลายผสม โดยให้ส่วนปลายล่างของแผ่น แขน้อยู่ในตัวทำละลายสูงประมาณ 0.5 เซนติเมตร โดยใช้สารละลายผสม ดังนี้

8.1.1 chloroform / methanol / 25% ammonia / water (1:4:2:1)

8.1.2 chloroform / methanol / 25% ammonia (2:3:2)

8.1.3 ethylacetate / acetic acid / water (3:1:1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8.1.4 acetone/nitrate / water (4:1)

8.1.5 chloroform / ethanol / acetic acid (100:50:15)

8.1.6 15% potassium dihydrogenphosphate, pH 4.4

เมื่อสารละลายซึมมาถึงตำแหน่งที่ห่างจากปลายบนประมาณ 2.0 เซนติเมตรนำมาทำให้แห้ง ตรวจสอบตำแหน่งที่มีการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โดยใช้วิธีออโตไบโอกราฟี (autobiography) กับเชื้อ Staphylococcus aureus TISTR 118 0.6 มิลลิลิตร ที่เป็นสารละลาย โดยมีการเจือจางให้มี 25 เปอร์เซ็นต์ ของการฉายแสงที่ 580 นาโนเมตร โดยใส่ลงใน Nutrient Agar ( ภาคผนวก ก/5 ) ผสมให้เข้ากัน และ แข็งตัวดีแล้ว หลังจากนั้นนำแผ่นซิลิกาเจลที่ผ่านการดีเวลลอป (develop) แล้ว มาวางทับบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่จะทดสอบ รอยบนกระทั่งสารปฏิชีวนะซึมจากแผ่นซิลิกาเจลไปบนอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว ประมาณ 1 นาที แล้วนำแผ่นซิลิกาเจลออกจากผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มอาหารเลี้ยงเชื้อในที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและตรวจสอบตำแหน่งที่มีบริเวณยับยั้งการเจริญ และตรวจสอบตำแหน่งของสาร โดยอบแผ่นซิลิกาเจล ที่ผ่านกรรมวิธีโครมาโตกราฟี อีก 2 แผ่น โดยแผ่นแรกตรวจสอบโดยการอบในภาชนะที่อ้อมตัวด้วยไอของไอโอดีน และแผ่นที่สอง นำมาตรวจสอบตำแหน่งของสารปฏิชีวนะโดยใช้เครื่องกำเนิดแสงที่มีความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และ 365 นาโนเมตร เปรียบเทียบตำแหน่งของสารที่ปรากฏ เมื่อตรวจสอบด้วยวิธีออโตไบโอกราฟี ไอโอดีน และ อัลตราไวโอเล็ต เพื่อกระบวนสารละลายที่เมื่อดีเวลลอป แล้วให้ส่วนที่มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของ Staphylococcus aureus TISTR 118 โดยแยกจากส่วนที่ปะปนอื่น ๆ มากที่สุด

8.2 การใช้วิธีทีนัลเลเยอร์โครมาโตกราฟี ในการแยกสารปฏิชีวนะที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียออกจากสิ่งเจือปน และจำแนกชนิดพร้อมทั้งสูตรโครงสร้างของสารปฏิชีวนะ

8.2.1 นำระบบสารละลายที่เหมาะสมตามข้อ 7.1 มาใช้ในการแยกสารปฏิชีวนะโดยการหาค่ารีเลทีฟเฟรอนท์ (Relative Front, RF value) ของสารปฏิชีวนะมาตรฐานที่ใช้กับสารปฏิชีวนะที่ได้จากกระบวนการหมัก โดย

เชื้อแอคติโนไมซีต ที่คัดเลือกได้

8.2.2 หยอดส่วนน้ำไลของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำให้เข้มข้นแล้วเหมือนข้อ 6 ลงบนแผ่นซีลิกาเจลขนาดกว้าง 10 เซนติเมตร ยาว 10 เซนติเมตร เป็นแนวตรง (streak) ตลอดความกว้างของแผ่นซีลิกาเจล โดยให้ห่างจากขอบด้านละ 1 เซนติเมตร และสูงจากด้านล่าง 1.5 เซนติเมตรนำไปตีเวลลอปในภาชนะที่อิมัวด้วยสารละลายผลึกที่เหมาะสมที่สุด ตามข้อ 7.1 เมื่อสารละลายห่างจากปลายบนประมาณ 2.0 เซนติเมตร นำมาทำให้แห้งติดซีลิกาเจลตำแหน่งที่ทราบแล้วว่ามีสารที่มีผลต่อแบคทีเรียชุดซีลิกาเจลที่เคลื่อนไ้วจากแผ่นซีลิกาเจลที่ติดมา ทำการละลายในสารละลายที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 6.1.2.1 หลังจากนั้นทำการกรองสารละลายที่ได้ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วนำฟิลเตรท (filtrate) ที่ได้นำมาทำให้เข้มข้นโดยเครื่องระเหยแบบสูญญากาศ หลังจากนั้นนำสารที่ได้จากการทำให้เข้มข้นแล้วนี้ ไปตรวจสอบโครงสร้างของสารโดยเครื่องนิวเคลียร์แมกเนติก เรโซแนนซ์ (Nuclear magnetic resonance , NMR)

## บทที่ 4

## ผลการวิจัย และ วิเคราะห์

1. การแยกและคัดเลือกรหัสเชื้อแอสคิโนไมยลิตที่สามารถผลิตสาร  
ปฏิชีวนะบนอาหารแข็ง

จากตัวอย่างดินที่เก็บจากสถานที่ต่าง ๆ เมื่อนำมาแยกและคัดเลือกรหัสเชื้อแอสคิโนไมยลิตที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งและบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 45<sup>o</sup> C สามารถแยกและคัดเลือกรหัสเชื้อได้ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 จำนวนเชื้อแอสคิโนไมยลิตที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะบนอาหารแข็งซึ่งแยกได้จากแหล่งต่าง ๆ

รหัสเชื้อ	สถานที่เก็บ	ลักษณะของดินและการเก็บ	จำนวนไอโซเลทที่แยกและคัดเลือกรหัสได้
A	อ.วิหารแดง จ.สระบุรี	ดินสีน้ำตาลอ่อน ละเยียด เก็บจากผิวดินและลึกลงไปประมาณ 10 นิ้ว	12
D	อ.อุทัย จ.สุพรรณบุรี	ดินสีน้ำตาลเทา สภาวแห้งแล้งเก็บจากผิวดินและลึกลงไปประมาณ 5 นิ้ว	1
G	อ.เมือง จ.ฉะเชิงเทรา	ดินสีน้ำตาลเข้ม ร่วนซุย ละเยียด เก็บจากผิวหน้าดิน	6
J	อ.เมือง จ.นครปฐม	ดินสีเทา ร่วนซุย เก็บจากผิวหน้าดิน	7
H	อ.บางคล้า จ.ฉะเชิงเทรา	ดินสีเทา ร่วน สภาวแห้ง เก็บจากผิวหน้าดิน	1
N	อ.เสนา จ.อยุธยา	ดินสีเทา ร่วนปนทรายเล็กน้อย เก็บจากผิวหน้าดิน	1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 (ต่อ) จำนวนเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะบนอาหารแข็งซึ่งแยกได้จากแหล่งต่าง ๆ

รหัสเชื้อ	สถานที่เก็บ	ลักษณะของดินและการเก็บ	จำนวนไอโซเลทที่แยกและคัดเลือกได้
R	อ.ศรีสวร จ.กาญจนบุรี	ดินสีน้ำตาลแดง ร่วนปนลูกกรัง เก็บจากผิวหน้าดิน	10
S	เขตลาดกระบัง กทม.	ดินสีน้ำตาล เหนียว เก็บจากผิวหน้าดิน	6
T	อ.บางใหญ่ จ.นนทบุรี	ดินสีน้ำตาล ร่วนซุย เก็บจากผิวหน้าดิน และลึกลงไปประมาณ 2 นิ้ว	1
U	อ.แก่ง จ.ระยอง	ดินสีน้ำตาลเข้ม ปนทรายเล็กน้อย เก็บจากผิวหน้าดิน	2
V	อ.เมือง จ.จันทบุรี	ดินสีน้ำตาลปนทราย เก็บจากผิวหน้าดิน	2
W	อ.เมือง จ.ราชบุรี	ดินสีน้ำตาลอ่อน มีเศษฟางแห้งปนบ้าง เล็กน้อย เก็บจากผิวหน้าดิน	6
X	อ.เมือง จ.ชลบุรี	ดินสีน้ำตาล ละเอียด ร่วนซุย มีหญ้าแห้ง ปนเล็กน้อย เก็บจากผิวหน้าดิน	8
Y	อ.บ้านโป่ง จ.ราชบุรี	ดินร่วนปนทราย เก็บจากผิวหน้าดิน	7
Z	อ.เมือง จ.ฉะเชิงเทรา	ดินสีน้ำตาลเหนียวเนื้อละเอียด เก็บจากริมฝั่งแม่น้ำ	16
		รวม	86

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบจำนวนเชื้อแอคติโนมัยสิทธิ์กับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดที่เจริญบนอาหารแข็ง AGS, YSA และ GCA ในดินที่สุ่มมา 10 ตัวอย่าง

รหัสดิน	จำนวนเชื้อแอคติโนมัยสิทธิ์ต่อเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด		
	AGS <sup>1</sup>	YSA <sup>1</sup>	GCA <sup>1</sup>
1	8.4/100	20/100	9/100
2	0	2.7/100	3.1/100
3	0	6.8/100	5.7/100
4	4.1/100	6.9/100	3.2/100
5	2.3/100	9.6/100	6.8/100
6	0	4.8/100	7.6/100
7	0	1.7/100	2.3/100
8	0	9/100	1.6/100
9	0	32/100	9.0/100
10	1.6/100	5.4/100	3.8/100

1. จำนวนโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยสิทธิ์ต่อจำนวนจุลินทรีย์ชนิดอื่น 100 โคโลนี

จากการทดลองนี้ พบว่าอาหารแข็งที่ใช้ในการคัดเลือก

แอคติโนมัยสิทธิ์ที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะซึ่งมีผลต่อแบคทีเรียในชั้นดินได้ดี คือ Yeast - starch agar (YSA) และ Glycerol - casein agar (GCA) เนื่องจากพบแอคติโนมัยสิทธิ์จำนวนมากที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้เมื่อเจริญบนอาหารทั้งสองชนิดนี้ แต่แอคติโนมัยสิทธิ์ส่วนมากจะเจริญบน YSA ได้เร็วกว่า

ที่เจริญบน GCA เห็นได้จากช่วงเวลาการบ่มเชื้อแอสคิตินัมยลิกก่อนที่จะนำไปทดสอบกับเชื้อทดสอบ ถ้าใช้ YSA จะใช้เวลาบ่มเชื้อประมาณ 2-3 วัน ถ้าใช้ GCA จะต้องใช้เวลาบ่มเชื้อ 4-5 วัน และในการคัดเลือกเชื้อแอสคิตินัมยลิกนี้ ถ้าใช้ GCA ซึ่งเป็นอาหารที่มีธาตุอาหารเป็นส่วนประกอบอยู่มากมายหลายชนิด (ภาคผนวก ก.) จะพบว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ เจริญได้ดีเมื่อเทียบกับจำนวนเชื้อแอสคิตินัมยลิก แต่ถ้าใช้อาหาร YSA ซึ่งเป็นอาหารที่มีธาตุอาหารเป็นส่วนประกอบอยู่น้อยและไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์บางชนิด จะได้จำนวนเชื้อแอสคิตินัมยลิกได้มากกว่าเมื่อเทียบกับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด แสดงดังตารางที่ 3 ดังนั้นเมื่อพิจารณาถึงความเหมาะสมในการคัดเลือกเชื้อแอสคิตินัมยลิกแล้ว ควรจะเลือกอาหาร YSA เพื่อใช้ในการคัดเลือกเชื้อในขั้นต่อไป

ความสามารถในการเจริญเติบโตของเชื้อแอสคิตินัมยลิกที่คัดเลือกได้จากตัวอย่างดินต่าง ๆ นั้น ขึ้นอยู่กับ ชนิดของอาหารและอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม แสดงดังตารางที่ 2 และ ตารางที่ 3

ตารางที่ 4. เปรียบเทียบความสามารถในการเจริญเติบโตของเชื้อแอคติโนมัย-  
ลิต เมื่อเลี้ยงในอาหารแข็ง YSA ที่อุณหภูมิ 27° ซ. 45° ซ  
และอุณหภูมิห้อง

รหัสเชื้อ	อุณหภูมิที่บ่ม		
	27° ซ'	45° ซ'	อุณหภูมิห้อง'
A1	++++	-	+++
A2	++++	-	++++
A3	++	-	++
A4	++++	-	++++
A5	++	-	++
A6	+++	+	++++
A7	++++	+	++++
A8	++++	+	++++
A9	++++	-	++++
A10	+++	+++	++++
A11	++++	+++	++++
A22	+++	+	++++
D2	++++	-	++++
G1	++++	++++	++++
G2	++++	++++	++++
G3	++++	-	++++
G4	+++	-	++++
G9	+++	+	+++
G11	++++	++++	++++

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๑ (ต่อ) เปรียบเทียบความเหมาะสมในการเจริญเติบโตของเชื้อ  
แอสคิโทไมซิส เมื่อเลี้ยงในอาหารแข็ง YSA ที่อุณหภูมิ  
27° ซ, 45° ซ และอุณหภูมิห้อง

รหัสเชื้อ	อุณหภูมิที่บ่ม		
	27° ซ <sup>1</sup>	45° ซ <sup>1</sup>	อุณหภูมิห้อง <sup>1</sup>
X5	+++	++++	+++
X6	++++	++++	++++
X7	++++	+++	+++
X11	++++	++++	++++
Y1	+++	++	++++
Y2	+++	-	+++
Y3	++++	-	++++
Y4	+++	-	-
Y5	++++	-	++++
Y6	++++	++++	++++
Y22	+++	-	++++
Z1	+++	+++	++++
Z2	+++	-	+++
Z3	++	-	++++
Z4	+++	-	+++
Z5	+++	-	++++
Z6	++++	-	++++
Z7	+++	+++	+++
Z8	++++	-	++++

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4. (ต่อ) เปรียบเทียบความสามารถในการเจริญเติบโตของเชื้อ  
แอสคิโนไมซีลิก เมื่อเลี้ยงในอาหารแข็ง YSA ที่อุณหภูมิ  
27° ซ, 45° ซ และอุณหภูมิห้อง

รหัสเชื้อ	อุณหภูมิที่บ่ม		
	27° ซ <sup>1</sup>	45° ซ <sup>1</sup>	อุณหภูมิห้อง <sup>1</sup>
Z9	++++	+++	++++
Z10	++++	-	++++
Z11	+++	++	+++
Z12	++++	+++	++++
Z13	+++	++++	+++
Z14	+++	-	++++
Z15	++++	-	++++
Z16	++++	++++	++++

หมายเหตุ 1. + เชื้อแอสคิโนไมซีลิกเจริญได้ 1-30 โคโลนี  
++ เชื้อแอสคิโนไมซีลิกเจริญได้ 31-60 โคโลนี  
+++ เชื้อแอสคิโนไมซีลิกเจริญได้ 61-150 โคโลนี  
++++ เชื้อแอสคิโนไมซีลิกเจริญได้ มากกว่า 150 โคโลนี

จากการทดสอบจะเห็นได้ว่าเชื้อแอสคิโนไมซีลิกที่เจริญบน  
อาหาร Yeast - starch agar (YSA) ที่อุณหภูมิ 27° ซ, 45° ซ และ  
อุณหภูมิห้องมีความสามารถในการเจริญต่างกัน พบว่าเชื้อแอสคิโนไมซีลิกสามารถ  
เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 27° ซ และ 45° ซ แต่ในการทดลองนี้ จะเลือกเชื้อ  
แอสคิโนไมซีลิกที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 45° ซ เพื่อคัดเลือกเชื้อแอสคิโนไมซีลิกที่  
สามารถสร้างสปอร์ที่ทนต่อความร้อนได้ดีที่สุด นั่นคือ จะเลือกเชื้อแอสคิโนไมซีลิกที่สามารถ  
เจริญได้มากกว่า 61 โคโลนีขึ้นไป ที่อุณหภูมิ 45° ซ รวมทั้งสิ้น 21 ไอโซเลต

2. การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสิทธิ์ที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะบนอาหารแข็ง

นำเชื้อแอคติโนมัยสิทธิ์ที่คัดเลือกได้ (ข้อ 1) จำนวน 21 ไอโซเลทมาศึกษาความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะบนอาหารแข็ง โดยเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสิทธิ์ที่มีอายุ 5 วัน บนอาหารแข็ง Glucose peptone meat extract agar (GPMA) และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-7 วัน เมื่อเชื้อเจริญเติบโตแล้วใช้ลูปเชื้อเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ที่ใช้ทดสอบอายุ 24 ชั่วโมง ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อในแนวตั้งฉากกับแนวของเชื้อแอคติโนมัยสิทธิ์ที่ซัดไว้เดิม บ่มเชื้อต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเมื่อตรวจดูบริเวณที่มีการยับยั้งการเจริญ (inhibition zone) ของเชื้อทดสอบพบว่า มีเชื้อแอคติโนมัยสิทธิ์ 19 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งเชื้อ B. subtilis TISTR 81 มีเชื้อแอคติโนมัยสิทธิ์ 20 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งเชื้อ S. aureus TISTR 1181 มีเชื้อแอคติโนมัยสิทธิ์ 14 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งเชื้อ E. coli TISTR 527, มีเชื้อแอคติโนมัยสิทธิ์ 19 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งเชื้อ Saccharomyces carlsbergensis TISTR 5203 และมีเชื้อแอคติโนมัยสิทธิ์ 20 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งเชื้อ C. albicans TISTR 5239 ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบความสามารถของเชื้อแอคติโนมัยลิตที่สามารถเกิดบริเวณยับยั้งการเจริญ (Inhibition zone) ของเชื้อทดสอบเมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง GPMA และบ่มที่อุณหภูมิห้อง

รหัสเชื้อ	เส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งการเจริญ (มิลลิเมตร)				
	<u>B.subtilis</u>	<u>S.aureus</u>	<u>E.coli</u>	<u>Saccharomyces carlsbergensis</u>	<u>C.albicans</u>
A10	20	25	-	10	2
A11	5	18	1	30	10
G1	3	3	1	7	20
J1	5	20	-	8	12
J3	-	10	-	-	-
J6	18	5	-	30	4
N1	14	10	20	16	21
R2	15	25	5	2	5
R5	10	5	-	25	5
R6	2	3	2	5	6
S5	30	30	20	30	25
S6	3	2	5	3	7
X1	30	25	25	25	25
X3	20	25	-	10	2
X6	16	14	11	11	8
X7	5	5	15	3	20
Z1	30	30	10	24	25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 (ต่อ) เปรียบเทียบความลามารถของเชื้อแอคติโนมัยสิทธิ์ที่สามารถเกิดบริเวณยับยั้งการเจริญ (Inhibition zone) ของเชื้อทดสอบเมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง GPMA และบ่มที่อุณหภูมิห้อง

รหัสเชื้อ	เส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งการเจริญ (มิลลิเมตร)				
	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	<i>C. albicans</i>
Z7	25	20	20	-	25
Z9	-	2	-	4	4
Z11	16	16	13	14	12
Y1	2	3	3	4	2

### 3. การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสิทธิ์ที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะในอาหารเหลว

นำเชื้อแอคติโนมัยสิทธิ์ที่คัดเลือกได้ (ข้อ 1) และสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45° ซ จำนวน 21 ไอโซเลทมาศึกษาความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะในอาหารเหลวโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวชนิด Glucose soybean medium (GSM) และบ่มที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน แล้วนำเอาส่วนน้ำใส (supernatant) ไปตรวจหาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธีไบโอแอสเสย์ (bio-assay) โดยใช้เชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 เป็นเชื้อทดสอบเพียงตัวเดียว พบว่ามีเชื้อจำนวน 21 ไอโซเลทที่สามารถผลิตสารซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* และพบว่าเชื้อ 13 ไอโซเลท สามารถผลิตสารปฏิชีวนะแล้วทำให้เชื้อทดสอบถูกยับยั้งการเจริญเป็นวงกว้างกว่า 5 มิลลิเมตร เมื่อวัดจากเส้นผ่าศูนย์กลาง ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิตสารปฏิชีวนะของเชื้อแอคติโนมัยซีทโดยวิธีไบโอแอสเซย์ เมื่อมี Staphylococcus aureus TISTR 118 เป็นเชื้อทดลอง เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว GSM เป็นเวลา 5 วันที่ยอดหมักห้อง

รหัสเชื้อ	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งการเจริญ (มิลลิเมตร)
A10	5
A11	10
G1	2
J1	4
J3	5
J6	2
N1	5
K2	7
K5	3
K6	2
S5	4
S6	9
X1	3
X3	3
X6	7
X7	5
Z1	12
Z7	9
Z9	7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 (ต่อ) เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิตสารปฏิชีวนะของเชื้อ แอคติโนมัยสิทโดยวิธีไบโอแอสเซย์ เมื่อมี Staphylococcus aureus TISTR 118 เป็นเชื้อทดสอบ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว GSM เป็นเวลา 5 วันก่อนหมักห้อง

รหัสเชื้อ	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งการเจริญ (มิลลิเมตร)
Z11	9
Y1	5

จากการคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสิทที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะ (ข้อ 2 และ ข้อ 3) พบว่าเชื้อรหัส Z<sub>11</sub> นั้นมีศักยภาพสูงที่สุดต่อการผลิตสารปฏิชีวนะ โดยสารปฏิชีวนะที่สร้างโดยเชื้อรหัส Z<sub>11</sub> สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ได้มากทั้งปริมาณและชนิดโดยเฉพาะการยับยั้งการเจริญของ Staphylococcus aureus TISTR 118 ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และจากตารางที่ 4 และตารางที่ 5 พบว่าเชื้อรหัส Z<sub>11</sub> เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวจะสามารถสร้างสารปฏิชีวนะและมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง Staphylococcus aureus TISTR 118 ได้ดีกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารแข็ง เนื่องจากในอาหารเหลวจะเกิดการละลายได้ง่ายกว่าในอาหารแข็ง เพราะมีโอกาสสัมผัสกับเอนไซม์มากกว่า (Markyama และคณะ., 1975 ; Suhara และคณะ., 1975) ดังนั้นชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อจึงเป็นปัจจัยสำคัญในการตรวจหาเชื้อที่ผลิตสารปฏิชีวนะ (Brock, 1996) และนอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับสภาพของการเลี้ยงเชื้อด้วย เช่น อุณหภูมิ สภาพความเป็นกรดเป็นด่าง (Iwai and Omura, 1983)

4. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตสารปฏิชีวนะของเชื้อแอคติโนมัยสิทที่คัดเลือกได้

นำเชื้อเชื้อแอคติโนมัยสิทที่คัดเลือกได้ (ข้อ 1, 2 และ 3) จำนวน 1 ไอโซเลทมาทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตสารปฏิชีวนะ โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว DSM และบ่มที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกวันแล้วนำเอาส่วนที่เป็นน้ำใส (supernatant) มาทำการตรวจหาประสิทธิภาพในการสร้างสารยับยั้ง S. aureus TISTR 118 ด้วยวิธีไบโอแอสเสย์ (bioassay) จะพบว่าช่วงเวลาที่มีการผลิตสารปฏิชีวนะมากที่สุดจะอยู่ในช่วงที่เลี้ยงเชื้อได้ 5 วันหรือ 7 วัน และสภาพความเป็นกรดค้างของอาหารในช่วงเวลาดังกล่าวมักจะอยู่ในช่วงที่ค่อนข้างเป็นกลางหรือเป็นด่างเล็กน้อย ไม่ว่าจะเป็อาหารเหลวชนิดใดก็ตาม ผลการศึกษาดังแสดงไว้ในตารางที่ 6 และ รูปที่ 1

จากรูปที่ 1 เมื่อเลี้ยงเชื้อรหัส Z<sub>1</sub> ในอาหารเหลวบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเห็นได้ว่าเชื้อไอโซเลทนี้เจริญได้อย่างช้า ๆ และจะตรวจพบสารปฏิชีวนะในวันที่ 3 ของการบ่มเชื้อซึ่งอยู่ในระยะที่เชื้อมีการเพิ่มปริมาณเซลล์อย่างรวดเร็ว (exponential phase) และตรวจพบปริมาณสารปฏิชีวนะสูงสุดในวันที่ 7 ของการบ่มเชื้อซึ่งเป็นระยะที่ปริมาณเซลล์คงที่ (stationary phase) จากนั้นปริมาณสารที่เชื้อผลิตได้จะคงที่เรื่อย ๆ จนถึงวันที่ 11 ของการบ่มเชื้อและอยู่ในระดับค่อนข้างคงที่ตลอด 4 วัน

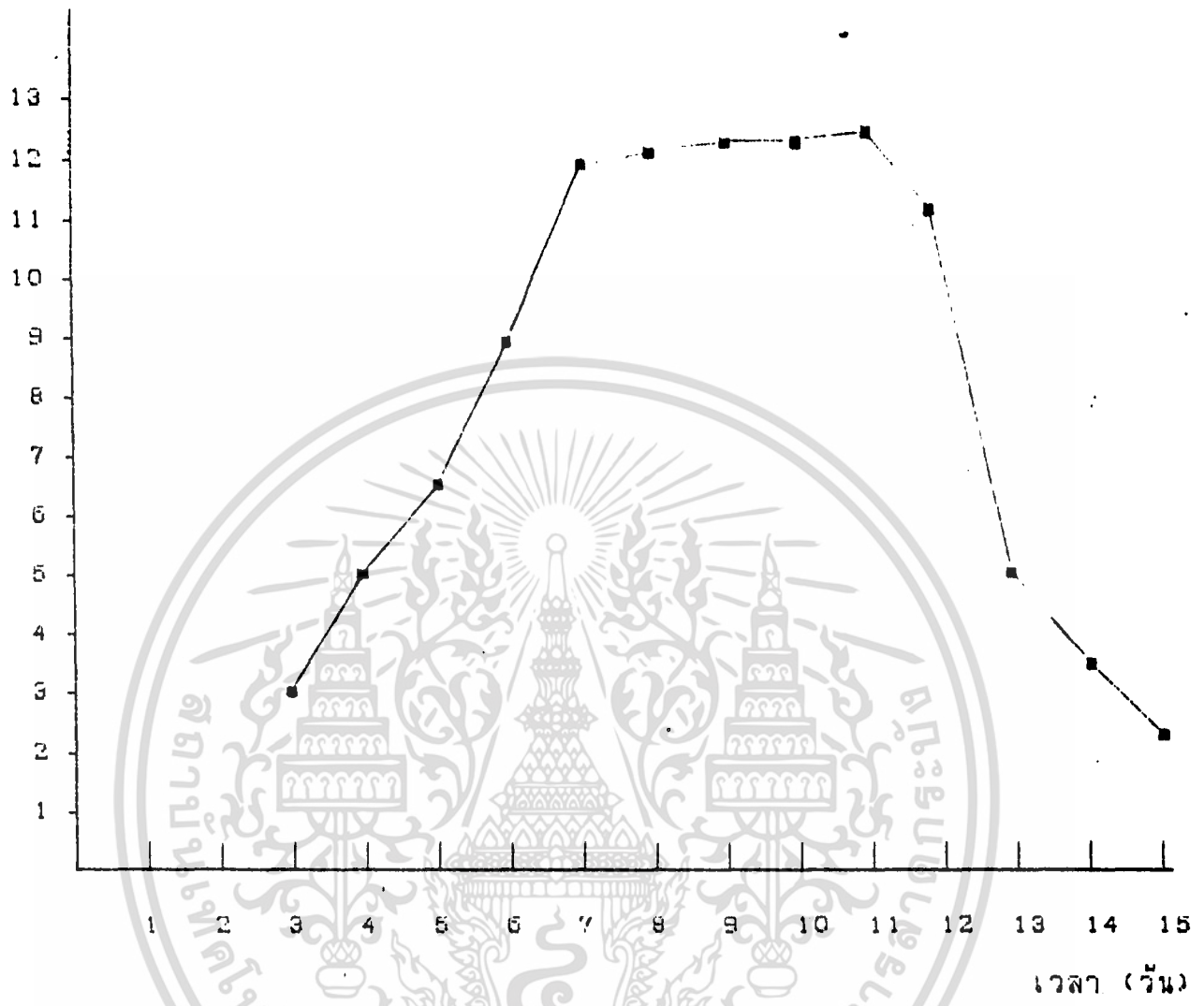
โดยปกติแล้วการผลิตสารปฏิชีวนะซึ่งเป็น secondary metabolite ชนิดหนึ่งนั้นจะไม่เกี่ยวข้องหรือจำเป็นสำหรับการเจริญของสิ่งมีชีวิตนั้น และการผลิตสารประเภทนี้จะเริ่มขึ้นในช่วงสุดท้ายของระยะการเจริญที่มีการเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างรวดเร็ว (exponential phase) ของจุลินทรีย์ใน batch culture (Bu'Lock, 1961; Haavik, 1974; Malik, 1979; Malik and Vining, 1970)

ตารางที่ 7 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตฟาร์บิวรีของเชื้อ  
 แอสดีโนมิยลิตราห์ส 2<sub>1</sub> โดยวิธีไบโอแอสเซย์ (bioassay)  
 ซึ่งใช้เชื้อ Staphylococcus aureus TISTR 118 เป็น  
 เชื้อทดสอบ

เวลา (วัน)	เส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งการเจริญ (มิลลิเมตร)
0	-
1	-
2	-
3	3
4	5
5	6.5
6	9
7	12
8	12.1
9	12.3
10	12.3
11	12.4
12	11
13	5
14	3
15	2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณที่ยับยั้ง (มม.)



รูปที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตสารปฏิชีวนะของเชื้อแอคติโนมัยสิตรหัส 2,

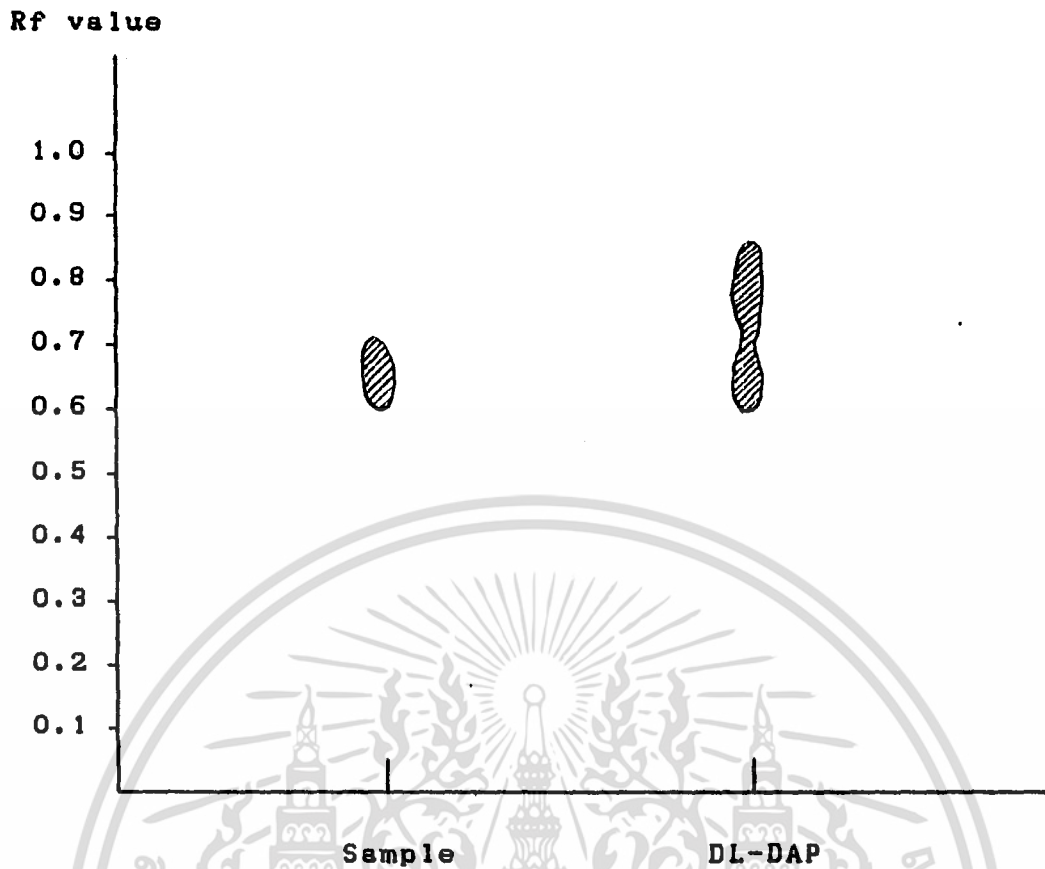
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. การจัดจำแนกเชื้อเชื้อแอคติโนมัยสิท รหัส Z<sub>1</sub> ที่คัดเลือกได้  
จากการจัดจำแนกเชื้อแอคติโนมัยสิทโดยทินน์เลเยอร์โครมา-  
โตกราฟี ตามวิธีของ Joseph L. Stanek และ Glenn D. Roberts  
สามารถจัดจำแนกแอคติโนมัยสิท ได้ดังตารางที่ 7

ตารางที่ ๘ การจัดจำแนกเชื้อแอคติโนมัยสิทโดยทินน์เลเยอร์โครมาโตกราฟี

DAP isomer	organism
L - DAP	<u>Streptomyces</u> sp.
meso-DAP	<u>Nocardia</u> sp. "Rhodochrous" group <u>Actinomadura</u> sp. <u>Micromonospora</u> sp.

เมื่อสกัดผนังเซลล์ของเชื้อรหัส Z<sub>1</sub> แล้วทำทินน์เลเยอร์โครมาโตกราฟี โดยทำการ spot คู่กับสารละลาย DL-DAP แล้วนำไป develop เป็นเวลา 4 ชั่วโมงหลังจากนั้นทำให้แห้งแล้วสเปรย์ด้วยสารละลายนินไฮดรินในอะซิโตน ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองแสดงได้ดัง รูปที่ 2



รูปที่ 2 การแยกสาร DAP โดยทินนเลเยอร์โครมาโตกราฟี

จากรูปที่ 2 จะเห็นได้ว่าผนังเซลล์ของเชื้อรหัส Z<sub>1</sub> จะมีสาร DAP เป็น L-DAP ที่มี Rf value 0.65 เมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐาน DL-DAP (Becker และคณะ, 1966) แสดงให้เห็นว่าเชื้อรหัส Z<sub>1</sub> เป็นเชื้อแอกติโนมัยสิทจีนัส Streptomyces sp.

จากตารางที่ ๑ พบว่า เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งการเจริญที่เกิดจากสารปฏิชีวนะในส่วนที่ใช้บิวทานอลเป็นตัวทำละลายจะกว้างกว่าบริเวณยับยั้งการเจริญที่เกิดจากสารในส่วนที่ใช้ตัวทำละลายชนิดอื่น และความกว้างของบริเวณยับยั้งจากส่วนน้ำหนักรวมจะมีความกว้างน้อยกว่าน้ำหนักรวมที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดอื่น แสดงให้เห็นว่าบิวทานอลเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดสารปฏิชีวนะที่ได้จากการผลิตโดยเชื้อรหัส 2, นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นว่าสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยเชื้อรหัส 2, มีสารที่เป็น *poliar group* อยู่ด้วย

จากการทดสอบดังกล่าวจะพบว่าบิวทานอลเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุดต่อการสกัดสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยเชื้อรหัส 2, และสามารถหาพีเอชที่เหมาะสมต่อการสกัดโดยการปรับพีเอชของน้ำหนักรวมเป็น 2, 4, 6 และ 8 โดยใช้ 2 N HCl และ 2 N NaOH ซึ่งจากการทดลอง (ตารางที่ ๑) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการสกัดโดยใช้บิวทานอล คือ พีเอช 4 เพราะจะมีความกว้างของบริเวณยับยั้งจากชั้นของตัวทำละลายมากที่สุด และความกว้างของบริเวณยับยั้งจากชั้นน้ำหนักรวมที่ผ่านการสกัดแล้ว น้อยที่สุด

6. การศึกษาคุณสมบัติด้านการละลายของสารปฏิชีวนะที่ผลิตจากเชื้อแอคติโนมัยสิทราห์ล  $Z_1$  โดยใช้ตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ และพีเอชที่เหมาะสม

จากการศึกษาความสามารถในการละลายของสารปฏิชีวนะที่อยู่ในส่วนน้ำใสของอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งได้จากการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสิทราห์ล  $Z_1$  ในอาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ โดยใช้ตัวทำละลาย 5 ชนิดได้แก่ เบนซีน, บิวทานอล, คลอโรฟอร์ม, เอทิลอะซิเตต และเอกเซน พบว่าสารปฏิชีวนะที่ผลิตขึ้นโดยเชื้อแอคติโนมัยสิทราห์ล  $Z_1$  สามารถสกัดโดยตัวทำละลายโดยแสดงให้เห็นบริเวณที่มีการยับยั้งจากส่วนของน้ำหนัก และส่วนของตัวทำละลาย (solvent part) ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ความสามารถในการละลายของสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยเชื้อแอคติโนมัยสิทราห์ล  $Z_1$  ในตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

ชนิดตัวทำละลาย	เส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งการเจริญของ <u>S. aureus</u> TISTR 118 (มิลลิเมตร)			
	ส่วนน้ำใส (aqueous part)		ส่วนตัวทำละลาย (solvent part)	
	control	$Z_1$	control	$Z_1$
เบนซีน	0.0	7.0	3.0	3.0
บิวทานอล	0.0	4.0	1.0	7.0
คลอโรฟอร์ม	0.0	7.0	1.0	3.0
เอทิลอะซิเตต	0.0	5.0	1.0	2.0
เอกเซน	0.0	6.0	0.0	4.0

ตารางที่ 10 ความสามารถในการกลั่นสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยเชื้อแอคติโนมัยสิท  
รหัส 2<sub>1</sub> ในระดับที่เอชต่าง ๆ กันโดยใช้บิวทานอลเป็นตัวสกัด

พีเอช	เส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งการเจริญของ <u>S. aureus</u> TISTR 118 (มิลลิเมตร)			
	ส่วนน้ำไล (aqueous part)		ส่วนตัวทำละลาย (solvent part)	
	control	2 <sub>1</sub>	control	2 <sub>1</sub>
2	0	7.0	0	4.0
4	0	7.0	0	13.0
6	0	7.0	0	9.0
8	0	7.0	0	5.0

7. การศึกษาเบื้องต้นในการแยกสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยเชื้อ  
แอคติโนมัยสิทรหัส 2<sub>1</sub> ออกจากสิ่งเจือปน

7.1 การเลือกระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสาร  
ที่ผลิตโดยเชื้อแอคติโนมัยสิทรหัส 2<sub>1</sub> ออกจากสิ่งเจือปน (impurity) โดย  
วิธีทีนัลเลเยอร์โครมาโตกราฟี (thin layer chromatography) ผลการ  
ทดลองในการเลือกระบบของตัวทำละลายที่ดี แสดงได้ดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 แสดงค่า Rf สำหรับสารปฏิชีวนะมาตรฐานกับสารปฏิชีวนะรหัส Z<sub>1</sub> ในระบบตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

Antibiotic	ระบบตัวทำละลาย					
	1	2	3	4	5	6
Penicillin	0.00	0.00	0.5	0.7	0.00	0.40
Streptomycin	0.00	0.0	0.00	0.00	0.73	0.45
Kanamycin A.	0.00	0.25	0.35	0.25	0.00	0.25
Gentamicin C <sub>1</sub>	0.00	0.08	0.00	0.59	0.00	0.28
Neomycin B	0.00	0.00	0.70	0.00	0.0	0.69
Tetracyclin	0.00	0.45	0.00	0.00	0.39	0.7

1. chloroform / methanol / 25 ammonia / water (1:4:2:1)
2. chloroform / methanol / 25 % ammonia / (2:3:2)
3. ethylacetate / acetic acid / water (3:1:1)
4. acetonitrile / water (4:1)
5. chloroform / ethanol / acetic acid (100:50:5)
6. 15 % KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> , pH 4.4

ระบบสารละลายที่เลือกใช้ในการทำทินเนลเยอร์โครมาโตกราฟีนี้ ระบบตัวทำละลายที่ใช้สารละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ความเป็นกรดเป็นด่าง 4.4 เหมาะต่อการทำทินเนลเยอร์โครมาโตกราฟีมากที่สุด เพราะสามารถแยกสารปฏิชีวนะจากเชื้อรหัส Z<sub>1</sub> และสารปฏิชีวนะมาตรฐานออกเป็นส่วนได้มากที่สุด จึงใช้สารละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ความเป็นกรดเป็นด่าง 4.4

แยกสิ่งเจือปนออกจากสารปฏิชีวนะที่ผลิตได้จากเชื้อรหัส  $Z_1$  สำหรับการทดสอบหาตำแหน่ง RF ของสารปฏิชีวนะโดยใช้ออโตไบโอกราฟีนั้น แสดงดังรูปที่ 3 จากการใช้วิธีซิลิกาเจลทินน์เลเยอร์โครมาโตกราฟีและตรวจหาตำแหน่งของสารโดยวิธีออโตไบโอกราฟี (autobiography) และไอของไอโอดีน พบว่าสารละลายของไอแทลเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 4.4 ต่อการแยกสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยเชื้อรหัส  $Z_1$  ออกจากสิ่งเจือปน และตำแหน่งของสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยเชื้อรหัส  $Z_1$  ซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย S. aureus TISTR 118 คือ ตำแหน่งที่ค่า RF เท่ากับ 0.5 ดังแสดงในรูปที่ 3 ซึ่งถ้าสังเกตตำแหน่งของสารด้วยตาเปล่าก่อนการตรวจหาด้วยวิธีต่าง ๆ พบว่าตำแหน่งสารที่ RF 0.5 ตรงกับตำแหน่งที่มีสีเหลืองบนแผ่นซิลิกาเจล

รูปที่ 3 แบบแผนของการแยกสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยเชื้อแอคติโนมัยสิตรหัส  $Z_1$  ออกจากสิ่งเจือปนโดยวิธีซิลิกาเจลทินน์เลเยอร์โครมาโตกราฟี โดยใช้แบบตัวทำละลายที่เหมาะสม

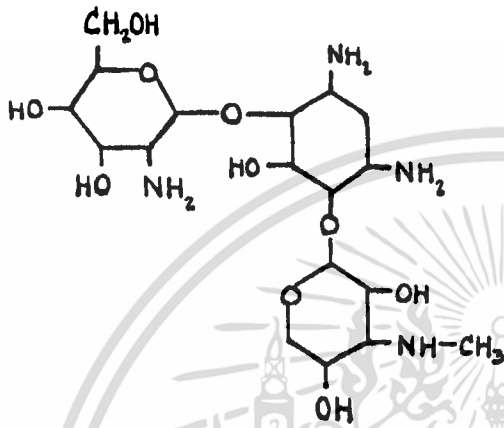
Rf value

1.0  
0.9  
0.8  
0.7  
0.6  
0.5  
0.4  
0.3  
0.2  
0.1



จากวิธีการทดลองที่ 8.2.2 เมื่อสกัดเอาสารปฏิชีวนะที่ Rf 0.5 มาวิเคราะห์สูตรโมเลกุลโดยเครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) สูตรโครงสร้างที่ได้คือ อะมิโนกลัยโคไซด์ ดังรูปที่ 4

รูปที่ 4 ภาพแสดงสูตรโครงสร้างของสารมันูซิวันะที่ได้จากเชื้อราที่ 2<sub>1</sub>



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 5

## สรุปและข้อเสนอนะ

จากตัวอย่างที่เก็บจากแหล่งต่าง ๆ เมื่อนำมาแยกและคัดเลือก เชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย และมีสี เพื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งและบ่มที่อุณหภูมิห้อง สามารถแยกและคัดเลือก ได้ 86% ไลโซเฟลก และเมื่อนำเชื้อที่คัดเลือกได้ทั้งหมดมาคัดเลือก เชื้อที่สามารถ ผลิตสารปฏิชีวนะได้ในเวลาการเลวเปรียบเทียบกับในอาหารแข็ง เพื่อคัดเลือก เชื้อที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการผลิตสารปฏิชีวนะปรากฏว่าได้ เชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะที่สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 45° ซ จำนวน 21 ไลโซเฟลก และได้เชื้อแอนติไบโอติกวทิส Z<sub>1</sub> เป็นเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะได้ดีที่สุด ซึ่งเชื้อตัวนี้แยกได้จากดินริมฝั่งแม่น้ำ อำเภอเมือง จังหวัดและเชิงเทาน สามารถ ผลิตสารซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ใช้เป็นเชื้อทดสอบ คือ Staphylococcus aureus TISTR 118 ได้เป็นอย่างดี และนำมารวมผลิตสารปฏิชีวนะ ได้ปริมาณสูงสุดในเวลา 6SM เหมบ่มเชื้อเป็นเวลา 7 วัน

จากการจัดจำแนกเชื้อแอนติไบโอติกวทิสโดยการทำกินและโครมาโตกราฟี ตามวิธีของ Joseph L. Stanock และ Glenn D. Roberts สามารถจัดจำแนกเชื้อแอนติไบโอติกวทิส Z<sub>1</sub> ไว้ในยีส Streptomyces

สารเริ่มสารปฏิชีวนะที่ผลิตได้โดยเชื้อวทิส Z<sub>1</sub> นี้สามารถแยกหึ่ง เชื้อแบคทีเรียที่ไวต่อการทำกินและโครมาโตกราฟี และเมื่อทดสอบตำแหน่ง ของสารปฏิชีวนะโดยวิธีวงวัดไมโครกราฟ โดยใช้เชื้อ Staphylococcus aureus TISTR 118 เป็นเชื้อทดสอบ ปรากฏว่าตำแหน่งของสารจะอยู่ที่ ตำแหน่งของค่า Rf 0.5 และเมื่อนำมาแยกและตรวจสอบสูตรโมเลกุลโดย ใช้เครื่อง Nuclear magnetic resonance จะได้สูตรโครงสร้างของ สารปฏิชีวนะที่ได้จากเชื้อวทิส Z<sub>1</sub> คือ อะมิโนกลัยโคไซด์

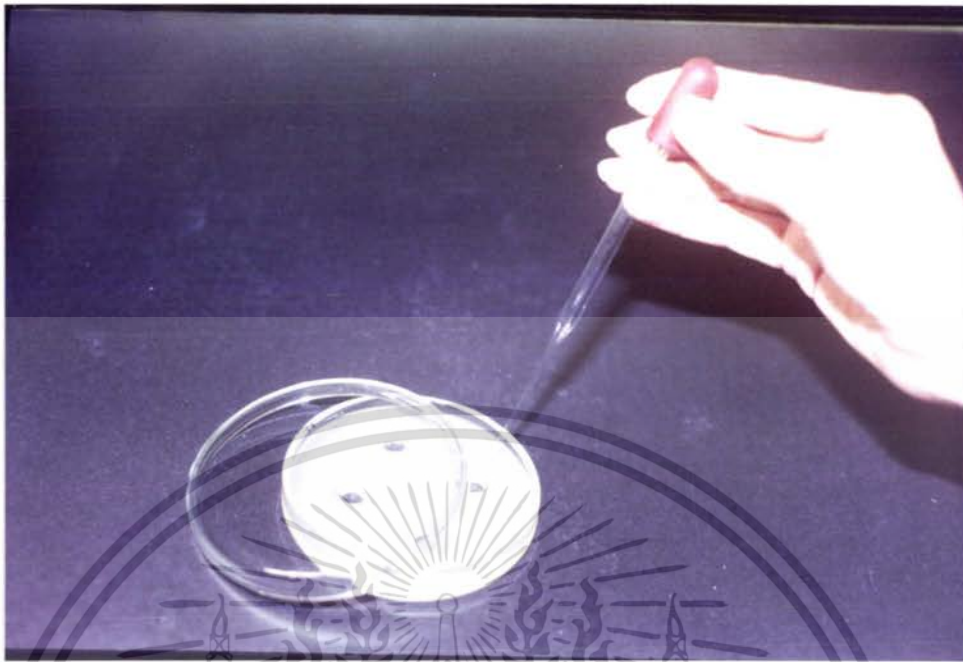


รูปที่ 5 ลักษณะของเชื้อที่บริสุทธิ์แล้วเมื่อเลี้ยงบนอาหารผิวเอียง

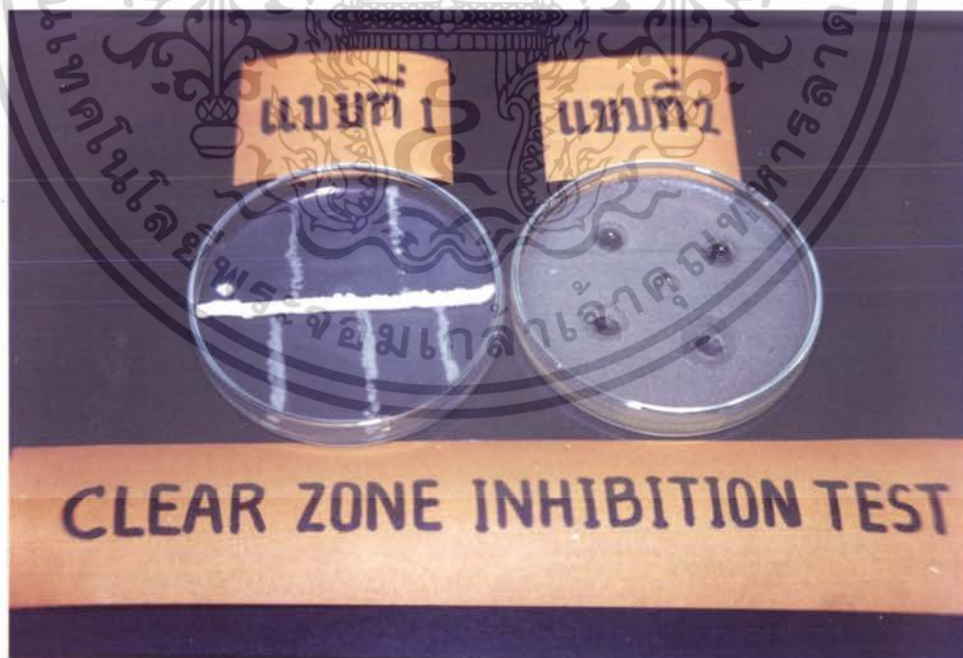


รูปที่ 6 วิธีคัดเลือกเชื้อโดยวิธี Cross streak plate

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

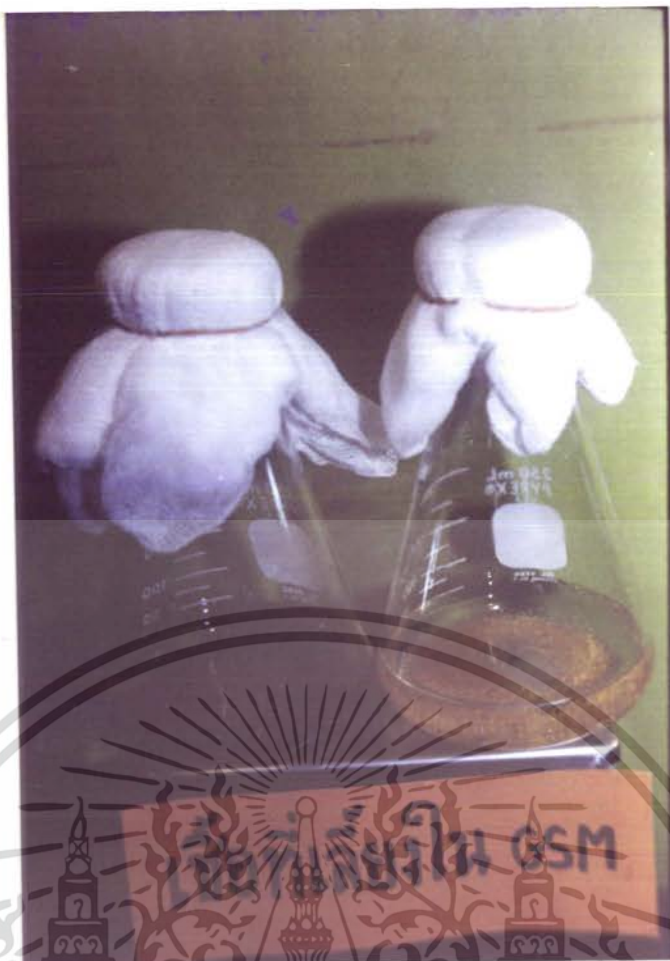


รูปที่ ๗ การตรวจหาความสามารถของเชื้อแอคติโนมัยสิทในการยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่น ๆ



รูปที่ ๘ วิธีการทำไบโอเอสเซย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 9 ลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยลิตที่คัดเลือกได้เมื่อเลี้ยงในอาหาร GSM



รูปที่ 10 การแยกสารปฏิชีวนะที่ผลิตได้ออกจากสิ่งเจือปนโดยวิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Arginine - glycerol - salt medium (AOS).

arginine monohydrochloride	1.0	กรัม
glycerol	12.5	"
$K_2 HPO_4$	1.0	"
NaCl	1.0	"
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5	"
$Fe_2(SO_4)_3 \cdot 6H_2O$	0.01	"
$CUSO_4 \cdot 5H_2O$	0.001	"
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.001	"
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.001	"
agar	15.0	"
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบข้างต้นให้ผสมกันในน้ำกลั่น ปรับ pH เท่ากับ 6.9 - 7.1 ด้วย 1 N. NaOH หรือ 1 N. HCl แล้วจึงเติมวุ้น (agar) หลอมวุ้นให้ละลายโดยใช้ความร้อนนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. Glycerol - casein agar (GCA)

glycerol (or starch)	10.0	กรัม
casein (Difco-vitamin-Free)	0.3	"
$KNO_3$	2.0	"
NaCl	2.0	"

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์การใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ 2.0 ใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.05	กรัม
CaCO <sub>3</sub>	0.02	"
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.01	"
bacto agar (Difco)	15.0	"
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบข้างต้นให้ผสมกันในน้ำกลั่น ปรับ pH เท่ากับ 7.0 - 7.2 ด้วย 1 N. NaOH หรือ 1 N. HCl แล้วจึงเติมวุ้น (agar) หลอมวุ้นให้ละลายโดยใช้ความร้อนนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

### 3. Yeast - starch agar (YSA)

Yeast extract	2.0	กรัม
soluble starch	10.0	"
agar	15.0	"
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบข้างต้นให้ผสมกันในน้ำกลั่น ปรับ pH เท่ากับ 7.3 ด้วย 1 N. NaOH หรือ 1 N. HCl แล้วจึงเติมวุ้น (agar) หลอมวุ้นให้ละลายโดยใช้ความร้อนนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

### 4. Glucose peptone meat extract agar (GPMA)

glucose	10.0	กรัม
meat extract	5.0	"
peptone	5.0	"
NaCl	5.0	"
agar	15.0	"

น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ไปใช้เพื่อการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ละลายส่วนประกอบข้างต้นให้ผสมกันในน้ำกลั่น ปรับ pH เท่ากับ 7.0 ด้วย 1 N. NaOH หรือ 1 N. HCl แล้วจึงเติมวุ้น (agar) หลอมวุ้นให้ละลายโดยใช้ความร้อนนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. Nutrient agar (NA)

beef extract	3.0	กรัม
peptone	5.0	"
agar	15.0	"
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบข้างต้นให้ผสมกันในน้ำกลั่น แล้วจึงเติมวุ้น (agar) หลอมวุ้นให้ละลายโดยใช้ความร้อน นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

6. Glucose soybean medium (GSM)

glucose	2.0	กรัม
soy bean powder	2.0	"
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.3	"
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.005	"
NaCl	0.4	"
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05	"
$\text{CaCO}_3$	0.5	"
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบข้างต้นให้ผสมกันในน้ำกลั่น ปรับ pH เท่ากับ 7.0 ด้วย 1 N. NaOH หรือ 1 N. HCl แล้วจึงเติมวุ้น (agar) หลอมวุ้นให้ละลายโดยใช้ความร้อน นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 15 ปอนด์ต่อ

เอกสารร่างนี้วางสารเป็นเวลา 15 นาทีเพื่อการศึกษเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะ (A-1 agar)

bacto - peptone	10.0	กรัม
beef extract	5.0	"
NaCl	5.0	"
agar	15.0	"
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบข้างต้นให้ผสมกันในน้ำกลั่น แล้วจึงเติมวุ้น (agar) หลอมวุ้นให้ละลายโดยใช้ความร้อน นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่ง ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

8. Brain heart infusion agar (BHI)

Brian heart infusion Agar	52	กรัม
H <sub>2</sub> O	1	ลิตร

ละลายส่วนประกอบด้วยความร้อน และฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่ง ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที ปรับ PH สุดท้ายเป็น 7.4 ± 0.2 ถ้าเป็น BHI broth ทำเช่นเดียวกัน

เอกสารอ้างอิง

1. คาราวิตน์ รอดพลาชี. 2525. สารต่อต้านเชื้อราที่ผลิตโดย Streptomyces sp.Cu 279 จากดินในประเทศไทย. กรุงเทพฯ วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
2. Aharonowitz, y. and A. L. Demain.1977. Influence of norganic phosphate and organic buffers on cephalosporin production by streptomyces clavuligerus. Arch. Microbiol.
3. Aharonowitz, Y. and A.L. Demain. 1977. Nitrogen nutrition and regulation of cephalosporin production in Streptomyces clavuligerus. Can. J. microbiol. 25:61-67
4. Arai, T.;K. Takahashi; J. Ishiguro; and K.Yazywa. 1980. increased production of saframycin A and isolation of saframycins. J. Antibiotics. 18:201-204
5. Arima, K.; H. Imanaka; M.kousaka; A. fukuda; and G. tamyra. 1965. Studies on pyrrolnitrin, a new antibiotic I. Isolation and properties of pyrrolnitrin. J.Antibiotics.33:201-204.
6. Audhya, T. K. and D. W. Russel. 1975. Enniantin production by Fusarium sambucinum primary, secondary and unitary metaboliso J. Gen. microbiol. 86:327-332
7. Bandyopadhyay, S. K. and S. K. Majumdar. 1974. Regulation of the formation of alkaline phosphatase during neomycin biosynthesis. Antimicrob. Agents Chemother. 5:431-434
8. Barbacid. M. and D. Vasquez. 1974. 3H-anisomycin binding to eukaryotic ribosomes. J. Mol. Biol. 84:608-623.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9. Brookes, R. 1969. Dissolved oxygen control. Process Biochem. 4:27-34.
10. Buchanan, R. E. and N. E. Gibbons. 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th ed. Baltimore: The Williams and Wilkins Company.
11. Bu'Lock, J. D. 1961 Intermediary metabolism and antibiotic synthesis. Adv. Appl. Microbiol. 3:293-342.
12. Bu'Lock, J. D.; D. Hamilton; M. A. Hulme; A.J.Powell; H. M. Smalley; D. Sheoherd; and G. N. Smith.1975. Metabolic development and secondary biosynthesis in *Penicillium urticae* Can. J. Microbiol. 11:765-778
13. Cella, R. and L. C. Vining. 1975. Resistance of streptomycin by a producing strain of *Streptomyces griseus*. Can. J. Microbiol. 21:463-471
14. Chatterjee, S. and L. C. vining. 1983. Nutritional requirement for chloramphenicol biosynthesis in *Streptomyces venezuelae*. Can. J. Microbiol. 29:247-253.
15. Cross, T. and M. Goodfellow. taxonomy and classification of the actinomycetes. in Sykes, C. and F. A. Skinner. 1973 Actinomycetales: Characteristics and Practical Importance. London : Academic Press.
16. Cummins, C. S. 1958. Studies on the cell-wall composition and taxonomy of Actinomycetales and related groups. J. Gen. Microbiol. 18:174-189.
17. Davay, V. F. and M. J. Johnson. 1953 Penicillin production in corn steep media with continuous carbohydrate addition. Appl. Microbiol. 1:208-211.

18. Davis, G. H. G. 1959 The classification of certain filamentous bacteria with respect to their chemical composition. J. Gen. Microbiol. 21:612-621.
19. Davis, B.; R. Dulbacco; Esien ; H. Gensberg; and W. Wood. 1973. Microbiology. 3rd ed. Maryland : Harper and Row Publishing.
20. Drew, S. W. and A. L. Demain. 1975. Production of cephalosporin C by single and double sulfur auxotrophic mutants of *Cephalosporium acremonium*. Antimicrob. Agents Chmother. 8:5-10.
21. Drew, S. W. and A. L. Demain. 1977. Effect of primary metabolites on secondary metabolism. Ann. Rev. Microbiol. 31: 342-356.
22. Dulaney, E. L. 1948. Observations on *Streptomyces griseus*. II. Nitrogen sources for growth and streptomycin production. J. Bacteriol. 56:305-313
23. Furukawa, H.; H. Matsuo; T. Deguchi; A. Shiga; and H. Samejima. 1968. Growth-promoting factors for *Lactobacillus bifidus* var. *pennsylvanicus* produced by the aminocarbonyl reaction of L-lysine and D-glucose. Agr. Biol. Chem. 32:617-623.
24. Gallo, M. and E. Katz. 1972. Regulation of secondary metabolite biosynthesis : Catabolite Repression of phenoxazinone synthase and actinomycin formation by glucose J. bacteriol. 109 (2):659-667.
25. Ghonaim, S. A.; A. M. Khalil ; A. A. Abou-zaid; and A. Eldowany. 1980. Factor affecting fermentative production of magnamycin by *Streptomyces halstedii*. Agric. Wastes.

26. Goree, E. Z. and L. E. Day. 1972. Effect of exogenous penicillin on penicillin biosynthesis. Antimicrob. Agents Chemother. 1:315-322.

27. Gottlieb, B. 1976. The production and role antibiotics in soil. J. Antibiotics. 29:987-1000.

28. Haavik, H. I. 1974. Studies on the formation of bacitracin by *Bacillus licheniformis*; Effect of glucose. J. Gen. Microbiol. 81:383-390.

29. Hadgkiss, W. 1965. Variation in spore morphology in a *Streptomyces*. J. gen Microbiol. 41:19.

30. Hall, M. J. and C. H. Hassall. 1970. Production of monamycins, novel depsipeptide antibiotics. Appl. Microbiol. 19:109-112.

31. Halvorson, H. O.; R. Mansen; and Campbell (ed.). 1972. Sporulation antibiotic of *Bacillus* spp., Spore V. Am. Society for microbiology. Washington, D.C.: American Society for Microbiology

32. Hapwood, D. A. 1973. Extrachromosomally determine antibiotic production. Ann. Rev. Microbiol. 23:373-392

33. Hurley, L. H. and D. Bialek. 1974. Regulation of antibiotic production : Catabolite inhibition and the dualistic of glucose on indolmycin production. J. Antibiotics. 27:49-55.

34. Hynes, M. J. 1974. Effect of ammonium, L-glutamate and L-glutamine on nitrogen catabolism in *Aspergillus nidulans*. J. Bacteriol. 120:1116-1123.

35. Isono, K.; K. Asahi; and Suzuki. 1969. Studies of polymyxins, antifungal antibiotic. XIII. The structure of polymyxins. J. Am. Chem. Soc. 91:7490-7500.

36. Twai, Y. and S. Omura. 1982. Culture condition for screening of new antibiotics. J. Antibiotics. 35:123-141.
37. Jones, A. and D. W. S. Westlake. 1974. Regulation of chloramphenicol synthesis in *Streptomyces* sp. 3022a. Properties of arylamine synthetase, an enzyme involved in antibiotic biosynthesis. Can. J. Microbiol. 20:1599-1611.
38. Kanoksilapatham, W. 1981. Studies on Antibiotic Production by *Streptomyces* and especially a *Streptoverticillium* Species. Bangkok: M.S. Thesis, Mahidol University.
39. Ketz, E.; M. Wise; and H. Weissbach. 1965. Actinomycin biosynthesis: Differential effect of chloramphenicol on protein and peptide antibiotic synthesis. J. Biol. Chem. 240:3071-3078.
40. Kenel, Y. M. and A. L. Demain. 1978. Effect of carbon sources on B-lactam antibiotic formation by *Cephalosporium acremonium*. Exp. Mycol. 2:234-238.
41. Khoklov, A. S. and I. I. Tovavova. Autoregulator from *Streptomyces griseus*. in Luckner, M. and K. Schreiber (ed.) 1979. Regulation of Secondary product and Plant Hormone Metabolism. New York: Pergamon Press.
42. Kominek, L. A. 1972. Biosynthesis of novobiocin by *Streptomyces niveus*. Antimicrob. Agents Chemother. 1:123-134.
43. \_\_\_\_\_. 1975. Sclcheximide production by *Streptomyces griseus*: Alleviation of end-product inhibition by dialysis - extraction fermentation. Antimicrob. Agents Chemother. 7:861-863.
44. Korzybski, T.; Z. Kowszyk-Gindifer; and W. Kurylowicz. 1967. Antibiotics: Origin, Nature and Properties. Toronto: PWN-polish Scientific Publishers.

45. Krasil'Nikor, N. A. 1960. Taxonomic principle in the Actinomycetales. J.Bacteriol. 79:65-74
46. Kutzner, H. J. and S. A. Waksman. 1972. Simple working keyfor the classification and identification of named taxa included in the ISP. Int.J. Syst.Bacteriol. 22:139.
47. Laskin, A. I. and E. A. Lechevalier. 1973. Handbook of Microbiology, Vol. III; Microbial products. Ohio; CRC Press, Inc.
48. Liu, Chao-Min; L. E. Mcdaniel; and C. P. Schaffner. 1975. Factor affecting the production of candicidin. Anti-Microb. Agents Chemother. 7:196-202.
49. Malik, V. S. and L. C. Vining. 1972. Effect of chloramphenicol on its biosynthesis by *Streptomyces* species 3022a. Can. J. Microbiol. 18:137-143.
50. Martin, J. F. 1977. Control of antibiotic synthesis by phosphate. Adv. Biochem. Eng. 6:105-127.
51. Martin, J. F. and A. L. Demain. 1980. Control of antibiotic biosynthesis. Microbiol. Reviews. 44(2):230-251.
52. Martin, J. F.; P. Liras; and A. L. Damain. 1978. ATP and adenylate energy change during phosphate- mediated control of antibiotic synthesis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 83:822-828.
53. Masurekar, P. and A. L. Demain. 1972. Lysine control of Penicillin biosynthesis. Can. J. Microbiol. 18:1045-1048.
54. Matelova, V.; A. Brecka; and J. Matouskova. 1972. New method of intermittent feeding in penicillin biosynthesis. Appl. Microbiol. 23:669-670.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

55. Meers, J. L.; D. W. Tempest; and C. M. Brown. 1971. Glutamine (amide): 2-oxo-glutarate amino transferase oxidoreductase (MADP); an enzyme involved in the synthesis of glutamate by some bacteria. J. Gen. Microbiol. 64:187-194.
56. Miller, A. L. and J. F. Walker. 1969. Enzymatic phosphorylation of streptomycin by extract of streptomycin - producing strains of *Streptomyces*. J. Bacteriol. 99:401-405.
57. \_\_\_\_\_. 1970. Accumulation of streptomycin-phosphate in cultures of streptomycin producers grown on a high-phosphate medium. J. Bacteriol. 104:8-12.
58. Miyairi, N.; T. Miyoshi; H. Aoki; M. Kohsaka; H. Ikushima; K. Kungita; H. Sakai; and H. Imanaka. 1970. Studies on thiopeptin antibiotics. J. Antibiotics. 23:113-119.
59. Miyoshi, T.; N. Miyairi; H. Aoki; M. Kohsaka; H. Sakai; and H. Imanaka. 1972. Biocyclomycin, a new antibiotic. I. Taxonomy, isolation and characterization. J. Antibiotics. 25: 569-575.
60. Miyoshi, T.; M. Isoki; T. Konomi; and H. Imanaka. 1980. Biosynthesis of biocyclomycin. I. Appearance of aerial mycelia negative strains (am). J. Antibiotics. 33:480-487.
61. Muth, W. L. and C. H. Nash. 1975. Biosynthesis of mycophenolic acid: Purification and characterization of S-adenosyl-L-methionine demethyltransferase. Antimicrob. Agents. Chemother. 8:321-327.
62. Nara, T.; T. Komuro; M. Misawa; and Kinoshita. 1966. Formation of psicose from glucose in autoclaved and unautoclaved fermentation media. Agri. Biol. Chem. 30:1129-1132.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

63. Nimi, O.; G. Ito; S. Sueda; and R. Nomi. 1971. Phosphorylation of streptomycin at C<sub>6</sub>-OH of streotidine moiety by an intracellular enzyme of *Streptomyces griseus*. Agri. Biol. Chem. 35:848-855.
64. Nishikiord, T.; U.R. Masuma; K. Oiwa; K. Katahira; J. Awaya; Y. Iwai; and S. Omura. 1978. Aurantinin, a new antibiotic of bacterial origin. J. Antibiotics 31:525-532.
65. Nonomura, H. and Y. Ohara. 1969. Distribution of actinomycetes in soil. VI. A culture method effective for both preferential isolation and enumeration of *Microbiospora* and *Streptosporangium* strains in soil. J. Ferment. Technol. 47:463-469.
66. Ogata, K. H. Osawa, and Y. Tani. 1977. Production of an antibiotic by *Streptomyces* sp. a-60. J. Ferment. Technol. 55(3):285-289.
67. Ohno, H.; M. Yoshida, Y. Takahashi, and S. Omura. 1980. Improvement of the productivity of elasin, a specific elastase inhibitor, by *Streptomyces noboritoensis* KM-2753. J. Antibiotics. 33:474-479
68. Okabe, M.; S. Azuma; I. Kojima; K. Kouno; R. Okamoto; Y. Fukagawa; and T. Lshikuba. 1982. Studies on the OA-6129 group of antibiotics, new carbapenem compounds. I. Taxonomy, isolation and physical properties. J. Antibiotics. 35:1019-1263.
69. Okami,; T. Okasake; T. Kitahara; and H. Umezawa. 1976. Studies on marine microorganisms: A new antibiotic, aplasmomycin, produced by a streptomycetes isolated from shallow sea mud. J. Antibiotics. 29:1019-1025.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

70. Omoto, S.; T. Shomura; H. Suzuki; and S. Inouye. 1979. Studies on Actinomycetales producing antibiotics only on agar culture. II. Isolation, structure and biological properties of N-carbamoyl-D-glucosamine (substance SF-1993). J. Antibiotics. 33:436-441.
71. Owen, S. P. and M. J. Johnson. 1955. The effect of temperature changes on the production of penicillin by *Penicillium chrysogenum* W49-133. Appl. Microbiol. 3:375-379.
72. Parenti, F. and C. Coronelli. 1979. Numbers of the genus *Actionplanus* and their antibiotics. Ann. Rev. Microbiol. 33:389-411.
73. Paulus, L. and K. Reczynska-Pojanowska. 1968. On the inhibition mechanisms of viomycin synthesis by inorganic phosphate. Acta Biochem. Pol. 15(4):355-367.
74. Paulus, K. Polymyxins. in Gottlieb, D. and P. D. Show (ed.). 1967. Antibiotic Vol. II. New York:Springer-Verlag, Inc.
75. Perlman, D. and E. O'Brien. 1954. Microbiological production of methylmycin and related antibiotics. Antibiotics Chmother. 4:894.
76. Prival, M. J.; J. E. Brenchley; and B. Magasonik. 1973. Glutamine synthetase and the regulation of histidase formation in *Klebsiella aerogenes*. J. Biol. Chem. 248:4334-4344.
77. Rake, G. and R. Donovick. 1946. Studies on the nutritional requirements of *Streptomyces griseus* for the formation of streptomycin. J. Bacteriol. 52:223-228.
78. Resnick, A. D. and Magasonik. 1976. L-Asparaginase of *Klebsiella aerogenes* : Activation of its biosynthesis by glutamine synthetase. J. Biol. Chem. 251:2722-2728.

79. Salpij, A.; H. Ogawa; and Y. Satomura. 1976. Regulation of N-acetylkanamycin amidohydrolase in the idiophase in kanamycin. Agr. Biol. Chem. 40:191-196.
80. Shirling, E.B. and D. Gottlieb. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. Int. J. Syst. Bacteriol. 16(3):313-340.
81. Shomura, T.; J. Yoshida; S. Amano; M. Kojima; and T. Niido. 1979. Studies on Actinomycetales producing antibiotics only on agar culture. I. screening, taxonomy and morphology-productivity relationship of *Streptomyces halsyedii* strain SF-1993. J. Antibiotics. 32:427-435.
82. Slater, E.C. 1973. The mechanism of action of the respiratory inhibitor, actinomycin. Biochem. Biophys. Acta. 301:129-154
83. Smith, R.L.; H.R. Bungay; and R.C. Pitterger. 1962. Growth-biosynthesis relationship in erythromycin fermentation. Appl. Microbiol. 010;293-296.
84. Soltero, F.V. and M.J. Johnson. 1953. Effect of the carbohydrate nutrition on penicillin production by *Penicillium chrysogenum* Q-176. Appl. Microbiol. 1:52-57.
85. Sparatt, B.G. and J.L. Strominger. 1976. Identification of the major penicillin-binding protein of *Escherichia coli* as D-alanine carboxypeptidase IA. J. Bacteriol. 127:660-663.
86. Stevens, C.M.; E.P. Abraham, F. Huang; and C.T. Sih. 1962. Incorporation of molecule oxygen at C-17 of cephalosporin C during its biosynthesis. Perspect. Biol. Med. 5 : 432.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

87. Suhara. Y.; H. B. Maruyama; Y. Kotoh; Y. Miyasaka; K. Yokose; H. Shirai; K. Takano; P. Quitt; and P. Lanz. 1975. A new antibiotic fumaramidmyoin. II. Isolation, structure and synthesis. J. Antibiotics. 28:648-655.
88. Umezawa, H. 1967. Index of Antibiotics from Actinomycetes, Vol. I. Tokyo: University of Tokyo Press.
89. \_\_\_\_\_. 1978. Index of Antibiotics from Actinomycetes. Vol. II. Tokyo; Japan Scientific Societies Press.
90. Vining. L. C. 1979. Antibiotic tolerance in producer organisms. Adv. Appl. Microbiol. 25:147-148.
91. Waksman, S. A. 1959. The Actinomycetes, Vol. I: Nature, Occurrence and Activities. Baltimore: The Williams and Wilkins Company.
92. Waksman, S. A. and Henrici. Streptomycetaceae. in Buchanan, R. E. and N. E. Gibbons. 1974. Pergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th ed. Baltimore: The Williams and Wilkins Company.
93. Walker, J. B. 1974. Biosynthesis of monoguanidinated inositol moiety of blensomycin, a possible evolutionary precursor of streptomycin. J. Biol. Chem. 249:2397-2404.
94. Weinberg, E. D. 1970. Biosynthesis of secondary metabolites: Role of trace metals. Adv. Microbiol. Physiol. 4:1-44.
95. \_\_\_\_\_. 1973. Secondary metabolism: Control by temperature and inorganic phosphate. Dev. Ind. Microbiol. 15:70-81.
96. Weinstein, M. J.; G. M. Luedemann; E. M. Oden; and G. H. Waksman. 1964. Gentamicin, a new broad-spectrum antibiotic complex. Antimicrob. Agents Chemother. 1963:1-7.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

97. \_\_\_\_\_. 1965. Everninomicin, anew antibiotic complex from *Micromonospora carbacea*. Antimicrob. Agents Chemother. 1964:24-32
98. \_\_\_\_\_. 1968. Halomicin, a new *Micromonospora* produced antibiotic. Antimicrob. Agents Chemother. 1967:435-441.
99. Weinstein, M. J.; C. H. Wagman; J. A. Marquez; R. T. Testa; E. Oden; and J. A. Naitz. 1969. Megalomicin , a new macrolide antibiotic complex produced by *Micromonospora*. J. Antibiotics. 22:253-258.
100. Whitney, J.G.;D.R. Brannon; J.A. Mabe; and K. J. Wickner. 1972. Incorporation of labeled precursors into A 16806. B, a novel B-lactam antibiotic produced by *Streptomyces clavuligerus*. Antimicrob. Agents Chemother. 1:247-251.
101. Yamaguchi, T. 1965. Comparison of the cell- wall composition of morphologically distinct actinomycetes. J. Bacteriol. 89(2):445-453.