

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การยืมยั้งเชื้อราโดยสารปฏิชีวนะจากเชื้อแอสคิโนมัยสิท



โครงการพิเศษนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.
ช163ก
2540

พ.ศ. 2540

เลขหมู่.....

เลขทะเบียน.....30619

วัน, เดือน, ปี.....28 ก.ค. 2541

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Inhibition of Fungi by Antibiotic from Actinomycetes



Miss Chomjit Taothongchai

Miss Dhanaporn Ruksajun

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

1997

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการ การยับยั้งเชื้อราโดยสารปฏิชีวนะจาก Actinomycetes

โดย นางสาวชมจิต ท้าวธงไชย

นางสาวชนพร รักษาจันทร์

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์มงคล เพ็ญสายใจ

อาจารย์ลินจง สุขคำภู

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
อนุมัติให้นับ โครงการพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....

(รศ.ดร.พรรณี ฐิตาภิชิต)

หัวหน้าภาควิชา

คณะกรรมการสอบโครงการพิเศษ

.....

(อาจารย์วีณา ชูโชติ)

ประธานกรรมการ

.....

(อาจารย์มงคล เพ็ญสายใจ)

กรรมการ

.....

(ผศ.อรไท สุขเจริญ)

กรรมการ

**ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การยับยั้งเชื้อราโดยสารปฏิชีวนะจากเชื้อแอสคิโนมัยซีท
นักศึกษา	นางสาว ชมจิต ท้าวธงไชย นางสาว ธนพร รักษาจันทร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ มงคล เพ็ญสายใจ อาจารย์ ลินจง สุขลำภู
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
ปีการศึกษา	2540

บทคัดย่อ

แอสคิโนมัยซีท เป็น กลุ่มของแบคทีเรียชั้นสูงที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้ ซึ่งในโครงการพิเศษนี้ได้ใช้เชื้อแอสคิโนมัยซีท 5 สายพันธุ์ คือ *Streptomyces alboniger*, *Streptomyces aminophilus* และ เชื้อแอสคิโนมัยซีทที่แยกได้จากดินอีก 3 สายพันธุ์ คือ รหัส A , B และ C มาศึกษาความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะโดยใช้เชื้อรา 3 สายพันธุ์ เป็นตัวทดสอบ ได้แก่ *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus parasiticus*. พบว่าสารสารปฏิชีวนะที่สกัดจากเส้นใยโดยเมทานอลของเชื้อแอสคิโนมัยซีท รหัส A ให้ผลยับยั้งราได้ดีที่สุด เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว GMP ครบ 5 วัน และเมื่อศึกษาถึงส่วนประกอบของอาหารที่มีผลต่อการผลิตสารปฏิชีวนะของเชื้อแอสคิโนมัยซีท พบว่าอาหารเหลว GMP ที่มีความเข้มข้นของกลูโคสและแมกนีเซียมร้อยละ 1.5 และ 0.025 ตามลำดับ จะมีผลให้เชื้อเกิดบริเวณยับยั้งมากที่สุด

กิตติกรรมประกาศ

รายงานโครงการพิเศษนี้ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ในการนี้ต้องขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์มงคล เพ็ญสายใจ อาจารย์ลินจง
สุขลำภู อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ชวีณา ชูโชติ ประธานกรรมการ และ ผศ. อรไท
สุขเจริญ อาจารย์กรรมการ ที่ให้คำปรึกษาที่เป็นประโยชน์ในระหว่างการทำโครงการ
พิเศษ และขอขอบพระคุณคุณวิทยา เขียวชิน ที่ให้ความสะดวกเกี่ยวกับการเบิกใช้
อุปกรณ์และสารเคมีในระหว่างการทำโครงการพิเศษ รวมทั้งเพื่อน ๆ น้อง ๆ ที่ช่วย
ให้กำลังใจจนรายงานเสร็จสมบูรณ์

10 เมษายน 2541

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญตาราง.....	ง
สารบัญรูป.....	จ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
- วัตถุประสงค์.....	2
- ขอบเขตการศึกษา.....	2
- ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
2 การตรวจเอกสาร.....	3
- ความหมายของสารปฏิชีวนะ.....	3
- ชนิดของสารปฏิชีวนะแบ่งตามชนิดของจุลินทรีย์.....	3
- เชื้อราที่ปนเปื้อนมากับผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร.....	8
- คุณสมบัติของ <i>Aspergillus</i> sp.....	8
- ส่วนประกอบของอาหารที่มีผลต่อการผลิตสารปฏิชีวนะ.....	11
- การผลิตสารปฏิชีวนะของเชื้อ <i>Streptomyces</i> sp.....	11
- ชนิด , รูปร่าง , โครงสร้าง ของ irumanolides.....	12
3 อุปกรณ์และวิธีการ	
- แหล่งของเชื้อแอสคิโนมัยซีท.....	18
- อุปกรณ์.....	18
- การคัดเลือกเชื้อแอสคิโนมัยซีท ที่ผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของ เชื้อราในอาหารแข็ง.....	18
- การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราของสารปฏิชีวนะ ที่ผลิตได้ โดยใช้ MY agar เป็น assay medium.....	23
- การศึกษาถึงอิทธิพลของส่วนประกอบของอาหารเหลว GMP ที่มีผลต่อการ ผลิตสารปฏิชีวนะ.....	23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4 ผลการวิจัย.....	26
- การศึกษาเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเชื้อ ราบนอาหารแข็ง.....	26
- การศึกษาการสร้างสารปฏิชีวนะในอาหารเหลว.....	32
- การศึกษาถึงอิทธิพลของส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ GMP broth ที่มี ผลต่อการผลิตสารปฏิชีวนะ.....	41
5 สรุป และ วิเคราะห์ ผลการทดลอง.....	44
เอกสารอ้างอิง.....	47
ภาคผนวก.....	49
- ภาคผนวก ก.....	50
- ภาคผนวก ข.....	52



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญดาราง

ตาราง		หน้า
1	รายงานการค้นพบสารปฏิชีวนะที่มีประโยชน์ในทางการแพทย์	5
2	ประวัติการค้นพบ antifungal antibiotic	7
3	ผลของความเป็นแบบเฉียบพลันของอะฟลาทอกซินในสัตว์ต่างๆ	9
4	ผลของสารอะฟลาทอกซินต่อเบ็ดและไก่	10
5	แสดงบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>Aspergillus</i> 3 สายพันธุ์ ของสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยเชื้อแอคติโนมัยสีททั้ง 5 สายพันธุ์	33
6	แสดงบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยเชื้อแอคติโนมัยสีทที่เลี้ยง ในอาหารเหลว GMP ที่มีความเข้มข้นของกลูโคสและแมกนีเซียม ที่ระดับต่างๆ	42

สารบัญรูป

รูป		หน้า
1	แสดงสัญญาณวิทยาของ <i>Aspergillus sp</i>	14
2	แสดงสูตรโครงสร้างของอะฟลาทอกซิน B1,B2,G1 และ G2	15
3	แสดงโครงสร้างของ irumamycin , irumanolides I และ II	16
4	แสดงวิธีการผลิต cephalosporin จากสายพันธุ์ลูกผสมของ <i>Penicillium chrysogenum</i> โดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม	17
5	แสดงเชื้อรา <i>Aspergillus niger</i> ที่เลี้ยงในหลอดอาหารแข็ง NA	20
6	แสดงเชื้อรา <i>Aspergillus parasiticus</i> ที่เลี้ยงในหลอดอาหารแข็ง NA	21
7	แสดงเชื้อรา <i>Aspergillus flavus</i> ที่เลี้ยงในหลอดอาหารแข็ง NA	22
8	แสดงสารปฏิชีวนะส่วนที่ละลายน้ำและส่วนที่สกัดจากเส้นใยโดยใช้ เมธานอล	25
9	แสดงเชื้อรา <i>Aspergillus niger</i> ที่เลี้ยงในงานอาหารเลี้ยงเชื้อ MY agar	27
10	แสดงเชื้อรา <i>Aspergillus parasiticus</i> ที่เลี้ยงในงานอาหารเลี้ยงเชื้อ MY agar	28
11	แสดงเชื้อรา <i>Aspergillus flavus</i> ที่เลี้ยงในงานอาหารเลี้ยงเชื้อ MY agar	29
12	แสดงบริเวณยับยั้งเชื้อรา <i>Aspergillus niger</i> ของเชื้อแอสคิโนมัยซีท A	30
13	แสดงบริเวณยับยั้งเชื้อรา <i>Aspergillus flavus</i> ของเชื้อแอสคิโนมัยซีท A	31
14	แสดงบริเวณยับยั้งเชื้อรา <i>Aspergillus</i> 3 สายพันธุ์ โดยสารปฏิชีวนะ ซึ่งผลิตจากเชื้อแอสคิโนมัยซีท 406 ในอาหารเหลว GMP	34
15	แสดงบริเวณยับยั้งเชื้อรา <i>Aspergillus</i> 3 สายพันธุ์ โดยสารปฏิชีวนะ ซึ่งผลิตจากเชื้อแอสคิโนมัยซีท 526 ในอาหารเหลว GMP	35
16	แสดงบริเวณยับยั้งเชื้อรา <i>Aspergillus</i> 3 สายพันธุ์ โดยสารปฏิชีวนะ ซึ่งผลิตจากเชื้อแอสคิโนมัยซีท A ในอาหารเหลว GMP	36
17	แสดงบริเวณยับยั้งเชื้อรา <i>Aspergillus</i> 3 สายพันธุ์ โดยสารปฏิชีวนะ ซึ่งผลิตจากเชื้อแอสคิโนมัยซีท B ในอาหารเหลว GMP	37
18	แสดงบริเวณยับยั้งเชื้อรา <i>Aspergillus</i> 3 สายพันธุ์ โดยสารปฏิชีวนะ ซึ่งผลิตจากเชื้อแอสคิโนมัยซีท C ในอาหารเหลว GMP	38

สารบัญรูป

รูป		หน้า
19	กราฟแสดงบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>Aspergillus</i> 3 สายพันธุ์ของสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยเชื้อแอสคิโนมัยสึท	39
20	แสดงบริเวณยับยั้งเชื้อรา <i>Aspergillus</i> 3 สายพันธุ์ โดยสารปฏิชีวนะซึ่งผลิตจากเชื้อแอสคิโนมัยสึท A	40
21	แสดงอิทธิพลของส่วนประกอบต่างๆในอาหารเหลว GMP broth ที่มีต่อการผลิตสารปฏิชีวนะ	43



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันได้มีการค้นพบสารปฏิชีวนะต่างๆมากมาย และนำมาใช้ประโยชน์ในการรักษาโรคได้ (วารุณี,2526) เช่น tetracyclin ใช้ในกรณีติดเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดพร้อมกัน, polyoxin ใช้ฆ่าเชื้อโรคต่างๆไป และนำมาใช้ประโยชน์ในการป้องกันโรคพืช เช่น blasticidins ซึ่งใช้เป็นสารฆ่าเชื้อราในใบพืช เป็นต้น (คุชฌี ,2537)

จุลินทรีย์บางชนิดเท่านั้นที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้ แหล่งจุลินทรีย์สำคัญที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะส่วนใหญ่ได้แก่ เชื้อแอคติโนมัยสิท โดยพบว่าสองในสามส่วนผลิตสารปฏิชีวนะที่ใช้ในปัจจุบันมาจากแอคติโนมัยสิท ในประเทศกำลังพัฒนาพบว่าผลผลิตจากการเกษตรที่เก็บเกี่ยวได้มักเกิดความเสียหายจากจุลินทรีย์มากกว่าครึ่งหนึ่งที่เกิดจากเชื้อรา(คุชฌี,2537) ได้มีการทดลองนำสารปฏิชีวนะที่ผลิตจากเชื้อแอคติโนมัยสิท มาใช้ในการยับยั้งเชื้อราแอคติโนมัยสิทที่ผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้มักอยู่ในดิน (สายสนม,2536) จึงควรที่จะทำการคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสิทที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเชื้อราซึ่งอาจปนเปื้อนมากับผลผลิตทางการเกษตรหรือที่อยู่ในโรงเก็บได้ การค้นหาสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ๆเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อจะนำไปใช้กำจัดเชื้อราที่ยังกำจัดไม่ได้หรือลดความเสียหายของผลผลิตทางการเกษตรจากเชื้อรา ซึ่งการศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อราโดยสารปฏิชีวนะที่ผลิตจากเชื้อแอคติโนมัยสิท อาจได้แนวทางหรือข้อมูลที่จะพัฒนาอุตสาหกรรมผลิตสารปฏิชีวนะให้เกิดประโยชน์มากยิ่งขึ้น

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดเลือกเชื้อแอสกีโนไมซีที่ที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะ ซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อราบางชนิด
2. ศึกษาถึงอิทธิพลของส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการผลิตสารปฏิชีวนะ

ขอบเขต

1. ศึกษาความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะของเชื้อแอสกีโนไมซี
2. คัดเลือกเชื้อแอสกีโนไมซี ที่มีความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะ ซึ่งมีผลยับยั้งเชื้อราบางชนิด ได้ดีที่สุด
3. ศึกษาระยะเวลาการบ่มเชื้อแอสกีโนไมซีที่เชื้อจะสามารถผลิตสารปฏิชีวนะ ได้สูงสุด
4. เปรียบเทียบการยับยั้งเชื้อราบางชนิดของสารปฏิชีวนะที่ผลิตจากเชื้อแอสกีโนไมซี ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบต่างกัน

ประโยชน์

1. สามารถนำเชื้อแอสกีโนไมซีไปใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา
2. สามารถนำเชื้อแอสกีโนไมซีที่มีอยู่ในธรรมชาติมาใช้ผลิตสารปฏิชีวนะ ได้
3. เป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อผลิตในระดับการผลิตที่ใหญ่ขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

Waksman ให้คำจำกัดความของสารปฏิชีวนะ (antibiotic) ว่า เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) ของสิ่งมีชีวิตบางชนิดซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ ได้ (Egorov,1985)

การผลิตสารปฏิชีวนะ มีลักษณะที่แตกต่างจากการผลิตสารเมทาบอลิท์อื่นๆของจุลินทรีย์ กล่าวคือไม่ได้ถูกผลิตมาเพื่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์แต่ถูกผลิตขึ้นมาในกรณีพิเศษ (Gottieb,1976) ซึ่งเรียกสารเมทาบอลิท์ชนิดนี้ว่า secondary metabolite และมีจุลินทรีย์บางชนิดเท่านั้น ที่ผลิตสารปฏิชีวนะได้ (สายสนม,2535) และพบว่าสารปฏิชีวนะที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์นั้นสามารถทำลายจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆได้แม้ในความเข้มข้นต่ำ (Dekker,1975) นอกจากนี้สารปฏิชีวนะบางชนิดสามารถต่อต้านเนื้องอกได้ (Egorov,1985) เช่น aclacinomycin จาก *Streptomyces galilaeus* เป็นต้น (คุยฉี,2537)

ปัจจุบันนอกจากจะค้นพบสารปฏิชีวนะที่ผลิตจากจุลินทรีย์แล้วยังพบว่าพืชและสัตว์ยังสามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้เช่นกัน เช่น allicin ผลิตจากกระเทียม, raphanin ผลิตจากเมล็ดหัวผักกาด และ ผลิตจากปลา (Egorov,1985)

อย่างไรก็ตามสารปฏิชีวนะจะมีผลต่อจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งอย่างจำเพาะเจาะจงกล่าวคืออาจยับยั้งจุลินทรีย์กลุ่มหนึ่งได้ แต่ไม่มีผลกับจุลินทรีย์อีกกลุ่มหนึ่ง (Egorov,1985)

ชนิดของสารปฏิชีวนะแบ่งตามจุลินทรีย์ที่ผลิต (Egorov,1985)

1. สารปฏิชีวนะจากแบคทีเรียลำดับ Eubacteriales

1.1 ผลิตจากสกุล *Pseudomonas* เช่น

pyocyanin จาก *Pseudomonas aeruginosa*

viscosin จาก *Pseudomonas visvosa*

1.2 ผลิตจากสกุล *Micrococcus* , *Streptococcus* , *Diplococcus*,*Chromobacterium* ,

Escherichia, *Proteus* เช่น

nisin จาก *Streptomyces lactis*

coliformin จาก *Escherichia coli*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ผลิตภัณฑ์จากสกุล *Bacillus*

gramicidins จาก *Bacillus brevis*

subtilis จาก *Bacillus subtilis*

2. สารปฏิชีวนะจากลำดับ Streptomycetales

streptomycin จาก *Streptomyces griseus*

tetracyclins จาก *Streptomyces rimosus*

novobiocin จาก *Streptomyces spheroides*

3. สารปฏิชีวนะจาก imperfect fungi

penicillin จาก *Penicillium chrysogenum*

trichothecin จาก *Trichothecium roseum*

4. สารปฏิชีวนะจาก fungi ในชั้น Basidiomycete และ Ascomycete

thermophilin จาก *Lenzites thermophila*

lenzitin จาก *Lenzites sepiaria*

5. สารปฏิชีวนะ จากไลเคนส์, สาหร่าย และพืชชั้นต่ำ

usnic acid จาก lichens

chlorellin จาก *Chlorella vulgaris*

6. สารปฏิชีวนะ จาก พืชชั้นสูง

allicin จาก *Allium sativum*

raphanin จาก *Raphanus sativum*

7. สารปฏิชีวนะ จาก สัตว์

lysozyme, ecmolin จาก *Tripanosoma cruzi*

ตารางที่ 1.แสดงรายงานการค้นพบสารปฏิชีวนะที่มีประโยชน์ในทางการแพทย์ และทางการเกษตรกรรม

Year of initial report	Now used in clinical medicine	Now used in Agriculture
Before 1945	Actinonyces D Gramicidin D Penicillin G Streptomycin Bacitracin Griseofulvin Penicillin V Tyrothricin	
1946-1950	Chloramphenicol Colistin Neomycin Polymycin B Chlotetracyclin Pumagillin	Actinomycin A Nisin Cycloheximide
1951-1955	Actinomycin D Erythromycin Nystatin Tetracycline Cycloserine Lucensomycin Spiramycin Viomycin Sarkomycin Trichomycin	Staphylomucins
1956-1960	Aminosidin Hamycin Kanamycin Pentamycin Vancomycin Novobiocin Rifamycin B Mitomycin Pimaricin Variotin Demethyichlorotetracycline	Blasticidin S Stendomucin Cellocidin Mikamycin Tylosin Hygromycin B Thiostrepton

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Year of initial report	Now used in clinical medicine	Now used in Agriculture
1961-1965	Azalomycin Cephalosporin	Aureofungin
	Gentamicin Siccama	Moenomycin
	Lincomycin Bleomycin	Destomycin
	Daunomycin Fusidin acid	Kasuga
	Capreomycin Pyrrolnitrin	Siomycin
1966-1970	Adriamycin Josamycin	Monensin
	Tobramycin Enduracidin	Validamycin
1971-1973	Maredamycin Lividomycin	Lasalodid
	Bicyclomycin Sisomicin	Salinomycin
		Macrabomycin
		Thipeptin
		Mocimycin

ที่มา : Haminton-Miller (1973)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.แสดงประวัติการค้นพบ Antifungal Antibiotics

ปีที่ค้นพบ	ชื่อสารปฏิชีวนะ	ผู้ค้นพบ
1950	Fradicin	Swart,Romano and Waksman
1951	Fungicidin	Hazen and Brown
	Rimocidin	Davission,Tanner, Finlay and Solomons
1952	Antimycoin	Raubitschex Acker and Waksman
	Ascocin	Hickey,et al
	Trichomycin	Hosoya, Komatsu, Soeda and Sonoda
1953	Candicidin	Lechevalier,et al
	Chromin	Wakaki, Hamada,Akanabe and Asahina
	Flavacid	Takahashi
1954	Candimycin	Shibata, Honjo, Tokui and Nakasawa
	Candidin	Taber, Vining, Waksman
	Mediocidin	Okami,et al
1955	Filipin	Whitfield,et al
	Fungichromin	Tytell,et al
1956	Amphotericin A and B	Vandeputte, Wachtel and Stiller
	Antibiotic 1968	Oswald, Reedy and Rendall

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื่องจากผลผลิตทางการเกษตรตลอดจนเมล็ดพันธุ์พืชเมื่อเก็บเกี่ยวจากแปลงแล้วนำมาเก็บไว้เพื่อรอจำหน่ายหรือรอราคาก็ตาม มักพบปัญหาเกี่ยวกับเชื้อราในโรงเก็บ ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายต่อผลิตผลทางการเกษตร องค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติพบว่า ความสูญเสียหลังการเก็บเกี่ยวมีมากถึงร้อยละ 20 ของผลิตผลต่อปี

เชื้อราที่ปนเปื้อนมากับผลิตผลทางการเกษตร และเชื้อราที่พบในโรงเก็บนั้นที่พบบมากที่สุดคือ *Aspergillus sp.* ซึ่งจะกระจายในโรงเก็บและสร้างความเสียหายโดยการปกคลุมเมล็ดหรือผลิตภัณฑ์ รวมทั้งเข้าทำลายเมล็ดหรือผลิตภัณฑ์ได้รวดเร็ว (กัญจนนา,2538)

การที่เชื้อราทั้งที่ติดมาจากไร่ (field fungi) หรือเชื้อราในโรงเก็บ (storage fungi) จะเจริญเติบโตได้ดี ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างเช่น

1. ความชื้น
2. อุณหภูมิ
3. ส่วนประกอบของบรรยากาศ โดยเฉพาะอย่างยิ่งออกซิเจน เพราะเชื้อราส่วนมาก

ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต

คุณสมบัติของเชื้อ *Aspergillus sp.* สรุปได้ดังนี้

1. จัดเป็นเชื้อราชนิดที่มีผนังกัน (septate hypha)
2. มีก้านชูสปอร์ (conidiophore) ออกจากสายใย ตำแหน่งที่ก้านชูสปอร์ออกจากสายใยเรียกว่า foot cell ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าสายใย ปลายก้านของสปอร์จะพองออกเป็นกระเปาะ (vesicle)
3. บนกระเปาะมีตั้ง (phialide) ชั้นเดียว หรือ สองชั้น
4. บนปลายตั้งเป็นที่เกิดของโคนิเดีย (conidia) ซึ่งมีเซลล์เดี่ยว มีลักษณะกลม เมื่อโคนิเดียอ่อนจะอยู่ปลายตั้ง เวลาที่โคนิเดียอ่อนเกิดจะดัน โคนิเดียแก่ออกไปปรากฏ โคนิเดียเป็นสาย ผิวของโคนิเดียอาจเรียบหรือขรุขระคล้ายหนาม ดังแสดงได้ดังรูปที่ 1

เชื้อรานี้นอกจากจะทำให้คุณภาพผลิตผลทางการเกษตรต่ำแล้ว ยังสร้างสารพิษซึ่งการบริโภคผลิตผลทางการเกษตรที่มีเชื้อราขึ้นจะเป็นอันตรายต่อมนุษย์หรือสัตว์ได้ หากเชื้อราสร้างสารพิษ(คุษณี,2537)

เชื้อรา *Aspergillus sp.* ที่มักปนเปื้อนมากับผลิตผลทางการเกษตรหรืออยู่ในโรงเก็บคือ (กัญจนนา,2538)

1. *A.niger* มักปนเปื้อนอยู่ตามหัวหอมและกระเทียม

2. *A. flavus* ขึ้นในเมล็ดธัญพืชโดยเฉพาะข้าวโพด, ถั่วลิสงและสร้างสารอะฟลาทอกซิน ซึ่งก่อให้เกิดอันตรายต่อคนและสัตว์ที่บริโภค

3. *A. parasiticus* สร้างสารอะฟลาทอกซิน พบในถั่วลิสงมาก

สารพิษอะฟลาทอกซินในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรต่างๆที่ผ่านการแปรรูปและยังไม่ผ่านการแปรรูปนั้น ตรวจพบได้ในผลิตภัณฑ์หลายชนิด เช่น ถั่วลิสง ข้าวโพด ข้าวสาร หอม มันสำปะหลัง กระเทียม พริกแห้ง งา ถั่วเหลือง และอาหารแห้ง เช่น ปลาแห้ง กุ้งแห้ง (สุกัญญาและสันทนา ,2540) ซึ่งปริมาณสารอะฟลาทอกซินที่จะปรากฏในอาหารมนุษย์และสัตว์ ได้ต้องไม่เกิน 20 พีพีเอ็ม ยกเว้นนมต้องมีสารอะฟลาทอกซินไม่เกิน 0.5 พีพีบี (ดุษณี,2537) ซึ่งผลของสารอะฟลาทอกซินแบบเฉียบพลันในสัตว์ต่าง ๆ แสดงดังตารางที่ 3.

ตารางที่ 3.แสดงผลของความเป็นพิษแบบเฉียบพลันของสารพิษอะฟลาทอกซินในสัตว์ต่าง ๆ (ดุษณี ,2537)

ชนิดของสัตว์	LD ₅₀ ^a มก.ต่อ กก.น้ำหนักตัว
กระต่าย	0.3
ลูกเป็ดอายุ 1 วัน	0.34
แมว	0.55
หมู	0.6
ปลาเทราท์	0.8
สุนัข	0.5-1.0
แกะ	1.0-2.0
ลิงบาบูน	2.0
ลูกไก่	6.3
หนูตัวผู้	5.5-7.2
หนูตัวเมีย	17.9

นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงผลของสารพิษอะฟลาทอกซินต่อเป็ดและไก่ด้วย แสดงดังตารางที่ 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.แสดงผลของสารพิษอะฟลาทอกซินต่อเป็ดและไก่ (ดุษณี,2537)

สารพิษ	อาการที่แสดง	ปริมาณสารพิษ (พีพีเอ็ม)
อะฟลาทอกซิน	ตายอย่างเฉียบพลัน การตายของเซลล์ตับ และเลือดไหลไม่หยุด	1-10
	ภูมิคุ้มกันบกพร่อง	0.25
	ความต้านทานลดลง	0.6-1.0
	น้ำหนักลดลง (decrease gain)	1.5-2.5
	การผลิตไข่ลดลง	2-8
ไอคราทอกซิน	เกิดการเนื้องอกเฉียบพลัน ท้องร่วง	4-16
	ตาย	
	Toxic nephropathy	4
ที-2-ทอกซิน	น้ำหนักลดลง	2-4
	การผลิตไข่ลดลง	2
	Oral necrosis	4
	น้ำหนักลดลง	4
	การผลิตไข่ลดลง	2

สารพิษอะฟลาทอกซินที่พบอยู่ทั่วไปจะเป็นอะฟลาทอกซิน B1 , B2 ,G1 และ G2
 ดังรูปที่ 2 (สุกัญญาและสันทนา,2540)

การใช้สารปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราตามลคปริมาณเชื้อราที่ปนเปื้อนมา
 กับผลผลิตทางการเกษตรหรือที่อยู่ในโรงเก็บ จะช่วยลดความเสียหายของผลิตผล และยังช่วยลด
 จุลินทรีย์ที่ผลิตสารพิษได้

กลไกในการทำลายเชื้อราของสารปฏิชีวนะ โดยจะเข้าไปจับกับsterol ที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์
 ของเชื้อรา มีผลทำให้โครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์เปลี่ยนแปลง และสูญเสียความสามารถในการ
 ควบคุมการผ่านเข้าออกของสารต่าง ๆ เซลล์จึงไม่สามารถดำรงชีพได้ (วารุณี , 2526)

ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการผลิตสารปฏิชีวนะ โดยต้องอยู่ในปริมาณที่เหมาะสมได้แก่ (วารุณี,2526)

1.แหล่งธาตุอาหารคาร์บอน (carbon source) โดยทั่วไปแล้วกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด และกลูโคสก็ทำให้เกิด carbon metabolite regulation ในการผลิตสารปฏิชีวนะหลายชนิด และยังพบว่าสามารถใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตสารต่อต้านเชื้อราได้ (ดรรรัตน์2525)

2.แหล่งธาตุอาหารไนโตรเจน (nitrogen source) นิยมใช้ถั่วเหลืองบด (soybean meal) เป็นแหล่งไนโตรเจน นอกจากนี้ยังใช้เปปโตนและสารสกัดจากเนื้อและ NaNO_3 มาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนผลิต temenimycin

3.อนินทรีย์ฟอสเฟต (inorganic phosphate) ถ้ามีอนินทรีย์ฟอสเฟตมากจะเร่งการใช้แหล่งอาหารคาร์บอน , ไนโตรเจน เป็นผลให้เจริญดี แต่การผลิตสารปฏิชีวนะจะลดลง

4.โลหะที่ต้องการในปริมาณน้อย (trace metals) ใช้เป็น โคแฟกเตอร์ในปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยเอนไซม์ ความต้องการโลหะนั้นอยู่ในปริมาณน้อยและต้องการในการผลิตสารปฏิชีวนะและการเจริญต่างกัน โดยจะต้องการในการผลิตมากกว่าในการเจริญมาก

Streptomyces griseus ผลิตสารปฏิชีวนะชื่อ candididin ซึ่งพบว่าจะเริ่มผลิตcandididin เมื่อบ่มเชื้อ 16 ชั่วโมง และ เซฟาโรสปอริน ผลิตได้จาก *S. persicinus p- 10* (Martin ,1980)

Kondon และ Nakamura (1977) ได้ค้นพบสารanticholesterol ซึ่งประกอบด้วย cholestrol และ polyene ซึ่งสาร 2 ตัวนี้สามารถยับยั้งเชื้อราได้โดยแยกสารนี้ได้จาก *Streptomyces H646-SY3* ซึ่งแยกได้จากดิน

สายพันธุ์เดิมคือ *Streptomyces roseovirdis* และพบว่าเมื่อใช้สาร anticholesterolที่ได้จาก *Streptomyces H 646-SY3* ร่วมกับtrichomycin ในความเข้มข้นที่เหมาะสมจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทั้งราและยีสต์ได้ดี

Streptomyces clavuligerus สามารถผลิต β -lactam antibiotic ได้และพบว่า *Streptomyces clavuligerus* NRRL 3585 (ATCC27664) สามารถผลิต penicillin N , cephalosporins โดยพบว่าที่ $A_w = 0.99$ การผลิตสารปฏิชีวนะจะเพิ่มขึ้น มีการทดลองศึกษาถึงการใช้แหล่งคาร์บอนของ *S. clavuligerus* NRRL 3585 พบว่าเชื้อนี้ใช้กลูโคสไม่ได้เนื่องจากระบบการนำกลูโคสไปใช้ผิดปกติไป จึงนำกลูโคสไปใช้ในการเจริญของเซลล์ได้ไม่เพียงพอ เซลล์จึงใช้กลีเซอรอลแทน (Cochet and Demain , 1996)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการศึกษาผลของสารปฏิชีวนะต่อเชื้อราโรคพืช มีรายงานถึงการศึกษาการยับยั้ง *Pythium arrhenomanes* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรครากเน่าในข้าวโพด พบว่าเชื้อแอสคิโนมัซีท ให้ผลการยับยั้งที่ดี และพบว่าโรครากเน่าจากเชื้อนี้ในอ้อยลดลงอย่างมากเมื่อใส่เชื้อแอสคิโนมัซีท ลงไปในดิน (Gottlieb, 1976) นอกจากนี้ดินแหล่งต่างๆ ของประเทศไทยจำนวนหลายตัวอย่างมี ผลยับยั้ง *Aspergillus niger* ได้ (วารุณี, 2526)

Streptomyces A67 ผลิตสารปฏิชีวนะเมื่อเลี้ยงในดินที่ไม่ได้ผ่านการสเตอไรส์และใส่ถั่วเหลืองบด (soybean meal) 0.5 กรัม , กลูโคส 0.5 กรัม , แคลเซียมคาร์บอเนต 0.2 กรัม และ และน้ำแช่ข้าวโพด (corn steep liquor) 0.15 มิลลิกรัม ลงไป ส่วน *Streptomyces venezuelae* สามารถผลิตคลอแรมฟิสิกอล เมื่อใช้เวลาลบเชื้อค่อนข้างนาน (Gottlieb, 1976)

irumamycin เป็นสารปฏิชีวนะซึ่งยับยั้งเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพืชผลิตได้จาก *Streptomyces subflavus* subsp *irumaensis* AM-3603 นอกจากนี้ *Streptomyces subflavus* subsp *irumaensis* FN-114 สามารถผลิตสารปฏิชีวนะใหม่อีก 2 ตัว คือ irumanolides I และ II ซึ่งมีคุณสมบัติ ทางกายภาพและเคมีดังนี้

ลักษณะรูปร่าง	irumanolides I		irumanolides II			
	สีขาว	ปน ร่วน	สีขาว	ปน ร่วน		
elemental analysis (%)	C	70.65	68.89	H	9.37	9.62
สูตรโครงสร้าง	$C_{34}H_{54}O_7$		$C_{34}H_{56}O_8$			
น้ำหนักโมเลกุล	574		592			

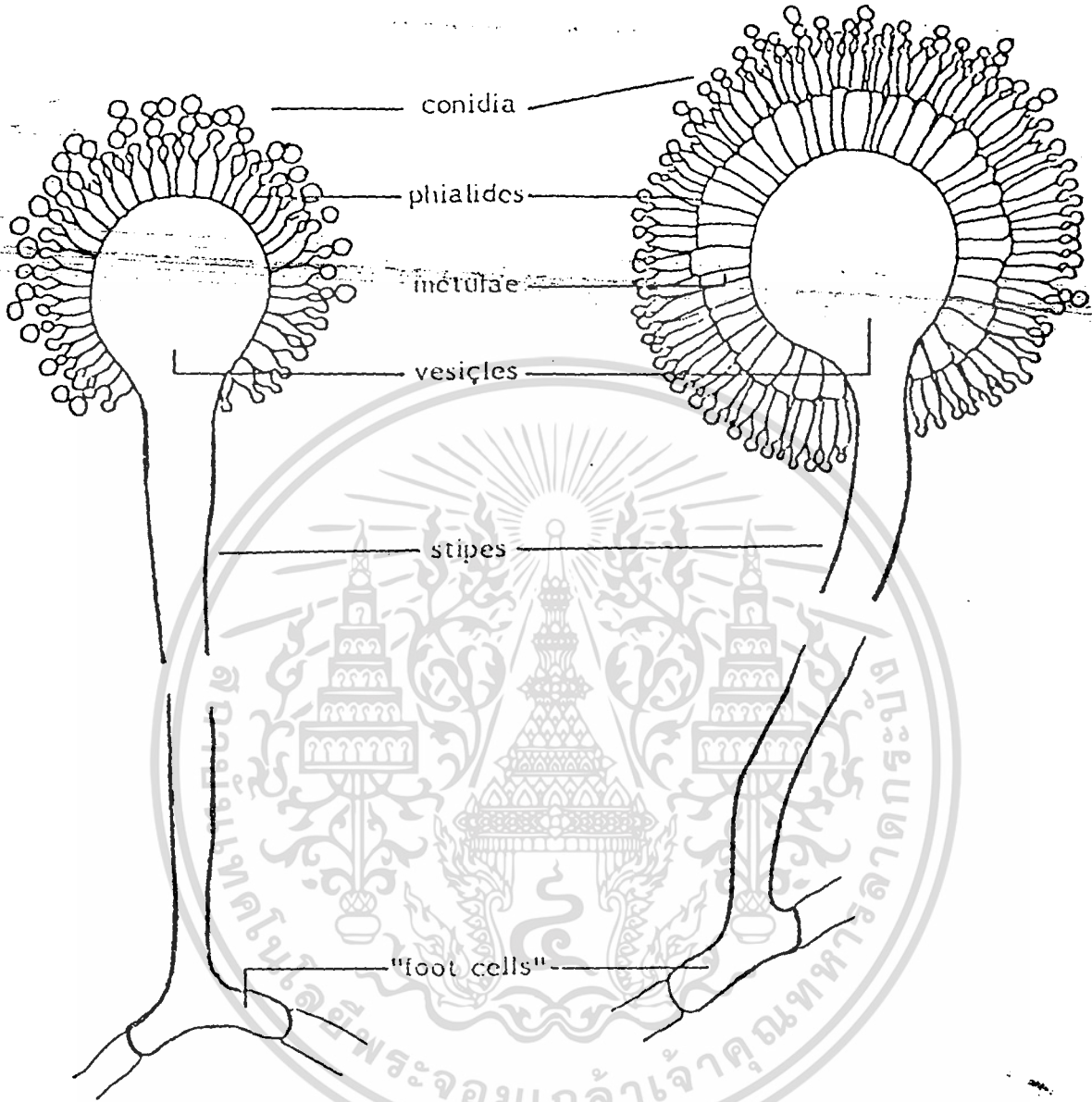
โครงสร้างของ irumamycin, irumanolides I และ II แสดงดังรูปที่ 3 จากรูปจะเห็นว่าโครงสร้างของทั้งสองตัวนี้ จะต่างกันตรงตำแหน่ง R_1 และ R_2 นั้นเอง และจากการศึกษาพบว่า irumanolides I และ irumanolides II มีฤทธิ์ยับยั้ง *Sclerotinia cinerae* และ *Piricularia oryzae* ได้ค่อนข้างน้อยในขณะที่สามารถยับยั้ง *Aspergillus niger* และ *Candida albicans* ได้ดี

สารปฏิชีวนะมากกว่า 5,000 ชนิด ที่แยกได้จากแบคทีเรีย, รา, แอสคิโนมัซีท และพืชนั้น ประมาณ 60 % แยกได้จากแอสคิโนมัซีท โดยเฉพาะสกุล *Streptomyces* sp. มักใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ มากมาย จึงได้มีความพยายามที่จะปรับปรุงสายพันธุ์ของ *Streptomyces* ให้มีความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะอย่างสม่ำเสมอ มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ (Cochet, 1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

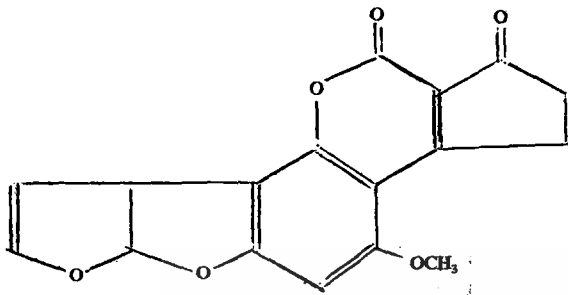
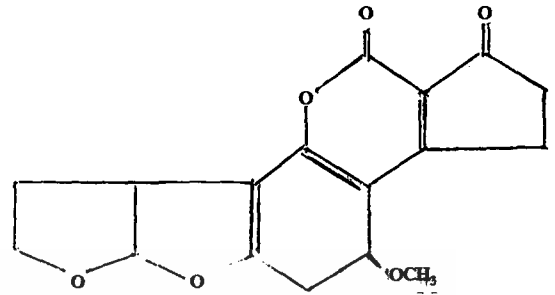
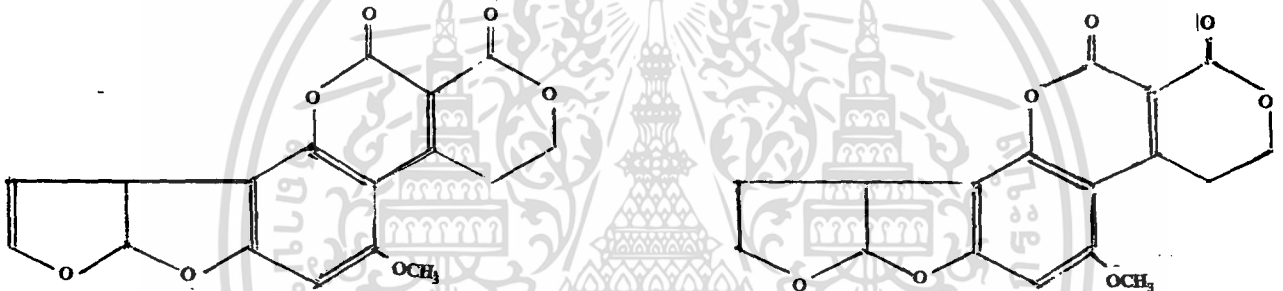
สารปฏิชีวนะที่พบว่าผลิตจาก *Streptomyces* มีมากมายหลายชนิด เช่น cephamycin, tylosin actinorhodin, undecylprodigiosin, streptomycin, puromycin, oxytetracyclin เป็นต้น ฉะนั้น เทคนิคที่จะนำมาใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์ของ *Streptomyces* sp. ดังกล่าวจึงเป็นที่น่าสนใจเป็นอย่างมาก เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมนับเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพที่ถูกนำมาใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์ในอุตสาหกรรมการผลิตสารปฏิชีวนะ ตัวอย่างเช่น การใส่ยีน cef D และยีน cef E ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการผลิต cephalosporin ของเชื้อ *Streptomyces clavuligerus* เข้าไปในโครโมโซมของ *Penicillium chrysogenum* ทำให้ *Penicillium chrysogenum* สามารถผลิต cephalosporin ได้ ดังแสดงในรูปที่ 4





รูปที่ 1 แสดงสัณฐานวิทยาของ *Aspergillus* sp.

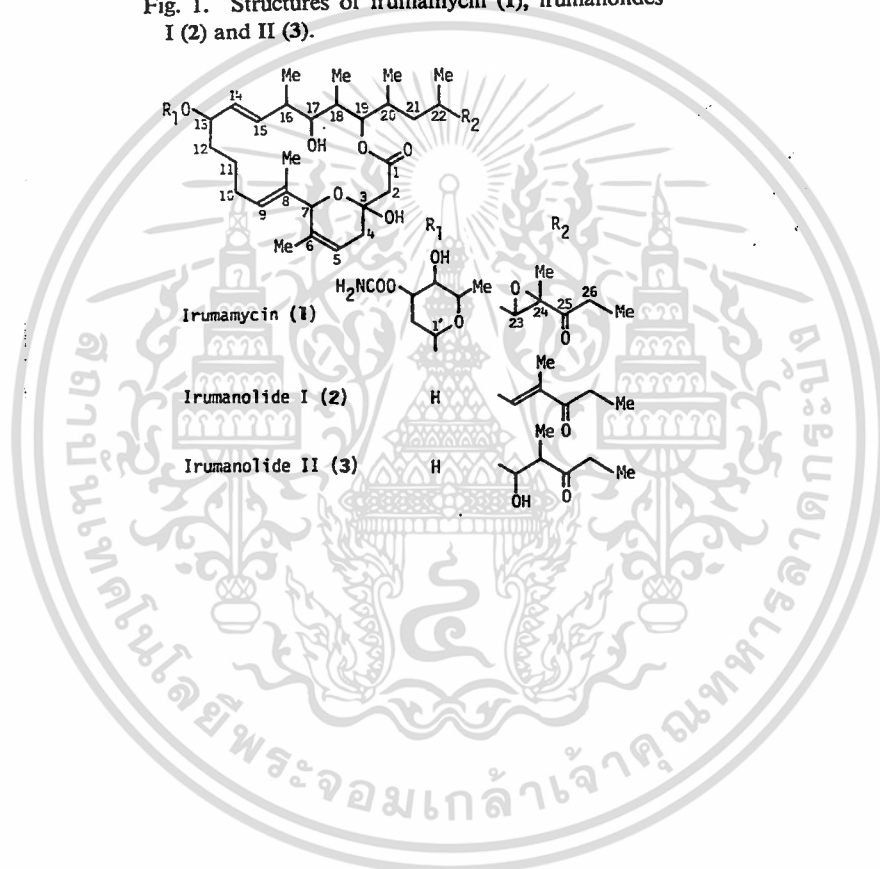
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

B₁B₂G₁G₂

รูปที่ 2 แสดงสูตรโครงสร้างของอะฟลาทอกซิน B₁, B₂, G₁ และ G₂

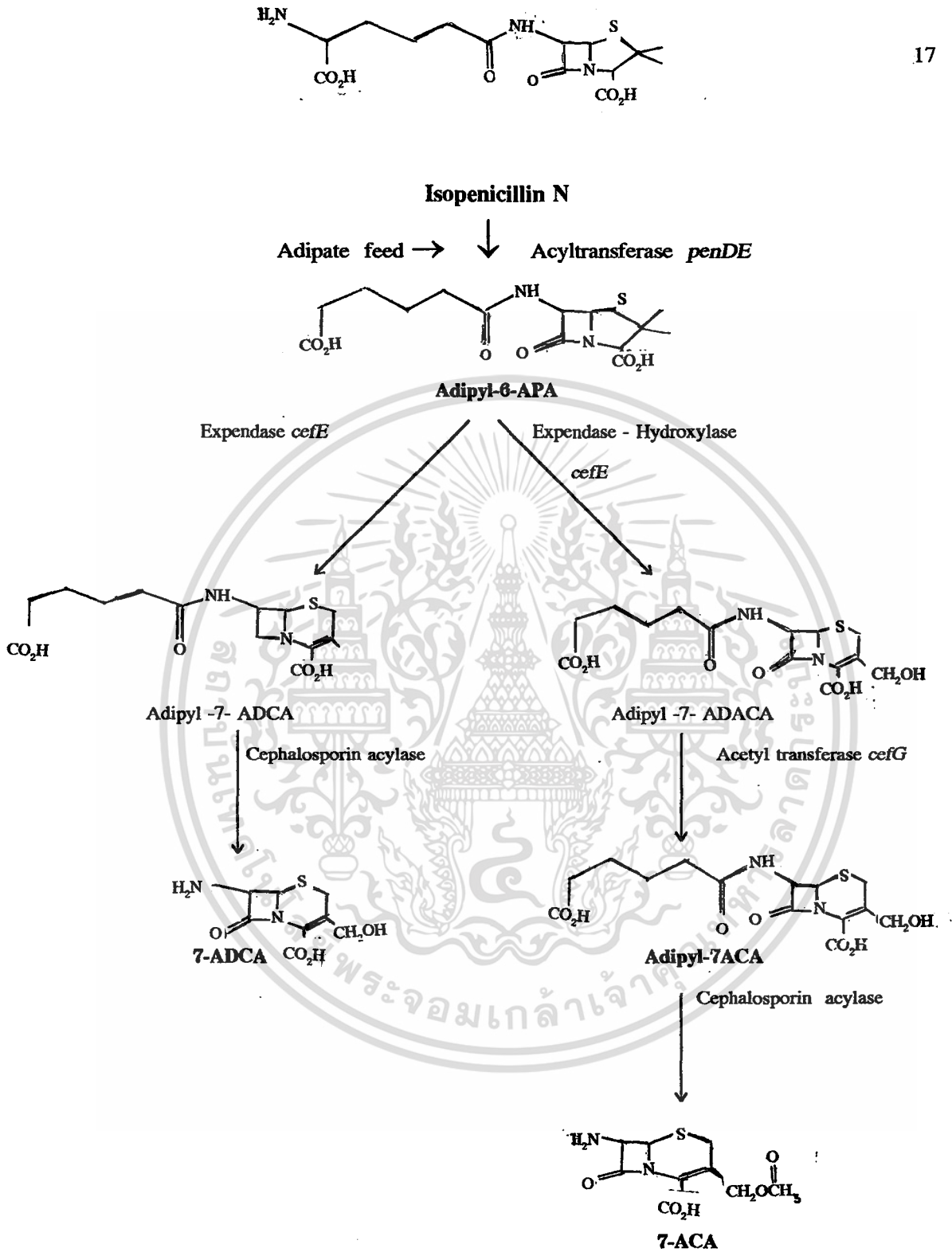
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Fig. 1. Structures of irumamycin (1), irumanolides I (2) and II (3).



รูปที่ 3 แสดงโครงสร้างของ irumamycin, irumanolides I และ II

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4 แสดงวิถีการผลิต cephalosporin จากสายพันธุ์ลูกผสมของ *Penicillium chrysogenum* โดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 8 อุปกรณ์ และ วิธีการ

3.1 แหล่งของเชื้อแอสโคดีโนไมซีตา

Streptomyces alboniger TISTR 406

Streptomyces aminophilus TISTR 526

เชื้อแอสโคดีโนไมซีตา A , B , C ที่แยกได้จากดิน

3.2 อุปกรณ์

เครื่องเขย่า (shaker)

ตู้ปลอดเชื้อ (larmina air flow)

เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)

เครื่องวัดพีเอช (pH meter)

ตู้อบเชื้อ (incubator)

cork borer

3.3 การคัดเลือก เชื้อแอสโคดีโนไมซีตา ที่ผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเชื้อราในอาหารแข็ง เชื้อรา และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้

อาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ P-5 agar ตารางภาคผนวก ก.

เชื้อราที่ใช้เป็นเชื้อทดสอบ ได้แก่ เชื้อรา *Aspergillus* sp. 3 สายพันธุ์
ได้แก่

Aspergillus niger

Aspergillus parasiticus

Aspergillus flavus

3.3.1 วิธีการคัดเลือกเชื้อ มีขั้นตอนดังนี้ คือ

3.3.1.1) เตรียมสารแขวนลอย (suspension) ของแอสโคดีโนไมซีตา ทั้ง 5 สายพันธุ์
โดยการเขย่าเชื้อแอสโคดีโนไมซีตาลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient
broth ปริมาตร 50 มล. นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 250 รอบต่อวินาที นาน 2 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.1.2) เทออาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar (NA) ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จานละ 20 มล. ใ้บีปเปิดดูดสารแขวนลอยของเชื้อแอกติโนมัยสีท 1 มล. ลงมา spread บนผิวหน้าอาหาร nutrient agar ที่เตรียมไว้บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 4 วัน

3.3.1.3) เทออาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA)ลงในจานเลี้ยงเชื้อจานละ 20 มล. เขี่ยเชื้อราที่จะใช้ทดสอบลงบนผิวของอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 4 วัน

3.3.2 วิธีทดสอบ

3.3.2.1) เทออาหารเลี้ยงเชื้อ P-5 agar ลงในจานอาหารเชื้อ จานละ 20 มล.

3.3.2.2) ใช้ cork borer เจาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar ที่ spread เชื้อแอกติโนมัยสีท พร้อมบ่มไว้แล้ว 4 วัน มาวางตรงกลางของจานอาหาร P-5 agar

3.3.2.3) ใช้ cork borer เจาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เขี่ยเชื้อราที่บ่มไว้แล้ว 4 วันมาวางบนจานอาหาร P-5 agar ที่วางเชื้อแอกติโนมัยสีท ไว้ตรงกลางแล้วโดยวางเป็นจุด 4 จุด จุดละมุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 4 วัน วัดความกว้างของบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น

3.4 การศึกษาการสร้างสารปฏิชีวนะในอาหารเหหลวง

นำเชื้อแอกติโนมัยสีทที่คัดเลือกได้จากข้อ 2 มาทดสอบความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะในอาหารเหหลวงอีกครั้ง โดยอาหารเหหลวงที่ใช้คือ อาหารเหหลวง GMP เพื่อคัดเลือกว่าเชื้อสายพันธุ์ใด สามารถผลิตสารปฏิชีวนะ ที่มีความสามารถในการยับยั้งราที่ใช้ทดสอบได้มากที่สุด

3.4.1 การทดสอบสารปฏิชีวนะในอาหารเหหลวง

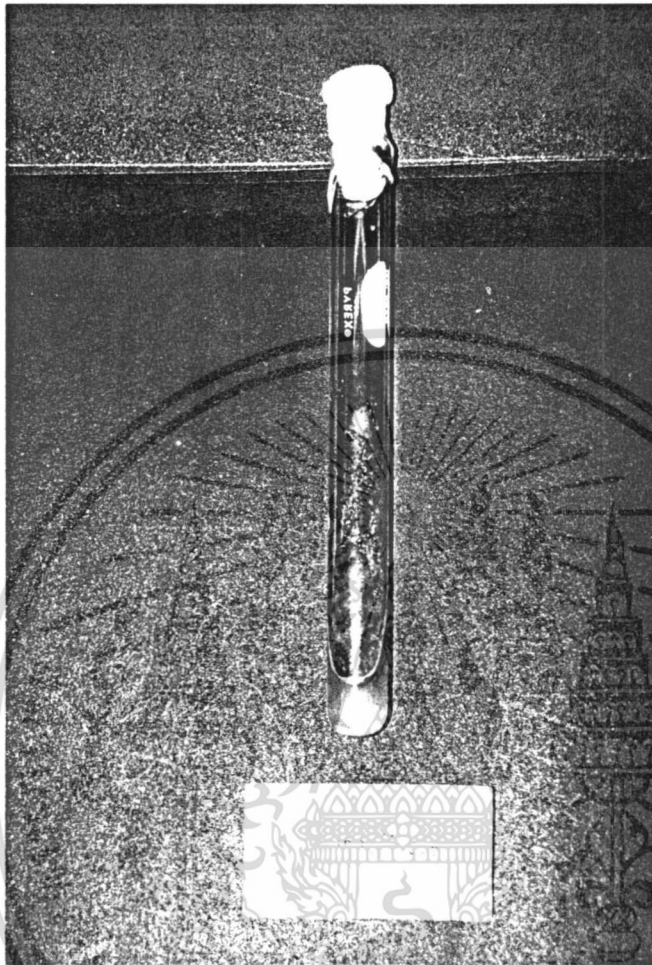
3.4.1.1) นำกล้าเชื้อแอกติโนมัยสีทลงในฟลasks ขนาด 250 มล. ที่บรรจุอาหารเหหลวง GMP ปริมาตร 50 มล. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างในช่วง 3 , 5, 7 วัน นำไปวัดค่าความเป็นกรดต่างที่เปลี่ยนไปในอาหาร จากนั้นนำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) แยกส่วนที่เป็นเสียของเชื้อออกจากอาหาร โดยใช้ความเร็วรอบ 15,000 รอบต่อนาที ที่ 0 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที นำส่วนน้ำ (supernatant) ไปตรวจหาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราทดสอบ

3.4.1.2) สำหรับส่วนของเส้นใย นำมาสกัดแยกสารที่อยู่ในเส้นใยโดยใช้เมทานอล (methanol) 50 มล. นำเข้าเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที นาน 2 ชั่วโมง จากนั้น



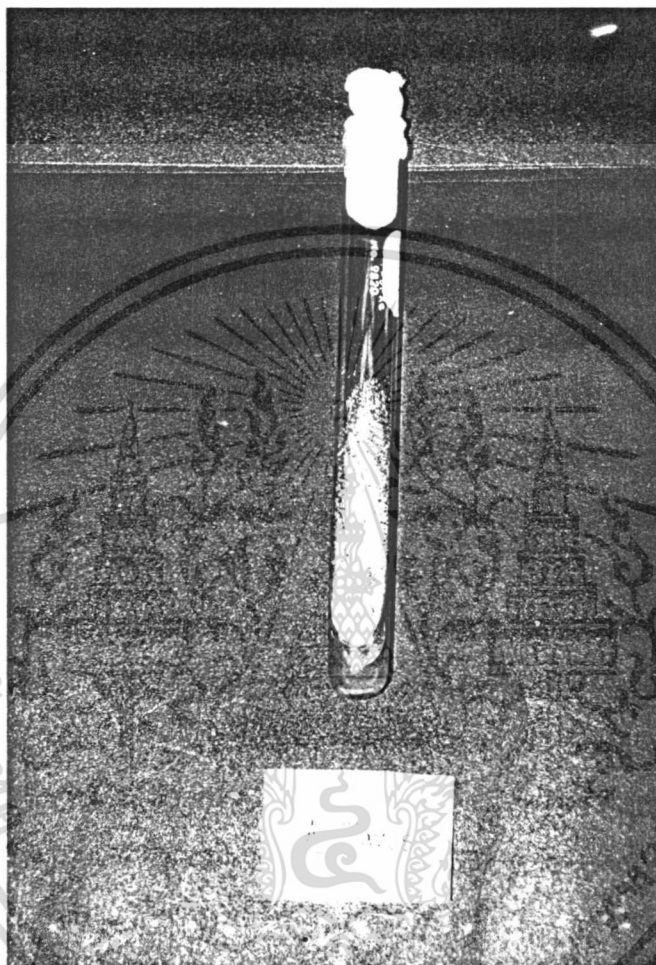
รูปที่ 5. แสดงเชื้อรา *Aspergillus niger* ที่เลี้ยงในหลอดอาหารแข็ง NA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 6. แสดงเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* ที่เลี้ยงในหลอดอาหารแข็ง NA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 7. แสดงเชื้อรา *Aspergillus flavus* ที่เลี้ยงในหลอดอาหารแข็ง NA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงแยกเอาเส้นใยออกโดยใช้ความเร็วรอบ 15,000 รอบต่อนาที ส่วนใสที่ได้คือส่วนของสารปฏิชีวนะที่ละลายอยู่ในเมทานอล นำไปทดสอบหาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราทดสอบ

3.5 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราของสารปฏิชีวนะที่ผลิตได้ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MY agar เป็น assay medium มีขั้นตอนดังนี้

3.5.1 เลี้ยงเชื้อราทั้งสามตัว ลงในงานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ MY agar อยู่ 20 มิลลิลิตร บ่มเชื้อไว้ 4 วัน

3.5.2 นำ cork borer มาเจาะที่ขอบของเส้นใย แล้วนำไปวางบนงานอาหารเลี้ยงเชื้อ MY agar อยู่ 20 มิลลิลิตร โดยวางเป็น 4 จุดให้มีระยะห่างจากจุดกึ่งกลางของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเท่าๆกัน คือ 20 มิลลิเมตร.

3.5.3 นำส่วนใสที่ปั่นแยกไว้ในข้อ 3.4 ทั้งส่วนของน้ำและเมทานอลมาตรวจหาประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราทดสอบ โดยเปิดมาอย่างละ 80 ไมโครลิตร หยดลงบนกระดาษกรองอบแล้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร. แล้วใช้ปากคีบคีบกระดาษกรองไปวางบนผิวหน้าอาหารตรงกลางของงานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร MY agar อยู่ 20 มิลลิลิตร ที่เตรียมไว้ นำไปเข้าตู้บ่มอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาตรวจดูบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อรา โดยวัดค่าที่ได้เป็นมิลลิเมตร

3.6 ศึกษาถึงอิทธิพลของส่วนประกอบของอาหารเหลว GMP ที่มีผลต่อการผลิตสารปฏิชีวนะเตรียมอาหารเหลว GMP ที่มีความเข้มข้นของกลูโคส และแมกนีเซียม ดังนี้

อาหารเหลว GMP ที่มีความเข้มข้นของกลูโคส 0.5 %

และความเข้มข้นของแมกนีเซียม 0.0125%

อาหารเหลว GMP ที่มีความเข้มข้นของกลูโคส 0.5 %

และความเข้มข้นของแมกนีเซียม 0.025 %

อาหารเหลว GMP ที่มีความเข้มข้นของกลูโคส 0.5 %

และความเข้มข้นของแมกนีเซียม 0.05 %

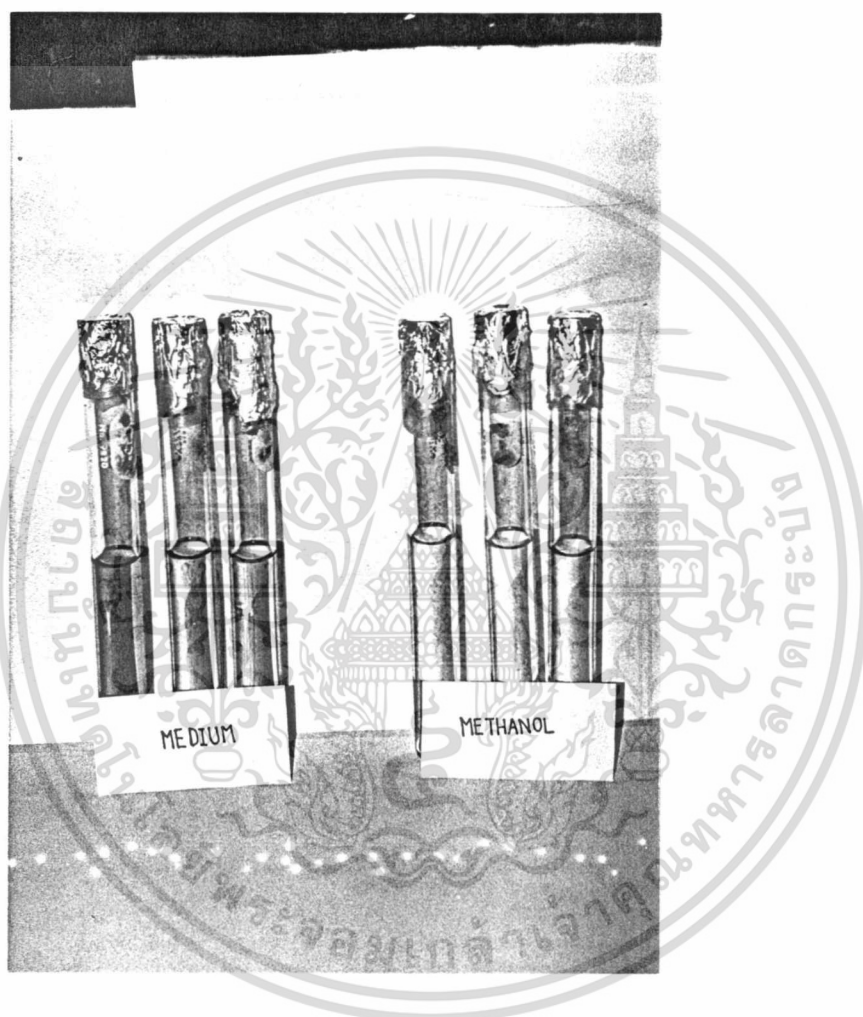
อาหารเหลว GMP ที่มีความเข้มข้นของกลูโคส 1.5 %

และความเข้มข้นของแมกนีเซียม 0.0125 %

- อาหารเหลว GMP ที่มีความเข้มข้นของกลูโคส 1.5 %
 และความเข้มข้นของแมกนีเซียม 0.025 %
- อาหารเหลว GMP ที่มีความเข้มข้นของกลูโคส 1.5 %
 และความเข้มข้นของแมกนีเซียม 0.05 %
- อาหารเหลว GMP ที่มีความเข้มข้นของกลูโคส 2.5 %
 และความเข้มข้นของแมกนีเซียม 0.0125 %
- อาหารเหลว GMP ที่มีความเข้มข้นของกลูโคส 2.5 %
 และความเข้มข้นของแมกนีเซียม 0.025 %
- อาหารเหลว GMP ที่มีความเข้มข้นของกลูโคส 2.5 %
 และความเข้มข้นของแมกนีเซียม 0.05 %



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 8. สารปฏิชีวนะส่วนที่ละลายน้ำ และ ส่วนที่สกัดจากเส้นใยโดยใช้เมทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

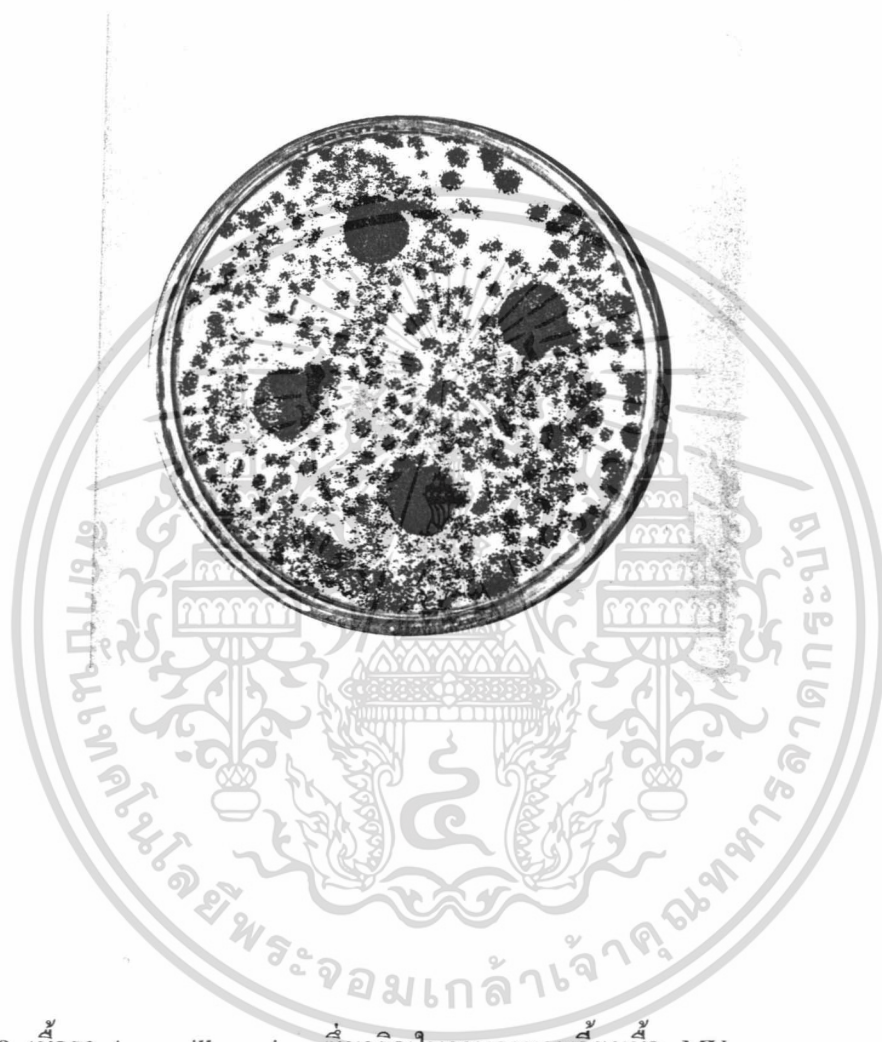
ผลการวิจัย

4.1) การศึกษาเชื้อแอสเพอซิลลินมัยสียที่ผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเชื้อราบนอาหารแข็ง

เมื่อนำเชื้อแอสเพอซิลลินมัยสีย สายพันธุ์ 406 , 526 , A , B , C มาศึกษาการผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* sp. ทั้งสามสายพันธุ์ คือ *A. niger* , *A. parasiticus* , *A. flavus* บนอาหารแข็ง P5 พบว่า เชื้อแอสเพอซิลลินมัยสียทั้ง 5 ตัว มีความสามารถในการยับยั้งราทั้งสามสายพันธุ์ได้ โดยวัดจากความกว้างของบริเวณที่มีการยับยั้ง จึงนำเชื้อแอสเพอซิลลินมัยสียทั้ง 5 ตัว ไปศึกษาในขั้นต่อไป เพื่อให้ได้เชื้อแอสเพอซิลลินมัยสียที่มีความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราทั้ง 3 สายพันธุ์ได้ดีที่สุด

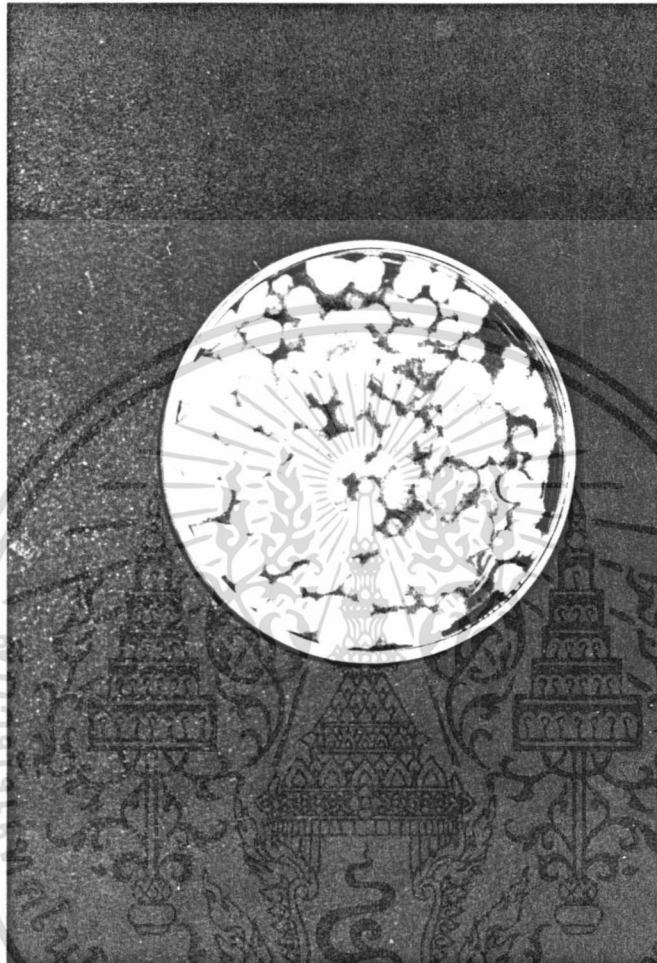


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



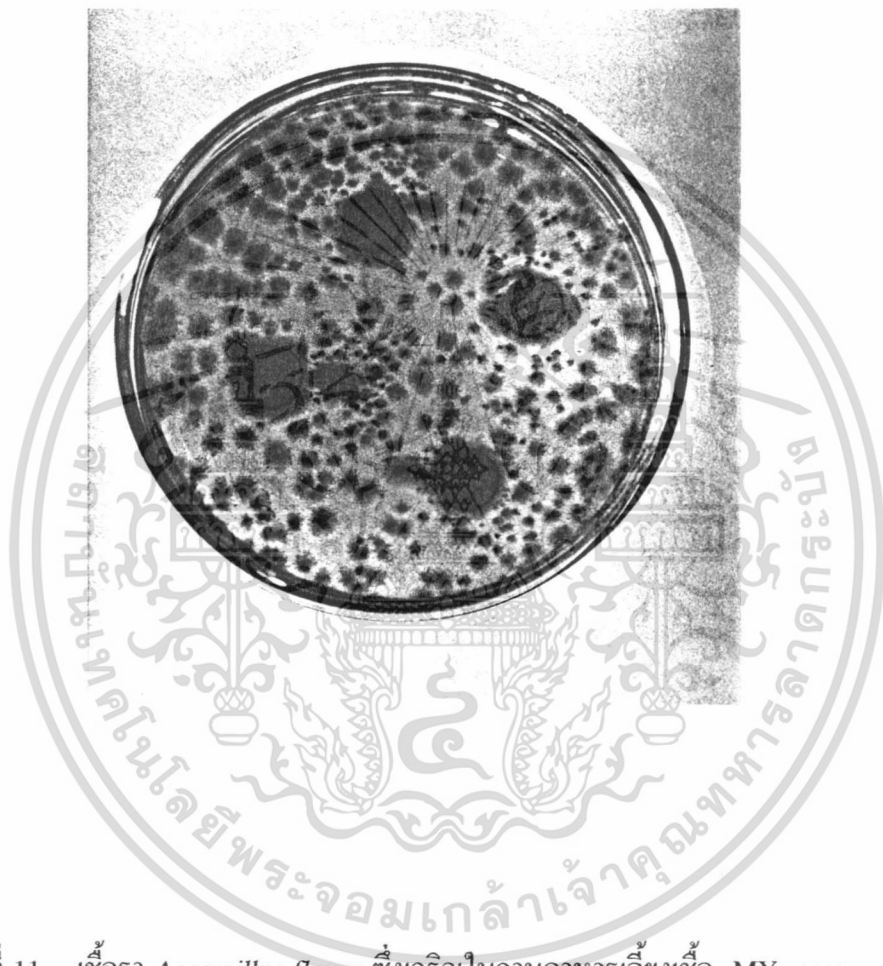
รูปที่ 9. เชื้อรา *Aspergillus niger* ซึ่งเจริญในงานอาหารเลี้ยงเชื้อ MY agar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



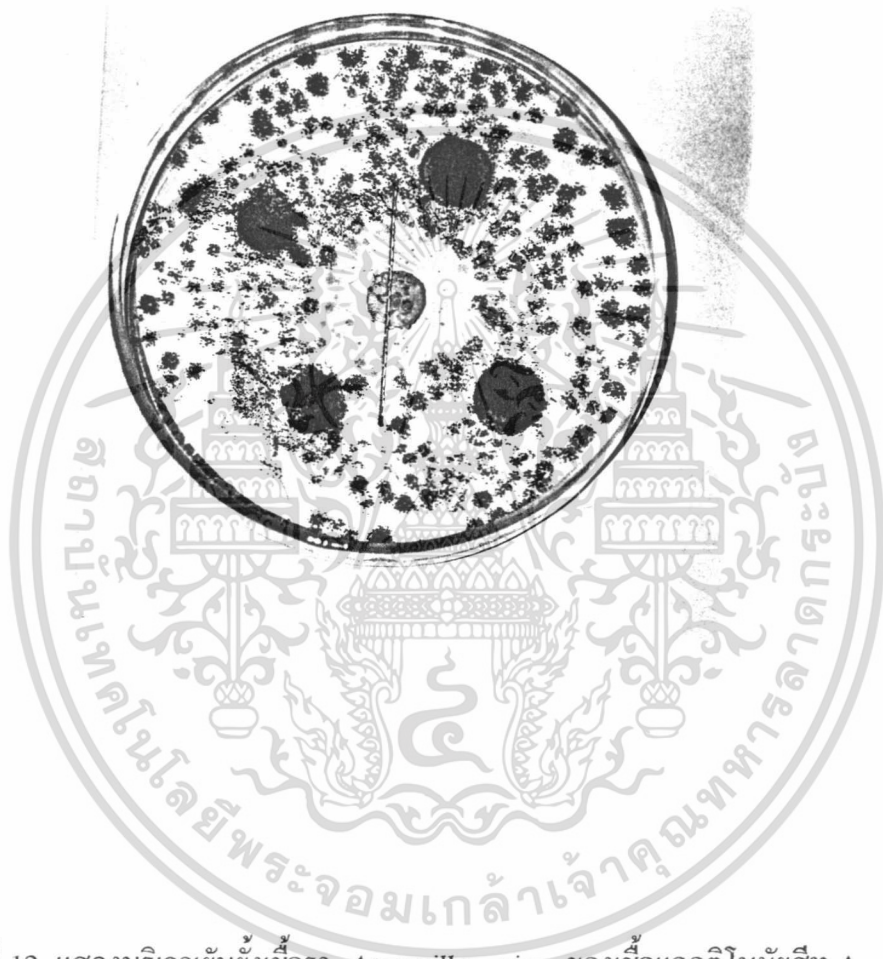
รูปที่ 10. เชื้อรา *Aspergillus parasiticus* ซึ่งเจริญในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MY agar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



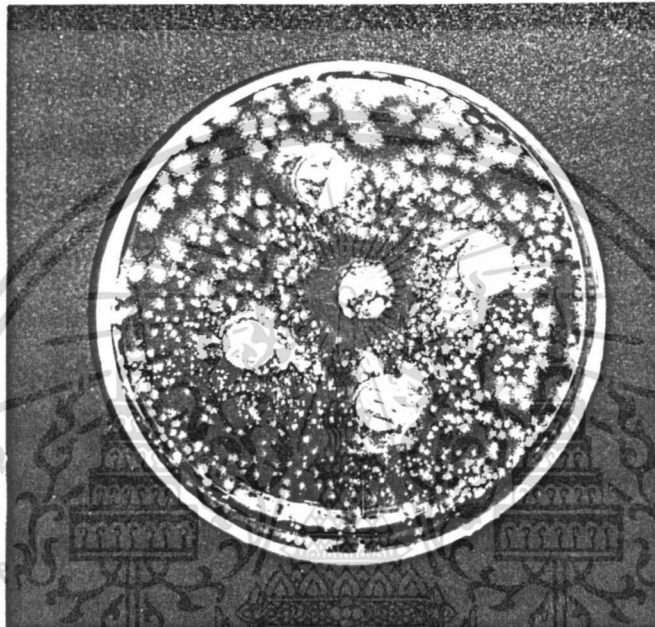
รูปที่ 11. เชื้อรา *Aspergillus flavus* ซึ่งเจริญในงานอาหารเลี้ยงเชื้อ MY agar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 12. แสดงบริเวณยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus niger* ของเชื้อแอกติโนมัยสีท A

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 13. แสดงบริเวณยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus flavus* ของเชื้อแอสคิตินมัยส์ท A

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2) การศึกษาการสร้างสารปฏิชีวนะในอาหารเหลว

เชื้อแอสคิโนมัยซีที่นำมาทำการทดลองเพื่อทดสอบความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะในอาหารเหลว GMP พบว่า เชื้อแอสคิโนมัยซีทั้ง 5 ตัว สามารถสร้างสารปฏิชีวนะในอาหารเหลว GMP ได้ ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยสารปฏิชีวนะที่ผลิตได้นี้ จะมีทั้งที่ละลายน้ำและส่วนที่ละลายในเมทานอล

จากภาพที่ 1 ก-จ แสดงให้เห็นว่าสารปฏิชีวนะที่สกัดได้จากเส้นใยโดยใช้เมทานอล สามารถยับยั้งเชื้อราทั้ง 3 สายพันธุ์ได้ดีกว่าสารปฏิชีวนะที่ละลายในน้ำ และเมื่อศึกษาหาระยะเวลาในการบ่มเชื้อ ที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้สูงสุด เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว GMP โดยเก็บตัวอย่างเมื่อบ่มครบ 3 , 5 และ 7 วัน แล้วเปรียบเทียบบริเวณยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา พบว่าเชื้อแอสคิโนมัยซี สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้สูงสุด เมื่อบ่มครบ 5 วัน และเมื่อบ่มครบ 7 วัน บริเวณยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราทั้ง 3 สายพันธุ์ ไม่เพิ่มขึ้นจากวันที่ 5 เลย

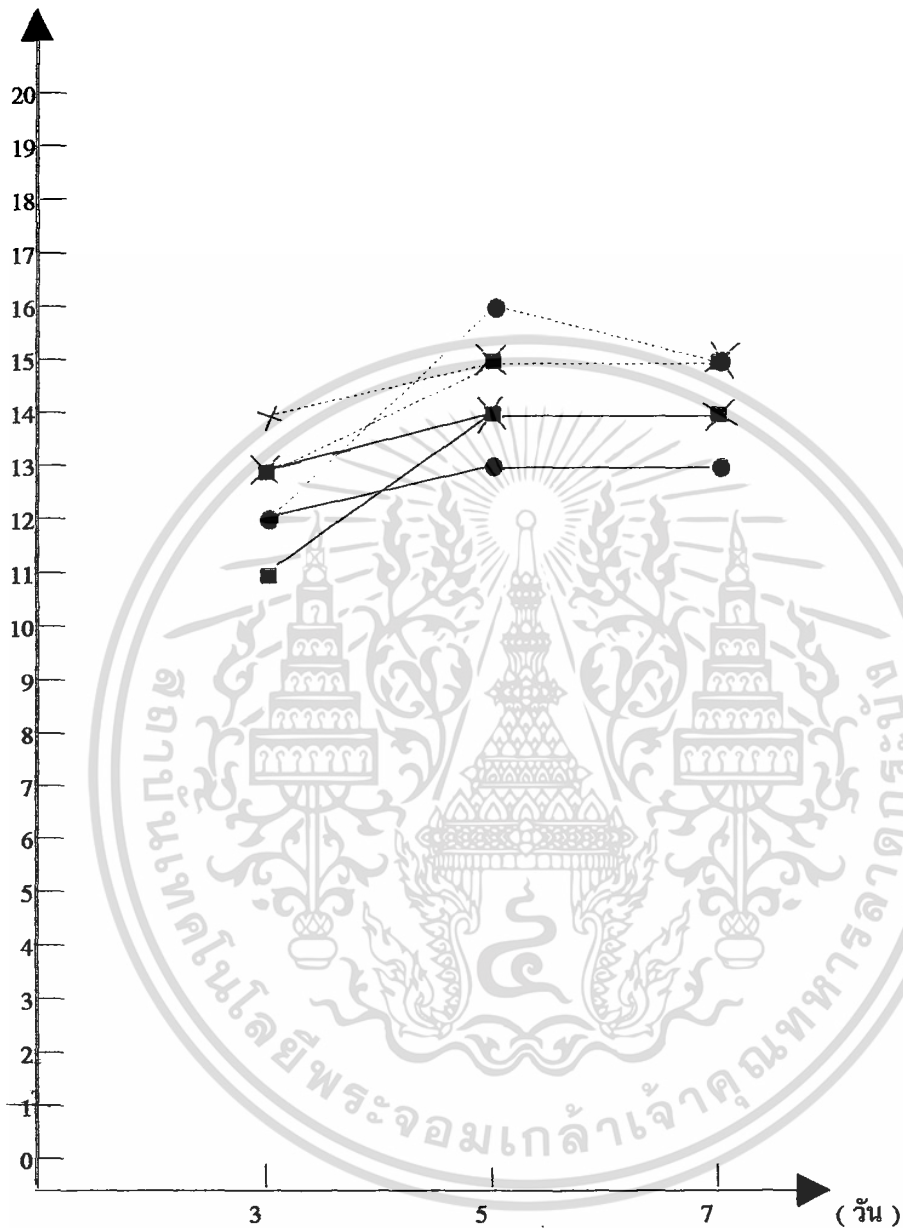
เมื่อเปรียบเทียบบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อรากับสารปฏิชีวนะที่ผลิตจากเชื้อแอสคิโนมัยซีทั้ง 5 ตัว ที่บ่มเชื้อครบ 5 วัน ซึ่งเป็นวันที่ผลิตสารปฏิชีวนะ ได้สูงสุด โดยใช้สารปฏิชีวนะที่อยู่ในเส้นใยสกัดโดยเมทานอล พบว่า เชื้อแอสคิโนมัยซีรหัส A ให้ผลยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้สูงสุด คือ 16 มม. จึงนำเชื้อแอสคิโนมัยซีรหัส A มาศึกษาในขั้นต่อไป โดยใช้สารปฏิชีวนะที่อยู่ในส่วนของเส้นใยและเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว GMP 5 วัน

ตารางที่ 5 แสดงบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* 3 สายพันธุ์ ของสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยเชื้อ แอคติโนมัยสีท ทั้ง 5 สายพันธุ์ ในระยะเวลาการบ่มเชื้อต่าง ๆ กัน ในอาหารเหลว GMP ที่อุณหภูมิห้อง ความเร็วของการเขย่า 150 รอบต่อนาที

ชนิดของ Actinomycetes	ชนิดของเชื้อราที่ใช้ในการทดลอง	บริเวณยับยั้ง (มม.)					
		ส่วนที่ละลายน้ำ			ส่วนที่ละลายในเส้นใยเมธานอล		
		3 วัน	5 วัน	7 วัน	3 วัน	5 วัน	7 วัน
406	<i>A.niger</i>	12	13	13	12	16	15
	<i>A.parasiticus</i>	13	14	14	14	15	15
	<i>A.flavus</i>	11	14	14	13	15	15
526	<i>A.niger</i>	11	14	14	12	15	14
	<i>A.parasiticus</i>	11	14	13	11	16	16
	<i>A.flavus</i>	9	14	14	11	15	15
A	<i>A.niger</i>	11	13	13	13	16	15
	<i>A.parasiticus</i>	10	13	13	13	16	16
	<i>A.flavus</i>	12	14	14	14	16	16
B	<i>A.niger</i>	11	13	13	12	14	13
	<i>A.parasiticus</i>	10	12	11	13	14	14
	<i>A.flavus</i>	11	13	13	11	13	13
C	<i>A.niger</i>	10	13	13	13	15	15
	<i>A.parasiticus</i>	11	13	13	13	14	14
	<i>A.flavus</i>	11	12	12	13	14	13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บริเวณยับยั้ง (มม.)



หมายเหตุ

Aspergillus niger



น้ำ

Aspergillus parasiticus



เมทานอล

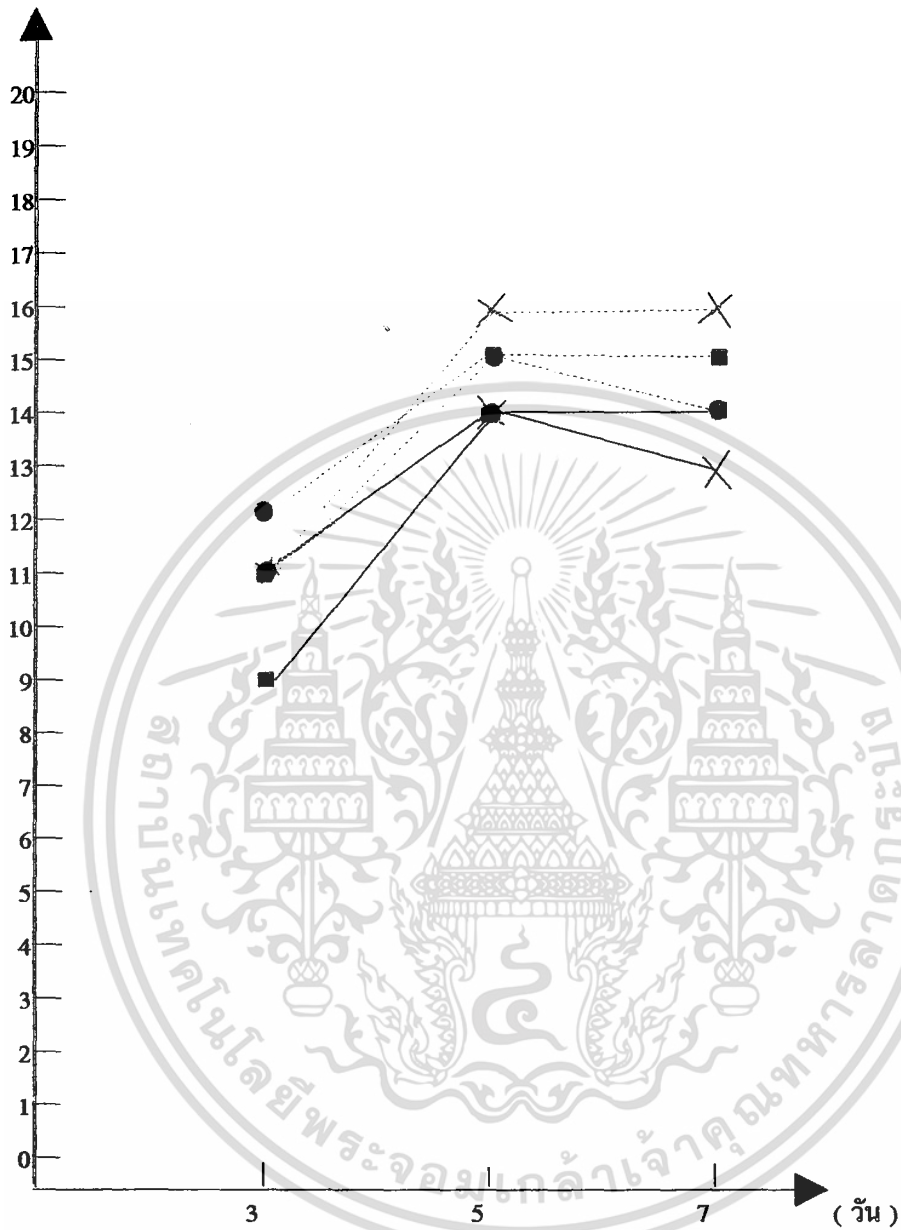
Aspergillus flavus



รูปที่ 14 แสดงการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* 3 สายพันธุ์ ของสารปฏิชีวนะที่ละลายน้ำและละลายในเมทานอล ซึ่งผลิตโดยเชื้อแอสคิโนมัยซีท 406 ในอาหารเหลว GMP

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บริเวณขั้วขี้ (มม.)



หมายเหตุ

Aspergillus niger



น้ำ

Aspergillus parasiticus



เมทานอล

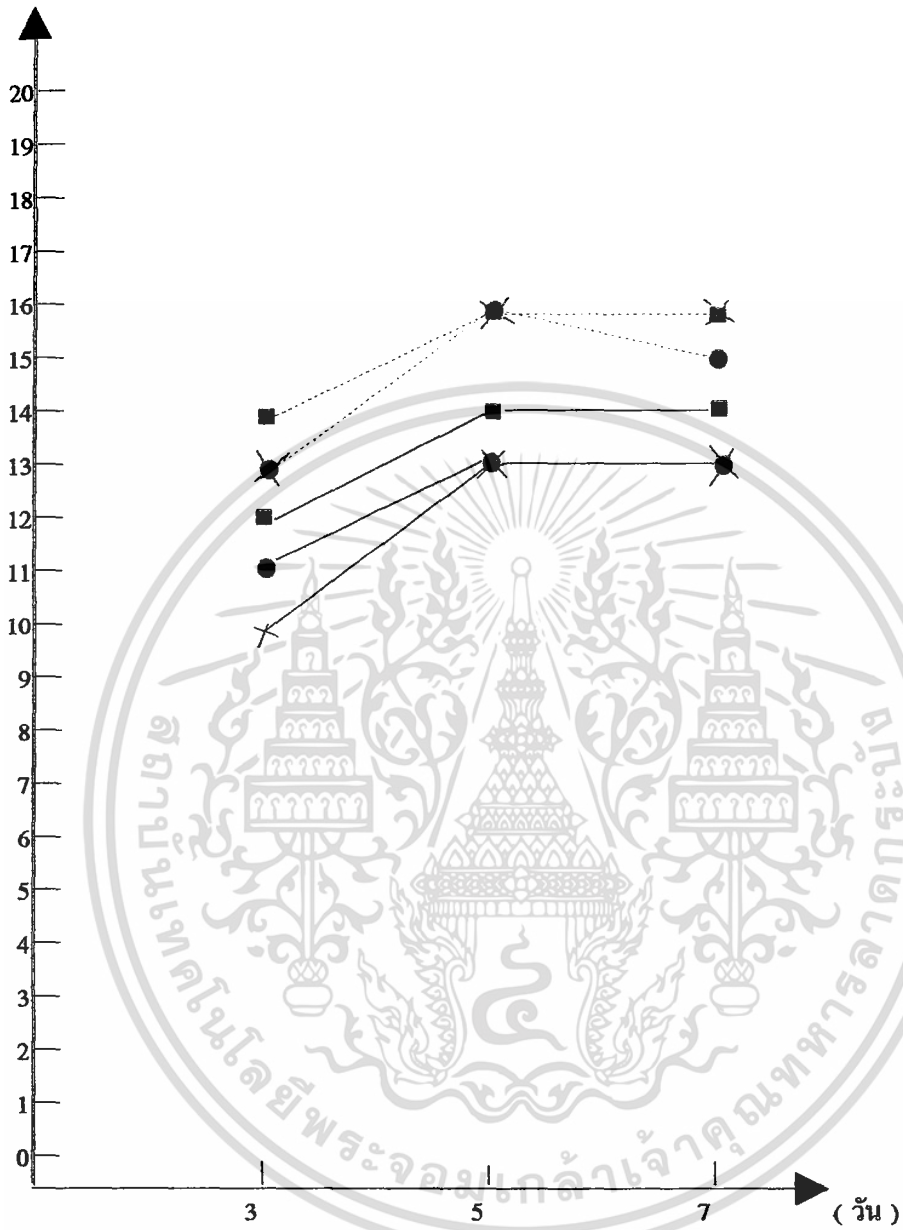
Aspergillus flavus



รูปที่ 15 แสดงการขยับขี้การเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* 3 สายพันธุ์ ของสารปฏิชีวนะที่ละลายน้ำและละลายในเมทานอล ซึ่งผลิตโดยเชื้อแอสคิโนมัซีส 526 ในอาหารเหลว GMP

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บริเวณขั้วขี้ (มม.)



หมายเหตุ

Aspergillus niger



น้ำ

Aspergillus parasiticus



เมทานอล

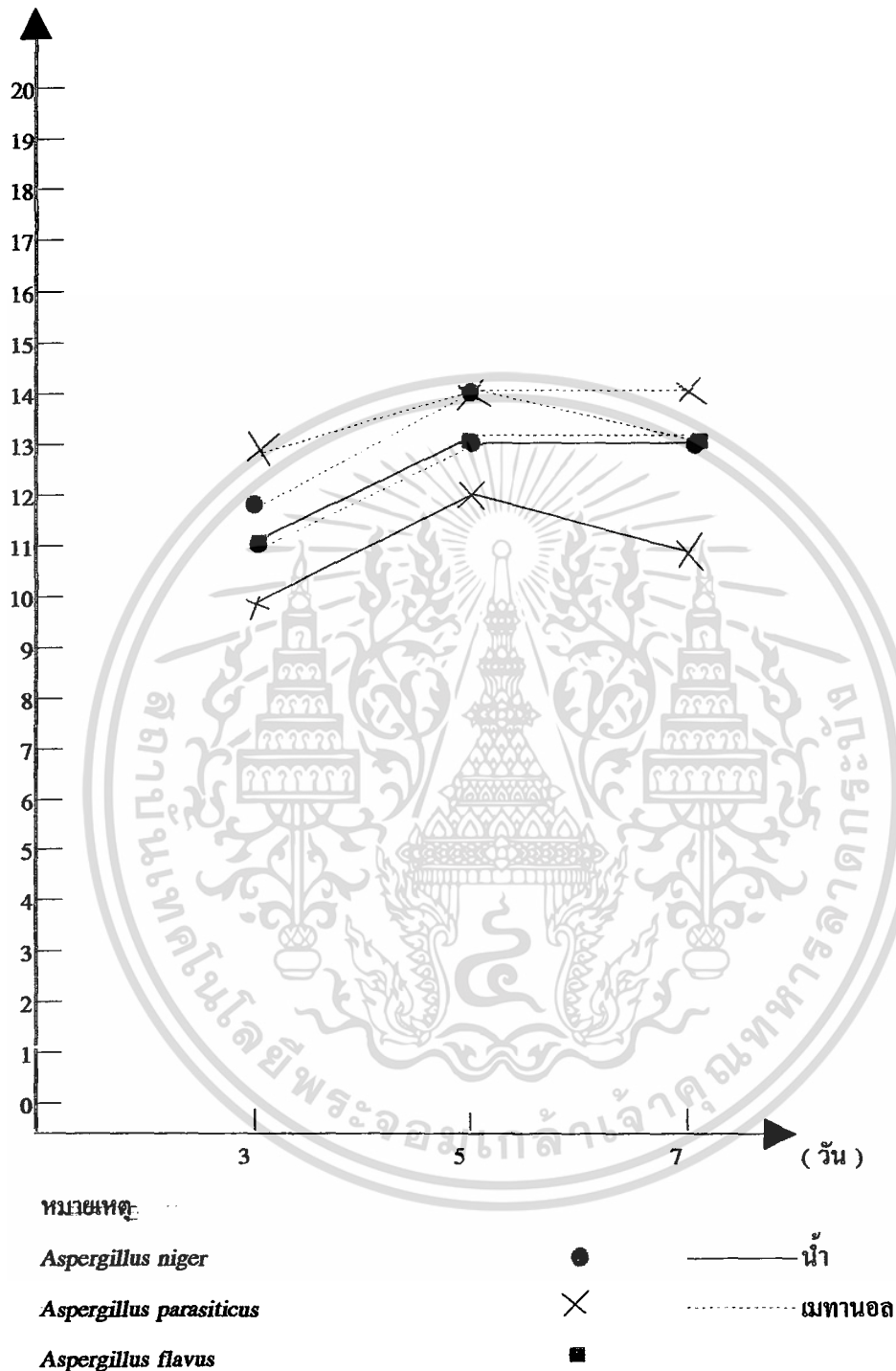
Aspergillus flavus



รูปที่ 16 แสดงการขยับขยายการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* 3 สายพันธุ์ ของสารปฏิชีวนะที่ละลายน้ำและละลายในเมทานอล ซึ่งผลิตโดยเชื้อแอสคิโนมัซิส A ในอาหารเหลว GMP

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

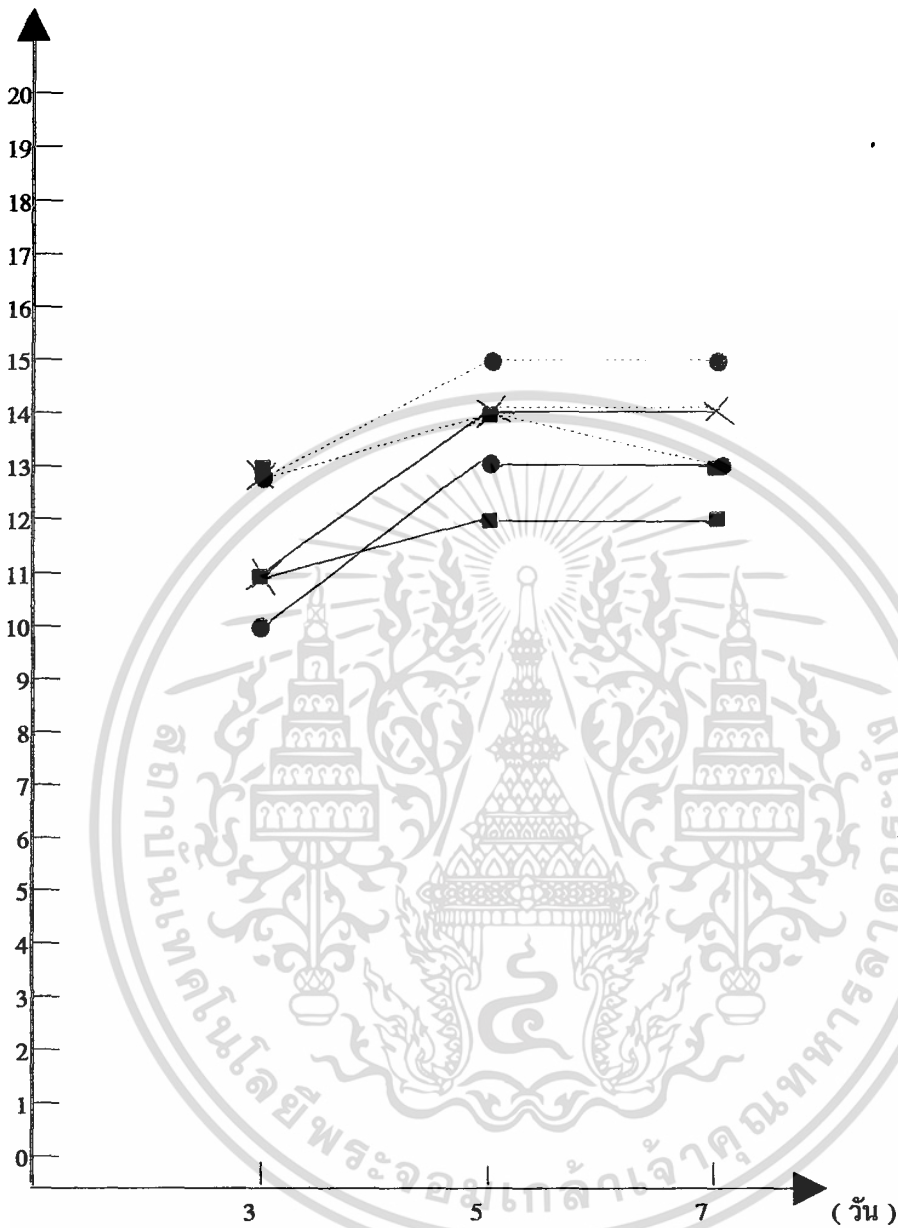
บริเวณขั้วขี้ (มม.)



รูปที่ 17 แสดงการขั้วขี้การเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* 3 สายพันธุ์ ของสารปฏิชีวนะที่ละลายน้ำและละลายในเมทานอล ซึ่งผลิตโดยเชื้อแอกติโนมัยสิต B ในอาหารเหลว GMP

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บริเวณขั้วขี้ (มม.)



หมายเหตุ

Aspergillus niger



น้ำ

Aspergillus parasiticus



เมทานอล

Aspergillus flavus

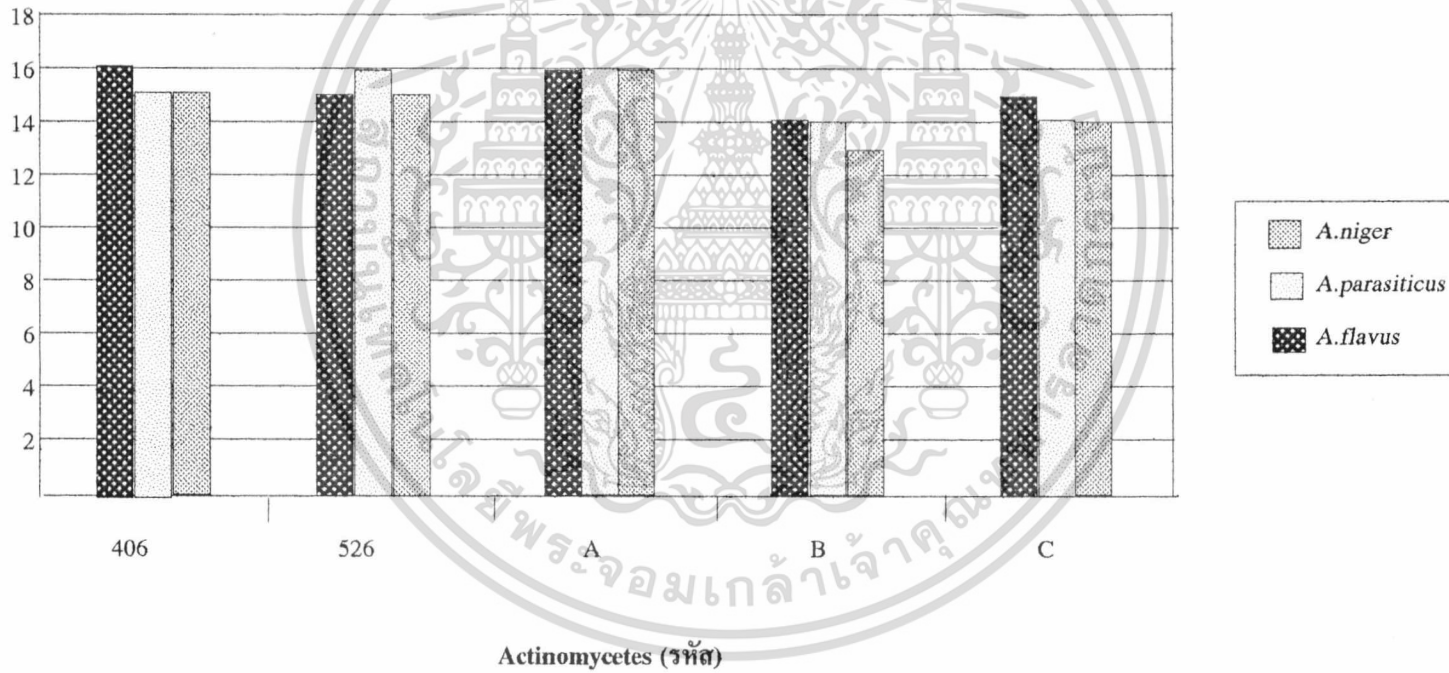


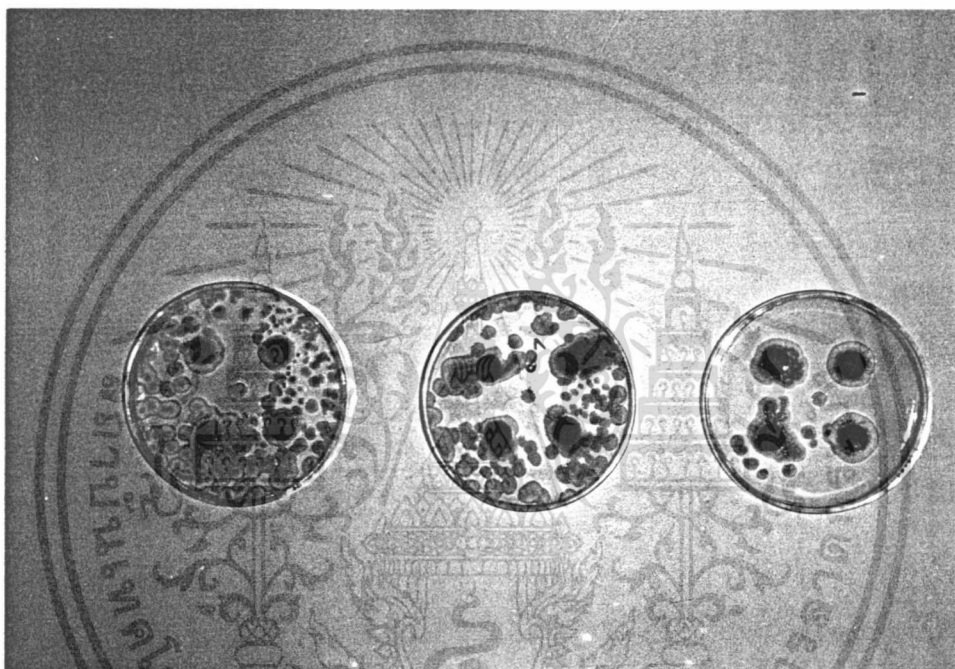
รูปที่ 18 แสดงการขั้วขี้การเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* 3 สายพันธุ์ ของสารปฏิชีวนะที่ละลายน้ำและละลายในเมทานอล ซึ่งผลิตโดยเชื้อแอสคิโนมัยสิท C ในอาหารเหลว GMP

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 19 กราฟแสดงบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* 3 สายพันธุ์ของสารปฏิชีวนะ
ที่ผลิตโดยเชื้อ แอคติโนมัยซีท ทั้ง 5 ตัว

Growth Inhibition zone



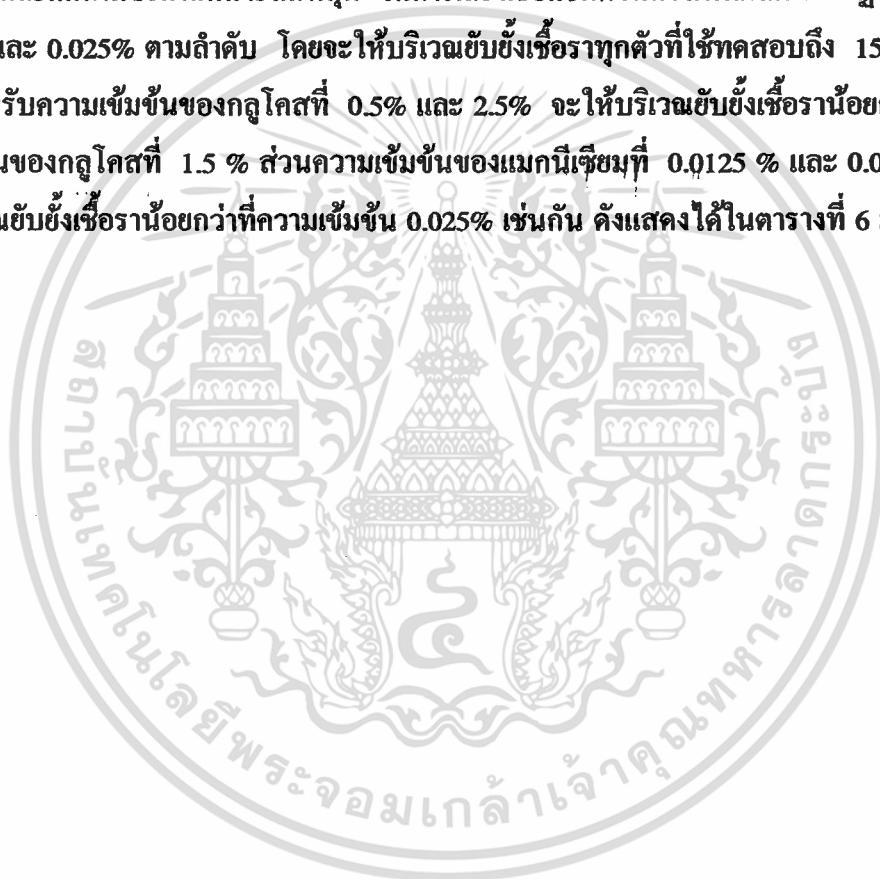


รูปที่ 20.. แสดงบริเวณยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus* sp. ทั้ง 3 สายพันธุ์โดยสารปฏิชีวนะซึ่งผลิตจากเชื้อแอคติโนมัยซีท A

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การศึกษาถึงอิทธิพลของส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ GMP broth ที่มีผลต่อการผลิตสารปฏิชีวนะ

การผลิตสารปฏิชีวนะของแอคติโนมัยสีทในอาหารที่มีความเข้มข้นของกลูโคส และแมกนีเซียมต่างกัน จะมีผลต่อการผลิตสารปฏิชีวนะต่างกัน โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของกลูโคสและแมกนีเซียมที่เหมาะสมที่สุด ในการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทที่ผลิตสารปฏิชีวนะคือ 1.5% และ 0.025% ตามลำดับ โดยจะให้บริเวณยับยั้งเชื้อราทุกตัวที่ใช้ทดสอบถึง 15 มิลลิเมตร สำหรับความเข้มข้นของกลูโคสที่ 0.5% และ 2.5% จะให้บริเวณยับยั้งเชื้อราน้อยกว่าที่ความเข้มข้นของกลูโคสที่ 1.5 % ส่วนความเข้มข้นของแมกนีเซียมที่ 0.0125 % และ 0.05% จะให้บริเวณยับยั้งเชื้อราน้อยกว่าที่ความเข้มข้น 0.025% เช่นกัน ดังแสดงได้ในตารางที่ 6 และรูปที่ 21

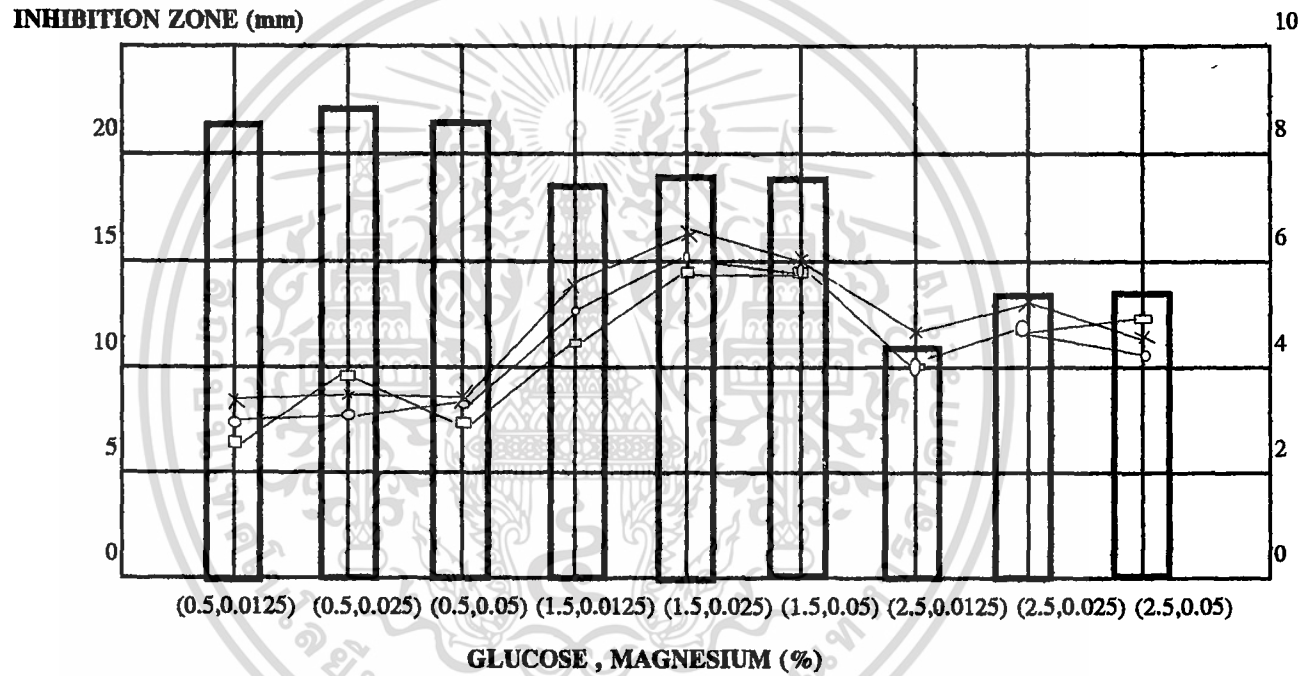


ตารางที่ 6 แสดงบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยสารปฏิชีวนะจากเชื้อแอสคิโนมัยซีทที่เลี้ยงในอาหารเหลว GMP ที่มีความเข้มข้นของกลูโคสและแมกนีเซียมที่ระดับต่าง ๆ

ความเข้มข้นของ กลูโคส , ความเข้มข้น ของแมกนีเซียม (%)	บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)		
	ชนิดของรา		
ตามลำดับ	<i>A.niger</i>	<i>A.parasiticus</i>	<i>A.flavus</i>
0.5 , 0.0125	6.00	7.00	6.00
0.5 , 0.025	8.00	9.00	8.00
0.5 , 0.05	7.00	8.00	7.00
1.5 , 0.0125	13.00	14.00	11.00
1.5 , 0.025	15.00	16.00	14.00
1.5 , 0.05	14.00	15.00	14.00
2.5 , 0.0125	10.00	11.00	10.00
2.5 , 0.025	12.00	13.00	12.00
2.5 , 0.05	11.00	12.00	12.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 21 แสดงอิทธิพลของส่วนประกอบต่าง ๆ ในอาหาร GMP broth ที่มีผลต่อการผลิตสารปฏิชีวนะที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน



- *Aspergillus niger*
- × *Aspergillus parviticus*
- *Aspergillus flavus*
- pH

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาการสร้างสารปฏิชีวนะของเชื้อแอสเพอซิลลินที่มีสายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus flavus* พบว่า เชื้อแอสเพอซิลลินที่มีสายพันธุ์ที่นำมาศึกษา คือเชื้อแอสเพอซิลลินที่มีสายพันธุ์รหัส 406,526, A,B,C มีความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะในอาหารแข็ง เมื่อนำมาศึกษาการสร้างสารปฏิชีวนะในอาหารเหลว GMP พบว่า สารปฏิชีวนะที่เชื้อแอสเพอซิลลินผลิตได้ จะมีอยู่ทั้งภายนอกและภายในเส้นใย (สายสนม,2535) ซึ่งสารปฏิชีวนะภายในเส้นใยจะสกัดออกจากเส้นใยโดยใช้เมทานอล (วารุณี,2536) และพบว่าสารปฏิชีวนะส่วนที่สกัดจากเส้นใยจะให้ผลยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีกว่าสารปฏิชีวนะที่ละลายน้ำ เมื่อศึกษาถึงความคงตัวของสารปฏิชีวนะที่ละลายน้ำพบว่ามีความคงตัวค่อนข้างต่ำ (สายสนม,2535) และสารปฏิชีวนะที่ผลิตได้นั้นจะให้ผลยับยั้งเชื้อราทั้ง 3 สายพันธุ์ได้มากที่สุด เมื่อบ่มเชื้อไว้ 5 วัน ในอาหารเหลว GMP (Dolak,1983) และเมื่อบ่มเชื้อในอาหารเหลว GMP 7 วัน บริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้ง 3 สายพันธุ์ ไม่เพิ่มขึ้นจากวันที่ 5 ซึ่งผลการทดลองนี้มีความสอดคล้องกับการทดลองอื่นที่ผ่านมามีด้วย (สายสนม,2535) ผลการศึกษาพบว่าเชื้อแอสเพอซิลลิน รหัส A ให้ผลยับยั้งเชื้อราทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้ดีที่สุดเมื่อบ่มเชื้อครบ 5 วัน โดยให้ผลยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้สูงสุด 16 มิลลิเมตร เนื่องจากเชื้อแอสเพอซิลลิน รหัส A มีประสิทธิภาพสูงสุดในการผลิตสารปฏิชีวนะ จึงได้นำเชื้อแอสเพอซิลลิน รหัส A ดังกล่าวมา ศึกษาถึงอิทธิพลของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีต่อการผลิตสารปฏิชีวนะ โดยนำ เชื้อแอสเพอซิลลิน รหัส A ดังกล่าวมาเลี้ยงในอาหารเหลว GMP ที่มีระดับความเข้มข้นของกลูโคส และแมกนีเซียมต่างๆ คือ ที่ความเข้มข้นของกลูโคสร้อยละ 0.5,1.5 และ 2.5 และที่ความเข้มข้นของแมกนีเซียมร้อยละ 0.0125,0.025 และ 0.05 นาน 5 วัน พบว่าอาหารเหลว GMP ที่มีความเข้มข้นของกลูโคสที่เหมาะสมที่สุดในการเลี้ยงเชื้อแอสเพอซิลลิน รหัส A คือ อาหารเหลว GMP ที่มีความเข้มข้นของกลูโคสร้อยละ 1.5 และความเข้มข้นของแมกนีเซียมร้อยละ 0.025 สำหรับในอาหารเหลว GMP ที่มีความเข้มข้นของกลูโคสในระดับอื่นๆ คือ ร้อยละ 2.5 มีผลทำให้การผลิตสารปฏิชีวนะลดต่ำลง เนื่องจากผลของ glucose regulation

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Martin, 1980) และปริมาณกลูโคสที่สูงจะทำให้เชื้อแอสคิโนมัยซีท นำไปใช้ในการสร้างเซลล์ และผลิตสารต่างๆ เช่น กรดแอสติค และ กรดไพรูวิก มากกว่าการผลิตสารปฏิชีวนะ (คารารัตน์, 2525) และในความเข้มข้นของกลูโคสร้อยละ 0.5 เชื้อแอสคิโนมัยซีทจะยังคงสามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้ แต่ในปริมาณไม่สูงนัก เนื่องจากว่าเชื้อแอสคิโนมัยซีท จะใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโต เมื่อมีการจำกัดปริมาณกลูโคสให้ลดลง ย่อมมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ ทำให้เชื้อแอสคิโนมัยซีทเจริญเติบโตได้ไม่เต็มที่ ประสิทธิภาพในการผลิตสารปฏิชีวนะย่อมลดลงด้วย แต่อย่างไรก็ตามเชื้อแอสคิโนมัยซีทจะสามารถผลิต สารปฏิชีวนะได้อยู่ ซึ่งสามารถวัดหาประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะที่ผลิตได้จากบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น นอกจากความเข้มข้นของกลูโคสจะมีผลต่อการผลิตสารปฏิชีวนะของเชื้อแล้ว ความเข้มข้นของแมกนีเซียม ยังมีผลต่อการผลิตสารปฏิชีวนะของเชื้ออีกด้วย เนื่องจากว่า แมกนีเซียม จะทำหน้าที่เป็น cofactor เพื่อเร่งปฏิกิริยาการผลิตสารปฏิชีวนะของเชื้อแอสคิโนมัยซีท (วารุณี, 2526) ดังนั้น เชื้อแอสคิโนมัยซีทที่เลี้ยงในอาหารเหลว GMP ที่มีความเข้มข้นของแมกนีเซียมต่ำ ย่อมมีผลให้การผลิตสารปฏิชีวนะมีปริมาณต่ำลงด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อเสนอแนะ

- 1) ควรศึกษาถึงความคงตัว , ความบริสุทธิ์ และโครงสร้างของสารปฏิชีวนะ ที่ผลิตจากเชื้อแอสคิโนมัยซีทสายพันธุ์ A ต่อไป
- 2) เนื่องจากดินในประเทศไทยมีสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อแอสคิโนมัยซีท คือ มีอินทรียสาร, มีความชื้นสูง จึงควรจะมีการสกัดเชื้อแอสคิโนมัยซีทจากดิน ที่มีความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะ เพื่อที่จะนำมาใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรม



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

1. กัญจนา พุทธสมัย “โรคมล็ดพันธุ์และเชื้อราในโรงเก็บ” กลุ่มวิจัยโรคพืชผลิตผลเกษตร กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร, 2538
2. คารารัตน์ รอดพยาธิ “สารต่อต้านเชื้อราที่ผลิตโดย *Streptomyces* sp. CU 279 จากดินในประเทศไทย” วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2525
3. คุษณี ชนะบริพัฒน์ จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม, พิมพ์ครั้งที่ 1, หน้า 1-20, โครงการตำรา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ, 2537
4. วารุณี ประดิษฐ์ศรีกุล “การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะที่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อราบางชนิด” วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 2526
5. สายสนม เอนกพลิน “การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเชื้อราบางชนิด” วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 2535
6. สุกันยา เพ็ญทะเล และ สันทนา พุ่มพวง “ผลของไคโตแซนที่มีต่อการเจริญและการผลิตสารอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus flavus* ในปลายข้าว” โครงการพิเศษ ปรียญตรี ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง 2540
7. Cochet, N. and Demain, A.L. “Effect of water activity on production of β -lactam antibiotics by *Streptomyces clavuligerus* in submerged culture” *J. of Applied Bacteriology* 80(1995): 333-337
8. Diez, B., Mellado, E., Rodriguez, M., Fouces, R., Barred, J.L. “Recombinant Microorganism for Industrial Production of Antibiotic” *Biotechnology and Bioengineering* 55(1996): 216-226
9. Dolak, L. A., Castle, T.M., Hannon, B.R., Argondelis A.D. and Reusser, F. “Fermentation, Isolation, Characterization and Structure of Nitrosofungin” *J. Antibiotics* 36(1983): 1425-1438

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10. Gottlieb, D. "The production and role of antibiotic in soil" J. Antibiotic 29(1976): 987-1000
11. Hamilton-Miller, J.M.I. 1973. Chemistry and biology of the polyene macroline antibiotics. Bacteriol. Rev.37(2): 166-196
12. Haynes, W.C., L.G. Wickerham and C.W. Hesseltine. 1955. Maintenance of cultures industrially important microorganisms. Appl. Microbiol. 3:361-368
13. Kaiser, D., Onken, U., Sattler, I. and Zeeck, A. "Influence of increased dissolved oxygen concentration on the formation of secondary metabolite by manumycin-producing *Streptomyces parulus*" Applied Microbiol Biotechnol 41(1993): 309-312
14. Kondo, H., and Nakamura, S. "H 646-SY 3 Substance, A potentiator for polyene antifungal antibiotic" J. Antibiotic 29(1977): 182-185
15. Kozlovsky, A.G., Vinokurona, N.G. m Solov'eva, T.F. and Buzilova, I.G. "Microfungal Nitrogen Containing Secondary metabolites" Applied Biochemistry and Microbiology 32(1996):39-48
16. Martin, J.F. and Demain, A.L. "Control of Antibiotic Biosynthesis" Microbiological Reviews,(1980): 230-251
17. Norman, A.W., Demel, R.A., Kruyff, B. and Van Deenen, L.L.M. "Studies on the Biological Properties of polyene Antibiotics" J. of Biological Chemistry 247(1972):1918-1929
18. Omura, S., Tanaka, Y., Nakagawa, A., Iwai, Y., Inoue, M. and Tanaka, H. "Irumamycin, a new antibiotic active against phytopathogenic fungi" J. Antibiotics 35(1981): 256-257
19. Sadakane, N., Taraka, Y. and Omura, S. "New 20-membered lactones, Irumanolides I and II, produced by a mutant of *Streptomyces*" J. Antibiotic 36(1983) 931-933
20. Society of American Bacteriologists. 1957. Manual of microbiological method. McGraw-Hill Book Company, Inc., London. p.572



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Nutrient agar

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มล.
pH	6.8- 7.0	
Agar	15	กรัม

2. P-5 agar (Soc. of Amer Bact., 1957)

Glucose	5	กรัม
Soluble starch	5	กรัม
L-Asparagine	0.5	กรัม
K_2HPO_4	0.5	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5	กรัม
Kcl	0.5	กรัม
NaCl	0.5	กรัม
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5	กรัม
Yeast extract	0.02	กรัม
Agar	20	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มล.
pH	7.0	

3. GMP broth (Soc. of Amer Bact., 1957)

Glucose	15	กรัม
Polypeptone	6	กรัม
Meat extract	3	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Yeast extract	3	กรัม
NaCl	5	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.25	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มล.
pH	7.0	

4. MY agar (Haynes et al ., 1955)

Peptone	5	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Malt extract	3	กรัม
Glucose	10	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มล.
pH	7.0	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ANALYSIS OF VARIANCE

Randomized Complete Block Design

Replication (R) = 3

Treatment : 3 x 2 x 5

Days (D) = 3

D1 = 3 วัน

D2 = 5 วัน

D3 = 7 วัน

Solvent (U) = 2

U1 = methanol

U2 = water

Actinomycetes (S) = 5

S1 = 406

S2 = 526

S3 = A

S4 = B

S5 = C

Ho : บริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อราของสารปฏิชีวนะจากเชื้อแอคติโนมัยซีทต่างสายพันธุ์จากส่วนที่ละลายน้ำและส่วนของเส้นใยที่เวลาต่างกัน ไม่แตกต่างกัน

H1 : บริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อราของสารปฏิชีวนะจากเชื้อแอคติโนมัยซีทต่างสายพันธุ์จากส่วนที่ละลายน้ำและส่วนของเส้นใยที่เวลาต่างกัน แตกต่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

INHIBITION ZONE (mm)

	REP1	REP2	REP3
REP TOTALS	397.00	399.00	395.00
REP MEANS	13.23	13.30	13.17

ANALYSIS OF VARIANCE FOR INHIBITION ZONE (mm)

SV	DF	SS	MS	F
REP(R)	2	0.3	0.1	<1
TREATMENT	29	200.8	6.9	13.81 **
DAYS (D)	2	102.1	51.0	101.83 **
SOLUT (U)	1	56.0	56.0	111.77 **
SP (S)	4	24.0	6.0	11.99 **
DxU	2	0.2	0.1	<1
DxS	8	11.8	1.5	2.95 **
UxS	4	5.4	1.3	2.68 *
DxUxS	8	1.3	0.2	<1
ERROR	58	29.1	0.5	
TOTAL	89	203.1		

cv = 5.3 %

** = significant at 1 % level ; * = significant at 5 % level

จากตาราง สรุปได้ว่า สารปฏิชีวนะจากเชื้อแอกติโนมัยสีทต่างสายพันธุ์กัน จากส่วนที่ละลายน้ำ และส่วนที่สกัดจากเส้นใยที่เวลาต่างกัน ให้บริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อราแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

UxS TABLE OF MEANS FOR INHIBITION ZONE (mm)
(AVE. OVER 3 D AND 3 REPS)

SP (S)	SOLUT (U)			DIFF
	U1	U2	S-MEAN	
S1	14.4 ab	13.1 a	13.5	1.3 **
S2	13.9 b	12.7 ab	13.3	1.2 **
S3	15.0 a	12.6 abc	13.8	2.4 **
S4	13.0 c	11.9 c	12.4	1.1 **
S5	13.8 b	12.0 bc	12.9	1.8 **
U - MEAN	14.0	12.4	13.2	1.6

** = significant at 1 % level

จากตาราง จะเห็นได้ว่า สารปฏิชีวนะจากส่วนของเส้นใย (U1) จะให้บริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่มากกว่า สารปฏิชีวนะ ส่วนที่ละลายน้ำ (U2) โดยให้ค่าเฉลี่ย 14 มิลลิเมตร และ 12.4 มิลลิเมตรตามลำดับ

In a column , means followed by a common letter are not significantly different at the 5 % level by DMRT.

Comparison	S.E.D.	LSD(5%)	LSD(1%)
2-U*S means	0.3	0.7	0.9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

DxS TABLE OF MEANS FOR INHIBITION ZONE (mm)
(AVE. OVER 2 U AND 3 REPS)

SP (S)	DAYS (D)			S-MEAN
	D1	D2	D3	
S1	12.5 a	14.5 a	14.3 a	13.8
S2	10.8 c	14.7 a	14.3 a	13.3
S3	12.2 ab	14.7 a	14.5 a	13.8
S4	11.3 bc	13.2 b	12.8 b	12.4
S5	11.8 ab	13.5 b	13.3 b	12.9
D-mean	11.7	14.1	13.9	13.2

In a column , means followed by a common letter are not significantly differedt at the 5 % level by DMRT.

Comparison	S.E.D.	LSD (5%)	LSD(1%)
2-D*S means	0.4	0.8	1.1

*** END OF ANALYSIS OF VARIANCE RUN ***

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

H_0 : สารปฏิชีวนะที่สกัดจากเส้นใยโดยเมทานอลของเชื้อแอคติโนมัยสิท สายพันธุ์ A ที่เลี้ยงใน ส่วนประกอบของอาหารเหลว GMP ที่มีปริมาณกลูโคสและแมกนีเซียมต่างกัน ให้บริเวณยับยั้ง การเจริญของเชื้อราไม่แตกต่างกัน

H_1 : สารปฏิชีวนะที่สกัดจากเส้นใยโดยเมทานอลของเชื้อแอคติโนมัยสิท สายพันธุ์ A ที่เลี้ยงใน ส่วนประกอบของอาหารเหลว GMP ที่มีปริมาณกลูโคสและแมกนีเซียมต่างกัน ให้บริเวณยับยั้ง การเจริญของเชื้อราแตกต่างกัน

	inhibition zone (mm)		
	<i>A.niger</i>	<i>A.parasiticus</i>	<i>A.flavus</i>
กลูโคส 0.5 , แมกนีเซียม 0.0125	6.00	7.00	6.00
กลูโคส 0.5 , แมกนีเซียม 0.025	8.00	9.00	8.00
กลูโคส 0.5 , แมกนีเซียม 0.05	7.00	8.00	7.00
กลูโคส 1.5 , แมกนีเซียม 0.0125	13.00	14.00	11.00
กลูโคส 1.5 , แมกนีเซียม 0.025	15.00	16.00	14.00
กลูโคส 1.5 , แมกนีเซียม 0.05	14.00	15.00	14.00
กลูโคส 2.5 , แมกนีเซียม 0.0125	10.00	11.00	10.00
กลูโคส 2.5 , แมกนีเซียม 0.025	12.00	13.00	12.00
กลูโคส 2.5 , แมกนีเซียม 0.05	11.00	12.00	12.00
REP TOTALS	96.00	105.00	94.00
REP MEANS	10.67	11.67	10.44

ANALYSIS OF VARIANCE FOR INHIBITION ZONE (mm)

SV	DF	SS	MS	F
CONC (C)	8	224.5185185	28.0648148	44.57 **
ERROR	18	11.3333333	0.6296296	
TOTAL	26	235.8518519		

cv = 7.3 %

** = significant at 1 % level

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารปฏิชีวนะที่สกัดจากเส้นใยเมทานอล ของเชื้อแอคติโนมัยซีท สายพันธุ์ A ที่เลี้ยงในอาหารเหลว GMP ที่มีปริมาณกลูโคสและแมกนีเซียมต่างกันจะให้บริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

TABLE OF CONC (C) MEANS FOR INHIBITION ZONE (mm)

ความเข้มข้นกลูโคส,แมกนีเซียม (%)	RANKS	MEANS
0.5 , 0.0125	1	6.333 e
0.5 , 0.025	3	8.333 d
0.5 , 0.05	2	7.333 de
1.5 , 0.0125	7	12.667 b
1.5 , 0.025	9	15.000 a
1.5 , 0.05	8	14.333 a
2.5 , 0.0125	4	10.333 c
2.5 , 0.025	6	12.333 b
2.5 , 0.05	5	11.667 bc
MEAN		10.926

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้