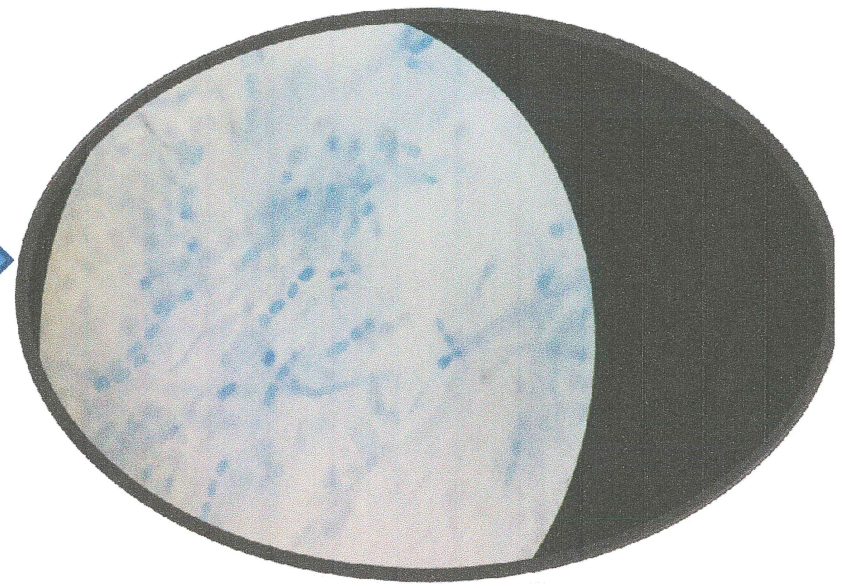
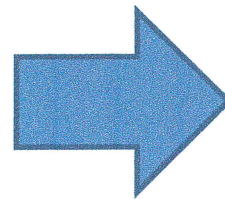


จุลินทรีย์ที่คัดแยกในธรรมชาติ
จากห้องปฏิบัติการของแผนกวิจัยและพัฒนา
บริษัท โพรไบโอติกแอนด์เฮอรับบัล จำกัด

วัตถุประสงค์

1. เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตยาและอาหารเสริม
2. เพื่อใช้ในในทางการเกษตร
3. เพื่อใช้ในทางการกำจัดแมลงในการแพทย์เช่นการควบคุม
ลูกน้ำยุงลาย

Fomitopsis meliae (รากขาว)



Cytotoxic and antimicrobial activities of endophytic fungi isolated from *Bacopa monnieri*

Methods: Endophytic fungi were isolated from the *Bacopa monnieri*.

Extracts from liquid cultures were tested for cytotoxicity against a number of cancer cell lines using the MTT assay. Antimicrobial activity was determined using the micro dilution method.

Results: 22% of the examined extracts showed potent (IC₅₀ of <20 µg/ml) cytotoxic activity against HCT-116 cell line. 5.5%, 11%, 11% of the extracts were found to be cytotoxic for MCF-7, PC-3, and A-549 cell lines respectively. 33% extracts displayed antimicrobial activity against at least one test organism with MIC value 10–100 µg/ml. The isolate B9_Pink showed the most potent cytotoxic activity for all the cell lines examined and maximum antimicrobial activity against the four pathogens examined which was followed by B19.

Conclusions: Results indicated the potential for production of bioactive agents from endophytes of *Bacopa monnieri*.

Neurospora sp.

(A) 6 hr artificial day

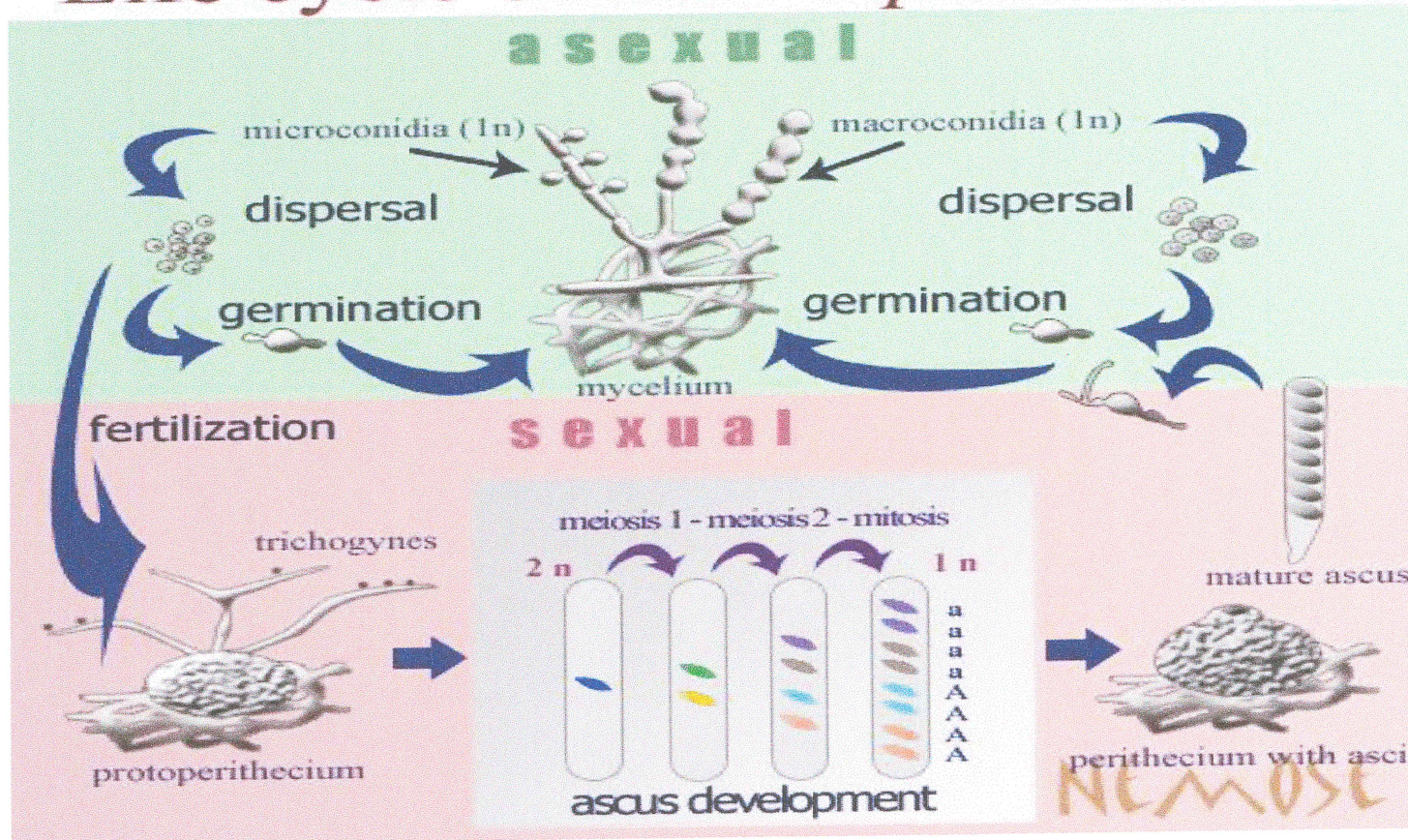
(B) 18 hr artificial day

(C) 48 hr artificial day



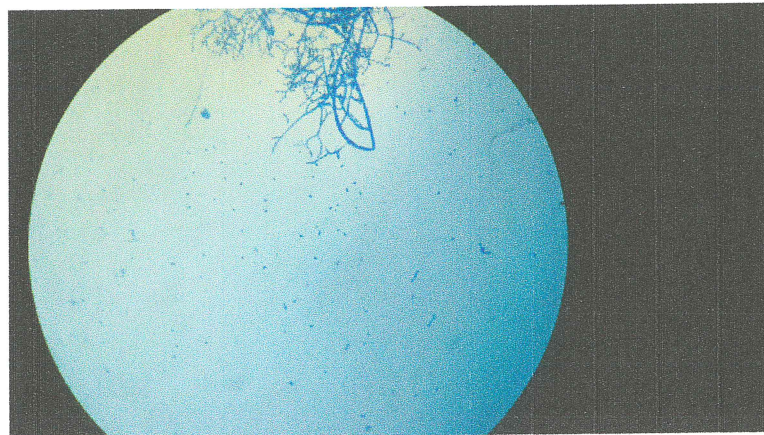
วงจรชีวิตของ *Neurospora sp.*

Life cycle of *Neurospora crassa*



Neurospora เป็นราพวก **Ascomycetes** ที่พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมเจริญได้ดีบนวัสดุจากพืช จึงมักพบปนเปื้อนและก่อปัญหาให้ทั้งแก่เกษตรกรผู้เพาะปลูกในภาคการเกษตรและโรงงานอุตสาหกรรมที่ใช้วัตถุดิบการเกษตร เช่น อ้อย ข้าว ข้าวโพด

Neurospora สร้างสีส้มซึ่งเป็นกลุ่มแคโรทีนอยด์ในโคนิเดีย นอกจากนี้มีการผลิตเอนไซม์ที่มีประโยชน์ในด้านอุตสาหกรรม เช่น เอนไซม์อินเวอร์เตส (**invertase**) เซลลูเลส (**cellulases**) โปรติเอส (**proteases**)



การใช้ประโยชน์ของ Neurospora sp.

- สีธรรมชาติคือสีที่สกัดได้จากวัตถุดิบจากแหล่งธรรมชาติเช่น พืช สัตว์ และแร่ธาตุต่างๆ ซึ่งเกิดขึ้นมาจากกระบวนการตามธรรมชาติ สีธรรมชาติมีบทบาทเกี่ยวข้องกับวิถีการดำรงชีวิตของมนุษย์มาช้านานนับตั้งแต่สมัยโบราณ มนุษย์ได้เรียนรู้ที่จะนำสีจากวัสดุธรรมชาติมาใช้ในกิจกรรมต่างๆ เช่น ทาสีตามร่างกาย สีของภาชนะ เครื่องปั้นดินเผา ย้อมสิ่งทอ เครื่องใช้ เครื่องนุ่งห่ม ภาพวาดฝาผนัง และเป็นส่วนประกอบในพิธีกรรมต่างๆตามความเชื่อของแต่ละท้องถิ่น
- สีธรรมชาติที่มีการใช้ในอดีตนั้นมักจะได้มาจาก พืช สัตว์ และแร่ธาตุต่างๆ โดยมีพัฒนาการสืบทอดกันมาจนถึงปัจจุบัน ตัวอย่างเช่น การใช้สีในการ ประกอบอาหาร และขนม การย้อมสิ่งทอ เครื่องนุ่งห่ม การย้อมเครื่องมือ เครื่องใช้ในครัวเรือน เช่น เครื่องมือดักจับสัตว์น้ำ การใช้เขม่าหรือควันไฟรมเครื่องจักสานให้เกิดสีและเสริมความทนทาน ตลอดจนการใช้ทาภาพเขียน

- จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถสร้างสารสีหรือรงควัตถุ ได้มาก และปลอดภัยพอที่จะนำไปใช้เป็นสีผสมอาหารได้ และจุลินทรีย์บางชนิดสามารถสร้างสารสีที่มีคุณสมบัติเป็นสารเร่งการเจริญ หรือเป็นประโยชน์ต่อร่างกาย เช่นมีคุณสมบัติเป็นวิตามิน ลักษณะของจุลินทรีย์ที่เป็นแหล่งสารสี ได้แก่

1. สามารถเจริญได้เร็ว ขยายพันธุ์ได้ดี

2. มีความสามารถผลิตผลิตภัณฑ์ได้สูง ได้ผลสม่ำเสมอ และไม่ควรรให้ผลพลอยได้ที่ไม่

จำเป็นหรือไม่ต้องการ

3. ควรเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถใช้วัตถุดิบหาง่าย และราคาถูกที่มีอยู่แล้วในท้องถิ่นได้ดี

4. มีความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมได้ดีมีช่วง pH และอุณหภูมิที่

เหมาะต่อการเจริญเติบโตกว้าง

5. เป็นจุลินทรีย์ที่มีลักษณะทางด้านพันธุกรรมที่คงที่ไม่เปลี่ยนแปลงง่าย

6. ควรเป็นเชื้อที่เลี้ยงง่าย ตายยาก และเก็บได้นาน

7. ควร เป็นเชื้อบริสุทธิ์ปราศจากฟาจ (phage) หรือทนต่อการทำลายของฟาจ (phage) หรือ

จุลินทรีย์ชนิดอื่น เช่น แบคทีเรียควรเป็นพันธุ์ต้านทานฟาจ (phage) สำหรับก็ควรทนต่อการเข้าทำลายของแบคทีเรียหรือรา

8. ต้องเป็นจุลินทรีย์ที่ไม่ก่อโรคในคน และไม่สร้างสารพิษให้กับผลิตภัณฑ์นั้น ๆ

Neurospora sp. สามารถสร้างแคโรทีนอยด์ เป็นรงควัตถุสีเหลือง ส้ม และแดง ซึ่งเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่ไม่มีออกซิเจน แคโรทีนอยด์สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท ตามลักษณะโครงสร้างทางเคมี คือ

2.1 แคโรทีน (รงควัตถุสีแดงส้ม) แคโรทีน แบ่งออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่

แอลฟาแคโรทีน เบต้าแคโรทีน และเอปซิลอนแคโรทีน โดยเบต้าแคโรทีน จะเป็นตัวที่พบได้ในสาหร่ายทุกชนิด

2.2 แซนโทฟิลล์ (รงควัตถุสีเหลือง) มีชื่ออีก

อย่างว่า ออกซิแคโรทีน (**Oxycarotene**) หรือ แคโรทีนอล (**Carotenol**)

เป็น **Antioxidant** ช่วยป้องกันโรคมะเร็ง ชะลอความแก่ เป็นสารช่วยเพิ่ม

ภูมิคุ้มกัน 2.3 ไฟโคไซยานิน คือ ไฟโคบิลิน + โพรตีน = ไฟโคบิลิโพรตีน

ไฟโคบิลิโซม) ละลายในน้ำได้เป็นสารสีแดง และน้ำเงิน

Monascus purpureus

เชื้อยีสต์แดง

ลักษณะยีสต์แดงใน PDA

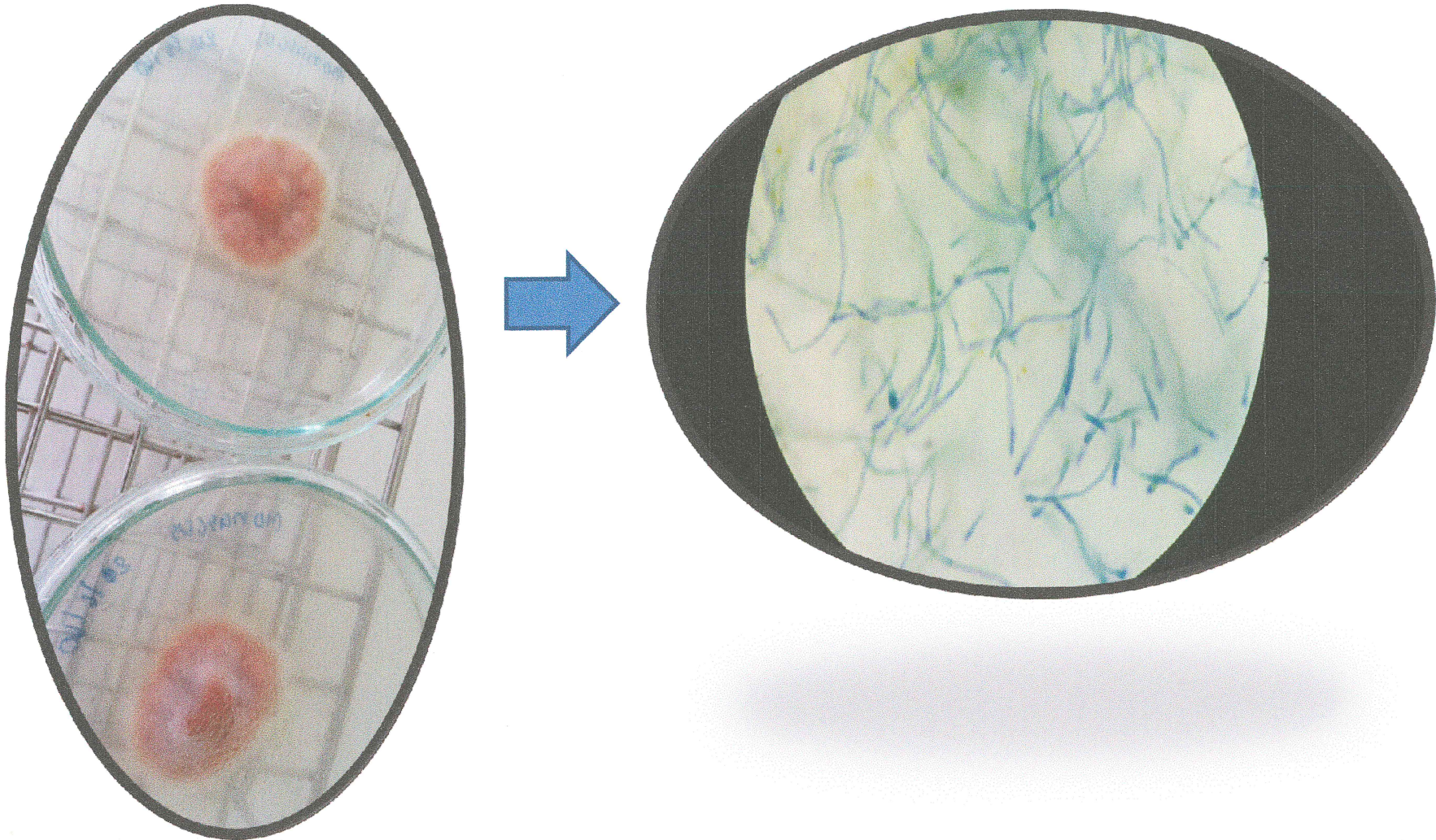


Monascus purpureus

เชื้อยีสต์แดง



เชื้อ *Monascus purpureus*



ลักษณะของเชื้อรา *Monascus spp.*

1. *Monascus spp.* จัดอยู่ในวงศ์ (Family) Monascaceae กลุ่ม (Class) Ascomycetes

กลุ่มย่อย (Subclass) Plectomycetidae อันดับ (Order) Eurotiales

2. เส้นใยมีผนังกัน(Septate) มีการสืบพันธุ์แบบมีเพศและไม่มีเพศ เส้นใยมีการแตกกิ่งก้านสาขามากมายและมักเจริญแบบซิดเกาะแน่นบนผิวของอาหารแข็ง เส้นใยเมื่ออายุน้อยไม่มีสีขาว แต่เมื่ออายุมากขึ้นจะมีสีแดงหรือแดงม่วง

3. การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อรา *Monascus spp.* ซึ่งจะมีการสร้างเพอริทีเซียม

(Perithecium) ซึ่งเป็นแอสโคคาร์ป (Ascocarp) มีรูปร่างกลม โดยจะเกิดบนก้าน (Stalk) ที่มี

หรือไม่มีผนังกันก็ได้แอสโคคาร์ปเกิดขึ้นบนเส้นใยซึ่งเป็นแบบโฮโมแทลลิก (Homothallic) โดยมีการสร้าง

โครงสร้างออกมา 2 ชนิดคือ แอนเทอริเดียม(Antheridium) และแอสโคโกเนียม (Ascogonium) เกิดการฟิว

ชัน (Fusion) ที่ปลายแอสโคโกเนียมกับส่วนฐานหรือส่วนกลางของแอนเทอริเดียมแล้วจึงจะมีการวิวัฒนาการต่อไป

อีกคือ แบ่งเซลล์แบบไมโอซิสตามมาด้วยไมโทซิสมี Daughter nuclei จากการแบ่งตัวมีการขยายผนังเซลล์ร่วม

ออกเรียกว่า การสร้างแอสโคคาร์ปขึ้นในที่สุด ภายใน เพอริทีเซียมมีแอสโคสปอร์ (Ascospores) มากมาย โดย

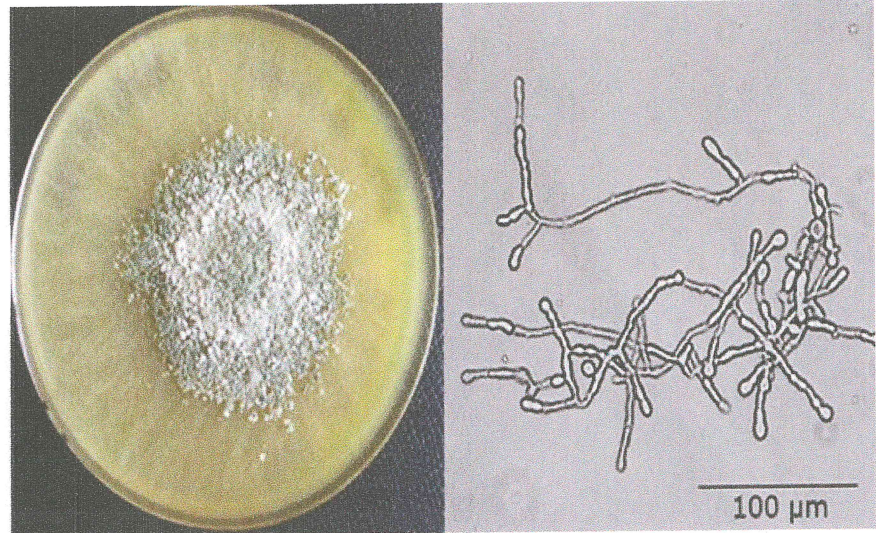
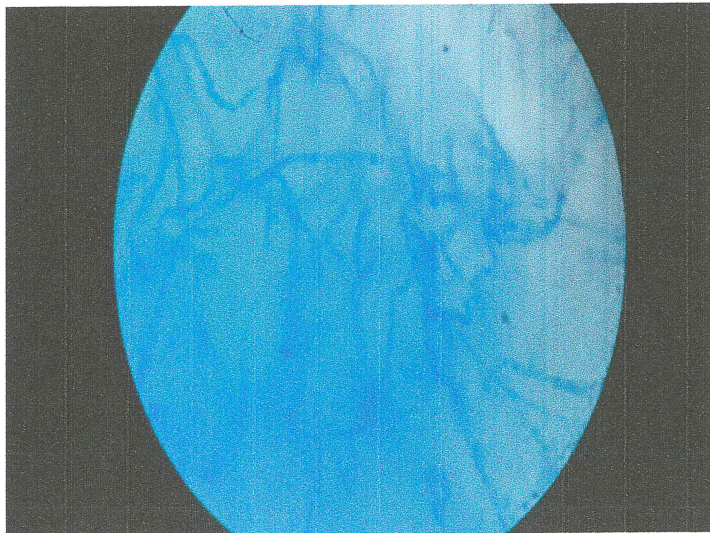
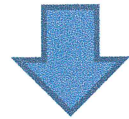
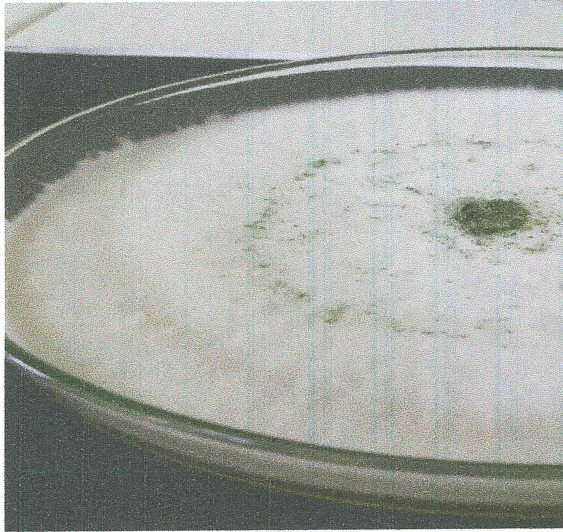
แอสโคสปอร์จำนวน 2-8 รวมอยู่ภายในแอสคัส (Ascus) แอสโคสปอร์มีลักษณะเป็นรูปไข่ อาจมีสีน้ำตาล สีแดง

สีส้มหรือไม่มีสี เมื่อผนังแอสโคคาร์ปแตกออกก็จะปล่อยแอสโคสปอร์ออกมาเป็นเส้นไหมขึ้น

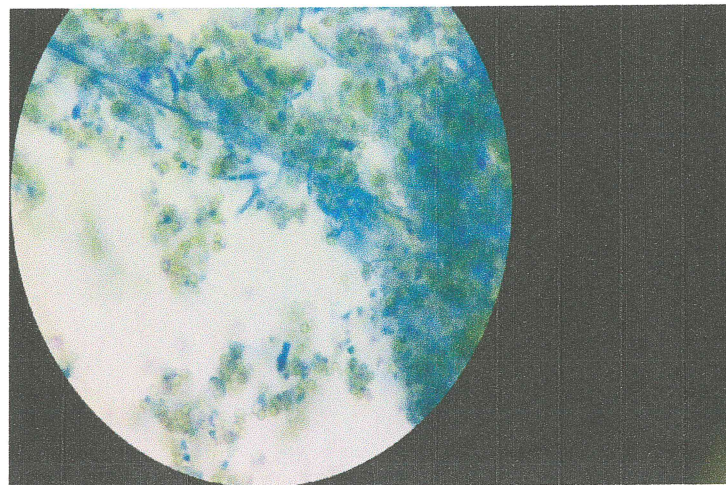
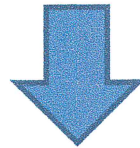
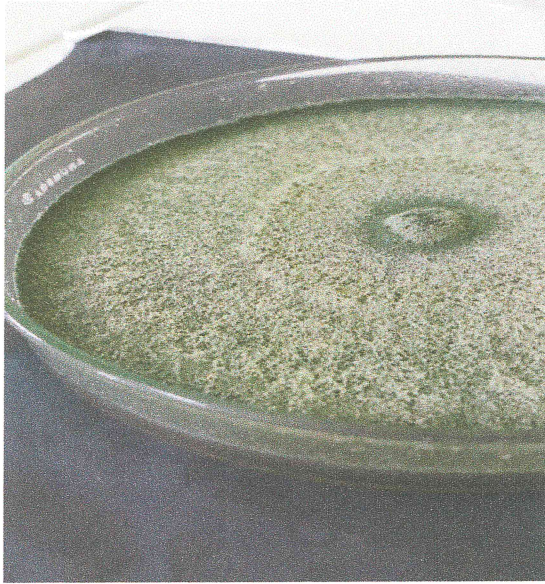
สายพันธุ์ของเชื้อราโมแนสคัส

Monascus spp. เป็นเชื้อราที่พบครั้งแรกแยกได้จากมันฝรั่งต้มในประเทศฝรั่งเศสและแบ่งได้เป็น 2 สายพันธุ์ *M. rubber* และ *M. mucoroides* ต่อมาได้แยกสายพันธุ์สำคัญคือ *M. purpureus* จากข้าวแดงหรืออังกัก ทำให้รู้จักประโยชน์ของเชื้อนี้กันอย่างแพร่หลายมากขึ้น ในปี 1930 ได้มีการแยกเชื้อและจัดจำแนกสปีชีส์อย่างชัดเจนรวมเป็น 5 สปีชีส์ ดังนี้ *M. purpureus*, *M. barkeri* Dangeard, *M. olei* Piedallu, *M. mucoroides* และ *M. rubber* van Tieghem

เชื้อราถักแป้ง (*Trichoderma reesei*)

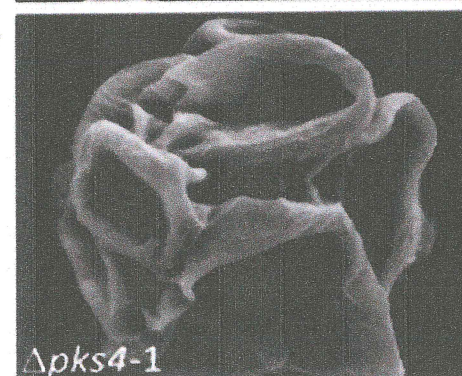
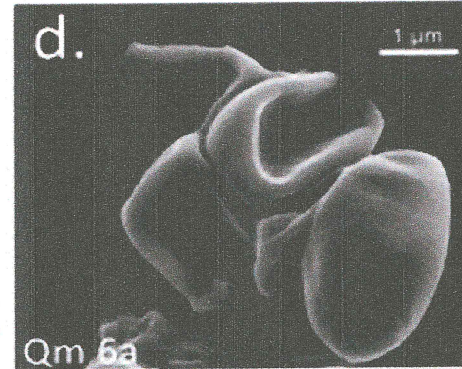
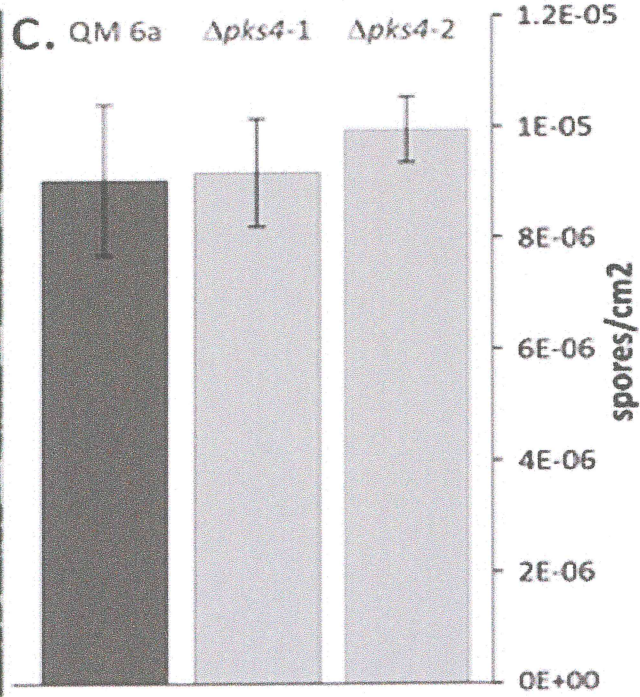
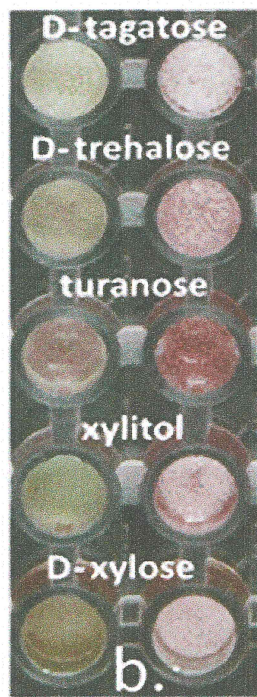


รารากไผ่ (*Trichoderma osperellum*)



- จากผลการวิจัยของห้องปฏิบัติการ Los Alamos National Laboratory และ U.S. Department of Energy Joint Genome Institute ใน วารสาร Nature Biotechnology รายงานว่าลำดับทางพันธุกรรม (genetic sequence) ของเชื้อเห็ดหรือรา *Trichoderma reesei* ช่วยไขปริศนาในเรื่องการย่อยสลายเส้นใยพืชให้เป็นน้ำตาล โดยแนวคิดโยงไปถึงความเป็นไปได้ในการนำมาใช้ในการย่อยสลายวัตถุดิบ เช่น ข้าวโพก หญ้าสวิตช์กราซ และขยะเซลลูโลส ไปสู่การผลิตเอทานอล ซึ่งการผลิตเอทานอลจากขยะเซลลูโลสในปัจจุบันนั้น จะเป็นทางเลือกที่ดีที่สุดหากเทียบจากปริมาณคาร์บอนที่ปล่อยออกมาจากกระบวนการผลิต
- เชื้อหรือรา *Trichoderma reesei* นั้นถูกค้นพบโดยทหารในช่วงสงครามโลกครั้งที่ 2 ที่เนื่องจากมันทำให้เสื้อผ้าเต็นท์ และเครื่องนอนของเหล่าทหารนั้นเน่า เปื่อย ผุพังไปอย่างรวดเร็ว ต่อมาได้ถูกตั้งชื่อตาม Dr. Elwyn T. Reese ผู้ที่จับเอาเห็ดราตัวนี้มาศึกษาอย่างจริงจัง
- เจ้าเห็ดราตัวนี้อาศัยเอนไซม์ที่มันสร้างขึ้นเพื่อย่อยสลายเส้นใยของพืชไปสู่น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เรียกว่า โมโนแซคคาไรด์ (monosaccharide) จากนั้นเห็ดจึงย่อยน้ำตาลนั้นเพื่อเป็นอาหาร
- นาย Los Alamos ผู้นำคณะศึกษากล่าวว่า คณะของเขาเชื่อว่า *Trichoderma reesei* นั้นมีกลุ่มยีนส์ (clusters) ที่ผลิตเอนไซม์ ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้อย่างมีประสิทธิภาพ
- ในภาคอุตสาหกรรม เชื้อเห็ดราชนิดนี้สามารถนำมาใช้เพื่อให้มันหลังเอนไซม์ แล้วนำมาทำให้ทำให้บริสุทธิ์แล้วเติมลงในน้ำหมักเซลลูโลส (เปลือกไม้ เศษหนังสือพิมพ์ หญ้าสวิตช์กราซ ฯลฯ) เพื่อผลิตน้ำตาล จากนั้นจึงใช้ยีสต์มาหมักเพื่อให้เกิดแอลกอฮอล์ต่อไป

เชื้อราถัปปิงหา (*Trichoderma reesei*)



Qm 6a $\Delta pks4-1$ Qm 6a $\Delta pks4-1$ $\Delta pks4-2$

ไตรโคเดอร์มา : เชื้อรามหัศจรรย์สำหรับใช้ควบคุมโรคพืช

TRICHODERMA : A miracle biocontrol agent for plant disease control

เชื้อราไตรโคเดอร์มา เป็นเชื้อราชั้นสูงที่ดำรงชีวิตอยู่ในดิน อาศัยเศษซากพืช ซากสัตว์และอินทรีย์วัตถุเป็นแหล่งอาหาร เจริญได้รวดเร็ว บนอาหารเลี้ยงเชื้อราหลายชนิด สร้างเส้นใยสีขาวและผลิตส่วนขยายพันธุ์ที่ เรียกว่า “โคนิเดีย” หรือ “สปอร์” จำนวนมากรวมเป็นกลุ่มหนาแน่นจนเห็นเป็น สีเขียว เชื้อราไตรโคเดอร์มาเป็นศัตรู (ปฏิปักษ์) ต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืชหลายชนิดโดยวิธีการเบียดเบียน หรือเป็นปรสิต และแข่งขันหรือแย่งใช้อาหารที่เชื้อโรคต้องการ นอกจากนี้เชื้อราไตรโคเดอร์มายังสามารถผลิตปฏิชีวนสาร และสารพิษ ตลอดจนน้ำย่อยหรือเอนไซม์สำหรับช่วยละลายผนังเส้นใยของเชื้อโรคพืช คุณสมบัติพิเศษของเชื้อราไตรโคเดอร์มาคือ สามารถช่วยละลายแร่ธาตุให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืช จึงช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และชักนำให้ต้นพืชมีความต้านทานต่อเชื้อโรคพืชทั้งเชื้อราและแบคทีเรียสาเหตุโรค

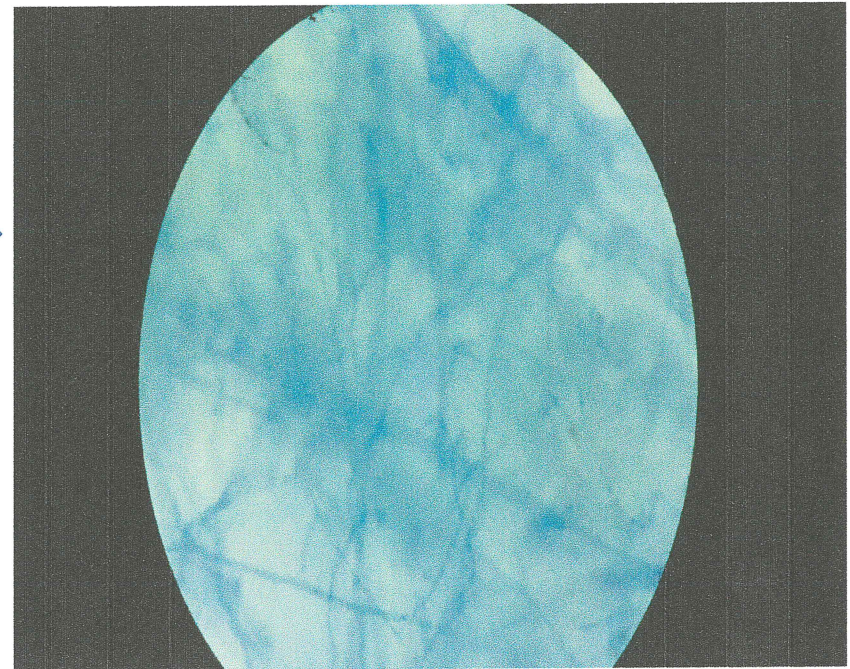
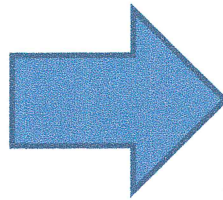
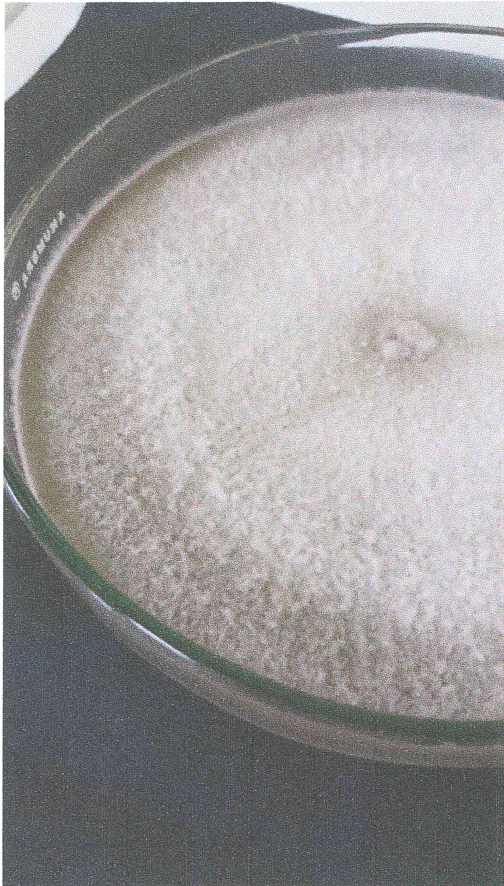
จากผลการดำเนินงานวิจัยตั้งแต่ พ.ศ.2528 ถึงปัจจุบัน สามารถคัดเลือกเชื้อราไตรโคเดอร์มาจากดินในธรรมชาติได้หลายสายพันธุ์ โดยเฉพาะสายพันธุ์ **CB-Pin-01** มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรคของพืชเศรษฐกิจต่างๆทั้งพืชไร่ ไม้ผล พืชผัก และไม้ดอกไม้ประดับหลายชนิดได้ ในสภาพแปลงเกษตรกร ทั้งโรคที่เกิดบนส่วนของพืชที่อยู่ใต้ดิน เช่น โรคเมล็ดเน่า โรคเน่าระดับดิน (โรครากลึบ) รากเน่า หัวหรือแง่งเน่า และโคนเน่า เป็นต้น โรคที่เกิดบนส่วนของพืชที่อยู่เหนือดินไม่ว่าจะเป็นส่วนของ กิ่ง ผล ใบ หรือดอก เช่น โรคลำต้นไหม้ของหน่อไม้ฝรั่ง โรคแคงเกอร์ของมะนาว โรคราดำของมะเขือเทศ โรคใบปื้นเหลืองและโรคดอกสนิมของกล้วยไม้ โรคแอนแทรคโนสของมะม่วงและพริกทั้งก่อนและหลังเก็บเกี่ยวผลผลิต นอกจากนี้ยังสามารถใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มาควบคุมโรครากเน่าของพืชผักสลัดและผักกินใบต่างๆที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหาร (ระบบไฮโดรโปนิคส์) และจากผลการวิจัยล่าสุดพบว่า การแช่เมล็ดข้าวเปลือกก่อนใช้หว่านลงในนาข้าว ช่วยลดการเกิดโรคเมล็ดต่าง เมล็ดลีบ ของข้าวที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อราหลายชนิด ตลอดจนช่วยเพิ่มความสมบูรณ์และน้ำหนักเมล็ด และเพิ่มผลผลิตต่อไร่ได้ด้วย

ผู้วิจัยได้พัฒนาชีวภัณฑ์เชื้อราไตรโคเดอร์มาให้อยู่ในรูปผงหัวเชื้อบริสุทธิ์ เพื่อให้เกษตรกรสามารถผลิตขยายเชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดสดไว้ใช้ได้เองตามต้องการ ด้วยการหุงปลายข้าวให้สุกในหม้อหุงข้าวไฟฟ้า อัตราปลายข้าว 3 ส่วน น้ำ 2 ส่วน ตักใส่ถุงพลาสติกแล้วใส่ผงหัวเชื้อลงไปเล็กน้อย บ่มไว้ 5-7 วัน ก็สามารถนำเชื้อสดไปใช้ได้ ขณะนี้ได้พัฒนาเชื้อสดดังกล่าวให้เป็นชีวภัณฑ์ในรูปน้ำและรูปผงแห้งผสมน้ำเพื่อใช้พ่นส่วนต่างๆของพืชและพ่นลงดินได้ ผงหัวเชื้อบริสุทธิ์นี้มีสปอร์ของเชื้อราไตรโคเดอร์มาในปริมาณไม่น้อยกว่า 100 ล้านหน่วยชีวิต (สปอร์) ต่อผงเชื้อ 1 กรัม สามารถเก็บรักษาได้เป็นระยะเวลานานไม่น้อยกว่า 1 ปีถ้าเก็บไว้ในตู้เย็น (ประมาณ 8-10 องศาเซลเซียส) แต่ถ้าเก็บที่อุณหภูมิในห้องปกติ (25-30 องศาเซลเซียส) สามารถเก็บไว้ได้นาน 6 เดือน

เห็ดต้นหมี่ (*Daldinia sp.*)



เห็ดด้นหมี่ (*Daldinia sp.*)



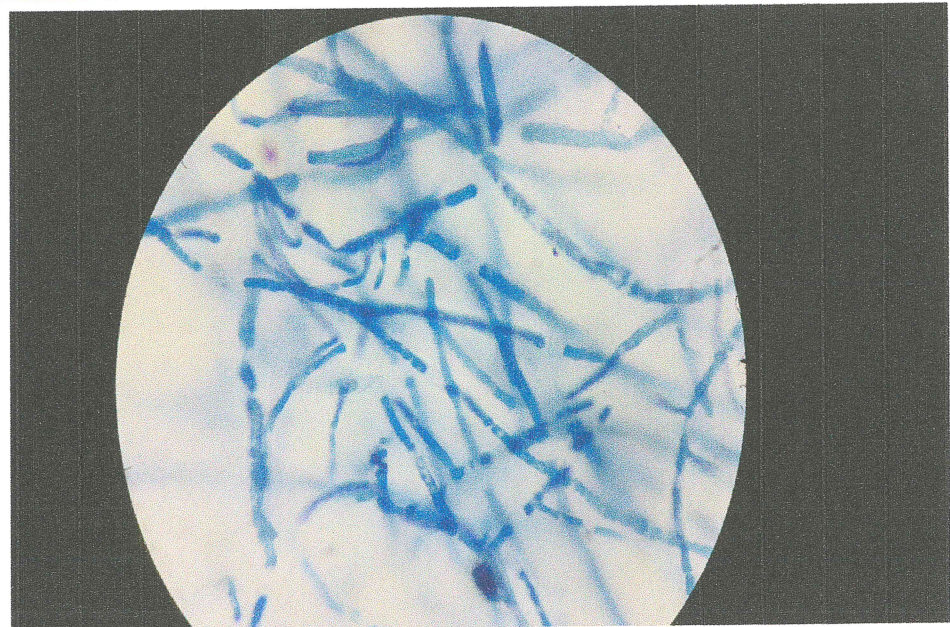
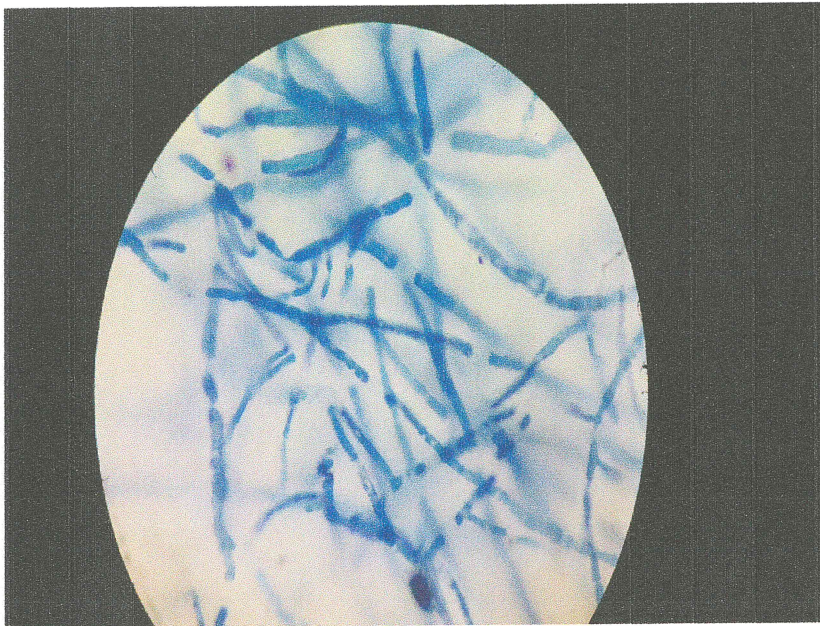
Daldinia sp. หรือเห็ดต้นหมี่ มีรูปร่างเป็นก้อนนูน เกือบเป็นทรงกลม ติดอยู่บนเนื้อไม้ แข็ง สีม่วงเข้มจนถึงดำ ผิวเรียบ เมื่อแก่ผิวเป็นตุ่มเล็ก ๆ ถ้าผ่าดูเนื้อข้างในจะเห็นเป็นลายเส้นวงซ้อนกันอยู่หลาย ๆ ชั้น สปอร์เกิดอยู่ภายในอวัยวะรูปคนโทเรียงเป็นแถวใต้ผิว



Nigrospora spp.



Nigrospora spp.

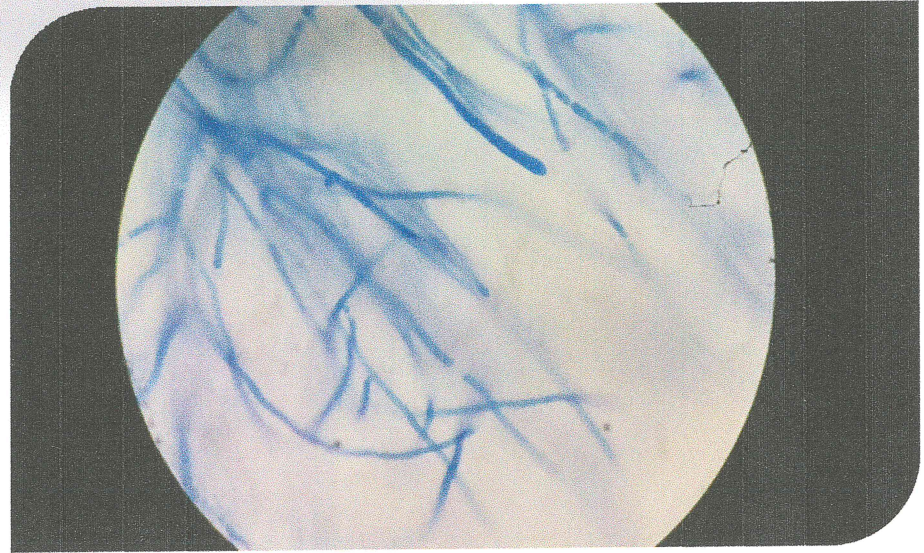
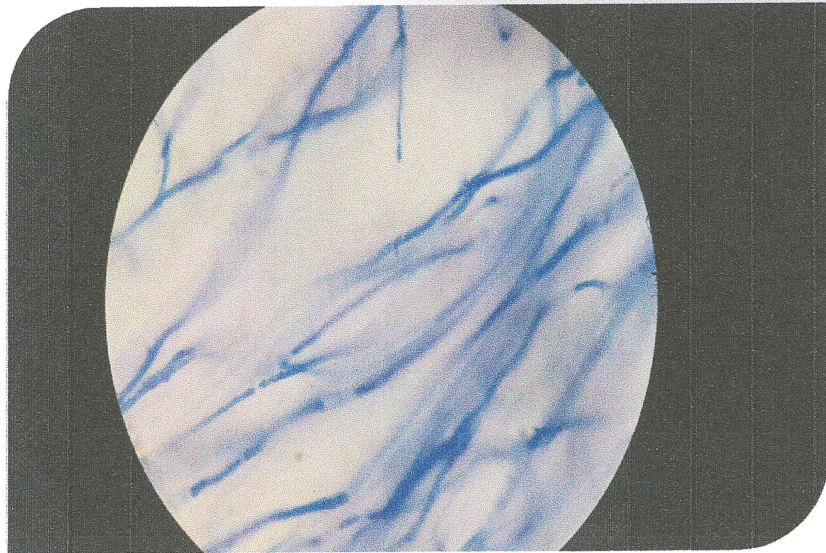


งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

รายงานฉบับนี้ ได้รายงานว่า **vinca alkaloid** แยกมาจากต้น
แพงพวย และนำมาแยกสารโดยใช้ **LCMS** จะได้สารสกัดอย่าง
หายาบจากเส้นใยเชื้อรา และกำหนดให้เป็น **vinblastine** สำหรับ
สาร **vinca alkaloid** จะถูกทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งด้วยวิธี **HPLC**
และทดสอบความเป็นพิษโดยใช้วิธี **MTT assays** เซลล์มะเร็งเต้านม
(**MDA-MB 231**) จะนำมาทดสอบกับ **vinblastine**
บริสุทธิ์ ที่ผลิตจากเซลล์ของเชื้อ ***Nigrospora sphaerica***
สำหรับ **vinblastine** บริสุทธิ์จะสกัดมาจากใบต้นแพงพวย ใช้เป็น
ตัวเปรียบเทียบ พบว่า **vinblastine** ที่ผลิตจาก
N. sphaerica ให้ผลในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม โดยมีค่า
IC50 มากกว่า $32 \mu\text{g ml}^{-1}$

Tichoderma spp.





Ganoderma sp. (เห็ดหลินจือป่า)

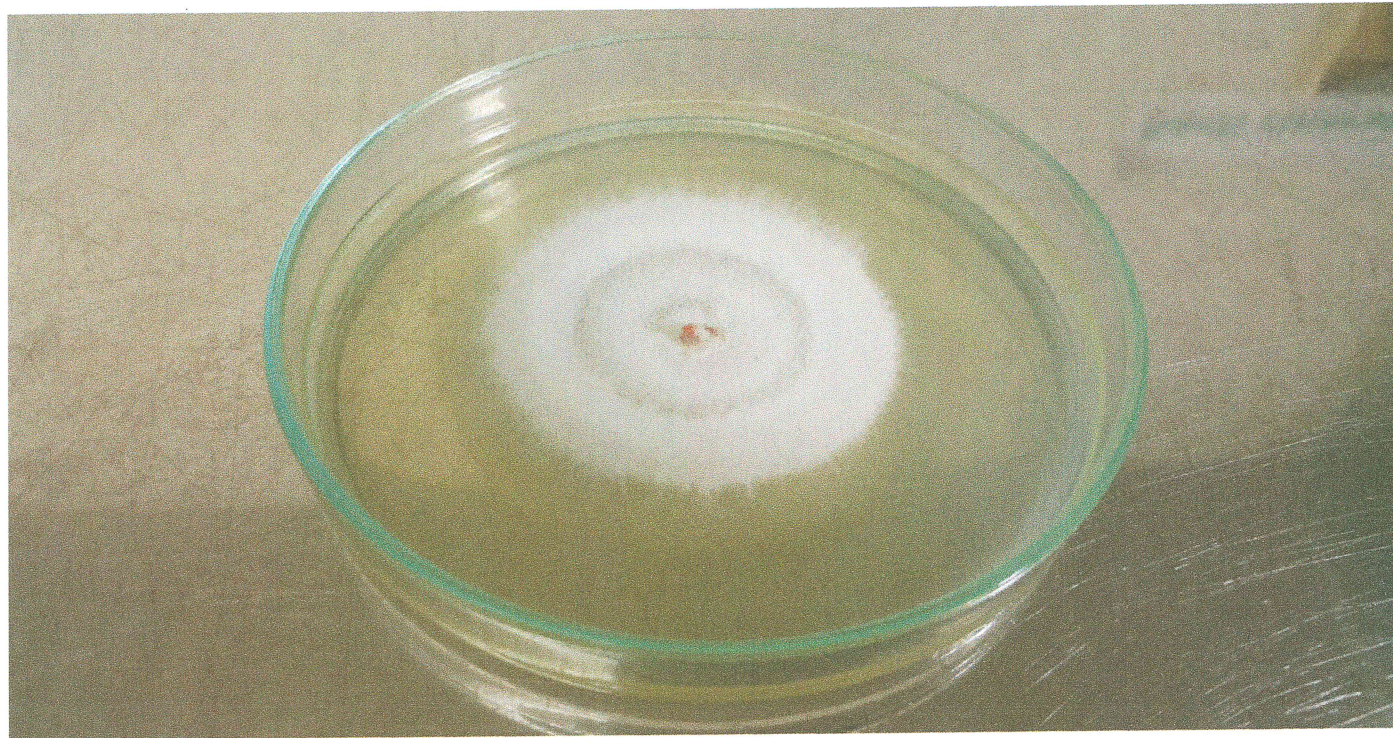
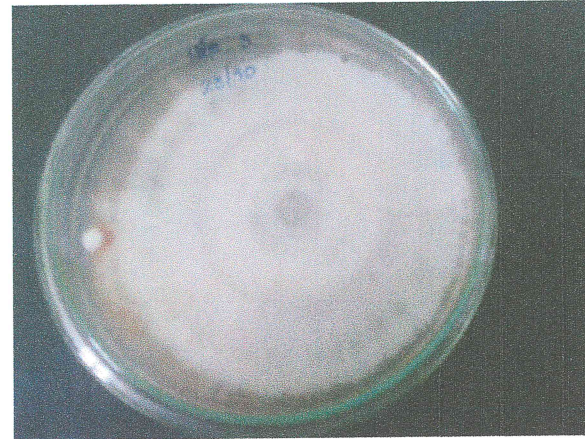


Ganoderma sp.



เห็ดขอนแดง
(*Pycnoporus sanguineus*)





เห็ดถั่งเช่า

(*Ophiocordyceps sinensis*)

