# บทที่ 2
## ตรวจเอกสาร

ในธรรมชาติ จุลินทรีย์บางชนิดอาจสร้างสารที่ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ชนิดนั้นเอง หรือจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ การต้านการเจริญของจุลินทรีย์สังเกตได้โดย "การเกิดแอนตาโกนิสม" (antagonism) ของจุลินทรีย์ 2 ชนิดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งในบริเวณเดียวกัน (simultaneous antagonism) หรือโดยการให้สารที่จุลินทรีย์ชนิดหนึ่งสร้างขึ้นซึ่งคาดว่าจะยับยั้งการเจริญแก่เชื้อทดสอบ (deferred antagonism) สารที่สร้างขึ้นนี้อาจจัดจำแนกได้หลายแบบ (Jack, Tagg และ Ray, 1995) ได้แก่

1. สารพิษ (Toxins)
2. เอนไซม์ที่สลายแบคทีเรีย (Bacteriolytic enzymes)
3. แบคเทอริโอฟาจ และแบคเทอริโอฟาจที่ไม่สมบูรณ์ (Bacteriophages and defective bacteriophages)
4. สารที่เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิสม (By-products of primary metabolic pathways)
5. สารปฏิชีวนะ (Antibiotic substances)
6. แบคเทอริโอซิน และสารคล้ายแบคเทอริโอซิน (Bacteriocins and bacteriocin-like agents)

### 2.1 สารพิษ (Toxins)

สารต้านจุลชีพในกลุ่มนี้จะมีความเป็นพิษต่อเซลล์พวกยูคาริโอต (eukaryotic cells) และสามารถต้านการเจริญของจุลินทรีย์อื่นๆ ได้ด้วยลักษณะโครงสร้างของโมเลกุลที่มีบริเวณหลัก (domain structure) คล้ายกับแบคเทอริโอซินและมีโครงสร้างส่วนที่ก่อให้เกิดพิษกับเซลล์พวกยูคาริโอต ตัวอย่างสารพิษเหล่านี้ เช่น diphteria toxins, tetanus toxins, cholera toxins และแบคเทอริโอซินที่ได้จากบางสายพันธุ์ของ *E. coli* (Farkas-Himsley และคณะ, 1992) และ *Streptococcus pyogenes* (Tagg และ McGiven, 1972)

## 2.2 เอนไซม์ที่สลายแบคทีเรีย (Bacteriolytic enzymes)

เอนไซม์ที่สลายแบคทีเรียบางชนิดสามารถแสดงผลต้านการเจริญของเชื้อทดสอบได้เช่นเดียวกับสารต้านอื่นๆ ตัวอย่างเอนไซม์เหล่านี้แสดงไว้ดังตารางที่ 2

**ตารางที่ 2 : ตัวอย่างเอนไซม์ที่แสดงความสามารถต้านจุลชีพ**

| เอนไซม์ | แหล่งที่พบ | ผู้ที่ศึกษา |
|---|---|---|
| virolysin | Staphylococcal phage lysates | Ralston และคณะ (1955) |
| lysostaphin | *Staphylococcus aureus* | Schindler และ Schuhardt (1965) |
| lysozyme | *Staphylococcus aureus* | Hawiger (1968) |
| endo-β-*N*-acetylglucosaminidase | *Staphylococcus aureus* | Wadstrom และ Hisatsune (1970) |
| phage-associated lysin | *Staphylococcus aureus* | Sonstein, Hammel และ Bondi (1971) |
| phospholipase A | *Lactococcus lactis* | Venema และคณะ (1993) |
| hemolysins | *Enterococcus faecalis* | Gilmore และคณะ (1991) |

## 2.3 แบคเทอริโอฟาจและแบคเทอริโอฟาจที่ไม่สมบูรณ์ (Bacteriophages and defective bacteriophages)

แบคเทอริโอฟาจจะเข้าไปเจริญในเซลล์ของเชื้อทดสอบ ทำให้เชื้อทดสอบไม่สามารถเจริญได้แล้วตายในเวลาต่อมา ความแตกต่างของฟาจกับสารต้านอื่นอาจแสดงได้โดยการเกิดพลาค (plaques) เมื่อเพิ่มการเจือจางของส่วนน้ำใส (supernatants) ที่นำมาทดสอบการต้านจุลชีพบนอาหารแข็งที่มีเชื้อทดสอบอยู่ นอกจากนี้ Hamon และ Peron (1968) ตรวจสอบพบว่าแบคเทอริโอฟาจมีความต้านทานอย่างมากต่อทริปซิน (trypsin)

## 2.4 สารที่เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิสม (By-products of metabolic pathways)

สารที่เกิดในกระบวนการเมตาบอลิสมบางอย่างก็ให้ผลต้านจุลชีพได้ เช่น lactic acid (Tramer, 1966) free fatty acids (Walstad, Reitz และ Sparling, 1974) ammonia (Rogula และ Carr, 1972) และ hydrogen peroxide (Malke และคณะ, 1974)

## 2.5 สารปฏิชีวนะ (antibiotic substances)

การสังเคราะห์สารปฏิชีวนะเกิดขึ้นโดยการทำงานของกลุ่มเอนไซม์ (multienzyme complexes) ไม่สามารถขัดขวางกระบวนการสร้างสารปฏิชีวนะโดยตรงด้วยสารที่ใช้ยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนผ่านทางไรโบโซม (inhibitors of ribosomal protein synthesis) ตัวอย่างสารปฏิชีวนะ ดังเช่น gramicidin, valinomycin และ bacitracin เป็นต้น

## 2.6 แบคเทอริโอซินและสารคล้ายแบคเทอริโอซิน (Bacteriocins and bacteriocin-like agents)

แบคเทอริโอซินและสารคล้ายแบคเทอริโอซินถูกสังเคราะห์โดยตรงด้วยกระบวนการสังเคราะห์พอลิเพปไทด์ผ่านทางไรโบโซม (ribosomally synthesized polypeptides) แบคเทอริโอซินที่มีการศึกษากันมากในระยะแรก เป็นแบคเทอริโอซินที่ได้จากแบคทีเรียแกรมลบใน Family Enterobacteriaceae (อาจจะเป็น *E. coli*) สมบัติโดยรวมของแบคเทอริโอซิน จึงอธิบายโดยอาศัย colicins เป็นต้นแบบ (model) ในการศึกษา (Tagg, Dajani และ Wannamaker, 1976) สมบัติดังกล่าวคือ

1) มักแสดงการต้านจุลชีพในวงแคบกับเชื้อทดสอบเพียงไม่กี่ชนิด เชื้อทดสอบนั้นจะเป็นชนิดที่ใกล้เคียงกับเชื้อที่สร้างแบคเทอริโอซิน
2) มีองค์ประกอบหลักในโมเลกุลเป็นโปรตีน
3) ยับยั้งแบคทีเรียด้วยการทำให้ตาย (bactericidal mode of action) โดยมีการทำงานได้ 2 แบบ คือ
   - ทำให้เกิด ion channels ที่เยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้เซลล์เสียความสามารถในการให้สารผ่านเข้าออก (permeability)
   - แสดงความสามารถในการสลายกรดนิวคลีอิก (nuclease activity)

4) จับกับเซลล์ในบริเวณที่จำเพาะ (specific cell receptors)

5) สังเคราะห์จากสารพันธุกรรมที่อยู่ในพลาสมิด (plasmid-borne genetic determinants)

6) สังเคราะห์ขึ้นในระยะที่เซลล์ใกล้ตาย

## 2.7 แบคเทอริโอซิน และสารคล้ายแบคเทอริโอซินที่สร้างโดยแบคทีเรียแกรมบวก

นอกจากแบคทีเรียแกรมลบบางชนิดจะสร้างแบคเทอริโอซินได้แล้ว แบคทีเรียแกรมบวกบางชนิดก็สามารถสร้างแบคเทอริโอซินหรือสารคล้ายได้เช่นเดียวกัน แบคเทอริโอซินและสารคล้ายจากแบคทีเรียแกรมบวก อาจมีสมบัติทั้งที่เหมือนและบางอย่างที่แตกต่างจากที่กล่าวข้างต้น อันได้แก่

1) แบคเทอริโอซินและสารคล้ายจากแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิดสามารถยับยั้งเชื้อได้หลายชนิดไม่เฉพาะแต่ในกลุ่มของพวกแกรมบวกเท่านั้น ยังสามารถต้านแบคทีเรียแกรมลบบางชนิดได้อีกด้วย เช่น nisin ที่ผลิตโดย *Lactococcus lactis* (Kalchayanand, Hanilin และ Ray, 1992; Stevens และคณะ, 1991)

2) มีองค์ประกอบหลักในโมเลกุลเป็นโปรตีนหรือเพปไทด์

นอกจากนั้นยังมีความหลากหลายทางโครงสร้างได้หลายกรณี แบคเทอริโอซินและสารคล้ายบางชนิดมีส่วนประกอบเพิ่มเติมเป็นคาร์โบไฮเดรตหรือไขมัน เช่น Plantaricins S และ T ที่มีไขมันอยู่ในโมเลกุล (Jimenez-Diaz และคณะ, 1993) และแบคเทอริโอซินที่ได้จาก *Leuconostoc paramesenteroides* ที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบในโมเลกุล (Lewus, Sun และ Montville, 1992) แบคเทอริโอซินบางชนิดที่มีมวลโมเลกุลสูง อาจประกอบไปด้วยหน่วยย่อยที่มีมวลโมเลกุลน้อยๆ เช่น Staphylococcin 1580 บางครั้งอาจพบแบคเทอริโอซินและสารคล้ายแบคเทอริโอซินที่มีขนาดเล็ก เช่น พวก lantibiotics (Klaenhammer, 1993) cerein (Naclerio และคณะ, 1993) เป็นต้น

3) การฆ่าแบคทีเรีย (Bactericidal action)

การออกฤทธิ์ในการฆ่าแบคทีเรียของแบคเทอริโอซินและสารคล้ายที่ได้จากแบคทีเรียแกรมบวก ทำงานได้คล้ายการทำงานทั้งสองแบบของแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแกรมลบคือ ทำให้เชื้อทดสอบเสียความสามารถในการผ่านเข้าออกของเซลล์ และการทำลายสารพันธุกรรมของเชื้อทดสอบ แต่โดยทั่วไปมักพบว่า ในแบคเทอริโอซินที่มีมวลโมเลกุลน้อยจะฆ่าเชื้อทดสอบโดยการทำให้เสียความสามารถในการผ่านเข้าออกของเซลล์ (Bhunia และคณะ, 1991; Bruno และ Montville, 1993; Chikindas และคณะ, 1993; Christensen และ Hutkins, 1992; Klaenhammer, 1993)

4) การจับกับเซลล์ในบริเวณจำเพาะ

การจับกับเซลล์ในบริเวณจำเพาะที่เยื่อหุ้มชั้นนอกเป็นขั้นแรกของปฏิสัมพันธ์ของแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแกรมลบกับเชื้อทดสอบ แต่แบคเทอริโอซินและสารคล้ายของแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิดจะแสดงความจำเพาะในการจับนี้น้อยมาก (Bhunia และคณะ, 1991; Yang, Johnson และ Ray, 1992)

5) พันธุกรรมการสร้างของแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแกรมบวก

มีรายงานว่าแบคเทอริโอซินหลายชนิด สร้างขึ้นจากรหัสพันธุกรรมที่อยู่บนพลาสมิด (Klaenhammer, 1993)

6) ระยะเวลาในการสังเคราะห์แบคเทอริโอซินและสารคล้ายในแบคทีเรียแกรมบวก

การสังเคราะห์แบคเทอริโอซินในแบคทีเรียแกรมบวกส่วนมากอยู่ในช่วงระยะการเจริญเต็มที่ (Klaenhammer, 1993)

## 2.8 สารต้านจุลชีพที่สร้างโดยแบคทีเรียในสกุลบาซิลลัส

บาซิลลัสเป็นแบคทีเรียอีกพวกหนึ่งที่สร้างสารต้านจุลชีพได้ สารต้านจุลชีพที่สร้างขึ้นส่วนใหญ่เป็นพวกโปรตีนและเปปไทด์ที่มีโครงสร้างต่างๆ กัน มีขนาดได้ทั้งเล็กและใหญ่ บางครั้งอาจเป็นสารประกอบของโปรตีนกับสารอื่น เช่น ไลโปโปรตีน ไกลโคโปรตีน ตัวอย่างสารต้านจุลชีพที่เป็นโปรตีนหรือเพปไทด์และสร้างโดยแบคทีเรียสกุลบาซิลลัสแสดงไว้ในตารางที่ 3

**ตารางที่ 3** : สารต้านจุลชีพที่เป็นเพปไทด์ซึ่งสร้างโดยบาซิลลัส (Zuber, Nakano และ Marahiel, 1993)

| สารต้านจุลชีพ | จุลินทรีย์ผู้สร้าง | โครงสร้าง | สมบัติ |
|---|---|---|---|
| Alboleutin | *B. subtilis* | | ต้านเชื้อรา |
| Bacillomycin | *B. subtilis* | Cyclic | ต้านเชื้อรา |
| Bacilysin | *B. subtilis* | Dipeptide | ต้านแบคทีเรียและรา |
| Bacitracin | *B. licheniformis* | Branched cyclic | ต้านแบคทีเรีย |
| Botrycidin AJ 1316 | *B. subtilis* | Polypeptide | ต้านเชื้อรา |
| Brevistin | *B. brevis* | Acylcyclic peptidolactone | ต้านแบคทีเรีย |
| Cerexins | *B. cereus* | Acylpeptide | ต้านแบคทีเรีย |
| Chlorotetain | *B. subtilis* | Dipeptide | ต้านเชื้อรา |
| Edeines | *B. brevis* Vm4 | Peptide | ต้านเชื้อรา |
| EM 49 | *B. circulans* | Cyclic acylated | ต้านแบคทีเรีย |
| Esperin | *B. mesentericus* | Lactone | ต้านไมโคแบคทีเรีย |
| Fengycin | *B. subtilis* F-29-3 | Modified acylpeptide | ต้านเชื้อรา |
| Gramicidin S | *B. brevis* | Cyclic | ต้านแบคทีเรียและลดแรงตึงผิว |
| Iturin | *B. subtilis* | Cyclic lipopeptide | ต้านเชื้อรา |
| Micrococcin | *B. pumilis* | Modified branched cyclic | ต้านแบคทีเรียและไมโคแบคทีเรีย |
| Mycosubtilin | *B. subtilis*<br>*B. subtilis* subsp. niger | Cyclic | ต้านเชื้อรา |
| Octapeptins | *B. circulans* ATCC 31805 | Branched cyclic acylpeptide | ต้านเชื้อรา แบคทีเรีย ไมโคแบคทีเรียและโปรโตซัว |
| Polymyxins | *B. polymyxa* | Branched cyclic acylpeptide | ต้านแบคทีเรีย |
| Polypeptins | *B. circulans* | Peptidolactone | ต้านแบคทีเรีย |
| Rhizocticins | *B. subtilis* | Dipeptide และ tripeptide | ต้านเชื้อรา |
| Subtilin | *B. subtilis* | Peptide | ต้านเชื้อรา |
| Surfactin | *B. subtilis* | Acylated cyclic | ต้านไมโคแบคทีเรีย |
| Tridecaptins | *B. polymyxa* | Acylated | ต้านแบคทีเรีย |
| Tyrocidine | *B. brevis* ATCC 8185 | Cyclic | ต้านแบคทีเรีย |

## 2.9 *Bacillus cereus* กับการก่อโรคในคน (Johnson, 1990)

### 2.9.1 ลักษณะทั่วไปของ *B. cereus*

*B. cereus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เซลล์เป็นรูปแท่งขนาดใหญ่ กว้าง 3 – 5 ไมครอน และยาว 1 - 1.2 ไมครอน มักปรากฏเรียงตัวเป็นสายมากกว่าอยู่เป็นเซลล์เดี่ยว เคลื่อนที่ด้วย peritrichous flagella เจริญได้ในภาวะมีอากาศ สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิตั้งแต่ 10 – 48 องศาเซลเซียส แต่ช่วงที่เหมาะสมคือ 28 – 35 องศาเซลเซียส เวลาในการแบ่งตัว (doubling time) เมื่ออยู่ในภาวะที่เหมาะสมเป็น 18 – 27 นาที บางสายพันธุ์เจริญได้ช้าๆ ในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ 7.5 % ช่วงพีเอชที่สามารถเจริญได้คือ 4.9 – 9.3 สร้างเอนโดสปอร์ได้ สปอร์นี้จะมีความทนทานมากกว่าเซลล์ต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสม เช่น ความร้อน ความแห้งแล้ง สารถนอมอาหาร (food preservatives) นอกจากนี้แบคทีเรียสกุลนี้สามารถสร้างสารที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตได้มากมาย เช่น เอนไซม์ที่ปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ (extracellular enzymes) หลายชนิด สารต้านจุลชีพ จึงเป็นประโยชน์ต่อการอาศัยอยู่ได้อย่างอิสระในแหล่งอาศัยที่กว้างขวาง

แบคทีเรียในสกุลบาซิลลัสแบ่งออกได้ 3 กลุ่มตามลักษณะของสปอร์และการบวมของสปอแรงเจียม โดย *B. cereus* จะถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 ซึ่งมีสปอร์เป็นรูปรี (ellipsoid) อยู่บริเวณกลาง (central) ถึงค่อนไปทางปลาย (subterminal) และไม่ทำให้สปอแรงเจีย (sporangia) ขยายออก ลักษณะดังกล่าวนี้จะใกล้เคียงกับ *B. megaterium* และ *B. anthracis*

การทดสอบทางชีวเคมีพบว่า *B. cereus* ให้ผลบวกในปฏิกิริยา Voges – Proskauer และปฏิกิริยา egg-yolk lecithinase มีความต้านทานต่อ 0.001% lysozyme ไม่สร้างกรดจาก mannitol ค่า mol %G+C ของ DNA ประมาณ 32 –38 (จาก 11 สายพันธุ์) และ 35.7 – 36.2 จาก type strain (ATCC 14579) DNA homologies ระหว่าง *B. anthracis*, *B. mycoides* และ *B. thuringiensis* เกินกว่า 80% แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับจุลชีพเหล่านี้

### 2.9.2 ประวัติของการก่อโรคในคน

*B. cereus* เป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร มีรายงานการศึกษาครั้งแรกในปี 1955 โดย Hauge ที่ Oslo ประเทศนอร์เวย์ ผู้ป่วยได้รับเชื้อนี้จากซอสวานิลลาที่เตรียมและเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง อาการที่เกิดขึ้นได้ คือ ท้องร่วง คลื่นไส้ และอาเจียน ต่อมามีอีกหลายรายงานที่เกี่ยวข้องกับโรคที่เกิดขึ้นโดยเชื้อนี้ ดังเช่น รายงานครั้งแรกเกี่ยวกับโรคท้องร่วงที่มีสาเหตุจากแบคทีเรียนี้ในปี 1969 การเกิดอาการคลื่นไส้และอาเจียนหลังจากได้รับอาหารปนเปื้อนเชื้อนี้ในประเทศอังกฤษในปี 1971 และเกิดขึ้นในประเทศต่างๆ อีกได้แก่แคนาดา อินเดีย ญี่ปุ่นและสิงคโปร์

### 2.9.3 แหล่งของเชื้อและอาการของโรค

เนื่องจาก *B. cereus* เป็นแบคทีเรียที่มีการสร้างสปอร์ได้ดังกล่าวข้างต้น จึงมีความทนทานและพบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม เช่น ในดิน นม ธัญพืช แป้ง เครื่องเทศ สมุนไพร อาหารแห้งพื้นผิวของเนื้อสัตว์ต่างๆ เมื่อพบในปริมาณมาก (มากกว่า $10^5$ CFU/g) ในอาหารอาจก่อโรคได้ อาการที่เกิดขึ้นเมื่อได้รับอาหารปนเปื้อนเชื้อในปริมาณมาก มีได้ 2 แบบ

1) แบบท้องร่วง (diarrheal type) ผู้ป่วยจะเกิดอาการท้องร่วงอย่างชัดเจน อาจมีการคลื่นไส้ ในบางครั้ง มีระยะพักตัว 4 – 16 ชั่วโมงและระยะแสดงอาการ 12 – 24 ชั่วโมง *B. cereus* ที่ทำให้เกิดอาการนี้พบในอาหารพวกผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ ซุป ซอสและผัก สารพิษที่ทำให้เกิดอาการนี้เป็นสารประกอบของโปรตีนสามชนิดที่มีมวลโมเลกุล 43,000 39,000 และ 38,000 สารนี้ไม่เสถียรที่พีเอชต่ำกว่า 4 และมากกว่า 11 ถูกทำลายได้ด้วยความร้อน 55 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที จะสร้างขึ้นในขณะที่เซลล์ *B. cereus* กำลังเจริญในระยะ log phase

2) แบบทำให้อาเจียน (emetic type) ผู้ป่วยจะเกิดการวิงเวียน คลื่นไส้ และ อาเจียนเป็นหลัก อาจมีการท้องเสียได้บ้างแต่ไม่มากนัก ระยะพักตัวของเชื้อ 1 – 5 ชั่วโมง ระยะแสดงอาการ 6 – 24 ชั่วโมง อาหารปนเปื้อนที่มักทำให้เกิดอาการนี้เช่น ธัญพืช ข้าวและพาสต้า สารพิษที่ทำให้เกิดอาการนี้เป็นโปรตีนขนาดเล็ก มีมวลโมเลกุลน้อยกว่า 10,000 เสถียรได้ในช่วงพีเอช 2 – 11 ทนความร้อนที่ 126 องศาเซลเซียส ได้ถึง 90 นาที สร้างขึ้นหลังจากเซลล์เจริญเต็มที่

### 2.9.4 การป้องกันโรค

เนื่องจากแบคทีเรียนี้พบได้ทั่วไปในอาหาร ดังนั้นหากมีปริมาณไม่มากในอาหารเพียงพอที่จะทำให้เกิดโรค ก็ไม่จำเป็นต้องกำจัด การป้องกันโรคจึงทำได้โดยการป้องกันการงอกและการเพิ่มจำนวนของเชื้อ อาหารที่เตรียมไว้จึงเก็บไว้โดยการแช่เย็นทันทีที่อุณหภูมิต่ำกว่า 7 องศาเซลเซียส หรืออุ่นไว้ตลอดเวลาที่อุณหภูมิสูงกว่า 55 – 60 องศาเซลเซียสและต้องทำให้ร้อนอีกครั้งก่อนรับประทาน

## 2.10 *Vibrio harveyi* กับการก่อโรคในกุ้งกุลาดำ

### 2.10.1 ลักษณะทั่วไปของ *Vibrio harveyi*

*V. harveyi* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อน เคลื่อนไหวได้ด้วยโพล่าร์ แฟลคเจลลา (polar flagella) หากเลี้ยงบนอาหารแข็งจะพบการสร้างแลทเทอรัล แฟลคเจลลา (lateral flagella) ได้ แบคทีเรียชนิดนี้ไม่สร้างเอนโดสปอร์ (endospores) ไมโครซีสต์ (microcysts) และเม็ดสี ดำรงชีวิตแบบ chemoorganotrophs ต้องการสารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน (carbon source) เจริญได้ภายใต้สภาวะกึ่งไร้อากาศ (facultative anaerobes) ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมแก่การเจริญอยู่ในช่วง 20 – 35 องศาเซลเซียส พีเอชที่เหมาะสมแก่การเจริญอยู่ในช่วง 7 – 9 ในธรรมชาติพบแบคทีเรียนี้อาศัยอยู่ในน้ำและเจริญได้ดีในน้ำที่มีความเค็ม 10 – 40 ส่วนในพันส่วน (ppt) *V. harveyi* สามารถสร้างเอนไซม์ได้หลายชนิด ได้แก่ amylase, gelatinase, lipase และ chitinase สร้าง alginase ได้ในบางสายพันธุ์ นอกจากนี้ยังพบว่าบางสายพันธุ์สร้างเอนไซม์ luciferase ซึ่งเกี่ยวกับปฏิกิริยาการเรืองแสงในที่มืด (Baumann และ Schubert, 1995)

### 2.10.2 การก่อโรคของ *V. harveyi* ในกุ้งกุลาดำ

*V. harveyi* เป็นหนึ่งในแบคทีเรียหลายชนิดที่พบได้ทั่วไปในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ เช่น บ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ บ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่มีสภาพดีจะพบแบคทีเรียชนิดนี้ไม่มากนักโดยประมาณไม่มากกว่า $10^2$ CFU/ml แต่เมื่อสภาพของบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำไม่ดี เช่น มีการสะสมสารอินทรีย์ในบ่อมาก มีปริมาณออกซิเจนน้อย ความเค็มสูงและอุณหภูมิของน้ำสูง สภาพดังกล่าวเหมาะสมแก่การเจริญได้ดีของแบคทีเรียนี้ ปริมาณเชื้อนี้ในน้ำเพิ่มขึ้นสูงอย่างรวดเร็วแล้วเข้าไปภายในตัวของกุ้งกุลาดำ โดยปกติกุ้งกุลาดำมีกลไกป้องกันตัวเองด้วยระบบภูมิคุ้มกันไม่จำเพาะ (non-specific immune response) ที่สามารถกำจัดแบคทีเรียนี้ไปได้ แต่หากมีปริมาณเชื้อเข้าสู่ตัวกุ้งมากเกินไปหรือกุ้งไม่แข็งแรง แบคทีเรียนี้ก็จะรอดพ้นจากระบบการป้องกันข้างต้น แล้วเข้าไปเพิ่มจำนวนในตับ (hepatopancreas) ของกุ้ง เกิดการอักเสบในตับกุ้ง เนื่องจากตับกุ้งเป็นอวัยวะที่สร้างน้ำย่อยสำหรับย่อยอาหารและเป็นอวัยวะที่สะสมอาหารที่ย่อยแล้ว ดังนั้นการที่ตับกุ้งอักเสบก็จะทำให้การย่อยอาหารไม่เป็นปกติ อาหารที่กุ้งสะสมไว้ในตับจะน้อยลง กุ้งจะเริ่มอ่อนแอและตายในที่สุด อัตราการตายจะมากหรือน้อยขึ้นกับความรุนแรงของโรค ในบางสายพันธุ์ของ *V. harveyi* ที่มีกระบวนการพิเศษสร้างสารเรืองแสงในที่มืดได้ เมื่อน้ำหรือตับกุ้งมีแบคทีเรียนี้มาก ก็จะเห็นการเรืองแสงในน้ำและเห็นกุ้งที่ว่ายน้ำอยู่มีแสงเรืองๆ ที่หัวกุ้งอันเป็นบริเวณของตับ จึงเรียกโรคนี้ว่า "โรคเรืองแสง" (บุญเสริม วิทยชำนาญกุล, 2540)

### 2.10.3 การป้องกันและรักษาโรค

การป้องกันโรคเรืองแสงทำได้โดยการปรับสภาพบ่อให้ดี เช่น การลดปริมาณอินทรีย์สารในบ่อ เพิ่มปริมาณออกซิเจนในบ่อ การกระตุ้นภูมิต้านทานของกุ้งกุลาดำ

## 2.11 การทำให้บริสุทธิ์บางส่วนของสารต้านจุลชีพ

กระบวนการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนของสารต้านจุลชีพทำได้โดยเลือกวิธีการทำให้บริสุทธิ์ที่เหมาะสมกับลักษณะทางชีวเคมีของสารต้านจุลชีพนั้น ในการศึกษาเบื้องต้น พบว่าสารต้านจุลชีพที่ได้จาก *Bacillus* sp. S11 เป็นสารประเภทโปรตีน กระบวนการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนของสารต้านจุลชีพนี้จึงใช้วิธีการทำให้บริสุทธิ์เช่นเดียวกับวิธีที่ใช้กับโปรตีน ขั้นตอนหลักเป็นดังนี้

1) การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต
2) โครมาโตกราฟีแบบเจลคัดแยกขนาด (Gel Permeation Chromatography)
3) โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน (Ion Exchange Chromatography)

### 2.11.1 การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (Harris, 1989)

การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต จัดเป็นหนึ่งในวิธีการตกตะกอนโปรตีนที่อาศัยหลักของการเพิ่มความแรงของไอออน (ion strength) หรือเรียกว่า "salting-out" การตกตะกอนเช่นนี้เป็นวิธีเบื้องต้นที่แพร่หลายอย่างหนึ่งในการคัดแยกโปรตีน โปรตีนที่ถูกตกตะกอนลงมามักจะไม่เสียสภาพและความสามารถในทำงานยังคงมีอยู่ได้หลังจากนำตะกอนไปละลายกลับ นอกจากนี้เกลือที่นำมาใช้ยังสามารถรักษาโปรตีนไว้ไม่ให้ถูกทำลายไปด้วยการทำงานของเอนไซม์ที่สลายโปรตีนหรือการปนเปื้อนของแบคทีเรีย วิธีการตกตะกอนโปรตีนนี้จึงเหมาะแก่การทำงานที่ต้องเก็บโปรตีนไว้ในระยะเวลาหนึ่ง การตกตะกอนโปรตีนตามหลักการ salting-out นี้จะขึ้นกับลักษณะไม่ชอบน้ำ (hydrophobic nature) ที่พื้นผิวของโปรตีน โดยทั่วไปแล้วจะพบส่วนที่ไม่ชอบน้ำได้มากบริเวณภายในโมเลกุลโปรตีน แต่ก็มีบางส่วนอยู่ที่พื้นผิวได้ ก่อนมีการเติมเกลือโมเลกุลน้ำจะถูกบังคับให้สัมผัสอยู่ที่บริเวณไม่ชอบน้ำ (hydrophobic patches) ต่อมาเมื่อเติมเกลือลงไปโมเลกุลของน้ำจะมาอยู่กับไอออนของเกลือทำให้บริเวณที่ไม่ชอบน้ำถูกเผยออก ทำให้โมเลกุลของโปรตีนแต่ละโมเลกุลเกิดปฏิสัมพันธ์กันได้ด้วยบริเวณดังกล่าวแล้วเกิดการรวมกลุ่มกันเป็นตะกอนโปรตีน ตะกอนนี้จะถูกแยกออกไปจากสารละลายได้ด้วยการเซนตริฟิวจ์ (centrifuge) ดังนั้นโมเลกุลโปรตีนที่มีบริเวณไม่ชอบน้ำขนาดใหญ่หรือมีหลายบริเวณจะเกิดการรวมกลุ่มได้ก่อนโมเลกุลโปรตีนที่มีบริเวณดังกล่าวมีขนาดเล็กหรือมีบริเวณไม่ชอบน้ำน้อยกว่า ส่วนที่ตกตะกอนได้ก่อนหรือหลังนี้นำไปใช้แยกลำดับส่วน (fractionation) ของโปรตีนได้ แต่ตะกอนโปรตีนที่ได้จะไม่บริสุทธิ์อาจมีโปรตีนอื่นปนออกมาบ้าง

เกลือที่ใช้ตกตะกอนโปรตีนมีหลายชนิด ประสิทธิภาพของเกลือในการตกตะกอนโปรตีนส่วนใหญ่ขึ้นกับลักษณะของแอนไอออน (anions) แอนไอออนที่มีหลายประจุ (multi-charged) จะมีประสิทธิภาพสูงสุด ประสิทธิภาพของเกลือเรียงตามลำดับจากมากไปน้อยได้ดังนี้ ฟอสเฟต ซัลเฟต อะซีเตต และคลอไรด์ ถึงแม้ว่าฟอสเฟตจะมีประสิทธิภาพมากกว่าซัลเฟต แต่ในทางปฏิบัติฟอสเฟตที่นำมาใช้มักจะอยู่ในรูป $HPO_4^{2-}$ และ $H_2PO_4^-$ ที่พีเอชที่เป็นกลางมากกว่าจะเป็นรูป $PO_4^{3-}$ ซึ่งเป็นรูปไอออนที่มีประสิทธิภาพสูงกว่า ดังนั้นซัลเฟตจึงเป็นที่นิยมใช้งานมากกว่า เมื่อพิจารณาถึงแคทไอออน (cations) แคทไอออนที่เป็นโมโนวาเลนต์ (monovalent) จะมีประสิทธิภาพสูงจากมากไปน้อยดังนี้ แอมโมเนียม โปแตสเซียม และโซเดียม นอกจากประสิทธิภาพแล้วการพิจารณาเลือกเกลือที่จะใช้ตกตะกอนต้องคำนึงถึงราคา ความบริสุทธิ์ของเกลือ และความสามารถในการละลายเพราะในสารละลายที่ทำการตกตะกอนต้องให้มีความเข้มข้นของเกลือสูงเพียงพอแก่การเกิดตะกอนของโปรตีนที่ต้องการ นอกจากนี้เมื่อเกลือเกิดการละลายไม่ควรเกิดความร้อนสูงเพราะอาจส่งผลกระทบต่อการเสียสภาพของโปรตีนได้

แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นเกลือที่ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในการตกตะกอนโปรตีนตามหลักการข้างต้น เนื่องด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตมีความสามารถในการตกตะกอนได้ดี ราคาถูก ความสามารถในการละลายดี (สามารถละลายในน้ำบริสุทธิ์ได้ถึงความเข้มข้น 4 โมลาร์) ในทางปฏิบัติจะกล่าวถึงความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น % saturation ( %sat ) การคำนวณจำนวนกรัม (g) ของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เติมลงในสารละลาย 1 ลิตรที่ 20 องศาเซลเซียส เป็นไปดังสมการ

$$g = \frac{533\,(S_2 - S_1)}{100 - 0.3\,S_2}$$

เมื่อ $S_1$ เป็นความเข้มข้น (% sat.) ของแอมโมเนียมซัลเฟต

$S_2$ เป็นความเข้มข้น (% sat.) สุดท้ายที่ต้องการ

เพื่อความสะดวกในการใช้งานจึงนิยมอ่านค่าจำนวนกรัมของแอมโมเนียมซัลเฟตดังแสดงในตารางที่ 4

**ตารางที่ 4 : จำนวนกรัม (g) ของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีน** (Harris, 1989)

| ความเข้มข้นเริ่มต้นของแอมโมเนียมซัลเฟต | ความเข้มข้นสุดท้ายของแอมโมเนียมซัลเฟต, % saturation ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 | 45 | 50 | 55 | 60 | 65 | 70 | 75 | 80 | 85 | 90 | 95 | 100 |
| | จำนวนกรัมในรูปของแข็งของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เติมลงในสารละลาย 100 มิลลิลิตร | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0 | 10.7 | 13.6 | 16.6 | 19.7 | 22.9 | 26.2 | 29.5 | 33.1 | 36.6 | 40.4 | 44.2 | 48.3 | 52.3 | 56.7 | 61.1 | 65.9 | 70.7 |
| 5 | 8.0 | 10.9 | 13.9 | 16.8 | 20.0 | 23.2 | 26.6 | 30.0 | 33.6 | 37.3 | 41.1 | 45.0 | 49.1 | 53.3 | 57.8 | 62.4 | 67.1 |
| 10 | 5.4 | 8.2 | 11.1 | 14.1 | 17.1 | 20.3 | 23.6 | 27.0 | 30.5 | 34.2 | 37.9 | 41.8 | 45.8 | 50.0 | 54.5 | 58.9 | 63.6 |
| 15 | 2.6 | 5.5 | 8.3 | 11.3 | 14.3 | 17.4 | 20.7 | 24.0 | 27.5 | 31.0 | 34.8 | 38.6 | 42.6 | 46.6 | 51.0 | 55.5 | 60.0 |
| 20 | 0 | 2.7 | 5.6 | 8.4 | 11.5 | 14.5 | 17.7 | 21.0 | 24.4 | 28.0 | 31.6 | 35.4 | 39.2 | 43.3 | 47.6 | 51.9 | 56.5 |
| 25 | | 0 | 2.7 | 5.7 | 8.5 | 11.7 | 14.8 | 18.2 | 21.4 | 24.8 | 28.4 | 32.1 | 36.0 | 40.1 | 44.2 | 48.5 | 52.9 |
| 30 | | | 0 | 2.8 | 5.7 | 8.7 | 11.9 | 15.0 | 18.4 | 21.7 | 25.3 | 28.9 | 32.8 | 36.7 | 40.8 | 45.1 | 49.5 |
| 35 | | | | 0 | 2.8 | 5.8 | 8.8 | 12.0 | 15.3 | 18.7 | 22.1 | 25.8 | 29.5 | 33.4 | 37.4 | 41.6 | 45.9 |
| 40 | | | | | 0 | 2.9 | 5.9 | 9.0 | 12.2 | 15.5 | 19.0 | 22.5 | 26.2 | 30.0 | 34.0 | 38.1 | 42.4 |
| 45 | | | | | | 0 | 2.9 | 6.0 | 9.1 | 12.5 | 15.8 | 19.3 | 22.9 | 26.7 | 30.6 | 34.7 | 38.8 |
| 50 | | | | | | | 0 | 3.0 | 6.1 | 9.3 | 12.7 | 16.1 | 19.7 | 23.3 | 27.2 | 31.2 | 35.3 |
| 55 | | | | | | | | 0 | 3.0 | 6.2 | 9.4 | 12.9 | 16.3 | 20.0 | 23.8 | 27.7 | 31.7 |
| 60 | | | | | | | | | 0 | 3.1 | 6.3 | 9.6 | 13.1 | 16.6 | 20.4 | 24.2 | 28.3 |
| 65 | | | | | | | | | | 0 | 3.1 | 6.4 | 9.8 | 13.4 | 17.0 | 20.8 | 24.7 |
| 70 | | | | | | | | | | | 0 | 3.2 | 6.6 | 10.0 | 13.6 | 17.3 | 21.2 |
| 75 | | | | | | | | | | | | 0 | 3.2 | 6.7 | 10.2 | 13.9 | 17.6 |
| 80 | | | | | | | | | | | | | 0 | 3.3 | 6.8 | 10.4 | 14.1 |
| 85 | | | | | | | | | | | | | | 0 | 3.4 | 6.9 | 10.6 |
| 90 | | | | | | | | | | | | | | | 0 | 3.4 | 7.1 |
| 95 | | | | | | | | | | | | | | | | 0 | 3.5 |
| 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | 0 |

### 2.11.2 โครมาโทกราฟีแบบเจลคัดแยกขนาด (Gel Permeation Chromatography) (Preneta, 1989)

โครมาโทกราฟีแบบเจลคัดแยกขนาด (Gel Permeation Chromatography) เป็นโครมาโทกราฟีที่แยกสารออกได้ด้วยความแตกต่างของขนาด โครมาโทกราฟีนี้มีชื่อเรียกได้หลายชื่อ ได้แก่ gel filtration, gel exclusion chromatography, molecular sieve chromatography หรือ gel chromatography

หลักการเบื้องต้นของโครมาโทกราฟีนี้คือ โมเลกุลของสารจะถูกแบ่งเข้าไป (partition) ในระหว่างส่วนของตัวทำละลายและส่วนที่ไม่เคลื่อนที่ (stationary phase) ซึ่งมีรูพรุนขนาดแน่นอน (uniform pore size) กระบวนการแยกทำได้โดยใช้สารตัวกลางซึ่งเป็นเจล (gel matrix) ที่มีรูพรุน มักมีรูปร่างเป็นเม็ดกลมเล็กๆ (bead) บรรจุลงในคอลัมน์ที่มีตัวทำละลายอยู่ด้วย สารผสมตัวอย่างที่ต้องการแยกจะประกอบด้วยโมเลกุลขนาดต่างๆ กันทั้งที่เล็กกว่า ใหญ่กว่า และขนาดเท่ากับขนาดของรูของสารตัวกลาง โดยปกติสารที่โมเลกุลเล็กกว่ารูพรุนของสารตัวกลางจะเข้าไปภายในสารตัวกลางได้จึงเคลื่อนที่ได้ช้าในคอลัมน์ แล้วออกจากคอลัมน์เป็นลำดับท้ายๆ โมเลกุลขนาดกลางที่พอดีกับรูพรุนสามารถเข้าไปในรูของสารตัวกลางได้เช่นกันแต่ใช้เวลาน้อยกว่าในการเคลื่อนที่จึงออกจากคอลัมน์ในลำดับต่อมา ในขณะที่สารที่มีขนาดใหญ่ไม่สามารถเข้าไปอยู่ในสารตัวกลาง จะอยู่ในส่วนของตัวทำละลายรอบๆ สารตัวกลาง เคลื่อนที่ได้เร็วกว่าจึงออกจากคอลัมน์ในลำดับแรกๆ ดังนั้นโมเลกุลต่างๆ จะถูกชะออกจากคอลัมน์ตามลำดับก่อนหลังจากขนาดโมเลกุลใหญ่ไปหาเล็ก รูปร่างของโมเลกุลก็มีผลต่อการแยกเช่นเดียวกับขนาดของโมเลกุล โมเลกุลที่มีรูปร่างยาวเป็นเส้นจะถูกชะออกมาได้ก่อนโมเลกุลรูปร่างเป็นก้อนกลม (globular) โครมาโทกราฟีนี้จึงใช้ศึกษาขนาดโมเลกุลหรือมวลโมเลกุล และรูปร่างโมเลกุลรวมไปถึงใช้ติดตามการเสียสภาพของโมเลกุลโปรตีนที่ทำให้รูปร่างโมเลกุลเปลี่ยนแปลงไป นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในการกำจัดเกลือออกจากโปรตีนที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือได้ด้วย

การศึกษาขนาดโมเลกุลด้วยโครมาโทกราฟีแบบคัดแยกขนาด ทำได้โดยการสร้างกราฟระหว่างมวลโมเลกุลของสารมาตรฐาน (สเกล log) กับค่า $K_{av}$ ของสารนั้น (สเกลปกติ) ค่า $K_{av}$ ของแต่ละโมเลกุลหาได้จากสมการดังนี้

$$K_{av} = \frac{(V_e - V_o)}{(V_t - V_o)}$$

เมื่อ $V_e$ คือปริมาตรตัวทำละลายที่ชะสารที่มีมวลโมเลกุลนั้นออกมา จากคอลัมน์ (elution volume)

$V_o$ คือปริมาตรตัวทำละลายที่ชะโมเลกุลขนาดใหญ่กว่ารูพรุนของสารตัวกลางออกมา (exclusion volume)

$V_t$ คือปริมาตรตัวทำละลายรวมทั้งที่อยู่ภายในและภายนอกสารตัวกลาง (Total bed volume)

ในการศึกษาเมื่อสร้างกราฟมาตรฐานข้างต้นได้แล้ว ทำการผ่านสารที่ต้องการทราบขนาดโมเลกุลลงในคอลัมน์เดิม บันทึกค่า $V_e$ ของสารนั้น คำนวณหาค่า $K_{av}$ จากสมการข้างบน แล้วเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน ทำให้ทราบมวลโมเลกุลของสารนั้นได้

สารตัวกลางที่นำมาใช้ในโครมาโตกราฟีแบบคัดแยกมีให้เลือกได้มากมาย การจะเลือกใช้สารตัวกลางชนิดใด ควรพิจารณาเบื้องต้นดังนี้

1) ช่วงพิสัยของการแยกลำดับส่วน (fractionation range)

เลือกใช้สารตัวกลางที่ให้ช่วงพิสัยของการแยกที่เหมาะสมกับขนาดของสารที่ต้องการแยก โดยสารที่ต้องการแยกต้องไม่ถูกชะออกมาใน exclusion volume และ total bed volume

2) ความสามารถในการแยก (resolution)

เม็ดเจลที่มีขนาดเล็กกว่า เช่น fine และ superfine grades มักจะให้ความสามารถในการแยกที่ดีกว่า แต่มักจะให้อัตราการไหลไม่ดีนัก

3) ความเสถียร (stablility)

สารตัวกลางต่างๆ มีความเสถียรต่างกันต่อ พีเอช อุณหภูมิและตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น สารตัวกลางที่เป็นอะกาโรส (agarose) จะไม่ทนต่อยูเรียและตัวทำละลายอินทรีย์เป็นต้น ดังนั้นสารตัวกลางที่นำมาใช้ต้องมีความเสถียรได้ในสภาวะที่ใช้ในการแยกจึงจะให้ความสามารถในการแยกสารได้เต็มที่

### 2.11.3 โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (Ion Exchange Chromatography) (Roe, 1989)

โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุถูกใช้อย่างแพร่หลายในการทำให้บริสุทธิ์ของโปรตีน เนื่องด้วยคุณสมบัติเหมาะสมหลายประการ เช่น ความง่ายต่อการขยายขนาด (scale-up) และค่าใช้จ่ายไม่สูงนักเมื่อเทียบกับวิธีอื่นๆ

โปรตีนสามารถมีได้ทั้งประจุบวกและประจุลบบนพื้นผิวของโมเลกุลเพราะโมเลกุลมี side chains ที่กรดอะมิโนอาจอยู่ในรูปกรดและรูปเบส ประจุบวกมักเกิดจาก histidine, lysine, arginine และส่วนที่เป็น N-terminal amines ประจุลบเกิดจาก aspartic และ glutamic acids, C-terminal carboxyl groups และบริเวณ cysteine residues ประจุสุทธิของโมเลกุลโปรตีนขึ้นกับจำนวนประจุบวกและประจุลบเหล่านั้น ประจุสุทธิเปลี่ยนแปลงได้ด้วยพีเอช พีเอชที่ทำให้ประจุสุทธิของโปรตีนเป็นศูนย์ จะเรียกว่า "isoelectric point" (pI) เมื่อโปรตีนอยู่ในพีเอชที่สูงกว่า pI โปรตีนจะมีประจุสุทธิเป็นลบ แต่ถ้าอยู่ในพีเอชที่ต่ำกว่า pI ประจุสุทธิของโปรตีนจะเป็นบวก

โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุจะแยกโปรตีนด้วยความแตกต่างของประจุสุทธิของโปรตีน โมเลกุลโปรตีนจะถูกดูดซับไว้บนผิวของสารตัวกลางที่มีประจุตรงข้ามกัน แต่โปรตีนที่มีประจุสุทธิเดียวกับสารตัวกลางหรือประจุสุทธิเป็นศูนย์จะถูกปล่อยออกมาจากคอลัมน์หลังจากล้างด้วยบัฟเฟอร์พีเอชเหมาะสม เมื่อจะนำโปรตีนที่ถูกดูดซับไว้ออกจากคอลัมน์จะทำโดยการแทนที่โมเลกุลโปรตีนด้วยไอออนที่มีความแข็งแรงในการจับกับสารตัวกลางมากกว่าโปรตีนนั้น โปรตีนที่จับกับสารตัวกลางได้ไม่แข็งแรงมากนักจะหลุดออกมาจากคอลัมน์เมื่อชะด้วยความเข้มข้นของไอออนต่ำ และโปรตีนที่จับกับสารตัวกลางได้แข็งแรงจะชะออกจากคอลัมน์ได้เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไอออนให้สูงขึ้น

สิ่งที่ควรพิจารณาในการทำให้บริสุทธิ์ด้วยการแลกเปลี่ยนประจุ

1) การเลือกสารตัวกลาง (matrix)

เลือกตามความเหมาะสมของชนิดตัวกลาง ขนาดของสารตัวกลาง ช่วงพีเอชในการทำงาน อัตราการไหล

2) การเลือกหมู่ฟังก์ชั่น (functional groups)

หมู่ฟังก์ชั่นที่อยู่บนผิวของสารตัวกลาง ทำให้เกิดความแรงในการจับและแลกเปลี่ยนประจุมากน้อยต่างกันตามชนิดของหมู่ฟังก์ชั่น เช่น Diethylaminoethyl (DEAE-) ใช้ในการแลกเปลี่ยนประจุลบ (anion exchange) อย่างอ่อน หมู่ฟังก์ชั่นที่เลือกใช้ต้องสอดคล้องตามประจุสุทธิของโปรตีนที่ต้องการแยก

3) บัฟเฟอร์

ประจุสุทธิของโปรตีนเกิดขึ้นได้เพราะพีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์ ถ้าโปรตีนอยู่ในสารละลายที่มีพีเอชสูงกว่าค่า pI ประจุสุทธิจะเป็นลบ แต่ถ้าพีเอชต่ำกว่า pI ประจุสุทธิของโปรตีนจะเป็นบวก บัฟเฟอร์ต้องให้ค่าพีเอชที่ทำให้โปรตีนที่ต้องการแยกเสถียร และไม่เกิดการรบกวนการแลกเปลี่ยนประจุ

### 2.11.4 การทำให้บริสุทธิ์ของสารต้านจุลชีพอื่นๆ

การทำให้บริสุทธิ์ของสารต้านจุลชีพส่วนใหญ่ใช้หลักการเดียวกับการทำให้บริสุทธิ์ของโปรตีน กระบวนการทำให้บริสุทธิ์ประกอบด้วยวิธีการที่แตกต่างกันหลายแบบ ขั้นตอนแรกมักเริ่มต้นด้วยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วงที่เหมาะสม ขั้นต่อมาเป็นโครมาโทกราฟีแบบต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 5

**ตารางที่ 5** : ตัวอย่างการทำให้บริสุทธิ์ของสารต้านจุลชีพ

| ชื่อสาร | จุลินทรีย์ที่ผลิต | ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ | ผลที่ได้ | ผู้วิจัย |
|---|---|---|---|---|
| Acidocin A | *Lactobacillus acidophilus* TK920 | 1.ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต<br>2.โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ<br>3. รีเวิร์สเฟสโครมาโทกราฟี | แอคติวิตีจำเพาะเพิ่มขึ้น 3000 เท่า<br>%recovery = 10% | Kanatani และคณะ (1995) |
| Plantaricin C | *L. plantarum* | 1.ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต<br>2.C8 hydrophobic column<br>3.FPLC MonoS cation-exchange column | แอคติวิตีจำเพาะเพิ่มขึ้น 3630 เท่า<br>%recovery = 48% | Gonzalez และคณะ (1994) |
| Curvaticin FS47 | *L. curvatus* FS47 | 1.ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต<br>2. solid-phase extraction on C18 Sep-Pak cartridges<br>3. รีเวิร์สเฟสโครมาโทกราฟี | แอคติวิตีจำเพาะเพิ่มขึ้น 25 เท่า<br>%recovery = 0.0034% | Garver และ Muriama (1994) |

ตารางที่ 5 (ต่อ)

| ชื่อสาร | จุลินทรีย์ที่ผลิต | ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ | ผลที่ได้ | ผู้วิจัย |
|---|---|---|---|---|
| Leucocin A-UAL 187 | *Leuconostoc gelidum* A-UAL 187 | 1.ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต<br>2.ตกตะกอนด้วยการปรับพีเอชเป็น 2.5<br>3.hydrophobic interaction โดย Amberlit XAD-2<br>4. Sephadex G-25<br>5.reverse phase HPLC | แอคติวิตีจำเพาะเพิ่มขึ้น 4500 เท่า<br>%recovery = 58% | Hastings และคณะ (1991) |
| Mesentericin Y 105 | *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* | 1.affinity chromatography<br>2. ultrafiltration<br>3.reverse-phase HPLC | แอคติวิตีจำเพาะเพิ่มขึ้น 419.2 เท่า<br>%recovery = 0.7% | Hechard และคณะ (1992) |