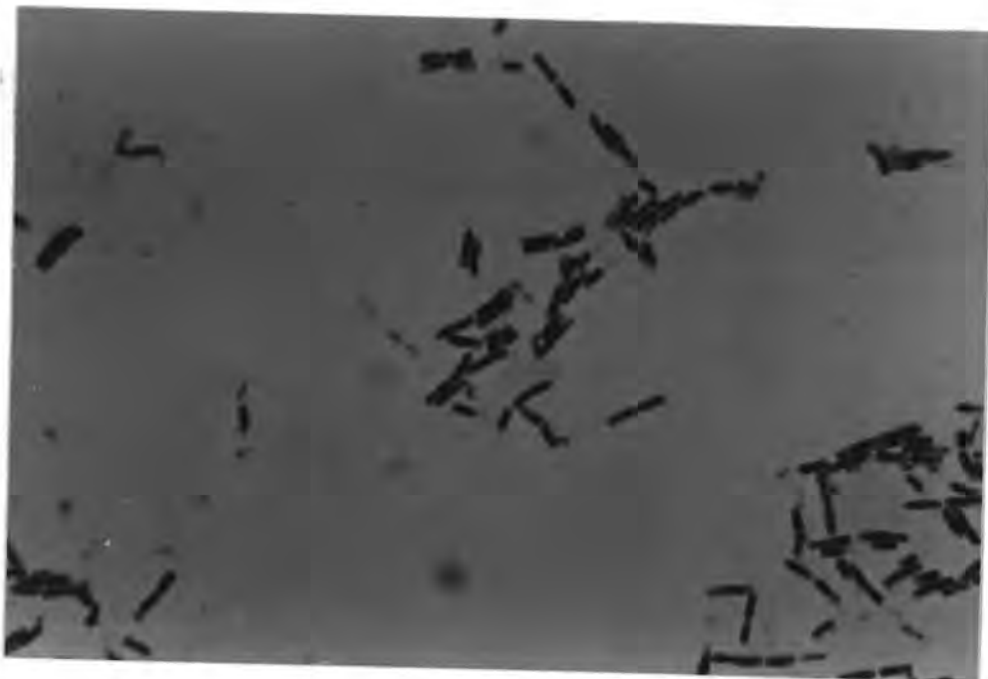


บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. การจำแนกเชื้อ (อนุกรมวิธาน)

สายพันธุ์ SR-1 ที่แยกได้ มีลักษณะโคโลนีบนอาหาร NA เป็นสีขาวนวล นูน ขอบหยัก ขนาด 13-15 มม. นำเชลมาย้อมสีแกรม และย้อมสีเอนโดสปอร์ พบว่าสายพันธุ์ SR-1 ติดสีแกรมบวก (Gram positive) รูปร่างเป็นแท่ง (Rod shape) ขนาดประมาณ 1.5×4.5 ไมครอน มีทั้งที่อยู่เป็นคู่และเป็นสาย ส่วนใหญ่สร้างเอนโดสปอร์กลางเชล (Central endospore) ได้แสดงรูปถ่ายของสายพันธุ์ SR-1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ไว้ดังรูปที่ 9 และเมื่อได้ทำการทดสอบทางชีวเคมี เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในอาหารชนิดต่าง ๆ และปฏิกิริยากับรีเอเจนต์ทดสอบ ได้แสดงผลไว้ในตารางที่ 4



รูปที่ 9 ภาพแสดงลักษณะเชลและการติดสีแกรมของสายพันธุ์ SR-1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 1000 เท่า)

ตารางที่ 4 ผลการตรวจสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีและรีเอเจนต์ทดสอบชนิดต่างๆ ของสายพันธุ์ SR-1

การทดสอบทางชีวเคมี	ผลการทดสอบ
Catalase	+
VP-reaction	+
Growth in anaerobic condition	+
Growth in NB pH 6.8	+
Growth in NB pH 5.7	+
Growth in NaCl-2%	+
-5%	+
-7.5%	+
-10%	-
Hydrolysis starch	+
Hydrolysis gelatin	+
Assimilation-Glucose	+
-Xylose	+
-Arabinose	+
-Manitol	-
Indole production	-
Degradation of tyrosine	-
Degradation of phenylalanine	-

หมายเหตุ + = ให้ปฏิกิริยา - = ไม่ให้ปฏิกิริยา

ผลที่แสดงดังตารางที่ 4 ใช้เทียบกับปฏิกิริยามาตรฐานตาม Burgey 's Manual (Cowan et al., 1970) ประกอบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา สายพันธุ์นี้จัดอยู่ในสกุล *Bacillus* และจำแนกได้ใกล้เคียงกับ *Bacillus licheniformis* ซึ่งจะเรียกสายพันธุ์นี้ว่า SR-1 ตลอดการทดลอง

3. การทดสอบกิจกรรมของสารปฏิชีวนะ

จากการทดสอบความสามารถของสายพันธุ์ SR-1 ต่อการยับยั้งการเจริญเชื้อชนิดต่างๆ ตามวิธีการทดลองข้อ 3. 2. 1 (Point inoculation) พบว่าสายพันธุ์ SR-1 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ทั้งแบคทีเรีย รา และยีสต์ ดังได้แสดงผลไว้ที่ตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงผลการยับยั้งของสายพันธุ์ SR-1 ต่อเชื้อทดสอบแบคทีเรีย รา และยีสต์ โดยวิธี Point inoculation

เชื้อทดสอบ	แกรม	ผลการยับยั้ง	Ø บริเวณยับยั้ง (มม.)
แบคทีเรีย			
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778 *	+	+	30.0
<i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581	+	+	28.0
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	+	+	26.5
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 *	-	+	32.0
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047 *	-	+	23.5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> IFO 3317 *	-	-	-
<i>Micrococcus luteus</i> TISTR 745	+	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 *	+	+	26.0
<i>Streptococcus faecium</i> IFO 3128	-	-	-
<i>Salmonella typhi</i> ATCC 19430 *	-	+	23.5
<i>Shigella dysenteriae</i> ATCC 11835 *	-	-	-
<i>Serratia mercenscens</i> ATCC 29632	+	+	22.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853 *	-	-	-
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 8427 *	-	+	23.5

หมายเหตุ * = เชื้อก่อโรค

ตารางที่ 5 (ต่อ)

ชื่อทดสอบ	ผลการยับยั้ง	Ø บริเวณยับยั้ง (มม.)
รา		
<i>Alternaria</i> sp.	-	-
<i>Aspergillus niger</i> °	+	18.0
<i>Cladosporium</i> sp.	-	-
<i>Curvularia</i> sp.	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i> **	-	-
<i>Fusarium solani</i> **	-	-
<i>Gliocladium</i> sp. °	+	22.0
<i>Penicillium</i> sp.	-	-
<i>Paecilomyces variotii</i> °	+	20.5
<i>Trichoderma</i> sp.	-	-
ยีสต์		
<i>Bullera crocea</i>	-	-
<i>Candida albicans</i> *	+	22.5
<i>Candida tropicalis</i> *	+	22.0
<i>Hansenula anomala</i>	-	-
<i>Rhodotorula</i> sp.	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-
<i>Schizosaccharomyces octosporus</i>	-	-
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	-	-
<i>Sporobolomyces</i> sp.	+	24.0
<i>Torulopsis glabrata</i>	-	-

หมายเหตุ * = เชื้อก่อโรค
** = เชื้อก่อโรคในพืช

° = เชื้อราที่ขึ้นและเจริญบนหนังสือสัตว์

สายพันธุ์ SR-1 สามารถยับยั้งการเจริญแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ได้แก่ *Bacillus cereus* ATCC 11778 *Bacillus megaterium* ATCC 14581 *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Escherichia coli* ATCC 25922 *Enterobacter cloacae* ATCC 13047 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *Salmonella typhi* ATCC 19430 และ *Proteus vulgaris* ATCC 8427

ในกลุ่มราและยีสต์ที่นำมาเป็นเชื้อทดสอบ สายพันธุ์ SR-1 สามารถยับยั้งการเจริญของรา *Aspergillus niger* *Gliocladium* sp. *Paecilomyces variotii* และยีสต์ *Candida albicans* *Candida tropicalis* *Sporobolomyces* sp. ได้แสดงรูปการยับยั้งการเจริญของสายพันธุ์ SR-1 ต่อเชื้อทดสอบบางชนิดโดยการทำ Point inoculation ไว้ในรูปที่ 10-12



รูปที่ 10 แสดงการยับยั้งการเจริญของสายพันธุ์ SR-1 ต่อเชื้อทดสอบ *Bacillus megaterium* ATCC 14581 โดยการทำ Point inoculation บ่มที่ 37° ซ. เป็นเวลา 24 ชม.



รูปที่ 11 แสดงการยับยั้งการเจริญของสายพันธุ์ SR-1 ต่อเชื้อทดสอบ *Paecilomyces variotii* โดยการทำให้ Point inoculation บ่มที่ 30^oซ. เป็นเวลา 24 ชม.

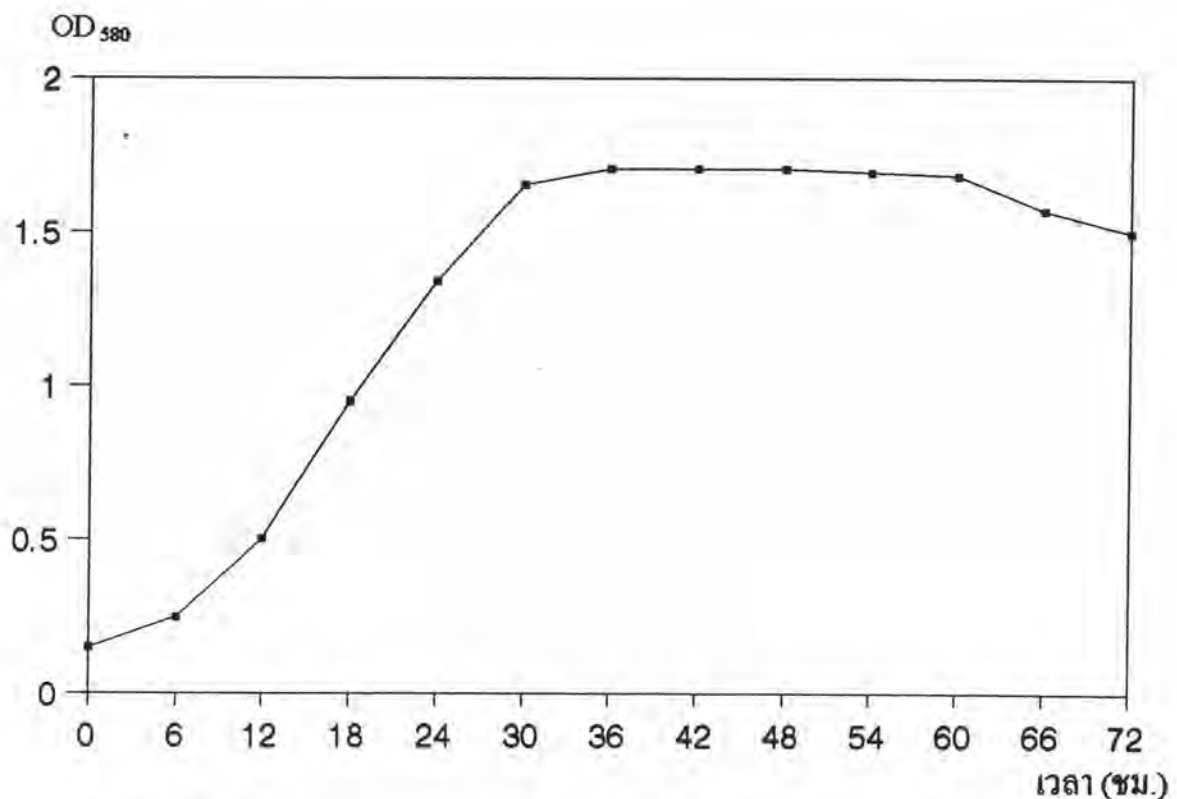


รูปที่ 12 แสดงการยับยั้งการเจริญของสายพันธุ์ SR-1 ต่อเชื้อทดสอบ *Candida albicans* โดยการทำให้ Point inoculation บ่มที่ 30^oซ. เป็นเวลา 24 ชม.

4. การศึกษารูปแบบการเจริญของ SR-1

จากการเลี้ยงสายพันธุ์ SR-1 ในอาหาร NB ที่มีพีเอชเริ่มต้น 7.0 ที่อุณหภูมิ $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$. บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ได้ตรวจรูปแบบการเจริญโดยดูจากค่าความขุ่น (Optical density) ที่ความยาวคลื่น 580 นาโนเมตรของเชื้อทุกๆ 6 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ได้รูปแบบการเจริญแสดงดังกราฟรูปที่ 13 จากกราฟสายพันธุ์ SR-1 มีระยะพักตัว (Lag phase) ชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ ระยะการเพิ่มจำนวน (Log phase) ที่ชั่วโมง 6-30 ระยะคงตัว (Stationary phase) ที่ชั่วโมง 30-60 หลังจากชั่วโมงที่ 60 ไปแล้วเป็นระยะการลดจำนวนเซลล์ (Decline phase)

รูปแบบการเจริญที่ได้ นำสายพันธุ์ SR-1 ที่เลี้ยงในภาวะดังกล่าวมาข้างต้นที่มีอายุในช่วง 16-18 ชั่วโมง ซึ่งอยู่ในช่วงกึ่งกลางการเจริญแบบเพิ่มจำนวน (Mid log phase) วัดค่าความขุ่นได้ประมาณ 0.8-0.9 โดยใช้ปริมาณหัวเชื้อ 4% (ปริมาตร/ ปริมาตร) เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป



รูปที่ 13 กราฟแสดงรูปแบบการเจริญของสายพันธุ์ SR-1 จากการเลี้ยงในอาหาร NB เป็นเวลา 72 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$. บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที

5. การปรับปรุงสูตรอาหารและภาวะในการเลี้ยงเชื้อ

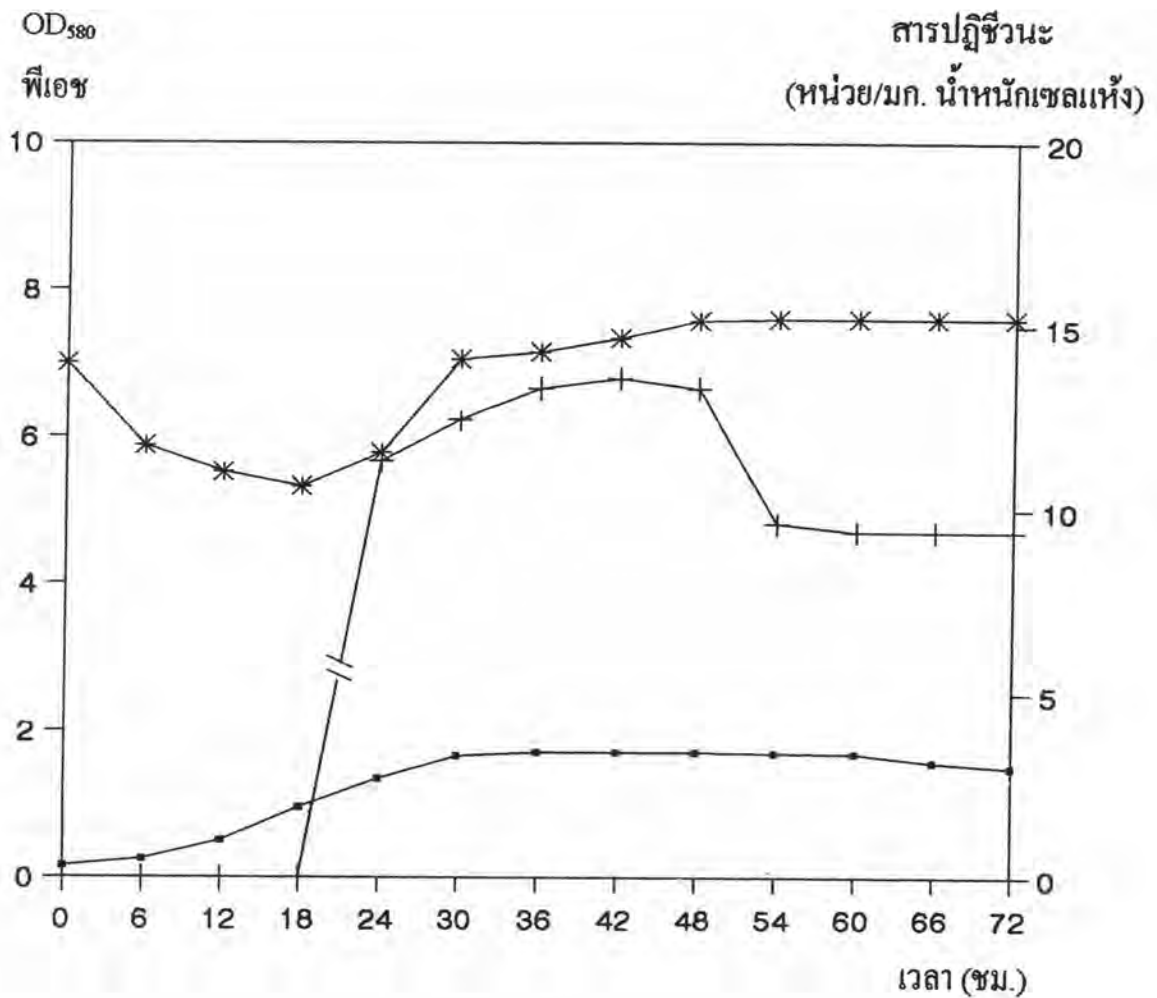
5.1 ปรับปรุงสูตรอาหาร

5.1.1 แหล่งคาร์บอน

ก่อนทำการปรับปรุงสูตรอาหารโดยการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอน ได้ศึกษารูปแบบการเปลี่ยนแปลงการเจริญ การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในอาหาร และ ปริมาณการสร้างสารปฏิชีวนะ จากการเลี้ยงสายพันธุ์ SR-1 ในอาหารชุดควบคุม (NB) ซึ่ง ไม่ได้เติมแหล่งคาร์บอน ได้รูปแบบการเปลี่ยนแปลงดังแสดงในกราฟรูปที่ 14 พบว่าสายพันธุ์ SR-1 มีระยะพักตัวชั่วโมงที่ 0-6 ของการเลี้ยงเชื้อ ระยะการเพิ่มจำนวนชั่วโมงที่ 6-30 ระยะคงตัวชั่วโมงที่ 30-60 หลังจากชั่วโมงที่ 60 เป็นระยะการลดจำนวนเซลล์

การเปลี่ยนแปลงของพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีค่าของพีเอชเริ่มต้น เท่ากับ 7.0 จะมีค่าลดต่ำลงเรื่อยๆ จนมีค่าต่ำสุดเท่ากับ 5.32 ในชั่วโมงที่ 18 ของการเลี้ยงเชื้อ หลังจากชั่วโมงที่ 18 พีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อจะเพิ่มขึ้นอีกครั้ง ค่าพีเอชที่เพิ่มขึ้นก่อนข้างคงที่โดยมีค่าประมาณ 7.5 ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 42 เป็นต้นไป

สำหรับการสร้างสารปฏิชีวนะในอาหารชนิดนี้ ตรวจพบตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 และได้ค่าสูงสุดของสารปฏิชีวนะในชั่วโมงที่ 42 ของการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 13.59 หน่วย/มก. น้ำหนักเซลล์แห้ง

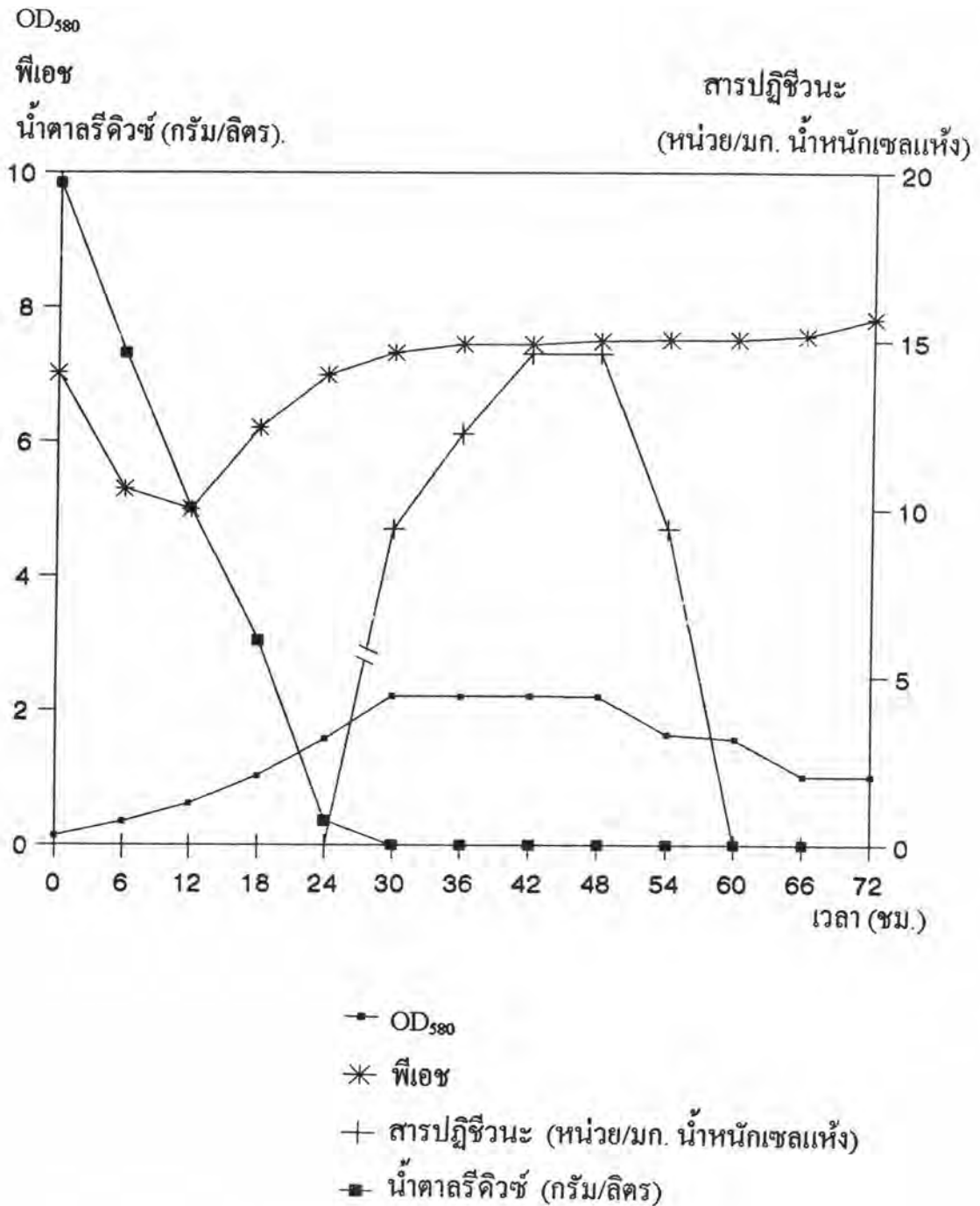


- OD₅₈₀
- *-*-* pH
- +--+ สารปฏิชีวนะ (หน่วย/มก. น้ำหนักเซลล์แห้ง)

รูปที่ 14 รูปแบบแสดงความสัมพันธ์การเจริญของสายพันธุ์ SR-1 การเปลี่ยนแปลงค่า pH และปริมาณการสร้างสารปฏิชีวนะ ในอาหารชุดควบคุม(NB) ซึ่งไม่เติมแหล่งคาร์บอน เลี้ยงที่อุณหภูมิ $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$. บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที

ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (NG) ได้รูปแบบการเจริญ การเปลี่ยนแปลงของพีเอช การสร้างสารปฏิชีวนะ และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ดังแสดงในกราฟรูปที่ 15 การเจริญของสายพันธุ์ SR-1 ในอาหารชนิดนี้ มีระยะพักตัวชั่วโมงที่ 0-6 ระยะการเพิ่มจำนวนชั่วโมงที่ 6-30 ระยะคงตัวชั่วโมงที่ 30-48 หลังจากชั่วโมงที่ 48 ไปแล้วเป็นระยะการลดจำนวนเซลล์ การเปลี่ยนแปลงของพีเอชในอาหารเริ่มต้นจากพีเอช 7.0 แล้วมีค่าลดลงและมีค่าต่ำสุดในชั่วโมงที่ 12 หลังจากนั้นพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้นอีกครั้ง ค่าพีเอชที่เพิ่มขึ้นก่อนข้างคงที่โดยมีค่าประมาณ 7.5 ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 36 เป็นต้นไป

การสร้างสารปฏิชีวนะในอาหารชนิดนี้ จะเริ่มตรวจพบสารปฏิชีวนะตั้งแต่ชั่วโมงที่ 30 ของการเลี้ยงเชื้อ และมีค่าสูงสุดระหว่างชั่วโมงที่ 42-48 ซึ่งได้ค่าของสารปฏิชีวนะเท่ากับ 14.618 หน่วย/มก. น้ำหนักเซลล์แห้ง สำหรับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟพบว่าน้ำตาลรีดิวซ์ค่อยๆ ลดลง จนถึงชั่วโมงที่ 30 ของการเลี้ยงเชื้อ หลังจากชั่วโมงที่ 30 เป็นต้นไปไม่พบน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ



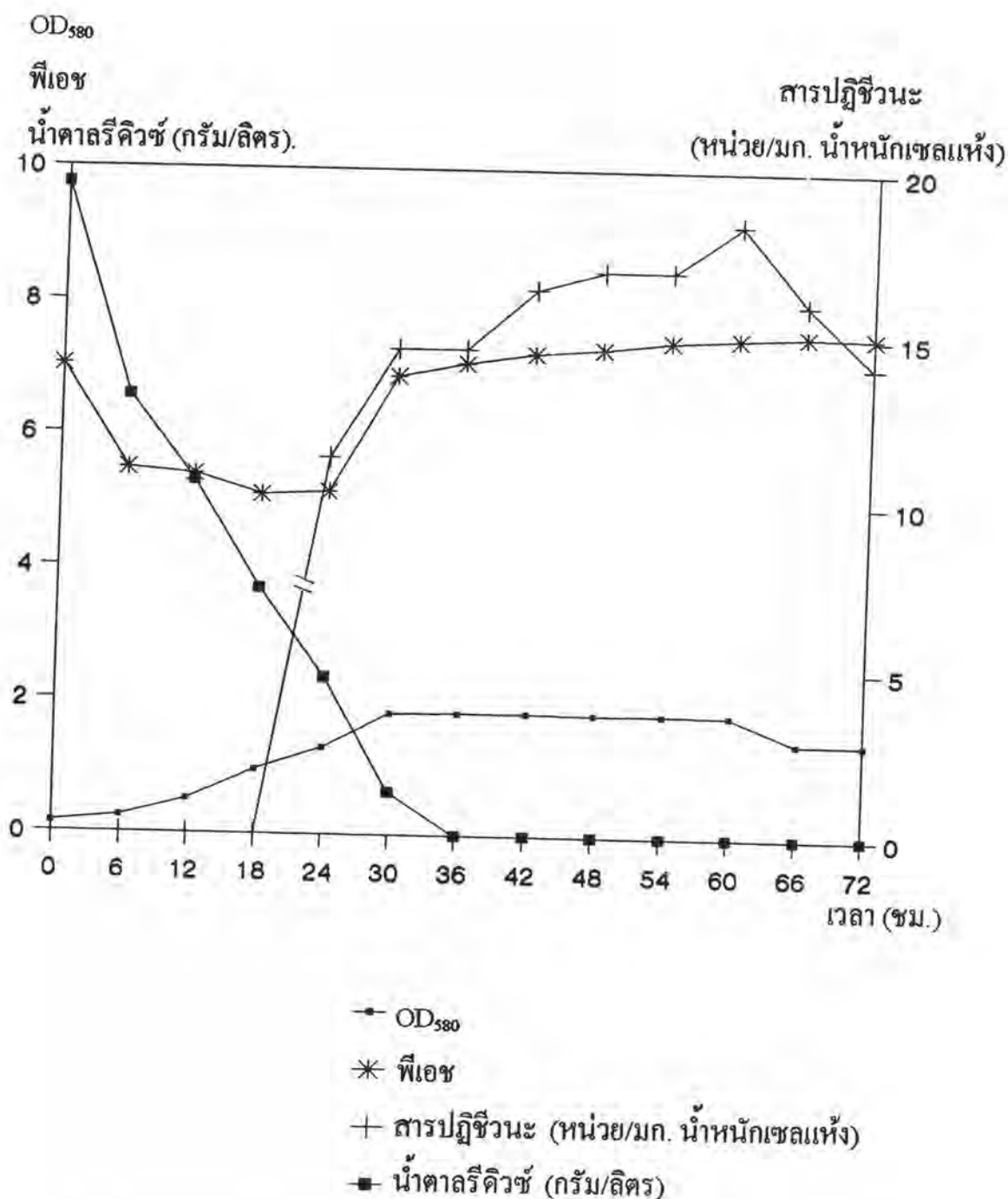
รูปที่ 15 กราฟแสดงการเจริญของสายพันธุ์ SR-1 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช ปริมาณการสร้างสารปฏิชีวนะ และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (NG) เลี้ยงที่อุณหภูมิ $30 \pm 2^\circ \text{C}$. บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที

ในอาหารที่มีมีมอลโดสเป็นแหล่งคาร์บอน (NM) ได้รูปแบบการเจริญ การเปลี่ยนแปลงของพีเอช ปริมาณการสร้างสารปฏิชีวนะ และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ดังแสดงในรูปที่ 16 การเจริญของ SR-1 ในอาหารชนิดนี้มีระยะพักตัวชั่วโมงที่ 0-6 ระยะการเพิ่มจำนวนชั่วโมงที่ 6-30 ระยะคงตัวชั่วโมงที่ 30-60 หลังจากชั่วโมงที่ 60 ไปแล้วเป็นระยะการลดจำนวนเซลล์ การเปลี่ยนแปลงของพีเอชในอาหารจะเริ่มต้นจากพีเอช 7.0 แล้วลดต่ำลงเรื่อยๆ จนมีค่าต่ำสุดเท่ากับ 5.15 ในชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเชื้อ หลังจากชั่วโมงที่ 24 ไปแล้วพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อจะเพิ่มขึ้นอีกครั้ง ค่าพีเอชที่เพิ่มขึ้นมีค่าประมาณ 7.45 ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 42 เป็นต้นไป

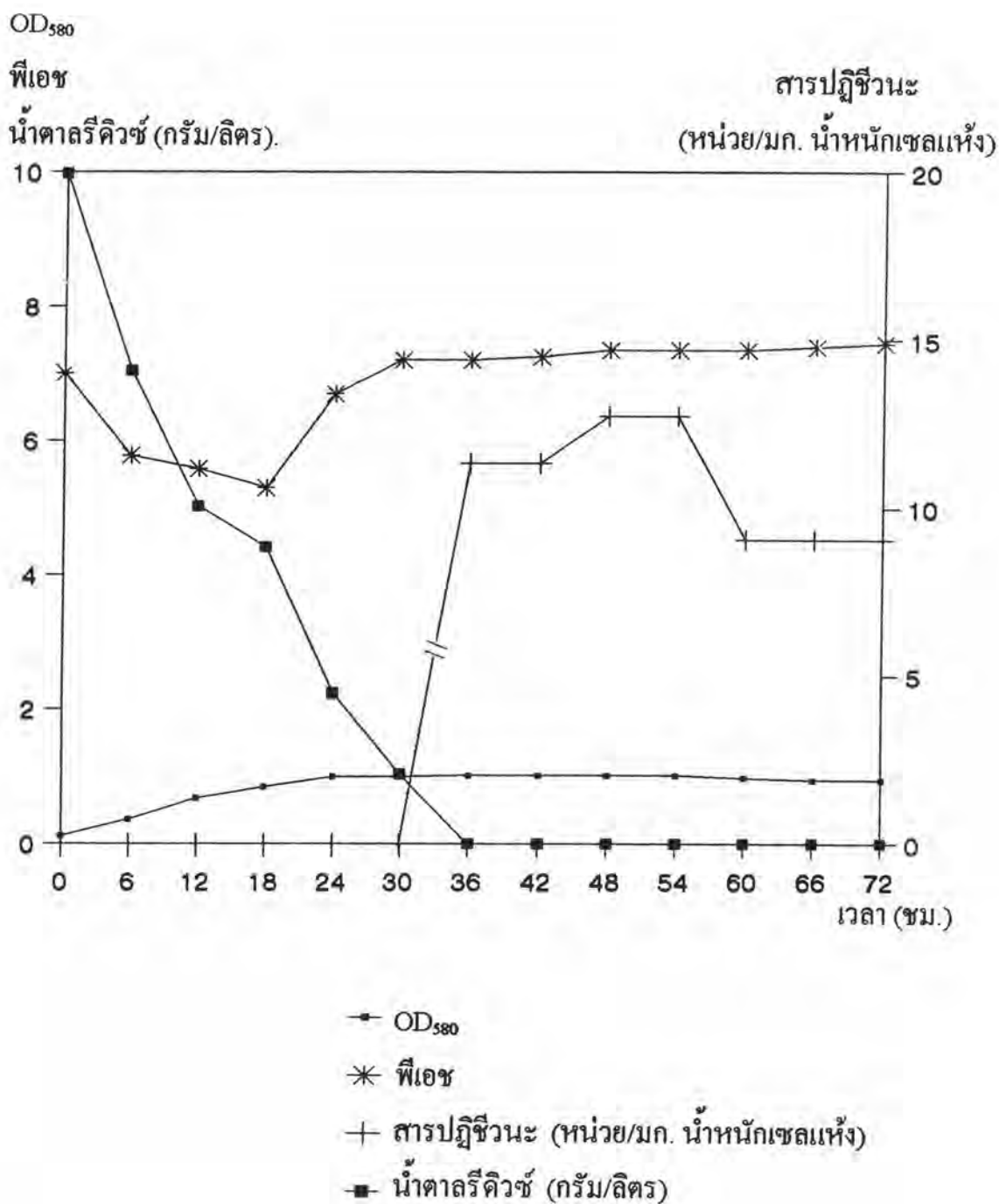
การสร้างสารปฏิชีวนะในอาหารชนิดนี้ ตรวจพบสารปฏิชีวนะตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเชื้อ และได้ค่าสูงสุดของสารปฏิชีวนะในชั่วโมงที่ 60 เท่ากับ 18.41 หน่วย/มก. น้ำหนักเซลล์แห้ง สำหรับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟพบว่าน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเรื่อยๆ จนถึงชั่วโมงที่ 36 ของการเลี้ยงเชื้อ หลังจากชั่วโมงที่ 36 เป็นต้นไป ตรวจไม่พบน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในอาหารที่มีแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน (NL) ได้รูปแบบการเจริญ การเปลี่ยนแปลงพีเอช ปริมาณการสร้างสารปฏิชีวนะ และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ดังแสดงในกราฟรูปที่ 17 การเจริญของสายพันธุ์ SR-1 ในอาหารชนิดนี้มีระยะพักตัวชั่วโมงที่ 0-6 ระยะการเพิ่มจำนวนชั่วโมงที่ 6-24 ระยะคงตัวชั่วโมงที่ 24-72 การเปลี่ยนแปลงของพีเอชในอาหารจะเริ่มต้นจากพีเอช 7.0 แล้วลดต่ำลง และมีค่าต่ำสุดเท่ากับ 5.24 ในชั่วโมงที่ 24 จากนั้นพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อจะเพิ่มขึ้นอีกครั้ง ค่าพีเอชที่เพิ่มขึ้นค่อนข้างคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 36 เป็นต้นไป.

การสร้างสารปฏิชีวนะในอาหารชนิดนี้ ตรวจพบสารปฏิชีวนะตั้งแต่ชั่วโมงที่ 36 ของการเลี้ยงเชื้อ และได้ค่าสูงสุดของสารปฏิชีวนะเท่ากับ 12.74 หน่วย/มก. น้ำหนักเซลล์แห้ง ระหว่างชั่วโมงที่ 48-54 สำหรับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเรื่อยๆ จนถึงชั่วโมงที่ 36 ของการเลี้ยงเชื้อ หลังจากชั่วโมงที่ 36 เป็นต้นไปไม่สามารถตรวจพบน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ



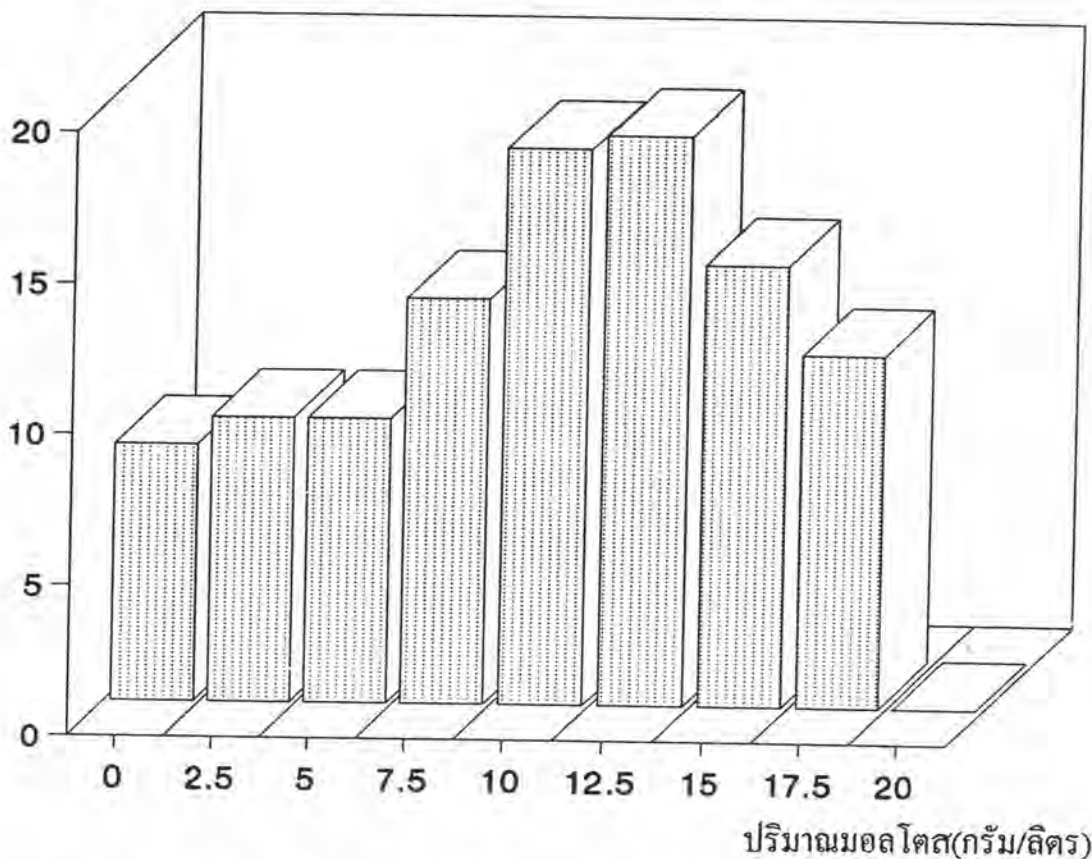
รูปที่ 16 กราฟแสดงการเจริญของสายพันธุ์ SR-1 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช ปริมาณการสร้างสารปฏิชีวนะ และปริมาณน้ำตาลรีดิวิซ์ ในอาหารที่มีมอลโตสเป็นแหล่งคาร์บอน (NM) เลี้ยงที่อุณหภูมิ $30 \pm 2^\circ \text{C}$. บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที



รูปที่ 17 กราฟแสดงการเจริญของสายพันธุ์ SR-1 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช ปริมาณการสร้างสารปฏิชีวนะ และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ในอาหารที่มีแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน (NL) เลี้ยงที่อุณหภูมิเลี้ยงที่อุณหภูมิ $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$. บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที

จากผลการทดลองการใช้แหล่งคาร์บอน 3 ชนิดคือ กลูโคส มอลโตส และแลคโตส เติมในอาหารชุดควบคุม (NB) พบว่าอาหารที่มีมอลโตสเป็นแหล่งคาร์บอนเกิดการสร้างสารปฏิชีวนะในปริมาณที่สูงสุดเมื่อเทียบกับแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆ จึงได้เลือกใช้มอลโตสเป็นแหล่งคาร์บอน และนำมาแปรผันปริมาณที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้ปริมาณตั้งแต่ 0-20 กรัม/ลิตร ซึ่งได้ผลดังแสดงในกราฟรูปที่ 18 จากกราฟปริมาณมอลโตส 12.5 กรัม/ลิตร เป็นปริมาณที่เชื้อสายพันธุ์ SR-1 สร้างสารปฏิชีวนะได้สูงสุด แต่เมื่อเปรียบเทียบผลที่ได้กับเมื่อใช้มอลโตสที่ปริมาณ 10 กรัม/ลิตร แล้ว สารปฏิชีวนะที่สร้างขึ้นมีค่าที่ใกล้เคียงกันมาก จึงได้ใช้ปริมาณมอลโตสเพียง 10 กรัม/ลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทำการทดลองแปรผันแหล่งไนโตรเจนร่วมต่อไป

สารปฏิชีวนะ(หน่วย/มก. น้ำหนักเซลล์แห้ง).



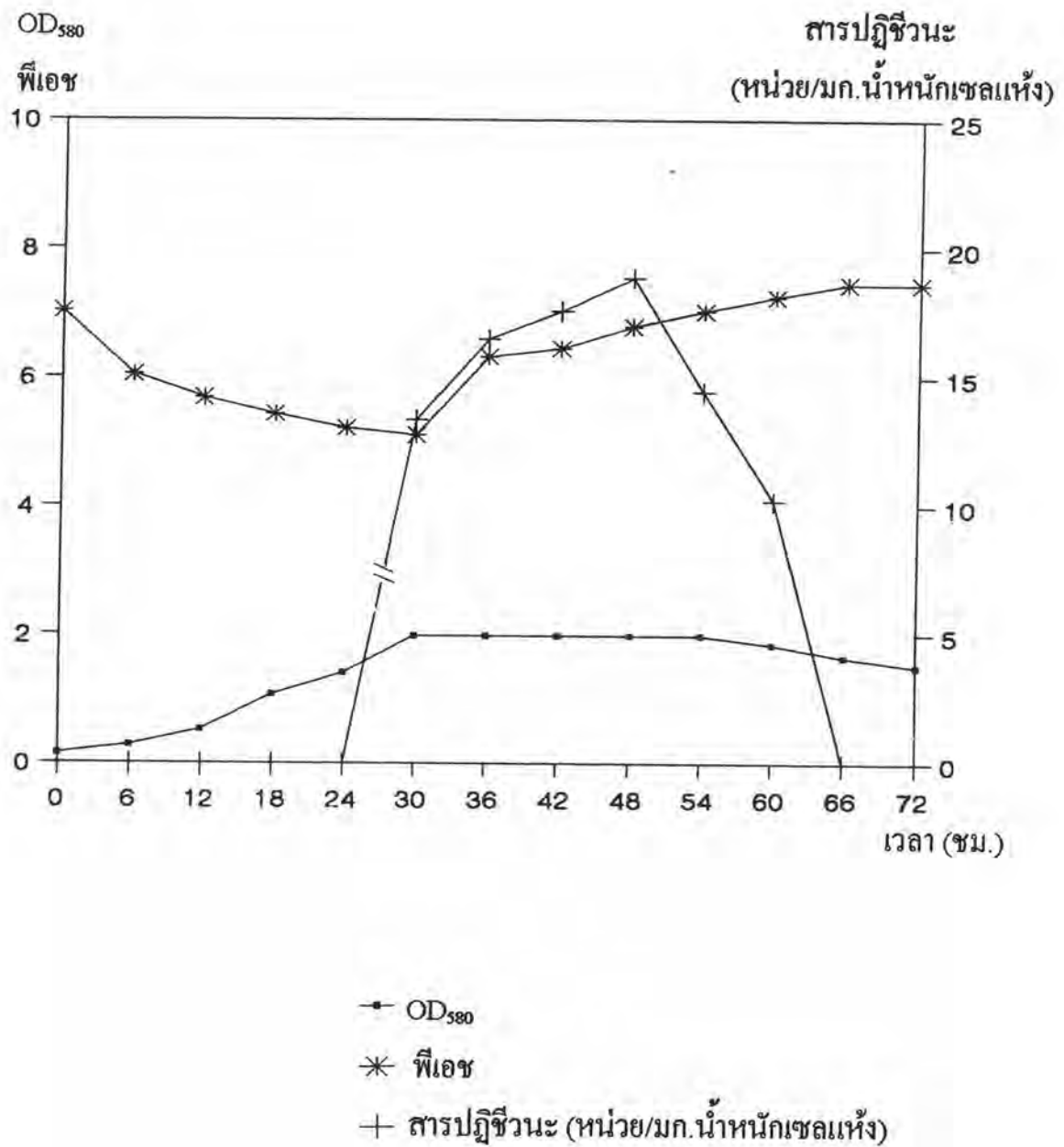
รูปที่ 18 กราฟแสดงปริมาณของสารปฏิชีวนะที่สายพันธุ์ SR-1 สร้างขึ้นเมื่อใช้ปริมาณมอลโตส 0-20 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารชุดควบคุม(NB) เลี้ยงที่อุณหภูมิเลี้ยงที่อุณหภูมิ $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$. บนเครื่องเขย่า ความเร็ว 200 รอบต่อนาที

5. 1. 2 แหล่งไนโตรเจนร่วม

จากการแปรผันแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่ามอลโตสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ทำให้สายพันธุ์ SR-1 สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้ปริมาณสูงสุดเมื่อเทียบกับแหล่งคาร์บอนอื่นๆ ที่ใช้ในการทดลอง ได้นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันแหล่งคาร์บอนแล้ว มาแปรผันแหล่งไนโตรเจนร่วมตามวิธีการทดลองในข้อ 5. 1. 2 เนื่องจากในอาหารหูดควบคุม(NB) ที่ใช้เป็นอาหารสูตรตั้งต้นนั้นมีองค์ประกอบของแบคโคเปปโตน และสารสกัดจากเนื้อ ซึ่งจัดเป็นแหล่งไนโตรเจน ในอาหารแต่ละชนิดได้ตรวจสอบคุณภาพการเจริญโดยดูจากค่าความขุ่นของเชื้อ การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในอาหาร และปริมาณการสร้างสารปฏิชีวนะ

อาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนร่วม (NAS) ได้กราฟของการเจริญ การเปลี่ยนแปลงของพีเอช และการสร้างสารปฏิชีวนะ ดังแสดงในกราฟรูปที่ 19 การเจริญของสายพันธุ์ SR-1 ในอาหารชนิดนี้มีระยะพักตัวชั่วโมงที่ 0-6 ระยะการเพิ่มจำนวนชั่วโมงที่ 6-30 ระยะคงตัวชั่วโมงที่ 30-54 หลังจากชั่วโมงที่ 54 ไปแล้วเป็นระยะการลดจำนวนเซลล์ การเปลี่ยนแปลงของพีเอชในอาหารจะเริ่มต้นจากพีเอช 7.0 แล้วจะมีค่าลดลงเรื่อยๆ จนมีค่าต่ำสุดในชั่วโมงที่ 30 ของการเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อจะเพิ่มขึ้นอีกครั้ง ค่าพีเอชที่เพิ่มขึ้นมีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อยๆ เมื่อเวลาในการเลี้ยงเชื้อมากขึ้น

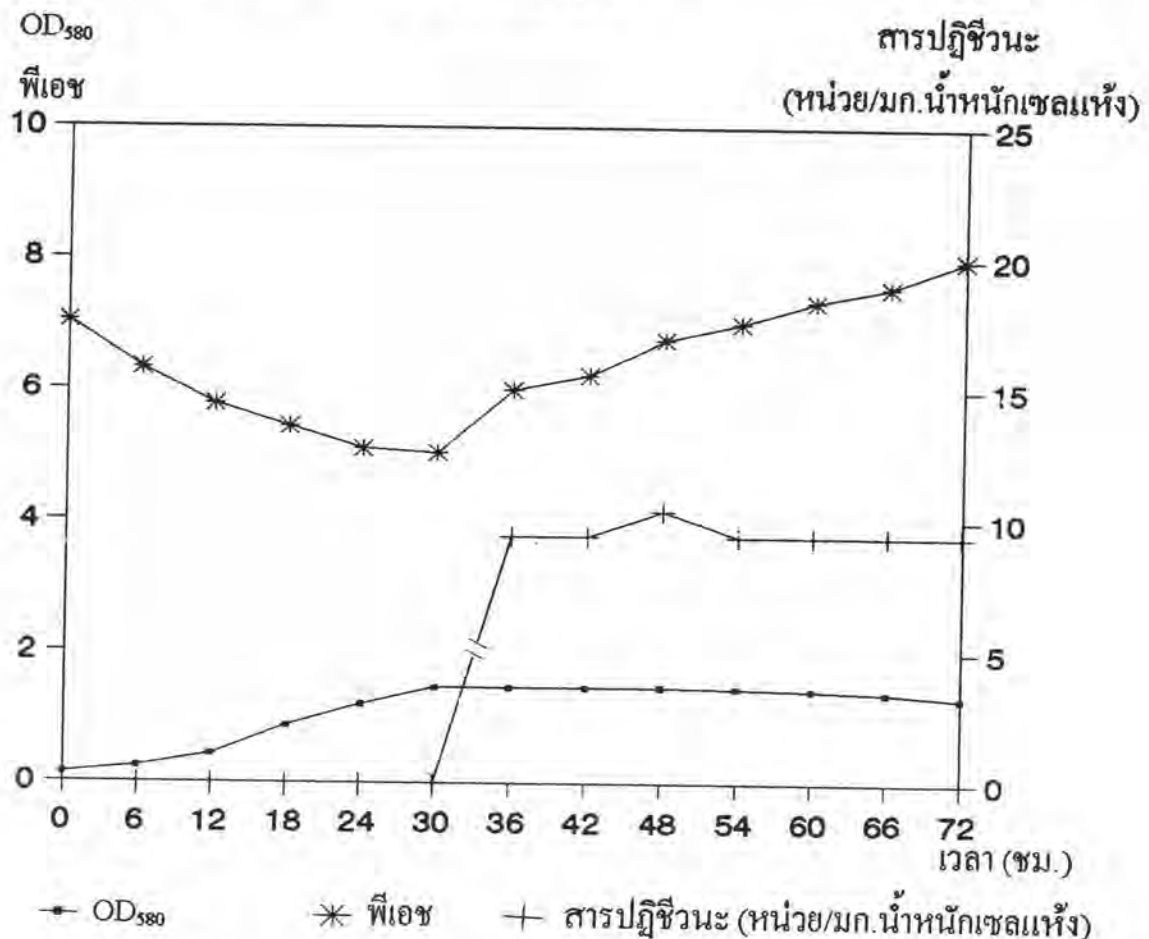
ส่วนการสร้างสารปฏิชีวนะในอาหารชนิดนี้ จะตรวจพบสารปฏิชีวนะตั้งแต่ชั่วโมงที่ 30 ของการเลี้ยงเชื้อ และมีค่าสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 ซึ่งได้ค่าของสารปฏิชีวนะเท่ากับ 18.86 หน่วย/มก. น้ำหนักเซลล์แห้ง



รูปที่ 19 กราฟแสดงการเจริญ การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช ปริมาณการสร้างสารปฏิชีวนะ ของสายพันธุ์ SR-1 ในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนร่วม (NAS) เลี้ยงที่อุณหภูมิ $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$. บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที

ในอาหารที่มีโปรตีนไฮโดรไลสเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนร่วม (NPP) ได้รูปแบบการเปลี่ยนแปลงการเจริญ ฟีเอช และการสร้างสารปฏิชีวนะ ดังแสดงในกราฟรูปที่ 20 การเจริญของสายพันธุ์ SR-1 ในอาหารชนิดนี้ มีระยะพักตัวชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ ระยะการเพิ่มจำนวนชั่วโมงที่ 6-30 ระยะคงตัวชั่วโมงที่ 30-60 การเปลี่ยนแปลงของฟีเอชในอาหารจะเริ่มต้นจากฟีเอช 7.0 แล้วลดต่ำลงเรื่อยๆ จนมีค่าต่ำสุดเท่ากับ 5.28 ในชั่วโมงที่ 30 ของการเลี้ยงเชื้อ หลังจากชั่วโมงที่ 30 ไปแล้วฟีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อจะเพิ่มขึ้นอีกครั้ง และมีค่าสูงขึ้นเรื่อยๆ

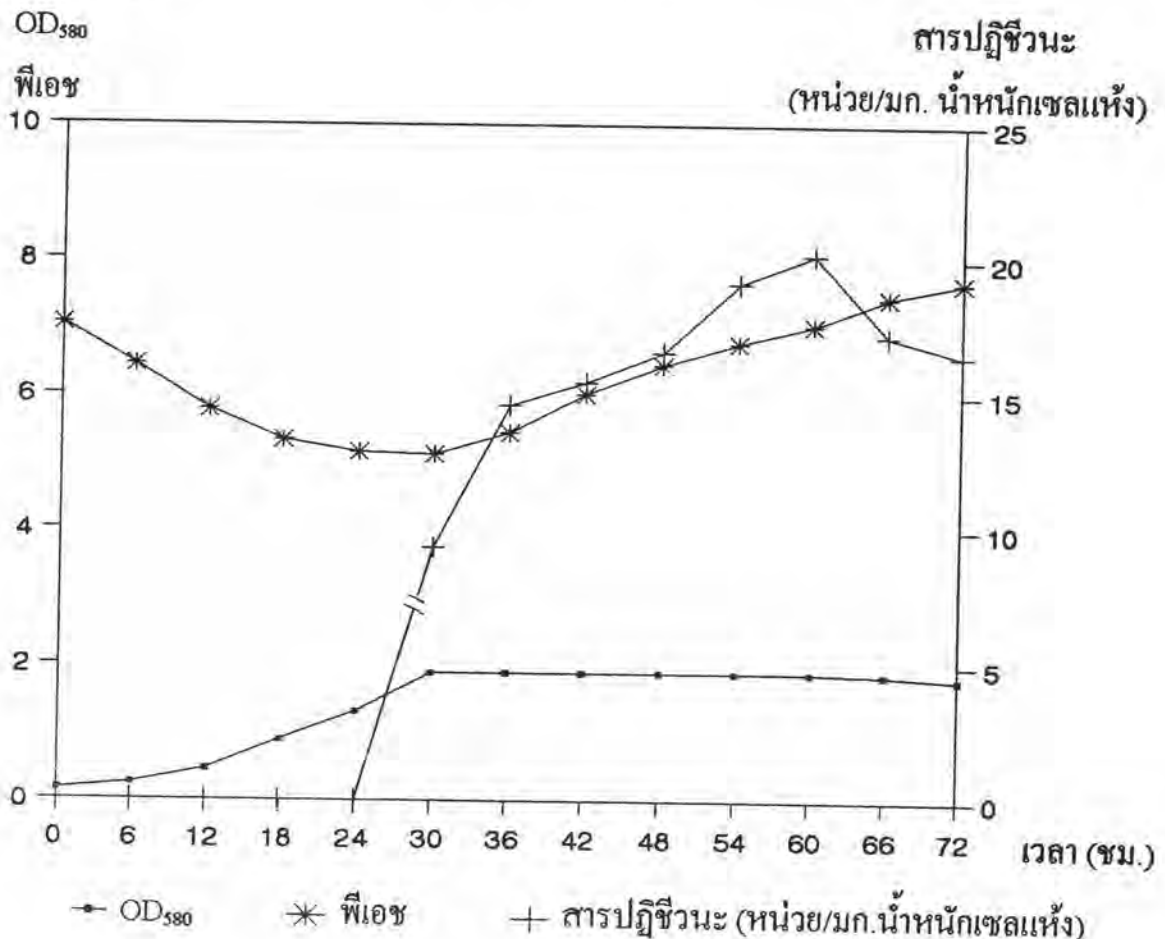
การสร้างสารปฏิชีวนะในอาหารชนิดนี้ จะตรวจพบสารปฏิชีวนะตั้งแต่ชั่วโมงที่ 36 ของการเลี้ยงเชื้อ และได้ค่าสูงสุดของสารปฏิชีวนะเท่ากับ 10.368 หน่วย/มก. น้ำหนักเซลล์แห้ง ในชั่วโมงที่ 48 ของการเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 20 กราฟแสดงการเจริญ การเปลี่ยนแปลงค่าฟีเอช ปริมาณการสร้างสารปฏิชีวนะของสายพันธุ์ SR-1 ในอาหารที่มีโปรตีนไฮโดรไลสเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนร่วม (NPP) เลี้ยงที่อุณหภูมิ $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$. บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที

อาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนร่วม (NYE) ได้กราฟการเปลี่ยนแปลงของการเจริญ พีเอช และการสร้างสารปฏิชีวนะ ดังแสดงในกราฟรูปที่ 21 ในอาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนร่วม ได้รูปแบบการเจริญของสายพันธุ์ SR-1 โดยมีระยะพักตัวชั่วโมงที่ 0-6 ระยะการเพิ่มจำนวนชั่วโมงที่ 6-30 ระยะคงตัวชั่วโมงที่ 30-72 การเปลี่ยนแปลงของพีเอชคล้ายกับในอาหารอื่นๆ โดยเริ่มต้นจากค่าพีเอช 7 แล้วลดต่ำลง และมีค่าต่ำสุดเท่ากับ 5.15 ในชั่วโมงที่ 30 ของการเลี้ยงเชื้อหลังจากนั้นค่าพีเอชจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ

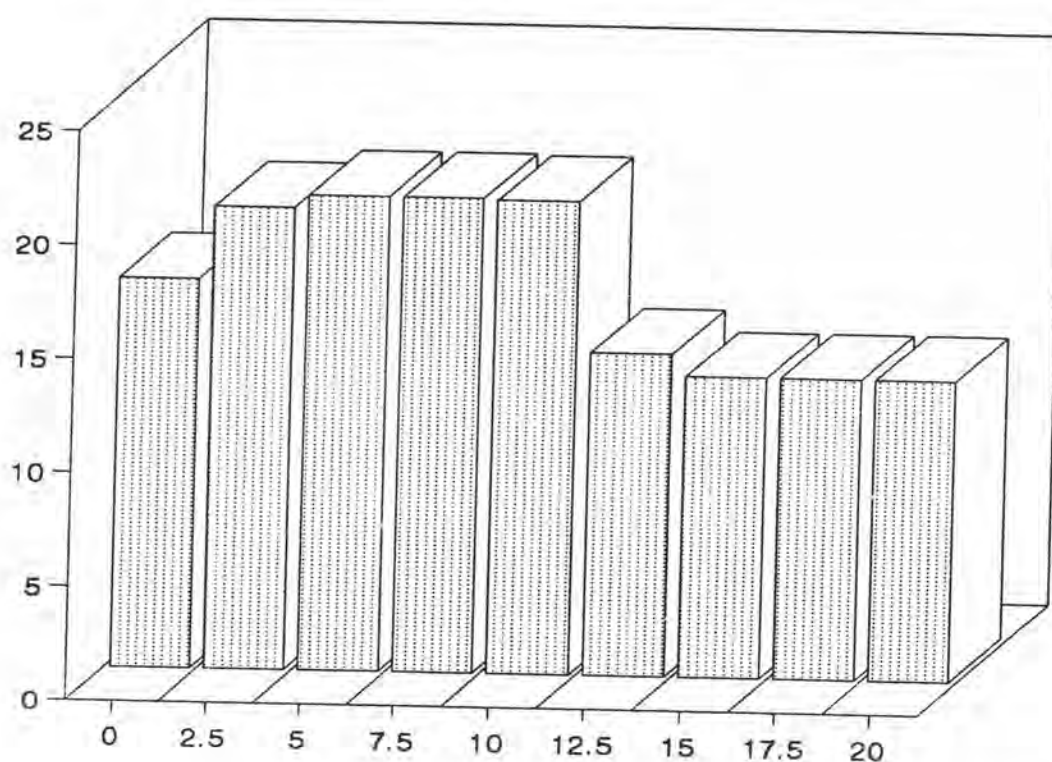
ส่วนการสร้างสารปฏิชีวนะ จะตรวจพบสารปฏิชีวนะในชั่วโมงที่ 30 และได้ค่าสูงสุดของสารปฏิชีวนะเท่ากับ 20.2 หน่วย/มก. น้ำหนักเซลล์แห้ง ในชั่วโมงที่ 60 ของการเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 21 กราฟแสดงการเจริญ การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช ปริมาณการสร้างสารปฏิชีวนะของสายพันธุ์ SR-1 ในอาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนร่วม (NYE) เลี้ยงที่อุณหภูมิ $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$. บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที

จากผลการทดลองที่ได้แปรผันแหล่งไนโตรเจนร่วม 3 ชนิด คือ แอมโมเนียม ซัลเฟต โปรติโอสเปปโตน และสารสกัดจากยีสต์ พบว่าสารสกัดจากยีสต์ จะให้ค่าของสารปฏิชีวนะสูงสุด จึงได้ใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนร่วม และนำมาแปรผันปริมาณที่จะใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยแปรผันปริมาณตั้งแต่ 0-20 กรัม/ลิตร ซึ่งได้ผลดังแสดงในกราฟรูปที่ 22 จากกราฟสารสกัดจากยีสต์ตั้งแต่ปริมาณ 2.5-10 กรัม/ลิตร ให้ค่าของการสร้างสารปฏิชีวนะใกล้เคียงกัน จึงได้ใช้สารสกัดจากยีสต์เพียง 2.5 กรัม/ลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทำการทดลองต่อไป

สารปฏิชีวนะ(หน่วย/มก. น้ำหนักเซลล์แห้ง)



สารสกัดจากยีสต์ (กรัม/ลิตร)

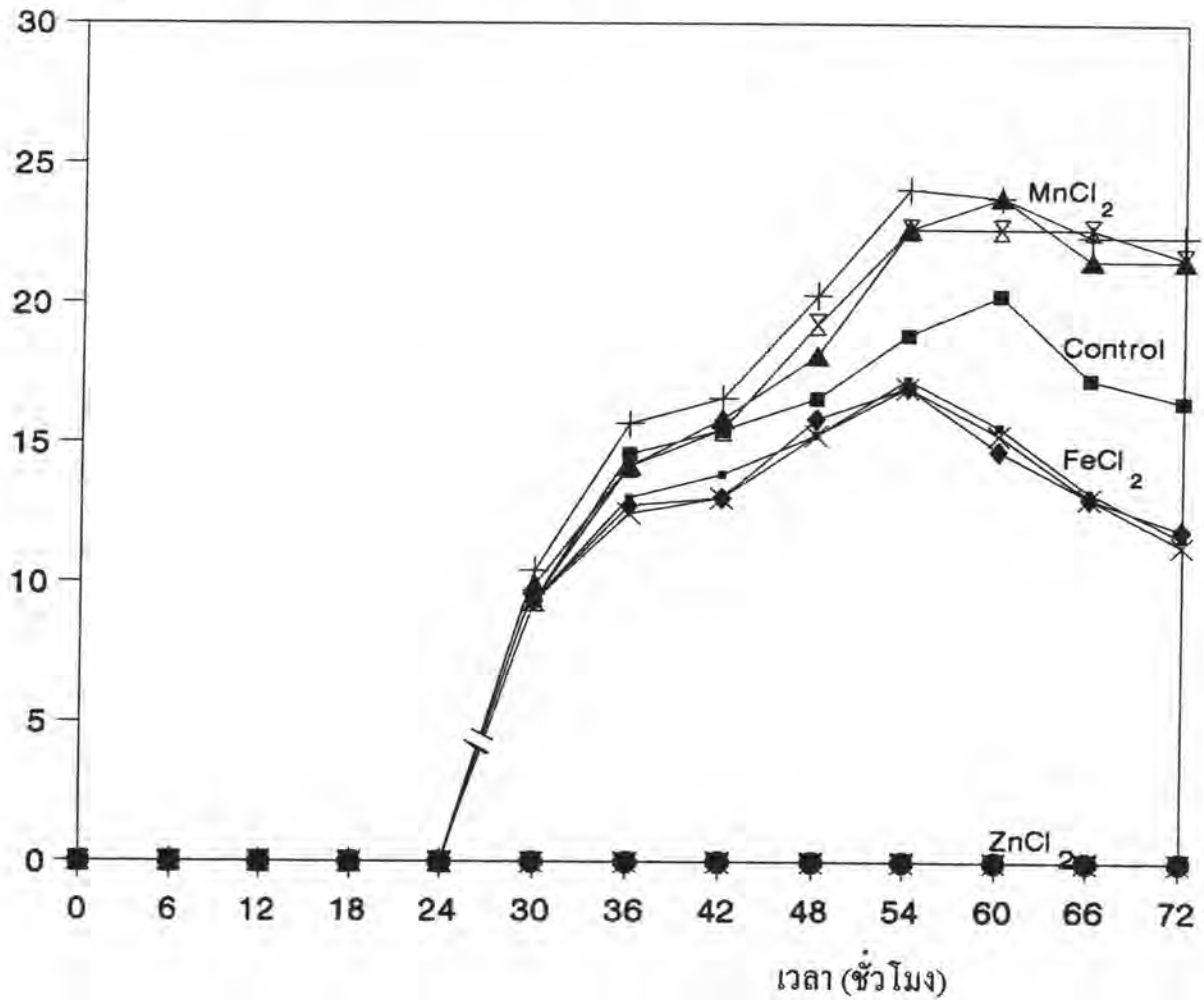
รูปที่ 22 กราฟแสดงปริมาณของสารปฏิชีวนะที่สายพันธุ์ SR-1 สร้างขึ้นเมื่อใช้ปริมาณสารสกัดจากยีสต์ 0-20 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนร่วม เลี้ยงที่อุณหภูมิ $30 \pm 2^{\circ} \text{C}$. บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที

5. 1. 3 แหล่งธาตุอาหารปริมาณน้อย (Trace elements)

เมื่อได้แปรผันแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนร่วมแล้ว ได้แปรผันแหล่งธาตุอาหารปริมาณน้อย โดยเลือกใช้ธาตุปริมาณน้อย 3 ชนิด คือ เฟอริกคลอไรด์ แมงกานีสคลอไรด์ และ ซิงค์คลอไรด์ ซึ่งจัดเป็นตัวยุทธในการสร้างสารปฏิชีวนะ (Lichstein, 1983) เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้ความเข้มข้น 0.5×10^{-5} , 1.0×10^{-5} และ 2.0×10^{-5} โมลาร์ ตามลำดับ ได้ผลการทดลองแสดงคิงกราฟรูปที่ 23 จากกราฟอาหารที่มีแมงกานีสคลอไรด์เป็นองค์ประกอบที่ทุกความเข้มข้น ให้ค่าของสารปฏิชีวนะที่สูงกว่าชุดควบคุม โดยที่ความเข้มข้นของแมงกานีสคลอไรด์ 0.5×10^{-5} โมลาร์ ให้ค่าของสารปฏิชีวนะสูงสุดเท่ากับ 24.08 หน่วย/มก. น้ำหนักเซลล์แห้ง ในชั่วโมงที่ 60 ของการเลี้ยงเชื้อ

อาหารที่มีเฟอริกคลอไรด์เป็นองค์ประกอบ ที่ทุกความเข้มข้น จะให้ค่าของสารปฏิชีวนะที่ใกล้เคียงกัน และมีค่าต่ำกว่าชุดควบคุม สำหรับอาหารที่เติมซิงค์คลอไรด์ทุกความเข้มข้น ไม่สามารถตรวจพบสารปฏิชีวนะ

สารปฏิชีวนะ (หน่วย/มก. น้ำหนักเซลล์แห้ง)



- | | |
|---|---|
| —+— FeCl ₂ = 0.5 × 10 ⁻⁵ โมลาร์ | * ZnCl ₂ = 0.5 × 10 ⁻⁵ โมลาร์ |
| —×— FeCl ₂ = 1.0 × 10 ⁻⁵ โมลาร์ | —▲— ZnCl ₂ = 1.0 × 10 ⁻⁵ โมลาร์ |
| —◆— FeCl ₂ = 2.0 × 10 ⁻⁵ โมลาร์ | —●— ZnCl ₂ = 2.0 × 10 ⁻⁵ โมลาร์ |
| —+— MnCl ₂ = 0.5 × 10 ⁻⁵ โมลาร์ | —■— ชุดควบคุม |
| —▲— MnCl ₂ = 1.0 × 10 ⁻⁵ โมลาร์ | |
| —⊖— MnCl ₂ = 2.0 × 10 ⁻⁵ โมลาร์ | |

รูปที่ 23 กราฟแสดงผลของธาตุปริมาณน้อย FeCl₂ MnCl₂ และ ZnCl₂ ต่อการสร้างสารปฏิชีวนะของสายพันธุ์ SR-1 เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 ± 2 °ซ. บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที

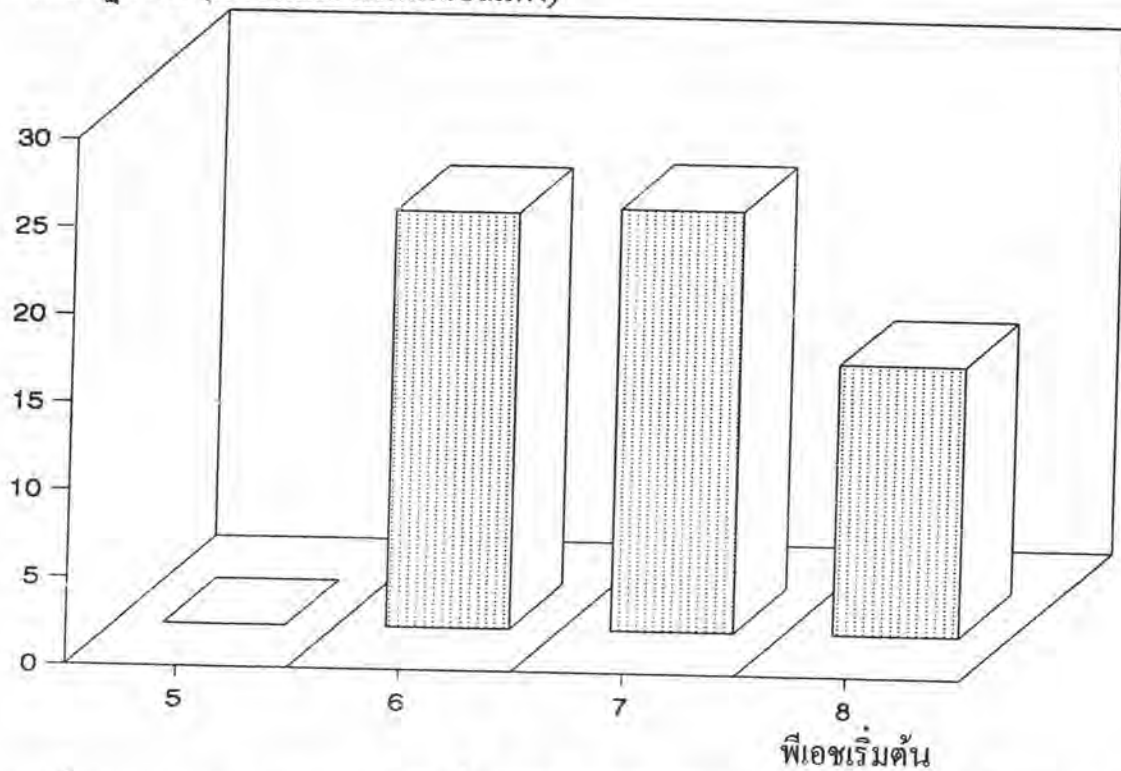
จากการปรับปรุงสูตรอาหารสำหรับเลี้ยงสายพันธุ์ SR-1 ได้อาหารสูตรปรับปรุงโดยให้ชื่อว่า อาหารสูตร R-1 โดยในปริมาณ 1 ลิตร มีองค์ประกอบของอาหาร เหลวนิวเตรียน (NB) 1000 มล. มอลโตส 10 กรัม สารสกัดจากยีสต์ 2.5 กรัม และแมกนีสิคคลอไรด์เข้มข้น 0.5×10^{-5} โมลาร์ จากสูตรอาหารที่ได้จะนำไปทดลองในข้อต่อๆไป

5.2 ภาวะในการเลี้ยง

5.2.1 ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ได้แปรผันค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารสูตร R-1 ในการเลี้ยงสายพันธุ์ SR-1 โดยแปรผันค่าพีเอชเริ่มต้นเป็น 5 6 7 และ 8 ตามลำดับ ทำการเลี้ยงเป็นเวลา 60 ชั่วโมง ซึ่งได้ผลแสดงดังกราฟรูปที่ 24 จากกราฟจะเห็นได้ว่าที่ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเป็น 6 และ 7 ให้ค่าของสารปฏิชีวนะสูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 24.108 หน่วย/มก. น้ำหนักเซลล์แห้ง

สารปฏิชีวนะ (หน่วย/มก. น้ำหนักเซลล์แห้ง)

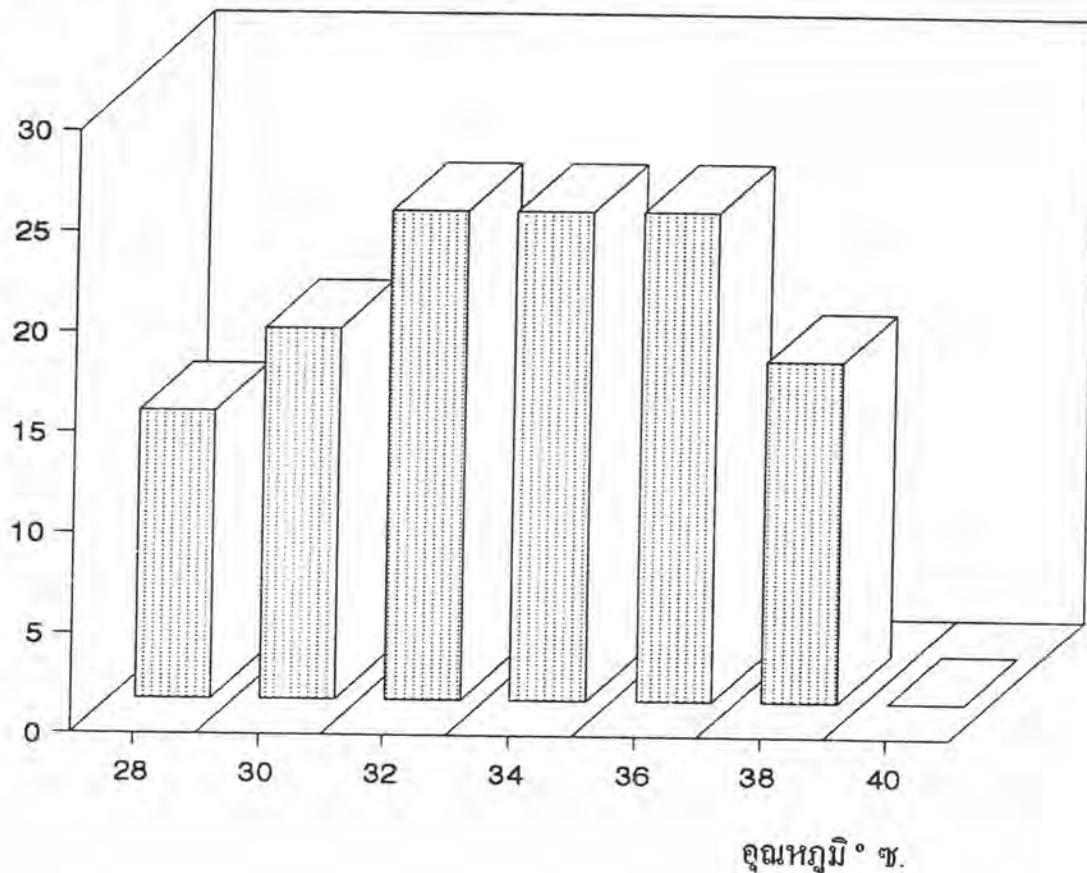


รูปที่ 24 กราฟแสดงผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการสร้างสารปฏิชีวนะ จากการเลี้ยงสายพันธุ์ SR-1 ในอาหารสูตรปรับปรุง R-1 เลี้ยงที่อุณหภูมิ $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$. บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที

5. 2. 2 อุณหภูมิ

ได้แปรผันอุณหภูมิในการเลี้ยงสายพันธุ์ SR-1 ในอาหารสูตร R-1 โดยมีค่าพีเอชเริ่มต้น 7.0 และแปรผันอุณหภูมิเป็น 28 °ซ. 30 °ซ. 32 °ซ. 34 °ซ. 36 °ซ. 38 °ซ. และ 40 °ซ. ตามลำดับ ทำการเลี้ยงเป็นเวลา 60 ชั่วโมง ซึ่งได้ผลแสดงดังกราฟรูปที่ 25 จากกราฟอุณหภูมิในช่วง 32 °ซ. - 36 °ซ. สายพันธุ์ SR-1 สร้างสารปฏิชีวนะสูงสุดโดยมีค่าประมาณ 24.36 หน่วย/มก. น้ำหนักเซลล์แห้ง

สารปฏิชีวนะ (หน่วย/มก. น้ำหนักเซลล์แห้ง)



รูปที่ 25 กราฟแสดงผลของอุณหภูมิในช่วง 28 °ซ.- 40 °ซ. ต่อการสร้างสารปฏิชีวนะของสายพันธุ์ SR-1 เลี้ยงในอาหารสูตรปรับปรุง R-1 พีเอชของอาหารเริ่มต้น 7.0 บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที

6. การทำสารปฏิชีวนะให้บริสุทธิ์บางส่วน (Partial purification)

จากการทดลองปรับปรุงสูตรอาหาร และภาวะในการผลิตดังแสดงผลการทดลองในข้อที่ 5 แล้ว นำสายพันธุ์ SR-1 เลี้ยงในอาหารสูตรปรับปรุง R-1 โดยมีค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเป็น 7.0 อุณหภูมิ 35⁰ซ. บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที โดยในขั้นตอนนี้เลี้ยงสายพันธุ์ SR-1 ในอาหารสูตร R-1 ให้ได้ปริมาตรรวม 2000 มล. ทำการเลี้ยงเป็นเวลา 60 ชั่วโมง แล้วปั่นแยกเก็บเซลล์มาทำการสกัดแยกสารปฏิชีวนะตามวิธีการทดลองข้อ 3.3 ซึ่งจะขอเรียกสารปฏิชีวนะที่ได้ว่าสารปฏิชีวนะอย่างหยาบ แล้วนำมาทดลอง 2 ส่วน ส่วนที่ 1 นำไปทดสอบการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อ 34 สายพันธุ์ ซึ่งแสดงผลดังตารางที่ 6 และส่วนที่ 2 นำไปผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนต่อไป

ตารางที่ 6 แสดงผลการยับยั้งการเจริญของสารปฏิชีวนะอย่างหยาบต่อเชื้อทดสอบต่างๆ

ชื่อทดสอบ	แกรม	ผลการยับยั้ง	Ø บริเวณยับยั้ง (มม.)
แบคทีเรีย			
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778 *	+	+	29.2
<i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581	+	+	27.0
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	+	+	25.2
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 *	-	+	29.0
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047 *	-	+	22.7
<i>Klebsiella pneumoniae</i> IFO 3317 *	-	-	-
<i>Micrococcus luteus</i> TISTR 745	+	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923 *	+	+	25.2
<i>Streptococcus faecium</i> IFO 3128	-	-	-
<i>Salmonella typhi</i> ATCC 19430 *	-	+	22.5
<i>Shigella dysenteriae</i> ATCC 11835 *	-	-	-
<i>Serratia mercerscens</i> ATCC 29632	+	+	21.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853 *	-	-	-
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 8427 *	-	+	23.0

หมายเหตุ * = เชื้อก่อโรค

ตารางที่ 6 (ต่อ)

ชื่อทดสอบ	ผลการยับยั้ง	Ø บริเวณยับยั้ง (มม.)
ร1		
<i>Alternaria</i> sp. (S)	-	-
<i>Alternaria</i> sp. (M)	-	-
<i>Aspergillus niger</i> ° (S)	+	18.0
<i>Aspergillus niger</i> ° (M)	-	-
<i>Cladosporium</i> sp. (S)	-	-
<i>Cladosporium</i> sp. (M)	-	-
<i>Curvularia</i> sp. (S)	-	-
<i>Curvularia</i> sp. (M)	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i> ** (S)	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i> ** (M)	-	-
<i>Fusarium solani</i> ** (S)	-	-
<i>Fusarium solani</i> ** (M)	-	-
<i>Gliocladium</i> sp. ° (S)	+	21.5
<i>Gliocladium</i> sp. ° (M)	-	-
<i>Paecilomyces variotii</i> ° (S)	+	20.2
<i>Paecilomyces variotii</i> ° (M)	-	-
<i>Penicillium</i> sp. (S)	-	-
<i>Penicillium</i> sp. (M)	-	-
<i>Trichoderma</i> sp. (S)	-	-
<i>Trichoderma</i> sp. (M)	-	-

หมายเหตุ ** = เชื้อก่อโรคในพืช

(S) = เชื้อระยะการงอกของสปอร์

° = เชื้อที่ขึ้นและเจริญบนหนังสือ

(M) = เชื้อระยะการเจริญของสายใย

ตารางที่ 6 (ต่อ)

เชื้อทดสอบ	ผลการยับยั้ง	Ø บริเวณยับยั้ง(มม.)
ยีสต์		
<i>Bullera crocea</i>	-	-
<i>Candida albicans</i> *	+	21.5
<i>Candida tropicalis</i> *	+	21.2
<i>Hanselnula anomala</i>	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-
<i>Schizosaccharomyces octosporus</i>	-	-
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	-	-
<i>Rhodotorula</i> sp.	-	-
<i>Sporobolomyces</i> sp.	+	23.0
<i>Torulopsis glabrata</i>	-	-

หมายเหตุ * = เชื้อก่อโรค

สารปฏิชีวนะอย่างหยาบที่ได้สามารถยับยั้งการเจริญแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ซึ่งได้แก่ *Bacillus cereus* ATCC 11778 *Bacillus megaterium* ATCC 14581 *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Escherichia coli* ATCC 25922 *Enterobacter cloacae* ATCC 13047 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *Salmonella typhi* ATCC 19430 และ *Proteus vulgaris* ATCC 8427

ผลการยับยั้งการเจริญของสารปฏิชีวนะอย่างหยาบต่อเชื้อทดสอบยีสต์ พบว่ายีสต์ที่ถูกยับยั้งได้แก่ *Candida albicans* *Candida tropicalis* และ *Sporobolomyces* sp.

เมื่อทดสอบสารปฏิชีวนะอย่างหยาบต่อการยับยั้งการเจริญของรา ทั้งระยะการงอกของสปอร์และการเจริญของสายใย สารปฏิชีวนะอย่างหยาบยับยั้งการเจริญของราในช่วงการงอกของสปอร์ แต่ไม่ยับยั้งในระยะการเจริญของสายใย ราที่นำมาทดสอบที่ถูกยับยั้งการเจริญได้แก่ *Aspergillus niger* *Gliocladium* sp. และ *Paecilomyces variotii*

6.1 การผ่านคอลัมน์เซพ-แพกซ์ 18 (SEP-PAK C₁₈)

ได้นำสารปฏิชีวนะอย่างหยาบ ปริมาตร 6 มล. มาทำการไดอะไลซ์ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เพื่อเป็นการทำสารปฏิชีวนะอย่างหยาบให้มีความเข้มข้นมากขึ้น หลังจากผ่านการทำให้เข้มข้นแล้วจะได้ สารปฏิชีวนะอย่างหยาบ ปริมาตร 3 มล. จากนั้นนำมาฉีดผ่านคอลัมน์เซพ-แพกซ์ 18 โดยให้มีอัตราการไหล 1.0 มล./นาที ซึ่งจะฉีดสารผ่านคอลัมน์นี้ 2 ครั้ง พบว่าสารส่วนที่ผ่านคอลัมน์ให้ผลการยับยั้งการเจริญต่อตัวแทนเชื้อทดสอบ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 แต่เมื่อทดสอบสารที่ถูกดูดซับอยู่บนคอลัมน์ซึ่งได้ชะด้วยเมทานอลนั้น ไม่ให้ผลยับยั้งต่อตัวแทนเชื้อทดสอบ จึงได้นำส่วนของสารปฏิชีวนะอย่างหยาบที่ได้จากการผ่านคอลัมน์ไปผ่านชั้นตอน ข้อ 6.2 ต่อไป

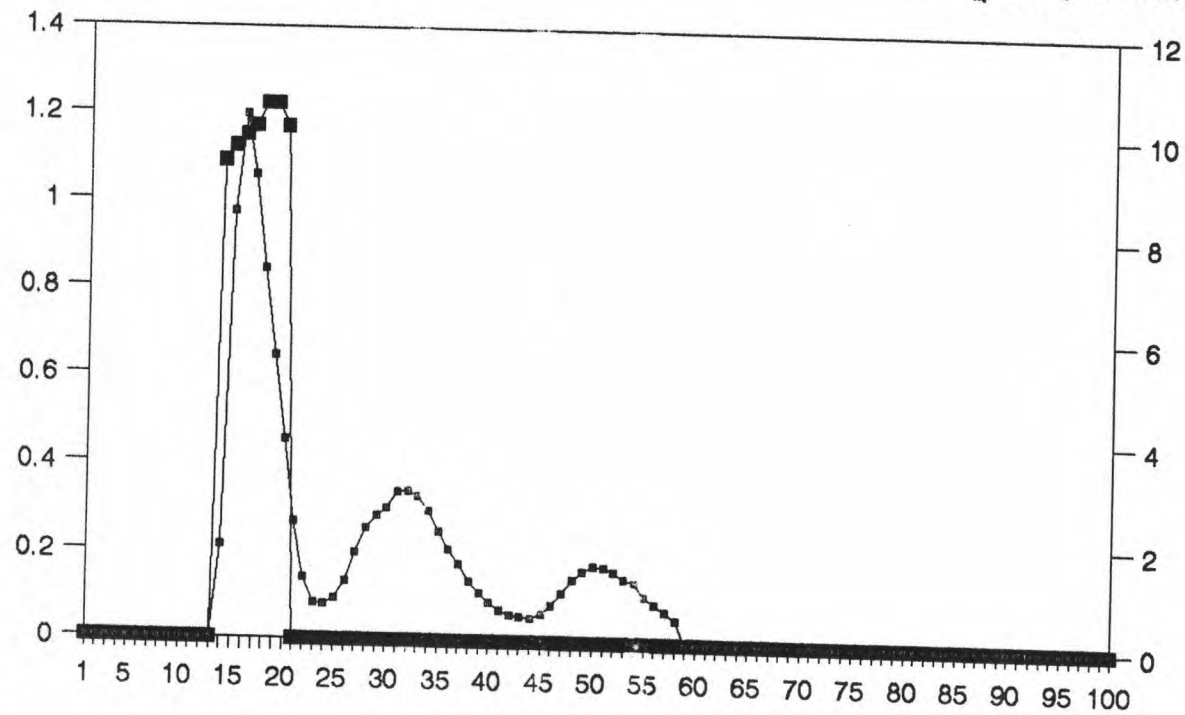
6.2 การผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟีแบบอาศัยความแตกต่างของโมเลกุล

นำสารปฏิชีวนะที่ได้จากข้อ 6.1 ปริมาตร 1 มล. มาไหลผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟีขนาด 1.5 x 50 ซม. ที่มีตัวค้ำจุนเป็นเซฟาเด็กซ์จี-25 ที่มีความสูงของตัวค้ำจุน 47 ซม. โดยให้มีอัตราการไหล (Flow rate) เท่ากับ 10 มล./ชม. เก็บแฟร็กชันของสารปฏิชีวนะครั้งละ 1 มล. เป็นจำนวน 100 แฟร็กชัน ทุกแฟร็กชันวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งตัวแทนเชื้อทดสอบ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ได้แสดงโครมาโตแกรมจากการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีไว้ในรูปที่ 26 โครมาโตแกรมที่ได้จะให้ยอด (peak) ทั้งหมด 3 ยอด ยอดแรกที่ได้ซึ่งอยู่ในช่วงแฟร็กชันที่ 14-20 ให้ผลการยับยั้งการเจริญต่อตัวแทนเชื้อทดสอบ จึงรวมแฟร็กชันที่ 14-20 เข้าด้วยกัน เพื่อทำการทดลองต่อไป

จากกระบวนการทำสารปฏิชีวนะให้บริสุทธิ์ หลังจากผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟีแล้ว พบว่าสารปฏิชีวนะที่ได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 16 เท่า ได้แสดงความบริสุทธิ์ที่เพิ่มขึ้นในแต่ละกระบวนการไว้ดังตารางที่ 7

ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

สารปฏิชีวนะ(หน่วย/มก. น้ำหนักเซลล์แห้ง)



—○— ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

—■— สารปฏิชีวนะ(หน่วย/มก. น้ำหนักเซลล์แห้ง)

รูปที่ 26 โครมาโตรแกรมของสารปฏิชีวนะที่ได้จากสายพันธุ์ SR-1 เมื่อทำโครมาโตรกราฟีแบบอาศัยความแตกต่างของโมเลกุล

ขั้นตอน การทำให้บริสุทธิ์	ปริมาตร(มล.)	โปรตีน		กิจกรรม (Activity)		แอกติวิตี้จำเพาะ (Specific activity)	ความบริสุทธิ์(เท่า) (Purification fold)
		(มก./มล.)	(มก.)	(หน่วย/มก. น้ำหนักเซลล์แห้ง)	หน่วยทั้งหมด (Total activity)		
1. สารปฏิชีวนะ อย่างหยาบ	6	14.34	86.04	22.66	135.96	1.580	1
2. SEP-PAK C ₁₈ ครั้งที่ 1	3	4.207	12.621	11.89	35.67	2.826	1.788
3. SEP-PAK C ₁₈ ครั้งที่ 2	2.9	2.153	6.243	11.89	34.481	5.222	3.494
4. Gel filtration (Sephadex G-25)	7	0.416	2.912	10.76	75.32 *	25.865	16.370

หมายเหตุ * อธิบายค่าที่ได้จากการทดลองไว้ที่บทสรุปผลและการวิจารณ์หน้าที่ 93

ตารางที่ 7 แสดงความบริสุทธิ์ที่เพิ่มขึ้นในขั้นตอนการทำสารปฏิชีวนะให้บริสุทธิ์

จากกระบวนการทำสารปฏิชีวนะให้บริสุทธิ์ โดยผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟี ได้รวมแฟรกชันของสารปฏิชีวนะที่ให้ผลการยับยั้งการเจริญต่อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ทั้งหมดปริมาตรรวม 7.0 มล. ได้นำสารปฏิชีวนะที่ได้มาทดสอบการยับยั้งต่อเชื้อต่างๆ อีกครั้ง ซึ่งได้ผลแสดงดังตารางที่ 8

สารปฏิชีวนะที่ได้จากสายพันธุ์ SR-1 หลังจากผ่านกระบวนการทำบริสุทธิ์โดยคอลัมน์โครมาโตกราฟี (ที่ได้จากข้อ 6.2) สามารถยับยั้งการเจริญเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวกและราบางชนิด แบคทีเรียที่ถูกยับยั้งการเจริญได้แก่ *Bacillus cereus* ATCC 11778 *Bacillus megaterium* ATCC 14581 *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 สำหรับราที่ถูกยับยั้งการเจริญได้แก่ *Gliocladium* sp. และ *Paecilomyces variotii* ซึ่งถูกยับยั้งการเจริญในระยะการงอกของสปอร์เท่านั้น ในกรณีของยีสต์ที่นำมาทดสอบ พบว่าไม่มียีสต์ชนิดใดที่ถูกยับยั้งการเจริญ

ตารางที่ 8 แสดงผลการยับยั้งการเจริญของสารปฏิชีวนะที่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์
บางส่วน (ได้จากข้อ 6.2) ต่อเชื้อทดสอบแบคทีเรีย รา และยีสต์

เชื้อทดสอบ	แกรม	ผลการ ยับยั้ง	Ø บริเวณยับยั้ง (มม.)
แบคทีเรีย			
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778 *	+	+	14.5
<i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581	+	+	14.3
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	+	+	13.7
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 *	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047 *	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> IFO 3317 *	-	-	-
<i>Micrococcus luteus</i> TISTR 745	+	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923 *	+	+	11.5
<i>Streptococcus faecium</i> IFO 3128	-	-	-
<i>Salmonella typhi</i> ATCC 19430 *	-	-	-
<i>Shigella dysenteriae</i> ATCC 11835 *	-	-	-
<i>Serratia mercenscens</i> ATCC 29632	+	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853 *	-	-	-
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 8427 *	-	-	-

หมายเหตุ * = เชื้อก่อโรค

ตารางที่ 8 (ต่อ)

ชื่อทดสอบ	ผลการยับยั้ง	Ø บริเวณยับยั้ง(มม.)
ร1		
<i>Alternaria</i> sp. (S)	-	-
<i>Alternaria</i> sp. (M)	-	-
<i>Aspergillus niger</i> ° (S)	-	-
<i>Aspergillus niger</i> ° (M)	-	-
<i>Cladosporium</i> sp. (S)	-	-
<i>Cladosporium</i> sp. (M)	-	-
<i>Curvularia</i> sp. (S)	-	-
<i>Curvularia</i> sp. (M)	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i> ** (S)	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i> ** (M)	-	-
<i>Fusarium solani</i> ** (S)	-	-
<i>Fusarium solani</i> ** (M)	-	-
<i>Gliocladium</i> sp. ° (S)	+	11.2
<i>Gliocladium</i> sp. ° (M)	-	-
<i>Paecilomyces variotii</i> ° (S)	+	11.0
<i>Paecilomyces variotii</i> ° (M)	-	-
<i>Penicillium</i> sp. (S)	-	-
<i>Penicillium</i> sp. (M)	-	-
<i>Trichoderma</i> sp. (S)	-	-
<i>Trichoderma</i> sp. (M)	-	-

หมายเหตุ ** = เชื้อก่อโรคในพืช

(S) = เชื้อระยะการงอกของสปอร์

° = เชื้อที่ขึ้นและเจริญบนหนังสือสัตว์

(M) = เชื้อระยะการเจริญของสายใย

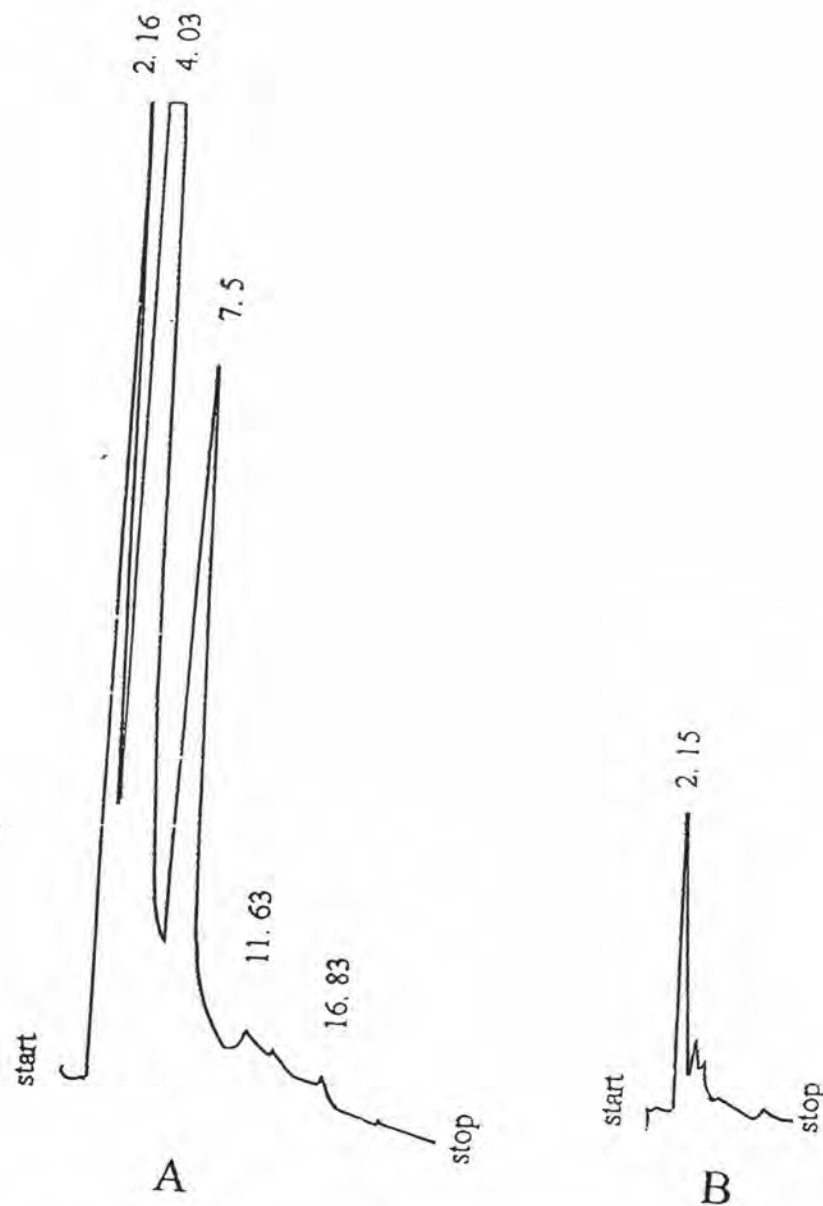
ตารางที่ 8 (ต่อ)

ชื่อทดสอบ	ผลการยับยั้ง	Ø บริเวณยับยั้ง(มม.)
ยีสต์		
<i>Bullera clocea</i>	-	-
<i>Candida albicans</i> *	-	-
<i>Candida tropicalis</i> *	-	-
<i>Hanselmula anomala</i>	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-
<i>Schizosaccharomyces octosporus</i>	-	-
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	-	-
<i>Rhodotorula</i> sp.	-	-
<i>Sporobolomyces</i> sp.	-	-
<i>Torulopsis glabrata</i>	-	-

หมายเหตุ * = เชื้อก่อโรค

6.3 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารปฏิชีวนะโดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟีแบบสมรรถนะสูง (RP-HPLC)

ได้นำสารปฏิชีวนะก่อนการทำให้บริสุทธิ์ซึ่งได้จากข้อ 6 (สารปฏิชีวนะอย่างหยาบ) และสารปฏิชีวนะที่ได้จากข้อ 6. 2 (สารปฏิชีวนะที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์เมื่อผ่าน Gel filtration แล้ว) มาฉีดผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟีแบบสมรรถนะสูง โดยใช้คอลัมน์ C₁₈ (Octadecylsilane) ขนาด 250x 3 มม. มีภาคนำพา (Mobile phase) เป็นอะซิโตไนไตรท์ และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.5 ด้วยอัตราส่วน 15:85 อัตราการไหล (Flow rate) เท่ากับ 0.3 มล./นาที ตรวจสอบผลโดยใช้แสงอุลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร ได้โครมาโตแกรมแสดงในรูปที่ 27 โครมาโตแกรม A คือสารปฏิชีวนะสารปฏิชีวนะก่อนการทำให้บริสุทธิ์ได้จากข้อ 6 (สารปฏิชีวนะอย่างหยาบ) ซึ่งได้ปรากฏจำนวนพิก (peak) จำนวนมาก ส่วนโครมาโตแกรม B เป็นสารปฏิชีวนะที่ได้จากข้อ 6. 2 (สารปฏิชีวนะที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์เมื่อผ่าน Gel filtration แล้ว) จะเห็นได้ว่ามีจำนวนพิกน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับโครมาโตแกรม A แสดงให้เห็นว่าสารปฏิชีวนะมีความบริสุทธิ์ขึ้นจริง และได้ปรากฏชัดว่าโครมาโตแกรม B ที่ได้นั้นมี Retention time เท่ากับ 2.15 นาที



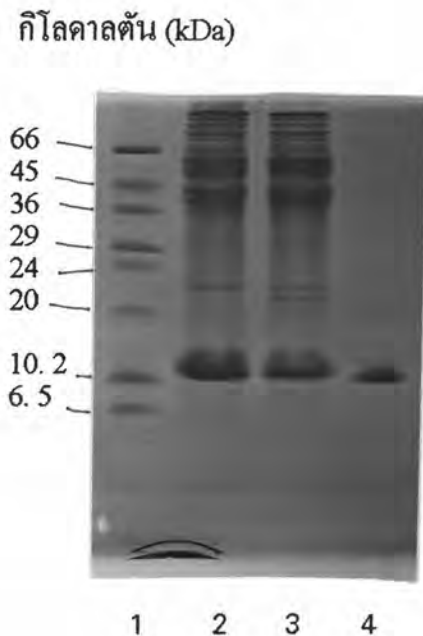
รูปที่ 27 โครมาโตแกรมของสารปฏิชีวนะที่ได้จากสายพันธุ์ SR-1 เมื่อทำ RP-HPLC โดยมีภาคนำพา (Mobile phase) เป็นอะซิโตนไนโตรที่และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.5 ด้วยอัตราส่วน 15:85 อัตราการไหล (Flow rate) เท่ากับ 0.3 มล./นาที ตรวจสอบโดยใช้แสงอุลตราไวโอเลตที่มีความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร

A. สารปฏิชีวนะก่อนการทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งได้ผลจากการทดลองข้อ 6 (สารปฏิชีวนะอย่างหยาบ)

B. สารปฏิชีวนะที่ได้จากข้อ 6.2 (สารปฏิชีวนะที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์หลังจากผ่าน Gel filtration)

6.4 การตรวจสอบความบริสุทธิ์และหาน้ำหนักโมเลกุลโดยการทำให้ SDS-PAGE

ได้นำสารปฏิชีวนะก่อนการทำให้บริสุทธิ์ซึ่งได้จากข้อ 6 (สารปฏิชีวนะอย่างหายาที่ได้จากการทำให้เซลล์แตก) และสารปฏิชีวนะที่ได้จากข้อ 6.2 (สารปฏิชีวนะที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์เมื่อผ่าน Gel filtration แล้ว) มาทำโซเดียมโดเดซิลโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (SDS-PAGE) โดยใช้เจลความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ทำการอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ 75 มิลลิแอมแปร์ จนสีบรอมฟีนอลบลูลงมาถึงเซพารเตดิงเจล แล้วลดกระแสให้เหลือ 50 มิลลิแอมแปร์ รอนสีบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนที่มาจนเกือบสุดปลายแผ่นเจล ซึ่งใช้เวลาทั้งหมด 2.15 ชม. ผลที่ได้แสดงในรูปที่ 28 จากผลการทดลองเห็นได้ว่า สารปฏิชีวนะก่อนการทำให้บริสุทธิ์ (ช่องที่ 2-3) จะให้แถบของโปรตีนจำนวนมาก ส่วนในช่องของสารปฏิชีวนะที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์เมื่อผ่าน Gel filtration (ช่อง 4) ให้แถบของโปรตีนน้อยลง และเห็นแถบที่ชัดเจน 1 แถบเท่านั้น และเมื่อหาค่าความสัมพันธ์ระหว่างการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐาน (R_f) กับค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุล เทียบกับค่าการเคลื่อนที่ของสารปฏิชีวนะที่ได้จากสายพันธุ์ SR-1 ซึ่งแสดงผลดังรูปที่ 29 สารปฏิชีวนะที่ได้จากสายพันธุ์ SR-1 ซึ่งมีค่าการเคลื่อนที่ (R_f) เท่ากับ 0.2503 เมื่อเทียบตามกราฟความสัมพันธ์แล้วได้น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 9700 ดาลตัน



รูปที่ 28 โซเดียมโดเดซิลโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (SDS-PAGE) ของสาร
 ปฏิชีวนะที่ผลิตจากสายพันธุ์ SR-1

ช่องที่ 1 : โปรตีนมาตรฐาน 8 ชนิด

66 kDa = Albumin, Bovine Serum

45 kDa = Ovalbumin

36 kDa = Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase

29 kDa = Carbonic Anhydrase

24 kDa = Trypsinogen

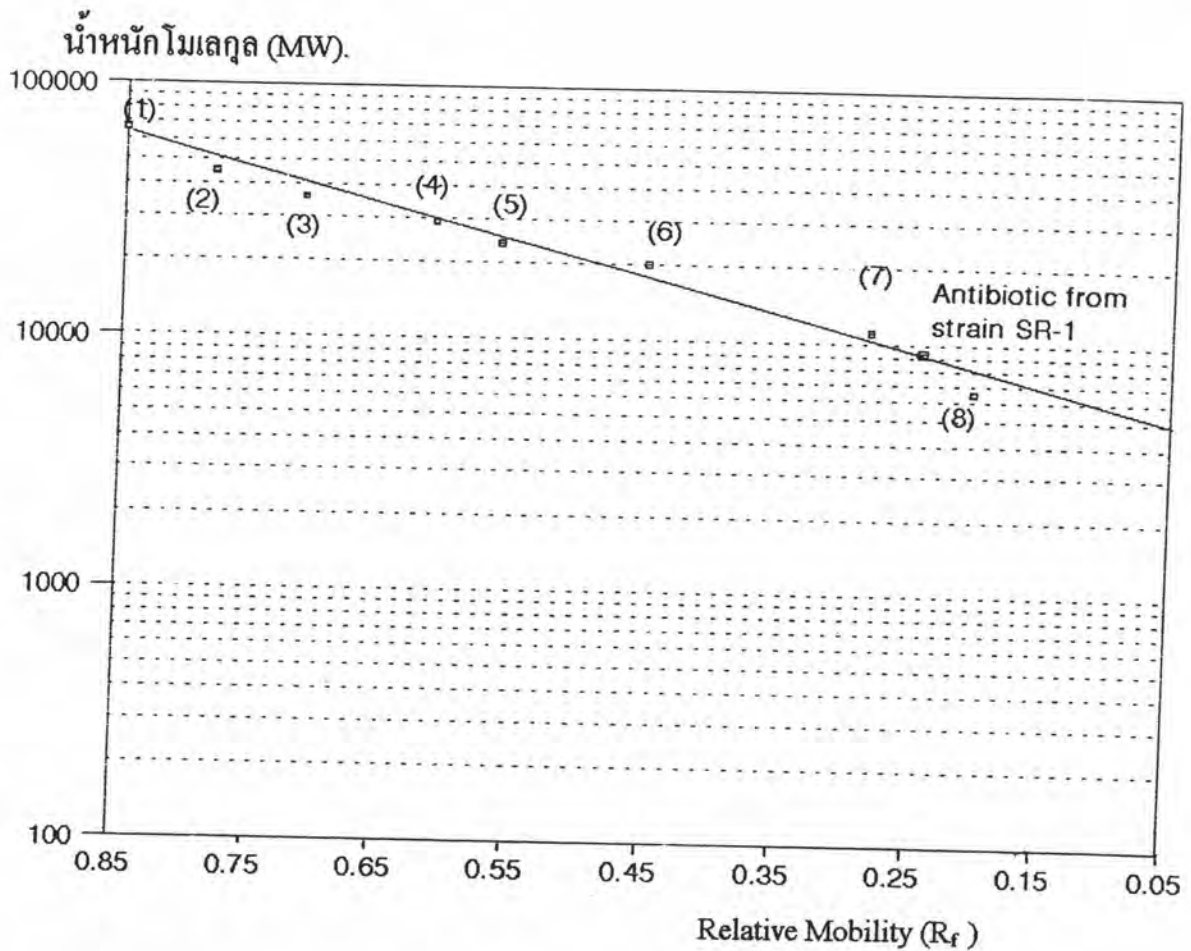
20 kDa = Trypsin Inhibitor

10.2 kDa = α -Lactalbumin

6.5 kDa = Aprotinin

ช่องที่ 2-3 : สารปฏิชีวนะก่อนการทำให้บริสุทธิ์ (ได้จากข้อ 6)

ช่องที่ 4 : สารปฏิชีวนะที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์เมื่อผ่าน Gel filtration แล้ว (ได้จากข้อ 6.2)



รูปที่ 29 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐานและลอกการีทิมของน้ำหนักโมเลกุล โดยการทำให้เคียมโคเคซิลโพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (SDS-PAGE) ที่มีความเข้มข้นของเจล 20 เปอร์เซ็นต์

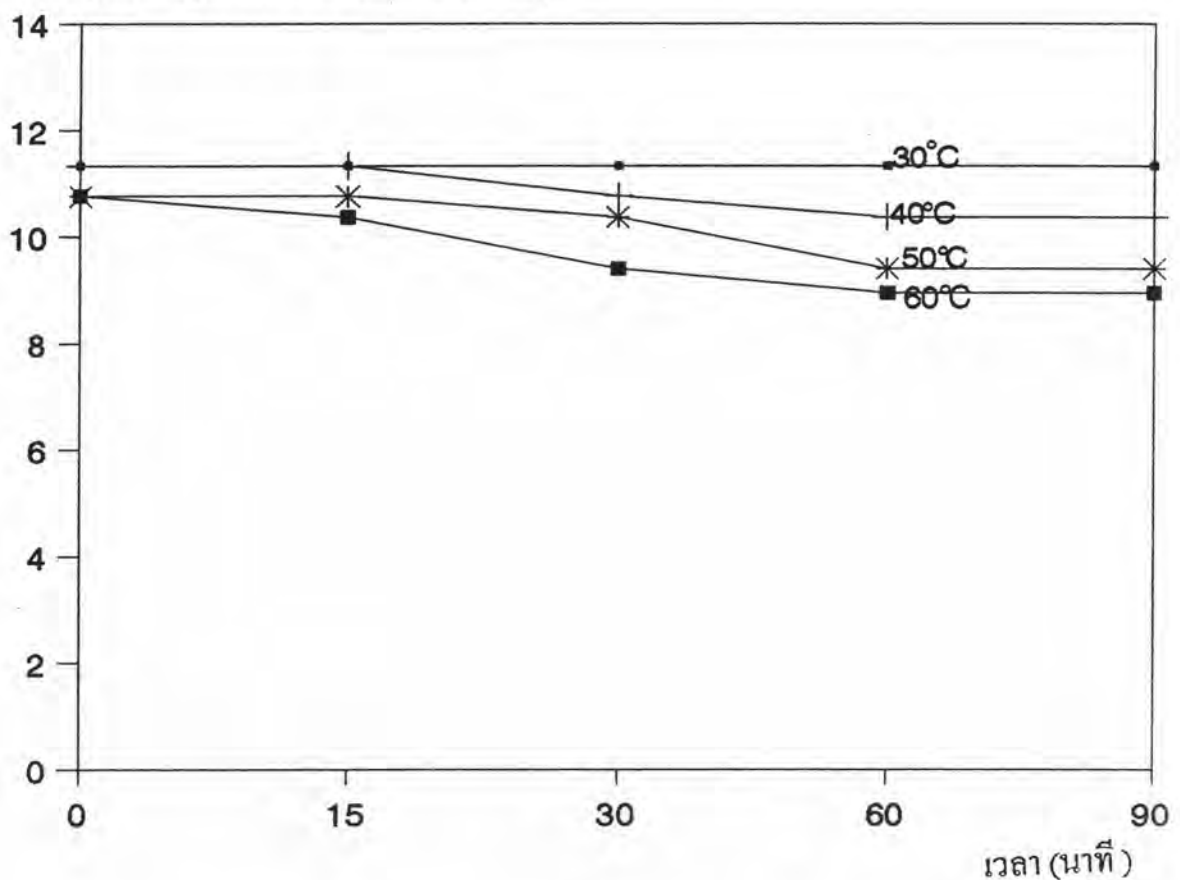
- (1) = Albumin, Bovine Serum
- (2) = Ovalbumin
- (3) = Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
- (4) = Carbonic Anhydrase
- (5) = Trysinogen
- (6) = Trypsin Inhibitor
- (7) = α -Lactalbumin
- (8) = Aprotinin

7. การตรวจสอบความเสถียรของสารปฏิชีวนะ

7.1 อุณหภูมิ

จากการทดสอบความเสถียรของสารปฏิชีวนะที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ (ได้จากข้อ 6.2) ต่ออุณหภูมิในช่วง 30-60 °ซ. โดยใช้เวลาในการบ่มสาร 0-90 นาที ซึ่งได้แสดงผลดังรูปที่ 30 จากกราฟที่อุณหภูมิ 30 °ซ. สารปฏิชีวนะยังมีกิจกรรมปกติเท่าเดิม ไม่ว่าจะใช้เวลาในการบ่มตั้งแต่ 0-90 นาที แต่ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 40-60°ซ. นั้นกิจกรรมของสารปฏิชีวนะลดลงเรื่อยๆ เมื่อเวลาในการบ่มมากขึ้น และกิจกรรมของสารปฏิชีวนะจะลดลงต่ำสุดเมื่อทดลองที่อุณหภูมิ 60 °ซ. เป็นเวลา 90 นาที

สารปฏิชีวนะ (หน่วย/มก. น้ำหนักเซลล์แห้ง)

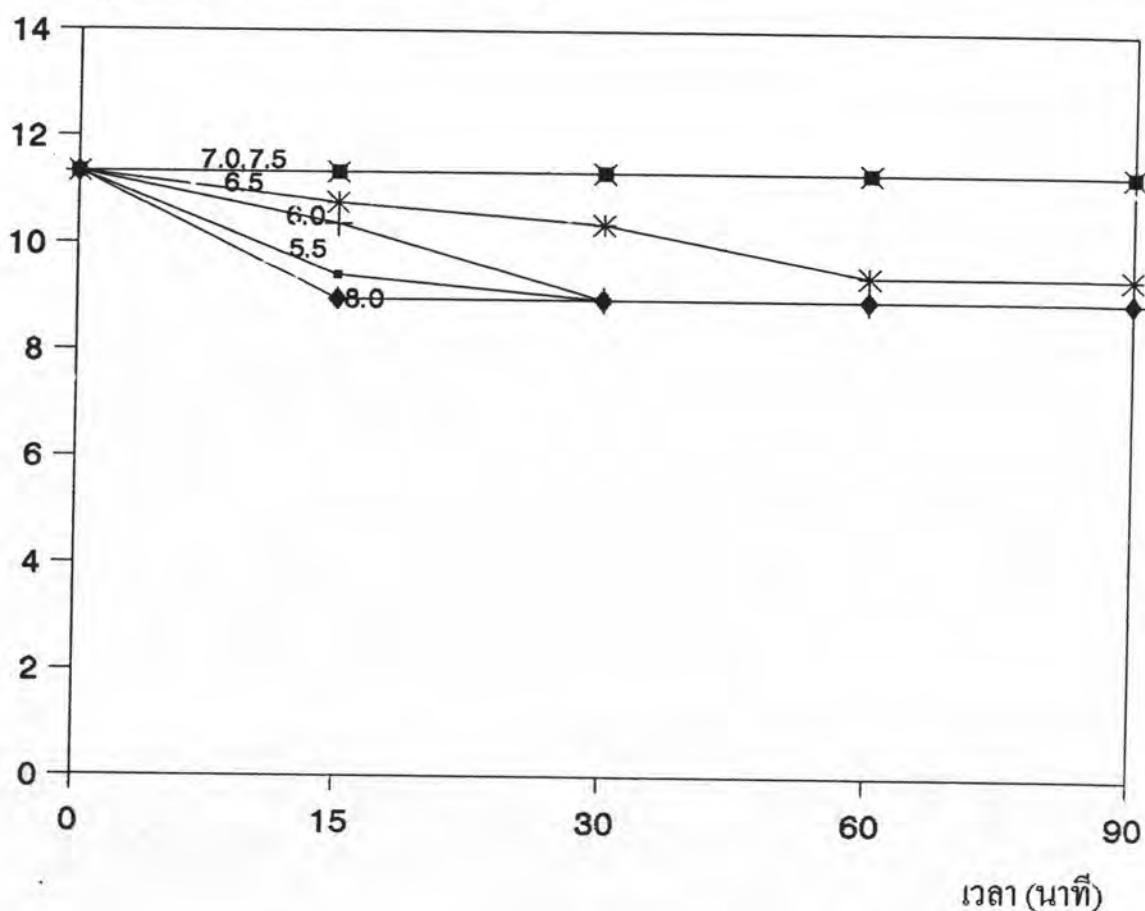


รูปที่ 30 กราฟแสดงความเสถียรของสารปฏิชีวนะหลังจากผ่าน Gel filtration ต่ออุณหภูมิในช่วง 30-60 °ซ.

7.1 ค่าพีเอช

จากการทดสอบความเสถียรของสารปฏิชีวนะที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ (ได้จากการผ่าน Gel filtration แล้ว) ต่อพีเอชในช่วง 5.5 - 8.0 โดยใช้เวลาในการบ่มสาร 0-90 นาที ซึ่งได้แสดงผลดังรูปที่ 31 จากกราฟพบว่าสารปฏิชีวนะมีความเสถียรในช่วงพีเอช 7.0 และ 7.5 ซึ่งแม้ว่าจะใช้เวลาในการบ่มถึง 90 นาที สารปฏิชีวนะยังมีกิจกรรมเท่าเดิม ส่วนที่ค่าพีเอชมากกว่า 7.5 หรือน้อยกว่า 7.0 เมื่อเวลาในการบ่มนานขึ้นสารปฏิชีวนะจะมีกิจกรรมที่ลดลงเรื่อยๆ

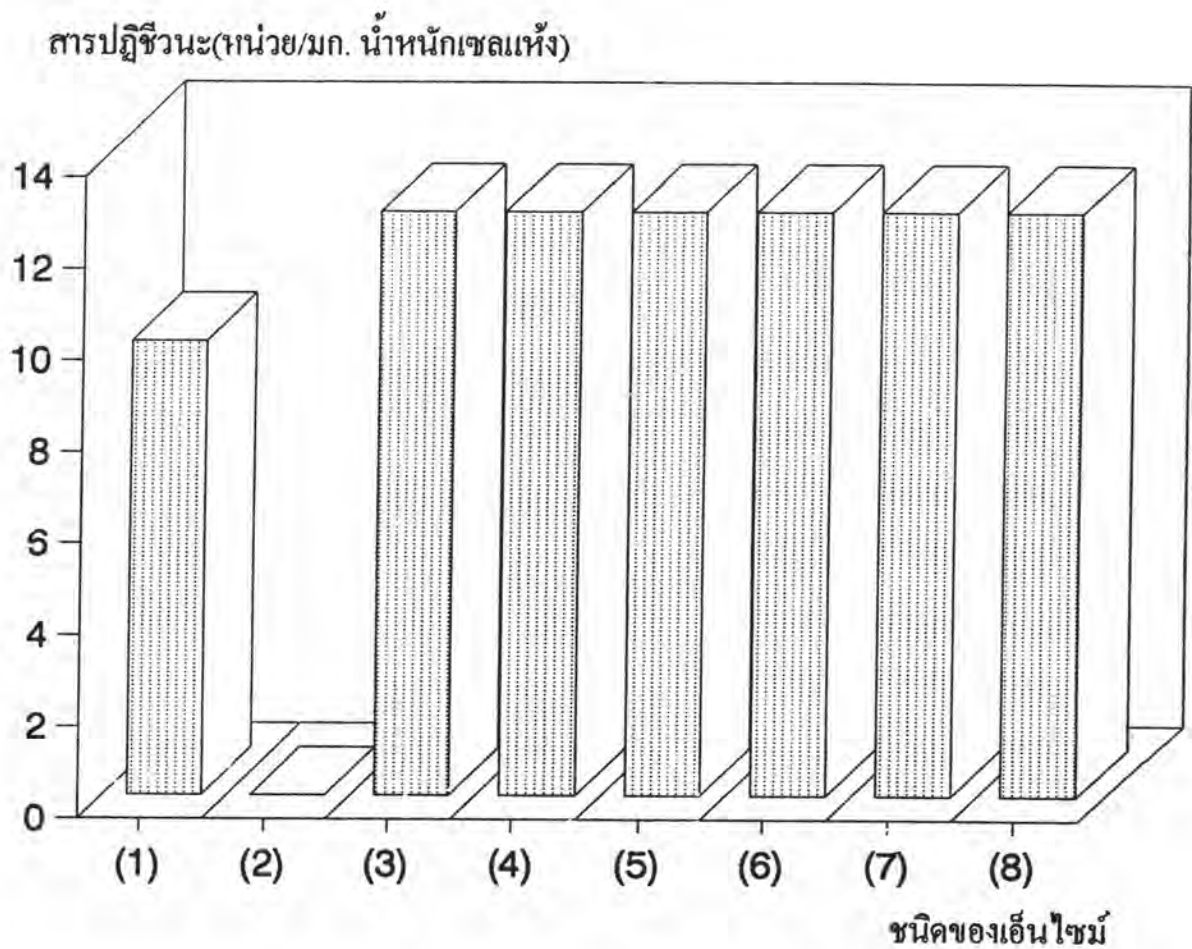
สารปฏิชีวนะ (หน่วย/มก. น้ำหนักเซลล์แห้ง)



รูปที่ 31 กราฟแสดงความเสถียรของสารปฏิชีวนะหลังจากผ่าน Gel filtration ต่อพีเอชในช่วง 5.5-8.0

7.3 เอ็นไซม์

จากการทดสอบความเสถียรของสารปฏิชีวนะที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ (ได้จากข้อ 5.2) ต่อเอ็นไซม์ 7 ชนิด ได้แก่ เปปซินจากกระเพาะหมู ทริปซินจากตับอ่อน ปาเปนจากมะละกอ โปรตีนเตจากมะละกอ โลโซไซม์จากไข่ขาว เบต้ากลูโคซิเดสจากเมล็ดอัลมอลด์ และเบต้าแลกเตมเมสจาก *Bacillus cereus* ซึ่งได้แสดงผลดังกราฟรูปที่ 32 พบว่าหลังจากบ่มสารปฏิชีวนะกับเอ็นไซม์เป็นเวลา 90 นาที เอ็นไซม์ 5 ชนิด คือ ปาเปน โปรตีนเต โลโซไซม์ เบต้ากลูโคซิเดส และเบต้าแลกเตมเมส ไม่มีผลทำให้กิจกรรมของสารปฏิชีวนะลดลง แต่เอ็นไซม์เปปซินสามารถทำให้กิจกรรมของสารปฏิชีวนะลดลงเหลือ 9.91 หน่วย/มก. น้ำหนักเซลล์แห้ง และทริปซินทำให้กิจกรรมของสารปฏิชีวนะลดลงจนเป็นศูนย์เมื่อใช้เวลาในการบ่ม 90 นาที

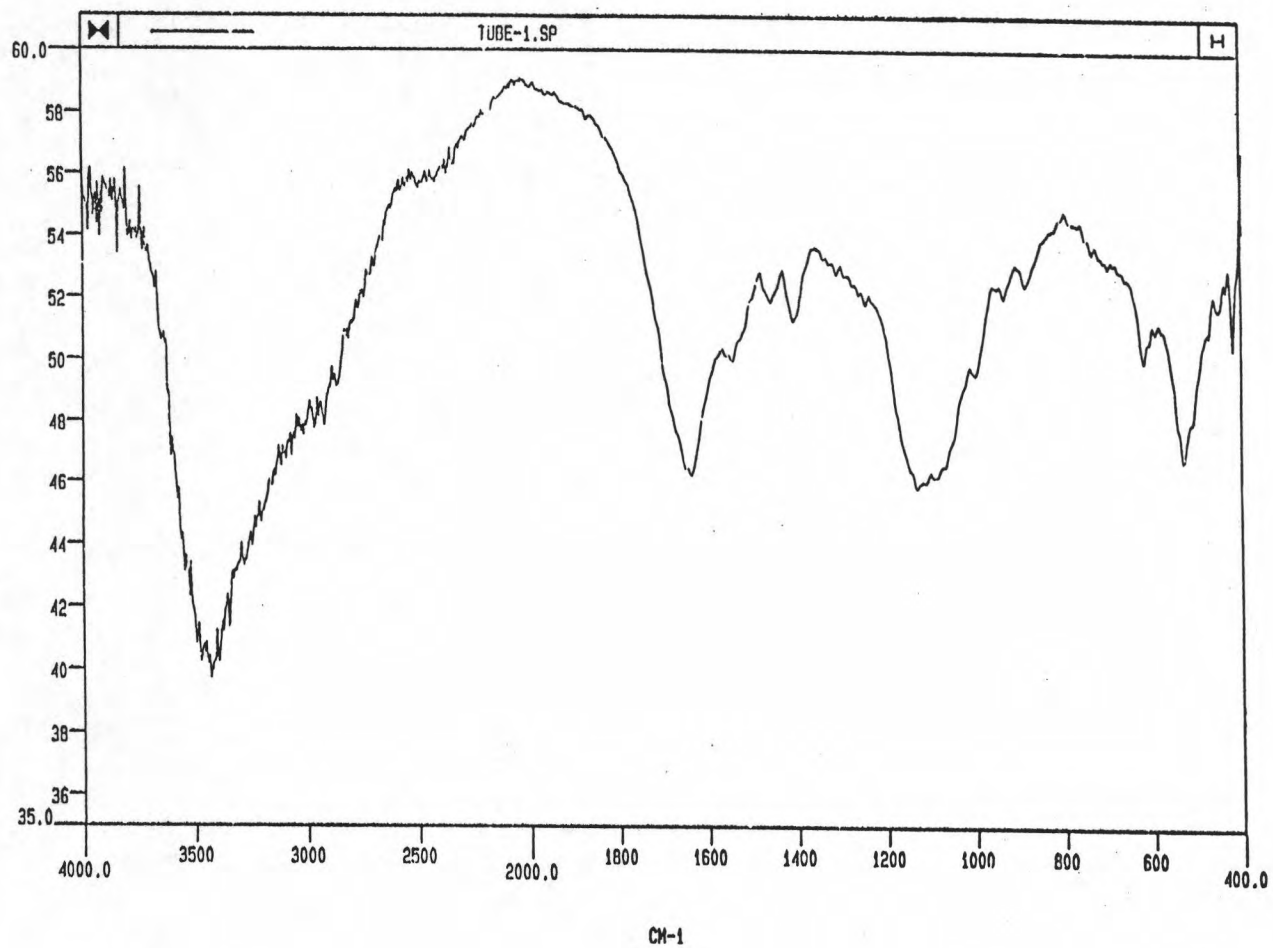


- หมายเหตุ
- (1) เปปซิน
 - (2) ทริปซิน
 - (3) ปาเปน
 - (4) โปรติเนส
 - (5) ไลโซไซม์
 - (6) เบต้ากลูโคซิเดส
 - (7) เบต้าแลกเตมเมส
 - (8) ชุดควบคุม (ไม่มีเอ็นไซม์)

รูปที่ 32 กราฟแสดงความเสถียรของสารปฏิชีวนะหลังจากผ่าน Gel filtration ต่อเอ็นไซม์บางชนิด

8. การตรวจสอบโครงสร้างเบื้องต้นโดยการทำอินฟราเรดสเปกตรัม (IR)

สารปฏิชีวนะที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ (ได้จากการผ่าน Gel filtration แล้ว) มาตรวจสอบโครงสร้างโดยอินฟราเรดสเปกตรัม ขั้นตอนนี้ได้ส่งไปทำการทดลองที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งให้ผลของโครมาโตแกรมดังแสดงในรูปที่ 33 โครมาโตแกรมที่ได้จะปรากฏ Adsorption band ในช่วงการดึงของโมเลกุล (Stretching) ที่ 3450 1635 และ 1550 ซม.⁻¹ ตามลำดับ ได้ตรวจสอบผลที่ได้เทียบกับการอ่านผลของอินฟราเรดตาม Morrison และคณะ (Morrison et al, 1993) ซึ่งแปรผลได้ว่า Adsorption band ที่ 3450 ซม.⁻¹ แสดงถึงการสั่นเนื่องจากการดึงของ N-H ถัดมาเป็น Adsorption band ที่ 1635 ซม.⁻¹ แสดงถึงหมู่ฟังก์ชันแอมไคด์คาร์บอนิล (C=O) และสุดท้าย Adsorption band ที่ 1550 ซม.⁻¹ แสดงถึงการสั่นเนื่องจากการดึงของ N-H และ C-N ดังนั้นผลที่ได้จากการทำอินฟราเรดสเปกตรัมแสดงให้เห็นว่า สารปฏิชีวนะที่ได้จากสายพันธุ์ SR-1 นี้มีพันธะเพปไทด์ (NH-CO) ดังนั้นคาดว่าจะเป็นสารปฏิชีวนะกลุ่มเพปไทด์ (Peptide antibiotic)



รูปที่ 33 โครมาโตแกรมของสารปฏิชีวนะที่ได้จากสายพันธุ์ SR-1 จากการทำอินฟราเรดสเปกตรัม