

การผลิตและลักษณะสมบัติของสารต้านจุลชีพที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis* K-05

นางสาวปิยนฎ ศิริบรรณ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF ANTIMICROBIAL COMPOUNDS

PRODUCED BY *Bacillus subtilis* K-05

Miss Piyanat Siriban

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2007

Copyright of Chulalongkorn University

ปริญญานิพนธ์ : การผลิตและลักษณะสมบัติของสารต้านจุลชีพที่ผลิตโดย *Bacillus*

subtilis K-05. (PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF ANTIMICROBIAL

COMPOUNDS PRODUCED BY *Bacillus subtilis* K-05) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร. สنجศรี

กุลปรีชา, 135 หน้า.

งานวิจัยนี้เป็นการผลิตสารต้านจุลชีพจาก *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ K-05 การทำสารให้บริสุทธิ์ และการศึกษาลักษณะสมบัติของสารต้านจุลชีพ ภาวะที่ใช้เลี้ยง *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ K-05 ได้แก่ เลี้ยงในอาหารเหลว Luria-Bertani (LB) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ชั่วโมง ได้สารซึ่งแสดงการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ทุกชนิด คือ สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์และราเส้นใย โดยจุลินทรีย์ทดสอบได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *Escherichia coli* ATCC 25922 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 *Candida albicans* ATCC 70014 *Aspergillus oryzae* *Fusarium* sp. และ *Alternaria* sp. เมื่อสกัดแยกสารต้านจุลชีพจากส่วนใสด้วยเอทิลอะซิเตท และจากเซลล์ด้วยเมทานอลแล้วนำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งต่อจุลินทรีย์ทดสอบ พบว่าสารสกัดทั้งจากส่วนใสและจากเซลล์ สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ทุกชนิดในระดับที่สูงกว่าเมื่อเทียบกับสารจากส่วนใส ยกเว้นการยับยั้งยีสต์ *C. albicans* ATCC 70014 ซึ่งมีผลการยับยั้งลดลง พบว่าสารสกัดจากส่วนใสและสารสกัดจากเซลล์ให้ผลยับยั้งต่อจุลินทรีย์ทดสอบได้ใกล้เคียงกันและใกล้เคียงกับชุดควบคุมบวก ซึ่งได้แก่ คลอแรมเฟนิคอลและนิสแตติน การแยกสารต้านจุลชีพจากส่วนใสและสารสกัดจากเซลล์โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง โดยระบบตัวพา คือ เมทานอล : เอทิลอะซิเตท (5:95 โดยปริมาตร) พบว่าสำหรับสารต้านจุลชีพจากส่วนใส แยกสารได้ 4 ตำแหน่งโดยมีค่า R_f ของสารเท่ากับ 0.17 0.29 0.61 และ 0.75 สารต้านจุลชีพจากเซลล์พบว่าแยกสารได้ 4 ตำแหน่งเช่นเดียวกัน โดยมีค่า R_f ของสารเท่ากับ 0.09 0.21 0.29 และ 0.61 แสดงให้เห็นว่าสารต้านจุลชีพที่ผลิตจากส่วนใสและสารสกัดจากเซลล์มีองค์ประกอบของสารบางอย่างที่แตกต่างกัน ศึกษาการทำให้สารต้านจุลชีพที่ได้จากส่วนใสบริสุทธิ์ เนื่องจากเป็นสารส่วนที่มีปริมาณมากและมีผลการศึกษามาก่อนว่าพบสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ ผลการทำสารต้านจุลชีพให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยมีระบบตัวพา คือ เอทิลอะซิเตท 20% (โดยปริมาตร) ในเฮกเซน พบว่า ได้สารที่บริสุทธิ์มีลักษณะเป็นของเหลวสีน้ำตาล ซึ่งสามารถแสดงการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ทุกชนิด จากการศึกษาวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีโดย $^1\text{H-NMR}$ $^{13}\text{C-NMR}$ 2D-NMR IR และ MS สรุปได้ว่าสารดังกล่าวคือ 2-methyl butanoic acid และ 3-methyl butanoic acid มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 102 ซึ่งสารทั้งสองชนิดนี้เป็นสารที่ไม่พบว่ามีรายงานการมีฤทธิ์เป็นสารต้านจุลชีพที่ผลิตโดย *Bacillus* spp. มาก่อน

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2550

4772598623 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD : *Bacillus subtilis* / ANTIFUNGAL / ANTIMICROBIAL

PIYANAT SIRIBAN : PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF
ANTIMICROBIAL COMPOUNDS PRODUCED BY *Bacillus subtilis* K-05. THESIS
ADVISOR : ASSOC.PROF.SONGSRI KULPREECHA , Ph.D.,135 pp.

The production, purification and characterization of the antimicrobial compounds produced by *Bacillus subtilis* strain K-05 has been studied. *B. subtilis* strain K-05 was cultivated in Lauria-Bertani (LB) liquid medium in shake flask and jar fermentor at 30 °C for 60 h with aeration. The supernatant obtained from culture broth exhibited broad spectrum activity against Gram positive and negative bacteria, yeasts and mycelial molds studied. The test organisms were *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichai coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 70014, *Aspergillus oryzae*, *Fusarium* sp. and *Alternaria* sp. Ethyl acetate extract of supernatant and methanol extract of cells could inhibit all test microorganisms. The inhibitory activity of crude extract was higher than that of the supernatant except on *Candida albicans* ATCC 70014. The inhibitory activity of crude extract of supernatant and cells was nearly equal to that of chloramphenicol and nystatin (positive control). Thin layer chromatography (TLC) using methanol: ethyl acetate (5:95) as eluent was used for isolation of the antimicrobial compounds from supernatant and cell extract. Supernatant extract showed 4 spots on TLC plate with R_f values of 0.17, 0.29, 0.61 and 0.75. While the cell extract gave 4 spots at R_f 0.09, 0.21, 0.29 and 0.61. This result indicated that some components in supernatant and cell extract was different. Purification of the antimicrobial compounds from supernatant was investigated due to it was the major portion and some purified compounds with inhibitory activity against some Gram positive bacteria was previously reported. After purification by column chromatography using 20% (v/v) ethyl acetate in hexane as eluent, the brown liquid purified compound was obtained. This compound revealed broad spectrum activity againt all test microorganisms. From the result of chemical analyses by $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, 2D-NMR , IR and MS, it was concluded that the compounds are 2-methyl butanoic acid and 3-methyl butanoic acid with M.W. of 102. So far, there have been no reports on antimicrobial activities and the productions of these two compounds by *Bacillus spp.*

Department Microbiology

Student 's signature.....

Frield of study Industrial Microbiology

Advisor's signature.....

Academic year 2007

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยและวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาอย่างยิ่งจากรองศาสตราจารย์ ดร.ส่งศรี กุลปรีชา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาเป็นที่ปรึกษาและให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนได้ช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ที่กรุณาได้รับเป็นประธานกรรมการสอบและรองศาสตราจารย์ ดร.ประกิตต์สินี สีहनนท์ ที่กรุณาได้รับเป็นกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์และได้ให้ข้อคิดเห็นข้อแนะนำที่ช่วยทำให้การแก้ไขปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม ที่กรุณาได้รับเป็นกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และอนุเคราะห์ในการใช้อุปกรณ์และสารเคมี ตลอดจนคำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ ในงานด้านการวิเคราะห์ทางเคมี รวมทั้งได้ช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณนายจุพล เหลียงสกุล และพี่ๆ เพื่อนๆ ทุกคนที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและมหาวิทยาลัยมหิดลที่ให้คำแนะนำและให้ความช่วยเหลือในการวิเคราะห์ทางเคมี

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนที่ทำให้กำลังใจ ให้ช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการทำวิทยานิพนธ์ด้วยดีตลอดมา

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัวของข้าพเจ้า ซึ่งเป็นกำลังใจและสนับสนุนในการทำวิทยานิพนธ์ตลอดมา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ญ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฎ
บทที่	
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 วารสารปริทัศน์.....	3
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....	43
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	55
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	98
รายการอ้างอิง.....	106
ภาคผนวก ก	117
ภาคผนวก ข.....	120
ภาคผนวก ค.....	134
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	135

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ตัวอย่างเอนไซม์ที่สามารถแสดงผลการยับยั้งจุลินทรีย์เช่นเดียวกับสารต้านจุลชีพ.....	4
2 ประวัติการค้นพบสารต้านจุลชีพชนิดต่าง ๆ	9
3 กลุ่มของจุลินทรีย์ที่สังเคราะห์สารต้านจุลชีพและจำนวนสารปฏิชีวนะที่พบ	11
4 สารต้านจุลชีพที่ผลิตจาก <i>Bacillus</i> สายพันธุ์ต่างๆ.....	13
5 จำนวนกรัม (g) ของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีน.....	29
6 spectrum of activity ของซัพเปดิน JM4-A และ JM4-B.....	36
7 ผลของเอนไซม์ต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารต้านจุลชีพจาก <i>B. amyloliquefaciens</i>	38
8 ผลของอุณหภูมิต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารต้านจุลชีพจาก <i>B. amyloliquefaciens</i>	38
9 ขั้นตอนการทำให้สารต้านจุลชีพจาก <i>B. amyloliquefaciens</i> ให้บริสุทธิ์.....	40
10 การเจริญของ <i>B. subtilis</i> K-05 และการยับยั้ง <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 และ รา <i>Fusarium</i> sp.ของสารต้านจุลชีพเมื่อเลี้ยง <i>B. subtilis</i> K-05 ในขวดทดลอง.....	56
11 การเจริญของ <i>B. subtilis</i> K-05 และการยับยั้ง <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 และ รา <i>Fusarium</i> sp. ของสารต้านจุลชีพเมื่อเลี้ยง <i>B. subtilis</i> K-05 ในถังหมัก.....	57
12 การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารต้านจุลชีพจากส่วนใส สารสกัดจากส่วนใสและ สารสกัดจากเซลล์ที่ผลิตโดย <i>B. subtilis</i> K-05.....	61
13 เปรูเซ็นการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบเปรียบเทียบกับชุดควบคุมบวกโดยสารต้านจุลชีพ จากส่วนใส สารสกัดจากส่วนใสและสารสกัดจากเซลล์ที่ผลิตโดย <i>B. subtilis</i> K-05.....	62
14 การแยกส่วนสาร(fractions)จากสารสกัดหยาบจากส่วนใสของสารต้านจุลชีพที่ผลิต โดย <i>Bacillus subtilis</i> K-05.....	66
15 ค่า Rf ตำแหน่งต่างๆ ของสารสกัดทั้ง 15 ส่วนเมื่อแยกสารบน TLC โดยใช้ระบบ ตัวพาเป็น 5% เมทานอลในเอทิลอะซิเตท	67
16 ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารต้านจุลชีพส่วนที่แยกได้จากคอลัมน์โครมาโท กราฟี.....	69
17 การแยกสารส่วนที่ 4 (F4) ให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีด้วยระบบ เฮกเซน90% ต่อ เอทิลอะซิเตท5% ต่อเมทานอล5%.....	74
18 การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารส่วนที่4 ที่ทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยวิธีคอลัมน์ โครมาโทกราฟีครั้งที่ 2	75

19	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ โดยสารส่วนที่ 4 ที่ทำให้บริสุทธิ์ขึ้น โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีครั้งที่ 2.....	76
20	การยับยั้งต่อจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารส่วน F 13-A และ F13-B.....	81
21	การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของสารส่วน F13-A ที่แยกด้วยเทคนิค HPLC.....	89
22	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของสารส่วน F13-A ที่แยกด้วยเทคนิค HPLC.....	89
23	ตำแหน่งการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสารส่วนที่4.....	93
24	การเปรียบเทียบตำแหน่งของ 2-methyl butanoic acid กับ 3-methyl butanoic acid จากข้อมูลที่ได้จาก $^1\text{H-NMR}$	94
25	การเปรียบเทียบตำแหน่งของ 2-methyl butanoic acid กับ 3-methyl butanoic acid จากข้อมูลที่ได้จาก $^{13}\text{C-NMR}$	94
26	ตำแหน่งของสาร 2-methyl butanoic acid จากข้อมูลที่ได้จาก $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$	95
27	ตำแหน่งของสาร 3-methyl butanoic acid จากข้อมูลที่ได้จาก $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$...	95
28	สารต้านจุลชีพจาก <i>Bacillus</i> สายพันธุ์ต่างๆ ที่มีลักษณะโครงสร้างทางเคมีเป็นสารชนิดอื่นนอกเหนือจากสารประเภทเปปไทด์.....	104

สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
1 โครงสร้างสารต้านจุลชีพที่สังเคราะห์โดย <i>Bacillus</i> spp.....	16
2 โครงสร้างของโนจิรีไมซิน	19
3 โครงสร้างของโมอีโนไมซิน เอ.....	20
4 โครงสร้างของไรฟาไมซิน.....	20
5 โครงสร้างของ cyclo(Leu-Gly).....	21
6 โครงสร้างของ cyclo(L-Leu-L-Pro)	21
7 โครงสร้างของ cyclo(L-Arg-D-Pro).....	21
8 โครงสร้างของคลอแรมเฟนิคอล.....	22
9 โครงสร้างของฟอสโฟไมซิน.....	22
10 ตัวอย่างสารต้านจุลชีพที่มีกลไกการทำงานในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย.....	24
11 ตัวอย่างสารต้านจุลชีพที่มีกลไกการทำงานในการยับยั้งการเจริญของรา.....	25
12 ตัวอย่างสารต้านจุลชีพที่มีกลไกการทำงานในการยับยั้งการเจริญไวรัส.....	25
13 ตัวอย่างสารต้านจุลชีพที่ได้จากกระบวนการกึ่งสังเคราะห์.....	26
14 โครงสร้างของอะมิควาซิน.....	34
15 โครงสร้างของสารต้านจุลชีพ lipopeptide ที่แยกได้จาก <i>Bacillus thuringiensis</i> CMB 26.....	35
16 การศึกษาการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบที่เป็นแบคทีเรียหรือยีสต์ โดยสารต้านจุลชีพที่ได้จาก <i>Bacillus subtilis</i> K-05.....	48
17 การศึกษาการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบที่เป็นราเส้นใยโดยสาร ต้านจุลชีพที่ได้จาก <i>Bacillus subtilis</i> K-05.....	49
18 การบริเวณยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบที่เป็นราเส้นใยโดยสารต้าน จุลชีพที่ได้จาก <i>Bacillus subtilis</i> K-05	49
19 แผนภาพสรุปขั้นตอนการแยกสารต้านจุลชีพที่ผลิตโดย <i>Bacillus subtilis</i> K-05 บริสุทธิ์.....	54
20 กราฟแสดงการเจริญของ <i>B. subtilis</i> K-05 ในอาหาร LB.....	57
21 การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ (<i>B. subtilis</i> ATCC 6633 และ <i>Fusarium</i> sp.) ของสาร ต้านจุลชีพที่ผลิตโดย <i>B. subtilis</i> K-05 เมื่อเลี้ยงในขวดทดลอง.....	58
22 การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารต้านจุลชีพจากส่วนไฮ สารสกัดจากส่วนไฮและ สารสกัดจากเซลล์.....	63

รูปที่	หน้า
23 โครมาโทแกรมจาก TLC โดยระบบตัวพามาแทนอล 5%ในเอทิลอะซิเตท.....	64
24 การแยกสารบน TLC โดยใช้ระบบตัวพามาแทนอล 5% เมทานอลในเอทิลอะซิเตทของ สารสกัดทั้ง 15 ส่วน.....	67
25 ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ โดยสารต้านจุลชีพส่วนที่แยกได้จากคอลัมน์โครมา โทกราฟี.....	70
26 แผนภาพแสดงขั้นตอนการแยกสารบริสุทธิ์ที่ผลิตโดย <i>Bacillus subtilis</i> K05 จากสารสกัดหยาบจากส่วนใส.....	72
27 ลักษณะสารส่วนที่ 4 (F4) จากการแยกสาร โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีครั้งที่ 1.....	73
28 โครมาโทแกรมจาก TLC ของสารส่วนที่ 4 เมื่อตรวจสอบตำแหน่งของสารที่ แยกได้ด้วยระบบเฮกเซน ต่อ 5%เอทิลอะซิเตท ต่อ 5%เมทานอล.....	73
29 แสดงผลการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารส่วนที่ 4 ที่ให้บริสุทธิ์ขึ้น โดย วิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี.....	77
30 ลักษณะสารส่วนที่ 4 (F4-E) จากการแยกสาร โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีครั้งที่ 2.....	79
31 ลักษณะสารส่วนที่ 13 (F13) จากการแยกสาร โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีครั้งที่ 1.....	80
32 การยับยั้งต่อจุลินทรีย์ทดสอบที่เป็นแบคทีเรียของสาร F 13-A และ สาร F13-B.....	82
33 โครมาโทแกรมจาก TLC ของสารส่วน F13-A.....	83
34 โครมาโทแกรมจาก TLC ของสารส่วน F13-A เมื่อตรวจสอบตำแหน่งของสารที่แยก ได้ด้วยระบบต่างๆ.....	84
35 การแยกสารส่วน F13-A โดยใช้ระบบ gradient ตั้งแต่ 0-100%.....	86
36 การแยกสาร F13-A ด้วยระบบ gradient 0-35% 50% 60% 70% และ 100%.....	88
37 ตัวอย่างผลการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของสารส่วน F13-A ที่แยกด้วยเทคนิค HPLC.....	90
38 โครงสร้างทางเคมีของสารส่วนที่ 4.....	92
39 โครงสร้างทางเคมีของสารส่วนที่ 4 (gCOSY)	96
40 โครงสร้างทางเคมีของสารส่วนที่ 4 (gHMBC).....	96
41 ¹ H-NMR และ ¹³ C-NMR spectrum ของ 2 methylbutanoic acid.....	121
42 ¹ H-NMR และ ¹³ C-NMR spectrum ของ 3 methylbutanoic acid.....	122
43 ¹ H-NMR spectrum ของสารส่วนที่ 4 (F4).....	123
44 ¹³ C-NMR spectrum ของสารส่วนที่ 4.....	124
45 COSY spectrum ของสารส่วนที่ 4.....	125
46 HSQC spectrum ของสารส่วนที่ 4.....	126
47 HMQC spectrum ของสารส่วนที่ 4.....	127

รูปที่	หน้า
48. HMBC spectrum ของสารส่วนที่ 4.....	128
49. IR spectrum ของสารส่วนที่ 4.....	129
50. Mass spectrum ของสารส่วนที่ 4.....	130
51. Dept Mass spectrum ของสารส่วนที่ 4.....	131
52. ¹ H-NMR spectrum ของสารส่วนที่ 13 (F13).....	132
53. IR spectrum ของสารส่วนที่ 13.....	133
54. <i>Bacillus subtilis</i> K-05.....	134

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

1. ATCC = American Type Culture Collection
2. pH = ความเป็นกรดต่าง
3. มม = มิลลิเมตร
4. ซม = เซนติเมตร
5. มก = มิลลิกรัม
6. มล = มิลลิลิตร
7. ชม = ชั่วโมง
8. μg = ไมโครกรัม
9. mm = มิลลิกรัม
10. g/l = กรัมต่อลิตร
11. OD_{660} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร
12. OD_{625} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร

บทที่ 1

บทนำ

สารต้านจุลชีพ (antimicrobial substance) หมายถึงสารที่สังเคราะห์ขึ้นจากสิ่งมีชีวิตด้วยกระบวนการทางชีวภาพโดย พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ สารต้านจุลชีพที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ชนิดใดชนิดหนึ่งอาจเป็นแบคทีเรีย รา หรือ แอคติโนมัยซีทจัดเป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ซึ่งสามารถยับยั้ง มีฤทธิ์ทำลายหรือชะลอการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์กลุ่มใดกลุ่มหนึ่งได้โดยใช้ปริมาณเพียงเล็กน้อย (Korzybski และคณะ, 1996) การผลิตสารต้านจุลชีพสามารถจำแนกได้ 3 กลุ่มตามกระบวนการสังเคราะห์คือ สารต้านจุลชีพที่ผลิตได้จากกระบวนการหมัก (biosynthetic process) เช่น เพนนิซิลิน จี กระบวนการกึ่งสังเคราะห์ (semi-synthetic process) เป็นการนำสารที่จุลินทรีย์สังเคราะห์ขึ้นเป็นสารตั้งต้นเพื่อปรับปรุงโครงสร้างให้ได้เป็นสารชนิดอื่นที่มีสมบัติที่ดีขึ้น เช่น การทนต่อกรด การทนต่อเอนไซม์ หรือเพิ่มความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ได้มากขึ้น โดยตัวอย่างสารต้านจุลชีพที่ผลิตโดยกระบวนการนี้ เช่น อนุพันธ์ของเพนนิซิลิน ได้แก่ แอมพิซิลลิน (ampicillin) แอมมอกซิซิลลิน (amoxicillin) และออกซาซิลลิน (oxacillin) และสารต้านจุลชีพบางชนิดสามารถสังเคราะห์ได้ด้วยกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี (synthetic process) เช่น คลอแรมเฟนิคอล (chloramphenicol) ไพโรลไนทริน (pyrrolitrin) และฟอสโฟไมซิน (phosphomycin) เป็นต้น (Sneider W., 2005)

สารต้านจุลชีพจัดเป็นสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นในช่วงปลายของการเจริญโดยจุลินทรีย์บางกลุ่มซึ่งเป็นช่วงที่จุลินทรีย์เริ่มหยุดการเพิ่มจำนวน สารปฏิชีวนะที่ถูกสร้างขึ้นในช่วงนี้อาจสร้างขึ้นเพื่อยับยั้งการสังเคราะห์สารโมเลกุลใหญ่ในเซลล์จึงเป็นการช่วยรักษาพลังงานบางส่วนไว้ได้ หรืออาจสร้างขึ้นเมื่อต้องอยู่ร่วมกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ในสภาวะที่มีการแย่งสารอาหาร (สมใจ สิริโชค, 2547) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่าจุลินทรีย์ผลิตสารเหล่านี้เพื่อประโยชน์บางประการ (Demain และ Fang, 2000) เช่น 1) ใช้ป้องกันตัวเองจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น พืช แมลง และสัตว์ 2) มีประโยชน์ต่อสิ่งมีชีวิตที่จุลินทรีย์อาศัยแบบพึ่งพา (symbiosis) 3) เป็นฮอร์โมน และ 4) เป็นสารที่ช่วยในการขนส่งโลหะ เป็นต้น จุลินทรีย์ที่สังเคราะห์สารต้านจุลชีพมีกลไกที่ป้องกันตัวเองจากสารนั้น โดยวิธีดังต่อไปนี้ 1) การลดความเป็นพิษ (detoxification) โดยทำให้สารต้านจุลชีพอยู่ในรูปของเอนไซม์คือสามารถกระตุ้นให้ทำงานหรือยับยั้งการทำงานได้ 2) เปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์ที่เป็นเป้าหมายของสารต้านจุลชีพ และ 3) สร้างและปล่อยออกภายนอกเซลล์ จากนั้นลดอัตราการแพร่ของสารเข้าสู่เซลล์ (Demain, 1974 อ้างถึงใน Martin และ Demain, 1980)

มูลเหตุจูงใจในการวิจัย

จากการใช้สารต้านจุลชีพอย่างกว้างขวางมาเป็นเวลานานแต่เนื่องจากในปัจจุบันมีโรคต่างๆ เกิดขึ้นใหม่มากมายและพบว่าจุลินทรีย์ก่อโรคสามารถต้านทานต่อยาต้านจุลชีพ (antimicrobial resistance) หรือมีการดื้อยา (drug resistance) ซึ่งสาเหตุที่ทำให้จุลชีพดื้อยา คือการใช้สารปฏิชีวนะ ผิดวิธี หรืออาจเกิดจากการถ่ายโอนยีนดื้อยาระหว่างจุลชีพก่อโรคทำให้เชื้อโรคมีการพัฒนาและต้านทานต่อสารต้านจุลชีพได้ นอกจากนี้สารต้านจุลชีพบางชนิดมีผลข้างเคียง (side effect) ต่อผู้ใช้งาน ดังนั้นจึงเป็นเหตุผลสำคัญที่ต้องมีการพัฒนาและค้นหาสารต้านจุลชีพชนิดใหม่ ๆ

งานวิจัยนี้มุ่งที่จะศึกษาสารต้านจุลชีพที่สร้างจาก *Bacillus subtilis* K-05 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีรายงานว่าสามารถสร้างสารต้านจุลชีพที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้หลายชนิด โดยพบว่าสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ และ ราเส้นใย จากการศึกษาเบื้องต้นด้วยวิธี cross streak เมื่อทำให้สารบริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีและศึกษาลักษณะสมบัติสารพบว่าสารดังกล่าวคือ โพรลีนและลิวซีน (cyclo(Pro-Leu)) และ โพรลีนและวาเลิน (cyclo(Pro-Val)) โดยสารทั้ง 2 ชนิด มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ (สุภารัตน์ บุญยง, 2548) นอกจากนี้ยังมีสารต้านจุลชีพส่วนอื่นที่ยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์และศึกษาลักษณะสมบัติสาร ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาสารต้านจุลชีพที่สร้างจาก *Bacillus subtilis* K-05 ในส่วนอื่นๆ ที่ยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์ ศึกษาลักษณะสมบัติสารด้วยการวิเคราะห์ทางเคมีและศึกษาฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ของสารต้านจุลชีพซึ่งอาจมีความเป็นไปได้ที่จะได้สารต้านจุลชีพชนิดใหม่เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคต่อไป

วัตถุประสงค์

ผลิตสารต้านจุลชีพจาก *Bacillus subtilis* K-05 ทำให้บริสุทธิ์และศึกษาลักษณะสมบัติของสารต้านจุลชีพ

ขั้นตอนการวิจัย

1. ผลิตสารต้านจุลชีพจาก *Bacillus subtilis* K-05 และศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ (antimicrobial activity) ของสารต้านจุลชีพ
2. ทำให้สารต้านจุลชีพบริสุทธิ์
3. การศึกษาลักษณะสมบัติของสารต้านจุลชีพ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัยนี้

ทราบถึงชนิด สมบัติและประสิทธิภาพของสารต้านจุลชีพที่สังเคราะห์โดยแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* K-05 ซึ่งอาจจะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอนาคตได้

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

ในกระบวนการตามธรรมชาติเมื่อจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะการเจริญที่ไม่ปกติ เช่น สภาวะการขาดสารอาหาร การทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ และเจริญสภาวะปฏิบัติ จุลินทรีย์บางชนิดจะสร้างสารบางอย่างเพื่อให้สามารถทนหรืออยู่รอดในสภาวะนั้นๆ ได้ โดยเฉพาะการสร้างสารในสภาวะปฏิบัติที่มีการแข่งขัน จุลินทรีย์จะสร้างสารเพื่อยับยั้งการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ชนิดนั้นเองหรือจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ การต้านการเจริญของจุลินทรีย์สังเกตได้โดย “การเกิดแอนตาโกนิสม” (antagonism) ของจุลินทรีย์ 2 ชนิดหรือโดยการทดสอบสารที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นซึ่งคาดว่าจะมีผลยับยั้งการเจริญแก่จุลินทรีย์ทดสอบด้วยกระบวนการทางชีววิธี (bioassay) โดยสารที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นในสภาวะการเจริญดังกล่าวสามารถจัดจำแนกได้หลายแบบ (Jack และคณะ, 1995 อ้างถึงใน นิโบล พรหมประสิทธิ์, 2542) ดังนี้

1. สารพิษ (toxins)
2. เอนไซม์ที่สลายแบคทีเรีย (bacteriolytic enzymes)
3. แบคทีเรียโอฟาจและแบคทีเรียโอฟาจที่ไม่สมบูรณ์ (bacteriophages and defective bacteriophages)
4. สารที่เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึม (by-products of primary metabolic pathways)
5. สารปฏิชีวนะ (antibiotic substances)
6. แบคทีเรียโอซิน และสารคล้ายแบคทีเรียโอซิน (bacteriocins and bacteriocin-like agents)

1. สารพิษ (toxins)

สารในกลุ่มนี้ที่สร้างจากจุลินทรีย์จะทำให้เชื้อจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ มีความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคมายิ่งขึ้น สารพิษที่สร้างขึ้นแล้วมีการปล่อยออกนอกเซลล์เรียกว่า เอกโซทอกซิน (exotoxin) หรือถ้าสร้างแล้วอยู่ภายในเซลล์เรียกว่า เอนโดทอกซิน (endotoxin) ซึ่งเอกโซทอกซินจะมีความเป็นพิษสูงกว่า โดยสารกลุ่มนี้จะมีพิษต่อเซลล์พวกยูคาริโอต (eukaryotic cells) และสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นๆ ได้แม้ใช้ปริมาณเพียงเล็กน้อยด้วยลักษณะโครงสร้างของโมเลกุลที่มีโครงสร้างหลัก (domain structure) คล้ายกับแบคทีเรียโอซินและมีโครงสร้างส่วนที่ก่อให้เกิดพิษกับเซลล์พวกยูคาริโอต ตัวอย่างสารพิษเหล่านี้ เช่น diphtheriatoxins, tetanus toxins, cholera toxins, enterotoxins, cytotoxins และเมื่อสารที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน (partial

purifications) ของแบคทีริโอซินที่สร้างจาก *E. coli* และ *Streptococcus pyogenes* ซึ่งมีรายงานในการก่อให้เกิดพิษกับเซลล์พวุกยูคาริโอต (Farkas-Himsley และคณะ, 1992)

2. เอนไซม์ที่สลายแบคทีเรีย (bacteriolytic enzymes)

เอนไซม์ที่ผลิตได้โดยจุลินทรีย์บางชนิดสามารถทำลายจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ได้โดยสามารถแสดงผลการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบได้เช่นเดียวกับสารต้านจุลชีพ จากการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งของเอนไซม์ต่อจุลินทรีย์ทดสอบพบว่า เอนไซม์กลุ่มนี้สามารถย่อยสลายผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ทดสอบได้ (Gilmore และคณะ (1991); Venema และคณะ (1993); Wichitra และคณะ (2006)) ตัวอย่างเอนไซม์เหล่านี้แสดงไว้ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ตัวอย่างเอนไซม์ที่สามารถแสดงผลการยับยั้งจุลินทรีย์เช่นเดียวกับสารต้านจุลชีพ

เอนไซม์	จุลินทรีย์ผู้ผลิต
Lysostaphin	<i>Staphylococcus aureus</i>
Lysozyme	<i>Staphylococcus aureus</i>
Hemolysins	<i>Enterococcus faecalis</i>
Phospholipase A	<i>Lactococcus lactis</i>
β -1,3-glucanase	<i>Bacillus subtilis</i> NSRS 89-24

3. แบคทีริโอฟาจและแบคทีริโอฟาจที่ไม่สมบูรณ์ (Bacteriophages and defective bacteriophages)

การยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ของแบคทีริโอฟาจเกิดขึ้นได้โดยแบคทีริโอฟาจจะเข้าไปเจริญในเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบไม่สามารถเจริญได้ ความแตกต่างของฟาจกับสารต้านจุลชีพชนิดอื่นๆ อาจแสดงได้โดยการเกิดพลาแก (plaques) เมื่อเพิ่มการเจือจางของส่วนใส (supernatants) ที่นำมาทดสอบการยับยั้งบนอาหารแข็งที่มีเชื้อทดสอบอยู่ นอกจากนี้ยังพบว่า แบคทีริโอฟาจมีความต้านทานอย่างมากต่อทริปซิน (trypsin)

4. สารที่เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึม (By-products of metabolic pathways)

ในกระบวนการเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์พบว่า อาจมีการสร้างสารบางชนิดที่ให้ผลยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ได้ เช่น lactic acid free fatty acids ammonia และ hydrogen peroxide (Rogula และ Carr, 1972; Malke และคณะ, 1974)

5. สารปฏิชีวนะ (antibiotic substances)

สารปฏิชีวนะ หมายถึง สารที่สังเคราะห์ขึ้นจากสิ่งมีชีวิตด้วยกระบวนการทางชีวภาพโดยพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ซึ่งสารกลุ่มนี้สามารถยับยั้ง มีฤทธิ์ทำลายหรือชะลอการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์กลุ่มใดกลุ่มหนึ่งได้โดยใช้ปริมาณเพียงเล็กน้อย การสังเคราะห์สารปฏิชีวนะเกิดขึ้นโดยการทำงานของกลุ่มเอนไซม์ (multienzyme complexes) ลักษณะของสารปฏิชีวนะที่ดีและเหมาะสมต่อการประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ มีดังนี้

- 1.สามารถทำลายหรือมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้หลายชนิดหรือมีขอบข่ายการออกฤทธิ์กว้าง (broad spectrum)
- 2.ไม่ทำให้จุลินทรีย์ที่ก่อโรคเกิดการต้านทานต่อยาหรือเกิดการผ่าเหล่า
- 3.ไม่ทำให้เกิดผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ต่อโฮสต์ เช่น ไม่ทำให้เกิดอาการแพ้ยาหรือเกิดการระคายเคืองกับระบบทางเดินอาหารหรือไต และไม่ทำอันตรายต่อระบบประสาท เป็นต้น
- 4.ไม่มีผลทำลายจุลินทรีย์ที่มีอยู่ตามปกติในร่างกายของโฮสต์ เพราะจะทำให้เสียสมดุลตามธรรมชาติ ซึ่งอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการติดเชื้อจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ และสามารถก่อโรคได้

6. แบคทีริโอซิน และสารคล้ายแบคทีริโอซิน (bacteriocins and bacteriocin-like agents)

แบคทีริโอซินและสารคล้ายแบคทีริโอซิน คือ สารที่ผลิตได้จากแบคทีเรียซึ่งมีการสังเคราะห์ได้โดยตรงด้วยกระบวนการสังเคราะห์พอลิเพปไทด์ผ่านทางไรโบโซม (ribosomally synthesized polypeptides) แบคทีริโอซินและสารคล้ายแบคทีริโอซินสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มตามองค์ประกอบของโครงสร้างของสาร คือ 1) lanthiiotics โดยมีโครงสร้างของกรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบ 2) cystibiotics โดยมีโครงสร้างสารประกอบด้วยพันธะซัลไฟด์หนึ่งหรือสองพันธะซึ่งมีความสำคัญต่อการมีฤทธิ์ยับยั้งของสารในกลุ่มนี้ และ 3) triolbiotics โดยมีโครงสร้างสารประกอบด้วย active -SH group (Jack และคณะ, 1995)

ในระยะแรกที่มีการศึกษาสารในกลุ่มนี้จะเป็นการศึกษาแบคทีริโอซินที่สังเคราะห์ได้จากแบคทีเรียแกรมลบในกลุ่ม *Enterobacteriaceae* (อาจจะเป็น *E.coli*) ซึ่งสามารถอธิบายลักษณะสมบัติของแบคทีริโอซินโดยอาศัยสาร colicins เป็นต้นแบบ (model) ในการศึกษา (Tagg และคณะ, 1976 อ้างถึงใน นิโบล พรหมประสิทธิ์, 2542)

ลักษณะสมบัติของแบคทีริโอซินที่สังเคราะห์ได้จากแบคทีเรียแกรมลบมีดังนี้

1. มักแสดงฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพซึ่งจะมีขอบข่ายการออกฤทธิ์ในวงแคบกับจุลินทรีย์ทดสอบเพียงไม่กี่ชนิด โดยจุลินทรีย์ทดสอบนั้นจะเป็นชนิดที่ใกล้เคียงกับจุลินทรีย์ผู้ผลิตที่สร้างแบคทีริโอซิน
2. มีองค์ประกอบหลักในโมเลกุลเป็น โปรตีน

3. การยับยั้งแบคทีเรียจะมีกระบวนการยับยั้งด้วยการทำให้ตาย (bactericidal mode of action) โดยมีกลไกการทำงานได้ 2 แบบ คือ
 - ทำให้เกิด ion channels บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งเป็นผลทำให้คุณสมบัติการเป็นเยื่อเลือกผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์เสียไป ส่งผลให้เซลล์เสียความสามารถในการยอมให้สารผ่านเข้าออก (permeability)
 - แสดงความสามารถในการสลายกรดนิวคลีอิก (nuclease activity)
4. แบคทีเรียโอซินและสารคล้ายแบคทีเรียโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแกรมลบจะจับกับเซลล์จุลินทรีย์ที่ทดสอบในบริเวณที่จำเพาะ (specific cell receptors)
5. พันธุกรรมการสร้างของแบคทีเรียโอซินและสารคล้ายแบคทีเรียโอซินจากแบคทีเรียแกรมลบสังเคราะห์จากสารพันธุกรรมที่อยู่ในพลาสมิด (plasmid-borne genetic determinants)
6. ระยะเวลาในการสังเคราะห์แบคทีเรียโอซินและสารคล้ายแบคทีเรียโอซินในแบคทีเรียแกรมลบส่วนมากจะมีการสังเคราะห์ขึ้นในระยะที่เซลล์กำลังจะตาย

นอกจากแบคทีเรียแกรมลบบางชนิดจะสามารถสร้างแบคทีเรียโอซินได้แล้ว แบคทีเรียแกรมบวกบางชนิดก็สามารถสร้างแบคทีเรียโอซินหรือสารคล้ายได้เช่นเดียวกัน แบคทีเรียโอซินและสารคล้ายที่สร้างจากแบคทีเรียแกรมบวกมีลักษณะสมบัติดังนี้

1. แบคทีเรียโอซินและสารคล้ายแบคทีเรียโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิดสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทดสอบได้หลายชนิดไม่เฉพาะแต่ในกลุ่มของจุลินทรีย์แกรมบวกด้วยกันเท่านั้น แต่ยังสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบบางชนิดได้อีกด้วย เช่น nisin ที่ผลิตโดย *Lactococcus lactis* (Kalchayanand, Hanlin และ Ray, 1992)
2. มีองค์ประกอบหลักในโมเลกุลเป็นโปรตีนหรือเปปไทด์และมีโครงสร้างขององค์ประกอบที่มีความหลากหลายซึ่งเป็นผลให้สารกลุ่มนี้มีโครงสร้างได้หลายแบบ แบคทีเรียโอซินและสารคล้ายแบคทีเรียโอซินบางชนิดมีส่วนประกอบเพิ่มเติมของคาร์โบไฮเดรตหรือไขมัน เช่น Plantaricins S และ T ที่มีไขมันอยู่ในโมเลกุล (Jimenez-Diaz และคณะ, 1993) และแบคทีเรียโอซินที่ได้จาก *Leuconostoc paramesenteroides* ที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบในโมเลกุล แบคทีเรียโอซินบางชนิดที่มีมวลโมเลกุลมากอาจประกอบไปด้วยหน่วยย่อยของแบคทีเรียโอซินที่มีมวลโมเลกุลน้อย เช่น Staphylococcin 1580 บางครั้งอาจพบแบคทีเรียโอซินและสารคล้ายแบคทีเรียโอซินที่มีขนาดเล็ก เช่น พวก lantibiotics และ cerein เป็นต้น
3. การออกฤทธิ์ในการฆ่าแบคทีเรียของแบคทีเรียโอซินและสารคล้ายแบคทีเรียโอซินที่สร้างโดยแบคทีเรียแกรมบวก มีกลไกการยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นๆ คล้ายแบคทีเรียโอซิน

ที่สร้างโดยแบคทีเรียแกรมลบกล่าวคือ มีผลทำให้คุณสมบัติการเป็นเชื้อเลือกผ่านของเชื้อหุ้มเซลล์เสียไป ซึ่งส่งผลให้เซลล์เสียความสามารถในการยอมให้สารผ่านเข้าออก (permeability) นอกจากนี้สารกลุ่มดังกล่าวยังมีผลต่อการทำลายสารพันธุกรรมของจุลินทรีย์ทดสอบอีกด้วย และโดยทั่วไปพบว่าแบคทีเรียโอซินที่มีมวลโมเลกุลน้อยจะมีผลยับยั้งต่อจุลินทรีย์ทดสอบได้ดีโดยการทำให้เสียความสามารถในการผ่านเข้าออกของเซลล์ (Bruno และ Montville, 1993; Klaenhammer, 1993)

4. สำหรับแบคทีเรียโอซินและสารคล้ายแบคทีเรียโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแกรมลบจะกับเซลล์ของจุลินทรีย์ทดสอบในบริเวณจำเพาะที่เชื่อมชั้นนอกเป็นขั้นแรกของการปฏิสัมพันธ์ของแบคทีเรียโอซิน แต่แบคทีเรียโอซินและสารคล้ายแบคทีเรียโอซินที่สร้างโดยแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิดจะแสดงความจำเพาะในการจับในลักษณะเช่นนี้น้อยมาก (Yang และ คณะ, 1992)
5. พันธุกรรมการสร้างของแบคทีเรียโอซินจากแบคทีเรียแกรมบวก มีรายงานว่าแบคทีเรียโอซินหลายชนิด สร้างขึ้นจากรหัสพันธุกรรมที่อยู่บนพลาสมิด เช่นเดียวกับแบคทีเรียแกรมลบ (Klaenhammer, 1993)
6. ระยะเวลาในการสังเคราะห์แบคทีเรียโอซินและสารคล้ายแบคทีเรียโอซินในแบคทีเรียแกรมบวกส่วนมากจะมีการสังเคราะห์อยู่ในช่วงระยะการเจริญเต็มที่ (Klaenhammer, 1993)

ตัวอย่างของแบคทีเรียโอซินและสารคล้ายแบคทีเรียโอซินที่ผลิตได้เช่น ซับทีลิน (subtilin) ซึ่งมีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง สารดังกล่าวคือ lanthibiotic ที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis* ATCC 6633 มีโครงสร้างและกลไกการออกฤทธิ์เหมือนไนซิน (nisin) ซึ่งเป็นสารที่มีการอนุญาตให้ใช้ได้ในการบวนการถนอมอาหาร สำหรับแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* สายพันธุ์อื่นๆ ที่มีรายงานว่าสามารถสร้างแบคทีเรียโอซินและสารคล้ายแบคทีเรียโอซินได้ คือ *B.thuringiensis* *B.subtilis* *B.sterarothermophilus* *B.licheniformis* *B.megaterium* และ *B.cereus* (He และคณะ, 2006)

ประวัติการค้นพบสารต้านจุลชีพ

สารต้านจุลชีพจัดเป็นสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นในช่วงปลายของการเจริญ (last log phase) และเริ่มเข้าสู่ระยะพัก (stationary phase) ซึ่งสารต้านจุลชีพที่สร้างขึ้นมีความสัมพันธ์กับกลไกการทำงานบางอย่างของจุลินทรีย์ ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับกระบวนการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ เช่น การเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ปกติ (vegetative cell) ไปเป็นเซลล์สืบพันธุ์ (reproductive cell) หรือ สปอร์ โดยมีรายงานว่ามีการสร้างสารต้านจุลชีพหลายชนิดที่ถูกสร้างขึ้นไปพร้อมๆ กับการสร้างสปอร์ (Katz และ Demain, 1977) หรือมักเกิดขึ้นในสถานะที่มีการขาดแคลนอาหาร (Marahiel และคณะ, 1993) และมีกลไกการควบคุมกระบวนการสังเคราะห์ค่อนข้างซับซ้อนไม่ว่าจะเป็นการชักนำกระบวนการสร้าง (Induction) การควบคุมคาตาบอไลต์ (catabolite repression) และการถูกควบคุมโดยผลลัพท์ (Feedback regulation)

การค้นพบสารต้านจุลชีพมีรายงานตั้งแต่ในปี ค.ศ. 1929 อเล็กซานเดอร์ เฟลมมิง ได้พบการปนเปื้อนของรา *Penicillium notatum* ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* และเมื่อนำไปศึกษาพบว่าเกิดจากสารชนิดหนึ่งที่ละลายน้ำได้ไม่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต สามารถสกัดออกมาทำให้เข้มข้นได้ จึงเรียกสารนี้ว่า เพนนิซิลิน (penicillin) ตามชื่อของรา และเมื่อนำมารักษาอาการติดเชื้อพบว่าสามารถนำมาใช้เป็นยารักษาโรคได้ (Fleming, 1945) ดังนั้นเพนนิซิลินจึงเป็นยาปฏิชีวนะชนิดแรกที่มีการค้นพบ

ต่อมา Dubos (1939a) นักจุลชีววิทยาชาวอเมริกันแยกจุลินทรีย์ในดิน พบว่ามีจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยแคปซูลของแบคทีเรีย *Pneumococcus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคปอดบวมได้ และพบว่า *Bacillus brevis* สามารถสังเคราะห์ไทโรทริน (tyrothricin) ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียหลายชนิด (Dubos, 1939b)

ในปี 1939-1940 Chain และคณะ (1946) สกัดเพนนิซิลินจากอาหารเห็ด โดยใช้ตัวทำลายอินทรีย์ ทำให้สามารถเตรียมเกลือเพนนิซิลินในรูปแบบผงแห้งได้โดยที่ยังคงความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้สำเร็จเป็นครั้งแรก

ในปี 1944 Selman Waksman (1952) นักจุลชีววิทยาชาวอเมริกันสามารถแยกสเตรปโตไมซิน (streptomycin) และสารปฏิชีวนะอื่นๆ จาก *Streptomyces griseus*

ประวัติการค้นพบสารต้านจุลชีพชนิดอื่นๆ แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ประวัติการค้นพบสารต้านจุลชีพชนิดต่าง ๆ (Mark S. Butter และคณะ, 2006 และ Rai University, 2006)

ชนิดของสารปฏิชีวนะ	จุลินทรีย์ผู้ผลิต	การยับยั้งจุลินทรีย์	ผู้ค้นพบ
เพนนิซิลิน	<i>Penicillium notatum</i>	ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก	Flemming (1929)
กรีซีโอฟุลวิน (griseofulvin)	<i>Penicillium griseofulvum</i>	ยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอของราเส้นใย	Roistric (1939)
แกรมิซิดิน (gramicidin)	<i>Bacillus brevis</i>	ทำลายผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียโดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก	Ren Dubos (1939)
ไทโรซิดิน (tyrocidin)	<i>Bacillus brevis</i>	ทำลายผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียโดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก	Ren Dubos (1939)
สเตรปโตไมซิน	<i>Streptomyces griseus</i>	ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของแบคทีเรียแกรมลบ กลุ่มซัลโมเนลลา และ <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Waksman (1944)
แบคซิทรากิน (bacitracin)	<i>Bacillus subtilis</i>	ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ	Meleney (1945)
คลอแรมเฟนิคอล (chloramphenicol)	<i>Streptomyces venezue/ae</i>	ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ และ <i>Rickettsia</i> บางชนิด	Burkholder (1947)
โพลีไมซิน (polymyxin)	<i>Bacillus polymyxa</i>	ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ	Brown และ Brownlee (1947)
เซฟาโรสปอริน (cephalosporin)	<i>Cephalosporium brotzu</i>	ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ	Florey (1948)
คลอโรเตตราไซคลิน (chlorotetracycline)	<i>Streptomyces aureofaciells</i>	ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ	Duggar

ตารางที่ 2 (ต่อ) ประวัติการค้นพบสารต้านจุลชีพชนิดต่าง ๆ (Mark S. Butter และคณะ, 2006 และ Rai University, 2006)

ชนิดของสารปฏิชีวนะ	จุลินทรีย์ผู้ผลิต	การยับยั้งจุลินทรีย์	ผู้ค้นพบ
นีโอไมซิน (neomycin)	<i>Streptomyces fradiae</i>	ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของแบคทีเรีย	Waksman (1949)
ออกซีเตตราไซคลิน (oxytetracycline)	<i>Streptomyces rimosus</i>	ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของแบคทีเรียแกรมบวกและริกเกตเซีย	Findley (1950)
นีสแตติน (nystatin)	<i>Streptomyces noursei</i>	ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของยีสต์และราเส้นใย	Hazen และ Brown (1950)
อีริโทรไมซิน (erythromycin)	<i>Streptomyces erythreus</i>	ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของแบคทีเรียแกรมบวก <i>Rickettsia</i> บางชนิดและไวรัสบางชนิด	Mcquire และ Tanner (1952)
โนโวไบโอซิน (novobiocin)	<i>Streptomyces spheroides</i> <i>Streptomyces lliveus</i>	ยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบบางชนิด	Welch (1955)
ไซโคลเซอรีน (cycloserine)	<i>Streptomyces garyphatus</i>	ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรีย	Welch (1955)
แวนโคไมซิน (vancomycin)	<i>Streptomyces orientalis</i>	ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรีย	Mccomick (1956)
แอมโฟเทอริซิน (amphotericin)	<i>Streptomyces nodosus</i>	ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของยีสต์ ราและเซลล์สัตว์	Gold (1956)
กานาไมซิน (kanamycin)	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของแบคทีเรีย	Umezawa (1957)
กรดฟูซิดิก (fusidic acid)	<i>Fusidium coccilleum</i>	ยับยั้งแบคทีเรีย และ <i>Staphylococcus</i> spp. ที่คือยาเพนนิซิลิน	- (1962)
เจนตาไมซิน (gentamicin)	<i>Micromonospora purpurea</i>	แบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบบางชนิด	Black (1963)

จุลินทรีย์ที่สังเคราะห์สารด้านจุลชีพ

มีรายงานการศึกษาสารด้านจุลชีพจากจุลินทรีย์ในกลุ่มต่างๆ ที่สามารถผลิตสารด้านจุลชีพที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ได้ โดยมีการรายงานมีทั้งในกลุ่มของแบคทีเรีย เช่น *Bacillus* *Actinomycetes* *Streptomyces* และรา เช่น ราในกลุ่ม *Aspergillaceae* และ *Moniliales* เป็นต้น (Korzybski และคณะ, 1996) ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 กลุ่มของจุลินทรีย์ที่สังเคราะห์สารด้านจุลชีพและจำนวนสารปฏิชีวนะที่พบ (Berdy , 1985 อ้างถึงใน George Wong, 2003)

กลุ่มของจุลินทรีย์	จำนวนของสารปฏิชีวนะ
แบคทีเรีย และ Actinomycetes บางชนิด	950
Actinomycetes	4600
ราเส้นใย	1600

Bacillus เป็นแบคทีเรียสกุลหนึ่งที่น่าสนใจในการนำมาศึกษาเกี่ยวกับการสร้างสารด้านจุลชีพเพราะสามารถสร้างสารด้านจุลชีพ และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลายชนิด (Wu และคณะ, 2005) *Bacillus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปทรงกระบอก มีสปอร์ภายในเซลล์ เป็นจุลชีพที่มีความสำคัญทั้งในด้านที่มีประโยชน์และด้านที่เป็นโทษ กล่าวคือ *Bacillus* บางสายพันธุ์สามารถสร้างสารด้านจุลชีพที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ได้ดี สร้างสารที่ช่วยให้พืชเติบโตได้ดี และบางสายพันธุ์เป็นจุลินทรีย์ก่อโรค เป็นต้น *Bacillus* เป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปสิ่งแวดล้อม แต่มักพบในดิน (Claus and Berkeley, 1986) โดยพบประมาณ 6×10^8 เซลล์ต่อดินหนึ่งกรัม หรือคิดเป็น 5% ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งจำนวนแบคทีเรียขึ้นอยู่กับฤดูกาล ชนิดของดิน ปริมาณความชื้น ระดับความลึกของดินและปริมาณออกซิเจน (Kilian และคณะ, 2006) *Bacillus* หลายชนิดสามารถสังเคราะห์สารที่มีประโยชน์และนำไปใช้มากมาย ได้แก่ เอนไซม์ เช่น ซีรีนโปรตีเอส (serine protease) (Rao และคณะ, 1998) อะไมเลส (amylase) (Pandey และคณะ, 2000) สารด้านจุลชีพ เช่น บาซิลทรานซิน อิทธิริน (Cho และคณะ, 2003) และสารด้านจุลชีพอื่น ๆ เมทาบอลิต์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการเกษตร เช่น กำจัดแมลงโดยสารพิษบีที (BT toxin) จาก *Bacillus thuringiensis* (Schnepf และคณะ, 1998) และสารที่ใช้ในอุตสาหกรรม (Turnbull และคณะ, 1990) เช่น เพียวรีนนิวคลีโอไทด์ (purine nucleotide) เพื่อแต่งกลิ่นรส (Saure และคณะ, 1998) ไรโบฟลาวิน (riboflavin) หรือวิตามินบี2 เพื่อเพิ่มวิตามินในอาหารบางประเภท (Stahlmaan และคณะ, 2000) เป็นต้น

สารต้านจุลชีพที่ได้จาก *Bacillus* มักเป็นสารประเภทเปปไทด์ ซึ่งมีกระบวนการสังเคราะห์ 2 แบบ ได้แก่ Ribosomal synthesis และ Nonribosomal synthesis (Wu และคณะ, 2005)

1. Ribosomal synthesis ในปี 1992 Kolter และ Moreno รายงานว่าสารปฏิชีวนะกลุ่มเพปไทด์ ที่มีกลไกการสังเคราะห์แบบ Ribosomal synthesis กระบวนการสังเคราะห์จะคล้ายคลึงกับการสังเคราะห์สายเพปไทด์ทั่วไป โดยเริ่มจากกรดอะมิโนจะถูกกระตุ้นให้จับกับ tRNA โดย Aminoacyl-tRNA synthetase จากนั้น tRNA ที่จับอยู่กับกรดอะมิโนจะเคลื่อนย้ายไปยัง Ribosome ตามลำดับที่อ่านจาก mRNA กรดอะมิโนที่ถูกนำพาไปจะเชื่อมต่อกันเป็น Prepeptide และจะมีการเปลี่ยนแปลง (Modify) โครงสร้างบนสายเพปไทด์โดยกรดอะมิโนบางชนิด เช่น Serine หรือ Threonine ซึ่งจะเกิดการสูญเสียน้ำแล้วได้เป็น Dehydroalanine และ Dehydrobutyrine ตามลำดับ จากนั้นจะเกิดการสร้าง Thioester linkage ระหว่างกรดอะมิโนที่ Dehydrate กับ Cysteine residue ทำให้ได้เป็นกรดอะมิโนที่ไม่ปกติ (Unusual amino acid) คือ สารปฏิชีวนะที่มีกระบวนการสังเคราะห์เช่นนี้สามารถแบ่งได้ 2 กลุ่ม ได้แก่

1. Linear shaped lantibiotic ได้แก่ Nisin และ Subtilin
2. Globular shaped lantibiotic ได้แก่ Cinnamycin และ gallidermin

2. Nonribosomal synthesis

การสังเคราะห์แบบนี้ มีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า Thiotemplate Multienzyme Mechanism (Preechaborisutkul, 1994) เป็นกลไกที่ถูกเร่งโดยระบบ Multienzyme complex โดยเริ่มจากกรดอะมิโนถูกกระตุ้นโดย ATP ได้เป็น Aminoacyl-adenylate และถูกเคลื่อนย้ายไปยัง Thio group ที่อยู่บน Enzyme Domain หลังจากนั้น Enzyme domain จะเกิดการเชื่อมต่อกันกับกรดอะมิโนด้วย Thioester linkages (S) จากนั้นจะเกิดกระบวนการ Transpeptidation โดยโคแฟกเตอร์ที่ชื่อว่า PAN ซึ่งจับอยู่บน Enzyme subunit ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์เป็นสายเพปไทด์ สายเพปไทด์ที่เกิดขึ้นนี้ จะมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างแตกต่างไปจากที่พบในการสังเคราะห์แบบ Ribosomal synthesis กล่าวคือ กระบวนการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจะเกิดการ Methylation ของกรดอะมิโน เป็นต้น สารปฏิชีวนะที่มีกระบวนการสร้างเช่นนี้แบ่งออกเป็น 4 กลุ่มคือ

1. Linear peptide ได้แก่ Evidine และ Linear Gramicidin
2. Cyclopeptide หรือ Cyclic oligopeptide ได้แก่ Tyrothycin และ Gramicidin S
3. Branched cyclopeptide ได้แก่ Bacitracin และ Polymyxin
4. Cyclic lipopeptide ได้แก่ Surfactin

ตารางที่ 4 สารต้านจุลชีพที่ผลิตจาก *Bacillus* สายพันธุ์ต่าง ๆ (Katz และ Demain, 1977 ; Zuber, Nakano และ Marahiel, 1993; Mannanov และ Sattarova, 2001; Stein, 2005)

จุลินทรีย์ผู้ผลิต	สารต้านจุลชีพ	โครงสร้าง	การยับยั้งจุลินทรีย์
<i>Bacillus brevis</i>	Gramicidin S	cyclic peptide	แบคทีเรีย
	Tyrocidine	cyclic peptide	แบคทีเรีย
	Linear gramicidin	polypeptide	แบคทีเรีย
	Brevin	peptide	แบคทีเรีย
	Edeine	peptide	ราเส้นใย
	Eseine	peptide	แบคทีเรีย
	Bresseine	peptide	แบคทีเรีย
	Brevistin	acyclic peptidolactone	แบคทีเรีย
<i>Bacillus subtilis</i>	Mycobacillin	peptide	ราเส้นใยและยีสต์
	Subtilin	peptide	ราเส้นใย
	Bacilysin	dipeptide	แบคทีเรียและรา
	Bacillomycin	cyclic peptide	ราเส้นใย
	Fungistatin	cyclic peptide	ราเส้นใยและยีสต์
	Agrasstatine	cyclic peptide	แบคทีเรีย
	Bacillin	peptide	แบคทีเรีย
	Subsporin	cyclic peptide	ราเส้นใย
	Bacillocin	polypeptide	ราเส้นใย
	Mycosubtilin	cyclic peptide	ราเส้นใย
	Fungycin	acylpeptide	ราเส้นใย
	Difficidin	polyene macrolide	แบคทีเรียแกรมบวก
	Iturin	cyclic lipopeptide	ราเส้นใย
	Bacitracin	polypeptide	แบคทีเรีย
	Alboleutin	peptide	ราเส้นใย
	Botrycidine AJ 1361	polypeptide	ราเส้นใย
	Chlorotetain	dipeptide	ราเส้นใย
	Rhizocticins	dipeptide , tripeptide	ราเส้นใย
	Serfactins	peptide	ไมโครแบคทีเรียม

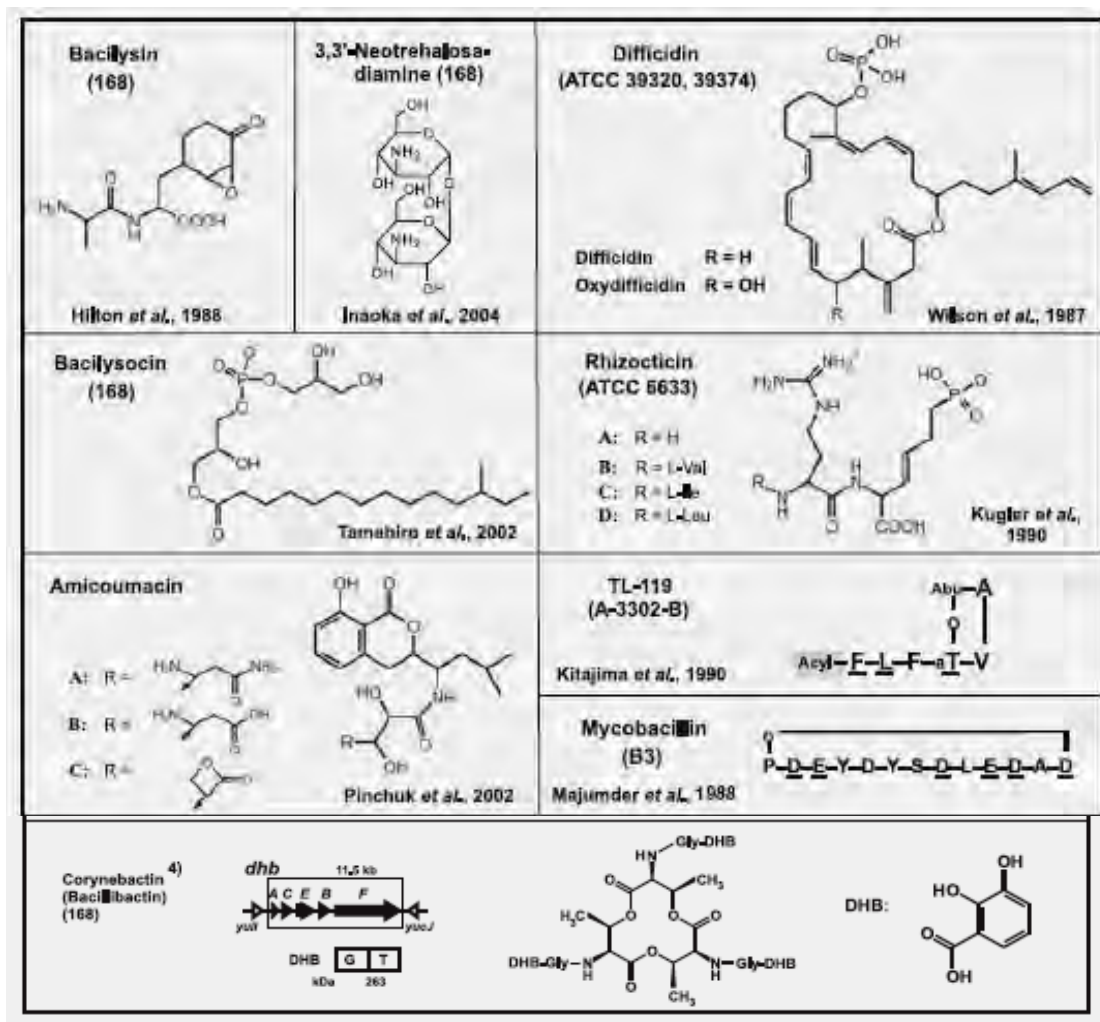
ตารางที่ 4 (ต่อ) สารต้านจุลชีพที่ผลิตจาก *Bacillus* สายพันธุ์ต่างๆ (Katz และ Demain, 1977 ; Zuber, Nakano และ Marahiel, 1993; Mannanov และ Sattarova, 200; Stein, 2005)

จุลินทรีย์ผู้ผลิต	สารต้านจุลชีพ	โครงสร้าง	การยับยั้งจุลินทรีย์
<i>Bacillus licheniformis</i>	Bacitracin	cyclic peptide	แบคทีเรีย
	Licheniformin	non-peptide	ไมโครแบคทีเรีย
	Proticin	phosphoruscontaining	ไม่มีข้อมูล
<i>Bacillus polymyxa</i>	Polymyxin	cyclic acylpeptide	แบคทีเรีย
	Colistin	cyclic polypeptide	แบคทีเรียแกรมลบ
	Gatavalin	peptide	ราเส้นใย
	Jolipeptin	peptide	แบคทีเรีย
	Tridecaptins	acylated peptide	แบคทีเรีย
<i>Bacillus circulans</i>	Butirosin	Aminoblycoside	แบคทีเรีย
	Circulin	peptide	แบคทีเรีย
	Polypeptin	Peptidolacton	แบคทีเรีย
	Xylostatin	peptide	แบคทีเรีย
	Octapeptins	cyclic acylpeptide	แบคทีเรีย ราเส้นใย และ โปรโตซัว
<i>Bacillus laterosporus</i>	Laterosporamine	non-peptide	แบคทีเรีย
	Laterosporin	non-peptide	ไมโครแบคทีเรีย
<i>Bacillus cereus</i>	Biocerin	peptide	แบคทีเรีย
	Cerexin	Acylpeptide	แบคทีเรีย
	Thiocillin	peptide	แบคทีเรียแกรมลบ
<i>Bacillus thiaminolyticus</i>	Octopytin(Thianosine)	peptide	แบคทีเรีย
	Baciphelacin	peptide	แบคทีเรีย
<i>Bacillus pumilis</i>	Micrococccin P	cyclic peptide	แบคทีเรีย
	Pumilin	peptide	แบคทีเรีย
	Tetain	peptide	แบคทีเรีย

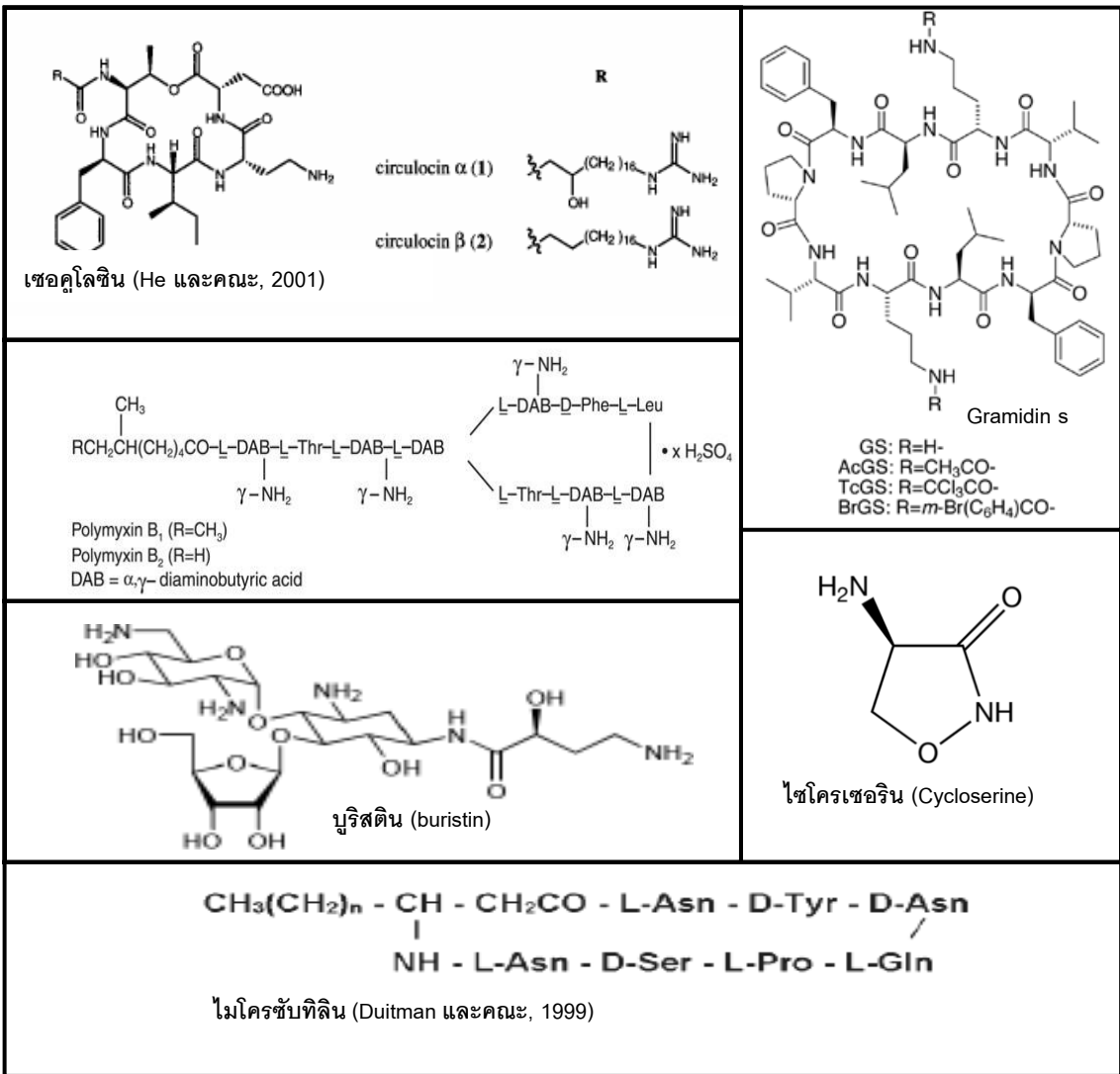
Katz และ Demain (1977) พบว่าสารต้านจุลชีพที่ได้จาก *Bacillus* มักเป็นสารประเภท เปปไทด์ ซึ่งนำมาใช้ในการรักษาและป้องกันโรคทั้งในพืชและสัตว์ (Pinchuk และคณะ, 2002) เช่น บาซิลโลซิน (bacilysin) ซึ่งเป็นสารต้านจุลชีพที่สร้างโดย *B. subtilis* มีโครงสร้างเป็นไดเปปไทด์ที่มีอะลาanine อยู่ที่ N-terminal และ L-anticapsin ที่ C-terminal (Walker และ Abraham, 1970a) มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียหลายชนิดและยีสต์ *Candida albican* (Tuzun และคณะ, 2003) บาซิลโลซิน (bacillocin) เป็นสารต้านจุลชีพที่สร้างโดย *Bacillus licheniformis* นิยมใช้ในอุตสาหกรรมนมเพราะทนความร้อนได้ดี (Martirani และคณะ, 2002) *Bacillus amyloliquefaciens* ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกับ *B. subtilis* สร้างสารที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมราก่อโรคราในพืชตระกูลแตงได้ (Asaka และ Shoda, 1996; Yoshida และคณะ, 2001) ซับทิลิน (subtilin) (Chung และคณะ, 1992) และไมโครซับทิลิน (microsubtilin) (Duitman และคณะ, 1999) เป็นสารต้านจุลชีพที่สังเคราะห์โดย *B. subtilis* ATCC6633 ซึ่งเป็นสารต้านราในกลุ่มอูโทริน บาซิลโลไมซิน L (bacillomycin L) เป็นสารต้านจุลชีพที่สังเคราะห์โดย *B. subtilis* เป็นสารต้านจุลชีพชนิดหนึ่งในกลุ่มอูโทริน (Volpon และคณะ, 1999) เซอคูโลซิน (circulocin) เป็นสารต้านจุลชีพที่สังเคราะห์โดย *Bacillus circulans* J2154 มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *Streptococcus* และ *Enterobacter* ได้ดี แต่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้เล็กน้อย (He และคณะ, 2001)

Cook และ Baker (1983) พบว่า *Bacillus* หลายสายพันธุ์สามารถผลิตสารต้านจุลชีพที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ได้ดี กล่าวคือ *B.cereus* *B.subtilis* และ *B.mycoides* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืชได้หลายชนิด ได้แก่ เชื้อราในสกุล *Rizoctonia* *Sclerotinia* *Fusarium* *Gaeummanomyces* *Nectria* *Pythium* และ *Phytophthora* (Mckinight, 1993; Fiddman และ Rossall, 1994) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า *Bacillus* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืชที่เกิดขึ้นหลังจากการเก็บเกี่ยว (post harvest control) ได้ดีอีกเช่นกัน โดยเมื่อนำสารยับยั้งการเจริญของราที่ผลิตจาก *Bacillus* สายพันธุ์ดังกล่าวมาศึกษาลักษณะสมบัติของสารพบว่า สารต้านจุลชีพที่ผลิตได้เป็นสารประเภทเปปไทด์ (Katz และ Domain, 1977) ตัวอย่างสารต้านจุลชีพที่ผลิตจาก *Bacillus* และมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของรา ได้แก่ ไมโครบาซิลลิน (Mycobacillin) ไมโครซับทิลิน (Mycosubtilin) ฟังจิสแตติน (fungistatins) ซับสปอริน (subsporins) และ อินทูริน (Iturins) ซึ่งสังเคราะห์โดย *Bacillus subtilis* (Besson และ Michel, 1990) โดยสารต้านจุลชีพดังกล่าวมีองค์ประกอบหลักเป็น cyclic peptides และอาจมีองค์ประกอบย่อยเป็นสารประเภทอื่นๆ เช่น cyclic acylpeptide และ lipopeptide เป็นต้น นอกจากนี้สารต้านจุลชีพประเภทนี้จะมีลักษณะเป็น cyclic peptides แล้วยังมีสารที่มีลักษณะที่เป็น โซ่ตรง เช่น Rhizocitocins โดยมีโครงสร้างเป็น dipeptide และ tripeptide (Kluger และคณะ, 1990)

จากรายงานการศึกษาสารต้านจุลชีพที่ผลิตจาก *Bacillus* สายพันธุ์ต่างๆ พบว่า สารต้านจุลชีพที่ผลิตได้มักเป็นสารประเภทเปปไทด์ (Katz และ Domain, 1977) โดยความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ขึ้นอยู่กับลักษณะโครงสร้างของสารที่เป็นองค์ประกอบ นอกจากนี้ยังพบว่า มีสารบางชนิดที่ผลิตจากกระบวนการเมทาบอลิซึมของ *Bacillus* บางสายพันธุ์ที่มีลักษณะโครงสร้างทางเคมีเป็นสารชนิดอื่นนอกเหนือจากสารประเภทเปปไทด์และมีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ได้เช่นเดียวกัน เช่น เอนไซม์ไคตินเนส (chitinase) และเอนไซม์ชนิดอื่นๆ ที่สามารถย่อยหรือทำลายผนังเซลล์ของสารต้านจุลชีพได้ (Pelletier และ Sygusch, 1990) สารประกอบประเภทสารระเหย (Sadfi และคณะ, 2001) สารประกอบที่แยกได้จากกลไกการต้านทานต่อยาหรือสารปฏิชีวนะ (Kehlenbeck และคณะ, 1994) สารกลุ่มโพลีคีไทด์ (polyketide) สารกลุ่มอะมิโนซูการ์ (amiosugar) และ ฟอสโฟลิปิด (Phospholipid) เป็นต้น (Stein, 2005)



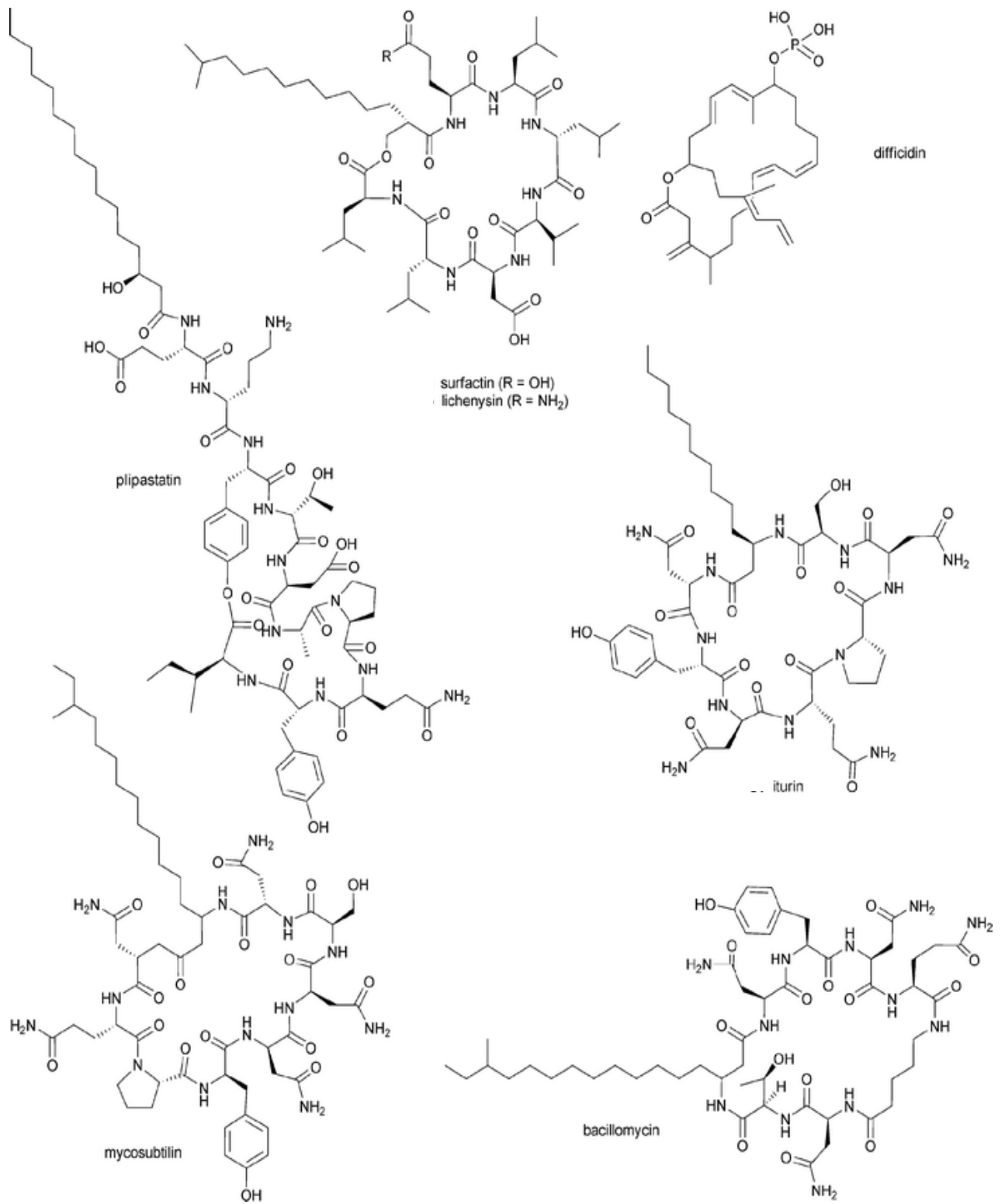
รูปที่ 1 โครงสร้างสารต้านจุลชีพที่สังเคราะห์โดย *Bacillus spp.*



โคริสติน (Colistin)

บาซิทรากซิน (Bacitracin)

รูปที่ 1 (ต่อ) โครงสร้างสารต้านจุลชีพที่สังเคราะห์โดย *Bacillus spp.*



รูปที่ 1 (ต่อ) โครงสร้างสารต้านจุลชีพที่สังเคราะห์โดย *Bacillus* spp.

การจำแนกชนิดของสารปฏิชีวนะ

สามารถแบ่งสารปฏิชีวนะได้เป็นหลายประเภท ดังนี้

1. แบ่งตามการออกฤทธิ์ต่อเซลล์ (Fix, 1997) จำแนกได้เป็น 2 ชนิด

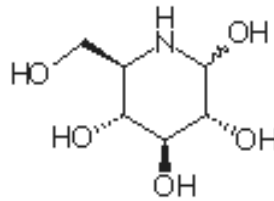
1.1 ยาที่ใช้ทำลายแบคทีเรีย (bactericidal drugs) มีฤทธิ์ทำลายเซลล์แบคทีเรียที่ยังมีชีวิตเท่านั้น เช่น สเตรปโตไมซิน อะมิโนไกลโคไซด์ (aminoglycosides) และเพนนิซิลิน เป็นต้น

1.2 ยาที่ใช้ยับยั้งแบคทีเรีย (bacteriostatic drug) ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ เช่น ซัลโฟนาไมด์ (sulfonamides) เตตราไซคลิน คลอแรมเฟนิคอล เป็นต้น

2. แบ่งตามโครงสร้างทางเคมี (Brock และ Medigan, 1991) ซึ่งการจัดจำแนกด้วยวิธีนี้จัดว่าเป็นวิธีที่ดีที่สุดเนื่องจากสามารถบ่งชี้ลักษณะความแตกต่างขององค์ประกอบของสารได้อย่างชัดเจน

2.1 สารปฏิชีวนะประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate containing antibiotics) ได้แก่

2.1.1 สารปฏิชีวนะที่เป็นพวงน้ำตาล เช่น โนจิริไมซิน (nojirimycin)



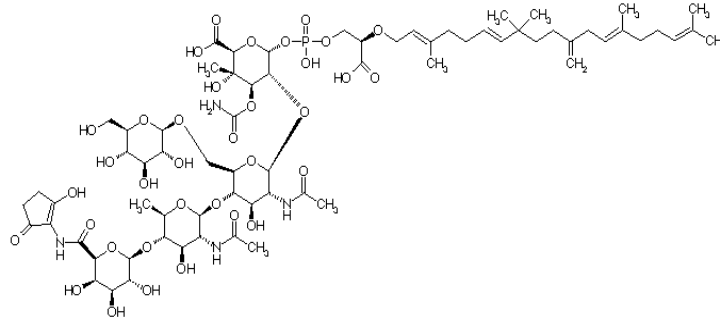
รูปที่ 2 โครงสร้างของโนจิริไมซิน (Dhavale และคณะ, 2002)

2.1.2 อะมิโนไกลโคไซด์ (aminoglycoside) เช่น สเตรปโตไมซิน กานาไมซิน (kanamycin) และเจนต้าไมซิน (gentamycin) เป็นต้น

2.1.3 n-ไกลโคไซด์ (n-glycoside) เช่น สเตรปโตทริซิน (streptothricin)

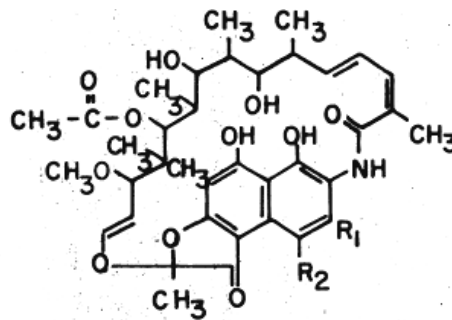
2.1.4 c-ไกลโคไซด์ (c-glycoside) เช่น แวนโคไมซิน (vancomycin)

2.1.5 ไกลโคลิปิด (glycolipid) เช่น โมอีโนไมซิน เอ (moenomycin A)



รูปที่ 3 โครงสร้างของมิกอนโซล เอ (Kurz และคณะ, 1998)

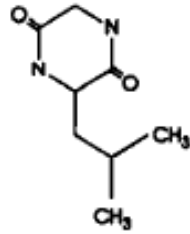
2.2 แมกโครไซคลิก แลกลาคโตน (macrocyclic lactones) ได้แก่ สารในกลุ่มแมกโครไลด์ เช่น อีริโทรซิน โพลีอินหรือแคนดิซิดิน (candicidin), แอซาไมซิน (ansamycin) และ ไรฟาไมซิน (rifamycin) เป็นต้น



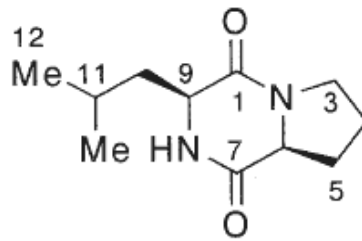
รูปที่ 4 โครงสร้างของไรฟาไมซิน (Jacob และ Rose, 1974)

2.3 ควินิน และสารปฏิชีวนะที่เกี่ยวข้อง (quinines and related antibiotics) ได้แก่ เตตราไซคลิน และแอนทราไซคลิน (anthracyclin) เป็นต้น

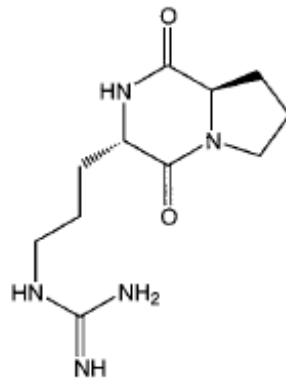
2.4 สารปฏิชีวนะพวกกรดอะมิโนและเปปไทด์ (amino acid and peptides antibiotics) ได้แก่ อนุพันธ์ของกรดอะมิโน เช่น ไซโคลซีรีน (cycloserine) พวกเปปไทด์ เช่น บาซิลลาริน ซับทิลิน (subtilin) พวกโครโมเปปไทด์ เช่น แอกทิโนไมซิน (actinomycins) เป็นต้น และยังรวมไปถึงพวกไซคลิกไดเปปไทด์ (cyclic dipeptide) ซึ่งเป็นเปปไทด์ที่พบในสัตว์และพืชรวมทั้งในกระบวนการหมัก (Prasad, 1995) เช่น ไซคลิกไดเปปไทด์ของ-ลิวซีน-ไกลซีน (cyclo(Leu-Gly)) ลิวซีน-โพรลีน (cyclo(L-Leu-L-Pro)) และ อาร์จินิน-โพรลีน (cyclo(L-Arg-D-Pro)) เป็นต้น



รูปที่ 5 โครงสร้างของ cyclo(Leu-Gly) (Prasad, 1995)



รูปที่ 6 โครงสร้างของ cyclo (L-Leu-L-Pro) (Yan และคณะ, 2004)



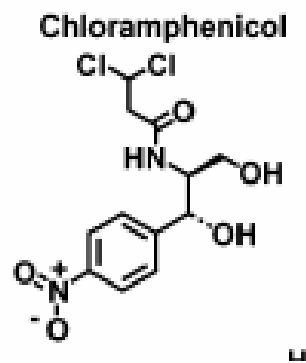
รูปที่ 7 โครงสร้างของ cyclo(L-Arg-D-Pro) (Houston และคณะ, 2002)

2.5 สารปฏิชีวนะพวกเฮเทอโรไซคลิกที่มีไนโตรเจน (heterocyclic antibiotics containing nitrogen) ได้แก่ สารปฏิชีวนะพวกนิวโคลไซด์ เช่น โพลีออกซิน (polyoxins)

2.6 สารปฏิชีวนะพวกเฮเทอโรไซคลิกที่มีออกซิเจน (heterocyclic antibiotics containing oxygen) ได้แก่ สารปฏิชีวนะพวกโพลีอีเทอร์ เช่น โมเนนซิน(monensin)

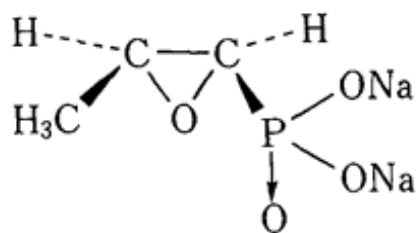
2.7 อนุพันธ์ของอะลิไซคลิก (alicyclic derivatives) ได้แก่ อนุพันธ์ของไซโคลอัลเคน (cycloalkane derivatives) เช่น ไซโคลเฮกซาไมด์ (cyclohexamide) สารปฏิชีวนะพวกสเตียรอยด์ (steroid antibiotics) เช่น กรดฟูซิดิก (fusidic acid)

2.8 สารปฏิชีวนะพวกอะโรมาติก (aromatic antibiotics) ได้แก่ อะโรมาติก อีเทอร์ (aromatic ether) เช่น โนโวไบโอซิน อนุพันธ์ของเบนซีน (benzene derivative) เช่น คลอแรมฟิสิกอล เป็นต้น



รูปที่ 8 โครงสร้างของคลอแรมฟิสิกอล (Hansen และคณะ, 2003)

2.9 สารปฏิชีวนะพวกอลิฟาติก (aliphatics antibiotics) เช่น ฟอสโฟไมซิน (fosfomycin)



รูปที่ 9 โครงสร้างของฟอสโฟไมซิน

3. แบ่งตามความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ (activity spectrum) (Fix, 1997)

3.1 สารปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้หลายชนิด (broad spectrum antibiotic) เช่น เซฟาโลสปอริน ยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ

3.2 สารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้เพียงบางชนิด (narrow spectrum antibiotic) เช่น เพนนิซิลิน ยับยั้งได้เฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก

4. แบ่งตามกระบวนการสังเคราะห์ (Foroumadi และคณะ, 2005; Greenwood และ Ogilvie, 2002)

4.1 สารปฏิชีวนะที่ได้จากการกระบวนการชีวภาพ ได้แก่ สารปฏิชีวนะที่ได้จากกระบวนการหมัก โดยเฉพาะถ้าเติม precursor ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ สามารถเพิ่มและเร่งปริมาณการผลิตสารปฏิชีวนะได้ เช่น เพนนิซิลิน G

4.2 สารปฏิชีวนะที่ได้จากกระบวนการกึ่งสังเคราะห์ ได้แก่ สารปฏิชีวนะที่ได้จากกระบวนการหมัก แล้วนำมาดัดแปลงโครงสร้างโดยวิธีการทางเคมี เช่น แอมพิซิลิน

4.3 สารปฏิชีวนะที่ได้จากกระบวนการทางเคมี ซึ่งมีต้นทุนการผลิตต่ำกว่าการหมัก เช่น คลอแรมฟินิโคล

5. พิจารณาจากกลไกการทำงาน หรือตำแหน่งที่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น (Todar, 2002 ; Neu และ Gootz, 2005) ดังนี้

5.1 สารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ เช่น เพนนิซิลิน เซฟาโรสปอริน

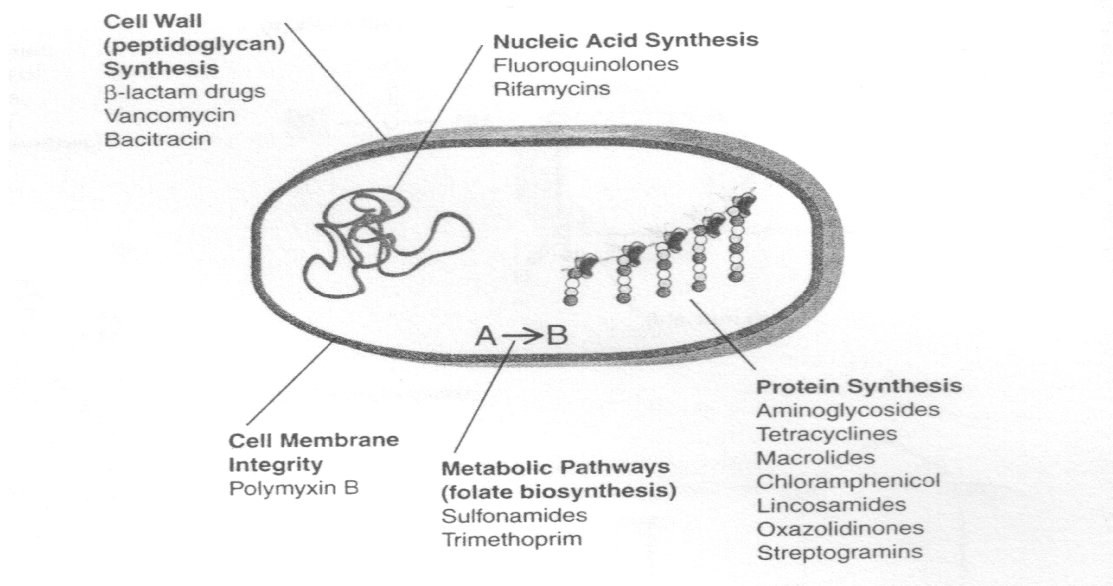
5.2 สารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ เช่น โพลีไมซิน โพลีอิน

5.3 สารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการสร้างโปรตีน เช่น คลอแรมเฟนิคอลยับยั้งการทำงานของ 50 S ของไรโบโซม สเตปโตไมซินยับยั้งการทำงานของ 30 S ของไรโบโซม

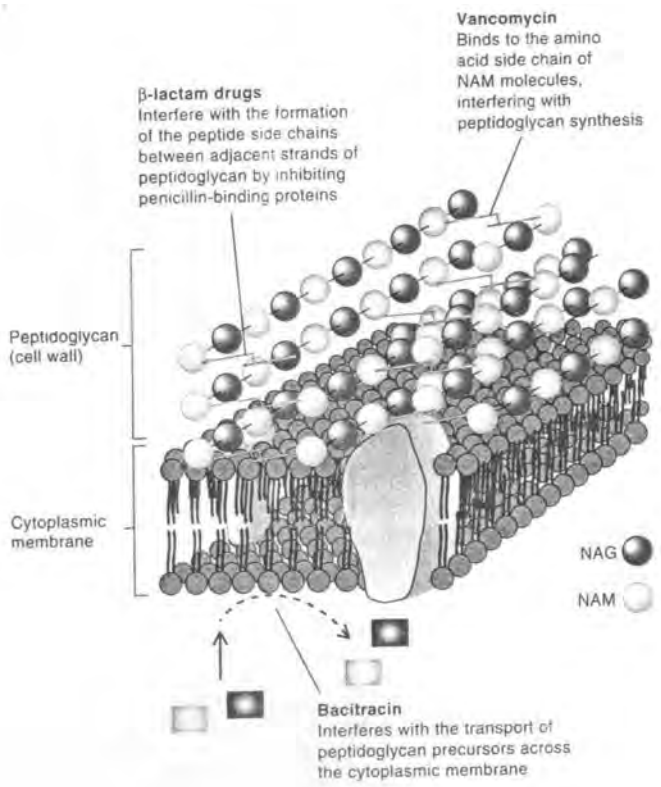
5.4 สารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการสร้างสารพันธุกรรม เช่น ไรแฟมพิน ควินโนโลน

5.5 สารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการสร้างเมตาบอไลต์ที่สำคัญ เช่น ซัลโฟนิลาไมด์ยับยั้งกระบวนการเมตาบอลิซึมของโฟเลต

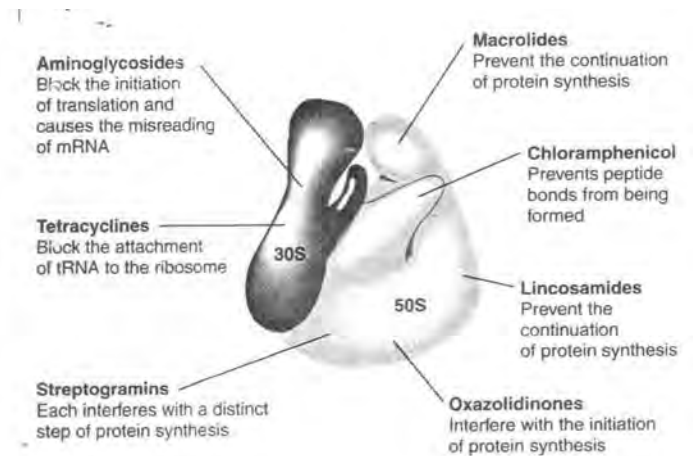
6. อาศัยลักษณะทางอนุกรมวิธาน โดยพิจารณาว่าจุลินทรีย์ผู้ผลิตจัดอยู่ในกลุ่มใด แล้วสามารถบอกว่สารดังกล่าวอยู่ในกลุ่มนั้นด้วย แต่มีข้อเสีย คือ จุลินทรีย์กลุ่มเดียวกันอาจผลิตสารได้หลายชนิด และสารเดียวกันอาจสังเคราะห์ได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด (Korzybski และคณะ, 1966)



1) สารต้านจุลชีพที่มีผลต่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

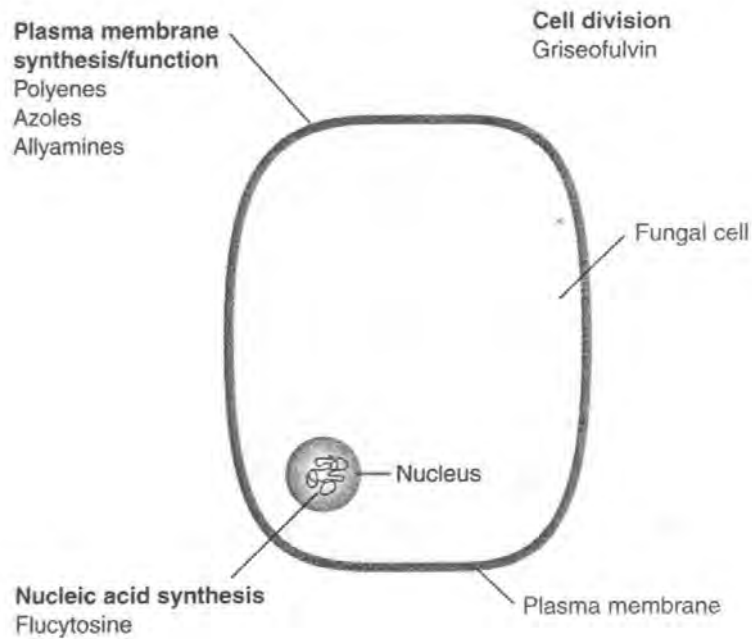


2) ยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์ผนังเซลล์

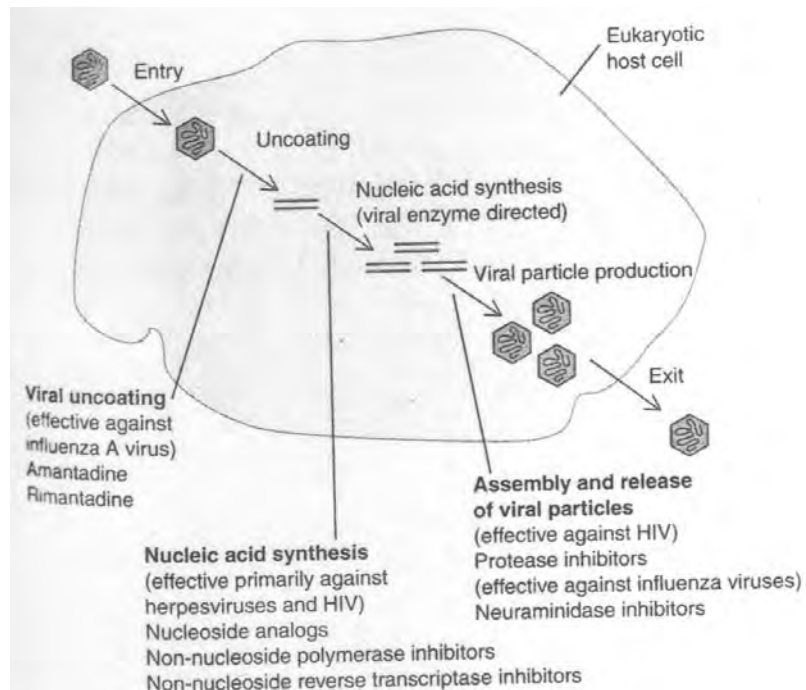


3) ยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน

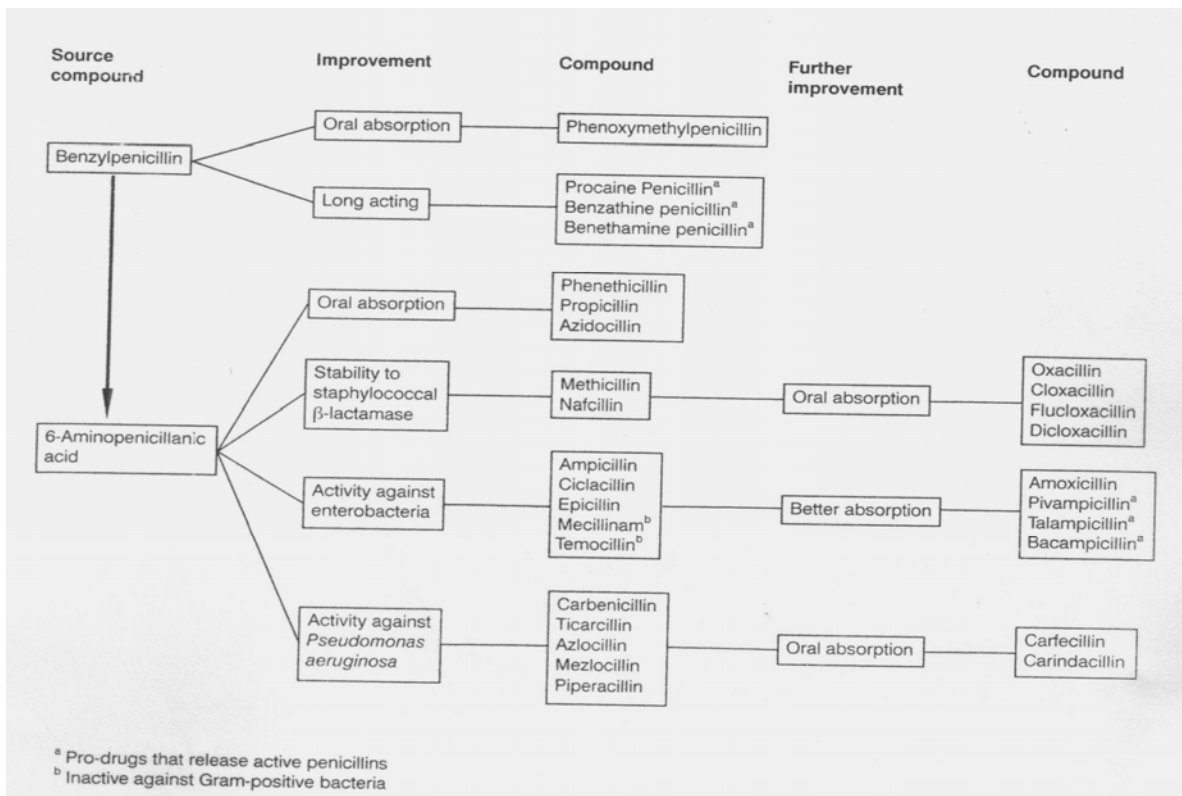
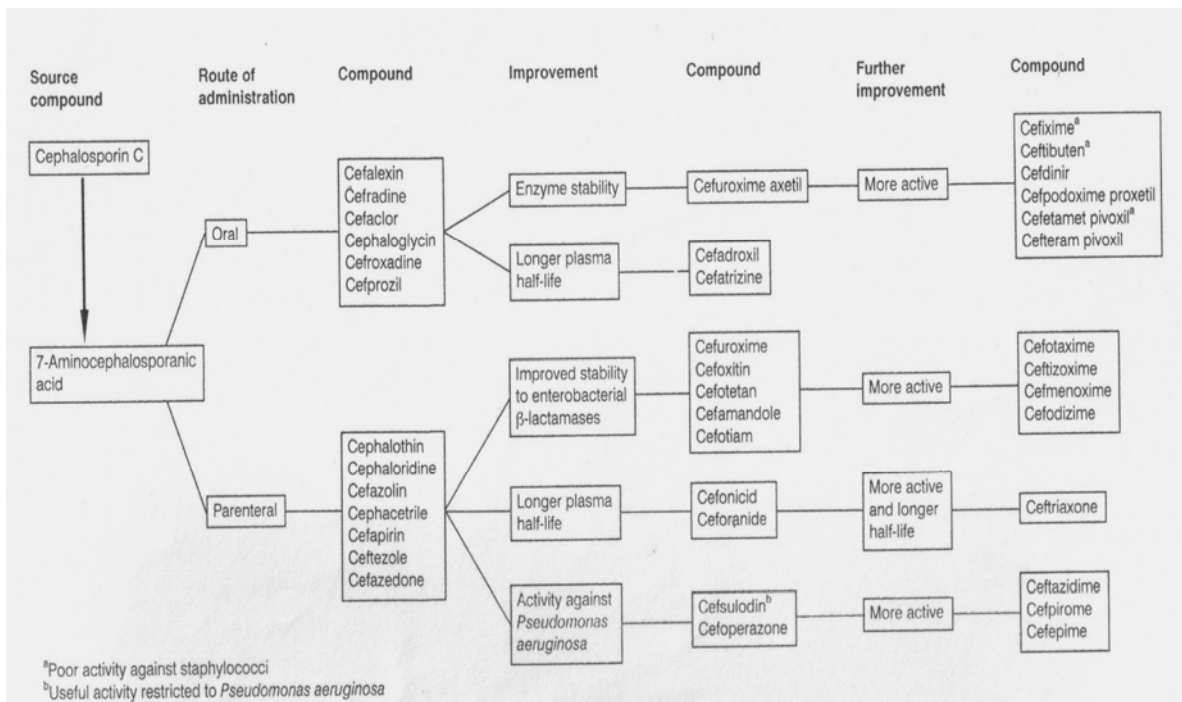
รูปที่ 10 ตัวอย่างสารต้านจุลชีพที่มีกลไกการทำงานในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย



รูปที่ 11 ตัวอย่างสารต้านจุลชีพที่มีกลไกการทำงานยับยั้งการเจริญของรา



รูปที่ 12 ตัวอย่างสารต้านจุลชีพที่มีกลไกการทำงานยับยั้งการเจริญไวรัส



รูปที่ 13 ตัวอย่างสารต้านจุลชีพที่ได้จากกระบวนการกึ่งสังเคราะห์

การทำสารต้านจุลชีพให้บริสุทธิ์

กระบวนการทำให้บริสุทธิ์ของสารต้านจุลชีพสามารถทำได้หลายวิธี โดยการเลือกวิธีการทำให้ที่ทำได้สารบริสุทธิ์ต้องมีความเหมาะสมกับลักษณะทางเคมีของสารต้านจุลชีพนั้นๆ ในการศึกษาเบื้องต้นสารต้านจุลชีพที่ได้จากจุลินทรีย์มักอยู่ในรูปของผสมและมีสิ่งเจือปนอื่น ๆ ที่อาจยับยั้งหรือลดการออกฤทธิ์ของสารต้านจุลชีพได้ จึงจำเป็นที่จะต้องสกัดแยกสารต้านจุลชีพนั้นๆ ให้บริสุทธิ์มากยิ่งขึ้นเพื่อนำไปศึกษาลักษณะสมบัติของสาร เช่น โครงสร้างและน้ำหนักโมเลกุล เพื่อสามารถนำไปจำแนกประเภทของสารต้านจุลชีพได้ การทำให้สารต้านจุลชีพทำได้หลายวิธี ดังนี้

1. การสกัดด้วยตัวทำละลาย

การสกัดแยกโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับสารปฏิชีวนะที่มีขั้วซึ่งเป็นวิธีที่ค่อนข้างจะมีความจำเพาะสูง ตัวทำละลายอินทรีย์ที่นิยมใช้ได้แก่ เอทิลอะซิเตท คลอโรฟอร์ม ไดเอทิลอีเทอร์ บิวทานอล บิวทิลอะซิเตท เฮกเซน เป็นต้น

2. การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต จัดเป็นหนึ่งในวิธีการตกตะกอน โปรตีนที่อาศัยหลักของการเพิ่มความแรงไอออน (ion strength) หรือเรียกว่า “salting-out” การตกตะกอนเช่นนี้เป็นวิธีเบื้องต้นที่แพร่หลายอย่างหนึ่งในการคัดแยกโปรตีน โปรตีนที่ถูกตกตะกอนลงมามักจะไม่เสียสภาพและความสามารถในการทำงานยังคงมีอยู่ได้หลังจากนำตะกอนไปละลายกลับ นอกจากนี้เกลือที่นำมาใช้ยังสามารถรักษาโปรตีนไว้ไม่ให้ถูกทำลายไปด้วยการทำงานของเอนไซม์ที่สลายโปรตีนหรือการปนเปื้อนของแบคทีเรีย วิธีการตกตะกอนโปรตีนนี้จึงเหมาะแก่การทำงานที่ต้องเก็บโปรตีนไว้ในระยะเวลาหนึ่ง การตกตะกอนโปรตีนตามหลักการ salting-out นี้จะขึ้นกับลักษณะไม่ชอบน้ำ (hydrophobic nature) ที่พื้นผิวของโปรตีน โดยทั่วไปแล้วจะพบส่วนที่ไม่ชอบน้ำได้มากบริเวณภายในโมเลกุลโปรตีนแต่ก็มีบางส่วนอยู่ที่พื้นผิวได้ ก่อนมีการเติมเกลือโมเลกุลน้ำจะถูกบังคับให้สัมผัสอยู่ที่บริเวณไม่ชอบน้ำ (hydrophobic patches) ต่อมาเมื่อเติมเกลือลงไป โมเลกุลน้ำจะมากอยู่กับไอออนของเกลือทำให้บริเวณที่ไม่ชอบน้ำถูกเหยียดออก ทำให้โมเลกุลของโปรตีนแต่ละโมเลกุลเกิดปฏิสัมพันธ์กันได้ด้วยบริเวณดังกล่าวแล้วเกิดการรวมกลุ่มเป็นตะกอนโปรตีน ตะกอนนี้จะถูกแยกออกไปจากสารละลายได้ด้วยการเซนตริฟิวจ์ (centrifuge) ดังนั้นโมเลกุลโปรตีนที่มีบริเวณไม่ชอบน้ำขนาดใหญ่หรือมีหลายบริเวณจะเกิดการรวมกลุ่มได้ก่อนโมเลกุลโปรตีนที่มีบริเวณดังกล่าวมีขนาดเล็กหรือมีบริเวณไม่ชอบน้ำน้อยกว่า ส่วนที่ตกตะกอนได้ก่อนหรือหลังนี้นำไปใช้แยกส่วน (fractionation) ของโปรตีนได้ แต่ตะกอนโปรตีนที่ได้จะไม่บริสุทธิ์อาจมีโปรตีนอื่นปนออกมาบ้าง (Wu และคณะ, 2005; Harris, 1989 อ้างถึงในนิโคลบล พรหมประสิทธิ์, 2542) เกลือที่ใช้ตกตะกอนโปรตีนมีหลายชนิด ประสิทธิภาพของเกลือในการตกตะกอนโปรตีนส่วนใหญ่ขึ้นกับลักษณะของแอนไอออน (anions) แอนไอออนที่มีหลายประจุ (multi-charged) จะมีประสิทธิภาพสูงสุด ประสิทธิภาพของเกลือ

เรียงลำดับจากมากไปน้อยได้ดังนี้ ฟอสเฟต ซัลเฟต อะซีเตต และคลอไรด์ ถึงแม้ว่าฟอสเฟตจะมีประสิทธิภาพมากกว่าซัลเฟต แต่ในทางปฏิบัติฟอสเฟตที่นำมาใช้มักจะอยู่ในรูป HPO_4^{2-} และ H_2PO_4^- ที่มีพีเอชที่เป็นกลางมากกว่าจะเป็นรูป PO_4^{3-} ซึ่งเป็นรูปไอออนที่มีประสิทธิภาพสูงกว่า ดังนั้นซัลเฟตจึงเป็นที่นิยมใช้งานมากกว่า เมื่อพิจารณาถึงแคทไอออน (cations) แคทไอออนที่เป็นโมโนวาเลนต์ (monovalent) จะมีประสิทธิภาพสูงจากมากไปน้อยดังนี้ แอมโมเนียม โปแตสเซียม และโซเดียม นอกจากประสิทธิภาพแล้วการพิจารณาเลือกเกลือที่จะใช้ตกตะกอนต้องคำนึงถึงราคา ความบริสุทธิ์ของเกลือ และความสามารถในการละลายเพราะการละลายที่ทำการตกตะกอนต้องให้มีความเข้มข้นของเกลือสูงเพียงพอแก่การเกิดตะกอนของโปรตีนที่ต้องการ นอกจากนี้เมื่อเกลือเกิดการละลายไม่ควรเกิดความร้อนสูงเพราะอาจส่งผลกระทบต่อเสถียรภาพของโปรตีนได้

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

เพื่อความสะดวกในการใช้งานจึงนิยามอ่านค่าจำนวนกรัมของแอมโมเนียมซัลเฟต ดังแสดงในตารางที่ 5

3) วิธีโครมาโทกราฟี

เป็นการแยกความแตกต่างด้านสมบัติของสารที่ต้องการจะแยก เช่น สมบัติการละลาย ขนาดโมเลกุล ประจุบนโมเลกุล เทคนิคดังกล่าวเป็นการแยกสารผสม แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ 1) ตัวพาหรือตัวทำละลายที่ทำหน้าที่พาของผสมให้แยกออกจากกัน และ 2) ตัวดูดซับเป็นส่วนที่ดูดซับของผสม (The American Heritage® Dictionary of the English Language, Fourth Edition, 2004) เช่น กระดาษ เจลาติน ซิลิกา และถ่าน เป็นต้น แต่ตัวดูดซับที่เลือกใช้ต้องไม่ทำปฏิกิริยากับสาร และต้องแยกสารออกมาจากตัวดูดซับได้ การแยกสารด้วยวิธีโครมาโทกราฟีมีได้หลายแบบ เช่น โครมาโทกราฟีแบบกระดาษ โครมาโทกราฟีแบบผิวบาง โครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ โครมาโทกราฟีแบบสมรรถนะสูง เป็นต้น ซึ่งสามารถเลือกใช้ได้ตามความเหมาะสม และอาจใช้ได้หลายวิธีร่วมกันเพื่อให้สารปฏิชีวนะมีความบริสุทธิ์มากขึ้น

3.1 เปเปอร์โครมาโทกราฟี (paper chromatography) คือ การแยกสารโดยใช้กระดาษเป็นตัวดูดซับ หยดสารลงบนกระดาษแล้วนำไปจุ่มในตัวทำละลาย เช่น เอทานอล น้ำ เป็นต้น ตัวทำละลายพาสารเคลื่อนที่จากล่างขึ้นบน สารใดที่ดูดซับได้ดีเคลื่อนที่ช้า Two-way paper chromatography คือ การนำแผ่นกระดาษที่แยกสารแล้วไปแยกซ้ำอีกครั้ง โดยหมุนแผ่นกระดาษ 90 องศา เปลี่ยนตัวพาเพื่อแยกสารผสมที่เคลื่อนที่ได้เท่ากันในครั้งแรกออกจากกัน

3.2 โครมาโทกราฟีแบบผิวบาง (Thin Layer Chromatography : TLC) เป็นการแยกสารบนแผ่น TLC ซึ่งมีตัวดูดซับเป็นซิลิกา ที่เคลือบบนแผ่นอะลูมิเนียม หรือแผ่นแก้ว เมื่อหยดสารบนแผ่น TLC แล้วนำไปวางจุ่มในสารละลายเมื่อสารถูกพาให้เคลื่อนที่ถึงบริเวณที่ต้องการนำออกจากสารละลาย ทิ้งไว้ให้แห้งและส่องดูด้วยแสงยูวีหรือวิธีอื่นๆ ที่สามารถตรวจสอบตำแหน่งของสารได้ (visualization)

3.3 คอลัมน์โครมาโทกราฟี เป็นเทคนิคที่ใช้แยกสารอินทรีย์ทั้งของแข็งและของเหลว ตัวดูดซับที่ใช้ เช่น ซิลิกาเจล อะลูมินา เป็นต้น สารตัวพาหรือตัวชะ คือ ตัวทำละลายอินทรีย์ ชนิดเดียว หรือผสมกันหลายชนิด เช่น เอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) ผสมกับ เมทานอล (methanol) ในอัตราส่วนต่าง ๆ เป็นต้น เรียกสารที่ชะออกมาว่า ส่วน (fraction) จากนั้นวิเคราะห์สารแต่ละส่วน (fraction) ด้วย TLC

3.4 โครมาโทกราฟีแบบเจลคัดแยกขนาด (Gel Permeation Chromatography) เป็นโครมาโทกราฟีที่แยกสารออกได้ด้วยความแตกต่างของขนาด โครมาโทกราฟีนี้มีชื่อเรียกได้หลายชื่อ ได้แก่ gel filtration, gel exclusion chromatography, molecular sieve chromatography หรือ gel chromatography หลักการเบื้องต้นของโครมาโทกราฟีนี้คือ โมเลกุลของสารจะถูกแบ่งเข้าไป (partition) ในระหว่างส่วนของตัวทำละลายและส่วนไม่เคลื่อนที่ (stationary phase) ซึ่งมีรูพรุนขนาดแน่นอน (uniform pore size) กระบวนการแยกทำได้โดยใช้สารตัวกลางซึ่งเป็นเจล (gel

maxtrix) ที่มีรูพรุนมักมีรูปร่างเป็นเม็ดกลมเล็ก ๆ (bead) บรรจุลงในคอลัมน์ที่มีตัวทำละลายอยู่ด้วย สารผสมตัวอย่างที่ต้องการแยกจะประกอบด้วยโมเลกุลขนาดต่าง ๆ กันทั้งที่เล็กกว่า ใหญ่กว่า และ ขนาดเท่ากับขนาดของรูสารตัวกลางโดยปกติสารที่โมเลกุลเล็กกว่ารูพรุนของสารตัวกลางจะเข้าไป ภายในสารตัวกลางได้จึงเคลื่อนที่ได้ช้าในคอลัมน์แล้วออกจากคอลัมน์เป็นลำดับท้ายๆ โมเลกุล ขนาดกลางที่พอดีกับรูพรุนสามารถเข้าไปในรูของสารตัวกลางได้เช่นกันแต่ใช้เวลาน้อยกว่าในการ เคลื่อนที่จึงออกจากคอลัมน์ในลำดับต่อมา ในขณะที่สารที่มีขนาดใหญ่ไม่สามารถเข้าไปอยู่ในสาร ตัวกลาง จะอยู่ในส่วนของตัวทำละลายรอบ ๆ สารตัวกลาง เคลื่อนที่ได้เร็วกว่าจึงออกจากคอลัมน์ ในลำดับแรก ๆ ดังนั้นโมเลกุลต่าง ๆ จะถูกชะออกจากคอลัมน์ตามลำดับก่อนหลังจากขนาด โมเลกุลใหญ่ไปหาเล็ก สำหรับรูปร่างของโมเลกุลมีผลต่อการแยกเช่นเดียวกับขนาดของโมเลกุล โดยโมเลกุลที่มีรูปร่างยาวเป็นเส้นจะถูกชะออกมาได้ก่อนโมเลกุลรูปร่างเป็นก้อนกลม (globular) โครมาโทกราฟีชนิดนี้จึงใช้ศึกษาขนาดโมเลกุลหรือมวลโมเลกุล และรูปร่างโมเลกุลรวมถึงใช้ ติดตามการเสียดสภาพของโมเลกุลโปรตีนที่ทำให้รูปร่างโมเลกุลเปลี่ยนแปลงไป นอกจากนี้ยัง สามารถใช้ในการกำจัดเกลือออกจากโปรตีนที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือได้ด้วยการศึกษาขนาด โมเลกุลด้วยโครมาโทกราฟีแบบคัดแยกขนาด ทำให้โดยการสร้างกราฟระหว่างมวลโมเลกุลของ สารมาตรฐาน (สเกล log) กับค่า K_{av} ของสารนั้น (สเกลปกติ) ค่า K_{av} ของแต่ละโมเลกุลหาได้จาก สมการดังนี้

$$K_{av} = \frac{(V_e - V_0)}{(V_t - V_0)}$$

เมื่อ V_e คือ ปริมาตรตัวทำละลายที่ชะสารที่มีมวลโมเลกุลนั้นออกมาจากคอลัมน์ (elution volume)

V_0 คือ ปริมาตรตัวทำละลายที่ชะสารที่มีมวลโมเลกุลขนาดใหญ่กว่ารูพรุนของสารตัวกลาง ออกมา (exclusion volume)

V_t คือ ปริมาตรตัวทำละลายทั้งที่อยู่ภายในและภายนอกสารตัวกลาง (Total bed volume)

ในการศึกษาเมื่อสร้างกราฟมาตรฐานข้างต้นได้แล้ว ทำการผ่านสารที่ต้องการทราบขนาด โมเลกุลลงในคอลัมน์เดิม บันทึกค่า V_e ของสารนั้น คำนวณหาค่า K_{av} จากสมการข้างบน แล้ว เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน ทำให้ทราบมวลโมเลกุลของสารนั้น ได้สารตัวกลางที่นำมาใช้ใน โครมาโทกราฟีแบบคัดแยกมีหลายประเภท การจะเลือกใช้สารตัวกลางชนิดใด ควรพิจารณา เบื้องต้นดังนี้

1. ช่วงพิสัยของการแยกลำดับส่วน (fractional range) เลือกใช้สารตัวกลางที่ให้ช่วงพิสัยของการแยกที่เหมาะสมกับขนาดของสารที่ต้องการแยกโดยสารที่ต้องการแยกต้องไม่ถูกชะออกมาใน exclusion volume และ total bed volume

2. ความสามารถในการแยก (resolution) เม็ดเจลเล็กที่มีขนาดเล็กกว่า เช่น fine และ superfine grades มักจะให้ความสามารถในการแยกที่ดีกว่า แต่มักจะให้อัตราการไหลไม่ดีนัก

3. ความเสถียร (stability) สารตัวกลางต่างๆ มีความเสถียรต่างกันต่อ พีเอช อุณหภูมิและตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น สารตัวกลางที่เป็นอะกาโรส (agarose) จะไม่ทนต่อยูเรียและตัวทำละลายอินทรีย์เป็นต้น ดังนั้นสารตัวกลางที่นำมาใช้ต้องมีความเสถียรได้ในสภาวะที่ใช้ในการแยกจึงจะให้ความสามารถในการแยกสารได้เต็มที่

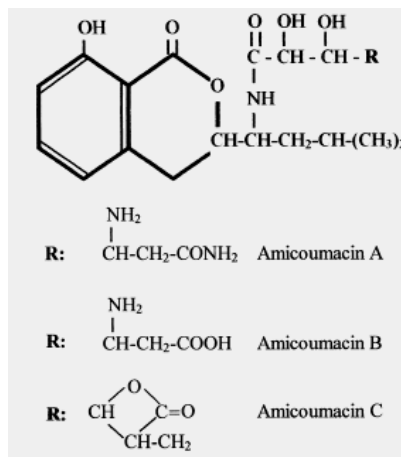
3.5 โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน (Ion Exchange Chromatography) โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุถูกใช้อย่างแพร่หลายในการทำให้บริสุทธิ์ของโปรตีนเนื่องจากคุณสมบัติเหมาะสมหลายประการ เช่น ความง่ายต่อการขยายขนาด (scale-up) และค่าใช้จ่ายไม่สูงนักเมื่อเทียบกับวิธีอื่นๆ โปรตีนสามารถมีได้ทั้งประจุบวกและประจุลบบนพื้นผิวของโมเลกุลเพราะโมเลกุลมี 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) เมื่อโปรตีนอยู่ใน pH ที่สูงกว่า pI โปรตีนจะมีประจุสุทธิเป็นลบ แต่ถ้าอยู่ในพีเอชที่ต่ำกว่า pI ประจุสุทธิของโปรตีนจะเป็นบวก โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุจำแนกโปรตีนด้วยความแตกต่างของประจุสุทธิของโปรตีน โมเลกุลโปรตีนจะถูกดูดซับไว้บนผิวของสารตัวกลางที่มีประจุตรงข้ามกัน แต่โปรตีนที่มีประจุสุทธิเดียวกับสารตัวกลางหรือประจุสุทธิเป็นศูนย์จะถูกปล่อยออกมาจากคอลัมน์หลังจากล้างด้วยบัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอชเหมาะสม เมื่อจะนำโปรตีนที่ถูกดูดซับไว้ออกจากคอลัมน์จะทำโดยการแทนที่โมเลกุลโปรตีนด้วยไอออนที่มีความแข็งแรงในการจับกับสารตัวกลางมากกว่าโปรตีนนั้น โปรตีนที่จับกับสารตัวกลางได้ไม่แข็งแรงมากมักจะหลุดออกมาจากคอลัมน์เมื่อชะด้วยความเข้มข้นของไอออนต่ำ และโปรตีนที่จับกับสารตัวกลางได้แข็งแรงจะชะออกจากคอลัมน์ได้เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไอออนให้สูงขึ้น

สิ่งที่ควรพิจารณาในการทำให้บริสุทธิ์ด้วยการเปลี่ยนประจุ

1. การเลือกสารตัวกลาง (matrix) เลือกตามความเหมาะสมของชนิดตัวกลางขนาดของสารตัวกลาง ช่วงพีเอชในการทำงานอัตราการใช้
2. การเลือกหมู่ฟังก์ชัน (functional groups) หมู่ฟังก์ชันที่อยู่บนผิวของสารตัวกลาง ทำให้เกิดความแรงในการจับและแลกเปลี่ยนประจุน้อยต่างกันตามชนิดหมู่ฟังก์ชัน เช่น Diethylaminoethyl (DEAE) ใช้ในการแลกเปลี่ยนประจุลบ (anion exchange) อย่างอ่อน หมู่ฟังก์ชันเลือกใช้ต้องสอดคล้องตามประจุนอกของโปรตีนที่ต้องการแยก
3. บัฟเฟอร์ ประจุนอกของโปรตีนเกิดขึ้นได้เพราะพีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์ ถ้าโปรตีนอยู่ในสารละลายที่มีค่าพีเอชสูงกว่าค่า pI ประจุนอกจะเป็นลบ แต่ถ้าค่าพีเอชต่ำกว่า pI ประจุนอกของโปรตีนจะเป็นบวก บัฟเฟอร์ต้องให้ค่าพีเอชที่ทำให้โปรตีนที่ต้องการแยกเสถียร และไม่เกิดการรบกวนการแลกเปลี่ยนประจุ

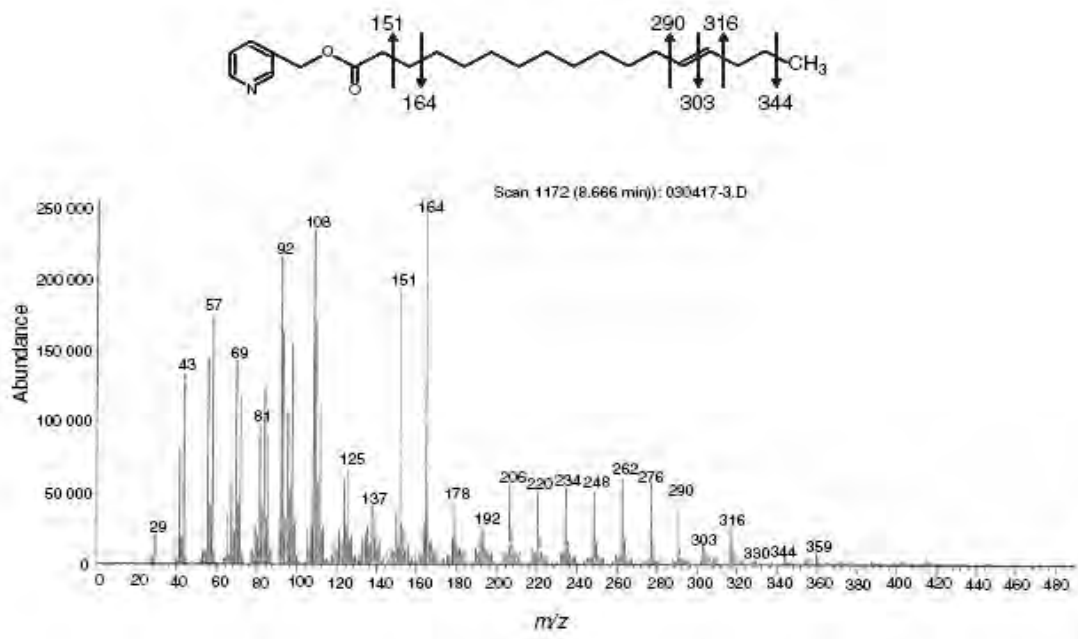
ตัวอย่างการศึกษาสารต้านจุลชีพที่ผลิตจาก *Bacillus* spp.

Pinchuk และคณะ (2002) จำแนก *Bacillus* จากแหล่งต่าง ๆ เช่น ดิน คน สัตว์ เป็นต้น รวมทั้งหมด 51 สายพันธุ์ จากนั้นศึกษาเอกลักษณ์และความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA พบว่า 47 สายพันธุ์เป็น *B. subtilis* 3 สายพันธุ์เป็น *Bacillus licheniformis* และอีกหนึ่งสายพันธุ์คือ *Bacillus pumilus* จากนั้นศึกษาการสร้างอะมิคูมาซิน (amicoumacin) จาก *Bacillus* ทั้งหมด โดยเลี้ยงในอาหารที่มีแข็งเป็นส่วนประกอบเพื่อช่วยในการสร้างสารต้านจุลชีพ (Saito และคณะ, 1992) โดยมีสูตรอาหารดังนี้ น้ำแข็ง 10 กรัมต่อลิตร เปปโทน 5 กรัมต่อลิตร และโซเดียมคลอไรด์ 0.5 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า 175 รอบต่อนาที แยกเซลล์และกรองผ่านแผ่นกรองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.45 ไมครอน แล้วนำส่วนใสที่ได้มาทดสอบกับ *Staphylococcus aureus* โดยวิธีแพร่ผ่าน (agar well diffusion) พบว่ามีเพียง 37 สายพันธุ์ที่สร้างสารยับยั้ง *S. aureus* ได้ ซึ่ง *B. subtilis* 34 สายพันธุ์ยับยั้งได้ดีที่สุด รองลงมาคือ *B. licheniformis* 2 สายพันธุ์ และ *B. pumilus* ตามลำดับ จึงเลือกส่วนใสที่ได้ทั้งหมดมาทำให้บริสุทธิ์ โดยผ่าน TLC ที่ใช้ $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} : \text{H}_2\text{O}$ (65 : 25 : 4) เป็นระบบตัวพา และแบ่งส่วนหนึ่งที่ได้จาก TLC ไปวิเคราะห์โครงสร้างด้วย MS และส่วนที่เหลือนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยสกัดด้วย SepPak C18 cartridge (solid phase extraction) นำไปวิเคราะห์โดยวิธี HPLC และหาโครงสร้างด้วย MS ซึ่งผลจากการทำ MS ซึ่งส่วนที่ได้จาก TLC พบว่ามีอะมิคูมาริน A และ B แต่ส่วนที่ได้จาก HPLC พบว่ามีอะมิคูมาริน C



รูปที่ 14 โครงสร้างของอะมิคูมาซิน (Pinchuk และคณะ, 2002)

Kim (2004) ศึกษาสารต้านจุลชีพที่ผลิตโดย *Bacillus thuringiensis* CMB 26 ซึ่งแยกได้จากดิน โดยเมื่อเลี้ยง *B.thuringiensis* CMB 26 ในอาหารเหลว LB ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 92 ชั่วโมง จะสามารถผลิตสารต้านจุลชีพที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเชื้อราที่ก่อโรคพืชได้ดี ได้แก่ *Collectotrichum gleosporioides* เมื่อเปรียบเทียบกับกรยับยั้งการเจริญด้วยสารบริสุทธิ์ที่ผลิตเป็นการค้า ได้แก่ เซอแฟคติน (surfactin) และอินทูริน (Intuirm) ในขั้นตอนการทำสารบริสุทธิ์จะใช้ส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อโดยการนำส่วนใสมาตกตะกอนด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 3 นอร์มอล (N) โดยส่วนใสจะเกิดการตกตะกอนเมื่อปรับค่า pH เท่ากับ 2 หลังจากนั้นนำตะกอนที่ได้มาสกัดด้วยตัวทำละลาย คือ คลอโรฟอร์มและเมทานอลในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 โดยปริมาตร และทำให้สารต้านจุลชีพบริสุทธิ์ขึ้นโดยใช้ revers-phase High Performance Liquid Chromatography (revers-phase HPLC) เป็นขั้นตอนต่อไป เมื่อทำการแยกจนได้สารที่บริสุทธิ์และทำการศึกษาลักษณะสมบัติแล้ว พบสารต้านจุลชีพดังกล่าวมีองค์ประกอบเป็น lipopeptide ที่มีลักษณะเป็นวง (cyclic structure) โดยมีกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของโมเลกุลได้แก่ L-Glu D-Orn L-Tyr D-allo-Thr D-Ala D-Val L-Pro L-Ile ในอัตราส่วน 3:1:2:1:1:2:1:1 ซึ่งกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของโมเลกุลของสารต้านจุลชีพดังกล่าวมีความเหมือนกับกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของโมเลกุลของสารฟังกิจิน (fengycin) แต่มีองค์ประกอบของกรดไขมันในโมเลกุลที่แตกต่างและเมื่อนำสารบริสุทธิ์ไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง พบว่าสารบริสุทธิ์ดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญรา แบคทีเรีย และแมลงที่สามารถก่อโรคพืชได้ดี จึงมีความเป็นไปได้ที่จะพัฒนาเพื่อประยุกต์ใช้ในโอกาสต่อไป



รูปที่ 15 โครงสร้างของสารต้านจุลชีพ lipopeptide ที่แยกได้จาก *Bacillus thuringiensis*
CMB 26 (Kim, 2004)

ในปี 2005 Wu และคณะ ศึกษาการสร้งสารต้านจุลชีพของ *B. subtilis* สายพันธุ์ JM4 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากตัวอย่างดินในปักกิ่ง โดยเลี้ยง *B. subtilis* สายพันธุ์ JM4 ในอาหาร LB ที่ 37 องศาเซลเซียส นำส่วนใสมาทำให้บริสุทธิ์โดยตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 80% แยกเกลือออกโดยวิธีไดอะไลซิส (dialysis) ในโซเดียมซิเตรท บัฟเฟอร์ (pH 4.0) แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี พบว่าสามารถแยกได้สาร 2 ชนิด คือ ซับเปปติน (subpeptin) JM4-A และ JM4-B จากนั้นศึกษา spectrum of activity กับจุลินทรีย์ทดสอบทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ พบว่าสามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้เกือบทุกชนิด ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 spectrum of activity ของซัพเปปติน JM4-A และ JM4-B (Wu และคณะ, 2005)

Strain	Diameter of zone of inhibition (mm)	
	Subpeptin JM4-A	Subpeptin JM4-B
Gram-positives		
<i>Bacillus subtilis</i> CGMCC 1.1087	0	0
<i>Bacillus cereus</i> CGMCC 1.819	15	23
<i>Bacillus megaterium</i> CGMCC 1.941	25	30
<i>Lactobacillus plantarum</i> CGMCC 1.3	15	20
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC2709	20	28
<i>Lactobacillus viridescens</i> CGMCC 1.14	22	30
<i>Micrococcus flavus</i> NCIB8166	30	30
<i>Staphylococcus aureus</i> CGMCC 1.2645	0	15
<i>Corynebacterium glutamicum</i> CGMCC 1.299	26	30
<i>Streptococcus faecalis</i> CGMCC 1.130	16	25
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> CGMCC 1.17	20	30
Gram-negatives		
<i>Escherichia coli</i> CMCC44104	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CGMCC 1.50	0	0
<i>Salmonella</i> CMCC50311	15	22
<i>Shigella flexneri</i> CMCC51285	0	15

เมื่อวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี Sodium dodesyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis พบว่าซัพเปปติน JM4-A และ JM4-B มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 2512 ดาลตัน เมื่อวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนโดยวิธีการสลายแบบเอ็ดมาน พบว่าซัพเปปติน JM4-A และ JM4-B ประกอบด้วยกรดอะมิโน 12 ชนิด คือ x (ไม่สามารถจำแนกชนิดของกรดอะมิโน) x ไลซีน กรดกลูตามิก ไอโซลิวซีน x ฮิสทีดิน(ทริปโตเฟน) ไอโซลิวซีน ฟีนิลอะลานีน ฮิสทีดิน กรดแอสปาดิก โดยที่กรดอะมิโนตัวที่ 7 ของซัพเปปติน JM4-A คือฮิสทีดิน แต่กรดอะมิโนตัวที่ 7 ของซัพเปปติน JM4-B คือทริปโตเฟน เมื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของซัพเปปติน JM4-A และ JM4-B ได้แก่ การย่อยด้วยโปรตีโอไลติกเอนไซม์ต่าง ๆ พบว่าซัพเปปติน JM4-A และ JM4-B ไม่ถูกทำลายด้วยเอนไซม์โปรเนส E (pronase E) และเปปซิน (pepsin) แต่โปรตีนเอส K (protenase K) และทริปซิน (trypsin) มีผลต่อการออกฤทธิ์ของสารทั้งสองชนิด เมื่อศึกษาผลของความร้อนต่อการทำงานของซัพเปปตินพบว่าทนความร้อนได้สูงถึง 100 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มนาน 30 นาที แต่การยับยั้งจุลินทรีย์ลดลงครึ่งหนึ่งเมื่อบ่มที่ 120 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มนาน 30 นาที และเมื่อศึกษาผลของ pH โดยการปรับ pH ของซัพเปปตินแล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน พบว่าที่ pH 2 4 6 และ 8 ไม่มีผลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ แต่ที่ pH 8 พบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบลดลงครึ่งหนึ่ง เมื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของซัพเปปติน JM4-A และ JM4-B ได้แก่ การย่อยด้วยโปรตีโอไลติกเอนไซม์ต่าง ๆ พบว่าซัพเปปติน JM4-A และ JM4-B ไม่ถูกทำลายด้วยเอนไซม์โปรเนส E (pronase E) และเปปซิน (pepsin) แต่โปรตีนเอส K (protenase K) และทริปซิน (trypsin) มีผลต่อการออกฤทธิ์ของสารทั้งสองชนิด เมื่อศึกษาผลของความร้อนต่อการทำงานของซัพเปปตินพบว่าทนความร้อนได้สูงถึง 100 องศาเซลเซียส เมื่อบ่ม

นาน 30 นาที แต่การยับยั้งจุลินทรีย์ลดลงครึ่งหนึ่งเมื่อบ่มที่ 120 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มนาน 30 นาที และเมื่อศึกษาผลของ pH โดยการปรับ pH ของซบเปบดินแล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ซ้ำมคั้น พบว่าที่ pH 2 4 6 และ 8 ไม่มีผลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ แต่ที่ pH 8 พบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบลดลงครึ่งหนึ่ง

ในปี 2007 Liu และคณะ ศึกษาสารต้านจุลชีพที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของราคือ บาซิซบูบิน (bacisbin) ที่ผลิตจาก *B.subtilis* B-916 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว YPG ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง การทำให้ได้สารต้านจุลชีพบริสุทธิ์ทำโดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือและทำให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบต่างๆ โดยมีขั้นตอนดังนี้คือ นำส่วนที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อมาตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟอัมตัว 95% จากนั้นนำตะกอนที่ได้มาละลายในทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ (Tris-HCl buffer) pH เท่ากับ 8.01 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร และเมื่อนำส่วนของโปรตีนที่ตกตะกอนไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งต่อราทดสอบ คือ *Rhizoctonia solani* พบว่าสารทดสอบให้ผลยับยั้งที่ดี จึงนำสารส่วนนี้มาทำให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบต่างๆ ได้แก่ คอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน (Ion exchange chromatography) โดยใช้คอลัมน์ DEAE Sepharose Fast Flow และ คอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบ Hydrophobic interaction (Hydrophobic interaction chromatography) โดยใช้คอลัมน์ Phenyl Sepharose 6 Fast Flow และ คอลัมน์ Hydroypatite โดยหลังจากที่ทำการทำให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นด้วยวิธีดังกล่าว จะได้สารบริสุทธิ์คือ บาซิซบูบิน ซึ่งจะมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยของราทดสอบหลายชนิด ได้แก่ *R.solani* *Alternaria oleraceae* *A.brassicae* และ *Botrytis cinerea* และเมื่อนำมาวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (protein marker) โดย SDS-page พบว่ามวลโมเลกุลเท่ากับ 41.9 กิโลดาลตัน (kDa)

Sutyak และ คณะ (2007) ศึกษาสารต้านจุลชีพจาก *B. amyloliquefaciens* ซึ่งแยกได้จากกระบวนการผลิตโยเกิร์ตและเมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์กับแบคทีเรียชนิดอื่นๆด้วยการทำ phylogenetic tree พบว่าแบคทีเรียดังกล่าวมีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับ *B.subtilis* เมื่อเลี้ยง *B. amyloliquefaciens* ในอาหารเหลว MRS ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยให้คาร์บอนไดออกไซด์ 5% พบว่า ส่วนที่ได้ออกมาจากการเลี้ยงเชื้อสามารถแสดงฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้หลายชนิด ได้แก่ *Listeria monocytogenes* *Gardnerella vaginalis* และ *Streptococcus agalactiae* ในระดับที่ดีเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมบวก คือ ไนซิน (nisin) ซึ่งเป็นแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis* และเป็นสารที่มีการอนุญาตให้ใช้ได้ในการบวนการถนอมอาหาร การทำให้ได้สารต้านจุลชีพบริสุทธิ์ทำได้โดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟอัมตัว 30% จากนั้นนำส่วนของโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนมาวิเคราะห์โดย SDS-page เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (protein marker) คือ ซับทีโรซิน (subtilosin) โดยพบว่าตำแหน่งบนแผ่นเจลจากส่วนของโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนมีองค์ประกอบที่แยกได้ตรงกับโปรตีน

มาตรฐาน จากนั้นนำสารในส่วนนี้มาทำให้มีความบริสุทธิ์มากยิ่งขึ้นโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้คอลัมน์ Sep-Pak C18 เพื่อแยกโปรตีนที่สนใจ การชะคอลัมน์จะใช้สารตัวพาคือ เมทานอล 50% จนถึง เมทานอล 100% โดยพบว่า สารที่แยกได้จากการใช้เมทานอล 90% เป็นสารตัวพาในการชะคอลัมน์แสดงฤทธิ์ยับยั้งต่อแบคทีเรียทดสอบได้ดีที่สุด โดยสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้หลายชนิด นอกจากนี้ยังพบว่าสารดังกล่าวสามารถทนต่อการถูกทำลายฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีเมื่ออยู่ในสภาวะต่างๆ คือ สามารถทนต่อเอนไซม์หลายชนิดยกเว้น ทริปซิน (trypsin) และโปรตีนเอส เค (protease k) สามารถทนต่อค่าความเป็นกรดต่างในช่วง pH กว้าง โดยยังคงแสดงฤทธิ์ยับยั้งต่อแบคทีเรียทดสอบได้ในช่วง pH เท่ากับ 2-10 และแสดงฤทธิ์ยับยั้งได้ในระดับที่ดีในช่วง pH ประมาณ 6.5 การทนต่อความร้อนพบว่าเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที สารต้านจุลชีพยังคงแสดงผลการยับยั้งที่ดีเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้รับความร้อน

ตารางที่ 7 ผลของเอนไซม์ต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารต้านจุลชีพจาก *B. amyloliquefaciens* (Sutyak และ คณะ 2007)

Enzyme	Enzyme diluent	Enzyme concentration (mg ml ⁻¹)	Zone of inhibition (mm)*
Catalase	50 mmol l ⁻¹ KPi (pH 7)	10	10
Pepsin	10 mmol l ⁻¹ HCl	10	0
Proteinase K	ddH ₂ O	10	0
Trypsin	1 mmol l ⁻¹ HCl	20	5
Chymotrypsin	1 mmol l ⁻¹ HCl	10	6
Lipase	ddH ₂ O	20	9
Protease	ddH ₂ O	10	7

*Average zone of inhibition for undigested cell-free supernatant was 10 mm.

ตารางที่ 8 ผลของอุณหภูมิต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารต้านจุลชีพจาก *B. amyloliquefaciens* (Sutyak และ คณะ 2007)

Temperature (°C)	Exposure time (min)	Highest active dilution (AU)
60	5	64
	60	64
80	5	64
	60	64
100	5	64
	60	64

Zhang และ คณะ (2008) ศึกษาสารต้านจุลชีพจาก *Bacillus sp.* B-TL2 ซึ่งแยกได้จากลำต้นของยาสูบ โดย *Bacillus sp.* B-TL2 สามารถสร้างสารต้านจุลชีพที่มีผลยับยั้งเชื้อราที่ก่อโรคพืชได้ดีเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ขั้นตอนสำหรับการทำให้ได้สารต้านจุลชีพบริสุทธิ์ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนตามลำดับ คือ การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต คอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน (cation exchange chromatography) และ revers-phase High Performance Liquid Chromatography (revers-phase HPLC) เป็นขั้นตอนสุดท้าย การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือทำได้โดยนำส่วนที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อมาตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 85% จากนั้นนำตะกอนที่ได้มาละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) pH เท่ากับ 6 ปริมาตร 50 มิลลิลิตรและแยกสิ่งเจือปนออก หลังจากนั้นนำสารนี้ไปทำให้ทำให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน (Ion exchange chromatography) โดยใช้คอลัมน์ CM Sepharose Fast Flow จากนั้นนำแต่ละส่วนที่แยกได้ในขั้นตอนนี้มาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งต่อเชื้อราทดสอบ คือ *A.niger* และนำส่วนที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งต่อราทดสอบมาทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นด้วย revers-phase High Performance Liquid Chromatography โดยใช้คอลัมน์ Source 5RPC ซึ่งขั้นตอนนี้จะปรากฏพีคที่แยกได้ 4 ตำแหน่ง โดยพบว่าพีคของสารตำแหน่งที่ 3 แสดงฤทธิ์การยับยั้งที่ดีต่อเชื้อราทดสอบและเมื่อนำมาวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดย SDS-page และ mass spectrometry พบว่ามวลโมเลกุลเท่ากับ 2500 ดาลตัน (Da) และมีลำดับกรดอะมิโนที่ N-terminal คือ NH₂-K-Q-Q-L-A-T-E-A-E-S-A-G-P-I-L ซึ่งลำดับกรดอะมิโนดังกล่าวมีความแตกต่างจากลำดับกรดอะมิโนที่ปรากฏในสารต้านจุลชีพชนิดอื่นๆ ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ที่เคยมีการรายงาน สารบริสุทธิ์ที่แยกได้จาก *Bacillus sp.* B-TL2 แสดงฤทธิ์การยับยั้งที่ดีต่อเชื้อราทดสอบซึ่งเป็นราที่ก่อโรคพืช ได้แก่ *Bipolaris maydis* *A. brassicae* *A.niger* และ *Cercospora personata* นอกจากนี้ยังพบว่าสารดังกล่าวสามารถทนต่อความร้อนได้ดีกล่าวคือ เมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที พบว่าสารต้านจุลชีพมีผลการยับยั้งที่ไม่ลดลง โดยสามารถแสดงฤทธิ์การยับยั้งได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้รับความร้อน

ตารางที่ 9 ขั้นตอนการทำให้สารต้านจุลชีพจาก *B. amyloliquefaciens* ให้บริสุทธิ์ (Zhang และคณะ, 2008)

Step	Amount of proteins (mg l ⁻¹)	Recover (%)
Culture supernatant	1407.1	100.0
Ammonium sulfate precipitation	861.1	61.2
CM cation exchange	11.5	0.82
Reversed-phase HPLC	2.1	0.15

ความจำเป็นในการศึกษาวิจัยเพื่อหาสารต้านจุลชีพชนิดใหม่

1. ผลข้างเคียงของสารปฏิชีวนะ สารปฏิชีวนะบางชนิดมีผลข้างเคียงที่ไม่ต้องการ เช่น การใช้อะมิโนไกลโคไซด์ในความเข้มข้นสูงมีผลทำลายไต ทำให้ระบบรับรู้ผิดปกติและหูหนวกได้ หรือสารปฏิชีวนะบางชนิดมีข้างเคียงในระยะยาว เช่น คลอแรมฟินิคอลทำให้เกิดโรค aplastic anemia (Nester และคณะ, 2004) หรือทำให้แพ้ยา (antibiotic allergy) เช่น ผู้ที่แพ้ยาแอมพิซิลินจะเป็นผื่นคันและลมพิษ (Gruchalla และคณะ, 2006) เป็นต้น

2. การดื้อสารปฏิชีวนะ การดื้อสารปฏิชีวนะเป็นกระบวนการที่จุลินทรีย์สามารถทนทานต่อสภาพแวดล้อมซึ่งอาจเกิดจากปัจจัยบางประการในตัวจุลินทรีย์เองหรืออาจเกิดภายหลังจากการที่จุลินทรีย์ได้รับปัจจัยที่มีผลต่อการดื้อสารปฏิชีวนะ สาเหตุที่สำคัญสาเหตุหนึ่งเนื่องมาจากการใช้สารปฏิชีวนะผิดวิธี เช่น ใช้ในปริมาณที่มากจนเกินไปทำให้จุลินทรีย์ก่อโรคมิการพัฒนาเพื่อต่อต้านกลไกการทำงานของสารปฏิชีวนะ (Oscariz และคณะ, 1999) เช่น *Streptococcus pneumoniae* เป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคปอดบวมในผู้ใหญ่สามารถทำลายได้ด้วยยาเพนนิซิลิน แต่ในปัจจุบัน *S. pneumoniae* บางสายพันธุ์คือต่อยาเพนนิซิลินเพราะตัวมันมีการเปลี่ยนแปลงยีนบางส่วนเพื่อลดตำแหน่งที่จับของเพนนิซิลินกับตัวเซลล์ (penicillin binding protein) (Nester และคณะ, 2004) นอกจากนี้การดื้อสารปฏิชีวนะอาจเกิดจาก

1. การยับยั้งแบบมีตัวแก่งแย่งระหว่างสารเมแทบอลิต์ที่จำเป็น และสารปฏิชีวนะที่มีโครงสร้างคล้ายสารเมแทบอลิต์ (metabolic analog)
2. การเปลี่ยนแปลงทางวิถีเมแทบอลิซึม (metabolic pathway) ที่หลีกเลี่ยงขั้นตอนที่จุลินทรีย์ถูกยับยั้งด้วยสารปฏิชีวนะ

3. การสังเคราะห์เอนไซม์ของจุลินทรีย์อยู่ในระดับที่สูงเกินกว่าที่สารปฏิชีวนะจะยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ได้
4. เกิดการเปลี่ยนแปลงบริเวณเชื้อหุ้มเซลล์เป็นผลให้สารปฏิชีวนะไม่สามารถแทรกซึมเข้าไปในเซลล์ได้

3. มีโรคเกิดขึ้นใหม่ จากการที่จุลินทรีย์ดื้อต่อสารปฏิชีวนะทำให้เกิดโรคขึ้นใหม่ เช่น Necrotizing otitis externa เป็นโรคติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* เป็นโรคติดเชื้อที่หูชั้นนอกแล้วลามไปถึงฐานกะโหลก (skull base) ทำให้การควบคุมกระบวนการเมแทบอลิซึมผิดปกติเป็นอันตรายถึงตายได้ (Peltier J., 2004)

การนำสารต้านจุลชีพไปใช้ประโยชน์

1. รักษาโรค เช่น รักษาโรคติดเชื้อต่างๆ โรคมะเร็ง
2. ควบคุมโรคพืช การใช้สารปฏิชีวนะเพื่อควบคุมโรคพืชมีข้อดีกว่าการใช้สารเคมีหลายประการ คือ ที่ความเข้มข้นต่ำมีความเป็นพิษเล็กน้อยต่อสัตว์เลื้อยคลานและแมลงที่มีประโยชน์ และสลายตัวได้เร็ว
3. การถนอมอาหาร เช่น ไพมาริซิน (pyrimacin) เป็นสารที่ใช้ฆ่าเชื้อราที่ผิวหน้าอาหารไทโรซิดิน (tyrocidin) สามารถทำลาย *Bacillus* ได้ดี และไนซินสามารถทำลาย *Clostridium* ได้ดีจึงนิยมใช้คู่กันในโรงงานอาหารกระป๋อง
4. การใช้เป็นสารส่งเสริมการเจริญเติบโตและใช้เป็นยารักษาโรคสัตว์ การเติมสารปฏิชีวนะลงใน อาหารสัตว์ปริมาณเล็กน้อย (1-10 มิลลิกรัม / กิโลกรัม อาหารสัตว์) ในระดับที่ต่ำกว่าที่ใช้ในการรักษาโรค จะช่วยเร่งการเจริญเติบโตของสัตว์ได้ เพราะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ ไมโครฟลอรา (microflora) ในทางเดินอาหารของสัตว์
5. การวิจัยทางด้านชีวเคมีและชีววิทยาระดับโมเลกุล ในปัจจุบันมีการใช้สารปฏิชีวนะช่วยในการคัดเลือกเซลล์ต่างๆ ในงานวิจัยทางด้านชีวเคมีและชีววิทยาระดับโมเลกุลอย่างกว้างขวาง ทำให้สามารถศึกษาหน้าที่ต่าง ๆ ของเซลล์ เช่น กระบวนการสร้างดีเอ็นเอ เป็นต้น สารที่นิยมใช้คือ คลอแรมฟินิโคลด แอมพิซิลลิน

งานวิจัยนี้มุ่งที่จะศึกษาสารต้านจุลชีพที่สร้างจาก *Bacillus subtilis* K-05 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีรายงานว่าสามารถสร้างสารต้านจุลชีพที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้หลายชนิด โดยพบว่าสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ และ ราเส้นใย จากการศึกษาเบื้องต้นด้วยวิธี cross streak เมื่อทำให้สารบริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีและศึกษาลักษณะสมบัติสารพบว่า สารดังกล่าวคือ โพรลีนและลิวซีน (cyclo(Pro-Leu)) และโพรลีนและวาเลีน (cyclo(Pro-Val)) โดยสารทั้ง 2 ชนิด มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ (สุดารัตน์ บุญยง, 2548) นอกจากนี้ยังมีสารต้านจุลชีพส่วนอื่นที่ยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์และศึกษาลักษณะสมบัติสาร ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาสารต้านจุลชีพที่สร้างจาก *Bacillus subtilis* K-05 ในส่วนอื่น ๆ ที่ยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์ ศึกษาลักษณะสมบัติสารด้วยการวิเคราะห์ทางเคมีและศึกษาฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ของสารต้านจุลชีพซึ่งอาจมีความเป็นไปได้ที่จะได้สารต้านจุลชีพชนิดใหม่เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคต่อไป

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์

- 3.1.1 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
- 3.1.2 ตู้ถ่ายเชื้อแบบ lamina flow
- 3.1.3 ตู้อบฆ่าเชื้อ ตู้อบแห้ง และหม้ออบฆ่าเชื้อ
- 3.1.4 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ของบริษัท Beckman
- 3.1.5 ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
- 3.1.6 ไมโครปิเปตและทิปขนาด 20 200 1,000 และ 5,000 มล.
- 3.1.7 อุปกรณ์สกัดสาร (separatory funnel) ขนาด 1000 มล.
- 3.1.8 ชุดอุปกรณ์ระเหยแห้ง ได้แก่ เครื่องระเหยแห้งสุญญากาศ (rotary vacuum evaporator) เครื่องควบคุมสุญญากาศ อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ อุปกรณ์หล่อเย็น และคอลัมน์ควบแน่น (condenser)
- 3.1.9 แผ่นโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง (TLC) สำเร็จรูปชนิด Art. 5554 TLC Aluminum sheet silicagel 60 F254 (1.05554.0001) ของบริษัท Merck
- 3.1.10 หลอดแคปปีลารี และถังใส่ตัวทำละลาย
- 3.1.11 หัวกรองและกระดาษกรอง (nylon membrane) ขนาด 0.45 ไมโครเมตร
- 3.1.12 วัสดุดูดซับ silica gel 60 No. 1.09385.9025 (0.04-0.063 มม.) ของบริษัท Merck
- 3.1.13 เครื่อง Mass spectrometer รุ่น VQ-TOF2 ของบริษัท Perkin Elmer เพื่อวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสาร
- 3.1.14 เครื่อง Oxford Model YH400 spectrometer รุ่น Varian Mercury 400 NMR เพื่อศึกษา Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy ($^1\text{H-NMR}$) และ $^{13}\text{C-NMR}$)
- 3.1.15 เครื่อง Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (FT-IR) รุ่น Perkin Elmer 683 ของบริษัท Perkin Elmer เพื่อวิเคราะห์กลุ่มฟังก์ชันของสาร
- 3.1.16 ชุดอุปกรณ์ทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้แก่ คอลัมน์แก้ว จุกแก้ว ขาดั่งและที่จับ
- 3.1.17 เครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC) ELSD detector (Evaporative Light Scattering Detector) รุ่น 2000ES ของบริษัท Alltech ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.1.18 คอลัมน์ Analytical High Performance Liquid Chromatography ชนิด C18 (packing material : Altima C18, 5u, 250x4.6 mm., serial number N507745) ของ

บริษัท Alltech ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.1.19 คอลัมน์ semi-preparative High Performance Liquid Chromatography ชนิด C18
(packing material : Altima C18, 10u, 250x10 mm., serial number 605090702.1)

ของบริษัท Alltech ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2 เคมีภัณฑ์

- 3.2.1 สารสกัดจากเนื้อ (beef extract)
- 3.2.2 สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)
- 3.2.3 สารสกัดจากมอลต์ (malt extract)
- 3.2.4 แบคโตเปปโทน (Bacto peptone)
- 3.2.5 ทริปโตน (tryptone)
- 3.2.6 แอซิดเคซีนไฮโดรไลเซท
- 3.2.7 แป้ง
- 3.2.8 ผงวุ้น
- 3.2.9 น้ำตาลกลูโคส
- 3.2.10 โซเดียมคลอไรด์
- 3.2.11 เอทิลอะซิเตท
- 3.2.12 เมทานอล
- 3.2.13 เฮกเซน
- 3.2.14 อะซิโตนไตรีล
- 3.2.15 ไดคลอโรมีเทน
- 3.2.16 โซเดียมไฮดรอกไซด์
- 3.2.17 ไดเมทิลซัลโฟกไซด์ (DMSO)
- 3.2.18 วานิลลิน (vanillin)
- 3.2.19 เกร็ดไอโอดีน
- 3.2.20 กลีเซอรอล
- 3.2.21 กรดไตรฟลูออโรอะซิติก (TFA)
- 3.2.22 สารยับยั้งการเจริญของรา ได้แก่ ไนสแตติน (Nystatin)
- 3.2.23 แผ่น disc มาตรฐาน คลอแรมฟนิคอลล (chloramphenicol) 30 ไมโครกรัม

3.3 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา

งานวิจัยนี้ใช้ *Bacillus subtilis* K-05 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีรายงานว่าสามารถสร้างสารต้านจุลชีพที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิด โดยพบว่าสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ และราเส้นใย (สุदारัตน์ บุญยง, 2548) โดยมุ่งที่จะศึกษาฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ (antimicrobial activity) การผลิตสารต้านจุลชีพจาก *Bacillus subtilis* K-05 ทำให้สารต้านจุลชีพบริสุทธิ์แล้วศึกษาลักษณะสมบัติของสารด้วยการวิเคราะห์ทางเคมี

ในการผลิตสารต้านจุลชีพและทำให้สารต้านจุลชีพบริสุทธิ์ในแต่ละขั้นตอนจะนำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์โดยใช้จุลินทรีย์ทดสอบ (test organism) ดังต่อไปนี้

- แบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- ยีสต์ ได้แก่ *Candida albicans* ATCC 70014
- ราเส้นใย ได้แก่ *Aspergillus oryzae* *Fusarium* sp. และ *Alternaria* sp.

3.3.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับ *Bacillus subtilis* K-05 ได้แก่อาหารเหลวลูเรีย (Luria Bertani broth : LB) อาหารแข็งลูเรีย (Luria Bertani agar : LA) (ภาคผนวก ก)

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับแบคทีเรียทดสอบ ได้แก่อาหารเหลวนิวเตรียนต์ (Nutrient broth : NB) อาหารแข็งนิวเตรียนต์ (Nutrient agar : NA) (ภาคผนวก ก)

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับยีสต์ และราทดสอบ ได้แก่ อาหารเหลวยีสต์มอลต์ (Yeast-Malt broth : YM) อาหารแข็งยีสต์มอลต์ (Yeast-Malt agar : YMA) และ อาหารแข็งซับบรอตเด็กโตรส (Subouraud' Dextrose agar : SDA) (ภาคผนวก ก)

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับศึกษาฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของสารต้านจุลชีพที่ผลิตในแต่ละขั้นตอนโดยวิธี Agar well diffusion ได้แก่ อาหารแข็งมิลเลอร์ฮินตัน (Mueller Hinton agar : MHA) (ภาคผนวก ก) สำหรับแบคทีเรียทดสอบ และอาหารแข็ง SDA สำหรับยีสต์ และราทดสอบ

3.3.1.2 การเก็บรักษาจุลินทรีย์

การเก็บรักษาแบคทีเรีย

ก. แบคทีเรียทดสอบ

เขี่ยแบคทีเรียมาเลี้ยงลงบนอาหารแข็งลาดเอียง NA แล้วนำไปป่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเททับด้วย 15% กลีเซอรอลที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ -20 องศาเซลเซียส

ข. แบคทีเรียผู้ผลิต *Bacillus subtilis* K-05

เขี่ยแบคทีเรียมาเลี้ยงลงบนอาหารแข็งลาดเอียง LB แล้วนำไปป่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเททับด้วย 15% กลีเซอรอลที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ -20 องศาเซลเซียส

การเก็บรักษายีสต์

เขี่ยยีสต์มาเลี้ยงลงบนอาหารแข็งลาดเอียง YMA แล้วนำไปป่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเททับด้วย 15% กลีเซอรอลที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อและนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ -20 องศาเซลเซียส

การเก็บรักษาราสันไย

เลี้ยงราสันไยบนอาหารแข็งลาดเอียง PDA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน แล้วเททับด้วย 15% กลีเซอรอล นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ -20 องศาเซลเซียส

3.3.2 ผลิตสารต้านจุลชีพจาก *Bacillus subtilis* K-05 และศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารต้านจุลชีพ

3.3.2.1 เตรียมหัวเชื้อโดยเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์แล้วขูดลงบนอาหารแข็ง LB นำไปป่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในขวดอาหารที่บรรจุอาหาร LB (ภาคผนวก ก) ขวดละ 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 ชั่วโมง (สุภารัตน์ บุญยง, 2548)

3.3.2.2 การถ่ายหัวเชื้อ

ก. ในระดับขวดทดลอง นำหัวเชื้อที่ได้จากข้อ 3.3.2.1 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ($OD_{660} = 0.500$) ถ่ายลงในขวดทดลอง ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเหลว LB ขวดละ 50 มิลลิลิตร นำไปป่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

ข. ในระดับถังหมัก (fermentor) นำหัวเชื้อที่ได้จากข้อ 3.3.2.1 ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ($OD_{660} = 0.500$) ถ่ายลงใน fermentor ขนาด 10 ลิตร ที่บรรจุอาหารเหลว LB 5 ลิตร โดยให้อากาศ 1 vvm. อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 ชั่วโมง

เก็บน้ำหมัก (culture broth) ทุก 3-12 ชั่วโมง ในการผลิตสารต้านจุลชีพจาก *Bacillus subtilis* K-05 ในระดับขวดทดลอง และทุก 12 ชั่วโมง เมื่อเลี้ยงเชื้อในระดับถังหมัก หลังจากนั้นปั่นแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใส (supernatant) ที่ได้มาทดสอบทางชีววิธี (bioassay) กับจุลินทรีย์ทดสอบด้วยวิธี Agar well diffusion (Briazani และ Brandelli, 2002) เซลล์ที่แยกออกจากส่วนใสนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายซึ่งจะกล่าวถึงในขั้นตอนของการทำสารบริสุทธิ์และนำสารสกัดหยาบ (crude extract) ที่ได้มาทดสอบทางชีววิธีกับจุลินทรีย์ทดสอบเช่นเดียวกับส่วนใส

3.3.3 การศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์โดยสารต้านจุลชีพด้วยวิธี Agar well diffusion

3.3.3.1 การเตรียมจุลินทรีย์ทดสอบ

ก. การเตรียมจุลินทรีย์ทดสอบที่เป็นแบคทีเรีย

เลี้ยงแบคทีเรียทดสอบบนอาหาร NA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วเขี่ยใส่ในหลอดทดลองซึ่งบรรจุอาหาร NB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชม จากนั้นวัดความขุ่นให้ได้ค่า OD_{625} เท่ากับ 0.10

ข. การเตรียมจุลินทรีย์ทดสอบที่เป็นยีสต์

เลี้ยงยีสต์ทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YMA เป็นเวลา 24 ชม ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้วเขี่ยเชื้อใส่ในหลอดทดลองซึ่งบรรจุอาหาร YMB บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นวัดความขุ่นให้มามีค่า OD_{600} เท่ากับ 0.10

ค. การเตรียมจุลินทรีย์ทดสอบที่เป็นราเส้นใย

เลี้ยงราบนอาหาร SDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน เจาะชิ้นวุ้นที่บริเวณริมโคโลนี แล้ววางลงบนกลางจานอาหารใหม่ (บรรจุอาหาร SDA) (Bernal และ คณะ, 2002) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน

3.3.3.2 การศึกษาการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ

ชุดควบคุมบวก (positive control) ได้แก่

-แผ่น disc มาตรฐาน chloramphenicol 30 μg สำหรับแบคทีเรีย

-สารละลาย Nystatin 10 μg สำหรับยีสต์และ 25 และ 50 μg สำหรับราทดสอบ

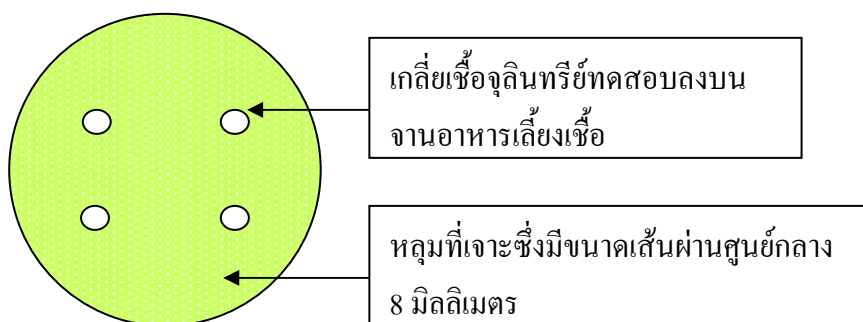
ชุดควบคุมลบ (negative control) ได้แก่ สารละลาย DMSO อาหารเหลว LB

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งต่อแบคทีเรียและยีสต์

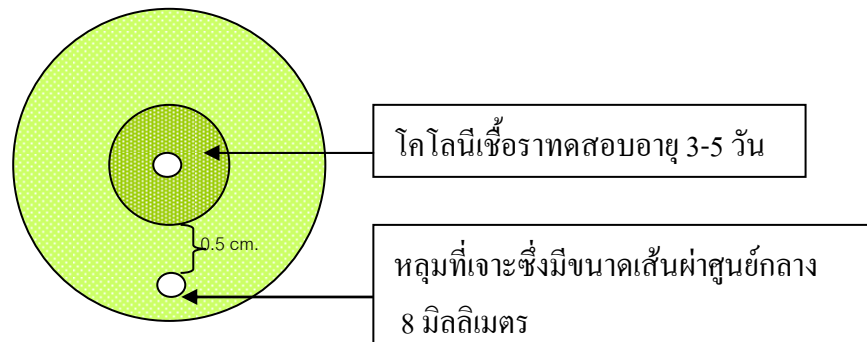
นำจุลินทรีย์ที่เตรียมได้จากการเลี้ยงเชื้อตามวิธีในข้อ ก. และ ข. ปริมาตร 50 ไมโครลิตร หยดลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (อาหารสำหรับแบคทีเรียและยีสต์ ได้แก่อาหาร MHA และ SDA ตามลำดับ) ใช้สำลีพันปลายไม้เกลี่ยลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ หมุนจานอาหารประมาณ 90 องศาแล้วเกลี่ยเชื้อให้ทั่วจาน จากนั้นเปิดสารทดสอบ 50 ไมโครลิตร หยดลงในหลุมที่เจาะเตรียมไว้ด้วยที่เจาะจุกคอร์ก (cork borer) ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร (รูปที่ 16) ทิ้งไว้จนสารทดสอบแพร่ไปบนอาหารแข็งที่ใช้ทดสอบจนหมด (รอจนสารทดสอบที่หยดลงไปแห้ง) แล้วนำไปบ่ม สำหรับแบคทีเรียนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง และยีสต์บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง ตามลำดับ บันทึกผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งราเส้นใย

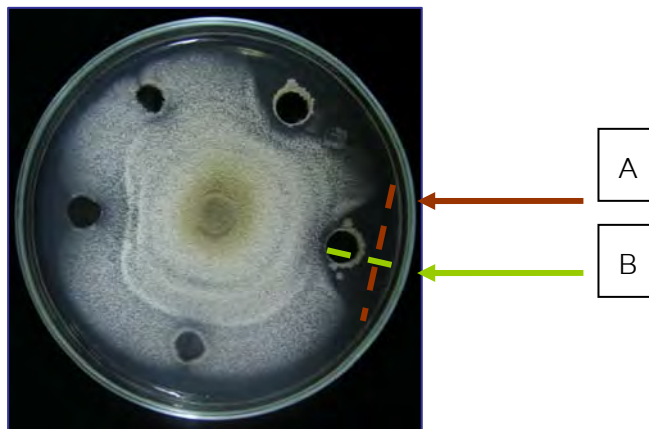
นำราทดสอบที่เตรียมได้จากการเลี้ยงเชื้อตามวิธีในข้อ ก. มาเจาะหลุมรอบโคโลนีของราทดสอบด้วยเจาะจุกคอร์ก ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร โดยเจาะให้ห่างจากริมโคโลนีของราทดสอบ 0.5 เซนติเมตร (รูปที่ 17) จากนั้นเปิดสารทดสอบ 50 ไมโครลิตร หยดลงในหลุมที่เจาะเตรียมไว้ ทิ้งไว้จนสารทดสอบแพร่ไปบนอาหารแข็งที่ใช้ทดสอบจนหมด (รอจนสารทดสอบที่หยดลงไปแห้ง) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน บันทึกผลการยับยั้ง เนื่องจากบริเวณยับยั้งโคโลนีของราเมื่อทดสอบด้วยวิธีดังกล่าวมีด้านกว้างและด้านยาวไม่เท่ากัน การวัดผลจึงวัดระยะยับยั้งทั้ง 2 ด้านแล้วคิดค่าเฉลี่ยดังแสดงเป็นไดอะแกรมในรูปที่ 18



รูปที่ 16 การศึกษาการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบที่เป็นแบคทีเรียหรือยีสต์ โดยสารต้านจุลชีพที่ได้จาก *Bacillus subtilis* K-05



รูปที่ 17 การศึกษาการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบที่เป็นราเส้นใยโดยสารต้านจุลชีพที่ได้จาก *Bacillus subtilis* K-05



รูปที่ 18 การวัดบริเวณยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบที่เป็นราเส้นใยโดยสารต้านจุลชีพที่ได้จาก *Bacillus subtilis* K-05

$$\text{บริเวณยับยั้งราเส้นใย} = \frac{A+B}{2}$$

3.3.4 การทำสารต้านจุลชีพที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* K-05 ให้บริสุทธิ์

3.3.4.1 การสกัดแยกสารต้านจุลชีพ

หลังจากเก็บน้ำหมักตามวิธีการผลิตสารต้านจุลชีพจาก *Bacillus subtilis* K-05 ในข้อ 3.3.2.2 แล้วนำน้ำหมักดังกล่าวมาปั่นแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นนำส่วนใสและเซลล์ที่ทำการปั่นแยกแล้วมาสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

ก. การสกัดแยกสารต้านจุลชีพจากส่วนใส

นำส่วนใสมาสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ เอทิลอะซิเตทโดยใช้ อัตราส่วนระหว่างส่วนใสและเอทิลอะซิเตท เท่ากับ 1 ต่อ 1 (โดยปริมาตร) และนำส่วนใสดังกล่าวมาสกัดซ้ำ 5 ครั้ง จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งโดยในงานวิจัยนี้ใช้ ส่วนใสในการสกัดปริมาณ 20 ลิตร

ข. การสกัดแยกสารต้านจุลชีพจากเซลล์

นำเซลล์มาสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ เมทานอล โดยใช้ อัตราส่วนระหว่างเซลล์และเมทานอล คือ ใช้เซลล์ 25.2 กรัม (จากการเก็บน้ำหมัก 20 ลิตร) สกัดด้วยเมทานอล 600 มิลลิตร เขย่าและแช่ทิ้งไว้ นาน 14-15 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นกรองสารสกัดด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และเมื่อกรองสารสกัดแล้วนำส่วนที่เหลือจากการสกัดไปสกัดในสารละลายเอทิลอะซิเตทอีกครั้งหนึ่ง และกรองสารสกัดที่ได้ด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 หลังจากนั้นรวมสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยเมทานอลและสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทแล้วนำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้ง (ปรับปรุงจาก ปัทมา บัวเพชร, 2549)

นำสารสกัดทั้ง 2 ส่วน คือ สารสกัดที่ได้จากส่วนใสและสารสกัดที่ได้จากเซลล์มาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งกับจุลินทรีย์ทดสอบด้วยวิธีที่กล่าวมาแล้วในข้อ 3.3.3 โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ (crude extract) ในการทดสอบ 1000 ไมโครกรัม (20 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร)

3.3.4.2 การวิเคราะห์สารสกัดหยาบโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง

(Thin Layer Chromatography : TLC)

นำสารสกัดทั้ง 2 ส่วน คือ สารสกัดที่ได้จากส่วนใสและสารสกัดที่ได้จากเซลล์ที่ได้ในข้อ 3.3.4.1 มาละลายในตัวทำละลาย คือ เอทิลอะซิเตทและเอทิลอะซิเตทผสมกับเมทานอลตามลำดับ แล้วหยดลงบนแผ่น TLC โดยมีระบบที่ใช้เป็นตัวพาให้สารเคลื่อนได้แก่ เมทานอล 5% ในเอทิลอะซิเตท จากนั้นตรวจสอบตำแหน่งของสารที่แยกได้โดยการส่องดูด้วยหลอดยูวีที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร การอิงไอโอไอโอดีน และสารละลายวานิลิน

ถ้าระบบตัวพามีความเหมาะสมสามารถแยกสารได้และมีสารบนแผ่น TLC จะสามารถตรวจสอบได้ดังนี้

- สังเกตเห็นจุดสีม่วงบนพื้นสีเขียว และสีม่วงเรืองแสงบนพื้นขาว เมื่อตรวจสอบด้วยยูวีที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร ตามลำดับ
- สังเกตเห็นจุดสีน้ำตาลเมื่อตรวจสอบตำแหน่งของสารที่แยกได้โดยการอ้งไอไอโอดีน
- สังเกตเห็นจุดสีม่วงเมื่อ จุ่มแผ่น TLC ลงในสารละลายวานิลินและให้ความร้อน

3.3.4.3 การแยกสารสกัดที่แยกได้จากส่วนใสให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโท

กราฟี (Column Chromatography)

การเตรียมคอลัมน์ทำได้โดยบรรจุคอลัมน์ขนาดต่างๆ ด้วยผงซิลิกาขนาด 0.04-0.063 มิลลิเมตร (silica gel 60 No. 1.09385.9025) โดยใช้ซิลิกา 50 กรัมต่อสารสกัดหยาบ 1 กรัม ผสมซิลิกากับระบบตัวพาเริ่มต้นที่จะใช้ในชะคอลัมน์คนให้เข้ากัน ใช้ตำลึงที่ปลายคอลัมน์เล็กน้อย เทซิลิกาใส่คอลัมน์ แล้วเคาะเบา ๆ ที่ข้างคอลัมน์เพื่อปรับผิวหน้าของผงซิลิกาให้เรียบเสมอกันและทำให้ผงซิลิกาบรรจุแน่นในคอลัมน์ ทิ้งไว้ข้ามคืนเพื่อให้ผงซิลิกาเรียงตัวได้ดี นำสารสกัดเอทิลอะซิเตทคลุกกับซิลิกาใส่ลงในคอลัมน์แล้วชะด้วยตัวทำละลายจากสารที่มีขั้วต่ำไปสูง เช่น ชะด้วย เฮกเซน 100% เฮกเซน 90% ในเอทิลอะซิเตท เฮกเซน 25% ในเอทิลอะซิเตท เอทิลอะซิเตท 100% เมทานอล 10% ในเอทิลอะซิเตท เมทานอล 50% ในเอทิลอะซิเตท ไปจนถึง เมทานอล 100% เก็บสารแต่ละส่วน (fraction) ที่แยกได้แล้วนำไป ระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสูญญากาศ จากนั้นนำมาวิเคราะห์โดย TLC แล้วตรวจสอบโดยส่องดูด้วยหลอดยูวีที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร การอ้งไอไอโอดีน และสารละลายวานิลิน ตามลำดับ จากนั้นนำส่วนที่มีจุดบนแผ่น TLC ที่ตำแหน่งเดียวกันมารวมกันแล้วทำให้ตัวทำละลายระเหยออกไป และนำไปศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบตามวิธีการทดลองข้อ 3.3.3

3.3.4.4 การแยกสารสกัดที่แยกได้จากส่วนใสให้บริสุทธิ์ด้วยเครื่อง High

Performance Liquid Chromatography (HPLC)

หลังจากที่แยกสารสกัดหยาบจากส่วนใสให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีและนำสารแต่ละส่วนมาทดสอบตามวิธีการทดลองข้อ 3.3.3 แล้ว นำสารส่วนที่ให้ผลยับยั้งต่อจุลินทรีย์ทดสอบมาทำให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วย HPLC ซึ่งการหาระบบที่เหมาะสมในการแยกเพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์จะใช้คอลัมน์ Analytical High performance Liquid Chromatography ชนิด C18 และใช้คอลัมน์ semi-preparative High Performance Liquid Chromatography ชนิด C18 ใน

การแยกสารเพื่อเก็บแต่ละลำดับส่วน จากนั้นนำไปศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบตามวิธีการทดลองข้อ 3.3.3

การหาระบบที่เหมาะสมเพื่อแยกให้ได้สารบริสุทธิ์โดย HPLC มีดังนี้

คอลัมน์ : - คอลัมน์ Analytical High performance Liquid Chromatography ชนิด C18 (packing material : Altima C18, 5u, 250x4.6 mm)
- คอลัมน์ semi-preparative High Performance Liquid Chromatography ชนิด C18 (packing material : Altima C18, 10u, 250x10 mm.)

ระบบตัวพา : A = น้ำปอดคประจุ (DI) + 0.05% TFA

B = อะซิโตนไตรล์ + 0.05% TFA

โดยศึกษาในสภาวะแบบ gradient ตั้งแต่ 0-100%

Detector : ELSD

Flowrate : 0.7 ml/min (คอลัมน์ analytical) และ 5 ml/min (คอลัมน์ semi-preparative)

Drift tube temp. : 110 องศาเซลเซียส

3.3.5 การศึกษาลักษณะสมบัติของสารต้านจุลชีพโดยวิธีวิเคราะห์ทางเคมี

3.3.5.1 Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry (NMR)

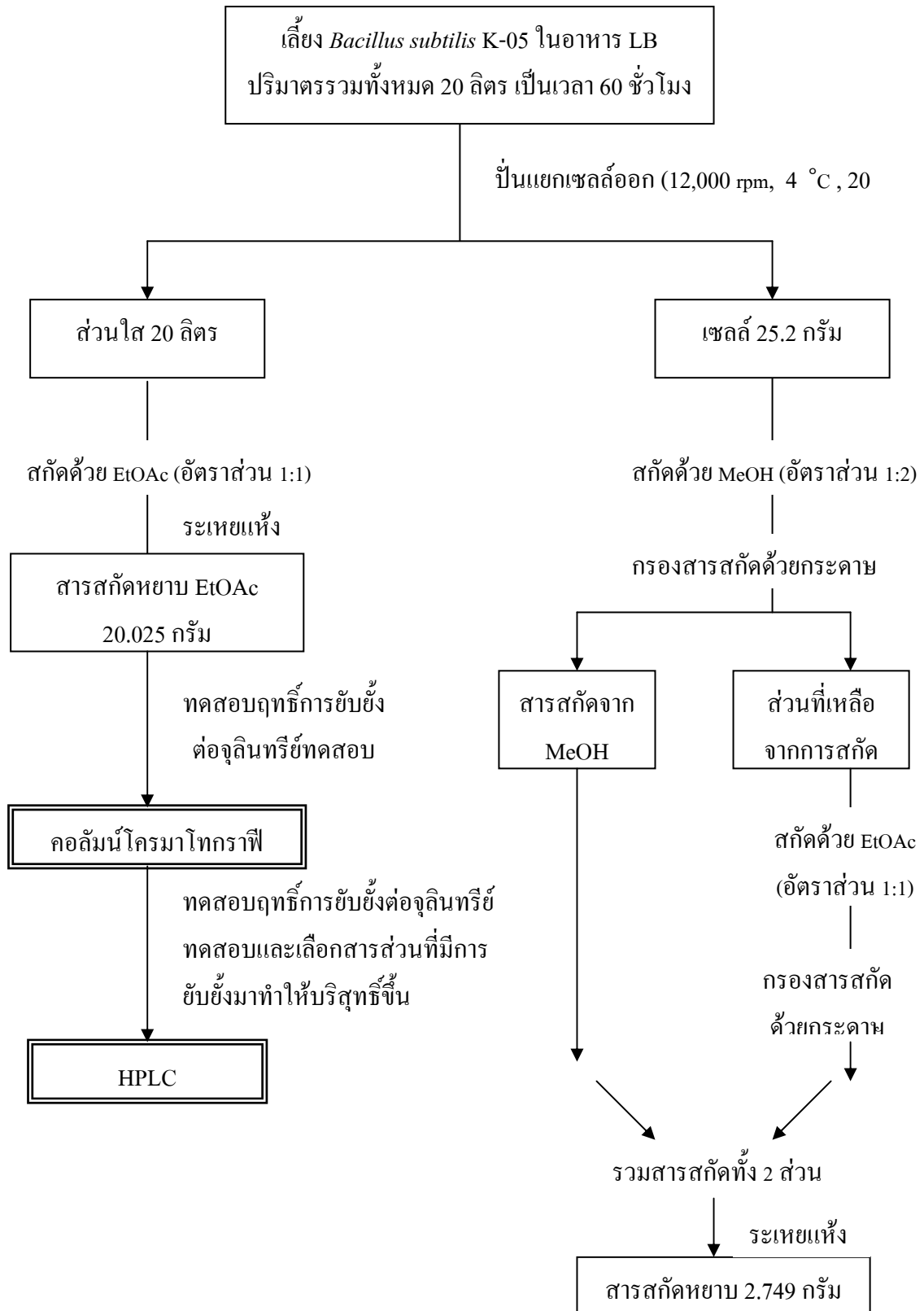
ศึกษา $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz) $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz) DEPT COSY HMQC และ HMBC ที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยใช้เครื่อง Varience Model YH400 spectrometer สำหรับการหาโปรตรอนและคาร์บอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตราโดยวัดค่าเคมีคอลชิฟท์เป็นพีพีเอ็ม (ppm) การเตรียมตัวอย่างสารที่ใช้ในการวิเคราะห์เตรียมโดยใช้สารตัวอย่าง 1-5 มิลลิกรัม สำหรับ $^1\text{H-NMR}$ มากกว่า 50 มิลลิกรัมสำหรับ $^{13}\text{C-NMR}$ และมากกว่า 20 มิลลิกรัมสำหรับ 2D-NMR โดยละลายสารตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ในตัวทำละลาย (Deuterated solvents) ที่เหมาะสม ได้แก่ คลอโรฟอร์ม-ดี₃ (chloroform-d : CDCl_3) เมทานอล-ดี₄ (methanol : CD_3OD) ไดมethylซัลฟอกไซด์-ดี₆ (DMSO-d₆) และคิวเทอร์เรียมออกไซด์ (D_2O) การศึกษา $^1\text{H-NMR}$ วิเคราะห์ที่ 400 MHz สำหรับ ^1H nuclei โดยอ้างอิงกับค่าเคมีคอลชิฟท์ของตัวทำละลาย โดยค่าเคมีคอลชิฟท์ 7.66 ppm สำหรับคลอโรฟอร์ม-ดี₃ 4.87 ppm สำหรับเมทานอล-ดี₄ 2.25 ppm สำหรับไดเมธิลซัลฟอกไซด์-ดี₆ และ 4.80 ppm สำหรับคิวเทอร์เรียมออกไซด์ และการศึกษา $^{13}\text{C-NMR}$ วิเคราะห์ที่ 100 MHz สำหรับ ^{13}C nuclei โดยอ้างอิงกับค่าเคมีคอลชิฟท์ของตัวทำละลาย โดยมีค่าเคมีคอลชิฟท์ 77.1 ppm สำหรับคลอโรฟอร์ม-ดี

3.3.5.2 Mass spectrometry (MS)

ใช้สำหรับการหามวลโมเลกุลของสารประกอบโดยวิเคราะห์ด้วยเทคนิค High resolution electrospray true of flight (HR-TOF-MS) ที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล การเตรียมตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ทำโดยละลายสารตัวอย่างในตัวทำละลาย (Deuterated solvents) ที่เหมาะสม ได้แก่ เมทานอลและเอทานอล เป็นต้น ซึ่งการเตรียมสารที่ใช้ในการวิเคราะห์เตรียมโดยใช้สารตัวอย่าง 1 มิลลิกรัม

3.3.5.3 Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (FT-IR)

ใช้สำหรับการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของสาร โดยการวัดอินฟราเรดสเปกตรัม ซึ่งการเตรียมตัวอย่างสารที่ใช้ในการวิเคราะห์เตรียมโดยใช้สารอย่างน้อย 20 มิลลิกรัม การวิเคราะห์สารตัวอย่างใช้บริการจากกรมวิทยาศาสตร์บริการ



รูปที่ 19 แผนภาพสรุปขั้นตอนการแยกสารต้านจุลชีพที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis* K-05 บริสุทธิ์

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลิตสารด้านจุลชีพจาก *Bacillus subtilis* K-05 และศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารด้านจุลชีพ

ก. การผลิตสารด้านจุลชีพในระดับขวดทดลอง การผลิตสารด้านจุลชีพจาก *B. subtilis* K05 ในระดับ flask ตามวิธีการทดลองในข้อ 3.3.2(ก) พบว่า *B. subtilis* K05 มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตั้งแต่ 0 ชั่วโมงจนถึงชั่วโมงที่ 60 ซึ่งมีน้ำหนักเซลล์แห้ง (cell dry weight) มากที่สุด คือ 1.264 กรัมต่อลิตร และหลังจาก 60 ชั่วโมงพบว่าการเจริญเติบโต *B. subtilis* K05 ค่อยๆ ลดลง และเริ่มสร้างสารด้านจุลชีพตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 และเมื่อศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารด้านจุลชีพจากส่วนใสกับเชื้อทดสอบ คือ *B. subtilis* ATCC 6633 และ *Fusarium* sp. โดยใช้ส่วนใส 50 ไมโครลิตร ทดสอบตามวิธีการทดลองในข้อ 3.3.3 พบว่าสารด้านจุลชีพที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อที่ชั่วโมงต่าง ๆ ให้ผลการยับยั้งที่เพิ่มขึ้นเป็นลำดับกล่าวคือ มีการยับยั้ง *B. subtilis* ATCC 6633 ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ซึ่งมีขนาดบริเวณยับยั้งเท่ากับ 12 มิลลิเมตรและมีการยับยั้งเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24-120 โดยมีขนาดบริเวณยับยั้งกว้างที่สุดประมาณ 19 มิลลิเมตร และตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 สำหรับรา *Fusarium* sp. โดยมีขนาดบริเวณยับยั้งเท่ากับ 16.5 มิลลิเมตรและมีการยับยั้งเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 9-120 โดยมีขนาดบริเวณยับยั้งกว้างที่สุดประมาณ 29.5 มิลลิเมตร (รูปที่ 21) ซึ่งผลการทดลองแสดงในตารางที่ 10

เมื่อเลี้ยงในอาหาร LB เป็นเวลานาน 60 ชั่วโมง ให้ผลยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ดีกว่าหรือใกล้เคียงกับตัวอย่างที่ได้การเลี้ยงเชื้อที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมง ดังนั้นในการศึกษาขั้นต่อไปจึงเก็บตัวอย่างที่ระยะเวลา 60 ชั่วโมง

ข. การผลิตสารด้านจุลชีพในระดับถังหมัก มีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มปริมาณสารสกัดหยาบให้เพียงพอสำหรับใช้ในขั้นตอนของการทำสารบริสุทธิ์ การผลิตสารด้านจุลชีพจาก *B. subtilis* K-05 ในระดับถังหมัก ตามวิธีการทดลองในข้อ 3.3.2 (ข) พบว่า *B. subtilis* K05 มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตั้งแต่ 0 ชั่วโมงจนถึงชั่วโมงที่ 36 ซึ่งมีน้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุด คือ 1.5 กรัมต่อลิตร และหลังจาก 36 ชั่วโมงพบว่าการเจริญเติบโต *B. subtilis* K05 ค่อยๆ ลดลง และเมื่อศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารด้านจุลชีพจากส่วนใสกับจุลินทรีย์ทดสอบ คือ *B. subtilis* ATCC 6633 และ *Fusarium* sp. โดยใช้ส่วนใส 50 ไมโครลิตร ทดสอบตามวิธีการทดลองในข้อ 3.3.3 พบว่าสารด้านจุลชีพที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อที่ชั่วโมงต่าง ๆ ให้ผลการยับยั้งที่เพิ่มขึ้นเป็นลำดับกล่าวคือมีการยับยั้ง *B. subtilis* ATCC 6633 ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ซึ่งมีขนาดบริเวณยับยั้งเท่ากับ 12 มิลลิเมตร และมีการยับยั้งเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24-60 โดยมีขนาดบริเวณยับยั้งกว้างที่สุดเท่ากับ 19 มิลลิเมตร

และสำหรับรา *Fusarium* sp. ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 มีขนาดบริเวณยับยั้งเท่ากับ 18 มิลลิเมตรและการยับยั้งเพิ่มขึ้นตามลำดับ ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24-60 โดยมีขนาดบริเวณยับยั้งกว้างที่สุดเท่ากับ 29 มิลลิเมตร (รูปที่ 21) ซึ่งผลการทดลองแสดงในตารางที่ 11

เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบคำนวณโดย

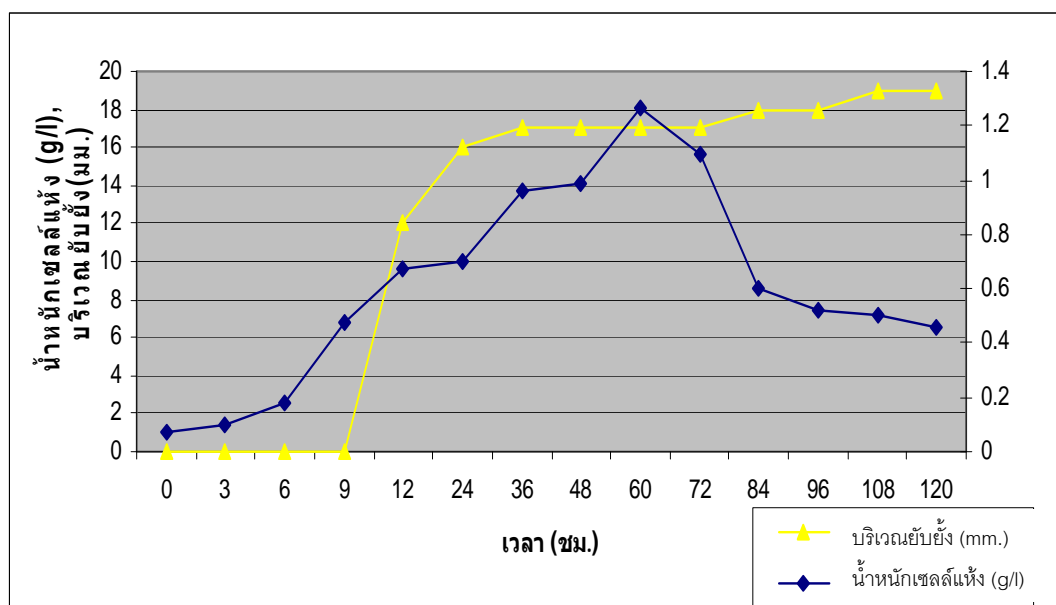
$$\text{การยับยั้งการเจริญ (\%)} = \frac{\text{บริเวณยับยั้งในแต่ละช่วงเวลา (มม.)} \times 100}{\text{บริเวณยับยั้งของชุดควบคุมบวก (มม.)}}$$

ตารางที่ 10 การเจริญของ *B. subtilis* K-05 และการยับยั้ง *B. subtilis* ATCC 6633 และรา *Fusarium* sp. ของสารต้านจุลชีพเมื่อเลี้ยง *B. subtilis* K-05 ในขวดทดลอง

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	บริเวณยับยั้ง (มม.)		การยับยั้งการเจริญ (%)	
		<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>Fusarium</i> sp.	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>Fusarium</i> sp.
0	0.072	0	0	0	0
3	0.096	0	0	0	0
6	0.176	0	16.5	0	80.49
9	0.472	0	17	0	82.93
12	0.676	12	18.5	50	90.24
24	0.704	16	25	66.66	100
36	0.960	17	25.5	70.83	>100
48	0.984	17	27	70.83	>100
60	1.264	17	27.5	70.83	>100
72	1.096	17	28	70.83	>100
84	0.600	18	29	75	>100
96	0.524	18	29	75	>100
108	0.500	19	29	79.17	>100
120	0.460	19	29	79.17	>100
Chloramphenicol / nystatin		24	20.5	100	100
อาหารเหลว LB		0	0	0	0

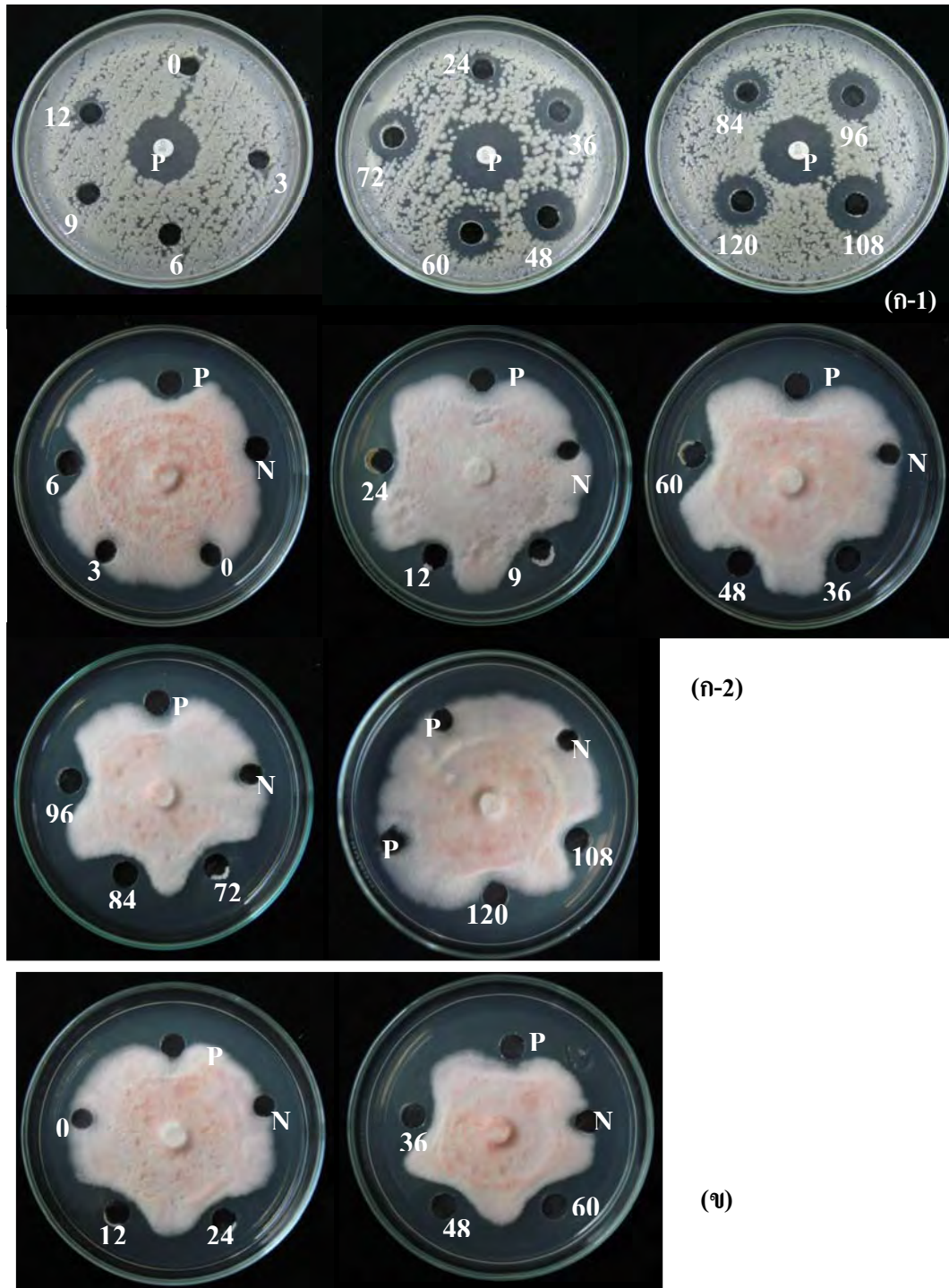
ตารางที่ 11 การเจริญของ *B. subtilis* K-05 และการยับยั้ง *B. subtilis* ATCC 6633 และรา *Fusarium* sp. ของสารต้านจุลชีพเมื่อเลี้ยง *B. subtilis* K-05 ในถังหมัก

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	บริเวณยับยั้ง (มม.)		การยับยั้งการเจริญ (%)	
		<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>Fusarium</i> sp	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>Fusarium</i> sp
0	0.068	0	0	0	0
12	0.50	12	18.5	50	90.24
24	1.00	17	20	70.83	97.56
36	1.50	19	27	79.17	>100
48	1.00	19	29	79.17	>100
60	1.00	19	29	79.17	>100
Chloramphenicol / nystatin		24	20.5	100	100
อาหารเหลว LB		0	0	0	0



รูปที่ 20 กราฟแสดงการเจริญของ *B. subtilis* K-05 ในอาหาร LB

ตัวอย่างแสดงผลการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของสารต้านจุลชีพที่ผลิตโดย *B. subtilis* K-05 ตั้งแต่ 0-120 ชั่วโมง เมื่อเลี้ยงในขวดทดลอง และ ตั้งแต่ 0-60 ชั่วโมงเมื่อเลี้ยงในถังหมัก



รูปที่ 21 การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ (*B. subtilis* ATCC 6633 และ *Fusarium* sp.) ของสารต้านจุลชีพที่ผลิตโดย *B. subtilis* K-05 เมื่อเลี้ยงในขวดทดลอง รูป (ก-1 และ ก-2) และในถังหมักรูป(ข)

(P) คือ ชุดควบคุมบวก ได้แก่ คลอแรมฟินิคอล 30 μg สำหรับแบคทีเรีย และนิสแตติน 50 μg สำหรับราเส้นใย (N) คือ ชุดควบคุมลบ ได้แก่ อาหารเหลว LB

4.2 การทำสารต้านจุลชีพที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis* K-05 ให้บริสุทธิ์

4.2.1 การสกัดสารต้านจุลชีพและการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารต้านจุลชีพในส่วนน้ำ สารสกัดจากส่วนน้ำ และสารสกัดจากเซลล์

ศุคารัตน์ บุญยง (2548) ศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยการสกัดส่วนน้ำที่ได้จากการเลี้ยง *B. subtilis* K-05 ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอีเทอร์ และเอทิลอะซิเตท พบว่าสารสกัดเฮกเซนไม่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้แสดงว่าเฮกเซนไม่สามารถแยกสารต้านจุลชีพจากส่วนน้ำได้ สารสกัดเอทิลอีเทอร์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ 2 ชนิด คือ *B. subtilis* ATCC 6633 และ *S. aureus* ATCC 2593 โดยมีขนาดบริเวณยับยั้งเท่ากับ 16 และ 11 มม. ตามลำดับ เมื่อสกัดแยกสารต้านจุลชีพด้วยเอทิลอะซิเตทพบว่ายับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทุกชนิด คือ แบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *B. subtilis* ATCC6633 *S. aureus* 25923 และ *M. luteus* โดยมีขนาดบริเวณยับยั้งเท่ากับ 19 15 และ 15 มม. แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Enterobacter* sp. *Serratia* sp. *Klebsiella* sp. โดยมีขนาดบริเวณยับยั้งประมาณ 12 มม. ยีสต์ ได้แก่ *S. cerevisiae* และ *C. albicans* ATCC 70014 มีขนาดบริเวณยับยั้งเท่ากับ 11 มม. และสารสกัดเอทิลอะซิเตทยับยั้งราเส้นใยทุกชนิด อย่างไรก็ตามไม่พบการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ 2 ชนิด ได้แก่ *E. coli* ATCC 25922 และ *P. aeruginosa* ATCC 27853 ซึ่งจากผลการทดลองนี้พบว่า สารสกัดเอทิลอะซิเตทยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ดีที่สุด จึงนำเอทิลอะซิเตทมาใช้เพื่อสกัดแยกสารต้านจุลชีพที่ได้จาก *B. subtilis* K-05 ให้บริสุทธิ์และศึกษาสมบัติต่าง ๆ ของสารต้านจุลชีพต่อไป

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้เอทิลอะซิเตทในการสกัดแยกสารต้านจุลชีพจากส่วนน้ำและทำให้บริสุทธิ์เพื่อนำไปศึกษาลักษณะสมบัติสารของสารต้านจุลชีพ เนื่องจากในงานวิจัยนี้ใช้ *B. subtilis* K-05 และสถานะในการผลิตสารต้านจุลชีพเช่นเดียวกับงานวิจัยดังกล่าว

หลังจากเก็บน้ำหมักตามวิธีการผลิตสารต้านจุลชีพจาก *Bacillus* K-05 ในข้อ 3.3.2.2 แล้วนำน้ำหมักดังกล่าวมาปั่นแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นนำส่วนน้ำและเซลล์ที่ทำการปั่นแยกแล้วมาสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ พบว่า เมื่อสกัดแยกสารต้านจุลชีพจากส่วนน้ำปริมาตร 20 ลิตร ด้วยเอทิลอะซิเตทโดยใช้อัตราส่วนระหว่างส่วนน้ำและเอทิลอะซิเตทเท่ากับ 1 ต่อ 1 (โดยปริมาตร) และนำไประเหยแห้งจะได้ปริมาณสารสกัดหยาบที่มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้มทั้งหมด 20.025 กรัม และเมื่อนำเซลล์ที่ทำการปั่นแยกออกจากส่วนน้ำปริมาตร 20 ลิตร ซึ่งมีน้ำหนักเซลล์ 25.2 กรัม มาสกัดตามวิธีการข้อ 3.3.4.1 (จ) และนำไประเหยแห้งจะได้ปริมาณสารสกัดหยาบที่มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลอ่อนทั้งหมด 2.749 กรัม จากนั้นนำสารสกัดทั้ง 2 ส่วน มาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งกับจุลินทรีย์ทดสอบเปรียบเทียบกับส่วนน้ำด้วยวิธีที่กล่าวมาแล้วในข้อ 3.3.3 โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบทั้ง 2 ส่วนในการทดสอบเท่ากับ 1000 ไมโครกรัม (20 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร)

เมื่อศึกษาผลการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยส่วนใส สารสกัดจากส่วนใส และสารสกัดจากเซลล์ พบว่าสารทดสอบแต่ละส่วนมีผลยับยั้งต่อจุลินทรีย์ทดสอบ ดังแสดงในตารางที่กล่าวคือ สารต้านจุลชีพจากทั้ง 3 ส่วนดังกล่าวให้ผลยับยั้งต่อจุลินทรีย์ทดสอบทุกชนิดในระดับที่แตกต่างกัน ยกเว้น *A. oryzae* ซึ่งไม่พบการยับยั้งเมื่อทดสอบกับสารสกัดจากส่วนใส โดยส่วนใสให้ผลยับยั้ง *C. albicans* ATCC 70014 มากที่สุด โดยมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 24 มิลลิเมตร และรองลงมาคือ *E. coli* ATCC 25922 *P. aeruginosa* ATCC 27853 *B. subtilis* ATCC 6633 และ *S. aureus* ATCC 25923 ตามลำดับ สำหรับราเส้นใยพบว่าส่วนใสให้ผลยับยั้งต่อ *Alternaria* sp. มากที่สุด โดยมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 40 มิลลิเมตร รองลงมา ได้แก่ *Fusarium* sp. และ *A. oryzae* ตามลำดับ ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของสารสกัดจากส่วนใส และสารสกัดจากเซลล์พบว่า สารสกัดจากทั้ง 2 ส่วนให้ผลยับยั้งต่อจุลินทรีย์ทดสอบมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับส่วนใส ยกเว้น *C. albicans* ATCC 70014 ราเส้นใย ได้แก่ *Fusarium* sp. และ *A. oryzae* พบว่า บริเวณยับยั้งน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการยับยั้งโดยสารสกัดจากส่วนใส และสำหรับ *A. oryzae* ได้ผลว่าไม่พบการยับยั้งโดยส่วนใส สารสกัดจากเซลล์มีผลต่อการยับยั้งแบคทีเรียโดยพบว่า ให้ยับยั้งต่อแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบได้ดีกว่าส่วนใสเล็กน้อย และพบว่าสารสกัดจากเซลล์สามารถยับยั้งราเส้นใยได้ทั้ง 3 ชนิด แต่บริเวณยับยั้งลดลงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับการยับยั้งโดยส่วนใส เมื่อเปรียบเทียบผลการยับยั้งกับชุดควบคุมพบว่ามีสารต้านจุลชีพที่ผลิตโดย *B. subtilis* K-05 สามารถยับยั้ง *E. coli* ATCC 25922 ได้ดีมากกว่าแบคทีเรียทดสอบทุกชนิด แต่สำหรับจุลินทรีย์ทดสอบที่เป็นราเส้นใย พบว่า สารในส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยง *B. subtilis* K-05 สามารถยับยั้งราเส้นใยได้มากกว่าชุดควบคุมบวก และสำหรับสารสกัดจากเซลล์ พบว่าสามารถยับยั้งราเส้นใยได้ใกล้เคียงหรือดีกว่าชุดควบคุมบวก

ตารางที่ 12 การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารต้านจุลชีพจากส่วนใย สารสกัดจากส่วนใยและสารสกัดจากเซลล์ที่ผลิตโดย *B. subtilis* K-05

จุลินทรีย์ทดสอบ	บริเวณยับยั้ง (มม.)				
	สารทดสอบ				
	ส่วนใย	สารสกัดจากส่วนใย	สารสกัดจากเซลล์	Chloramphenicol / nystatin	DMSO
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	17	20	20	24	-
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	15	21	21	26	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	20	22	25	28	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	19	19	20	13	-
<i>C. albicans</i> ATCC 70014	24	12	12	33	-
<i>A. oryzae</i>	28.5	-	22.5	11.5	-
<i>Fusarium</i> sp.	27.5	16.5	24	20.5	-
<i>Alternaria</i> sp.	40	28	28.5	34	-

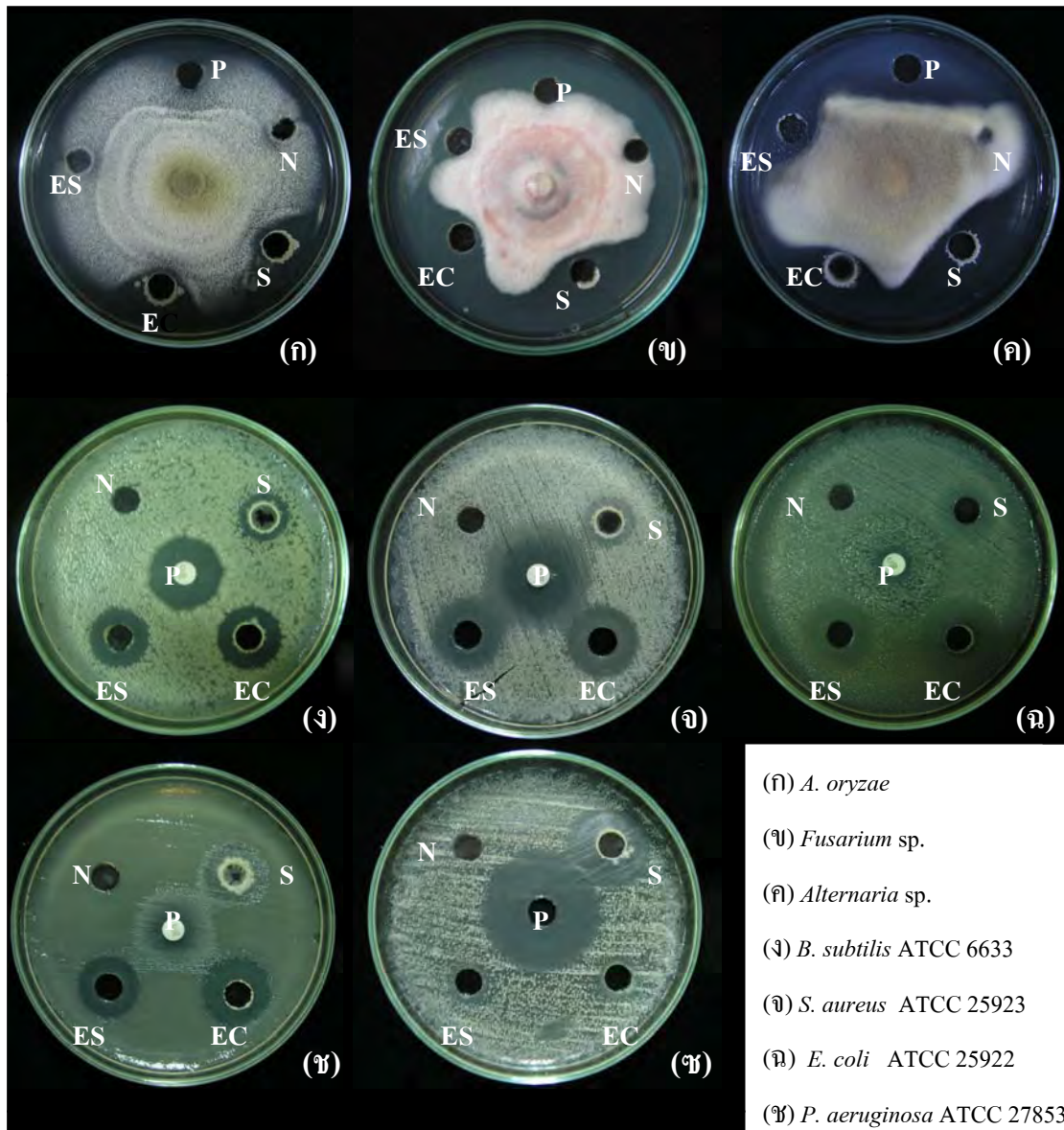
หมายเหตุ - = ไม่มีการยับยั้ง

ตารางที่ 13 เปร้ร้เ้เนการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบเปรียบเทียบกับชุดควบคุมบวกโดยสารต้านจุลชีพจากส่วนไส สารสกัดจากส่วนไสและสารสกัดจากเซลล์ที่ผลิตโดย *B. subtilis* K-05

จุลินทรีย์ทดสอบ	การยับยั้งการเจริญ (%)				
	สารทดสอบ				
	ส่วนไส	สารสกัดจากส่วนไส	สารสกัดจากเซลล์	Chloramphenicol / nystatin	DMSO
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	70.83	83.3	83.3	100	-
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	57.69	80.77	80.77	100	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	71.43	78.57	89.29	100	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	>100	>100	>100	100	-
<i>C. albicans</i> ATCC 70014	72.73	36.36	36.36	100	-
<i>A. oryzae</i>	>100	-	>100	100	-
<i>Fusarium</i> sp.	>100	80.49	>100	100	-
<i>Alternaria</i> sp.	>100	82.35	83.82	100	-

หมายเหตุ - = ไม่มีการยับยั้ง

ตัวอย่างแสดงการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารต้านจุลชีพจากส่วนใบ สารสกัดจากส่วน
ใบและสารสกัดจากเซลล์



รูปที่ 22 การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารต้านจุลชีพจากส่วนใบ สารสกัดจากส่วนใบ และสารสกัดจากเซลล์ (P) คือ ชุดควบคุมบวก ได้แก่ คลอแรมฟินิคอล 30 μg สำหรับแบคทีเรีย ไนสแตติน 10 และ 50 μg สำหรับยีสต์และราเส้นใยตามลำดับ (N) คือ ชุดควบคุมลบ ได้แก่ DMSO หมายเหตุ (S) คือส่วนใบ

(EC) คือสารสกัดจากตัวเซลล์

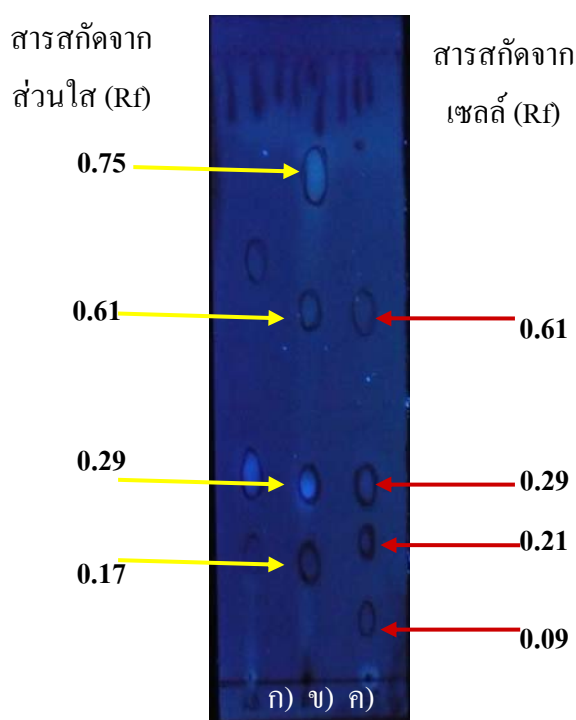
(ES) คือสารสกัดจากส่วนใบ

4.2.2 การทำสารต้านจุลชีพให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง

เมื่อนำสารสกัดทั้ง 2 ส่วน คือ สารสกัดจากส่วนใบและสารสกัดจากเซลล์มาวิเคราะห์โดยวิธี TLC โดยระบบตัวทำละลายชนิดต่างๆ เพื่อหาระบบตัวพาที่เหมาะสมสำหรับเป็นแนวทางในการแยกสารโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยพบว่าระบบตัวพาที่ดีที่สุดที่เหมาะสมสำหรับแยกสารสกัดทั้ง 2 ส่วนนี้ คือ เมทานอล 5% ในเอทิลอะซิเตท

เมื่อแยกสารสกัดจากส่วนใบด้วยระบบดังกล่าวและตรวจสอบตำแหน่งของสารที่แยกได้ โดยการส่องดูด้วยหลอดยูวีที่มีความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร การอ้งไอไอโอดีน และสารละลายวานิลิน ตามลำดับ พบว่าสามารถแยกสารสกัดได้ 4 ตำแหน่ง มีค่า R_f เท่ากับ 0.17 0.29 0.61 และ 0.75 ตามลำดับ และเมื่อแยกสารสกัดจากเซลล์ด้วยระบบดังกล่าวและตรวจสอบตำแหน่งของสารที่แยกได้โดยการส่องดูด้วยหลอดยูวีที่มีความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร การอ้งไอไอโอดีน และสารละลายวานิลิน ตามลำดับ พบว่าสามารถแยกสารสกัดได้ 4 ตำแหน่ง มีค่า R_f เท่ากับ 0.09 0.21 0.29 และ 0.61 ตามลำดับ

จากผลการวิเคราะห์ดังกล่าวพบว่าสารที่มีค่า R_f เท่ากับ 0.29 เป็นสารที่พบทั้งในอาหาร LB สกัด สารสกัดจากส่วนใบและสารสกัดจากเซลล์ นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากส่วนใบและสารสกัดจากเซลล์ มีตำแหน่งของสารที่แยกได้ตรงกัน 2 ตำแหน่ง คือที่ค่า R_f เท่ากับ 0.29 และ 0.61



รูปที่ 23 โครมาโทแกรมจาก TLC โดยระบบตัวพามาเมทานอล 5% ในเอทิลอะซิเตท

ก) อาหาร LB สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท ข) สารสกัดจากส่วนใบ ค) สารสกัดจากเซลล์

4.2.3 การทำสารต้านจุลชีพให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

จากการวิเคราะห์สารสกัดจากส่วนใบและสารสกัดจากเซลล์ด้วยวิธี TLC โดยใช้ระบบตัวพา คือ เมทานอล 5% ในเอทิลอะซิเตต ตามวิธีการทดลองข้อที่ 3.3.4.2 สามารถนำมาใช้เป็นแนวทางในการเลือกระบบชะสารจากคอลัมน์โครมาโทกราฟี เช่น เฮกเซน 100% ไม่สามารถแยกสารได้ ดังนั้นเมื่อแยกสารด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีการชะคอลัมน์จึงควรเพิ่มความมีขี้ของสารตัวพา (eluent) ให้สูงขึ้นได้ แต่ถ้าระบบตัวพานั้นสามารถแยกสารได้ดีให้ชะด้วยระบบตัวพาดังกล่าวมากกว่าระบบตัวพาอื่น และการชะคอลัมน์จะชะด้วยสารตัวพาที่มีความเป็นขี้ต่ำไปจนถึงสารตัวพาที่มีความเป็นขี้สูง ตามวิธีการทดลองข้อที่ 3.3.4.3

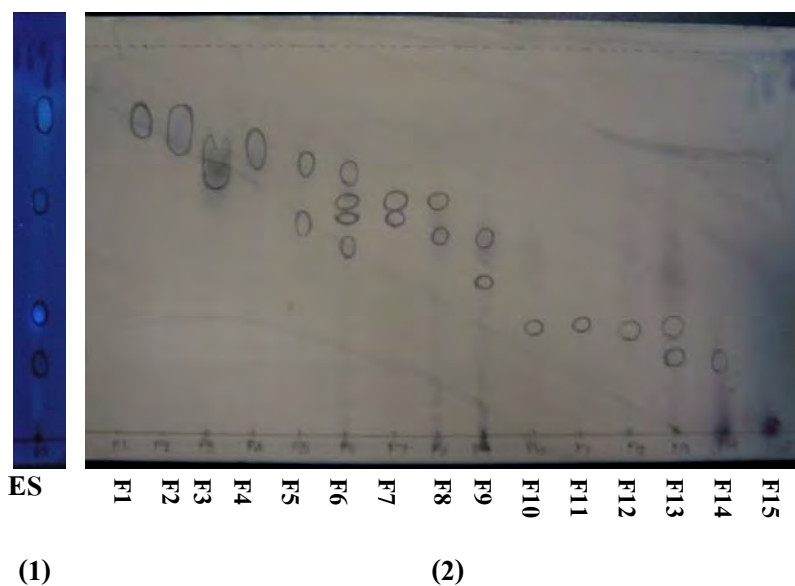
จากผลการวิเคราะห์สารสกัดจากส่วนใบและสารสกัดจากเซลล์โดยวิธี TLC ดังกล่าวพบว่าตำแหน่งของสารที่แยกได้ตรงกัน 2 ตำแหน่ง คือที่ค่า Rf ประมาณ 0.44 และ 0.74 ส่วนที่ตำแหน่งอื่นมี ค่า Rf ต่างกัน ดังนั้นในการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนนี้จึงไม่นำสารทั้ง 2 ส่วนมารวมกันเพราะจะทำให้การแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ทำได้ยากขึ้น และเลือกที่จะศึกษาสารสกัดจากส่วนใบก่อนเป็นลำดับแรกเนื่องจากเป็นส่วนที่มีปริมาณมากและเคยมีรายงานการพบสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ และยังมีสารต้านจุลชีพส่วนอื่นที่ยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์ (สุภารัตน์ บุญยง, 2548)

การแยกสารสกัดจากส่วนใบทำโดยนำสารสกัดหยาบ 20.025 กรัม (สกัดจากส่วนใบ 20 ลิตร) มาแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีตามวิธีการในข้อ 3.3.4.3 การแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีครั้งที่ 1 ใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตรและใช้ซิลิกาเจล (300 กรัม) เป็นตัวดูดซับซึ่งแพ็ค (pack) สูงเท่ากับ 50 เซนติเมตร เก็บสารส่วนที่ชะได้จากคอลัมน์ครั้งละ 25-50 มิลลิตร โดยระบบสารตัวพาที่ใช้ชะคอลัมน์ได้ชะด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีความเป็นขี้ต่ำไปจนถึงสารตัวพาที่มีความเป็นขี้สูง (ตารางที่ 14) ตามวิธีการทดลองข้อที่ 3.3.4.3

เมื่อแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีและตรวจสอบตำแหน่งของสารที่แยกได้โดยการส่องดูด้วยหลอดยูวีที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร การอ้งไอโอไดน และสารละลายวานิลิน ตามลำดับแล้ว นำสารส่วนที่มีตำแหน่งบนแผ่น TLC ตำแหน่งเดียวกันมารวมกัน พบว่าแยกสารได้ทั้งหมด 15 ส่วน (F1-F15) หลังจากนั้นนำส่วนที่แยกได้มาศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบตามวิธีการทดลองข้อที่ 3.3.3 โดยใช้ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม (10 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร) เป็นขั้นตอนต่อไป

ตารางที่14 การแยกส่วนสาร(fractions) จากสารสกัดหยาบจากส่วนใตของสารต้านจุลชีพที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis* K-05

ส่วนสาร	ระบบที่ใช้ชะคอัลมัน์	ลักษณะของสาร	น้ำหนัก (กรัม)
F1	เฮกเซน100%	สารใสไม่มีสี	0.003
F2	เอธิลอะซิเตต20%ในเฮกเซน	ของเหลวหนืดสีเหลือง+ ของแข็งสีขาว	0.3118
F3	เอธิลอะซิเตต 20%ในเฮกเซน	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลอ่อน (ปนน้ำมัน)	0.9399
F4	เอธิลอะซิเตต 20%ในเฮกเซน	ของเหลวสีน้ำตาล (ปนน้ำมัน)	1.8587
F5	เอธิลอะซิเตต 50%ในเฮกเซน	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม+ ของแข็งสีน้ำตาล	2.0289
F6	เฮกเซน 30%ในเอธิลอะซิเตต	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล+ ของแข็งสีน้ำตาล	0.1406
F7	เฮกเซน 25%ในเอธิลอะซิเตต	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลอ่อน+ ของแข็งสีน้ำตาล	0.0128
F8	เอธิลอะซิเตต100%	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลอ่อน	5.0837
F9	เอธิลอะซิเตต100%	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลอ่อน	0.1271
F10	เมทานอล 5% ในเอธิลอะซิเตต	ของเหลวหนืดสีเหลือง	0.1266
F11	เมทานอล5%ในเอธิลอะซิเตต	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล+ ของแข็งสีเหลือง	0.1563
F12	เมทานอล25%ในเอธิลอะซิเตต	ของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อน+ ของแข็งสีเหลืองอ่อน	0.8171
F13	เมทานอล25%ในเอธิลอะซิเตต	ของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อน+ ของแข็งสีขาว	0.3846
F14	เมทานอล50%ในเอธิลอะซิเตต	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลอ่อน	6.2786
F15	เมทานอล 80%-100ใน เอธิลอะซิเตต	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม	4.0861



รูปที่ 24 การแยกสารบน TLC โดยใช้ระบบตัวพาเป็น 5% เมทานอลในเอทิลอะซิเตทของสารสกัด ทั้ง 15 ส่วน (1) สารสกัดจากส่วนไส (2) สารส่วนที่1-15

ตารางที่ 15 ค่า Rf ตำแหน่งต่างๆ ของสารสกัดทั้ง 15 ส่วนเมื่อแยกสารบน TLC โดยใช้ระบบตัวพา เป็น 5% เมทานอลในเอทิลอะซิเตท

ส่วน	ตำแหน่งสารที่แยก ได้	ค่า Rf
F1	1	0.85
F2	1	0.82
F3	1	0.70
F4	1	0.75
F5	2	0.5, 0.65
F6	4	0.45, 0.52, 0.56, 0.62
F7	2	0.52, 0.56
F8	2	0.54, 0.56
F9	3	0.37, 0.43, 0.54
F10	2	0.33, 0.45
F11	2	0.33, 0.45
F12	2	0.32, 0.43
F13	3	0.25, 0.32, 0.42
F14	1	0.24
F15	0	ไม่สามารถแยกได้ด้วยระบบนี้

4.2.4 การศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยส่วนที่แยกได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟี

เมื่อนำส่วนที่แยกได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีทั้งหมด 15 ส่วนมาศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบตามวิธีการทดลองข้อที่ 3.3.3 โดยเลือกตัวแทนของเชื้อทดสอบ 4 คือ แบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *B. subtilis* ATCC 6633 แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *E. coli* ATCC 25922 ยีสต์ ได้แก่ *C. albicans* ATCC 70014 และราเส้นใย ได้แก่ *Alternaria* sp. ซึ่งผลการทดสอบแสดงในตารางที่ 16 ผลการศึกษาพบว่า สารส่วนที่แยกได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีทั้ง 15 ส่วน (F1-F15) ให้ผลยับยั้งแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ทดสอบ โดยเมื่อทดสอบกับ *B. subtilis* ATCC 6633 พบว่าสารเกือบทุกส่วนให้ผลยับยั้งต่อแบคทีเรียดังกล่าว ยกเว้นสารส่วน F1 และ F11 ซึ่งไม่มีผลยับยั้ง โดยส่วนของสารที่ให้ผลการยับยั้งต่อ *B. subtilis* ATCC 6633 ดีที่สุดคือสารส่วน F4 และ F8 ซึ่งมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 26 และ 25 มิลลิเมตร ตามลำดับ และเมื่อทดสอบสารทั้ง 15 ส่วนกับ *E. coli* ATCC 25922 พบว่าสารเกือบทุกส่วนให้ผลยับยั้งต่อเชื้อดังกล่าว ยกเว้นสารส่วน F1 F2 และ F11 ซึ่งไม่แสดงผลยับยั้ง โดยส่วนของสารที่ให้ผลการยับยั้งต่อ *E. coli* ATCC 25922 ดีที่สุดคือสารส่วน F4 และ F13 ซึ่งมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 28 และ 27 มิลลิเมตร ตามลำดับ และเมื่อทดสอบสารทั้ง 15 ส่วนกับ *C. albicans* ATCC 70014 พบว่ามีสารเพียงบางส่วนที่ให้ผลยับยั้งต่อเชื้อดังกล่าว คือ สารส่วน F3-F11 โดยส่วนของสารที่ให้ผลการยับยั้งต่อ *C. albicans* ATCC 70014 ดีที่สุดคือสารส่วน F4 ซึ่งมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 25 มิลลิเมตร และเมื่อทดสอบสารทั้ง 15 ส่วนกับราเส้นใยคือ *Alternaria* sp. พบว่ามีสารเพียง 1 ส่วนที่ให้ผลยับยั้งต่อเชื้อดังกล่าว คือ F4 โดยส่วนของสารที่ให้ผลการยับยั้งต่อ *Alternaria* sp. ดีที่สุดคือสารส่วน F4 ซึ่งมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 28.5 มิลลิเมตร

สรุปผลการทดลองนี้ทำให้พบว่าสารส่วน F4 เป็นสารส่วนที่เป็นสารส่วนที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก (*B. subtilis* ATCC 6633) แบคทีเรียแกรมลบ (*E. coli*) ยีสต์ (*C. albicans* ATCC 70014) และราเส้นใย (*Alternaria* sp.) โดยบริเวณยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทุกกลุ่มที่ศึกษาได้ใกล้เคียงกับการยับยั้งโดยชุดควบคุมบวก และสารส่วน F13 ซึ่งมีบริเวณยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก (*B. subtilis* ATCC 6633) แบคทีเรียแกรมลบ (*E. coli*) โดยเฉพาะ *E. coli* โดยมีบริเวณยับยั้งใกล้เคียงกับการยับยั้งโดยชุดควบคุมบวก

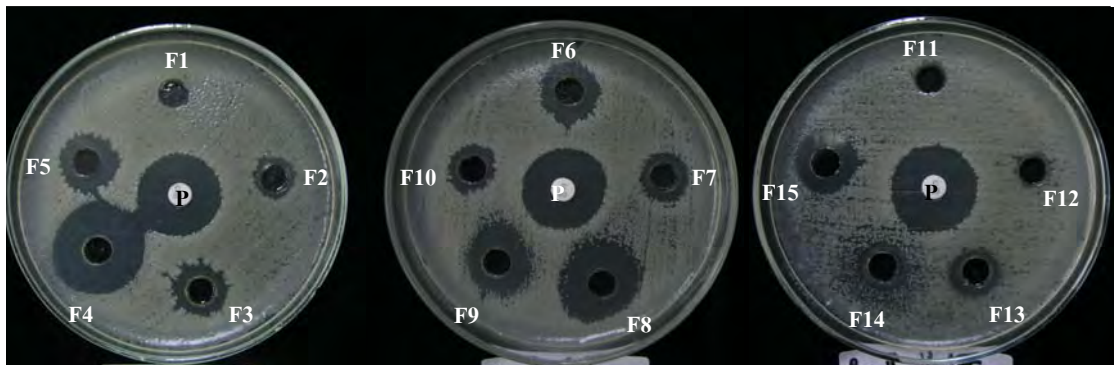
ดังนั้นจึงเป็นผลการศึกษาที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากชุดควบคุมบวกเป็นสารบริสุทธิ์ จำหน่ายเป็นการค้าย่อมมีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีมาก เมื่อสารที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* K-05 และแยกให้บริสุทธิ์มาเป็นสารส่วน F4 แล้วสามารถแสดงฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์และราเส้นใย (broad spectrum) และสารส่วน F13 ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ แบคทีเรียแกรมบวก โดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมลบซึ่งมีสารต้านจุลชีพน้อยชนิดที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบมีความซับซ้อนมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก จึงน่าจะมีประโยชน์ถ้าสามารถศึกษาลักษณะสมบัติทางเคมีของสารนี้ เพื่อประโยชน์ในการพัฒนา เพื่อนำมาใช้ทางเภสัชวิทยาต่อไป

ตารางที่ 16 ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารต้านจุลชีพส่วนที่แยกได้จากคอแลมน์โครมาโทกราฟี ทั้งหมด 15 ส่วน

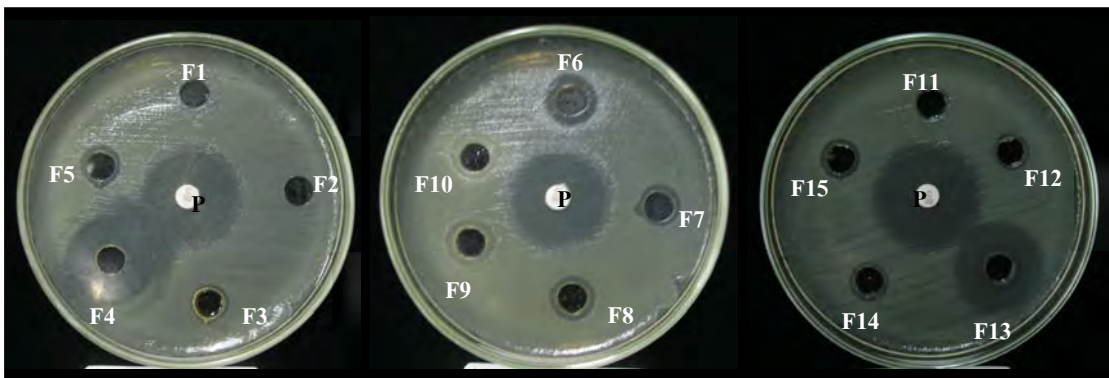
ส่วนสาร	บริเวณยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ (มม.) / (%)							
	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633		<i>E. coli</i> ATCC 25922		<i>C. albican</i> ATCC 70014		<i>Alternaria</i> sp.	
	(มม.)	(%)	(มม.)	(%)	(มม.)	(%)	(มม.)	(%)
F1	-	-	-	-	-	-	-	-
F2	12	50	-	-	-	-	-	-
F3	15	62.5	9	32.14	11	36.67	-	-
F4	26	>100	28	100	25	83.33	28.5	>100
F5	18	75	13	46.43	11	36.67	-	-
F6	17	70.83	16	57.14	16	53.33	-	-
F7	15	62.5	12	42.86	10	33.33	-	-
F8	25	>100	12	42.86	13	43.33	-	-
F9	21	87.5	14	50	12	40	-	-
F10	19	79.17	15	53.57	-	-	-	-
F11	-	-	-	-	-	-	-	-
F12	9	37.5	10	35.71	-	-	-	-
F13	15	62.5	27	96.43	-	-	-	-
F14	19	79.17	12	42.86	-	-	-	-
F15	20	83.33	12	42.86	-	-	-	-
Chloramphenicol / nystatin	24	100	28	100	30	100	22.5	100
DMSO	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ (-) = ไม่มีการยับยั้ง

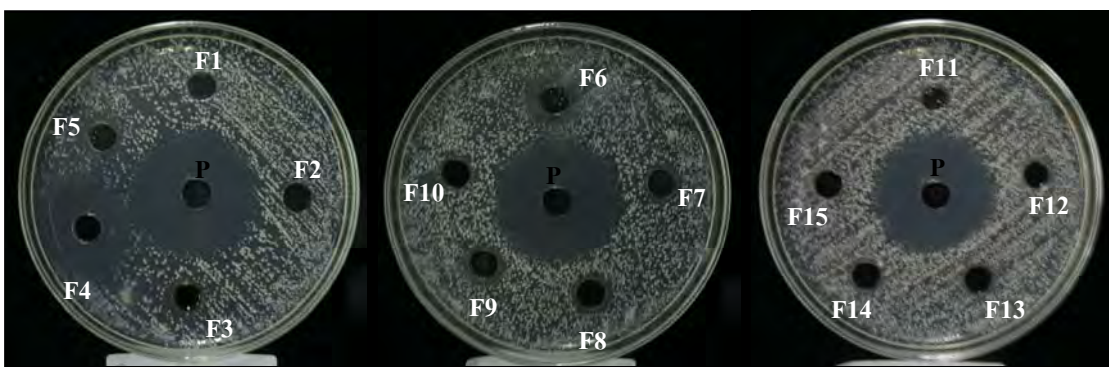
ตัวอย่างแสดงการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารต้านจุลชีพส่วนที่แยกได้จากคลอสมน์โครมาโทกราฟี ทั้งหมด 15 ส่วน



(ก)



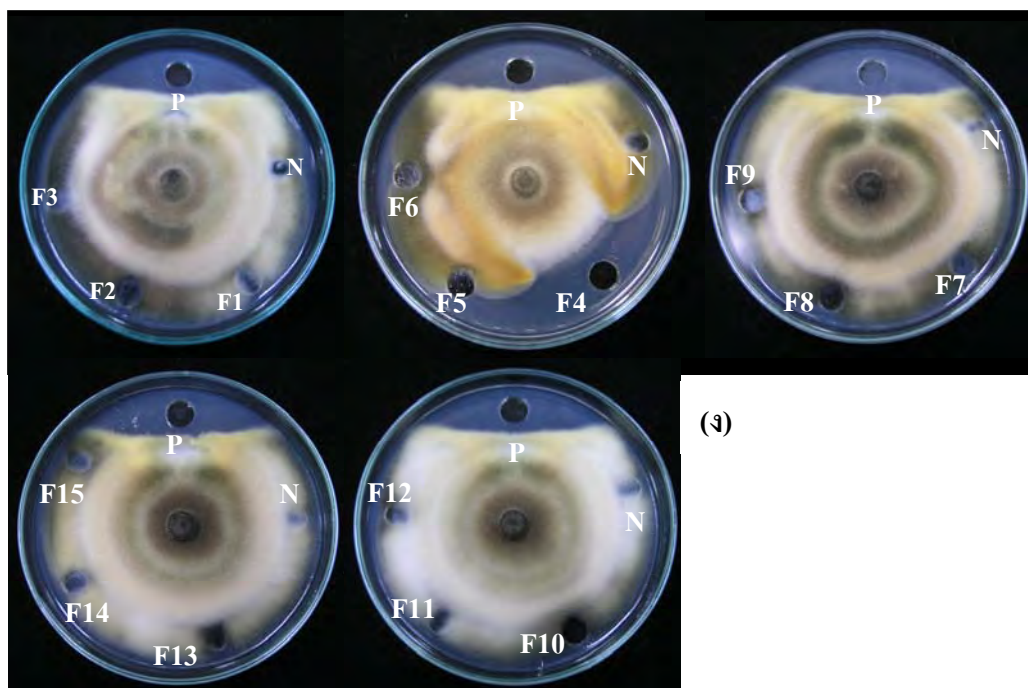
(ข)



(ค)

รูปที่ 25 ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารต้านจุลชีพส่วนที่แยกได้จากคลอสมน์โครมาโทกราฟี ทั้งหมด 15 ส่วน (ก) *B. subtilis* ATCC 6633 (ข) *E. coli* ATCC 25922 (ค) *C. albican* ATCC 70014 และ (ง) *Alternaria* sp.

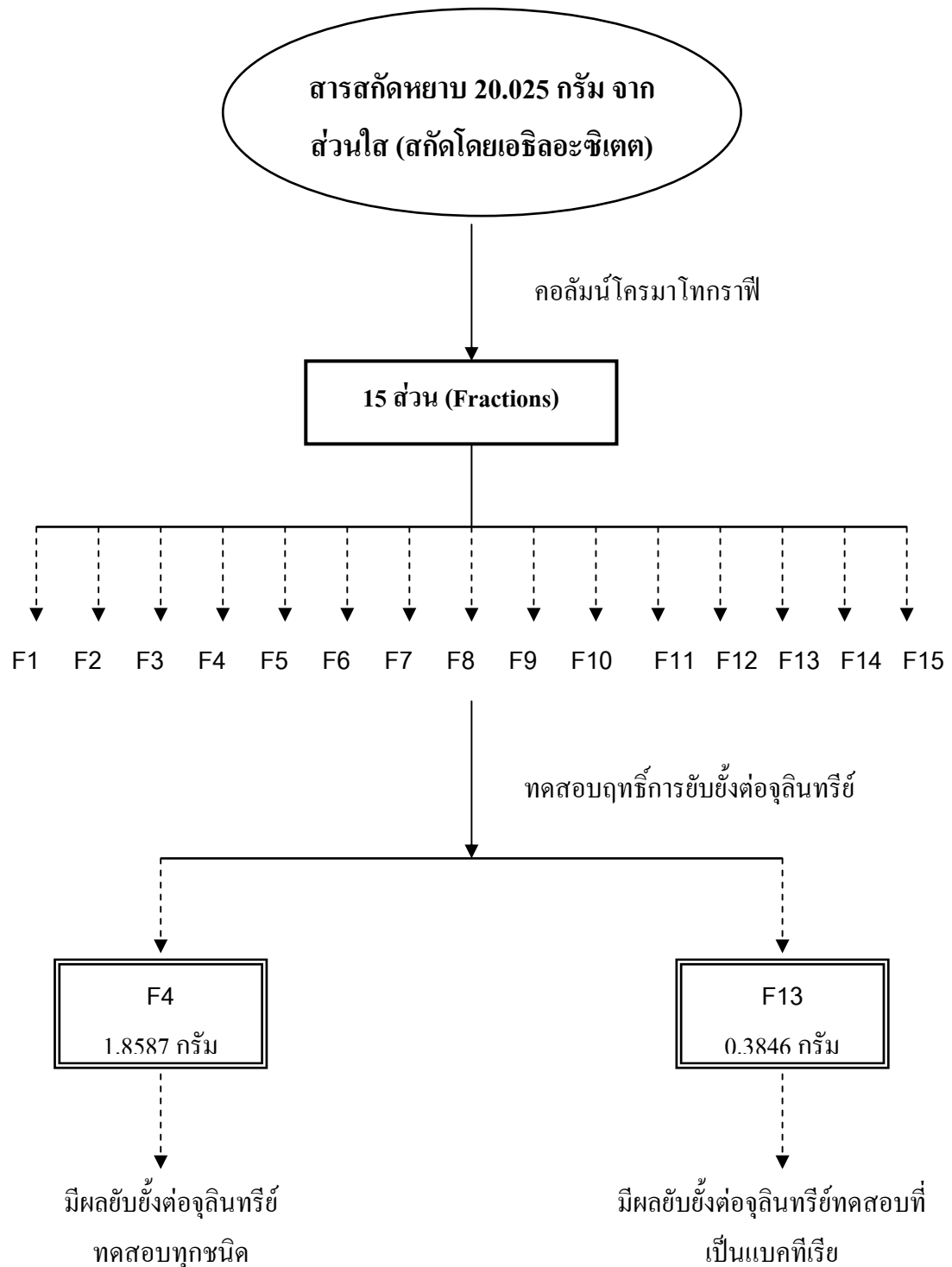
(P) คือ ชุดควบคุมบวก ได้แก่ คลอแรมฟินิโคล 30 μg สำหรับแบคทีเรีย นิสเตดดิน 10 และ 25 μg สำหรับยีสต์และราเส้นใยตามลำดับ (N) คือ ชุดควบคุมลบ ได้แก่ DMSO



รูปที่ 25 (ต่อ) ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารต้านจุลชีพส่วนที่แยกได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟี ทั้งหมด 15 ส่วน (ก) *B. subtilis* ATCC 6633 (ข) *E. coli* ATCC 25922 (ค) *C. albican* ATCC 70014 และ (ง) *Alternaria* sp.

(P) คือ ชุดควบคุมบวก ได้แก่ คลอแรมฟินิคอล 30 μg สำหรับแบคทีเรีย นิสแตติน 10 และ 25 μg สำหรับยีสต์และราเส้นใยตามลำดับ (N) คือ ชุดควบคุมลบ ได้แก่ DMSO

จากผลการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารต้านจุลชีพส่วนที่แยกได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีทั้งหมด 15 ส่วน สรุปได้ว่า สารส่วนที่ 4 (F4) ให้ผลการยับยั้งต่อจุลินทรีย์ทดสอบได้ดีที่สุด โดยสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ทุกชนิดและให้บริเวณยับยั้งที่กว้าง และสารอีกส่วนที่ให้ผลการยับยั้งต่อจุลินทรีย์ทดสอบได้ดีรองลงมาคือ สารส่วนที่ 13 (F13) ซึ่งสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ คือ *B. subtilis* ATCC 6633 และ *E. coli* ATCC 25922 โดยเฉพาะให้ผลยังยั้งเป็นบริเวณยับยั้งที่กว้าง ต่อ *E. coli* ATCC 25922 และสารทั้ง 2 ส่วนนี้ยังให้ผลการยับยั้งต่อจุลินทรีย์ทดสอบ ใกล้เคียงกับชุดควบคุมบวก ได้แก่ คลอแรมฟินิคอล 30 μg สำหรับแบคทีเรีย และนิสแตติน 10 และ 25 μg สำหรับยีสต์และราเส้นใย ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกสารทั้ง 2 ส่วน ในการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นและศึกษาลักษณะสมบัติสารต่อไป



รูปที่ 26 แผนภาพแสดงขั้นตอนการแยกสารบริสุทธิ์ที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis* K05 จากสารสกัดหยาบจากส่วนใส

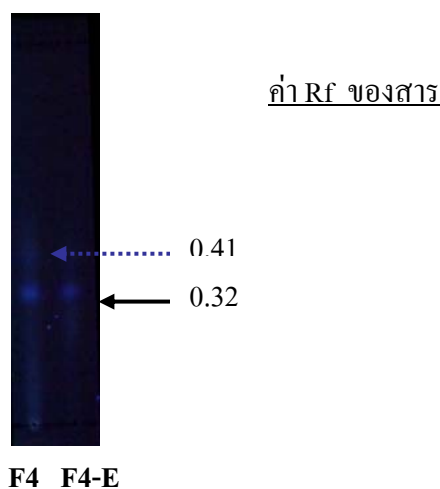
4.2.4.2 การทำให้สารต้านจุลชีพบริสุทธิ์ขึ้นของสารส่วนที่ 4 (F4)

สารส่วนที่ 4 (F4) แยกได้จากสารสกัดหยาบจากส่วนใบที่สกัดด้วยเอธิลอะซิเตต จากวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบเอธิลอะซิเตต 20% ในเฮกเซนเป็นระบบที่ชะสารส่วนดังกล่าวจากคอลัมน์ได้ของเหลวสีน้ำตาลมีลักษณะเป็นน้ำมัน มีน้ำหนัก 1.8587 กรัม ซึ่งสามารถละลายได้ดีในเอธิลอะซิเตตและเฮกเซนและจากการทำ TLC โดยใช้ระบบตัวพาเป็น 5% เมทานอลในเอธิลอะซิเตต และตรวจสอบโดยการส่องดูด้วยหลอดยูวีที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร การอ้งไอโอไอโอดีน และสารละลายวานิลิน ตามลำดับแล้ว พบว่ามีค่า $R_f = 0.75$ (รูปที่ 24)



รูปที่ 27 ลักษณะสารส่วนที่ 4 (F4) จากการแยกสารโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีครั้งที่ 1

และเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมีคือ $^1\text{H-NMR}$ $^{13}\text{C-NMR}$ และ 2D-NMR พบว่าสารส่วนนี้น่าจะมีสารปนกันอยู่มากกว่า 1 ชนิด จึงนำไปทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยวิธีโครมาโทกราฟีอีกครั้ง และเมื่อนำ F4 มาทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยการหาระบบที่เหมาะสมบน TLC เพื่อใช้แยกสารส่วนดังกล่าวให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีครั้งที่ 2 โดยใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 เซนติเมตรและใช้ซิลิกาเจล 150 กรัม เป็นตัวดูดซับซึ่งแผ่คสูงเท่ากับ 30 เซนติเมตร เก็บสารส่วนที่ชะได้จากคอลัมน์ครั้งละ 10-15 มิลลิตร โดยระบบสารตัวพาที่ใช้ชะคอลัมน์ คือ เฮกเซน 90% ต่อ เอธิลอะซิเตต 5% ต่อ เมทานอล 5% ซึ่งเป็นระบบที่แยกลำดับส่วนนี้ได้ดีที่สุด (รูปที่ 28)



รูปที่ 28 โครมาโทแกรมจาก TLC ของสารส่วนที่ 4 (F4 และ F4-E) เมื่อตรวจสอบตำแหน่งของสารที่แยกได้ด้วยระบบเฮกเซน ต่อ 5%เอธิลอะซิเตต ต่อ 5%เมทานอล

ตารางที่17 การแยกสารส่วนที่ 4 (F4) ให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีด้วยระบบเฮกเซน90% ต่อ เอทิลอะซิเตท5% ต่อเมทานอล5%

ลำดับส่วน(fractions)	ลักษณะของสาร	น้ำหนัก (กรัม)
F4-A	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล	0.0171
F4-B	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล	0.0118
F4-C	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล+ของแข็งสีขาว	0.0086
F4-D	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล+ของแข็งสีขาว	0.0093
F4-E	ของแข็งสีขาว+ของเหลวหนืดสีน้ำตาล	0.1099
F4-F	ของแข็งสีขาว+ของเหลวหนืดสีเหลือง	0.0394
F4-G	ของแข็งสีน้ำตาล+ของเหลวหนืดสีเหลือง	0.0387
F4-H	ของแข็งสีน้ำตาล+ของเหลวหนืดสีเหลือง	0.0376
F4-I	ของแข็งสีน้ำตาล+ของเหลวหนืดสีเหลือง	0.085

เมื่อนำสารส่วน F4 มาทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีด้วยระบบเฮกเซน 90% ต่อ เอทิลอะซิเตท5% ต่อเมทานอล5%และตรวจสอบตำแหน่งของสารที่แยกได้โดยการส่องดูด้วยหลอดยูวีที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร การอ้งไอไอโอดีน และสารละลายวานิลินตามลำดับแล้ว นำสารส่วนที่มีตำแหน่งบนแผ่น TLC ตำแหน่งเดียวกันมารวมกัน พบว่าแยกสารได้ทั้งหมด 9 ส่วน (F4-A - F4-I) ซึ่งสารส่วนที่แยกออกมาได้ปริมาณมากที่สุด คือ F4-E โดยมีน้ำหนัก 0.1099 กรัม ซึ่งมีลักษณะเป็นของแข็งปนของเหลวหนืดสีน้ำตาลเล็กน้อย

หลังจากนั้นนำส่วนที่แยกได้ทั้งหมดจากคอลัมน์ทั้ง 9 ส่วน (F4-A - F4-I) มาศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบตามวิธีการทดลองข้อที่ 3.3.3 โดยใช้ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม (10 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร) เป็นขั้นตอนต่อไป

ตารางที่18 การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารส่วนที่4 ที่ทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีครั้งที่ 2 (ระบบสารตัวพา เฮกเซน90% ต่อเอทิลอะซิเตท 5% ต่อเมทานอล5%)

ส่วนสาร	บริเวณยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ (มม.)					
	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>C. albican</i>	<i>Alternaria</i>
	ATCC 6633	ATCC 25923	ATCC 25922	ATCC 27853	ATCC 70014	sp.
F4-A	12	-	11	11	-	-
F4-B	14	-	11	14	10	-
F4-C	15	16	14	17	11	-
F4-D	16	15	16	29	11	-
F4-E	17	10	15	18	11	-
F4-F	10	10	10	10	-	-
F4-G	10	10	10	10	11	-
F4-H	11	10	10	9	11	-
F4-I	13	10	11	9	10	-
รวม F4 A-I	13	12	12	11	11	-
Chloramphenicol/ Nystatin	24	27	28	16	30	22.5
DMSO	-	-	-	-	-	-

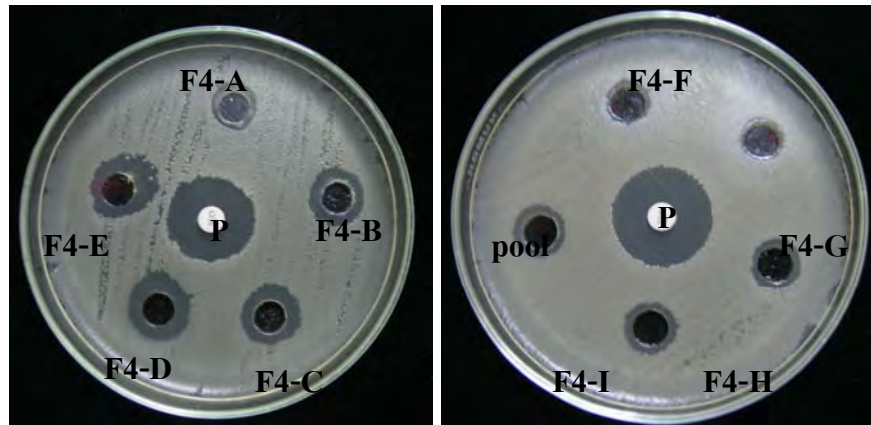
หมายเหตุ (-) = ไม่มีการยับยั้ง

ตารางที่ 19 เปรูชันการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารส่วนที่ 4 ที่ทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยวิธีคอลัมน์โครมาโท กราฟี่ครั้งที่ 2 (ระบบสารตัวพา เฮกเซน90% ต่อเอทิลอะซิเตท 5% ต่อเมทานอล5%)

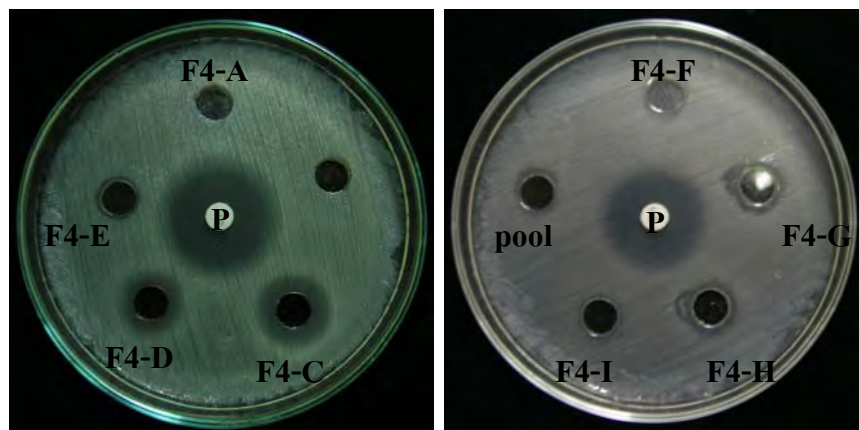
ส่วนสาร	การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ (%)					
	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>C. albican</i> ATCC 70014	<i>Alternaria</i> sp.
F4-A	50	-	39.29	68.75	-	-
F4-B	58.33	-	39.29	87.5	33.33	-
F4-C	62.5	59.26	50	>100	36.68	-
F4-D	66.67	55.56	57.14	>100	36.68	-
F4-E	70.83	37.04	53.57	>100	36.68	-
F4-F	41.67	37.04	35.71	62.5	-	-
F4-G	41.67	37.04	35.71	62.5	36.68	-
F4-H	45.83	37.04	35.71	56.25	36.68	-
F4-I	54.17	37.04	39.29	56.25	33.33	-
รวม F4 A-I	54.17	44.44	42.86	68.75	36.68	-
Chloramphenicol/ Nystatin	100	100	100	100	100	100
DMSO	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ (-) = ไม่มีการยับยั้ง

ตัวอย่างแสดงผลการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารส่วนที่ 4 ที่ทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีด้วยระบบ เฮกเซน90% ต่อเอทิลอะซิเตท 5% ต่อเมทานอล 5%



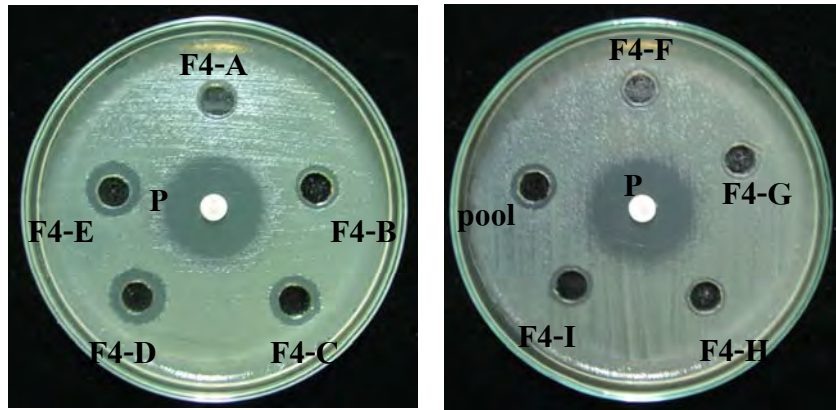
(ก)



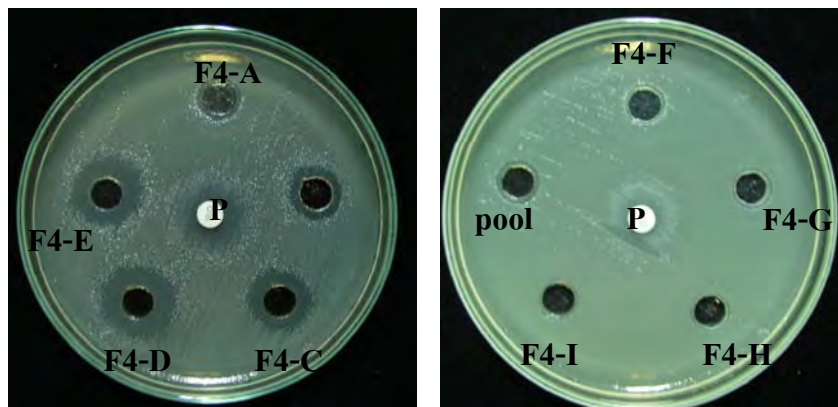
(ข)

รูปที่ 29 ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารส่วนที่ 4 ที่ทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีครั้งที่ 2 (F4-A - F4-I) (ก) *B. subtilis* ATCC 6633 (ข) *S. aureus* ATCC 25923 (ค) *E. coli* ATCC 25922 และ (ง) *P. aeruginosa* ATCC 27853

(P) คือ ชุดควบคุมบวก ได้แก่ กลอแรมฟินิคอล 30 μg (N) คือ ชุดควบคุมลบ ได้แก่ DMSO



(ค)



(ง)

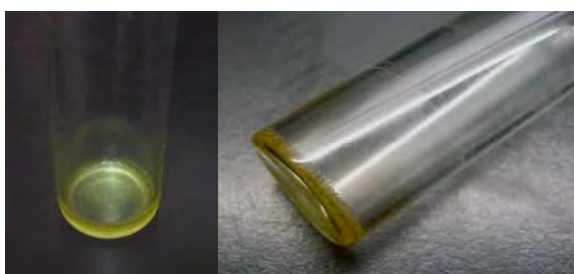
รูปที่ 29 (ต่อ) .การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารส่วนที่ 4 ที่ทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีครั้งที่ 2 (F4-A - F4-I) (ค) *B. subtilis* ATCC 6633 (ข) *S. aureus* ATCC 25923 (ค) *E. coli* ATCC 25922 และ (ง) *P. aeruginosa* ATCC 27853

(P) คือ ชุดควบคุมบวก ได้แก่ คลอแรมฟินิคอล 30 μg (N) คือ ชุดควบคุมลบ ได้แก่ DMSO

จากผลการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารด้านจุลชีพส่วนที่ 4 (F4) ที่ทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีครั้งที่ 2 ด้วยระบบเฮกเซน 90% ต่อ เอทิลอะซิเตท 5% ต่อ เมทานอล 5% จะได้ส่วนของสารที่แยกจากคอลัมน์ทั้งหมด 9 ส่วน (F4-A - F4-I) และเมื่อนำลำดับส่วนที่แยกได้มาศึกษาการฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ พบว่า หลังจากที้นำสารส่วนที่ 4 (F4) มาทำให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นมีผลทำให้ฤทธิ์การยับยั้งต่อจุลินทรีย์ทดสอบลดลง กล่าวคือ ให้ผลการยับยั้งต่อชนิดของจุลินทรีย์ทดสอบและมีบริเวณยับยั้งที่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับก่อนที่จะทำให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น (ก่อนลงคอลัมน์โครมาโทกราฟีครั้งที่ 2) ซึ่งจากเดิมที่เคยให้ผลการยับยั้งที่ดีต่อจุลินทรีย์ทดสอบทุกชนิด คือ แบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *B. subtilis* ATCC 6633 แบคทีเรีย

แกรมลบได้แก่ *E. coli* ATCC 25922 ยีสต์ได้แก่ *C. albican* ATCC 70014 และราเส้นใยได้แก่ *Alternaria* sp. หลังจากที่ทำให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นและนำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบพบว่า ลำดับสารทุกส่วนที่แยกได้ (F4-A - F4-I) ไม่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของ ราเส้นใย ได้แก่ *Alternaria* sp. และมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของ *C. albican* ATCC 70014 ในระดับที่ลดลงมากเมื่อเปรียบเทียบกับก่อนที่จะทำให้มีความบริสุทธิ์มากยิ่งขึ้น สำหรับจุลินทรีย์ทดสอบที่เป็นแบคทีเรียพบว่า แม้ว่าสารแต่ละส่วนจะมีระดับผลการยับยั้งที่ลดลง แต่บริเวณที่ยังที่ปรากฏก็ยังคงให้ผลที่สามารถวัดระดับการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้ โดยคือ เมื่อทดสอบกับ *B. subtilis* ATCC 6633 พบว่า สารส่วน F4-A - F4-E ให้ผลการยับยั้งในระดับที่ใกล้เคียงกัน ซึ่ง F4-E ให้ผลการยับยั้งได้ดีที่สุดซึ่งมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 17 มิลลิเมตร *S. aureus* ATCC 25923 สารส่วน F4-C - F4-D ให้ผลการยับยั้งในระดับที่ใกล้เคียงกัน ซึ่ง F4-C ให้ผลการยับยั้งได้ดีที่สุดซึ่งมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 16 มิลลิเมตร *E. coli* ATCC 25922 สารส่วน F4-C - F4-D ให้ผลการยับยั้งในระดับที่ใกล้เคียงกัน ซึ่ง F4-D ให้ผลการยับยั้งได้ดีที่สุดซึ่งมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 16 มิลลิเมตร *P. aeruginosa* ATCC 27853 สารส่วน F4-B - F4-E ให้ผลการยับยั้งในระดับที่ใกล้เคียงกัน ซึ่ง F4-D ให้ผลการยับยั้งได้ดีที่สุดซึ่งมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 19 มิลลิเมตร และเมื่อนำสารทุกส่วนกลับมารวมกัน (F4-A - F4-I) พบว่า ไม่มีผลทำให้การยับยั้งเพิ่มขึ้น

จากผลการทดลองดังกล่าวสรุปได้ว่าสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบอยู่ในช่วงแรกๆ ของการชะคอลลัมน์ด้วยระบบเฮกเซน90% ต่อ เอทิลอะซิเตท5% ต่อเมทานอล5% คือ F4-A - F4-E ส่วนในช่วงหลัง คือ F4-F - F4-I ให้ผลการยับยั้งในระดับที่ต่ำมากหรือไม่มีผลยับยั้งเลย ดังนั้นในขั้นตอนของการศึกษาลักษณะสมบัติสาร จึงเลือกส่วน F4-E เนื่องจากเป็นสารที่มีปริมาณมากที่สุดที่ได้จากการลงคอลลัมน์โครมาโทกราฟีครั้งที่2 และเป็นสารที่ให้ผลที่ดีต่อการยับยั้งต่อจุลินทรีย์ทดสอบเมื่อเปรียบเทียบกับสารส่วนอื่นๆ นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์สารแต่ละส่วนด้วยวิธีทางเคมี คือ ¹H-NMR พบว่าสารส่วนนี้มีลักษณะโครมาโทแกรมที่ดีเมื่อเปรียบเทียบกับสารส่วนอื่นๆ ซึ่งน่าจะนำมาศึกษาลักษณะสมบัติของสารได้



รูปที่ 30 ลักษณะสารส่วนที่4 (F4-E) จากการแยกสาร โดยวิธีคอลลัมน์โครมาโทกราฟีครั้งที่2

4.2.4.3 การทำให้สารต้านจุลชีพบริสุทธิ์ขึ้นของสารส่วนที่ 13 (F13)

สารส่วนที่13(F13) แยกได้จากสารสกัดหยาบจากส่วนใบที่สกัดด้วยเอธิลอะซิเตตโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีด้วยระบบตัวพา คือ เมทานอล25%ในเอธิลอะซิเตตเป็นระบบที่ชะสารส่วนดังกล่าวจากคอลัมน์จะได้ของแข็งสีเหลืองมีน้ำหนัก 0.3846 กรัม ซึ่งสามารถละลายได้ดีในเอธิลอะซิเตตและเมทานอล และเมื่อนำมาล้างด้วยเอธิลอะซิเตตและปล่อยให้ตกตะกอน (5 ครั้ง) จะสามารถแยกสารได้ 2 ส่วน คือ ของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อน (F 13-A)ปนกับของแข็งสีขาว (F13-B) ซึ่งมีน้ำหนัก 0.3283 กรัม และ 0.0563 กรัม ตามลำดับ หลังจากนั้นนำสารที่แยกได้ทั้ง 2 ส่วนมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งต่อจุลินทรีย์ทดสอบที่เป็นแบคทีเรียซึ่งแสดงผลในตารางที่ 20



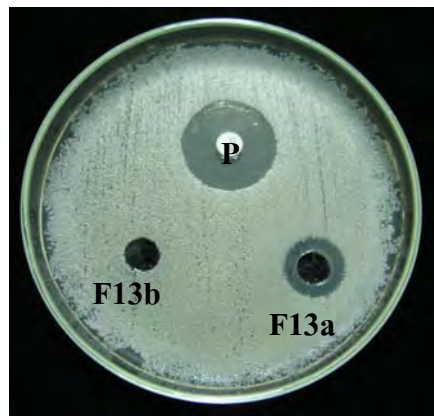
รูปที่ 31 ลักษณะสารส่วนที่13 (F13) จากการแยกสาร โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีครั้งที่1

ตารางที่ 20 การยับยั้งต่อจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารส่วน F 13-A และ F13-B

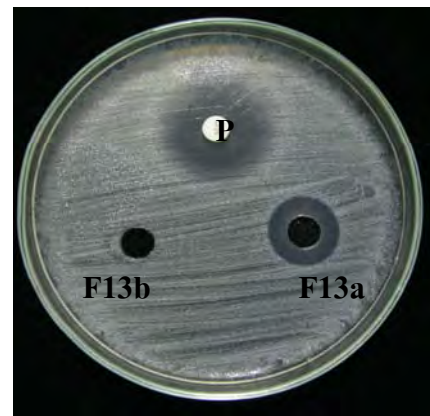
จุลินทรีย์ทดสอบ	บริเวณยับยั้ง (มม.) / (%การยับยั้ง)						
	สารทดสอบ						
	F 13A		F13-B		Chloramphenicol		DMSO
	(มม.)	(%)	(มม.)	(%)	(มม.)	(%)	
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	16	66.67	-		24	100	-
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	18	69.29	-		26	100	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	25	89.29	-		28	100	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	20	>100	-		16	100	-

หมายเหตุ - = ไม่มีการยับยั้ง

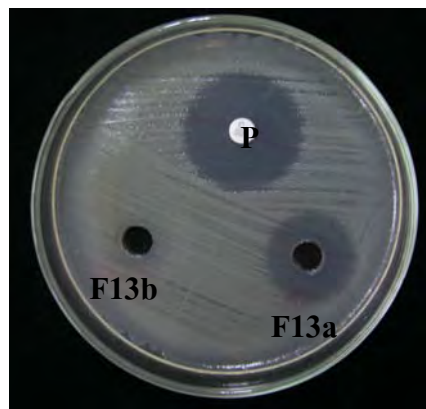
ตัวอย่างแสดงผลการยับยั้งต่อจุลินทรีย์ทดสอบที่เป็นแบคทีเรียของสารส่วน F 13-A และ สารส่วน F13-B



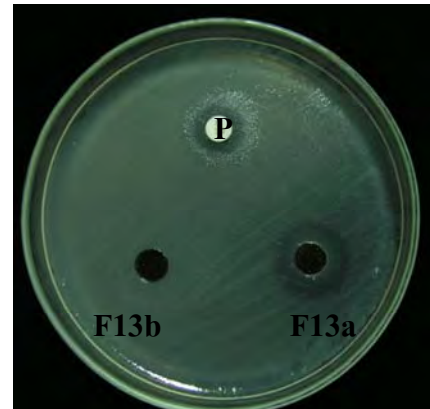
(ก)



(ข)



(ค)



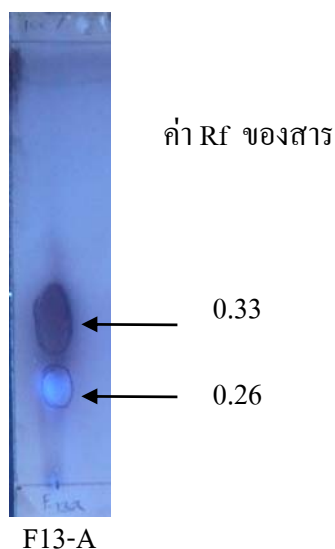
(ง)

รูปที่ 32 การยับยั้งต่อจุลินทรีย์ทดสอบที่เป็นแบคทีเรียของสาร F 13-A และ สาร F13-B
 (ก) *B. subtilis* ATCC 6633 (ข) *S. aureus* ATCC 25923 (ค) *E. coli* ATCC 25922 และ
 (ง) *P. aeruginosa* ATCC 27853

(P) คือ ชุดควบคุมบวก ได้แก่ คลอแรมฟินิคอล 30 μg (N) คือ ชุดควบคุมลบ ได้แก่ DMSO

เมื่อนำสารที่แยกได้ทั้ง 2 ส่วนมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งต่อจุลินทรีย์ทดสอบที่เป็นแบคทีเรียพบว่า สารส่วน F13-A ให้ผลการยับยั้งต่อจุลินทรีย์ทดสอบที่เป็นแบคทีเรียทุกชนิดในระดับที่แตกต่างกัน โดยให้ผลยับยั้งที่ต่อแบคทีเรียแกรมลบคือ *E. coli* ATCC 25922 และ *P.aeruginosa* ATCC 27853 ซึ่งมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 25 และ 20 มิลลิเมตร ตามลำดับ และให้ผลยับยั้งรองลงมาต่อแบคทีเรียแกรมบวกคือ *S. aureus* ATCC 25923 และ *B. subtilis* ATCC 6633 ซึ่งมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 18 และ 16 มิลลิเมตร ตามลำดับ สำหรับสารส่วน F13-B ไม่มีผลยับยั้งต่อจุลินทรีย์ทดสอบทุกชนิด

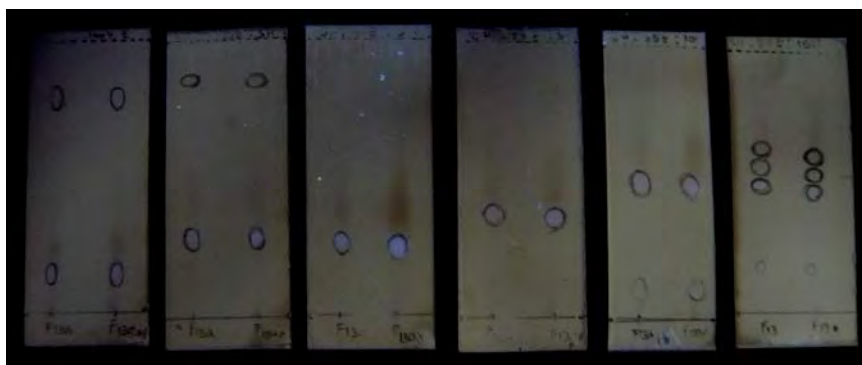
จากผลการทดลองดังกล่าวพบว่าสารที่มีฤทธิ์การยับยั้งต่อจุลินทรีย์ทดสอบอยู่ในส่วนของ F 13-A จึงนำสารในส่วนนี้มาทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยการหาระบบที่เหมาะสมบน TLC เพื่อใช้ในการแยกสารดังกล่าวโดยใช้ preparative plate ซึ่งระบบที่ดีที่สุดที่สามารถแยกสารได้ คือ 100%เอทิลอะซิเตทซึ่งสามารถแยกสารได้ 2 ส่วน ซึ่งมี $R_f = 0.26$ และ 0.33 (รูปที่33) จึงใช้ระบบดังกล่าวในการแยกสารและเมื่อแยกสาร F 13-A บน preparative plate พบว่าสามารถแยกสารได้ 2 ตำแหน่งเช่นกัน แต่เมื่อจุดแยกสารทั้ง 2 ตำแหน่งมาวิเคราะห์ทางเคมี ($^1\text{H-NMR}$) พบว่าสาร 2 ตำแหน่งยังปนกันอยู่



รูปที่ 33 โครมาโทแกรมจาก TLC ของสารส่วน F13-A เมื่อตรวจสอบตำแหน่งของสารที่แยกได้ด้วยระบบเอทิลอะซิเตท 100%

จากผลการวิเคราะห์ทางเคมี ($^1\text{H-NMR}$) พบว่า สาร 2 ตำแหน่งที่แยกบน TLC ด้วยระบบเอทิลอะซิเตท 100% ยังปนกันอยู่ เมื่อแยกสารดังกล่าวโดยใช้ Preparative plate TLC (PTLC) จึงสรุปได้ว่าวิธีนี้ไม่เหมาะสมในการแยกสารส่วนที่ 13-A เพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์

จากนั้นทำการศึกษาระบบที่เหมาะสมบน TLC เพื่อใช้แยกสารส่วนที่ 13-A โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ระบบตัวพาต่างๆ เช่น เมทานอล 2% ในเอทิลอะซิเตต เมทานอล 5% ในเอทิลอะซิเตต เฮกเซน 5% ต่อเอทิลอะซิเตต 90% ต่อเมทานอล 5% เฮกเซน 10% ต่อเอทิลอะซิเตต 85% ต่อเมทานอล 5% เฮกเซน 5% ต่อเอทิลอะซิเตต 85% ต่อเมทานอล 10% เฮกเซน 5% ต่อเอทิลอะซิเตต 80% ต่อเมทานอล 15% เป็นต้น ดังแสดงในรูปที่ 34 ซึ่งพบว่า การแยกของสารในแต่ละระบบมีแนวโน้มไม่แตกต่างกัน โดยตำแหน่งของสารที่แยกได้มีค่า Rf ใกล้เคียงกันมาก จึงคาดว่า การหาระบบที่เหมาะสมบน TLC เพื่อใช้แยกสารส่วนที่ 13-A โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี จะไม่สามารถแยกสารให้มีความบริสุทธิ์ได้ จึงนำสารดังกล่าวมาทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยใช้เทคนิคอื่นๆ คือ HPLC ในขั้นตอนต่อไป

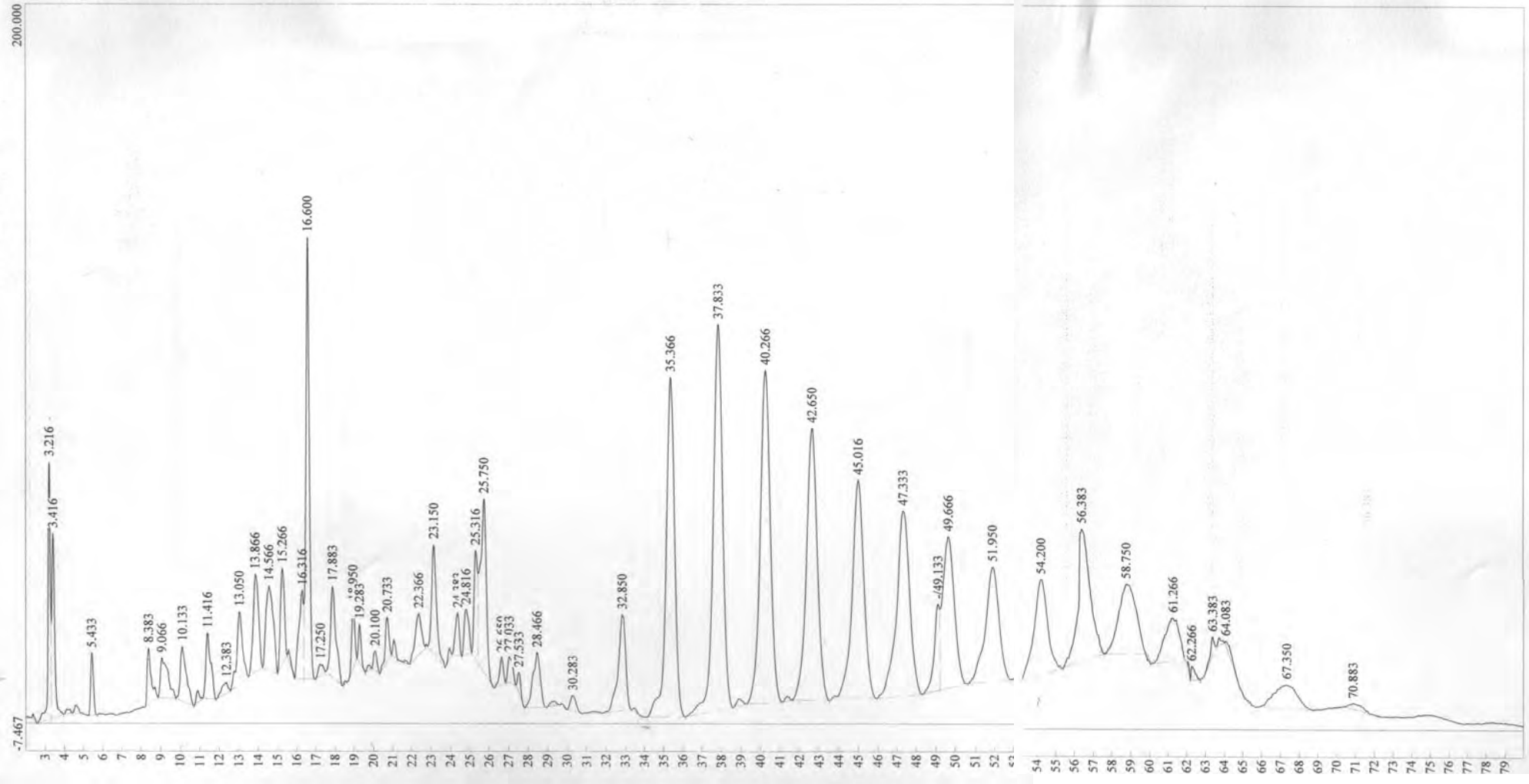


รูปที่ 34 โครมาโทแกรมจาก TLC ของสารส่วน F13-A เมื่อตรวจสอบตำแหน่งของสารที่แยกได้ด้วยระบบต่างๆ

4.2.4.3.1 การทำให้สารส่วน F 13-A ให้บริสุทธิ์ขึ้นโดย HPLC

เนื่องจากการทำให้สารส่วน F13-A มีความบริสุทธิ์ขึ้น โดยวิธีต่างๆ ที่กล่าวมาแล้ว ในข้างต้นยังไม่มีความเหมาะสมที่จะทำให้สารส่วนนี้มีความบริสุทธิ์มากพอที่จะศึกษาลักษณะสมบัติของสารด้วยวิธีทางเคมีได้ จึงนำสารส่วน F 13-A ซึ่งให้ผลที่ดีต่อจุลินทรีย์ทดสอบ โดยเฉพาะต่อแบคทีเรียแกรมลบมาทำให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วย HPLC ซึ่งการหาระบบที่เหมาะสมในการแยกเพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์จะใช้คอลัมน์ analytical High performance liquid chromatography ชนิด C18 และใช้คอลัมน์ semi-preparative High performance liquid chromatography ชนิด C18 ในการแยกสารเพื่อเก็บแต่ละส่วน จากนั้นนำไปศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบตามวิธีการทดลองข้อ 3.3.3

ในการวิเคราะห์เพื่อหาระบบที่เหมาะสมเพื่อแยกให้ได้สารบริสุทธิ์จะเตรียมให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 20 mg/ml และใช้ปริมาณสารในการวิเคราะห์ครั้งละ 100 ไมโครลิตร ซึ่งสภาวะในการแยกสารใช้ระบบ gradient ตั้งแต่ 0-100% โดยระบบตัวพา ได้แก่ ปุ่ม A คือน้ำปลอดประจุ (DI) + 0.05% TFA และ ปุ่ม B คือ อะซิโตไนไตรด์+ 0.05% TFA และใช้เวลา 30 นาทีแรกในการแยกสารในระบบ gradient ตั้งแต่ 0-50% และใช้เวลา 30 นาทีหลังในการแยกสารในระบบ gradient ตั้งแต่ 51-100% ซึ่งจากผลการวิเคราะห์พบว่า ปรากฏพีค (peak) ของสารจำนวนมากที่สามารถแยกได้ในช่วงระบบตัวพาและช่วงเวลาต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 35



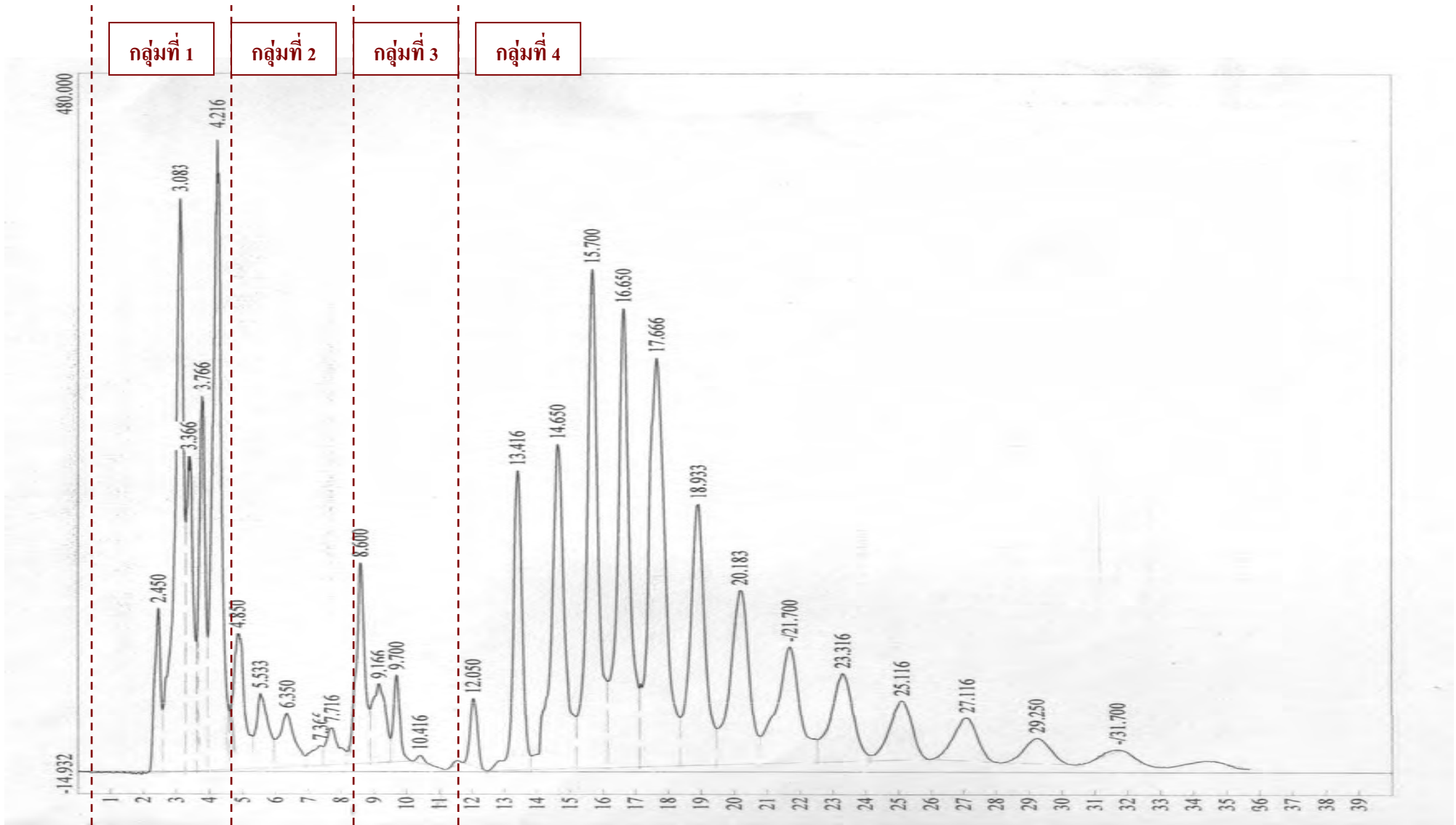
รูปที่ 35 การแยกสารส่วน F13-A โดยใช้ระบบ gradient ตั้งแต่ 0-100%

จากผลการแยกสารโดยใช้ระบบ gradient ตั้งแต่ 0-100% ที่แสดงดังกล่าวซึ่งปรากฏฟีกของสารจำนวนมากที่สามารถแยกได้ในช่วงระบบตัวพาและช่วงเวลาต่างๆ จึงทำให้ไม่สามารถเก็บส่วนของสารที่แยกในแต่ละฟีกได้ จึงทำการทดลองโดยการหาระบบที่เหมาะสมเพื่อแยกฟีกของสารออกเป็นกลุ่มๆ แล้วนำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบตามวิธีการทดลองข้อ 3.3.3 ก่อน แล้วจึงนำส่วนที่มีผลยับยั้งต่อจุลินทรีย์ทดสอบมาทำให้อริสุทรีขึ้นและศึกษาลักษณะสมบัติสาร

จากการหาระบบที่เหมาะสมเพื่อแยกฟีกของสารออกเป็นกลุ่มๆ และสามารถเก็บส่วนของสารที่แยกได้ พบว่า ระบบที่เหมาะสมคือระบบ gradient 0-35% ที่เวลา 0-5 นาที 50% ที่เวลา 6 นาที 60% ที่เวลา 10 นาที 70% ที่เวลา 12 นาที และ 100% ที่เวลา 15-40 นาที ซึ่งทำให้สามารถแยกเก็บสารตามลักษณะช่วงฟีกที่ปรากฏและเวลาที่ใช้ในการแยกสารได้เป็น 4 กลุ่ม ดังแสดงในรูปที่ 36

และเมื่อนำสารแต่ละส่วนมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบพบว่า สารแต่ละส่วนให้ผลการยับยั้งต่อจุลินทรีย์ทดสอบที่เป็นแบคทีเรียทุกชนิดในระดับที่ใกล้เคียงกัน ดังแสดงในตารางที่ 21 โดยเมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของสารแต่ละส่วนกับชุดควบคุม พบว่าสารทุกส่วนให้ผลการยับยั้งที่ดีต่อ *P. aeruginosa* ATCC 27853 โดยมียับยั้งของสารส่วนที่ 1-4 เท่ากับ 13 14 15 และ 16 มิลลิเมตร ตามลำดับ รองลงมาคือ *B. subtilis* ATCC 6633 และ *S. aureus* ATCC 25923 โดยมียับยั้งของสารส่วนที่ 1-4 เท่ากับ 14 15 16 และ 17 มิลลิเมตร และ 15 13 11 และ 14 มิลลิเมตร ตามลำดับ และสำหรับ *E. coli* ATCC 25922 พบว่าสารทุกส่วนมีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 13 มิลลิเมตร ซึ่งจะพบว่ามีการยับยั้งลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับในขั้นตอนก่อนที่จะทำสารส่วน F13-A ให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนนี้

จากผลการทดลองดังกล่าวพบว่า การแยกสารที่มีฤทธิ์ต่อการยับยั้งต่อจุลินทรีย์ทดสอบในส่วนนี้ยังไม่สามารถแยกออกจากกันจนเป็นสารบริสุทธิ์ได้หรืออาจมีความเป็นไปได้ว่าจะมีสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งมากกว่า 1 ส่วนเนื่องจากจะพบว่ามีสารที่ให้ผลต่อการยับยั้ง จุลินทรีย์ทดสอบใกล้เคียงกันอยู่ในทุกส่วนของสารที่แยกด้วยเทคนิค HPLC และเมื่อนำสารทั้ง 4 กลุ่ม มาวิเคราะห์ทางเคมี (¹H-NMR) พบว่าสารส่วนนี้ยังคงไม่บริสุทธิ์ ซึ่งอาจเป็นเพราะสภาวะหรือเทคนิคที่ใช้ในการแยกสารส่วนนี้ยังไม่มีความเหมาะสมสำหรับสารส่วนนี้จึงต้องศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีความเป็นไปได้ในการแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ในโอกาสต่อไป ดังนั้นสารในส่วนดังกล่าวจึงยังไม่สามารถนำไปศึกษาลักษณะสมบัติสารได้เนื่องจากยังมีความบริสุทธิ์ไม่เพียงพอ แต่สามารถสรุปได้ว่าสารส่วนนี้เป็นสารประเภทเปปไทด์เนื่องจากข้อมูลการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชัน (functional group) ของสารโดย IR พบว่ามีหมู่ฟังก์ชันของสารเป็นสารเอไมด์ (amide) เป็นองค์ประกอบในโมเลกุล



รูปที่ 36 การแยกสาร F13-A ด้วยระบบ gradient 0-35% ที่เวลา 0-5 นาที 50% ที่เวลา 6 นาที 60% ที่เวลา 10 นาที 70% ที่เวลา 12 นาที และ 100% ที่เวลา 15-40 นาที

ตารางที่ 21 การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของสารส่วน F13-A ที่แยกด้วยเทคนิค HPLC

จุลินทรีย์ทดสอบ	บริเวณยับยั้ง (มม.)					
	สารทดสอบ					
	ส่วนที่1	ส่วนที่2	ส่วนที่3	ส่วนที่4	Chloram phenicol	DMSO
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	14	15	16	17	21	-
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	15	13	11	14	23	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	13	13	13	13	28	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	13	14	15	16	13	-

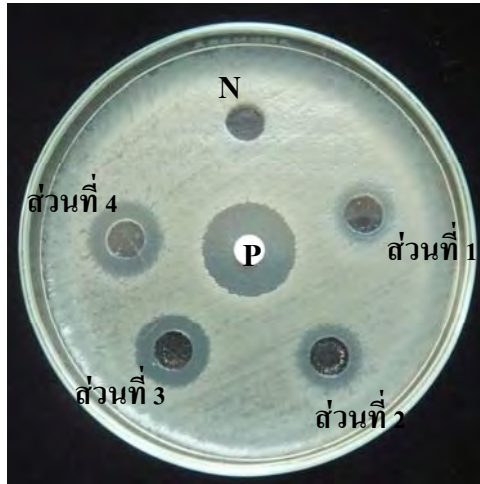
หมายเหตุ - = ไม่มีการยับยั้ง

ตารางที่ 22 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของสารส่วน F13-A ที่แยกด้วยเทคนิค HPLC

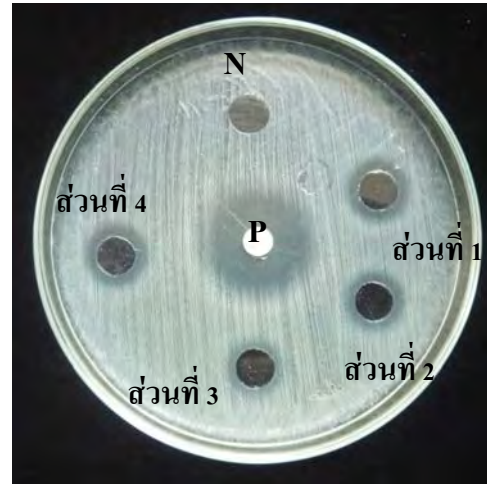
จุลินทรีย์ทดสอบ	บริเวณยับยั้ง (%)					
	สารทดสอบ					
	ส่วนที่1	ส่วนที่2	ส่วนที่3	ส่วนที่4	Chloram phenicol	DMSO
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	66.67	74.43	76.19	80.95	100	-
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	65.22	56.52	47.83	60.87	100	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	46.43	46.43	46.43	46.43	100	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	100	>100	>100	>100	100	-

หมายเหตุ - = ไม่มีการยับยั้ง

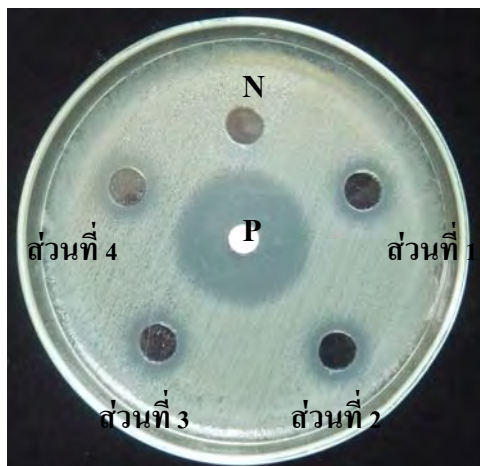
ตัวอย่างแสดงผลการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของสารส่วน F13-A ที่แยกด้วยเทคนิค HPLC



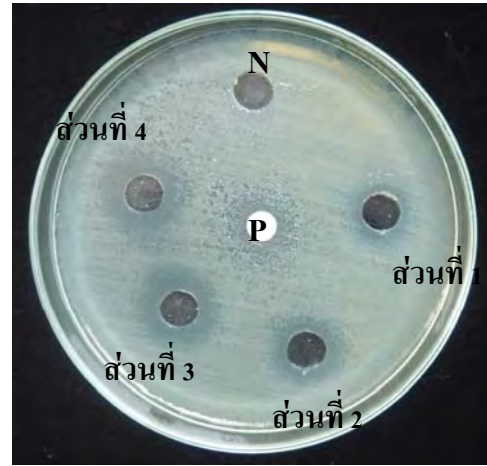
(ก)



(ข)



(ค)



(ง)

รูปที่ 37 ตัวอย่างผลการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของสารส่วน F13-A ที่แยกด้วยเทคนิค HPLC

(ก) *B. subtilis* ATCC 6633 (ข) *S. aureus* ATCC 25923 (ค) *E. coli* ATCC 25922 และ (ง) *P. aeruginosa* ATCC 27853

(P) คือ ชุดควบคุมบวก ได้แก่ คลอแรมฟินิโคล 30 μg (N) คือ ชุดควบคุมลบ ได้แก่ DMSO

4.2.4 การศึกษาลักษณะสมบัติของสารต้านจุลชีพโดยวิธีวิเคราะห์ทางเคมี

จากการศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารส่วนที่แยกได้จากคอลลัมน์โครมาโทกราฟีพบว่า ส่วนที่มีฤทธิ์ยับยั้งที่ดีต่อจุลินทรีย์ทดสอบ คือ สารส่วนที่ 4 (F4) ซึ่งสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ทุกชนิดใกล้เคียงกับชุดควบคุมบวก ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์และราเส้นใย และสารส่วนที่ 13 (F13) ซึ่งให้ผลยับยั้งที่ดีต่อแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *E. coli* ATCC 25922 จึงนำสารทั้ง 2 ส่วนดังกล่าวมาทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยวิธีต่างๆ ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้นและวิเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมี พบว่าสารส่วนที่ 4 (F4) มีความบริสุทธิ์เพียงพอที่จะนำมาศึกษาลักษณะสมบัติของสารได้ และสำหรับสารส่วนที่ 13 (F13) ยังไม่มีความบริสุทธิ์พอซึ่งอาจเป็นเพราะสภาวะหรือเทคนิคที่ใช้ในการแยกสารส่วนนี้ยังไม่มีความเหมาะสมสำหรับสารส่วนนี้จึงต้องศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีความเป็นไปได้ในการแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ในโอกาสต่อไป ดังนั้นในขั้นตอนการศึกษาลักษณะสมบัติของสารจึงเลือกที่จะศึกษาสารส่วนที่ 4 (F4) เนื่องจากมีความบริสุทธิ์เพียงพอและให้ผลยับยั้งที่ดีต่อจุลินทรีย์ทดสอบทุกชนิด

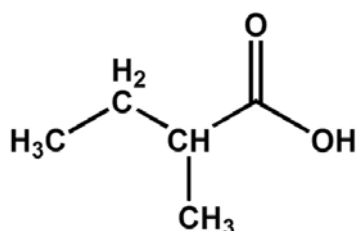
สารส่วนที่ 4 (F4) แยกได้จากสารสกัดหยาบจากส่วนใบที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตตจากเทคนิคคอลลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบเอทิลอะซิเตต 20% ในเฮกเซนเป็นระบบสารตัวพาที่ใช้ชะส่วนดังกล่าวจากคอลลัมน์จะได้ของเหลวสีน้ำตาลมีลักษณะเป็นน้ำมัน มีน้ำหนัก 1.8587 กรัม ซึ่งสามารถละลายได้ดีในเอทิลอะซิเตตและเฮกเซนและจากการทำ TLC โดยใช้ระบบตัวพาเป็น 5% เมทานอลในเอทิลอะซิเตต และตรวจสอบโดยการส่องดูด้วยหลอดยูวีที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร การอ้งไอโอไอโอดีน และสารละลายวานิลิน ตามลำดับแล้ว พบว่ามีค่า $R_f = 0.75$

และจากการศึกษาลักษณะสมบัติของสารโดยวิธีวิเคราะห์ทางเคมี คือ $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ พบว่าในสารส่วนนี้น่าจะมีสารบริสุทธิ์มากกว่า 1 ชนิด จึงทำการแยกสารส่วนนี้อีกครั้งด้วยเทคนิคคอลลัมน์โครมาโทกราฟี ครั้งที่ 2 โดยระบบที่ใช้ชะคอลลัมน์คือ เฮกเซน 90% ต่อเอทิลอะซิเตต 5% ต่อ เมทานอล 5% โดยสารที่แยกได้จากคอลลัมน์มีทั้งหมด 9 ส่วน (F4-A - F4-I) และเมื่อนำส่วนที่แยกได้มาศึกษาการฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ พบว่าหลังจากที่นำสารส่วนที่ 4 (F4) มาทำให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นมีผลทำให้ฤทธิ์การยับยั้งต่อจุลินทรีย์ทดสอบลดลง กล่าวคือให้ผลการยับยั้งต่อชนิดของจุลินทรีย์ทดสอบและมีบริเวณยับยั้งที่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับก่อนที่จะทำให้มีความบริสุทธิ์มากยิ่งขึ้น (ก่อนลงคอลลัมน์โครมาโทกราฟีครั้งที่ 2) ซึ่งจากเดิมที่เคยให้ผลการยับยั้งที่ดีต่อตัวแทนจุลินทรีย์ทดสอบทุกชนิดดังที่กล่าวมาแล้วในข้อ 4.2.4.2 และสารส่วน F4-E เป็นสารที่มีปริมาณมากที่สุดที่ได้จากการลงคอลลัมน์โครมาโทกราฟีในครั้งนี้ และเป็นสารที่ให้ผลที่ดีต่อการยับยั้งต่อจุลินทรีย์ทดสอบเมื่อเปรียบเทียบกับสารส่วนอื่นๆ จึงเลือกสารส่วนนี้ มาศึกษาในขั้นตอนของการลักษณะสมบัติสาร

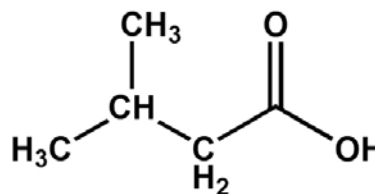
สารส่วน F4-E มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลปนกับของแข็งสีขาว มีน้ำหนัก 0.1099 กรัมและเมื่อนำมาศึกษาลักษณะสมบัติสารโดยวิธีวิเคราะห์ทางเคมี คือ $^1\text{H-NMR}$ $^{13}\text{C-NMR}$ IR และ MS พบว่าลักษณะของสารมีการเปลี่ยนแปลงจนไม่สามารถศึกษาลักษณะสมบัติสารได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความเป็นกรดของซิลิกาเจลที่ใช้ ซึ่งอาจไปมีผลในการเร่งการเกิดปฏิกิริยาการสลายตัวของสารส่วนนี้

จากเหตุผลดังกล่าวจึงต้องใช้ข้อมูลจากวิเคราะห์ทางเคมีของสารส่วนที่ 4 (F4) (ก่อนลงคอลัมน์โครมาโทกราฟีครั้งที่ 2) คือ $^1\text{H-NMR}$ $^{13}\text{C-NMR}$ IR และ MS เพื่อใช้ในการลักษณะสมบัติสาร ซึ่งได้ผลดังนี้

จากข้อมูลทั้งหมดสรุปได้ว่าสารส่วนที่ 4 ประกอบด้วย สารประกอบของกรดคาร์บอกซิลิก 2 ชนิด คือ 2-methyl butanoic acid กับ 3-methyl butanoic acid ดังแสดงในรูปที่ 38 ซึ่งในการแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีด้วยระบบที่ใช้ในการทดลองไม่สามารถแยกสารทั้งสองชนิดออกจากกันได้



2-methyl butanoic acid



3-methyl butanoic acid

รูปที่ 38 โครงสร้างทางเคมีของสารส่วนที่ 4

$$R_f = 0.75 \text{ ในระบบเมทานอล 5% ในเอซิลอะซิเตต}$$

$$MW = 102$$

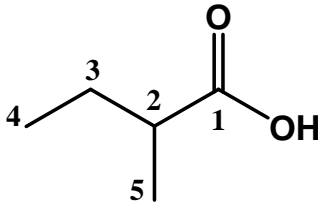
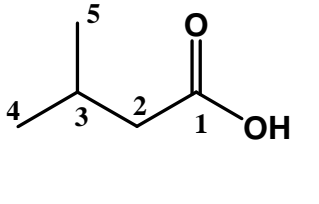
จากข้อมูลของ IR(CHCl_3) ν_{max} 3300-2500 (br), 2965 (s), 2932 (s), 1709 (s), 1466 (m), 1414 (m), 1301 (m), 1226 (m), 940(w) ดังแสดงในตารางที่ 23

ตารางที่ 23 ตำแหน่งการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสารส่วนที่ 4

แถบการดูดกลืนแสง	ความเข้ม	แสดงลักษณะ
3300-2500	กว้าง	O-H สั่นแบบยืดของ carboxylic acid
2965	สูง	C-H สั่นแบบยืดของ CH ₃
2932	สูง	C-H สั่นแบบยืดของ CH ₂
1709	สูง	C=O สั่นแบบยืดของ carboxylic acid
1466	ปานกลาง	C-H สั่นในแนวระนาบของ CH ₂ , CH ₃
1414	ปานกลาง	C-O สั่นแบบยืดของ carboxylic acid
1301	ปานกลาง	O-H สั่นในแนวระนาบของ carboxylic acid
1226	ปานกลาง	O-H สั่นในแนวระนาบของ carboxylic acid
940	น้อย	O-H สั่นในแนวอนอกระนาบของ carboxylic acid

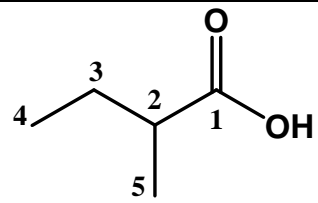
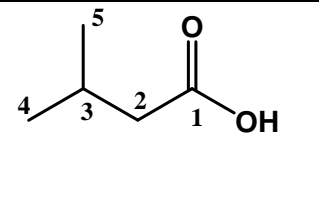
จากข้อมูลของ ¹H-NMR พบตำแหน่งของโปรตอนที่สำคัญตามที่ค่าเคมีคอลชิฟท์ (δ_H) (CDCl₃, 400 MHz): 10.30 (2H, br.s, OH), 2.39 (1H, m, CHCH₃), 2.22 (2H, d, $J = 7.2$ Hz, COCH₂CH(CH₃)₂), 2.11 (1H, m, CH₂CH(CH₃)₂), 1.68 (1H, m, CH_dHCH₃), 1.49 (1H, m, CHH_bCH₃), 1.17 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, CHCH₃), 0.97 (6H, d, $J = 6.8$ Hz, CH(CH₃)₂), 0.94 (3H, t, $J = 7.6$ Hz, CH₃CH₂) ซึ่งข้อมูลของ ¹H-NMR ข้างต้นประกอบด้วยสาร 2 ตัวคือ 2-methyl butanoic acid กับ 3-methyl butanoic acid ซึ่งแสดงดังในตารางที่ 24

ตารางที่ 24 การเปรียบเทียบตำแหน่งของ 2-methyl butanoic acid กับ 3-methyl butanoic acid โดยข้อมูลที่ได้จาก $^1\text{H-NMR}$

 2-methylbutanoic acid		 3-methylbutanoic acid	
(δ_{H}) , multiplicity	แสดงลักษณะโปรตอนตำแหน่งคาร์บอน	(δ_{H}) , multiplicity	แสดงลักษณะโปรตอนตำแหน่งคาร์บอน
2.39, m	2	2.22, d	2
1.68, m และ 1.49, m	3	2.11, m	3
1.17, d	5	0.97, d	4 และ 5
0.94, t	4		

จากข้อมูลของ $^{13}\text{C-NMR}$ พบตำแหน่งของคาร์บอนที่สำคัญานที่ค่าเคมีคอลชิฟท์ (δ_{C}) (CDCl_3 , 400 MHz): 183.50 (C), 179.87 (C), 43.18 (CH_2), 40.89 (CH), 26.50 (CH_2), 25.45 (CH), 22.30 (2 x CH_3), 16.29 (CH_3), 11.47 (CH_3) ดังแสดงในตารางที่ 25

ตารางที่ 25 การเปรียบเทียบตำแหน่งของ 2-methyl butanoic acid กับ 3-methyl butanoic acid โดยข้อมูลที่ได้จาก $^{13}\text{C-NMR}$

 2-methylbutanoic acid		 3-methylbutanoic acid	
(δ_{C})	ตำแหน่งของคาร์บอน	(δ_{C})	ตำแหน่งของคาร์บอน
183.50	1	179.87	1
40.89	2	43.18	2
26.50	3	25.45	3
11.47	4	22.30	4 และ 5
16.30	5		

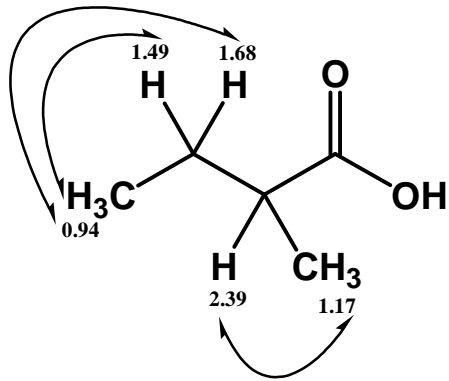
ผลการวิเคราะห์ 2D-NMR ของสารส่วนนี้ใช้เทคนิค gCOSY, HMQC และ gHMBC โดยแสดงผลดังตารางที่ 26 และ 27

ตารางที่ 26 ตำแหน่งของสาร 2-methyl butanoic acid โดยข้อมูลที่ได้จาก $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$

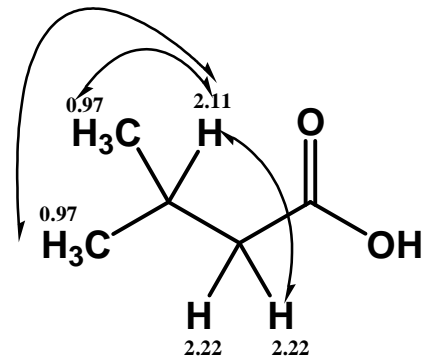
ตำแหน่ง	$^{13}\text{C-NMR}$ (δ_c)	$^1\text{H-NMR}$ (δ_H)	gCOSY	gHMBC
1	183.50	-	-	-
2	40.89	2.39, m	H-5	C-4
3	26.50	1.68, m และ 1.49, m	H-4	C-1, C-5
4	11.47	0.94, t	H-3	C-2
5	16.30	1.17, d	H-2	C-3

ตารางที่ 27 ตำแหน่งของสาร 3-methyl butanoic acid โดยข้อมูลที่ได้จาก $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$

ตำแหน่ง	$^{13}\text{C-NMR}$ (δ_c)	$^1\text{H-NMR}$ (δ_H)	gCOSY	gHMBC
1	179.87	-	-	-
2	43.18	2.22, d	H-3	C-4, C-5
3	25.45	2.11, m	H-2, H-4, H-5	C-1
4	22.30	0.97, d	H-3	C-2, C-5
5	22.30	0.97, d	H-3	C-2, C-4

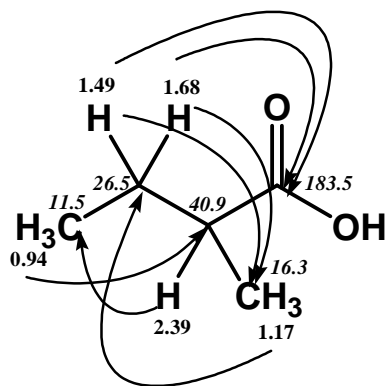


2-methylbutanoic acid

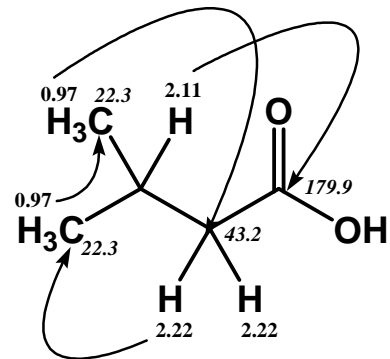


3-methylbutanoic acid

รูปที่ 39 โครงสร้างทางเคมีของสารส่วนที่ 4 (gCOSY)



2-methylbutanoic acid



3-methylbutanoic acid

รูปที่ 40 โครงสร้างทางเคมีของสารส่วนที่ 4 (gHMBC)

จากผลการทดลองสรุปได้ว่า สารส่วนที่ 4 ที่แยกได้จากเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีด้วยระบบเฮกเซน 80 % ในเอธิลอะซิเตต ประกอบด้วย สารประกอบของกรดคาร์บอกซิลิก 2 ชนิด คือ 2-methyl butanoic acid กับ 3-methyl butanoic acid ซึ่งสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ทุกชนิด ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์และราเส้นใย และเมื่อแยกสารทั้ง 2 ชนิด ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีอีกครั้งหนึ่ง พบว่าสารที่แยกได้มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบลดลง กล่าวคือ ให้ผลการยับยั้งต่อชนิดของจุลินทรีย์ทดสอบและมีบริเวณยับยั้งที่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับก่อนที่จะทำให้มีความบริสุทธิ์มากยิ่งขึ้น ซึ่งอาจมีความเป็นไปได้ว่าวิธีการแยกสารทั้ง 2 ชนิดออกจากกันด้วยเทคนิคนี้มีความไม่เหมาะสม หรือเหตุผลอีกประการหนึ่งคือเมื่อสารทั้ง 2 ชนิดอยู่ร่วมกันจะมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ดีกว่า ดังนั้นถ้าความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบที่ลดลงเป็นไปตามเหตุผลดังกล่าวจึงไม่มีความจำเป็นที่จะต้องทำการแยกสารทั้ง 2 ชนิดออกจากกัน

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

5.1 การผลิตสารต้านจุลชีพจาก *Bacillus subtilis* K-05 และศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารต้านจุลชีพ

การผลิตสารต้านจุลชีพจาก *B. subtilis* K-05 ในระดับขวดทดลองเพื่อศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยง *B. subtilis* K-05 ในการผลิตสารต้านจุลชีพ โดยใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ 120 ชั่วโมง ในอาหารเหลว LB ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า *B. subtilis* K-05 มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตั้งแต่ 0 ชั่วโมงจนถึงชั่วโมงที่ 60 ซึ่งมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุด คือ 1.264 กรัมต่อลิตร และหลังจาก 60 ชั่วโมงพบว่าการเจริญของ *B. subtilis* K-05 ค่อยๆ ลดลง จากผลการศึกษาข้างต้นสรุปว่าระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยง *B. subtilis* K-05 เพื่อการผลิตสารต้านจุลชีพ คือ 60 ชั่วโมง เนื่องจากการเลี้ยงในอาหาร LB เป็นเวลานาน 60 ชั่วโมง ให้ผลยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ดีกว่าหรือใกล้เคียงกับตัวอย่างที่ได้การเลี้ยงเชื้อที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมง

ในขั้นตอนของการผลิตสารต้านจุลชีพในระดับถังหมักมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มปริมาณสารให้เพียงพอสำหรับใช้ในขั้นตอนของการทำสารบริสุทธิ์ โดยพบว่า *B. subtilis* K-05 มีการเจริญเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตั้งแต่ 0 ชั่วโมงจนถึงชั่วโมงที่ 36 ซึ่งมีน้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุด คือ 1.5 กรัมต่อลิตร และหลังจาก 36 ชั่วโมง พบว่าการเจริญของ *B. subtilis* K-05 ค่อยๆ ลดลง และเมื่อศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารต้านจุลชีพจากส่วนใสกับจุลินทรีย์ทดสอบ พบว่าสารต้านจุลชีพที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแสดงผลการยับยั้งแบคทีเรีย ยีสต์และราเส้นใยที่ใช้ทดสอบ

เมื่อเปรียบเทียบการเจริญและผลการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของสารต้านจุลชีพจาก *B. subtilis* K-05 เมื่อเลี้ยงในระดับขวดทดลองและในระดับถังหมักพบว่า รูปแบบการเจริญในสภาวะการทดลองดังกล่าวมีความสัมพันธ์กัน คือมีการสร้างสารต้านจุลชีพที่มีผลยับยั้งต่อจุลินทรีย์ทดสอบในช่วงต้นของการเจริญเช่นเดียวกันแต่การเลี้ยงในระดับถังหมักการเจริญของจุลินทรีย์จะเริ่มลดลงเร็วกว่าการเลี้ยงในระดับขวดทดลอง และจากผลการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบที่พบในช่วงต้นของการเจริญมีความสอดคล้องกับรายงานของ Katz และ Demain (1977) ซึ่งสรุปได้ว่าแม้ว่าสารต้านจุลชีพเป็นสารทุติยภูมิที่สร้างขึ้นในช่วงปลายของระยะเพิ่มจำนวนแบบทวีคูณ (logarithmic phase) แต่สามารถตรวจพบได้ตั้งแต่ระยะเริ่มต้นของการเจริญเช่นเดียวกับที่ Ohno และคณะ (1993) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของ *B. subtilis* NB 22 และการสร้างสารต้านจุลชีพ คือ อีทรีน พบว่ามีการสร้างอีทรีนตั้งแต่ระยะเริ่มต้นของการเจริญ (ก่อนชั่วโมงที่ 24) และมีการสร้างอีทรีนไปพร้อมๆ กับการเจริญของ *B. subtilis* NB 22

5.2 การทำสารต้านจุลชีพที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis* K-05 ให้บริสุทธิ์และการศึกษาลักษณะสมบัติของสารต้านจุลชีพ

5.2.1 การสกัดสารต้านจุลชีพและการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารต้านจุลชีพในส่วนใส สารสกัดจากส่วนใส และสารสกัดจากเซลล์

หลังจากเก็บน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยง *Bacillus* K-05 และแยกเซลล์ออกแล้ว นำทั้ง 2 ส่วนมาสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ จากนั้นนำสารสกัดทั้ง 2 ส่วน ไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งต่อจุลินทรีย์ทดสอบเปรียบเทียบกับส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยง *Bacillus* K-05 ซึ่งพบว่า สารต้านจุลชีพจากทั้ง 3 ส่วนดังกล่าวให้ผลยับยั้งต่อจุลินทรีย์ทดสอบทุกชนิดในระดับที่แตกต่างกัน ยกเว้นราเส้นใย *A. oryzae* ซึ่งไม่พบการยับยั้งเมื่อทดสอบกับสารสกัดจากส่วนใส นอกจากนี้ยังพบว่า สารสกัดจากส่วนใสและสารสกัดจากเซลล์มีระดับการยับยั้งต่อจุลินทรีย์ทดสอบทุกชนิดใกล้เคียงกันและให้ผลการยับยั้งที่ดีกว่าส่วนใสก่อนการสกัดเมื่อทดสอบกับจุลินทรีย์ทดสอบที่เป็นแบคทีเรียซึ่งน่าจะเป็นเพราะในสารสกัดประกอบด้วยสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่มีความบริสุทธิ์มากขึ้น แต่สำหรับจุลินทรีย์ทดสอบที่เป็นราเส้นใยและยีสต์พบว่า มีบริเวณยับยั้งที่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับส่วนใสก่อนการสกัด ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าวิธีการสกัดและตัวทำละลายที่ใช้ยังมีความเหมาะสมไม่เพียงพอที่จะนำสารส่วนที่แสดงฤทธิ์ออกมาได้ทั้งหมด และเมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ของสารต้านจุลชีพในท่อกับชุดควบคุมบวก พบว่าสารต้านจุลชีพในท่อกับชุดควบคุมบวกสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบที่เป็นแบคทีเรียได้ใกล้เคียงกับชุดควบคุมบวก และสำหรับราเส้นใยพบว่าสามารถยับยั้งได้ใกล้เคียงหรือดีกว่าชุดควบคุมบวก

เมื่อนำสารสกัดจากส่วนใสและสารสกัดจากเซลล์มาวิเคราะห์โดยวิธี TLC โดยระบบตัวพา คือ เมทานอล 5% ในเอทิลอะซิเตต ซึ่งเป็นระบบที่ดีที่สุดในการแยกสารสกัดทั้ง 2 ส่วน พบว่าสารสกัดจากส่วนใสและสารสกัดจากเซลล์ มีตำแหน่งของสารที่แยกได้ตรงกัน 2 ตำแหน่ง และต่างกัน 3 ตำแหน่ง ซึ่งอาจสรุปได้ว่า สารสกัดทั้ง 2 ส่วน มีชนิดของสารออกฤทธิ์บางส่วนที่ต่างกันจึงทำให้มีความแตกต่างของตำแหน่งของสารที่แยกได้บน TLC

5.2.2 การทำสารต้านจุลชีพที่สกัดจากส่วนใส ให้บริสุทธิ์

จากการสรุปผลในขั้นตอนของการวิเคราะห์สารสกัดจากส่วนใสและสารสกัดจากเซลล์โดยวิธี TLC ทำให้ทราบว่าสารสกัดทั้ง 2 ส่วน มีชนิดของสารออกฤทธิ์บางส่วนที่ต่างกัน ดังนั้นในการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนนี้จึงไม่นำสารทั้ง 2 ส่วนมารวมกันเพราะจะทำให้การแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ทำได้ยากขึ้น และเลือกที่จะศึกษาสารสกัดจากส่วนใสก่อนเป็นลำดับแรกเนื่องจากเป็นส่วนที่มีปริมาณมากและเคยมีรายงานการพบสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ และยังมีสารต้านจุลชีพส่วนอื่นที่ยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์จากรายงานของสุภารัตน์ บุญยง (2548) พบว่า สารบริสุทธิ์ 2 ชนิดที่พบเป็นสารประเภทเปปไทด์ โดยสารที่ชนิด 1 และสารชนิดที่ 2 จะ

ออกมาจากคอลัมน์ด้วยระบบตัวพาคือเฮกเซน 30% ในเอธิลอะซิเตท และเฮกเซน 25% ในเอธิลอะซิเตท ตามลำดับ ซึ่งเมื่อทำให้ตัวทำละลายอินทรีย์ระเหยไปได้สารมีลักษณะเป็นผงสีครีม และยับยั้งแบคทีเรีย ได้แก่ *B. subtilis* ATCC6633 *S. aureus* ATCC25923 และ *M. luteus* เช่นเดียวกันเมื่อนำสารชนิดที่ 1 มาวิเคราะห์โครงสร้างโมเลกุลด้วยวิธี NMR และวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยใช้ MS พบว่าสารที่ 1 มีโครงสร้างโมเลกุลเป็นวงของกรดอะมิโน 2 ชนิด คือ cyclo(Leu-Pro) หรือมีชื่อทางเคมีว่า 3-isobutylhexahydro-pyrrolo [1,2- α]pyrazine-1,4-dione และมีน้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 210.1446 และสารชนิดที่ 2 มีโครงสร้างโมเลกุลเป็นวงของกรดอะมิโน 2 ชนิด คือ cyclo(Val-Pro) หรือมีชื่อทางเคมีว่า 3-isopropylhexahydro-pyrrolo [1,2- α]pyrazine-1,4-dione มีน้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 196.1269

ในงานวิจัยนี้ศึกษาการทำสารสกัดจากส่วนใส้ให้บริสุทธิ์ โดยใช้สารสกัดเริ่มต้น 20.025 กรัม มาทำให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีและนำสารแต่ละส่วนที่ได้จากการชะคอลัมน์ มาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งต่อจุลินทรีย์ทดสอบ จากขั้นตอนนี้พบว่ามีสาร 2 ส่วนคือสารส่วนที่ 4 (F4) และสารส่วนที่ 13 (F13) ที่มีความน่าสนใจที่จะทำให้บริสุทธิ์ขึ้นและนำมาศึกษาลักษณะสมบัติสาร เนื่องจากสารส่วนที่ 4 เป็นสารส่วนที่สามารถแสดงฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทุกกลุ่มที่ศึกษาได้ใกล้เคียงกับการยับยั้งโดยชุดควบคุมบวก และสารส่วนที่ 13 ซึ่งแสดงการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *E. coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ โดยมีบริเวณยับยั้งใกล้เคียงกับการยับยั้งโดยชุดควบคุมบวก ซึ่งมีสารต้านจุลชีพน้อยชนิดที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบมีความซับซ้อนมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก ดังนั้นจึงเป็นผลการศึกษาที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่งเนื่องจากชุดควบคุมบวก ซึ่งได้แก่ คลอแรมฟินิคอล และนิสเตติน เป็นสารบริสุทธิ์จำหน่ายเป็นการค้าย่อมมีประสิทธิภาพ ในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีจึงน่าจะมีประโยชน์ถ้าสามารถศึกษาลักษณะสมบัติทางเคมีของสารนี้ เพื่อประโยชน์ในการพัฒนาและนำมาใช้ทางเภสัชวิทยาต่อไป

สำหรับสารส่วนที่ 4 ใช้ระบบเอธิลอะซิเตท 20% ในเฮกเซนเป็นระบบที่ชะสารส่วนดังกล่าวจากคอลัมน์ได้ของเหลวสีน้ำตาลมีลักษณะเป็นของเหลวและเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมีคือ $^1\text{H-NMR}$ $^{13}\text{C-NMR}$ และ 2D-NMR พบว่าสารส่วนนี้น่าจะมีสารปนกันอยู่มากกว่า 1 ชนิด จึงนำไปทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยวิธีโครมาโทกราฟีอีกครั้ง โดยระบบสารตัวพาคือเฮกเซน 30% ในเอธิลอะซิเตท 25% ต่อ เอธิลอะซิเตท 5% ต่อ เมทานอล 5% ซึ่งเป็นระบบที่แยกสารส่วนนี้ได้ดีที่สุด จากผลการของการแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีครั้งที่ 2 นำมาศึกษาลักษณะสมบัติสารโดยวิธีวิเคราะห์ทางเคมี คือ $^1\text{H-NMR}$ $^{13}\text{C-NMR}$ IR และ MS พบว่า ลักษณะของสารมีการเปลี่ยนแปลงจนไม่สามารถศึกษาลักษณะสมบัติสารได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความเป็นกรดของซิลิกาเจลที่ใช้ ซึ่งอาจไปมีผลในการเร่งการเกิดปฏิกิริยาการสลายตัวของสารส่วนนี้ และจากเหตุผลดังกล่าวจึงต้องใช้ข้อมูลจากวิเคราะห์ทางเคมีของสารส่วนที่ 4 (ก่อนลงคอลัมน์โครมาโทกราฟีครั้ง

ที่ 2) คือ $^1\text{H-NMR}$ $^{13}\text{C-NMR}$ 2D-NMR IR และ MS เพื่อใช้ในการศึกษาลักษณะสมบัติสาร ซึ่งได้ผลดังนี้ จากข้อมูลทั้งหมดสรุปได้ว่าสารส่วนที่ 4 ประกอบด้วยสารประกอบของกรดคาร์บอกซิลิก (carboxylic acid) 2 ชนิด คือ 2-methyl butanoic acid กับ 3-methyl butanoic acid ซึ่งในการแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีด้วยระบบที่ใช้ในการทดลองไม่สามารถแยกสารทั้งสองชนิดออกจากกันได้เนื่องจากสารทั้ง 2 ชนิดเป็นสารที่มีลักษณะใกล้เคียงกัน โดยมีมวลโมเลกุลเท่ากันคือ 102 และมีโครงสร้างหลักที่เหมือนกันแต่ต่างกันที่ตำแหน่งการต่อกับคาร์บอนของหมู่ methyl ซึ่งมีการเกาะกับคาร์บอนในตำแหน่งที่ 2 และตำแหน่งที่ 3 ตามลำดับ โดยสารส่วนนี้สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ทุกชนิดดังที่กล่าวมาแล้ว และเมื่อแยกสารทั้ง 2 ชนิด เพื่อหาค่าความบริสุทธิ์ขึ้นด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีอีกครั้งหนึ่งพบว่า สารที่แยกได้มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับก่อนที่จะทำให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นและมีลักษณะของสารที่เปลี่ยนแปลงจนไม่สามารถศึกษาลักษณะสมบัติสารได้ซึ่งอาจมีความเป็นไปได้ว่าวิธีการแยกสารทั้ง 2 ชนิดออกจากกันด้วยเทคนิคนี้ยังไม่เหมาะสม หรือเหตุผลอีกประการหนึ่งคือเมื่อสารทั้ง 2 ชนิดอยู่ร่วมกันจะมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ดีกว่า ดังนั้นถ้าความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบที่ลดลงเป็นไปตามเหตุผลดังกล่าวจึงไม่มีความจำเป็นที่จะต้องทำการแยกสารทั้ง 2 ชนิดนี้ออกจากกัน

ในปี 2006 Rhee ได้รายงานการออกฤทธิ์ร่วมกันของสารประเภทไดเปปไทด์สองชนิด ได้แก่ cyclo(Leu-Propyl) และ cyclo(Phe-Pro) ซึ่งผลิตจาก *Streptomyces* sp. พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิดและแบคทีเรียแกรมลบที่ไม่ใช้ออกซิเจนบางชนิด (negative anaerobic bacteria) รวมทั้งยังมีฤทธิ์ป้องกันผลที่เกิดจากรังสีต่อไฟโบรบลาสต์ของเซลล์ปอด กล่าวคือ เมื่อ fibroblast cell lines (เซลล์เริ่มต้น 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ได้รับสารทดสอบทั้ง 3 กลุ่มคือ cyclo(Leu-Pro) ร่วมกับ cyclo(Phe-Pro) และ cyclo(Leu-Pro) และ cyclo(Phe-Pro) นานเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมารับรังสีจะพบว่า ถ้าใช้สารประเภทไดเปปไทด์ชนิดใดชนิดหนึ่งเซลล์มีอัตราการอยู่รอดน้อยกว่า 80% แต่ถ้าใช้สารประเภทไดเปปไทด์ทั้งสองชนิดทำงานร่วมกัน เซลล์มีอัตราการอยู่รอดมากกว่า 90%

และสำหรับสารส่วนที่ 13 ซึ่งเป็นสารอีกส่วนหนึ่งที่แยกได้จากการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์ครั้งที่ 1 ซึ่งมีความน่าสนใจเนื่องจากแสดงการยับยั้ง *E. coli* ซึ่งแบคทีเรียแกรมลบได้โดยมีบริเวณยับยั้งใกล้เคียงกับการยับยั้งโดยชุดควบคุมบวกซึ่งมีสารต้านจุลชีพน้อยชนิดที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบมีความซับซ้อนมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวกดังที่กล่าวมาแล้ว การทำให้สารส่วนนี้มีความบริสุทธิ์ขึ้นโดยผ่านขั้นตอนดังนี้ คือ คอลัมน์โครมาโทกราฟี การแยกโดยการปล่อยให้สารค่อยๆ ตกตะกอน การแยกสารโดยใช้ Preparative plate TLC (PTLC) และการแยกสารด้วยวิธี HPLC ตามลำดับ จากนั้นขั้นตอนของการ

แยกส่วนที่ 13 ด้วยวิธีการต่างๆ ดังที่กล่าวมา ผลการทดลองพบว่า การแยกสารที่มีฤทธิ์ยับยั้ง จุลินทรีย์ทดสอบในส่วนนี้ยังไม่สามารถแยกจนเป็นสารบริสุทธิ์ได้หรืออาจมีความเป็นไปได้ว่าจะมี สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งมากกว่า 1 ส่วนเนื่องจากได้พบว่ามีสารที่ให้ผลยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบใกล้เคียงกัน อยู่ในทุกส่วนของสารที่แยกด้วยวิธี HPLC เมื่อวิเคราะห์ทางเคมีโดยใช้ $^1\text{H-NMR}$ พบว่าสารส่วนที่ 13 ยังคงไม่บริสุทธิ์ ซึ่งอาจเป็นเพราะสภาวะหรือเทคนิคที่ใช้ในการแยกสารส่วนนี้ยังไม่เหมาะสม สำหรับสารส่วนนี้ จึงต้องมีการศึกษาการแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ต่อไป ดังนั้นสารในส่วนดังกล่าว จึงยังไม่สามารถนำไปศึกษาลักษณะสมบัติสารได้เนื่องจากยังมีความบริสุทธิ์ไม่เพียงพอ แต่สามารถ ระบุได้ว่าสารส่วนนี้เป็นสารประเภทเปปไทด์เนื่องจากข้อมูลการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชัน (functional group) ของสาร โดย IR พบว่ามีหมู่ฟังก์ชันของสารเป็นสารเอไมด์ (amide) เป็นองค์ประกอบใน โมเลกุล

จากการรายงานผลงานวิจัยอื่น ๆ ที่มีการศึกษาสารต้านจุลชีพจากแบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* พบว่าสารต้านจุลชีพที่สังเคราะห์ได้จากแบคทีเรียจีนัสนี้มักเป็นสารประเภทเปปไทด์ที่มีโครงสร้าง หลากหลายดังแสดงในตารางที่ 4 กล่าวคือสารต้านจุลชีพที่ผลิตได้จะมีองค์ประกอบหลักเป็นเปป ไทด์และอาจมีองค์ประกอบย่อยเป็นสารประเภทอื่นๆ เช่น cyclic acylpeptide และ lipopeptide เป็น ต้น นอกจากนี้ยังพบว่าสารต้านจุลชีพประเภทนี้อาจมีลักษณะเป็นวง (cyclic peptides) เช่น อีตูริน โดยมีโครงสร้างเป็น cyclic lipopeptide หรืออาจมีลักษณะที่เป็นโซ่ตรง เช่น ไโรโซซิซิน โดยมี โครงสร้างเป็นไคเปปไทด์และไตรเปปไทด์ (Kluger และคณะ, 1990) ซึ่งความสามารถในการยับยั้ง จุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ขึ้นอยู่กับลักษณะ โครงสร้างของสารที่เป็นองค์ประกอบ

Han และคณะ (2005) ศึกษาสารต้านจุลชีพจาก *Bacillus sunhua* โดยแบคทีเรียดังกล่าว สามารถผลิตสารต้านจุลชีพยับยั้ง *Streptomyces scabiei* เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว TSB ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อมาสกัดด้วยเอธิลอะซิ เตตและนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี พบว่ามีสาร 2 ส่วนที่ให้ผลการยับยั้งที่ดี ต่อจุลินทรีย์ทดสอบ จึงนำสารทั้ง 2 ส่วนมาทำให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นด้วย preparative HPLC ซึ่ง เมื่อทำการศึกษาลักษณะสมบัติสารด้วยวิธีทางเคมี คือ $^1\text{H-NMR}$ $^{13}\text{C-NMR}$ HMBC HMQC NOESY และ MS จะได้สารบริสุทธิ์ที่มีโครงสร้างเป็น cyclic lipopeptide คือ iturin A และ maccrolactin A ซึ่งมีผลต่อการยับยั้งการสร้างสปอร์และมีผลต่อการทำลายเส้นใยของ *S. scabiei* ตามลำดับ

Hu และ คณะ (2006) ศึกษาสารต้านจุลชีพจาก *Bacillus subtilis* ซึ่งแยกลำต้นของพืชที่มีการ ถูกทำลายโดยเชื้อก่อโรคคือ *Slerotinia sclerotiorum* เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Czapek ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อสามารถยับยั้ง *Fusarium moniliform* และเมื่อทำให้บริสุทธิ์ด้วย การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียม ซัลเฟต 25-60% จากนั้นทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นด้วยคอลัมน์ Sephadex G-25 คอลัมน์ DEAE-52

คอลัมน์ Sephadex G-25 และ revers-phase HPLC (reverse-phase High Performance Liquid Chromatography) ศึกษาลักษณะสมบัติสารด้วยวิธีทางเคมีจะได้สารบริสุทธิ์ที่มีโครงสร้างเป็น lipopeptide คือ ฟังจิซิน (fungycin)

Zhang และ คณะ (2008) ศึกษาสารต้านจุลชีพจาก *Bacillus sp.* B-TL2 ซึ่งแยกได้จากลำต้นของยาสูบ โดย *Bacillus sp.* B-TL2 สามารถสร้างสารต้านจุลชีพที่มีผลยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชได้ดีเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ขั้นตอนสำหรับการทำให้ได้สารต้านจุลชีพบริสุทธิ์ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนตามลำดับ คือ การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต คอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน (cation exchange chromatography) โดยใช้คอลัมน์ CM Sepharose Fast Flow และ reverse-phase HPLC โดยใช้คอลัมน์ Source 5RPC เป็นขั้นตอนสุดท้าย ทำให้ได้สารบริสุทธิ์ที่แสดงฤทธิ์การยับยั้งที่ดีต่อราทดสอบ สารบริสุทธิ์ที่แยกได้จาก *Bacillus sp.* B-TL2 แสดงฤทธิ์การยับยั้งที่ดีต่อเชื้อราทดสอบซึ่งเป็นราที่ก่อโรคพืช ได้แก่ *Bipolaris maydis* *Aspergillus brassicae* *A.niger* และ *Cercospora personata* และเมื่อนำมาวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดย SDS-page และ mass spectrometry พบว่ามีมวลโมเลกุลเท่ากับ 2500 ดาลตัน (Da) และมีลำดับกรดอะมิโนที่ N-terminal คือ NH₂-K-Q-Q-L-A-T-E-A-E-S-A-G-P-I-L ซึ่งลำดับกรดอะมิโนดังกล่าวมีความแตกต่างจากลำดับกรดอะมิโนที่ปรากฏในสารต้านจุลชีพชนิดอื่นๆ ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ที่เคยมีการรายงาน

นอกจากสารต้านจุลชีพประเภทเปปไทด์ซึ่งเป็นสารส่วนใหญ่ที่มีรายงานพบจาก *Bacillus* สปีชีส์ต่างๆ ยังพบว่ามีสารบางชนิดที่ผลิตจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของ *Bacillus* บางสปีชีส์ที่มีลักษณะ โครงสร้างทางเคมีเป็นสารชนิดอื่นนอกเหนือจากสารประเภทเปปไทด์และมีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ได้เช่นเดียวกัน เช่น เอนไซม์ไคตินเนส (chitinase) และ เอนไซม์ชนิดอื่นๆ ที่สามารถย่อยหรือทำลายผนังเซลล์ของสารต้านจุลชีพได้ (Sygusch, 1990) สารประกอบประเภทสารระเหย (Sadfi และคณะ, 2001) สารประกอบที่แยกได้จากกลไกการต้านทานต่อยาหรือสารปฏิชีวนะ (Kehlenbeck และคณะ, 1994) สารกลุ่มโพลีคีไทด์ (polyketide) สารกลุ่มอะมิโนซูการ์ (aminosugar) และ ฟอสโฟลิปิด (Phospholipid) เป็นต้น (Stein, 2005)

ตารางที่ 28 สารต้านจุลชีพจาก *Bacillus* สายพันธุ์ต่างๆ ที่มีลักษณะโครงสร้างทางเคมีเป็นสารชนิดอื่นนอกเหนือจากสารประเภทเปปไทด์

จุลินทรีย์ผู้ผลิต	สารต้านจุลชีพ	โครงสร้างสาร	การยับยั้ง	อ้างอิง
<i>B.Subtilis</i>	Butirosin	aminoglycoside	แบคทีเรีย	Glasby, 1993
<i>B.Subtilis</i> 168	Bacilysoin	Phospholipids	แบคทีเรียและรา	Tamehiro และคณะ 2002
<i>B.Subtilis</i> A1/3	Difficidin Bacillaene	Polyene macrolide Polyketide	แบคทีเรียแกรมบวก	Hofemeister และคณะ 2004
<i>B.pumilus</i>	Neotrehalosdiamine	aminosugar	ยับยั้งจุลินทรีย์ทุกกลุ่ม	Inaoku และคณะ 2004
<i>B.Subtilis</i> K-05	2methylbutanoic acid 3methylbutanoic acid	carboxylic acid	แบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ ยีสต์ ราเส้นใย	งานวิจัยนี้

ในงานวิจัยนี้ได้พบสารที่ผลิตจาก *B.subtilis* K-05 ได้แก่ สารประกอบของกรดคาร์บอกซิลิก (carboxylic acid) 2 ตัว คือ 2-methyl butanoic acid และ 3-methyl butanoic acid ซึ่งแสดงฤทธิ์การยับยั้งที่ดีต่อจุลินทรีย์ทดสอบหลายชนิด ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ และราเส้นใย จากการสืบค้นข้อมูลพบว่าสารต้านจุลชีพส่วนใหญ่ที่ผลิตจาก *Bacillus* สายพันธุ์ต่างๆ มักเป็นสารประเภทเปปไทด์ (ตารางที่ 4) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารที่พบในงานวิจัยนี้เป็นสารที่มีความน่าสนใจเนื่องจากเป็นสารที่สามารถแสดงฤทธิ์การยับยั้งที่ดีต่อจุลินทรีย์ทดสอบได้หลายชนิดและเป็นสารที่ไม่เคยมีรายงานการพบใน *Bacillus* sp. มาก่อน

สาร 2-methyl butanoic acid และ 3-methyl butanoic acid หรือชื่ออื่นๆ คือ 2-methyl butyric acid และ Isovaleric acid สารดังกล่าวเป็นสารที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์และเป็นสารที่มีการผลิตทางการค้าซึ่งใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น การสังเคราะห์กรดอะมิโน (Dionisi และคณะ, 2006)

มีรายงานการพบสารชนิดนี้ในสิ่งมีชีวิตต่างๆ ได้แก่ แบคทีเรียมีโดยมีรายงานการพบสารดังกล่าว ในกลุ่ม lactic acid bacteria และ propionic acid bacteria และในพืช ได้แก่ *Gypsophila paniculata*

Thierry และ Maillard (2002) พบว่าสารกลุ่มนี้เป็นสารที่เกิดขึ้นจากกระบวนการ catabolism ของกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ในกระบวนการผลิตเนยแข็ง (swiss type cheeses) ซึ่งทำให้เกิดกลิ่น โดยพบว่า 2-methyl butanoic acid และ 3-methyl butanoic acid เป็นสารที่ได้จากกระบวนการ catabolism ของกรดอะมิโน ได้แก่ ไอโซลิวซีน และลิวซีน (Leu) ตามลำดับ โดย propionic acid bacteria และแบคทีเรีย *Lactobacillus sp.* Tavarria และคณะ (2002) และ Genesan และคณะ (2006) พบว่า สารกลุ่มนี้เป็นสารที่ทำให้เกิดกลิ่นซึ่งเกิดขึ้นจากกระบวนการ catabolism ของกรดอะมิโนชนิดต่างๆ โดย lactic acid bacteria โดยพบว่า 3-methyl butanoic acid เป็นสารที่ได้จากกระบวนการ catabolism ของลิวซีน และสำหรับกรดอะมิโนชนิดอื่นๆ พบว่าสามารถเกิดเป็นสารประกอบที่ทำให้เกิดกลิ่นได้เช่นเดียวกัน เช่น อะลานีน วาลีนและไกลซีนทำให้เกิดเป็นสารประกอบได้แก่ กรดโพรพิโอนิก ไอโซโพรพิลบิวทาเรท และกรดอะซิติก ตามลำดับ

สำหรับพืช ได้แก่ *Gypsophila paniculata* มีรายงานการพบการสังเคราะห์สาร 3-methyl butanoic acid ได้กระบวนการ catabolism ของกรดอะมิโน ได้แก่ ลิวซีน (Leu) เช่นกัน ซึ่งกระบวนการสังเคราะห์มีความสัมพันธ์กับกระบวนการเกิดดอกของ *Gypsophila paniculata* (Nimitkeatkai และคณะ 2005)

สรุปว่างานวิจัยนี้ได้ผลิตสารด้านจุลชีพจาก *B. subtilis* สายพันธุ์ K-05 ทำให้บริสุทธิ์และศึกษาลักษณะสมบัติของสาร พบว่าสารด้านจุลชีพที่ผลิตได้ คือ สาร 2-methyl butanoic acid และ 3-methyl butanoic acid ซึ่งเป็นสารที่มีความน่าสนใจเนื่องจากเป็นสารที่สามารถแสดงฤทธิ์การยับยั้งที่ดีต่อจุลินทรีย์ทดสอบได้หลายชนิดและเป็นสารที่ไม่เคยมีรายงานการมีฤทธิ์เป็นสารด้านจุลชีพที่ผลิตโดย *Bacillus spp.* มาก่อน

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- นิโบล พรหมประสิทธิ์. 2542. การทำให้บริสุทธิ์บางส่วนของสารต้านจุลชีพที่ผลิตจาก *Bacillus sp.* S11. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต. หลักสูตรจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ปัทมา บัวเพชร. 2549. สารทุติยภูมิออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโคไฟต์ *Fusarium equiseti* ที่แยกจากเหง้าขมิ้นชัน. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต. หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ. คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สมใจ ศิริโชค. 2547. สารปฏิชีวนะ. จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม. ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ. กรุงเทพฯ. หน้า 249.
- สุภารัตน์ บุญยง. 2548. สารต้านจุลชีพที่ผลิตจาก *Bacillus sp.* สายพันธุ์ K-05. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต. หลักสูตรจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

- Adamczeski M., Reed .R., and Crews P. 1995. New and Know diketopeperazines from the Caribbean sponge, Cclyx CF. Podatypa. Journal of Natural Product. 58 : 201-208.
- Asaka, O., and Shoda, M. 1996. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. Applied and Environmental Microbiology. 62 : 4081-4085.
- Basha, S. and Ulaganathan, K. 2002. Antagonism of *Bacillus* species (strain BC121) towards *Curvularia lunata*. Current science 82 (12) : 1457-1463.
- Bernal, G., A., Ciampi, L. 2002. Isolation and partial purification of a metabolite from a mutant strain of *Bacillus sp.* with antibiotic activity against plant pathogenic agents. Electronic Journal of Biotechnology. 5 : 12-20.
- Besson, F. and Michel, G. 1990. Mycosubtilins B and C : minor antibiotics from ayco subtilin producing *Bacillus subtilis*. Microbiology, 62 : 93-99.
- Brizani, D., and Brandelli, A. 2002. Characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus sp.* strain 8A. Journal of Appiled Microbiology. 93 : 512-519.

- Brock, D., and Medigan, T. 1991. Biological of Microbiology. 6th ed. Prentice-Hall Inc, USA. pp. 361- 370.
- Brune, M. E. C. and Montrille, T. J. 1993. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. Apply and Environmental Microbiology. 59 : 3003-3010.
- Butler, M. S. and Buss, A. D. 2006. Natural products-The future scaffolds for novel antibiotics? Biochemical Pharmacology. 71 : 919-929.
- Callow, R. K., and Work, T. S. 1952. Antibiotic peptides from *Bacillus licheniformis*. Licheniformins A, B and C. Journal of Biochemistry. 51 : 558-569.
- Cavaglieri, L., Orlando, J., Rodriguez, M.I., Chulze, S., and Etcheverry, M. 2005. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at the maize root level. Research in Microbiology. 156 : 748-754.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 1999. Control of infection disease. Morbidity and Mortality Weekly Reports. 46 : 1-51.
- Chaurasia, B., Pandey, A., Palni, L.M.S., Trivedi, P., Kumar, B., and Colvin, N. 2005. Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi in vitro. Microbiology Research. 160 : 75-81.
- Chain, E.B. 1946. The chemical structure of the penicillins. Nobel Lecture. Available from: <http://nobelprize.org/medicine/laureates/1945/chain-lecture.pdf>. [2005, Dec 24].
- Chiang, Y., Yang, C., Li c, C., Ho, Y., Chien-Ku Lin C. and Tsen, H. 2006. Identification of *Bacillus* sp., *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Staphylococcus* sp. and *Vibrio* sp. with 16S ribosomal DNA-based oligonucleotide array hybridization. International Journal of Food Microbiology. 107 : 131-137.
- Cho, S., Lee S.,Cha B., Kim Y., Shin K. 2003. Detection and characterization of the *Gloeosporium gloeosporioides* growth inhibitory compound iturin A from *Bacillus subtilis* strain KS03. FEMS Microbiology Letters. 223 : 47-51.
- Chung, Y. J., Steen, M. T. and Hansen, J. N. 1992. The Subtilin Gene of *Bacillus subtilis* ATCC 6633 Is Encoded in an Operon That Contains a Homolog of the Hemolysin B Transport Protein. Journal of Bacteriology. 174 : 1417-1422.
- Cladera-Olivera, F., Caron, G.R., and Brandelli, A. 2004. Bacteriocin production by *Bacillus licheniformis* strain P40 in cheese whey using response surface methodology. Biochemical Engineering Journal. 21 : 53-58.

- Claus, D., and Berkeley, R.C.W. 1986. The genus *Bacillus*. Bergey's manual of systematic bacteriology, Williams and Wilkins Baltimore. vol. 2. pp. 1105-1139.
- Cook, R. J. and Baker, K. F. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. APS Press, St. Paul, Minnesota.
- Dhavale, D.D., Desai V. N., Saha N. N. and Tilekar J. N. 2002. Chiron approaches to polyhydroxylated piperidines : promising glycosidase inhibitors. Arkivoc. 5 : 91-105.
- Dubos, R.J., 1939a. Studies on a bactericidal agent extracted from a soil *Bacillus* : I preparation of the agent. It's activity in vitro. The Journal of Experimental Medicine, Vol 70 : 1-10.
- Dubos, R.J., 1939b. Studies on a bactericidal agent extracted from a soil *Bacillus* II. Protective effect of the bactericidal agent against experimental *Pneumococcus infection* in mice. The Journal of Experimental Medicine. 70 : 11-17.
- Duitman, E.H., Hamoen, L.W., Rembold M., Venema, G., Seitz, H., Saenger W., Bernhard, F., Reinhardt, R., Schmidt M., Ullrich, C., Stein, T., Leenders, F., and Vater J. 1999. The mycosubtilin synthetase of *Bacillus subtilis* ATCC6633 : A multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase, and a fatty acid synthase. PNAS. 96 : 13294-13299.
- Farkas-Himsley, H., Zhang, Y. S., Yaun, M. and Musclow, C. E. 1992. Partially purified bacteriocin kills alignant cells by apoptosis: programmed cell death. Cell Molecular Biology. 38 : 643-651.
- Fleming, A. 1945. Penicillin. Nobel Lecture. Available from: <http://nobelprize.org/medicine/laureates/1945/fleming-lecture.pdf>. [2006, Jan 6].
- Fix, D. 1997. Antimicrobial Chemotherapy. Medical Microbiology Site located on the CEHS Web Server at SIUC : Department of Microbiology Southern Illinois University at Carbondale Carbondale, IL 62901. Available from: <http://www.cehs.siu.edu/fix/medmicro/chemo.htm>. [2005, 5 Mar].
- Foroumadi, A., Emami S., Mehni M., Moshafic M.H., and Shafiee A. 2005. Synthesis and antibacterial activity of N-[2-(5-bromothiophen-2-yl)-2-oxoethyl] and N-[(2-5-bromothiophen-2-yl)-2-oximinoethyl] derivatives of piperazinyl quinolones. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 15 : 4536–4539.
- Ganesan, B., Dobrowolski, P., and Weimer C. B. Identification of Leucine-to-2-Metylbutyric acid Catabolic Pathway of *Lactococcus lactis*. Journal of Appiled Microbiology. 72 : 4264-4273.

- Gilmire, M. S., Dunny, G. M., Cleary, P. P. and McKay, L. L. 1991. Enterococcus faecalis hemolysis/bacteriocin, in G. M. Dunny, P. P. Cleary and L. L. McKay (eds.), Genetics and Molecular Biology of Streptococci, Lactococci and Enterococci. pp. 206-213. Washington D. C.: American Society for Microbiology.
- Greenwood, D. and Ogilvie, M. M. 2002. Antimicrobial agents. Medical Microbiology : A guide to microbial infections pathogenesis, immunity, laboratory diagnosis and control. 16th edition. Churchill livingstone, Edinburge London. pp 46.
- Greenwood, D., and Whitley, R. 2002. Chapter 2 : Modes of action. Available from : <http://www.intl.elsevierhealth.com/e-books/pdf/360.pdf> . [2003, May 5]
- Gruchalla, R. S., and Pirmohamed, M. 2006. Antibiotics allergy. The new england journal of medicine. 354 : 601-609.
- Han, J. S., Cheng, J. H., Yoon, T. M., Song., J., Rajkarnikar, A., Kim, W. G., Yoo., I. D. and Yang, Y. Y. 2005. Biological control agent of common scab disease by antagonistic strain *Bacillus* sp. sunhua. Journal of Appiled Microbiology. 99 : 213-221.
- Hansen, J. L., Moore¹, P. B. and Steitz¹, T. A. 2003. Structures of five antibiotics bound at the peptidyl transferase center of the large ribosomal subunit. Journal of Molecular Biology. 330 : 1061–1075.
- Harris, E. L. V. 1989. Concentration of the extract: precipitation by increasing the ionic strength (sa;ting-out). In E. L. V. Harris and S. Angal (eds.), Protein Purification Methods : a practical approach. pp 154-157. New York : Oxford University Press.
- He, H., Shen, B., Korshalla, J. and Carter, G. T. 2001. Circulocins, new antibacterial lipopeptides from *Bacillus circulans*, J2154. Tetrahedron. 57 : 1189-1195.
- He, L., Chen, W. and Liu, Y. 2006. Production and partial characterization of bacteriocin-like peptides by *Bacillus licheniformis* ZJU12. Microbiological Research. 161 : 321-326.
- Hofemeister, J., Conrad, B., Adler, B., Hofemeister, B., Feesche, J., Kucheryava, N., Steinborn, G., Franke, P., Grammel, N., Zwintscher, A., Lenders, F., Hitzeroth, G. and Vater, J. 2004. Genetic analysis of the biosynthesis of non-ribosomal peptide and polydetide-like antibiotics, iron uptake and biofilm formation by *Bacillus subtilis* A1/3. Molecular Genetic Genomics. 272 : 363-378.
- Houston, D. R., Eggleston, I., Synstad B., Eijsink, G. H., and Aalten, D. M. 2002. The cyclic dipeptide CI-4 [cyclo-(L-Arg-D-Pro)] inhibits family 18 chitinases by structural mimicry of a reaction intermediate. Journal of Biochemistry. 368 : 23-27.

- Hu, L. B., Shi, Z. Q., Zhang, T. and Yang, Z. M. 2007. Fengycin antibiotics isolated from B-F501 culture inhibit the growth of *Fusarium moniliforme* Sheldon ATCC 38932. FEMS Microbiology Letter. 272 : 91-98.
- Inaoka, T., Takahashi, K., Yada, H., Yoshida, M., and Ochi, K. 2004. RNA polymerase mutation activates the production of a dormant antibiotic 3,3'-neotrehalosdiamine via an autoinduction mechanism in *Bacillus subtilis*. The Journal of Biological Chemistry. 279 : 3885-3892.
- Jack, R. W., Tagg, J. R. and Ray, B. 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. Microbiological Reviews. 59 : 171-200.
- Jacob, S. T. and Rose, K. M. 1974. Inhibition of poly(A) polymerase by rifamycin derivatives. Nucleic Acids Research. 1 : 1549-1559.
- Jimenez-Diaz, R., Rios-Sanchez, R. M., Dezmazeaud, M., Riz-Barba, J. L. and Piard, J. C. 1993. Plantaricins S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO 10 isolated from a green olive fermentation. Applied and Environmental Microbiology. 59 : 1416-1424.
- Johnston, L. M., and Jaykus, L. A. 2004. Antimicrobial resistance of *Enterococcus* species isolated from produce. Applied and Environmental Microbiology. 70 : 3133-7.
- Kalchayanand, N., Hanilin, M. B. and Ray, B. 1992. Sublethal injury makes Gram-negative and resistant Gram-positive bacteria sensitive to the bacteriocins, pediocin AcH and nisin. Letter of Apply Microbiology. 15 : 239-243.
- Katz, E. and Demain, A. L. 1977. The peptide antibiotics of *Bacillus* : Chemistry, biogenesis, and possible functions. Bacteriological Review. 41 : 449-474.
- Kehlenbeck, H., Krone, C., Oerke, E. C. and Schonbeck, F. 1994. The effective of induced resistance on yield of mildwed barley. Journal of Plant Diseases Protein. 101 : 11-21.
- Kilian, M., Steiner U., Krebs U., Junge H., Schmiedeknecht, G. and Hain R. FZB 24 *Bacillus subtilis* – mode of action of a microbial enhancing plant vitality. Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer. p 72-93.
- Kim, P. I., Bai, H., Bai, D., Chae, H., Chung, S., Kim, Y., Park, R. and Chi, Y.-T. 2004. Purification and characterization of a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis* CMB26. Journal of Applied Microbiology. 97 : 942-949.
- Klaenhammer, T. R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria FEMS. Microbiology Review. 12 : 39-86.

- Kluger, M., Loeffler, W., Rapp, C., Kern, A. and Jung, G. 1990. Rhizocticin A, an antifungal phosphono-oligopeptide of *Bacillus subtilis* ATCC 6633 : biological properties. Arch. Microbiology. 153 : 276-281.
- Kolter, R. and Moreno, F. 1992. Genetic and ribosomally synthesized peptide antibiotics. Annual Review Microbiology. 46 : 141-163
- Korzybski, T., Kowszyk-Gindifer, Z., and Kurylowicz, W. 1996. Introduction. Antibiotics : Origin, Nature and Properties. Vol 1. Pergamon Press. PWN-Polish Scientific Publishers. pp 1.
- Kurz, M., Guba, W., and Ver'tesy, L. 1998. Three-dimensional structure of moenomycin A potent inhibitor of penicillin-binding protein 1b. European Journal of Biochemistry. 252 : 500-507.
- Leelasuphakul, W., Sivanunsakul, P., Phongpaichit, S. 2006. Purification, characterization and synergistic activity of β -1,3-glucanase and antibiotic extract from antagonistic *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 against rice blast and sheat blight. Enzyme and Microbial Technology. 38: 990-997.
- Li, W. F., Ma. G. X. and Zhou. X. X. 2006. Apidaecin-type peptides: Biodiversity, structure-function relationships and mode of action. Peptides. Article in press.
- Liu, Y., Chen, Z., and Ng, T. B. 2007. Bacisulin, an antifungal protein with ribosome and hemagglutinating activity from *Bacillus subtilis* strain B-16. Peptides. 28 : 553-559.
- Malk, H., Starke, R., Jacob, H. E. and Kohler, W. 1974. Bacteriocine-like activity of group A Streptococci due to the production of peroxide. Journal of Medical Microbiology. 7 : 367-374.
- Mannanov. R. N. and Sattarova. R. K. 2001. Antibiotics produced by *Bacillus* bacteria. Chemistry of Natural Compounds. 37 : 117-123.
- Marie-Isabel. A. 2004. HPLC of peptides and proteins: Methods and protocols. Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Martin, J. F. and Demain, A. L. 1980. Control of antibiotic biosynthesis. Microbiological review. 1980. 230-251.
- Martiranil, L., Varcamontil, M., Naclerio, G. and Felice, M. D. 2002. Purification and partial characterization of bacillocin 490, a novel bacteriocin produced by a thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*. Microbial Cell Factories. Available from: <http://www.microbialcellfactories.com/content/1/1/1>. [2005, Dec 24].

- McKnight, S. E. 1993. Effects of *Bacillus subtilis* on cotton seeding development : University of Nottingham, Ph.D. Thesis, Nottingham.
- Montel, M. C., Masson & Talon, R. 1998. Bacterial Role in Flavor Development. *Meat Science*, 49 : 0309-1740.
- Nester, E. T., Anderson D. G., Roberts E. C., Pearsall, N. N., and Nester M. T. 2004. Microbiology : Human Perspective. 4 th edition. McGraw-Hill Companies Inc. New York USA. pp 510, 523.
- Neu, H. C., and Gootz, T. D. Antimicrobial Chemotherapy. Available from: <http://gsbs.utmb.edu/microbook/ch011.htm>. [2005, Feb 5].
- Nimitkeatkai, H., Ueda Y., Furukava, H., Inamoto, K., Doi, M., 2005. Emission of methyl butyric acid from *Gypsophila paniculata* L. during bud opening : Changes in amino acid catabolism. Scientia Horticulturae.106: 370-380.
- Ohno, A., Ano, T., and Shoda, M. 1993. Production of the Antifungal Peptide Antibiotic, Iturin by *Bacillus subtilis* NB22 in Solid State Fermentation. Journal of Fermentation and Bioengineering. 75 (1) : 23-27.
- Oscariz, J. C., Lasa, I., and Pisabarro, A. G. 1999. Detection and characterization of cerein 7, a new bacteriocin produced by *Bacillus cereus* with a broad spectrum of activity. FEMS Microbiology Letters.178 : 337-341.
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C. R., Soccol, V. T., Singh, D., and Mohan, R. 2000. Advances in microbial amylase. Biotechnology Applied Biochemistry. 31 : 135-152.
- Pavliuk, I. V., Bogatskii, M. A., Orlova, N. V., and Anakhova, V. A. 1979. Effect of phosphorus on polymyxin B biosynthesis by *B. polymyxa* 1538 on media of varying makeup. Antibiotiki. 24 :723-727.
- Peltier, J. 2004. Microbiology, Infection, and Antibiotic Therapy. Dept. of Otolaryngology. Available from : <http://www.utmb.edu/otoref/grnds/Microbiology-2004-0218/Microbiology-2004-0211.htm>[2004, Feb 18].
- Pelletier, A. and Sygusch, J. 1990. Purification and charterization of three chitosannase activities from *Bacillus megaterium* P1. Applied and Environmental Microbiology. 56 : 844-848.
- Phister, T. G., Sullivan, D. J., and McKay, L. L. 2004. Identification of Bacilysin, Chlorotetaine, and Iturin A Produced by *Bacillus* sp. Strain CS93 Isolated from Pozol, a Mexican Fermented Maize Dough. Applied and Environmental Microbiology. 70 : 631-634.

- Pinchuk, I. V., Bressollier, P., Sorokulova, I. B., Verneuil, B., and Urdaci, M. C. 2002. Amicoumacin antibiotic production and genetic diversity of *Bacillus subtilis* strains isolated from different habitats. Research in Microbiology. 153 : 269-276.
- Pichard, B., Larue, J.P., and Thouvenot, D. 1995. Gavaserin and saltavalin, new peptide antibiotics produced by *Bacillus polymyxa*. FEMS Microbiology Letters. 133 :215-218.
- Prasad, C. 1995. Bioactive cyclic dipeptides. Peptides.16 :151-64.
- Preechaborisutkul, J. 1994. Isolation and characterization of peptide antibiotics produce by *Bacillus subtilis*. Master's Thesis, Mahidol University.
- Rai University. Lesson 31 : Introduction and Background-Antibiotics and Vaccines. Applied Microbiology and Diagnostics. Available from : <http://rcw.raioniversity.edu/biotechnology/MScBioinformatics/pharmaceuticalbiotechnologyanddiagnostics/lecture-notes/lecture-31.pdf> . [2006, Feb 2]. 168-193.
- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., and Deshpande, V. V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial protease. Microbiological Molecular Review 62 : 597-635.
- Rhee, K. H. 2006. In Vitro Ativity of cyclic dipeptides against Gram-possitive and Gram-negative anaerobic bacteria and eadioprotective effect on lung cells. Journal of Microbiology Biotechnology. 16 : 158-162.
- Roger, A. H. 1972. Effect of the medium on bacteriocin production among strains of *Streptococcus mutans*. Applied Microbiology. 24 : 294-295.
- Sadfi, N., Cherif, M., Hajlaoui, M. R., Boudabbous, A., Belanger, R. 2002. Isolation and partial purification of antifungal metabolites produced by *Bacillus cereus*. Annual Microbiology. 52 : 323-337.
- Sadfi, N., Cherif, M., Fliss, I., Boudabbous, A. and Antoun, H. 2001. Evaluation of *Bacillus* isolates from salty soils and *Bacillus thuringiensis* strains for the biocontrol of *Fusarium* dry rot of potato tubers. Journal of Plant Pathology. 83 : 101-118.
- Saito, T., Nagai, K., Suzuki, K., Morioka, M., Saito, T., Nohara, C., Susaki, K., and Takebayash, Y. 1992. A new isocoumarin antibiotic. Journal of Antibiotics. 45 : 1949-1952.
- Saure, U., Cameron, D. C. and Bailey, J. E. 1998. Metabolic capacity of *Bacillus subyilis* for the production off purine nucleosides riboflavin and folic acid. Biotechnology and Bioengineering. 59 : 227-238.

- Schnepf, E., Crickmore, N. and Van-Rie, J. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiology Molecular Reviews. 62 : 775-806.
- Sneider. W. Drug discovery: A history. 2005. John Wiley & Sons, Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex PO19 8SQ, England.
- Stahlmann, K. P., Revuelta, J. L., and Seulberger, H. 2000. Three biotechnical processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata* or *Bacillus subtilis* compete with riboflavin production. Applied Microbiology and Biotechnology. 53 : 509-516.
- Stein, T., 2005. *Bacillus subtilis* antibiotic: Structures, syntheses and specific functions. 2005. Molecular Microbiology. 56: 845-857.
- Sutyak. K. E., Wirawan. R. E., Aroutcheva. A. A. and Chikindas. M. L. 2007. Isolation of the *Bacillus subtilis* antimicrobial peptide subtilosin from the dairy product-derived *Bacillus amyloiquefaciens*. Journal of Applied Microbiology. 104 : 1067-1074.
- Tamehiro. N., Okamoto-Hosoya. Y., Okamoto. S., Ubukata. M., Hamada. M., Naganawa. H. and Ochi. K. 2002. Bacilysocin, a novel phospholipid antibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 46 : 315-320.
- Tavaria, F. K., and Dahl, S., Amino Acid Catabolism and Generation of Volatiles by Lactic Acid Bacteria. American Dairy Science Association. 85 : 2462-2470.
- The American Heritage® Dictionary of the English Language, 2004. Fourth edition.
- Thierry, A., Mailard, M. B., Production of cheese flavour compounds derived from amino acid catabolism by *Propionibacterium freudenreichii*. 2002. Biotechnology and Bioengineering. 59 : 17-32.
- Todar K., 2005. Antimicrobial Agents Used in Treatment of Infectious Disease. University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology. Available from : <http://textbookofbacteriology.net/antimicrobial.html>. [2005, Nov 2].
- Todorov, S.D., Dicks, L.M.T. 2006. Effect of medium components on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* strains ST23LD and ST341LD, isolated from spoiled olive brine. Microbiological Research. 161 : 102-108.
- Turnbull, P., Kramer J., Melling J. 1990. *Bacillus*. In : Topley and Wilson principles of bacteriology, virology and immunity. 8th ed. London : Edward Arnold. p 185-210.
- Tuzun I, Karatas A. Y., Sesenoglu O, Demir A. S., Ozcengiz G. 2003. 2-Amino-N-(2-furylmethyl) propanamide as a novel alanyl-glycine equivalent synthesized by bacilysin synthetase. Enzyme and Microbial Technology. 33 : 725-728.

- Venema, K., Abee, T., Haandrikman, A. J., Leenhouts, K. J., Kok, J., Konings, W. N. and Venema, G. 1993. Mode of action of lactococcin B, a thio-activated bacteriocin from *Lactococcus lactis*. Applied and Environmental Microbiology. 59 : 1041-1048.
- Volpon, L., Besson, F., and Lancelin, J. 1999. NMR structure of active and inactive forms of the sterol – dependent antifungal antibiotic bacillomycin L. European Journal of Biochemistry. 264 : 200-210.
- Walker, E. and Abraham, E. P. 1970. Isolation of Bacilysin and a New Amino Acid from Culture Filtrates of *Bacillus subtilis*. Journal of Biochemistry. 118 : 557-561.
- Wong, G. 2003. The Aftermath of Penicillin. Department of Botany. University of Hawaii at Manoa. Available from : <http://www.botany.hawaii.edu/faculty/wong/BOT135/Lect 23.htm>. [2005, Dec 23].
- Wu, S., Jia, S., Sun, D., Chen, M., Chen, X., Zhong, J. and Huan, L. 2005 Purification and characterization of two novel antimicrobials peptides subpeptin JM4-A and subpeptin JMB-4 produced by *Bacillus subtilis* JM4. Current Microbiology. 51 : 292-296.
- Yan, P., Song, Y., Sakuno, E., Hiromitsu Nakajima, H., Nakagawa, H., and Kimiko Yabe, K. 2004. Cyclo(L-Leucyl-L-Prolyl) Produced by *Achromobacter xylosoxidans* Inhibits Aflatoxin Production by *Aspergillus parasiticus*. Applied and Environmental Microbiology. 70 : 7466-7473.
- Yang, R., Johnson, M. C. and Ray, B. 1992. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. Applied and Environmental Microbiology. 58 : 3356-3359.
- Zhang, B., Xie, C., and Yang, X. 2008. A novel small antifungal peptide from *Bacillus* strain B-TL12 isolated from tobacco stems. Peptides. 29 : 350-355.
- Zuber, P., Nakano, M. M. and Marahiel, M. A. 1993. Peptide antibiotics. In L. S. Abraham (ed.), Bacillus subtilis and other gram-positive bacteria biochemistry. Physiology and Molecular Genetics. pp 897-916. Washington D.C. : American Society for Microbiology.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. Nutrient Broth : NB ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

แบคโตเปปโตน	5	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ	3	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มล

- ละลายน้ำและผสมให้เข้ากัน นึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. Nutrient Agar : NA ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

แบคโตเปปโตน	5	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ	3	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มล

- ละลายน้ำและผสมให้เข้ากัน นึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. Potato Dextrose Agar : PDA ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

มันฝรั่งชิ้นเล็ก	200	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มล

- ต้มมันฝรั่งให้สุก จากนั้นกรองเอาแต่น้ำต้มมัน และนำไปผสมกับส่วนผสมต่าง ๆ ได้แก่

กลูโคส	10	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม

- ละลายน้ำและผสมให้เข้ากัน นึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. Yeast Malt Extract : YM ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

สารสกัดจากยีสต์	3	กรัม
สารสกัดจากมอลต์	3	กรัม
เปปโตน	5	กรัม
กลูโคส	10	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มล

- ละลายน้ำและผสมให้เข้ากัน นึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. Yeast Malt Extract Agar : YMA ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

สารสกัดจากยีสต์	3	กรัม
สารสกัดจากมอลต์	3	กรัม
เปปโตน	5	กรัม
กลูโคส	10	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มล

- ละลายน้ำและผสมให้เข้ากัน นึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

6. Luria-Bertani Agar : LBA ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

ทริปโตน	10	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มล

- ละลายและผสมให้เข้ากัน นึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

7. Luria-Bertani Broth : LB ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

ทริปโตเนน	10	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มล

- ละลายน้ำและผสมให้เข้ากัน นึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

8. Sabauraud Dextrose Agar : SDA ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

แบคโตเปปโทน	10	กรัม
กลูโคส	40	กรัม
ผงวุ้น	20	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มล.

- ละลายน้ำและผสมให้เข้ากัน นึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

9. Mueller Hinton Agar : MHA ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

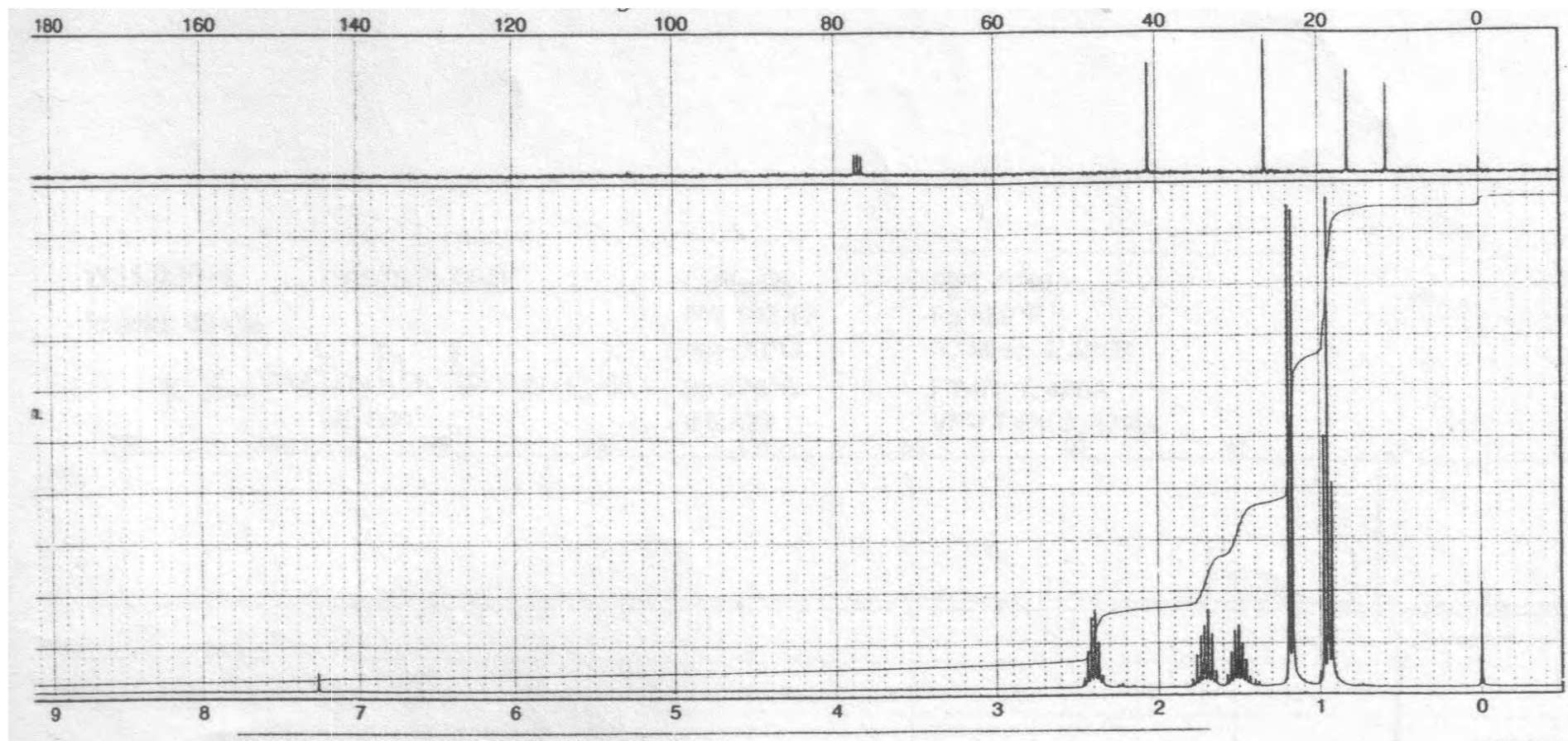
สารสกัดจากเนื้อ	2	กรัม
แอสซิดเคซีนไฮโดรไลเซท	17.5	กรัม
แป้ง	1.5	กรัม
ผงวุ้น	17	กรัม

- ละลายน้ำและผสมให้เข้ากัน นึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

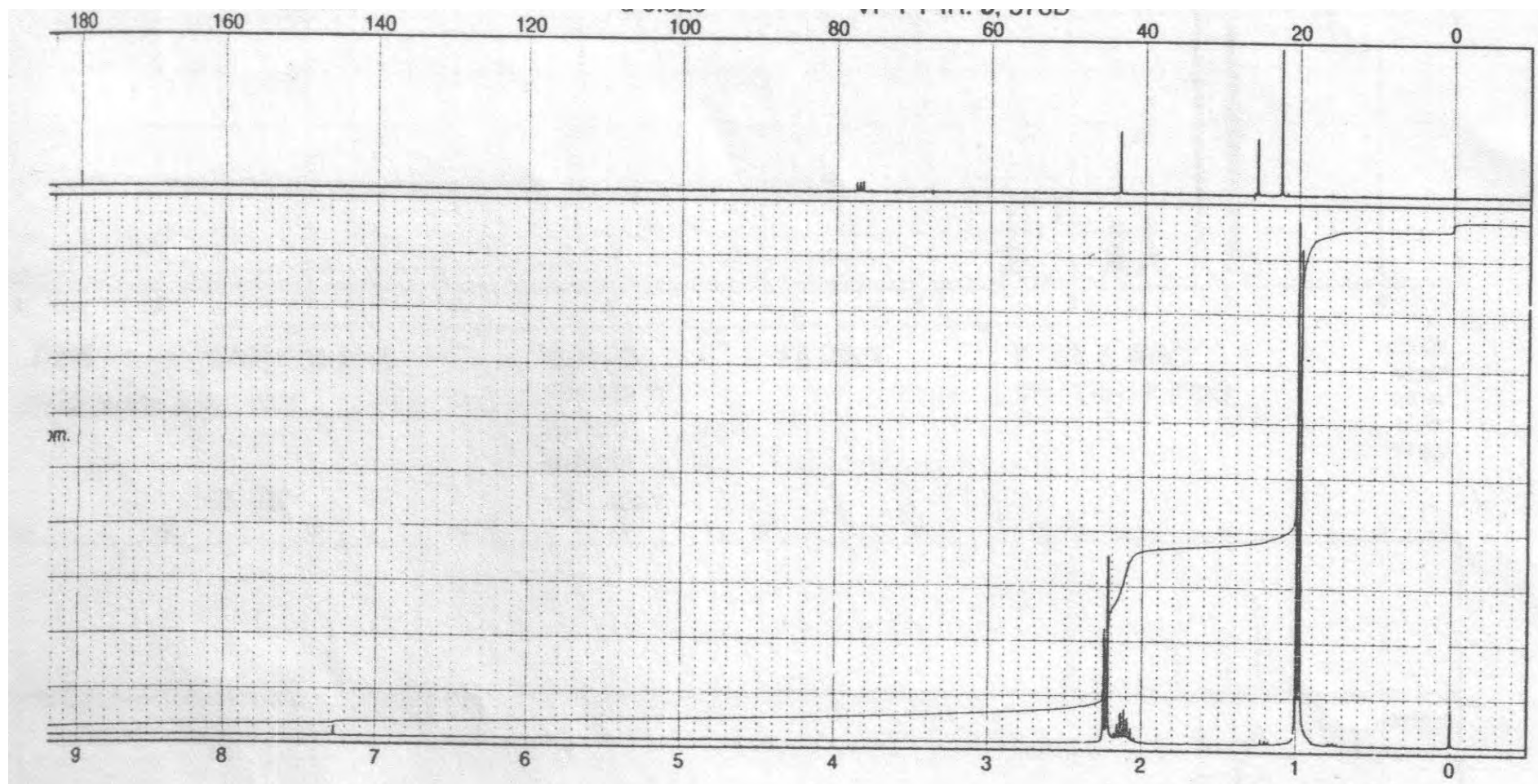
ภาคผนวก ข

โครมาโทแกรมการวิเคราะห์ลักษณะสมบัติของสาร

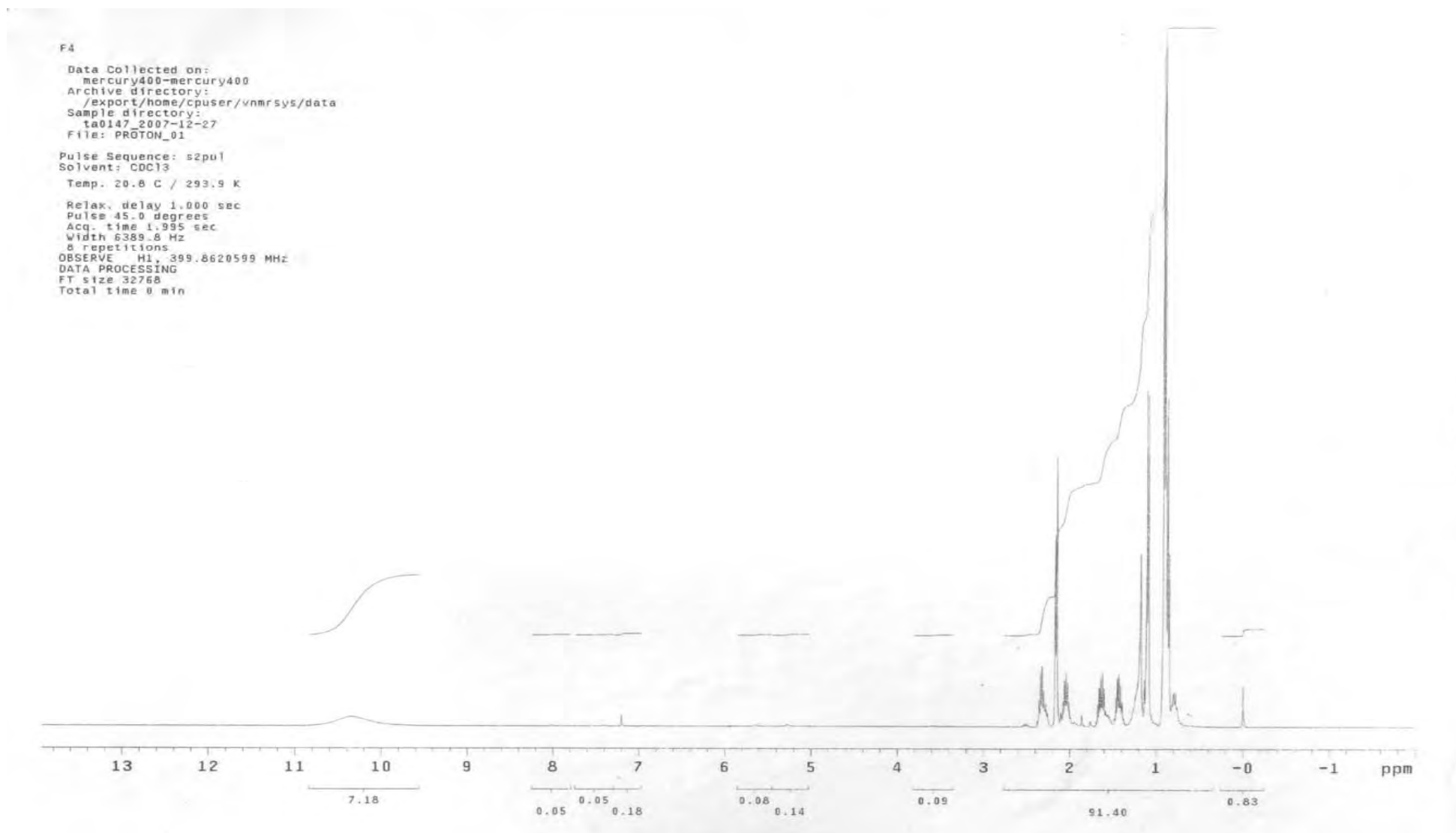
1. $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum ของ 2 methylbutanoic acid
2. $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum ของ 3 methylbutanoic acid
3. $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสารส่วนที่ 4 (F4)
4. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum ของสารส่วนที่ 4
5. COSY spectrum ของสารส่วนที่ 4
6. HSQC spectrum ของสารส่วนที่ 4
7. HMQC spectrum ของสารส่วนที่ 4
8. HMBC spectrum ของสารส่วนที่ 4
9. IR spectrum ของสารส่วนที่ 4
10. Mass spectrum ของสารส่วนที่ 4
11. Dept Mass spectrum ของสารส่วนที่ 4
12. $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสารส่วนที่ 13 (F13)
13. IR spectrum ของสารส่วนที่ 13



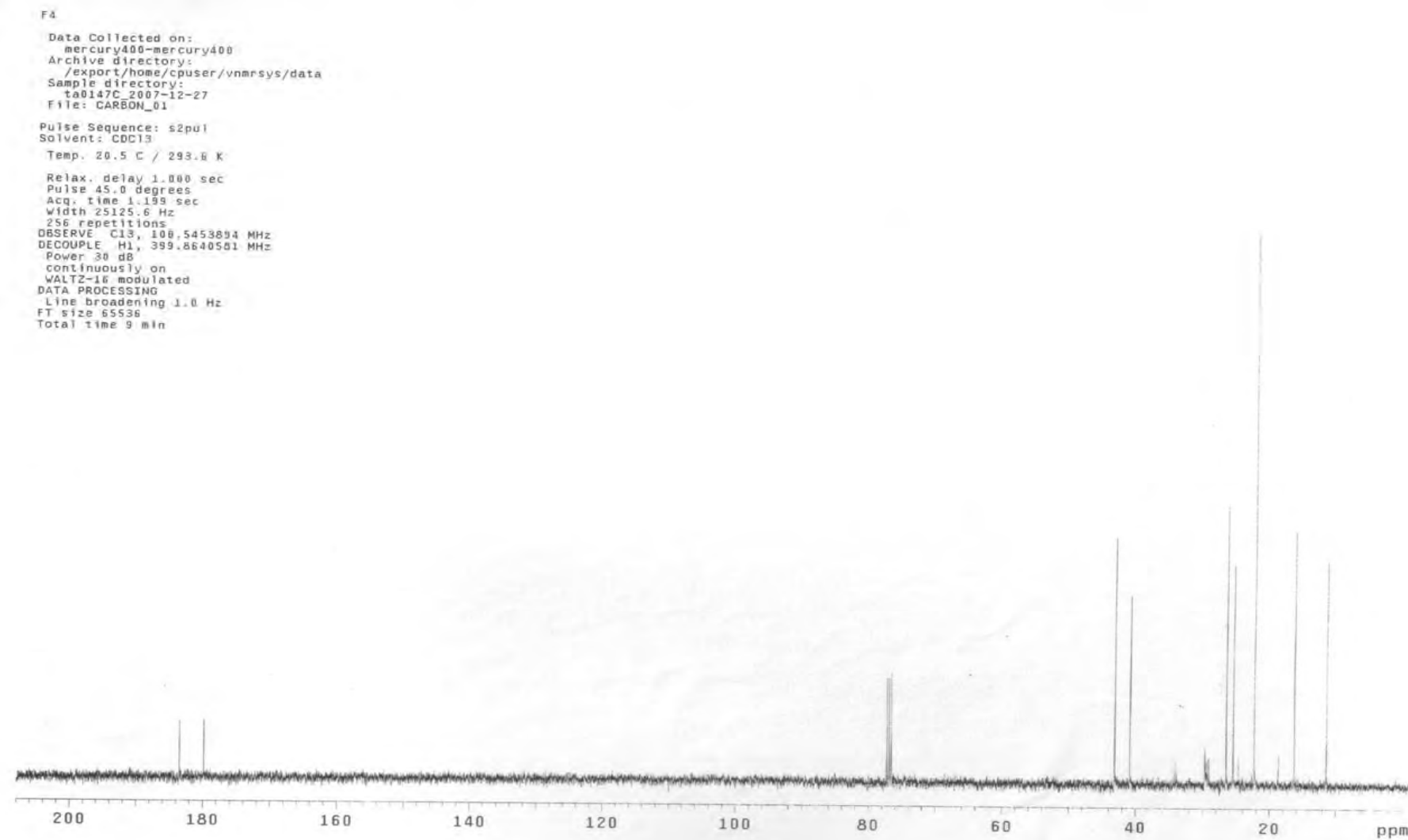
รูปที่ 41 ^1H -NMR และ ^{13}C -NMR spectrum ของ 2 methylbutanoic acid



รูปที่ 42 ^1H -NMR และ ^{13}C -NMR spectrum ของ 3 methylbutanoic acid



รูปที่ 43 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสารส่วนที่ 4 (F4)



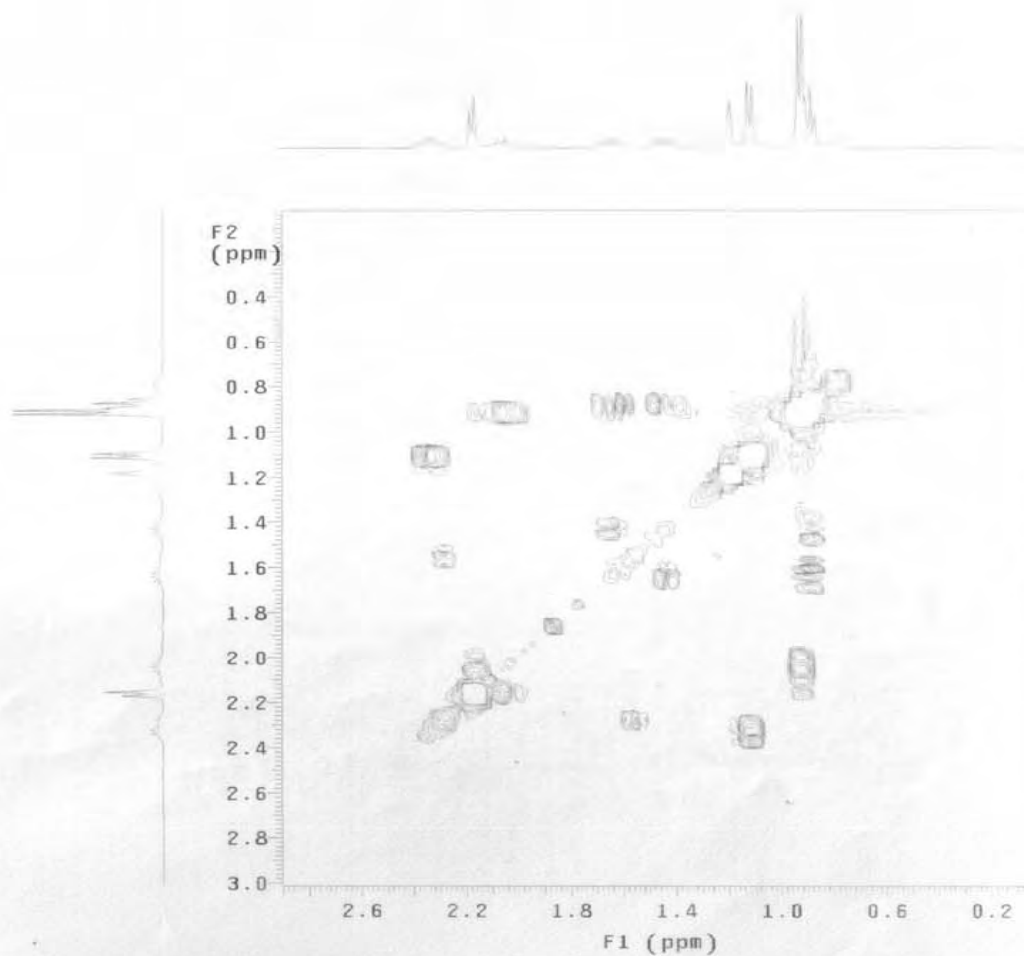
รูปที่ 44 ^{13}C -NMR spectrum ของสารส่วนที่ 4

F4

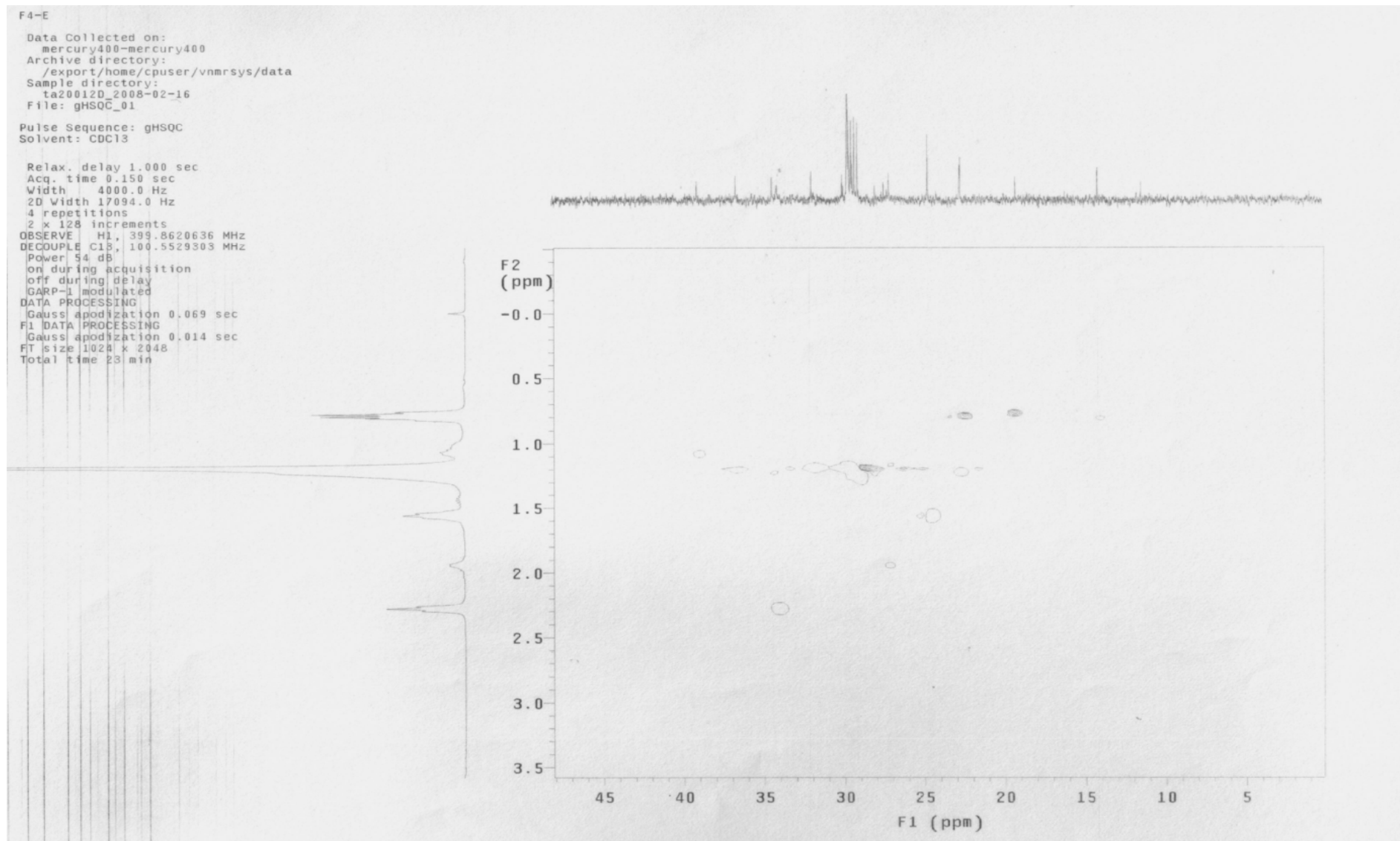
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/export/home/cpuser/vnmrsys/data
Sample directory:
ta200220_2008-02-17
File: gCOSY_01

Pulse Sequence: gCOSY
Solvent: CDCl3

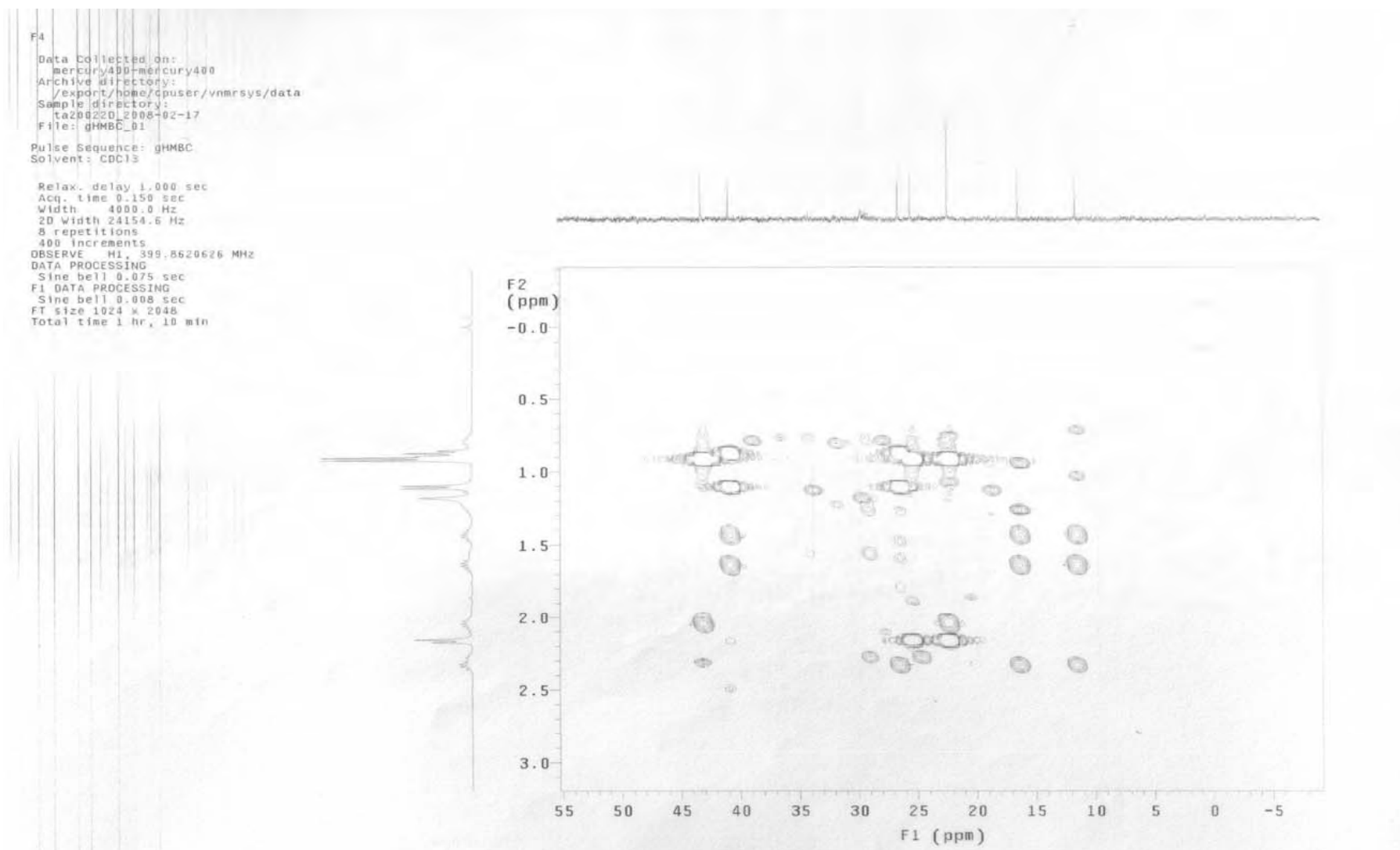
Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.154 sec
Width 4000.0 Hz
2D Width 4000.0 Hz
2 repetitions
128 increments
OBSERVE H1, 399.8620626 MHz
DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.075 sec
F1 DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.032 sec
FT size 1024 x 1024
Total time 5 min



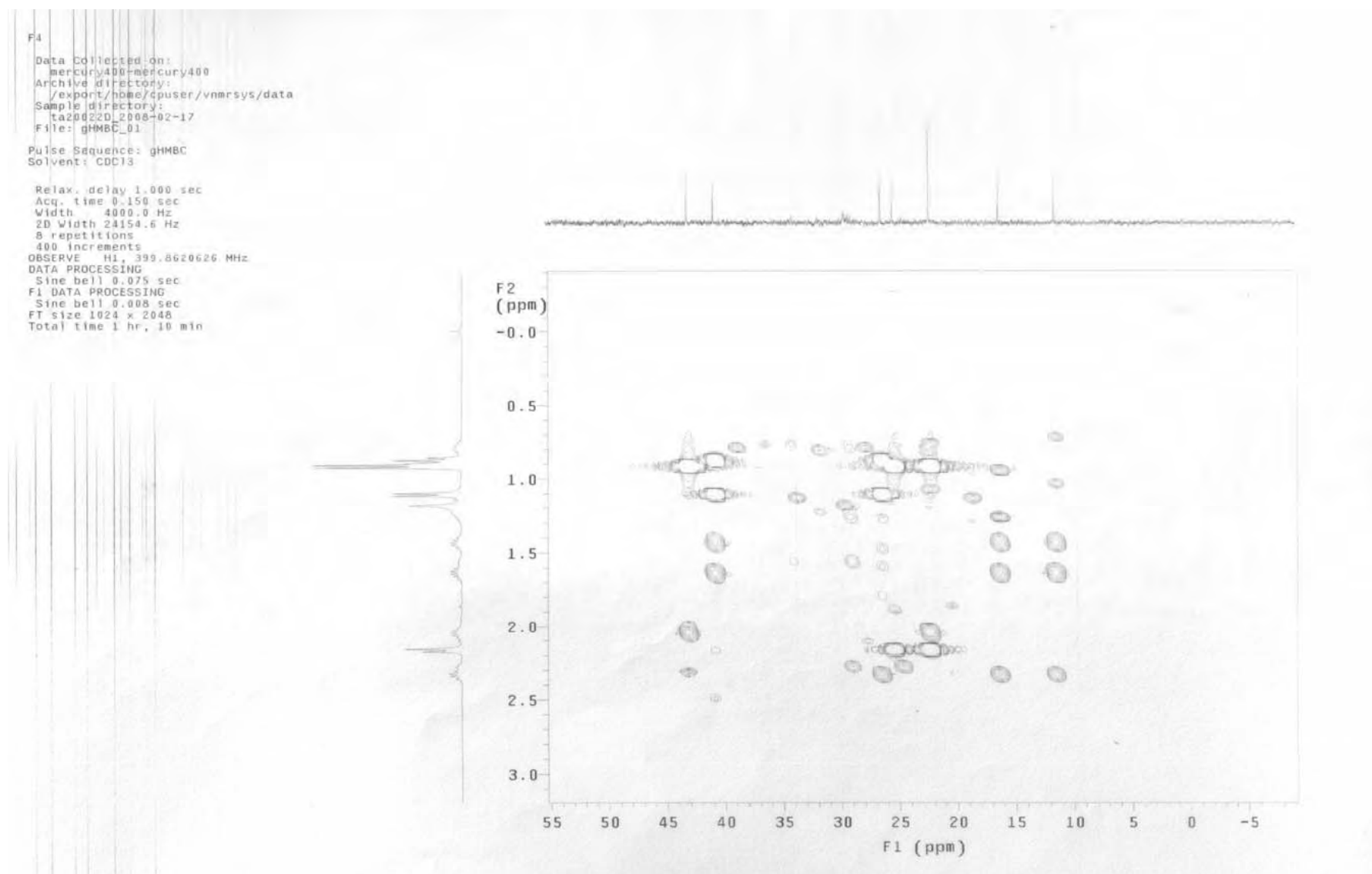
รูปที่ 45 COSY spectrum ของสารส่วนที่ 4



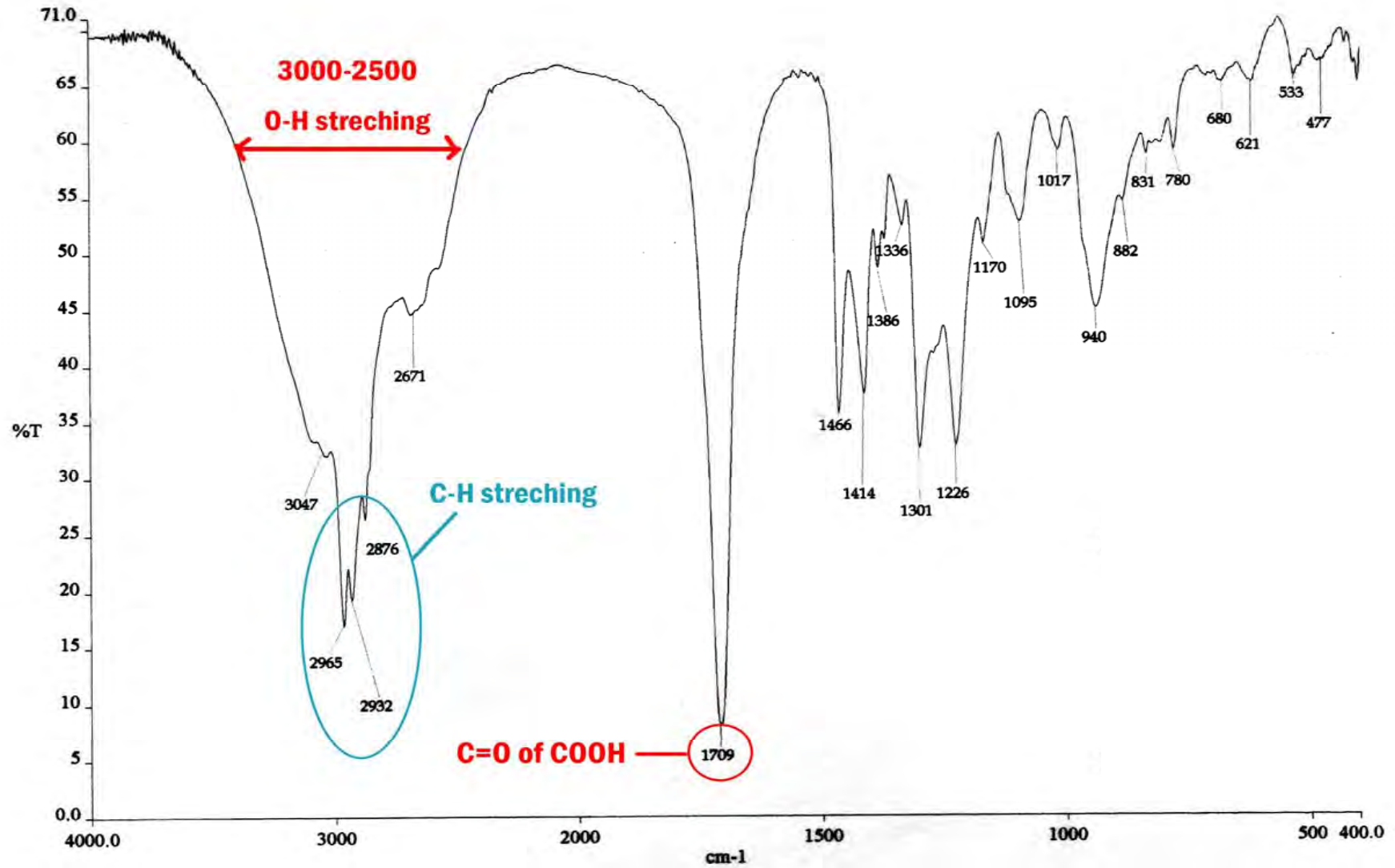
รูปที่ 46 HSQC spectrum ของสารส่วนที่ 4



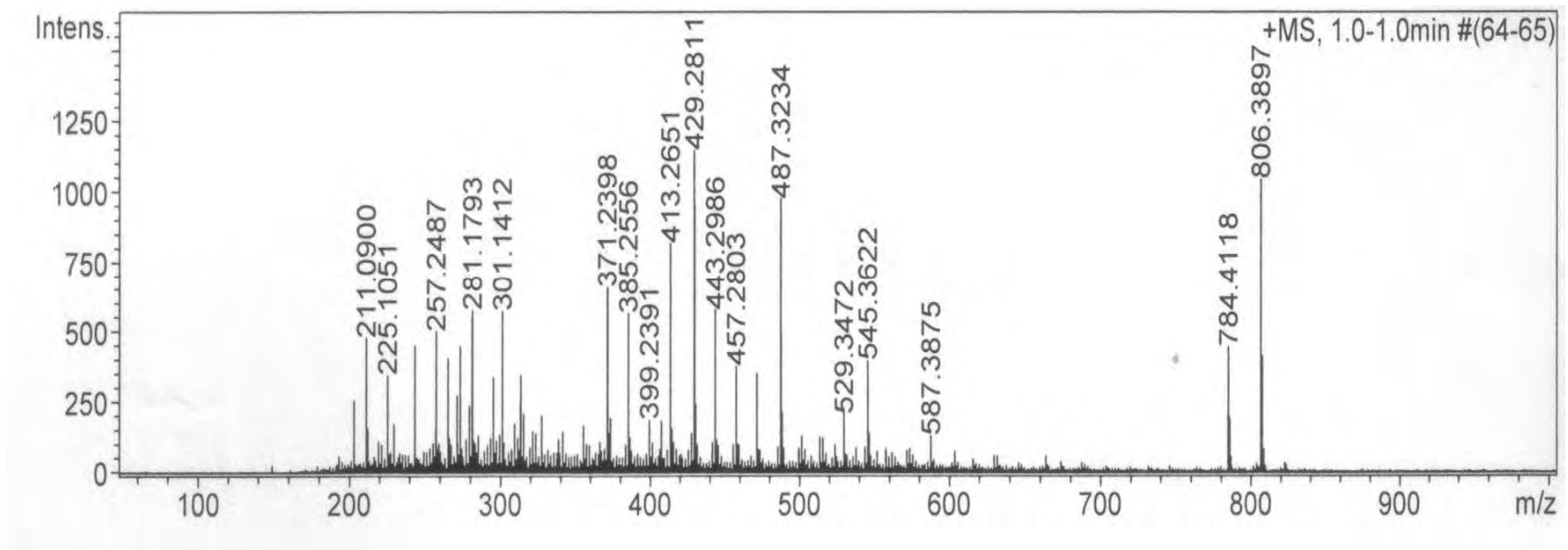
รูปที่ 47 HMQC spectrum ของสารส่วนที่ 4



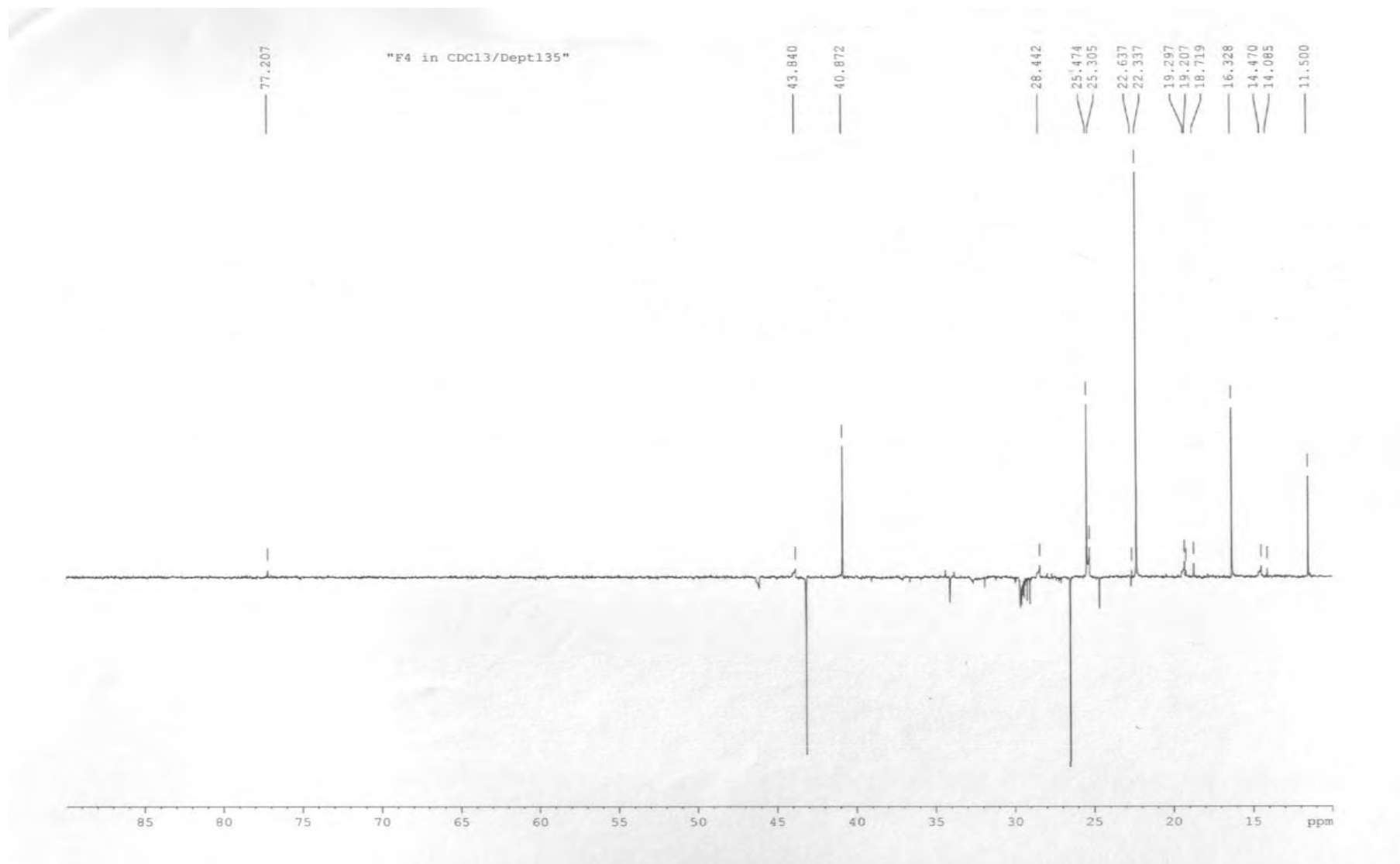
รูปที่ 48 HMBC spectrum ของสารส่วนที่ 4



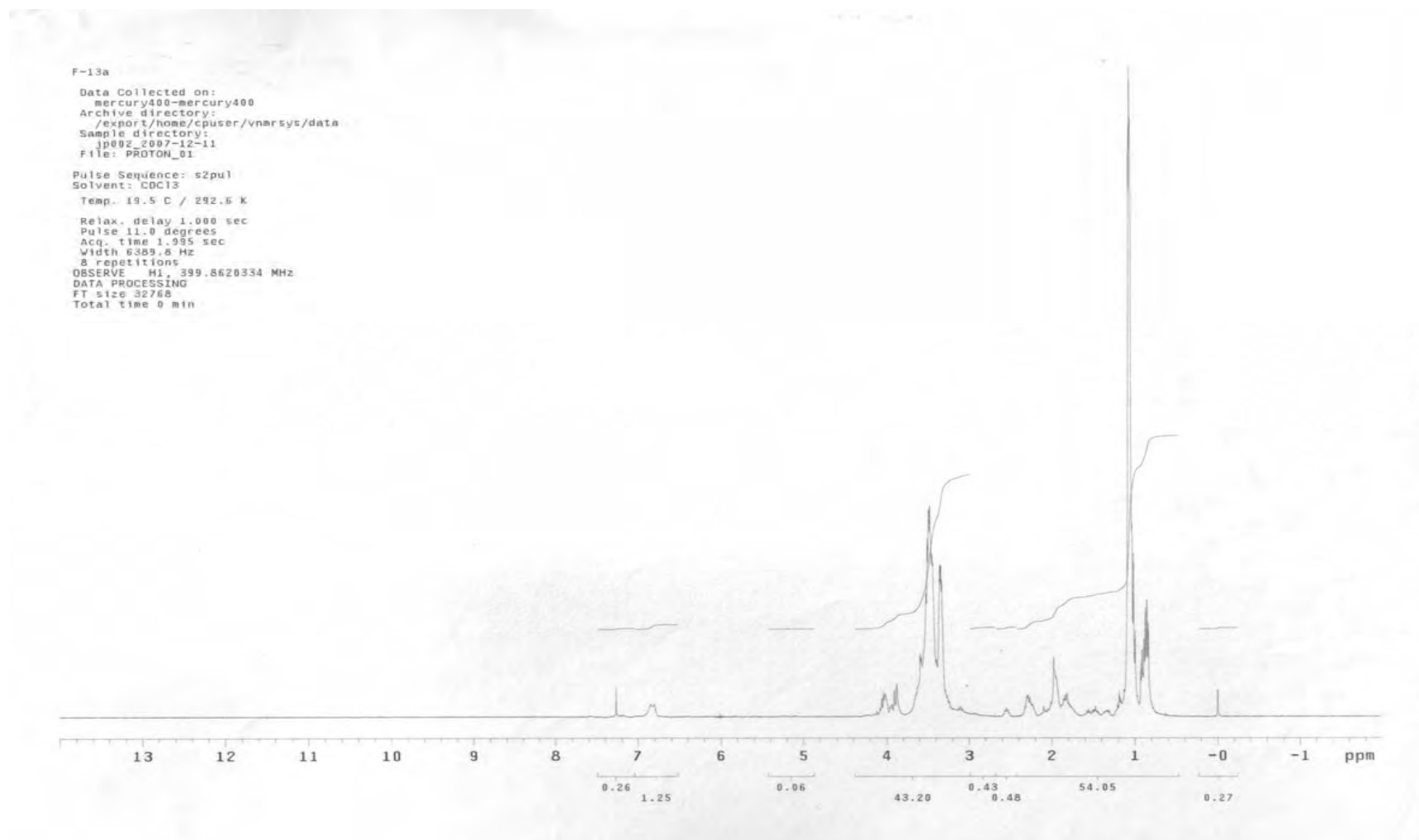
รูปที่ 49 IR spectrum ของสารส่วนที่ 4



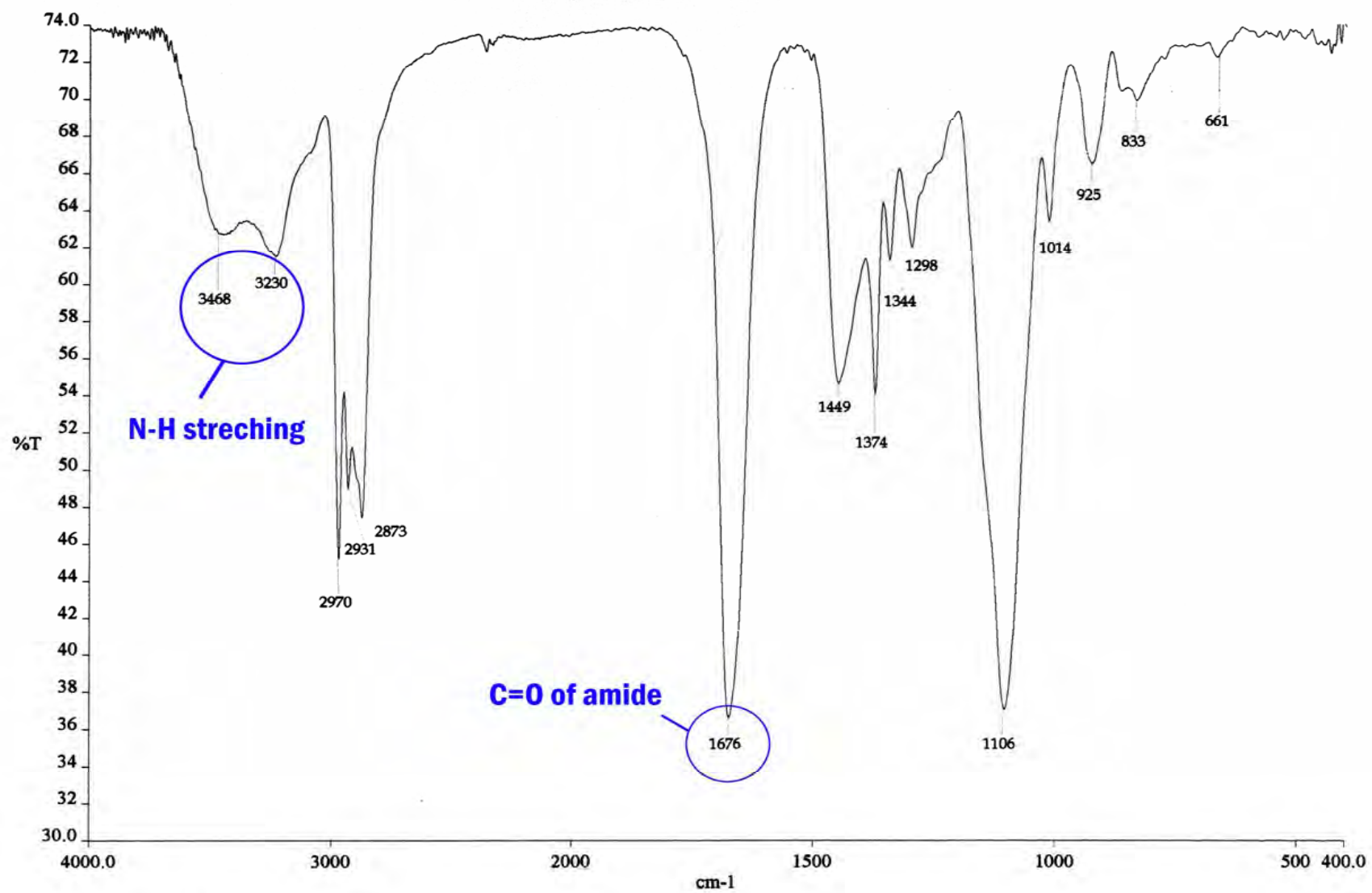
รูปที่ 50 Mass spectrum ของสารส่วนที่ 4



รูปที่ 51 Dept Mass spectrum ของสารส่วนที่ 4



รูปที่ 52 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสารส่วนที่ 13 (F13)



รูปที่ 53 IR spectrum ของสารส่วนที่ 13

ภาคผนวก ค



รูปที่ 54 *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ K-05 (กำลังขยาย 100x)

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวปิยนากู ศิริบรรณ เกิดเมื่อวันที่ 16 ตุลาคม พ.ศ. 2523 ที่จังหวัดชัยนาท สำเร็จ การศึกษาระดับมัธยมศึกษาจากโรงเรียนสตรีนครสวรรค์ สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิตจาก ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เมื่อปีการศึกษา 2545 และเข้าศึกษา ต่อในระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต หลักสูตร จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2547 โดยระหว่างการศึกษาได้เข้าร่วม เสนอผลงานหัวข้อเรื่อง “Purification and Characterization of antimicrobial compounds from *Bacillus subtilis* K-05” ในงาน TSB 2007 ณ.มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ระหว่างวันที่ 9-12 ตุลาคม 2550