

สารต้านจุลชีพที่ผลิตโดย *Bacillus* spp.



นางสาว สุภารัตน์ บุญยง

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

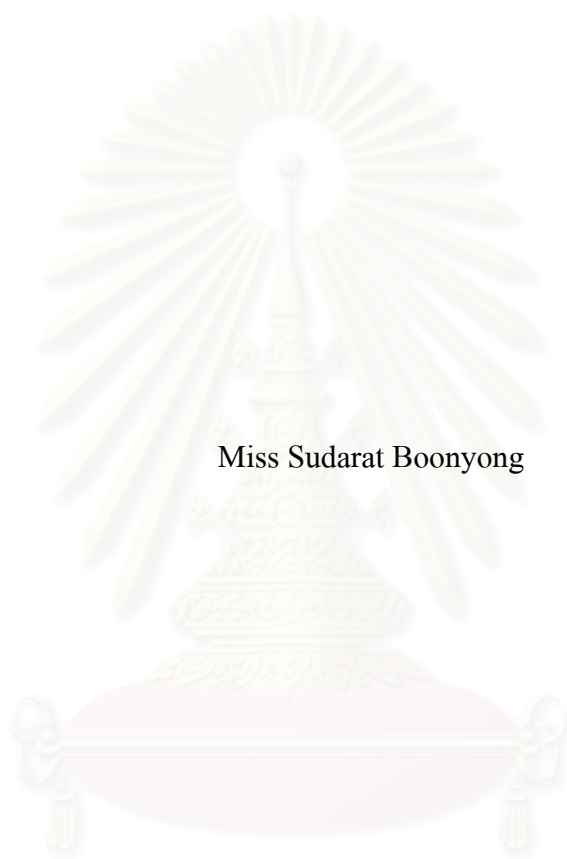
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-14-3383-2

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ANTIMICROBIAL SUBSTANCE(S) PRODUCED BY *Bacillus* spp.



Miss Sudarat Boonyong

สถาบันวิทยบริการ

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

Department of Microbiology

Faculty of Science


Chulalongkorn University

Academic Year 2005

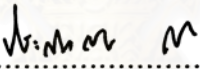
ISBN 974-14-3383-2

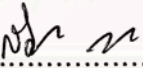
หัวข้อวิทยานิพนธ์	สารต้านจุลชีพที่ผลิตโดย <i>Bacillus</i> spp.
โดย	นางสาว สุภารัตน์ บุญยง
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.สงศรี กุลปรีชา
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม (ถ้ามี)	รองศาสตราจารย์ ดร.อมร เพชรสม

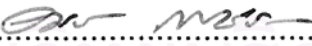
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโท



.....รองคณบดีฝ่ายบริหารรักษาราชการแทน
.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.ชราพงษ์ วิทิตสานต์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ประกิตต์สิน สีहनนท์)


.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร. สงศรี กุลปรีชา)


.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม)


.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

นางสาวสุภารัตน์ บุญยง : สารต้านจุลชีพที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. (ANTIMICROBIAL SUBSTANCE PRODUCED BY *Bacillus* spp.) อ. ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร. ส่งศรี ฤกษ์ปรีชา อ. ที่ปรึกษาร่วม : รองศาสตราจารย์ ดร.อมร เพชรสม จำนวน 119 หน้า.
ISBN 974-14-3383-2.

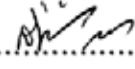
จากการคัดกรอง *Bacillus* spp. จำนวน 5 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากดินในประเทศไทยซึ่งสามารถยับยั้ง จุลินทรีย์ทดสอบด้วยวิธี cross streak พบว่า *Bacillus* sp. K-05 ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์และราเส้นใยได้ ศึกษาการสร้างสารต้านจุลชีพในอาหารเหลว NB TSB และ LB โดยวิธี paper disc diffusion พบว่าส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหาร LB ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ดีกว่าส่วนใสที่ได้จากการ เลี้ยงเชื้อในอาหาร NB และ TSB โดยพบว่าสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC6633 *Staphylococcus aureus* ATCC25923 และ *Micrococcus luteus* แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Serratia* sp. และราเส้นใยทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ *Aspergillus oryzae* *Fusarium* sp. และ *Alternaria* sp. แต่ไม่ พบการยับยั้งยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Candida albicans* สารต้านจุลชีพในส่วนใสซึ่งเก็บไว้ ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 10 เดือน มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้แตกต่างกัน โดยพบว่าการยับยั้งจุลินทรีย์ ทดสอบค่อย ๆ ลดลงตามระยะเวลา โดยมีการยับยั้งได้นานถึง 4-7 เดือน ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ทดสอบ สารต้านจุลชีพทนต่อความร้อนระหว่าง 60-100 องศาเซลเซียส โดยมีผลยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้แตกต่างกัน เมื่อได้รับความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส พบว่าไม่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทุกชนิดที่นำมาศึกษา การจำแนกสปีชีส์ของ *Bacillus* sp. K-05 โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA และเปรียบเทียบกับข้อมูลใน GenBank พบว่ามีความเหมือนกับ *Bacillus subtilis* M04 เท่ากับ 99% จึงจัดว่า *Bacillus* sp. K-05 เป็น *Bacillus subtilis* การสกัดแยกสารต้านจุลชีพด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ พบว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตทยับยั้ง จุลินทรีย์ทดสอบได้ดีกว่าสารสกัดเฮกเซนและสารสกัดเอทิลอีเทอร์ การแยกสารต้านจุลชีพโดยโครมาโทกราฟี แบบผิวบางด้วยระบบตัวพา คือ เมทานอล-เอทิลอะซิเตท (5:95) พบว่าแยกสารได้ 5 ตำแหน่ง มีค่า R_f เท่ากับ 0.21 0.33 0.43 0.55 และ 0.79 ผลการทำสารต้านจุลชีพให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยมีระบบ ตัวพา คือ เฮกเซน-เอทิลอะซิเตท ได้สารที่บริสุทธิ์ 2 สาร มีลักษณะเป็นผงสีครีม ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรม บวก ได้แก่ *B. subtilis* ATCC6633 *S. aureus* ATCC25923 และ *M. luteus* จากการวิเคราะห์ โครงสร้างโดยวิธีทางเคมี สรุปได้ว่าสารที่ I คือ cyclo(Leu-Pro) มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 210.1446 สาร ที่ II คือ cyclo(Val-Pro) มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 196.1269 ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานมาก่อนว่ามีสาร cyclic dipeptide ดังกล่าวเป็นสารต้านจุลชีพที่ผลิตจาก *B. subtilis*


ภาควิชาจุลชีววิทยา

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม

ปีการศึกษา 2548

ลายมือชื่อนิสิต.....ผู้แต่ง.....บุญยง.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..........

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..........

4672449723 : MAJOR Industrial Microbiology

KEY WORD : *Bacillus* / dipeptide / antimicrobial substance

SUDARAT BOONYONG : ANTIMICROBIAL SUBSTANCE PRODUCED BY *Bacillus* spp. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SONGSRI KULPREECHA Ph. D., THESIS COADVISOR : ASSOC. PROF. AMORN PETSOM Ph. D., 119 pp. ISBN 974-14-3383-2. 9

Out of 5 strains of *Bacillus* spp. isolated from soil in Thailand capable of inhibiting the test organism using cross streak method, *Bacillus* sp. K-05 showed antimicrobial activity against Gram positive and Gram negative bacteria, yeasts and molds. Antimicrobial substance production in NB, TSB and LB using paper disc diffusion as test method showed that the supernatant from culture broth of LB had higher antimicrobial activity than that of NB and TSB media. The supernatant had inhibitory activity against Gram positive bacteria i.e. *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, and *Micrococcus luteus*; Gram negative bacteria i.e. *Serratia* sp. and molds i.e. *Aspergillus oryzae*, *Fusarium* sp., *Alternaria* sp. but had no activity against yeasts i.e. *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*. The antimicrobial substance in supernatant kept at 4 °C for 10 months showed different inhibitory effect on the test organism. The activity gradually decreased as the keeping period increased which showed the inhibitory activity for 4-7 months depending on group of microorganism. The substance was stable after heat treatment at 60-100 °C with different activity on test organisms but showed no activity after heated at 121 °C. *Bacillus* sp. K-05 was identified by nucleotide sequencing of 16S rDNA and compared with GenBank database. It was found that *Bacillus* sp. K-05 was 99% identity to *Bacillus subtilis* M04, thus it was identified as *Bacillus subtilis*. Extraction of substance by organic solvent showed that ethyl acetate extract had higher activity than that of hexane and ethyl ether extract. The ethyl acetate extract was analyzed by TLC using methanol-ethyl acetate (5:95) as solvent system. The mixture of antimicrobial substance were separated to 5 fractions with different Rf 0.21 0.33 0.45 0.55 and 0.79. After purification by column chromatography using hexane-ethyl acetate as eluted solvent, obtained fractions had 2 purified components which showed antimicrobial activity on *B. subtilis* ATCC6633, *S. aureus* ATCC25923, and *M. luteus*. Based on chemical analyses, the compound I and II were identified as cyclo(Leu-Pro) with M.W. 210.1446, and cyclo(Val-Pro) with M.W. 196.1269 respectively. This is the first report of cyclic dipeptide that exhibited antimicrobial activity produced by *B. subtilis*.

Department Microbiology

Field of study Industrial Microbiology

Academic year 2005

Student's signature.....

Advisor's signature.....

Co-advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

กราบขอบพระคุณ รศ.ดร.ส่งศรี กุลปรีชา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และรศ.ดร.อมร เพชรสม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาเป็นที่ปรึกษาให้คำแนะนำและให้ข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนได้ช่วยตรวจและแก้ไขตัวเล่มวิทยานิพนธ์ทำให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.ประกิตสิน สีहनนท์ ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการสอบ รศ.ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และช่วยแก้ไขตรวจทานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.กาญจนา ชาญสง่าเวช ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์เกี่ยวกับสารเคมีและอุปกรณ์ และคำแนะนำที่มีประโยชน์สำหรับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ขอขอบคุณ นายจตุพล เหลียงสกุล ที่ได้คำแนะนำและให้ความช่วยเหลือในการวิเคราะห์สารต้านจุลชีพด้วยวิธีการทางเคมี

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา ตลอดจนพี่ๆ น้องๆ และเพื่อนๆ ทุกคนที่ให้ความสนใจ ให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในการทำวิจัยด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณโครงการ พสวท. และบัณฑิตวิทยาลัยที่ให้ทุนการศึกษาและการทำวิจัย ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

สุดท้ายนี้กราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และญาติพี่น้องที่คอยเป็นกำลังใจ และให้ความช่วยเหลือด้านต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์ตลอดมา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูป.....	ฉุ
คำย่อ.....	ฎ
บทที่	
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 วารสารปริทัศน์	
2.1 ประวัติการค้นพบสารต้านจุลชีพ.....	3
2.2 จุลินทรีย์ที่สังเคราะห์สารต้านจุลชีพ.....	6
2.3 การจำแนกชนิดของสารปฏิชีวนะ.....	9
2.4 สมบัติของสารต้านจุลชีพประเภทเปปไทด์ที่ผลิตจาก <i>Bacillus</i>	13
2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของสารต้านจุลชีพ.....	14
2.6 ตัวอย่างการศึกษาสารต้านจุลชีพที่ผลิตจาก <i>Bacillus</i> sp.	15
2.7 ความจำเป็นในการศึกษาวิจัยเพื่อหาสารต้านจุลชีพชนิดใหม่.....	23
2.8 การนำสารต้านจุลชีพไปใช้ประโยชน์.....	23
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	
3.1 วัสดุอุปกรณ์.....	25
3.2 เคมีภัณฑ์.....	26
3.3 วิธีการดำเนินการวิจัย	
3.3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา.....	27
3.3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	27
3.3.3 การเก็บรักษาจุลินทรีย์.....	27
3.3.4 การคัดกรอง <i>Bacillus</i> spp. สายพันธุ์ที่ผลิตสารต้านจุลชีพที่มีผลยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดี.....	28
3.3.5 การศึกษาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เหมาะสมต่อการสร้างสารต้านจุลชีพที่ผลิตโดย <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ K-05.....	30
3.3.6 การศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์โดยสารต้านจุลชีพด้วยวิธี paper disc diffusion.....	30
3.3.7 การศึกษาปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของสารต้านจุลชีพ.....	32
3.3.8 การจำแนกสปีชีส์ของ <i>Bacillus</i> sp. K-05.....	32

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.3.9 การแยกสารต้านจุลชีพที่ผลิตจาก <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ K-05 ให้บริสุทธิ์.....	35
3.3.10 การศึกษาลักษณะสมบัติของสารต้านจุลชีพโดยวิธีวิเคราะห์ทางเคมี.....	38
บทที่ 4 ผลการทดลอง	
4.1 การคัดกรอง <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ที่ผลิตสารต้านจุลชีพที่มีผลยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดี.....	39
4.2 การศึกษาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เหมาะสมต่อการสร้างสารต้านจุลชีพที่ผลิตโดย <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ K-05.....	42
4.3 การศึกษาปัจจัยบางประการที่มีผลต่อความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์โดยสารต้านจุลชีพ.....	48
4.4 การจำแนกสปีชีส์ของ <i>Bacillus</i> sp. K-05.....	53
4.5 การทำสารต้านจุลชีพให้บริสุทธิ์.....	55
4.6 การศึกษาลักษณะสมบัติของสารต้านจุลชีพโดยวิธีวิเคราะห์ทางเคมี.....	62
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	66
รายการอ้างอิง.....	74
ภาคผนวก.....	83
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	113

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ประวัติการค้นพบสารต้านจุลชีพชนิดต่าง ๆ.....	5
2	กลุ่มของจุลินทรีย์ที่สังเคราะห์สารต้านจุลชีพและจำนวนสารปฏิชีวนะที่พบ.....	6
3	สารต้านจุลชีพที่ได้จาก <i>Bacillus</i> ชนิดต่าง ๆ.....	7
4	spectrum of activity ของซีรีอิน 7.....	17
5	spectrum of activity ของซบเปดิน JM4-A และ JM4-B.....	21
6	ผลของเอนไซม์ อูณหภูมิ และ pH ต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ของซบเปดิน.....	22
7	โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน 16S rDNA.....	34
8	โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA.....	35
9	ระบบตัวพาที่ใช้หะสารจากโคลัมน์.....	37
10	การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดย <i>Bacillus</i> spp. 5 สายพันธุ์ ด้วยวิธี cross streak.....	40
11	การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารต้านจุลชีพที่ผลิตโดย <i>Bacillus</i> sp. K-05 เมื่อเลี้ยงในอาหาร NB.....	43
12	การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารต้านจุลชีพที่ผลิตโดย <i>Bacillus</i> sp. K-05 เมื่อเลี้ยงในอาหาร TSB.....	44
13	การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารต้านจุลชีพที่ผลิตโดย <i>Bacillus</i> sp. K-05 เมื่อเลี้ยงในอาหาร LB.....	46
14	การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารต้านจุลชีพเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0-10 เดือน.....	49
15	การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารต้านจุลชีพที่ผลิตโดย <i>Bacillus</i> sp. K-05 เมื่อได้รับความร้อนที่ 60-121 องศาเซลเซียส.....	52
16	การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารสกัดเฮกเซน อีเทอร์ และเอทิลอะซิเตท.....	56
17	การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารต้านจุลชีพในส่วนใสและสารสกัดเอทิลอะซิเตท.....	58
18	การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารที่ I และสารที่ II.....	62
19	การวิเคราะห์ผลโดยวิธี ¹³ C-NMR และ ¹ H-NMR ของสารที่ I.....	63
20	การวิเคราะห์ผลโดยวิธี ¹³ C-NMR และ ¹ H-NMR ของสารที่ II.....	65
21	สารต้านจุลชีพที่สร้างจาก <i>Bacillus</i> สปีชีส์ต่าง ๆ.....	71
22	สรุปสาร cyclic dipeptide ที่ผลิตโดยสิ่งมีชีวิตที่มีรายงานไว้.....	73

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	อัตราการตายที่เกิดจากการติดเชื้อในประเทศสหรัฐอเมริกาในระหว่างปี ค.ศ. 1900-1996.....	3
2	โครงสร้างของไมโครซัพทิลิน.....	8
3	โครงสร้างของเซอคูโลซิน.....	8
4	โครงสร้างของโนจิริไมซิน.....	9
5	โครงสร้างของโมอีโนไมซิน เอ.....	10
6	โครงสร้างของไรฟาไมซิน.....	10
7	โครงสร้างของ cyclo(Leu-Gly).....	11
8	โครงสร้างของ cyclo(L-Leu-L-Pro).....	11
9	โครงสร้างของ cyclo(L-Arg-D-Val).....	11
10	โครงสร้างของคลอแรมเฟนิคอลล.....	12
11	โครงสร้างของฟอสโฟไมซิน.....	12
12	ขั้นตอนการแยกสารต้านเชื้อราจากส่วนไส้ที่ผลิตโดย <i>B. amyloliquefaciens</i> RC-2.....	18
13	โครงสร้างของอะมิคูมาซินชนิดต่าง ๆ.....	20
14	ลำดับกรดอะมิโนของสารต้านจุลชีพที่ได้จาก <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ KS03.....	20
15	ลำดับกรดอะมิโนของซัพเปดิน JM4-A และ JM4-B.....	21
16	การศึกษาการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบที่เป็นแบคทีเรีย และยีสต์โดย <i>Bacillus</i> spp.	29
17	การศึกษาการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบที่เป็นราเส้นใยโดย <i>Bacillus</i> spp.....	29
18	การศึกษาการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบที่เป็นแบคทีเรียหรือยีสต์โดยสารต้านจุลชีพ ที่ได้จาก <i>Bacillus</i> sp. K-05 โดยวิธี paper disc diffusion.....	31
19	การศึกษาการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบที่เป็นราเส้นใยโดยสารต้านจุลชีพที่ได้จาก <i>Bacillus</i> sp. K-05 โดยวิธี paper disc diffusion.....	31
20	การยับยั้งต่อแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ <i>B. subtilis</i> ATCC6633 <i>S. aureus</i> ATCC25923 และ <i>M. luteus</i> โดย <i>Bacillus</i> sp. K-05.....	41
21	การยับยั้งต่อยีสต์ ได้แก่ <i>C. albicans</i> และ <i>S. cerevisiae</i> โดย <i>Bacillus</i> sp. K-05.....	41
22	การยับยั้งต่อราทดสอบ ได้แก่ (ก) <i>Fusarium</i> sp. และ (ข) <i>Alternaria</i> sp. โดย <i>Bacillus</i> sp. K-05	41
23	โคโลนีราเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA อายุ 7 วัน.....	47
24	การยับยั้งการเจริญของ <i>B. subtilis</i> ATCC6633 โดยสารต้านจุลชีพจาก <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ K-05.....	47

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
25 การยับยั้งการเจริญของ <i>A. oryzae</i> โดยสารต้านจุลชีพจาก <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ K-05 ตั้งแต่ 0-84 ชม.....	48
26 การยับยั้งการเจริญของ <i>A. oryzae</i> โดยสารต้านจุลชีพเมื่อเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 0 และ 4 เดือน.....	50
27 การยับยั้งการเจริญของ <i>Fusarium</i> sp. โดยสารต้านจุลชีพเมื่อเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 0 และ 4 เดือน.....	50
28 การยับยั้ง <i>A. oryzae</i> โดยสารต้านจุลชีพที่ได้รับความร้อนที่ 60 80 100 และ 121 องศาเซลเซียส.....	53
29 ชิ้นส่วนของ 16S rDNA ของแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp. สายพันธุ์ K-05.....	54
30 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของ <i>Bacillus</i> sp. K-05.....	55
31 การยับยั้ง <i>M. luteus</i> โดยส่วนใสเข้มข้น สารสกัดเอทิลอะซิเตท และส่วนที่เหลือจากการสกัด.....	59
32 โครมาโทแกรมจาก TLC.....	60
33 โครมาโทแกรมของสารที่ I และสารที่ II.....	61
34 ลักษณะของ (ก) สารที่ I และ (ข) สารที่ II.....	61
35 โครงสร้างของสารที่ I.....	64
36 โครงสร้างของสารที่ II.....	65
37 โครงสร้างของไดคีโตเปปอราซิน.....	70

คำย่อ

- | | | |
|-----------------------|---|--|
| 1. ATCC | = | American Type Culture Collection |
| 2. KTCC | = | Korean Agricultural Culture Collection |
| 3. pH | = | ความเป็นกรดด่าง |
| 4. กก. | = | กิโลกรัม |
| 5. มม. | = | มิลลิเมตร |
| 6. ซม. | = | เซนติเมตร |
| 7. มก. | = | มิลลิกรัม |
| 8. มล. | = | มิลลิลิตร |
| 9. ชม. | = | ชั่วโมง |
| 10. λ_{max} | = | ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุด |
| 11. OD ₆₆₀ | = | ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร |
| 12. OD ₆₂₅ | = | ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร |
| 13. OD ₂₆₀ | = | ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร |
| 14. OD ₂₈₀ | = | ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร |
| 15. dNTP | = | ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต |

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

สารต้านจุลชีพ (antimicrobial substance) เป็นสารที่สังเคราะห์ขึ้นจากสิ่งมีชีวิตด้วยกระบวนการทางชีวภาพโดย พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ซึ่งมีฤทธิ์ทำลายหรือยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้โดยใช้ปริมาณเพียงเล็กน้อย (Korzybski และคณะ, 1966) สารต้านจุลชีพรวมถึงสารปฏิชีวนะ ยาต้านไวรัส (anti-viral drug) สารต้านเชื้อรา (anti-fungal drug) และยากำจัดปรสิต (anti-parasitic drug) (The Columbia Electronic Encyclopedia, 2003) ในปัจจุบันสารต้านจุลชีพบางชนิดสามารถสังเคราะห์ได้ด้วยกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี เช่น (N-[2-(5-bromothiophen-2-yl)-2-oxoethyl]) และ (N-[(2-5-bromothiophen-2-yl)-2-oximinoethyl]) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของเปปอราซีนิด ควิโนโลน (piperazinyl quinolones) (Foroumadi และคณะ, 2005) เป็นต้น กระบวนการกึ่งสังเคราะห์ (semi-synthesis process) เป็นการนำสารที่จุลินทรีย์สังเคราะห์ขึ้นเป็นสารตั้งต้นเพื่อปรับปรุงโครงสร้างให้ได้เป็นสารชนิดอื่นที่มีสมบัติที่ดีขึ้น เช่น อนุพันธ์ของเพนนิซิลิน (Greenwood และ Ogilvie, 2002)

สารต้านจุลชีพจัดเป็นสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นในช่วงปลายของการเจริญโดยจุลินทรีย์บางกลุ่ม เช่น สารต้านจุลชีพ ได้แก่ แมกโครไลด์ (macrolides) โพลีเอิน (polyenes) และเตตราไซคลิน (tetracycline) (Berdy, 1974) เป็นต้น สารต้านอนุมูลอิสระ เช่น ควิโนลีน (quinolines) เทอร์ปีนอยด์ (terpenoids) (Berdy, 1974) เป็นต้น มีการศึกษาพบว่าจุลินทรีย์ผลิตสารเหล่านี้เพื่อประโยชน์บางประการ (Demain และ Fang, 2000) เช่น 1) ใช้ป้องกันตัวเองจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น พืช แมลง และสัตว์ 2) มีประโยชน์ต่อสิ่งมีชีวิตที่จุลินทรีย์อาศัยแบบพึ่งพา (symbiosis) 3) เป็นฮอร์โมน 4) เป็นสารที่ช่วยในการขนส่งโลหะ เป็นต้น จุลินทรีย์ที่สังเคราะห์สารต้านจุลชีพมีกลไกที่ป้องกันตัวเองจากสารนั้น โดยวิธีดังต่อไปนี้ 1) การลดความเป็นพิษ (detoxification) โดยทำให้สารต้านจุลชีพอยู่ในรูปของเอนไซม์ก็สามารถกระตุ้นให้ทำงานหรือยับยั้งการทำงานได้ 2) เปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์ที่เป็นเป้าหมายของสารต้านจุลชีพ และ 3) สร้างและปล่อยออกนอกเซลล์ จากนั้นลดอัตราการแพร่ของสารเข้าสู่เซลล์ (Demain, 1974 อ้างถึงใน Martin และ Demain, 1980)

มูลเหตุจูงใจในการวิจัย

จากการใช้สารต้านจุลชีพอย่างกว้างขวางมาเป็นเวลานานแต่ก็มีโรคเกิดขึ้นใหม่มาเรื่อยๆ และปัจจุบันพบว่าจุลินทรีย์ก่อโรคสามารถต้านทานต่อยาต้านจุลชีพ (antimicrobial resistance) หรือมีการดื้อยา (drug resistance) ซึ่งสาเหตุที่ทำให้จุลชีพดื้อยา คือการใช้สารปฏิชีวนะผิดวิธี หรืออาจ

เกิดจากการถ่ายโอนยีนดื้อยาระหว่างจุลชีพก่อโรคทำให้เชื้อโรคมักมีการพัฒนาและต้านทานต่อสารต้านจุลชีพได้ นอกจากนี้สารต้านจุลชีพบางชนิดมีผลข้างเคียง(side effect) ต่อผู้ใช้ ดังนั้นจึงต้องมีการพัฒนาและค้นหาสารต้านจุลชีพชนิดใหม่ ๆ

งานวิจัยนี้สนใจศึกษาสารต้านจุลชีพที่สร้างจากแบคทีเรียที่แยกได้ใหม่จากดินในประเทศไทย เมื่อศึกษาลักษณะสมบัติทางชีวเคมีและพีโนไทป์พบว่าเป็นจีแนส *Bacillus* (จิราพร จิราพงษ์, 2545) จากการศึกษาเบื้องต้นด้วยวิธี cross streak พบว่าสารที่สร้างจาก *Bacillus* spp. สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* และ *Escherichia coli* ยีสต์ ได้แก่ *Candida albicans* และ *Saccharomyces cerevisiae* และราเส้นใย ได้แก่ *Aspergillus oryzae* โดยคัดกรอง *Bacillus* spp. สายพันธุ์ที่ผลิตสารต้านจุลชีพที่ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ดี และศึกษาลักษณะสมบัติบางประการของสารต้านจุลชีพที่สังเคราะห์โดย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่ดีที่สุดหนึ่งสายพันธุ์ซึ่งอาจมีความเป็นไปได้ที่จะได้สารต้านจุลชีพชนิดใหม่เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคต่อไป

วัตถุประสงค์

1. คัดกรอง *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่สังเคราะห์สารต้านจุลชีพที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้
2. ศึกษาโครงสร้างและสมบัติบางประการของสารต้านจุลชีพที่สังเคราะห์โดย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่ดีที่สุดจำนวนหนึ่งสายพันธุ์ซึ่งคัดเลือกได้จากข้อ 1

ขั้นตอนการวิจัย

1. คัดกรองแบคทีเรีย *Bacillus* spp. สายพันธุ์ที่ผลิตสารต้านจุลชีพที่มีผลยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ดี
2. ศึกษาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เหมาะสมต่อการสร้างสารต้านจุลชีพที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่ดีที่สุดหนึ่งสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 1
3. ศึกษาปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของสารต้านจุลชีพ
4. การจำแนกสปีชีส์ (species) ของ *Bacillus* sp.
5. การแยกสารต้านจุลชีพที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. ให้บริสุทธิ์
6. การศึกษาลักษณะสมบัติของสารต้านจุลชีพโดยวิธีวิเคราะห์ทางเคมี

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัยนี้

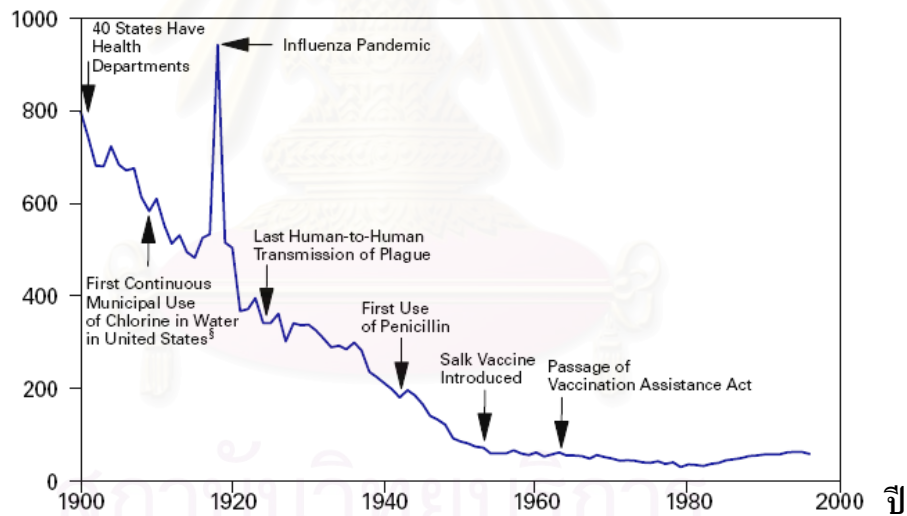
ทราบถึงชนิด สมบัติและประสิทธิภาพของสารต้านจุลชีพที่สังเคราะห์โดยแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่คัดเลือกซึ่งอาจจะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอนาคตได้

บทที่ 2 วารสารปริทัศน์

2.1 ประวัติการค้นพบสารต้านจุลชีพ

แม้ว่าจะมีการค้นหาสิ่งมีชีวิตหรือผลิตภัณฑ์จากสิ่งมีชีวิตมานานหลายศตวรรษเพื่อรักษาการติดเชื้อต่าง ๆ แต่ไม่สามารถลดอัตราการติดเชื้อและการตายได้ (Burgess และคณะ, 1999) จนกระทั่งช่วงต้นศตวรรษที่ 20 มีข้อมูลรายงานว่าอัตราการตายของประชากรอันเนื่องมาจากการติดเชื้อในประเทศสหรัฐอเมริกาลดลงอย่างชัดเจน (CDC, 1999) (รูปที่ 1) โดยพบว่าอัตราการตายของประชากรอันเนื่องมาจากการติดเชื้อของประชากรลดลงตามลำดับ เนื่องมาจากการค้นพบสารต้านจุลชีพและวัคซีนชนิดต่าง ๆ

อัตราการตาย



* Per 100,000 population per year.

† Adapted from Armstrong GL, Conn LA, Pinner RW. Trends in infectious disease mortality in the United States during the 20th century. JAMA 1999;281:61-6.

‡ American Water Works Association. Water chlorination principles and practices: AWWA manual M20. Denver, Colorado: American Water Works Association, 1973.

รูปที่ 1 อัตราการตายที่เกิดจากการติดเชื้อในประเทศสหรัฐอเมริกาในระหว่างปี ค.ศ. 1900-1996 (CDC, 1999)

ในปี ค.ศ. 1929 อเล็กซานเดอร์ เฟลมมิง พบการปนเปื้อนของรา *Penicillium notatum* ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* และเมื่อนำไปศึกษาพบว่าเกิด

จากสารชนิดหนึ่ง ที่ละลายน้ำได้ไม่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต สามารถสกัดออกมาทำให้เข้มข้นได้ จึงเรียกสารนี้ว่า เพนนิซิลิน (penicillin) ตามชื่อของรา และเมื่อนำมารักษาอาการติดเชื้อพบว่าสามารถนำมาใช้เป็นยารักษาโรคได้ ดังนั้นเพนนิซิลินจึงเป็นยาปฏิชีวนะชนิดแรกที่มีการค้นพบ

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

ในปี 1939-1940 Chain และคณะ (1946) สกัดเพนนิซิลินจากอาหารเห็ด โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ ทำให้สามารถเตรียมเกลือเพนนิซิลินในรูปแบบแห้งได้โดยที่ยังคงความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้สำเร็จเป็นครั้งแรก

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



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติการค้นพบสารต้านจุลชีพอื่นชนิดต่าง ๆ แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ประวัติการค้นพบสารต้านจุลชีพชนิดต่าง ๆ (Rai University, 2006)

ชนิดของสารปฏิชีวนะ	จุลินทรีย์ผู้ผลิต	การยับยั้งจุลินทรีย์
เพนนิซิลลิน (1929)	<i>Penicillium notatum</i>	แบคทีเรียแกรมบวก
กริซีโอฟูลวิน (griseofulvin) (1939)	<i>Penicillium griseofulvum</i>	ราเส้นใย
สเตรปโตไมซิน (1944)	<i>Streptomyces griseus</i>	แบคทีเรีย และ <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
คลอแรมเฟนิคอล(chloramphenicol) (1947)	<i>Streptomyces venezue/ae</i>	แบคทีเรีย และ <i>Rickettsia</i> บางชนิด
โพลีไมซิน (polymyxin) (1947)	<i>Bacillus polymyxa</i>	แบคทีเรียแกรมลบ
เซฟาโรสปอริน (cephalosporin) (1948)	<i>Cephalosporium brotzu</i>	แบคทีเรีย
คลอโรเตตราไซคลิน(chlorotetracycline) (1948)	<i>Streptomyces aureofaciells</i>	แบคทีเรีย
นีโอไมซิน (neomycin) (1949)	<i>Streptomyces fradiae</i>	แบคทีเรีย
ออกซีเตตราไซคลิน (oxytetracycline) (1950)	<i>Streptomyces rimoslls</i>	แบคทีเรีย
อีริโทรไมซิน (erythromycin) (1952)	<i>Streptomyces erythreus</i>	แบคทีเรียแกรมบวก <i>Rickettsia</i> บางชนิด และไวรัสบางชนิด
โนโวไบโอซิน (novobiocin) (1956)	<i>Streptomyces spheroids</i> <i>Streptomyces lliveus</i>	แบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ บางชนิด
กรดฟูซิดิก (fusidic acid) (1962)	<i>Fusidium coccilleum</i>	แบคทีเรียและ <i>Staphylococcus</i> spp. ที่ดื้อยาเพนนิซิลลิน
เจนตาไมซิน (gentamicin) (1963)	<i>Micromonospora purpurea</i>	แบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ บางชนิด

2.2 จุลินทรีย์ที่สังเคราะห์สารต้านจุลชีพ

จุลินทรีย์ที่ผลิตสารต้านจุลชีพ (ตารางที่ 2) มีทั้งแบคทีเรีย เช่น *Bacillus* *Actinomycetes* *Streptomyces* และรา เช่น ราในกลุ่ม *Aspergillaceae* และ *Moniliales* เป็นต้น (Korzybski และคณะ, 1966)

ตารางที่ 2 กลุ่มของจุลินทรีย์ที่สังเคราะห์สารต้านจุลชีพและจำนวนสารปฏิชีวนะที่พบ
(Berdy, 1985 ; อ้างถึงใน Wong, 2003)

กลุ่มของจุลินทรีย์	จำนวนของสารปฏิชีวนะ
แบคทีเรีย	950
Actinomycetes	4600
ราเส้นใย	1600

Bacillus เป็นแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่น่าสนใจในการนำมาศึกษาเกี่ยวกับการสร้างสารต้านจุลชีพเพราะสามารถสร้างสารต้านจุลชีพ และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลายชนิด (Wu และคณะ, 2005) *Bacillus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปทรงกระบอก มีสปอร์ภายในเซลล์ เป็นจุลชีพที่มีความสำคัญทั้งในด้านที่มีประโยชน์ และด้านที่เป็นโทษ คือ สร้างสารต้านจุลชีพ สารที่ช่วยให้พืชเติบโตดี บางชนิดเป็นจุลินทรีย์ก่อโรค เป็นต้น พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม 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) สารต้านจุลชีพ เช่น บาซิลลาริน อีทูริน (Cho และคณะ, 2003) และสารต้านจุลชีพอื่น ๆ (ตารางที่ 3) 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

ตารางที่ 3 สารต้านจุลชีพที่ได้จาก *Bacillus* ชนิดต่าง ๆ (Katz และ Demain, 1977)

สปีชีส์	สารต้านจุลชีพ
<i>Bacillus brevis</i>	Gramicidin S, Tyrocidine, Linear gramicidin, Brevin,
<i>B. subtilis</i>	Mycosubtilin, Subtilin, Subsporin, Iturin, Neocidin
<i>B. pumilis</i>	Micrococccin , Pumilin, Tetaim
<i>B. polymyxa</i>	Polymyxin, Colistin, Gatavalin, Jolipeptin
<i>B. circulans</i>	Butirosin, Circulin, Polypeptin, Xylostatin
<i>B. cereus</i>	Biocerin, Cerexin, Thiocillin
<i>B. licheniformis</i>	Bacitracin, Licheniformin, Proticin

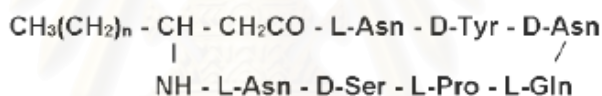
การจัดจำแนกสปีชีส์ของ *Bacillus* ทำได้โดย 1) การศึกษาฟิโนไทป์ทำได้โดยการศึกษารูปร่างและการติดสีโดยดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ลักษณะสมบัติทางชีวเคมี เช่น การใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ และ 2) การศึกษาจีโนไทป์โดยการเปรียบเทียบปริมาณเบสกวานีน (G) และไซโทซีน (C) (G+C content) และการเปรียบเทียบลำดับลำดับนิวคลีโอไทด์โดยวิเคราะห์ 16S rDNA (Fox และคณะ, 1992)

Cho และคณะ (2003) ได้คัดแยกแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ KS03 ซึ่งสร้างสารต้านจุลชีพยับยั้ง *Gloeosporium gloeosporioides* มาจำแนกจีโนสและสปีชีส์โดยการเปรียบเทียบลำดับ นิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA โดยการสกัด DNA และทำปฏิกิริยาลูกโซ่ (polymerase chain reaction : PCR) เพื่อเพิ่มจำนวน (amplification) 16S rDNA โดยใช้ไพรเมอร์เป็น 27F (5PAGAGTTTGATCMTGGCTCAG) และ 1492R (5P-GGYTACCTTGTTACGACTT) (Lane, 1991 อ้างถึงใน Cho และคณะ, 2003) เมื่อได้ PCR product แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์และหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้เครื่อง ABI PRISM1 model 377 DNA sequencer หลังจากเปรียบเทียบกับข้อมูลใน Gene Bank พบว่าแบคทีเรียดังกล่าวมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (similarity) กับแบคทีเรีย *B. subtilis* ATCC 21331 เท่ากับ 98%

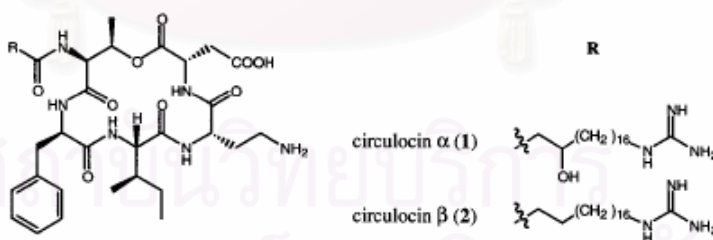
Wu และคณะ (2005) ศึกษาการจำแนกสปีชีส์ของแบคทีเรียที่แยกได้จากดินโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA โดยใช้ไพรเมอร์ คือ 16SF มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') และ 16SR มีลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นย่อยผลผลิตของ PCR (PCR product) แล้วเชื่อมต่อกับ pGEM-T vector เพื่อนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าเป็น *B. subtilis* สายพันธุ์ JM4

Katz และ Demain (1977) พบว่าสารต้านจุลชีพที่ได้จาก *Bacillus* มักเป็นสารประเภทเปปไทด์ ซึ่งนำมาใช้ในการรักษาและป้องกันโรคทั้งในพืชและสัตว์ (Pinchuk และคณะ, 2002) เช่น บาซิลลิน (bacilysin) ซึ่งเป็นสารต้านจุลชีพที่สร้างโดย *B. subtilis* มีโครงสร้างเป็นไดเปป

ไทด์ที่มีอะลานีนอยู่ที่ 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* สร้างสารที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมราก่อโรคในพืชตระกูลแตงได้ (Asaka และ Shoda, 1996; Yoshida และคณะ, 2001) ซับทีลิน (subtilin) (Chung และคณะ, 1992) และไมโครซับทีลิน (microsubtilin) (รูปที่ 2) (Duitman และคณะ, 1999) เป็นสารต้านจุลชีพที่สังเคราะห์โดย *B. subtilis* ATCC6633 ซึ่งเป็นสารต้านราในกลุ่มอิมูริน บาซิลโลไมซิน L (bacillomycin L) เป็นสารต้านจุลชีพที่สังเคราะห์โดย *B. subtilis* เป็นสารต้านจุลชีพชนิดหนึ่งในกลุ่มอิมูริน (Volpon และคณะ, 1999) เซอคูโลซิน (circulocin) (รูปที่ 3) เป็นสารต้านจุลชีพที่สังเคราะห์โดย *Bacillus circulans* J2154 มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *Streptococcus* และ *Enterobacter* ได้ดี แต่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้เล็กน้อย (He และคณะ, 2001)



รูปที่ 2 โครงสร้างของไมโครซับทีลิน (Duitman และคณะ, 1999)



รูปที่ 3 โครงสร้างของเซอคูโลซิน (He และคณะ, 2001)

2.3 การจำแนกชนิดของสารปฏิชีวนะ

สามารถแบ่งสารปฏิชีวนะได้เป็นหลายประเภท ดังนี้

2.3.1 แบ่งตามการออกฤทธิ์ต่อเซลล์ (Fix, 1997) จำแนกได้เป็น 2 ชนิด

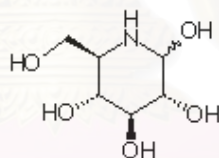
2.3.1.1 ยาที่ใช้ทำลายแบคทีเรีย (bactericidal drugs) มีฤทธิ์ทำลายเซลล์แบคทีเรียที่ยังมีชีวิตเท่านั้น เช่น สเตรปโตไมซิน อะมิโนไกลโคไซด์ (aminoglycosides) และเพนนิซิลิน เป็นต้น

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

2.3.2 แบ่งตามโครงสร้างทางเคมี (Brock และ Medigan, 1991) ซึ่งวิธีนี้จัดว่าดีที่สุดเพราะบอกความแตกต่างได้ชัดเจน

2.3.2.1 สารปฏิชีวนะประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate containing antibiotics) ได้แก่

ก. สารปฏิชีวนะที่เป็นพวงน้ำตาล เช่น โนจิริไมซิน (nojirimycin) (รูปที่ 4)



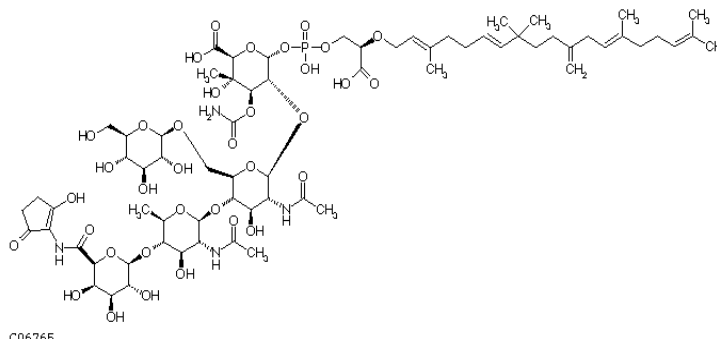
รูปที่ 4 โครงสร้างของโนจิริไมซิน (Dhavale และคณะ, 2002)

ข. อะมิโนไกลโคไซด์ (aminoglycoside) เช่น สเตรปโตไมซิน กานาไมซิน (kanamycin) และเจนต้าไมซิน (gentamycin) เป็นต้น

ค. n-ไกลโคไซด์ (n-glycoside) เช่น สเตรปโตทริซิน (streptothricin)

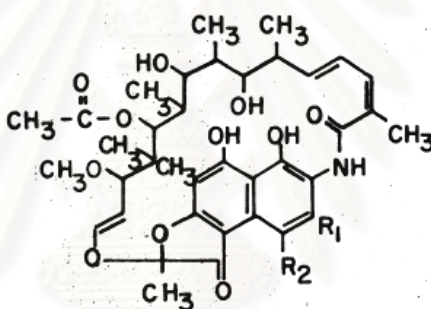
ง. c-ไกลโคไซด์ (c-glycoside) เช่น แวนโคไมซิน (vancomycin)

จ. ไกลโคลิปิด (glycolipid) เช่น โมอีโนไมซิน เอ (moenomycin A) (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 โครงสร้างของโมอีโนไมซิน เอ (Kurz และคณะ, 1998)

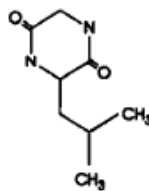
2.3.2.2 แมกโครไซคลิก แล็กโตน (macrocyclic lactones) ได้แก่ สารในกลุ่มแมกโครไลด์ เช่น อีริโทรซิน โพลีอินหรือแคนดิซิดิน (candicidin), แอซาไมซิน (ansamycin) และ ไรฟาไมซิน (rifamycin) (รูปที่ 6) เป็นต้น



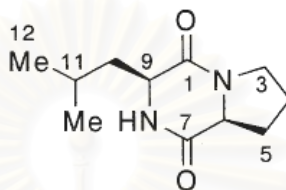
รูปที่ 6 โครงสร้างของไรฟาไมซิน (Jacob และ Rose, 1974)

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

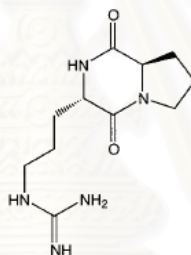
2.3.2.4 สารปฏิชีวนะพวกกรดอะมิโนและเปปไทด์ (amino acid and peptides antibiotics) ได้แก่ อนุพันธ์ของกรดอะมิโน เช่น ไซโคลซีรีน (cycloserine) พวกเปปไทด์ เช่น บาซิลทรานซิน ซับทีลิน (subtilin) พวกโครโมเปปไทด์ เช่น แอกทิโนไมซิน (actinomycins) เป็นต้น และยังรวมไปถึงพวกไซคลิกไดเปปไทด์ (cyclic dipeptide) ซึ่งเป็นเปปไทด์ที่พบในสัตว์และพืชรวมทั้งในกระบวนการหมัก (Prasad, 1995) เช่น cyclo(Leu-Gly) (รูปที่ 7) cyclo(L-Leu-L-Pro) (รูปที่ 8) และ cyclo(L-Arg-D-Pro) (รูปที่ 9) เป็นต้น



รูปที่ 7 โครงสร้างของ cyclo(Leu-Gly) (Prasad, 1995)



รูปที่ 8 โครงสร้างของ cyclo(L-Leu-L-Pro) (Yan และคณะ, 2004)



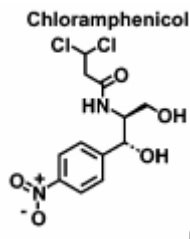
รูปที่ 9 โครงสร้างของ cyclo(L-Arg-D-Pro) (Houston และคณะ, 2002)

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

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

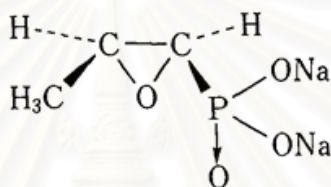
2.3.2.7 อนุพันธ์ของอะลิไซคลิก (alicyclic derivatives) ได้แก่ อนุพันธ์ของไซโคลอัลเคน (cycloalkane derivatives) เช่น ไซโคลเฮกซาไมด์ (cyclohexamide) สารปฏิชีวนะพวกสเตียรอยด์ (steroid antibiotics) เช่น กรดฟูซิดิก (fusidic acid)

2.3.2.8 สารปฏิชีวนะพวกอะโรมาติก (aromatic antibiotics) ได้แก่ อะโรมาติกอีเทอร์ (aromatic ether) เช่น โนโวไบโอซิน (รูปที่ 10) อนุพันธ์ของเบนซีน (benzene derivative) เช่น กลอแรมเฟนิคอล เป็นต้น



รูปที่ 10 โครงสร้างของคลอแรมเฟนิคอล (Hansen และคณะ, 2003)

2.3.2.9 สารปฏิชีวนะพวกอลิฟาติก (aliphatics antibiotics) เช่น ฟอสโฟไมซิน (fosfomycin) (รูปที่ 11)



รูปที่ 11 โครงสร้างของฟอสโฟไมซิน

(http://medicine.cug.net/drug/01/01_01_10.htm)

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

2.3.3.1 สารปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้หลายชนิด (broad spectrum antibiotic) เช่น เซฟาโลสปอริน ยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ

2.3.3.2 สารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้เพียงบางชนิด (narrow spectrum antibiotic) เช่น เพนนิซิลิน ยับยั้งได้เฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก

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

2.3.4.1 สารปฏิชีวนะที่ได้จากการกระบวนการชีวภาพ ได้แก่ สารปฏิชีวนะที่ได้จากการหมัก โดยเฉพาะถ้าเติม precursor ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถเพิ่มและเร่งปริมาณการผลิตสารปฏิชีวนะได้ เช่น เพนนิซิลิน G

2.3.4.2 สารปฏิชีวนะที่ได้จากการกึ่งสังเคราะห์ ได้แก่ สารปฏิชีวนะที่ได้จากการหมัก แล้วนำมาดัดแปลงโครงสร้างโดยวิธีการทางเคมี เช่น แอมพิซิลิน

2.3.4.3 สารปฏิชีวนะที่ได้จากกระบวนการทางเคมี ซึ่งมีต้นทุนการผลิตต่ำกว่าการหมัก เช่น คลอแรมเฟนิคอล

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

- 2.3.5.1 สารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ เช่น เพนนิซิลิน เซฟาโรสปอริน
- 2.3.5.2 สารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ เช่น โพลีไมซิน โพลีอิน
- 2.3.5.3 สารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการสร้างโปรตีน เช่น คลอแรมเฟนิคอลยับยั้งการทำงานของ 50 S ของไรโบโซม สเตปโตไมซินยับยั้งการทำงานของ 30 S ของไรโบโซม
- 2.3.5.4 สารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการสร้างสารพันธุกรรม เช่น ไรแฟมพิน ควินโนโลน
- 2.3.5.5 สารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการสร้างเมตาบอไลต์ที่สำคัญ เช่น ซัลโฟนิลาไมด์ยับยั้งกระบวนการเมตาบอลิซึมของโฟเลต

2.3.6 อาศัยลักษณะทางอนุกรมวิธาน โดยพิจารณาว่าจุลินทรีย์ผู้ผลิตจัดอยู่ในกลุ่มใด แล้วสามารถบอกได้ว่าสารดังกล่าวอยู่ในกลุ่มนั้นด้วย แต่มีข้อเสีย คือ จุลินทรีย์กลุ่มเดียวกันอาจผลิตสารได้หลายชนิด และสารเดียวกันอาจสังเคราะห์ได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด (Korzybski และคณะ, 1966)

2.4 สมบัติของสารต้านจุลชีพประเภทเปปไทด์ที่ผลิตจาก *Bacillus*

สารต้านจุลชีพซึ่งผลิตจาก *Bacillus* มักเป็นเปปไทด์ (Wu และคณะ, 2005) สมบัติของสารต้านจุลชีพพวกเปปไทด์ (Katz และ Demain, 1977) มีดังนี้

- 2.4.1 สารต้านจุลชีพพวกเปปไทด์มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่าโปรตีนชนิดอื่น
- 2.4.2 จุลินทรีย์ชนิดเดียวกันสามารถสร้างสารต้านจุลชีพได้หลายกลุ่มโดยแบ่งตามองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกันและสารปฏิชีวนะที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันอาจมีความแตกต่างของกรดอะมิโนตั้งแต่หนึ่งชนิดขึ้นไป
- 2.4.3 เปปไทด์ที่ได้จาก *Bacillus* จะมีโครงสร้างคล้ายกัน เช่น *Bacillus brevis* สร้างแกรมิซิดิน และไทโรซิดิน
- 2.4.4 โครงสร้างโมเลกุลมักมีองค์ประกอบอื่น นอกจากกรดอะมิโนซึ่งแตกต่างจากโปรตีนที่ได้จากพืชและสัตว์ เช่น พบกรดไขมันเมทิลออกตะโนอิก (6-methyl-octanoic) ในโคลิสติน (colistin) ที่ได้จาก *B. circulans*
- 2.4.5 ส่วนมากประกอบด้วยกรดอะมิโนที่แตกต่างจากที่พบในโปรตีนอื่น

2.4.6 ส่วนมากเปปไทด์ที่สังเคราะห์ขึ้นมักเป็นวง (cyclic) เช่น บราซิทรานิน กรามิซิดิน S แต่บางชนิดก็มีโครงสร้างแบบเส้นตรง (linear structure) เช่น ไนซิน (nisin) อีวิดิน (avidine) เป็นต้น

2.4.7 สารในกลุ่มนี้ทนต่อการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนทั่วไป (Proteolytic enzymes) เช่น เปปติเดส โปรติเอส

2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของสารต้านจุลชีพ

2.5.1 ความร้อน

Yu และคณะ (2002) พบว่าส่วนสไลด์ที่ได้จากการเลี้ยง *B. amyloliquefacien* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่ทำให้เข้มข้นขึ้น 5 เท่า ไปต้มที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที และที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วทดสอบกับ *Rhizoctonia zolani* พบว่าการต้มที่ 100 องศาเซลเซียส ไม่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของสารต้านจุลชีพ แต่การต้มที่ 121 องศาเซลเซียส ทำให้ประสิทธิภาพของสารต้านจุลชีพลดลง 40%

Han และคณะ (2005) พบว่าเมื่อนำส่วนสไลด์ที่ผลิตโดย *Bacillus sp. sunhua* ไปปรับความร้อนที่ 40 60 80 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำมาทดสอบกับ *Streptomyces scabiei* KACC 20101 ด้วยวิธี disc diffusion พบว่าส่วนสไลด์ที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ไม่ยับยั้ง *S. scabiei* KACC 20101 ส่วนสไลด์ที่ได้รับความร้อนที่ 40 และ 60 องศาเซลเซียส มีแอกติวิตีต่อ *S. scabiei* KACC20101 ประมาณ 94 และ 82% และส่วนสไลด์ที่ได้รับความร้อนที่ 80 และ 100 องศาเซลเซียสมีแอกติวิตีลดลง 50%

2.5.2 pH

Yu และคณะ (2002) พบว่าส่วนสไลด์ที่ได้จากการเลี้ยง *B. amyloliquefacien* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่ทำให้เข้มข้นขึ้น 5 เท่า ปรับ pH ด้วย 0.5 M NaOH หรือ HCl ให้ได้ 3 4 5 ถึง 11 และบ่มที่ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง แล้วทดสอบกับ *R. zolani* พบว่าค่า pH ไม่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของสารต้านจุลชีพ

Han และคณะ (2005) พบว่าเมื่อนำส่วนสไลด์ที่ผลิตโดย *Bacillus sp. sunhua* มาปรับ pH เป็น 1-14 ทิ้งไว้ 20 ชม และปรับ pH ให้เป็นกลางแล้วนำมาทดสอบกับ *Streptomyces scabiei* KACC 20101 ด้วยวิธี disc diffusion พบว่ามีแอกติวิตีที่ดีที่สุดเมื่อมี pH เป็นกลาง ส่วนสไลด์ที่ปรับ pH เป็น 8.0-13.0 มีแอกติวิตีใกล้เคียงกัน แต่ส่วนสไลด์ที่มี pH 1.0-4.0 พบว่าแอกติวิตีค่อย ๆ ลดลงและไม่มีแอกติวิตีเมื่อส่วนสไลด์มีค่า pH เท่ากับ 2.0

2.5.3 แสง

Yu และคณะ (2002) พบว่าเมื่อนำส่วนใสเข้มข้นที่ได้จาก *B. amyloliquefacien* หยดใส่แผ่นกระดาษ 100 ไมโครลิตร จำนวน 15 แผ่น ผึ่งให้แห้งในที่มืด จากนั้นนำ 5 แผ่นที่วางไว้ในที่มืดเป็นชุดควบคุม อีก 5 แผ่นมาตากแดดนาน 30 นาที และ 5 แผ่นที่เหลือนำไปส่องด้วยแสงยูวีที่มีความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร โดยวางห่างจากหลอดยูวี 10 ซม นาน 30 นาที แล้วนำมาทดสอบกับ *Rhizoctonia solani* พบว่าทั้งแสงแดดและรังสียูวีไม่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของสารต้านจุลชีพ

2.5.4 เอนไซม์ย่อยโปรตีน (proteolytic enzyme)

Brizani และ Brandelli (2002) ศึกษาผลของเอนไซม์ ได้แก่ ปาเปน (papain) ทริปซิน (trypsin) โปรตีเนส K (proteinase K) โพรเนส (pronase K) อะไมเลส (α -amylase) β -glucuronidase β -galactosidase และ β -N-acetylglucosaminidase (ความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อแบคทีเรียไอซอิน เท่ากับ 3200 AU/มล) ต่อการออกฤทธิ์ของแบคทีเรียไอซอินที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ 8A พบว่าเอนไซม์ทุกชนิดไม่มีผลต่อแอกติวิตีของแบคทีเรียไอซอิน แต่โปรตีเนส K และโพรเนส K ทำให้แอกติวิตีของแบคทีเรียไอซอินลดลง 100%

Wu และคณะ (2005) พบว่าเมื่อนำซบเปปติน (subpeptin) JM4-A และ JM4-B ที่ผลิตโดย *B. subtilis* JM4 มาย่อยด้วยเอนไซม์โพรเนส E เปปซิน (pepsin) โปรตีเนส K และทริปซิน (trypsin) พบว่าซบเปปติน (subpeptin) JM4-A และ JM4-B ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์โพรเนส E และเปปซิน แต่โปรตีเนส K และทริปซิน (trypsin) ทำให้การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของสารทั้งสองชนิดลดลง 50%

2.6 ตัวอย่างการศึกษาสารต้านจุลชีพที่ผลิตจาก *Bacillus* sp.

Pichard และคณะ (1995) ศึกษาสารต้านจุลชีพที่ได้จาก *Bacillus polymyxa* สายพันธุ์ BP1 เพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อโรครักกับพืช คือแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* โดยเลี้ยง *B. polymyxa* สายพันธุ์ BP1 ในอาหารเหลวที่มีแลคโตส แอมโมเนียมซัลเฟต และกรดอะมิโน พบว่าสายพันธุ์ BP1 สามารถสร้างสารต้านจุลชีพได้ จากนั้นนำไปทำให้แห้งภายใต้เยือกแข็ง (lyophilized) และแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วย semi-preparative reverse phase HPLC พบว่าแยกได้สาร 2 ชนิด ได้แก่ 1) กาวาซีรีน (gavaserin) เมื่อนำวิเคราะห์กรดอะมิโนและกรดไขมัน พบว่าไม่มีกรดไขมันในสารนี้ เมื่อนำไปย่อยด้วยกรดและเอนไซม์ (acid and enzyme hydrolysis) พบว่าประกอบด้วยกรดกลูตามิก อะลานีน วาลีน ซีรีน 2,4-diaminobutyric acid และกรดออกตะโนอิก (octanoic acid) ตามลำดับ และหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีแมสสเปกโทรสโกปี (mass spectroscopy)

: MS) พบว่าสารนี้มีน้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 911 คาลตัน 2) ซอลตาวัลลิน (saltavalin) ประกอบด้วย ซีรีน อะลานีน ลิวซีน ทรีโอนีน วาลีน และ 2,4-diaminobutyric acid มีน้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 903 คาลตัน

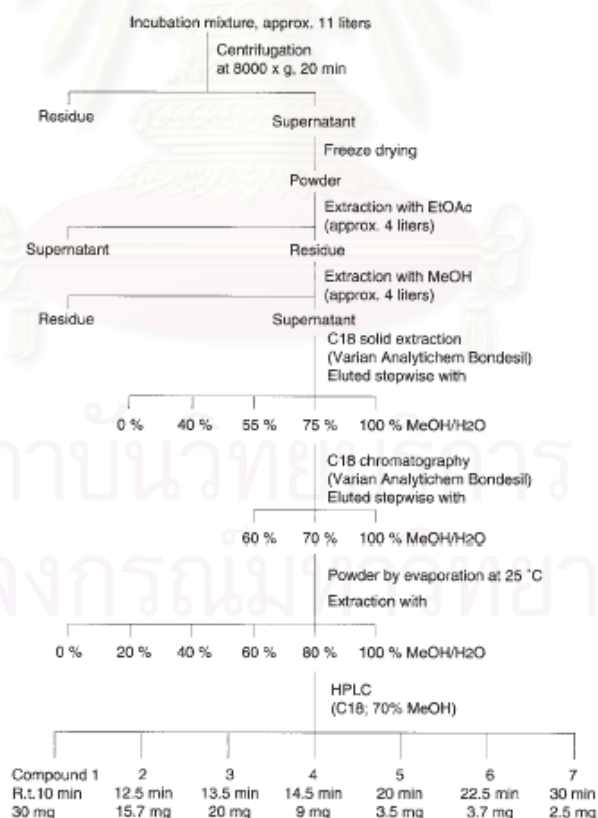
Oscariz และคณะ (1999) ศึกษาสารต้านจุลชีพพวกเปปไทด์ในกลุ่มแบคทีริโอซิน (bacteriocin) คือ ซีรีอิน 7 (cerein 7) ซึ่งยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียในจีนัส *Listeria* เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร โดยแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดิน และจำแนกชนิดโดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CHB fermentation พบว่าแบคทีเรียที่สร้างสารต้านจุลชีพ คือ *Bacillus cereus* โดยเลี้ยงในอาหารเหลว Brian Heart Infusion (BHI) แยกเซลล์ออกแล้วนำส่วนใสที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 65% แล้วนำตะกอนที่ได้ละลายในโซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ซาไลน์ (sodium phosphate buffer saline : PBS) pH 6.8 เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 เท่า (ของส่วนใสที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต) จากนั้นสกัดด้วยบิวทานอล (butanol : BuOH) อัตราส่วน 2 : 3 (BuOH : ส่วนใส) นำไประเหยแห้งและละลายใน PBS ปริมาตร 100 เท่า (ของส่วนใสที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต) เมื่อนำไปศึกษาการยับยั้ง จุลินทรีย์ทดสอบ พบว่าสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้หลายชนิด แต่ไม่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ (ตารางที่ 4) จากนั้นวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี Sodium Dodecyl Sulphate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) โดยใช้โปรตีนมาตรฐาน (standard protein) ขนาด 4.4-37.5 กิโลคาลตัน พบว่าเป็นไฮโดรโฟบิกโปรตีนโมเลกุลเล็ก (small hydrophobic protein) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 9.0-4.4 กิโลคาลตัน และวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลอย่างละเอียดด้วย mass spectrometry พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 3.9 กิโลคาลตัน

ตารางที่ 4 spectrum of activity ของซีรีน 7 (Oscariz และคณะ,1999)

Indicator strain	Sensitivity ^a
Gram-positives	-
<i>Bacillus cereus</i> Bc7	++
<i>Bacillus cereus</i> (3 strains)	++
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	++
<i>Bacillus subtilis</i> (2 strains)	++
<i>Bacillus subtilis</i>	++
<i>Clostridium acetobutyricum</i>	++
<i>Clostridium botulinum</i>	++
<i>Clostridium butyricum</i>	++
<i>Clostridium perfringens</i>	++
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	++
<i>Listeria innocua</i> (2 strains)	++
<i>Listeria ivanovii</i> (6 strains)	++
<i>Listeria monocytogenes</i> (13 strains)	++
<i>Listeria seeligeri</i> (3 strains)	++
<i>Micrococcus luteus</i> (3 strains)	+++
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 9144	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12600	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (3 strains)	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (teicoplanin-resistant) (2 strains)	++
<i>Streptococcus bovis</i>	++
<i>Streptococcus avium</i> (vancomycin-resistant)	++
<i>Streptococcus equinus</i> (teicoplanin-resistant)	++
Gram-negatives	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-
<i>Escherichia coli</i> (2 strains)	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-
<i>Pseudomonas putida</i>	-

^aInsensitivity is indicated by - ; different sensitivity levels of sensitivity range from low (+) to high (+++).

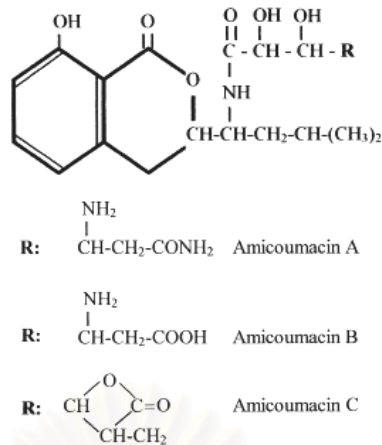
Yoshida และคณะ (2001) ศึกษาแบคทีเรีย *B. amyloliquefaciens* RC-2 ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้ง *Colletotrichum dematium* ที่เป็นราก่อโรคแอนแทรกโนส (anthracnose) ของต้นมันเบอรรี่ โดยเลี้ยง *B. amyloliquefaciens* RC-2 ใน LB จากนั้นแยกเซลล์แล้วนำส่วนไซมาเจ็องและทดสอบกับราทดสอบ พบว่า ส่วนไซที่ได้จาก RC-2 มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของรา ได้แก่ *Bipolaris leersiae* *Colletotrichum acutatum* *Colletotrichum dematium* *Diaporthe nomurai* *Fusarium lateritium* f.sp. *mori* *Glomerella cingulata* *Myrothecium roridum* *Pyricularia oryzae* *Rosellinia necatrix* *Sclerotinia sclerotiorum* และแบคทีเรีย ได้แก่ *Agrobacterium tumefaciens* *Pseudomonas cichorii* *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora* *Pseudomonas marginalis* pv. *Marginalis* *Pseudomonas syringae* pv. *mori*, *Pseudomonas tolaasii* *Pseudomonas viridiflava* และ *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* จากนั้นนำส่วนไซสกัดด้วยเอทานอล เมทานอล และสกัดด้วยชุดสกัดชนิด C18 solid-phase และทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟี (รูปที่ 12) จากนั้นนำส่วนต่าง ๆ ที่แยกได้มาทดสอบกับราทดสอบ และศึกษาโครงสร้างโดยใช้ NMR และ MS พบว่าสารหนึ่งที่แยกได้ คือ อีทูริน A₂



รูปที่ 12 ขั้นตอนการแยกสารต้านเชื้อราจากส่วนไซที่ผลิตโดย *B. amyloliquefaciens* RC-2 (Yoshida และคณะ, 2001)

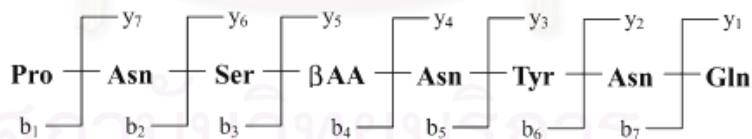
ในปี 2002 Yu และคณะ ศึกษาสารต้านจุลชีพที่ได้จาก *B. amyloliquefaciens* ที่มีฤทธิ์ยับยั้งราก่อโรคในต้นถั่วเหลือง คือ *Rhizoctonia solani* โดยเลี้ยง *B. amyloliquefaciens* ในอาหาร LB แล้วทำให้สารเข้มข้นและแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วย TLC ซึ่งมีระบบตัวทำละลายคือ คลอโรฟอร์มต่อเมทานอลต่อน้ำในอัตราส่วน 65:25:4 พบว่าแยกสารต้านเชื้อราได้ 3 ชนิด ซึ่งประกอบด้วยชนิดและสัดส่วนของกรดอะมิโนเช่นเดียวกัน ได้แก่ แอสปาราจีน กลูตามีน ซีรีน โพรลีน และ ไทโรซีน ในอัตราส่วนประมาณ 3:1:1:1:1 เมื่อศึกษาเมสสเปกตรัม พบว่าสารทั้งสามชนิดที่แยกได้เป็นอิthurin เอ โดยที่สารชนิดที่สนใจศึกษามีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 1042.5533 ซึ่งเท่ากับน้ำหนักโมเลกุลของ อิthurin เอ และมีโครงสร้างเป็นไซคลิก ไลโปเปปไทด์จากนั้นหาลำดับกรดอะมิโนโดยวิธีการสลายแบบเอ็ดมาน (Edman degradation) พบว่าประกอบด้วยกรดอะมิโน คือ โพรลีน แอสปาราจีน ซีรีน บีต้า-อะมิโน (β -amino acid) แอสปาราจีน ไทโรซีน แอสปาราจีน และกลูตามีน ส่วนอีกสองชนิดมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 1057.9 และ 1069.5 ตามลำดับ แต่ไม่ได้รายงานลำดับกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ

ต่อมา 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* และอีกหนึ่งสายพันธุ์ คือ *Bacillus pumilus* จากนั้นศึกษาการสร้างอะมิคูมาซิน (amicoumacin) จาก *Bacillus* ทั้งหมด โดยเลี้ยงในอาหารที่มีแป้งเป็นส่วนประกอบเพื่อช่วยสร้างสารต้านจุลชีพ (Saito และคณะ, 1992) โดยมีสูตรอาหารดังนี้ น้ำแป้ง 10 กรัมต่อลิตร เปปโทน 5 กรัมต่อลิตร และไซเดียมคลอไรด์ 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 CH_2Cl_2 : MeOH : H_2O (65 : 25 : 4) เป็นระบบตัวพา และแบ่งส่วนหนึ่งที่ได้จาก TLC ไปวิเคราะห์โครงสร้างด้วย MS และส่วนที่เหลือนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยสกัดด้วย SepPak C18 cartridge (solid phase extraction) นำไปวิเคราะห์โดยวิธี HPLC และหาโครงสร้างสารด้วย MS ซึ่งผลจากการทำ MS ซึ่งส่วนที่ได้จาก TLC พบว่ามีอะมิคูมาริน A และ B แต่ส่วนที่ได้จาก HPLC พบว่ามีอะมิคูมาริน C (รูปที่ 13)



รูปที่ 13 โครงสร้างของอะมิคูมาซินชนิดต่าง ๆ (Pinchuk และคณะ, 2002)

Cho และคณะ (2003) แยกและศึกษาสารต้านเชื้อราที่ได้จาก *B. subtilis* สายพันธุ์ KS03 ที่มีฤทธิ์ยับยั้งรา *Gloeosporium gloeosporioides* ที่เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรกโนสในผักและผลไม้ ขั้นแรกเป็นการเตรียมสารต้านจุลชีพโดยเลี้ยงสายพันธุ์ KS03 ในอาหาร LB แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยสกัดด้วยบิวทานอลแล้วนำมาแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีที่แพคด้วยเซฟาโรส (sepharose) และวิธีโครมาโทกราฟีผิวบางแบบเปปเปอร์เรทีฟ (preparative TLC) ตามลำดับ จากนั้นหาน้ำหนักโมเลกุลด้วย MS พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 1042 และมีลำดับกรดอะมิโน (รูปที่ 14) คือ โพรลีน แอสพาราจีน ซีรีน บีต้า-อะมิโน แอสพาราจีน ไทโรซีน แอสพาราจีน และกลูตามีน ซึ่งเป็นโครงสร้างของอิทูรินที่ปกติแล้วมี 8 ไอโซเมอร์ และแต่ละไอโซเมอร์ต่างกันที่โครงสร้างของกรดอะมิโนชนิดบีต้าจึงสรุปได้ว่าสารต้านเชื้อราที่ได้จาก *B. subtilis* สายพันธุ์ KS03 มีน้ำหนักโมเลกุลและโครงสร้างเหมือนกับอิทูริน A₂



รูปที่ 14 ลำดับกรดอะมิโนของสารต้านจุลชีพที่ได้จาก *B. subtilis* สายพันธุ์ KS03 (Cho และคณะ, 2003)

ในปี 2005 Wu และคณะ ศึกษาการสร้างสารต้านจุลชีพของ *B. subtilis* สายพันธุ์ JM4 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากตัวอย่างดินในปักกิ่ง โดยเลี้ยง *B. subtilis* สายพันธุ์ JM4 ในอาหาร LB ที่ 37 องศาเซลเซียส นำส่วนใสมาทำให้บริสุทธิ์โดยตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 80% แยกเกลือออกโดยวิธีไดอะไลซิส (dialysis) ในโซเดียมซิเตรท บัฟเฟอร์ (pH 4.0) แล้วนำมาแยกต่อด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี พบว่าแยกได้สาร 2 ชนิด คือ ซับเปปติน (subpeptin) JM4-

A และ JM4-B จากนั้นศึกษา spectrum of activity กับจุลินทรีย์ทดสอบทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ พบว่าสามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้เกือบทุกชนิดดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 spectrum of activity ของซับเปปติน 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 พบว่าซับเปปติน JM4-A และ JM4-B มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 2512 ดาลตัน เมื่อวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนโดยวิธีการสลายแบบเอ็ดมาน พบว่าซับเปปติน JM4-A และ JM4-B ประกอบด้วยกรดอะมิโน 12 ชนิด คือ x (ไม่สามารถจำแนกชนิดของกรดอะมิโน) x ไลซีน กรดกลูตามิก ไอโซลิวซีน x ฮีสทิดีน(ทริปโตเฟน) ไอโซลิวซีน ฟีนิลอะลานีน ฮีสทิดีน กรดแอสปาดิก โดยที่กรดอะมิโนตัวที่ 7 ของซับเปปติน JM4-A คือฮีสทิดีน แต่กรดอะมิโนตัวที่ 7 ของซับเปปติน JM4-B คือทริปโตเฟน ดังแสดงในรูปที่ 15

Subpeptin JM4-A X-X-K-E-I-X-W-I-F-H-D-N
Subpeptin JM4-B X-X-K-E-I-X-H-I-F-H-D-N

รูปที่ 15 ลำดับกรดอะมิโนของซับเปปติน JM4-A และ JM4-B (Wu และคณะ, 2005)

เมื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของซับเปปติน JM4-A และ JM4-B ได้แก่ การย่อยด้วยโปรตีโอไลติกเอนไซม์ต่าง ๆ พบว่าซับเปปติน JM4-A และ JM4-B ไม่ถูกทำลายด้วยเอนไซม์โปรเนส E (pronase E) และเปปซิน (pepsin) แต่โปรตีเนส K (protenase K) และทริปซิน

(trypsin) มีผลต่อการออกฤทธิ์ของสารทั้งสองชนิด (ตารางที่ 7) เมื่อศึกษาผลของความร้อนต่อการทำงานของซับเปปตินพบว่าทนความร้อนได้สูงถึง 100 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มนาน 30 นาที แต่การยับยั้งจุลินทรีย์ลดลงครึ่งหนึ่งเมื่อบ่มที่ 120 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มนาน 30 นาที และเมื่อศึกษาผลของ pH โดยการปรับ pH ของซับเปปตินแล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน พบว่าที่ pH 2 4 6 และ 8 ไม่มีผลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ แต่ที่ pH 8 พบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบลดลงครึ่งหนึ่ง เมื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของซับเปปติน JM4-A และ JM4-B ได้แก่ การย่อยด้วยโปรตีโอไลติกเอนไซม์ต่าง ๆ พบว่าซับเปปติน JM4-A และ JM4-B ไม่ถูกทำลายด้วยเอนไซม์โปรเนส E (pronase E) และเปปซิน (pepsin) แต่โปรตีเนส K (protenase K) และทริปซิน (trypsin) มีผลต่อการออกฤทธิ์ของสารทั้งสองชนิด (ตารางที่ 6) เมื่อศึกษาผลของความร้อนต่อการทำงานของซับเปปตินพบว่าทนความร้อนได้สูงถึง 100 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มนาน 30 นาที แต่การยับยั้งจุลินทรีย์ลดลงครึ่งหนึ่งเมื่อบ่มที่ 120 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มนาน 30 นาที และเมื่อศึกษาผลของ pH โดยการปรับ pH ของซับเปปตินแล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน พบว่าที่ pH 2 4 6 และ 8 ไม่มีผลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ แต่ที่ pH 8 พบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบลดลงครึ่งหนึ่ง

ตารางที่ 6 ผลของเอนไซม์ อุณหภูมิ และ pH ต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ของซับเปปติน (Wu และคณะ, 2005)

Treatment	Inhibitory activities (AU/mL)	
	Subpeptin JM4-A	Subpeptin JM4-B
Enzymes		
Control	1280	1280
Pronase E	1280	1280
Pepsin	1280	1280
Proteinase K	640	640
Trypsin	320	640
Temperature (°C)		
Control	1280	1280
20	1280	1280
40	1280	1280
60	1280	1280
100	1280	1280
120	640	640
pH		
Control	1280	1280
2	1280	1280
4	1280	1280
6	1280	1280
8	1280	1280
10	640	640

2.7 ความจำเป็นในการศึกษาวิจัยเพื่อหาสารต้านจุลชีพชนิดใหม่

2.7.1 ผลข้างเคียงของยาปฏิชีวนะ

ยาปฏิชีวนะบางชนิดมีผลข้างเคียงที่ไม่ต้องการ เช่น การใช้อะมิโนไกลโคไซด์ในความเข้มข้นสูงมีผลทำลายไต ทำให้ระบบรับรู้ผิดปกติและหูหนวกได้ หรือยาปฏิชีวนะบางชนิดมีข้างเคียงในระยะยาว เช่น คลอแรมเฟนิคอลทำให้เกิดโรค aplastic anemia (Nester และคณะ, 2004) หรือทำให้แพ้ยา (antibiotic allergy) เช่น ผู้ที่แพ้ยาแอมพิลินจะเป็นผื่นคันและลมพิษ (Gruchalla และคณะ, 2006) เป็นต้น

2.7.2 การดื้อยาปฏิชีวนะ

เนื่องจากการใช้ยาปฏิชีวนะผิดวิธี เช่น ใช้ในปริมาณที่มากเกินไปทำให้จุลินทรีย์ก่อโรคมักมีการพัฒนาเพื่อต่อต้านกลไกการทำงานของยาปฏิชีวนะ (Oscariz และคณะ, 1999) เช่น *Streptococcus pneumoniae* เป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคปอดบวมในผู้ใหญ่สามารถทำลายได้ด้วยยาเพนิซิลิน แต่ในปัจจุบัน *S. pneumoniae* บางสายพันธุ์ดื้อต่อยาเพนิซิลินเพราะตัวมันมีการเปลี่ยนแปลงยีนบางส่วนเพื่อลดตำแหน่งที่จับของเพนิซิลินกับตัวเซลล์ (penicillin binding protein) (Nester และคณะ, 2004)

2.7.3 มีโรคเกิดขึ้นใหม่

จากการที่จุลินทรีย์ดื้อต่อยาปฏิชีวนะทำให้เกิดโรคขึ้นใหม่ เช่น Necrotizing otitis externa เป็นโรคติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* เป็นโรคติดเชื้อที่หูชั้นนอกแล้วลามไปถึงฐานกะโหลก (skull base) ทำให้การควบคุมกระบวนการเมตาบอลิซึมผิดปกติเป็นอันตรายถึงตายได้ (Peltier J., 2004)

2.8 การนำสารต้านจุลชีพไปใช้ประโยชน์ (Rai University, 2006)

2.8.1 รักษาโรค เช่น รักษาโรคติดเชื้อต่าง ๆ โรคมะเร็ง

2.8.2 ควบคุมโรคพืช การใช้สารปฏิชีวนะเพื่อควบคุมโรคพืชมีข้อดีกว่าการใช้สารเคมีหลายประการ คือ ที่ความเข้มข้นต่ำมีความเป็นพิษเล็กน้อยต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและแมลงที่มีประโยชน์และสลายตัวได้เร็ว

2.8.3 การถนอมอาหาร เช่น ไพมาริซิน (pyrimacin) เป็นสารที่ใช้ฆ่าเชื้อราที่ผิวหน้าอาหาร ไทโลซิดีน (tyrocidin) สามารถทำลาย *Bacillus* ได้ดี และในจีนสามารถทำลาย *Clostridium* ได้ดีจึงนิยมใช้คู่กันในโรงงานอาหารกระป๋อง

2.8.4 การใช้เป็นสารส่งเสริมการเจริญเติบโตและใช้เป็นยารักษาโรคสัตว์ การเติมสารปฏิชีวนะลงในอาหารสัตว์ปริมาณเล็กน้อย (1-10 มก/กก อาหารสัตว์) ในระดับที่ต่ำกว่าที่ใช้ในการ

รักษาโรค จะช่วยเร่งการเจริญเติบโตของสัตว์ได้ เพราะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของไมโครฟลอรา (microflora) ในทางเดินอาหารของสัตว์

2.8.5 การวิจัยทางด้านชีวเคมีและชีววิทยาระดับโมเลกุล ในปัจจุบันมีการใช้สารปฏิชีวนะช่วยในการคัดเลือกเซลล์ต่างๆ ในงานวิจัยทางด้านชีวเคมีและชีววิทยาระดับโมเลกุลอย่างกว้างขวาง ทำให้สามารถศึกษาหน้าที่ต่าง ๆ ของเซลล์ เช่น กระบวนการสร้างดีเอ็นเอ เป็นต้น สารที่นิยมใช้คือ คลอแรมเฟนิคอลลอ แอมพิซิลลิน

ในงานวิจัยนี้คัดกรอง *Bacillus* spp. สายพันธุ์ที่ผลิตสารต้านจุลชีพที่ยับยั้งจุลินทรีย์จำนวน 5 สายพันธุ์เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่ดีที่สุด 1 สายพันธุ์ โดยมีจุลินทรีย์ทดสอบเป็นแบคทีเรียแกรมบวก 3 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Micrococcus luteus* แบคทีเรียแกรมลบ 5 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 25922 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 *Enterobacter* sp. *Klebsiella* sp. และ *Serratia* sp. ยีสต์ 2 ชนิด ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Candida albicans* และราเส้นใย 3 ชนิด ได้แก่ *Aspergillus oryzae* *Alternaria* sp. และ *Fusarium* sp. ศึกษาปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของสารต้านจุลชีพที่ผลิตได้จากสายพันธุ์ที่คัดเลือก จำแนกสปีชีส์ของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่ศึกษาด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ การสกัดแยกให้สารต้านจุลชีพบริสุทธิ์แล้วศึกษาลักษณะสมบัติบางประการของสารต้านจุลชีพที่สังเคราะห์โดย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่คัดเลือกซึ่งอาจมีความเป็นไปได้ที่จะได้สารต้านจุลชีพชนิดใหม่ที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคต่างๆ ได้ต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์

- 3.1.1 เครื่องชั่งละเอียด รุ่น A200S
- 3.1.2 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
- 3.1.3 ตู้ถ่ายเชื้อแบบ lamina flow
- 3.1.4 ตู้อบฆ่าเชื้อ ตู้อบแห้ง และหม้ออบฆ่าเชื้อ
- 3.1.5 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (psycrotherm incubator shaker) รุ่น G27
- 3.1.6 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ของบริษัท Beckman
- 3.1.7 เครื่องปั่นเหวี่ยงอุณหภูมิต่ำ Avanti รุ่น J-301 ของบริษัท Beckman และเครื่องปั่นเหวี่ยงอุณหภูมิต่ำ Mikro รุ่น 22R
- 3.1.8 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
- 3.1.9 ไมโครปิเปตและทิปขนาด 20 100 200 1,000 และ 5,000 มล.
- 3.1.10 ชุดอุปกรณ์ระเหยแห้ง ได้แก่ เครื่องระเหยแห้งสุญญากาศ (rotary vacuum evaporator) เครื่องควบคุมสุญญากาศ อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ อุปกรณ์หล่อเย็น และคอลัมน์ควบแน่น (condenser)
- 3.1.11 ชุดอุปกรณ์ทำ agarose gel electrophoresis ได้แก่ ถาดเทเจล ด้งใส่สารละลายแผ่นหวี และแหล่งจ่ายไฟ
- 3.1.12 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง UV / VIS spectrophotometer ยี่ห้อ Perkin-Elmer Lambda และหลอดใส่ตัวอย่าง (cuvette)
- 3.1.13 แผ่น TLC หลอดแคปป์ลารี และด้งใส่ตัวทำละลาย
- 3.1.14 เครื่องวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุล (Mass spectrometer)
- 3.1.15 เครื่อง Oxford Model YH400 spectrometer เพื่อศึกษา Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR)
- 3.1.16 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง spectrophotometer และหลอดใส่ตัวอย่าง (cuvette)
- 3.1.17 ชุดอุปกรณ์ทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้แก่ คอลัมน์แก้ว จุกแก้ว ขาดังและที่จับ

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 ทริปโทน (tryptone)
- 3.2.6 ผงวุ้น
- 3.2.7 น้ำตาลกลูโคส
- 3.2.8 โซเดียมคลอไรด์
- 3.2.9 เอทิลอะซิเตท
- 3.2.10 เมทานอล
- 3.2.11 กรดเอทิลีนไดอะมีนเตตราอะซิติก (ethylenediaminetetraacetic acid : EDTA)
- 3.2.12 ทริสมา เบส (Trisma base)
- 3.2.13 เอทานอล และเอบโซลูทเอทานอล (absolute ethanol)
- 3.2.14 เฮกเซน
- 3.2.15 เอทิลอีเทอร์
- 3.2.16 โซเดียมไฮดรอกไซด์
- 3.2.17 คลอโรฟอร์ม
- 3.2.18 วานิลลิน (vanillin)
- 3.2.19 กรดไฮโดรคลอริก
- 3.2.20 กลีเซอรอล
- 3.2.21 ผงชิลิกา

3.3 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา

จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้พบแบคทีเรียที่ผลิตสารต้านจุลชีพ ได้แก่ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ K-01 K-02 K-03 K-05 และ K-08 ซึ่งแยกและจำแนกจีโนมโดย จิราพร จิราพงษ์ (2545)

ในการงานวิจัยนี้ได้คัดกรอง *Bacillus* spp. จำนวน 5 สายพันธุ์ดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้นเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถผลิตสารต้านจุลชีพได้ดีเพื่อนำมาศึกษาในขั้นต่อไป โดยใช้จุลินทรีย์ทดสอบ (test organism) ดังต่อไปนี้

- แบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Micrococcus luteus*
- แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 25922 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 *Enterobacter* sp. *Klebsiella* sp. และ *Serratia* sp.
- ยีสต์ ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Candida albicans*
- ราเส้นใย ได้แก่ *Aspergillus oryzae* *Fusarium* sp. และ *Alternaria* sp.

3.3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับ *Bacillus* spp. ได้แก่ อาหารเหลวนิวตริเยน (Nutrient broth : NB) อาหารแข็งนิวตริเยน (Nutrient agar : NA) อาหารเหลวลูเรีย (Luria broth : LB) อาหารแข็งลูเรีย (Luria agar : LA) อาหารเหลวทริปติเคสซอย (Trypticase Soy Broth : TSB) และอาหารแข็งทริปติเคสซอย (Trypticase Soy agar : TSBA) (ภาคผนวก ก)

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับแบคทีเรียทดสอบ ได้แก่ อาหาร NB และอาหาร NA อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับยีสต์ และรา ได้แก่ อาหารเหลวยีสต์มอลต์ (Yeast-Malt broth : YM) อาหารแข็งยีสต์มอลต์ (Yeast-Malt agar : YMA) และอาหารแข็งโพเตโตเด็กโตรส (Potato Dextrose agar : PDA) (ภาคผนวก ก)

3.3.3 การเก็บรักษาจุลินทรีย์

3.3.3.1 การเก็บรักษาแบคทีเรีย

ก. แบคทีเรียทดสอบ

เขียนแบคทีเรียมาเลี้ยงลงบนอาหารแข็งลาดเอียง NA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม. แล้วเททับด้วย 15% กลีเซอรอลที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ -20 องศาเซลเซียส

ข. แบคทีเรีย *Bacillus* sp.

เจียแบคทีเรียมาเลี้ยงลงบนอาหารแข็งลาดเอียง LB แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม. แล้วเททับด้วย 15% กลีเซอรอลที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ -20 องศาเซลเซียส

3.3.3.2 การเก็บรักษายีสต์

เจียยีสต์มาเลี้ยงลงบนอาหารแข็งลาดเอียง YMA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม. แล้วเททับด้วย 15% กลีเซอรอลที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อและนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ -20 องศาเซลเซียส

3.3.3.3 การเก็บรักษาราสีไย

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

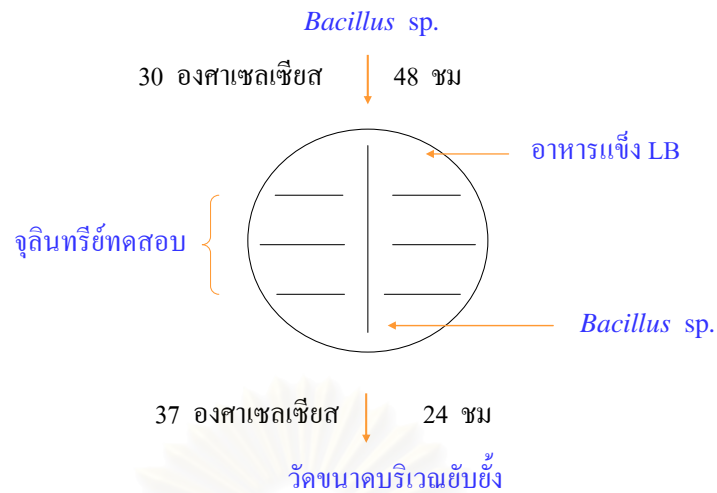
3.3.4 การคัดกรอง *Bacillus* spp. สายพันธุ์ที่ผลิตสารต้านจุลชีพที่มีผลยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดี

จิราพร จิราพงษ์ (2545) รายงานการแยกและคัดกรองได้ *Bacillus* spp. ทั้ง 5 สายพันธุ์ที่ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ดี ได้แก่ K-01 K-02 K-03 K-05 และ K-08 โดยเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 ชม. แล้วศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ดีที่สุดโดยใช้วิธี cross streak (โดยจุลินทรีย์ทดสอบที่ใช้ คือ แบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *B. subtilis* *S. aureus* แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *E. coli* และ *P. aeruginosa* ยีสต์ ได้แก่ *S. cerevisiae* และ *C. tropicalis* และราสีไย ได้แก่ *A. oryzae*)

ในขั้นตอนการศึกษาเพื่อคัดกรอง *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ดี เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป มีวิธีการศึกษาดังต่อไปนี้

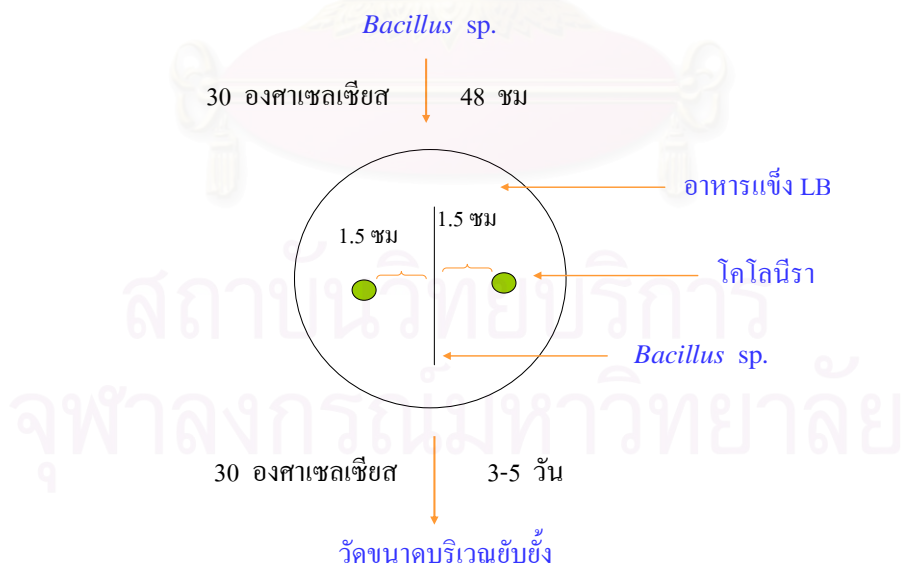
3.3.4.1 เจีย *Bacillus* sp. เชื้อบริสุทธิ์มาซิดเป็นแนวยาวกลางจานอาหารแข็ง LB นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชม.

3.3.4.2 จีจุลินทรีย์ทดสอบในแนวตั้งฉากให้ชิดกับแนวการเจริญของ *Bacillus* sp. แต่ไม่ให้ตัดกับแนวการเจริญนั้น (รูปที่ 16) สำหรับแบคทีเรียนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และสำหรับยีสต์บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม. บันทึกผลการยับยั้ง



รูปที่ 16 การศึกษาการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบที่เป็นแบคทีเรียและยีสต์โดย *Bacillus* spp.

สำหรับราเส้นใยซึ่งใช้เวลาในการเจริญนานกว่าแบคทีเรียและยีสต์ทำการศึกษา โดยเลี้ยงราเส้นใยบนอาหาร PDA นาน 3-5 วัน แล้วตัดชิ้นอาหารบริเวณริมโคโลนีขนาด 8 มม. (Kim และ Chung, 2004) นำมาวางห่างจากแนวการเจริญของ *Bacillus* sp. เท่ากับ 1.5 ซม. (รูปที่ 17) จากนั้นนำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน บันทึกผลการยับยั้ง



รูปที่ 17 การศึกษาการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบที่เป็นราเส้นใยโดย *Bacillus* spp.

3.3.5 การศึกษาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เหมาะสมต่อการสร้างสารต้านจุลชีพที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ K-05

3.3.5.1 เตรียมหัวเชื้อ โดยเจียเชื้อบริสุทธิ์แล้วฉีดลงบนอาหารแข็ง NA LB และ TSB นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (จิราพร จิราพงษ์, 2542) เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นถ่ายเชื้อลงในขวดอาหารที่บรรจุอาหาร NB LB (ภาคผนวก ก) (Yu และคณะ, 2002) และ TSB (ภาคผนวก ก) (Milner และคณะ, 1996) ขวดละ 50 มล. ที่บรรจุอยู่ในขวดทดลองขนาด 250 มล. นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 ชม.

3.3.5.2 ถ่ายหัวเชื้อ 4 มล. ($OD_{660} = 0.500$) ที่ได้จากอาหารเหลวแต่ละชนิดใส่ลงในขวดทดลอง ขนาด 250 มล. ที่บรรจุอาหารเหลวชนิดเดิมขวดละ 50 มล. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชม. เก็บน้ำหมัก (culture broth) ทุก 12 ชม. แยกเซลล์ออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใส (supernatant) ที่ได้มาทดสอบทางชีววิธี (bioassay) กับจุลินทรีย์ทดสอบด้วยวิธี paper disc diffusion (Briazani และ Brandelli, 2002)

3.3.6 การศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์โดยสารต้านจุลชีพด้วยวิธี paper disc diffusion

3.3.6.1 การเตรียมจุลินทรีย์ทดสอบที่เป็นแบคทีเรีย

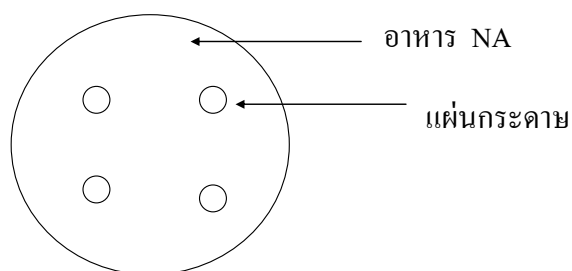
เลี้ยงแบคทีเรียทดสอบบนอาหาร NA เป็นเวลา 24 ชม. ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วเจียใส่ในหลอดทดลองซึ่งบรรจุอาหาร NB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชม. จากนั้นวัดความขุ่นให้ได้ค่า OD_{625} เท่ากับ 0.10

3.3.6.2 การเตรียมจุลินทรีย์ทดสอบที่เป็นยีสต์

เลี้ยงยีสต์ทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YMA เป็นเวลา 24 ชม. ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้วเจียใส่ในหลอดทดลองซึ่งบรรจุอาหาร YMB บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชม. จากนั้นวัดความขุ่นให้มีค่า OD_{625} เท่ากับ 0.10

3.3.6.3 การศึกษาการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ

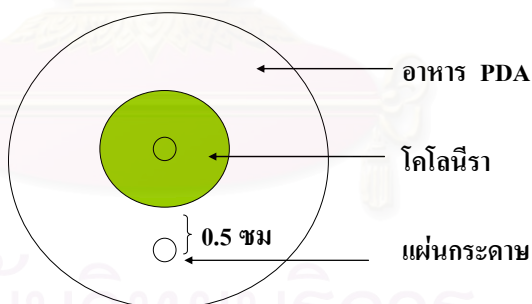
ใช้สำลีพันปลายไม้จุ่มหัวเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อตามวิธีในข้อ 6.1 และ 6.2 เกลี่ยลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (อาหารสำหรับแบคทีเรีย และยีสต์ ได้แก่ อาหาร NA และ YMA ตามลำดับ) หมุนจานอาหารประมาณ 90 องศาแล้วเกลี่ยเชื้อให้ทั่วจาน จากนั้นเปิดสารทดสอบ 100 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่นกระดาษกลม (paper disc) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วนำแผ่นกระดาษนั้นไปวางบนจานทดสอบ กดเบา ๆ ให้แผ่นกระดาษแนบกับผิวอาหาร (รูปที่ 18) สำหรับแบคทีเรียนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชม. และยีสต์บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชม. ตามลำดับ บันทึกผลการยับยั้ง



รูปที่ 18 การศึกษาการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบที่เป็นแบคทีเรียหรือยีสต์โดยสารต้านจุลชีพที่ได้จาก *Bacillus* sp. K-05 โดยวิธี paper disc diffusion

3.3.6.4 การเตรียมจุลินทรีย์ทดสอบที่เป็นราเส้นใย

เลี้ยงรบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน เจาะชิ้นวุ้นที่บริเวณริมโคโลนี แล้ววางลงบนกลางจานอาหารใหม่ (บรรจุอาหาร PDA) (Bernal และคณะ, 2002) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน แล้ววางแผ่นกระดาษกลมที่มีสารทดสอบห่างจากขอบโคโลนีรา 0.5 เซนติเมตร (รูปที่ 19) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน บันทึกผลการยับยั้ง



รูปที่ 19 การศึกษาการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบที่เป็นราเส้นใยโดยสารต้านจุลชีพที่ได้จาก *Bacillus* sp. K-05 โดยวิธี paper disc diffusion

3.3.7 การศึกษาปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของสารต้านจุลชีพ

จากการศึกษาในข้อ 3.3.6 พบว่าเมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. K-05 ในอาหาร LB ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 60 ชม. ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบได้ดีกว่าตัวอย่างส่วนใสที่เวลาอื่น ดังนั้นในการศึกษาขั้นต่อไปจึงเลี้ยง *Bacillus* sp. K-05 เป็นระยะเวลานาน 60 ชม.

3.3.7.1 ระยะเวลาการเก็บ

ถ่ายหัวเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ K-05 ปริมาตร 4 มล. ใส่ในอาหาร LB ปริมาตร 50 มล. ที่บรรจุในขวดทดลองขนาด 250 มล. นำไปเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 ชม. เก็บน้ำหมักที่ 60 ชม. แยกเซลล์ออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนใสไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 เดือน และนำมาทดสอบกับจุลินทรีย์ทดสอบตามวิธีในข้อ 3.3.6 ทุก ๆ 1 เดือน

3.3.7.2 ความร้อน

ถ่ายหัวเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ K-05 ปริมาตร 4 มล. ใส่ในอาหาร LB ปริมาตร 50 มล. ที่บรรจุในขวดทดลองขนาด 250 มล. นำไปเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 ชม. เก็บน้ำหมักที่เวลา 60 ชม. แยกเซลล์ออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อที่เวลา 60 ชม. ไปได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 60 80 100 และ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำมาทดสอบกับจุลินทรีย์ทดสอบตามวิธีการทดลองข้อ 3.3.6

3.3.8 การจำแนกสปีชีส์ของ *Bacillus* sp. K-05

3.3.8.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA) (Cai and Wolk, 1990)

เลี้ยง *Bacillus* sp. K-05 ในอาหาร LB ปริมาตร 50 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าที่ 30 องศาเซลเซียส 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 9 ชม. จากนั้นปั่นแยกเซลล์ที่ 12,000 รอบต่อนาที 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ล้างเซลล์และพอลิแซคคาไรด์ด้วย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ จากนั้นปั่นแยกเซลล์ที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสทิ้งแล้วเติมทีอีบัฟเฟอร์ 400 ไมโครลิตร ใส่เม็ดแก้ว 0.15 กรัม และ 10% โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ปั่นเบา ๆ 1 นาที จุ่มน้ำแข็ง ทำซ้ำ 10 ครั้ง ปั่นแยกเซลล์ที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ดูดส่วนใสขึ้นบนใสในหลอดเอพเพนคอฟใหม่และเติมสารละลายฟีนอลต่อคลอโรฟอร์มต่อไอโซอามิลแอลกอฮอล์ (phenol : CH₃Cl : isoamyl alcohol = 25 : 24 : 1) ปริมาตร 1 ต่อ 1 คั่วหลอดไปมาเบา ๆ จะเกิดสีขาวขุ่น จากนั้น

ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส และดูดส่วนใสขึ้นบนใสในหลอดแอฟเฟนดรอฟใหม่ แล้วเติม CH_2Cl_2 : isoamyl alcohol (24 :1) ปริมาตร 1 ต่อ 1 ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เติมนสารละลายโซเดียมอะซิเตท 3 โมลาร์ ปริมาตร 0.1 เท่า ผสมกับเอทิลเอทานอล ปริมาตร 2.5 เท่า เก็บไว้ที่ -70 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 10 นาที เพื่อตกตะกอน DNA จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% เอทานอล 300 ไมโครลิตร ละลายตะกอน DNA ในน้ำกลั่น 20 ไมโครลิตร วัดค่า OD_{260} และ OD_{280} กำหนดความเข้มข้นของ DNA โดยใช้วิธีมาตรฐานซึ่งกำหนดให้ OD_{260} เท่ากับ 1.0 มีปริมาณ DNA 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บ DNA ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ตรวจสอบคุณภาพของ DNA โดยใช้วิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Agarose Gel Electrophoresis)

3.3.8.2 การแยกดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Agarose gel electrophoresis)

อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเป็นการทำเพื่อตรวจสอบคุณภาพของ DNA โดยใช้ 0.8% Agarose Gel Electrophoresis และตรวจสอบคุณภาพของผลิตภัณฑ์ PCR โดยใช้ 1.25% Agarose Gel Electrophoresis การทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสทำได้โดยละลายอะกาโรสเจลในทีอีบัฟเฟอร์ เทลงในถาดและเสียบขั้วหลอดด้านแคโทด (ด้านบน) เมื่อเจลแข็งดีงหัว ออก ใส่ทีอีบัฟเฟอร์ในถัง (electrophoresis chamber) ให้ท่วมเจล ผสม DNA 2 ไมโครลิตร (สำหรับ ผลิตภัณฑ์ PCR ใช้ปริมาณ 10 ไมโครลิตร) และสี (loading dye) 2 ไมโครลิตร หยดลงในช่องหัว เสียบสายไฟโดยให้ขั้วแคโทด (ด้านที่โหลดสาร) อยู่ด้านบน ขั้วแอนโอดอยู่ด้านล่าง เปิดสวิตช์ 55 โวลต์ จนกระทั่งสีเดินทางถึงปลายเจล ปิดสวิตช์นำเจลไปจุ่มในสารละลายอีทีดีเอ็มโบรไมด์ 10 วินาที ตรวจสอบแถบ DNA ด้วยแสงยูวีความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร

3.3.8.3 การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของ 16S rDNA โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction)

ชิ้นส่วน 16S rDNA ของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ K-05 ถูกเพิ่มจำนวนโดยการทำ PCR โดยมีส่วนผสมต่างๆ ตามวิธีการของ Dorsch และ Stackebrandt (1992) ดังนี้ ไพรเมอร์ (ตารางที่ 7) (เข้มข้น 200 นาโนกรัมต่อไมโครกรัม) ปริมาตร 0.25 ไมโครลิตร DNA แม่แบบ 2 ไมโครลิตร แมกนีเซียมคลอไรด์ ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร dNTP 1 ไมโครลิตร ทีอีอาร์บัฟเฟอร์ 5 ไมโครลิตร เอนไซม์แทคทีเอ็นเอพอลิเมอเรส (Taq DNA polymerase) ปริมาตร 0.25 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นปลอดเชื้อปลอดประจุ (เพื่อปรับปริมาตรรวมของสารในปฏิกิริยาให้มีปริมาตรสุทธิเท่ากับ 50 ไมโครลิตร)

ตารางที่ 7 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ใช้ในการการเพิ่มจำนวน 16S rDNA

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')
Forward primer 27F	GAGTTTGATCCTGGCTCAG
Reverse primer 1492R	ACGGCTACCTTGTTACGACTT

นำส่วนผสมที่เตรียมไว้ไปเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermol Cyclor) โดยตั้งโปรแกรม ดังนี้

Hot start	อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที	} 30 รอบ
Denaturation	อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที	
Annealing	อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที	
Extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 วินาที	
Final extension	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 300 วินาที	

ตรวจสอบผลที่ได้โดยดูลายพิมพ์ DNA ตามวิธีการทดลองข้อที่ 3.3.9.2

3.3.8.4 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA

นำผลิตภัณฑ์ PCR ของ 16S rDNA ของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ K-05 ที่ได้จากขั้นตอนที่ 3.3.8.3 ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หน่วยบริการชีวภาพ (BIOSERVICE UNIT, BSU) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) โดยใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ดังแสดงในตารางที่ 8 เพื่อวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ จนครบทั้งสายของ 16S rDNA

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่ใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')
Forward primer 27F	GAGTTTGATCCTGGCTCAG
Reverse primer 343R	CTGCTGCCTCCCGTA
Reverse primer 519R	G(TA)ATTACCGCGGC(TG)GCTG
Reverse primer 787R	CTACCAGGGTATCTAAT
Reverse primer 907R	CCGTCAATTCATTTGAGTTT
Reverse primer 1100R	AGGGTTGCGCTCGTTG
Reverse primer 1385R	CGGTGT(AG)CAAGGCC
Reverse primer 1241R	ACGGCTACCTTGTTACGACTT
Reverse primer 1492R	ACGGCTACCTTGTTACGACTT

3.3.8.5 การวิเคราะห์ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

นำผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ มาเชื่อมต่อลำดับเบสทั้งหมดโดยใช้โปรแกรม BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu>) แล้วนำมารวมกันเพื่อให้ได้ลำดับเบสบนเส้น sense strand ของ 16S rDNA โดยเรียงลำดับจากปลาย 5'-phosphate --> 3'-OH แล้วนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้โปรแกรม NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/>)

3.3.9 การแยกสารต้านจุลชีพที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ K-05 ให้บริสุทธิ์

3.3.9.1 การศึกษาชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมเพื่อการสกัดแยกสารต้านจุลชีพ

ก. เตรียมสารต้านจุลชีพ โดยใส่หัวเชื้อปริมาตร 8 มล. ลงในอาหาร LB ปริมาตร 100 มล. ที่บรรจุในขวดทดลองขนาด 250 มล. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 ชม. เก็บน้ำหมักมาแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้ เครื่องระเหยแห้ง (rotary evaporater) (อุณหภูมิของอ่างน้ำเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส) จนเหลือส่วนใสประมาณ 200 มล. (ส่วนใสเริ่มต้น 2 ลิตร)

ข. นำส่วนใสที่ทำให้เข้มข้นมาสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่

เฮกเซน เอทิลอีเทอร์ และเอทิลอะซิเตท โดยใช้อัตราส่วนระหว่างส่วนใส และตัวทำละลายอินทรีย์ต่าง ๆ อย่างละ 1 ต่อ 1 (โดยปริมาตร) นำสารสกัด ที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้ง เติมตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้สกัด ปริมาณเล็กน้อยลงในสารสกัดเพื่อละลายสารที่สกัดได้ (1 มก./มล.) แล้ว นำมาทดสอบกับจุลินทรีย์ทดสอบด้วยวิธีที่กล่าวมาแล้วในข้อ 3.3.6 โดยมี ชุดควบคุม คือ ตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอีเทอร์ และ เอทิลอะซิเตท ที่หยดลงบนแผ่นกระดาษแล้วทำให้ตัวทำละลายระเหยไป

3.3.9.2 การสกัดแยกสารต้านจุลชีพจาก *Bacillus* sp. K-05 ให้บริสุทธิ์

จากการศึกษาในข้อ 10.1 พบว่าเมื่อสกัดสารต้านจุลชีพด้วยเอทิลอะซิเตท แล้วนำมาทดสอบกับจุลินทรีย์ทดสอบพบว่ามีความบริสุทธิ์ของจุลินทรีย์ทดสอบได้ดีกว่าการสกัดด้วยเฮกเซนและเอทิลอีเทอร์ ดังนั้นจึงใช้เอทิลอะซิเตทเพื่อสกัดสารต้านจุลชีพต่อไป

การเตรียมสารต้านจุลชีพทำได้โดยถ่ายหัวเชื้อ *Bacillus* sp. K-05 ปริมาตร 8 มล. ในอาหาร LB ปริมาตร 100 มล. ที่บรรจุในขวดทดลองขนาด 250 มล. นำไปเลี้ยงในตู้บ่มที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 ชม. เก็บน้ำหมักมาแยก เซลล์ออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้เครื่องระเหยแห้ง (rotary vacuum evaporater) (อุณหภูมิ ของอ่างน้ำ = 37 องศาเซลเซียส) จนเหลือส่วนใสประมาณ 500 มล. (ส่วนใสเริ่มต้น 5 ลิตร) จากนั้นนำส่วนใสที่ทำให้เข้มข้นขึ้นมาสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท โดยใช้อัตราส่วนระหว่างส่วนใสและ เอทิลอะซิเตทเท่ากับ 1 ต่อ 1 จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้ง นำสาร สกัดเอทิลอะซิเตทมาละลายในตัวทำละลายอินทรีย์แล้วนำมาทดสอบกับจุลินทรีย์ทดสอบด้วยวิธีที่ กล่าวมาแล้วในข้อ 3.3.6

3.3.9.3 การวิเคราะห์สารสกัดเอทิลอะซิเตทโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง (Thin Layer Chromatography : TLC)

ละลายสารสกัดเอทิลอะซิเตทที่ได้จากข้อ 3.3.10.2 ในเอทิลอะซิเตท แล้ว หยดลงบนแผ่น TLC โดยมีระบบตัวทำละลาย (solvent system) ที่ใช้เป็นตัวพาให้สารเคลื่อน ได้แก่ 75% เฮกเซนในเอทิลอะซิเตท 50% เฮกเซนในเอทิลอะซิเตท 25% เฮกเซนในเอทิลอะซิเตท 10% เฮกเซนในเอทิลอะซิเตท 100% เอทิลอะซิเตท 5% เมทานอล ในเอทิลอะซิเตท และ 50% เมทานอลในเอทิลอะซิเตท จากนั้นตรวจสอบตำแหน่งของสารที่แยกได้โดยการอังโอไอโอได้น และส่องดูด้วยหลอดยูวีที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร ถ้ามีสารบนแผ่น TLC จะ มองเห็นจุดสีน้ำตาล สีม่วงบนพื้นสีเขียว และสีม่วงเรืองแสงบนพื้นขาว ตามลำดับ

3.3.9.4 การแยกสารสกัดเอทิลอะซิเตทด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

การเตรียมคอลัมน์ ทำได้โดยบรรจุคอลัมน์ด้วยผงซิลิกาขนาด 0.04-0.06 มม. โดยใช้ซิลิกา 50 กรัมต่อสารสกัด 1 กรัม ผสมซิลิกากับเฮกเซนคนให้เข้ากัน ใช้สำลีอุดที่ปลายคอลัมน์เล็กน้อย เทซิลิกาใส่คอลัมน์ แล้วเคาะเบา ๆ ที่ข้างคอลัมน์เพื่อปรับผิวหน้าของผงซิลิกาให้เรียบเสมอกันและทำให้ผงซิลิกาบรรจุแน่นในคอลัมน์ ทิ้งไว้ข้ามคืนเพื่อให้ผงซิลิกาเรียงตัวได้ดี นำสารสกัดเอทิลอะซิเตทคลุกกับซิลิกาใส่ลงในคอลัมน์แล้วชะด้วยระบบตัวพาดังแสดงในตารางที่ 9 จากนั้นเก็บแต่ละส่วน (fraction) ที่แยกได้แล้วนำไป ระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสูญญากาศ นำมาทำ TLC แล้วส่องดูด้วยหลอดยูวีที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร นำส่วนที่มีจุดบนแผ่น TLC ที่ตำแหน่งเดียวกันมารวมกันแล้วทำให้ตัวทำละลายระเหยไป จากนั้นนำไปศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบตามวิธีการทดลองข้อ 3.3.6 โดยใช้ความเข้มข้นเท่ากับ 1 มก./มล.

ตารางที่ 9 ระบบตัวพาที่ใช้ชะสารจากคอลัมน์

ระบบตัวพา	ปริมาตร (มล.)
90% เฮกเซนในเอทิลอะซิเตท	100
80% เฮกเซนในเอทิลอะซิเตท	100
70% เฮกเซนในเอทิลอะซิเตท	100
60% เฮกเซนในเอทิลอะซิเตท	200
55% เฮกเซนในเอทิลอะซิเตท	200
50% เฮกเซนในเอทิลอะซิเตท	100
40% เฮกเซนในเอทิลอะซิเตท	100
35% เฮกเซนในเอทิลอะซิเตท	200
30% เฮกเซนในเอทิลอะซิเตท	200
25% เฮกเซนในเอทิลอะซิเตท	200
เฮกเซนในเอทิลอะซิเตท	100
10% เฮกเซนในเอทิลอะซิเตท	100
100% เอทิลอะซิเตท	100
10% เมทานอลในเอทิลอะซิเตท	100
20% เมทานอลในเอทิลอะซิเตท	100
50% เมทานอลในเอทิลอะซิเตท	100
100% เมทานอล	300

3.3.10 การศึกษาลักษณะสมบัติของสารต้านจุลชีพโดยวิธีวิเคราะห์ทางเคมี

3.3.10.1 UV-VIS spectroscopy

นำส่วนที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เมทานอล เอทานอล เป็นต้น จากนั้นนำมาหา UV-VIS spectrum โดยใช้ UV-VIS Spectrometer ยี่ห้อ Perkin-Elmer Lambda ที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.10.2 Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry (NMR)

ศึกษา $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz) $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz) DEPT COSY HMQC HMBC NOESY และ TOCSY spectra ที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยใช้เครื่อง Varience Model YH400 spectrometer และตัวทำละลาย (Deuterated solvents) ที่ใช้ ได้แก่ คลอโรฟอร์ม (chloroform-d : CDCl_3) เมทานอล (methanol : CD_3OD) และ น้ำ (D_2O)

3.3.10.3 Mass spectrometry (MS)

นำส่วนที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เมทานอล เอทานอล เป็นต้น ศึกษา mass spectrum แบบ high resolution โดยใช้บริการจากหน่วยบริการเครื่องมือเครื่องมือ (BRU) ศูนย์พันธุวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การคัดกรอง *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่ผลิตสารต้านจุลชีพที่มีผลยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดี

Kim และ Chung (2004) แยกจุลินทรีย์จากดินเพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สร้างสารต้านจุลชีพยับยั้ง *Collectotrichu lagenarium* โดยวิธี cross streak พบว่าแยกจุลินทรีย์ได้ทั้งหมด 250 ไอโซเลต แต่มีเพียงไอโซเลตเดียวที่ยับยั้ง *C. lagenarium*

ในงานวิจัยนี้ได้คัดกรอง *Bacillus* spp. สายพันธุ์ K-01 K-02 K-03 K-05 และ K-08 เพื่อศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยวิธี cross streak ตามวิธีการทดลองข้อที่ 3.3.4 พบว่า *Bacillus* spp. สายพันธุ์ K-01 K-02 K-03 K-05 และ K-08 ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทั้งหมด 4 6 1 12 และ 5 ชนิด ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 10 ซึ่งเห็นได้ว่า *Bacillus* sp. K-05 ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้มากกว่าสายพันธุ์อื่น กล่าวคือ *Bacillus* sp. K-05 ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก (รูปที่ 20) ได้แก่ *B. subtilis* ATCC 6633 *S. aureus* ATCC 25923 และ *M. luteus* แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *E. coli* ATCC 25922 *Serratia* sp. *Klebsiella* sp. และ *Enterobacter* sp. สำหรับยีสต์ พบว่า *Bacillus* sp. K-05 ยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* และ *S. cerevisiae* ได้ดังแสดงในรูปที่ 21 และยับยั้งราเส้นใย ได้แก่ *A. oryzae* *Fusarium* sp. และ *Alternaria* sp. ดังแสดงในรูปที่ 22

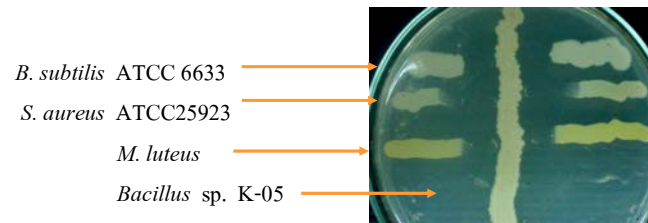
จากการคัดกรอง *Bacillus* spp. จำนวน 5 สายพันธุ์ โดยวิธี cross streak พบว่า *Bacillus* sp. K-05 ยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิดและมีขนาดของบริเวณยับยั้งมากกว่าที่ได้จากสายพันธุ์อื่น ดังนั้นจึงเลือก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ K-05 มาใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

ตารางที่ 10 การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดย *Bacillus* spp. 5 สายพันธุ์ ด้วยวิธี cross streak

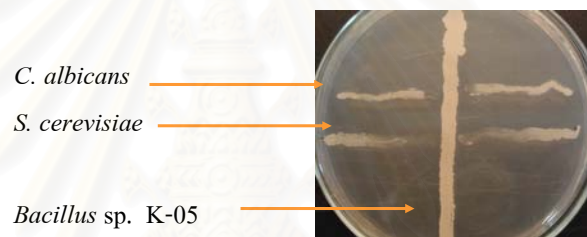
จุลินทรีย์ทดสอบ	<i>Bacillus</i> spp.				
	K-01	K-02	K-03	K-05	K-08
แบคทีเรียแกรมบวก					
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	++	++	-	++++	+
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	++	++	-	+++++	+
<i>M. luteus</i>	-	-	-	++++	-
แบคทีเรียแกรมลบ					
<i>E. coli</i> ATCC 25922	+++	+++	-	+	+++
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter</i> sp.	-	-	-	++	-
<i>Serratia</i> sp.	-	-	-	++	-
<i>Klebisella</i> sp.	-	-	-	++	-
ยีสต์					
<i>S. cerevisiae</i>	-	+	++++	++	+++
<i>C. albicans</i>	++	+	-	++	++++
ราเส้นใย					
<i>A. oryzae</i>	-	+	-	+	-
<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-	+++	-
<i>Alternaria</i> sp.	-	-	-	+++	-

หมายเหตุ - = ไม่มีการยับยั้ง + = บริเวณยับยั้ง = 0.1-0.3 ซม.
 ++ = บริเวณยับยั้ง = 0.4-0.7 ซม. +++ = บริเวณยับยั้ง = 0.8-1.0 ซม.
 ++++ = บริเวณยับยั้ง = 1.1-1.3 ซม. +++++ = บริเวณยับยั้ง > 1.4 ซม.

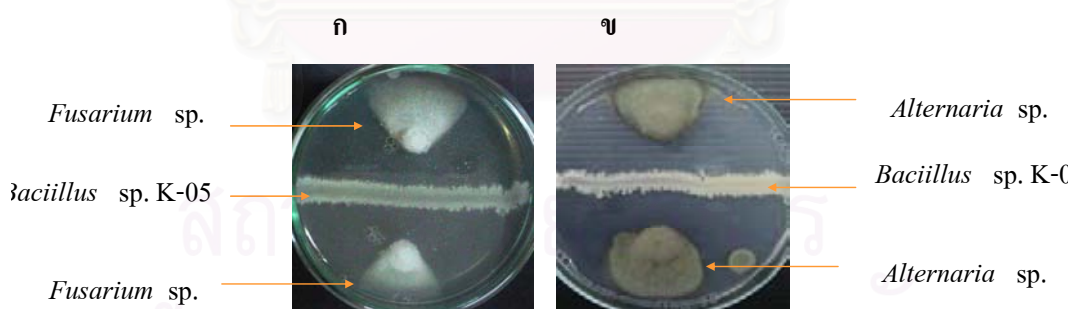
ตัวอย่างแสดงการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดย *Bacillus* sp. K-05 ด้วยวิธี cross streak



รูปที่ 20 การยับยั้งต่อแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *B. subtilis* ATCC6633 *S. aureus* ATCC25923 และ *M. luteus* โดย *Bacillus* sp. K-05



รูปที่ 21 การยับยั้งต่อยีสต์ ได้แก่ *C. albicans* และ *S. cerevisiae* โดย *Bacillus* sp. K-05



รูปที่ 22 การยับยั้งต่อราทดสอบ ได้แก่ (ก) *Fusarium* sp. และ (ข) *Alternaria* sp. โดย *Bacillus* sp. K-05

4.2 การศึกษาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เหมาะสมต่อการสร้างสารต้านจุลชีพที่ผลิตโดย

Bacillus sp. สายพันธุ์ K-05

Milner และคณะ (1996) ศึกษาชนิดของอาหารต่อการสร้างคาโนซามีน (kanosamine) โดยแบคทีเรีย *Bacillus cereus* UW85 ในอาหารเหลวชนิดต่าง ๆ ได้แก่ TSB TSB ผสมเหล็ก 0.5 มิลลิโมลาร์ TSB ผสมฟอสเฟต 100 มิลลิโมลาร์ และ MES (morpholineethanesulfonic acid) พบว่าการสร้างคาโนซามีนเมื่อเลี้ยงในอาหาร TSB TSB ผสมเหล็ก 0.5 มิลลิโมลาร์ แต่ไม่พบว่าการสร้างคาโนซามีนเมื่อเลี้ยงในอาหาร TSB ผสมฟอสเฟต 100 มิลลิโมลาร์ และ MES

Bernal และคณะ (2002) รายงานการสร้างสารต้านจุลชีพที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 3 ชนิด ได้แก่ CPG (กลูโคส 10 กรัมต่อลิตร กรดคาซามิโน 1 กรัมต่อลิตร และเปปโทน 10 กรัมต่อลิตร) CPM (มานิทอล 10 กรัมต่อลิตร กรดคาซามิโน 1 กรัมต่อลิตร และเปปโทน 10 กรัมต่อลิตร) และ CPM ผสมแคลเซียม (มานิทอล 10 กรัมต่อลิตร กรดคาซามิโน 1 กรัมต่อลิตร เปปโทน 10 กรัมต่อลิตร และแคลเซียม 5 กรัมต่อลิตร ($\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$) พบว่าการสร้างสารต้านจุลชีพได้ดีเมื่อเลี้ยงในอาหาร CPM ผสมแคลเซียม CPG และ CPM ตามลำดับ

ในงานวิจัยนี้ศึกษาการผลิตสารต้านจุลชีพที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. K-05 ในอาหารเหลว 3 ชนิด ได้แก่ อาหาร NB อาหาร TSB และอาหาร LB ตามวิธีการทดลองข้อที่ 3.3.5 แล้วนำส่วนใสมาทดสอบกับจุลินทรีย์ทดสอบด้วยวิธี paper disc diffusion ตามวิธีการทดลองที่ 3.3.6 พบว่าเมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. K-05 ในอาหาร NB มีผลยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกชนิดเดียว คือ *B. subtilis* ATCC 6633 โดยพบว่าเริ่มมีการยับยั้งตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 และมีขนาดบริเวณยับยั้งเท่ากับ 20 มม. และตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ถึงชั่วโมงที่ 60 พบว่าการยับยั้งเพิ่มขึ้นเล็กน้อยโดยมีขนาดบริเวณเท่ากับ 25 มม. จากนั้นพบว่าการยับยั้งลดลงเล็กน้อย ดังแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารต้านจุลชีพที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. K-05 เมื่อเลี้ยงในอาหาร NB

จุลินทรีย์ทดสอบ	บริเวณยับยั้ง (มม.)								
	ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ (ชม.)								
	0	12	24	36	48	60	72	84	96
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	-	20	25	25	25	25	22	22	20
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. luteus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Serratia</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. albican</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. oryzae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Alternaria</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่มีการยับยั้ง

เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. K-05 ในอาหาร TSB พบว่ามีการสร้างสารต้านจุลชีพยับยั้ง จุลินทรีย์ทดสอบ 2 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 12 กล่าวคือ สารต้านจุลชีพที่ผลิตได้ตั้งแต่ชั่วโมง ที่ 12 -96 ยับยั้ง *B. subtilis* ATCC 6633 ได้ใกล้เคียงกัน โดยมีบริเวณยับยั้งประมาณ 20 มม. สำหรับการยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923 พบว่ามีการยับยั้งใกล้เคียงกันตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ถึง 96 โดยมีขนาดบริเวณยับยั้งประมาณ 14 มม.

ตารางที่ 12 การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารต้านจุลชีพที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. K-05 เมื่อเลี้ยงในอาหาร TSB

จุลินทรีย์ทดสอบ	บริเวณยับยั้ง (มม.)								
	ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ (ชม.)								
	0	12	24	36	48	60	72	84	96
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	-	18	18	20	20	20	19	19	19
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	-	-	14	14	14	16	12	10	10
<i>M. luteus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Serratia</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. oryzae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Alternaria</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่มีการยับยั้ง

สำหรับการสร้างสารต้านจุลชีพโดย *Bacillus* sp. K-05 ในอาหาร LB พบว่ายับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *B. subtilis* ATCC 6633 *S. aureus* ATCC 25923 และ *M. luteus* แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Serratia* sp. และราเส้นใยทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ *A. oryzae* *Fusarium* sp. และ *Alternaria* sp. โดยเปรียบเทียบกัซชุดควบคุมซึ่งแสดงลักษณะโคโลนีของราเส้นใยเมื่อไม่มีการยับยั้ง (รูปที่ 23) จากตารางที่ 13 พบว่า *Bacillus* sp. K-05 เริ่มสร้างสารต้านจุลชีพตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 และเมื่อนำไปทดสอบกับจุลินทรีย์ทดสอบ พบว่าสารต้านจุลชีพที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อที่ชั่วโมงต่าง ๆ ให้ผลการยับยั้งใกล้เคียงกัน กล่าวคือ มีการยับยั้ง *B. subtilis* ATCC 6633 (รูปที่ 24) *M. luteus* *A. oryzae* (รูปที่ 25) *Fusarium* sp. และ *Alternaria* sp. ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 สำหรับ *S. aureus* ATCC 25923 และ *Serratia* sp. มีการยับยั้งตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 และในการยับยั้ง *B. subtilis* ATCC 6633 โดยสารต้านจุลชีพที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. K-05 ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 มีขนาดบริเวณยับยั้งเท่ากับ 29 มม. และมีการยับยั้งเพิ่มขึ้นเล็กน้อยตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24-96 โดยมีขนาดบริเวณยับยั้งประมาณ 33 มม. การยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923 เริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 โดยมีขนาดบริเวณยับยั้งเท่ากับ 13 มม. และมีการยับยั้งเพิ่มขึ้นเล็กน้อยตั้งแต่ชั่วโมงที่ 36-72 โดยมีขนาดบริเวณยับยั้งเท่ากับ 18 มม. และยับยั้งได้ลดลงเล็กน้อย การยับยั้ง *M. luteus* โดยสารต้านจุลชีพที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. K-05 พบว่ามีการยับยั้งตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 โดยมีขนาดบริเวณยับยั้งเท่ากับ 18 มม. และมีการยับยั้งเพิ่มขึ้นเล็กน้อยตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24-96 โดยมีขนาดบริเวณยับยั้งประมาณ 25 มม. การยับยั้ง *Serratia* sp. มีขนาดบริเวณยับยั้งใกล้เคียงกันสำหรับการยับยั้งราเส้นใยทั้ง 3 ชนิด พบว่ามีค่าใกล้เคียงกันตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12

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

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

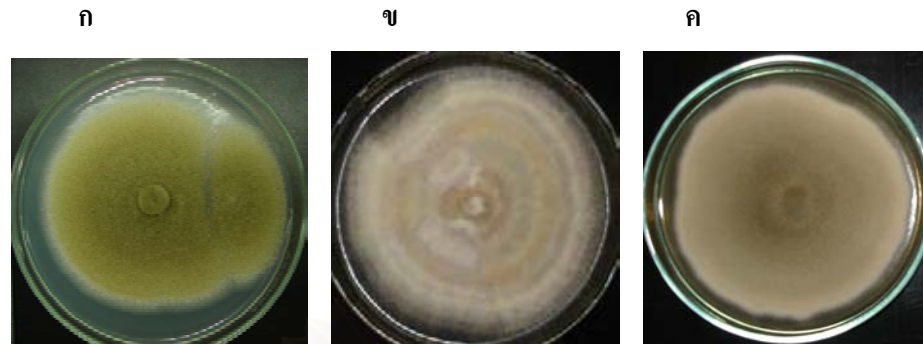
ตารางที่ 13 การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารต้านจุลชีพที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. K-05 เมื่อเลี้ยง
ในอาหาร LB

จุลินทรีย์ทดสอบ	บริเวณยับยั้ง (มม.)								
	ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ (ชม.)								
	0	12	24	36	48	60	72	84	96
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	-	29	33	33	33	34	31	30	30
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	-	-	13	18	18	18	18	14	14
<i>M. luteus</i>	-	18	22	25	25	26	26	26	25
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Serratia</i> sp.	-	-	-	10	16	18	18	18	16
<i>Klebsiella</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
* <i>A. oryzae</i>	-	10,18	10,17	11,17	12,18	15,18	11,18	10,16	10,15
* <i>Fusarium</i> sp.	-	10,25	15,25	15,25	15,25	15,25	15,25	15,25	15,25
* <i>Alternaria</i> sp.	-	10,20	10,25	8,25	8,30	11,30	10,30	10,30	10,30

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่มีการยับยั้ง

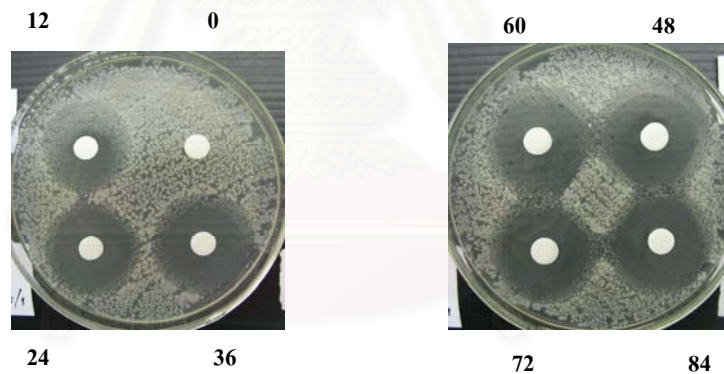
* บริเวณยับยั้ง หมายถึง ระยะห่างจากแผ่นกระดาษ (ด้านกว้าง และด้านยาว)
ถึงขอบโคโลนี (เทียบกับชุดควบคุม)

ตัวอย่างโคโลนีราเส้นใย

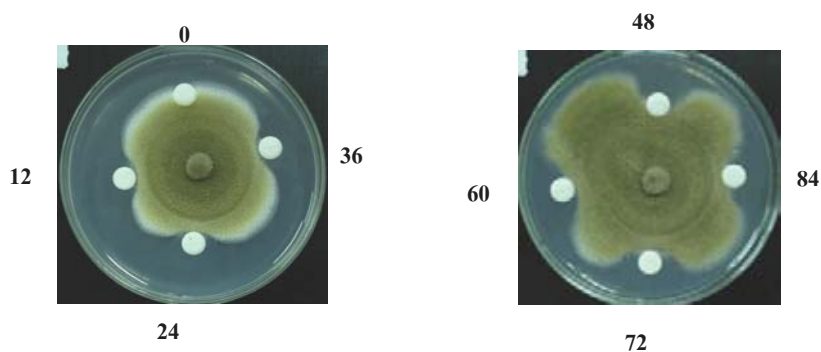


รูปที่ 23 โคโลนีราเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA อายุ 7 วัน (ก) *A. oryzae* (ข) *Fusarium* sp. และ (ค) *Alternaria* sp.

ตัวอย่างแสดงการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยง *Bacillus* sp. K-05 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB โดยวิธี paper disc diffusion



รูปที่ 24 การยับยั้งการเจริญของ *B. subtilis* ATCC6633 โดยสารต้านจุลชีพเมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. K-05 ตั้งแต่ 0-84 ชม.



รูปที่ 25 การยับยั้งการเจริญของ *A. oryzae* โดยสารต้านจุลชีพเมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. สายพันธุ์ K-05 ตั้งแต่ 0-84 ชม.

4.3 การศึกษาปัจจัยบางประการที่มีผลต่อความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์โดยสารต้านจุลชีพ

4.3.1 ระยะเวลาการเก็บ

เมื่อนำส่วนไตที่ได้จากการเลี้ยง *Bacillus* sp. K-05 เป็นระยะเวลานาน 60 ชม. มาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทดสอบกับจุลินทรีย์ทดสอบทุก ๆ 1 เดือน เป็นระยะเวลา 10 เดือน พบว่าความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบค่อย ๆ ลดลงทุกเดือน (ตารางที่ 14) โดยพบว่าไม่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ตั้งแต่เดือนที่ 6-8 ขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์ทดสอบ กล่าวคือ สารต้านจุลชีพยับยั้งการเจริญของ *B. subtilis* ATCC6633 และ *A. oryzae* ได้จนถึงเวลา 5 เดือน (รูปที่ 26) โดยพบว่าสำหรับ *B. subtilis* ATCC6633 มีขนาดบริเวณยับยั้งเริ่มต้นเท่ากับ 27 มม. จากนั้นค่อย ๆ ลดลงและไม่พบการยับยั้งเมื่อเก็บตัวอย่างนาน 6 เดือน เป็นต้นไป สารต้านจุลชีพยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ATCC25923 และ *Fusarium* sp. (รูปที่ 27) ได้จนถึงเวลา 6 เดือน โดยไม่พบการยับยั้งเมื่อเก็บตัวอย่างนาน 7 เดือน เป็นต้นไป สารต้านจุลชีพยับยั้งการเจริญของ *M. luteus* และ *Alternaria* sp. ได้จนถึงเวลา 7 เดือน โดยไม่พบการยับยั้งเมื่อเก็บตัวอย่างนาน 8 เดือน เป็นต้นไป สำหรับ *Serratia* sp. พบว่าสารต้านจุลชีพยับยั้งการเจริญของ *Serratia* sp. ได้จนถึงเวลา 4 เดือน โดยไม่พบการยับยั้งเมื่อเก็บตัวอย่างนาน 5 เดือน เป็นต้นไป

ตารางที่ 14 การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารต้านจุลชีพเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 เดือน

จุลินทรีย์ทดสอบ	บริเวณยับยั้ง (มม.)										
	ระยะเวลาเก็บรักษาน้ำหมัก (เดือน)										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	27	27	27	25	20	15	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	18	18	18	15	15	15	12	-	-	-	-
<i>M. luteus</i>	32	31	32	30	28	25	24	16	-	-	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Serratia</i> sp.	21	17	16	16	10	-	-	-	-	-	-
<i>Klebsella</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. albican</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
* <i>A. oryzae</i>	10,22	8,20	9,22	8,15	8,15	8,10	-	-	-	-	-
* <i>Fusarium</i> sp.	16,34	12,32	10,25	10,23	10,18	10,15	10,15	-	-	-	-
* <i>Alternaria</i> sp.	12,28	12,25	11,21	10,21	10,18	11,18	10,15	10,15	-	-	-

หมายเหตุ

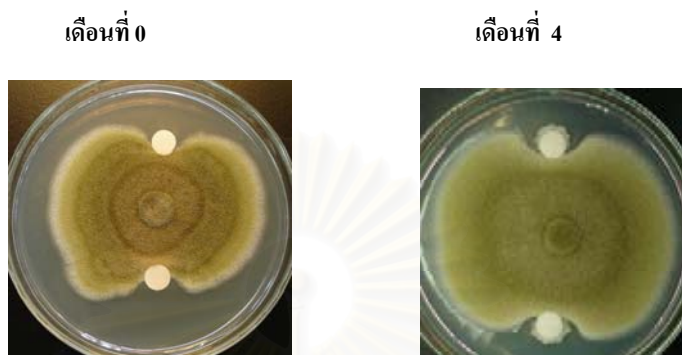
0 คือส่วนใสที่ทำการทดสอบทันที

- หมายถึงไม่มีการยับยั้ง

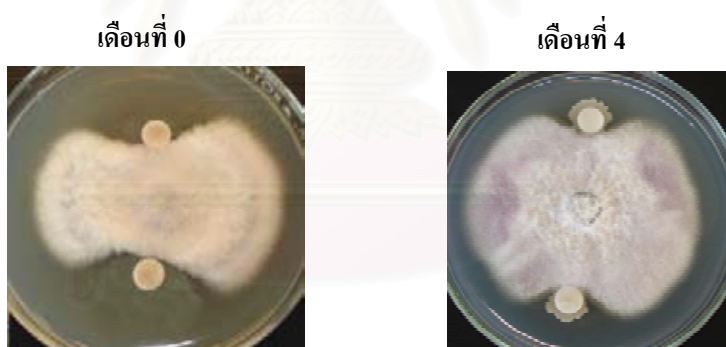
* บริเวณยับยั้ง หมายถึง ระยะห่างจากแผ่นกระดาษ (ด้านกว้าง และด้านยาว)

ถึงขอบโคโลนี (เทียบกับชุดควบคุม)

ตัวอย่างการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารต้านจุลชีพที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. K-05 เมื่อเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส



รูปที่ 26 การยับยั้งการเจริญของ *A. oryzae* โดยสารต้านจุลชีพเมื่อเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 0 และ 4 เดือน



รูปที่ 27 การยับยั้งการเจริญของ *Fusarium* sp. โดยสารต้านจุลชีพเมื่อเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 0 และ 4 เดือน

4.3.2 ความร้อน

Motta และคณะ (2004) คัดแยก *Bacillus* sp. จำนวน 19 สายพันธุ์จากแม่น้ำอะเมซอน แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Brain Heart Infusion (BHI) ที่อุณหภูมิ 31 องศาเซลเซียส แยกเซลล์แล้วนำส่วนใสมารับความร้อนที่อุณหภูมิ 40-100 และ 121 องศาเซลเซียส เป็น

เวลา 15 นาที จากนั้นศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ ได้แก่ *Corynebacterium fimi* NCTC 7547 *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 *B. cereus* ATCC 963437 *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 *S. aureus* ATCC 25923 *E. coli* ATCC 25922 และ *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 พบว่าสารต้านจุลชีพยังคงยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้แม้ว่าได้รับความร้อนถึง 100 องศาเซลเซียส และเมื่อได้รับความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส พบว่ามีเพียงส่วนใสที่ได้จาก *Bacillus* sp. 14 สายพันธุ์เท่านั้นที่ยังคงยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ แต่ส่วนใสที่ได้จาก *Bacillus* sp. อีก 5 สายพันธุ์พบว่าความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบลดลง

ในงานวิจัยนี้เมื่อนำสารต้านจุลชีพที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ K-05 ในอาหาร LB เป็นเวลา 60 ชม. ไปให้ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 60 80 100 และ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 15 นาที และเมื่อนำไปทดสอบกับจุลินทรีย์ทดสอบตามวิธีการทดลองข้อ 3.3.6 พบว่าการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบลดลงเมื่อได้รับความร้อนที่อุณหภูมิสูงขึ้น (ตารางที่ 15) กล่าวคือ ส่วนใสที่ไม่ได้รับความร้อน (ชุดควบคุม) สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ ได้แก่ *B. subtilis* ATCC 6633 *S. aureus* ATCC 25923 *M. luteus* *Serratia* sp. *A. oryzae* *Fusarium* sp. และ *Alternaria* sp. เมื่อส่วนใสได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ ได้แก่ *B. subtilis* ATCC 6633 *S. aureus* ATCC 25923 *A. oryzae* (รูปที่ 28) *Fusarium* sp. และ *Alternaria* sp. และส่วนใสได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส สามารถยับยั้งราเส้นใย *Alternaria* sp. แต่ส่วนใสที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ไม่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทุกชนิด

ตารางที่ 15 การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารต้านจุลชีพที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. K-05 เมื่อได้รับความร้อนที่ 60-121 องศาเซลเซียส

จุลินทรีย์ทดสอบ	บริเวณยับยั้ง (มม.)				
	ชุดควบคุม	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)			
		60	80	100	121
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	22	20	20	-	-
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	14	13	13	-	-
<i>M. luteus</i>	25	-	-	-	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter</i> sp.	-	-	-	-	-
<i>Serratia</i> sp.	15	-	-	-	-
<i>Klebsiella</i> sp.	-	-	-	-	-
<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-
* <i>A. oryzae</i>	8,21	8,20	8,20	-	-
* <i>Fusarium</i> sp.	13,20	8,25	8,20	-	-
* <i>Alternaria</i> sp.	11,38	15,33	15,23	11,36	-

หมายเหตุ ชุดควบคุม คือ ส่วนที่ไม่ได้รับความร้อน

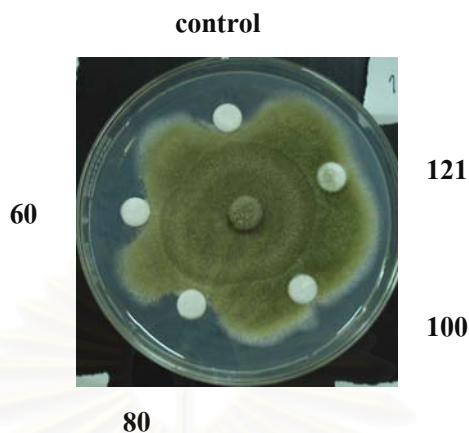
- หมายถึงไม่มีการยับยั้ง

* บริเวณยับยั้ง หมายถึง ระยะห่างจากแผ่นกระดาษ (ด้านกว้าง และด้านยาว)

ถึงขอบโคโลนี (เทียบกับชุดควบคุม)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตัวอย่างแสดงการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารต้านจุลชีพที่ได้รับความร้อนที่ 60 80 100 และ 121 องศาเซลเซียส



รูปที่ 28 การยับยั้ง *A. oryzae* โดยสารต้านจุลชีพที่ได้รับความร้อนที่ 60 80 100 และ 121 องศาเซลเซียส

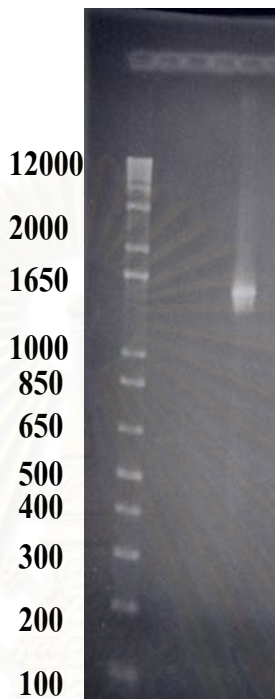
4.4 การจำแนกสปีชีส์ของ *Bacillus* sp. K-05

จากการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Bacillus* sp. K-05 ตามวิธีการทดลองข้อ 3.3.9 แล้วนำไปวิเคราะห์หาความบริสุทธิ์ของสารละลายดีเอ็นเอโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตรด้วย UV-VIS Spectroscopy และนำไปคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอพบว่ามีความเข้มข้นเท่ากับ 1.105 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เมื่อนำสารละลายดีเอ็นเอไปทำ PCR และอิเล็กโทรโฟรีซิสได้ชิ้นส่วนของ 16S rDNA ดังรูปที่ 29

ขนาด DNA marker 16S rDNA ของ *Bacillus* sp. K-05



รูปที่ 29 ชิ้นส่วนของ 16S rDNA ของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ K-05

จากนั้นส่งตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ที่หน่วยบริการชีวภาพ (BIOSERVICE UNIT, BSU) โดยใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ดังแสดงในตารางที่ 9 ในวิธีการทดลองข้อ 3.3.8.4 เพื่อวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ จนครบทั้งสายของ 16S rDNA (ประมาณ 1,400-1,600 เบส) และนำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาหาส่วนที่ซ้อนทับของแต่ละไพรเมอร์แล้วนำมารวมกันเพื่อให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์บนเส้น sense strand ของ 16S rDNA โดยเรียงจากปลาย 5'-phosphate ไป 3'-OH ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA ของ *Bacillus* sp. K-05 ดังแสดงในรูปที่ 30

เมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA กับข้อมูลที่มีรายงานไว้ใน Genbank โดยใช้โปรแกรม Blastn ใน www.ncbi.nlm.nih.gov/blast ได้ผลดังแสดงในภาคผนวก ข จำนวนนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของ *Bacillus* sp. K-05 เท่ากับ 1,407 bp และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลใน GenBank พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายกับ *Bacillus*

subtilis สายพันธุ์ MO4 ที่รายงานไว้ 1,388 นิวคลีโอไทด์ คิดเป็น 99% แสดงว่า *Bacillus* sp. สายพันธุ์ K-05 คือ *Bacillus subtilis*

5'				
TTACGGCTAC	CTTGTTACGA	CTTCACCCCA	ATCATCTGTC	CCACCTTCGG
CGGCTGGCTC	CATAAAGGTT	ACCTCACCGA	CTTCGGGTGT	TACAAACTCT
CGTGGTGTGA	CGGGCGGTGT	GTACAAGGCC	CGGGAACGTA	TCAATCCGCG
GCATGCTGAT	CCGCGATT-C	TAGCGATTCC	AGCTTCACGC	AGTCGAGTTG
CAGACTGCGA	TCCGAACTGA	GAACAGATTT	GTGGGATTGG	CTTAACCTCG
CGGTTTCGCT	GCCCTTTGTT	CTGTCCATTG	TAGCACGTGT	GTAGCCCAGG
TCATAAGGGG	CATGATGATT	TGACGTCATC	CCCACCTTCC	TCCGGTTTTGT
CACCGGCAGT	CACCTTAGAG	TGCCCAACTG	AATGCTGGCA	ACTAAGATCA
AGGGTTGCGC	TCGTTGCGGG	ACGGCTAACA	ACATCTCCGA	CCGAGCTGAC
TACAACCATG	CACCACCTGT	CACTCTGCCC	CCGAAGGGGA	CGTCCTATCT
CTAGGATTGT	CAGAGGATGT	CAAGACCTGG	TAAGGTTCTT	CGCGTTGCTT
CGAATTA AAC	CACATGCTCC	ACCGCTTG TG	CGGGCCCCCG	TCAATTCCTT
TGAGTTTCAG	TCTTGCGACC	G TACTCCCCA	GGCGGAGTGC	TTAATGCGTT
AGCTGCAGCA	CTAAGGGGCG	GAAACCCCT	AACACTTAGC	ACTCATCGTT
TACGGCGTGG	ACTACCAGGG	TATCTAATCC	TGTTTCGCTCC	CCACGCTTTC
GCTCCTCAGC	GTCAGTTACA	GACCAGAGAG	TCGCCTTCGC	CACTGGTGT
CTCCACATC	TCTACGCATT	TCACCGCTAC	ACGTGGAATT	CCACTCTCCT
CCTTCGCACT	CAAGTTCCCC	AGTTTTCAAT	GACCCTCCCC	GGTTGAGCCG
GGGGCTTTCA	CATCAGACTT	AAGAAACCGC	CTGCGAGCCC	TTTACGCCCA
ATAATTCGGG	ACAACGCTTG	CCACCTACGT	ATTACCGCGG	CTGCTGGCAC
GTAGTTAGCC	GTGGCTTTCT	GGTTAGGTAC	CGTCAAGGTG	CCGCCCTATT
TGAACGGCAC	TTGTTCTTCC	CTAACACAG	AGCTTTACGA	TCCGAAAACC
TTCATCACTC	ACGCGGCGTT	GCTCCGTCAG	ACTTTCGTCC	ATGGCGGAAA
ATCCCTACT	GCTGCCTCCC	GTAGGAATCT	GGGCCGGGTC	TCATTCCCAG
GGGGGCGATC	ACCTCTCAGG	TGTTACCAT	CGTGCCTGGG	GGACCGTTAC
CTCACAAC TA	CTAAGGCCCC	GGGTCTTTTG	TAAGTGGTAG	CCGAAGCCAC
C TTTTATGTC	TGAACCATGC	GGTTCAAACA	ACCATCCGGT	ATTAGCCCCG
G TTTCCCGGA	GTTATCCCAG	TCTTACAGGC	AGGTTACCCA	CGTGTTACTC
ACCCGTC CGC	CGCTAACATC	AGGGAGCAAG	CTCCCATCTG	TCCGCTCGAC
TTGCATGTAT	TAGGCACGCC	GCCAGCGTTC	GTCCTGAGCC	AGGGATCAAA
CTCAACGTCC	CCC			
	3'			

รูปที่ 30 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของ *Bacillus* sp. K-05

4.5 การทำสารต้านจุลชีพให้บริสุทธิ์

4.5.1 การศึกษาประสิทธิภาพของสารต้านจุลชีพที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

จากการศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยการสกัดส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยง *B. subtilis* K-05 ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอีเทอร์ และเอทิลอะซิเตท ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 16 กล่าวคือ สารสกัดเฮกเซนไม่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้แสดงว่าเฮกเซนไม่สามารถแยกสารต้านจุลชีพจากส่วนใสได้ สารสกัดเอทิลอีเธอร์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ 2 ชนิด คือ *B. subtilis* ATCC 6633 และ *S. aureus* ATCC 2593 โดยมีขนาดบริเวณยับยั้งเท่ากับ 16 และ 11 มม. ตามลำดับ เมื่อสกัดแยกสารต้านจุลชีพด้วยเอทิลอะซิเตทพบว่ายับยั้งจุลินทรีย์

ทดสอบทุกชนิด 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* มีขนาดบริเวณยับยั้งเท่ากับ 11 มม.. และสารสกัด เอทิลอะซิเตทยับยั้งราเส้นใยทุกชนิด อย่างไรก็ตามไม่พบการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ 2 ชนิด ได้แก่ *E. coli* ATCC 25922 และ *P. aeruginosa* ATCC 27853 ดังนั้นในการแยกสารด้านจุลชีพให้บริสุทธิ์เพื่อนำไปศึกษาสมบัติของสารด้านจุลชีพจึงสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท

ตารางที่ 16 การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารสกัดเฮกเซน อีเทอร์ และเอทิลอะซิเตท

จุลินทรีย์ทดสอบ	บริเวณยับยั้ง (มม.)					
	ตัวอย่างทดสอบ					
	เฮกเซน	สารสกัด เฮกเซน	เอทิลอีเทอร์	สารสกัด เอทิลอีเทอร์	เอทิลอะซิเตท	สารสกัด เอทิลอะซิเตท
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	-	-	-	16	-	19
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	11	-	15
<i>M. luteus</i>	-	-	-	-	-	15
<i>E. coli</i> ATCC25922	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter</i> sp.	-	-	-	-	-	11
<i>Serratia</i> sp.	-	-	-	-	-	12
<i>Klebsiella</i> sp.	-	-	-	-	-	12
<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	-	11
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	11
* <i>A. oryzae</i>	-	-	-	-	-	10,15
* <i>Fusarium</i> sp.	-	-	-	-	-	10,18
* <i>Alternaria</i> sp.	-	-	-	-	-	10,20

หมายเหตุ - = ไม่มีการยับยั้ง

* บริเวณยับยั้ง หมายถึง ระยะห่างจากแผ่นกระดาษ (ด้านกว้าง และด้านยาว)

ถึงขอบ โคลโลนี่ (เทียบกับชุดควบคุม)

4.5.2 การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารต้านจุลชีพในส่วนใส และในสารสกัดเอทิลอะซิเตท

จากผลการศึกษาในข้อที่ 4.6.1 พบว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตทยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ดีที่สุด จึงนำมาใช้เพื่อการแยกสารต้านจุลชีพที่ได้จาก *B. subtilis* K-05 ให้บริสุทธิ์เพื่อศึกษาสมบัติต่าง ๆ ของสารต้านจุลชีพ

เมื่อศึกษาผลการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบระหว่างส่วนใส ส่วนใสเข้มข้น สารสกัดเอทิลอะซิเตท และส่วนใสที่เหลือจากการสกัด พบว่าได้ผลการยับยั้งดังแสดงในตารางที่ 17 กล่าวคือ ส่วนใสยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *B. subtilis* ATCC 6633 *S. aureus* ATCC 25923 *M. luteus* (รูปที่ 30) แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Serratia* sp. ราเส้นใย ได้แก่ *A. oryzae* *Fusarium* sp. และ *Alternaria* sp. ส่วนใสเข้มข้นยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *B. subtilis* ATCC 6633 *S. aureus* ATCC 25923 และ *M. luteus* แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Enterobacter* sp. และ *Serratia* sp. และราเส้นใย ได้แก่ *A. oryzae* *Fusarium* sp. และ *Alternaria* sp. สารสกัดเอทิลอะซิเตทยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *B. subtilis* ATCC 6633 *S. aureus* ATCC 25923 และ *M. luteus* แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Enterobacter* sp. และ *Serratia* sp. ยีสต์ ได้แก่ *S. cerevisiae* และ *C. albicans* และราเส้นใย ได้แก่ *A. oryzae* *Fusarium* sp. และ *Alternaria* sp.

จากตารางที่ 16 พบว่าส่วนใสและสารสกัดเอทิลอะซิเตทสามารถยับยั้ง *Klebsiella* sp. ได้โดยมีขนาดบริเวณยับยั้งใกล้เคียงกันและไม่พบการยับยั้งเมื่อทดสอบด้วยส่วนใส อย่างไรก็ตามพบว่าการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารสกัดเอทิลอะซิเตทมีขนาดบริเวณยับยั้งใกล้เคียงกับส่วนใส เช่น การยับยั้ง *B. subtilis* ATCC 6633 โดยส่วนใส ส่วนใสเข้มข้น และสารสกัดเอทิลอะซิเตทมีขนาดบริเวณยับยั้งเท่ากับ 34 21 และ 21 มม. การยับยั้ง *S. aureus* โดยส่วนใส ส่วนใสเข้มข้น และสารสกัดมีขนาดบริเวณยับยั้งใกล้เคียงกันประมาณ 16 มม.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 17 การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารต้านจุลชีพในส่วนไอและสารสกัดเอทิลอะซิเตท

จุลินทรีย์ทดสอบ	บริเวณยับยั้ง (มม.)				
	ตัวอย่างทดสอบ				
	ส่วนไอ	ส่วนไอ เข้มข้น	เอทิลอะซิเตท	สารสกัด เอทิลอะซิเตท	ส่วนที่เหลือ จากการสกัด
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	34	21	-	20	-
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	18	16	-	16	-
<i>M. luteus</i>	26	28	-	23	23
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter</i> sp.	-	14	-	13	-
<i>Serratia</i> sp.	18	13	-	15	13
<i>Klebsiella</i> sp.	-	12	-	12	15
<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	-
<i>C. albican</i>	-	-	-	-	-
* <i>A. oryzae</i>	10,15	10,17	-	10,15	-
* <i>Fusarium</i> sp.	15,30	10,16	-	10,16	-
* <i>Alternaria</i> sp.	11,30	11,20	-	11,18	-

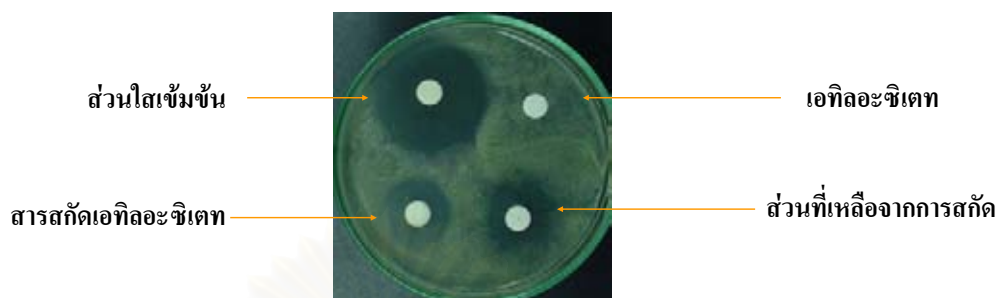
หมายเหตุ - = ไม่มีการยับยั้ง

* บริเวณยับยั้ง หมายถึง ระยะห่างจากแผ่นกระดาษ (ด้านกว้าง และด้านยาว)

ถึงขอบโคโลนี (เทียบกับชุดควบคุม)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

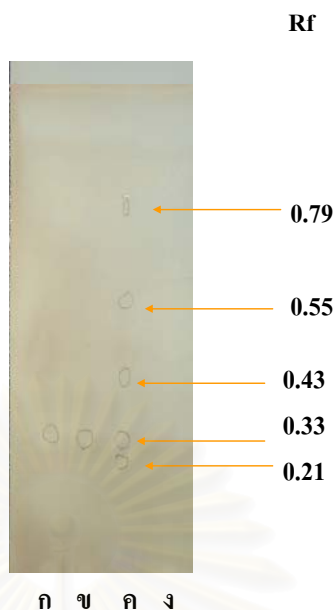
ตัวอย่างการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทดสอบโดยsupernatantเข้มข้น สารสกัดเอทิลอะซิเตท และ ส่วนที่เหลือจากการสกัด



รูปที่ 31 การยับยั้ง *M. luteus* โดยส่วนใสเข้มข้น สารสกัดเอทิลอะซิเตท และส่วนที่เหลือจากการสกัด

4.5.3 การทำสารต้านจุลชีพให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง

จากการนำสารสกัดเอทิลอะซิเตทมาวิเคราะห์โดยวิธี TLC ด้วยระบบตัวทำละลายต่าง ๆ ตามวิธีการทดลองข้อที่ 3.3.9.3 พบว่าไม่สามารถแยกสารสกัดเอทิลอะซิเตทเมื่อแยกสารสกัดโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น 100% เฮกเซน และ 75% เฮกเซนในเอทิลอะซิเตท แต่เมื่อแยกโดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น 5% เมทานอลในเอทิลอะซิเตท พบว่าแยกสารสกัดเอทิลอะซิเตทได้ดีกว่าระบบตัวทำละลายอื่น และเมื่อตรวจสอบโดยการอ้งไอโอไดน พบว่าแยกสารสกัดเอทิลอะซิเตทได้ 5 ตำแหน่ง มีค่า Rf เท่ากับ 0.21 0.33 0.43 0.55 และ 0.79 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 32 พบว่าสารที่มีค่า Rf ประมาณ 0.33 เป็นสารที่พบทั้งในอาหาร LB สกัด ส่วนใสเข้มข้น สารสกัดเอทิลอะซิเตท และส่วนที่เหลือจากการสกัด



รูปที่ 32 โครมาโทแกรมจาก TLC

- ก) อาหาร LB สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท ข) ส่วนใสเข้มข้น
ค) สารสกัดเอทิลอะซิเตท ง) ส่วนที่เหลือจากการสกัด

4.5.4 การทำสารต้านจุลชีพให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

จากการวิเคราะห์สารสกัดเอทิลอะซิเตทด้วยวิธี TLC โดยใช้ระบบตัวพา ตามวิธีการทดลองข้อที่ 3.3.9.3 สามารถนำมาใช้เป็นแนวทางในการเลือกระบบชะสารจากคอลัมน์โครมาโทกราฟี เช่น 100% เฮกเซนไม่สามารถแยกสารได้ ดังนั้นเมื่อชะคอลัมน์ให้เพิ่มความเข้มข้นของตัวชะให้สูงขึ้นได้ แต่ถ้าระบบตัวพานั้นแยกสารได้ดีให้ชะด้วยระบบตัวพานั้นมากกว่าระบบตัวพาอื่น และชะด้วยสารที่มีขั้วต่ำไปสูง ตามวิธีการทดลองข้อที่ 3.3.9.4

เมื่อแยกสารสกัดเอทิลอะซิเตท (0.2518 กรัม) ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี และนำส่วนที่มีตำแหน่งบนแผ่น TLC ตำแหน่งเดียวกันมารวมกัน พบว่าแยกสารได้ทั้งหมด 14 ส่วน และนำส่วนที่แยกได้มาศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบตามวิธีการทดลองข้อที่ 3.3.6 โดยใช้ความเข้มข้น 1 มก./มล.

4.5.5 การศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยส่วนที่แยกได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟี

เมื่อนำส่วนที่แยกได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีมาศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบตามวิธีการทดลองข้อที่ 3.3.6 แยกสารได้ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ 2 ส่วน คือ สารที่ I เป็นสารที่ชะจากคอลัมน์ด้วย 30% เฮกเซนในเอทิลอะซิเตท มีน้ำหนัก 5.11 มก. และจากการทำ TLC โดยใช้ระบบตัวพาเป็น 5% เมทานอลในเอทิลอะซิเตท และตรวจสอบด้วยหลอดยูวีที่ 254 และ 365 นาโนเมตร พบว่าเรืองแสงที่ 254 และ 365 นาโนเมตร

มีค่า $R_f = 0.53$ (รูปที่ 33) เมื่อทำให้ตัวทำละลายระเหยแห้งสารนี้มีลักษณะเป็นสีครีม (รูปที่ 34 ก)

สารที่ II ซึ่งเป็นสารที่ชะจากคอลัมน์ด้วย 25% เฮกเซนในเอทิลอะซิเตท มีน้ำหนัก 3.03 กรัม และจากการทำ TLC โดยใช้ระบบตัวพาเป็น 5% เมทานอลในเอทิลอะซิเตท และตรวจสอบด้วยหลอดยูวีที่ 254 และ 365 นาโนเมตร พบว่าเรืองแสงที่ 254 นาโนเมตร มีค่า $R_f = 0.37$ (รูปที่ 33) เมื่อทำให้ตัวทำละลายระเหยแห้งสารนี้มีลักษณะเป็นสีครีม (รูปที่ 34 ข)



รูปที่ 33 โครมาโทแกรมของสารที่ I และสารที่ II



รูปที่ 34 ลักษณะของ (ก) สารที่ I และ (ข) สารที่ II

เมื่อนำสารที่ I และ II มาศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบพบว่าสารทั้งสองชนิดยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก (ตารางที่ 18) กล่าวคือสารที่ I และสารที่ II ยับยั้ง ได้แก่ *B. subtilis* ATCC 6633 *S. aureus* ATCC 25923 และ *M. luteus* โดยมีขนาดบริเวณยับยั้งใกล้เคียงกัน ประมาณ 16 มม.

ตารางที่ 18 การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยสารที่ I และสารที่ II

จุลินทรีย์ทดสอบ	บริเวณยับยั้ง (มม.)		
	เมทานอล	สารส่วนที่ I	สารส่วนที่ II
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	-	18	17
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	-	15	15
<i>M. luteus</i>	-	15	14
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-
<i>Enterobacter</i> sp.	-	-	-
<i>Serratia</i> sp.	-	-	-
<i>Klebsiella</i> sp.	-	-	-
<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-
<i>C. albican</i>	-	-	-
<i>A. oryzae</i>	-	-	-
<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-
<i>Alternaria</i> sp.	-	-	-

หมายเหตุ - = ไม่มีการยับยั้ง

4.6 การศึกษาลักษณะสมบัติของสารต้านจุลชีพโดยวิธีวิเคราะห์ทางเคมี

จากการศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบโดยส่วนที่แยกได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีพบว่าส่วนที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ คือ สารที่ I และสารที่ II จึงนำสารทั้งสองมาศึกษาลักษณะมาศึกษาสมบัติของสารต้านจุลชีพโดยวิธีวิเคราะห์ทางเคมี

4.6.1 ลักษณะสมบัติของสารที่ I

เมื่อนำส่วนที่ 1 ละลายใน 95% เอทานอล แล้วนำไปหาความยาวคลื่นที่ดูดกลืนได้ดี (λ_{\max}) ด้วย UV-VIS Spectrometer พบว่ามีค่า $\lambda_{\max} = 210.06$ และ 265.30 ดังแสดงในภาคผนวก ข

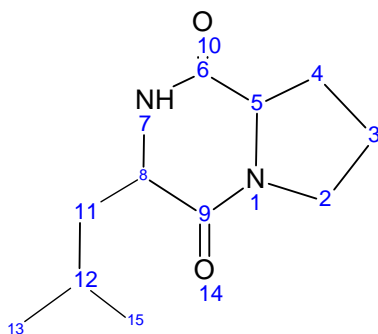
เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างของสารที่ I ด้วยวิธี $^{13}\text{C-NMR}$ พบว่ามี $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum resonance ดังแสดงในภาคผนวก ข และสามารถอ่านผลการวิเคราะห์ได้ดังแสดงในตารางที่ 19 คือ 166.15 (s,C-1) 45.51(t, CH2-3) 22.74 (t,CH2-4) 28.11 (t, CH2-6) 58.98 (d,CH-7) 170.16 (s,C-8) 53.35 (d,CH-10) 38.58 (t,CH2-11) 24.69 (d,CH-12) 21.15 (q,CH3-13) 23.31 (q,CH3-14) จากการวิเคราะห์โครงสร้างของสารที่ I ด้วยวิธี $^1\text{H-NMR}$ พบว่ามี $^1\text{H-}$

NMR spectrum resonance ดังแสดงในภาคผนวก ข และสามารถอ่านผลการวิเคราะห์ได้ดังแสดงในตารางที่ 18 คือ 3.56 (1H,m,H-3) 1.82 (1H,m,H-4) และ 1.92 (1H,m,H-4) 2.06 (1H,m,H-5) และ 2.28 (1H,m,H-5) 4.06 (1H,dd,J = 7.6 และ 8.4 H₂, H-6) 5.84 (1H,brs,NH-8) 3.95 (1H,dd,J = 3.2 และ 9.6 H₂,H-9) 1.46 (1H,ddd,J = 4.8, 9.6, 14.4, H₂,H-10) และ 2.02 (1H,m,H-10) 1.66 (1H,m,H-11) 0.88 (3H,d,J = 6.8, H₂,H-12) 0.93 (3H,d,J = 6.4, H₂, H-13) เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างของสารที่ I ด้วยวิธี H,H correlation spectroscopy (gCOSY) และ heteronuclear multiple bond connectivity (gHMBC) พบว่ามี spectrum ดังแสดงในภาคผนวก ข และจากการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วย ESTOF-MS พบว่าของสารที่ I มีค่า m/z เท่ากับ 211.1446 (M+H⁺) (ภาคผนวก ข) ดังนั้นสารนี้มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 210.1446 ดาลตัน

ตารางที่ 19 การวิเคราะห์ผลโดยวิธี ¹³C-NMR และ ¹H-NMR ของสารส่วนที่ I

ตำแหน่ง	¹³ C-NMR	¹ H-NMR
1	166.15 (s,C-1)	-
2	-	-
3	45.51(t, CH ₂ -3)	3.56 (1H,m,H-3)
4	22.74 (t,CH ₂ -4)	1.82 (1H,m,H-4) และ 1.94 (1H,m,H-4)
5	28.11 (t, CH ₂ -5)	2.06 (1H,m,H-5) และ 2.28 (1H,m,H-5)
6	58.98 (d,H-10)	4.06 (1H,dd,J = 7.6 และ 8.4 H ₂ , H-6)
7	170.16 (s,C-7)	-
8	-	5.84 (1H,brs,NH-8)
9	53.35 (d,CH-9)	3.95 (1H,dd,J = 3.2 และ 9.6 H ₂ ,H-9)
10	38.58 (t,CH ₂ -10)	1.46 (1H,ddd,J = 4.8, 9.6, 14.4, H ₂ ,H-10) และ 2.02 (1H,m,CH ₂ -10)
11	24.69 (d,CH-11)	1.66 (1H,m,H-11)
12	21.15 (q,CH ₃ -12)	0.88 (3H,d,J = 6.8, H ₂ , H-12)
13	23.31 (q,CH ₃ -13)	0.93 (3H,d,J = 6.4, H ₂ , H-13)

จากข้อมูล ¹³C-NMR ¹H-NMR two-dimension NMR (COSY และ HMBC) และ MS spectrum สรุปว่าสารที่ I เป็นสารที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 2 ชนิด ได้แก่ ลิวซีน และโพรลีนต่อกันเป็นวง เรียกว่า cyclo(Leu-Pro) ดังแสดงในรูปที่ 35



รูปที่ 35 โครงสร้างของสารที่ I

4.6.2 ลักษณะสมบัติของสารที่ II

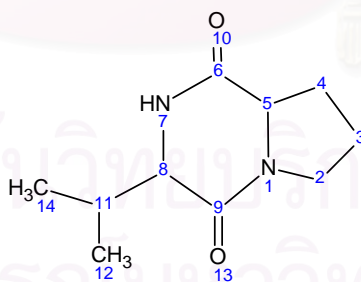
เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างของสารที่ II ด้วยวิธี $^{13}\text{C-NMR}$ พบว่ามี $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum ดังแสดงในภาคผนวก ข และมี $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum resonance ดังแสดงในตารางที่ 20 คือ 164.85 (s, C-1) 45.15 (t, CH₂-3) 22.35 (t, CH₂-4) 29.69 (t, CH₂-5) 28.52 (t, CH₂-6) 58.82 (d, CH-7) 169.95 (s, C-8) 60.33 (d, CH-10) 28.72 (d, CH-11) 16.03 (q, CH₂-12) 19.30 (q, CH₃-13)) จากการวิเคราะห์โครงสร้างของสารที่ II ด้วยวิธี $^1\text{H-NMR}$ พบว่ามี

$^1\text{H-NMR}$ spectrum resonance ดังแสดงในตารางที่ 20 คือ 3.48 (1H, m, H-3) และ 3.56 (1H, m, H-3) 1.84 (1H, m, H-4) และ 1.97 (1H, m, H-4) 1.18 (2H, s, H-5) 2.31 (2H, dt, J = 7.2 และ 12.4, H-6) 4.02 (1H, dd, J = 7.6 และ 8.0, H-2, H-7) 5.72 (1H, brs, NH-9) 3.87 (1H, s, H-10) 2.56 (1H, dq, J = 1.0 และ 7.2 H₂, H-11) 0.84 (3H, d, J = 7.2 H₂, H-12) และ 1.00 (3H, d, J = 7.2 H₂, H-13) เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างของสารที่ II ด้วยวิธี H,H correlation spectroscopy (gCOSY) และ heteronuclear multiple bond connectivity (gHMBC) พบว่ามี spectrum ดังแสดงในภาคผนวก ข จากการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วย ESTOF-MS พบว่ามี spectrum ดังแสดงในภาคผนวก ข ซึ่งสารที่ II มีค่า m/z เท่ากับ 197.1269 (M+H⁺) ดังนั้นสารนี้มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 196.1269 คาลตัน

ตารางที่ 20 การวิเคราะห์ผลโดยวิธี $^{13}\text{C-NMR}$ และ $^1\text{H-NMR}$ ของสารที่ II

ตำแหน่ง	$^{13}\text{C-NMR}$	$^1\text{H-NMR}$
1	164.85 (s,C-1)	-
2	-	-
3	45.15 (t,CH ₂ -3)	3.48 (1H,m,H-3) และ 3.56 (1H,m,H-3)
4	22.35 (t,CH ₂ -4)	1.84 (1H,m,H-4) และ 1.97 (1H,m,H-4)
5	28.52 (t,CH ₂ -5)	2.31 (2H,dt,J = 7.2,12.4 H ₂ , H-5)
6	58.82 (d, CH-6)	4.02 (1H,dd,J = 7.6 และ 8.0, H ₂ , H-6)
7	169.95 (s, C-7)	-
8	-	5.72 (1H,brs,NH-8)
9	60.33 (d, CH-8)	3.87 (1H,s,H-7)
10	28.72 (d, CH-11)	2.56 (1H,dq,J= 1.0 และ 7.2 H ₂ ,H-10)
11	16.03 (q, CH ₃ -11)	0.84 (3H,d,J = 7.2 H ₂ , H-11)
12	19.30 (q, CH ₃ -12)	1.00 (3H,d,J = 7.2 H ₂ , H-12)

จากข้อมูล $^{13}\text{C-NMR}$ $^1\text{H-NMR}$ two-dimension NMR (COSY และ HMBC) และ MS spectrum สรุปว่าสารที่ II สรุปได้ว่าสารที่ II เป็นสารที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 2 ชนิด ได้แก่ วาลีนและโพรลีนต่อกันเป็นวง เรียกว่า cyclo(Val-Pro) ดังแสดงในรูปที่ 36



รูปที่ 36 โครงสร้างของสารที่ II

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 การคัดกรอง *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่ผลิตสารต้านจุลชีพที่มีผลยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ดี

ในงานวิจัยนี้คัดกรอง *Bacillus* sp. จำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus* sp. K-01 K-05 และ K-08 ซึ่งแยกได้จากดินในกรุงเทพฯ *Bacillus* sp. K-03 แยกจากดินในจังหวัดลำปาง และ *Bacillus* sp. K-02 จากดินในจังหวัดชุมพร เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. บนอาหารแข็ง LB แล้วนำมาศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ พบว่า *Bacillus* sp. สายพันธุ์ K-05 สร้างสารต้านจุลชีพยับยั้งทั้งแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *B. subtilis* ATCC6633 *S. aureus* ATCC25923 และ *M. luteus* แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *E. coli* ATCC25922 *Serratia* sp. *Klebsiella* sp. และ *Enterobacter* sp. ยีสต์ ได้แก่ *C. albicans* และ *S. cerevisiae* และราเส้นใย ได้แก่ *A. oryzae* *Fusarium* sp. และ *Alternaria* sp. จึงนำ *Bacillus* sp. K-05 ไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป จากผลการวิจัยของ Yilmax และคณะ (2006) สรุปได้ว่าสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดย *Bacillus* ส่วนใหญ่มีผลต่อแบคทีเรียแกรมบวก ส่วนสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ และสารต้านเชื้อรามีสดส่วนน้อยกว่า (Morikawa และคณะ, 1992; Perez และคณะ, 1993; Eltem และ Ucar, 1988 อ้างถึงใน Yilmax, 2006)

5.2 การศึกษาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เหมาะสมต่อการสร้างสารต้านจุลชีพที่ผลิตโดย

Bacillus sp. สายพันธุ์ K-05

ในงานวิจัยนี้ศึกษาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เหมาะสมสำหรับการสร้างสารต้านจุลชีพของ *Bacillus* sp. K-05 ในอาหารเหลว NB TSB และ LB พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร LB สร้างสารต้านจุลชีพได้ดีกว่าในอาหาร TSB และ NB ตามลำดับ กล่าวคือสารต้านจุลชีพจากอาหาร LB ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *B. subtilis* ATCC 6633 *S. aureus* ATCC 25923 และ *M. luteus* แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Serratia* sp. และราทดสอบทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ *A. oryzae* *Fusarium* sp. และ *Alternaria* sp. แต่ไม่พบการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบบางชนิดคือ *E. coli* ATCC 25922 *Klebsiella* sp. และ *Enterobacter* sp. และไม่พบการยับยั้งยีสต์ที่ใช้เป็นจุลินทรีย์ทดสอบ ได้แก่ *C. albicans* และ *S. cerevisiae* ซึ่งแตกต่างจากเมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. K-05 บนอาหารแข็ง

Martin และ Demain (1980) รายงานว่าฟอสเฟตมีผลยับยั้งการสร้างทุติยภูมิ และกลูโคสยับยั้งการสร้างสารต้านจุลชีพเพราะทำให้เกิดคาตาบอไลต์รีเพรสชัน (catabolite repression)

Audisio และคณะ (2001) ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิต bacteriocin โดย *Enterococcus faecium* สรุปได้ว่าการ complex carbohydrate จากโรงงานน้ำตาล เช่น กากน้ำตาล มีผลให้การผลิต bacteriocin ดีกว่าการใช้น้ำตาลทรายขาว และน้ำตาลทรายแดง

Noaman และคณะ (2004) ศึกษาผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตสารต้านจุลชีพจาก *Synechococcus leopoliensis* ซึ่งยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* พบว่าลิควินเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดสำหรับ antimicrobial activity แหล่งคาร์บอน ได้แก่ ซิเตรท และอะซิเตท ได้พบว่า antimicrobial activity สูงขึ้นมากเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกาแลคโตสร่วมกับแหล่งไนโตรเจน คือ อะลานีน หรือใช้ธาร์บิโนสกับเมไทโอนีน

Todorov และ Dicks (2006) ศึกษาผลของอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ MRS BHI M-17 soy meal และกากน้ำตาล และค่า pH ที่มีผลต่อการผลิต bacteriocin โดย *Lactobacillus plantarums* พบว่ามีการสร้าง bacteriocin ได้ดีในอาหาร MRS

ในงานวิจัยนี้เมื่อศึกษาการสร้างสารต้านจุลชีพในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวแล้วนำมาทดสอบกับจุลินทรีย์ทดสอบโดยวิธี paper disc diffusion พบว่าจำนวนจุลินทรีย์ทดสอบที่ถูกยับยั้งน้อยกว่าทดสอบด้วยวิธี cross streak อาจมีสาเหตุมาจากปริมาณสารต้านจุลชีพในส่วนใสมีน้อยกว่าสารต้านจุลชีพที่มีอยู่ในอาหารแข็งบริเวณโดยรอบโคโลนีของ *Bacillus* sp. K-05 หรืออาจเป็นไปได้ว่าเมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. K-05 บนอาหารแข็งร่วมกับจุลินทรีย์ทดสอบมี “antagonistic effect” (Basha S. และ Ulaganathan, 2002) จึงมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบได้หลายชนิด

เมื่อนำส่วนใสมาศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ พบว่าเริ่มมีการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 และค่อย ๆ เพิ่มขึ้นจนคงที่ในชั่วโมงที่ 60 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Katz และ Demain (1977) ซึ่งสรุปได้ว่าแม้ว่าสารต้านจุลชีพเป็นสารทุติยภูมิที่สร้างขึ้นในช่วงปลายของระยะเพิ่มจำนวนแบบทวีคูณ (logarithum phase) แต่สามารถตรวจพบได้ตั้งแต่ระยะเริ่มต้นของการเจริญ (very early growth stages) เช่นเดียวกับที่ Ohno และคณะ (1993) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของ *B. subtilis* NB 22 และการสร้างสารต้านจุลชีพ คือ อิทูริน พบว่ามีการสร้างอิทูรินตั้งแต่ระยะเริ่มต้นของการเจริญ (ก่อนชั่วโมงที่ 24) และมีการสร้างอิทูรินไปพร้อม ๆ กับการเจริญของ *B. subtilis* NB 22

เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. BC121 บนอาหารแข็ง NA ร่วมกับราเส้นใย คือ *Curvularia lutana* พบว่ามี “antagonistic effect” ส่งผลให้เส้นใยราวม บิดเบี้ยว และผนังเซลล์แตก (Basha S. และ Ulaganathan, 2002) Sadfi และคณะ (2002) รายงานว่า *Bacillus cereus* ยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *Fusarium roseum* var. *sambucinum* เมื่อเลี้ยง *B. cereus* บนอาหารแข็งนาน 24 ชม แล้วจึงเพาะราเส้นใย *F. roseum* var. *sambucinum* ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าในงานวิจัยนี้การเลี้ยง *B. subtilis* K-05 บนอาหารแข็งร่วมกับจุลินทรีย์ทดสอบเป็นผลให้มีการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบได้ดีกว่าเมื่อใช้ supernatant ที่ได้จากการเลี้ยง *B. subtilis* K-

05 โดยลำพังในอาหารเหลว ซึ่งอาจเป็นปรากฏการณ์ในลักษณะคล้ายกันกับ antagonistic effect หรืออาจเป็นไปได้ว่าสารต้านจุลชีพที่อยู่ในอาหารแข็งมีความเข้มข้นมากกว่าที่อยู่ในอาหารเหลว

5.3 การศึกษาปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของสารต้านจุลชีพ

ในงานวิจัยนี้เมื่อศึกษาผลของระยะเวลาการเก็บส่วนใสที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 เดือน และนำมาศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์พบว่า การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบค่อย ๆ ลดลงทุกเดือนเช้า หรือเร็วแล้วแต่ชนิดของจุลินทรีย์ทดสอบ เมื่อศึกษาผลของความร้อนต่อการออกฤทธิ์ของสารต้านจุลชีพโดยส่วนใสที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 60 80 100 และ 121 องศาเซลเซียส พบว่าการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบลดลง กล่าวคือ เมื่อได้รับความร้อนที่อุณหภูมิต่ำกว่า 100 องศาเซลเซียสสารต้านจุลชีพยังมีการออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ แต่ไม่พบการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบเมื่อส่วนใสได้รับความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส

Brizani และ Brandelli (2002) ศึกษาผลของความร้อนต่อการออกฤทธิ์ของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *Bacillus cereus* ซึ่งไม่พบแอกติวิตีของแบคทีเรียโอซินเมื่อได้รับความร้อนที่ 100 และ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เมื่อนำแบคทีเรียโอซินไปเก็บไว้ในที่มีอุณหภูมิ 4 และ 30 องศาเซลเซียส นาน 30 วัน และเก็บแบคทีเรียโอซินแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dried) พบว่าแบคทีเรียโอซินยังคงมีแอกติวิตีเท่าเดิม

Sadfi และคณะ (2002) ศึกษาผลของความร้อนต่อ antibiotic activity ของสารที่ผลิตโดย *B. cereus* ที่ยับยั้ง *Fusarium* sp. โดยบ่มสารที่อุณหภูมิตั้งแต่ 40-121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ได้พบว่าสารทนต่อความร้อนได้จนถึง 80 องศาเซลเซียส และไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเมื่อได้รับความร้อนที่ 100 และ 121 องศาเซลเซียส

5.4 การจำแนกสปีชีส์ของ *Bacillus* sp. K-05

วิธีการจำแนกสปีชีส์ของแบคทีเรียมีหลายวิธี เช่น ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา ชีวเคมี และอาศัยข้อมูลทางพันธุกรรมโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 1S rDNA แต่พบว่าการจำแนกสปีชีส์โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 1S rDNA มีความแม่นยำกว่าวิธีอื่น ๆ (Chiang และคณะ, 2006) โดยงานวิจัยนี้จำแนกสปีชีส์ของ *Bacillus* sp. K-05 ซึ่งแยกได้จากดินในกรุงเทพฯ ฯ โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA แล้วนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลใน GenBank พบว่ามีความเหมือน (identity) กับ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ M04 เท่ากับ 99% จึงจัดว่า *Bacillus* sp. สายพันธุ์ K-05 เป็น *Bacillus subtilis* เช่นเดียวกับที่ Pinchuk และคณะ (2002) ได้รายงานการจำแนก *Bacillus* จากแหล่งต่าง ๆ เช่น ดิน คน สัตว์ เป็นต้น รวมทั้งหมด 51 สายพันธุ์ แล้วนำมาศึกษาเอกลักษณ์และความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA พบว่าเป็น *B. subtilis* 47 สายพันธุ์ อีก 3 สาย

พันธุ์เป็น *Bacillus licheniformis* อย่างไรก็ตามได้มีรายงานการวิจัยที่จำแนกสปีชีส์โดยยังคงใช้ข้อมูลทางอนุกรมวิธาน (taxonomic description) เช่นในรายงานของ Yilmax และคณะ (2006) ที่ได้แยกแบคทีเรียจากดินในท้องถิ่นต่าง ๆ ในตุรกี พบว่าเป็น *Bacillus* จำนวน 29 สายพันธุ์ และได้จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ต่าง ๆ

5.5 การทำสารต้านจุลชีพให้บริสุทธิ์และการศึกษาลักษณะสมบัติของสารต้านจุลชีพ

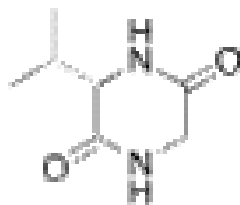
จากการทำสารต้านจุลชีพให้บริสุทธิ์โดยการสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท การวิเคราะห์ด้วย TLC และคอลัมน์โครมาโทกราฟีแล้วนำส่วนที่แยกได้มาศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบพบว่าสารที่ได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีที่มีปริมาณมาก มี 2 ส่วน เรียกว่าสารที่ I และ สารที่ II ซึ่งเมื่อทำให้ตัวทำละลายอินทรีย์ระเหยไปได้สารมีลักษณะเป็นผงสีขาว และยับยั้งแบคทีเรีย ได้แก่ *B. subtilis* ATCC6633 *S. aureus* ATCC25923 และ *M. luteus* เหมือนกัน

เมื่อนำสารที่ I มาวิเคราะห์โครงสร้างโมเลกุลด้วยวิธี NMR และวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยใช้ MS พบว่าสารที่ I มีโครงสร้างโมเลกุลเป็นวงของกรดอะมิโน 2 ชนิด คือ cyclo(Leu-Pro) หรือมีชื่อทางเคมีว่า 3-isobutylhexahydro-pyrrolo [1,2- α]pyrazine-1,4-dione และมีน้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 210.1446 และสารที่ II มีโครงสร้างโมเลกุลเป็นวงของกรดอะมิโน 2 ชนิด คือ cyclo(Val-Pro) หรือมีชื่อทางเคมีว่า 3-isopropylhexahydro-pyrrolo [1,2- α] pyrazine-1,4-dione มีน้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 196.1269

สำหรับสารต้านแบคทีเรียแกรมลบ สารต้านยีสต์และสารต้านเชื้อรา ซึ่งพบในการศึกษาผลการยับยั้งจุลินทรีย์ในตอนต้นของงานวิจัยนี้อาจอยู่ในสารที่แยกจากคอลัมน์โครมาโทกราฟีส่วนที่ยังไม่ได้นำมาศึกษาหรืออาจเป็นเพราะสารไม่คงรูป (unstable) หรืออาจต้องใช้วิธีการอื่น ๆ ที่แตกต่างจากการศึกษาในงานวิจัยนี้ ได้แก่ การใช้ preparative high- performance liquid chromatography (Hagelin และคณะ, 2004) ซึ่งจะต้องมีการศึกษาวิจัยต่อไป

ในปี 1995 Adamcezeski และคณะ พบว่าสารไดคีโตเปเปอร์าซีน (diketopeperazine) ที่ผลิตโดยฟองน้ำ (sponge) จากทะเลแคริบเบียนที่อยู่ร่วมกับไซยาโนแบคทีเรียแบบซิมไบโอซิส มีโครงสร้างเป็นไดเปปไทด์ที่เป็นโพลินและกรดอะมิโนอื่น ได้แก่ cyclo-(S-Pro-R-Leu) cyclo-(S-Pro-S-Ile) cyclo-(S-Pro-R-Val) cyclo-(R-Pro-R-Phe) cyclo-(4-methyl-R-Pro-S-nor Val) และ cyclo-(R-Pro-R-Phe)

ไดคีโตเปเปอร์าซีนเป็นกลุ่มของสารอินทรีย์ที่มีโครงสร้างเป็นวงประกอบด้วยกรดอะมิโนสองชนิดที่เชื่อมกันด้วยพันธะเปปไทด์ ซึ่งเป็นการสร้างพันธะระหว่างคีโตนและเปปเปอร์าซีน (รูปที่ 37) ซึ่งเป็นวงหกเหลี่ยมมีไนโตรเจนสองโมเลกุลอยู่ตรงกันข้าม



รูปที่ 37 โครงสร้างของไดคิโตเปปเปอราซีน (<http://www.chem.ox.ac.uk/oc/sgdavies/research.html>)

ในปี 2002 Rhee รายงานการค้นพบสารต้านจุลชีพชนิดใหม่ที่ผลิตโดย *Streptomyces* sp. KH-614 ซึ่งยับยั้ง vancomycin resistance enterococci (VRE) ได้แก่ *Enterococcus faecium* (vanA, vanB) และ *Enterococcus faecalis* (vanA, vanB) รวมทั้ง *E. faecalis* (K-99-34) *E. faecalis* (K-00-184) *E. faecalis* (K-00-221) ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้พบว่าสารดังกล่าวซึ่ง ได้แก่ cyclo(L-Leu-Pro) ยับยั้ง leukemic cell lines ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ถ้าใช้ cyclo(L-Leu-Pro) ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของ leukemic cell lines ได้โดยพบว่าการเจริญของ leukemic cell lines K562 HL60 และ U937 ลดลง 95% 91% และ 93% ตามลำดับ แสดงว่า cyclo(L-Leu-Pro) เป็นสารต้านจุลชีพที่มีฤทธิ์ยับยั้งทั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวและยับยั้ง VRE ได้

Yan และคณะ(2004) รายงานการค้นพบ cyclo(L-Leu-Pro) ซึ่งผลิตโดย *Achromobacter xylosoxidans* มีฤทธิ์ยับยั้ง precursor ของอัลฟาโทกซินที่ผลิตโดย *Aspergillus parasiticus* โดยพบว่าการยับยั้งการสร้าง precursor ของอัลฟาโทกซินที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 3.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสามารถยับยั้งการสร้าง precursor ของอัลฟาโทกซินและการสร้างสปอร์เมื่อมีความเข้มข้นเท่ากับ 6.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อใช้ cyclo (L-Leu-L-Pro) ที่ความเข้มข้นมากกว่า 6.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. parasiticus* ได้ ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่า ถ้า cyclo(L-Leu-Pro) ที่ได้จาก *B. subtilis* K-05 เข้มข้น 6.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรจะยับยั้งราเส้นใย *A. oryzae* หรืออาจรวมไปถึงการยับยั้ง *Fusarium* sp. และ *Alternaria* sp. ได้ เมื่อศึกษาการเบี่ยงเบนระนาบแสง (optical rotation) ของ cyclo(D-Leu-D-Pro) และ cyclo(L-Leu-L-Pro) พบว่ามีค่าเท่ากับ $[\alpha]_D^{24} - 124^\circ$ (c 0.4, EtOH) และ $[\alpha]_D^{24} + 152^\circ$ (c 0.4, EtOH) ตามลำดับ

Rhee (2004) ศึกษาการยับยั้งของ cyclo(Leucyl-Propyl) และ cyclo(Phenyl-Pro) ต่อจุลินทรีย์ทดสอบ ได้แก่ vancomycin resistance enterococci (VRE) ได้แก่ *Enterococcus faecalis* (K-99-38) *Enterococcus faecalis* (K-99-17) *E. faecalis* (K-99-258) *E. faecium* (K-01-312) และ *E. faecalis* (K-01-511) ที่ความเข้มข้น 0.25–1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และยับยั้ง *Candida albicans* *Escherichia coli* *Staphylococcus aureus* *Micrococcus luteus* และ *Cryptococcus*

neoformans ที่ความเข้มข้น 0.25–0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และพบว่าสามารถยับยั้งการกลายพันธุ์ใน *Salmonella typhimurium* TA98 และ TA100 ได้

ในปี 2006 Rhee รายงานการออกฤทธิ์ของไคเปปไทด์สองชนิดรวมกัน ได้แก่ cyclo(Leu cyl-Propyl) และ cyclo(Phenyl-Prol) ซึ่งผลิตจาก *Streptomyces* sp. พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิดและแบคทีเรียแกรมลบที่ไม่ใช้ออกซิเจนบางชนิด (negative anaerobic bacteria) รวมทั้งยังมีฤทธิ์ป้องกันผลที่เกิดจากรังสีต่อไฟโบรบลาสต์ของเซลล์ปอดกล่าวคือ เมื่อ fibroblast cell lines (เซลล์เริ่มต้น 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ได้รับ cyclo(Leu cyl-Propyl) cyclo(Phenyl-Prol) และ cyclo(Leucyl-Propyl) และ cyclo(Phenyl-Prol) นาน 24 ชม. จากนั้นนำมารับรังสี พบว่าถ้าใช้ไคเปปไทด์ชนิดใดชนิดหนึ่งเซลล์มีการอยู่รอดน้อยกว่า 80% แต่ถ้าใช้ไคเปปไทด์สองชนิดรวมกัน เซลล์มีการอยู่รอดมากกว่า 90%

สารต้านจุลชีพที่สร้างจาก *Bacillus* สปีชีส์ต่าง ๆ สรุปได้ดังแสดงในตารางที่ 21

ตารางที่ 21 สารต้านจุลชีพที่สร้างจาก *Bacillus* สปีชีส์ต่าง ๆ

สปีชีส์	สารต้านจุลชีพ	เอกสารอ้างอิง
<i>Bacillus</i> sp. 8A	bacteriocin	Brizani และ Brandelli, 2002
<i>Bacillus</i> sp. GB-017 และ GB-0356	polyene และ lactone	Kim และคณะ, 2003
<i>Bacillus</i> sp. CS93	bacilysin chlorotetaine และ iturin A	Phister และคณะ, 2004
<i>Bacillus</i> sp. sunhua	macrolacrin A	Han และคณะ, 2005
<i>B. amyloliquefaciens</i>	iturin A	Yoshida และคณะ, 2001
	iturin A	Yu และคณะ, 2002
<i>B. cereus</i>	kanosamine	Milner และคณะ, 1996
	cerein 7	Osacariz และคณะ, 1999
	zwittermicin A	Emmert และคณะ, 2004
<i>B. circulans</i>	Butirocin	Nam และ Ryu, 1985
	circulocin	He และคณะ, 2001
<i>B. licheniformis</i>	licheniformins	Callow และ Work, 1952
	bacillocin 490	Martirani และคณะ, 2002
	bacteriocins	Cladera-Olivera และคณะ, 2004
<i>B. polymyxa</i>	polymyxin	Pavliuk และคณะ, 1979
	gavaserin และ saltavalin	Pichard และคณะ, 1995

ตารางที่ 21 สารต้านจุลชีพที่สร้างจาก *Bacillus* สปีชีส์ต่าง ๆ (ต่อ)

สปีชีส์	สารต้านจุลชีพ	เอกสารอ้างอิง
<i>B. thermoleovorans</i>	bacteriocins	Novotny และ Perry, 1992
<i>B. subtilis</i>	bacilysin subtilin mycosubtilin bacillomycin L amicoumacin iturin A maltacine complex fumonisin B1 diffusible and volatile antifungal compound subpeptin JM4-A และ JM4-B	Walker และ Abraham, 1970 Chung และคณะ, 1992 Duitman และคณะ, 1999 Volpon และคณะ, 1999 Pinchuk และคณะ, 2002 Cho และคณะ, 2003 Hagelin และคณะ, 2004 Cavaglieri และคณะ, 2005 Chaurasia และคณะ, 2005 Wu และคณะ, 2005
<i>B. brevis</i>	gramicidin C และ tyrocidin	Mannanov และ Sattarova, 2001
<i>B. thuringiensis</i>	BT toxin	Schnepf และคณะ, 1998
<i>B. subtilis</i> K-05 (งานวิจัยนี้)	cyclo(Pro-Leu) และ cyclo(Pro-Val)	

สารต้านจุลชีพพวกไซคลิกไดเปปไทด์ที่สร้างจากสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ สรุปได้ดังแสดงในตารางที่ 22

ตารางที่ 22 สรุปสาร cyclic dipeptide ที่ผลิตโดยสิ่งมีชีวิตที่มีรายงาน

สาร cyclic dipeptide	สิ่งมีชีวิตที่ผลิตสาร	การออกฤทธิ์	เอกสารอ้างอิง
cyclo(Pro-Leu) cyclo(Pro-Ile) cyclo(Pro-Val) cyclo(Pro-Phe)	<i>Calyx cf. podatypa</i> (sponge)	เป็น secondary metabolite จากฟองน้ำ	Adamczeski และคณะ, 1995
cyclo(L-Leucyl-LProlyl)	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	ยับยั้ง vancomycin resistance enterococci (VRE)	Yan และคณะ, 2004
cyclo(Leucyl-Prolyl)	<i>Streptomyces</i> sp. KH-614	ยับยั้งการสร้าง precursor ของอัลลาทอกซิน (norsolorinic acid)	Rhee, 2002
cyclo(Leucyl-Prolyl) Cyclo(Phenyl-Propyl)	<i>Streptomyces</i> sp.	ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิดและแบคทีเรียแกรมลบที่ไม่ใช้ออกซิเจนบางชนิด (negative anaerobic bacteria) รวมทั้งยังมีฤทธิ์ป้องกันผลที่เกิดจากรังสีต่อไฟโบรบลาสของเซลล์ปอด	Rhee, 2006
cyclo(Pro-Leu) cyclo(Pro-Val)	<i>B. subtilis</i> K-05	ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก คือ <i>B. subtilis</i> ATCC6633 <i>S. aureus</i> ATCC25923 และ <i>M. luteus</i>	งานวิจัยนี้

สรุปว่างานวิจัยนี้ได้พบสารที่ผลิตจาก *B. subtilis* K-05 2 ชนิด ได้แก่ สารที่ I คือ cyclo(Leu-Pro) และสารที่ II คือ cyclo(Val-Pro) และจากการเปรียบเทียบกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compound) ที่ผลิตจากสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ เท่าที่สืบค้นมาได้ดังสรุปในตารางที่ 24 พบว่ายังไม่เคยมีรายงานว่า *Bacillus* sp. ผลิตสารต้านจุลชีพกลุ่มไดเปปไทด์ cyclo(Leu-Pro) และ cyclo(Val-Pro) มาก่อน

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

จิราพร จิราพงษ์. 2545. การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์. โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อประสบการณ์. ภาควิชาจุลชีววิทยา. 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.
- Audisio, M.C., Oliver, G., Apella, M.C. 2001. Effect of different complex carbon sources on
growth and bacteriocin synthesis of *Enterococcus faecium*. International Journal of Food
Microbiology. 63 : 235-241.
- Basha, S., and Ulaganathan, K. 2002. Antagonism of *Bacillus* species (strain BC121) towards
Curvularia lunata. Current science 82 (12) : 1457-1463.
- Bernal, G., Ill, 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.
- Brizani, D., and Brandelli, A. 2002. Characterization of a bacteriocin produced by a newly
isolated *Bacillus* sp. strain 8A. Journal of Applied Microbiology. 93 : 512-519.
- Brock, D., and Medigan, T. 1991. Biological of Microbiology. 6th ed. Prentice-Hall Inc, USA. p.
361- 370.
- Cai, Y. and Wolk C. P. 1990. Use of a conditionally lethal gene in *Anabaena* sp. strain PCC 7120
to select for double recombinants and to entrap insertion sequences. Journal of
bacteriology. 172 : 3138-3145.

- 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. แหล่งที่มา : <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* spp., *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp. and *Vibrio* spp. 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.
- 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.
- Dorsch, M., and Strackebrandt. 1992. Some modifications in the procedure of direct sequencing of PCR amplified 16S rDNA. Journal of Microbiological Methods. 16 : 271-279.

- 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.
- Emmert, A.B., Klimowicz, A.K., Thomas, M.G., and Handelsman, J. 2004. Genetics of Zwittermicin A Production by *Bacillus cereus*. Applied and Environmental Microbiology. 70 : 104-113.
- Fleming, A. 1945. Penicillin. Nobel Lecture. แหล่งที่มา : <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. แหล่งที่มา : <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.
- Fox, G.E, Wisotzkey, J.D. and Jurtshuk, P.J. 1992 How close is close : 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. Int. Journal Systematic Bacteriology. 42 : 166–170.
- Genereux, D.P. and Bergstrom C.T. Evolution in Action : Understanding Antibiotic Resistance. แหล่งที่มา : <http://octavia.zoology.washington.edu/people/GenereuxAndBergstrom05.pdf>. [2006, Feb 5].
- 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. p 46.

- Greenwood, D., and Whitley, R. 2002. Chapter 2 : Modes of action. แหล่งที่มา : <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.
- Hagelin, G., Oulie, I., Raknes, A., Undheim, K., and Clausen, O. 2004. Preparative high-performance liquid chromatographic separation and analysis of the Maltacine complex - a family of cyclic peptide antibiotics from *Bacillus subtilis*. Journal of Chromatography. 811 : 243-251.
- Han, J.S., Cheng, J.H., Yoon, T.M., Song, J., Rajkarnikar, A., Kim, W.G., Yoo., I.D., Yang, Y.Y. 2005. Biological control agent of common scab disease by antagonistic strain *Bacillus* sp. sunhua. Journal of Applied 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.
- He, H., Shen B., Korshalla J., and Carter G. T. 2001. Circulocins, new antibacterial lipopeptides from *Bacillus circulans*, J2154. Tetrahedron. 57 : 1189-1195.
- 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.
- Jacob, S.T. and Rose, K.M. 1974. Inhibition of poly(A) polymerase by rifamycin derivatives. Nucleic Acids Research. 1 : 1549-1559.
- Johnston, L.M., and Jaykus, L.A. 2004. Antimicrobial resistance of *Enterococcus* species isolated from produce. Applied and Environmental Microbiology. 70 : 3133-7.
- Katz, E. and Demain, A.L. 1977. The Peptide Antibiotics of *Bacillus* : Chemistry, Biogenesis, and Possible Functions. Bacteriological Review. 41 : 449-474.
- 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, H., Park, J., Choi, S., Choi, K., Lee, G., Ban, S.J., Lee, C.H., and Kim, C. S. 2003. Isolation and Characterization of *Bacillus* Strains for Biological Control. The Journal of Microbiology. 41 : 196-201.

- Kim, P.I., and Chung, K. 2004. Production of an antifungal protein for control of *Collectrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908. FEMS Microbiology Lettes. 234 : 177-183.
- Korzybski, T., Kowszyk-Gindifer, Z., and Kurylowicz, W. 1966. Introduction. Antibiotics : Origin, Nature and Properties. Vol 1. Pergamon Press. PWN-Polish Scientific Publishers. p. 1.
- Kurz ,M., Guba W., and Ver'tesy L. 1998. Three-dimensional structure of moenomycin A A potent inhibitor of penicillin-binding protein 1b. European Journal of Biochemistry. 252 : 500-507.
- 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. แหล่งที่มา : <http://www.microbialcellfactories.com/content/1/1/1>. [2005, Dec 24].
- Milner, J. L., Silo-suh, L., Lee, J. C., He, H., Clardy, J., and Handelsman, J. 1996. Production of kanosamine by *Bacillus cereus* UW85. Applied and Environmental Microbiology. 62 : 3061-3065.
- Motta, A., Cladera-Olivera, F., and Brandelli, A. 2004. Screening for antimicrobial activity among bacteria isolated from the amason basin. Brazilian Journal of Microbiology. 35 : 307-310.
- Nam, D.H., and Ryu, D.Y. 1985. Relationship Between Butirosin Biosynthesis and Sporulation in *Bacillus circulans*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 25 : 798-801.
- 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. Newyork USA. p. 510, 523.
- Neu, H.C., and Gootz, T.D. Antimicrobial Chemotherapy. แหล่งที่มา : <http://gsbs.utmb.edu/microbook/ch011.htm>. [2005, Feb 5].
- Noamana, N.H., Fattah, A., Khaleafab, M., and Zakyb, S.H. 2001. Factors affecting antimicrobial activity of *Synechococcus leopoliensis*. Microbiological Research. 159 : 395-402.

- Novotny, J.F., and Perry, J.J. 1992. Characterization of Bacteriocins from Two Strains of *Bacillus thermoleovorans*, a Thermophilic Hydrocarbon-Utilizing Species. Applied and Environmental Microbiology. 58 : 2393-2396.
- 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. แหล่งที่มา : <http://www.utmb.edu/otoref/grnds/Microbiology-2004-0218/Microbiology-2004-0211.htm> [2004, Feb 18].
- 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.
- Poole, C. F., Poole, S. K. 1994. Instrumental Thin-Layer Chromatography. Analytical Chemistry. 1994, 66, 27A-37A. แหล่งที่มา : <http://www.chemistry.adelaide.edu.au/external/soc-rel/content/tlc.htm>. [2006, Feb 5].
- Prasad, C. 1995. Bioactive cyclic dipeptides. Peptides. 16 : 151-64.

- Rai University. Lesson 10 : β -lactam antibiotics. Pharmaceutical Biotechnology and Diagnostic. แหล่งที่มา : <http://rcw.raiuniversity.edu/biotechnology/MScBioinformatics/pharmaceuticalbiotechnologyanddiagnostics/lecture-notes/lecture-10.pdf> . [2006, Feb 6]. 59-71.
- Rai University. Lesson 31 : Introduction and Background-Antibiotics and Vaccines. Applied Microbiology and Diagnostics. แหล่งที่มา : <http://rcw.raiuniversity.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. 2002. Isolation and characterization of *Streptomyces* sp. KH-614 producing anti-VRE (vancomycin-resistant enterococi) antibiotics. Journal of Applied Microbiology. 48 : 321-327.
- Rhee, K. H. 2004. Cyclic dipeptides exhibit synergistic, broad spectrum antimicrobial effects and have anti-mutagenic properties. International Journal of Antimicrobial Agents. 24 : 423-427.
- Rhee, K. H. 2006. In Vitro Activity of cyclic dipeptides against Gram-positive and Gram-negative anaerobic bacteria and radioprotective effect on lung cells. Journal of Microbiology Biotechnology. 16(1) : 158-162.
- 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.
- 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 subtilis* for the production of 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.
- 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.

- The American Heritage® Dictionary of the English Language, 2004. Fourth edition.
- The Columbia Electronic Encyclopedia, Columbia University Press. 2003. antibiotic. แหล่งที่มา : <http://www.answers.com/topic/antibiotic> [2006, Feb 2].
- Todar K., 2005. Antimicrobial Agents Used in Treatment of Infectious Disease. University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology. แหล่งที่มา : <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. 8 th ed. London : Edward Arnold. p 185-210.
- Tuzun I, Karatas AY, Sesenoglu O, Demir AS, 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.
- 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 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.
- Waksman, S. A., 1952. Streptomycin : background, isolation, properties, and utilization. Nobel Lecture. แหล่งที่มา : <http://nobelprize.org/medicine/laureates/1952/waksman-lecture.pdf>. [2006, Jan 8].
- Wikipedia. Wikipedia, 2005. antibiotic. แหล่งที่มา : <http://www.answers.com/topic/antibiotic>. [2006, Jan 8].
- Wong, G. 2003. The Aftermath of Penicillin. Department of Botany. University of Hawaii at Manoa. แหล่งที่มา : 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., Huan, L. 2005 Purification and characterization of two novel antimicrobial peptides subpeptin JM4-A and subpeptin JMB-4 produced by *Bacillus subtilis* JM4. Current Microbiology. 51 : 292-296.

Yan, P., Song, Y., Sakuno, E., 2 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.

Yilmaz, M., Soran, H., and Beyatli, Y. 2006. Antimicrobial activities of some *Bacillus* spp. strains isolated from the soil. Microbiological Research. 161 : 127-131.

Yoshida S., Hiradate S., Tsukamoto T., Hatakeda K., and A. Shirata A. 2001. Antimicrobial Activity of Culture Filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 Isolated from Mulberry Leaves. Phytopathology. 91 : 181-187.

Yu, G.Y., Sinclair, J.B., Hartman, G.L. and Bertagnoli, B.L., 2002. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizotonia solani*. Soil Biology and Biochemistry. 34 : 955-963.

http://medicine.cug.net/drug/01/01_01_10.htm

<http://en.wikipedia.org/wiki/Chromatography>

http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/C/Chromatography_paper.html

<http://www.wfu.edu/academics/chemistry/courses/CC/>

<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/>

<http://www.mbio.ncsu.edu>

<http://www.chem.ox.ac.uk/oc/sgdavies/research.html>

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

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

- ละลายน้ำและผสมให้เข้ากัน นึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

8. **Trypticase Soy Broth : TSB** ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

แบคโต เปปโตน	30	กรัม
เปปโตนจากถั่วเหลือง	3.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5.0	กรัม
กลูโคส	2.5	กรัม
โพแทสเซียมฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2.5	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มล

- ละลายน้ำและผสมให้เข้ากัน นึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

9. **10x TE buffer** (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5)

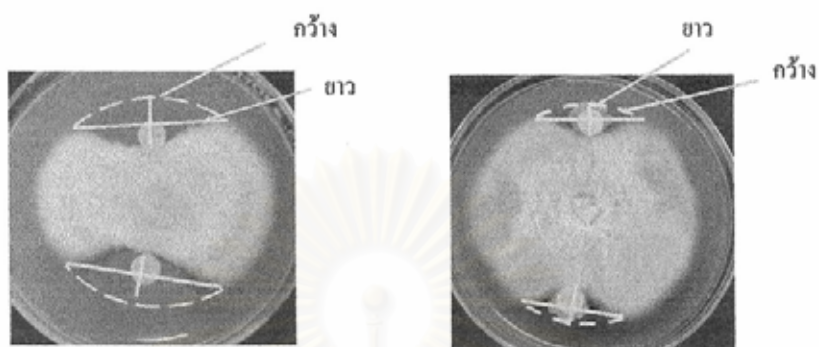
ทริสเบส (Tris base)	0.12	กรัม
EDTA	0.037	กรัม

- เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 100 มล ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ได้ 8.0 โดยใช้ 0.1 N NaOH นำไปผ่านเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

การวัดบริเวณชั้นยั้งเมื่อจุลินทรีย์ทดสอบเป็นราเส้นใย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ K-05 ทั้ง 9 ไพรเมอร์

1. 27F
2. 343R
3. 519R
4. 787R
5. 907R
6. 1100R
7. 1241F
8. 1385R
9. 1492R



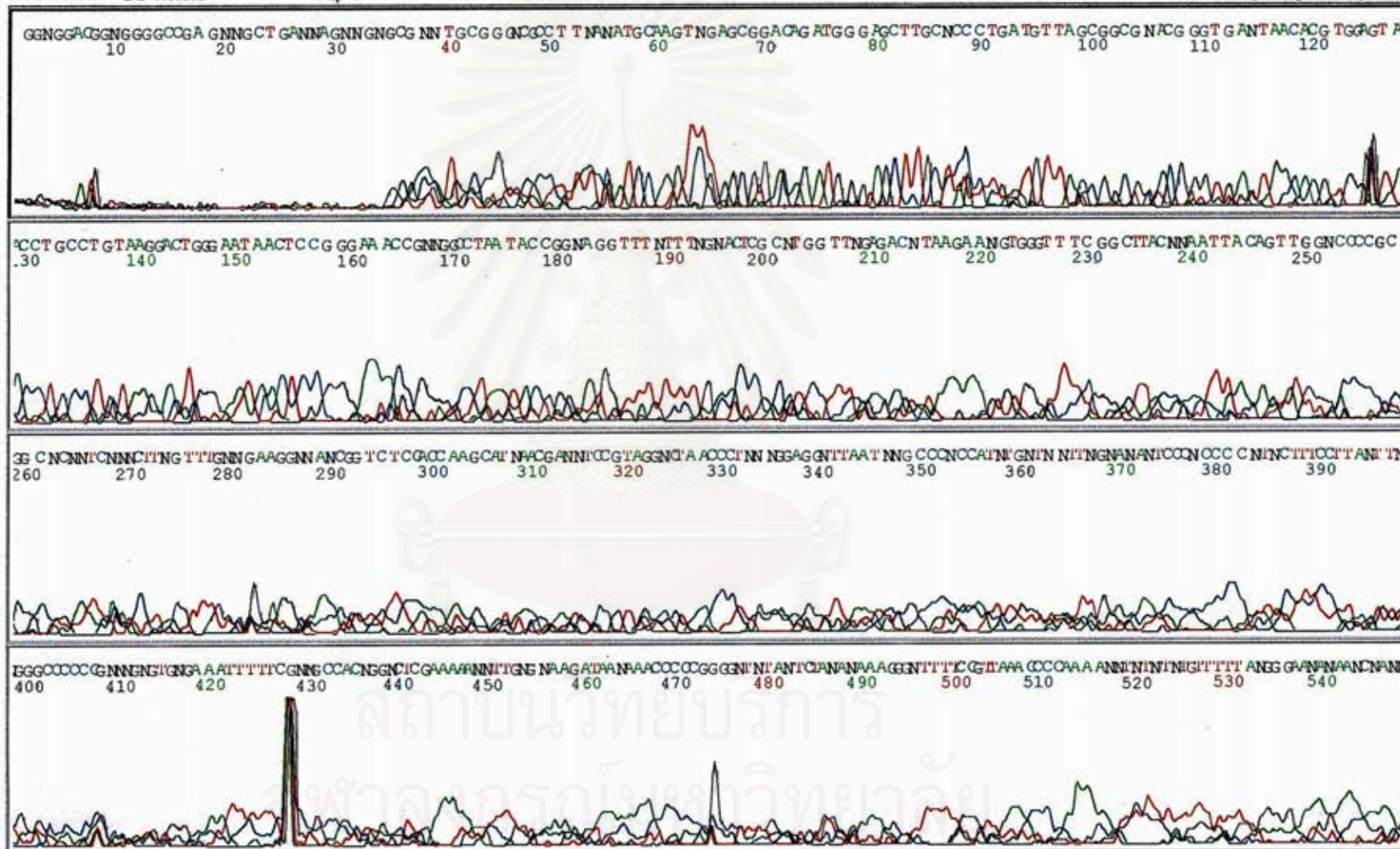
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



Model 3100
Version 3.7
Basecaller-3100APOP6S23_27F
BC 1.5.0.0 Cap 1

Signal G:13 A:16 T:9 C:13
DT3100POP6(BDV3)v1.mob
BSU_3100
Points 250 to 10106 Pk 1 Loc: 250

Page 1 of 2
Fri, Jun 24, 2005 8:38 AM
Thu, Jun 23, 2005 4:47 PM
Spacing: 12.19(12.19)

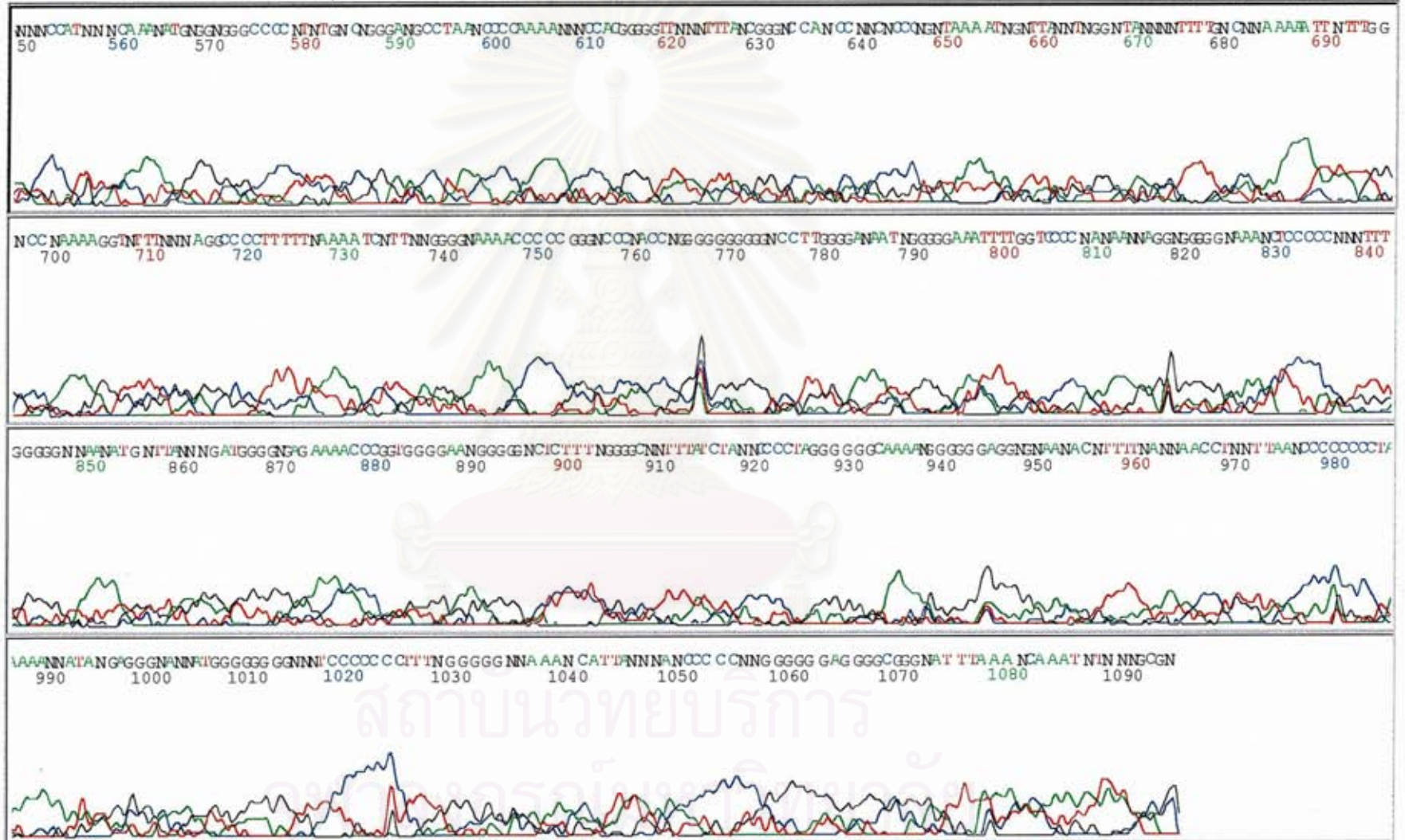




Model 3100 23-6-05_A01_23_27F_01.ab1
Version 3.7
Basecaller-3100APOP6S23_27F
BC 1.5.0.0 Cap 1

Signal G:13 A:16 T:9 C:13
DT3100POP6(BDv3)v1.mob
BSU_3100
Points 250 to 10106 Pk 1 Loc: 250

Page 2 of 2
Fri, Jun 24, 2005 8:38 AM
Thu, Jun 23, 2005 4:47 PM
Spacing: 12.19(12.19)



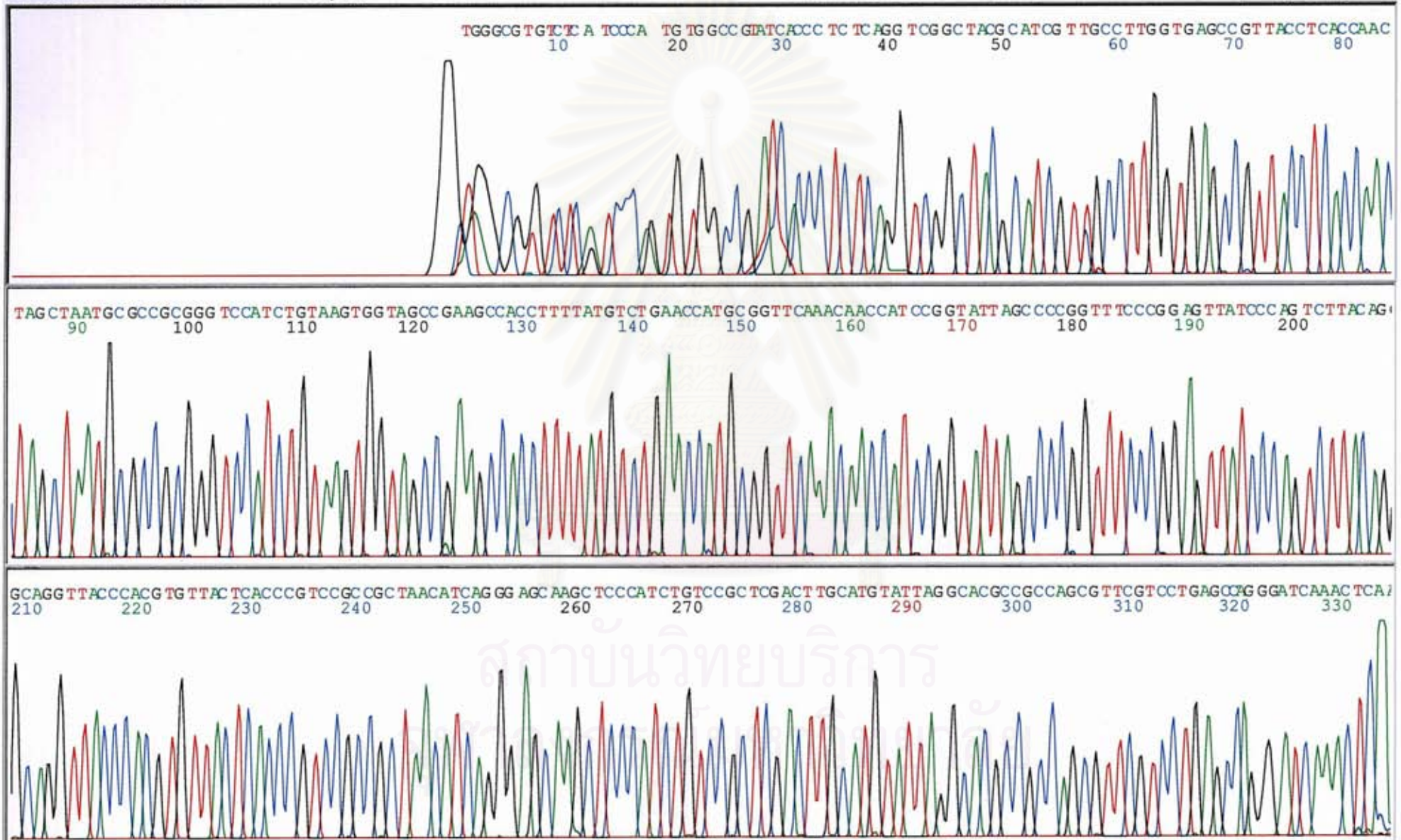
สภานวทยบริการ
ศูนย์บริการสุขภาพ



Model 3100
Version 3.7
Basecaller-3100APOP6S13_343R
BC 1.5.0.0
1-8-48A_G06_13_343R_14.ab1
Cap 14

Signal G:357 A:157 T:168 C:212
DT3100POP6(BDv3)v1.mob
BSU_3100
Points 250 to 5000 Pk 1 Loc: 250

Page 1 of 2
Tue, Aug 02, 2005 9:02 AM
Mon, Aug 01, 2005 11:57 PM
Spacing: 11.25{11.25}

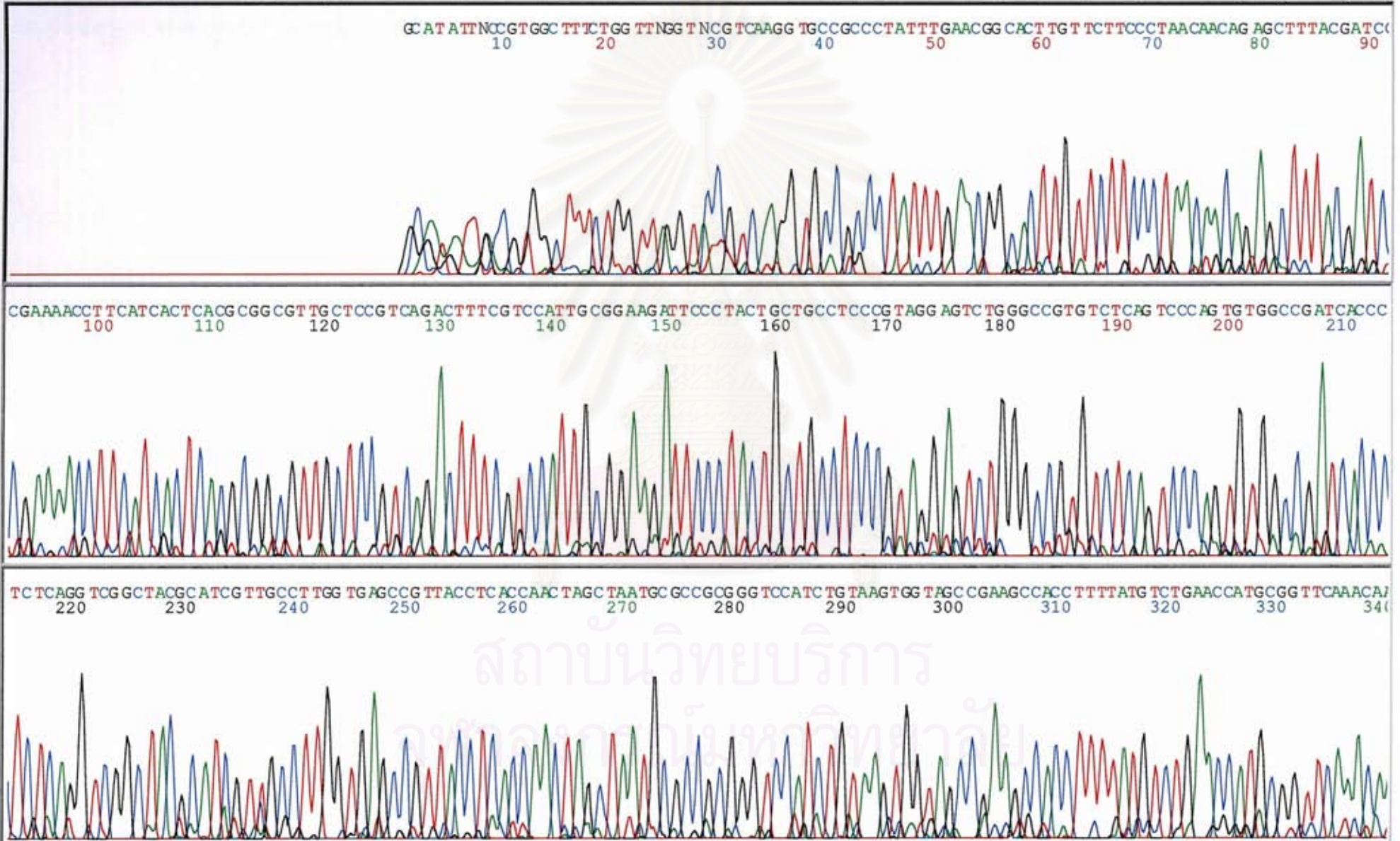




Model 3100
Version 3.7
Basecaller-3100APOP6S13_519R
BC 1.5.0.0
1-8-48B_A11_13_519R_01.ab1
Cap 1

Signal G:196 A:106 T:120 C:131
DT3100POP6{BDv3}v1.mob
BSU_3100
Points 250 to 10106 Pk 1 Loc: 250

Page 1 of 3
Tue, Aug 02, 2005 8:30 AM
Tue, Aug 02, 2005 2:24 AM
Spacing: 11.77{11.77}





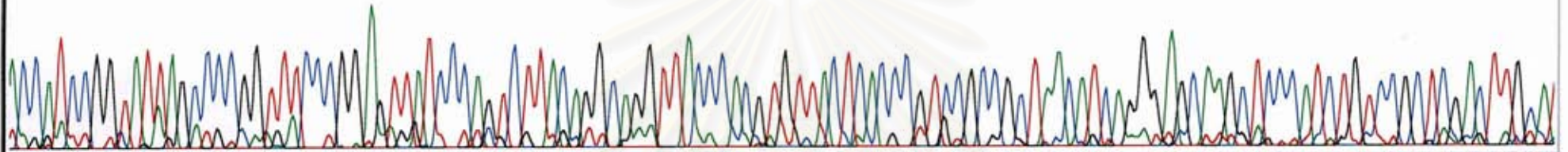
Model 3100
Version 3.7
Basecaller-3100APOP6S13_519R
BC 1.5.0.0 Cap 1

1-8-48B_A11_13_519R_01.ab1

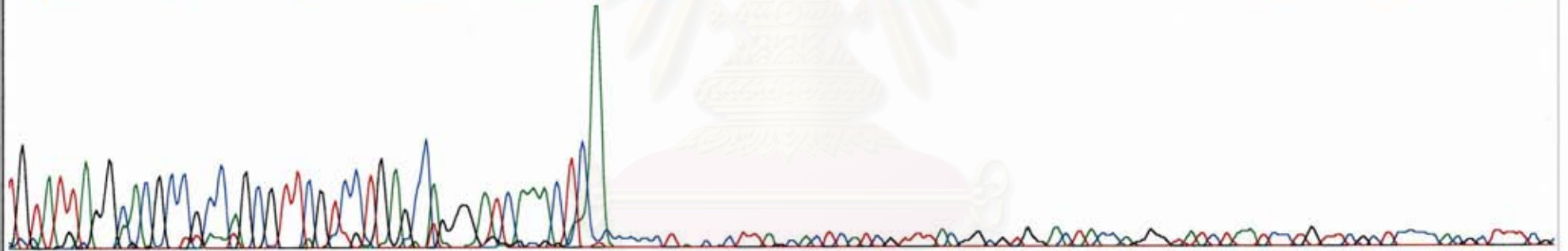
Signal G:196 A:106 T:120 C:131
DT3100POP6{BDv3}v1.mob
BSU_3100
Points 250 to 10106 Pk 1 Loc: 250

Page 2 of 3
Tue, Aug 02, 2005 8:30 AM
Tue, Aug 02, 2005 2:24 AM
Spacing: 11.77{11.77}

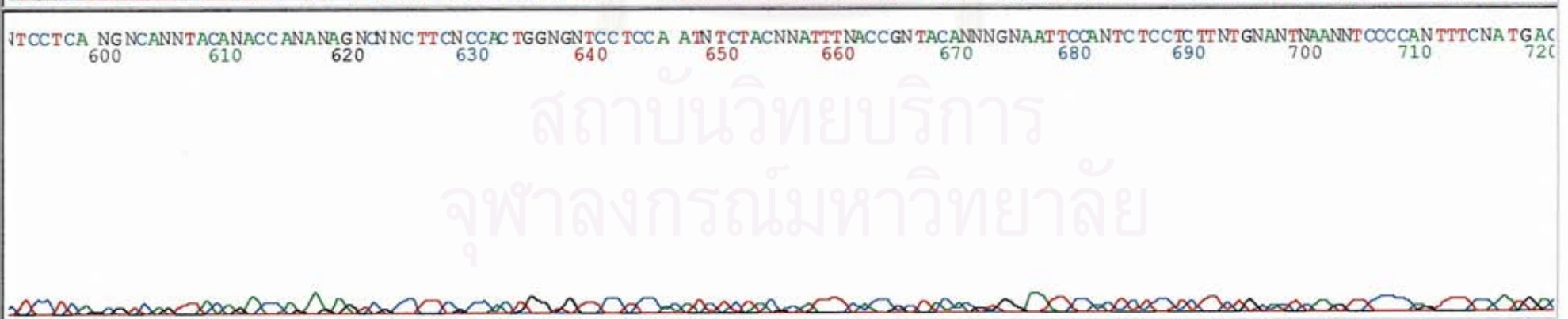
CCATCCGGTATTAGCCCCGGTTCCCGGAGTTATCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTATCACCCTCCGCGCTAACATCAGGGAGCAAGCTCCCATCTGTCCGC TCGACTTGCAI
350 360 370 380 390 400 410 420 430 440 450 460



GTATTAGGNACGCCGCCAGCGTTCGTCCTGAGCCAGGGATCAAAC TCA CCCC TNNNC TANNACTCATC GTTTACNGNGTGNACTACCANGG NATCTAATCCCTGTTCGN TCCCCANNNTTTCNN
470 480 490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590



TCCTCA NGNCANNTACANACCANANAGNCNCTTCNCCACTGGNGNTCC TCCA AIN TCTACNNATTTNACCGN TACANNNGNAATTCANTC TCCTC TTNTGNANTNANN TCCCAN TTTCNA TGAC
600 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

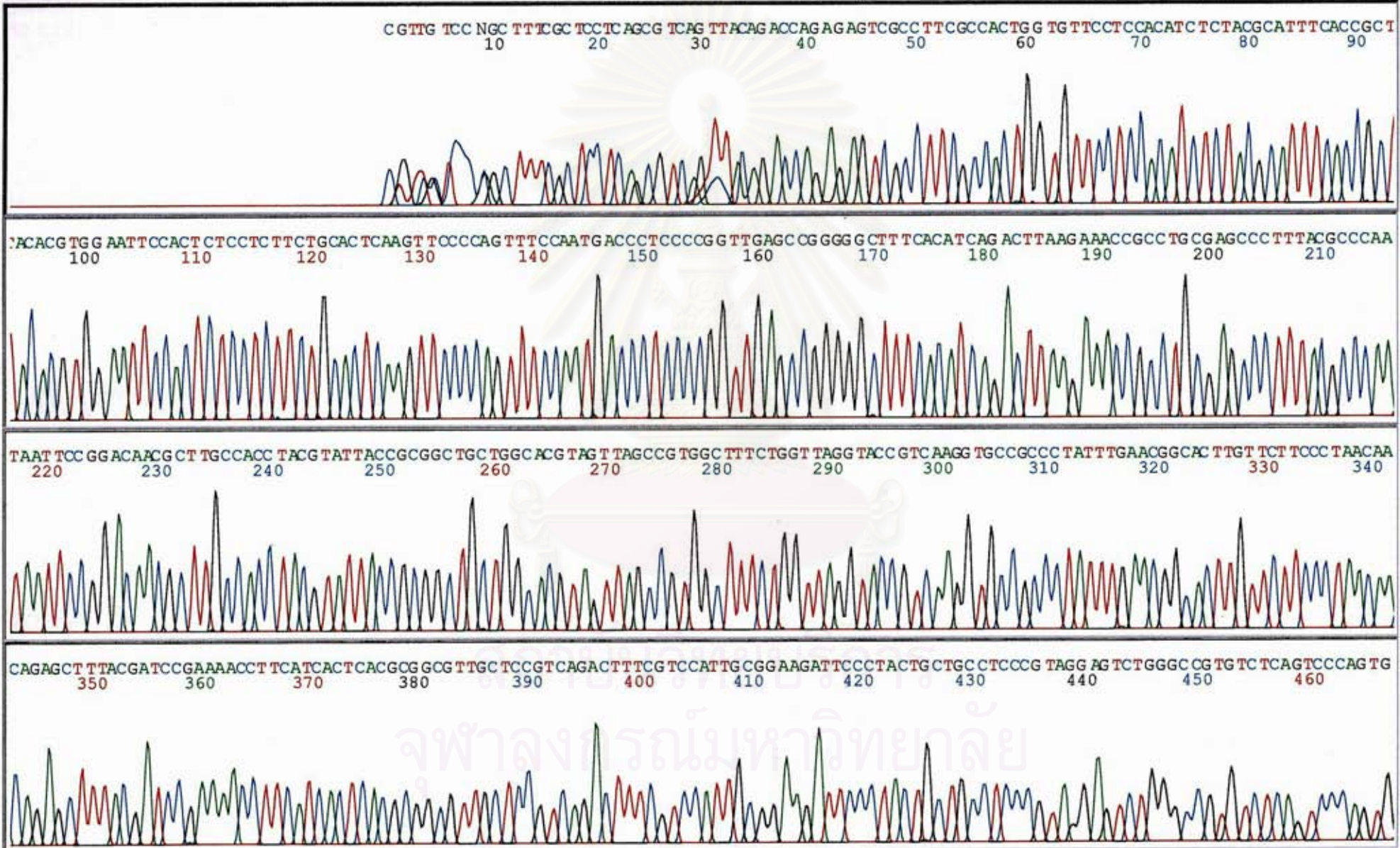


Model 3100
Version 3.7
Basecaller-3100APOP6S13_787R
BC 1.5.0.0 Cap 3

1-8-48B_B11_13_787R_03.ab1

Signal G:171 A:97 T:120 C:139
DT3100POP6{BDV3}v1.mob
BSU_3100
Points 250 to 10106 Pk 1 Loc: 250

Page 1 of 3
Tue, Aug 02, 2005 8:30 AM
Tue, Aug 02, 2005 2:24 AM
Spacing: 11.64{11.64}

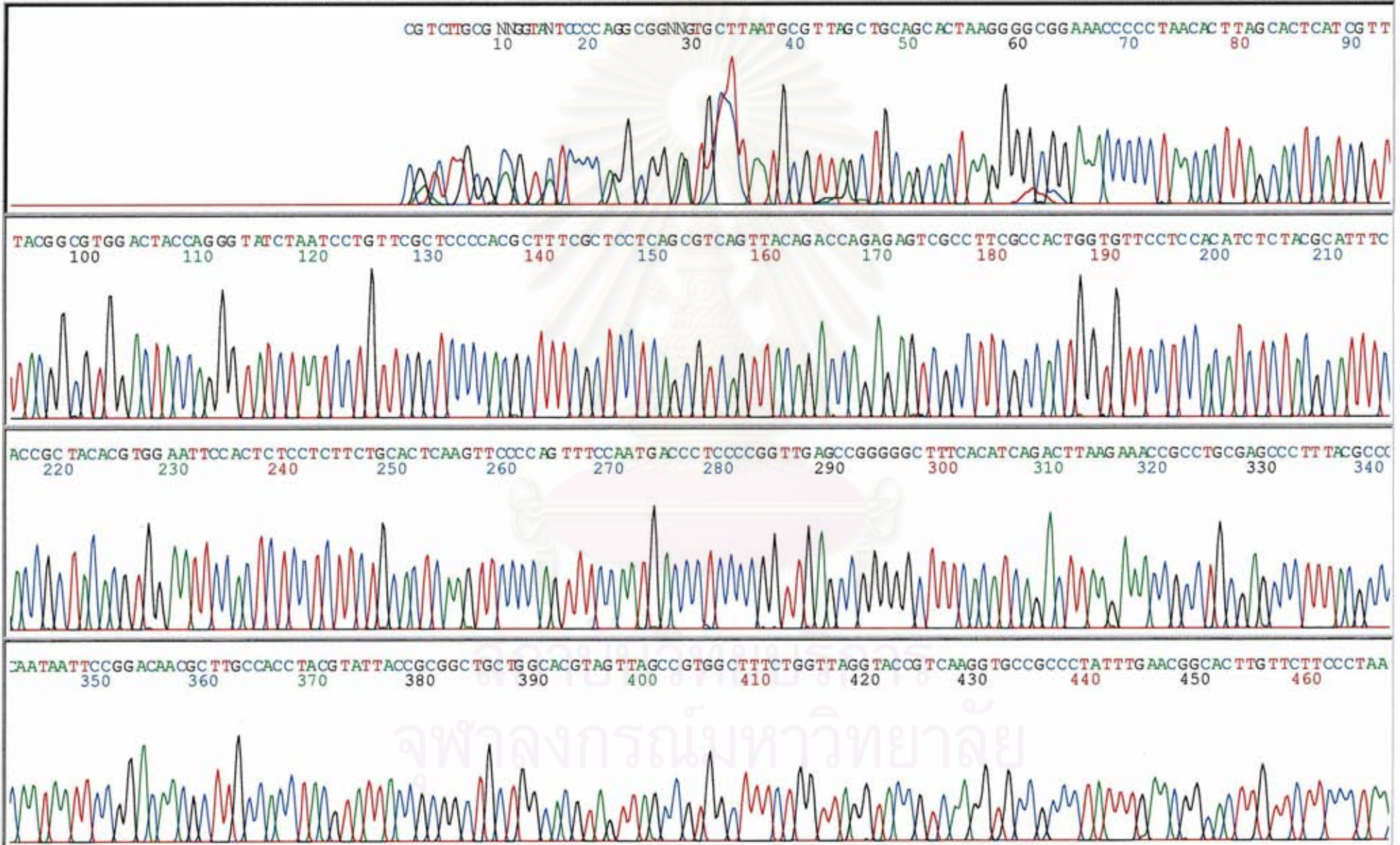




Model 3100
Version 3.7
Basecaller-3100APOP6S13_907R
BC 1.5.0.0
1-8-48A_H05_13_907R_15.ab1
Cap 15

Signal G:171 A:106 T:128 C:151
DT3100POP6(BDv3)v1.mob
BSU_3100
Points 250 to 10106 Pk 1 Loc: 250

Page 1 of 3
Tue, Aug 02, 2005 8:28 AM
Mon, Aug 01, 2005 11:57 PM
Spacing: 11.38{11.38}



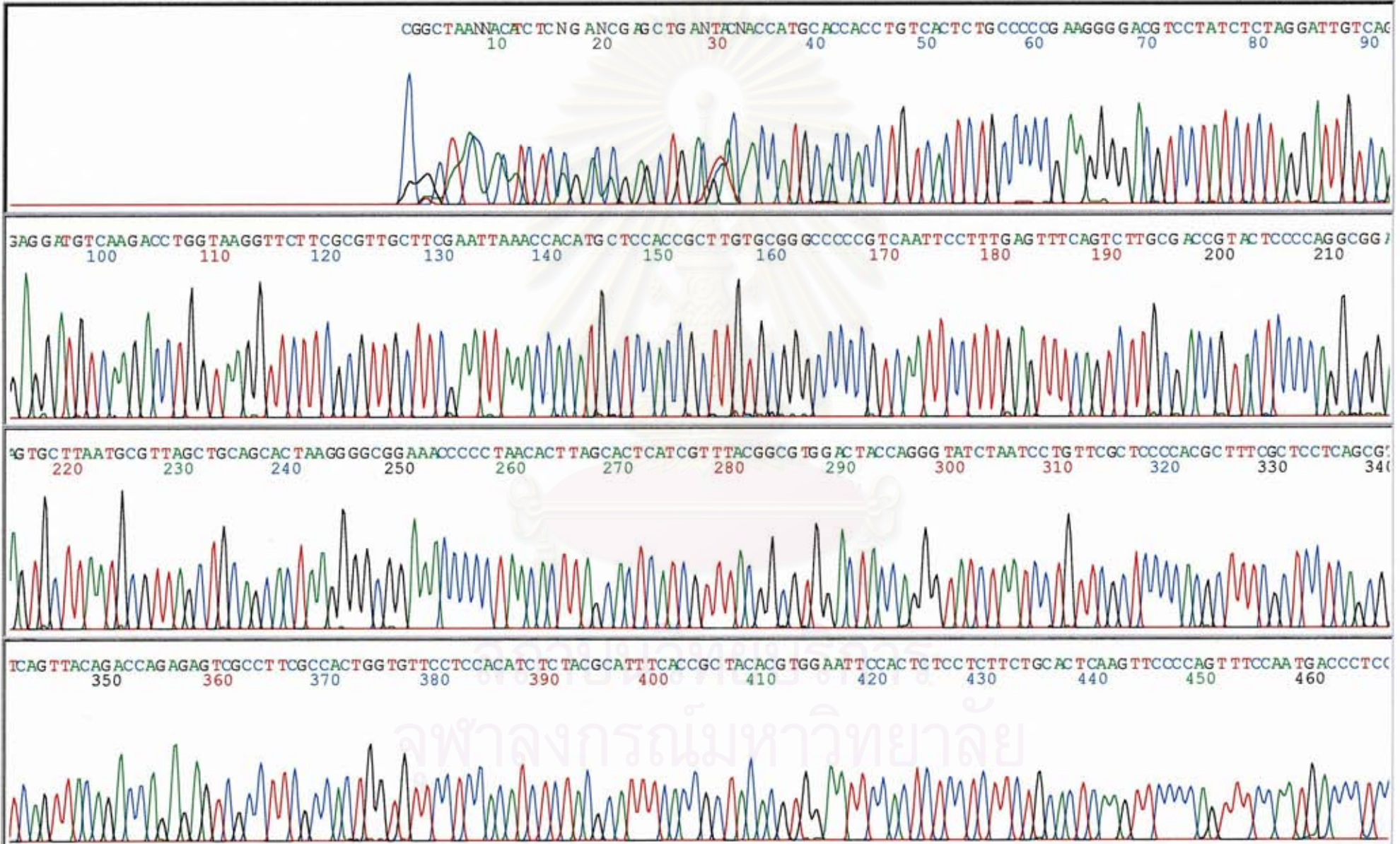


Model 3100
Version 3.7
Basecaller-3100APOP6S13_1100R
BC 1.5.0.0
Cap 16

1-8-48A_H06_13_1100R_16.ab1

Signal G:263 A:162 T:175 C:209
DT3100POP6{BDv3}v1.mob
BSU_3100
Points 250 to 10106 Pk 1 Loc: 250

Page 1 of 3
Tue, Aug 02, 2005 8:28 AM
Mon, Aug 01, 2005 11:57 PM
Spacing: 11.38{11.38}





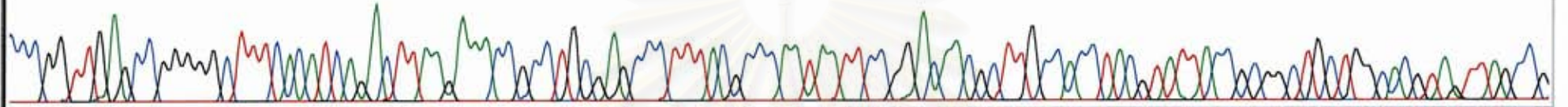
Model 3100
Version 3.7
Basecaller-3100APOP6S13_1100R
BC 1.5.0.0 Cap 16

1-8-48A_H06_13_1100R_16.ab1

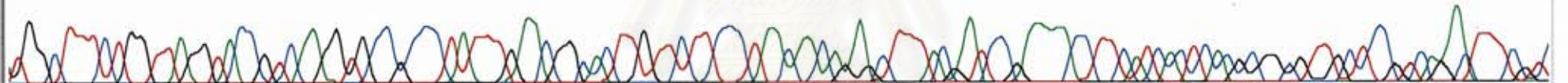
Signal G:263 A:162 T:175 C:209
DT3100POP6{BDv3}v1.mob
BSU_3100
Points 250 to 10106 Pk 1 Loc: 250

Page 2 of 3
Tue, Aug 02, 2005 8:28 AM
Mon, Aug 01, 2005 11:57 PM
Spacing: 11.38{11.38}

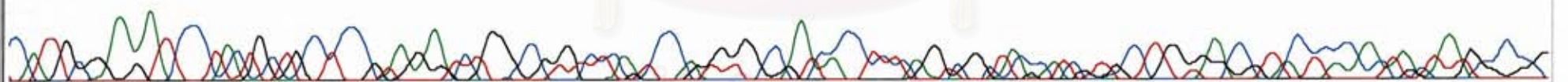
XCCGG T TGAGCCGGGGGC TTTCACATCAGACT TAAGAAACCGCC TCGAGCCCT TTACGCCCAATAATTCCG GACAACGC TTGCCACCTACG TATTACCGCGGCTGC TGGCACGTAGTTAGCCG
470 480 490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 59



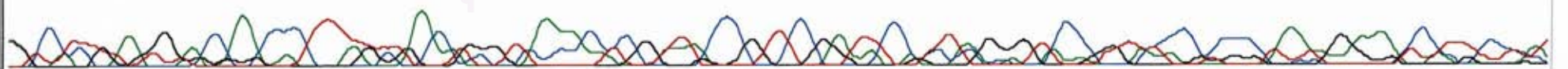
TG GC TTTC TGG TTAGGTACCG TCAAGG TGCCGCCCTATTTG AACGGCAC TTG TTCTTCC TAAACACAGAGCTTTACG ATCCGAAAAC TT CATCACTCACGCGG CGTTGC TCNGTCAGACTTTTCGT
0 600 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700 710



CA TNGC GNA AATCCCTACTG CTGC CTCCGTAGGANTCT GGG CCGNGTCANTCCAGNGNGCGANCA CCTCA GGTGGNTAN C ATCG TGCCTGGNGAN CGTTACCTCACA ACTA CT ANGGCCCGG
720 730 740 750 760 770 780 790 800 810 820 830 840 850



GTCTNTGTANNGGAGCC AANCNCT TTTTGT TGANCA GGGNTCAAAA CATCGGAT ACCCGG TNCNGAATNC CNNTTA GGG GGTACCNGG TATCNCNN CNCNT AANA GGAAAN TCN TTTC CTNA
860 870 880 890 900 910 920 930 940 950 960 970



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

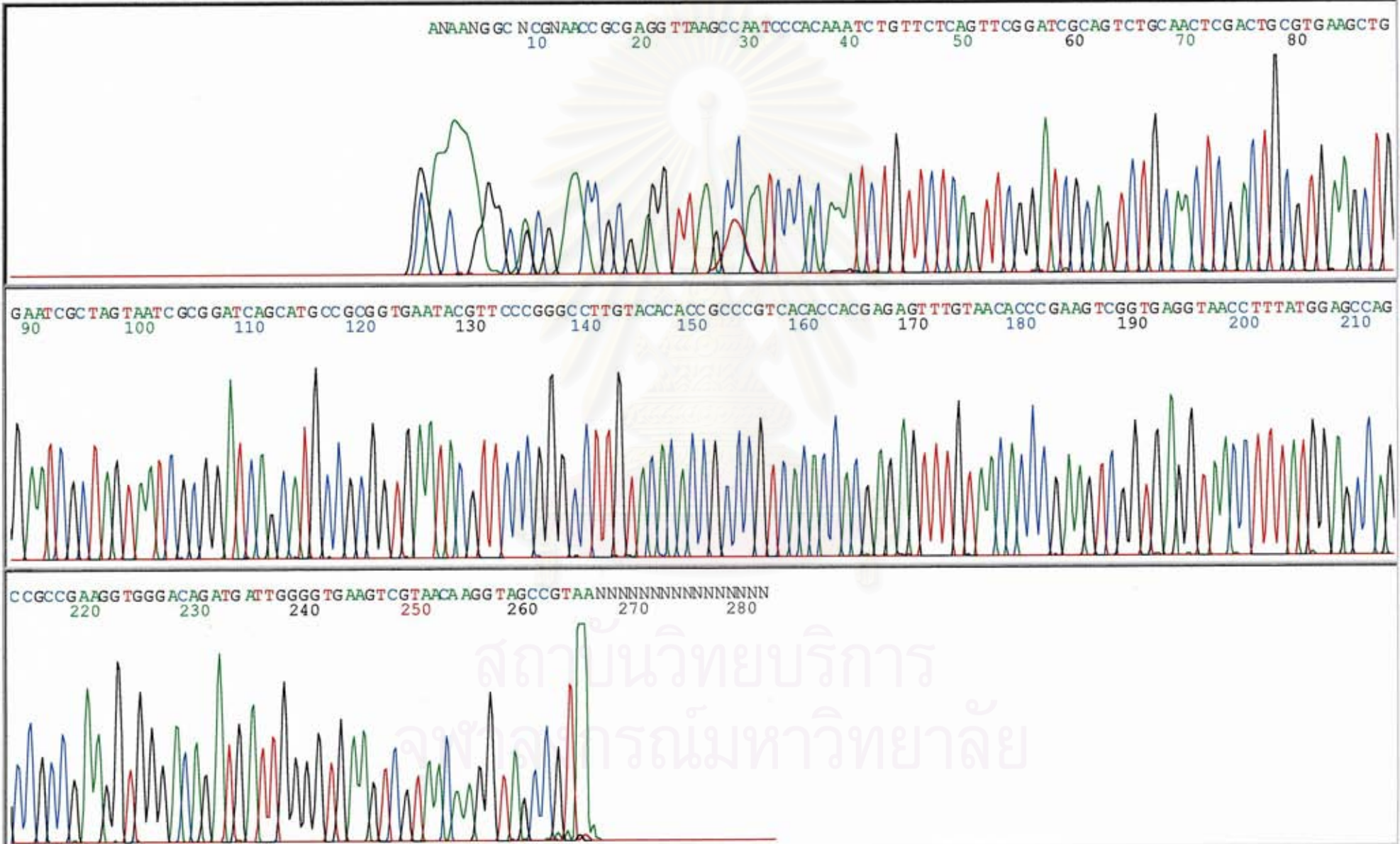


Model 3100
Version 3.7
Basecaller-3100APOP6S13_1241F
BC 1.5.0.0 Cap 4

1-8-48B_B12_13_1241F_04.ab1

Signal G:238 A:130 T:79 C:100
DT3100POP6{BDv3}v1.mob
BSU_3100
Points 250 to 4000 Pk 1 Loc: 250

Page 1 of 1
Tue, Aug 02, 2005 8:31 AM
Tue, Aug 02, 2005 2:24 AM
Spacing: 11.77{11.77}



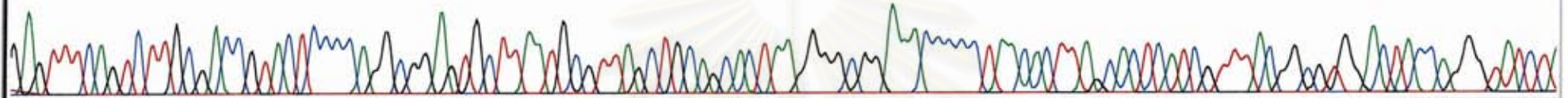


Model 3100
Version 3.7
Basecaller-3100APOP6S13_1385R
BC 1.5.0.0
1-8-48B_A12_13_1385R_02.ab1
Cap 2

Signal G:187 A:106 T:131 C:128
DT3100POP6(BDv3)v1.mob
BSU_3100
Points 250 to 10106 Pk 1 Loc: 250

Page 2 of 2
Tue, Aug 02, 2005 8:30 AM
Tue, Aug 02, 2005 2:24 AM
Spacing: 11.77{11.77}

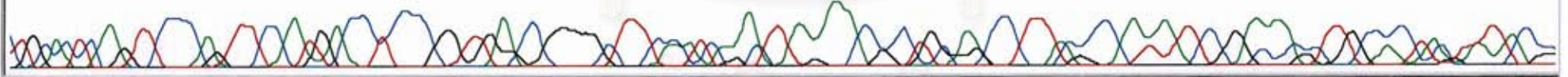
GAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGTCTAATGCGTTAGCTGCAGCCTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTT
470 480 490 500 510 520 530 540 550 560 570 580



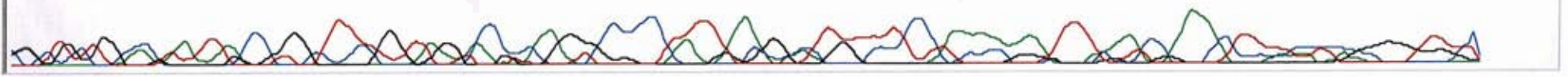
ATCCTGTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCTCAGCGTCAGTTACAGACANAGAGTCGCC TTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTCAACGCTACACGTGGAAATTCACCTCTCCTCTTC
590 600 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700 710



TGCACTCAAGTTNCCAGTTTCCAATGACCTCCCCGGTTGANCCGGGGCTTTCAATCAAANTTA AAAA C G CCTGCNAGCCCTTNCCC CAANA TTCCGGAAAA CCTNGCCACCTACGTATTA CCC
720 730 740 750 760 770 780 790 800 810 820 830 840



GGNTGCTGGNCCGTANTTANCCGGNNTTNTGGTTAGSNACNNCAA G GNNCCCCCTATTTAANGGNNNTTTTTCNTAAAAAAAATTTNAAACCNAA AACTTNTTCTCANGGGGNTNTTC
850 860 870 880 890 900 910 920 930 940 950 960 970



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

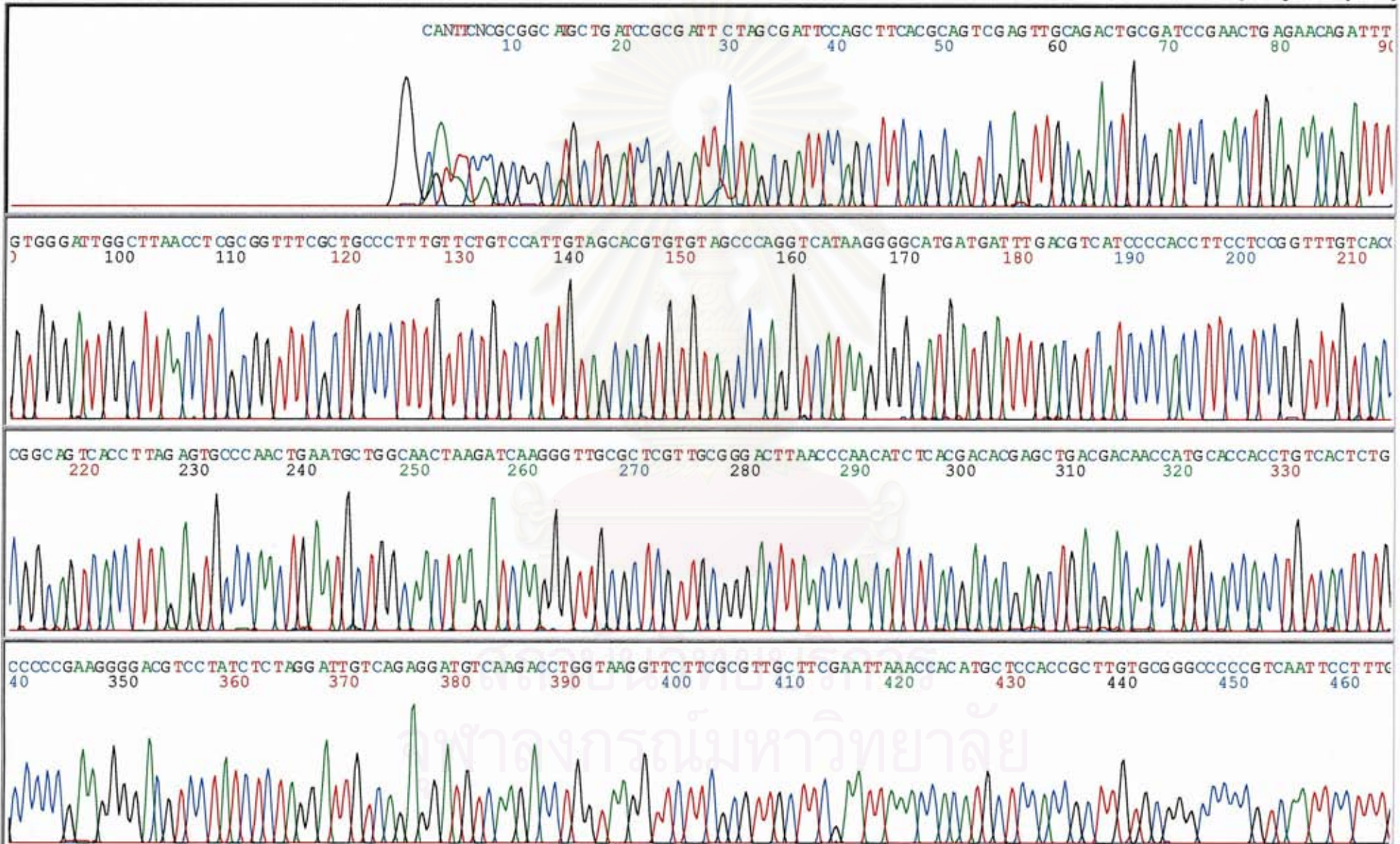


Model 3100
Version 3.7
Basecaller-3100APOP6S13_1385R
BC 1.5.0.0 Cap 2

1-8-48B_A12_13_1385R_02.ab1

Signal G:187 A:106 T:131 C:128
DT3100POP6{BDV3}v1.mob
BSU_3100
Points 250 to 10106 Pk 1 Loc: 250

Page 1 of 2
Tue, Aug 02, 2005 8:30 AM
Tue, Aug 02, 2005 2:24 AM
Spacing: 11.77{11.77}

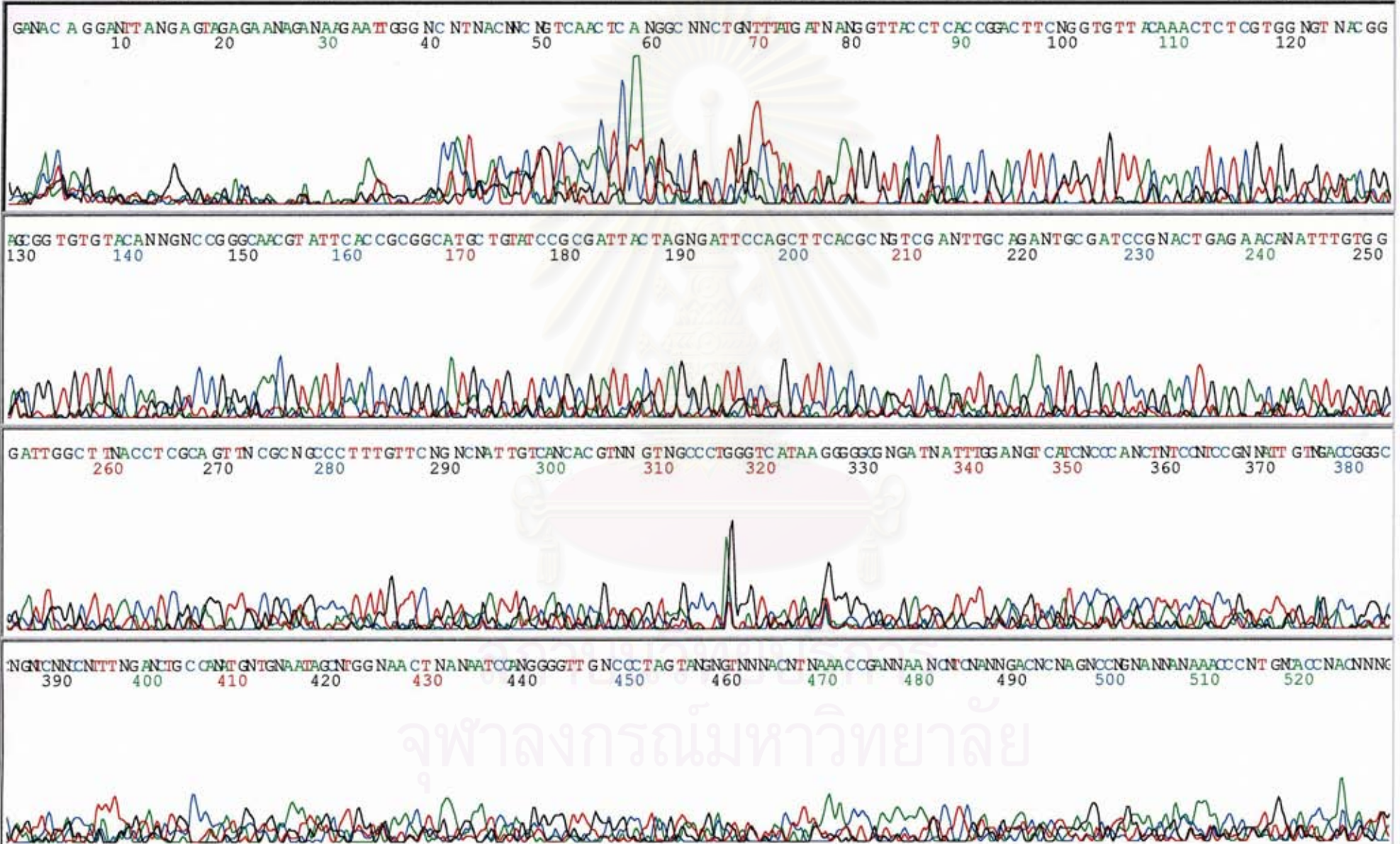




Model 3100
Version 3.7
Basecaller-3100APOP6S23_1492R
BC 1.5.0.0
23-6-05_A02_23_1492R_02.ab1
Cap 2

Signal G:6 A:6 T:6 C:6
DT3100POP6(BDv3)v1.mob
BSU_3100
Points 250 to 10106 Pk 1 Loc: 250

Page 1 of 2
Fri, Jun 24, 2005 8:38 AM
Thu, Jun 23, 2005 4:47 PM
Spacing: 12.49(12.49)



ผลการศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์

K-05 กับข้อมูลใน GenBank

>gi|47834651|gb|AY553097.1| *Bacillus subtilis* strain MO4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length=1504

Score = 2198 bits (1109), Expect = 0.0

Identities = 1182/1201 (98%), Gaps = 4/1201 (0%)

Strand=Plus/Minus

Query 2 TACGGCTACCTTGTACGACTTCACCCCAATCATCTGTCCCACCTTCGGCGGCTGGCTCC 61
 |||
 Sbjct 1495 TACGGCTACCTTGTACGACTTCACCCCAATCATCTGTCCCACCTTCGGCGGCTGGCTCC 1436

Query 62 ATAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTG 121
 |||
 Sbjct 1435 ATAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTG 1376

Query 122 TACAAGGCCCGGGAACGTATCAATCCGCGGCATGCTGATCCGCGATT-CTAGCGATTCCA 180
 ||| |
 Sbjct 1375 TACAAGGCCCGGGAACGTATTCA-CCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCA 1317

Query 181 GCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGC 240
 |||
 Sbjct 1316 GCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGC 1257

Query 241 TTAACCTCGCGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTAGCCCAGGT 300
 |||
 Sbjct 1256 TTAACCTCGCGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTAGCCCAGGT 1197

Query 301 CATAAGGGGCATGATGATTTGACGTATCCCCACCTTCCTCCGTTTGTACCCGGCAGTC 360
 |||
 Sbjct 1196 CATAAGGGGCATGATGATTTGACGTATCCCCACCTTCCTCCGTTTGTACCCGGCAGTC 1137

Query 361 ACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGA 420
 |||
 Sbjct 1136 ACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGA 1077

Query 421 CGGCTAACAACATCTC-CGAC-CGAGCTGACTACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCC 478
 | |||
 Sbjct 1076 CTTAACCAACATCTCACGACAGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCC 1017

Query 479 CCCGAAGGGGACGTCCTATCTCTAGGATTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCT 538
 |||
 Sbjct 1016 CCCGAAGGGGACGTCCTATCTCTAGGATTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCT 957

Query 539 TCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCT 598
 |||
 Sbjct 956 TCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCT 897

Query 599 TTGAGTTTCAGTCTTGCACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGC 658
 |||
 Sbjct 896 TTGAGTTTCAGTCTTGCACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGC 837

Query 659 ACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGG 718
 |||
 Sbjct 836 ACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGG 777

Query 719 GTATCTAATCCTGTTGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGA 778
 |||
 Sbjct 776 GTATCTAATCCTGTTGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGA 717

Query 775 GTCGCCTTCGCCACTGGTGTCTCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACACGTGGAAT 838
 |||
 Sbjct 716 GTCGCCTTCGCCACTGGTGTCTCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACACGTGGAAT 857

Query 839 TCCACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAGCC 898
 |||
 Sbjct 656 TCCACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAGCC 597

Query 899 GGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGAGCCCTTTACGCCAATAATTCCG 958
 |||
 Sbjct 596 GGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGAGCCCTTTACGCCAATAATTCCG 537

Query 959 GACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTC 1018
 |||
 Sbjct 536 GACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTC 477

Query 1019 TGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCGCCCTATTTGAACGGCACTTGTTCCTCCCTAACAACA 1078
 |||
 Sbjct 476 TGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCGCCCTATTTGAACGGCACTTGTTCCTCCCTAACAACA 417

Query 1079 GAGCTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGGCGGCTTGTCCGTCAGACTTTCGTC 1138
 |||
 Sbjct 416 GAGCTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGGCGGCTTGTCCGTCAGACTTTCGTC 357

Query 1139 CATGGCGGAAAATCCCTACAGCTGCTGCCCTCCCGTAGGAACTGGGCCGGGTCTCATTCCCA 1198
 |||
 Sbjct 356 CATTGCGGAAGATCCCTACTGCTGCCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGCTCTCAGTCCCA 297

Query 1199 G 1199
 |
 Sbjct 296 G 296

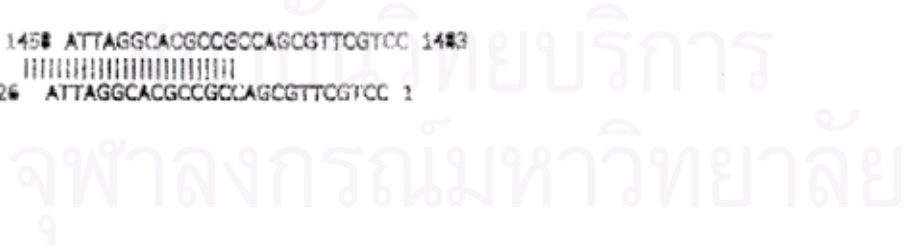
Score = 488 bits (200), Expect = 2e-110
 Identities = 206/206 (100%), Gaps = 0/206 (0%)
 Strand=Plus/Minus

Query 1278 TGTAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTTTATGTCTGAACCATGCGGTCAAACAACCATCCG 1337
 |||
 Sbjct 206 TGTAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTTTATGTCTGAACCATGCGGTCAAACAACCATCCG 147

Query 1338 GTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCACTCTACAGGCAGGTTAGCCACGTGTTAC 1397
 |||
 Sbjct 146 GTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCACTCTACAGGCAGGTTAGCCACGTGTTAC 87

Query 1398 TCACCCGTCGCGCGCTAACATCAGGGAGCAAGCTCCCATCTGTCCGCTCGACTTGCATGT 1457
 |||
 Sbjct 86 TCACCCGTCGCGCGCTAACATCAGGGAGCAAGCTCCCATCTGTCCGCTCGACTTGCATGT 27

Query 1458 ATTAGGCACGCCGCCAGCGTTGCTCC 1483
 |||
 Sbjct 26 ATTAGGCACGCCGCCAGCGTTGCTCC 1

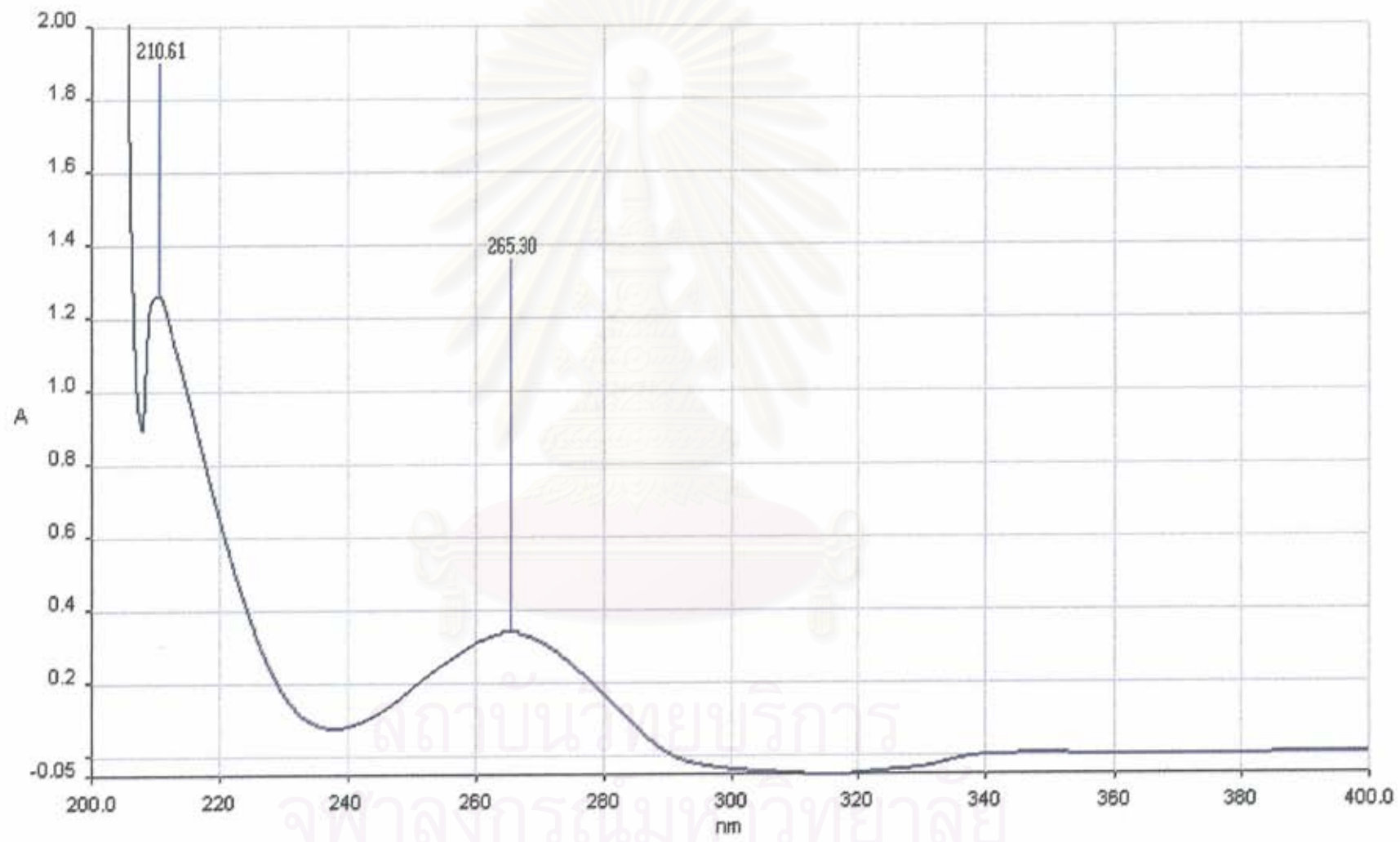


โครมาโทแกรมการวิเคราะห์ลักษณะสมบัติของสารที่ I

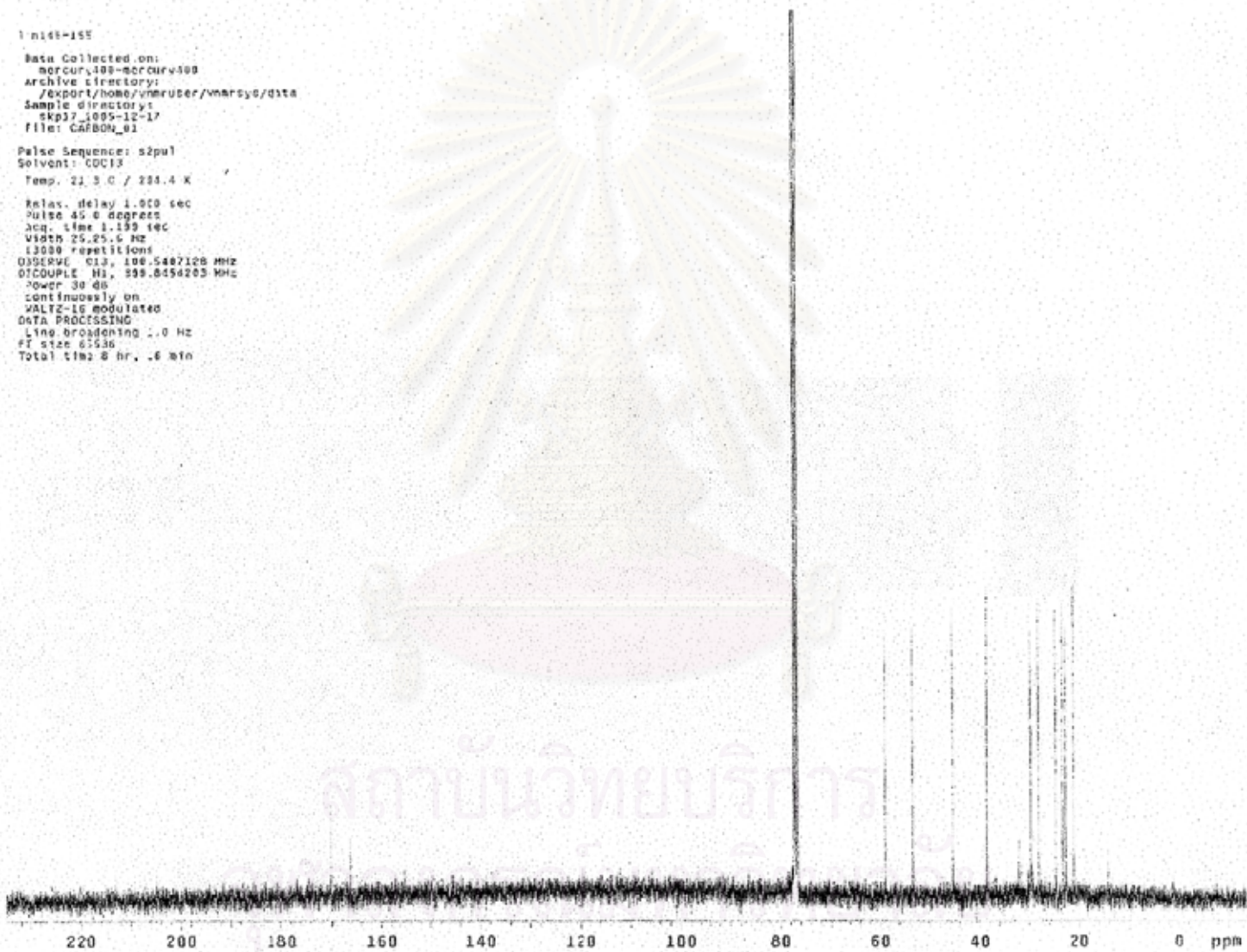
1. UV-VIS spectrum ของสารที่ I
2. ^{13}C -NMR spectrum ของสารที่ I
3. ^1H -NMR spectrum ของสารที่ I
4. COSY spectrum ของสารที่ I
5. HMBC spectrum ของสารที่ I
6. MS spectrum ของสารที่ I



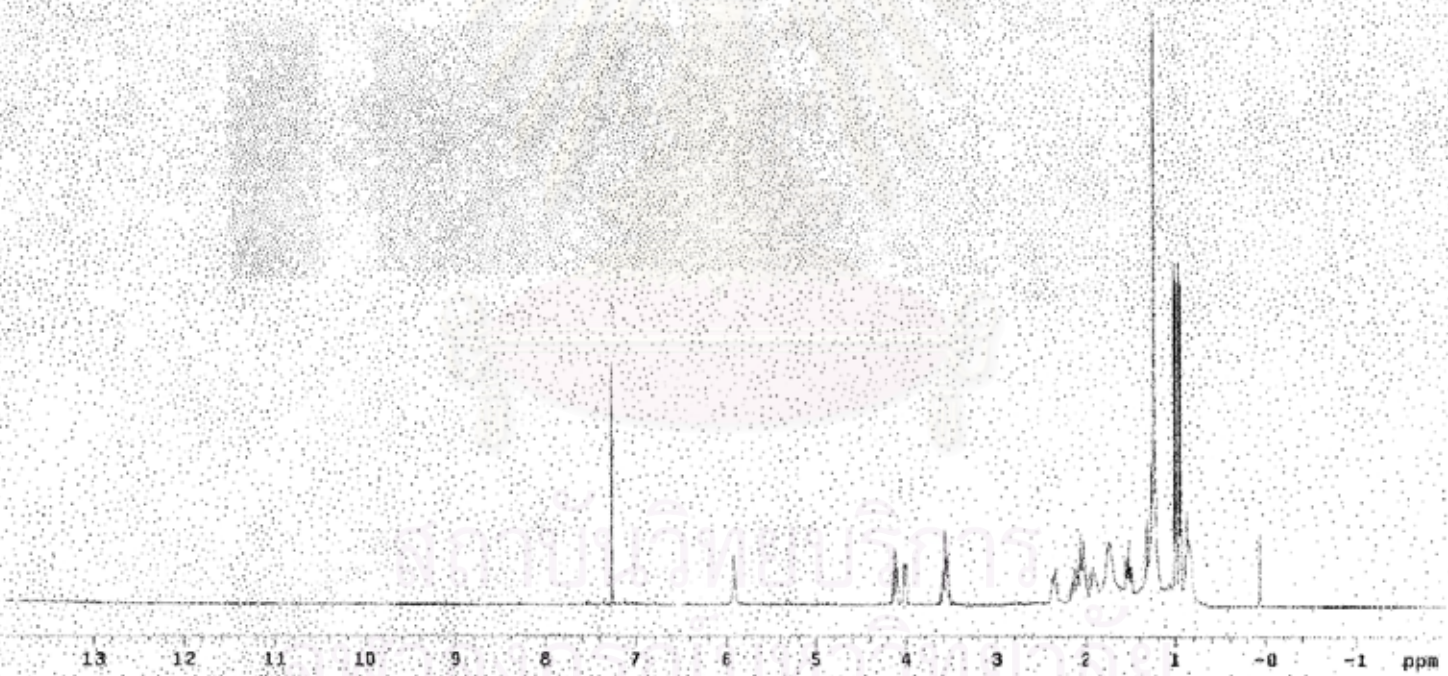
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



1-n148-155
Data Collected on:
mercur-100-mercurv300
Archive directory:
/export/home/vmruber/vmarsys/data
Sample directory:
skp37_1005-12-17
File: CARBON_01
Pulse Sequence: s2pul
Solvent: CDCl3
Temp: 21.3 C / 291.4 K
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.199 sec
Width 25.25.6 Hz
13000 repetitions
OBSERVE C13, 100.6487128 MHz
DECUPLE H1, 500.8454203 MHz
Power 30 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 1.0 Hz
FT size 6536
Total time 8 hr. .6 min



11m45-155
FULL spectrum
Date Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/export/home/vmruser/vmruser/data
Sample directory:
exp7-2005-12-17
File: PROTON
Pulse sequence: c2pu1
Solvent: CDCl3

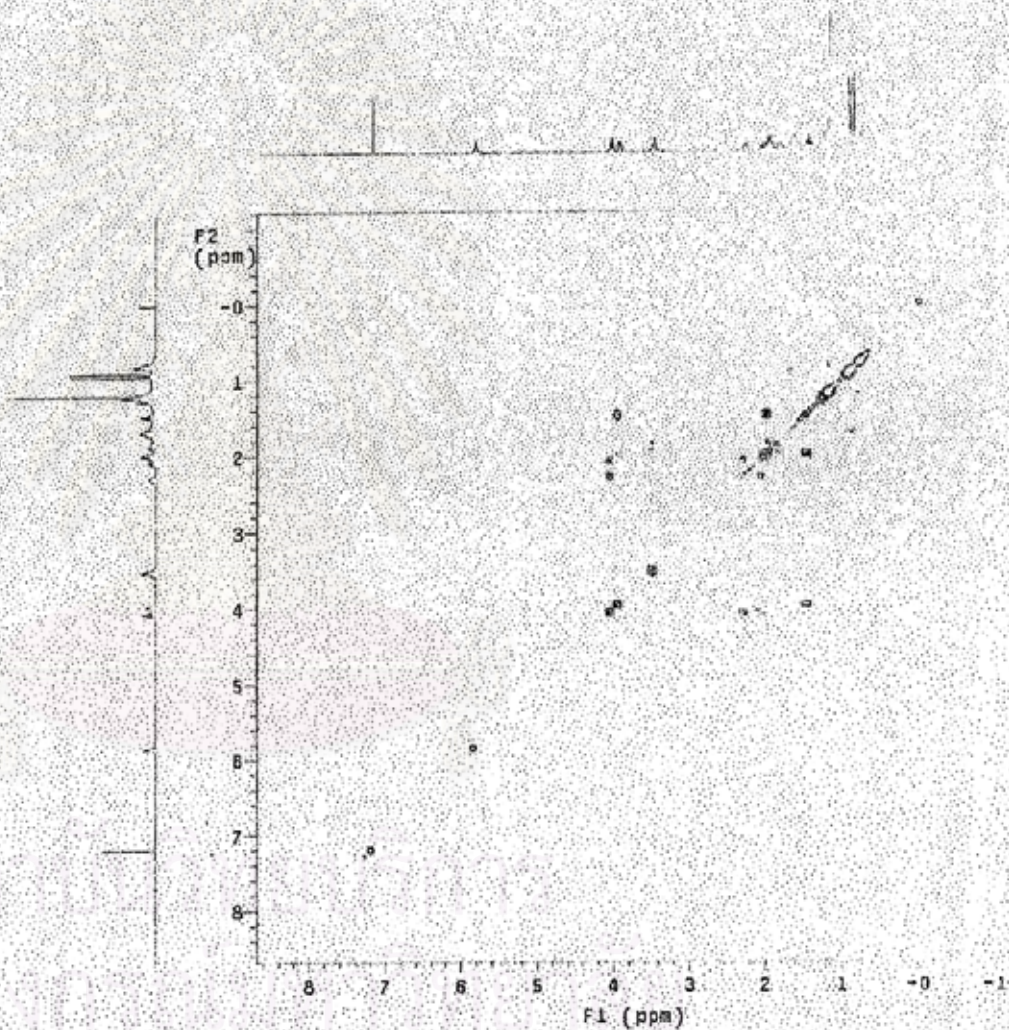


1inj45-155

Data Collected on
#mercury400-mercury400
Archive directory:
/export/home/vmruser/vmr/sys/data
Sample directory:
SKD17_2005-12-17
File: g0007_01

Pulse sequence: g0007
Solvent: CCl₃
Temp: 29.5 C / 299.5 K

Relax. delay: 1.000 sec
Acq. time: 0.138 sec
Width: 3968.3 Hz
F0 width: 1984.3 Hz
Single scan
128 increments
OBSERVE: #1, 399.4434000 MHz
DATA PROCESSING
Sf: sine bell 0.015 sec
F1 DATA PROCESSING
Sf: sine bell 0.012 sec
FT: 128 1024 x 1024
Total time: 3 min



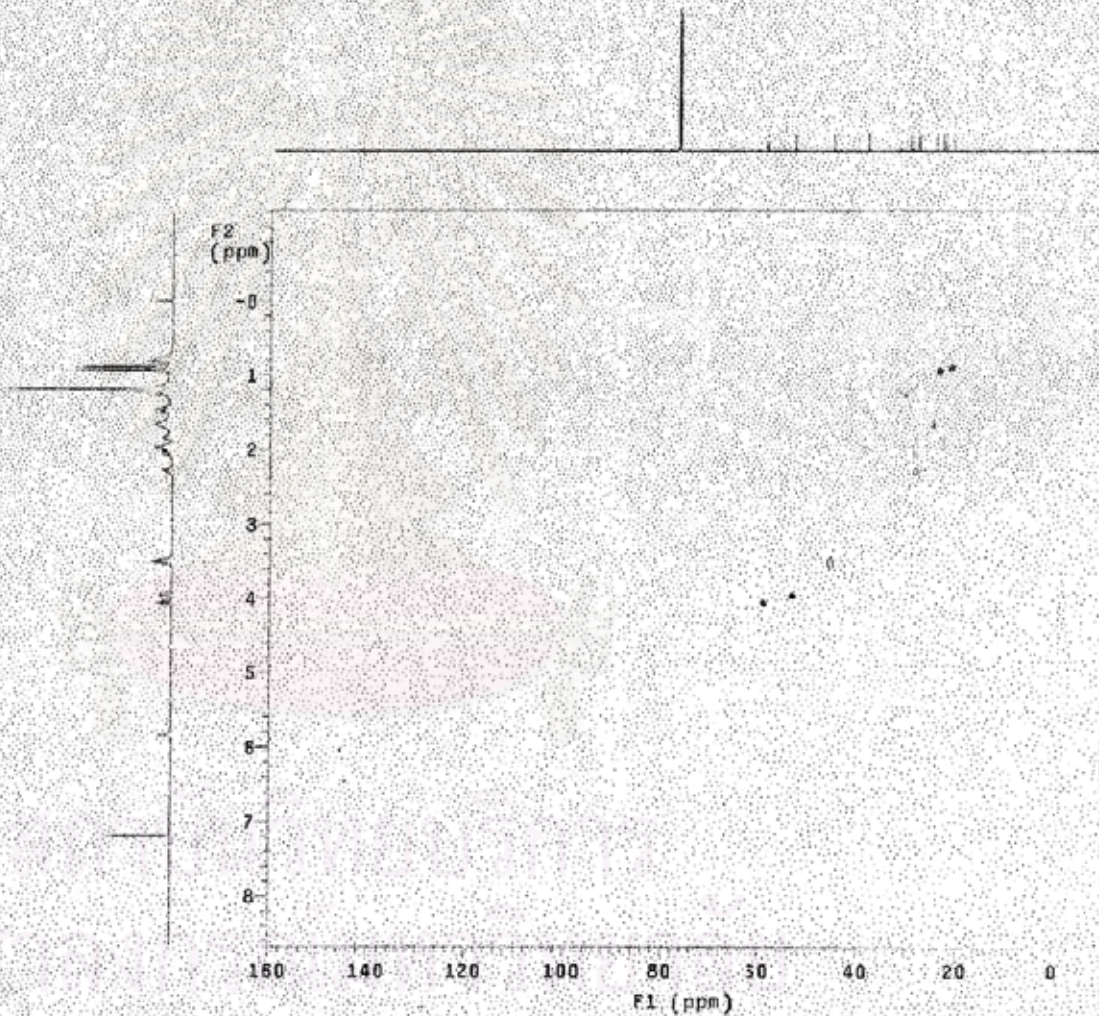
116145-155

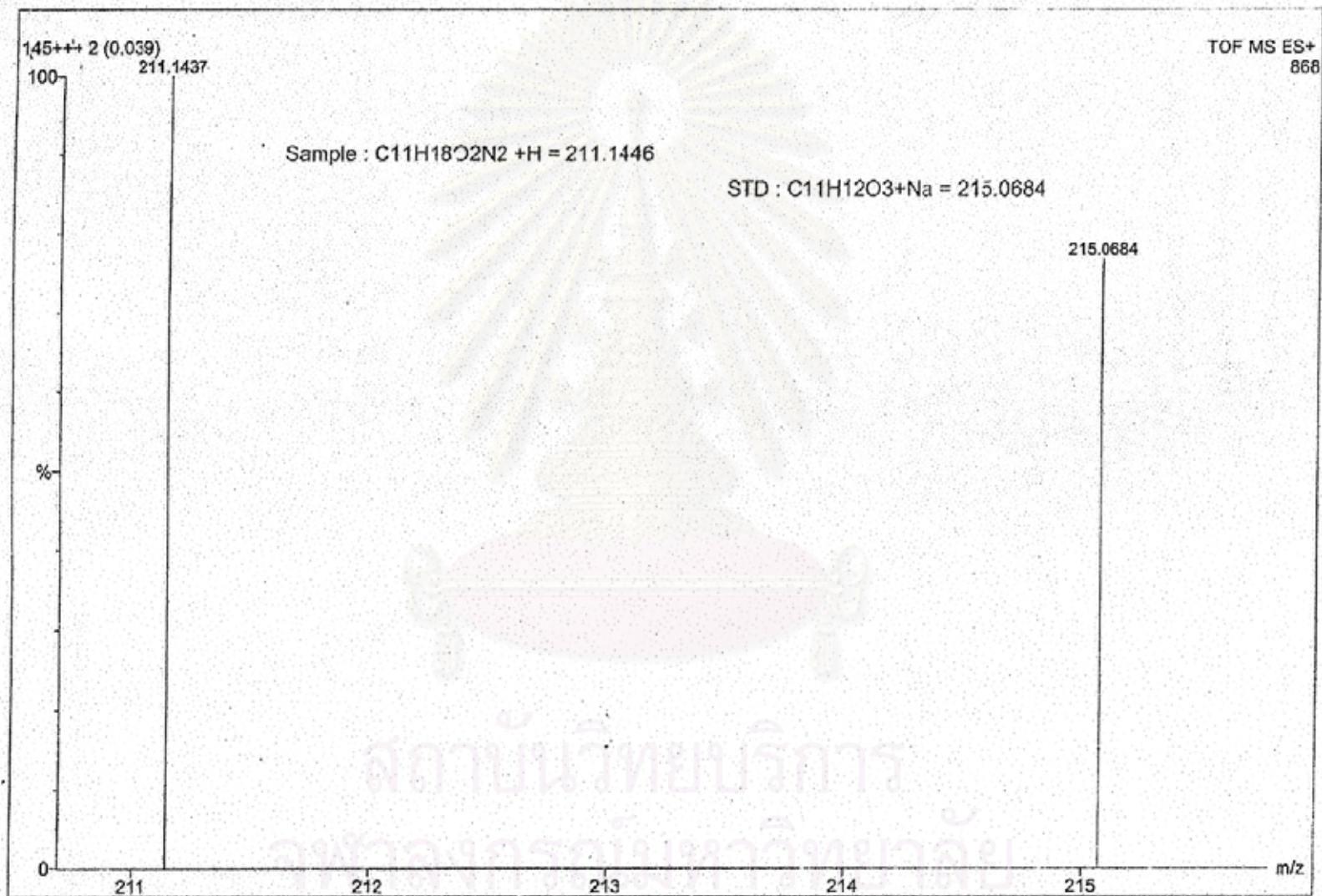
Data Collected On:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/expct/home/vmruser/vmrsys/data
Sample directory:
skp17_2005-12-17
File: CHSOC_01

Pulse Sequence: gHSQC
Solvent: CDCl3

Temp: 21.3 C / 294.4 K

Relax. delay: 1.000 sec
Acq. time: 8.191 sec
Width: 3368.3 Hz
2D Width: 17094.0 Hz
4 repetitions
2 x 128 increments
OBSERVE: H1, 313.843466 MHz
DECOUPLE: C13, 101.5482533 MHz
Power: 3.00
on during acquisition
off during delay
GARP-1 modulated
DATA PROCESSING
Gauss spoolization: 0.081 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss spoolization: 0.017 sec
F1 size: 1024 x 1024
Total time: 2.9 min





โครมาโทแกรมการวิเคราะห์ลักษณะสมบัติของสารที่ II

1. ^{13}C -NMR spectrum ของสารที่ II
2. ^1H -NMR spectrum ของสารที่ II
3. COSY spectrum ของสารที่ II
4. HMBC spectrum ของสารที่ II
5. MS spectrum ของสารที่ II



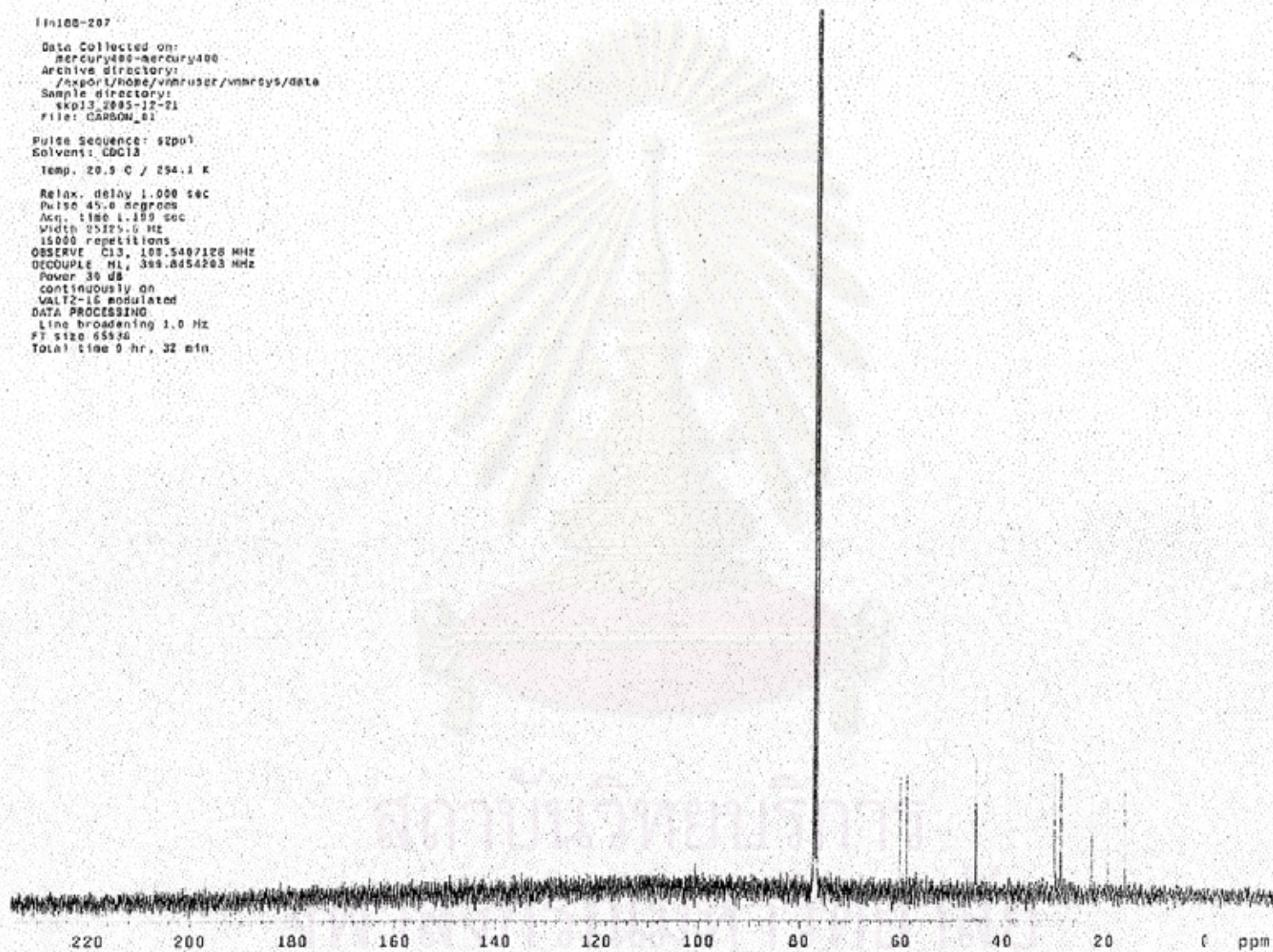
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

11100-207

Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/export/home/vmruser/vmrucys/data
Sample directory:
sk013_2005-12-21
File: CARSON_01

Pulse Sequence: zgpg1
Solvent: CDCl3
Temp. 20.5 C / 294.1 K

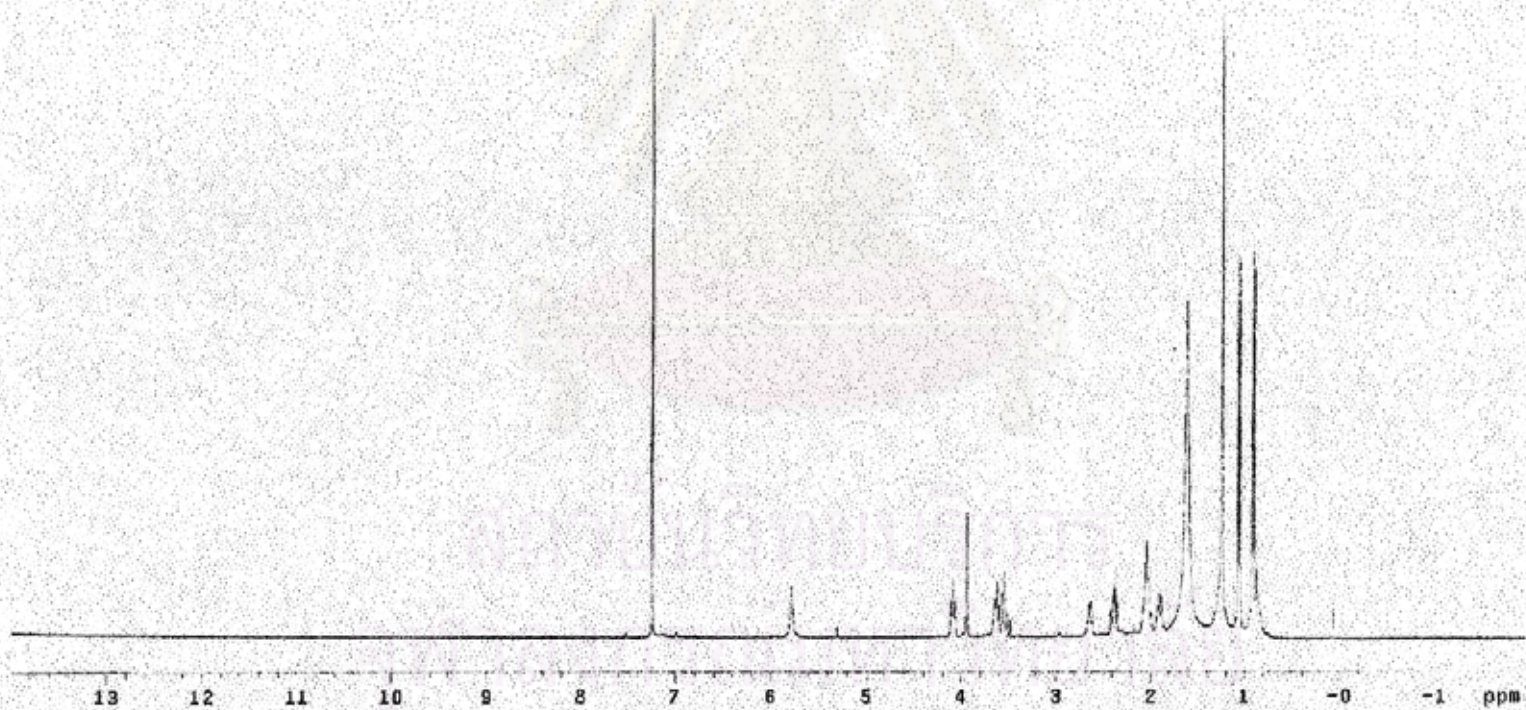
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.199 sec
Width 25125.0 Hz
15000 repetitions
OBSERVE C13, 101.5407128 MHz
DECOUPLE H1, 399.8454203 MHz
Power 39 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 1.0 Hz
FT size 65536
TOTAL time 0 hr, 32 min



11108-207
Full Spectrum

Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/export/hcme/vharseser/vme/sys/data
Sample directory:
skp13 2005-12-21
File: PROTOA

Pulse Sequence: s2pu
Solvent: CDCl3



11n189-217

Data Collected on:
mercury400-ma-cury400
Archive directory:
/export/home/inneruser/vmr/sys/data
Sample directory:
skp13_1005-12-21
File: gCOSY_01

Pulse Sequence: yCOSY
Solvent: CDCl₃

Temp: 21.4 C / 294.6 K

Relax. delay: 1.000 sec

Acq. time: 3.150 sec

Width: 3937.0 Hz

2D Width: 3937.0 Hz

Single scan

128 increments

OBSERVE: H1, 399.8434650 MHz

DATA PROCESSING

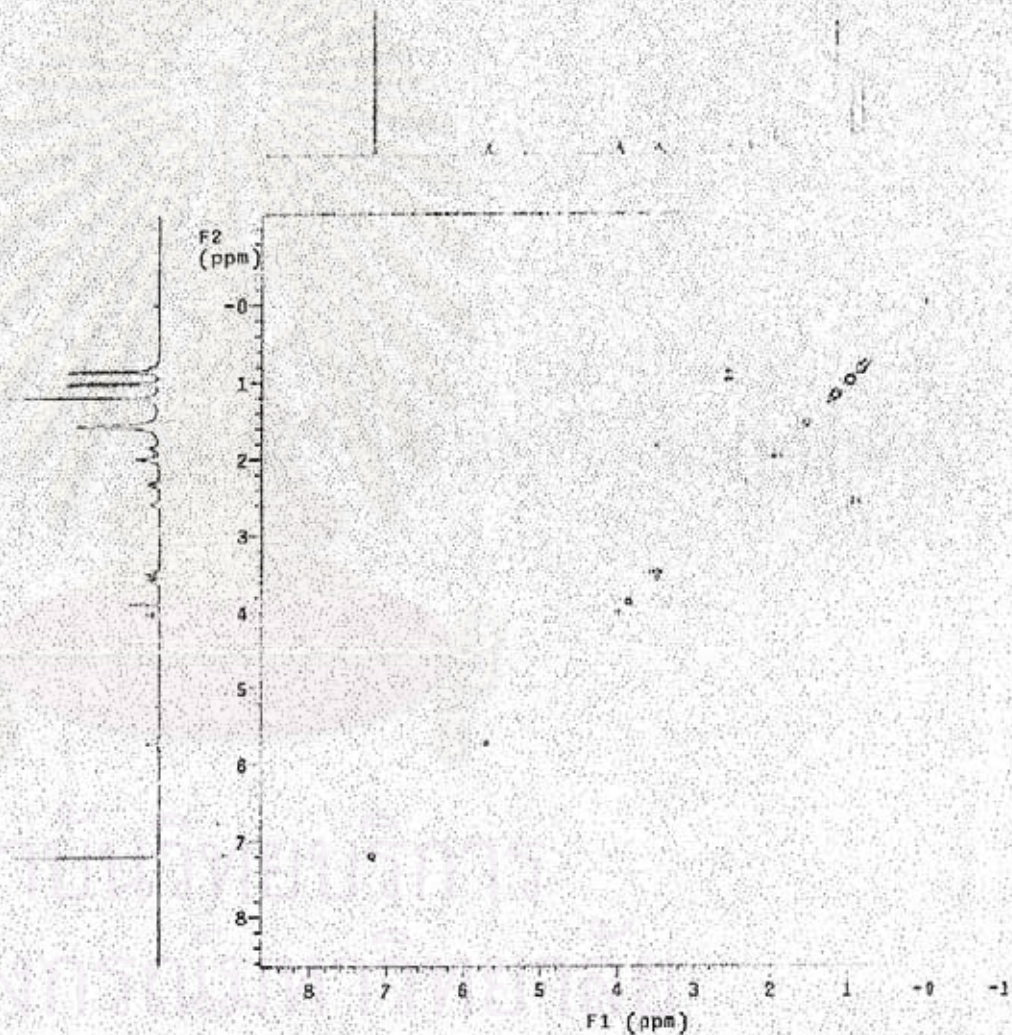
64, sinc bell 0.075 sec

F1 DATA PROCESSING

34, sinc bell 0.033 sec

F1 size 1024 x 1024

Total time 3 min

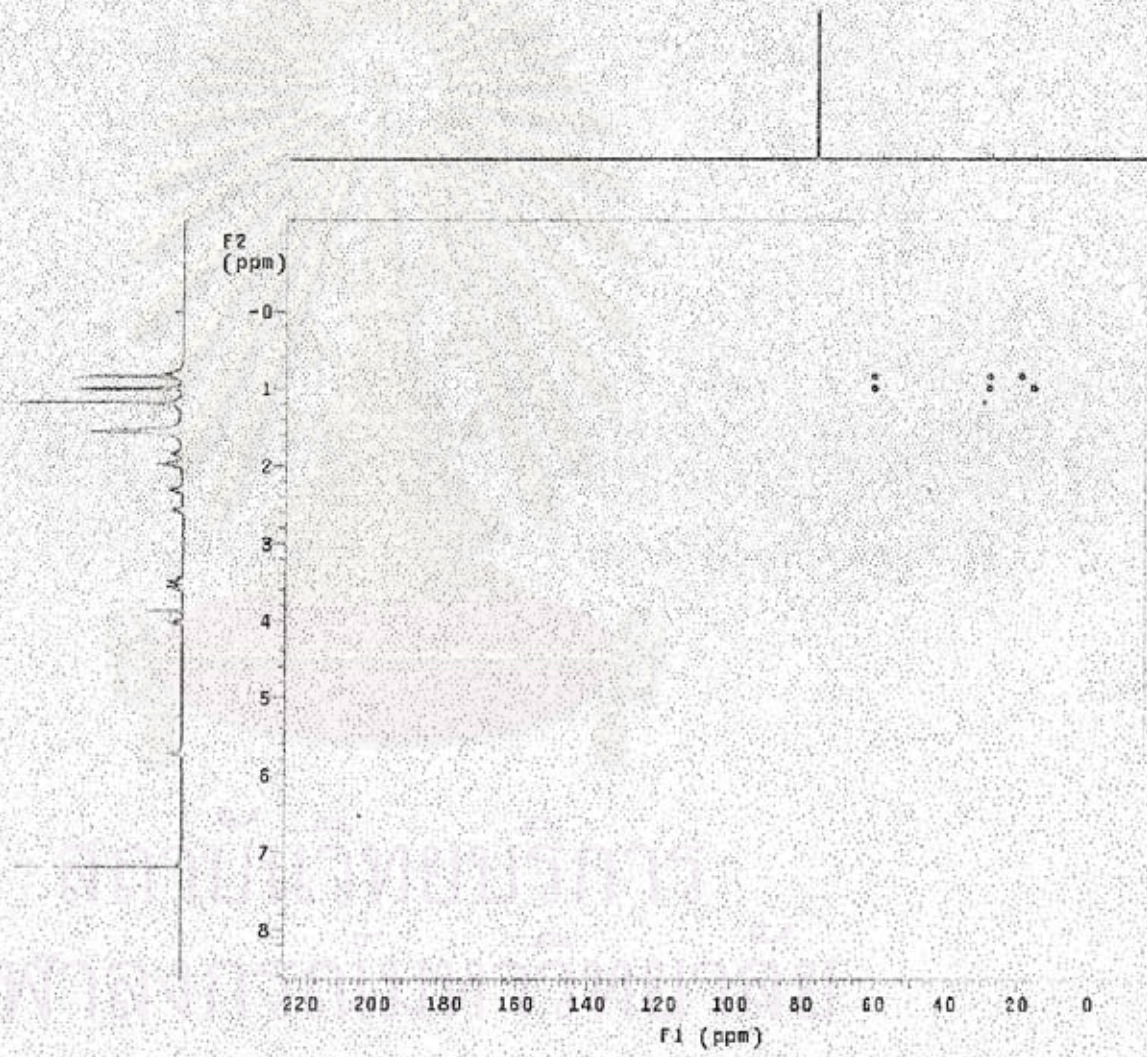


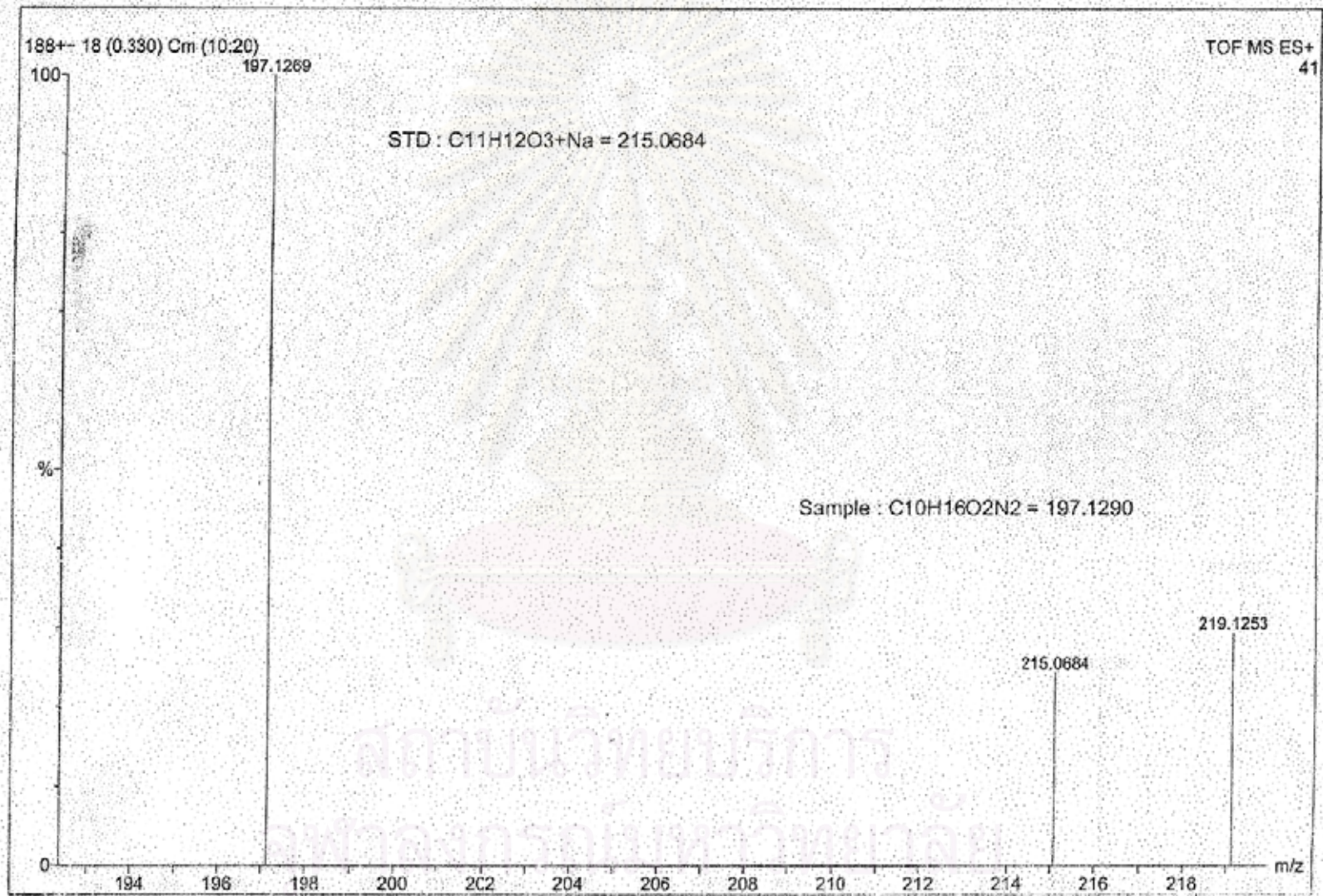
lin109-207

Data Collection on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/export/home/vmraser/vmraser/data
Sample directory:
sk013_2009-11-21
File: gHMBC.f1

Pulse Sequence: gHMBC
Solvent: CDCl3
Temp: 21.4 C / 70.4 F K

Relax. delay 1.000 sec
Acq. Time 0.150 sec
Widtn 2937.0 Hz
2D Width 24154.6 Hz
8 repetitions
400 increments
OBSERVE W: 300.6434050 MHz
DATA PROCESSING
Sine bell 0.075 sec
F1 DATA PROCESSING
Sine bell 0.000 sec
FT size 1024 x 2048
Total time 1 hr, 10 min





ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวสุภารัตน์ บุญยง เกิดวันที่ 17 พฤษภาคม พ.ศ. 2524 ที่จังหวัดนครราชสีมา ได้รับทุน พสวท. สำหรับการศึกษาในระดับปริญญาตรี ถึงปริญญาเอกตั้งแต่ปี พ.ศ. 2542 สำเร็จการศึกษา ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต เกียรตินิยมอันดับสอง ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร เมื่อปีการศึกษา 2545 และในปี 2546 ได้ศึกษาคณะระดับปริญญาโทบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยระหว่างการศึกษาได้เข้าร่วมเสนอผลงานในหัวข้อเรื่อง “Antimicrobial Substance(s) Produced by a New Isolate of *Bacillus* sp. K-05” ในงาน Biothailand 2005 ณ ศูนย์ประชุมแห่งชาติ สิริกิตติ์ เมื่อวันที่ 2-5 พฤศจิกายน 2548



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย