รายงานการวิจัย

เรื่อง

การผลิต การแยก และคุณสมบัติของสารปฏิชีวนะจากแบคทีเรียจำพวกแอคติโนมัยสีท(Actinomycetes)

Production, Isolation and Properties of antibiotics from Actinomycetes

โดย

สัตถาพร สิโรตมรัตน์ และคณะ

สนับสนุนโดยทุนงบประมาณแผ่นดิน
2537

กิตติกรรมประกาศ

เนื่องจากโครงการวิจัยนี้เป็นโครงการวิจัยต่อเนื่อง ต่อจากโครงการการคัดเลือกเชื้อ และการหาสภาวะเหมาะสมที่เชื้อเจริญสามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้ดี จึงขอขอบคุณอาจารย์เพ็ญพรรณ แน่นหนา และผู้ช่วยศาสตราจารย์ณัฐดา วิโรจน์แสงอรุณ ที่ได้มอบเชื้อจุลินทรีย์ให้นำมาทำการวิจัยต่อมา

ขอขอบพระคุณคณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้จัดสรรทุนงบประมาณแผ่นดินเพื่อการวิจัยโครงการนี้ ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยาและภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความสะดวกในการใช้สถานที่ เครื่องมือ อุปกรณ์และวัสดุบางอย่างในการปฏิบัติงานวิจัยจนงานสำเร็จลุล่วงไปในระดับหนึ่ง แม้ว่าไม่สามารถทำการวิจัยจนสำเร็จทุกหัวข้อที่ได้ตั้งเป้าหมายไว้ คือ การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของสารปฏิชีวนะ เนื่องจากขาดประสบการณ์ในการทำงาน ซึ่งผู้วิจัยจะพยายามศึกษาค้นคว้าต่อไป

คณะผู้วิจัย

บทคัดย่อ

ได้แยกสารปฏิชีวนะจากน้ำหมัก (fermentation broth) และเส้นใย (mycelia) ของเชื้อ Streptomyces sp. 74-3 ซึ่งแยกได้จากดินในประเทศไทย โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวดัดแปลงจาก glucose soybean meal medium มีแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนและถั่วเหลืองบดเป็นแหล่งไนโตรเจน ให้สารปฏิชีวนะซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก คือ Staphylococcus aureus ATCC 6538P ได้ดี

สารปฏิชีวนะที่ผลิตได้นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยการสกัดด้วยตัวทำละลายคลอโรฟอร์มและเอธิลอะซิเตต พบว่าสารปฏิชีวนะเป็นสารพวก non - polar นำมาทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นด้วยวิธีทางโครมาโตกราฟฟีได้สารบริสุทธิ์ คือ N_5 เมื่อได้ศึกษาคุณสมบัติของสารในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (MIC) ทราบว่ายับยั้งการเจริญของเชื้อแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์ได้

Abstract

The antibiotic was isolated from both fermentation broth and mycelia of Streptomyces sp. 74-3, a soil isolate from Thailand. The fermentation broth was modified from glucose soybean meal medium using cassava starch as a carbon source and soybean meal as a nitrogen source. This antibiotic was found to have antibacterial activity to the Gram positive bacteria, Staphylococcus aureus ATCC 6538P

This antibiotic was purified by extraction with chloroform and ethyl acetate. It was found to be a non polar substance. By using the technique of chromatogram, the pure substance obtained is N_8. The Minimal Inhibitory concentration (MIC) of this antibiotic showed that it had more effect on the Gram positive bacteria than the Gram negative bacteria at 100 ug/ml. Additionally it could not inhibit the growth of fungi and yeast.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	(1)
บทคัดย่อภาษาไทย	(2)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	(3)
สารบัญ	(4)
สารบัญตาราง	(5)
สารบัญภาพ	(6)
คณะผู้วิจัย	(7)
อักษรย่อ	(8)
บทนำ	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	1
การตรวจเอกสาร	2
ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Taxonomy)	5
อุปกรณ์และวิธีการ	10
ผลการทดลอง	14
สรุปและวิจารณ์ผล	30
เอกสารอ้างอิง	32
ภาคผนวก ก.	37
ข.	42

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1ก	ลักษณะการเจริญบนอาหารของเชื้อ Streptomyces sp. '74-3	7
2ก	คุณสมบัติทางสรีรวิทยาของเชื้อ Streptomyces sp. 74-3	7
3ก	การใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อ Streptomyces sp. 74-3	8
4ก	เปรียบเทียบการใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อ Streptomyces sp. 74-3 กับเชื้อ Streptomyces longisporus	8
5ก	ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ใน column chromatography	13
1	ผลิตสารปฏิชีวนะโดยเชื้อเจริญในฟลาสต์	14
2	ผลิตสารปฏิชีวนะโดยเชื้อเจริญในถังหมัก	15
3	ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ Staphylococcus aureus ATCC 6538P ของสารสกัดเอธิลอะซิเตต และคลอโรฟอร์ม	16
4	ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดเอธิลอะซิเตต (F_1)	16
5	ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญต่อเชื้อ S.aureus ATCC 6538P ของสารละลาย F_1 ที่แยกใน column chromatography	19
6	น้ำหนักแห้งของสารสกัดเส้นใยและส่วนน้ำใส	20
7	ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญต่อเชื้อ S.aureus ATCC 6538P ของสารสกัดเส้นใยและส่วนน้ำใส	21
8	ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญต่อเชื้อ S.aureus ATCC 6538P ของสารสกัดคลอโรฟอร์มแยกบน TLC	23
9	ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญต่อเชื้อ S.aureus ATCC 6538P ของสารสกัดเอธิลอะซิเตตแยกบน TLC	23
10	น้ำหนักสารและฤทธิ์การยับยั้งการเจริญต่อเชื้อ S.aureus ATCC 6538P ของสารกลุ่มต่างๆ ที่ได้จากคอลัมน์โครมาโตกราฟฟี่	25
11	น้ำหนักสารกลุ่มย่อยที่ได้จากสารกลุ่ม C	26
12	ค่า MIC ของสารบริสุทธิ์ N_5 ต่อเชื้อจุลินทรีย์	29

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
1.	ลักษณะเส้นใยของเชื้อ Streptomyces sp. 74-3	6
2.	ลักษณะสะปอร์ของเชื้อ Streptomyces sp. 74-3	6
3.	สารสกัด F_1 แยกบน TLC	18
4.	สาร fraction 1A และ 2 แยกบน TLC	19
5.	สารสกัดคลอโรฟอร์มแยกบน TLC	22
6.	สารสกัดเอธิลอะซิเตตแยกบน TLC	22
7.	ไดอะแกรมสรุปขั้นตอนการสกัดเพื่อให้ได้สาร สกัดคลอโรฟอร์มและเอธิลอะซิเตต	24
8.	ไดอะแกรมขั้นตอนแยกสารบริสุทธิ์จากสารกลุ่ม I	28

คณะผู้วิจัย

1.	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตถาพร สิโรตมรัตน์	ภาควิชาจุลชีววิทยา*	หัวหน้าโครงการ
2.	รองศาสตราจารย์ ดร.สุนิพนธ์ กุมมางกูร	ภาควิชาเภสัชเคมี*	
3.	อาจารย์ ดร.คณิต สุวรรณบริรักษ์	ภาควิชาเภสัชเวท*	
4.	อาจารย์ ณัฐสุรางค์ หอมจันทร์	ภาควิชาชีววิทยา**	

* คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

** คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง

อักษรย่อ

ม.ก.	ย่อจาก	มิลลิกรัม
ม.ม.	"	มิลลิเมตร
ม.ล.	"	มิลลิลิตร
TLC	"	Thin layer chromatography
MIC	"	Minimal Inhibitory Concentration
DMSO	"	dimethyl sulfoxide

บทนำ

สารปฏิชีวนะ (antibiotics) เป็นสารจำพวก secondary metabolites ชนิดหนึ่งที่ผลิตโดยสิ่งมีชีวิต เพื่อยับยั้งหรือทำลายการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง (Waksman 1961, Peleczar และ Reid 1965) สารชนิดนี้จะผลิตในระยะปลายของการเจริญเติบโตของเซลล์แต่ไม่เกี่ยวข้องกับการเจริญของเซลล์ที่ผลิต จึงเรียกกระบวนการนี้ว่า secondary metabolism (Bu' Lock 1961, Walker 1974) สิ่งมีชีวิตที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้ที่สำคัญ คือ จุลินทรีย์ (microorganism) ซึ่งได้แก่ เชื้อราและแบคทีเรียบางชนิด ส่วนใหญ่จะเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม actinomycetes พบว่า 90 เปอร์เซนต์ของสารปฏิชีวนะที่ใช้ในปัจจุบันได้จากจำพวก Streptomyces ซึ่งเป็นตัวสำคัญในกลุ่มดังกล่าว (Kurylowicz 1976, Kanoksilapatham 1981) แต่เชื้อในกลุ่มนี้มักมีการเปลี่ยนแปลง (variation) ได้ง่าย อาจเนื่องมาจากการกลายพันธุ์ (mutation) หรือสภาพของการเจริญ ได้แก่ ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ความเป็นกรดด่าง (pH) ของอาหาร อุณหภูมิและอายุของเชื้อ สภาวะเหล่านี้อาจมีผลต่อสีของเส้นใย (Krasil' Nikov 1960) การสร้างรงควัตถุที่ละลายน้ำ (Kutzner และคณะ 1972) ความสามารถในการสร้างสะปอร์ และสัณฐานวิทยาของผิวสะปอร์ (Kadgkiss 1965) โดยเฉพาะอย่างยิ่งความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะ (Perlman และ Brien 1954) นอกจากนั้นพบว่าเชื้อ Streptomyces จะลดความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะลงตามธรรมชาติภายหลังจากที่มีการปลูกถ่ายเชื้อหลายๆครั้ง ดังนั้นจึงควรเก็บเชื้อต้นตอไว้ด้วยวิธี lyophilization (Otani และคณะ 1987)

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อผลิตสารปฏิชีวนะจากเชื้อจำพวก Actinomycetes ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม
2. แยกสารปฏิชีวนะที่ผลิตได้จากสารที่เจือปน
3. ศึกษาคุณสมบัติของสารปฏิชีวนะที่แยกได้ ดังนี้
   - 3.1 ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ที่ใช้เป็น test organisms (biological properties)
   - 3.2 ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของสารปฏิชีวนะ (physico - chemical properties)

การตรวจเอกสาร

เชื้อแอคติโนมัยสีท (Actinomycetes) เป็นแบคทีเรียจัดอยู่ใน order Actinomycetales ประกอบด้วย 8 ตระกูล (families) คือ Actinomycetaceae Actinoplanaceae Dermatophilaceae Frankiaceae Micromonosporaceae Mycobacteriaceae Nocardiaceae และ Streptomycetaceae (Buchanan และ Gibbons 1974) แบคทีเรียใน order นี้ สามารถสร้างสายเซลล์ที่แตกกิ่งก้านสาขาได้ ในบางตระกูลสายเซลล์จะพัฒนาเป็นเส้นใยคล้ายเชื้อราแต่บอบบางกว่า บางตระกูลพบการสร้างสะปอร์บนเส้นใยเหนืออาหารเลี้ยงเชื้อ (aerial hypha) หรือเส้นใยที่เจริญอยู่ในอาหาร (substrate hypha) มีลักษณะเป็นคู่หรือต่อกันเป็นสายมีจำนวนสะปอร์แตกต่างกัน สายสะปอร์อาจมีลักษณะตรงเป็นวงหรือขดเป็นเกลียวสายสะปอร์อาจจะเกิดเดี่ยวๆ จากเส้นใยหรือเกิดเป็นกลุ่มจากจุดเดียวกันของเส้นใย (verticillate) แต่บางสกุล (genus) ในตระกูล Actinoplanaceae มีสะปอร์เกิดใน sporangium (Buchanan และ Gibbons 1974) เชื้อ Actinomycetes เป็นแบคทีเรียย้อมติดสีแกรมบวก แต่อาจเปลี่ยนแปลงได้ตามอายุของเชื้อ ส่วนพวก mycobacteria จะติดสี acid-fast แบคทีเรียใน order นี้ ส่วนใหญ่เป็นชนิดที่ต้องการออกซิเจน (aerobic) ยกเว้นบางสกุลในตระกูล Actinomycetaceae ที่เป็น anaerobic facultative anaerobic หรือ aerobic ก็ได้

ในธรรมชาติจะพบเชื้อแอคติโนมัยสีทอยู่ทั่วไปทั้งในดิน ปุ๋ยหมัก อาหาร น้ำ และอากาศ พบมากในดินที่มีความลึกต่างๆกัน เป็นดินที่ค่อนข้างแห้งและมีอินทรีย์วัตถุมากเจริญได้ดีในดินที่เป็นกลางหรือเป็นด่างมากกว่าดินที่เป็นกรด มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในดิน (Waksman 1959) บางชนิดทำให้เกิดโรคกับคน สัตว์ และพืช เช่น บางชนิด (species) ในสกุล Actinomyces Norcardia Actinomadura และ Streptomyces เป็นต้น สำหรับ Streptomyces บางชนิดที่พบในดินทำให้เกิดโรค actinomycotic mycetoma กับคนได้ (Rippon 1974)

แบคทีเรียในตระกูล Streptomycetaceae เป็นตระกูลที่มีความสำคัญทางด้านเศรษฐกิจ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่ม Streptomyces ซึ่งมีความสามารถในการผลิตสาร secondary metabolites ได้หลายชนิด เช่น วิตามิน เอนไซม์ รงควัตถุ (pigment) และสารที่มีปฏิกิริยาทางสรีรวิทยาที่สำคัญ คือ สารปฏิชีวนะซึ่งมีความสำคัญทางด้านอุตสาหกรรม (Goodfellow และ Cross 1984) ยาปฏิชีวนะที่รู้จักกันประมาณ 5000 ชนิด พบว่า 60 เปอร์เซนต์ได้มาจากเชื้อ Streptomyces และ 70 เปอร์เซนต์ของยาปฏิชีวนะที่ใช้รักษาโรคติดเชื้อที่มีขายในท้องตลาด (Hopwood และคณะ 1977) ในปัจจุบันนี้มีการนำเชื้อในกลุ่ม

Actinomycetes (Goodfellow และ Cross 1984) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อ Streptomyces (Crawford 1988) มาใช้ในงานด้าน Biotechnology ด้านต่างๆ และนำเอาวิธีการทาง genetic engineering มาใช้เพื่อพัฒนาสายพันธุ์ของเชื้อให้มีความสามารถในการผลิตมากขึ้น โดยการควบคุมในระดับ differentiation

สารจำพวก secondary metabolites เป็นพื้นฐานทางด้านวิทยาศาสตร์ที่ได้รับความสนใจ (Ochi 1982, Lago และ Streicher 1982, Tsai และ Chan 1987) กล่าวได้ว่าแบคทีเรียจำพวก Streptomyces มีการพัฒนามากที่สุด เป็นตัวอย่างของการพัฒนาระหว่าง prokaryotic bacteria และ eukaryotic fungi (Levy, S.B. และ Miller, K.V., 1989)

สารที่เป็น Secondary metabolites อาจเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า idiolites (Walker, 1974) มักผลิตขึ้นในช่วงที่มีการเจริญอย่างรวดเร็ว (exponential phase) ของสิ่งมีชีวิตที่ผลิตเกือบจะสิ้นสุด เป็นลักษณะสำคัญของ secondary metabolism (Martin และ Demain, 1980) ได้แก่ การผลิต amino sugar, quinones, coumarins, epoxides, ergot alkaloids, glutarimides, glycosides, indole derivatives, lactone, macrolides, naphthalenes, peptides, phenazines, polyacetylenes, polyenes, pyrroles, quinolines, terpenoids, tetracyclines เป็นต้น

Bu' Lock และคณะ (1975) ใช้คำว่า trophophase สำหรับเรียก ระยะการเจริญ (growth phase) และใช้ idiophase เรียกระยะที่มีการผลิต idiolites (production phase) ซึ่งได้แก่ สารปฏิชีวนะ การสังเคราะห์สารปฏิชีวนะจะเริ่มขึ้นในช่วงสุดท้ายของระยะการเจริญที่มีการเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างรวดเร็ว (exponential phase) ของจุลินทรีย์ใน batch culture (Haavik 1974, Malik 1979)

ในกรณีที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีชาตุอาหารเป็นส่วนประกอบอยู่น้อย ทำให้จุลินทรีย์ที่เจริญช้าผลิตสารปฏิชีวนะได้เหมือนกัน อัตราการเจริญ (growth rate) ของจุลินทรีย์ที่ผลิตสารปฏิชีวนะก็มีผลต่อ pattern ของการผลิตบ้างเหมือนกัน เช่น การผลิตสารปฏิชีวนะพวก chloramphenicol, colistin, penicillin และ bacitracin จะพบ trophophase-idiophase dynamic เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งสนับสนุนการเจริญอย่างรวดเร็ว แต่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เชื้อเจริญอย่างช้าๆ นั้นพบว่า trophophase และ idiophase จะคาบเกี่ยวกัน (Haavik 1974a, 1974b, Malik and Vining 1970)

ในสภาพธรรมชาติการผลิตสารปฏิชีวนะอาจจะเป็นประโยชน์ต่อการอยู่รอดเนื่องจากมีอาหารจำกัดสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ (Gottlieb, 1976) การผลิตสารปฏิชีวนะบางชนิด

เช่น edeine, bacitracin, gramicidin, tyrocidines และ polymyxin เกิดขึ้นในขณะที่การสร้างเอนโดสะปอร์ของแบคทีเรียกลุ่มที่มีรูปร่างเป็นท่อน และสารบางชนิดที่เกิดในขณะที่มีการสร้างโคนิเดียของพวก Streptomyces (Halvorson และคณะ, 1972, Demain and Pirct, 1979)

เชื้อในสกุล Streptomyces สามารถสร้างเส้นใยทั้งที่เจริญอยู่เหนืออาหารเลี้ยงเชื้อและที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะเส้นใยไม่มีผนังกั้นเซลล์ (coenocytic hyphae) ในการแยกเชื้อจะสังเกตเห็นโคโลนีมีขนาดเล็กเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1-10 มิลลิเมตร สร้างสะปอร์แบบสายโซ่ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ในช่วง 25-35 °C ยกเว้นบางสายพันธุ์ที่เจริญในช่วงอุณหภูมิสูง (Thermophilic range) ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการเจริญ คือ 6.5-8.0 ถูกยับยั้งการเจริญได้โดยสารต้านแบคทีเรียบางชนิด เช่น penicillin, streptomycin, tetracycline เป็นต้น (Davis et al, 1973) มีการจัดจำแนกชนิด (species) ของ Streptomyces ตามลักษณะโดยละเอียดที่แตกต่างกันไปตามวิธีมาตรฐานในการศึกษาของ Shirling และ Gottlieb (1966, 1969) และ Buchanan และ Gibbons (1974) เช่น ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological characteristics) ได้แก่ สีของกลุ่มสะปอร์ที่เจริญเต็มที่แล้ว สัณฐานวิทยาของสายสะปอร์ ลักษณะการเจริญและสรีรวิทยา ได้แก่ การสร้าง melanoid pigment การใช้แหล่งอาหารคาร์บอน ไนโตรเจน การสร้างสารประกอบเคมีที่จำเพาะ เช่น วิตามิน เอนไซม์ และสารปฏิชีวนะ จึงมีการจัดจำแนกเชื้อตามกลุ่มของสารปฏิชีวนะที่เชื้อสร้างขึ้นด้วย

เชื้อ Streptomyces มากกว่า 3000 ชนิดที่มีลักษณะแตกต่างกันได้ถูกจัดจำแนกในรายงาน (Omer และ Cohen 1986) การอธิบายชนิดส่วนมากขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ที่ผลิตสารปฏิชีวนะหรือ secondary metabolites ที่ผลิตได้เกี่ยวข้องกับจีโนม (genome) ของเชื้อที่มีลำดับ sequence ที่จะ code ให้สาร secondary metabolites ที่แตกต่างกัน ดังนั้น subgroups ของเชื้อ Streptomyces จะต้องสัมพันธ์กับด้านพันธุศาสตร์ด้วย (Omer และ Cohen 1986)

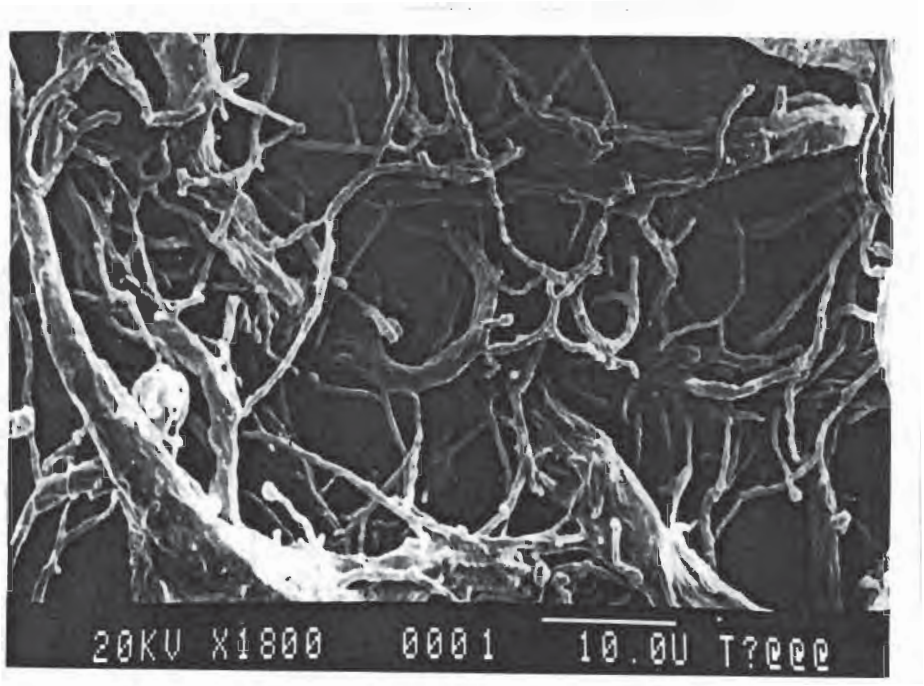
ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Taxonomy)

เชื้อ Streptomyces sp. 74-3 แยกเชื้อได้จากดินท้องนา จังหวัดสุรินทร์ ประเทศไทย เมื่อแยกเป็นเชื้อบริสุทธิ์นำมาจัดจำแนกเชื้อตาม Bergey's Manual เล่มที่ 8 (Buchanan และ Gibbons 1974) และการใช้สารอาหารของเชื้อตามวิธีของ Waksman (1961) ให้เชื้อเจริญบนอาหาร yeast extract - malt extract agar นาน 5 วัน พบว่าเชื้อมีลักษณะดังนี้ คือ เส้นใยบนอาหาร (aerial mycelium) มีสีขาว รูปร่างตรงถึงโค้ง (flexious) สีเส้นใยในอาหาร (substrate mycelium) สีน้ำตาลเหลือง ส่วนสะปอร์มีสีขาว มีลักษณะยาวเป็นเกลียว (Spiral) ผิวมีหนาม (spiny) รูปที่ 1 และ รูปที่ 2

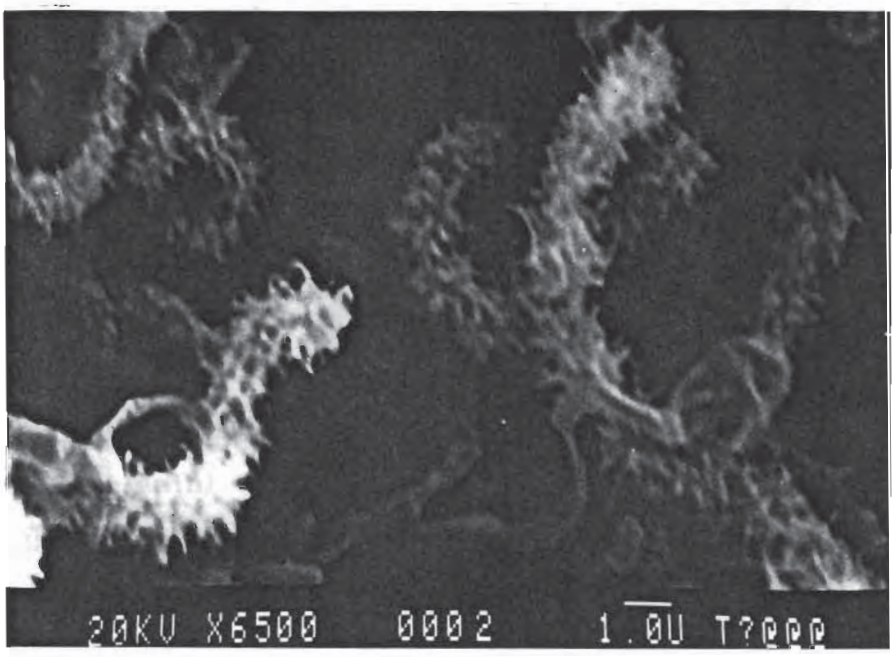
ลักษณะการเจริญบนอาหารชนิดต่างๆของเชื้อตัวนี้แสดงในตารางที่ 1ก ลักษณะเส้นใยบนอาหารส่วนมากจะเป็นสีครีมบนอาหารบางชนิด ส่วนเส้นใยที่เจริญในอาหารมักจะเป็นสีน้ำตาลเหลืองจนถึงน้ำตาลเข้ม และสามารถสร้างรงควัตถุสีน้ำตาลดำบนอาหาร Glucose-aspargine agar Glycerol-asparagine agar และ Tyrosine agar

ส่วนลักษณะทางสรีรวิทยาของเชื้อ แสดงในตารางที่ 2ก สำหรับการย่อยสลายแหล่งคาร์บอน เช่น น้ำตาลชนิดต่างๆ ทดสอบตามวิธีของ Pridham และ Gottlieb (1948) สามารถใช้น้ำตาลบางชนิดเป็นแหล่งคาร์บอนได้ ดังแสดงในตารางที่ 3ก

จากลักษณะทางสรีรวิทยาพบว่า เชื้อจุลินทรีย์ชนิดนี้เป็นเชื้อในสกุล (genus) Streptomyces ส่วนชนิด (species) ใกล้เคียงกับ longisporus มากกว่าตัวใด ตารางที่ 4ก



รูปที่ 1 เส้นใยของเชื้อ Streptomyces sp. 74-3 ถ่ายด้วย EM กำลังขยาย 1800 เท่า



รูปที่ 2 สะปอร์ของเชื้อ Streptomyces sp. 74-3 ถ่ายด้วย EM กำลังขยาย 6500 เท่า

ตารางที่ 1ก ลักษณะการเจริญบนอาหารของเชื้อ Streptomyces sp. 74-3

อาหาร	การเจริญ	เส้นใยบนอาหาร (aerial mycelium)	ด้านหลัง (reverse side)	รงควัตถุที่ละลายน้ำ (soluble pigment)
Yeast extract -malt extract agar	ดี	ขาว	เหลืองอมน้ำตาล	-
Glucose -asparagine agar	ดี	น้ำตาล	น้ำตาลอ่อน	+
Nitrient agar	ปานกลาง	ครีม	ครีม	-
Inorganic salt starch agar	ดี	ครีม	น้ำตาล	-
Glycerol -asparagine agar	ดี	ครีม	น้ำตาล	+
Tyrosine agar	ดี	ครีม	น้ำตาล	+
Sucrose - nitrate agar (czapek)	ไม่เจริญ			

ตารางที่ 2ก คุณสมบัติทางสรีรวิทยาของเชื้อ Streptomyces sp. 74-3

อุณหภูมิเหมาะสมสำหรับการเจริญ	25 - 35 °C
การสร้างรงควัตถุ (melanin)	+
การย่อยสลายแป้ง	-
การย่อยสลายเจลาติน	-
การรีดิวส์ไนเตรต	+
การทนเกลือ	>4% <7%

ตารางที่ 3ก การใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อ Streptomyces sp. 74-3

น้ำตาล	การเจริญ	เส้นใยบนอาหาร (aerial mycelium)	ด้านหลัง (reverse side)	รงควัตถุที่ละลายน้ำ (soluble pigment)
กลูโคส	ดี	ขาว	น้ำตาลดำ	+
ไซโลส	ดี	เทา	น้ำตาลเหลือง	-
อะราบิโนส	ไม่เจริญ	ขาว	น้ำตาลดำ	+
แรมโนส	น้อยมาก	-	-	-
ฟรุคโตส	ดี	-	-	-
กาแลคโตส	น้อยมาก	ขาว	น้ำตาลดำ	+
ราฟฟิโนส	น้อย	-	-	-
แมนิตอล	น้อย	-	-	-
ไอ-อินอสิทอล	น้อย	-	-	-
ซาลิซิน	น้อยมาก	-	-	-
ซูโครส	ดี	ขาว	น้ำตาล	+

ตารางที่ 4ก เปรียบเทียบการใช้แหล่งคาร์บอนของเชื้อ Streptomyces sp. 74-3 กับเชื้อ Streptomyces longisporus

น้ำตาล	Streptomyces sp. 74-3	S. longisporus
กลูโคส	+	+
ไซโลส	+	+
อะราบิโนส	+	+
แรมโนส	-	+
ฟรุคโตส	-	+
กาแลคโตส	+	+
ราฟฟิโนส	-	+
แมนิตอล	-	+

น้ำตาล	Streptomyces sp. 74-3	S. longisporus
ไอ-อินอลิตอล	-	+
ซาลิซิน	+	±
ซูโครส	+	+

อุปกรณ์และวิธีการ

1. เชื้อจุลินทรีย์

ปลูกเชื้อ Streptomyces sp. 74-3 บน Sodium caseinate agar slant pH 7.0 (ภาคผนวก ก-ข) บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 4-5 วัน แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

2. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตสารปฏิชีวนะ

อาหารที่เหมาะสมที่สุดสำหรับผลิตสารปฏิชีวนะ คือ อาหารที่ดัดแปลงจาก glucose soybean meal medium (GSM) pH 7.0 (ภาคผนวก ก-2)

3. วิธีผลิตสารปฏิชีวนะโดยเชื้อ Streptomyces sp. 74-3

3.1 ผลิตโดยใช้ฟลาสก์ เตรียมกล้าเชื้อ (inoculum) โดยนำ Streptomyces sp. 74-3 ที่เจริญบน sodium caseinate agar slant อายุ 5 วัน ปลูกเชื้อลงในอาหารเหลวที่ดัดแปลงจาก glucose soybean meal medium pH 7.0 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องเขย่า 180 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน นำกล้าเชื้อที่ได้ 7 มิลลิลิตร มาเติมลงในอาหารเหลวชนิดเดิมปริมาตร 350 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 1000 มิลลิลิตร เขย่า 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 วัน โดยทุกๆวันเก็บตัวอย่างน้ำหมัก (fermentation broth) มาทดสอบ โดยนำไปเข้าเครื่องเหวี่ยงที่ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกเอาส่วนน้ำใส (supernatant) เพื่อวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) และศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ใช้เป็นตัวทดสอบ (test organisms) ส่วนเส้นใยของเชื้อนำไปวัดการเจริญ โดยล้างด้วยน้ำเกลือที่ฆ่าเชื้อ (NSS) 3 ครั้ง แล้วอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นำไปชั่งหาน้ำหนักแห้ง จนได้น้ำหนักคงที่

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ โดยวิธี paper disc agar diffusion เชื้อทดสอบคือ Staphylococcus aureus ATCC 6538 P อายุ 24 ชั่วโมง เจริญบน antibiotic no.1 agar slant นำเชื้อมาทำ dilution ในน้ำเกลือที่ฆ่าเชื้อ (NSS) เทียบความขุ่นกับ MC Faland no. 0.5 ใช้ swab จุ่มสารละลายเชื้อแล้วเกลี่ยลงบน plate ที่มีอาหาร tryptic soy agar pH 7.0 ทำ 3 ระนาบ วางไว้สักครู่ให้หน้าวุ้นแห้ง แล้ววางแผ่นดิสก์ (disc) เส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตรที่หยดส่วนน้ำใสลงไป 20 ไมโครลิตร และ 40 ไมโครลิตร ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง วัดโซนใสที่เกิดขึ้นรอบๆ แผ่นดิสก์ โดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางผ่านแผ่นดิสก์

3.2 ผลิตในถังหมัก (fermenter) ที่มีขนาด 1000 มิลลิลิตร เตรียมกล้าเชื้อเช่นเดียวกับข้อ 3.1 เติมกล้าเชื้อ 7 มิลลิลิตร ลงในถังหมักที่มีอาหารเหลวปริมาตร 350 มิลลิลิตร (กล้าเชื้อ 2 เปอร์เซ็นต์) ให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที (vvm) อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30-33 องศาเซลเซียส) เนื่องจากเครื่องไม่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ เก็บตัวอย่างน้ำหมักมาทดสอบเช่นเดียวกันกับข้อ 3.1

4. การหาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดต่างๆ และเชื้อราบางชนิด (Biological activity)

นำส่วนน้ำใสที่ได้มาทดสอบโดยใช้วิธี paper disc agar diffusion ดังที่กล่าวแล้วเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบ ได้แก่ Bacillus subtilis ATCC 6633 Escherichia coli Pseudomonas aeruginosa Salmonella typhi Shigella sp. ส่วนเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคผิวหนัง ได้แก่ Candida albicans Trichophyton mentagrophyte Microsporum gypseum และ Epidermophyton floccosum สังเกตโซนใสที่เกิดขึ้นรอบๆ แผ่นดิสก์ หลังจากที่บ่มเชื้อไว้ 24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อแบคทีเรียและ 3 วัน สำหรับเชื้อรา

5. การหาค่า MIC (Minimal Inhibitory concentration) ของส่วนน้ำใส

นำส่วนน้ำใสปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำ lyophilize จนแห้ง แล้วชั่งน้ำหนักของสารที่ได้ นำมาละลายด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2M pH 7.0 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วหาค่า MIC ด้วยวิธี two-fold broth dilution อาหารเหลวที่ใช้คือ tryptic soy broth ปริมาตรหลอดละ 10 มิลลิลิตร เชื้อที่ใช้ทดสอบคือ S.aureus ATCC 6538P และ B.subtilis ATCC 6633 บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง สังเกตดูความขุ่นของเชื้อในอาหารเหลว

6. การทดลองขั้นต้นโดยสกัดสารปฏิชีวนะด้วย เอธิลอะซีเตต (ethyl acetate) และคลอโรฟอร์ม (chloroform)

เลี้ยงเชื้อ Streptomyces sp. no. 74-3 ในอาหารเหลวที่สภาวะเหมาะสมในการผลิตให้สารปฏิชีวนะได้ดีที่สุด แยกเอาส่วนน้ำใส ปริมาตร 2000 มิลลิลิตร เติมสารละลายเอธิลอะซิเตตลงไป 2000 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกันแล้วตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายแยกเป็นสองส่วนแบ่งส่วนที่ละลายในเอธิลอะซิเตตออกมา เป็นสารละลาย (F_1A) อีกส่วนนำไประเหยเอาเอธิลอะซิเตตออก (F_1) นำตะกอนที่ได้ไปชั่งน้ำหนัก อีกส่วนที่ละลายในน้ำปรับ pH ให้เป็นกรด

ด้วยกรดเกลือ (hydrochloric acid) และเติมคลอโรฟอร์มลงไปในปริมาตรที่เท่ากัน เขย่าให้ผสมกัน แล้วตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายแยกออกเป็นสองส่วน แบ่งส่วนที่ละลายในคลอโรฟอร์มส่วนหนึ่งเป็นสารละลาย (F_2A) อีกส่วนหนึ่งระเหยเอาคลอโรฟอร์มออก (F_2) ชั่งน้ำหนักตะกอนที่ได้ นำส่วนที่ละลายในน้ำที่เหลือ ปรับ pH ให้เป็นด่างด้วยแอมโมเนียแล้วเติมคลอโรฟอร์มลงไปในปริมาตรเท่ากัน เขย่าให้ผสมกันแล้วตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายแยกกัน แบ่งส่วนที่ละลายในคลอโรฟอร์มส่วนหนึ่งเป็นสารละลาย (F_3A) อีกส่วนระเหยเอาคลอโรฟอร์มออก (F_3) ในทำนองเดียวกัน และส่วนที่ละลายในน้ำ (F_4)

6.1 นำส่วนที่สกัดได้ทั้งหมดมาทดสอบหาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย S.aureus ATCC 6538P โดยวิธี paper disc diffusion โดยส่วนสกัดที่เป็นตะกอนนำมาละลายด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 3 มิลลิลิตร ปริมาตรสารละลายที่ใช้ทดสอบบนแผ่นดิสก์ คือ 5 10 และ 20 ไมโครลิตร ตามลำดับ ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมง สังเกตโซนใสรอบๆ แผ่นดิสก์

6.2 นำสารสกัดเอธิลอะซีเตต (F_1) มาศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย เช่น B.subtilis ATCC 6633, E.coli, S.typhi, Ps.aeruginosa, Shigella sp. และเชื้อราที่ก่อโรคผิวหนัง Candida albicans, Trichophyton mentagrophyte โดยใช้วิธี paper disc agar diffusion ใช้ปริมาตรสารละลายปฏิชีวนะ 20 ไมโครลิตร สังเกตโซนใสที่เกิดขึ้นรอบๆ แผ่นดิสก์

7. การทำให้สารละลายปฏิชีวนะบริสุทธิ์มากขึ้นโดยเทคนิคทางโครมาโตกราฟี

นำสารสกัดเอธิลอะซิเตต (F_1) ละลายในเอธิลอะซิเตต นำสารละลายมาทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นดังต่อไปนี้

7.1 เทคนิค thin layer chromatography (TLC) โดยชะ (elute) ด้วยตัวทำละลาย (solvent) ชนิดต่างๆในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน ได้แก่ เฮกเซน : เอธิลอะซีเตต (1:1, 1:2 และ 1:3) เมธานอล : คลอโรฟอร์ม (1:1, 1:5, 1:10 และ 1:19)

7.2 เทคนิค column chromatography โดยใช้ตัวทำละลายต่างๆดังตารางที่ 5ก เก็บสารละลายจาก fraction ต่างๆ มาระเหยเอาตัวทำละลายออกเลือกบาง fraction มาละลายด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3 มิลลิลิตร นำไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ S.aureus ATCC 6538P ด้วยวิธี paper disc agar diffusion ปริมาตรสารละลายที่ใช้คือ 20 ไมโครลิตรต่อแผ่นดิสก์

ตารางที่ 5ก ตัวทำละลายที่ใช้ใน column chromatography

ตัวทำละลาย	fraction
คลอโรฟอร์ม	1
	1A
เมธานอล : คลอโรฟอร์ม 1:19	2
	2A
เมธานอล : คลอโรฟอร์ม 1:15	3
	3A
เมธานอล : คลอโรฟอร์ม 1:10	4
	4A
เมธานอล : คลอโรฟอร์ม 1:5	5
	5A
เมธานอล : คลอโรฟอร์ม 1:1	6
	6A
เมธานอล	7
	7A

นำสารละลายมาระเหยเอาคลอโรฟอร์มออกไป นำไปชั่งน้ำหนักเลือกบาง fraction มาทดสอบต่อ เช่น 1, 1A, 2, 3, 5, 6, 6A และ 7A เติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อลงไป 3 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ในแต่ละ fraction มาศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อ S.aureus ATCC 6538P โดยวิธี paper disc agar diffusion ปริมาตรสารละลายที่ใช้ 20 ไมโครลิตรต่อแผ่นดิสต์

8. **ทดลองซ้ำโดยเลี้ยงเชื้อปริมาตรเพิ่มขึ้น เพื่อนำมาสกัดและแยกสารปฏิชีวนะให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น**

8.1 การสกัดเบื้องต้นด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

8.2 การแยกสารด้วยวิธีทางโครมาโตกราฟฟี

9. ศึกษาคุณสมบัติของสารปฏิชีวนะที่แยกได้

9.1 คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพ (physico - chemical properties)

9.2 คุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (Biological properties)

ผลการทดลอง

1. การผลิตสารปฏิชีวนะในฟลาสก์และในถังหมัก (fermenter)

จากการเก็บน้ำหมักมาทดสอบทุกๆ วันตั้งแต่วันที่สองถึงวันที่แปด พบว่า pH ของน้ำหมักจะเพิ่มขึ้นจาก pH เป็นกลางเปลี่ยนเป็นด่าง และเชื้อเจริญเข้าสู่ระยะพักตัว (stationary phase) ในขณะเดียวกันเชื้อ Streptomyces sp. 74-3 เริ่มมีการผลิตสารปฏิชีวนะได้สูงขึ้น เชื้อที่เจริญในฟลาสก์จะให้สารปฏิชีวนะสูงสุดในวันที่ 6 ส่วนในถังหมักสูงสุดในวันที่ 7 และพบว่าฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบของสารละลายจากฟลาสก์จะดีกว่าจากถังหมัก ทั้งนี้เนื่องจากขณะที่เชื้อเจริญสามารถควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ได้ตลอดเวลา คือ 28 องศาเซลเซียส ต่างจากในถังหมักเชื้อเจริญที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งประมาณ 30-33 องศาเซลเซียส ดังนั้นถ้าสามารถควบคุมอุณหภูมิในถังหมักเป็น 28 องศาเซลเซียส ตลอดการทดลองคาดว่าจะให้ฤทธิ์ยับยั้งสูงกว่าสารละลายที่ได้จากฟลาสก์ ดังแสดงในตารางที่ 1, 2

ตารางที่ 1 ผลิตสารปฏิชีวนะโดยเชื้อที่เจริญในฟลาสก์

วัน	ความเป็นกรดด่าง(pH)	น้ำหนักแห้ง (กรัม)	ขนาดของโซนใส (ม.ม.)	
			20 ไมโครลิตร	40 ไมโครลิตร
1	7	-	-	-
2	5.52	0.239	-	-
3	6.98	0.223	-	-
4	7.95	0.227	10.7	11.4
5	8.27	0.214	16.9	17.2
6	8.44	0.203	17.4	19.7
7	8.83	0.138	17.2	19.3
8	8.10	0.205	16.8	17.8

ตารางที่ 2 ผลิตสารปฏิชีวนะโดยเชื้อเจริญในถังหมัก

วัน	ความเป็นกรดด่าง(pH)	น้ำหนักแห้ง (กรัม)	ขนาดของโซนใส (ม.ม.)	
			20 ไมโครลิตร	40 ไมโครลิตร
1	7	-	-	-
2	5.51	0.172	-	-
3	5.81	0.129	-	-
4	6.86	0.161	-	7.25
5	8.20	0.136	10.77	15.3
6	8.74	0.125	13.6	16.7
7	8.71	0.114	13.8	16.8
8	8.24	0.144	13.4	16.5

2. การหาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดต่างๆ และเชื้อราบางชนิด (Biological activity)

จากการนำส่วนน้ำใสมาทดสอบหาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่นโดยวิธี paper-disc agar diffusion พบว่ายับยั้งการเจริญได้เฉพาะเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกคือ Bacillus subtilis ATCC 6633 ให้โซนใสกว้าง 17.8 มิลลิเมตร แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ และเชื้อราที่ก่อโรคได้

3. การหาค่า MIC ของส่วนน้ำใส

จากการนำส่วนน้ำใสปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำให้แห้งโดยวิธี lyophilization นำส่วนที่แห้งเป็นผงมาชั่งน้ำหนักได้ 0.058 กรัม แล้วจึงเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2M pH 7.0 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงไปคำนวณความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะในบัฟเฟอร์ได้ 1160 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาเจือจางในอาหาร Tryptic soy broth pH 7.0 ซึ่งมีปริมาตร 10 มิลลิลิตรในหนึ่งหลอด โดยเจือจางเป็น 2 เท่า ตามลำดับ ได้ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ

ในบัฟเฟอร์เป็น 116 58 29 14.5 และ 7.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ S.aureus ATCC 6538P และ B.subtilis ATCC 6633 มีค่าเท่ากันคือ 29 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สำหรับการหาค่า MIC ของแบคทีเรียแกรมลบ เช่น Escherichia coli, Salmonella typhi, Pseudomonas aeruginosa, Shigella sp. โดยความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะในบัฟเฟอร์เป็น 1160 580 290 145 72.5 36.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้ ดังนั้น MIC มีค่ามากกว่า 1160 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4. การหาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ S.aureus ATCC 6538P ของสารสกัด เอธิลอะซีเตต และคลอโรฟอร์ม

นำสารสกัดด้วยเอธิลอะซีเตตและคลอโรฟอร์ม ในข้อ 6.1 พบว่าสารสกัดที่ระเหยเอาเอธิลอะซีเตตและคลอโรฟอร์มออก เมื่อเติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อลงไป 3 มิลลิลิตร สามารถละลายได้เพียงเล็กน้อย แต่พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ S.aureus ATCC 6538P ได้ดี แต่ส่วนที่เป็นน้ำหลังจากสกัดด้วยสารสกัดทั้งสองชนิดแล้ว (F_4) ไม่พบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ S.aureus ATCC 6538P ของสารสกัดเอธิลอะซีเตตและคลอโรฟอร์ม

สารสกัด	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ขนาดของโซนใส (ม.ม.)
F_1	5	31.3
	10	33.4
	20	31.4
F_1A	20	22.5
F_2	5	8.2
	10	10.6
	20	15.8

สารสกัด	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ขนาดของโซนใส (ม.ม.)
F_2A	20	7.6
F_3	5	12.0
	10	17.8
	20	23.6
F_3A	20	7.4
F_4	20	-
ส่วนน้ำใสก่อนสกัด	20	19.8

5. **ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดเอธิลอะซีเตต (F_1)**

การหาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ และเชื้อราตามข้อ 6.2 พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียบางชนิดได้ยกเว้นเชื้อรา ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดเอธิลอะซีเตต (F_1)

เชื้อทดสอบ	ขนาดของโซนใส (ม.ม.)
B.subtilis ATCC 6633	32
E.coli	10.6
S.typhi	13.0
Ps. aeruginosa	15.2
Shigella sp.	-
เชื้อรา	-

6. การทำให้สารละลายปฏิชีวนะบริสุทธิ์มากขึ้นด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟี

6.1 จากการนำสารละลาย F_1 มาแยกด้วย thin layer chromatography พบว่าตัวทำละลายที่แยกให้ spot ชัดเจนดีคือ เมธานอล : คลอโรฟอร์ม 1:19 ดังในรูปที่ 3

รูปที่ 3 สารสกัด F_1 แยกบน TLC

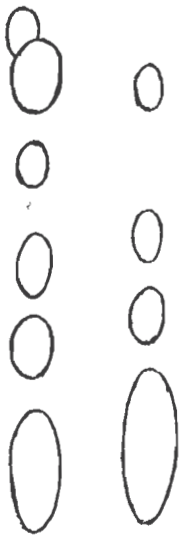
6.2 การแยกสารละลาย F_1 ด้วย column chromatography พบว่า fraction 1 1A 2 และ 3 ตะกอนมีลักษณะสีน้ำตาลเข้ม ละลายในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อได้น้อยมาก ส่วน fraction ที่ 5 6 6A และ 7A มีสีน้ำตาลอ่อนหรือส้ม สามารถละลายในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อได้ เมื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ S.aureus ATCC 6538P พบว่ามีใน fraction ที่ 1 1A 2 และ 3 แต่ไม่พบใน fraction ที่ 5 6 6A และ 7A ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของสารปฏิชีวนะต่อเชื้อ S.aureus ATCC 6538P ของสารละลาย F_1 ที่แยกโดย column chromatography

fraction	ขนาดของโซนใส (ม.ม.)
1	12.45
1A	18.3
2	22.22
3	13.7
5	-
6	-
6A	-
7A	-

fraction 1A กับ 2 มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทดสอบได้ดี นำมาแยกใน Thin layer chromatography ต่อไป โดยชะด้วยเฮกเซน : เอธิลอะซีเตต = 1:3 ดังภาพที่ 4

รูปที่ 4 สารละลาย fraction ที่ 1A และ 2 แยกบน TLC



8. **การสกัดและแยกสารปฏิชีวนะ**

8.1 การสกัดเบื้องต้นด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent)

เลี้ยงเชื้อ Streptomyces sp. 74-3 ในอาหารเหลวสภาพเหมาะสมดังกล่าวข้างต้น ปริมาตรครั้งละ 6 ลิตร เป็นเวลา 8 วัน ทำซ้ำ 4 ครั้ง (ได้ปริมาตรทั้งหมด 22 ลิตร) นำน้ำหมักมาแยกเอาส่วนเส้นใยออกโดยใช้เครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที นำเส้นใยมาหมักด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 3 ลิตร เป็นเวลา 2 วัน กรองเอาส่วนที่เป็นกากทิ้งไปนำส่วนที่เป็นน้ำแอลกอฮอล์มาระเหยเอาแอลกอฮอล์ออก นำส่วนนี้และส่วนน้ำใส (supernatant) มาสกัดเอาส่วนที่เป็นน้ำมันออกด้วยปิโตรเลียมอีเธอร์ (petroleum ether) ปริมาตรเท่ากันกับสารละลายแต่ละชนิด ได้สารสกัดจากปิโตรเลียมอีเธอร์ (petroleum ether extract) และส่วนที่เป็นน้ำ (aqueous solution) นำทั้งสองส่วนไปหาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ S.aureus ATCC 6538P ด้วยวิธี paper-disc agar diffusion

ผลที่ได้พบว่าส่วนที่เป็นน้ำ (aqueous solution) เท่านั้นที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้

นำส่วนที่เป็นน้ำมาสกัดต่อด้วยคลอโรฟอร์มปริมาตรเท่ากัน ได้สารสกัดที่เรียกว่าสารสกัดคลอโรฟอร์ม (chloroform extract) และส่วนที่เป็นน้ำสกัดต่อด้วยเอธิลอะซีเตตปริมาตรเท่ากัน ได้สารสกัดที่เรียกว่า สารสกัดเอธิลอะซีเตต (ethyl acetate extract) นำสารสกัดทั้งสองนี้ปริมาตรเล็กน้อยไปหาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โดยนำไประเหยให้แห้งภายใต้ความดันต่ำ แล้วชั่งน้ำหนักดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 น้ำหนักแห้งของสารสกัดจากเส้นใยและส่วนน้ำใส

	สารสกัดคลอโรฟอร์ม (ม.ก.)	สารสกัดเอธิลอะซีเตต (ม.ก.)
สารสกัดจากเส้นใย	8.0	7.5
สารสกัดจากส่วนน้ำใส	8.5	6.55

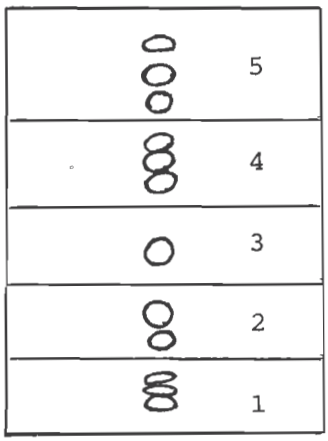
นำสารสกัดที่แห้งมาละลายด้วยเมธานอล (methanol) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เพื่อทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อ S.aureus ATCC 6538P ด้วยวิธี paper-disc agar diffusion ใช้ปริมาตรสารละลายต่อดิสก์ 5 10 20 และ 40 ไมโครลิตร วัดโซนใสที่เกิดขึ้นรอบแผ่นดิสก์ ดังแสดงในตารางที่ 7 พบว่าสารละลายเกือบทุกปริมาตรของสารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ S.aureus ATCC 6538P ได้

ตารางที่ 7 ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญต่อเชื้อ S.aureus ATCC 6538P ของสารสกัดจากเส้นใยและส่วนน้ำใส

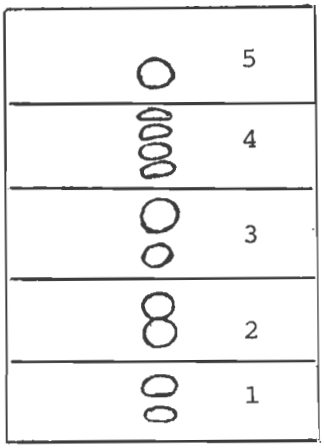
สารสกัด/ไมโครลิตร		ขนาดของโซนใส (ม.ม.)			
		5	10	20	40
สารสกัดจากเส้นใย	สารสกัดคลอโรฟอร์ม	16.9 (0.08 มก./มล.)	20.55 (0.16)	20.6 (0.32)	22.1 (0.64)
	สารสกัดเอธิลอะซิเตต	- (0.075 มก./มล.)	9.0 (0.15)	13.85 (0.3)	17.85 (0.6)
สารสกัดจากส่วนน้ำใส	สารสกัดคลอโรฟอร์ม	26.5 (0.085 มก./มล.)	28.4 (0.17)	27.15 (0.34)	27.65 (0.68)
	สารสกัดเอธิลอะซิเตต	20.0 (0.66 มก./มล.)	22.2 (0.13)	25.0 (0.26)	27.1 (0.52)

นำสารสกัดคลอโรฟอร์มและสารสกัดเอธิลอะซิเตตมาแยกบน thin layer chromatography (TLC) โดยใช้สารสกัดปริมาตร 10 ไมโครลิตรจุดลงบนแผ่นอะลูมิเนียมที่เคลือบด้วย silica gel GF_{254} หนา 250 ไมครอน ขนาดของแผ่น 2 x 6 เซนติเมตร นำไป develop ใน tank โดยใช้ส่วนผสมของคลอโรฟอร์มและเมธานอล (19:1) เป็น mobile phase หลังจากนั้นตรวจสอบตำแหน่งของสารต่างๆ หรือกลุ่มของสารบน TLC ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร แบ่งออกได้เป็น 5 กลุ่ม ตามรูปที่ 5 และ 6

รูปที่ 5 สารสกัดคลอโรฟอร์มแยกบน TLC



รูปที่ 6 สารสกัดเอธิลอะซีเตตแยกบน TLC



ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ S.aureus ATCC 6538P ของกลุ่มสารดังกล่าวโดยตัดเฉพาะส่วนของกลุ่มสารนั้นมาวางแทนดิสก์ แล้ววัดโซนใสที่เกิดขึ้น ดังตารางที่ 8 และ 9

ตารางที่ 8 ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญต่อเชื้อ S.aureus ATCC 6538P ของสารสกัดคลอโรฟอร์มแยกบน TLC

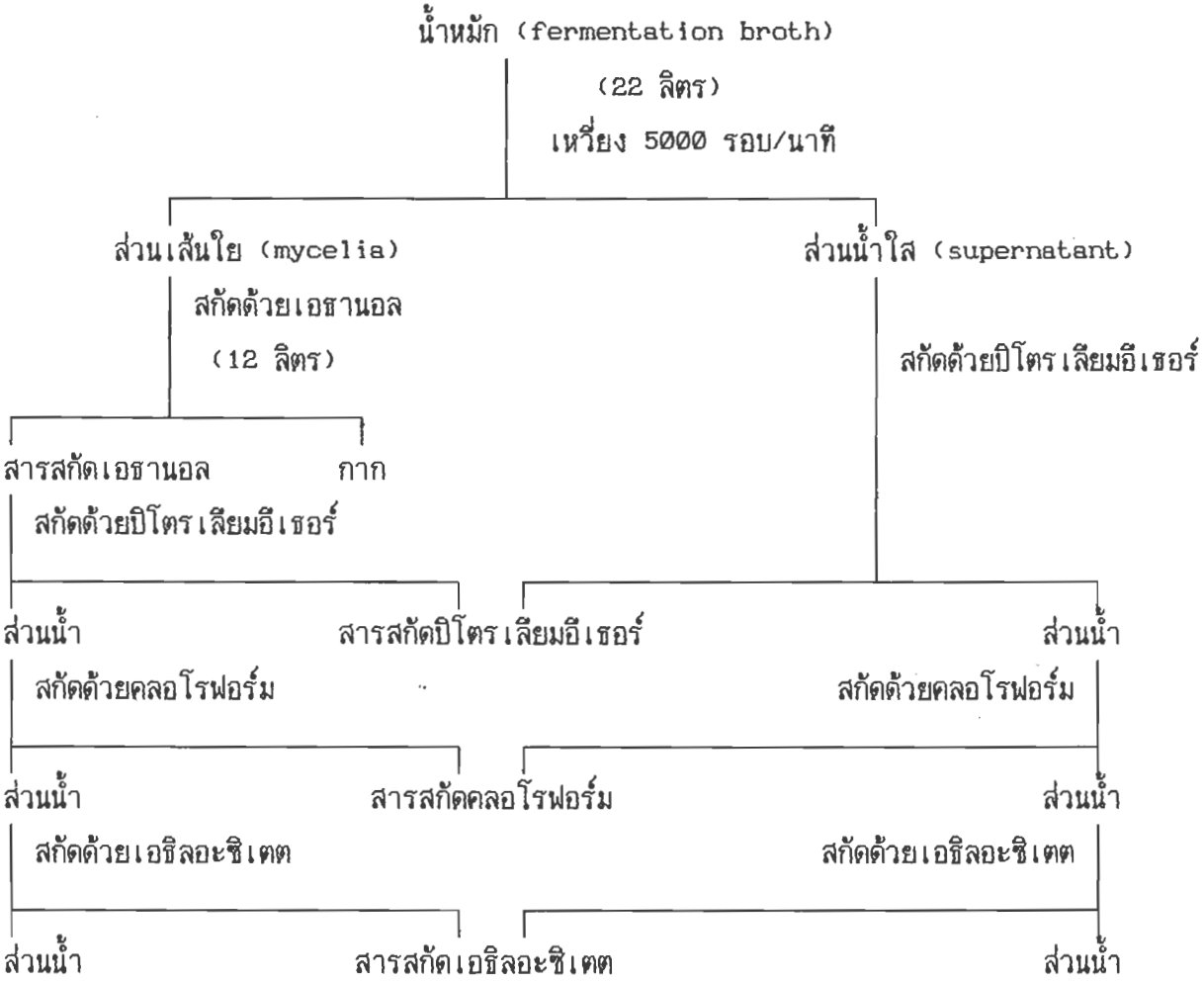
กลุ่มสาร	ขนาดของโซนใส (ม.ม.)
1	20
2	17.5
3	27.5
4	23.3
5	-

ตารางที่ 9 ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญต่อเชื้อ S.aureus ATCC 6538P ของสารสกัดเอธิลอะซิเตตแยกบน TLC

กลุ่มสาร	ขนาดของโซนใส (ม.ม.)
1	17
2	-
3	21.6
4	21.6
5	-

เนื่องจากลักษณะของ TLC chromatogram และฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดทั้งสองชนิดที่ได้จากเส้นใยและส่วนน้ำใส ไม่ค่อยมีความแตกต่างกันมาก จึงได้รวมทั้งสองส่วนเข้าด้วยกัน เพื่อนำไปแยกหาสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียต่อไป โดยวิธีทางโครมาโตกราฟฟี

รูปที่ 7 ไดอะแกรมขั้นตอนการสกัดเพื่อให้ได้สารสกัดคลอโรฟอร์มและเอธิลอะซิเตต



8.2 การแยกสารด้วยวิธีทางโครมาโตกราฟฟี่

นำสารสกัดคลอโรฟอร์มและสารสกัดเอธิลอะซีเตต ที่ได้รวมกันจำนวน 7.3 กรัม มาแบ่งเป็น 2 ส่วนๆ ละ 3 กรัม เอาแต่ละส่วนมาแยกสารให้เป็นกลุ่มๆ โดยใช้คอลัมน์แก้ว ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.5 เซนติเมตร silica gel 60 ชนิดที่ใช้กับคอลัมน์ปริมาณ 90 กรัม แล้วชะด้วยตัวทำละลาย (solvent system) ต่อไปนี้ ตามลำดับ

1.	คลอโรฟอร์ม : เฮกเซน (3:1)	ปริมาตร	300	มิลลิลิตร
2.	คลอโรฟอร์ม : เฮกเซน (4:1)	"	300	มิลลิลิตร
3.	คลอโรฟอร์ม	"	300	มิลลิลิตร
4.	1% เมธานอลในคลอโรฟอร์ม	"	300	มิลลิลิตร
5.	2% เมธานอลในคลอโรฟอร์ม	"	300	มิลลิลิตร

6.	5% เมธานอลในคลอโรฟอร์ม	"	300	มิลลิลิตร
7.	10% เมธานอลในคลอโรฟอร์ม	"	300	มิลลิลิตร

เก็บแต่ละ fraction ปริมาตร 30 มิลลิลิตร และรวม fraction ที่มีลักษณะบน TLC เหมือนกันไว้ด้วยกัน นำไประเหยเพื่อกำจัดตัวทำละลายให้หมด ภายใต้การลดความดันบรรยากาศ ได้เป็นสารทั้งหมด 11 กลุ่ม เรียงตามลำดับสภาพความมีขั้ว นำสารแต่ละกลุ่มไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อ S.aureus ATCC 6538P โดยวิธี paper-disc agar diffusion ใช้ความเข้มข้นของแต่ละกลุ่มเป็น 150 ไมโครกรัม/ดิสก์ ผลที่ได้แสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 **น้ำหนักสารและฤทธิ์การยับยั้งการเจริญต่อเชื้อ S.aureus ATCC 6538P ของสารกลุ่มต่างๆ ที่ได้จากคอลัมน์โครมาโตกราฟี**

กลุ่มสาร	น้ำหนักสาร(ม.ก.)	ขนาดของโซนใส (ม.ม.)
A	472	-
B	360	-
C	1,418	32.2
D	1,116	-
E	250	-
F	720	-
G	56	-
H	134	15.1
I	122	26.8
J	126	-

จากการทดลองพบว่าสารในกลุ่ม C และ I แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ S.aureus ATCC 6538P ได้ดี จึงได้นำสารในกลุ่มนี้ไปแยกเพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์ต่อไป

8.2.1 การแยกสารบริสุทธิ์ของสารในกลุ่ม C

นำสารกลุ่ม C จำนวน 1,400 มิลลิกรัม แบ่งเป็นสองส่วนๆ ละประมาณ 700 มิลลิกรัม มาแยกต่อด้วย silica gel column chromatography ใช้คอลัมน์แก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร silica gel 60 ปริมาณ 50 กรัม ชะด้วยตัวทำละลายต่อไปนี้ตามลำดับ

1.	เฮกเซน	: เอธิลอะซิเตต	(3:1)	ปริมาตร	200	มิลลิลิตร
2.	เฮกเซน	: เอธิลอะซิเตต	(2:1)	ปริมาตร	200	มิลลิลิตร
3.	เฮกเซน	: เอธิลอะซิเตต	(1:1)	ปริมาตร	200	มิลลิลิตร
4.	เฮกเซน	: เอธิลอะซิเตต	(1:2)	ปริมาตร	200	มิลลิลิตร
5.	เฮกเซน	: เอธิลอะซิเตต	(1:3)	ปริมาตร	200	มิลลิลิตร
6.	เอธิลอะซิเตต			ปริมาตร	200	มิลลิลิตร

เก็บแต่ละ fraction ปริมาตร 20 มิลลิลิตร แล้วรวม fraction ที่มีลักษณะบน TLC ที่เหมือนกันไว้ด้วยกัน นำไประเหยภายใต้การลดความดันบรรยากาศได้สารทั้งหมด 7 กลุ่มย่อยตามลำดับ ตามสภาพความมีขั้ว ดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 **น้ำหนักสารกลุ่มย่อยที่ได้จากสารกลุ่ม C**

สารกลุ่มย่อย	น้ำหนักสาร (ม.ก.)	น้ำหนักสารที่ตกผลึก (ม.ก.)
C-1	64	
C-2	312	
C-3	152	--------> N_1 4
C-4	13	
C-5	853	--------> N_2 20
C-6	21	
C-7	242	

จากการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อ S.aureus ATCC 6538P ของแต่ละกลุ่มพบว่า สารในกลุ่ม C-2 ซึ่งประกอบด้วยสารเรืองแสงที่ทำภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลต ที่ 356 นาโนเมตร แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อดังกล่าวได้เป็นอย่างดี โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใส 27.3 มิลลิเมตร ที่ความเข้มข้นของสาร 150 ไมโครกรัม /ดิสก์ ส่วนสารกลุ่มอื่นไม่แสดงฤทธิ์

อย่างไรก็ตามสารกลุ่ม C-3 และ C-5 ได้ให้ผลึกของสาร 2 ชนิด คือ N_1 (4 ม.ก.) และ N_2 (20 ม.ก.) ตามลำดับ แต่สารทั้งสองไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ จึงไม่ได้ทำการศึกษาต่อ

นำสารกลุ่ม C-2 (300 ม.ก.) ไปทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี medium pressure chromatography ใช้ Column Lichroprep RP-8 (ขนาด 10 X 240 มิลลิเมตร) ใช้ 70% เมธานอลในน้ำเป็น mobile phase ชะด้วยความเร็ว 1 มิลลิลิตร/นาที แต่ละครั้ง load สารในขนาด 40 มิลลิกรัม/200 ไมโครลิตรของเมธานอล

ตรวจสอบสารด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตที่ 254 นาโนเมตร แล้วเก็บสารที่ออกมาในช่วง 16-22 นาที และช่วงเวลา 26-32 นาที นำไประเหยแห้งภายใต้การลดความดัน ได้สาร F052 (65 มก.) และ F053 (40 มก.) ตามลำดับ

เมื่อนำ fraction ทั้งสองไปตรวจสอบด้วยวิธี high pressure liquid chromatography ใช้ colum TSK ODS - 120 Tm (ขนาด 4.6 x 250 มิลลิเมตร) ตัวทำละลาย คือ 30-70% CH_3CN ในน้ำ (gradient ภายใน 40 นาที) ชะด้วยความเร็ว 0.8 มิลลิลิตร/นาที

ตรวจสอบด้วยแสงอัลตราไวโอเลตที่ 254 นาโนเมตร พบว่า F052 มีสารหลักที่มี retention time ที่ 33.0 นาที และ F053 มีสารหลักที่มี retention time ที่ 35.4 นาที

ได้นำทั้งสองส่วน (F052 และ F053) มาแยกต่อไปด้วยวิธี high pressure liquid chromatography ใช้ column TSK gel ODS-80 Tm (ขนาด 7.8 x 300 มิลลิเมตร) ใช้ตัวทำละลาย 50-80% CH_3CN ในน้ำ (gradient ภายใน 40 นาที) ชะด้วยความเร็ว 1.2 มิลลิลิตร/นาที ตรวจสอบด้วยแสงอัลตราไวโอเลต ที่ 254 นาโนเมตร และ load สารแต่ละครั้งในขนาด 6 มิลลิกรัม

สำหรับ F052 นั้นให้สาร N_6 (15 มก.) มี retention time 23.1 นาที

F053 ให้สาร N_7 (10 มก.) มี retention time 24.9 นาที

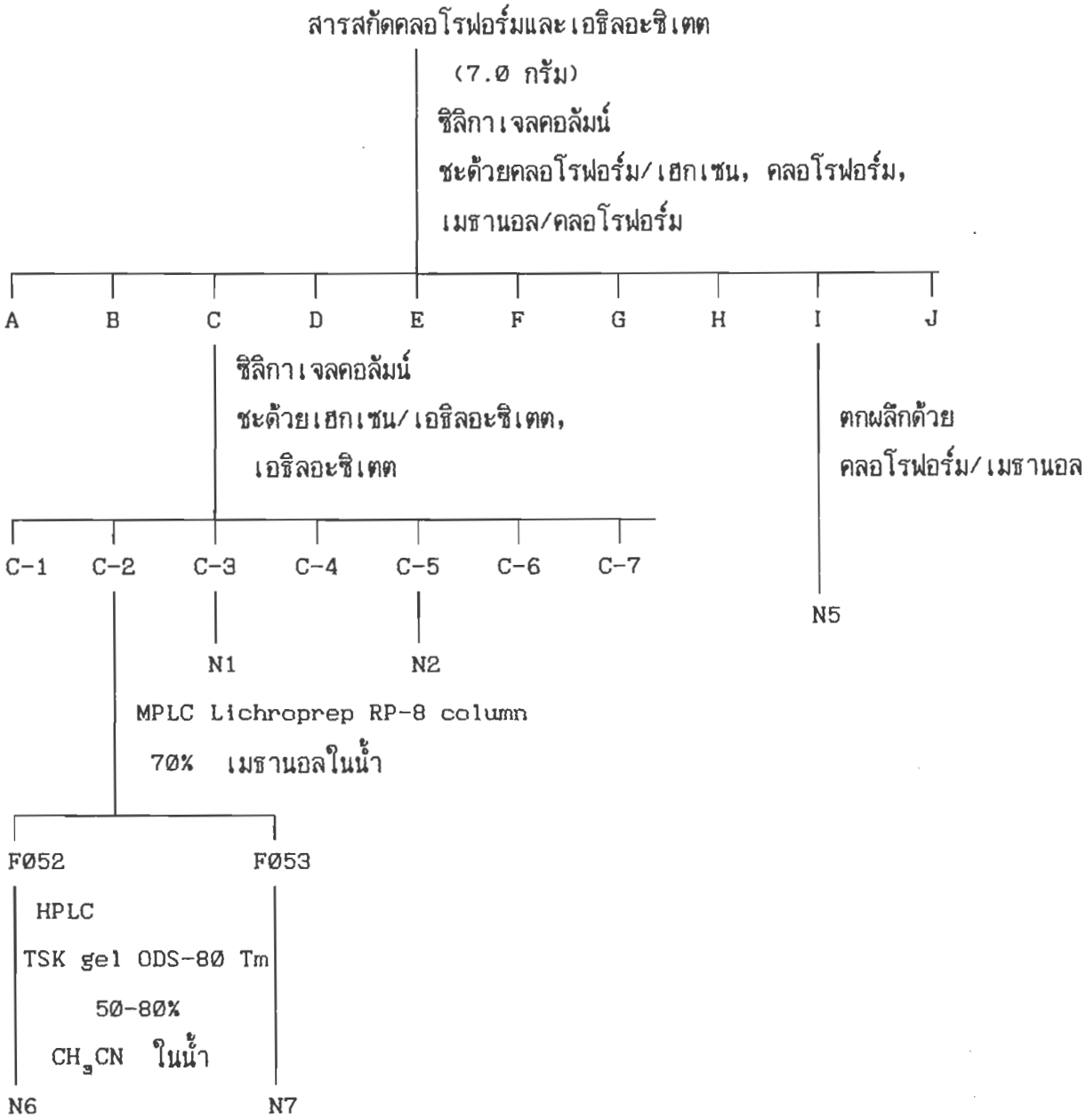
เมื่อนำสาร N_6 และ N_7 ไปตรวจสอบเพื่อหาโครงสร้างทางเคมีด้วยวิธี nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) พบว่าไม่ใช่สารบริสุทธิ์ประกอบด้วยสารมากกว่า 1 ชนิด ซึ่งจาก ^1H และ ^{13}C NMR spectrum พบว่า สารเหล่านี้อาจประกอบด้วย

ส่วนที่เป็น amide linkage ส่วน aromatic rings และส่วนที่เป็น aliphatic part ที่ซับซ้อนมาก

8.2.2 การแยกสารบริสุทธิ์ของสารกลุ่ม I

นำสารกลุ่ม I (60 มิลลิกรัม) มาตกผลึกด้วยสารละลายผสมของคลอโรฟอร์มและเมธานอล ได้ผลึกสีขาวรูปเข็ม เรียกสารบริสุทธิ์นี้ว่า N_5 ปริมาณ 37 มิลลิกรัม นำสารนี้ไปหาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ S.aureus ATCC 6538P ใช้ความเข้มข้น 150 ไมโครกรัมต่อดิสก์ สามารถให้โซนใสขนาด 21.8 มิลลิเมตร

รูปที่ 8 **ไดอะแกรมขั้นตอนการแยกสารบริสุทธิ์จากสารกลุ่ม I**



9. **ศึกษาคุณสมบัติของสารปฏิชีวนะที่แยกได้**

คุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (Biological properties)

นำสารบริสุทธิ์ N5 ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ S.aureus ATCC 6538P มาหาค่า MIC (Minimal Inhibitory concentration) ใช้เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบหลายชนิดทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ เชื้อยีสต์และรา วิธีที่ใช้ทดสอบ คือ Broth dilution test เจือจางสารด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อโดยวิธี two fold dilution อาหารที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรีย คือ tryptic soy broth (TSB) pH 7.0 ส่วนเชื้อยีสต์และราใช้ Malt yeast extract broth pH 5.0 หลอดละ 4.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย N_5 ใน DMSO แต่ละความเข้มข้นหลอดละ 0.5 มิลลิลิตร และเติมเชื้อจุลินทรีย์หลอดละ 0.1 มิลลิลิตร (เชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นแบคทีเรียและยีสต์ เตรียมโดยเจือจางด้วยน้ำเกลือฆ่าเชื้อ 0.85 เปอร์เซนต์เทียบความขุ่นกับ Mc Faland no. 0.5 ส่วนเชื้อรานำสปอร์มาทำให้เจือจางเช่นเดียวกัน) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อแบคทีเรีย ส่วนยีสต์และราบ่มที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1-3 วัน ดูผลจากความขุ่นที่เชื้อเจริญได้ ความเข้มข้นแรกที่ไม่มีเชื้อเจริญ แสดงว่า ความเข้มข้นของสารในหลอดนั้นเป็นค่า MIC ดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 ค่า MIC ของสารบริสุทธิ์ N5 ต่อเชื้อจุลินทรีย์

จุลินทรีย์	MIC (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
แบคทีเรียแกรมบวก	
Staphylococcus aureus ATCC 6538P	50
Bacillus subtilis ATCC 6633	>100
แบคทีเรียแกรมลบ	
Escherichia coli	>100
Pseudomonas aeruginosa	>100
Salmonella typhimurium	>100
Salmonella typhi	>100
Shigella sp.	>100
เชื้อราและยีสต์	
Candida albicans	-
Trichophyton mentgrophyte	-
Aspergillus niger	-

สรุปผลและวิจารณ์

ได้จัดจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาทดลองผลิตสารปฏิชีวนะ หมายเลข 74-3 แล้ว พบว่าเป็นเชื้อในสกุล (genus) Streptomyces ส่วนการจัดจำแนกพบว่าไม่เหมือนชนิด (species) ใดโดยตรงเพียงแต่มีลักษณะคล้ายคลึงกับชนิด longisporus มากกว่าชนิดใดๆ เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ glucose soybean meal medium ที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนและถั่วเหลืองบดเป็นแหล่งไนโตรเจน pH 7.0 เชื้อเจริญได้ดีและให้สารปฏิชีวนะได้สูงเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ ประมาณ 28 องศาเซลเซียส สาเหตุที่ใช้แป้งมันสำปะหลังและถั่วเหลืองบด เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศกสิกรรมที่มีแหล่งวัตถุดิบทั้งสองชนิดมากมาย จนกระทั่งก่อให้เกิดปัญหากับเกษตรกร เนื่องจากราคาผลผลิตตกต่ำมาก ดังนั้นการนำวัตถุดิบทั้งสองชนิดมาใช้ประโยชน์เพื่อผลิตสารที่มีราคาแพงขึ้นได้ก็คาดว่าเป็นการแก้ปัญหาด้านเศรษฐกิจของประเทศไทยได้ในอีกทางหนึ่ง

สารปฏิชีวนะที่ผลิตได้เมื่อนำมาแยกออกจากสารที่เจือปนโดยการสกัดด้วยตัวทำละลายคลอโรฟอร์มและเอธิลอะซีเตตได้ผลดี การใช้เอธิลอะซีเตตในการสกัดสารปฏิชีวนะจาก culture ของเชื้อ Streptomyces spp. มีผู้ทดลองได้ผลสำเร็จมาแล้วหลายราย ได้แก่ การสกัดสาร eponemycin (Sugawara และคณะ 1989) สาร himastatin (Lam และคณะ 1989) สาร rubiginone (Oka และคณะ 1990) และสาร semi-naphthaquinone (Fukuda และคณะ 1989)

นำสารสกัดที่ได้มาแยกด้วยวิธีทางโครมาโตกราฟฟี ได้สารบริสุทธิ์ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ S.aureus ATCC 6538P ได้ดี คือสาร N_5 สาร N_5 นี้ เป็นโมเลกุลที่เปลี่ยนแปลงได้ง่ายไม่ค่อยมีความคงตัวทำให้สูญเสียคุณสมบัติทาง biological activity ได้ง่าย นอกจากนั้นสารชนิดนี้ยังละลายน้ำได้น้อยในขณะที่ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น Dimethyl sulfoxide Chloroform Ethanol Methanol Acetone Ethyl acetate ตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของ Cocito 1979 อาจกล่าวได้ว่า วิธีการสกัดการทำให้ตกผลึกและทำให้บริสุทธิ์ ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของการละลายของสาร (Janssen และคณะ, 1977 ; Vanderhaeghe และ Parmentier, 1960)

คุณสมบัติทาง biologogical activity ของสารปฏิชีวนะ N_5 คือ ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี ให้ค่า MIC ต่ำกว่าแบคทีเรียแกรมลบมาก ส่วนเซลล์พวก eucaryote เช่น ยีสต์และรา สารปฏิชีวนะชนิดนี้ไม่สามารถทำลายเซลล์ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Cocito (1979)

การวิจัยควรมีการตรวจสอบชนิดของสารปฏิชีวนะ N_5 ด้วยวิธีทางเคมีและกายภาพ เพื่อให้ทราบว่าสารบริสุทธิ์ N_5 เป็นสารชนิดใด จะทำให้งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จสมบูรณ์ แต่เนื่องจากผู้วิจัยขาดประสบการณ์ในการทำวิจัยทางด้านนี้จึงไม่สามารถศึกษาชนิดของสารบริสุทธิ์ตัวนี้ได้ ต้องขออภัยมา ณ.ที่นี้ด้วย

เอกสารอ้างอิง

1. Arai, M. ; Nakamura, S. ; Sakagami, Y. ; Fukuhara, K. and Yonegara, H. 1956. A new antibiotic, Mikamycin. J. Antibiotics 9 : 193.
2. Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E. 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th ed. Baltimore : The Williams and Wilkins Company.
3. Bu' Lock, J.D. 1961. Intermediary metablism and antibiotic synthesis. Adv. Appl Microbiol. 3 : 293 - 342.
4. Cocito, C. 1979. Antibiotics of Virginiamycin Family, Inhibitors Which Contain Synergistic Components. Microbiological reviews. 43(2) : 145-198.
5. Crawford, D. L. 1988. Biodegradation of agricultural and urban wastes. In : Actinomycetes in Biotechnology. (M. Goodfellow, S.T. Williams, and M. Mordarski, eds.) pp. 433-459, Academic Press, London.
6. Davis, B. ; Dulbacco, R. ; Esien, H ; Gens berg, H.; wood, W. 1973. Microbiology. 3rd ed. Maryland : Harper and Row Publishing.
7. Demain, A.L. and Pirct, J. Relationship between antibiotics biosynthesis and sporulation. In Luckner, M. and K. Schreiber (ed.) 1979. Regulation of secondary product and plant hormone metabolism. New York : Pergamon Press.
8. Fukuda, D.S. ; Mynderse, J.S. ; Baker, P.J. ; Berry, D.M. and Boeck, L.D. et al 1989. A80915, A new antibiotic complex produced by Streptomyces aculeolatus. J. Antibiotics. XLIII (6) : 623-633.

9. Goodfellow, M., and cross, T. 1984. Classification. In : The Biology of Actinomycetes. (M. Goodfellow, M. Mordarski, and S.T. Williams, eds.) pp. 7-164. Academic Press, London

10. Gottlieb, B. 1976. The production and role of antibiotics in soil. J. Antibiotics 29 : 987-1000.

11. Haavik, H.I 1974a. Studies on the formation of bacitracin by Bacillus licheniformis : Effect of glucose. J.Gen.Microbiol. 81 : 383-390.

12. Haavik, H.I. 1974b. Studies on the formation of bacitracin by Bacillus licheniformis : Role of catabolite repression and organic acids. J. Gen. Microbiol. 84 : 321-326.

13. Hadgkiss, W. 1965. Variation in spore morphology in a Streptomyces. J. Gen. Microbiol. 41 : 19.

14. Halvorson, H.O.; Hansen, R. and Campbell (ed.) 1972. Sporulation antibiotic of Bacillus ep., Spore V. Am. Society for Microbiology. Washington, D.C. : American Society for Microbiology.

15. Hopwood, D.A. ; Wright, H.M.; Bibb, M.J. and Kohen, S.N. 1977. Genetic recombination through protoplast fusion in Streptomyces.Nature 268 : 171-174.

16. Janssen, G.; Anne, J. and Vander haeghe, H. 1977. Preparation and properties of derivatives fo virginiamycin S. J. Antibiotics 30 : 141-145.

17. Kanoksilapatham, W. 1981. Studies on Antibiotic Production by Streptomyces and especially a Streptoverticillium species. Bangkok : M.S. Thesis, Mahidol University.

18. Krasil' Nikov, N.A. 1960. Taxonomic principle in the Actinomycetales. J Bacteriol. 79 : 65-74.

19. Kurylowicz, W. (ed.) 1976. Antibiotics : A Critical Review. warsaw : Polish Medical Publishers.

20. Kutzner, H.J. and Waksman, S.A. 1972. Simple working key for the classification and identification of named taxa included in the ISP. Int. J. Syst. Bacteriol. 22 : 139.

21. Lago, B.D. and Streicher, S.L. 1982. New genetics of Streptomyces. ASM News 48 : 53-57.

22. Lam, K.S. ; Hesler, G.A. ; Mattei, J.M. ; Mamber, S.W. and Forenza, S. 1989. Himastatin, A new antitumor antibiotic from Streptomyces hygroscopicus. J. Antibiotics. XLIII (8) : 956-960.

23. Levy, S. B and Miller, R.V. 1989. Gene transfer in the environment. Mc Graw - Hill Publishing Company, pp. 309-375.

24. Malik, V.S. and Viming, L.C. 1970. Metabolism of Choloramphenicol by the producing organism. Can. J. Microbiol. 16 : 175-179.

25. Martin, J.F. and Demain, A.L. 1980. Control of antibiotic biosynthesis. Microbiol. Reviews. 44 (2) : 230-251.

26. Meevootism, V. ; Matangkasombat, P. and Nomi, R. 1980. Studies on antibiotics production by Streptomyces species from Thai soils. Microbial Utilization of Renewable Resource 1 : 42-48.

27. Ochi, K. 1982. Protoplast fusion permits high frequency transfer of a Streptomyces determinant which mediates actinomycin synthesis, J.Bacteriol. 150 : 592-597.

28. Oka, M. ; Kamei, H., Hamagishi, Y. ; Tomita, K.; Miyaki, T.; Konishi, M. and Oki, T. 1990. Chemical and Biological properties of rubiginone, A complex of new antibiotics with vifncristine - cyto - toxicity potentiating activity. J.antibiotics XLIII (8) : 967-976.

29. Omer, C.A. ; and Cohen, S.N. 1986. Structural analysis of plasmid and chromosomal loci involved in site specific excision and integration of the SLP_1 element of Streptomyces coclicolor. J. Bacteriol. 166 : 999-1006.

30. Otani, T., Yamawaki, I.; Matsumoto, H; Minomi, Y.; Yamada,Y and Marunaka, T. 1987. New antibiotics 4181-A and B from Streptomyces griseus ; Taxonomy, Fermentation, Isolation and Characterization. J. Antibiotics. XII (3) : 275-281.

31. Perlman, D. and O' Brien, E. 1954. Microbiological production of methylmycin and related antibiotic. Antibiotics Chemother. 4 : 894.

32. Peleczar, M. J. and R.D Reid 1965 Microbiology. New York. Mc Graw - Hill Book company.

33. Pridham, T.G. and Gottlieb, D. 1948. The utilization of carbon compounds by some Actinomycetales as an aid for species determination. J.Bacteriol. 56 : 107-114.

34. Rippon, J.W. 1974. Medical Mycology : The Pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes. Toronto : W.B. Saunders Company.

35. Shirling, E. B. and Gottlieb, D. 1966. Methods for characterization of Streptomyces sp. Int. J. Syst. Bacteriol. 16 (3) : 313 - 340.

36. Smith, E.L. 1963. The ostreogrycins - a family of synergistic antibiotics. J. Gen. Microbiol. 33 : 3 - 4.

37. Society of American Bacteriologists. 1957. Manual of Micro biological Method. New York. Mc. Graw-Hill Book Company.

38. Sugawara, K. ; Hatori, M. ; Nishiyama, Y.; Tomita, K.; Kamei,H.; Konishi, M. and Oki, T. 1989. Eponemycin, A new antibiotic active against B16 melanoma 1. Production, Isolation, Structure and Biological Activity. J.Antibiotics. XLIII (1) : 8-18.

39. Tsai, J.F. Y., and Chen, C.W. 1987. Isolation and Characterization of Streptomyces lividans deficient in intraplasmid recombination. Mol. Gen. Genet. 208 : 211-218.

40. Vanderhaeghe, H. and Parmentier, G. 1960. The structure of actor S of staphylomycin. J. Am. Chem. Soc. 82 : 4414-4422.

41. Waksman, S.A. (Ed.) : The Actinomycetes Classification, Identification and Description of Genera and Species. Vol. 2 Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1961.

42. Walker, J.B. 1974. Biosynthesis of monoguanidinated inositol moiety of bluensomycin, a possible evolutionary precursor of streptomycin. J. Biol. Chem. 249 : 2397-2404.

43. Watanabe, K.; Yonehara, H. ; Tanaka, N. and Umezawa, H. 1959. Studies on mikamycin B. J. Antibiotics. 12 : 112-117.

ภาคผนวก ก.

1. Sodium caseinate agar (Soc. of American Bacteriologist, 1957)

sodium caseinate	2	กรัม
glucose	1	กรัม
K_2HPO_4	0.2	กรัม
$MgSO_4$	0.2	กรัม
$FeSO_4$	trace	
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
agar	15	กรัม

pH 7.0

2. Glucose soybean meal medium (Meevootisom และคณะ, 1980)

glucose	20	กรัม
soybean meal	20	กรัม
$(NH_4)_2 SO_4$	3	กรัม
K_2HPO_4	0.5	กรัม
NaCl	4	กรัม
$MgSO_4 . 7H_2O$	0.5	กรัม
$CaCO_3$	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

pH 7.0

3. Yeast extract - malt extract agar

Bacto - yeast extract	4	กรัม
Bacto - malt extract	10	กรัม
Bacto - dextrose	4	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
Bacto - agar	20	กรัม

pH 7.3

4. Nutrient agar

peptone	5	กรัม
beef extract	3	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
agar	15	กรัม

pH 7.0

5. Tryptic soy broth

Trypticase	17	กรัม
Bacto - soytone	3	กรัม
Bacto - dextrose	2.5	กรัม
Dipotassium phosphate	2.5	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

pH 7.3

6. Tryptic soy agar

สูตรเหมือน Tryptic soy broth เติม agar 15 กรัม

7. Sucrose - nitrate agar (Czapek's agar)

sucrose	30	กรัม
$NaNO_3$	3	กรัม
KH_2PO_4	1	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5	กรัม
KCl	0.5	กรัม
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
agar	15	กรัม

8. Glucose - asparagine agar

glucose	10	กรัม
asparagine	0.5	กรัม
K_2HPO_4	0.5	กรัม
beef extract	2	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
agar	15	กรัม

pH 6.8

9. Glycerol - asparagine agar

L-asparagine (anhydrous basis)	1	กรัม
glycerol	10	กรัม
K_2HPO_4 anhydrous basis	1	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
trace salt solution A (ภาคผนวก ข.)	1	มิลลิลิตร
agar	20.0	กรัม

pH 7.0 - 7.4

10. Inorganic salts - starch agar

สารละลาย A : ละลายแป้ง (soluble starch) 10 กรัม ในน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

สารละลาย B :

K_2HPO_4 (anhydrous basis)	1	กรัม
$MgSO_4 . 7H_2O$	1	กรัม
NaCl	1	กรัม
$(NH_4)_2 SO_4$	2	กรัม
$CaCO_3$	2	กรัม
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร
Trace salt solution A (ภาคผนวก ข.)	1	มิลลิลิตร

pH 7.0 - 7.4

ผสมสารละลาย A และ B เข้าด้วยกัน เติมวุ้น 20 กรัม หลอมให้วุ้นละลาย แล้วนึ่งฆ่าเชื้อ

11. Nitrate broth

beef extract	3	กรัม
Bacto - peptone	5	กรัม
KNO_3	1	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

pH 6.9

12. Nutrient gelatin medium

beef extract	3	กรัม
peptone	5	กรัม
gelatin	120	กรัม
น้ำกลั่น	1000	

pH 7.2

13. Peptone - yeast extract iron agar

Bacto - peptone	15	กรัม
Proteose - peptone	5	กรัม
ferric ammonium citrate	0.5	กรัม
dipotassium phosphate	1	กรัม
sodium thiosulfate	0.08	กรัม
Bacto - yeast extract	1	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
Bacto - agar	15	กรัม

pH 7.0 - 7.2

14. Salt tolerance agar

yeast extract	4	กรัม
malt extract	10	กรัม
glucose	4	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
agar	15	กรัม

pH 7.3

เติม NaCl 4 7 10 และ 13 เปอร์เซนต์ แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

15. Starch agar

soluble starch	10	กรัม
$NaNO_3$	1	กรัม
K_2HPO_4	0.3	กรัม
NaCl	0.5	กรัม
$MgCO_3$	1	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

agar	15	กรัม

pH 7.0 - 7.2

16. Tyrosine agar

glycerol	15	กรัม
L - tysosine	0.5	กรัม
L - asparagine	1	กรัม
K_2HPO_4	0.5	กรัม
$MgSO_4 . 7H_2O$	0.5	กรัม
NaCl	0.5	กรัม
$FeSO_4 . 7H_2O$	0.01	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
Trace salts solution A (ภาคผนวก ช.)	1	มิลลิลิตร
Bacto - agar	20	กรัม

pH 7.2 - 7.4

17. อาหารสำหรับทดสอบการใช้น้ำตาล

Basal mineral salts medium

$(NH_4)_2 SO_4$	2.64	กรัม
KH_2PO_4 anhydrous	2.38	กรัม
$K_2HPO_4 . 3H_2O$	5.65	กรัม
$MgSO_4 . 7 H_2O$	1	กรัม
Trace salts solution B (ภาคผนวก ช)	1	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
agar	15	กรัม

pH 6.8 - 7.0

ภาคผนวก ข

1. สารละลายไอโอดีน (ทดสอบแป้ง)

crystal iodine	1	กรัม
potassium iodine	2	กรัม
ethyl alcohol	30	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	300	มิลลิลิตร

ละลาย crystal iodine กับ potassium iodine เติมน้ำเล็กน้อยให้ผลึกละลาย แล้วเติมน้ำจนครบ 300 มิลลิลิตร และ ethyl alcohol 30 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดสีน้ำตาลเพื่อป้องกันแสง

2. Nitrate test solution

สารละลาย A : 0.8% sulfanilic acid solution

sulfanilic acid	8	กรัม
5 N acetic acid	1000	มิลลิลิตร

ละลาย sulfanilic acid ด้วย acetic acid 800 มิลลิลิตร แล้วเทใส่ volumetric flask ขนาด 1000 มิลลิลิตร เติม acetic acid จนได้ปริมาตรครบ 1000 มิลลิลิตร

สารละลาย B : 0.6% dimethyl - alpha - naphthylamine solution

- naphthylamine	5	กรัม
(หรือ dimethyl - - naphthylamine	6	กรัม)
5 N acetic acid	1000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียมคล้ายกับสารละลาย A

3. Trace salts solution A

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1	กรัม
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.1	กรัม
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

4. Trace salts solution B

$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	Ø.64	กรัม
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	Ø.11	กรัม
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	Ø.79	กรัม
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	Ø.15	กรัม
น้ำกลั่น	1ØØ	มิลลิลิตร

5. น้ำเกลือ Ø.85 เปอร์เซนต์

ชั่ง NaCl Ø.85 กรัม ใส่ลงใน volumetric flask เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1ØØ มิลลิลิตรแล้วนึ่งฆ่าเชื้อ