บทที่ 4

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

สายพันธุ์ SR-1 แยกได้จากตัวอย่างหนังสัตว์ติดเชื้อ(Infected leather) ที่ผ่านการอาบน้ำยาเคมี PARMETOL 23 ซึ่งจัดจำแนกได้ใกล้เคียงกับ *Bacillus licheniformis* (Cowan et al., 1970) พบว่าสายพันธุ์นี้สามารถสร้างสารที่แสดงสมบัติยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิดทั้งแบคทีเรียแกรมบวก *Bacillus cereus* ATCC 11778 *Bacillus megaterium* ATCC 14581 *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 แบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli* ATCC 25922 *Proteus vulgaris* ATCC 8427 *Salmonella typhi* ATCC 19430 ยีสต์ *Candida albicans* *Candida tropicalis* *Sporobolomyces* sp. และรา *Aspergillus niger* *Gliocladium* sp. *Paecilomyces variotii* ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับงานวิจัยหลายฉบับที่ได้รายงานว่าสกุล Bacillus เป็นสกุลหนึ่งที่มีความสำคัญและมีบทบาทในการสร้างสารปฏิชีวนะโดยเฉพาะในกลุ่มเพปไทด์ (Katz and Demain , 1977 ; Berdy , 1977 ; Paryski , 1967 ; Sakaguchi et al., 1971 ; Kleinkauf and Dohren , 1987 ; Marahiel et al., 1993)

เมื่อเปรียบเทียบการเจริญของสายพันธุ์ SR-1 ในอาหารชุดควบคุม (NB) ที่ไม่ได้เติมแหล่งคาร์บอนเปรียบเทียบกับอาหารที่มีการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอน อันได้แก่ อาหารที่มีมอลโตส (NM) อาหารที่มีกลูโคส (NG) อาหารที่มีแลกโตส (NL) จากผลการทดลอง อาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนนั้นจะให้การเจริญสูงสุด รองลงมาเป็นอาหารที่มีมอลโตส อาหารชุดควบคุม และอาหารที่มีแลกโตสตามลำดับ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่ากลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและไม่ซับซ้อน จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้รวดเร็ว จึงทำให้มีอัตราการเจริญที่สูงตามไปด้วย(Voet , 1995 ; Drew et al., 1977) และจุลินทรีย์มักจะเลือกใช้กลูโคสก่อนแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆซึ่งได้ปรากฏรายงานโดย Tangney (1992) ว่าในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus licheniformis* เมื่อมีคาร์บอน 2 ชนิดในอาหารคือ กลูโคส และมอลโตส Bacillus จะใช้กลูโคสก่อน โดยจะยับยั้งเอ็น

ไซม์ในการย่อยสลายมอลโตส จนเมื่อกลูโคสหมดจึงจะเริ่มใช้มอลโตสแทน อย่างไรก็ตามได้ปรากฏว่าอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนนั้น แม้ว่าจะให้การเจริญที่สูงสุดเมื่อเทียบกับอาหารชนิดอื่นๆ แต่กลับไม่ได้ให้ค่าการสร้างสารปฏิชีวนะที่สูงตามไปด้วย ซึ่งคาดว่าอาจเนื่องมาจากปรากฏการณ์ คาตาบอไลต์ รีเพรสชั่น (Catabolite repression) ได้มีรายงานของ Drew และคณะ (1977) ; Hutter และคณะ (1978) ; Martin and Demain (1980) ; Neway (1989) ในการเกิดปรากฏการณ์ยับยั้งการสร้างสารปฏิชีวนะโดยกลูโคสในการผลิตสารปฏิชีวนะหลายชนิด อย่างไรก็ตามในการผลิตสารปฏิชีวนะบางชนิดกลูโคสก็เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม เช่น Iturin A , B , C ที่ผลิตได้จาก *Bacillus subtilis* เป็นต้น (Peypoux et al., 1978 ; Ullrich et al., 1991)

จากผลการทดลองการปรับปรุงอาหารเลี้ยงเชื้อและภาวะในการผลิตในระดับขวดเขย่า ได้เปรียบเทียบชนิดแหล่งคาร์บอนที่เติมลงในอาหารชุดควบคุม พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีมอลโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ตรวจพบการสร้างสารปฏิชีวนะสูงสุดเมื่อเทียบกับแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆ ที่ใช้ในการทดลองซึ่งได้แก่ กลูโคส และแลกโตส โดยอาหารที่มีมอลโตสจะให้ค่าของสารปฏิชีวนะสูงสุดเท่ากับ 18. 41 หน่วย/มก. น้ำหนักเซลแห้ง ในชั่วโมงที่ 60 ของการผลิต (แสดงดังกราฟรูปที่ 16) ได้มีรายงานว่าในการผลิตสารปฏิชีวนะหลายชนิดว่ามอลโตสเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมตัวอย่างเช่น สารปฏิชีวนะ Siomycin Violacein และ Neomycin เป็นต้น (Hutter et al., 1978) แต่ในอาหารที่มีการเติมแลกโตสเป็นแหล่งคาร์บอนนั้น สายพันธุ์ SR-1 มีการเจริญและสร้างสารปฏิชีวนะต่ำกว่าชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอน แม้ว่าจากการตรวจปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยวิธี DNSA ก็ลดลงเช่นเดียวกับในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆ ผลที่ได้นี้อาจเป็นเพราะว่าสายพันธุ์ SR-1 นำแลกโตสไปสร้างผลิตภัณฑ์อื่นๆ หรือสายพันธุ์ SR-1 ไม่สามารถใช้แลกโตสได้ แต่การตรวจปริมาณแลกโตสในการทดลองนี้คือวิธี DNSA (ใช้ในการตรวจน้ำตาลที่มีหมู่รีดิวซ์อิสระทุกชนิด) ยังไม่มีความจำเพาะมากพอ ซึ่งอาจต้องเลือกใช้วิธีอื่นในการตรวจแลกโตส ที่ให้ความจำเพาะสูงกว่าเช่นการทำปฏิกริยากับกรดไนตริกซึ่งจะได้เป็นกรดมิวสิก ทำให้สามารถแยกแลกโตสออกจากน้ำตาลรีดิวซ์ตัวอื่นได้ง่าย

สำหรับแหล่งไนโตรเจนเป็นแหล่งอาหารสำคัญชนิดหนึ่ง ที่เป็นตัวควบคุมการสร้างสารปฏิชีวนะ (Aharonowitz , 1980 ; Martin and Demain , 1980) ในการแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจนร่วมในอาหารชุดควบคุม โดยใช้แหล่งไนโตรเจนร่วม 3 ชนิด คือ แอมโมเนียมซัลเฟต โปรติโอสเปปโตน และสารสกัดจากยีสต์ จากผลการทดลองแหล่งไนโตรเจนร่วมชนิดที่เป็น แอมโมเนียมซัลเฟต และสารสกัดจากยีสต์ให้ปริมาณการสร้างสารปฏิชีวนะใกล้เคียงกัน ส่วนแหล่งไนโตรเจนร่วมชนิดโปรติโอสเปปโตนให้ปริมาณการสร้างสารปฏิชีวนะต่ำ ในการทดลองนี้ไม่สามารถสรุปได้ว่าแหล่งไนโตรเจนร่วมชนิดไหนเหมาะแก่การสร้างสารปฏิชีวนะได้ดีกว่ากัน เนื่องจากในการทดลองไม่ได้ตรวจปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ประกอบกับในอาหารชุดควบคุมคืออาหาร NB นั้นก็มีแหล่งไนโตรเจนคือ แบคโตเปปโตนและสารสกัดจากเนื้ออยู่แล้ว ทำให้ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีแหล่งไนโตรเจนร่วมหลายชนิด ข้อบกพร่องนี้จึงเป็นข้อแนะนำในการทำวิจัยต่อไป คือถ้าทำการปรับปรุงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตสารปฏิชีวนะ ควรจะเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนและแปรผันเป็นชนิดๆ ไป และควรจะตรวจสอบปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย มิฉะนั้นจะไม่สามารถแปรผลการทดลองได้ว่าจุลินทรีย์ใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดไหนในการสร้างสารปฏิชีวนะดีกว่ากัน

ส่วนแหล่งธาตุปริมาณน้อย(Trace element) ที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ แมงกานีสคลอไรด์ เฟอริกคลอไรด์ และซิงค์คลอไรด์ พบว่าแมงกานีสคลอไรด์ทำให้เกิดการสร้างสารปฏิชีวนะเพิ่มขึ้น จากผลการทดลองซึ่งแสดงในกราฟรูปที่ 23 พบว่าแมงกานีสคลอไรด์ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5×10^{-5} - 2.0×10^{-5} โมลาร์ เป็นปริมาณที่ทำให้เกิดการสร้างสารปฏิชีวนะเพิ่มขึ้นโดยให้ค่าของสารปฏิชีวนะเท่ากับ 24.08 หน่วย/มก. น้ำหนักแห้ง ในชั่วโมงที่ 60 ส่วนเฟอริกคลอไรด์ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5×10^{-5} - 2.0×10^{-5} โมลาร์ ยังตรวจพบการสร้างสารปฏิชีวนะ แต่พบในปริมาณที่ต่ำกว่าชุดควบคุมและชุดที่มีการเติมแมงกานีสคลอไรด์ โดยจะให้ค่าของสารปฏิชีวนะสูงสุดเท่ากับ 16.99 หน่วย/มก. น้ำหนักแห้ง ในชั่วโมงที่ 48 สำหรับซิงค์คลอไรด์ทุกความเข้มข้นที่ใช้เติมลงในอาหารนั้น ไม่สามารถตรวจพบสารปฏิชีวนะ ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับรายงานในการสร้างสารปฏิชีวนะจาก Bacillus ซึ่งจะนิยมใช้ Mn^{2+} เติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ และจะมีผลในการเพิ่มผลิตภัณฑ์ เช่น ในการผลิต Bacitracin จาก *Bacillus licheniformis*

(Ishihara and Shimura , 1973) และ Mycobacillin จาก *Bacillus subtilis* (Weinberg , 1989)

จากการทดลองพบว่า สารปฏิชีวนะที่สร้างขึ้นจากสายพันธุ์ SR-1 เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นภายในเซล (Intracellular product) ได้สกัดแยกสารปฏิชีวนะจากจากเซลโดยทำให้เซลแตกโดยการแช่เข็ง (freeze & thaw) แล้วนำเซลที่ได้มาแขวนลอยในบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม จากนั้นใช้เอ็นไซม์ไลโซไซม์ร่วมในการทำให้เซลแตก ได้มีรายงานสนับสนุนของ O'leary (1989) และ Asenjo (1990) ว่าไลโซไซม์เป็นเอ็นไซม์ที่นิยมใช้ในการชักนำให้เซลแตก เพื่อได้มาซึ่งผลิตภัณฑ์ไม่ว่าจะเป็นเอ็นไซม์ สารปฏิชีวนะ หรือโพลีแซกคาไลน์บางอย่างที่อยู่ภายในเซล การใช้เอ็นไซม์ไลโซไซม์ในการทำให้เซลแตกเพื่อสกัดแยกสารปฏิชีวนะที่สร้างขึ้นภายในเซล เช่น สารปฏิชีวนะชนิด Surfactin ที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* ATCC 21232 (Kluge et al., 1988)

เมื่อแยกสารปฏิชีวนะออกจากเซลตามวิธีที่กล่าวมาข้างต้นแล้ว นำสารปฏิชีวนะที่ได้ไปทำให้เข้มข้น (Concentration) โดยการไดอะไลซ์ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 50 % ซึ่งจะลดปริมาตรของสารปฏิชีวนะลงครึ่งหนึ่ง จากนั้นนำสารปฏิชีวนะที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยการฉีดผ่านคอลัมน์สำเร็จรูปเซพแพก ซี-18 2 ครั้ง คอลัมน์ชนิดนี้มีตัวค้ำจุนเป็น High-performance macroreticular hydrophobic adsorbent resin พบว่าได้ส่วนสารปฏิชีวนะที่มีผลยับยั้งการเจริญต่อตัวแทนเชื้อทดสอบ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ได้ผ่านออกมาจากคอลัมน์เซพแพก ซี-18 จากนั้นนำสารปฏิชีวนะที่ได้ไปผ่านในคอลัมน์โครมาโตรกราฟีแบบอาศัยความแตกต่างของโมเลกุล (gel fitration) ที่มีตัวค้ำจุน เป็นเซฟาเด็กซ์จี-25 จากการทดลองสารปฏิชีวนะได้ผ่านออกมากับยอดแรกซึ่งอยู่ในช่วงแฟรกชั่น 14-20 (แสดงดังกราฟรูปที่ 26) หลังจากผ่านกระบวนการทำกึ่งบริสุทธิ์ตามวิธีนี้ทำให้สารปฏิชีวนะที่ได้จากสายพันธุ์ SR-1 มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นประมาณ 16 เท่า (แสดงดังตารางที่ 7) กระบวนการทำให้บริสุทธิ์ของสารปฏิชีวนะนั้น จำเป็นต้องหาวิธีที่เหมาะสมแก่สารปฏิชีวนะซึ่งขึ้นกับสมบัติและโครงสร้างของสารปฏิชีวนะเอง ตัวอย่างเช่นสารปฏิชีวนะชนิด surfactin ที่ได้จาก *Bacillus subtilis* ทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยกรดไฮโดรคลอริกแล้วสกัดแยกต่อโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์(Sandrin , 1990) หรือสาร

ปฏิชีวนะ A12-C ที่ได้จาก *Bacillus licheniformis* สามารถทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์โครมาโตรกราฟีโดยใช้ตัวกลางเป็นคิว-เซฟาโรส แล้วนำมาผ่านต่อในคอลัมน์ซุปเปอร์โดซิล แอลซี-18 และ ไวแดกซ์ ซี-18 ตามลำดับ ซึ่งกระบวนการดังกล่าวจะให้ความบริสุทธิ์ของสารปฏิชีวนะเพิ่มขึ้น 24 เท่า(Antanio et al., 1993) สำหรับสารปฏิชีวนะที่ได้จากสายพันธุ์ SR-1 ในงานวิจัยนี้ได้ใช้คอลัมน์โครมาโตรกราฟีในการทำให้บริสุทธิ์ เนื่องจากเมื่อได้ทดลองใช้วิธีตามที่เคยมีรายงานไว้ ไม่ว่าจะเป็นการตกตะกอนสารปฏิชีวนะโดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟต กรดไฮโดรคลอริก หรืออะซิโตน หรือแม้แต่การสกัดแยกด้วยตัวทำละลายอินทรีย์นั้น ทำให้เกิดการสูญเสียสมบัติและกิจกรรมของสารปฏิชีวนะในระหว่างการสกัดเป็นอย่างมาก จึงได้หาวิธีการประยุกต์ใช้วิธีทดลองให้ได้สารกึ่งบริสุทธิ์ดังที่กล่าวมาเป็นผลสำเร็จ

ได้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารปฏิชีวนะ หลังจากผ่านคอลัมน์โครมาโตรกราฟี (Gel fitration) แล้ว ด้วยเครื่องโครมาโตรกราฟีแบบสมรรถนะสูง (RP-HPLC) โดยใช้คอลัมน์ C_{18} (octadecylsilane) มีภาคนำพา (mobile phase) เป็นอะซิโตไนไตร์ทและฟอสเฟตบัฟเฟอร์ด้วยอัตราส่วน (15 : 85) อัตราการไหล 0. 3 มล/นาที ตรวจผลโดยแสงอุลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร สารปฏิชีวนะที่ได้จากสายพันธุ์ SR-1 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มีจำนวนพีคน้อยลง และให้ค่า retention time ที่ 2. 15 นาที (แสดงดังรูปที่ 27) สามารถยืนยันความบริสุทธิ์ของสารปฏิชีวนะอีกวิธีจากการทำโซเดียมโดเดซิลโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟริซิส(SDS-PAGE) จากผลการทดลองในช่องของสารปฏิชีวนะที่ผ่านการให้บริสุทธิ์เมื่อผ่าน Gel fitration แล้ว มีจำนวนแถบโปรตีนน้อยลง และเห็นแถบของโปรตีนที่ชัด 1 แถบ (แสดงดังรูปที่ 28) ดังนั้นสารปฏิชีวนะที่ได้จากสายพันธุ์ SR-1 ที่ผ่านกระบวนการสกัดและทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีที่ใช้ในงานวิจัยนี้จึงมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นจริง .

ได้ทำการทดลองตรวจสอบโครงสร้างโมเลกุลของสารปฏิชีวนะที่ได้จากสายพันธุ์ SR-1 ในเบื้องต้น ด้วยการทำอินฟราเรดสเปกตรัม (ได้แสดงผลไว้ที่รูปที่ 33) ซึ่งปรากฏแถบการดูดกลืนแสงที่เด่น(adsorption band) ในช่วงการดึงของโมเลกุล (Stretching) เป็น 3450 1635 และ 1550 ซม$^{-1}$ ตามลำดับ แถบเหล่านี้แสดงถึงการมีพันธะเพปไทด์

(NH-CO) ดังนั้นสารปฏิชีวนะที่ได้จากสายพันธุ์ SR-1 น่าจะเป็นสารปฏิชีวนะในกลุ่มเพปไทด์(Morrison and Boyd , 1991) การตรวจสอบโดยการทำอินฟราเรดสเปกตรัมเป็นวิธีหนึ่งเพื่อการประกอบการยืนยัน ในสารปฏิชีวนะกลุ่มเพปไทด์หลายชนิด เช่น Polymyxin T1 และ S1 (Shoji et al., 1976) Antibiotic LI-F03 , F04 , F05 , F07 , F08 (Kurusu et al., 1987) และ Cispentacin (Konishi et al., 1989) เป็นต้น ซึ่งโครมาโตรแกรมของสารปฏิชีวนะดังที่กล่าวมานี้จะให้ adsorption band ในช่วงการดึงของโมเลกุลเช่นเดียวกับที่ปรากฏในสารปฏิชีวนะที่ได้จากสายพันธุ์ SR-1

เมื่อตรวจสอบความเสถียรของสารปฏิชีวนะที่ได้จากสายพันธุ์ SR-1 ต่ออุณหภูมิและพีเอช พบว่าสารปฏิชีวนะ SR-1 มีความเสถียรมากที่สุด ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. (แสดงดังกราฟรูปที่ 30) และที่ค่าความเป็นกรดด่าง 7. 0-7. 5 (แสดงดังกราฟรูปที่ 31) และได้ตรวจสอบความเสถียรของสารปฏิชีวนะต่อการย่อยของเอ็นไซม์ที่ใช้ย่อยโปรตีนทั่วไป ได้แก่ โปรติเนสเค ปาเปน เปปซิน ทริปซิน และเอ็นไซม์กลุ่มอื่นๆ ได้แก่ เบต้าแลคแตมเมส เบต้ากลูโคซิเดส ไลโซไซม์ (แสดงผลดังกราฟรูปที่ 32) พบว่าสารปฏิชีวนะทนต่อการย่อยของเบต้าแลคแตมเมส เบต้ากลูโคนิเดส โปรติเนสเค ปาเปน และไลโซไซม์ ถูกย่อยบางส่วนด้วยเปปซิน และถูกย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ด้วยทริปซิน ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าสารปฏิชีวนะที่ได้จากสายพันธุ์ SR-1 ไม่ใช่สารปฏิชีวนะในกลุ่มเบต้าแลคแตม หรือกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ แต่เป็นสารปฏิชีวนะในกลุ่มเพปไทด์(ยืนยันได้จากผลการทำอินฟราเรดสเปกตรัมที่แสดงไว้ที่รูป 33) และยังเป็นการสนับสนุนสมบัติประการหนึ่งของสารปฏิชีวนะกลุ่มเพปไทด์ ซึ่งได้รายงานไว้ว่าสามารถทนต่อการย่อยต่อเอ็นไซม์กลุ่มที่ใช้ย่อยโปรตีน ได้มีข้อมูลยืนยันและสนับสนุนว่าสารปฏิชีวนะในกลุ่มเพปไทด์นี้ ทนต่อการย่อยของเอ็นไซม์ในกลุ่มที่ใช้ย่อยโปรตีน เช่น สารปฏิชีวนะ A12-C ที่ผลิตจาก *Bacillus licheniformis* สามารถทนต่อการย่อยของทริปซิน โปรเนส และ โปรติเนสเค(Antanio et al., 1992) Fungicin M4 ที่ผลิตจาก *Bacillus licheniformis* ทนต่อทริปซิน โปรติเนสเค(Lebbadi et al., 1994) แต่อย่างไรก็ตามได้มีรายงานว่าสารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้บางชนิดสามารถถูกย่อยด้วยเอ็นไซม์ที่ใช้ย่อยโปรตีนได้อย่างสมบูรณ์เช่น Cerein ที่ผลิตจาก *Bacillus cereus* (Naclerio et al., 1993) เป็นต้น

ผลการหาค่าน้ำหนักโมเลกุลโดยประมาณ ของสารปฏิชีวนะที่ได้จากสายพันธุ์ SR-1 จากการทำ SDS-PAGE ได้ค่าน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 9700 ดาลตัน (แสดงดังในกราฟรูปที่ 28) ค่าน้ำหนักโมเลกุลที่ได้มีความแตกต่างจากสารปฏิชีวนะกลุ่มเพปไทด์ดังที่เคยมีรายงาน ไว้ว่าสารปฏิชีวนะกลุ่มเพปไทด์ มักมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำคือจะอยู่ในช่วง 270 - 4500 ดาลตัน (Bodensky and Perlman , 1964 ; Katz and Demain , 1977) แต่ก็พบสารปฏิชีวนะกลุ่มนี้ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เช่น Saramycitine ที่ผลิตได้จาก *Streptomyces saraceticus* มีน้ำหนักโมเลกุล 14000 ดาลตัน (Bodensky and Perlman , 1964) เป็นต้น และหลังจากนั้นก็ปรากฏรายงานการพบสารปฏิชีวนะกลุ่มนี้ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่าช่วง 270-4500 ดาลตัน เช่น Cerein ที่ผลิตจาก *Bacillus cereus* ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 9000 ดาลตัน (Naclerio et al., 1993)

สารปฏิชีวนะที่ได้จากสายพันธุ์ SR-1 เมื่อผ่านการสกัดและกระบวนการทำบริสุทธิ์สามาถยับยั้งการเจริญแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Bacillus cereus* ATCC 11778 *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Bacillus megaterium* ATCC 14581 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และราบางชนิดได้แก่ *Gliocladium* sp. *Paecilomyces variotii* ในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งราทั้งระยะการงอกของสปอร์ (3-6 ชม.) และระยะการเจริญของสายใย (18-24 ชม.) ด้วยสารปฏิชีวนะจากสายพันธุ์ SR-1 จากผลการทดลองพบว่าจะให้ผลการยับยั้งราในช่วงการงอกของสปอร์เท่านั้น ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับรายงานหลายฉบับที่ได้ใช้สารปฏิชีวนะกลุ่มเพปไทด์ในการยับยั้งรา ซึ่งได้ปรากฏว่าจะเกิดการยับยั้งในช่วงการงอกของสปอร์เช่นกัน ตัวอย่างเช่น Gramicidin S ที่ผลิตจาก *Bacillus brevis* สามารถยับยั้งราก่อโรคเช่น *Fusarium nivale* และ *Dictyostellium discoidium* ได้ (Murray et al., 1986) หรือสาร AFV (Antifungal volatile) ที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* สามารถยับยั้ง *Rhizoctonia solani* ได้ (Fiddaman and Rossall , 1994) จากปฏิกริยาการยับยั้งของสารปฏิชีวนะที่ได้นี้เป็นที่น่าสนใจมากเนื่องจากสารปฏิชีวนะที่ได้จากการทดลองนี้ นอกจากสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคบางชนิด เช่น *Bacillus cereus* ATCC 11778 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 แล้ว ยังสามารถยับยั้งเชื้อรา *Paecilomyces variotii* ซึ่งราตัวที่กล่าวนี้จัดเป็นราก่อโรคในคน (Beneke and Roger , 1980) และมีรายงานจากหน่วยวิจัยและพัฒนาของบริษัท Applied Industrial Chemical ,

Norderstedt (1986) ที่ได้อ้างถึง *Paecilomyces variotii* ไว้ว่าเป็นรากลุ่มเด่นที่ทำความเสียหายให้แก่อุตสาหกรรมหนังสัตว์อีกด้วย

จากการเปรียบเทียบขอบเขตของปฏิกริยาการยับยั้ง (Antimicrobial spectrum) ของสารปฏิชีวนะที่สายพันธุ์ SR-1 สร้างขึ้น โดยการทดสอบจากการทำ point inoculation จนถึงสิ้นสุดกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ คาดว่าสายพันธุ์ SR-1 น่าจะผลิตสารปฏิชีวนะมากกว่า 1 ชนิดเนื่องจากในขั้นตอนทดสอบโดยการทำ point inoculation นั้นสารปฏิชีวนะจาก SR-1 สามารถยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรีย รา และ ยีสต์ แต่เมื่อผ่านกระบวนการทำกึ่งบริสุทธิ์หลังจากผ่านคอลัมน์โตรมาโตรกราฟีแบบอาศัยความแตกต่างโมเลกุล(Gel fitration) แล้วสารปฏิชีวนะที่ได้มีสามารถยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก และราบางชนิดเท่านั้น คาดว่าน่าจะมีสารปฏิชีวนะอีกชนิดที่ถูกดูดซับอยู่บนคอลัมน์เซพแพก ซี-18 หรืออาจอยู่ในยอดพีคอื่นๆ ของการทำโครมาโตรกราฟีแบบอาศัยความแตกต่างของโมเลกุล เนื่องจากในช่วงการทำสารปฏิชีวนะให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์เซพแพก ซี-18 และการทำโครมาโตรกราฟีนี้ได้ใช้ตัวแทนเชื้อทดสอบเพียงชนิดเดียวคือ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

สารปฏิชีวนะกลุ่มเพปไทด์ดังที่เคยมีรายงานมานั้น จัดเป็นกลุ่มสารปฏิชีวนะที่มีความหลากหลายในการออกฤทธิ์ยับยั้งมาก แต่โดยมากแล้วจะมีสมบัติยับยั้งแบคทีเรีย (Antibacterial antibiotic) เป็นส่วนใหญ่ สำหรับกลุ่มมีฤทธิ์ยับยั้งทั้งแบคทีเรียและรา (Antifungal and Antibacterial Antibiotic) ดังเช่นสารปฏิชีวนะที่ได้ในงานวิจัยนี้จะพบน้อย ตัวอย่างเช่นสารปฏิชีวนะ A12-C ที่ผลิตจาก *Bacillus licheniformis*(Antanio et al., 1992) Bacilysin ที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* และ Octapeptin ที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* ATCC 31805 (Preecaborisutkul , 1994) เป็นต้น

ดังนั้นสารปฏิชีวนะที่ได้จากสายพันธุ์ SR-1 ที่ได้ศึกษาในงานวิจัยครั้งนี้คาดว่าจัดอยู่ในกลุ่มเพปไทด์ที่มีสมบัติยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและราบางชนิด เนื่องด้วยสมบัติที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคเช่น *Bacillus cereus* ATCC 11778 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 สารปฏิชีวนะที่ได้จากการทดลองนี้ควรจะนำไปศึกษาในระดับโครงสร้างโมเลกุล กลไกการออกฤทธิ์ในสัตว์ทดลองต่อไป ซึ่งอาจจะเป็นประโยชน์ใน

การแพทย์และการประยุกต์ใช้ในงานอื่นๆ เช่น ใช้กับหนังสัตว์ก่อนเพื่อเป็นการป้องกันการติดเชื้อ แทนการใช้สารเคมีที่เคยใช้กันอยู่ปัจจุบัน ซึ่งมีข้อเสียที่จุลินทรีย์ที่ก่อความเสียหายเกิดการดื้อและทน(Resistance) ต่อสารเคมี และการใช้สารเคมียังทำให้เกิดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะ

1. ในการทดสอบกิจกรรมของสารปฏิชีวนะในงานวิจัยนี้ ใช้วิธีไบโอแอสเสย์ (Bioassay) ซึ่งวิธีนี้มีความคลาดเคลื่อนสูง อันเนื่องมาจากปัจจัยหลายประการ เช่น อัตรา การแพร่ผ่านของสารปฏิชีวนะในวุ้นแต่ละครั้ง ความชื้น อุณหภูมิ อายุของเชื้อที่ใช้ทดสอบ เป็นต้น ดังนั้นในการศึกษาต่อๆไปควรใช้วิธีอื่น ประกอบในการทดสอบกิจกรรมของสารปฏิชีวนะ เช่น การทำ HPLC เทียบกับสารปฏิชีวนะมาตรฐานโดยใช้ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้

2. ผลการทดลองในกระบวนการทำสารปฏิชีวนะให้บริสุทธิ์ หลังจากผ่านคอลัมน์โครมาโตรกราฟีแบบอาศัยความแตกต่างโมเลกุลแล้ว พบว่าสารปฏิชีวนะที่ได้จากสายพันธุ์ SR-1 มีกิจกรรมรวม (Total activity) เพิ่มขึ้นจากขั้นตอนที่ผ่านคอลัมน์เซพแพก ซี-18 (แสดงดังตารางที่ 7) ซึ่งผลที่ได้นี้คาดว่าเนื่องมาจากการทดสอบกิจกรรมโดยวิธีไบโอแอสเสย์ มีข้อจำกัดของความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะกับค่าของบริเวณยับยั้งที่แสดงต่อเชื้อทดสอบ ซึ่งให้ความสัมพันธ์เป็นกราฟมาตรฐานที่จะเป็นเส้นตรงเพียงช่วงใดช่วงหนึ่งของค่าความเข้มข้นสารปฏิชีวนะเท่านั้น และเนื่องจากในการทดลองครั้งนี้กำหนดหน่วยของสารปฏิชีวนะโดยไม่ได้ทำกราฟมาตรฐาน จึงไม่สามารถทราบช่วงความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะที่ให้ความสัมพันธ์ กับค่าบริเวณยับยั้งต่อเชื้อทดสอบที่เป็นเส้นตรง จึงอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดความผิดพลาดในงานวิจัยครั้งนี้ได้ ดังนั้นค่าความบริสุทธิ์ที่เพิ่มขึ้นจากขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ในงานวิจัยนี้จึงเป็นค่าประมาณเท่านั้น