บทที่ 1

บทนำ

เมื่อกล่าวถึงคำว่าทอกซินจากแบคทีเรีย (Bacterial Toxins) จะเป็นที่เข้าใจกันว่าหมายถึง สารอินทรีย์ที่สร้างขึ้นจากกระบวนการเมตาบอลิซึม (Metabolisms) ของแบคทีเรีย ซึ่งก่อให้เกิดโทษต่อสิ่งมีชีวิตเจ้าบ้าน (Host) ที่แบคทีเรียนั้นอาศัยอยู่ โดยผลที่ก่อในเจ้าบ้านอาจก่อให้เกิดอาการเจ็บป่วย หรือล้มตายเนื่องมาจากผลของสารพิษนี้ ซึ่งอาจเป็นชนิดที่แบคทีเรียสร้างและสะสมไว้ภายในเซล (Cell-fixed bacterial products) หรือเป็นชนิดที่สร้างขึ้นแล้วปลดปล่อยออกสู่ภายนอกเซล (Extracellular products) (Isenberg และ Balows, 1981) Smith (1968) ได้จัดกลุ่มทอกซินที่สร้างจากแบคทีเรียได้เป็น 4 แบบ ได้แก่

1. ทอกซินที่มีผลโดยตรงในการก่อให้เกิดโรคหรืออาการเจ็บป่วยต่อสิ่งมีชีวิตเจ้าบ้าน เช่น ทอกซินโรคคอตีบ (Diphtheria toxin), ทอกซินโรคบาดทะยัก (Tetanus toxin), โบทูลินัมทอกซิน (Botulinum toxin) ซึ่งก่อให้เกิดโรคคอตีบ บาดทะยัก และอาหารเป็นพิษตามลำดับ

2. ทอกซินซึ่งไม่ได้มีบทบาทโดยตรงในการก่อให้เกิดโทษต่อสิ่งมีชีวิตเจ้าบ้าน เช่น สารพิษที่สร้างขึ้นแล้วปลดปล่อยออกสู่ภายนอกเซล (Extracellular toxins) ของเชื้อ *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp. , *Clostridium* sp. และสารพิษที่สร้างขึ้นแล้วสะสมไว้ภายในเซล (Endotoxins) ของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ เป็นต้น

3. ทอกซินซึ่งผลิตออกมาจากจุลินทรีย์ที่ไม่ทราบชนิดภายในหลอดทดลอง (*in vitro* toxin) ซึ่งมีผลก่อโรคต่อสิ่งมีชีวิตเจ้าบ้าน ซึ่งทั้งนี้จะรวมถึง สารที่ผลิตขึ้นมาจากฝีมือมนุษย์ภายในห้องปฏิบัติการแล้วมีผลก่อให้เกิดโรค เช่น สารพิษจาก *Staphylococcus* sp. และ *Streptococcus* sp. ซึ่งมีผลก่อให้เกิดโรคพิษ, สารพิษที่มีผลต่อระบบประสาท (Neurotoxin) ซึ่งสร้างจากเชื้อ *Shigella dysenteriae*

4. ทอกซินซึ่งผลิตออกมาเฉพาะในเซลสิ่งมีชีวิต (*in vivo* toxin) ซึ่งไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้ภายในหลอดทดลอง เช่น สารพิษจาก *Pneumococcus* sp., *Shigella* sp. และ *Mycobacterium tuberculosis* เป็นต้น

แม้ว่าทอกซินโดยทั่วไปจะก่อให้เกิดผลเสียต่อร่างกาย แต่ก็ได้มีการนำทอกซินจากแบคทีเรียหลายชนิดมาใช้ให้เกิดประโยชน์ในหลาย ๆ ด้าน ตัวอย่างได้แก่ ใช้สำหรับควบคุมสภาวะแวดล้อมทางธรรมชาติ เช่น ทอกซินที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus thruringiensis* และ *Bacillus sphaericus* ซึ่งได้ผ่านการตรวจสอบและยอมรับให้ใช้เป็นสารกำจัดและควบคุมแมลง (insect-control agents) ทดแทนการใช้ยาฆ่าแมลงคัตรูพืช (pesticide) ที่มีความเป็นพิษสูง มีปัญหาพิษตกค้าง อีกทั้งยังเป็นอันตรายต่อคน สัตว์และพืช ตลอดจนก่อปัญหาต่อสภาวะแวดล้อมด้วย ทั้งนี้ทอกซินจากแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้ให้ผลดีกับการกำจัดแมลงในกลุ่ม Lepidoptera และ Diptera โดยเฉพาะพวก Lepidoptera ได้ผลกว่า 150 ชนิด อีกทั้งยังรวมถึงแมลงคัตรูพืชที่สำคัญอื่น ๆ ด้วย (Fridlender และคณะ, 1989)

สำหรับประโยชน์ในทางการแพทย์ ได้มีการค้นพบทอกซินหลายชนิด ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญหรือทำลายจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ โดย Selman Waksman ให้ชื่อทอกซินชนิดนี้ว่า "สารปฏิชีวนะ" (Antibiotics) ซึ่งหมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการเมตาบอริซึมของจุลินทรีย์บางชนิด ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโต และ/หรือ การอยู่รอดของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นได้ในปริมาณการใช้ระดับต่ำ ๆ โดยไม่รวมถึงสารสกัดจากพืชหรือแหล่งอื่นที่ไม่ใช่จุลินทรีย์ ตลอดจนสารสังเคราะห์ทางเคมี เนื่องจากการยับยั้งการเจริญของสิ่งมีชีวิตโดยสารสกัดเหล่านี้ต้องใช้ในปริมาณและความเข้มข้นที่สูง เช่น ควินิน (Quinine) จากต้นซินโคน่า (Cinchona tree), ไลโซไซม์ (Lysozyme) จากไข่ขาว สารทั้งสองชนิดนี้แม้ว่าจะสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ แต่จัดเป็นผลิตภัณฑ์จากพืชและสัตว์ จึงไม่จัดอยู่ในประเภทของสารปฏิชีวนะ (Waksman, 1961) สารปฏิชีวนะเป็นสารเมตาบอไลท์(Metabolites) ที่ไม่ได้ถูกผลิตขึ้นมาเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตของผู้ผลิตเอง แต่ถูกผลิตขึ้นมาเป็นพิเศษ จึงเรียกสารนี้ว่า เมตาบอไลท์ทุติยภูมิ (Secondary metabolite) การผลิตสารเมตาบอไลท์ทุติยภูมินี้จะเกิดขึ้นในช่วงการผลิต (Production Phase) ภายหลังสิ้นสุดการเจริญของจุลินทรีย์แล้ว จึงเป็นสารที่ไม่สัมพันธ์กับการเจริญของจุลินทรีย์ผู้ผลิตสาร (Nongrowth-associated product) (Martin และ Demain, 1980)

สารปฏิชีวนะ (Antibiotics)

การจัดกลุ่มสารปฏิชีวนะ (Classification of Antibiotics)

การจัดกลุ่มสารปฏิชีวนะสามารถทำได้หลายลักษณะ เช่น การจัดกลุ่มตามแหล่งกำเนิด, การจัดกลุ่มตามการสังเคราะห์ , การจัดกลุ่มตามขอบเขตการทำลาย , การจัดกลุ่มตามกลไกการออกฤทธิ์ , การจัดกลุ่มตามโครงสร้างทางเคมี เป็นต้น ในปัจจุบันยังไม่มีวิธีใดที่สามารถจัดกลุ่มสารปฏิชีวนะได้อย่างสมบูรณ์ เพราะแต่ละวิธีก็มีข้อบกพร่อง ในที่นี้จะกล่าวถึงเฉพาะการจัดกลุ่มสารปฏิชีวนะตามโครงสร้างทางเคมี (Hiitter และคณะ, 1978)

การจัดกลุ่มสารปฏิชีวนะตามโครงสร้างทางเคมี สามารถจัดได้เป็น 9 กลุ่ม คือ

1. กลุ่มเพนนิซิลินและกลุ่มใกล้เคียง (Penicillin and related antibiotics) สารปฏิชีวนะกลุ่มนี้ โครงสร้างพื้นฐานประกอบด้วย 2 ส่วน คือ Thiazolidine ring และ Beta-Lactam ring โดยที่ส่วน Thiazolidine ring เกิดจาก แอล-ซิสเตอีน (L-cysteine) และ ดี-วาลีน (D-valine) มาจัดเรียงตัวกันเป็นวงแหวน (Cyclic dipeptide)

2. กลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ (Aminoglycoside antibiotics) โครงสร้างพื้นฐานประกอบด้วยน้ำตาลอะมิโน (Amino sugar) ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (Glycosidic linkage) ซึ่งจะแตกต่างจากกลุ่มเพนนิซิลินตรงที่ประกอบด้วยเบสอินทรีย์ (Organic base) แทนที่จะเป็นกรดอินทรีย์ (Organic acid)

3. กลุ่มมาโครไลด์ (Macrolide antibiotics) สารปฏิชีวนะกลุ่มนี้มีสูตรโครงสร้างขนาดใหญ่คือ มี Macrocyclic lactone ring เป็นองค์ประกอบ ซึ่งจะขึ้นกับน้ำตาลหรือแอลกอฮอล์และมีอะตอมของคาร์บอนมากกว่า 20 ตัวขึ้นไป

4. กลุ่มเตตราไซคลิน (Tetracycline antibiotics) มีโครงสร้างเป็น Hydronaphthacene นิวเคลียสมีวงแหวน (Ring) ต่อกันอยู่ 4 อัน

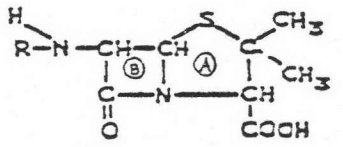
5. กลุ่มคลอแรมนินิคอล (chloramphenical) เป็นสารปฏิชีวนะ ที่มีสูตรโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 1.1

6. กลุ่มเปปไทด์ (Peptide antibiotics) สูตรโครงสร้างจะประกอบไปด้วยกรดอะมิโนมาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเปปไทด์ (Peptide bond) ซึ่งกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบจะมีทั้งในรูป ดี (D) และแอล (L-form) กับสารประกอบอื่น ๆ

7. กลุ่มโพลีอีน (Polyene antibiotics) ซึ่งจะมีโพลีอีนเป็นองค์ประกอบในสูตรโครงสร้าง

8. กลุ่มเซฟาโรสปอริน (Cepharosporines antibiotics) มีโครงสร้างพื้นฐานคล้ายคลึงกับกลุ่มเพนนิซิลิน คือประกอบไปด้วย Beta-lactam-ring แต่จะมี dihydrothiazine ring แทน thiazolidine ring ในเพนนิซิลิน

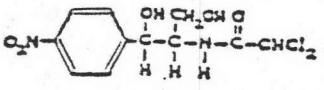
9. กลุ่มสารปฏิชีวนะอื่น ๆ ที่ไม่สามารถจำแนกเข้าในกลุ่มอื่น ๆ ได้



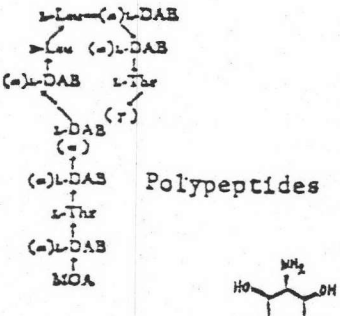
Penicillins

A = Thiazolidine ring

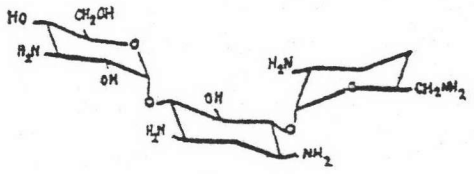
B = Beta-Lactam ring



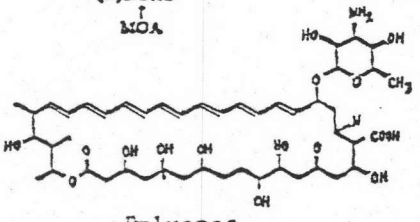
Chloramphenicol



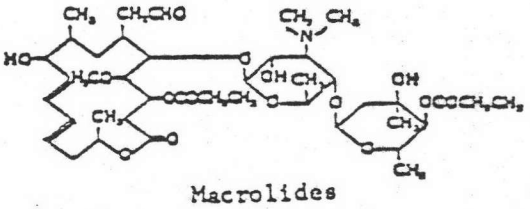
Polypeptides



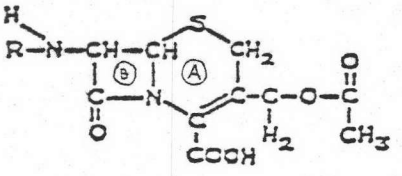
Aminoglycosides



Polyenes



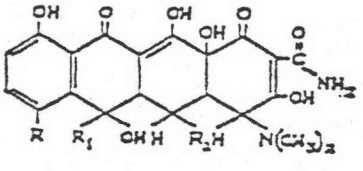
Macrolides



Cephalosporins

A = Dihydrothiazine ring

B = Beta-Lactam ring



Tetracyclines

Others

รูปที่ 1.1 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสารปฏิชีวนะกลุ่มต่าง ๆ

สารปฏิชีวนะกลุ่มเปปไทด์ (Peptide antibiotics)

ในสารปฏิชีวนะทั้งหมด สารปฏิชีวนะกลุ่มเปปไทด์จัดว่าเป็นสารปฏิชีวนะกลุ่มใหญ่ แต่ได้มีการนำมาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์เพียงไม่กี่ชนิด เมื่อเทียบกับจำนวนที่ค้นพบทั้งหมด ซึ่งอาจจะเนื่องมาจากสารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้มีความเสถียรน้อย (unstable) มีความเป็นพิษและทำให้บริสุทธิ์ได้ยาก (Casida, 1968) สารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ใช้ผสมในอาหารสัตว์ รวมทั้งรักษาโรคของสัตว์ (Qadeer และคณะ, 1988) นอกจากนี้ยังใช้สำหรับการรักษาโรคมะเร็งอีกด้วย สำหรับแหล่งของสารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* sp. และ *Streptomyces* sp. จากจุลินทรีย์ชนิดอื่นมีน้อยมาก ตัวอย่างของพวกนี้ ได้แก่ *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium arenaceum* และ *Pseudomonas antimycetica* เป็นต้น (Mark และคณะ, 1978) สารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่จะยับยั้งแบคทีเรียพวกแกรมบวกได้ดี แต่บางชนิดก็สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ เช่น โพลีมิกซิน (Polymyxin) ,โคลิสติน (Colistin) และ เซอคิวริน (Circulin) ในขณะที่บาซิโลมัยซิน (Bacillomycin), มัยโคบาซิลิน (Mycobacillin) และฟังจิสเตติน (Fungistatin) มีความสามารถดีในการยับยั้งการเจริญของราและยีสต์ได้ (Katz และ Demain, 1977)

แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* sp. นั้นได้มีรายงานการค้นพบสารปฏิชีวนะถึง 168 ชนิด (Shoji, 1978) ซึ่งส่วนใหญ่จัดเป็นสารพวกเปปไทด์หรือโพลีเปปไทด์ จัดเป็นสารปฏิชีวนะในกลุ่มอื่นน้อยมาก เช่น บิวติโรซิน (Butirosin) ซึ่งสร้างขึ้นจากเชื้อ *Bacillus circulans* จัดอยู่ในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ (Anderson และคณะ, 1972) และโปรติซิน (Proticin) จากเชื้อ *Bacillus licheniformis* var.*mesentericus* จัดอยู่ในสารปฏิชีวนะกลุ่มไตรอีน (Phosphorus-containng triene) เป็นต้น (Nesemann และคณะ, 1972) ตัวอย่างของสารปฏิชีวนะกลุ่มเปปไทด์ที่สร้างขึ้นจาก *Bacillus* sp. ดังแสดงในตารางที่ 1.1

ตารางที่ 1.1 ตัวอย่างของสารปฏิชีวนะกลุ่มเปปไทด์ที่สร้างขึ้นจากแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* sp.(จาก Katz และ Demain,1977)

สายพันธุ์	สารปฏิชีวนะ
Bacillus brevis	กรามิซิดิน-เอส (Gramicidin S)
	ไทโรซิดิน (Tyrocidine)
	ลิเนียร์-กรามิซิดิน (Linear gramicidine)
	บรีวิน (Brevin)
	อีดีอีน (Ediene)
	เบสสิอีน (Bresseine)
	บีวิสติน (Brevistin)
Bacillus subtilis	มัยโคบาซิลลิน (Mycobacillin)
	ซับทิลิน (Subtilin)
	บาซิไลซิน (Bacilysin)
	บาซิโลมัยซิน (Bacillomycin)
	ฟังจิสเตติน (Fungistatin)
	บัลบิฟอร์มิน (Bulbiformin)
	บาซิลลิน (Bacillin)
	ซับสปอริน (Subsporin)
	บาซิลโลซิน (Bacillocin)
	มัยโคซับทิลิน (Mycosubtilin)
	ฟังโกซิน (Fungocin)
	อิทูลิน (Iturin)
	นีโอซิดิน (Neocidin)
	อียูมัยซิน (Eumycin)

สายพันธุ์	สารปฏิชีวนะ
Bacillus pumilis	ไมโครคอคซิน-พี (Micrococcin-P)
	พูมิลิน (Pumilin)
	เตตาอีน (Tetaine)
Bacillus mesentericus	เอสเปอริน (Esperin)
Bacillus thiaminolyticus	ออกตาไพติน (Octapytin) หรือ
	ไทอะโนซีน (Thianosine)
	บาซิฟิลาซิน (Baciphelacin)
Bacillus licheniformis	เบซิเทรซิน (Bacitracin)
	ไลเคนนิฟอร์มิน (Licheniformin)
	โปรติซิน (Proticin)
Bacillus polymyxa	โพลีมิกซิน (Poymyxin)
	โคลิสติน (Colistin)
	กาตาวาลิน (Gatavalin)
	โจลิเปปติน (Jolipeptin)
Bacillus circulans	บิวทิโรซิน (Butirocin)
	เซอคิวลิน (Circulin)
	โพลีเปปติน (Polypeptin)
	ไซโลสเตติน (Xylostatin)
	อีเอ็ม-49 (EM-49)
Bacillus laterosporus	เลเทอโรสปอเรมีน (Laterosporamine)
	เลเทอโรสปอริน (Laterosporin)
Bacillus cereus	ไบโอเซอริน (Biocerin)
	ซีรีซิน (Cerexin)
	ไทโอซิลลิน (Thiocillin)

จากตารางที่ 1.1 แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* sp. นี้ บางสายพันธุ์สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้หลายชนิด และในขณะเดียวกันสารปฏิชีวนะชนิดเดียวก็อาจจะผลิตจากสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน เช่น เบซิเทรซินจาก *B. licheniformis* และ *B. subtilis* (Callow และ Work, 1952) โพลีมัยซินจาก *B. polymyxa*, *B. aerosporin*, *B. colistinus* และ *B. circulans* เป็นต้น (Shoji, 1978)

ความสัมพันธ์ระหว่างการสร้างสารปฏิชีวนะกับการเจริญของจุลินทรีย์

ตามที่กล่าวไปแล้วข้างต้นว่า สารปฏิชีวนะจัดเป็นสารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิ ซึ่งจะถูกสร้างขึ้นภายหลังจุลินทรีย์มีการเจริญเต็มที่แล้ว Tomino และคณะ (1967) ได้ศึกษาการสร้างสารปฏิชีวนะกรามิซิดีน-เอส จาก *Bacillus brevis* พบว่า เอนไซม์ที่มีความสำคัญในการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะชนิดนี้จะถูกผลิตออกมาในช่วงระยะหลังของการเจริญแบบลอกาลิธึม (Late logarithmic phase) และแอคติวิตีของเอนไซม์นี้จะลดลงและหายไปอย่างรวดเร็วภายในระยะเวลาสั้น ๆ ซึ่งเป็นลักษณะที่สามารถพบได้ในสารปฏิชีวนะชนิดอื่นที่มีการสังเคราะห์ในลักษณะเดียวกันนี้ เช่น ไทโรซิดีน (Tyrocidine), โพลีมิกซิน (Polymyxin), อีดีอีน (Ediene), บาซิเทรซิน (Bacitracin), มัยโคบาซิลลิน (Mycobacillin) และ บาซิไลซิน (Bacilysin) เป็นต้น สาเหตุของการหายไปของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารปฏิชีวนะนี้ยังไม่เป็นที่ทราบสาเหตุแน่ชัด แต่มีข้อสันนิษฐานว่าอาจเนื่องมาจาก จุลินทรีย์นำไปใช้ในกระบวนการสร้างสปอร์ในช่วงที่การสร้างสปอร์ยังไม่สมบูรณ์ (Lee และคณะ, 1975) หรืออาจเสียแอคติวิตี้ไปเนื่องจากออกซิเจน (oxygen-dependent inactivation) (Demain และคณะ, 1976) อย่างไรก็ตามพบว่าการสร้างสารปฏิชีวนะบางครั้งอาจถูกสร้างขึ้นได้ในระยะการเจริญของจุลินทรีย์ (Growth phase) ซึ่งปัจจัยที่เป็นตัวกำหนดคือลักษณะทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์และองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ Demain และคณะ (1972) พบว่าการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะกลุ่มเปปไทด์จะถูกควบคุมด้วยคาตาบอไลท์ รีเพรสชั่น (Catabolite repression) ของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ตัวอย่าง

เช่น การผลิตสารปฏิชีวนะเบซิเทรซิน โดย *Bacillus licheniformis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ (Chemical defined medium) นั้นจะสร้างขึ้นควบคู่กับการเจริญของเซล แต่เมื่อมีการเติมกลูโคสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ การสร้างสารปฏิชีวนะจะถูกยับยั้งในช่วงแรกที่เซลมีการเจริญ ซึ่งเป็นผลมาจากกรดอะซิติก (Acetic acid) และกรดไพรูวิก (Pyruvic acid) ซึ่งสร้างขึ้นจากกลูโคสที่เติมลงไป (Haavik, 1974a) นอกจากเบซิเทรซินแล้วยังมีสารปฏิชีวนะอื่นที่มีสังเคราะห์ในลักษณะเดียวกันนี้ เช่น ลิเนียร์-กรามิซิดีน (linear-gramicidine), โคลิสติน (Colistin) เป็นต้น

ความสัมพันธ์ระหว่างการสร้างสารปฏิชีวนะกับการสร้างสปอร์

ได้มีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างการสร้างสารปฏิชีวนะกับการสร้างสปอร์ของแบคทีเรีย ซึ่งมีการสนับสนุนถึงความสัมพันธ์นี้ โดยมีการพบว่า

1. จุลินทรีย์ที่สร้างสปอร์เกือบทั้งหมดจะมีการสร้างสารปฏิชีวนะด้วย โดยที่การสร้างสปอร์จะเริ่มขึ้นเมื่อเซลได้สังเคราะห์สารปฏิชีวนะถึงจุดสูงสุด และสารปฏิชีวนะจะถูกสังเคราะห์ก็ต่อเมื่อสภาวะในการเลี้ยงเชื้อเอื้ออำนวยต่อการสร้างสปอร์เท่านั้น (Katz และคณะ, 1965)

2. สารปฏิชีวนะกลุ่มเปปไทด์ที่สร้างจากแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* sp. ที่ความเข้มข้นระดับหนึ่งซึ่งสร้างได้ในระยะที่มีการสร้างสปอร์ จะสามารถยับยั้งขบวนการที่สำคัญภายในเซลปกติ (Vegetative cell) ได้ เช่น ขบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (Deoxyribonucleic acid synthesis), ขบวนการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและหน้าที่ของเมมเบรน เป็นต้น ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจากเซลปกติเข้าสู่ระยะการสร้างสปอร์ (Sadoff, 1972)

3. การสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่มเปปไทด์มักจะถูกสร้างขึ้นในระยะหลังของการเจริญแบบลอกาลิธึม (Late-logarithmic phase) และการสังเคราะห์จะดำเนินต่อไปจนถึงระยะต้นของการสร้างสปอร์ใน *Bacillus* sp. (Banerjee และ Bose, 1964)

4. หากจุลินทรีย์ได้รับการกลายพันธุ์หรือยับยั้งการสร้างสารปฏิชีวนะ จุลินทรีย์จะไม่สามารถสร้างสปอร์ได้ (Bernlohr และ Novelli, 1963 ; Bodanszky และ Perlman, 1969)

5. สารยับยั้ง (Inhibitors) ที่มีผลในการยับยั้งกระบวนการสร้างสปอร์ จะยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะด้วย (Bernlohr และ Novelli, 1959)

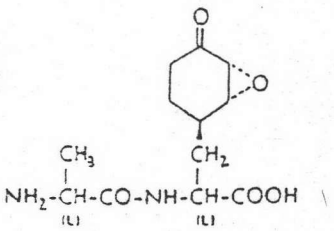
6. ความสำคัญของสารปฏิชีวนะต่อการสร้างสปอร์นั้นอาจจะเนื่องจากจุลินทรีย์นำสารปฏิชีวนะไปใช้ในกระบวนการสร้างสปอร์ กล่าวคือ ในช่วงที่การสร้างสปอร์ยังไม่สมบูรณ์ (forespore) สารปฏิชีวนะกลุ่มเปปไทด์จะทำหน้าที่เป็นตัวนำแคลเซียมอิออน (Ca^{2+}) และกรดไดพิโคลินิก (DPA) ผ่านเยื่อหุ้มสปอร์ส่วนนอก (Outer forespore membrane) ไปยังบริเวณคอร์เทกซ์ของสปอร์ หลังจากนั้นยังมีบทบาทในการดึงน้ำจากไซโตพลาสซึมของสปอร์ ซึ่งทำให้สปอร์เกิดการหดตัวและหยุดขบวนการเมตาบอริซึมทั้งหมด (Hodgson, 1970)

จากข้อสังเกตข้างต้นทั้งหมดทำให้พอจะสรุปได้ว่า การสร้างสารปฏิชีวนะมีความสำคัญต่อขบวนการสร้างสปอร์ของจุลินทรีย์มาก

<u>สมบัติโดยทั่วไปของสารปฏิชีวนะกลุ่มเปปไทด์</u>

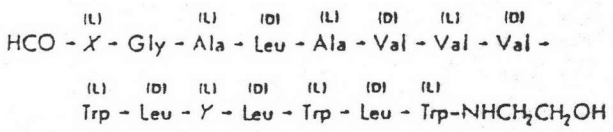
ได้มีการศึกษาสมบัติของสารปฏิชีวนะกลุ่มเปปไทด์ โดยนักวิทยาศาสตร์หลายกลุ่ม อาทิ เช่น Bodanszky และ Berlman,1964 ; Katz และ Demain,1977 ; Grayson, 1982 ทำให้สามารถสรุปได้ว่า

1. สารปฏิชีวนะกลุ่มเปปไทด์มักจะมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำเมื่อเทียบกับโปรตีนชนิดอื่น ๆ คือมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 270-4,500 ดาลตัน น้ำหนักโมเลกุลน้อยที่สุดคือ บาซิไลซิน (รูปที่ 1.2) และน้ำหนักโมเลกุลมากที่สุดคือ ไลเคนนิฟอร์มิน

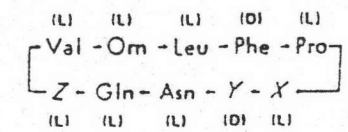


รูปที่ 1.2 แสดงโครงสร้างของบาซิไลซิน

2. สารปฏิชีวนะหลายกลุ่มสามารถสร้างได้จากจุลินทรีย์ชนิดเดียวกัน โดยแบ่งตามความแตกต่างขององค์ประกอบและโครงสร้างทางเคมี และสารปฏิชีวนะที่จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันอาจมีความแตกต่างของกรดอะมิโนเพียงตัวเดียว ไปจนถึงหลาย ๆ ตัว เช่น ในกรณีของ *Bacillus brevis* ซึ่งสามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้ทั้งลิเนียร์-กรามิซิดีน (linear gramicidines) ซึ่งมีโครงสร้างเป็นเส้นตรงและไทโรซิดีน (Tyrocidines) ซึ่งมีโครงสร้างเกาะกันเป็นวงแหวน (รูปที่ 1.3)



	X	Y
Valine-gramicidin A	Val	Trp
Isoleucine-gramidin A	Ile	Trp
Valine-gramicidin B	Val	Phe
Isoleucine-gramicidin B	Ile	Phe
Valine-gramicidin C	Val	Tyr
Isoleucin-gramicidin C	Ile	Tyr



		X	Y	Z
Tyrocidin	A	Phe	Phe	Tyr
	B	Trp	Phe	Tyr
	C	Trp	Trp	Tyr
	D	Trp	Trp	Trp
	E	Phe	Phe	Phe

รูปที่ 1.3 แสดงโครงสร้างของลิเนียร์-กรามิซิดีน และไทโรซิดีน

3. สารปฏิชีวนะกลุ่มเปปไทด์ส่วนใหญ่ที่สร้างโดยจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Bacillus* sp. จะประกอบด้วยกรดอะมิโนเพียงอย่างเดียวภายในโครงสร้างโมเลกุล แต่อาจพบองค์ประกอบอื่น ๆ ในโครงสร้างโมเลกุลนอกเหนือจากกรดอะมิโนได้ เช่น อิตีอีน มีเบสสเปอมิดีน (Spermidine) เป็นองค์ประกอบ (Hettinger และ Craig, 1968) และโพลีมัยซินมีกรดไขมัน 6-เมธิลเฮพทาโนอิค (6-Methylheptanoic acid) เป็นองค์ประกอบ (Vogler และ Studer, 1966)

4. โดยทั่วไปแล้วสารปฏิชีวนะกลุ่มเปปไทด์มักประกอบไปด้วยกรดอะมิโนซึ่งมีลักษณะเฉพาะที่ไม่พบในโปรตีนชนิดอื่น ๆ อาทิ เช่น กรดอะมิโนในรูป ดี (D-amino acids), กรดอะมิโนชนิดเบสิก (Basic-amino acids) ได้แก่ ออร์นิทริน (Ornithine) และกรดไดอะมิโนบิวไทริค

(Diaminobutyric acids) กรดอะมิโนชนิดเบต้า (β-amino acids), กรดดีไฮโดรอะมิโน (Dehydroamino acids) ได้แก่ ดีไฮโดรอะลานีน (Dehydroalanine) และกรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์ ได้แก่ แลนไทโอนีน (Lanthionine) ในทางตรงกันข้ามเมื่อเปรียบเทียบกับเปปไทด์ซึ่งสร้างจากเชื้อราและแอคติโนมัยซิส พบว่า เปปไทด์จาก *Bacillus* sp. จะไม่พบ กรดอะมิโนชนิดเอ็น-เมธิล (N-methylamino acid) เป็นองค์ประกอบ

5. โครงสร้างของสารปฏิชีวนะกลุ่มเปปไทด์ส่วนใหญ่จะมีลักษณะเป็นวงแหวน (Cyclic) แต่ในบางกรณีอาจพบในรูปแนวเส้นตรงได้ เช่น อีดีอีน, ลิเนียร์-กรามิซิดีน เป็นต้น

6. สารปฏิชีวนะกลุ่มเปปไทด์จะไม่ถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนโดยทั่วไป เช่น เปปติเดส (Peptidase) และโปรติเอส (Protease) ที่ได้จากพืชและสัตว์ ในขณะที่สารปฏิชีวนะบางชนิด เช่น โพลีมิกซิน-บี สามารถถูกย่อยด้วยฟิซิน (Ficin) และปาเปน (Papain) (Daulus และ Gray, 1964),อีดีอีนเอและบี ถูกย่อยได้โดยเอนไซม์คาร์บอกซีเปปติเดส (Carboxypeptidase) (Hettinger และ Raig, 1970)

7. ในกระบวนการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะกลุ่มเปปไทด์นี้ ถ้ามีการแทนที่กรดอะมิโนบางตัวด้วยกรดอะมิโนอื่น ที่มีความสัมพันธ์กันก็จะไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาแต่อย่างใด เช่น ในโครงสร้างของเบซิเทรซินสามารถแทนที่แอล-วาลีน (L-valine) ด้วยแอล-ไอโซลิวซีน (L-isoleucine)

8. กระบวนการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะในกลุ่มนี้จะแตกต่างจากการสังเคราะห์โปรตีนโดยทั่ว ๆ ไป คือจะถูกสังเคราะห์ด้วยระบบของเอนไซม์ ไม่ใช่กระบวนการสังเคราะห์โดยใช้ไรโบโซม (Lipmann, 1973) เมื่อเติมสารยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน เช่น คลอแรมฟีนิคอล (Chloramphenicol), พูโรมัยซิน (Puromycin) , แอคติโนมัยซิน-ดี (Actinomycin-D), ไรแฟมพิซิน (Rifampicin), ดีออกซีไรโบนิวคลีเอส (Deoxyribonuclease) และไรโบนิวคลีเอส (Ribonuclease) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะไม่มีผลต่อการผลิตสารปฏิชีวนะแต่อย่างใด (Cornell และ Snoke, 1964; Roscoe และ Abraham, 1966; Bodernszky และ Perlman, 1969)

<u>บทบาทของยีสต์ต่ออุตสาหกรรม</u>

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญกับมนุษยชาติในด้านที่เป็นประโยชน์ต่อมนุษย์มานานที่สุด มีหลักฐานว่า มีการใช้ยีสต์ในการทำเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ และใช้ยีสต์ในการทำขนมปังตั้งแต่ 3000 ปีก่อนคริสต์กาล ช่วงก่อนปี ค.ศ. 1900 ผลผลิตจากอุตสาหกรรมการหมักคือ แอลกอฮอล์ ในรูปเครื่องดื่มและน้ำส้มสายชู การผลิตเบียร์มีมาตั้งแต่ยุคอียิปต์โบราณ แต่การผลิตปริมาณมากๆ เริ่มประมาณปี ค.ศ.1700 พอถึงช่วงกลางศตวรรษที่ 18 จากการศึกษาของ Cangiard-Lalour และการศึกษาของ Schwann และ Kutzing พบว่ายีสต์เกี่ยวข้องกับการหมักแอลกอฮอล์ จนถึงปลายคริสตศตวรรษที่ 18 Hansen นักวิทยาศาสตร์ของโรงงานเบียร์ได้พัฒนาวิธีแยกและเลี้ยงยีสต์เซลล์เดี่ยวให้ได้เป็นเชื้อบริสุทธิ์และพัฒนาระบบในการผลิตเชื้อตั้งต้น จากคุณสมบัติที่ยีสต์สามารถเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นแอลกอฮอล์และคาร์บอนไดออกไซด์ได้อย่างรวดเร็วนี้ ทำให้ระบบอุตสาหกรรมการหมักให้ความสนใจกับการใช้ยีสต์ (ดวงพร คันธโชติ,2530) ในปัจจุบันอุตสาหกรรมการหมักที่ใช้ยีสต์ในการผลิตจัดเป็นอุตสาหกรรมการหมักที่ใหญ่ที่สุด มีจำนวนเงินหมุนเวียนมากที่สุด ซึ่งอุตสาหกรรมการหมักที่ใช้ยีสต์ในการผลิตที่สำคัญมีดังนี้

1. อุตสาหกรรมการผลิตเครื่องดื่มประเภทมีแอลกอฮอล์ (Alcoholic beverages) คือ อุตสาหกรรมการผลิตเอธานอล และ สารประเภทออกาโนเลบติคอลลี คอมเปานด์ (Organoleptically compound) โดยการหมักข้าวชนิดต่างๆ ,ผลไม้ หรือสิ่งสกัดจากพืชผัก โดยยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ ตัวอย่างของเครื่องดื่มมีแอลกอฮอล์ เช่น เบียร์ (beer), แชมเปญ (champagne),ไวน์ (wine), สาเก (sake), วิสกี้ (whisky) และบรั่นดี (brandy)เป็นต้น

2. อุตสาหกรรมการผลิตแอลกอฮอล์เพื่อเป็นเชื้อเพลิง (Ethanol as a fuel source) เป็นการผลิตแอลกอฮอล์เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงาน เนื่องจากความสนใจในการนำแอลกอฮอล์ที่ได้จากการหมักมาใช้เป็นเชื้อเพลิงในรถยนต์มีมากขึ้น ประมาณ 80 เปอร์เซนต์ของแอลกอฮอล์ทั่วโลกที่ได้มาจากการหมัก ในประเทศที่มีความก้าวหน้าทางเทคโนโลยี เช่น สหรัฐอเมริกา อุตสาหกรรมการ

ผลิตเอธานอลเกือบทั้งหมดทำมาจากเอธิลีน (Ethylene) ซึ่งได้มาจากน้ำมันปิโตรเลียม ทำให้ราคาของแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้นตามราคาของน้ำมันปิโตรเลียม เพื่อแก้ปัญหานี้จึงได้มีการพัฒนาเทคโนโลยีในการผลิตเอธานอลโดยการหมักวัตถุดิบทางการเกษตร เพื่อใช้เป็นแหล่งทดแทน

3. อุตสาหกรรมการผลิตยีสต์ขนมอบ (Bakers yeasts) ในอดีตที่ผ่านมาการทำขนมอบนั้นเกิดจากการใช้แป้งสดกับแป้งที่เป็นหัวเชื้อจากการทำขนมอบครั้งก่อน ๆ ผสมกัน ผลที่ได้จะไม่สม่ำเสมอ เพราะการหมักน้ำตาลในแป้งที่ทำขนมอบขึ้นอยู่กับปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ซึ่งบางครั้งอาจมีน้อยมากเนื่องจากเชื้ออ่อนแอ จนกระทั่งปลายปีคริสตศตวรรษที่ 18 เริ่มมีการผลิตยีสต์สำหรับทำขนมอบโดยเฉพาะ ในปัจจุบันประมาณกันว่าทั่วโลกแต่ละปีจะมีการผลิตยีสต์ขนมอบอย่างน้อยที่สุดประมาณ 700,000 ตัน และการผลิตมีแนวโน้มจะมากขึ้นในอนาคต เนื่องจากความต้องการในการเก็บยีสต์ไว้ให้นานที่สุด โดยที่เชื้อยังมีความสามารถอยู่ ทำให้มีการพัฒนาการผลิตยีสต์แห้งขึ้น ซึ่งมีผลดีในแง่ลดพื้นที่ในการเก็บและค่าขนส่ง ปัจจุบันการผลิตยีสต์ขนมอบนิยมผลิตในรูปของยีสต์แห้ง (Live dry yeast หรือ Active dry yeast) เมื่อเก็บไว้ในภาชนะที่เป็นสุญญากาศ จะสามารถเก็บเชื้อโดยคงความสามารถไว้ได้นานเป็นปี

4. อุตสาหกรรมการผลิตยีสต์เพื่อเป็นอาหารของคนและสัตว์ (Food and fodder yeasts) ในปี ค.ศ.1955 องค์การอนามัยโลก(WHO)ได้จัดตั้งหน่วยงานที่มีชื่อว่า Protein Advisory Group เพื่อหาแหล่งโปรตีนใหม่สำหรับมนุษย์ ซึ่งจะต้องมีความปลอดภัยและเหมาะสมสำหรับเป็นอาหารของมนุษย์(Food) หรือเป็นอาหารสัตว์(Feed) หน่วยงานนี้ได้ให้ความสนใจในการพัฒนาโปรตีนเซลล์เดียว (Single Cell Protein: SCP) เนื่องจากการขาดแคลนอาหารโปรตีน ขาดแคลนวัตถุดิบที่จะใช้ผลิตโปรตีนจากเนื้อสัตว์ ปัญหาการกำจัดของเหลือใช้ ดังนั้นการใช้โปรตีนเซลล์เดียวจึงเป็นหนทางหนึ่งที่แก้ปัญหาดังกล่าวได้ จุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตเป็นโปรตีนเซลล์เดียวมีทั้ง สาหร่าย เชื้อรา แบคทีเรีย และยีสต์ แต่จุลินทรีย์ที่เหมาะที่สุดในการใช้เป็นแหล่งโปรตีนคือ ยีสต์ เนื่องจากภายในเซลล์ยีสต์มีส่วนประกอบของสารและเกลือแร่หลายชนิดเป็นปริมาณมากโดยเฉพาะโปรตีน ซึ่งเฉลี่ยแล้วในเซลล์ยีสต์จะประกอบด้วยโปรตีนทั้งหมดประมาณ 45-50 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักแห้ง นอกจากนี้ยังอาจเนื่องมาจากเป็นจุลินทรีย์ที่มนุษย์รู้จักกันมานานและเป็นที่ยอมรับ มีอัตราการเจริญเร็ว ไม่เป็นจุลินทรีย์ก่อโรค และมีการศึกษาจนรู้คุณสมบัติทางด้านพันธุกรรมและชีวเคมีเป็นอย่างดี

จากประโยชน์ในอุตสาหกรรมทั้งหมดดังได้กล่าวข้างต้น ยีสต์ที่มีบทบาทและได้รับการเลือกใช้มากได้แก่ยีสต์ในจีนัส *Saccharomyces* โดยเฉพาะอย่างยิ่งสายพันธุ์ของ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นสายพันธุ์ที่ถูกนำมาใช้ประโยชน์มากที่สุดในอุตสาหกรรมการหมักประเภทต่างๆ ได้แก่ การผลิตไวน์และเครื่องดื่มที่มีแอลกอออล์, การผลิตเอธานอล เป็นต้น

การใช้สารปฏิชีวนะในการฆ่ายีสต์

ดังได้กล่าวแล้วข้างต้นถึงประโยชน์ของยีสต์ในอุตสาหกรรม จะเห็นได้ว่ายีสต์มีบทบาทสูงต่อการพัฒนาและการปรับปรุงกระบวนการผลิต โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่ออุตสาหกรรมการหมัก แต่ในทางตรงข้ามยีสต์บางสายพันธุ์อาจก่อให้เกิดโทษต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์และสัตว์ได้ เช่น ก่อให้เกิดโรค ทำให้เกิดการบูดเน่าของอาหาร เป็นต้น จึงได้มีนักวิทยาศาสตร์หลายท่านได้ทำการค้นคว้าและศึกษาเพื่อหายาปฏิชีวนะที่มีผลดีในการทำลายจุลินทรีย์ได้อย่างกว้างขวาง ทั้งแบคทีเรีย รา และ ยีสต์

Landy และคณะ (1948) รายงานถึงความสามารถของสารปฏิชีวนะบาซิโลมัยซิน จากเชื้อ *Bacillus subtilis* ในการทำลายเชื้อราและยีสต์ก่อโรค (Pathogenic fungi)

Bevan และ Makower (1963) ได้รายงานถึงการค้นพบสายพันธุ์ยีสต์ซึ่งสามารถผลิตสารประกอบโปรตีนซึ่งมีผลฆ่ายีสต์อื่นๆได้เป็นครั้งแรก จึงให้ชื่อยีสต์ชนิดนี้ว่า คิลเลอร์ยีสต์ (Killer yeast) และเรียกสารประกอบโปรตีนที่สร้างขึ้นว่า คิลเลอร์ทอกซิน (Killer toxin) ซึ่งในระยะต่อมาพบว่าสายพันธุ์คิลเลอร์ยีสต์ส่วนใหญ่ที่พบจะอยู่ในกลุ่มของ *Saccharomyces cerevisiae*

Meyer และคณะ (1973) ค้นพบสารปฏิชีวนะอีเอ็ม 49 (EM 49) ซึ่งอยู่ในรูปสารประกอบจากน้ำเลี้ยงเชื้อของ *Bacillus circulans* ซึ่งสารปฏิชีวนะที่ค้นพบมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลชีพอื่นได้กว้างขวางทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ ตลอดจนเชื้อรา โปรโตซัว และยีสต์

Kurusu และคณะ (1987) ได้ทำการศึกษาจุลินทรีย์ *Bacillus polymyxa* และพบว่าสามารถผลิตสารปฏิชีวนะในรูปสารประกอบเปปไทด์ชนิดใหม่ ที่มีชื่อว่า LI-F ซึ่งประกอบด้วยองค์ประกอบย่อย 10 หน่วยชนิด (Components) ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงต่อรา ยีสต์ และแบคทีเรีย

018960

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารปฏิชีวนะ

1. องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยพื้นฐานที่สำคัญในการเจริญของจุลินทรีย์ เช่นเดียวกับสิ่งมีชีวิตทั่ว ๆ ไป คือเป็นแหล่งให้พลังงานสำหรับกิจกรรมต่าง ๆ ของเซล เช่น การหายใจ การเคลื่อนไหว การทำงานของเอนไซม์ ตลอดจนการสังเคราะห์สารเมตาบอไลท์ ซึ่งองค์ประกอบที่สำคัญของอาหารเลี้ยงเชื้อได้แก่

1.1 แหล่งคาร์บอน

สารคาร์บอนเป็นธาตุที่มีความสำคัญในการเป็นโครงสร้างของเซล นอกจากนี้ยังมีความสำคัญในการเป็นแหล่งพลังงานสำหรับการสร้างสารเมตาบอไลท์ชนิดต่าง ๆ แบคทีเรียสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้ทั้งในรูปอนินทรีย์ เช่น CO, CO_2 และสารประกอบอินทรีย์ เช่น คาร์โบไฮเดรท, แอลกอฮอล์, กรดอินทรีย์, ไฮโดรคาร์บอน และอื่น ๆ เป็นต้น (Dunn, 1986) แหล่งสารคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะแต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป ขึ้นกับชนิดของสารปฏิชีวนะและชนิดของจุลินทรีย์ ตัวอย่างเช่น น้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเพนนิซิลิน จี จากรา *Penicillium chrysogenum* (Soltero และ Johnson, 1953) แป้งถั่วเหลือง เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับ *Streptomyces griseus* ในการผลิตสเตรปโตมัยซิน (Streptomycin) ซึ่งมีผลในการทำลายโรคพืชที่เกิดจากแบคทีเรีย (Hiitter และคณะ, 1978) การที่ทั้งน้ำตาลแลคโตสและแป้งถั่วเหลืองให้ผลดีต่อการสร้างสารปฏิชีวนะนั้นมีผลเนื่องจากโครงสร้างโมเลกุลที่ซับซ้อนของมันทำให้การใช้งานโดยจุลินทรีย์เกิดขึ้น อย่างช้า ๆ ซึ่งเป็นการป้องกันการสะสมของน้ำตาลเฮกโซส (Hexose) ที่เป็นสาเหตุของการยับยั้งการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะ สำหรับน้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่จุลินทรีย์ทุกชนิดสามารถนำไปใช้ได้ง่ายโดยมากจะมีความเหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ในช่วงแรกของการเจริญ แต่ในขณะเดียวกัน

จะมีผลยับยั้งและควบคุมการสังเคราะห์ (catabolite repression) สารปฏิชีวนะชนิดต่างๆ เช่น มีผลต่อการผลิตออร์แรนทริน (aurantin) ของ *Bacillus aurantinus* และการผลิตเซฟาโรสปอริน (cephalosporin)ของ *Streptomyces cleavaligerus* แต่ปรากฏการณ์นี้สามารถหลีกเลี่ยงได้โดยใช้การเติมแหล่งคาร์บอนเป็นระยะ ๆ หรือใช้แหล่งคาร์บอนชนิดอื่นแทนการใช้กลูโคส สำหรับการผลิตเบซิเทรซิน จากเชื้อ *Bacillus licheniformis* น้ำตาลกลูโคสจะเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด (Haavik,1974a) นอกจากนี้แหล่งคาร์บอนยังมีความสำคัญในการกำหนดชนิดของสารปฏิชีวนะ ในกรณีที่จุลินทรีย์ชนิดหนึ่งสามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้หลายชนิด เช่น *Bacillus licheniformis* จะผลิตเบซิเทรซินเมื่อมีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และจะผลิตไลเคนนิฟอร์มิน เมื่อมีน้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน (Callow และ Work, 1952)

1.2 แหล่งไนโตรเจน

ไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารอีกชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญต่อจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์สามารถใช้ได้ทั้งในรูปสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์เช่นเดียวกับธาตุคาร์บอน ไนโตรเจนส่วนใหญ่จะถูกเมตาบอไลท์เพื่อใช้สร้างเป็นโปรตีน กรดนิวคลีอิก และโพลิเมอร์ของผนังเซล จากน้ำหนักเซลแห้งพบว่า ไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบภายในเซลแบคทีเรียถึง 12% และ 10% สำหรับเซลรา (Mandelstam, 1958) ไนโตรเจนเป็นสารที่มีบทบาทสำคัญต่อการผลิตสารปฏิชีวนะ จากการศึกษาพบว่า แหล่งสารไนโตรเจนชนิดอนินทรีย์จะไม่เหมาะต่อการผลิตสารปฏิชีวนะ เนื่องจากแอมโมเนีย (Ammonium effect) ที่เกิดจากการย่อยสลาย จะมีผลทำให้ได้ผลผลิตของสารปฏิชีวนะต่ำ เช่น ในการผลิตอิริโทรมัยซิน (Erythromycin) การสังเคราะห์จะคงดำเนินไปเรื่อย ๆ ตราบใดที่ยังคงมีแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่เมื่อมีการเติมแอมโมเนียมคลอไรด์ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนลงไป การสังเคราะห์อิริโทรมัยซินจะลดลง (Smith และคณะ, 1962) สำหรับแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ จุลินทรีย์สามารถย่อยสลายเพื่อนำไปใช้ได้อย่างช้า ๆ จะให้ผลดีในการผลิตสารปฏิชีวนะ เช่น กากถั่วเหลืองสกัด (Soybean meal extract), กากเมล็ดฝ้าย (Cottonseed meal) เป็นต้น นอกจากนี้ปริมาณของไนโตรเจนที่ใช้ในการผลิตสารปฏิชีวนะต้องได้ส่วนกับคาร์บอน

คือต้องศึกษาหาค่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจน (C/N ratio) ให้เหมาะสม เนื่องจากค่าอัตราส่วนนี้มีความสำคัญในการกำหนดชนิดของสารปฏิชีวนะที่จะถูกสร้างขึ้น เช่น ในกรณีของ *B. licheniformis* ATCC 10716 ซึ่งสามารถสังเคราะห์สารปฏิชีวนะได้หลายชนิด ทั้งเบซิเทรซิน, กรามิซิดิน, ไทโรซิดิน และไลเคนนิฟอร์มิน การที่จุลินทรีย์จะผลิตสารปฏิชีวนะตัวใดขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะในการควบคุมปฏิกิริยาการหมัก (Simlot และคณะ, 1973)

1.3 แหล่งเกลือแร่และวิตามิน

เกลือแร่และวิตามินเป็นปัจจัยหนึ่งที่จุลินทรีย์ต้องการใช้เพื่อการเจริญเติบโตนอกเหนือจากแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน นอกจากนี้ยังมีผลในการเป็นตัวกระตุ้น (Activator) ต่อการทำงานของเอนไซม์ในการผลิตสารปฏิชีวนะ เนื่องจากสารปฏิชีวนะจัดเป็นเมตาบอไลท์ทุติยภูมิ จากการศึกษาพบว่าเกลือแร่ที่จำเป็นต่อการผลิตเมตาบอไลท์ทุติยภูมิมีด้วยกันทั้งหมด 9 ชนิด มีเลขอะตอมตั้งแต่ 23-30 และ 42 ได้แก่ วานาเดียม (V), โครเมียม (Cr), แมงกานีส (Mn), เหล็ก (Fe), โคบอลท์ (Co), นิกเกิล (Ni), คอปเปอร์ (Cu), สังกะสี (Zn) และโมลิบดินัม (Mo) (Weinberg, 1970)

2. สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารปฏิชีวนะ

2.1 อุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างหนึ่งในการเจริญ และปรับตัวเพื่อการอยู่รอดของจุลินทรีย์ ในการผลิตสารปฏิชีวนะจะต้องมีการควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วงที่พอเหมาะ เพราะมีการศึกษาพบว่าอุณหภูมิที่พอเหมาะต่อการเจริญอาจไม่ใช่อุณหภูมิที่พอเหมาะต่อการสร้างสารปฏิชีวนะ เช่น *P. chrysogenum* จะเจริญได้ที่อุณหภูมิ 30°ซ. แต่การผลิตสารปฏิชีวนะเพนนิซิลินจะผลิตได้ดีที่อุณหภูมิ 20°ซ. (Soltero และ Johnson, 1953)

2.2 ความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อมีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์มากเนื่องจากการเจริญของจุลินทรีย์หรือสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ถูกควบคุมโดยขบวนการเมตาโบลิซึม ซึ่งมีเอนไซม์เป็นตัวสำคัญ และการทำงานของเอนไซม์มีผลกระทบจากความเป็นกรด-ด่าง โดยทั่วไปค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป ราและยีสต์จะเจริญได้ดีในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่างค่อนข้างต่ำ แต่แบคทีเรียจะเจริญได้ดีในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่างที่เป็นกลาง องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยสำคัญอันหนึ่งที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากจุลินทรีย์จะมีการย่อยสลายสารอาหารเพื่อเป็นแหล่งพลังงาน ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีองค์ประกอบที่เป็นโปรตีนและไนโตรเจนเมื่อถูกย่อยสลายจะปลดปล่อยสารที่เป็นแอมโมเนีย หรืออัลคาไลน์อื่น ๆ ออกมา แต่ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีองค์ประกอบที่เป็นคาร์โบไฮเดรต เมื่อถูกย่อยสลายจะขับสารที่เป็นกรดอินทรีย์ออกมา ซึ่งสิ่งที่ขับออกมานี้จะทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเปลี่ยนแปลงไป จนอยู่ในสภาพที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ นอกจากนี้ ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อยังมีความสำคัญในการกำหนดระยะเวลาในการผลิตสารปฏิชีวนะของจุลินทรีย์ ดังได้กล่าวข้างต้นแล้วว่าสารปฏิชีวนะกลุ่มเปปไทด์มักจะมีการผลิตออกมาในช่วงหลังของการเจริญ แต่เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสมจะสามารถทำให้การผลิตเกิดขึ้นในช่วงของการเจริญได้ (Hendlin, 1949 ; Egorov และคณะ, 1986) เช่น ในการผลิตเบซิเทรซินจาก *Bacillus licheniformis* เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ที่ไม่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เบซิเทรซินจะถูกผลิตออกมาได้ในช่วงของการเจริญ แต่เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ในช่วงแรกของการเจริญการผลิตเบซิเทรซินจะถูกยับยั้งไว้ เพราะอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำ เนื่องจากกรดอะซิติกและกรดไพรูวิก ซึ่งเป็นกรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นจากขบวนการคาตาบอลิซึมของกลูโคส ซึ่งเมื่ออยู่ในสภาพที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำ กรดอินทรีย์นี้จะคงรูปในสภาพที่ไม่แตกตัว (Undissociated) และเนื่องจากโมเลกุลของกรดอินทรีย์มีขนาดเล็ก จึงสามารถผ่านเมมเบรนของแบคทีเรียเข้าไปได้ง่าย ทำให้ภายในเซลมีสภาพเป็นกรด ซึ่งอาจเป็นสาเหตุสำคัญของการยับยั้งการผลิตเบซิเทรซิน

(Haavik,1974) การป้องกันการยับยั้งการผลิตเบซิเทรซินในช่วงแรกของการเจริญของจุลินทรีย์สามารถทำได้โดยการเติมสารแคลเซียมคาร์บอเนต ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เหมาะสมต่อการผลิตเบซิเทรซิน (Haavik, 1974b) ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการผลิตเบซิเทรซินคือ ค่าความเป็นกรด-ด่างในช่วงที่เป็นกลาง แต่ความเป็นกรด-ด่างที่ให้ผลผลิตของเบซิเทรซินสูงสุดคือ 8.0 (Snoke, 1961)

2.3 การให้อากาศ

การให้อากาศหรือการกวนเป็นการเพิ่มปริมาณออกซิเจนให้กับจุลินทรีย์เพื่อนำไปใช้ในขบวนการเมตาบอริซึมทางหนึ่ง นอกจากนี้ยังเป็นการช่วยให้จุลินทรีย์อยู่ในสภาพสารแขวนลอยสามารถดูดซึมปริมาณออกซิเจนเพื่อนำไปใช้ได้มากขึ้น ออกซิเจนที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้นั้นต้องอยู่ในรูปของโมเลกุลออกซิเจนที่ละลาย หรืออยู่ในรูปของเหลว การละลายของออกซิเจนในน้ำมีปริมาณจำกัด ออกซิเจนสามารถละลายในสื่อกลางที่เป็นน้ำได้เพียงไม่กี่มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยอากาศที่ความดัน 1 บรรยากาศ จึงนับว่าน้อยมากเมื่อเทียบกับปริมาณของออกซิเจนที่จุลินทรีย์ต้องการ ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่หนาแน่นมากอาจต้องการออกซิเจนสูงถึง 50 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำให้มีออกซิเจนละลายเข้าไปในอาหารเหลวอยู่ตลอดเวลาโดยการถ่ายเทจากอากาศ ซึ่งวิธีการที่ง่ายที่สุดในการเพิ่มปริมาณออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อคือ การเขย่าหรือการกวน วิธีการนี้จะช่วยให้จุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศเจริญเติบโตได้ด้วยความหนาแน่นสูง ภายใต้สภาวะที่เป็นอันหนึ่งอันเดียวกัน ดังนั้นจะเห็นว่าในขั้นตอนของขบวนการหมักจึงต้องมีการให้อากาศตลอดเวลา ซึ่งในการผลิตสารปฏิชีวนะก็เช่นกัน ปริมาณออกซิเจนที่ให้ต้องอยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อความต้องการของจุลินทรีย์นั้น ๆ

<u>การทำสารปฏิชีวนะให้บริสุทธิ์</u>

การทำสารปฏิชีวนะและการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์มีหลักการเดียวกัน คือประกอบไปด้วยขั้นตอนสำคัญ ดังนี้ ขั้นแรกเป็นการตกตะกอนสารปฏิชีวนะที่ต้องการด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต หรือ

ตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสม จากนั้นนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟีต่าง ๆ เช่น โครมาโตกราฟีแบบดูดซับ (Adsorption chromatography) ตัวอย่างเรซินที่ใช้ในการทดลองคือ ซิลิกาเจล (Silica gel) , อะลูมินา (Alumina) เป็นต้น โครมาโตกราฟีที่อาศัยความแตกต่างระหว่างประจุในโมเลกุล (Ion exchange chromatrography) ตัวอย่างเช่น ดีอีเออี-เซลลูโลส (DEAE-cellulose) , ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ (DEAE-sephadex) เป็นต้น และโครมาโตกราฟีแบบอาศัยความแตกต่างของขนาดโมเลกุล (Molecular sieve หรือ Gel filtration) ตัวอย่างเรซินเช่น เซฟาเด็กซ์ จี-100 (Sephadex G-100) หรือ เซฟาเด็กซ์ จี-150 (Sephadex G-150) เป็นต้น ซึ่งตัวอย่างการทำสารปฏิชีวนะให้บริสุทธิ์และศึกษาสมบัติบางประการโดยนักวิทยาศาสตร์กลุ่มต่าง ๆ ได้แก่

Herbert และคณะ (1948) ได้ศึกษาการทำสารปฏิชีวนะเบซิเทรซินที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus subtilis* กึ่งบริสุทธิ์ โดยการสกัดด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างบิวทานอลและอีเทอร์ และแยกสารปนเปื้อนที่ไม่ต้องการออกด้วยแมกเนเซียมออกไซด์ จากนั้นนำมาตกตะกอนสารปฏิชีวนะที่ต้องการอีกครั้งด้วยกรดซาลิซิลิค (Salicilic acid) พบว่า ด้วยวิธีนี้สารปฏิชีวนะจะสูญเสียแอคติวิตีไปน้อยมาก

Kurusu และคณะ (1987) ศึกษาการทำสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus polymyxa* ให้บริสุทธิ์โดยการสกัดด้วยบิวทานอล และทำโครมาโตกราฟีบนคอลัมน์ซิลิกาเจล จากนั้นนำไปตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยใช้โครมาโตกราฟีแบบของเหลวความดันสูง (High performance liquid chromatrography) ผลปรากฏว่า โครมาโตแกรมที่ได้ประกอบไปด้วย 10 พีค (Peak) ซึ่งแสดงว่า สารปฏิชีวนะ LI-F นี้ประกอบไปด้วยองค์ประกอบย่อย 10 หน่วยชนิด (Components)

Bhunia และคณะ (1988) ได้ศึกษาการทำสารปฏิชีวนะกลุ่มเปปไทด์ที่ผลิตจากเชื้อ *Pediococcus acidilactici* สายพันธุ์ H ให้บริสุทธิ์ โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และนำไปทำโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบ (Anion exchanger chromatrography) จากนั้นนำไปหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี SDS-โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟริซิส พบว่า มีค่าประมาณ 2,700 ดาลตัน

จากการรวบรวมผลงานวิจัยข้างต้น แสดงให้เห็นว่า ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์จำนวนมากได้ให้ความสนใจในการค้นหายาปฏิชีวนะชนิดใหม่ เพื่อนำมาใช้กับเชื้อโรคที่เพิ่มความต้านทานสูงขึ้นหรือเชื้อโรคที่ยังหายามากำจัดไม่ได้ โดยการคัดเลือกหาจุลชีพที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะจากธรรมชาติ เช่น ดิน ผัก และผลไม้ เป็นต้น จากนั้นนำมาหาสมบัติของสารปฏิชีวนะที่สร้างขึ้น ซึ่งอาจทำได้โดยการเพาะจุลชีพที่ผลิตสารปฏิชีวนะบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อทดสอบเจริญอยู่ แล้วดูความสามารถของการยับยั้งที่เกิดขึ้น (Inhibition zone) โดยสังเกตส่วนใสบนอาหารที่เกิดจากการฆ่าแบคทีเรียทดสอบ ต่อมาได้มีการเลี้ยงจุลชีพในอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำน้ำใส (Culture filtrate) มาทดสอบประสิทธิภาพโดยวิธีการซึมของยาในในวุ้นเพาะเชื้อ (Agar diffusion) ซึ่งจากข้อมูลงานวิจัยเบื้องต้นของผู้วิจัย ที่ได้ทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตทอกซินจากตัวอย่างอาหารหมักดอง ผัก และผลไม้จากตลาดสดแหล่งต่าง ๆ ในบริเวณกรุงเทพมหานครและจังหวัดใกล้เคียง โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกหาจุลินทรีย์ที่มีผลยับยั้งการเจริญต่อยีสต์ ที่มีบทบาทสำคัญในขั้นตอนของการหมัก โดยวิธีการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์แล้วนำไปเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีเชื้อทดสอบเจริญอยู่ เมื่อตรวจดูความกว้างของบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น พบว่าแบคทีเรีย 3 ตัว ได้แก่ F2.2 , 5/12 และ 3/38 ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มของ *Bacillus* sp. มีความสามารถสูงในการผลิตสารที่มีคุณสมบัติต่อต้านจุลชีพอื่นได้หลายชนิด ทั้งแบคทีเรีย รา และให้ผลดีมากโดยเฉพาะกับยีสต์ ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาและปรับปรุงหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตทอกซิน ซึ่งให้ผลดีในการยับยั้งการเจริญของยีสต์ เพื่อให้ได้ผลผลิตตามต้องการและมีปริมาณสูงสุด ตลอดจนศึกษาขั้นตอนในการแยกทอกซินให้บริสุทธิ์ โดยวิธีการเบื้องต้นทางชีวเคมี จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบได้แก่ *Torulopsis glabrata* และ *Saccharomyces cerevisiae* ทั้งนี้ในกรณีของ *Torulopsis glabrata* นั้น เป็นสายพันธุ์ที่ใช้เป็นสายพันธุ์มาตรฐานสำหรับการทดสอบโดยทั่วไป (Young และ Yagin,1978) ในขณะที่ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นสายพันธุ์ที่นิยมใช้กันทั่วไปทางอุตสาหกรรม ดังนั้น ในกรณีหลังหาก *Saccharomyces cerevisiae* มีความไวต่อทอกซินนี้อาจสามารถประยุกต์ใช้ทอกซินนี้สำหรับฆ่าเซลยีสต์เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักได้