Bacillus เป็นแบคทีเรียที่นิยมใช้ในการผลิตสารปฏิชีวนะหลายชนิดเช่น *Bacillus licheniformis* ใช้ในการผลิต Bacitracin (Haavik, 1974 a) *Bacillus subtilis* NCIB 8872 ผลิต Bacilomycin-L (Chevanet, 1986) *Bacillus subtilis* ผลิต Iturin A (Besson *et al.*, 1983) และ Surfactin (Ohno, *et al.*, 1995 a) *Bacillus brevis* ผลิต Tyrocidine *Bacillus polymyxa* ผลิต Colistin

โดยในการผลิตสารปฏิชีวนะมีปัจจัยที่สำคัญที่จะต้องคำนึงถึงก็คือ

1. ส่วนประกอบของอาหาร
2. สภาวะของการเพาะเลี้ยง

1. ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 แหล่งคาร์บอน คาร์บอนเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญสำหรับการเจริญ และการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์ ในการผลิตสารปฏิชีวนะนั้น พบว่ากลูโคสจะเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ แต่ในขณะเดียวกันกลูโคสก็ทำให้เกิด carbon catabolite regulation ในการผลิตสารปฏิชีวนะหลายชนิด (Martin and Demain, 1980) ซึ่งการแก้ปัญหาทำได้หลายวิธี เช่น การใช้แหล่งคาร์บอนชนิดอื่นที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารปฏิชีวนะ (Iwai and Omura, 1982) หรือการใช้แหล่งคาร์บอน 2 ชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ คือกลูโคสสำหรับให้จุลินทรีย์เจริญ และคาร์บอนชนิดอื่นที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารปฏิชีวนะหรือโดยการเติมแหล่งคาร์บอนเป็นระยะ หรือเติมแหล่งคาร์บอนทีละน้อย (Martin and Demain, 1980) นอกจากนี้อาจทำได้โดยการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutation) ของจุลินทรีย์ที่ผลิตสารปฏิชีวนะ โดยพันธุ์กลายที่ได้นี้จะสามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้ดีในอาหารที่มีกลูโคสอยู่สูง

Haavik (1974 a,b) รายงานว่าในการเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* เพื่อผลิตสารปฏิชีวนะ Bacitracin นั้น เชื้อสามารถใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดี แต่เมื่อกลูโคสมีความเข้มข้นมากกว่าร้อยละ 1 จะทำให้มีผลยับยั้งการผลิต Bacitracin เนื่องจากกลูโคสที่มีปริมาณมากเกินไปนั้นจะถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดอะซิติกและกรดไพรูวิก โดยที่กรดสองชนิดนี้มีผลยับยั้งการผลิต Bacitracin เช่นเดียวกับรายงานของ Chevanet และคณะ (1986) ที่พบว่าใน

การเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NCIB 8872 เพื่อผลิต Bacilomycin-L เชื้อสามารถผลิต Bacilomycin-L ได้สูงสุดเมื่อใช้กลูโคสที่มีความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และกลูโคสที่มีความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตรจะมีผลทำให้การผลิตสารปฏิชีวนะ Bacilomycin-L ลดลง

สุชล แก้วพรหม (2539) พบว่าอาหารสูตร PDB เป็นอาหารที่ช่วยส่งเสริมหรือชักนำให้เชื้อ *B. subtilis* NSRS 89-24 มีการผลิตสารปฏิชีวนะมากที่สุด รองลงมาคือ Czapek Dox Broth (CDB) และ NB ตามลำดับ ซึ่งในอาหารสูตร PDB นี้ แหล่งคาร์บอนคือกลูโคส ร้อยละ 2.0

นอกจากกลูโคสแล้วก็ยังมีการใช้น้ำตาลชนิดอื่นเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตสารปฏิชีวนะ เช่น การผลิต Iturin A จาก *B. subtilis* ใช้แมนนิทอล ฟรุกโตสและซูโครส เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสามารถผลิต Iturin A ได้มากกว่าใช้กลูโคสที่ความเข้มข้นเดียวกัน (Besson *et al.*, 1987) การผลิต Surfactin ร่วมกับการผลิต Iturin A จาก *B. subtilis* ATCC 21332 ใช้ ซูโครส ฟรุกโตส และกลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอนได้ดี (Sandrin *et al.*, 1990) การผลิต Aurantinin จาก *B. aurantinus* ที่ใช้กลีเซอรอลและแป้งร่วมกันเป็นแหล่งคาร์บอนโดยจุลินทรีย์มีการใช้กลีเซอรอลในการเจริญและใช้แป้งในการผลิต Aurantinin โดยจะผลิต Aurantinin เมื่อกลีเซอรอลเกือบหมดแล้วและเริ่มใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน ดังนั้นกลีเซอรอลจึงเป็น carbon catabolite เช่นกัน (Nishikiori *et al.*, 1978 อ้างโดย สุชาดา คูชัยสิทธิ์, 2535) แสดงว่ายังมีแหล่งคาร์บอนอื่นที่ทำให้เกิด carbon catabolite ได้ นอกจากนี้ในการทดลองของ อรพิน ภูมิภมร และสมใจ เอี่ยมพรรัตน์ (2532 ก) พบว่า *Bacillus* KUBA 8601.2 สามารถใช้แป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวโพดหรือซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตสารปฏิชีวนะ ดังนั้นชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะจะขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และชนิดของสารปฏิชีวนะที่ผลิตและพบว่าน้ำตาลชนิดที่จุลินทรีย์สามารถใช้ได้อย่างช้าๆจะให้ผลผลิตของสารปฏิชีวนะสูง (Hu and Demain, 1979)

1.2 แหล่งไนโตรเจน การผลิตสารปฏิชีวนะส่วนใหญ่พบว่าอะมิโนไนโตรเจนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด และทำให้จุลินทรีย์เจริญได้ดีด้วย อะมิโนไนโตรเจนที่ใช้กันมาก ได้แก่ L-asparagine glycine arginine และ aspatic acid (Aharonowitz and Demain, 1979; Byrne and Greenstein, 1986) การเปลี่ยนแปลงชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนมีผลต่อการผลิตสารปฏิชีวนะ เนื่องจากการผลิตสารปฏิชีวนะมีการควบคุมโดย nitrogen metabolite ซึ่งการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะสามารถถูกกดการสร้าง

ได้โดยแอมโมเนีย (ammonia) และชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่จุลินทรีย์ใช้ได้เร็ว (Aharonowitz, 1980)

Hanlon และคณะ (1982) รายงานผลของแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อการผลิต Bacitracin จากเชื้อ *B. licheniformis* พบว่าแอมโมเนียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นสูงในระดับหนึ่งจะมีผลไปยับยั้งการสร้าง Bacitracin แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจะขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และสารปฏิชีวนะที่ผลิตเช่นเดียวกับแหล่งคาร์บอน เช่นการเลี้ยงเชื้อ *B. brevis* เพื่อผลิตสารปฏิชีวนะไทโรซิดีน (Tyrocidine) พบว่า ถ้าไม่เติมกรดอะมิโนในอาหาร ไทโรซิดีนที่ผลิตได้เป็นชนิด A B และ C แต่ถ้าเติมทริปโตเฟนในอาหารสารปฏิชีวนะที่ผลิตได้เป็นชนิดC และ D และถ้าเติมฟีนีลอะลานีนสารปฏิชีวนะเป็นชนิด A และ B ถ้าเติมฟีนีลอะลานีนและทริปโตเฟนเชื้อสามารถผลิตสารปฏิชีวนะชนิด A B C และ D (Katz and Demain, 1977)

Besson (1987) พบว่าการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* เพื่อผลิตสารปฏิชีวนะ Iturin แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการผลิตคือ L-glutamic acid L และ D-aspatic และ L-asparagine ส่วน D-asparagine จะยับยั้งการผลิตสารปฏิชีวนะ

Chevanet และคณะ (1986) รายงานว่า DL-alanine ที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิโมล และ L-glutamic acid ความเข้มข้น 34 มิลลิโมลจะส่งเสริมการผลิต Bacilomycin-L

สุชาดา คูชัยสิทธิ์ (2535) พบว่าในการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* B31 เพื่อผลิตสารปฏิชีวนะ แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ก็คือ L-glutamic acid ร้อยละ 0.4 หรือ monosodium glutamate ร้อยละ 0.8 จุลินทรีย์บางชนิดต้องการแหล่งไนโตรเจนในรูปของไนโตรเจนเชิงซ้อน (complex nitrogen) เช่น การผลิตสารปฏิชีวนะจาก *Bacillus* KUBA 8601.2 พบว่าสามารถใช้กากถั่วเขียวเป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิตได้ (อรพิน ภูมิภมร และสมใจ เอี่ยมพรรัตน์, 2532ข) และในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่แล้วไม่ค่อยพบว่ามีการผลิตสารปฏิชีวนะ (Pusey and Wilson, 1984)

ตารางที่ 2 การใช้เชื้อ *Bacillus subtilis* ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี

พืช	เชื้อที่ทำให้เกิดโรค
Apple	*Nectria galligena* Bres.
	Phytophthora cactorum Leb.
Carnation	*Fusarium oxysporum* Schlecht.
Cherry	*Alternaria alternata* (Fr.) Keissler
	Monilinia fructicola (Wint.) Honey
Citrus	*Alternaria citri* Ellis & Pierce
Corn	*Fusarium roseum* (LK.) emend. Snyd. & Hans
Cotton	*Fusarium oxysporum* Schlecht.
Onion	*Sclerotium cepivorum* Berk.
Stone fruit	*Monilinia fructicola* (Wint.) Honey
Potato	*Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid
	Botryodiplodia solani-tuberosi Thirum.
	& O'Brien
Snap dry bean	*Uromyces appendiculatus* (Pers. ex Pers.) Unger
Soybean	*Phomopsis* sp. Sacc. *Rhizoctonia solani* Kuhn
Sugarbeet	*Rhizoctonia* sp. DC.

ที่มา : Pusey (1989)

1.3 ฟอสเฟตอนินทรีย์ การที่มีฟอสเฟตอนินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าจะเร่งการใช้แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนและกระบวนการหายใจทำให้จุลินทรีย์เจริญได้ดี แต่จะมีการผลิตสารปฏิชีวนะต่ำ (Weinberg, 1973; Kleinkauf and Dohren, 1985) ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารปฏิชีวนะ เช่น ฟอสเฟตอนินทรีย์ 10 มิลลิโมล เหมาะสมสำหรับการผลิตสารปฏิชีวนะ (Martin and Demain, 1980) กล่าวคือการผลิต Candicidin จาก *Streptomyces niveus* Oxytetracycline จาก *Streptomyces rimusus* และ Bacitracin จาก *Bacillus licheniformis* เป็นต้น

1.4 เกลืออนินทรีย์อื่นๆ ที่นิยมใช้เพิ่มผลผลิตสารปฏิชีวนะคือโซเดียมคลอไรด์ เช่น การผลิต Streptomycin จากเชื้อ *Streptomyces griseus* ถ้าเติมโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.5 ผลผลิตจะเพิ่มขึ้น แต่ถ้ามากเกินไปจะยับยั้งการผลิต (ดวงพร คันธโชติ, 2530) และในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* พบว่า ถ้าเติมโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.5 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้เชื้อเจริญได้ดี (ธีรโชติ มณีโชติ, 2537)

1.5 โลหะที่ต้องการในปริมาณน้อย โลหะมีความจำเป็นเนื่องจากเป็น activator ของเอนไซม์ในการผลิตสารปฏิชีวนะ เนื่องจากสารปฏิชีวนะจัดเป็น secondary metabolites โลหะที่ต้องการและมีบทบาทสำคัญคือ Mg Mn Fe และ Zn เช่น Leifert และคณะ (1995) รายงานว่า *B. subtilis* CL 27 และ *B. pumilus* CL 45 ในอาหาร NB ที่มี Mn จะชักนำให้เพิ่มกิจกรรมการต่อต้าน *Botrytis cinerea* และเพิ่มการสร้างสปอร์ของแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ ในทำนองเดียวกัน Oyama และ Kubota (1993) ก็ได้ รายงานว่า *B. brevis* ATCC 818 สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้สองชนิดคือ Tyrocidine และ Gramicidine ในระยะแรกของ stationary phase จากนั้นจะสร้างสปอร์โดยที่ Mn^{2+} มีความสำคัญในการชักนำให้แบคทีเรียนี้สร้างสปอร์และผลิตสารปฏิชีวนะ การผลิต Bacitracin โดย *B. licheniformis* ส่งเสริมได้โดยการเติม Mg ลงในอาหาร (Hanlon *et al.*, 1982) การเติมเหล็กลงในอาหาร PDB พบว่าจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ของ *B. subtilis* AF 1 (Podile *et al.*, 1987)

ความต้องการโลหะของ *B. subtilis* อยู่ในปริมาณน้อย และปริมาณของโลหะที่ต้องการสำหรับการผลิตสารปฏิชีวนะและการเจริญจะต่างกัน โดยความต้องการสำหรับขบวนการผลิตสารปฏิชีวนะจะมากกว่าความต้องการสำหรับการเจริญ 10 ถึง 100 เท่า (Iwai and Omura, 1982)

2. สภาวะการเลี้ยงเชื้อ

2.1 ความเป็นกรด - ด่าง ของอาหารมีผลต่อการเจริญและการผลิตสารปฏิชีวนะ พบว่าการยับยั้งการผลิตสารปฏิชีวนะเนื่องจากกลูโคสไม่ได้เป็นผลมาจาก carbon catabolite repression เพียงอย่างเดียว แต่เนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงพีเอชในระหว่างการผลิตเช่นการยับยั้งการผลิต Bacitracin โดย *B. licheniformis* เนื่องจากพีเอชที่ลดลง ซึ่งเกิดจากการสร้างกรดอินทรีย์จากการใช้กลูโคสของจุลินทรีย์ (Haavik, 1974 b) โดยทั่วไปจะพบว่าช่วงที่จุลินทรีย์เริ่มมีการผลิตสารปฏิชีวนะค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดต่ำลงเสมอ *B. subtilis* เจริญได้ในอาหารที่มีพีเอชอยู่ในช่วง 5.5-8.5 (Buchanan *et al.*, 1974) และการรักษาพีเอชในอาหารไม่ให้มีการเปลี่ยนแปลงมากนัก อาจทำได้โดยการเติม buffering agent เช่น $CaCO_3$ และ K_2HPO_4 (Iwai and Omura, 1982) และการควบคุมพีเอชในอาหารระหว่างการผลิตให้เหมาะสมจะทำให้ผลิตเพิ่มขึ้นได้

2.2 อุณหภูมิ อุณหภูมิเป็นสิ่งจำเป็นที่จะต้องศึกษาถึงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารปฏิชีวนะเพราะพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะมักเกิดขึ้นที่อุณหภูมิหนึ่งที่ค่อนข้างคงที่ แต่มักไม่ใช่อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ (ดวงพร คันธโชติ, 2530) เช่น การผลิต Colistin จากเชื้อ *B. polymyxa* ผลิตสารปฏิชีวนะได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 28-32 องศาเซลเซียส โดยมีการเจริญของจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น แต่การผลิต Colistin ลดลง (Kuratsu and Inuzuka, 1983) Deltamycin อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตคือ 20 องศาเซลเซียส (Okamura *et al.*,1977) Phae และ Shoda (1991) ก็พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิต Iturin จาก *B. subtilis* คือ 30 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่สูงขึ้นถึง 40 องศาเซลเซียสจะเหมาะต่อการเจริญของจุลินทรีย์มากกว่า

2.3 ปริมาณออกซิเจน การผลิตสารปฏิชีวนะส่วนใหญ่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ แต่ปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในน้ำนั้นมีปริมาณต่ำ จึงจำเป็นต้องมีการให้อากาศในอาหารเหลวที่ใช้ผลิตสารปฏิชีวนะ (Tuffile and Pinto, 1970) ปริมาณอากาศที่เหมาะสมในการผลิตสารปฏิชีวนะขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์นั้น เช่น การผลิต Colistin จาก *B. polymyxa* ต้องการออกซิเจนมาก โดยพบว่าการกวนในอัตรา 600-700 รอบต่อนาที ทำให้ผลผลิตสูงขึ้น (Karatsu and Inuzuka, 1983) ในทำนองเดียวกัน ประไพศรี สมใจ (2538) ศึกษาการผลิตสารปฏิชีวนะจาก *B. subtilis* TISTR 1 พบว่าเมื่อให้อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที ปริมาณเซลล์ค่อยๆเพิ่มขึ้นจนสูงสุดที่ 36 ชั่วโมง มีปริมาณเซลล์ 1.99×10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อให้อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที ปริมาณเซลล์สูงสุดที่ 12 ชั่วโมง เป็น 3.61×10^{9} เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วลดลงอย่างรวดเร็ว และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพ

การป้องกันราโดยสารชีวภาพจากจุลินทรีย์นี้ พบว่าน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อที่อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที มีประสิทธิภาพการป้องกันการเจริญของราทดสอบสูงกว่าอัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และในการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NB 22 เพื่อผลิต Iturin พบว่าเชื้อมีอัตราการเจริญสูงสุดเมื่ออัตราการให้อากาศที่เหมาะสมคือ 0.3 VVM แต่อัตราการให้อากาศที่เหมาะสมสำหรับการผลิต iturin คือ 0.1 VVM (Phae and Shoda, 1991)

2.4 ปัจจัยอื่นๆ ได้แก่ ความดัน oxidation-reduction potential เช่น การผลิต Bicyclomycin จาก *Streptococcus sappronensis* สามารถทนต่อสภาพรีดิวซ์ในการผลิตได้โดยเพิ่มการกวนร่วมกับการใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ไม่สร้าง aerial mycelium เพื่อป้องกันการสูญหายของพลาสมิดเมื่อเซลล์ถูกทำลายเนื่องจากการกวน (Miyoshi *et al.*, 1980) ส่วนสารกำจัดฟอง (antifoam) ที่ดีควรมีคุณสมบัติต่อไปนี้ (สมใจ ศิริโชค, 2537) คือ กระจายตัวได้ดีและทำลายฟองได้อย่างรวดเร็วโดยใช้ความเข้มข้นต่ำ ไม่เป็นพิษต่อจุลินทรีย์ มนุษย์และสัตว์ ไม่ทำให้เกิดปัญหาในการเก็บเกี่ยวผลผลิต ไม่มีผลต่อการส่งผ่านออกซิเจน ทนความร้อนที่ใช้ในการทำให้ปราศจากเชื้อได้และราคาถูก