บทที่ 3

ผลการทดลอง

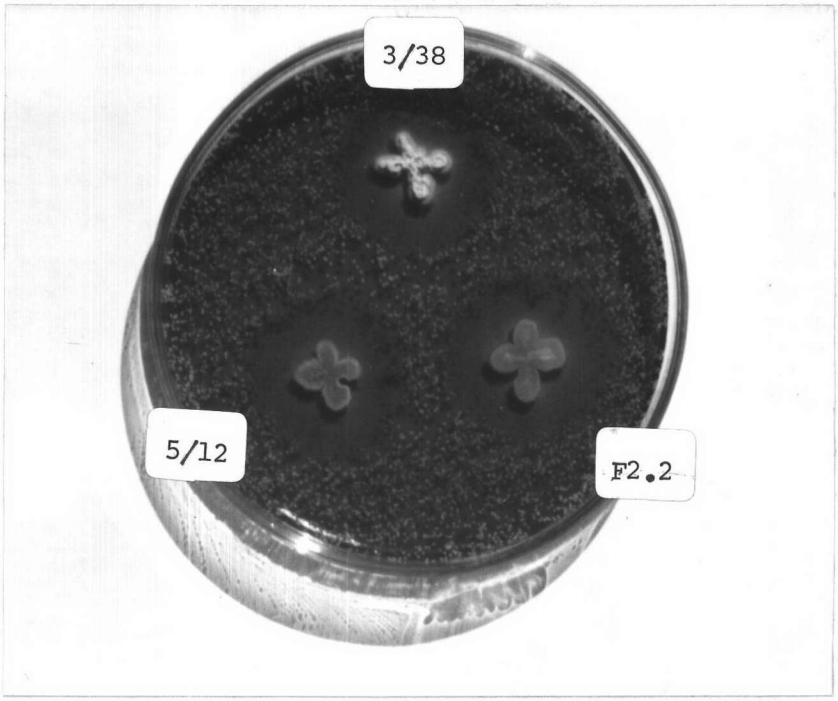
3.1 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อทดสอบ

3.1.1 การแยกเชื้อจากตัวอย่างอาหารที่เก็บได้

จากการทำการแยกเชื้อจากตัวอย่างอาหารหมักดอง ผัก และผลไม้ที่ได้ทำการเก็บตัวอย่างจากตลาดสดแหล่งต่าง ๆ ในบริเวณกรุงเทพมหานครและเขตจังหวัดใกล้เคียง บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิดวายเอ็ม เชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้เมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการฆ่าโดยการขีดไขว้ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิดวายอีพีดีที่มี *Torulopsis glabrata* ATCC 15126 ซึ่งเป็นยีสต์ทดสอบมาตรฐานเจริญอยู่ พบว่า แบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ ได้แก่ F2.2, 5/12 และ 3/38 (ตารางที่ 3.1) ให้บริเวณใสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งแสดงถึงความสามารถในการฆ่าเชื้อทดสอบ ดังแสดงในรูป 3.1

ตารางที่ 3.1 แสดงชนิดของตัวอย่างอาหารและสถานที่เก็บตัวอย่างของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ 3 สายพันธุ์

สายพันธุ์	คัดแยกจาก	สถานที่เก็บตัวอย่าง
F2.2	ลางสาด	ตลาดอัมพวา จ.สมุทรสงคราม
5/12	น้ำพริก	ตลาดสด อ.เมือง จ.เพชรบุรี
3/38	เต้าเจี้ยว	ตลาดสด อ.เมือง จ.ราชบุรี



รูปที่ 3.1 แสดงการยับยั้งของแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ ได้แก่ F2.2, 5/12 และ 3/38 ต่อ *Torulopsis glabrata* ATCC 15126 ซึ่งเป็นเชื้อทดสอบ โดยวิธีการขีดไขว้บนอาหารแข็ง เมื่อบ่มเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.1.2 ความสามารถในการฆ่าของจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.1.1 ต่อเชื้อทดสอบกลุ่มต่าง ๆ

จากการทำการทดสอบความสามารถในการฆ่าเชื้อทดสอบที่เป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มต่าง ๆ ทั้งแบคทีเรีย รา และยีสต์ของแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.1.1 โดยวิธีการขีดไขว้ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีเชื้อทดสอบต่าง ๆ เจริญอยู่ แล้วตรวจดูบริเวณใสที่เกิดขึ้นบนจานเพาะเชื้อ พบว่า แบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ F2.2, 5/12 และ 3/38 จะให้ผลการทดสอบที่ชัดเจนบนอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อทำการบ่มไว้ที่ 25°ซ. เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง โดย

สายพันธุ์ทั้งสามจะให้ผลดีมากในการฆ่าจุลินทรีย์ในกลุ่มยีสต์ และให้ผลดีในการฆ่าจุลินทรีย์ในกลุ่มรา สำหรับจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียจะสามารถฆ่าแบคทีเรียได้บางสายพันธุ์ โดยไม่มีความจำกัดต่อชนิดแกรมบวกหรือลบ ดังแสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 แสดงความสามารถในการฆ่าเชื้อทดสอบกลุ่มต่าง ๆ ของแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.1.1

เชื้อทดสอบ	ระยะเวลาในการบ่ม (ชั่วโมง)					
	48			72		
	F2.2	3/38	5/12	F2.2	3/38	5/12
กลุ่มยีสต์						
Torulopsis glabrata	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Saccharomyces cerevisiae	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Kloeckera apiculata	++	++	++	++	++	++
Saccharomycopsis lipolytica	++	++	++	+++	+++	+++
Candida lipolytica	+++	++	+++	+++	+++	+++
Hansenula mrakii	++	++	++	++	++	++
Kluveromyces drosophilarum	+	+	+	+	+	+
Hansenula anomala	++	+++	+++	++	++	+++
Pichia kluyveri	+	++	++	+	++	++

เชื้อทดสอบ	ระยะเวลาในการบ่ม (ชั่วโมง)					
	48			72		
	F2.2	3/38	5/12	F2.2	3/38	5/12
<u>กลุ่มแบคทีเรีย</u>						
แกรมบวก						
Micrococcus luteus	-	-	-	-	-	-
Bacillus subtilis	+++	++	++	+++	++	++
แกรมลบ						
Pseudomonas aeruginosa	++	-	-	++	-	-
Escherichia coli	++	+++	+++	++	+++	+++
<u>กลุ่มรา</u>						
Aspergillus niger	++	+++	++	++	+++	++
Pennicillium sp.	++	++	+	++	++	+
Fusarium sp.	++	++	++	++	++	++
Cladosporium sp.	+++	++	+++	+++	++	+++

<u>หมายเหตุ</u> +, ++, +++ แสดงความกว้างของบริเวณใสบนจานเพาะเชื้อ 1.0, 2.0 และ 3.0 ซม. ตามลำดับ

- หมายถึง ไม่แสดงบริเวณใสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

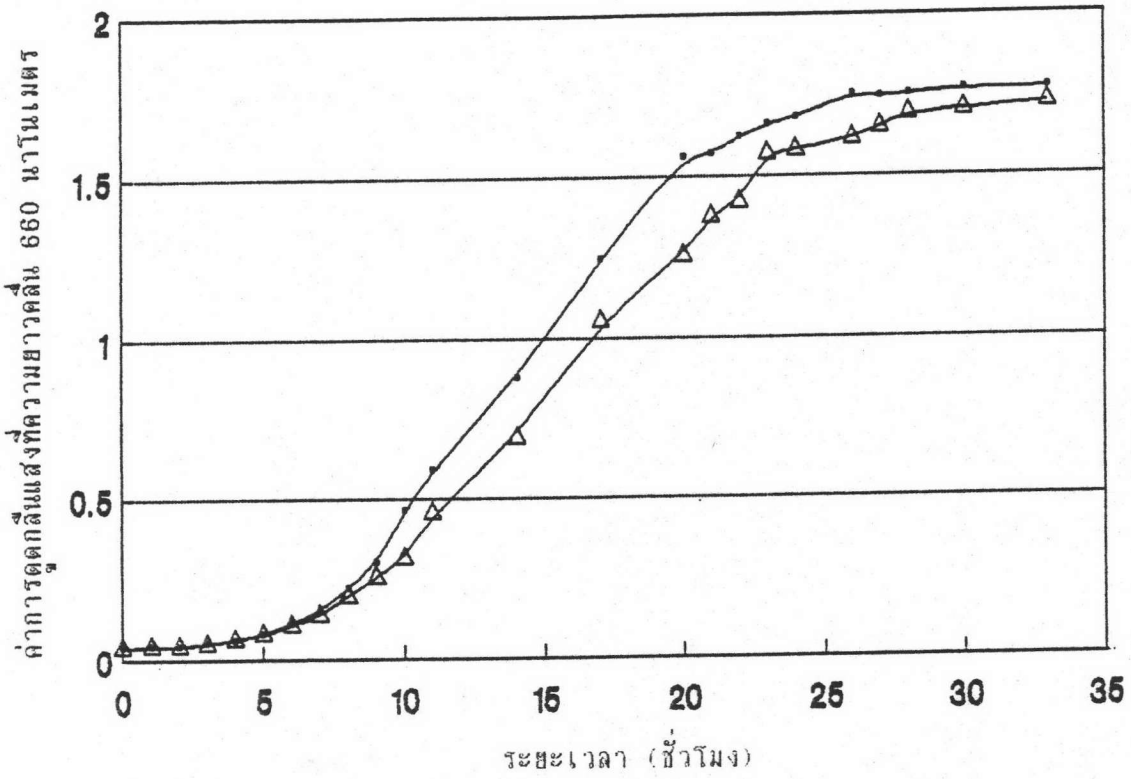
3.2 การคัดเลือกเชื้อทดสอบที่ไวต่อการออกฤทธิ์ของทอกซินจากจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ในข้อ 3.1.1

3.2.1 การเปรียบเทียบระยะเวลาในการเจริญของเชื้อยีสต์ทดสอบ

จากการทำการทดลองเพื่อติดตามและเปรียบเทียบรูปแบบการเจริญของ *Torulopsis glabrata* และ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นเชื้อยีสต์ทดสอบเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวชนิดวายอีพีดีในขวดเขย่า โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรที่เวลาต่าง ๆ ของการเจริญ พบว่า รูปแบบและอัตราการเจริญของยีสต์ทดสอบทั้งสองมีความคล้ายคลึงและใกล้เคียงกันมาก โดย *Saccharomyces cerevesiae* จะมีอัตราการเจริญที่เร็วกว่า *Torulopsis glabrata* เล็กน้อย คือจะมีการเพิ่มจำนวนและเข้าสู่ระยะพัก (Stationary phase) ก่อน *Torulopsis glabrata* ประมาณ 1-2 ชั่วโมง ดังแสดงในรูป 3.2

3.2.3 การเปรียบเทียบความกว้างของบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้นจากการดูดซึมของทอกซินที่หยอดลงในวุ้นเพาะเชื้อที่มีเชื้อทดสอบเจริญอยู่

จากการทำการทดสอบความสามารถในการเป็นเชื้อทดสอบของ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Torulopsis glabrata* โดยวิธีการเปรียบเทียบความกว้างของบริเวณใสที่เกิดขึ้นจากการฆ่าเชื้อทดสอบโดยทอกซินในวุ้นเพาะเชื้อ (agar diffusion) ตามวิธีข้อ 2.4.2 ผลการทดลองแสดงไว้ในรูป 3.3 ซึ่งพบว่า เมื่อใช้ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นเชื้อทดสอบจะให้ความกว้างของบริเวณยับยั้งมากกว่าการใช้ *Torulopsis glabrata* เป็นเชื้อทดสอบเล็กน้อย ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3.3 ดังนั้นในการทำการทดลองในลำดับต่อๆไป จึงพิจารณาเลือกใช้ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นเชื้อทดสอบต่อการออกฤทธิ์ของทอกซินเพียงสายพันธุ์เดียว



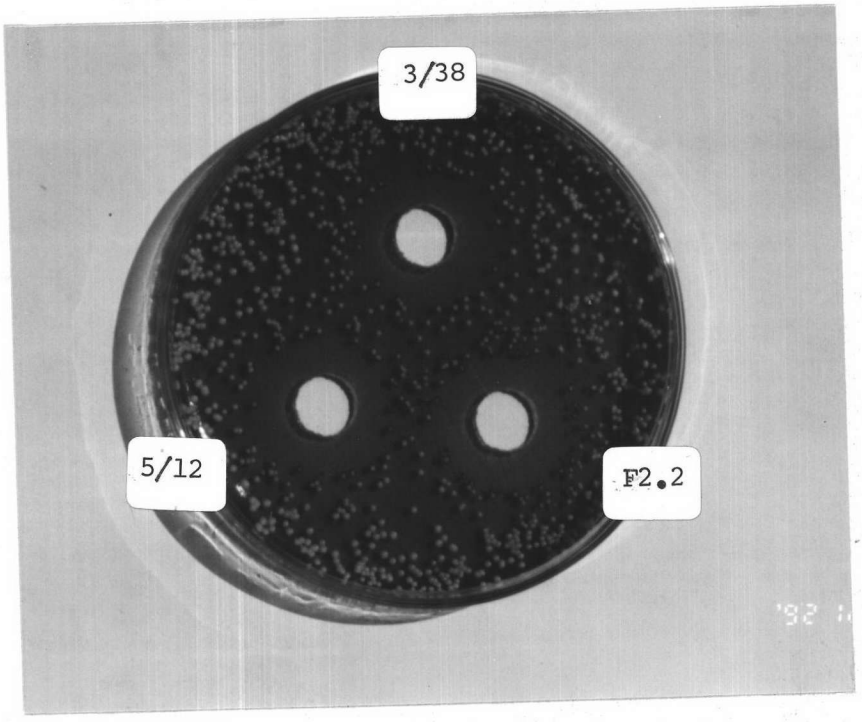
รูปที่ 3.2 เปรียบเทียบรูปแบบการเจริญของ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Torulopsis glabrata* ซึ่งเป็นเชื้อยีสต์ทดสอบในอาหารเหลวชนิดวายอีพีดี เมื่อเลี้ยงในขวดเขย่า ติดตามการเจริญโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

—•— หมายถึง รูปแบบการเจริญของ *Saccharomyces cerevisiae*

—△— หมายถึง รูปแบบการเจริญของ *Torulopsis glabrata*

ตารางที่ 3.3 แสดงการเปรียบเทียบความกว้างของบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้นเมื่อใช้ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Torulopsis glabrata* เป็นเชื้อทดสอบ

สายพันธุ์ที่สร้างทอกซิน	ค่าเฉลี่ยความกว้างของบริเวณยับยั้ง (ซม.)	
	Torulopsis glabrata	*Saccharomyces cerevisiae*
F2.2	2.96	3.00
5/12	2.76	2.88
3/38	2.73	2.86



รูปที่ 3.3 แสดงบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้นจากการดูดซึมทอกซินในวุ้นเพาะเชื้อ (agar diffusion) เมื่อใช้ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นเชื้อทดสอบ

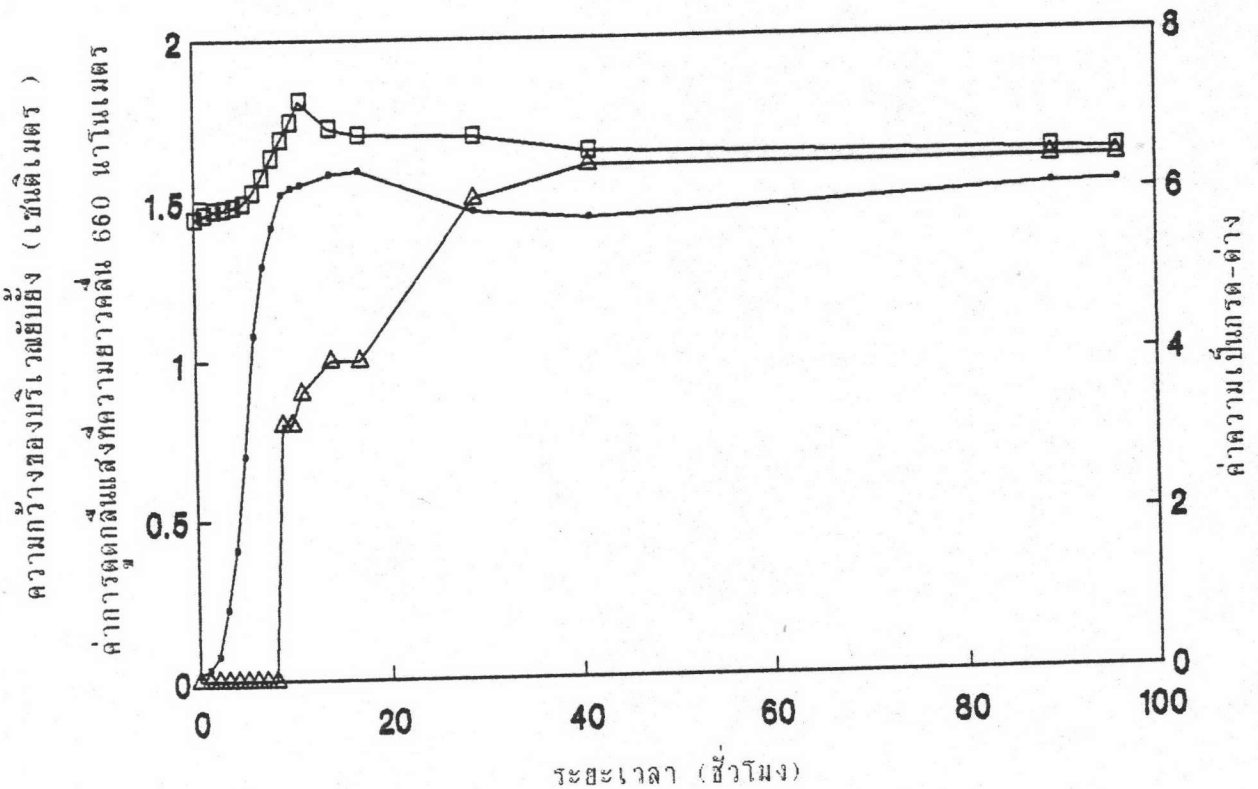
3.3 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีสมบัติดีที่สุดเพื่อใช้ในการผลิตทอกซิน

3.3.1 การติดตามกราฟแสดงการเจริญของเชื้อ *Bacillus* sp. ทั้งสามสายพันธุ์ที่เวลาต่าง ๆ

จากการติดตามและเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2, 5/12 และ 3/38 ที่เวลาต่าง ๆ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (รูปที่ 3.4 , 3.5 และ 3.6 ตามลำดับ) พบว่าสายพันธุ์ F2.2 และ 5/12 มีอัตราการเจริญที่ใกล้เคียงกัน จะเริ่มเข้าสู่ระยะพัก (Stationary phase) ในชั่วโมงที่ 14 ส่วนสายพันธุ์ 3/38 จะมีอัตราการเจริญสูงสุดที่ช้ากว่า คือที่ชั่วโมงที่ 14 สำหรับการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่า จะมีลักษณะการเปลี่ยนแปลงที่เหมือนกันทั้งสามสายพันธุ์ คือ จะมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วง 5.5-7.5 การเปรียบเทียบความกว้างของบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อของจุลินทรีย์ทั้งสามสายพันธุ์ที่เวลาต่าง ๆ มาหยอดลงในวุ้นเพาะเชื้อที่มีเชื้อทดสอบเจริญอยู่ พบว่า สายพันธุ์ F2.2 จะเริ่มมีบริเวณยับยั้งเกิดขึ้นเร็วกว่าสายพันธุ์ 5/12 และ 3/38 เล็กน้อย ส่วนการเปรียบเทียบความกว้างของบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้นในแต่ละช่วงเวลา พบว่า สายพันธุ์ F2.2 จะให้ความกว้างของบริเวณยับยั้งมากกว่าสายพันธุ์ 5/12 และ 3/38

3.3.2 การทดสอบความเสถียรของทอกซินที่ผลิตได้

จากการทดสอบความเสถียรของทอกซินที่ผลิตได้ โดยนำส่วนน้ำใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 และ 5/12 ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ได้แก่ อุณหภูมิห้อง, 0°ซ., -70°ซ. และการทำให้แห้งภายใต้อุณหภูมิต่ำ จากนั้นนำมาทดสอบ และเปรียบเทียบความสามารถในการฆ่าเชื้อทดสอบโดยวิธี tube test โดยการเติมทอกซินลงในสารละลายแขวนลอยของเชื้อทดสอบ แล้วติดตามผลโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660

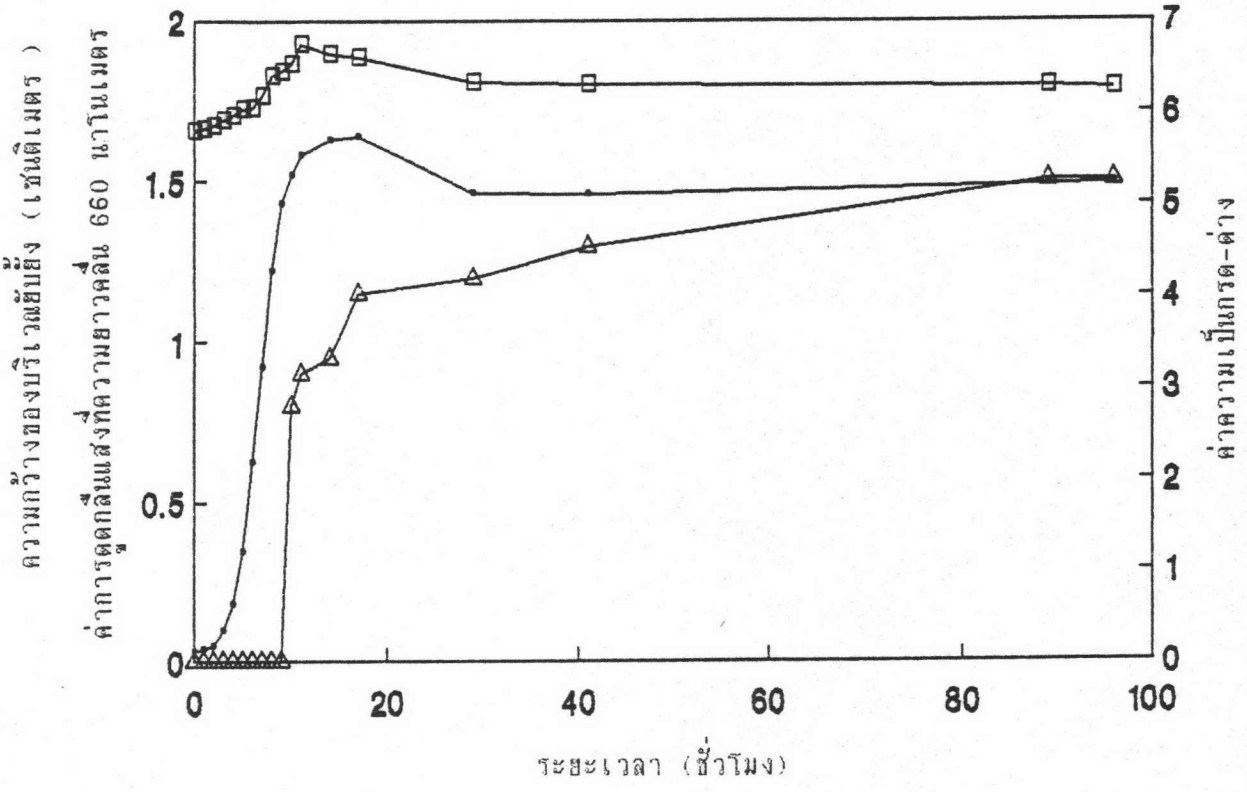


รูปที่ 3.4 แสดงรูปแบบการเจริญ, การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง และความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบในช่วงเวลาต่าง ๆ ของเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 เมื่อใช้ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นเชื้อทดสอบ

—•— หมายถึง รูปแบบการเจริญ (ติดตามโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร)

—□— หมายถึง ค่าความเป็นกรด-ด่าง

—△— หมายถึง ความกว้างของบริเวณยับยั้ง (ซม.)

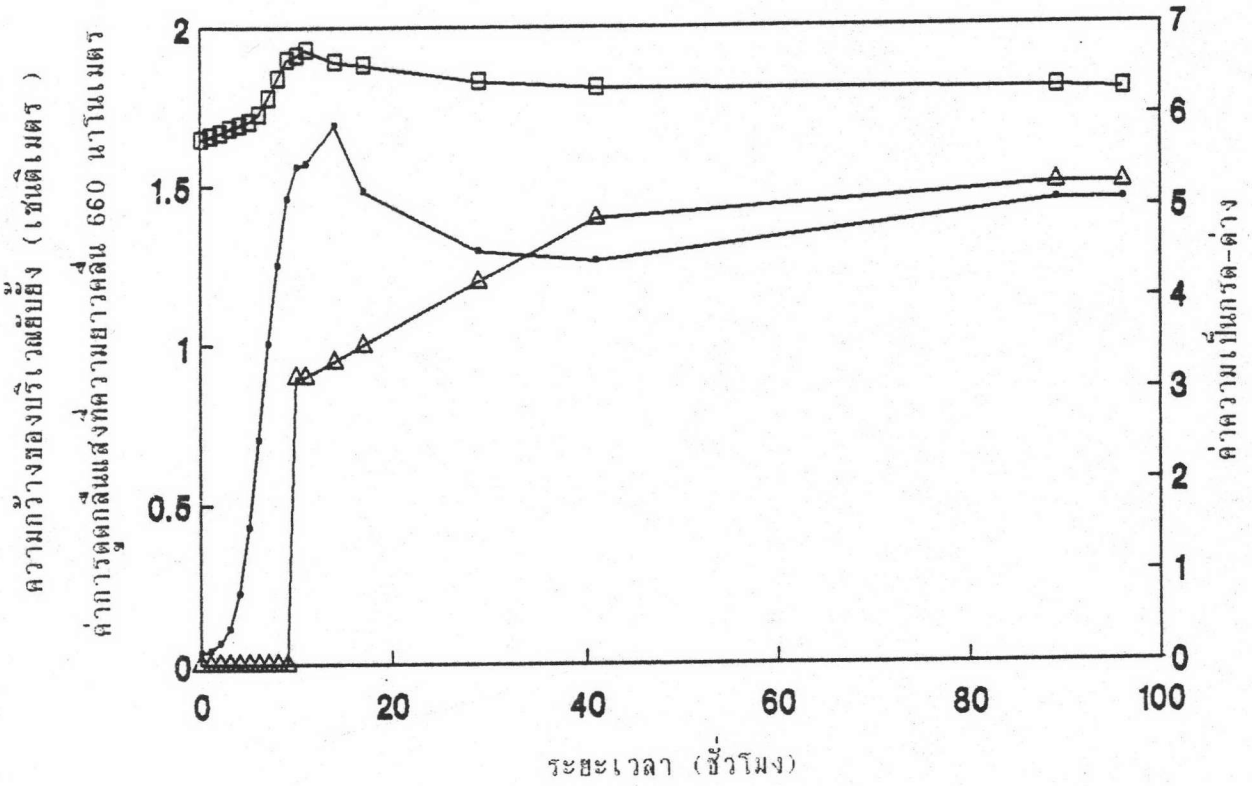


รูปที่ 3.5 แสดงรูปแบบการเจริญ, การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง และความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบในช่วงเวลาต่าง ๆ ของเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ 5/12 เมื่อใช้ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นเชื้อทดสอบ

—•— หมายถึง รูปแบบการเจริญ (ติดตามโดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร)

—□— หมายถึง ค่าความเป็นกรด-ด่าง

—△— หมายถึง ความกว้างของบริเวณยับยั้ง (ซม.)



รูปที่ 3.6 แสดงรูปแบบการเจริญ, การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง และความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบในช่วงเวลาต่าง ๆ ของเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ 3/38 เมื่อใช้ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นเชื้อทดสอบ

—•— หมายถึง รูปแบบการเจริญ (ติดตามโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร)

—□— หมายถึง ค่าความเป็นกรด-ด่าง

—△— หมายถึง ความกว้างของบริเวณยับยั้ง (ซม.)

นาโนเมตร พบว่า ทอกซินที่สร้างจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 จะให้ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ต่ำกว่าทอกซินที่สร้างจากสายพันธุ์ 5/12 ในทุกสภาวะของการทดสอบ และจากการเปรียบเทียบความเสถียรของทอกซินเมื่อเก็บไว้ที่สภาวะต่าง ๆ พบว่า ทอกซินจากสายพันธุ์ F2.2 เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0°ซ.จะให้ค่าการดูดกลืนแสงต่ำที่สุด รองลงมาได้แก่ อุณหภูมิ -70°ซ., การทำให้แห้งภายใต้อุณหภูมิต่ำ และการเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องตามลำดับ ส่วนทอกซินที่สร้างจากสายพันธุ์ 5/12 จะให้ค่าการดูดกลืนแสงต่ำที่สุดเมื่อผ่านการทำให้แห้งภายใต้อุณหภูมิต่ำ รองลงมาได้แก่ การเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70°ซ.,0°ซ. จนสูงสุดเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องดังแสดงในรูป 3.7 เมื่อเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรของทอกซินที่สร้างจากแบคทีเรียสายพันธุ์ F2.2 และ 5/12 ที่ผ่านการเก็บที่สภาวะอุณหภูมิต่าง ๆ กับการทดสอบความสามารถในการฆ่าเชื้อทดสอบทันที และคำนวณเปอร์เซนต์การฆ่าสัมพัทธ์ที่ลดลง ผลการทดลองได้แสดงไว้ในตารางที่ 3.4 ซึ่งจากการศึกษาต่างๆที่ผ่านมา จะเห็นได้ว่า สายพันธุ์ F2.2 นั้นมีศักยภาพในการฆ่าเชื้อทดสอบได้ดีกว่าสายพันธุ์ 5/12 ดังนั้นจึงคัดเลือกสายพันธุ์ F2.2 ไว้ใช้ในการสร้างทอกซินเพื่อการศึกษา ในลำดับต่อไป

ตารางที่ 3.4 แสดงเปอร์เซนต์การฆ่าสัมพัทธ์ที่ลดลงเมื่อนำทอกซินที่สร้างได้จากแบคทีเรียสายพันธุ์ F2.2 และ 5/12 ไปผ่านการเก็บไว้ที่สภาวะต่าง ๆ เทียบกับการทดสอบความสามารถในการฆ่าเชื้อทดสอบทันที

สภาวะในการทดสอบ	เปอร์เซนต์การฆ่าสัมพัทธ์ที่ลดลง (%)	
	F2.2	5/12
การเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70°ซ.	26.45	59.85
การเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0°ซ.	23.55	63.74
การเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง	58.70	111.43
การทำให้แห้งภายใต้อุณหภูมิต่ำ	47.10	19.71

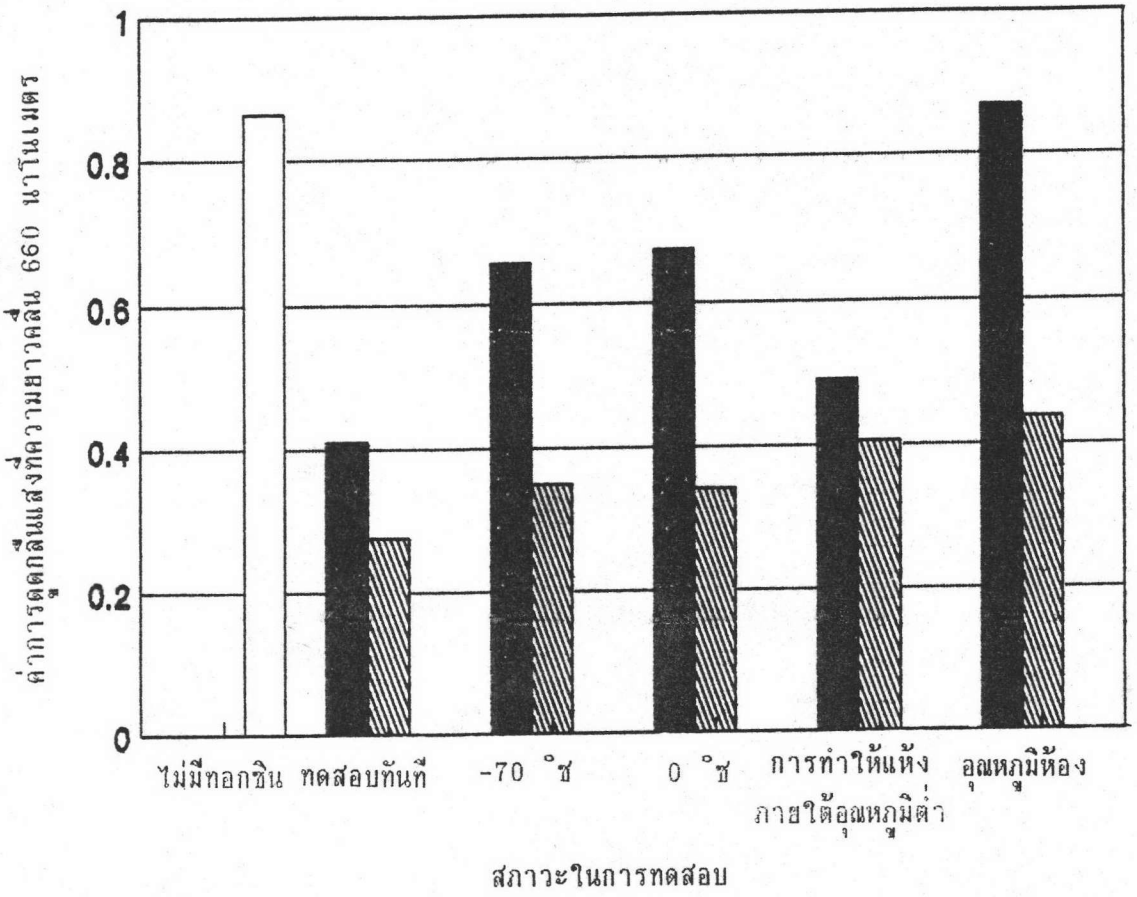
เปอร์เซนต์การฆ่าสัมพันธ์ที่ลดลง (%) = $\frac{OD_{660}\ (A) - OD_{660}\ (B)}{OD_{660}\ (B)} \times 100$

A = การฆ่าเชื้อทดสอบของทอกซินเมื่อเก็บไว้ที่สภาวะต่างๆ

B = การฆ่าเชื้อทดสอบของทอกซินเมื่อทำการทดสอบทันที

3.4 <u>ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญกับการสร้างทอกซินของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3</u>

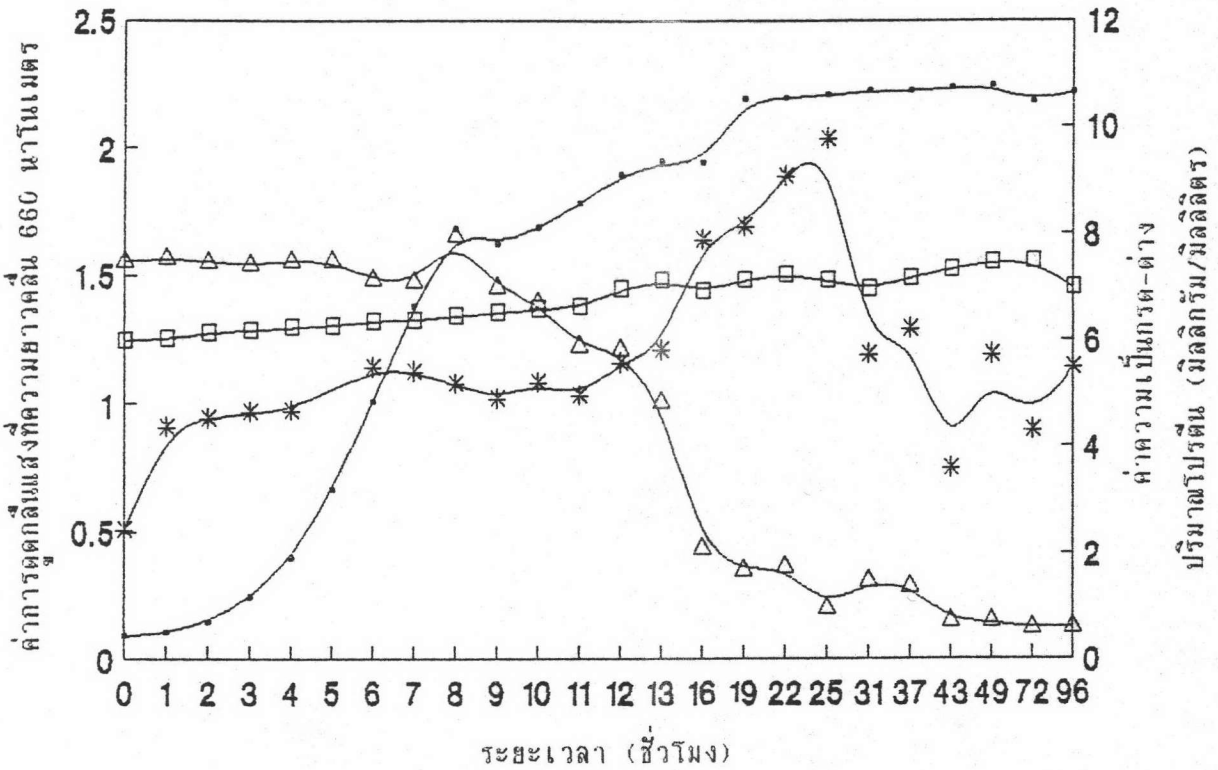
จากการติดตามรูปแบบการเจริญของเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (รูปที่ 3.8) พบว่า ในชั่วโมงแรก ๆ ของการเลี้ยงเชื้อ จุลินทรีย์จะมีการเจริญและเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มสูงขึ้น เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ อัตราการเจริญและเพิ่มจำนวนจะเริ่มคงที่ และเข้าสู่ระยะพักเมื่อชั่วโมงที่ 19 สำหรับการติดตามความสามารถในการออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อทดสอบของทอกซินที่สร้างจากสายพันธุ์ F2.2 โดยการทดสอบด้วยวิธี tube test และวัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์แขวนลอยของจุลชีพทดสอบที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร พบว่า จุลินทรีย์จะเริ่มสร้างทอกซินและปลดปล่อยออกสู่อาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเห็นได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรจะเริ่มลดต่ำลงเรื่อย ๆ และจะให้ผลดีที่สุดในการฆ่าจุลินทรีย์ทดสอบเมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 19 เป็นต้นไป ซึ่งระยะนี้เป็นระยะที่จุลินทรีย์หยุดการเจริญและเข้าสู่ระยะพัก จากการติดตามการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ระยะเวลาต่าง ๆ พบว่า ไม่มีการเปลี่ยนแปลงมากนักคือ จะมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วง 5.5-7.5 ส่วนการติดตามปริมาณโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อตามวิธีการของ Lowry และคณะ พบว่าในระยะแรกของการเจริญ ปริมาณโปรตีนจะค่อนข้างคงที่ จนกระทั่งเข้าสู่ชั่วโมงที่ 12 ปริมาณโปรตีนจะเริ่มสูงขึ้นและสูงสุดในชั่วโมงที่ 22 ซึ่งตรงกับระยะพักของการเจริญของจุลินทรีย์ และระยะนี้เป็นระยะที่ให้ค่าความสามารถในการฆ่าเชื้อทดสอบสูง จากนั้นปริมาณโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อจะเริ่มลดลง และมีการเปลี่ยนแปลงบ้าง



รูปที่ 3.7 แสดงการเปรียบเทียบการออกฤทธิ์และทดสอบความเสถียรของทอกซินจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 และ 5/12 โดยวิธี tube test เมื่อนำส่วนน้ำใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อไปทำการบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ ตลอดจนการนำไปผ่านขั้นตอนการทำให้แห้งภายใต้อุณหภูมิต่ำ ติดตามผลการฆ่าจุลชีพทดสอบโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์แขวนลอยของจุลชีพทดสอบที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

■ หมายถึง *Bacillus* sp. สายพันธุ์ 5/12

▨ หมายถึง *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2



รูปที่ 3.8 แสดงรูปแบบการเจริญ, การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง, ปริมาณโปรตีน และความสามารถในการออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อทดสอบในช่วงเวลาต่าง ๆ ของการเจริญของเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 เมื่อเลี้ยงในขวดเขย่า และใช้ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นเชื้อทดสอบ ติดตามการเจริญโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และติดตามความสามารถในการฆ่าเชื้อทดสอบโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์แขวนของจุลชีพทดสอบที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

—•— หมายถึง รูปแบบการเจริญ

—□— หมายถึง ค่าความเป็นกรด-ด่าง

—△— หมายถึง ความสามารถในการฆ่าเชื้อทดสอบ

—*— หมายถึง ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

3.5 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตทอกซิน

3.5.1 ระยะเวลาของการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตทอกซิน

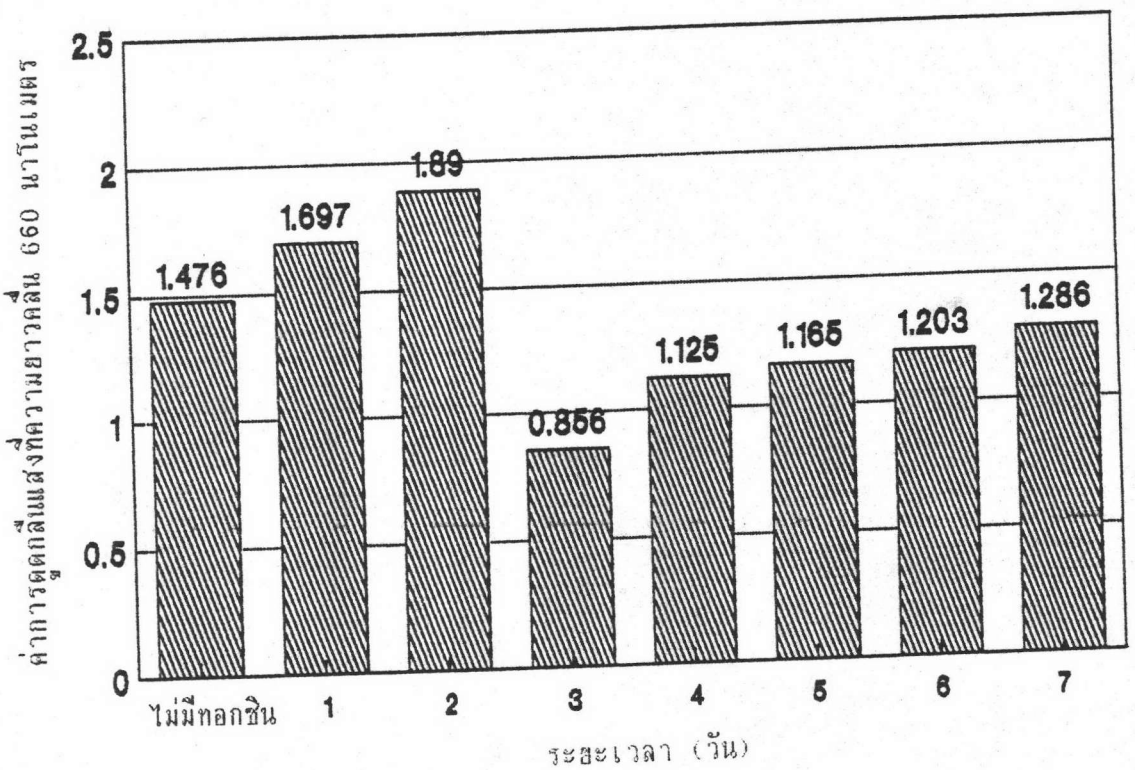
จากการทำการศึกษาเพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมของการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 ในขวดเขย่าเพื่อให้ได้ปริมาณทอกซินสูงสุด โดยการแปรค่าระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเหลว (ภาคผนวกหมายเลข 1.5) ต่าง ๆ กันตั้งแต่ 1-7 วัน แล้วนำมาทดสอบความสามารถในการฆ่าเชื้อทดสอบโดยวิธี tube test ติดตามผลโดยการวัดค่าดูดกลืนแสงของเซลล์แขวนลอยของจุลชีพทดสอบที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร พบว่า การเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน ให้ค่าการดูดกลืนแสงต่ำที่สุด นั่นคือทอกซินมีความสามารถในการฆ่า *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นเชื้อทดสอบได้ดีที่สุด เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน ดังแสดงในรูป 3.9

3.5.2 ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เหมาะสมต่อการผลิตทอกซิน

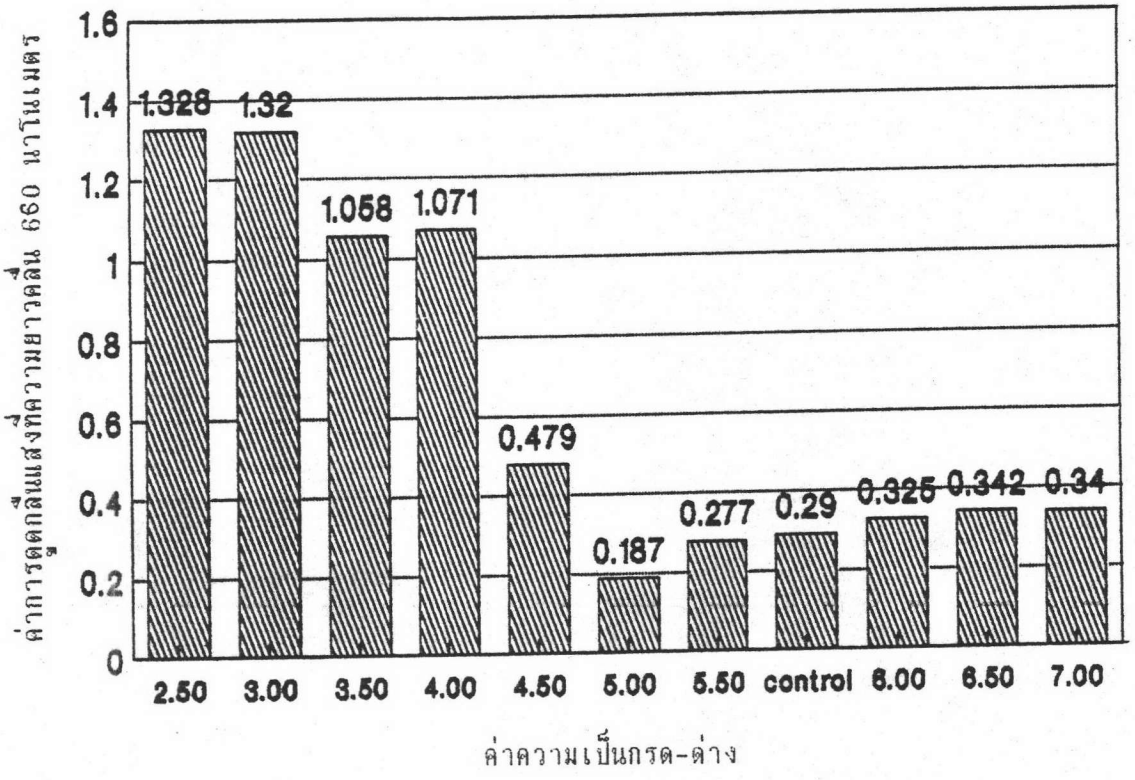
การทดลองเพื่อหาค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตทอกซินจากเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 ในขวดเขย่า ตามวิธีการในข้อ 2.5 ในสูตรอาหารเหลวชนิดวายอีพีดี (ภาคผนวกหมายเลข 1.5) นั้นทำโดยการแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่ 2.5-7.0 เก็บตัวอย่างพร้อมกันเมื่อครบ 3 วัน และนำมาทดสอบความสามารถในการฆ่าเชื้อทดสอบโดยวิธี tube test เมื่อติดตามค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์แขวนลอยของจุลชีพทดสอบที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร พบว่าเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 จะสามารถผลิตทอกซินได้ดีภายใต้สภาวะที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งแต่ 5.0-7.0 ดังแสดงในรูป 3.10

3.5.3 อุณหภูมิของการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตทอกซิน

จากการทำการศึกษาเพื่อหาอุณหภูมิของการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตทอกซินจากเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 ในขวดเขย่า เลี้ยงเชื้อตามวิธีการในข้อ 2.5



รูปที่ 3.9 ผลของระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ ต่อการผลิตทอกซินจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 ในอาหารเหลวชนิดวายอีพีดี เมื่อเลี้ยงในขวดเขย่าที่อุณหภูมิ 25°ซ. ด้วยอัตราเร็ว 200 รอบ/นาที ติดตามผลการฆ่าจุลชีพทดสอบโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์แขวนลอยของจุลชีพทดสอบที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร



รูปที่ 3.10 ผลของความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตทอกซิน จาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F.2.2 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวชนิดวายอีพีดีที่มีการแปรค่าความเป็นกรด-ด่างต่าง ๆ กัน ในขวดเขย่า ที่อุณหภูมิ 25°ซ. ด้วยอัตราเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 วัน ติดตามผลการฆ่าจุลชีพทดสอบโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์แขวนลอยของจุลชีพทดสอบที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

(control หมายถึง ค่าความเป็นกรดด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อปกติซึ่งมีค่าเท่ากับ 5.88)

ในสูตรอาหารเหลวชนิดวายอีพีดี (ภาคผนวกหมายเลข 1.5) ทำการศึกษาโดยเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ ทำการแปรผันอุณหภูมิที่ทำการศึกษาเป็น 25°ซ., 30°ซ., 35°ซ., 37°ซ. และ 40°ซ. เมื่อทำการทดสอบความสามารถของทอกซินที่สร้างจากจุลินทรีย์ที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิต่าง ๆ และติดตามค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร พบว่า อุณหภูมิของการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตทอกซินของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 คือ 30°ซ. ดังแสดงในรูป 3.11

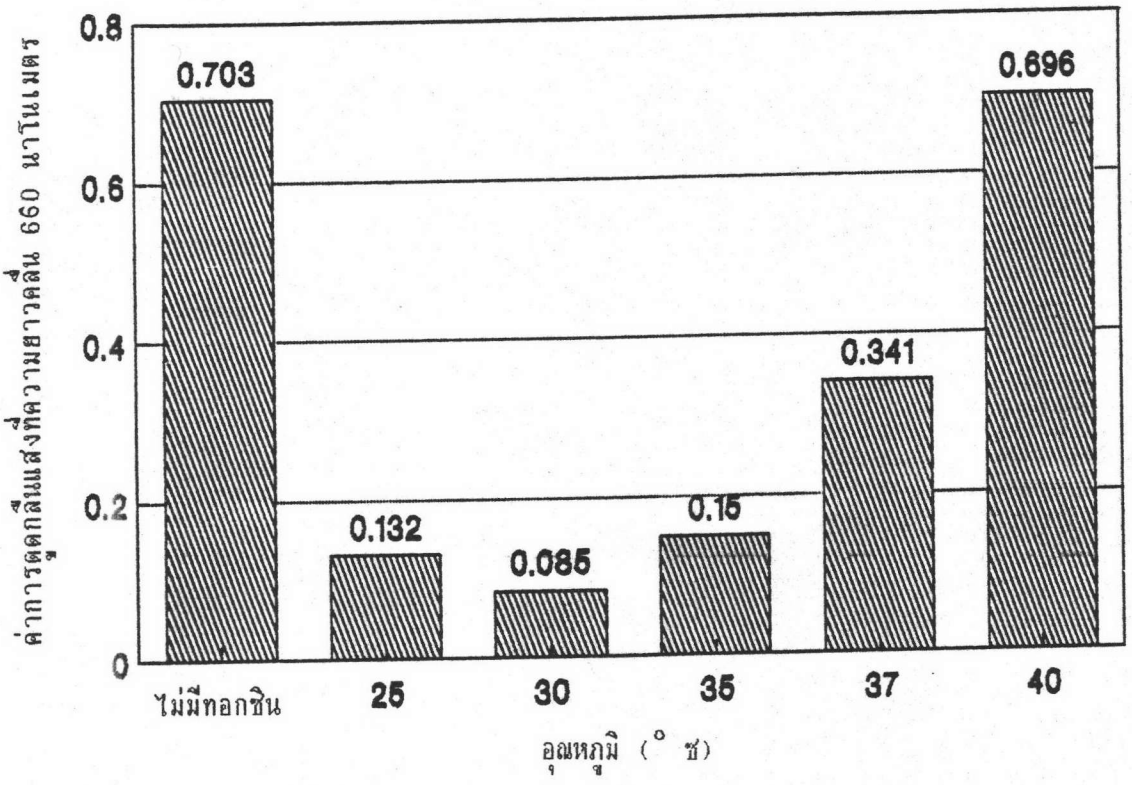
3.5.4 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตทอกซิน

3.5.4.1 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตทอกซิน

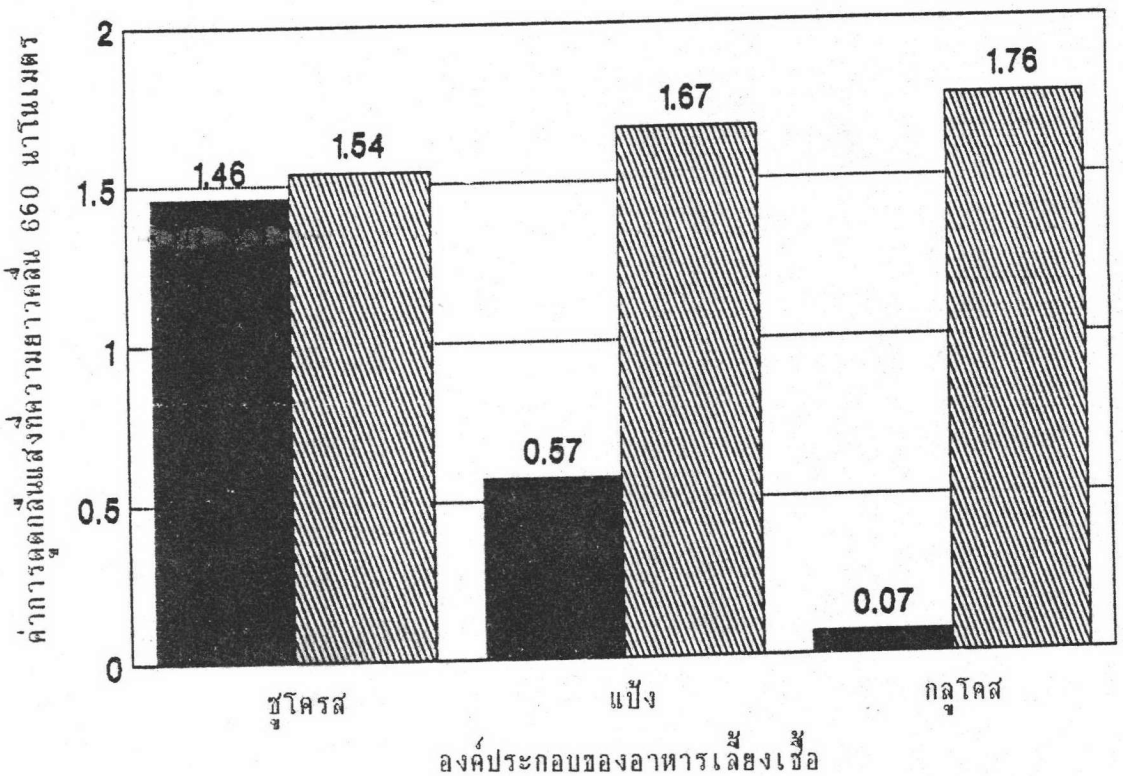
จากการทำการศึกษาเพื่อหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตทอกซิน จาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 ในขวดเขย่า เลี้ยงเชื้อตามวิธีการในข้อ 2.5 ในสูตรอาหารชนิดวายอีพีดี (ภาคผนวกหมายเลข 1.5) ที่มีการแปรแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ กันได้แก่ กลูโคส, ซูโครส และแป้ง เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการฆ่าเชื้อทดสอบโดยวิธี tube test และติดตามค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์แขวนลอยของจุลชีพทดสอบที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร พบว่ากลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ให้ประสิทธิภาพการผลิตทอกซินสูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้แป้งและซูโครส ดังแสดงในรูปที่ 3.12

3.5.4.2 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตทอกซิน

จากการทำการศึกษาเพื่อหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในขวดเขย่าเพื่อให้ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 ผลิตทอกซินได้สูงสุด วิธีการทำการศึกษาเช่นเดียวกับการหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม กล่าวคือ แปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ กันได้แก่ เปปโตน, ทริปโตน และผงมอล์ทสกัด ในสูตรอาหารเหลวชนิดวายอีพีดี (ภาคผนวกหมายเลข 1.5) และนำมาทดสอบความสามารถในการฆ่าเชื้อทดสอบโดยวิธี tube test ติดตามผลโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์แขวนลอยของจุลชีพทดสอบที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร พบว่า เปปโตน



รูปที่ 3.11 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตทอกซินจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวชนิดวายอีพีดี ในขวดเขย่า ด้วยอัตราเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 วัน ติดตามผลการฆ่าจุลชีพทดสอบโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์แขวนลอยของจุลชีพทดสอบที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร



รูปที่ 3.12 ผลของแหล่งสารคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ต่อการสร้างทอกซินของเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 ในขวดเขย่า โดยมีองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อดังแสดงในภาคผนวกหมายเลข 1.5 ทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25°ซ. ด้วยอัตราเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 วัน ติดตามผลการฆ่าจุลชีพทดสอบโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์แขวนลอยของจุลชีพทดสอบที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

■ หมายถึง หลอดทดสอบที่มีการเติมทอกซิน

▨ หมายถึง หลอดควบคุมที่ไม่มีการเติมทอกซิน

เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงต่ำสุด นั่นคือ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดในการผลิตทอกซิน เมื่อเทียบกับการใช้ทริปโตนและผงมอล์ทสกัด ดังแสดงในรูป 3.13

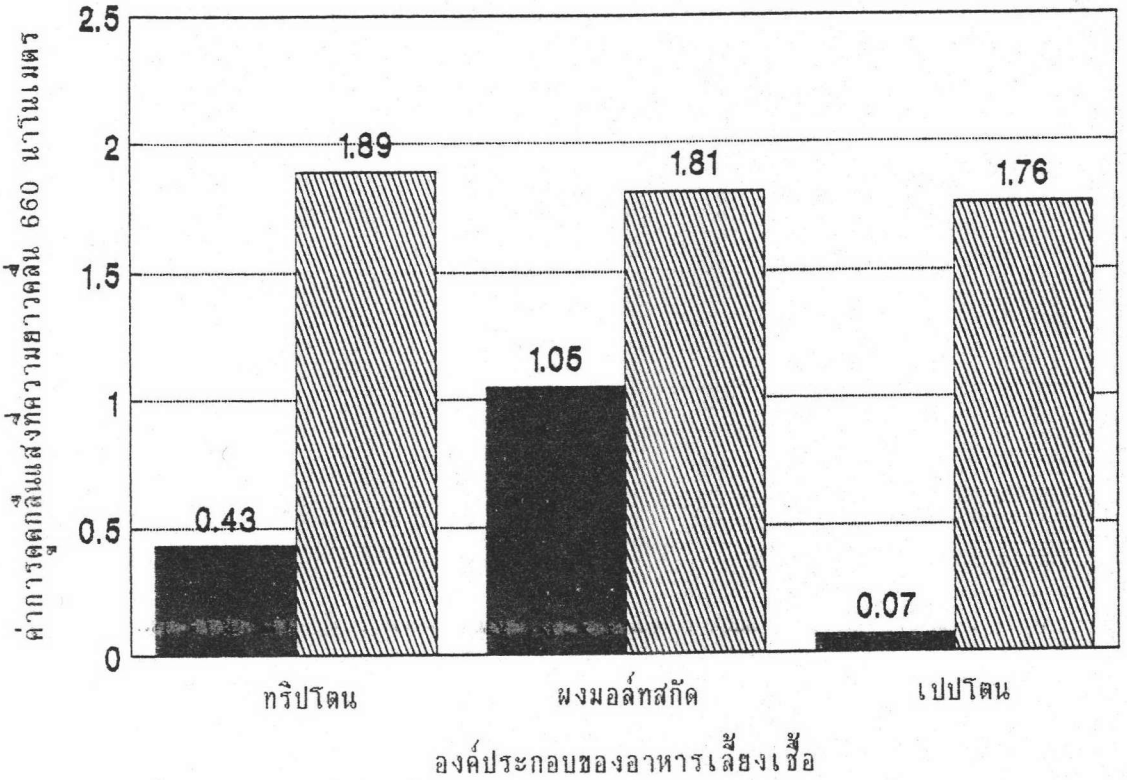
3.5.4.3 แหล่งเกลือแร่และวิตามินที่เหมาะสมต่อการผลิตทอกซิน

จากการทำการศึกษาเพื่อหาแหล่งเกลือแร่และวิตามินที่เหมาะสมต่อการผลิตทอกซินจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 ในขวดเขย่า เพื่อให้ได้ทอกซินสูงสุด เลี้ยงเชื้อตามวิธีการในข้อ 2.5 ในสูตรอาหารเหลววายอีนีดี (ภาคผนวกหมายเลข 1.5) ที่มีการแปรผันแหล่งเกลือแร่และวิตามินต่าง ๆ ได้แก่ คอร์นสตีฟลิเคอร์, สารสกัดจากยีสต์และคาซามิโนแอซิด เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการฆ่าเชื้อทดสอบโดยวิธี tube test และวัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์แขวนลอยของจุลชีพทดสอบที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร พบว่า สารสกัดจากยีสต์ให้ค่าการดูดกลืนแสงต่ำที่สุด และมีค่าต่ำกว่า คาซามิโนแอซิดและคอร์นสตีฟลิเคอร์มาก นั่นคือ สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งเกลือแร่และวิตามินที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตทอกซิน ดังแสดงในรูป 3.14

3.6 <u>สภาวะที่เหมาะสมในการออกฤทธิ์ของทอกซินต่อยีสต์ทดสอบ</u>

3.6.1 ระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการออกฤทธิ์ของทอกซิน

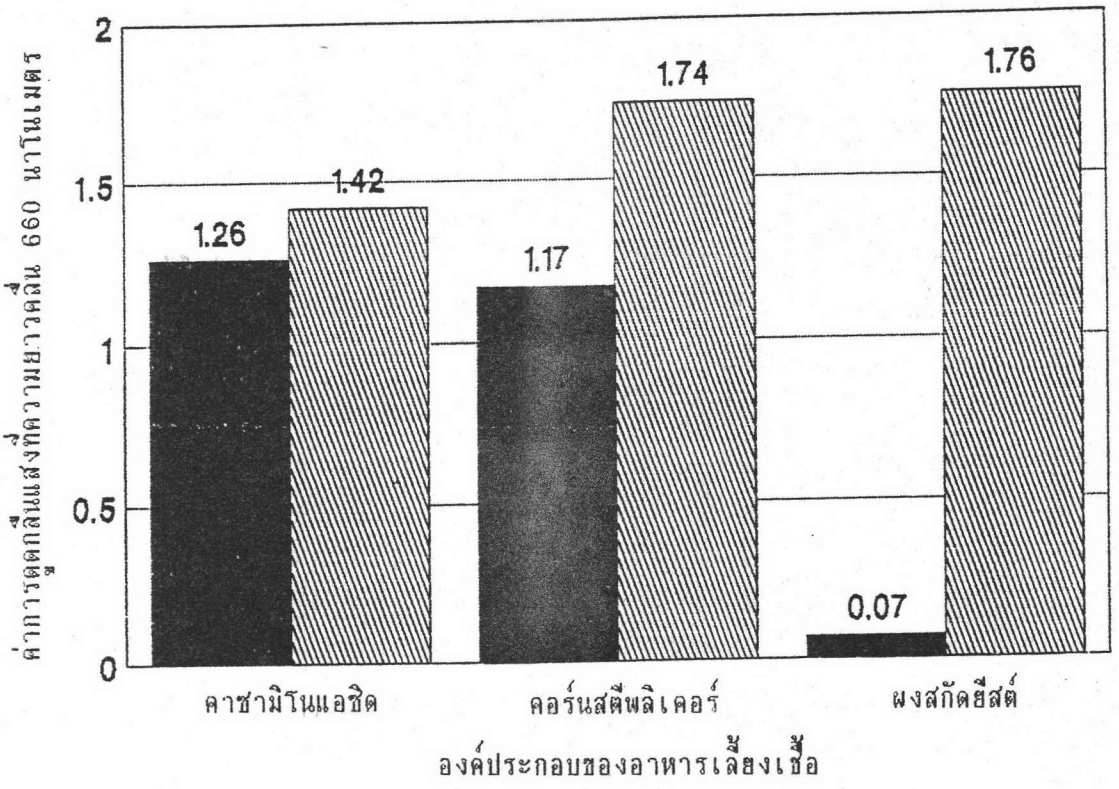
ทำการศึกษาเพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการออกฤทธิ์ของทอกซินต่อเชื้อทดสอบโดยวิธี tube test ด้วยการติดตามค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายแขวนลอยของยีสต์ทดสอบเมื่อมีและไม่มีทอกซินที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร โดยแปรค่าระยะเวลาในการบ่มทอกซินกับเชื้อทดสอบต่าง ๆ กันตั้งแต่ 10 นาที จนถึง 24 ชม.บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 25°ซ. ด้วยอัตราเร็ว 200 รอบ/นาที พบว่าระยะเวลาในการบ่ม 14 ชั่วโมงเป็นต้นไป จะให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรต่ำมาก นั่นคือ ระยะเวลาในการบ่มที่สั้นที่สุดและทอกซินสามารถออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อทดสอบได้ดีที่สุดคือ 14 ชั่วโมง ดังแสดงในรูป 3.15



รูปที่ 3.13 ผลของแหล่งสารไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ต่อการสร้างทอกซินของเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 ในขวดเขย่า โดยมีองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อดังแสดงในภาคผนวกหมายเลข 1.5 ทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25°ซ. ด้วยอัตราเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 วัน ติดตามผลการฆ่าจุลชีพทดสอบโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์แขวนลอยของจุลชีพทดสอบที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

■ หมายถึง หลอดทดสอบที่มีการเติมทอกซิน

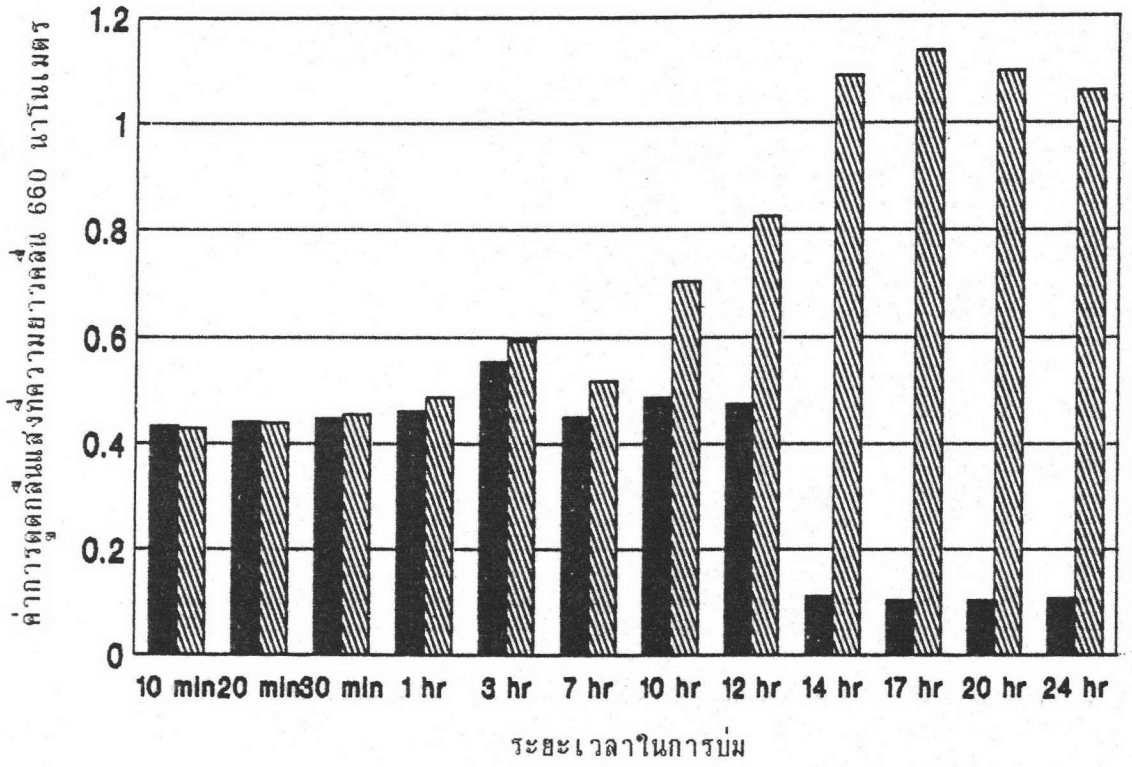
▨ หมายถึง หลอดควบคุมที่ไม่มีการเติมทอกซิน



รูปที่ 3.14 ผลของแหล่งเกลือแร่และวิตามินต่อการสร้างทอกซินของเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 ในขวดเขย่า โดยมีองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อดังแสดงในภาคผนวกหมายเลข 1.5 ทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25°ซ. ด้วยอัตราเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 วัน ติดตามผลการฆ่าจุลชีพทดสอบโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์แขวนลอยของจุลชีพทดสอบที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

■ หมายถึง หลอดทดสอบที่มีการเติมทอกซิน

▨ หมายถึง หลอดควบคุมที่ไม่มีการเติมทอกซิน



รูปที่ 3.15 ผลของการแปรผันระยะเวลาในการบ่มทอกซินกับ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นเชื้อยีสต์ทดสอบเพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการออกฤทธิ์ของทอกซินที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 ทำการทดสอบโดยวิธี tube test และติดตามผลการฆ่าจุลชีพทดสอบโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์แขวนลอยของจุลชีพทดสอบที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

■ หมายถึง หลอดทดสอบที่มีการเติมทอกซิน

▨ หมายถึง หลอดควบคุมที่ไม่มีการเติมทอกซิน

3.6.2 ความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการออกฤทธิ์ของทอกซิน

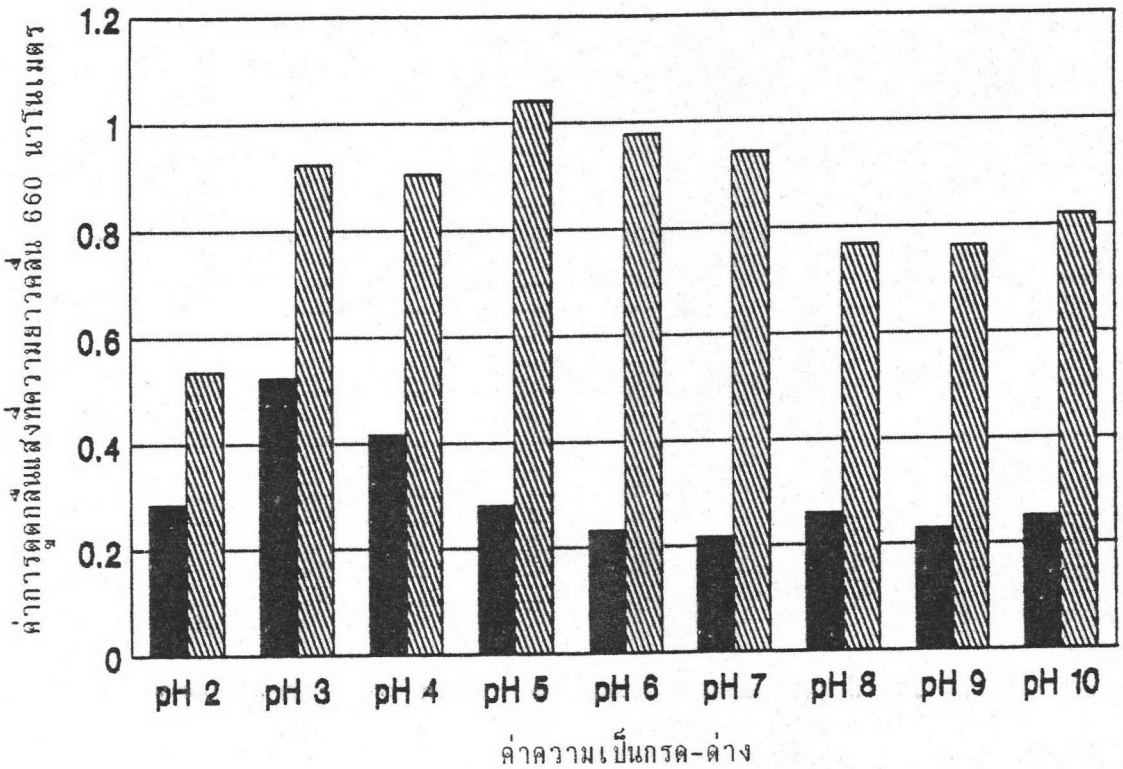
จากการทดสอบความสามารถของทอกซินในการฆ่าเชื้อยีสต์ทดสอบ โดยวิธี tube test ที่ทำการแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างในหลอดทดลองที่ทำการบ่มทอกซินกับ *Saccharomyces cerevisiae* ต่าง ๆ กัน เมื่อติดตามค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์แขวนลอยของจุลชีพทดสอบที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร พบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อทดสอบของทอกซินในหลอดทดลอง คือ ค่าความเป็นกรด-ด่างในช่วง 5.0-7.0 ดังแสดงในรูป 3.16

3.6.3 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการออกฤทธิ์ของทอกซิน

จากการทำการทดลองเพื่อหาอุณหภูมิในการบ่มทอกซินกับ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นยีสต์ทดสอบที่เหมาะสม และให้ผลในการฆ่าดีที่สุดโดยวิธี tube test เมื่อติดตามค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร พบว่า อุณหภูมิในการบ่มเท่ากับ 25°ซ. จะให้ค่าการดูดกลืนแสงต่ำที่สุด เมื่อเทียบกับการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30°ซ. และอุณหภูมิห้อง นั่นคือ อุณหภูมิ 25°ซ. เป็นอุณหภูมิที่ทอกซินออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อทดสอบได้ดีที่สุดดังแสดงในรูป 3.17

3.6.4 ระยะเวลาในการเจริญของเชื้อทดสอบที่เหมาะสมต่อการออกฤทธิ์ของทอกซิน

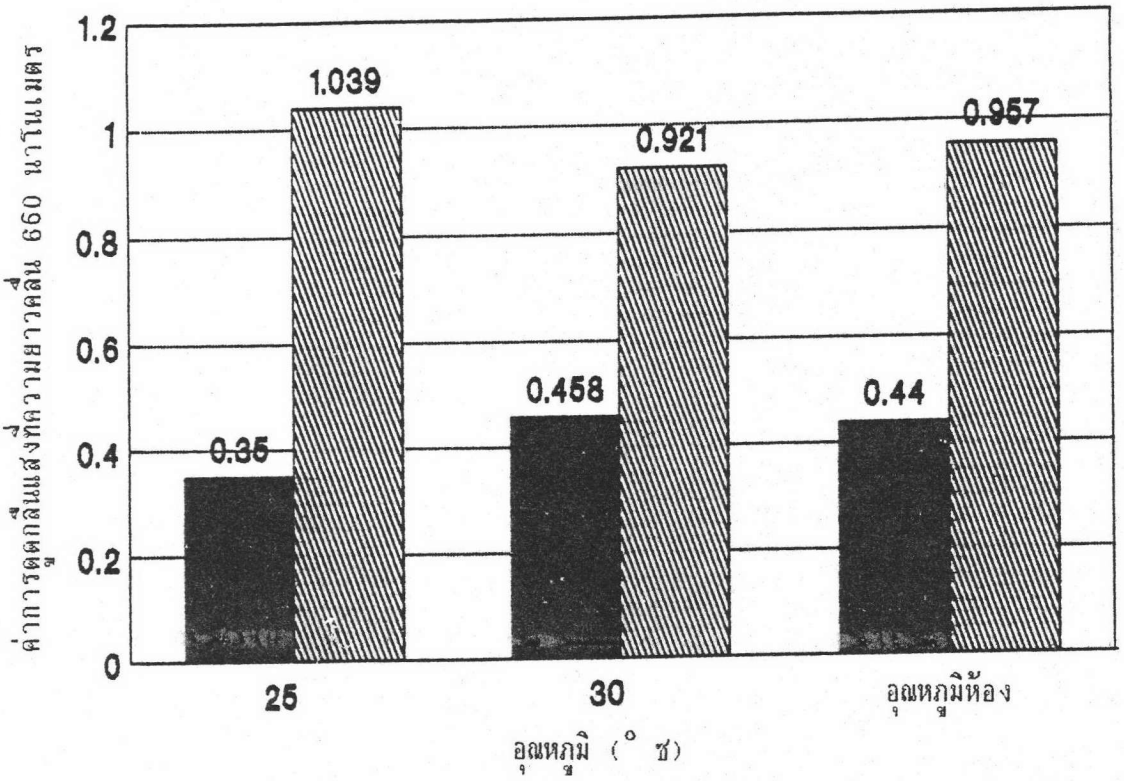
จากการติดตามการเจริญของ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นเชื้อยีสต์ทดสอบในช่วงเวลาต่าง ๆ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวชนิดวายอีนีดี (ภาคผนวกหมายเลข 1.5) โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร พบว่าผลการทดลองดังแสดงในรูป 3.18 และเมื่อนำเซลในระยะต่าง ๆ ของการเจริญมาทดสอบการออกฤทธิ์ของทอกซินที่สร้างจากเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 โดยวิธี tube test และติดตามผลการฆ่าเชื้อทดสอบโดย



รูปที่ 3.16 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างต่อการออกฤทธิ์ของทอกซินที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 เมื่อทำการบ่มทอกซิน และ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นยีสต์ทดสอบไว้ในหลอดทดสอบที่มีการแปรค่าความเป็นกรด-ด่างต่าง ๆ ติดตามผลการฆ่าจุลชีพทดสอบโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์แขวนลอยของจุลชีพทดสอบที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

■ หมายถึง หลอดทดสอบที่มีการเติมทอกซิน

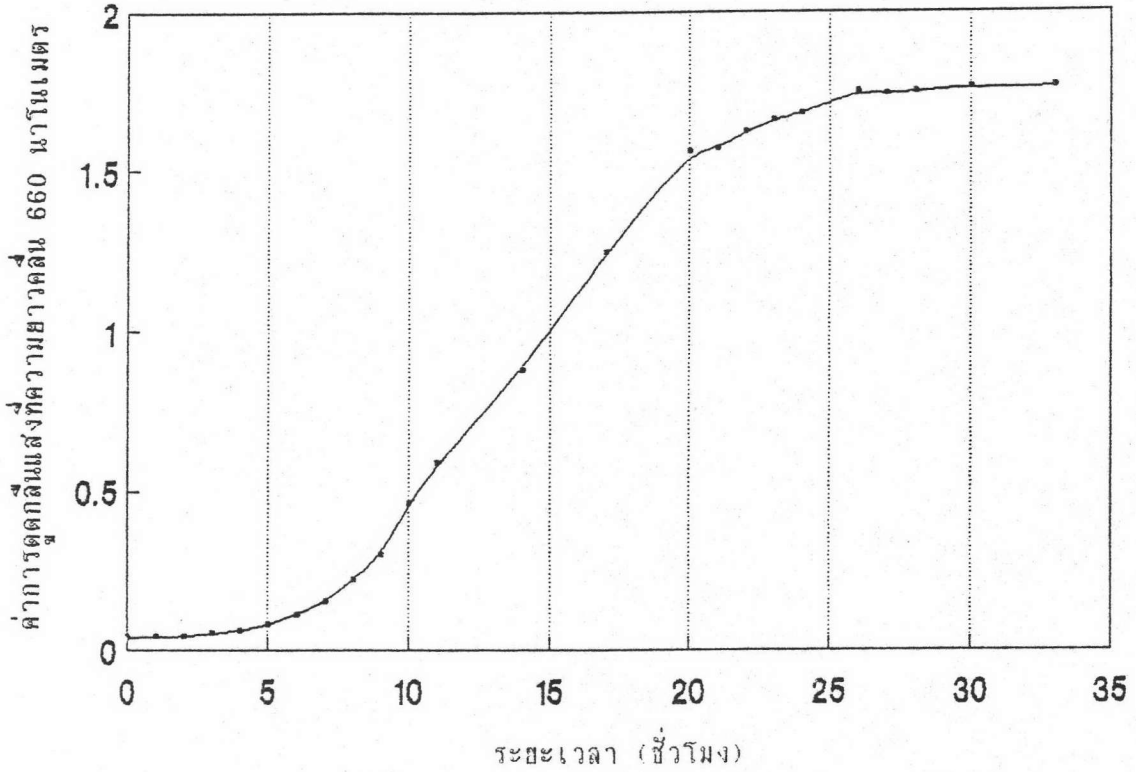
▨ หมายถึง หลอดควบคุมที่ไม่มีการเติมทอกซิน



รูปที่ 3.17 ผลของอุณหภูมิต่อการออกฤทธิ์ของทอกซิน ที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 เมื่อทำการบ่มทอกซินและ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นยีสต์ทดสอบไว้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ติดตามผลการฆ่าจุลชีพทดสอบโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์แขวนลอยของจุลชีพทดสอบที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

■ หมายถึง หลอดทดสอบที่มีการเติมทอกซิน

▨ หมายถึง หลอดควบคุมที่ไม่มีการเติมทอกซิน



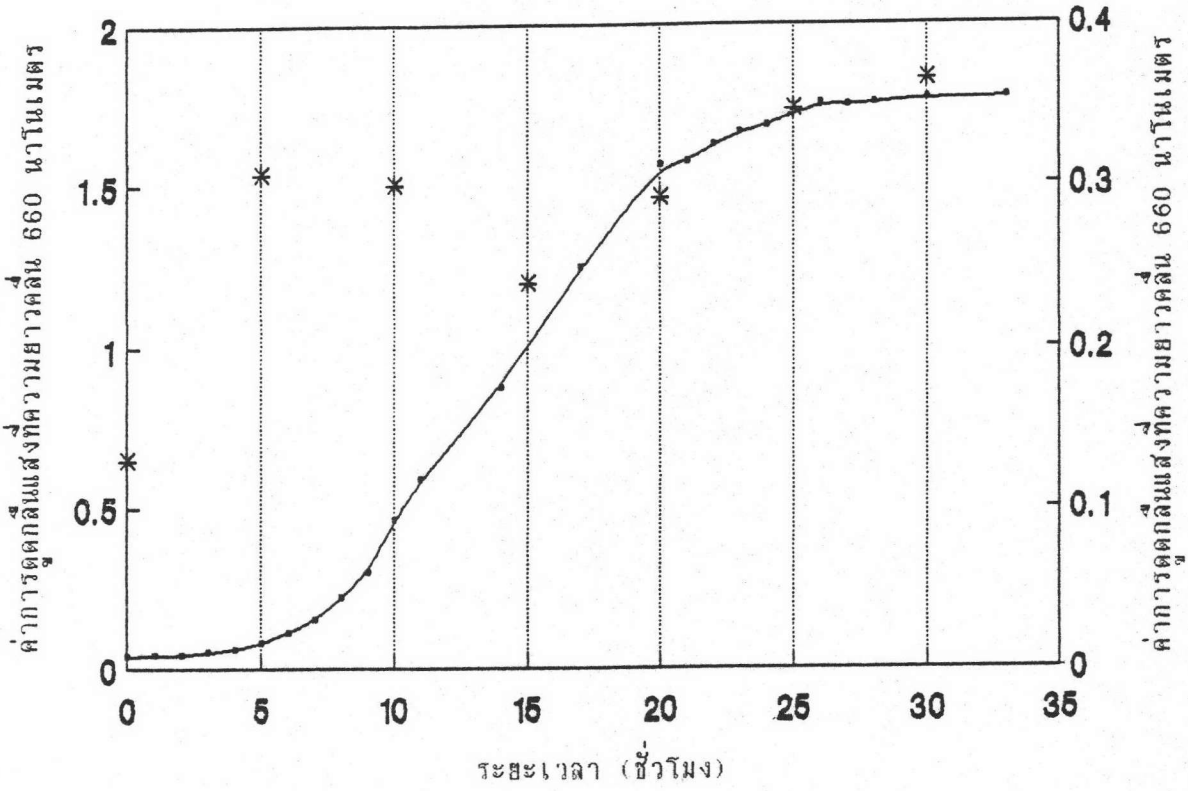
รูปที่ 3.18 แสดงรูปแบบการเจริญของ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นเชื้อยีสต์ทดสอบในช่วงเวลาต่าง ๆ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวชนิดวายอีพีดี ในขวดเขย่า ที่อุณหภูมิ 25°ซ. อัตราเร็ว 200 รอบ/นาที ติดตามการเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

การวัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์แขวนลอยของจุลชีพทดสอบที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร พบว่าช่วงเวลาในการเจริญของยีสต์ที่เวลา 15 ชั่วโมงให้ค่าการดูดกลืนแสงต่ำที่สุด ดังแสดงในรูป 3.19 นั่นคือ เซลล์ยีสต์ที่เวลาของการเลี้ยงเชื้อ 15 ชั่วโมง มีความเหมาะสมต่อการออกฤทธิ์ของทอกซินมากที่สุด

3.7 การศึกษาสมบัติเบื้องต้นของทอกซินที่ผลิตได้

3.7.1 การทดสอบว่าเป็นสารประเภทโปรตีนหรือไม่

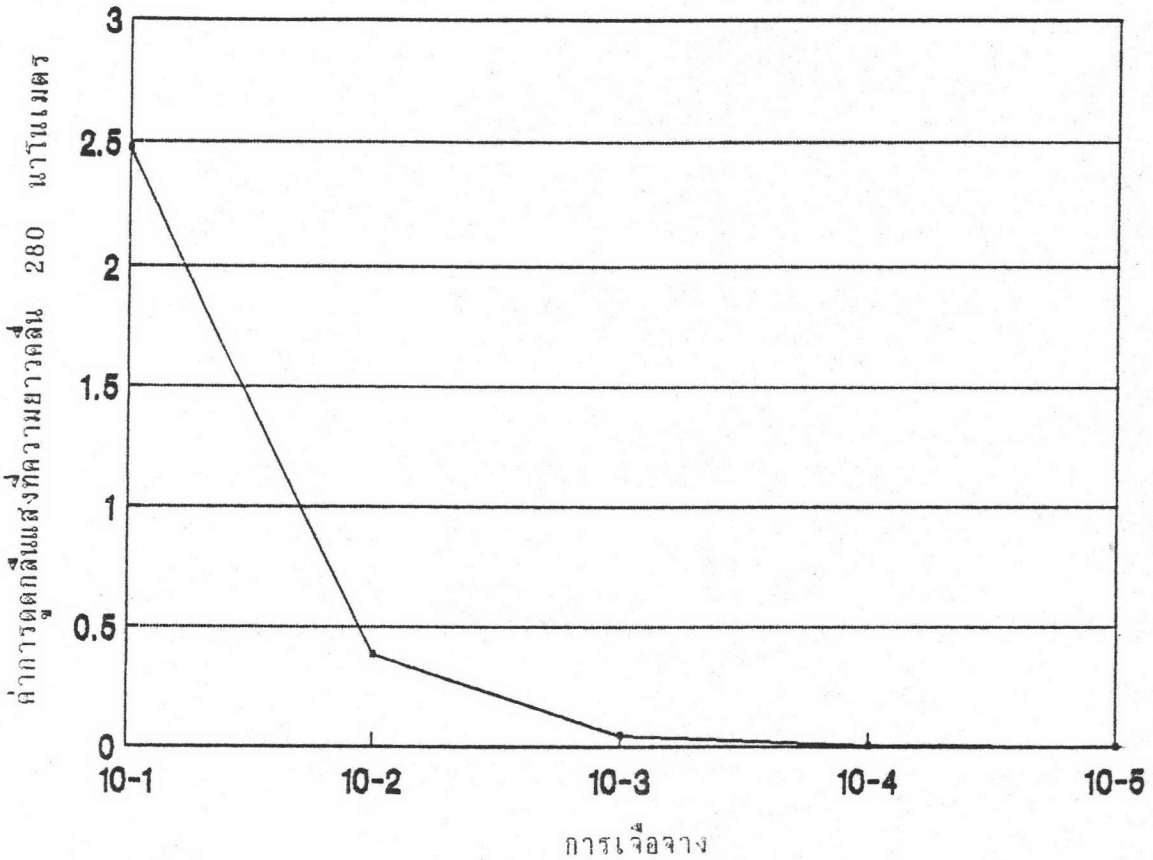
ในการศึกษาสมบัติการเป็นสารประเภทโปรตีนเบื้องต้นของทอกซินที่ผลิตได้จากเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร เทียบกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร พบว่าอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงทั้งสองมีค่าเท่ากับ 1.54 ซึ่งใกล้เคียงกับ 2.0 นั่นคืออาจบอกได้ว่า ทอกซินที่ผลิตได้จากสายพันธุ์ F2.2 มีคุณสมบัติเป็นสารประเภทโปรตีนโดยอาจมีการปนเปื้อนจากกรดนิวคลิอิกบ้างเล็กน้อย เมื่อนำทอกซินมาทำการเจือจาง แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร พบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้จะลดลงตามลำดับ ดังแสดงในรูป 3.20 เพื่อเป็นการยืนยันคุณสมบัติการเป็นโปรตีนของทอกซินข้างต้น จึงได้ทำการทดลองโดยการเปรียบเทียบบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้นจากการหยอดทอกซิน, การหยอดเอนไซม์โปรติเอส และการหยอดสารละลายผสมระหว่างทอกซินกับเอนไซม์โปรติเอสลงในหลุมต่าง ๆ ของวุ้นเพาะเชื้อที่มีเชื้อทดสอบเจริญอยู่ พบว่าผลการทดลองเป็นดังแสดงในรูป 3.21 หลุมที่มีการหยอดเอนไซม์โปรติเอสจะไม่แสดงบริเวณใส ส่วนหลุมที่มีการหยอดทอกซินและหลุมที่หยอดสารละลายผสมระหว่างทอกซินกับเอนไซม์โปรติเอสจะให้บริเวณใสเกิดขึ้น แต่บริเวณใสที่เกิดขึ้นจากการหยอดทอกซินจะมีความกว้างมากกว่า ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ทอกซินที่สร้างขึ้นจากเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 จะสามารถถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนได้เพียงบางส่วน ซึ่งบริเวณที่ถูกย่อยสลายอาจจะไม่ใช่บริเวณจำเพาะจึงทำให้ความสามารถของทอกซินสูญเสียไปเพียงบางส่วน



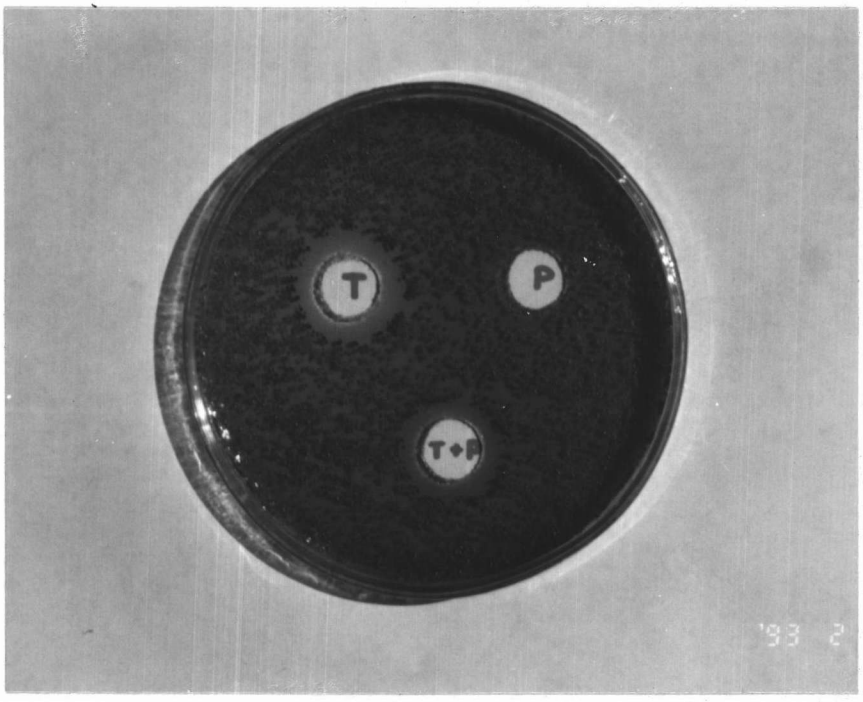
รูปที่ 3.19 แสดงความเหมาะสมในช่วงเวลาต่าง ๆ ของการเลี้ยงเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นยีสต์ทดสอบต่อการออกฤทธิ์ของทอกซิน จากเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 เมื่อเลี้ยงในอาหารเขย่า ติดตามการเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และทดสอบความเหมาะสมต่อการออกฤทธิ์ของทอกซินโดยวิธี tube test ติดตามผลการฆ่าจุลชีพทดสอบโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์แขวนลอยของจุลชีพทดสอบที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

—•— หมายถึง รูปแบบการเจริญของ *Saccharomyces cerevisiae*

* หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร เมื่อนำช่วงเวลาต่าง ๆ ในการเจริญของเซลล์ยีสต์มาทำการทดสอบโดยวิธี tube test



รูปที่ 3.20 แสดงการติดตามค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ของทอกซินที่ผลิตได้จากเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 เมื่อทำการเจือจางค่าต่าง ๆ กัน



รูปที่ 3.21 แสดงการเปรียบเทียบบริเวณยับยั้งที่เกิดจากการหยอดทอกซินที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2, การหยอดเอนไซม์โปรติเอส และการหยอดสารละลายผสมระหว่างทอกซินกับเอนไซม์โปรติเอสลงในหลุมต่าง ๆ ของวุ้นเพาะเชื้อที่มี *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นเชื้อทดสอบเจริญอยู่

3.7.2 การเติมสารทวีน 80 ลงในหลอดทดสอบ

จากผลการทดลองในข้อ 3.7.1 ซึ่งพบว่า เอนไซม์โปรติเอสไม่สามารถย่อยสลายทอกซินที่สร้างจากเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 ได้ จึงได้ตั้งสมมุติฐานว่า ทอกซินที่สร้างขึ้นอาจประกอบไปด้วยองค์ประกอบอื่นที่ไม่ใช่โปรตีนเพียงอย่างเดียว จึงได้ทำการทดลองโดยเติมสารทวีน 80 ซึ่งมีคุณสมบัติในการเป็นดีเทอร์เจนท์ (Detergent) ลงในหลอดทดสอบเมื่อทำการทดสอบโดยวิธี tube test ที่ประกอบไปด้วยทอกซินจากเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์

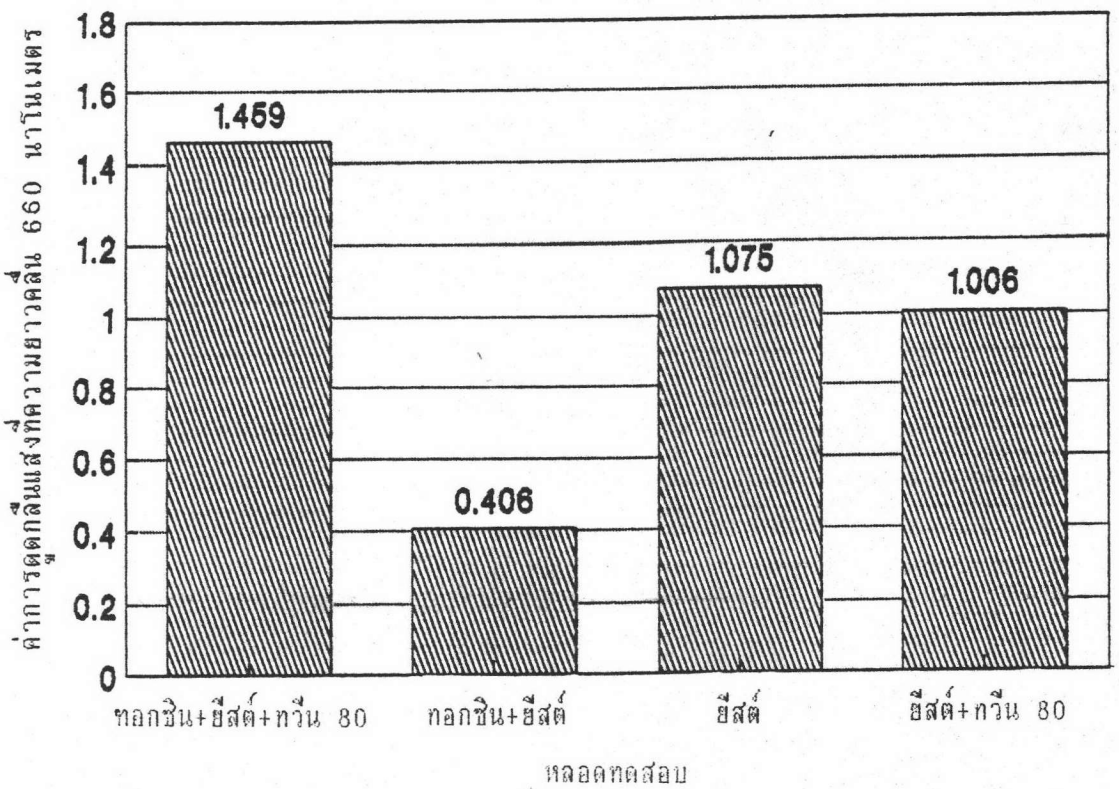
F2.2 และ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นยีสต์ทดสอบ และติดตามผลการฆ่าจุลชีพทดสอบ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์แขวนลอยของจุลชีพทดสอบที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับหลอดทดสอบอื่น ๆ ที่ไม่มีการเติมทวีน 80 ผลการทดลองพบว่า หลอดทดสอบที่ประกอบไปด้วยทอกซินกับยีสต์ทดสอบจะให้ค่าการดูดกลืนแสงต่ำที่สุด แต่เมื่อมีการเติมทวีน 80 ลงไป ค่าการดูดกลืนแสงจะเพิ่มสูงขึ้นอย่างมาก จนสูงกว่าหลอดควบคุมที่ประกอบด้วยยีสต์ทดสอบอย่างเดียว และยีสต์ทดสอบกับทวีน 80 ดังแสดง ในรูป 3.22

3.7.3 การศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่างต่อความเสถียรของทอกซิน

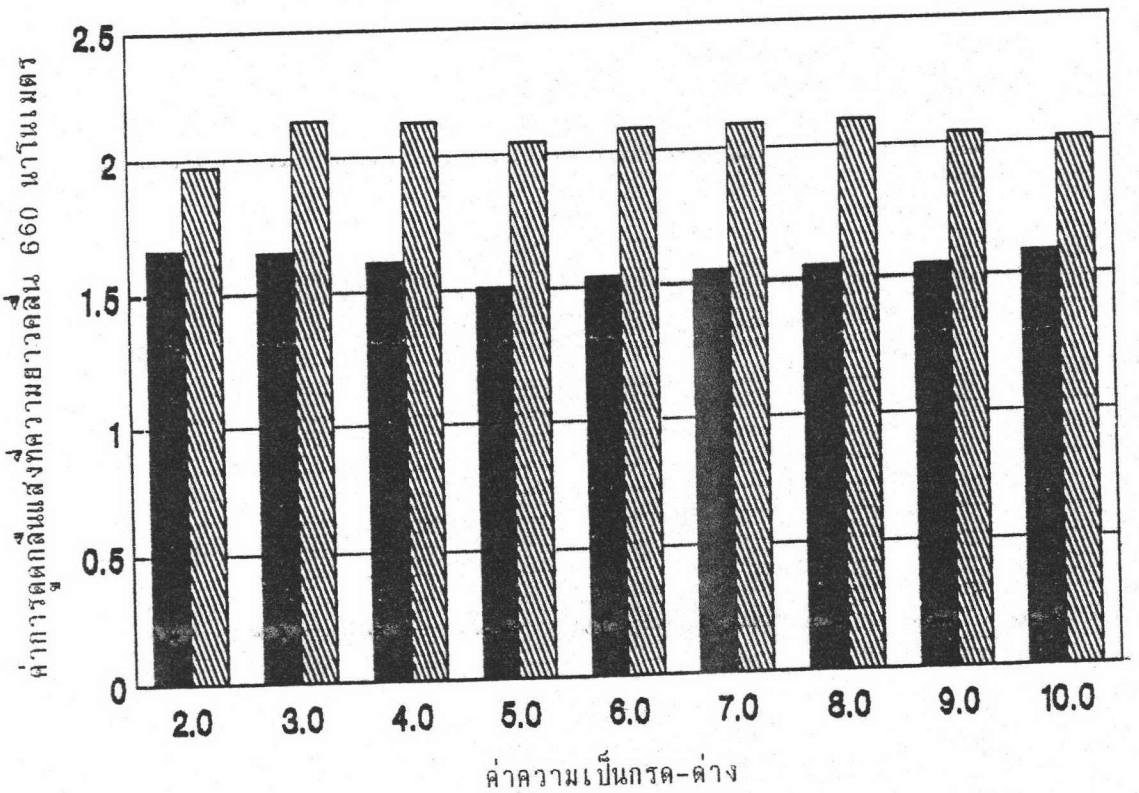
จากการศึกษาความเสถียรของทอกซินจากเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 ที่ระดับความเป็นกรด-ด่างต่าง ๆ ในบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ 4 ชนิด คือ ไฮโดรคลอริก-โปแทสเซียมคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเป็นกรด-ด่างที่ศึกษาคือ 2.0 ซิเตรท-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเป็นกรด-ด่างที่ทำการศึกษาคือ 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 และ 7.0 ทริสไฮดรอกซีเมทธิล อะมิโนมีเทนบัฟเฟอร์ ความเป็นกรด-ด่างที่ทำการศึกษาคือ 8.0 และ 9.0 และไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์ ความเป็นกรด-ด่างที่ทำการศึกษาคือ 10.0 โดยการบ่มทอกซินในบัฟเฟอร์ต่าง ๆ ดังกล่าวข้างต้นเป็นเวลา 10 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4°ซ แล้วนำไปทดสอบความสามารถในการฆ่ายีสต์ทดสอบโดยวิธี tube test ติดตามผลโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร จากการทดลองพบว่า ทอกซินจะมีความเสถียรที่ค่าความเป็นกรด-ด่างในช่วงกว้างคือ 5.0-9.0 ดังแสดงในรูป 3.23

3.7.4 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของทอกซิน

จากการศึกษาความเสถียรของทอกซินจากเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 เมื่อทำการบ่มในสภาวะที่มีอุณหภูมิต่าง ๆ กัน โดยการนำสารละลายทอกซินที่แยกได้ตามวิธีในข้อ



รูปที่ 3.22 แสดงผลของการเติมทวีน 80 ลงในหลอดทดสอบของการทดสอบโดยวิธี tube test ที่ประกอบไปด้วย ทอกซินจากเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 และ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นเชื้อทดสอบ ติดตามผลการฆ่าเชื้อทดสอบโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์แขวนลอยของเชื้อทดสอบที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร



รูปที่ 3.23 แสดงความเสถียรของทอกซินจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 ต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง เมื่อทำการบ่มทอกซินในบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างต่าง ๆ กัน แล้วจึงนำไปทดสอบความสามารถในการฆ่ายีสต์ทดสอบโดยวิธี tube test ติดตามผลโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์แขวนลอยของจุลชีพทดสอบที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

■ หมายถึง หลอดทดสอบที่มีการเติมทอกซิน

▨ หมายถึง หลอดควบคุมที่ไม่มีการเติมทอกซิน

2.4.2 ไปบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ -70°ซ., -20°ซ., 0°ซ., 4°ซ., 45°ซ., 60°ซ. และอุณหภูมิห้องเป็นเวลาต่าง ๆ กันคือ 0-7 วัน สำหรับอุณหภูมิ 45°ซ., 60°ซ. และอุณหภูมิห้อง, 0-30 วัน สำหรับอุณหภูมิ 4°ซ. และ 0-15 อาทิตย์ สำหรับอุณหภูมิ -70°ซ., -20°ซ. และ 0°ซ. เมื่อครบกำหนดในแต่ละวันนำออกมาทดสอบการออกฤทธิ์กับเชื้อทดสอบโดยวิธี tube test เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร พบว่าการบ่มทอกซินที่อุณหภูมิ -70°ซ. -20°ซ. และ 0°ซ. ในช่วงเวลาต่าง ๆ ให้ผลการทดลองที่ใกล้เคียงกัน โดยทอกซินจะเริ่มสูญเสียความเสถียรหลังจากผ่านการบ่มเป็นเวลา 9 อาทิตย์ สังเกตได้จากค่าการดูดกลืนแสงจะมีค่าสูงขึ้นจนใกล้เคียงกับหลอดควบคุมดังแสดงในรูป 3.24 และ 3.25 การบ่มทอกซินที่อุณหภูมิ 4°ซ. พบว่าทอกซินจะเริ่มสูญเสียความเสถียรหลังจากทำการบ่มเป็นเวลา 2 อาทิตย์ ดังแสดงในรูป 3.26 และสำหรับการบ่มทอกซินที่อุณหภูมิห้อง , 45°ซ. และ 60°ซ.พบว่า หลังจากผ่านการบ่มทอกซินเป็นเวลาเพียง 1 วัน ทอกซินก็จะเริ่มสูญเสียความเสถียรไป ดังแสดงในรูป 3.27

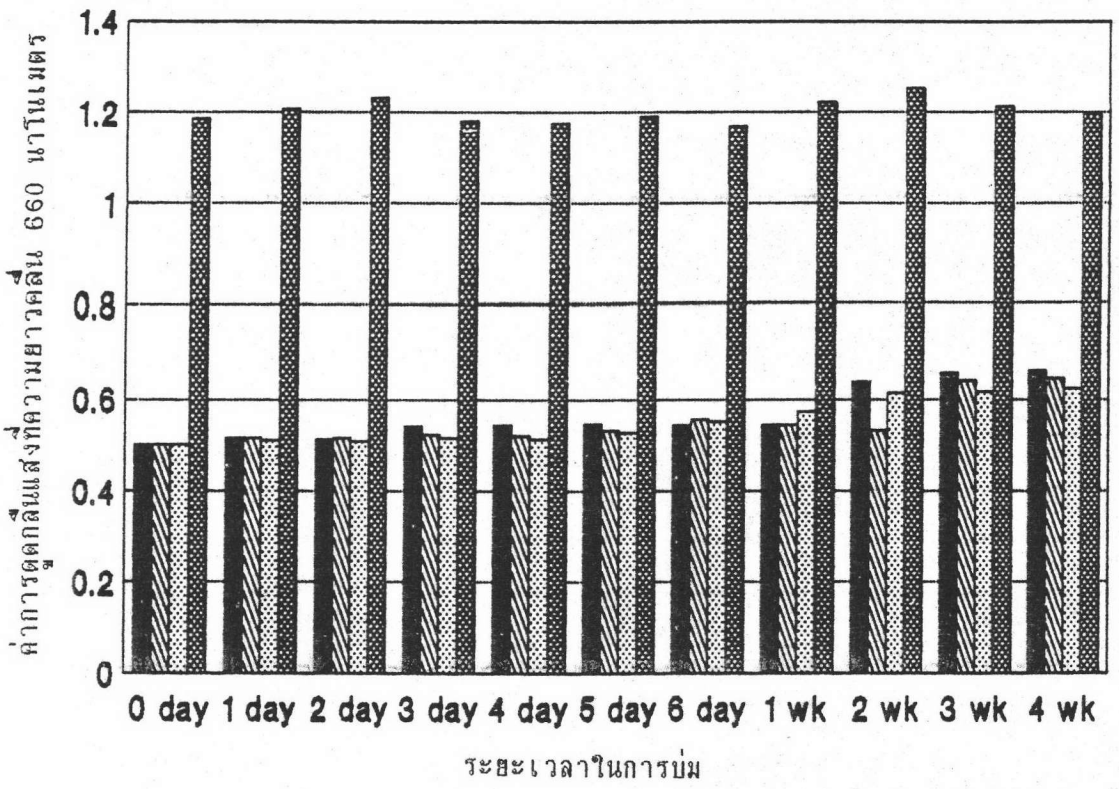
3.8 <u>การทำทอกซินกึ่งบริสุทธิ์</u>

3.8.1 การสกัดแยกเซลล์ *Bacillus* sp. ออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อ

จากการปั่นแยกเซลล์ *Bacillus* sp. ออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูงภายใต้อุณหภูมิต่ำ เมื่อแยกส่วนน้ำใสไปทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วนำมาทดสอบความสามารถในการฆ่าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นเชื้อทดสอบโดยหาบริเวณใสซึ่งมีการฆ่าเชื้อทดสอบรอบ ๆ หลุมทดสอบ ผลการทดลองดังแสดงในรูป 3.28 (หลุมหมายเลข 1)

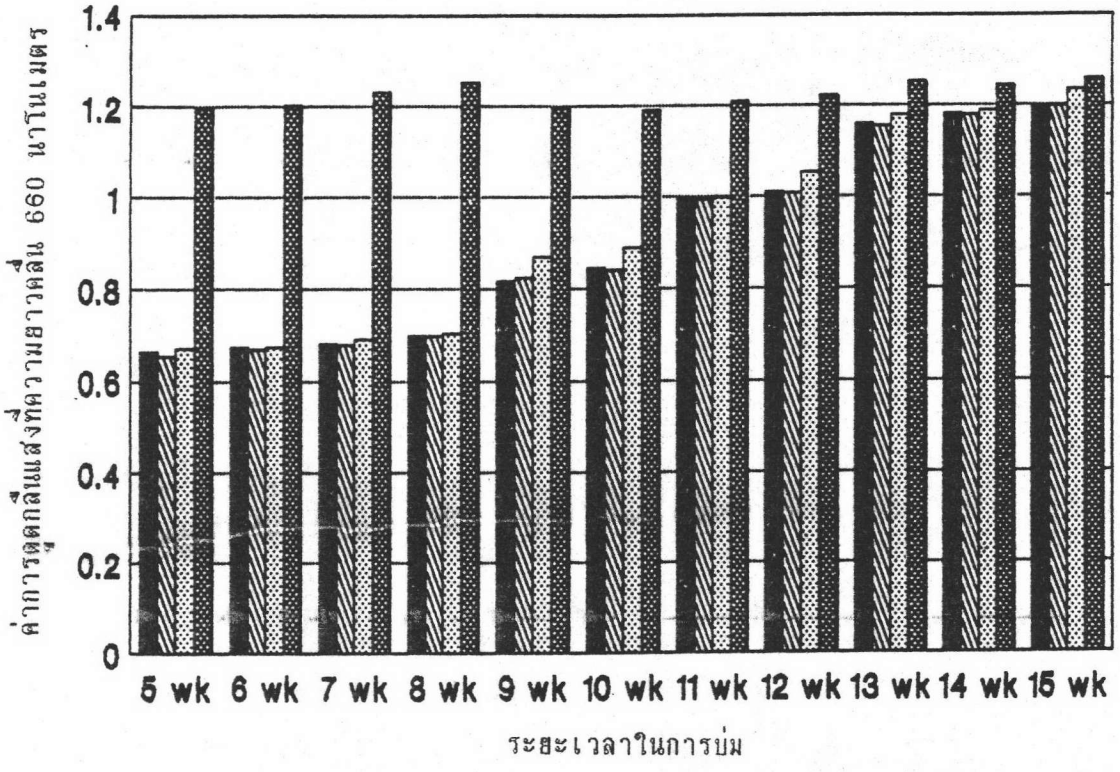
3.8.2 การแยกทอกซินโดยการตกตะกอนด้วยกรดไอโดรคลอริก

ตกตะกอนส่วนน้ำใสที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อ ด้วยกรดไอโดรคลอริกเข้มข้น



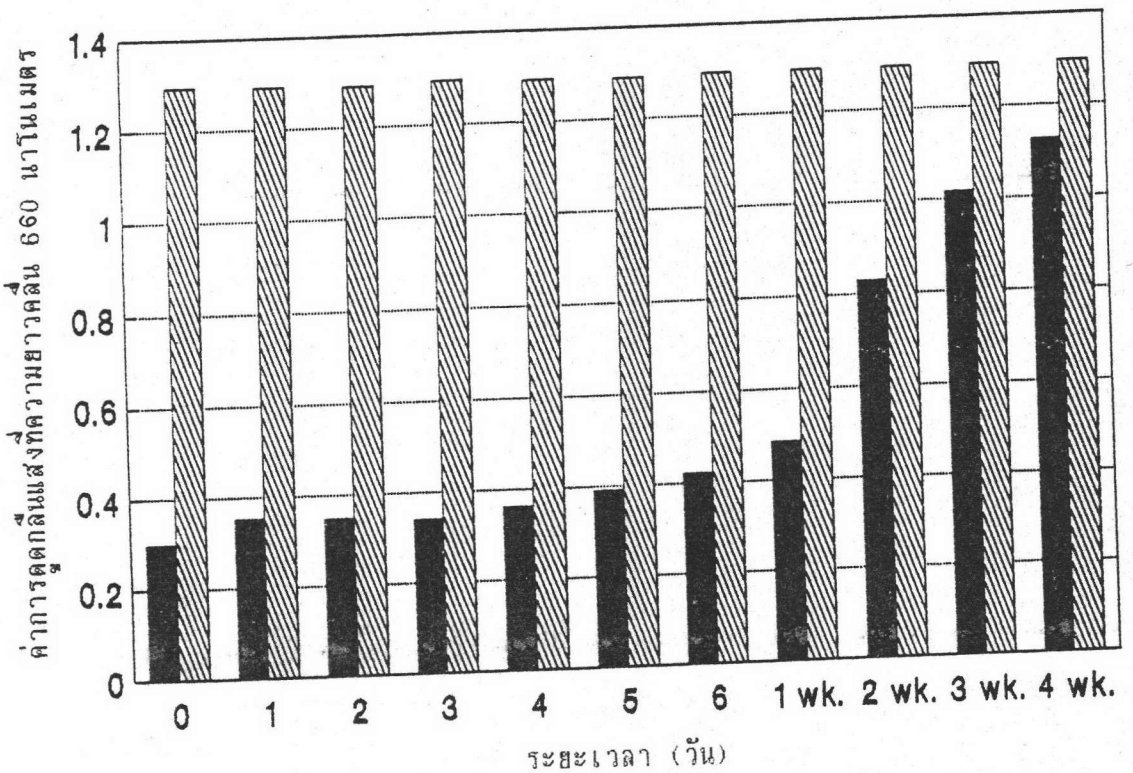
รูปที่ 3.24 แสดงความเสถียรของทอกซินจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 ต่ออุณหภูมิ เมื่อทำการบ่มทอกซินที่อุณหภูมิ -70°ซ., -20°ซ. และ 0°ซ. เป็นเวลาต่าง ๆ กันตั้งแต่ 0 วันจนถึง 4 อาทิตย์ แล้วจึงนำไปทดสอบความสามารถในการฆ่ายีสต์ทดสอบโดยวิธี tube test ติดตามผลการฆ่าจุลชีพทดสอบโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์แขวนลอยของจุลชีพทดสอบที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

- หมายถึง การบ่มทอกซินที่อุณหภูมิ -70°ซ.
- หมายถึง การบ่มทอกซินที่อุณหภูมิ -20°ซ.
- หมายถึง การบ่มทอกซินที่อุณหภูมิ 0°ซ.
- หมายถึง หลอดควบคุมที่ไม่มีการเติมทอกซิน



รูปที่ 3.25 แสดงความเสถียรของทอกซินจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 ต่ออุณหภูมิ เมื่อทำการบ่มทอกซินที่อุณหภูมิ -70°ซ., -20°ซ. และ 0°ซ. เป็นเวลาต่าง ๆ กันตั้งแต่ 5-15 อาทิตย์ แล้วจึงนำไปทดสอบความสามารถในการฆ่ายีสต์ทดสอบโดยวิธี tube test ติดตามผลการฆ่าจุลชีพทดสอบโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์แขวนลอยของจุลชีพทดสอบที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

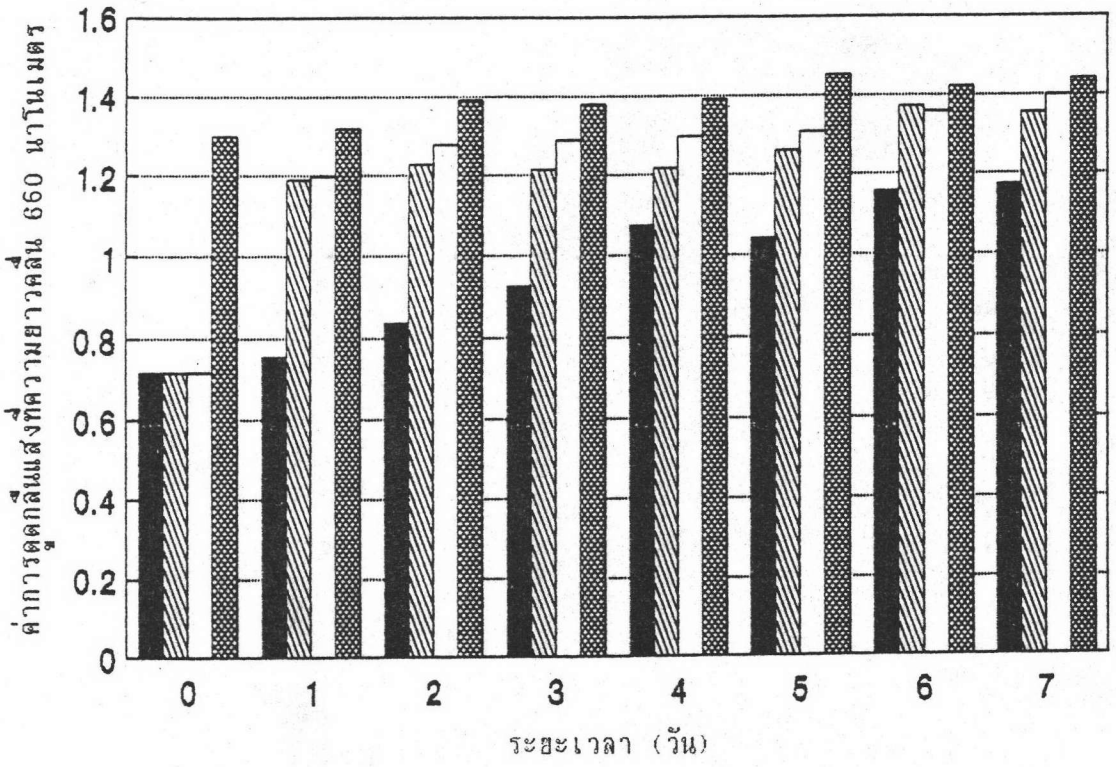
- หมายถึง การบ่มทอกซินที่อุณหภูมิ -70°ซ.
- หมายถึง การบ่มทอกซินที่อุณหภูมิ -20°ซ.
- หมายถึง การบ่มทอกซินที่อุณหภูมิ 0°ซ.
- หมายถึง หลอดควบคุมที่ไม่มีการเติมทอกซิน



รูปที่ 3.26 แสดงความเสถียรของทอกซินจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 เมื่อทำการบ่มทอกซินที่อุณหภูมิ 4°ซ. เป็นเวลาต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 0-30 วัน แล้วจึงนำไปทดสอบความสามารถในการฆ่ายีสต์ทดสอบโดยวิธี tube test ติดตามผลการฆ่าจุลชีพทดสอบโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์แขวนลอยของจุลชีพทดสอบที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

■ หมายถึง หลอดทดสอบที่มีการเติมทอกซิน

▨ หมายถึง หลอดควบคุมที่ไม่มีการเติมทอกซิน



รูปที่ 3.27 แสดงความเสถียรของทอกซินจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 ต่ออุณหภูมิ เมื่อทำการบ่มทอกซินที่อุณหภูมิห้อง, 45°ซ. และ 60°ซ. เป็นเวลาต่าง ๆ กันตั้งแต่ 0-7 วัน แล้วนำไปทดสอบความสามารถในการฆ่ายีสต์ทดสอบโดยวิธี tube test ติดตามผลการฆ่าจุลชีพทดสอบโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์แขวนลอยของจุลชีพทดสอบที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

■ หมายถึง การบ่มทอกซินที่อุณหภูมิห้อง

▨ หมายถึง การบ่มทอกซินที่อุณหภูมิ 45°ซ.

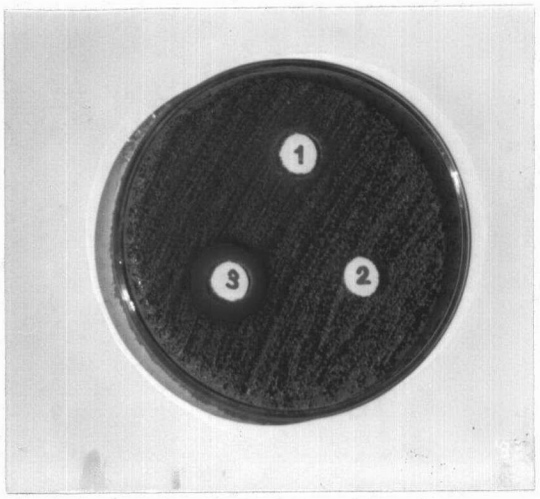
□ หมายถึง การบ่มทอกซินที่อุณหภูมิ 60°ซ.

▩ หมายถึง หลอดควบคุมที่ไม่มีการเติมทอกซิน

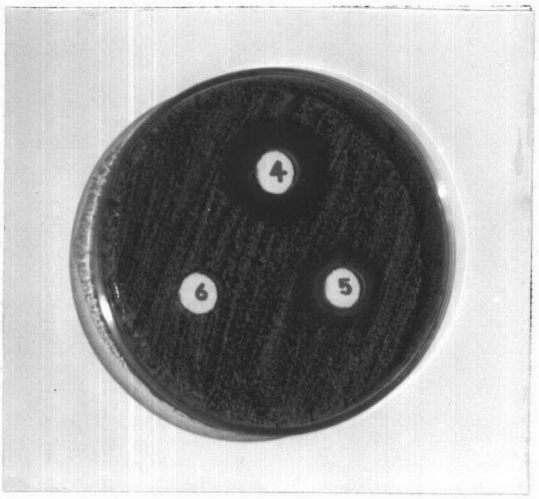
จนสารละลายมีสภาวะเป็นกรด (มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2.5) แล้วนำไปปั่นแยกที่ความเร็วสูงเพื่อเก็บส่วนตะกอน ละลายตะกอนที่ได้ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.5 ทิ้งไว้ข้ามคืนที่ 4°ซ. จนตะกอนละลายหมด นำสารละลายตะกอนที่ได้และส่วนน้ำใสจากการปั่นแยกมาทดสอบความสามารถในการฆ่าเชื้อทดสอบ โดยการดูการฆ่าเชื้อทดสอบบนวุ้นเพาะเชื้อ พบว่า หลุมที่มีการหยอดสารละลายตะกอนจะให้บริเวณใสเกิดขึ้น ในขณะที่ส่วนน้ำใสไม่ให้บริเวณใสรอบหลุมทดสอบ (หลุมที่ 3 และ 2 รูปที่ 3.28)

3.8.3 การสกัดแยกทอกซินด้วยบิวทานอล

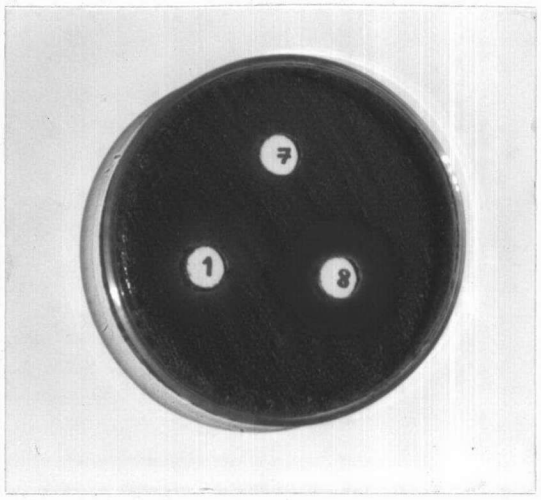
เติมอะซิโตนที่เย็นจัดลงในสารละลายตะกอนที่ได้จากข้อ 3.9.2 เขย่าจนเกิดตะกอนขึ้น ตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็งจนตะกอนตกลงมาหมด แล้วปั่นแยกที่ความเร็วสูง 12,000 รอบ/นาที เพื่อเก็บส่วนน้ำใส นำส่วนน้ำใสที่ได้จากการตกตะกอนด้วยอะซิโตนและส่วนตะกอนที่ไม่ต้องการมาทดสอบความสามารถในการฆ่าเชื้อทดสอบบนจานเพาะเชื้อที่มี *Saccharomyces cerevisiae* เจริญอยู่ พบว่า มีบริเวณใสเกิดขึ้นรอบหลุมทดสอบที่มีการหยอดส่วนน้ำใสอย่างชัดเจน ส่วนหลุมที่ทำการหยอดด้วยสารละลายตะกอนจะให้ผลในการทดสอบบ้างเล็กน้อย ซึ่งอาจเป็นผลมาจากอะซิโตนซึ่งหลงเหลืออยู่ ดังแสดงในรูป 3.29 (หลุมที่ 4 และ 5 ตามลำดับ) กำจัดอะซิโตนออกจากส่วนน้ำใสที่แยกได้โดยการระเหยภายใต้สภาวะสุญญากาศ แล้วนำส่วนที่เหลือไปทำการสกัดแยกทอกซินด้วยบิวทานอล เก็บส่วนชั้นบนซึ่งเป็นชั้นบิวทานอลไว้ ล้าง 1 ครั้งด้วยน้ำกลั่น นำแต่ละส่วนมาทดสอบความสามารถในการฆ่าเชื้อทดสอบบนจานเพาะเชื้ออีกครั้ง พบว่า สารละลายส่วนล่างจากการสกัดด้วยบิวทานอลและส่วนน้ำที่ใช้ล้างบิวทานอล จะไม่ให้ผลในการฆ่าเชื้อทดสอบ ดังแสดงในรูปที่ 3.29 (หลุมที่ 6) และรูปที่ 3.30 (หลุมที่ 7) ตามลำดับ ส่วนสารละลายชั้นบนซึ่งเป็นชั้นบิวทานอลจะให้บริเวณกว้างและให้ผลชัดเจนในการฆ่าเชื้อทดสอบ ดังแสดงในรูป 3.30 (หลุมที่ 8)



รูปที่ 3.28



รูปที่ 3.29



รูปที่ 3.30

รูปที่ 3.28, 3.29 และ 3.30 แสดงบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้นจากการดูดซึมทอกซินในวุ้นเพาะเชื้อ ที่มี *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นเชื้อทดสอบเจริญอยู่ เมื่อนำของเหลวในขั้นตอนต่าง ๆ ของการทำทอกซินกึ่งบริสุทธิ์มาหยอดลงในหลุมทดสอบ

1 หมายถึง หลุมที่หยอดส่วนน้ำใสจากการเลี้ยงเชื้อ

2 หมายถึง หลุมที่หยอดส่วนน้ำใสจากการตกตะกอนด้วยกรดไฮโดรคลอริก

3 หมายถึง หลุมที่หยอดสารละลายตะกอนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยกรดไฮโดรคลอริก

4 หมายถึง หลุมที่หยอดส่วนน้ำใสจากการตกตะกอนด้วยอะซิโตน

5 หมายถึง หลุมที่หยอดสารละลายตะกอนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยอะซิโตน

6 หมายถึง หลุมที่หยอดสารละลายส่วนล่างของการสกัดแยกทอกซินด้วยบิวทานอล

7 หมายถึง หลุมที่หยอดน้ำซึ่งใช้ในการล้างสารละลายส่วนบิวทานอล

8 หมายถึง หลุมที่หยอดสารละลายทอกซินซึ่งละลายอยู่ในชั้นบิวทานอล

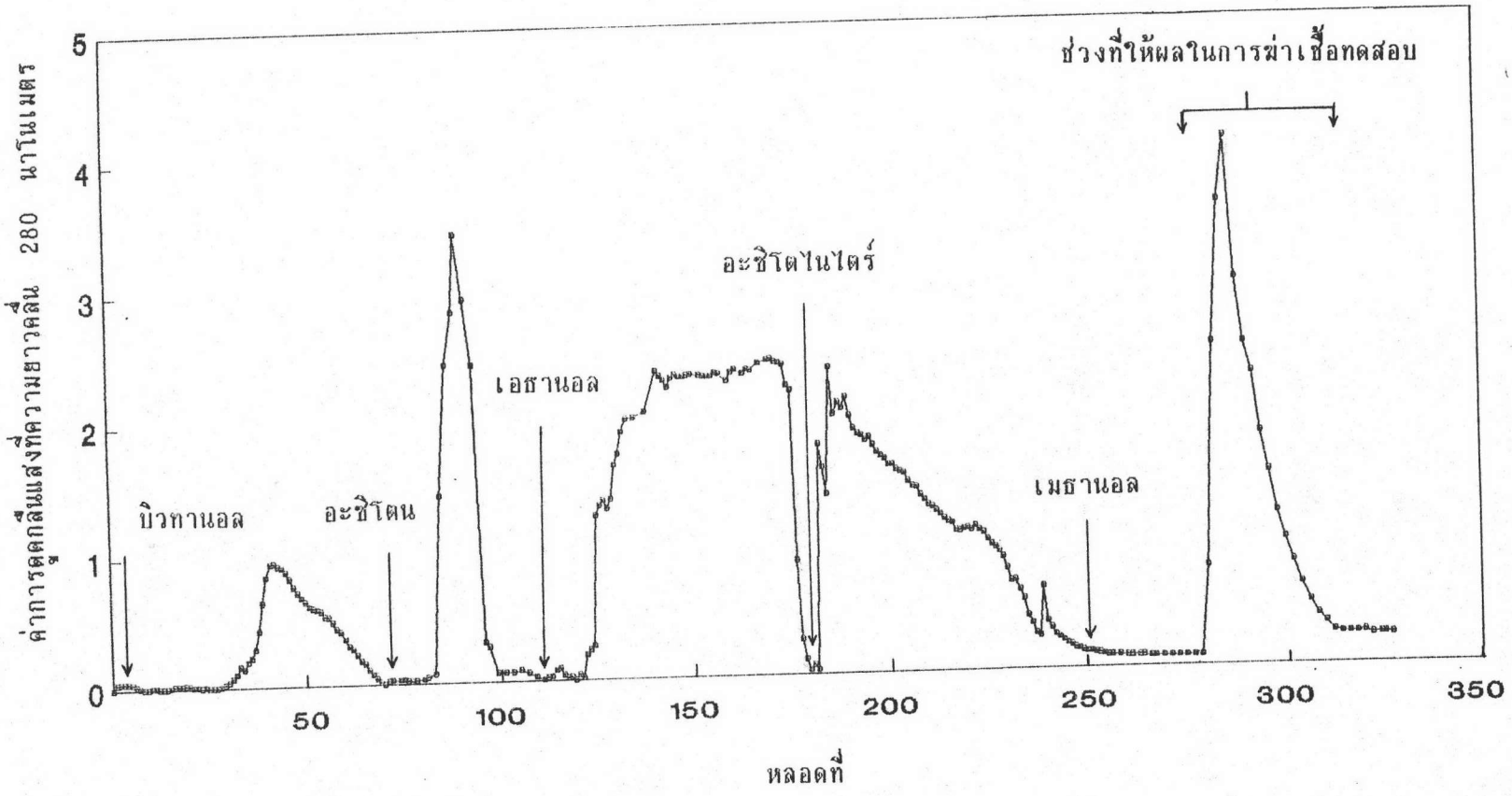
3.8.4 การแยกทอกซินโดยการทำโครมาโตรกราฟี

3.8.4.1 การทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ซิลิกาเจล

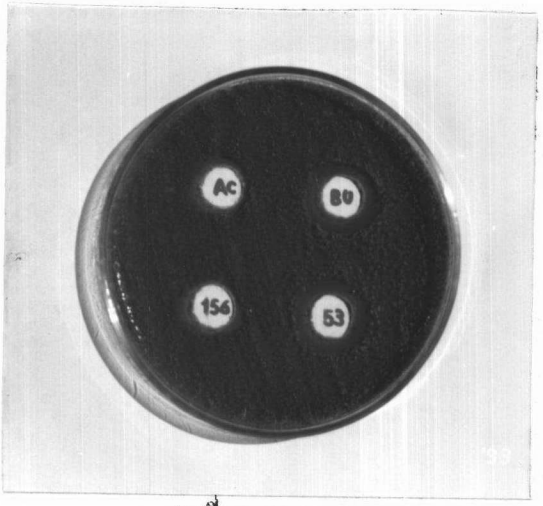
นำทอกซินที่ได้จากการผ่านขั้นตอนต่าง ๆ ดังกล่าวข้างต้น ซึ่งละลายอยู่ในบิวทานอลมาผ่านลงในคอลัมน์ที่บรรจุด้วยซิลิกาเจล (ขนาด 2.4x4.5 ซม.) ที่เตรียมขึ้นตามวิธีในหัวข้อ 2.10.4.1 ชะโปรตีนภายในคอลัมน์ออกด้วยบิวทานอล , อะซิโตน , เอธานอล , อะซิโตไนไทร์ และเมธานอล ตามลำดับ เก็บลำดับส่วนที่ชะออกลำดับส่วนละ 3 มล. วัดโปรตีนและทดสอบความสามารถในการฆ่าเชื้อทดสอบ รูปที่ 3.31 แสดงผลที่ได้โดย พบว่ามีโปรตีนออกมา 5 ยอด ทั้งนี้ทอกซินที่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* จะอยู่ในยอดที่ 5 ชะโปรตีนในคอลัมน์ด้วยเมธานอล รวมหลอดที่ให้ผลในการทดสอบเข้าด้วยกันและนำไปทำให้เข้มข้นโดยการระเหยภายใต้สภาวะสุญญากาศ แล้วละลายกลับด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.5 นำโปรตีนในยอดต่าง ๆ ทั้ง 5 ยอดที่ชะออกจากคอลัมน์มาทดสอบความสามารถในการฆ่าเชื้อทดสอบพบว่า เฉพาะโปรตีนในยอดที่ออกมากับการชะคอลัมน์ด้วยเมธานอลเท่านั้นที่ให้บริเวณใสรอบหลุมทดสอบ ดังแสดงในรูปที่ 3.32, 3.33 และ 3.34 ตามลำดับ

3.8.4.2 การทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ซีเอ็ม-เซฟาเด็กซ์ ซี-50 และ คอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50

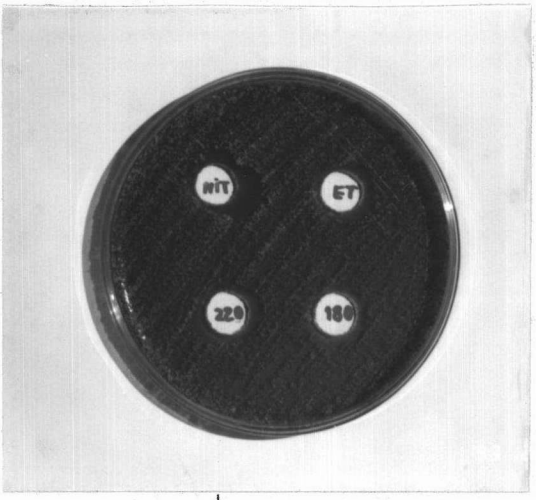
นำส่วนทอกซินซึ่งถูกชะออกจากคอลัมน์ซิลิกาเจลด้วยเมธานอล ที่ให้ผลในการฆ่าเชื้อทดสอบ และผ่านการทำให้เข้มข้นโดยการระเหยภายใต้สภาวะสุญญากาศ ซึ่งแขวนลอยอยู่ใน 0.05 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 มาทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยวิธีโครมาโตรกราฟีบนซีเอ็ม-เซฟาเด็กซ์ ซี-50 ซึ่งเป็นตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุภาคบวก (cation exchanger) ขั้นตอนนี้เพื่อกำจัดโปรตีนอื่นที่มีประจุตรงข้ามกับทอกซินออกไป และยังสามารถกำจัดโปรตีนที่มีประจุต่างกับทอกซินมาก ๆ ออกด้วย โดยใช้ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์



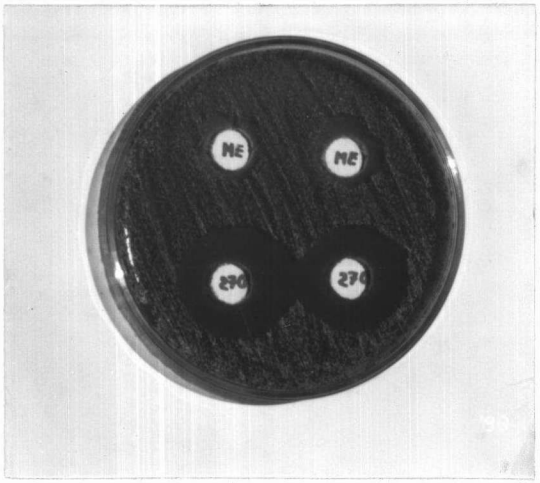
รูปที่ 3.31 การทำโครมาโตกราฟีของทอกซินที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 โดยใช้คอลัมน์ซิลิกาเจล รายละเอียดการทดลอง ดังได้กล่าวไว้ในหัวข้อ 2.10.4.1



รูปที่ 3.32



รูปที่ 3.33



รูปที่ 3.34

รูปที่ 3.32, 3.33 และ 3.34 แสดงการทดสอบความสามารถในการฆ่าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นเชื้อทดสอบของโปรตีนในยอดต่าง ๆ ที่ออกมาจากการชะคอลัมน์ด้วยบิวทานอล, อะซิโตน, เอธานอล, อะซิโตไนไทร์ และเมธานอล เมื่อทำการทดสอบโดยการสังเกตบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้นจากการดูดซึมทอกซินในวุ้นเพาะเชื้อ

BU หมายถึง หลุมควบคุมที่หยอดด้วยบิวทานอล

AC หมายถึง หลุมควบคุมที่หยอดด้วยอะซิโตน

ET หมายถึง หลุมควบคุมที่หยอดด้วยเอธานอล

NIT หมายถึง หลุมควบคุมที่หยอดด้วยอะซิโตไนไทร์

ME หมายถึง หลุมควบคุมที่หยอดด้วยเมธานอล

53, 156, 180, 220, 270 หมายถึง หลุมทดสอบที่ทำการหยอดด้วยโปรตีนที่ออกมาจากการชะคอลัมน์ด้วยบิวทานอล, อะซิโตน, เอธานอล, อะซิโตไนไทร์ และเมธานอล ตามลำดับ

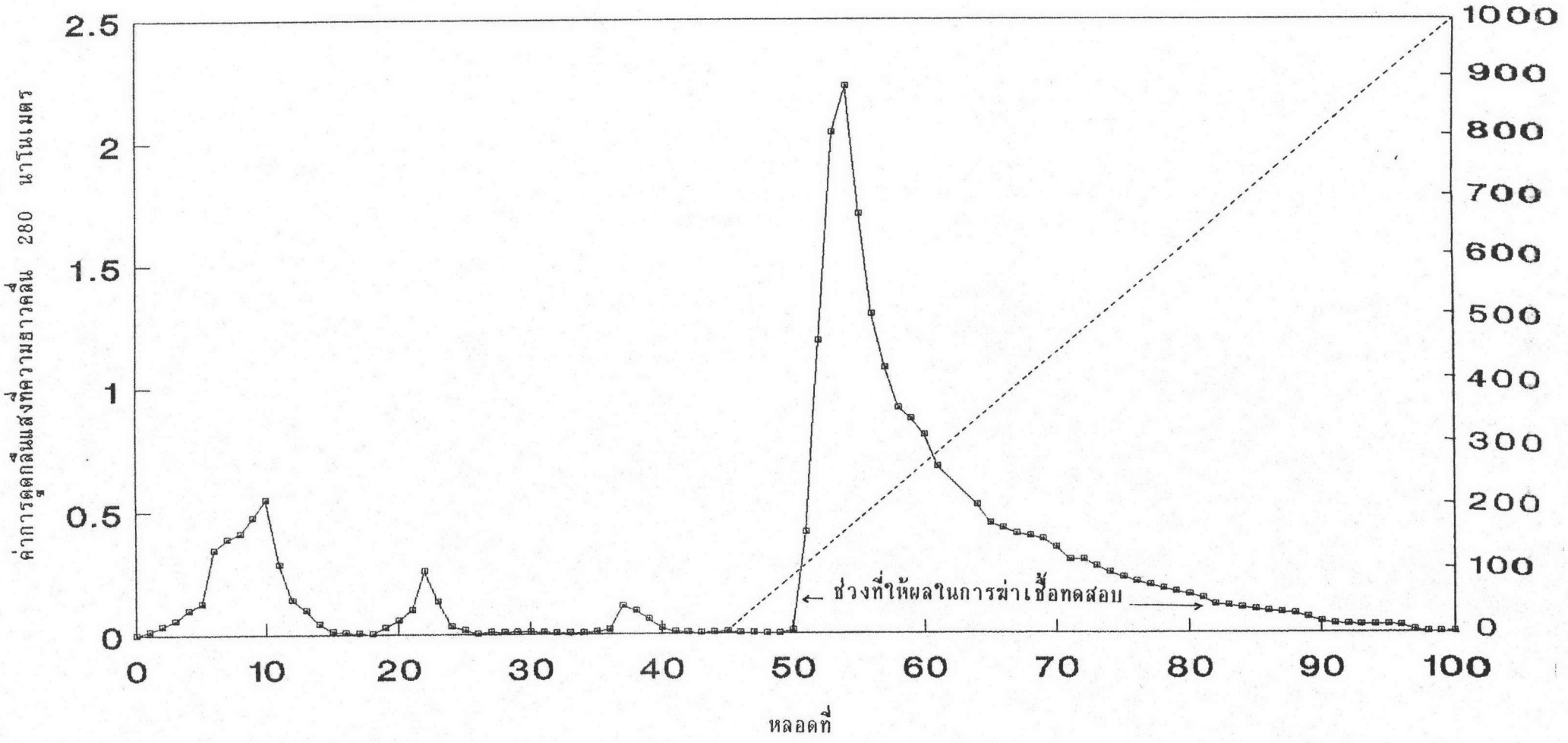
ที่ต่างกัน ตามวิธีการในข้อ 2.10.4.2 ผลการทดลองพบว่า ทอกซินที่ให้ผลในการฆ่าเชื้อทดสอบจะถูกชะออกมาจากคอลัมน์พร้อมกับโปรตีนในส่วนที่ไม่ยึดเกาะกับตัวกลาง แสดงว่า ทอกซินไม่ได้มีประจุเป็นบวก นำไปทำโครมาโตรกราฟีอีกครั้งบนดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 ซึ่งเป็นตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุภาคลบ (anion exchanger) ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 3.35 โดยพบว่าทอกซินจะถูกชะออกมาในลำดับส่วนที่ 50-100 ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 100-300 มิลลิโมลาร์ แสดงว่า ทอกซินมีประจุเป็นลบ เมื่อรวมลำดับส่วนที่ 50-100 เข้าด้วยกัน แล้วนำไปทดสอบความสามารถในการฆ่าเชื้อทดสอบพบว่า มีบริเวณใสเกิดขึ้นรอบหลุมทดสอบจริง ซึ่งเป็นการยืนยันว่าทอกซินถูกชะออกมากับโปรตีนในยอดนี้ (รูปที่ 3.36)

3.8.4.3 การทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-75

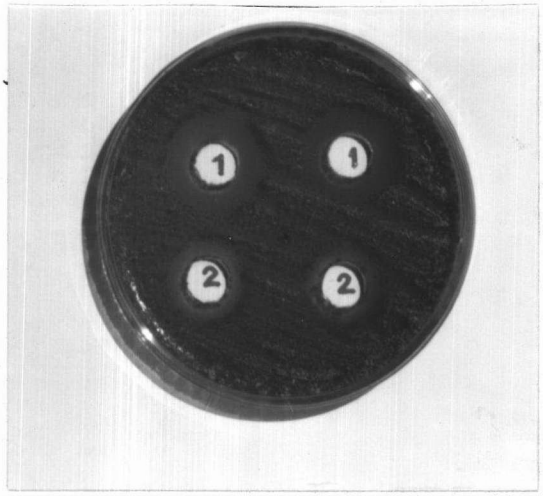
การทำทอกซินให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนนี้ อาศัยหลักการแยกโปรตีนที่มีขนาดแตกต่างจากทอกซินออกไป โดยนำมาผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-75 ดังวิธีการในข้อ 2.10.4.3 ได้ผลดังแสดงในรูป 3.37 โดยผ่านทอกซินที่ออกจากคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 ในลำดับส่วนที่ให้ผลในการฆ่าเชื้อทดสอบ ซึ่งแขวนลอยใน 0.05 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 ลงบนคอลัมน์เก็บสารละลายลำดับส่วนละ 3 มิลลิลิตร มาวัดโปรตีนและรวมหลอดที่ออกมากับโปรตีนในยอดเดียวกันเข้าด้วยกัน นำโปรตีนที่ออกมาในแต่ละยอดไปทดสอบความสามารถในการฆ่าเชื้อทดสอบบนจานเพาะเชื้อที่มีเชื้อทดสอบเจริญอยู่ พบว่าเฉพาะโปรตีนที่ออกมาในลำดับส่วนที่ 52-65 จะให้บริเวณใสรอบหลุมทดสอบ ดังแสดงในรูป 3.38

3.8.5 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของทอกซินด้วย HPLC

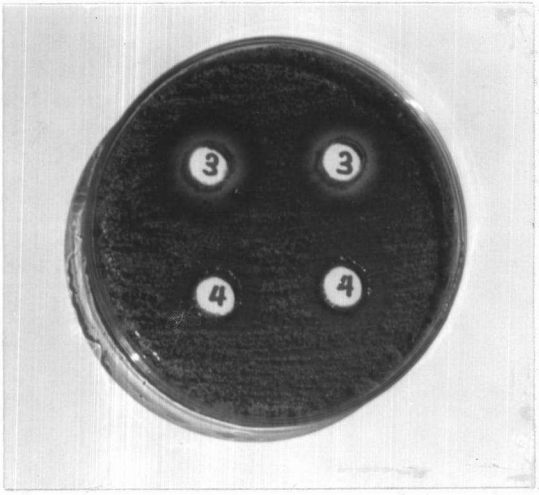
จากการวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของทอกซินก่อนและหลังการผ่านขั้นตอนในการทำให้บริสุทธิ์ด้วย HPLC พบว่า พีค (Peak) ที่ปรากฏในโครมาโตรแกรมของทอกซินก่อนการทำให้บริสุทธิ์มีจำนวนมาก (รูปที่ 3.39 A) นั่นคือมีส่วนที่เป็นของสารอื่นปะปนอยู่ จึงจำเป็นต้องนำทอกซิน



รูปที่ 3.35 การทำโครมาโตกราฟีของทอกซินที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 โดยใช้คอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 รายละเอียดการทดลองดังได้กล่าวไว้ในหัวข้อ 2.10.4.2



รูปที่ 3.36



รูปที่ 3.38

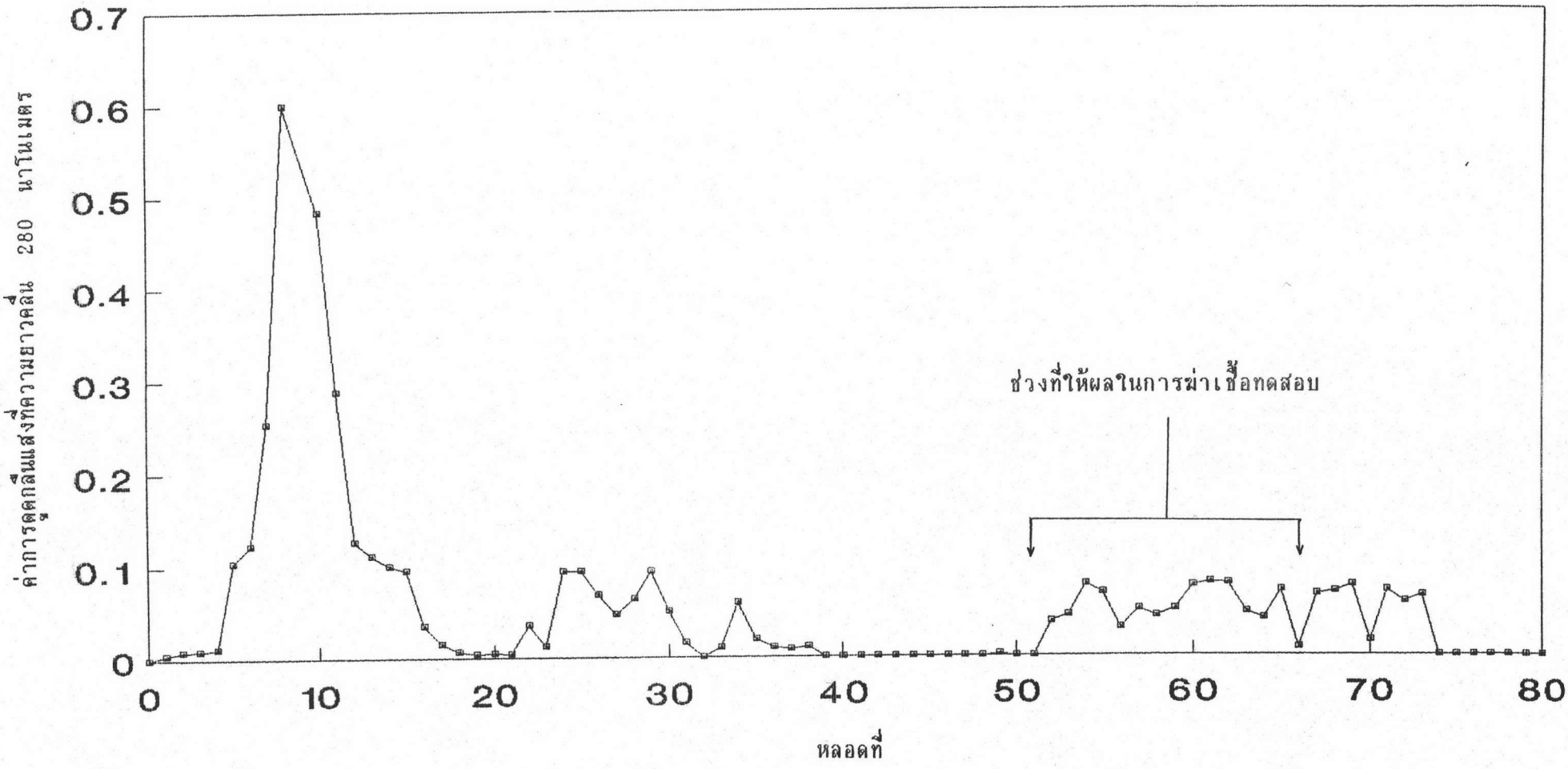
รูปที่ 3.36 และ 3.38 แสดงการทดสอบความสามารถในการฆ่าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นเชื้อทดสอบของทอกซินที่ผ่านขั้นตอนต่าง ๆ ในการทำให้บริสุทธิ์ โดยสังเกตบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้นจากการดูดซึมทอกซินในวุ้นเพาะเชื้อ

1 หมายถึง ทอกซินที่ถูกชะออกมากับโปรตีนในส่วนที่ไม่เกาะกับตัวกลาง เมื่อผ่านทอกซินลงในคอลัมน์ซีเอ็ม-เซฟาเด็กซ์ ซี-50

2 หมายถึง ทอกซินที่ถูกชะออกมากับโปรตีนในลำดับส่วนที่ 50-100 เมื่อผ่านทอกซินลงในคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50

3 หมายถึง ทอกซินที่ถูกชะออกมากับโปรตีนในลำดับส่วนที่ 52-65 เมื่อผ่านทอกซินลงในคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-75

4 หมายถึง หลุมควบคุมที่ไม่มีการเติมทอกซิน



รูปที่ 3.37 การทำโครมาโตกราฟีของทอกซินที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 โดยใช้คอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-75 รายละเอียดการทดลองดังได้กล่าวไว้ในหัวข้อ 2.10.4.3

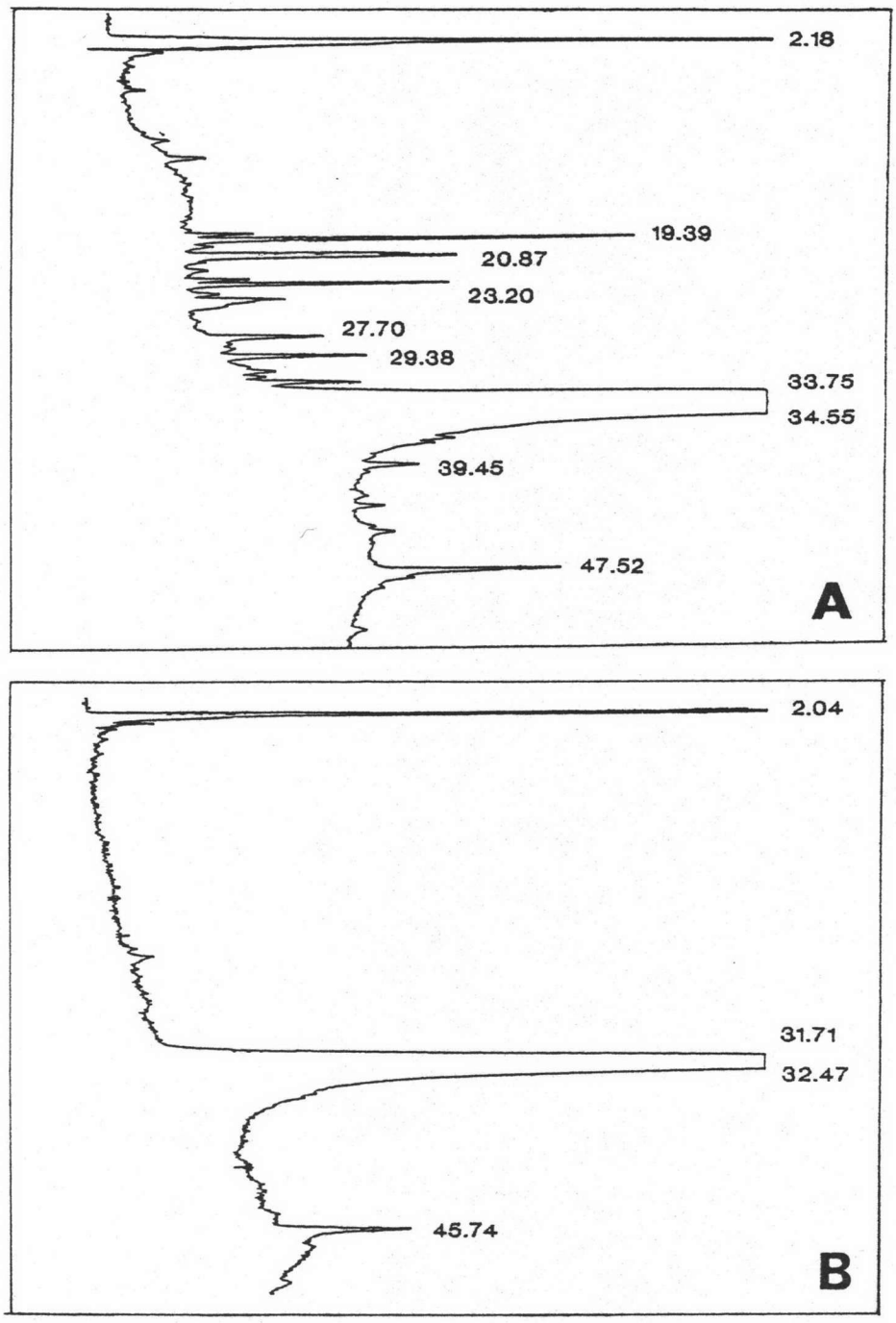
มาผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยวิธีโครมาโตรกราฟี และเมื่อนำทอกซินที่ได้จากการผ่านขั้นตอนเหล่านี้ไปตรวจสอบความบริสุทธิ์อีกครั้งด้วย HPLC พบว่า พีคที่ปรากฏในโครมาโตรแกรมมีจำนวนลดลง (รูปที่ 3.39 B) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าทอกซินในลำดับสุดท้ายที่ได้จากการผ่านคอลัมน์ต่าง ๆ มีความบริสุทธิ์สูงขึ้น

3.8.6 การหาน้ำหนักโมเลกุลของทอกซินโดยวิธีอิเลคโตรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจล

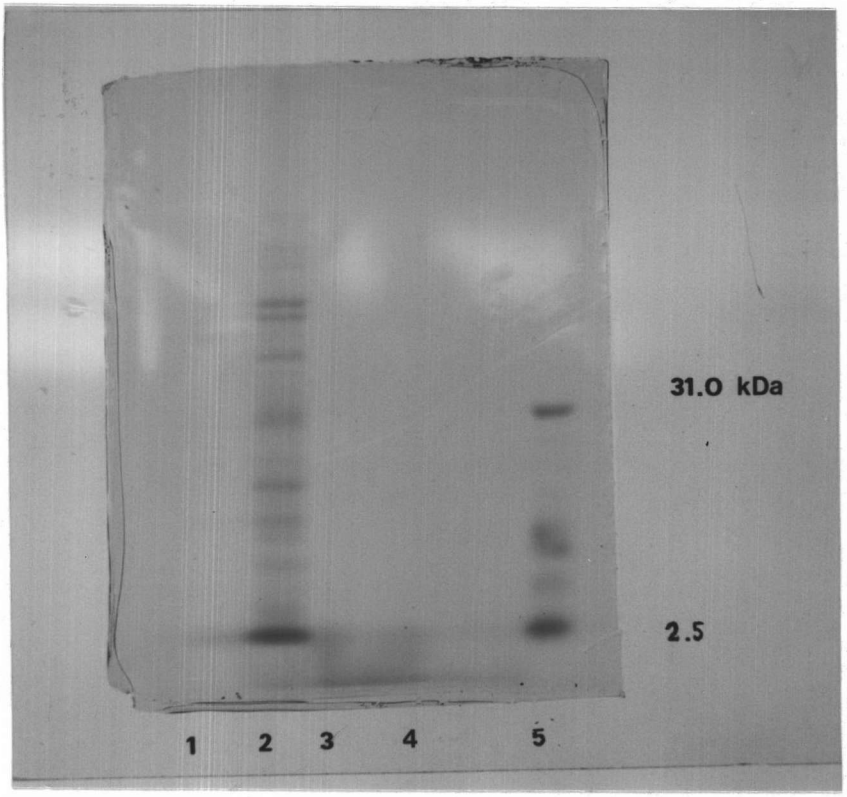
นำทอกซินในขั้นตอนต่าง ๆ ของการทำให้บริสุทธิ์ มาศึกษาองค์ประกอบของหน่วยย่อยของโปรตีนโดยการทำอิเลคโตรโฟริซิสบน SDS โพลีอะคริลาไมด์เจล ดังวิธีการในข้อ 2.10.6 ได้ผลการทดลองในรูปที่ 3.40 และ 3.41 พบว่า เมื่อเปรียบเทียบทอกซินที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 ในลำดับแรกก่อนการทำให้บริสุทธิ์และลำดับสุดท้ายที่ได้จากการผ่านคอลัมน์ต่าง ๆ จำนวนแถบโปรตีนที่ติดสีจะลดลงเหลือเพียง 1 แถบ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 2,500 ดาลตัน เมื่อเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (รูปที่ 3.42) และประกอบไปด้วยโพลีเปปไทด์สายเดี่ยวที่ไม่มีหน่วยย่อย

3.9 การตรวจสอบชนิดของจุลินทรีย์ทางอนุกรมวิธาน

จากการตรวจสอบชนิดของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการออกฤทธิ์ฆ่า *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นเชื้อยีสต์ทดสอบ พบว่า ลักษณะโคโลนีบนอาหารนิวเตรียนท์อการ์มีสีขาวขุ่น นูน ขอบโคโลนีเป็นรอยหยัก เมื่อย้อมแกรมและตรวจดูลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จะเห็นเซลติดสีน้ำเงินของแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อนมีเอนโดสปอร์รูปไข่อยู่บริเวณกลางเซล เมื่อทำการวัดขนาดของเซลโดยใช้ stage และ occular micrometer ภายใต้กล้องพบว่ามีขนาดประมาณ 0.78x1.89 ไมโครเมตร มีคุณสมบัติในการย่อยเคซิน, แป้งและใช้ซิเตรท ให้ผลบวกเมื่อทำการทดสอบคาตาเลส (Catalase

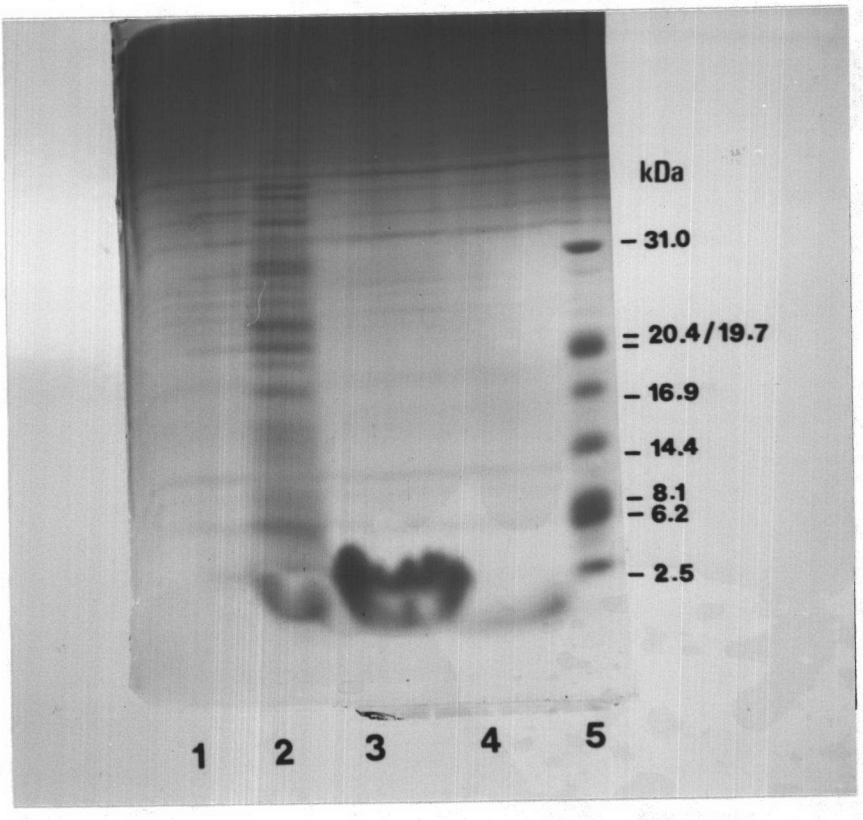


รูปที่ 3.39 การเปรียบเทียบ HPLC โครมาโตแกรม ของทอกซินที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 ก่อนและหลังผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ โดยวิธีโครมาโตกราฟี (รูป A และ B ตามลำดับ)



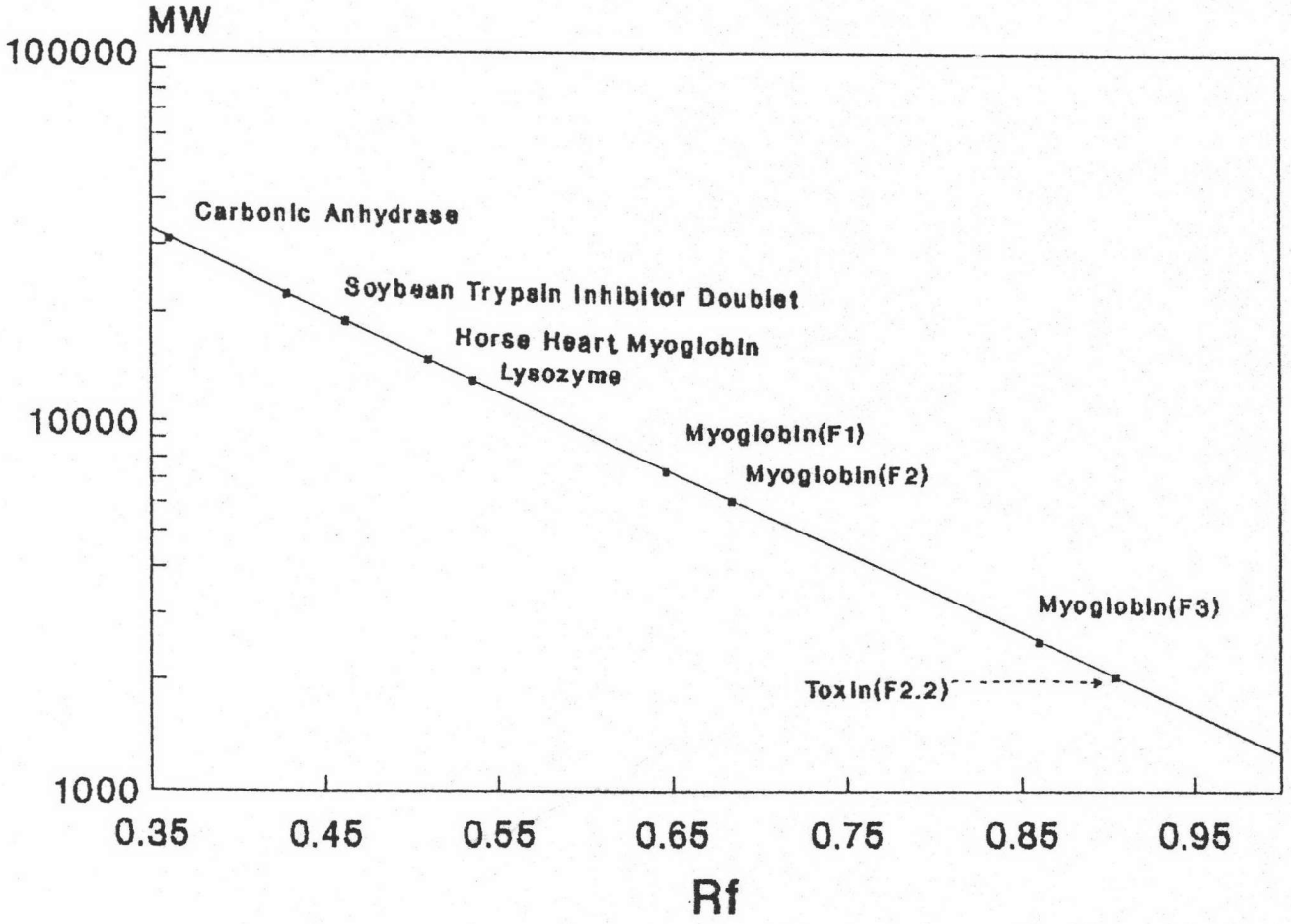
รูปที่ 3.40 โซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟริซิสของทอกซินที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 ในขั้นตอนต่าง ๆ ของการทำให้บริสุทธิ์ และโปรตีนมาตรฐาน เมื่อเจลมีความเข้มข้น 16.5 เปอร์เซนต์

1. ส่วนน้ำใสจากการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 (ปริมาณโปรตีน 384 ไมโครกรัม)
2. สารละลายตะกอนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยกรดไฮโดรคลอริก (ปริมาณโปรตีน 2,022.5 ไมโครกรัม)
3. ทอกซินที่ผ่านออกจากคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 (ปริมาณโปรตีน 1,554.5 ไมโครกรัม)
4. ทอกซินที่ผ่านออกจากคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-75 (ปริมาณโปรตีน 307.1 ไมโครกรัม)



รูปที่ 3.41 โซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟริซิสของทอกซินที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 ในขั้นตอนต่าง ๆ ของการทำให้บริสุทธิ์ และโปรตีนมาตรฐาน เมื่อเจลมีความเข้มข้น 20 เปอร์เซนต์

1. ส่วนน้ำใสจากการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 (ปริมาณโปรตีน 768 ไมโครกรัม)
2. สารละลายตะกอนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยกรดไฮโดรคลอริก (ปริมาณโปรตีน 4,045 ไมโครกรัม)
3. ทอกซินที่ผ่านออกจากคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 (ปริมาณโปรตีน 3,109 ไมโครกรัม)
4. ทอกซินที่ผ่านออกจากคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-75 (ปริมาณโปรตีน 614.2 ไมโครกรัม)



รูปที่ 3.42 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐาน และลอการิธึมของน้ำหนักโมเลกุล โดยการทำโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟริซิส ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.10.6

test) ,การทดสอบวี-พี (V-P test) แต่ให้ผลลบเมื่อทำการทดสอบอินโดล (Indole test) ผลิตกรดออกมาเมื่อเลี้ยงในเบซัลมีเดียมที่มีน้ำตาลกลูโคส , ฟรุกโตส, แมนนิทอล, ไซโลส และอลาบิโนส สามารถเจริญได้ในอาหารนิวเตรียนท์บรอทที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.7 , 6.8 และในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 2%, 5%, 7% แต่ไม่สามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นเกลือ 10% ดังแสดงในตารางที่ 3.5 และ 3.6

ตารางที่ 3.5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics) ของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2

ลักษณะ	รายละเอียด
โคโลนีบนนิวเตรียนท์ อการ์	สีขาวขุ่น นูนเป็นมัน ขอบหยัก มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3-5 มิลลิเมตร
เซลล์ : รูปร่าง	เป็นท่อนตรง
: ขนาด	0.78x1.89 ไมโครเมตร
: การย้อมสีแกรมส์	ติดสีน้ำเงิน (positive)
เอนโดสปอร์ : รูปร่าง	เป็นรูปไข่
: ตำแหน่ง	กึ่งกลางเซลล์

ตารางที่ 3.6 ลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมี (Physiological and Biochemical characteristics) ของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 เมื่อเปรียบเทียบกับ *Bacillus licheniformis* จาก Bergey's manual of systematic bacteriology. (Sneath และคณะ ,1986)

ลักษณะที่ศึกษา	ผลการศึกษา	
	Bacillus sp. สายพันธุ์ F2.2	*Bacillus licheniformis*
การทดสอบคาตาเลส	+	+
การทดสอบวี-พี	+	+
การทดสอบอินโดล	-	-
การผลิตกรดจากน้ำตาลกลูโคส	+	+
ฟรุกโตส	+	+
แมนนิทอล	+	+
ไซโลส	+	+
อลาบิโนส	+	+
การย่อยเคซีน	+	+
การย่อยแป้ง	+	+
การใช้ซิเตรท	+	+
การเจริญในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ 2%	+	+
5%	+	+
7%	+	+
10%	-	ND

ลักษณะที่ศึกษา	ผลการศึกษา	
	Bacillus sp. สายพันธุ์ F2.2	*Bacillus licheniformis*
การเจริญในนิวเตรียนท์บรอท pH 5.7	+	+
6.8	+	+
การเจริญในแอนแอโรบิคอการ์	+	+

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่ให้ผลในการทดสอบ

\+ หมายถึง ให้ผลในการทดสอบ

ND หมายถึง ไม่มีข้อมูลในการรายงาน

จากผลการศึกษาจากตารางที่ 3.5 และ 3.6 พิจารณาได้ว่า *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 มีสมบัติที่เหมือนกับ *Bacillus licheniformis* (Sneath และคณะ, 1986) ในการทดสอบต่าง ๆ ที่ทำ ดังนั้นเชื้อนี้น่าจะเป็น *Bacillus licheniformis*