

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
เงินอุดหนุนงบประมาณแผ่นดิน
รายงานผลการวิจัย

การทำบริสุทธิ์สารต่อต้านจุลชีพ จาก *Bacillus* S11

โดย
สิริรัตน์ เร่งพิทักษ์

ประจำปีงบประมาณ 2541

ยพ
วท 15
009874



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
เงินอุดหนุนงบประมาณแผ่นดิน
รายงานผลการวิจัย

การทำบริสุทธิ์สารต่อต้านจุลชีพ จาก *Bacillus* S11

โดย
ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์

31 สิงหาคม 2542

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

24 พ.ค. 2543

I18656688

Chulalongkorn University

The Royal Thai Government Fund

Research Report

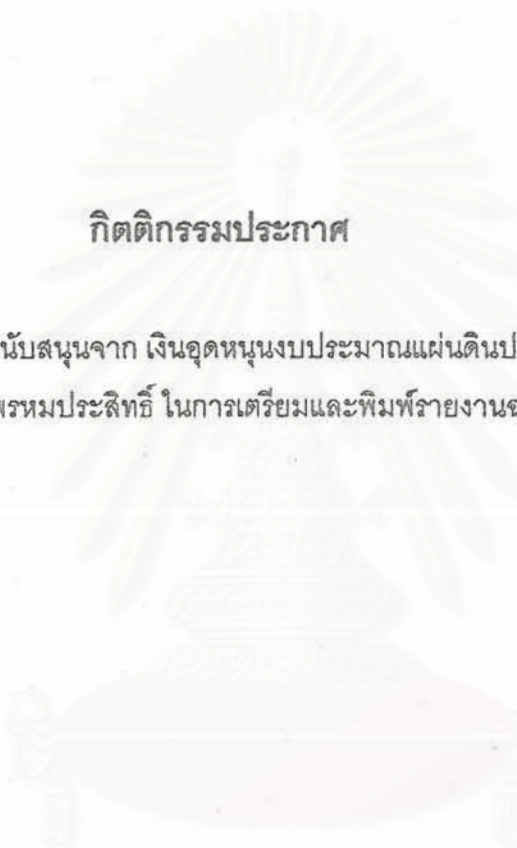
Purification of Antimicrobial Substance from *Bacillus* S11

by

Sirirat Rengpipat

August 31, 1999

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจาก เงินอุดหนุนงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2542 ผู้วิจัย
ขอขอบคุณ นางสาวนิโลบล พรหมประสิทธิ์ ในการเตรียมและพิมพ์รายงานฉบับนี้เป็นอย่างยิ่ง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

Bacillus sp. S11 ที่ใช้เป็นโพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำสามารถสร้างสารต้านจุลชีพได้ในระยะ log phase ของการเจริญ ภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการสร้างสารนี้คือ การใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย สารสกัดจากยีสต์ 2 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดโทแทสเซียม ฟอสเฟต 0.25 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นที่ 7.0 ใช้ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้นที่ 2.0 % (ปริมาตร/ปริมาตร) อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง 40 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที สารต้านจุลชีพที่ได้ถูกทำให้บริสุทธิ์ตามขั้นตอนดังนี้ ตกตะกอนด้วย 0-30 % แอมโมเนียม ซัลเฟต ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-50 และผ่าน DEAE- Sephadex ให้ค่า specific activity เพิ่มขึ้นจากที่มีในน้ำหมัก 29.10 AU/mg protein เป็น 52.63, 75.36 และ 95.23 AU/mg protein ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE พบว่าสารนี้มีมวลโมเลกุลประมาณ 3.5 kDa และมี lipid เป็นองค์ประกอบ สารนี้สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 70 และ 80 องศาเซลเซียส ได้ 15 นาทีและถูกทำลายหมดภายในเวลา 60 นาที เมื่อเก็บไว้ที่ 100 องศาเซลเซียส แอคติวิตีของสารหมดไปภายใน 10 นาที และตรวจไม่พบแอคติวิตีของสารนี้หลังผ่านการ ึ่งฆ่าเชื้อ 121 องศาเซลเซียส 20 นาที สารนี้ให้แอคติวิตีได้ในช่วง pH ตั้งแต่ 3 -10 และปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 0 - 5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ไม่มีผลต่อแอคติวิตี ภายหลังจากการบำบัดด้วย เอนไซม์ protease, α -amylase และ lipase พบว่า protease ทำให้แอคติวิตีของสารนี้ลดลง ในขณะที่เอนไซม์อีกสองชนิดไม่มีผลต่อแอคติวิตีของสารต้านจุลชีพนี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Abstract

Bacillus sp. S11, used as probiotic in *Penaeus monodon*, produced antimicrobial substance in log phase of growth cycle. In this research, the optimum conditions for production of this antimicrobial substance are medium containing 2% (w/v) yeast extract, 0.25% (w/v) dipotassium phosphate; pH 7.0, 2.0% (v/v) inoculum, and aeration at 200 rpm; 40 ° C. The purification of this substance was performed by the steps of precipitating with 0 – 30% ammonium sulfate, running through Sephadex G-50 column chromatography and DEAE-Sephadex column chromatography. The specific activity of this substance increased from 29.10 AU/mg protein of cultured broth to 52.63, 75.36 and 95.23 AU/ mg protein, in each step, respectively. The results from SDS-PAGE showed that this molecular weight was approximately 3.5 kDa and consisted of lipid. The antimicrobial activity decreased after incubating at 70 and 80 ° C for 15 minutes and could not be detected after 60 minutes. Its activity also disappeared after incubating at 100 ° C for 10 minutes or autoclaving at 121 ° C for 20 minutes. Antimicrobial substance showed its activity at the conditions of wide range of pH (3-10) and 0 – 5 % (w/v) sodium chloride. Protease could reduce the activity of the substance whereas no effect of α -amylase and lipase have been detected.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	i
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	iii
สารบัญ.....	iv
รายการตารางประกอบ.....	v
รายการภาพประกอบ.....	vi
รายการสัญลักษณ์.....	viii
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
3. วิธีการวิจัย.....	6
4. ผลการวิจัย.....	11
5. การอภิปรายผล.....	51
6. ข้อเสนอสรุป.....	54
7. ข้อเสนอแนะ.....	55
ส่วนอ้างอิง.....	56
ภาคผนวก.....	61

เลขที่ กฟ
 " กท 15
 เลขทะเบียน 009874
 วัน,เดือน,ปี 21 ม.ค. 43

รายการตารางประกอบ

ตารางที่	หน้า
1. ปริมาณโปรตีนในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีการแปรผันปริมาณกลูโคส.....	14
2. ปริมาณโปรตีนในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีการแปรผันปริมาณสารสกัดจายีสต์.....	19
3. ปริมาณโปรตีนในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีการแปรผันปริมาณโซเดียมคลอไรด์.....	24
4. ปริมาณโปรตีนในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีการแปรผันปริมาณหัวเชื้อ.....	29
5. ปริมาณโปรตีนในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีการแปรผันอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง.....	34
6. ปริมาณโปรตีนในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีการแปรผันพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	38
7. ปริมาณโปรตีนในตัวอย่างของการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต.....	40
8. Specific activity ของสารต้านจุลชีพเมื่อผ่านการทำให้บริสุทธิ์	43
9. ผลของเอนไซม์ต่อแอกติวิตีของสารต้านจุลชีพ.....	50

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการภาพประกอบ

รูปที่	หน้า
1. การเจริญของ <i>Bacillus</i> sp. S11 เมื่อเพาะเลี้ยงโดยการแปรผันปริมาณกลูโคส	11
2. การเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอช เมื่อเพาะเลี้ยงโดยการแปรผันปริมาณกลูโคส	12
3. แอคติวิตีของสารต้านจุลชีพเมื่อเพาะเลี้ยงโดยการแปรผันปริมาณกลูโคส	13
4. การเจริญของ <i>Bacillus</i> sp. S11 เมื่อเพาะเลี้ยงโดยการแปรผันปริมาณสารสกัดจากยีสต์ .	16
5. การเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอช เมื่อเพาะเลี้ยงโดยการแปรผันปริมาณสารสกัดจากยีสต์	17
6. แอคติวิตีของสารต้านจุลชีพเมื่อเพาะเลี้ยงโดยการแปรผันปริมาณสารสกัดจากยีสต์	18
7. การเจริญของ <i>Bacillus</i> sp. S11 เมื่อเพาะเลี้ยงโดยการแปรผันปริมาณโซเดียมคลอไรด์.....	21
8. การเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอช เมื่อเพาะเลี้ยงโดยการแปรผันปริมาณโซเดียมคลอไรด์	22
9. แอคติวิตีของสารต้านจุลชีพเมื่อเพาะเลี้ยงโดยการแปรผันปริมาณโซเดียมคลอไรด์	23
10. การเจริญของ <i>Bacillus</i> sp. S11 เมื่อเพาะเลี้ยงโดยการแปรผันปริมาณหัวเชื้อ	26
11. การเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอช เมื่อเพาะเลี้ยงโดยการแปรผันปริมาณหัวเชื้อ	27
12. แอคติวิตีของสารต้านจุลชีพเมื่อเพาะเลี้ยงโดยการแปรผันปริมาณหัวเชื้อ	28
13. การเจริญของ <i>Bacillus</i> sp. S11 เมื่อเพาะเลี้ยงโดยการแปรผันอุณหภูมิ	31
14. การเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอช เมื่อเพาะเลี้ยงโดยการแปรผันอุณหภูมิ	32
15. แอคติวิตีของสารต้านจุลชีพเมื่อเพาะเลี้ยงโดยการแปรผันอุณหภูมิ	33
16. การเจริญของ <i>Bacillus</i> sp. S11 เมื่อเพาะเลี้ยงโดยการแปรผันพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อ ...	35
17. การเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอช เมื่อเพาะเลี้ยงโดยการแปรผันพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อ	36
18. แอคติวิตีของสารต้านจุลชีพเมื่อเพาะเลี้ยงโดยการแปรผันพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อ	37
19. แอคติวิตีของสารต้านจุลชีพที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ในช่วงต่างๆ	40
20. Protein profile ของ gel permeable chromatography	41
21. Protein profile ของ ion exchange chromatography	42
22. Polyacrylamide Gel เมื่อย้อมด้วย Coomassie Blue G-250	44
23. Polyacrylamide Gel เมื่อย้อมเพื่อตรวจหา glycoprotein	45
24. Polyacrylamide Gel เมื่อย้อมเพื่อตรวจหา lipoprotein	46

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
25. ผลของอุณหภูมิต่อแอกติวิตีของสารต้านจุลชีพ	47
26. ผลของพีเอชต่อแอกติวิตีของสารต้านจุลชีพ	48
27. ผลของปริมาณโซเดียมคลอไรด์ต่อแอกติวิตีของสารต้านจุลชีพ	49

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการภาพสัญลักษณ์และคำย่อ

มม.	=	มิลลิเมตร
มล.	=	มิลลิลิตร
AU	=	Arbitrary Unit
°C	=	องศาเซลเซียส
g/l	=	กรัมต่อลิตร
mg	=	มิลลิกรัม
mg/ml	=	มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
mm	=	มิลลิเมตร
MW	=	มวลโมเลกุล
w/v	=	น้ำหนัก/ปริมาตร
v/v	=	ปริมาตร/ปริมาตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันพบว่าในวงการเกษตรกรรมการเลี้ยงสัตว์ นิยมกลับมาใช้โพรไบโอติกเพื่อลดปัญหาการใช้สารปฏิชีวนะ โพรไบโอติกดังกล่าวได้แก่ จุลินทรีย์ที่มีชีวิตอยู่ในสกุล *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* sp., *Bifidobacterium* spp., *Enterococcus* sp., *Bacillus subtilis*, *Clostridium butyricum*, *Escherichia coli*, Yeast และ Mixed culture ที่นำมาเสริมในอาหารสัตว์เพื่อให้เกิดผลความสมดุลในระบบทางเดินอาหาร ลักษณะของโพรไบโอติกที่ดีควรเป็นสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสัตว์ เช่น เพิ่มการเจริญเติบโต หรือต้านการเกิดโรค จุลินทรีย์ที่ใช้ไม่ก่อให้เกิดโรคขณะที่ให้แก่สัตว์ ต้องเป็นเซลล์ที่มีชีวิต เพิ่มจำนวนได้มาก สามารถมีชีวิตอยู่รอดในระบบทางเดินอาหาร และต้องเป็นจุลินทรีย์ที่คงทน มีชีวิตอยู่รอดในสภาพการเก็บรักษา รวมทั้งขณะทำการทดลอง

ในปี 1977 Baird ใช้ *Lactobacillus* sp. ที่มีสมบัติเป็นโพรไบโอติกเสริมในอาหารสัตว์แทนสารปฏิชีวนะในการเลี้ยงสุกร ผลการทดลองพบว่ากลุ่มที่ได้รับโพรไบโอติกมีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น Han และคณะ (1984a, 1984b, 1984c) ใช้ *Lactobacillus sporogenes* และ *Clostridium butyricum* เสริมในอาหารไก่และหุ้พบว่าไก่และหุ้มีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นและลดอัตราการติดเชื้อง่ายโรค *Staphylococcus* sp. และ Coliform bacteria นอกจากนี้ ฐิติพงษ์ ธนะรัชติการนทร์ ได้แสดงให้เห็นว่าการใช้ *Lactobacillus* spp. เป็นโพรไบโอติกในการเลี้ยงไก่ ทำให้ไก่มีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตเร็วกว่าปกติ และสามารถต้านการติดเชื้อ *Salmonella* Typhimurium โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลง Food conversion ratio

เป็นที่น่าสังเกตว่าการใช้โพรไบโอติกในสัตว์น้ำมีน้อยมาก ขณะนี้ไม่มีรายงานเกี่ยวกับการใช้โพรไบโอติกในอาหารกุ้ง ทั้งที่กุ้งเป็นสินค้าที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย (ปริมาณส่งออกปี พ.ศ. 2538 จำนวน 202,000 ตัน) โดยเฉพาะกุ้งกุลาดำ (ราคา 180 - 200 บาทต่อกิโลกรัม) ซึ่งปัจจุบันประสบปัญหาการติดเชื้อโรคหัวเหลือง โรคตัวแดงจุดขาว โรคเรืองแสง โรคเสียน้ำ ทำให้กุ้งกุลาดำตายเป็นจำนวนมาก การรักษาส่วนใหญ่ผู้เลี้ยงจะใช้สารปฏิชีวนะซึ่งก่อให้เกิดปัญหาการดื้อยาและการตกค้างในเนื้อกุ้งและสิ่งแวดล้อม

ผลงานวิจัยที่ได้ทำมาแล้วนั้นได้คัดเลือกแบคทีเรียที่มีสมบัติเป็นโพรไบโอติกจากลำไส้กุ้ง แม่พันธุ์ที่จับได้จากอ่าวไทย เพื่อนำมาใช้เสริมในอาหารกุ้ง หลังจากทำการทดสอบทางจุลชีววิทยาสามารถจัดกลุ่มแบคทีเรียดังกล่าวในสกุล *Bacillus* sp. ซึ่งสามารถสร้างสารต่อต้านจุลินทรีย์ที่มีผลยับยั้ง

การเจริญของเชื้อก่อโรคในกุ้ง ในการศึกษาครั้งนี้ต้องการทำบริสุทธิ์สารต่อต้านจุลชีพที่แยกได้จาก *Bacillus* S11 เพื่อนำไปศึกษาให้ทราบถึงชนิดของสารประกอบดังกล่าว

วัตถุประสงค์ของโครงการ

ทำบริสุทธิ์บางส่วนของสารต่อต้านจุลชีพ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เพื่อทราบชนิดของสารต่อต้านจุลชีพว่าประกอบด้วยสารประเภทใด



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กุ้งกุลาดำแช่แข็ง เป็นสินค้าที่ทำรายได้ให้ประเทศไทยอย่างมากโดยมีมูลค่าการส่งออกอยู่ในอันดับที่ 8 ของสินค้าส่งออกที่ทำรายได้เข้าประเทศในปี 2540 คิดเป็นมูลค่า 47,184.90 ล้านบาท ปริมาณการส่งออก 137,082 เมตริกตัน ถึงแม้ว่าประเทศไทยจะมีปริมาณการส่งออกรวมในสองตลาดหลัก (สหรัฐอเมริกาและญี่ปุ่น) เป็นอันดับที่ 1 แต่พบว่าปริมาณการส่งออกลดลงถึง 15% เมื่อเทียบกับปริมาณการส่งออกในปี 2539 ซึ่งมีปริมาณการส่งออก 161,486 เมตริกตัน (กรมเศรษฐกิจการพาณิชย์, 2541) ดังนั้นประเทศไทยจึงต้องมีการพัฒนาอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งกุลาดำอย่างมาก เพื่อให้ได้ผลผลิตจากการเลี้ยงกุ้งที่มีปริมาณและคุณภาพเพียงพอแก่การแข่งขันในตลาดโลก และเพื่อรักษารายได้หลักของประเทศไว้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อมีการจำกัดพื้นที่การเลี้ยงกุ้งกุลาดำให้อยู่เฉพาะเขตพื้นที่น้ำเค็ม

ปัญหาหนึ่งในการพัฒนาอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ คือ การจัดการโรคของกุ้งกุลาดำ ซึ่งการป้องกันโรคจะทำได้ง่ายกว่าการรักษาโรค ในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำสมัยเริ่มต้นมีการใช้สารปฏิชีวนะ ในการป้องกันโรคติดเชื้อ ผลที่ตามมาจากการใช้สารปฏิชีวนะที่พบมากคือ การตกค้างในสิ่งแวดล้อมและการตกค้างในเนื้อกุ้ง ส่งผลให้ได้รับการปฏิเสธการนำเข้าจากประเทศที่เป็นตลาดสำคัญ เช่น ญี่ปุ่น (คมสัน สีสาคะหกิจ, 2539) ดังนั้น เพื่อไม่ให้เกิดปัญหาสารปฏิชีวนะตกค้าง แนวทางการป้องกันโรคในสัตว์น้ำจึงเปลี่ยนไปสู่การใช้สารกระตุ้นภูมิ (Immunostimulants) (Siwicki และคณะ, 1994) ที่มีผลต่อการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันที่ตอบสนองโดยเซลล์ (Cellular immune response) ซึ่งทำให้เกิดกระบวนการต่างๆ เช่น phagocytosis, hemocytosis, coagulation และ encapsulation และระบบภูมิคุ้มกันที่ตอบสนองโดยสารน้ำ (Humoral immune response) ซึ่งได้แก่ การสังเคราะห์ agglutinins lysins precipitins และ bactericidin เป็นต้น สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่ใช้กันในสัตว์น้ำ และสัตว์อื่น ๆ ได้แก่ trace minerals วิตามินรวม และสารธรรมชาติจากพืช ด้วง และจุลินทรีย์ ดังตัวอย่างเช่น การใช้ β -glucan, lipopolysaccharides (LPS) กระตุ้น phagocytosis และระบบเอนไซม์ prophenoloxidase (proPO) ในกุ้งสีน้ำตาล (*Penaeus californiensis*) (Vargas - Albores, 1995) การใช้แบคทีเรีย EMB-1 ในรูปเซลล์ที่มีชีวิตและถูกฆ่าด้วยฟอร์มาลิน 0.5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ฉีดเข้าตัวกุ้ง *Panulirus argus* เพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยการสร้างสารที่มีฤทธิ์ทำลายแบคทีเรีย (bactericidin) ในเลือดกุ้ง (Evans และคณะ, 1968 และ 1969) การใช้ *Pseudomonas perolans* ที่ตายแล้วกระตุ้นฤทธิ์การทำลายแบคทีเรียในน้ำเลือดกุ้งมังกร (*Homorus americanus*) (Stewart และ Zwicker, 1972)

อย่างไรก็ตาม การศึกษาการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำยังมีไม่มากนัก โดยในปี 1991 Itami และคณะ พบว่าอัตราการรอดชีวิตของลูกกุ้งกุลาดำ สูงขึ้น เมื่อใช้ *Vibrio* sp. ที่ฆ่าด้วยฟอร์มาลิน ผสมอาหารให้ลูกกุ้งในรูปแบบ microencapsule ต่อมาในปี 1995 Sritunyalucksana พบว่าการใช้ 0.4% peptidoglycan และ 0.002% lipopolysaccharides สามารถกระตุ้นเอนไซม์ phenoloxidase ในหลอดทดลองได้ ส่วน Sung, Yang และ Song (1996) ใช้เซลล์ *Vibrio* sp. ที่ทำให้ตายด้วยความร้อน หรือ β -glucan หรือ zymosan กระตุ้นฤทธิ์การทำลายแบคทีเรียในเลือดกุ้งกุลาดำ (*in vivo*) จันทนา นิธิเมธาโชค (2539) รายงานว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับ *Clostridium butyricum* ที่ทำให้ตายด้วยฟอร์มาลินเสริมลงในอาหาร มีความต้านทานเพิ่มขึ้นต่อการเกิดโรคจากการได้รับเชื้อ *V. harveyi* และวรรณิภา เพ็ญภักตร์ (2539) นำโพรไบโอติกมาเสริมในอาหารกุ้งเป็นครั้งแรก โดยใช้ *Bacillus* sp. S11 ซึ่งทำหน้าที่เร่งการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำและเพิ่มความต้านทานการติดโรคจาก *V. harveyi* ซึ่งอาจเป็นผลจากกุ้งมีภูมิคุ้มกันที่ดีจากการได้รับโพรไบโอติก

โดยทั่วไป จุลินทรีย์บางชนิดจะสร้างสารที่ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ชนิดนั้นเองและจุลินทรีย์อื่นๆ (Jack, Tagg และ Ray, 1995) สารเหล่านั้นได้แก่

1. Toxins เช่น cholera toxins
2. Bacteriolytic enzymes เช่น lysostaphin, phospholipase A และ hemolysins
3. By-products ของ primary metabolic pathways เช่น กรดอินทรีย์ แอมโมเนีย ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นต้น
4. Antibiotic substances เป็นสารที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นโดยใช้ multienzyme complexes ซึ่งไม่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนผ่านไรโบโซม (ribosomal protein synthesis)
5. Other antibiotics ได้แก่ bacteriocins และ bacteriocin - like molecules ซึ่งสังเคราะห์ส่วนที่เป็นเปปไทด์หรือโปรตีนบนไรโบโซม (ribosomal protein synthesis)

แบคทีริโอซินทุกชนิด จะประกอบด้วยส่วนที่เป็นโปรตีนหรือเปปไทด์ บางชนิดประกอบด้วยการรวมตัวของโปรตีนต่างชนิดกัน (Allison และคณะ, 1994; Nissen-Meyer และคณะ, 1992; Van Belkum และคณะ, 1991) บางชนิดมีส่วนประกอบของโปรตีนหรือเปปไทด์กับคาร์โบไฮเดรตหรือไขมัน (Jimenez-Diaz และคณะ, 1993; Lewus และคณะ, 1992) แบคทีริโอซินที่พบในพวกแบคทีเรียแกรมบวก จึงพบได้ทั้งที่มีมวลโมเลกุลมาก (high-molecular-weight) (Joerger และ Klaenhammer, 1986; Toba และคณะ, 1991; Vaughan และคณะ, 1992) และพวกที่มีมวลโมเลกุลน้อย (low-molecular-weight) เช่น พวก lantibiotics (Klaenhammer, 1993), cerein (Naclerio และคณะ, 1993) เป็นต้น

แบคทีเรียที่มีฤทธิ์ในการฆ่าหรือทำลายแบคทีเรียที่มีภูมิรับไว (Susceptible bacteria) และจำเพาะต่อบริเวณรับแบคทีเรีย (Bacteriocin receptor) บนเซลล์แบคทีเรีย มีผลยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มใกล้เคียงกัน (Tagg, Dajani และ Wannamaker, 1976; Klaenhammer, 1988)

แบคทีเรียถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารอย่างแพร่หลายมานาน ตัวอย่างเช่น การใช้ nisin ที่ผลิตได้จาก *Lactococcus lactis* เป็นสารถนอมอาหารโดยเฉพาะอย่างยิ่งในผลิตภัณฑ์นม ซึ่งไม่มีผลข้างเคียงของการใช้ และจัดอยู่ใน GRAS (Generally Recognized As Safe) (Rogers, 1928; Gross และ Morell, 1971; Hurst, 1981) *Bacillus* sp. มีการสร้างแบคทีเรียได้เช่นกัน ตัวอย่างเช่น *B. megaterium*, *B. thermophilus*, *B. licheniformis*, *B. thuringiensis*, *B. subtilis* (Tagg, Dajani และ Wannamaker, 1976), *B. thermoleovorans* (Novotny และ Perry, 1992) และ *B. cereus* (Naclerio และคณะ, 1993)

Bacillus sp. S11 ที่นำมาใช้เป็นโพรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ได้รับการคัดเลือกมาจากลำไส้ของกุ้งกุลาดำ สามารถเจริญได้ในช่วง ที่เลข 5-8 และที่อุณหภูมิ 20-50 องศาเซลเซียส แบคทีเรียดังกล่าวนี้มีความสามารถในการสร้างสารต้านจุลชีพ อันเป็นคุณสมบัติที่สื่ออย่างหนึ่งของการเป็นโพรไบโอติก (Fuller, 1989) จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า *Bacillus* sp. S11 มีการสร้างสารต้านจุลชีพในหลอดทดลองในระยะการเจริญที่ late log phase และ stationary phase โดยพบว่าน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติกบรอส (Tryptic soy broth) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้ผลต้านแบคทีเรียที่ก่อโรคบางสายพันธุ์ในกุ้งกุลาดำ ได้แก่ *Aeromonas hydrophila*, *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* และ *V. cholera* นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถ ต้านแบคทีเรียบางสายพันธุ์ที่ก่อโรคในคน ได้แก่ *B. cereus*, *Listeria monocytogenes*, และ *Staphylococcus aureus*, (วรรณิกา เพ็ญนภัคศรี, 2539)

บทที่ 3

วิธีการวิจัย

1. การเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 ในภาวะที่เหมาะสมแก่การสร้างสารต้านจุลชีพ

1.1 เตรียมหัวเชื้อสำหรับเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11

เชื้อเชื้อ 1 ลูบจากโคโลนีของ *Bacillus* sp. S11 ที่เจริญบนอาหารแข็งทริปติกชอย (Tryptic Soy Agar) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ลงในอาหารเหลวทริปติกชอย (Tryptic Soy Broth) ปริมาตร 50 มล. ที่บรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. เชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

1.2 การแปรผันปริมาณกลูโคสในการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 เพื่อให้ผลิตสารต้านจุลชีพปริมาณสูง

เพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 ในอาหารสูตรพื้นฐาน (Yeast extract 20 g/l, NaCl 5 g/l, Dipotassium phosphate 2.5 g/l; พีเอช 7.0) ที่แปรผันปริมาณกลูโคสที่ 0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00 และ 2.00 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ใช้ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้น 2.0 % โดยปริมาตร เชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่ได้มาติดตามการเจริญด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 nm วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในน้ำเลี้ยงเชื้อตามวิธีของ Lowry และคณะ (1951) แอคติวิตีของสารต้านจุลชีพต่อเชื้อทดสอบ *B.cereus* ATCC 11778

1.3 การแปรผันปริมาณสารสกัดจากยีสต์ในการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 เพื่อให้ผลิตสารต้านจุลชีพปริมาณสูง

เพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 ในอาหารสูตรปรับปรุง (NaCl 5 g/l, Dipotassium phosphate 2.5 g/l ; พีเอช 7.0) แปรผันปริมาณสารสกัดจากยีสต์ที่ 0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.50 และ 2.00 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ใช้ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้น 2.0 % โดยปริมาตร ทำการทดลอง เก็บตัวอย่าง ติดตามการเจริญ ปริมาณโปรตีนในน้ำเลี้ยงเชื้อตามวิธีของ และแอคติวิตีของสารต้านจุลชีพเช่นเดียวกับข้อ 1.2

1.4 การแปรผันปริมาณโซเดียมคลอไรด์ในการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 เพื่อให้ผลผลิตสารต้านจุลชีพปริมาณสูง

เพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 ในอาหารสูตรปรับปรุงที่มี ปริมาณกลูโคส และปริมาณสารสกัดจากยีสต์ ที่เหมาะสมจากข้อ 1.2 และ 1.3 , พีเอช 7.0 ใช้ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้น 2.0% โดยปริมาตร แปรผันปริมาณโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 0, 0.25, 0.50, 1.00 และ 2.00 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ทำการทดลอง เก็บตัวอย่าง ติดตามการเจริญ ปริมาณโปรตีนในน้ำเลี้ยงเชื้อตามวิธีของ และ แอคติวิตีของสารต้านจุลชีพเช่นเดียวกับข้อ 1.2

1.5 การแปรผันปริมาณหัวเชื้อ (Inoculum) ในการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 เพื่อให้ผลผลิตสารต้านจุลชีพปริมาณสูง

เพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 ในอาหารสูตรปรับปรุงที่มี ปริมาณกลูโคส ปริมาณสารสกัดจากยีสต์ และปริมาณโซเดียมคลอไรด์ ที่เหมาะสมจากข้อ 1.2, 1.3 และ 1.4 ตามลำดับ พีเอช 7.0 โดยแปรผันปริมาณหัวเชื้อตั้งต้นดังนี้ 1, 2, 3, 4, 5 และ 10 % โดยปริมาตร ทำการทดลอง เก็บตัวอย่าง ติดตามการเจริญ ปริมาณโปรตีนในน้ำเลี้ยงเชื้อตามวิธีของ และแอคติวิตีของสารต้านจุลชีพเช่นเดียวกับข้อ 1.2

1.6 การแปรผันอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 เพื่อให้ผลผลิตสารต้านจุลชีพปริมาณสูง

เพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 ในอาหารสูตรปรับปรุงที่มี ปริมาณกลูโคส ปริมาณสารสกัดจากยีสต์ ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ และปริมาณหัวเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสมจากข้อ 1.2, 1.3, 1.4 และ 1.5 ตามลำดับ พีเอช 7.0 โดยแปรผันอุณหภูมิเป็นที่ 25, 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส ทำการทดลอง เก็บตัวอย่าง ติดตามการเจริญ ปริมาณโปรตีนในน้ำเลี้ยงเชื้อตามวิธีของ และแอคติวิตีของสารต้านจุลชีพเช่นเดียวกับข้อ 1.2

1.7 การแปรผัน พีเอช ของอาหารเลี้ยงเชื้อในการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 เพื่อให้ผลิตสารต้านจุลชีพปริมาณสูง

เพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 ในอาหารสูตรปรับปรุงที่มี ปริมาณกลูโคส ปริมาณสารสกัดจากยีสต์ ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้น และอุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 1.2, 1.3, 1.4, 1.5 และ 1.6 ตามลำดับ แปรผัน พีเอช ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 ทำการทดลอง เก็บตัวอย่าง ติดตามการเจริญ ปริมาณโปรตีนในน้ำเลี้ยงเชื้อตามวิธีของ และแอกติวิตีของสารต้านจุลชีพเช่นเดียวกับข้อ 1.2

1.8 การทดสอบแอกติวิตีของสารต้านจุลชีพด้วยวิธี Agar diffusion (Bauer และคณะ, 1966)

นำเชื้อทดสอบ *B. cereus* ATCC 11778 ที่มีอายุ 18 ชั่วโมงจากการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลวทริปติก (Tryptic Soy Broth) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที แล้วปรับค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตรให้เป็น 0.1 ด้วย 0.85 % (ปริมาตร/ปริมาตร) สารละลายโซเดียมคลอไรด์ แล้วนำมา 0.1 มล. กระจายให้ทั่วบนจานเลี้ยงเชื้อที่มี Mueller Hinton Agar จานละ 25 มล. เจาะหลุมด้วย Cork Borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มม. หยอดแต่ละหลุมด้วยตัวอย่างที่ต้องการทดสอบหลุมละ 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้ววัดขนาดขอบเขตการยับยั้ง

1.9 การทดสอบแอกติวิตีของสารต้านจุลชีพ แบบกึ่งปริมาณวิเคราะห์ (semiquantitative assay) (Barefoot and Klaenhammer, 1983)

เจือจางสารตัวอย่างแบบ two fold serial dilutions นำแต่ละความเข้มข้นของสารตัวอย่างมาทดสอบแอกติวิตีด้วยวิธี Agar diffusion ดังข้อ 1.8 วัดผลเป็นค่า Arbitrary Unit (AU) คือส่วนกลับของ dilution ที่สูงสุดในการทำการเจือจางที่ให้ขอบเขตการยับยั้งต่อเชื้อทดสอบ วัดปริมาณโปรตีนในสารตัวอย่าง คำนวณเพื่อทราบปริมาณโปรตีนที่ใส่ลงไปในแต่ละหลุม แล้วรายงานค่า specific activity ของสารตัวอย่างเป็น AU/mg protein

2 การทำบริสุทธิ์บางส่วนของสารต้านจุลชีพที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11

2.1 การทำบริสุทธิ์เบื้องต้นด้วยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

ปั่นแยกน้ำหมักออกจากเซลล์ด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสมาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีความเข้มข้นอิ่มตัวเป็นช่วง (Ammonium sulfate fractionation) 0 – 30%, 30 – 50% และ 50 – 80% รวมตะกอนจากช่วงที่ให้ แอคติวิตีสูงสุดตามวิธีในข้อ 1.9 มาทำบริสุทธิ์ขั้นต่อไป

2.2 การทำบริสุทธิ์ด้วย Gel permeable chromatography

นำตะกอนที่ได้จากการตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟต 0 – 30% มาละลายใน 0.05 M Tris-HCl, พีเอช 7.0 แล้วผ่านคอลัมน์ Sephadex G-50 ซะด้วย 0.05 M Tris-HCl, พีเอช 7.0 ในอัตราไหล 12 มล./ชั่วโมง เก็บลำดับส่วนละ 2 มล. ติดตามโปรตีนด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร เก็บลำดับส่วนที่ให้เป็นจุดยอดมาตรวจวัดแอกติวิตีดังข้อ 1.9 เลือกลำดับส่วนที่ให้ค่า แอกติวิตีสูงสุดมาทำบริสุทธิ์ต่อไป

2.3 การทำบริสุทธิ์ด้วย Ion exchange chromatography

นำลำดับส่วนที่ให้แอกติวิตีของสารต้านจุลชีพจากการทำให้บริสุทธิ์ด้วย ข้อ 2.2 มาผ่านคอลัมน์ของ DEAE-Sephadex ซะด้วย 0.05 M Tris-HCl, pH 7.0 ติดตามโปรตีนโดยวัดการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร เมื่อปริมาณโปรตีนลดลงเกือบเป็นศูนย์ติดต่อกันเป็นระยะเวลาหนึ่ง จึงชะด้วย NaCl gradient โดยใช้ 0 – 1.0 M NaCl ในบัฟเฟอร์ 0.05 M Tris-HCl, pH 7.0 ติดตามปริมาณโปรตีนต่อไป แล้วเก็บลำดับส่วนบริเวณยอดมาตรวจวัดแอกติวิตีดังข้อ 1.9



3 ศึกษาสมบัติเบื้องต้นของสารต้านจุลชีพที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11

3.1 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของสารต้านจุลชีพ

นำส่วนน้ำใสที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 ในภาวะที่เหมาะสมแก่การสร้างสารต้านจุลชีพ มาไว้ที่อุณหภูมิ 25, 37, 40, 50, 70, 80, 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และผ่านการ autoclave (121 องศาเซลเซียส, 20 นาที) เก็บตัวอย่างเพื่อตรวจวัดแอคติวิตีตามวิธีในข้อ 1.8 ที่เวลา 0, 5, 10, 15, 20, 30 และ 60 นาที ยกเว้นการนิ่งมาเชื้อ จะเก็บเพียง 2 ครั้งคือ ก่อนและหลังนิ่งมาเชื้อ

3.2 ศึกษาผลของ พีเอช ต่อแอคติวิตีของสารต้านจุลชีพ

นำส่วนน้ำใสที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 ในภาวะที่เหมาะสมแก่การสร้างสารต้านจุลชีพ มาปรับ พีเอช ตั้งแต่ 1 ถึง 14 (ช่วงละ 1 หน่วยพีเอช) แล้วตรวจวัดแอคติวิตีของสารต้านจุลชีพโดยวิธีแพร่ผ่านอาหารแข็งดังแสดงในข้อ 1.8

3.3 ศึกษาผลของปริมาณโซเดียมคลอไรด์ต่อแอคติวิตีของสารต้านจุลชีพ

นำส่วนน้ำใสที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 ในภาวะที่เหมาะสมแก่การสร้างสารต้านจุลชีพ มาเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ 0, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0 และ 5.0 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) แล้วตรวจวัดแอคติวิตีของสารต้านจุลชีพโดยวิธีแพร่ผ่านอาหารแข็งดังแสดงในข้อ 1.8

3.4 ศึกษาผลของเอนไซม์ต่อแอคติวิตีของสารต้านจุลชีพ

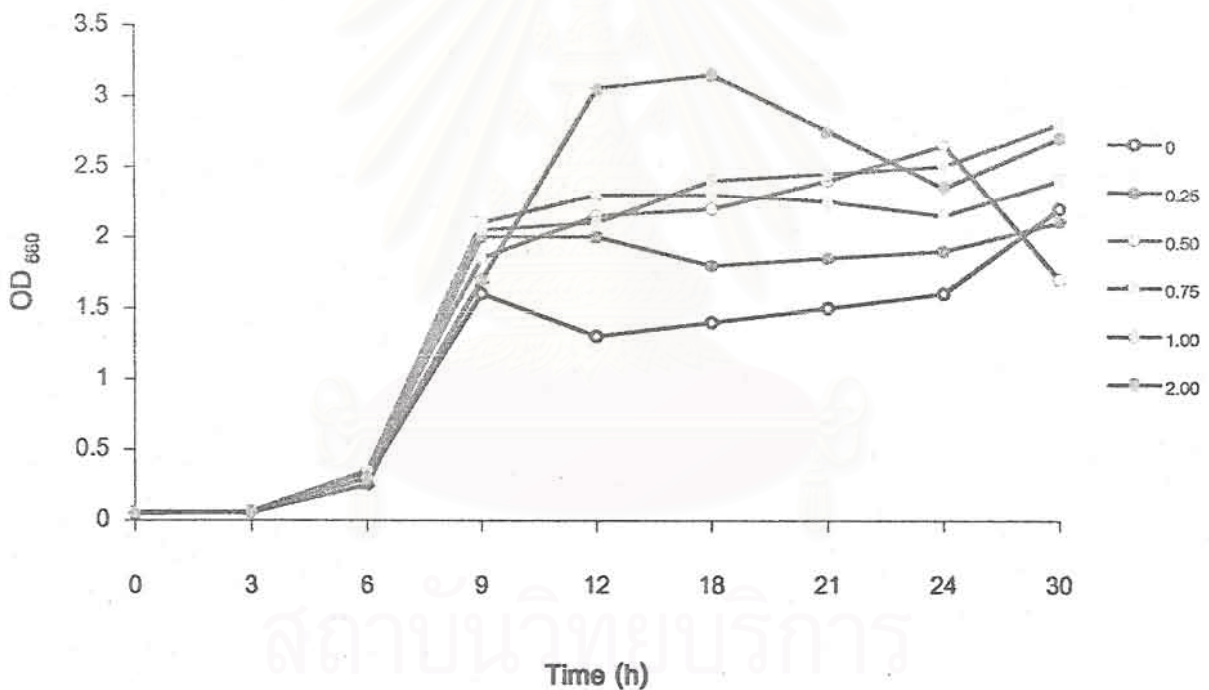
นำส่วนน้ำใสที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 ในภาวะที่เหมาะสมแก่การสร้างสารต้านจุลชีพ มาเติมเอนไซม์ ได้แก่ protease (type IX, from *Bacillus polymyxa*, 0.7 units/mg solid; Sigma), α -amylase (from *Bacillus* species, 320 units/mg solid; Sigma) และ lipase (type XIII, from *Pseudomonas* species, 25 units/mg solid; Sigma) โดยใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์แต่ละชนิดเป็น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในอัตรา 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วตรวจวัดแอคติวิตีของสารต้านจุลชีพโดยวิธีแพร่ผ่านอาหารแข็งดังแสดงในข้อ 1.8

บทที่ 4

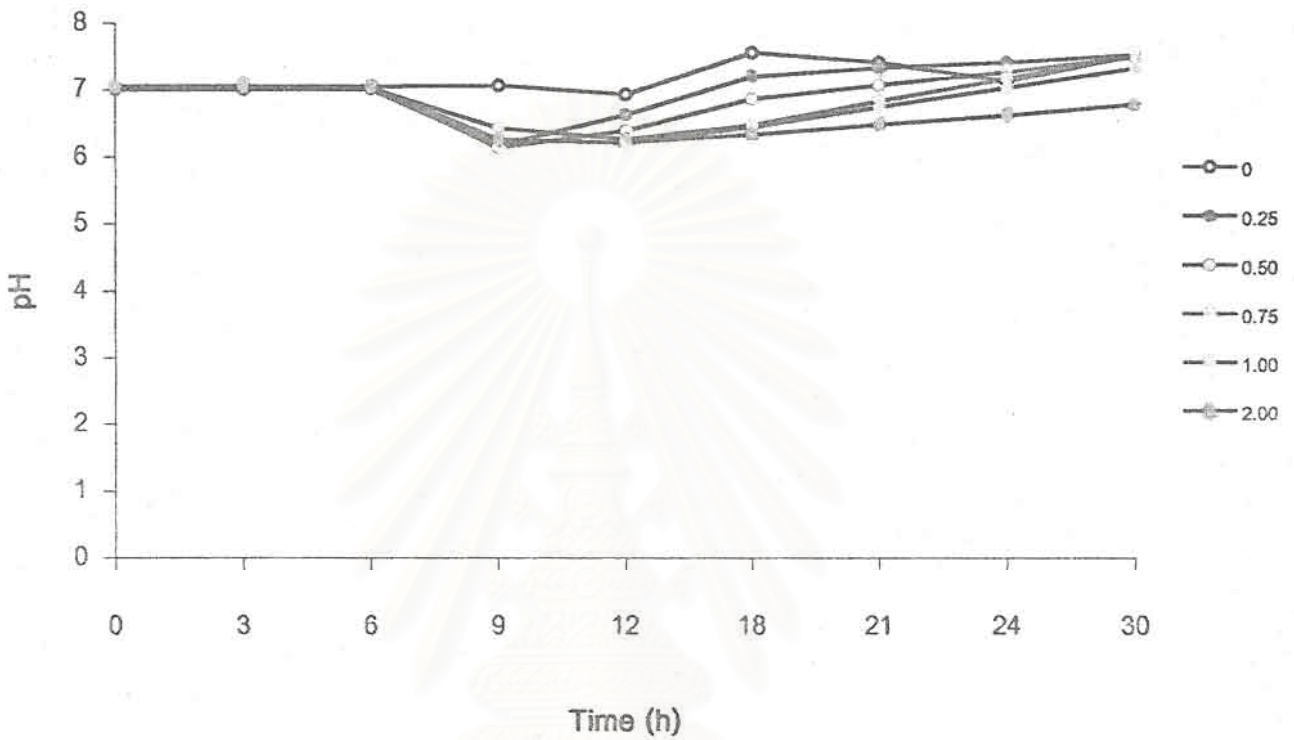
ผลการวิจัย

1. การเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 ในภาวะที่เหมาะสมแก่การสร้างสารต้านจุลชีพ

1.1 การปรับปริมาณกลูโคสในการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 เพื่อให้ผลิตสารต้านจุลชีพปริมาณสูง

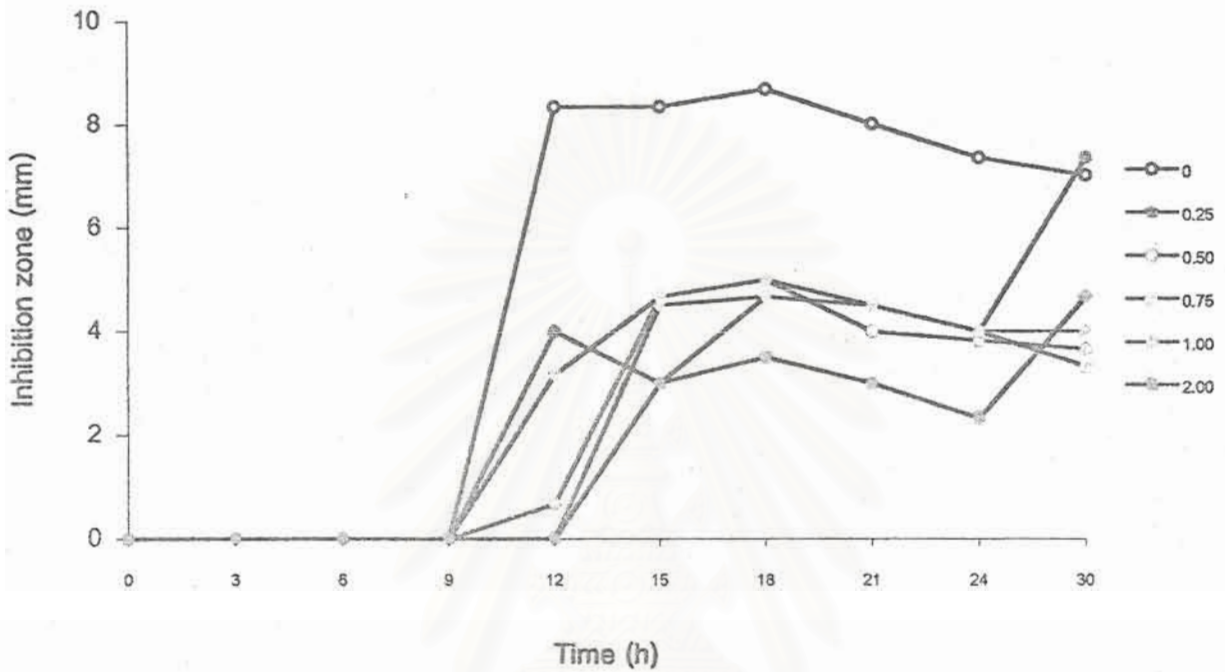


รูปที่ 1 : การเจริญของ *Bacillus* sp. S11 เมื่อเพาะเลี้ยงโดยปรับปริมาณกลูโคส พบว่า ปริมาณกลูโคสที่ 2.00 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ให้การเจริญสูงสุด



รูปที่ 2 : การเปลี่ยนแปลงของค่า พีเอช เมื่อทำเพาะเลี้ยงโดยแปรผันปริมาณกลูโคส โดยรวมพบว่าขณะที่ *Bacillus* sp. S11 มีการเจริญ ค่าพีเอชจะลดลงเล็กน้อยในช่วงต้นของ log phase แล้วเริ่มเพิ่มขึ้นเล็กน้อยและคงที่ในช่วงท้ายของ log phase และช่วงต้นของ stationary phase

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3 : Activity ของสารต้านจุลชีพ เมื่อทำเพาะเลี้ยงโดยแปรผันปริมาณกลูโคส พบว่า ปริมาณกลูโคสที่เติมเพิ่ม 0 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ให้ แอคติวิตี ของสารต้านจุลชีพสูงสุด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

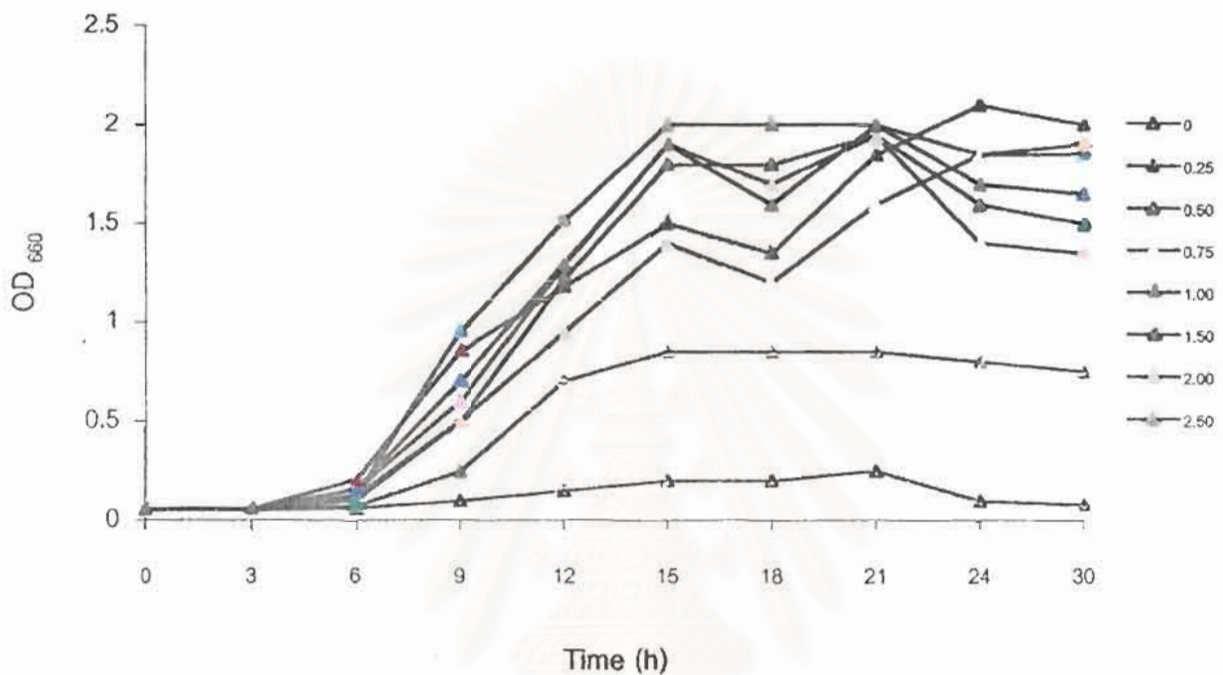
ตารางที่ 1 : ปริมาณโปรตีนในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีการแปรผันปริมาณกลูโคส

% ปริมาณ กลูโคส (น้ำหนัก/ ปริมาตร)	ชั่วโมงที่	ปริมาณ โปรตีน (mg/ml)
0	0	5.39
	9	5.20
	12	5.10
	18	5.69
	24	4.90
	30	4.31
0.25	0	5.49
	9	5.55
	12	5.69
	18	6.08
	24	5.29
	30	4.51
0.50	0	5.47
	9	5.58
	12	5.69
	18	4.90
	24	5.00
	30	4.90
0.75	0	5.30
	9	5.35
	12	5.49
	18	6.08
	24	5.59
	30	5.10

ตารางที่ 1 : (ต่อ)

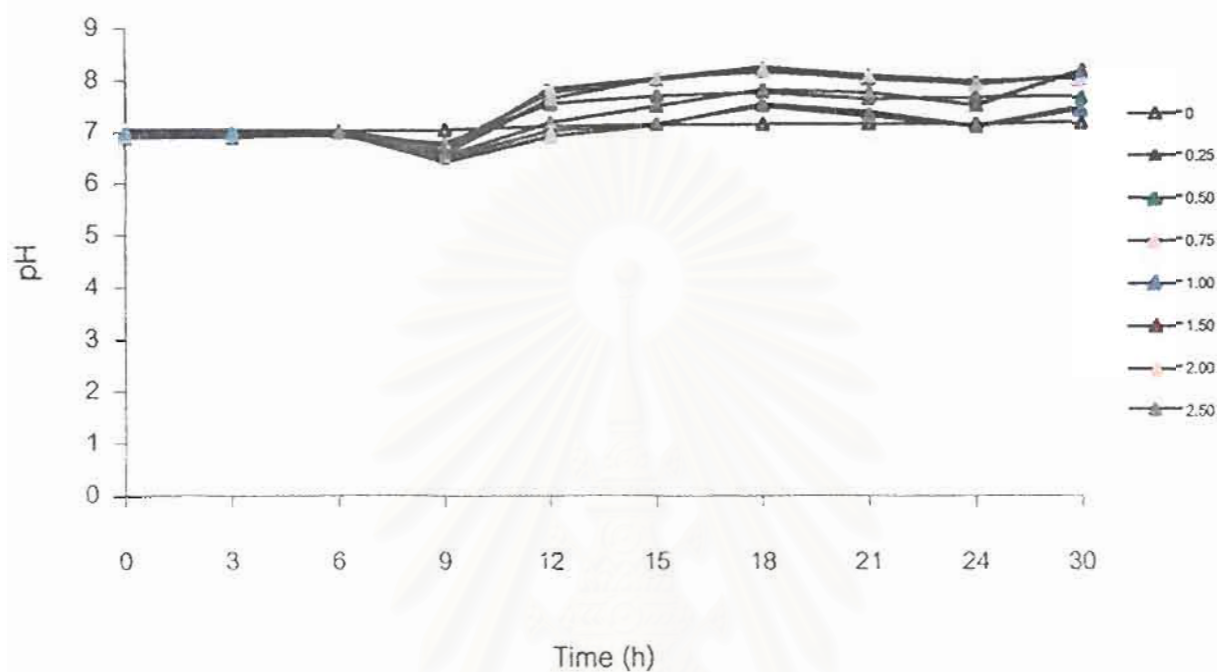
% ปริมาณ กลูโคส (น้ำหนัก/ ปริมาตร)	ชั่วโมงที่	ปริมาณ โปรตีน (mg/ml)
1.00	0	5.89
	9	5.70
	12	5.00
	18	5.10
	24	4.51
	30	5.29
2.00	0	5.10
	9	5.25
	12	5.69
	18	6.27
	24	4.90
	30	5.49

1.2 การแปรผันปริมาณสารสกัดจากยีสต์ในการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11
เพื่อให้ผลิตสารต้านจุลชีพปริมาณสูง



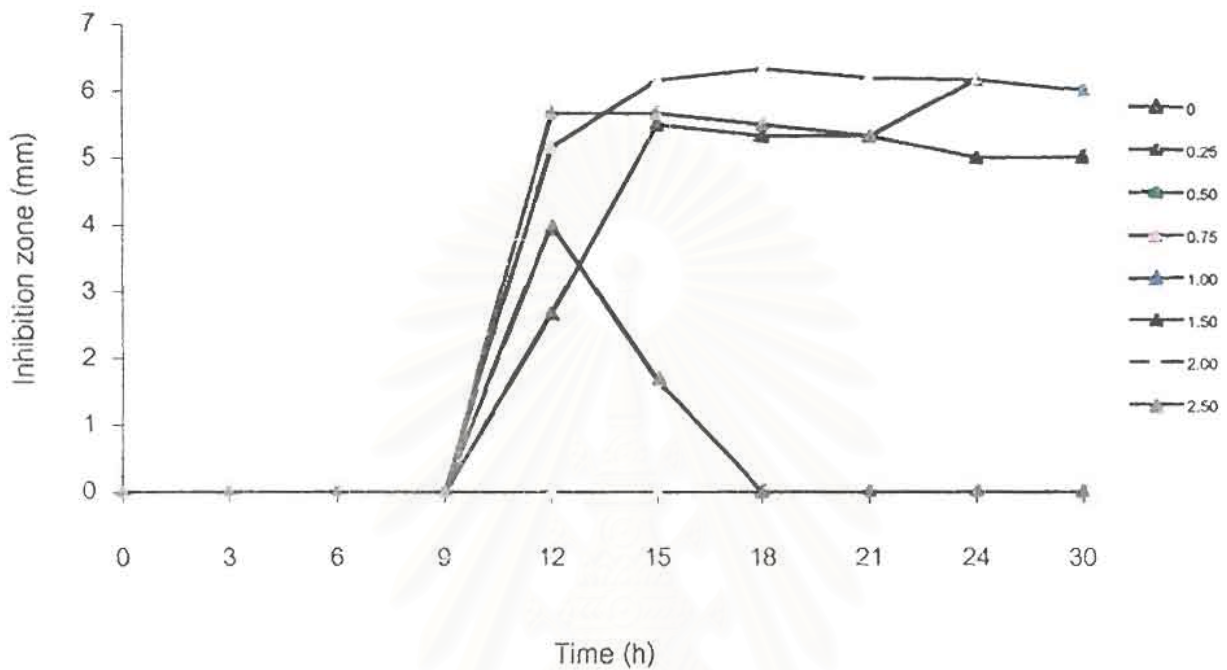
รูปที่ 4 : การเจริญของ *Bacillus* sp. S11 เมื่อเพาะเลี้ยงโดยแปรผันปริมาณสารสกัดจากยีสต์ พบว่าปริมาณสารสกัดจากยีสต์ที่ 2.50 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ให้การเจริญสูงสุดในช่วง log phase

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5 : การเปลี่ยนแปลงของค่า พีเอช เมื่อทำเพาะเลี้ยงโดยแปรผันปริมาณสารสกัดจากยีสต์ โดยรวมพบว่าขณะที่ *Bacillus* sp. S11 มีการเจริญ ค่าพีเอชจะลดลงเล็กน้อยในช่วงต้นของ log phase แล้วเริ่มเพิ่มขึ้นเล็กน้อยและคงที่ในช่วงท้ายของ log phase และช่วงต้นของ stationary phase

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 6 : แอคติวิตี ของสารต้านจุลชีพ เมื่อทำเพาะเลี้ยงโดยแปรผันปริมาณสารสกัดจากยีสต์ พบว่าปริมาณสารสกัดจากยีสต์ ที่ 2.00 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ให้ แอคติวิตี ของสารต้านจุลชีพสูงสุด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

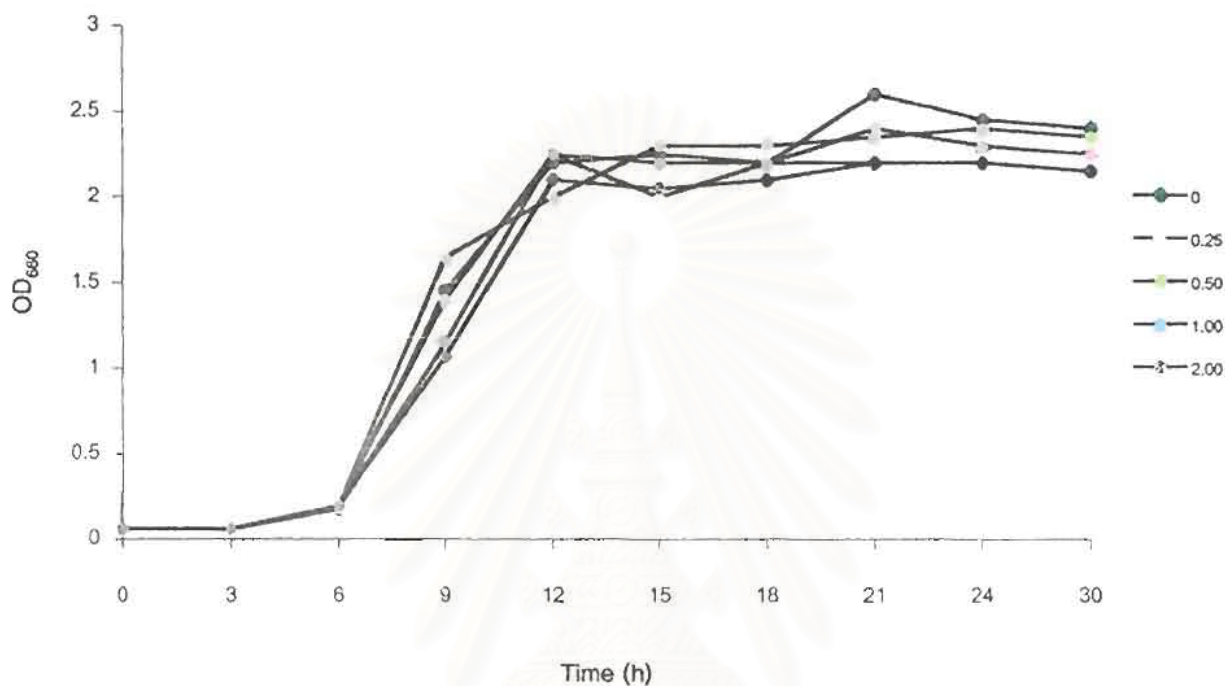
ตารางที่ 2 : ปริมาณโปรตีนในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีการแปรผันปริมาณสารสกัดจากยีสต์

% ปริมาณสารสกัดจากยีสต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร)	ชั่วโมงที่	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)
0	0	0.18
	9	0.17
	12	0.18
	18	0.19
	24	0.22
	30	0.20
0.25	0	0.70
	9	0.72
	12	0.75
	18	0.80
	24	0.65
	30	0.60
0.50	0	1.30
	9	1.32
	12	1.40
	18	1.50
	24	1.25
	30	1.20
0.75	0	1.91
	9	2.00
	12	2.10
	18	2.20
	24	1.87
	30	1.80

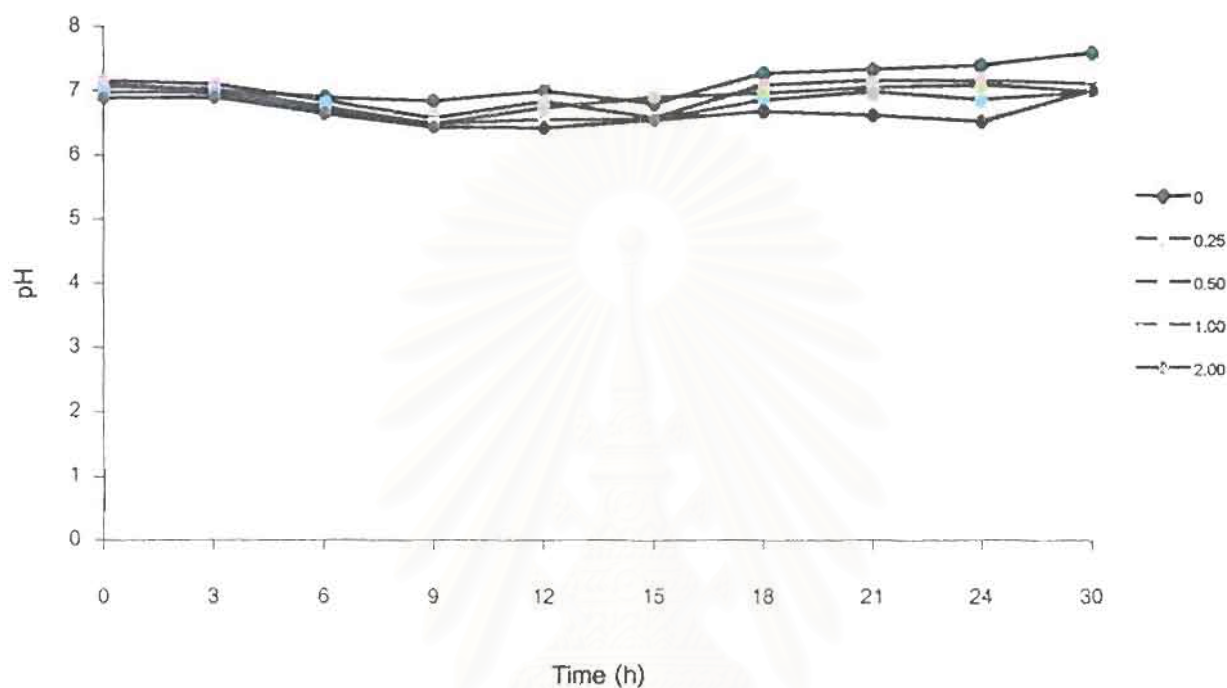
ตารางที่ 2 : (ต่อ)

% ปริมาณสารสกัดจากยีสต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร)	ชั่วโมง	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)
1.00	0	2.55
	9	2.65
	12	2.80
	18	3.00
	24	2.50
	30	2.40
1.50	0	3.80
	9	4.00
	12	4.30
	18	4.55
	24	3.65
	30	3.45
2.00	0	5.20
	9	5.35
	12	5.79
	18	6.17
	24	4.95
	30	4.80
2.50	0	6.50
	9	6.69
	12	7.24
	18	7.65
	24	6.19
	30	6.00

1.3 การแปรผันปริมาณโซเดียมคลอไรด์ในการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11
เพื่อให้ผลผลิตสารต้านจุลชีพปริมาณสูง

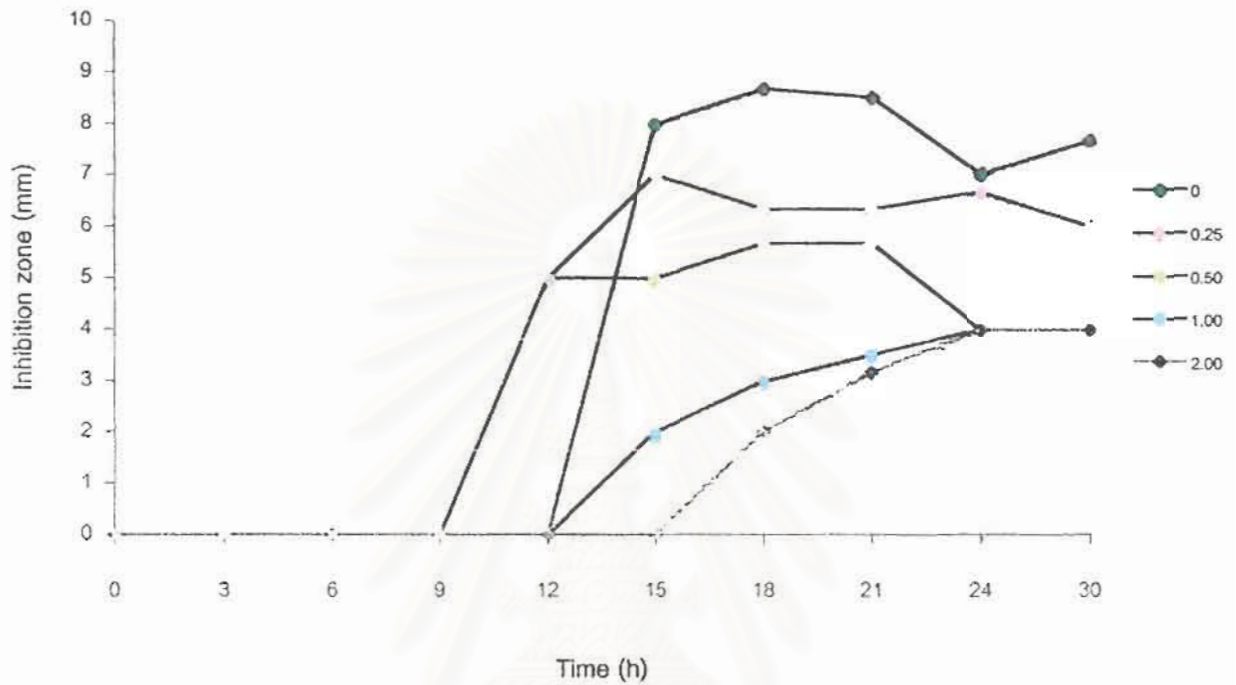


รูปที่ 7 : การเจริญของ *Bacillus* sp. S11 เมื่อเพาะเลี้ยงโดยแปรผันปริมาณโซเดียมคลอไรด์ พบว่าให้การเจริญไม่แตกต่างกันมากนัก



รูปที่ 8 : การเปลี่ยนแปลงของค่า พีเอช เมื่อทำเพาะเลี้ยงโดยแปรผันปริมาณโชนีเดียมคลอไรด์ โดยรวมพบว่าขณะที่ *Bacillus* sp. S11 มีการเจริญ ค่าพีเอชจะลดลงเล็กน้อยในช่วงต้นของ log phase แล้วเริ่มเพิ่มขึ้นเล็กน้อยและคงที่ในช่วงท้ายของ log phase และช่วงต้นของ stationary phase

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 9 : แอคติวิตี ของสารต้านจุลชีพ เมื่อทำเพาะเลี้ยงโดยแปรผันปริมาณโซเดียมคลอไรด์ พบว่าปริมาณโซเดียมคลอไรด์ ที่ 0 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ให้ แอคติวิตี ของสารต้านจุลชีพสูงสุด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 : ปริมาณโปรตีนในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีการแปรผันปริมาณไซเตียมคอลลอยด์

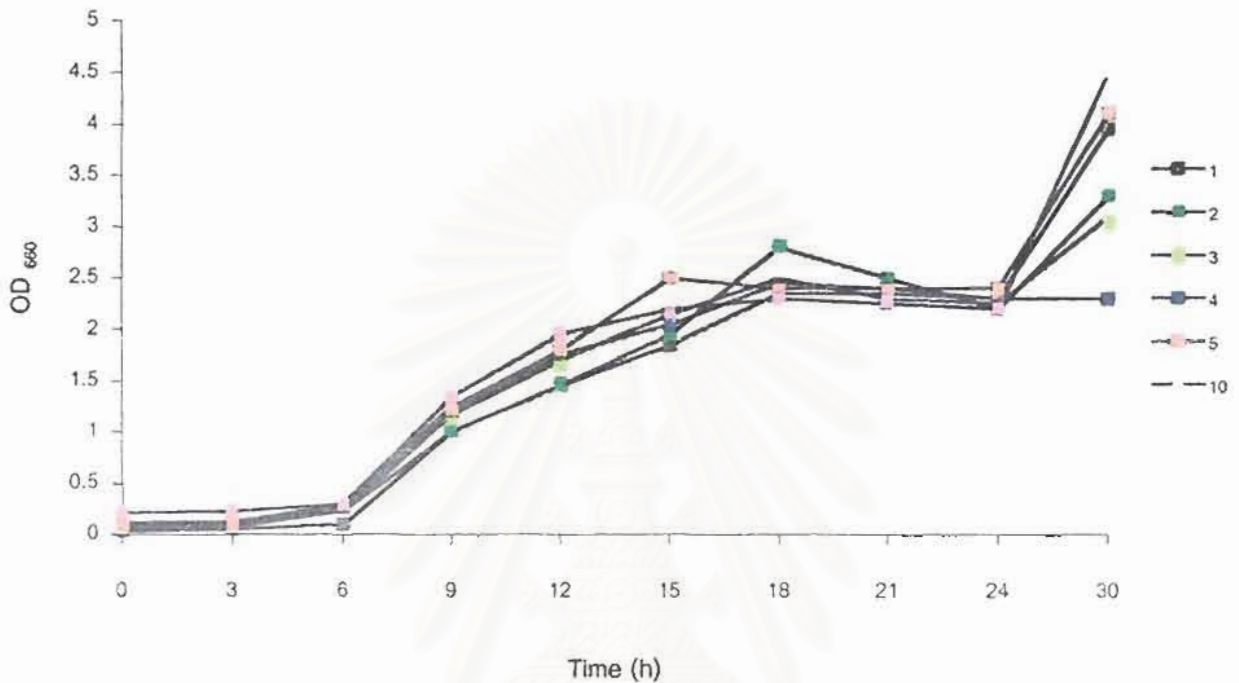
% ปริมาณ ไซเตียมคอลลอยด์ (น้ำหนัก/ ปริมาตร)	ชั่วโมงที่	ปริมาณ โปรตีน (mg/ml)
0	0	5.30
	9	5.20
	12	5.15
	18	5.55
	24	4.95
	30	4.35
0.25	0	5.20
	9	5.15
	12	5.10
	18	5.50
	24	4.80
	30	4.40
0.50	0	5.25
	9	5.15
	12	5.20
	18	5.55
	24	4.90
	30	4.45
1.00	0	5.30
	9	5.20
	12	5.10
	18	5.60
	24	4.90
	30	4.40

ตารางที่ 3 : (ต่อ)

% ปริมาณ โซเดียมคลอไรด์ (น้ำหนัก/ ปริมาตร)	ชั่วโมง โมงที่	ปริมาณ โปรตีน (mg/ml)
2.00	0	5.25
	9	5.20
	12	5.15
	18	5.60
	24	4.85
	30	4.45

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

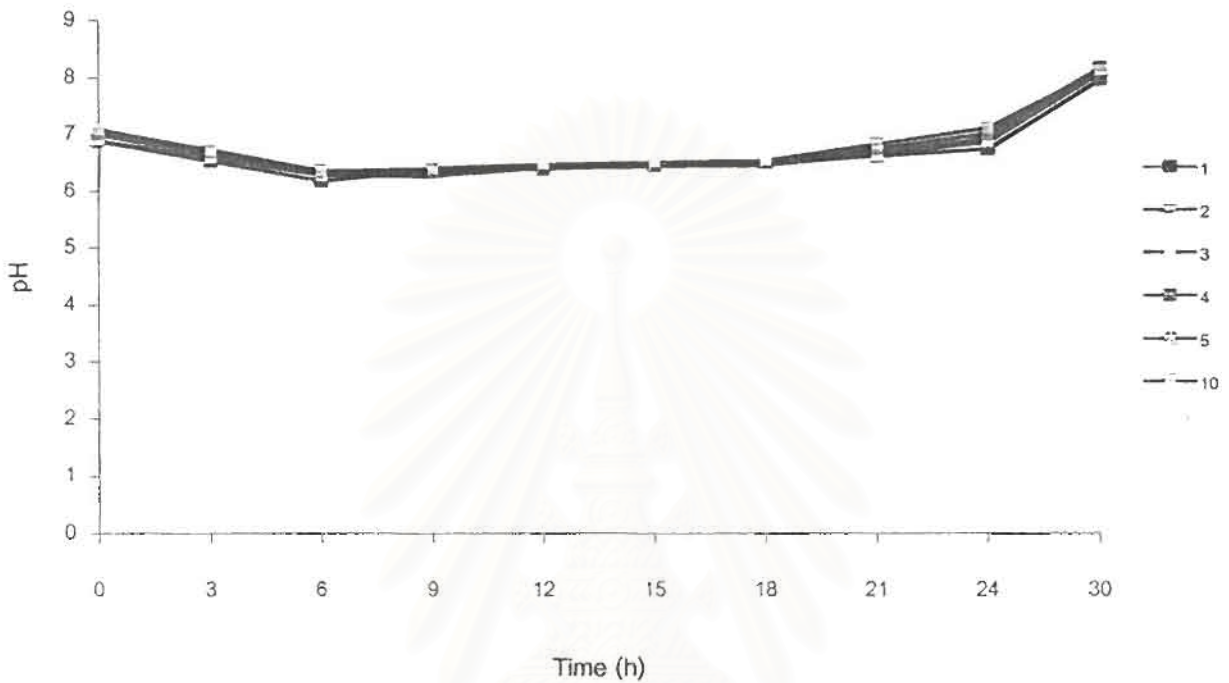
1.4 การแปรผันปริมาณหัวเชื้อ (Inoculum) ในการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11
เพื่อให้ผลผลิตสารต้านจุลชีพปริมาณสูง



รูปที่ 10 : การเจริญของ *Bacillus* sp. S11 เมื่อเพาะเลี้ยงโดยแปรผันปริมาณหัวเชื้อ พบว่าในช่วง log phase ให้การเจริญไม่แตกต่างกันมากนัก

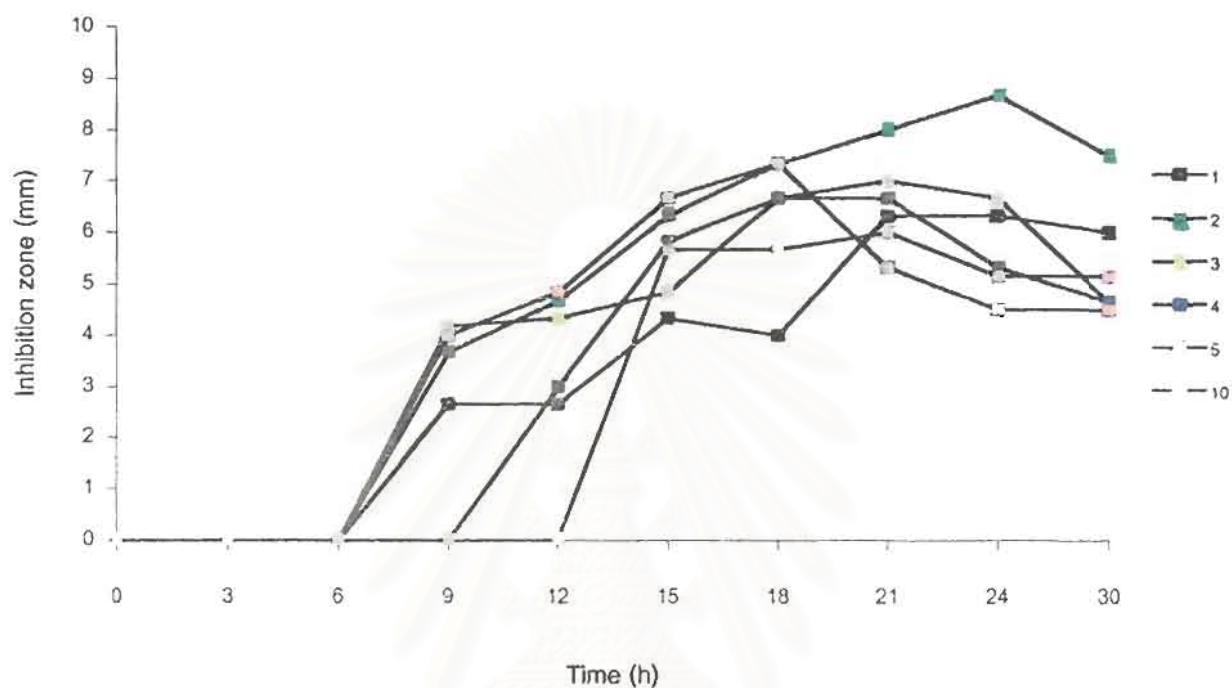
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





รูปที่ 11 : การเปลี่ยนแปลงของค่า พีเอช เมื่อทำเพาะเลี้ยงโดยแปรผันปริมาณหัวเชื้อ โดยรวมพบว่าขณะที่ *Bacillus* sp. S11 มีการเจริญ ค่าพีเอชจะลดลงเล็กน้อยในช่วงต้นของ log phase แล้วเพิ่มขึ้นเล็กน้อยและคงที่ในช่วงท้ายของ log phase และช่วงต้นของ stationary phase

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 12 : แอคติวิตี ของสารต้านจุลชีพ เมื่อทำเพาะเลี้ยงโดยแปรผันปริมาณหัวเชื้อ พบว่า ปริมาณหัวเชื้อ ที่ 2 % โดยปริมาตร ให้ แอคติวิตี ของสารต้านจุลชีพสูงสุด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 : ปริมาณโปรตีนในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีการแปรผันปริมาณหัวเชื้อ

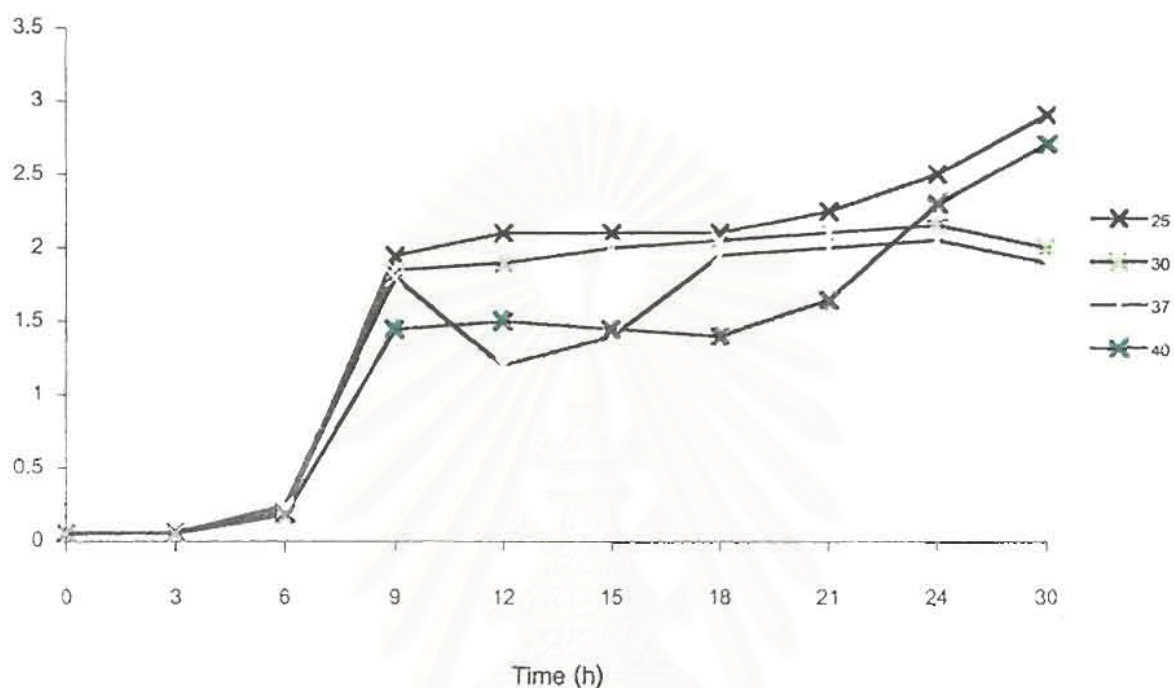
% ปริมาณหัวเชื้อ (ปริมาตร/ปริมาตร)	ชั่วโมง ที่	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)
1	0	5.20
	9	5.15
	12	5.10
	18	5.15
	24	5.20
	30	4.50
2	0	5.30
	9	5.20
	12	5.15
	18	5.55
	24	4.90
	30	4.44
3	0	5.20
	9	5.10
	12	5.15
	18	5.40
	24	4.80
	30	4.60
4	0	5.25
	9	5.00
	12	5.15
	18	5.45
	24	5.00
	30	4.55

ตารางที่ 4 : (ต่อ)

% ปริมาณหัวเชื้อ (ปริมาตร/ปริมาตร)	ชั่วโมง ที่	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)
5	0	5.35
	9	5.05
	12	5.15
	18	5.45
	24	4.98
	30	4.67
10	0	5.41
	9	5.10
	12	5.21
	18	5.36
	24	5.00
	30	4.50

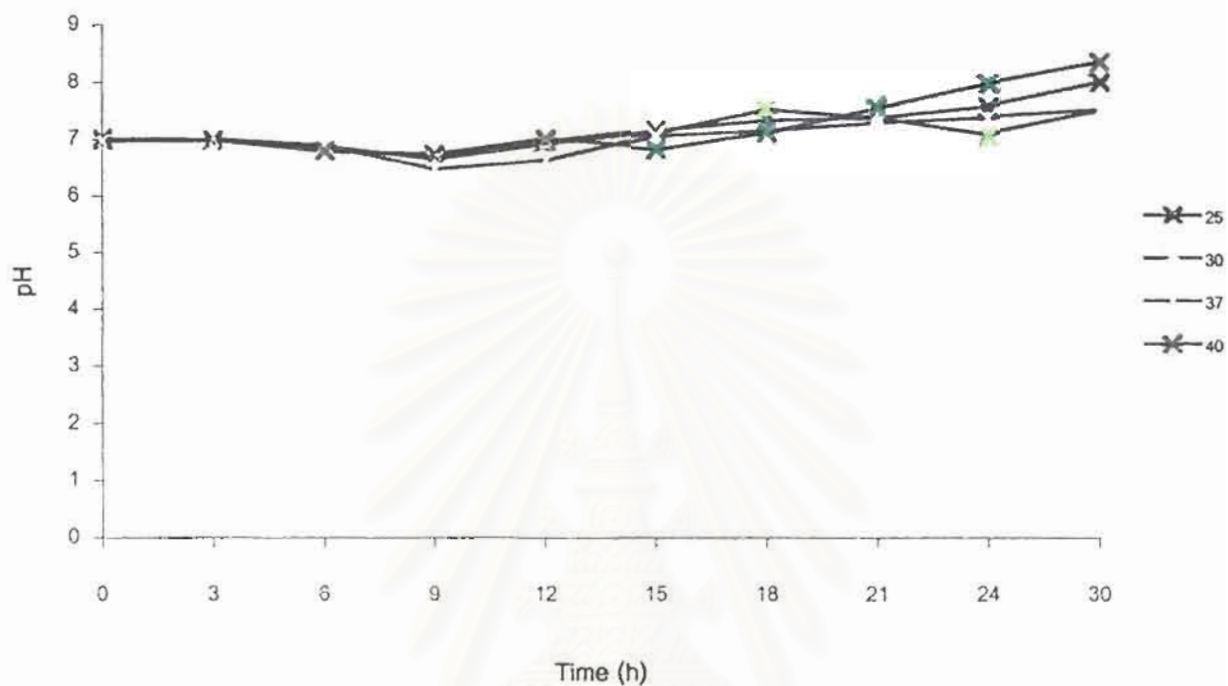
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.5 การแปรผันอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 เพื่อให้ผลิตสารต้านจุลชีพ ปริมาณสูง



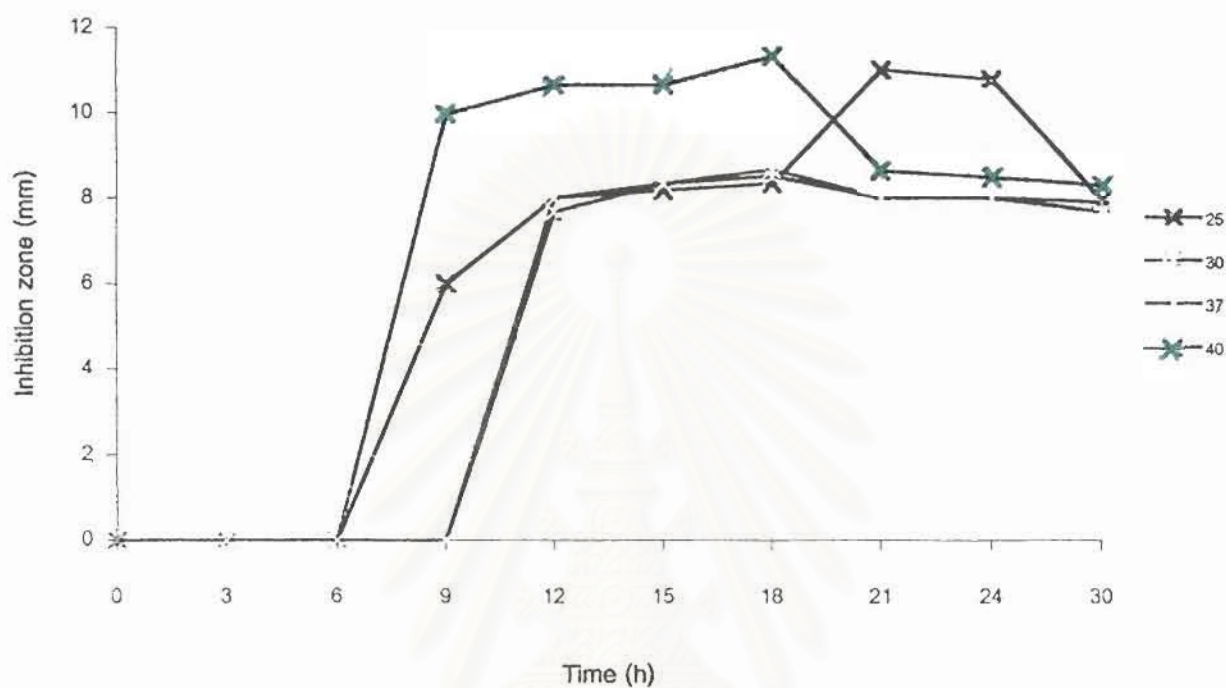
รูปที่ 13 : การเจริญของ *Bacillus* sp. S11 เมื่อเพาะเลี้ยงโดยแปรผันอุณหภูมิ พบว่าให้การเจริญใกล้เคียงกัน จากกราฟ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสให้การเจริญสูงสุด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 14 : การเปลี่ยนแปลงของค่า พีเอช ในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อทำเพาะเลี้ยงโดยแปรผันอุณหภูมิ โดยรวมพบว่าขณะที่ *Bacillus* sp. S11 มีการเจริญ ค่าพีเอชจะลดลงเล็กน้อยในช่วงต้นของ log phase แล้วเพิ่มขึ้นเล็กน้อยและคงที่ในช่วงท้ายของ log phase และช่วงต้นของ stationary phase

สถาบันวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



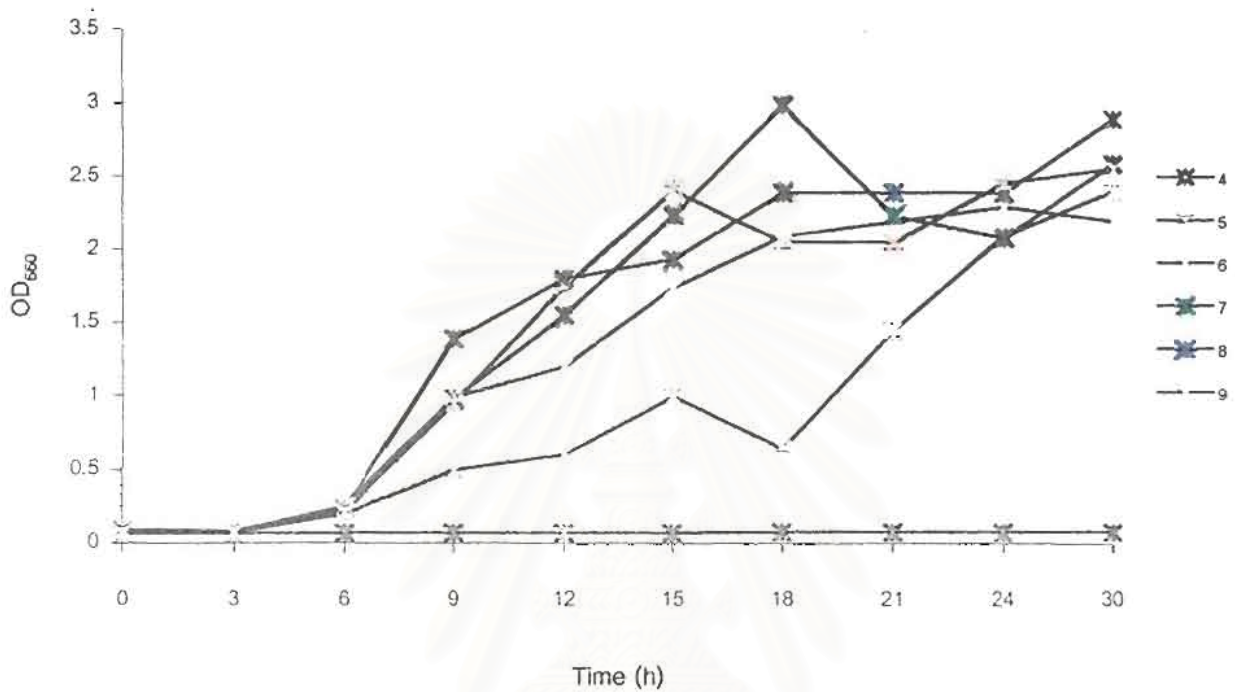
รูปที่ 15 : แอคติวิตี ของสารต้านจุลชีพ เมื่อทำเพาะเลี้ยงโดยแปรผันอุณหภูมิ พบว่าการเพาะเลี้ยงด้วยอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสให้ แอคติวิตี ของสารต้านจุลชีพสูงสุด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

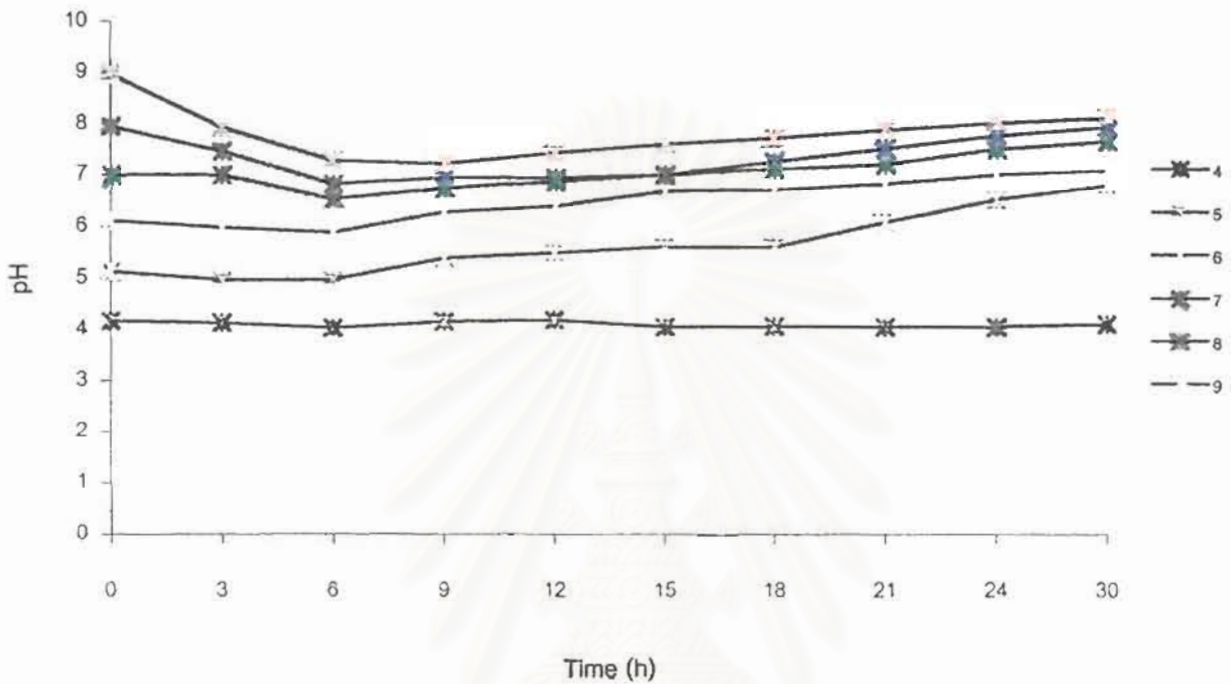
ตารางที่ 5 : ปริมาณโปรตีนในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีการปรับปริมาณอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ชั่วโมง ที่	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)
25	0	5.35
	9	5.21
	12	5.09
	18	5.60
	24	4.87
	30	4.41
30	0	5.30
	9	5.18
	12	5.07
	18	5.65
	24	4.90
	30	4.46
37	0	5.25
	9	5.19
	12	5.07
	18	5.46
	24	4.85
	30	4.49
40	0	5.30
	9	5.22
	12	5.59
	18	5.70
	24	4.95
	30	4.55

1.6 การแปรผันพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อในการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11
เพื่อให้ผลิตสารต้านจุลชีพปริมาณสูง

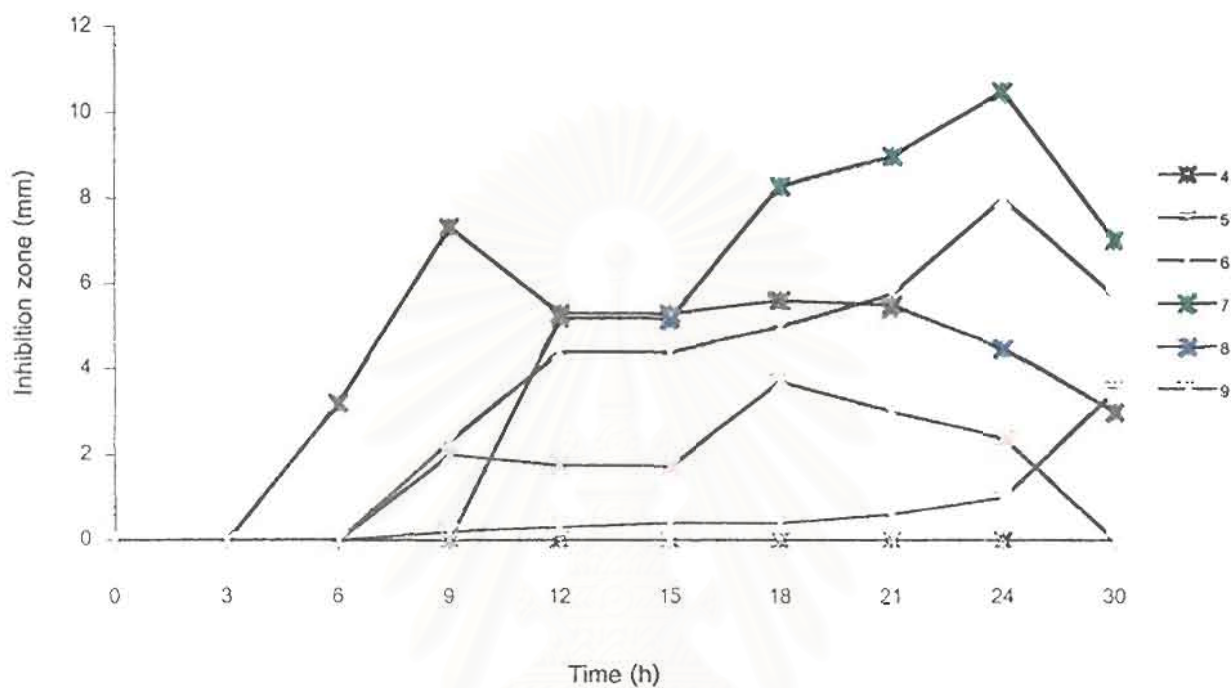


รูปที่ 16 : การเจริญของ *Bacillus* sp. S11 เมื่อเพาะเลี้ยงโดยแปรผันพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า ในช่วง พีเอช 6-9 ให้การเจริญไม่แตกต่างกันมากนัก



รูปที่ 17 : การเปลี่ยนแปลงของค่า ทีเอช เมื่อทำเพาะเลี้ยงโดยแปรผันทีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยรวมพบว่าขณะที่ *Bacillus* sp. S11 มีการเจริญ ค่าทีเอชจะลดลงเล็กน้อยในช่วงต้นของ log phase แล้วเริ่มเพิ่มขึ้นเล็กน้อยและคงที่ในช่วงท้ายของ log phase และช่วงต้นของ stationary phase ยกเว้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีทีเอชเริ่มต้น 4.0 จะไม่มีการเปลี่ยนแปลงค่าทีเอชมากนักในขณะทำการเพาะเลี้ยง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 18 : แอคติวิตี ของสารต้านจุลชีพ เมื่อทำเพาะเลี้ยงโดยแปรผันพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า การเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเริ่มต้น 7.0 ให้ แอคติวิตี ของสารต้านจุลชีพสูงสุด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 : ปริมาณโปรตีนในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีการแปรผันที่เอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

pH เริ่มต้น	ชั่วโมง ที่	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)
4	0	5.30
	9	5.28
	12	5.31
	18	5.29
	24	5.28
	30	5.30
5	0	5.32
	9	5.29
	12	5.30
	18	5.34
	24	5.09
	30	5.00
6	0	5.30
	9	5.20
	12	5.25
	18	5.53
	24	4.75
	30	4.40
7	0	5.25
	9	5.17
	12	5.09
	18	5.55
	24	4.82
	30	4.46

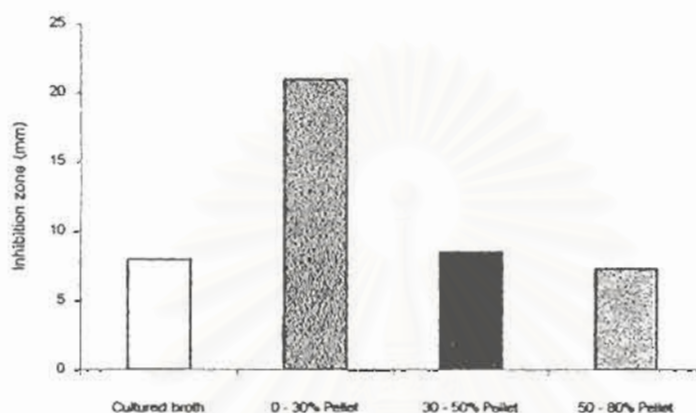
ตารางที่ 6 : (ต่อ)

pH เริ่มต้น	ชั่วโมง ที่	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)
8	0	5.33
	9	5.40
	12	5.35
	18	5.38
	24	4.81
	30	4.70
9	0	5.28
	9	5.20
	12	5.37
	18	5.25
	24	5.10
	30	4.65

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2 การทำบริสุทธิ์บางส่วนของสารต้านจุลชีพที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11

2.1 การทำบริสุทธิ์เบื้องต้นด้วยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

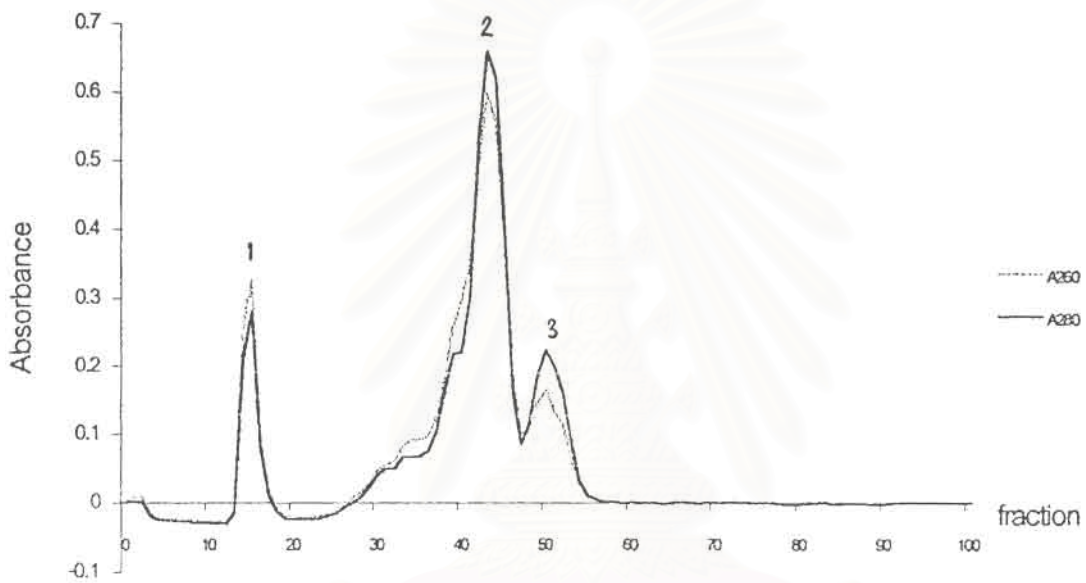


รูปที่ 19 : แอคติวิตีของสารต้านจุลชีพที่ได้จากการตกตะกอนน้ำหมักด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วงต่างๆ : เมื่อนำตะกอนที่ได้มาเจือจางลง 10 เท่าด้วย 0.05 M phosphate buffer, pH 7.0 แล้วทดสอบแอคติวิตีพบว่า ตะกอนในช่วง 0-30 % จะให้แอคติวิตีสูงสุด

ตารางที่ 7 : ปริมาณโปรตีนในตัวอย่างของการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

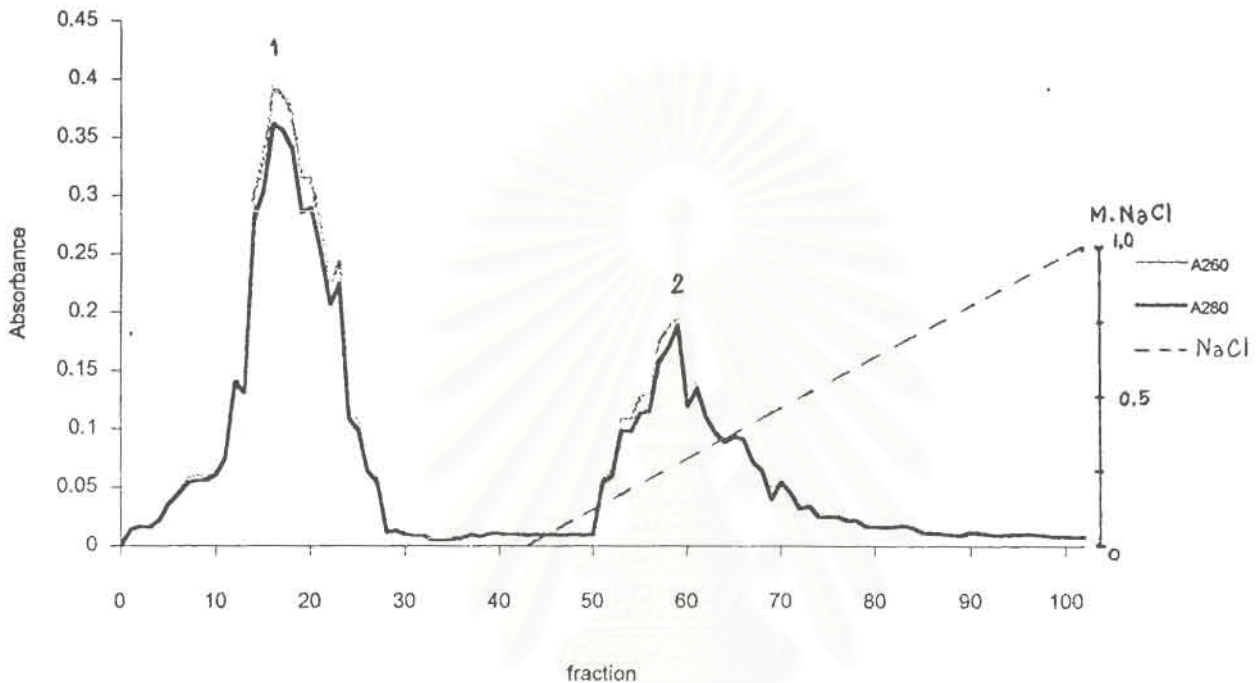
ตัวอย่าง	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)
น้ำหมัก	5.60
0 - 30 % pellet	10.58
0 - 30 % supernate	5.46
30 - 50 % pellet	10.13
30 - 50 % supernate	5.42
50 - 80 % pellet	10.98
50 - 80 % supernate	5.30

2.2 การทำบริสุทธิ์ด้วย Gel permeable chromatography



รูปที่ 20 : เมื่อนำสารละลายตะกอนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 0 – 30 % มาผ่านคอลัมน์ Sephadex G-50 ติดตามโปรตีนด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตรแล้วพบว่า ให้รูปแบบโปรตีนเป็น 3 พีค จึงเก็บลำดับส่วนในแต่ละพีคมาผ่านการทำให้แห้งเยือกแข็ง (lyophilization) แล้วละลายกลับด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดิม จากนั้นตรวจวัดแอกติวิตี พบว่า โปรตีนในยอดที่ 3 เท่านั้นที่ให้ผลด้านจุลชีพต่อ *B. cereus* ATCC 11778

2.3 การทำให้บริสุทธิ์ด้วย Ion exchange chromatography



รูปที่ 21 : Protein profile ของ ion exchange chromatography : เมื่อนำตัวอย่างที่ได้จากพีคที่ 3 หลังผ่าน gel permeable chromatography แล้วมาผ่านคอลัมน์ DEAE-Sephadex จะให้รูปแบบโปรตีนเป็น 2 พีค คือก่อนและหลังทำ gradient ด้วย 0-1.0 M NaCl จึงเก็บลำดับส่วนในแต่ละพีคมาทำให้เข้มข้นโดยการทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง แล้วละลายกลับด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดิม จากนั้นตรวจวัดแอกติวิตี พบว่าโปรตีนในยอดที่ 2 เท่านั้นที่ให้ผลต้านเชื้อทดสอบ

2.4 เปรียบเทียบแอกติวิตีหลังผ่านการทำให้บริสุทธิ์ขั้นตอนต่างๆ

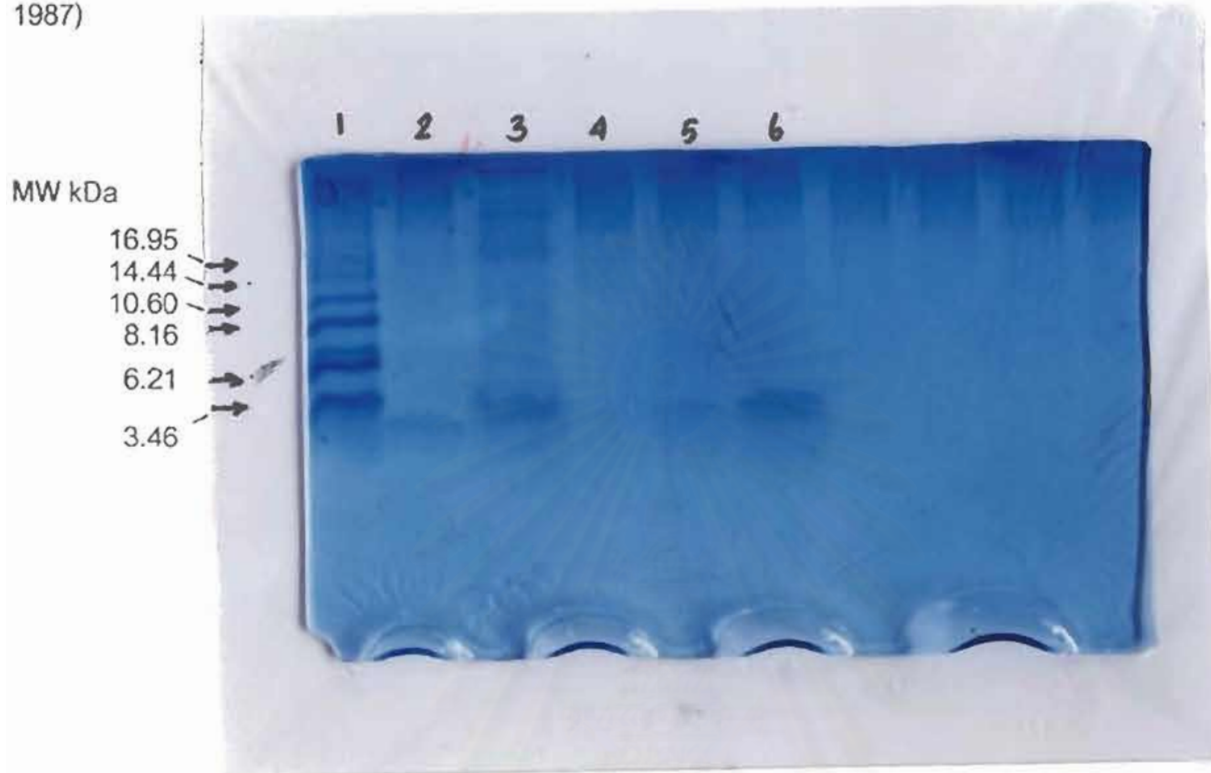
ตารางที่ 8 : แอกติวิตีของสารต้านจุลชีพเมื่อผ่านการทำให้บริสุทธิ์

ขั้นตอน	Specific Activity (AU/mg protein)
Cultured Broth	29.10
ตกตะกอนด้วย 0-30 % แอมโมเนียมซัลเฟต	52.63
Gel permeable chromatography	85.36
Ion exchange chromatography	95.23

หมายเหตุ: AU คือส่วนกลับของ Dilution ที่สูงสุดของการเจือจางแบบ two fold ที่สามารถแสดงขอบเขตการยับยั้งเชื้อทดสอบได้

2.5 การติดตามความบริสุทธิ์ด้วย SDS-PAGE analysis (Schagger และ von Jagow,

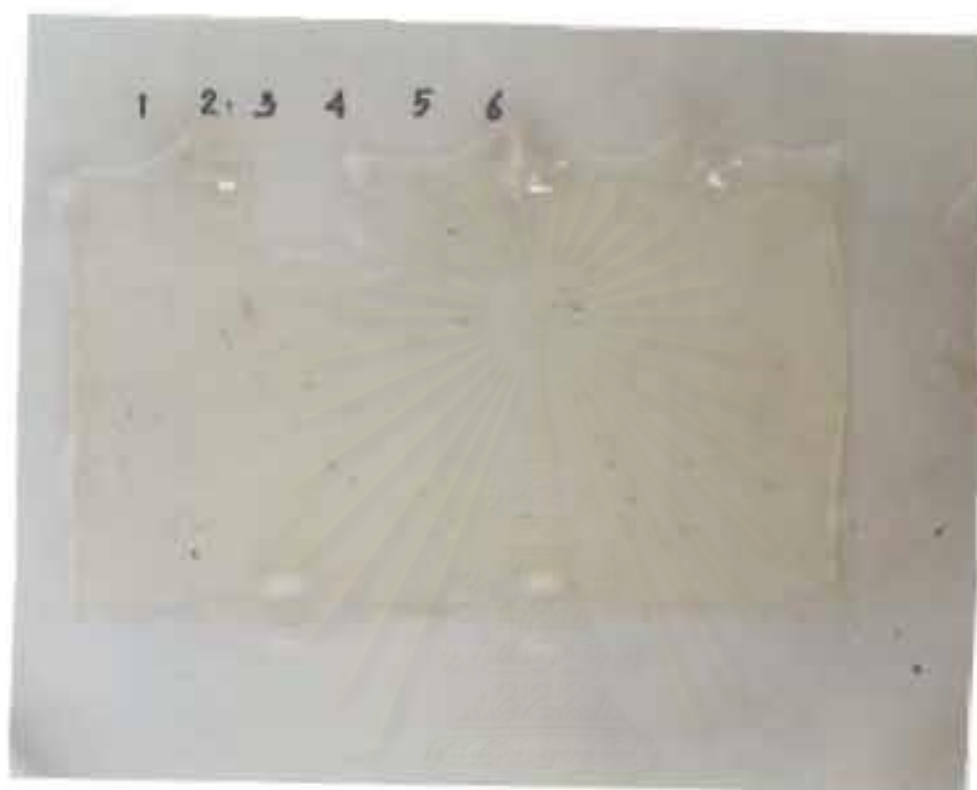
1987)



รูปที่ 22 : ภายหลังจากผ่าน SDS-PAGE แล้วย้อมด้วย Coomassie Blue G-250 พบว่าสาร
ด้านจุดสีที่ดังกล่าวมีมวลโมเลกุลประมาณ 3.5 kDa ลำดับของตัวอย่างในช่องต่างๆ เป็นดังนี้

1. SDS Molecular Weight Markers 2500 – 17000 Da (ปริมาณโปรตีน 5 ไมโครกรัม)
2. Insulin chain B, oxidized form MW 3496 (" 5 ")
3. Cultured Broth (" 250 ")
4. ตะกอนที่ตกด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 0-30% (" 75 ")
5. พีคที่ 3 หลังผ่านคอลัมน์ Sephadex G-50 (" 10 ")
6. พีคที่ 2 หลังผ่านคอลัมน์ DEAE-Sephadex (" 20 ")





รูปที่ 23 : ภาพหลังจาก SDS-PAGE แล้วย้อมเพื่อตรวจสอบ glycoprotein ด้วย thymol และกรดซัลฟูริก ตามวิธีของ Racusen (1979) (ภาคผนวก 1.) พบว่า สารต้านจุลชีพดังกล่าวไม่ได้เป็น glycoprotein ลำดับของตัวอย่างในช่องต่างๆ เป็นดังนี้

1. SDS Molecular Weight Markers 2500 – 17000 Da (ปริมาณโปรตีน 5 ไมโครกรัม)
2. Insulin chain B, oxidized form MW 3496 (* 5 *)
3. Cultured Broth (* 250 *)
4. ตะกอนที่ตกด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 0-30% (* 75 *)
5. พีคที่ 3 หลังผ่านคอลัมน์ Sephadex G-60 (* 10 *)
6. พีคที่ 2 หลังผ่านคอลัมน์ DEAE-Sephadex (* 20 *)

หมายเหตุ : glycoprotein จะให้แถบสีเข้มแดงเมื่อตรวจสอบด้วยวิธีนี้ ซึ่งไม่ได้แสดงไว้ในภาพ



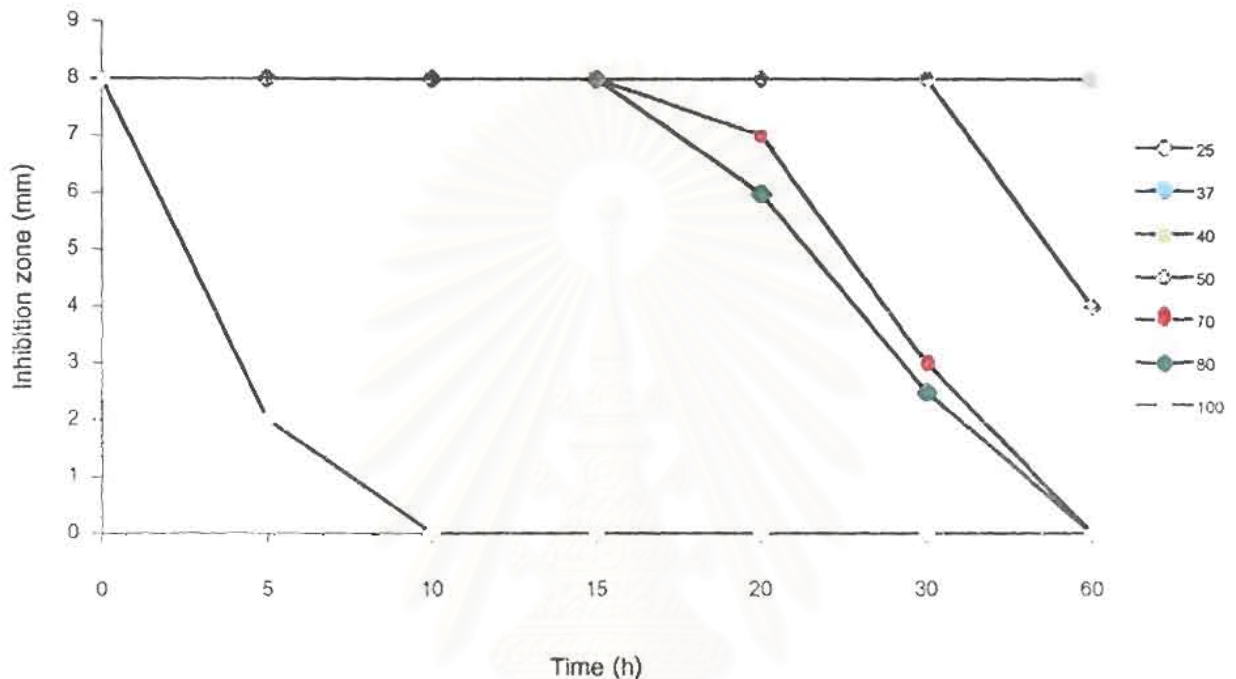
รูปที่ 24 : หลังจากทำ SDS-PAGE แล้วย้อมเพื่อตรวจสอบ lipoprotein ด้วย Sudan Black (ภาคผนวก 2.) พบว่า สารต้านจุลชีพดังกล่าวมีองค์ประกอบส่วนหนึ่งเป็น lipid ลำดับของตัวอย่างในช่องต่างๆ เป็นดังนี้

- | | |
|--|-------------|
| 1. SDS Molecular Weight Markers 2500 – 17000 Da (ปริมาณโปรตีน 5 ไมโครกรัม) | |
| 2. Insulin chain B, oxidized form MW 3496 | (* 5 *) |
| 3. Cultured Broth | (* 250 *) |
| 4. กระจกที่สกปรกได้ในช่วง 0-30% | (* 100 *) |
| 5. พืชที่ 3 หลังผ่านคอลัมน์ Sephadex G-50 | (* 5 *) |
| 6. พืชที่ 2 หลังผ่านคอลัมน์ DEAE-Sephadex | (* 5 *) |

หมายเหตุ : เนื่องจากตัวอย่างในช่องที่ 1 และ 2 ไม่มีองค์ประกอบของ lipid จึงไม่เกิดแถบสีค่าตามวิธีนี้ และในการทดสอบนี้ไม่แสดงตัวอย่างของ lipoprotein ชนิดอื่น

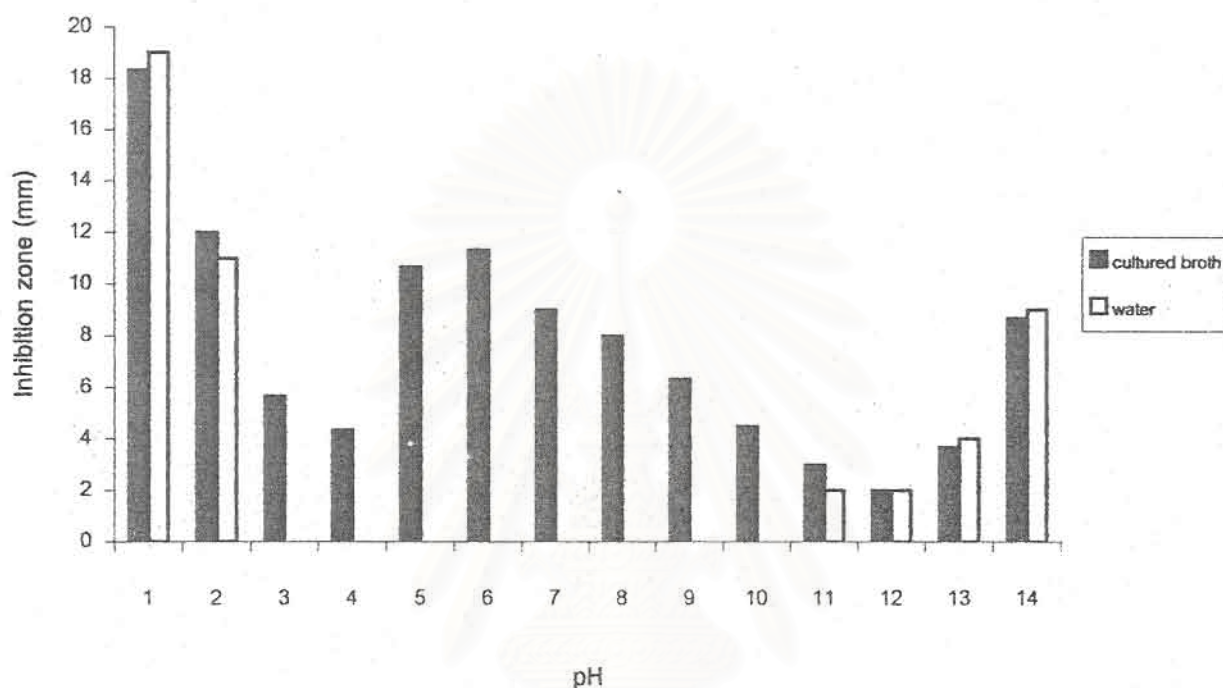
3. ศึกษาสมบัติเบื้องต้นของสารต้านจุลชีพที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11

3.1 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อแอกติวิตีของสารต้านจุลชีพ



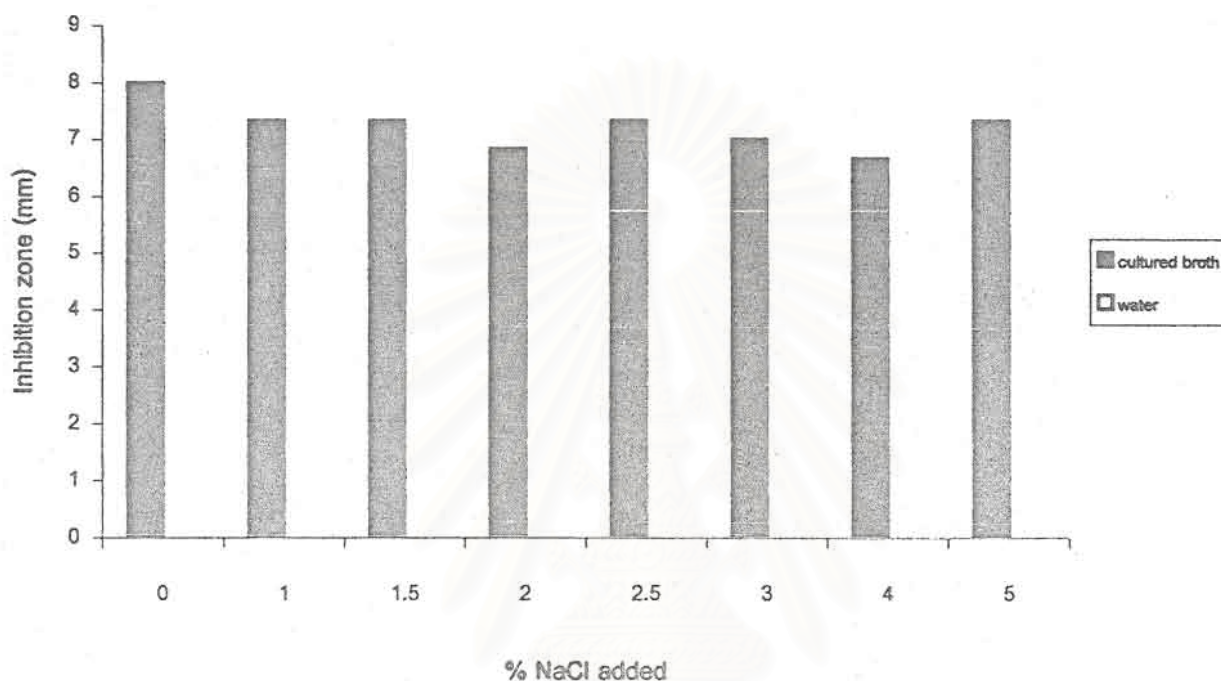
รูปที่ 25 : เมื่อนำส่วนน้ำใสที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 มาเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ กัน พบว่าการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 – 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาทีไม่ทำให้ แอกติวิตีเปลี่ยนแปลง การเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสขึ้นไป ทำให้ แอกติวิตี ลดลงได้ และการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสตั้งแต่ 5 นาทีจะทำให้ แอกติวิตี ลดลงอย่างมากจนไม่สามารถตรวจพบแอกติวิตี ภายในเวลา 10 นาที นอกจากนั้น หลังผ่านการ autoclave (121 องศาเซลเซียส 20 นาที) ไม่พบ แอกติวิตี ของส่วนน้ำใส

3.2 ศึกษาผลของ พีเอช ต่อแอกติวิตีของสารต้านจุลชีพ



รูปที่ 26 : ส่วนน้ำไลต์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 ในภาวะที่เหมาะสม แก่การสร้างสารต้านจุลชีพ เมื่อผ่านการปรับ pH (■) แล้วทดสอบแอกติวิตี เปรียบเทียบผลกับน้ำที่ปรับ pH (□) พบว่า น้ำสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ที่ช่วง pH 1-2 และ 11-14 ดังนั้นจึงสรุปว่า สารต้านจุลชีพให้ แอกติวิตี ได้ในช่วง pH 3 - 10

3.3 ศึกษาผลของปริมาณโซเดียมคลอไรด์ต่อแอกติวิตีของสารต้านจุลชีพ



รูปที่ 27 : ส่วนน้ำใสที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 ในภาวะที่เหมาะสมแก่การสร้างสารต้านจุลชีพ มาเติมโซเดียมคลอไรด์ปริมาณต่างกัน (■) พบว่าปริมาณโซเดียมคลอไรด์ในช่วง 0 - 5 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ไม่มีผลต่อแอกติวิตีของสารต้านจุลชีพนี้ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เป็นน้ำ (□) ที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ ปริมาณเท่ากัน ซึ่งพบว่าไม่มีแอกติวิตีจากปริมาณโซเดียมคลอไรด์ที่เติมลงในน้ำ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4 ศึกษาผลของเอนไซม์ต่อแอกติวิตีของสารต้านจุลชีพ

ตารางที่ 9 : แอกติวิตีของสารต้านจุลชีพเมื่อบำบัดด้วยเอนไซม์

เอนไซม์ที่เติม	Average Inhibition zone (mm)
-	7.0 ± 0.56
protease	0.0 ± 0.00
α -amylase	7.0 ± 0.62
lipase	6.8 ± 0.23

หมายเหตุ : ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ต่อ cultured broth 10 มล. เป็นดังนี้

protease 0.07 units

α -amylase 32 units

lipase 2.5 units

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

การอภิปรายผล

Bacillus sp. S11 ที่ใช้เป็นโพรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งสามารถสร้างสารต้านจุลชีพได้ โดยสามารถในการต้านแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ได้แก่ *B. cereus*, *B. megaterium*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* (วรรณิภา เพ็ญนัทธ์, 2539) คุณสมบัติดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานที่มีมาก่อนหลายฉบับ กล่าวคือ กลุ่มที่สร้างสารปฏิชีวนะ เช่น *B. circulans* (Murray และคณะ, 1949), *B. polymyxa* (Francis และ Rippon, 1949), *B. pumilus* (Abraham และคณะ, 1956) และ *B. cereus* (Johnson และคณะ, 1949) กลุ่มที่สร้าง bacteriocin-like เช่น *B. stearothermophilus* (Shafia, 1966) และกลุ่มที่สร้าง bacteriocin เช่น *B. megaterium* (Ivanovics และ Alfoldi, 1954; von Tersch และ Carlton 1983; Stahl, 1989.), *B. subtilis* (Jansen และ Hirschmann, 1944; Babasaki, 1985), *B. thermoleovorans* (Novotny และ Perry, 1992) และ *B. cereus* (Naclerio และคณะ, 1993)

โดยทั่วไป การสร้างสารต้านจุลชีพของแบคทีเรียเกิดขึ้นได้ตลอดช่วงของการเจริญ (growth cycle) ดังในการศึกษาของ Schlegel และ Slade (1974) พบว่าการสร้าง streptocin STH, จะเกิดได้ดีในช่วง exponential ของการเจริญ เช่นเดียวกับกับการสร้างสารต้านจุลชีพจาก *Bacillus* sp. S11 ที่เริ่มปรากฏในระยะ log phase และมากที่สุดในระยะสุดท้ายของ log phase

อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการสร้างสารต้านจุลชีพในการวิจัยครั้งนี้คือ สารสกัดจากยีสต์ 2% (น้ำหนัก/ปริมาตร), ไคโทแซนเนียม ฟอสเฟต 0.25 % (น้ำหนัก/ปริมาตร); pH 7.0 โดยไม่เติม กลูโคสและโซเดียมคลอไรด์ ใช้ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้นที่ 2% (ปริมาตร/ปริมาตร) ให้อากาศด้วยการเขย่า 200 รอบ/นาที และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นที่สังเกตว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้จะมีองค์ประกอบของไนโตรเจนสูง ปรากฏการณ์นี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Rogers (1972) ที่ใช้ สารสกัดจากยีสต์ 2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) เติมนลงใน Trypticase medium เพื่อส่งเสริมการสร้าง bacteriocin และเช่นเดียวกับผลงานของ Clarke และคณะ (1975) ที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย casein hydrolysate 5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) เพื่อการสร้าง butyricin 7423

การใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pH เริ่มต้นคือ 4.0 จะไม่มีการสร้างสารต้านจุลชีพนี้ เนื่องจาก *Bacillus* sp. S11 ไม่สามารถเจริญได้ที่ pH นี้ แต่จะเจริญได้ดีและสามารถสร้างสารขึ้นได้ใน pH 6 – 9 และ pH ที่เหมาะสมสำหรับการสร้างได้ดีที่ pH 7.0

จากขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ เมื่อทำการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วงต่างๆ คือ 0 – 30 %, 30 – 50 % และ 50 – 80 % ผลที่ได้คือ ทุกช่วงของการตกตะกอนสามารถให้แอกติวิตีของสารต้านจุลชีพ แต่จะพบมากที่สุดในช่วง 0 – 30 % ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารนี้มีคุณสมบัติเป็นโปรตีนที่มี hydrophobic patches เป็นบริเวณมาก จึงตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตได้เร็ว (Harris และ Angal, 1989) ต่อจากนั้นนำตะกอนในช่วงนี้มาผ่านขั้นตอนต่อมา คือ gel permeable chromatography ด้วย Sephadex G-50 ที่มีช่วงการแยกขนาดโมเลกุล (fractionation range) ที่ 1500 – 30000 ผลที่ได้คือโปรตีนในบริเวณพีคที่ 3 เท่านั้นที่ให้แอกติวิตี แสดงให้เห็นว่าโมเลกุลนี้มีขนาดเล็ก และเมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE ผลที่ได้มีความสอดคล้องกันคือ มวลโมเลกุลขนาดประมาณ 3.5 kDa เมื่อผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดย ion exchange chromatography ด้วย DEAE-Sephadex หลังจากชะด้วย 0.05 M Tris-HCl; pH 7.0 ตรวจพบแอกติวิตีในพีคที่เกิดขึ้นหลังจากการชะด้วย gradient 0 – 1.0 M NaCl ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่า สารนี้น่าจะมีค่า pI ต่ำกว่า 7.0

เมื่อเปรียบเทียบในการวิจัยเกี่ยวกับการสร้างสารต้านจุลชีพของ *Bacillus* ชนิดอื่นๆ แล้วเป็นไปได้ว่า สารที่สร้างขึ้นสามารถมีมวลโมเลกุลขนาดเล็ก 3.5 kDa และค่า pI ต่ำกว่า 7.0 โดยผลดังกล่าว มีความใกล้เคียงกับผลจากการศึกษาของ Zheng และ Slavik (1999) ที่แสดงให้เห็นว่า *B. subtilis* ที่แยกได้จาก Chinese fermented soybean seasoning สร้างแบคทีริโอซินที่มีขนาด 3.4 kDa pI ประมาณ 4.7

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารต้านจุลชีพที่ทนต่ออุณหภูมิสูงได้ระยะเวลาหนึ่ง ดังจะเห็นได้จากหลังจากการเก็บสารนี้ไว้ที่อุณหภูมิ 70 และ 80 เป็นเวลา 15 นาที แล้วแอกติวิตีของสารนี้จะลดลง แอกติวิตีของสารสามารถทำงานได้ในช่วง pH ที่กว้างคือ 3 – 10 โดยปริมาณโซเดียมคลอไรด์ไม่มีผลต่อแอกติวิตีของสารนี้ จึงมีความเป็นไปได้ในการนำสารนี้มาใช้ในทางอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำโดยใช้เป็นสารเสริมในอาหารกุ้งต่อไป

นอกจากนั้น เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE พบว่าสารต้านจุลชีพที่ได้จาก *Bacillus* sp. S11 นี้มีส่วนประกอบที่เป็น polypeptides และ lipid ดังแสดงให้เห็นจากการติดสี Coomassie Blue G-250 และ Sudan Black B ดังแสดงในรูปที่ 22 และ 24 และไม่ใช่องค์ประกอบแบบ glycoprotein เพราะจากแถบของสารนี้ให้ผลลบ (ไม่ให้แถบสีส้มแดง) เมื่อย้อมด้วย thymol และกรดซัลฟูริก (รูปที่ 23) อย่างไรก็ตาม จากตัวอย่างที่ผ่านลงคอลัมน์ Sephadex G-50 และ DEAE-Sephadex ไม่ให้ผลหลังจากย้อมด้วย Sudan Black B ดังแสดงในรูปที่ 24 (แถวที่ 5 และ 6) เป็นไปได้ว่าตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบมีความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพที่ต่ำ และการย้อมสี Sudan Black B ต่อ lipid มีความไวไม่เพียงพอ เมื่อบำบัดด้วย protease พบว่าสามารถลดแอกติวิตีของสารนี้ได้ ทำให้สรุปได้ว่าสารดังกล่าวมีสมบัติเป็นโปรตีน และเนื่องจากตรวจพบว่ามีมวลโมเลกุล 3.5 kDa ซึ่งเป็นขนาดเล็กจึงสามารถจัดกลุ่มให้เป็น polypeptide ได้ ดังรายงานของ Klaenhammer (1993) ในขณะที่ α -amylase และ lipase ไม่สามารถลดแอกติวิตีของสารนี้ได้ การที่ lipase ไม่สามารถลดแอกติวิตีของสารนี้ได้ทั้งที่สารนี้มีองค์ประกอบของไขมัน อาจเป็นไปได้ว่า lipid ที่เป็นองค์ประกอบนั้นไม่มีหน้าที่หลักเกี่ยวกับการเกิดแอกติวิตีของสารนี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 6

ข้อสรุป

1. *Bacillus* sp. S11 สร้างสารต้านจุลชีพเริ่มปรากฏในระยะ lcg phase และมากที่สุดในระยะสุดท้ายของ log phase
2. อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการสร้างสารต้านจุลชีพในการวิจัยครั้งนี้คือ สารสกัดจากยีสต์ 2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดโทแทลเทียม ฟอสเฟต 0.25 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ; pH 7.0 โดยไม่เติมกลูโคสและโซเดียมคลอไรด์เพิ่ม ใช้ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้นที่ 2% (ปริมาตร/ปริมาตร) ให้อากาศด้วยการเขย่า 200 รอบ/นาที และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส
3. สารต้านจุลชีพนี้ทำให้บริสุทธิ์ได้ด้วยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 0 – 30 % ขั้นตอนต่อมา คือนำมาเติมลงใน gel permeable chromatography ด้วย Sephadex G-50 และขั้นสุดท้ายคือ ผ่านการทำบริสุทธิ์โดย ion exchange chromatography ด้วย DEAE-Sephadex
4. สารต้านจุลชีพนี้มีมวลโมเลกุลขนาดประมาณ 3.5 kDa ค่า pI ต่ำกว่า 7.0 และสารนี้มีองค์ประกอบเป็น lipid และ polypeptides
4. สารนี้ทนต่ออุณหภูมิสูงได้ระยะเวลาหนึ่ง คือ หลังจากการเก็บสารนี้ไว้ที่อุณหภูมิ 70 หรือ 80 ° C ภายในเวลา 15 นาที
6. สารนี้สามารถทำงานได้ในช่วง pH 3 – 10
7. ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ไม่มีผลต่อแอกติวิตีของสารนี้
8. protease สามารถลดแอกติวิตีของสารนี้ได้ ในขณะที่ α -amylase และ lipase ไม่สามารถลดแอกติวิตีของสารนี้ได้

บทที่ 7

ข้อเสนอแนะ

1. จากข้อมูลที่ได้เกี่ยวกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับการสร้างสารต้านจุลชีพนี้ ควรมีการศึกษาปรับปรุงอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีราคาถูกลงเพื่อความเป็นไปได้ในการใช้ในอุตสาหกรรม
2. ควรมีการปรับปรุงวิธีการทำให้บริสุทธิ์ให้รวดเร็วยิ่งขึ้นเพื่อนำไปสู่ความเป็นไปได้ในการใช้ในทางอุตสาหกรรม
3. เนื่องจากยีสานี้มีความสามารถในการต้านเชื้อ *B. cereus* ซึ่งพบเป็นเชื้อก่อโรคทางเดินอาหาร จึงควรศึกษาต่อไปถึงความเป็นไปได้ในการนำยีสานี้มาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

ส่วนอ้างอิง

- กรมเศรษฐกิจการพาณิชย์. 2541. สภาพภาวะการส่งออกอาหารแช่แข็งในปี 2540 และ 2541. วารสาร
เครื่องเจริญโภคภัณฑ์ ขาวกุ้ง 117 : 4.
- คมสัน ลีลาคหิกจ. 2539. กฎหมายใหม่ของญี่ปุ่นกับการส่งออกกุ้งกุลาดำของไทย. วิชาการปริทัศน์
2 : 6 - 8.
- จันทนา นิธิเมธาโชค. 2539. การเสริมภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* โดย *Clostridium*
butyricum. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชา
จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ฐิติพงษ์ ณะรัชติการนนท์. 2538. การใช้แลคติกแอซิดแบคทีเรียเป็นโปรไบโอติก เพื่อเสริมในอาหาร
ไก่. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- วรรณิภา เพ็ญนภัทธร. 2539. การใช้แบคทีเรียเป็นโปรไบโอติกเสริมในอาหารกุ้ง. วิทยานิพนธ์
มหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- Abraham, E. P., Heatley, N. G., Brookes, P., Fuller, A.T. and Walker, J. 1956. Probable
Identity of an antibiotic produced by a spore-bearing bacillus of the *B. pumilus*
group with micrococcin. Nature. (London) 178 : 44 – 45.
- Allison, G., Fremaux C., Ahn, C. and Klaenhammer, T.R. 1994. Expansion of the bacteriocin
activity and host range upon complementation of two peptides encoded within the
lactacin F operon. J. Bacteriol. 176 : 2235-2241.
- Babasaki, K., Takao, T., Shimonishi, Y. and Kurahashi, K. 1985. Subtilosin A, a new
antibiotic peptide produced by *Bacillus subtilis* 168 : isolation, structural analysis,
and biogenesis. Journal of Biochemistry (Tokyo). 98 : 585 – 603.
- Baird, D.M. 1977. Probiotics help boost feed efficiency. Feedstuffs. 49 : 11 – 12.
- Barefoot, S. F. and Klaenhammer, T. R. 1983. Detection and activity of lactacin B, a
bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. Appl. Environ. Microbiol. 45 :
1808 - 1815.
- Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C. and Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing
by a standardized single disc method. Amer. J. Clin. Pathol. 45 : 493-496.

- Clarke, D. J., Robson, R. M. and Morris, J. G. 1975. Purification of two *Clostridium* bacteriocins by procedures appropriate to hydrophobic proteins. Antimicrob. Agents Chemother. 7 : 256 – 264.
- Evans, E.E., Painter, B., Evans, M.L., Weinheimer, P. and Acton, R.T. 1968. An induced bactericidin in the spiny lobster, *Panulirus argus*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 128 : 394-397.
- _____, Weinheimer, P.F., Painter, B., Acton, R.T. and Evans, M.L. 1969. Secondary and tertiary responses of the induced bactericidin from the west indian spiny lobster, *Panulirus argus*. J. Bacteriol. 98 : 943-946.
- Francis, A. E. and Rippon J.E. 1949. *Bacillus polymyxa* and its bacteriophages. J. Gen. Microbiol. 3 : 425 –432.
- Fuller, R. 1992. Probiotics: The Scientific Basis. 1st ed. London : Chapman & Hall. : 209-221.
- Gross, E. and Morell, J.L. 1971. The structure of nisin. J. Am. Chem. Soc. 93 : 4634-4635.
- Han, I.K., Lee, S.C., Lee, J.H., Lee, K.K. and Lee, J.C. 1984a. Studies on the growth effects of probiotics I. The effects of *Lactobacillus sporogenes* in the growing performance and the change in microbial flora of the faeces and intestinal contents of the broiler chicks. Korean Journal of Animal Science. 26 : 150 –157.
- Han, I.K., Lee, S.C., Lee, J.H., Kim, J.D., Jung, P.K. and Lee, J.C. 1984b. Studies on the growth promoting effects of probiotics II. The effects of *Clostridium butyricum* ID on the performance and the changes in the microbial flora of the faeces and intestinal contents of the broiler chicks. Korean Journal of Animal Science. 26 : 158 – 165.
- Han, I.K., Kim, J.D., Lee, J.H., Lee, S.C., Kim, T.H. and Kwang, J.H. 1984c. Studies on the growth promoting effects of probiotics III. The effects of *Clostridium butyricum* ID on the performance and the changes in the microbial flora of the faeces of growing pigs. Korean Journal of Animal Science. 26 : 166 – 171.
- Harris, E. L. V. and Angal, S. 1989. Concentration of the extract : precipitation by increasing the ionic strength (salting-out). P.154 – 157. Protein Purification methods. Oxford University Press. London. 1989.
- Hurst, A. 1981. Nisin. Adv. Appl. Microbiol. 27 : 85-123.



- Itami, T., Takahashi, Y., Yoneoka, K. and Yan, Y. 1991. Survival of larval giant tiger prawn *Penaeus monodon* after addition of killed *Vibrio* cells to a microencapsulated diet. J. Aquat. Anim. Health. 3 : 151-152.
- Ivanovics, G. and Alföldi, L. 1954. A new antibacterial principle : megacine. Nature. 4427 : 465.
- Jack, R.W., Tagg, J.R. and Ray, B. 1995. Bacteriocins of Gram-Positive bacteria. Microbiol. Rev. 59 : 171-200.
- Jansen, E. F. and Hirschmann, D. J. 1944. Subtilin – an antibacterial product of *Bacillus subtilis* : culturing conditions and properties. Archives of Biochemistry. 4 : 287 – 309.
- Johnson, C. W., West, H. D., Jones, H. L. and Long, C. J. 1949. Biocerin : an antibiotic Produced by *Bacillus cereus*. J. Bacteriol. 57 : 63 –65.
- Jimenez-Diaz, R., Rios-Sanchez, R.M., Dezmazeaud, M., Ruiz-Barba, J.L. and Piard, J.C. 1993. Plantaricins S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO 10 isolated from a green olive fermentation. Appl. Environ. Microbiol. 59 : 1416-1424.
- Joerger, M.C. and Klaenhammer, T.R. 1986. Characterization and purification of Helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. J. Bacteriol. 167 : 439-446.
- Klaenhammer, T.R. 1988. Bacteriocin production by lactic acid bacteria. Biochemie. 70 : 337-349.
- Klaenhammer, T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 12 : 39-86.
- Lewus, C.B., Sun, S. and Montville, T.J. 1992. Production of an amylase-sensitive bacteriocin by an atypical *Leuconostoc paramesenteroides* strain. Appl. Environ. Microbiol. 58 : 143-149.
- Lowry, O. H., Rosebrough, A.L., Farr, A.L., and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- Murray, F. J., Tetrault, P. A., Kaufmann, O. W., Koffer, H., Peterson, D. H. and Coiingsworth, D. R. 1949. Circulin, an antibiotic from and organism resembling *Bacillus circulans*. J. Bacteriol. 57 : 305 – 312.

- Naclerio, G., Ricca, E., Sacco, M. and Felice, M.D. 1993. Antimicrobial activity of a newly identified bacteriocin of *Bacillus cereus*. Appl. Environ. Microbiol. 59 : 4313 - 4316.
- Nissen-Meyer, J., Larsen, A.G., Sletten, K., Daeschel, M. and Nes, I.F. 1992. A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. J. Bacteriol. 174 : 5686-5692.
- Novotny, J.F. Jr. and Perry, J.J. 1992. Characterization of bacteriocins from two strains of *Bacillus thermoleovorans*, a thermophilic hydrocarbon-utilizing species. Appl. Environ. Microbiol. 58 : 2393-2396.
- Racusen, D. 1979. Glycoprotein detection in polyacrylamide gel with thymol and sulfuric acid. Analytical Biochemistry. 99 : 474 – 476.
- Rogers, A. H. 1972. Effect of the medium on bacteriocin production among strains of *Streptococcus mutans*. Appl. Microbiol. 24 : 294 – 295.
- Rogers, L. A. 1928. The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. J. Bacteriol. 16 : 321-325.
- Schägger, H. and von Jagow, G. 1987. Tricine – sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Analytical Biochemistry. 166 : 368 – 379.
- Schlegel, R. and Slade, H. D. 1974. Alteration of macromolecular synthesis and membrane permeability by *Streptococcus sanguis* bacteriocin. J. Gen. Microbiol. 81 : 275 – 277.
- Shafia, F. 1966. Thermocins of *Bacillus stearothermophilus*. J. Bacteriol. 95 : 524 – 525.
- Siwicki, A.K., Anderson, D.P. and Rumsey, G.L. 1994. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. Vet. Immunol. Immunopathol. 41 : 125-139.
- Sritunyalucksana, K. 1995. Study of the humoral defense factors in the black tiger prawn, *Penaeus monodon*. Master thesis, Mahidol University.
- Stähl, S. 1989. A new bacteriocinogenic activity : megacin B 11 encoded by plasmid pSE 203 in strains of *Bacillus megaterium*. Archives of Microbiology. 151 : 159 – 165.

- Stewart, J.E. and Zwicker, B.M. 1972. Natural and induced bactericidal activities in the hemolymph of the lobster, *Homorus americanus* : Products of hemocyte-plasma interaction. Can. J. Microbiol. 18 : 1499-1508.
- Sung, H.H., Yang, Y.L. and Song, Y.L. 1996. Enhancement of microbicidal activity in the tiger shrimp *Penaeus monodon* via immunostimulation. J. Crustacean. Biol. 16 : 278-284.
- Tagg, J.R., Dajani, A.S. and Wannamaker, L.W. 1976. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. Bacteriol. Rev. 40 : 722-756.
- von Tersch, M. A. and Carlton, B. C. 1983. Bacteriocin from *Bacillus megaterium* ATCC 19213 : comparative studies with megacin A – 216. Journal of Bacteriol. 155 : 866 – 871.
- Toba, T., Yoshioka, E. and Itoh, T. 1991. Acidophilucin A, a new heat-labile bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* LAPT 1060. Lett. Appl. Microbiol. 12 : 106-108.
- Van Belkum, M.J., Hayema, B.J., Jeeninga, R.E., Kok, J. and Venema, G. 1991. Organization and nucleotide sequence of two lactococcal bacteriocin operons. Appl. Environ. Microbiol. 57 : 492-498.
- Vargas-Albores, F. 1995. The defense system of brown shrimp (*Penaeus californiensis*) : Humoral recognition and cellular responses. J. Mar. Biotechnol. 3 : 153-156.
- Vaughan, E.E., Daly, C. and Fitzgerald., G.F. 1992. Identification and characterization of Helveticin V-1829, a bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 1829. J. Appl. Bacteriol. 73 : 299-308.
- Weinheimer, P.F., Acton, R.T., Sawyer, S. and Evans, E.E. 1969. Specificity of the induced bactericidin of the west indian spiny lobster, *Panulirus argus*. J. Bacteriol. 98 : 947-948.
- Zheng, G. and Slavik, M. F. 1999. Isolation, partial purification and characterization of a Bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus subtilis* strain. Letters in Applied Microbiology. 28 : 363 – 367.

ภาคผนวก

1. การย้อม glycoprotein

มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

- 1.1 นำเจลจากการทำ SDS-PAGE มาแช่ในสารละลาย 25% (ปริมาตร/ปริมาตร) isopropanol ใน 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) กรดอะซิติก เป็นเวลาข้ามคืน
- 1.2 ย้อมด้วยสารละลาย 1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) thymol ใน 25% (ปริมาตร/ปริมาตร) isopropanol และ 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) กรดอะซิติก เป็นเวลา 3-6 ชั่วโมง
- 1.3 ล้างด้วยสารละลาย 80% (ปริมาตร/ปริมาตร) กรดซัลฟูริกใน 20% (ปริมาตร/ปริมาตร) เอทานอลเป็นเวลา 15-30 นาที สารที่เป็น glycoprotein จะค่อยๆ ปรากฏเป็นแถบสีส้มแดงเข้มจนเกือบเป็นสีน้ำตาล ทำการบันทึกผลทันที

2. การย้อม lipoprotein ด้วย Sudan Black B

มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

- 2.1 แช่แผ่นเจลที่ได้จากการทำ SDS-PAGE ใน 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) ฟอรัลดีไฮด์ เป็นเวลาข้ามคืน
- 2.2 แช่ล้างด้วยน้ำกลั่น 4 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที
- 2.3 แช่ใน ethylene glycol 2 ครั้ง ๆ ละ 20 นาที
- 2.4 แช่ในสารละลาย 1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) Sudan Black B ใน ethylene glycol เป็นเวลาข้ามคืน
- 2.5 แช่ล้างด้วยสารละลาย 20% (ปริมาตร/ปริมาตร) อะซีโตน ใน 15% (ปริมาตร/ปริมาตร) กรดอะซิติก ทำการล้างซ้ำ จนแถบสีดำที่เกิดจากการติดสีของ lipoprotein ปรากฏชัดเจน แล้วบันทึกผล