

การผลิตและการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน
ของสารปฏิชีวนะจาก *Bacillus* sp. SR-1

นางสาวรุ่งอรุณ วาณิช



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ. ศ. 2539

ISBN 974-633-153-1

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION AND PARTIAL PURIFICATION
OF ANTIBIOTIC FROM *Bacillus* sp. SR-1

Miss Rungaroon Waditee

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of The Requirements

for The Degree of Master of Science

Department of Microbiology

Graduated School

Chulalongkorn University

1996

ISBN 974-633-153-1

พิมพ์ต้นฉบับบทความวิจัยวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว

รุ่งอรุณ วาดีตี : การผลิตและการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนของสารปฏิชีวนะจาก
Bacillus sp. SR-1 (PRODUCTION AND PARTIAL PURIFICATION OF ANTIBIOTIC
FROM Bacillus sp. SR-1) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.สุมาลี พิษญากร, 113 หน้า.
ISBN 974-633-153-1

ได้คัดแยกแบคทีเรียสายพันธุ์ SR-1 จากตัวอย่างหนังสือตัวที่มีการติดเชื้อ และสามารถสกัดจำแนก
ได้ใกล้เคียงกับ Bacillus licheniformis สายพันธุ์ SR-1 สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของ
จุลินทรีย์ ได้ทั้งแบคทีเรีย รา และยีสต์ ได้นำสายพันธุ์ SR-1 มาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิต
สารปฏิชีวนะในระดับขวดเยาะ โดยการปรับปรุงสูตรอาหารและภาวะในการเลี้ยง พบว่าสายพันธุ์
SR-1 ผลิตสารปฏิชีวนะได้สูงสุดในอาหารสูตรปรับปรุง R-1 ซึ่งมีองค์ประกอบเป็น แบทโตเปปโตน
0.5% สารสกัดจากเนื้อ 0.3% มอลโตส 1.0% สารสกัดจากยีสต์ 0.25% และแมงกานีสคลอไรด์
ความเข้มข้น 0.5×10^{-5} โมลาร์ โดยมีพีเอชเริ่มต้นของอาหารเป็น 7.0 เลี้ยงที่อุณหภูมิ 35°C . บน
แคร์เยาะความเร็ว 200 รอบต่อนาที ซึ่งจะให้ค่าของสารปฏิชีวนะ 24.36 หน่วย/มก. น้ำหนักเซลล์แห้ง
ในช่วงเวลาที่ 60 ของการเลี้ยงเชื้อ

สารปฏิชีวนะที่สร้างขึ้นจากสายพันธุ์ SR-1 เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ ได้ทำการสกัด
แยกสารปฏิชีวนะออกจากเซลล์โดยการแช่แข็งร่วมกับการใช้เอ็นไซม์ไลโซไซม์ และสามารถทำสาร
ปฏิชีวนะให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยการโครมาโตกราฟีในกลีเซอรอล ผ่านคอลัมน์เซฟ-แพก ซี18 2 ครั้ง และ
ตามด้วยคอลัมน์เซฟา เด็กซ์-25 ตามกระบวนการดังกล่าวทำให้สารปฏิชีวนะมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 16
เท่า สารปฏิชีวนะที่บริสุทธิ์ที่ได้สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก Bacillus cereus ATCC 11778
Bacillus subtilis ATCC 6633 Bacillus megaterium ATCC 14581 Staphylococcus
aureus ATCC 25923 และรา Gliocladium sp. Paecilomyces variotii

ได้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารปฏิชีวนะที่ได้ โดยการทำให้โครมาโตกราฟีแบบสมรรถนะสูง
ซึ่งปรากฏยอดพีคเด่น 1 พีคที่ Retention time เป็น 2.15 นาที เมื่อได้นำมาตรวจสอบหาน้ำหนัก
โมเลกุลโดยการทำให้เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ได้ค่าน้ำหนักโมเลกุลของสารปฏิชีวนะที่ได้จากสายพันธุ์ SR-1
ประมาณ 9700 ดาลตัน และได้ตรวจสอบโครงสร้างเบื้องต้น โดยการทำให้อินฟราเรดสเปกตรัมจะให้
แถบเด่นในช่วงการดึงของโมเลกุลเป็น 3450 1650 และ 1450 cm^{-1} ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็น
ว่าสารปฏิชีวนะที่ได้จากสายพันธุ์ SR-1 เป็นสารปฏิชีวนะกลุ่มเพปไทด์

สารปฏิชีวนะที่ได้จากสายพันธุ์ SR-1 มีความเสถียรสูงสุดในช่วงพีเอช 7.0-7.5 และที่
อุณหภูมิ 30°C . ไม่สูญเสียกิจกรรมต่อเบต้าแลกแทมเมส เบต้ากลูโคซิลเตส ไลโซไซม์ ปาเปน
โปรตีนเค สู่สูญเสียกิจกรรมบางส่วนต่อเปปซิน และสูญเสียกิจกรรมทั้งหมดต่อทริปซิน

ภาควิชา..... จุลชีววิทยา
สาขาวิชา..... จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
ปีการศึกษา..... 2538

ลายมือชื่อนิสิต.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

C626299 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: ANTIBIOTIC / Bacillus/ PRODUCTION/ PURIFICATION

RUNGAROON WADITEE : PRODUCTION AND PARTIAL PURIFICATION OF

ANTIBIOTIC FROM Bacillus sp. SR-1. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF.

SUMALEE PICHYANGKURA, Ph.D. 113 pp. ISBN 974-633-153-1

The bacterial strain; SR-1, was isolated from infected leather, and identified as Bacillus licheniformis. This strain was found the capability to produce an antifungal and antibacterial antibiotics. The cultivated conditions for antibiotic production of SR-1 was optimized in shake flask scale. It was found that SR-1 was produced high amount of antibiotic in modified R-1 medium which consisted of 0.5% Bacto peptone, 0.3% Beef extract, 1.0% Maltose, 0.25% Yeast extract and 0.5×10^{-5} M. $MnCl_2$, initial pH 7.0, temperature 35°C on shaking flask at 200 rpm. The cells were harvested after cultivation for 60 hours. Under these conditions, 24.36 unit/mg. cell mass of antibiotic was obtained.

The antibiotic from SR-1 was determined as an intracellular substances. The cells were broken by freeze-thawed followed by lysozyme treatment. Whole cells extract were concentrated in 50% glycerol and then partially purified twice through the SEP-PAK C_{18} and Sephadex G-25, respectively. According to these system, antibiotic from strain SR-1 was 16-folds increase in purification. The purified antibiotic was inhibited both gram-positive bacteria; Bacillus cereus ATCC 11778, Bacillus subtilis ATCC 6633, Bacillus megaterium ATCC 14581, Staphylococcus aureus ATCC 25923 and some fungi; Gliocladium sp., Paecilomyces variotii.

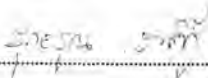
Purified antibiotic was detected by RP-HPLC which showed single peak at retention time 2.15 minute. This antibiotic was estimated molecular weight about 9700 dalton, by using SDS-PAGE. To determine preliminary structure of purified antibiotic by the Infrared Spectrum, IR spectra appeared adsorption band at 3450, 1650 and 1450 cm^{-1} , respectively. These indicated that antibiotic from strain SR-1 was peptide antibiotic.

Purified antibiotic was mostly stable at temperature 30°C and pH 7.0-7.5; resisted to B-glucosidase, B-lactamase, lysozyme, papain and proteinase K, but slightly hydrolysed by pepsin and completely hydrolysed by trypsin.

ภาควิชา.....จุลชีววิทยา.....

สาขาวิชา.....จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม.....

ปีการศึกษา.....2538.....

ลายมือชื่อนิสิต..........

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..........

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....



กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สุมาลี พิชญางกูร ที่ได้กรุณารับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์และได้ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ คำปรึกษา ตลอดจนให้ตัวอย่างของสายพันธุ์ SR-1 ในงานวิจัยนี้ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้สำเร็จถูกล่วงไปด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล ประธานกรรมการ ที่กรุณาให้คำแนะนำ คำปรึกษา ข้อคิดในการดำเนินงานวิจัย และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุวิมล กิรติพิบูล ที่ได้ให้คำปรึกษาในการดำเนินงานวิจัย คำแนะนำ ความอนุเคราะห์ในเอกสารอ้างอิงทางวิชาการ และกรุณารับเป็นกรรมการในการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ดร. ชัญญา พุทธิจันทร์ ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อัญชริดา สวารชร์ ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือในการวิจัยบางส่วน

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา เจ้าหน้าที่ทุกๆ ท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือและความอนุเคราะห์ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการวิเคราะห์สารตัวอย่าง

ขอขอบคุณ เพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ที่คอยเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์อย่างเสมอมา

ท้ายที่สุดขอกราบขอบพระคุณ คุณแม่ พี่ และน้อง ที่คอยเป็นกำลังใจให้คำปรึกษา และให้ความช่วยเหลือทุกๆ สิ่งอย่างหาที่สุดไม่ได้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ซ
สารบัญรูป.....	ฌ
คำย่อ.....	ฉ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
2 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....	22
3 ผลการทดลอง.....	40
4 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	85
เอกสารอ้างอิง.....	94
ภาคผนวก ก.....	102
ภาคผนวก ข.....	109
ประวัติผู้เขียน.....	113

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ตัวอย่างของสารปฏิชีวนะกลุ่มเพปไทด์บางชนิด ที่ได้จากสกุล Bacillus.....	6
2	แสดงกรดอะมิโนลักษณะจำเพาะ ที่พบในสารปฏิชีวนะกลุ่มเพปไทด์.....	7
3	แสดงแหล่งคาร์บอนที่มีและไม่มีผลกระทบ ต่อการสร้างสารปฏิชีวนะบางชนิด.....	16
4	ผลการตรวจสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี และรีเอเจนต์ทดสอบชนิดต่างๆ ของสายพันธุ์ SR-1	41
5	แสดงผลการยับยั้งของสายพันธุ์ SR-1 ต่อเชื้อทดสอบแบคทีเรีย รา และยีสต์โดยวิธี Point inoculation.....	42
6	แสดงผลการยับยั้งการเจริญของสารปฏิชีวนะอย่างหยาบต่อเชื้อทดสอบชนิดต่างๆ.....	64
7	แสดงความบริสุทธิ์ที่เพิ่มขึ้น ในขั้นตอนการทำสารปฏิชีวนะให้บริสุทธิ์.....	69
8	แสดงผลการยับยั้งการเจริญของสารปฏิชีวนะที่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ต่อเชื้อทดสอบแบคทีเรีย รา และยีสต์	71

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1 แสดงการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะกลุ่มเพปไทด์แบบ Ribosomal synthesis.....	9
2 แสดงการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะกลุ่มเพปไทด์แบบ Nonribosomal synthesis.....	11
3 โครงสร้างของ Bacilysin ที่ได้จาก <i>Bacillus subtilis</i>	12
4 โครงสร้างของ Chlorotetain ที่ได้จาก <i>Bacillus subtilis</i>	12
5 โครงสร้างของ Rhizocticin ที่ได้จาก <i>Bacillus subtilis</i>	13
6 โครงสร้างของ Baciphelacin ที่ได้จาก <i>Bacillus thioaminolyticus</i> ..	13
7 โครงสร้างของ Mersacidin ที่ได้จาก <i>Bacillus</i> sp. HIL-85.....	14
8 โครงสร้างของ Bacillomycin D ที่ได้จาก <i>Bacillus subtilis</i>	14
9 ภาพแสดงลักษณะเซลล์และการติดสีแกรมของสายพันธุ์ SR-1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์.....	40
10 แสดงการยับยั้งการเจริญของสายพันธุ์ SR-1 ต่อเชื้อทดสอบ <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581 โดยการทำให้ Point inoculation บ่มที่ 37° ซ. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	44
11 แสดงการยับยั้งการเจริญของสายพันธุ์ SR-1 ต่อเชื้อทดสอบ <i>Paecilomyces variotii</i> โดยการทำให้ Point inoculation บ่มที่ 30° ซ. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	45
12 แสดงการยับยั้งการเจริญของสายพันธุ์ SR-1 ต่อเชื้อทดสอบ <i>Candida albicans</i> โดยการทำให้ Point inoculation บ่มที่ 30° ซ. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	45
13 กราฟแสดงรูปแบบการเจริญของสายพันธุ์ SR-1 จากการเลี้ยงในอาหาร NB เป็นเวลา 72 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30 ± 2° ซ. บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที.....	46

รูปที่	หน้า
14	48
15	50
16	52
17	53
18	54
19	56
20	57

รูปที่	หน้า
21 กราฟแสดงการเจริญของสายพันธุ์ SR-1 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช ปริมาณการสร้างสารปฏิชีวนะ ในอาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนร่วม (NYE) เลี้ยงที่อุณหภูมิ $30 \pm 2^{\circ}$ ซ. บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที.....	58
22 กราฟแสดงปริมาณของสารปฏิชีวนะที่สายพันธุ์ SR-1 สร้างขึ้น เมื่อใช้ปริมาณสารสกัดจากยีสต์ 0-20 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนร่วมเลี้ยงที่อุณหภูมิ $30 \pm 2^{\circ}$ ซ. บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที.....	59
23 กราฟแสดงผลของธาตุปริมาณน้อย $FeCl_2$ $MnCl_2$ และ $ZnCl_2$ ต่อการสร้างสารปฏิชีวนะของสายพันธุ์ SR-1 เลี้ยงที่อุณหภูมิ $30 \pm 2^{\circ}$ ซ. บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที.....	61
24 กราฟแสดงผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการสร้างสารปฏิชีวนะ จากการเลี้ยงสายพันธุ์ SR-1 ในอาหารสูตรปรับปรุง R-1 เลี้ยงที่อุณหภูมิ $30 \pm 2^{\circ}$ ซ. บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที.....	62
25 กราฟแสดงผลของอุณหภูมิในช่วง $28 - 40^{\circ}$ ซ. ต่อการสร้างสารปฏิชีวนะของสายพันธุ์ SR-1 ในอาหารสูตรปรับปรุง R-1 พีเอชของอาหารเริ่มต้น 7.0 บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที.....	63
26 โครมาโตรแกรมของสารปฏิชีวนะที่ได้จากสายพันธุ์ SR-1 เมื่อทำโครมาโตรกราฟีแบบอาศัยความแตกต่างของโมเลกุล.....	68
27 โครมาโตรแกรมของสารปฏิชีวนะที่ได้จากสายพันธุ์ SR-1 เมื่อทำ RP-HPLC ภาคนำพาเป็นอะซิโตนไตรีนและฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.5 คิวอัตราส่วน 15 : 85 อัตราการไหล 0.3 มล./นาที ตรวจสอบผลโดยแสงอุลตราไวโอเลตที่ 230 นาโนเมตร.....	75
28 โซเดียมโดเดซิลโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (SDS-PAGE) ของสารปฏิชีวนะที่ผลิตจากสายพันธุ์ SR-1.....	77
29 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐาน และ ลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุล โดยการทำให้โซเดียมโดเดซิลโพลี	

รูปที่	หน้า
	อะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟริซิสที่เจลความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์
30	กราฟแสดงความเสถียรของสารปฏิชีวนะหลังจากผ่าน Gel filtration ต่ออุณหภูมิในช่วง 30-60 ° ซ.....
31	กราฟแสดงความเสถียรของสารปฏิชีวนะหลังจากผ่าน Gel filtration ต่อพีเอชในช่วง 5.5-8.0
32	กราฟแสดงความเสถียรของสารปฏิชีวนะหลังจากผ่าน Gel filtration ต่อเอ็นไซม์บางชนิด.....
33	โครมาโตแกรมของสารปฏิชีวนะที่ได้จากสายพันธุ์ SR-1 จากการ ทำอินฟราเรดสเปกตรัม.....
34	กราฟมาตรฐานบีเอสเอ.....
35	กราฟมาตรฐานกลูโคส.....

คำย่อ

- ° ซ. = องศาเซลเซียส
ชม. = ชั่วโมง
ซม. = เซนติเมตร
กก. = มิลลิกรัม
มม. = มิลลิเมตร
มล. = มิลลิลิตร
% = เปอร์เซ็นต์
∅ = เส้นผ่าศูนย์กลาง
OD₅₈₀ = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 580 นาโนเมตร