

## บทที่ 4

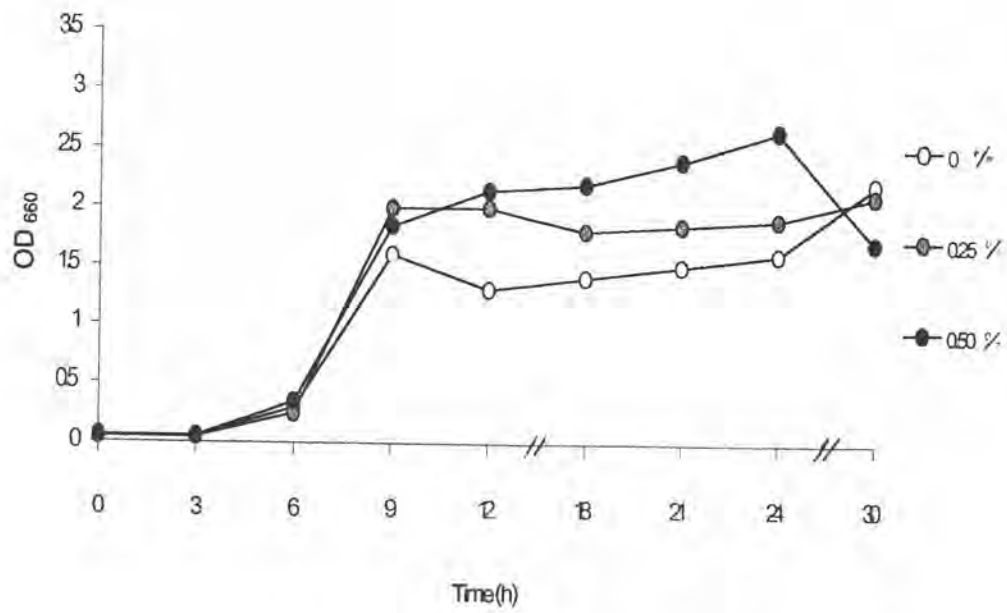
### ผลการวิจัย

#### ก. การเพาะเลี้ยง *Bacillus sp. S11* ในภาวะที่เหมาะสมแก่การสร้างสาร ต้านจุลชีพ

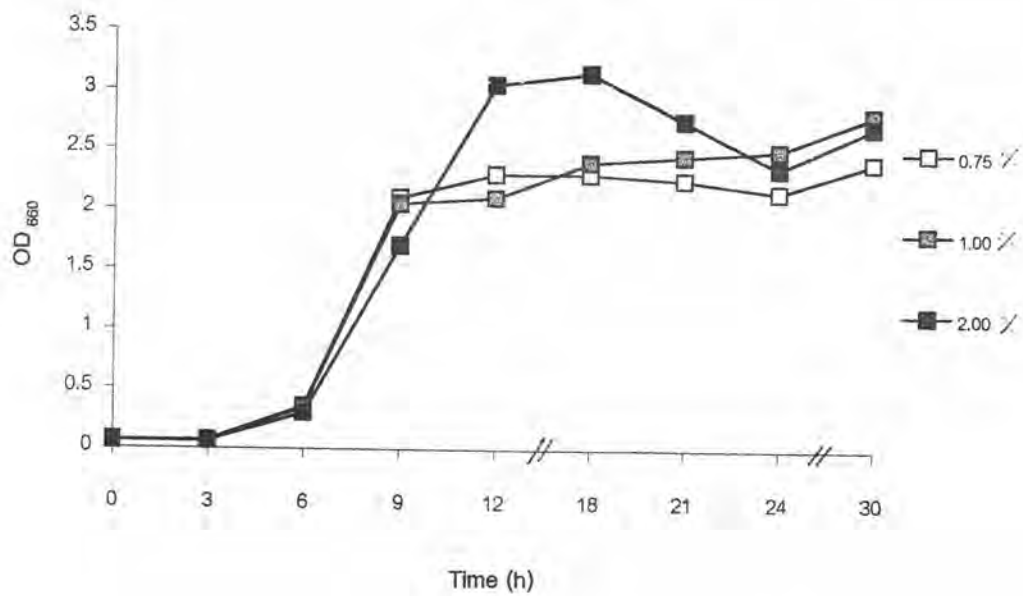
##### 4.1 การแปรผันปริมาณกลูโคสในการเพาะเลี้ยง *Bacillus sp. S11* เพื่อให้ผลิตสาร ต้านจุลชีพปริมาณสูง

จากการศึกษาเบื้องต้นของวรรณิกา เพ็ญนัทธ์ (2539) พบว่า *Bacillus sp. S11* ผลิตสารต้านจุลชีพได้ในการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลวทริปติกชอย ซึ่งมีองค์ประกอบคือ ทริปโตน (tryptone) 17 กรัม/ลิตร ผงสกัดถั่วเหลือง (soy fine) 3 กรัม/ลิตร โซเดียมคลอไรด์ 5 กรัม/ลิตร ไดโพลแทสเซียม ฟอสเฟต 2.5 กรัม/ลิตร และเดกซ์โทรส (dextrose) 2.5 กรัม/ลิตร ดังนั้นในการทดลองนี้จึงดัดแปลงจากสูตรอาหารเหลวทริปติก เป็นอาหารที่ประกอบด้วย สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) 20 กรัม/ลิตร โซเดียมคลอไรด์ 5 กรัม/ลิตร และไดโพลแทสเซียม ฟอสเฟต 2.5 กรัม/ลิตร แปรผันปริมาณกลูโคสที่ 0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.0 และ 2.0% (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดยใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่ 2.0% โดยปริมาตร ทำการเพาะเลี้ยงตั้งข้อ 3.5 เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 30 ชั่วโมง ติดตามการเจริญด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในน้ำเลี้ยงเชื้อตามวิธีของ Lowry และคณะ (1951) และติดตามแอกติวิตีของสารต้านจุลชีพต่อเชื้อทดสอบ *Bacillus cereus* ATCC 11778 ด้วยวิธีการแพร่ผ่านอาหารแข็งตั้งข้อ 3.12 จากการศึกษาพบว่าปริมาณกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 2.0% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ให้การเจริญสูงสุด (ดังรูปที่ 1) การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อจากรูปที่ 2 แสดงให้เห็นว่าขณะที่ *Bacillus sp. S11* เจริญจะทำให้ค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงในช่วงต้นของ log phase แล้วเริ่มเพิ่มขึ้นและคงที่ในช่วงท้ายของ log phase และ stationary phase ปริมาณโปรตีน (ตารางที่ 6) มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยตลอดการเพาะเลี้ยงในทุกสูตรอาหาร เชื้อจุลชีพนี้จะสร้างสารต้านจุลชีพสูงสุดเมื่อไม่มีการเติมกลูโคสเพิ่ม (ดังรูปที่ 3)

ก.

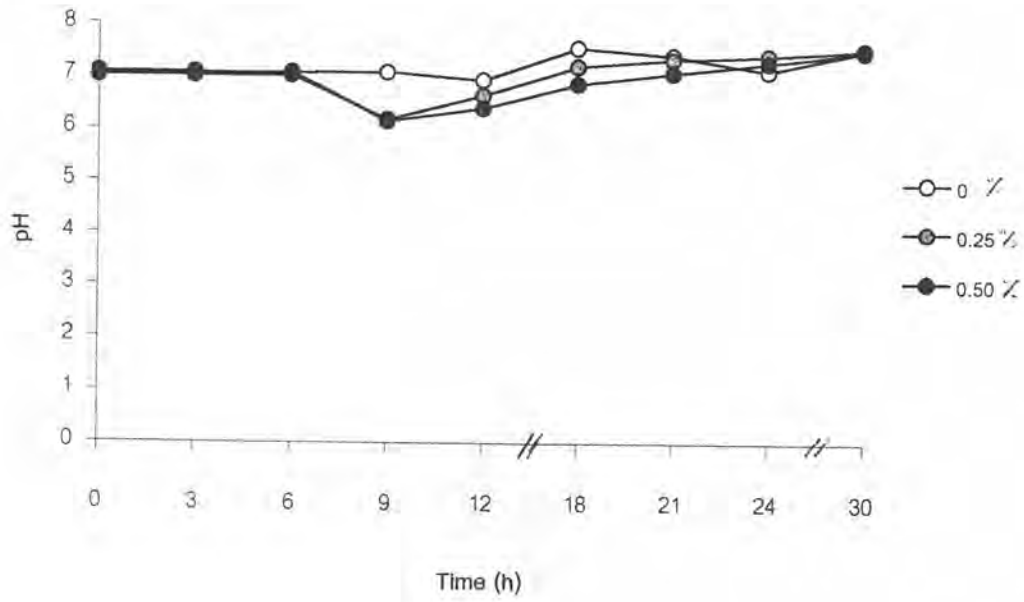


ข.

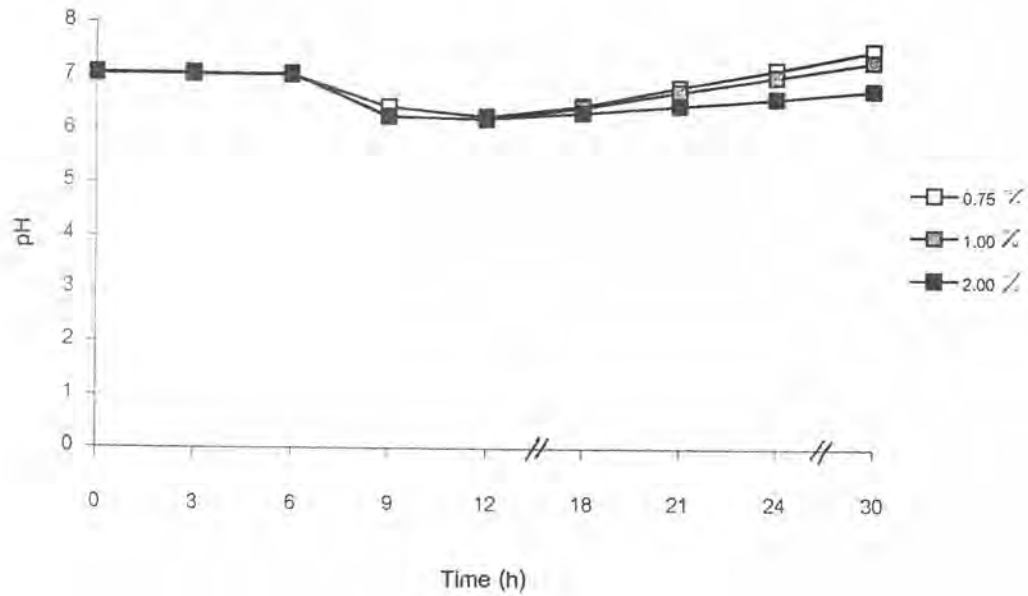


รูปที่ 1 : การเจริญของ *Bacillus* sp. S11 เมื่อเพาะเลี้ยงโดยแปรผันปริมาณกลูโคส

ก.

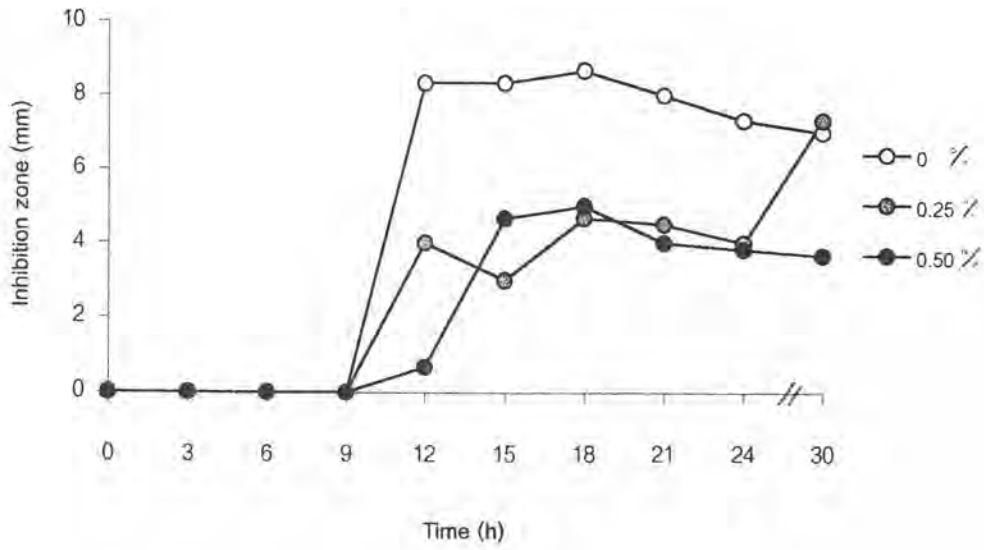


ข.

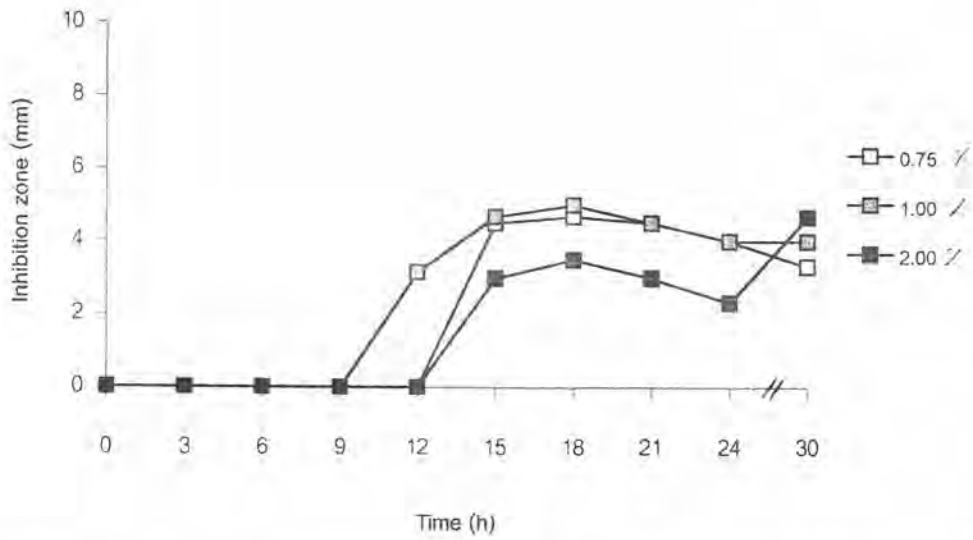


รูปที่ 2 : การเปลี่ยนแปลงของค่า พีเอช เมื่อทำเพาะเลี้ยงโดยแปรผันปริมาณกลูโคส

ก.



ข.



รูปที่ 3 : ขอบเขตของการยับยั้งเชื้อทดสอบ *Bacillus cereus* ATCC 11778 เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 โดยการแปรผันปริมาณกลูโคส

ตารางที่ 6 : 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

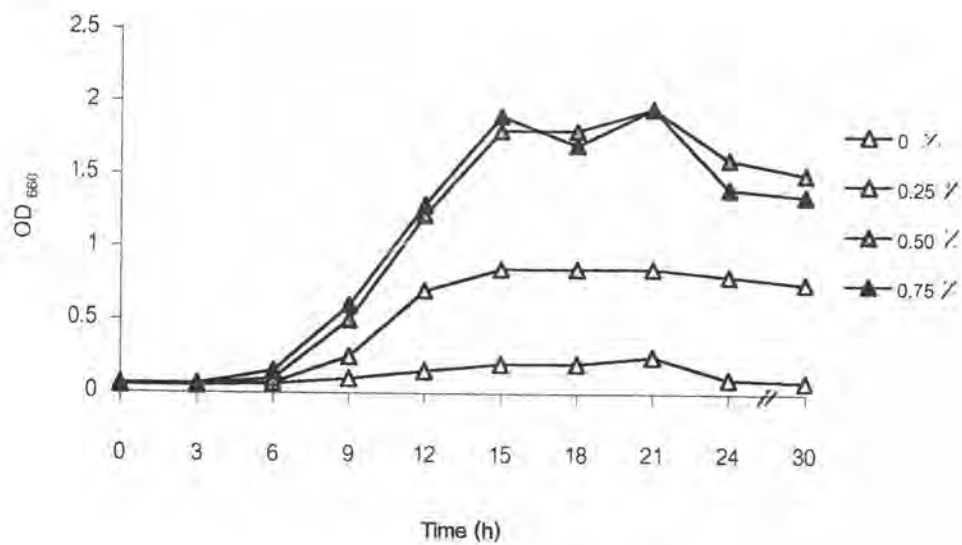
ตารางที่ 6 : (ต่อ)

% 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

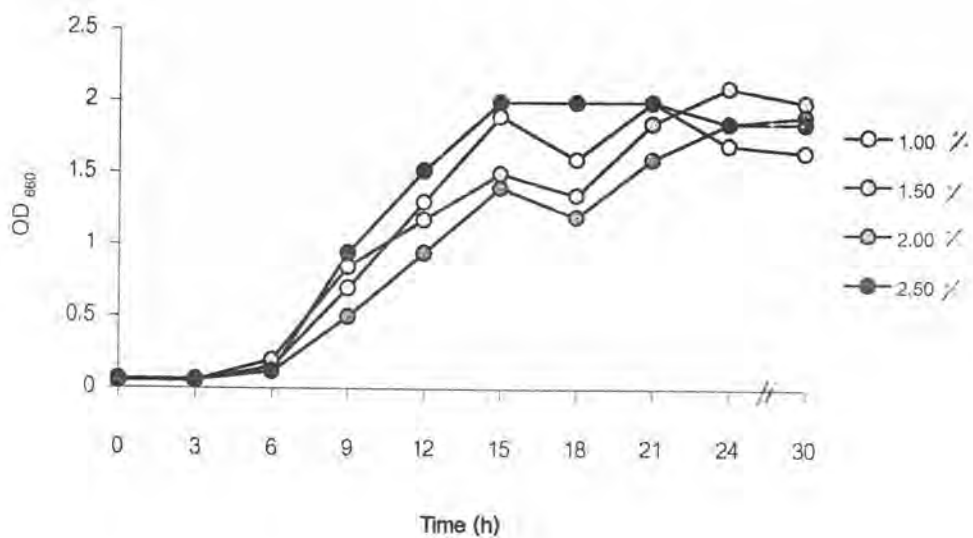
#### 4.2 การแปรผันปริมาณสารสกัดจากยีสต์ในการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 เพื่อให้ผลิตสารต้านจุลชีพปริมาณสูง

จากผลการศึกษาปริมาณกลูโคสที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 ดังในข้อ 4.1 นำมาสู่การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับปรุงที่ไม่เติมกลูโคสเพิ่ม มีโซเดียมคลอไรด์ 5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ไดโพลแซลเทียมฟอสเฟต 2.5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) พีเอช 7.0 และแปรผันปริมาณสารสกัดจากยีสต์เป็น 0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ติดตามการเจริญ การเปลี่ยนแปลงพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณโปรตีนในน้ำเลี้ยงเชื้อและแอกติวิตีของสารต้านจุลชีพดังวิธีในข้อ 3.6 พบว่าปริมาณสารสกัดจากยีสต์ที่ 2.5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ให้การเจริญสูงสุดในช่วง log phase ดังรูปที่ 4 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อจากรูปที่ 5 แสดงให้เห็นว่าขณะที่ *Bacillus* sp. S11 เจริญจะทำให้ค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงในช่วงต้นของ log phase แล้วเริ่มเพิ่มขึ้นและคงที่ในช่วงท้ายของ log phase และ stationary phase ปริมาณโปรตีน (ตารางที่ 7) มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยตลอดการเพาะเลี้ยงในทุกสูตรอาหาร เชื้อจุลชีพนี้จะสร้างสารต้านจุลชีพสูงสุดเมื่อมีปริมาณสารสกัดจากยีสต์เป็น 2.0% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ดังรูปที่ 6

ก.



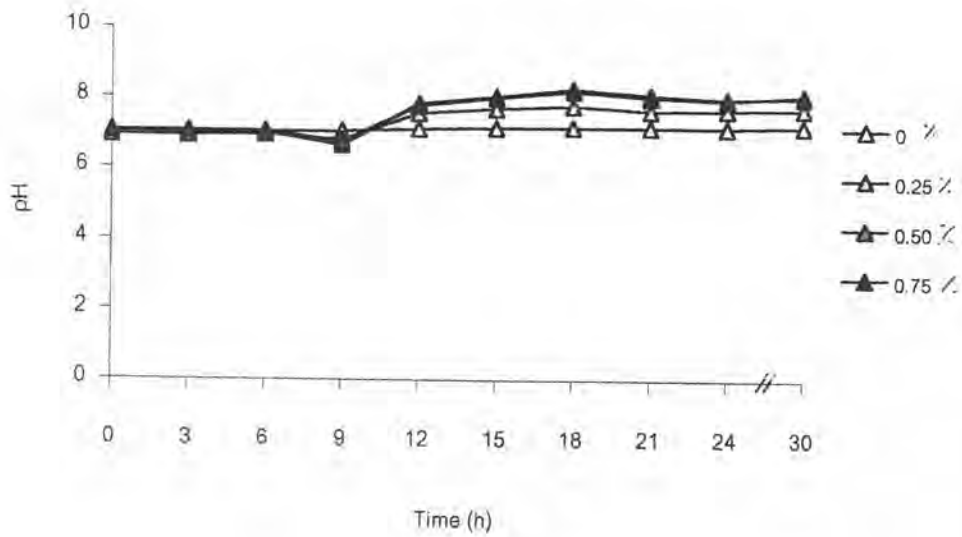
ข.



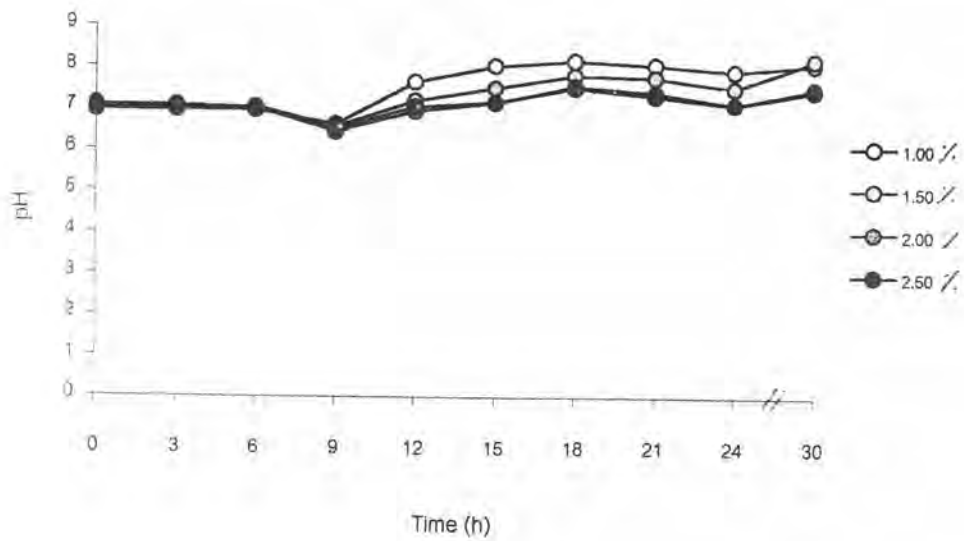
รูปที่ 4 : การเจริญของ *Bacillus* sp. S11 เมื่อเพาะเลี้ยงโดยแปรผันปริมาณสารสกัดจากยีสต์



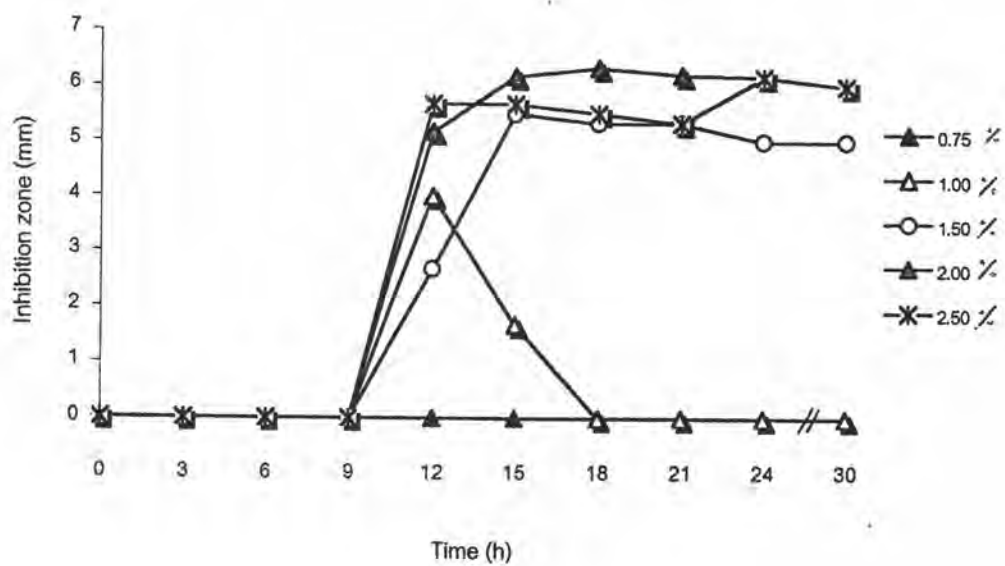
ก.



ข.



รูปที่ 5 : การเปลี่ยนแปลงของค่า พีเอช เมื่อทำเพาะเลี้ยงโดยแปรผันปริมาณสารสกัดจากยีสต์



รูปที่ 6 : ขอบเขตการยับยั้งเชื้อทดสอบเมื่อเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 โดยการแปรผันปริมาณสารสกัดจากยีสต์

ตารางที่ 7 : ปริมาณโปรตีนในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีการแปรผันปริมาณสารสกัดจากยีสต์

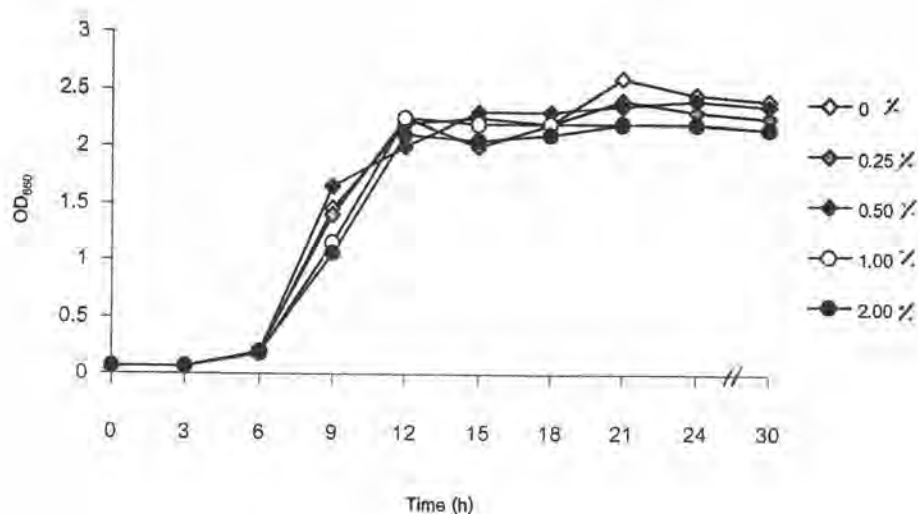
% ปริมาณสารสกัดจากยีสต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร)	ชั่วโมงที่	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)
0	0	0.18
	9	0.17
	12	0.18
	18	0.19
	24	0.22
	30	0.20
0.25	0	0.70
	9	0.72
	12	0.75
	18	0.80
	24	0.65
	30	0.60
0.50	0	1.30
	9	1.32
	12	1.40
	18	1.50
	24	1.25
	30	1.20
0.75	0	1.91
	9	2.00
	12	2.10
	18	2.20
	24	1.87
	30	1.80

ตารางที่ 7 : ( ต่อ )

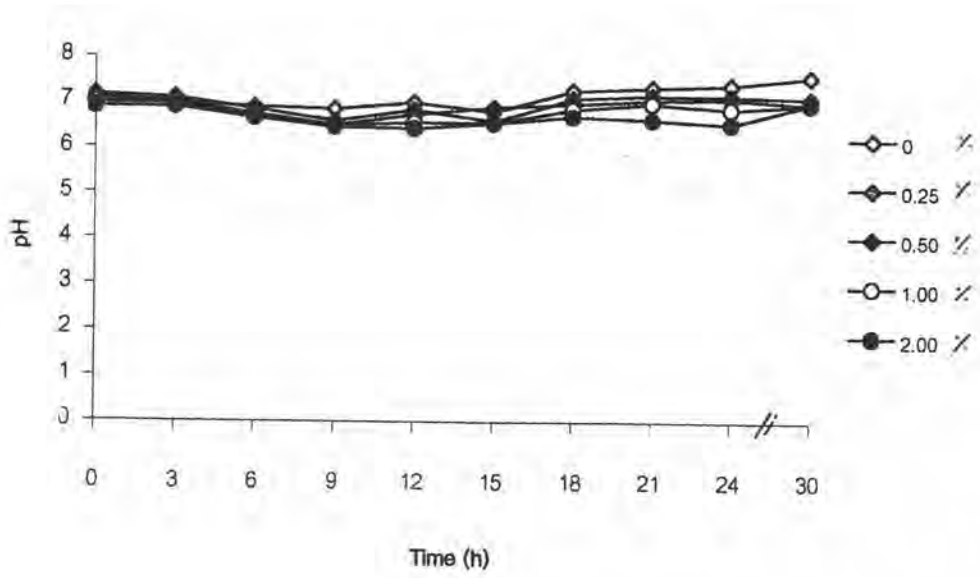
% ปริมาณสารสกัดจากยีสต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร)	ชั่วโมงที่	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)
1.00	0	2.55
	9	2.65
	12	2.80
	18	3.00
	24	2.50
	30	2.40
1.50	0	3.80
	9	4.00
	12	4.30
	18	4.55
	24	3.65
	30	3.45
2.00	0	5.20
	9	5.35
	12	5.79
	18	6.17
	24	4.95
	30	4.80
2.50	0	6.50
	9	6.69
	12	7.24
	18	7.65
	24	6.19
	30	6.00

### 4.3 การเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 โดยการแปรผันปริมาณโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ผลิตสารต้านจุลชีพปริมาณสูง

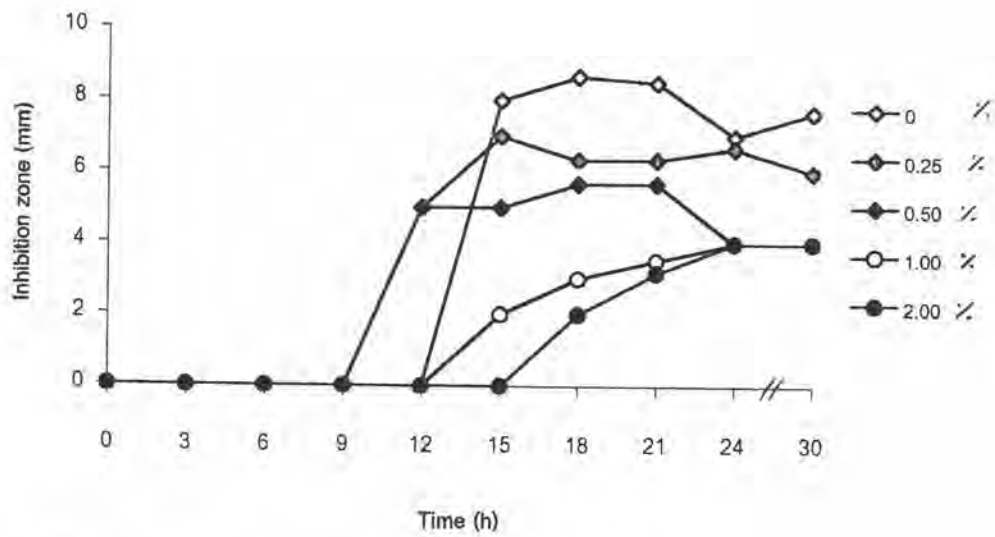
ผลจากการศึกษาในข้อ 4.1 และ 4.2 ทำให้ได้สูตรอาหารปรับปรุงนำมาใช้ในการศึกษา ประกอบด้วย สารสกัดจากยีสต์ 2.0% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ไคโทแซนเทียมฟอสเฟต 2.5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) พีเอช 7.0 ทำการแปรผันปริมาณโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 0, 0.25, 0.5, 1.0 และ 2.0% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ทำการทดลองและติดตามผลต่างๆ ดังวิธีในข้อ 3.7 พบว่าการเจริญเกือบไม่ต่างกันเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่แปรผันปริมาณโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อจากรูปที่ 8 แสดงให้เห็นว่าขณะที่ *Bacillus* sp. S11 เจริญจะทำให้ค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงในช่วงต้นของ log phase แล้วเริ่มเพิ่มขึ้นและคงที่ในช่วงท้ายของ log phase และ stationary phase ปริมาณโปรตีนในตารางที่ 8 แสดงการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยตลอดการเพาะเลี้ยง ในทุกสูตรอาหาร และพบว่าการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 ด้วยปริมาณโซเดียมคลอไรด์ที่ 0% (น้ำหนัก/ปริมาตร) จะให้ขอบเขตการยับยั้งเชื้อทดสอบได้สูงสุดดังรูปที่ 9



รูปที่ 7 : การเจริญของ *Bacillus* sp. S11 เมื่อเพาะเลี้ยงโดยแปรผันปริมาณโซเดียมคลอไรด์



รูปที่ 8 : การเปลี่ยนแปลงของค่า พีเอช เมื่อทำเพาะเลี้ยงโดยแปรผันปริมาณโซเดียมคลอไรด์



รูปที่ 9 : เมื่อทำเพาะเลี้ยงโดยแปรผันปริมาณโซเดียมคลอไรด์

ตารางที่ 8 : ปริมาณโปรตีนในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีการแปรผันปริมาณโซเดียมคลอไรด์

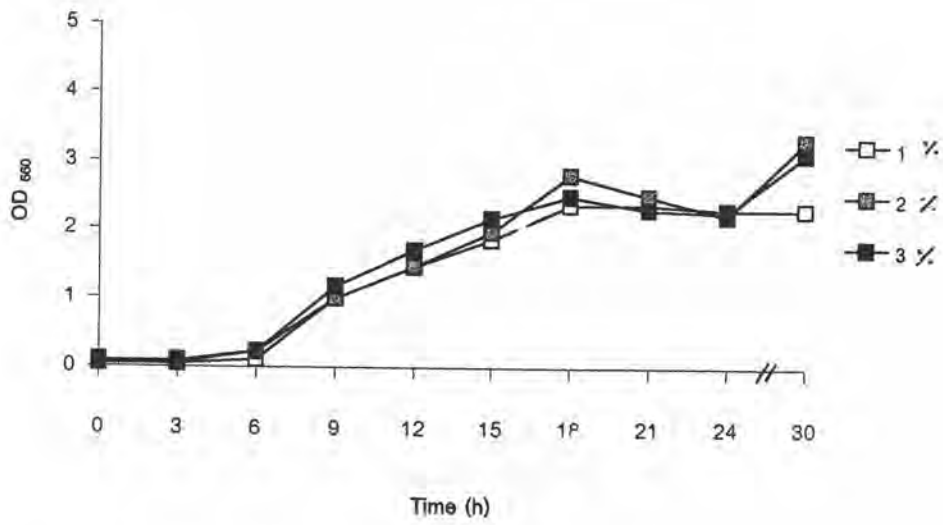
% ปริมาณโซเดียม คลอไรด์ (น้ำหนัก/ปริมาตร)	ชั่วโมง ที่	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)
0	0	5.30
	9	5.20
	12	5.15
	18	5.55
	24	4.95
	30	4.35
0.25	0	5.20
	9	5.15
	12	5.10
	18	5.50
	24	4.80
	30	4.40
0.50	0	5.25
	9	5.15
	12	5.20
	18	5.55
	24	4.90
	30	4.45
1.00	0	5.30
	9	5.20
	12	5.10
	18	5.60
	24	4.90
	30	4.40
2.00	0	5.25
	9	5.20
	12	5.15
	18	5.60
	24	4.85
	30	4.45

#### 4.4 การแปรผันปริมาณหัวเชื้อ (Inoculum) ในการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 เพื่อให้ผลิตสารต้านจุลชีพปริมาณสูง

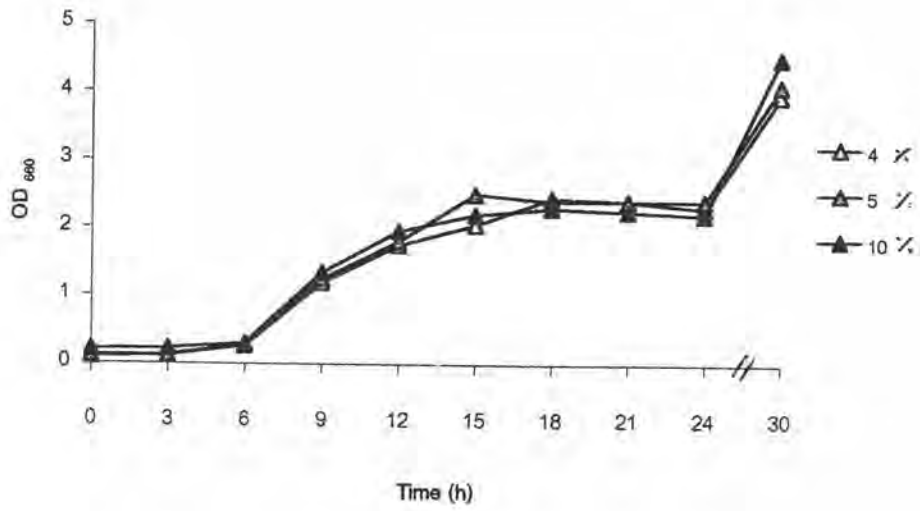
เพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 ด้วยสูตรอาหารปรับปรุงที่ประกอบด้วยสารสกัดจากยีสต์ 2.0% (น้ำหนัก/ปริมาตร) และไดโพลแทสเซียมฟอสเฟต 2.5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) พีเอช 7.0 แปรผันปริมาณหัวเชื้อดังนี้ 1, 2, 3, 4, 5 และ 10% โดยปริมาตร ทำการทดลองและติดตามผลดังข้อ 3.8 พบว่าในช่วง log phase มีการเจริญไม่แตกต่างกันมากนักดังรูปที่ 10 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช ในอาหารเลี้ยงเชื้อจากรูปที่ 11 แสดงให้เห็นว่าขณะที่ *Bacillus* sp. S11 เจริญจะทำให้ค่าพีเอช ในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงในช่วงต้นของ log phase แล้วเริ่มเพิ่มขึ้นและคงที่ในช่วงท้ายของ log phase และ stationary phase ปริมาณโปรตีนในตารางที่ 9 แสดงการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยตลอดการเพาะเลี้ยงในทุกสูตรอาหาร และพบว่าการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 ด้วยปริมาณหัวเชื้อที่ 2% โดยปริมาตรจะให้ขอบเขตการยับยั้งเชื้อทดสอบได้สูงสุดดังรูปที่ 12



ก.

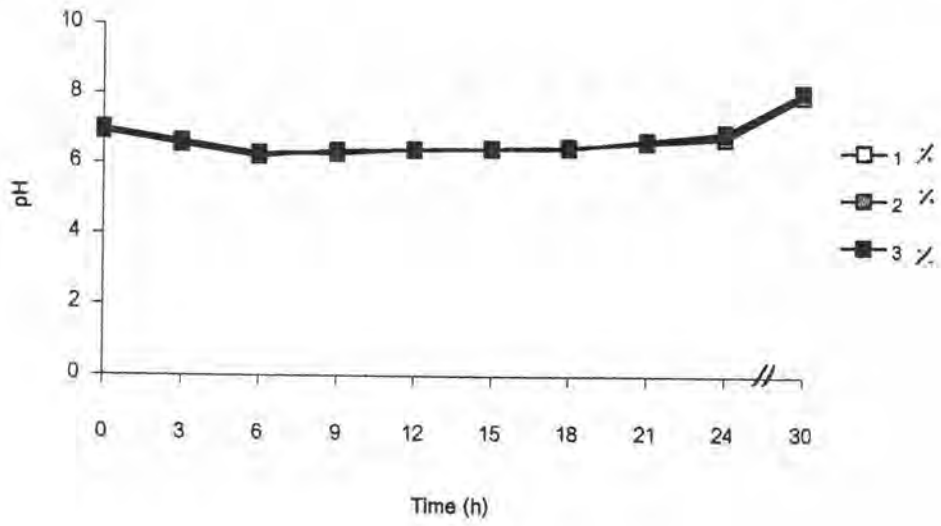


ข.

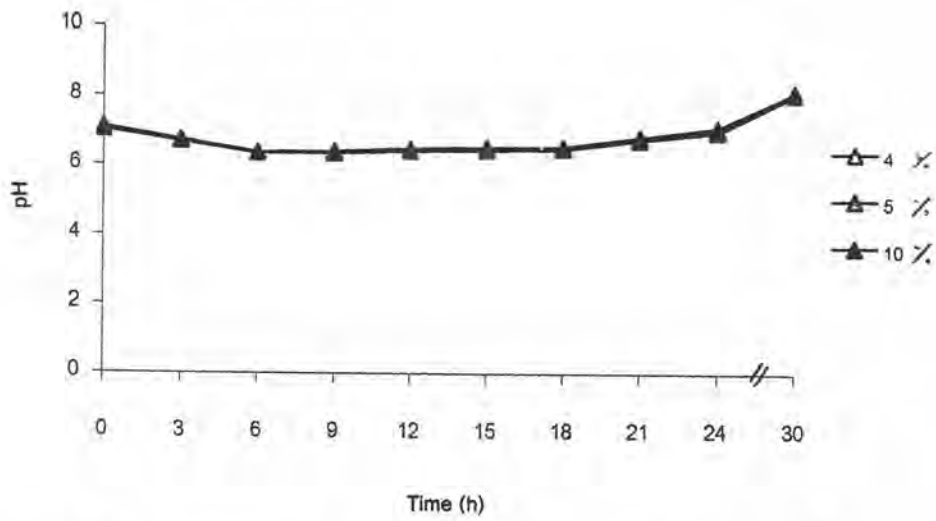


รูปที่ 10 : การเจริญของ *Bacillus* sp. S11 เมื่อเพาะเลี้ยงโดยแปรผันปริมาณหัวเชื้อ

ก.

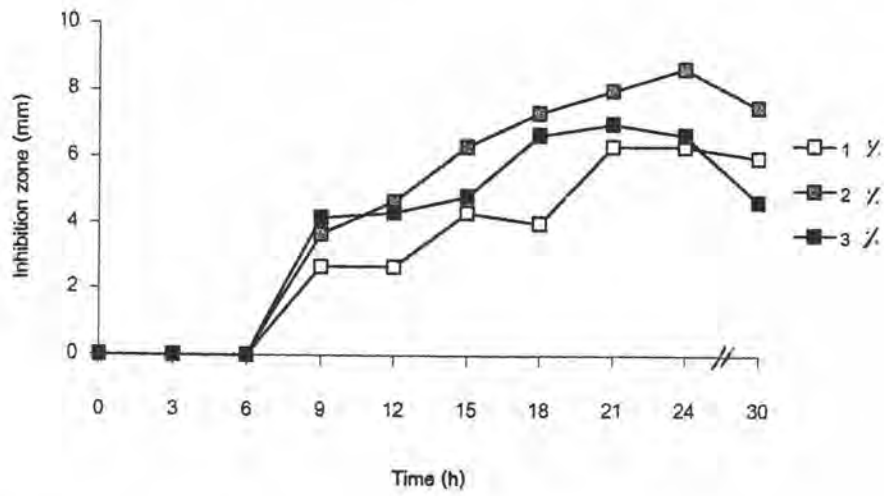


ข.

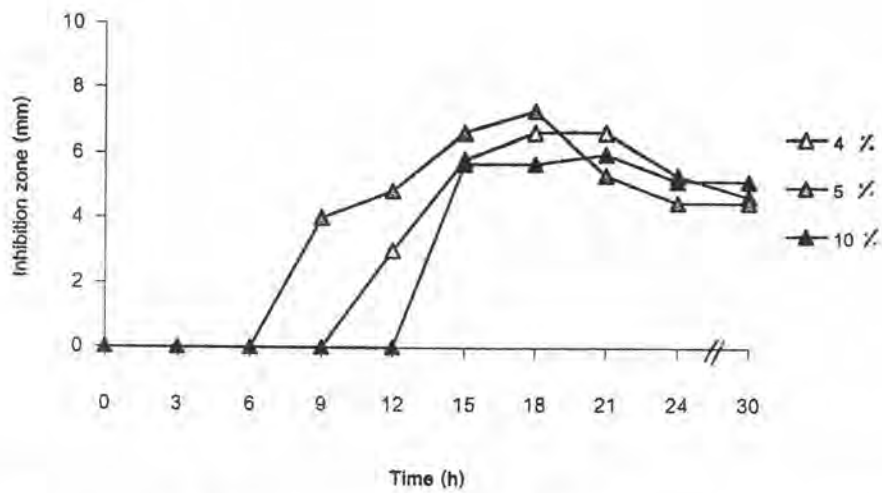


รูปที่ 11 : การเปลี่ยนแปลงของค่า พีเอช เมื่อทำเพาะเลี้ยงโดยแปรผันปริมาณหัวเชื้อ

ก.



ข.



รูปที่ 12 : ขอบเขตการยับยั้งเชื้อทดสอบของสารต้านจุลชีพเมื่อทำเพาะเลี้ยงโดยแปรผันปริมาณหัวเชื้อ

ตารางที่ 9 : ปริมาณโปรตีนในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีการแปรผันปริมาณหัวเชื้อ

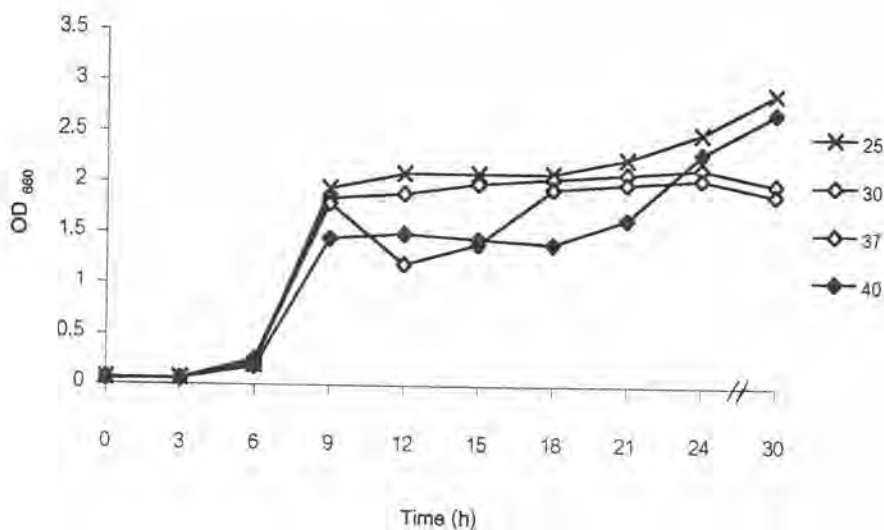
% ปริมาณหัวเชื้อ(ปริมาตร/ปริมาตร)	ชั่วโมงที่	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)
1	0	5.20
	9	5.15
	12	5.10
	18	5.15
	24	5.20
	30	4.50
2	0	5.30
	9	5.20
	12	5.15
	18	5.55
	24	4.90
	30	4.44
3	0	5.20
	9	5.10
	12	5.15
	18	5.40
	24	4.80
	30	4.60
4	0	5.25
	9	5.00
	12	5.15
	18	5.45
	24	5.00
	30	4.55

ตารางที่ 9 : (ต่อ)

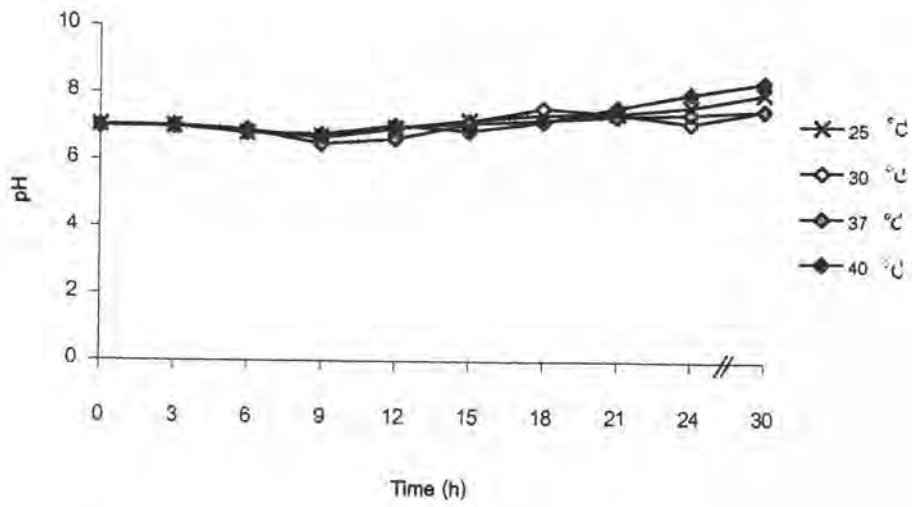
% ปริมาณหัว เชื้อ (ปริมาตร/ ปริมาตร)	ชั่วโมงที่	ปริมาณ โปรตีน (mg/ml)
5	0	5.35
	9	5.05
	12	5.15
	18	5.45
	24	4.98
	30	4.67
10	0	5.41
	9	5.10
	12	5.21
	18	5.36
	24	5.00
	30	4.50

#### 4.5 การแปรผันอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 เพื่อให้ผลิตสารต้านจุลชีพปริมาณสูง

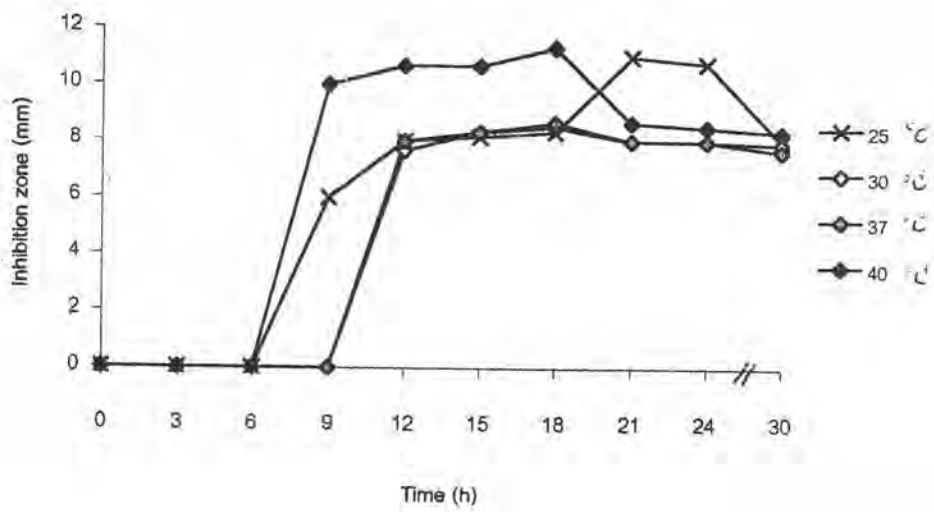
เพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 ด้วยสูตรอาหารปรับปรุงที่ประกอบด้วยสารสกัดจากยีสต์ 2.0% (น้ำหนัก/ปริมาตร) และไดโทแทสเซียมฟอสเฟต 2.5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) พีเอช 7.0 ปริมาณหัวเชื้อ 2% โดยปริมาตร แปรผันอุณหภูมิเป็น 25, 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส ทำการทดลองและติดตามผลดังข้อ 3.9 พบว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสให้การเจริญสูงสุดดังรูปที่ 13 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อจากรูปที่ 14 แสดงให้เห็นว่าขณะที่ *Bacillus* sp. S11 เจริญจะทำให้ค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงในช่วงต้นของ log phase แล้วเริ่มเพิ่มขึ้นและคงที่ในช่วงท้ายของ log phase และ stationary phase ปริมาณโปรตีนในตารางที่ 10 แสดงการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยตลอดการเพาะเลี้ยงในทุกสูตรอาหาร และพบว่าหากเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 ด้วยอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสจะให้สารต้านจุลชีพที่มีขอบเขตการยับยั้งเชื้อทดสอบ *Bacillus cereus* ATCC 11778 ได้สูงสุดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 9 ถึง 18 แล้วเริ่มลดลงหลังจากนั้นจนถึงชั่วโมงที่ 30 แต่การเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสก็สามารถให้สารต้านจุลชีพได้เช่นกัน เห็นได้จากขอบเขตการยับยั้งเชื้อทดสอบที่เกิดขึ้น ณ ชั่วโมงที่ 21 ถึง 24 และลดลงในชั่วโมงที่ 30 ดังรูปที่ 15



รูปที่ 13 : การเจริญของ *Bacillus* sp. S11 เมื่อเพาะเลี้ยงโดยแปรผันอุณหภูมิ



รูปที่ 14 : การเปลี่ยนแปลงของค่า พีเอช ในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อทำเพาะเลี้ยงโดยแปรผันอุณหภูมิ



รูปที่ 15 : ขอบเขตการยับยั้งเชื้อทดสอบของสารต้านจุลชีพเมื่อทำเพาะเลี้ยงโดยแปรผันอุณหภูมิ

ตารางที่ 10 : ปริมาณโปรตีนในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีการแปรผันปริมาณอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ชั่วโมงที่	ปริมาณ โปรตีน (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

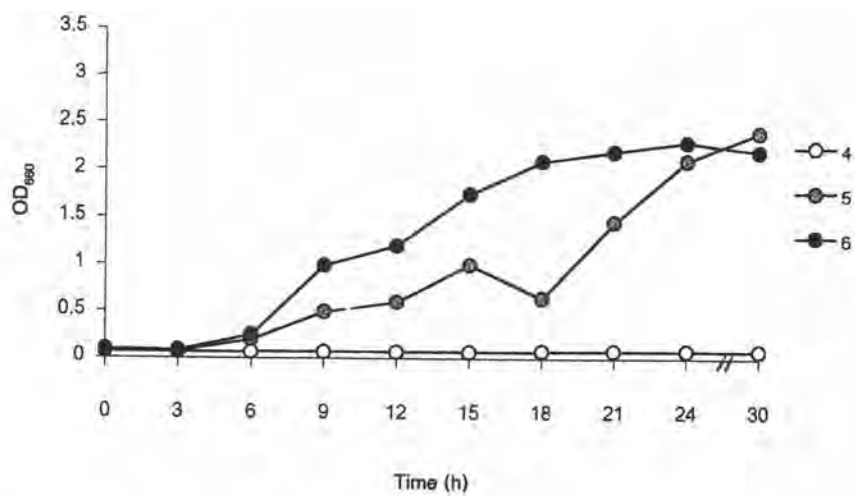


#### 4.6 การแปรผันพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อในการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11

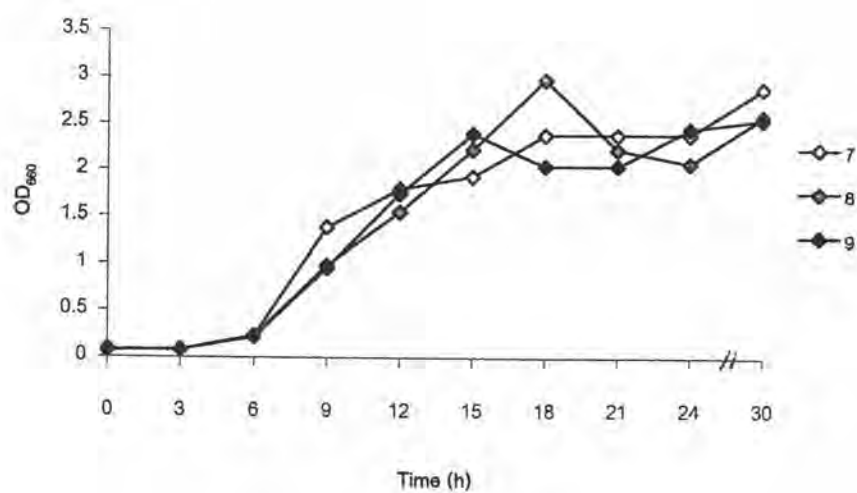
##### เพื่อให้ผลิตสารต้านจุลชีพปริมาณสูง

ใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมจากผลการศึกษาในข้อ 4.1 - 4.5 คือสารสกัดจากยีสต์ 2.0% (น้ำหนัก/ปริมาตร) และไดโพแทสเซียมฟอสเฟต 2.5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาณหัวเชื้อ 2% โดยปริมาตร อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แปรผันพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 และ 9.0 ทำการทดลองและติดตามผลดังข้อ 3.10 จากรูปที่ 16 แสดงให้เห็นว่า *Bacillus* sp. S11 ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเริ่มต้นที่ 4.0 และเจริญได้ไม่ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเริ่มต้นที่ 5.0 แต่เจริญได้ใกล้เคียงกันเมื่อพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ในช่วง 6.0 ถึง 9.0 ผลจากรูปที่ 17 กล่าวได้ว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชระหว่างการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเริ่มต้นที่ 4.0 ในขณะที่พีเอชเริ่มต้นที่ 5.0 นั้นเชื้อมีการเจริญได้บ้างและเกิดการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชระหว่างการเลี้ยงได้บ้างในช่วงท้ายของการเจริญ นอกจากนี้ อาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละสูตรที่มีพีเอชเริ่มต้นในช่วง 6 ถึง 9 จะมีการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงในช่วงต้นของ log phase แล้วเริ่มเพิ่มขึ้นและคงที่ในช่วงท้ายของ log phase และ stationary phase ปริมาณโปรตีนในตารางที่ 11 แสดงการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยตลอดการเพาะเลี้ยงในทุกสูตรอาหาร และพบว่าหากเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 ด้วยพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 7.0 จะให้สารต้านจุลชีพที่มีขอบเขตการยับยั้งเชื้อทดสอบ *Bacillus cereus* ATCC 11778 ได้สูงสุดดังแสดงในรูปที่ 18

ก.

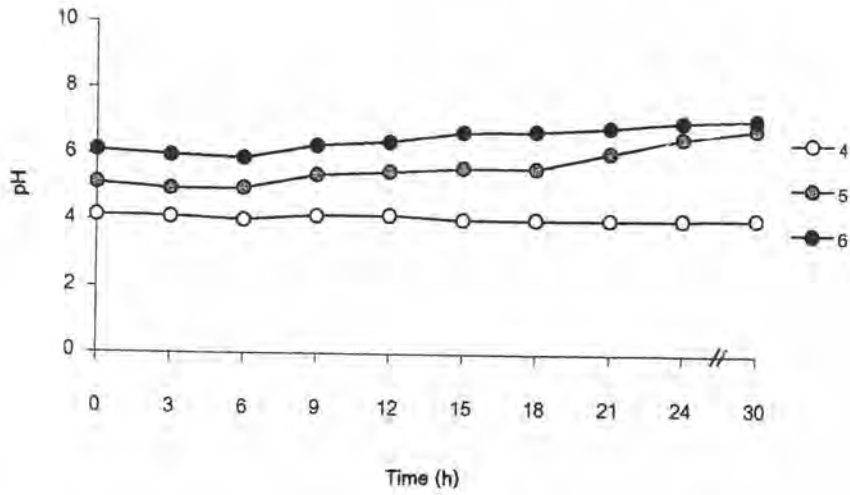


ข.

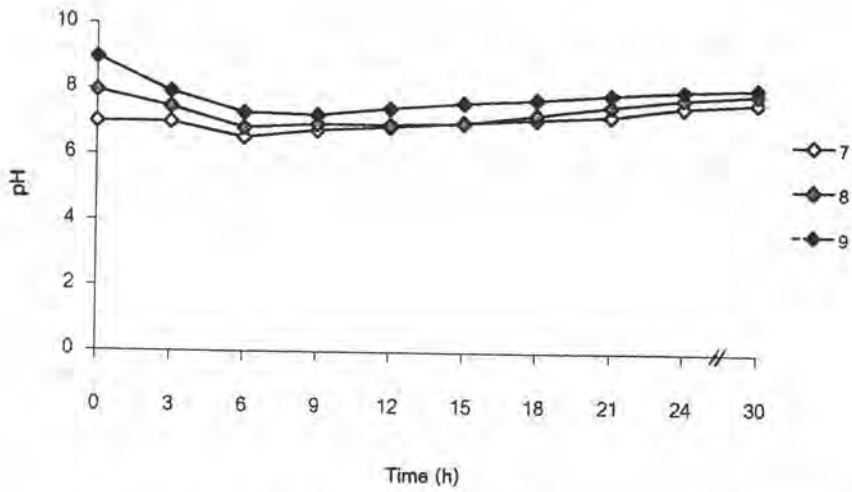


รูปที่ 16 : การเจริญของ *Bacillus* sp. S11 เมื่อเพาะเลี้ยงโดยแปรผันพีเอชเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ก.

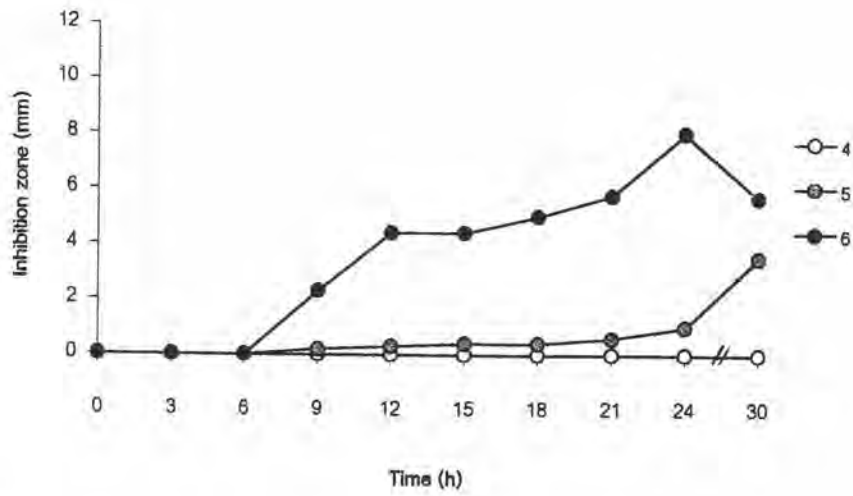


ข.

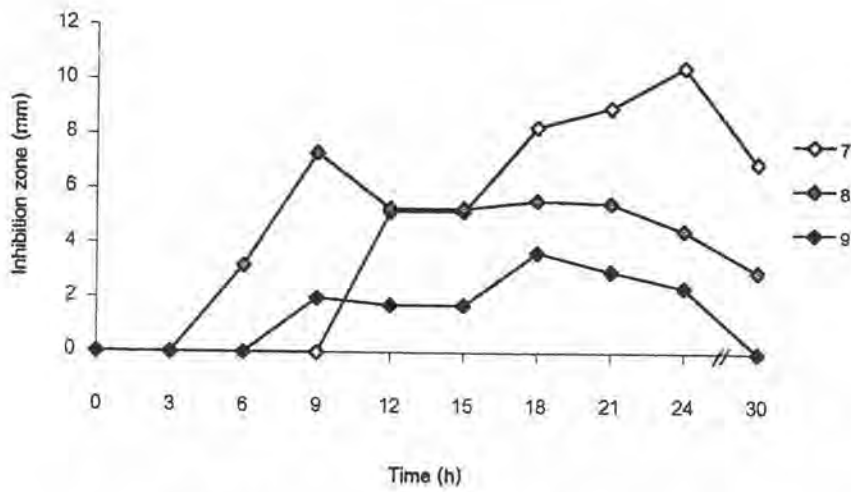


รูปที่ 17 : การเปลี่ยนแปลงของค่า พีเอช เมื่อทำเพาะเลี้ยงโดยแปรผันพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ก.



ข.



รูปที่ 18 : ขอบเขตการยับยั้งเชื้อทดสอบ *Bacillus cereus* ATCC 11778 ของสารต้านจุลชีพ เมื่อทำเพาะเลี้ยงโดยแผ่นพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 11 : ปริมาณโปรตีนในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีการแปรผันที่เอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

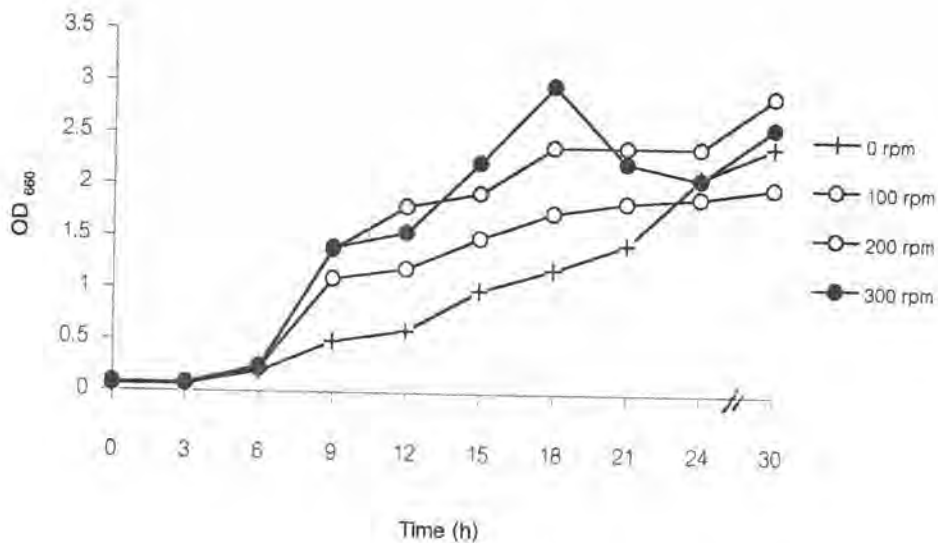
pH เริ่มต้น	ชั่วโมงที่	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)
4	0	5.30
	9	5.28
	12	5.31
	18	5.29
	24	5.28
	30	5.30
5	0	5.32
	9	5.29
	12	5.30
	18	5.34
	24	5.09
	30	5.00
6	0	5.30
	9	5.20
	12	5.25
	18	5.53
	24	4.75
	30	4.40
7	0	5.25
	9	5.17
	12	5.09
	18	5.55
	24	4.82
	30	4.46

ตารางที่ 11 : ( ต่อ )

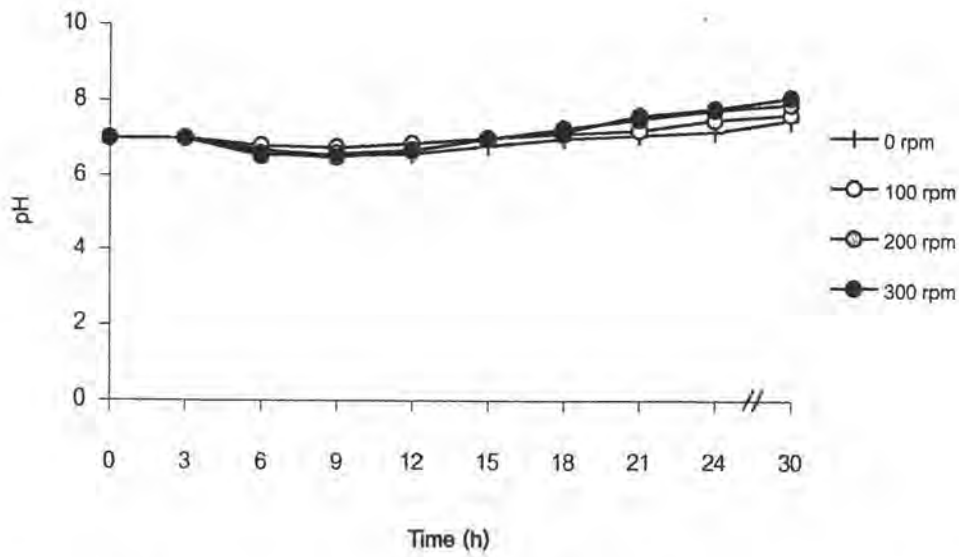
pH เริ่มต้น	ชั่วโมงที่	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)
8	0	5.33
	9	5.40
	12	5.35
	18	5.38
	24	4.81
	30	4.70
9	0	5.28
	9	5.20
	12	5.37
	18	5.25
	24	5.10
	30	4.65

#### 4.7 การแปรผันการให้อากาศในการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 เพื่อให้ผลิตสารต้านจุลชีพปริมาณสูง

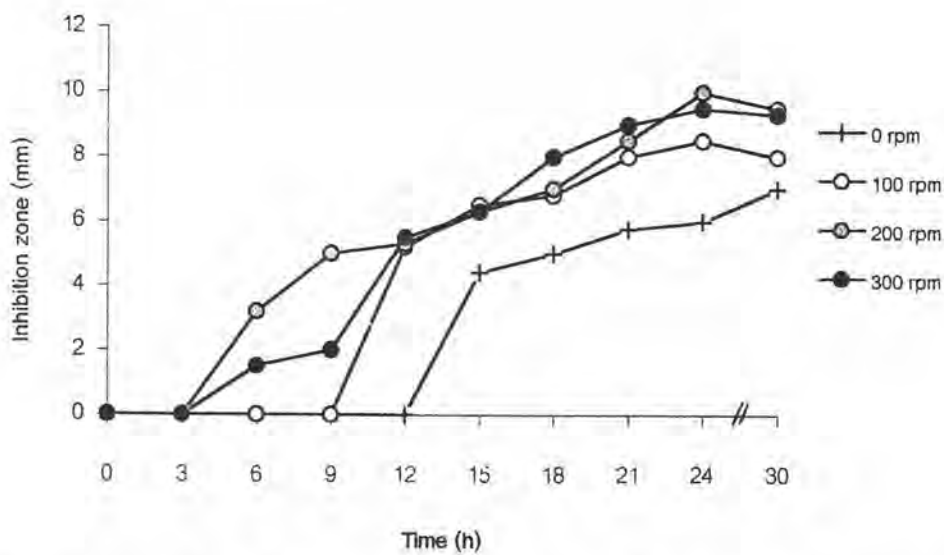
ใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมจากผลการศึกษาในข้อ 4.1 - 4.6 คือ สารสกัดจากยีสต์ 2.0% (น้ำหนัก/ปริมาตร) และไดโพลแทสเซียมฟอสเฟต 2.5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาตรหัวเชื้อ 2% โดยปริมาตร อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 ทำการทดลองและติดตามผลดังข้อ 3.11 จากรูปที่ 19 แสดงให้เห็นว่า *Bacillus* sp. S11 มีการเจริญได้ต่างกันในช่วงเวลาก่อน 24 ชั่วโมง จำนวนรอบของเขย่าที่มากกว่าจะทำให้การเจริญสูงกว่า และเชื้อนี้สามารถเจริญได้ไม่มากเมื่อไม่มีการให้อากาศเพิ่ม จากรูปที่ 20 แสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงในช่วงต้นของ log phase แล้วเริ่มเพิ่มขึ้นและคงที่ในช่วงท้ายของ log phase และ stationary phase ปริมาณโปรตีนในตารางที่ 12 แสดงการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยตลอดการเพาะเลี้ยงทุกชุดทดลอง และพบว่าหากเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 ด้วยการให้อากาศ 200 และ 300 รอบต่อนาทีให้สารต้านจุลชีพที่มีขอบเขตการยับยั้งเชื้อทดสอบได้ใกล้เคียงกันดังแสดงในรูปที่ 21



รูปที่ 19 : การเจริญของ *Bacillus* sp. S11 เมื่อเพาะเลี้ยงโดยการแปรผันการให้อากาศ



รูปที่ 20 : การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 ให้อากาศเพิ่มเติมด้วยการเขย่าที่จำนวนรอบต่างๆ



รูปที่ 21 : ขอบเขตการยับยั้งเชื้อทดสอบของสารต้านจุลชีพที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 ให้อากาศเพิ่มเติมด้วยการเขย่า



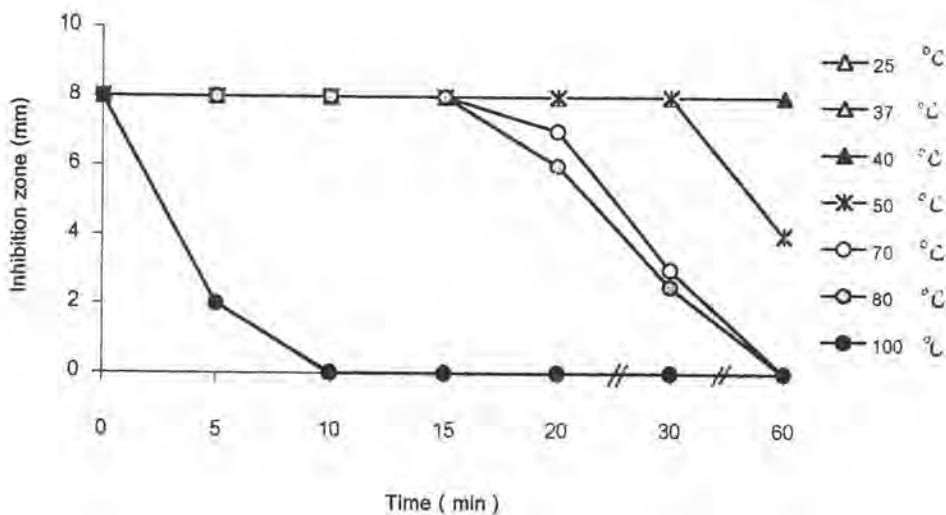
ตารางที่ 12 : ปริมาณโปรตีนในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีการแปรผันการให้อากาศ

การเขย่า (รอบต่อนาที)	ชั่วโมง	ปริมาณ โปรตีน (mg/ml)
0	0	5.30
	9	5.29
	12	5.31
	18	5.35
	24	5.15
	30	5.10
100	0	5.30
	9	5.20
	12	5.25
	18	5.35
	24	4.80
	30	4.60
200	0	5.25
	9	5.17
	12	5.09
	18	5.30
	24	4.85
	30	4.46
300	0	5.33
	9	5.40
	12	5.35
	18	5.38
	24	4.91
	30	4.75

## ข. การศึกษาสมบัติเบื้องต้นของสารต้านจุลชีพที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11

### 4.8 การศึกษาผลของความร้อนต่อแอกติวิตีของสารต้านจุลชีพ

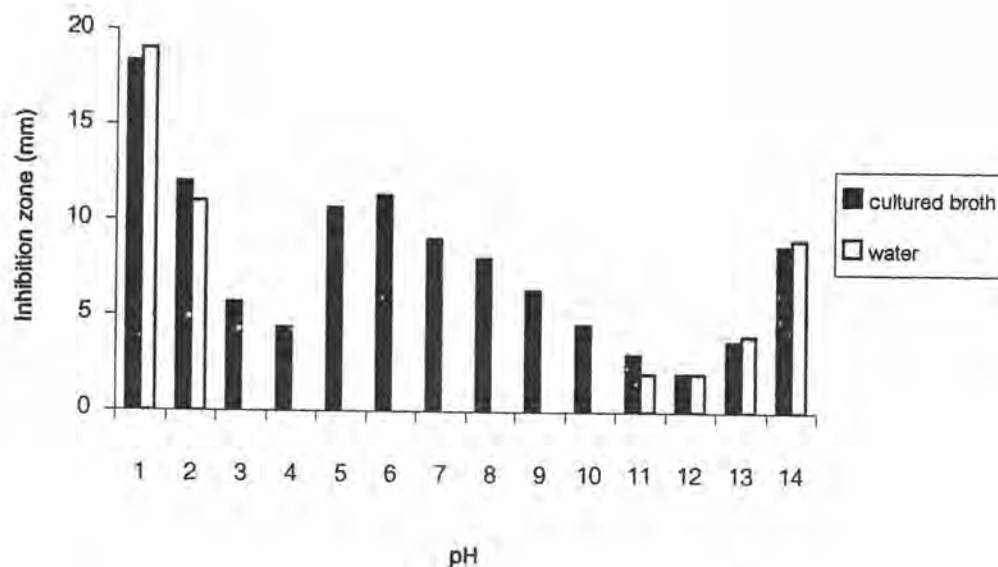
นำส่วนน้ำไลต์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 ในภาวะที่เหมาะสมแก่การสร้างสารต้านจุลชีพ มาไว้ที่อุณหภูมิต่างกันคือ 25, 37, 40, 50, 70, 80, 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และผ่านการ autoclave (121 องศาเซลเซียส, 20 นาที) เก็บตัวอย่างเพื่อติดตามแอกติวิตีตามวิธีในข้อ 3.13 ที่เวลา 0, 5, 10, 15, 20, 30 และ 60 นาทีหลังการบ่ม ยกเว้นการนึ่งฆ่าเชื้อ จะเก็บเพียง 2 ครั้งคือ ก่อนและหลังนึ่งฆ่าเชื้อ ผลที่ได้เป็นดังในรูปที่ 22 เมื่อนำส่วนน้ำไลต์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 มาบ่มที่อุณหภูมิ 25 – 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาทีไม่ทำให้ขอบเขตการยับยั้งเปลี่ยนแปลง การบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสขึ้นไปทำให้ ขอบเขตการยับยั้งลดลงเมื่อเก็บเป็นเวลานานตั้งแต่ 30 นาทีขึ้นไป การบ่มที่อุณหภูมิ 70 และ 80 องศาเซลเซียสจะทำให้ขอบเขตการยับยั้งเชื้อทดสอบลดลงเมื่อบ่มเป็นเวลานานตั้งแต่ 15 นาทีขึ้นไป การบ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสตั้งแต่ 5 นาทีจะทำให้ขอบเขตการยับยั้งลดลงอย่างรวดเร็วจนไม่สามารถตรวจพบภายในเวลา 10 นาที และหลังผ่านการ autoclave (121 องศาเซลเซียส 20 นาที) ไม่พบ แอกติวิตี ของส่วนน้ำไลต์



รูปที่ 22 : ผลของการบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ ต่อแอกติวิตีของสารต้านจุลชีพจาก *Bacillus* sp. S11

#### 4.9 การศึกษาผลของพีเอชต่อแอกติวิตีของสารต้านจุลชีพ

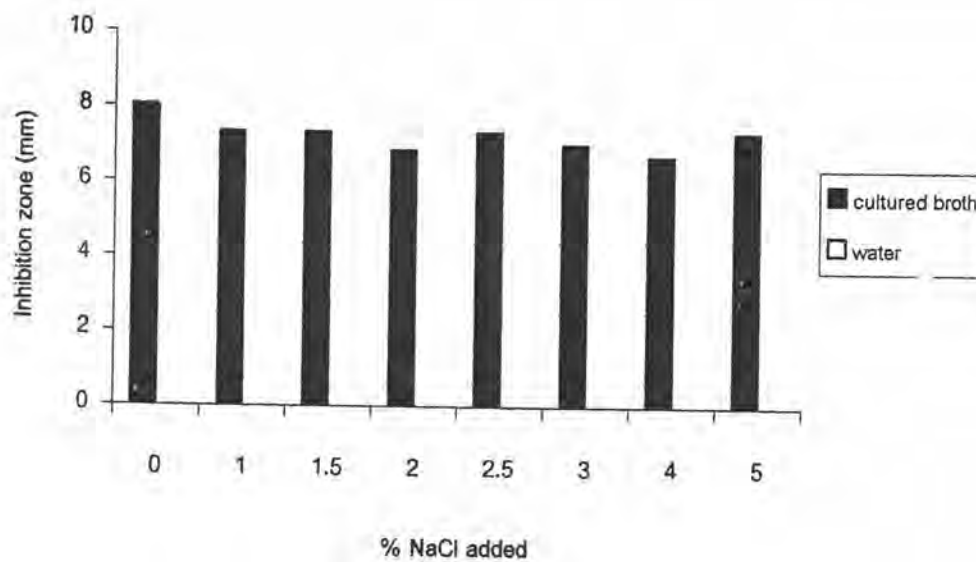
นำส่วนน้ำใสที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 ในภาวะที่เหมาะสมแก่การสร้างสารต้านจุลชีพ มาปรับ พีเอช ตั้งแต่ 1 ถึง 14 (ช่วงละ 1 หน่วยพีเอช) แล้วติดตามแอกติวิตีของสารต้านจุลชีพโดยวิธีแพร่ผ่านอาหารแข็งดังแสดงในข้อ 3.14 เปรียบเทียบกับน้ำกลั่นที่ปรับพีเอชเช่นเดียวกัน พบว่าน้ำกลั่นที่ปรับพีเอชสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ที่ช่วงพีเอช 1-2 และ 11-15 สารต้านจุลชีพที่ปรับพีเอชแล้วให้ขอบเขตการยับยั้งเชื้อได้ทุกพีเอช แต่เมื่อเปรียบเทียบผลกับน้ำกลั่นแล้วกล่าวได้ว่า สารต้านจุลชีพให้ แอกติวิตี ได้ในช่วงพีเอช 4 - 10 ดังแสดงในรูปที่ 23



รูปที่ 23 : ผลของพีเอชต่อแอกติวิตีของสารต้านจุลชีพจาก *Bacillus* sp. S11 เมื่อผ่านการปรับพีเอช (■) เปรียบเทียบกับน้ำกลั่นที่ปรับพีเอช (□)

#### 4.10 การศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อแอคติวิตีของสารต้านจุลชีพ

เมื่อนำส่วนน้ำไลต์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 ในภาวะที่เหมาะสมแก่การสร้างสารต้านจุลชีพ มาเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ 0, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0 และ 5.0 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) แล้วติดตามแอคติวิตีของสารต้านจุลชีพโดยวิธีแพร่ผ่านอาหารแข็งดังข้อ 3.15 ผลดังรูปที่ 24 แสดงว่าปริมาณโซเดียมคลอไรด์ในช่วง 0 – 5 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ไม่มีผลต่อแอคติวิตีของสารต้านจุลชีพนี้ โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เป็นสารละลายโซเดียมคลอไรด์ในน้ำกลั่น ( □ ) ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เช่นเดียวกัน แต่ไม่ให้ขอบเขตการยับยั้งเชื้อทดสอบ



รูปที่ 24 : ผลของปริมาณโซเดียมคลอไรด์ต่อแอคติวิตีของสารต้านจุลชีพต่อ *Bacillus* sp. S11

#### 4.11 การศึกษาผลของเอนไซม์ต่อแอคติวิตีของสารต้านจุลชีพ

เมื่อนำส่วนน้ำใสที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 ในภาวะที่เหมาะสมแก่การสร้างสารต้านจุลชีพ มาเติมเอนไซม์ได้แก่ protease ,  $\alpha$ -amylase และ lipase รายละเอียดดังแสดงในข้อ 3.16 โดยใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์แต่ละชนิดเป็น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในอัตรา 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ต่อ cultured broth 10 มล. ได้แก่ protease 0.07 units,  $\alpha$ -amylase 32 units , lipase 2.5 units นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วติดตามแอคติวิตีของสารต้านจุลชีพดังวิธีในข้อ 3.16 จากตารางที่ 13 แสดงให้เห็นว่าสารต้านจุลชีพนี้สูญเสียแอคติวิตีหมดเมื่อบ่มกับ protease type IX จาก *B. polymyxa* แต่เมื่อบ่มกับ  $\alpha$  - amylase จาก *Bacillus* spp. และ lipase type XIII จาก *Pseudomonas* spp. แล้วไม่ทำให้แอคติวิตีหมดไป

ตารางที่ 13 : แอคติวิตีของสารต้านจุลชีพเมื่อนำบ่มด้วยเอนไซม์

เอนไซม์ที่เติม	Average Inhibition zone (mm)
-	$7.0 \pm 0.56$
protease	$0.0 \pm 0.00$
$\alpha$ - amylase	$7.0 \pm 0.62$
lipase	$6.8 \pm 0.23$

หมายเหตุ : ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 5 ซ้ำ

#### 4.12 การศึกษาผลของตัวทำละลาย (solvents) ต่อแอคติวิตีของสารต้านจุลชีพ

หลังจากนำส่วนน้ำใสที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 ในภาวะที่เหมาะสมแก่การสร้างสารต้านจุลชีพมา 5 ml เติมด้วยตัวทำละลายปริมาตรที่เท่ากัน ตรวจสอบแอคติวิตีของสารต้านจุลชีพดังวิธีในข้อ 3.17 เปรียบเทียบกับน้ำหมักที่ไม่ได้ผ่านการผสมตัวทำละลายใดๆ ตัวทำละลายที่นำมาใช้ได้แก่ อะซีโตน อะซีโตนไทรอิล คลอโรฟอร์ม ไดเอทิลอีเธอร์ เอทานอล เมทานอล และโทลูอีน ผลที่ได้เป็นดังตารางที่ 14 กล่าวได้ว่า แอคติวิตีของสารนี้ไม่ถูกทำลายไปด้วย อะซีโตน อะซีโตนไทรอิล เอทานอล และเมทานอล สารต้านจุลชีพนี้สามารถละลายในน้ำได้และมีความเป็นขั้วสูง เนื่องจากพบ

แอกติวิตีของสารนี้อยู่ในชั้นน้ำ (aqueous phase) มากกว่าที่ไปอยู่ในชั้นของตัวทำละลาย (organic phase) เมื่อเติมด้วยสารละลายที่มีความเป็นขั้วต่ำ เช่น ไดเอธิลอีเธอร์ และโทลูอิน และทำให้สูญเสียแอกติวิตีในชั้นน้ำไปบางส่วนเมื่อเติม คลอโรฟอร์ม

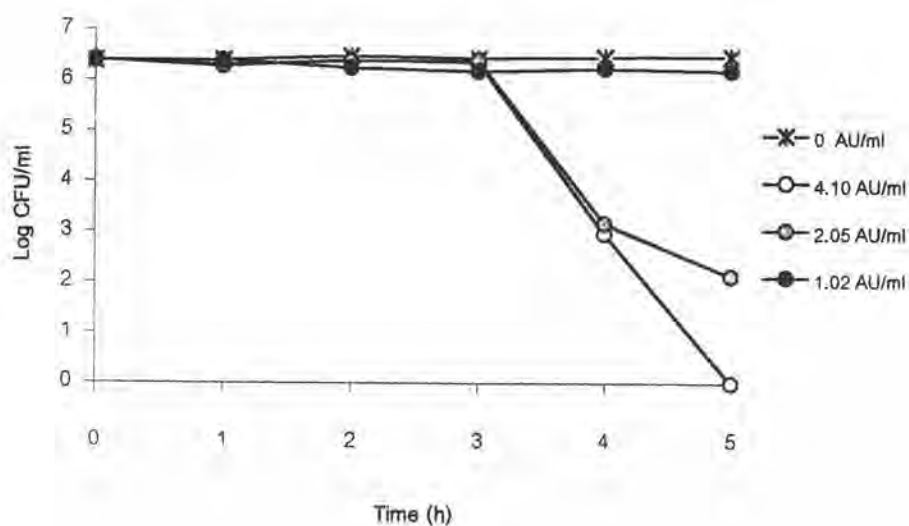
ตารางที่ 14 : ผลของตัวทำละลายต่อแอกติวิตีของสารต้านจุลชีพ

ตัวทำละลาย	Average Inhibition zone (mm)
-	$10.0 \pm 0.10$
Acetone	$10.0 \pm 0.21$
Acetonitrile	$10.0 \pm 0.23$
Ethanol	$10.0 \pm 0.10$
Methanol	$10.0 \pm 0.10$
Chloroform (organic phase)	$0.00 \pm 0.00$
Chloroform (aqueous phase)	$7.50 \pm 0.33$
Diethylether (organic phase)	$5.40 \pm 0.33$
Diethylether (aqueous phase)	$8.33 \pm 0.23$
Toluene (organic phase)	$3.33 \pm 0.23$
Toluene (aqueous phase)	$9.5 \pm 0.13$

หมายเหตุ : ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 5 ซ้ำ

#### 4.13 การศึกษา bactericidal activity โดยใช้ *Bacillus cereus* ATCC 11778 เป็นเชื้อทดสอบ

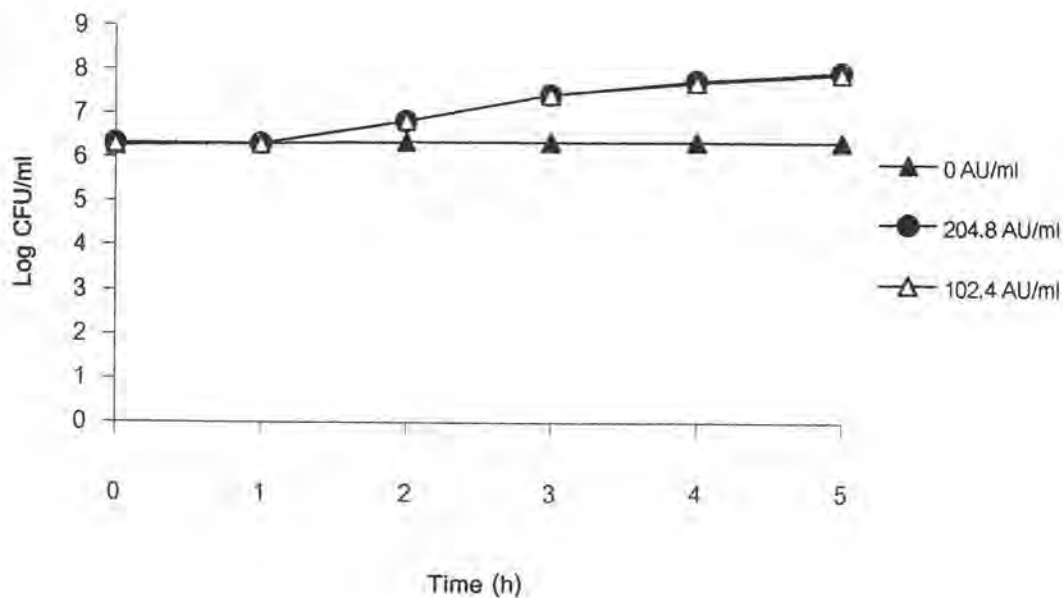
นำ *B. cereus* ATCC 11778 ความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ  $10^6$  CFU/ml ใน 0.05 M โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 มาเติมด้วยสารต้านจุลชีพที่ได้รับการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตให้มีความเข้มข้นสุดท้ายต่างกันคือ 0, 4.10, 2.05 และ 1.02 AU/ml นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อทดสอบบนอาหารแข็งทริบติกชอย ทุกๆ ชั่วโมง จนครบ 5 ชั่วโมง ผลในรูปที่ 25 แสดงผลการเติมสารต้านจุลชีพที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นสุดท้าย 2.05 และ 4.10 AU/ml ทำให้เชื้อทดสอบลดจำนวนลง โดยความเข้มข้นที่ 2.05 AU/ml ทำให้เชื้อทดสอบลดจำนวนลงหลังจากชั่วโมง 3 เป็นต้นไป แต่ไม่สามารถฆ่าเชื้อให้หมดสิ้นไปภายในเวลา 5 ชั่วโมง ขณะที่ความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพที่ 4.10 AU/ml ทำให้เชื้อเริ่มลดจำนวนลงหลังจากชั่วโมงที่ 2 และฆ่าเชื้อให้หมดไปภายในเวลา 5 ชั่วโมง



รูปที่ 25 : Bactericidal activity ของสารต้านจุลชีพที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (0 – 30 % sat) ต่อเชื้อทดสอบ *B. cereus* ATCC 11778

#### 4.14 การศึกษา bactericidal activity โดยใช้ *Vibrio harveyi* 639 เป็นเชื้อทดสอบ

นำเซลล์ *V. harveyi* 639 ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคเรืองแสงในกุ้งกุลาดำมาปรับให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ  $10^6$  CFU/ml ด้วย 0.05 M โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ที่มีเกลือ 2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) จากนั้นเติมสารต้านจุลชีพซึ่งผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0, 204.8 และ 102.4 AU/ml แล้วนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อทดสอบบนอาหารแข็งทริปติกชอย ที่มีเกลือ 2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ทุกๆ ชั่วโมง จนครบ 5 ชั่วโมง ผลการศึกษาเป็นดังรูปที่ 26 กล่าวคือการเติมสารต้านจุลชีพที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นสุดท้ายน้อยกว่า 204.8 AU/ml ลงมาไม่ทำให้เชื้อทดสอบลดจำนวนลงภายในเวลา 5 ชั่วโมง และส่งเสริมให้เชื้อทดสอบ *V. harveyi* 639 เจริญได้



รูปที่ 26 : Bactericidal activity ของสารต้านจุลชีพที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (0 – 30 % sat.) ต่อเชื้อทดสอบ *V. harveyi* 639



### ค. การทำบริสุทธิ์บางส่วนสารต้านจุลชีพที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus sp. S11*

#### 4.15 การทำบริสุทธิ์เบื้องต้นด้วยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

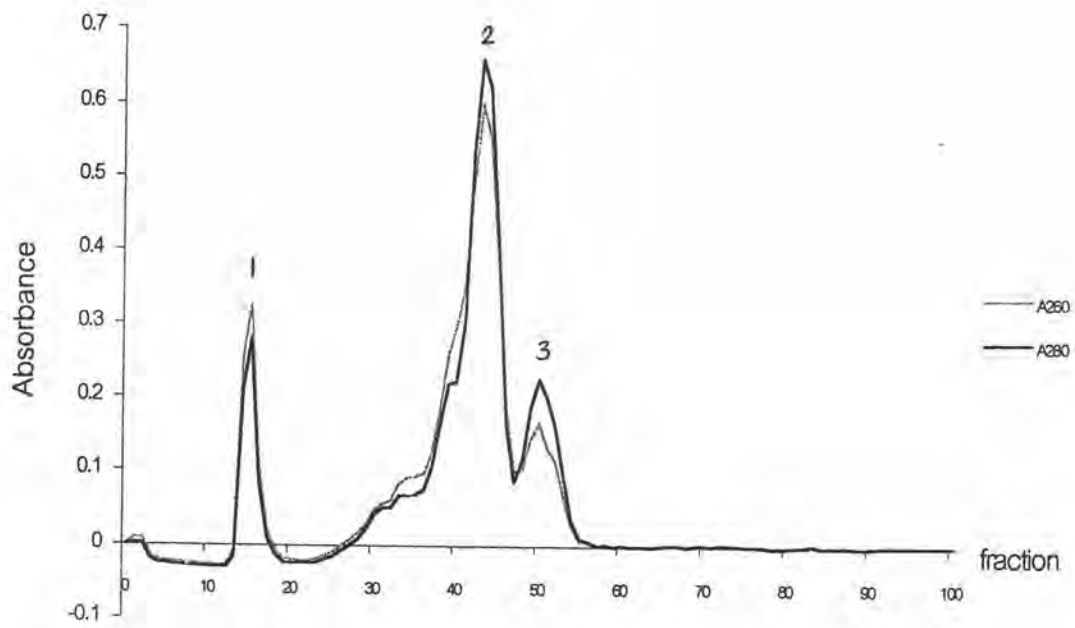
เมื่อน้ำหมักที่แยกเซลล์มาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีความเข้มข้นอิ่มตัวเป็นช่วง (Ammonium sulfate fractionation) 0 – 30%, 30 – 50% และ 50 – 80% ตรวจวัดแอกติวิตีตามวิธีในข้อ 3.23 ผลการศึกษาเป็นไปดังตารางที่ 15 ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตทุกช่วง มีแอกติวิตีของสารต้านจุลชีพในปริมาณมากน้อยต่างกัน ตะกอนของน้ำหมักที่ได้จากช่วง 0 – 30% เหมาะสมที่จะใช้เป็นขั้นตอนหนึ่งในการทำให้บริสุทธิ์เบื้องต้นเพราะให้แอกติวิตีจำเพาะสูงสุด กอปรกับตะกอนในช่วงอื่นซึ่งให้ผลด้านเชื้อทดสอบได้ มีสาเหตุส่วนหนึ่งมาจากแอมโมเนียมซัลเฟตที่ตกค้างอยู่

ตารางที่ 15 : การทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

ตัวอย่าง	ปริมาตร (ml)	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)	แอกติวิตี (AU/ml)	แอกติวิตีจำเพาะ (AU/mg protein)
น้ำหมัก	1000	5.60	160	28.57
ตะกอนน้ำหมักช่วง 0-30%	10	8.15	10240	1256.44
ตะกอนอาหารเปล่าช่วง 0-30%	10	1.45	0	0
ตะกอนน้ำหมักช่วง 30-50%	10	12.20	10240	839.34
ตะกอนอาหารเปล่าช่วง 30 – 50%	10	3.50	0	0
ตะกอนน้ำหมักช่วง 50-80%	10	25.30	10240	404.74
ตะกอนอาหารเปล่าช่วง 50 – 80 %	10	18.50	40	2.16

#### 4.16 การทำบริสุทธิ์ด้วย Gel Permeation Chromatography

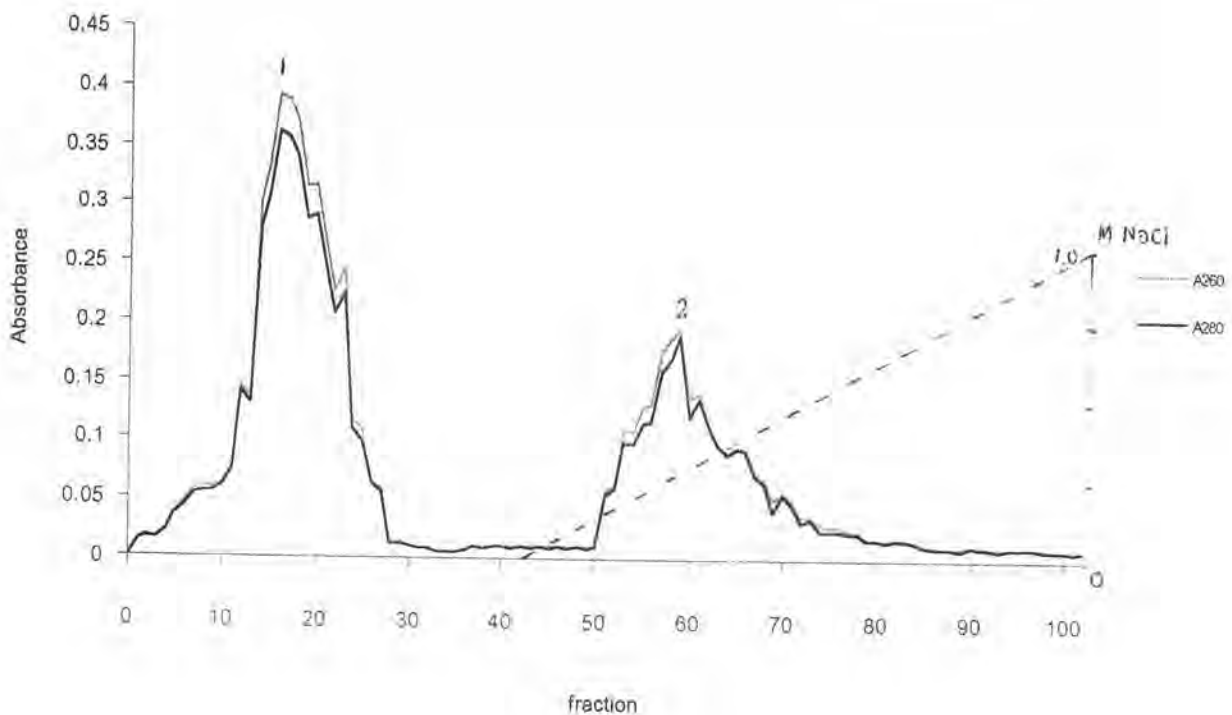
นำตะกอนที่ได้จากการตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 0 – 30% ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-50 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.0 เซนติเมตร ยาว 50 เซนติเมตร ชะด้วย 0.015 M Tris-HCl, พีเอช 7.0 ในอัตราไหล 12 ml/ชั่วโมง เก็บลำดับส่วนละ 2 ml ติดตามโปรตีนด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร รูปแบบโปรตีนที่ได้เป็นดังภาพที่ 27 เมื่อเก็บส่วนยอดมาตรวจหาแอกติวิตีของสารต้านจุลชีพแล้วพบว่าโปรตีนในยอดที่ 3 เท่านั้นที่ให้แอกติวิตีของสารต้านจุลชีพ



รูปที่ 27 : รูปแบบโปรตีนเมื่อผ่านคอลัมน์ Sephadex G-50 ซึ่งติดตามโปรตีนด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร

#### 4.17 การทำบริสุทธิ์ด้วย Ion exchange chromatography

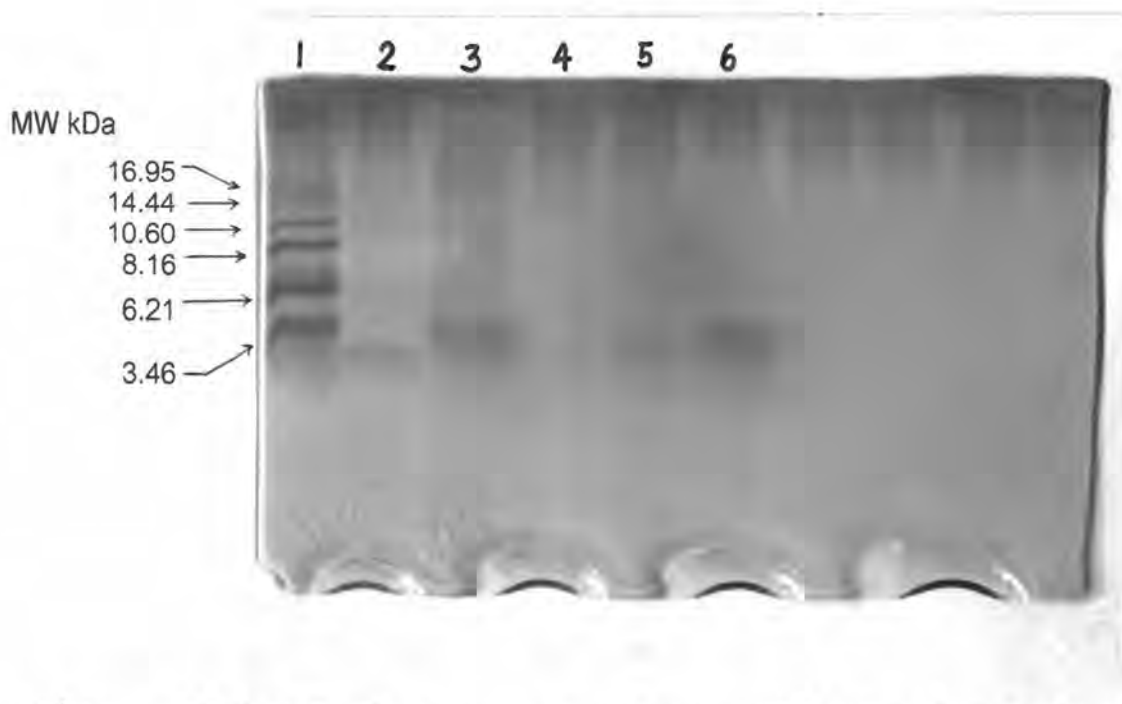
นำลำดับส่วนที่ให้แอกติวิตีของสารต้านจุลชีพจากการทำให้บริสุทธิ์ด้วยการผ่านคอลัมน์ของ Sephadex G-50 มาผ่านคอลัมน์ของ DEAE-Sephadex A-25 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ยาว 20 เซนติเมตร ชะด้วย 0.015 M Tris-HCl, pH 7.0 เก็บลำดับส่วนละ 2 ml ติดตามโปรตีนโดยวัดการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร เมื่อปริมาณโปรตีนลดลงเกือบเป็นศูนย์ติดต่อกันเป็นระยะเวลาหนึ่ง จึงชะด้วย NaCl gradient โดยใช้ 0 – 1.0 M NaCl ในบัฟเฟอร์ 0.015 M Tris-HCl, pH 7.0 ปริมาตรรวมในการทำเกรเดียนท์เป็น 60 ml ติดตามปริมาณโปรตีนต่อไป รูปแบบโปรตีนที่ได้เป็นดังรูปที่ 28 ปรากฏโปรตีน 2 ยอด ก่อนและหลังการชะด้วย NaCl gradient โปรตีนในยอดที่เกิดขึ้นหลังการชะด้วยโซเดียมคลอไรด์เท่านั้นที่จะให้แอกติวิตีของสารต้านจุลชีพ



รูปที่ 28 : รูปแบบโปรตีนจากการทำ ion exchange chromatography

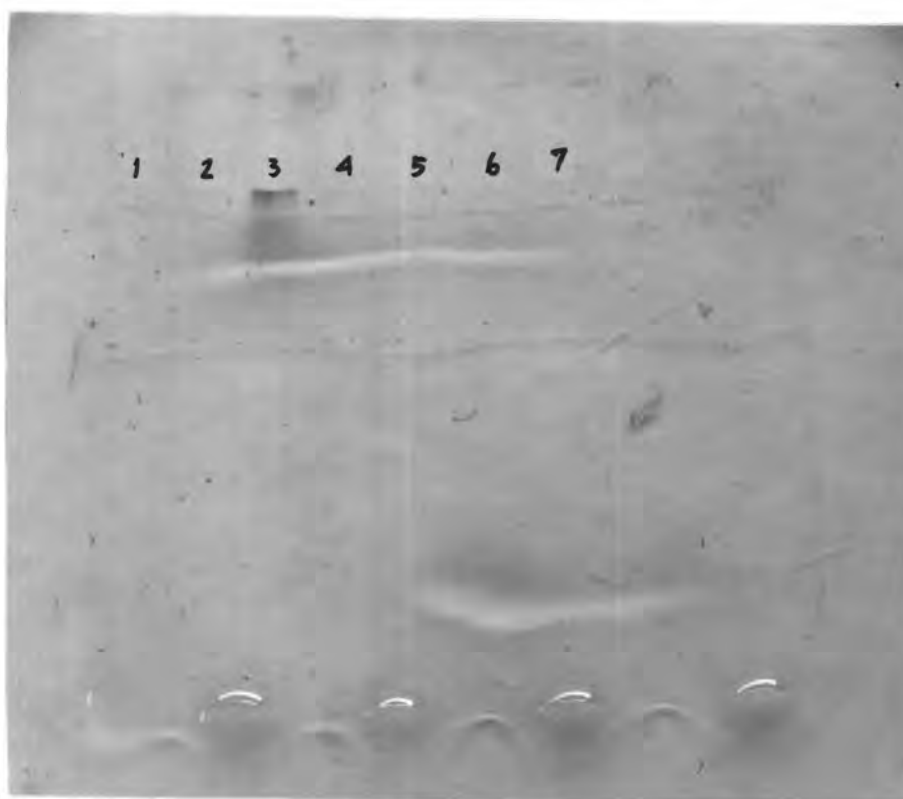
#### 4.18 การวิเคราะห์ด้วย Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

นำสารตัวอย่างที่ได้จากขั้นทำให้บริสุทธิ์ต่าง ๆ มาวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE โดยใช้ 16.5% T, 3% C ในช่วงของ Separating gel และ 4%T, 3%C ในช่วงของ Stacking gel ใช้ molecular weight markers ในช่วง 2,500 – 17,000 Daltons (Sigma, USA) ย้อม 3 แบบ ได้แก่การย้อมโปรตีน การย้อมไกลโคโปรตีนและการย้อมไลโปโปรตีน ดังรูปที่ 29, 30 และ 31 ตามลำดับ ผลจากรูปที่ 29 แสดงว่าสารต้านจุลชีพนี้เป็นเปปไทด์ที่มีมวลโมเลกุลประมาณ 3.5 kDa จากรูปที่ 30 แสดงว่าสารนี้ไม่ใช่สารที่มีองค์ประกอบอย่าง glycoprotein และจากรูปที่ 31 แสดงว่าสารนี้มี lipid เป็นองค์ประกอบ



รูปที่ 29 : แถบโปรตีนเมื่อย้อมด้วย Coomassie Blue G-250 แสดงให้เห็นว่าสารต้านจุลชีพดังกล่าวมีมวลโมเลกุลประมาณ 3.5 kDa ลำดับของตัวอย่างในช่องต่างๆ เป็นดังนี้

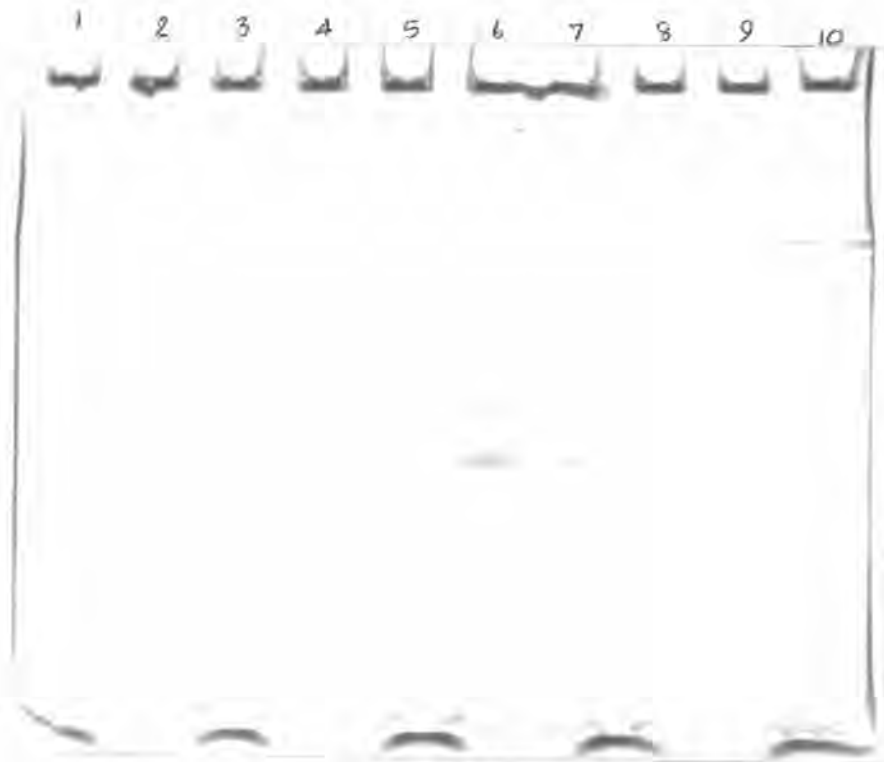
1. SDS Molecular Weight Markers 2500 – 17000 Da (ปริมาณโปรตีน 5 ไมโครกรัม)
2. Insulin chain B, oxidized form MW 3496 ( " 5 " )
3. Cultured Broth ผ่าน lyophilization และละลายกลับ  
ด้วย 0.05 M Phosphate Buffer pH 7.0 ( " 250 " )
4. ตะกอนที่ตกด้วยแอมโมเนียซัลเฟตในช่วง 0-30% ( " 75 " )
5. ยอดที่ 3 หลังผ่านคอลัมน์ Sephadex G-50 ( " 10 " )
6. ยอดที่ 2 หลังผ่านคอลัมน์ DEAE-Sephadex A-25 ( " 20 " )



รูปที่ 30 : แถบโปรตีนเมื่อย้อมเพื่อตรวจสอบ glycoprotein ด้วย thymol และ กรดซัลฟูริก ตามวิธีของ Racusen (1979) ภาคผนวก ค. พบว่า สารด้านจุดที่พดั่งกล่าวไม่ได้เป็น glycoprotein ลำดับของตัวอย่างในช่องต่างๆ เป็นดังนี้

1. SDS Molecular Weight Markers 2500 – 17000 Da (ปริมาณโปรตีน 5 ไมโครกรัม)
2. Insulin chain B, oxidized form MW 3496 ( " 5 " )
3. โปรตีน "Anti-D" ซึ่งเป็น IgG และ IgM ( " 5 " )
4. Cultured Broth ผ่าน lyophilization และละลายกลับ  
ด้วย 0.05 M Phosphate Buffer pH 7.0 ( " 250 " )
5. ตะกอนที่ตกด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 0-30% ( " 75 " )
6. ยอดที่ 3 หลังผ่านคอลัมน์ Sephadex G-50 ( " 10 " )
7. ยอดที่ 2 หลังผ่านคอลัมน์ DEAE-Sephadex A-25 ( " 20 " )

หมายเหตุ : "Anti-D" เป็น glycoprotein จึงให้แถบสีส้มแดงเมื่อตรวจสอบด้วยวิธีนี้



**รูปที่ 31 :** แถบโปรตีนเมื่อย้อมเพื่อตรวจสอบด้วย Sudan Black แสดงให้เห็นว่าสารต้านจุลชีพดังกล่าวมีองค์ประกอบส่วนหนึ่งเป็น lipid ลำดับของตัวอย่างในช่องต่างๆ เป็นดังนี้

1. Cultured Broth ผ่าน lyophilization และละลายกลับ  
ด้วย 0.05 M Phosphate Buffer pH 7.0 (ปริมาณโปรตีน 250 ไมโครกรัม )
2. ตะกอนที่ตกได้ในช่วง 0-30% ( " 100 " )
3. พีคที่ 3 หลังผ่านคอลัมน์ Sephadex G-50 ( " 5 " )
4. พีคที่ 2 หลังผ่านคอลัมน์ DEAE-Sephadex A-25 ( " 5 " )
5. -
6. lipase type XIII จาก *Pseudomonas* species ( " 10 " )
7. lipase type XIII จาก *Pseudomonas* species ( " 5 " )
8. -
9. SDS Molecular Weight Markers 2500 – 17000 Da ( " 5 " )
10. Insulin chain B, oxidized form MW 3496 ( " 5 " )

**หมายเหตุ :** ตัวอย่างในช่องที่ 1 และ 2 ไม่มีองค์ประกอบของ lipid จึงไม่เกิดแถบสีดำตามวิธีนี้ และในการทดสอบนี้ใช้ lipase type XIII เป็นตัวอย่าง lipoprotein

#### 4.19 สรุปการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนสารต้านจุลชีพจาก *Bacillus* sp. S11

น้ำหมักของ *Bacillus* sp. S11 ที่เพาะเลี้ยงด้วยภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมจะมีแอกติวิตีจำเพาะเริ่มต้นที่ 28.57 AU/mg protein ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 0-30 (% sat) ทำให้ได้แอกติวิตีจำเพาะเป็น 1256.44 AU/mg protein ตามด้วยขั้นตอน Gel Permeation Chromatography และ Ion Exchange Chromatography จะได้แอกติวิตีจำเพาะเพิ่มขึ้นเป็น 2133.33 และ 3200 AU/mg protein ตามลำดับ จากขั้นตอนการทำบริสุทธิ์บางส่วนทั้งสามขั้นตอนนี้กล่าวได้ว่าสามารถทำให้สารต้านจุลชีพนี้บริสุทธิ์ขึ้นได้บางส่วนโดยพิจารณาจากค่า Purification Factor ที่เพิ่มขึ้นมากกว่าในน้ำหมักเป็น 44, 75 และ 112 เท่า เมื่อผ่านขั้นตอนการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (0-30% sat) ผ่าน Gel Permeation Chromatography และ Ion Exchange Chromatography ตามลำดับ ตลอดจนการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนนี้เกิดการสูญเสียแอกติวิตีไปมากดังจะเห็นได้จาก %Recovery ที่ลดลงตลอดขั้นตอนทำให้บริสุทธิ์ทั้งสามจนในขั้นตอนสุดท้ายคือ Ion Exchange Chromatography ที่เหลือ %Recovery เป็น 8% ดังแสดงในตารางที่ 16

ตารางที่ 16 : สรุปการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนของสารต้านจุลชีพจาก *Bacillus* sp. S11

สารตัวอย่างจากขั้นตอน	ปริมาตร (ml)	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)	แอกติวิตี (AU/ml)	แอกติวิตีจำเพาะ (AU/mg protein)	Purification Factor	แอกติวิตีรวม (AU)	% Recovery
น้ำหมัก	1000	5.60	160	28.57	1	160000	100
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0-30% saturated	10	8.15	10240	1256.44	44	102400	64
Sephadex G-50	48	0.15	320	2133.33	75	15360	9.6
DEAE-Sephadex A-25	40	0.10	320	3200	112	12800	8

หมายเหตุ : Purification Factor = แอกติวิตีจำเพาะในขั้นตอนนี้ / แอกติวิตีจำเพาะของน้ำหมัก

% Recovery = (แอกติวิตีรวมในขั้นตอนนี้ / แอกติวิตีรวมของน้ำหมัก) × 100