

จากการคัดกรอง *Bacillus* spp. จำนวน 5 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากดินในประเทศไทยซึ่งสามารถยับยั้ง จุลินทรีย์ทดสอบด้วยวิธี cross streak พบว่า *Bacillus* sp. K-05 ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์และราเส้นใยได้ ศึกษาการสร้างสารต้านจุลชีพในอาหารเหลว NB TSB และ LB โดยวิธี paper disc diffusion พบว่าส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหาร LB ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ดีกว่าส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหาร NB และ TSB โดยพบว่าสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC6633 *Staphylococcus aureus* ATCC25923 และ *Micrococcus luteus* แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Serratia* sp. และราเส้นใยทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ *Aspergillus oryzae* *Fusarium* sp. และ *Alternaria* sp. แต่ไม่พบการยับยั้งยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Candida albicans* สารต้านจุลชีพในส่วนใสซึ่งเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 10 เดือน มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้แตกต่างกัน โดยพบว่าการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบค่อย ๆ ลดลงตามระยะเวลา โดยมีการยับยั้งได้นานถึง 4-7 เดือน ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ทดสอบ สารต้านจุลชีพทนต่อความร้อนระหว่าง 60-100 องศาเซลเซียส โดยมีผลยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้แตกต่างกัน เมื่อได้รับความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส พบว่าไม่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทุกชนิดที่นำมาศึกษา การจำแนกสปีชีส์ของ *Bacillus* sp. K-05 โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA และเปรียบเทียบกับข้อมูลใน GenBank พบว่ามีความเหมือนกับ *Bacillus subtilis* M04 เท่ากับ 99% จึงจัดว่า *Bacillus* sp. K-05 เป็น *Bacillus subtilis* การสกัดแยกสารต้านจุลชีพด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ พบว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตทยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ดีกว่าสารสกัดเฮกเซนและสารสกัดเอทิลอีเทอร์ การแยกสารต้านจุลชีพโดยโครมาโทกราฟีแบบผิวบางด้วยระบบตัวพา คือ เมทานอล-เอทิลอะซิเตท (5:95) พบว่าแยกสารได้ 5 ตำแหน่ง มีค่า R_f เท่ากับ 0.21 0.33 0.43 0.55 และ 0.79 ผลการทำสารต้านจุลชีพให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยมีระบบตัวพา คือ เฮกเซน-เอทิลอะซิเตท ได้สารที่บริสุทธิ์ 2 สาร มีลักษณะเป็นผงสีขาว ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *B. subtilis* ATCC6633 *S. aureus* ATCC25923 และ *M. luteus* จากการวิเคราะห์โครงสร้างโดยวิธีทางเคมี สรุปได้ว่าสารที่ I คือ cyclo(Leu-Pro) มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 210.1446 สารที่ II คือ cyclo(Val-Pro) มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 196.1269 ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานมาก่อนว่ามีสาร cyclic dipeptide ดังกล่าวเป็นสารต้านจุลชีพที่ผลิตจาก *B. subtilis*

4672449723 : MAJOR Industrial Microbiology

KEY WORD : *Bacillus* / dipeptide / antimicrobial substance

SUDARAT BOONYONG : ANTIMICROBIAL SUBSTANCE PRODUCED BY *Bacillus* spp. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SONGSRI KULPREECHA Ph. D., THESIS COADVISOR : ASSOC. PROF. AMORN PETSOM Ph. D., 119 pp. ISBN 974-14-3383-2. 9

Out of 5 strains of *Bacillus* spp. isolated from soil in Thailand capable of inhibiting the test organism using cross streak method, *Bacillus* sp. K-05 showed antimicrobial activity against Gram positive and Gram negative bacteria, yeasts and molds. Antimicrobial substance production in NB, TSB and LB using paper disc diffusion as test method showed that the supernatant from culture broth of LB had higher antimicrobial activity than that of NB and TSB media. The supernatant had inhibitory activity against Gram positive bacteria i.e. *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, and *Micrococcus luteus*; Gram negative bacteria i.e. *Serratia* sp. and molds i.e. *Aspergillus oryzae*, *Fusarium* sp., *Alternaria* sp. but had no activity against yeasts i.e. *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*. The antimicrobial substance in supernatant kept at 4 °C for 10 months showed different inhibitory effect on the test organism. The activity gradually decreased as the keeping period increased which showed the inhibitory activity for 4-7 months depending on group of microorganism. The substance was stable after heat treatment at 60-100 °C with different activity on test organisms but showed no activity after heated at 121 °C. *Bacillus* sp. K-05 was identified by nucleotide sequencing of 16S rDNA and compared with GenBank database. It was found that *Bacillus* sp. K-05 was 99% identity to *Bacillus subtilis* M04, thus it was identified as *Bacillus subtilis*. Extraction of substance by organic solvent showed that ethyl acetate extract had higher activity than that of hexane and ethyl ether extract. The ethyl acetate extract was analyzed by TLC using methanol-ethyl acetate (5:95) as solvent system. The mixture of antimicrobial substance were separated to 5 fractions with different R_f 0.21 0.33 0.45 0.55 and 0.79. After purification by column chromatography using hexane-ethyl acetate as eluted solvent, obtained fractions had 2 purified components which showed antimicrobial activity on *B. subtilis* ATCC6633, *S. aureus* ATCC25923, and *M. luteus*. Based on chemical analyses, the compound I and II were identified as cyclo(Leu-Pro) with M.W. 210.1446, and cyclo(Val-Pro) with M.W. 196.1269 respectively. This is the first report of cyclic dipeptide that exhibited antimicrobial activity produced by *B. subtilis*.