

การศึกษาสารออกฤทธิ์ด้านเชื้อแบคทีเรียในชีร่มจะเข้สายพันธุ์ไทย (*Crocodylus siamensis*)

สมชาติ วงศ์แก้ว¹⁾ ศักดา ดาดวง¹⁾ ชีรศักดิ์ สมดี²⁾ และ สมปอง ธรรมศิริรักษ์^{*1)}

1) ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น Email : somkly@kku.ac.th

2) ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาสารออกฤทธิ์ด้านเชื้อแบคทีเรียในชีร่มจะเข้สายพันธุ์ไทยโดยเทคนิคการตกตะกอนโปรตีนหรือเพปไทด์ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตและคอลัมน์โครมาโตกราฟีแล้วทำการตรวจสอบความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียด้วย disc diffusion method และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนหรือเพปไทด์ด้วย SDS-PAGE จากการศึกษาพบว่าการตกตะกอนโปรตีนหรือเพปไทด์ที่ 20-50 % แอมโมเนียมซัลเฟตมีสมบัติต้านเชื้อแบคทีเรีย 3 ชนิด คือ *Salmonella typhi* , *Pseudomonas aeruginosa* และ *Klebsiella oxytoca* และจากการแยกบริสุทธิ์ด้วย DEAE anion exchange column chromatography พบ 6 peak ของโปรตีนหรือเพปไทด์ซึ่งแต่ละ peak มีสมบัติในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่แตกต่างกันและจากการตรวจสอบด้วย SDS-PAGE พบว่ามีโปรตีนหรือเพปไทด์เป็นองค์ประกอบอยู่จำนวนมาก นอกจากนี้ยังพบตะกอนโปรตีนหรือเพปไทด์ที่มีสีฟ้าซึ่งคาดว่าจะเป็นสีของคอปเปอร์ที่จับอยู่กับโมเลกุลของโปรตีนหรือเพปไทด์ซึ่งอาจจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับกลไกการต้านเชื้อแบคทีเรีย

คำสำคัญ : จะเข้, ชีร่ม, สารต้านฤทธิ์แบคทีเรีย

1. บทนำ

ปัจจุบันประเทศไทยพบว่ามีเชื้อก่อโรคหลายชนิดมีความสามารถดื้อต่อยาปฏิชีวนะซึ่งเชื้อส่วนใหญ่จะเป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญในคน เช่น เชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ที่ก่อให้เกิดโรควัณโรค และเชื้อกลุ่ม *Nonfermenter* และ *Klepsiella sp.* โรคที่เกี่ยวข้องกับโรคระบบทางเดินอาหาร โดยมีปัจจัยที่สำคัญในการดื้อต่อยาปฏิชีวนะคือ การใช้ยาปฏิชีวนะอย่างไม่ถูกต้องทางด้านการแพทย์และเกษตรกรรม ซึ่งส่งผลให้เกิดการดื้อยา และมีแนวโน้มที่จะแพร่กระจายเป็นวงกว้างอันนำมาซึ่งวิกฤตการณ์ที่รุนแรงในปัจจุบันทำให้เป็นปัญหาอย่างมากในวงการแพทย์

ด้วยเหตุนี้จึงมีงานวิจัยที่มุ่งเน้นหายาด้านเชื้อแบคทีเรียชนิดใหม่จากธรรมชาติที่มีความจำเพาะ มีประสิทธิภาพสูง และไม่ก่อให้เกิดการดื้อยา จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงมี defense mechanism ในการป้องกันตนเองจากการติดเชื้อแบคทีเรียหรือสิ่งแปลกปลอมโดยการสร้างโปรตีนหรือเพปไทด์ขึ้นมาเพื่อทำลาย

หรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ถือว่าเป็น innate immunity ในสิ่งมีชีวิต โดยมีกลไกการทำลายที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย และทำให้แบคทีเรียตายในที่สุด ซึ่งการทำลายในลักษณะนี้จะไม่เอื้อต่อการพัฒนาของแบคทีเรียเพื่อต่อการทำงาน

(Matsuzaki, K., 1999)

จะเข้เป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศชนิดหนึ่ง จากข้อมูลการเพาะเลี้ยงพบว่าจะเข้เป็นสัตว์ที่มีพฤติกรรมก้าวร้าว กัดกันจนทำให้เกิดบาดแผล แต่จะไม่ค่อยพบว่ามีปัญหาของการติดเชื้อ (ปานเทพ รัตนกร, 2541) จึงอาจเป็นไปได้ว่าจะเข้มีการสร้างโปรตีนหรือเพปไทด์ชนิดพิเศษที่สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพสูง โดยเฉพาะในเลือดซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการแปรรูปที่ยังไม่มีการศึกษานำไปใช้ประโยชน์อย่างเต็มที่ ถ้าสามารถทราบและแยกบริสุทธิ์ได้จะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการนำไปพัฒนาใช้เพื่อผลิตเป็นวัคซีนหรือยา และยังเป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับอุตสาหกรรมจะเข้ด้วย

ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาสารต้านเชื้อแบคทีเรียในซีรัมจากเลือดจระเข้สายพันธุ์ไทย (*Crocodylus siamensis*) โดยทำการตกตะกอนโปรตีนหรือเพปไทด์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วนำโปรตีนหรือเพปไทด์ที่ตกตะกอนได้ไปกำจัดเกล็ดออกโดยผ่าน Sephadex G-25 และทดสอบการต้านเชื้อแบคทีเรียโดยเทคนิค disc diffusion method จากนั้นทำการแยกบริสุทธิ์ด้วย ion exchange column chromatography แล้วนำส่วนที่แยกได้ตรวจสอบสมบัติการต้านเชื้อแบคทีเรียและตรวจสอบความบริสุทธิ์โปรตีนโดยเทคนิค SDS-PAGE

2. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่างๆ

ซึ่งแอมโมเนียมซัลเฟตตามที่ต้องการและค่อยๆ โรยเกล็ดลงในซีรัมจะแช่ที่เจือจางด้วย 0.05 M sodium phosphate buffer pH 7.0 ในอัตราส่วน 1:2 ทำการ stir เบาๆ ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ 10,000 xg เป็นเวลา 30 นาที เก็บส่วนของ supernatant โดยแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกนำไปกำจัดเกล็ดโดยผ่านคอลัมน์ Sephadex G-25 และทดสอบการต้านเชื้อแบคทีเรียโดยเทคนิค disc diffusion method ส่วนที่สองนำไปตกตะกอนต่อที่ % ความเข้มข้นเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตในลำดับต่อไป สำหรับส่วน pellet นำไปกำจัดเกล็ดแล้วทำการทดสอบการต้านเชื้อแบคทีเรียโดย disc diffusion method และตรวจสอบความบริสุทธิ์โปรตีนด้วย SDS-PAGE

2.2 การกำจัดเกล็ดแอมโมเนียมซัลเฟตโดยผ่านคอลัมน์ Sephadex G-25

นำสารละลายโปรตีนตัวอย่างที่ได้จากการตกตะกอน applied ลงในคอลัมน์ขนาดเท่ากับ 1.5x 100 cm ที่ equilibrate column ด้วย 0.05 M sodium phosphate buffer pH 7.0 เก็บ fraction ละ 6 ml นำแต่ละ fraction ไปวัด A_{280} และ A_{220} ทำการ pooled fraction ที่มี peak โปรตีนหรือเพปไทด์เกิดขึ้น แล้ว

นำไปวัดความสามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียด้วย disc diffusion method ตรวจสอบความบริสุทธิ์โปรตีนโดยเทคนิค SDS-PAGE

2.3 การตรวจสอบความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียด้วย disc diffusion method

applied สารละลายโปรตีนตัวอย่างลงใน paper discs บน plate อาหาร Mueller Hinton Agar ที่ swab ด้วยเชื้อ *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella oxytoca* และ *Salmonella typhi* บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ตรวจวัด clear zone ที่เกิดขึ้น (วัด 3 ครั้ง โดยรอบๆ clear zone หาค่าเฉลี่ยแล้วนำไปวิเคราะห์ผลในลำดับต่อไป)

2.4 การแยกบริสุทธิ์โปรตีนหรือเพปไทด์ด้วย

เทคนิค ion exchange column chromatography

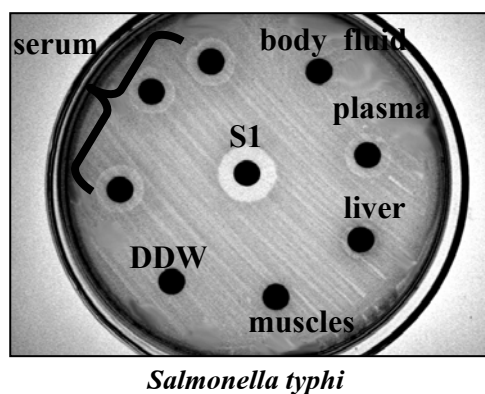
นำสารละลายโปรตีนหรือเพปไทด์ที่พบว่ามีความสามารถทำลายเชื้อแบคทีเรีย applied ลงใน column ขนาด 1x90 cm ที่ผ่านการ equilibrate ด้วย 0.05 M sodium phosphate buffer pH 7.0 เก็บ fraction ละ 3 ml ล้างคอลัมน์ด้วย 0.05 M sodium phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 300 ml ทำการชะโปรตีนแบบ linear gradient ด้วย 0.0-0.5 M NaCl ใน 0.05 M sodium phosphate buffer pH 7.0 เก็บทุก fraction ไปวัด A_{280} และ A_{220} ทำการ pooled fraction ที่มี peak โปรตีนหรือเพปไทด์ เพื่อนำไปตรวจสอบความสามารถในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย และทดสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนหรือเพปไทด์ที่แยกได้

2.5 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนหรือเพปไทด์ด้วย SDS-PAGE

SDS-PAGE ได้ทำการทดลองตามเทคนิคของ Laemmli (1970) และย้อมเจลด้วย Coomassie brilliant Blue R250 และ Silver Staining

3. ผลการทดลองและอภิปรายผล

ก่อนที่จะทำการศึกษาสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียในซีรัมจะเข้าสู่ขั้นไทย ได้มีการศึกษาเบื้องต้นโดยการนำซีรัม พลาสมา บอดีฟลูอิด สารสกัดจากตับและสารสกัดจากกล้ามเนื้อ มาตรวจสอบการต้านเชื้อแบคทีเรียด้วย disc diffusion method ซึ่งได้ผลการทดลองดังรูปที่ 1.



รูปที่ 1. การตรวจสอบการต้านเชื้อ *Salmonella typhi* โดย disc diffusion method

S10 : Streptomycin 10 MC g (Positive Control)

W : Double Distill Water ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (Negative Control)

จากผลการทดลองพบว่าใน ซีรัม พลาสมา และสารสกัดจากตับมีความสามารถในการต้านเชื้อ *S. typhi* ส่วนบอดีฟลูอิดและสารสกัดจากกล้ามเนื้อไม่พบว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อดังกล่าว จากข้อมูลนี้จำเป็นต้องทำการศึกษาต่อไปว่าสารที่มีสมบัติต้านการติดเชื้อแบคทีเรียในซีรัมจะเข้าสู่ขั้นไทย

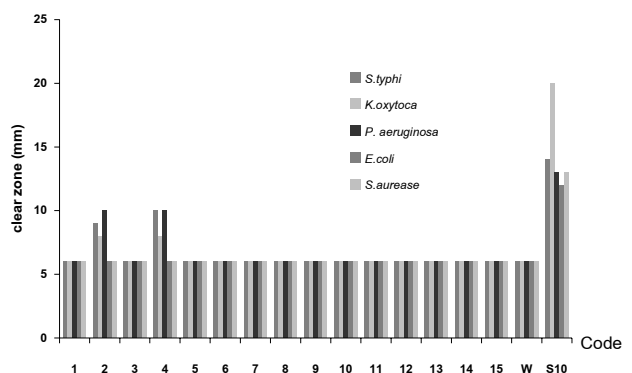
3.1 ผลการตกตะกอนโปรตีนหรือเพปไทด์จากซีรัมจะเข้าสู่ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

จากการตกตะกอนโปรตีนซีรัมจะเข้าสู่ด้วย 30%, 50%, 70% และ 90% เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต แล้วนำส่วนตะกอนและส่วนใสที่ได้ไปกำจัดเกลือโดยผ่านคอลัมน์ Sephadex G-25 นำแต่ละ fractions ไป

วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ A_{220} และ A_{280} แล้วทำการรวม fractions ซึ่งได้ทั้งหมด 15 ส่วน (code 1-15)

3.2 ผลการตรวจสอบสมบัติการต้านเชื้อแบคทีเรียของโปรตีนส่วนต่าง ๆ ที่ได้จากการตกตะกอน

นำส่วนต่างๆจากการผ่านคอลัมน์ Sephadex G-25 ไปทดสอบการต้านเชื้อแบคทีเรียด้วย disc diffusion method โดยทดสอบกับเชื้อ *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella oxytoca* และ *Salmonella typhi* ได้ผลการทดสอบดังรูปที่ 2.



รูปที่ 2. ผลการตรวจสอบการต้านเชื้อแบคทีเรียของ code 1-15 โดย disc diffusion method

S10 : Streptomycin 10 MC g

(Positive Control)

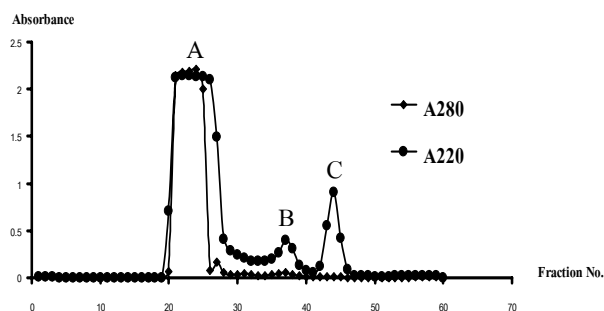
W : Double Distill Water ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (Negative Control)

จากกราฟแท่งเปรียบเทียบความสามารถในการทำละลายเชื้อแบคทีเรีย (clear zone) ของส่วนต่างๆจาก pooled fraction (Code1-15) ของการตกตะกอนโปรตีน พบว่าที่ส่วนใส 30% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Code 2) และตะกอน 50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Code 4) มีการทำละลายเชื้อ *S. typhi* และยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *K. oxytoca* และ *P. aeruginosa* สำหรับส่วนที่เหลือไม่พบการทำละลายเชื้อแบคทีเรียเนื่องจาก clear zone เท่ากับ Negative Control ส่วน Streptomycin (S10)

ซึ่งเป็น Positive Control นั้นสามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียได้ทั้ง 5 ชนิด

3.3 ผลการตกตะกอนโปรตีนหรือเพปไทด์ด้วย 20-50 % เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

จากผลการทดลองที่ผ่านมาทำให้ทราบช่วงความเข้มข้นของเกลือที่สามารถตกตะกอนให้โปรตีนหรือเพปไทด์ที่มีสมบัติด้านเชื้อแบคทีเรีย คือ 30-50% เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ดังนั้นเพื่อให้ได้ปริมาณโปรตีนหรือเพปไทด์ที่เพียงพอสำหรับการทดลองในขั้นตอนต่อไป จึงได้ทำการตกตะกอนซ้ำอีกครั้งที่ 20-50% เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต แล้วเก็บส่วนที่เป็นตะกอนนำไปกำจัดเกลือออกโดยคอลัมน์ Sephadex G-25 ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 3.

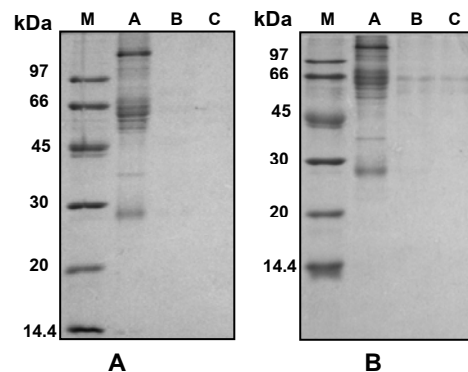


รูปที่ 3. กราฟแสดงการกำจัดเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตโดยผ่านคอลัมน์ Sephadex G-25 ของส่วนตะกอนซึ่งจะแช่ที่ตกตะกอนด้วย 20-50% เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

3.5 ผลการตรวจสอบขนาดและความบริสุทธิ์โปรตีนของ peak A, B และ C ด้วย SDS-PAGE

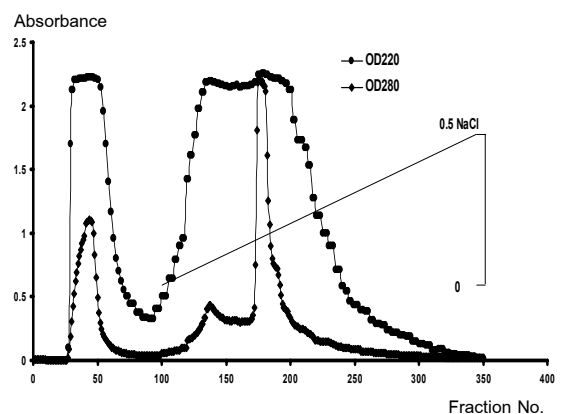
จากการ pooled fraction ของ peak A, B และ C (รูปที่ 3.) และนำไปตรวจสอบความบริสุทธิ์โปรตีน ด้วย 12.5% SDS-PAGE (รูปที่ 4A) และ 15% SDS-PAGE (รูปที่ 4B) พบว่าใน peak A มีแถบโปรตีนอยู่หลายขนาดตั้งแต่ high molecular weight (>100 kDa) จนถึง low molecular weight (<50 kDa) ส่วน peak B และ C พบแถบโปรตีนจางมาก ดังนั้นจึงสนใจการศึกษาในส่วนของ peak A โดย

นำไปแยกบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค ion exchange column chromatography



รูปที่ 4. แสดงการตรวจสอบขนาดและความบริสุทธิ์โปรตีนของ peak A, B และ C ด้วย 12.5% SDS-PAGE (A) และ 15% SDS-PAGE (B)

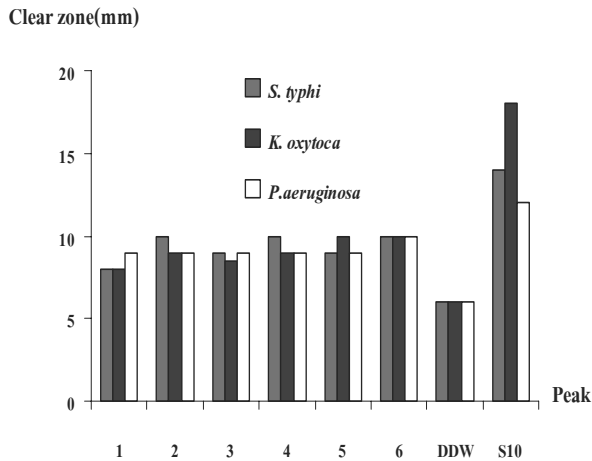
3.6 ผลการแยกบริสุทธิ์โปรตีนหรือเพปไทด์ของ peak A ด้วย Ion exchange column chromatography



รูปที่ 5. แสดง elution profile ของการแยกบริสุทธิ์โปรตีนจากการตกตะกอนโปรตีนที่ 20-50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ของ peak A ด้วย DEAE anion exchange column chromatography

จากการแยกบริสุทธิ์ด้วย DEAE anion exchange column chromatography พบว่าสามารถแยกโปรตีนหรือเพปไทด์ออกได้เป็น 6 peak จากนั้น

จึงนำทั้ง 6 peak ไปทดสอบการต้านเชื้อแบคทีเรียโดย disc diffusion method ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 6.

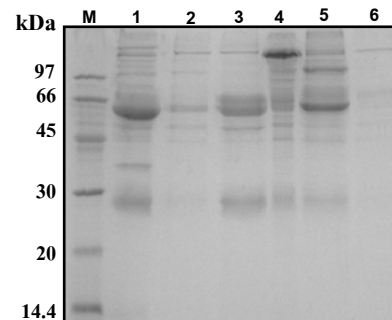


รูปที่ 6. แสดงผลการตรวจสอบการต้านเชื้อแบคทีเรียของ peak 1- 6 โดย disc diffusion method
S10 : Streptomycin 10 MC g (Positive Control)
DDW : Double Distill Water ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (Negative Control)

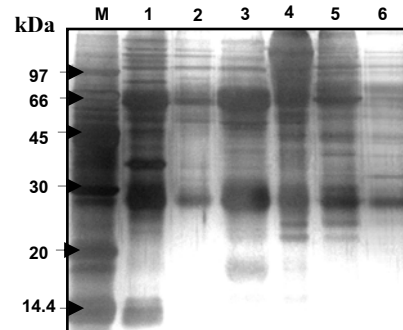
จากการตรวจสอบการต้านเชื้อแบคทีเรียโดย disc diffusion method ของโปรตีนหรือเพปไทด์ทั้ง 6 peak พบว่าโปรตีนหรือเพปไทด์ทั้ง 6 peak มีความสามารถทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแตกต่างกัน โดย peak ที่ 2, 4 และ 6 สามารถทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. typhi* ได้ดีที่สุดและนอกจากนี้ใน peak ที่ 6 ยังสามารถทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทั้ง 3 ชนิดได้ดีกว่า peak อื่นๆ จากนั้นทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนหรือเพปไทด์ทั้ง 6 peak ด้วย SDS-PAGE ซึ่งย้อมด้วย Coomassie brilliant Blue R250 และ Silver Staining ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 7-8

จากการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนหรือเพปไทด์ของ peak ที่ 1-6 ด้วย 12.5% SDS-PAGE ย้อมด้วย Coomassie brilliant Blue R250 (รูปที่ 7) และ Silver Staining (รูปที่ 8) จะพบว่าประกอบด้วยโปรตีนหรือเพปไทด์อยู่จำนวนมาก และจะพบว่าเมื่อย้อมด้วย Coomassie brilliant Blue R250 แถบ

โปรตีนหรือเพปไทด์จะมีลักษณะจาง ในขณะที่ย้อมด้วย Silver Staining แถบโปรตีนหรือเพปไทด์จะเข้ม ดังนั้นจึงแสดงว่าโปรตีนหรือเพปไทด์น่าจะมีคุณสมบัติเป็นลบมากกว่าความเป็นไฮโดรโฟบิก ซึ่งจะจับกับประจุบวกของ Silver (Ag^+) ได้ดีกว่า Coomassie brilliant Blue



รูปที่ 7. การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนหรือเพปไทด์ ของ peak ที่ 1- 6 ด้วย 12.5 % SDS-PAGE ย้อมด้วย Coomassie brilliant Blue R250



รูปที่ 8. แสดงการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนหรือเพปไทด์ ของ peak ที่ 1- 6 ด้วย 12.5 % SDS-PAGE ย้อมด้วย Silver Staining

4. สรุปผลการทดลอง

ในซีรัมจะเข้สายพันธุ์ไทย (*Crocodylus siamensis*) ประกอบด้วยโปรตีนหรือเพปไทด์ที่มีประสิทธิภาพสูงมากในการทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย และพบว่ามีความจำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบมากที่สุด โดยเฉพาะ *S. typhi* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคไทฟอยด์ที่ยังถือว่า

เป็นปัญหาทางสาธารณสุขของประเทศไทยในปัจจุบัน ในการทดลองนี้ให้ผลสอดคล้องกับการทดลองของ วิน เชยชมศรี (ม.ป.ป.) ที่ทำการศึกษาและพบว่าในซีรัม จะจะมีสารที่สามารถทำลายหรือยับยั้งการเจริญโต ของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบของเชื้อ *P. aeruginosa* และยังมีผลที่เป็นไปในทางเดียวกันกับ Cherie Roche และคณะ (2002) ที่ได้ทำการศึกษาในซีรัมจะเข้สาย พันธุ์อเมริกัน (*Alligator mississippiensis*) ซึ่งพบว่า ซีรัมจะเข้สายพันธุ์อเมริกัน มีผลทำให้อัตราการรอด ชีวิตของเชื้อ *E. coli* ลดลงกว่าปกติ 10 เท่า ซึ่งจาก รายงานส่วนใหญ่พบว่าในซีรัมจะเข้เกือบทั้งทุกสาย พันธุ์จะมีความสามารถสูงมากในการทำลายหรือยับยั้ง การเจริญเติบโตเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ และนี่คือราย งานแรกที่พบโปรตีนลักษณะมีสีฟ้าจากการตกตะกอน โปรตีนพบว่าโปรตีนสีฟ้า ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นสีของ คอปเปอร์ที่จับอยู่กับโมเลกุลของโปรตีนหรือเพปไทด์ ซึ่ง copper containing protein อาจจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับ กลไกการต้านเชื้อแบคทีเรียในซีรัมจะเข้

สุดท้ายการพบโปรตีนหรือเพปไทด์ที่มีสมบัติ ทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่มี ความแรงและมีประสิทธิภาพสูงในซีรัมจะเข้ถือว่ามี ความสำคัญเป็นอย่างมากที่จะเป็นวิธีการหรือทางเลือก ใหม่ในวงการแพทย์ที่จะใช้ antibiotic peptides เพื่อ ช่วยลดปัญหาในการเกิดการดื้อยาของโรคติดเชื้อต่อไป ในอนาคต

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ฝ่ายอุตสาหกรรม โครงการ งบประมาณอุตสาหกรรมสำหรับปริญญาดุษฎีประจำปี 2546 และได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างศึกษาจากบริษัท ศรีราชาฟาร์ม กรู๊ป จำกัด

บรรณานุกรม

ปานเทพ รัตนากร. (2541). การเพาะเลี้ยงจะเข้ เบื้องต้น. นครปฐม: โรงพิมพ์ศูนย์ส่งเสริมและ ฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ.

วิน เชยชมศรี. (ม.ป.ป.). ประสิทธิภาพของซีรัมจะเข้ น้ำจืดพันธุ์ไทยในการยับยั้งการเจริญ โตของ แบคทีเรีย. เทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด. 25, 4.

Britton, A., G.; Diamond, D. L.; Kaiser, V. Antimicrobial activity in the blood of the Saltwater crocodile. 2002. In Crocodiles. Proceedings of the 16th Working Meeting of the Crocodile Specialist Group, IUCN The World Conservation Union, Gland, Switzerland and Cambridge UK. 2002.

Laemmli, U.K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature*, **1970**, 227: 463-467.

Matsuzaki, K., Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1999**, 1462, 1-10.

Merchant, M.; Roche, C.; Young, B.; Cabello, K.; Thibodeaux, D.; Van, Gossen, R.; Else, R. Identification of serum complement activity in the American alligator. In: Crocodiles. Proceedings of the 16th Working Meeting of the Crocodile Specialist Group, IUCN The World Conservation Union, Gland, Switzerland and Cambridge UK. 2002.

Roche, C., et al Antibiotics properties of serum in the American alligator (*Alligator mississippiensis*). Mark E. Merchant Shearman Research Initiative Award. 2002.