



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์คณภูมิบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การศึกษาคุณสมบัติของสารต้านจุลินทรีย์ที่สร้างจากเชื้อ *Bacillus* สายพันธุ์ B-1 ที่คัดแยกได้จากบ่อเลี้ยงปลา และการทำให้บริสุทธิ์

Characterization and Purification of Antimicrobial Substances from *Bacillus* strain B-1 from Fish Pond

นามผู้วิจัย นางสาวสุปราณี พึ่งแพง

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ชลอ ลิมสุวรรณ, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วัชรวิภา ฐิริวิโรจน์กุล, ป.ร.ค.)

ประธานสาขาวิชา

(รองศาสตราจารย์พงศ์เทพ อัครชนกุล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

สืบสถิติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาคุณสมบัติของสารต้านจุลินทรีย์ที่สร้างจากเชื้อ *Bacillus* สายพันธุ์ B-1
ที่คัดแยกได้จากบ่อเลี้ยงปลาและการทำให้บริสุทธิ์

Characterization and Purification of Antimicrobial Substances
from *Bacillus* strain B-1 from Fish Pond

โดย

นางสาวสุปราณี พึ่งแพง

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

พ.ศ. 2554

สุปราณี พึ่งแพง 2554: การศึกษาคุณสมบัติของสารต้านจุลินทรีย์จากเชื้อ *Bacillus* สายพันธุ์ B-1 ที่คัดแยกได้จากบ่อเลี้ยงปลา และการทำให้บริสุทธิ์ ปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์ชลอ ลิมสุวรรณ, Ph.D. 91 หน้า

Bacillus สายพันธุ์ B-1 ที่คัดแยกได้จากบ่อเลี้ยงปลาในสถานีวิจัยประมงกำแพงแสน คณะประมงมหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ถูกนำมาใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับสารต้านจุลินทรีย์ โดยนำแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ B-1 มาจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยใช้เทคนิค 16 S rDNA พบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ B-1 ซึ่งเชื่อมีความสามารถในการผลิตสารต้านจุลินทรีย์ ที่มีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ABRCS 01, *Aeromonas hydrophila* ABRCA 01, *Staphylococcus aureus* ATCC 12600, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Micrococcus luteus* IFO 12708, *Bacillus circulans* JCM 2504 และ *Bacillus coagulans* JCM 2257 เมื่อทดสอบด้วยเทคนิค spot on lawn, agar well diffusion, ทดสอบคุณลักษณะทางกายภาพของสารต้านจุลินทรีย์ที่ผลิตโดยเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ B-1 โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *Listeria innocua* ATCC 33090 เป็นเชื้อทดสอบ เนื่องจากเชื้อ *Listeria innocua* ATCC 33090 ซึ่งมีความไวต่อสารต้านจุลินทรีย์ในการยับยั้งสูงสุด (320 AU ต่อมิลลิเมตร) พบว่าสารต้านจุลินทรีย์สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ได้นาน 50 นาที (320 AU ต่อมิลลิเมตร) และสารต้านจุลินทรีย์ให้ค่ากิจกรรมสูงสุดของสารที่ 320 AU ต่อมิลลิเมตร เมื่ออยู่ที่ค่า pH ระหว่าง 2.0-10.0 เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และให้ค่ากิจกรรมสูงสุดของสารจะลดลง เมื่ออยู่ที่ค่า pH ระหว่าง 2.0-8.0 ในอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที สารต้านจุลินทรีย์ของเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* B-1 มีความไวต่อการถูกย่อยโดยเอนไซม์ α -chymotrypsin, trypsin, proteinase K และ protease นอกจากนี้สารต้านจุลินทรีย์ยังสามารถคงตัวได้เมื่ออยู่ในสถานะที่มีโซเดียมคลอไรด์ 3, 6, 9, 12 และ 15% เมื่อสกัดสารต้านจุลินทรีย์ออกจากน้ำเลี้ยงแบคทีเรีย โดยใช้ amberlite เป็นตัวดูดซับและใช้เครื่อง HPLC เป็นตัวแยกสารต้านจุลินทรีย์ พบว่ามีเพียง fraction เดียว (B1-1) ที่เวลา 30.221 นาที มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบ และ fraction ดังกล่าวมีน้ำหนักโมเลกุล 3,398.05 ดาลตัน เมื่อวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค mass spectrometry (MALDI-TOF) และวิเคราะห์แยกส่วนประกอบของสารต้านจุลินทรีย์โดยใช้เทคนิค 2D-PAGE พบ 5 จุดบนเจล ตัดเจลแต่ละจุดมาผ่านเข้าเครื่อง LC-MS/MS พบว่าจุดที่ 3 และจุดที่ 5 ที่มีฐานข้อมูลสัมพันธ์กับสารต้านจุลินทรีย์กลุ่ม mycosubtilin และ lipopeptide ตามลำดับ

Supranee Arai 2011: Characterization and Purification of Antimicrobial Substances from *Bacillus* strain B-1 from Fish Pond. Doctor of Philosophy (Agricultural Biotechnology), Major Field: Agricultural Biotechnology, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Associate Professor. Chalor Limsuwan, Ph.D. 93 pages.

Bacillus B-1, was isolated from fish ponds in Kamphangsaeen Fisheries Research Station, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Kamphangsaeen campus, Nakhonratchasima Province, can produce the antimicrobial substance to inhibit *Streptococcus agalactiae*, then use to study the antimicrobial substance. Identification of the strain was performed by molecular genetic (16 S rDNA) basis. This strain was identified as *B. subtilis* strain B-1. The microbial inhibitory activity was determined by spot on lawn and agar well diffusion technique and the inhibitory activity of *B. subtilis* strain B-1 was shown to be effective against *Streptococcus agalactiae* ABRCs 01, *Aeromonas hydrophila* ABRCa 01, *Staphylococcus aureus* ATCC 12600, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Micrococcus luteus* IFO 12708, *Bacillus circulans* JCM 2504 and *Bacillus coagulans* JCM 2257. The physical characterization of the antimicrobial substance that was produced by *B. subtilis* strains B-1 can inhibit many strains of the pathogenic bacteria especially *L. innocua* ATCC 33090 which yielded the highest sensitivity of indicator strain (320 AU ml⁻¹). The cell-free neutralized supernatant (CFNS) of *B. subtilis* B-1 were stabled at 100°C for 50 min (320 AU ml⁻¹) and maximum activity of 320 AU ml⁻¹ were retained between pH 2.0-10.0 at 4 °C, and the activities decreased under pH 2.0-8.0 at 100°C for 60 min. The antimicrobial substances of *B. subtilis* B-1 were sensitive to the proteolytic properties of α -chymotrypsin, trypsin, proteinase K and protease, and exhibited stable qualities under 3, 6, 9, 12 and 15% sodium chloride (NaCl). Antimicrobial substances purification was carried out by amberlite adsorption, and reverse-phase high performance liquid chromatography. Molecular mass was determined by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight mass spectrometry (MALDI-TOF). The purification of antimicrobial substances by amberlite adsorption and reverse-phase chromatography resulted in only one single active peak at 30.221 min, which was designated B1-1. Molecular weight of this fraction by mass spectrometry was 3,398.05 Da then analyzed the antimicrobial substance by the 2D-PAGE technique that reported 5 spots after that cut them to LC-MS/MS. The result showed the third and the fifth spots related to mycosubtilin and lipopeptide respectively.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณครอบครัวที่เป็นกำลังใจให้กับข้าพเจ้า รศ. ดร. ชลอ ลีสุวรรณ อาจารย์ที่
ปรึกษา ผศ. ดร. วัชรียา ภูริวิโรจน์กุล กรรมการร่วม รศ. ดร. วันชัย วรวัฒนาเมธีกุล ผศ. ดร.
พงษ์เทพ วิไลพันธ์ ที่ให้คำปรึกษาในการทำวิจัย อ. ดร. คุณฤดี ปานพรหมมินทร์ ผู้แทนภายนอก
รศ. ดร. งามอาจ เล่าหิวนิจ ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ครอบครัวหุตากร ครอบครัวนิธิรัตนวิช
ครอบครัวเดชาพัทธ์ธนบูรณ์ และครอบครัวประกายเพชรกุล พี่ ๆ และน้อง ๆ ในศูนย์วิจัยเพาะเลี้ยง
ธุรกิจสัตว์น้ำ และวิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โดย
งบประมาณของโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ภายใต้โครงการ
บัณฑิต ศึกษาและวิจัย สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา
กระทรวงศึกษาธิการ

สุปราณี พึ่งแพง

กันยายน 2554

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	37
อุปกรณ์	37
วิธีการ	40
ผลและวิจารณ์การทดลอง	46
สรุปและข้อเสนอแนะ	69
สรุป	69
ข้อเสนอแนะ	69
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	70
ภาคผนวก	84
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	91

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงชื่อและน้ำหนักโมเลกุลของสารต้านจุลินทรีย์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียสกุล <i>Bacillus</i>	21
2	แสดงสรุปกระบวนการไอออไนซ์	32
3	การทดสอบความสามารถของ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ B-1 ในการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียทดสอบชนิดต่าง ๆ โดยวิธี direct method	49
4	ค่ากิจกรรมของสารยับยั้งจุลินทรีย์ใน CFNS ของ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ B-1 ในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบชนิดต่าง ๆ	50
5	ผลของเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ต่อกิจกรรมของสารยับยั้งจุลินทรีย์ในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีสถานะเป็นกลางและปลอดเชื้อ (CFNS) ของ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ B-1	51
6	ผลของการให้ความร้อนต่อกิจกรรมของสารยับยั้งจุลินทรีย์ในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีสถานะเป็นกลางและปลอดเชื้อ (CFNS) ของ <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ B-1	53
7	การคงตัวของสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่สร้างจาก <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ B-1 ภายใต้สถานะที่มีค่า pH ต่าง ๆ	55
8	การคงตัวของสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่สร้างจาก <i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ B-1 ภายใต้สถานะของ NaCl ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	56
9	แสดงค่าที่ค้นหาโดย Peptide Mass Fingerprint (PMF) จาก spot ทั้ง 5 จุด	67
ตารางผนวกที่		
1	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (X) กับปริมาณเชื้อแบคทีเรีย <i>Bacillus subtilis</i> สายพันธุ์ B-1	85

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงการจำแนกการวิเคราะห์โดยวิธี chromatography	27
2	แสดงการวัดและคำนวณค่ากิจกรรมของสารต้านจุลินทรีย์ใน CFNS วิธี critical dilution assay	42
3	การเปรียบเทียบลำดับเบสของ 16S rDNA ของ <i>Bacillus</i> สายพันธุ์ B-1 และ <i>B. subtilis</i> WD23	46
4	Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง <i>Bacillus</i> สายพันธุ์ B-1 กับแบคทีเรียสกุล <i>Bacillus</i> สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ได้มีการจัดจำแนกไว้แล้ว	48
5	mass spectrum ของสารต้านจุลินทรีย์ที่ผ่านการดูดซับสารด้วย amberlite ที่ได้จาก <i>B. subtilis</i> B-1 และนำมาแยกโดยใช้เทคนิค chromatography	57
6	mass spectrum ของสารต้านจุลินทรีย์ B1-1 และนำมาแยก refraction โดยใช้เทคนิค chromatography	57
7	mass spectrum จากเครื่อง MALDI-TOF ของสารต้านจุลินทรีย์ที่ได้จาก <i>B. subtilis</i> B-1	58
8	จุดโปรตีน spot 1, spot 2, spot 3, spot 4 และ spot 5 ซึ่งมีค่า pI เท่ากับ 3, 5, 6, 5.5 และ 5 ตามลำดับ ที่ได้จากการแยกด้วยเทคนิค 2D-PAGE ในช่วง pI 3 ถึง 10	62
9	mass spectrum ของแถบโปรตีน spot 1 จาก 2D-PAGE ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยเทคนิค LC-MS/MS	63
10	mass spectrum ของแถบโปรตีน spot 2 จาก 2D-PAGE ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยเทคนิค LC-MS/MS	64
11	mass spectrum ของแถบโปรตีน spot 3 จาก 2D-PAGE ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยเทคนิค LC-MS/MS	64
12	mass spectrum ของแถบโปรตีน spot 4 จาก 2D-PAGE ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยเทคนิค LC-MS/MS	65

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
13	mass spectrum ของแถบโปรตีน spot 5 จาก 2D-PAGE ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยเทคนิค LC-MS/MS	65
ภาพผนวกที่		
1	standard curve ของความสัมพันธ์ระหว่างค่าความดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และปริมาณเชื้อ <i>Bacillus</i> sp.	85

การศึกษาคุณสมบัติของสารต้านจุลินทรีย์จากเชื้อ *Bacillus* สายพันธุ์ B-1 ที่คัดแยกได้จากบ่อเลี้ยงปลา และการทำให้บริสุทธิ์

Characterization and Purification of Antimicrobial Substances from *Bacillus* Strain B-1 from Fish Pond

คำนำ

แบคทีเรียสกุล *Bacillus* พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เจริญได้ในทุกสภาพแวดล้อม และพบว่าแบคทีเรียสกุลนี้ยังสามารถผลิตสารต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์ได้หลายชนิด เช่น เอนไซม์ ได้แก่ α -amylase จาก *B. amyloliquefaciens*, β -glucanase จาก *B. amyloliquefaciens* และ *B. subtilis* เป็นต้น สารกลุ่ม siderophores ได้แก่ bacillibactin และ petrobactin จาก *B. anthracis* กลุ่มสารฆ่าแมลง ได้แก่ δ -endotoxin จาก *B. thuringiensis* กลุ่มกรด อะมิโน ได้แก่ tyrocidine จาก *B. brevis* และกลุ่มสารต้านจุลินทรีย์ ได้แก่ bacitracin, subpeptin และ polymyxin จาก *B. subtilis* ซึ่งมีการนำไปประยุกต์ใช้ทางการแพทย์และอุตสาหกรรมกันอย่างแพร่หลาย (Katz and Demain, 1977; Wu *et al.*, 2005)

ในกลุ่มของสารต้านจุลินทรีย์มีงานวิจัยหลายสาขาสันนิษฐานว่าสารดังกล่าวมีฤทธิ์ในการยับยั้ง ควบคุม หรือฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรค โดยเฉพาะในกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวก จึงเป็นที่น่าสนใจ และมีการศึกษาในด้านคุณสมบัติทั้งทางกายภาพ ชีวภาพ และเคมี เช่น การทนความร้อน การทนกรด-ด่าง ความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค และโครงสร้างของสารกลุ่มดังกล่าว เป็นต้น รวมทั้งมีการนำแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร ยารักษาโรค รวมถึงอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ (Verschuere *et al.*, 2000; Bizani *et al.*, 2005; Gray *et al.*, 2006; Lisboa *et al.*, 2006; Motta *et al.*, 2007) ซึ่งถือเป็นอีกทางเลือกที่จะลดการใช้ยาปฏิชีวนะที่เป็นสาเหตุของปัญหาเรื่องยาตกค้างในผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ และอุตสาหกรรมอื่น ๆ

Bacillus สายพันธุ์ B-1 เป็นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากบ่อเลี้ยงปลา จากการทดสอบเบื้องต้นโดยสุปราณี และคณะ (2550) พบว่าเชื้อนี้มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Streptococcus agalactiae* สายพันธุ์ที่ก่อโรค Streptococcosis ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*) งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาคุณสมบัติของสารต้านจุลินทรีย์จาก *Bacillus* สายพันธุ์ B-1 ทั้งด้านกายภาพ ชีวภาพ และเคมี เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ต่อไป



วัตถุประสงค์

1. เพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ B-1 ที่คัดแยกได้จากบ่อเลี้ยงปลา
2. เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางด้านกายภาพ ชีวภาพ และเคมีของสารต้านจุลินทรีย์ที่สร้างจาก *Bacillus* สายพันธุ์ B-1
3. เพื่อทำสารต้านจุลินทรีย์ให้บริสุทธิ์ และศึกษาลำดับกรดอะมิโนของสารต้านจุลินทรีย์ที่สร้างจาก *Bacillus* สายพันธุ์ B-1

การตรวจเอกสาร

Bacillus sp.

แบคทีเรียสกุล *Bacillus* อยู่ในคลาสที่ 1 ของไฟลัม Firmicutes (Abriouel *et al.*, 2010) วงศ์ Bacillaceae มีลักษณะเป็นแบคทีเรียรูปท่อน แกรมบวก สร้างเอนโดสปอร์ ผลิตเอนไซม์ catalase ได้ และสามารถอยู่ได้ทั้งสภาวะแบบ aerobe หรือ facultative anaerobe แบคทีเรียในสกุลนี้ส่วนมากสามารถผลิตสารต้านจุลินทรีย์รวมถึง peptide, lipopeptide, antibiotics และ bacteriocin ได้ แบคทีเรียในสกุล *Bacillus* เป็นกลุ่มที่มีความหลากหลายทางด้านชีวเคมี สรีรวิทยา รวมถึงมีความต้องการสารอาหารที่หลากหลาย สามารถย่อยสลายสารจากพืช หรือสัตว์ เช่น เซลลูโลส แป้ง เพกติน และอื่น ๆ บางชนิดผลิตสารต้านจุลินทรีย์หรือสารปฏิชีวนะ บางชนิดสามารถเกิดกระบวนการ nitrification, denitrification หรือสามารถตรึงไนโตรเจน แบคทีเรียสกุลนี้มีทั้งชนิดที่เป็น acidophile, alkalophile, psychrophile หรือ thermophile และมี % G+C content ที่กว้าง คือ อยู่ในช่วง 32-69% การจัดหมวดหมู่โดย numerical classification จำแนก *Bacillus* sp. ออกได้เป็น 368 ชนิด (species) ส่วนการจำแนกโดยศึกษาคุณสมบัติทาง genotype และ phenotype สามารถจำแนกออกได้เป็น 79 cluster (อภิญา, 2525; พรทิพภา, 2536) แบคทีเรียสกุล *Bacillus* พบได้ทั่วไปทุกหนทุกแห่งในดิน ดินตะกอน น้ำทะเล และน้ำจืด นอกจากนี้ยังพบได้ในอาหารพวกเครื่องเทศ เม็ดโกโก้ ถั่ว และขนมปัง รวมไปถึงในระบบทางเดินอาหารของแมลง และสัตว์หลายชนิด (Colin, 1989; Nicholson, 2002) โดยธรรมชาติทั่ว ๆ ไป จะพบการกระจายของเชื้ออย่างกว้างขวาง และมักพบในระบบนิเวศแบบ saprophyte ในพื้นดิน และอาจกระจายไปกับฝุ่นละออง น้ำ ติดไปกับพืช หรือสัตว์ แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถรอดชีวิตอยู่ได้ในระหว่างที่มีการกระจายออกไป เนื่องจากสร้างสปอร์ซึ่งมีความทนทานต่อสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ ได้ดี

ยีน ribosomal DNA (rRNA)

ไรโบโซมของสิ่งมีชีวิตกลุ่ม prokaryote มีขนาด 70 S ประกอบด้วยหน่วยย่อยขนาดใหญ่ 50 S ซึ่งประกอบด้วย 23 S (ประมาณ 3,000 nucleotide) และ 5 S (ประมาณ 120 nucleotide) รวมกับโปรตีนอีก 34 หน่วย และหน่วยย่อยขนาดเล็ก 30 S ที่ประกอบด้วย 16 S (ประมาณ 1,500 nucleotide) รวมกับโปรตีนอีก 21 หน่วย (Noller, 1984; Lewin, 2000) ยีนของ ribosomal DNA (rRNA) มีกระจายอยู่หลายชุดบนจีโนมในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด (Woese, 1987) ซึ่งมีความสำคัญในการ

สังเคราะห์โปรตีน โดยมีส่วนที่เป็นบริเวณอนุรักษ์ (conserve) ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงของยีนน้อยมาก และสามารถพบได้ในทุกสิ่งมีชีวิต แม้แต่สิ่งมีชีวิตที่อยู่คนละกลุ่มก็ยังมีส่วนของยีน rDNA ที่เหมือนกัน จึงสามารถนำมาใช้ประเมินความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตได้ (Woese, 1987) ความผันแปรของลำดับ nucleotide ของยีน 16 S rDNA ที่เกิดขึ้นระหว่างแบคทีเรียที่มีความใกล้ชิดกันมาก ก็สามารถนำมาเปรียบเทียบกัน เพื่อจัดจำแนกได้ถึงระดับชนิด และนำมาศึกษาในรูปแบบ phylogenetic tree ได้ จากความเหมือนของลำดับ nucleotide ของยีน rDNA ของสิ่งมีชีวิตสองชนิดจะสะท้อนให้เห็นความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากรูปแบบของ phylogenetic tree ถ้ามีความเหมือนกันมาก (เทพิน, 2546) แสดงว่าเพิ่งเกิดการแยกจากบรรพบุรุษเดียวกันเมื่อไม่นาน แต่ถ้ามีความเหมือนกันน้อยแสดงว่าเกิดการแยกจากบรรพบุรุษร่วมกันมานานแล้ว (Woese, 1987)

ในแบคทีเรียส่วนใหญ่ การเรียงตัวของยีน rDNA จะเป็นชุดในลำดับ 16 S-23 S-5 S เช่นใน *Caulobacter crescentus* (Ohta and Newton, 1981; Feingold *et al.*, 1985), *Rhodobacter capsulatus* (Yu *et al.*, 1982), *E. coli* (Morgan, 1982), *Salmonella typhimurium* (Lehner *et al.*, 1984), *B. subtilis* (Bott *et al.*, 1984), *Mycoplasma capricolum* (Sawada *et al.*, 1984), *Streptomyces coelicolor* A 3 (2) (Baylis and Bibb, 1988), *S. lividans* (Suzuki *et al.*, 1988), *S. griseus* (Kim *et al.*, 1991), *S. rimosus* (Plohl and Gamulin, 1991) และ *S. ambofaciens* (Pernodet *et al.*, 1989) แต่ก็มีข้อยกเว้นในแบคทีเรียบางชนิด เช่น *Thermus thermophilus* มี 16 S และ 23 S อยู่ห่างกันหลายกิโลเบส (Ulbrich *et al.*, 1984) *Vibrio harveyi* มีการเรียงตัวของยีน 16 S rDNA ในลำดับที่แตกต่างออกไป คือ 23 S-16 S-5 S (Lanfrom *et al.*, 1978)

วิธีการศึกษาประสิทธิภาพของสารต้านจุลินทรีย์

การวัดประสิทธิภาพของสารต้านจุลินทรีย์ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสามารถของสารต้านจุลินทรีย์ในการยับยั้งหรือฆ่าเชื้อแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการ โดยแบ่งเป็น 2 แบบ คือ การวัดแบบกึ่งปริมาณวิเคราะห์ และแบบปริมาณวิเคราะห์ ซึ่งเทคนิคที่ใช้ส่วนใหญ่มีการดัดแปลงมาจากการทดลองของ Fleming ปี ค. ศ. 1928 ที่ได้พบการแพร่ของสาร penicillin จาก *Penicillium notatum* ซึ่งเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค โดยในขั้นแรกนำตัวอย่างมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วนตัวอย่าง 10 กรัม ต่อน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร จากนั้นนำไป spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปเพาะเลี้ยงไว้จนเกิด

โคโลนี และนำไป streak ให้ได้โคโลนีเดี่ยว เก็บเป็น stock เพื่อทดสอบต่อไป ซึ่งวิธีการทดสอบหาสารต้านจุลินทรีย์สามารถทำได้หลายวิธีได้แก่

1. วิธีการ swab ทำโดยนำเชื้อแบคทีเรียซึ่งคาดว่าผลิตสารต้านจุลินทรีย์ได้มา swab บนอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นใช้ cork borer เจาะอาหารและย้ายไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบเจริญอยู่ ส่วนใหญ่มักเป็นเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค และมีความต้านทานปานกลางต่อสารต้านจุลินทรีย์ เช่น *Staphylococcus aureus* หรือ *E. coli*

2. วิธีการ bioautograph โดยนำเชื้อที่ศึกษาแล้วว่ามีสารสร้างสารต้านจุลินทรีย์มาเพาะเลี้ยงและสกัดแยกสารต้านจุลินทรีย์ออกจากเชื้อจุลินทรีย์ จากนั้นนำมาหยดให้เป็นจุด บนกระดาษ chromatography และนำไปใส่ในตู้สำหรับ chromatography สารจะมีการแพร่ไปบนกระดาษพร้อมกับสารละลายด้วยอัตราที่ต่างกัน และนำกระดาษ chromatography นี้ไปทำให้แห้ง จากนั้นวางบนอาหารที่มีเชื้อทดสอบเจริญอยู่โดยวางทิ้งไว้ 10-15 นาที แล้วแยกกระดาษออก และนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปเพาะเลี้ยงต่อข้ามคืนซึ่งจะพบบริเวณใสเกิดขึ้นตรงกับตำแหน่งของสารต้านจุลินทรีย์บน chromatogram

3. วิธีการ MIC (minimal inhibition concentration) เพื่อตรวจหาความเข้มข้นน้อยที่สุดที่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ โดยเจือจางสารต้านจุลินทรีย์ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กันในอาหารเหลว และเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบลงไป ในสภาวะที่เหมาะสม การเจริญจะเกิดขึ้นมากในอาหารเหลวที่มีความเข้มข้นของสารต้านจุลินทรีย์ต่ำกว่าระดับที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ ซึ่งจะเห็นว่าขุ่นมาก ส่วนในอาหารเหลวที่มีสารต้านจุลินทรีย์สูงกว่าระดับที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ อาหารจะมีลักษณะใส เนื่องจากไม่มีการเจริญเกิดขึ้น เปรียบเทียบผลที่เกิดขึ้น และความเข้มข้นในระดับต่ำที่สุดที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่เรียกว่า MIC

4. วิธีการ gradient plate อาศัยการแพร่ของสารต้านจุลินทรีย์จากที่มีความเข้มข้นสูงไปสู่บริเวณที่มีความเข้มข้นน้อย ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นมีจุลินทรีย์ที่ไวต่อสารต้านจุลินทรีย์ ก็จะพบบริเวณที่มีการยับยั้ง เมื่อความเข้มข้นมากกว่าระดับ MIC ในจุลินทรีย์แต่ละชนิด ซึ่งความแตกต่างของความเข้มข้นสามารถทำได้โดยเอียงจานอาหารให้เกิดมุมเล็กน้อย และเติมอาหารที่มีสารต้านจุลินทรีย์ผสมอยู่ลงไป รอจนอาหารแข็ง และวางกลับลงมาในแนวราบ จากนั้นเติมอาหารที่ไม่มีสารต้านจุลินทรีย์ลงไปในปริมาณที่เท่ากัน ทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว streak เชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคที่

ต้องการทดสอบ และทราบว่าไวต่อสารต้านจุลินทรีย์ โดย streak จากบริเวณที่มีความเข้มข้นของสารต้านจุลินทรีย์ต่ำไปหาความเข้มข้นสูง นำไปบ่มสังเกตการเจริญเปรียบเทียบกัน

5. วิธีการ diffusion การทดสอบวิธีนี้จะทำให้ทราบว่าสารต้านจุลินทรีย์ไวต่อเชื้อที่ทดสอบหรือไม่ โดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทดสอบ แล้วนำสารต้านจุลินทรีย์ที่ทราบความเข้มข้นหยดลงไป สังเกตและวัด inhibition zone รอบหลุมหรือกระดาศกรอง แล้วนำมาแปลผลว่าเชื้อไวหรือคือสารต้านจุลินทรีย์ (สายสมร, 2524; กมลชัย, 2547)

สารต้านจุลินทรีย์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียสกุล *Bacillus*

สารต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial substances) หมายถึง สารประกอบที่ได้มาจากธรรมชาติ ซึ่งถูกสร้างโดยจุลินทรีย์ และมีผลในการยับยั้งการเจริญ หรือฆ่าสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีความเจือจางสูง ๆ ไม่รวมกรดอินทรีย์ เปอร้ออกไซด์ และแอลกอฮอล์ หรือเป็นสารที่สังเคราะห์ขึ้นมา และมีผลต่อต้าน หรือทำลายเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ โดยสารนั้นจะไม่ทำอันตรายต่อเจ้าบ้าน (สายสมร, 2524; กมลชัย, 2547) สารต้านจุลินทรีย์เป็นสารที่ผลิตในกระบวนการสังเคราะห์ ribosomal ซึ่งสารกลุ่มนี้เป็นพวกแบคเทอริโอซิน (bacteriocin) มีคุณสมบัติเป็น proteinaceous antimicrobial substances มีรายงานครั้งแรกเกี่ยวกับสาร bacteriocin ชื่อ colicin ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *E. coli* (Cascales *et al.*, 2007; Adriouel *et al.*, 2010) และมีการศึกษามากในกลุ่มของแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก (lactic acid bacteria) ซึ่งนิยมใช้เป็น biopreservatives ในกลุ่มโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร แบคทีเรียสามารถผลิตสารต้านจุลินทรีย์ได้ มีประมาณ 360 ชนิด และประมาณ 168 ชนิด ผลิตโดยแบคทีเรียสกุล *Bacillus* (Berdy, 1974) ส่วนใหญ่เป็นสารพวก peptide หรือ polypeptide (Katz and Demain, 1977)

สารต้านจุลินทรีย์แบ่งออกตามแหล่งที่มาได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ได้จากสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติ และกลุ่มที่สังเคราะห์ได้โดยกรรมวิธีทางเคมี โดยกลุ่มที่ได้จากสิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่จะมีแหล่งที่อยู่อาศัยบนบก เช่น จุลินทรีย์ พืชชั้นสูง และสัตว์ Berdy (1989) รายงานว่าสารต้านจุลินทรีย์ที่ได้จากสิ่งมีชีวิตมีอยู่ประมาณ 13,500 ชนิด และประมาณ 90 ชนิด ถูกนำมาใช้ทำเป็นยารักษาโรคในปัจจุบัน ส่วนสารต้านจุลินทรีย์ที่เหลือแม้ว่ายังไม่สามารถนำมาใช้เป็นยาได้ แต่นำมาเป็นโมเลกุลต้นแบบสำหรับสังเคราะห์ยารักษาโรคโดยใช้กระบวนการทางเคมีแทน

การสังเคราะห์สารต้านจุลินทรีย์จากแบคทีเรีย *Bacillus*

สารต้านจุลินทรีย์ที่ผลิตจากแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* โดยส่วนใหญ่เป็นสารพวก polypeptide ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ และกลไกการสังเคราะห์สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ

1. การสังเคราะห์โดยอาศัยไรโบโซม (ribosomal mechanism) เป็นการสังเคราะห์ที่มีรหัสของยีนเป็นตัวควบคุม มีการแปลรหัสโดย mRNA บนไรโบโซม ตัวอย่างเช่น subtilin ผลิตโดย *B. subtilis* ATCC 6633 มีรหัสยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์ peptide 56 residue subtilosin A ผลิตโดยแบคทีเรีย *B. subtilis* 168 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 32 อนุโมล ที่มีโครงสร้างเป็นวง (Kleinkauf and Dohren, 1987)

2. การสังเคราะห์โดยไม่อาศัยไรโบโซม (non ribosomal mechanism) การสังเคราะห์เกิดจากการควบคุมของระบบ multifunctional thiotemplate system โดยอาศัยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์หลายชนิด เรียกว่า multifunctional enzyme complex ตัวอย่างของสารต้านจุลินทรีย์ ได้แก่ gramicidin S synthetase, thioctic acid synthetase, bacitracin synthetase เป็นต้น นอกจากนี้มีการสังเคราะห์สารต้านจุลินทรีย์ที่ไม่ได้เกิดจากการควบคุมของระบบดังกล่าว เช่น mycosubtilin, surfactin และ bacilysin เป็นต้น (Kleinkauf and Dohren, 1987)

การจำแนกสารต้านจุลินทรีย์

สารต้านจุลินทรีย์สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มต่าง ๆ ได้หลายแบบแล้วแต่หลักเกณฑ์ที่ใช้ในการจำแนกมีดังนี้

1. จำแนกตามฤทธิ์ต่อเชื้อจุลินทรีย์ แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มย่อยตามลักษณะการทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ คือ

1.1 สารที่มีผลไปยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย โดยจะมีผลทำให้เชื้อแบคทีเรียไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้

1.2 สารที่มีผลไปทำลายหรือฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรียลดลงอย่างรวดเร็ว

2. จำแนกตามขอบเขตการออกฤทธิ์ของสารต้านจุลินทรีย์ แบ่งได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ

2.1 ออกฤทธิ์วงแคบ ต่อเชื้อแบคทีเรียเพียงไม่กี่ชนิด เฉพาะแกรมบวกหรือแกรมลบ เพียงอย่างเดียวอย่างหนึ่ง

2.2 ออกฤทธิ์ระดับปานกลาง ต่อเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ

2.3 ออกฤทธิ์กว้าง ต่อเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ เชื้อ rickettsiae เชื้อไวรัส ขนาดใหญ่ ตลอดจนถึง protozoa และปรสิตบางชนิด

3. จำแนกตามกลไกการออกฤทธิ์ สารต้านจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีกลไกการออกฤทธิ์ เพื่อที่จะทำให้แบคทีเรียหยุดการเจริญ โดยแบ่งได้เป็น 5 กลุ่ม คือ

3.1 ขยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ ผนังเซลล์ของแบคทีเรียประกอบด้วย peptidoglycan (N-acetyl-glucosamine และ N-acetylmuramine) ซึ่งมี cross link ด้วย 5' glycine อยู่ กรดอะมิโน ทั้ง 4 คือ D/L-alanine, D-glutamine, L-lysine และ glycine ซึ่ง peptidoglycan มีเฉพาะในแบคทีเรีย เท่านั้น และเป็นตำแหน่งที่ไวต่อสารปฏิชีวนะ โดยสารปฏิชีวนะจะไปรบกวนการสังเคราะห์ peptidoglycan และทำลาย cross link ในโครงสร้างส่วนที่มีโมเลกุลใหญ่ ซึ่งจะทำให้การเจริญหยุดลง และฆ่าเชื้อแบคทีเรีย การสังเคราะห์ peptidoglycan มีขั้นตอนดังนี้ขั้นแรก สังเคราะห์สารเริ่มต้น uridine nucleotide 2 ตัว คือ UDP-acetylmuramyl-pentapeptide และ UDP-acetylglucosamine (UDP, uridine diphosphate) ซึ่งเกิดใน cytoplasm โดย nucleotide เองไม่ได้เป็นส่วนของผนังเซลล์ เป็นแต่เพียงนำโครงสร้างหลักของผนังส่วน acetylmuramic acid และ acetylglucosamine มา

ขั้นที่สอง สารตั้งต้นทั้งสองตัวจะเชื่อมเข้าด้วยกันเป็นน้ำตาลเชิงประกอบ ที่มี peptide 5 ตัว ซึ่งจะถูกลำเลียงผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ไปยังผนังเซลล์ ในขณะที่มีการสร้างในรูปที่นำโดย ไขมันโมเลกุล เนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์ประกอบด้วยไขมัน น้ำตาลเชิงประกอบที่มี peptide 5 ตัว แต่ไม่สามารถผ่านได้โดยตรง และขั้นสุดท้าย ปฏิกิริยาจะเกิดในส่วนของผนังเซลล์ เป็นการเกิด cross links ของสาย peptidoglycan ทำให้ได้สาย peptidoglycan ที่สมบูรณ์มีความแข็งแรงสามารถรองรับเยื่อหุ้มเซลล์ได้ การทำงานของสารต้านจุลินทรีย์จะไปยับยั้งขั้นตอนการสร้าง uridinediphospho-N-

acetylmuramate ในการรวมตัวของ UDP-GlcNAc กับ phosphoenol pyruvate ทำให้การสร้าง UDP-MurNAc หยุดชะงัก

3.2 ควบคุมหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งเป็นด่านกั้นอันตรายให้กับส่วน cytoplasm ทำหน้าที่ควบคุมการเข้าและออกของสาร และเป็นตำแหน่งที่มีการสังเคราะห์ทั้งส่วนประกอบของผนังเซลล์ และส่วนที่หุ้มภายนอกอื่น ๆ การที่เยื่อหุ้มเซลล์ทำหน้าที่หลายอย่างจึงเป็นตำแหน่งการทำลายของสารหลายชนิด ซึ่งการรบกวนหรือทำลายเยื่อหุ้มเซลล์จะทำให้จุลินทรีย์ตายในที่สุด

โดยสารต้านจุลินทรีย์จะจับกันอย่างแน่นกับส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ อาจจะเป็นโปรตีน ซึ่งส่วนนี้จะไวต่อสารต้านจุลินทรีย์ แม้ในความเข้มข้นที่ต่ำมากก็จะทำให้เกิดการทำลายหรือถูกทำลาย เนื่องจากความสามารถในการควบคุมการเข้า-ออกของสารระหว่างเซลล์ และสภาวะแวดล้อมเสียไป การจับตัวจะเริ่มพบที่ส่วนประกอบของ cytoplasm ที่มีน้ำหนัโมเลกุลต่ำจะสะสมไอออนของโพแทสเซียมติดกับ gradient ของความเข้มข้น คือ ทำให้ความเข้มข้นภายในเซลล์สูงกว่าสิ่งแวดล้อม แต่ถ้าเยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลายอัตราการรั่วของสารภายในเซลล์จะสัมพันธ์กับขนาดโมเลกุล โดยขนาดเล็กจะออกมาเร็ว และมีการรั่วของสารอื่นออกมาอีก เช่น nucleotide และกรดอะมิโนบางชนิด นอกจากนี้การจับตัวแน่นของสารต้านจุลินทรีย์กับเยื่อหุ้มเซลล์ อาจชักนำให้เกิดการปล่อยเอนไซม์ออกมาย่อยสลายโปรตีน และกรดนิวคลีอิก ซึ่งทำให้เกิดการแตกสลายในที่สุด

3.3 ยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก โดยจะไปยับยั้งการนำ thymine เข้าจับกับ nucleotide ตัวอื่น ๆ ทำให้การสร้าง DNA ไม่สมบูรณ์ นอกจากนี้ยังขัดขวางการทำงานของ RNA polymerase ทำให้ RNA ไม่สามารถไปจับคู่กับ DNA การแย่งจับกับเบสคู่สม (complementary base pair) ส่งผลต่อการสังเคราะห์ nucleotide โดยสร้าง base analogue หรืออนุพันธ์เข้าไปแทรกรวมตัวเข้าไปใน DNA แทนที่ base เดิม ส่งผลให้เอนไซม์ DNA polymerase ที่ต้องใช้ในการ replication ไม่สามารถทำงานได้ นอกจากนี้สารต้านจุลินทรีย์สามารถยึดจับกับ DNA ทั้งสองสายด้วยปฏิกิริยา alkylation ทำให้ DNA ไม่แยกออกจากกัน

4. ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน เซลล์แบคทีเรียจะสร้างโปรตีนต้องอาศัยทั้งเอนไซม์ ribosomal particles, mRNA, tRNA และกรดอะมิโน การสร้างโปรตีนจะแบ่งเป็น 2 ขั้นตอนใหญ่ ๆ คือ

4.1 transcription เป็นขั้นตอนที่เกิดขึ้นในนิวเคลียส โดยมีการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมจาก DNA มาให้ mRNA เพื่อให้มีการสร้างโปรตีน

4.2 translation เป็นขั้นตอนที่เกิดขึ้นในส่วนของ cytoplasm โดยข้อมูลจาก mRNA จะทำหน้าที่ให้มีการสร้างสายกรดอะมิโน เพื่อให้ได้โปรตีนตามต้องการ

การ transcription เป็นการส่งข้อมูลจาก DNA ในนิวเคลียส ผ่านมากับ mRNA เพื่อให้มีการสร้างโปรตีนในส่วนของ cytoplasm โดยที่ mRNA จะเลียนแบบมาจากส่วนหนึ่งของสาย DNA จึงมีลำดับ nucleotide เหมือนกับลำดับ nucleotide ในสาย DNA ส่วนที่คัดลอกมาจะผ่านออกมาอยู่ใน cytoplasm เพื่อให้มีการสร้างโปรตีนในขั้นต่อไป การ translation หรือการสร้างโปรตีน เกิดขึ้นในส่วน ribosome โดยมีผลยับยั้งการสร้างโปรตีน หรือทำให้สร้างโปรตีนผิดไป ซึ่งออกฤทธิ์ต่อการสร้างโปรตีนที่ระดับไรโบโซม

5. รบกวนกระบวนการ เมตาบอลิซึม สารต้านจุลินทรีย์อาจมีโครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึม จึงแย่งจับกับเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องได้ และการยับยั้งลักษณะนี้พบว่าสามารถฟื้นกลับสู่สภาพเดิม เมื่อสารต้านจุลินทรีย์สลายตัว ส่วนใหญ่จะรบกวนกระบวนการเมตาบอลิซึม คือ การสังเคราะห์ tetrahydrofolate ซึ่งเป็นสารจำเป็นของเซลล์ที่ใช้เป็น cofactor ในการสังเคราะห์กรดอะมิโน purine และ pyrimidine (สายสมร, 2524; มาลิน, 2540; กมลชัย, 2547)

Shoji (1978) ได้จำแนกสารต้านจุลินทรีย์ที่ได้จากแบคทีเรียสกุล *Bacillus* สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มได้ดังนี้

1. แบ่งตามโครงสร้างทางเคมีของสารต้านจุลินทรีย์ ได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่

1.1 กลุ่มที่มีโครงสร้างทางเคมีเป็นเส้นตรง (linear peptide) ได้แก่ bacilysin, gramicidins, edeines และสารกลุ่ม tridecaptin เช่น tridecaptin A

1.2 กลุ่มที่มีโครงสร้างทางเคมีเป็นวง (cyclic peptides) ได้แก่ gramicidin S, tyrocidines, bacteriocin, mycobacillin, iturin A, mycosubtilin, bacillomycin L, polymyxins เช่น polymyxin S1, polymyxin F, colistin และ curculin และกลุ่ม octapeptin เช่น EN-49, EN 333-25, Bu-1880,

TM-473, Y-8495 และ AB-1

1.3 กลุ่ม peptide lactone ได้แก่ esperin, surfactin, brevistin, TL-119 และ A-3302-A

2. แบ่งออกตามกลไกการออกฤทธิ์ที่ต่างกัน แม้ว่าจะมีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกัน สามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่

2.1 ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ ได้แก่ พวก cyclic peptides เช่น bacitracin ซึ่งมีผลต่อการสังเคราะห์ peptidoglycan ของ *S. aureus* และพวก linear peptides

2.2 ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน โดยการขัดขวางกระบวนการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก เช่น edeines

2.3 ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง หรือหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ ได้แก่ พวก linear peptides หรือ cyclic peptides เช่น tyrocidine และ gramicidin โดยทำให้ส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ผิดปกติ มีผลทำให้กรดอะมิโน ฟอสเฟตภายในเซลล์แบคทีเรีย และไอออนต่าง ๆ ที่เป็น electrolyte ที่สำคัญในกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ผิดปกติ ส่งผลให้กระบวนการสร้างพลังงานของเซลล์หยุดชะงัก และเซลล์หยุดการเจริญ (Wolin, 1979) กลุ่ม polymyxins ที่มีกรดไขมันเป็นส่วนประกอบ โดยกรดไขมันจะแทรกเข้าไปในเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้การเรียงตัวของส่วนไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ผิดปกติ ทำให้เกิดการรั่วไหลของสารออกนอกเซลล์ เป็นผลให้กระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ผิดปกติ (มาลินี, 2525)

สารต้านจุลินทรีย์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ส่วนมากมีฤทธิ์ต่อแบคทีเรียแกรมบวกเป็นส่วนใหญ่ เช่น gramicidin มีผลต่อเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก, bacitracin มีผลต่อแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างกลม, tyrocidine มีผลทั้งต่อแกรมบวกและแกรมลบ อย่างไรก็ตามสารต้านจุลินทรีย์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสกุล *Bacillus* บางชนิดมีฤทธิ์ต่อต้านแบคทีเรียแกรมลบได้เป็นส่วนใหญ่ โดยไม่มีผลต่อแบคทีเรียแกรมบวกเลย ได้แก่ polymyxin, colistin และ curcubin บางชนิดมีฤทธิ์เป็นสารต้านเชื้อรา โดยมีฤทธิ์ต่อยีสต์และรา ได้แก่ itrin A (Besson *et al.*, 1987) และ mycosubtilin (Mukhopadhyay *et al.*, 1986) เป็นต้น

Bacteriocin ที่ผลิตโดยแบคทีเรียแกรมบวก

แบคทีเรียแกรมบวกหลายสกุลมีความสามารถในการผลิต bacteriocin ได้ ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับสารต้านจุลินทรีย์ที่ผลิตโดยพวก eukaryote โดยส่วนมากจะเป็น cationic, amphiphilic และ membrane permeabilizing มีขนาดประมาณช่วง 2-6 กิโลดาลตัน (Heng *et al.*, 2007) แบคทีเรียสกุล *Bacillus* มีความสามารถในการผลิตสารต้านจุลินทรีย์ได้หลายชนิด โดยหนึ่งในนั้นคือ bacteriocin ซึ่งเป็นสารประกอบโปรตีน มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่มีความไวต่อสารดังกล่าวและไม่เป็นพิษต่อเซลล์ที่ผลิต (De Vuyst and Vandamme, 1994) bacteriocin มีการค้นพบครั้งแรกในกลุ่มของ *E.coli*

Klaenhammer (1993) ได้แบ่งประเภทของ bacteriocin โดยพิจารณาจากโครงสร้างพื้นฐานของโมเลกุล มวลโมเลกุล รวมถึงคุณสมบัติด้านอื่น ๆ เช่น การทนต่อความร้อน ทำให้สามารถจัดแบ่ง bacteriocin ออกได้เป็น 4 กลุ่ม คือ

1. กลุ่มแลนทิไบโอติก (lantibiotic) เป็น bacteriocin มีลักษณะเป็นสาย peptide ขนาดเล็ก ประกอบด้วยจำนวนกรดอะมิโนระหว่าง 19–38 โมเลกุล โดยทั่วไปมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 5,000 ดาลตัน มีชนิดของกรดอะมิโนที่แตกต่างจากกรดอะมิโนทั่วไป เช่น dehydrobutyrine, dehydroalanine มีวงแหวนที่เกิดจากพันธะระหว่างโมเลกุลของสารประกอบซัลเฟอร์ภายในโมเลกุลที่เรียกว่า lanthionine และ β -methyl lanthionine เป็น bacteriocin ที่มีคุณสมบัติในการทนต่อความร้อน ซึ่ง bacteriocin กลุ่มนี้แบ่งได้ออกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มย่อย A peptide มีประจุบวกและมีคุณสมบัติชอบน้ำ (hydrophilic) มีโครงสร้างเกลียว ยึดออกได้ เช่น nisin และกลุ่มย่อย B มีโครงสร้างเป็นก้อนกลม ไม่มีประจุทางไฟฟ้า เช่น mersacidin (Cleveland *et al.*, 2001)

2. กลุ่ม non lantibiotic ที่มีขนาดเล็กและทนความร้อน เป็น bacteriocin กลุ่มที่มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่า 15,000 ดาลตัน และทนความร้อนได้ดีตั้งแต่ 100–121 องศาเซลเซียส สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มย่อย ได้แก่

- 2.1 กลุ่ม bacteriocin ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Listeria sp.* ได้ดี ซึ่งกลุ่มนี้ถูกสร้างขึ้นในลักษณะที่เป็นสาย peptide ดั้งเดิม (precursor peptide) ที่ยังไม่สามารถทำลายเซลล์เป้าหมายได้

แต่จะถูกตัดแปลงโดยการตัดสาย peptide ในตำแหน่งที่มีกรดอะมิโน glycine 2 โมเลกุลติดกัน
ได้เป็นสาย peptide ที่สมบูรณ์และมีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์เป้าหมาย เช่น pediocin PA-1,
sakacin A, leucocin A

2.2 กลุ่ม bacteriocin ที่ประกอบด้วยสาย peptide 2 สายที่แตกต่างกัน (two-peptide bacteriocin) และในการทำลายเซลล์เป้าหมายอย่างมีประสิทธิภาพสูงสุดต้องอาศัยการทำงาน
ร่วมกันของสาย peptide ดังกล่าว เช่น lactococcins G และ F, lactacin F, plantaricin EF และ JK

3. กลุ่ม non lantibiotic ที่มีขนาดใหญ่และไม่ทนความร้อน มีขนาดของโมเลกุลใหญ่กว่า
15,000 ดาลตัน และไม่ทนความร้อน เช่น helveticins J และ V-1829, acidophilucin A, lactacins A
และ B

4. กลุ่มที่รวมตัวเป็นสารประกอบเชิงซ้อนขนาดใหญ่กับสารอื่น ๆ เช่น ไขมัน หรือ
คาร์โบไฮเดรต เช่น lactocin 27

กลไกการออกฤทธิ์ของ bacteriocin

การทำลายเซลล์เป้าหมายของ bacteriocin เกิดจากการที่ bacteriocin แต่ละโมเลกุลมารวม
กันทำให้เกิดเป็นรูหรือช่องว่างบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์เป้าหมาย ซึ่งทำให้เกิดการเสียสมดุลของไอออน
กรดอะมิโน และสารประกอบอินทรีย์ในกลุ่มฟอสเฟตซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญในการสร้าง
พลังงานของเซลล์ ขั้นตอนและกลไกในการทำลายเซลล์เป้าหมายจะแตกต่างกันไปตามชนิดของ
bacteriocin เช่น bacteriocin ในกลุ่ม lantibiotic ที่สร้างจาก *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* พบว่า
เป็นสาย peptide ที่มีประจุสุทธิเป็นบวกจะเข้าจับกับเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมายทำให้เยื่อหุ้มเซลล์
ถูกรบกวน ส่งผลให้เกิดการรั่วขององค์ประกอบภายในเซลล์ที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเซลล์ออก
สู่ภายนอก

ในกรณีที่เปปไทด์ของแบคทีเรียพบว่ายึดหุ้มเซลล์จะถูกทำลายอย่างรวดเร็ว ในระหว่าง
ที่สปอร์เกิดการงอกออกมา ส่วนใน bacteriocin ที่มีขนาดเล็ก และทนความร้อน เช่น pediocin PA-
1, sakacin A พบว่าในขั้นตอนแรกปลายด้าน N-terminal ของโมเลกุล bacteriocin ซึ่งมีประจุบวกจะ

เข้าจับส่วนหัวของฟอสโฟลิปิดที่เชื่อมเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมายซึ่งมีประจุลบ โดยแรงทางไฟฟ้าสถิตย์ (electrostatic binding) หลังจากนั้นปลายด้าน C-terminal ในโมเลกุล bacteriocin ที่มีคุณสมบัติเป็น hydrophobic จะทำปฏิกิริยากับหมู่เอซิลของไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดเป็นรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ส่งผลให้เกิดการสูญเสียสมดุลของไอออนและสารประกอบฟอสเฟตภายในเซลล์ (Ennahar *et al.*, 2000) นอกจากนี้ bacteriocin เช่น ไนซินที่ความเข้มข้นสูง ๆ สามารถยับยั้งการสร้าง peptidoglycan ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญในผนังเซลล์ของ *B. stearothermophilus* และ *E. coli* ได้ (Davidson and Hoover, 1993)

โดย bacteriocin ยับยั้งการเจริญของเซลล์เป้าหมายทั้งแบบฆ่าทำลาย (bactericidal) และแบบที่ทำให้เกิดการหยุดการเจริญของเซลล์ (bacteriostatic) ได้ด้วยดังเช่นที่พบใน leuconocin S และการที่ bacteriocin จะมีผลต่อเซลล์ในลักษณะใดนั้นมักขึ้นอยู่กับความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของ bacteriocin สภาพแวดล้อมรวมถึงชนิดและปริมาณของเซลล์เป้าหมาย (De Vuyst and Vandamme, 1994)

Galvez *et al.* (1993) รายงานการศึกษาเกี่ยวกับสารต้านจุลินทรีย์ amoebicin A 12-A และ A 12-B ที่ผลิตได้จาก *Bacillus licheniformis* A 12 พบว่าสารดังกล่าวมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 770 ดาลตัน สามารถยับยั้งการเจริญของ *Naegleria fowleri*, *Saccharomyces heterogenicus* และ *Cryptococcus neoformans* รวมทั้งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา เช่น *Aspergillus niger* และ *Microsporium canis* เป็นต้น

Zheng and Slavik (1999) รายงานการศึกษาสารต้านจุลินทรีย์ที่ผลิตจาก *B. subtilis* โดยใช้เทคนิค ammonium sulfate precipitation ในการสกัดสารต้านจุลินทรีย์ พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 3,400 ดาลตัน และมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Bacillus cereus* และ *Listeria monocytogenes*

Cherif *et al.* (2001) ได้รายงานการวิเคราะห์สารต้านจุลินทรีย์จาก *Bacillus thuringiensis* BMG 1.7 ซึ่งแยกได้จากดิน เป็นสารกลุ่ม bacteriocin ชื่อ thuricin 7 พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก รวมทั้ง *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *L. monocytogenes* และ *Streptococcus pyogenes* ได้ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 11.6 กิโลดาลตัน และทนความร้อนที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส ได้นาน 30 นาที

Lee *et al.* (2001) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับสารต้านจุลินทรีย์ที่ได้จาก *Bacillus polyfermenticus* SCD พบว่าเป็นกลุ่มของ bacteriocin ที่มีชื่อว่า polyfermenticin SCD มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 14.3 กิโลดาลตัน สารดังกล่าวสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Bacillus subtilis* IFO 12113, *Staphylococcus aureus* KCCM 32359 *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Clostridium perfringens* ATCC 3624, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus cereus* TSA 37, *Bacillus pumilis* HTD-1, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Micrococcus flavus* ATCC 10240 ได้ และทนความร้อนที่อุณหภูมิ 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ได้ อีกทั้งยังทน pH ที่ระหว่าง 2.0-9.0 และทนต่อการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ protease, α -chymotrypsin, β -chymotrypsin, α -amylase, lipase และ trypsin

Pinchuk *et al.* (2001) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับสารต้านจุลินทรีย์จากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* 3 พบว่าสามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที และทนต่อ pH ระหว่าง 3.0-11.0 นอกจากนี้ยังทนต่อการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ pepsin, trypsin, proteinase K, lipase, α -amylase และ lysozyme ได้ และเมื่อทำการวิเคราะห์โครงสร้างพบว่า ประกอบด้วย amicoumacin A, B และ C ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 400 ดาลตัน

Pattnaik *et al.* (2001) ได้รายงานการวิเคราะห์สารต้านจุลินทรีย์จาก *Bacillus licheniformis* 26 L-10/3 RA โดยใช้เทคนิค ammonium sulfate precipitation และ chromatography ในการสกัด พบว่าเป็นสาร lichenin มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 1,400 ดาลตัน ลำดับกรดอะมิโนเป็น ISLEICXIFHDN สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ได้ และทนต่อการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ α -chymotrypsin และ pronase E อีกทั้งสามารถเก็บได้นาน 16 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และสารดังกล่าวมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus bovis* SB3, *Streptococcus bovis* 26 และ *Lactobacillus casei* ED-108 เป็นต้น

Martirani *et al.* (2002) ได้รายงานถึงการศึกษาเกี่ยวกับสารต้านจุลินทรีย์ที่ได้จาก *B. licheniformis* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่เจริญได้ที่อุณหภูมิสูง พบว่าแบคทีเรียดังกล่าวผลิตสารต้านจุลินทรีย์กลุ่ม bacteriocin ชื่อ bacillocin 490 มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 2 กิโลดาลตัน สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ได้นาน 3 ชั่วโมง อีกทั้งยังทน pH ที่ระหว่าง 3.5-11.0 เมื่อเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 12 เดือน และมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Bacillus anthracis*, *Bacillus stearothermophilus* และ *Bacillus smithii*

Stein *et al.* (2002) ได้รายงานการวิเคราะห์สารต้านจุลินทรีย์จาก *Bacillus subtilis* A 1/3 โดยใช้เทคนิค mass spectrometry ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของสาร พบว่าเป็นสาร bacteriocin กลุ่ม lantibiotic ชื่อ ericin S และ ericin A ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 3,442 และ 2,986 ดาลตัน ตามลำดับ สามารถทนความร้อน และทนการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ protease

Cladera-Olivera *et al.* (2004) ทำการศึกษาเกี่ยวกับการวิเคราะห์สารต้านจุลินทรีย์จาก *Bacillus licheniformis* สายพันธุ์ P 40 ที่แยกได้จาก Amazon basin พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *A. hydrophila* (clinical isolate), *Aeromonas* sp. และเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus* spp. สายพันธุ์ก่อโรค ได้ อีกทั้งยังสามารถทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 60, 80 และ 100 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และทนต่อการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ trypsin, papain และ pronase E

Korenblum *et al.* (2004) ได้รายงานการศึกษาเกี่ยวกับสารต้านจุลินทรีย์ที่ได้จาก *Bacillus subtilis* LFE-1, *Bacillus firmus* H₂O-1 และ *Bacillus licheniformis* T 6-5 ซึ่งแยกได้จาก Brazilian oil reservoir พบว่ามีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียในกลุ่ม sulphate reducing ทนต่อการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ pronase E, proteinase K, trypsin, RNase, chitinase, manosidase, α -galactosidase และ β -galactosidase ทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 45, 65 และ 100 องศาเซลเซียส ได้นาน 45 และ 60 นาที และทนต่อ pH ระหว่าง 3.5-9.5

Mendo *et al.* (2004) ทำการศึกษาเกี่ยวกับการวิเคราะห์สารต้านจุลินทรีย์จาก *Bacillus licheniformis* สายพันธุ์ I 89 จากแหล่งธรรมชาติของน้ำพุร้อนที่ประเทศโปรตุเกส พบว่าแบคทีเรียดังกล่าวสามารถผลิตสารต้านจุลินทรีย์ที่สามารถทนอุณหภูมิ 50 และ 100 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมงได้ และมีน้ำหนักโมเลกุล 3,249.7 ดาลตัน ทนการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ proteolytic สามารถอยู่ในสภาพ pH ที่ระหว่าง 3.5-8.0 และมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย เช่น *Bacillus subtilis* ATCC 14593, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 และ *S. aureus* (hospital isolate) เป็นต้น

Risoen *et al.* (2004) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับสารต้านจุลินทรีย์ที่ได้จาก *Bacillus cereus* ATCC 14579 พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 3.4 กิโลดาลตัน สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* และ *Micrococcus luteus* ได้ ทนต่อการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ chymotrypsin, DNase, lysozyme, pronase

E, protease, proteinase K, RNase และ trypsin ทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 25, 50, 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที และทนต่อ pH ระหว่าง 2.0-9.0 ได้

Bizani *et al.* (2005) ได้รายงานการสกัดสารต้านจุลินทรีย์จาก *Bacillus cereus* 8 A ซึ่งแยกได้จากดินของ native woodlands ทางตอนใต้ของประเทศบราซิล ทำการสกัดโดยใช้เทคนิค ammonium sulfate precipitation และ chromatography พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 26 กิโลดาลตัน ชื่อ cerein 8 A สารต้านจุลินทรีย์สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 60 และ 75 นาน 30 นาที อีกทั้งยังยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Bacillus* spp., *Streptococcus* spp. และ *L. monocytogenes* ได้ แต่ไม่ทนต่อการถูกย่อยด้วยเอนไซม์กลุ่ม protease

Kamoun *et al.* (2005) ได้รายงานการศึกษาเกี่ยวกับการสกัดสารต้านจุลินทรีย์จาก *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain BUPM 4 โดยใช้เทคนิค ammonium sulfate precipitation และ chromatography ในการสกัดพบว่าสารอยู่ในกลุ่ม bacteriocin ชื่อ bacthuricin F 4 ซึ่งสามารถทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ได้นาน 30 นาที และยังทนต่อ pH ระหว่าง 2.0-9.0 เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง อีกทั้งยังสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus* และ *Klebsiella pneumonia* เป็นต้น และสารดังกล่าวมีน้ำหนักโมเลกุล 3,160.05 ดาลตัน และลำดับกรดอะมิโนเป็น DWTXWSXL

Wu *et al.* (2005) ได้รายงานการศึกษาเกี่ยวกับสารต้านจุลินทรีย์จาก *B. subtilis* JM 4 ซึ่งแยกได้จากดินทำการจำแนกชนิดโดยวิธีชีวเคมี และ 16 S rDNA ทำการสกัดสารดังกล่าวโดยใช้เทคนิค chromatography พบว่าเป็นสาร subpeptin JM 4-A และ subpeptin JM 4-B มีน้ำหนักโมเลกุล 1,422.71 และ 1,422.65 ดาลตัน ตามลำดับ ซึ่งวิเคราะห์โดย mass spectrometry นอกจากนี้ยังพบว่าสารต้านจุลินทรีย์จาก *B. subtilis* JM 4 สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Bacillus cereus* CGMCC 1.819, *Bacillus megaterium* CGMCC 1.941, *Lactobacillus casei* ATCC 2709, *Micrococcus flavus* NCIB 8166 และ *Streptococcus faecalis* CGMCC 1.130 เป็นต้น และแกรมลบ เช่น *Salmonella* CMCC 50311 และ *Shigella flexneri* CMCC 51285 เป็นต้น อีกทั้งยังทนต่อการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ pronase E, proteinase K, pepsin และ trypsin และสามารถทนอุณหภูมิ 100 และ 120 องศาเซลเซียส ได้นาน 30 นาที อีกทั้งยังทนต่อ pH ที่ระหว่าง 2.0-10.0 ได้

Gray *et al.* (2006) ได้รายงานผลการศึกษาเกี่ยวกับสารต้านจุลินทรีย์ของ *Bacillus thuringiensis* NEB 17 ทำการสกัดโดยใช้เทคนิค chromatography พบว่าเป็นสารกลุ่ม bacteriocin ชื่อว่า thuricin 17 ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของ *B. thuringiensis*, *B. cereus* และ *E. coli* ได้ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 3,162 ดาลตัน ทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที และทนต่อ pH ระหว่าง 1.0-9.25 แต่ไม่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ proteinase K และ protease

Lisboa *et al.* (2006) ได้ทำการทดลองเกี่ยวกับสารต้านจุลินทรีย์ที่ได้จาก *B. amyloliquefaciens* ซึ่งแยกได้จาก Brazilian Atlantic forest และพบว่าสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อโรค เช่น *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *Serratia marcescens* และ *Pasteurella naemolytica* ได้ อีกทั้งยังทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 10, 40, 60 และ 80 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 30, 40, 50 และ 60 นาที สามารถทน pH ระหว่าง 3.0-8.0 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ได้นาน 2 ชั่วโมง และพบว่าสารดังกล่าวมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 5,000 ดาลตัน

Qiu *et al.* (2006) ได้ทำการทดลองเกี่ยวกับสารต้านจุลินทรีย์ที่ได้จาก *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ B-11 พบว่าสามารถทนต่อการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ proteinase K, pepsin และ trypsin และทนความร้อนที่อุณหภูมิ 60, 80, 100 และ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ได้

Motta *et al.* (2007) ได้รายงานการศึกษาสารต้านจุลินทรีย์จาก *Bacillus* sp. P34 ที่แยกได้จาก Amazon basin โดยใช้เทคนิค ammonium sulfate precipitation และ chromatography พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 1,456 ดาลตัน มีฤทธิ์ยับยั้ง *L. monocytogenes* และสามารถทนอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ไม่สามารถทนต่อการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ proteolytic

Kayalvizhi and Gunasekaran (2008) ได้รายงานการศึกษาสารต้านจุลินทรีย์จาก *Bacillus licheniformis* MKU 3 พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 1.5 กิโลดาลตัน มีความสามารถในการทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที และทนต่อ pH ระหว่าง 3.0-10.0 อีกทั้งมีฤทธิ์ยับยั้ง *Bacillus subtilis* B 4219, *Bacillus smithii* NRS 173, *Lactobacillus acidophilus* B 4495 และ *Staphylococcus epidermidis* B 4268

Li *et al.* (2009) ได้ทำการศึกษาสารต้านเชื้อราจากเชื้อ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ B 29 ที่แยกได้จากดิน พบว่ามีน้ำหนัก 42.3 กิโลดาลตัน มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium moniliforme* และ *Sclerotinia sclerotiorum* ได้

Ghanbari *et al.* (2009) ได้รายงานการศึกษาสารกลุ่ม bacteriocin ที่ผลิตโดย *Bacillus cereus* สายพันธุ์ RF 140 ซึ่งแยกได้จาก *Rutilus frisii kutum* พบว่าผลิตสาร bacteriocin ซึ่งยับยั้งแบคทีเรีย *L. monocytogenes*, *C. perfringens*, *Bacillus cereus* ATCC 9634, *B. coagulans* และแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ได้ นอกจากนี้ยังทนต่อสภาวะค่า pH ระหว่าง 4-9

Lee *et al.* (2010) ได้รายงานการคัดแยกเชื้อ *Bacillus subtilis* SC-8 จากอาหารหมักพวกลูกเต้า (soybean paste (cheonggukjang)) พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus* และพบว่าสารดังกล่าวเป็นกลุ่มของ lipopeptide ซึ่งมีความทนต่ออุณหภูมิสูงตั้งแต่ 60 องศาเซลเซียส ขึ้นไปได้

Abdel-Mohsein *et al.* (2011) ได้รายงานการแยกเชื้อ *Bacillus licheniformis* H 1 จาก cow manure compost พบว่าเป็นสารพวก bacteriocin-like substance ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 และทนต่ออุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส ได้นาน 60 นาที และทน pH ระหว่าง 3-9

ข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่าแบคทีเรียสกุล *Bacillus* มีความสามารถในการสร้างสารต้านจุลินทรีย์ได้หลากหลายชนิด ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงชื่อ และน้ำหนักโมเลกุลของสารต้านจุลินทรีย์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียสกุล *Bacillus*

แบคทีเรีย	สารต้านจุลินทรีย์	น้ำหนักโมเลกุล (กิโลดาลตัน)	อ้างอิง
<i>B. licheniformis</i> A12	amoebicin A 12-A และ A 12-B	0.7	Galvez <i>et al.</i> (1993)
<i>B. subtilis</i>	bacteriocin	3.4	Zheng and Slavik (1999)
<i>B. thuringiensis</i> BMG 1.7	thuricin 7	11.6	Cherif <i>et al.</i> (2001)
<i>B. polyfermenticus</i> SCD	polyfermenticin SCD	14.3	Lee <i>et al.</i> (2001)
<i>B. subtilis</i> 3	bacteriocin	4	Pinchuk <i>et al.</i> (2001)
<i>B. licheniformis</i> 26L-10/3RA	lichenin	1.4	Pattnaik <i>et al.</i> (2001)
<i>B. licheniformis</i>	bacillocin 490	2	Martirani <i>et al.</i> (2002)
<i>B. subtilis</i> A 1/3	ericin S, ericin A	3.4, 2.9	Stein <i>et al.</i> (2002)
<i>B. licheniformis</i> สายพันธุ์ P 40	bacteriocin	-	Cladera-Olivera <i>et al.</i> (2004)
<i>B. licheniformis</i> สายพันธุ์ I 89	bacteriocin	3.2	Mendo <i>et al.</i> (2004)
<i>B. cereus</i> ATCC 14579	bacteriocin	3.4	Risoen <i>et al.</i> (2004)
<i>B. cereus</i> 8A	cericin 8A	26	Bizani <i>et al.</i> (2005)
<i>B. licheniformis</i> สายพันธุ์ P 40	bacteriocin	-	Cladera-Olivera <i>et al.</i> (2004)

ตารางที่ 1 (ต่อ)

แบคทีเรีย	สารต้านจุลินทรีย์	น้ำหนักโมเลกุล (กิโลดาลตัน)	อ้างอิง
<i>B. licheniformis</i> สายพันธุ์ I 89	bacteriocin	3.2	Mendo <i>et al.</i> (2004)
<i>B. cereus</i> ATCC 14579	bacteriocin	3.4	Risoen <i>et al.</i> (2004)
<i>B. subtilis</i> JM 4	subpeptin JM4-A	1.4	Wu <i>et al.</i> (2005)
<i>B. thuringiensis</i> NEB17	thuricin 17	-	Gray <i>et al.</i> (2006)
<i>B. amyloliquefaciens</i>	bacteriocin	5	Lisboa <i>et al.</i> (2006)
<i>B. subtilis</i> สายพันธุ์ B-11	bacteriocin	-	Qiu <i>et al.</i> (2006)
<i>Bacillus</i> sp. P34	bacteriocin	1.4	Motta <i>et al.</i> (2007)
<i>B. licheniformis</i> MKU3	bacteriocin	1.5	Kayalvizhi and Gunasekaran (2008)

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR)

การเพิ่มปริมาณยีนในหลอดทดลองโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส หรือเทคนิคพีซีอาร์ เป็นวิธีการที่ได้รับความนิยมนำมาใช้ในงานวิจัยทางด้านพันธุวิศวกรรม ซึ่งจุดเด่นของเทคนิคดังกล่าว สามารถย่นระยะเวลา และลดขั้นตอนการทำงานในส่วนของการเพิ่มปริมาณยีน ซึ่งจากเดิมที่ต้องตัดต่อยีนเข้ากับ plasmid ก่อน แล้วจึงเพิ่มปริมาณ plasmid ในเซลล์ หลังจากนั้นจึงแยกสกัด plasmid ออกจากเซลล์ และแยกยีนออกมาตามลำดับ และเทคนิคนี้สามารถช่วยลดเวลาลง เนื่องจากไม่ต้องทำการโคลนนิ่ง (cloning) และ DNA ที่ได้มีความบริสุทธิ์เพียงพอ สำหรับใช้ในการทำงาน ในปัจจุบันเทคนิคดังกล่าวถูกนำมาใช้ประโยชน์ในงานวิจัยทั้งในรูปแบบพื้นฐาน และการประยุกต์ตามความเหมาะสม (Mullis, 1990)

การเพิ่มปริมาณ DNA ในหลอดทดลองโดยปฏิกิริยาอุทกโซโพลิเมอเรสต้องประกอบด้วย (วิจารณ์, 2535)

1. DNA ต้นแบบ (DNA template) ใช้ได้ทั้ง DNA ที่บริสุทธิ์คุณภาพดี และที่คุณภาพไม่ดี ซึ่งได้มาจากการสกัดโดยตรงจากแหล่งต่าง ๆ เช่น แบคทีเรีย พืช สัตว์ และตัวอย่างเลือดต่าง ๆ
2. oligonucleotide primer ที่นิยมใช้จะมีขนาด 20-24 nucleotide มีองค์ประกอบของเบส G และ C อยู่ระหว่าง 40-60% โดย primer ทั้ง 2 ชนิดที่ใช้ร่วมกันควรมีส่วนประกอบของ G+C เท่ากัน และไม่ควรให้ primer ทั้ง 2 มีลำดับเบสเป็นคู่สมกัน (complementary base pair) เพราะจะจับกันเองได้เป็นผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ
3. เอนไซม์ DNA polymerase ทำหน้าที่ในการเติม deoxyribonucleotide ตรงตำแหน่งปลายด้าน 3' ของ DNA ซึ่งต้องมีคุณสมบัติในการทนอุณหภูมิสูง ซึ่งปัจจุบันใช้ *Taq* DNA polymerase
4. บัฟเฟอร์สำหรับทำปฏิกิริยา เป็นบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase
5. dNTP ประกอบด้วย dATP, dTTP, dCTP และ dGTP ซึ่งเป็นสารที่ DNA polymerase นำมาสร้างเป็น DNA สายใหม่
6. แมกนีเซียมคลอไรด์ เป็นส่วนที่ช่วยเสริมการทำงานของ DNA polymerase และในปฏิกิริยา 1 รอบ จะประกอบด้วยขั้นตอนดังต่อไปนี้

6.1 denaturation step เป็นการทำให้ DNA ต้นแบบที่เป็นสายคู่ (double strand) แยกออกเป็นสายเดี่ยว (single strand) ที่อุณหภูมิ 90-95 องศาเซลเซียส

6.2 annealing step primer ที่สังเคราะห์ขึ้น จะจับกับ DNA ต้นแบบเส้นเดี่ยวทั้งสองเส้น ที่มีลำดับเบสคู่สมกัน โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 40-60 องศาเซลเซียส

6.3 extension step เป็นขั้นตอนการนำ nucleotide ที่เหมาะสมเข้ามาต่อที่ปลาย 3' OH ของ primer โดยการทำงานของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ซึ่งต้องการอุณหภูมิประมาณ 70-73 องศาเซลเซียส

Chromatography

Chromatography เป็นเทคนิคในการแยกองค์ประกอบต่าง ๆ ในของผสมที่อยู่ในสถานะสมดุลระหว่างเฟส 2 เฟสออกจากกัน โดยอาศัยความแตกต่างของการกระจายตัว โดยโมเลกุลของตัวถูกละลายในของผสมผ่านเข้าไปใน column จะถูกพาออกจาก column ด้วยเฟสเคลื่อนที่ ในขณะที่ตัวถูกละลายเคลื่อนที่จะเกิดการกระจายตัว ระหว่างเฟสเคลื่อนที่กับเฟสอยู่กับที่ไปพร้อม ๆ กัน การแยกสารด้วยเทคนิคนี้ขึ้นอยู่กับเวลา ความสามารถในการดูดซับที่แตกต่างกันของตัวละลายบนตัวกลางดูดซับ (เพ็ญแข, 2541; ชุติมา, 2546) ชนิดของเทคนิค chromatography สามารถแบ่งได้หลายวิธี (ภาพที่ 1) ดังนี้

1. แบ่งตามคุณสมบัติทางกายภาพ คือ การแบ่งตามลักษณะรูปแบบของวิธี chromatography

1.1 plane chromatography มีอยู่ 2 ประเภท คือ แยกแบบ partition มีกระดาษเป็น stationary phase แยกสารที่ spot บนกระดาษ ในระบบปิดที่อ้อมตัวด้วย mobile phase และอีกประเภทหนึ่ง คือ แยกแบบ adsorption เช่น thin layer chromatography (TLC) ใช้กระดาษที่เคลือบด้วยตัวดูดซับเป็น stationary phase หลักการอื่น ๆ เช่นเดียวกับ paper chromatography

1.2 column chromatography โดยเฟสของ stationary phase เป็นเฟสที่บรรจุใน column และให้ mobile phase ไหลผ่าน column สารต่าง ๆ จะถูกชะออกจาก column และความเร็วขึ้นกับสมบัติของสารนั้นที่กระทำต่อ stationary phase หรือความสามารถในการละลายของสารใน mobile phase นิยมใช้ column chromatography กับระบบของ GC, GLC, LLC, LSC

2. แบ่งตามเฟสเคลื่อนที่เฟสเคลื่อนที่มี 3 ชนิด คือ แก๊ส ของเหลว และของไหล

2.1 การใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นแก๊ส ทำให้เกิดวิธีวิเคราะห์ที่เรียกว่า gas chromatography (GC) เป็นเทคนิคสำหรับแยกสารตัวอย่างที่เป็นสารผสม โดยเปลี่ยนสารผสมให้เป็นไอที่อุณหภูมิหนึ่ง แล้วให้ไอของสารเหล่านั้นผ่านเข้าไปยัง column ที่บรรจุด้วยเฟสคงที่ (stationary phase) โดยอาศัยการพาไปของเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) หรือ carrier gas องค์ประกอบของสารผสมที่มีความสามารถในการเคลื่อนที่และการกระจายตัวผ่านเฟสคงที่ต่างกันจะแยกออกจากกัน วิธีการวิเคราะห์มี 2 วิธี คือ วิธีที่ใช้ของเหลวเป็นเฟสที่อยู่กับที่เรียกว่า gas-liquid chromatography (GLC) และวิธีที่ใช้ของแข็งเป็นเฟสที่อยู่กับที่เรียกว่า gas-solid chromatography (GSC) (แม้น และอมร, 2539)

2.2 การใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นของเหลว ทำให้เกิดวิธีวิเคราะห์ที่เรียกว่า liquid chromatography (LC) เช่น plane chromatography แต่ถ้าเฟสที่อยู่กับที่เฟสที่เป็นของเหลวจะเรียกว่า liquid-liquid chromatography (LLC) บางชนิดถ้าเฟสที่อยู่กับที่เฟสเป็นของแข็ง เรียกว่า liquid-solid chromatography (LSC) เช่น column chromatography การทำ chromatography แบบนี้รู้จักกันดี และใช้กันมาก สามารถใช้ได้กับเฟสที่อยู่กับที่เฟสเป็นของเหลว ซึ่งเรียกว่า LLC หรือที่เฟสเป็นของแข็ง ซึ่งเรียกว่า LSC

2.3 การใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นของไหลวิกฤตยิ่งยวด ทำให้เกิดวิธีวิเคราะห์ที่เรียกว่า supercritical fluid chromatography (SFC)

3. แบ่งตามกลไกของการแยกที่เกิดขึ้นใน column

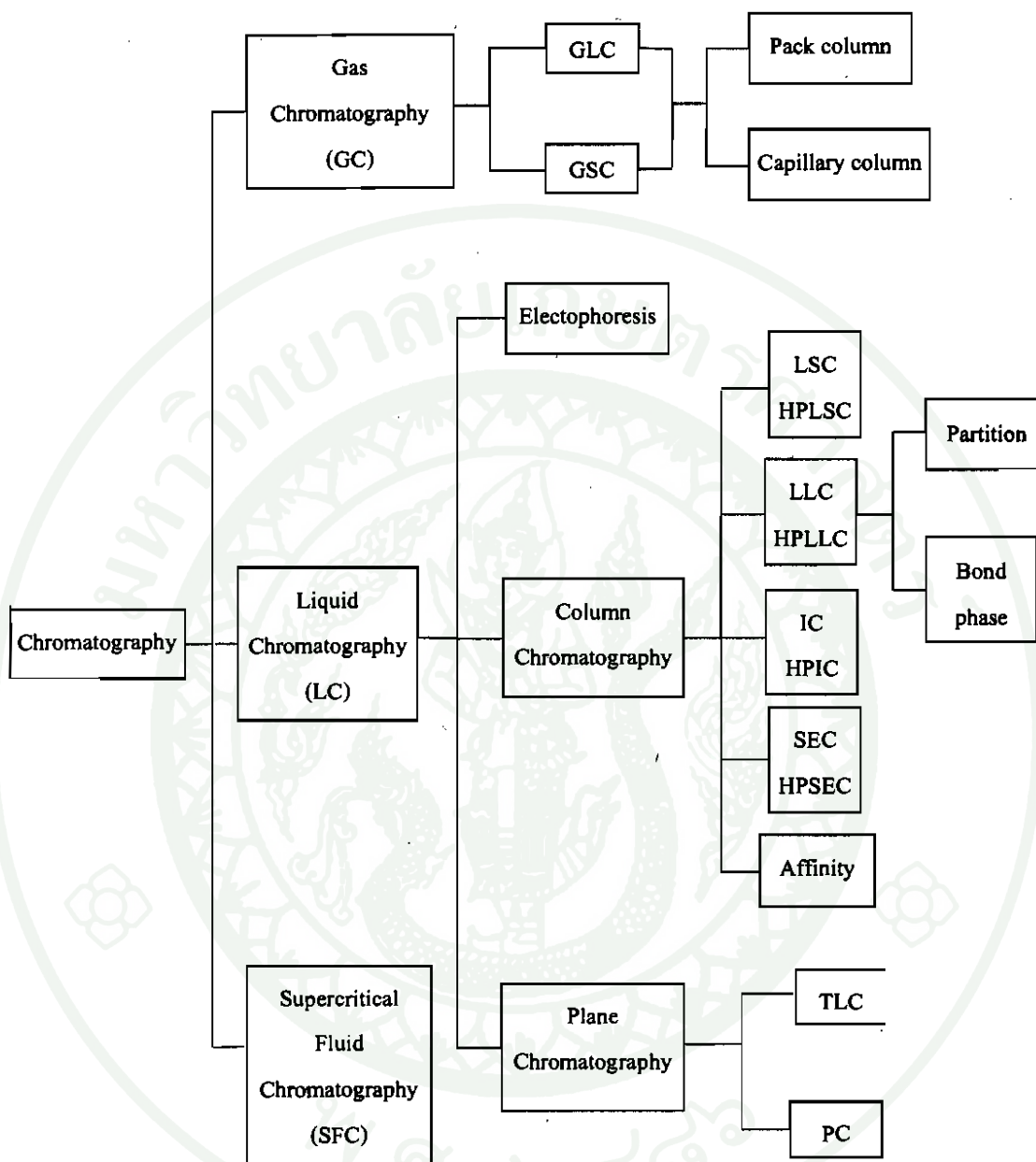
3.1 การดูดซับ (adsorption) แยกสารโดยอาศัย polarity ที่แตกต่างกัน ซึ่ง polarity ของสารจะขึ้นกับหมู่ function group และตำแหน่งที่ปรากฏในโมเลกุล ต้องเป็นสารที่ละลายในสารละลายอินทรีย์ได้ และไม่แตกตัวเป็นไอออน ใช้แยก isomer ได้ดี เช่น thin layer chromatography (TLC) โดยมากนิยมใช้ silica gel หรือ alumina เป็น stationary phase

3.2 การแบ่งส่วน (partition) เป็นการแยกโดยใช้ของเหลวที่เป็น stationary phase เคลือบบนสารที่ inert และ stationary phase และ mobile phase จะต้องไม่ละลายซึ่งกันและกัน ตัวอย่างจะละลายไปในระหว่าง 2 เฟสนี้ จึงเรียก LLC ว่าเป็น partition chromatography แต่ในทางปฏิบัติทั้ง 2 เฟส จะมีการรวมกันอยู่บ้าง ทำให้ stationary phase ลดน้อยลงไป นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของ mobile phase อุณหภูมิ และความดันเพียงเล็กน้อย ก็ทำให้สมดุลเปลี่ยนแปลงไป ไม่สามารถวิเคราะห์แบบ gradient elution ได้ จึงทำให้เกิด bound phase chromatography (BPC) ขึ้น

3.3 การแลกเปลี่ยนไอออน (ion exchange) อาศัยหลักการแยกสารที่แตกเป็นประจุได้ การแยกจะขึ้นอยู่กับ pH และ ionic strength ของ buffer ที่ใช้เป็น mobile phase ส่วน stationary phase ที่ทำหน้าที่เป็นตัวแลกเปลี่ยนประจุ ถ้ามีประจุบวก เรียก anion exchanger และถ้ามีประจุลบ เรียก cation exchanger ประจุเหล่านี้จะถูกทำให้หมดไปหรือหมดลง โดยการใช้ counter ion ที่มีประจุตรงข้าม เมื่อสารที่ต้องการวิเคราะห์มีประจุเหมือนกับ counter ion จะเกิดการแลกเปลี่ยนกับ counter ion สารที่มีประจุสูงกว่า counter ion จะติดค้างอยู่ใน column แต่สารที่ประจุน้อยกว่าจะถูกไล่ออกจาก column

3.4 การร่อนขนาด (size exclusion) เป็นการแยกสารโดยอาศัยความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุล และรูปร่าง สามารถใช้แยกโมเลกุลขนาดเล็ก (<2,000) ได้ ถ้าขนาดโมเลกุลของสารมีความแตกต่างกันประมาณ 10% และใช้ตรวจสอบสารน้ำหนักโมเลกุลสูง ๆ (>2,000) ที่อยู่ในสารตัวอย่างได้ง่าย

3.5 การเกิดสัมพรรคภาพ (affinity) เทคนิคการแยกสารโดยอาศัยความสัมพรรคภาพหรือความชอบกัน (affinity) ระหว่างสารตัวอย่างกับลิแกนด์ (ligand) ที่เชื่อมอยู่กับ stationary phase การเชื่อม ligand กับ stationary phase มักจะใช้แขน (spacer) ยื่นออกมาเล็กน้อยเพื่อให้สารตัวอย่างเข้ามาโอบล้อมจับ ligand ได้สะดวกขึ้น affinity chromatography เป็นเทคนิคการแยกสารที่ให้ selectivity สูงมากเพราะมีการใช้ affinity ligand ที่จำเพาะเจาะจงกับ solute ที่สนใจ โดยอาศัยความสัมพันธ์ระหว่าง affinity ligand กับ solute ที่สนใจและ solute ตัวอื่นจะแยกออกมาก่อนเหลือแต่ตัวที่ถูกยึดไว้จะถูกชะออกมาได้ โดยการเปลี่ยน condition เช่น ความเป็นกรด-ด่างหรือการเติมตัวแย่งจับ inhibitors (สุนันท์, 2534; รัชนี้, 2550)



ภาพที่ 1 แสดงการจำแนกการวิเคราะห์โดยวิธี chromatography

ที่มา: ชูติมา (2546)

ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง (Isoelectric focusing)

Isoelectric focusing เป็นเทคนิคที่ใช้แยกโมเลกุล เช่น โปรตีน และ peptide โดยอาศัยความแตกต่างของ isoelectric point หรือค่า pI เทคนิคนี้มีประสิทธิภาพในการแยกสารสูงสามารถแยกโมเลกุลใหญ่ที่มีค่า pI ต่างกันประมาณ 0.01-0.02 หน่วย pH เมื่อให้สนามไฟฟ้ากับตัวกลางจำแนกพวกเจล ampholyte ซึ่งเตรียมมาจากสารผสมของสารที่เป็นทั้งกรดและด่าง โมเลกุลเล็ก ๆ จะทำหน้าที่สร้างเกรเดียนต์ของ pH แบบ linear เมื่อสารตัวอย่างที่มีประจุหรือสารที่เป็นทั้งกรดและด่างเคลื่อนที่ผ่านเกรเดียนต์ของ pH จะสูญเสียประจุไปจนกระทั่งถึง pH ของเกรเดียนต์ที่มีค่าเท่ากับ pI ของมัน และจะสูญเสียประจุอย่างสมบูรณ์หรือมีประจุสุทธิเป็นศูนย์ ที่จุดนี้สารจะหยุดเคลื่อนที่และจะถูกสะสมหรือทำให้เข้มข้นเป็นแถบแคบ ๆ

ข้อดีของเทคนิคไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง

1. ใช้สารเคมีไม่มากนัก เสร็จสมบูรณ์ภายใน 2-3 ชั่วโมง
2. ให้ผลการแยกโปรตีนที่ดีมาก สามารถแยกโปรตีนที่มีค่า pI ต่างกันเพียง 0.02 หน่วย pH เท่านั้นและได้แถบของโปรตีนคมชัด
3. สามารถหาค่า pI ของโปรตีนได้โดยการวัด pH ในเกรเดียนต์ตรงตำแหน่งของแถบโปรตีนที่ปรากฏ
4. เนื่องจากโปรตีนเคลื่อนที่จากจุดต่าง ๆ ในเกรเดียนต์ไปสู่ตำแหน่ง pI ของมัน ทำให้ตำแหน่งที่หยุดสารตัวอย่างไม่สำคัญและสามารถใช้สารตัวอย่างที่เจือจาง
5. การเคลื่อนที่ของโมเลกุลจะหยุดที่ $pH = pI$ ของแต่ละโมเลกุล จึงทำให้เทคนิคนี้ไม่ขึ้นกับเวลาและความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ (อาภัสสรา, 2537)

Electrophoresis 2 มิติ

การทำ electrophoresis 1 มิติ ไม่ว่าจะเป็นการแยกสาร โดยอาศัยความแตกต่างของมวลโมเลกุล ประจุสุทธิ หรือค่า pI จะเกิดปัญหาในการวิเคราะห์ผลจากแถบของโปรตีนขึ้นได้ เนื่องจากโปรตีนชนิดต่างกัน แต่มีการเคลื่อนที่เท่ากัน จึงมีการปรับปรุงการทำ electrophoresis เป็น 2 มิติ โปรตีนทุกชนิดเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าด้วยความเร็วขึ้นกับขนาด โครงรูป และประจุไฟฟ้า โปรตีนสามารถถูกทำให้เปลี่ยนแปลงได้ เมื่อมีสารที่มาทำลายสภาพธรรมชาติ ซึ่งทำปฏิกิริยากับโปรตีน

วิธี 2 มิตินี้ได้ถูกทำขึ้นเพื่อแยกโปรตีนผสมแต่ละชนิดออกจากกันโดยอาศัยความแตกต่างของประจุสุทธิ หรือความแตกต่างของค่า pI นั่นคือทำ isoelectric focusing (IEF) แล้วจึงทำมิติที่ 2 คือ SDS-PAGE โดยอาศัยความแตกต่างของมวลโมเลกุลของ polypeptide (อาภัสสร, 2537)

Mass spectrometry

Mass spectrometry เป็นเทคนิคที่ใช้สำหรับการศึกษเกี่ยวกับโครงสร้างและมวลของสาร โดยอาศัยหลักการทำให้โมเลกุลแตกตัวเป็นไอออนด้วยการให้โมเลกุลรับพลังงานที่มากพอจนทำให้โมเลกุลนั้นเกิดการแตกตัวเป็นไอออน ถ้าหากสารมีสถานะเป็นของแข็งหรือของเหลวต้องให้พลังงานแก่สาร เพื่อให้สารเปลี่ยนสถานะจากของแข็งหรือของเหลวไปเป็นแก๊ส แล้วจึงยิงลำอิเล็กตรอนที่มีพลังงานสูงไปยังสาร เพื่อทำให้อิเล็กตรอนหลุดออกจากโมเลกุลของสาร เกิดเป็นอนุภาคมูลย่อย ๆ เมื่อไอออนบวกมีมวลต่างกัน ผ่านเข้าไปในสนามแม่เหล็กที่มีความเข้มข้นสูง จะเกิดการเบี่ยงเบนได้น้อยกว่าไอออนที่มีค่ามวลต่อประจุ (m/z) หรือ m/e ของไอออนที่เกิดจากการแตกหักของโครงสร้างของสารน้อย ไอออนบวกเหล่านี้เมื่อผ่านเครื่องตรวจหาไอออน จะถูกบันทึกเป็นอัตราส่วนของมวลต่อประจุ (m/z) ส่วนประกอบของเครื่อง mass spectrometer ประกอบด้วย 4 ส่วนคือ ส่วนแรกระบบการใส่ตัวอย่างเพื่อทำให้กลายเป็นไอ ส่วนที่ 2 แหล่งทำให้เกิดเป็นไอออน ส่วนที่ 3 วิธีการแยกไอออน และส่วนสุดท้าย ระบบการตรวจไอออน

โดยส่วนที่สำคัญเป็นหัวใจหลักของเครื่อง mass spectrometer อยู่ที่แหล่งผลิตไอออน ซึ่งทำให้หา mass spectrum ได้อย่างรวดเร็ว วิธีการที่ทำให้สารเกิดเป็นไอออนเชชันได้มีดังนี้

1.1 อิเล็กตรอนไอออไนเซชัน (electron-ionization, EI) วิธีนี้เป็นที่นิยมกันมาก โดยทำให้โมเลกุลของสารเปลี่ยนเป็นไอออนบวกด้วยการชนกับอิเล็กตรอนที่มีพลังงานสูง โดยใช้ปืนอิเล็กตรอน ผลิตลำอิเล็กตรอนจากธาตุ rhenium หรือ tungsten ซึ่งทำให้เป็น filament บาง ๆ และร้อนแดง อิเล็กตรอนจะถูกเร่งและโฟกัสด้วยการทำให้ filament นั้นมีศักย์ไฟฟ้าเป็นลบ 70 V แต่เนื่องจากโมเลกุลทั่วไปมีพันธะ covalent จะต้องใช้พลังงานศักย์ที่ทำให้เกิดเป็นไอออนประมาณ 10 eV ดังนั้นอิเล็กตรอนที่มีพลังงาน 70 eV จะทำให้อิเล็กตรอนหลุดออกไปจาก orbital เกิดเป็นไอออนย่อย ๆ ที่มีพลังงานภายในต่าง ๆ กัน ซึ่งขึ้นอยู่กับพลังงานที่ได้รับจากลำอิเล็กตรอน เมื่อแหล่งผลิตไอออนทำงานอย่างสม่ำเสมอจะทำให้ได้ไอออนบวกออกมาอย่างสม่ำเสมอ แต่เทคนิคนี้จะมีปัญหาเกี่ยวกับการวัดมวลโมเลกุลของสารบางชนิด มีความยากต่อการแยกสูตรโครงสร้างของ

สารที่มีไอโซเมอร์ และสารบางชนิดอาจเกิดการสลายตัวก่อนที่จะเกิดไอออนในเซชัน เนื่องจากการใช้อุณหภูมิสูงในการให้เกิดไอออนในเซชัน นอกจากนี้ภายใต้สภาวะของ EI โมเลกุลหลายชนิดไม่มีไอออนโมเลกุลที่เสถียรหรือความอุดมสมบูรณ์ของไอออนโมเลกุลอาจจะมีน้อย รวมทั้งได้ mass spectrum ที่ซับซ้อนยากต่อการแปล

1.2 เคมีคัลไอออนในเซชัน (chemical ionization, CI) โดยการผสมตัวอย่างเข้ากับแก๊ส (มีเทน ไอโซบิวเทน และแอมโมเนีย) ที่จะทำปฏิกิริยาแล้วผ่านของผสมนี้เข้าไปในห้องที่ทำให้เกิดไอออน ด้วยการให้ชนกับลำอิเล็กตรอน ข้อดีของวิธีการนี้ คือ ทำให้ได้ไอออนย่อยที่เสถียร ทำให้รูปแบบการแตกตัวง่ายขึ้น mass spectrum ที่ได้ไม่ซับซ้อน

1.3 field ionization (FI) หลักการ คือ การดึงอิเล็กตรอนจากสารตัวอย่างในสภาวะที่เป็นไอ โดยการผ่านไอของสารตัวอย่างเข้าไปในสนามไฟฟ้าที่มีศักย์ 10^8 V/cm ที่เกิดจากการป้อนศักย์ไฟฟ้ากำลังสูงเข้าไป 10-20 kV ไอของสารตัวอย่างอยู่ใกล้กับแอโนด และอิเล็กตรอนจากไอของสารตัวอย่างจะถูกดึงเข้าไปใน orbital ที่ว่าง จะได้ไอออนโมเลกุลแล้วถูกผลักดันไปยังแคโทด ซึ่ง mass spectrum ที่ได้จะไม่ซับซ้อน ได้ปริมาณไอออนโมเลกุลมาก แต่ความไวและกำลังแยกต่ำ

1.4 field desorption (FD) จะมีหลักการพื้นฐานเหมือนวิธี FI แต่ต้องให้อุณหภูมิที่ emitter สูงกว่าที่แคโทด วิธี FD จะให้ไอออนโมเลกุล แต่จะไม่เห็นพีคส่วนย่อยที่เกิดจากการแตกหักของไอออนโมเลกุล ข้อดีของวิธีการนี้ คือ ได้ไอออนจำนวนมาก และ mass spectrum ไม่ซับซ้อน แต่มีข้อเสีย คือ สภาพไว และ resolution ต่ำ เทคนิคนี้เหมาะสำหรับสารซึ่งไม่ระเหย และไม่เสถียร เช่น คาร์โบไฮเดรต

1.5 fast atom bombardment (FAB) หลักการ คือ การระดมยิงสารตัวอย่างที่เป็นของแข็งซึ่งละลายในเมทริกซ์ (เช่น กลีเซอรอลหรือ diethanolamine) ด้วยอะตอมที่มีพลังงานสูงหรือความเร็วสูงแล้วทำให้สารตัวอย่างถูกไอออไนซ์ วิธีการนี้เหมาะสมกับสารตัวอย่างประเภทเกลือหรือสารตัวอย่างที่มีประจุหรือตัวอย่างที่มีมวลโมเลกุลสูง

1.6 spark source ionization (SSI) วิธีนี้จะใช้กับสารอินทรีย์ที่ไม่ระเหยกลายเป็นไอ เช่น โลหะ แร่ หรือ เกลือ โดยผสมผงตัวอย่างกับแกรไฟต์ใส่ในหลอดที่ทำหน้าที่เป็นแอโนด ส่วนแคโทดเป็นหลอดเปล่า จากนั้นผ่านกระแสไฟฟ้าให้กับขั้วไฟฟ้า ซึ่งจะทำให้อะตอมของโลหะ

กลายเป็นไอออน mass spectrum ที่ได้ประกอบด้วย peak ของธาตุหลัก ซึ่งวิธีการนี้เหมาะสำหรับวิเคราะห์ธาตุปริมาณน้อย มีความไวสูง สามารถตรวจหลายธาตุในขณะเดียวกัน

1.7 secondary ion mass spectrometry (SIMS) โดยการระดมยิงผิวของสารตัวอย่างด้วยไอออนที่มีพลังงานสูง จะทำให้มีการหลุดของอนุภาคที่เป็นกลาง หรือเป็นไอออนลบหรือบวก ออกจากผิวหน้าของสารตัวอย่าง อนุภาคที่หลุดออกมาอาจเป็นอะตอมหรือกลุ่มย่อยของส่วนโมเลกุล วิธี SIMS จะนำเฉพาะไอออนบวกเข้าสู่ส่วนแยกมวลของไอออน

1.8 matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) เป็นวิธีการใหม่ในการทำไอออนไนซ์ โดยให้ข้อมูลด้านมวลโมเลกุลของสาร biopolymer ชนิดมีขั้วได้อย่างถูกต้อง (มวลโมเลกุลตั้งแต่หลักพันถึงหลักแสนดาลตัน) หลักการ คือ ละลายสารตัวอย่างในแอลกอฮอล์ที่ผสมกับวัสดุเมทริกซ์ในปริมาณที่มากเกินไปที่สามารถดูดกลืนคลื่นแสงได้ดีมาก แล้วนำสารตัวอย่างเข้าห้องไอออนไนซ์ และยิงด้วยลำแสงของเลเซอร์ เพื่อให้สารเกิดการระเหิดได้ไอออน แล้วเข้าสู่ส่วนแยกมวลของไอออน

1.9 electrospray ionization (ESI) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์สารชีวโมเลกุล เช่น polymer โปรตีน และ oligonucleotide ซึ่งมีมวลโมเลกุล 100,000 ดาลตัน หรือมากกว่า หลักการ คือ อัดสารตัวอย่างเข้าไปในหลอดรูเล็กที่ทำจากเหล็กกล้าไร้สนิม แล้วฉีดเข้าไปในสนามไฟฟ้า สารละลายจะถูกเปลี่ยนเป็นหยดของเหลวที่มีขนาดเล็ก แล้วถูกระเหยเอาตัวทำละลายออก จะมีขนาดเล็กลงมีความหนาแน่นของประจุที่ผิวของหยดของเหลวเพิ่มขึ้น และมีการผลัดประจุ หยดของเหลวจึงแตกออกได้ไอออน โมเลกุลที่มีประจุและให้ peak แยกกันน้อย

1.10 plasma desorption (PD) หลักการคือ ติดตั้ง Cf-252 อยู่ระหว่างสารตัวอย่าง และ fission fragment detector เมื่อเกิดปฏิกิริยา fission จะได้ส่วนย่อย 2 ส่วน โดยส่วนหนึ่งวิ่งไปชนสารตัวอย่าง อีกส่วนวิ่งไปที่ตัววัดสัญญาณ และเกิดการผลัดไอออน และโฟตอน ออกจากสารตัวอย่าง และตรวจวัดโดยให้ข้อมูลเป็นพล็อตเล็กทรอนิกส์เทียบกับเวลาที่ไอออนมากระทบตัววัดสัญญาณ

จากข้อมูลข้างต้นกระบวนการไอออนไนซ์สามารถสรุปได้ดังในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงสรุปกระบวนการไอออนไนซ์

Ionization method	Type	Sample	Mass	Method
	Analytical	Introduction	Range	Highlights
Electron Impact (EI)	Relatively small volatile	GC or liquid/solid probe	to 1,000 Da	Hard method versatile provides structure info
Chemical Ionization (CI)	Relatively small volatile	GC or liquid/solid probe	to 1,000 Da	Soft method molecular ion peak
Electrospray (ESI)	Peptides Proteins Nonvolatile	Liquid Chromatography or syringe	to 200 kDa	Soft method ion often multiply charged
Fast Atom Bombardment (FAB)	Carbohydrates Organometallics Peptides Nonvolatile	Sample mixed in viscous matrix	to 6,000 Da	Soft method but harder than ESI or MALDI
Matrix Assisted Laser Desorption (MALDI)	Peptides Proteins Nucleotide	Sample mixed in solid matrix mass	to 500 kDa	Soft method very high

ที่มา: นิพนธ์ และ คณิดา (2550)

อีกส่วนที่สำคัญคือ ส่วนแยกมวลของไอออน (mass analyzer) โดยอาศัยอัตราส่วนของมวลต่อประจุ จากการใช้สนามแม่เหล็กหรือสนามไฟฟ้า ส่วนวิเคราะห์แยกมวลมีหลายชนิดได้แก่

1.1 magnetic analyzer คือ เมื่อไอออนซึ่งมีมวล m และมีประจุ z เคลื่อนที่ออกจากแหล่งกำเนิดไอออนผ่าน ion source slit จะเคลื่อนที่เป็นแนวตรง และเข้าไปในส่วนบริเวณโค้งที่ขนานด้วยขั้วแม่เหล็กที่ให้สนามแม่เหล็กออกมา เพื่อทำหน้าที่กระจายไอออนที่มี m/z ต่างกันให้วิ่งเป็นแนวโค้งที่มีรัศมีต่างกัน โดยไอออนที่มีมวลมากจะเบี่ยงเบนน้อย และไอออนที่มีมวลน้อยจะ

เบี่ยงเบนมาก ซึ่งไอออนจะถูกโฟกัสตกลงที่จุดเดียวกันและจะตรงผ่าน collector slit เข้าสู่ตัวตรวจวัดสัญญาณและค่าที่ออกมาเป็น mass spectrum ที่ port ระหว่างอัตราส่วน m/z และความอุดมของไอออน

1.2 electrostatic analyzer ไอออนเคลื่อนที่ออกจากแหล่งกำเนิดด้วยพลังงานจลน์ที่ต่างกัน และเมื่อผ่านเข้าไปในบริเวณส่วนโค้งที่ประกอบด้วยแผ่นโค้งที่ขนานกันสองแผ่น ซึ่งมีความต่างศักย์ โดยแผ่นโค้งแผ่นหนึ่งทำหน้าที่เป็นขั้วบวก อีกแผ่นทำหน้าที่เป็นขั้วลบ ไอออนที่มีพลังงานจลน์สูงจะเบี่ยงเบนเพียงเล็กน้อยจนชนกับขั้วบวกและจะวิ่งช้าลง ส่วนไอออนที่มีพลังงานจลน์ต่ำจะเบี่ยงเบนชนกับขั้วลบและวิ่งช้าลง รัศมีความโค้งของไอออนจะขึ้นอยู่กับความต่างศักย์แรงไอออนและความต่างศักย์ของสนามไฟฟ้าโดยไม่ขึ้นอยู่กับอัตราส่วน m/z

1.3 double-focusing (sector) analyzer ประกอบด้วย electrostatic analyzer และ magnetic analyzer ซึ่งจะมีการโฟกัสไอออน 2 ครั้ง โดยที่ electrostatic analyzer จะทำหน้าที่โฟกัสด้านเร็ว ส่วน magnetic analyzer จะทำหน้าที่โฟกัสด้านทิศทาง ไอออนที่ถูกเร่งด้วยศักย์และผ่านสนามไฟฟ้าที่มีศักย์ไฟฟ้าจะมีรัศมีความโค้งเดียวกัน และวิ่งไปในแนวเดียวกันโดยไม่ขึ้นอยู่กับ m/z ของไอออน เมื่อสนามไฟฟ้า E คงที่ไอออนจะถูกโฟกัสให้เคลื่อนที่ไปตามค่าพลังงานจลน์ และจะวิ่งเข้าไปในสนามแม่เหล็ก เพื่อแยกมวลที่ต่างกัน ซึ่งขึ้นกับการจัดเรียงตัวของ analyzer

1.4 time-of-flight (TOF) เป็นการแยกมวลโดยการวัดเวลาที่ไอออนเคลื่อนที่จากแหล่งกำเนิดไอออนไปยังตัววัดสัญญาณ โดยไอออนต่าง ๆ จะเคลื่อนที่เป็นแนวเส้นตรงด้วยความเร็วคงที่ตามลำดับของมวลที่เพิ่มขึ้นจนมาถึงตัววัดสัญญาณ เพราะว่าไอออนต่าง ๆ มีพลังงานจลน์เท่ากัน ดังนั้นความเร็วจึงขึ้นอยู่กับมวล ไอออนที่มีมวลต่ำจะมาถึงที่ตัววัดสัญญาณก่อน ไอออนที่มีมวลสูงกว่าและเกิดการแยกมวลตาม m/z

1.5 quadrupole mass analyzer โดยการให้ความต่างศักย์ทั้งแบบกระแสดตรงและกระแสสลับพร้อม ๆ กันไปยังแท่งโลหะกลมทั้งสี่แท่งที่ประกอบอยู่ ทำให้เกิดสนามไฟฟ้าแม่เหล็กที่ไปทำให้ไอออนเกิดการสั่น ทำให้ลำไอออนผ่านศูนย์กลางของแท่งโลหะออกสู่ตัววัดสัญญาณ ไอออนที่เหมาะสมจะมีการสั่นพอดีกับสนามแม่เหล็ก และผ่านเข้าสู่ตัววัดสัญญาณ ส่วนไอออนที่มีการสั่นไม่ตรงกับสนามไฟฟ้าแม่เหล็กที่จะถูกกรองออก

1.6 ion trap analyzer เป็นการแยกมวลของไอออนอีกแบบหนึ่งของ quadrupole ไอออนจากแหล่งกำเนิดไอออนเข้าไปในตัวไอออนกักเก็บ ซึ่งเก็บไว้ในสนาม quadrupole ซึ่งเกิดจากการให้ความต่างศักย์จากความถี่คลื่นวิทยุ แนววิถีของไอออนจะขึ้นอยู่กับค่าศักย์ไฟฟ้าและค่า m/z ของไอออน เมื่อเพิ่มค่าความต่างศักย์อย่างรวดเร็วจะทำให้ไอออนที่ถูกกักเก็บไม่เสถียรจึงออกจากสนามอย่างรวดเร็ว

1.7 fourier transform ion cyclotron resonance (FT-ICR) โดยอาศัยการกระตุ้นจากพัลส์ของความถี่วิทยุ ให้ไอออนเข้าไปอยู่ในสนามแม่เหล็ก ไอออนที่ถูกกระตุ้นจะเคลื่อนที่เป็นแนววงกลม และพัลส์ของความถี่วิทยุหนึ่ง จะกระตุ้น ไอออนที่มีค่าเฉพาะ m/z หนึ่งค่าด้วย (แมน, 2539; นิพนธ์ และคณิตา, 2547; สมเดช, 2547; เย็นหทัย, 2549)

ลำดับของกรดอะมิโนใน polypeptide และโปรตีน

Polymer ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 2, 3 หรือมากกว่า 10 หน่วยขึ้นไป ซึ่งจะเรียกว่า dipeptide, tripeptide, oligomer หรือ polypeptide ส่วนโปรตีนจะประกอบไปด้วย polypeptide 1 โมเลกุล หรือมากกว่านั้น polypeptide เป็น polymer เส้นตรง โดยที่ปลายข้างหนึ่งเป็น amino acid residue ที่มีหมู่ $-NH_2$ เหลืออยู่ ส่วนปลายอีกด้านจะมี amino acid residue ที่มีหมู่ $-CO_2$ เหลืออยู่ ทั้งสองหมู่นี้จะเรียกว่า N-terminal และ C-terminal ตามลำดับ การหาลำดับกรดอะมิโนใน polypeptide และโปรตีน จำเป็นจะต้องหาน้ำหนักของโมเลกุลด้วย ซึ่งมีหลายวิธี เช่น วิธีทางเคมี light scattering, X-ray diffraction, ultracentrifugation, osmotic pressure เป็นต้น เมื่อทราบน้ำหนักแล้ว จึงทำการหาลำดับกรดอะมิโนที่มีอยู่ใน polypeptide หรือโปรตีนนั้น ๆ โดยจะตรวจสอบโครงสร้าง covalent structure หรือ primary structure (พันธะ amide) ถ้าเป็น tripeptide ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนต่างกัน 3 ชนิด จะมีลำดับกรดอะมิโนที่เป็นไปได้ 6 แบบ แต่ถ้าเป็น tetrapeptide จะมีถึง 24 แบบ

การหาลำดับของกรดอะมิโนใน peptide หรือโปรตีน จึงมีความสำคัญอย่างมากต่อการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีน การศึกษาลำดับกรดอะมิโนมีหลักการทั่ว ๆ ไป คือ ทางปลายอะมิโนของโปรตีนหรือ peptide จะถูกติดฉลากด้วยสารบางชนิด หลังจากนั้นพันธะ peptide ที่นอกสุดจะถูกตัดที่ละพันธะ กรดอะมิโนที่ติดฉลากอยู่กับสารจะถูกตรวจวัดโดยเทคนิค chromatography ทำให้ทราบลำดับของกรดอะมิโนจากทางด้านปลายอะมิโนที่ละลำดับกรดอะมิโน

Frederick Sanger เป็นนักวิทยาศาสตร์คนแรกที่พบปฏิกิริยาที่ปลายอะมิโน โดยพบว่า fluorodinitrobenzene สามารถเกิดพันธะ covalent กับหมู่อะมิโนที่ปลายอะมิโนของ peptide หรือ โปรตีน ต่อมามีการใช้ dansyl chloride แทนโดยสารจะทำปฏิกิริยากับทางปลายอะมิโนของโปรตีน หรือ peptide ต่อมา Pehr Victor Edman ได้พัฒนาวิธีการตัดลากลกรดอะมิโนทางปลายอะมิโนของ โปรตีน หรือ peptide และมีการตัดพันธะ peptide ที่ละพันธะ ที่เรียกว่า “Edman degradation” (สมปอง, 2550)

วิธีการหาลำดับของกรดอะมิโนที่ใช้กับสารด้านจุลินทรีย์มี 2 วิธี

1. การวิเคราะห์กรดอะมิโนที่ปลายทั้ง 2 ข้าง มี 2 วิธี คือ

1.1 วิธีของ Sanger (Sanger method) โดยใช้ 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene (DNFB) มาทำปฏิกิริยากับ polypeptide ในสารละลายที่เป็นเบสจะเกิดปฏิกิริยา nucleophilic aromatic substitution เกิดขึ้นกับปลายของ polypeptide ในด้านที่เป็น N-terminal residue โดยหมู่ 2,4-dinitrophenyl จะไปเกาะอยู่ที่อะตอมไนโตรเจน หลังจากทำการแยกกรดอะมิโน จะสามารถตรวจสอบว่าที่ปลายเป็นกรดอะมิโนประเภทไหน

1.2 วิธีของ Edman degradation วิธีนี้จะเอาปลาย N-terminal ออกเท่านั้น โดยทั้งส่วนที่เหลือไว้ และ label หมู่อะมิโนของ N-terminal ด้วย phenyl isothiocyanate และเติมกรดลงไป เพื่อให้ N-terminal เกิดการจัดเรียงตัวใหม่ได้สารประกอบ phenylthiohydantoin เป็นผลิตภัณฑ์ และนำไปทดสอบ โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน phenylthiohydantoin ที่เตรียมได้จากกรดอะมิโนต่าง ๆ ส่วน polypeptide ที่เหลือจากการทำ Edman degradation ในครั้งแรก จะนำไปย่อยสลายตัวครั้งต่อ ๆ ไปได้อีก และสามารถทำได้อย่างอัตโนมัติโดยเครื่องที่เรียกว่า sequenator วิธีนี้กรดอะมิโนจะถูกพิสูจน์ทราบเป็นลำดับตามที่ถูกเอาออกมาจาก polypeptide ซึ่งสามารถใช้กับ polypeptide ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนมากถึง 60 หน่วย สำหรับ C-terminal สามารถพิสูจน์โดยใช้เอนไซม์ carboxypeptidase โดยจะย่อยพันธะ amine ของ amino acid residue ที่มี $-COOH$ อิสระอยู่เท่านั้น และเกิดกรดอะมิโนอิสระ แต่เอนไซม์นี้จะ hydrolyze ไปอย่างต่อเนื่อง จึงต้องติดตามกรดอะมิโนที่หลุดออกมาเป็นฟังก์ชันของเวลา

2. การ hydrolysis บางส่วน วิธีนี้จะใช้กรด หรือเอนไซม์ เช่น trypsin, chymotrypsin ช่วยย่อยโมเลกุลของ polypeptide หรือโปรตีนก่อน หลังจากนั้นจึงทำการวิเคราะห์ต่อโดยใช้วิธีของ Sanger หรือ Edman และการย่อยด้วยเอนไซม์ carboxypeptidase ต่อไป หลังจากที่เราได้ข้อมูลของส่วนย่อย ๆ จึงนำมาต่อเป็นโมเลกุลใหญ่ ๆ เพื่อให้ได้โครงสร้างของ polypeptide ข้อดีของวิธีนี้คือ ช่วยแก้ปัญหากรณีปลายด้าน N-terminal ถูก block

ประโยชน์ของการหาลำดับกรดอะมิโน

1. ใช้เปรียบเทียบกับลำดับของกรดอะมิโนลำดับอื่น ๆ ที่มีอยู่
2. การเปรียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนชนิดเดียวกันในต่างสายพันธุ์ จะให้ข้อมูลเกี่ยวกับสายวิวัฒนาการ
3. ลำดับกรดอะมิโนสามารถค้นหาการมีอยู่ของ internal repeats
4. ลำดับกรดอะมิโนจะเป็นตัวควบคุมและบอกการทำงานทุกอย่างของโปรตีน
5. ข้อมูลของลำดับกรดอะมิโนจะใช้ในการเตรียม antibody จำเพาะสำหรับโปรตีน
6. การทราบข้อมูลของลำดับกรดอะมิโนทำให้สามารถสร้าง DNA probe ของโปรตีนชนิดนั้น

การศึกษาลำดับกรดอะมิโนด้วยเทคนิค mass spectrophotometry เป็นเครื่องมือที่สามารถใช้วัดหาน้ำหนักโมเลกุลต่อประจุของไอออน และยังให้ข้อมูลของลักษณะของโครงสร้างของโปรตีนได้โดยอาศัย tandem mass spectrometer ซึ่งทำได้โดยการทำให้โมเลกุลโปรตีนถูกตัดเป็นเส้นเล็ก ๆ ภายในเครื่องวัดแล้วตรวจวัดน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนสายสั้น ๆ ที่ได้ นำมาเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโน โดยเทคนิคนี้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้อีกหลาย ๆ งาน เช่น งานด้านเทคโนโลยี ชีวภาพ ด้านเภสัชกรรม ด้านการวินิจฉัยโรค ด้านสภาพภูมิศาสตร์ เป็นต้น (สมปอง, 2550)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

1.1 เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ B-1

1.2 เชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในสัตว์น้ำ ได้แก่ *Streptococcus agalactiae* ABRCs 01 และ *Aeromonas hydrophila* ABRCa 01

1.3 เชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคและทำให้อาหารเน่าเสีย ได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC 12600, *Escherichia coli* JM 109 และ *Listeria innocua* ATCC 33090

1.4 เชื้อแบคทีเรียทดสอบชนิดอื่น ๆ ได้แก่ *Micrococcus luteus* IFO 12708, *Bacillus circulans* JCM 2504 และ *Bacillus coagulans* JCM 2257

2. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

2.1 Nutrient agar (NA) และ nutrient broth (NB) ; Himedia

2.2 Tryptic soy broth (TSB) และ tryptic soy agar (TSA) ; Himedia

2.3 Brain heart infusion broth (BHIB) และ brain heart infusion agar (BHIA) ; Himedia

3. อุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย

3.1 เครื่องปั่นเหวี่ยงแยกสาร ; Kubota 5800, Kubota

3.2 เครื่อง Spectrophotometer ; Biomate 3, Thermo Scientific

3.3 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ; Hirayama HA-300 M, Pegasus Scientific Inc.

3.4 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ; Vision; VS-8480 SFN, Integra Medsciences. Pvt. LTD

3.5 ตู้บ่มเชื้อ ; Memmert

3.6 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง ; Mettler PJ 400, Mettler-Toledo, Heightstown

3.7 เครื่องแก้วที่จำเป็น เช่น หลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร แท่งแก้วรูปตัวแอล

4. สารเคมีสำหรับการ purification สารต้านจุลินทรีย์

- 4.1 amberlite XAD-16 ; Sigma
- 4.2 2-propanol ; Sigma
- 4.3 acetonitrile ; Fisher
- 4.4 trifluoroacetic acid (TFA) ; Merck
- 4.5 เครื่อง high performance liquid chromatography ; Variance Prostar 800
- 4.6 เครื่อง mass spectrophotometer ; Bruker Daltonics, Billerica

5. เอนไซม์

- 5.1 เอนไซม์โปรตีนเอส เค (proteinase K) ; Sigma
- 5.2 เอนไซม์โปรติเอส (protease) ; Sigma
- 5.3 เอนไซม์ทริปซิน (trypsin) ; Sigma
- 5.4 เอนไซม์ไลเปส (lipase) ; Sigma
- 5.5 เอนไซม์อะไมเลส (amylase) ; Sigma
- 5.6 เอนไซม์อัลฟา-ไคโมทริปซิน (α -chymotrypsin) ; Sigma

6. อุปกรณ์และสารเคมีเกี่ยวกับการวิเคราะห์หาลำดับ nucleotide

- 6.1 QIA quick PCR purification kit ; Qiagen
- 6.2 Mag extractor plasmid kit ; Promega
- 6.3 *Taq* DNA polymerase ; Promega
- 6.4 p-Gem-T ; Promega

7. อุปกรณ์และสารเคมีเกี่ยวกับการวิเคราะห์ two dimensional gel electrophoresis

- 7.1 2 D clean-up kit ; Amersham Biosciences
- 7.2 immobiline™ DryStrip, pH 3-10 (7 เซนติเมตร) ; Amersham Biosciences
- 7.3 IPG Buffer, pH 3-10 ; Amersham Biosciences
- 7.4 immobiline dry strip cover fluid ; Amersham Biosciences
- 7.5 Bradford solution ; Bio-Rad
- 7.6 dithiothreitol (DTT) ; Sigma
- 7.7 bromophenol blue ; Sigma

7.8 acrylamide ; Bio-Rad

7.9 N,N'-methylenebisacrylamide ; Bio-Rad

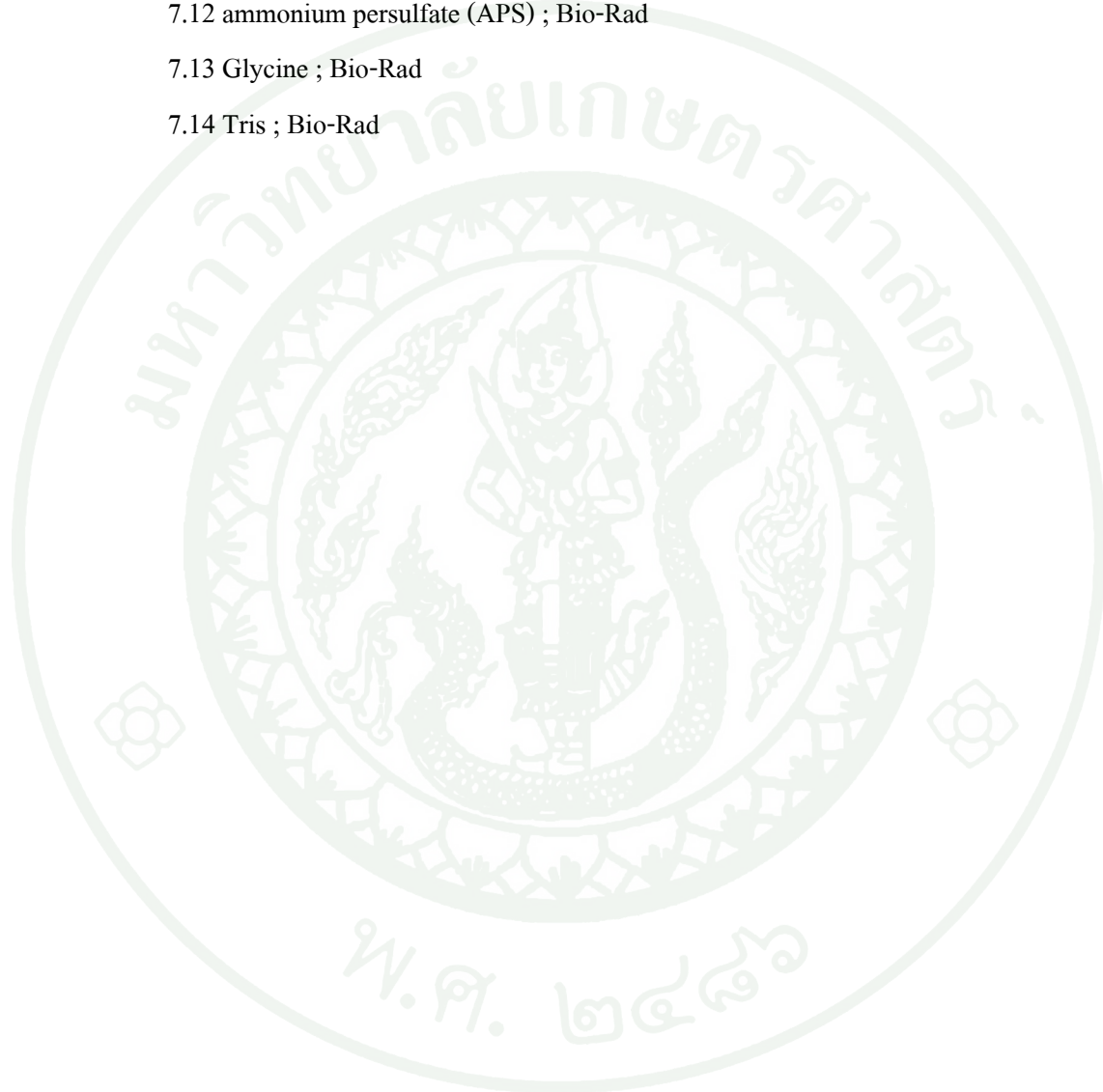
7.10 sodium dodecyl sulfate ; Bio-Rad

7.11 NNN'N'-Tetrametylenediamine (TEMED) ; Bio-Rad

7.12 ammonium persulfate (APS) ; Bio-Rad

7.13 Glycine ; Bio-Rad

7.14 Tris ; Bio-Rad



วิธีการทดลอง

1. การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ B-1 โดยการศึกษาลำดับเบสในบางส่วนของ 16 S rDNA โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Marmur (1961) ; Kawasaki *et al.* (1993) และ Yamada *et al.* (2000)

นำแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ B-1 ที่ได้จากงานวิจัยเรื่องการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากบ่อเลี้ยงปลาในการยับยั้งเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ที่ก่อโรคในปลานิล (*O. niloticus*) (สุปราณี, 2550; สุปราณี และ คณะ, 2550) มาเลี้ยงในอาหาร TSA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการแยก DNA ออกจากเซลล์ โดยเจียโคโลนิของแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ B-1 มาทำละลายในสารละลาย TE บัฟเฟอร์ ปริมาตร 360 ไมโครลิตร แล้วเติม lysozyme ลงไปเล็กน้อย หลังจากนั้นนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นเติม 10% SDS 40 ไมโครลิตร และนำไปปั่นที่ 55 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เมื่อครบเวลานำไปเติม phenol: chloroform: isoamylalcohol (อัตราส่วน 25: 24: 1) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm นาน 15 นาที และนำสารละลายที่ได้ไปเติม chloroform: isoamylalcohol (อัตราส่วน 24: 1) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm นาน 15 นาที หลังจากนั้นเติม 3 M sodium acetate ปริมาตร 1/10 เท่าของปริมาตรสารในหลอด และเติม ethanol เย็นลงไปประมาณ 2 เท่าของปริมาตรสารในหลอด นำ DNA ที่ได้ไปทำให้แห้ง แล้วนำไปละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตามวิธีของ Marmur (1961) และทำให้ชิ้นส่วน DNA เป้าหมายที่ได้ให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยใช้ชุดสำเร็จรูป QIA quick จากนั้นทำการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน DNA เป้าหมาย โดยใช้ปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้เครื่องควบคุมแบบอัตโนมัติและใช้ primer 1 คู่ คือ 20 F forward primer (5' GAG TTT GAT CCT GC TCA G 3') และ 1500 R reward prime (5' GTT ACC TTG TTA CGA CTT 3') โดยกำหนดโปรแกรมของเครื่องควบคุมการเพิ่มจำนวนชิ้น DNA แบบอัตโนมัติ คือ (1) การทำให้สาย DNA แยกเป็น DNA สายเดี่ยวที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ (2) ปฏิกิริยาต่อเนื่องที่เรียงตามลำดับดังต่อไปนี้ จำนวน 25 รอบ ได้แก่ การแยกสาย DNA ให้เป็น DNA สายเดี่ยว (denaturation) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที การเข้าจับกันของ DNA primer กับ DNA เป้าหมาย (primer annealing) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และการต่อขยายเส้น DNA primer (primer extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที (3) อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ และทำการตรวจ

สอบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้โดยใช้ agarose gel electrophoresis จากนั้นวิเคราะห์ลำดับเบสของ PCR product ที่ได้ (1,500 base pairs) โดยใช้เครื่อง DNA Engine Dyad[®] Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories) ตามวิธีของ Kawasaki *et al.* (1993); Yamada *et al.* (2000) และทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล โดยใช้ฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information (NCBI), National Institutes of Health ประเทศสหรัฐอเมริกา เพื่อจัดจำแนกชนิดของ *Bacillus* สายพันธุ์ B-1 ที่นำมาศึกษา

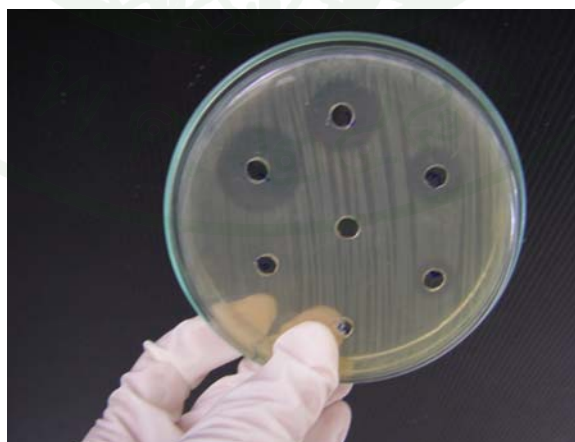
2. การทดสอบความสามารถของแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ B-1 ในการสร้างสารต้านจุลินทรีย์

การศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบชนิดต่าง ๆ ของเชื้อ *Bacillus* สายพันธุ์ B-1 ที่คัดแยกได้ โดยใช้สายพันธุ์แบคทีเรียทดสอบ 3 กลุ่ม ได้แก่

1. กลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในสัตว์น้ำ ได้แก่ *S. agalactiae* ABRC5 01 และ *A. hydrophila* ABRC4 01
2. กลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคและทำให้อาหารเน่าเสีย ได้แก่ *S. aureus* ATCC 12600, *E. coli* JM 109 และ *L. innocua* ATCC 33090
3. กลุ่มเชื้อแบคทีเรียทดสอบชนิดอื่น ๆ ได้แก่ *M. luteus* IFO 12708, *B. circulans* JCM 2504 และ *B. coagulans* JCM 2257 โดยใช้วิธีการต่าง ๆ ดังนี้

2.1 วิธี direct method (Schillinger and Lucke, 1989) โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ทดสอบทั้ง 8 ชนิด ในอาหาร TSB ให้อยู่ช่วงระยะ log (log phase) ซึ่งมีเซลล์ประมาณ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB+วุ้น 0.75% ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเทลงบนหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ B-1 บนอาหาร TSA และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ B-1 spot ลงไปบนอาหาร TSA ที่เตรียมไว้ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิซึ่งเหมาะสมสำหรับการเจริญของแบคทีเรียทดสอบแต่ละชนิด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบบริเวณส่วนในสโรว ๆ บริเวณที่จุดเชื้อ *Bacillus* สายพันธุ์ B-1 ลงไปซึ่งหากสังเกตเห็นส่วนใสแสดงให้เห็นว่า *Bacillus* สายพันธุ์ B-1 มีการสร้างสารออกมายับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบได้

2.2 วิธี agar well diffusion (Mayr-Harting *et al.*, 1972; Cintas *et al.*, 1995) โดยทำการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* สายพันธุ์ B-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-5 วัน หลังจากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อมาแยกเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แยกเอาน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใส (supernatant) มาทำให้ปลอดเชื้อ (sterile) โดยการกรองผ่านแผ่นเยื่อกรอง (membrane) ที่มีรูพรุนขนาด 0.22 ไมโครเมตร น้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จะมีสถานะเป็นกลางและปลอดเชื้อ (cell-free neutralized supernatant หรือเรียกย่อว่า CFNS) จากนั้นตอนที่ผ่านมามีวัดค่ากิจกรรมของสารต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial activity) กับแบคทีเรียทดสอบ โดยเตรียมเชื้อแบคทีเรียทดสอบให้อยู่ในช่วงระยะ log (log phase) ซึ่งมีเซลล์ประมาณ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอาหาร TSB และนำแบคทีเรียทดสอบ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB+วุ้น 0.75% ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเทลงบนหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA แล้วเจาะหลุมด้วย cork borer แล้วดูด CFNS มาทำการเจือจางกับน้ำกลั่น ปลอดเชื้อ ครั้งละ 2 เท่า ใน microtiter plate และเรียกวิธีการดังกล่าวว่า “critical dilution assay” และนำตัวอย่างที่ได้มาหยดลงในหลุมที่เตรียมไว้ หลุมละ 50 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง ทำการตรวจผลโดยสังเกตจากการเกิดบริเวณใสที่ความเจือจางต่าง ๆ และใช้ส่วนกลับของค่าความเจือจางสูงสุดของ CFNS ซึ่งยังสามารถสังเกตเห็นบริเวณใสที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบไปคูณด้วย 1,000 แล้วหารด้วยปริมาตรของ CFNS ที่หยดลงไป คือ 50 ไมโครลิตร ซึ่งค่าแฟกเตอร์ที่ได้เท่ากับ 20 ดังเช่นในภาพที่ 2 และค่ากิจกรรมที่ได้ออกมาเป็นหน่วยยูนิตต่อมิลลิลิตร (AU ml^{-1}) เป็นการแสดงให้เห็นว่าใน CFNS มีสารต้านจุลินทรีย์อยู่จริง



ภาพที่ 2 แสดงการศึกษากิจกรรมของสารต้านจุลินทรีย์ใน CFNS ด้วยวิธี critical dilution assay

3. การศึกษาคุณสมบัติของสารต้านจุลินทรีย์ที่สร้างจาก *Bacillus* สายพันธุ์ B-1

3.1 การทนต่อเอนไซม์ต่าง ๆ โดยนำ CFNS มาทดสอบกับเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ α -chymotrypsin, proteinase K, lipase, amylase, protease และ trypsin ที่ความเข้มข้นสุดท้ายของเอนไซม์เท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะ pH ที่เหมาะสมของเอนไซม์แต่ละชนิด หลังจากครบเวลาที่กำหนด ทำการหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยการนำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำไปวัดค่ากิจกรรมของสารต้านจุลินทรีย์ที่เหลืออยู่ด้วยวิธี critical dilution assay โดยใช้ *L. innocua* ATCC 33090 เป็นแบคทีเรียทดสอบ เนื่องจากเป็นเชื้อที่มีความไวต่อสารต้านจุลินทรีย์ที่สร้างจาก *Bacillus* สายพันธุ์ B-1 สูงที่สุด โดยแบคทีเรียทดสอบดังกล่าวจะถูกใช้ในการวัดค่ากิจกรรมของสารต้านจุลินทรีย์ในขั้นต่อไป

3.2 การทนความร้อน โดยนำ CFNS มาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 นาที และที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที โดยใช้หม้อนึ่งความดันไอ เมื่อครบเวลาทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วด้วยน้ำแข็ง หลังจากนั้นนำไปวัดค่ากิจกรรมที่เหลืออยู่ของสารต้านจุลินทรีย์

3.3 การศึกษาความคงตัวของสารต้านจุลินทรีย์ ภายใต้สภาวะที่มี pH ต่าง ๆ นำ CFNS มาปรับ pH ให้เป็น 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 และ 10.0 ด้วยสารละลาย 5 M NaOH หรือ HCl แบ่งทำการทดลองในทุก pH ออกเป็น 2 ชุด โดยนำชุดการทดลองแรกไปให้ความร้อนในน้ำเดือดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ส่วนชุดการทดลองที่ 2 นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำหลอดทดลองในแต่ละชุดมาวัดค่ากิจกรรมของสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่เหลืออยู่ โดยก่อนการทดสอบให้ปรับ pH ของ CFNS ให้เป็น 6.5

3.4 การศึกษาความคงตัวของสารต้านจุลินทรีย์ ภายใต้สภาวะที่มี NaCl เข้มข้นต่าง ๆ โดยผสม NaCl ที่ปราศจากเชื้อลงใน CFNS ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 3, 6, 9, 12 และ 15% (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) นำหลอดทดลองไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการวัดค่ากิจกรรมของสารต้านจุลินทรีย์ที่เหลืออยู่

4. การทำสารต้านจุลินทรีย์ให้เป็นสารบริสุทธิ์ โดยดัดแปลงจากวิธีของ Pinchuk *et al.* (2001) ; Oscariz *et al.* (2006) และ Atsushi *et al.* (2008)

4.1 แยกสารต้านจุลินทรีย์ ออกจาก CFNS โดยใช้ amberlite XAD-16 น้ำหนัก 20 กรัม ใส่ลงใน CFNS 1 ลิตร จากนั้นนำไปทำให้เกิดการกระจายตัวสม่ำเสมอด้วยเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดแยก amberlite XAD-16 ออกจาก CFNS แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นล้างด้วย ethanol ความเข้มข้น 40% ปริมาตร 80 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติม 2-propanol ความเข้มข้น 70% ลงไปปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปประเหยเพื่อให้แอลกอฮอล์ออกไปด้วยเครื่องระเหยสารละลายแบบหมุนเหวี่ยง จนเหลือปริมาตรรวมประมาณ 5 มิลลิลิตร

4.2 การทำให้เป็นสารบริสุทธิ์ด้วยเครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) นำสารต้านจุลินทรีย์ที่ได้จากขั้นตอน ผ่านเข้าไปใน BDS hypersil C₁₈ reverse-phase column (thermo scientific) ที่ผ่านการทำให้เกิดสถานะสมดุลด้วยสารละลาย acetonitrile ที่มี 0.1% TFA ผสมอยู่ และต่อกับเครื่อง HPLC ด้วยอัตราความเร็วประมาณ 1 มิลลิลิตรต่อนาที หลังจากนั้นแยกสารต้านจุลินทรีย์ออกจาก column ด้วยสารละลายผสมระหว่าง acetonitrile ที่มี 0.1% TFA และมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ acetonitrile อย่างต่อเนื่องจาก 15 ถึง 70% ภายในเวลา 30 นาที ด้วยอัตราเร็ว 1 มิลลิลิตรต่อนาที ทำการตรวจวัดโปรตีนที่ถูกแยกออกมาจาก column ด้วย photodiode array detector ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และเก็บสารละลายที่ถูกแยกออกมา เพื่อตรวจวัดค่ากิจกรรมของสารต้านจุลินทรีย์ เพื่อเปรียบเทียบกับ chromatogram ที่บันทึกได้จากเครื่อง HPLC และนำสารละลายในหลอดทดลองที่พบค่ากิจกรรมในแต่ละช่วงเวลามาผ่าน column อีกครั้งตามวิธีการที่กล่าวในข้างต้น

5. ศึกษาค่า isoelectric point ขององค์ประกอบของโปรตีนโดยใช้เทคนิค two dimensional gel electrophoresis (2 D PAGE)

เตรียมสารต้านจุลินทรีย์ที่ได้จากข้อ 4 ด้วย 2 D clean-up kit และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford (1976) เพื่อปรับให้ปริมาณโปรตีนเท่ากับ 10-62 ไมโครกรัม เพื่อใช้แยกตามค่า pI (isoelectric point) บน immobilized dry strip ที่ช่วง pH 3-10 ใน rehydration buffer ช่วง pH 3-10 โดยตั้งค่าเครื่อง Ettan IPGphor ให้ rehydration นาน 12 ชั่วโมง ที่ 20 องศาเซลเซียส ขั้นที่ 1 ความ

ต่างศักย์ 250 โวลต์ต่อชั่วโมง นาน 30 นาที ขั้นที่ 2 ความต่างศักย์ 500 โวลต์ต่อชั่วโมง นาน 30 นาที และขั้นที่ 3 ความต่างศักย์ 7,500 โวลต์ต่อชั่วโมง นาน 1 ชั่วโมง 30 นาที เมื่อครบขั้นตอน แขน immobiline drystrip ใน equilibration buffer ที่มี dithiothreitol นาน 10 นาที และเปลี่ยนมาแช่ใน equilibration buffer ที่มี iodoacetamide นาน 10 นาที นำ immobiline dry strip ไปแยกโปรตีนตาม น้ำหนักโมเลกุลบน SDS-PAGE (stacking gel 17.5% acrylamide) ใช้ marker เป็นโปรตีนมาตรฐาน ใช้กระแสไฟฟ้า 10 มิลลิแอมแปร์และความต่างศักย์ 300 โวลต์ นาน 15 นาทีและเปลี่ยน เป็น กระแสไฟฟ้า 20 มิลลิแอมแปร์และความต่างศักย์ 300 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง 30 นาที นำแผ่นเจลที่ได้ ย้อมด้วย coomassie brilliant blue R-250 นาน 12 ชั่วโมง แล้วล้างเจลจนเห็นจุดโปรตีนชัดเจน

6. วิเคราะห์หา mass spectrum และน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนโดยเทคนิค MALDI-TOF

นำจุดโปรตีนของสารด้านจุลินทรีย์ที่ถูกคัดเลือกไปวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Billerica, USA) ที่หน่วยบริการชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์แห่งชาติ จังหวัดปทุมธานี

7. วิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนโดยเทคนิค LC-MS/MS และเปรียบเทียบชนิดโปรตีนโดยใช้ฐานข้อมูลโปรตีน

นำแถบโปรตีนของสารด้านจุลินทรีย์จาก 2 D PAGE ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS (thermo electron corporation) ที่หน่วยบริการชีวภาพ (Bioservice Units) ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์แห่งชาติ จังหวัดปทุมธานี ข้อมูล mass spectrometry spectrum ของโปรตีนที่ได้นำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีนใน MASCOT

ผลและวิจารณ์การทดลอง

1. การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ B-1 โดยการศึกษาลำดับเบสบางส่วนของ 16 S rDNA

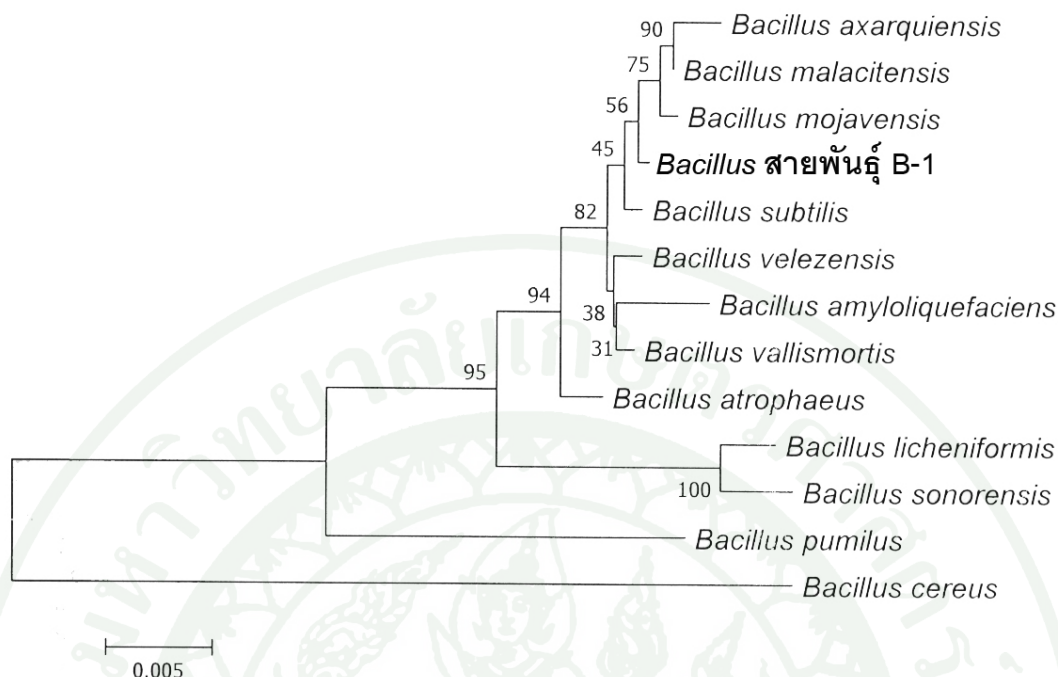
จากการศึกษาลำดับเบสในส่วน 16 S rDNA ของ *Bacillus* สายพันธุ์ B-1 และนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล 16 S rDNA ของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ที่มีการศึกษาไว้แล้ว ในฐานข้อมูลของ national center for biotechnology information (NCBI), national institutes of health ประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่า *Bacillus* สายพันธุ์ B-1 มีลำดับเบสบนส่วนของ 16 S rDNA เหมือน (homology) กับ *B. subtilis* ถึง 99% ดังแสดงในภาพที่ 3 นอกจากนี้ความเหมือนของ ลำดับ nucleotide ของยีน 16 S rDNA ระหว่างแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ B-1 และ *B. subtilis* WD 23 มีความใกล้เคียงกันมาก สามารถนำมาใช้ประเมินความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแบคทีเรียได้ และคุณสมบัตินี้สามารถนำมาศึกษาแบบ phylogenetic tree ได้ ดังแสดงในภาพที่ 4

Query	2	GCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGC	61
Sbjct	14	GCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGC	73
Query	62	TTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGNAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGA	121
Sbjct	74	TTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTG-AGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGA	132
Query	122	CTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCA	181
Sbjct	133	CTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCA	192
Query	182	AACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTG	241
Sbjct	193	AACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTG	252
Query	242	GTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCAC	301
Sbjct	253	GTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCAC	312
Query	302	ACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAA	361
Sbjct	313	ACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAA	372
Query	362	TGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGC	421
Sbjct	373	TGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGC	432
Query	422	TCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAAC	481
Sbjct	433	TCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAAC	492
Query	482	CAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTG	541
Sbjct	493	CAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTG	552

ภาพที่ 3 การเปรียบเทียบลำดับเบสของ 16 S rDNA ของ *Bacillus* สายพันธุ์ B-1 และ *B. subtilis*

Query	542	TCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCC	601
Sbjct	553	TCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCC	612
Query	602	CCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAAGTGCAGAAGAGGAGAGTG	661
Sbjct	613	CCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAAGTGCAGAAGAGGAGAGTG	672
Query	662	GAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCG	721
Sbjct	673	GAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCG	732
Query	722	ACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGAT	781
Sbjct	733	ACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGAT	792
Query	782	ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTA	841
Sbjct	793	ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTA	852
Query	842	GTGCTGCAGCTAACGCAT - AAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAACTC	900
Sbjct	853	GTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAACTC	912
Query	901	ANAGGAATTGACGGGGGCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGCAAGCAACGC	960
Sbjct	913	AAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGCAAGCAACGC	972
Query	961	GAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCG	1020
Sbjct	973	GAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCG	1032
Query	1021	GGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTA	1080
Sbjct	1033	GGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTA	1092
Query	1081	AGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAAGTTGGGCACTCTAAG	1140
Sbjct	1093	AGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAAGTTGGGCACTCTAAG	1152
Query	1141	GTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTA	1200
Sbjct	1153	GTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTA	1212
Query	1201	TGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTT	1260
Sbjct	1213	TGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTT	1272
Query	1261	AAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAA	1320
Sbjct	1273	AAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAA	1332
Query	1321	GCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGT	1380
Sbjct	1333	GCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGT	1392
Query	1381	ACACACCGCCCGTACACACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTT	1440
Sbjct	1393	ACACACCGCCCGTACACACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTT	1452
Query	1441	AGGAGCCAGCCGCCTAATGTGGGACAGATGATTGGGGTGAGTC	1483
Sbjct	1453	AGGAGCCAGCCGCCTAATGTGGGACAGATGATTGGGGTGAGTC	1496

ภาพที่ 3 (ต่อ)



ภาพที่ 4 phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง *Bacillus* สายพันธุ์ B-1 กับแบคทีเรียสกุล *Bacillus* สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ได้มีการจัดจำแนกไว้แล้ว

rRNA เป็น RNA ที่มีการสร้างมากที่สุดในเซลล์ มีโครงสร้างเป็นทุติยภูมิของ RNA ที่ไม่แปลรหัส แต่มีหน้าที่สำคัญในการทำงานเพื่อสังเคราะห์โปรตีน ร่วมกับไรโบโซมอลโปรตีน ซึ่งเป็นโปรตีนจำเพาะ ยีน 16 S rDNA ในแบคทีเรียแกรมบวกจะมีลำดับ nucleotide เป็น UUUAU UUCG (Stackebrandt *et al.*, 1991) การจัดจำแนกสกุลของเชื้อแบคทีเรียมีหลายวิธีเหมือน เช่น ในแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ เช่น อาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา วิธีการทางชีวเคมี ซึ่งวิธีการดังกล่าวจะแปรผันกับโครงสร้างทางเคมีของเซลล์ในเวลานั้น และยังสามารถแปรผันตามสภาพแวดล้อม จึงมีการพัฒนาวิธีการจำแนกชนิดของแบคทีเรียขึ้น เช่น การทำ DNA-DNA hybridization และการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16 S rDNA เป็นต้น ซึ่งเป็นที่นิยมในปัจจุบัน เนื่องจากไม่แปรผันต่อสิ่งแวดล้อม ยีน rDNA ถูกนำมาใช้การศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตเป็นอย่างมาก โดยยีนเหล่านี้จะเหมือนกันในสิ่งมีชีวิตที่มีวิวัฒนาการใกล้เคียงกัน โดยยีนกลุ่มนี้จะประกอบด้วยยีน 3 ยีนทำงานเป็นระบบ operon ซึ่งใน *B. subtilis* มี 10 operons จึงมีการใช้ประโยชน์จากยีนนี้ โดยการสร้าง primer เพื่อเพิ่มปริมาณของยีน โดยใช้เทคนิค PCR และนำลำดับเบสที่ได้ เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล ซึ่งสามารถช่วยในการจัดจำแนกแบคทีเรียในระดับชนิดได้ นอกจากนี้ยีนส่วนนี้ลำดับเบสในส่วนของยีน 23 S และ 5 S rDNA ก็สามารถนำมาใช้ได้เช่นเดียวกัน (ปราการ, 2547; Pernodet *et al.*, 1989)

2. การทดสอบความสามารถของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ B-1 ในการสร้างสารต้านจุลินทรีย์

จากผลการทดสอบความสามารถของ *B. subtilis* สายพันธุ์ B-1 ในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบชนิดต่าง ๆ โดยใช้วิธี direct method พบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ B-1 มีความสามารถในการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้หลายชนิด โดยสังเกตเห็นได้จากบริเวณโซนใสรอบ ๆ จุดที่ปลูกเชื้อ (spot) ซึ่งเจริญอยู่บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ถูกกลี้นผิวหน้าด้วยแบคทีเรียทดสอบชนิดต่าง ๆ ดังผลการทดลองที่แสดงในตารางที่ 3 หลังจากนั้นนำ *B. subtilis* สายพันธุ์ B-1 มาทดสอบการสร้างสารต้านจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวด้วยวิธี agar well diffusion method ซึ่งได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 3 การทดสอบความสามารถของ *B. subtilis* สายพันธุ์ B-1 ในการสร้างสารต้านจุลินทรีย์ทดสอบชนิดต่าง ๆ โดยวิธี direct method

แบคทีเรียทดสอบ	สภาวะการเลี้ยงเชื้อ	ผลการยับยั้ง
1. แบคทีเรียก่อโรคและทำให้อาหารเน่าเสีย		
<i>S. aureus</i> ATCC 12600	TSA (37 องศาเซลเซียส)	+ve
<i>E. coli</i> JM 109	TSA (37 องศาเซลเซียส)	-ve
<i>L. innocua</i> ATCC 33090	TSA (37 องศาเซลเซียส)	+ve
2. แบคทีเรียกลุ่มที่ทำให้เกิดโรคในสัตว์น้ำ		
<i>S. agalactiae</i> ABRCS 01	TSA (37 องศาเซลเซียส)	+ve
<i>A. hydrophila</i> ABRCA 01	TSA (37 องศาเซลเซียส)	+ve
3. แบคทีเรียทดสอบชนิดอื่น ๆ		
<i>M. luteus</i> IFO 12708	TSA (37 องศาเซลเซียส)	+ve
<i>B. circulans</i> JCM 2504	TSA (37 องศาเซลเซียส)	+ve
<i>B. coagulans</i> JCM 2257	TSA (37 องศาเซลเซียส)	+ve

หมายเหตุ +ve เกิดบริเวณโซนใส

-ve ไม่เกิดบริเวณโซนใส

ตารางที่ 4 ค่ากิจกรรมของสารต้านจุลินทรีย์ใน CFNS ของ *B. subtilis* สายพันธุ์ B-1 ในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบชนิดต่าง ๆ

แบคทีเรียทดสอบ	ค่ากิจกรรมของสารต้านจุลินทรีย์ (AU ml ⁻¹) ^a
1. แบคทีเรียก่อโรคและทำให้อาหารเน่าเสีย	
<i>L. innocua</i> ATCC 33090	320
<i>S. aureus</i> ATCC 12600	20
2. แบคทีเรียกลุ่มที่ทำให้เกิดโรคในสัตว์น้ำ	
<i>S. agalactiae</i> ABRCs 01	20
<i>A. hydrophila</i> ABRCa 01	20
3. แบคทีเรียทดสอบชนิดอื่น ๆ	
<i>M. luteus</i> IFO 12708	20
<i>B. circulans</i> JCM 2504	40
<i>B. coagulans</i> JCM 2257	80

^a ค่ากิจกรรมที่เหลืออยู่ของสารต้านจุลินทรีย์ซึ่งตรวจวัดด้วยวิธี critical dilution method และใช้ *L. innocua* ATCC 33090 เป็นแบคทีเรียทดสอบ

ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Zheng and Slavik (1999) ซึ่งใช้สารต้านจุลินทรีย์ที่ผลิตได้จาก *B. subtilis* ในการยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* ATCC 14893, *S. aureus* ATCC 6538, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *E. coli* O157: H7 ATCC 43888, *Yersinia enterocolitica* ATCC 27729 และ *L. innocua* ได้ เช่นเดียวกับรายงานของ Ouoba et al. (2006) ซึ่งพบว่าสารต้านจุลินทรีย์จาก *B. subtilis* ซึ่งคัดแยกได้จากการหมัก African locust bean สามารถยับยั้งการเจริญของ *M. luteus* A1, *B. cereus* A4, *B. cereus* A10, *E. coli* A13, *S. aureus* A11 และ *S. aureus* A12 ได้ Bronwyn et al. (2006) พบว่าสารต้านจุลินทรีย์ที่ได้จาก *B. subtilis* 168 สามารถยับยั้งแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ได้หลายชนิด เช่น *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* และ *B. atrophaeus* Xie et al. (2009) ได้คัดแยกสาร bacteriocin จากแบคทีเรีย *B. subtilis* LFB 112 จากสัตว์เลี้ยงพบว่าสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวก และแกรมลบได้หลายชนิด ได้แก่ *E. coli*, *S. pullorum*, *S. aureus*, *B. cereus* และเชื้อรา เป็นต้น Li et al. (2009) ได้รายงานการศึกษาสารต้านจุลินทรีย์จากเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ B 29 พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา เช่น *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, *R. hizoctonia solani* และ *S. sclerotiorum* จากข้อมูล

ข้างต้นจะเห็นได้ว่าสารต้านจุลินทรีย์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ซึ่งสังเคราะห์จากไรโบโซมจะมีฤทธิ์การยับยั้งแคบและเป็นพิษกับแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกัน (อรอนงค์, 2550)

3. การศึกษาคุณสมบัติของสารต้านจุลินทรีย์ที่สร้างจาก *B. subtilis* สายพันธุ์ B-1

3.1 การทนต่อเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ

จากผลการทดลองนำสารต้านจุลินทรีย์ที่ผลิตจาก *B. subtilis* สายพันธุ์ B-1 ซึ่งอยู่ใน CFNS ไปย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ พบว่าให้ผลดังในตารางที่ 5 โดยเอนไซม์ protease, proteinase K และ trypsin สามารถลดค่ากิจกรรมของสารต้านจุลินทรีย์ต่อแบคทีเรียทดสอบลงเหลือ 25% ส่วนเอนไซม์ α -chymotrypsin สามารถลดค่ากิจกรรมลงเหลือ 12% ส่วนเอนไซม์ที่ไม่สามารถย่อยสารต้านจุลินทรีย์ได้ ซึ่งได้แก่ เอนไซม์ amylase และ lipase ไม่สามารถลดค่ากิจกรรมของสารต้านจุลินทรีย์ใน CFNS ได้ เมื่อใช้ *L. innocua* ATCC 33090 เป็นแบคทีเรียทดสอบ

ตารางที่ 5 ผลของเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ต่อกิจกรรมของสารต้านจุลินทรีย์ในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีสถานะเป็นกลางและปลอดเชื้อ (CFNS) ของ *B. subtilis* สายพันธุ์ B-1

เอนไซม์	ค่ากิจกรรมของสารต้านจุลินทรีย์ (AU ml ⁻¹) ^a	เปอร์เซ็นต์ของค่ากิจกรรมที่ลดลง
ชุดควบคุม (control)	320	100
อัลฟา-ไคโมทริปซิน (α -chymotrypsin)	40	12
โปรติเอส (protease)	80	25
โปรติเนส เค (proteinase K)	80	25
ทริปซิน (trypsin)	80	25
อะไมเลส (amylase)	320	0
ไลเปส (lipase)	320	0

^a ค่ากิจกรรมที่เหลืออยู่ของสารต้านจุลินทรีย์ซึ่งตรวจวัดด้วยวิธี critical dilution method และใช้ *L. innocua* ATCC 33090 เป็นแบคทีเรียทดสอบ

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าสารต้านจุลินทรีย์ที่ผลิตจาก *B. subtilis* สายพันธุ์ B-1 ซึ่งอยู่ใน CFNS ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับรายงานของ Oguntoyinbo *et al.* (2007) ซึ่งศึกษาคุณลักษณะของสารต้านจุลินทรีย์ ซึ่งผลิตจาก *B. subtilis* ที่คัดแยกได้จากอาหาร okpehe และพบว่าสารดังกล่าวถูกย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน เช่นเดียวกับการศึกษาของ Qi-qin *et al.* (2007) ที่พบว่าสารต้านจุลินทรีย์ที่สร้างจาก *B. subtilis* สายพันธุ์ B 11 ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน ซึ่งจากคุณสมบัติของสารต้านจุลินทรีย์ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนทำให้สามารถยืนยันได้ว่าสารดังกล่าวมีคุณสมบัติเป็นโปรตีน โดยเอนไซม์ trypsin เป็นเอนไซม์ประเภท serine proteinase มีความสามารถในการตัดสาย peptide บริเวณหมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโน lysine และ arginine residue เช่นเดียวกับเอนไซม์ α -chymotrypsin แต่ต่างกันที่ตำแหน่งการตัดบริเวณหมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโน tyrosine, tryptophan และ alanine เพราะกรดอะมิโนเหล่านี้มีโครงสร้างเป็น aromatic ring ที่เหมาะต่อการเข้าจับบริเวณ “hydrophobic pocket” ของเอนไซม์ นอกจากนี้ยังตัดของ leucine, methionine และ glutamine residue เอนไซม์ proteinase K ที่ใช้ในการทดลอง เป็นกลุ่มของ serine protease มีจุดตัดอยู่ที่หมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโนที่มีโครงสร้างเป็น aliphatic และกรดอะมิโนที่เป็นพวก aromatic ซึ่งถูก block ด้วย alpha amino เอนไซม์ protease เป็นเอนไซม์พวก proteinase ที่มีคุณสมบัติเป็น proteolysis สามารถ hydrolysis พันธะ peptide

3.2 การทนต่อความร้อน

จากการทดลองนำสารต้านจุลินทรีย์ที่สร้างจาก *B. subtilis* สายพันธุ์ B-1 ซึ่งอยู่ใน CFNS ไปทดสอบความสามารถในการทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่าง ๆ และที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที พบว่าได้ผลดังแสดงในตารางที่ 6 โดยค่ากิจกรรมของสารต้านจุลินทรีย์ใน CFNS ไม่ลดลงไปจากเดิมเมื่อผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่าง ๆ ค่ากิจกรรมของสารต้านจุลินทรีย์คงเท่าเดิมคือ 100% แต่เมื่อให้ความร้อนสูงขึ้นที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จะไม่พบค่ากิจกรรมของสารต้านจุลินทรีย์เหลืออยู่

จากผลการทดลองที่ได้พบว่าสอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Pinchuk *et al.* (2001) ซึ่งพบว่าสารต้านจุลินทรีย์ที่สร้างจาก *B. subtilis* 3 สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ได้นาน 60 นาที เช่นเดียวกับ Korenblum *et al.* (2004) ซึ่งได้รายงานว่าสารต้านจุลินทรีย์ที่ผลิตโดย *B. subtilis* LFE-1 สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 42, 65 และ 100 องศาเซลเซียส นาน 60 นาทีได้ แต่ไม่สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ตารางที่ 6 ผลของการให้ความร้อนต่อกิจกรรมของสารต้านจุลินทรีย์ในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีสถานะเป็นกลางและปลอดเชื้อ (CFNS) ของ *B. subtilis* สายพันธุ์ B-1

สถานะการทดลอง	ค่ากิจกรรมของสารต้านจุลินทรีย์ (AU ml ⁻¹) ^a
ชุดควบคุม	320
5 นาที ที่ 100 องศาเซลเซียส	320
10 นาที ที่ 100 องศาเซลเซียส	320
15 นาที ที่ 100 องศาเซลเซียส	320
20 นาที ที่ 100 องศาเซลเซียส	320
30 นาที ที่ 100 องศาเซลเซียส	320
40 นาที ที่ 100 องศาเซลเซียส	320
50 นาที ที่ 100 องศาเซลเซียส	320
15 นาที ที่ 121 องศาเซลเซียส	0

^a ค่ากิจกรรมที่เหลือของสารต้านจุลินทรีย์หลังจากผ่านการให้ความร้อนซึ่งตรวจวัดด้วยวิธี critical dilution method และใช้ *L. innocua* ATCC 33090 เป็นแบคทีเรียทดสอบ

นอกจากนี้การวิจัยที่ผ่านมายังพบว่าสารต้านจุลินทรีย์ที่สร้างจากแบคทีเรียสกุล *Bacillus* อีกหลายชนิดสามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิต่าง ๆ ได้ เช่น รายงานของ Cladera-Olivera *et al.* (2004) ซึ่งศึกษาเกี่ยวกับสารต้านจุลินทรีย์ที่สร้างจาก *B. licheniformis* สายพันธุ์ P 40 และพบว่าสามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 60, 80 และ 100 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ได้ รวมถึงรายงานการศึกษาของสออดคล้องกับ Risoen *et al.* (2004) ซึ่งรายงานว่าถึงการทนความร้อนของสารต้านจุลินทรีย์ที่สร้างจาก *B. cereus* ทนความร้อนที่อุณหภูมิ 25, 50, 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ได้ ซึ่งคุณสมบัติในการทนความร้อนของสารต้านจุลินทรีย์ที่สร้างจากแบคทีเรียสกุล *Bacillus* นี้เป็นความร้อนในระดับที่ใช้ในอุตสาหกรรมได้

3.3 การทนต่อความเป็นกรด-ด่าง

จากผลการทดลองพบว่าเมื่อเก็บสารต้านจุลินทรีย์ที่สร้างจาก *B. subtilis* สายพันธุ์ B-1 ภายใต้อุณหภูมิ pH ระหว่าง 2.0–10.0 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ค่ากิจกรรมของสารต้านจุลินทรีย์ไม่มีการเปลี่ยนแปลง คือยังคงจะเหลืออยู่สูงสุด (320 AU ml⁻¹) แต่เมื่อเก็บสาร

ด้านจุลินทรีย์ไว้ในสภาวะที่มี pH ระหว่าง 2-10 ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ค่ากิจกรรมของสารด้านจุลินทรีย์จะเหลืออยู่แตกต่างกันไป โดยจะพบว่าสารด้านจุลินทรีย์ที่สร้างจาก *B. subtilis* สายพันธุ์ B-1 ภายใต้อุณหภูมิ pH เท่ากับ 2.0 และ 3.0 มีค่ากิจกรรมของสารด้านจุลินทรีย์เหลือเท่ากับ 20 AU ml⁻¹ และภายใต้อุณหภูมิ pH เท่ากับ 4.0, 5.0 และ 6.0 ซึ่งมีค่ากิจกรรมของสารด้านจุลินทรีย์เหลือเท่ากับ 80 AU ml⁻¹ และค่าความคงตัวของสารด้านจุลินทรีย์จะลดลงเท่ากับ 40 AU ml⁻¹ เมื่อมีสภาวะ pH เท่ากับ 7.0 และ 8.0 ในขณะที่ค่ากิจกรรมของสารด้านจุลินทรีย์จะสูญเสียหมดไปที่ความเป็น pH เท่ากับ 9.0 และ 10.0 ดังผลการทดลองที่ได้แสดงในตารางที่ 7

จากผลการวิจัยที่ผ่านมาพบว่าสารด้านจุลินทรีย์ที่สร้างจากแบคทีเรียสกุล *Bacillus* มีความสามารถในการทนต่อ pH แตกต่างกัน เช่น การศึกษาของ Pinchuk *et al.* (2001) พบว่าสารด้านจุลินทรีย์ที่สร้างจาก *B. subtilis* 3 ทน pH ได้ดีในช่วงระหว่าง 3.0-10.0 โดยที่ค่ากิจกรรมของสารด้านจุลินทรีย์ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม แต่จะลดลงเหลือประมาณ 10% เมื่ออยู่ภายใต้อุณหภูมิ pH เท่ากับ 11.0 Lee *et al.* (2001) ซึ่งพบว่าค่ากิจกรรมของสารด้านจุลินทรีย์จาก *B. polyfermenticus* จะคงที่เมื่ออยู่ในช่วง pH ระหว่าง 2.0-9.0 รายงานของ Risoen *et al.* (2004) พบว่าสารด้านจุลินทรีย์ที่สร้างจาก *B. cereus* มีความสามารถทนต่อ pH ในช่วง 2.0-5.0 โดยที่ค่ากิจกรรมของสารด้านจุลินทรีย์ไม่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และค่ากิจกรรมของสารด้านจุลินทรีย์จะลดลงเมื่อ pH เปลี่ยนเป็น 7.0 เช่นเดียวกับรายงานของ Wu *et al.* (2005) ซึ่งพบว่าสารด้านจุลินทรีย์ที่สร้างจาก *B. subtilis* JM 4 สามารถทน pH ได้ดี ในช่วงระหว่าง 2.0-8.0 แต่ค่ากิจกรรมของสารด้านจุลินทรีย์จะลดลงเมื่อ pH เท่ากับ 10.0 Oguntoyinbo *et al.* (2007) ได้ทำการศึกษาสารด้านจุลินทรีย์ที่สร้างโดย *B. subtilis* ซึ่งคัดแยกได้จากอาหาร okpehe และพบว่าค่ากิจกรรมของสารด้านจุลินทรีย์ในช่วง pH ระหว่าง 2.0-6.0 จะไม่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และพบว่าค่ากิจกรรมของสารด้านจุลินทรีย์จะลดลงเมื่อ pH เพิ่มขึ้นระหว่าง 7.0-10.0

ตารางที่ 7 การคงตัวของสารต้านจุลินทรีย์ที่สร้างจาก *B. subtilis* สายพันธุ์ B-1 ภายใต้สภาวะที่มี pH ต่าง ๆ

pH	ค่ากิจกรรมของสารต้านจุลินทรีย์ (AU ml ⁻¹) ^a	
	4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง	100 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที
2.0	320	20
3.0	320	20
4.0	320	80
5.0	320	80
6.0	320	80
7.0	320	40
8.0	320	40
9.0	320	0
10.0	320	0

^a ค่ากิจกรรมที่เหลือของสารต้านจุลินทรีย์ที่เหลือซึ่งตรวจวัดด้วยวิธี critical dilution method และใช้ *L. innocua* ATCC 33090 เป็นแบคทีเรียทดสอบ

3.4 การทนต่อ NaCl

จากผลการทดลองที่แสดงในตารางที่ 8 เมื่อเก็บรักษาสารต้านจุลินทรีย์ที่สร้างจาก *B. subtilis* สายพันธุ์ B-1 ที่อุณหภูมิต่ำ (4 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่มี NaCl ระหว่าง 3-15% พบว่าค่ากิจกรรมของสารต้านจุลินทรีย์ที่ภายใต้สภาวะที่มี NaCl เท่ากับ 3, 6, 9, 12 และ 15% มีค่าเท่ากับชุดควบคุม (320 AU ml⁻¹) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับ การเก็บรักษาสารต้านจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงพบว่าค่ากิจกรรมของสารต้านจุลินทรีย์จะลดลงประมาณ 75% เมื่ออยู่ภายใต้สภาวะที่มี NaCl เท่ากับ 3, 6, 9, 12 และ 15% โดยค่ากิจกรรมจะเหลือเท่ากับ 80 AU ml⁻¹

จากการทดลองเห็นได้ว่าสารต้านจุลินทรีย์ที่สร้างจาก *B. subtilis* สายพันธุ์ B-1 มีความสามารถในการคงตัวภายใต้สภาวะของ NaCl ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ทั้งที่อุณหภูมิต่ำ และ อุณหภูมิห้อง ซึ่งแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของสารต้านจุลินทรีย์ที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ใน

อุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์น้ำ การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ หรืออุตสาหกรรมอาหารอื่น ๆ เป็นต้น

ตารางที่ 8 การคงตัวของสารต้านจุลินทรีย์ที่สร้างจาก *B. subtilis* สายพันธุ์ B-1 ภายใต้สภาวะของ NaCl ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

NaCl (%: W/V)	ค่ากิจกรรมของสารต้านจุลินทรีย์ (AU ml ⁻¹) ^a	
	4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง	37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง
3	320	80
6	320	80
9	320	80
12	320	80
15	320	80

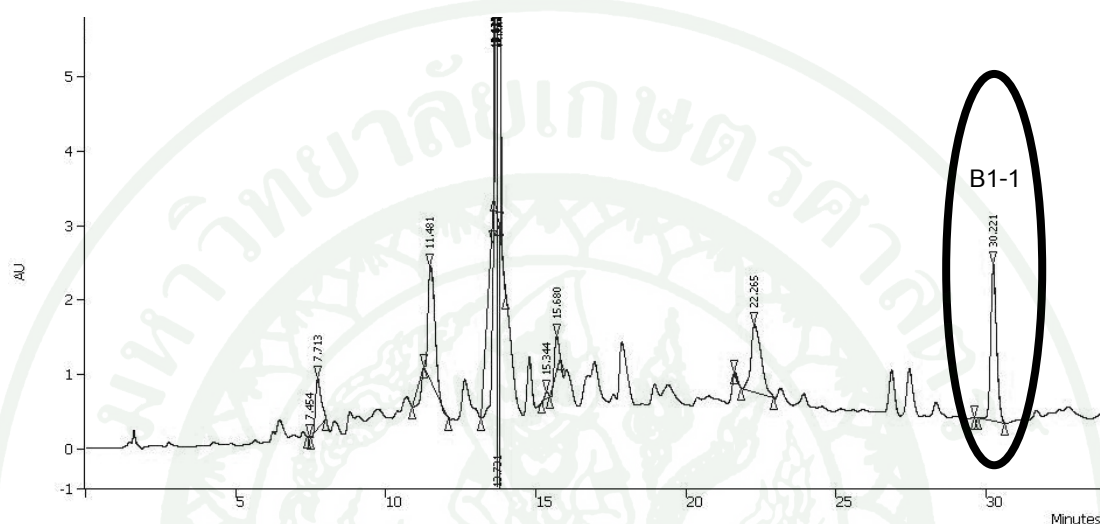
^a ค่ากิจกรรมที่เหลือของสารต้านจุลินทรีย์ซึ่งตรวจวัดด้วยวิธี critical dilution method และใช้ *L. innocua* ATCC 33090 เป็นแบคทีเรียทดสอบ

4. การทำสารต้านจุลินทรีย์ให้เป็นสารบริสุทธิ์โดยดัดแปลงจากวิธีของ Pinchuk *et al.* (2001) ; Oscariz *et al.* (2006) และ Atsushi *et al.* (2008)

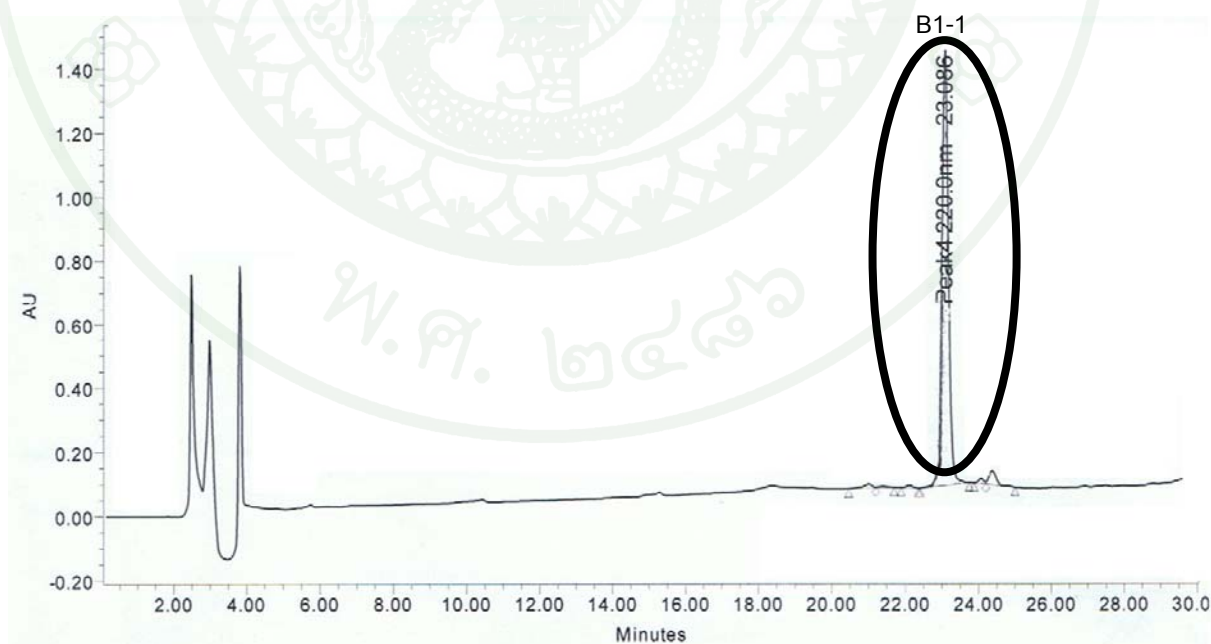
จากการทดลองเมื่อฉีดสารที่สกัดได้ผ่านเข้าไปใน column ที่ต่อกับเครื่อง HPLC พบว่ามี fraction ที่สนใจประมาณ 6 fraction ออกมาที่เวลา ประมาณ 7.713, 11.481, 13.000, 15.000, 22.000 และ 30.221 นาที (ภาพที่ 5) จากนั้นนำ fraction ที่น่าสนใจมาทำการทดสอบกับ *L. innocua* ATCC 33090 พบว่า fraction ที่ 6 คือ ที่เวลาประมาณ 30.221 นาที มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบ *L. innocua* ATCC 33090 ได้ ตามภาพที่ 5

จากการทดลองแยกสารต้านจุลินทรีย์ โดยใช้เทคนิค chromatography พบว่าสารในกลุ่มดังกล่าวเป็นสารประเภทมีขั้วน้อย เนื่องจากช่วงเวลาที่ออกมาอัตราส่วนของ A (acetonitrile ผสมกับ 0.1 % TFA) : B (น้ำผสม 0.1 % TFA) เท่ากับ 63:37 แสดงว่าสารต้านจุลินทรีย์สามารถละลายใน acetonitrile ได้ดีกว่าในน้ำ และพบว่าเมื่อนำสารต้านจุลินทรีย์ B1-1 มาทำการผ่าน column อีกครั้งพบว่าสารออกมาที่ช่วงเวลาประมาณ 22 นาที และค่ากิจกรรมของสารเพิ่มขึ้นเป็น 51,200

AU ml⁻¹ จากเดิม 320 AU ml⁻¹ ตามภาพที่ 6 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Stein *et al.* (2004) ใช้เทคนิค chromatography แยกสารต้านจุลินทรีย์ subtilisin ออกจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* โดยใช้เครื่อง HPLC คู่กับ column C₁₈ reversed-phase และใช้ mobile phase เป็น actetonitrile ผสมกับ TFA พบว่าสารออกมาในช่วงเวลาประมาณ 20 และ 22 นาที



ภาพที่ 5 mass spectrum ของสารต้านจุลินทรีย์ที่ผ่านการดูดซับสารด้วย amberlite ที่ได้จาก *B. subtilis* B-1 และนำมาใช้แยกโดยใช้เทคนิค chromatography

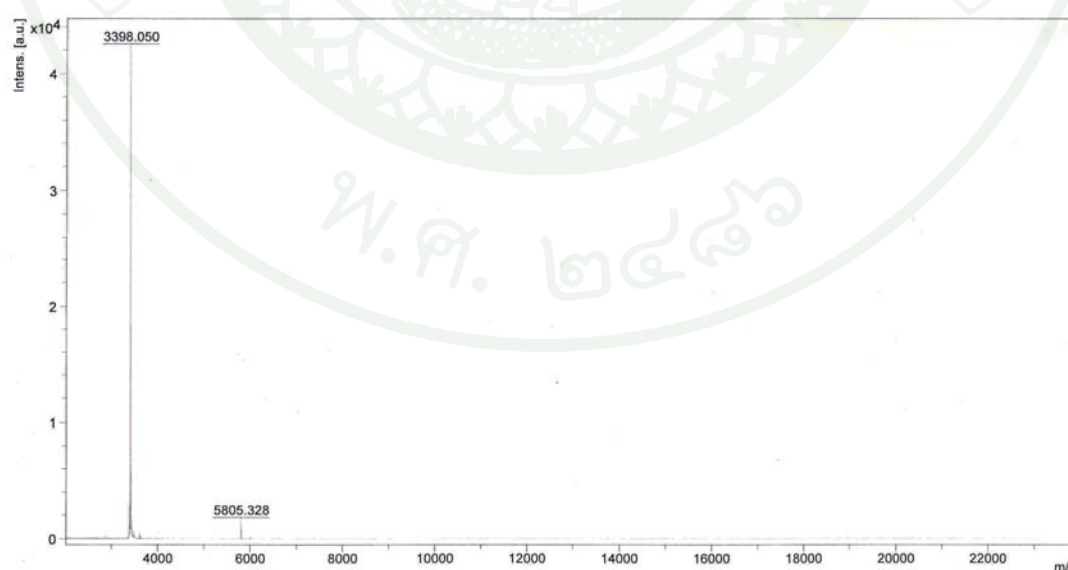


ภาพที่ 6 mass spectrum ของสารต้านจุลินทรีย์ B1-1 และนำมาแยก refraction โดยใช้เทคนิค chromatography

เทคนิค HPLC เป็นการวิเคราะห์สารเชิงคุณภาพ และปริมาณ มีการนำไปใช้วิเคราะห์กลุ่มสารต้านจุลินทรีย์ โดยสามารถตรวจวิเคราะห์ได้แม้มีสารอยู่ในปริมาณที่ต่ำ ๆ ได้ในระดับไมโครกรัม ถึงพิโคกรัม ซึ่งมีหลายการทดลองเกี่ยวกับสารต้านจุลินทรีย์ที่นำเทคนิค HPLC มาใช้ในการเพิ่มความบริสุทธิ์ของสาร เช่น Bechard *et al.* (1998) ใช้เทคนิค HPLC เพื่อแยกสาร lipoprotein ที่ผลิตโดย *B. subtilis* โดยใช้ column C_{18} reversed-phase และ mobile phase เป็น acetonitrile 1% acetic acid และสารดังกล่าวออกมาที่เวลาประมาณ 7.58 นาที Ahern *et al.* (2003) ใช้เทคนิค HPLC เพื่อแยกสาร thuricin 439 จากเชื้อแบคทีเรีย *B. thuringiensis* สายพันธุ์ B 439 โดยใช้ column C_{18} reversed-phase โดยใช้ condition เป็นแบบ gradient และ mobile phase เป็น acetonitrile/น้ำ พบว่าสารดังกล่าวออกมาที่ช่วงเวลา 60 และ 65 นาที Das *et al.* (2008) และ Mukherjee *et al.* (2009) ใช้เทคนิค HPLC และ high performance thin layer chromatography (HPTLC) ในการทำให้สารต้านจุลินทรีย์ กลุ่ม biosurfactants จากเชื้อ *B. circulans* บริสุทธิ์ขึ้นตามลำดับ

5. วิเคราะห์หา mass spectrum และน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนโดยเทคนิค MALDI-TOF

จากผลการทดลองดังภาพที่ 7 เมื่อนำสารต้านจุลินทรีย์ที่ได้จากเครื่อง HPLC มาผ่านเครื่อง MALDI-TOF สำหรับวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของสาร พบไอออนมวลต่อประจุ (m/z) คือ 3,398.050 คาลตัน



ภาพที่ 7 mass spectrum จากเครื่อง MALDI-TOF ของสารต้านจุลินทรีย์ที่ได้จาก *B. subtilis* สายพันธุ์ B-1

ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับ Stein *et al.* (2004) ได้ศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของสารต้านจุลินทรีย์ 2 ชนิด คือ subtilin ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *B. subtilis* ATCC 6633 และ subtilosin A จาก *B. subtilis* สายพันธุ์ 168 โดยเทคนิค mass spectrometry แบบ MALDI-TOF พบว่าสาร subtilin มีน้ำหนักโมเลกุล 3,3319.4 และสาร subtilosin A มีน้ำหนักโมเลกุล 3,419.4 คาลตัน เช่นเดียวกับในการทดลองของ Shelburne *et al.* (2007) ได้ศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของสารต้านจุลินทรีย์ subtilosin A จาก *B. subtilis* ATCC 6633 โดยสารดังกล่าวออกฤทธิ์ยับยั้งทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ โดยใช้เทคนิค mass spectrometry วิธี MALDI-TOF พบว่าสารดังกล่าวมีน้ำหนักโมเลกุล 3,400.7 คาลตัน ซึ่งเมื่อเทียบกับสารต้านจุลินทรีย์ที่ผลิตโดย *B. subtilis* สายพันธุ์ B-1 จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกันกับสาร subtilosin A ที่ผลิตโดย *B. subtilis* ATCC 6633

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับสารต้านจุลินทรีย์ โดยการนำเทคนิค mass spectrometry มาใช้ในการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุล เช่น Ahern *et al.* (2003) ศึกษาเกี่ยวกับน้ำหนักโมเลกุลของสารในกลุ่ม bacteriocin ชื่อ thuricin 439 A และ thuricin 439 B พบว่ามีน้ำหนัก 2,919.9 และ 2,803.8 คาลตัน ตามลำดับ โดยใช้เทคนิค mass spectrophotometry และสารดังกล่าวผลิตจาก *B. thuringiensis* สายพันธุ์ B 439 การทดลองของ Svetoch *et al.* (2005) ศึกษาเกี่ยวกับสารในกลุ่ม bacteriocin จาก *B. circulans* NRRL B-30644 และ *Paenibacillus polymyxa* NRRL B-30507 และ *P. polymyxa* NRRL B-30509 ที่ได้จากสิ่งแวดล้อมและอวัยวะภายในต่าง ๆ ของสัตว์ปีก ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญในไก่ *Campylobacter jejuni* จากนั้นวิเคราะห์ศึกษาเกี่ยวกับน้ำหนักโมเลกุลของสารด้วยเทคนิค mass spectrometry วิธี MALDI-TOF พบว่า *B. circulans* NRRLB-30644 ผลิตสาร SRCAM 37 ขนาด 3,214 คาลตัน *P. polymyxa* NRRLB-30507 ผลิตสาร SRCAM 602 ขนาด 3,864 คาลตัน และ *P. polymyxa* NRRLB-30509 ผลิตสาร SRCAM 1580 ขนาด 3,486 คาลตัน ตามลำดับ

Kamoun *et al.* (2005) ได้ศึกษาสาร bacteriocin ชื่อ bacthurin F 4 ที่ได้จากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* สายพันธุ์ BUPM 4 ที่คัดแยกได้จาก Tunisia soil litter โดยใช้เทคนิค mass spectrometry วิธี MALDI-TOF เพื่อทำการหาน้ำหนักโมเลกุล พบว่าสารมีน้ำหนัก 3,160.05 คาลตัน Wu *et al.* (2005) ได้ศึกษาเกี่ยวกับสารต้านจุลินทรีย์ที่ได้จาก *B. subtilis* JM 4 แยกได้จากตัวอย่างดินในกรุงปักกิ่ง ประเทศจีน ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Micrococcus flavus* NCIB 8166 พบสารต้านจุลินทรีย์ 2 ชนิด คือ subpeptin JM4-A ขนาด 1,422.71 คาลตัน และ subpeptin JM4-B มีน้ำหนักโมเลกุลขนาด 1,422.65 คาลตัน และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค

mass spectrometry วิธี MALDI-TOF คล้ายกับงานทดลองของ Gray *et al.* (2006) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับสารต้านจุลินทรีย์กลุ่ม bacteriocin ที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย *B. thuringiensis* NEB 17 โดยศึกษาสาร thuricin 17 พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 3,061 ดาลตัน ด้วยวิธี MALDI-TOF สอดคล้องกับ Sirtori *et al.* (2006) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับสาร antimicrobial peptide กลุ่ม bacteriocin ซึ่งผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. P 45 ที่ได้จาก Amazon basin fish (*Piaractus mesopotamicus*) ด้วยวิธี MALDI-TOF ในการคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุล พบว่ามีน้ำหนัก 1,450 ดาลตัน

สอดคล้องกับการทดลองของ Motta *et al.* (2007) ที่ใช้เทคนิคเดียวกันนี้ ในการวิเคราะห์สารต้านจุลินทรีย์จากเชื้อ *Bacillus* sp. P34 ที่ได้จาก Amazon basin และมีความสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *L. monocytogenes* พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลขนาด 1,456 ดาลตัน Dischinger *et al.* (2009) ศึกษาเกี่ยวกับน้ำหนักโมเลกุลของสารต้านจุลินทรีย์ในกลุ่ม lantiotic ชื่อ lichenicidin จากเชื้อ *B. licheniformis* DSM13 ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวก โดยใช้วิธี MALDI-TOF พบ lic α และ lic β มีน้ำหนักโมเลกุล 3,020.6 และ 3,250.6 ดาลตัน

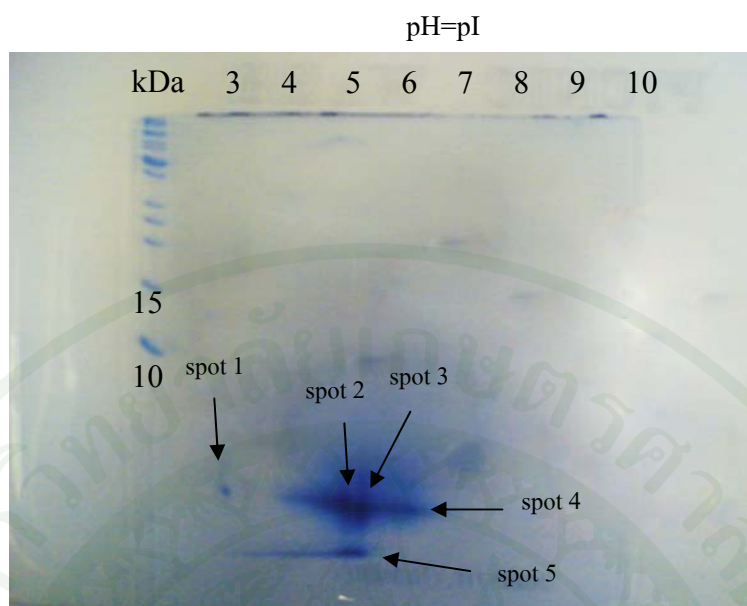
นอกจากวิธี MALDI-TOF แล้วยังมีวิธีการอื่นที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์สารต้านจุลินทรีย์ เช่น Teo and Tan (2005) ได้ทำการแยกสารต้านจุลินทรีย์จากแบคทีเรีย *B. subtilis* PB 6 ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Clostridium perfringens* ATCC 13124 จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาน้ำหนักของสารโดยใช้เทคนิค mass spectrometry โดยวิธี electrospray ionization พบว่ามีขนาดอยู่ในช่วง 960-983 ดาลตัน เช่นเดียวกับการทดลองของ Aunpad and Na-Bangchang (2007) ได้ศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรีย *B. pumilus* สายพันธุ์ WAPB 4 ซึ่งผลิตสาร pumilicin 4 มีฤทธิ์เป็น anti-MRSA และ anti-VRE (vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*) จากนั้นทำการศึกษาเกี่ยวกับน้ำหนักโมเลกุลของสารดังกล่าวพบว่ามีขนาด 1,994.62 ดาลตัน ด้วยเทคนิค mass spectrometry วิธี LC-MS/MS

ปัจจุบันเทคนิค mass spectrometry เป็นที่นิยมนำมาใช้ในการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของสารต้านจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นการวิเคราะห์โดยอาศัยการแตกตัวของโมเลกุล เมื่อถูกอิเล็กตรอนจากแหล่งพลังงานพุ่งชนทำให้แตกเป็นไอออน แล้วแยกไอออนและส่วนแยกย่อย ออกตามค่ามวลต่อประจุ จึงมีความแม่นยำสูง อีกทั้งยังใช้ปริมาณสารตัวอย่างในการวิเคราะห์น้อย และรวดเร็ว (Zendo *et al.*, 2008) การเกิดไอออนในเซชันหรือการทำให้ได้ประจุบวกมีหลายวิธี ได้แก่ electron impact (EI), chemical ionization (CI), electrospray (ESI), fast atom bombardment (FAB) และ matrix

assisted laser desorption (MALDI) เป็นต้น แต่วิธี MALDI เหมาะสมกับสารในกลุ่ม peptide โปรตีน และ nucleotide ที่มีขนาดตั้งแต่หลักพันถึงหลักแสนดาลตัน

6. ศึกษาค่า isoelectric point ขององค์ประกอบของสารต้านจุลินทรีย์โดยใช้เทคนิค two dimensional gel electrophoresis

เมื่อนำสารต้านจุลินทรีย์ที่ได้จากขั้นตอนที่ 4 มาแยกด้วยด้วยเทคนิค 2 D PAGE พบจุดโปรตีนทั้ง 5 จุดด้วยกัน ได้แก่ spot 1, spot 2, spot 3, spot 4 และ spot 5 ซึ่งมีค่า pI เท่ากับ 3, 5, 5.5, 6 และ 5 โดยตำแหน่งปรากฏใกล้เคียงกับน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 4 กิโลดาลตันตามภาพที่ 8 และเมื่อพิจารณาตามหลักของค่า pI พบว่า spot 1 น่าจะมีส่วนประกอบของกรดอะมิโน asparatic acid หรือ glutamic acid เป็นองค์ประกอบในส่วน side chain, spot 2 น่าจะมีส่วนประกอบของกรดอะมิโน cysteine เป็นองค์ประกอบในส่วน side chain spot 3 น่าจะมีส่วนประกอบของกรดอะมิโน glycine, isoleucine หรือ leucine เป็นองค์ประกอบในส่วน side chain, spot 4 น่าจะมีส่วนประกอบของกรดอะมิโน proline เป็นองค์ประกอบในส่วน side chain และ spot 5 น่าจะมีส่วนประกอบของกรดอะมิโน cysteine เป็นองค์ประกอบในส่วน side chain คล้ายกับ spot 2 จากผลการทดลองค่า pI ของกรดอะมิโนแต่ละชนิดแบ่งตามความแตกต่างของโซ่กิ่ง (branced chain) สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 กรดอะมิโนที่เป็นกลาง จะมีโซ่กิ่งเป็น hydrocarbon (aliphatic หรือ aromatic), กลุ่มที่ 2 กรดอะมิโนที่เป็นกรด มีโซ่กิ่งเป็นหมู่ carboxylic group (-COOH) และกลุ่มสุดท้าย กรดอะมิโนที่เป็นเบส มีโซ่กิ่งเป็นหมู่อะมิโน (-NHR)



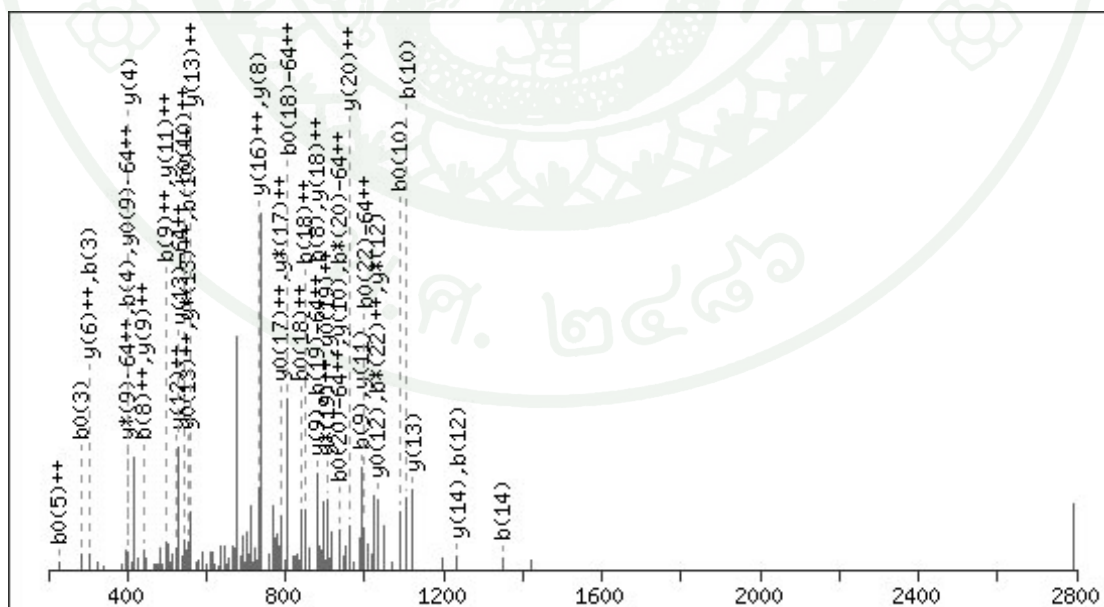
ภาพที่ 8 จุดโปรตีน spot 1, spot 2, spot 3, spot 4 และ spot 5 ซึ่งมีค่า pI เท่ากับ 3, 5, 5.5, 6 และ 5 ตามลำดับ ที่ได้จากการแยกด้วยเทคนิค 2D-PAGE ในช่วง pI 3 ถึง 10

ค่า isoelectric point เป็นค่าเฉพาะตัวของกรดอะมิโนแต่ละชนิด และเป็นค่า pH ของสารละลายกรดอะมิโนที่มีประจุสุทธิเป็นศูนย์ และกรดอะมิโนจะไม่มีการวิ่งไปที่ขั้วไฟฟ้าใด ซึ่งมีค่า pI ของกรดอะมิโนแต่ละชนิดเป็นดังนี้ คือ alanine (Ala, A) มีค่า pI เท่ากับ 6.0, asparagine (Asn, N) มีค่า pI เท่ากับ 5.4, cysteine (Cys, C) มีค่า pI เท่ากับ 5.0, glutamine (Gln, Q) มีค่า pI เท่ากับ 5.7, glycine (Gly, G) มีค่า pI เท่ากับ 6.0, isoleucine (Ile, I) มีค่า pI เท่ากับ 6.0, leucine (Leu, L) มีค่า pI เท่ากับ 6.0, methionine (Met, M) มีค่า pI เท่ากับ 5.7, phenylalanine (Phe, F) มีค่า pI เท่ากับ 5.9, proline (Pro, P) มีค่า pI เท่ากับ 6.3, serine (Ser, S) มีค่า pI เท่ากับ 105, threonine (Thr, T) มีค่า pI เท่ากับ 5.6, tryptophan (Trp, W) มีค่า pI เท่ากับ 5.9, tyrosine (Tyr, Y) มีค่า pI เท่ากับ 5.7, valine (Val, V) มีค่า pI เท่ากับ 6.0, aspartic acid (Asp, D) มีค่า pI เท่ากับ 3.0, glutamic acid (Glu, E) มีค่า pI เท่ากับ 3.2, arginine (Arg, R) มีค่า pI เท่ากับ 10.8, histidine (His, H) มีค่า pI เท่ากับ 7.6, lysine (Lys, K) มีค่า pI เท่ากับ 9.7 ด้วยเหตุนี้จึงใช้วิธีการวิเคราะห์หาชนิดของกรดอะมิโนโดยเทคนิคนี้ ร่วมกับการแยกด้วยไฟฟ้า (electrophoresis) ที่เรียกว่า two dimensional gel electrophoresis มีหลายงานทดลองที่นำเทคนิคดังกล่าวมาใช้ เช่น งานทดลองของ Zheng and Slavik (1999) วิเคราะห์หาค่า pI ของสาร bacteriocin จากเชื้อ *B. subtilis* พบว่ามีค่าประมาณ 4.7 Moyne *et al.* (2001) วิเคราะห์หาค่า pI ของสาร bacillomycin D จาก *B. subtilis* AU 195 พบว่ามีค่าประมาณ 4.5 Svetoch *et al.*

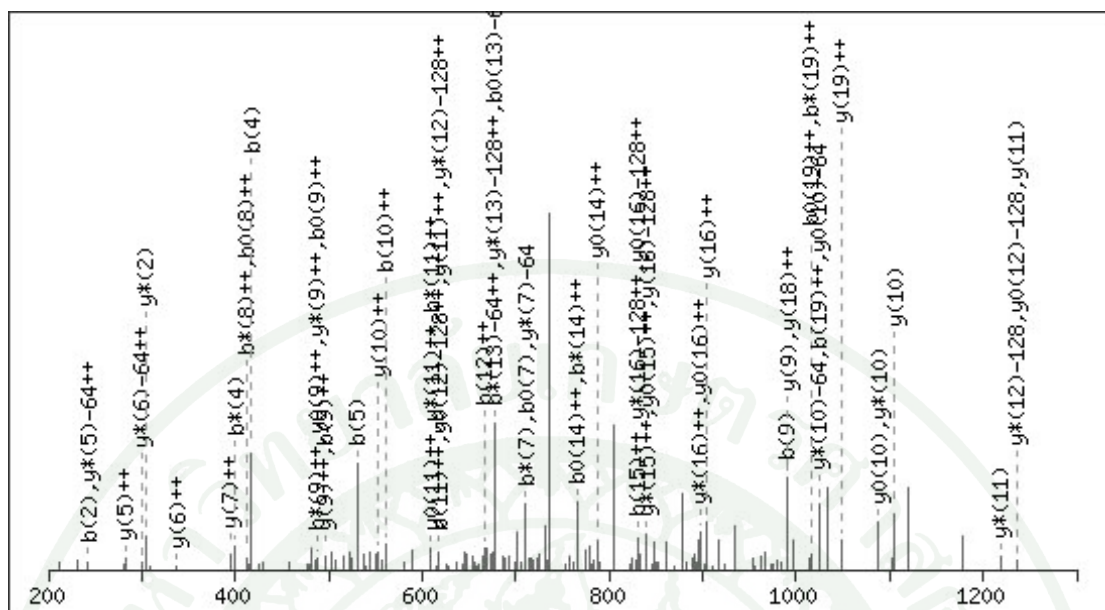
(2004) ใช้เทคนิคดังกล่าวในการหาค่า pI ของสาร bacteriocin จาก *B. circulans* และ *P. polymyxa* พบว่ามีค่า 4.8 และ 7.2 ตามลำดับ Riazi *et al.* (2009) วิเคราะห์หาค่า pI ของ lactosporin จาก *B. coagulans* ATCC 7050 พบว่ามีค่าระหว่าง 3.5-4.0 Li *et al.* (2009) วิเคราะห์หาค่า pI ของ antifungal protein จาก *B. subtilis* สายพันธุ์ B 29 พบว่ามีค่าเท่ากับ 5.9 โดยใช้วิธี isoelectric focusing

7. วิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนโดยเทคนิค LC-MS/MS และเปรียบเทียบชนิดโปรตีนโดยใช้ฐานข้อมูลโปรตีน

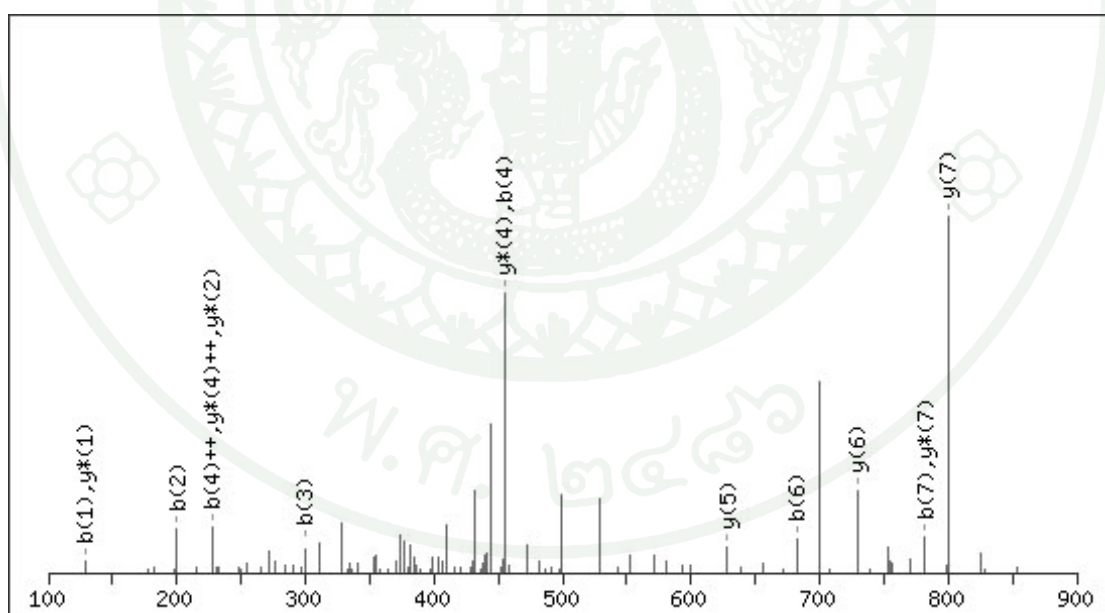
เมื่อส่งตัวอย่างโปรตีนที่ได้จาก 2D-PAGE ในแถบโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลประมาณเท่ากับ 4 กิโลดาลตัน เพื่อวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนด้วยเทคนิค LC-MS/MS ได้ mass spectrum ของโปรตีน spot 1 ดังภาพที่ 9 ซึ่งได้เป็นลำดับกรดอะมิโนดังนี้ AETVAYEDLLAGGGMAGA KEAGK, spot 2 ดังภาพที่ 10 ซึ่งได้เป็นลำดับกรดอะมิโนดังนี้ QISSITPDME ITTILKGGM, spot 3 ดังภาพที่ 11 ได้เป็นลำดับกรดอะมิโนดังนี้ QAVRNIVK, spot 4 ดังภาพที่ 12 ได้เป็นลำดับกรดอะมิโนดังนี้ AETVAYEDLLAGGGMAGAKEAGK, spot 5 ดังภาพที่ 12 ได้เป็นลำดับกรดอะมิโนดังนี้ GTVCSPFALFAVLENTGEKLIK และสรุปได้ดังตารางที่ 9



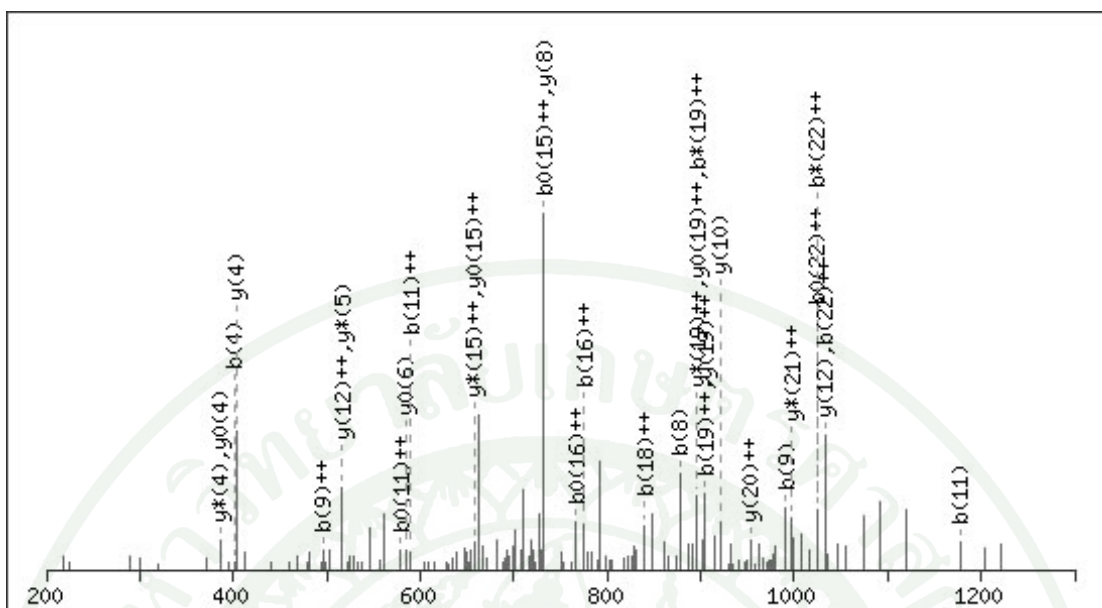
ภาพที่ 9 mass spectrum ของแถบโปรตีน spot 1 จาก 2D-PAGE ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยเทคนิค LC-MS/MS



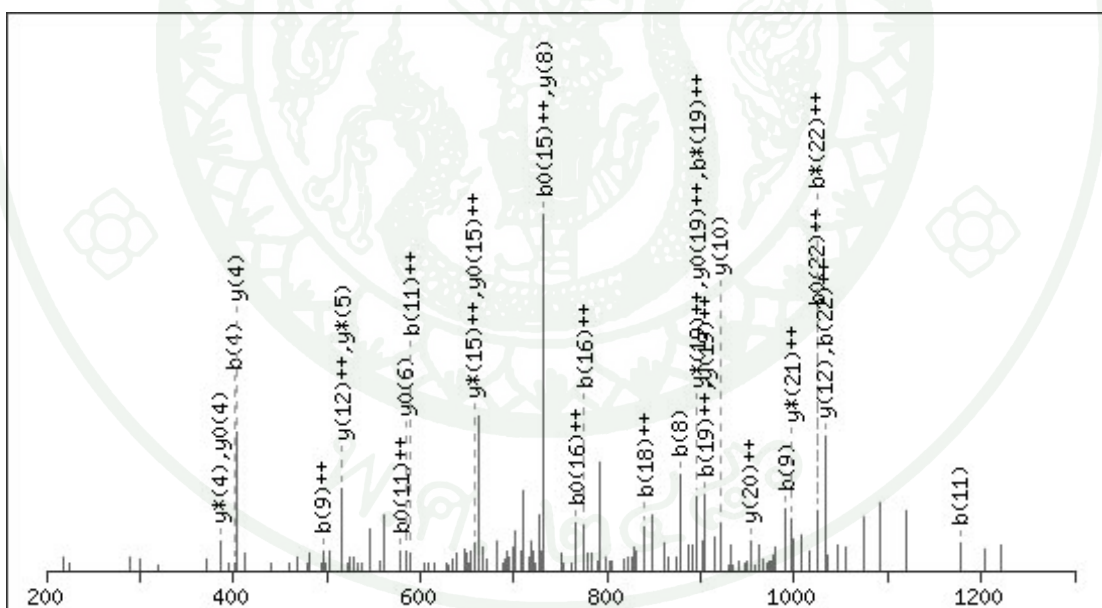
ภาพที่ 10 mass spectrum ของแถบโปรตีน spot 2 จาก 2D-PAGE ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยเทคนิค LC-MS/MS



ภาพที่ 11 mass spectrum ของแถบโปรตีน spot 3 จาก 2D-PAGE ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยเทคนิค LC-MS/MS



ภาพที่ 12 mass spectrum ของแถบโปรตีน spot 4 จาก 2D-PAGE ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยเทคนิค LC-MS/MS



ภาพที่ 13 mass spectrum ของแถบโปรตีน spot 5 จาก 2D-PAGE ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยเทคนิค LC-MS/MS

จากการวิเคราะห์ชนิดของโปรตีน โดยใช้เครื่อง LC-MS/MS ได้ผลลัพธ์ออกมาเป็น peptide mass fingerprint (PMF) และนำผลที่ได้ไปค้นหาในฐานข้อมูลของ MSDB โดยโปรแกรม MASCOT พบว่า โปรตีนที่ค้นหาทั้งหมดนั้นมีค่า MOWSE score ไม่ถึง 65 ซึ่งยังไม่สามารถจำแนก

ได้ชัดเจนว่าเป็นโปรตีนชนิดใดในฐานข้อมูล และชนิดของข้อมูลที่ได้นั้นมี 2 ชุด ที่เกี่ยวข้องกับสารต้านจุลินทรีย์ คือ กลุ่มสาร mycosubtilin และ lipopeptide แต่ค่า MOWSE score ของสารทั้ง 2 ชนิดยังต่ำกว่า 65 และเมื่อทำการคัดเลือก m/z peak ของ PMF ที่มี intensity สูงสุดมาแตกเป็นอนุพันธ์พบว่าค่า MOWSE score ไม่ถึง 65 รวมทั้งค่า pI น้ำหนักโมเลกุล และวิธีการดังกล่าวจะสามารถนำมาใช้ได้ก็ต่อเมื่อมีฐานข้อมูลที่เพียงพอ ดังตารางที่ 9

เทคนิค mass spectrometry จึงถูกนำมาใช้ในการหาลำดับกรดอะมิโนของสารในกลุ่มโปรตีน เช่น สารต้านจุลินทรีย์ ร่วมกับวิธีการ hydrolysis polypeptide บางส่วน และเทียบข้อมูลที่ได้ออกมาฐานข้อมูล และพบว่าวิธีดังกล่าวให้ประสิทธิภาพสูงและรวดเร็ว โดย Leenders *et al.* (1999) ได้ทดลองนำเทคนิค MALDI-TOF/MS เข้ามาหาสาร secondary metabolite จำพวกโปรตีน ที่ผลิตโดย *B. subtilis* ทั้งหมด 6 สายพันธุ์ โดยสารที่หาแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกเป็นกลุ่มของสารประเภท small hydrophilic และ antifungal peptides เช่น bacilysin และ rhizocticins กลุ่มที่ 2 สารประเภท amphiphilic, lipoprotide, antibiotics antifungal เช่น surfactin, fengycin, iturin family (iturin, mycosubtilin และ bacillomycin) และกลุ่มสุดท้ายเป็นสารพวก antibacterial และ polypeptide antibiotic เช่น lantibiotic group (subtilin) และ subtilosin เช่นเดียวกับ Marx *et al.* (2001) ใช้เทคนิค MALDI-TOFMS ในการศึกษาโครงสร้างของสาร subtilosin A ที่ผลิตโดยแบคทีเรีย *B. subtilis* พบว่าสาร subtilosin A เป็นพวก macrocyclic peptide ซึ่งประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 35 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุล 3,399.7 ดาลตัน และทำการหาโครงสร้างของสารดังกล่าวร่วมด้วยโดยใช้เทคนิค H-NMR Gray *et al.* (2006) ศึกษาวิเคราะห์ proteomic ของสาร bacteriocin ชื่อ thuricin ที่ผลิตโดย *Bacillus thuringiensis* NEB 17 โดยใช้เทคนิค MALDI-QTOF MS/MS ร่วมกับวิธี Edman degradation พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนด้านปลาย N-terminal เป็น DWTXWSXL เช่นเดียวกับ Li *et al.* (2009) วิเคราะห์สาร antifungal protein B 29 I โดยใช้เครื่อง ESI-QUADRUPOLE-OA-TOF และเปรียบเทียบข้อมูลของ PMF ที่ได้จากฐานข้อมูล MASCOT ได้ลำดับกรดอะมิโนเป็น 3 กลุ่ม คือ KTHVLEDEFK, KGYQTGDFGAYLH และ RTYEVAEE SPVLGL

ตารางที่ 9 แสดงค่าที่ค้นหาโดย Peptide Mass Fingerprint (PMF) จาก spot ทั้ง 5 จุด

เลขที่จุด โปรตีน	accession no.	ค่าการค้นหาโดย PeptideMass Fingerprint (PMF)		
		MOWSE score	Protein match	Peptide
1	gi 16081144	36	GTP-dependent nucleic acid-binding protein EngD	AETVAYEDLLAGGGMAGAKEAGK
	gi 16078647	33	Putative dihydroxyacetone /glyceraldehyde kinase	GDFMGILNGTIIGTSENQLSAAK
2	gi 1075928	42	Transcription activator bmrR	QISSITPDMEITTILKGGMR
	gi 16080196	33	C-S lyase	LSDPSVTILFILCNPHNPSGR
3	gi 16081144	52	GTP-dependent nucleic acid-binding protein EngD	AETVAYEDLLAGGGMAGAKEAGK
	gi 75489094	32	Mycosubtilin synthetase subunit A	QAVRNIVK
4	gi 16081144	59	GTP-dependent nucleic acid-binding protein EngD	AETVAYEDLLAGGGMAGAKEAGK
	gi 1381682	44	Orf1	ASEELKTTFIAGGPSMDVVEK
5	gi 16081144	27	lipoprotein for biofilm formation	GTVCSPFALFAVLENTGECLK
	gi 16081144	52	GTP-dependent nucleic acid-binding protein EngD	AETVAYEDLLAGGGMAGAKEAGK

Kim *et al.* (2009) ศึกษาสาร surfactin ที่ผลิตโดย *B. polyfermenticus* KJS-2 โดยใช้เครื่อง ESI Q-TOF MS เพื่อหาลำดับอะมิโนของสาร พบว่าประกอบด้วย Gln-Leu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของ lipopeptide ที่ชื่อ surfactin นอกจากนี้เทคนิค mass spectrometry ถูกนำมาพัฒนาใช้ในวิเคราะห์สาร bacteriocin หรือ lantibiotic ที่ผลิตโดยแบคทีเรีย อย่างหลากหลายรูปแบบ เช่น ใช้ whole-cell ของแบคทีเรีย ดังในการทดลองของ Stein (2008) และในการทดลองของ Zendo *et al.* (2008) ใช้ supernatant จากแบคทีเรีย

นอกจากนี้วิธี Edman degradation มีการนำมาใช้สำหรับหาลำดับกรดอะมิโนของสารต้านจุลินทรีย์เช่นกัน โดยทดลองของ Pattnaik *et al.* (2001) นำมาใช้หาลำดับกรดอะมิโนของสาร lichenin ที่ผลิตโดย *B. licheniformis* พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนเป็น ISLEICXIFHDN Ahern *et al.* (2003) ศึกษาสาร thuricin 439 A และ B ที่ผลิตโดย *B. thuringiensis* พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนเป็น GWVAXVGAXGTVVLASGGVV เช่นเดียวกับ Kamoun *et al.* (2005) ศึกษาสาร bacthuricin จาก *B. thuringiensis* พบว่ามีลำดับอะมิโนเป็น DWTXWSXL การทดลองของ Oscariz *et al.* (2006) ศึกษาสาร cerein 7 จาก *B. cereus* Bc 7 พบลำดับกรดอะมิโนดังนี้ N-Gly-Trp-Gly-Asp-Val-Leu (7 A) และ N-Gly-Trp-Trp-Asn-Ser-Trp-Gly-Lys (7 B)

ปัจจุบันการศึกษาเกี่ยวกับโปรตีนกลุ่มสารต้านจุลินทรีย์มีการนำเทคนิคอื่นเข้ามาใช้ร่วมเพื่อศึกษาถึงโครงสร้างของสาร เช่น nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) เป็นการศึกษาโครงสร้างโปรตีนโดยอาศัยสเปกตรัม (สมปอง, 2550)

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ B-1 โดยการศึกษาจากลำดับเบสของ 16S rDNA พบว่าเป็นเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ B-1
2. การทดสอบประสิทธิภาพของสารต้านจุลินทรีย์จากเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ B-1 ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสัตว์น้ำ และเชื้ออื่น ๆ พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในสัตว์น้ำได้ และเชื้ออื่น ๆ ยกเว้น *E. coli*
3. การศึกษาคุณสมบัติของสารต้านจุลินทรีย์ที่สร้างจากเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ B-1 พบว่าสามารถทนความร้อน ทน pH ทนเกลือ เหมาะสำหรั้นำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมได้
4. การทำให้สารต้านจุลินทรีย์ให้เป็นสารบริสุทธิ์ และการศึกษาคุณสมบัติทางเคมี เช่น น้ำหนักโมเลกุล ลำดับกรดอะมิโน พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 3,398 ดาลตัน และมีลำดับกรดอะมิโนใกล้เคียงกับ mycosubtilin และ lipopeptide เมื่อเทียบฐานข้อมูลจาก Mascot search results

ข้อเสนอแนะ

ควรมีการนำสารต้านจุลินทรีย์แบบ partial purification ผสมกับอาหารสำเร็จรูป และนำไปประยุกต์ใช้ในสัตว์น้ำ โดยเฉพาะในการเพาะเลี้ยงปลานิล พร้อมทั้งศึกษาเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกัน การเจริญเติบโต รวมทั้งผลที่มีต่ออัตราการรอดตายและของสัตว์น้ำด้วย ค่าใช้จ่ายสำหรับการทำอาหารที่ผสมด้วยสารต้านจุลินทรีย์ จะเริ่มต้นที่ประมาณ 50 บาท/ 1 ลิตร

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กมลชัย ตรงวานิชนาม. 2547. การใช้ยาด้านจุลชีพในสัตว์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

ชุติมา ศรีวิบูลย์. 2546. การวิเคราะห์โดยเครื่องมือ chromatography Analysis by chromatographic instruments CM 437. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง, กรุงเทพฯ.

เทพิน เดชนันทรัตน. 2546. การตัดแยกแอดดีโนมัยส์ที่สร้างสารต่อต้านเชื้อรา และศึกษาความสัมพันธ์ ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) และ Ribotyping. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นิพนธ์ ดังคนานุรักษ์ และ คณิดา ดังคนานุรักษ์. 2547. สเปกโทรสโกปีด้านการวิเคราะห์ (Analytical spectroscopy). สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ปราการ กระฉินทอง. 2547. การศึกษาแอดดีโนมัยส์ที่สร้างเอนไซม์ตัดจำเพาะและจัดจำแนกโดยวิธีหาลำดับเบสของยีน 16S rDNA. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พรทิพา นวกิจกุล. 2536. แบคทีเรียวิทยาทางสัตวแพทย์: แบคทีเรียชนิดแกรมบวก. ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

เพ็ญแข วันไชยชนวงศ์. 2541. เทคโนโลยีการแยกผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์. คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

มาลิน จุลศิริ. 2540. ยาด้านจุลชีพ ความรู้พื้นฐานและการประยุกต์. โรงพิมพ์สถาบันพัฒนาการสาธารณสุขอาเซียน, กรุงเทพฯ.

มาลินี ลิ้มโกคา. 2525. ยาต้านจุลชีพในสัตว์ (ยาปฏิชีวนะ, ยาซัลฟาและสารปฏิชีวนะ). โรงพิมพ์
จัดสนิทวงศ์, กรุงเทพฯ.

แม่น อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม. 2539. หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ. โรง
พิมพ์ชวนพิมพ์, กรุงเทพฯ.

เย็นหทัย เน้นหนา. 2549. สเปกโทรสโกปี สำหรับเคมีอินทรีย์. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์
มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

รัชณี ตันตะพานิชกุล. 2550. ปฏิบัติการเคมีอินทรีย์ 3. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยรามคำแหง, กรุงเทพฯ.

วิจารณ์ พานิช. 2535. ปฏิบัติการลูกโซ่โพลีเมอร์. สงขลานครินทร์เวชสาร 8: 395-414.

สมเดช กนกเมธากุล. 2547. สเปกโทรสโกปีในการพิสูจน์โครงสร้างของสารอินทรีย์. ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

สมปอง ธรรมศิริรักษ์. 2550. โครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีน. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

สายสมร ถ้ายอง. 2524. สารปฏิชีวนะและปฏิกิริยาการต่อต้านจุลินทรีย์. คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

สุชาดา คูชัยสิทธิ์. 2535. การผลิตสารปฏิชีวนะจากเชื้อ *Bacillus subtilis*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุนันท์ รังษิกาญจน์ส่อง. 2534. คู่มือหลักสูตรเข้มข้นการวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง High
performance liquid chromatography. ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

สุปราณี พึ่งแพง. 2550. ผลของแบคทีเรียที่แยกได้จากบ่อเลี้ยงปลาต่อการยับยั้งเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ที่ก่อโรคในปลานิล (*Oreochromis niloticus*). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุปราณี พึ่งแพง กังสดาลย์ บุญปราบ สุริยัน รัชฎกิจจานุกิจ นนทวิทย์ อาริย์ชน และ ประพันธ์ศักดิ์ ศิริษะภูมิ. 2550. การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากบ่อเลี้ยงปลาในการยับยั้งเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ที่ก่อโรคในปลานิล (*Oreochromis niloticus*). ว. วิทย. กษ. 38: 571-580.

อภิญา ผลิตโกมล. 2525. แบคทีเรีย. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

อรอนงค์ พริ้งสุลกะ. 2550. แบคทีริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติก. วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. 23(2) : 145-160.

อากัสสรา ชมิดท์. 2537. เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis technique). พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์ริ้วเขียว.

Abdel-Mohsein, H.S., T. Sasaki, C. Tada and Y. Nakai. 2011. Characterization and partial purification of a bacteriocin-like substance produced by thermophilic *Bacillus licheniformis* H 1 isolated from cow manure compost. **Anim. Sci. J.** 82: 340-351.

Abriouel, H., C.M.A.P. Franz, N.B. Omar and A. Gálvez. 2010. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. **FEMS Microbiol. Rev.** 35: 201-235.

Ahern, M., S. Verchueren and D. van Sinderen. 2003. Isolation and characterization of a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* strain B 439. **FEMS Microbiol. Lett.** 220: 127-131.

- Atsushi, U., H. Nagai, M. Ishida, Y. Nagashima and K. Shiomi. 2008. Purification and molecular cloning of SE-cephalotoxin, a novel proteinaceous toxin from the posterior salivary gland of cuttlefish *Sepia esculenta*. **Toxicon** 52: 574-581.
- Aunpad R. and K. Na-Bangchang. 2007. Pumilicin 4, a novel bacteriocin with anti-MRSA and anti-VRE activity produced by newly isolated bacteria *Bacillus pumilus* strain WAPB4. **Curr. Microbiol.** 55(4) : 308-313.
- Baylis, H.A. and M.J. Bibb. 1988. Organization of the ribosomal RNA genes in *Streptomyces coelicolor* A 3(2). **Mol. Gen. Genet.** 211: 191-196.
- Bechard, J., K.C. Eastwell, P.L. Sholberg, G. Mazza and B. Skura. 1998. Isolation and partial chemical characterization of an antimicrobial peptide produced by a strain of *Bacillus subtilis*. **J. Agric. Food Chem.** 46: 5355-5361.
- Berdy, J. 1974. Recent development of antibiotic research and classification of antibiotic according to chemical structure. **Adv. Appl. Microbiol.** 18: 309-406.
- _____. 1989. The discovery of new bioactive microbial metabolite: Screening and identification, pp. 3-25. In M.E. Bushell and U. Grafe, eds. **Bioactive Metabolites from Microorganisms**. Amsterdam Elsevier Science Publishers.
- Besson, F., C. Chevanet and G. Michel. 1987. Influence of the culture media on the production of iturin A by *Bacillus subtilis*. **J. Gen. Microbiol.** 133: 767-772.
- Bizani, D., A.P.M. Dominguez and A. Brandelli. 2005. Purification and partial chemical characterization of the antimicrobial peptide cerein 8A. **Lett. Appl. Microbiol.** 41: 269-273.

- Bott, K.F., G.C. Stewart and A.G. Anderson. 1984. Genetic mapping of cloned ribosomal RNA genes, pp. 19-34. *In* D. Dubnau, ed. **Genetic and Biotechnology of *Bacilli***. Academic Press, New York.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72: 248-254.
- Bronwyn, G.B and J.D. Helmann. 2006. Identification of *Bacillus subtilis* σ^W -dependent genes that provide intrinsic resistance to antimicrobial compounds produced by *Bacilli*. **Mol. Microbiol.** 60(3) : 765-782.
- Cascales E., S.K. Buchanan, D. Duché, C. Kleanthous, R. Llobès, K. Postle, M. Riley, S. Slatin and D. Cavard. 2007. Colicin biology. **Microbiol. Mol. Biol. R.** 71: 158–229.
- Cherif, A., H. Ouzari, D. Daffonchio, H. Cherif, K.B. Slama, A. Hassen, S. Jaouaand and A. Boudabous. 2001. Thuricin 7: a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* BMG17, a new strain isolated from soil. **Lett. Appl. Microbiol.** 32: 243–247.
- Cintas, L.M., J.M. Rodriguez, M.F. Fernandez, K. Nes, I.F. Sletten, P.E. Hernandez and H. Holo. 1995. Isolation and characterization of pediocin L50, a new bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* with a broad inhibitory spectrum. **Appl. Environ. Microbiol.** 61: 2643–2648.
- Cladera-Olivera, F., G.R. Caron and A. Brandelli. 2004. Bacteriocin-like substance production by *Bacillus licheniformis* strain P40. **Lett. Appl. Microbiol.** 38: 251-256.
- Cleveland, J., T.J. Montville, I.F. Nes and M.L. Chikindas. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **Int. J. Food Microbiol.** 71: 1-20.
- Colin, R.H. 1989. ***Bacillus***. Plenum Press, New York.

- Das, P., S. Mukherjee and R. Sen. 2008. Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. **J. Appl. Microbiol.** 104: 1675-1684.
- Davidson, P.M. and D.G. Hoover. 1993. Antimicrobial components from lactic acid bacteria, pp. 127-160. *In* S. Salminen and A. von Wright, eds. **Lactic acid Bacteria**. Marcel Dekker, Inc., New York.
- De Vuyst, L. and E.J. Vandamme. 1994. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria, pp. 91-142. *In* L. De Vuyst and E.J. Vandamme, eds. **Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Applications**. Blackie Academic & Professional, London
- Dischinger, J., M. Josten, C. Szekat, H.G. Sahl and G. Bierbaum. 2009. Production of the novel two-peptide lantibiotic lichenicidin by *Bacillus licheniformis* DSM 13. **Plos one.** 4: 1-11
- Ennahar, S., T. Sashihara, K. Sonomoto and A. Ishizaki. 2000. Class Ila bacteriocin biosynthesis, structure and activity. **FEMS Microbiol. Rev.** 24: 85-106.
- Feingold, J., V. Bellofatto, L. Shapiro and K. Amemiya. 1985. Organization and nucleotide sequence analysis of a rRNA and tRNA gene cluster from *Caulobacter crescentus*. **J. Bacteriol.** 163: 155-166.
- Galvez, A., E. Valdivia, A.G. Segura, M. Lebbadi, M.M. Bueno and M. Maqueda. 1993. Purification, characterization, and lytic activity against *Naegleria fowleri* of two amoebicins produced by *Bacillus licheniformis* A12. **Appl. Environ. Microbiol.** 59: 1480-1486.
- Ghanbari, M., M. Rezaei, M. Soltani and Gh. Shah-Hosseini. 2009. Production of bacteriocin by a novel *Bacillus* sp. strain RF 140, an intestine bacterium of Caspian Frisian roach (*Rutilus frisii kutum*). **IJST** 10(3) : 267-272.

- Gray, E.J., K.D. Lee, A.M. Souleimanov, M.R. Di Falco, X. Zhou, A. Ly, T.C. Charles, B.T. Driscoll and D.L. Smith. 2006. A novel bacteriocin, thuricin 17, produced by plant growth promoting rhizobacteria strain *Bacillus thuringiensis* NEB17: isolation and classification. **J. Appl. Microbiol.** 100: 545-554.
- Heng, N.C.K., P.A. Wescombe, J.P. Burton, R.W. Jack and J.R. Tagg. 2007. The diversity of bacteriocins in gram positive bacteria, pp. 45-92. *In* M.A. Riley and M. Chavan, eds. **Bacteriocins: Ecology and Evolution.** Springer, Berlin.
- Kamoun, F., H. Mejdoub, H. Auissaioui, J. Reinbolt, A. Hammani and S. Jaoua. 2005. Purification, amino acid sequence and characterization of bacthuricin F4, a new bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis*. **J. Appl. Microbiol.** 98: 881-888.
- Katz, E. and A.L. Demain. 1977. The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis, and possible functions. **Bacteriol. Rev.** 41: 449-74.
- Kawasaki, H., Y. Hoshino, A. Hirata and K. Yamasato. 1993. Is intracytoplasmic membrane structure a generic criterion? It does not coincide with phylogenetic interrelationships among photosynthetic purple non-sulfur bacteria. **Arch. Microbiol.** 160: 358-362.
- Kayalvizhi, N. and P. Gunasekaran. 2008. Production and characterization of a low-molecular-weight bacteriocin from *Bacillus licheniformis* MKU 3. **Letf. Appl. Microbiol.** 47: 600-607.
- Kim, E., H. Kim, K.H. Kang, Y.H. Kho and Y.H. Park. 1991. Complete nucleotide sequence of a 16 S ribosomal RNA gene from *Streptomyces griseus* subsp. *griseus*. **Nucleic Acids Res.** 19: 1149.
- Kim, K.M., J.Y. Lee, C.K. Kim and J.S. Kang. 2009. Isolation and characterization of surfactin produced by *Bacillus polyfermenticus* KJS-2. **Arch. Pharm. Res.** 32(5) : 711-715.

Klaenhammer, T.R., C. Fremaux, C. Ahn and K. Milton. 1993. Molecular biology of bacteriocins produced by *Lactobacillus*, pp. 151-180. In D.G. Hoover and L.R. Steenson, eds.

Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Academic Press, Inc. New York.

Kleinkauf, H. and H. von Dohren. 1987. Biosynthesis of peptide antibiotics. **Annu. Rev. Microbiol.** 41: 259-289.

Korenblum, E., I. von der Weid, A.L.S. Santos, A.S. Rosado, G.V. Sebastian, C.M.L.M. Coutinho, F.C.M. Magalhaes, M.M. de Paiva and L. Seldin. 2004. Production of antimicrobial substances by *Bacillus subtilis* LFE-1, *B. firmus* H₂O-1 and *B. licheniformis* T6-5 isolated from an oil reservoir in Brazil. **J. Appl. Microbiol.** 98: 667-675.

Lanfrom, H., A. Sarabhai and J. Abelson. 1978. Cloning of *Benecke* genes in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** 133: 354-363.

Lee, K.H., K.H. Jun, W.S. Kim and H.D. Paik. 2001. Partial characterization of polyfermenticin SCD, a newly identified bacteriocin of *Bacillus polyfermenticus*. **Lett. Appl. Microbiol.** 32: 146-151.

Leenders F., T.H. Stein, B. Kablitz, P. Franke and J. Vater. 1999. Rapid typing of *Bacillus subtilis* strains by their secondary metabolites using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of intact cells. **Rapid Commun. Mass Spectrom.** 13: 943-949

Lehner, A.F., S. Harvey and C.W. Hill. 1984. Mapping and spacer identification of rRNA operons of *Salmonella typhimurium*. **J. Bacteriol.** 160: 682-686.

Lewin, B. 2000. **GeneVII.** Oxford University Press, New York.

- Leenders, F., T.H. Stein, B. Kablitz and J. Vater. 1999. Rapid typing of *Bacillus subtilis* strains by their secondary metabolites using matrix-assisted laser desorption/ ionization mass spectrometry of intact cells. **Rapid Commun. Mass. Spectrom.** 13: 943-949.
- Li, J., Q. Yang, L.H. Zhao, S.M. Zhang, Y.X. Wang and X.Y. Zhao. 2009. Purification and characterization of a novel antifungal protein from *Bacillus subtilis* strain B 29. **J. Zhejiang Univ. Sci. B.** 10(4) : 264-272.
- Lisboa, M.P, D. Bonatto, D. Bizani, J.A.P. Henriques and A. Brandelli. 2006. Characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from the Brazilian Atlantic forest. **Int. Microbiol.** 9:111–116.
- Martirani, L., M. Varcamonti, G. Naclerio and M. de Felice. 2002. Purification and partial characterization of bacillocin 490, a novel bacteriocin produced by a thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*. **Microbial. Cell Factories.** 20: 21-25.
- Marmur, J.A. 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. **J. Mol. Biol.** 3: 208-218.
- Marx, R., T. Stein, K.D. Entian and S.J. Glaser. 2001. Structure of the *Bacillus subtilis* peptide antibiotic subtilisin A determined by H-NMR and matrix assisted laser desorption/ ionization time-of-flight mass spectrometry. **J. Protein Chem.** 20(6) : 501-506.
- Mayr-Harting, A., A.J. Hedges and R.C.W. Berkeley. 1972. Method for studying bacteriocins, vol. 7 A, pp. 315-422. In T. Bergen and J.R. Norris, eds. **Methods in Microbiology.** Academic Press, Inc., London.
- Mendo, S., N.A. Faustino, A.C. Sarmiento, F. Amado and A.J.G. Moir. 2004. Purification and characterization of a new peptide antibiotic produced by a thermotolerant *Bacillus licheniformis* strain. **Biot. Lett.** 26: 115–119.

- Morgan, E.A. 1982. Ribosomal RNA genes in *Escherichia coli*, pp. 1-29. In H. Busch and L. Rothblum, eds. **The Cell Nucleus**, vol. 10. Academic Press, Inc., New York.
- Motta, A.S., D.M. Lorenzini and A. Brandelli. 2007. Purification and partial characterization of an antimicrobial peptide produced by a novel *Bacillus* sp. isolated from the Amazon basin. **Curr. Microbiol.** 54: 282–286.
- Moyne, A.L., R. Shelby, T.E. Cleveland and S. Tuzun. 2001. Bacillomycin D: an iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*. **J. Appl. Microbiol.** 90: 622-629.
- Mukherjee, S., P. Das, C. Sivapathasekaran and R. Sen. 2009. Antimicrobial biosurfactants from marine *Bacillus circulans*: extracellular synthesis and purification. **Lett. Appl. Microbiol.** 48(3) : 281-288.
- Mukhopadhyay, N.K., S. Majumder, S.K. Ghosh and S.K. Bose. 1986. Characteristic of three-fraction mycobacillin synthetase. **J. Biochem.** 235: 639-643.
- Mullis, K. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Sci. Am.** 262: 36–43
- Nicholson, W.L. 2002. Roles of *Bacillus* spores in the environment. **Cell Mol. Life Sci.** 59: 410-416.
- Noller, H.F. 1984. Structure of ribosomal RNA. **Annu. Rev. Biochem.** 53: 119-162.
- Oguntoyinbo, F.A., A.I. Sanni, C.M.A.P. Franz and W.H. Holzapfel. 2007. Phenotypic diversity and technological properties of *Bacillus subtilis* species isolated from okpehe, a traditional fermented condiment. **J. Microbiol. Biot.** 23(3) : 401-410.
- Ohta, N. and A. Newton. 1981. Isolation and mapping of ribosomal RNA genes of *Caulobacter crescentus*. **J. Mol. Biol.** 153: 291-303.

- Oscariz, J.C., L. Cintas, H. Holo, I. Lasa, I.F. Nes and A.G. Pisabarro. 2006. Purification and sequencing of cerein 7B, a novel bacteriocin produced by *Bacillus cereus* Bc7. **FFMS Microbiol. Lett.** 254: 108-115.
- Ouoba, L.I.I., B. Diawara, L. Jespersen and M. Jakobsen. 2006. Antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* during the fermentation of African locust bean (*Parkia biglobosa*) for Soumbala production. **J. Appl. Microbiol.** 102(4) : 963-970.
- Pattnaik, P., J.K. Kaushik, S. Grover and V.K. Batish. 2001. Purification and characterization of a bacteriocin-like compound (Lichenin) produced anaerobically by *Bacillus licheniformis* isolated from water buffalo. **J. Appl. Microbiol.** 91: 636–645.
- Pernodet, J.L., F. Boccard, M.T. Alegre, J. Gagnat and M. Guèrinea. 1989. Organization and nucleotide sequence analysis of a ribosomal RNA gene cluster from *Streptomyces ambofaciens*. **Gene** 79: 33-46.
- Pinchuk, I., V. Pinchuk, P. Bressollier, B. Verneuil, B. Fenet, I.B. Sorokulova, F. Mégraud and M.C. Urdaci. 2001. *In vitro* anti-helicobacter pylori activity of the probiotic strain *Bacillus subtilis* 3 is due to secretion of antibiotics. **Antimicrob. Agents Chemother.** 45: 3156-3161.
- Plohl, M. and V. Gamulin. 1991. Sequence of the 5 S rRNA gene and organization of ribosomal RNA operons in *Streptomyces rimosus*. **FEMS Microbiol. Lett.** 77: 139-144.
- Qi-qin, L., M. Xian-ying, , W. Xue, L. Wei, D. Cheng-jei, F. Jia-xun and T. Ji-liang. 2007. Purification of two antimicrobial substances produced by *Bacillus subtilis* strain B11 and their properties. **Agric. Sci. China.** 5(5) : 363-369.

- Qiu, Y., S. Kathariou and D.M. Lubman. 2006. Proteomic analysis of cold adaptation in a Siberian permafrost bacterium *Exiguobacterium sibiricum* 255-15 by two-dimensional liquid separation coupled with mass spectrometry. **Proteomics** 6: 5221–5233.
- Risoen, P.A., P. Ronning, I.K. Hagne and A.B. Kolsto. 2004. Characterization of a broad range antimicrobial substance produced by *Bacillus cereus*. **J. Appl. Microbiol.** 96: 648–655.
- Sawada, M., A. Muto, M. Iwami, F. Yamao and S. Osawa. 1984. Organization of ribosomal RNA genes in *Mycoplasma capricolum*. **Mol. Gen. Genet.** 196: 311-316.
- Schillinger, U. and F.K. Lucke. 1989. Antimicrobial activity of *Lactobacillus sakei* isolated from meat. **Appl. Environ. Microbiol.** 55: 1901-1908.
- Shelburne, C.E., Y.A. Florence, V. Dholpe, A. Ramamoorthy, D.E. Lopatin and M.S. Lantz. 2007. The spectrum of antimicrobial activity of the bacteriocin subtilisin A. **J. Antimicrob. Chemother.** 59(2) : 297-300.
- Shoji, J. 1978. Recent chemical studies on peptide antibiotic from the genus *Bacillus*. **Adv. Appl. Microbiol.** 24: 187-214.
- Sirtori, L.R, F. Cladera-Olivera, D.M. Lorenzini, S.M. Tsai and A. Brandelli. 2006. Purification and partial characterization of an antimicrobial peptide produced by *Bacillus* sp. strain P45, a bacterium from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 52(6) : 357-363.
- Stackebrandt, D.W., C. Kemmerling, R. Kroppenstedt and W. Liesack. 1991. Designation of Streptomycete 16 S and 23 S rRNA-based target regions for oligonucleotide probes. **Appl. Environment. Microbiol.** 57: 1468-1477.

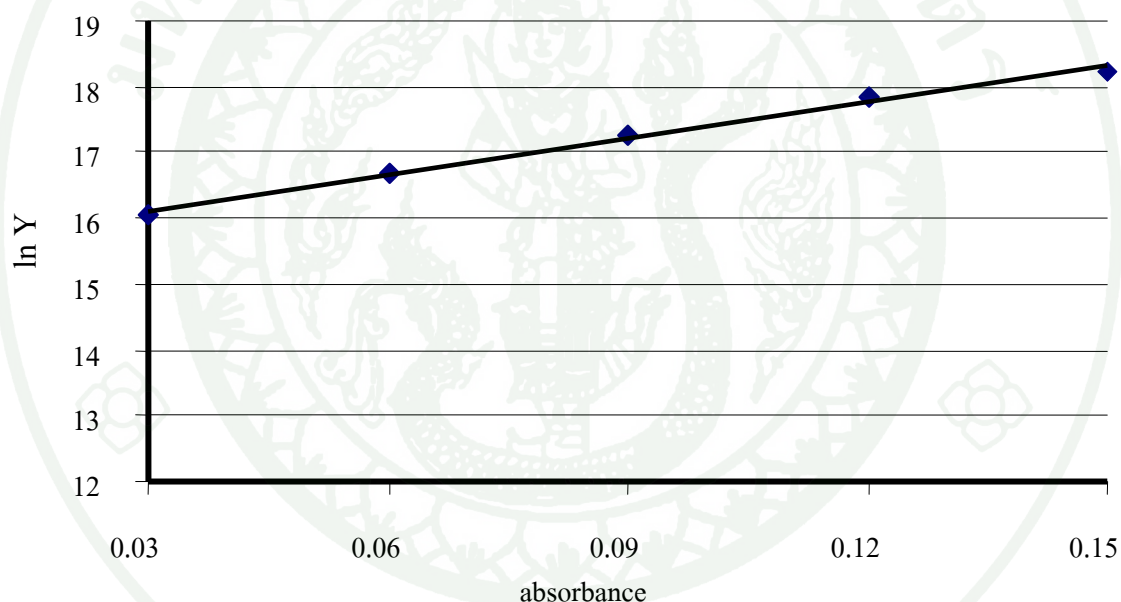
- Stein, T. 2008. Whole-cell matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for rapid identification of bacteriocin/ lantibiotic-producing bacteria. **Rapid Commun. Mass Spectrom.** 22: 1146-1152.
- _____, S. Borchert, B. Conrad, J. Feesche, B. Hofemeister, J. Hofemeister and K.D. Entian. 2002. Two different lantibiotic-like peptides originate from the ericin gene cluster of *Bacillus subtilis* A1/3. **J. Bacteriol.** 184: 1703–1711.
- _____, S. Düsterhus, A. Stroh and K.D. Entian. 2004. Subtilisin production by two *Bacillus subtilis* subspecies and variance of the sbo-alb cluster. **Appl. Environ. Microbiol.** 70(4) : 2349-53.
- Svetoch, E.D., N.J. Stern, B.V. Eruslanov, Y.N. Kovalev, L.I. Volodina, V.V. Perelygin, E.V. Mitsevich, I.P. Mitsevich, V.D. Pokhilenko, V.N. Borzenkov, V.P. Levchuk, O.E. Svetoch and T.Y. Kudriavtseva. 2005. Isolation of *Bacillus circulans* and *Paenibacillus polymyxa* strains inhibitory to *Campylobacter jejuni* and characterization of associated bacteriocins. **J. Food Prot.** 68: 11-17.
- Suzuki, Y., Y. Ono, A. Nagata and T. Yamada. 1988. Molecular cloning and characterization of an rRNA operon in *Streptomyces lividans* TK21. **J. Bacteriol.** 170: 1631-1636
- Teo, A.Y.L and H.M. Tan. 2005. Inhibition of *Clostridium perfringens* by a novel strain of *Bacillus subtilis* isolated from the gastrointestinal tracts of healthy chickens. **Appl. Environ. Microbiol.** 71: 4185-4190.
- Ulbrich, N., I. Kumagai and V.A. Erdmann. 1984. The number of ribosomal RNA genes in *Thermus thermophilus* HB 8. **Nucleic Acid Res.** 12: 2055-2060.
- Verschuere, L., G. Rombaut, P. Sorgeloos and W. Verstraete. 2000. Probiotics bacteria as biological control agents in aquaculture. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 64: 655-671.

- Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution. **Microbiol. Rev.** 51: 221-271.
- Wolin, M.J. 1979. Physical agents, bactericidal substances and chemotherapeutic drugs, pp. 121-156. In B.A. Freeman, ed. **Textbook of Microbiology**, 21st ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia.
- Wu, S., S. Jia, D. Sun, M. Chen, X. Chen, J. Zhong and L. Huan. 2005. Purification and characterization of two novel antimicrobial peptides subpeptin JM4-A and subpeptin JM4-B produced by *Bacillus subtilis* JM 4. **Curr. Microbiol.** 51: 292–296.
- Xie, J, R. Zheng, C. Shang and Y. Guo. 2009. Isolation and characterization of bacteriocin produced by an isolated *Bacillus subtilis* LFB112 that exhibits antimicrobial activity against domestic animal pathogens. **Afr. J. Biol.** 8(20) : 5611-5619.
- Yamada, Y., K. Katsura, H. Kawasaki, Y. Widyastuti, S. Saono, T. Seki, T. Uchimura and K. Komagata. 2000. *Asaia bogorensis* gen. nov., sp. nov., an unusual acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 50: 823-829.
- Yu, P.L., B. Hohn, H. Falk and G. Drews. 1982. Molecular cloning of the ribosomal RNA genes of the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas capsulata*. **Mol. Gen. Genet.** 188: 392-39.
- Zendo, T., J. Nakayama, K. Fujita and K. Sonomoto. 2008. Bacteriocin detection by liquid chromatography/mass spectrometry for rapid identification. **Appl. Microbiol.** 104(2) : 499-507.
- Zheng, G. and M.F. Slavik. 1999. Isolation, partial purification and characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus subtilis* strain. **Lett. Appl. Microbiol.** 28: 363-367.



ตารางผนวกที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (X) กับ ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ B-1

absorbance	จำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร(Y)	ln Y
0.03	9.2×10^6	16.034
0.06	$18. \times 10^7$	16.705
0.09	3.2×10^7	17.281
0.12	5.6×10^7	17.840
0.15	8.2×10^7	18.222



ภาพผนวกที่ 1 standard curve ของความสัมพันธ์ระหว่างค่าความดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และปริมาณเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ B-1

$$\ln(Y) = 18.367X + 15.564$$

Y = จำนวนเซลล์แบคทีเรีย / มิลลิลิตร

X = ค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

r^2 = ค่า Coefficient of Determinative = 0.9912

อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

1. Brain heart infusion (BHI)

Brain heart infusion	37	กรัม
Water	1,000	มิลลิลิตร

2. Plate count agar (PCA)

Tryptone	5	กรัม/ลิตร
Yeast extract	2.5	กรัม/ลิตร
Glucose	1	กรัม/ลิตร
Agar	15	กรัม/ลิตร
Water	1,000	มิลลิลิตร

3. Tryptic soy agar (TSA)

Tryptone	5	กรัม/ลิตร
Peptone	5	กรัม/ลิตร
NaCl	5	กรัม/ลิตร
Agar	15	กรัม/ลิตร
Water	1,000	มิลลิลิตร

4. Tryptic soy broth (TSB)

Tryptone	5	กรัม/ลิตร
Peptone	5	กรัม/ลิตร
NaCl	5	กรัม/ลิตร
Water	1,000	มิลลิลิตร

สารเคมีสำหรับ 2 D PAGE

1. Rehydration solution

Urea	12	กรัม
CHAPS	1	กรัม
DTT	70	มิลลิกรัม
IPG buffer pH 3-10	500	ไมโครลิตร
Bromophenol blue	1%	w/v
Water	25	มิลลิลิตร

2. 1% Bromophenol blue stock solution

Bromophenol blue	100	มิลลิกรัม
Tris-base	60	มิลลิกรัม
Water	10	มิลลิลิตร

3. SDS equilibration buffer

Tris-HCl, pH 8.8	10	มิลลิลิตร
Urea	72.07	กรัม
Glycerol	87%	v/v
SDS	4	กรัม
Bromophenol blue	1%	w/v
Water	200	มิลลิลิตร

4. 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8

Tris-base	181.6	กรัม
Water	1000	มิลลิลิตร

ปรับค่า pH ด้วยกรด 5 M HCl ให้ได้ค่า pH 8.8

5. Acrylamide stock solution (30% T, 2.6% C monomer stock solution)

Acrylamide	60	กรัม
N,N'-methylenebisacrylamide	1.6	กรัม
Water	200	มิลลิลิตร

6. 10% Sodium dodecyl sulfate (SDS)

Sodium dodecyl sulfate (SDS)	5	กรัม
Water	50	มิลลิลิตร

7. 10% Ammonium persulfate (APS)

Ammonium persulfate (APS)	0.1	กรัม
Water	1	มิลลิลิตร

8. SDS electrophoresis buffer

Tris-base	30.3	กรัม
Glycine	144	กรัม
SDS	10	กรัม
Water	10	ลิตร

9. 17.5% Acrylamide gel

Acrylamide stock	4.5	มิลลิลิตร
4 x Tris-HCl, pH 8.8	2.0	มิลลิลิตร
10% APS	26.6	ไมโครลิตร
Water	1.39	มิลลิลิตร
TEMED	6	ไมโครลิตร

10. Gel fixing solution 1

Ethanol	50	มิลลิลิตร
Acetic acid	10	มิลลิลิตร
Water	100	มิลลิลิตร

12. Gel fixing solution 2

Ethanol	90	มิลลิลิตร
Water	300	มิลลิลิตร



ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ นางสาวสุปราณี พึ่งแพง
 เกิดวันที่ 1 กันยายน 2525
 สถานที่เกิด อำเภอหัวหิน จังหวัดประจวบคีรีขันธ์
 ประวัติการศึกษา วท. บ. (ประมง) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
 วท. ม. (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
 ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิจัยศูนย์วิจัยธุรกิจเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ
 ผลงานดีเด่น

1. ปัญหาพิเศษ กุ้งแผ่น รับรางวัลรองชนะเลิศโครงการเกษตรสู่ชาติ งานเกษตรแห่งชาติประจำปี 2547

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ

1. สุปราณี พึ่งแพง, กังสดาลย์ บุญปราบ, สุริยัน ชาญกิจจานุกิจ, นนทวิทย์ อารีชน และประพันธ์ศักดิ์ ศรีษะภูมิ. 2550. การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากบ่อเลี้ยงปลาในการยับยั้งเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ที่ก่อโรคในปลานิล (*Oreochromis niloticus*). ว. วิทย. กษ. 38(6): 571-5
2. สุปราณี พึ่งแพง, ชลอ ลิมสุวรรณ, วัชรียา ภูริวิโรจน์กุล. 2554. การจำแนกสายพันธุ์และศึกษาสมบัติบางประการของสารต้านจุลินทรีย์จากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. B-1 ที่คัดแยกได้จากบ่อเลี้ยงปลา. ว. วิทย. กษ. 42(3): In press.
3. Pungpang, S., C. Limsuwan and P. Wilaipun. 2011. The antimicrobial effects of *Bacillus subtilis* B-1 isolated from fish culture pond. **Asian Fish. Sci.** 24: 343-35

ผลงานนำเสนอในการประชุมวิชาการระดับชาติ และนานาชาติ

1. สุปราณี พึ่งแพง, ชลอ ลิมสุวรรณ และวัชรียา ภูริวิโรจน์กุล. 2554. การวิเคราะห์สารต้านจุลินทรีย์จากเชื้อ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ B-1 ที่คัดแยกได้จากบ่อเลี้ยงปลา, น. 53-54. ใน การประชุมวิชาการประมง ครั้งที่ 6 “เพื่อความมั่นคงด้านการประมงและทรัพยากรทางน้ำ” 1-3 ธันวาคม 2554. มหาวิทยาลัยแม่โจ้, จังหวัดเชียงใหม่.

2. กอบทรัพย์ ผลเจริญ, ชลอ ลิ่มสุวรรณ, นิตี ชูเชิด, วัชรียา ภูริวิโรจน์กุล, พุทธรัตน์ เป้าประเสริฐ, เต็มดวง สมศิริ, จิตติพร หลาวประเสริฐ, สุปราณี พึ่งแพง และเกศินี หลายสุทธิสาร. 2554. ผลของยาออกซิเตตราซัยคลิน และยาซัลฟาไดเมททอกซีนร่วมกับไครเมโทพริมในการยับยั้งการเจริญและฆ่าเชื้อไวรัสโอ ที่แยกได้จากกุ้งขาวแวนนาไมที่มีอาการโรคจีขาว, น. 19-20. ใน การประชุมวิชาการประมง ครั้งที่ 6 “เพื่อความมั่นคงด้านการประมงและทรัพยากรทางน้ำ” 1-3 ธันวาคม 2554. มหาวิทยาลัยแม่โจ้, จังหวัดเชียงใหม่.

3. Pungpang, S., N. Areechon and P. Wilaipun. 2009. Characterization of the antimicrobial substances produced by *Bacillus* sp. B-1 isolated from Nile tilapia culture pond. In ISSAAS International congress 2009 “Agriculture for better living and global economy” 11-15 January 2010. Pattaya, Thailand. (Proceeding)

4. Pungpang, S. 2011. A study on effects of *Bacillus subtilis* B-1 isolated from fish culture pond to control the pathogenic bacteria. In the 9th Asian fisheries and aquaculture forum “Better science better fish better life” 21-24 April 2011, Shanghai, China. (Proceeding)

5. Purivirojkul, W. and S. Pungpang. 2011. *In vitro* selection of spore forming bacteria for control motile aeromonas disease in hybrid catfish (*Clarias macrocephalus* vs *Clarias gariepinus*). In the 9th Asian fisheries and aquaculture forum “Better science better fish better life” 21-24 April 2011, Shanghai, China. (Proceeding)

ทุนการศึกษาที่ได้รับ ตั้งแต่ปี 2547-2554 จากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และจากศูนย์วิจัยธุรกิจเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน ปี 2554