บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

3.1 เครื่องมือหลักที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (controlled environmental incubator shaker) ของบริษัท New Brunswick Scientific Co., Ltd. USA.

3.1.2 ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิและอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิของบริษัท Memmert, Germany

3.1.3 เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) ของบริษัท Kokusan, Japan

3.1.4 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น Cyberscan 2000 ของบริษัท Eutech Cybernetics, Singapore

3.1.5 เครื่องชั่งรุ่น A200S ของบริษัท Forma Scientific, USA; รุ่น PB 3002 ของบริษัท METTLER TOLEDO, Switzerland

3.1.6 เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิได้ (refrigerated centrifuge) รุ่น JS21 ของบริษัท Beckman, UK

3.1.7 ชุดอุปกรณ์ SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) รุ่น MiniPROTEAN II Dual I ของบริษัท Bio-Rad Laboratories, Canada และเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้ารุ่น PAC 300 ของบริษัท Bio-Rad Laboratories, USA

3.1.8 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงช่วง visible (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 ของบริษัท Bausch and Lomb, USA

3.1.9 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง UV (UV/VIS spectrophotometer) รุ่น UV 160 A ของบริษัท Shimadzu, Japan

3.1.10 เครื่องแก้วของบริษัท Pyrex, USA

3.1.11 ชุดกรองสารตัวอย่างให้ปราศจากเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 ซม. กระดาษกรองเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 ซม. ขนาดรู 0.45 ไมครอน ของบริษัท Millipore,USA. และกระบอกฉีดยาปริมาตร 5 มล.

3.1.12 Cork Borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 mm.

3.1.13 คอลัมน์แก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.0 ซม. ยาว 50 ซม.ของบริษัท Bio-Rad Laboratories, USA

3.1.14 คอลัมน์แก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.0 ซม. ยาว 20 ซม. ของบริษัท Pharmacia, Sweden

3.2 เคมีภัณฑ์

3.2.1 สารเคมี

สารเคมีทุกชนิดที่ใช้ในการวิจัยนี้เป็นเกรดเพื่อการวิเคราะห์ (analytical grade) ของบริษัท Merck, Germany ยกเว้น อะคริลาไมด์ (acylamide) และ N,N'-Methylene-bis-acrylamide ของบริษัท Sigma, USA.

3.2.2 เอนไซม์

- โปรตีเอส (protease) type IX, from *Bacillus polymyxa*, 0.7 units/mg solid ของบริษัท Sigma, USA
- อะไมเลส (α-amylase) from *Bacillus* species, 320 units/mg solid ของบริษัท Sigma, USA
- ไลเปส (lipase) type XIII, from *Pseudomonas* species, 25 units/mg solid ของบริษัท Sigma, USA

3.2.3 สารมาตรฐาน

- โปรตีนมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ใช้ Bovine Serum Albumin ของบริษัท Sigma, USA
- SDS molecular weight markers 2,500 – 17,000 Daltons ของบริษัท Sigma, USA

3.2.4 สารตัวกลางสำหรับโครมาโทกราฟี ได้แก่ Sephadex G-50 และ DEAE-Sephadex A-25 ของบริษัท Pharmacia, Sweden

3.3 เชื้อจุลินทรีย์

3.3.1 *Bacillus* sp. S11 คัดเลือกได้จากลำไส้กุ้งกุลาดำที่มีสุขภาพดี คัดเลือกและศึกษาโดย วรรนิภา เพี้ยนภักตร์ (2539) ลักษณะเบื้องต้น มีรูปร่างเป็นท่อน แกรมบวก เจริญได้ดีในที่มีอากาศ ไม่เจริญในที่ไม่มีอากาศ สร้างเอนโดสปอร์ ให้ผลบวกกับ catalase test

3.3.2 เชื้อทดสอบที่ใช้คือ *Bacillus cereus* ATCC 11778 ได้รับการเอื้อเฟื้อจาก ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.3 *Vibrio harveyi* 639 คัดเลือกได้จากกุ้งที่ป่วยเป็นโรคเรืองแสงตายในจังหวัดสุราษฎร์ธานี ได้รับการเอื้อเฟื้อจากภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ก. การเพาะเลี้ยง *Bacillus sp. S11* ในภาวะที่เหมาะสมแก่การสร้างสารต้านจุลชีพ

3.4 การเตรียมหัวเชื้อสำหรับเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11

เขี่ยเชื้อ 1 ลูปจากโคโลนีของ *Bacillus* sp. S11 ที่เจริญบนอาหารแข็งทริปติกซอย (Tryptic Soy Agar) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ลงในอาหารเหลวทริปติกซอย (Tryptic Soy Broth) ปริมาตร 50 มล. ที่บรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. เขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

3.5 การแปรผันปริมาณกลูโคสในการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 เพื่อให้ผลิตสารต้านจุลชีพปริมาณสูง

เพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 ในอาหารสูตรพื้นฐาน (สารสกัดจากยีสต์ 20 กรัม/ลิตร โซเดียมคลอไรด์ 5 กรัม/ลิตร ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต 2.5 กรัม/ลิตร พีเอช 7.0) ที่แปรผันปริมาณกลูโคสที่ 0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00 และ 2.00 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ใช้ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้น 2.0 % โดยปริมาตร เขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่ได้มาติดตามการเจริญด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร ปั่นแยกเซลล์ออกด้วยความเร็ว 8000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใส (supernatant) มาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อตามวิธีของ Lowry และคณะ (1951) ดังแสดงในภาคผนวก ค. แอคติวิตีของสารต้านจุลชีพต่อเชื้อทดสอบ *B. cereus* ATCC 11778 ด้วยวิธีในข้อ 3.12 บันทึกผลเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

3.6 การแปรผันปริมาณสารสกัดจากยีสต์ในการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11เพื่อให้ผลิตสารต้านจุลชีพปริมาณสูง

เพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 ในอาหารสูตรปรับปรุง (ปริมาณกลูโคสที่ได้ตามข้อ 3.5 โซเดียมคลอไรด์ 5 กรัม/ลิตร ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต 2.5 กรัม/ลิตร พีเอช 7.0) แปรผันปริมาณสารสกัดจากยีสต์ที่ 0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.50, 2.0 และ 2.5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ใช้ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้น 2.0 % โดยปริมาตร ทำการทดลอง เก็บตัวอย่าง ติดตามการเจริญ ปริมาณโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อและแอคติวิตีของสารต้านจุลชีพเช่นเดียวกับข้อ 3.5

3.7 การแปรผันปริมาณโซเดียมคลอไรด์ในการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11เพื่อให้ผลิตสารต้านจุลชีพปริมาณสูง

เพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 ในอาหารสูตรปรับปรุงที่มี ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต 2.5 กรัม/ลิตร ปริมาณกลูโคส และปริมาณสารสกัดจากยีสต์ ที่เหมาะสมจากข้อ 3.5 และ 3.6 , พีเอช 7.0 ใช้ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้น 2.0% โดยปริมาตร แปรผันปริมาณโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 0, 0.25, 0.50, 1.00 และ 2.00 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ทำการทดลอง เก็บตัวอย่าง ติดตามการเจริญ ปริมาณโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อและแอคติวิตีของสารต้านจุลชีพเช่นเดียวกับข้อ 3.5

3.8 การแปรผันปริมาณหัวเชื้อ (Inoculum) ในการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 เพื่อให้ผลิตสารต้านจุลชีพปริมาณสูง

เพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 ในอาหารสูตรปรับปรุงที่มี ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต 2.5 กรัม/ลิตร ปริมาณกลูโคส ปริมาณสารสกัดจากยีสต์ และปริมาณโซเดียมคลอไรด์ ที่เหมาะสมจากข้อ 3.5, 3.6 และ 3.7 ตามลำดับ พีเอช 7.0 โดยแปรผันปริมาณหัวเชื้อตั้งต้นดังนี้ 1, 2, 3, 4, 5 และ 10 % โดยปริมาตร ทำการทดลอง เก็บตัวอย่าง ติดตามการเจริญ ปริมาณโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อและแอคติวิตีของสารต้านจุลชีพเช่นเดียวกับข้อ 3.5

3.9 การแปรผันอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 เพื่อให้ผลิตสารต้านจุลชีพปริมาณสูง

เพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 ในอาหารสูตรปรับปรุงที่มี ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต 2.5 กรัม/ลิตร ปริมาณกลูโคส ปริมาณสารสกัดจากยีสต์ ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ และปริมาณหัวเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสมจากข้อ 3.5, 3.6, 3.7 และ 3.8 ตามลำดับ พีเอช 7.0 โดยแปรผันอุณหภูมิเป็นที่ 25, 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส ทำการทดลอง เก็บตัวอย่าง ติดตามการเจริญ ปริมาณโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อและแอคติวิตีของสารต้านจุลชีพเช่นเดียวกับข้อ 3.5

3.10 การแปรผัน พีเอช ของอาหารเลี้ยงเชื้อในการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 เพื่อให้ผลิตสารต้านจุลชีพปริมาณสูง

เพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 ในอาหารสูตรปรับปรุงที่มี ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต 2.5 กรัม/ลิตร ปริมาณกลูโคส ปริมาณสารสกัดจากยีสต์ ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้น และอุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 3.5, 3.6, 3.7, 3.8 และ 3.9 ตามลำดับ แปรผัน พีเอช ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 ทำการทดลอง เก็บตัวอย่าง ติดตามการเจริญ ปริมาณโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อและแอคติวิตีของสารต้านจุลชีพเช่นเดียวกับข้อ 3.5

3.11 การแปรผันการให้อากาศในการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 เพื่อให้ผลิตสารต้านจุลชีพปริมาณสูง

เพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 ในอาหารสูตรปรับปรุงที่มี ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต 2.5 กรัม/ลิตร ปริมาณกลูโคส ปริมาณสารสกัดจากยีสต์ ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้น อุณหภูมิที่เหมาะสมและพีเอชจากข้อ 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9 และ 3.10 ตามลำดับ แปรผันการให้อากาศด้วยการเขย่าที่ 0, 100, 200 และ 300 รอบ/นาที ทำการทดลอง เก็บตัวอย่าง ติดตามการเจริญ ปริมาณโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อและแอคติวิตีของสารต้านจุลชีพเช่นเดียวกับข้อ 3.5

3.12 การติดตามแอคติวิตีของสารต้านจุลชีพด้วยวิธีแพร่ผ่านอาหารแข็ง (Bauer และคณะ, 1966)

นำเชื้อทดสอบ *B. cereus* ATCC 11778 ที่มีอายุ 18 ชั่วโมงจากการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลวทริปติกซอย (Tryptic Soy Broth) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที แล้วปรับค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตรให้เป็น 0.1 ด้วย 0.85 % (ปริมาตร/ปริมาตร) สารละลายโซเดียมคลอไรด์ แล้วนำมา 0.1 มล. กระจายให้ทั่วบนจานเลี้ยงเชื้อที่มี Mueller Hinton Agar จานละ 25 มล. เจาะหลุมด้วย Cork Borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มม. หยอดแต่ละหลุมด้วยตัวอย่างที่ต้องการทดสอบซึ่งผ่านการกรองด้วยกระดาษกรองที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรู 0.45 ไมครอน ปริมาณสารหลุมละ 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้ววัดขนาดขอบเขตการยับยั้ง

ข. การศึกษาสมบัติเบื้องต้นของสารต้านจุลชีพที่ได้จากการเพาะเลี้ยง Bacillus sp. S11

3.13 การศึกษาผลของความร้อนต่อแอคติวิตีของสารต้านจุลชีพ

นำส่วนน้ำใสที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 ในภาวะที่เหมาะสมแก่การสร้างสารต้านจุลชีพ มาไว้ที่อุณหภูมิ 25, 37, 40, 50, 70, 80, 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และผ่านการ autoclave (121 องศาเซลเซียส, 20 นาที) เก็บตัวอย่างเพื่อติดตามแอคติวิตีตามวิธีในข้อ 3.12 ที่เวลา 0, 5, 10, 15, 20, 30 และ 60 นาทีหลังการบ่ม ยกเว้นการนึ่งฆ่าเชื้อ จะเก็บเพียง 2 ครั้งคือ ก่อนและหลังนึ่งฆ่าเชื้อ

3.14 การศึกษาผลของ พีเอช ต่อแอคติวิตีของสารต้านจุลชีพ

นำส่วนน้ำใสที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 ในภาวะที่เหมาะสมแก่การสร้างสารต้านจุลชีพ มาปรับ พีเอช ตั้งแต่ 1 ถึง 14 (ช่วงละ 1 หน่วยพีเอช) แล้วติดตามแอคติวิตีของสารต้านจุลชีพโดยวิธีแพร่ผ่านอาหารแข็งดังแสดงในข้อ 3.12

3.15 การศึกษาผลของปริมาณโซเดียมคลอไรด์ต่อแอคติวิตีของสารต้านจุลชีพ

นำส่วนน้ำใสที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 ในภาวะที่เหมาะสมแก่การสร้างสารต้านจุลชีพ มาเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ 0, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0 และ 5.0 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) แล้วติดตามแอคติวิตีของสารต้านจุลชีพโดยวิธีแพร่ผ่านอาหารแข็งดังข้อ 3.12

3.16 การศึกษาผลของเอนไซม์ต่อแอคติวิตีของสารต้านจุลชีพ

นำส่วนน้ำใสที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 ในภาวะที่เหมาะสมแก่การสร้างสารต้านจุลชีพ มาเติมเอนไซม์ ได้แก่ protease (type IX, from *Bacillus polymyxa*, 0.7 units/mg solid; Sigma), α-amylase (from *Bacillus* species, 320 units/mg solid; Sigma) และ lipase (type XIII, from *Pseudomonas* species, 25 units/mg solid; Sigma) โดยใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์แต่ละชนิดเป็น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในอัตรา 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วติดตามแอคติวิตีของสารต้านจุลชีพโดยวิธีแพร่ผ่านอาหารแข็งดังข้อ 3.12 วิธีนี้ดัดแปลงจาก Naclerio และคณะ (1993)

3.17 การศึกษาผลของตัวทำละลาย (solvents) ต่อแอคติวิตีของสารต้านจุลชีพ

นำส่วนน้ำใสที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 ในภาวะที่เหมาะสมแก่การสร้างสารต้านจุลชีพมา 5 ml เติมด้วยตัวทำละลายปริมาตรที่เท่ากัน ผสมอย่างแรงเป็นเวลา 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดการแยกชั้น ตรวจหาแอคติวิตีของสารต้านจุลชีพดังวิธีในข้อ 3.12 ทั้งในส่วนที่อยู่ในตัวทำละลาย (organic phase) และส่วนที่อยู่ในน้ำ (aqueous phase) สารต้านจุลชีพที่อยู่ในส่วนของตัวทำละลายต้องระเหยตัวทำละลายออกเสียก่อนแล้วละลายกลับ (redissolve) ด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ปริมาตร 5 ml สำหรับสารต้านจุลชีพที่อยู่ในส่วนน้ำให้ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 5 ml ด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว ในกรณีถ้าผสมตัวทำละลายกับส่วนน้ำหมักแล้วไม่เกิดการแยกชั้นต้องระเหยส่วนที่เป็นตัวทำละลายออกก่อน จึงปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 5 ml ก่อนจะนำไปตรวจหาแอคติวิตีตามวิธีดังข้อ 3.12 เปรียบเทียบกับน้ำหมักที่ไม่ได้ผ่านการผสมตัวทำละลายใดๆ ตัวทำละลายที่นำมาใช้ได้แก่ อะซีโตน (acetone) อะซีโตไนไทรล์ (acetonitrile) คลอโรฟอร์ม (chloroform) ไดเอธิลอีเธอร์ (diethylether) เอธานอล (ethanol) เมธานอล (methanol) และโทลูอีน (toluene)

3.18 การศึกษา bactericidal activity โดยใช้ *Bacillus cereus* ATCC 11778 เป็นเชื้อทดสอบ

เลี้ยงเชื้อทดสอบ *B. cereus* ATCC 11778 ด้วยอาหารเหลวทริปติกซอยที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำมาปั่นแยกล้างด้วย 0. 05 M โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 นำเฉพาะเซลล์ปรับให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 10^5 CFU/ml ด้วยบัฟเฟอร์เดิม ถ่ายเชื้อทดสอบลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตรที่ปราศจากเชื้อ เติมสารต้านจุลชีพปริมาณที่ศึกษาซึ่งผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในความเข้มข้นที่เหมาะสม ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 25 มิลลิลิตรด้วยบัฟเฟอร์เดิม เขย่าที่ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อทดสอบด้วยการนับจำนวน (CFU/ml) บนอาหารแข็ง (plate counting) ทริปติกซอย ทุกๆ ชั่วโมง จนครบ 5 ชั่วโมง

3.19 การศึกษา bactericidal activity โดยใช้ *Vibrio harveyi 639* เป็นเชื้อทดสอบ

V. harveyi 639 เป็นเชื้อก่อโรคเรืองแสงในกุ้งกุลาดำแยกได้จากกุ้งกุลาดำที่ป่วยตายด้วยโรคนี้ ณ จังหวัดสุราษฎร์ธานี นำมาเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลวทริปติกซอยที่มีเกลือ 2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำมาปั่นล้างด้วย 0. 05 M โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ที่มีเกลือ 2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แยกออกเอาเฉพาะเซลล์ ปรับให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 10^6 CFU/ml ด้วยบัฟเฟอร์เดิม ถ่ายเชื้อทดสอบลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตรที่ปราศจากเชื้อ เติมสารต้านจุลชีพปริมาณที่ศึกษาซึ่งผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในความเข้มข้นที่เหมาะสม ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 25 มิลลิลิตรด้วยบัฟเฟอร์เดิมนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อทดสอบด้วยการนับจำนวน (CFU/ml) บนอาหารแข็งทริปติกซอยที่มีเกลือ 2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ทุกๆ ชั่วโมง จนครบ 5 ชั่วโมง

ค. การทำบริสุทธิ์บางส่วนสารต้านจุลชีพที่ได้จากการเพาะเลี้ยง Bacillus sp. S11

3.20 การทำบริสุทธิ์เบื้องต้นด้วยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

ปั่นแยกน้ำหมักออกจากเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสมาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีความเข้มข้นอิ่มตัวเป็นช่วง (Ammonium sulfate fractionation) 0 – 30%, 30 – 50% และ 50 – 80% ปั่นแยกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตรวจวัดแอคติวิตีของตะกอนที่ได้ในแต่ละช่วงตามวิธีในข้อ 3.23 เปรียบเทียบกับตะกอนที่ได้จากการตกตะกอนอาหารเหลวสูตรเดียวกันที่ไม่ได้เลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp.S11 ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วงเดียวกัน นำตะกอนจากน้ำหมักที่มี

แอคติวิตีสูงสุด มาทำบริสุทธิ์ด้วย Gel Permeation Chromatography ดังข้อ 3.21 และวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE ดังข้อ 3.24

3.21 การทำบริสุทธิ์ด้วย Gel Permeation Chromatography

นำตะกอนที่ได้จากการตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วงที่เหมาะสมจากข้อ 3.20 มาละลายใน 0.015 M Tris-HCl, พีเอช 7.0 แล้วผ่านคอลัมน์ Sephadex G-50 ขนาดคอลัมน์ที่ใช้มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.0 เซนติเมตร ยาว 50 เซนติเมตร ชะด้วย 0.015 M Tris-HCl, พีเอช 7.0 ในอัตราไหล 12 ml/ชั่วโมง เก็บลำดับส่วนละ 2 ml ติดตามโปรตีนด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร เก็บลำดับส่วนที่ให้เป็นจุดยอดมาตรวจวัดแอคติวิตีดังข้อ 3.23 เลือกลำดับส่วนที่ให้แอคติวิตีมาทำบริสุทธิ์ต่อไปด้วย Ion exchange chromatography ในข้อ 3.22 และวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE ดังข้อ 3.24

3.22 การทำบริสุทธิ์ด้วย Ion exchange chromatography

นำลำดับส่วนที่ให้แอคติวิตีของสารต้านจุลชีพจากการทำให้บริสุทธิ์ด้วย ข้อ 3.21 มาผ่านคอลัมน์ของ DEAE-Sephadex A-25 ขนาดคอลัมน์เส้นผ่านศูนย์กลาง 1.0 เซนติเมตร ยาว 20 เซนติเมตร ชะด้วย 0.015 M Tris-HCl, pH 7.0 ด้วยอัตราการไหล 16 ml/ชั่วโมง ติดตามโปรตีนโดยวัดการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร เมื่อปริมาณโปรตีนลดลงเกือบเป็นศูนย์ติดต่อกันเป็นระยะเวลาหนึ่ง จึงชะด้วย NaCl gradient โดยใช้ 0 – 1.0 M NaCl ในบัฟเฟอร์ 0.015 M Tris-HCl, pH 7.0 ปริมาตรรวมตลอดการทำเกรเดียนท์เป็น 60 ml ติดตามปริมาณโปรตีนต่อไป แล้วเก็บลำดับส่วนบริเวณยอดมาติดตามแอคติวิตีดังข้อ 3.23 และวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE ดังข้อ 3.24

3.23 การทดสอบแอคติวิตีของสารต้านจุลชีพ (Barefoot and Klaenhammer, 1983)

เจือจางสารตัวอย่างแบบ two fold serial dilutions ดังนั้นในหลอดแรกที่ไม่ได้เจือจางจะมีความเข้มข้นเป็น 1 เท่า หลอดที่สองจะมีความเข้มข้นเป็น ½ เท่า หลอดที่สามจะมีความเข้มข้นเป็น ¼ เท่า หลอดที่สี่มีความเข้มข้นเป็น 1/8 เท่า หลอดที่ห้ามีความเข้มข้นเป็น 1/16 เท่า ตามลำดับ นำแต่ละความเข้มข้นของสารตัวอย่างมาทดสอบแอคติวิตีด้วยวิธีแพร่ผ่านอาหารวุ้นดังแสดงในข้อ 3.12 วัดผลเป็นค่า Arbitrary Unit (AU) คือส่วนกลับของ dilution ที่สูงสุดในการทำการเจือจางที่ให้ขอบเขตการยับยั้งต่อเชื้อทดสอบ วัดปริมาณโปรตีนในสารตัวอย่าง คำนวณเพื่อทราบปริมาณโปรตีนที่ใส่ลงไปในแต่ละหลุม แล้วรายงานค่า specific activity ของสารตัวอย่างเป็น AU/mg protein

ตัวอย่างเช่น น้ำหมักจากการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. S11 มีความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ยับยั้งเชื้อทดสอบเมื่อเจือจางลง 1/16 เท่า ปริมาณสารที่หยอดลงในหลุมเป็น 100 ไมโครลิตร น้ำหมักนี้จึงมี

แอคติวิตีก่อนเจือจางเป็น 16 AU/0.1 ml หรือ 160 AU/ml ปริมาณโปรตีนในน้ำหมักก่อนเจือจางเป็น 5.60 mg/ml ดังนั้น แอคติวิตีจำเพาะ (specific activity) ของน้ำหมักนี้จึงเป็น 160/5.6 = 28.57 AU/mg protein

3.24 การวิเคราะห์ด้วย Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Schägger และ von Jagow, 1987)

นำสารตัวอย่างที่ได้จากข้อ 3.20, 3.21 และ 3.22 มาทำการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE ด้วยเครื่องมือสำหรับทำการแยกโปรตีนด้วยไฟฟ้าแบบแผ่นเจล รุ่น MiniPROTEAN II ของบริษัท Bio-Rad, USA ประกอบด้วยกระจกสองแผ่นขนาด 7.3 x 10.2 และ 8.3 x 10.2 ช่วงของ Separating gel มีความสูง 6 เซนติเมตรโดยมี 16.5% T, 3%C และช่วงของ Stacking gel มี 4%T, 3%C ใช้ molecular weight markers ในช่วง 2,500 – 17,000 Daltons (Sigma, USA) เตรียมสารตัวอย่างให้มีความเข้มข้นของโปรตีน 1 mg/ml ใน sample buffer นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที นำตัวอย่างที่ผ่านการเตรียมแล้วหยอดลงในแต่ละช่องของ Stacking gel ให้กระแสไฟฟ้าคงที่ 20 mA เป็นเวลา 60 นาที (ในช่วง stacking gel) และกระแสไฟฟ้าคงที่ 30 mA เป็นเวลา 120 นาที จึงหยุดการให้กระแสไฟฟ้าแล้วนำแผ่นเจลออก ตรึงสารที่อยู่บนแผ่นเจลตามแต่ละวิธีที่ใช้ย้อมสาร ซึ่งมีการตรึง การย้อม และการล้างที่ต่างกัน ในการศึกษานี้จะทำการย้อม 3 แบบ ได้แก่การย้อมโปรตีน การย้อมไกลโคโปรตีนและการย้อมไลโปโปรตีน รายละเอียดดังแสดงในภาคผนวก ค.