บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 <u>การแยกเชื้อบริสุทธิ์ของ *Streptococcus spp.*</u>

3.1.1 การแยกเชื้อ *Streptococcus spp.* จากน้ำนมดิบ

ตัวอย่างนมดิบที่นำมาใช้ในงานวิจัยนี้ได้รับจาก โรงนมมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ซึ่งได้จากฟาร์ม 4 แห่ง คือ ฟาร์มยุทธนา (YU) , ฟาร์มปรีชา (PR) , ฟาร์มนมหนองโพ (NO) และ ฟาร์มขององค์การส่งเสริมกิจการโคนม (TD) โดยเก็บตัวอย่างฟาร์มละ 2 ตัวอย่าง

จากตัวอย่างนมที่ได้รับ เมื่อนำมาทำการแยกเชื้อ *Streptococcus* spp. โดยทำการเจือจางตัวอย่างนมเป็น 10^{-1},10^{-2} และ 10^{-3} เท่า จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร Azide Dextrose Agar พบว่าตัวอย่างนมที่เจือจาง 10^{-1}เท่า เท่านั้นที่พบว่ามีการเจริญของเชื้อ ซึ่งจำนวนโคโลนีที่พบบนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นดังนี้

ฟาร์มยุทธนา	18	โคโลนี	(YU 1 - YU 18)
ฟาร์มปรีชา	20	โคโลนี	(PR 1 - PR 20)
ฟาร์มนมหนองโพ	14	โคโลนี	(NO 1 - NO 14)
ฟาร์มขององค์การส่งเสริมกิจการโคนม	24	โคโลนี	(TD 1 - TD 24)
<u>รวมทั้งหมด</u>	76	โคโลนี	

เนื่องจากจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นมีปริมาณน้อย จึงทำการเก็บเชื้อทุกโคโลนีไว้ทำการทดสอบต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1.2 การตรวจสอบชนิดของจุลินทรีย์ที่แยกได้ทางอนุกรมวิธาน

<u>ลักษณะโคโลนีและสัณฐาน</u> (Morphological and Cultural Characteristics)

ลักษณะโคโลนีบนอาหาร M17 เป็นโคโลนีกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1-2 มม. ขอบเรียบ ไม่ใส ไม่สร้างรงควัตถุ ทุกสายพันธุ์ที่ได้เมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์เป็นแกรมบวก รูปกลม รี ไม่สร้างสปอร์ ไม่สามารถเคลื่อนไหวได้เอง ดังตัวอย่างในรูปที่ 1

ผลการทดสอบคะตะเลสทุกสายพันธุ์ให้ผลเป็นลบ

จากผลการตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์และการทดสอบคะตะเลสที่ได้เป็นการทดสอบอย่างคร่าวๆว่า เชื้อที่แยกได้เป็น *Streptococcus* spp.

เพื่อคัดเลือกเชื้อ *Streptococcus* spp. ที่ไม่ทำให้เกิดโรค จึงทำการทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง สายพันธุ์ใดที่ให้ผลการย่อยเม็ดเลือดแดงอย่างสมบูรณ์จะทำการคัดทิ้ง

จากผลการทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงทั้งหมด 76 ตัวอย่าง พบว่า มีเพียง 38 ตัวอย่างเท่านั้นที่ไม่พบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง เนื่องจากในการคัดเลือกเชื้อ *Streptococcus* spp. ต้องการที่จะนำไปเตรียมผลิตภัณฑ์นมประเภทโยเกิร์ตจึงทำการเก็บตัวอย่างที่ได้ทั้งหมดไปตรวจสอบการเคิร์ดน้ำนม เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถเคิร์ดน้ำนมได้รวดเร็ว และศึกษาสมบัติทางชีวเคมีอื่นๆต่อไป ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 2

ผลการทดสอบการเคิร์ดน้ำนม แสดงดังตารางที่ 3

ผลการทดสอบสมบัติทางชีวเคมี แสดงดังตารางที่ 4

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ถ่ายที่กำลังขยาย 100X (oil)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 1 ลักษณะและรูปร่างของเชื้อ *Streptococcus* sp. สายพันธุ์ TD 1 จากกล้องจุลทรรศน์

ถ่ายที่กำลังขยาย 100X (oil)

รูปที่ 2 ลักษณะและรูปร่างของเชื้อ *Streptococcus* sp. สายพันธุ์ TD 3 จากกล้องจุลทรรศน์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ถ่ายที่กำลังขยาย 100X (oil)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3 ลักษณะและรูปร่างของเชื้อ *Streptococcus* sp. สายพันธุ์ NO 2 จากกล้องจุลทรรศน์

ตารางที่ 2 การย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของ *Streptococcus spp.* ที่แยกได้

สายพันธุ์ที่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง	สายพันธุ์ที่ไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง
NO 6 , NO 10 , NO 12 , NO 14	TD 1- TD 24
YU 1 - YU 9 , YU 11 - YU 18	NO 1 - NO 5 , NO 7 - NO 9 ,
PR 1 - PR 13 , PR 15 - PR 19	NO 11 , NO 13
	YU 10
	PR 14 , PR 18 , PR 20

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 การเคิร์ดน้ำนมของ *Streptococcus spp.*

จุลินทรีย์	เวลาที่ใช้ในการเคิร์ดน้ำนม (วัน)
TD 1 , TD 3 , TD 13 ,TD 18 , TD 19 , NO 2 , NO 8	0.375
PR 18 , PR 20	1
TD 4 , TD 10 , TD 14 , TD 22 , PR 14	2
TD 11 , TD 15 , TD 16 , TD 17 , TD 20 , TD 21 , NO 1 , NO 7	3
TD 2 , TD 5 , TD 6 , TD 7 , TD 8 , TD 12 , TD 24 , NO 3	4
TD 9 , NO 5	5
NO 13	7

ตารางที่ 3 (ต่อ)

จุลินทรีย์	เวลาที่ใช้ในการเคิร์ดน้ำนม (วัน)
TD 23 , NO 4 , NO 9 , NO 11 , YU 10	8

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 การทดสอบสมบัติทางชีวเคมีบางประการของ *Streptococcus spp.* ที่แยกได้

จุลินทรีย์ / การทดสอบ	TD 1	TD 2	TD 3	TD 4	TD 5	TD 6	TD 7	TD 8	TD 9	TD 10	TD 11	TD 12
Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycerol	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Melizetose	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+
Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Xylose	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Esculin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hippurate	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-
NH_3*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6.5% NaCl	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+

หมายเหตุ * NH_3 หมายถึง การเกิดแอมโมเนียจากอาร์จีนีน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>ตารางที่ 4 (ต่อ)</u>

จุลินทรีย์ / การทดสอบ	TD 13	TD 14	TD 15	TD 16	TD 17	TD 18	TD 19	TD 20	TD 21	TD 22	TD 23	TD 24
Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Melibiose	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Melizetose	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esculin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hippurate	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-
NH_3*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
6.5% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+

<u>หมายเหตุ</u> * NH_3 หมายถึง การเกิดแอมโมเนียจากอาร์จีนีน

ตารางที่ 4 (ต่อ)

จุลินทรีย์ / การทดสอบ	NO 1	NO 2	NO 3	NO 4	NO 5	NO 7	NO 8	NO 9	NO 11	NO 13	PR 14	PR 18	PR 20	YU 10
Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycerol	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+
Melizetose	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
Ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
Esculin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hippurate	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+
NH_3*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
6.5% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

หมายเหตุ * NH_3 หมายถึง การเกิดแอมโมเนียจากอาร์จีนีน

I17391337

ผลจากการทดสอบสมบัติทางชีวเคมีสามารถจัดจำแนกเชื้อ *Streptococcus* spp. ทั้ง 38 สายพันธุ์ ดังตารางที่ 5

3.2 <u>การคัดเลือก Streptococci ที่สร้างสารต่อต้านจุลชีพ</u>

3.2.1 การทดสอบการสร้างสารต่อต้านจุลชีพของ *Streptococcus* spp. บนอาหารแข็ง

จากการนำส่วนน้ำใส (supernatant) ของเชื้อ *St.* spp. ที่แยกได้มาวัดระดับความเป็นกรด-ด่าง พบว่าจะอยู่ในช่วง 5.0 - 5.5 เมื่อนำมาทดสอบการต่อต้านจุลชีพทดสอบ 7 ชนิด ได้แก่ *Bacillus cereus* , *Escherichia coli* , *Listeria monocytogenes* , *Pseudomonas aeruginosa* , *Salmonella typhi* , *Salmonella typhimurium* และ *S. aureus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar โดยตรวจผลจากบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น (บริเวณที่เชื้อไม่เจริญ) ผลการทดสอบพบว่าส่วนน้ำใสของเชื้อ *St.* spp. ที่แยกได้ สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบบนอาหารแข็งได้เพียงชนิดเดียว คือ สามารถยับยั้ง *S. aureus* แต่ตรวจไม่พบการยับยั้งในเชื้อทดสอบชนิดอื่น ผลการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* แสดงดังตารางที่ 6

ตารางที่ 5 การจัดจำแนกเชื้อ *Streptococcus* spp. ที่แยกได้

Streptococcus spp. ที่แยกได้	ชนิด สายพันธุ์ที่จำแนกได้
TD 1, TD 3, TD 7, TD 9, TD 13, TD 14, TD 17, TD 19, TD 21, NO 1 ,NO 3, NO 5 , NO 8, NO 11, NO 13	*Streptococcus uberis*
TD 2, TD 5, TD 6, TD 8, TD 10, TD 11, TD 12, TD 16, TD 20, TD 23, TD 24, NO 2, NO 7	*Streptococcus sobrinus*
TD 4, NO 4, NO 9, PR 14, PR 18, PR 20	*Streptococcus lactis*
TD 15, TD 18, TD 22, YU 10	*Streptococcus agalactiae*

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 การยับยั้งด้วยส่วนน้ำใสจากจุลินทรีย์ *Streptococcus* spp. ต่อการเจริญของเชื้อทดสอบ *S. aureus* บนอาหารแข็ง

จุลินทรีย์	บริเวณยับยั้ง (ซม.)
TD 1 - TD 3 , TD 12 , TD 20 , TD 21 , NO 3 , NO 4 , NO 9 , YU 10	1.2
NO 11	1.1
TD 4 , NO 5 , NO 13	1.0
TD 14 , TD 15 , NO 7 , NO 8 , PR 14	0.9
TD 5 , TD 7 , TD 16 - TD 18 , TD 22 , TD 24 , PR 20	0.8
TD 6 , TD 9 - TD 11, TD 13 , TD 23 , NO 1 , NO 2 , PR 18	0.7

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 (ต่อ)

จุลินทรีย์	บริเวณยับยั้ง (ซม.)
TD 19	0.6
TD 8	0.4

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เมื่อนำส่วนน้ำใสของ *Streptococcus* spp. ที่ได้ มาทำการปรับระดับความเป็นกรด-ด่างให้มีค่า 6.5 แล้วนำไปทดสอบการต่อต้านจุลชีพทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวข้างต้น เมื่อตรวจดูผลจากบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น พบว่า ส่วนน้ำใสของน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptococcus* spp. มีผลยับยั้งเชื้อทดสอบเพียงชนิดเดียว คือ *S. aureus* ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 7

3.2.2 การทดสอบการสร้างสารต่อต้านจุลชีพของ *Streptococcus sp.* ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบทั้ง 7 ชนิด ได้แก่ *Bacillus cereus*,*Escherichia coli* , *Listeria monocytogenes* , *Pseudomonas aeruginosa* , *Salmonella typhi* , *Salmonella typhimurium* และ *Staphylococcus aureus* โดยเปรียบเทียบเวลาการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า (doubling time) ของเชื้อทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว โดยคัดเลือก *Streptococcus* spp. 3 ตัว ที่มีการเคิร์ดน้ำนมได้รวดเร็ว และให้ผลการยับยั้งเชื้อทดสอบบนอาหารแข็งได้ดี คือ TD 1 , TD 3 และ NO 2 พบว่าเชื้อทั้ง 3 ตัว สามารถหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบได้ ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4 - 10 และตารางที่ 8

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 การยับยั้งด้วยส่วนน้ำใสจากจุลินทรีย์ *Streptococcus* spp. หลังปรับค่าความเป็นกรด - ด่าง เท่ากับ 6.5 ต่อการเจริญของเชื้อทดสอบ *S. aureus* บนอาหารแข็ง

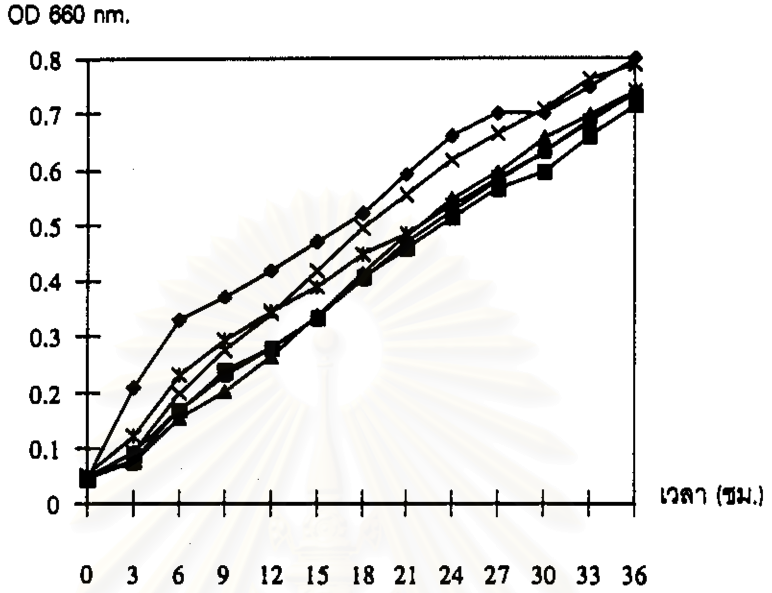
จุลินทรีย์	บริเวณยับยั้ง (ซม.)
TD 2	1.4
TD 1 , TD 3 , TD 12	1.2
TD 4 , TD 5 , TD 14 , TD 16 , TD 18 , NO 1 , NO 3	1.0
TD 15 , TD 17	0.9
TD 6 , TD 8 , TD 10 , TD 19 , NO 2 , NO 5 , NO 7 - NO 9 , NO 11 , PR 14	0.8
TD 7 , TD 9 , TD 13 , TD 20 , TD 21 , TD 23 , TD 24 , NO 4 , NO 13	0.7

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 (ต่อ)

จุลินทรีย์	บริเวณยับยั้ง (ซม.)
TD 11 , TD 22 , YU 10	0.6
PR 18	0.4
PR 20	-

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4 การหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อ *Bacillus cereus* ในช่วงเวลาต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปรับค่าความเป็นกรด - ด่างเท่ากับ 6.5 ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Streptococcus spp.* สายพันธุ์ที่คัดเลือก

—◆— *Bacillus cereus*

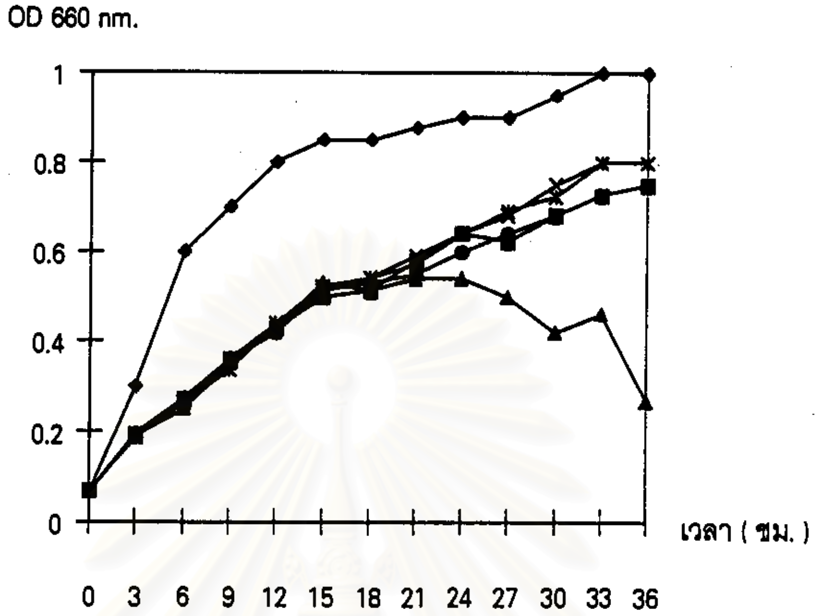
—■— *Bacillus cereus* ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จาก *Streptococcus spp.* สายพันธุ์ TD 1

—▲— *Bacillus cereus* ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จาก *Streptococcus spp.* สายพันธุ์ TD 3

—✕— *Bacillus cereus* ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จาก *Streptococcus spp.* สายพันธุ์ NO 2

—✱— *Bacillus cereus* ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จาก *Streptococcus lactis* TISTR 457

—●— *Bacillus cereus* ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จาก *Streptococcus cremoris* TISTR 456



รูปที่ 5 การหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli* ในช่วงเวลาต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปรับค่าความเป็นกรด - ด่างเท่ากับ 6.5 ที่ได้จากการเลี้ยง เชื้อ *St. spp.* สายพันธุ์ที่คัดเลือก

—◆— *Escherichia coli*

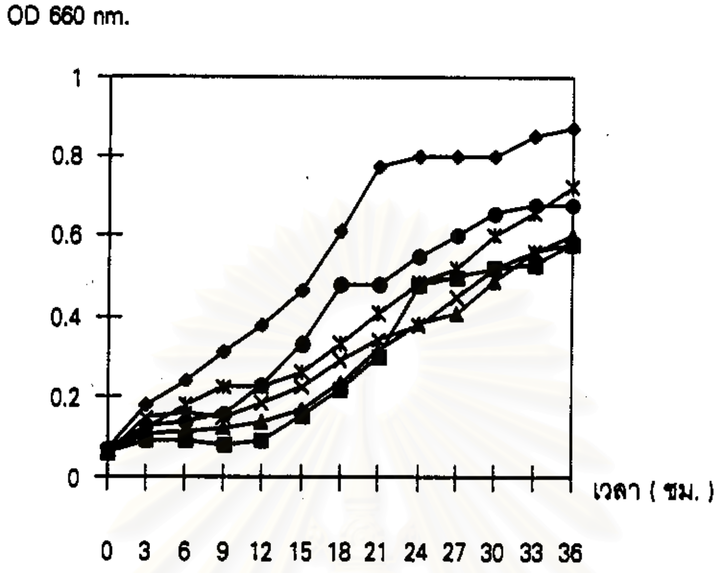
—■— *Escherichia coli* ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จาก *Streptococcus spp.* สายพันธุ์ TD 1

—▲— *Escherichia coli* ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จาก *Streptococcus spp.* สายพันธุ์ TD 3

—✕— *Escherichia coli* ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จาก *Streptococcus spp.* สายพันธุ์ NO 2

—✱— *Escherichia coli* ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จาก *Streptococcus lactis* TISTR 457

—●— *Escherichia coli* ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จาก *Streptococcus cremoris* TISTR 456



รูปที่ 6 การหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในช่วงเวลาต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปรับค่าความเป็นกรด - ด่างเท่ากับ 6.5 ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Streptococcus spp.* สายพันธุ์ที่คัดเลือก

—◆— *Listeria monocytogenes*

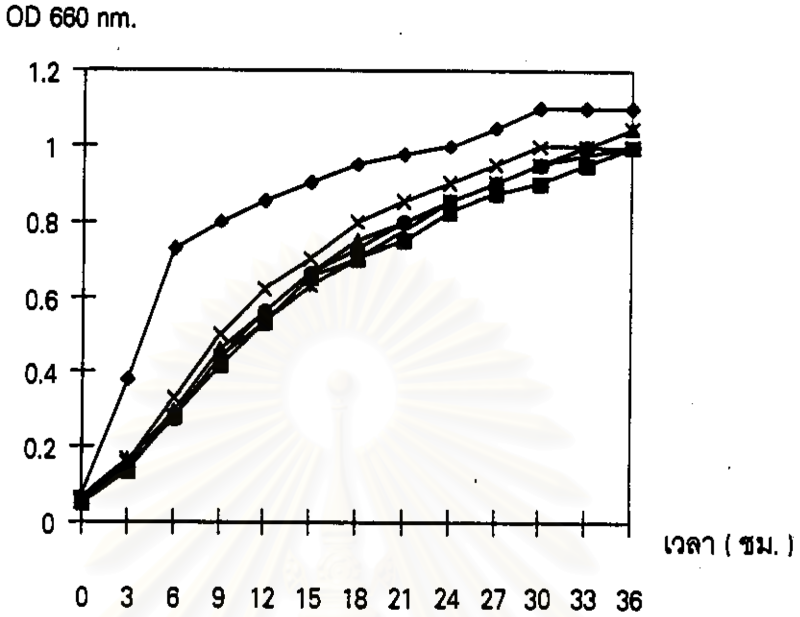
—■— *Listeria monocytogenes* ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จาก *Streptococcus spp.* สายพันธุ์ TD 1

—▲— *Listeria monocytogenes* ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จาก *Streptococcus spp.* สายพันธุ์ TD 3

—✳— *Listeria monocytogenes* ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จาก *Streptococcus spp.* สายพันธุ์ NO 2

—✚— *Listeria monocytogenes* ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จาก *Streptococcus lactis* TISTR 457

—●— *Listeria monocytogenes* ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จาก *Streptococcus cremoris* TISTR 456



รูปที่ 7 การหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ในช่วงเวลาต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่ปรับค่าความเป็นกรด - ด่างเท่ากับ 6.5 ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Streptococcus spp.* สายพันธุ์ที่คัดเลือก

—◆— *Pseudomonas aeruginosa*

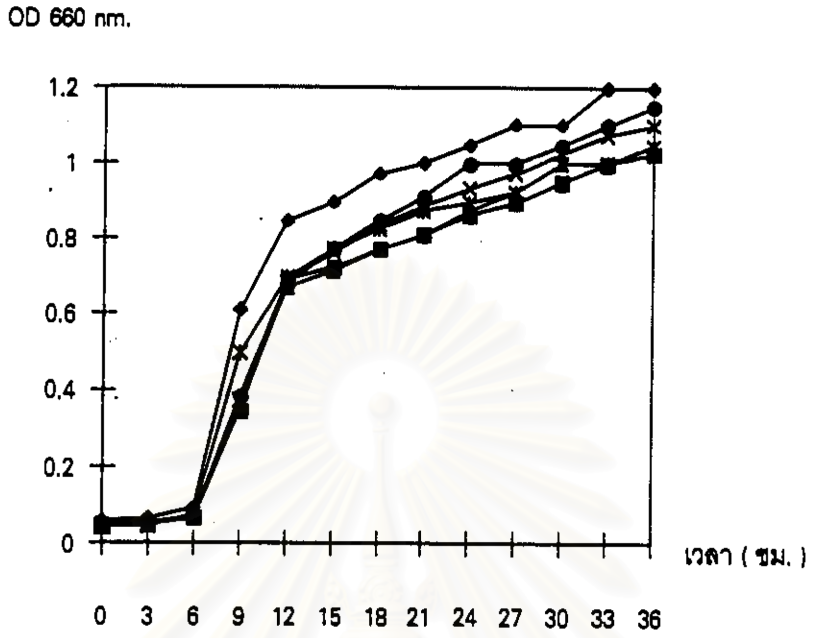
—■— *Pseudomonas aeruginosa* ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จาก *Streptococcus spp.* สายพันธุ์ TD 1

—▲— *Pseudomonas aeruginosa* ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จาก *Streptococcus spp.* สายพันธุ์ TD 3

—×— *Pseudomonas aeruginosa* ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จาก *Streptococcus spp.* สายพันธุ์ NO 2

—✱— *Pseudomonas aeruginosa* ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จาก *Streptococcus lactis* TISTR 457

—●— *Pseudomonas aeruginosa* ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จาก *Streptococcus cremoris* TISTR 456



รูปที่ 8 การหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อ *Salmonella typhi* ในช่วงเวลาต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ปรับค่าความเป็นกรด - ด่างเท่ากับ 6.5 ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Streptococcus spp.* สายพันธุ์ที่คัดเลือก

—◆— *Salmonella typhi*

—■— *Salmonella typhi* ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จาก *Streptococcus spp.* สายพันธุ์ TD 1

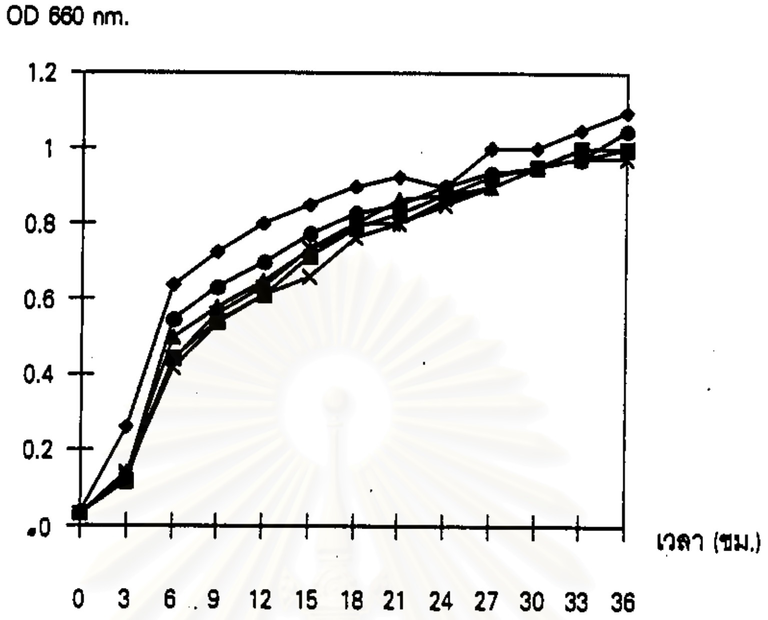
—▲— *Salmonella typhi* ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จาก *Streptococcus spp.* สายพันธุ์ TD 3

—✕— *Salmonella typhi* ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จาก *Streptococcus spp.* สายพันธุ์ NO 2

—✱— *Salmonella typhi* ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จาก *Streptococcus lactis* TISTR 457

—●— *Salmonella typhi* ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จาก *Streptococcus cremoris* TISTR 456

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 9 การหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อ *Salmonella typhimurium* ในช่วงเวลาต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่ปรับค่าความเป็นกรด - ด่างเท่ากับ 6.5 ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Streptococcus spp.* สายพันธุ์ที่คัดเลือก

—◆— *Salmonella typhimurium*

—■— *Salmonella typhimurium* ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จาก *Streptococcus spp.* สายพันธุ์ TD 1

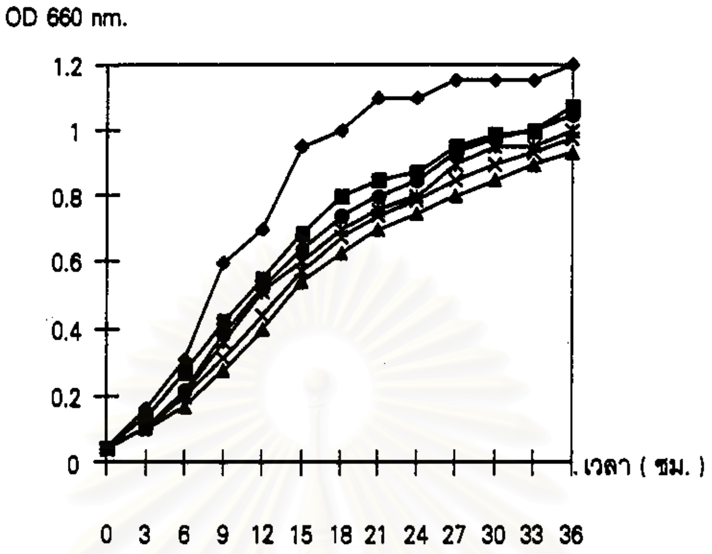
—▲— *Salmonella typhimurium* ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จาก *Streptococcus spp.* สายพันธุ์ TD 3

—×— *Salmonella typhimurium* ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จาก *Streptococcus spp.* สายพันธุ์ NO 2

—✱— *Salmonella typhimurium* ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จาก *Streptococcus lactis* TISTR 457

—●— *Salmonella typhimurium* ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จาก *Streptococcus cremoris* TISTR 456

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 10 การหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในช่วงเวลาต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ปรับค่าความเป็นกรด - ด่างเท่ากับ 6.5 ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Streptococcus spp.* สายพันธุ์ที่คัดเลือก

—◆— *Staphylococcus aureus*

—■— *Staphylococcus aureus* ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จาก *Streptococcus spp.* สายพันธุ์ TD 1

—▲— *Staphylococcus aureus* ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จาก *Streptococcus spp.* สายพันธุ์ TD 3

—✕— *Staphylococcus aureus* ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จาก *Streptococcus spp.* สายพันธุ์ NO 2

—✱— *Staphylococcus aureus* ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จาก *Streptococcus lactis* TISTR 457

—●— *Staphylococcus aureus* ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จาก *Streptococcus cremoris* TISTR 456

ตารางที่ 8 เวลาการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า (t_d) ของเชื้อทดสอบเมื่อเติมส่วนน้ำใสของ *Streptococcus* spp. สายพันธุ์ที่คัดเลือก ปรับให้มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.5

Streptococcus spp.	เวลาการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า (ชม.)						
	Bacillus cereus	*Escherichia coli*	*Listeria monocytogenes*	*Pseudomonas aeruginosa*	*Salmonella typhi*	*Salmonella typhimurium*	*Staphylococcus aureus*
control	17.43	6.93	12.38	6.03	4.52	5.47	10.66
TD 1	36.86 (2.11)	27.18 (3.92)	26.05 (2.10)	16.62 (2.76)	6.63 (1.47)	6.35 (1.16)	15.01 (1.41)
TD 3	34.14 (1.96)	22.60 (3.26)	27.72 (2.24)	16.12 (2.67)	6.84 (1.51)	5.66 (1.03)	15.69 (1.47)
NO 2	29.91 (1.72)	26.48 (3.82)	31.99 (2.58)	14.35 (2.38)	6.68 (1.48)	7.23 (1.32)	17.27 (1.62)

หมายเหตุ ตัวเลขในวงเล็บคืออัตราส่วนของเวลาการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่าของเชื้อทดสอบเมื่อนำส่วนน้ำใสของ *Streptococcus* spp. สายพันธุ์ที่คัดเลือก มาทดสอบต่อส่วนน้ำใสของตัวควบคุม (t_d *Streptococcus* spp. / t_d control)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

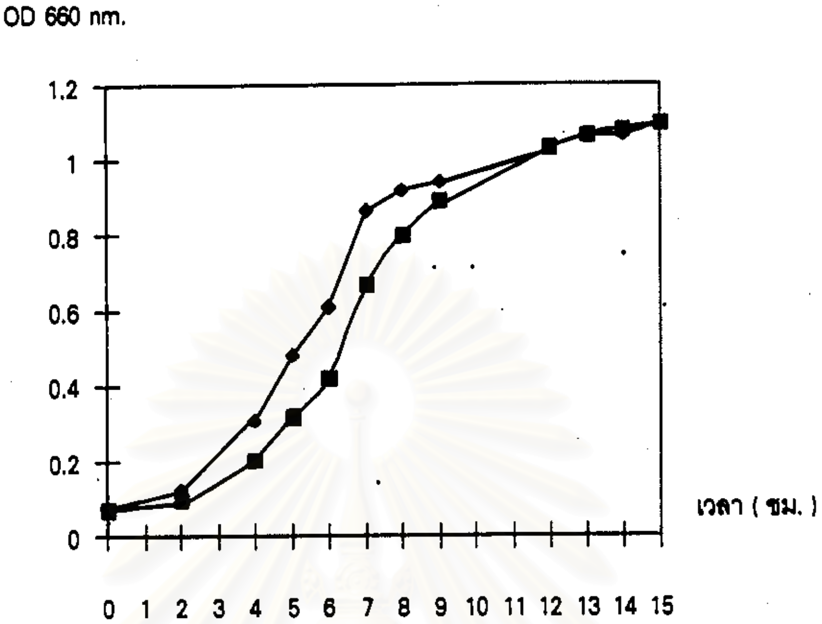
3.3 <u>การคัดเลือก *Streptococcus spp.* ที่สร้างสารต่อต้านจุลชีพ เพื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์</u>

จากผลการทดสอบการสร้างสารต่อต้านจุลชีพของเชื้อ *Streptococcus* spp. สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ คือ TD 1 , TD 3 และ NO 2 พบว่าเชื้อ TD 1 และ TD 3 ให้ผลการยับยั้งเชื้อทดสอบได้ผลดีใกล้เคียงกัน และให้ผลการยับยั้งดีกว่าเชื้อ NO 2 ดังนั้นจึงทำการเปรียบเทียบระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญของเชื้อ TD 1 และ TD 3 พบว่าเชื้อ TD 1 ใช้ระยะเวลาในการเจริญน้อยกว่า คือใช้เวลาในการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า (doubling time) เท่ากับ 3.18 ชั่วโมง แต่เชื้อ TD 3 ใช้เวลาในการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า เท่ากับ 3.3 ชั่วโมงดังนั้นจึงใช้เชื้อ TD 1 ในการเตรียมสารต่อต้านจุลชีพเพื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์ต่อไป ผลการทดลองเปรียบเทียบระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญของเชื้อ TD 1และ TD 3 แสดงดังรูปที่ 11

3.4 <u>การทดสอบการต่อต้านจุลชีพของสารต่อต้านจุลชีพที่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์</u>

3.4.1 การแยกสารต่อต้านจุลชีพและการทดสอบการต่อต้านจุลชีพของสารต่อต้านจุลชีพที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)

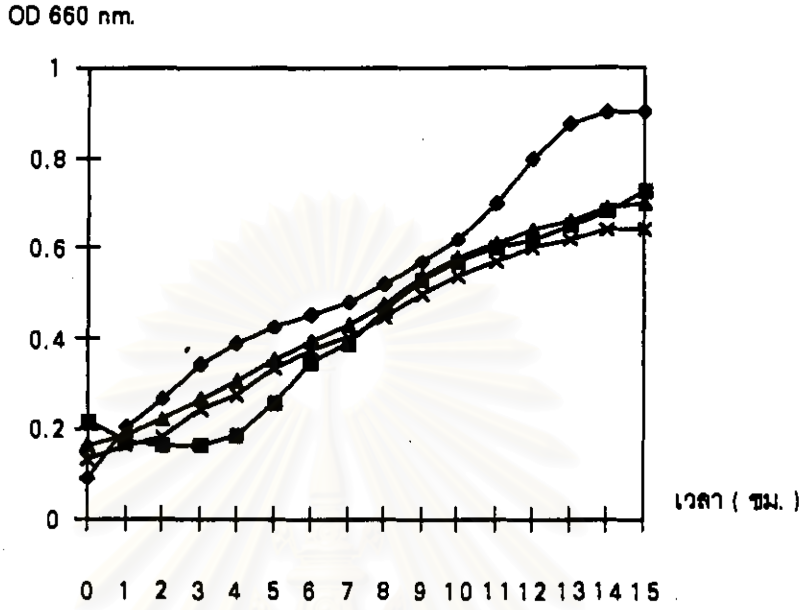
นำน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptococcus* sp. สายพันธุ์ TD 1 มาปั่นแยกเซลล์ออก แล้วจึงนำส่วนน้ำใสที่ได้ไปตกตะกอนแยกสารต่อต้านจุลชีพด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 0 - 60 , 60 - 70 และ 70 - 80 % ตามลำดับ หลังจากนั้นนำแต่ละส่วนไปปั่นแยกตะกอนสารต่อต้านจุลชีพตามวิธีการในข้อ 2.7.2 ละลายตะกอนในแต่ละลำดับส่วนด้วย 10 มิลลิโมลาร์ โซเดียมซิเตรท บัฟเฟอร์ ที่มีค่าความเป็นกรด - ด่าง 5.0 และนำมาทดสอบความสามารถในการต่อต้านจุลชีพในอาหารเหลวพบว่าสารต่อต้านจุลชีพที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 70 - 80 % มีฤทธิ์ในการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบจากปริมาณโปรตีน (*ภาคผนวก ค.*) ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 12 - 18 และตารางที่ 8



รูปที่ 11 เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ *Streptococcus sp.* สายพันธุ์ TD 1 และ TD 3 ในอาหารเหลว

—◆— *Streptococcus* sp. สายพันธุ์ TD 1

—■— *Streptococcus* sp. สายพันธุ์ TD 3



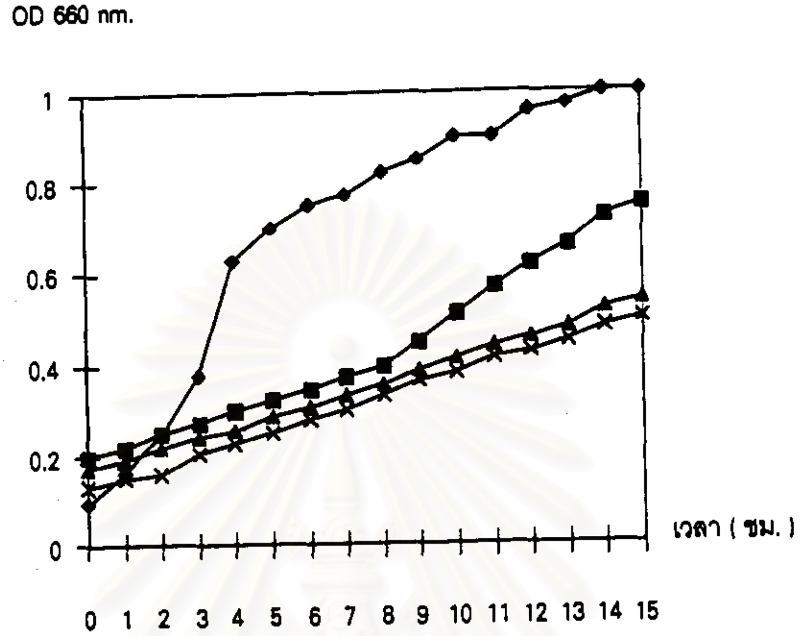
รูปที่ 12 แสดงการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อ *Bacillus cereus* ในช่วงเวลาต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Streptococcus* sp. สายพันธุ์ TD 1 และตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่างๆ

—◆— *Bacillus cereus*

—■— *Bacillus cereus* ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 0 - 60 %

—▲— *Bacillus cereus* ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 60 - 70 %

—×— *Bacillus cereus* ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 70 - 80 %



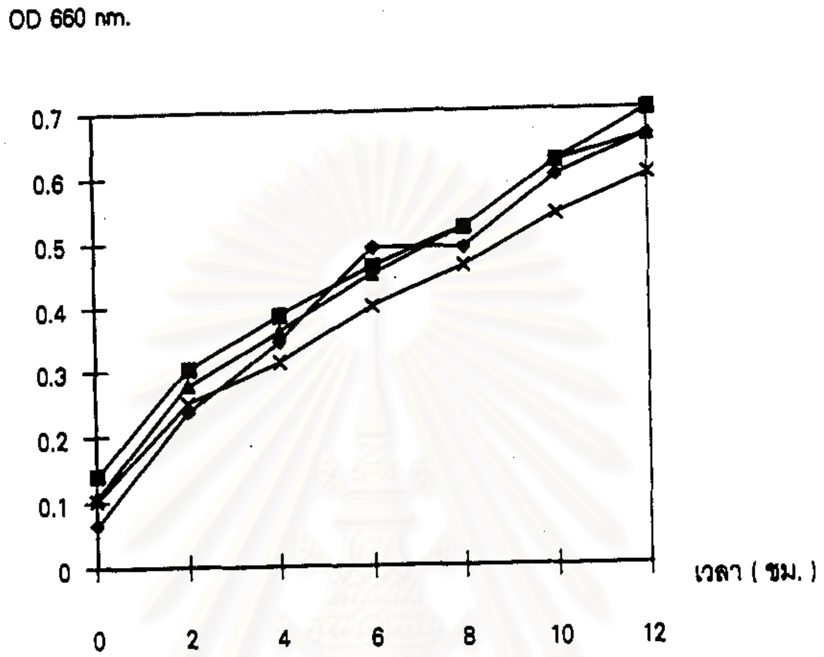
รูปที่ 13 แสดงการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli* ในช่วงเวลาต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Streptococcus* sp. สายพันธุ์ TD 1 และตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่างๆ

—◆— *Escherichia coli*

—■— *Escherichia coli* ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 0 - 60 %

—▲— *Escherichia coli* ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 60 - 70 %

—✕— *Escherichia coli* ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 70 - 80 %



รูปที่ 14 แสดงการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในช่วงเวลาต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Streptococcus* sp. สายพันธุ์ TD 1 และตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่างๆ

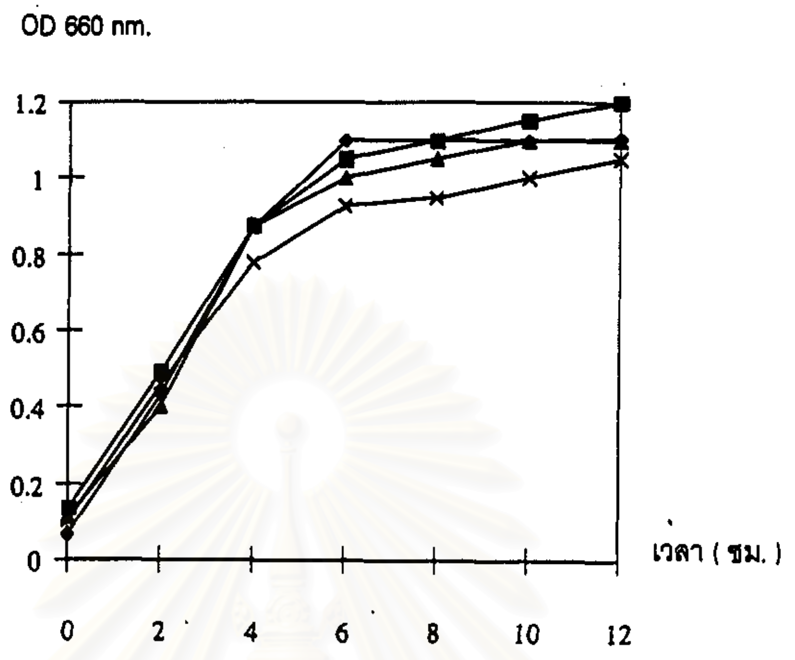
—◆— *Listeria monocytogenes*

—■— *Listeria monocytogenes* ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 0 - 60 %

—▲— *Listeria monocytogenes* ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 60 - 70 %

—✕— *Listeria monocytogenes* ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 70 - 80 %

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



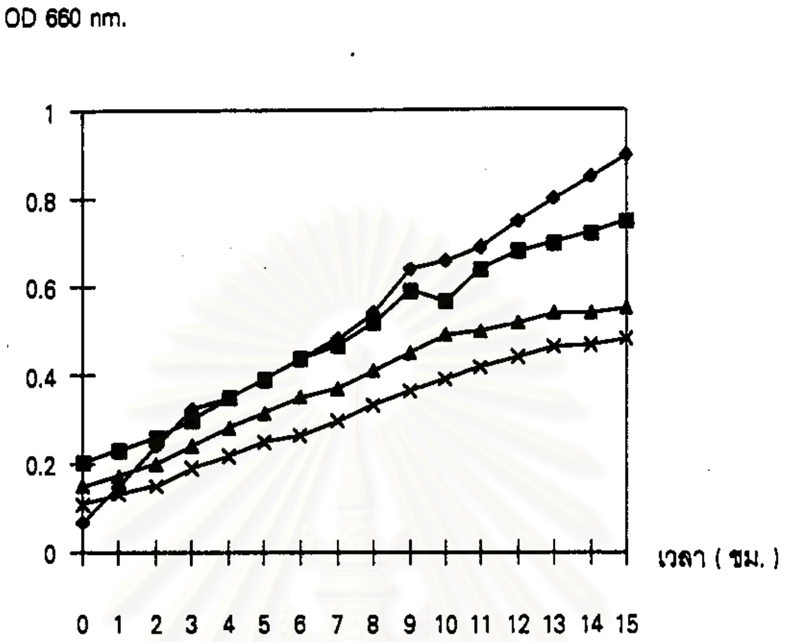
รูปที่ 15 แสดงการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ในช่วงเวลาต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Streptococcus* sp. สายพันธุ์ TD 1 และตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่างๆ

—◆— *Pseudomonas aeruginosa*

—■— *Pseudomonas aeruginosa* ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 0 - 60 %

—▲— *Pseudomonas aeruginosa* ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 60 - 70 %

—✕— *Pseudomonas aeruginosa* ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 70 - 80 %



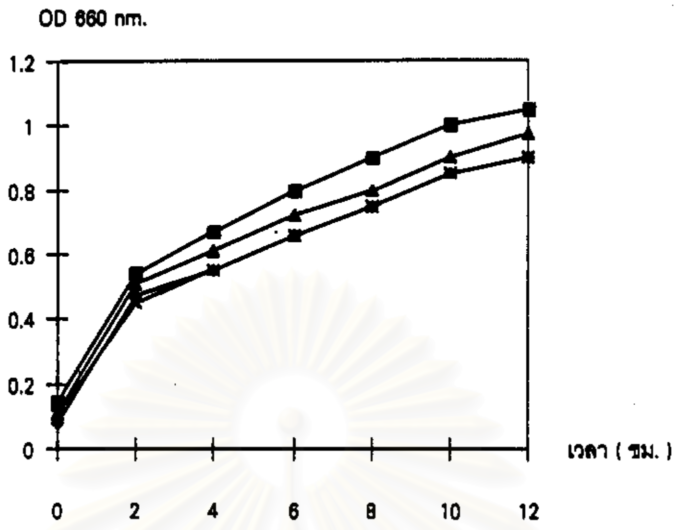
รูปที่ 16 แสดงการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อ *Salmonella typhi* ในช่วงเวลาต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Streptococcus* sp. สายพันธุ์ TD 1 และตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่างๆ

—◆— *Salmonella typhi*

—■— *Salmonella typhi* ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 0 - 60 %

—▲— *Salmonella typhi* ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 60 - 70 %

—✕— *Salmonella typhi* ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 70 - 80 %



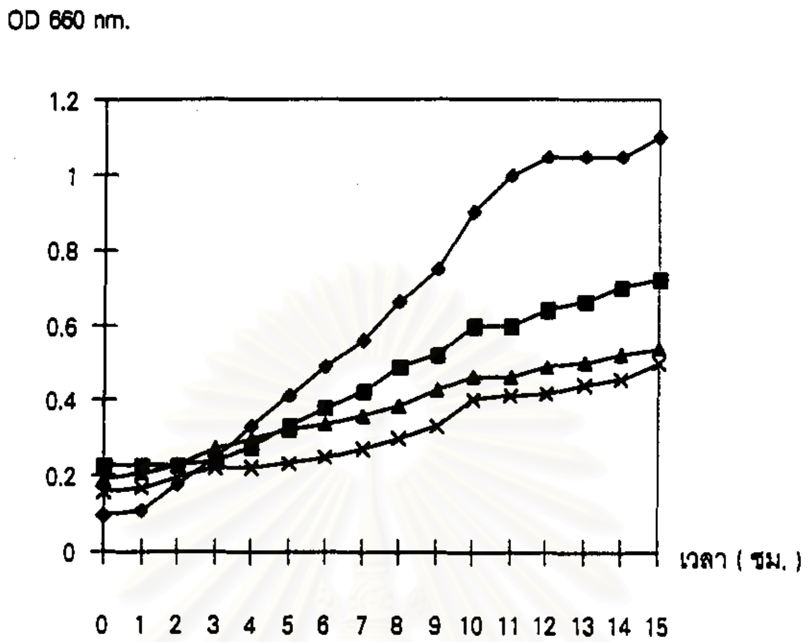
รูปที่ 17 แสดงการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อ *Salmonella typhimurium* ในช่วงเวลาต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Streptococcus* sp. สายพันธุ์ TD 1 และตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่างๆ

—◆— *Salmonella typhimurium*

—■— *Salmonella typhimurium* ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 0 - 60 %

—▲— *Salmonella typhimurium* ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 60 - 70 %

—✕— *Salmonella typhimurium* ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 70 - 80 %



รูปที่ 18 แสดงการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในช่วงเวลาต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Streptococcus* sp. สายพันธุ์ TD 1 และตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่างๆ

—◆— *Staphylococcus aureus*

—■— *Staphylococcus aureus* ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 0 - 60 %

—▲— *Staphylococcus aureus* ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 60 - 70 %

—✕— *Staphylococcus aureus* ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 70 - 80 %

ตารางที่ 10 แสดงการเปรียบเทียบเวลาการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า (t_d) ของเชื้อทดสอบเมื่อเติมส่วนน้ำใสของ *Streptococcus* sp. สายพันธุ์ TD 1 ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.5 และนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ ซีเอ็ม-เซลลูโลส

Fraction Number	เวลาการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า (ชม.)						
	Bacillus cereus	*Escherichia coli*	*Listeria monocytogenes*	*Pseudomonas aeruginosa*	*Salmonella typhi*	*Salmonella typhimurium*	*Staphylococcus aureus*
control	10.58	4.39	11.09	3.15	8.15	3.55	9.03
9 - 12	19.12 (1.81)	22.56 (5.14)	16.40 (1.48)	3.25 (1.03)	21.66 (2.66)	3.65 (1.03)	21.09 (2.34)
62 - 64	21.56 (2.04)	23.55 (5.36)	16.31 (1.47)	3.30 (1.05)	49.50 (6.07)	3.70 (1.04)	18.48 (2.05)

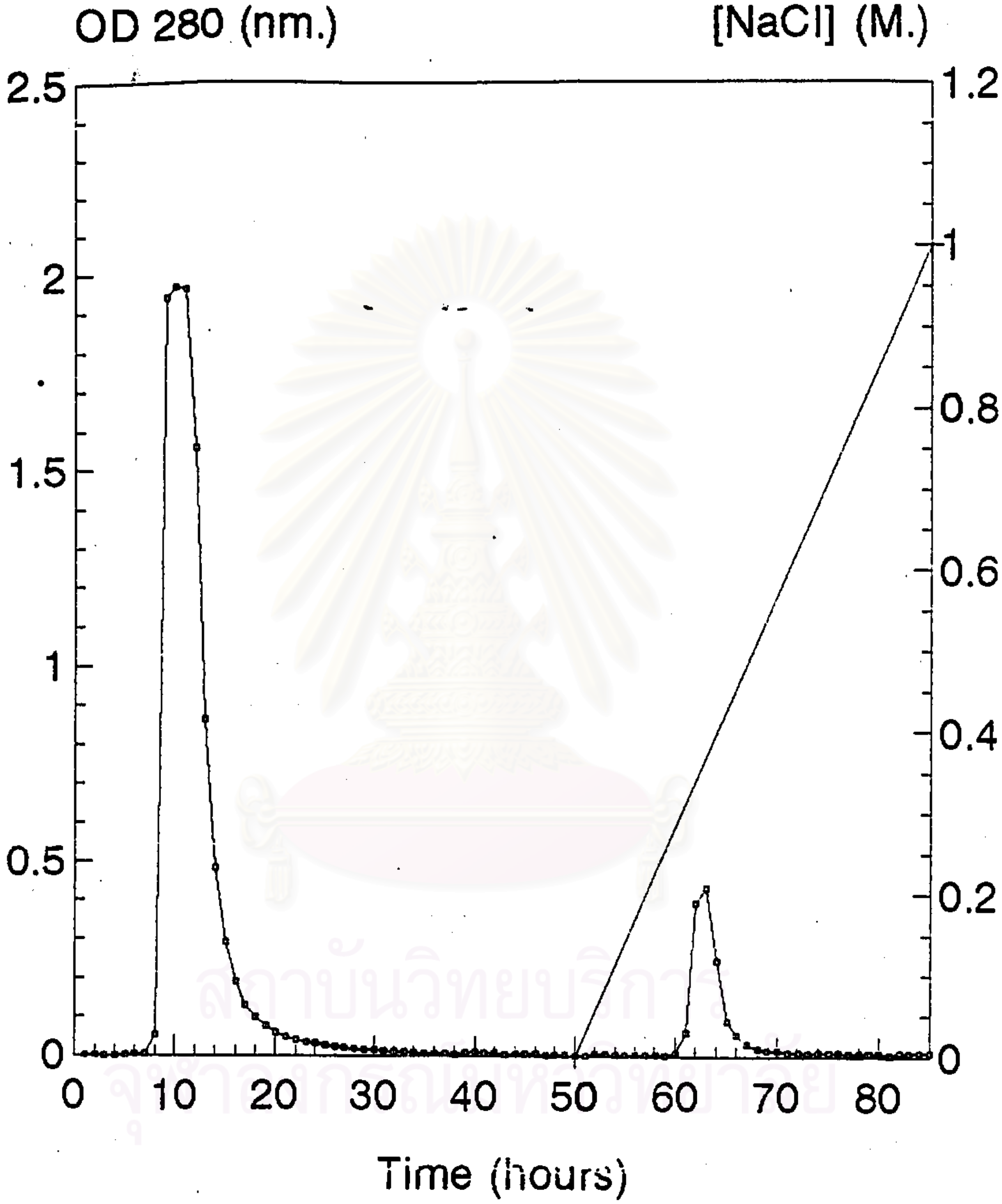
<u>หมายเหตุ</u> ตัวเลขในวงเล็บคืออัตราส่วนของเวลาการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่าของเชื้อทดสอบ เมื่อนำส่วนน้ำใสของ Streptococcus sp. สายพันธุ์ TD 1 มาทดสอบต่อส่วนน้ำใสของตัวควบคุม (t_d *Streptococcus* sp. สายพันธุ์ TD 1/ t_d control)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

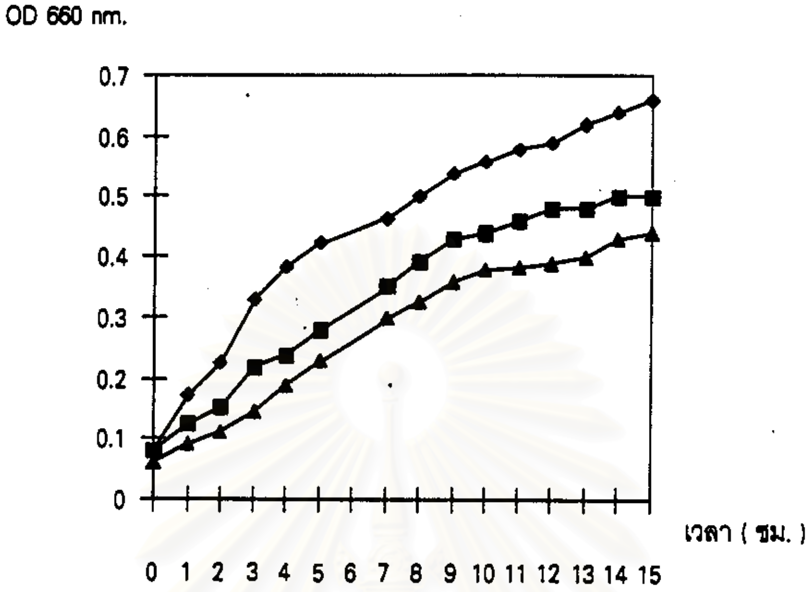
3.4.2 การทำให้บริสุทธิ์โดย คอลัมน์ ซีเอ็ม - เซลลูโลส และการทดสอบการต่อต้านจุลชีพของสารต่อต้านจุลชีพที่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์

นำส่วนของสารต่อต้านจุลชีพที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้น 70 - 80 % ของเชื้อ *Streptococcus* sp. สายพันธุ์ TD 1 มาผ่านกระบวนการไดอะไลซิสเพื่อกำจัดแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหลืออยู่ตามวิธีในข้อ 2.7.2 จากนั้นนำมาทำให้บริสุทธิ์เพิ่ม ขึ้นโดยวิธีโครมาโตกราฟี ซึ่งใช้ ซีเอ็ม - เซลลูโลสเป็นตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุบวก (Cation Exchanger) โดยทำการทดลองตามวิธีการในข้อ 2.7.3 แล้วนำลำดับส่วนที่มีโปรตีนไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบในอาหารเหลว ผลการทดลองพบว่าส่วนที่ถูกชะออกมาจากคอลัมน์ในลำดับที่ 9 - 12 ก่อนที่จะทำการชะคอลัมน์ด้วยโซเดียมคลอไรด์ และส่วนที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ในลำดับที่ 62 - 64 หลังจากที่ทำการชะคอลัมน์ด้วยโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นเข้มข้น 325 - 400 มิลลิโมลาร์ สามารถหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบได้ โดยสารที่ออกจากคอลัมน์ในลำดับที่ 62 - 64 จะแสดงผลการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบจากปริมาณโปรตีน (ภาคผนวก ค.) ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 19 - 26 และตารางที่ 10

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 19 แสดงการทำโครมาโตกราฟีของสารต่อต้านจุลชีพที่ผลิตโดย *Streptococcus* sp. สายพันธุ์ TD 1 โดยใช้คอลัมน์ ซีเอ็ม - เซลลูโลส



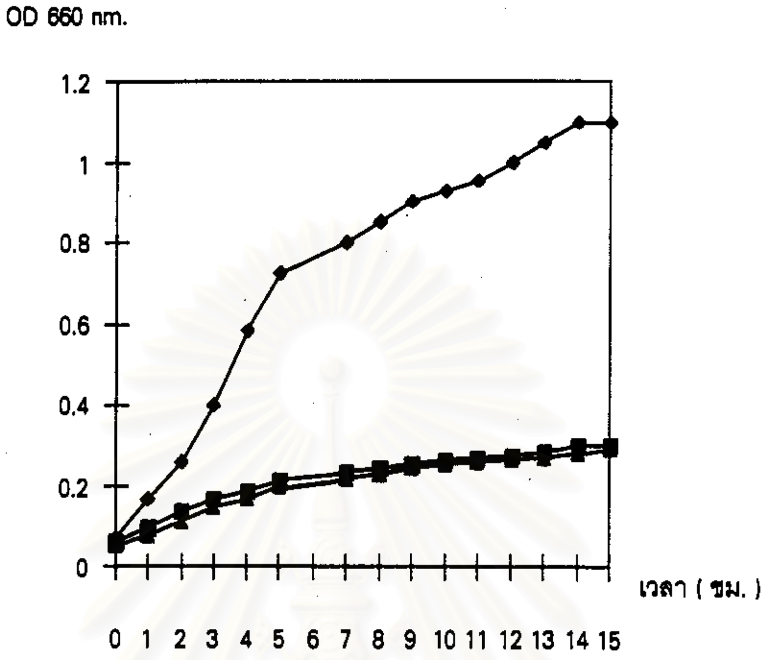
รูปที่ 20 แสดงการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อ *Bacillus cereus* ในช่วงเวลาต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่มีการเติมสารต่อต้านจุลชีพที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ ซีเอ็ม - เซลลูโลส

—◆— *Bacillus cereus*

—■— *Bacillus cereus* ที่มีการเติมสารต่อต้านจุลชีพที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ลำดับที่ 9 - 12

—▲— *Bacillus cereus* ที่มีการเติมสารต่อต้านจุลชีพที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ลำดับที่ 62 - 64

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



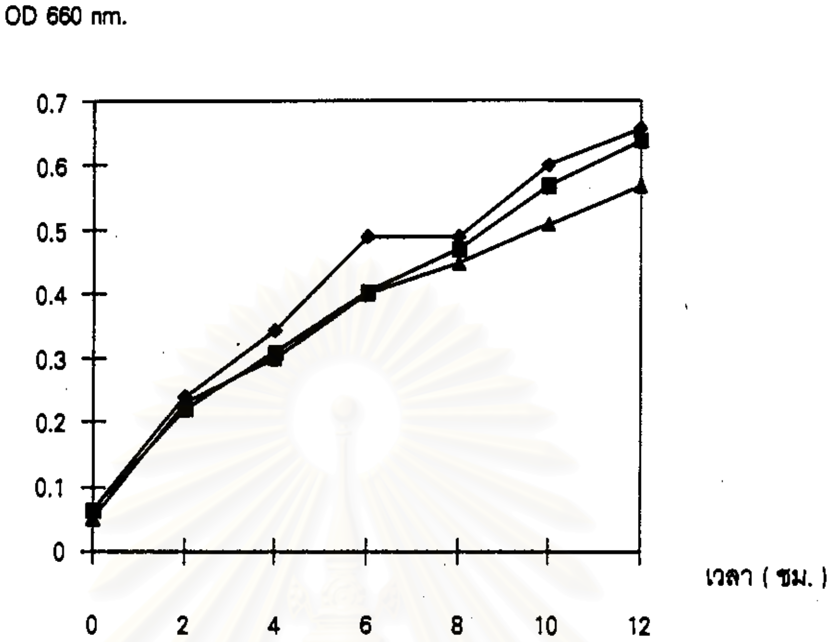
รูปที่ 21 แสดงการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli* ในช่วงเวลาต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่มีการเติมสารต่อต้านจุลชีพที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ ซีเอ็ม - เซลลูโลส

—◆— *Escherichia coli*

—■— *Escherichia coli* ที่มีการเติมสารต่อต้านจุลชีพที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ลำดับที่ 9 - 12

—▲— *Escherichia coli* ที่มีการเติมสารต่อต้านจุลชีพที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ลำดับที่ 62 - 64

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



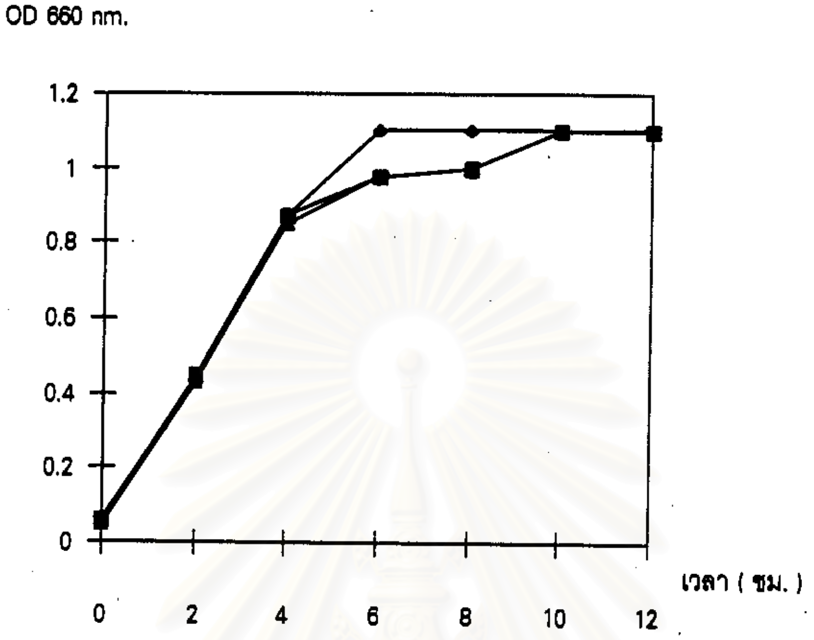
รูปที่.22 แสดงการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในช่วงเวลาต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่มีการเติมสารต่อต้านจุลชีพที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ ซีเอ็ม - เซลลูโลส

—◆— *Listeria monocytogenes*

—■— *Listeria monocytogenes* ที่มีการเติมสารต่อต้านจุลชีพที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ ลำดับที่ 9 - 12

—▲— *Listeria monocytogenes* ที่มีการเติมสารต่อต้านจุลชีพที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ ลำดับที่ 62 - 64

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

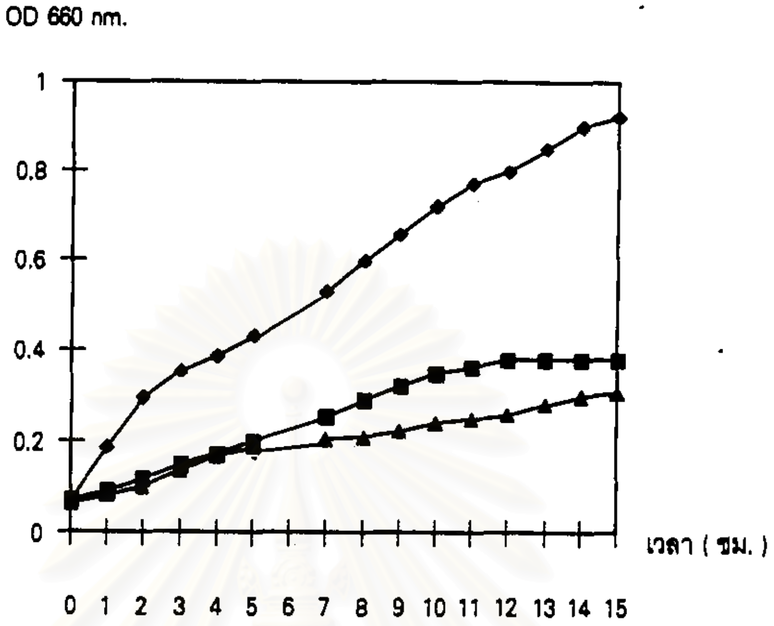


รูปที่ 23 แสดงการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ในช่วงเวลาต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่มีการเติมสารต่อต้านจุลชีพที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ ซีเอ็ม - เซลลูโลส

—◆— *Pseudomonas aeruginosa*

—■— *Pseudomonas aeruginosa* ที่มีการเติมสารต่อต้านจุลชีพที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ลำดับที่ 9 - 12

—▲— *Pseudomonas aeruginosa* ที่มีการเติมสารต่อต้านจุลชีพที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ลำดับที่ 62 - 64



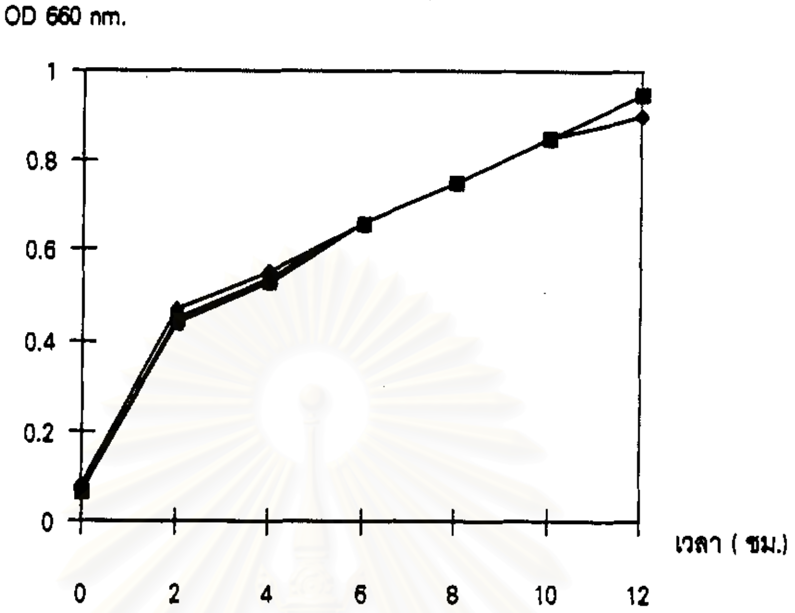
รูปที่ 24 แสดงการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อ *Salmonella typhi* ในช่วงเวลาต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่มีการเติมสารต่อต้านจุลชีพที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ ซีเอ็ม - เซลลูโลส

—◆— *Salmonella typhi*

—■— *Salmonella typhi* ที่มีการเติมสารต่อต้านจุลชีพที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ลำดับที่ 9 - 12

—▲— *Salmonella typhi* ที่มีการเติมสารต่อต้านจุลชีพที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ลำดับที่ 62 - 64

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

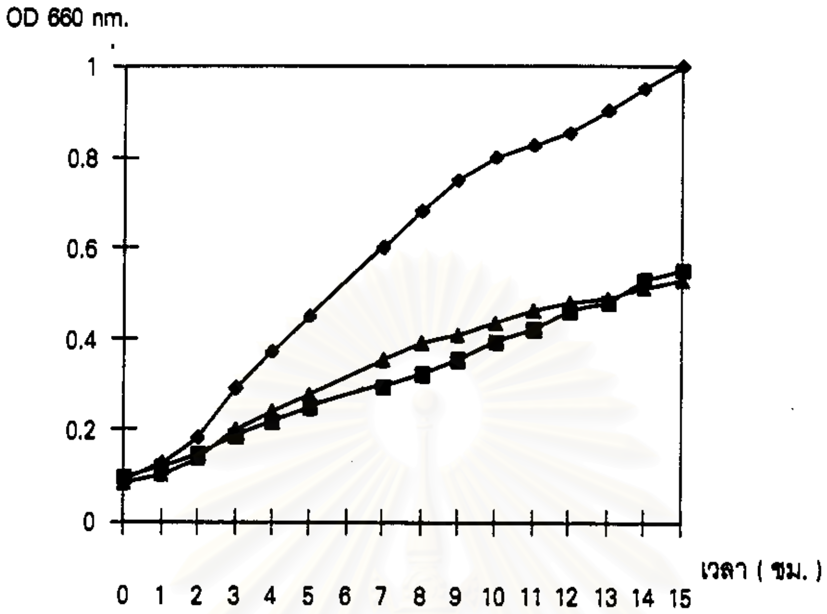


รูปที่ 25 แสดงการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อ *Salmonella typhimurium* ในช่วงเวลาต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่มีการเติมสารต่อต้านจุลชีพที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ ซีเอ็ม - เซลลูโลส

—◆— *Salmonella typhimurium*

—■— *Salmonella typhimurium* ที่มีการเติมสารต่อต้านจุลชีพที่ผ่านออกมาจาก คอลัมน์ ลำดับที่ 9 - 12

—▲— *Salmonella typhimurium* ที่มีการเติมสารต่อต้านจุลชีพที่ผ่านออกมาจาก คอลัมน์ ลำดับที่ 62 - 64



รูปที่ 26 แสดงการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในช่วงเวลาต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่มีการเติมสารต่อต้านจุลชีพที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ ซีเอ็ม - เซลลูโลส

—◆— *Staphylococcus aureus*

—■— *Staphylococcus aureus* ที่มีการเติมสารต่อต้านจุลชีพที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ ลำดับที่ 9 - 12

—▲— *Staphylococcus aureus* ที่มีการเติมสารต่อต้านจุลชีพที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ ลำดับที่ 62 - 64

ตารางที่ 9 แสดงการเปรียบเทียบเวลาการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า (t_d) ของเชื้อทดสอบเมื่อเติมส่วนน้ำใสของ *Streptococcus* sp. สายพันธุ์ TD 1 ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.5 และนำมาตกตะกอนด้วย $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้นต่างๆ

$(NH_4)_2SO_4$ precipitation (%)	เวลาการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า (ชม.)						
	Bacillus cereus	*Escherichia coli*	*Listeria monocytogenes*	*Pseudomonas aeruginosa*	*Salmonella typhi*	*Salmonella typhimurium*	*Staphylococcus aureus*
control	13.59	4.59	11.09	3.15	13.72	3.55	8.4
0 - 60 %	10.66 (0.78)	22.35 (4.87)	19.25 (1.74)	3.65 (1.16)	15.72 (1.15)	3.51 (0.99)	13.25 (1.58)
60 - 70 %	16.03 (1.18)	29.85 (6.50)	17.11 (1.54)	2.92 (0.93)	19.75 (1.44)	3.51 (0.99)	25.87 (3.08)
70 - 80 %	13.73 (1.01)	28.88 (6.29)	19.52 (1.76)	4.44 (1.41)	24.72 (1.80)	4.02 (1.13)	28.17 (3.35)

<u>หมายเหตุ</u> ตัวเลขในวงเล็บคืออัตราส่วนของเวลาการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่าของเชื้อทดสอบ เมื่อนำส่วนน้ำใสของ Streptococcus sp. สายพันธุ์ TD 1 มาทดสอบต่อส่วนน้ำใสของตัวควบคุม (t_d *Streptococcus* sp. สายพันธุ์ TD 1/ t_d control)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

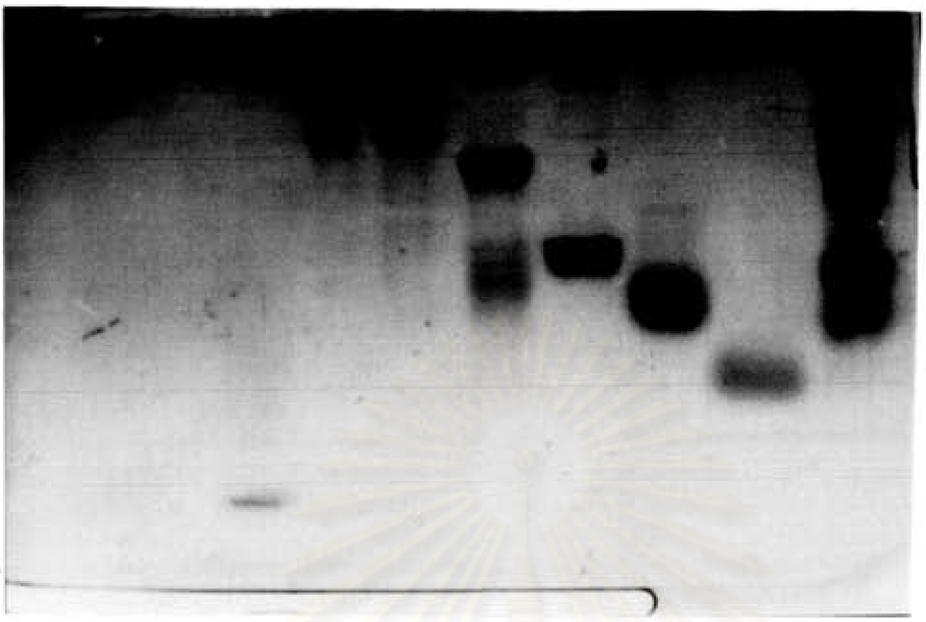
3.4.3 การทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี 50

นำส่วนของสารต่อต้านจุลชีพที่ออกจากคอลัมน์ซีเอ็ม - เซลลูโลส ที่มีผลในการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบได้ดี ในลำดับส่วนที่ 62 - 64 มาทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นด้วยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี 50 และนำลำดับส่วนที่มีโปรตีนไปทดสอบความสามารถในการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบในอาหารเหลว ผลการทดลองไม่พบลำดับส่วนที่มีโปรตีนผ่านออกมาจากคอลัมน์นี้ แสดงว่าสารต่อต้านจุลชีพที่สร้างจากเชื้อ *Streptococcus* sp. สายพันธุ์ TD 1 ไม่สามารถทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี 50

3.5 <u>การศึกษาคุณสมบัติบางประการของสารต่อต้านจุลชีพโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส บนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่น</u>

นำสารต่อต้านจุลชีพในขั้นตอนต่างๆของการทำให้บริสุทธิ์ มาศึกษาองค์ประกอบหน่วยย่อยของโปรตีนและหาน้ำหนักโมเลกุล โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจล ตามวิธีการในข้อ 2 .7. 5 ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 27 -พบว่าสารต่อต้านจุลชีพที่ผ่านคอลัมน์ ซีเอ็ม - เซลลูโลส ในลำดับที่ 9 - 12 ให้แถบของโปรตีน 1 แถบ เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานคาดว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 1,100 ดาลตัน ส่วนสารต่อต้านจุลชีพที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 70 - 80 % และส่วนของสารต่อต้านจุลชีพที่ผ่านคอลัมน์ ซีเอ็ม - เซลลูโลส ในลำดับส่วนที่ 62 - 64 ตรวจไม่พบแถบของโปรตีน และเมื่อย่อยสารต่อต้านจุลชีพที่ผ่านคอลัมน์ ซีเอ็ม - เซลลูโลส ในลำดับส่วนที่ 9 - 12 ด้วยเอนไซม์โปรติเอส ไลเปส และอะไมเลส คาดว่าสารต่อต้านจุลชีพที่ได้น่าจะเป็นสารประเภทไลโพโปรตีน (Lipoprotein) ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 28

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 27 โซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟริซิสของสารต่อต้านจุลชีพที่ผลิตจาก *Streptococcus* sp. สายพันธุ์ TD 1

ช่องที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน (Apotinin , Lysozyme , Trypsinogen , Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenes , Bovine Serum Albumin) ปริมาณโปรตีน 5 ไมโครกรัม

ช่องที่ 2 Glucagon ปริมาณโปรตีน 5 ไมโครกรัม

ช่องที่ 3 Apotinin ปริมาณโปรตีน 5 ไมโครกรัม

ช่องที่ 4 Lysozyme ปริมาณโปรตีน 5 ไมโครกรัม

ช่องที่ 5 Trypsinogen ปริมาณโปรตีน 5 ไมโครกรัม

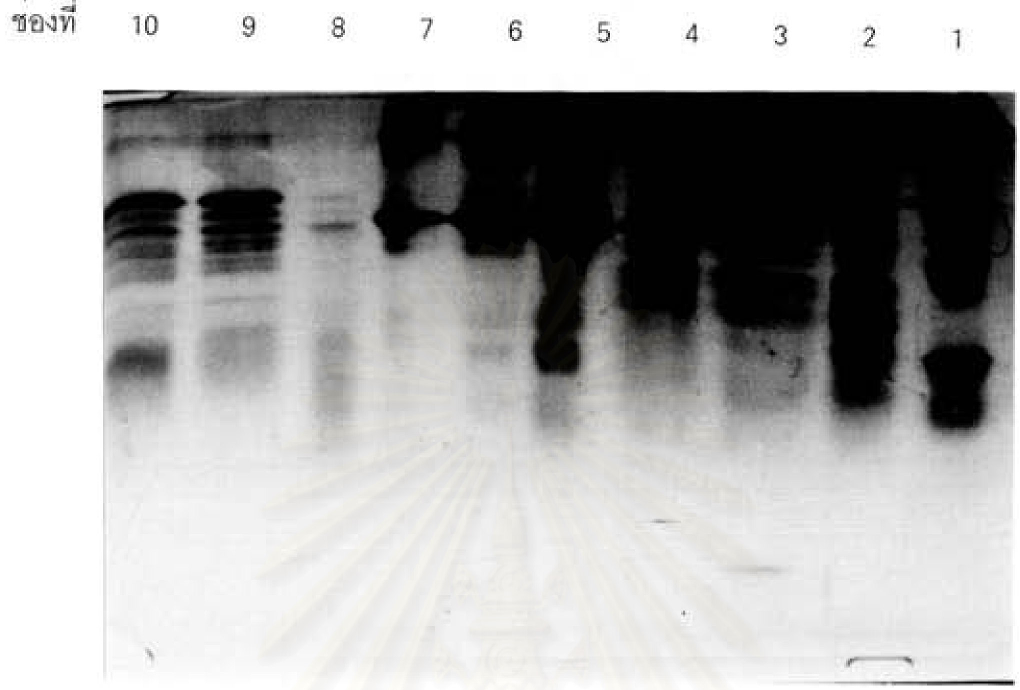
ช่องที่ 6 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenes ปริมาณโปรตีน 5 ไมโครกรัม

ช่องที่ 7 Bovine Serum Albumin ปริมาณโปรตีน 5 ไมโครกรัม

ช่องที่ 8 สารต่อต้านจุลชีพจากคอลัมน์ ซีเอ็ม - เซลลูโลส ลำดับส่วนที่ 9-12 ปริมาณโปรตีน 11.8 ไมโครกรัม

ช่องที่ 9 สารต่อต้านจุลชีพจากคอลัมน์ ซีเอ็ม - เซลลูโลส ลำดับส่วนที่ 62 - 64 ปริมาณโปรตีน 2.56 ไมโครกรัม

ช่องที่ 10 สารต่อต้านจุลชีพที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้น 70 - 80 % ปริมาณโปรตีน 12.75 ไมโครกรัม



รูปที่ 28 โซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟริซิสของสารต่อต้านจุลชีพที่ผลิตจาก Streptococcus sp. สายพันธุ์ TD 1 หลังจากตัดด้วยเอนไซม์ชนิดต่างๆ

ช่องที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน (Apotinin , Lysozyme , Trypsinogen , Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenes , Bovine Serum Albumin)

ช่องที่ 2 เอนไซม์อะไมเลส

ช่องที่ 3 สารต่อต้านจุลชีพจากคอลัมน์ ซีเอ็ม - เซลลูโลส ลำดับส่วนที่ 9-12 + เอนไซม์อะไมเลส

ช่องที่ 4 สารต่อต้านจุลชีพจากคอลัมน์ ซีเอ็ม - เซลลูโลส ลำดับส่วนที่ 62-64 + เอนไซม์อะไมเลส

ช่องที่ 5 เอนไซม์ไลเปส

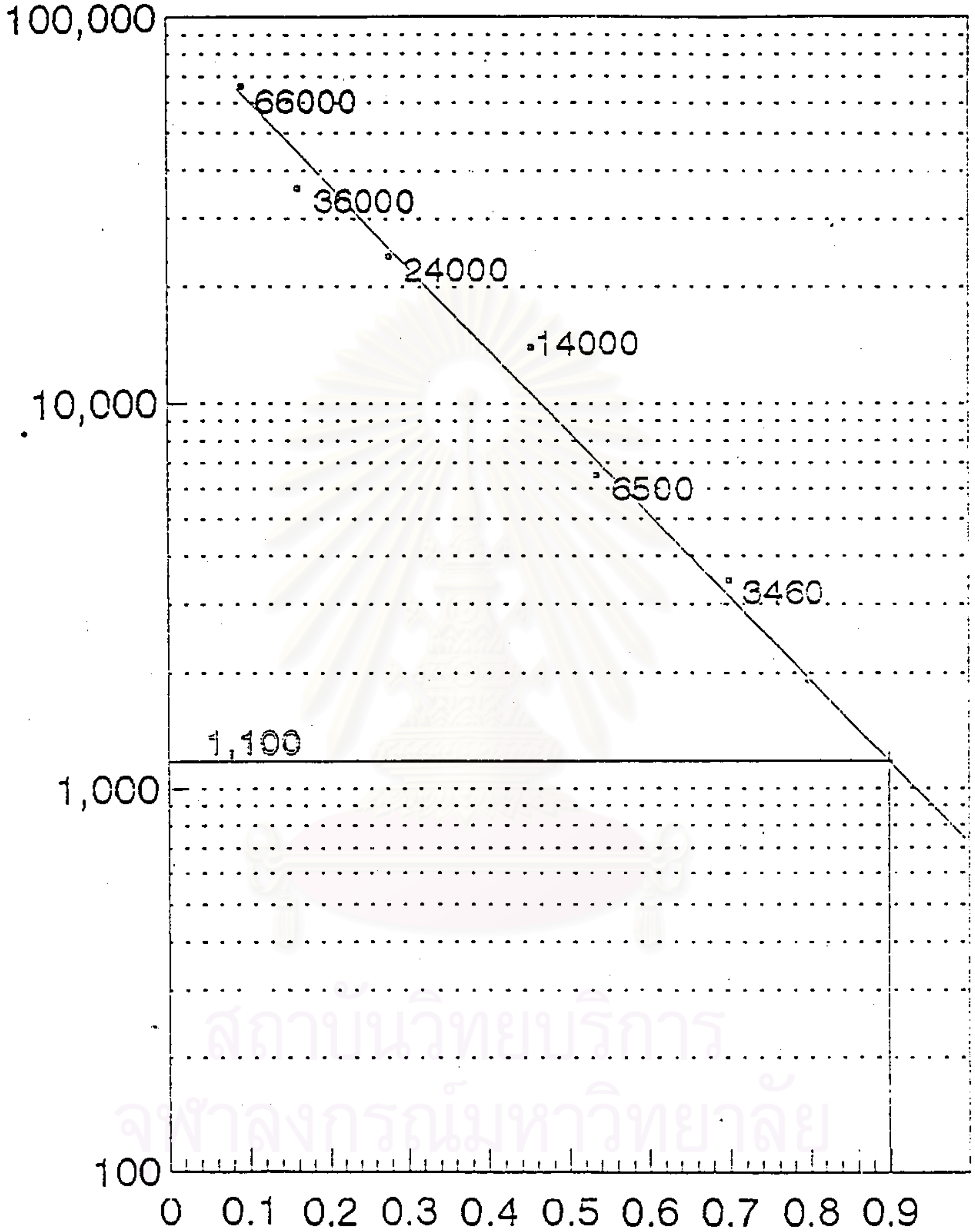
ช่องที่ 6 สารต่อต้านจุลชีพจากคอลัมน์ ซีเอ็ม - เซลลูโลส ลำดับส่วนที่ 9-12 + เอนไซม์ไลเปส

ช่องที่ 7 สารต่อต้านจุลชีพจากคอลัมน์ ซีเอ็ม - เซลลูโลส ลำดับส่วนที่ 62-64 + เอนไซม์ไลเปส

ช่องที่ 8 เอนไซม์โปรติเอส

ช่องที่ 9 สารต่อต้านจุลชีพจากคอลัมน์ ซีเอ็ม - เซลลูโลส ลำดับส่วนที่ 9-12 + เอนไซม์โปรติเอส

ช่องที่ 10 สารต่อต้านจุลชีพจากคอลัมน์ ซีเอ็ม - เซลลูโลส ลำดับส่วนที่ 62-64 + เอนไซม์โปรติเอส



รูปที่ 29 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐาน และลอกการิธึม ของน้ำหนักโมเลกุล โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วยโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจล ตามวิธีการในข้อ 2.7.5