ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารกีดขวางช่องโซเดียมโดย *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1

นางสาวนันทวัน ฤทธิ์เดช

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาจุลชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2539

ISBN 974-634-317-3

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

i 17020001

OPTIMAL CONDITIONS FOR PRODUCING SODIUM CHANNEL BLOCKING SUBSTANCES BY *Vibrio* sp. STRAIN St-1-1

MISS NUNTAVUN RIDDECH

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partail Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
Department of Microbiology
Graduate School
Chulalongkorn University
1996

ISBN 974-634-317-3

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมโดย *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1
โดย	นางสาวนันทวัน ฤทธิ์เดช
ภาควิชา	จุลชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจณา จันทองจีน
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. สันติ ถุงสุวรรณ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ส่งศรี กุลปรีชา)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจณา จันทองจีน)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ วีระวุฒิ มหามนตรี)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

นันทวัน ฤทธิ์เดช : ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารกีดขวางช่องโซเดียมโดย *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 (OPTIMAL CONDITIONS FOR PRODUCING SODIUM CHANNEL BLOCKING SUBSTANCES BY *Vibrio* sp. STRAIN St-1-1) อ.ที่ปรึกษา รศ.ดร.กาญจนา จันทองจีน, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ, 116 หน้า ISBN 974-634-317-3.

Vibrio sp. สายพันธุ์ St-1-1 ที่แยกจากหอยทรายบริเวณชายฝั่งทะเลเกาะสีชังจังหวัดชลบุรี สามารถสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมได้ จากการศึกษาองค์ประกอบของอาหาร และภาวะในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมในระดับขวดเขย่า พบว่าองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมประกอบด้วยกลูโคส 0.2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน โพลีเปปโตน 0.1 เปอร์เซ็นต์และสารสกัดจากยีสต์ 0.5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งไนโตรเจน และโซเดียมคลอไรด์ 1.8 เปอร์เซ็นต์, แมกนีเซียมซัลเฟต 0.35 เปอร์เซ็นต์, ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งเกลือแร่ ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.5 อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ภายใต้ภาวะดังกล่าวเชื้อสามารถสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมได้ 64.27 ไมโครกรัมต่อลิตรหรือเพิ่มขึ้น 3 เท่าเมื่อเทียบกับการเลี้ยงในภาวะเดิมที่ยังไม่ได้ปรับปรุงซึ่งเชื้อผลิตได้เพียง 21.74 ไมโครกรัมต่อลิตร

จากการวิเคราะห์หาชนิดอนุพันธ์ของสารกีดขวางช่องโซเดียมที่สร้างจาก *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 โดยวิธีอิเลคโตรโฟริซีส สามารถตรวจพบสารกีดขวางช่องโซเดียมกลุ่มพิษอัมพาตจากหอย (PSPs) เป็นอนุพันธ์ GTX1 และเมื่อทำการวิเคราะห์โดยวิธีเอช พี แอล ซี พบอนุพันธ์ GTX2 และอนุพันธ์ GTX4 ซึ่งเป็น epimer ของอนุพันธ์ GTX1 และพบฟีคที่อาจจะเป็นสารกีดขวางช่องโซเดียมกลุ่มเทโทรโดทอกซิน (TTXs) อนุพันธ์ 4epi-TTX ปนอยู่ในสารกีดขวางช่องโซเดียม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต นันทวัน ฤทธิ์เดช

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2538 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

##C626258 :MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY
KEY WORD: *Vibrio* sp. STRAIN St-1-1 / SODIUM CHANNEL BLOCKER / TETRODOTOXIN
NUNTAVUN RIDDECH : OPTIMAL CONDITIONS FOR PRODUCING SODIUM CHANNEL BLOCKING SUBSTANCES BY *Vibrio* sp. STRAIN St-1-1. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. KANCHANA JUNTONGJIN, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. PAIROH PINPHANICHAKARN, Ph.D., 116 pp.
ISBN 974-634-317-3

Vibrio sp. strain St-1-1 isolated from sand clams in the coastal area of Sichang Island Cholburi province was capable to produce sodium channel blocking (SCB) substances. Medium compositions and cultivation conditions for SCB production by *Vibrio* sp. strain St-1-1 were optimized in shake flask. Optimal medium compositions consisted of 0.2% glucose as a carbon source, 0.1% polypeptone and 0.5% yeast extract as nitrogen sources with the supplement of 1.8% NaCl, 0.35% $MgSO_4$, $7H_2O$ and 0.05% Na_2HPO_4. $2H_2O$ as mineral salts. Under the optimal cultivating conditions at initial pH 7.5, 28 ^oC incubation with 200 rpm shaking speed for 72 hours, the maximum SCB yield of 64.27 ug/l was obtained. This condition increased toxin production three times higher than that of the un-optimized one (21.74 ug/l).

SCB derivatives produced under the optimal conditions were examined by electrophoresis and HPLC. The positive spot appeared in electrophoresis possibly be GTX1. HPLC chromatogram showed the other GTX derivatives which were GTX2 and GTX4 (an epimer of GTX1). Another small shoulder peak suggested a TTX derivative (4-epi TTX) probably existed in the SCB mixture.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต นันทวัน ฤทธิ์เดช

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2538 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงลงไปได้ด้วยดีโดยได้รับความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจณา จันทองจีน และอาจารย์ที่ปรึกษาร่วมรองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ แนวทางในการทำงานวิจัยข้อคิดเห็นตลอดจนแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ.ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. สังศรี กุลปรีชา และรองศาสตราจารย์ วีระวุฒิ มหามนตรี ที่ได้กรุณาเป็นคณะกรรมการในการสอบและให้คำแนะนำต่างๆ รวมทั้งแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบรูณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ Professor Masaaki Kodama, Laboratory of Marine Biological Chemistry, School of Fisheries Sciences, Kitasato University, Sanriku, Japan. ที่ให้ความกรุณาช่วยเหลือในด้านการวิเคราะห์โดยวิธีเอช พี แอล ซี

ขอขอบพระคุณสำนักงานปลัดทบวงมหาวิทยาลัย โครงการผลิตและพัฒนาอาจารย์และบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนการศึกษาและวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน คุณเบญจภรณ์ รุ่งพิทักษ์ไชย และคุณพรพิมล เปรมชัยพร ที่ให้ความสะดวกในด้านต่างๆ และมีส่วนช่วยเหลือในงานวิจัย

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ที่ให้กำลังใจ และมีส่วนช่วยเหลืองานวิจัยนี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และคุณยาย ที่ได้ให้กำลังใจ ช่วยเหลือและสนับสนุนในด้านต่างๆ จนงานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีและสำเร็จการศึกษา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญรูป	ฎ
สัญลักษณ์และคำย่อ	ณ
บทที่	
1. บทนำ	1
2. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย	22
3. ผลการทดลอง	36
4. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	81
รายการอ้างอิง	88
ภาคผนวก ก	95
ภาคผนวก ข	100
ภาคผนวก ค	107
ประวัติผู้เขียน	116

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. สมบัติของสารกีดขวางช่องโซเดียมอนุพันธ์เทโทรโดทอกซิน (TTXs)..... 3
2. สมบัติของสารกีดขวางช่องโซเดียมอนุพันธ์ซัคซิทอกซิน (STX)..... 7
3. ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ การสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม และค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเลี้ยง *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 ในอาหารเหลว L - medium..... 38
4. ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมที่สร้างโดย *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ภายหลังการเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชม..... 41
5. การเจริญของ *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ภายหลังการเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชม..... 41
6. ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเลี้ยง *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 ในอาหารเหลวที่แปรผันแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ภายหลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชม..... 42
7. ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมที่สร้างโดย *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันแหล่งไนโตรเจนชนิดอินทรีย์สาร ภายหลังการเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชม..... 47
8. การเจริญของ *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันแหล่งไนโตรเจนชนิดอินทรีย์สารภายหลังการเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชม..... 47
9. ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเลี้ยง *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 ในอาหารเหลวที่แปรผันแหล่งไนโตรเจนชนิดอินทรีย์สาร ภายหลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชม..... 48
10. ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมที่สร้างโดย *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันแหล่งไนโตรเจนชนิดอนินทรีย์สาร ภายหลังการเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชม..... 50

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

11. การเจริญของ *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันแหล่งไนโตรเจนชนิดอนินทรีย์สารภายหลังการเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชม..... 50
12. ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเลี้ยง *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 ในอาหารเหลวที่แปรผันแหล่งไนโตรเจนชนิดอนินทรีย์สาร ภายหลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชม..... 51
13. ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมที่สร้างโดย *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันปริมาณโซเดียมคลอไรด์ ภายหลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชม..... 55
14. การเจริญของ *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันปริมาณโซเดียมคลอไรด์ ภายหลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชม..... 55
15. ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมที่สร้างโดย *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟต ภายหลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชม..... 57
16. การเจริญของ *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟต ภายหลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชม..... 57
17. ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมที่สร้างโดย *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันปริมาณไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ภายหลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชม..... 59
18. การเจริญของ *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันปริมาณไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ภายหลังการเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชม..... 59
19. ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมที่สร้างโดย *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันปริมาณไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ภายหลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชม..... 61
20. การเจริญของ *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันปริมาณไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ภายหลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชม..... 61

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

21. ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเลี้ยง *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 ในอาหารเหลวที่แปรผันเกลือแร่ชนิดต่างๆ ภายหลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชม..... 62
22. ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมที่สร้างโดย *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ภายหลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชม..... 66
23. การเจริญของ *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ภายหลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชม..... 66
24. ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมที่สร้างโดย *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับปรุงแล้วที่อุณหภูมิต่างๆ ภายหลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชม..... 68
25. การเจริญของ *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับปรุงแล้วที่อุณหภูมิต่างๆ ภายหลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชม..... 68
26. ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียมที่สร้างโดย *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับปรุงแล้ว และนำไปบ่มเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที, 100 รอบต่อนาที และภาวะที่ไม่เขย่า ภายหลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชม..... 70
27. การเจริญของ *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับปรุงแล้ว และนำไปบ่มเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที, 100รอบต่อนาที และภาวะที่ไม่เขย่า ภายหลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชม..... 70
28 แสดงค่าการเจริญ ปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม ค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ และปริมาณไนโตรเจน เมื่อเลี้ยง *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 ในอาหารเหลวที่ได้ทำการปรับปรุงแล้ว ซึ่งประกอบด้วย กลูโคส 0.2 เปอร์เซนต์ โพลีเปปโตน 0.1 เปอร์เซนต์ สารสกัดจากยีสต์ 0.5 เปอร์เซนต์ โซเดียมคลอไรด์ 1.8 เปอร์เซนต์ แมกนีเซียมซัลเฟต 0.35 เปอร์เซนต์ และไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซนต์ ปรับความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 7.5 บ่มเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชม..... 72

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

29. ชนิดอนุพันธ์ของสารกีดขวางช่องโซเดียมกลุ่มเทโทรโดทอกซิน (TTXs) ที่ตรวจพบในสารสกัดจาก *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรที่ปรับปรุงแล้ว และวิเคราะห์โดยวิธี เอช พี แอล ซี..... 76
30. ชนิดอนุพันธ์ของสารกีดขวางช่องโซเดียมกลุ่มพิษอัมพาตจากหอย (PSPs) ที่ตรวจพบในสารสกัดจาก *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรที่ปรับปรุงแล้ว และวิเคราะห์โดยวิธี เอช พี แอล ซี..... 76

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1. โครงสร้างโมเลกุลของเทโทรโดทอกซิน..... 4
2. โครงสร้างโมเลกุลของเทโทรโดทอกซินในสารละลาย..... 5
3. โครงสร้างโมเลกุลของอนุพันธ์เทโทรโดทอกซิน..... 6
4. โครงสร้างโมเลกุลของอนุพันธ์ซัคซิทอกซิน..... 8
5. โครงสร้างสูตรโมเลกุลของอนุพันธ์พิษอัมพาตจากหอย..... 10
6. โครงสร้างของช่องโซเดียมที่ถูกขัดขวางด้วยสารกีดขวางช่องโซเดียม..... 11
7. การเจริญและการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม ของ *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว L-medium (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) ที่ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 7.5 บ่มเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชม.... 37
8. การสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม (ก) และการเจริญของ *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 ที่ 72 ชม. (ข) เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวในภาคผนวก ก ข้อ 1โดยแปรผันชนิดปริมาณแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ กลีเซอรอล ซูโครส กลูโคส สารละลายแป้ง ฟรุกโตส ความเข้มข้น 0-0.5 เปอร์เซนต์ ปรับระดับความเป็นกรดด่างที่ 7.5 บ่มเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชม..... 40
9. การสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม (ก) และการเจริญของ *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 ที่ 72 ชม. (ข) เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีกลูโคส 0.2 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรผันปริมาณโพลีเปปโตนความเข้มข้น 0-0.5 เปอร์เซนต์ แต่ไม่เติมสารสกัดจากยีสต์ St-1-1 ส่วนองค์ประกอบอาหารชนิดอื่น และภาวะการเลี้ยง ดังกล่าวไว้ภายใต้รูปที่ 8..... 45
10. การสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม (ก) และการเจริญของ *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 ที่ 72 ชม. (ข) เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีกลูโคส 0.2 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรผันชนิดและปริมาณอินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ โพลีเปปโตน ไฟโตเปปโตน โปรติโอสเปปโตน หมายเลข 3 เปปโตน และยูเรีย ความเข้มข้น 0-0.5 เปอร์เซนต์ ปรับระดับความเป็นกรดด่างที่ 7.5 บ่มเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชม..... 46

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

11. การสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม (ก) และการเจริญของ *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 ที่ 72 ชม. (ข) เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีกลูโคส 0.2 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรผันชนิดและปริมาณอนินทรีย์ไนโตรเจน โดยไม่เติมแหล่งไนโตรเจนชนิดอื่นๆ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0-0.5 เปอร์เซนต์ ปรับระดับความเป็นกรดด่างที่ 7.5 บ่มเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชม..... 49

12. การสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม (ก) และการเจริญของ *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 ที่ 72 ชม. (ข) เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีกลูโคส 0.2 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอน โพลีเปปโตน 0.1 เปอร์เซนต์ และสารสกัดจากยีสต์ 0.5 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน แหล่งเกลือแร่ ได้แก่ แมกนีเซียมซัลเฟต 0.25 เปอร์เซนต์ และไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1 เปอร์เซนต์ แล้วแปรผันปริมาณโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-2.0 เปอร์เซนต์ ปรับความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.5 บ่มเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชม..... 54

13. การสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม (ก) และการเจริญของ *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 ที่ 72 ชม. (ข) เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบและภาวะในการเลี้ยงเชื้อ เช่นเดียวกับที่ระบุไว้ใต้รูปที่ 12 ยกเว้นใช้โซเดียมคลอไรด์ 1.8 เปอร์เซนต์ และแปรผันปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้น 0-0.4 เปอร์เซนต์..... 56

14. การสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม (ก) และการเจริญของ *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 ที่ 72 ชม. (ข) เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบและภาวะในการเลี้ยงดังกล่าวภายใต้รูปที่ 13 ยกเว้นใช้แมกนีเซียมซัลเฟต 0.35 เปอร์เซนต์ และแปรผันปริมาณไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 0-0.25 เปอร์เซนต์..... 58

15. การสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม (ก) และการเจริญของ *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 ที่ 72 ชม. (ข) เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบและภาวะในการเลี้ยงเช่นเดียวกับที่กล่าวไว้ใต้รูปที่ 14 ยกเว้นไม่เติมไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต และแปรผันปริมาณไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 0-0.25 เปอร์เซนต์..... 60

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

16. การสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม (ก) และการเจริญของ *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 ที่ 72 ชม. (ข) เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่ปรับปรุงแล้ว (ภาคผนวก ก หมายเลข 3) และแปรผันความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วง 6.0-8.5 บ่มเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาทีที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชม..... 65

17. การสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม (ก) และการเจริญของ *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 ที่ 72 ชม. (ข) เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่ปรับปรุงแล้ว (ภาคผนวก ก หมายเลข 3) แล้วปรับความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 7.5 โดยแปรผันอุณหภูมิในช่วง 25-37 องศาเซลเซียส บ่มเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชม..... 67

18. การสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียม (ก) และการเจริญของ *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 ที่ 72 ชม. (ข) เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่ปรับปรุงแล้ว (ภาคผนวก ก หมายเลข 3) ปรับความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 7.5 โดยแปรผันความเร็วรอบในการเขย่าเป็น 100, 200 รอบต่อนาที และไม่เขย่า ที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชม..... 69

19. รูปแบบของการเจริญและการสร้างสารกีดขวางช่องโซเดียมของ *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ทำการปรับปรุงแล้ว ซึ่งประกอบด้วยกลูโคส 0.2 เปอร์เซนต์ โพลีเปปโตน 0.1 เปอร์เซนต์ สารสกัดจากยีสต์ 0.5 เปอร์เซนต์ โซเดียมคลอไรด์ 1.8 เปอร์เซนต์ แมกนีเซียมซัลเฟต 0.35 เปอร์เซนต์ และไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซนต์ ปรับความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 7.5 บ่มเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชม..... 71

20. ผลการวิเคราะห์ชนิดอนุพันธ์สารกีดขวางช่องโซเดียมโดยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีส เมื่อใช้ระบบการวิเคราะห์สารกลุ่มพิษอัมพาตจากหอย (PSPs) ตามวิธีการทดลองในบทที่ 2 ข้อ 1 หน้า 32..... 73

21. ผลการวิเคราะห์ชนิดอนุพันธ์สารกีดขวางช่องโซเดียมโดยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีส เมื่อใช้ระบบการวิเคราะห์สารกลุ่มเทโทรโดทอกซิน (TTXs) ตามวิธีการทดลองในบทที่ 2 ข้อ 1 หน้า 32..... 74

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

22. โครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์โดยวิธีเอช พี แอล ซี ของสารมาตรฐานกลุ่มเทโทรโดทอกซิน (A) ซึ่งได้แก่ TTX (1), 6epi-TTX (2), 6e anh-TTX (3), 4epi-TTX (4), anh-TTX (5) และโครมาโตแกรมของสารสกัดจาก *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 (B) คือพีคของสารสกัดที่มี retention time ใกล้เคียงกับพีคของสารมาตรฐาน 4epi-TTX..... 77

23. โครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์โดยวิธีเอช พี แอล ซี ของสารมาตรฐานกลุ่มกอนิออทอกซิน (A) ซึ่งได้แก่ GTX4 (1), GTX1 (2), GTX5 (3), GTX3 (4), GTX2 (5) และโครมาโตแกรมของสารสกัดจาก *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 (B) คือพีคของสารสกัดที่มี retention time ใกล้เคียงกับพีคของสารมาตรฐาน GTX2 และ GTX4..... 78

24. โครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์โดยวิธีเอช พี แอล ซี ของสารมาตรฐานกลุ่มซัคซิทอกซิน (A) ซึ่งได้แก่ NSTX (1), DSTX (2), STX (3) และโครมาโตแกรมของสารสกัดจาก *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 (B) คือพีคของสารสกัดที่มี retention time ใกล้เคียงกับพีคของสารมาตรฐาน 79

25. โครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์โดยวิธีเอช พี แอล ซี ของสารมาตรฐานกลุ่มซี ซึ่งได้แก่ C1 (1), C2 (2), C3 (3), C4 (4) และโครมาโตแกรมของสารสกัดจาก *Vibrio* sp. สายพันธุ์ St-1-1 (B) คือพีคของสารสกัดที่มี retention time ใกล้เคียงกับพีคของสารมาตรฐาน 80

26. กราฟมาตรฐานระหว่างร้อยละของเซลล์เพาะเลี้ยงที่ยังมีชีวิตกับปริมาณเทโทรโดทอกซิน (ไมโครกรัมต่อ 10 ไมโครลิตร) จากวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ..... 105

27. ลักษณะของเซลล์เพาะเลี้ยง neuro-2A ATCC CCL 131 ที่ใช้ในการตรวจหาปริมาณสารกีดขวางช่องโซเดียม เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ phase contrast กำลังขยาย 500 เท่า..... 106

สัญญลักษณ์และคำย่อ

ชม. = ชั่วโมง

มก. = มิลลิกรัม

มม. = มิลลิเมตร

มล. = มิลลิลิตร

M = โมลาร์

mM = มิลลิโมลาร์

μM = ไมโครโมลาร์

μg = ไมโครกรัม

rpm = รอบต่อนาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย