บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. 1 อุปกรณ์สำคัญ

เครื่องเขย่า (Shaker) รุ่น G-10 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co. Inc, USA.

เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น 240 ของบริษัท Corning , USA.

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 ของบริษัท Bausch & Lomb , USA.

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV / Vis spectrophotometer) รุ่น PR-1 ของบริษัท Shimudzu , Japan.

เครื่องเก็บสารลำดับส่วน (Fraction Collector) รุ่น Fraction - 200 ของบริษัท Pharmacia Fine Chemical , Japan.

เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก(Microcentrifuge)รุ่น H-103N ของบริษัท Kokusan, Japan.

เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (Refrigerated Centrifuge) รุ่น J2 - 21 ของบริษัท Beckman , USA.

ตู้ลามินาโฟล์ว (Lamina Flow) รุ่น W-760 ของบริษัท Olympus , Japan.

กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CH-C01-764604 ของบริษัท Olympus , Japan.

กล้องสเตริโอสองตา รุ่น VM-20515 ของบริษัทOlympus , Japan.

กล้องจุลทรรศน์สำหรับถ่ายภาพ รุ่น BH-2 ของบริษัท Olympus , Japan.

อุปกรณ์นับเม็ดเลือด(Haemacytometer) ของบริษัท Becco , Germany.

หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) รุ่น HA-36 ของบริษัท Hirayama Manufacturing Cooperation , Japan.

กระดาษทดสอบ(Paper Disc) ของบริษัท Toyo Seisakusho ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มม. หนา 1 มม.

ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (Deep Freeze) อุณหภูมิ -20^{0}C รุ่น FO535 ของบริษัท Sanyo Electric Co. ,Ltd, Japan.

ชุดเครื่องมือสำหรับทำเจลอิเลคโตโฟริซิสแบบแผ่น (Slab Gel Electrophoresis Equipment) รุ่น Mini Protein Dual Slab Cell ของบริษัท Biorad , USA.

คอลัมน์สำหรับทำโครมาโตรกราฟีของบริษัท Biorad , USA.

เครื่องไฮเพอร์ฟอแมนซ์ลิควิดโครมาโตรกราฟี (High Performance Liquid Chromatography) รุ่น LC-3A ของบริษัท Shimudzu , Japan.

เครื่องอินฟราเรดสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Infrared Spectrophotometer) ของบริษัท Perkin-Elmer , USA.

1. 2 เคมีภัณฑ์

แอบโซลูท เอทานอล (Absolute Ethanol) ของบริษัท E. Merck , Germany.

อะซิโตไนไตรท์ (Acetonitrile) ของบริษัท E. Merck , Germany.

อะคริลาไมด์ (Acylamide) ของบริษัท Sigma Chemical Company , USA.

แอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium Sulphate) ของบริษัท E . Merck , Germany.

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (Ammonium Persulphate) ของบริษัท Sigma Chemical Company , USA.

3 , 5 ไดไนโตรซาลิไซลิกแอซิด (3 ,5-Dinitrosalicylic acid) ของบริษัท Sigma Chemical Company , USA.

อีดีทีเอ (EDTA) ของบริษัท Sigma Chemical Company , USA.

เฟอริกคลอไรด์ (Ferric Chloride) ของบริษัท E . Merck , Germany.

แมกนีเซียมคลอไรด์ (Magnesium Chloride) ของษริษัท E .Merck , Germany.

แมงกานีสคลอไรด์ (Manganise Chloride) ของบริษัท E .Merck , Germany.

2-เมอแคปโตเอทานอล (2-mercaptoethanol) ของบริษัท E. Merck , Germany.

เมทานอล (Methanol) ของบริษัท E. Merck , Germany.

เซฟาเด็กซ์ จี-25 (Sephadex G-25)ของบริษัท Pharmacia Fine Chemical , USA.

โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Sodium Hydrogen Phosphate) ของบริษัท E. Merck , Germany.

โซเดียมคลอไรด์ (Sodium Cloride) ของบริษัท E. Merck , Germany.

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium Hydroxide) ของบริษัท E. Merck , Germany.

โซเดียมโปแตสเซียมตาร์เตต (Sodium Potassium Tartrate) ของบริษัท E.

Merck , Germany.

โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ (Sodium Metabisulphite) ของบริษัท Sigma Chemical Company , USA.

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium Dodecyl Sulphate) ของบริษัท Sigma Chemical Company , USA.

ทีเมด (TEMED) ของบริษัท Sigma Chemical Company , USA.

ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ (Tris-HCl)ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.

ทริส-เบส(Tris-base) ของบริษัท Sigma Chemical Company , USA.

2. เอ็นไซม์

ไลโซไซม์ (Lysozyme) ของบริษัท Sigma Chemical Company , USA.

ปาเปน (Papain) ของบริษัท Sigma Chemical Company , USA.

เปปซิน (Pepsin) ของบริษัท Sigma Chemical Company , USA.

โปรติเนสเค (Proteinase K) ของบริษัท Sigma Chemical Company , USA.

ทริปซิน (Trypsin) ของบริษัท Sigma Chemical Company , USA.

เบต้า-กลูโคซิเดส(β -glucosidase)ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.

เบต้า-แลคแตมเมส(β-lactamase) ของบริษัท Sigma Chemical Company , USA.

3. สารปฏิชีวนะ

เบซิเทรซิน (Bacitracin) ของบริษัท Sigma Chemical Company , USA.

โพลีมิกซิน (Polymyxin) ของบริษัท Sigma Chemical Company , USA.

สเตรปโตมัยซินซัลเฟต (Streptomycin sulphate) ของบริษัท Sigma Chemical Company , USA.

4. อาหารเลี้ยงเชื้อ

แบคโตอาการ์ (Bacto Agar) ของบริษัท Difco Laboratories , USA.

กลูโคส (Glucose) ของบริษัท E. Merck , Germany.

แลคโตส (Lactose) ของบริษัท Difco Laboratories , USA.

มอลโตส (Maltose) ของบริษัท Difco Laboratories , USA.

นีโอเปปโตน (Neopeptone) ของบริษัท Difco Laboratories , USA.

นิวเตรียนบรอท (Nutrient Broth) ของบริษัท Difco Laboratories , USA

โปเตโตเดกโทสอาการ์ (Potatoes Dextrose Agar)ของบริษัท Difco Laboratories, USA.

โปรติโอสเปปโตน (Proteose Peptone) ของบริษัท Difco Laboratories , USA.

สารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract) ของบริษัท Difco Laboratories , USA

5. จุลินทรีย์

Bacillus sp. SR-1 แยกได้จากตัวอย่างหนังสัตว์อาบน้ำยาเคมี PARMETOL 23 ที่มีการติดเชื้อ ทำการแยกจนเป็นเชื้อบริสุทธิ์โดย รศ. ดร. สุมาลี พิชญางกูร

จุลินทรีย์ทดสอบกลุ่มแบคทีเรีย ได้จาก American Type Culture Collection (ATCC) Institute of Fermentation เมืองโอซาก้า ประเทศญี่ปุ่น (IFO) และหน่วยบริการเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (TISTR) ได้แก่

แบคทีเรียแกรมบวก

Bacillus cereus ATCC 11778

Bacillus megaterium ATCC 14581

Bacillus subtilis ATCC 6633

Staphylococcus aureus ATCC 25923

Micrococcus luteus TISTR 745

Streptococcus faecium IFO 3128

แบคทีเรียแกรมลบ

Enterobacter cloacae ATCC 13047

Escherichia coli ATCC 25922

Klebsiella pneumoniae IFO 3317

Proteus vulgaris ATCC 8427

Pseudomonas aeroginosa ATCC 10145

Salmonella typhi ATCC 19430

Shigella dysenteriae ATCC 11835

Serratia mercessens ATCC 29632

จุลินทรีย์ทดสอบกลุ่มยีสต์ 10 สายพันธุ์ ได้จากหน่วยบริการเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ได้แก่

Bullera crocea

Candida tropicalis

Hanselnula anomala

Rhodotorula sp.

Saccharomyces cerevesiae

Shizosaccharomyces pombe

Shizosacchoromyces octosporus

Sporobolomyces sp.

Torulopsis glabrata

Candida albicans ได้จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ยศเส กรุงเทพ

จุลินทรีย์ทดสอบกลุ่มราได้รับความอนุเคราะห์จากคุณเบ็ญจมาส พฤกษ์กานนท์ ได้แก่

Aspergillus niger

Alternaria sp.

Cladosporium sp.

Curvularia sp.

Gliocladium sp.

Paecilomyces variotii

Penicillium sp.

Trichoderma sp.

Fusarium oxysporum ได้จากสถาบันเทคโนโลยีเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

Fusarium solani ได้จากสถาบันเทคโนโลยีเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

วิธีการทดลอง

1. การจำแนกเชื้อ (อนุกรมวิธาน)

เชื้อสายพันธุ์ SR-1 แยกได้จากตัวอย่างหนังสัตว์ติดเชื้อที่ผ่านการอาบน้ำยาเคมี PARMETOL 23 ในห้องปฏิบัติการภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดย รศ. ดร. สุมาลี พิชญางกูร นำสายพันธุ์ที่ได้มาจำแนกโดยใช้หลักตาม Burgey 's Manual (Cowan et al. ,1970) โดยทำการศึกษาดังนี้

1. 1 การเจริญของเชื้อและลักษณะทางสันฐานวิทยา (Cultural and Morphological Characteristic)

โดยการตรวจสอบและบันทึกลักษณะของโคโลนีของเชื้อ ที่เจริญบนอาหารแข็งนิวเตรียน (NA ; Nutrient Agar) (ภาคผนวก ก ข้อ 1. 2) วัดขนาดของเซลด้วยไมโครมิเตอร์ ตรวจสอบการติดสีแกรม (ภาคผนวก ก ข้อ 4. 1) และเอ็นโดสปอร์ (ภาคผนวก ก ข้อ 4. 2) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

1. 2 สมบัติทางชีวเคมี (Biochemical Characteristics)

โดยการตรวจสอบปฏิกริยาการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารชนิดต่างๆ และปฏิกริยากับรีเอเจนต์ทดสอบดังนี้

1. 2. 1 อาหารเหลววีพี (Voges-Proskaver Broth) (ภาคผนวก ก ข้อ 1. 6) อาหารชนิดนี้ใช้เพื่อตรวจสอบเชื้อต่อการผลิตมีอะซิทิล เมทิล คาร์บีนอล (acetyl methyl carbinol) โดยนำเชื้ออายุ 24 ชม. ที่เจริญบนอาหารแข็งนิวเตรียน 1 ลูป ปลูกในอาหารเหลววีพีปริมาตร 5 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ. เป็นเวลา 3 วัน ตรวจสอบการสร้างอะซิทิล เมทิล คาร์บีนอล โดยการเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 40 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาตร 3 มล. ผสมให้เข้ากันแล้วเติมครีเอทิน (creatine) ลงไปอีก 0. 5 มก. ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ถ้าเกิดสีแดงแสดงว่ามีอะซิทิล เมทิล คาร์บีนอล

1. 2. 2 อาหารวุ้นผสมแป้ง (Starch Agar) (ภาคผนวก ก ข้อ 1. 7) อาหารชนิดนี้ใช้เพื่อตรวจสอบเชื้อต่อการผลิตเอ็นไซม์ในการย่อยสลายแป้ง โดยการขีด (streak) เชื้อบนอาหารวุ้นผสมแป้ง บ่มที่อุณหภูมิ 37 ° ซ. เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำเอทานอล 95 % มาเทราดบนจานเพาะเชื้อ ถ้ามีการย่อยสลายแป้งจะเกิดบริเวณใสรอบๆ โคโลนีของเชื้อ

1. 2. 3 อาหารเหลวเจลาติน (Nutrient Gelatin) (ภาคผนวก ก ข้อ

1. 10) อาหารชนิดนี้ใช้เพื่อตรวจสอบเชื้อต่อการย่อยสลายเจลาติน โดยการนำเข็มเขี่ยเชื้อแล้วแทงผ่านลงในอาหารเหลวเจลาติน ที่บรรจุในหลอดปริมาตร 5 มล. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 ° ซ. เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำไปแช่ในน้ำแข็ง 30 นาที สังเกตุลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้ามีความเหลวของอาหารเพิ่มขึ้นแสดงว่าเชื้อสามารถย่อยสลายเจลาตินได้

1. 2. 4 อาหารผลิตอินโดล (Indole Production) (ภาคผนวก ก ข้อ 1. 8) อาหารชนิดนี้ใช้ตรวจสอบเชื้อต่อการผลิตอินโดล โดยการนำเชื้อ 1 ลูปปลูกลงในอาหารอินโดลปริมาตร 5 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 37 ° ซ. เป็นเวลา 7 วันแล้วเติมรีเอเจนต์ทดสอบอินโดลปริมาตร 2 มล. (ภาคผนวก ก ข้อ 2. 2) เขย่าให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว ถ้ามีอินโดลจะเกิดสีชมพูในอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. 2. 5 อาหารซอล์ทโทเลอแรนซ์ (Salt Tolerance Medium) (ภาคผนวก ก ข้อ 1. 9) อาหารชนิดนี้ใช้ตรวจสอบเชื้อต่อความเข้มข้นของเกลือ โดยนำเชื้อ 1 ลูปปลูกในอาหารซอล์ทโทเลอแรนซ์ปริมาตร 5 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 37 ° ซ. เป็นเวลา 24 ชม. ถ้าเชื้อสามารถทนความเข้มข้นของเกลือที่ใช้ จะสามารถเจริญซึ่งจะเกิดความขุ่นในอาหารเลี้ยงเชื้อ แสดงว่าให้ปฏิกริยาเป็นบวก

1. 2. 6 อาหารเหลวนิวเตรียน(NB ; Nutrient Broth) (ภาคผนวก ก ข้อ 1. 1) อาหารชนิดนี้ใช้ตรวจสอบการเจริญของเชื้อที่พีเอช 5. 8 และ 6. 5 โดยการนำเชื้อ 1 ลูปปลูกในอาหารเหลวนิวเตรียนปริมาตร 5 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 37 ° ซ. เป็นเวลา 24 ชม. ตรวจดูการเจริญ ของเชื้อโดยสังเกตุความขุ่นที่เกิดขึ้นในอาหาร และสามารถใช้อาหารนี้ตรวจสอบการเจริญ ของเชื้อในสภาวะแบบไร้อากาศอีกด้วย โดยเมื่อปลูกเชื้อในอาหารแล้วใช้พาราฟินเหลว (Liquid Parafin) เททับทันที ตรวจดูการเจริญของเชื้อโดยสังเกตุความขุ่นที่เกิดขึ้น

1. 2. 7 อาหารฟีนอลเรดบรอทเบส (Phenol Red Broth Base) (ภาคผนวก ก ข้อ 1. 11) อาหารชนิดนี้ใช้ตรวจสอบความสามารถของเชื้อในการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ อันได้แก่ กลูโคส อาราบิโนส ไซโลส และแมนนิทอล โดยการปลูกเชื้อ 1 ลูปลงในอาหารทดสอบปริมาตร 5 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 37 ° ซ. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ้าเกิดการใช้น้ำตาลชนิดใดจะเกิดการเปลี่ยนแปลงสีในอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีแดงเป็นสีเหลือง

1. 2. 8 อาหารแข็งไทโรซีน (Tyrosine Agar) (ภาคผนวก ก ข้อ 1. 13) อาหารชนิดนี้ใช้ตรวจสอบความสามารถของเชื้อต่อการย่อยไทโรซีน โดยการขีด

เชื้อบนอาหารแข็งไทโรซีน บ่มที่อุณหภูมิ 37 ° ซ. เป็นเวลา 7 วัน ถ้าเกิดการย่อยไทโรซีนจะเกิดผลึกใสรอบโคโลนีของเชื้อ

1. 2. 9 อาหารแข็งฟีนิลอาลานิน (Phenylalanine Agar) (ภาคผนวก ก ข้อ 1. 14) อาหารชนิดนี้ใช้ตรวจสอบเชื้อต่อการย่อยฟีนิลอาลานิน โดยการขีดเชื้อบนอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ. เป็นเวลา 7 วัน แล้วนำสารละลายเฟอริกคลอไรด์ 10% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ลงบนโคโลนีของเชื้อ ถ้ามีการย่อยฟีนิลอาลานินจะเกิดสีเขียวรอบโคโลนีของเชื้อ

1. 2. 10 การทำปฏิกริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เพื่อตรวจสอบเชื้อต่อการสร้างเอ็นไซม์คาตาเลส โดยการเขี่ยเชื้อที่เจริญบนอาหาร NA ลงบนสไลด์ หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 3% (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงไป (ภาคผนวก ก ข้อ 2. 1) ถ้ามีเอ็นไซม์คาตาเลสจะเกิดฟองขึ้นภายใน 30 วินาที

2. การกำหนดหน่วยของสารปฏิชีวนะ

หน่วยของสารปฏิชีวนะในการวิจัยนี้ ได้กำหนดว่า สารปฏิชีวนะ 1 หน่วย เท่ากับความกว้างของบริเวณยับยั้ง (Clear Zone) ที่แสดงต่อเชื้อทดสอบ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 เป็นระยะเส้นผ่าศูนย์กลาง 15 มม. ซึ่งจะใช้ตลอดการวิจัยนี้

3. การเตรียมเชื้อและการทดสอบกิจกรรมของสารปฏิชีวนะ

3. 1 การเตรียมเชื้อทดสอบกิจกรรม (Activity)ของสารปฏิชีวนะ

3. 1. 1 แบคทีเรีย สายพันธุ์ที่นำมาทดสอบทั้งหมด 14 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus cereus* ATCC 11778 *Bacillus megaterium* ATCC 14581 *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Micrococcus luteus* TISTR 745 *Proteus vulgaris* ATCC 8427 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *Streptococcus faecium* IFO 3128 *Enterobacter cloacae* ATCC 13047 *Escherichia coli* ATCC 25922 *Klebsiella pheumoniae* IFO 3317 *Pseudomonas aeroginosa* ATCC 10145 *Salmonella typhi* ATCC 19430 *Shigella dyenteriae* ATCC 11835 และ *Serratia mercescens* ATCC 29632

วิธีการเตรียมจะย้ายแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบแต่ละเชื้อ ที่เจริญบนอาหาร NA 1 ลูป ปลูกในอาหาร NB ปริมาตร 50 มล. ที่บรรจุในฟลาสท์ขนาด 250 มล. นำไปบ่มที่

อุณหภูมิ 37 ° ซ. บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 - 8 ชม. ซึ่งจะได้ค่าความขุ่นโดยวัดที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ประมาณ 0. 6-0. 8 นำเชื้อ ที่ได้ 2 มล. ผสมในอาหาร NA ที่หลอมแล้วซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ 42-45 °ซ. ปริมาตร 250 มล. ผสมให้เข้ากัน ซึ่งพร้อมที่จะนำไปใช้ในการทดลองข้อ 3. 2. 1 - 3. 2. 2 ต่อไป

3. 1. 2 ยีสต์ สายพันธุ์ที่นำมาทดสอบจำนวน 10 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bullera crocea* *Candida albicans* *Candida tropicalis* *Henselnula anomala* *Rhodotorula* sp. *Saccharomyces cerevisiae* *Schizosaccharomyces pombe* *Schizosaccharomyces octosporus* *Sporobolomyces* sp. และ *Torulopsis glabrata*

โดยย้ายเชื้อยีสต์ 1 ลูป ปลูกในอาหารวายเอ็ม (ภาคผนวก ก ข้อ 1. 5) ปริมาตร 50 มล. ที่บรรจุในฟลาสท์ขนาด 250 มล. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 ° ซ. บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6-8 ชม. ซึ่งจะได้ค่าความขุ่นโดยวัดที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรประมาณ 0. 6-0. 8 นำเชื้อที่ได้ปริมาตร 2 มล. ผสมในอาหารแข็งวายเอ็มที่หลอมแล้วมีอุณหภูมิประมาณ 42-45 ° ซ. ปริมาตร 250 มล. ผสมให้เข้ากัน ซึ่งพร้อมที่จะนำไปใช้ในการทดลองข้อ 3. 2. 1 - 3. 2. 2 ต่อไป สำหรับยีสต์ก่อโรคได้แก่ *Candida albicans* *Candida tropicalis* จะเปลี่ยนจากการเลี้ยงในอาหารวายเอ็มเป็นอาหารแซบบรอท (ภาคผนวก ก ข้อ 1. 4)

3. 1. 3 รา สายพันธุ์ที่นำมาใช้ในการทดสอบจำนวน 10 สายพันธุ์ ได้แก่ *Aspergillus niger* *Alternaria* sp. *Cladosporium* sp. *Curvularia* sp. *Fusarium oxysporum* *Fusarium solani* *Gliocladium* sp. *Paecilomyces variotii* *Penicillium* sp. และ *Trichoderma* sp. โดยนำเชื้อที่เจริญบนอาหารพีดีเอที่โตเต็มที่ ขูดสปอร์มาแขวนลอยในน้ำกลั่นผสมทวีน 80 นับจำนวนสปอร์โดยอุปกรณ์นับเม็ดเลือด (Haemacytometer) ให้ได้จำนวนสปอร์ตั้งต้น 1-2 x 10^8 สปอร์ / มล. นำสปอร์แขวนลอยที่ได้ปริมาตร 2 มล. ผสมในอาหารพีดีเอเอ็มที่หลอมแล้วมีอุณหภูมิประมาณ 42-45 ° ซ. ปริมาตร 250 มล. ผสมให้เข้ากัน ซึ่งพร้อมที่จะนำไปใช้ในการทดลองข้อ 3. 2. 1 ต่อไป

สำหรับเชื้อราที่จะนำไปทดสอบในข้อ 3. 2. 2 นั้นได้มีการเตรียมเพื่อทดสอบที่แตกต่างออกไป โดยจะมีการเตรียมเชื้อราที่มีช่วงอายุ 2 ระยะคือ

3. 1. 3. 1 เชื้อราในระยะการงอกของสปอร์ (Spore Germination) นำสปอร์แขวนลอยที่มีจำนวนสปอร์ตั้งต้น 1-2 x 10^8 สปอร์ / มล. ปริมาตร 0. 3 มล.

มากระจายบนอาหารแข็งพีดีเอ บ่มที่อุณหภูมิ 30° ซ. นำจานเพาะเชื้อที่บ่มมาสังเกตุการณ์ใต้กล้องจุลทรรศน์ทุก ๆ ชั่วโมง เพื่อดูการงอกของสปอร์งอก ใช้สปอร์ที่เริ่มงอกบนจานเพาะเชื้อโดยใช้เวลาประมาณ 3 - 6 ชม. ซึ่งพร้อมจะนำไปใช้ในการทดลองข้อ 3. 2. 2 ต่อไป

3. 1. 3. 2 เชื้อราในระยะการเจริญของสายใย (Mycelial Growth) วิธีการเตรียมเช่นเดียวกับระยะการงอกของสปอร์ แต่จะต้องสังเกตุการณ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์จนเริ่มเห็นสายใยของรา ซึ่งปกติจะใช้เวลาประมาณ 18-24 ชม. จะได้เชื้อในระยะการเจริญของสายใยเพื่อนำไปใช้ในข้อ 3. 2. 2 ต่อไป

3. 2 วิธีการทดสอบกิจกรรมของสารที่ได้ในช่วงต่างๆ

เนื่องจากสายพันธุ์ SR-1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวจะผลิตสารปฏิชีวนะภายในเซลแต่มีการปลดปล่อยออกมานอกเซลเป็นจำนวนน้อย จึงต้องการเปรียบเทียบว่าสารปฏิชีวนะที่สร้างขึ้นจากสายพันธุ์ SR-1 นั้นเมื่อทำการสกัดแยกจากเซลและเมื่อนำไปผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์แล้ว จะมีความแตกต่างในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อทดสอบหรือไม่ จึงได้ใช้วิธีการทดสอบกิจกรรมดังนี้

3. 2. 1 วิธี point inoculation

วิธีการนี้ใช้ตรวจสอบความสามารถของสายพันธุ์ SR-1 ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ โดยนำเข็มเขี่ยสายพันธุ์ SR-1 อายุ 24 ชม. แตะลงบนกลางจานอาหาร NA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ. เป็นเวลา 2 วัน แล้วนำเชื้อที่จะนำมาทดสอบทั้งหมด 34 สายพันธุ์ ดังต่อไปนี้

แบคทีเรีย 14 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus cereus* ATCC 11778 *Bacillus megaterium* ATCC 14581 *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Micrococcus luteus* TISTR 745 *Proteus vulgaris* ATCC 8427 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *Streptococcus faecium* IFO 3128 *Enterobacter cloacae* ATCC 13047 *Escherichia coli* ATCC 25922 *Klebsiella pheumoniae* IFO 3317 *Pseudomonas aeroginosa* ATCC 10145 *Salmonella typhi* ATCC 19430 *Shigella dyenteriae* ATCC 11835 และ *Serratia mercescens* ATCC 29632

ยีสต์ 10 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bullera crocea* *Candida albicans* *Candida tropicalis* *Henselnula anomala* *Rhodotorula* sp. *Saccharomyces cerevisiae* *Schizosaccharomyces pombe* *Schizosaccharomyces octosporus*

Sporobolomyces sp. และ *Torulopsis glabrata*

รา 10 สายพันธุ์ ได้แก่ *Aspergillus niger* *Alternaria* sp. *Cladosporium* sp. *Curvularia* sp. *Fusarium oxysporum* *Fusarium solani* *Gliocladium* sp. *Paecilomyces variotii* *Penicillium* sp. *Trichoderma* sp.

เชื้อทั้งหมดมีวิธีการเตรียมดังข้อ 3. 1. 1-3. 1. 3 นำเชื้อที่เตรียมปริมาตร 15 มล. เททับลงบนจานเพาะเชื้อสายพันธุ์ SR-1 ที่เพาะไว้ 2 วัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ° ซ. เป็นเวลา 24 ชม. นำมาตรวจสอบดูผลการยับยั้งซึ่งจะแสดงบริเวณใสรอบๆ โคโลนีสายพันธุ์ SR-1 วัดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้งแล้วบันทึกผล

3. 2. 2 วิธี Disc Diffusion Method วิธีการนี้จะใช้ทดสอบกิจกรรมของสารปฏิชีวนะที่สกัดจากเซล โดยการนำเชื้อซึ่งได้เตรียมตามข้อ 3. 1. 1-3. 1. 3 ปริมาตร 15 มล. เทลงในจานเพาะเชื้อทิ้งไว้ให้แข็งตัว นำกระดาษทดสอบ (Paper Disc) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มม. หนา 1 มม. วางบนจานเพาะเชื้อแล้วหยดสารปฏิชีวนะที่จะนำมาทดสอบปริมาตร 40 ไมโครลิตร หยดลงบนกระดาษทดสอบนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ. สำหรับแบคทีเรีย และ 30 ° ซ. สำหรับราและยีสต์ ตรวจบันทึกผลโดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง หลังจากบ่มเป็นเวลา 24 ชม.

3. 3 การสกัดสารปฏิชีวนะจากเซล

การเตรียมสารปฏิชีวนะโดยการสกัดจากเซลได้ปรับปรุงจากวิธีของ John (1985) โดยนำสายพันธุ์ SR-1 ที่เลี้ยงในอาหารปริมาตร 100 มล. มาปั่นแยกเซลโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ ด้วยความเร็ว 10000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 ° ซ. เป็นเวลา 30 นาที นำเซลที่ได้มาล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7. 5 ปั่นแยกเก็บเซลอีกครั้ง นำเซลที่ได้ไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 ° ซ. เป็นเวลา 12 ชั่วโมงก่อนทำให้เซลแตก จากนั้นนำเซลแช่แข็งที่ได้มาแขวนลอยในบัฟเฟอร์ชนิดเดิม โดยใช้อัตราส่วนของเซลต่อบัฟเฟอร์ 1: 1 ส่วน กวนเบาๆ ให้เกิดการแขวนลอยของเซล แล้วนำไปปั่นแยกเซลอีกครั้ง เก็บเซลที่ได้นำไปแขวนลอยในบัฟเฟอร์ฟอสเฟตแบบปรับปรุง (ภาคผนวก ก ข้อ 3) จากนั้น เติมไลโซไซม์ลงไปโดยให้มีความเข้มข้นสุดท้าย (Final concentration) เป็น 0. 1 มก./มล. เพื่อทำให้เซลแตกแล้วเติมดีเอนเอส(DNase) และ อาร์เอ็นเอส (RNase) เพื่อทำลายดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอที่ปนเปื้อน โดยใช้ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/มล. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ° ซ. เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปปั่นแยก

เศษเซลทิ้ง จะได้สารปฏิชีวนะที่สกัดแยกได้จากเซล

4. ศึกษารูปแบบการเจริญของสายพันธุ์ SR-1

นำสายพันธุ์ SR-1 ที่เจริญในอาหาร NA 1 ลูป ปลูกในอาหาร NB ปริมาตร 50 มล. ในฟลาสท์ขนาด 250 มล. พีเอช 7. 0 บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 ° ซ.) บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 6 ชม. เป็นเวลา 72 ชม. นำมาวัดค่าความขุ่น (Optical Density) ที่ความยาวคลื่น 580 นาโนเมตรเพื่อดูรูปแบบการเจริญของเชื้อ

5. การปรับปรุงสูตรอาหารและภาวะในการเลี้ยงเชื้อ

5. 1 ปรับปรุงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

5. 1. 1 แหล่งคาร์บอน

เลือกใช้แหล่งคาร์บอน 3 ชนิดคือ กลูโคส มอลโตส และแลคโตส เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร ให้ชื่ออาหารทั้ง 3 ชนิดว่า NG NM และ NL ตามลำดับ นำหัวเชื้อสายพันธุ์ SR-1 ปริมาตร 2 มล. เติมลงในอาหาร NG NM และ NL ปริมาตร 50 มล. ที่บรรจุในฟลาสท์ขนาด 250 มล. พีเอช 7. 0 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง(30 ± 2 ° ซ.) ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างครั้งละ 2 ฟลาสท์ทุก 6 ชั่วโมง เพื่อศึกษารูปแบบการเจริญโดยการวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 580 นาโนเมตร การเปลี่ยนแปลงของพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้เครื่องวัดพีเอช ปริมาณการสร้างสารปฏิชีวนะที่สกัดแยกได้จากเซลโดยวิธี Disc diffusion method และปริมาณน้ำตาลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยวิธี DNSA (ภาคผนวก ข ข้อ 2) เลือกสูตรอาหารที่ทำให้เกิดการสร้างสารปฏิชีวนะที่ดีที่สุด เพื่อนำไปแปรผันปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสมโดยใช้ปริมาณตั้งแต่ 0-20 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร ต่อไป

5. 1. 2 แหล่งไนโตรเจนร่วม

นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการปรับปรุงโดยเติมชนิดของแหล่งคาร์บอนต่างกัน 3 ชนิดในปริมาณที่เหมาะสม ซึ่งได้จากการทดลองในข้อ 5. 1. 1 มาแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจนร่วม ได้เลือกใช้แหล่งไนโตรเจนร่วม 3 ชนิดคือ โปรติโอสเปปโตน แอมโมเนียมซัลเฟต และสารสกัดจากยีสต์ เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 10กรัม/ลิตร ให้ชื่ออาหารทั้ง 3 ชนิดว่า NPP NAS และ NYE ตามลำดับ นำหัวเชื้อสายพันธุ์

SR-1 ปริมาตร 2 มล. เติมลงในอาหาร NPP NAS และ NYE ปริมาตร 50 มล. ที่บรรจุในฟลาสท์ขนาด 250 มล. พีเอชเริ่มต้น 7.0 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 ± 2 ° ซ. ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมงเพื่อดูรูปแบบการเจริญ การเปลี่ยนแปลงพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อ และปริมาณการสร้างสารปฏิชีวนะ เลือกอาหารที่สร้างสารปฏิชีวนะได้ดีสุดเพื่อนำมาแปรผันปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมโดยใช้ปริมาณตั้งแต่ 0-20กรัม/ลิตร

5. 1. 3 แหล่งธาตุอาหารปริมาณน้อย (Trace element)

ได้เลือกใช้ แมงกานีสคลอไรด์($MnCl_2$) เฟอริกคลอไรด์($FeCl_2$) และซิงค์คลอไรด์ ($ZnCl_2$) ซึ่งจัดเป็นคีย์สำคัญในการสร้างสารปฏิชีวนะ (Lichstien , 1983) โดยใช้ความเข้มข้น 0. 5 , 1. 0 , และ 2.0×10^{-5} โมลาร์ เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปรับปรุงแหล่งคาร์บอน(5. 1. 1) และแหล่งไนโตรเจน (5. 2. 2) แล้ว นำหัวเชื้อสายพันธุ์ SR-1 ปริมาตร 2 มล. เติมลงในอาหารปริมาตร 50 มล. ที่บรรจุในฟลาสท์ขนาด 250 มล. พีเอชเริ่มต้น 7.0 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 ± 2 ° ซ. บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เพื่อตรวจสอบปริมาณการสร้างสารปฏิชีวนะที่สร้างขึ้น

จากการปรับปรุงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งได้แปรผัน แหล่งคาร์บอน(5. 1. 1) ไนโตรเจน(5. 1. 2) และธาตุอาหารรอง(5. 1. 3) แล้ว จะได้สูตรอาหารปรับปรุงโดยให้ชื่อว่าอาหาร R-1 (ภาคผนวก ก ข้อ 1. 12)

5. 2 ภาวะในการเลี้ยงเชื้อ

5. 2. 1 ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ

นำหัวเชื้อ SR-1 ปริมาตร 2 มล. ปลูกในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร R-1 ปริมาตร 50 มล. ที่บรรจุในฟลาสท์ขนาด 250 มล. ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที โดยการแปรผันพีเอชเริ่มต้นเป็น 5 6 7 และ 8 เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 60 ชั่วโมง ตรวจสอบสารปฏิชีวนะที่เกิดขึ้น

5. 2. 2 อุณหภูมิ

นำหัวเชื้อ SR-1 ปริมาตร 2 มล. ปลูกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร R-1 ปริมาตร 50 มล. ที่บรรจุในฟลาสท์ขนาด 250 มล. พีเอชเริ่มต้นของอาหารเป็น 7. 0 บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที แปรผันช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 28-40 ° ซ. โดยเพิ่มทีละ 2 ° ซ. เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 60 ชั่วโมง ตรวจสอบสารปฏิชีวนะที่เกิดขึ้น

6. การทำสารปฏิชีวนะให้บริสุทธิ์บางส่วน (Partial purification)

นำสายพันธุ์ SR-1 ที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารสูตรปรับปรุง R-1 ปริมาตร 50 มล. ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. พีเอชเริ่มต้น 7. 0 ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 ° ซ. เป็นเวลา 60 ชม. ในขั้นตอนนี้จะใช้เชื้อทั้งหมดจำนวน 40 ฟลาสก์ ซึ่งจะได้ปริมาตรรวมของเซลและอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 2000 มล. มาสกัดแยกสารปฏิชีวนะโดยใช้วิธีการตาม ข้อ 3. 3 สารปฏิชีวนะที่ได้จะเรียกว่าสารปฏิชีวนะอย่างหยาบ (Crude Antibiotic) นำสารปฏิชีวนะอย่างอยาบที่ได้ไปตรวจสอบการยับยั้งของสารต่อเชื้อทดสอบโดยวิธี Disc Diffusion Method โดยมีเชื้อทดสอบดังต่อไปนี้

แบคทีเรีย 14 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus cereus* ATCC 11778 *Bacillus megaterium* ATCC 14581 *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Micrococcus luteus* TISTR 745 *Proteus vulgaris* ATCC 8427 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *Streptococcus faecium* IFO 3128 *Enterobacter cloacae* ATCC 13047 *Escherichia coli* ATCC 25922 *Klebsiella pheumoniae* IFO 3317 *Pseudomonas aeroginosa* ATCC 10145 *Salmonella typhi* ATCC 19430 *Shigella dyenteriae* ATCC 11835 และ *Serratia mercescens* ATCC 29632

ยีสต์ 10 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bullera crocea* *Candida albicans* *Candida tropicalis* *Henselnula anomala* *Rhodotorula* sp. *Saccharomyces cerevisiae* *Schizosaccharomyces pombe* *Schizosaccharomyces octosporus* *Sporobolomyces* sp. และ *Torulopsis glabrata*

รา 10 สายพันธุ์ ได้แก่ *Aspergillus niger* *Alternaria* sp. *Cladosporium* sp. *Curvularia* sp. *Fusarium oxysporum* *Fusarium solani* *Gliocladium* sp. *Paecilomyces variotii* *Penicillium* sp. *Trichoderma* sp.

เมื่อได้ทดสอบการยับยั้งต่อเชื้อแล้ว นำสารปฏิชีวนะอย่างหยาบตรวจสอบดูปริมาณโปรตีนตามวิธีของลาว์รี่ (ภาคผนวก ข ข้อ 1) และทำสารปฏิชีวนะอย่างอยาบให้เข้มข้นขึ้น โดยใช้ปริมาตร 6 มล. ไป ไดอะไลซ์ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 50 % เป็นเวลา 4 ชั่วโมงจะได้สารปฏิชีวนะอย่างหยาบลดลงเหลือ 3 มล. นำสารปฏิชีวนะที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านกระบวนการดังนี้

6. 1 การผ่านคอลัมน์เซพแพก ซี 18 (SEP-PAK C_{18})

คอลัมน์ที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นคอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 ซม. สูง 1. 5 ซม. โดยมีตัวค้ำจุนเป็น High-performance macroreticular hydrophobic adsorbent resin เตรียมคอลัมน์ก่อนการใช้ โดยนำเมทานอลชะเป็นปริมาตร 10 มล. แล้วชะต่อด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุเป็นปริมาตร 10 มล. จะได้คอลัมน์ที่พร้อมใช้งาน จากนั้นนำสารปฏิชีวนะที่ผ่านการไดอะไลซ์ในกลีเซอรอลปริมาตร 3 มล. ฉีดผ่านคอลัมน์โดยให้มีอัตราการไหล 1. 0 มล./นาที เก็บสารส่วนที่ผ่านคอลัมน์ (ส่วนที่ 1) และส่วนที่ถูกดูดซับบนคอลัมน์ซึ่งจะชะด้วยเมธานอล (ส่วนที่2) มาตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อตัวแทนเชื้อทดสอบ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของลาวรี่ แล้วจึงนำส่วนที่ให้ปฏิกริยาต่อเชื้อทดสอบไปใช้ในขั้นตอน 6 . 2 ต่อไป

6. 2 การทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์โครมาโตรกราฟีแบบอาศัยความแตกต่างของโมเลกุล (Gel filtration)

ในคอลัมน์นี้บรรจุสารตัวค้ำจุนเป็นเซฟาเด็กซ์จี-25 โดยเตรียมดังนี้ ชั่งเซฟาเด็กซ์จี-25 ประมาณ 5 กรัม ค่อยๆโปรยลงบนฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่ตั้งต้มไว้บนอ่างน้ำเดือด ต้มต่อไปอีก 3 ชม. ปล่อยให้ เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำไปกำจัดฟองอากาศ (degas) โดยใช้ปั๊มสูญญากาศ จะได้เจลที่พร้อมจะบรรจุบนคอลัมน์ ซึ่งได้ใช้คอลัมน์ขนาด 50 x 1. 5 ซม. การบรรจุเจลทำได้โดยเทฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ลงบนคอลัมน์ประมาณครึ่งหนึ่งของความสูง จากนั้นค่อยๆ เทเจลให้ไหลลงบนคอลัมน์อย่างช้าๆ และสม่ำเสมอ บรรจุเจลลงบนคอลัมน์ให้มีความสูงประมาณ 45 ซม. ทำการปรับสมดุล (equilibrate) คอลัมน์ที่บรรจุเจลแล้วด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดิมอย่างน้อย 5-10 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ จากนั้นนำสารปฏิชีวนะที่ผ่านจากขั้นตอนข้อ 6. 1 โหลดผ่านคอลัมน์โดยให้มีอัตราการไหล (flow rate) เท่ากับ 10 มล./ชม. ความดัน (Operating pressure) เป็น 12 ซม. เก็บแฟรคชั่นครั้งละ 1 มล. นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อตัวแทนเชื้อทดสอบ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 รวมแฟรกชั่นที่ให้ผลยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 เข้าด้วยกันแล้วนำไปตรวจสอบการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อทดสอบทั้งหมดอีกครั้ง ซึ่งได้แก่

แบคทีเรีย 14 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus cereus* ATCC 11778 *Bacillus megaterium* ATCC 14581 *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Micrococcus luteus* TISTR 745 *Proteus vulgaris* ATCC 8427 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *Streptococcus faecium* IFO 3128 *Enterobacter cloacae* ATCC 13047 *Escherichia coli* ATCC 25922 *Klebsiella pheumoniae* IFO 3317 *Pseudomonas aeroginosa* ATCC 10145 *Salmonella typhi* ATCC 19430 *Shigella dyenteriae* ATCC 11835 และ *Serratia mercescens* ATCC 29632

ยีสต์ 10 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bullera crocea* *Candida albicans* *Candida tropicalis* *Henselnula anomala* *Rhodotorula* sp. *Saccharomyces cerevisiae* *Schizosaccharomyces pombe* *Schizosaccharomyces octosporus* *Sporobolomyces* sp. และ *Torulopsis glabrata*

รา 10 สายพันธุ์ ได้แก่ *Aspergillus niger* *Alternaria* sp. *Cladosporium* sp. *Curvularia* sp. *Fusarium oxysporum* *Fusarium solani* *Gliocladium* sp. *Paecilomyces variotii* *Penicillium* sp. *Trichoderma* sp.

6. 3 ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารปฏิชีวนะด้วยโครมาโตรกราฟีแบบสมรรถนะสูง (Reverse Phase High performance liquid chromatography ; RP-HPLC)

วิธีการในขั้นตอนนี้ได้ส่งไปวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือฯ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยนำสารปฏิชีวนะอย่างหยาบ (Crude antibiotic) ที่ได้จากข้อ 6 และสารปฏิชีวนะที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ที่ได้ข้อ 6. 2 ไปตรวจสอบด้วย RP-HPLC โดยการใช้คอลัมน์ซี-18 (Octadecylsilane) ขนาด 250 x 3 มม. โดยมีสภาวะในการฉีดดังนี้

ภาคน้ำพา(mobile phase) : อะซิโตไนไตรท์และฟอตเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7. 5 ด้วยอัตราส่วน 15 : 85

อัตราการไหล(flow rate) : 0. 3 มล. /นาที 0. 2 aufs

ตรวจผลโดยใช้แสงอุลตร้าไวโอเลต (UV detector) ที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร

6. 4 ตรวจสอบความบริสุทธิ์และหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีอิเลคโตรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลแบบแผ่น (SDS-PAGE)

ประกบแผ่นแก้วขนาด 8x10 ซม. 2 แผ่นเข้าด้วยกันสอดแผ่นพลาสติก (spacer) ที่ขอบด้านข้างทั้งสอง แล้วเทสารละลายผสมของเซพาเรติงเจล

(separating gel) ที่มีความเข้มข้น 20 % (ภาคผนวก ก ข้อ 5. 9) ลงไปในแผ่นแก้วให้มีความสูง 4. 5 ซม. หยดน้ำลงบนผิวหน้า เจลเล็กน้อยเพื่อเป็นการปรับ ระดับเจล ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 45 นาทีจนกระทั่งเจลแข็งตัวดี เทน้ำออกแล้ววางแผ่น พลาสติกสำหรับเตรียมช่องใส่ตัวอย่าง (slot former) ลงระหว่างแผ่นแก้วทั้งสองเทสารละลายผสมของสแตกกิงเจล (ภาคผนวก ก ข้อ 5. 10) ลงไป เมื่อเจลแข็งตัวดีแล้วค่อยๆดึงแผ่นพลาสติกออก ล้างช่องใส่ตัวอย่างด้วยอิเลคโตรดบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ก ข้อ 5 . 1) แล้วเติมอิเลคโตรดบัฟเฟอร์ลงในช่องใส่ตัวอย่างจนเต็ม นำโปรตีนที่จะวิเคราะห์และโปรตีนมาตราฐานละลายในบัฟเฟอร์(ภาคผนวก ก ข้อ 5. 6) ต้มที่อุณหภูมิ 95 ° ซ. เป็นเวลา 4 นาที จากนั้นหยอดตัวอย่างลงในช่องใส่ตัวอย่างบนแผ่นเจล ทำการอิเลคโตรโฟริซิสที่ 75 มิลลิแอมแปร์ จนกระทั่งสีของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนที่มาถึงเซพาเรติงเจล แล้วให้ลดกระแสเหลือ 50 มิลลิแอมแปร์ รอจนกระทั่งสีของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนที่มาจนเกือบปลายสุดแผ่นเจล จากนั้นแกะแผ่นเจลมาแช่ในน้ำยาย้อมสีโปรตีน(ภาคผนวก ก ข้อ 5. 11) เป็นเวลา 30 นาที ชะล้างด้วยสารละลายชะล้างสี (ภาคผนวก ก ข้อ 5 . 12) จนเห็นแถบสีของโปรตีนชัดเจน

7. ตรวจสอบความเสถียรของสารปฏิชีวนะที่ผ่านการทำกึ่งบริสุทธิ์

7. 1 ความเสถียรต่ออุณหภูมิ

นำสารปฏิชีวนะที่ผ่านขั้นตอนจากข้อ 6. 2 ปริมาตร ไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 40 50 และ 60 °ซ. โดยแต่ละอุณหภูมิบ่มเป็นเวลา 0 15 30 60 90 นาที ตามลำดับ ทดสอบสารปฏิชีวนะที่ผ่านการบ่มต่อการยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 บันทึกผลของบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น

7. 2 ความเสถียรต่อความเป็นกรดด่าง

นำสารปฏิชีวนะที่ผ่านขั้นตอนจากข้อ 6. 2 ผสมในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่ค่าพีเอชตั้งแต่ 5. 5-8. 0 ในอัตราส่วน 1 : 1 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ. เป็นเวลา 0 15 30 60 90 นาทีตามลำดับ ทดสอบสารปฏิชีวนะที่ผ่านการบ่มต่อการยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 บันทึกผลของบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น

7. 3 ความเสถียรต่อเอ็นไซม์ที่ใช้ย่อยโปรตีนบางชนิด

เนื่องจากมีงานวิจัยหลายฉบับ ที่ได้ทดสอบสมบัติของสารปฏิชีวนะกลุ่มเพปไทด์ว่ามีความทนต่อการย่อยสลายของเอ็นไซม์ที่ใช้ย่อยโปรตีนทั่วไป (Bodensky and Perlman , 1963 ; Katz and Demain , 1977 ; Antanio et al., 1993) จึงได้เลือกเอ็นไซม์กลุ่มนี้ และเอ็นไซม์อื่นๆในการทดสอบ โดยเอ็นไซม์ที่ใช้ย่อยสลายโปรตีนได้เลือกใช้เปปซินจากกระเพาะหมู ปาเปนจากมะละกอ โปรติเนสเคจากมะละกอ และทริปซินจากตับอ่อน ส่วนเอ็นไซม์กลุ่มอื่นๆ ได้เลือกใช้ ไลโซไซม์จากไข่ขาว เบต้าเลคแตมเมสจาก *Bacillus cereus* และเบต้ากลูโคซิเดสจากเมล็ดอัลมอนด์ โดยเตรียมสารละลายเอ็นไซม์ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7. 5 ให้ได้ความเข้มข้นของเอ็นไซม์เป็น 1 มก./มล.

นำสารปฏิชีวนะบ่มกับสารละลายเอ็นไซม์แต่ละชนิดในอัตราส่วน 1 : 1 ที่อุณหภูมิ 37 ° ซ. เป็นเวลา 90 นาที จากนั้นจึงนำมาทดสอบในการยับยั้งการเจริญ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 เทียบกับชุดควบคุมของเอ็นไซม์ที่ไม่มีสารปฏิชีวนะในปฏิกริยา

8. ตรวจสอบโครงสร้างเบื้องต้นโดยเครื่องอินฟราเรดสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

วิธีการในขั้นตอนนี้ได้ส่งไปวิเคราะห์ ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย