การผลิตและลักษณะสมบัติของทอกซินจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 ที่มีผลฆ่ายีสต์

นางสาว วิบูลย์ลักษณ์ วิสุทธิศักดิ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2536

ISBN 974-583-326-6

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

018960
1173842X

Production and Characterization of Toxin from *Bacillus* sp. strain F2.2 with Cidal Activity Toward Yeasts

Miss Wiboonluk Wisuttisak

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Microbiology

Graduate School

Chulalongkorn University

1993

ISBN 974-583-326-6

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตและลักษณะสมบัติของทอกซินจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 ที่มีผลฆ่ายีสต์
โดย	นางสาววิบูลย์ลักษณ์ วิสุทธิศักดิ์
ภาควิชา	จุลชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน
ปีการศึกษา	2536

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ประกิตติ์สิน สีหนนทน์)

.....ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน)

.....ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

วิบูลย์ลักษณ์ วิสุทธิศักดิ์ : การผลิตและลักษณะสมบัติของทอกซินจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 ที่มีผลฆ่ายีสต์ (PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF TOXIN FROM *Bacillus* sp. STRAIN F2.2 WITH CIDAL ACTIVITY TOWARD YEASTS) อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.สุเทพ ธนียวัน และ ผศ.จิราภรณ์ ธนียวัน, 136 หน้า. ISBN 974-583-326-6

จากการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตทอกซินจากตัวอย่างอาหารหมักดอง ผัก และผลไม้ เพื่อดูความสามารถในการฆ่าจุลชีพอื่น ๆ พบว่า แบคทีเรีย F2.2 ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มของ *Bacillus* sp. มีความสามารถในการฆ่าจุลชีพอื่น ๆ ได้อย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะยีสต์ เมื่อทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตทอกซินในขวดเขย่าขนาด 250 มิลลิลิตร พบว่าจุลินทรีย์นี้จะปลดปล่อยทอกซินออกมาในปริมาณสูง เมื่อเลี้ยงในอาหารวายอีพีดี ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน มีเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน และมีผงสกัดยีสต์เป็นแหล่งเกลือแร่และวิตามิน ค่าความเป็นกรด-ด่าง เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.0 และบ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ. อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน สำหรับสภาวะที่เหมาะสมในการออกฤทธิ์ของทอกซินพบว่า หากบ่มทอกซินร่วมกับจุลินทรีย์ทดล่อบที่อุณหภูมิ 25°ซ. ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6.0 เป็นเวลา 14 ชั่วโมง จะให้ค่าการออกฤทธิ์ดีที่สุด

การทำทอกซินกึ่งบริสุทธิ์ กระทำโดย การตกตะกอนด้วยกรดไฮโดรคลอริกแล้วสกัดแยกสารด้วยบิวทานอล นำส่วนสกัดไปทำให้บริสุทธิ์โดยการทำโครมาโตกราฟีอย่างต่อเนื่องบนซิลิกาเจล, ดีอีเออี-เซฟฟาเด็กซ์ เอ-50 และเซฟฟาเด็กซ์ จี-75 เมื่อนำทอกซินที่ผ่านกระบวนการดังกล่าวไปตรวจสอบด้วย HPLC ปฏิภาคกลับโดยใช้คอลัมน์ LichroCART 2504(100 RP-18) พบว่า จำนวนพีคที่ปรากฏในโครมาโตแกรมลดลง เมื่อเทียบกับตัวอย่างเริ่มต้นที่ผ่านการตกตะกอนด้วยกรดไฮโดรคลอริก อันเป็นเครื่องบ่งว่า ทอกซินมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต วิบูลย์ลักษณ์ วิสุทธิศักดิ์

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2536 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

C326179 : MAJOR : INDUSTRIAL MICROBIOLOGY
KEY WORD: TOXIN / Bacillus / Saccharomyces cerevisiae

WIBOONLUK WISUTTISAK : PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF TOXIN FROM *Bacillus* sp. STRAIN F2.2 WITH CIDAL ACTIVITY TOWARD YEASTS. THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. SUTHEP THANIYAVARN, Ph.D. AND ASSIST. PROF. JIRAPORN THANIYAVARN, 136 pp. ISBN 974-583-326-6

Bacteria capable of killing other microorganisms were screened and isolated from fermented food, vegetables and fruits. Among these, F2.2 which was later identified as member of the genus *Bacillus* showed a wide range of microbial killing activities. Optimization for toxin production was carried out in the shake flask level. It was found that the organisms produced toxin in high amount upon cultivating in YEPD medium containing glucose as sole source of carbon with peptone as nitrogen source, yeast extract as trace mineral and initial pH of 5.0. Cultivation was done in a 250 ml. flasks at 30°c, 200 rpm. with maximum yield after 3 days of cultivation. The optimum conditions for killing activity of toxin toward *Saccharomyces cerevisiae* were : 14 hr. incubation at 25°c and pH of 6.0.

Toxin was partially purified by consecutive chromatography on silica gel, DEAE-Sephadex A-50 and Sephadex G-75 columns, respectively. The last fraction obtained was subjected to reverse phase HPLC equipped with LichroCART 250-4(100 RP-18) column, analytical HPLC chromatogram showed profile of less peaks in comparision to sample obtained from HCl precipitation, indicated a higher degree of purity.

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต วิบูลย์ลักษณ์ วิสุทธิศักดิ์

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2536 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความช่วยเหลือจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน โดยได้กรุณาให้คำแนะนำ ปรึกษา รวมทั้งแนวคิดต่าง ๆ ในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นอย่างดียิ่ง ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รวมทั้งพี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ที่ได้กรุณาให้กำลังใจในการทำวิจัยนี้เป็นอย่างดี ตลอดจนเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา ที่ได้ช่วยเหลือด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนสำหรับการทำวิจัย ตลอดจนเจ้าหน้าที่ของบัณฑิตวิทยาลัย ที่ได้ช่วยอำนวยความสะดวกต่าง ๆ

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ น้อง ๆ และญาติ ๆ ทุกคน ที่ได้สนับสนุนในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ตั้งแต่เริ่มต้นจนสมบูรณ์

ท้ายสุดนี้ขอขอบคุณ นพ.พิเชษฐ พัวพันกิจเจริญ ที่ได้ให้การสนับสนุน เป็นกำลังใจ และให้คำแนะนำเสมอมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ซ

สารบัญรูป ..... ฌ

คำย่อ ..... ฒ

บทที่

1. บทนำ 1

2. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง 23

3. ผลการทดลอง 43

4. การอภิปรายและสรุปผลการทดลอง 101

เอกสารอ้างอิง 112

ภาคผนวก 122

ประวัติผู้เขียน 136

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.1	ตัวอย่างของสารปฏิชีวนะกลุ่มเปปไทด์ที่สร้างขึ้นจากแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* sp.	4
3.1	แสดงชนิดของตัวอย่างอาหารและสถานที่เก็บตัวอย่างของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ 3 สายพันธุ์	43
3.2	แสดงความสามารถในการฆ่าเชื้อทดสอบกลุ่มต่าง ๆ ของแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้	45
3.3	แสดงการเปรียบเทียบความกว้างของบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้นเมื่อใช้ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Torulopsis glabrata* เป็นเชื้อทดสอบ	49
3.4	แสดงเปอร์เซนต์การฆ่าสัมพัทธ์ที่ลดลงเมื่อนำทอกซินที่สร้างได้จากแบคทีเรียสายพันธุ์ F2.2 และ 5/12 ไปผ่านการเก็บไว้ที่สภาวะต่าง ๆ เทียบกับการทดสอบความสามารถในการฆ่าเชื้อทดสอบทันที	54
3.5	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characterisitcs) ของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2	98
3.6	ลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมี (Physiological and Biochemical Characteristics) ของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 เมื่อเทียบกับ *Bacillus licheniformis*	99

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.1	แสดงโครงสร้างทางเคมีของสารปฏิชีวนะกลุ่มต่าง ๆ	4
1.2	แสดงโครงสร้างของบาซิไลซิน	10
1.3	แสดงโครงสร้างของลิเนียร์กรามิซิดีนและไทโรซิดีน	11
3.1	แสดงการยับยั้งของแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ ได้แก่ F2.2, 5/12 และ 3/38 ต่อ *Torulopsis glabrata* ซึ่งเป็นเชื้อทดสอบ โดยวิธีการขีดไขว้บนอาหารแข็ง เมื่อบ่มเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง	44
3.2	เปรียบเทียบรูปแบบการเจริญของ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Torulopsis glabrata* ซึ่งเป็นเชื้อยีสต์ทดสอบในอาหารเหลวชนิดวายอีพีดี เมื่อเลี้ยงในขวดเขย่า ติดตามการเจริญ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร	48
3.3	แสดงบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้นจากการดูดซึมทอกซินในวุ้นเพาะเชื้อ (agar diffusion) เมื่อใช้ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นเชื้อทดสอบ	49
3.4	แสดงรูปแบบการเจริญ, การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง และความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบในช่วงเวลาต่าง ๆ ของเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 เมื่อใช้ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นเชื้อทดสอบ	51
3.5	แสดงรูปแบบการเจริญ, การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง และความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบในช่วงเวลาต่าง ๆ ของเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ 5/12 เมื่อใช้ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นเชื้อทดสอบ	52
3.6	แสดงรูปแบบการเจริญ, การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง และความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบในช่วงเวลาต่าง ๆ ของเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ 3/38 เมื่อใช้ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นเชื้อทดสอบ	53

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

3.7 แสดงการเปรียบเทียบการออกฤทธิ์และทดสอบความเสถียรของทอกซินจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 และ 5/12 โดยวิธี tube test เมื่อนำส่วนน้ำใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อไปทำการบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ ตลอดจนการนำไปผ่านขั้นตอนการทำให้แห้งภายใต้อุณหภูมิต่ำ 56

3.8 แสดงรูปแบบการเจริญ, การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง, ปริมาณโปรตีน และความสามารถในการออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อทดสอบในช่วงเวลาต่าง ๆ ของการเจริญของเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 เมื่อเลี้ยงในขวดเขย่า และใช้ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นเชื้อทดสอบ 57

3.9 ผลของระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ ต่อการผลิตทอกซินจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 ในอาหารเหลวชนิดวายอีพีดี เมื่อเลี้ยงในขวดเขย่าที่อุณหภูมิ 25°ซ. ด้วยอัตราเร็ว 200 รอบ/นาที 59

3.10 ผลของความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตทอกซินจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวชนิดวายอีพีดีที่มีการแปรค่าความเป็นกรด-ด่างต่าง ๆ กัน ในขวดเขย่า ที่อุณหภูมิ 25°ซ. ด้วยอัตราเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 วัน 60

3.11 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตทอกซินจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวชนิดวายอีพีดี ในขวดเขย่า ด้วยอัตราเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 วัน 62

3.12 ผลของแหล่งสารคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ต่อการสร้างทอกซินของเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 ในขวดเขย่า โดยมีองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อดังแสดงในภาคผนวกหมายเลข 2 ทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25°ซ. ด้วยอัตราเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 วัน 63

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

3.13 ผลของแหล่งสารไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ต่อการสร้างทอกซินของเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 ในขวดเขย่า โดยมีองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อดังแสดงในภาคผนวกหมายเลข 2 ทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25°ซ. ด้วยอัตราเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 วัน 65

3.14 ผลของแหล่งเกลือแร่และวิตามินต่อการสร้างทอกซินของเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 ในขวดเขย่า โดยมีองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อดังแสดงในภาคผนวกหมายเลข 2 ทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25°ซ. ด้วยอัตราเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 วัน 66

3.15 ผลของการแปรผันระยะเวลาในการบ่มทอกซินกับ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นเชื้อยีสต์ทดสอบเพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการออกฤทธิ์ของทอกซินที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 ทำการทดสอบโดยวิธี tube test 67

3.16 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างต่อการออกฤทธิ์ของทอกซินที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 เมื่อทำการบ่มทอกซิน และ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นยีสต์ทดสอบไว้ในหลอดทดสอบที่มีการแปรค่าความเป็นกรด-ด่างต่าง ๆ 69

3.17 ผลของอุณหภูมิต่อการออกฤทธิ์ของทอกซิน ที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 เมื่อทำการบ่มทอกซินและ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นยีสต์ทดสอบไว้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ 70

3.18 แสดงรูปแบบการเจริญของ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นเชื้อยีสต์ทดสอบในช่วงเวลาต่าง ๆ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวชนิดวายอีนีดี ในขวดเขย่าที่อุณหภูมิ 25°ซ. อัตราเร็ว 200 รอบ/นาที ติดตามการเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร 71

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

3.19 แสดงความเหมาะสมในช่วงเวลาต่าง ๆ ของการเลี้ยงเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นยีสต์ทดสอบต่อการออกฤทธิ์ของทอกซิน จากเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 เมื่อเลี้ยงในขวดเขย่า ติดตามการเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และทดสอบความเหมาะสมต่อการออกฤทธิ์ของทอกซินโดยวิธี tube test 73

3.20 แสดงการติดตามค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ของทอกซินที่ผลิตได้จากเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 เมื่อทำการเจือจางค่าต่าง ๆ กัน 74

3.21 แสดงการเปรียบเทียบริเวณยับยั้งที่เกิดจากการหยอดทอกซินจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 การหยอดเอนไซม์โปรติเอส และการหยอดสารละลายผสมระหว่างทอกซินกับเอนไซม์โปรติเอส ลงในหลุมต่าง ๆ ของวุ้นเพาะเชื้อที่มียีสต์เจริญอยู่... 75

3.22 แสดงผลของการเติมทวีน 80 ลงในหลอดทดสอบของการทดสอบโดยวิธี tube test ที่ประกอบไปด้วย ทอกซินจากเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 และ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นเชื้อทดสอบ 77

3.23 แสดงความเสถียรของทอกซินจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 ต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง เมื่อทำการบ่มทอกซินในบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างต่าง ๆ กัน แล้วจึงนำไปทดสอบความสามารถในการฆ่ายีสต์ทดสอบโดยวิธี tube test 78

3.24 แสดงความเสถียรของทอกซินจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 ต่ออุณหภูมิ เมื่อทำการบ่มทอกซินที่อุณหภูมิ -70°ซ., -20°ซ. และ 0°ซ. เป็นเวลาต่าง ๆ กันตั้งแต่ 0 วันจนถึง 4 อาทิตย์ แล้วจึงนำไปทดสอบความสามารถในการฆ่ายีสต์ทดสอบโดยวิธี tube test 80

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

3.25 แสดงความเสถียรของทอกซินจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 ต่ออุณหภูมิ เมื่อทำการบ่มทอกซินที่อุณหภูมิ -70°ซ., -20°ซ. และ 0°ซ. เป็นเวลาต่าง ๆ กันตั้งแต่ 5-15 อาทิตย์ แล้วจึงนำไปทดสอบความสามารถในการฆ่ายีสต์ทดสอบโดยวิธี tube test 81

3.26 แสดงความเสถียรของทอกซินจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 เมื่อทำการบ่มทอกซินที่อุณหภูมิ 4°ซ. เป็นเวลาต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 0-30 วัน แล้วจึงนำไปทดสอบความสามารถในการฆ่ายีสต์ทดสอบโดยวิธี tube test .. 82

3.27 แสดงความเสถียรของทอกซินจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 ต่ออุณหภูมิ เมื่อทำการบ่มทอกซินที่อุณหภูมิห้อง, 45°ซ. และ 60°ซ. เป็นเวลาต่าง ๆ กันตั้งแต่ 0-7 วัน แล้วนำไปทดสอบความสามารถในการฆ่ายีสต์ทดสอบโดยวิธี tube test 83

3.28-30 แสดงบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้นจากการดูดซึมทอกซินในวุ้นเพาะเชื้อ ที่มี *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นเชื้อทดสอบเจริญอยู่ เมื่อนำของเหลวในขั้นตอนต่าง ๆ ของการทำทอกซินกึ่งบริสุทธิ์มาหยอดลงในหลุมทดสอบ 85

3.31 การทำโครมาโตรกราฟีของทอกซินที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 โดยใช้คอลัมน์ซิลิกาเจล 87

3.32-34 แสดงการทดสอบความสามารถในการฆ่าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นเชื้อทดสอบของโปรตีนในยอดต่าง ๆ ที่ออกมาจากการชะคอลัมน์ด้วย บิวทานอล, อะซิโตน, เอธานอล, อะซิโตไนไทร์ และเมธานอล เมื่อทำการทดสอบโดยการสังเกตบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้นจากการดูดซึมทอกซินในวุ้นเพาะเชื้อ 88

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
3.35	การทำโครมาโตรกราฟีของทอกซินที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 โดยใช้คอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50	90
3.36,38	แสดงการทดสอบความสามารถในการฆ่าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นเชื้อทดสอบของทอกซินที่ผ่านขั้นตอนต่าง ๆ ในการทำให้บริสุทธิ์โดยสังเกตบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้นจากการดูดซึมทอกซินในวุ้นเพาะเชื้อ	91
3.37	การทำโครมาโตรกราฟีของทอกซินที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 โดยใช้คอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-75	92
3.39	การเปรียบเทียบ HPLC โครมาโตแกรม ของทอกซินที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 ก่อนและหลังผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโตรกราฟี	94
3.40	โซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟริซิสของทอกซินจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 ในขั้นตอนต่าง ๆ ของการทำให้บริสุทธิ์ เมื่อเจลมีความเข้มข้น 16.5 เปอร์เซนต์	95
3.41	โซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟริซิสของทอกซินจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ F2.2 ในขั้นตอนต่าง ๆ ของการทำให้บริสุทธิ์ เมื่อเจลมีความเข้มข้น 20 เปอร์เซนต์	96
3.42	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐานและลอการิธึมของน้ำหนักโมเลกุล โดยการทำโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟริซิส	97

คำย่อ

°ซ.	=	องศาเซลเซียส
ชม.	=	ชั่วโมง
ซม.	=	เซนติเมตร
มม.	=	มิลลิเมตร
มล.	=	มิลลิลิตร
°C	=	องศาเซลเซียส
wk	=	สัปดาห์
ID	=	Inner diameter
%	=	เปอร์เซนต์