รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การใช้ประโยชน์จากของเหลือทิ้งจากโรงงานอาหารทะเลในการผลิตเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เพื่อผลิตสารไลโปเปปไทด์สำหรับคุมโรคผลเน่าส้มหลังเก็บเกี่ยว

Use of waste product from seafood factory in cultivation of antagonistic microorganism to produce lipopeptide compounds for postharvest disease control of citrus fruit rot

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. วิจิตรา ลีละศุภกุล

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

(งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนเงินรายได้มหาวิทยาลัย

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ประจำปีประจำปีงบประมาณ 2558 รหัสโครงการ SCI809305)

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีเป้าหมายในการนำโปรตีนที่ได้จากสารอินทรีย์ในของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารทะเล จำพวกน้ำเลือดปลา และ ซากหัวปลา มาใช้ประโยชน์สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราเขียว *Penicillium digitatum* สาเหตุของโรคผลเน่าในส้ม *B. subtilis* ABS-S14 เป็นสายพันธุ์ที่แสดงการยับยั้งได้สูงสุดที่ 89% การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียด้วยอาหารที่มีโปรตีนสกัดจากซากหัวปลาบดละเอียดและน้ำเลือดปลาที่เป็นของเหลือใช้สำหรับนำไปทิ้งจากโรงงานอาหารทะเล และกากน้ำตาล ตรวจดูอัตราการเจริญ พบว่าแบคทีเรียสามารถใช้โปรตีนที่ได้จากน้ำเลือดปลา (8 mg/ml) ซากหัวปลา (4 mg/ml) และ molasses (10% v/v) ในการเจริญเติบโตได้ และสามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเชื้อราเขียว *P. digitatum* ได้ตั้งแต่ระยะเข้าช่วง lag phase จนถึง stationary phase ทำการแยก cyclic lipopeptides (CLPs: fengycins, surfactins และ iturins) จากสารสกัดหยาบที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* ABS-S14 ด้วยวิธี preparative thin Layer chromatography (PTLC) ตามด้วยวิธี solid phase extraction (SPE) และยืนยันชนิดของสารได้ด้วยวิธี high performance liquid chromatography (HPLC) และวิธี matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectroscopy (MALDI-TOF MS) การจัดจำแนกเชื้อ *B. subtilis* ด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา (Molecular biology) โดยใช้ลำดับเบสของ gene 16S rRNA และวิธี MALDI-TOF MS เพื่อติดตามตัวเชื้อ *B. subtilis* เมื่อหยดลงบนผิวส้ม พบว่าแบบแผนโปรตีนบริเวณผนังเซลล์ สามารถระบุความจำเพาะของเชื้อ *B. subtilis* ABS-S14 ด้วยวิธี MALDI-TOF MS ได้ดีชัดเจนกว่าการตรวจหา 16S rRNA ลำดับเบส สามารถตรวจพบสาร CLPs ที่หยดลงบนแผลที่เปลือกผลส้มในปริมาณน้อยมากได้ แต่ไม่พบการสร้างสาร CLPs ของเชื้อ *B. subtilis* สายพันธุ์ ABS-S14 เมื่อใส่บนผิวส้ม

ABSTRACT

This research aims to reuse the recovered organic proteins from the waste products obtained from the seafood factory for a cultivation of the antagonistic strain *Bacillus subtilis* for postharvest control of green mold disease in citrus fruit caused by *Penicillium digitatum*. *B. subtilis* ABS-S14 showed the highest fungal growth inhibition at 89%. Bacterial growth curves of *B. subtilis* ABS-S14 were detected when optimization of the culture media with the soluble proteins extracted from hemolysed blood (8 mg/ml) and head (4 mg/ml) of the fishes obtained from the seafood factory waste. Also a comparison of the bacterial growth in these media to that of obtaining from molasses (10% v/v) was carried out. Fungal inhibition of the bacterial culture filtrates harvested from those culture media was increasingly demonstrated from lag phase until stationary phase of bacterial growth. The cyclic lipopeptides (CLPs: fengycins, surfactins และ iturins) were purified from the crude extract obtained from bacterial culture filtrate by steps of preparative thin layer chromatography (PTLC), followed by solid phase extraction (SPE) and the identity of the substances was carried out using high performance liquid chromatography (HPLC) and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectroscopy (MALDI-TOF MS). Upon identification, the bacterial typing by 16S rRNA gene sequencing and determination of membrane protein spectrum of bacterial cells by MALDI-TOF MS *B. subtilis* ABS-S14 was clearly detected when running MALDI-TOF MS, particularly once very small amount of the bacterial CLPs was loaded into a wound on the fruit surface and the CLPs were detected afterward. However, the in vivo synthesized CLPs from *B. subtilis* ABS-S14 were undetectable when the bacterial cells were applied into the wound.