

- ความปลอดภัยและความคุ้มโรคของวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสุกร  
ชนิดน้ำมันที่มี Montanide 80 เป็นสารลดแรงตึงผิว  
นริศ ว่องวัฒนากุล นพพร พัฒนประสิทธิ์
- เปรียบเทียบการตรวจหาปริมาณไวรัสกัมโบโรเชื้อเป็นด้วยการฉีด Route  
ต่างๆ เข้าไขไก่อฟัก  
พรชัย ศรีดามา กมลทิพย์ ธัญพิมล  
ระวีวรรณ ชิงวรรณศิริ
- การศึกษาโครงสร้าง หน้าที่และชีวสังเคราะห์ของโปรตีนผนังเซลล์ฮีสต์  
: การตรวจวิเคราะห์โปรตีนที่ควบคุมโดยยีน AWA 1  
รชนี อัครดิ ฮิโตชิ ชิโมอิ
- ผลของอุณหภูมิน้ำกลั่นก่อนนึ่งคือ Heat penetration time เมื่อใช้เครื่อง  
นึ่งมาเชื่อมด้วยไอน้ำร้อน  
รังสรรค์ รักษากุลวิทยา นิตยา รักศรี
- การผลิตวัคซีนกาฬโรคเปิดด้วยเซลล์เนื้อเยื่อคัพภะไก่ที่เพาะเลี้ยงต่อ  
ระวีวรรณ ชิงวรรณศิริ กมลทิพย์ ธัญพิมล
- กองบรรณาธิการ

# วารสารชีวผลิตภัณฑ์

The Journal of Veterinary Biologics

---

ปีที่ 8 ฉบับที่ 2 กันยายน 2541

Volume 8 No. 2 September 1998

---

## วัตถุประสงค์

1. เพื่อเผยแพร่งานวิชาการด้านการผลิตชีวภัณฑ์
2. เพื่อเผยแพร่ความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับการใช้วัคซีน
3. เพื่อสนับสนุนการศึกษา ค้นคว้า และการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับชีวผลิตภัณฑ์
4. เพื่อเพิ่มพูนความรู้ ความก้าวหน้าทางวิชาการ

ฉบับที่ 2 กันยายน 2541 พิมพ์เผยแพร่ กันยายน 2542 จำนวนพิมพ์ 400 เล่ม

## วารสารชีวผลิตภัณฑ์

บรรณาธิการ	แอบ คงทน
ผู้ช่วยบรรณาธิการ	พยนต์ สินสุวงศ์วัฒน์
กองบรรณาธิการ	วัชรีย์ สินสุวงศ์วัฒน์ สมใจ กมลศิริพิชัยพร วรัญญา ชมเฟื่องแก้ว เดิมนพล รัตนวงศ์
สำนักงาน	กองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ พญาไท กรุงเทพฯ 10400
กำหนดออก	ปีละ 2 ฉบับ : เดือนมีนาคม และกันยายน
พิมพ์ที่	ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา

## The Journal of Veterinary Biologics

Editor	Ab Kongthon
Assistant editor	Payont Sinsuwonkwat
Editorial board	Wachari Sinsuwonkwat Somjai Kamolsiripichaiporn Varunyu Chomphaungkew Dermopol Ratanawonk
Office	Division of Veterinary Biologics, Phyathai, Bangkok, Thailand, 10400
Publications	twice a year in March and September

# วารสารชีวผลิตภัณฑ์

ปีที่ 8 ฉบับที่ 2 กันยายน 2541

## สารบัญ

- ความปลอดภัยและความคุ้มโรคของวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสุกรชนิดน้ำมันที่มี Montanide 80 เป็นสารลดแรงตึงผิว  
นริศ ว่องวัฒนากุล นพพร พัฒนประสิทธิ์ 7
- เปรียบเทียบการตรวจหาปริมาณไวรัสกัมโบโรเชื้อเป็นด้วยการฉีด Route ต่างๆ เข้าไขไก่ฟัก  
พรชัย ศรีดามา กมลทิพย์ ธัญพิมล  
ระวีวรรณ ยิ่งวรรณศิริ 14
- การศึกษาโครงสร้าง หน้าที่และชีวสังเคราะห์ของโปรตีนผนังเซลล์ยีสต์ : การตรวจวิเคราะห์โปรตีนที่ควบคุมโดยยีน *AWA 1*  
รัชณี อัดถิ ฮิโตชิ ชิโมอิ 22
- ผลของอุณหภูมิน้ำกลั่นก่อนนึ่งต่อ Heat penetration time เมื่อใช้เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำร้อน  
รังสรรค์ รัชกุลวิทยา นิตยา รักศรี 35
- การผลิตวัคซีนกาฬโรคเป็ดด้วยเซลล์เนื้อเยื่อตับไก่ที่เพาะเลี้ยงต่อ  
ระวีวรรณ ยิ่งวรรณศิริ กมลทิพย์ ธัญพิมล 43
- กองบรรณาธิการ 51

# The Journal of Veterinary Biologics

---

Volume 8 No. 2 September 1998

---

## Contents

- Safety and potency of swine FMD oil emulsion vaccine contained  
Montanide 80 as a surfactant 7  
Narit Wongwattanakul and Nopporn Pattanaprasith
  
- Comparison of virus content of Gumboro disease virus with different  
inoculated route in chicken embryo 14  
Pornchai Sridama, Kamonthip Thunpimon and  
Raweevan Yingvansiri
  
- Studies on structures, functions and biosynthesis of yeast cell wall proteins 22  
: Identification and analysis of AWA 1 protein  
Ratchanee Atthi and Hitoshi Shimot
  
- Effect of distilled water temperature before sterilization on heat penetration  
time in autoclave 35  
Rangsan Rugskulvithaya and Nittaya Ruksri
  
- The preparation of duck plague vaccine from subculture chicken embryo  
fibroblast 43  
Raweevan Yingvansiri and Kamonthip Thunpimon
  
- Editorial board 51

## ข้อแนะนำสำหรับผู้เขียน

วารสารชีวผลิตภัณฑ์ เป็นวารสารเผยแพร่งานวิชาการของกองผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ กำหนดออกปีละ 2 ฉบับ คือ เดือนมีนาคมและกันยายน วัตถุประสงค์ เพื่อพิมพ์เผยแพร่งานทางด้านวิชาการของกองผลิตชีวภัณฑ์ และหน่วยงานอื่นที่คล้ายกัน งานวิชาการที่จะพิมพ์ในวารสารนี้ต้องผ่านการอนุมัติให้เผยแพร่ผลงานทางวิชาการแล้ว

### เรื่องที่จะนำลง

1. งานวิจัย (Technical papers) : เป็นการเสนอผลการวิจัยที่ผู้เขียนได้ทำขึ้นเอง
2. บทความ (Articles) : เป็นบทความทางวิชาการ ที่รวบรวมข้อมูล ความคิดเห็นและประสบการณ์ของผู้เขียน
3. เรื่องอื่น ๆ ที่คณะผู้จัดทำพิจารณาเห็นสมควร

การส่งเรื่อง ส่งถึงกองบรรณาธิการวารสารชีวผลิตภัณฑ์ ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130  
โทร. 044-311592 Fax. 044-312870

### ต้นฉบับ

1. ต้นฉบับที่ส่งมาพิมพ์ในวารสารชีวผลิตภัณฑ์ ไม่ควรเป็นเรื่องที่เคยพิมพ์ หรือกำลังอยู่ระหว่างการพิจารณาเพื่อลงพิมพ์วารสารอื่น
2. ต้นฉบับเป็นภาษาไทยหรือภาษาอังกฤษ บนกระดาษ A 4 ส่งมาพร้อมกัน Disket โดยพิมพ์บทความด้วยโปรแกรม MS.word 6 ขนาดกั้นบน 5/4" ล่าง 1" ซ้าย 5/4" ขวา 3/4" พร้อมสำเนาอีก 1 ชุด
3. มีความยาวไม่เกิน 8 หน้า

### การลำดับเรื่อง

1. ชื่อเรื่อง (Title) ควรตั้งชื่อให้สั้นและสื่อความหมายได้ดี
2. ชื่อผู้เขียนและผู้ร่วมงาน (Author and co-workers) เขียนชื่อนามสกุลเต็มทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ได้ชื่อเรื่อง พร้อมทั้งสถานที่ทำงานที่จะติดต่อได้สะดวกเป็นหมายเหตุ (foot note)
3. บทคัดย่อ (Abstract) เขียนสั้นให้ได้เนื้อความคลุมเรื่องทั้งหมดโดยเฉพาะวัตถุประสงค์ วิธีการและผล ไม่ควรเกิน 3% ของตัวเรื่อง มีทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ แต่ละภาษาเขียนแยกหน้าต่างหาก โดยถ้าบทความหลักเป็นภาษาไทย ให้เขียนบทคัดย่อเป็นภาษาอังกฤษไว้หลังเอกสารอ้างอิง และถ้าบทความหลักเป็นภาษาอังกฤษ ให้เขียนบทคัดย่อเป็นภาษาไทยไว้หลังเอกสารอ้างอิงเช่นกัน
4. คำสำคัญ (Key words) เป็นคำหรือข้อความสั้น ๆ ที่มีความหมายแสดงถึงความเป็นไปของการทดลองนั้น ๆ รวมกันแล้วไม่เกิน 4 คำ หากไม่สามารถแปลเป็นภาษาไทยได้ให้ใช้ภาษาไทยสะกดทับศัพท์ อยู่ใต้บทคัดย่อ
5. เนื้อหา (Text) สำหรับงานวิจัยประกอบด้วย
  - 5.1 บทนำ (Introduction) อธิบายถึงปัญหาและวัตถุประสงค์และควรมีการตรวจเอกสาร (literature review)
  - 5.2 อุปกรณ์และวิธีการ (Materials and Methods) อธิบายเครื่องมือ อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง วิธีการที่ใช้ถ้าคิดค้นขึ้นควรอธิบายอย่างละเอียด แต่ถ้าเป็นที่ทราบกันควรเขียนในลักษณะอ้างอิงถึง ถ้าเป็นเครื่องหมายตราหรือชื่อการค้าควรทำเป็น foot note ไว้ที่ข้างล่างของหน้านั้น
  - 5.3 ผล (Results) รายงานผลการทดลองเป็นคำบรรยาย ให้ละเอียดและเข้าใจง่าย โดยแบ่งเป็นหลาย ๆ ย่อหน้า และจัดข้อความที่มีเนื้อหาเดียวกันไว้ด้วยกัน หากเป็นไปได้ควรเสนอในรูปของตาราง หรือ รูปภาพ หรือกราฟพร้อมทั้งบรรยายประกอบ ทั้งนี้ตาราง รูป หรือกราฟ ไม่ควรแสดงผลที่เหมือนกัน

ตาราง (Tables) ควรพิมพ์ให้ชัดเจนเหมาะกับหน้า ต้องมีความหมายในตัวเอง และมีคำอธิบายตารางอยู่เหนือตารางนั้น ๆ

รูปภาพ (Figures) ควรเป็นภาพขาว-ดำ ภาพสีหากจำเป็นผู้เขียนต้องเสียค่าใช้จ่ายเอง อธิบายรายละเอียดไว้ได้รูปนั้น ๆ

5.4 **วิจารณ์ (Discussion)** เป็นการวิจารณ์ผลการทดลอง โดยมีจุดมุ่งหมาย เพื่อให้ผู้อื่นเห็นคล้อย ถึงหลักการที่แสดงออกมาจากผลการทดลอง หรือเพื่อสนับสนุน หรือคัดค้านทฤษฎีที่มีผู้เสนอมาก่อน หรือเพื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองและการตีความหมายของผู้อื่น ผู้เขียนควรพยายามเน้นถึงปัญหาหรือข้อโต้แย้งในสาระสำคัญของเรื่องที่กำลังกล่าวถึง ตลอดจนข้อเสนอแนะเพื่อการวิจัยในอนาคตและแนวทางที่จะนำไปใช้เป็นประโยชน์

5.5 **สรุป (Conclusion)** เขียนใจความที่สำคัญและคุณค่าของงานเพื่อผู้อ่านจะได้เข้าใจได้ง่ายขึ้น

5.6 **กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)** ควรมีในกรณีที่ได้รับความช่วยเหลือหรือความร่วมมือที่ได้การสนับสนุนงานค้นคว้าวิจัยนั้น ๆ

5.7 **เอกสารอ้างอิง (References)**

ก. **กรณีอ้างอิงในเนื้อเรื่อง** ควรอ้างอิงดังนี้คือ

1. กรณีที่อ้างจากการตรวจเอกสาร โดยผู้อื่น ให้ใช้คำว่าอ้างถึงโดย (cited by)
2. กรณีผู้รายงานเอกสารเป็นคนไทย เมื่อเป็นประธานของประโยค เช่น นพพร (2539) หรือเมื่อรายงานงานอยู่กลาง หรือท้ายประโยค เช่น (นพพร, 2539), (วิไลและคณะ, 2532)
3. กรณีผู้รายงานเอกสารเป็นชาวต่างประเทศ เมื่อเป็นประธานของประโยค เช่น Lin และ Lee (1981), Kumagai และคณะ (1961) หรือเมื่อผู้รายงานอยู่กลางหรือท้ายประโยค เช่น (Lin and Lee, 1981) (Kumagai et al., 1961)

ข. **การเขียนเอกสารอ้างอิงท้ายเรื่อง** ควรขึ้นเอกสารอ้างอิงภาษาไทย เขียนเรียงตามลำดับพหุชนะของผู้เขียน ถ้าเป็นภาษาอังกฤษใช้ชื่อสกุลตามด้วยชื่อย่อของผู้แต่ง แล้วตามด้วยชื่อเรื่อง ชื่อหนังสือ หรือชื่อย่อวารสาร ปีที่ฉบับที่ และหน้าที่อ้างอิง ดังตัวอย่าง

กัญญา สุวินทรากร และอนุทิน หาญวิรุฬ 1991 (2534) การตรวจสอบหาไวรัสอหิวาต์สุกร ไข่นาสเตรนชนิดผ่านกระดาษ โดยใช้เซลล์คัลเจอร์ เวชศาสตร์สัตวแพทย์ 21(2) : 69-78

Johnson, R.H. and Collings, D.F., 1971. Transplacental infection of piglets with a porcine parvovirus. Res. Vet. Sci., 12 : 570-572.

หากเอกสารอ้างอิงเป็นตำราให้ระบุ ชื่อผู้เขียน ปีที่ตีพิมพ์ ชื่อเรื่อง ชื่อตำรา (พิมพ์ครั้งที่เท่าใด และบรรณาธิการ) สำนักพิมพ์ เมืองที่พิมพ์ หน้าแรกและหน้าสุดท้ายที่อ้างอิง ดังตัวอย่าง

Van Oirschot, J.T. 1986. Hog Cholera. In : Disease of Swine, 6<sup>th</sup> ed. Leman, A.D. ed., Iowa state university Press, Iowa. p. 293-297.

**หมายเหตุ** ชื่อทางวิทยาศาสตร์ทั้งภาษาอังกฤษและภาษาไทย ใช้ตัวอักษรที่ต่างจากตัวเรื่อง การตรวจแก้ไข

คณะกรรมการขอสงวนสิทธิตรวจแก้ไขเรื่องที่ตั้งมาพิมพ์ทุกเรื่อง ตามแต่จะเห็นควร ในกรณีที่จำเป็นจะส่งต้นฉบับเดิมหรือฉบับที่แก้ไขแล้ว ให้ผู้เขียนเพื่อตรวจความถูกต้องอีกครั้งหนึ่ง

**ความปลอดภัยและความคุ้มโรค  
ของวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสูตรชนิดน้ำมัน  
ที่มี Montanide 80 เป็นสารลดแรงตึงผิว**

**นริศ ว่องวัฒนากุล\* นพพร พัฒนประสิทธิ์\***

**บทคัดย่อ**

ทำการทดสอบความปลอดภัยและความคุ้มโรคของวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสูตรชนิดน้ำมันที่เปลี่ยนการใช้สารลดแรงตึงผิวจาก Arlacel A เป็น Montanide 80 โดยมีส่วนประกอบอื่น คงเดิมตามมาตรฐาน เมื่อใช้ Montanide 80 ตั้งแต่ 6.5% - 7.3% w/v พบว่าวัคซีนผ่านการทดสอบความปลอดภัยและความคุ้มโรคได้ตามมาตรฐาน

**คำสำคัญ :** ความปลอดภัยและความคุ้มโรค วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสูตรชนิดน้ำมัน  
สารลดแรงตึงผิว

---

\* ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130



## บทนำ

ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย เริ่มทำการผลิตวัคซีนสุกรชนิดน้ำมันในระดับอุตสาหกรรมในปี พ.ศ. 2533 เนื่องจากสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มโรคได้สูงและนานกว่าวัคซีนชนิดน้ำแบบเดิม (Bahnmann and Mesquita, 1987; Barteling and Vreeswijk, 1991; Mekercher, 1986) ซึ่งวัคซีนนี้เป็นอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (oil in water, o/w) ที่ 40% ในสูตรวัตถุดิบน้ำมันใช้สารลดแรงตึงผิว (surfactant) 2 ชนิดคือ Eumulgin M8 ซึ่งมี hydrophilic-lipophilic balance number หรือ HLB number 9 - 11 (Henkel, 1997) และ Arlcel A ซึ่งมี HLB number 4.3 (ICI, 1985) ต่อมาเปลี่ยนเป็น Montanide 80 ซึ่งมี HLB number 2.6 (Seppic, 1987a; Seppic, 1987b; Seppic, 1991) ซึ่งทั้งสองเป็นสารชนิดเดียวกัน แต่ต่างที่ HLB number สูตรวัตถุดิบกำหนดใช้ปริมาณ 140S ของไวรัส (มนตรี และ เขาวฤทธิ, 2535; Doel and Chong, 1982) การผสมวัคซีนใช้เทคนิคการกลับวัตถุดิบ (phase inversion technique) ที่ให้ความคงตัวดีกว่าการผสมแบบอื่น (พิมพ์, 2534)

วัคซีนสุกรชนิดน้ำมันผลิตออกมา 3 ชนิดคือ ชนิดโทไบเดียว (monovalent) ชนิดรวมสองโทไบ (bivalent) และชนิดรวมสามโทไบ (trivalent) ซึ่งเมื่อใช้สารลดแรงตึงผิวชนิดเดียวกัน แต่ต่าง HLB number หรือใช้ชุดการผลิตใหม่แทนชุดการผลิตเก่า เนื่องจาก Eumulgin M8 มีค่า HLB number ช่วงกว้างมาก เมื่อหาปริมาณการใช้ที่เหมาะสมของสารลดแรงตึงผิวในวัคซีนได้แล้ว จะสามารถผลิตอิมัลชันที่มีคุณลักษณะที่เหมาะสมคือ มีความคงตัวไม่น้อยกว่า 1 ปีที่ 40% โดยไม่แยกชั้นแบบ creaming, flocculation หรือ coalescence (นวลจิรา, 2527; พิมพ์, 2534) มีความหนืดต่ำ ฉีดง่าย และสะดวกในขั้นตอนการผลิตระดับอุตสาหกรรม ซึ่งใช้เครื่องบรรจุวัคซีนแบบกระบอกสูบและเครื่องนับปริมาตรแบบคิจิตอล

ดังนั้นเมื่อในขบวนการผลิตเปลี่ยนจาก Arlcel A เป็น Montanide 80 จึงจำเป็นต้องศึกษาผลของการทดสอบความปลอดภัย (Safety Test) และการทดสอบความคุ้มโรค (Potency Test) ในสุกรเมื่อใช้วัคซีนที่มี Montanide 80 เป็นสารลดแรงตึงผิว

## อุปกรณ์และวิธีการ

### อุปกรณ์

#### 1. วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสุกรชนิดน้ำมัน

ที่ผลิตตามมาตรฐานศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย รวม 8 ชุด

- 1.1 วัคซีนชุดที่ 1 เป็น monovalent type O มี Arlcel A 7.3% w/v
- 1.2 วัคซีนชุดที่ 2 เป็น bivalent type O,A มี Arlcel A 8.0% w/v
- 1.3 วัคซีนชุดที่ 3,4 และ 5 เป็น bivalent type O,Asia 1 มี Montanide 80 7.3% w/v

1.4 วัคซีนชุดที่ 6,7 และ 8 เป็น Trivalent type O,A,Asia 1 มี Montanide 80 6.5%, 6.7%, 6.9% w/v ตามลำดับ

## 2.สูตรทดลอง

ใช้สูตรลูกผสม 3 สาย จากแม่สูตรที่ไม่เคยฉีดวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อย น.น.20 กก.ขึ้นไป อายุ ประมาณ 2 เดือน จำนวน 72 ตัว สำหรับ Safety Test 16 ตัวและ Potency Test 56 ตัว

## 3.เชื้อพิษ 3 ไทป์

ได้แก่ type O<sub>1</sub>/Udonthani / 87,type A<sub>22</sub>/Nakornprathom / 87,type Asia 1/Petchaburi / 85

## วิธีการ

ทำการทดสอบวัคซีนทั้ง 8 ชุดในสูตร ดังนี้

### 1.Safety Test

ตามมาตรฐานการทดสอบความปลอดภัยของวัคซีนของศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย (นพพร,2539) วัคซีน 1 ชุดใช้สูตร 2 ตัว โดยฉีดสูตรแต่ละตัว ที่ coronary band I/D ด้วยขนาดที่กำหนดให้ใช้ในพื้นที คือ 2 มล.(1 โด๊ส) และ I/M ขนาด 2 โด๊ส อ่านผลภายใน 7 วัน โดยตรวจดูสูตร ต้องไม่แสดงอาการแพ้ หรือเกิดโรคนี้

### 2.Potency Test

ตามมาตรฐานการทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีนของศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย (นพพร,2539) วัคซีน 1 ชุดใช้สูตร 7 ตัว โดยฉีดวัคซีนขนาด 1 โด๊ส I/M ให้สูตร 5 ตัว หลังจากนั้น 3 สัปดาห์ ทำการเจาะเลือดเพื่อหาค่า SN titer และฉีดเชื้อพิษทับด้วยไวรัส 100 PID<sub>50</sub>/ml I/D บริเวณ coronary band เท้าหลังซ้าย จำนวน 1 มล.พร้อมด้วยฉีดเชื้อพิษให้สูตร control ที่ไม่ฉีดวัคซีน อีกจำนวน 2 ตัว

อ่านผลภายหลังฉีดเชื้อพิษทับวันที่ 5 และ 7 สูตรจะต้องให้ความคุ้มโรคตั้งแต่ 60% ขึ้นไป (นพพร, 1988 Technical Report ผลงานยังไม่ได้ตีพิมพ์) คือสูตรที่ฉีดวัคซีนขนาด 1 โด๊สปกติตั้งแต่ 3 ตัวขึ้นไป จะต้องไม่เกิดอาการของโรคนี้ที่เท้า ยกเว้นที่จุดฉีดเชื้อพิษ วัคซีนจึงจะได้มาตรฐาน การทดสอบคุณภาพวัคซีน

## ผลการทดลอง

เมื่อทำการทดสอบ safety test และ potency test ของวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสูตร ชนิดน้ำมัน เนื่องจากในขบวนการผลิตวัคซีน ได้เปลี่ยนจาก Arlcel A เป็น Montanide 80 ได้แก่ วัคซีน ชุดที่ 1 Monovalent vaccine type O มี Arlcel A 7.3% w/v วัคซีนชุดที่ 2 Bivalent vaccine type O,A มี Arlcel A 8.0% w/v วัคซีนชุดที่ 3 - 5 Bivalent vaccine type O,Asia 1 มี Montanide 80 ที่ 7.3% w/v วัคซีนชุดที่ 6 - 8 Trivalent vaccine type O, A, Asia 1 มี Montanide 80 ที่ 6.5%, 6.7%, 6.9% w/v โดยทุกชุดใช้ Eumulgin

M8 ที่ 4.0% w/v และให้คุณลักษณะที่เหมาะสมของอิมัลชันวัคซีน พบว่าวัคซีนทุกชุดผ่านการทดสอบ safety test และ potency test ตามมาตรฐาน ดังตารางที่ 1

## วิจารณ์

วัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสูตรชนิดน้ำมันที่ใช้ในการทดลองทั้ง 8 ชุด ที่ใช้สารลดแรงตึงผิวชนิดเดิม คือ Arlacel A จำนวน 2 ชุด และชนิดใหม่ คือ Montanide 80 จำนวน 6 ชุด เมื่อทดสอบความปลอดภัยและความคุ้มโรคในสุกร วัคซีนทุกชุดให้ความปลอดภัยและความคุ้มโรคตามมาตรฐาน โดยเมื่อทดสอบคุณสมบัติของวัคซีนชนิดน้ำมันก็พบว่าเป็นวัคซีนชนิดน้ำมันที่มีคุณลักษณะที่เหมาะสมด้วย แต่ได้เคยผลิตวัคซีนที่มีความหนืดสูงกว่าในตารางที่ 1 เป็น Trivalent vaccine type O,A, Asia 1 ที่มี Montanide 80 7.3% w/v ความหนืด 71.74 centipoise หนืดมากกว่าค่าเฉลี่ยในตาราง ที่ 1 ถึง 8.24 เท่า แต่วัคซีนยังให้ความปลอดภัยและความคุ้มโรคได้ตามมาตรฐานเช่นกัน เพียงแต่ผู้ใช้จะดูและฉีดวัคซีนได้ยากกว่า

สิ่งที่ต้องการเสนอแนะ คือ เมื่อใช้สารลดแรงตึงผิวชนิดเดียวกันแต่ต่าง HLB number หรือใช้ชุดการผลิตใหม่แทนชุดการผลิตเก่า โดยเฉพาะ Eumulgin M8 ที่มีค่า HLB number ช่วงกว้างมากนั้น ควรหาปริมาณการใช้ที่เหมาะสมของสารลดแรงตึงผิวในวัคซีนก่อน เพื่อผลิตอิมัลชันที่มีคุณลักษณะที่เหมาะสม และป้องกันปัญหาการเกิด Bad emulsion

## สรุป

การทดสอบความปลอดภัยและความคุ้มโรคของวัคซีนโรคปากและเท้าเปื่อยสูตรชนิดน้ำมันที่มี Montanide 80 เป็นสารลดแรงตึงผิวที่นำมาใช้แทน Arlacel A ใช้ตั้งแต่ 6.5% - 7.3% w/v ส่วน Arlacel A ใช้ 7.3% และ 8.0% w/v ขณะที่ Eumulgin M8 ใช้คงที่ที่ 4% w/v พบว่าวัคซีนผ่านการทดสอบความปลอดภัยและความคุ้มโรคตามมาตรฐาน

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นายสัตวแพทย์พยนต์ สิ้นสุวงศ์วัฒน์ ผู้อำนวยการศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย ที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำ และขอขอบคุณผู้ที่มีส่วนทำให้การผลิตวัคซีนเป็นไปด้วยดีทุกท่าน

## วิจารณ์

การฉีดไวรัสเข้า CAM (artificial air sac) จะให้ความไวต่อการทดสอบหรือเพิ่มจำนวนไวรัสมากที่สุด (Rosengerger, 1989) คือ ได้ค่าเฉลี่ยของปริมาณไวรัสที่สูงกว่าการฉีดเข้า CAM of method A, yolk sac และ allantoic sac ประกอบกับมีค่าความแปรปรวน 0.07 ใกล้เคียงกับการฉีดเข้า yolk sac ซึ่งมีค่าความแปรปรวน 0.04 ดังแสดงในตารางที่ 1 เมื่อคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ความผิดพลาดของการฉีดเข้า CAM (artificial air sac) แล้วมีค่า 6.45% แตกต่างจากค่าเปอร์เซ็นต์ความผิดพลาดของการฉีดเข้า yolk sac ซึ่งมีค่า 5.58% เพียง 0.87% ที่ระดับความมีนัยสำคัญทางสถิติ  $P < 0.01$  ดังแสดงในตารางที่ 2 ในขณะที่ความไวต่อการทดสอบของการฉีดเข้า CAM (artificial air sac) สูงกว่า คือ ได้ค่าเฉลี่ยของปริมาณไวรัส ( $\log_{10} ELD_{50}/0.1$  มล.) มากกว่าการฉีดเข้า yolk sac ถึง  $0.38 \pm 0.38$  ที่ระดับความมีนัยสำคัญทางสถิติ  $P < 0.01$  ดังแสดงในตารางที่ 3 ดังนั้นวิธีการฉีดเข้า CAM (artificial air sac) นี้จึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการทดสอบหาปริมาณไวรัส แต่วิธีการเตรียม artificial air sac ค่อนข้างจะยุ่งยากและสูญเสียไข่ไก่ฟักจำนวนหนึ่ง ซึ่งขึ้นอยู่กับความชำนาญของผู้เตรียม และเพื่อแก้ไขปัญหาในการเตรียมนี้จึงทำการฉีดโดยวิธี CAM of method A ซึ่งวิธีนี้มีค่าความแปรปรวนค่อนข้างสูงกว่าวิธีการฉีดเข้า CAM (artificial air sac) เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณไวรัสของ 2 วิธีแล้ว ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ  $P < 0.005$  แต่วิธีการฉีดเข้า CAM of method A ก็ขึ้นอยู่กับความชำนาญของผู้ฉีดแต่ละคนอาจจะให้ค่าที่แตกต่างกันได้ ส่วนการฉีดเข้า allantoic sac ไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการทดสอบหาปริมาณไวรัส เนื่องจากมีค่าความแปรปรวนมากที่สุดและให้ความไวต่อการทดสอบน้อยที่สุด ถึงแม้ว่าวิธีเตรียมการฉีดจะง่ายที่สุดก็ตาม

## สรุป

วิธีการใดตรงเพื่อทดสอบหาปริมาณไวรัสที่ตีนั้น ควรจะให้ความไวและความแม่นยำต่อการทดสอบสูง หรือความแปรปรวนต่อการทดสอบต่ำ จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าวิธีการฉีดเข้า CAM (artificial air sac) ให้ความไวต่อการทดสอบสูงกว่าวิธีการฉีดเข้า CAM of method A, yolk sac และ allantoic sac ตามลำดับ วิธีการฉีดเข้า yolk sac ให้ความแม่นยำสูงกว่า CAM (artificial air sac), CAM of method A และ allantoic sac ตามลำดับ วิธีการฉีดเข้า allantoic sac ให้ความแปรปรวนสูงกว่า CAM of method A, CAM (artificial air sac) และ yolk sac ตามลำดับ

## เอกสารอ้างอิง

- กานดา พูนลาภทวี 2539 สถิติเพื่อการวิจัย ภาควิชาครุศาสตร์เทคโนโลยี คณะครุศาสตร์อุตสาหกรรม และวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ หน้า 155-187
- ภรณ์ เจริญภัคตร์ กรรณิกา ทิตาราม สุพัตคา ปวนะฤทธิ์ พิมพา เพิ่มพูล สุมณา สุรนาคะพันธ์ แสงนวล นวลตรีณี และอารมณี แสงเพชรส่อง 2537 ความน่าจะเป็นและสถิติ ภาควิชา - คณิตศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย หน้า 208-216
- Gorham, J.R. 1957. A simple technique for the inoculation of the chorio-allantoic membrane of chicken embryos. *Am. J. Vet. Res.* 18 : 691-692.
- Lukert, P.D. and Saif, Y.M. 1991. Infectious bursal disease. *Disease of poultry*, 9<sup>th</sup> ed. p.648-663.
- Reed, L.J. and Muench, H. 1938. A simple method for estimating fifty percent endpoints. *Amer. J. Hyg.* 27 : 493-497.
- Rosenberger, J.K. 1989. Infectious bursal disease. A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens, 3<sup>rd</sup> ed. 39 : 165-166
- Senne, D.A. 1989. Viral propagation in Embryonating egg. A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens, 3<sup>rd</sup> ed. 41 : 176-181.

## Comparison of Virus Content of Gumboro Disease Virus with Different Inoculated Routes in Chicken Embryo

Pornchai Sridama \* Kamonthip Thunpimon \* Raweewan Yingvansiri \*

### Abstract

The 0.1 ml of virus titration from  $10^{-2}$  to  $10^{-8}$  dilution of the Gumboro disease virus vaccine, Cu-1 M strain were inoculated into 8-day-old chicken embryos by allantoic sac, yolk sac, CAM (chorioallantoic membrane) of method A route respectively and 11-day-old chicken embryos by chorioallantoic membrane (artificial air sac). The virus titration test was repeated 6 times. The results gave the mean virus content of  $10^{3.20}$ ,  $10^{5.20}$ ,  $10^{5.31}$  and  $10^{5.58}$  ELD<sub>50</sub>/0.1ml, the standard deviation of  $10^{0.59}$ ,  $10^{0.21}$ ,  $10^{0.47}$  and  $10^{0.26}$ , the variance value of  $10^{0.35}$ ,  $10^{0.04}$ ,  $10^{0.23}$  and  $10^{0.07}$  in allantoic sac, yolk sac, CAM of method A and CAM (artificial air sac) respectively. The yolk sac route, the highest accuracy because of the lowest variance value, gave the virus content range between allantoic sac and CAM route. The allantoic sac gave the highest variation. The CAM (artificial air sac) route did not give the virus content different from CAM of method A ( $P < 0.005$ ) but it gave higher than yolk sac route ( $P < 0.005$ ). The CAM of method A route did not give the virus content different from yolk sac route ( $P < 0.005$ ). The CAM (artificial air sac), CAM of method A and yolk sac route gave the virus content higher than allantoic sac route ( $P < 0.005$ ).

Key words : Virus content, Gumboro disease virus, Inoculated route

**Studies on Structures, Functions and Biosynthesis  
of Yeast Cell Wall Proteins  
: Identification and Analysis  
of Awa1 Protein**

**Ratchanee Atthi<sup>\*</sup> Hitoshi Shimoi<sup>\*\*</sup>**

**Abstract**

Most of Sake' yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, form thick foam layer on Sake' mash. The *AWA1* gene which encodes a large 1713-amino acid, serine-and- threonine-rich protein and contains signals for the addition of a glycosyl-phosphotidyl-inositol (GPI) anchor was previously cloned. This gene is considered to be involved in the foam formation of yeasts. In order to confirm that *AWA1* gene product (Awa1p) is a true cell wall protein , the localization of epitope-tagged Awa1p on intact yeast cells using enzyme linked immunosorbent assay and immunofluorescence microscopy was carried out. In this study, Awa1p was shown to be located at the yeast cell surface. Moreover, the protein was detected in  $\beta$ -1,3-glucanase extract cell walls by immunoblot analysis, which indicates that Awa1p is a glucanase extractable cell wall protein. Deletion analysis of *AWA1* revealed that N and C-terminal regions are important for the foam formation and hydrophobicity of yeasts. The hydrophobicity of yeast cells is related to the foam forming ability. These results indicate that Awa1p is a cell wall protein involving in the foam forming ability and hydrophobicity of yeast cells.

**Key words :** *Saccharomyces cerevisiae*, cell wall protein, AWA1 gene

---

\* Veterinary Biologics Center, Pakchong, Nakornratchasima 30130

\*\* Genetic Engineering Division, National Research Institute of Brewing,3-3-1 Higashi  
Hiroshima 739-0046, Japan

## INTRODUCTION

Most of Sake' yeasts, *Saccharomyces cerevisiae* form thick foam layer on Sake' mash during fermentation. This characteristic causes a great trouble for Sake' fermentation since the high capacity fermenting tank, a mechanical foam breaker and a protective circular wall are needed to prevent an outflow of the foam. Thus, the lacking of foam forming during fermentation is one of the desired properties of Sake' yeast apart from high ethanol tolerance, auxotrophic mutants (pink Sake'), killer character and etc. (Walker,1998)

The isolation of non-foaming yeasts have been of interest since 1916. In 1963, Akiyama *et al.* isolated non-foaming yeast and studied its morphological properties but the result showed that it was inferior in flavour and taste of the products. Therefore, attempts to obtain non-foaming yeasts using strain Kyokai no.7 (K7), one of the best breeds of Sake' yeast were performed (Ouchi,K. and Akiyama,H.,1971). Recently, the *AWAI* gene has been identified and isolated as the foam formation gene by Shimoi H. and Sakamoto,K. (personal communication). The presence of *AWAI* gene can convert the non-foaming yeast to the foaming one. The nucleotide sequence of *AWAI* gene was determined and shown that it contains one open reading frame of 5142 bp and encodes a large 1713 -amino- acid- serine and threonine- rich polypeptide. In addition, the *AWAI* product contains hydrophobic C-terminal sequences which are characteristics of signals for glycosyl phosphatidylinositol (GPI) anchor addition. These features are consistent with a cell surface localization of *AWAI* gene ( Bidard *et al.* 1995,Stratford,1994). However, no evidence on the *AWAI* protein localization have been confirmed.

In this study, we examined Awa1p localization by introducing 3xHA-epitope into *AWAI* gene and detecting the tagged gene by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and immunofluorescence microscopy on intact yeast cells in addition to the localization of Awa1p in the cell wall extracts using Western blot analysis. The deletion analysis of the protein was also performed in order to obtain more information about the control of *AWAI* gene expression. The results confirmed that Awa1p is a cell wall protein involved in foam formation during fermentation and the hydrophobicity of Awa1p is related to the foam forming ability.



## MATERIALS AND METHODS

### **Strains and culture conditions.**

*Saccharomyces cerevisiae* strain YPH 499 (*MATa*, *ura3-52*, *lys 2-801*, *ade2-101*, *trp1-Δ 63*, *his3-Δ 200*, *leu2-Δ 1*), UT-1 (*MATa/α*, *awa1/awa1*, *ura3/ura3*, *trp1/trp1*) were used. Yeast strains were grown at 30°C in YPAD medium (1% yeast extract, 2% Bacto peptone, 40 mg of adenine sulfate per liter and 2% glucose) and Synthetic medium (0.67% yeast nitrogen base, 2% glucose and 18% sorbitol and 0.074% complete supplement without Uracil) for yeast transformation.

*Escherichia coli* strain JM109 was used for the preparation of DNA and strain DMI was used for cloning of *AWA1* gene in order to obtain non-methylated DNA for the deleted gene construction using methylase sensitive restriction enzyme. *E.coli* strains were grown at 37°C in Luria-Bertani (LB) broth containing 100 µg/ml of Ampicillin for the selection of transformants.

### **Plasmid, DNA manipulation and transformation.**

The plasmid pRS416 containing *AWA1* gene (pRS416:*AWA1*) previously constructed by Kazutoshi Sakamoto was used throughout the experiment. DNA manipulation and transformation were carried out following standard protocols (Sambrook *et al*, 1989).

### **Construction of the plasmid coding for HA-tagged *AWA1* protein**

The sequence of a triple HA epitope (5'-TACCCATACGATGTTCCCTGACTATGCGGGCTATCCCTATGACGTCCCGGACTATGCAGGATCCTATCCATATGACGTTCCAGATTACGCT-3') was amplified by PCR with primer HA-1 (5'-ATACCCATACGATGTTCCCTGAC-3') and HA-2 (5'-GTAGCGTAATCTGGAACGTCATA-3'). The amplified sequence was cloned into the *HpaI* site of pRS416:*AWA1* and transformed into *E.coli* JM109. Transformants were screened for one with the HA insertion by digestion with *AatII* that has only recognition site in the inserted sequence. The DNA of the candidate plasmid was then determined for the correct direction of HA inserted by PCR amplification using two sets of primers as followings:-i) R1 (5'-GGGGTCTCTTATTGTTA-3') and HA-1 (described above) ii) R1 and HA-2 (described above). The resultant plasmid was confirmed by sequencing with primer F101 (5'-TGGGTGTTTACGTCTCCG-3') before transformation of yeast strain YPH499 and UT-1 for further experiments.

### ***Immunological techniques.***

Immunological experiments were performed using the techniques based on the detection of HA epitope tagged proteins on intact yeast cells with the conjugated anti-HA antibodies specific for the enzyme – linked immunosorbent assay (ELISA) and the fluorescence microscopy test.

Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) were performed on intact yeast cells. Twenty four-hour yeast cells culture was fixed with 3.7 % formaldehyde at 30° C for 30 min , washed once with TBST before blocking non specific binding sites with 1% BSA in TBST at 30° C for 30 min. Mouse anti-HA monoclonal antibody (Boehringer Mannheim,Germany) at a concentration of 1 µg per ml in TBST was then added to the washed cells . After incubation at 30° C with rotating for 1 h , cells were washed three times , 5 min per wash, with TBST and incubated with anti – mouse immunoglobulin G antibody conjugated with alkaline phosphatase (Promega,USA) for 1 h and washed three times with TBST. After the last wash, the supernatant was discarded and the freshly prepared substrate consisting 3.3 µl of 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP, Promega,USA) and 6.6 µl of nitroblue tetrazolium (NBT, Promega,USA) in 1 ml of alkaline phosphatase buffer (100mM Tris HCl ,pH9.5, 100mM NaCl, 5mM MgCl) was then added. The colour development was examined at room temperature with shaking. The conjugated cells harbouring HA-tagged epitope on the cell surface resulted in a dark purple colour in contrary to those without HA-tagged epitope , no colour changed.

### ***Fluorescence microscopy test.***

Immunofluorescence staining of intact yeast cells was performed. Yeast cells grown to exponential phase (optical density at 660 nm,1 ) were fixed with 3.7 % formaldehyde at 30° C for 15 min and washed once with phosphate-buffered saline (PBS; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.15 M NaCl, 3 mM KCl [pH 7.4]). The washed cells were suspended in PBS containing 1% BSA and incubated at 30° C with rotating for 30 min to block non specific binding sites before incubation with mouse anti-HA monoclonal antibody (Boehringer Mannheim,Germany), 1µg per ml in PBS, at 30° C for 1 h. After three washes with PBS, FITC- conjugated goat anti- mouse immunoglobulin G antibody (GibcoBRL [Life Technologies], New York) incubated at 30° C with rotating for 1 h, washed twice and suspended in distilled water. Conjugated cells were examined under the fluorescence microscope (UFX-II, Nikon).

***Preparation of cell wall and enzyme treatment.***

Yeast cell extracts were prepared according to the method previously described (Shimoi et al,1998) . Briefly, four milliliters of yeast cells cultured in synthetic medium at 30°C for 48 h were inoculated into 200 ml of YPAD medium. After 24 h incubation at 30°C with shaking, cells were washed twice with distilled water and disrupted by shaking with glass beads in the Braun homogenizer (B.Braun Melsungen,Germany). The cells were collected by centrifugation , washed three times with 1mM phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF), three times with 5M LiCl solution and another three times with PMSF. The washed disrupted cells were suspended in 20 ml of 50 mM Tris-HCl,pH8.0 containing 2% Sodium dodecylsulfate (SDS ),100 mM EDTA and 40mM dithiothreitol and boiled for 10 min to remove noncovalently bound and disulfide bridge bound proteins. The SDS cell-extracted proteins were then centrifuged at 15,000 g for 5 min . The supernatant was analyzed for SDS extractable cell wall proteins and the pellet was divided into 2 parts for Rarobacter proteaseI (RPI) and Laminarinase treatment.

For RPI treatment, cell pellet was digested with 5 µg of RPI per ml in 20 ml of 50 mM Tris-HCl buffer,pH8.0 at 30°C for 3 h. The supernatant was collected by centrifugation at 15,000 g for 10 min and analyzed as RPI- extracted cell wall proteins.

For Laminarinase treatment, cell pellet was digested with 50 mU of β-1,3-glucanase (laminarinase ;L5144; Sigma, Germany) per ml in 20 ml of 50 mM sodium acetate buffer ,pH5.0 containing 1 mM PMSF at 30°C for 3 h . The supernatant was collected by centrifugation at 15,000 g for 10 min and analyzed as glucanase extracted cell wall proteins

***Western blot analysis.***

Yeast cell extracts were subjected to SDS-PAGE by the method described by Laemmli (1970) using a 2 to 15 % gradient gel (Multi Gel; Daiichi,Japan) and electrotransferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Tefco,Japan) in 0.025 M Tris – HCl . 0.192 M Glycine buffer,pH 8.4 containing 20 %(v/v) of methanol (90 min,180 mA) . The blotted membrane was then blocked with 1% bovine serum albumin in Tris-buffered saline(25 mM Tris-HCl,150 mM NaCl,pH7.5) containing0.05 % Tween20 (TBST). for 1 h at room temperature with gentle agitation and incubated with Anti-HA antibody (Boehringer Mannheim,Germany) at a concentration of 1µg/ml and washed three times with TBST for 10 min. The membrane was then incubated with alkaline phosphatase - conjugated anti - mouse IgG (Promega,USA) at a 1:5000 dilution. The reaction was visualized using NBT/BCIP substrate solution (Promega,USA).

### **Cell surface hydrophobicity assay**

Yeast cell surface hydrophobicity was performed by determination of Hydrophobic Interaction Chromatography for Flocculation (HICF) value according to the method of Akiyama-Jibiki *et al.*(1997). Yeast cells grown in synthetic minimal medium for 48 hours at 30 °C with shaking were harvested, washed twice with 100 mM sodium acetate buffer, pH4.2 and resuspended in the same buffer to a final concentration of 5% wet weight per volume. Phenyl Sepharose CL-4B gels (Pharmacia,Sweden) were packed in the disposable chromatography column (Bio-rad,USA) to a volume of 0.25 ml and equilibrated with 100 mM sodium acetate buffer containing 1.0 M NaCl. Yeast cell suspensions, 0.1 ml, were then applied to the column and eluted with 3 ml of the buffer containing NaCl. The optical density at 660 nm ( $OD_{660}$ ) of the eluent was measured.

The hydrophobicity was determined by using the following equation:

HICF value(%) =  $100(A_{\text{applied}} - A_{\text{eluent}})/A_{\text{applied}}$ , where  $A_{\text{applied}}$  is the  $OD_{660}$  of 0.1 ml of the cell suspension diluted with 3 ml of elution buffer and  $A_{\text{eluent}}$  is the  $OD_{660}$  of the eluent.

### **Foam formation test**

Five milliliters of 48-h culture of yeast cells grown in YPAD medium were inoculated into the mash composed of 38 g of dry steamed rice ( $\alpha$ -rice), 12 g of dry koji (a culture of *Aspergillus oryzae* on steamed rice), 120 ml of tap water and 100  $\mu$ l of lactic acid in wide mouth container (8 cm x 12 cm) and incubated at 30 °C. The foam formation was observed after one and two days of fermentation (Ouchi and Akiyama,1971).

### **Deletion analysis**

Deletion analysis was performed by constructing deletion mutants of *AWAI* gene. Each mutant was constructed by digesting the plasmid pRS416 carrying *AWAI* gene with three sets of restriction enzymes :- i. HpaI and Ball, ii. HpaI and FbaI, iii. SpeI and deleting the sequences between restriction sites by ligation. The effects of the deletion were then assessed by cloning deleted constructs into yeast strain UT-1 and determining the foam forming expression of the genes and hydrophobicity of gene products.

## RESULTS AND DISCUSSION

### *Construction of the plasmid coding for 3xHA-tagged Awa1 protein*

The epitope tagging of *AWA1* gene was performed in order to identify the *AWA1* protein (Awa1p) because the specific antiserum against Awa1p is not available. Tagging the gene with a triple HA (3xHA) epitope was used in many experiments, the sensitivity of the tagged gene detection is more sensitive than using a single HA epitope. Green Fluorescent Protein (GFP) is also one of the most useful epitope being used in many experiments especially on the localization of the cell wall protein. Attempt to construct the GFP-tagged Awa1 p was carried out using the same manner of method for 3xHA tagging but no transformant which was inserted by the right direction of GFP sequence was obtained. In this experiment we used 3xHA as the epitope.

The plasmid containing 3xHA tagged *AWA1* gene were constructed and transformed into yeasts strain YPH499 and UT-1. In order to study whether the HA-tagging affects the foam forming expression of *AWA1* gene, each transformant was tested for foam forming ability. The result showed that 3xHA epitope tagging did not affect the foam forming expression of *AWA1* gene in both strains. However, the yeast strain YPH 499, both transformed by the plasmid containing tagged and untagged *AWA1* gene, did not confer the foam formation (Table 1). It is possibly because of the low fermentation activity of the yeast strain.

### *Localization of AWA1 protein on intact yeast cells*

The presence of *AWA1* protein at the surface of yeast strain UT-1 and YPH 499 transformed with *AWA1* gene were detected using ELISA on intact cells. Both strains of yeast transformed with untagged Awa1p were also included in the trial. The color development reaction indicated the Awa1p is located at the cell surface (Table 1).

Immunofluorescence labelling of the yeasts strain UT1 and YPH499 transformed with *AWA1* were performed comparing with those which were not transformed. The result as shown in Figure 1, the transformed cells exhibited a ring of intense fluorescence at the edge of the cells. This pattern is consistent with localization of Awa1p to the cell surface. Control that were not transformed with *AWA1* exhibited no fluorescence at all (figure not shown).

### **Localization of *AWA1* protein in the yeast cell wall extract**

To localize *Awa1* p, cell walls of yeast cells, strain YPH 499, harboring 3xHA-tagged *Awa1*p were isolated and extracted with SDS and glucanase (Laminarinase and RPI). Western blot analysis of these fractions showed reactive protein bands with mouse anti-HA monoclonal antibody as a high molecular mass (Figure 2). This result indicates that *AWA1*p is cell wall protein which is covalently bound to the cell wall glucan and can be solubilized from SDS-treated cell walls by laminarinase or RPI digestion. The presence of reacted band in the SDS extract is possibly because the loosely associated form of the cell wall proteins was removed during SDS extraction.

### **Assessment of hydrophobicity**

The hydrophobicity of yeasts were determined using the HICF value and compared to the foam formation ability (Figure 3). Yeasts with foam-forming ability (:-K7, UT-1 transformed with *AWA1* and 7H3) revealed a higher HICF value than those which do not form foam during fermentation (:- K701, UT-1 and mutant of 7H3 which *AWA1* was deleted). This result indicates that the hydrophobicity of yeast cells is related to the foam formation and *Awa1*p is involved in the foam formation of Sake' yeast.

### **Deletion Analysis of *AWA1***

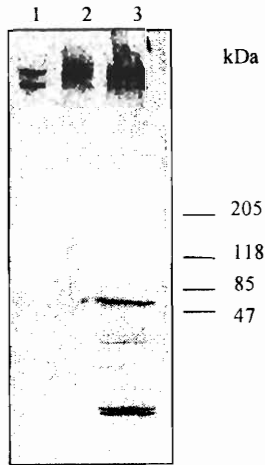
In order to study which part of *Awa1*p is involved in foam formation and hydrophobicity, the deletion analysis of *AWA1* gene was performed by constructing the plasmid containing *AWA1* gene which has deletion of sequences within the open reading frame (ORF) of the gene. The plasmid pRS416 containing *AWA1* was used as the starting material. The constructs obtained in this study are presented in Figure 4. Each of the constructs were transformed into yeast UT-1 strain and determined for foam forming ability and hydrophobicity. All mutants are lack of foam formation ability and the hydrophobicity are decreased as compared with yeast UT-1 transformed with full length of *AWA1* gene. This result indicates that the deletion of the region homologous to partial sequence of YJR151c which is hydrophobic (mutant #2) and located near N- terminal signal sequence of *AWA1* in addition to the deletion of C-terminal hydrophobicity region affected foam formation ability of *Awa1*p. In addition the hydrophobicity of yeasts is related to the formation of Sake yeast.

**Table 1:** Effect of the HA epitope tagging on the foam formation expression of *AWA1* gene and immunodetection of 3xHA tagged *Awa1p* in the yeast cell suspension by alkaline phosphatase test of yeasts strain UT-1 and YPH499.

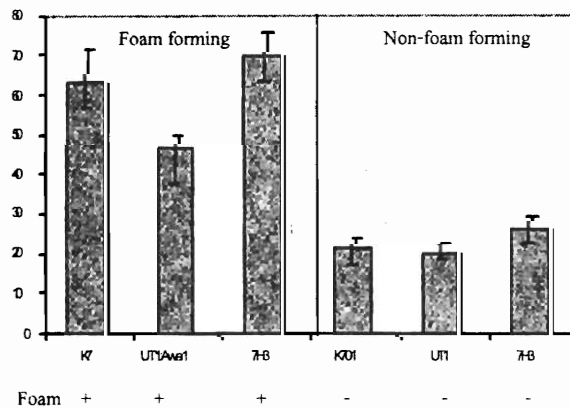
Yeast	Foam formation	ALP ,ELISA
UT-1: <i>AWA1</i>	+	-
UT-1:3xHA- <i>AWA1</i>	+	+
YPH499- <i>AWA1</i>	-	-
YPH499-3xHA <i>AWA1</i>	-	+



**Figure 1:** Fluorescence microscopy test of intact yeast cells of strain UT-1 transformed with 3xHA tagged *AWA1*. Fixed yeast cells were probed with mouse anti-HA and stained with FITC labeled goat anti-mouse IgG .  
 A: yeast cells observed under light microscope  
 B: the same cells observed under fluorescent microscope

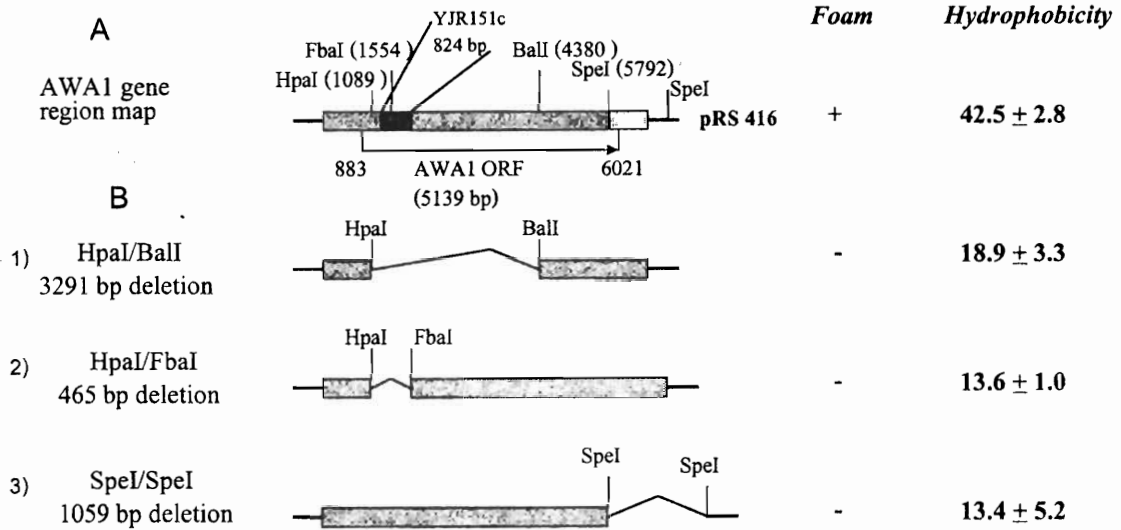


**Figure 2:** Immunoblotting of 3xHA- tagged Awa1 protein in the yeast cell wall extracts. Protein fractions from strain YPH 499 harboring 3xHA-tagged Awa1p were electrophoresed on a 2 to 15% polyacrylamide gradient, blotted onto a PVDF membrane and probed with mouse anti-HA monoclonal antibody and anti-mouse IgG conjugated with alkaline phosphatase. Lane 1, extraction of SDS-treated cell walls with Laminarinase. Lane 2, extraction of SDS-treated cell walls with RPI. Lane 3, SDS extract.



**Figure 3:** Hydrophobicity of Sake' yeasts . Hydrophobic Interaction Chromatography for Flocculation (HICF) value of 48-hour yeast culture in synthetic minimal medium was determined and compared with the foam forming ability carried out by small Sake making as described in materials and methods. Three separated experiments were performed for each strain of yeast .





**Figure 4:** Schematic representation of the *Awa1* gene and constructs. (A) Restriction map of *AWA1* gene region. (B) Schematic representation of the different constructs. 1) Deletion of HpaI / BallI fragment (3290 bp). 2) Deletion of HpaI/FbaI fragment (465 bp). 3) Deletion of SpeI/SpeI fragment (1059 bp). The foam formation ability of each construct is indicated by + (foam forming) and - (non-foam forming). The hydrophobicity is indicated by the average HICF value (%) of three separated experiment from each construct.

## CONCLUSION

It is not doubtful that *AWA1* gene encodes for the cell wall protein and is involved in the foam formation during fermentation. This has been confirmed by cell surface localization of *AWA1* protein tagged with 3xHA using enzyme immunosorbent assay and immunofluorescence microscopy. Detection of epitope tagged *Awa1p* in a  $\beta$ -1,3- glucanase extract of cell walls by immunoblot analysis indicates that *Awa1p* is a glucanase extractable cell wall protein covalently bound to the yeast cell surface.

*Awa1p* involves in the yeast cell hydrophobicity which is related to the foam formation ability. The yeast cells which are hydrophobic form foam during fermentation whereas those which are hydrophilic loss the foam formation ability. The deletion of the region homologous to partial sequence of YJR151c which is hydrophobic and located near N- terminal signal sequence of *Awa1* in addition to the deletion of C-terminal hydrophobicity region resulted a non-foam forming phenotype and hydrophilic.

## ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to thank Dr. Hitoshi Shimoi for his invaluable technical guidance and knowledge that I have learned during my training at the National Research Institute of Brewing. I want to thank National Research Institute of Brewing for the facilities and all researchers who had supported this experiment and made it successful.

Finally I would appreciate to give a special thank to the Japan International Cooperation Agency who gave me a chance to be trained in Japan.

## REFERENCES

- Akiyama-Jibiki,M., Ishibiki,T., Yamashita,H. and Eto,M. 1997. A rapid and simple assay to measure flocculation in brewer's yeast. Technical Quarterly 34(1); 278-281.
- Laemmli,U.K. 1970. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227 : 680-685.
- Ouchi,K. and Akiyama,H. 1971. Non-foaming Mutants of Sake yeast: Selection by Cell Agglutination Method and by Froth Flotation Method, Agr. Biol. Chem.35(7),1024-1032.
- Sambrook,J., Fritsch,E.F. and Maniatis,T. 1989. Molecular cloning : A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Shimoi,H. Kitagaki,H., Iimura,Y. and Ito, K. 1998. Sed1p is a major cell wall protein of *Saccharomyces cerevisiae* in the stationary phase and is involved in lytic enzyme resistance. J. bacteriol. 180 (13):3381-3387.
- Walker,G.M. 1998. Yeast technology: Yeast physiology and Biotechnology. P.290. John Wiley & Son Ltd,England.

# การศึกษาโครงสร้าง หน้าที่ และชีวสังเคราะห์ของโปรตีนผนังเซลล์ยีสต์ การตรวจวิเคราะห์โปรตีนที่ควบคุมโดยยีน *AWA1*

รัชณี อັถถิ\* อีโตชิ ชิโมอิ\*\*

## บทคัดย่อ

ยีสต์ที่ใช้ในการผลิตสาเกคือ *Saccharomyces cerevisiae* ส่วนใหญ่จะทำให้เกิดฟองหนาขณะหมักบ่ม ทำให้เปลือกเนื้อที่ถ้งหมัก เมื่อไม่นานมานี้ได้มีการโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการทำให้ยีสต์เกิดฟองสำเร็จ คือ ยีน *AWA1* เป็นยีนควบคุมการสร้างโปรตีนที่มีกรดอะมิโน 1713 ตัว ที่เป็น Serine และ Threonine จำนวนมาก และมี Glycosyl - phosphotidyl - inositol (GPI) anchor ซึ่งเป็นคุณสมบัติบ่งชี้ของโปรตีนผนังเซลล์ยีสต์ การทดลองนี้เป็นการตรวจสอบเพื่อยืนยันว่าโปรตีนผลผลิตของยีน *AWA1*(Awa1p) นี้เป็นโปรตีนผนังเซลล์โดยการติดฉลาก epitope เข้ากับ DNA แล้วตรวจด้วยวิธีอีไลซ่า และอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ นอกจากนี้ยังตรวจโดยวิธี Immunoblot ซึ่งพบว่า Awa1p เป็นโปรตีนที่สามารถถูกสกัดด้วย  $\beta$ -1,3-glucanase และจากการทำ deletion analysis พบว่าทั้ง N และ C - terminal region ของ Awa1p มีความสำคัญในการสร้างฟองและ Hydrophobicity ของยีสต์ และคุณสมบัติ Hydrophobicity ของเซลล์ยีสต์นี้มีความเกี่ยวข้องกับการสร้างฟอง

**คำสำคัญ :** แซคคาโรมายเซส เซอเวริซิเอ ยีสต์ ยีนอว่าวัน

\* ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

\*\* Genetic Engineering Division , National Research Institute of Brewing, 7-3-1 Higashi-Hiroshima 739-0046, Japan

## ผลของอุณหภูมิน้ำกลั่นก่อนหนึ่งต่อ Heat penetration time เมื่อใช้เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำร้อน

รังสรรค์ รักษากุลวิทยา \* นิตยา รักศรี\*

### บทคัดย่อ

ศึกษาการเพิ่มอุณหภูมิในน้ำกลั่นบรรจุในขวดแก้วขนาด 5 ลิตร จากอุณหภูมิเริ่มต้นที่ไม่เท่ากัน จนถึง 121°ซ. ด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำร้อน พบว่าน้ำกลั่นในขวดแก้วที่อุณหภูมิเริ่มต้น 25, 30, 35, 40 และ 45°ซ. ใช้เวลา 38, 37, 36, 34 และ 33 นาที ตามลำดับ เมื่อนำไปหาค่า Heat penetration time ตามสูตรของ Rubbo และ Gardner จะได้เท่ากับ 29, 28, 27, 25 และ 24 นาที ตามลำดับ ดังนั้นค่า Heat penetration time ของน้ำกลั่นจะแปรผันตามอุณหภูมิเริ่มต้น โดยน้ำกลั่นอุณหภูมิเริ่มต้นสูง จะมีค่า Heat penetration time น้อยกว่าน้ำกลั่นที่อุณหภูมิเริ่มต้นต่ำ

คำสำคัญ : น้ำกลั่น เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำร้อน

## บทนำ

การใช้เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำร้อน (Autoclave) ให้มีประสิทธิภาพ ต้องใช้ระยะเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสม ระยะเวลาที่ใช้จะคำนวณได้จากค่า Heat penetration time (HPT), Holding time และ Safety time ที่อุณหภูมิกำหนด 121°ซ.(Baker and Breach,1980; Cruickshank ,1965; Fuerst,1983) เพื่อนำไปหาค่า Sterilization time\*(Rubbo and Gardner,1965)

งานผลิตวัคซีนสัตว์ปีกเพื่อสนับสนุนการส่งออก ได้เคยทำการทดลองหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการนึ่งสารละลาย PBS ปริมาตร 5 และ 10 ลิตร ให้ปราศจากเชื้อ โดยใช้ Autoclave ได้พบปัญหา คือ บางครั้งอุณหภูมิสารละลาย PBS ก่อนเข้าเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อไม่เท่ากัน ทำให้ผลการทดลองช่วงแรกได้ผลไม่แน่นอน การทดลองนั้นจึงได้ทำการแก้ไขโดยกำหนด อุณหภูมิเริ่มต้น 20°ซ.ทุกครั้ง และปัจจุบันการเตรียมสารละลายหรืออาหารเลี้ยงเชื้อมีทั้งใช้น้ำกลั่นที่ร้อนและเย็นรวมทั้งใช้เวลาในการเตรียมไม่เท่ากัน ทำให้อุณหภูมิก่อนนึ่งแตกต่างกันจึงควรทำการศึกษาหาระยะเวลา HPT ของสารละลายที่มีอุณหภูมิเริ่มต้นต่างกัน ซึ่งการทดลองนี้ใช้น้ำกลั่น เพราะเป็น Standard diluent ซึ่งมีความคงที่มากกว่าสารละลายอื่น

## อุปกรณ์และวิธีการ

### อุปกรณ์

1. Autoclave\*\* แบบ 2 ประตู ระบบอัตโนมัติ มีจอภาพแสดงและบันทึกเวลา อุณหภูมิ ความดัน ภายในตู้หนึ่งระหว่างการทำงาน และพิมพ์ออกมาตรวจสอบได้ในแต่ละครั้งที่ใช้งาน แต่ไม่มีเทอร์โมมิเตอร์ วัดอุณหภูมิในสารละลายขณะนึ่ง ปริมาตรห้องนึ่ง 0.673 ลบ.ม.และค่า chamber heating-up time สำหรับ โปรแกรม Fluid คือ 9 นาที

\*ระยะเวลาในการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำร้อน

(Sterilization time = Heat penetration time<sup>1</sup> + Holding time<sup>2</sup> + Safety time<sup>3</sup>)

<sup>1</sup> ระยะเวลาที่ความร้อนแทรกผ่านภาชนะเข้าไปในสารละลายที่บรรจุอยู่ภายในจนสารละลายนั้น อุณหภูมิสูงถึงต้องการ โดยเริ่มนับเมื่ออุณหภูมิ chamber ถึง 121°ซ. แล้ว

<sup>2</sup> ระยะเวลาสั้นที่สุดที่ใช้ทำลายจุลชีพได้หมดเริ่มนับหลัง HPT

<sup>3</sup> ระยะเวลาที่เพิ่มเพื่อความแน่ใจว่าสามารถทำลายจุลชีพได้หมดใช้ 1/2 ของ Holding time

\*\* เป็นของบริษัท Consolidated stills & Sterilizers U.S.A. ชนิด Steromaster"MARK V" รุ่น SR

2. น้ำกลั่นขณะร้อนจำนวน 880 ลิตร
3. ขวดแก้วชนิดฝาเกลียวทนความร้อน\* ขนาด 5 ลิตร จำนวน 186 ใบ
4. เทอร์โมมิเตอร์ชนิด Broken thermometer\*\* มีคุณสมบัติพิเศษสามารถวัดอุณหภูมิได้ตั้งแต่ 0-150°ซ. และปรอทจะค้างที่อุณหภูมิสูงสุดของแต่ละครั้งการใช้งานจำนวน 5 อัน

## วิธีการ

1. บรรจุน้ำกลั่นขณะร้อนลงในขวดขนาด 5 ลิตรปริมาตรขวดละ 5 ลิตร จำนวน 5 ขวด
2. ปรับอุณหภูมิน้ำกลั่นในขวดให้อุณหภูมิขวดที่ 1-5 เป็น 25, 30, 35, 40 และ 45°ซ
3. นำน้ำกลั่นทั้ง 5 ขวดใส่ Broken thermometer ผูกเชือกยึดที่ปากขวดให้กระเปาะส่วนล่างของเทอร์โมมิเตอร์ จุ่มลงไปกลางน้ำกลั่นในขวดปิดฝาเกลียวหลวมๆ
4. นำขวดน้ำกลั่นทั้ง 5 ขวดที่มีเทอร์โมมิเตอร์อยู่ข้างในใน Autoclave ทันทีเพื่อป้องกันอุณหภูมิเปลี่ยนแปลง โดยวางไว้กลางห้องนึ่งส่วนพื้นที่ว่างนำขวดน้ำใส่ให้เต็มเพื่อให้ใกล้เคียงกับสภาพการใช้งาน เริ่มเดินเครื่องโดยตั้งเวลาเริ่มต้นที่ 5 นาที เมื่อครบเวลา นำขวดน้ำกลั่นออกมาจากเครื่องแล้วอ่านอุณหภูมิจากปรอทที่ค้างอยู่แล้วบันทึกอุณหภูมิที่อ่านได้
5. ทำเหมือนข้อ 1-4 โดยค่อยๆเพิ่มเวลาในการนึ่งครั้งละ 2 นาที จนกระทั่งเทอร์โมมิเตอร์อ่านค่าได้ 121°ซ. สำหรับเวลา 34,36 และ 38 นาทีในตารางเป็นเวลาทีหนึ่งเพิ่มเพื่อต้องการหา End point ที่อุณหภูมิถึง 121°ซ.
6. ทำการทดลองซ้ำอีกครั้งหนึ่ง

## ผลการทดลอง

เมื่อใช้ Autoclave นึ่งน้ำกลั่นในขวดแก้วขนาดบรรจุ 5 ลิตร ในระยะเวลาที่ค่อยๆ เพิ่มขึ้นทุก 2 นาที โดยทำการทดลองรวม 2 ครั้ง พบว่าการนึ่งน้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิเริ่มต้น 25, 30, 35, 40 และ 45°ซ. จากเริ่มต้นจนถึง 121°ซ. ใช้เวลา 38, 37, 36, 34 และ 33 นาทีตามลำดับ ดังตารางที่ 1 และรูปที่ 1

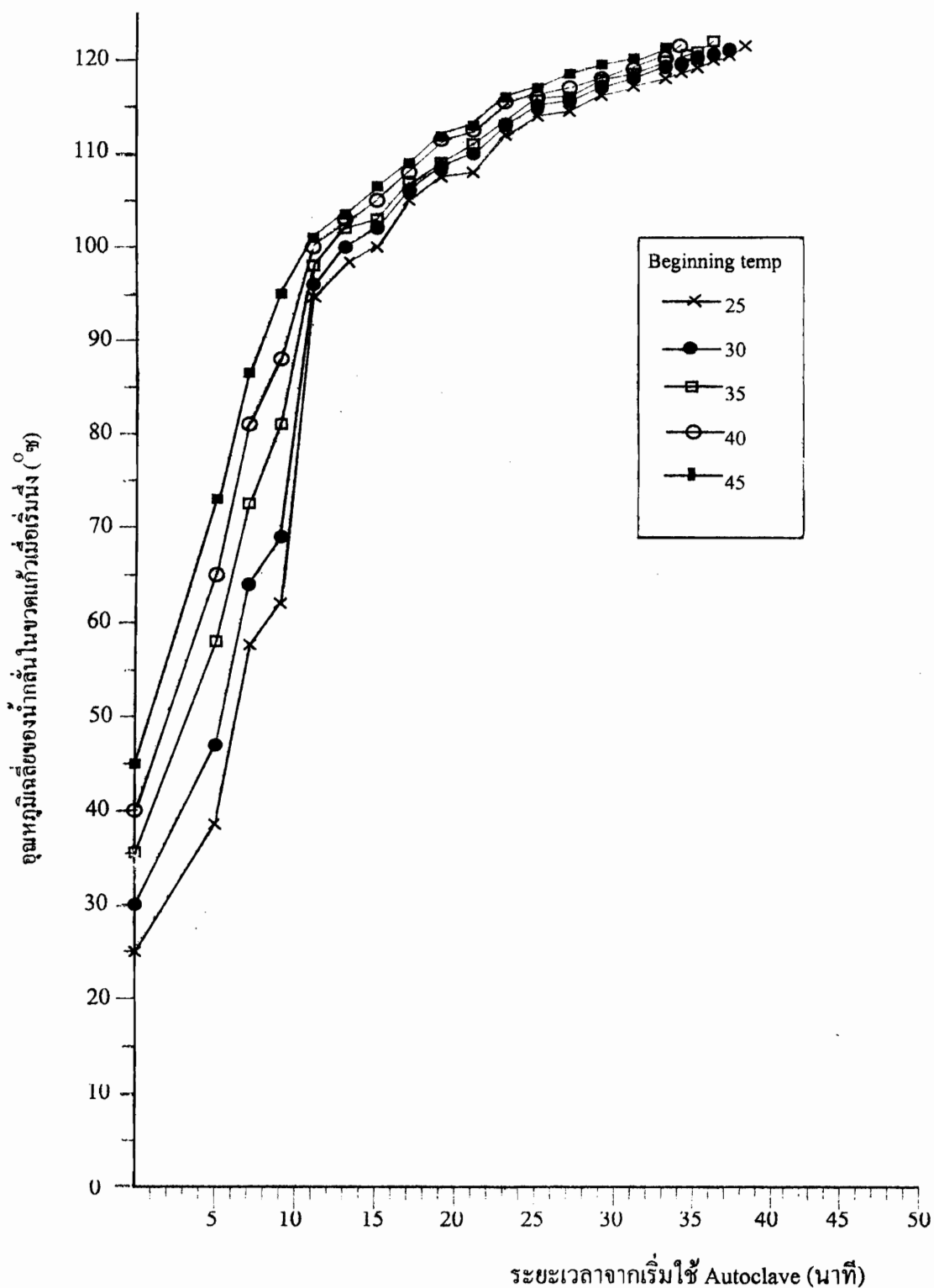
\* ยี่ห้อ Duran Scott

\*\* เป็นของบริษัท Lloyd's register quality company

ตารางที่ 1 อุณหภูมิของน้ำกลั่นที่บรรจุในขวดแก้วขนาด 5 ลิตรขณะใช้ Autoclave ตั้งแต่เวลาเริ่มต้นจนถึงอุณหภูมิ 121°ซ.

ระยะ	ค่าเฉลี่ยอุณหภูมิของน้ำภายหลังการนิ่ง (°ซ)				
เวลา	ที่อุณหภูมิเริ่มต้น				
(นาที)	25°ซ	30°ซ	35°ซ	40°ซ	45°ซ
ก่อนนิ่ง	25	30	35	40	45
5	38.5	47	58	65	73
7	57.5	64.5	72.5	81	86.5
9	62	69	81	88	95
11	94.5	96	98	100	101
13	98	100	102	103	103.5
15	100	102	103	105	106.5
17	105	106	107	108	109
19	106.5	108.5	109	111.5	111.75
21	107	110	111	112.5	113
23	112	113	113	115.5	116
25	114	115	115.5	116	117
27	114.5	115.5	116	117	118.5
29	116.25	117	117.75	118	119.25
31	117.25	118	118.5	119	120.25
33	118	119.25	119.75	120.25	121.5
34	118.75	119.75	120	121.5	
35	119.25	120.25	120.75		
36	120	120.5	122		
37	120.5	121			
38	121.5				

รูปที่ 1 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยอุณหภูมิของน้ำกลั่นในขวดแก้วบรรจุ 5 ลิตร เมื่อใช้ Autoclave โดยเริ่มที่อุณหภูมิ 25,30,35,40 และ 45 °ซ.





## วิจารณ์

จากผลการทดลอง เวลาที่ใช้ในการเพิ่มอุณหภูมิจากเริ่มต้นจนถึง 121 °ซ.ของน้ำกลั่น พบว่าน้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิเริ่มต้นต่ำจะมากกว่าน้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิเริ่มต้นสูง สอดคล้องกับกฎความร้อนจำเพาะของน้ำ เนื่องจากอัตราพลังงานความร้อนจากAutoclaveเครื่องเดียวกันกระทำต่อน้ำปริมาตรที่เท่ากัน

น้ำอุณหภูมิเริ่มต้นสูงจะได้รับพลังงานความร้อนเท่ากันกับน้ำอุณหภูมิเริ่มต้นต่ำ แต่เนื่องจากจุดเริ่มต้นอุณหภูมิที่สูงกว่าทำให้ไปถึงอุณหภูมิที่กำหนด 121 °ซ ก่อน นั่นคือใช้เวลาน้อยกว่า ทำให้ HPT ในการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำร้อนสั้นลง เวลาที่ใช้ในการนึ่งฆ่าเชื่อน้อยลง เป็นการประหยัดพลังงานไฟฟ้า ซึ่งสามารถใช้เป็นข้อมูลในการกำหนดเวลาการนึ่งฆ่าเชื้ออาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายอื่นได้แต่ควรคำนึงถึงปัจจัยอื่นที่มีผลต่อ heat penetration time ด้วยเช่น ความหนืด ประสิทธิภาพการทำให้ร้อนขึ้นของAutoclave ปริมาตรของสารละลายที่ต้องการนึ่งฆ่าเชื้อและความหนาของขวดที่ใส่สารละลาย (Rubbo and Gardner, 1965)

เมื่อนำเวลาที่ใช้ในการเพิ่มอุณหภูมิจากเริ่มต้นถึง 121 °ซ. มาหาค่า Heat penetration time โดยหักออกด้วย 9 นาที ซึ่งเป็น chamber heating-up time ของเครื่อง ตามสูตร sterilization time ของ Rubbo และ Gardner (1965) จะได้เท่ากับ 29 (38-9) , 28 (37-9), 27 (36-9), 25 (34-9) และ 24 (33-9) นาที สำหรับน้ำอุณหภูมิเริ่มต้น 25,30, 35, 40 และ 45 °ซ. ตามลำดับ ดังนั้นน้ำที่มีอุณหภูมิเริ่มต้นสูงจะมีค่า HPT น้อยกว่าน้ำอุณหภูมิเริ่มต้นต่ำ

## สรุป

HPT ของน้ำกลั่นจะแปรผันกับอุณหภูมิเริ่มต้น โดยน้ำกลั่นอุณหภูมิเริ่มต้นสูงจะมี HPT น้อยกว่าน้ำกลั่นอุณหภูมิเริ่มต้นต่ำ

ผลการทดลองนี้เป็นข้อมูลเบื้องต้นหรือเป็นแนวทางการศึกษาค้นคว้า เพื่อหาเวลาเหมาะสมในการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำร้อนของสารละลายหรือของเหลวที่มีน้ำเป็นส่วนประกอบ

## เอกสารอ้างอิง

- Baker, F.J.and Breach, M.R.1980. Medical Microbiological Techniques. Butter worth & Co (Publishing) Ltd. p.41
- Cruickshank, R.1965. Medical Microbiology. Edition 11<sup>th</sup> E. & S.Living stone Ltd. p.680-694
- Fuerst, R.1983. Microbiology in Health and Disease. Edition 15<sup>th</sup> W.B. Saunders company. p.637-638
- Rubbo, S.D. and Gardner, J.F. 1965. A review of sterilization and disinfection as applied to medical industrial and laboratory practice. Year book medical publisher, Chicogo, p.66-69

## **Effect of Distilled Water Temperature before Sterilization on Heat Penetration Time in Autoclave**

**Rangsan Rugskulvithaya<sup>\*</sup> Nittaya Ruksri<sup>\*</sup>**

### **Abstract**

The time taken for autoclave to increase the five different beginning temperature of distilled water in 5 litres glass bottle were studied. It was found that the time used for heating up 5 litres of distilled water from 25, 30, 35, 40 and 45°C to 121°C were 38, 37, 36, 34 and 33 minutes respectively. According to Rubbo and Gardner's formula; the heat penetration time were 29, 28, 27, 25 and 24 minutes respectively. Therefore heat penetration time of distilled water is vary as its beginning temperature. The heat penetration time of the high beginning temperature of distilled water is less than the lower beginning temperature of distilled water.

**Key words :** Distilled water, Autoclave , Heat penetration time

---

<sup>\*</sup> Veterinary Biologics Center , Pakchong, Nakornratchasima, 30130

## การผลิตวัคซีนกาฬโรคเป็ด ด้วยเซลล์เนื้อเยื่อคัพพะโกที่เพาะเลี้ยงต่อ

ระวีวรรณ ยิ่งวรรณศิริ\* กมลทิพย์ รัชฎาพิมล\*

### บทคัดย่อ

ทำการทดลองเตรียมวัคซีนกาฬโรคเป็ด จากเซลล์เนื้อเยื่อคัพพะโกที่เพาะเลี้ยงต่อ โดยใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้น  $1.28 \times 10^5$ ,  $2.73 \times 10^5$  และ  $3.38 \times 10^5$  เซลล์/มล. ตามลำดับ พบว่าปริมาณเซลล์  $2.73 \times 10^5$  และ  $3.38 \times 10^5$  เซลล์/มล. เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 2 วัน และเซลล์ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงต่อสามารถใช้เพาะเลี้ยงไวรัสและผลิตเป็นวัคซีนกาฬโรคเป็ดได้ ซึ่งวัคซีนที่ผลิตมีคุณภาพตามมาตรฐานการผลิตวัคซีนกาฬโรคเป็ดของศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์

คำสำคัญ : เนื้อเยื่อคัพพะโก เพาะเลี้ยงต่อ วัคซีนกาฬโรคเป็ด

---

\* ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30130

## คำนำ

การผลิตวัคซีนกาฬโรคเป็ด (Duck Plague) ของศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ ใช้ Chicken embryo fibroblasts (CEF) ซึ่งเป็น Primary cell culture ( $1^0$  CEF) ที่มาจากตัวอ่อนของไข่ไก่ฟัก อายุ 11 วัน โดยใช้เซลล์อายุ 2-3 วัน มาเพาะเลี้ยงไวรัสสายพันธุ์ เจนเสน (Jansen strain) เพื่อได้ไวรัสจำนวนมากสำหรับผลิตเป็นวัคซีนชนิดเชื้อเป็น (Live attenuated virus vaccine) ปริมาณไวรัสที่ผลิตได้ขึ้นอยู่กับปริมาณของเซลล์ที่ผลิตได้จากไข่ไก่ฟัก ซึ่งมีราคาสูง รวมทั้งขั้นตอนในการเตรียมใช้เวลามากและยุ่งยาก ดังนั้น ถ้าสามารถนำ  $1^0$  CEF ที่ได้มาเพาะเลี้ยงต่อ (Subculture) เพื่อได้เซลล์ CEF มากขึ้น โดยที่ไม่ต้องเพิ่มจำนวนไข่ไก่ฟัก ก็จะทำให้ผลผลิตวัคซีนเพิ่มขึ้นด้วย จึงทำการทดลองครั้งนี้โดยมีจุดประสงค์คือนำ  $1^0$  CEF มาเพาะเลี้ยงต่อเพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ แล้วนำเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงต่อมาผลิตเป็นวัคซีนและทำการทดสอบวัคซีนที่ผลิตได้ ซึ่งการทดลองนี้สามารถนำมาเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการพัฒนาการผลิตวัคซีนกาฬโรคเป็ดต่อไป

## อุปกรณ์และวิธีการ

### อุปกรณ์

1. ขวดแก้วเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ Stationary cell culture ขนาด 1 ลิตร มีพื้นที่เพาะเลี้ยงเซลล์ 270 ซม<sup>2</sup> พร้อมจุกยาง ผ่านการอบฆ่าเชื้อ จำนวน 60 ขวด สำหรับการทดลอง 5 ครั้ง ครั้งละ 12 ขวด
2. 10CEF เพาะเลี้ยงแบบ Stationary cell culture แล้วเป็นเวลา 2 วัน มีเซลล์ CEF เจริญเต็มพื้นที่ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 1 ลิตร และเพาะเลี้ยงอยู่ใน Growth Medium (GM\*) + 3.6% Calf serum (CS) 100 มล. จำนวน 35 ขวด พร้อมทั้งจะนำไปผลิตเป็นวัคซีนกาฬโรคเป็ด (ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์, 1987)
3. อาหารเลี้ยงเซลล์ที่เพาะเลี้ยงต่อ เป็น GM + 10% CS
4. PBS ชนิดไม่มี Ca<sup>++</sup> และ Mg<sup>++</sup> (PBS( ))
5. Calf serum
6. Trypsin - Versene mixture (TV) ประกอบด้วย Trypsin 0.125 % และ Versene (EDTA) 0.025% ใน PBS
7. Attenuated duck plague virus, Jansen strain เป็น Seed ชุด WS1/2 สำหรับผลิตวัคซีนกาฬโรคเป็ดของกรมปศุสัตว์ มีปริมาณไวรัส  $10^{5.75}$  TCID<sub>50</sub>/ มล. ผลิตวันที่ 3 เมษายน 2541

---

\* GM ประกอบด้วย : 9% M199 (10x) with Earle's salt, 5.8% of 2.1% NaHCO<sub>3</sub>, 1% Antibiotics, 0.1% Fungizone, 0.1% Vitamins in tridistilled water, adjust pH with CO<sub>2</sub> pH range 7-7.20

8. Maintenance Medium (MM\*) + 3.6% CS สำหรับเพาะเลี้ยงไวรัสกาฬโรคเป็ด
9. เปิดทดลองพันธุ์ผสมพื้นเมืองกับกาก็แคมเบลล์อายุ 1 เดือนจากศูนย์เพาะพันธุ์สัตว์ปีกบางปะกง กรมปศุสัตว์ จำนวน 100 ตัว ที่ไม่เคยได้รับการฉีดวัคซีนกาฬโรคเป็ด มีสุขภาพดี ผ่านการตรวจ Virus Neutralization มีค่า Neutralization Index (N.I.) ต่ำกว่า 1.2 (Dardiri and Hess, 1967)
10. เชื้อไวรัสกาฬโรคเป็ดชนิดรุนแรงเป็น Local strain สำหรับฉีดพิษทับของศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ มีปริมาณไวรัส  $10^5$  DLD<sub>50</sub>/มล.
11. สารคงสภาพ (stabilizer) สำหรับการทำให้วัคซีน ประกอบด้วย 0.042% Polyvinyl pyrrolidone (PVP), 1.38 % Lactose anhydrous และ 0.166% Casitone (ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์, 1987)

## วิธีการ

การเพาะเลี้ยงต่อ  $1^0$  CEF (Freshney, 1983) และนำมาผลิตเป็นวัคซีนกาฬโรคเป็ด (ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์, 1987)

$1^0$  CEF จำนวน 5 ขวด นำไปเพาะเลี้ยงต่อ และอีก 2 ขวด นำไปผลิตเป็นวัคซีนกาฬโรคเป็ด และเก็บไว้ frozen dry พร้อมกับวัคซีนที่ผลิตจาก CEF ที่เพาะเลี้ยงต่อ

การเพาะเลี้ยงต่อ เริ่มจากนำ  $1^0$  CEF 5 ขวด ล้างเซลล์ CEF ที่เกาะอยู่บนพื้นขวดแก้วด้วย PBS<sup>-</sup> 2 ครั้ง ใส่ TV ลงในขวดละ 5 มล. เติงให้ทั่วพื้นเซลล์ ทิ้งไว้นาน 3 นาที CEF จะถูกย่อยออกจากพื้นขวด ใส่ CS ขวดละ 5 มล. เพื่อหยุดการทำงานของ Trypsin นำเซลล์ที่ย่อยแล้วทั้ง 5 ขวดมารวมกัน นับจำนวนเซลล์ที่ได้ทั้งหมดและหาค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ต่อขวด

จากนั้นนำเซลล์ที่ได้มาเพาะเลี้ยงในขวดเพาะเซลล์ชุดใหม่ที่มี GM + 10% CS 100 มล. จำนวน 12 ขวด โดยแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มๆ ละ 4 ขวด มีปริมาณเซลล์ดังนี้  $1 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^5$  และ  $3 \times 10^5$  เซลล์/มล. ตามลำดับ นับจำนวนเซลล์ (Bird and Forrester, 1981) หาค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์แต่ละความเข้มข้น จากนั้นนำไป Incubate ที่  $39^{\circ}\text{C}$  สังเกตดูการเจริญเติบโตของเซลล์ในทุกขวด หลังจากนั้นคัดเลือกขวดที่มีเซลล์เจริญเต็มพื้นขวดภายใน 2 วันออกมามีการดำเนินการ ดังนี้ ใช้กลุ่มละ 2 ขวดมาย่อยด้วย TV แล้วนับจำนวนเซลล์ หาค่าเฉลี่ยของเซลล์ เพื่อนำไปเปรียบเทียบกับก่อน Incubate ส่วนอีก 2 ขวดนำมาผลิตเป็นวัคซีนกาฬโรคเป็ดโดยดูด GM ออกแล้วใส่ MM 100 มล.+Seed Virus 2.0 มล. จากนั้นนำไป Incubate ที่  $39^{\circ}\text{C}$  นาน 2 วัน เมื่อเกิด Cytopathic effect (CPE) 90-100% นำไป Freezed ที่  $-50^{\circ}\text{C}$  นาน 1 วัน และ Thaw ที่อุณหภูมิห้อง

---

MM\* ประกอบด้วย : 4.7% M199 (10x) with Earle's salt, 4% Tryptose phosphate broth, 4% F10, 5% of 2.1% NaHCO<sub>3</sub>, 1% Antibiotics, 0.1% Fungizone, 0.1% Vitamins, 1% L-glutamine in tridistilled water, adjust pH with CO<sub>2</sub> pH range 7-7.20

แล้ว Harvest ไวรัสแต่ละกลุ่ม จากนั้นนำมารวมกันเพื่อใช้ในการผลิตวัคซีน

### เปรียบเทียบวัคซีนที่ผลิตด้วย 1<sup>0</sup> CEF และ CEF ที่เพาะเลี้ยงต่อ

นำ virus suspension ที่ได้จาก 1<sup>0</sup> CEF และ CEF ที่เพาะเลี้ยงต่อ จำนวนอย่างละ 200 มล. ทำเป็น vaccine ชนิด freeze-dry จากนั้นทำการตรวจสอบคุณภาพของวัคซีนทั้ง 2 แบบ ดังนี้

1. ทดสอบคุณสมบัติทั่วไป คุณลักษณะสีของวัคซีนทำแห้ง ต้องเป็น cake มีสีเหลืองอ่อน ปริมาณความชื้นไม่เกิน 4% และบรรจุอยู่ในสภาพสุญญากาศ

2. Sterility test การปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อรา แบคทีเรีย และมัคโคพลาสมา โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Fluid Thioglycollate medium, blood agar, Sabouraud dextrose medium และ PPLO medium (Baker, 1967)

3. Virus content หาปริมาณไวรัส ด้วยวิธี Tube method โดยใช้ 1<sup>0</sup> CEF และคำนวณหาปริมาณไวรัสตามวิธีของ Reed and Muench (1938)

4. Safety test โดยละลายวัคซีนด้วยน้ำยาละลาย คือ 2% casitone ใช้ความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของโดสปกติ ฉีดเข้ากล้ามเนื้อขาของเป็ด จำนวนชุดละ 10 ตัว สังเกตอาการนาน 21 วัน ต้องไม่แสดงอาการใดๆ

5. Potency test โดยฉีดวัคซีนขนาดโดสปกติเข้ากล้ามเนื้อขาของเป็ดชุดละ 12 ตัว และ 14 วันต่อมา นำเป็ดทั้ง 2 ชุด พร้อมกับกลุ่มเป็ดควบคุม 5 ตัว ไปฉีดเชื้อพิษตับด้วยขนาด 10<sup>5</sup> DLD<sub>50</sub> ต่อตัว พร้อมกับเป็ดกลุ่มควบคุมเชื้อพิษจำนวน 5 ตัว สังเกตอาการนาน 14 วัน

### ผลการทดลอง

1<sup>0</sup> CEF ที่ใช้ในการทดลองมีปริมาณเซลล์เฉลี่ย 5.58 x 10<sup>5</sup> เซลล์/มล. หรือ 558 x 10<sup>5</sup> เซลล์/ขวด (ตารางที่ 1) เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงต่อโดยใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นเฉลี่ย 1.28 x 10<sup>5</sup>, 2.73 x 10<sup>5</sup> และ 3.38 x 10<sup>5</sup> เซลล์/มล. ตามลำดับ (ตารางที่ 2) พบว่า ภายหลังจากเพาะเลี้ยงต่อ 2 วัน กลุ่มที่ 2 และ 3 ซึ่งมีเซลล์เริ่มต้น 2.73 x 10<sup>5</sup> และ 3.38 x 10<sup>5</sup> เซลล์/มล. เซลล์เจริญเติบโตเต็มพื้นขวด ลักษณะเป็นรูปกระสวยสมมาตร สภาพสมบูรณ์ ปริมาณเซลล์เฉลี่ย 5.64 x 10<sup>5</sup> และ 6.79 x 10<sup>5</sup> เซลล์/มล. ตามลำดับ

CEF ที่เพาะเลี้ยงต่อของกลุ่มที่ 2 และ 3 จากการทดลองทั้ง 5 ครั้ง สามารถนำไปเพาะเลี้ยง Seed virus กากโรคเป็ดได้ และเมื่อผลิตเป็นวัคซีนแห้งเปรียบเทียบกับวัคซีนที่ทำจาก 1<sup>0</sup> CEF พบว่า วัคซีนมีคุณสมบัติทั่วไป และมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกันทั้ง Safety, Potency และ Virus content (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 1 ปริมาณ  $1^0$  CEF ที่เพาะเลี้ยงแบบ Stationary cell culture ในขวดขนาด 1 ลิตร ก่อนเพาะเลี้ยงต่อ

การทดลองที่	ปริมาณเซลล์ $1^0$ CEF เซลล์/มล. (N=5)
1	$5.11 \times 10^5$
2	$5.77 \times 10^5$
3	$8.22 \times 10^5$
4	$4.17 \times 10^5$
5	$4.61 \times 10^5$
ค่าเฉลี่ย	$5.58 \times 10^5$

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบปริมาณ CEF ที่เริ่มต้น (start) กับเพาะเลี้ยงต่อ 2 วัน

การทดลอง ครั้งที่	กลุ่มที่ 1 เซลล์/มล		กลุ่มที่ 2 เซลล์/มล		กลุ่มที่ 3 เซลล์/มล	
	start	2 days	start	2 days	start	2 days
1	$1.07 \times 10^5$	*	$2.49 \times 10^5$	$5.58 \times 10^5$	$3.03 \times 10^5$	$5.12 \times 10^5$
2	$1.15 \times 10^5$	*	$2.52 \times 10^5$	$4.95 \times 10^5$	$3.14 \times 10^5$	$6.24 \times 10^5$
3	$1.24 \times 10^5$	*	$2.75 \times 10^5$	$5.91 \times 10^5$	$3.32 \times 10^5$	$7.98 \times 10^5$
4	$1.38 \times 10^5$	*	$2.92 \times 10^5$	$5.65 \times 10^5$	$3.69 \times 10^5$	$6.77 \times 10^5$
5	$1.54 \times 10^5$	*	$2.95 \times 10^5$	$6.12 \times 10^5$	$3.72 \times 10^5$	$7.86 \times 10^5$
เฉลี่ย	$1.28 \times 10^5$	*	$2.73 \times 10^5$	$5.64 \times 10^5$	$3.38 \times 10^5$	$6.79 \times 10^5$

\* การเจริญเติบโตไม่เหมาะสมที่จะนำไปผลิตไวรัส



ตารางที่ 3 เปรียบเทียบคุณภาพของวัคซีนที่ผลิตจาก  $1^0$  CEF และ CEF ที่เพาะเลี้ยงต่อ (Sub)

การทดลอง ครั้งที่	Virus content (TCID <sub>50</sub> /โดส)		Safety test		Potency test	
	$1^0$ CEF	Sub	$1^0$ CEF	Sub	$1^0$ CEF	Sub
1	$10^{4.6}$	$10^{4.6}$	/	/	/	/
2	$10^{4.6}$	$10^{4.6}$	/	/	/	/
3	$10^{4.4}$	$10^{4.4}$	/	/	/	/
4	$10^{4.2}$	$10^{4.2}$	/	/	/	/
5	$10^{3.8}$	$10^{3.7}$	/	/	/	/
เฉลี่ย	$10^{4.32}$	$10^{4.3}$				

/ ผ่านการทดสอบ

### วิจารณ์

การผลิตวัคซีนกาฬโรคเปิดปัจจุบันใช้  $1^0$  CEF ยังไม่มีการนำ  $1^0$  CEF ที่มาใช้ในการผลิตวัคซีน วิธีการนี้เป็นวิธีการที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณเซลล์ทั้ง Primary cell culture และ Continuous cell culture (Freshney, 1983) การทดลองครั้งนี้ได้ประยุกต์วิธีการเพาะเลี้ยงต่อ เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ที่ใช้ในการผลิตวัคซีน

การนำ  $1^0$  CEF มาเพาะเลี้ยงต่อในเวลา 2 วัน ได้ปริมาณเซลล์เพิ่มตั้งแต่ 1 เท่า ซึ่งเต็มพื้นที่ขวดเพาะเลี้ยง พบว่า ถ้าใช้ปริมาณเซลล์ที่เหมาะสมก็จะสามารถนำไปผลิตเป็นวัคซีนได้ เช่น ในตารางที่ 2 เมื่อใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นเฉลี่ยอย่างน้อย  $2.73 \times 10^5$  เซลล์/มล. สามารถเพิ่มปริมาณเซลล์เพื่อนำไปผลิตเป็นวัคซีนได้ แต่ถ้าปริมาณเซลล์น้อยมาก เมื่อเพาะเลี้ยง 2 วัน เซลล์ยังเจริญไม่เต็มพื้นที่ขวด จึงไม่เหมาะสำหรับการเพาะเลี้ยงไวรัสที่จะนำไปผลิตเป็นวัคซีน

การเลือกใช้เวลา 2 วัน ในการนำ  $1^0$  CEF มาเพาะเลี้ยงต่อนั้น เพราะเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมกับแผนการปฏิบัติงานการผลิตวัคซีนกาฬโรคเปิดที่ทำเป็นประจำ ซึ่งจะต่อเนื่อง สะดวกและประหยัดเวลาในการผลิต

จากผลการทดลองครั้งนี้ ทำให้มีแนวทางที่จะสามารถขยายกำลังการผลิตวัคซีนกาฬโรคเปิดโดยใช้  $1^0$  CEF ที่เพาะเลี้ยงต่อ ซึ่งคาดว่าจะทำให้สามารถเพิ่มผลผลิตวัคซีนได้มากเป็น 2 เท่าหรือมากกว่า โดยใช้

ปริมาณไข่ไก่ฟักเท่าเดิม การทดลองนี้เป็นประโยชน์ในการพัฒนาการผลิตวัคซีน ในด้านการประหยัด ต้นทุน แรงงาน และระยะเวลาการผลิต

## สรุป

$10^0$  CEF อายุ 2 วัน ที่ผลิตจากไข่ไก่ฟักอายุ 11 วัน สามารถนำมาเพาะเลี้ยงต่อได้ เมื่อใช้ปริมาณเซลล์ เริ่มต้นเฉลี่ย  $2.73 \times 10^5$  และ  $3.38 \times 10^5$  เซลล์/มล. เมื่อเพาะเลี้ยงต่อนาน 2 วัน สามารถเพิ่มปริมาณได้เฉลี่ย  $5.64 \times 10^5$  และ  $6.79 \times 10^5$  เซลล์/มล.ตามลำดับ ซึ่งเพิ่มขึ้นประมาณ 1 เท่า สามารถนำไปเพาะเลี้ยงไวรัสและ ผลิตเป็นวัคซีนกาฬโรคเป็ดได้ โดยมีคุณภาพได้ตามมาตรฐานของวัคซีนกาฬโรคเป็ด

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คุณวรัญญา ชมเฟื่องแก้ว ศูนย์โรคปากและเท้าเปื่อย ที่กรุณาแนะนำเพิ่มเติมทางด้าน Cell culture และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่หน่วยเทคนิคบริการของศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ที่จัดพิมพ์เอกสารนี้

## เอกสารอ้างอิง

ศูนย์ผลิตชีวภัณฑ์ กองผลิตชีวภัณฑ์ 1987 ( 2530 ) มาตรฐานต่ำสุดที่กำหนดของวัคซีนกาฬโรคเป็ดชนิด

ทำแห้ง ( Minimum requirements for duck plague vaccine , freeze dried ) กรมปศุสัตว์  
กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

Baker, F.J. 1967. Handbook of bacteriological technique. 2<sup>nd</sup>, London Butterwords & Co. (Publishers)  
Ltd. p. 94-201.

Bird, B.R. and Forrester, F.T. 1981. Basic Laboratory techniques in Cell culture. p. 43-49.

Dardiri, A.H. and Hess, W.R.1967. The incidence of neutralizing antibodies to duck plague virus in  
serum from domestic ducks and wild water fowl in the United States of America Proc. 71 St  
Ama Meet-U.S.Livestock Somit. Assoc. p. 225-237.

Freshney, R.I. 1983. Culture of animal cells, a manual of basic technique. p. 121-123.

Reed, L.J. and Muench ,H. 1938 . A simple method for estimating fifty percent end points. Amer. J. Hyg.  
27 : 493 -497

## **The Preparation of Duck Plague Vaccine from Subculture Chicken Embryo Fibroblast**

Raweewan Yingvansiri.\* Kamonthip Thunpimon\*

### **Abstract**

The trial of duck plague vaccine preparation using chicken embryo fibroblasts subcultured from primary chicken embryonated cell culture was carried out from started subculture cells at the amount of  $1.28 \times 10^5$ ,  $2.73 \times 10^5$  and  $3.38 \times 10^5$  cells/ml. respectively. It was shown that the amount of started cells at  $2.37 \times 10^5$  cells/ml. and  $3.38 \times 10^5$  cells/ml. was appropriate for two days cultivation and suitable for virus and vaccine preparation. The quality of these vaccines met the standard requirement of the Veterinary Biologics Center.

**Key words :** Chicken embryo fibroblast, Subculture, Duck plague vaccine.

---

\* Veterinary Biologics Center, Pakchong, Nakhonratchasima 30130.

## จากกองบรรณาธิการ

วารสารชีวผลิตภัณฑ์ ฉบับที่ 2 เดือนกันยายน 2541 ของปีที่ 8 เป็นการรวบรวมผลงานวิจัยต่างๆ จำนวน 5 เรื่อง ทุกเรื่องน่าสนใจ ผลงานเป็นประโยชน์ควรรู้และนำศึกษาทั้งจากการเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบในวัคซีน การพัฒนาการผลิต ผลการตรวจหาปริมาณไวรัสจากหลากหลาย route นอกจากนั้นยังมีเรื่องที่น่าสนใจเกี่ยวกับ Autoclave และความน่ารู้ “ของสาเก” จากแคนาดาโดยผู้รับทุน JIGA ซึ่งสามารถใช้เป็นแนวทางในการศึกษาเชื้ออื่น

กองบรรณาธิการ