



การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตสารยับยั้งการเจริญ
ของเชื้อรา และการแสดงออกของยีนไคติเนส
ในแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้

**Isolation and Selection of Antifungal Producing Lactic Acid
Bacteria and Expression of Chitinase-Encoding Gene
in Selected Isolate**

มณฑล เลิศคนาวณิชกุล

กันยายน 2547

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตสารยับยั้งการ
เจริญของเชื้อรา และการแสดงออกของยีนไคติเนส
ในแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้

มณฑล เลิศคุณาวิชกุล

มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยที่ให้การสนับสนุนเงินทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ ปี 2546 แก่ผู้วิจัย และขอขอบคุณ รศ.ดร. จันทร์เพ็ญ วิวัฒน์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ความอนุเคราะห์เป็นนักวิจัยพี่เลี้ยงในการทำงานวิจัยครั้งนี้ รวมทั้งขอขอบคุณสำนักวิชาสหเวชศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ที่เอื้อเฟื้อวัสดุอุปกรณ์บางส่วนและเครื่องมือต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำวิจัย

มณฑล เลิศคณาวณิชกุล

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG4680022

ชื่อโครงการ : การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราและการแสดงออกของยีนไคตินเนสในแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้

ชื่อนักวิจัย : นายมณฑล เลิศคณาวณิชกุล
สำนักวิชาสหเวชศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัย
วลัยลักษณ์ จังหวัดนครศรีธรรมราช

E-mail address : lmonthon@wu.ac.th, monthon_55@yahoo.com

ระยะเวลาโครงการ : กรกฎาคม 2546 – กันยายน 2547

สามารถคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 40 isolates จากอาหารหมักชนิดต่างๆ โดยการใช้วิธี Dual-culture agar plate เป็นวิธีทดสอบเบื้องต้นในการคัดเลือกลักษณะสมบัติในการยับยั้งเชื้อราด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ปรากฏว่าเชื้อทุก isolates สามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Candida albicans* แต่พบว่ามีเฉพาะส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกหมายเลข 14 เท่านั้นที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อราด้วยวิธี agar well diffusion ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวจะตรวจพบได้สูงสุดในช่วงต้นของ stationary phase และลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่าคุณสมบัติของสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรามีความทนทานต่ออุณหภูมิสูงถึง 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และมี pH อยู่ในช่วง 2.5-4.0 แต่จะสูญเสียคุณสมบัติไปเมื่อปรับ pH ให้สูงขึ้น

เมื่อนำพลาสมิดลูกผสมยีนไคตินเนสจากเชื้อ *Bacillus circulans* No.4.1 เข้าสู่แบคทีเรียกรดแลคติกโดยวิธี electroporation พบว่าส่วนของยีนไคตินเนสถูกตัดย่อยออกไปทำให้ไม่มีการแสดงออกของยีนไคตินเนสในแบคทีเรียกรดแลคติกและไม่สามารถศึกษาฤทธิ์ร่วมกันกับเอนไซม์ไคตินเนสในการยับยั้งเชื้อรา *C. albicans* อย่างไรก็ตามพบว่าเอนไซม์ไคตินเนสมีฤทธิ์ร่วมกับยาแอมโฟเทอริซิน บี ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. albicans*

คำหลัก : แบคทีเรียกรดแลคติก การยับยั้งเชื้อรา *Candida albicans*

Abstract

Project Code : MRG4680022

Project Title : Isolation and Selection of Antifungal Producing Lactic Acid Bacteria and Expression of Chitinase-Encoding Gene in Selected Isolate

Investigator : Mr. Monthon Lertcanawanichakul
Institute of Allied Health Sciences and Public Health,
Walailak University, Nakhon Si Thammarat

E-mail address : lmonthon@wu.ac.th, monthon_55@yahoo.com

Project Period : July 2003 – September 2004

The forty isolates of lactic acid bacteria (LAB) were obtained from various fermented foods. Dual-culture agar plate assay used as preliminary screening of antifungal activity spectrum. LAB were isolated by selective medium, MRS. Most of the isolates showed inhibition against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Candida albicans*. Only isolate No. 14's liquid culture showed the antifungal activity by means of agar well diffusion assay. Its antifungal activity with *C. albicans* maximized early in the stationary growth phase, but with a rapid decline after 48 hour. The activity was stable during heat treatment and was retained even after autoclaving at 121°C for 15 minute. Maximum activity was observed at pH valued of between 2.5-4.0, and was lost at higher pH values.

To investigate the expression of chitinase gene in selected LAB, cloned chitinase gene from *Bacillus circulans* No.4.1 was introduced into selected LAB by electroporation. It was found that the chitinase gene portion was structurally instable and did not express in selected LAB. The synergistically effect, filtrated from selected LAB and chitinase, on *C. albicans* was not clearly observed. However, a little more activity was observed against *C. albicans* when using chitinase coupled with Amphotericin B.

Keywords : Lactic acid bacteria, Antifungal activity, *Candida albicans*

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....	i
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....	ii
สารบัญตาราง.....	vi
สารบัญภาพ.....	vii
สารบัญคำย่อ.....	viii
บทที่	
1 บทนำ.....	1
2 เอกสารที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย.....	3
1. รายละเอียดเกี่ยวกับแบคทีเรียกรดแลคติก.....	3
1.1 ความรู้ทั่วไป.....	3
1.2 หลักในการจัดแบ่งชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติก.....	4
1.3 สารยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อจุลินทรีย์อื่น.....	5
2. รายละเอียดที่เกี่ยวข้องกับ <i>Candida albicans</i>	8
2.1 ความรู้ทั่วไป.....	8
2.2 ลักษณะของโรค.....	9
3. รายละเอียดที่เกี่ยวข้องกับยาแอมโฟเทอริซิน บี.....	22
4. รายละเอียดเกี่ยวกับเอนไซม์โคติเนส.....	24
5. การควบคุมการแสดงออกของจีน.....	25
6. งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา.....	26
3. วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง.....	31
1. วัสดุอุปกรณ์.....	30
2. ขั้นตอนการทดลอง.....	31
I. การศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติก.....	
1. การคัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติก.....	31
2. การศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติก	
ในการยับยั้งจุลินทรีย์.....	33
3. การทดสอบความสามารถในการเกาะติดพื้นผิว.....	33
4. การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อของแบคทีเรีย	
กรดแลคติกด้วยเทคนิค agar well diffusion.....	34

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
II. การถ่ายทอดจีนไคตินเนสเข้าสู่แบคทีเรียกรดแลคติก	
1. การเตรียมเซลล์เจ้าบ้าน	34
2. การนำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน	35
3. การทำ agarose gel electrophoresis	36
4. การทำ dot blot hybridization	36
5. การทดสอบการแสดงออกของจีนไคตินเนส	37
III. การทดสอบฤทธิ์ร่วมกันของเอนไซม์ไคตินเนสกับแบคทีเรียกรดแลคติก หรือยาแอมโฟเทอริซิน บี	
1. การทดสอบหาค่า minimum inhibition concentration โดยวิธี broth microdilution plate	38
4. ผลการทดลอง	41
4.1 การศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติก	41
4.1.1 การคัดเลือกสายพันธุ์	41
4.1.2 ความสามารถในการเกาะติดพื้นผิว	43
4.2 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของแบคทีเรียกรดแลคติก	43
4.2.1 วิธีซีดเชื้อ	43
4.2.2 วิธี double layer (overlay)	44
4.2.3 วิธี agar well diffusion	45
4.3 ผลของ pH ต่อ antimicrobial activity	46
4.4 ผลการทดสอบการถ่ายจีนไคตินเนสเข้าสู่แบคทีเรียกรดแลคติก	47
4.4.1 การเตรียมเซลล์เจ้าบ้าน	47
4.4.2 การยีนย่นพลาสมิดลูกผสม	49
4.4.2.1 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	49
4.4.2.2 การแสดงออกของจีนไคตินเนส	51
4.4.2.2.1 ขยี้เซลล์	51
4.4.2.2.2 agar well diffusion	51
4.5 การทดสอบฤทธิ์ร่วมกันของเอนไซม์ไคตินเนส ยาแอมโฟเทอริซิน บี แบคทีเรียกรดแลคติก	52
4.5.1 agar well diffusion	52
4.5.2 broth microdilution	52

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
5. บทย่อ สรุปผล อภิปรายผล	57
อภิปรายผลการทดลอง	59
สรุป	62
เอกสารอ้างอิง	63
ภาคผนวก	68
ภาคผนวก ก ประกาศนียบัตรงานนำเสนอผลงานวิจัยรูปแบบโปสเตอร์.....	70

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1. การสร้างห้องอก	19
2. คุณสมบัติของ <i>Candida</i> บาง species	20
3. การทดสอบทางชีวเคมีที่จำเป็นในการแยกแยะระหว่าง <i>Candida lusitanae</i> <i>C. parapsilosis</i> และ <i>C. tropicalis</i>	21
4. การทดสอบหาค่า MIC ต่อเชื้อโดยวิธี broth microdilution.....	39
5. จำนวน isolates ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักชนิดต่างๆ	41
6. แสดงผลของ pH ต่อการยับยั้งเชื้อ <i>C. albicans</i> ของแบคทีเรียกรดแลคติก หมายเลข 14	47
7. การเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกหมายเลข 14 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB หรือ MRS	48
8. แสดงผลการทดสอบการออกฤทธิ์ร่วมกันของเอนไซม์โคติเนสและกรดแลคติก ที่ผลิตจาก transformants โดยวิธี agar well diffusion.....	52
9. MIC ของ AmpB หรือเอนไซม์โคติเนสต่อ <i>Candida albicans</i>	54
10. เปรียบเทียบค่า MIC ด้วยการวัดความขุ่นที่ OD600 ของ AmpB, Chi หรือ AmpB+Chi	55
11. การเกิดตะกอนเกาะกลุ่มจากการใช้ AmpB, Chi หรือ AmpB+Chi ใน microtiter plate	56

สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
1. Chlamydoconidia ของเชื้อ <i>Candida albicans</i>	40
2. แสดงตัวอย่างการทดสอบค่า MIC โดยวิธี broth microdilution.....	40
3. การเกิด colonization	43
4. แสดง antimicrobial activity ของแบคทีเรียกรดแลคติกหมายเลข 14	44
5. แสดงตัวอย่างการทดสอบ antifungal activity ด้วยวิธี double layer.....	45
6. แสดง inhibition zone จากวิธี agar well diffusion.....	45
7. การเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกหมายเลข 14 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB หรือ MRS	49
8. electrophoretic patterns ของพลาสมิดลูกผสมที่สกัดจาก tLAB	50
9. dot blot hybridization	50
10. การทดสอบเอนไซม์โคติเนสด้วยวิธี agar well diffusion	51
11. การเกาะกลุ่มของเชื้อ <i>Candida albicans</i> ใน microtiter plate	56

สารบัญคำย่อ

มก., mg	มิลลิกรัม
มล., ml	มิลลิลิตร
มม.	มิลลิเมตร
มค.ม.	ไมโครเมตร
มค.ล.	ไมโครลิตร
มค.ก.	ไมโครกรัม
°ซ.	องศาเซลเซียส
นม., nm	นาโนเมตร
ชม.	ชั่วโมง
AmpB	Amphotericin B, แอมโฟเทอริซิน บี
Chi	Chitinase, เอนไซม์ไคติเนส
CFU	Colony Forming Unit
min	minute, นาที
sp., spp.	species
LAB	Lactic Acid Bacteria, แบคทีเรียกรดแลคติก
tLAB	transformed Lactic Acid Bacteria

บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันพบว่าอัตราการเกิดโรคติดเชื้อราแบบแพร่กระจายสูงขึ้นในผู้ป่วยติดเชื้อไวรัส HIV กลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับยาต้านเชื้อแบคทีเรียเป็นระยะเวลานาน (นงนุช, 2540) ผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนอวัยวะ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยเอดส์เต็มขั้นพบการติดเชื้อ *Candida albicans* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค Candidiasis ได้ถึง 71.26 % ของโรคติดเชื้อฉวยโอกาสที่พบ (วิชาญ, 2540) ยาต้านจุลชีพที่ใช้รักษาโรคติดเชื้อราที่ใช้อยู่ไม่เพียงพอสำหรับรักษาโรคได้ทุกชนิดจากเชื้อในกลุ่มเดียวกัน ทั้งนี้เพราะปัญหาด้านการออกฤทธิ์ต่อเชื้อ พิษของยาและตลอดจนอุบัติการณ์ของเชื้อดื้อยา (โสภิต, 2542) เช่น หากมีการใช้ยาแอมโฟเทอริซิน บีรักษาโรคติดเชื้อราในร่างกาย (systemic fungal infections) เป็นระยะเวลานานก็จะมีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วย เช่น electrolyte ผิดปกติ ไตวาย กดไขกระดูก มีอาการไข้ เป็นต้น (วิชาญ, 2540) และแม้ว่ายาตัวใหม่ในกลุ่ม azole ที่มีผลข้างเคียงน้อยลงแต่เมื่อใช้รักษาเป็นระยะเวลานานก็จะพบอัตราการดื้อยาของเชื้อเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับปัญหาที่พบในระบบการเลี้ยงปศุสัตว์กล่าวคือนอกจากกลุ่มแบคทีเรียแล้วยังพบว่ากลุ่มเชื้อราและ/หรือสารพิษที่ผลิตจากเชื้อราเหล่านั้นยังมีผลกระทบต่อสุขภาพของปศุสัตว์และอาจมีผลต่อการชักนำให้เกิดกลุ่มเชื้อที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะถ้าหากมีการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างไม่ถูกต้อง ซึ่งทำให้ต้องมีการใช้ยาใหม่ที่มีราคาแพงกว่าเดิมและมักเป็นปัญหาทางเศรษฐกิจของประเทศ ดังนั้นวิธีควบคุมอัตราการดื้อยาที่ดีที่สุดคือการเลือกใช้ยาต้านจุลชีพอย่างเหมาะสมทั้งชนิดและระยะเวลาจึงได้มีการศึกษาแบบแผนความไวต่อยาของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคเหล่านั้นรวมทั้งการหาทางเลือกใหม่ในการรักษาโรคเช่น การใช้สารสกัดจากสมุนไพร (โสภิต, 2542; อภิราม และ มณฑล, 2545) และ/หรือการคัดเลือกกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางเภสัช เป็นต้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียโอสลินที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria) เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการรักษาโรคติดเชื้อ ซึ่งในปัจจุบันได้มีการศึกษาคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกอย่างมากมาย เพื่อค้นหาชีวสาร ได้แก่ กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดอะซีติล อะเซทาลดีไฮด์ รูเทอริน และ แบคทีเรียโอสลินที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ (ดวงพร, 2537; สุมณฑา, 2545) ซึ่งอาจสามารถนำมาทดแทนสารเคมีสังเคราะห์เพื่อผลิตเป็นสารต้านจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียและ/หรือจุลินทรีย์ก่อโรคในมนุษย์ได้

nisin เป็นแบคทีเรียโอสลินที่นิยมนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิด แต่ไม่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์และรา ซึ่งอาจเนื่องมาจากเชื้อแต่ละชนิดมีโครงสร้างทางผนังเซลล์ที่แตกต่างกันกล่าวคือ ในแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบมีผนังเซลล์ที่มีความซับซ้อน (หนา) กว่า เนื่องจากมีจำนวนชั้นมากกว่าและมีส่วนประกอบที่เพิ่มขึ้นมาคือ lipopolysaccharides ในผนังชั้นนอก (outer membrane) นอกจากนี้เชื้อบางชนิดอาจมีผนังชั้นนอกสุดเป็น capsule เช่นใน *Klebsiella* หรือ slime layer เช่นใน *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่งทำให้ยาต้านจุลชีพรวมทั้งแบคทีเรียโอสลินซึมผ่านเข้าไป

ออกฤทธิ์ที่ target sites ได้ยาก แต่การเติมสารบางจำพวก เช่น EDTA ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น chelating agent มาจับกับส่วนของ outer membrane ของแบคทีเรียแกรมลบทำให้มีการเพิ่มการแพร่ผ่าน (permeability) ของสารเข้าสู่เซลล์ได้มากขึ้นซึ่งจะทำให้มีการเพิ่มฤทธิ์ของแบคทีเรียโอซินได้ในระดับหนึ่ง (Kordel and Sahl, 1986; Stevens et.al., 1991) อย่างไรก็ตามได้มีรายงานพบว่าหากมีการใช้ nisin เป็นระยะเวลายาวนานติดต่อกันในเชื้อกลุ่มที่มีการดื้อยา เช่น MRSA, multidrug resistance *Streptococcus pneumoniae* ก็จะทำให้มีการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีการดื้อต่อ nisin ขึ้นมาได้เช่นกัน จึงจำเป็นต้องมีการระมัดระวังในการเลือกใช้แบคทีเรียโอซินต่อเชื้อโรคให้มากขึ้นกว่าเดิม นอกจากนี้ยังพบว่า nisin ยังไม่มีฤทธิ์ต่อยีสต์ โดยอาจเนื่องมาจากยีสต์มีโครงสร้างทางผนังเซลล์ที่หนาแน่นประกอบด้วยโครงร่างที่เป็นร่างแหของ ไคติน (chitin) กับโปรตีนถึง 22-44% ซึ่งคล้ายกับที่พบใน filamentous fungi ทำให้การแพร่ผ่านของ nisin เข้าสู่ target site เป็นไปได้อย่างลำบาก (Dielbandhosing et.al., 1998) อย่างไรก็ตามเป็นที่ทราบกันว่าไคตินสามารถถูกย่อยได้ด้วยเอนไซม์ไคตินเนส (chitinase : Chi) ซึ่งพบได้ทั่วไปในพืช แมลง จุลินทรีย์ต่างๆ (Felse and Panda, 1999) หรือแม้แต่ในมนุษย์ และได้มีบทสรุปจากงานวิจัยหลายฉบับว่าไคตินเนสที่สร้างจาก macrophage ในร่างกายมนุษย์ก็เพื่อเป็นกลไกการป้องกันร่างกายต่อการติดเชื้อในกลุ่มรา (fungi) และ/หรือ กลุ่มจุลินทรีย์ที่มีไคตินเป็นองค์ประกอบ (Boot et.al., 1995; Escott and Adams, 1995) และได้มีการศึกษาฤทธิ์ของไคตินเนสร่วมกับเชื้อ *Bacillus thuringiensis* ในการทำลายแมลงศัตรูพืชซึ่งมีไคตินเป็นองค์ประกอบอยู่บางส่วนเปลือกนอกและส่วน peritrophic membrane ภายใน mid gut (Richards and Richards, 1977) หรือแม้กระทั่งการใช้ไคตินเนสยับยั้งการแพร่กระจายของแมลงหรือเชื้อราก่อโรคพืช ซึ่งในเบื้องต้นพบว่าการเสริมฤทธิ์ในการทำลายได้ดียิ่งขึ้นซึ่งเป็นจุดที่น่าสนใจอย่างยิ่ง (Sneh et.al., 1983; Smirnoff, 1971;1973;1974; Smirnoff et.al, 1973; Morris, 1976; Regev et.al., 1996; Wiwat et.al., 1996; Kramer et.al., 1997; Tantimavanich et.al., 1997, Lertcanawanichakul et.al., 2004) ดังนั้นในงานวิจัยฉบับนี้จึงได้พยายามศึกษาการแสดงออกของยีนไคตินเนสในเชื้อแลคโตบาซิลลัสเพื่อดูฤทธิ์ร่วมกันในเบื้องต้นต่อการยับยั้งเชื้อราโดยใช้ตัวแทนคือ *Candida albicans* เพื่อเป็นประโยชน์ในการนำไปปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อแลคโต-บาซิลลัสที่มีคุณสมบัติที่ดีในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในมนุษย์ในอนาคตต่อไป

บทที่ 2

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

รายละเอียดที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

1. รายละเอียดเกี่ยวกับแบคทีเรียกรดแลคติก
2. รายละเอียดเกี่ยวกับ *Candida albicans*
3. รายละเอียดเกี่ยวกับยาแอมโฟเทอริซิน บี
4. รายละเอียดเกี่ยวกับเอนไซม์โคติเนส
5. การควบคุมการส่งออกของจีน
6. งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

1. รายละเอียดเกี่ยวกับแบคทีเรียกรดแลคติก (พงษ์เทพ, 2546; สุมณฑา, 2542)

1.1 ความรู้ทั่วไป

แบคทีเรียสร้างกรดแลคติก (LAB) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (gram-positive bacteria) ไม่สร้างสปอร์ (non spore-forming) ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อยในการเจริญเติบโต (microaerophile) แต่บางชนิดก็สามารถเจริญเติบโตได้ในที่ที่ไม่มีอากาศ (strictly anaerobe) แบคทีเรียสร้างกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียรูปร่างทั้งแบบท่อนและแบบกลม ประกอบไปด้วยหลายสกุล (genus) คือ

- | | |
|------------------|-------------------|
| - Aerococcus | - Pediococcus |
| - Alloiococcus | - Streptococcus |
| - Carnobacterium | - Tetragenococcus |
| - Enterococcus | - Vagococcus |
| - Lactobacillus | - Bifidobacterium |
| - Lactococcus | |

แบคทีเรียสร้างกรดแลคติกสามารถแบ่งออกตามลักษณะการหมักได้เป็น 2 กลุ่ม คือ homofermentative lactic acid bacteria ซึ่งหมักน้ำตาลแล้วให้กรดแลคติกเพียงอย่างเดียว (ร้อยละ 85-95) และ heterofermentative lactic acid bacteria ซึ่งสามารถหมักน้ำตาลแล้วให้กรดแลคติก (ร้อยละ 50) ร่วมกับผลิตภัณฑ์อื่นๆ ด้วยเช่น กรดอะซิติก คาร์บอนไดออกไซด์ และเอทานอล เป็นต้น

แบคทีเรียสร้างกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียที่พบได้มากในอาหาร เช่น อาหารหมัก ผักสด เครื่องดื่ม และผลิตภัณฑ์นม เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบได้ในร่างกายคนและสัตว์ด้วย เช่นทาง

เดินอาหารและทางเดินหายใจ เป็นต้น แบคทีเรียสร้างกรดแลคติกส่วนใหญ่มักเป็นเชื้อที่มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมอาหารโดยนำไปใช้เป็นหัวเชื้อเติมลงไปในการหมัก เพื่อช่วยปรุงแต่งกลิ่น และรสชาติอาหาร และยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย

กรดแลคติก เป็นผลผลิตของ lactic acid bacteria ซึ่งใช้เป็นหัวเชื้อของการหมัก หมักอาหารและทำหน้าที่เป็น antimicrobial ตามธรรมชาติ โดยที่กรดแลคติกมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสียของอาหารได้หลายชนิด รวมถึงแบคทีเรียในกลุ่ม *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonadaceae* ในจำพวก กรดอินทรีย์ Lactic acid เป็นตัวที่ preserve ผลิตภัณฑ์หมักดองในธรรมชาติ เป็นตัวยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคโดยเป็นตัววัด pH ในเซลล์ และรบกวนการแลกเปลี่ยนประจุภายในและภายนอกเซลล์

สิ่งที่มีความสัมพันธ์ต่อประสิทธิภาพของกรดแลคติกในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ นอกจากความสามารถในการละลายน้ำทำให้มีโมเลกุลที่มีขนาดเล็กพอที่จะซึมผ่านเข้าสู่ periplasm แล้วโมเลกุลใหญ่พวกโปรตีน (เช่น bacteriocins or enzymes) และ hydrophobic substances (เช่น hydrophobic antibiotics) ซึ่งจะทำให้เกิดการสูญเสียชั้นของ lipopolysaccharide (LPS) ขณะเดียวกันก็มีการสูญเสียหน้าที่ของ permeability barrier ด้วย โดยสารที่ถูกเรียกว่าเป็น permeabilizers นั้น เช่น EDTA ซึ่งมีสมบัติเป็น chelating agent ซึ่งทำปฏิกิริยาต่อ OM โดยทำให้สูญเสีย LPS และ polycations เช่น polythethyleneimine หรือ polymyxin B nonapeptide ซึ่งเป็นสิ่งที่ทำให้ OM ถูกทำลาย Permeabilizers ไม่จำเป็นที่จะต้องมีความสามารถในการฆ่าเชื้อหรือยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ แต่จะมีส่วนประกอบอื่นๆที่แทรกซึมเข้าไปและเพิ่มความไวต่อ hydrophobic antibiotics, detergents, lysozyme หรือ bacteriocins จึงมีความคิดที่จะใช้ permeabilizers ร่วมกับ antimicrobials อื่นๆในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบซึ่งเป็นสาเหตุให้อาหารเน่าเสีย

1.2 หลักในการจัดแบ่งเป็นชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติก (ดวงพร, 2537)

1.2.1 *Lactobacillus* spp. เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดหนึ่ง จึงจัดแบ่งกลุ่มตามความสามารถในการหมักกรดแลคติก แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มดังนี้

1.2.1.1 กลุ่มที่ทำให้เกิดการหมักแบบ homofermentative เพียงอย่างเดียว (obligate homofermenters) หมักน้ำตาลกลูโคสจะได้กรดแลคติกเป็นส่วนใหญ่ โดยทั่วไปได้ 85% หรือมากกว่า ในการหมักน้ำตาลกลูโคสหรือกลูโคเนตไม่เกิดแก๊ส เช่น *L. delbrueckii*, *L. leichmanii* และมีบางชนิดที่หมักน้ำตาลกลูโคสไม่เกิดแก๊ส แต่ถ้าเป็นกลูโคเนตจะเกิดแก๊ส เช่น *L. casei*, *L. plantarum* เป็นต้น

1.2.1.2 กลุ่มที่ทำให้เกิดการหมักได้ทั้ง 2 แบบ (facultative heterofermenters) การหมักน้ำตาลกลูโคสจะได้กรดแลคติกประมาณ 56% นอกนั้นเป็น CO₂ กรดอะซิติก และเอทานอล เกิดแก๊สจากการหมักน้ำตาลกลูโคสและกลูโคเนต อุณหภูมิที่เชื้อเจริญได้มีผลต่อการ

แบ่งเป็นชนิดต่างๆ เช่น *L. fermentum* เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่ 15 องศาเซลเซียส เป็นต้น

1.2.1.3 กลุ่มที่ทำให้เกิดการหมักแบบ heterofermentative เพียงอย่างเดียว (obligate heterofermenters) การหมักคาร์โบไฮเดรตจะเกิดกรดแลคติก CO_2 และ กรดอะซิติก สมาชิกของพวกนี้เป็นที่รู้จักกันน้อย เช่น *L. hilgardii* , *L. trichodes* และ *L. heterohiochii* เป็นต้น

สำหรับแบคทีเรียอื่นๆที่ไม่ใช่ *Lactobacillus* spp. ประกอบด้วย

1.2.2 *Leuconostoc* spp. เป็นแบคทีเรียแลคติกที่มีรูปร่างกลมอันเป็นลักษณะสำคัญที่ทำให้สามารถจำแนกออกจากพวก *Lactobacillus* spp. ได้ง่าย แบคทีเรียชนิดนี้ไม่นิยมนำมาใช้ในการหมักกรดแลคติกเพราะเกิดเมือก

1.2.3 *Pediococcus* spp. เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่นิยมนำมาใช้หมักกรดแลคติกมากกว่า เช่น *P. pentosaceus* ส่วน *P. halophilus* ในปัจจุบันถูกจัดไว้ใน species ใหม่ในชื่อว่า *Tetragenococcus halophilus*

1.2.4 *Streptococcus* spp. เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกอีก species หนึ่ง มีลักษณะเด่นที่สามารถจำแนกย่อยออกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ *Enterococcus* spp., *Lactococcus* spp. และ *Streptococcus* spp.

นักจุลชีววิทยาบางคนยังจัดแบคทีเรียสกุล *Bifidobacterium* ไว้ในกลุ่มแบคทีเรียที่ให้กรดแลคติกด้วย แม้ว่าจะมีลักษณะทางพันธุกรรมและทางชีวเคมีแตกต่างจากแบคทีเรียที่ให้กรดแลคติกก็ตาม

1.3 สารยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อจุลินทรีย์อื่น

สารยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อจุลินทรีย์อื่น (antibacterial substance) ที่สร้างมาจากแบคทีเรียกรดแลคติก ได้แก่ กรดอินทรีย์ (organic acid) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) ไดอะซีทิล (diacetyl) รูเทอริน (reuterin) และแบคเทอริโอซิน (bacteriocins)

1.3.1 กรดอินทรีย์ (organic acid) กรดอินทรีย์ที่สร้างจากแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกคือ กรดแลคติกและกรดอะซิติก โดยกรดอินทรีย์จะทำให้ค่า pH ของอาหารลดลง จึงสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบได้หลายชนิด ความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์โดยกรดอินทรีย์จะขึ้นอยู่กับค่า pH, pKa (dissociation constant) และความเข้มข้นของกรดอินทรีย์นั้นโดยทั่วไปกรดอะซิติกสามารถยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีกว่ากรดแลคติก อย่างไรก็ตามมีจุลินทรีย์บางชนิดที่สามารถทนทานต่อกรดอินทรีย์ได้ เช่น ยีสต์ รา และแบคทีเรียที่สร้างกรด (acid-producing bacteria)

1.3.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) แบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกสามารถสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ได้ในสภาวะที่มีออกซิเจน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นได้เนื่องจากไปทำให้ความสามารถในการซึมผ่านเข้าและออกจากเยื่อหุ้มเซลล์ของสารต่าง ๆ เสียไป และยังมีผลทำให้เกิดการทำลายชีวโมเลกุลอื่น

ๆ ภายในเซลล์ด้วย เช่น โปรตีน และ กรดนิวคลีอิก เป็นต้น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์นอกจากจะมีผลต่อเซลล์โดยตรงแล้วยังอาจมีผลในทางอ้อมด้วยเช่น เมื่อรวมกับ thiocyanate ภายในเซลล์ และมีเอนไซม์ lactoperoxidase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะทำให้เกิดสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ เรียกกระบวนการเกิดสารยับยั้งดังกล่าวว่า “ lactoperoxidase antibacterial system”

1.3.3 ไดอะซีทิล (diacetyl) ไดอะซีทิล หรือ 2,3 –butanedione เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากการเมแทบอลิซึมของ pyruvate ทั้งแบบใช้ออกซิเจนและไม่ใช้ออกซิเจนแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกที่สามารถสร้างไดอะซีทิลได้จะต้องสามารถหมักซิเตรท (citrate) ได้ ไดอะซีทิลเป็นสารที่สามารถยับยั้งการเจริญได้ทั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคและเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ และราได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก กลไกการยับยั้งของไดอะซีทิลเชื่อว่าเกิดจากไปรบกวนการใช้อาร์จินีน (arginine) ภายในเซลล์โดยไปทำปฏิกิริยากับ arginine-binding protein ของแบคทีเรียแกรมลบ

ไดอะซีทิลเป็นสารที่ให้กลิ่นหอมซึ่งเป็นกลิ่นที่มีอยู่ในอาหารหมักหลายชนิด เช่น เนย ไวน์แดง ไวน์ขาว บรันดี และกาแฟ ความเข้มข้นของไดอะซีทิลที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารได้โดยทั่วไปจะมากกว่า 400 ไมโครกรัม/มิลลิตร ความเข้มข้นของไดอะซีทิลในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป ถึงแม้ว่าไดอะซีทิลจะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์อื่นได้แต่ก็ต้องใช้ในปริมาณที่ค่อนข้างสูง อีกทั้งยังเป็นสารระเหยที่ให้กลิ่นหอมดังนั้นจึงไม่นิยมนำไปใช้เป็นสารถนอมอาหาร แต่นิยมใช้เป็นสารกีดกันเชื้อในการทำความสะดวกภาชนะหรือเครื่องมือเครื่องใช้ต่าง ๆ ในอุตสาหกรรมอาหาร

1.3.4 อะเซทาลดีไฮด์ (acetaldehyde) เป็นสารที่เกิดขึ้นในกระบวนการเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตโดย hetero fermentative lactic acid bacteria ซึ่งในที่สุดก็จะถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลโดยเอนไซม์ alcohol dehydrogenase ถ้าแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกขาดเอนไซม์ alcohol dehydrogenase หรือ เอนไซม์นี้ถูกกดการสร้างจะทำให้มีอะเซทาลดีไฮด์หลั่งออกมานอกเซลล์ อะเซทาลดีไฮด์เป็นสารที่ให้กลิ่นเฉพาะของโยเกิร์ต

ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นโดยอะเซทาลดีไฮด์มีรายงานไว้น้อยมาก อะเซทาลดีไฮด์ ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 1 – 100 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคบางชนิดในอาหารได้ เช่น *E. coli* , *Salmonella typhimurium*, *S. aureus* เป็นต้น เนื่องจากในอาหารที่เติมแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกจะมีปริมาณอะเซทาลดีไฮด์ค่อนข้างน้อยเช่น โยเกิร์ตพบประมาณ 25 ppm เท่านั้น ดังนั้นบทบาทในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารของอะเซทาลดีไฮด์ จึงนับว่าน้อยมาก

1.3.5 รูเทอริน (reuterin) เป็นสารที่สร้างจากแบคทีเรียสร้างกรดแลคติก รูเทอรินที่มีการศึกษากันมากเป็นรูเทอรินที่สร้างจากเชื้อ *Lactobacillus reuteri* รูเทอรินมีคุณสมบัติสำคัญ

คือ มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ละลายน้ำได้ แต่ไม่ใช่โปรตีนเพราะไม่ถูกทำลายฤทธิ์โดย proteolytic enzyme จึงทำให้รูเทอรินแตกต่างจากแบคทีริโอซิน เมื่อศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของรูเทอริน พบว่าเป็น (β -hydroxypropionaldehyde ซึ่งอาจอยู่ในรูป monomer หรือ dimers โดยเกิดขึ้นในกระบวนการ เมแทบอลิซึมของกลีเซอรอล

ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยรูเทอรินมีค่อนข้างกว้าง สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ยีสต์ รา และโปรโตซัว แบคทีเรียที่ถูกยับยั้งการเจริญได้โดยรูเทอรินได้แก่ *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Staphylococcus* และ *Listeria* เป็นต้น โดยเชื่อว่ารูเทอรินมีฤทธิ์ไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บางชนิดเช่น ribonucleotide reductase จึงทำให้การสังเคราะห์ DNA เสียไป ดังนั้นรูเทอรินหรือแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกที่สร้างรูเทอรินจึงน่าจะนำไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการนอมอาหารได้

1.3.6 แบคทีริโอซิน (bacteriocin) แบคทีเรียสร้างกรดแลคติกที่สร้างแบคทีริโอซินได้มีหลายชนิด คุณสมบัติสำคัญของแบคทีริโอซินคือ เป็นโปรตีนหรือสารประกอบของโปรตีน เช่น lipocarbohydrate proteins หรือ glycoprotein แบคทีริโอซินส่วนใหญ่มักจะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกโดยเฉพาะแบคทีเรียที่อยู่ในสกุล หรือสปีชีส์ใกล้เคียงกับเชื้อจุลินทรีย์ที่สร้างแบคทีริโอซินนั้น แบคทีริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียต่างชนิดกันมักจะมีคุณสมบัติทางเคมีและทางชีวภาพแตกต่างกัน เช่น น้ำหนักโมเลกุล ความสามารถในการฆ่าหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ เสถียรภาพต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีน และกลไกการทำลายเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมาย

กลไกการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์อื่นโดยแบคทีริโอซินอาจมีหลายแบบขึ้นกับชนิดของแบคทีริโอซิน กลไกหนึ่งที่เป็นไปได้คือเซลล์ที่จะถูกทำลายโดยแบคทีริโอซินจะต้องมีที่รับ สำหรับแบคทีริโอซินนั้นอยู่บนผิวเซลล์ เมื่อแบคทีริโอซินจับกับที่รับแล้วจะทำให้เกิดรูที่ผิวเซลล์ ดังนั้นการผ่านเข้าออกของไอออนต่างๆ ระหว่างในและนอกเซลล์จึงเสียสมดุลไปและทำให้เซลล์ตายในที่สุด อย่างไรก็ตามแบคทีริโอซินบางชนิดก็อาจทำให้เซลล์ตายโดยเซลล์ยังคงสภาพเดิมได้ ทั้งนี้เซลล์ที่สร้างแบคทีริโอซินจะมีภูมิคุ้มกันต่อแบคทีริโอซินชนิดที่ตนเองสร้าง ด้วยเหตุนี้จึงทำให้แบคทีริโอซินที่สร้างออกมานั้นไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ที่สร้าง

นอกจากนี้แบคทีริโอซินยังถูกทำลายได้ด้วยเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน แบคทีริโอซินนอกจากถูกสร้างโดยแบคทีเรียกรดแลคติกแล้วยังถูกสร้างขึ้นโดยแบคทีเรียชนิดอื่นๆอีก ได้แก่ *Acetobacter*, *Actinobacillus*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Clostridium*, *Staphylococcus* เป็นต้น โดยแบคทีริโอซินจัดเป็นสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่มีความแตกต่างจากสารปฏิชีวนะ (antibiotic) ซึ่งสามารถสรุปความแตกต่างระหว่างแบคทีริโอซินและสารปฏิชีวนะได้ ดังตาราง

ลักษณะและคุณสมบัติ	แบคทีเรียโอซิน	สารปฏิชีวนะ
การนำไปใช้งาน	ทางอาหาร	ทางการแพทย์
กระบวนการสังเคราะห์	ผลิตจากไรโบโซม	ผลิตผ่านsecondary metabolite
ความสามารถในการยับยั้ง	น้อย	มาก
แบคทีเรียเป้าหมายที่หลากหลาย		
การสร้างระบบภูมิคุ้มกันตนเอง	มี	ไม่มี
ของเซลล์ผู้ผลิต		
การต่อต้านของเซลล์เป้าหมาย	ปรับสภาพองค์ประกอบ	การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม
	ของเยื่อหุ้มเซลล์	
ปฏิกิริยาต่อเซลล์เป้าหมาย	ทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้ม	ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์หรือโครงสร้างภายในเซลล์
	เซลล์	
ความเป็นพิษหรือผลข้างเคียง	ยังไม่มีรายงาน	มี

2. รายละเอียดที่เกี่ยวข้องกับ *Candida albicans* (เมทะนี, 2527; พรรณกร, 2543)

2.1 ความรู้ทั่วไป

Candida เป็นเชื้อราที่จัดอยู่ในตระกูล Cryptococcaceae อยู่ในไฟลัม Deuteromycota หรือ fungi imperfecti เชื้อราชนิดที่มีความสำคัญทางการแพทย์คือ *Candida albicans* แบ่งย่อยได้เป็น 2 serotypes คือ A และ B พบว่า type A ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์มากกว่า type B เชื้อ *Candida albicans* จัดอยู่ใน genus *Candida* มีลักษณะเป็น yeast-like-fungi คือตัวเชื้อเป็นเซลล์ยีสต์ สืบพันธุ์โดยการแตกหน่อ (budding) ได้เป็น blastoconidia มีรูปทรงกลม รี หรือแบบรูปไข่มีขนาดตั้งแต่ 2-5 x 3-14 ไมครอน อาจมีลักษณะเดี่ยว กลุ่ม หรือสาย และพบสร้างได้ทั้ง true hyphae และ pseudohyphae มีผนังเซลล์ประกอบด้วย polymer ของเฮกโซส (hexose) และเฮกโซซามีน (hexosamine) เช่น เซลลูโลส (cellulose) กลูแคน (glucan) แมนแนน (mannan) ช่วยให้เซลล์มีความแข็งแรงและป้องกันอันตรายจากสิ่งแวดล้อมภายนอก นอกจากนี้ยังพบสารประเภทไคติน (chitin) ซึ่งเป็น polymer ของ N-acetylglucosamine และถูกย่อยได้ด้วยเอนไซม์ไคติเนสซึ่งเป็นส่วนหนึ่งในขบวนการแตกหน่อโดยทำงานร่วมกันกับ chitin synthase, chitin deacetylase, chitosanase เป็นต้น (Kollar et.al., 1995; Dielbandhoesing et.al., 1998; Rast et.al., 2003) และพบว่าในร่างกายมนุษย์มีการผลิต

เอนไซม์ไลโซไคเนส (นอกจาก lysozyme) ออกมาจาก leukocytes เพื่อป้องกันร่างกายจากการติดเชื้อจุลินทรีย์ที่มีผนังเซลล์เป็นองค์ประกอบของไคติน (Escott and Adams, 1995)

Candida albicans เป็นสาเหตุของโรค Candidiasis และพบกระจายทุกหนทุกแห่งทั่วโลก มีแหล่งอาศัยในมนุษย์และสัตว์ ส่วนใหญ่การก่อโรคมักจะเป็นแบบเชื้อที่พบอยู่ภายในผู้ป่วยเอง (endogenous) ซึ่งความรุนแรงของโรคนั้นขึ้นอยู่กับความต้านทานของผู้ป่วย

อาการทางคลินิกขึ้นอยู่กับตำแหน่งที่เกิดโรคในผู้ป่วยและมักจะเป็นสาเหตุของโรคในกลุ่มผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำโดยเฉพาะในกลุ่มผู้ป่วยโรค AIDS ซึ่งรอยโรคมักปรากฏอยู่บริเวณรอยต่อของเยื่อเมือกกับผิวหนัง นอกจากนี้ยังพบได้ในบริเวณช่องคลอด penis หลอดลม ปอด ผิวหนัง ทางเดินอาหาร และที่สำคัญคือสามารถพบเป็นเชื้อประจำถิ่นในคนปกติได้ นอกจากนี้ในกลุ่มผู้ป่วยโรค AIDS แล้วยังพบว่าเป็นสาเหตุของโรคในผู้ป่วยโรคมะเร็ง โรคเบาหวาน ผู้ป่วยที่ได้รับยาปฏิชีวนะติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน

2.2 ลักษณะของโรค

Candidiasis

แคนดิดิเอซิสเป็นโรคที่รู้จักกันมาตั้งแต่สมัย Hippocrates และ Galen การศึกษาเกี่ยวกับโรคและเชื้อที่เป็นสาเหตุเพิ่งเริ่มขึ้นอย่างจริงจังเมื่อคริสต์ศตวรรษที่ 19 นี้เอง ความรู้เกี่ยวกับโรคนี้ได้คืบหน้าตามลำดับมาจนถึงปัจจุบัน พอสรุปได้ว่าเชื้อก่อโรค Candidiasis ส่วนใหญ่ได้แก่ *C. albicans* และรองลงไปได้แก่ *Candida* ชนิดอื่น เช่น *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* และ *C. guilliermondii*

เชื้อแคนดิดามีแหล่งกำเนิดอยู่ทั้งนอกร่างกาย (exogenous) และในร่างกาย (endogenous) เชื้อนอกร่างกายพบอยู่ทั่วไปตามแหล่งธรรมชาติ เช่น อาหารสดที่ไม่สะอาด แหล่งน้ำตามโรงอาหาร และดินที่เปียกชื้น ส่วนอวัยวะของร่างกาย เช่น ปาก ทางเดินอาหาร และช่องคลอดก็พบเชื้อนี้อาศัยอยู่ได้เช่นกัน โรคมิได้เกิดจากความรุนแรงของเชื้อดังกล่าวแต่เพียงฝ่ายเดียว แต่ยังขึ้นอยู่กับภูมิคุ้มกันของร่างกายของผู้ป่วยเองด้วย และปัจจัยร่วมอีกหลายอย่าง เช่น

- 1.โรคที่ทำให้ภูมิคุ้มกันต่ำลง เช่น เบาหวาน โรคต่อมไร้ท่อ และมะเร็งชนิดต่างๆ
- 2.เด็กอ่อน คนแก่ คนอ้วน และการมีครรภ์
- 3.อาหาร เช่น การขาดวิตามินและแร่ธาตุโดยเฉพาะเหล็ก
- 4.การที่ได้รับบาดเจ็บและเชื้อเข้าไปในแผล
- 5.ยาที่ทำให้เชื้อแคนดิดาสามารถแบ่งตัวได้มากขึ้น เช่น ยาปฏิชีวนะ สารสเตียรอยด์ ยาคุมกำเนิด ยารักษามะเร็ง และยากล่อมประสาท
- 6.ความอบอุ่นของอุณหภูมิรอบตัวรวมทั้งความชื้นจากเหงื่อ เช่นในประเทศร้อน
- 7.พันธุกรรม

เชื้อแคนดิดาสามารถก่อโรคขึ้นได้เกือบจะทุกส่วนของร่างกายแต่ที่พบบ่อยเสมอได้แก่ ผิวหนัง เยื่อช่องปาก และอวัยวะเพศ หรืออาจเป็นอย่างชนิดแพร่กระจายไปทั่วอวัยวะของร่างกายก็ได้

โรคแคนดิดิเอซิสที่ผิวหนังและเยื่อช่องปากแบ่งออกได้ดังต่อไปนี้

- 1.Candidiasis of oral cavity หรือแคนดิดิเอซิสในช่องปาก
- 2.Cutaneous candidiasis
- 3.Chronic mucocutaneous candidiasis รวมทั้ง Candida gramuloma
- 4.Candidiasis of the genitalia หรือแคนดิดิเอซิสที่อวัยวะเพศ

1. แคนดิดิเอซิสในช่องปาก (Candidiasis of Oral Cavity)

อุบัติการณ์

ภายในปากมีสภาพเปียกชื้น และเป็นที่รวมของเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดด้วยกัน เมื่อเนื้อเยื่อภายในช่องปากมีภูมิต้านทานต่อเชื้อน้อยลง เชื้อต่างๆโดยเฉพาะ *C. albicans* จะสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนขึ้นได้เป็นจำนวนมากและในบางครั้งก็อาจก่อโรคขึ้นที่อวัยวะภายในปากตั้งแต่ที่มุมปาก กระพุ้งแก้มจนลึกลงไปถึงในลำคอ โรคนี้พบได้บ่อยในคนที่สุขภาพปากไม่ดี ผู้ป่วยที่ได้รับยาปฏิชีวนะหรือสารสเตียรอยด์เป็นเวลานาน ๆ โรคจะเริ่มเม็ดเลือดขาวหรือในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำจากสาเหตุต่างๆกัน เชื้อที่เป็นสาเหตุคือ *C. albicans*

ลักษณะทางคลินิกของแคนดิดิเอซิสในช่องปากสามารถพบได้ดังต่อไปนี้

- 1.1 Acute pseudomembranous candidiasis
- 1.2 Angular cheilitis
- 1.3 Candida leukoplakia
- 1.4 Denture stomatitis

1.1 Acute pseudomembranous candidiasis (Oral Thrush, Muguet)

โรคนี้พบได้บ่อยในทารกแรกเกิดและในคนชราที่ความสะอาดในช่องปากไม่ดีพอ นอกจากนั้นยังพบได้ในผู้ป่วยโรคเบาหวาน ลิ่วคีเมีย ผู้ที่ได้รับยาปฏิชีวนะหรือยากดภูมิคุ้มกัน เช่น สารสเตียรอยด์ หรือยาคุมกำเนิดเป็นเวลานานๆ รวมทั้งโรค SLE หรือ ผู้ป่วยโรคเรื้อรังชนิดอื่นๆในทารกแรกเกิด โรคแคนดิดิเอซิสในช่องปากเกิดขึ้นได้เนื่องจาก

1. ภูมิคุ้มกันต่อเชื้อยังเกิดขึ้นไม่เพียงพอ
2. ติดเชื้อจากหัวนม ขวดนม และน้ำนมที่ใช้เลี้ยงทารก
3. ติดเชื้อจากช่องคลอดของมารดาที่เป็นโรคแคนดิดิเอซิสที่ช่องคลอด

ลักษณะของโรค thrush ที่พบในปากจะเห็นเป็นแผ่นฝ้า (pseudomembrane) สีขาวหนาพอประมาณคลุมอยู่ที่ในกระพุ้งแก้ม ลิ้น เหงือก เพดาน ปาก ตลอดจนทอมซิล เมื่อใช้ปาก

คืบจับดูจะอ่อนนุ่มคล้ายฝ้าน้ำนม (milk curd) ซึ่งหลุดออกได้ง่ายโดยเลือดไม่ออก โดยทั่วไปโรคนี้ไม่ทำให้เกิดอาการเจ็บปวด นอกจากในรายที่รุนแรงเนื้อเยื่อตายกลายเป็นแผล

พยาธิสภาพของโรคประกอบด้วยเซลล์บุกระพุ้งแก้มหรือลิ้นที่ตายหลุดออกมา นอกจากนั้นในแผ่นฝ้ายยังพบเศษอาหาร เม็ดเลือดขาว แบคทีเรีย และเชื้อยีสต์ เนื้อเยื่อของปากจะมีการอักเสบและอาการบวมของชั้นหนังแท้ หลอดเลือดทั่วไปขยายตัวและพบเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลและโมโนนิวเคลียร์อยู่รอบๆ

การวินิจฉัยกระทำได้โดยขีดแผ่น thrush มาย้อมด้วยสีแกรม หรือใช้ผสมกับน้ำยาโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์แล้วดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จะพบปล้องเทียมของเชื้อรา (pseudomycelium) และสปอร์ (blastospore) รูปร่างกลมรีเป็นจำนวนมาก ทั้งในและนอกเซลล์บุกระพุ้งแก้มหรือลิ้น นอกจากนั้นก็ใช้วิธีแยกเชื้อในวุ้นเพาะเลี้ยงเชื้อร่วมกันไปด้วย

1.2 Angular Cheilitis (Perle'che, ปากนกกระจอก)

โดยทั่วไปบริเวณมุมปากเป็นส่วนที่ชื้นจากน้ำลายอยู่ตลอดเวลา โดยเฉพาะในเด็กอ่อนหรือในคนแก่ที่ไม่ได้ใส่ฟันปลอม น้ำลายมักจะทำให้ผิวหนังเปื่อยยุ่ย ในสภาพเช่นนี้จึงทำให้เชื้อยีสต์ เช่น *C. albicans* ซึ่งอาศัยอยู่เป็นปกติในปากเข้าไปทำให้เกิดโรคขึ้นได้ง่ายเรียกว่า Angular cheilitis หรือ Perle'che ซึ่งภาษาไทยเรียกว่า ปากนกกระจอก ปัจจัยร่วมที่พบควบคู่กับโรคนี้ได้แก่

1. ผิวหนังที่มุมปากอยู่ในสภาพที่ทับกัน เช่น ในเด็กอ่อนหรือคนแก่
2. เป็นโรคเรื้อรังที่ต้องนอนอยู่นานๆ
3. ได้รับยาปฏิชีวนะเป็นเวลานานๆ
4. ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน เช่น สารสเตียรอยด์หรือยารักษามะเร็ง
5. โรคเกี่ยวกับต่อมไร้ท่อ เช่น โรคเบาหวาน
6. ผู้ป่วยที่มีแคนดิดาเอนซิสในช่องปาก เช่น thrush
7. โรคขาดอาหารเรื้อรังรวมทั้งการขาดธาตุเหล็ก

ลักษณะทางคลินิก

ผิวหนังตรงมุมปากที่เป็นโรคข้างใดข้างหนึ่งหรือทั้ง 2 ข้างมีลักษณะเปื่อยยุ่ย (maceration) เป็นคราบสีขาวและเห็นรอยปริ (fissure) ซึ่งอาจพบน้ำเหลืองจับกรังเป็นสะเก็ดสีเหลืองอยู่ที่ขอบ ในรายที่เป็นมากๆ พื้นของแผลที่อยู่ลึกลงไปจะอักเสบสีแดงเรื่อๆ ผู้ป่วยมีความรู้สึกแสบๆคันๆโดยเฉพาะเมื่อรับประทานอาหารรสจัด ผู้ป่วยด้วยโรคปากนกกระจอกนี้อาจพบ thrush ร่วมอยู่ภายในปากด้วย ในสภาพที่ร่างกายมีภูมิคุ้มกันต่ำมากๆ perle'che นี้อาจเปลี่ยนรูปร่างกลายเป็น *Candida granuloma* ขึ้นมาได้ คือมีลักษณะเป็นก้อนนูนแข็งสีแดงมีสะเก็ดสีเหลืองปกคลุม

1.3 Candida Leukoplakia (Chronic Hyperplastic Candidiasis)

Leukoplakia หมายความว่าผื่นผ้าสีขาว (white patch) ปัจจุบันได้ลงความเห็นว่าเป็นโรคชนิดหนึ่ง ส่วนแคนดิดาเอนซิสของปากก็เป็นอีกโรคหนึ่ง ทั้งนี้ได้หมายความว่าแคนดิดาจะเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิด leukoplakia ในข้อเท็จจริง leukoplakia มีลักษณะทางคลินิกเป็นผื่นผ้าขาวมีขอบยกขึ้นมาเล็กน้อย การที่ส่วนของโรคมีลักษณะขรุขระก็อาจทำให้เชื้อแคนดิดาเข้าไปอาศัยอยู่ได้และอาจกระตุ้นให้ leukoplakia ขยายตัวโตขึ้น ซึ่งอาจกลายเป็นมะเร็งในเวลาต่อมา

ที่เยื่อช่องปากและลิ้นจะเห็นเป็นผื่นผ้าสีขาวนูนขึ้นมา ผิวอาจเรียบหรือขรุขระได้ตามลักษณะของ Leukoplakia ทั่วๆไป ในบางครั้งจะพบ trush เกิดขึ้นร่วมไปด้วยกัน ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญอย่างหนึ่งที่ทำให้นึกถึงโรคนี้ เชื้อแคนดิดามักกระจายตัวอยู่ที่ผิวของเยื่อเท่านั้น มีบางรายที่เชื้อลุกลามกินลึกลงไปใต้เยื่อ ทำให้เกิดพยาธิสภาพในรูปแบบของแกรนูโลมา หรือเป็นแผลลึกซึ่งพบในผู้ป่วยที่เป็น Chronic mucocutaneous candidiasis

1.4 Denture Stomatitis (Denture Sore Mouth, Chronic Atrophic Candidiasis)

โรคแคนดิดาเอนซิสที่เหงือกและเพดานปากได้รายงานโดย Cawson และ Budtz-Jorgensen ซึ่ง

ปัจจุบันได้เป็นที่ยอมรับกันทั่วไปว่าโรคนี้มีสาเหตุมาจากเชื้อแคนดิดา Nyquist พบได้ร้อยละ 24 ในคนใส่ฟันปลอม 1,080 ราย ส่วน Budtz-Jorgensen และคณะพบร้อยละ 60 ใน 463 ราย คนสูงอายุพบเป็นโรคนี้ได้บ่อย Cawson ได้เน้นอีกว่า denture stomatitis นั้นเป็นโรคที่พบได้บ่อยที่สุดในกลุ่มของแคนดิดาเอนซิสในช่องปาก (oropharyngeal candidiasis)

ได้มีรายงานกล่าวถึงอยู่มากมายว่า *C. albicans* เป็นเชื้อที่ก่อโรคและสามารถแยกเชื้อได้ถึงร้อยละ 90 ของผู้ป่วยด้วยโรคนี้ โดยพบปล้องเทียมและสปอร์เป็นจำนวนมากอยู่ที่เยื่อและแผลตรงระดับที่ใส่ฟันปลอม ผู้รายงานดังกล่าวเข้าใจว่าฟันปลอมเป็นสาเหตุแรกที่ทำให้เกิดแผลขึ้นก่อนแล้ว *C. albicans* จึงได้เจริญลุกลามตามเข้าไปก่อโรคขึ้นมา

พยาธิสภาพของแผลพบว่าการอักเสบของชั้นใต้เยื่อโดยพบเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียร์และนิวโตรฟิลเป็นจำนวนมากอยู่ในบริเวณพยาธิสภาพนอกจากนั้นยังพบเชื้อ *C. albicans* กระจายอยู่บนผิวของแผลแต่ไม่ลุกลามลงไปชั้นใต้เยื่อส่วนลึก

อาการของโรคนี้จะปรากฏเป็นแผลอักเสบเรื้อรังที่รอยต่อของขอบเหงือกกับฟันปลอม ซึ่งอาจเป็นแผลเดียวหรือมากกว่านั้นก็ได้ ในบางรายที่เป็นเยื่อเหงือกอาจมีลักษณะเพียงบวมแดงเท่านั้น แผลนี้เจ็บบ้างเล็กน้อย และรู้สึกสับสนบ้างเมื่อรับประทานอาหารรสจัด โรคนี้อาจพบเกิดร่วมกับ perle'che ได้

2. Cutaneous Candidiasis

อุบัติการณ์

โรคแคนดิดาเอสิสเกิดขึ้นได้ง่ายตามบริเวณรอยพับของผิวหนัง เช่น ขาหนีบ ง่ามกัน รักแร้ และได้แต่นมของผู้หญิงซึ่งเป็นที่อับชื้น เช่นเดียวกับในเด็กอ่อนมักพบโรคได้ที่ซอกคอ ขาหนีบ และในบริเวณที่ผ้าอ้อมห่อ เนื่องจากความร้อนทำให้เหงื่อออกมามากหรือปัสสาวะเปียก ชุ่มอยู่ตลอดเวลา นอกจากนั้นยังมีปัจจัยอื่นที่มาช่วยส่งเสริมทำให้เป็นโรคได้ง่าย เช่น ความ อ้วน โรคเบาหวาน โรคเลือด ผู้ที่ได้รับยาปฏิชีวนะหรือสารสเตียรอยด์และโรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง

สาเหตุ

เชื้อที่แยกได้จากบริเวณโรคส่วนมากเป็น *C. albicans* เกือบทั้งหมด Maibach และ Kligman ได้อธิบายการเกิดโรคแคนดิดาเอสิสที่ผิวหนังไว้ดังต่อไปนี้

1. เกิดจากการปิดอับ (occlusion) และเน่าเปื่อย (maceration) ของผิวหนังจากเชื้อที่มี จำนวนมาก
2. ในเด็กอ่อนมักเกิดร่วมกับโรคผ้าอ้อมกัด (napkin dermatitis หรือ diaper rash) โดยเชื้ออาจแพร่มาจากอุจจาระ
3. อาจเกิดเป็นทุติยภูมิในโรคผิวหนังอักเสบอื่นได้ง่าย เช่น eczema
4. จากสาเหตุร่วมดังกล่าวแล้วข้างต้น เช่น คนอ้วนหรือโรคเบาหวาน

พยาธิสภาพ

C. albicans จะรายตัวอยู่ในหนังกำพร้าชั้นที่มีเคอราติน (stratum corneum) ที่สูญเสีย ความแน่นไปจากโรค เชื้อไม่เข้าไปอยู่ในชั้นหนังแท้ เพราะร่างกายสามารถสร้างแอนติชีรัมา ด้านเชื้อเอาไว้ การอักเสบเกิดขึ้นจากสารที่ขับถ่ายออกมาจากตัวเชื้อแล้วซึมผ่านชั้นหนังกำพร้า เข้าไปสู่ชั้นหนังแท้ทำให้เกิดการอักเสบขึ้นรอบหลอดเลือดที่รายล้อมไปด้วยเซลล์การอักเสบ เช่น นิวโตรฟิล ลิมโฟไซต์ ฮิสติโอไซต์ และพลาสมาเซลล์ ต่อมาเซลล์การอักเสบเหล่านี้ก็ เคลื่อนตัวผ่านเซลล์ของหนังกำพร้าที่บวมหรือตายแล้วขึ้นมาอยู่ใต้ชั้น stratum corneum เป็น จุดหนองเล็กๆอยู่ทั่วไป เรียกว่า subcorneal spongioform pustule ลักษณะดังกล่าวนี้ยังพบได้ ในโรคเชื้อหนองพุพอง ส่วนประกอบของหนังแท้ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงมากมายนัก นอกจาก พบการบวมของไยคอลลาเจนเท่านั้น เมื่อย้อมชิ้นเนื้อด้วยวิธี PAS หรือ Gomori เชื้อแคนดิดา จะติดสีม่วงแดงหรือสีดำตามลำดับ เชื้อมีรูปร่างกลมหรือรี ขนาด 8-12 ไมครอน ซึ่งมีติ่งกลม เล็กๆ (Budding blastospore) ติดอยู่ด้านข้างของผนังแม่ ในกรณีที่โรคเป็นรุนแรงอาจพบท่อน ปล้องเทียมของเชื้อ (pseudomycelium) ปะปนอยู่ด้วย

ลักษณะทางคลินิก

โรคเริ่มต้นด้วยตุ่มอักเสบลึกๆสีแดงหลายๆเม็ดเกิดขึ้นพร้อมกันที่บริเวณหลิбыรอยพับ ต่อมาตุ่มเหล่านี้จะกลายเป็นหนองแล้วแตกออกเป็นแผลตื้นๆและมีฝ้าสีขาวของผิวหนังที่ตายติดอยู่ ตุ่มโรคเหล่านี้จะขยายตัวมารวมกันเป็นแผ่นผื่นใหญ่ในหลิбыรอยพับ มองเห็นพื้นส่วนล่างเป็นสีแดง (มี maceration) รอบๆบริเวณพยาธิสภาพเดิมจะพบตุ่มแดงเล็กๆเกิดขึ้นใหม่อีกเป็นจำนวนมากกระจายตัวออกไป (satellite) โรคนี้มีอาการคันและแสบ ในรายที่เป็นนานๆแผ่นผื่นค่อยๆเลือนหายไปเอง แต่ผิวหนังบริเวณที่เป็นโรคจะหนาขึ้นมีสีคล้ำพร้อมด้วยรอยปริปรากฏอยู่ตรงซอกหลิбыรอยพับ ลักษณะของโรคชนิดนี้เรียกว่า *Candida intertrigo*

นอกจากนี้ โรคแคนดิดาเอดิสยังพบเกิดขึ้นได้บ่อยที่บริเวณซอกนิ้วมือหรือนิ้วเท้า โดยผิวหนังมีอาการตายเป็นฝ้าสีขาวแล้วหลุดลอกออกไป เห็นพื้นส่วนล่างเป็นสีแดงสด ผู้ป่วยมีอาการเจ็บๆคันๆ ลักษณะของโรคเช่นนี้เรียกว่า *Erosio interdigitalis blastomycetica* ซึ่งพบได้บ่อยในคนที่ทำงานอยู่กับน้ำตลอดทั้งวัน เช่น แม่ค้า แม่บ้าน และลูกจ้างซักผ้า เป็นต้น

3. Chronic Mucocutaneous Candidiasis (CMC)

โรคแคนดิดาเอดิสที่ผิวหนังที่พบกันอยู่ทั่วไปมักเกิดที่ผิวหนังชั้นนอกเท่านั้น และพบที่บริเวณหลิбыรอยพับเป็นส่วนใหญ่ แต่ในผู้ป่วยบางรายที่มีภูมิต้านทานของร่างกายลดต่ำลง เช่น โรคต่อมไร้ท่อ พันธุกรรม และโรคที่มีการเสื่อมทางภูมิคุ้มกัน ก็เป็นสิ่งที่กระตุ้นส่งเสริมให้แคนดิดาเอดิสสามารถลุกลามไปได้ทั่วทั้งร่างกาย เช่น ที่ลำตัว ศีรษะ ปาก ซอกปาก ลิ้น อวัยวะสืบพันธุ์ และเล็บ เกิดเป็นกลุ่มอาการขึ้นมาเรียกว่า *Chronic mucocutaneous candidiasis* ซึ่งพบเกิดขึ้นได้ในเด็กช่วงอายุ 10 ขวบแรก และเป็นโรคที่มีอาการรุนแรงมากจนอาจทำให้เสียชีวิตได้

สาเหตุ

C. albicans ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคนี้ในสมัยก่อนเชื่อกันว่าเชื้อต้องเป็นชนิดที่มีความรุนแรงสูงจึงสามารถก่อโรคขึ้นได้ในคน แต่ปัจจุบันข้ออ้างดังกล่าวนี้ได้เปลี่ยนแปลงไปเป็นว่า เนื่องจากร่างกายมีภูมิต้านทานต่ำหรือมีความเสื่อมทางภูมิคุ้มกัน

ร่างกายมีวิธีป้องกันการติดเชื้อได้ 2 วิธีด้วยกันคือ ประการแรกได้แก่การทำลายเชื้อให้สลายไปโดยวิธี phagocytosis กล่าวคือเชื้อจะถูกทำลายโดยเม็ดเลือดขาวชนิด polymorphonuclear cell ที่ผ่านออกมาทางผนังหลอดเลือด ส่วนอีกวิธีหนึ่งเป็นการขจัดการติดเชื้อโดยการอาศัย cellular และ humoral immunity จาก T-cell และ B-cell ของต่อมธัยมัส เพื่อช่วยส่งเสริมการทำลายเชื้อโดยวิธี phagocytosis ให้ได้ผลอย่างสมบูรณ์ นอกจากนั้นการทำงานของต่อมไร้ท่อยังมีความสัมพันธ์กับระบบการขจัดและทำลายเชื้ออีกด้วย ถ้ามีการเสื่อมของต่อมเหล่านี้แล้ว CMC ก็เกิดขึ้นได้ง่าย นอกจากนั้นยังมีแร่ธาตุบางชนิด เช่น เหล็ก ซึ่งเป็นสารที่สำคัญมากชนิดหนึ่งในการป้องกันการเกิดโรค ดังนั้นเมื่อพบ CMC จึงควรตรวจหาระดับของเหล็กในเลือดร่วมไปด้วยกัน

พยาธิสภาพ

ชั้นหนังกำพร้าโดยทั่วไปมีความหนาตัวเพิ่มขึ้น (acanthosis) พร้อมด้วย parakeratosis และ spongioform pustule ซึ่งประกอบด้วยนิวโทรฟิลเป็นจำนวนมาก เมื่อโรคเกิดขึ้นเป็นเวลายาวนานชั้นหนังกำพร้าจะแสดงลักษณะของ pseudoepitheliomatous hyperplasia ในชั้นหนังแท้ลึกลงมาหลอดเลือดฝอยมีการขยายตัวและมีเม็ดเลือดขาวซึ่งเป็นจากการอักเสบ คือ นิวโทรฟิลและ round cell (mononuclear cell) มารายล้อมเอาไว้ เนื้อเยื่อของชั้นหนังแท้แสดงปฏิกิริยาตอบโต้ต่อเชื้อแคนดิดาในรูปแบบของแกรนูโลมา ซึ่งประกอบด้วยเซลล์การอักเสบและ foreign body giant cell กระจายอยู่เป็นหย่อมๆ

C. albicans ย้อมติดสีได้ดีโดยวิธี PAS หรือ Gomori แต่ไม่ติดสี HE เซลล์มีลักษณะกลมรีมีติ่งติดอยู่ข้างๆกระจายอยู่ทั่วไปใน stratum corneum และบางครั้งอาจพบ pseudomycelium ที่มีรูปร่างเป็นปล้องรวมกันไปด้วย สปอร์ของ *C. albicans* อาจพบอยู่ในก้อนแกรนูโลมาโดยเฉพาะใน giant cell

ลักษณะโรคทางคลินิก

อาการของ chronic mucocutaneous candidiasis เกิดขึ้นได้มานาน้อยเพียงใดนั้น ขึ้นอยู่กับชนิดของโรคดังกล่าวมาแล้ว ตำแหน่งของโรคที่พบได้อยู่เสมอคือ

1. ที่ผิวหนัง (cutaneous candidiasis) ที่ลำตัว แขนขา ใบหน้าและศีรษะ
2. ที่รอบปากและในช่องปาก (oral candidiasis)
3. ที่อวัยวะสืบพันธุ์ (genital candidiasis)
4. ที่เล็บ (paronychia และ proximal subungual onychomycosis)

ที่ผิวหนังจะพบพยาธิสภาพกระจายอยู่ทั่วทั้งตัวตั้งแต่ศีรษะจรดเท้า เริ่มแรกพยาธิสภาพจะเป็นตุ่มน้ำปนหนองเม็ดเล็ก ๆ สีแดงเกิดขึ้นหลายตุ่มรวมกันอยู่เป็นกลุ่มๆซึ่งมีอาการเจ็บๆคันๆ ต่อมาตุ่มเหล่านี้จะแตกออกแล้วรวมกันเป็นแผ่นฝ้า (patch) ปนกับสะเก็ด (crust) สีเหลือง ผิวหนังรอบๆแผ่นฝ้าจะมีอาการอักเสบ ในระยะนี้พยาธิสภาพค่อยๆขยายตัวออกไปโดยเกิดเป็นบริเวณขนาดเล็กขึ้นที่ขอบเดิมของโรค ผิวหนังที่เป็นโรคยกตัวเป็นแผ่นแข็งนูนขึ้นมาและมีสะเก็ดสีเหลืองปิดอยู่คล้ายเพรียงเกาะ (rupioid) เรียกว่า crusty granuloma เมื่อใช้ปากคืบดึงสะเก็ดออกมามองด้วยกล้องจุลทรรศน์มองเห็นเชื้อแคนดิดาอาศัยอยู่เป็นจำนวนมาก

Candida granuloma ถ้าเกิดขึ้นที่หนังศีรษะสามารถทำให้เกิดผมร่วง (Candida alopecia) ขึ้นได้ และในผู้ป่วยบางรายโรคอาจลุกลามลงมาเป็นทั้งใบหน้าและบริเวณคิ้ว นอกจากนั้นแกรนูโลมาในลักษณะเดียวกันยังเกิดขึ้นได้ที่ผิวหนังบริเวณอวัยวะสืบพันธุ์เช่นที่ labia และมักพบเป็น candida vaginitis หรือ perianal candidiasis ในลักษณะของ intertrigo ร่วมไปด้วย ส่วนใหญ่ในผู้ชายก็พบลักษณะของพยาธิสภาพดังกล่าวที่ปลายองคชาติและหนังหุ้มปลายองคชาติ (เป็น candida balanitis)

ผิวหนังที่ขอบเล็บมีการอักเสบบวมแดงและมีน้ำเหลืองไหลซึมออกมา แต่ไม่เป็นหนอง เรียกว่า paronychia ผิวของแผ่นเล็บจะกลายเป็นระลอกคลื่นในแนวขวาง (onychodystrophy)

ถ้ามีเกรนูลโลมาร่วมด้วยเล็บอาจถูกทำลายและแยกตัวแล้วหลุดออกไป (proximal subungual onychomycosis)

อาการทั่วไป

ผู้ป่วยโรค CMC มักจะมีไข้ต่ำๆ เบื่ออาหาร ผอมแห้ง แสดงอาการขาดอาหารและโลหิตจาง อาจคล้ายกับ ม้าม และต่อมน้ำเหลืองได้แต่ไม่สามารถใช้เป็นเครื่องบ่งชี้ในการวินิจฉัยโรค เม็ดเลือดขาวมีจำนวนสูงขึ้น เม็ดเลือดแดงตกตะกอนเร็วมาก ในผู้ป่วยบางรายอาจพบโรคเกิดขึ้นที่อวัยวะภายในด้วย ซึ่งอาจทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้

4. แคนดิดิเอสซิสที่อวัยวะเพศ (Candidiasis of the Genitalia)

โรคแคนดิดิเอสซิสที่อวัยวะเพศทั้งหญิงและชายมีความสำคัญในวงการแพทย์อยู่มาก ถึงแม้ว่าอาการของโรคจะไม่รุนแรงมากมายนักก็ตาม แต่ก็ทำให้ผู้ป่วยเกิดความรำคาญและความกังวลใจเนื่องจากอาการเรื้อรังหรือการที่เป็นโรคนี้อยู่ ๆ ครั้ง

4.1 Candida Vulvovaginitis (Vaginal Thrush)

สาเหตุ

เชื้อที่เป็นสาเหตุของ vaginal thrush ได้แก่ *C. albicans* ถึงร้อยละ 90 รองลงมาได้แก่ *Torulopsis glabrata* และเชื้อแคนดิดาชนิดอื่นซึ่งไม่มีความสำคัญต่อโรคนัก ในคนปกติ *C. albicans* อาศัยอยู่ได้ในช่องคลอดโดยไม่ทำให้เกิดโรค แต่เมื่อร่างกายมีภูมิคุ้มกันต่ำลงและมีสาเหตุอื่นเข้ามาแทรกแซงเช่นโรคเบาหวาน ก็จะเป็นสิ่งกระตุ้นให้เชื้อแบ่งตัวได้อย่างรวดเร็ว และสามารถก่อโรคขึ้นต่อเยื่อภายในช่องคลอด

1. การร่วมเพศ โดยได้รับเชื้อถ่ายทอดโดยตรงจากคู่อร่วม
2. เกิดจาก perianal candidiasis ที่ลามออกมาเป็นที่อวัยวะเพศ
3. เกิดในระยะมีครรภ์โดยเฉพาะในระยะไตรมาสที่ 3 เนื่องจากความเป็นกรด-ด่างของช่องคลอดเปลี่ยนแปลงไป
4. มีโรคต่อมไร้ท่อ เช่นธัยรอยด์ เข้ามาร่วม
5. การเสียมและเสียทางภูมิคุ้มกัน
6. ได้รับยาปฏิชีวนะ ยารักษาเมเร็ง และสารสเตียรอยด์นานๆ

พยาธิสภาพ

Vaginal candidiasis หรือ Vaginal thrush ทำให้เกิดการอักเสบชั้นที่ผิวหนังของอวัยวะเพศ โดยพบการอักเสบเกิดขึ้นในชั้น tunica propria ประกอบด้วยเม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆเรียงตัวล้อมรอบหลอดเลือดฝอย และแทรกผ่านเอพิธีเลียมขึ้นมาอยู่ในชั้น stratum corneum เป็น neutrophilic spongioform pustule เช่นเดียวกับในช่องปาก นอกจากนั้นยังพบว่าเซลล์ของเอพิธีเลียมมีลักษณะโปร่งใส ถึงแม้เซลล์เหล่านี้จะถูกกรบกวโดยเชื้ออยู่ตลอดเวลา

แต่ก็ไม่ปรากฏว่าเปลี่ยนไปเป็นเซลล์มะเร็งได้ เชื้อ *C. albicans* จะเรียงตัวอยู่ในชั้น stratum corneum เท่านั้น ไม่เหมือนกับ candida granuloma ซึ่งพบเชื้อนี้กินลึกลงไปชั้น tunica propria

ลักษณะโรคทางคลินิก

โรคนี้วินิจฉัยได้ง่ายมาก โดยผู้ป่วยมีอาการคันในช่องคลอดพร้อม ๆ กับพบอาการตกขาว (leucorrhoea) อาการคันจะเพิ่มมากขึ้นในขณะที่กำลังนอนหรือหลังอาบน้ำ นอกจากนั้นผู้ป่วยอาจมีอาการแสบจากการระคายเคืองเกิดขึ้นได้ เช่นขณะปัสสาวะ การร่วมเพศ การตรวจภายในหรือขณะที่มีประจำเดือน ตกขาวมีลักษณะเป็นเมือกข้นสีขาวหรือเหลืองอ่อนๆ หรืออาจจะใส มีกลิ่นเปรี้ยวคล้ายของหมักดอง ไม่เหม็นเน่าเหมือนในโรคพยาธิช่องคลอด (trichomoniasis)

ภายในช่องคลอดพบว่าผิวเยื่อที่เป็นโรคมีลักษณะเป็นแผ่นฝ้าสีขาวเปื่อยยุ่ยและมีแผลตื้นๆ ขนาดเล็กๆ ลักษณะดังกล่าวนี้เห็นได้แต่ปากช่องคลอดจนถึงปากมดลูก อาการของโรคจะเป็นมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับระยะเวลาของการเกิดโรค ในผู้ป่วยที่มีตกขาวเกิดขึ้นเป็นจำนวนมาก เมื่อนี้ก็จะไหลออกมาภายนอกช่องคลอดทำให้เกิด cutaneous candidiasis ซึ่งอาจลุกลามไปถึงรอบทวารหนักหรือขาหนีบ

4.2 Candida Balanitis

C. albicans นอกจากทำให้เกิดโรคขึ้นภายในช่องคลอดของสตรีได้ง่ายแล้ว เชื้อนี้ในบางกรณีก็สามารถทำให้เกิดโรคขึ้นที่อวัยวะเพศชายได้ โดยเฉพาะที่ปลายองคชาติ ในปัจจุบันโรค Candida balanitis ได้กลายเป็นโรคที่พบได้บ่อยและมีความสำคัญโรคหนึ่งของสังคม ซึ่งติดต่อกันได้ทางเพศสัมพันธ์ (sexual transmitted disease)

ปัจจัยร่วม

1. ผู้ที่มีหนังหุ้มปลายอวัยวะสืบพันธุ์ยาวและหุ้มห่อปลายองคชาติไว้ทั้งหมดทำให้อับชื้น
2. โรคเบาหวาน เป็นโรคที่ส่งเสริมทำให้เกิดโรคนี้ขึ้นได้ง่าย
3. จากการร่วมเพศโดยรับเชื้อ *C. albicans* มาจากช่องคลอดของคู่ร่วม
4. รับประทานปฏิชีวนะหรือสารสเตียรอยด์นานๆ
5. การเสื่อมทางภูมิคุ้มกัน

ลักษณะทางคลินิก

ที่ด้านบนของปลายองคชาติจะพบจุดสีแดงขนาดเล็กเท่าหัวเข็มหมุดกระจายอยู่ทั่วไป ต่อมาเมื่อตุ่มเหล่านี้แตกออกก็จะกลายเป็นฝ้าเยื่อสีขาวอยู่เต็มผิวหนังในบริเวณที่เป็นโรค เมื่อฝ้าเหล่านี้หลุดออกไปหมด ผิวเนื้อจะมีสีแดงสด มีอาการแสบและคันเมื่อเวลาอาบน้ำหรือถูกับกางเกง นอกจากนั้นอาจพบการอักเสบของหลอดปัสสาวะ (urethritis) เกิดร่วมกันไป โดยมีเมือกใสหรือสีขาวขุ่นในตอนเช้าผู้ป่วยมีอาการแสบและคันเป็นบางเวลา

การวินิจฉัย

1. ลักษณะอาการทางคลินิก
2. การวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ

2.1 การย้อม โดยทำการขูดหรือป้ายบริเวณรอยโรคมาตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ ด้วยการหยดน้ำยาโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ 5-10 % ลงบนสิ่งที่ส่งมาตรวจ หรือย้อมสีแกรม (Gram stain) เชื้อ *Candida* จะติดสีแกรมบวก ปรากฏเซลล์ยีสต์และสายรา สิ่งที่ส่งมาตรวจจากเสมหะ ช่องคลอด ปัสสาวะหรืออุจจาระ ถ้าพบเชื้อ *Candida* อย่าเพิ่งแน่ใจว่าเป็นสาเหตุก่อโรค เพราะบริเวณดังกล่าวพบเชื้อได้อยู่เป็นประจำ ถ้าพบเชื้อ *Candida* จำนวนมากและสร้างสายรา ให้สงสัยว่าน่าจะเป็นสาเหตุก่อโรค

2.2 การเพาะเชื้อ *Candida* ขึ้นได้ง่ายบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา วันเพาะเลี้ยงควรผสมยาปฏิชีวนะลงไปเพื่อฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่อาจปนเปื้อนด้วย ในการเพาะเชื้อพบว่า *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* ไวต่อ Cycloheximide (actidione) เชื้อ *Candida* ปรากฏโคโลนีภายใน 24 ชั่วโมง เมื่อปรากฏโคโลนีแล้วให้เขี่ยออกมาและหยด lactophenol cotton blue ลงไปเพื่อดูลักษณะทางกล้องจุลทรรศน์โดยใช้กำลังขยาย 100-400 เท่า จะพบเซลล์ยีสต์รูปกลมหรือรี

การทดสอบอื่นๆที่จำเป็นในการจำแนกเชื้อ ได้แก่

1. การสร้างท่อนอก (germ tube test)

เป็นการแสดงคุณสมบัติในการสร้างท่อนอก (germ tube) ของเชื้อ *Candida* บางสายพันธุ์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซีรัมอยู่ด้วย ซีรัมที่ใช้ ได้แก่ ซีรัมกระต่าย ม้า แกะหรือหนูตะเภา ถ้าจำเป็นต้องใช้ซีรัมของคน ควรคำนึงถึงด้วยว่าซีรัมของคนมี transferrin (เหล็กรวมกับโปรตีน) สามารถกีดการสร้างท่อนอกของเชื้อ *Candida* ได้ นอกจากนี้อาจเพาะเลี้ยงใน peptone, tissue culture media 199, trypticase soy broth, หรือไข่ขาวก็ได้

นำซีรัมของสัตว์ต่างๆดังกล่าวประมาณ 0.3 ml ใส่ลงในหลอดทดลอง เขี่ยเชื้อลงในซีรัมประมาณ 1 วง (loop) หรือ 10^5 - 10^6 cell/ml เกลี่ยให้เชื้อและซีรัมเข้ากัน นำหลอดทดลองไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2.5-3 ชั่วโมง ประมาณร้อยละ 95 ของ *C. albicans* และ *C. stellatoidea* จะสร้างท่อนอกได้ การทดสอบนี้ควรทำคอนโทรลร่วมด้วยโดยใช้เชื้อ *C. tropicalis* ซึ่งจะสร้างท่อนอกเพียงร้อยละ 2.4

ตารางที่ 1 การสร้างท้องอก

	เชื้อ	การทดสอบที่ควรทำต่อไป
สร้างท้องอก	<i>C. albicans</i>	การหมักน้ำตาล
	<i>C. stellatoides</i>	
ไม่สร้างท้องอก	<i>C. tropicalis</i>	การหมักน้ำตาล
	และ <i>Candida</i> species อื่นๆ	การสร้างสายราและโคนิเดีย ป่อง (chlamydoconidia)

2. การสร้างสายราและ Chlamydoconidia (Dalmau plate)

ในบรรดาวิธีที่มีความสำคัญทางการแพทย์เชื้อ *Candida* สามารถสร้างสายและ chlamydoconidia ได้เมื่อทำการเพาะเลี้ยงใน Dalmau plate วิธีทำคือ เตรียมวุ้นแป้งข้าวโพด (corn meal) หรือวุ้นแป้งข้าวเหนียว (glutinous rice) ซึ่งผสมด้วย Tween 80 ที่มีความเข้มข้น 1 % วุ้นเพาะนี้จัดเป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการต่ำ ป้ายเชื้อ *Candida* ลงบนวุ้นแบบเดียวกับการเพาะแบคทีเรีย ให้ยาว 3-5 ซม.แล้วปิดด้วย cover slip (ภาวะเช่นนี้ปริมาณก๊าซออกซิเจนจะลดลง ทั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 2 วัน นำจานเพาะเชื้อมาตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ เชื้อ *Candida* สามารถสร้างสายราแท้ได้ และถ้าพบ chlamydoconidia อยู่ตรงปลายสาย (terminal chlamydoconidia) จะเป็นลักษณะของ *C. albicans* (การทดสอบนี้เชื้อถือได้ประมาณ 96 %) เชื้อ *C. glabrata* (*Tourlopsis grabrata*) ไม่สามารถสร้างสายราแท้ในวุ้นเพาะนี้ เมื่อใช้การสร้างท้องอกรวมกับการสร้างสายและ chlamydoconidia สามารถวินิจฉัยเชื้อ *C. albicans* ได้ถึง 99.5 %

3. การหมักน้ำตาล (Sugar Fermentation)

อาศัยหลักที่ว่าเชื้อ *Candida* สามารถเจริญได้ในภาวะที่มีปริมาณก๊าซออกซิเจนลดลงและมีเอนไซม์ เช่น alcohol dehydrogenase และ pyruvate decarboxylase ประกอบกับกลไกชักนำคาร์โบไฮเดรตผ่านเนื้อเยื่อในภาวะที่ปราศจากก๊าซออกซิเจนจึงสามารถนำน้ำตาลมาใช้ได้ตามสมการนี้

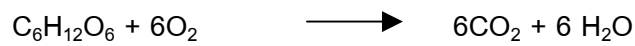


ปมหลอดทดสอบน้ำตาลไว้ที่อุณหภูมิห้อง การอ่านผลให้ดูการเกิดก๊าซในหลอดทดลอง ปกติใช้น้ำตาลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2 น้ำตาลที่เป็นหลักมี 6 ชนิดคือ กลูโคส มอลโตส แซคคาไรส แล็กโตส กาแล็คโตส และ ทรีฮาโรส เชื้อ *Candida* สามารถย่อยน้ำตาลได้ตามตารางที่ 2

การทดสอบทั้ง 3 วิธีที่กล่าวมา สามารถบอก species ของเชื้อ *Candida* ได้ ถ้ายังจำแนกไม่ได้หรือเพื่อยืนยันความสามารถในการหมักน้ำตาลต้องใช้วิธี assimilation ต่อไป

4. การทดสอบความสามารถในการใช้สารอาหาร (Assimilation Test)

การทดสอบนี้อาศัยหลักที่ว่า ยีสต์บาง species สามารถใช้น้ำตาลหรือไนโตรเจนเพื่อการสร้างพลังงานและการเจริญในภาวะที่มีก๊าซออกซิเจน ถ้าจะทดสอบการใช้น้ำตาลต้องเลี้ยงเชื้อยีสต์ในภาวะที่มีอาหารอื่นครบถ้วนนอกจากน้ำตาล แล้วจึงเติมน้ำตาลที่จะทดสอบแต่ละชนิด การอ่านผลดูจากการเจริญของเชื้อ หรือภาวะที่ pH เป็นกรด ผลการทดสอบเป็นไปตามสมการนี้



การอ่านผลให้อ่านในวันที่ 3-4 บางครั้งอาจนานกว่านั้น เนื่องจากปฏิกิริยาของบางเอนไซม์เกิดช้า การจำแนก species ของเชื้อ *Candida* ที่สำคัญทางการแพทย์ โดยวิธี assimilation และ fermentation ตามตารางที่ 2 และ 3

ตารางที่ 2 คุณสมบัติของ *Candida* บาง species

	Assimilation		Fermentation	
	Cellobiose	Rhamnose	Cellobiose	Maltose
<i>C. lusitanae</i>	+	+	+	+
<i>C. parapsilosis</i>	-	-	-	-
<i>C. tropicalis</i>	+	-	-	+

ตารางที่ 3 การทดสอบทางชีวเคมีที่จำเป็นในการแยกแยะระหว่าง *Candida lusitanae*, *C. parapsilosis* และ *C. tropicalis*

เชื้อ	Assimilations												Fermentations					คุณสมบัติอื่นๆ					
	Glucose	Maltose	Sucrose	Lactose	Galactose	Melibiose	Cellobiose	Inositol	Xylose	Raffinose	Trehalose	Dulcitol	Glucose	Maltose	Sucrose	Lactose	Galactose	Trehalose	Urease	Pseudo or true hyphae	Growth at 37° C	Germ tube	Chlamydoconidia
<i>C. albicans</i>	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	F	F	-	-	F	F	-	+	+	+	+
<i>C. parapsilosis</i>	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	F	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>C. tropicalis</i>	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	F	F	F	-	F	F	-	+	+	-	-
<i>C. kefyr</i>	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	F	-	F	F	F	-	-	+	+	-	-
<i>(C. pseudotropicalis)</i>																							
<i>C. krusei</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
<i>C. guilliermondii</i>	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	F	-	F	-	F	F	-	+	+	-	-
<i>C. glabrata</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	F	-	-	-	-	F	-	-	+	-	-
<i>(T. glabrata)</i>																							

F = ใช้น้ำตาลและเกิดก๊าซ

5. การทดสอบโดยใช้ปฏิกิริยาทางน้ำเหลือง (Serology)

เพื่อตรวจหาแอนติเจนหรือแอนติบอดีในการวินิจฉัยโรคติดเชื้อตามระบบซึ่งเกิดจากเชื้อ *Candida* มีหลายวิธี วิธีที่ได้ผลแน่นอนในการช่วยวินิจฉัยโรคคือ การหาแอนติบอดีจำเพาะอาจใช้วิธี immunodiffusion หรือ counter immunoelectrophoresis โดยใช้เซลล์ของ *Candida* ที่ตีแตกแล้ว (*Candida lysate*) เป็นแอนติเจน ทดสอบกับซีรัมของผู้ป่วยที่เกิดโรคตามระบบ จะเกิดเส้นตะกอนของ antigen-antibody complex หลายเส้น *Candida* ทุก species จะให้ปฏิกิริยาข้ามกันได้ ยกเว้น *C. krusei* ดังนั้นแอนติเจนที่ใช้จึงต้องใช้ทั้ง *C. albicans* และ *C. krusei*

นอกจากนี้ผนังเซลล์ของเชื้อ *Candida* และ *Cryptococcus* มีแอนติเจนบางส่วนคล้ายกันดังนั้นเมื่อใช้ *Candida* เป็นแอนติเจนทดสอบกับซีรัมผู้ป่วย systemic cryptococcosis จะปรากฏเส้นตะกอน เมื่อใช้ซีรัมของผู้ป่วยเอดส์ 1:1 แต่เมื่อเจือจางซีรัม 1:2 ไม่พบเส้นตะกอน ส่วนผู้ป่วยที่เป็นโรคติดเชื้อ *Candida* ตามระบบจะตรวจพบเส้นตะกอนเมื่อใช้ซีรัมผู้

ป่วยเจ็บจากตั้งแต่ 1:2 จึงใช้ไทรเตอร์ 1:2 เป็นเกณฑ์มาตรฐานในการวินิจฉัยโรคติดเชื้อ Candida ตามระบบ

การรักษา

ในรายที่เกิดฝ้าขาวในปาก ยาอันดับแรกได้แก่ clotrimazole troche 10 มก. อมจนละลายหมดวันละ 4-5 ครั้ง เป็นเวลา 5-11 วันหรือ ketoconazole 200 มก./วัน หรือ fluconazole 100-200 มก./วัน นอกจากนี้การใช้ miconazole gel ป้ายวันละ 4 ครั้งหลังอาหาร ได้ผลดีกว่าการใช้ nystatin suspension

ผู้ป่วยที่เกิดโรคติดเชื้อตามระบบใช้ยาแอมโฟเทอริซิน บี เข้าทางหลอดเลือดดำทุกวัน โดยเจือจางใน dextrose ความเข้มข้น 5-10 % ขนาดเริ่มในเด็ก 0.25 มก./กก. ขนาดยาในผู้ใหญ่ 0.5-1.5 มก./กก./วัน อาการแทรกซ้อนที่ต้องระวังคือพิษต่อไต โปแตสเซียมต่ำ ไช้ และหนาวสั่น นอกจากนี้อาจใช้ fluconazole ขนาด 200-600 มก./วัน อาการจะดีขึ้นภายใน 16-19 วัน

ถ้ามีโรคที่ตาใช้ flucytosine เพราะยาจะผ่านเข้าตาได้ดีและมีฤทธิ์เสริมกับยาแอมโฟเทอริซิน บี เนื่องจากยาแอมโฟเทอริซิน บี มีฤทธิ์ข้างเคียงมาก ปัจจุบันมีผู้นำยาแอมโฟเทอริซิน บี ที่รวมกับ lipid มาใช้ พบว่าได้ผลดีและฤทธิ์ข้างเคียงลดลง

รายที่โรคเกิดที่ผิวหนังและผู้หญิงที่เกิดตกขาวจากเชื้อ Candida ใช้ imidazole รูปครีมหรือยาเหน็บช่องคลอดระยะเวลา 1 สัปดาห์ได้ผลดี นอกจากนี้อาจให้รับประทาน fluconazole หรือ itraconazole พร้อมทั้งรักษาโรคที่มีอยู่และหลีกเลี่ยงปัจจัยเสริม

ส่วนโรคติดเชื้อ Candida เรื้อรังบริเวณผิวหนังและเยื่อเมือก นอกจากการรักษาด้วยยาแล้ว มีผู้พยายามใช้ lymphocyte transfer factor การปลูกถ่ายเม็ดเลือดขาวทางเลือดหรือไขกระดูก

3. รายละเอียดที่เกี่ยวข้องกับยาแอมโฟเทอริซิน บี (ยุพินและคณะ, 2539)

แอมโฟเทอริซิน บี เป็นสารพวกโพลีอีนแมคโครไลด์ ซึ่งสกัดมาจากเชื้อรา Streptomyces nodosus โมเลกุลของยาส่วนหนึ่งชอบน้ำแต่อีกส่วนหนึ่งไม่ชอบน้ำ ยานี้ละลายน้ำได้น้อยมาก ที่มีขายในท้องตลาดอยู่ในรูปยาผงแห้ง

3.1 ขอบเขตการต้านจุลชีพ

แอมโฟเทอริซิน บี มีขอบเขตการต้านจุลชีพกว้างกว่ายาด้านเชื้อราชนิดอื่นๆ ยานี้สามารถฆ่าหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราหลายชนิด และสามารถฆ่าเชื้อโปรโตซัวหลายชนิด แต่ไม่มีผลต่อแบคทีเรีย Rickettsiae และไวรัส

3.2 กลไกการออกฤทธิ์

การที่ยาแอมโฟเทอริซิน บี มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา อาจเนื่องจากยานี้จับกับเยื่อหุ้มเซลล์ส่วนที่เป็น Sterol ของ eukaryote โดยเฉพาะอย่างยิ่งจะจับกับ ergosterol ในเยื่อหุ้มเซลล์ของราได้ดีกว่า Cholesterol ในเยื่อหุ้มเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ทำให้ลักษณะและคุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์เปลี่ยนไป ไอออนที่สำคัญและสารต่างๆซึ่งจำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเชื้อราเช่น K^+ , H^+ , NH_4^+ กรดอะมิโน นิวคลีโอไทด์ และน้ำตาลอิสระ ฯลฯ สามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้มากขึ้น ทำให้เชื้อราไม่เจริญเติบโตและตาย ยาแอมโฟเทอริซิน บี จะออกฤทธิ์ฆ่าหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของยาในเลือดและความไวของเชื้อราต่อยา ถ้าความเข้มข้นสูงจะมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อรา (fungicidal) แต่ถ้าความเข้มข้นต่ำจะยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (fungistatic)

3.3 เกสัชจลนศาสตร์

ยาถูกดูดซึมได้น้อยมาก (น้อยกว่า 5 %) จากทางเดินอาหารหรือจากการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ จึงให้โดยการหยดเข้าหลอดเลือดดำ ยากกระจายทั่วร่างกาย แต่อยู่ในไขมันและสมองน้อย ระดับยาในพลาสมา (เมื่อใช้ในขนาดรักษา) มีค่าประมาณ 2 มก./มล. ยานี้มีค่าครึ่งชีวิตแรกประมาณ 2-24 ชั่วโมงและค่าครึ่งชีวิตที่สองประมาณ 15 วัน ยานี้จับกับโปรตีนในพลาสมาได้ดี (90 %) ส่วนใหญ่ขับออกทางน้ำดี และส่วนน้อยขับออกทางไต ทั้งในรูปที่เปลี่ยนแปลงและรูปเดิม (2-5 % ของขนาดยาที่ให้แต่แรก)

3.4 ประโยชน์ที่ใช้ในการรักษา

แอมโฟเทอริซิน บี เป็นยาที่มีประสิทธิภาพสูงในการรักษาเชื้อราหลายชนิด ระยะเวลาในการใช้ยานี้จะนานหรือสั้นขึ้นกับความรุนแรงของโรค ชนิดของเชื้อราและอาการไม่พึงประสงค์ของยา เนื่องจากยานี้มีพิษสูงจึงควรใช้รักษาเฉพาะผู้ป่วยที่อยู่ในโรงพยาบาล การให้ยาจำเป็นต้องให้โดยการหยดเข้าหลอดเลือดดำอย่างช้าๆ ยาแอมโฟเทอริซิน บี อาจใช้รักษาการติดเชื้อราเฉพาะที่ เช่นที่กระเพาะปัสสาวะ โดยการสวนล้างด้วยยารวันละ 3 ครั้ง ประมาณ 4-5 วัน ร่วมกับการหยดยาเข้าหลอดเลือดดำ ยานี้อาจใช้ยาร่วมกับ Tetracycline เพื่อยับยั้งการเจริญเกินปกติของเชื้อรา หรือยีสต์ที่เกิดจากการใช้ยาที่มีขอบเขตการต้านจุลชีพกว้าง

3.5 อาการไม่พึงประสงค์

แอมโฟเทอริซิน บี เป็นยาที่ทำให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์หลายอย่างได้แก่

1. อาการที่เกิดระยะสั้นภายใน 4-6 ชั่วโมงหลังให้ยา ได้แก่ มีไข้ คลื่นไส้ ซึ่งแก้ไขโดยให้ยาแก้แพ้ ยาแก้ไอหรือ Hydrocortisone การให้ยาเร็วเกินไปอาจทำให้เกิดภาวะหัวใจเต้นเร็วได้
2. อาการที่เกิดในระยะยาวหลังใช้ยา ได้แก่ โลหิตจาง ระดับโปแตสเซียมในเลือดลดลง

อาการพิษที่ไต ซึ่งพบว่ามี creatinine ในซีรัม และมี urea nitrogen ในเลือดเพิ่มขึ้น อาการพิษทั้งหมดจะลดลงหรือหายไปเมื่อหยุดยา การฉีดยาเข้าไขสันหลังอาจทำให้เกิดอาการพิษที่ระบบประสาทส่วนกลาง ได้แก่ ปวดศีรษะและอาเจียน อาจมีเลือดออก arachnoiditis และ myopathy

3.6 ปฏิกริยาต่อกันของยา

แอมโฟเทอริซิน บี เสริมฤทธิ์กับยา Flucytosine, Rifampin, Tetracycline และ Minocycline ฯลฯ โดยอาจเพิ่มการดูดซึมของยาผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ การใช้ยาแอมโฟเทอริซิน บี ร่วมกับยาเหล่านี้จะทำให้ประสิทธิภาพในการรักษาดีขึ้นและทำให้พิษของยาแอมโฟเทอริซิน บี ลดลงโดยการลดขนาดยาและย่นระยะเวลาในการรักษา

4. รายละเอียดเกี่ยวกับเอนไซม์ไคติเนส

ไคตินเป็นสายยาวของโมเลกุล N-acetyl-(D)-glucosamine (NAG) ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -1,4 เป็นสารที่ไม่ละลายน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ (Jeuniaux, 1966; Flach et.al., 1992) เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่สำคัญในธรรมชาติของกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนส และในทางเกษตรกรรมพบว่าเอนไซม์ไคติเนสสามารถยับยั้งการรุกรานของเชื้อราก่อโรคพืชได้ (Fuchs et. al., 1986)

เอนไซม์ไคติเนสแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มตามลักษณะการตัดย่อยสายไคตินได้เป็นเอกโซไคติเนส (exochitinase) และเอนโดไคติเนส (endochitinase) (Bade and Hickey, 1988) ซึ่งจะเข้าไปสลายพันธะตรงตำแหน่งคาร์บอนตัวที่ 1 และคาร์บอนตัวที่ 4 ของโมเลกุล NAG ที่อยู่ติดกัน โดยที่เอกโซไคติเนสจะย่อยสายไคตินทางด้านปลายให้ไคโตไบโอส (chitobiose: dimer ของ N-acetylglucosamine) ส่วนเอนโดไคติเนสจะย่อยพันธะไกลโคซิดิกภายในสายไคติน (Jeuniaux, 1966) ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์ออกมาหลายแบบตั้งแต่ dimer, trimer หรือ tetramer ของ N-acetylglucosamine โดยมีชื่อเรียกว่า chitobiose, chitotriose หรือ chitotetraose ตามลำดับ (Roberts and Selitrennikoff, 1988; Bassler et.al., 1991) และที่สำคัญคือเอนโดไคติเนสสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ นอกจากนี้แล้วในระบบเอนไซม์ไคติเนส (chitinolytic) ยังสามารถตรวจพบเอนไซม์ไคโตไบโอเอส (chitobiase) และ N-acetylglucosaminidase ที่สามารถย่อยไคโตไบโอเอสได้ NAG อีสรออกมา ซึ่งเอนไซม์ทั้ง 2 ถูกจัดว่ามีหน้าที่เหมือนกัน (Tronsmo and Harman, 1993) แต่ที่ต่างกันคือเอนไซม์ N-acetylglucosaminidase สามารถใช้ไคโตไตรโอสเป็นสารตั้งต้นได้นอกจากไคโตไบโอเอส (Flach et.al., 1992; Soto-gil and Zyskind, 1989)

ถึงแม้ว่าไคตินจะสามารถตรวจพบได้เป็นปริมาณสูงในธรรมชาติและสามารถหาซื้อได้ แต่คุณสมบัติยังไม่เหมาะต่อการนำมาทดสอบการทำงานของเอนไซม์ไคติเนสเนื่องจากยังมีขนาดใหญ่และซับซ้อน ซึ่งจำเป็นต้องมีการเตรียมก่อนนำมาใช้และเรียกชื่อเป็น colloidal chitin (Flach et.al., 1992) ที่ไม่ละลายน้ำ หรือ glycol chitin หรือ carboxymethyl chitin ที่อยู่ในรูป

ของสารละลาย นอกจากนั้นการติดฉลากโคตินด้วยสีย้อมเช่น procion red G และ remazol brilliant violet 5R ก็ถูกนำมาใช้ในการทดสอบเอนไซม์โคติเนส (Hackman and Goldberg, 1964) แต่ความไวยังต่ำ ซึ่งแก้ไขโดยใช้ tritiated chitin (Molano et.al., 1977) เข้ามาแทนที่แต่เนื่องจากเป็นสาร radioactive ดังนั้นจึงยากต่อการจัดการ ซึ่งวิธีการทดสอบเอนไซม์โคติเนสได้มีการพัฒนาขึ้นมาเป็นลำดับเพื่อให้มีความไวสูงขึ้นเช่นการใช้สารเรืองแสง (fluorogenic substance) เช่น 4-methylumbelliferone (4-MU) (O'Brien and Colwell, 1987) หรือสารให้สี p-nitrophenol (Fuches et.al., 1986) แบคทีเรียที่สามารถย่อยโคตินได้จะทำให้เกิดวงใส (clear zone) รอบโคโลนีดังกล่าวและสามารถตรวจวัดปริมาณได้อย่างคร่าวๆ โดยดูจากขนาดวงใสหรือจำนวนวันที่ใช้ทำให้เกิดวงใส แต่นอกจากการใช้โคตินที่ไม่ละลายน้ำมาเพื่อทดสอบเอนไซม์โคติเนสแล้วยังมีโคตินที่ละลายน้ำได้มาทดสอบได้ด้วยและทดสอบการย่อยโคตินด้วยการย้อมด้วยสีย้อม congored (Teather and Wood, 1982) 1989) หรือ calcoflor white M2R (Trudel and Asselin) หรือ trypan blue (Ueda et.al., 1994) นอกจากนั้นการใช้สารเรืองแสงในการหาปริมาณเอนไซม์โคติเนสเป็นที่นิยมมากเนื่องจากมีความรวดเร็ว เช่นการเททับโคโลนีที่ถูกย่อยด้วยสารเรืองแสง 4-MU หรือ p-Nitrophenol ดูการเรืองแสงสีฟ้าขาวภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลตหรือการปรากฏสีเหลืองรอบโคโลนี ตามลำดับ แล้วจึงใช้เครื่องมือ fluorometry ในการหาปริมาณประกอบ (Wortman et.al., 1986; Kless et.al., 1989)

5. การควบคุมการแสดงออกของจีน

การแสดงออกของรหัสพันธุกรรมที่ปรากฏใน DNA ต้องอาศัยกระบวนการหลายอย่างประกอบเข้าด้วยกัน อันดับแรกก็คือการถอดรหัส (transcription) สาย DNA ให้เปลี่ยนไปเป็น RNAs ซึ่งประกอบด้วย transfer RNA (tRNA), ribosomal RNA (rRNA) และ messenger RNA (mRNA) โดยที่ลำดับเบสที่ปรากฏอยู่ในสาย mRNA จะถูกแปลรหัส (translation) ไปเป็นสายของกรดอะมิโน (amino acid) ประกอบเป็นโปรตีน ส่วน tRNA และ rRNA เป็นอนุพันธ์ที่มาจาก precursor RNA สายยาวที่ผ่านกระบวนการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ย่อย RNA (RNA processing enzyme) โดยที่โมเลกุลของ RNAs ทั้งหมดมีบทบาทสำคัญในการแสดงออกของยีน (Doi, 1991)

ระบบของเอนไซม์ (enzyme machinery) ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการถอดรหัสของจีนคือ DNA-dependent RNA polymerase ที่เรียกย่อ ๆ ว่า RNA polymerase ซึ่งเป็นเอนไซม์แกน (core enzyme) ที่ทำปฏิกิริยาร่วมกับ sigma (σ) factor เปลี่ยนไปเป็น holoenzyme และจะไปจับอย่างจำเพาะกับส่วนของลำดับเบสที่ปลายสาย 5' ที่เป็นตำแหน่งของ promoter

ขอบเขตของ promoter ประกอบด้วยลำดับเบสประมาณ 40-50 เบสพาร์ (base pair: bp) และลำดับเบสอื่นที่จะถูกจับด้วยเอนไซม์ RNA polymerase โดยส่วนของ σ factor ซึ่งส่วนใหญ่แล้วจะอยู่ที่ตำแหน่ง conserved region ที่ -10 (TATAAT) และ -35 (TTGACA) และที่ตำแหน่ง +1 ซึ่งเป็นตำแหน่งแรกของการถอดรหัส มีการทดลองเปลี่ยนแปลงลำดับเบส

(mutation) ที่ตำแหน่ง -10 และ -35 ปรากฏว่าทำให้ promoter มีหน้าที่ลดลงแต่หากมี mutation ที่ตำแหน่งอื่นด้านปลาย 3' ปรากฏว่าไม่มีผลต่อหน้าที่ของ promoter โดยส่วนใหญ่แล้ว จินและชุดของจิน (operon) จะถูกควบคุมด้วย promoter หลายแบบอาจเป็นแบบเรียงลำดับซ้ำกันในทิศทางเดียวกัน (tandem) หรือทับซ้อนกัน (overlap) ซึ่งการถอดรหัสอาจเป็นการใช้ holoenzyme ชนิดเดียวกันหรือมากกว่านั้น

σ factors มีอยู่ด้วยกันหลายชนิดและเมื่อรวมกับ RNA polymerase ได้เป็น holoenzymes หลายแบบที่มีความแตกต่างจำเพาะกับ promoters ชนิดต่างๆ (Streips, 1991) ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการถอดรหัสในเชื้อแต่ละชนิด เช่น holoenzymes ของ *Bacillus subtilis* (σ^{43}), *E. coli* (σ^{70}) และ *Lactobacillus lactis* (σ^{39}) จะมีตำแหน่งจับจำเพาะที่เดียวกัน ตรงตำแหน่ง -10 (TATAAT) และ -35 (TTGACA) และต้องมีเบสระหว่าง (spacer) 2 ตำแหน่ง จำนวน 17 bp และในแบคทีเรียกรดแลคติกที่ตำแหน่ง -15 ควรมีลำดับเบสคู่เป็น TG ส่วนที่ตำแหน่งเหนือกว่า -35 ไปทางปลาย 3' ควรเป็นตำแหน่งที่มี AT ซ้ำกันมากๆ (AT rich) จึงจะเป็น promoter ที่มีประสิทธิภาพในแบคทีเรียกรดแลคติก (Araya et.al., 1993; de Vos, 1999)

6. งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

อาภัสรา กอบกัยกิจ (2536) การแยกแลคติกแอซิดแบคทีเรียจากอาหารหมักไทย ผัก ผลไม้ดอง แหนม และไส้กรอกเปรี้ยว จากตลาดสดต่าง ๆ ได้เชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย 50 สายพันธุ์ ซึ่งสามารถจัดอยู่ในกลุ่มของ *Lactobacillus plantarum* 40 สายพันธุ์, *Lactobacillus animalis* 7 สายพันธุ์, *Lactobacillus pentosus* 1 สายพันธุ์, *Lactobacillus marinus* 1 สายพันธุ์, *Lactobacillus casei* subsp. *tolerance* 1 สายพันธุ์ ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบ *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* พบว่าส่วนน้ำเลี้ยง เชื้อที่มีค่า pH 3.3-4.0 ของแลคติกแอซิดแบคทีเรียทุกสายพันธุ์สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง โดยดูความกว้างของบริเวณ ยับยั้งและวัดค่าการดูดกลืนแสงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว เมื่อ ทดสอบความสามารถในการสร้างสารต่อต้านจุลชีพพบว่า น้ำเลี้ยงเชื้ออายุ 36 ชม. ของ *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์ BL ที่แยกได้จากหน่อไม้ ดอง ปรับให้มีค่าความเป็นกรดต่าง 6.5 จะสามารถเกิดบริเวณใสบนอาหาร เลี้ยงเชื้อแข็งต่อเชื้อทดสอบ *B. subtilis* และหนองเหนียวการเจริญของ เชื้อทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวได้มากที่สุด การทำสารต่อต้านจุลชีพกึ่งบริสุทธิ์ โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต นำส่วนสกัดไปทำให้บริสุทธิ์โดยการโครมาโตกราฟีอย่างต่อเนื่องบน ดีอีเออี-เซฟาเดกซ์ เอ-50 และเซฟาเดกซ์ จี-75 ตรวจสอบชนิด และขนาดของสารต่อต้านจุลชีพโดยโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์ เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าน่าจะเป็นสารไลโปโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 33,000 และ 43,000 ดาลตัน ใช้ *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์ BL ที่ผลิตสารต่อต้านจุลชีพเป็นหัวเชื้อเตรียมโยเกิร์ตระดับห้องปฏิบัติการ จากการทดสอบด้วยประสาทสัมผัสระดับการให้คะแนนของสีและเนื้อสัมผัสของโยเกิร์ตที่เตรียมด้วยเชื้อดังกล่าวจะมีค่าสูงกว่าโยเกิร์ตที่ทำ

จากโยเกิร์ตที่จำหน่ายในท้องตลาด ค่าการยับยั้งรวมของโยเกิร์ตทั้งหมดมีค่าใกล้เคียงกัน ประมาณ 5.33

วิลาวณย์ เจริญจิระตระกูล (2542) ได้ทำการแยกแลคติกแบคทีเรียจากอาหารหมักพื้นบ้านภาคใต้และนำแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมดไปทดสอบผลการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ 4 ชนิดคือ *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* ATCC 25723, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Salmonella typhimurium* 3230 ซึ่งเชื้อที่แยกได้นี้ได้สร้างสารยับยั้งเป็นกรดอินทรีย์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และพบว่าบางชนิดสร้างสารยับยั้งซึ่งไม่มีคุณสมบัติเป็นกรดอินทรีย์ โดยเป็นสารพวกโปรตีนที่ทนความร้อนได้สูง และสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งคาดว่าสารยับยั้งดังกล่าวน่าจะเป็น แบคเทอริโอซิน

ปาริชาติ พุ่มขจร และคณะ (2543) ได้ศึกษาถึงความสามารถในการต่อต้านจุลินทรีย์ของกรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคเทอริโอซิน ที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมัก โดยนำแบคทีเรียแลคติกจำนวน 273 ไอโซเลต ซึ่งแยกได้จากอาหารหมักจำนวน 15 ตัวอย่าง มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์ตัวบ่งชี้ (indicator organism) 5 ชนิด คือ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473, *Escherichia coli* ATCC 25923 และ *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่งเมื่อนำ culture supernatant ดังกล่าวมาปรับ pH 7 ปรากฏว่าที่แบคทีเรียแลคติกจำนวน 81 ไอโซเลต ที่ยังคงยับยั้งจุลินทรีย์เหล่านี้ และเมื่อเติมเอนไซม์อะไมเลสลงไป พบว่ามีแบคทีเรียแลคติก จำนวน 37 ไอโซเลต ที่ยังสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และเมื่อเติมเอนไซม์โปรตีนเนสเคลงไปอีก พบว่ามีแบคทีเรียแลคติก 5 ไอโซเลต ที่ยังสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ผลการวิจัยนี้สามารถสรุปได้ว่าแบคเทอริโอซินมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์บางชนิดได้ ซึ่งสามารถที่จะนำไปใช้ได้จริงในขั้นตอนการผลิตอาหารหมัก และอุตสาหกรรมการผลิตอาหารอื่นๆ

ธิดาทิพย์ วงศ์สุรวัฒน์ และคณะ (2544) จากการนำแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหารหมักไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ 2 ชนิด คือ *Leuconostoc mesenteroides* และ *Staphylococcus aureus* โดยวิธี swab paper disc และวิธี spot on lawn พบว่ามีแลคติกแอซิดแบคทีเรีย 2 ไอโซเลต ที่ให้ผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* จากการทดสอบด้วยวิธีการทั้งสองดังที่กล่าวข้างต้น ดังนั้นจึงได้นำสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่อยู่ใน culture supernatant ของแลคติกแอซิดแบคทีเรียแบคทีเรีย 2 ไอโซเลตดังกล่าวไปศึกษาความสามารถในการทนต่อเอนไซม์ pepsin และ protienase K ซึ่งปรากฏว่าสารดังกล่าวถูกทำลายได้ด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิด และเมื่อนำแลคติกแอซิดแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลตไปเทียบเคียงชนิด พบว่าเป็นเชื้อ *Streptococcus* ทั้ง 2 ไอโซเลต

ปาริชาติ พุ่มขจร และพงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ (2544) ได้ทำการ review ในเรื่องของแบคทีเรียสร้างกรดแลคติก ที่มักใช้เป็นหัวเชื้อของอาหารหมักในอุตสาหกรรมอาหารหมักหลายชนิด เนื่องจากแบคทีเรียในกลุ่มนี้สามารถสร้างสารที่ช่วยในการปรุงแต่งกลิ่น และรสชาติอาหาร นอกจากนี้ยังสามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์อื่น สารดังกล่าวได้แก่ สารพวกกรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดอะซีติล อะเซทาลดีไฮด์ รูเทอร์ริน และแบคเทอรีโอซิน เป็นต้น โดยสารแต่ละชนิดมีคุณสมบัติและความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์อื่นได้แตกต่างกัน

สมบุรณ์ ธนาสุภวัฒน์ (2544) เขียนบทความเกี่ยวกับแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกที่พบในปลาร้าและปลาจ่อมโดยได้รายงานไว้ว่า อาหารหมักพื้นบ้านของไทยเช่น น้ำปลา บูดู ซิอิ้ว แหนม ปลาสาม ส้มผัก หอยดอง ผักกาดดอง หอมดอง ไส้กรอกเปรี้ยว เป็นต้น มีรสเปรี้ยวเนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติกและช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคได้ พบว่าในอาหารหมักที่มีปริมาณเกลือต่ำมีกรดมากจะมีแบคทีเรียรูปร่างแท่งคือ แลคโตบาซิลลัส เพนโตซัส และแลคโตบาซิลลัส แพลนทาร์ม และพวกรูปร่างกลม เพติโอคอคคัส เพนโตซาเซ็นส ส่วนอาหารหมักที่มีปริมาณเกลือสูง เช่น น้ำปลา บูดูและ ซิอิ้ว มีกรดน้อยจะพบแบคทีเรียกรดแลคติกสกุลเตตราจีโนคอคคัส แต่อย่างไรก็ตามอาหารหมักที่มีเกลือสูงแต่มีรสเปรี้ยวเช่น ปลาร้า ปลาจ่อมก็พบแลคโตบาซิลลัสหลายชนิด ซึ่งประโยชน์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักอาหาร เช่น นมหมัก (โยเกิร์ต หรือ นมเปรี้ยว) โดยเชื้อจะผลิตกรดแลคติก กรดอะซิติก และเอธานอลไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ คาร์บอนไดออกไซด์ ไดอะเซทิล โพลีแซคคาไรด์ แบคเทอรีโอซินซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะ สำหรับใช้เป็นสารถนอมอาหารเพื่อยับยั้งเชื้อโรคได้ และใช้เป็นเซลล์ที่มีชีวิตเป็นโพรไบโอติก (probiotic) เพื่อทำให้เกิดสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ของโฮสต์และป้องกันการเกิดโรคท้องร่วง ทำให้สัตว์เจริญเติบโตได้ดี ส่วนความสำคัญทางด้านสุขภาพได้รายงานไว้ว่าไม่ใช่แบคทีเรียกรดแลคติกทุกชนิดที่จะมีผลต่อสุขภาพ จะพบเพียงบางตัวเท่านั้น เช่น แลคโตบาซิลลัส และไปฟีโดแบคทีเรียบางชนิดที่มีบทบาทในลำไส้ในการช่วยลดโคเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ กลูโคสในเลือด ความดันและการดูดน้ำในลำไส้ใหญ่ ในต่างประเทศนิยมใช้เชื้อแลคโตบาซิลลัส แอซิโดฟิลลัส เป็นหัวเชื้อในการผลิตนมเปรี้ยวหรือเชื้อผงสำหรับรักษาโรคในลำไส้ แลคโตบาซิลลัส แพลนทาร์ม มีผลต่อการสร้างแอนติบอดีแลคโตบาซิลลัส คาเซโอ เพิ่มความต้านทานของโฮสต์ต่อการติดเชื้อแบคทีเรียและไวรัส เช่นเดียวกับเชื้อชนิดอื่นที่พบในอาหารหมักของไทยก็จะเข้าสู่ลำไส้โดยการบริโภคอาหารหมักดองต่าง ๆ เป็นประจำ ซึ่งอาจมีบทบาทในทางก่อโรคได้เช่นกัน

ชุตินันท์ ประสิทธิ์ภูมิปริชา และคณะ (2545) ได้ศึกษาคุณสมบัติของสารแบคเทอรีโอซิน ของเชื้อ *Lactobacillus* spp. ที่แยกได้จากอาหาร โดยทำการคัดเลือกเชื้อ *Lactobacillus* spp. จากอาหารหมักดอง ผลไม้ และผลิตภัณฑ์นมหลายชนิดใน อ.วารินชำราบ จ. อุบลราชธานี จำนวน 73 ไอโซเลต และทดสอบคุณสมบัติพื้นฐานทางชีวเคมี เพื่อคัดเลือกเชื้อ *Lactobacillus* spp. จำนวน 21 ไอโซเลตสกัดสารแบคเทอรีโอซินจากเชื้อ

Lactobacillus spp. เพื่อทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อทดสอบ 5 สายพันธุ์ คือ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 , *Escherichia coli* ATCC 25922 , *Salmonella Typhi* ATCC 13311 , *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Sarcina lutea* ATCC 9341 นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาคูณสมบัติการทนต่อความร้อนของสารแบคทีริโอซิน และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเชื้อ *Lactobacillus* spp. ในการสร้างสารแบคทีริโอซินที่มีประสิทธิภาพในการต้านจุลชีพด้วย ผลการศึกษาวิจัยในครั้งนี้จะนำไปสู่แนวทางในการพัฒนายาต้านจุลชีพ และ สารถนอมอาหารจากเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพ และปลอดภัย

Alakomi และคณะ (2000) ผลของกรดแลคติก ที่สามารถซึมผ่าน outer membrane ของ *Escherichia coli* O157:H7 , *Pseudomonas aeruginosa* และ *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ถูกศึกษาโดยใช้ a fluorescent – probe uptake assay และใช้วิธีตรวจหา sensitize ของการแตกสลายของแบคทีเรีย(bacteriolysis) โดยใช้ตัวควบคุมคือ EDTA (a permeabilizer acting by chelation) และกรดไฮโดรคลอริก ซึ่งปรับความเป็นกรดต่างสุดทำให้ตรงกับกรดแลคติก และมีการทดสอบในการแสดงออกของ KCN ด้วย ผลสุดท้ายจะได้ว่า กรดแลคติกที่ความเข้มข้น 5 mM (pH 4) จะให้ผลที่ชัดเจนต่อความสามารถในการซึมผ่านของเชื้อที่ใช้ทดสอบแต่ละสปีชีส์ ผลจากการทดสอบ fluorescent assay ให้ผลดีกว่า EDTA หรือ HCl หรือ HCl + KCN ยกเว้น *Pseudomonas aeruginosa* การซึมผ่านของกรดแลคติกและกรดไฮโดรคลอริก ถูกยับยั้งโดย $MgCl_2$ ความไวต่อการสลาย outer membrane ของ *Escherichia coli* และ serovar Typhimurium เมื่อใช้ Lactic acid + sodium dodecyl sulfate (SDS) จะมากกว่า HCl + SDS อย่างไรก็ดีตาม กรดทั้งสอง เมื่อเติม SDS และเติม Triton x-100 จะมีความไวต่อ *Pseudomonas aeruginosa* กรดนี้จะทำให้มีการปลดปล่อย lipopolysaccharide จาก serovar Typhimurium ออกมาในสัดส่วนที่ค่อนข้างมากโดยสามารถวิเคราะห์ได้โดยการทำ electrophoresis และทำ fatty acid analysis ซึ่งจะแสดงให้เห็นเช่นกัน การปลดปล่อย lipopolysaccharide จาก outer membrane ที่เกิดจากกรดแลคติก เกิดขึ้นได้ดีกว่า EDTA และ HCl ดังนั้นจะได้ว่ากรดแลคติกมีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลชีพ(antimicrobial) ที่ pH ต่ำๆ ร่วมกับการซึมผ่านเข้าสู่ outer membrane ของ Gram- Negative Bacteria และอาจเกิดจาก effect ของ antimicrobial substances อื่นๆ

Tjoelker LW และคณะ (2000) รายงานการตรวจพบการผลิตไคตินเนสจากหนูตะเภาที่ติดเชื้อ *Aspergillus* และได้สรุปโครงสร้างของไคตินเนสจากมนุษย์ ว่าอย่างน้อยต้องประกอบด้วย chitin binding domain โดยอยู่ทางด้าน C-terminal 49 ซึ่งถ้าส่วนนี้ขาดหายไปจะทำให้คุณสมบัติ chitin binding activity หายไป ส่วนของ chitin binding domain เป็นส่วนสำคัญที่จะไปจับและย่อยสลาย insoluble chitin ตรงส่วนผนังเซลล์ของเชื้อรา

Seliternikoff CP (2001) ได้ review เกี่ยวกับโปรตีนที่มีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อรา (Antifungal proteins) ที่ผลิตออกมาโดยพืชที่ถูกรุกรานจากเชื้อราหรือไวรัส ซึ่งพบมีอยู่หลายชนิดด้วยกัน กล่าวคือ pathogenesis-related (PR) proteins ที่ถูกจัดแบ่งออกได้เป็น PR-1, 2, 3,

4, 5 และโปรตีนอื่น ๆ เช่น Defensins, Cyclophilin-like protein , Glycine/histidine-rich protein, RIPs, LTPs, Killer proteins เป็นต้น และหนึ่งในกลุ่มของ PR protein (PR-3) ก็คือ ไคตินเนสสามารถป้องกันเชื้อราก่อโรคในมนุษย์ด้วย เช่น *Alternaria solani*, *A. radicina*, *Fusarium oxysporum* เป็นต้น

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

1. วัสดุ อุปกรณ์

1.1 อาหารที่ใช้เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติก

อาหารที่ใช้มีทั้งประเภท แป้ง เนื้อสัตว์ ผัก ผลไม้ และผลิตภัณฑ์นม

- อาหารประเภทแป้ง ได้แก่ เส้นขนมจีน ข้าวหมาก
- อาหารประเภทเนื้อสัตว์ ได้แก่ กะปิ กุ้งส้ม ไตปลา ปลาจืด ปลา หมู แหนมปลา แหนมหมู แหนมไก่
- อาหารประเภท ผัก ผลไม้ ได้แก่ ผักกาดดอง หน่อไม้ หัวผักกาดเค็ม กะหล่ำปลี มะม่วงสุก
- ผลิตภัณฑ์นม ได้แก่ นมเปรี้ยว

1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- Trypticase soy broth (TSB) และ Trypticase soy agar (TSA)
- MRS broth และ MRS agar
- Luria-Bertani (LB) ประกอบด้วย Tryptone, yeast extract, sodium chloride

(NaCl)

- Sabouraud Dextrose Agar (SDA)

1.3 เชื้อทดสอบ

Lactobacillus (L.) plantarum ATCC 8014 (TISTR 050)

Bacillus (B.) subtilis ATCC 6633 (TISTR 008)

Candida (C.) albicans DSM 70014 (TISTR 5239)

Escherichia (E.) coli ATCC 25922 (TISTR 887)

Pseudomonas (P.) aeruginosa ATCC 9027 (TISTR 781)

Staphylococcus (S.) aureus ATCC 25923 (TISTR517)

Micrococcus (M.) luteus TISTR 884

1.4 พลาสมิดลูกผสมจีนโคติเนส pHYB43 : ประกอบด้วย pHY300PLK กับชิ้นจีนโคติเนส จากเชื้อ *Bacillus circulans* No.4.1 เชื่อมต่อกันที่ตำแหน่ง HindIII

1.5 สารเคมีและยาปฏิชีวนะ

1.5.1 ทดสอบ catalase test

3% hydrogen peroxide

1.5.2 ทดสอบ transformants

Lysozyme

Tetracycline

Restriction enzyme *Hind*III และ *Eco*RI

4-methylumbelliferyl- β -D-N,N'-diacetylchitobiose (4-MUG)

glycol chitin

ไคตินเนสของเชื้อ *Streptomyces*

1.5.3 electrophoresis

Agarose gel

Hydrochloric acid

EDTA

Trisma Base

Lambda (λ)-DNA

1.6 อุปกรณ์

Pipette, L-shape rod, Appendorf tube, centrifuge tube ไม้จิ้มฟัน กระดาษกรอง ช้อนตักยา Microtiter plate

1.7 เครื่องมือ

กล้องจุลทรรศน์

UV transilluminator

Spectrophotometer

High-speed refrigerated centrifuge

pH meter

2. ขั้นตอนการทดลอง

I. การศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติก

1. การคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

1.1 การเตรียมตัวอย่างอาหาร (อาหารหมัก ผลไม้ และ / หรือ ผลิตภัณฑ์นม)

1.1.1 ชั่งตัวอย่างอาหารแต่ละชนิด 25 กรัม ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (broth) Mann-Rogosa-Shane (MRS) ปริมาตร 225 มล. เขย่าให้เข้ากันจนทั่ว นำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ($^{\circ}\text{C}$) ข้ามคืน

1.1.2 ดูดสารแขวนลอย (suspension) ของเชื้อจากข้อ 1.1.1 มากระจายเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS agar plate (ทำซ้ำ 2 plate) ด้วยเทคนิคการกระจายเชื้อ (spread plate technique) แล้วกระจายจนทั่ว agar โดยใช้แท่งแก้ว (L-shape glass rod)

1.1.3 บ่มเพาะจนเพาะเชื้อทั้งหมดจากข้อ 1.1.2 ที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}\text{C}$ ในบรรยากาศที่มี 5-10 % CO_2 (candle jar) นาน 48 ชั่วโมง (ชม.)

1.1.4 สุ่มเลือกโคโลนีที่เจริญขึ้นในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS โดยแต่ละโคโลนีที่บริเวณรอบ ๆ ไม่มี เชื้ออื่นเจริญขึ้นมาเพื่อทำเป็นเชื้อบริสุทธิ์ (pure culture) โดยใช้ needle เขี่ยเชื้อแล้วนำมาขีด (streak) ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS โดยวิธีการขีดเชื้อ (streak plate method)

1.1.5 บ่มเพาะจานเพาะเชื้อจากข้อ 1.1.4 ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชม. ในสภาวะเช่นเดียวกับข้อ 1.1.3

2. การศึกษาฤทธิ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกในการยับยั้งจุลินทรีย์ (Antimicrobial spectrum)

2.1 แต่ละโคโลนีของแบคทีเรียกรดแลคติกจากข้อ 1.1.5 ในหัวข้อ 1. มาขีดเป็นเส้นตรงตรงกลางในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ TGE จากขอบข้างหนึ่งไปยังขอบอีกข้างหนึ่งของจานเพาะเชื้อ แล้วนำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C นาน 48 ชั่วโมง ในสภาวะเช่นเดียวกับข้อ 1.1.3

2.2 แต่ละเชื้อ *S. aureus* ด้วย loop แล้วขีดเป็นเส้นตรงเริ่มจากริมของเชื้อจากข้อ 2.1 (อย่าให้ loop สัมผัสกับเชื้อจากข้อ 2.1) ไปยังขอบของจานเพาะเชื้อที่อยู่ข้างเดียวกัน

2.3 ทำเช่นเดียวกับข้อ 2.2 แต่ใช้เชื้อ *L. plantarum*, *E. coli*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* และ *C. albicans* โดย แบ่งเป็น 2 ข้าง แล้วนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชม.

2.4 สังเกตโดยดูรอยขีดเชื้อที่ติดกับเชื้อในข้อ 2.2 ว่ามีเชื้อเจริญขึ้นหรือไม่

3. การทดสอบความสามารถในการเกาะติดพื้นผิว (colonization)

3.1 นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อที่คัดเลือกได้จากข้อ 1. มาทดสอบกลุ่มเชื้อโดยใช้วิธีย้อมสีแบบ แกรมและทดสอบการผลิตเอนไซม์ catalase ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียรูปท่อน/กลมติดสีแกรมบวกไม่สร้างสปอร์และให้ผลลบกับการทดสอบ catalase test (ไม่เกิดฟองก๊าซ)

3.2 นำโคโลนีจากข้อ 3.1 มาทดสอบ colonization ดังนี้

3.2.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ในหลอดเลี้ยงเชื้อขนาด 16×150 มม. ซึ่งภายในมีเส้นลวดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.3 เซนติเมตร (ชม) บรรจุอยู่ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจำนวน 1 เส้น จากนั้นเขี่ยโคโลนีของเชื้อที่คัดเลือกได้ใส่ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างละหลอด

3.2.2 บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C และให้สังเกตการเกาะกลุ่มของเชื้อบริเวณโดยรอบเส้นลวดหรือบริเวณผิวด้านในของหลอดทดลองเป็นเวลาอย่างน้อย 7 วัน

4. ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อของแบคทีเรียกรดแลคติกด้วยเทคนิค agar well diffusion assay

4.1 บ่มเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 48 ชั่วโมง ใน candle jar

4.2 นำไปปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 5000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C แล้วนำส่วนใสมากรองด้วยเยื่อกรอง (Millipore) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตร (มค.ม) แล้ววัด pH ด้วย pH meter

4.3 นำส่วนใสที่ได้มาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อที่ใช้เป็นเชื้อดัชนี (indicating strains) ดังนี้

4.3.1 เตรียมเชื้อ indicating strains ให้มีความขุ่นเท่ากับ Macfarland No. 0.5 จากนั้นนำไปป้ายให้ทั่วพื้นผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ TGE ด้วยสำลีพันก้านไม้ (swab) ปราศจากเชื้อ ตั้งทิ้งไว้ให้ผิวหน้าแห้งประมาณ 5 นาที

4.3.2 เจาะหลุมในจานเพาะเชื้อในข้อ 4.3.1 ให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 ซม. แล้วหยอด culture broth ที่เตรียมได้จากข้อ 4.2 ลงไปในหลุมให้มีปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.3.3 ตรวจผลการยับยั้งเชื้อ indicating strains โดยดู inhibition zone ที่เกิดขึ้นรอบหลุม

II. การถ่ายยีนโคติเนสเข้าสู่แบคทีเรียกรดแลคติก

1. การเตรียมเซลล์เจ้าบ้าน

1.1 เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีส่วนผสมของ 0.5% กลีเซอรอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (มล) บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องโดยไม่ต้องเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.2 แยกเก็บตะกอนเชื้อโดยนำขวดสารแขวนลอยเชื้อในข้อ 1.1 มาแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งส่วนใส

1.3 ล้างตะกอนเซลล์ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ปริมาตร 20 มล แช่ในน้ำแข็ง 5 นาทีแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนเซลล์ด้วยสภาวะเช่นเดียวกับข้อ 1.2 ทำซ้ำ 2 ครั้ง

1.4 ละลายตะกอนเชื้อด้วย 40% polyethyleneglycol (PEG) 4000 ปริมาตร 1 มล แล้วแบ่งเก็บใส่ microcentrifuge tube หลอดละ 200 ไมโครลิตร นำเซลล์ไปใช้ได้ทันทีหรือเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -70°C

2. การนำพลาสมิดลูกผสม (recombinant plasmid) เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (Sambrook et.al., 1989)

2.1 สกัดพลาสมิดลูกผสมยีนโคติเนส pHYB43 (ประกอบด้วย shuttle plasmid pHY300PLK เชื่อมต่อกับยีนโคติเนสจากเชื้อ *B. circulans* No.4.1 ที่ตำแหน่ง *HindIII*) จากเซลล์เจ้าบ้านชนิด *Escherichia coli* DH 5 α ด้วย วิธี alkaline lysis method ดังนี้

ถ่าย overnight culture ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ลงใน microcentrifuge tube นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 5000 rpm (Microcentrifuge EBA 12, Hettich) เป็นเวลา 2 นาที ทำการกระจายตะกอนเชื้อด้วย Solution I (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl และ 10 mM EDTA pH 8.0) ที่ผสม 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (มก/มล) lysozyme ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วแช่ไว้ในอ่างน้ำร้อนอุณหภูมิ 37 °ซ. เป็นเวลา 60 นาที แล้วเติม Solution II (0.2 N NaOH และ 1% SDS) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับลอดไปมา 4-5 ครั้ง จากนั้นจึงเติม Solution III (3 M sodium acetate pH 4.8) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับลอดไปมาหลายๆ ครั้งแล้วแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 12000 rpm เป็นเวลา 20 นาที และเก็บส่วนใสมาผสมกับ Isopropanol ปริมาตร 450 ไมโครลิตรแล้วนำไปปั่นตกตะกอน พลาสมิดที่ความเร็วรอบ 12000 rpm เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำตะกอนที่ได้มาล้างด้วย 70% ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตรและตั้งทิ้งให้ตะกอนแห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 15 นาทีแล้วละลายตะกอนด้วย TE buffer (10 mM Tris-HCl และ 1 mM EDTA pH 8.0) ที่ผสม 1 มก/มล RNase ปริมาตร 40 มค.ล แล้วนำไปให้ความร้อนที่ 65°ซ. เป็นเวลา 10 นาที แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20°ซ. หรือนำมาใช้ได้ทันที

2.2 นำเซลล์เจ้าบ้านที่เตรียมได้จากข้อ 1. ปริมาตร 200 มค.ล มาผสมกับพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 2.1 ความเข้มข้นประมาณ 1 มค.ก จากนั้นนำมาทำขบวนการ electroporation เพื่อนำพลาสมิดดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ โดยนำส่วนผสมไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นถ่ายใส่ลงใน cuvette ขนาด 0.2 เซนติเมตร และนำกลับมาแช่ในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปให้กระแสไฟแบบ single discharge (2,500 โวลต์ 50 ไมโครฟารัด 600 โอห์ม) ภายใต้เครื่อง electroporation (BioRad) จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ลงไป ปริมาตร 800 มค.ล. นำไปบ่มเลี้ยงในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 3 ชม. แบ่งเชื้อมา ปริมาตร 100 มค.ล. กระจายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่มียาปฏิชีวนะเตตราซัยคลิน ความเข้มข้น 15 มค.ก./มล. นำจานเพาะเชื้อไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 24 ชม ใน candle jar

2.3 คัดเลือก electrotransformants ที่เจริญขึ้นในจานอาหารเลี้ยงเชื้อในข้อ 2.2 แล้วนำไปเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนและสกัดพลาสมิดลูกผสม ตัดด้วย restriction enzyme *HindIII* ตามคำแนะนำของบริษัท (Biolabs, England) แล้วนำมาตรวจสอบลักษณะของพลาสมิดด้วยการนำมาวิ่งในวุ้น อะกาโรสภายใต้กระแสไฟฟ้า (agarose gel electrophoresis) 100 โวลท์

3. การทำ agarose gel electrophoresis

3.1 การเตรียมวุ้นอะกาโรส

ชั่งวุ้นอะกาโรส 0.7 กรัม ใส่ในบัฟเฟอร์ Tris Borrate EDTA (TBE) ปริมาตร 100 มล. ต้มจนกระทั่งวุ้นอะกาโรสละลาย ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงประมาณ 60 °ซ เทลงบน gel chamber ที่มีช่อง (comb) สำหรับหยดดีเอ็นเอ จากนั้นปล่อยให้เย็นประมาณ 15 นาที เพื่อให้วุ้นอะกาโรสแข็งตัว แล้วดึงเอาช่องที่หยดดีเอ็นเอออก วางใส่ลงในเครื่อง gel electrophoresis ที่มีบัฟเฟอร์ TBE ท่วมวุ้นอะกาโรส

3.2 นำดีเอ็นเอมาผสมกับ loading dye ด้วยอัตราส่วน 3:1 แล้วหยดลงในช่องที่เตรียมไว้บนวุ้นอะกาโรส หลุมละประมาณ 10 มค.ล

3.3 ต่อขั้วอิเล็กโทรดเข้ากับ power supply โดยให้กระแสวิ่งจากขั้วลบไปยังขั้วบวก แรงเคลื่อน 100 โวลล์ ใช้เวลาประมาณ 45-60 นาที หรือจนกระทั่ง loading dye เคลื่อนที่ไปเกือบถึงปลายสุดอีกข้างของเจล จากนั้นปิด power supply และค่อย ๆ นำวุ้นอะกาโรสเจลออกจาก chamberc แล้วแช่วุ้นอะกาโรสลงในเอธิเดียมโบรไมด์ประมาณ 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (ใส่ถุงมือเพื่อป้องกันไม่ ให้ถูกกับเอธิเดียมโบรไมด์) แล้วนำไปล้างเอธิเดียมโบรไมด์ส่วนเกินออกในน้ำกลั่น เขย่าเบาๆ 15-30 นาที หรืออาจจะทิ้งวุ้นอะกาโรสไว้ในน้ำกลั่นค้างคืน แล้วนำไปส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง UV transilluminator

4. การทำ dot blot hybridization

4.1 dot blot

4.1.1 สกัด DNAs จากเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกเซลล์เจ้าบ้านหรือ transformants ด้วยวิธี alkaline lysis extraction ตามวิธีของ Sambrook et. al.(1989) จากนั้นนำมาต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกสาย DNAs (denatured DNAs)

4.1.2 นำ denatured DNAs จากข้อ 4.1.1 มาหยดลงบน nylon membrane หยดละประมาณ 20 มค.ล ผึ่งให้แห้ง แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 °ซ (baked membrane)

4.2 การเตรียม DNA ตัวติดตาม (DNA probe) ที่ติดฉลากด้วย digoxigenin-11-dUTP

4.2.1 เตรียมชิ้นส่วน DNA ติดตาม (ยีนโคติเนสจากพลาสมิดลูกผสม pHYB43 ขนาด 2.6 กิโลเบส) มาทำการติดฉลากด้วย digoxigenin-11-dUTP แบบสุ่ม (random primer method) ตามคำแนะนำของบริษัท (Boehringer Mannheim)

4.2.2 ตกตะกอน DNA ที่ถูกติดฉลาก (labeled DNA) ด้วยเอธานอลปริมาณเป็น 2 เท่าของปริมาตรเดิม ปั่นตกตะกอน DNA ที่ความเร็วรอบ 13000 rpm นาน 30 นาที เทส่วนใสทิ้งแล้วตากให้แห้ง ละลายตะกอน DNA ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 20 มค.ล

4.3 การทำ hybridization

4.3.1 นำ baked membrane จากข้อ 4.1.2 มาแช่ในสารละลาย prehybridization [5xSSC, 50% (w/v) formamide, 0.1% (w/v) N-lauroylsarcosine, 0.02% (w/v) SDS และ 2% (w/v) blocking reagent] ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที

4.3.2 เติม DNA ติดตาม (labeled probe) ลงไปในสารละลายข้อ 4.3.1 ตั้งทิ้งไว้ข้ามคืนแบบเขย่าเบา ๆ

4.4 ตรวจวัดสัญญาณการเกิดสี (color detection)

4.4.1 ล้าง membrane ในข้อ 4.3.2 ด้วย 2xSSC, 0.1%(w/v) SDS ปริมาตร 50 มล นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

4.4.2 ล้าง membrane ในข้อ 4.4.1 ด้วย 0.1xSSC, 0.1%(w/v) SDS นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 68°C จากนั้นนำ membrane มาผึ่งให้แห้ง

4.4.3 ล้าง membrane ด้วย washing buffer [0.1M maleic acid, 0.15M NaCl, pH 7.5 ที่ผสม 0.3% (w/v) tween 20] นาน 5 นาที จากนั้นนำไปแช่ใน 1X blocking reagent นาน 30 นาที

4.4.4 แช่ membrane ใน diluted antibody conjugate solution (anti-DIG) ปริมาตร 20 มล นาน 30 นาที แล้วล้างออกด้วย washing buffer ปริมาตร 100 มล นาน 15 นาทีพร้อมเขย่าเบา ๆ

4.4.5 แช่ membrane ใน detection buffer (0.1M Tris-Cl, 0.1M NaCl, 50 mM MgCl₂, pH 9.5) ปริมาตร 20 มล นาน 5 นาที

4.4.6 เติม color solution ที่เตรียมใหม่ใน detection buffer ปริมาตร 20 มล ที่มีส่วนผสมของ nitroblue tetrazolium salt (NBT) ปริมาตร 45 มล. และ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (X-phosphate) ปริมาตร 35 มล. แช่ membrane ทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นนำมาล้างด้วย TE buffer นาน 5 นาทีเพื่อหยุดปฏิกิริยา

5. ทดสอบการแสดงออกของจีนโคติเนส

5.1 ทดสอบโดยวิธีการยีสเซลล์

นำโคโลนีของ transformants อายุไม่เกิน 48 ชั่วโมง มาขยี้ด้วยแท่งแก้ว แล้วหยดทับด้วย 4-Methylumbelliferyl β -D-N,N'-diacetylchitobioside (4-MUG) แล้วนำไปดูจุดเรืองแสงสีฟ้าสว่าง (light blue fluorescence) ภายใต้เครื่อง UV transilluminator

5.2 ทดสอบ Activity ในการย่อยสลายโคตินโดยวิธี well diffusion assay

5.2.1 ปั่นเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกที่ไม่มีพลาสมิด (host) หรือมีพลาสมิด (transformant) ในอาหารเหลว MRS ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ 5000 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที

5.2.2 แยกเก็บส่วนใสนำไป กรองด้วย Millipore ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตร แล้วนำไปทดสอบ activity ดังนี้

5.2.2.1 เจาะหลุม glycol chitin (1.5% agar + 0.05% glycol chitin) ให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ประมาณ 0.6 ซม.

5.2.2.2 หยอดส่วนใสที่เตรียมได้จากข้อ 5.2.2 ลงในหลุมดังกล่าวจนเต็มหลุม (ประมาณ 100 มค.ล)

5.2.2.3 บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลการย่อยสลาย glycol chitin ด้วยการรดทับผิวจาน glycol chitin ด้วยสารละลาย Calcofluor White 2R ใน Tris-HCl pH 8.0 ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นเทสารละลายทิ้ง แล้วเติมน้ำให้ท่วมจาน glycol chitin เพื่อทำการล้าง Calcofluor White M2R นาน 12 ชั่วโมงพร้อมเขย่าเบาๆ แล้วเทน้ำทิ้ง นำจาน glycol chitin มาศึกษาการทำงานของเอนไซม์ไคตินเนส (chitinase activity) โดยส่องดูด้วย UV transilluminator ซึ่งผลบวกจะเห็นเป็นวงสีดาร์กอบหลุม ผลลบเห็นเรืองแสงรอบหลุม

III. การทดสอบฤทธิ์ร่วมกันของเอนไซม์ไคตินเนสกับแบคทีเรียกรดแลคติกหรือยาแอมโฟเทอริซิน บี (AmpB)

1. การทดสอบหาค่า Minimum Inhibition Concentration (MIC) โดยวิธี Broth microdilution

1.1 การเตรียมยาหรือเอนไซม์ไคตินเนส

ละลายผงไคตินเนสด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 1 มก/มล (2 มิลลิยูนิต) เก็บใส่หลอด microcentrifuge หลอดละ 1.5 ml เก็บที่อุณหภูมิ -30 °C

ละลายยาแอมโฟเทอริซิน บี ด้วย 5 % Dextrose ที่ปราศจากเชื้อ

1.2 การเตรียมเชื้อ

เพาะเลี้ยงเชื้อ *C. albicans* บนจานเพาะเชื้อ Sabouraud Dextrose Agar (SDA) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อเชื้อมา 3-5 โคโลนี (เส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 1 มิลลิเมตร) ลงใน 0.85 % NaCl ปรับให้ได้ความขุ่น 85 % Transmittance ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร จะได้ความเข้มข้นของเชื้อประมาณ $1 \times 10^6 - 5 \times 10^6$ CFU/ml แล้วเจือจางด้วย RPMI-1640 ให้ได้ความเข้มข้นของเชื้อประมาณ $1 \times 10^3 - 5 \times 10^3$ ก่อนนำไปใช้

1.3 การทำเจือจางยาหรือเอนไซม์ไคตินเนส

1.3.1 เติม SDB ลงใน microtiter plate ปราศจากเชื้อทุกหลุม ๆ ละ 100 มค.ล และหลุมแรกของแต่ละแถวจะเติมสารต่าง ๆ ดังนี้ (รูปที่ 2)

แถว A และ B เติมไคตินเนส+ยา AmpB

แถว C และ D เติมไคตินเนส ปริมาณตั้งต้น 2 มิลลิยูนิต

แถว E,F,G และ H เติมยาแอมโฟเทอริซิน บี ความเข้มข้นเริ่มต้น 5 มก/มล

1.3.2 ใช้ Multichannel pipette ขนาด 100 มค.ล ผสมยาหรือโคติเนสในหลุมแรกให้เข้ากันดี จากนั้นดูดสารละลายจากหลุมแรกใส่ในหลุมที่สองทำเป็น Two-fold serial dilution จนถึงหลุมที่ 11

1.3.3 นำเชื้อที่เตรียมไว้แล้วใส่ลงใน microplate โดยใส่หลุมละ 100 มค.ลทุกหลุมยกเว้นหลุมที่ 11 เพื่อใช้เป็น negative control และใช้หลุมที่ 12 เป็น positive control แล้วนำไปบ่มเพาะที่ อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยสรุปขั้นตอนการทดสอบทั้งหมดดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงการทดสอบหาค่า MIC ต่อเชื้อโดยวิธี broth microdilution

number well content	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11*	12**
SDB medium	-	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Antifungal agent / chitinase	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	-
Yeast suspended	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	-	100
Total volume (μ l)	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200

* negative control

** positive control

การอ่านผล

ค่า MIC

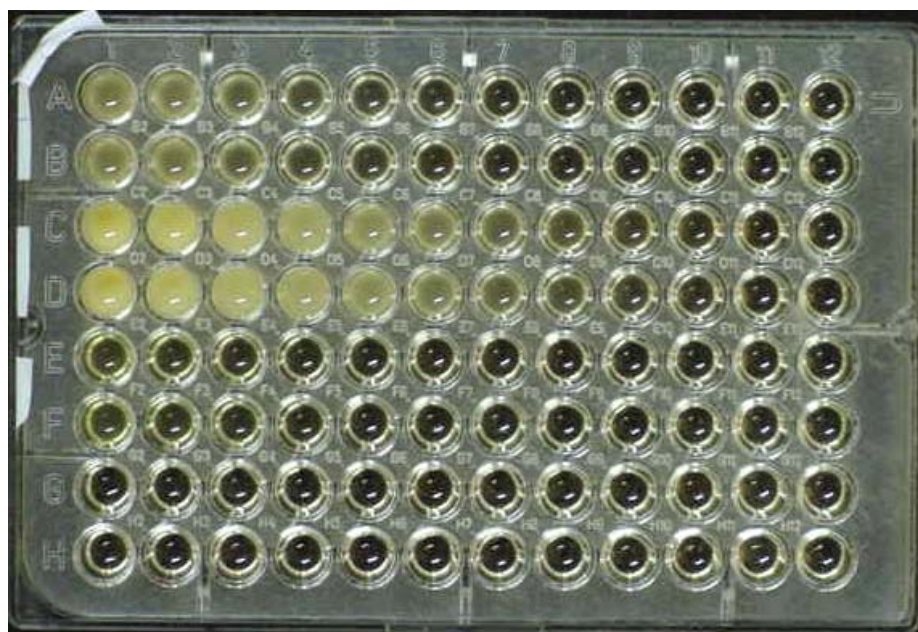
อ่านผลค่า MIC ด้วยตาเปล่าเมื่อบ่มครบ 24 ชั่วโมงสำหรับเชื้อ *C. albicans* แล้วให้คะแนนดังนี้ 0 = สารละลายใส, 1+ = สารละลายขุ่น 0-25 % เมื่อเทียบกับ positive control, 2+ = สารละลายขุ่นมากกว่า 25-50 %, 3+ = สารละลายขุ่นมากกว่า 50-75 % และ 4+ = สารละลายขุ่นมากกว่า 75-100 % อ่านค่า MIC ที่คะแนน = 0

ค่า MFC

ดูดสารละลายที่ให้ผล MIC เท่ากับ 0, 1+, 2+ หลุมละ 100 ไมโครลิตรลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA บ่มที่ 37 °C นาน 24 ชั่วโมงสำหรับเชื้อ *C. albicans* อ่านค่า MFC ที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่มีเชื้อเจริญน้อยกว่า 5 โคโลนี



รูปที่ 1 Chlamydoconidia ของเชื้อ *C. albicans*



} ไคตินเนส+AmpB
 } ไคตินเนส
 } แอมโฟเทอริซิน บี

รูปที่ 2 แสดงตัวอย่างการทดสอบหาค่า MIC โดยวิธี Broth microdilution method แบบ two-fold serial dilution ของยาแอมโฟเทอริซิน บี (AmpB) เอนไซม์ไคตินเนส (Chi) และAmpB ร่วมกับเอนไซม์ ไคตินเนส (AmpB+Chi) ต่อเชื้อ *C. albicans*

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติก

1.1 การคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากตัวอย่างอาหารหมักด้วยเทคนิคกระจายเชื้อบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS เปรียบเทียบกับเชื้อที่ขึ้นในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar (TSA) และ TGE และทดลองเลี้ยงเชื้อที่นำมาใช้เป็น indicating strains ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิดปรากฏว่าแบคทีเรียกรดแลคติกเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS และ TGE และสามารถสุ่มเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความทนทานอากาศได้จำนวน 40 isolates ส่วนเชื้อที่ใช้เป็น indicating strains เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA และ TGE ดังนั้นจึงเลือกใช้ TGE เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่นำมาใช้ทดสอบ antimicrobial activity ด้วยวิธีซีดเชื้อ ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 จำนวน isolates ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักมีคุณสมบัติ colonization และมี antimicrobial activity ต่อ indicating strains ที่ใช้ทดสอบ

Isolate ที่	ชื่อ	Colonization ¹	Antimicrobial activity ²					
			Indicating strains			<i>Candida albicans</i>		
			1.1	1.2	1.3	1.1	1.2	1.3
1	L1	-	+	+	+	-	+	-
2	L2	+	+	+	+	-	+	+
3	L3	-	+	+	+	-	+	-
4	L4	+	+	+	+	-	+	+
5	L5	-	+	+	+	-	+	-
6	L7	-	+	+	+	-	+	-
7	L8	-	+	+	+	-	+	-
8	L9	-	+	+	+	-	+	-
9	L10	+	+	+	+	-	+	-
10	L11	-	+	+	+	-	+	-
11	L12	-	+	+	+	-	+	+
12	L13	-	+	+	+	-	+	+
13	L14	+	+	+	+	+	+	+

Isolate ที่	ชื่อ	Colonization ¹	Antimicrobial activity ²					
			Indicating strains			<i>Candida albicans</i>		
			1.1	1.2	1.3	1.1	1.2	1.3
14	L15	-	+	+	+	-	+	-
15	L16	-	+	+	+	-	+	-
16	L17	-	+	+	+	-	+	-
17	L18	-	+	+	+	-	+	-
18	L19	+	+	+	+	-	+	-
19	L20	+ ^w	+	+	+	-	+	-
20	L21	-	+	+	+	-	+	-
21	L22	-	+	+	+	-	+	-
22	L23	-	+	+	+	-	+	-
23	L24	-	+	+	+	-	+	-
24	L25	-	+	+	+	-	+	+
25	L26	+ ^w	+	+	+	-	+	+
26	L27	-	+	+	+	-	+	-
27	L28	-	+	+	+	-	+	-
28	L28	-	+	+	+	-	+	-
29	L29	-	+	+	+	-	+	-
30	L30	-	+	+	+	-	+	-
31	L31	+	+	+	+	-	+	+
32	L32	-	+	+	+	-	+	-
33	L33	+ ^w	+	+	+	-	+	-
34	L34	+ ^w	+	+	+	-	+	-
35	L35	+ ^w	+	+	+	-	+	-
36	L36	+ ^w	+	+	+	-	+	-
37	L37	+ ^w	+	+	+	-	+	-
38	L38	+ ^w	+	+	+	-	+	-
39	C3	-	+	+	+	-	+	-
40	C7	-	+	+	+	-	+	+

¹ ความสามารถในการเกาะติดพื้นผิว, + เกาะติดข้างหลอด; +^w เกาะติดข้างหลอดเล็กน้อย;

- ไม่เกาะติดข้างหลอด

² ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ : + มีฤทธิ์; - ไม่มีฤทธิ์

1.1 1.2 และ 1.3 เป็นวิธีทดสอบ Antimicrobial activity โดยวิธีขีดเชื้อ double layer และ agar well diffusion assay ตามลำดับ

1.2 การทดสอบความสามารถในการเกาะติดพื้นผิว (colonization) โดยการนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้มาทดสอบกลุ่มเชื้อโดยใช้วิธีย้อมสีแบบแกรมและทดสอบการผลิตเอนไซม์ catalase ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียรูปท่อน/กลมติดสักรวมบวกไม่สร้างสปอร์และให้ผลลบกับการทดสอบ catalase test (ไม่เกิดฟองก๊าซ) จากนั้นนำโคโลนีมาทดสอบ colonization โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อขนาด 16×150 มม ปั่นเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C และให้สังเกตการเกาะกลุ่มของเชื้อบริเวณโดยรอบผิวหลอดด้านในหลอดทดลองทุกวัน (ไม่ต้องเขย่าหลอด) เป็นเวลาอย่างน้อย 7 วัน พบว่ามีเชื้อ 17 isolates ที่แสดงคุณสมบัติเกาะข้างหลอดทดลองดังแสดงในตารางที่ 5 รวมทั้งแบคทีเรียกรดแลคติกหมายเลข 14 ดังแสดงในรูปที่ 3

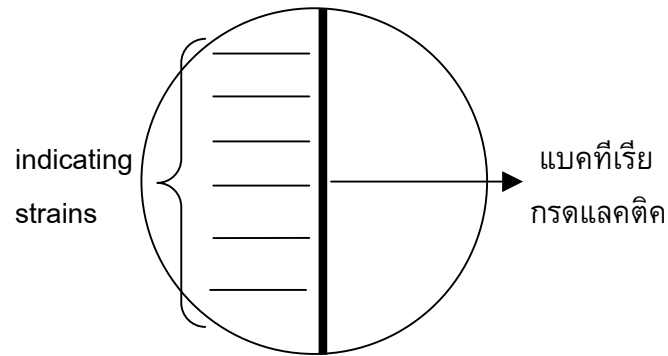


รูปที่ 3 การเกิด colonization ของแบคทีเรียกรดแลคติก (หลอดกลาง) เปรียบเทียบกับ negative control (MRS : หลอดซ้ายมือ) และแบคทีเรียกรดแลคติกที่ไม่เกิด colonization (หลอดขวามือ)

2. การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ (Antimicrobial spectrum) ของแบคทีเรียกรดแลคติก

2.1 วิธีขีดเชื้อ (streak plate) โดยการขีดเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ไว้กลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ TGE ปั่นเพาะจานเพาะเชื้อที่ 37°C เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นแตะเชื้อที่ใช้เป็น indicating strains [*L. plantarum* ATCC8014 (TISTR050), *Bacillus subtilis* ATCC6633 (TISTR008), *Escherichia coli* ATCC25922 (TISTR887), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027 (TISTR781), *Staphylococcus aureus* ATCC25923 (TISTR517), *Micrococcus luteus*, *Candida albicans* DSM 70014 (TISTR 5239)] ด้วย loop แล้วขีดเป็นเส้นตรงเริ่มจากริมของเส้นเชื้อกลางจานเพาะเชื้อ (อย่าให้ loop สัมผัสกับรอยขีดเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย (ดังรูป) ปั่นเพาะจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชม ปรากฏว่าแบคทีเรียกรดแลคติก

ที่คัดเลือกออกมาได้ทั้งหมดมีฤทธิ์ยับยั้ง indicating bacterial strains แต่มีเฉพาะ isolate หมายเลข 14 เท่านั้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของ indicating bacterial strains รวมทั้ง *C. albicans* ดังแสดงในตารางที่ 5 และรูปที่ 4



ก



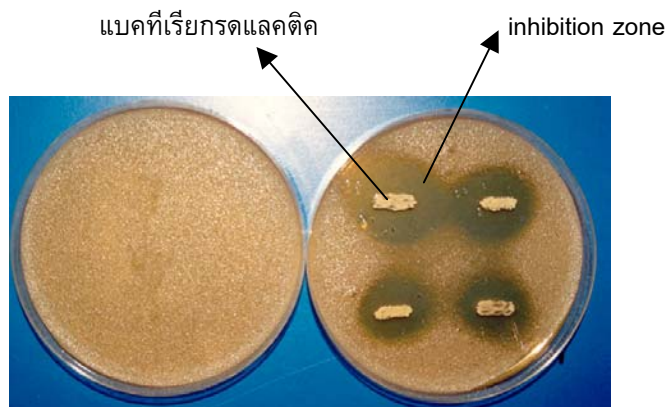
ข



ค

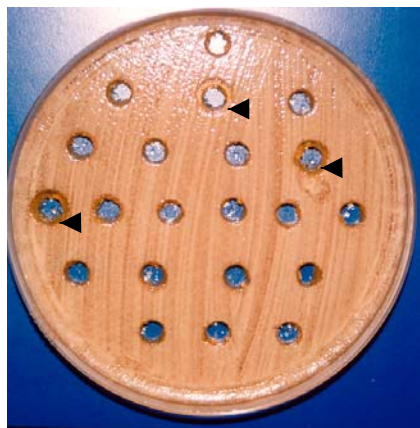
รูปที่ 4 แสดง Antimicrobial activity ของแบคทีเรียกรดแลคติกหมายเลข 14 (รูป 4 ค) จากรูปจะเห็นว่า isolate ที่ 14 มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *C. albicans* (ลูกศรชี้) เทียบกับ negative control (รูป 4 ก) และ isolate ที่ 1 (รูป 4 ข). Indicating strains เรียงลำดับจากบนลงล่าง คือ *E. coli*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *S. aureus* และ *M. luteus*

2.2 double-layer (overlay) โดยการขีดเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ไว้บนผิวจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS บ่มเพาะจนเพาะเชื้อที่ 37°C . เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นรดทับด้วย suspension ของเชื้อ *C. albicans* ใน Sabouraud dextrose broth (SDB) ที่มีวันผลสมอยู่ 0.7 % (ความขุ่นเทียบเท่า MacFarland No. 0.5) รอให้วันแข็งตัวแล้วนำไปบ่มไว้ที่ 37°C . เป็นเวลา 24 ชม สังเกตโดยดูรอยขีดเชื้อที่ติดกับแบคทีเรียกรดแลคติกว่ามีเชื้อเจริญขึ้นมาหรือไม่ ปรากฏว่าเชื้อทุก isolates สามารถยับยั้งเชื้อ indicating bacterial strains รวมทั้ง *C. albicans* ดังตารางที่ 5 และรูปที่ 5



รูปที่ 5 แสดงตัวอย่างของการทดสอบ antifungal activity ด้วยวิธี double layer. ขีดแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้บนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ยาวประมาณ 1 เซนติเมตร (ซม) บ่มใน candle jar ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 วัน แล้วนำมารดทับด้วย suspension ของเชื้อ *Candida albicans* นำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 วัน สังเกตการเกิด inhibition zone รอบรอยขีดของแบคทีเรียกรดแลคติก (จานเพาะเชื้อทางขวามือ) negative control คือ จานเพาะเชื้อทางซ้ายมือ (มีเฉพาะเชื้อ *Candida albicans*)

2.3 agar well diffusion assay โดยนำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถยับยั้งเชื้อ indicating bacterial strains รวมทั้ง *C. albicans* มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ปริมาตร 50 มล แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชม. จากนั้นนำมาแยกตะกอนเชื้อโดยการนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง refrigerated ultra centrifuge (Sorval) ที่ความเร็วรอบ 10000 rpm อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที แล้วทำการกรองส่วน supernatant culture broth ผ่านกระดาษกรองที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตร (มค.ม) จากนั้นนำไปหยอดใส่ลงในหลุมของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA ที่ได้ป้ายเชื้อ *C. albicans* ที่มีความขุ่นเทียบเท่ากับ Macfarland No.0.5 ไว้แล้วหลุมละ 100 มค.ล แล้วนำไปบ่มไว้ที่ 37°C นาน 24-48 ชม. สังเกตดู clear zone รอบหลุม ปรากฏว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทุก isolates สามารถยับยั้งเชื้อ indicating bacterial strains แต่จะมีเฉพาะ isolates ที่ 2, 4, 12-14, 24, 26, 31 และ C7 ที่สามารถยับยั้งการเจริญ *C. albicans* ดังตารางที่ 5 และรูปที่ 6



รูปที่ 6 แสดง inhibition zone (ลูกศรชี้) ต่อเชื้อ *C. albicans* ด้วยวิธี agar well diffusion. filtrate ของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS เป็นเวลา 2 วันและมี pH อยู่ในช่วง 3.25-4.01

3. ผลของ pH ต่อ antimicrobial activity

เนื่องจากการทดสอบ antimicrobial activity ของแบคทีเรียกรดแลคติก 3 วิธี กล่าวคือ streak plate, double layer และ agar well diffusion ปรากฏว่ามีเฉพาะแบคทีเรียกรดแลคติก หมายเลข 14 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ indicating bacterial strains รวมทั้ง *C. albicans* จากการทดสอบทั้ง 3 วิธี ดังแสดงในตารางที่ 1 จึงเลือกแบคทีเรียกรดแลคติก หมายเลข 14 มาทดสอบผลของ pH ต่อ antimicrobial activity โดยนำแบคทีเรียกรดแลคติก หมายเลข 14 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ปริมาตร 50 มล ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน แล้วทำการแยกเชื้อด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที จากนั้นนำ supernatant culture broth ไปทำการระเหยน้ำที่ 50°C. เพื่อให้มีปริมาตรลดลงครึ่งหนึ่งและให้ปรับ pH ก่อนนำมาหยอดลงในหลุม แล้วบันทึกการเกิด clear zone ปรากฏว่า supernatant culture broth จากแบคทีเรียกรดแลคติก หมายเลข 14 มี pH หลังจากเลี้ยงเชื้อไว้ 2 วัน และทำการระเหยน้ำ มีค่าเท่ากับ 4.01 ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *C. albicans* จากนั้นทำการปรับ pH ให้มีค่าอยู่ระหว่าง 2.5-10.0 ปรากฏว่า pH ที่สารยังมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *C. albicans* อยู่ในช่วง 2.5-3.5 และเมื่อปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับค่าตั้งต้น (pH 4.01) พบว่ายังคงมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* และเมื่อนำ supernatant culture broth ดังกล่าวไป autoclave (121°C. 15 นาที) พบว่า supernatant culture broth ยังคงมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ดังแสดงในตารางที่

ตารางที่ 6 แสดงผลของ pH ต่อการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ของ supernatant culture broth จากแบคทีเรียกรดแลคติก หมายเลข 14

Isolate ที่	pH	การยับยั้งเชื้อ <i>C. albicans</i>
14	ตั้งต้น 4.01	+
	2.5	+
	3.0	+
	3.5	+
	4.0	+
	4.5	-
	5.0	-
	5.5	-
	6.5	-
	7.0	-
	8.0	-
	9.0	-
	10.0	-
		-

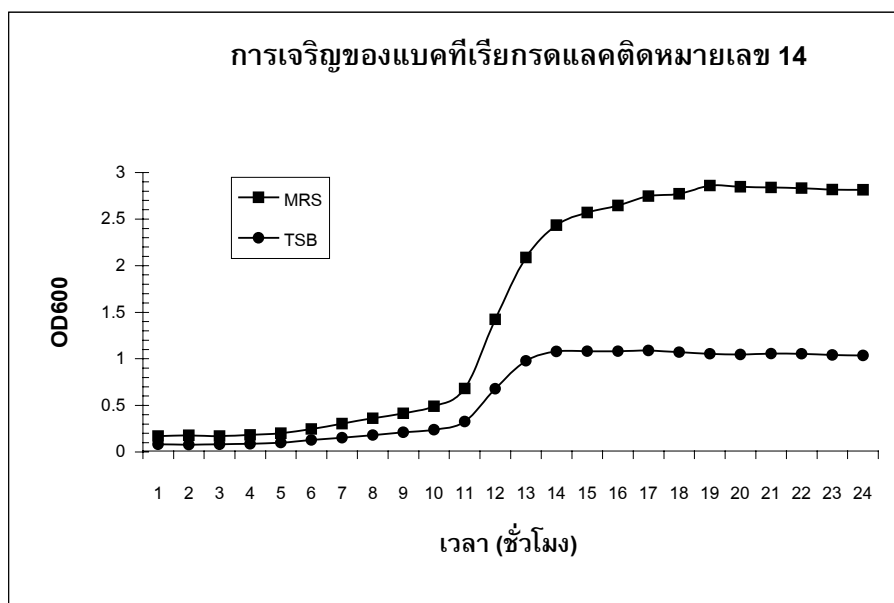
+ มีฤทธิ์; - ไม่มีฤทธิ์

4. ผลการทดสอบการถ่ายยีนโคติเนสเข้าสู่แบคทีเรียกรดแลคติก

4.1 เพื่อเตรียมเซลล์เจ้าบ้าน (host) ให้เหมาะสมกับการถ่ายยีนพลาสมิดลูกผสมโคติเนสเข้าสู่แบคทีเรียกรดแลคติกหมายเลข 14 ด้วยวิธี electroporation (Bio-Rad) จึงได้ทดลองเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกดังกล่าวในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 2 ชนิด คือ TSB หรือ MRS ปริมาตร 100 มล โดยให้ความเข้มข้นของเชื้อตั้งต้นเทียบเท่าความขุ่น MacFarland No.0.5 แล้วบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C ด้วย shaking incubator ความเร็วรอบประมาณ 100 rpm จากนั้นเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อในเวลา 32 ชม ปรากฏว่าแบคทีเรียกรดแลคติกหมายเลข 14 สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ได้ดีกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB โดยสังเกตค่าดูดกลืนแสงจากการนำ suspension ของเชื้อแต่ละช่วงที่ความยาวคลื่น (λ) 600 นาโนเมตร (nm.) (OD600) ดังแสดงในตารางที่ 7 และสามารถนำมาสร้างกราฟเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อได้ ดังรูปที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกหมายเลข 14 ที่บ่มเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ
เหลว TSB หรือ MRS ที่อุณหภูมิ 37^oซ ใน shaking incubator เป็นเวลา 32 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าการดูดกลืนแสง (OD600)	
	TSB	MRS
0	0.082	0.089
0.5	0.079	0.099
1	0.084	0.087
1.5	0.088	0.096
2	0.101	0.101
2.5	0.127	0.120
3	0.154	0.150
3.5	0.180	0.181
4	0.211	0.204
4.5	0.238	0.253
5	0.327	0.355
6	0.678	0.746
7	0.977	1.110
8	1.078	1.356
9	1.081	1.489
10	1.081	1.565
11	1.088	1.657
12	1.070	1.700
23	1.054	1.804
24	1.047	1.799
26	1.055	1.783
28	1.053	1.778
30	1.040	1.777
32	1.037	1.776



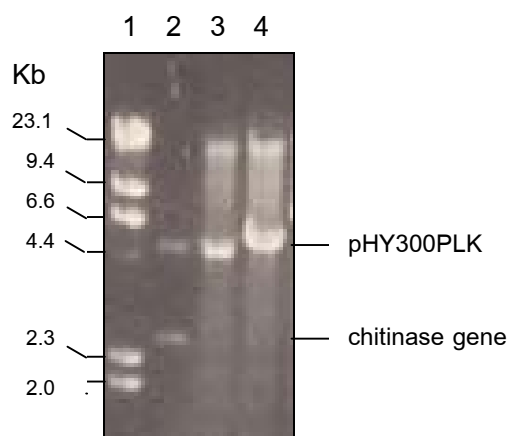
รูปที่ 7 เปรียบเทียบการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกหมายเลข 14 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSB หรือ MRS ที่อุณหภูมิ 37°C ใน shaking incubator เป็นเวลา 32 ชั่วโมง

จากตารางจะเห็นว่าในการเตรียมแบคทีเรียกรดแลคติกเพื่อใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้าน (host) เพื่อใช้ในการถ่ายยีนพลาสมิดลูกผสมโคติเนสควรมีเชื้อเป็นเวลา 6-8 ชั่วโมงเพื่อให้เชื้อเจริญอยู่ในช่วง mid-logarithmic phase และควรเลี้ยงใน MRS broth ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมของแบคทีเรียกรดแลคติก

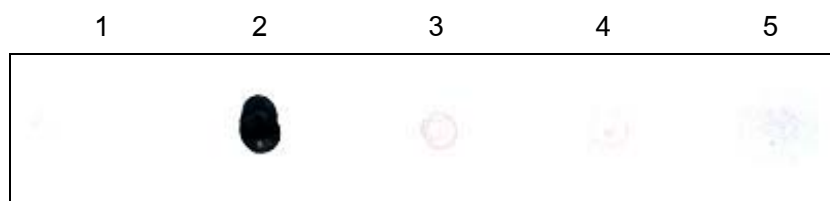
4.2 การยืนยันพลาสมิดลูกผสมและการแสดงออกของยีนโคติเนสใน transformants Lactic Acid Bacteria (tLAB) หมายเลข 14

4.2.1 การยืนยันด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III และ dot blot hybridization

เมื่อทำการเตรียมเซลล์เจ้าบ้านตามขั้นตอนที่เหมาะสมแล้วทำการถ่ายทอดพลาสมิดลูกผสมโคติเนสเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านและทำการคัดเลือก tLAB ในจานเพาะเชื้อ MRS ที่ผสมยาปฏิชีวนะเตตราซัยคลิน (Tc) ความเข้มข้น 15 มก.ก/มล ได้แล้ว จึงสุ่มเลือก tLAB ดังกล่าวมาสกัดพลาสมิดด้วยวิธี alkaline lysis แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III ปรากฏว่าส่วนของยีนโคติเนสในพลาสมิดลูกผสมโคติเนสถูกตัดย่อยไปคงเหลือเฉพาะส่วนของพลาสมิดพาหะ (plasmid vector) pHY300PLK ดังแสดงในรูปที่ 8 จึงได้ทำการยืนยันการคงอยู่ของพลาสมิดลูกผสมด้วยวิธี dot blot hybridization อีกครั้งหนึ่งโดยใช้ส่วนของยีนโคติเนสเป็น DNA ติดตาม (DNA probe) ปรากฏว่าไม่เกิด positive dot blot ขึ้นตรงตำแหน่งของ tLAB ดังแสดงในรูปที่ 9



รูปที่ 8 electrophoretic patterns ของพลาสมิดที่สกัดได้จาก tLAB และตัดด้วย restriction enzyme *HindIII*. Lane 1, lambda DNA; lane 2, พลาสมิดลูกผสมไคติเนส pHYB43; lane 3 และ 4, พลาสมิดที่สกัดได้จาก tLAB หมายเลข 14.1 และ 14.2 ตามลำดับ. พลาสมิดทั้งหมดถูกตัดด้วย restriction enzyme *HindIII*



รูปที่ 9 dot blot hybridization. หลังจากการสกัดพลาสมิดลูกผสมไคติเนสจาก tLAB ด้วยวิธี alkaline lysis แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปหยดลงบน nylon membrane ปล่อยให้แห้งและอบที่อุณหภูมิ 80°C แล้วนำมาทำปฏิกิริยา hybridization ด้วยชุดทดสอบ DIG-DNA Labeling and Detection kit (Boeringer-Mannheim) ปรากฏว่าจะมีเฉพาะ dot ที่ 2 (พลาสมิดลูกผสมไคติเนส pHYB43) ที่ปรากฏผลบวกโดยให้เป็นจุดสีเข้มปรากฏขึ้นมา สำหรับ dot ที่ 1 คือแบคทีเรียกรดแลคติกหมายเลข 14, dot ที่ 3-5 คือ พลาสมิดพาหะ pHY300PLK, พลาสมิดที่สกัดได้จาก tLAB หมายเลข 14.1 และ 14.2 ตามลำดับ

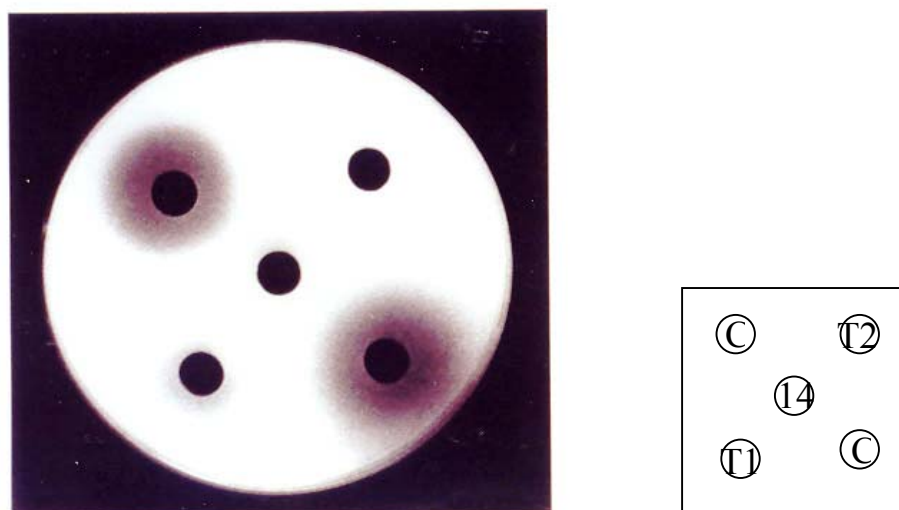
4.2.2 การทดสอบการแสดงออกของยีนไคติเนส

4.2.2.1 การทดสอบด้วยการขยี้เซลล์

เมื่อนำโคโลนีแบคทีเรียกรดแลกติกหมายเลข 14 หรือ tLAB หรือ transformed *E. coli* (pHYB43) (Positive control) มาขยี้ด้วยแท่งแก้วบนกระดาษกรอง Whatman No. 1 แล้วหยดทับด้วย 4-MUG substrate (active substrate) จากนั้นนำไปตรวจดูการเรืองแสงสีฟ้าปนขาวภายใต้เครื่อง UV Transilluminator ปรากฏว่ามีเฉพาะ transformed *E. coli* (pHYB43) ที่ปรากฏเรืองแสงสีฟ้าสว่าง

4.2.2.2 การทดสอบด้วย agar well diffusion

จากการทดสอบ activity ของเอนไซม์ไคติเนสที่ผลิตจาก tLAB ด้วยวิธี agar well diffusion โดยใช้ส่วนใส (filtrate หรือ culture supernatant) ที่ได้จากการเลี้ยง tLAB หมายเลข 14.1 หรือ 14.2 หรือ transformed *Bacillus subtilis* (pHYB43) (positive control) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS หรือ Luria-Bertani (LB) ตามลำดับ ปริมาตร 100 มล. หยดลงในหลุม 0.05% glycol chitin plate ปรากฏว่ามีเฉพาะ culture supernatant จาก transformed *B. subtilis* (pHYB43) ที่แสดงการย่อย glycol chitin โดยให้ผลเป็นวง halo zone (วงสีดำ) ปรากฏอยู่รอบหลุม ดังรูปที่ 10



รูปที่ 10 การทดสอบคุณสมบัติของไคติเนสด้วยวิธี agar well diffusion. นำ filtrate จากการเพาะเลี้ยงเชื้อมาหยดลงในหลุมในจาน glycol chitin แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37°C. จากนั้นนำมาขยี้ด้วย Calcochlor White M2R แล้วล้างออกด้วยน้ำสะอาด นำไปส่องดูด้วย UV transilluminator. C, positive control; 14, แบคทีเรียกรดแลกติกหมายเลข 14; T1 และ T2, transformed แบคทีเรียกรดแลกติก หมายเลข 14.1 และ 14.2 ตามลำดับ

5. การทดสอบฤทธิ์ร่วมกันของเอนไซม์โคติเนส, แบคทีเรียกรดแลคติก หรือยาแอมโฟเทอริซิน

5.1 การทดสอบฤทธิ์ของ tLAB ต่อการยับยั้ง indicating strains ด้วยวิธี agar well diffusion

จากการทดสอบการออกฤทธิ์ร่วมกันของโคติเนสและกรดแลคติกที่สร้างจาก tLAB ด้วยวิธี agar well diffusion โดยใช้ indicating strains กล่าวคือ *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *Micrococcus luteus*, *Candida albicans* และ *E. coli* ที่มีความเข้มข้นเทียบเท่า MacFarland No.0.5 มาป้ายให้เต็มพื้นผิวจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Brain Heart Infusion (BHI) ด้วยสำลีพันก้านไม้ (swab) ปรากฏว่าไม่มีผลการยับยั้ง indicating strains ให้เห็นอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับระหว่างเซลล์เจ้าบ้าน (แบคทีเรียกรดแลคติก) และ transformed cells (tLAB หมายเลข 14.1 หรือ 14.2) ซึ่งแสดงขนาดของ clear zone ที่ได้ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงผลการทดสอบการออกฤทธิ์ร่วมกันของเอนไซม์โคติเนสและกรดแลคติกที่สร้างจาก transformants ด้วยวิธี agar well diffusion

ส่วนใสจาก	Clear zone (cm)					
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>M. luteus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>E. coli</i>
แบคทีเรียกรดแลคติก หมายเลข 14	1.5	1.5	2.0	2.2	-	1.2
tLAB หมายเลขที่ 14.1	1.4	1.4	1.5	2.5	-	1.2
tLAB หมายเลขที่ 14.2	1.45	1.7	1.8	2.4	-	1.2
transformed <i>B.subtilis</i>	-	-	-	-	-	-
Control (MRS Broth)	-	-	-	-	-	-

- ไม่เกิด clear zone

tLAB, transformed Lactic Acid Bacteria

5.2 การศึกษาฤทธิ์ร่วมกันของเอนไซม์โคติเนสและ AmpB ด้วยวิธี micro dilution plate

จากการนำเชื้อ *Candida albicans* TISTR 5239 เพาะเลี้ยงเชื้อบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง SDA แล้วนำไปหมักเพาะที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชม. เพื่อให้ได้โคโลนีขนาดเล็กซึ่งคาดว่าจะว่าผนังเซลล์ยังอ่อนเพื่อนำมาปรับให้มีความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 10^3 CFU/ml ก่อนนำมาทดสอบการออกฤทธิ์ร่วมกันของเอนไซม์โคติเนสและ AmpB ซึ่งแยกแสดงผลได้ดังนี้

5.2.1 ค่า MIC และ MFC ของยาแอมโฟเทอริซิน บี

เตรียม AmpB ด้วย 5% dextrose ก่อนนำไปใช้แล้วนำมาทำ two fold serial dilution เพื่อหาค่า MIC (รายละเอียดอ่านในวิธีการทดลอง) ซึ่งมีรายละเอียดโดยย่อดังนี้ : เริ่มจากเติม SDB หลุมละ 100 มค.ล ลงในหลุมที่ 2-15 ของ microtiter plate จากนั้นเติมยา AmpB (ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 0.1 mg/ml) ลงในหลุมที่ 1 และ 2 หลุมละ 100 มค.ล ดูดส่วนผสมจากหลุมที่ 2 ไปหลุมที่ 3 ปริมาตร 100 มค.ล ทำต่อไปเรื่อย ๆ จนถึงหลุมที่ 14 แล้วดูดทิ้งไป 100 มค.ล เติมเชื้อที่เตรียมไว้ข้างต้นในข้อ 5.2 ลงในหลุม ๆ ละ 100 มค.ล ทุกหลุม ดังนั้นหลุมที่ 15 จะเป็น control ที่มีเฉพาะเชื้อและ SDB นำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 35-37°C เป็นเวลา 24 ชม. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสง (ความขุ่น) ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (nm) ปรากฏว่าความเข้มข้นต่ำสุดของ AmpB ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) *C. albicans* เท่ากับ 9.76×10^{-5} มก/มล ดังแสดงในตารางที่ 9 และเมื่อนำเชื้อจากไมโครเพลตปริมาตร 100 มค.ล มากระจายลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง SDA นำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 35-37°C เป็นเวลา 24 ชม. ปรากฏว่าความเข้มข้นต่ำสุดของ AmpB ที่สามารถฆ่าเชื้อ *C. albicans* มีความเข้มข้นเท่ากับ 1.95×10^{-4} มก/มล

5.2.2 ค่า MIC และ MFC ของเอนไซม์โคติเนส

จากการนำเชื้อ *Candida albicans* TISTR 5239 ที่เตรียมไว้ข้างต้น มาทดสอบหาค่า MIC และ MFC ของเอนไซม์โคติเนส โดยเริ่มจากเติม SDB หลุมละ 100 มค.ล ลงในหลุมที่ 2-16 ของ microtiter plate จากนั้นเติมเอนไซม์โคติเนสที่มีความเข้มข้นตั้งต้นที่ 2 มิลลิยูนิต ลงในหลุมที่ 1 และ 2 หลุมละ 100 มค.ล ดูดส่วนผสมจากหลุมที่ 2 ไปหลุมที่ 3 ปริมาตร 100 มค.ล ทำต่อไปเรื่อย ๆ จนถึงหลุมที่ 5 แล้วดูดทิ้งไป 100 มค.ล เติมเชื้อที่เตรียมไว้ข้างต้นลงในหลุม ๆ ละ 100 มค.ล นำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 35-37°C นำไปวัดความขุ่นด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 nm พบว่าไม่สามารถหาค่า MIC ของเอนไซม์โคติเนสได้เนื่องจากพบว่าวัดความขุ่นได้ทุกหลุมที่ทำการทดสอบแสดงว่ามีการเจริญของเชื้อ *C. albicans* ดังแสดงไว้ในตารางที่ 9 นอกจากนี้ยังไม่พบค่า MFC ของเอนไซม์โคติเนสต่อ *C. albicans*

5.2.3 ค่า MIC และ MFC ของ AmpB ร่วมกับเอนไซม์โคติเนสต่อเชื้อ *C. albicans*

จากการนำเชื้อ *C. albicans* TISTR 5239 มาทำการทดสอบหาค่า MIC โดยทำการเจือจาง AmpB ให้มีความเข้มข้น 4.88×10^{-5} มก/มล ผสมลงใน SDB จากนั้นนำไปใส่ลงใน microtiter plate ในหลุมที่ 1-16 หลุมละ 100 มค.ล จากนั้นเติมเอนไซม์โคติเนสลงในหลุมที่ 1 และ 2 หลุมละ 100 มค.ล ดูดส่วนผสมจากหลุมที่ 2 ไปหลุมที่ 3 ปริมาตร 100 มค.ล ทำต่อไปเรื่อย ๆ จนถึงหลุมที่ 15 แล้วดูดทิ้งไป 100 มค.ล เติมเชื้อที่เจือจางลงในหลุม ๆ ละ 100 มค.ล ทุกหลุม นำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 35-37°C นำไปวัดความขุ่นด้วยเครื่อง Spectrophotometer

ที่ความยาวคลื่น 600 nm ปรากฏว่าระดับความขุ่นที่ตรวจวัดได้จะมีระดับลดลงแต่ยังไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดังที่แสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 9 ค่า MIC ของ AmpB หรือเอนไซม์ไคติเนสต่อ *C. albicans*

หลุม	[AmpB] มก/มล	OD600	[Chi] มิลลิยูนิต	OD600	OD600* [Amp] + [Chi]
1	0.10	0	2.00	0.117	0.072
2	0.05	0	1.00	0.270	0.099
3	0.25×10^{-1}	0	0.50	0.297	0.117
4	1.25×10^{-2}	0	0.25	0.414	0.126
5	6.25×10^{-3}	0	0.13	0.459	0.162
6	3.12×10^{-3}	0	6.25×10^{-2}	0.621	0.243
7	1.56×10^{-3}	0	3.13×10^{-2}	0.783	0.351
8	7.81×10^{-4}	0	1.56×10^{-2}	0.837	0.414
9	3.91×10^{-4}	0	7.81×10^{-3}	0.999	0.549
10	1.95×10^{-4}	0	3.91×10^{-3}	1.116	0.765
11	9.76×10^{-5}	0	1.95×10^{-3}	1.242	0.990
12	4.88×10^{-5}	0.126	9.77×10^{-4}	1.431	1.089
13	2.44×10^{-5}	0.342	4.88×10^{-4}	1.593	1.341
14	1.22×10^{-5}	0.756	2.44×10^{-4}	1.701	1.530
15	6.10×10^{-5}	1.368	1.22×10^{-4}	1.755	1.665
16	0.00	1.836	0.00	1.872	1.863

* ความเข้มข้นของ AmpB ที่ใช้ร่วมกับเอนไซม์ไคติเนสคือ 4.88×10^{-5} มก/มล.

Chi, เอนไซม์ไคติเนส

เมื่อเปรียบเทียบค่า OD600 ที่วัดได้ ปรากฏว่าค่า OD600 ในหลุมที่ 9 ของการใช้เอนไซม์ไคติเนสอย่างเดียว (ระดับของเอนไซม์ที่ไม่มีผลต่อการเจริญของ *C. albicans*) เปรียบเทียบกับการใช้ AmpB ร่วมกับเอนไซม์ไคติเนสพบว่ามีค่า OD600 ลดลงจาก 0.945 เป็น 0.666 เช่นเดียวกับในหลุมที่ 11 ของการใช้เอนไซม์ไคติเนสอย่างเดียวกับการใช้ยา AmpB ร่วมกับไคติเนส ซึ่งเป็นหลุมแรกๆ ที่เห็นการเกาะกลุ่มสมบูรณ์ มีค่า OD600 ลดลงจาก 1.197 เป็น 1.004 แสดงให้เห็นว่าการใช้ AmpB ร่วมกับเอนไซม์ไคติเนสมีผลทำให้การเจริญของเชื้อ *C. albicans* ลดลงจึงสามารถวัดความขุ่นได้ในระดับที่ต่ำลงไปดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบค่า MIC ด้วยการวัดความขุ่น OD600 ของ AmpB, เอนไซม์ไคตินเนส (Chi) และ AmpB ร่วมกับ Chi

หลุม	OD600 (ค่าเฉลี่ย)		
	AmpB	Chi	AmpB+Chi
1	0	0.113	0.077
2	0	0.261	0.105
3	0	0.302	0.122
4	0	0.428	0.135
5	0	0.473	0.178
6	0	0.617	0.293
7	0	0.729	0.369
8	0	0.810	0.473
9	0	0.945	0.666
10	0	1.080	0.815
11	0	1.197	1.004
12	0.140	1.386	1.125
13	0.373	1.580	1.386
14	0.792	1.742	1.557
15	1.386	1.778	1.679
16	1.841	1.868	1.859

จากนั้นเปรียบเทียบการอ่านค่า MIC ด้วยการดูขนาดเม็ดกระดุมในการเกาะกลุ่มของเชื้อ *C. albicans* ที่กันหลุม microtiter plate เปรียบเทียบผลระหว่างการใช้เฉพาะ AmpB เฉพาะเอนไซม์ไคตินเนส (Chi) และ AmpB+Chi (เบื้องต้นพบว่า OD600 ต่างกัน : ตารางที่ 10) โดยเปรียบเทียบผลการออกฤทธิ์ร่วมกันโดยใช้หลักดังนี้

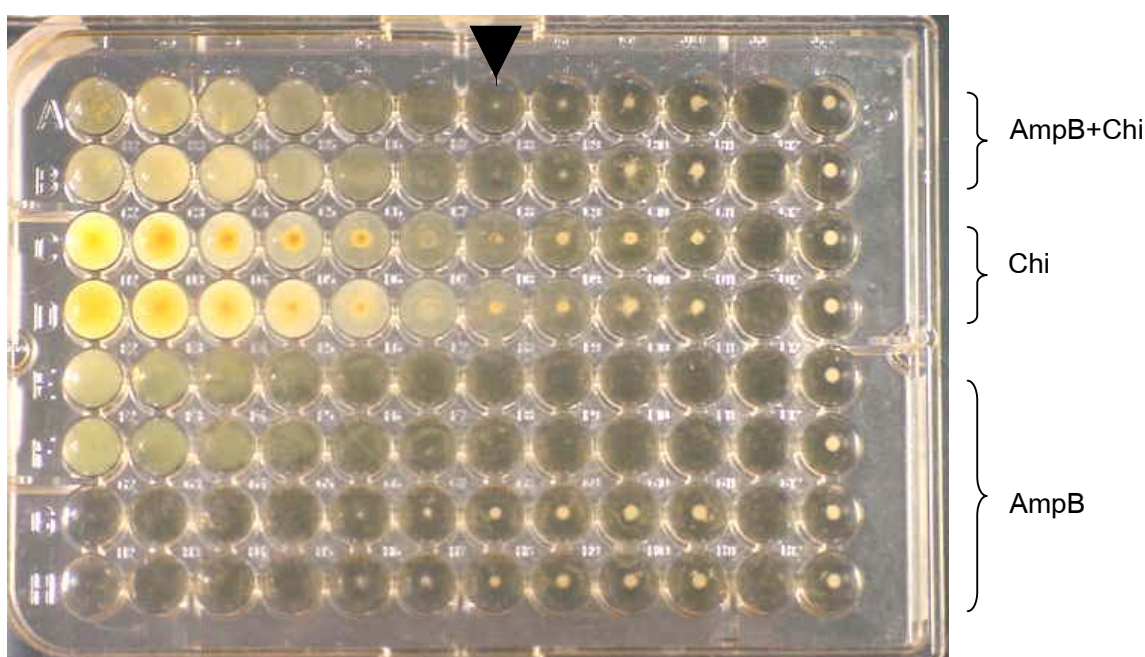
ตะกอนเกาะกลุ่ม 100 %	อ่านได้ 4+
ตะกอนเกาะกลุ่ม 75 %	อ่านได้ 3+
ตะกอนเกาะกลุ่ม 50 %	อ่านได้ 2+
ตะกอนเกาะกลุ่ม 25 %	อ่านได้ 1+
ตะกอนเกาะกลุ่ม <25 % และสารละลายขุ่น	อ่านได้ -/+
ไม่มีตะกอน-สารละลายใส	อ่านได้ -

ตารางที่ 11 การเกิดตะกอนเกาะกลุ่มจากการใช้เฉพาะ AmpB, เฉพาะ Chi หรือ AmpB+Chi ใน microtiter plate ด้วยเทคนิค microdilution plate

สาร	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
AmpB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3+	4+	4+	4+	4+
Chi	2+	2+	3+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
AmpB+Chi	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	1+	2+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+

AmpB, แอมโพลีเทอรีซิน บี; Chi, เอนไซม์ไคตินเนส

จากการอ่านผลการทดสอบโดยดูการเกาะกลุ่มตะกอน ปรากฏว่าทุกความเข้มข้นจากการใช้เฉพาะเอนไซม์ไคตินเนสจะเห็นการเกาะกลุ่มเป็นเม็ดกระดุมถึง 100% (4+) แสดงว่าไม่พบค่า MIC ต่อเชื้อจากการใช้เฉพาะเอนไซม์ไคตินเนส แต่เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ AmpB ร่วมกับเอนไซม์ไคตินเนส (AmpB+Chi) จะเห็นว่าเม็ดกระดุมจะเริ่มชัดเจนที่หลุมที่ 7 แสดงว่าการใช้ AmpB+Chi มีผลทำให้การเจริญของเชื้อลดลง แสดงในรูปที่ 11 และตารางที่ 11



รูปที่ 11 ผลการทดสอบ MIC ของ AmpB+เอนไซม์ไคตินเนส (Chi) จาก microtiter plate เห็นการเกาะกลุ่มเป็นเม็ดกระดุมชัดเจนเริ่มที่หลุมที่ 7 (ลูกศรชี้ : แถวที่ 1 และ 2) แต่หากใช้เอนไซม์ไคตินเนสเพียงอย่างเดียวจะเห็นเม็ดกระดุมตั้งแต่หลุมที่ 1 (แถวที่ 3 และ 4)

บทที่ 5

บทย่อ อภิปรายผลและสรุปผล

จุดมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า

1. เพื่อตรวจหาและคัดเลือกเชื้อกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์อาหารหมักชนิดต่างๆ
2. เพื่อศึกษาการแสดงออกของพลาสมิดลูกผสมจีนไคติเนสในแบคทีเรียกรดแลคติก
3. เพื่อศึกษาการตรวจสอบสารตามต้องการที่เชื้อผลิต

ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า

1. ทำการคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งกลุ่มเชื้อที่ใช้เป็น indicating strains กล่าวคือ

Lactobacillus plantarum ATCC 8014 (TISTR 050)

Bacillus subtilis ATCC 6633 (TISTR 008)

Candida albicans DSM 70014 (TISTR 5239)

Escherichia coli ATCC 25922 (TISTR 887)

Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027 (TISTR 781)

Staphylococcus aureus ATCC 25923 (TISTR 517)

2. ศึกษาการการแสดงออกของจีนไคติเนส (ทางคุณภาพ) ในแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 1.

วิธีดำเนินการทดลอง

- I. การศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติก
 1. การคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อแลคโตบาซิลลัสจากผลิตภัณฑ์อาหารหมักโดยวิธีกระจายเชื้อบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Mann Rogosa Shane (MRS)
 2. การทดสอบความสามารถในการเกาะติดพื้นผิว (colonization) โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS แล้วสังเกตการเกาะติดผิวหลอด
 3. การศึกษา Antimicrobial spectrum โดยวิธี overlay, streak plate และ agar well diffusion

II. การถ่ายยีนไคติเนสเข้าสู่แบคทีเรียกรดแลคติก

1. การเตรียม intact cell ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้จาก I. เป็นเซลล์เจ้าบ้าน
2. การนำพลาสมิดลูกผสมยีนไคติเนสเข้าสู่แบคทีเรียกรดแลคติกด้วยเทคนิค electroporation
3. การศึกษา stability ของพลาสมิดลูกผสมไคติเนส transformed แบคทีเรียกรดแลคติกด้วยวิธี restriction enzyme analysis ด้วย *HindIII*
4. ศึกษาการแสดงออกของยีนไคติเนสด้วยวิธีออบโคโลนีด้วยไฮคลอโรฟอร์มแล้ววาดทับด้วยวุ้น 0.7% ผสม 4-methylumbelliferyl- β -D-N,N'-diacetylchitobioside (4-MUG) และ agar well diffusion ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 0.1% glycol chitin ย้อมด้วยสี Calcoflour white M2R

III. การศึกษาฤทธิ์ร่วมกันของไคติเนส แบคทีเรียกรดแลคติก หรือยาแอมโฟเทอริซิน บี

1. การทดสอบอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ ที่นำมาใช้ในการทดลองต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก
2. ศึกษาผลของเอนไซม์ไคติเนสร่วมกับแบคทีเรียกรดแลคติกหรือยาแอมโฟเทอริซิน บี ต่อเชื้อ *C. albicans* ด้วยวิธี broth microdilution plate

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

1. antiimicrobial activity สังเกตได้จากการเกิดวงใสของ indicating strains รอบโคโลนีแบคทีเรียกรดแลคติก
2. chitinase activity สังเกตจากการเกิด
 - 2.1 เรืองแสงสีฟ้าสว่างรอบโคโลนีเมื่อใช้สาร 4-MUG
 - 2.2 halo zone รอบหลุมที่ทำการหยด filtrate เมื่อย้อมด้วย calcoflour white M2R
3. การเปรียบเทียบฤทธิ์ของเอนไซม์ไคติเนสหรือยาแอมโฟเทอริซิน บี หรือฤทธิ์ร่วมกันด้วยวิธี broth microdilution plate ให้อ่านจากค่าความขุ่นที่ OD600 และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ (MIC) รวมทั้งสังเกตขนาดของเม็ดกระดุมที่เกิดจากการเกาะกลุ่มของเชื้อใน microtiter plate

อภิปรายผลการทดลอง

1. การศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติก

1.1 คุณสมบัติเบื้องต้น

จากผลการคัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกจากอาหารหมักประเภทต่างๆ พบว่ามีเชื้อเจริญในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ซึ่งเป็นอาหารที่ใช้สำหรับคัดเลือก (selective media) แบคทีเรียกรดแลคติก (ซุตินันท์, 2545) ซึ่งมีลักษณะทาง Macroscopic คือ โคลนีขาว ชุ่ม กลมมน ขอบเรียบ ส่วนลักษณะทาง Microscopic กล่าวคือแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน ไม่สร้างสปอร์ (catalase test = Negative, Gram strain = Positive bacilli, non-spore forming) และเมื่อคัดเลือกโคลนีของเชื้อทั้ง 40 โคลนี นำไปทดสอบ antimicrobial activity โดยใช้เชื้อทดสอบ คือ *L. plantarum*, *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* และ *C. albicans* พบว่าให้ผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่นำมาเป็นเชื้อดัชนีได้ทั้งหมด การที่เชื้อแต่ละ isolates มีคุณสมบัติ antimicrobial แตกต่างกันอาจเนื่องมาจากหลายปัจจัยด้วยกัน อาทิ เช่น ระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์แบคทีเรีย องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงเชื้อ (Batish et.al, 1997; Harlander, 1993) และความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งอาจปรับปรุงได้โดยใช้อาหาร MRS ที่มีน้ำตาลกลูโคสเพียง 0.2% (MRS 0.2%) เพื่อลดการเกิดกรดของอาหาร (วิลาวณีย์, 2542) นอกจากนี้อาจขึ้นอยู่กับปัจจัยสำคัญคือสายพันธุ์ของเชื้อที่แยกได้ซึ่งอาจอยู่ในกลุ่มของ homofermentative lactic acid bacteria ซึ่งสามารถหมักน้ำตาลแล้วให้กรดแลคติกเพียงอย่างเดียว (ร้อยละ 85-95) (ปาริชาติ, 2543) จึงทำให้ความเข้มข้นของสารยับยั้งอื่นมีน้อย นอกจากนี้การทดสอบฤทธิ์ด้วยวิธี agar well diffusion มีข้อจำกัดในด้านการแพร่ของสารสกัดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และขนาดโมเลกุลของสารแบคทีเรียโอซิน ดังนั้น ควรทดสอบเพิ่มเติมด้วยวิธี broth dilution เพื่อเป็นการยืนยันผลการทดสอบอีกครั้งหนึ่ง (ซุตินันท์, 2545)

การทดสอบความสามารถในการเกาะติดพื้นผิวของเชื้อที่คัดเลือกได้พบว่ามีเชื้อเพียงบาง isolates ที่ยึดเกาะติดพื้นผิวได้ ซึ่งอาจเนื่องมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ไม่เหมาะสมและ/หรือขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของเชื้อเองซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการมีแคปซูลหรือพิลิ (pili) ของเชื้อ โดย โครงสร้างทั้ง 2 ชนิดได้ถูกรายงานว่าเกี่ยวข้องกับการเกาะกลุ่มของเชื้อและมีความเกี่ยวข้องกับการก่อโรค (นริกุล และคณะ, 2526)

1.2 คุณสมบัติการยับยั้งเชื้อรา *C. albicans*

การยับยั้งกลุ่มแบคทีเรียโดยแบคทีเรียกรดแลคติกได้มีรายงานมากมาย แต่ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรายังพบมีรายงานอยู่น้อย (Batish et.al, 1997) ซึ่งโดยส่วนใหญ่จะพบในกลุ่มของ heterofermentative lactic acid bacteria โดยเป็นคุณสมบัติส่วนใหญ่ของกรดแลคติกหรืออะซิติก (Rocken, 1996) รวมถึง metabolites ต่างๆ (Corsetti et.al., 1998; Niku-Paavola et.al., 1999) หรือเป็นการทำงานร่วมกันของกรดแลคติกที่ผลิตมาจากแบคทีเรียกรดแลคติกกับกรดอะซิติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS (Cabo et.al., 2002) ซึ่งในการทดลองนี้พบว่าแบคทีเรียกรด

แลคติกหมายเลข 14 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราเมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี streak plate, overlay และ agar well diffusion แต่เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกหมายเลข 14 หรือ filtrate ที่เก็บรักษาใน -20°C มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราปรากฏว่ามีการสูญเสียฤทธิ์ไปซึ่งไม่ทราบเหตุผลแน่ชัดซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Magnusson and Schnurer (2001), Magnusson et.al. (2003) แต่อาจเนื่องมาจากการบวนการตกตะกอนเสียสภาพที่ไม่สามารถเปลี่ยนกลับมารูปแบบเดิม (irreversible precipitation-denaturation process) สืบเนื่องมาจาก freeze-thaw และโดยทั่วไปแล้วแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่ม *L. plantarum*, *L. coryniformis* มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (Magnusson et.al. 2003) โดยคาดว่าแบคทีเรียกรดแลคติกหมายเลข 14 น่าจะอยู่ในสกุล *Lactobacillus* species เช่นกันเนื่องจากย้อมติดสีแกรมบวกรูปร่างท่อนไม่มีสปอร์

แบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักดองมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่นำมาใช้เป็นดัชนีรวมทั้งแบคทีเรียกรดแลคติกหมายเลข 14 ซึ่งอาจเนื่องมาจากการดอินทรีย์ที่เชื้อสร้างขึ้นมาหรือสารอื่นๆ เช่นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไตอะซิดิล อะเซทาลดีไฮด์ รุเทอรินและแบคเทอริโอซิน เป็นต้น (ปาริชาติและพงศ์ศักดิ์, 2543; ปาริชาติและคณะ, 2543; ชูตินันท์และคณะ, 2545) แต่มีเฉพาะแบคทีเรียกรดแลคติกหมายเลข 14 ที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราโดยมีรายงานว่ากรดอินทรีย์แสดงคุณสมบัติดังกล่าว (Corsetti et.al., 1998) ดังนั้นเพื่อยืนยันข้อความดังกล่าวจึงได้ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 2.5-11.0 ซึ่งฤทธิ์จะยังคงอยู่ในช่วงที่ pH เป็นกรดแสดงว่ากรดอินทรีย์มีบทบาทดังกล่าว อย่างไรก็ตามได้มีรายงานว่ารุเทอรินก็มีบทบาทในการยับยั้งเชื้อราเช่นกัน (Daeschel, 1989)

2. การแสดงออกของจีนโคติเนสในแบคทีเรียกรดแลคติกหมายเลข 14

ปัญหาที่พบได้บ่อยที่สุดของการถ่ายทอดยีนต่างชนิด (heterologous gene) เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (host) ใหม่ ก็คือการไม่เสถียรของจีน (gene instability) หรือไม่สามารถถ่ายทอดไปยังเซลล์รุ่นลูกได้ (segregational instability) (Uhlen et. al., 1981; Ostroff and Pene, 1984) โดยได้มีรายงานการวิจัยหลายฉบับเกี่ยวกับปัจจัยที่มีผลต่อการคงอยู่ของพลาสมิดในเซลล์เจ้าบ้านว่าขึ้นอยู่กับอุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง สายพันธุ์ของเชื้อที่นำมาเป็นเซลล์เจ้าบ้าน ขนาดและคุณสมบัติของพลาสมิด คุณสมบัติของอาหารเลี้ยงเชื้อ แหล่งของพลาสมิด เป็นต้น (Gamel and Piot, 1992; Brigidi et al., 1996) รวมถึงการแสดงออกของจีนที่อาจเป็นพิษต่อเซลล์ทำให้พลาสมิดถูกกำจัดออกไป (Mari et. al., 1999; Vassileva-Atanasova et. al., 1999) หรืออาจเนื่องมาจากการใช้เชื้อเริ่มต้นในการบ่มเลี้ยงไม่เท่ากัน (Brigidi et. al., 1996) นอกจากนี้ instability ยังเกี่ยวข้องกับการที่พลาสมิดพาหะมีชิ้นจีนสอดใส่เข้าไป (inserted gene) (Gruss and Ehrlich, 1988) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองนี้ที่ตรวจพบว่าการตัดชิ้นส่วนของจีนโคติเนสออกไปเพื่อให้เหลือขนาดพลาสมิดที่พอเหมาะต่อการคงอยู่ในเซลล์เจ้าบ้านหรือในอีกกรณีหนึ่งก็คือเพื่อให้ transformed cells ของแบคทีเรียกรดแลคติกเจริญได้ในจานเพาะเชื้อที่มียา

ปฏิชีวนะเตตราซัยคลิน (Tetracycline: Tc) ซึ่งก็คือคุณสมบัติของพลาสมิดพาหะ pHY300PLK ดังนั้นจึงไม่สามารถตรวจพบการแสดงออกของจีนไคตินเนสแต่เชื้อยังสามารถเจริญได้บนจานเพาะเชื้อที่ผสมยาปฏิชีวนะ Tc และสอดคล้องกับรายงานของ Watanabe et. al. (1994) ที่พบว่าพลาสมิด pHY300PLK สามารถคงอยู่ได้ในแบคทีเรียกรดแลคติก

3. การออกฤทธิ์ร่วมกันของเอนไซม์ไคตินเนสกับยา AmpB

เนื่องจาก tLAB ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเนสได้ดังนั้นการศึกษากการออกฤทธิ์ร่วมกันของเอนไซม์ไคตินเนสกับแบคทีเรียกรดแลคติกจึงไม่สามารถทำการศึกษได้ จึงได้ทำการศึกษากการออกฤทธิ์ร่วมกันของเอนไซม์ไคตินเนสกับยา Amp โดยนำเชื้อ *C. albicans* TISTR 5239 มาทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ AmpB ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) พบว่าหลุมที่ 1-11 เมื่อมองด้วยตาเปล่าจะใสไม่มีตะกอนของเชื้อ และเมื่อวัดความขุ่นที่ OD600 นม. ได้ค่าเท่ากับ 0 แสดงว่าไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. albicans* ส่วนหลุมที่ 12-16 จะเห็นตะกอนของเชื้อตกเป็นเม็ดกระดุมชัดเจน ดังนั้นค่า MIC ของ *C. albicans* จะเท่ากับ 9.76×10^{-5} มก/มล (ตารางที่ 9) ดังนั้นจึงเลือกค่าความเข้มข้นของ AmpB ที่จะนำไปทดสอบการออกฤทธิ์ร่วมกันกับเอนไซม์ไคตินเนสคือค่าที่ถดลงมาจาก MIC หนึ่งค่าซึ่งเท่ากับ 4.88×10^{-5} มก/มล ส่วนค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถทำลายเชื้อ (MFC) ได้จากหลุมที่ 10 ซึ่งมีความเข้มข้นเท่ากับ 1.95×10^{-4} มก/มล และสามารถกล่าวได้ว่า AmpB เป็นยาที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราเนื่องจากมีค่า MIC และ MFC คนละค่ากัน (มาลิน, 2532)

ผลการทดสอบ MIC และ MFC ของเอนไซม์ไคตินเนสไม่สามารถระบุค่าที่ชัดเจนได้ แต่จากการเปรียบเทียบค่าความขุ่นที่ OD600 นม. พบว่ามีค่าลดลงและจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเชื้อ SDA ที่มีความหนาแน่นน้อยกว่า สามารถบอกได้ว่าเอนไซม์ไคตินเนสที่ความเข้มข้นตั้งต้นเท่ากับ 2 mU มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. albicans* มากกว่า AmpB ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 4.88×10^{-5} มก/มล (ตารางที่ 10)

ผลการทดสอบ MIC และ MFC ของ AmpB ร่วมกับเอนไซม์ไคตินเนสไม่สามารถระบุค่าที่ชัดเจนได้เช่นกัน แต่อาจบอกได้ว่าไคตินเนสจะเข้าไปเสริมฤทธิ์กับ AmpB โดยจะเข้าทำลายไคตินที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อรา (Escott And Adams, 1995; Dielbandhoosing et.al., 1998; Marcilla et.al., 1998; Selitrennikoff C, 2001) ทำให้โครงสร้างของเซลล์เปลี่ยนแปลงและเสียหายที่ไป ทำให้การควบคุมการซึมผ่านของผนังเซลล์ลดลงทำให้ AmpB ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 4.88×10^{-5} มก/มล ซึ่งไม่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. albicans* สามารถเข้าทำลายเชื้อได้มากขึ้นจึงพบเชื้อเจริญลดลง ซึ่งเปรียบเทียบผลได้จากความขุ่นที่ OD600 นม. ที่ลดลงจาก 0.945 เป็น 0.666 จากการใช้ไคตินเนสเพียงอย่างเดียวหรือใช้ไคตินเนสร่วมกับ AmpB ตามลำดับ ในหลุมที่ 9 (ตารางที่ 10) และเมื่อเปรียบเทียบขนาดของเม็ดกระดุมตะกอนเชื้อที่กันหลุมไมโครเพลตของเชื้อ *C. albicans* พบว่าจะเริ่มเห็นเม็ดกระดุมที่หลุมที่ 7 ในขณะที่การใช้เอนไซม์ไคตินเนสเพียงอย่างเดียวจะเห็นเม็ดกระดุมตั้งแต่หลุมที่ 1 (ตารางที่

11, รูปที่ 11) ซึ่งอาจบอกได้ว่า AmpB ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 4.88×10^{-5} มก./มล. ร่วมกับ เอนไซม์โคติเนสมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. albicans* มากกว่าการใช้ AmpB หรือ เอนไซม์โคติเนสอย่างใดอย่างหนึ่งเพียงอย่างเดียว

สรุป

แบคทีเรียกรดแลคติก 40 isolates จากการคัดเลือกออกมาจากอาหารหมักต่างๆ สามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Candida albicans* เมื่อทดสอบด้วยวิธี overlay แต่พบว่ามีเฉพาะส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกหมายเลข 14 เท่านั้นที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อราด้วยวิธี agar well diffusion ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวจะตรวจพบได้สูงสุดในช่วงต้นของ stationary phase นอกจากนี้ยังพบว่าคุณสมบัติของสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรามีความทนทานต่ออุณหภูมิสูงถึง 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และมี pH อยู่ในช่วง 2.5-4.0 แต่จะสูญเสียคุณสมบัติไปเมื่อปรับ pH ให้สูงขึ้น

เมื่อนำพลาสมิดลูกผสมจีนโคติเนสจากเชื้อ *Bacillus circulans* No.4.1 เข้าสู่แบคทีเรียกรดแลคติกโดยวิธี electroporation พบว่าส่วนของจีนโคติเนสถูกตัดย่อยออกไปทำให้ไม่มีการแสดงออกของจีนโคติเนสในแบคทีเรียกรดแลคติกและไม่สามารถศึกษาฤทธิ์ร่วมกันกับเอนไซม์โคติเนสในการยับยั้งเชื้อรา *C. albicans* อย่างไรก็ตามพบว่าเอนไซม์โคติเนสมีฤทธิ์ร่วมกับยาแอมโฟเทอริซิน บี ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. albicans* โดยจะทำให้ยาแอมโฟเทอริซิน บี ความเข้มข้น 4.88×10^{-5} มก./มล. ซึ่งเป็นระดับที่ต่ำกว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อ (MIC) หนึ่งค่า มีผลทำให้มีการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. albicans* ลดลงโดยคาดว่าเอนไซม์โคติเนสจะเข้าทำลายโคตินที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อราทำให้โครงสร้างของเซลล์เปลี่ยนแปลงและเสียหายที่ไปทำให้ยาสามารถเข้าไปทำลายเซลล์ได้มากกว่าเมื่อเทียบกับการใช้เพียงยาแอมโฟเทอริซิน บี หรือ เอนไซม์โคติเนสอย่างใดอย่างหนึ่งเพียงอย่างเดียว ดังนั้นถ้ามีการปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกให้สามารถผลิตเอนไซม์โคติเนสได้ก็น่าจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อราได้ดียิ่งขึ้นแต่ควรทำการหาระบบเซลล์เจ้าบ้าน-พาหะ (host-vector system) รวมทั้งจีนจีนที่มีความเหมาะสมเพื่อป้องกันการเกิดความไม่เสถียรของพลาสมิดเมื่อนำเข้าสู่แบคทีเรียกรดแลคติก

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาสารสำคัญในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกที่ยับยั้งเชื้อราได้
2. ควรมีการศึกษาระบบการแสดงออกของจีนในแบคทีเรียกรดแลคติกในพลาสมิดชนิดต่างๆ

เอกสารอ้างอิง

1. ชุตินันท์ ประสิทธิ์ภูริปรีชา, จันทรวดี โล่เสถียรกิจ, และศิริมา สุวรรณภูมิ. สารแบคทีเรียโอซิน ของเชื้อ *Lactobacillus* spp. ที่แยกได้จากอาหาร. วารสารวิชาการม.อบ. มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี 2545: 4(2); 10-20.
2. ดวงพร คันทโชติ. อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, 2537.
3. นงนุช วณิตยธนาคม. วิทยาเชื้อราทางการแพทย์. กรุงเทพมหานคร : พี.บี. ฟอเรน บัคส์ เซ็นเตอร์, 2540.
4. นริกุล สุระพัฒน์และคณะ. จุลชีววิทยาทางการแพทย์. กรุงเทพมหานคร: กรุงเทพเวชสาร. 2526.
5. ปาริชาติ พุ่มขจร, พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ, และยุภารัตน์ เครือวงษา. ความสามารถในการต่อต้านจุลินทรีย์ของกรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคทีเรียโอซิน ที่ผลิตโดยแลคติกแอซิด แบคทีเรียที่แยกได้จากอาหารหมัก. วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 2543: 28(1); 22-30.
6. ปาริชาติ พุ่มขจร และพงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ. แลคติกแอซิดแบคทีเรีย : สารยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์. วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด 2543: 12(3); 101-107.
7. ปาริชาติ พุ่มขจร และพงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ. การคัดเลือกเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สร้างแบคทีเรียโอซินจากอาหารหมัก. เทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด 2542: 11(2); 65-71. พงษ์เทพ วิไลพันธ์. แบคทีเรียโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติกในอุตสาหกรรมอาหาร. วารสารอาหาร 2546: 3; 173-179.
8. พงษ์เทพ วิไลพันธ์. แบคทีเรียโอซิน. วารสารจารย์พา 2546: 72; 16-25.
9. พรรณกร อิมวิทยา. โรคติดเชื้อรา. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์สำนักเลขาธิการ คณะรัฐมนตรี, 2543; 61-68.
10. มาลิน จุลศิริ. ยาต้านจุลชีพ (ความรู้พื้นฐานและการประยุกต์). กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์อักษรบัณฑิต. 2532.
11. เมระณี เทียนประสิทธิ์. โรคเชื้อราที่ผิวหนัง. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์กรุงเทพเวชสาร, 2527; 159-177.
12. ยุพิน สังวรินทะ และคณะ. เกสัชวิทยา. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพมหานคร : ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2539; 538-540.
13. วิชาญ วิทยาศาสตร์ และประคอง วิทยาศาสตร์. เวชปฏิบัติของผู้ติดเชื้อเอดส์. กรุงเทพมหานคร : บริษัท โอ.เอส.พรินติ้งเฮาส์ จำกัด, 2540.

14. วิลาวรรณย์ เจริญจิระตระกูล.ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของแบคทีเรียแลคติกที่แยกจากอาหารหมักพื้นบ้านภาคใต้ของไทย. สงขลานครินทร์ วทท. 2543: 22(2); 177-189.
15. ไสภิต ธีรราช. การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชสมุนไพรบางชนิดที่มีผลในการยับยั้งเชื้อรา. ภาคนิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคนิคการแพทย์); คณะเทคนิคการแพทย์. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2542.
16. สุมณฑา วัฒนสินธุ์. จุลชีพเพื่อสุขภาพ. วารสารจารย์พา 2542: 65; 41-44.
17. อภิราม ส่องศรี และ มณฑล เลิศคณาวณิชกุล. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Candida albicans* และ *Cryptococcus neoformans* ของสารสกัดสมุนไพร. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 2545 (ตุลาคม-ธันวาคม) : 44(4); 250-260.
18. Alakomi H-L et. al. Lactic Acid Permeabilizes Gram-Negative Bacteria by disrupting the Outer Membrane. Appl Environ Microbiol 2000: 66(5); 2001-2005.
19. Araya T, Ishinachi N, Shimamura S, Tanaka T and Takahashi H. Genetic and Molecular analysis of the *rpoD* gene from *Lactobacillus lactis*. Biosc Biotech Biochem 1993: 57; 88-92.
20. Bade ML and Hickey K. Classification of enzymes hydrolyzing chitins. In : Gudmund S-B, Anthonson T and Sandford P, International Conference on Chitin and Chitosan (4th : 1988 : Trundheim) London : Elsevier Appl Sci 1988; 835 p.
21. Bassler BL, Yu C, Lee YC and Roseman S. Chitin utilization by marine bacteria : degradation and catabolism of chitin oligosaccharides by *Vibrio Furnissii*. J Biol Chem 1991: 266(36); 24276-24286.
22. Batish VK, Roy U, Lal R and Grover S. Antifungal attributes of lactic acid bacteria – A review. Cri Rev Biotechnol 1997: 17(3); 209-225.
23. Boot RG, Renkema H, Strijland A and Van Zonneveld AJ. Cloning of a cDNA encoding chitotriosidase, a human chitinase produced by macrophage. J Biol Chem 1995: 44(3); 26252-26256.
24. Brigidi, P., Gonzakez-Veray, R.A., Rossi, M. and Matteuzzi, D. Study of stability of recombinant plasmids during the continuous culture of *Bacillus sterothermophilus* NUB3621 in nonselective medium. Biotechnol Bioengineer 1996: 53; 507-514.
25. Cabo ML, Braber AF and Koenraad P. Apparent antifungal activity of several lactic acid bacteria against *Penicillium discolor* is due to acetic acid in the medium. J food Protect 2002: 65; 1309-1316.

26. De Vos WM. Gene expression systems for lactic acid bacteria. *Curr Opin Microbiol* 1999; 2; 289-295.
27. Dielbandhosing KS, Zang H, Carop HL, Varrt DV and Klis MF. Specific cell wall protein confer resistance to nisin upon yeast cell. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64; 4047-4052.
28. Doi RH. Regulation of gene expression; page 15-39. In: Strips UN and Yasbin RE (ed.). *Modern Microbiol Genetics*. USA: John-Wiley&Sons, Inc. 1991, 548 pp.
29. Escott MG and Adams JD. Chitinase activity in human serum and leukocytes. *Infect Immun* 1995; 63; 4770-4773.
30. Felse AP and Panda T. Regulation and cloning of microbial chitinase genes. *Appl Microbiol Biotechnol* 1999; 51; 141-151.
31. Flach J, Pilet P-E and Jolles P. What's new in chitinase research?. *Experientia* 1992; 48; 701-716.
32. Fuchs RL, McPherson SA and Drahos DJ. Cloning of a *Serratia marcescens* gene encoding chitinase. *Appl Environ Microbiol* 1986; 51(3); 504-509.
33. Gamel PH and Piot JC. Characterization and properties of a novel plasmid vector for *Bacillus thuringiensis* displaying compatibility with host plasmids. *Gene* 1992; 120; 17-26.
34. Gruss A. and Ehrlich D. Insertion of foreign DNA into plasmids from Gram-positive bacteria induces formation of high-molecular-weight plasmid multimers. *J Bacteriol* 1988; 3; 1183-1190.
35. Hackman RH and Goldberg M. New substrates for use with chitinases. *Analyt Biochem* 1964; 8; 397-401.
36. Jeuniaux C. Chitinase. In : Colowick SP, Kaplan NO (ed.). *Meth Enzymol* 1966; 8; 645-650.
37. Kless H, Ditrit Y, Chet I and Oppenheim AB. Cloning of the gene encoding for chitobiase of *Serratia marcescens*. *Mol Gen Gent* 1989; 217; 471-473.
38. Kollar R, Petrakova E, Ashwell G, Robbins WP and Cabib E. Architecture of the yeast cell wall : the linkage between chitin and β -(1,3) glucan. *J Biol Chem* 1995; 270; 1170-1178.
39. Kordel M and Sahl H-G. Susceptibility of bacterial, eukaryotic and artificial membranes to the disruptive action of the cationic peptides Pep5 and nisin. *FEMs Microbiol Lett* 1986; 34; 139-144.

40. Kramer KJ, Muthukrishnan S. Insect chitinase: Molecular biology and potential used as biopesticides. *Insect Biochem Molec Biol* 1997: 27(11); 887-900.
41. Lertcanawanichakul M, Wiwat C, Bhumiratana A, Dean DH. Expression of chitinase-encoding genes in *Bacillus thuringiensis* and Toxicity of engineered *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* toward *Lymantria dispar*. *Current Microbiology* (in press: March 2004).
42. Magnusson J and Schnurer J. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryneformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Appl Environ Microbiol* 2001: 67(1); 1-5.
43. Magnusson J, Strom K, Roos, S, Sjogren J and Schnurer J. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 2003: 219; 129-135.
44. Marcilla A, Valentin E and Sentandreu R. The cwl wall structure : developments in diagnosis and treatment of candidiasis. *Internatl Microbiol* 1998: 1; 107-116.
45. Mari YM, Espinoza AES, Ubieta R., Batista OF and Fernandez MT. Effect of the selection marker on the viability and plasmid stability of two human proteins with neurotrophic action expressed in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commu* 1999: 258; 29-31.
46. Molsno J, Duran A and Canbib E. A rapid and sensitive assay for chitinase using tritiated chitin. *Analyt Biochem* 1977: 83; 648-656.
47. Morris ON. A 2-year study of the efficacy of *Bacillus thuringiensis* –chitinase in a spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*) control. *Can Entomol* 1976: 108; 225-233.
48. O'Brien and Colwell RR. A rapid test for chitinase activity that uses 4-Methylumbelliferyl-N-Acetyl- β ,D-Glucosaminide. *Appl Environ Microbiol* 1987: 53; 1718-1720.
49. Old RW and Primrose SB. Principles of gene manipulations 4th edn. Oxford: Blackwell Scientific Publication. 1989.
50. Ostroff, G.R. and Pene, J.J. 1984. Molecular cloning with bifunctional vector in *Escherichia coli* to *Bacillus subtilis*. *Mol Gener Genet* 1984: 193;; 306-311.

51. Rast MD, Baumgarter D, Mayer C and Hollenstein OG. Cell wall-associated enzymes in fungi. *Phytochemistry* 2003 : 64; 339-366.
52. Regev A, Keller M, Strizhov N, Sneh B, Prudovsky E, Chet I, Ginzberg I, Koncz-Kalman Z, Koncz C, Schell J and Zilberstein A. Synergistic activity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin and a bacterial endochitinase against *Spodoptera littoralis* larvae. *Appl Environ Microbiol* 1996: 62; 3581-3586.
53. Richards AG and Richards PA. The Peritrophic membranes of insects. *Annu Rev Entomol* 1977: 22; 219-140.
54. Roberts WK and Selitrennikoff CP. Plant and Bacterial chitinases differ in antifungal activity. *J Gen Microbiol* 1988: 134; 169-176.
55. Sambrook J., Fritsch Ef and Maniatis T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
56. Selitrennikoff C. Antifungal proteins. *Appl Environ Microbiol* 2001: 67(7); 2883-2894.
57. Smirnoff WA, Randall AP, Martineau R, Haliberton W and Juneau. Field test of the effectiveness of chitinase additive to *Bacillus thuringiensis* Berliner against *Choristoneura fumiferana* (Clem.). *Can J For Res* 1973: 3; 228-236.
58. Smirnoff WA. Three years of aerial field experiments with *Bacillus thuringiensis* plus chitinase formulation against the spruce bud worm. *J Invert Pathol* 1974: 24; 344-348.
59. Smirnoff WA. Effect of chitinase on the action of *Bacillus thuringiensis*. *Can Entomol* 1971: 103; 1829-1831.
60. Smirnoff WA. Results of tests with *Bacillus thuringiensis* and chitinase on larvae of the spruce budworm. *J Invert Pathol* 1973: 21; 116-118.
61. Sneh B, Schuster S and Gross S. Improvement of the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* var *entomocidus* on larvae of *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera, Noctuidae) by addition of chitinolytic bacteria, a phagostimulant and UV-protectant. *Z Ang Entomol* 1983: 96; 77-83.
62. Soto-gil RW and Zyskind JW. N,N'-diacetylchitobiase of *Vibrio harveyi* : primary structure, processing, and evolutionary relationship. *J Biol Chem* 1989: 264(25); 14778-14783.

63. Stevens KA, Sheldon BW, Klapes NA and Klaenhammer TR. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* and other gram-negative bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1991: 57; 3316-3315.
64. Streips UN. Regulation system; page 1-13. In: Streips UN and Yasbin RE (ed.). *Modern Microbiol Genetics*. USA: John-Wiley&Sons, Inc. 1991, 548 pp.
65. Tantaimavanich S, Pantuwatana S, Bhumiratana A and Panbangred W. Cloning of chitinase gene into *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* for enhanced insecticidal activity. *J Gen Appl Microbiol* 1997: 43(6); 341-347.
66. Tronsmo A and Harman GE. Detection and quantification of N-acetyl- β -D-glucosaminidase, chitobiosidase and exochitinase in solutions and on gels. *Analt Biochem* 1993: 208; 74-79.
67. Teather RM and Wood PJ. Use of Congo Red-Polysaccharide interaction in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl Environ Microbiol* 1982: 43(4); 777-780.
68. Trudel J and Asselin A. Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. *Analyt Biochem* 1989: 178; 362-366.
69. Ueda M, Kawagushi T and Arai M. Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene encoding chitinase II from *Aeromonas* sp. No. 10S-24. *J Ferment Bieng* 1994: 78(3); 205-211.
70. Vassileva-Atanassova A., Mironova R., Nacheva G. and Ivanovl. N-terminal methionine in recombinant proteins expressed in two different *Escherichia coli* strains. *J Bacteriol* 1999: 69; 63-67.
71. Watanabe K, Hamasaki M, Nakashima Y, Kakita Y and Miake F. High-frequency transformation of *Lactobacillus casei* with plasmid pHY300PLK by electroporation. *Curr Microbiol* 1994: 29; 217-222.
72. Wiwat C, Lertcanawanichakul M, Siwayapram P, Pantuwatana S and Bhumiratana A. Expression of chitinase encoding genes from *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas maltophilia* in *Bacillus thuringiensis*. subsp. *israelensis*. *Gene* 1996: 179; 119-126.
73. Wortman AT, Somerville CC and Colwell RR. Chitinase determinations of *Vibrio vulnificus* : gene cloning and application of a chitinase probe. *Appl Environ Microbiol* 1986: 52; 142-145.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

Output

และ

จดหมายตอบรับพร้อมประกาศนียบัตรการนำเสนอผลงานวิจัยรูปแบบโปสเตอร์
เรื่อง

“Isolation and Selection of Antifungal Producing Lactic Acid Bacteria”

ในงาน

10th ASEAN Conference in Medical Laboratory Technology



10th ASEAN Conference in Medical Laboratory Technology

March 29, 2004

RE: SC 128/ I-009

Dear Monthon Lertcanawanichakul,

It is my pleasure to inform you that your abstract entitled **“Isolation and Selection of Antifungal Producing Lactic Bacteria”** has been accepted for poster presentation during the 10th ASEAN Conference in Medical Laboratory Technology (10th ACMLT) which will be held at Lotus Pang Suan Kaew Hotel, Chiang Mai, Thailand during 26-30 April, 2004. Please prepare your poster according to the detailed suggestion in the final announcement, you can also get this information from www.10thacmlt.com

If you have not registered yet, please fully register with the completely filled registration form and payment sent to the secretariat of 10th ACMLT. Please be informed that all presenters of poster presentation must have fully registered.

Your poster number is **I-009**.

The poster can be posted starting from Sunday April 25 afternoon or Monday morning 8.00-9.30 a.m. and must be displayed through the conference period till April 30 at noon. Necessary amount of double sided tape (14 pieces) will be provided at your poster stand, should you need more, please bring for your own. All presenters are asked to stand at their poster stand on **Wednesday April 28, 2004 during 1.00-3.00 a.m.** to accommodate questions and comments from interesting participants.

The scientific committee is pleased to inform you that there will be awards for outstanding poster presentation, the criteria for judgment are merit of content,, academic impact, complete form, and attractive presentation. The prizes include certificates and 100, 60, and 40 USD for the first, second and third prizes respectively. There will be also one popular poster award prize of 50 USD. The awards will be given during the closing ceremony on April 30.

Thank you very much for your interest to join the 10th ACMLT and looking forward to seeing you soon in Chiang Mai.

Yours sincerely,

R. Santiyanont.

Assoc.Prof.Rachana Santiyanont, Ph.D

Chairman of Scientific Committee, the 10th ACMLT

Scientific Committee: A/Prof.Dr.Rachana Santiyanont Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University, Wittayakitti Building Floor 13, Siam Square, Phyathai Road, Bangkok 10330, Thailand.
T (66-2) 2183766 , F (66-2) 2743670 E-mail: rachana.S@chula.ac.th, rachana@10thacmlt.com

Secretariat: Sirirat Tansakul: National Cancer Institute, Pathology Section, 268/1 Rama 6 Road, Rajthevi, Bangkok 10400, Thailand T/F (66-2)2460061 ext 1305 E-mail: siriratt@10thacmlt.com

Isolation and Selection of Antifungal Producing Lactic Acid Bacteria

Monthon Lertcanawanichakul¹ and Chanpen Wiwat²

¹Institute of Allied Health Sciences and Public Health, Walailak University, Nakhon-Si-Thammarat 801

²Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Sri-Ayudthaya Rd., Bangkok 1



Objective

To screen and select antifungal producing lactic acid bacteria (LAB).

Abstract

The forty isolates of lactic acid bacteria (LAB) were obtained from various fermented foods. Dual-culture agar plate assay used as preliminary screening of antifungal activity spectrum. LAB were isolated by selective medium, MRS. Most of the isolates showed inhibition against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, including *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. In liquid culture, agar well diffusion assay, only isolate No 14^a antifungal activity with maximum yeast (*C. albicans* or *C. neoformans*) inhibition early in the stationary growth phase, but with a rapid decline in antifungal activity after 48 hour. The activity was stable during heat treatment and was retained even after autoclaving at 121°C for 15 min. Maximum activity was observed at pH value of between 2.5-3.5, and was lost at higher pH values. The antifungal activity was fully regained after readjustment of the pH to the initial value (pH 3.6). The prospects of exceptional trait as a potential probiotics.

Introduction

Molds and Yeasts are important spoilage organisms in different food and feed systems [1]. Lactic acid bacteria (LAB) are of particularly interest as biopreservative organisms, especially, its can produce bacteriocins. The subject of various research interest in bacteriocin because of their potential use as antimicrobial agents or food preservatives. While many studies have assessed their antibacterial effects, there are very few reports on specific antifungal compounds from LAB [2]. Early research suggested antifungal activities from a *Lactobacillus casei* strain that inhibited both the growth and the aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus* [3]. The antifungal activity was caused by formation of several short-chained fatty acid, among which caproic acid was the most important molecule [4]. Moreover, LAB essentially have a GRAS (generally regarded as safe) identity. Equally important, antifungal proteins are being tested for use as pharmaceutical agents for the treatment of human and animal fungal diseases.

Materials and Methods

Organisms LAB which were isolated from various source, such as, fermentation of meats, vegetables, fruits and milk, and phylloplane. The strains had been isolated on MRS agar and grown at 37°C in 5-10% CO₂ atmospheric condition. The indicator organisms, such as, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, including *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* were used (Thailand Institute of Scientific and Technology Research and American Type Culture Collection).

Screening for antifungal activity

The Streak Plate Method. LAB were streaked on MRS agar plate, incubated at 37°C in 5-10% CO₂ atmospheric condition for 48 h. Subsequently, indicator organisms were streaked on both sides of each LAB isolate and then incubated at 37°C for 24 h. Sensitivity of indicator organisms against each LAB isolate was detected.

The overlay method. It was performed using MRS agar plates on which LAB were inoculated as two 2-cm-long lines and incubated at 37°C for 48 h in 5-10% CO₂ atmospheric condition. The plates were then overlaid with 5-ml of Sabouraud dextrose broth soft agar containing yeasts cell (Macfarland No. 0.5), incubated aerobically at 30°C for 48 h. The plates were examined for clear zones of inhibition around the bacterial streaks.

Agar-well diffusion method. LAB were grown in MRS broth at 37°C for 24 h. Bacterial cells were removed by centrifugation at 1000 rpm at 4° for 20 min. The supernatant was filtrated through 0.45 µm nitrocellulose membrane. Yeasts (*Candida albicans* or *Cryptococcus neoformans*) were grown in sabouraud dextrose (SD) broth at 37°C for 18-24 h in aerobic conditions and their turbidities were adjusted by UV spectrophotometer OD600 nm. Then, they were spreaded on SD agar (SDA) by sterilized cotton swab. The supernatant was placed into the well in SDA which were spreaded with yeasts. The inhibition zones were detected after incubating at 37°C for 48 h in aerobic condition.

Effect of heat on antifungal activity. The concentrated supernatant were subjected to the heat treatment at 50°C and 121°C for 15 min. The samples were around to cool and then tested for antifungal activity by means of agar diffusion assay as previously described.

Effect of pH on antifungal activity. The pH effect was investigated with culture filtrate, in 10 ml aliquots, adjusted to pH values of 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.5, 7.0, 8.0, 9.0 and 10.0 with 1 M HCl and 2 M NaOH before evaluating the antifungal activity. MRS broth was adjusted to the same pH values, serve as control. antifungal activity by means of agar diffusion assay as previously described.

Results

Screening of antifungal activity

The forty isolates of LAB were tested their antagonistic effect against indicator organisms (bacteria and yeasts: Materials and Methods) by three methods, i.e., streak plate method, overlay method and agar-well diffusion method. All isolates of LAB could only inhibit growth of indicator bacteria, exceptionally, isolate No.14 could inhibit growth of both bacteria and yeasts by means of three methods (Fig 1-2).



Fig. 1 Testing the sensitivity of six indicator strains to an isolates of LAB by streak plate method. Arrow head () indicates *Candida albicans*.

A shows the indicator strains, i.e., *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Micrococcus luteus*

B shows the antimicrobial activity of *Lactobacillus plantarum*. The results was indicated that *L. plantarum* could only inhibit indicator bacteria.

C shows the antimicrobial activity of isolate No.14. The results was indicated that isolate No.14 could inhibit growth of both bacteria and yeast.

Effect of pH and temperature on antifungal activity

The antifungal activity was found to be heat stable. The concentrated supernatant autoclaved for 15 min at 121°C retained full inhibitory activity against yeasts growth. The activity was stable at pH values that were between 2.5-3.5 but rapidly decreased between pH 3.5 and 6.0. No inhibitory activity was detected at a pH above 6.0. The activity was fully regained after readjustment of the pH to the starting value (pH3.6) (Table 1).

Stability. The antifungal activity of culture filtrate was lost during prolonged storage. The activity was stable during storage for 7 d at 4°C, but it rapidly decreased after 7 d at this temperature. No activity could be recovered after storage for 2 d at -29°C.

Table 1. Antifungal activity of supernatant isolate No.14 on SDA plate against *Candida albicans*

Isolate	pH	Sensitivity against <i>C. albicans</i>
14	3.5	+
	2.5	+
	3.0	+
	3.5	+
	4.0	-
	4.5	-
	5.0	-
	5.5	-
	6.5	-
	7.0	-
	8.0	-
	9.0	-
	10.0	-

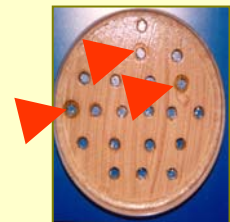


Fig. 2 Antifungal activity of supernatant isolate No. 14 against *Candida albicans*. Arrow head indicates inhibition zone of supernatant isolate No.14.

Discussion

The principles of the agar-well diffusion method base on the ability of an antimicrobial agent to diffuse through agar and inhibit the test organism. Moreover, there are many factors effect in inhibition zones, such as incubation temperatures, incubation times, concentrations on indicator strains, media compositions and molecular weight of antimicrobial agent. A dual-culture agar system to evaluate the antifungal effects. The pH value in the inhibition zone was ca 3.5-3.6, suggesting a limited contribution of undissociated acid and other antifungal activity. However, the observed reduction in antifungal activity of the culture filtrates at pH value exceeding 4.5 indicates synergistic effects between acid and other antifungal compounds (2). The poor stability of the antifungal activity at reduced temperature further complicates the purification process. The loss of activity after storage at -29°C. Might be due to an irreversible precipitation-denaturation process process.

It is necessary to purify and follow at each step in the process by monitoring arbitrary unit (total AU or AU/ml), protein concentration (mg/ml), and/or specific activity (AU/mg).

Acknowledgements

This research work was supported by the Thailand Research Fund (TRF).

References

- 1.Stiles EM (1996). Antonie Leeuwenhook. 70: 331-345.
- 2.Magnusson J and Schmurmer J (2001). Appl Environ Microbiol. 67(1): 1-5)
- 3.Gourama H and Bullerman LB (1995). J Food Prot. 58: 1249-1256.
- 4.Corsetti A, Gobetti M, Rossi J and Damiani P (1998). Appl Microb Biotechnol. 50: 2253-256.