



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การผลิตสารต้านจุลชีพจากแลคติกแอซิดแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหาร
Production of bacteriocin by lactic acid bacteria in the intestinal tract

โดย ผศ.ดร.ปิยะนุช เนียมทรัพย์ และคณะ

ตุลาคม 2553

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตสารต้านจุลชีพจากแลคติกแอซิดแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหาร
Production of bacteriocin by lactic acid bacteria in the intestinal tract

คณะผู้วิจัย

สังกัด

ผศ.ดร.ปิยะนุช เนียมทรัพย์
รศ.ดร.อภิญา อัครานิก

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา
และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) ที่ให้การสนับสนุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานของอาจารย์รุ่นใหม่ในครั้งนี้

การวิจัยครั้งนี้สำเร็จลงไปได้ด้วยดี จากความอนุเคราะห์อุปกรณ์และเครื่องมือในสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ และห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้และภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล คณะผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

ปิยะนุช เนียมทรัพย์

อภิญญา อัครนิก

คณะผู้วิจัย

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ	MRG4780015
ชื่อโครงการ	การผลิตสารต้านจุลชีพจากแลคติกแอซิดแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหาร
ชื่อนักวิจัย	ผศ.ดร.ปิยะนุช เนียมทรัพย์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ รศ.ดร.อภิญา อ้วนนิก ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
Email address	piyanuch@mju.ac.th
ระยะเวลาโครงการ	กรกฎาคม 2547-ธันวาคม 2549

การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์ ที่สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินได้ โดยวิธี direct plating จำนวน 26,765 โคโลนี พบว่า มีโคโลนีที่เกิดวงใสต่อเชื้อทดสอบ จำนวน 66 ไอโซเลท เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ของแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งต่อเชื้อทดสอบ โดยวิธี well diffusion assay พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท CF50, CF51 และ CF52 มีฤทธิ์การยับยั้งต่อแบคทีเรียกรดแลคติกที่อยู่ในกลุ่มใกล้เคียง และแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดในอาหารได้ แบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท สามารถทนความร้อนได้ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที สามารถทนพีเอชได้ในช่วง 3.0-10.0 และกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินถูกทำลายได้โดยเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน เช่น proteinase k และ protease จากการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งต่อทดสอบ และการทนความร้อนของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท CF52 ให้ผลการทดสอบดีที่สุด เมื่อนำไปจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CH และหาลำดับเบสของ DNA ในส่วนของยีน 16S rRNA พบว่า เป็นแบคทีเรีย *Lactobacillus salivarius* CF52 จากการทดสอบหาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 พบว่า แบคทีเรียชนิดนี้สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินที่มีค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงสุดเท่ากับ 5,120 AU/ml ในอาหาร MRS สูตรดัดแปลง ซึ่งประกอบด้วย maltose เข้มข้น 2.5 % (w/v), peptone เข้มข้น 0.5 % (w/v), beef extract เข้มข้น 1.0 % (w/v), K_2HPO_4 เข้มข้น 0.1-0.2 % (w/v), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ เข้มข้น 1.0 % (w/v), CH_3COONa เข้มข้น 0.5 % (w/v), $(NH_4)_2C_6H_6O_7$ เข้มข้น 0.2 % (w/v), $MnSO_4 \cdot H_2O$ เข้มข้น 0.004 % (w/v) และ Tween 80 เข้มข้น 0.1 % (w/v) พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจนและทำให้แบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์บางส่วนโดยตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และ gel filtration ทำให้ แบคทีเรียโอซินมีกิจกรรมการยับยั้งจำเพาะสูงขึ้น 207 เท่า และมีน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนประมาณ 3.5 kDa โดยวิธี 16.5 % Tris-Tricine-SDS-PAGE

คำสำคัญ: แบคทีเรียกรดแลคติก แบคทีเรียโอซิน ระบบทางเดินอาหาร

Abstract

Project code	MRG4780015
Project title	Production of bacteriocin by lactic acid bacteria in the intestinal tract
Investigator	Assistant Professor Dr.Piyanuch Niamsup Program in Biotechnology, Faculty of Science, Maejo University Associate Professor Dr.Apinya Assavanig Department of Biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University
Email address	piyanuch@mju.ac.th
Project period	July 2004-December 2006

The isolation of 26,765 colonies of lactic acid bacteria (LAB) from human and animal gastrointestinal tracts to test for their bacteriocidin production through direct plating, resulted to only 66 isolates which were able to produce bacteriocin. Later when these isolates were tested for the antimicrobial spectrum of bacteriocin against indicator strains using the well diffusion assay, it was found that CF50, CF51 and CF52 isolates were able to inhibit not only closely related LAB but also some food-borne pathogens. Bacteriocin produced by these three strains was found to be heat resistant at 121°C for 20 minutes and pH range of 3.0-10.0 but bacteriocin was also found to be inactivated by enzymes, proteinase k and protease. Based on the study of the antimicrobial spectrum of the bacteriocin and heat resistance of these isolates, results indicated that bacterial isolate CF52 gave the best findings and later, when tested for classification of bacterial strain by API 50 CH and of DNA base sequencing in terms of 16S rRNA, this isolate was identified as *Lactobacillus salivarius* CF52. Further study on media composition and suitable culture conditions for bacteriocin production, results showed that this *Lb. salivarius* CF52 displayed optimum bacterial inhibition activity (5,120 AU/ml) when cultured with modified MRS medium containing maltose (2.5%), peptone (0.5%), beef extract (1.0%) K₂HPO₄ (0.1-0.2%), MgSO₄7H₂O (1.0%), Na-acetate (0.5%), (NH₄)₂C₆H₆O₇ (0.2%), MnSO₄H₂O (0.004%) and Tween 80 (0.1%), with an initial pH of 6.5 and incubated anaerobically at 37°C for 16 hours. In addition, when bacteriocin was partially purified using ammonium sulfate precipitation and gel filtration, results indicated a 270-fold increase of its specific activity and a molecular weight of about 3.5 kDa.

Keywords: lactic acid bacteria, bacteriocin, gastrointestinal tract

Executive summary

แบคทีเรียกรดแลคติก จำนวน 66 ไอโซเลท ซึ่งคัดแยกจากระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์ เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ของแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งต่อเชื้อทดสอบ 36 ชนิด พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท CF50 CF51 และ CF52 มีฤทธิ์การยับยั้งต่อแบคทีเรียกรดแลคติกที่อยู่ในกลุ่มใกล้เคียง และแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดได้ แบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท มีความเสถียรต่อความร้อน มีกิจกรรมการยับยั้งในช่วงพีเอชกว้าง และเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนทำลายกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซิน ซึ่งแสดงว่า แบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท เป็นสารประกอบประเภทโปรตีน และพบว่า แบคทีเรียไอโซเลท CF52 ผลิตแบคทีเรียโอซินมีฤทธิ์การยับยั้งต่อทดสอบและทนต่อความร้อนได้ดีที่สุด เมื่อนำไปจำแนกชนิดของแบคทีเรียในระดับสปีชีส์ พบว่าเป็นแบคทีเรีย *Lactobacillus salivarius* CF52 จากการทดสอบหาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 พบว่า แบคทีเรียชนิดนี้ สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินที่มีค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงสุดเท่ากับ 5,120 AU/ml ในอาหาร MRS สูตรดัดแปลง ซึ่งประกอบด้วย maltose เข้มข้น 2.5 % (w/v), peptone เข้มข้น 0.5 % (w/v), beef extract เข้มข้น 1.0 % (w/v), K_2HPO_4 เข้มข้น 0.1-0.2 % (w/v), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ เข้มข้น 1.0 % (w/v), CH_3COONa เข้มข้น 0.5 % (w/v), $(NH_4)_2C_6H_6O_7$ เข้มข้น 0.2 % (w/v), $MnSO_4 \cdot H_2O$ เข้มข้น 0.004 % (w/v) และ Tween 80 เข้มข้น 0.1 % (w/v) พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน และทำให้แบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์บางส่วนโดยตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และ gel filtration ทำให้แบคทีเรียโอซินมีกิจกรรมการยับยั้งจำเพาะสูงขึ้น 207 เท่า และเมื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของแบคทีเรียโอซินด้วยวิธี 16.5 % Tris-Tricine-SDS-PAGE พบว่าแบคทีเรียโอซินชนิดนี้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 3.5 KDa

จากผลการวิจัย พบว่า แบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 เป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่ง หากได้มีการศึกษาข้อมูลต่าง ๆ เพิ่มเติม ซึ่งน่าจะเป็นประโยชน์ได้ในการนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารนอมอาหาร หรือใช้เป็นเชื้อตั้งต้นในการผลิตอาหารหมัก หรือนำไปใช้เป็นโปรไบโอติกในอาหารสัตว์ ซึ่งจะช่วยส่งเสริมสุขภาพสัตว์ และช่วยลดการเกิดโรคติดเชื้อในสัตว์เศรษฐกิจ

สารบัญเรื่อง

หน้า

กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
ABSTRACT	ค
Executive summary	ง
สารบัญเรื่อง	จ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ฉ
สารบัญตารางภาคผนวก	ฎ
สารบัญภาพภาคผนวก	ฏ
บทที่ 1 บทนำ	1
ความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	3
ระบบทางเดินอาหาร	3
จุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร	5
แบคทีเรียกรดแลคติก	7
แบคทีเรียกรดแลคติกในระบบทางเดินอาหาร	8
สารต้านทานจุลชีพจากแบคทีเรียกรดแลคติก	9
คำจำกัดความของแบคทีเรียโอซิน	12
ระบบการตั้งชื่อของแบคทีเรียโอซิน	13
การจำแนกชนิดของแบคทีเรียโอซิน	13
แหล่งของแบคทีเรียโอซิน	15
การสังเคราะห์แบคทีเรียโอซิน	16
กิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซิน	16
การผลิตแบคทีเรียโอซิน	17
การทำแบคทีเรียโอซินให้บริสุทธิ์	18
การประยุกต์ใช้แบคทีเรียโอซินในอาหาร	18
แบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินได้จากระบบทางเดินอาหาร	19

	หน้า
กรอบแนวความคิด	21
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	22
อุปกรณ์การทดลอง	22
วิธีการทดลอง	26
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	42
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	74
ข้อเสนอแนะ	75
Output ที่ได้ของโครงการ	75
บรรณานุกรม	76
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ	85
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมี	89
ภาคผนวก ค ลำดับเบสของ DNA ในส่วนของยีน 16S rRNA	94
ภาคผนวก ง กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีน	96
ภาคผนวก จ มวลโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน	105
ภาคผนวก ฉ บทความสำหรับการเผยแพร่ทางวิชาการ	101

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1 แสดงสายพันธุ์แบคทีเรียทดสอบและสภาวะในการเลี้ยง	28
2 ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ	37
3 จำนวนส่วนโคโลนีที่เกิดวงใสเทียบกับจำนวนโคโลนีทั้งหมด	43
4 ฤทธิ์การยับยั้งของแบคทีเรียโอซินต่อเชื้อทดสอบ โดยวิธี well diffusion assay	44
5 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซิน โดยวิธี well diffusion assay โดยใช้ <i>Lb. fermentum</i> JCM 1173 เป็นเชื้อทดสอบ	47
6 ผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่อกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินโดยวิธี well diffusion assay โดยใช้ <i>Lb. fermentum</i> JCM 1173 เป็นเชื้อทดสอบ	47
7 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของแบคทีเรียไอโซเลท CF52 เปรียบเทียบกับ <i>Lb. salivarius</i> K7	49
8 คุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียไอโซเลท CF52	51
9 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรีย <i>Lb. salivarius</i> CF52	55
10 ผลของ maltose ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตแบคทีเรียโอซินของ แบคทีเรีย <i>Lb. salivarius</i> CF52	57
11 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรีย <i>Lb. salivarius</i> CF52	59
12 ผลของการเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ต่อการผลิตแบคทีเรียโอซิน ของแบคทีเรีย <i>Lb. salivarius</i> CF52	61
13 ผลความเข้มข้นของ K_2HPO_4 ต่อการผลิตแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรีย <i>Lb. salivarius</i> CF52	63
14 ผลความเข้มข้นของ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ต่อการผลิตแบคทีเรียโอซินของ แบคทีเรีย <i>Lb. salivarius</i> CF52	65
15 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียโอซินของ แบคทีเรีย <i>Lb. salivarius</i> CF52	66

ตาราง (ต่อ)	หน้า
16 ผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตแบคทีเรียโอซิน ของแบคทีเรีย <i>Lb. salivarius</i> CF52	67
17 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรีย <i>Lb. salivarius</i> CF52	68
18 ผลของระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่มีต่อการผลิตแบคทีเรียโอซิน ของแบคทีเรีย <i>Lactobacillus salivarius</i> CF52	70
19 การทำให้แบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรีย <i>Lb. salivarius</i> CF52 บริสุทธิ์บางส่วน	72

สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
1 แสดงส่วนประกอบของท่อทางเดินอาหารของสัตว์	4
2 แสดงชนิดจุลินทรีย์ประจำถิ่นของระบบทางเดินอาหารมนุษย์	6
3 แสดงลักษณะผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำตาลกลูโคสของแบคทีเรียกรดแลคติก	8
4 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งของแบคทีเรียโอซินจากแบคทีเรียไอโซเลท CF50, CF51 และ CF52 ในการยับยั้ง <i>Lb. fermentum</i> JCM 1173 โดยวิธี well diffusion assay	42
5 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ของสารแบคทีเรียโอซินจากแบคทีเรียไอโซเลท CF50, CF51 และ CF52 ในการยับยั้งเชื้อ <i>Lb. fermentum</i> JCM 1173 โดยวิธี well diffusion assay	44
6 ผลของอุณหภูมิต่อการยับยั้งของแบคทีเรียโอซิน โดยวิธี well diffusion assay โดยใช้ <i>Lb. fermentum</i> JCM 1173 เป็นเชื้อทดสอบ	45
7 รูปร่างและการติดสีแกรมของแบคทีเรียไอโซเลท CF52 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ กำลังขยาย 1,000 เท่า	48
8 ผลการหมักคาร์บอนไฮเดรตของแบคทีเรียไอโซเลท CF52 ด้วย API 50 CH	51
9 ขนาดของ DNA ที่ได้จากการทำ PCR ในส่วนของยีน 16S rDNA ตำแหน่งลำดับเบส บริเวณ V ₁ -V ₃ ของแบคทีเรียไอโซเลท CF52	52
10 ลำดับของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลท CF52 เกิดจากการนำลำดับเบสของ primer 27F และ primer 520R ไปเทียบกันในโปรแกรม BioEdit	53
11 แบคทีเรียที่มีลำดับเบสในส่วนยีน 16S rRNA คล้ายกับแบคทีเรียไอโซเลท CF52	53
12 แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรีย <i>Lb. salivarius</i> CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน	55
13 ผลของ maltose ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรีย <i>Lb. salivarius</i> CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน	57
14 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรีย <i>Lb. salivarius</i> CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น maltose เข้มข้น 2.5 % (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน	59

ภาพ (ต่อ)	หน้า
15 ผลของการเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ต่อการผลิตแบคทีเรียโอซิน ของแบคทีเรีย <i>Lb. salivarius</i> CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น maltose เข้มข้น 2.5 % (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน	61
16 ผลของความเข้มข้นของ K_2HPO_4 ที่เหมาะสม ต่อการผลิตแบคทีเรียโอซิน ของแบคทีเรีย <i>Lb. salivarius</i> CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS ประกอบด้วย maltose เข้มข้น 2.5 % (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน และมี peptone เข้มข้น 0.5 % (w/v) ร่วมกับ beef extract เข้มข้น 1.0 % (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน	63
17 ผลความเข้มข้นที่เหมาะสมของ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ต่อการผลิตแบคทีเรียโอซิน ของแบคทีเรีย <i>Lb. salivarius</i> CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS ประกอบด้วย maltose เข้มข้น 2.5 % (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน และมี peptone เข้มข้น 0.5% (w/v) ร่วมกับ beef extract เข้มข้น 1.0% (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน และมี K_2HPO_4 เข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน	66 67
18 ผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรีย <i>Lb. salivarius</i> CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน	
19 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรีย <i>Lb. salivarius</i> CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS ที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 บ่มที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้ออกซิเจน	69
20 ผลของระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่มีต่อการผลิตแบคทีเรียโอซิน ของแบคทีเรีย <i>Lactobacillus salivarius</i> CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS ที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน	71
21 ผลการแยกแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรีย <i>Lb. salivarius</i> CF52 โดยใช้วิธี 16.5 % Tricine-SDS-PAG	73

สารบัญตารางภาคผนวก

ตารางภาคผนวก		หน้า
1	แสดงปริมาณของสารละลายต่าง ๆ ที่ใช้สำหรับหาปริมาณโปรตีน โดยวิธี Lowry	97
2	แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรของ สารละลายโปรตีนมาตรฐาน	98
3	มวลโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน (Polypeptide SDS-PAGE standards)	100

สารบัญภาพภาคผนวก

ภาพภาคผนวก		หน้า
1	ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย ไอโซเลท CF52 ที่ได้จาก primer 27F	94
2	ลำดับเบสของดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย ไอโซเลท CF52 ที่ได้จาก primer 520R	95
3	แสดงกราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry	99

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญของปัญหา

แบคทีเรียโอซิน (bacteriocin) เป็นสารประกอบประเภทโปรตีนที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย และสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นที่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน หรืออยู่ในกลุ่มใกล้เคียงกันได้ จึงมีการนำสารแบคทีเรียโอซินมาใช้ประโยชน์ในรูปของสารถนอมอาหารและสารต้านทานจุลชีพ สารแบคทีเรียโอซินสร้างจากเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิด แต่งานวิจัยในปัจจุบันมักให้ความสนใจศึกษาสารแบคทีเรียโอซินที่สร้างจากเชื้อแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกหรือแบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria; LAB) ตัวอย่างในเชื้อกลุ่มนี้ได้แก่ lactobacilli, lactococci, pediococci, enterococci, carnobacterium และ leuconostocs เป็นต้น เชื้อกลุ่มนี้มีความสำคัญมากในปัจจุบันทั้งในอาหารคนและอาหารสัตว์ สามารถผลิตกรดแลคติกที่มีประโยชน์มากในอุตสาหกรรมหลาย ๆ ชนิด และยังสามารถผลิตสารแบคทีเรียโอซินที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญหรือทำลายแบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกเอง หรือแบคทีเรียที่ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์ (Gilliland and Speck, 1977) และเมื่ออยู่ในลำไส้สัตว์ยังอาจช่วยเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของสัตว์ได้อีกด้วย นอกจากนี้ปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะของจุลินทรีย์ทำให้มนุษย์จำเป็นต้องหายาด้านต้านทานจุลชีพใหม่ ๆ เพื่อทดแทนยาต้านทานจุลชีพชนิดเดิม แบคทีเรียโอซินซึ่งเป็น antimicrobial protein จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่นับว่ามีศักยภาพสูงในการผลิตสารต้านทานจุลชีพชนิดใหม่ นอกเหนือจากความได้เปรียบทางด้านความปลอดภัยเนื่องจากความเป็นธรรมชาติแล้ว การพัฒนาการผลิตในระบบอุตสาหกรรมโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพก็สามารถทำได้โดยง่าย (Hoover *et al.*, 1993) นักวิจัยส่วนใหญ่ศึกษาการสร้างสารแบคทีเรียโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากอาหารและผลิตภัณฑ์นมเป็นส่วนใหญ่ เพื่อมุ่งเน้นในการนำเอาแบคทีเรียโอซินไปประยุกต์ใช้ในการถนอมอาหาร และมีสารแบคทีเรียโอซินเพียงชนิดเดียวเท่านั้น คือ ไนซิน (nisin) ที่ได้รับการยอมรับว่าปลอดภัย (Generally Recognized As Safe; GRAS) สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารถนอมอาหารในระดับอุตสาหกรรมได้ (Delves-Broughton *et al.*, 1992) งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกจากแหล่งใหม่ ๆ เช่น ในระบบทางเดินอาหารเพื่อที่จะสามารถนำไปพัฒนาใช้เป็นโปรไบโอติกในอาหารคนและสัตว์ (animal feed) ซึ่งจะช่วยส่งเสริมสุขภาพสัตว์ และช่วยลดปัญหาการเกิดโรคติดเชื้อในสัตว์เศรษฐกิจได้ ผลงานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อกลุ่มประกอบการอาหารและกลุ่มเกษตรกรในการเพิ่มคุณภาพมาตรฐานของอาหารที่ใช้บริโภคในประเทศและที่ส่งออก

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากระบบทางเดินอาหารที่สามารถสร้างสารแบคทีเรียโอซินได้
2. เพื่อศึกษาความสามารถของสารแบคทีเรียโอซินที่สกัดได้ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบ
3. เพื่อศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตและยับยั้งเชื้อทดสอบของสารแบคทีเรียโอซิน
4. เพื่อศึกษาคุณสมบัติของสารแบคทีเรียโอซินที่สกัดได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจากแหล่งใหม่ ๆ เช่น ในระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์เศรษฐกิจที่สามารถผลิตสารแบคทีเรียโอซินได้ อาจนำไปสู่แนวทางในการพัฒนายาต้านจุลชีพและสารถนอมอาหารจากเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพและปลอดภัย เป็นข้อมูลสำคัญสำหรับนักวิจัยใช้เป็นส่วนประกอบในการตัดสินใจที่จะนำเอาสารแบคทีเรียโอซินไปใช้ประโยชน์ทั้งในด้านการแพทย์และในระดับอุตสาหกรรมอย่างเหมาะสมและมีประสิทธิภาพสูงสุดต่อไป ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อกลุ่มผู้ประกอบการอาหารและกลุ่มเกษตรกรในการเพิ่มคุณภาพของอาหารที่ใช้บริโภคในประเทศและส่งออก นอกจากนี้การใช้แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นโปรไบโอติกจะช่วยส่งเสริมคุณภาพสัตว์ และช่วยลดปัญหาการเกิดโรคติดเชื้อในสัตว์เศรษฐกิจได้

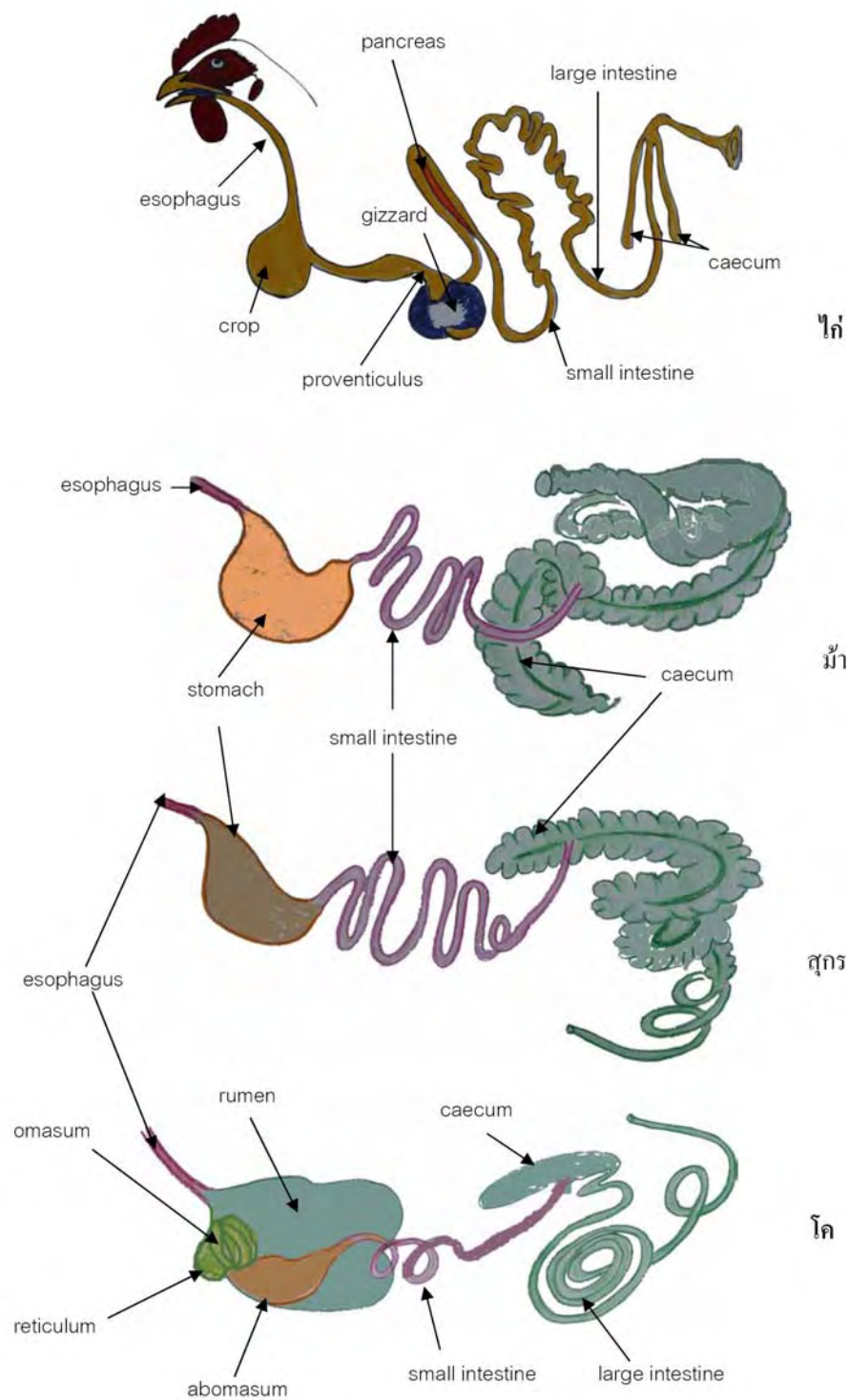
บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

ระบบทางเดินอาหาร (Gastrointestinal tract)

ระบบทางเดินอาหารมีลักษณะพิเศษที่เกี่ยวข้องกับการย่อยอาหาร (กระเพาะอาหารและส่วนต้นของลำไส้เล็ก) ดูดซึมสารอาหาร (ลำไส้เล็ก) และการเก็บรักษาน้ำและกักเก็บของเสีย (ลำไส้ใหญ่) เมื่อมนุษย์หรือสัตว์กินอาหารเข้าไปในร่างกาย อาหารจะเคลื่อนที่ผ่านระบบทางเดินอาหาร ในขณะที่อาหารเคลื่อนที่ผ่านระบบทางเดินอาหารส่วนต่าง ๆ จะเกิดการย่อยอาหาร ทำให้โมเลกุลของอาหารมีขนาดเล็กลง จนกระทั่งสามารถดูดซึมผ่านเข้าระบบเลือด หรือระบบน้ำเหลืองเพื่อเข้าสู่ตับ จากนั้นจึงถูกส่งไปในส่วนต่าง ๆ ของร่างกายเพื่อใช้ประโยชน์ต่อไป (Tannock, 1995)

ระบบย่อยอาหารของมนุษย์ หรือในสัตว์เศรษฐกิจทุกชนิด ประกอบด้วย อวัยวะย่อยอาหารที่มีท่อทางเดินอาหารที่มีลักษณะเป็นท่อยาว เริ่มต้นตั้งแต่ช่องปาก (mouth) และสิ้นสุดที่ช่องทวาร (anus) นอกจากนี้ ยังมีส่วนของอวัยวะที่ช่วยในการย่อยอาหารอื่น ๆ อีก เช่น ต่อมน้ำลาย ตับ และ ตับอ่อน เป็นต้น โครงสร้างพื้นฐานของท่อทางเดินอาหารในสัตว์ทุกชนิด ประกอบด้วยผนัง 4 ชั้น คือ ชั้นเยื่อเมือก (mucous membrane หรือ mucosa) ชั้นใต้เยื่อเมือก (submucosa) ชั้นกล้ามเนื้อ (muscularis externa) ส่วนใหญ่เป็นส่วนของกล้ามเนื้อเรียบ (smooth muscle) และชั้นเซโรซาหรือชั้นเยื่อหุ้มท่อน้ำอาหารด้านนอก (serosa membrane) แต่ละส่วนของท่อทางเดินอาหารมีโครงสร้างพื้นฐานเหมือนกัน แต่มีความแตกต่างกันที่ขนาดรูปร่างและความหนาของผนังแต่ละชั้น มนุษย์ โค สุนัข และสัตว์ปีก มีการพัฒนาท่อทางเดินอาหารที่แตกต่างกันไปตามลักษณะของอาหารที่สัตว์กิน ภาพ 1 แสดงส่วนประกอบของท่อทางเดินอาหารของสัตว์ โดยสัตว์กระเพาะเดี่ยวท่อทางเดินอาหารมีลักษณะเป็นถุง มีการขนส่งกรดเกลือและเอนไซม์เปปซินใช้ในการย่อยโปรตีนจะหลั่งเอนไซม์จากตับอ่อนและถุงน้ำดี เพื่อย่อยอาหารในลำไส้เล็ก (James, 2000) สัตว์ปีกทางเดินอาหารจะมีกระเพาะพักสำหรับเก็บอาหาร มีกระเพาะแท้หลั่งน้ำย่อย และกินสำหรับบดอาหาร (สุโขทัยธรรมมาธิราช, 2543) สัตว์เคี้ยวเอื้องมี 4 กระเพาะ และมีกระบวนการย่อยอาหารพวกเคี้ยว โดยอาศัยน้ำย่อยจากจุลินทรีย์ในกระเพาะส่วนหน้า ส่วนในกระเพาะโอบมาซิมและลำไส้สามารถหลั่งน้ำย่อย ซึ่งย่อยอาหารคล้ายกับสัตว์กระเพาะเดี่ยว โดยความจุของท่อทางเดินอาหารสัตว์ประเภทนี้จะแตกต่างกันตามชนิดสัตว์ (James and Baker, 2003)



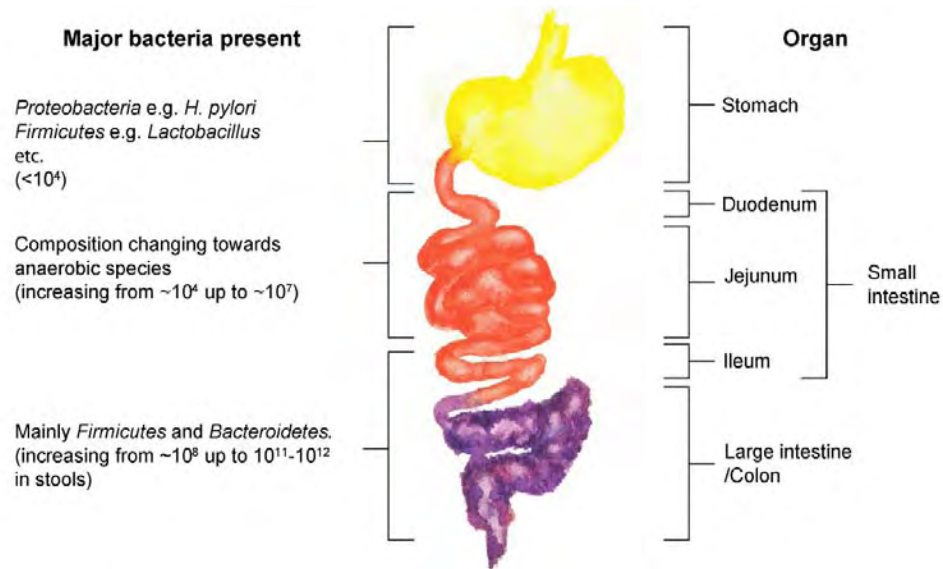
ภาพ 1 แสดงส่วนประกอบของท่อทางเดินอาหารของสัตว์
ที่มา: James and Baker (2003)

จุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร (Microbial in the gastrointestinal tract)

มนุษย์หรือสัตว์แรกเกิดจะไม่มีหรือมีจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารน้อยมาก แต่การที่มนุษย์หรือสัตว์ได้สัมผัสกับจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม อาหาร สิ่งปรุรงนอน มูลสัตว์ ก็จะทำให้สัตว์ได้รับจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ เข้าไปในทางเดินอาหาร ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้จะเจริญเติบโตต่อไปในระบบทางเดินอาหาร โดยจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ที่อยู่ในระบบทางเดินอาหารจะดำเนินกิจกรรมเพื่อการเติบโตและเพิ่มปริมาณโดยใช้สารอาหารที่สัตว์กินเข้าไป เพียงระยะเวลาประมาณ 2-3 เดือนหลังจากที่สัตว์คลอด ประชากรของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารเริ่มมีความเสถียร (Fanaro *et al.*, 2003) และจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีแนวโน้มที่จะอาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารเพิ่มมากขึ้น ซึ่งจะมีความแตกต่างกันในแต่ละสิ่งมีชีวิต ขึ้นอยู่กับสิ่งแวดล้อม อาหาร และปัจจัยอื่น ๆ เป็นสิ่งบ่งชี้ลักษณะจำเพาะของจุลินทรีย์ชนิดนั้น ๆ ดังนั้น ในระบบทางเดินอาหารมนุษย์หรือสัตว์แต่ละชนิดมีลักษณะพิเศษคือ มีทั้งจุลินทรีย์ชนิดที่เป็น predominant และ subdominant อาศัยอยู่ในเยื่อเมือกของระบบทางเดินอาหารจำนวนมาก (Guarner, 2006) สำหรับกลไกการใช้ประโยชน์ของอาหารในลำไส้เล็ก มีวิลไลทำหน้าที่เป็นตัวกรองและอนุญาตให้สารอาหารที่ย่อยสมบูรณ์ ผ่านเข้ากระแสเลือดไปเลี้ยงเซลล์ต่าง ๆ ของร่างกาย ถ้าสมดุลของจุลินทรีย์ไม่เหมาะสม หรือมีจุลินทรีย์ก่อโรคมก ซึ่งจะขับสารพิษออกมาขัดเกาะวิลไล เกิดภาวะทำให้วิลไลไม่สามารถกรองเชื้อโรคได้ ทำให้เข้าไปในกระแสเลือดเกิดโรคต่าง ๆ ขึ้น ต่อมน้ำเหลืองในลำไส้เป็นส่วนสำคัญต่อการทำงานในการป้องกันการดูดซึมสารพิษ และแบคทีเรียเข้าไปในระบบของร่างกาย จุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์จะสามารถทำลายเชื้อโรคโดยตรง ซึ่งจุลินทรีย์ในลำไส้คนหรือสัตว์แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกเป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ (beneficial microorganisms) ซึ่งจะยึดเกาะพื้นที่เยื่อเมือกในลำไส้ของสัตว์ สามารถป้องกันไม่ให้จุลินทรีย์ที่ก่อโรคเจริญเติบโต ได้แก่ กลุ่มแบคทีเรีย lactobacilli, bifidobacterium, bacilli, streptococci และ กลุ่ม yeast เป็นต้น และกลุ่มสองเป็นจุลินทรีย์ที่ก่อโรค (pathogenic microorganisms) จะขับสารพิษออกมาขัดเกาะวิลไล ทำให้เกิดโรคในสัตว์ ซึ่งสัตว์จะมีอัตราการตายสูง น้ำหนักลดลง การใช้ประโยชน์จากอาหารที่กินลดลง การให้ผลผลิตต่ำ เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจ ได้แก่ กลุ่มแบคทีเรีย Coliforms, *Salmonella*, *Clostridia*, *Shigella* และ *Staphylococcus* เป็นต้น (Hardy, 1975)

ปัจจุบันความรู้เกี่ยวกับจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารค่อนข้างสมบูรณ์ เริ่มจากพื้นฐานการศึกษาโดยการเพาะเลี้ยงและการศึกษาลำดับเบสดีเอ็นเอส่วนยีน 16S rRNA ซึ่งสามารถแสดงถึงความหลากหลายของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารได้อย่างชัดเจน (Dethlefsen *et al.*, 2006) จำนวนจุลินทรีย์ในกระเพาะอาหารมีปริมาณน้อย เนื่องจากกระเพาะอาหารมีสภาวะความเป็นกรดสูง ซึ่งมีจำนวนจุลินทรีย์มากที่สุดประมาณ 10^4 CFU/ml ของน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร แบคทีเรียชนิด *Helicobacter pylori* เพียงชนิดเดียวที่อาศัยอยู่ตามเยื่อเมือกของกระเพาะอาหารมนุษย์ (Dethlefsen

et al., 2006) แต่ในปัจจุบัน จากการศึกษาลำดับเบสดีเอ็นเอส่วนยีน 16S rRNA พบว่า มีจำนวนจุลินทรีย์ที่หลงเหลือในกระเพาะอาหารประมาณ 128 ชนิด (Bik *et al.*, 2006) กลุ่มของ จุลินทรีย์ที่น่าสนใจคือ กลุ่มแบคทีเรีย *Lactobacilli* และกลุ่มแบคทีเรียชนิดใหม่ ๆ ที่ได้ทำการจำแนกจากเนื้อเยื่อในกระเพาะอาหาร (Roos *et al.*, 2005) การลบล้างอาหารจากปากถึงลำไส้เล็กในส่วนไอเลียมในการย่อยอาหารใช้เวลาอย่างน้อยประมาณ 4-6 ชั่วโมง (Bourlioux *et al.*, 2003) ซึ่งเป็นปัจจัยจำกัดสำหรับการสร้างอาณานิคมของจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตาม จำนวนจุลินทรีย์ในลำไส้เล็กส่วนเจจูนัม (jejunum) และในลำไส้เล็กในส่วนไอเลียม (ileum) มีจำนวนจุลินทรีย์ประมาณ 10^8 CFU/ml (Metchikoff, 1907) สำหรับลำไส้ใหญ่เป็นแหล่งของจุลินทรีย์ประจำถิ่นอาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารมากที่สุด เนื่องจากการลบล้างอาหารในการย่อยและดูดซึมอาหารในลำไส้ใหญ่ใช้เวลานานมากประมาณ 55 ชั่วโมง (Bourlioux *et al.*, 2003) จึงทำให้มีจุลินทรีย์หลากหลายชนิดอาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่เป็นจำนวนมากประมาณ 10^{11} - 10^{12} CFU/ml (Dethlefsen *et al.*, 2006) ในภาพ 2 แสดงชนิดจุลินทรีย์ประจำถิ่นของระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ อย่างไรก็ตาม แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ระหว่างลูเมน (lumen) และเยื่อเมือก (mucosal membrane) จะมีความแตกต่างกัน (Zoetendal *et al.*, 2002)



ภาพ 2 แสดงชนิดจุลินทรีย์ประจำถิ่นของระบบทางเดินอาหารของมนุษย์
 ที่มา : Dethlefsen *et al.* (2006)

แบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria; LAB)

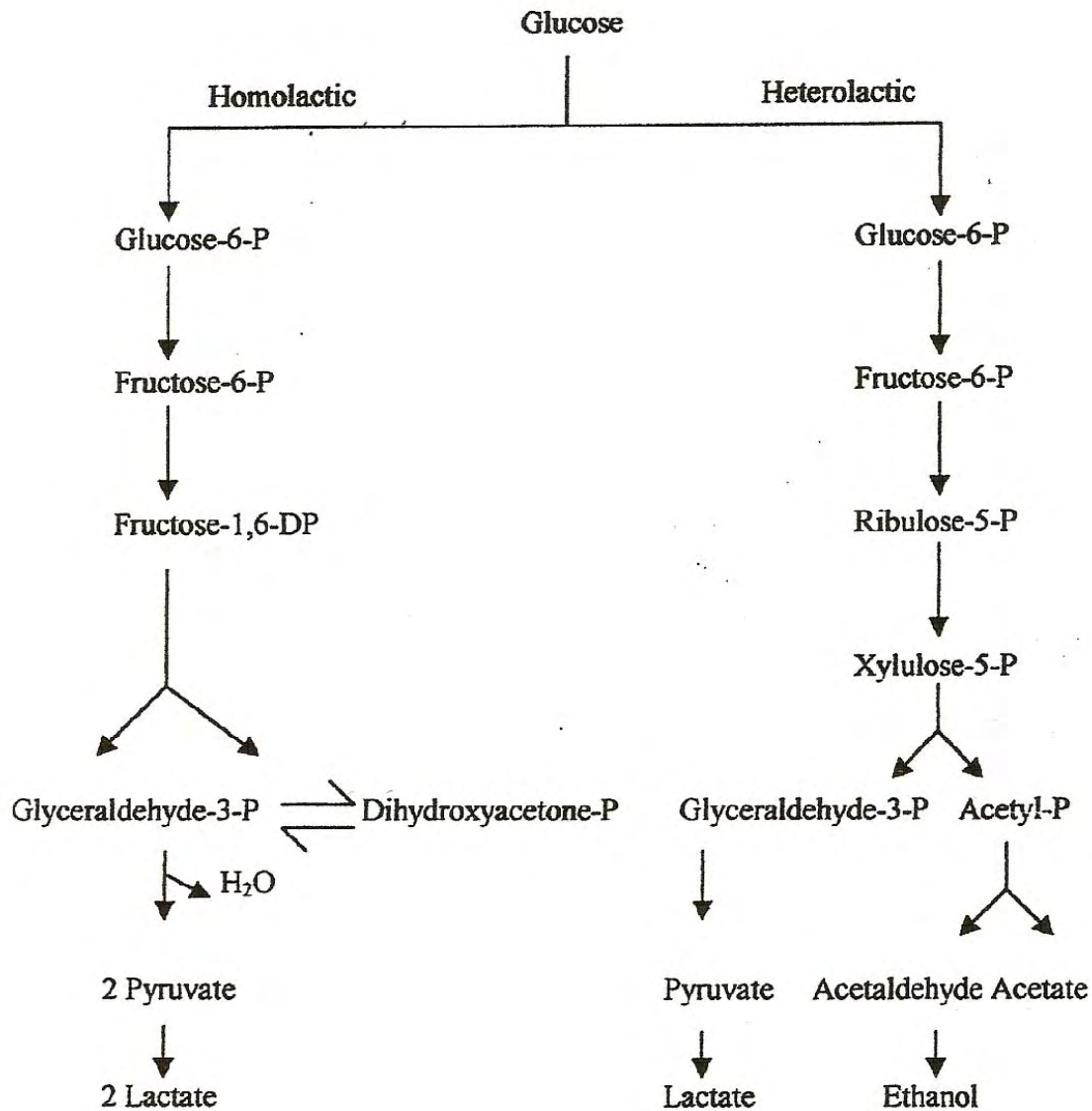
แบคทีเรียกรดแลคติก เป็นแบคทีเรียกลุ่มหนึ่งที่มีความสามารถในการหมักน้ำตาลกลูโคส และสับสเตรตอื่น ๆ ที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารหมักอาหารเป็นแหล่งพลังงาน และให้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นกรดแลคติก (Sneath *et al.*, 1986) แบคทีเรียกลุ่มนี้มีลักษณะทั่วไปดังนี้คือ ติดสีแกรมบวก รูปร่างมีทั้งแบบท่อน ทรงกลม และกึ่งท่อนกึ่งทรงกลม ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ ไม่มีระบบ ไซโตโครม ไม่สร้างเอนไซม์อะตเลส มีความต้องการธาตุอาหารซับซ้อน และค่อนข้างอุดมสมบูรณ์ ใช้กรดอะมิโนเป็นแหล่งไนโตรเจน ใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอน เจริญได้ในอาหารที่มีปัจจัยการเจริญ และวิตามินหลายชนิด เช่น biotin, riboflavin และต้องการสารอนินทรีย์ในปริมาณค่อนข้างสูง เช่น แมงกานีส แมกนีเซียม และ ฟอสฟอรัส เป็นต้น สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน และสามารถทนกรดได้ (Wood and Halzapfel, 1995) แบคทีเรียกรดแลคติกเจริญภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนเล็กน้อย จนถึงสภาวะไร้ออกซิเจน ส่วนใหญ่เป็นพวกไม่ก่อโรค โดยธรรมชาติมักพบอยู่ทั่วไปโดยเฉพาะในอาหาร เช่น ผลิตภัณฑ์นม เนื้อหมัก ไข่กรอกเปรี้ยว ผักดอง หน่อหมัก เครื่องดื่มต่าง ๆ นอกจากนี้ ยังพบในพืช ช่องคลอดของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ลำไส้เล็ก และทางเดินหายใจของคนและสัตว์ (เอกชัย, 2536)

แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ ตามลักษณะการใช้อาหารและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมัก (นภา, 2534) คือ

1. โฮโมเฟอร์เมนเตทีฟ (homofermentative) เป็นกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกที่หมักกลูโคสแล้วให้กรดแลคติกเป็นส่วนใหญ่ โดยทั่วไปประมาณร้อยละ 85 หรือมากกว่า ไม่ต้องการไทามีน (thiamine) ในการเจริญเติบโต เจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส หรือ 15 องศาเซลเซียส สร้างเอนไซม์อัลโดเลส (aldolase) และเอนไซม์เฮกโซมไอโซเมอเรส (hexose isomerase) และใช้ Emden-Meyerhof-Parnas (EMP) ทำให้ได้กรดแลคติก 2 โมเลกุลต่อกลูโคส 1 โมเลกุล ได้แก่ *Lactobacillus sake*, *Lb. acidophilus*, *Pediococcus pentosaceus* และ *P. dextrincus* เป็นต้น

2. เฮเทอโรเฟอร์เมนเตทีฟ (Heterofermentative) เป็นกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกที่หมักกลูโคสให้กรดแลคติกประมาณร้อยละ 50 นอกจากนี้ให้ กรดอะซิติก เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ โดยกระบวนการฟอสโฟคีโตเลส ได้แก่ *Lb. fermentum*, *Lb. brevis*, *Lb. plantarum* และ *Lb. buchneri* เป็นต้น ภาพ 3 แสดงลักษณะผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำตาลกลูโคสของแบคทีเรียกรดแลคติก

ภาพ 3 แสดงลักษณะผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำตาลกลูโคสของแบคทีเรียกรดแลคติก
ที่มา : Caplice and Fitzgerald (1999)



แบคทีเรียกรดแลคติกในระบบทางเดินอาหาร

แบคทีเรียกรดแลคติกในระบบทางเดินอาหารมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสุขภาพของคน และสัตว์ เพราะสามารถช่วยป้องกันการแข่งขันและการแพร่กระจายของแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร นอกจากนี้ ยังมีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก (Oh *et al.*, 2000) มีคำจำกัดความมากมายเกี่ยวกับโปรไบโอติก ซึ่งเกิดขึ้นครั้งแรกโดย Lilly and Stillwell (1965) อธิบายว่าโปรไบโอติกเป็นสารที่ผลิตจากโปรโตชีวชนิดหนึ่ง และสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง ต่อมา Parker (1974) อธิบายว่าโปรไบโอติก คือ กลุ่มของจุลินทรีย์หรือสารที่เสริมในอาหารสัตว์ และมีประโยชน์ในอาหารสัตว์และมี

ประโยชน์ต่อสัตว์ โดยจะไปมีผลกับจุลินทรีย์ในลำไส้ของสัตว์ คำจำกัดความของ Parker บอกชัดเจนเกี่ยวกับจุลินทรีย์และสารบางอย่าง ซึ่งทำให้เกิดสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ คำจำกัดความใหม่นี้เน้นถึงความสำคัญของเซลล์สิ่งมีชีวิตซึ่งเป็นองค์ประกอบที่มีความสำคัญของการเป็นโปรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพ ต่อมาได้มีผู้ให้คำจำกัด ความเกี่ยวกับโปรไบโอติกมากมาย ซึ่งในปัจจุบันโปรไบโอติกได้มีคำจำกัดความว่า จุลินทรีย์ที่มีชีวิตมีจำนวนพอเพียงที่จะสามารถเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ดั้งเดิม (โดยการฝังหรือยัดเกาะ) ในช่องท้องของโฮสต์และมีประโยชน์ต่อสุขภาพของโฮสต์ (Schrezenmeir and De Vrese, 2001) นอกจากนี้ โปรไบโอติกยังได้รับการยอมรับจาก FAO/WHO โดยให้คำจำกัดความของ โปรไบโอติกว่า จุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งเมื่อได้รับในปริมาณที่เพียงพอจะทำให้มีประโยชน์ต่อสุขภาพร่างกายที่มันเข้าไปอาศัยอยู่ (FAO/WHO, 2001) ในปัจจุบันมีโปรไบโอติกจำนวนมากและหาง่ายในอาหารหมัก โดยเฉพาะโยเกิร์ต แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ที่มีความหลากหลาย โดยได้รับการพิจารณาว่ามีประโยชน์ต่อมนุษย์ เช่น แบคทีเรียกรดแลคติกที่อาศัยอยู่บริเวณของลำไส้และที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร กลุ่มของจุลินทรีย์โปรไบโอติก ได้แก่ *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Lactococcus* และ *Saccharomyces* เป็นต้น (Fuller, 1992) ส่วนใหญ่ที่แบคทีเรียกรดแลคติกมักนำมาใช้เสริมในการเลี้ยงสัตว์ เนื่องจากมีคุณสมบัติครบตามเกณฑ์ของโปรไบโอติกที่ดี ได้แก่ เป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่ไม่ก่อโรค พบเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารคนและสัตว์ สามารถเจริญเพิ่มจำนวนได้ดี และมีเมตาบอลิซึมในร่างกายผู้อาศัยสามารถทนกรดและเกลือได้ดีที่ความเข้มข้นสูง สามารถเจริญอยู่ในระบบทางเดินอาหารและลำไส้สัตว์ได้ สร้างกรดอินทรีย์และสารต้านจุลินทรีย์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในลำไส้ได้ เพิ่มจำนวนและเพาะเลี้ยงได้ง่ายที่อุณหภูมิห้อง รวมทั้งทนต่อสารปฏิชีวนะที่เสริมในอาหารสัตว์ได้ โดยสามารถแยกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ทนสารปฏิชีวนะได้จาก สุกร ไก่ และโค ที่ได้รับสารปฏิชีวนะ (Nousiamean and Setala, 1992)

สารต้านทานจุลชีพจากแบคทีเรียกรดแลคติก

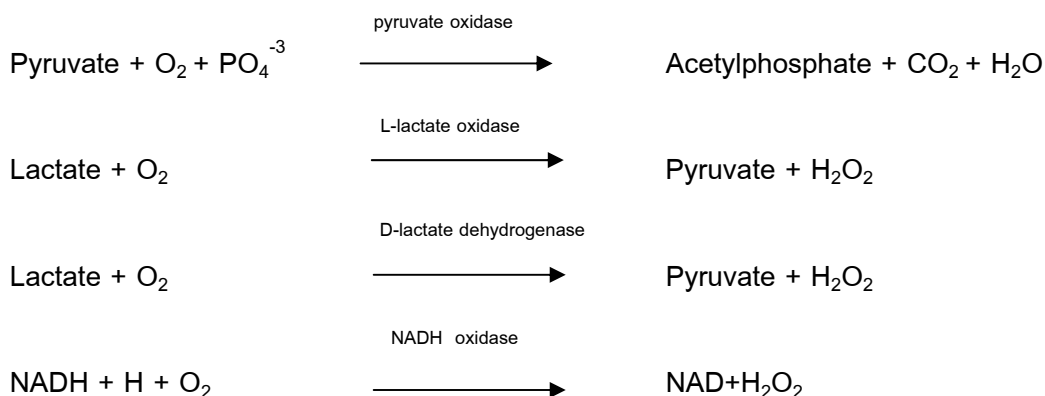
แบคทีเรียกรดแลคติก มีบทบาทในกระบวนการหมักอาหาร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ทำให้เน่าเสียและจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค ทำให้ผลิตภัณฑ์มีความปลอดภัยสูงขึ้น โดยปัจจัยหลักที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งคือ การสร้างกรด ทำให้พีเอชลดต่ำลง ทำให้สภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสมในการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ซึ่งกรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของแบคทีเรีย คือ กรดแลคติก และกรดอะซิติก นอกจากนี้ ยังมีสารประกอบอินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ที่เกิดขึ้น และมีผลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น สารที่แบคทีเรียกรดแลคติกผลิตขึ้นมีหลายชนิด ได้แก่

1. กรดอินทรีย์ (Organic acid)

กรดอินทรีย์ที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกในกระบวนการหมัก ได้แก่ กรดแลคติก และกรดอะซิติก ซึ่งทำให้พีเอชลดลงจนสามารถที่จะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์บางชนิดได้ กรดอ่อนที่มีพีเอชต่ำสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดีกว่าพีเอชเป็นกลาง ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละชนิดจะผลิตกรดอะซิติกและกรดโพรพิโอนิกในปริมาณน้อย และกรดทั้งสองชนิดมีค่า pK_a สูงกว่ากรดแลคติก ซึ่งทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกรดแลคติก (Davison, 1990) กรดอะซิติกและกรดโพรพิโอนิกถูกนำมาใช้เติมลงไปในการหมัก แต่ไม่ได้ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่ได้มาจากการสังเคราะห์ทางเคมี อาหารหมักบางชนิด ต้องอาศัยการทำงานร่วมกันระหว่างกรดอะซิติกกับกรดแลคติก เพื่อทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ดีกว่าใช้ชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงอย่างเดียว (Rubin, 1978) เมื่อกรดอินทรีย์เข้าไปภายในเซลล์แบคทีเรียจะแตกตัวปล่อยโปรตอนเข้าไปในไซโทพลาสซึม ทำให้เกิดภาวะที่เป็นกรด มีผลยับยั้งกระบวนการเมตาบอลิซึมที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์ ซึ่งมีผลทำให้จุลินทรีย์ตาย (Fuller, 1989) มีรายงานว่า แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถยับยั้งจุลินทรีย์กลุ่มที่ก่อโรคได้ โดยส่วนใหญ่จะเป็น *Lactobacillus sake* ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์เนื้อ สามารถสร้างกรดอินทรีย์มายับยั้งการเจริญของ *Salmonella typhimurium* และ *Staphylococcus aureus* ได้ (Schillinger and Lucke, 1989)

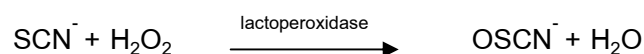
2. ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide; H_2O_2)

เป็นสารที่ได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึมในระหว่างการเจริญของ *Lactobacillus* ซึ่งอาจเกิดได้หลายทางดังนี้ปฏิกิริยา



ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นในระหว่างการเจริญของแบคทีเรีย จะสะสมเพิ่มขึ้นในอาหาร เนื่องจากไม่มีเอนไซม์คะตะเลสที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ และเป็นสารที่มี

สมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังสามารถทำปฏิกิริยากับสารอื่นกลายเป็นสารที่มีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ มีรายงานว่า ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่มีความเข้มข้น 0.12 มิลลิโมลต่อลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของ *lactococci* ได้ร้อยละ 51 และที่ความเข้มข้นมากกว่า 1.5 มิลลิโมลต่อลิตร จะมีผลทำให้เซลล์ตาย (Ander, 1970) ในสภาวะที่มีออกซิเจน แบคทีเรียกรดแลคติกจะสามารถสร้างไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ซึ่งเป็นตัวออกซิไดซ์ที่รุนแรง และมีผลต่อเซลล์แบคทีเรีย โดยหมู่ *sulfhydryl* ภายในโมเลกุลโปรตีนของเซลล์และในชั้นไขมันที่เมมเบรนสามารถออกซิไดซ์ได้ (Lindgren and Dobrogosz, 1990) ทำให้โครงสร้างของกรดนิวคลีอิกและโปรตีนในเซลล์เปลี่ยนไปจนไม่สามารถทำหน้าที่ได้ปกติ นอกจากนี้ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ยังสามารถรวมตัวกับสารประกอบอื่นเกิดเป็นสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์อื่นได้ เช่น ในน้ำนมดิบ ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์จะรวมตัวกับไทโอไซยาไนด์ (thiocyanite; SCN^-) โดยเอนไซม์แลคโตเพอร์ออกซิเดส (lactoperoxidase) เกิดเป็นไฮโปไทโอไซยาไนด์ (hypothiocyanite; OSCN^-) ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่นได้ (Banks *et al.*, 1986)



โครงสร้างเมมเบรนของแบคทีเรียจะถูกทำลายหรือมีการเปลี่ยนแปลงได้ เมื่อทำปฏิกิริยาเป็นไฮโปไทโอไซยาไนด์ (Kamau *et al.*, 1990) โดย Ocana *et al.* (1999) ได้พบว่า *Lactobacillus crispatus* F117 ที่แยกได้จากระบบสืบพันธุ์เพศหญิงสามารถสร้างไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในระดับสูง ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ได้

3. คาร์บอนไดออกไซด์ (Carbon dioxide; CO_2)

ส่วนใหญ่คาร์บอนไดออกไซด์จะเกิดจากกระบวนการหมักของน้ำตาลเฮกโซสให้เป็นกรดแลคติกแบบ heterofermentative fermentation นอกจากนี้ วิถีเมตาบอลิซึมอื่น ๆ สามารถสร้างคาร์บอนไดออกไซด์ได้ระหว่างกระบวนการหมัก คาร์บอนไดออกไซด์จะไปยับยั้งระบบเอนไซม์ของกระบวนการดีคาร์บอกซิลเลชัน (decarboxylation) (King and Nagel, 1975) และมีการสะสมของคาร์บอนไดออกไซด์ในชั้นไขมัน เป็นสาเหตุให้คุณสมบัติในการซึมผ่านของสารเสียไป (Lindgren and Dobrogosz, 1990) คาร์บอนไดออกไซด์ที่มีความเข้มข้นสูง ๆ สามารถป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์บางชนิดได้

4. ไดอะเซทิล (Diacetyl)

ไดอะเซทิลสังเคราะห์ขึ้นจากไพรูเวตที่เป็นสารตัวกลาง (intermediate) แบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างไดอะเซทิล ได้แก่ *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* และ *Streptococcus* (Jay, 1982) ไดอะเซทิลเป็นสารที่ให้กลิ่นเฉพาะในผลิตภัณฑ์นมหมัก และมีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ด้วย สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ยีสต์ และรา ได้มากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ กลไกการยับยั้งของไดอะเซทิลคาดว่า เกิดจากการทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่ยึดจับตรงตำแหน่งกรดอะมิโนอาร์จินีน ที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีน หรือเอนไซม์ (Ouweland, 1998) Kang and Fung (1999) ได้ศึกษาพบว่า ไดอะเซทิลที่ความเข้มข้น 300 ppm มีผลในการควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ ที่ก่อโรค คือ *E. coli* 0157 : H7 และ *Salmonella typhimurium* ในระหว่างการหมักเนื้อได้ ไดอะเซทิล ได้รับการยอมรับว่าปลอดภัย (GRAS) สามารถใช้เป็นสารกันบูดในอาหาร แต่ก็มีข้อจำกัดคือ ต้องใช้ปริมาณมากจึงจะมีผลในการถนอมอาหาร และเนื่องจากมีกลิ่นที่รุนแรงจึงทำให้สามารถใช้ในอาหารได้เพียงบางชนิด

5. รูทีริน (Reuterin)

รูทีรินเป็นสารที่ไม่ใช่โปรตีน น้ำหนักโมเลกุลต่ำ ละลายน้ำได้ดีที่พีเอชเป็นกลาง สร้างจากแบคทีเรียพวก *Lactobacillus reuteri* รูทีรินสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้หลายชนิด ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ ยีสต์ รา โปรโตซัว และจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ เช่น *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Candida* และ *Trypanosoma* ดังนั้น จึงอาจใช้รูทีรินในการถนอมอาหารคนและอาหารสัตว์ โดยช่วยลดจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคและที่ทำให้อาหารเสีย (Ouweland, 1998)

6. แบคเทอริโอซิน (Bacteriocin)

คำจำกัดความของแบคเทอริโอซิน

แบคเทอริโอซินเป็นสารประกอบประเภทโปรตีนโมเลกุลใหญ่ ที่ผลิตจากแบคทีเรียหลายชนิดทั้งแกรมลบและแกรมบวก โดยแบคเทอริโอซินที่ผลิตได้สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันหรือกลุ่มใกล้เคียงได้ (Klaenhammer, 1988) แบคเทอริโอซินบางชนิดสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียบางชนิดได้ นอกจากนี้ ยังมีคำอธิบายคำจำกัดความของแบคเทอริโอซินเพิ่มเติมว่า แบคเทอริโอซินผลิตโดยแบคทีเรียหลากหลายชนิด จากกลุ่มยีน heterogenous ของสารต้านทานจุลชีพ ที่มีกลไกการผลิต กิจกรรมการยับยั้ง มวลโมเลกุลโปรตีน คุณสมบัติทางชีวเคมี และพันธุกรรมที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียชนิดนั้น ๆ (Klaenhammer,

1993) แบคทีเรียโอซินที่มีความสำคัญในการนำมาใช้เพื่อถนอมอาหารและใช้ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในอาหาร ได้แก่ nisin, acidophilin, bulgarican และ lacticins เป็นต้น (Nettles and Barefoot, 1993) ซึ่งปัจจุบันมีแบคทีเรียโอซินเพียงชนิดเดียวเท่านั้นคือ nisin ที่ได้รับการยอมรับว่าปลอดภัย (Generally Recognized as Safe ; GRAS) และสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารถนอมอาหารในระดับอุตสาหกรรมได้ (Delvels-Broughton *et al.*, 1992)

ระบบการตั้งชื่อของแบคทีเรียโอซิน

การตั้งชื่อของแบคทีเรียโอซินที่ผ่านมายังไม่มีแบบแผนที่แน่นอน โดยเริ่มแรกมีพื้นฐานการตั้งชื่อตามชื่อจีนัส และเวลาต่อมาได้ตั้งชื่อตามชื่อสปีชีส์ของสายพันธุ์ที่ผลิตแบคทีเรียโอซิน ชนิดนั้น ๆ หรืออาจมีทั้งชื่อตามจีนัสและสปีชีส์ก็ได้ ตัวอย่างการตั้งชื่อตามชื่อจีนัส ได้แก่ แบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *Enterococcus faecium* ตั้งชื่อเป็น enterocin A (Aymerich *et al.*, 1996) แบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *Lactobacillus sake* ตั้งชื่อเป็น lactocin S (Mortved *et al.*, 1991) และ แบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *Leuconostoc gelidum* ตั้งชื่อเป็น leucocin A-UAL 187 (Hastings *et al.*, 1991) เป็นต้น ตัวอย่างการตั้งชื่อตามชื่อสปีชีส์ ได้แก่ แบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *Lactobacillus helveticus* ตั้งชื่อเป็น helveticin J (Joerger and Klaenhammer, 1986) แบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *Lactobacillus acidophilus* ตั้งชื่อเป็น acidocin B (Leer *et al.*, 1995) และแบคทีเรียโอซินที่ผลิต *Staphylococcus epidermidis* โดยตั้งชื่อเป็น epidermin (Allgaier *et al.*, 1986) เป็นต้น ในบางครั้งการเขียนชื่อแบคทีเรียโอซินอาจมีโดยการเติม “ e “ ท้ายชื่อแบคทีเรียโอซิน เช่น staphylococcine (Fredericq, 1946), listeriocine (Tubylewicz, 1963) และ corycine (Krylova, 1969)

การจำแนกชนิดของแบคทีเรียโอซิน

แบคทีเรียโอซินเป็นสารประกอบโปรตีนที่สังเคราะห์ในไรโบโซมของแบคทีเรีย มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่อยู่ในกลุ่มใกล้เคียงกัน คุณสมบัติของแบคทีเรียโอซินจะพิจารณาจาก ขนาด ความคงตัว การดัดแปลงหลังผ่านการแปลรหัสทางพันธุกรรม และกลไกการทำงาน ซึ่งสามารถแบ่งแบคทีเรียโอซินตามคุณสมบัติและโครงสร้างพื้นฐานออกเป็น 4 กลุ่มด้วยกันดังนี้ (Klaenhammer, 1993 ; Nes *et al.*, 1996)

1. Class I : Lantibiotic

เป็นเปปไทด์ขนาดเล็กกว่า 5 kDa ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีการดัดแปลงหลังจากการแปลรหัสพันธุกรรม (post translational) ก่อนที่จะมีการส่งออกนอกเซลล์ ซึ่งมีลักษณะแตกต่างออกไป เช่น lantionine, α -methyllanthionine, dehydroalanine, และ dehydrobutyrine เป็นต้น ซึ่งชื่อ lantionine นี้ได้นำไปใช้ในการตั้งชื่อ lantibiotics ซึ่งเป็นชื่อย่อ lantionine ที่ประกอบด้วยสายเปปไทด์ของยาปฏิชีวนะ (antibiotics) ถึงแม้ว่า lantibiotics จะมีความสัมพันธ์กับกลุ่มของยาปฏิชีวนะ เช่น กรามิซิดิน (gramicidin) หรือ วาลิโนไมซิน (valinomycin) แต่มีกระบวนการการสังเคราะห์ไรโบโซมที่ชัดเจน ดังนั้น จึงจัด lantibiotics อยู่ในกลุ่มแบคทีริโอซิน ซึ่งกลุ่มนี้แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย ตามลักษณะโครงสร้างทางเคมีและกิจกรรมการต่อต้านจุลินทรีย์คือ type A และ type B โดย lantibiotics ชนิด type A เป็นเปปไทด์สายยาวมีประจุบวก ซึ่งจะทำให้เกิดรูรั่วเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์เป้าหมายได้ ตัวอย่างของแบคทีริโอซินชนิดนี้ เช่น nisin, lactacin 481 และอื่น ๆ เป็นต้น ส่วน type B เป็นเปปไทด์ที่มีลักษณะเป็นทรงกลมมีประจุเป็นลบหรือไม่มีประจุเลย แบคทีริโอซินในกลุ่มนี้จะออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่จำเพาะเจาะจงของจุลินทรีย์เป้าหมายได้ เช่น mersacidin, ancovenin, cinnamycin และอื่น ๆ เป็นต้น (Chen and Hoover, 2003)

2. Class II : small non – lantibiotic

เป็นเปปไทด์ที่มีขนาดเล็กกว่า 10 kDa สายของเปปไทด์ประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิด non-lanthionine มีความเสถียรต่อความร้อน โดยแบคทีริโอซินในกลุ่มนี้มีจำนวนและความหลากหลายมากที่สุด ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มย่อย (Klaenhammer, 1993) คือ Class IIa ประกอบด้วยเปปไทด์ที่มีลักษณะเหมือนกับ pediocin ในสายในสายเปปไทด์ที่ปลาย N มีลำดับกรดอะมิโนเป็น Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys ซึ่งเป็นกลุ่มที่ได้รับความสนใจมากเนื่องจากสามารถยับยั้งกิจกรรมของ *Listeria* ได้ เช่น pediocin PA1/AcH, enterocin A และอื่น ๆ เป็นต้น (Larsen *et al.*, 1993) Class IIb ประกอบด้วยแบคทีริโอซินที่ต้องการเปปไทด์ 2 ชนิดที่แตกต่างกัน สำหรับใช้ในกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีริโอซิน เช่น lactococcin G และ lactacin F และ Class IIc ประกอบด้วยเปปไทด์หลากหลายชนิดที่แตกต่างจาก Class IIa และ Class IIb รวมถึง sec-dependent ที่ขับออกมา เช่น acidocin B และ divergicin A เป็นต้น

3. Class III : large heat-labile proteins

เป็นเปปไทด์ที่มีขนาดใหญ่มากกว่า 30 kDa ซึ่งไม่เสถียรต่อความร้อน แบคทีเรียโอซินกลุ่มนี้นักวิทยาศาสตร์ให้ความสนใจในการศึกษาน้อยมาก เนื่องจากไม่ทราบกลไกการทำงานที่แน่ชัด ตัวอย่างแบคทีเรียโอซินในกลุ่มนี้ได้แก่ acidophilucin A, caseicin 80, helveticin J และ lacticin A เป็นต้น (Chen and Hoover, 2003) นอกจากนี้ อาจจะรวมถึงเอนไซม์ที่มีลักษณะทางกายภาพคล้ายกับแบคทีเรียโอซินอีกด้วย

4. Class IV : complex bacteriocin

เป็นกลุ่มของแบคทีเรียโอซินที่มีโครงสร้างซับซ้อน ต้องการคาร์โบไฮเดรตหรือไขมันครึ่งหนึ่งสำหรับกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซิน แบคทีเรียโอซินในกลุ่มนี้ไม่ได้ถูกจำแนกในระดับทางชีวเคมีอย่างเพียงพอ ซึ่งยังต้องการข้อมูลเพิ่มเติมในการอธิบายความจำกััดความของกลุ่มนี้ ตัวอย่างแบคทีเรียโอซินในกลุ่มนี้ได้แก่ lactocin 27, leuconocin และ pediocin AcH เป็นต้น (Klaenhammer, 1993)

แหล่งของแบคทีเรียโอซิน

แบคทีเรียโอซินเป็นสารประกอบประเภทโปรตีนโมเลกุลใหญ่ ที่ผลิตจากแบคทีเรียหลายชนิดทั้งแกรมลบและแกรมบวก โดยแบคทีเรียโอซินที่ผลิตได้สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันหรือกลุ่มใกล้เคียงได้ (Klaenhammer, 1988) ปัจจุบันแบคทีเรียโอซินที่ผลิตได้จากแบคทีเรียกรดแลคติกได้รับความสนใจอย่างมาก เนื่องจากได้รับการยอมรับว่าปลอดภัยและมีศักยภาพเป็นสารถนอมอาหารตามธรรมชาตินอกจากนี้แล้วยังช่วยส่งเสริมสุขภาพโดยมีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกได้อีกด้วย (Montville and Winkowskin, 1997) แบคทีเรียโอซินส่วนใหญ่แยกมาจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้เป็นเชื้อต้นหรือปนเปื้อนในอาหารหลากหลายชนิด เช่น ผลิตภัณฑ์เนื้อ ผัก และนม เพื่อนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารถนอมอาหาร ตัวอย่างแบคทีเรียกรดแลคติก ที่สามารถผลิตแบคทีเรียโอซิน ได้แก่ pediococci (pediocins), lactobacilli (lactocin, plantocin, sakacin , lactocin, reuterin, brevicin, caseicin และ gasseridin), enterococci (enterococcin), carnobacterium (carnocin), leuconostocs (mesenterocins) และ lactococci (nisin, dispiococcin, lactostrepcin, lactococcin) (Kim, 1993; Klaenhammer, 1988; Brock *et al.*, 1963) เป็นต้น

การสังเคราะห์แบคทีเรียโอซิน

แบคทีเรียโอซินเป็นสารประเภทโปรตีนที่สังเคราะห์ในไรโบโซมของแบคทีเรีย การผลิตแบคทีเรียโอซินถูกควบคุมโดยกลุ่มยีนที่อยู่ร่วมกัน และควบคุมร่วมกันเป็นลักษณะของโอเปอรอน (operon) โอเปอรอนสำหรับผลิตแบคทีเรียโอซินชนิด Lantibiotic จะประกอบด้วยยีนคู่เหมือน (homologous) ที่ถูกสร้างเป็นกลุ่มยีนหลาย ๆ ยีน (Cleveland *et al.*, 2001) ลักษณะดังกล่าวส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียโอซินที่อยู่ใน Class Ia และจากการศึกษาเมื่อเร็ว ๆ นี้ พบว่า กลุ่มยีนที่อยู่ร่วมกันที่มีความสมบูรณ์อยู่ใน Class Ib คือ mersacidin (Altena *et al.*, 2000) กลุ่มยีนที่สังเคราะห์แบคทีเรียโอซินอาจตั้งอยู่บนโครโมโซม เช่น subtilin และ mersacidin หรืออาจตั้งอยู่บนพลาสมิด เช่น divergicin A และ sakacin A หรือบางชนิดอาจตั้งอยู่บนทรานโพซอน เช่น nisin และ lactacin 481 ซึ่งกลุ่มยีนจะถูกแปลรหัสเป็นโปรตีน และจะมีการดัดแปลงโครงสร้างอยู่ในรูปแบบที่แอคทีฟ (active form) ก่อนที่จะมีการส่งออกนอกเซลล์ (Klein *et al.*, 1992) สำหรับแบคทีเรียโอซินในกลุ่ม non-lantibiotic เช่น pediocin และ sakacin มียีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แบคทีเรียโอซินที่มีลักษณะเช่นเดียวกับแบคทีเรียโอซินชนิด lantibiotic แต่ไม่มีการดัดแปลงโครงสร้างโปรตีนก่อนส่งออกนอกเซลล์ จากการศึกษาของ plantaricin พบว่า รหัสยีนเป็นมัลติแบคทีเรียโอซินร่วมกับการขนส่งและระบบการบังคับ อย่างไรก็ตามแบคทีเรียโอซินมีระบบคุ้มกันตัวเอง (Diep *et al.*, 1996)

กิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซิน

แบคทีเรียโอซิน จัดเป็นสารประกอบเปปไทด์ ที่สามารถซึมผ่านเยื่อของเซลล์จุลินทรีย์เป้าหมายได้ ทำให้เกิดรูรั่วของเยื่อเซลล์ และเกิดการรั่วไหลขององค์ประกอบเซลล์ติดตามมา จึงทำให้สามารถยับยั้งการเจริญหรือเกิดการตายของจุลินทรีย์เป้าหมายได้ ซึ่งการเกิดอันตรกิริยาระหว่างแบคทีเรียโอซินกับเยื่อเซลล์มีหลายขั้นตอน ก่อให้เกิดสารคอมเพล็กซ์ที่เป็นสาเหตุของสภาพการณ์ดังกล่าวได้ (สารโรจน์, 2547) กลไกการทำงานของแบคทีเรียโอซินได้สร้างภาวะที่ไม่สมดุลของไอออนให้เกิดขึ้นในเซลล์ของจุลินทรีย์เป้าหมาย ซึ่งทำให้เซลล์ต้องสูญเสียสมดุลศักย์ไฟฟ้าและเกรเดียนต์ความเป็นกรดต่างไป โดยแบคทีเรียโอซินแต่ละชนิดจะให้ผลกระทบโดยตรงต่อความต่างศักย์และ/หรือเกรเดียนต์พีเอช ต่างกัน ทำให้กิจกรรมการยับยั้งเซลล์จุลินทรีย์เป้าหมายแตกต่างกัน เช่น nisin มีกิจกรรมยับยั้งแบบกว้าง คือสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้หลายชนิด และยับยั้งการงอกของสปอร์ *Bacillus* spp. และ *Clostridium* spp. ในขณะที่ lactococcin A มีกิจกรรมยับยั้งแบบแคบ คือสามารถยับยั้งกลุ่มแบคทีเรีย lactococcal เท่านั้น (Grooss and Morell, 1971) ดังนั้น แบคทีเรียโอซินจึงเป็นสารที่มีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์เป้าหมายได้อย่างจำเพาะเจาะจง

การผลิตแบคทีเรียโอซิน (Production of bacterocins)

การผลิตแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรียแต่ละชนิด เพื่อให้ได้ผลผลิตเพิ่มมากขึ้น มักมีปัจจัยที่สำคัญหลายชนิดที่เกี่ยวข้องในการผลิตแบคทีเรียโอซิน ได้แก่ องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะต่าง ๆ ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย (Kim *et al.*, 2006) แบคทีเรียหลายชนิดที่ไม่ปรากฏปัจจัยและสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแบคทีเรียโอซินอย่างชัดเจน จึงมีความจำเป็นต้องทำการศึกษาทดลองหาปัจจัยและสภาวะที่เหมาะสม ในการช่วยเพิ่มผลผลิตแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรีย ได้แก่

1. ส่วนประกอบของอาหารในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

แบคทีเรียต้องการสารอาหารเพื่อนำไปใช้ในการเจริญเติบโตของเซลล์และผลิตสารบางชนิด ดังนั้น อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรียจึงมีความสำคัญมาก แบคทีเรียแต่ละชนิดมีความต้องการสารอาหารแตกต่างกัน ได้แก่ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน แร่ธาตุ และวิตามิน (Li *et al.*, 2002) ดังนั้น ในการผลิตสารแบคทีเรียโอซินเพื่อให้ได้ผลผลิตเพิ่มขึ้น จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง ในการหาส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรียแต่ละชนิด ตัวอย่างรายงานผลของส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตแบคทีเรียโอซิน เช่น การผลิตแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *S. mutans* โดยทำการเติม yeast extract เข้มข้นเท่ากับ 2.0 % (w/v) เพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจนลงไปในการอาหารเหลวสูตร trypticase พบว่า แบคทีเรียสามารถผลิตแบคทีเรียโอซินให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งเพิ่มมากขึ้น (Rogers, 1972) เช่นเดียวกับการผลิต microcin GO5 จากแบคทีเรีย *Micococcus* sp. GO5 โดยใช้อาหารเหลวสูตร MRS ที่มีส่วนประกอบคือ sucrose เข้มข้น 2.0 % (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน, tryptone เข้มข้น 0.5 % (w/v) ร่วมกับ yeast extract เข้มข้นเท่ากับ 1.0 % (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน, K_2HPO_4 เข้มข้น 20-50 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งฟอสเฟตอินทรีย์ และ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ เข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งแมกนีเซียมอินทรีย์ พบว่าแบคทีเรียสามารถผลิตแบคทีเรียโอซินให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งเพิ่มขึ้น 16 เท่า เมื่อเทียบกับการใช้อาหารเหลวสูตร MRS ปกติ นอกจากนี้ ยังมีรายงานเกี่ยวกับการผลิต butyricin 7423 ในอาหารสูตรกึ่งดัดแปลง ผลผลิตเพิ่มขึ้นจะอยู่กับจำนวนเซลล์ที่เติมลงไปในการอาหารเลี้ยงเชื้อ (Clarke *et al.*, 1975)

2. สภาวะในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

การเปลี่ยนแปลงสภาวะในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย เช่น อุณหภูมิ เวลา การเติมอากาศ และพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ จะมีผลต่อการผลิตและกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซิน ซึ่งโดยทั่วไปแล้ว อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียมักจะเป็นอุณหภูมิเดียวกับอุณหภูมิ ที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียโอซิน การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่อุณหภูมิสูงมาก ๆ อาจจะทำให้ความร้อนไปทำลายแบคทีเรียโอซินที่ผลิตขึ้น และบางครั้งอาจจะทำให้เสียสภาพไม่สามารถคืนสู่สภาพเดิมได้ (Dajani and

Taube, 1974) แต่จากการรายงานที่ผ่านมาการสูญเสียกิจกรรมการยับยั้ง อันเนื่องมาจากพันธุกรรมของการผลิตแบคทีเรียโอซินสายพันธุ์นั้น ๆ ส่วนปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อการผลิตแบคทีเรียโอซินที่เห็นได้ชัดเจน คือ พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีความสำคัญมากต่อการผลิตแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรีย เนื่องจากมีผลต่อการรวมตัวหรือการดูดซึมของแบคทีเรียโอซินกลับเข้าไปในเซลล์ และการย่อยสลายของแบคทีเรียโอซินโดยเอนไซม์กลุ่มโปรตีเอส (Parente *et al.*, 1994) นอกจากนี้ ระยะเวลาในแต่ละช่วงการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย จะมีการผลิตแบคทีเรียโอซินออกมาแตกต่างกัน ดังนั้น ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย เพื่อผลิตแบคทีเรียโอซินให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงสุด นับว่าเป็นปัจจัยสำคัญ Schlegel and Slade (1973) ได้มีการศึกษาผลผลิตของ streptococcin STH พบว่า ผลผลิตสูงสุดอยู่ในช่วง exponential ของการเจริญของแบคทีเรีย หลังจากนั้นผลผลิตค่อย ๆ ลดลงก่อนเข้าสู่ช่วง stationary ซึ่งแตกต่างกับ streptococcin AFF22 ที่มีการเริ่มผลิตในช่วงปลายของ logarithmic และจะค่อย ๆ ลดลงอย่างช้า ๆ ในช่วง prolonged ของการเพาะเลี้ยง ในทำนองเดียวกันของผลผลิต staphylococcin C55 เริ่มในช่วง logarithmic จนถึงช่วงที่สูงสุดใช้เวลาประมาณ 24-48 ชั่วโมง ต่อมาผลผลิตจะค่อย ๆ ลดลง (Dajani and Wannamak, 1969)

การทำแบคทีเรียโอซินให้บริสุทธิ์

การผลิตแบคทีเรียโอซินส่วนใหญ่ได้มาจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย ดังนั้น แบคทีเรียจะผลิตแบคทีเรียโอซินปล่อยออกมาจากเซลล์ ซึ่งจะละลายปนอยู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อหรือเซลล์แบคทีเรีย สำหรับการนำเอาแบคทีเรียโอซินไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ จึงมีความจำเป็นที่จะต้องทำให้แบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์เพื่อความเหมาะสมในการใช้ประโยชน์ในด้านนั้น ๆ ซึ่งการทำแบคทีเรียโอซินให้บริสุทธิ์มีหลายวิธีด้วยกัน วิธีที่นิยมส่วนใหญ่ขั้นตอนแรกมักจะทำการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต เพื่อให้แบคทีเรียโอซินมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น จากนั้นนำแบคทีเรียโอซินที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีต่าง ๆ ได้แก่ cation exchange chromatography, hydrophobic interaction chromatography และ Reverse-phase high performance liquid chromatography (Nes *et al.*, 1996) ซึ่งการเลือกวิธีการทำแบคทีเรียโอซินให้บริสุทธิ์ ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมในการนำไปใช้ประโยชน์ด้วย

การประยุกต์ใช้แบคทีเรียโอซินในอาหาร

ผู้บริโภคมีความวิตกกังวลเกี่ยวกับอันตราย ที่ส่งผลกระทบต่อนิสัยการบริโภค เนื่องจากในปัจจุบัน มีการเติมสารเคมีลงไปในการเพิ่มมากขึ้น เพื่อใช้ในการถนอมอาหาร เช่น ไนเตรท โพแทสเซียมโซเบท และกรดอินทรีย์อื่น ๆ ซึ่งสารเหล่านี้เมื่อสะสมอยู่ในร่างกายในปริมาณมาก ๆ จะส่งผลเสียต่อร่างกาย ดังนั้น ผู้บริโภคเริ่มมีความสนใจการถนอมอาหารที่มาจากธรรมชาติเพื่อ

ทดแทนสารเคมี ดังนั้น จึงมีการกระตุ้นให้มีการศึกษาวิจัยสารธรรมชาติที่ผลิตโดยเมตาบอลิซึมของแบคทีเรีย ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียได้ โดยเฉพาะแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติก ซึ่งได้รับความสนใจอย่างมาก เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติก หรือสารเมตาโบไลต์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย กรดแลคติกมีความปลอดภัย และได้รับการยอมรับจากผู้บริโภคโดยจะมีความได้เปรียบในด้านของความเป็นธรรมชาติ และนอกจากนั้นยังช่วยส่งเสริมคุณภาพโดยมีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกได้อีกด้วย (Montville and Winkowskin, 1997)

แบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินได้จากระบบทางเดินอาหาร

Booth และ คณะ (1977) คัดแยกแบคทีเรีย จีโนส *Bacteroides* ที่สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินที่แยกจากอุจจาระมนุษย์ พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท T1-1 มีค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินสูงสุด เมื่อนำไปจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยวิธี RNA homology พบว่า เป็นแบคทีเรีย *B. thetaiotaomicron* แบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยเชื้อสายพันธุ์นี้ มีความเสถียรในช่วงพีเอชที่กว้างคือ 1.0-12.0 และสามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ถูกทำให้เสียสภาพโดยเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนบางชนิด คือ trypsin และ pronase และแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรีย *B. thetaiotaomicron* มีมวลโมเลกุลโปรตีนประมาณ 30 KDa ซึ่งแบคทีเรียเริ่มผลิตแบคทีเรียโอซินในช่วง logarithmic phase ของการเจริญของแบคทีเรีย และจะหยุดผลิตแบคทีเรียโอซินในช่วง stationary ของการเจริญของแบคทีเรีย ต่อมาในปี ค.ศ. 2000 Robredo and Torres ได้คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินจากระบบทางเดินอาหารสัตว์ หมู สุนัข แมว จำนวน 29 ไอโซเลท มาทดสอบกับเชื้อทดสอบ ซึ่งที่เป็นแบคทีเรียก่อโรคในมนุษย์และแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกมาจากมูลสัตว์ จำนวน 52 ชนิด พบว่า เป็นแบคทีเรีย *Lb. salivarius* ที่สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินได้ จำนวน 11 ไอโซเลทจากทั้งหมด 18 ไอโซเลท ซึ่งแยกจากมูลวัว คิดเป็น 61 เปอร์เซ็นต์ ของแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่ไม่สามารถผลิต แบคทีเรียโอซิน และ พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท X13 มีค่ากิจกรรมการยับยั้งต่อเชื้อทดสอบดีที่สุด คือ สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบจำนวน 11 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Listeria murrayi*, *Lb. salivarius*, *Lb. fermentum*, *Lb. paracasei*, *Pediococcus acidilactici* และ *P. pentosaceus* ดังนั้น แบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Lb. salivarius* ไอโซเลท X13 เป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารถนอมอาหาร ในปี ค.ศ. 2004 Arici และ คณะ ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติก จีโนส *Lactobacillus* ที่สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินได้จากอุจจาระเด็กทั้งหมด 21 ไอโซเลท ซึ่งเป็นแบคทีเรีย *Lb. rhamnosus* จำนวน 7 ไอโซเลท แบคทีเรีย *Lb. paracasei* spp. จำนวน 4 ไอโซเลท *Lb. fermentum* จำนวน 4 ไอโซเลท *Lb. buchneri* จำนวน 2 ไอโซเลท และ *Lb. brevis* จำนวน 1 ไอโซเลท และ *Lactobacillus* spp. จำนวน 2 ไอโซเลท เพื่อทดสอบการผลิตกรด การทนต่อยาปฏิชีวนะ

การผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และหาค่ากิจกรรมยับยั้งเชื้อทดสอบที่ก่อโรคบางชนิด โดยวิธี well diffusion assay พบว่า แบคทีเรียสามารถผลิตแบคเทอริโอซินยับยั้งเชื้อทดสอบดังนี้ *B. cereus* FMC19, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 2392 และ *Y. enterocolitica* ATCC 1501 แบคทีเรียบางไอโซเลทที่ทำการคัดแยกผลิตแบคเทอริโอซินที่มีค่ากิจกรรมยับยั้งแบบกว้าง ซึ่งมีศักยภาพเป็นเชื้อตั้งต้นในการผลิตอาหารหมัก และเป็นสายพันธุ์ที่ใช้เป็นโปรไบโอติกได้อีกด้วย ต่อมาใน ค.ศ. 2006 Pilasombut และ คณะ ได้ทำการแยกแบคทีเรียกรดแลคติก จินัส *Lactobacillus* ที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้จากลำไส้ไก่ในฟาร์มของประเทศไทย โดยใช้วิธีทดสอบหาค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินด้วยวิธี spot-on-lawn พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติก *Lb. salivaius* K7 ที่จำแนกโดยใช้วิธีทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและหาลำดับเบส DNA ในส่วนของยีน 16S rDNA ซึ่งแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Lb. salivaius* K7 สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ แบคทีเรีย *B. coagulans*, *Leu. mesenterides* และ *Lb. sakei* เป็นต้น แต่ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ แบคเทอริโอซินชนิดนี้ เสียสภาพกิจกรรมการยับยั้งโดยเอนไซม์ในกลุ่มที่ย่อยโปรตีน เช่น trypsin, proteinase K และ pepsin เป็นต้น มีความเสถียรต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และมีความเสถียรต่อพีเอชที่กว้างคือ 3.0-10.0 มีมวลโมเลกุลโปรตีนประมาณ 4331.70 Da โดยใช้เทคนิค ESI mass spectrometry และต่อมาใน ค.ศ. 2007 Strompfova และ Laukova ทำการจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติก จินัส *Enterococci* ที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้จากระบบทางเดินอาหารไก่ จำนวน 17 ไอโซเลท มาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งต่อเชื้อทดสอบ 20 ชนิด โดยวิธี agar diffusion พบว่า ไอโซเลท EF55, EF3S1, EF2S3, EF2S1 และ EFH31 สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้ และจำแนกชนิดของแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลทโดยวิธี PCR พบว่า เป็นแบคทีเรีย *E. faecium* และพบว่า แบคทีเรียไอโซเลท EF55 มีค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินสูงสุดเท่ากับ 200 AU/ml และมีฤทธิ์ยับยั้งทั้งแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก นอกจากนี้ แบคเทอริโอซินยังเสียดสภาพโดยเอนไซม์ย่อยโปรตีน ได้แก่ protease, trypsin, alpha-chymotrypsin และ pepsin นอกจากนี้ มีความเสถียรต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 60, 80 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20, 10 และ 10 นาที ตามลำดับ และมีความคงทนต่อพีเอชแบบกว้าง คือ พีเอช 3.0-9.0 เมื่อนำแบคทีเรียไอโซเลท EF55 มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน 5 ชนิด คือ อาหารสูตร MRS อาหารสูตร BHI อาหารสูตร TSY อาหารสูตร TH และอาหารสูตร NB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน พบว่า แบคทีเรียสามารถผลิตแบคเทอริโอซินในอาหารสูตร MRS ที่มีพีเอชเริ่มต้นเป็น 6.0-7.0 ให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงสุด และแบคเทอริโอซินชนิดนี้มีมวลโมเลกุลโปรตีนประมาณ 10 KDa

กรอบแนวความคิด

เนื่องจากในปัจจุบันมีการใช้สารปฏิชีวนะผสมในอาหารสัตว์เพื่อเร่งการเจริญเติบโต และการเติมสารเคมีลงไปในการอาหาร เพื่อเป็นสารถนอมอาหารเพิ่มมากขึ้น ซึ่งสารเหล่านี้เมื่อสะสมอยู่ในร่างกายปริมาณมาก ๆ จะเป็นอันตรายต่อร่างกาย ผู้บริโภคมีความวิตกกังวลเกี่ยวกับอันตรายที่อาจส่งผลเสียต่อสุขภาพ ดังนั้น มีการศึกษาหาสารอื่นมาทดแทนสารปฏิชีวนะและสารเคมีเพิ่มมากขึ้น สารธรรมชาติที่ผลิตโดยเมตาบอลิซึมของแบคทีเรีย โดยเฉพาะแบคทีเรียกรดแลคติกได้รับความสนใจอย่างมาก เนื่องจากเชื้อกลุ่มนี้มีความสำคัญทั้งในอาหารคนและอาหารสัตว์ ซึ่งสามารถผลิตกรดแลคติกที่มีประโยชน์มากในอุตสาหกรรมหลาย ๆ ชนิด และยังสามารถผลิตสารแบคทีเรียโอซินที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ หรือทำลายแบคทีเรียในกลุ่มแลคติกเอง หรือแบคทีเรียที่ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์ และเมื่ออยู่ในลำไส้สัตว์ช่วยเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของสัตว์ได้อีกด้วย นอกจากนี้ปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะของจุลินทรีย์ทำให้มนุษย์จำเป็นต้องหายาด้านต้านจุลชีพใหม่ๆ เพื่อทดแทนยาต้านจุลชีพชนิดเดิม แบคทีเรียโอซินซึ่งเป็น antimicrobial protein จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่นับว่ามีศักยภาพสูงในการผลิตสารต้านจุลชีพชนิดใหม่ นอกเหนือจากความได้เปรียบทางด้านความปลอดภัยเนื่องจากความเป็นธรรมชาติแล้ว การพัฒนาการผลิตในระบบอุตสาหกรรมโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพก็สามารถทำได้โดยง่ายซึ่งนักวิจัยส่วนใหญ่ศึกษาการผลิตแบคทีเรียโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากอาหารและผลิตภัณฑ์นม เพื่อมุ่งเน้นนำไปเป็นสารถนอมอาหาร ประกอบกับการศึกษาการผลิตแบคทีเรียโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติกในระบบทางเดินอาหารยังมีน้อย ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาแบคทีเรียโอซินจากแหล่งใหม่ ๆ คือ ระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์ เพื่อสามารถนำไปพัฒนาใช้เป็นโปรไบโอติกในอาหารคนและอาหารสัตว์ ซึ่งจะช่วยส่งเสริมสุขภาพสัตว์และลดปัญหาการเกิดโรคติดเชื้อในสัตว์เศรษฐกิจได้

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์การทดลอง

1. ตัวอย่างที่ใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติก

- 1.1 อุจจาระมนุษย์จากนักศึกษาแพทยหญิงและชายในมหาวิทยาลัยแม่โจ้ จำนวน 7 ตัวอย่าง
- 1.2 ตัวอย่างมูลไก่จากหมู่บ้านต่าง ๆ ในจังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 8 ตัวอย่าง
- 1.3 ตัวอย่างมูลโคจากฟาร์มโคในบริเวณใกล้เคียงกับมหาวิทยาลัยแม่โจ้ จำนวน 3 ตัวอย่าง
- 1.4 ตัวอย่างมูลสุกรจากฟาร์มสุกรมหาวิทยาลัยแม่โจ้ จำนวน 7 ตัวอย่าง

2. แบคทีเรียที่ใช้เป็นเชื้อทดสอบ (indicator strains)

- | | |
|---|--|
| 2.1 <i>Lactobacillus casei</i> JCM 1134 | 2.19 <i>Staphylococcus aureus</i> TISTR 517 |
| 2.2 <i>Lactobacillus fermentum</i> JCM 1173 | 2.20 <i>Listeria monocytogenes</i> DMST 1327 |
| 2.3 <i>Lactobacillus delbrueckii</i> JCM 1012 | 2.21 <i>Listeria monocytogenes</i> DMST 2871 |
| 2.4 <i>Lactobacillus gallinarum</i> JCM 2011 | 2.22 <i>Listeria monocytogenes</i> DMST 1783 |
| 2.5 <i>Lactobacillus crispatus</i> JCM 5810 | 2.23 <i>Listeria monocytogenes</i> DMST 4553 |
| 2.6 <i>Lactobacillus pentosus</i> JCM 1558 | 2.24 <i>Listeria murrayi</i> DMST 4564 |
| 2.7 <i>Lactobacillus agilis</i> JCM 1187 | 2.25 <i>Streptococcus agalactiae</i> DMST 11366 |
| 2.8 <i>Lactobacillus thermotolerans</i> JCM 11425 | 2.26 <i>Streptococcus dysgalactiae</i> DMST10953 |
| 2.9 <i>Lactobacillus mucosae</i> DMST 13345 | 2.27 <i>Helicobacter pylori</i> DMST 20165 |
| 2.10 <i>Enterococcus avium</i> JCM 8722 | 2.28 <i>Escherichia coli</i> MJU |
| 2.11 <i>Enterococcus durans</i> JCM 8725 | 2.29 <i>Escherichia coli</i> DMST 12743 |
| 2.12 <i>Enterococcus gallinarum</i> JCM 8728 | 2.30 <i>Enterobacter aerogenes</i> MJU |
| 2.13 <i>Enterococcus faecium</i> MJU 92 | 2.31 <i>Serratia marcescens</i> MJU |
| 2.14 <i>Pediococcus pentosaceus</i> MJU 78 | 2.32 <i>Salmonella typhimurium</i> TISTR 292 |
| 2.15 <i>Pediococcus acidilactici</i> MJU | 2.33 <i>Salmonella choleraesuis</i> DMST 8014 |
| 2.16 <i>Bacillus subtilis</i> TISTR 008 | 2.34 <i>Salmonella enteritidis</i> DMST 15676 |
| 2.17 <i>Bacillus cereus</i> MJU | 2.35 <i>Vibrio cholerae</i> DMST 2873 |
| 2.18 <i>Micrococcus luteus</i> MJU | 2.36 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> DMST5665 |

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)

- 3.1 อาหารเหลวสูตร De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) (Criterion, USA)
- 3.2 อาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว สูตร De Man, Rogosa and Sharpe (0.7 % agar) (Criterion, USA)
- 3.3 อาหารแข็งสูตร De Man, Rogosa and Sharpe (1.5 % agar) (Criterion, USA)
- 3.4 อาหารเหลวสูตร Brain Heart Infusion (BHI) (Scharlau, Spain)
- 3.5 อาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวสูตร Brain Heart Infusion (0.7 % agar) (Scharlau, Spain)
- 3.6 อาหารแข็งสูตร Brain Heart Infusion (1.5 % agar) (Scharlau, Spain)

4. สารเคมี (ภาคผนวก ข)

- 4.1 สารเคมีที่ใช้สำหรับปรับพีเอช
 - 4.1.1 สารละลาย NaOH ความเข้มข้น 5.0 นอร์มอล (Merck, Germany)
 - 4.1.2 สารละลาย HCl ความเข้มข้น 5.0 นอร์มอล (Merck, Germany)
- 4.2 สารเคมีที่ใช้ทดสอบกิจกรรมของแบคทีเรียโอซิน
 - 4.2.1 เอนไซม์ proteinase K (Sigma, USA)
 - 4.2.2 เอนไซม์ protease (Sigma, USA)
 - 4.2.3 เอนไซม์ catalase (Sigma, USA)
 - 4.2.4 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 3 % ที่ทำการเจือจางกับน้ำ ในอัตราส่วน 1:16
- 4.3 สารเคมีที่ใช้ในการจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติก โดยวิธีการหาลำดับเบสของ DNA ในส่วนของ ยีน 16S rDNA
 - 4.3.1 ชุดสกัด DNA สำเร็จรูป (Isoplant DNA extraction kit No.314-02731) (Nippon Gene, Japan)
 - 4.3.2 เอนไซม์ RNase (Nippon Gene, Japan)
 - 4.3.3 Absolute ethanol และ 70 % ethanol (Merck, Germany)
 - 4.3.4 27F (forward primer) 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG- 3' (Operon, Germany)
 - 4.3.5 520R (reverse primer) 5'-ACCGCGGCKGCTGGC- 3' (Operon, Germany)
 - 4.3.6 Master mix (Eppendorf, USA)
 - 4.3.7 ชุดทำ PCR product ให้บริสุทธิ์ (TaKaRa SUPRECTM-PCR) (Takara, Japan)
 - 4.3.8 O' GeneRulerTM 100 bp DNA ladder (Fermentas LIFE SCIENCES, USA)
 - 4.3.9 loading dye (Fermentas LIFE SCIENCES, USA)
 - 4.3.10 ผงวุ้นอะกาโรส (agarose)
 - 4.3.11 TE buffer (พีเอช 8.0)
 - 4.3.12 1X TAE buffer

4.3.12 สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (EtBr)

4.4 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

4.4.1 สารละลาย A : Na_2CO_3 ความเข้มข้น 2.0 % (w/v) (Fisher chemical, UK)

NaHO ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ (Merck, Germany)

4.4.2 สารละลาย B : $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ความเข้มข้น 2.0 % (w/v) (Carlo erba, France)

Na-K-tartrate ความเข้มข้น 1.0 % (w/v) (Carlo erba, France)

4.4.3 สารละลาย C : สารละลาย A ปริมาตร 50.0 มิลลิลิตร และสารละลาย B

ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร

4.4.4 สารละลาย D : Folin ciocateus phenol reagent (Merck, Germany)

4.4.5 สารละลายโปรตีนมาตรฐาน (Bovine Serum Albumin; BSA) (Fluka, Switzerland)

4.4.6 แอมโมเนียมซัลเฟต (Merck, Germany)

4.5 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโปรตีน

4.5.1 SDS (Sodium dodecyl sulphate) ความเข้มข้น 10 % (w/v) (Fisher chemicals, UK)

4.5.2 Coomassie R-250 ความเข้มข้น 5 % (w/v) (Bio-rad, USA)

4.5.3 Tris base (Univar, Australia) (Univar, Australia)

4.5.4 Tricine (Bio-rad, USA) (Bio-rad, USA)

4.5.5 β -mercaptoethanol (Bio-rad, USA)

4.5.6 Ammonium persulfate ความเข้มข้น 10 % (w/v) (Bio-rad, USA)

4.5.7 Glycerol ความเข้มข้น 87 % (w/v) และ Glycerol ความเข้มข้น 10 % (w/v) (Univar,

4.5.8 Glycerol ความเข้มข้น 10 % (w/v)

4.5.9 เจลสำเร็จรูป Ready Gel^R Precast Gels (BIO-RAD)

4.5.10 เมทานอล ความเข้มข้น 40 % (v/v) (Merck, Germany)

4.5.11 กรดอะซิติก ความเข้มข้น 10 % (v/v) (Merck, Germany)

4.5.12 Polypeptide SDS-PAGE standard (molecular weight marker) (Bio-rad, USA)

5. เครื่องมือ

5.1 เครื่องวัดค่าความเป็นกรดต่าง (pH meter) ยี่ห้อ Metrohm

5.2 ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar flow) ยี่ห้อ Microflow รุ่น Advanced Bio Safety Cabinet Class II

5.3 เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (microcentrifuge) ยี่ห้อ Sanyo รุ่น Harrier

5.4 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ยี่ห้อ HETTICH รุ่น EBA 12R

5.5 ตู้บ่มเชื้อ (incubator) ยี่ห้อ Binder

5.6 ตู้อบเครื่องแก้ว (hot air oven) ยี่ห้อ Binder

- 5.7 กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ (compound microscopy) ยี่ห้อ Olympus
- 5.8 เครื่อง Microwave ยี่ห้อ Sharp
- 5.9 เครื่อง PCR Sprint Thermal Cycler ยี่ห้อ Thermo hybrid รุ่น Spint
- 5.10 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (analytical balance) ยี่ห้อ OHAUS
- 5.11 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (microbalance) ยี่ห้อ Metler Toledo
- 5.12 เครื่องแยกตัวอย่าง DNA (gel-electrophoresis) ยี่ห้อ Bio-rad
- 5.13 เครื่องแยกตัวอย่างโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า (SDS-PAGE apparatus) ยี่ห้อ Bio-rad
- 5.14 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ยี่ห้อ Genesys 20
- 5.15 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ยี่ห้อ Perkin-Elmer รุ่น OGENE
- 5.16 เครื่อง Transluminator ยี่ห้อ Bio-rad
- 5.17 หม้อนึ่งความดัน (autoclave) ยี่ห้อ Pressure sterilizer Model No. 1941X
- 5.18 ตู้เย็นเก็บสารเคมี (refrigerator) ยี่ห้อ Mitsubishi
- 5.19 ตู้แช่แข็ง (deep freezer) – 80 องศาเซลเซียส ยี่ห้อ Sanyo

6. อุปกรณ์และเครื่องแก้วอื่น ๆ

- 6.1 ปีกเกอร์ (beaker) ขนาด 250 และ 1,000 มิลลิลิตร
- 6.2 ขวดรูปชมพู่ (flask) ขนาด 125, 250 และ 500 มิลลิลิตร
- 6.3 ขวดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 100 และ 500 มิลลิลิตร
- 6.4 หลอดทดลอง (tube) ขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร
- 6.5 กระบอกตวง (measuring cylinder) ขนาด 100 และ 1,000 มิลลิลิตร
- 6.6 ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด 0-20, 20-200 และ 100-1,000 มิลลิลิตร
- 6.7 ห่วงถ่ายเชื้อ (loop)
- 6.8 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (petri dish)
- 6.9 ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 6.10 ตัวกรองชนิดไนลอน (nylon syringe filter) ขนาด 0.2 ไมโครเมตร
- 6.11 Centri-sep columns (Applied Biosystems, USA)
- 6.12 Anaerobic jar
- 6.13 สำลี
- 6.14 ถังพลาสติก
- 6.15 ข้อนตักสาร
- 6.16 ขวดเก็บสารเคมี
- 6.17 ไมโครปิเปตทิฟ

วิธีการทดลอง

1. การแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินจากระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์

1.1 การเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่าง 4 แหล่ง คือ ตัวอย่างอุจจาระมนุษย์จากนักศึกษาแพทยและชายในมหาวิทยาลัยแม่โจ้ จำนวน 7 ตัวอย่าง ตัวอย่างมูลไก่จากอำเภอสันทรายในจังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 8 ตัวอย่าง ตัวอย่างมูลโคจากฟาร์มโคในบริเวณใกล้เคียงกับมหาวิทยาลัยแม่โจ้ จำนวน 3 ตัวอย่าง และตัวอย่างมูลสุกรจากฟาร์มสุกรมหาวิทยาลัยแม่โจ้ จำนวน 7 ตัวอย่าง โดยทำการเก็บตัวอย่างใส่ในหลอดพลาสติกที่ปราศจากเชื้อขนาด 16 X 150 มิลลิเมตร และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการแยกแบคทีเรียต่อไป

1.2 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินขึ้นต้น

นำตัวอย่างที่เก็บได้มาทำการแยกแบคทีเรียกรดแลคติก ที่สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินได้ในห้องปฏิบัติการ โดยใช้วิธี the direct plating (Noonpakdee *et al.*, 2003) ขั้นตอนแรกทำการเพิ่มจำนวน (enrichment) แบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารเหลวสูตร MRS ก่อน โดยการนำตัวอย่างไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MRS บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน (anaerobic) หลังจากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแบคทีเรียเจือจางตามลำดับ (serial dilution) ด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ เลือกระดับความเจือจางที่เหมาะสม 2 ระดับ มาเกลี่ยเชื้อ (spread) บนอาหารแข็งสูตร MRS ที่มีกลูโคส เข้มข้น 0.2 % (w/v) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน แบคทีเรียกรดแลคติกจะเจริญเป็นโคโลนีเดี่ยวบนผิวหน้าอาหารแข็งสูตร MRS จากนั้นเททับด้วยอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวสูตร MRS (0.7 % agar) ที่มีเชื้อทดสอบแต่ละชนิดผสมอยู่ มีค่าดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ผสมอยู่ที่ความเข้มข้น 0.1% (v/v) โดยการทดลองนี้ใช้เชื้อทดสอบทั้งสิ้น 4 ชนิด คือ *Lactobacillus fermentum* JCM 1173, *Lactobacillus casei* JCM 1134, *Enterococcus durans* JCM 8725 และ *Pediococcus pentosaceus* MJU 78 จากนั้นนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง ในสภาพไร้ออกซิเจน จากนั้นสังเกตดูลักษณะวงใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นรอบ ๆ โคโลนีแบคทีเรียกรดแลคติก แล้วนำโคโลนีที่เกิดวงใสไปทำให้บริสุทธิ์

1.3 การทำเชื้อให้บริสุทธิ์และการเก็บรักษาเชื้อ

เลือกโคโลนีแบคทีเรียที่เกิดวงใสมาขีด (streak) ลงบนอาหารแข็งสูตร MRS เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว (single colony) จากนั้นนำแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีเดี่ยวไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MRS ซึ่งบรรจุในหลอดทดลองปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน จากนั้นนำแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวมาปั่นเหวี่ยง แยกตะกอนเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ และละลายตะกอนเซลล์ที่ได้ด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นเก็บเชื้อบริสุทธิ์ในกลีซอลรอล 20 % (v/v) ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบในขั้นตอนต่อไป (Niamsup *et al.*, 2003)

2. การทดสอบฤทธิ์ของสารแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งต่อแบคทีเรียทดสอบ

2.1 การเตรียมตัวอย่างเพื่อทดสอบกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซิน ดัดแปลงจากวิธีการของ Schillinger and Lucke (1989)

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกที่เกิดวงใสที่แยกได้จากข้อ 1.3 ในอาหารเหลวสูตร MRS ที่บรรจุในหลอดทดลอง ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แยกเอาส่วนใส (supernatant) ที่ได้ มาทำการปรับค่าพีเอชให้ได้เท่ากับ 6.5 ด้วยสารละลาย NaOH เข้มข้น 5 นอร์มอล เพื่อลดอิทธิพลที่เกิดจากการกรดอินทรีย์ต่าง ๆ ที่แบคทีเรียผลิตขึ้น และทำการเติมเอนไซม์อะไมเลสให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อลดอิทธิพลที่เกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงไปในตัวอย่าง จากนั้นนำมากรองด้วยชุดกรองชนิดไนลอน (nylon syringe filter) ที่มีขนาดรูประมาณ 0.2 ไมโครเมตร และเก็บของเหลวใสที่ได้จากการกรองไว้ในหลอด microcentrifuge ที่ปราศจากเชื้อ เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อทำการทดสอบขั้นต่อไป

2.2 การเตรียมแบคทีเรียทดสอบ (Indicator bacterial strain)

แบคทีเรียทดสอบจำนวนทั้งสิ้น 36 ชนิด ได้แก่ แบคทีเรียทดสอบที่ก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร และแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียมีทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ ดังแสดงในตาราง 1

ตาราง 1 แสดงสายพันธุ์แบคทีเรียทดสอบและสภาวะในการเพาะเลี้ยง

เชื้อทดสอบ	แกรม	อาหาร	สภาวะการเพาะเลี้ยง
<i>Lactobacillus casei</i> JCM 1134	+	MRS	37 °C, anaerobic
<i>Lactobacillus fermentum</i> JCM 1173	+	MRS	37 °C, anaerobic
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> JCM 1012	+	MRS	37 °C, anaerobic
<i>Lactobacillus gallinarum</i> JCM 2011	+	MRS	37 °C, anaerobic
<i>Lactobacillus crispatus</i> JCM 5810	+	MRS	37 °C, anaerobic
<i>Lactobacillus pentosus</i> JCM 1558	+	MRS	37 °C, anaerobic
<i>Lactobacillus agilis</i> JCM 1187	+	MRS	37 °C, anaerobic
<i>Lactobacillus thermotolerans</i> JCM 11425	+	MRS	37 °C, anaerobic
<i>Lactobacillus mucosae</i> DMST 13345	+	MRS	37 °C, anaerobic
<i>Enterococcus avium</i> JCM 8722	+	MRS	37 °C, anaerobic
<i>Enterococcus durans</i> JCM 8725	+	MRS	37 °C, anaerobic
<i>Enterococcus gallinarum</i> JCM 8728	+	MRS	37 °C, anaerobic
<i>Enterococcus faecium</i> MJU 92	+	MRS	37 °C, anaerobic
<i>Pediococcus pentosaceus</i> MJU 78	+	MRS	37 °C, anaerobic
<i>Pediococcus acidilactici</i> MJU No.1	+	MRS	37 °C, anaerobic
<i>Bacillus subtilis</i> TISTR 008	+	BHI	37 °C, anaerobic
<i>Bacillus cereus</i> MJU	+	BHI	37 °C, anaerobic
<i>Micrococcus luteus</i> MJU	+	BHI	37 °C, anaerobic
<i>Staphylococcus aureus</i> TISTR 517	+	BHI	37 °C, anaerobic
<i>Listeria monocytogenes</i> DMST 1327	+	BHI	37 °C, anaerobic

ตาราง 1 สายพันธุ์แบคทีเรียทดสอบและสภาวะในการเพาะเลี้ยง (ต่อ)

เชื้อทดสอบ	แกรม	อาหาร	สภาวะการเพาะเลี้ยง
<i>Listeria monocytogenes</i> DMST 2871	+	BHI	37 °C, anaerobic
<i>Listeria monocytogenes</i> DMST 1783	+	BHI	37 °C, anaerobic
<i>Listeria monocytogenes</i> DMST 1783	+	BHI	37 °C, anaerobic
<i>Listeria monocytogenes</i> DMST 4553	+	BHI	37 °C, anaerobic
<i>Listeria murrayi</i> DMST 4564	+	BHI	37 °C, anaerobic
<i>Streptococcus agalactiae</i> DMST 11366	+	BHI	37 °C, aerobic
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> DMTS 10953	+	BHI	37 °C, aerobic
<i>Helicobacter pylori</i> DMST 20165	+	BHI	37 °C, anaerobic
<i>Escherichia coli</i> MJU	-	BHI	37 °C, aerobic
<i>Escherichia coli</i> DMST 12743	-	BHI	37 °C, aerobic
<i>Enterobacter aerogenes</i> MJU	-	BHI	37 °C, aerobic
<i>Serratia marcescens</i> MJU	-	BHI	37 °C, aerobic
<i>Salmonella typhimurium</i> TISTR 292	-	BHI	37 °C, aerobic
<i>Salmonella choleraesuis</i> DMST 8014	-	BHI	37 °C, aerobic
<i>Salmonella enteritidis</i> DMST 15676	-	BHI	37 °C, aerobic
<i>Vibrio cholerae</i> DMST 2873	-	BHI	37 °C, aerobic
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> DMST 5665	-	BHI	37 °C, aerobic

2.3 การทดสอบฤทธิ์ของแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ

นำแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกด้วยวิธี direct plating มาทดสอบหาค่ากิจกรรมการยับยั้งต่อแบคทีเรียทดสอบจำนวน 36 ชนิด ได้แก่ แบคทีเรียทดสอบที่ก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร และแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย โดยวิธี well diffusion assay (ดัดแปลงจากวิธีการของ Schillinger and Lucke, 1989) ดังนี้คือ นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารแข็งสูตร MRS หรืออาจเป็นอาหารแข็งสูตร BHI (ขึ้นกับชนิดของเชื้อทดสอบที่ใช้) มาเททับด้วยอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวสูตร MRS (0.7% agar) หรืออาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวสูตร BHI (0.7% agar) และมีเชื้อทดสอบแต่ละสายพันธุ์ที่ผสมอยู่ความเข้มข้น 0.1 % (v/v)

จากนั้นทำการเจาะหลุมบนอาหารด้วย cork borer ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5 มิลลิเมตร และหยอดอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวสูตร MRS (0.7% agar) ลงไปเล็กน้อยเพื่อรองกันหลุม จากนั้นนำของเหลวใสที่เตรียมไว้ข้างต้นตามข้อ 2.1 หยอดลงไปให้หลุมปริมาตร 50 ไมโครลิตร ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 3.0 % ที่ทำการเจือจางกับน้ำ ในอัตราส่วน 1:16 เป็น positive control และอาหารเหลวสูตร MRS เป็น negative control จากนั้นนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน สังเกตดูวงใสที่เกิดขึ้น วัดค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินต่อเชื้อทดสอบตามขนาดวงใส (Noonpakdee *et al.*, 2003) เมื่อนำแบคทีเรียมาทดสอบฤทธิ์ของแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อทดสอบ จำนวน 36 ชนิด จากนั้นคัดเลือกแบคทีเรียที่มีกิจกรรมการยับยั้งต่อเชื้อทดสอบมากที่สุด จำนวน 3 ไอโซเลท มาทำการหาค่ากิจกรรมการยับยั้งต่อเชื้อทดสอบซ้ำอีกครั้งหนึ่ง เพื่อนำผลมาเปรียบเทียบใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียไอโซเลทที่มีค่ากิจกรรมการยับยั้งต่อเชื้อทดสอบดีที่สุด เพื่อนำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป

3. ลักษณะความคงตัวของแบคทีเรียโอซิน

3.1 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซิน

การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซิน จัดแปลงจากวิธีการของ Oh *et al.* (2000) โดยเฉพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลท CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน เตรียมตัวอย่างของแบคทีเรียโอซินตามขั้นตอนข้อ 2.1 จากนั้นนำแบคทีเรียโอซินมาทดสอบคุณสมบัติการทนต่อความร้อน โดยนำไปแช่ไว้ในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 65, 95 และ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40, 20 และ 20 นาที ตามลำดับ นำแบคทีเรียโอซินมาทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ ครั้งละ 2 เท่า ตามลำดับ (two fold dilution) (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 และ 1:64) จากนั้นนำไปทดสอบหาค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินด้วยวิธี well diffusion assay โดยใช้ *Lb. fermentum* JCM 1173 เป็นเชื้อทดสอบ

3.2 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซิน

การศึกษาผลของพีเอชต่อกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซิน จัดแปลงจากวิธีการของ Oh *et al.* (2000) โดยเฉพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมงในสภาวะไร้ออกซิเจน จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้มาการปรับค่าพีเอชด้วยสารละลาย NaOH และสารละลาย HCl ความเข้มข้น 5 นอร์มอล ให้มีค่าเท่ากับ 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 และ 10.0 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นปรับค่าพีเอชของแบคทีเรียโอซินให้เป็น 6.5 และเติมเอนไซม์อะไมเลสให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำมากรองผ่านชุดกรองชนิดในลอน ที่มีขนาดรู 0.2 ไมโครเมตร แล้วทำการเจือ

จางด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อครั้งละ 2 เท่า ตามลำดับ จากนั้นนำไปทดสอบค่ากิจกรรมยับยั้งของแบคทีเรียโอซินที่เหลือยู่ด้วยวิธี well diffusion assay โดยใช้ *Lb. fermentum* JCM 1173 เป็นเชื้อทดสอบ

3.3 ผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่อกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซิน

การศึกษาผลของเอนไซม์ต่อกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซิน จัดแปลงจากวิธีการของ Noonpakdee *et al.* (2003) โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน เตรียมตัวอย่างของแบคทีเรียโอซินตามขั้นตอนข้อ 2.1 จากนั้นนำแบคทีเรียโอซินมาเติมเอนไซม์ proteinase K และ protease ลงไป ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ แล้วทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ ครั้งละ 2 เท่า ตามลำดับ จากนั้นนำไปทดสอบค่ากิจกรรมยับยั้งของแบคทีเรียโอซินที่เหลือยู่ ด้วยวิธี well diffusion assay โดยใช้ *Lb. fermentum* JCM 1173 เป็นเชื้อทดสอบ

4. การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียไอโซเลท CF52

4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทางสรีรวิทยา

4.1.1 ศึกษา รูปร่าง การติดสีแกรม และการจัดเรียงตัวของเซลล์

นำแบคทีเรียบริสุทธิ์ไอโซเลท CF52 อายุ 18-24 ชั่วโมง มาเกลี่ย (smear) บนสไลด์ ปล่อยให้แห้งในอากาศ นำสไลด์ผ่านเปลวไฟไปมา 2-3 ครั้ง เพื่อตรึงเซลล์ให้ติดกับสไลด์แน่นขึ้น จากนั้นทำการย้อมแบบแกรม (Gram's staining) โดยหยด crystal violet ให้ทั่วมรอยเชื้อที่เกลี่ยไว้ นาน 1 นาที เทสีทิ้ง ล้างออกด้วยน้ำประปาเบา ๆ หยดสารละลายไอโอดีนลงไป ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำประปา จากนั้นล้างสี crystal violet ด้วย acetone alcohol เป็นเวลา 5-10 วินาที ล้างออกด้วยน้ำอีกครั้งหนึ่ง ย้อมทับด้วยสี safranin เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเทสีทิ้งพร้อมกับล้างสีออกด้วยน้ำเบา ๆ ซับสไลด์ให้แห้ง จากนั้นนำสไลด์ไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บันทึกลักษณะ รูปร่าง การติดสีแกรม การจัดเรียงตัวของเซลล์

4.1.2 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์อะไมเลส

นำแบคทีเรียไอโซเลท CF52 ไปขีดลงบนอาหารแข็งสูตร MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เลือกแบคทีเรียที่เจริญเป็นลักษณะโคโลนีเดี่ยว มาเกลี่ยลงบนสไลด์ที่สะอาด จากนั้นผสมด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 3.0 % (w/v) ให้ทั่วมรอยเชื้อที่

เกลียวไว้ สังเกตปฏิกิริยาการเกิดฟองหลังจากหยดสารละลาย ผลการทดสอบให้ผลบวกจะเกิดฟองก๊าซขึ้น ส่วนผลลบไม่เกิดฟองก๊าซ

4.1.3 การทดสอบความสามารถในการสร้างก๊าซ

นำแบคทีเรียไอโซเลท CF52 มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MRS broth ที่บรรจุในหลอดทดลอง ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นำห้วงเชื้อ (loop) มาลงไฟจนร้อนแดง จากนั้นนำไปจุ่มลงไปอาหารเหลวสูตร MRS ที่มีแบคทีเรียเจริญอยู่ สังเกตปฏิกิริยาการเกิดฟองก๊าซในอาหารเลี้ยงเชื้อ ผลการทดสอบให้ผลบวกจะเกิดฟองก๊าซจำนวนมากในอาหารเชื้อ ส่วนผลลบไม่เกิดฟองก๊าซในอาหารเชื้อ

4.1.4 การศึกษาผลของอุณหภูมิ พีเอช และความเข้มข้นของ NaCl ต่อการเจริญของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

ทดสอบการเจริญของแบคทีเรียที่อุณหภูมิแตกต่างกัน โดยเฉพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลท CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS ที่บรรจุในหลอดทดลอง ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30, 37, 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เกิดขึ้น

ทดสอบการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเริ่มต้นเป็นกรดและด่าง โดยนำแบคทีเรียไอโซเลท CF52 มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MRS ที่มีค่าพีเอชเริ่มต้น เท่ากับ 4.5 และ 9.6 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เกิดขึ้น

การทดสอบการเจริญของแบคทีเรียที่มีความเข้มข้นของ NaCl ที่แตกต่างกัน โดยทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลท CF 52 ในอาหารเหลวสูตร MRS ประกอบด้วย NaCl ที่มีความเข้มข้น 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.5 และ 18.0 % (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เกิดขึ้น

4.2 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีโดยชุดทดสอบ API 50 CH (Biomerieux)

นำแบคทีเรียไอโซเลท CF52 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อเจริญอยู่ ไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนใสออกจากเซลล์ เทส่วนใสทิ้ง และล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จากนั้นนำเซลล์ไปละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร หยดสารละลายเซลล์ที่ได้ลงในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยนับจำนวนหยดที่เติมลงไป จนได้ความขุ่นของสารละลายเซลล์แบคทีเรียเท่ากับ 2 เท่าของ McFarland แล้วใช้สารละลายเซลล์ปริมาตรเป็น 2 เท่าของจำนวนที่หยดที่เติมลงไปมาผสมกับอาหาร API 50 CHL นำอาหารที่มีสารละลายเซลล์ผสมอยู่หยดลงในหลอดเล็ก ๆ บนแผ่น strip จากนั้นหยดน้ำมัน (mineral oil) ทับผิวหน้า เพื่อให้แบคทีเรียอยู่ในสภาวะไร้ออกซิเจน

นำแผ่น strip นี้ไปวางในกล่องบ่ม (incubation box) ที่มีการเติมน้ำกลั่นลงไปประมาณ 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และอ่านผลหลังจากการบ่ม เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ถ้าแบคทีเรียสามารถหมักน้ำตาลชนิดนั้นได้ อาหารเลี้ยงเชื้อที่อยู่ในหลอดเล็ก ๆ จะเปลี่ยนสีจากสีม่วงเป็นสีเหลือง ยกเว้นหลอดที่ 25 จากสีม่วงเปลี่ยนเป็นสีดำ เนื่องจากพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเกิดการเปลี่ยนแปลง บันทึกผลการทดลองเพื่อนำไปวิเคราะห์ผลในเว็บไซต์ API web™ (<http://apiweb.biomerieux.com>)

4.3 การหาลำดับเบสของ DNA ในส่วนยีน 16S rRNA

4.3.1 การสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลท CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS ที่บรรจุในหลอดทดลองปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ เก็บเกี่ยวเซลล์โดยการนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที (rpm) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนใสทิ้ง นำตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่ได้มาทำการสกัด DNA โดยใช้ชุดสกัด DNA สำเร็จรูป (Isoplant DNA extraction kit) โดยเติม solution I ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และผสมให้เข้ากันโดยเขย่าด้วย vortex เป็นเวลา 1-2 นาที จากนั้นเติม solution II ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex เป็นเวลา 5-6 นาที แล้วนำมาบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติม solution III ปริมาตร 150 ไมโครลิตร และผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex เป็นเวลา 1-2 นาที จากนั้นนำไปแช่ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นใช้ไมโครปิเปตดูดส่วนใสส่วนบนออกมาปริมาตร 300 ไมโครลิตร มาใส่ในหลอด microcentrifuge หลอดใหม่ เติม absolute ethanol ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปแช่ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 15 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เท absolute ethanol ทิ้งให้หมด แล้วเติม ethanol เข้มข้น 70 % ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เท ethanol ทิ้ง เปิดฝาทิ้งไว้ให้ ethanol ระเหยออกให้หมด แล้วเติม TE buffer (pH 8.0) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นเติม RNase ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เพื่อทำลาย RNA ที่อาจปนเปื้อนมา นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ซึ่งจะได้ genomic DNA แล้วทำการวัดความเข้มข้นของ genomic DNA โดยใช้เครื่องวิชิเบลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร เพื่อใช้คำนวณความเข้มข้น genomic DNA ตามสูตรดังนี้

$$\text{ความเข้มข้น DNA (นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)} = A_{260} \times 50 \times \text{dilution factor}$$

4.3.2 การเพิ่มปริมาณ DNA ของยีน 16S rRNA โดยวิธี Polymerase chain reation (PCR)

นำ genomic DNA ที่สกัดได้จากแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท CF52 จากข้อ 4.3.1 มาทำการเพิ่มปริมาณในส่วนของยีน 16S rRNA โดยใช้ universal primer ซึ่งมี primer 2 ชนิด คือ 27F (forward primer) มีลำดับเบสดังนี้ 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' และ 520R (reverse primer) มีลำดับเบสดังนี้ 5'-ACCGCGGCKGCTGGC-3' (Operon, Germany) ซึ่งตรงกับลำดับเบสที่ตำแหน่ง V₁-V₃ (ประมาณ 500 คู่เบส) ทำการเตรียมปฏิกิริยาสำหรับการทำ PCR ให้มีปริมาตรสุดท้าย 50 ไมโครลิตร ซึ่งในแต่ละปฏิกิริยาประกอบด้วย mastermix ปริมาตร 20 ไมโครลิตร (Mg 1.5 มิลลิโมลาร์, dNTPs 200 ไมโครโมลาร์, Taq DNA polymerase 1.25 U), primer 27F ปริมาตร 2 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 10 พิโกโมลาร์), primer 520R ปริมาตร 2 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 10 พิโกโมลาร์), genomic DNA ปริมาตร 1 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) เติมน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 20 ไมโครลิตร ผสมส่วนประกอบต่าง ๆ ให้เข้ากัน จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณโดยใช้ PCR Sprint Thermal Cycler (ยี่ห้อ Thermohybrid รุ่น Sprint) โดยตั้งโปรแกรมในการทำงานดังนี้

25 รอบ {	Initial denaturation	94 องศาเซลเซียส	5 นาที
	Denaturation	94 องศาเซลเซียส	1 นาที
	Annealing	56 องศาเซลเซียส	1 นาที
	Extension	72 องศาเซลเซียส	1 นาที
	Terminating	72 องศาเซลเซียส	5 นาที
	Hold	4 องศาเซลเซียส	จนกว่าจะใช้

4.3.3 การทำ PCR product ให้บริสุทธิ์

เมื่อเพิ่มปริมาณ DNA ของยีน 16S rRNA โดยวิธี Polymerase chain reation (PCR) แล้ว จากนั้นทำ PCR product ให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุด TaKaRa SUPRECTM – PCR, Japan มีขั้นตอนดังนี้ ปิเปต PCR product ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และ TE buffer (พีเอช 8.0) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ใส่ลงในคอลัมน์ นำคอลัมน์ใส่ลงในหลอดใส่ลงในหลอด microcentrifuge แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำของเหลวที่อยู่ในหลอด microcentrifuge ที่เติม TE buffer (พีเอช 8.0) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ ผสมให้เข้ากันโดยการไขไมโครปิเปตดูดขึ้นลง และทำการดูด DNA ที่ค้างอยู่บนเยื่อกรอง (filter) ในคอลัมน์ให้หลุดออกมา คว่ำคอลัมน์ในหลอด microcentrifuge หลอดใหม่ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ซึ่งจะได้ PCR product บริสุทธิ์ที่มีปริมาตร 20 ไมโครลิตร

4.3.4 ตรวจสอบขนาด DNA ภายใต้สนามไฟฟ้าโดยผ่านตัวกลางชนิดวุ้น (Agarose)

นำ PCR product บริสุทธิ์ที่ได้มาตรวจสอบขนาด DNA ภายใต้สนามไฟฟ้าโดยผ่านตัวกลางชนิดวุ้น ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ เตรียม agarose gel ที่มีความเข้มข้น 1.5 % (w/v) จากนั้นวางเจลที่มีหลุมที่ปลายด้านหนึ่งลงในเครื่อง run gel เทสารละลาย 1X TAE buffer ลงไปให้ท่วมเจล เตรียม DNA ตัวอย่าง ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร นำ DNA ตัวอย่างที่ผสม loading dye ปริมาตร 5 ไมโครลิตร แล้วนำหยอดลงในหลุมบนเจล โดยใช้ O' GeneRuler™ 100 bp DNA ladder (Fermentas LIFE SCIENCES, USA) เป็น DNA marker ปริมาตร 5 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร) จากนั้นปิดฝาเครื่อง ตั้งค่ากระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ ใช้เวลาประมาณ 20 นาที นำเจลไปย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (EtBr) เป็นเวลา 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำเจลไปส่องดูแถบ DNA ภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง Transluminator

4.3.5 การหาลำดับเบส DNA

เมื่อทราบขนาดของ DNA และการเพิ่มปริมาณ DNA ส่วนของยีน 16S rRNA โดยไม่มีสิ่งปนเปื้อนแล้ว จึงนำ PCR product บริสุทธิ์ส่วนที่เหลือไปทำการหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA โดยหน่วยบริการชีวภาพ (BSU) ชั้น 5 อาคารสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (สวทช) จากนั้นนำลำดับเบสที่ได้ไปเทียบความคล้ายกับฐานข้อมูลใน GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST เว็บไซต์ของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ซึ่งจะช่วยให้ทราบชนิดของจุลินทรีย์

5. การศึกษาส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียโอซิน

5.1 ศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียโอซิน (ดัดแปลงจากวิธี

การของ Kim *et al.*, 2006)

เตรียมอาหารเหลวสูตร MRS ที่มีส่วนประกอบของแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน 7 ชนิด คือ glucose, lactose, dextrin, fructose, maltose, sucrose และ sorbitol ความเข้มข้น 2.0 % (w/v) บรรจุในหลอดทดลอง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Lactobacillus salivarius* CF52 โดยใช้ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้น เท่ากับ 0.2 % (v/v) แต่ละการทดลองทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน จากนั้นวัดค่าการเจริญของแบคทีเรียโดยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และนำไปเตรียมเป็นตัวอย่างของแบคทีเรียโอซินตามวิธีข้อ 2.1 เพื่อนำไปหาค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินโดยวิธี well diffusion assay โดยใช้ *Lb. fermentum* JCM 1173 เป็นเชื้อทดสอบ เลือกชนิดของแหล่งคาร์บอนที่มีความเหมาะสมที่มีค่ากิจกรรมการยับยั้งมากที่สุด เพื่อใช้ในการทดลองในขั้นตอนต่อไป

5.2 ศึกษาหาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียโอซิน (ดัดแปลงจากวิธีการของ Kim *et al.*, 2006)

นำแหล่งคาร์บอนที่มีความเหมาะสมในการผลิตแบคทีเรียโอซินจากข้อ 5.1 มาหารระดับความเข้มข้นของชนิดแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตแบคทีเรียโอซิน โดยทำการเตรียมอาหารเหลวสูตร MRS ที่มีส่วนประกอบของชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 และ 4.0 % (w/v) บรรจุในหลอดทดลอง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปเพาะเลี้ยง *Lb. salivarius* CF52 โดยใช้ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้น เท่ากับ 0.2 % (v/v) แต่ละการทดลองทำการทดลอง 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นนาน 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน จากนั้นวัดค่าการเจริญของแบคทีเรียโดยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และนำไปเตรียมเป็นตัวอย่างของแบคทีเรียโอซินตามวิธีข้อ 2.1 เพื่อนำไปหาค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินโดยวิธี well diffusion assay โดยใช้ *Lb. fermentum* JCM 1173 เป็นเชื้อทดสอบ เลือกระดับความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่มีความเหมาะสมที่มีค่ากิจกรรมการยับยั้งมากที่สุด เพื่อใช้ในการทดลองในขั้นตอนต่อไป

5.3 ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียโอซิน (ดัดแปลงจากวิธีการของ Kim *et al.*, 2006)

ทำการเตรียมอาหารเหลวสูตร MRS ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น maltose เข้มข้น 2.5 % (w/v) และมีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน 8 ชนิด คือ beef extract, peptone, skim milk, urea, NH₄Cl, tryptone, ammonium sulfate และ yeast extract เข้มข้น 1.0 % (w/v) บรรจุในหลอดทดลอง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเพาะเลี้ยง *Lb. salivarius* CF52 โดยใช้ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้น เท่ากับ 0.2 % (v/v) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน แต่ละการทดลองทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นวัดค่าการเจริญของแบคทีเรียโดยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และนำไปเตรียมเป็นตัวอย่างของแบคทีเรียโอซินตามวิธีข้อ 2.1 เพื่อนำไปหาค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซิน โดยใช้วิธี well diffusion assay โดยใช้ *Lb. fermentum* JCM 1173 เป็นเชื้อทดสอบ เลือกแหล่งไนโตรเจนที่มีความเหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียโอซิน จำนวน 4 ชนิด เพื่อหาส่วนผสมของแหล่งไนโตรเจนในขั้นตอนต่อไป

5.4 การทดสอบหาส่วนผสมของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียโอซิน (ดัดแปลงจากวิธีการของ Kim *et al.*, 2006)

ทำการเตรียมอาหารเหลวสูตร MRS ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น maltose เข้มข้น 2.5 % (w/v) และมีแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ คือ peptone, tryptone, beef extract และ yeast extract โดยเติมความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนแต่ละชนิดแสดงดังตาราง 2 บรรจุในหลอดทดลอง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

จากนั้นไปเลี้ยงเพาะเลี้ยง *Lb. salivarius* CF52 โดยใช้ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.2 % (v/v) แต่ผลการทดลองทำการทดลอง 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นนาน 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน จากนั้นวัดค่าการเจริญของแบคทีเรียโดยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และนำไปเตรียมเป็นตัวอย่างของแบคทีเรียโอซินตามวิธีข้อ 2.1 เพื่อนำไปหาค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินโดยวิธี well diffusion assay โดยใช้ *Lb. fermentum* JCM 1173 เป็นเชื้อทดสอบ เลือกแหล่งไนโตรเจนที่มีความเหมาะสมที่มีค่ากิจกรรมการยับยั้งมากที่สุด เพื่อใช้ในการทดลองในขั้นตอนต่อไป

ตาราง 2 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ

หลอดที่	แหล่งไนโตรเจน
1	Not added
2	0.5 % PP
3	1.0 % PP
4	0.5 % PP + 0.5 % TP
5	0.5 % PP + 1.0 % TP
6	0.5 % PP + 0.5 % YE
7	0.5 % PP + 1.0 % YE
8	0.5 % PP + 0.5 % BE
9	0.5 % PP + 1.0 % BE
10	0.5 % PP + 1.0 % TP + 0.5 % YE
11	0.5 % PP + 0.5 % BE + 0.5 % YE
12	0.5 % PP + 0.5 % TP + 0.5 % BE
13	0.5 % PP + 0.5 % TP + 0.5 % YE
14	0.5 % PP + 0.5 % TP + 0.5 % YE + 0.5 % BE

หมายเหตุ : PP (peptone), TP (tryptone), BE (beef extract) และ YE (yeast extract)

5.5 การทดสอบหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของฟอสเฟตต่อการผลิตแบคทีเรียโอซิน

(ดัดแปลงจากวิธีการของ Kim *et al.*, 2006)

ทำการเตรียมอาหารเหลวสูตร MRS ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น maltose เข้มข้น 2.5 % (w/v) มี peptone เข้มข้น 0.5 % (w/v) และ beef extract เข้มข้น 1.0 % (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน และมี K_2HPO_4 ที่มีระดับความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0 และ 30.0 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งฟอสเฟส บรรจุในหลอดทดลอง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 โดยใช้ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.2 % (v/v) แต่ละการทดลองทำการทดลอง 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน จากนั้นวัดค่าการเจริญของแบคทีเรีย โดยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตขึ้นโดยใช้วิธี well diffusion assay โดยใช้ *Lb. fermentum* JCM 1173 เป็นเชื้อทดสอบ

5.5 การทดสอบหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของแมกนีเซียมซัลเฟตต่อการผลิตแบคทีเรียโอซิน

(ดัดแปลงจากวิธีการของ Kim *et al.*, 2006)

ทำการเตรียมอาหารเหลวสูตร MRS ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น maltose เข้มข้น 2.5 % (w/v) มี peptone เข้มข้น 0.5 % (w/v) และ beef extract เข้มข้น 1.0 % (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน และมี K_2HPO_4 เข้มข้น 0.1 % (w/v) เป็นแหล่งฟอสเฟส และมี $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 7.0, 10.0 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งแมกนีเซียม บรรจุในหลอดทดลอง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 โดยใช้ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.2 % (v/v) แต่ละการทดลองทำการทดลอง 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นนาน 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน จากนั้นวัดค่าการเจริญของแบคทีเรียโดยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตขึ้นโดยวิธี well diffusion assay โดยใช้ *Lb. fermentum* JCM 1173 เป็นเชื้อทดสอบ

6. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียต่อการผลิตแบคทีเรียโอซิน

6.1 การศึกษาพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียโอซิน

(ดัดแปลงจากวิธีการของ Todorov and dicks, 2005)

ทำการเตรียมอาหารเหลวสูตร MRS ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น maltose เข้มข้น 2.5 % (w/v) มี peptone เข้มข้น 0.5 % (w/v) และ beef extract เข้มข้น 1.0 % (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน และมี K_2HPO_4 เข้มข้น 0.1 % (w/v) เป็นแหล่งฟอสเฟส และมี $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ เข้มข้น 1.0 % (w/v) ซึ่งเป็นอาหารสูตรดัดแปลงที่เหมาะสมในการผลิตแบคทีเรียโอซิน โดยทำการปรับค่า pH เริ่มต้นของอาหารที่พีเอชต่าง ๆ คือ 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 ตามลำดับ บรรจุในหลอดทดลอง ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

จากนั้นไปเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 โดยใช้ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.2 % (v/v) แต่ผลการทดลองทำการทดลอง 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน จากนั้นวัดค่าการเจริญของแบคทีเรียโดยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตขึ้นโดยวิธี well diffusion assay โดยใช้ *Lb. fermentum* JCM 1173 เป็นเชื้อทดสอบ

6.2 การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียโอซิน

(ดัดแปลงจากวิธีการของ Kim *et al.*, 2006)

ทำการเตรียมอาหารเหลวสูตร MRS ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น maltose เข้มข้น 2.5 % (w/v) มี peptone เข้มข้น 0.5 % (w/v) และ beef extract เข้มข้น 1.0 % (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน และมี K_2HPO_4 เข้มข้น 0.1 % (w/v) เป็นแหล่งฟอสเฟส และมี $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ เข้มข้น 1.0 % (w/v) โดยทำการปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 6.5 บรรจุในหลอดทดลอง ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 โดยใช้ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.2 % (v/v) แต่ผลการทดลองทดลอง 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12, 15 และ 18 ชั่วโมง ตามลำดับ ในสภาวะไร้ออกซิเจน จากนั้นวัดค่าการเจริญของแบคทีเรียโดยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตขึ้น โดยวิธี well diffusion assay โดยใช้ *Lb. fermentum* JCM 1173 เป็นเชื้อทดสอบ

6.3 การศึกษาผลของระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่มีต่อการผลิตแบคทีเรียโอซิน

(ดัดแปลงจากวิธีการของ Noonpakdee *et al.*, 2003)

ทำการเตรียมอาหารเหลวสูตร MRS สูตรดัดแปลงที่มีความเหมาะสมในการผลิตแบคทีเรียโอซิน ทำการปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.5 บรรจุในหลอดทดลอง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จำนวนทั้งสิ้น 36 หลอด จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 โดยใช้ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.2 % (v/v) โดยทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้ออกซิเจน ทำการสุ่มเก็บตัวอย่าง ทุก ๆ 2 ชั่วโมง จำนวนครั้งละ 3 ซ้ำ จนครบชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย จากนั้นวัดค่าการเจริญของแบคทีเรียโดยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตขึ้นโดยวิธี well diffusion assay โดยใช้ *Lb. fermentum* JCM 1173 เป็นเชื้อทดสอบ

7. การทำให้แบคทีเรียโอสตินบริสุทธิ์บางส่วน

7.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 ในสูตรที่เหมาะสมจากการทดลองทั้งหมด จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนใสออกจากเซลล์ ด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำของเหลวใสมาทำการปรับค่าพีเอชเท่ากับ 6.5 แยกของเหลวใสส่วนหนึ่งออกมา ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อนำไปทดสอบกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอสตินโดยวิธี well diffusion assay และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry *et al.* (1951) นำของเหลวใสที่เหลือไปตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต โดยค่อย ๆ เติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตทีละน้อยลงในของเหลวใส จำนวน 472 กรัมต่อลิตร (70 % saturation) กวนทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อแยกตะกอนโปรตีนออกจากของเหลวใส นำตะกอนโปรตีนที่ได้ซึ่งมีลักษณะสีน้ำตาลเข้ม มาละลายในโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 6.5 ปริมาตร 6 มิลลิลิตร แบ่งสารละลายโปรตีนออกมา ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อนำไปทดสอบกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอสตินโดยวิธี well diffusion assay และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน นำสารละลายโปรตีนที่เหลือไปทำการแยกเกลือออกจากสารละลายในขั้นตอนต่อไป

7.2 ทำการแยกเกลือออกจากสารละลายแบคทีเรียโอสตินโดยผ่านกระบวนการ gel filtration

นำสารละลายโปรตีนไปทำการแยกเกลือออก โดยผ่านกระบวนการ gel filtration ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้คือ ทำการเติมน้ำบริสุทธิ์ที่ปราศจากไอออน (deionized water) ปริมาตร 0.80 มิลลิลิตร ลงในคอลัมน์ Centri – sep จำนวน 20 คอลัมน์ ซึ่งภายในคอลัมน์มีเจลบรรจุอยู่ ทำการผสมส่วนของเจลกับน้ำให้เข้ากัน เจลจะฟองตัวเต็มคอลัมน์ ทำการไล่ฟองอากาศภายในเจลออกให้หมด ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 2,400 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที เพื่อไล่น้ำออกจากเจล จะได้เจลที่มีผิวหน้าตัดเฉียง จากนั้นทำการหยดสารละลายแบคทีเรียโอสตินลงไปในผิวหน้าเจลในแต่ละคอลัมน์ ปริมาตร 75 ไมโครลิตร นำคอลัมน์ไปวางบนหลอด microcentrifuge tube แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 2,400 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ได้สารละลายแบคทีเรียโอสติน ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นหาค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอสติน และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน นำส่วนสารละลายแบคทีเรียโอสตินที่เหลือเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์หาผลโมเลกุลโปรตีนในขั้นตอนต่อไป

7.3 การแยกสารแบบเทอริโอซินโดยวิธี tricine sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (Tricine-SDS-PAGE)

นำตัวอย่างสารแบบเทอริโอซินมาทำการวิเคราะห์หามวลโมเลกุลโปรตีน โดยวิธี 16.5 % Tricine-SDS-PAGE ซึ่งใช้เจลสำเร็จรูป Ready Gel[®] Precast Gels (BIO-RAD) ก่อนใช้ทำการตัดเทปกาวยึดตามยาวแล้วดึงออก จากนั้นดึงซี่หวีออกจากแผ่นเจลอย่างระมัดระวัง ล้างหลุมเจลด้วยน้ำปราศจากอ็อกซิเจน จากนั้นประกอบแผ่นเจลกับชุด SDS-PAGE (BIO-RAD) แล้วเทสารละลาย running buffer ลงไป แล้วนำตัวอย่างแบบเทอริโอซินผสมกับ sample buffer ในอัตราส่วน 1 : 1 ผสมให้เข้ากัน นำไปให้ความร้อนในน้ำเดือดประมาณ 5 นาที ก่อนที่นำไปหยดในช่องบนเจล ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และโปรตีนมาตรฐาน (Polypeptide SDS-PAGE standard) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดในช่องบนเจล จากนั้นทำการแยกตัวอย่างด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นแบ่งเจลออกเป็น 2 ส่วน คือ เจลส่วนแรกทำการตรึงตัวอย่างด้วย สารละลาย destaining เป็นเวลา 30 นาที ต่อมาย้อม Coomassie blue stain และล้างออกด้วย destaining เป็นเวลา 3 ชั่วโมง สังเกตแถบโปรตีน จากนั้นนำไปเก็บรักษาในกลีเซอรอล เข้มข้น 10.0 % (v/v) และเจลส่วนที่สองทำการตรึงตัวอย่างด้วยสารละลาย destaining เป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วยน้ำปราศจากอ็อกซิเจนครั้งละ 30 นาที จำนวน 4 ครั้ง จากนั้นย้ายเจลส่วนที่สองไว้ในจานเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย ทำการเททับด้วยอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวสูตร MRS (0.7 % agar) ที่มีเชื้อทดสอบผสมอยู่ 0.1 % (v/v) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตบริเวณที่เกิดวงใส จากนั้นนำเจลส่วนแรกและส่วนที่สองเทียบหามวลโมเลกุลแบบเทอริโอซิน โดยทำการเทียบตำแหน่งจุดศูนย์กลางการเกิดวงใสของเจลส่วนที่สอง ตรงกับตำแหน่งของแถบโปรตีนใดในส่วนของเจลส่วนแรก ทำให้ทราบมวลโมเลกุลโปรตีนของแบบเทอริโอซินชนิดนี้

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การแยกแบคทีเรียกรดแลคติกเบื้องต้นที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินจากระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์

ผลการแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์ ที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซิน โดยทำการเก็บตัวอย่างจากอุจจาระคนและมูลสัตว์ชนิดต่าง ๆ เช่น มูลโค มูลไก่ และ มูลสุกร จำนวนทั้งสิ้น 25 ตัวอย่าง โดยวิธี direct plating แสดงผลดังภาพ 4 จากแบคทีเรียบนอาหารแข็งสูตร MRS ทั้งสิ้นจำนวน 26,765 โคโลนี พบว่า มีโคโลนีที่เกิดวงใสต่อเชื้อทดสอบจำนวน 66 โคโลนี (คิดเป็น 0.25 % เทียบกับจำนวนโคโลนีทั้งหมด) โดยพบผลบวกต่อเชื้อแบคทีเรียทดสอบ *Lactobacillus fermentum* JCM 1173, *Lactobacillus casei* JCM 1134, *Enterococcus durans* JCM 8725 และ *Pediococcus pentosaceus* MJU 78 จำนวน 27, 11, 12 และ 16 โคโลนี ตามลำดับ แสดงผลดังตาราง 3



ภาพ 4 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหาร บนอาหารแข็งสูตร MRS ที่มีวงใสต่อเชื้อทดสอบโดยวิธี direct plating ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

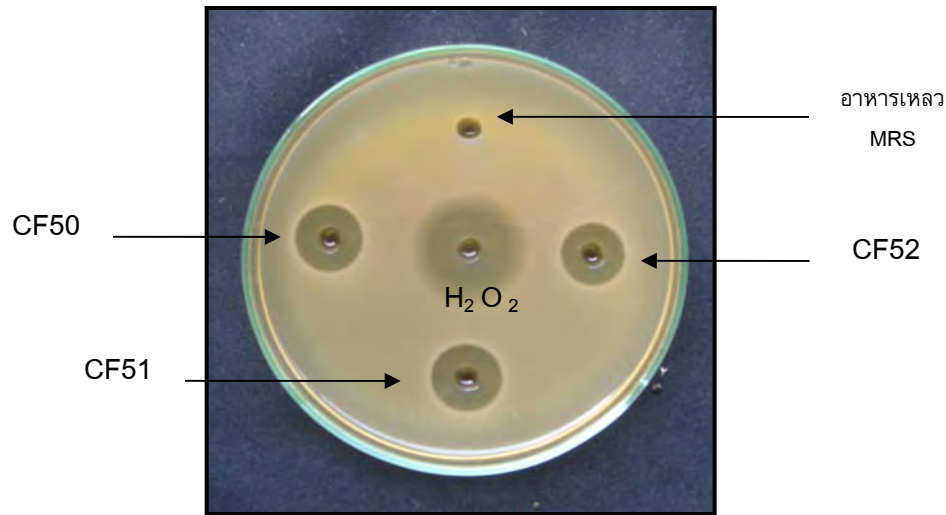
ตาราง 3 จำนวนส่วนโคลนที่เกิดวงใสเทียบกับจำนวนโคลนทั้งหมด

แหล่ง ตัวอย่าง	จำนวน โคลน ทั้งหมด	จำนวนโคลนที่เกิดวงใสต่อแบคทีเรียทดสอบ			
		<i>Lb. fermentum</i> JCM 1173	<i>Lb. casei</i> JCM 1134	<i>E. faecium</i> JCM 8725	<i>P. pentosaceus</i> MJU 78
มนุษย์	7,251	-	3	5	8
ไก่	11,113	9	-	-	4
โค	697	16	7	5	1
สุกร	7,704	2	1	2	3
ทั้งหมด	26,765	27	11	12	16
%	100	จำนวนทั้งสิ้น 66 โคลน (0.25 %*)			

* % คำนวณจากจำนวนโคลนที่เกิดวงใสต่อเชื้อทดสอบเทียบกับจำนวนโคลนทั้งหมด x 100

2. การทดสอบฤทธิ์ของแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ

เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 66 ไอโซเลท ที่เกิดวงใสต่อเชื้อทดสอบ มาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งของแบคทีเรียโอซินต่อเชื้อทดสอบ จำนวน 36 ชนิด โดยวิธี well diffusion assay พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท CF50, CF51 และ CF52 ซึ่งแยกมาจากตัวอย่างมูลโค มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ 11 ชนิด ดังภาพ 5 และ ตาราง 4 แสดงการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งของแบคทีเรียโอซิน โดยพบว่า มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติกในกลุ่มใกล้เคียงกัน เช่น *Lb. fermentum* JCM 1173 และ *E. durans* JCM 8725 เป็นต้น และแบคทีเรียแกรมบวกก่อโรคบางชนิด เช่น *L. monocytogenes* DMST 1327 และ *B. cereus* MJU เป็นต้น ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ Oh *et al.* (2000) ที่ได้ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจาก *Lb. acidophilus* 30SC พบว่า สามารถยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดอื่นในกลุ่มเดียวกันหรือกลุ่มใกล้เคียงกัน รวมทั้งแบคทีเรียก่อโรคแกรมบวกบางชนิดได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ อย่างไรก็ตาม จากรายงานผลวิจัยที่ผ่านมา พบว่า แบคทีเรียโอซินบางชนิดมีฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ เช่น Enterocin 012 ผลิตโดยเชื้อ *E. gallinarum* ที่แยกมาจากลำไส้นกกระเจือกเทศ มีฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ คือ *Clostridium perfringens*, *E. coli* OVI9476, *Pseudomonas aeruginosa* OVI2770 และ *S. typhimurium* OVI2812 (Jennes *et al.*, 2000) ซึ่ง แบคทีเรียโอซินแต่ละชนิด มีฤทธิ์ในการยับยั้งต่อแบคทีเรียเป้าหมายต่างกัน



ภาพ 5 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งของแบคทีเรียโอซินจากแบคทีเรียโอซินที่เรียโอซินเลท CF50, CF51 และ CF52 ในการยับยั้ง *Lb. fermentum* JCM 1173 โดยวิธี well diffusion assay

ตาราง 4 ฤทธิ์การยับยั้งของแบคทีเรียโอซินต่อเชื้อทดสอบโดยวิธี well diffusion assay

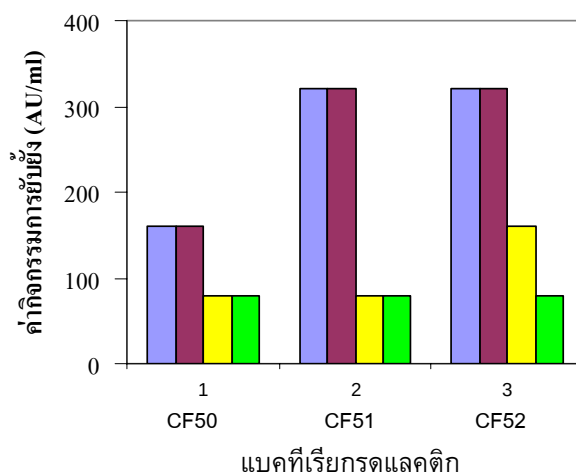
เชื้อทดสอบ	ฤทธิ์การยับยั้งของแบคทีเรียโอซินต่อเชื้อทดสอบ		
	CF50	CF51	CF52
<i>Lb. fermentum</i> JCM 1173	+++	+++	+++
<i>E. durans</i> JCM 8725	++	++	++
<i>E. gallinarum</i> JCM 8728	++	++	+++
<i>E. faecium</i> MJU 92	+++	+++	+++
<i>P. pentosaceus</i> MJU 78	++	+++	+++
<i>L. monocytogenes</i> DMST 1327	+	++	+++
<i>L. monocytogenes</i> DMST 1783	+	++	++
<i>L. monocytogenes</i> DMST 2871	++	++	++
<i>L. monocytogenes</i> DMST 4553	++	++	++
<i>B. cereus</i> MJU	++	++	++
<i>M. luteus</i> MJU	+++	+++	+++

หมายเหตุ : Inhibition zone (mm): +++ (11-15); ++ (6-10) ; + (1-5) ; - (no inhibition)

3. การศึกษาลักษณะความคงตัวของแบคทีเรียโอซิน

3.1 ผลของอุณหภูมิต่อการยับยั้งของแบคทีเรียโอซิน

ทำการทดสอบผลของอุณหภูมิต่อการยับยั้งของแบคทีเรียโอซิน โดยนำแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท CF50, CF51 และ CF52 มาทดสอบคุณสมบัติการทนความร้อน 3 ระดับ คือ ที่อุณหภูมิ 65, 95 และ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40, 20 และ 20 นาที ตามลำดับ พบว่า แบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 3 ไอโซเลท สามารถทนความร้อนได้ทั้ง 3 อุณหภูมิ ซึ่งจะเห็นได้ว่า เมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงขึ้นเรื่อย ๆ กิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินมีค่าลดลงตามลำดับ และแบคทีเรียโอซินสามารถทนความร้อนได้ที่ระดับอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ซึ่งมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 80 AU/ml แสดงผลดังภาพ 6 จะเห็นได้ว่าแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 3 ไอโซเลท มีความสามารถทนความร้อนได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ Oh *et al.* (2000) ที่รายงานว่าแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจาก *Lb. acidophilus* 30SC มีความสามารถทนความร้อนได้ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เช่นเดียวกันแบคทีเรียโอซินที่สามารถทนความร้อนได้ดีส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียโอซินที่อยู่ใน Class IIa และ Class IIb เช่น leucocin A, mesentericin Y105 และ pediocin AcH (Sablon *et al.*, 2000) เนื่องจากแบคทีเรียโอซินมีโครงสร้างที่ซับซ้อนคือ ประกอบด้วยส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic region) อยู่ภายในโครงสร้าง และมีไกลซีนที่เชื่อมต่อกับพันธะที่แข็งแรง (s-s bridge) อยู่ในโครงสร้างของเปปไทด์ (N-terminal) ปริมาณมาก จึงไม่ถูกทำลายได้ง่ายด้วยความร้อน (Cleveland *et al.*, 2001) แบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรด แลคติกทั้ง 3 ไอโซเลท สามารถทนความร้อนได้ดี น่าจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอาหารที่ผ่านกระบวนการความร้อนสูง ๆ โดยไม่ทำให้แบคทีเรียโอซินเสียสภาพ



ภาพ 6 ผลของอุณหภูมิต่อการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินโดยวิธี well diffusion assay โดยใช้

Lb. fermentum JCM 1173 เป็นเชื้อทดสอบ

(■) ไม่ให้ความร้อน, (■) 65 °C/40 นาที, (■) 95 °C/20 นาที และ (■) 121 °C/20 นาที

3.2 ผลของพีเอชต่อค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซิน

จากการศึกษาผลของพีเอชต่อค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซิน โดยนำแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียโอโซเลท CF50, CF51 และ CF52 มาทำการปรับพีเอชให้มีความแตกต่างกันคือ 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 และ 10.0 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และปรับพีเอชกลับคืนเป็น 6.5 และเติมเอนไซม์อะไมเลส นำมากรองผ่านชุดกรองชนิดไนลอน จากนั้นนำไปทดสอบค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินที่เหลื่ออยู่โดยวิธี well diffusion assay โดยใช้ *Lb. fermentum* JCM 1173 เป็นเชื้อทดสอบ พบว่า แบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียทั้ง 3 โอโซเลท มีความคงทนต่อพีเอชแบบกว้าง ตั้งแต่ 3.0-10.0 โดยค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินจะมีความเสถียรที่พีเอช 5.0-6.0 แต่เมื่อพีเอชที่มีความเป็นกรดมากขึ้น (พีเอช 3.0-4.0) กิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินจะมีค่าลดลง แต่จะลดลงน้อยกว่าช่วงพีเอชที่เป็นด่าง (พีเอช 8.0-10.0) แสดงผลดังตาราง 5 แบคทีเรียโอซินส่วนใหญ่จะมีความเสถียรที่พีเอชเป็นกรด และค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินจะลดลง เมื่อพีเอชมีความเป็นด่างมาก ๆ (Hill, 1995) เนื่องจากแบคทีเรียโอซินมีโครงสร้างโปรตีนทุติยภูมิ ความแตกต่างไปทำลายโครงสร้างส่วนนี้ ทำให้กิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินมีค่าลดลง (Osmanagaoglu *et al.*, 1998) แบคทีเรียโอซินที่มีความคงทนต่อพีเอชแบบกว้าง และมีความเสถียรช่วงพีเอชเป็นกรดได้จากแบคทีเรียทั้ง 3 โอโซเลท ในการทดลองนี้ น่าจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารในอาหารที่ในกระบวนการผลิตอาหารหมักซึ่งมีค่าพีเอชเป็นกรด เช่น นมเปรี้ยว แหนม ผักดอง เป็นต้น ซึ่งน่าจะยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ดี แต่อย่างไรก็ตามมีแบคทีเรียโอซินบางชนิดมีกิจกรรมการยับยั้งสูงสุดอยู่ในช่วงพีเอชเป็นด่าง ซึ่งงานทดลองของ Pilasombut *et al.* (2006) พบว่าแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจาก *Lb. salivarius* K7 ที่แยกมาจากลำไส้ไก่ กิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินมีความเสถียรที่พีเอชเป็นกรด แต่ค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงสุดอยู่ในช่วงพีเอช 8.0-10.0 น่าจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นโปรไบโอติก เนื่องจากสามารถผลิตแบคทีเรียโอซินที่ทนต่อสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะอาหารได้ และทนต่อสภาวะความเป็นด่างในลำไส้เล็ก

3.3 ผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่อกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซิน

จากการศึกษาเอนไซม์ต่อกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซิน โดยนำส่วนใสที่ได้มาจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโอโซเลท CF50, CF51 และ CF52 มาปรับพีเอชเป็น 6.5 และเติมเอนไซม์อะไมเลส ก่อนนำมาทดสอบกับ proteinase K และ protease พบว่า แบคทีเรียโอซินที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้ง 3 โอโซเลท เสียสภาพด้วยเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนทั้ง 2 ชนิด คือ proteinase K และ protease แสดงดังตาราง 6 แสดงว่า กิจกรรมการยับยั้งต่อเชื้อทดสอบเกิดจากสารประเภทโปรตีน หรือแบคทีเรียโอซิน ไม่ใช่เกิดจากสารอื่น เช่น กรดอินทรีย์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เนื่องจากถูกกำจัดไปโดยการปรับพีเอชให้เป็นกลาง เพื่อกำจัดอิทธิพลจากกรดอินทรีย์ และเติมเอนไซม์อะไมเลสเพื่อกำจัดอิทธิพลจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ Jennes *et al.* (2000) คือ

Enterocin 012 ผลิตโดยแบคทีเรีย *E. gallinarum* ที่แยกมาจากลำไส้นกกระจอกเทศ ถูกทำให้เสียสภาพโดยเอนไซม์ proteinase K, α -chymotrypsin, trypsin และ pepsin แต่ไม่ทำให้เสียสภาพโดย lysozyme

ตาราง 5 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินโดยวิธี well diffusion assay โดยใช้ *Lb. fermentum* JCM 1173 เป็นเชื้อทดสอบ

พีเอช	ค่ากิจกรรมการยับยั้ง (AU/ml)		
	CF50	CF51	CF52
3.0	80	160	160
4.0	160	160	160
5.0	320	320	320
6.0	320	320	320
7.0	160	160	160
8.0	80	160	160
9.0	80	80	80
10.0	80	80	80

ตาราง 6 ผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่อกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินโดยวิธี well diffusion assay โดยใช้ *Lb. fermentum* JCM 1173 เป็นเชื้อทดสอบ

เอนไซม์	ค่ากิจกรรมการยับยั้ง (AU/ml)		
	CF50	CF51	CF52
Proteinase K	0	0	0
protease	0	0	0

จากผลการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งต่อเชื้อทดสอบ และความคงตัวของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียไอโซเลท CF50, CF51 และ CF52 พบว่า แบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียไอโซเลท CF52 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อทดสอบ และมีความสามารถในการทนความร้อนได้ดีกว่า

แบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียไอโซเลท CF50 และ CF51 ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกแบคทีเรียไอโซเลท CF52 ไปจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรีย โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาเบื้องต้น คุณสมบัติทางชีวเคมีโดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CH (Biomérieux) และหาลำดับเบสของ DNA ในส่วนยีน 16S rRNA

4. การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียไอโซเลท CF52

4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา

นำแบคทีเรียไอโซเลท CF52 มาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน เพื่อศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหารแข็งสูตร MRS ของแบคทีเรียไอโซเลท CF52 พบว่า มีโคโลนีขนาดเล็ก ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีประมาณ 1-2 มิลลิเมตร โคโลนีมีสีขาว ขอบโคโลนีเรียบ และโคโลนีมีผิวหน้าเกลี้ยง เมื่อนำมาย้อมสีแบบแกรมแล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่า ติดสีแกรมบวก มีรูปร่างท่อน การจัดเรียงตัวเป็นเชลเดี่ยวและอยู่เป็นคู่ (ภาพ 7) และจากการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยา พบว่า ไม่สร้างก๊าซ ไม่สร้างเอนไซม์อะตะเลส เมื่อนำแบคทีเรียไอโซเลท CF52 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MRS บ่มที่อุณหภูมิ 30, 37, 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า แบคทีเรียสามารถเจริญได้ในอาหารเหลวสูตร MRS บ่มที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MRS ประกอบด้วยโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เข้มข้น 1.0-5.0 %, 6.5 % และ 18.0 % พบว่า แบคทีเรียสามารถเจริญในอาหารเหลวสูตร MRS ประกอบด้วย NaCl เข้มข้น 1.0-5.0 % สามารถเจริญในอาหารที่ประกอบด้วย NaCl เข้มข้น 6.5 % และ 18.0 % และ พบว่า แบคทีเรียสามารถเจริญในอาหารเหลวสูตร MRS ที่มีพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 4.5 และ 9.6 ผลการทดลองดังตาราง 7



ภาพ 7 รูปร่างและการติดสีแกรมของแบคทีเรียไอโซเลท CF52 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ กำลังขยาย 1,000 เท่า

ตาราง 7 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของแบคทีเรียไอโซเลท CF52 เปรียบเทียบกับ
Lb. salivarius K7

การทดสอบ		ผลการทดสอบ	
		<i>Lb. salivarius</i> K7*	ไอโซเลท CF52
ย้อมแกรม		แกรมบวก	แกรมบวก
รูปร่าง		ท่อนสั้น	ท่อนสั้น
การจัดเรียงตัว		เดี่ยว/คู่	เดี่ยว/คู่
การผลิตก๊าซ		-	-
เอนไซม์อะเลส		-	-
การเจริญของเซลล์			
อุณหภูมิ	5-15 °C	-	NT
	30 °C	+	+
	37 °C	+	+
	45 °C	+	+
	50 °C	-	-
NaCl	1.0-5.0%	+	+
	6.5 %	-	-
	18.0%	-	-
pH 4.5		+	+
pH 9.6		+	+

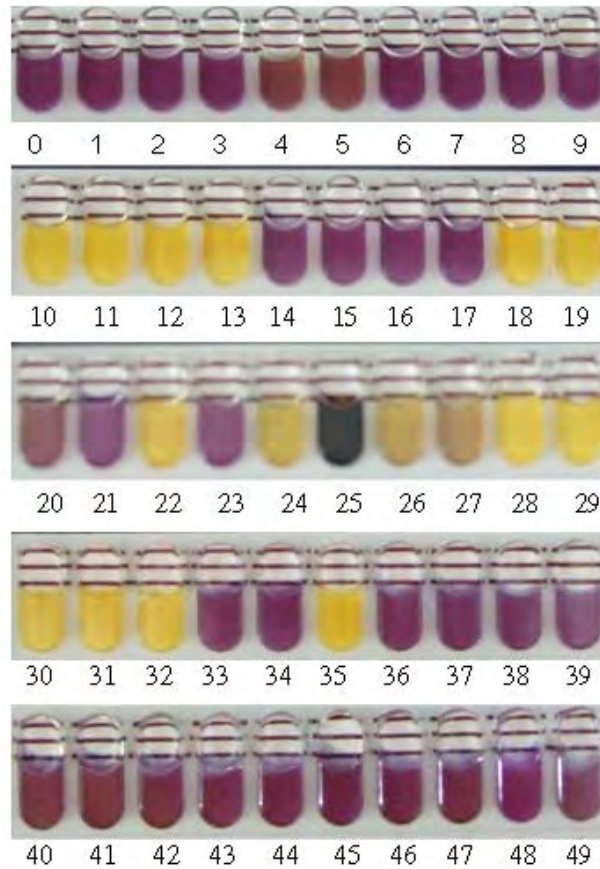
* ที่มา : Pilasombut *et al.* (2006)

หมายเหตุ : + หมายถึง ผลการทดสอบให้ผลบวก
 - หมายถึง ผลการทดสอบให้ผลลบ
 - NT หมายถึง ไม่ได้ทำการทดสอบ

จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาเบื้องต้นของแบคทีเรียไอโซเลท CF52 พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างเป็นท่อน ไม่ผลิตเอนไซม์อะตะเลส เจริญได้โดยไม่ต้องการอากาศในการเจริญ สามารถเจริญได้ในอาหารเหลวสูตร MRS ที่มีค่าพีเอช 4.5 และ 9.6 สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิระหว่าง 30-45 องศาเซลเซียส และสามารถเจริญได้ใน NaCl ที่มีความเข้มข้น 5.0 % ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับ *Lb. salivarius* K และเปรียบเทียบลักษณะพื้นฐานตามคู่มือ Bergey's manual of determinative bacteriology แล้วนำไปศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีโดยชุดทดสอบ API 50 CH ต่อไป

4.2 ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีโดยชุดทดสอบ API 50 CH

จากการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีโดยใช้ชุดทดสอบแบบสำเร็จ ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก และรวดเร็ว ในการจำแนกแบคทีเรีย ซึ่งแบคทีเรียไอโซเลท CF52 มีลักษณะคล้ายแบคทีเรียกรดแลคติกในกลุ่ม *Lactobacillus* จึงเลือกใช้ชุดทดสอบ API 50 CHL ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีโดยชุดทดสอบ API 50 CHL เพื่อจำแนกแบคทีเรียไอโซเลท CF52 พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อ API 50 CHL หลอดที่ให้ผลบวก เปลี่ยนสีอาหารจากสีม่วงเป็นเหลืองมีทั้งหมด 16 หลอด คือ หลอดที่ 10, 11, 12, 13, 18, 19, 22, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 และ 35 และหลอดที่เปลี่ยนสีม่วงเป็นสีดำ คือ หลอดที่ 25 แสดงดังภาพ 8 พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท CF52 สามารถหมักน้ำตาลได้ 17 ชนิดคือ galactose, glucose, fructose, mannose, sorbitol, N-Acetyl-glucosamine, arbutin, esculin, salicin, cellobiose, maltose, lactose, melibiose, sucrose, trehalose, insulin และ raffinose แสดงผลดังตาราง 8 จากนั้นนำผลการทดลองไปวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม API webTM (<http://apiweb.biomerieux.com>) พบว่า คุณสมบัติในการหมักน้ำตาลที่ได้มีความคล้ายกับแบคทีเรีย *Lb. salivarius* ถึง 99.9 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น จึงสรุปว่า แบคทีเรียไอโซเลท CF52 เป็นแบคทีเรีย *Lb. salivarius* จากนั้นทำการยืนยันผลการจำแนกอีกครั้งด้วยการหาลำดับเบสของ DNA ในส่วนยีน 16S rRNA



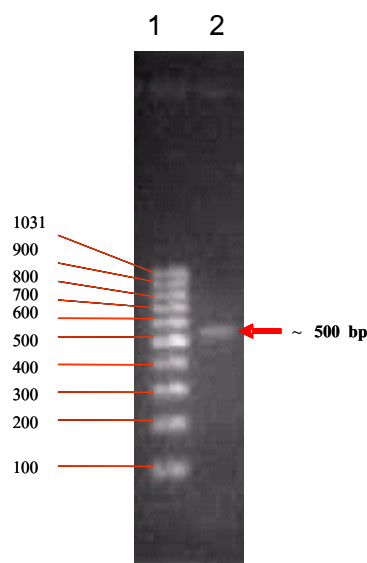
ภาพ 8 ผลการหมักคาร์บอนไฮเดรตของแบคทีเรียไอโซเลท CF52 ด้วย API 50 CH

ตาราง 8 คุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียไอโซเลท CF52

คุณสมบัติทางชีวเคมี	ชนิดน้ำตาล						
	Galactose	Glucose	Fructose	Mannose	Sorbitol	N-Acetyl-Glucosamine	
Fermentable sugar	Arbutin	Esculin	Salicin	Cellobiose	Maltose	Lactose	Melibiose
	Sucrose	Trehalose	Insulin	Raffinose			
Non-Fermentable sugar	Glycerol	Erythritol	D-Arabinose	L-Arabinose	Ribose	D-Xylose	
	L-Xylose	Adonitol	β -Methyl-Xyloside	Melezitose	Starch	Glycogen	Xylitol
	Gentiobiose	D-Turanose	D-Lyxose	D-Tagatose	D-Fucose	L-Fucose	
	D-Arabitol	L-Arabitol	2-Keto-Gluconate	5-Keto-Gluconate			

4.3 การหาลำดับเบสของ DNA ในส่วนยีน 16S rRNA

จากการนำเทคนิคทางด้านชีววิทยาโมเลกุล โดยการหาลำดับเบสในส่วนยีน 16S rRNA โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลท CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน นำไปสกัด DNA โดยใช้ชุดสกัด DNA สำเร็จรูป จากนั้นนำ Genomic DNA ความเข้มข้นประมาณ 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร มาทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณลำดับเบส DNA ในส่วนยีน 16S rRNA ที่ลำดับเบสในตำแหน่ง V₁-V₃ โดยใช้ universal primer 2 ชนิด คือ 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') และ 520R (5'-ACCGCGGCKGCTGGC-3') และทำ PCR product ให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุด TaKaRa SUPREC™ – PCR จากนั้นตรวจสอบขนาดของชิ้น DNA พบว่า มีขนาดประมาณ 500 คู่เบส แสดงผลดังภาพ 9 จากนั้นนำ PCR product ไปหาลำดับเบส DNA ในส่วนยีน 16S rRNA โดยหน่วยบริการชีวภาพ (BSU) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ แล้วนำลำดับเบสของยีน 16S rRNA ไปเทียบกับในโปรแกรม BioEdit แสดงดังภาพ 10 และนำไปเทียบความคล้ายจากฐานข้อมูลลำดับเบสใน GenBank โดยใช้ BLASTn ของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท CF52 มีลำดับเบส DNA ในส่วนของยีน 16S rRNA ที่คล้ายกับ *Lb. salivarius* 99.2 เปอร์เซ็นต์ (accession no. DQ444477) แสดงดังภาพ 11 ดังนั้น จึงสรุปได้ว่า แบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท CF52 เป็น *Lb. salivarius* ในการทดลองนี้ กำหนดชื่อแบคทีเรียไอโซเลท CF52 เป็น *Lb. salivarius* CF 52



ภาพ 9 ขนาดของ DNA ที่ได้จากการทำ PCR ในส่วนของยีน 16S rDNA ตำแหน่งลำดับเบสบริเวณ V₁-V₃ของแบคทีเรียไอโซเลท CF52

หมายเหตุ : Lane 1 คือ DNA Marker (O'GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder)

Lane 2 คือ ผลผลิตที่ได้จากการทำ PCR

5'TACCGCGGCGGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGACNTGCTGGTTAGATACCGTCATCGAATGAACAGTTAC
TCTCACTCGGTGTTCTTCTCTAACAACAGAGTTTTACGATCCGAAGACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCT
CCATCAGACTTGCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAG
TCCCAATGTGGCCGATCAACCTCTCAGTTCGGCTACGTATCATCACCTTGGTAGGCCGTTACCCACCAACT
AGTTAATACGCCGCGGGTCCATCTAAAAGCGATAGCAGAACCATCTTTCATCTAAGGATCATGCGATCCTTA
GAGATATACGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCCTTCTTTTAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCA
CCCGTCCGCCACTCAACTTCTTACGGTGAATGCAAGCATTGGGTGTAAGAAAGTTTCGTTGCACTTGCATGT
ATTAGGCACGCCGCCA3'

ภาพ 10 ลำดับของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลท CF52 เกิดจากการนำลำดับเบสของ
primer 27F และ primer 520R ไปเทียบกับในโปรแกรม BioEdit

Gb/DQ444477/*Lactobacillus salivarius* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length=1527 Score = 981 bits (495), Expect = 0.0 Identities = 514/518 (99.2 %),

Gaps = 2/518 (0 %) Strand=Plus/Minus

Query	1	TACCGCGGCGGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGACNTGCTGGTTAGATACCGTCATCGAAT	60
Sbjct	545	TACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTG-ACCTGCTGGTTAGATACCGTCATCGAAT	487
Query	61	GAACAGTTACTCTCACTCGGTGTTCTTCTCTAACAACAGAGTTTTACGATCCGAAGACCT	120
Sbjct	486	GAACAGTTACTCTCACTCG-TGTTCTTCTCTAACAACAGAGTTTTACGATCCGAAGACCT	428
Query	121	TCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCCATCAGACTTGCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTG	180
Sbjct	427	TCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCCATCAGACTTGCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTG	368
Query	181	CTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATCAACCTCTCAG	240
Sbjct	367	CTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATCAACCTCTCAG	308
Query	241	TTCGGCTACGTATCATCACCTTGGTAGGCCGTTACCCACCAACTAGTTAATACGCCGCG	300
Sbjct	307	TTCGGCTACGTATCATCACCTTGGTAGGCCGTTACCCACCAACTAGTTAATACGCCGCG	248
Query	301	GGTCCATCTAAAAGCGATAGCAGAACCATCTTTCATCTAAGGATCATGCGATCCTTAGAG	360
Sbjct	247	GGTCCATCTAAAAGCGATAGCAGAACCATCTTTCATCTAAGGATCATGCGATCCTTAGAG	188
Query	361	ATATACGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCCTTCTTTTAGGCAGGTTACCCAC	420
Sbjct	187	ATATACGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCCTTCTTTTAGGCAGGTTACCCAC	128
Query	421	GTGTTACTCACCCGTCGCCCACTCAACTTCTTACGGTGAATGCAAGCATTTCGGTGTAAAG	480
Sbjct	127	GTGTTACTCACCCGTCGCCCACTCAACTTCTTACGGTGAATGCAAGCATTTCGGTGTAAAG	68
Query	481	AAGTTTCGTTTCGACTTGCAATGATTAGGCACGCCGCA	518
Sbjct	67	AAGTTTCGTTTCGACTTGCAATGATTAGGCACGCCGCA	30

ภาพ 11 แบคทีเรียที่มีลำดับเบสในส่วนยีน 16S rRNA คล้ายกับแบคทีเรียไอโซเลท CF52

5. ผลการศึกษาส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตแบคทีเรียโอซิน

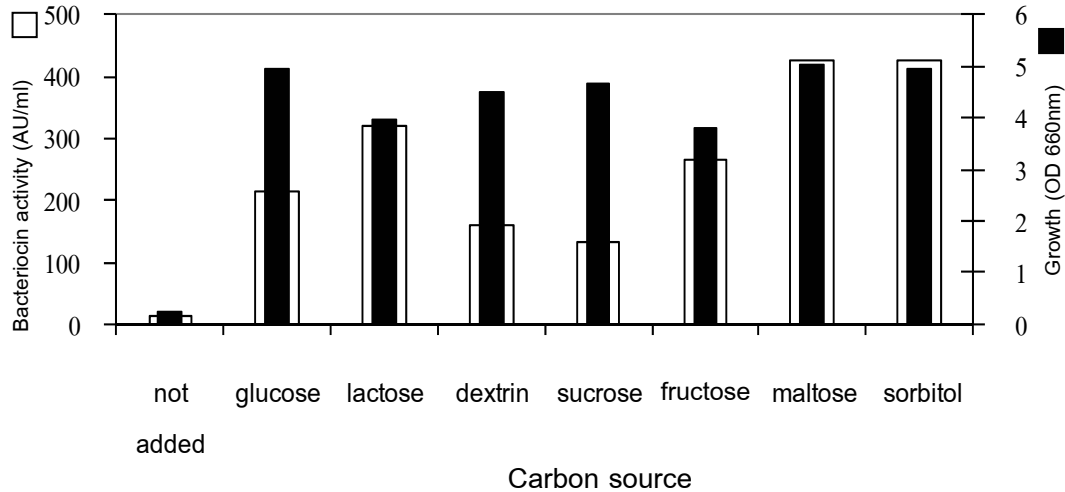
5.1 ผลการศึกษานิตของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS มีส่วนประกอบของแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน 7 ชนิด คือ glucose, lactose, dextrin, fructose, maltose, sucrose และ sorbitol ความเข้มข้น 2.0 % (w/v) แทน glucose นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน พบว่า แบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 สามารถเจริญได้ดีในอาหารเหลวสูตร MRS ที่มี glucose, lactose, dextrin, fructose, maltose, sucrose และ sorbitol เป็นแหล่งคาร์บอน ดังนั้น แหล่งคาร์บอนจำนวนทั้ง 7 ชนิดนี้ถือได้ว่ามีความเหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย แต่แบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินที่มีกิจกรรมการยับยั้งสูงสุดในอาหารเหลวสูตร MRS ที่มี maltose หรือ/และ sorbitol เป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 426.67 AU/ml เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดอื่น ๆ คือ glucose, lactose, dextrin, sucrose และ fructose ซึ่งมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 213.33, 320.00, 160.00, 133.33 และ 266.66 AU/ml ตามลำดับ และในอาหารเหลวสูตร MRS ที่ไม่มีแหล่งคาร์บอน แบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินได้น้อยมาก โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 13.33 AU/ml แสดงดังตาราง 9 และภาพ 12 ดังนั้น maltose หรือ sorbitol เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 แต่เมื่อคำนึงในเชิงเศรษฐศาสตร์ พบว่า เมื่อใช้ maltose เป็นแหล่งคาร์บอนมีต้นทุนต่ำกว่า ซึ่ง Toddorov *et al.* (2004) มีรายงานผลการทดลองหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียโอซินจากแบคทีเรีย *Lb. plantarum* ST13BR พบว่า maltose ให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินสูงสุด โดยค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 6,400 AU/ml และต่อมา Toddorov and Dicks (2006) มีรายงานการผลิตแบคทีเรียโอซินจากแบคทีเรีย *Lb. plantarum* ST23LD โดยใช้ maltose เป็นแหล่งคาร์บอน ทำให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงถึง 12,800 AU/ml ดังนั้น ในการทดลองนี้จึงเลือกใช้ maltose เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อใช้ในการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

ตาราง 9 แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52

แหล่งคาร์บอน (2 % w/v)	ค่าดูดกลืนแสง (OD _{660nm})	ค่ากิจกรรมการยับยั้ง* (AU/ml)
not added	0.229	13.33
glucose	4.961	213.33
lactose	3.984	320.00
dextrin	4.508	160.00
sucrose	4.649	133.33
fructose	3.808	266.66
maltose	5.038	426.67
sorbitol	4.958	426.67

หมายเหตุ : * ข้อมูลที่ได้มาจากการหาค่าเฉลี่ยในการทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ



ภาพ 12 แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตแบคเทอริโอซินของของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมงในสภาวะไร้ออกซิเจน

5.2 ผลการศึกษาความเข้มข้นของ maltose ที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรีย

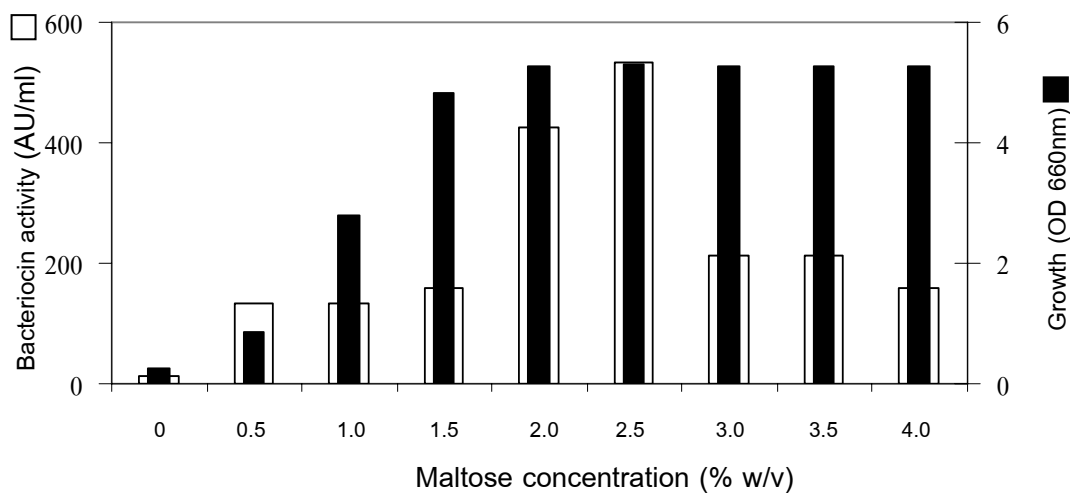
Lb. salivarius CF52

จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS ที่มี maltose เป็นแหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 และ 4.0 % (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ maltose ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ระดับความเข้มข้นของ maltose 0.5-2.5 % (w/v) ส่งผลให้แบคทีเรียมีการเจริญและการผลิตแบคทีเรียโอซินมีค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงขึ้น แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ maltose ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ระดับความเข้มข้น 3.0-4.0 % (w/v) จะเห็นได้ว่า แบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 มีการเจริญและมีค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินลดลงตามลำดับ และ maltose ที่ระดับความเข้มข้น 2.5 % (w/v) แบคทีเรียมีการเจริญและผลิตแบคทีเรียโอซินให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งดีที่สุด คือ มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เท่ากับ 5.301 และมีกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินเท่ากับ 533.33 AU/ml ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงในตาราง 10 และ ภาพ 13 จากผลการทดลองนี้ พบว่า maltose ที่ระดับความเข้มข้น 2.5 % (w/v) เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 มีรายงานการศึกษาผลของความเข้มข้นของ maltose ที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียโอซิน ได้แก่การผลิตแบคทีเรียโอซินผลิตจากแบคทีเรีย *Lb. plantarum* ST13BR พบว่า maltose ที่ระดับความเข้มข้น 0-0.5 % (w/v) ส่งผลให้แบคทีเรียไม่สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินได้ maltose ที่ระดับความเข้มข้น 2.0-3.0 % (w/v) ให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินสูงสุด โดยค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 6,400 AU/ml แต่เมื่อทำการเพิ่ม maltose ระดับความเข้มข้น 4.0 % ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่งผลให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินลดลงเหลือ 3,200 AU/ml (Todorov *et al.*, 2004) จากรายงานที่ผ่านมา การอธิบายถึงผลของความเข้มข้นของ maltose ต่อการผลิตแบคทีเรียโอซินยังมีน้อย แต่อาจสันนิษฐานได้ว่า มีส่วนเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนที่ผลิตแบคทีเรียโอซินด้วย ดังนั้น การทดลองนี้ทำการเลือก maltose ที่ระดับความเข้มข้น 2.5 % (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อทำการทดลองในขั้นตอนต่อไป

ตาราง 10 ผลของ maltose ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตแบคทีริโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52

ความเข้มข้นของ maltose (% w/v)	ค่าดูดกลืนแสง (OD ₆₆₀)	ค่ากิจกรรมการยับยั้ง*
0.0	0.246	13.33
0.5	0.855	133.33
1.0	2.782	133.33
1.5	4.839	160.00
2.0	5.284	426.67
2.5	5.301	533.33
3.0	5.281	213.33
3.5	5.278	213.33
4.0	5.258	160.00

หมายเหตุ : * ข้อมูลที่ได้มาจากการหาค่าเฉลี่ยในการทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ



ภาพ 13 ผลของ maltose ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการผลิตแบคทีริโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน

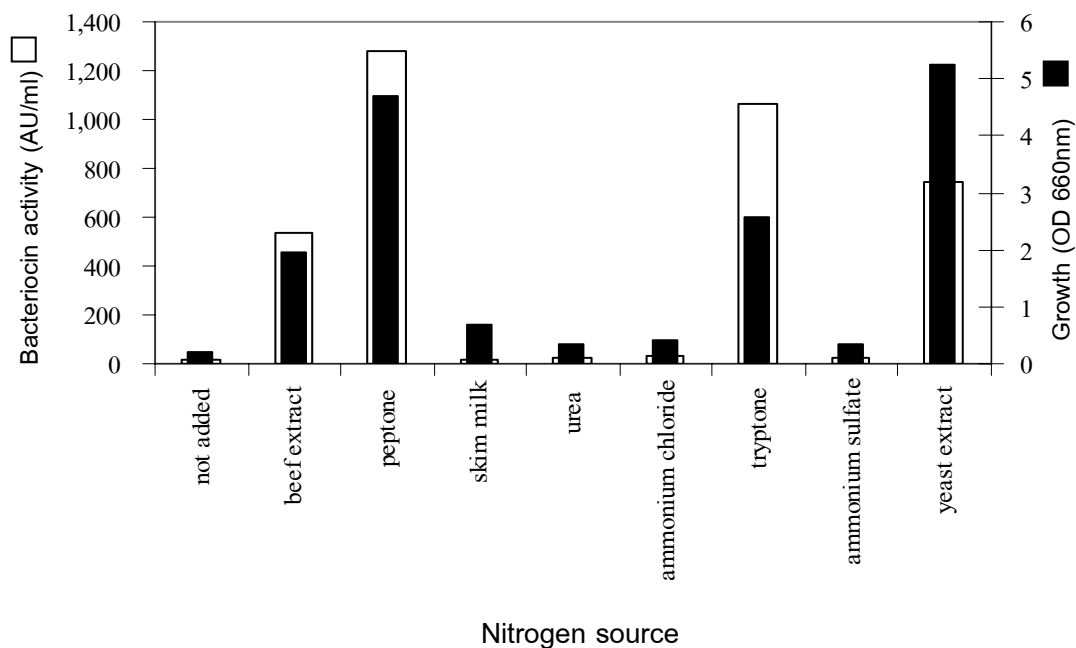
5.3 ผลการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียโอซิน

จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น maltose เข้มข้น 2.5 % (w/v) และมีแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน 8 ชนิด คือ beef extract, peptone, skim milk, urea, NH_4Cl , tryptone, ammonium sulfate และ yeast extract เข้มข้น 1.0 % (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน พบว่า แบคทีเรียสามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มี peptone, beef extract, tryptone และ yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน จะเห็นได้ว่า อาหารเหลวสูตร MRS ที่มี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน แบคทีเรียสามารถเจริญได้ดีที่สุด แต่แบคทีเรียสามารถผลิตสารแบคทีเรียโอซินที่มีค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงสุดในอาหารที่มี peptone เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินเท่ากับ 1,280 AU/ml รองลงมาคือ tryptone, yeast extract และ beef extract โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซิน เท่ากับ 1,066.67, 746.67 และ 533.33 AU/ml ตามลำดับ ส่วนแหล่งไนโตรเจนชนิดอื่น ๆ คือ skim milk, urea, ammonium chloride และ ammonium sulfate ส่งผลให้แบคทีเรียผลิตแบคทีเรียโอซินมีค่ากิจกรรมการยับยั้งน้อยมาก แสดงดังตาราง 11 และภาพ 14 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 สามารถใช้แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์และสามารถผลิตแบคทีเรียโอซินได้ดีกว่าแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์ ซึ่งจากการทดลองนี้ พบว่า yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย แต่ส่งผลให้มีการผลิตแบคทีเรียโอซินน้อยกว่าการใช้ peptone ซึ่ง peptone เป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีความเหมาะสมมากที่สุดต่อการผลิตแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 ซึ่งมีรายงานการใช้ peptone เป็นแหล่งไนโตรเจนทำให้แบคทีเรีย *Lb. plantarum* 423 สามารถเพิ่มผลผลิต plantaricin 423 ได้ (Verellen *et al.*, 1998) และสามารถเพิ่มผลผลิตแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Lactococcus lactis* มากขึ้น (Li *et al.*, 2002) นอกจากนี้ Todorov *et al.* (2004) รายงานว่า การใช้แหล่งไนโตรเจนหลาย ๆ ชนิดรวมเข้าด้วยกัน จะช่วยส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรีย และแบคทีเรียสามารถผลิตแบคทีเรียโอซินเพิ่มมากขึ้นมากกว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว

ตาราง 11 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52

แหล่งไนโตรเจน (1% w/v)	ค่าดูดกลืนแสง (OD ₆₆₀)	ค่ากิจกรรมการยับยั้ง* (AU/ml)
not added	0.209	13.33
beef extract	1.965	533.33
peptone	4.686	1,280.00
skim milk	0.700	13.33
urea	0.355	26.67
ammonium chloride	0.405	33.33
tryptone	2.555	1,066.67
ammonium sulfate	0.333	26.67
yeast extract	5.236	746.67

หมายเหตุ : * ข้อมูลที่ได้มาจากการหาค่าเฉลี่ยในการทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ



ภาพ 14 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น maltose เข้มข้น 2.5 % (w/v) ปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน

5.4 ผลการศึกษาของการเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

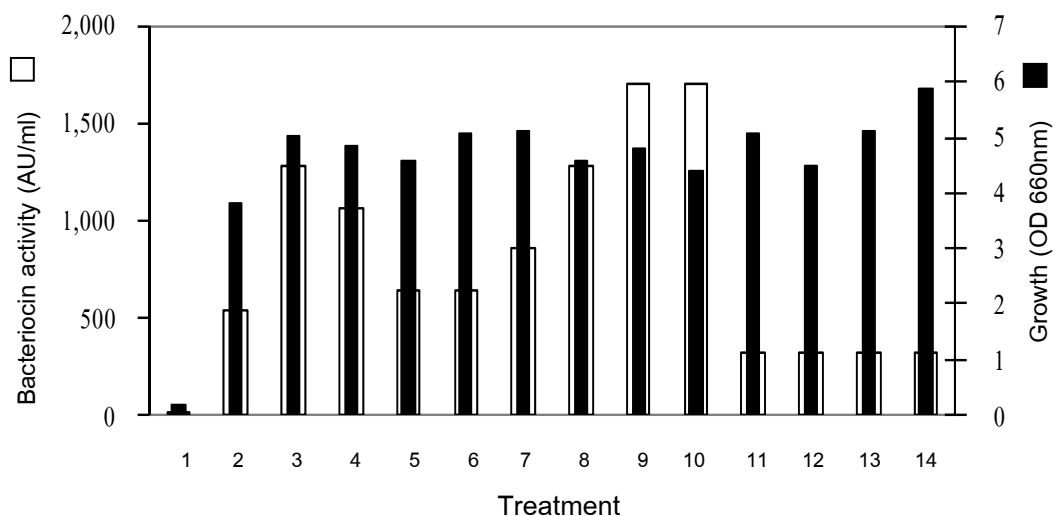
ผลการศึกษาของการเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเฉพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น maltose เข้มข้น 2.5 % (w/v) และมีการรวมแหล่งไนโตรเจน 4 ชนิดเข้าด้วยกัน คือ peptone, tryptone, yeast extract และ beef extract โดยมีความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนแต่ละชนิดแสดงดังตารางที่ 2 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน พบว่า การเติมแหล่งไนโตรเจนหลาย ๆ ชนิด โดยมี peptone เป็นแหล่งไนโตรเจนหลัก ส่งผลให้การเจริญของแบคทีเรียมีแนวโน้มสูงขึ้นมากกว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว โดยแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 สามารถเจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่เติม peptone เข้มข้น 0.5 % (w/v), tryptone เข้มข้น 1.0 % (w/v), yeast extract เข้มข้น 0.5 % (w/v) และ beef extract เข้มข้น 0.5 % (w/v) ผสมเข้าด้วยกันเป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่แบคทีเรียสามารถผลิตแบคทีริโอซินมีกิจกรรมการยับยั้งสูงสุด ที่มี peptone เข้มข้น 0.5 % (w/v) ร่วมกับ beef extract เข้มข้น 1.0 % (w/v) หรือ peptone เข้มข้น 0.5 % (w/v), tryptone เข้มข้น 1.0 % (w/v) และ yeast extract เข้มข้น 0.5 % (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีริโอซินเท่ากับ 1,706.67 AU/ml ดังตาราง 12 และ ภาพ 15 การทดลองนี้ทำการเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี peptone เข้มข้น 0.5 % (w/v) ร่วมกับ beef extract เข้มข้น 1.0 % (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีริโอซินเพื่อใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป เนื่องจากประกอบด้วยแหล่งไนโตรเจนเพียง 2 ชนิด แต่สามารถผลิตแบคทีริโอซินที่มีค่ากิจกรรมการยับยั้งได้เท่ากับแหล่งไนโตรเจน 3 ชนิด ซึ่งช่วยประหยัดต้นทุนในการทดลองขั้นตอนต่อไป

ตาราง 12 ผลของการเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ต่อการผลิตแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52

หลอดที่	แหล่งไนโตรเจน	ค่าดูดกลืนแสง (OD 660nm)	ค่ากิจกรรมการยับยั้ง* (AU/ml)
1	Not added	0.201	13.33
2	0.5 % PP	3.828	533.33
3	1.0 % PP	5.041	1,280.00
4	0.5 % PP+0.5 % TP	4.841	1,066.67
5	0.5 % PP+1.0 % TP	4.594	640.00
6	0.5 % PP+0.5 % YE	5.066	640.00
7	0.5 % PP+1.0 % YE	5.125	853.33
8	0.5 % PP+0.5 % BE	4.596	1,280.00
9	0.5 % PP+1.0 % BE	4.802	1,706.67
10	0.5 % PP+1.0 % TP+0.5 % YE	4.412	1,706.67
11	0.5 % PP+0.5 % BE+0.5 % YE	5.052	320.00
12	0.5 % PP+0.5 % TP+0.5 % BE	4.505	320.00
13	0.5 % PP+0.5 % TP+0.5 % YE	5.131	320.00
14	0.5 % PP+1.0 %TP+0.5 %YE+0.5 %BE	5.885	320.00

หมายเหตุ : PP : peptone, TP : tryptone, BE : beef extract และ YE : yeast extract

* ข้อมูลที่ได้มาจากหาค่าเฉลี่ยในการทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ



ภาพ 15 ผลของการเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ต่อการผลิตแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น maltose เข้มข้น 2.5 % (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน

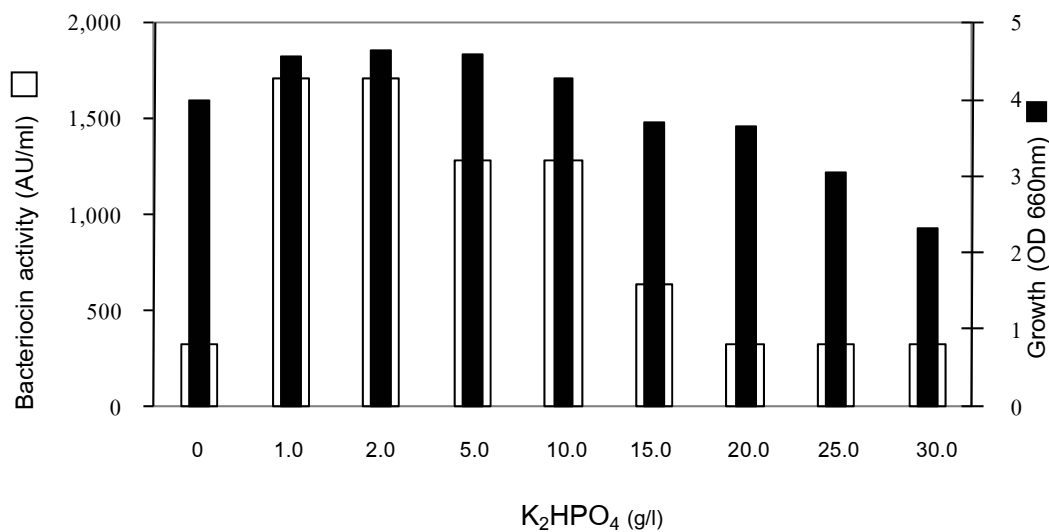
5.5 ผลการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของฟอสเฟตอนินทรีย์ (inorganic phosphate) ต่อการผลิตแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52

ผลการศึกษาความเข้มข้นของฟอสเฟตอนินทรีย์ต่อการผลิตแบคทีเรียโอซิน โดยทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น maltose เข้มข้น 2.5 % (w/v) มี peptone เข้มข้น 0.5 % (w/v) และ beef extract เข้มข้น 1.0 % (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน และมี K_2HPO_4 ที่มีระดับความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0 และ 30.0 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งฟอสเฟส บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้น K_2HPO_4 ที่ระดับความเข้มข้น 1.0-5.0 กรัมต่อลิตร ไม่สามารถช่วยให้แบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 เจริญเพิ่มมากขึ้น แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นสูงขึ้นเรื่อย ๆ ที่ระดับหนึ่ง (ความเข้มข้น 10.0-30.0 กรัมต่อลิตร) จะส่งผลยับยั้งการเจริญของผลิตแบคทีเรียโอซินลดลงเช่นกัน แบคทีเรียผลิตแบคทีเรียโอซินมีค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงสุดที่ความเข้มข้น 1.0-2.0 กรัมต่อลิตร โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินเท่ากับ 1,706.67 AU/ml เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ K_2HPO_4 ที่ระดับสูงขึ้นคือความเข้มข้น 10.0, 15.0, 20.0, 25.0 และ 30.0 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้การผลิตแบคทีเรียโอซินมีค่ากิจกรรมการยับยั้งลดลง โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินเท่ากับ 1,280, 1,280, 640, 320, 320 และ 320 AU/ml ตามลำดับ ดังตาราง 13 และภาพ 16 ซึ่งมีรายงานที่เกี่ยวกับผลของฟอสเฟตอนินทรีย์ต่อการผลิตแบคทีเรียโอซินมากมาย เช่น K_2HPO_4 เข้มข้น 5 และ 10 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้แบคทีเรีย *Lb. plantarum* ผลิตแบคทีเรียโอซินให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงสุด (Todorov and Dicks, 2004) และ Enan *et al.* (1996) มีรายงานว่า K_2HPO_4 เข้มข้น 7 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้แบคทีเรีย *Lb. plantarum* UG1 ให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงสุด นอกจากนี้ ยังมีรายงานผลเกี่ยวกับการเปรียบเทียบฟอสเฟตอนินทรีย์ที่อยู่ในรูปต่างกันต่อการผลิตแบคทีเรียโอซิน เช่น K_2HPO_4 สามารถกระตุ้นให้แบคทีเรีย *Lb. plantarum* UG1 ผลิตแบคทีเรียโอซินให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงกว่า K_2HPO_4 ที่ความเข้มข้นเท่ากัน (Todorov *et al.*, 2004) ในการทดลองนี้ทำการเลือก K_2HPO_4 เข้มข้น 1.0-2.0 กรัมต่อลิตร เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

ตาราง 13 ผลความเข้มข้นของ K_2HPO_4 ต่อการผลิตแบคทีริโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52

ความเข้มข้นของ K_2HPO_4 (กรัมต่อลิตร)	ค่าดูดกลืนแสง (OD ₆₆₀)	ค่ากิจกรรมการยับยั้ง* (AU/ml)
Not added	3.995	320.00
1.0	4.567	1,706.67
2.0	4.635	1,706.67
5.0	4.597	1,280.00
10.0	4.278	1,280.00
15.0	3.712	640.00
20.0	3.642	320.00
25.0	3.061	320.00
30.0	2.321	320.00

หมายเหตุ : * ข้อมูลที่ได้มาจากหาค่าเฉลี่ยในการทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ



ภาพ 16 ผลของความเข้มข้นของ K_2HPO_4 ที่เหมาะสม ต่อการผลิตแบคทีริโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS ประกอบด้วย maltose เข้มข้น 2.5 % (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน และมี peptone เข้มข้น 0.5 % (w/v) ร่วมกับ beef extract เข้มข้น 1.0 % (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน

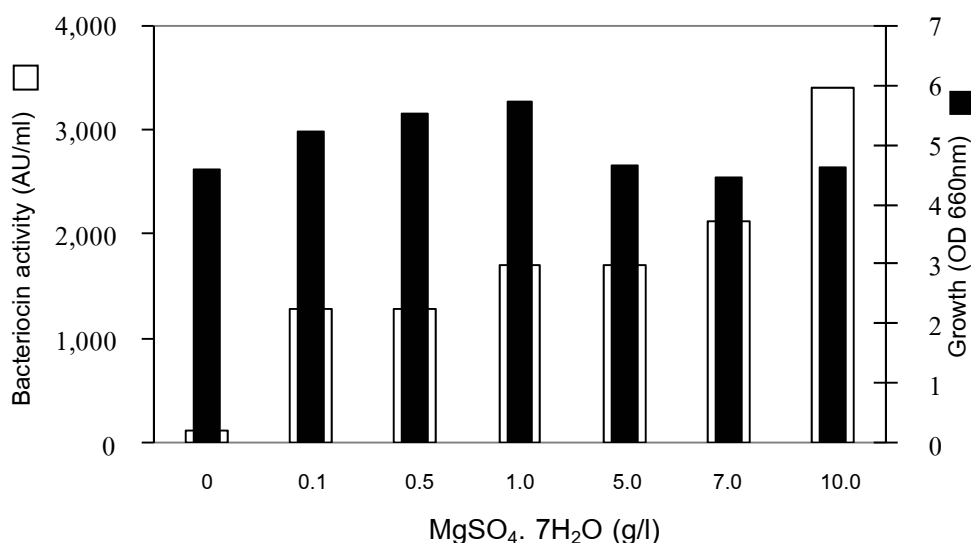
5.6 ผลของแมกนีเซียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียโอซิน

ผลการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแมกนีเซียมซัลเฟตต่อการผลิตแบคทีเรียโอซิน โดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS ประกอบด้วย maltose ที่มีเข้มข้น 2.5 % (w/v) แหล่งคาร์บอนเป็น มี peptone เข้มข้น 0.5 % (w/v) ร่วมกับ beef extract เข้มข้น 1.0 % (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน และ K_2HPO_4 เข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งฟอสเฟส และมี $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 7.0 และ 10.0 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งแมกนีเซียม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแมกนีเซียม ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1.0 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้แบคทีเรียมีการเจริญสูงขึ้นเล็กน้อย แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแมกนีเซียมสูงขึ้นเรื่อย ๆ ที่ระดับความเข้มข้น 5.0, 7.0 และ 10.0 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้แบคทีเรียมีการเจริญลดลงตามลำดับ แต่แบคทีเรียสามารถผลิตแบคทีเรียโอซินมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเพิ่มมากขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแมกนีเซียมสูงขึ้นเรื่อยๆ ส่งผลให้การผลิตแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรียเพิ่มมากขึ้นด้วย โดยค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงสุดของแบคทีเรียโอซินมีค่าเท่ากับ 3,413 AU/ml (แมกนีเซียมความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร) ดังตาราง 14 และภาพ 17 ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kim *et al.* (2006) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อมากขึ้น ส่งผลให้แบคทีเรีย *Micrococcus* sp. ผลิตแบคทีเรียโอซินชนิด micrococcus GO5 เพิ่มขึ้น และ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ เข้มข้น 5-10 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้แบคทีเรียผลิตแบคทีเรียโอซินให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงสุด โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 4,096 AU/ml นอกจากนี้ Li *et al.* (2002) รายงานว่า $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ เข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้แบคทีเรีย *Lactococcus lactis* ผลิตแบคทีเรียโอซินให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงสุด จากผลการทดลองนี้ จึงเลือก $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ เข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร เพื่อใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

ตาราง 14 ผลความเข้มข้นของ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ต่อการผลิตแบคทีริโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (กรัมต่อลิตร)	ค่าดูดกลืนแสง (OD_{660})	ค่ากิจกรรมการยับยั้ง* (AU/ml)
Not added	4.595	106.67
0.1	5.227	1,280.00
0.5	5.534	1,280.00
1	5.744	1,706.67
5	4.659	1,706.67
7	4.454	2,133.33
10	4.607	3,413.00

หมายเหตุ : * ข้อมูลที่ได้มาจากการหาค่าเฉลี่ยในการทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ



ภาพ 17 ผลของ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีริโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS ประกอบด้วย maltose เข้มข้น 2.5 % (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน และมี peptone เข้มข้น 0.5 % (w/v) ร่วมกับ beef extract เข้มข้น 1.0 % (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน และมี K_2HPO_4 เข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร บ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน

จากการทดลองเพื่อหาองค์ประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียโอซินจากแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 สามารถสรุปองค์ประกอบต่าง ๆ ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม ดังตารางที่ 15

ตาราง 15 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52

Composition	MRS (%)	Modified MRS (%)
Glucose	2.0	-
Maltose	-	2.5
Peptone	1.0	0.5
Yeast extract	0.5	-
Beef extract	1.0	1.0
K ₂ HPO ₄	0.2	0.1-0.2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.002	1.0
+ 0.5 % CH ₃ COONa, 0.2 % (NH ₄) ₂ C ₆ H ₆ O ₇ , 0.004 % MnSO ₄ ·H ₂ O, 0.1 % Tween 80		
Activity (AU/ml)	320	3,413

6. ผลของสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรีย

Lb. salivarius CF52

6.1 ผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตแบคทีเรียโอซิน

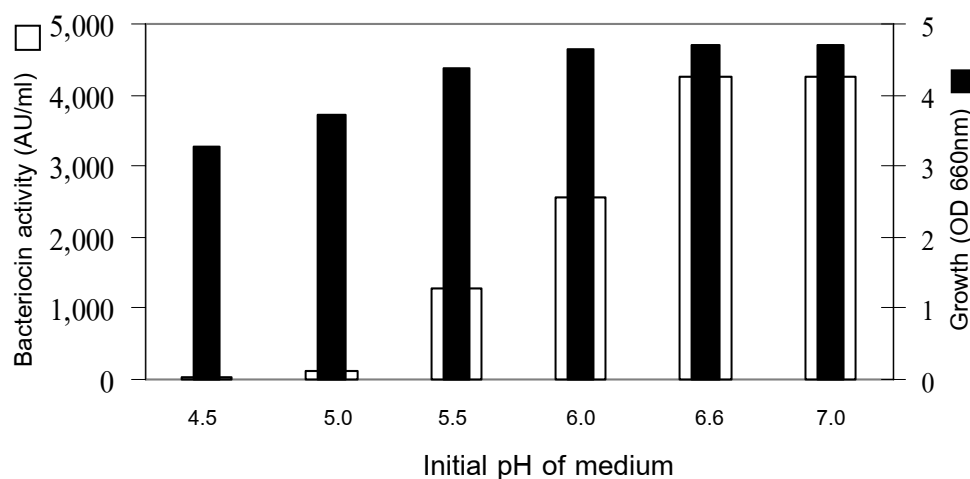
จากผลการศึกษาพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตแบคทีเรียโอซิน โดยทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS ประกอบด้วย maltose ที่มีความเข้มข้น 2.5 % (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน มี peptone เข้มข้น 0.5 % (w/v) ร่วมกับ beef extract เข้มข้น 1.0 % (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน มี K₂HPO₄ เข้มข้น 0.1 % (w/v) เป็นแหล่งฟอสเฟส มี MgSO₄·7H₂O ความเข้มข้น 1.0 % (w/v) เป็นแหล่งแมกนีเซียม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน พบว่า แบคทีเรียสามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4.5-7.0 และเจริญได้ดีที่สุดที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7 แต่แบคทีเรียสามารถผลิตแบคทีเรียโอซินให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งมากที่สุดที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 และ 7.0 โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 4,266.67 AU/ml ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่พีเอชเริ่มต้นอื่น ๆ คือ 4.5, 5.0 และ 6.0 โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินคือ 40, 106.67, 1,280 และ 2,560 AU/ml ตามลำดับ ดังตาราง 16 และภาพ 18 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่พีเอชเริ่มต้นมีความเป็นกรดมากและความเป็น

ต่างมาก ส่งผลทำให้แบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 ผลิตแบคเทอรีโอซินให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งลดลง และอาหารเลี้ยงเชื้อที่พีเอชเริ่มต้นเป็นกรดอ่อนหรือเป็นกลางมีความเหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอรีโอซิน มีรายงานเกี่ยวกับผลของพีเอชเริ่มต้นอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตแบคเทอรีโอซิน ที่สอดคล้องกับผลการทดลองนี้มากมาย เช่น การผลิตแบคเทอรีโอซินจากแบคทีเรีย *Lb. plantarum* ST23MS โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 มีผลทำให้แบคทีเรียสามารถผลิตแบคเทอรีโอซินให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงสุด โดยค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 2,930 AU/ml (Todorov and Dicks, 2006)

ตาราง 16 ผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตแบคเทอรีโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52

พีเอชเริ่มต้นของ อาหารเลี้ยงเชื้อ	ค่าดูดกลืนแสง (OD ₆₆₀)	ค่ากิจกรรมการยับยั้ง* (AU/ml)
4.5	3.272	40.00
5.0	3.715	106.67
5.5	4.383	1280.00
6.0	4.630	2,560.00
6.5	4.695	4,266.67
7.0	4.705	4,266.67

หมายเหตุ : * ข้อมูลที่ได้มาจากการหาค่าเฉลี่ยในการทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ



ภาพ 18 ผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตแบคเทอรีโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน

6.2 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52

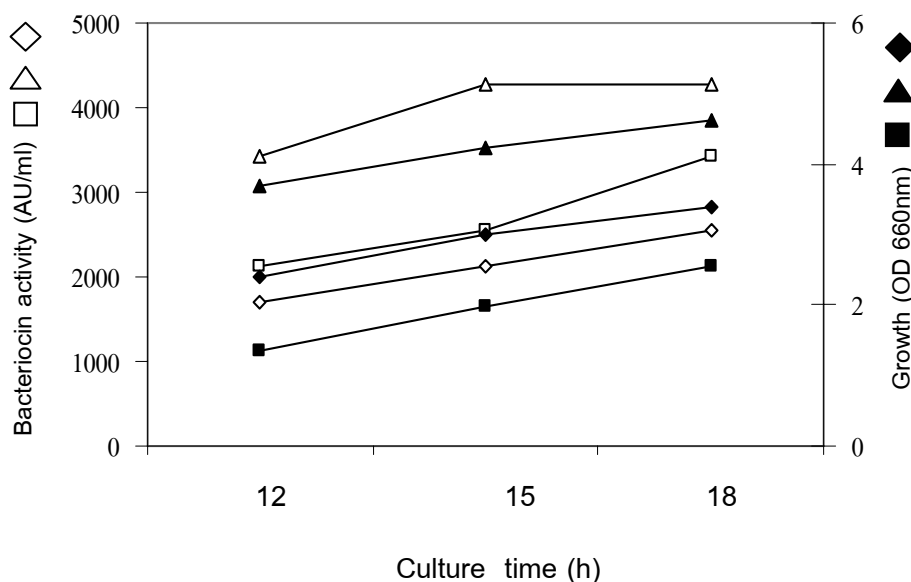
จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS ดัดแปลง โดยมีองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียโอซิน และปรับอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส โดยแต่ละอุณหภูมิบ่มเป็นเวลา 12, 15 และ 18 ชั่วโมง พบว่า แบคทีเรียเจริญเติบโตได้ดีที่สุดคืออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บ่มเป็นเวลา 15-18 ชั่วโมง ให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินสูงสุด อุณหภูมิ 30 และ 45 องศาเซลเซียส บ่มเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินสูงสุด เมื่อเปรียบเทียบทั้ง 3 อุณหภูมิ พบว่า ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อทดสอบที่สูงที่สุด คือ 4,266.67 (AU/ml) แสดงดังตาราง 17 และ ภาพ 19 จากการทดลองนี้ พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญจะเป็นอุณหภูมิเดียวกับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียโอซินซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับการผลิต lactocin A (Parent *et al.*, 1994) enterocin 1146 (Parent and Ricciandi, 1999) amylovorin 1471 (De Vuyst *et al.*, 1996) และ nisin Z (Matsusaki *et al.*, 1996)

ตาราง 17 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52

อุณหภูมิ	บ่ม 12 ชั่วโมง		บ่ม 15 ชั่วโมง		บ่ม 18 ชั่วโมง	
	A*	B*	A*	B*	A*	B*
30	1.352	2133.33	1.972	2,560.00	2.55	3,413.33
37	3.687	3,413.33	4.216	4,266.67	4.632	4,266.67
45	2.388	1,706.67	2.99	2133.33	3.402	2,560.00

หมายเหตุ : A* = ค่าดูดกลืนแสง (OD₆₆₀) B* = ค่ากิจกรรมการยับยั้ง (AU/ml)

* = ข้อมูลที่ได้มาจากการหาค่าเฉลี่ยในการทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ



ภาพ 19 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตแบคทีริโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS ที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 บ่มที่ (□, ■) อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (△, ▲) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ (◇, ◆) อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้ออกซิเจน

6.3 ผลของระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่มีต่อการผลิตแบคทีริโอซิน

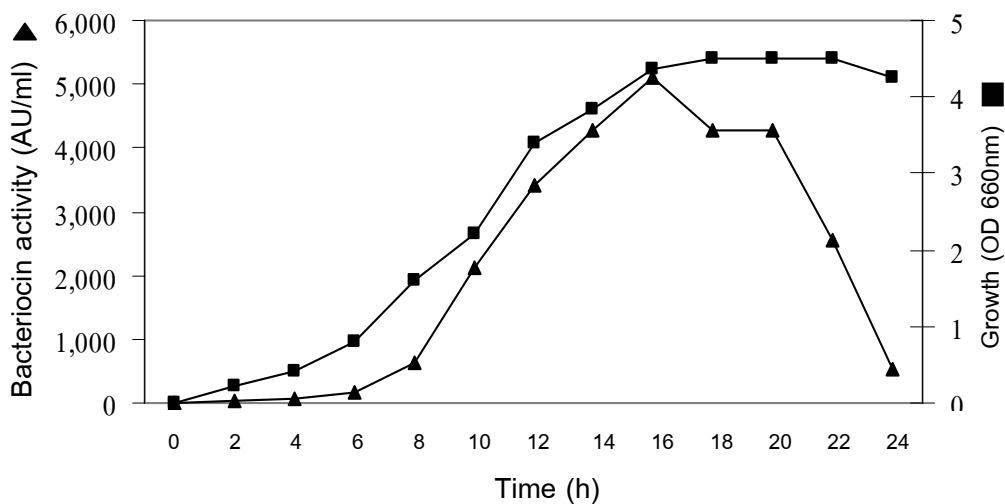
จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS ดัดแปลง โดยองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีริโอซิน และมีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้ออกซิเจน ทำการเก็บตัวอย่างทุก ๆ 2 ชั่วโมง จนครบชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย พบว่า แบคทีริโอซินเริ่มมีการผลิตออกมาในชั่วโมงที่ 2 ของการเจริญของแบคทีเรีย (lag phase) หลังจากนั้นการผลิตแบคทีริโอซินเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ตามลำดับ หลังจากชั่วโมงที่ 10 ของการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย (log phase) ค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีริโอซินเพิ่มอย่างรวดเร็ว และในชั่วโมงที่ 16 ของการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย (early stationary phase) พบว่า แบคทีเรียผลิตแบคทีริโอซินให้มีค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงสุด โดยค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีริโอซินเท่ากับ 5,120.00 AU/ml หลังจากนั้นกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีริโอซินมีค่าลดลงตามลำดับ แสดงดังตาราง 18 และ ภาพ 20 ซึ่งมีรายงานมากมายเกี่ยวกับ ผลของระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่มีต่อการผลิตแบคทีริโอซิน เช่น Schlegel and Slade (1973) ได้มีการศึกษาผลผลิตของ streptococcin AFF22 พบว่า แบคทีเรียผลิตแบคทีริโอซินมีกิจกรรมการยับยั้งสูงสุดอยู่ในช่วง log phase ของการเจริญของแบคทีเรีย หลังจากนั้นผลผลิตค่อย ๆ ลดลงก่อนเข้าสู่ช่วง

stationary phase ซึ่งแตกต่างกับ streptococci AFF22 ที่มีการเริ่มผลิตในช่วงปลายของ log phase และจะค่อย ๆ ลดลงอย่างช้า ๆ ในช่วง stationary phase ของการเพาะเลี้ยง Lachowicz (1965) ได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงผลผลิตของ streptococci A-1262a บนอาหารแข็ง พบว่าค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินเพิ่มขึ้นหลังจากการบ่มเป็นเวลา 8 ชั่วโมง และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียนาน 18-24 ชั่วโมง พบว่า ให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินสูงสุด หลังจากนั้นค่อย ๆ ลดลงตามลำดับ นอกจากนี้ Noonpakdee *et al.* (2003) รายงานผลการศึกษาผลผลิตของ nisin จากแบคทีเรีย *Lactococcus lactis* WNC20 พบว่า แบคทีเรียผลิตแบคทีเรียโอซินให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงสุดในช่วง early stationary ของการเจริญของแบคทีเรีย และค่ากิจกรรมการยับยั้งค่อย ๆ ลดลงตามลำดับ Parente *et al.* (1994) ได้อธิบายการสูญเสียกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซิน เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเป็นระยะเวลานานมาก สิ่งเหล่านี้อาจขึ้นอยู่กับความจำเพาะของแบคทีเรียโอซินในการสูญเสียกิจกรรมการยับยั้ง หรือการถูกย่อยโดยเอนไซม์ หรือ คุณสมบัติในการดูดซึมของแบคทีเรียโอซินของเซลล์ผู้ผลิต

ตาราง 18 ผลของระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่มีต่อการผลิตแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52

เวลาในการบ่มเชื้อแบคทีเรีย (ชั่วโมง)	ค่าดูดกลืนแสง (OD ₆₆₀)	ค่ากิจกรรมการยับยั้ง* (AU/ml)
0	0.01	0.00
2	0.22	20.00
4	0.415	53.33
6	0.812	160.00
8	1.589	640.00
10	2.213	2,133.33
12	3.585	3,413.33
14	3.833	4,266.67
16	4.254	5,120.00
18	4.499	4,266.67
20	4.501	4,266.67
22	4.502	2,560.00
24	4.245	533.33

หมายเหตุ : *ข้อมูลที่ได้มาจากการหาค่าเฉลี่ยในการทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ



ภาพ 20 ผลของระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่มีต่อการผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS ที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน

7. ผลการทำแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 ให้บริสุทธิ์บางส่วน

จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 โดยใช้ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.2 % (v/v) ในอาหารเหลวสูตร MRS สูตรดัดแปลง ที่มีความเหมาะสมในการผลิตแบคเทอริโอซิน ปริมาตร 500 มิลลิลิตร มีพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.5 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนใสออกจากเซลล์ ด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำของเหลวใสมาทำการปรับค่าพีเอชเป็น 6.5 พบว่า แบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 มีการผลิต แบคเทอริโอซินมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 1,280 AU/ml มีปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 1,988 มิลลิกรัม และมีค่ากิจกรรมการยับยั้งจำเพาะเท่ากับ 321.93 AU/mg จากนั้นนำของเหลวใสที่เหลือไปตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต จำนวน 472 กรัมต่อลิตร (70 % NH_4SO_4 saturation) กวนทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อแยกตะกอนโปรตีนออกจากของเหลวใส นำตะกอนโปรตีนที่ได้ซึ่งมีลักษณะสีน้ำตาลเข้ม มาละลายในโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ ปริมาตร 6 มิลลิลิตร พบว่า แบคเทอริโอซินมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเพิ่มขึ้นเป็น 40,960 AU/ml มีปริมาณโปรตีนทั้งหมด 59.04 มิลลิกรัม และมีค่ากิจกรรมการยับยั้งจำเพาะเท่ากับ 4162.6 AU/mg ดังนั้น ขั้นตอนการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตทำให้แบคเทอริโอซินมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 12.93 เท่า การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต เป็นวิธีที่ง่ายในการทำให้ แบคเทอริโอซิน

เข้มข้นเพิ่มขึ้น ซึ่ง Mao และคณะ (2001) ได้รายงานว่าการทำแบคทีเรียโอซินให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีนี้สามารถทำให้ lacticin FS 92 มีกิจกรรมการยับยั้งจำเพาะสูงขึ้นเป็น 40 เท่า และจากนั้นนำแบคทีเรียโอซินมาทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้น โดยนำมาผ่านคอลัมน์ CENTRI-SEP (Gel filtration) เพื่อทำการแยกเกล็ดและองค์ประกอบอื่น ๆ ออกจากแบคทีเรียโอซิน พบว่า แบคทีเรียโอซินมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 5,4613 AU/ml มีปริมาณโปรตีนทั้งหมด 4.896 มิลลิกรัม และมีค่ากิจกรรมการยับยั้งจำเพาะเท่ากับ 66,927.69 AU/mg ขั้นตอนการแยกเกล็ดและสารประกอบอื่น ๆ ออกจากแบคทีเรียโอซิน ทำให้แบคทีเรียโอซินมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 207.89 เท่า ดังตาราง 19 วิธีการแยกเกล็ดและองค์ประกอบอื่น ๆ ออกจากแบคทีเรียโอซิน มีหลายวิธีด้วยกัน เช่น การใช้ถุงไตอะไลซิส (dialysis) ที่มีขนาด cut-off เท่ากับ 1 kDa, cation exchange chromatography, hydrophobic interaction chromatography และ reverse-phase high performance liquid chromatography (Nes *et al*, 1996)

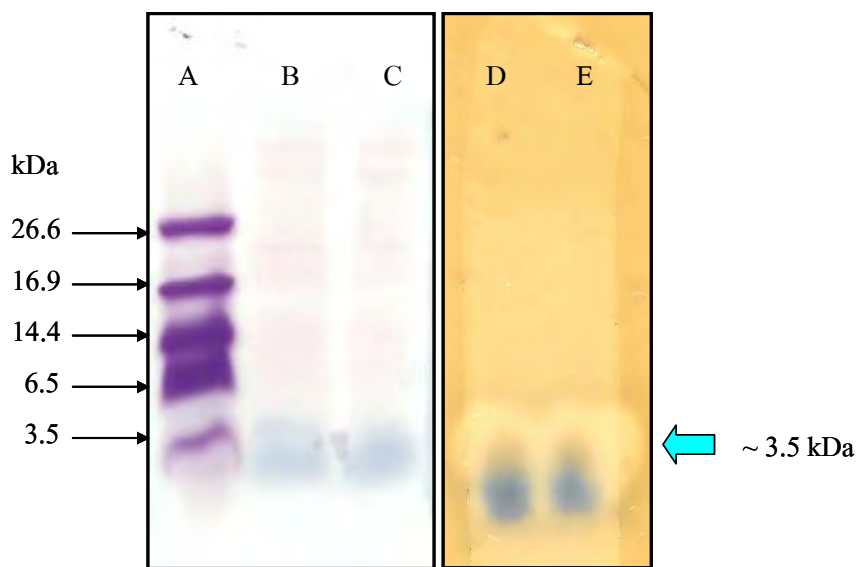
ตาราง 19 การทำให้แบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 บริสุทธิ์บางส่วน

Step	Volume (ml)	Activity (AU/ml)	Total activity (AU)	Total protein (mg)	Specific activity (AU/mg)	Fold of purification (fold)
I. Culture supernatant	500	1,280	64,000	1,988	321.93	1
II. Ammonium sulfate precipitation	6	40,960	245,760	59.04	4,162.60	12.93
III. Gel filtration	6	54,613	327,678	4.896	66,927.69	207.89

8. การแยกสารแบคทีเรียโอซินโดยวิธี **tricine sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (Tricine-SDS-PAGE)**

จากการนำตัวอย่างแบคทีเรียโอซินที่ผ่านกระบวนการ gel filtration มาทำการวิเคราะห์หามวลโมเลกุลโปรตีน โดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสบนเจลสำเร็จรูป Ready Gel[®] Precast Gels (BIO-RAD) ประกอบด้วย 16.5 % Tricine-SDS polyacrylamide gel ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นแบ่งเจลออกเป็น 2 ส่วน คือ เจลส่วนแรกทำการตรึงตัวอย่างด้วย สารละลาย destaining เป็นเวลา 30 นาที ต่อมาย้อม Coomassie blue stain และล้างออกด้วย destaining เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่า เกิดแถบโปรตีน 1 แถบ และเจลส่วนที่สองทำการตรึงตัวอย่างด้วยสารละลาย destaining เป็น

เวลา 30 นาที ล้างด้วยน้ำปราศจากอ็อกซิเจนครั้งละ 30 นาที จำนวน 4 ครั้ง เพื่อนำไปทดสอบหาบริเวณการยับยั้งของแบคทีเรียโอซิน พบว่าบริเวณที่เกิดการยับยั้งต่อแบคทีเรียทดสอบเกิดขึ้นตรงตำแหน่งเดียวกับที่เกิดแถบโปรตีนของเจลส่วนแรก แสดงว่า แบคทีเรียโอซินชนิดนี้มีมวลโมเลกุลโปรตีนประมาณ 3.5 kDa ดังภาพ 21 ซึ่งผลการทดลองนี้ให้ผลเช่นเดียวกับ Oh *et al.* (2000) วิเคราะห์มวลโมเลกุลโปรตีนของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Lb. acidophilus* 30SC โดยวิธี 16.5 % Tricine-SDS-PAGE พบว่า มีมวลโมเลกุลโปรตีนของแบคทีเรียโอซินเท่ากับ 3.5 kDa แบคทีเรียโอซินชนิดนี้อาจจัดอยู่ใน Class IIa เนื่องจากมีขนาดโมเลกุลโปรตีนขนาดเล็ก สามารถทนความร้อนได้ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที โดยเฉพาะมีค่ากิจกรรมยับยั้งแบคทีเรียกลุ่ม lital เป็นหลัก ซึ่งมีรายงานเกี่ยวกับแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Lb. salivarius* เช่น bacteriocin OR7 ผลิตจากแบคทีเรีย *Lb. salivarius* มีมวลโมเลกุลประมาณ 6 kDa สามารถทนความร้อนได้ดี มีความจำเพาะในการยับยั้งแบคทีเรียกลุ่ม lital ซึ่งถูกจัดอยู่ใน Class IIa (Stern *et al.*, 2006) นอกจากนี้ salivarin B ผลิตจากแบคทีเรีย *Lb. salivarius* M7 ถูกจัดอยู่ใน Class IIa เช่นเดียวกัน (Cataloluk and Gurakan, 2003)



ภาพ 21 ผลการแยกแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 โดยวิธี 16.5 % Tricine-SDS-PAGE

- | | |
|--------------|--|
| Lane A | โปรตีนมาตรฐาน |
| Lane B และ C | แถบแบคทีเรียโอซินที่ย้อมด้วยสี Coomassie brilliant blue |
| Lane D และ E | บริเวณเกิด clear zone การยับยั้งของแบคทีเรียโอซินต่อ <i>Lb. fermentum</i> JCM 1173 |

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

แบคทีเรียกรดแลคติก จำนวน 66 ไอโซเลท ซึ่งคัดแยกจากระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์ เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ของแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งต่อเชื้อทดสอบ 36 ชนิด พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท CF50, CF51 และ CF52 มีฤทธิ์การยับยั้งต่อแบคทีเรียกรดแลคติกที่อยู่ในกลุ่มใกล้เคียง และแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดได้ แบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท มีความเสถียรต่อความร้อน มีกิจกรรมการยับยั้งในช่วงพีเอชกว้าง และเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนทำลายกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซิน ซึ่งแสดงว่าแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท เป็นสารประกอบประเภทโปรตีน และพบว่า แบคทีเรียไอโซเลท CF52 ผลิตแบคทีเรียโอซินมีฤทธิ์การยับยั้งต่อทดสอบและทนต่อความร้อนได้ดีที่สุด เมื่อนำไปจำแนกชนิดของแบคทีเรียในระดับสปีชีส์พบว่าเป็นแบคทีเรีย *Lactobacillus salivarius* CF52 จากการทดสอบหาลำดับประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 พบว่า แบคทีเรียชนิดนี้ สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินที่มีค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงสุดเท่ากับ 5,120 AU/ml ในอาหาร MRS สูตรดัดแปลง ซึ่งประกอบด้วย maltose เข้มข้น 2.5 % (w/v), peptone เข้มข้น 0.5 % (w/v), beef extract เข้มข้น 1.0 % (w/v), K_2HPO_4 เข้มข้น 0.1-0.2 % (w/v), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ เข้มข้น 1.0 % (w/v), CH_3COONa เข้มข้น 0.5 % (w/v), $(NH_4)_2C_6H_6O_7$ เข้มข้น 0.2 % (w/v), $MnSO_4 \cdot H_2O$ เข้มข้น 0.004 % (w/v) และ Tween 80 เข้มข้น 0.1 % (w/v) พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน และทำให้แบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์บางส่วนโดยตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และ gel filtration ทำให้แบคทีเรียโอซินมีกิจกรรมการยับยั้งจำเพาะสูงขึ้น 207 เท่า และเมื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของแบคทีเรียโอซินด้วยวิธี 16.5 % Tris-Tricine-SDS-PAGE พบว่าแบคทีเรียโอซินชนิดนี้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 3.5 KDa

จากผลการวิจัย พบว่า แบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 เป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่ง หากได้มีการศึกษาข้อมูลต่าง ๆ เพิ่มเติม ซึ่งน่าจะเป็นไปได้ในการนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารถนอมอาหาร หรือใช้เป็นเชื้อตั้งต้นในการผลิตอาหารหมัก หรือนำไปใช้เป็นโปรไบโอติกในอาหารสัตว์ ซึ่งจะช่วยส่งเสริมสุขภาพสัตว์ และช่วยลดการเกิดโรคติดเชื้อในสัตว์เศรษฐกิจ

ข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลอง พบว่า แบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแลคติกในกลุ่มใกล้เคียงกัน และแบคทีเรียที่ก่อโรคในอาหารบางชนิดได้ ซึ่งค่ากิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียโอซินไม่ค่อนสูงมากนัก แต่เมื่อหาค่าประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียโอซินแล้ว ทำให้กิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินสูงขึ้นค่อนข้างมาก หากนำเอาแบคทีเรียโอซินชนิดนี้ไปใช้ประโยชน์จริงควรทำการศึกษาข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับสภาวะแวดล้อม ในการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซิน หรือลดสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ซึ่งทำลายกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินให้ลดลง และจากการทดลอง พบว่าแบคทีเรียชนิดนี้ผลิตแบคทีเรียโอซินที่มีมวลโมเลกุลขนาด 3.5 kDa แต่ยังไม่ทราบชนิดของแบคทีเรียโอซินที่แบคทีเรียผลิตขึ้นมา ดังนั้นจึงควรทำการทดลองเพิ่มเติมเพื่อหาโครงสร้างของโปรตีน ลำดับของกรดอะมิโนของแบคทีเรียโอซิน และบริเวณยีนที่ผลิตแบคทีเรียโอซิน ซึ่งเป็นประโยชน์ในการจะนำเอาแบคทีเรียโอซินชนิดนี้ไปใช้ได้จริง

Output ที่ได้จากโครงการ

1. เสนอผลงานระดับนานาชาติ จำนวน 1 เรื่อง และเสนอผลงานระดับชาติ จำนวน 1 เรื่อง (ภาคผนวก จ)
2. กำลังดำเนินการเขียนผลงานวิจัยเพื่อตีพิมพ์ลงในวารสารทางวิชาการที่ สกว. ยอมรับ

บรรณานุกรม

- นภา โล่ห์ทอง. 2534. กล้าเชื้ออาหารหมักและเทคโนโลยีการผลิต. พับลิชชิง. กรุงเทพฯ
- สาโรจน์ ศิริตันสนียกุล. 2547. เทคโนโลยีชีวภาพทางอาหาร การหมักและสิ่งแวดล้อม. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 326 น.
- สุโขทัยธรรมมาริราช. มหาวิทยาลัย. 2543. โภชนศาสตร์และอาหารสัตว์. สาขาวิชาส่งเสริมการเกษตรและสหกรณ์ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมมาริราช กรุงเทพฯ.
- เอกชัย ชูเกียรติโรจน์. 2536. การผลิตกรดแลคติกโดยแบคทีเรียแลคติกที่ย่อยแบ่งได้. ปัญหาพิเศษ วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- Allgaier, H., G. Jung, G.G. Werner, U. Schneider and H. Zahner. 1986. Epidermin: sequencing of a heterodetetracyclic 21-peptide amide antibiotic. **Eur. J. Biochem.** 160: 474-484.
- Altena, K., A. Guder, C. Cramer and G. bierbaum. 2000. Biosynthesis of the lantibiotic mersacidin: organization of a typy B lantibiotic gene cluster. **Appl. Environ. Microbiol.** 66: 2565-2571.
- Ander, R.F. 1970. Formation of hydrogenperoxide by group N *Streptococcus* and its effect on their growth and metabolism. **Appl. Microbiol.** 19: 602-616.
- Arici, M., B. Bilgin, O. Sagdic and C. Ozdemic. 2004. Some characteristics of *Lactobacillus* isolates from infant faeces. **Food Microbiol.** 21: 19-24.
- Aymerich. T., H. Holo, L.S. Havarstein, M. Hugas, M. Garriga and I.F. Nes. 1996. Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. **Appl. Environ. Microbiol.** 62: 1676-1682.
- Banks, J.G., R.G. Broad and N.H.C. Sparks. 1986. Natural antimicrobial system and their potential in food preservation of the future. **Biotech. Appl. Biochem.** 8: 103-147.
- Bik, E.M., P.B. Eckburg, S.R. Gill, K.E. Nelson, E.A. Purdom, F. Francois, G. Perez-Perez, M.J. Blaser and D.A. Relman. 2006. Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 103: 732-737.
- Booth, S.J., J.L. Johnson and T.D. Wilkins. 1977. Bacteriocin production by strains of bacteroides isolated from human feces and the role of these strains in the bacterial ecology of the colon. **Antimicrob. Agents Chemother.** Apr. 718-724.

- Bourlioux, P., B. Koletzko, F. Guarner and V. Braesco. 2003. The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium "The Intelligent Intestine," held in Paris, June 14, 2002.. **Am. J. Clin. Nutr.** 78: 675-683.
- Brock, T.D., B. Peacher and D. Pierson. 1963. Survey of the bacteriocins of enterococci. **J. Bacteriol.** 86 (4):702-707.
- Caplice E. and G.F. Fitzgerald. 1999. Food fermentation : role of microorganisms in food production and preservation. **Int. J. Food Microbiol.** 50: 131-149.
- Cataloluk, O. and C.G. Gurakan. 2003. Characterization of salivaricin B, a protein expressed by *Lactobacillus salivarius* M7. **Turk. J. Biol.** 27: 131-136.
- Chen, H. and D.G. Hoover. 2003. Bacteriocins and their foods applications. **Comprehensive reviews in food science and food** .[Online]. 2:82-100 (July). Available <http://www.ift.org/publications/crfsfs> (20 May 2006).
- Clarke, D. J., R.M. Robson, and J.G. Morris. 1975. Purification of two *Clostridium* bacteriocins by procedures appropriate to hydrophobic proteins. **Antimicrob. Agents Chemother.** 7: 256-264.
- Cleveland, J., T.J. Montville, I.F. Nes and M.L. Chikindas. 2001. Bacteriocins: Safe, natural antimicrobials food preservation. **Int. J. Food Microbiol.** 71: 1-20.
- Dajani, A.S., and L.W. Wannamak. 1969. Demonstration of a bactericidal substance against beta-hemolytic streptococci in supernatant fluids of staphylococcal cultures. **J. Bacteriol.** 97: 985-991.
- Dajani, A.S., and Z. Taube. 1974. Plasmidmediated production of staphylococcin in bacteriophage type 71 *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 5: 594-598.
- Davison, P.M. 1990. **Antimicrobial agents** , p. 83-117. In Branen, A.L., Davison, P.M. and S. Saminen (eds.). Antimicrobials in foods.
- Delvels-Broughton, J.D., G.C. Wilkinson and S. Wilkinson. 1992. The use of the bacteriocin, nisin, as a preservation in pasteurized liquid whole egg. **Lett. Appl. Microbiol.** 15: 133-136.
- Dethlefsen, L., P.B. Eckburg, E.M. Bik and D.A. Relman. 2006. Assembly of the human intestinal microbiota. **Trends Ecol. Evol.** 21: 517-523.

- De Vuyst, L., R. Callewaert and K. Crabbe. 1996. Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavorable growth condition. **Microbiol.** 142: 817-827.
- Diep, D.B., L.S. Havarstein and I.F. Nes. 1996. Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11. **J. Bacteriol.** 178: 4472-4483.
- Enan, G., A.A. Essawy, M. Uyttendaele and J. Debevere. 1996. Antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* UG1 isolated from dry sausage : characterization, production and bactericidal action of plantaricin UG1. **Int. J. Microbiol.** 30(3) :189-215.
- Fanaro, S., R. Chierici, P. Guerrini and V. Vigi. 2003. Intestinal microflora in early infancy: composition and development. **Acta Paediatr. Suppl.** 91: 48-55.
- FAO/WHO, 2001. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with lactic acid bacteria (LAB). October. 2001.
- Fredericq, P. 1946. Sur la sensibilité et l'activité antibiotique des Staphylocoques. **C. R. Seances Soc. Biol. Paris.** 140:1167-1170.
- Fuller, R. 1989. Probiotic in man and animal. **J. Appl. Bacteriol.** 66: 365-378.
- _____. 1992. Beneficial interrelationships between certain microorganism and humans: candidate microorganisms for use as dietary adjuncts. **J. Food Prot.** 42:164.
- Gilliland, S.E. and M.C. Speck. 1977. Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and food-borne pathogens in association culture. **J. Food Prot.** 40: 820-823..
- Grooss, E. and J.L. Morell. 1971. The structure of nisin. **J. Am. Chem. Soc.** 93: 4634-4635.
- Guarner, F. 2006. Enteric flora in health and disease. **Digestion.** 73 (1): 5-12.
- Hardy, K.G. 1975. Colicinogeny and related phenomena. **Bacteriol. Rev.** 39:464-515.
- Hastings, J. W., M. Sailer, K. Johnson, K. L. Roy, J. C. Vederas and M. E. Stiles. 1991. Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. **J. Bacteriol.** 173: 7491-500.
- Hill, C. 1995. **Bacteriocin: natural antimicrobials from microorganisms** In : Gould G.W. Editor. New methods of food preservation. New York : Blackie academic and professional.
- Hoover, D.G. and L.R. Steenson. 1993. **Bacteriocin of lactic acid bacteria.** New York; Academic Press Inc. 63-86.

- James , B.L. and M.C. Baker. 2003. Introduction to Veterinary Science. Thomson Learning : Canada.
- James , R.G. 2000. Modern Livestock and Poultry Production. 6th ed. Thomson Learning : Canada. Mello, J. P. F. 2000. Farm Animal Metabolism and Nutrition. Biotechnology Department The Scottish Agricultural College Edinburgh , UK.
- Jay, J.M. 1982. Antimicrobial properties of diacetyl. **Appl. Environ. Microbiol.** 44: 525-532.
- Jennes, W., L.M.T. Dicks and D.J. Verwoerd. 2000. Enterocin O12, a bacteriocin produced by *Enterococcus gallinarum* isolated from the intestinal tract of ostrich. **J. Appl. Microbiol.** 88: 349-357.
- Joerger, M.C. and T.R. Klaenhammer. 1986. Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. **J. Bacteriol.** 167: 439-46.
- Kamau, D.N., S. Doores and K.M. Pruitt. 1990. Enhanced thermal destruction of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* by lactoperoxidase system. **Appt. Environ. Microbiol.** 5: 2711-2716.
- Kang, D.H. and D.Y.C. Fung. 1999. Effect of diacetyl on controlling *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* in the presence of starter culture in a laboratory medium and during meat fermentation. **J. food Prot.** 62(9): 975-979.
- Kim, W.J. 1993. Bacteriocins of lactic acid bacteria : their potentials as food biopreservative. **Food Rev.** 9 (2): 299-313.
- Kim, M.H., Y.J. Kong, H. Baek and H.H. Hyun. 2006. Optimization of culture conditions and medium composition for the production of micrococcin GO5 by *Micrococcus* sp. GO5. **J. Biotechnol.** 121: 54-61.
- King, A.D.J. and C.W. Nagel. 1975. Influence of carbon dioxide upon the metabolism of *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Food Sci.** 40: 362-366.
- Klaenhammer, T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiol. Rev.** 12: 39-85.
- _____ 1988 . Bacteriocins of lactic acid bacteria. **J. Biochem.** 70: 337-349.
- Klein, C., Kaletta, C., Schnell, N. and Entian, K.D., 1992. Analysis of genes involved in biosynthesis of the lantibiotic subtilin. **Appl. Environ. Microbiol.** 60: 2793-2801.

- Krylova, M.D. 1969. A study of bacteriocines of mitis type diphtheria bacilli. Zh. **J. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol.** 46(3): 11-15.
- Lachowicz, T. 1965. Investigations on staphylococcins. **Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1 Orig. Reihe A.** 196: 340-351.
- Larsen, A.G. and B. Norrung. 1993. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bavaricin A, a bactericin produced by *Lactobacillus bavaricus* M1041. *Lett. Appl. Microbiol.* 17:132-134.
- Leer, R.J., van J.M. der Vossen, M. van Giezen, J.M. van Noort, and P.H. Pouwels. 1995. Genetic analysis of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. **J. Microbiol.** 141: 1629-1635.
- Li, C., J. Bai, Z. Cai and F. Ouyang. 2002. Optimization of a cultural medium for bacteriocin production by *Lactococcus lactis* using response surface methodology. **J. Biotechnology.** 93: 27-34.
- Lilly, D.M. and R.H. Stillwell. 1965. Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms. **Science.** 147: 744-748.
- Lindgren, S.E. and W.J. Dobrogosz. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. **FEMS Microbiol.** 19: 602-616.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193: 265-275.
- Mao, Y., P.M. Muriana and M.A. Cousin. 2001. Purification and transpositional inactivation of Lacticin FS92, broad-spectrum bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* FS92. **Food Microbiol.** 18(2):169-175.
- Matsusaki, H., N. Endo, N. Sonomoto and A. Ishizaki. 1996. Lantibiotic nisin Z fermentative production by *Lactococcus lactis* 10-1: relationship between production of the lantibiotic and lactate and cell growth. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 45: 36-40.
- Metchikoff, E. 1907. **The prolongation of life.** In *optimistic studies* (Heinemann W., Ed.) pp. 1-100. G. P. Putnam and Sons, London, UK.
- Montville, T.J. and T. Winkowski. 1997. **Biologically based preservation systems and probiotic bacteria.** In: Doyle, M. P., L.R. Beuchat and T. J. Montville. (Eds.) *Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers.* ASM Press, USA, pp. 557-576.

- Mortved, C.I., J. Nissen-Meyer, K. Sletten and I.F. Nes. 1991. Purification and amino acid sequence of lactocin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* L45. **Appl. Environ. Microbiol.** 57: 1829-1834.
- Niamsup, P., N. Sujaya, M. Tanaka, T. Sone, S. Hanada, Y. Kamagata, S. Lumyong, A. Assavaning, K. Asano, F. Tomita and A. Yokota. 2003. *Lactobacillus thermotolerans* sp.nov., anovel thermotolerant species isolated from chicken faeces. **Int. J. Systematic Evol. Microbiol.** 53: 2256- 2263.
- Nes, I.F., D.B. Diep, L.S. Havarstein, M.B. Brurberg, V. Eijsink and H.Holo. 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek** 70: 113-128.
- Nettles, C.G. and S.F. Barefoot. 1993. Biochem and genet characteristics of bacteriocins of food associated lactic acid bacteria. **J. Food Prot.** 56 (4): 338-356.
- Noonpakdee, W., C. Santivarangkna, P. Jumriangrit, K. Sonomoto and S. Panyim. 2003. Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC 20 strain from nham, a traditional thai fermented sausage. **Int. J. Food Microbiol.** 81 (2) :137-145.
- Nousianean, R.J. and A.T. Setala. 1992. Lactic acid bacteria as animal probiotics, in lactic acid bacteria in health and disease: volume1. **London. E. Appl. Sci.** 25: 260-268.
- Ocana, V.S., A.A. Pesce de Ruiz Holgado and M.E. Nader-macias. 1999. Selection of vaginal H₂O₂ generating *Lactobacillus* species for probiotic use. **Curr. Microbiol.** 38: 279-284.
- Oh, S., S.H. Kim and R.W. Worobo. 2000. Characterization and purification of a bacteriocin produced by a potential probiotic culture, *Lactobacillus acidophilus* 30SC . **J. Dairy Sci.** 83 : 2747-2752.
- Osmanagaoglu, O., U. Gonduz, Y. Beyati and U. Gunduz. 1998. Purification and characterization of pediocin F, a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* F. **Tr. J. Biol.** 22: 217-228.
- Ouwehand, A.C. 1998. **Antimicrobial components from lactic acid bacteria**, pp. 139-159. In S. Salminen and A. von Wright (eds.). Lactic acid bacteria. 2nd ed., Mercel Dekker Inc., New York.
- Parente, E., A. Ricciandi and G. Addario. 1994. Influence of pH on growth and bacteriocin production by *lactococcus lactis* subsp.*lactis* 140 VWC during batch fermentation. **Appl.Microbiol.** 14(4):388-394.

- Parente, E. and A. Ricciandi. 1999. Production, recovery and purification of bacteriocin from lactic acid bacteria. **App. Microbiol. Biotechnol.** 52:628-638.
- Parker, R.B. 1974. Probiotics, The other half of the antibiotic story. **Anim. Nutr. Health.** 29:4-8.
- Pilasombut, K., T. Sakpuarum, W. Wajiwalku, S. Nitisinprasert, A. Swetwiwathana, T. Zendo, K. Fujita, J. Nakayama and K. Sonomoto. 2006. Purification and amino acid sequence of a bacteriocins produced by *Lactobacillus salivarius* K7 isolate from chicken intestine. **Songklanakarin J. Sci. Technol.** 28: 121-131.
- Robredo, B. and C. Torres. 2000. Bacteriocin production by *Lactobacillus salivarius* of animal origin . **J. Clin. Microbiology.** 38(10): 3908-3909.
- Rogers, A.H. 1972. Effect of the medium on bacteriocin production among strains of *Streptococcus mutans*. **Appl. Microbiol.** 24: 294-295.
- Roos, S., L Engstrand and H. Jonsson. 2005. *Lactobacillus gastricus* sp. nov., *Lactobacillus antri* sp. nov., *Lactobacillus kalixensis* sp. nov. and *Lactobacillus ultunensis* sp. nov., isolated from human stomach mucosa. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 55: 77-82.
- Rubin, H.E. 1978. Toxicology model for a two-acid system. **Appl. Environ. Microbiol.** 36: 623-624.
- Sablon, E., B. Contreras and E. Vandamme. 2000. Antimicrobial peptides of lactic acid bacteria : mode of action, geneties and biosynthesis. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.** 68: 21-60.
- Schillinger, U. and F. Lucke. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. **Appl. Environ. Microbiol.** 55: 1901-1906.
- Schlegel, R., and H.D. Slade. 1973. Properties of a *Streptococcus sanguis* (Group H) bacteriocin and its separation from the competence factor of transformation. **J. Bacteriol.** 155: 655-661.
- Schrezenmeir, J. and M. De Vrese, 2001. Probiotic, prebiotics and synbiotics- approaching a definition. **Am. J. Clin. Nutr.** 73: 361-364.
- Sneath, P.H.A., N.S. Mair, M.E. Share and J.G. Holt. 1986. **Berger's manual of systematic bacteriology**. Volume 2 . Williams and Wilkins, Baltimore.
- Stern, N.J., E.A. Svetoch, B.V. Eruslanob, V.V. Perelygin, E.V. Mitsevich, I.P. Mitsevich, V.D. Pokhilenko, V.p. Levchuk, O.E. Svetoch and B.S. Seal. 2006. Isolation of a *Lactobacillus salivarius* strain and purification of its bacteriocin, which is inhibitory to *Campylobacter jejuni* in the chicken gastrotestinal. **Antimicrob. Agents Chemother.** 50(9): 3111-3116.

- Strompfova, V. and A. Laukova. 2007. *In Vitro* study on bacteriocin production of enterococci associated with chickens. Doi:10.1016/J.
- Tannock, G.W. 1995. Sticky microbes: the association of microbes with host surfaces. In *Normal Microflora*. Chapman and Hall. London. 49-62. pp.
- Todorov, S.D., C.A. Reenen and L.M.T. Dicks. 2004. Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST13BR, a strain isolated from barley beer. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 50: 149-157.
- Todorov, S.D. and L.M.T. Dicks. 2006. Effect of medium componemts on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* strains ST23LD and ST341LD, isolated from spoiled olive brine. **Microbiol. Res.** 161: 102-108.
- _____. 2004. Effect of medium componemts on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* strains ST15BR, astrain isolated from beer produced by the fermentation of maize, barley and soy flour. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 20:643-650.
- Tubylewicz, H. 1963. Studies on the bacteriocinogeny of *Listeria monocytogenes* Strains. **Bull. Acad. Pol. Sci. (Biol.)** 11: 519-521.
- Verellen, T.L.J., G. Bruggeman, C.A. Van Reenen, L.M.T. Dicks and E.J. Vandamme. 1998. Fermentation optimization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* 423. **J. Ferm. Bioeng.** 86: 174-179.
- Wood, B.J.B. and W.H. Holzapfel. 1995. **The general of lactic acid bacteria**. United Kinndom: St Edmundsbury Press. 398p.
- Zoetendal, E.G., A. von Wright, T. Vilpponen-Salmela, K. Ben-Amor, A.D.L. Akkermans and W.M. de Vos. 2002. Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. **Appl. Environ. Microbiol.** 3401-3407.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเหลวสูตร De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) อาหารสำเร็จรูปของบริษัท Criterion ส่วนประกอบมีดังนี้

Meat peptone	10.0	กรัม
Beef extract	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Glucose	20.0	กรัม
Tween 80	1.0	กรัม
Sodium acetate	5.0	กรัม
Dipotassium phosphate	2.0	กรัม
Ammonium citrate	2.0	กรัม
Magnesium sulfate	0.01	กรัม
Manganese sulfate	0.05	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ซึ่งอาหาร De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) อาหารสำเร็จรูป จำนวน 55 กรัม ผสมและละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน จากนั้นนำไปใส่ในหลอดขนาด 16 x 50 มิลลิลิตร ปริมาตรหลอดละ 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว De Man, Rogosa and Sharpe สูตร (0.7% agar) อาหารสำเร็จรูปของบริษัท Criterion ส่วนประกอบมีดังนี้

Meat peptone	10.0	กรัม
Beef extract	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Glucose	20.0	กรัม
Tween 80	1.0	กรัม
Sodium acetate	5.0	กรัม

Dipotassium phosphate	2.0 กรัม
Ammonium citrate	2.0 กรัม
Magnesium sulfate	0.01 กรัม
Manganese sulfate	0.05 กรัม
ผงวุ้น	7.0 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

ซังอาหาร De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) อาหารสำเร็จรูป จำนวน 55 กรัม และเติมผงวุ้น จำนวน 7 กรัม ผสมและละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารแข็งสูตร De Man, Rogosa and Sharpe (1.5 % agar) อาหารสำเร็จรูปของบริษัท Criterion ส่วนประกอบมีดังนี้

Meat peptone	10.0 กรัม
Beef extract	10.0 กรัม
Yeast extract	5.0 กรัม
Glucose	20.0 กรัม
Tween 80	1.0 กรัม
Sodium acetate	5.0 กรัม
Dipotassium phosphate	2.0 กรัม
Ammonium citrate	2.0 กรัม
Magnesium sulfate	0.01 กรัม
Manganese sulfate	0.05 กรัม
ผงวุ้น	15.0 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

ซังอาหาร De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) อาหารสำเร็จรูป จำนวน 55 กรัม และเติมผงวุ้น จำนวน 15 กรัม ผสมและละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหารเหลวสูตร Brain Heart Infusion (BHI) อาหารสำเร็จรูปของบริษัท Scharlau, ส่วนประกอบมีดังนี้

Brain extract	12.5 กรัม
Heart extract	9.8 กรัม
Peptone	10.0 กรัม
Dextrose	2.0 กรัม
Sodium chloride	5.0 กรัม
Disodium phosphate	2.5 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

ซึ่งอาหาร Brain Heart Infusion อาหารสำเร็จรูป จำนวน 37.0 กรัม ผสมและละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน จากนั้นนำไปใส่ในหลอดขนาด 16 x 50 มิลลิลิตร ปริมาตรหลอดละ 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. อาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวสูตร Brain Heart Infusion (0.7 % agar) อาหารสำเร็จรูปของบริษัท Scharlau ส่วนประกอบมีดังนี้

Brain extract	12.5 กรัม
Heart extract	9.8 กรัม
Peptone	10.0 กรัม
Dextrose	2.0 กรัม
Sodium chloride	5.0 กรัม
Disodium phosphate	2.5 กรัม
ผงวุ้น	7.0 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

ซึ่งอาหาร Brain Heart Infusion อาหารสำเร็จรูป จำนวน 37.0 กรัม และเติมผงวุ้น จำนวน 7 กรัม ผสมและละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน แล้วนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6. อาหารแข็งสูตร Brain Heart Infusion (1.5 % agar) อาหารสำเร็จรูปของบริษัท Scharlau
ส่วนประกอบมีดังนี้

Brain extract	12.5 กรัม
Heart extract	9.8 กรัม
Peptone	10.0 กรัม
Dextrose	2.0 กรัม
Sodium chloride	5.0 กรัม
Disodium phosphate	2.5 กรัม
ผงวุ้น	15.0 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

ชั่งอาหาร Brain Heart Infusion อาหารสำเร็จรูป จำนวน 37.0 กรัม และเติมผงวุ้น จำนวน 15 กรัม ผสมและละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

สารเคมีที่ใช้สำหรับปรับพีเอช

1. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 5.0 นอร์มอล

ทำการชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ ($M_w = 40$ กรัมต่อลิตร) ของบริษัท Merck จำนวน 20 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นจนสารละลายหมด แล้วปรับด้วยปริมาตรให้ได้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา

2. สารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 5.0 นอร์มอล

ปิเปตสารละลายกรดไฮโดรคลอริกจาก stock ที่มีความเข้มข้น 37% (v/v) ปริมาตร 41.46 มิลลิลิตร มาละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร เก็บไว้ในขวดสีชา

สารเคมีที่ใช้ทดสอบกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซิน

1. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 3 % เจือจางด้วยน้ำ ในอัตราส่วน 1:16

ทำการปิเปตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 3 % ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจาง แบบ two-fold ตามลำดับ ในหลอด microcentrifuge จนได้อัตราส่วนเป็น 1:16 เก็บไว้ทดสอบกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินซึ่งใช้เป็น positive control

2. เอนไซม์ต่าง ๆ เช่น proteinase K และ protease

นำเอนไซม์แต่ละชนิด มาทำการละลายด้วยน้ำกลั่นที่ปราศเชื้อ ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บไว้ในหลอด microcentrifuge พร้อมใช้งาน

สารเคมีที่ใช้ในการจำแนกแบคทีเรียโดยวิธีการหาลำดับของ DNA ในส่วนของยีน 16S rDNA

1. เอทานอล ความเข้มข้น 70 % (v/v)

เตรียมเอทานอล ความเข้มข้น 70 % (v/v) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากเอทานอลเกรดวิเคราะห์ ความเข้มข้น 95 % (v/v) โดยทำการคำนวณจากสูตรดังนี้

$$\begin{aligned} C1V1 &= C2V2 \\ 70 \times 100 &= 95 \times V2 \\ V2 &= 73.68 \end{aligned}$$

ดังนั้นทำการปิเปตเอทานอล ความเข้มข้น 95 % (v/v) ปริมาตร เท่ากับ 7 มิลลิลิตร ละลายด้วย น้ำกลั่น ทำการปรับปริมาตรเท่ากับ 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร

2. สารละลาย TE buffer (พีเอช 8.5) ประกอบสารต่าง ๆ ดังนี้

Tris base	10 mM
EDTA	1 mM

ชั่งสาร Tris base จำนวน 0.12 กรัม และสาร EDTA จำนวน 0.0372 กรัม ละลายด้วย น้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ได้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร จากนั้นนำไปปรับพี-เอชให้ได้เท่ากับ 8.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก แล้วนำไปหนึ่งชั่วโมงที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. สารละลาย TAE buffer ความเข้มข้น 1X

เตรียมสารละลาย TAE buffer ความเข้มข้น 1X จาก TAE buffer ความเข้มข้น 50X ซึ่งมีวิธีเตรียมดังนี้

TAE buffer ความเข้มข้น 50X มีส่วนประกอบดังนี้

Tris base	242 กรัม
Glacial acetic acid	57.1 มิลลิลิตร
0.5M EDTA (พีเอช 8.0)	100 มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเตรียม TAE buffer ความเข้มข้น 1X ปริมาตร 500 มิลลิลิตร โดยคำนวณจากสูตรดังนี้

$$\begin{aligned} C1V1 &= C2V2 \\ 1 \times 500 &= 50 \times V2 \\ V2 &= 10 \end{aligned}$$

ดังนั้น ต้องปิเปต TAE buffer ความเข้มข้น 50X ปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาละลายด้วย น้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้เป็น 500 มิลลิลิตร

4. เตรียม 1.5 % (w/v) agarose gel

ทำการชั่งผงวุ้นอะกาโรส สำหรับทำ electrophoresis จำนวน 1.5 กรัม ละลายใน TAE buffer มีความเข้มข้นเท่ากับ 1X ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปหลอมให้ละลายด้วยเครื่อง Microwave

5. สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์

ทำการผสมสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์สำเร็จรูป ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ในน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry และ คณะ (1951) เตรียมสารเคมีดังนี้

1. สารละลาย A

ประกอบด้วย Na_2CO_3 ความเข้มข้น 2.0 % (w/v) ในสารละลาย NaOH ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยชั่ง NaOH จำนวน 0.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ได้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร จากนั้นชั่ง Na_2CO_3 จำนวน 2.0 กรัม ใส่ลงไปคนให้ละลายจนเข้ากันดี

2. สารละลาย B

ประกอบด้วย $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ความเข้มข้น 0.5 % (w/v) ละลายใน Na-K-tartrate ที่มีความเข้มข้น 1 % (w/v) โดยชั่ง Na-K-tartrate จำนวน 1.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ได้เท่ากับ 100.0 มิลลิลิตร จากนั้นชั่ง $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ จำนวน 0.5 กรัมใส่ลงไปคนให้ละลายจนเข้ากันดี

3. สารละลาย C

ประกอบด้วยสารละลาย A ปริมาตร 50.0 มิลลิลิตร และผสมกับสารละลาย B ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร

4. สารละลาย D

ประกอบด้วย Folin ciocateus phenol reagent ละลายในน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1: 1

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์มวลโมเลกุลโปรตีน

1. Sample buffer ประกอบด้วย

Deionized water	5.0 มิลลิลิตร
1.0 M Tris-HCl, pH 6.8	1.0 มิลลิลิตร
87 % Glycerol	2.4 มิลลิลิตร
10 % SDS	1.0 มิลลิลิตร
0.5 % Coomassie G-250	0.4 มิลลิลิตร
B-mercaptoethanol	0.2 มิลลิลิตร
Total	10.0 มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ปีเปตน้ำปราศจากอออน (Deionized water) ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร , 1.0 M Tris-HCl (pH เท่ากับ 6.8) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร, 87 % Glycerol ปริมาตร 2.4 มิลลิลิตร , 10 % SDS ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร, 0.5 % Coomassie G-250 ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ใส่ในบีกเกอร์ละลายให้เข้ากัน ก่อนนำไปใช้เติม B-mercaptoethanol 0.2 มิลลิลิตร

2. Running buffer (0.1M tris, 0.1M tricine, 0.1 % SDS) ประกอบด้วย

Tris base	6.055 กรัม
Tricine	8.960 กรัม
SDS	0.500 กรัม
Deionized water	500 มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ชั่งสาร Tris base จำนวน 6.055 กรัม และสาร Tricine จำนวน 8.960 กรัม ละลายในน้ำปราศจากอออน (Deionized water) ผสมให้เข้ากัน จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้เท่ากับ 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. Coomassie blue staining solution

Coomassie blue	0.1 % (w/v)
Methanol	40 % (v/v)
Acetic acid	10 % (v/v)
Deionized water	125 มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ตวง Methanol เกรดวิเคราะห์ ความเข้มข้น 40 % (v/v) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และตวง Acetic acid ความเข้มข้น 10 % (v/v) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมสาร Coomassie blue จำนวน 0.25 กรัม แล้วทำการปรับปริมาตรโดยละลายในน้ำปราศจากอออน (Deionized water) ให้ได้ปริมาตรเท่ากับ 250 มิลลิลิตร

4. Destaining solution

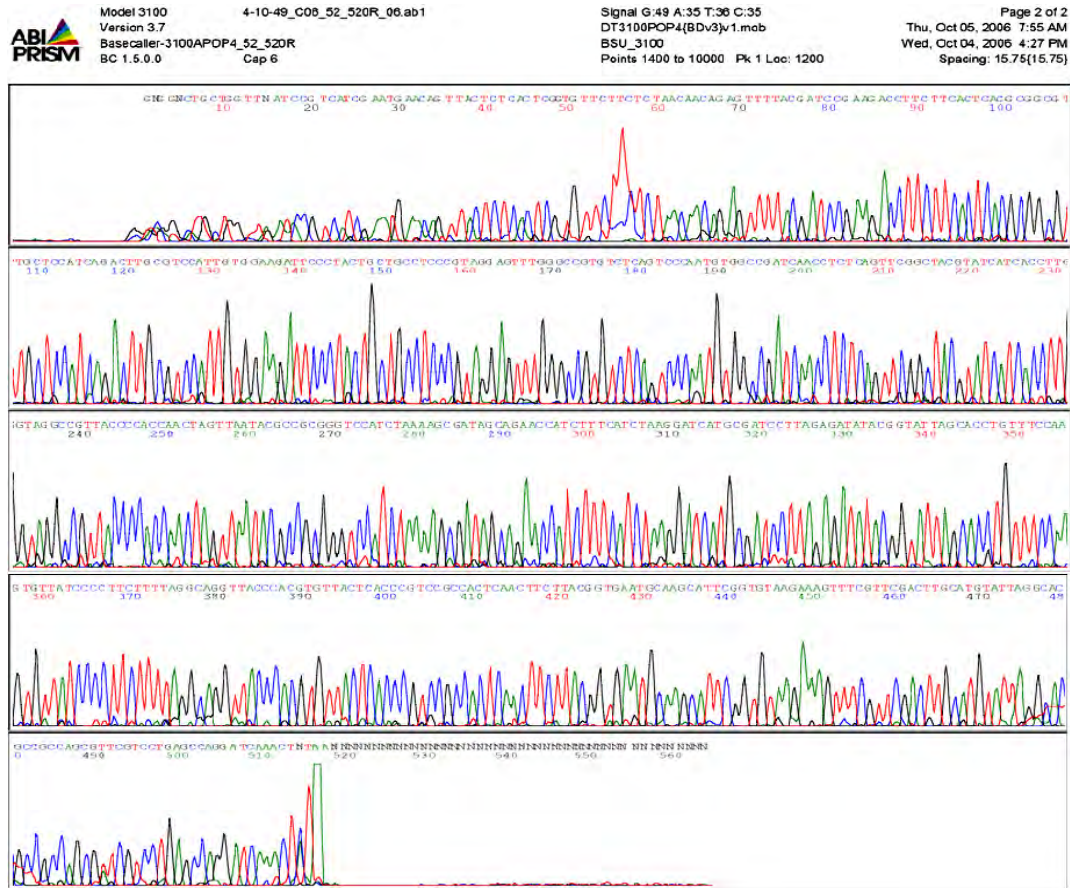
Methanol	40 % (v/v)
Acetic acid	10 % (v/v)
Deionized water	250 มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ตวง Methanol เกรดวิเคราะห์ ความเข้มข้น 40 % (v/v) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร และตวง Acetic acid ความเข้มข้น 10 % (v/v) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วทำการปรับปริมาตร โดยละลายในน้ำปราศจากไอออน (Deionized water) ให้ได้ปริมาตรเท่ากับ 500 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค

ลำดับเบสของ DNA ในส่วนของยีน 16S rRNA



5'ACTGGCGGCGTGCCTATCATGCAAGTCGAACGAACTTTCTTACACCGAATGCTTGCATTCA
CCGTAAGAAGTTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTAAAAGAAGGG
GATAACACTTGAAACAGGTGCTAATACCGTATATCTCTAAGGATCGCATGATCCTTAGATGA
AAGATGGTTCTGCTATCGCTTTTAGATGGACCCGCGGCGTATTAAGTAGTTGGTGGGGTAAC
GGCCTACCAAGGTGATGATACGTAGCCGAAGTGAAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGA
GACACGGCCCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTC
TGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTCTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGA
AGAACACGAGTGAGAGTAACTGTTTCATTTCGATGACGGTATCTAACCAGCANGTCACGGCTAA
CTACGTGCCAGCCGCGCGGTA3'

ภาพภาคผนวก 1 ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลท CF52 ที่ได้จาก primer 27F



5'GGNCTGCTGGTTNATCCGTCATCGAATGAACAGTTACTCTCACTCGGTGTTCTTCTCTAACA
 ACAGAGTTTTACGATCCGAAGACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCCATCAGACTTGCGTCC
 CATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAAT
 GTGGCCGATCAACCTCTCAGTTCGGCTACGTATCATCACCTTGGTAGGCCGTTACCCACCA
 ACTAGTTAATACGCCGCGGGTCCATCTAAAAGCGATAGCAGAACCATCTTTCATCTAAGGATC
 ATGCGATCCTTAGAGATATACGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCCTTCTTTAGGC
 AGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCGCCACTCAACTTCTTACGGTGAATGCAAGCATTG
 GTGTAAGAAAGTTTCGTTCTGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGNTCGTCCTG
 AGCCAGGATCAAACCT3'

ภาพภาคผนวก 2 ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลท CF52 ที่ได้จาก primer 520R

ภาคผนวก ง

กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีน

การทำกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีน

การเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

เตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA (bovine serum albumin) ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่ง BSA 0.002 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจนเข้ากันดี ปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร นำมาเตรียมเป็นสารละลายโปรตีนมาตรฐานความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ดังตารางภาคผนวก 1) จากนั้นเติมสารละลาย C ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที แล้วเติมสารละลาย D ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectronic โดยเทียบกับ blank (ดังตารางภาคผนวก 2) สร้างกราฟมาตรฐานเพื่อใช้หาปริมาณโปรตีน โดยการสร้างกราฟระหว่างค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (ภาพภาคผนวก 3)

การเตรียมปริมาณโปรตีนจากสารละลายแบคทีเรียโอซิน

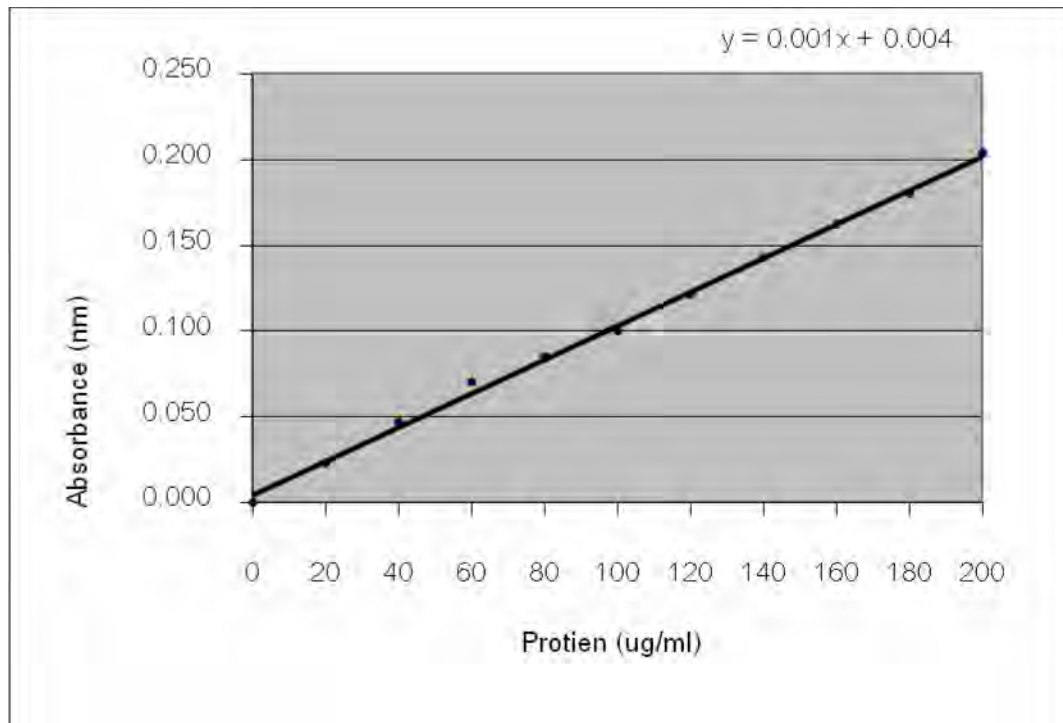
ทำโดยนำสารละลายแบคทีเรียโอซิน 0.05 มิลลิลิตร มาละลายในน้ำกลั่น ให้ได้มีปริมาตรเท่ากับ 1.0 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายจากนั้นเติมสารละลาย C และ D เช่นเดียวกับการเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐานข้างต้น วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร แล้วทำการหาความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลาย แบคทีเรียโอซินโดยอ่านค่าจากกราฟมาตรฐาน

ตารางภาคผนวก 1 แสดงปริมาณของสารละลายต่าง ๆ ที่ใช้สำหรับหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry

หลอดทดลอง	สารละลาย BSA มาตรฐาน (ml)	สารละลาย แบคทีริโอซิน (ml)	น้ำกลั่น ที่เติม (ml)	ความเข้มข้นของโปรตีน (ug/ml)
Blank	-	-	1	0
1	0.1	-	0.9	20
2	0.2	-	0.8	40
3	0.3	-	0.7	60
4	0.4	-	0.6	80
5	0.5	-	0.5	100
6	0.6	-	0.4	120
7	0.7	-	0.3	140
8	0.8	-	0.2	160
9	0.9	-	0.1	180
10	1	-	0	200
bacteriocin	-	0.5	0.95	-

ตารางภาคผนวก 2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรของสารละลายโปรตีน
มาตรฐาน

ความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร
0	0.000
20	0.023
40	0.046
60	0.070
80	0.085
100	0.100
120	0.121
140	0.143
160	0.162
180	0.180
200	0.203



ภาพภาคผนวก 3 แสดงกราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry

ภาคผนวก จ
มวลโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน
(Polypeptide SDS-PAGE standards)

ตารางภาคผนวก 3 มวลโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน (Polypeptide SDS-PAGE standards)

Poly peptide	Molecular weigh (Daltons)
Triosephosphate isomerase	26,625
Myoylobin	16,950
α -lactabumin	14,437
Aprotinin	6,512
Insulin b chain, Oxidized	3,496
Bacitracin5	1,423

ภาคผนวก จ
บทความสำหรับการเผยแพร่ทางวิชาการ

1. **Boonkumklao, P.**, Ketkaew, W., Yokota, A. and Assavanig, A. Bacteriocin production from lactic acid bacteria in the gastrointestinal tract. Poster presentation at the 3rd Asian Conference on Lactic Acid Bacteria. Sanur, Bali, Indonesia. 25-27 August, 2005.
2. วันดี เกตุแก้ว และปิยะนุช เนียมทรัพย์. 2550. การผลิตสารแบคทีริโอซินจาก *Lactobacillus salivarius* CF52 ที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหาร. รายงานการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 5 มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 29-30 พฤษภาคม 2550. ณ ศูนย์การศึกษาและฝึกอบรมนานาชาติ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่. หน้า 355-361.

Asian Conference on Lactic Acid Bacteria. Sanur, Bali, Indonesia. 25-27 August, 2005.

Bacteriocin production from lactic acid bacteria in the gastrointestinal tract

**Piyanuch Boonkumklao¹, Wandee Ketkaew¹, Atsushi Yokota² and
Apinya Assavanig³**

¹Department of Biology, Faculty of Science, Maejo University, Sansai, Chiang Mai 50290,
Thailand

²Laboratory of Microbial Resources and Ecology, Graduate School of Agriculture,
Hokkaido University, Sapporo 060-8589, Japan

³Department of Biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Rd.,
Bangkok 10400, Thailand

Bacteriocins produced by lactic acid bacteria (LAB) have been the subject of considerable researches and industrial interest due to their potential as food biopreservatives. There has been very little research on the occurrence of bacteriocin production among LAB in the gastrointestinal (GI) tract. The microbial populations of the GI tract include a very dense bacterial population. The extent of bacterial diversity in the GI tract is still not completely defined, but estimates of diversity have increased dramatically over the last decades. The objective of this study was to detect bacteriocin production in LAB isolated from human and animal GI tract in order to determine their inhibitory spectrum to other LAB and pathogens.

At present, one hundred and seventy isolates of LAB, obtained from human and animal GI tract, have been examined for their ability to produce bacteriocins. Three isolates showed antagonism against at least one of the indicator strains, by the well diffusion assay. These strains were identified by 16S rDNA sequencing as *Enterococcus faecium* (from human), *Weissella confusa* and *Lactobacillus salivarius* (from duck). Of these isolates, only one designated *Enterococcus faecium* HF84 from human feces stably secreted inhibitory substance into culture broth. It produces an inhibitory compound, which reach its maximum activity at the beginning of the stationary phase of growth. This bacteriocin has a proteinaceous nature, is stable over a broad range of pH, and shows a bactericidal action against *Enterococcus durans* JCM 8725.



Bacteriocin production from lactic acid bacteria in the gastrointestinal tract

Piyanuch Boonkunklao¹, Wandee Ketkaew¹, Atsushi Yokota² and Apinya Assavanig³

¹Department of Biology, Faculty of Science, Maejo University, Sansai, Chiang Mai 50290, Thailand

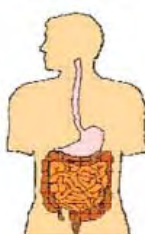
²Laboratory of Microbial Resources and Ecology, Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060-8589, Japan

³Department of Biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Rd., Bangkok 10400, Thailand



[Abstract] Bacteriocins produced by lactic acid bacteria (LAB) have been the subject of considerable researches and industrial interest due to their potential as food biopreservatives. There has been very little research on the occurrence of bacteriocin production among LAB in the gastrointestinal (GI) tract. The microbial populations of the GI tract include a very dense bacterial population. The extent of bacterial diversity in the GI tract is still not completely defined, but estimates of diversity have increased dramatically over the last decades. The objective of this study was to detect bacteriocin production in LAB isolated from human and animal GI tract in order to determine their inhibitory spectrum to other LAB and pathogens. At present, one hundred and seventy isolates of LAB, obtained from human and animal GI tract, have been examined for their ability to produce bacteriocins. Three isolates showed antagonism against at least one of the indicator strains, by the well diffusion assay. These strains were identified by 16S rDNA sequencing as *Enterococcus faecium* (from human), *Weissella confusa* and *Lactobacillus salivarius* (from duck). Of these isolates, only one designated *Enterococcus faecium* HF84 from human feces stably secreted inhibitory substance into culture broth. This strain produces an inhibitory compound, which reaches its maximum activity at the last log phase of growth and shows a bacteriocidal action against *E. durans* JCM 8725. This bacteriocin has a proteinaceous nature, is stable over a broad range of pH, and resistant to the temperature at 65°C but not at 95°C and 121°C.

Background



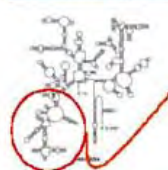
Intestinal LAB

- closely associated with the host's health
- is an importance biodefense factor in preventing colonization of pathogenic bacteria
- LAB produce a number of antimicrobial substances, including bacteriocins

Bacteriocins producing LAB

- produce peptides or proteins, which exhibit inhibitory activity against sensitive bacteria
- potential candidate for probiotic strain?

16S rDNA sequencing of the isolates



Primers for PCR amplification

M27F
5'-TGTAACACGGCCAGTAGAC
TTTGATCCTGGCTCAG-3'
S20R
5'-ACCGCGGCGCTGGC-3'



V1-V3 region

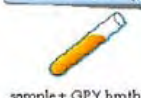
Table 2. Three bacteriocin producing LAB identified by 16S rDNA sequencing.

Bacteriocin producing isolates	source	Indicator strain
<i>Enterococcus faecium</i> HF84	Human feces	<i>E. durans</i> JCM 8725
<i>Weissella confusa</i> DF112	Duck feces	<i>L. acidus</i> JCM 1134
<i>Lactobacillus salivarius</i> DF114	Duck feces	<i>L. fermentum</i> JCM 1173

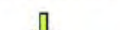
Objectives

To detect bacteriocin production in LAB isolated from human and animals gastrointestinal tract in order to determine their spectrum of action, including pathogens.

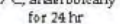
Isolation of LAB



sample + GPY broth



Incubate at 37°C, anaerobically for 24 hr



Spread on GPY agar + 5% CaCO₃ and BCP

anaerobically at the same temperature



Colony with clear zone

Streak to isolate pure colony

Source of samples

Fecal samples and/or intestinal content collected from:
• Human
• Animals e.g. chicken, duck, pig and cow

170 isolates

Bacteriocin assay



LAB in MRS broth

Incubate at 37°C, anaerobically for 16 h



Supernatant pH 6.5

Well diffusion assay

Table 3. Effect of various treatments on bacteriocin from *E. faecium* HF84

Treatment	Result
Proteinase K	-
Protease	-
Catalase	+
pH 3.0	+
pH 5.0	+
pH 7.0	+
pH 9.0	+
pH 10.0	+
Heat treatment at 65°C for 40 min	+
Heat treatment at 95°C for 20 min	-
Heat treatment at 121°C for 20 min	-
Control	+

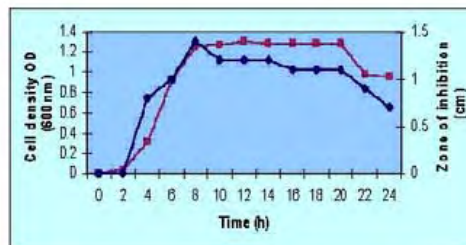


Fig. 1. Growth (■) and bacteriocin production (◆) of *E. faecium* HF84 in MRS broth with uncontrolled pH condition at 37°C.

Conclusion

- 170 LAB were isolated from human and animals GI tract which three isolates showed antagonism against at least one indicator strain.
- *Enterococcus faecium* HF84 from human feces stably secreted bacteriocin, which reaches its maximum activity at the last log phase of growth.
- This bacteriocin has a proteinaceous nature, is stable over a broad range of pH, and resistant to the temperature at 65°C but not at 95°C and 121°C.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from the Thailand Research Fund (TRF)

Indicator strains	Gram	Indicator strains	Gram
<i>Lactobacillus acidus</i> JCM 1134	+	<i>Bacillus subtilis</i> TISTR 008	+
<i>Lb. fermentum</i> JCM 1173	+	<i>Listeria monocytogenes</i> DMST 4553	+
<i>Lb. agilis</i> JCM 1187	+	<i>L. monocytogenes</i> DMST 1327	+
<i>Lb. pentosus</i> JCM 1558	+	<i>L. murrayi</i> DMST 4564	+
<i>Lb. thermotolerans</i> JCM 11425	+	<i>Staphylococcus aureus</i> TISTR 517	+
<i>Enterococcus durans</i> JCM 8725	+	<i>Micrococcus luteus</i> MJU	+
<i>E. avium</i> JCM 8722	+	<i>Escherichia coli</i> TISTR 887	-
<i>E. gallinarum</i> JCM 8728	+	<i>Salmonella typhimurium</i> TISTR 292	-
<i>E. faecium</i> HF 92	+	<i>Serratia marcescens</i> MJU	-
<i>Pediococcus pentosaceus</i> PI 78	+	<i>Enterobacter aerogenes</i> MJU	-
<i>Bacillus cereus</i> MJU	+	<i>Proteus vulgaris</i> MJU	-

การผลิตสารแบคทีริโอซินจาก *Lactobacillus salivarius* CF52
ที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหาร

Production of Bacteriocin by *Lactobacillus salivarius* CF52
Isolated from Gastrointestinal Tract

วันดี เกตุแก้ว และปิยะนุช เนียมทรัพย์

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

E-mail: piyanuch@mju.ac.th

บทคัดย่อ

จากแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 26,765 โคโลนีที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์ เมื่อนำมาทดสอบการผลิตสารแบคทีริโอซินพบว่ามีเพียงไอโซเลตเดียว คือ *Lactobacillus salivarius* CF52 ที่สามารถผลิตสารแบคทีริโอซินที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติกในกลุ่มใกล้เคียงและแบคทีเรียที่ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารบางชนิดได้ นอกจากนี้แบคทีริโอซินที่ได้อีกยังมีความเสถียรต่อความร้อน มีกิจกรรมการยับยั้งในช่วง pH ที่กว้างและทำให้เสียสภาพกิจกรรมการยับยั้งด้วยเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน เมื่อนำมาศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารแบคทีริโอซิน พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร MRS สูตรดัดแปลง ซึ่งประกอบด้วย 2.5% Maltose, 0.5% Peptone, 1.0% Beef extract, 0.1-0.2% K_2HPO_4 , 1.0% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5% Na-acetate, 0.2% $(NH_4)_2$ citrate, 0.004% $MnSO_4 \cdot H_2O$ และ 0.1% Tween 80 ที่มี pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.5-7.0 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C

คำสำคัญ: แบคทีเรียกรดแลคติก แบคทีริโอซิน ระบบทางเดินอาหาร

Abstract

A total 26,765 lactic acid bacteria (LAB) were isolated from human and animal gastrointestinal tract and screened for bacteriocin production. One *Lactobacillus salivarius* strain CF52 produced a bacteriocin that not only inhibited closely related LAB, but also some food-borne pathogens. Biochemical studies revealed that the bacteriocin was heat-stable and was active over a wide pH range. The bacteriocin was inactivated by proteolytic enzyme. Optimization of culture condition and medium composition for the production when grown modified MRS medium containing 2.5% Maltose, 0.5% Peptone, 1.0% Beef extract, 0.1-0.2% K_2HPO_4 , 1.0% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5% Na-acetate, 0.2% $(NH_4)_2$ citrate, 0.004% $MnSO_4 \cdot H_2O$ and 0.1% Tween 80. The optimal initial pH and temperature for bacteriocin production were 6.5-7.0 and 37 °C respectively.

Key word: lactic acid bacteria, bacteriocin, gastrointestinal tract

คำนำ

แบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria) ในระบบทางเดินอาหารมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสุขภาพของคนและสัตว์ เพราะสามารถช่วยป้องกันการแข่งขันและการแพร่กระจายของแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติเป็นโปรโอโอดิก (Oh *et al.*, 2000) แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถผลิตสารต้านทานจุลชีพได้หลายชนิดรวมทั้งแบคเทอริโอซิน (bacteriocin) ซึ่งเป็นสารประกอบประเภทโปรตีนสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นที่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน หรือกลุ่มใกล้เคียงได้ (Gilliland and Speck, 1997) นักวิจัยส่วนใหญ่ศึกษาการสร้างแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากอาหารและผลิตภัณฑ์นม เพื่อมุ่งเน้นในการนำไปประยุกต์ใช้ในการถนอมอาหาร งานวิจัยนี้จึงได้มุ่งเน้นศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกจากแหล่งใหม่ๆ เช่น ระบบทางเดินอาหาร เพื่อที่สามารถนำไปพัฒนาใช้เป็นโปรโอโอดิกในอาหารคนและสัตว์ ซึ่งช่วยส่งเสริมสุขภาพและช่วยลดปัญหาการเกิดโรคติดเชื้อในคนและสัตว์ได้ นอกจากนี้ยังเป็นประโยชน์ต่อกลุ่มเกษตรกรในการเพิ่มคุณภาพมาตรฐานของสัตว์เศรษฐกิจได้

อุปกรณ์และวิธีการ

ทำการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจากระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์ที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้โดยวิธี direct plating บนอาหารแข็งสูตร MRS ตามวิธีของ Noonpakdee *et al.*, (2003) โดยใช้เชื้อทดสอบ 4 ชนิดคือ *Lactobacillus fermentum* JCM 1173, *Lactobacillus casei* JCM 1134, *Enterococcus durans* JCM 8725 และ *Pediococcus pentosaceus* MJU 78 ทำการคัดเลือกเฉพาะโคโลนีที่เกิดวงใสต่อเชื้อทดสอบมาทำให้บริสุทธิ์และเก็บรักษาเชื้อในกลีเซอรอล 20% (v/v) ที่อุณหภูมิ -80 °C ต่อมาทำการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งของแบคเทอริโอซินที่ผลิตต่อเชื้อทดสอบ 36 ชนิด ได้แก่ แบคทีเรียกรดแลคติก เช่น *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp., *Pediococcus* spp. และแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารบางชนิด เช่น *Listeria monocytogenes* และ *Bacillus cereus* โดยวิธี well diffusion assay ตามวิธีของ Schillinger and Lücke (1989) จากนั้นทำการคัดเลือกไอโซเลทที่มีฤทธิ์การยับยั้งที่ดีที่สุดมาทำการจำแนกแบคทีเรียโดยใช้วิธี 16S rDNA sequencing ในส่วน V1-V3 ซึ่งมีความยาวประมาณ 500 bp หลังจากนั้นนำมาวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม BioEdit และเปรียบเทียบความเหมือนจากฐานข้อมูลลำดับเบสใน GenBank โดยใช้ BLASTn ของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) จากนั้นทำการศึกษาลักษณะกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินที่มีผลต่ออุณหภูมิ 3 ระดับ คือ อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 40 นาที 95 °C เป็นเวลา 40 นาที และ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที ค่าความเป็นกรดต่างที่ต่างกันคือ 3 4 5 6 7 8 9 และ 10 และเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนบางชนิดคือ proteinase K และ protease โดยใช้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Ogunbanwo *et al.*, 2003) จากนั้นวัดค่ากิจกรรมการยับยั้งที่เหลือต่อเชื้อทดสอบด้วยวิธี well diffusion assay โดยทำการเจือจางตัวอย่างแบบ 2 เท่า (two fold) และวัดค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินในหน่วยของ Arbitrary unit (AU/ml) ซึ่งคำนวณได้จากนำส่วนกลับของค่าอัตราการเจือจางสูงสุดที่มีค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นทำการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย ได้แก่ pH เริ่มต้นของ

อาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ และส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อในการผลิตสารแบคทีริโอซิน เพื่อเพิ่มผลผลิตและกิจกรรมการยับยั้งแบคทีริโอซินให้มากยิ่งขึ้น

ผลการทดลอง

ผลการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์โดยทำการเก็บตัวอย่างจากอุจจาระคนและมูลสัตว์ชนิดต่างๆ เช่น มูลโค มูลไก่ และ มูลสุกร โดยใช้วิธี direct plating แสดงผลใน Figure 1 จากแบคทีเรียกรดแลคติกที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MRS ทั้งสิ้นจำนวน 26,765 โคโลนี พบว่ามีโคโลนีที่เกิดวงใสต่อเชื้อทดสอบจำนวน 66 โคโลนี (คิดเป็น 0.25% เทียบกับจำนวนโคโลนีทั้งหมด) โดยพบผลบวกต่อเชื้อแบคทีเรียทดสอบ *Lactobacillus fermentum* JCM 1173, *Lactobacillus casei* JCM 1134, *Enterococcus durans* JCM 8725 และ *Pediococcus pentosaceus* MJU 78 จำนวน 27, 11, 12 และ 16 โคโลนี ตามลำดับดังแสดงผลใน Table 1



Figure 1 Bacteriocin-producing bacteria were isolated by the direct plating method

Table 1 Percentage detection rates of bacteriocin-producing isolates

Sources	Tested colonies	Inhibition of indicator strains			
		<i>L. fermentum</i>	<i>L. casei</i>	<i>E. faecium</i>	<i>P. pentosaceus</i>
		JCM 1173	JCM 1134	JCM 8725	MJU 78
Human	7,251	-	3	5	8
Chicken	11,113	9	-	-	4
Cow	697	16	7	5	1
Pig	7,704	2	1	2	3
Total	26,765	27	11	12	16
%	100	Total = 66 (0.25%*)			

* % detection rate was determined by dividing the number of positive colonies by the total tested colonies x 100

เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 66 ไอโซเลทที่ได้จากการแยกในการทดลองข้างต้น (เกิดวงใสต่อเชื้อทดสอบ) มาทำการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตต่อเชื้อทดสอบ 36 ชนิด ได้แก่ แบคทีเรียกรดแลคติกและแบคทีเรียก่อโรคโดยวิธี well diffusion assay พบว่าไอโซเลท CF50 CF51 และ CF52 มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ 11 ชนิด และเมื่อทำการเปรียบเทียบแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 3 ไอโซเลท พบว่าไอโซเลท CF52 มีฤทธิ์การยับยั้งต่อเชื้อทดสอบได้ดีที่สุดดังแสดงผลใน Table 2

Table 2 Antimicrobial spectrum of bacteriocin by well diffusion assay

Indicator strains	Sensitivity*		
	CF50	CF51	CF52
<i>L. fermentum</i> JCM 1173	+++	+++	+++
<i>E. durans</i> JCM 8725	++	++	++
<i>E. gallinarum</i> JCM 8728	++	++	+++
<i>P. pentosaceus</i> MJU 78	++	+++	+++
<i>E. faecium</i> MJU 92	+++	+++	+++
<i>L. monocytogenes</i> DMST 1327	+	++	+++
<i>L. monocytogenes</i> DMST 1783	+	++	++
<i>L. monocytogenes</i> DMST 2871	++	++	++
<i>L. monocytogenes</i> DMST 4553	++	++	++
<i>B. cereus</i> MJU	++	++	++
<i>M. luteus</i> MJU	+++	+++	+++

*Inhibition zone (mm): +++, 11-15 ; ++, 6-10 ; +, 1-5 ; -, no inhibition

นำแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท CF52 มาทำการจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยใช้วิธี 16S rDNA sequencing ในส่วน V1-V3 ซึ่งมีความยาวประมาณ 500 bp หลังจากนั้นนำมาวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม BioEdit และเปรียบเทียบความเหมือนจากฐานข้อมูลลำดับเบสใน GenBank โดยใช้ BLASTn ของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท CF52 มีลำดับเบสของยีนในส่วน 16S rDNA คล้ายกับ *Lactobacillus salivarius* 16S ribosomal RNA gene ที่เปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 99.2 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าแบคทีเรียไอโซเลท CF52 เป็น *L. salivarius* และกำหนดให้ชื่อว่า *L. salivarius* CF52

เมื่อทำการศึกษาความคงทนต่อความร้อนของแบคทีเรียโอซิน ที่มีลักษณะกิจกรรมการยับยั้งต่อแบคทีเรียทดสอบ คือ *L. fermentum* JCM1173 พบว่าแบคทีเรียโอซินที่ผลิตได้จากเชื้อ *L. salivarius* CF52 สามารถทนต่อความร้อนได้ทั้ง 3 ระดับ คือ อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 40 นาที มีค่ากิจกรรมการยับยั้งเป็น 320 AU/ml ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 40 นาที มีค่ากิจกรรมการยับยั้งเป็น 160 AU/ml และที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที มีค่ากิจกรรมการยับยั้งเป็น 80 AU/ml เมื่อทำการศึกษาความคงทนต่อค่า pH ต่างๆ ที่มีลักษณะกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินต่อแบคทีเรียทดสอบ *L. fermentum* JCM1173 พบว่ามีความคงทนที่ค่า pH ตั้งแต่ 3-10 แต่พบวาค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อทดสอบมีค่าลดลงเมื่อเลี้ยงในสภาวะที่มีความเป็นกรดและด่างมาก เมื่อทำการศึกษาลักษณะกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินที่มีผล

ต่อเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนชนิดต่างๆ พบว่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีริโอซินต่อเชื้อทดสอบ ถูกทำให้เสถียรภาพโดยเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนทั้ง 2 ชนิด คือ proteinase K และ protease ดังแสดงผลใน Table 3

Table 3 Stability of bacteriocin from *L. salivarius* CF52 against *L. fermentum* JCM1173

Treatment	Bacteriocin activity (AU/ml)*
Enzymes	
Proteinase k	0
Protease	0
pH	
3	160
4	160
5	320
6	320
7	160
8	160
9	80
10	80
Heat	
65 °C, 40 min	320
95 °C, 20 min	160
121 °C, 20 min	80

*The activity was expressed as arbitrary units (AU/ml)

เมื่อทำการศึกษาค้นหาส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง *Lactobacillus salivarius* CF52 เพื่อผลิตสารแบคทีริโอซิน พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS สูตรดัดแปลงซึ่งประกอบด้วย 2.5% Maltose, 0.5% Peptone, 1.0% Beef extract, 0.1-0.2% K₂HPO₄, 1.0% MgSO₄·7H₂O, 0.5% Na-acetate, 0.2% (NH₄)₂ citrate, 0.004% MnSO₄·H₂O และ 0.1% Tween 80 แบคทีริโอซินที่ได้มีกิจกรรมการยับยั้งสูงสุดคือ 3,413 AU/ml ซึ่งดีกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ทั่วไป คือ 320 AU/ml ดังแสดงผลใน Table 4

Table 4 Optimization of culturing medium for bacteriocin production

Composition	MRS (%)	Modified MRS (%)
Glucose	2	-
Maltose	-	2.5
Peptone	1	0.5
Yeast extract	0.5	-
Beef extract	1.0	1
K ₂ HPO ₄	0.2	0.1-0.2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.002	1
+ 0.5% Na-acetate, 0.2% (NH ₄) ₂ citrate, 0.004% MnSO ₄ ·H ₂ O, 0.1% Tween 80		
Activity (AU/ml)	320	3,413

หลังจากนั้นจึงได้ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติก *L. salivarius* CF52 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS สูตรดัดแปลงที่ได้ เพื่อนำมาศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแบคทีเรียโอซิน โดยปรับอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีค่า pH เริ่มต้นของอาหารที่ pH ต่างๆ กัน คือ 4.5 5.0 5.5 6.0 6.5 และ 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นนาน 18 ชั่วโมงในสภาวะไร้ออกซิเจน พบว่า pH เริ่มต้นของอาหารเหลว MRS ที่ 6.5-7.0 มีค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อทดสอบสูงสุดต่อ *L. fermentum* JCM1173 คือ 4,266 AU/ml และเมื่อทำการเพาะเลี้ยง *L. salivarius* CF52 ในอาหาร MRS สูตรดัดแปลงที่มีค่า pH เริ่มต้นของอาหารที่ pH เป็น 6.5 ทำการบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 30 37 และ 45 °C เป็นเวลา 12 15 และ 18 ชั่วโมง พบว่าการเพาะเลี้ยง *L. salivarius* CF52 ในอาหาร MRS สูตรดัดแปลงที่มีค่า pH เริ่มต้นของอาหารที่ pH เป็น 6.5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 15-18 ชั่วโมงให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงสุดคือ 4,266 AU/ml ดังแสดงผลใน Figure 2

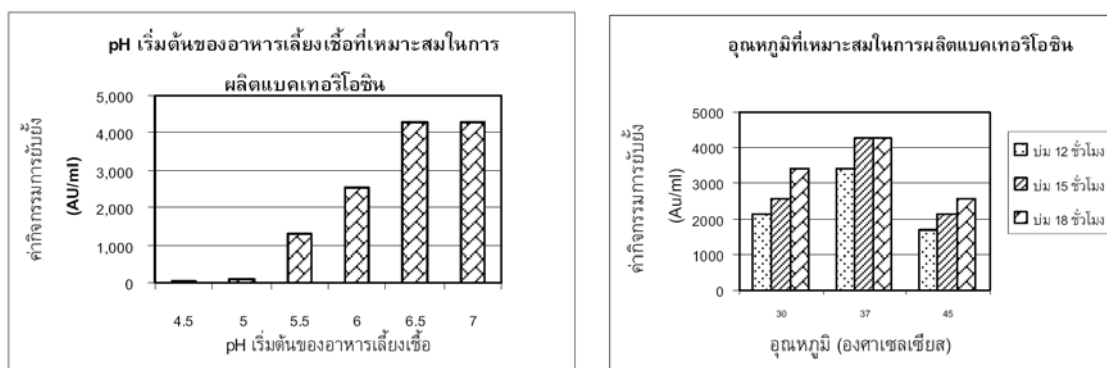


Figure 2 The optimal initial pH and temperature for bacteriocin production

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

จากการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์โดยใช้วิธี direct plating จำนวนทั้งสิ้น 26,765 โคโลนี เมื่อนำมาทดสอบการผลิตสารแบคทีเรียโอซิน พบว่ามีเพียงไอโซเลตเดียวคือ *Lactobacillus salivarius* CF52 ที่สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติกในกลุ่มใกล้เคียงกันและแบคทีเรียที่ก่อโรคในอาหารบางชนิดได้ สอดคล้องกับงานทดลองของ Oh *et al.* (2000) ที่ทดสอบฤทธิ์ของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *L. acidophilus* 30SC พบว่าสามารถยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดอื่นในกลุ่มเดียวกันหรือกลุ่มใกล้เคียงกัน รวมทั้งแบคทีเรียก่อโรคแกรมบวกบางชนิดได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ

นอกจากนี้ลักษณะของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตสามารถทนต่อช่วง pH ที่กว้างตั้งแต่ 3-10 และสามารถทนความร้อนได้ถึงอุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที ถูกทำให้เสียสภาพโดยเอนไซม์ด้วย proteinase K และ protease สอดคล้องกับงานทดลองของ Oh *et al.* (2000) ที่ทำการศึกษาลักษณะของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *L. acidophilus* 30SC พบว่า มีความเสถียรต่อความร้อน มีกิจกรรมการยับยั้งในช่วง pH ที่กว้าง ถูกทำให้เสียสภาพกิจกรรมการยับยั้งด้วยเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน

สภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียและส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อในการผลิตแบคทีเรียโอซินของ *L. salivarius* CF52 คือการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร MRS สูตรดัดแปลงซึ่งประกอบด้วย 2.5% Maltose, 0.5% Peptone, 1.0% Beef extract, 0.1-0.2% K_2HPO_4 , 1.0% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5% Na-acetate, 0.2% $(NH_4)_2$ citrate, 0.004% $MnSO_4 \cdot H_2O$ และ 0.1% Tween 80 ค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.5-7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ Kim *et al.* (2006) ที่ทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย และส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อในการผลิต micrococcin GO จากเชื้อ *Micrococcus* sp. GO5 ในอาหาร MRS สูตรดัดแปลง พบว่าสามารถทำให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินสูงขึ้นกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS ทั่วไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว) ที่สนับสนุนทุนการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- Gilliland, S. E. and M. C. Speck. 1997. Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and food-borne pathogens in association culture. **J. Food Prot.** 40: 820-823
- Kim, M. H., Y. J. Kong, H. Baek and H. H. Hyun. 2006. Optimization of culture conditions and medium composition for the production of micrococcin GO5 by *Micrococcus* GO5. **J. Biotechnology.** 121: 54-61.
- Noonpakdee, W., C. Santivarangkna, P. Jumriangrit, K. Sonomoto and S. Panyim. 2003. Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC 20 strain from nham, a traditional thai fermented sausage. **Int. J. Food Microbiol.** 81(2): 137-145.
- Ogunbanwo, S. T., A. I. Sanni and A. A. Onilude. 2003. Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. **Afr. J. Biotechnol.** 2(8): 219-227.
- Oh, S., S. H. Kim, and R. W. Worobo. 2000. Characterization and purification of a bacteriocin produced by a potential probiotic culture, *Lactobacillus acidophilus* 30SC. **J. Dairy Sci.** 83: 2747-2752
- Schillinger, U. and F.K. Lücke. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. **Appl. Environ. Microbiol.** 55: 1901-1906.