

โปรตีน Surface enzyme เช่น Prt B ของเชื้อ *L. delbrueckii* ซึ่งโปรตีนต่างๆ ที่กล่าวมานี้ล้วนเป็นโปรตีนที่ช่วยในการเกาะติดทั้งสิ้น นอกจากนี้ยังพบว่า *L. plantarum* มี adhesin-gene คือ mub และ mab ซึ่งช่วยในการเกาะติด (Ramiah et.al., 2008) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถใช้ fibrillae ซึ่งน่าจะเป็นสารกลุ่มคาร์โบไฮเดรตที่สามารถช่วยให้ตัวเชื้อเกาะติดกับ epithelial cell ได้และยังพบอีกว่า lipoteichoic acid ซึ่งเป็น polymer ของ glycerophosphate ที่จะไปรวมตัวกับโปรตีนบนผิวเซลล์ ทำให้มีลักษณะเหมือนสะพานเชื่อมติดกับ epithelial cell และนอกจากนี้ยังพบว่า lectins ซึ่งอาจพบได้ที่ผิวของ lactobacilli ผิวของเซลล์เจ้าบ้านหรือจากอาหารที่รับประทานเข้าไป โดย lectins จะเข้าไปจับแบบจำเพาะกับ receptor ที่เป็นคาร์โบไฮเดรตที่อยู่บนผิว epithelial cell หรือบนผิว lactobacilli (Gerald and Tannock, 1992)

II. การคัดเลือกแบคทีเรียกลุ่มอื่นและฤทธิ์ต่าง ๆ ของเมตาบอไลต์จากแบคทีเรีย

แบคทีเรียสกุล *Bacillus* หลายชนิด สามารถสร้างสารปฏิชีวนะและปล่อยออกมานอกเซลล์ (Huang et.al., 2005) ซึ่ง *Brev. laterosporus* SA14 ได้ผลิตสารปฏิชีวนะดังกล่าวได้เช่นกัน โดยสามารถตรวจพบฤทธิ์การยับยั้ง *S. aureus* TISTR 517 ในน้ำเลี้ยงเชื้อ ตั้งแต่วันแรกจนถึงวันที่ 7 ของการบ่มเลี้ยงเชื้อ ซึ่งฤทธิ์ที่ตรวจพบสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ ที่พบว่าสารปฏิชีวนะถูกผลิตและปล่อยออกมานอกเซลล์ตั้งแต่วันแรกของการบ่มเลี้ยงเชื้อ (กฤษณวัฒน์ และคณะ, 2550) แต่จากการศึกษาครั้งนี้ฤทธิ์ปฏิชีวนะดังกล่าวพบได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพียงบางขวดในวันแรกของการบ่มเลี้ยง และจะพบฤทธิ์ปฏิชีวนะครบทุกขวดในวันที่ 3 ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวอาจเกิดจากปัจจัยอื่นเข้ามาเกี่ยวข้อง เช่น ปริมาณเชื้อตั้งต้นในการบ่มเลี้ยง สภาพะในการบ่มเลี้ยง องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ หรืออุณหภูมิ ซึ่งอาจจะต้องศึกษาเพิ่มเติมต่อไป ภายในเซลล์ของแบคทีเรีย จะมีการสร้างโปรตีนชนิดต่างๆ มากมายที่มีความสำคัญเกี่ยวกับการดำรงชีวิต โดยโปรตีนบางส่วนได้ถูกผลิตและปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ ซึ่งมักพบได้บ่อยในกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวกที่สามารถหลั่งสารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์และผนังเซลล์ออกสู่สิ่งแวดล้อมภายนอกได้โดยตรง อันเนื่องมาจากโครงสร้างของผนังเซลล์ที่มีแต่เพียงชั้นของ peptidoglycan ไม่มีชั้นไขมันมาห่อหุ้มเหมือนกับที่มีในแบคทีเรียแกรมลบที่มีความซับซ้อนกว่า จึงทำให้สามารถตรวจพบฤทธิ์ปฏิชีวนะจากโปรตีนที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อและภายในเซลล์แบคทีเรีย (ภัทรชัย, 2549)

จากการนำอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่ผ่านการตกตะกอน และโปรตีนชีวสารจากเชื้อแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14 มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งช่องปากที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี MTT พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่ผ่านการตกตะกอน ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งช่องปาก ส่วนโปรตีนชีวสารที่ได้จากเชื้อแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14 มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งช่องปากได้ร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น

22 ไมโครกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าวน่าจะเป็นกลุ่มของ microbial peptide และ secondary metabolites (Reddy et.al., 2004) ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้มีความสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาที่พบว่าโปรตีนชีวสารจาก *Brev. laterosporus* SA14 ที่บ่มเลี้ยงเป็นระยะเวลา 5 วัน มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปากได้ร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 34 ไมโครกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร (นันทวัน และคณะ, 2553) จากการศึกษาฤทธิ์ของ crude proteins ของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14 ต่อความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ (HT-29 colon cancer cells) พบว่าความเข้มข้นที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ร้อยละ 50 เท่ากับ 360 ไมโครกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร (มณฑล และ วรางคณา, 2552) ซึ่งกลไกการทำลายเซลล์มะเร็งน่าจะเป็นผลเนื่องมาจาก antimicrobial peptide มีประจวบเหมาะ ซึ่งสามารถเข้าจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีประจุลบของเซลล์มะเร็งได้ ซึ่งต่างจากเซลล์ปกติที่มีประจุเป็นกลาง ส่งผลให้เซลล์มะเร็งเกิดเป็นรูพรุน (Hoskin et.al., 2008) โดยผลการยับยั้งเซลล์มะเร็งแต่ละชนิดที่แตกต่างกันนี้อาจเกิดเนื่องจากสภาวะที่ใช้ทดสอบและพันธุกรรมของเซลล์แต่ละชนิดที่แตกต่างกัน

เมื่อนำเซลล์มะเร็งช่องปากที่ทดสอบด้วยโปรตีนชีวสารจากเชื้อแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มาสกัด RNA เพื่อศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *Bcl-2* และ ยีน *p21* ด้วยวิธี Real Time PCR พบว่าโปรตีนชีวสารที่ความเข้มข้น 10-30 ไมโครกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร ไม่มีต่อการแสดงออกของยีน *Bcl-2* แต่เหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีน *p21* เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้ทดสอบด้วยโปรตีนชีวสาร มีรายงานการวิจัยพบว่าในชั้นเนื้อมะเร็งจากผู้ป่วยมะเร็งช่องปากและจากเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงมีการแสดงออกของโปรตีน *Bcl-2* ที่สูง (De Sousa et.al., 2009) ดังนั้นยีน *Bcl-2* และโปรตีน *Bcl-2* จึงเป็นเป้าหมายที่สำคัญของยาต้านมะเร็งหลายชนิด อย่างไรก็ตามพบว่าโปรตีนชีวสารดังกล่าวไม่ได้มีผลลดการแสดงออกของยีน *Bcl-2* จากการวิจัยที่ผ่านมาเกี่ยวกับยาที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งพบว่ายาที่มีเป้าหมายที่สำคัญคือไปเพิ่มการแสดงออกของยีน *p21* งานวิจัยหนึ่งพบว่าสาร 50-nitro-indirubinoxime (50-NIO) มีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งช่องปาก โดยส่งเสริมให้มีการหยุดวงจรชีวิตของเซลล์ในระยะ G2/M และ G1/S โดยมีกลไกที่สำคัญคือ เพิ่มการแสดงออกของยีน *p21* (Kim et.al., 2009) นอกจากนี้ยังพบอีกว่า สาร vesnarinone สามารถยับยั้งการเจริญของ squamous cell carcinoma cells ได้ โดยสารดังกล่าวทำให้เซลล์มีการแสดงออกของยีน *p21* เพิ่มขึ้น (Yoneda et.al., 1998) สำหรับกลไกของโปรตีนชีวสารจาก *Brev. laterosporus* SA14 ในการเพิ่มระดับการแสดงออกของยีน *p21* ยังไม่มีการรายงานและการศึกษาถึงกลไกที่แน่ชัด แต่รายงานวิจัยพบว่า antimicrobial peptide สามารถกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส โดยการทำลายเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย (Hoskin et.al., 2008)

เมื่อนำโปรตีนชีวสารจากเชื้อ *Brev. laterosporus* SA14 มาทดสอบกับเซลล์มะเร็งช่องปาก พบว่าโปรตีนชีวสารมีผลลดการแสดงออกของโปรตีน phospho ERK1/2 ในเซลล์มะเร็งช่องปาก

โดยมีรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าขึ้นเนื้อมะเร็งช่องปากจากผู้ป่วยมีการแสดงออกของ phospho ERK1/2 สูง (Park et.al., 2010) โปรตีน phospho ERK1/2 จึงเป็น molecular target ของยาที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็งหลายชนิด ซึ่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเช่น curcumin (Shin et.al., 2010) และ aspirin (Park et.al., 2010) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งช่องปากได้โดยผ่านกลไกการยับยั้งการแสดงออกของ phospho ERK1/2 ส่วนโปรตีน total ERK1/2 ไม่มีการเปลี่ยนแปลง แต่อย่างไรก็ตามในส่วนของกลไกยังไม่ทราบแน่ชัด น่าจะเกิดจากการที่เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลายทำให้มีผลรบกวนโปรตีน tyrosine kinase ซึ่งเป็น receptor ที่ควบคุมการส่งสัญญาณผ่านวิถี MAP kinase pathway หรืออาจเกิดจากโปรตีนชีวสารมีผลทำลาย intracellular enzyme ภายในเซลล์ดังเช่นที่พบในเซลล์แบคทีเรีย (Hoskin and Ramamoorthy, 2008)

จากการนำชีวสารที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14 มาทดสอบความสามารถในการสมานแผลของเซลล์ HaCaT ที่ความเข้มข้น 0.39 µg protein/ml ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีองค์ประกอบของ 2% FBS พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14 ที่เตรียมจากการตกตะกอนด้วย 80 % ammonium sulfate ทำให้เซลล์ มีการเคลื่อนที่เข้ามายังบริเวณที่เกิดบาดแผลได้เร็วกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้มีความสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาที่พบว่าเมื่อมีการอักเสบ เช่น การติดเชื้อแบคทีเรียทำให้ epithelial cell ได้รับความเจ็บและจะทำให้เกิดการซ่อมแซมและสมานบาดแผลอย่างรวดเร็วเพื่อที่จะปิดบาดแผลที่เกิดขึ้นโดยทำให้เกิดการเคลื่อนที่ (migration) และกระตุ้นให้เกิดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของ epithelial cell จนกระทั่งปิดบาดแผลนั้น (Karrasch et.al., 2009)

สำหรับแบคทีเรียสกุลสเตรปโตมัยซิสเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีความสำคัญและหลากหลาย *Streptomyces* spp. CO4, WU6, และ WU10 ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้สามารถผลิตสารปฏิชีวนะออกฤทธิ์ต้าน MRSA แตกต่างกันได้ อาจเนื่องมาจากแต่ละไอโซเลทของ *Streptomyces* spp. สามารถผลิตสารปฏิชีวนะที่แตกต่างกันและออกฤทธิ์ได้หลายแบบดังที่กล่าวไว้ข้างต้น โดยแบคทีเรียสกุลสเตรปโตมัยซิสที่แยกได้และได้นำมาทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งในเบื้องต้นพบว่ามี 3 ไอโซเลทได้แก่ ไอโซเลท CO4 ไอโซเลท WU10 และไอโซเลท WU6 และเมื่อจำแนกสายพันธุ์พบว่าเป็นเชื้อ *Streptomyces antibioticus* strain 1022-257, *Streptomyces flaveolus* strain NRRLB-13334 และ *Streptomyces* sp. b26 ตามลำดับ (สุเมธ และคณะ, 2552) ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งช่องปากของชีวสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการระเหิดแห้งจากไอโซเลท CO4 พบว่าสามารถทำลายเซลล์มะเร็งได้ดีกว่าไอโซเลท WU10 และ WU6 ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากแบคทีเรียแกรมบวกจะปลดปล่อยสารออกมานอกเซลล์ (Lewis et.al., 1984) ดังนั้นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพส่วนใหญ่อาจถูกปลดปล่อยออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อจึงให้ฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง ดังเช่นรายงานที่พบสาร mithramycin (MM) ที่มี

ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งลำไส้ในอาหารเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. AA030098 (Lee et.al., 2007) มีรายงานพบว่าเชื้อ *Streptomyces antibioticus* สามารถผลิตสาร pentostatin ซึ่งเป็น purine nucleoside analog ที่ได้จากกระบวนการหมัก มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว แต่ในขณะนั้นยังไม่เคยมีการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งชนิดอื่น (Spiers, 1996) ส่วนเชื้อ *Streptomyces flaveolus* พบว่ายังไม่เคยมีรายงานฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของเชื้อดังกล่าว อย่างไรก็ตามพบว่าเชื้อ *Streptomyces flaveolus* strain Tü 1240 สามารถสังเคราะห์สาร tirandamycin A ที่มีฤทธิ์ทำลายเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ (Hagenmaier et.al., 1976) นอกจากนั้นมีการค้นพบสาร angucycline landomycin E (LE) และสาร guanine-7-oxide จากเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งช่องปากได้ โดยที่กลไกการตายของเซลล์มะเร็งเกี่ยวข้องกับการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส (Korynevskaya et.al., 2007) การทดสอบความเป็นพิษกับเซลล์ปกติและการศึกษากลไกการยับยั้งเซลล์มะเร็งของสาร เป็นสิ่งที่ต้องศึกษาเพิ่มเติมเพื่อที่จะได้นำสารนั้นมาพัฒนาเป็นสารต้นแบบในการยับยั้งเซลล์มะเร็งต่อไป

III. ฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน

การศึกษาเกี่ยวกับการใช้แบคทีเรียกรดแลคติกกระตุ้นเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกัน มีรายงานการใช้แบคทีเรียกรดแลคติกหลายรูปแบบ ได้แก่ การใช้ความร้อน การทำเป็นผงแห้ง (lyophilized bacteria) การใช้แสงอัลตราไวโอเลต (Fink LN. และคณะ, 2008; Chuang L. และคณะ, 2007) สำหรับการใช้แสงอัลตราไวโอเลตมีข้อดีคือ ทำได้ง่ายภายใน 15 นาที ก็สามารถทำลายแบคทีเรียได้หมด Hiramatsu Y. และคณะ (2007) ทดสอบการใช้แบคทีเรียกรดแลคติกในรูปแบบต่างๆ ได้แก่ แบคทีเรียที่มีชีวิต แบคทีเรียที่ถูกทำลายด้วยความร้อน และแบคทีเรียที่ทำให้เซลล์แตกโดยการทำให้ sonicator พบว่าแบคทีเรียที่มีชีวิตและแบคทีเรียที่ผ่านความร้อน กระตุ้นภูมิคุ้มกันได้น้อยกว่าแบคทีเรียที่ผ่านการทำให้เซลล์แตก ดังนั้นองค์ประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรียซึ่งมีผลต่อการกระตุ้นเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันจะมีปริมาณแตกต่างกันขึ้นกับวิธีการเตรียมแบคทีเรียก่อนนำไปใช้ในการกระตุ้น

CD69 เป็นเครื่องหมายบ่งชี้การตอบสนองของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันเช่น ลิมโฟไซต์ (activated T, B cell) และ NK cell จากการทดลองนี้ เมื่อเซลล์ลิมโฟไซต์และโมโนไซต์ถูกกระตุ้นด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก จะมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ที่มีการแสดงออกของ CD69 เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ถูกกระตุ้น (Elmadfah I. และคณะ, 2010) การเพิ่มขึ้นของ CD69 อาจเนื่องมาจาก APC ในโมโนนิวเคลียร์เซลล์รับรู้แบคทีเรียกรดแลคติกและนำไปสู่การกระตุ้น T-lymphocyte Fink LN. และคณะ (2008) ได้ศึกษาการแสดงออกของ CD69 บน NK cell เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์เดนดริติกที่ถูกกระตุ้นด้วย *L. acidophilus* และ *B. bifidum* โดยพบว่าสามารถกระตุ้นให้มีการแสดงออกของ CD69 ได้ไม่ต่างกัน แต่กระตุ้นให้ NK cell สร้างไซโต

ไคน์ IFN- γ ได้ต่างกัน นั่นคือแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถทำให้เกิดการเจริญแก่ตัวของเซลล์เดนดริติกแล้วไปกระตุ้นเซลล์อื่นๆ ในระบบภูมิคุ้มกันต่อไป ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้การเพิ่มขึ้นของ CD69 บนลิ้มโฟซัยต์จึงน่าจะเป็นผลมาจากเซลล์เดนดริติกที่ถูกกระตุ้น ส่วนการเพิ่มขึ้นของ CD69 บนโมโนซัยต์เป็นผลมาจากการกระตุ้นจากแบคทีเรียโดยตรง

ผลการตรวจวัดการแสดงออกของ CD80 และ CD86 บนมัยอีลอยด์เดนดริติกเซลล์และพลาสมาซัยตอยด์เดนดริติกเซลล์เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก ซึ่งบ่งชี้การเจริญแก่ตัว (maturation marker) เช่นเดียวกับ HLA-DR, CD54 CD83 CD209 (Elmadfah I. และคณะ; 2010) เดนดริติกเซลล์ที่ตัวแก่นี้มีความสำคัญในการกระตุ้น T cell ให้เปลี่ยนไปเป็น Th1/Th2, effector cytotoxic T cell หรือ regulatory T cells (Treg) (Foligne B และคณะ; 2007) จากผลการทดลองนี้เมื่อมัยอีลอยด์เดนดริติกเซลล์ถูกกระตุ้นด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกมีการแสดงออกของ CD80 CD86 ประมาณ 70-80% ซึ่งไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ไม่ถูกกระตุ้น อาจเนื่องมาจากเดนดริติกเซลล์ที่นำมากระตุ้นนี้เป็นเดนดริติกเซลล์ที่อยู่ในกระแสเลือดอาจจะถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนอยู่ก่อนแล้ว จึงทำให้กลุ่มที่ไม่ถูกกระตุ้นมีการแสดงออกของ CD86 สูง Zeuthen LH. และคณะ (2006) ได้ทำการศึกษาการตอบสนอง MoDCs ต่อแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ *L. acidophilus* X37, *L. paracasei* Z11, *L. reuteri* DSM12246, *B. bifidum* S131 และ *L. rhamnosus* GG พบว่ามีการแสดงออกของ CD86 เพิ่มขึ้นแตกต่างกัน โดย MoDC ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย *L. acidophilus* X37 และ *L. paracasei* Z11 สูงกว่า *L. reuteri*, *B. bifidum* S131 และ *L. rhamnosus* GG และ MoDC ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วยแบคทีเรียมีการแสดงออกของ CD86 ในระดับสูง ซึ่งไม่แตกต่างจากการกระตุ้นด้วย *L. reuteri*, *B. bifidum* S131 และ *L. rhamnosus* GG มากนัก นั่นคือการแสดงออกของ CD86 มากหรือน้อยขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรีย จากการศึกษาของ Chuang L. และคณะ (2007) ศึกษาการกระตุ้น MoDC ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยวัดการสร้างไซโตไคน์ IL-12 โดยพบว่าปริมาณการตอบสนองขึ้นกับระยะเวลาการกระตุ้นโดยเวลาที่ 24 ชั่วโมง จะตอบสนองได้ดีกว่า 48 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ

การศึกษานี้เป็นการวิจัยเบื้องต้นถึงการนำเซลล์เดนดริติกในกระแสเลือดมาใช้เพื่อศึกษาฤทธิ์การกระตุ้นภูมิคุ้มกันของแบคทีเรียกรดแลคติกและไม่มีความแตกต่างกับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น ดังนั้นการศึกษากการเจริญแก่ตัวของเซลล์เดนดริติกจึงควรใช้ immature dendritic cells ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจากโมโนซัยต์หรือเซลล์ต้นกำเนิดจะให้ผลดีกว่าและลดปัญหาเรื่องจำนวนเซลล์ที่มีน้อยเกินไป

สรุป

การทดลองในรอบปีที่ 1

1. คัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกจากตัวอย่างอาหารหมักด้วยเทคนิคกระจายเชื้อบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS และทดลองเลี้ยงเชื้อที่นำมาใช้เป็น indicating strains ในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว ปรากฏว่ามีเฉพาะแบคทีเรียกรดแลคติกที่เจริญได้ดีในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS และสามารถสุ่มเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความทนทานอากาศได้จำนวน 76 ไอโซเลท ซึ่งในเบื้องต้นพบว่าไอโซเลททั้งหมดที่แยกออกมาได้ไม่สามารถทดสอบ antimicrobial activity ด้วยวิธีซีดเชื้อได้ อาจเนื่องมาจาก indicating strains ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS จึงได้สุ่มเลือกมา 10 ไอโซเลทมาทดสอบ antimicrobial activity ด้วยวิธี agar well diffusion ดังข้อ 2

2. ศึกษาฤทธิ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 10 ไอโซเลทมาทดสอบฤทธิ์ antimicrobial spectrum โดยวิธี agar diffusion assay ด้วยการนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (มล.) แล้วนำไปบ่มไว้ที่ 37°C. 48 ชม. จากนั้นนำมาแยกเชื้อโดยการนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง refrigerated ultra centrifuge (Sorval) ที่ความเร็วรอบ 10000 rpm อุณหภูมิ 4°C. นาน 10 นาที แล้วทำการกรองส่วน supernatant ผ่านกระดาษกรองที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตร (มค.ม.) นำไปหยดลงในหลุมของจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง tryptic soy (TS) ที่ได้ทำการป้ายจุลินทรีย์ดัชนี (indicating strains) ที่มีความชุ่มเทียบเท่า McFarland No.0.5 ไว้ก่อนหน้านี้แล้ว นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มไว้ที่ 37°C. 24 ชม. สังเกตโดยดูรอบรอยหลุมว่าเกิด inhibition zone หรือไม่ ปรากฏว่าเชื้อทั้ง 10 ไอโซเลทที่สุ่มเลือกมาทดสอบสามารถยับยั้ง indicating strains แต่เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อดังกล่าวข้างต้นไปปรับ pH ให้เป็นกลางด้วย 2N NaOH ปรากฏว่าไม่มีวงใสของการยับยั้งเชื้อปรากฏขึ้น

3. ปรับปรุงสายพันธุ์โดยการใช้ UV และสอดใส่ซินิโนโคตินเนสโดยใช้ *Lactobacillus plantarum* TISTR 050 เป็นต้นแบบ และใช้ *Candida albicans* TISTR 5239 เป็นเชื้อดัชนี ปรากฏว่า

3.1 *L. plantarum* ที่ผ่าน UV ให้ผลการยับยั้ง *C. albicans* ดีขึ้น แต่พบว่าเมื่อทำการเลี้ยงสายพันธุ์ผ่าเหล่าด้วย UV หลายๆ รุ่น จะพบว่าฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของยีสต์ลดลง

3.2 การสอดใส่ซินิโนโคตินเนสเข้าสู่ *L. plantarum* นั้นสามารถตรวจพบการแสดงออกของซินิโนโคตินเนสเพียงเล็กน้อยและซินิโนไม่เสถียรรูปเมื่อเลี้ยงเชื้อไว้หลายรุ่น และเบื้องต้นพบว่ามีเฉพาะฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญ *Micrococcus luteus* TISTR 884 เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามฤทธิ์ดังกล่าวจะสูญหายไปเมื่อเลี้ยงสายพันธุ์ปรับปรุงพันธุ์ไว้หลายๆ รุ่น

การทดลองในรอบปีที่ 2

1. การคัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกเพิ่มเติมและการคัดเลือกคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียโปรไบโอติก โดยใช้เกณฑ์ดังนี้คือ 1) การเลือกแบคทีเรียจากแหล่งต่างๆ เช่น ผัก ผลไม้ ผลิตภัณฑ์นม ผลการศึกษาเมื่อคัดเลือกแบคทีเรียโปรไบโอติกจากผัก-ผลไม้ (มะเขือเทศ แดงโม มะพร้าว กะหล่ำปลี) นมวัว และนมแพะพบว่าตรวจพบโคโลนีของแบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งมีลักษณะคือ หนูน สีขาวขุ่น ขอบเรียบ ผิวหน้าเรียบเป็นมันวาว ทึบแสง และให้ผลทดสอบกะตะเลสเป็นลบ ย้อมติดสีแกรมบวกรูปท่อน โดยได้ทำการคัดเลือกได้ทั้งหมด 106 ไอโซเลท 2) การทดสอบความสามารถในการเกาะติดพื้นผิวของเชื้อที่คัดเลือกได้จำนวน 106 ไอโซเลทรวมเชื้อควบคุม (C3, C7 และ *Lactobacillus plantarum* TISTR 050) ปรากฏว่ามีเพียงไอโซเลทที่ 9 ที่แยกออกมาได้จากมะเขือเทศ และไอโซเลทที่ 35 ที่แยกออกมาได้จากนมเท่านั้นที่สามารถแสดงการเกาะติดผิวหลอดด้านในของหลอดทดลอง จึงได้ตั้งชื่อว่า T9 และ N35 ตามลำดับ แต่พบว่า T9 แสดงการเกาะกลุ่มที่เร็วกว่าและยาวนานกว่า 3) การผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ให้โทษโดยเมตาบอลิต์ต่างๆ พบว่าไอโซเลท T9 ที่คัดเลือกได้จากมะเขือเทศมีฤทธิ์ทำลายแบคทีเรียดัชนีที่นำมาทดสอบทั้งหมดจำนวน 6 สายพันธุ์ (*Micrococcus luteus* TISTR 884, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Salmonella typhimurium* TISTR 292, *Staphylococcus aureus* TISTR 517, *Escherichia coli* TISTR 887, *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 1467) แต่ไม่แสดงฤทธิ์ทำลายราดัชนี *Candida albicans* TISTR 5779 เมื่อทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion 4) การแยกกลุ่มและวินิจฉัยแยกชนิดแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบทางชีวเคมี API 50 CHL และนำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยซอฟต์แวร์ API 50 V.5.1 ปรากฏว่าไอโซเลท T9 ที่แยกได้มาจากมะเขือเทศคือ *Lactobacillus plantarum* 1 ที่ระดับความเชื่อมั่น 99.9% ดังนั้นจึงสรุปว่าเชื้อที่ได้ทำการคัดเลือกมาได้ถูกจัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียโปรไบโอติก 5) ความทนต่อระดับ pH 2-10 พบว่าไอโซเลท T9 สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่ปรับ pH 2-10 และสามารถสังเกตเห็นการเกาะติดพื้นผิวหลอดด้านในของแบคทีเรียดังกล่าวในหลอดทดลอง 6) ความทนทานต่อการถูกทำลายโดยยาปฏิชีวนะพบว่าไอโซเลท T9 ตื้อต่อยาปฏิชีวนะที่นำมาทดสอบเกือบทั้งหมดได้ดีกว่าแบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 050 ยกเว้นยา nitrofurantoin 7) ความคงตัวในสภาวะที่มีสารเสริมต่างๆ ประมาณ 1 เดือน 8) ความคงทนต่อการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิแช่เยือกแข็ง (-20 องศาเซลเซียส) ไอโซเลท T9 สามารถเจริญเป็นโคโลนีในจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ภายหลังจากการเก็บรักษาไว้ใน 15% กลีเซอรอลที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 เดือน

2. การศึกษาการคงอยู่ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากข้อที่ 1. ในน้ำผลไม้ 3 ชนิด (น้ำแดงโม น้ำมะพร้าว และน้ำมะเขือเทศ) พบว่าไอโซเลท T9 สามารถมีชีวิตรอดได้ในน้ำผลไม้ที่นำมาศึกษาแตกต่างกันโดยพบว่าสามารถมีชีวิตเหลือรอดได้ดีในน้ำแดงโมและน้ำมะเขือเทศในการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 21 วัน ส่วนน้ำ

มะพร้าวทำให้แบคทีเรียตายทั้งหมดภายหลังการจัดเก็บไว้เพียง 9 วันที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แบคทีเรีย *L. plantarum* 1 (ไอโซเลท T9) ที่ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 8 log CFU/ml มีอัตราการอยู่รอดโดยเฉลี่ยมากที่สุดในน้ำแฉะโมที่ไม่เติมสารฟรีไบโอติกโดยมีปริมาณเซลล์หลงเหลือชีวิตปริมาณ 5.4 ± 0.21 log CFU/ml เมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 21 วัน รองลงมาคือการอยู่รอดในน้ำมะเขือเทศที่เติมสารฟรีไบโอติก (5.3 log CFU/ml) ในน้ำมะเขือเทศที่ไม่เติมสารฟรีไบโอติก (5.2 log CFU/ml) ในน้ำแฉะโมที่เติมสารฟรีไบโอติก (5.0 log CFU/ml) ส่วนในน้ำมะพร้าวทั้งที่เติมสารฟรีไบโอติกและไม่เติมสารฟรีไบโอติกนั้นเชื้ออยู่รอดได้เพียงประมาณ 6 วัน และเมื่อทำการวิเคราะห์ผลข้อมูลที่ได้โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์อัตโนมัติ SPSS โดยใช้การวิเคราะห์สถิติแบบ ONE WAY ANOVA เพื่อเปรียบเทียบผลของการเติมและไม่เติมสารฟรีไบโอติกลงในน้ำผลไม้ต่อการอยู่รอดของแบคทีเรีย *L. plantarum* 1 ปรากฏว่า การเติมและไม่เติมสารฟรีไบโอติกไม่มีผลต่ออัตราการอยู่รอดของแบคทีเรียดังกล่าวในน้ำผลไม้ ($p\text{-value} < 0.05$)

3. การคัดเลือกกลุ่มจุลินทรีย์อื่นๆ เช่น *Bacillus* และ *Streptomyces* spp. ที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะนอกเหนือจากกลุ่มกรดแลคติก ผลการนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้จากการเลี้ยงเชื้อกลุ่ม *Bacillus* คือ *Brev. laterosporus* SA14 พบว่ามีฤทธิ์ต่อต้านการเจริญของ *S. aureus* ทั้งวิธีทดสอบแบบ agar well diffusion และ spot on lawn และจะเริ่มตรวจพบฤทธิ์ดังกล่าวจากน้ำเลี้ยงเชื้อได้ตั้งแต่วันที่ 3 ของการบ่มเลี้ยงเชื้อ ในอาหารเหลว LB ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ใน Duran ขนาดบรรจุ 500 มิลลิลิตร นอกจากนี้การนำน้ำเลี้ยงเชื้อกลุ่ม *Streptomyces* spp. เมื่อทดสอบด้วยวิธี agar plug diffusion พบว่าไอโซเลท CO4 และไอโซเลท WU6 มีฤทธิ์ต้าน MRSA ทั้งหมด ส่วนไอโซเลท CK9 มีฤทธิ์ต้าน MRSA เพียง 3 สายพันธุ์ (MRSA 414, MRSA 539, MRSA 3576) และ *S. aureus* TISTR 517 สำหรับไอโซเลท WU10 ไม่มีฤทธิ์ต้าน MRSA ส่วนการทดสอบโดยใช้วัฏรอบโคโลนีของเชื้อดังกล่าวพบว่ามีเฉพาะ CO4 เท่านั้นที่มีฤทธิ์ต้าน MRSA ที่นำมาศึกษา

4. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์จากน้ำเลี้ยงเชื้อของกลุ่มจุลินทรีย์ *Bacillus* และ *Streptomyces* spp. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของกลุ่มจุลินทรีย์ *Bacillus* ด้วยวิธี MTT พบว่าชีวสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรีย *Brevibacillus laterosporus* SA14 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.033 mg protein/ml (3.67 mg/ml) และยาต้านมะเร็ง (5-FU) มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.75 mg/ml จากการทดลองยังพบอีกว่าชีวสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการตกตะกอนโปรตีนด้วย 80% ammonium sulfate ทั้งที่ผ่านความร้อนและไม่ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 15 นาทีจะให้ค่า IC_{50} ที่เท่ากันคือ 0.034 mg protein/ml สำหรับการทดสอบความเป็นพิษ

ต่อเซลล์มะเร็งช่องปากของเชื้อกลุ่ม *Streptomyces* spp. โดยใช้ชีวสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการระเหิดแห้ง (lyophilization) พบว่าไอโซเลท CO4 ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.005 mg protein/ml หรือเท่ากับความเข้มข้น 5.88 mg/ml (w/v) ส่วนชีวสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อไอโซเลท WU6 ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.032 mg protein/ml หรือเท่ากับความเข้มข้น 34.83 mg/ml และชีวสารของน้ำเลี้ยงเชื้อไอโซเลท WU10 ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.023 mg protein/ml หรือเท่ากับความเข้มข้น 25.62 mg/ml ซึ่งชีวสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปากได้ดี

การทดลองในรอบปีที่ 3

1. ศึกษากลไกการตายของเซลล์มะเร็งที่ทดสอบด้วยเมตาบอไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบาซิลลัส (*Brevibacillus laterosporus* SA14)

จากการศึกษาการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งช่องปากเมื่อทดสอบด้วยโปรตีนชีวสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14 พบว่าโปรตีนชีวสารดังกล่าวสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปากได้ร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 22 ไมโครกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร และจากการศึกษาการตายของเซลล์มะเร็งช่องปาก (CLS-354) ด้วยโปรตีนชีวสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14 โดยศึกษาจากการแสดงออกของยีน *Bcl-2* และยีน *p21* ด้วยวิธี Real Time PCR พบว่าโปรตีนชีวสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14 ที่ความเข้มข้น 10-30 ไมโครกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร มีผลเพิ่มการแสดงออกของยีน *p21* เมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุมแต่ไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีน *Bcl-2* และเมื่อนำโปรตีนชีวสารจากเชื้อดังกล่าวมาทดสอบการแสดงออกของโปรตีน phospho ERK1/2 และ โปรตีน total ERK1/2 โดยวิธี Western blot analysis พบว่าโปรตีนชีวสารสามารถลดการแสดงออกของโปรตีน phospho ERK1/2 แต่ไม่มีผลต่อปริมาณ total ERK1/2 ดังนั้นจึงสรุปได้ว่ากลไกการตายของเซลล์มะเร็งช่องปากน่าจะเกิดจากการเหนี่ยวนำให้มีการลดลงของโปรตีน phospho ERK1/2 และการเพิ่มสูงขึ้นของยีน *p21* ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับการส่งเสริมให้เกิดการหยุดวงจรชีวิตของเซลล์และทำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิสในที่สุด

2. ศึกษาคุณสมบัติในการสมานบาดแผลของเมตาบอไลต์จากน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบาซิลลัส

จากการศึกษาพบว่าโปรตีนชีวสารจากแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14 ไม่มีผลกระตุ้นการเจริญของเซลล์ HaCaT อย่างไรก็ตามจากการศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์ HaCaT เข้ามาปิดบริเวณบาดแผลด้วยวิธี wound closure assay ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีองค์ประกอบของ 2% fetal bovine serum พบว่าโปรตีนชีวสารจากแบคทีเรีย *Brev. laterosporus* SA14 ทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของเซลล์ HaCaT ได้เร็วกว่าเซลล์ HaCaT ที่บ่มเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ผ่านการเลี้ยงเชื้อ

3. ศึกษาฤทธิ์ของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 5 สายพันธุ์ ในการกระตุ้นเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกัน

ผลการกระตุ้นโมโนนิวเคลียร์เซลล์ ได้แก่ ลิมโฟไซต์ โมโนไซต์ และ เซลล์เดนทริติก ด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ *P. pentosaceus* 1 L14/1 (L14/1), *P. acidilactici* L25 (L25), *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 L26 (L26), N15 (N15) และ *L plantarum* TISTR 050 (Lp) พบว่าสามารถกระตุ้นให้มีการแสดงออกของ CD69 เพิ่มขึ้นบนโมโนไซต์และลิมโฟไซต์ เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น และกระตุ้นให้มีการแสดงออกของ CD80 และ CD86 บนมายอีลอยต์เดนทริติกเซลล์แต่ไม่แตกต่างจากเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งเป็นสายพันธุ์ท้องถิ่นที่ถูกคัดเลือกมามีคุณสมบัติในการปรับสภาวะภูมิคุ้มกัน แต่ต้องศึกษาเพิ่มเติมถึงการกระตุ้นเซลล์อื่นๆในระบบภูมิคุ้มกัน รวมทั้งใช้เป็นแนวทางในการศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์อื่นๆ ต่อไป

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาสารสำคัญในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกที่ออกฤทธิ์ด้านจุลินทรีย์ ฤทธิ์ต้านมะเร็ง
2. ควรมีการศึกษาระบบการแสดงออกของจีนในแบคทีเรียกรดแลคติกในพลาสมิดชนิดต่างๆ

เอกสารอ้างอิง

1. กฤษณวัฒน์ นาคบุตร กุ้ง ดาววีระกุล อภิญญา ชูพันธ์. การศึกษาคุณสมบัติของเมตาบอไลต์จากแบคทีเรียหมายเลข SA14, SA15 หรือ SA16 ที่มีฤทธิ์ต้านสแตปฟีโลคอคคัสออเรียส ที่ดื้อยาเมธิซิลลิน (วทบ. เทคนิคการแพทย์), สำนักวิชาสหเวชศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์, มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ นครศรีธรรมราช, ประเทศไทย, 2550.
2. ชูตินันท์ ประสิทธิ์ภูมิรักษา, จันทรวดี โล่เสถียรกิจ, และศิริมา สุวรรณภูมิ. สารแบคทีเรียโอซิน ของเชื้อ *Lactobacillus* spp. ที่แยกได้จากอาหาร. วารสารวิชาการม.อ. มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี 2545; 4(2): 10-20.
3. ดวงพร คันทโชติ. อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, 2537.
4. นงนุช วนิตย์ธนาคม. วิทยาเชื้อราทางการแพทย์. กรุงเทพมหานคร : พี.บี. ฟอเรนบิกส์ เซ็นเตอร์, 2540.
5. นริกุล สุระพัฒน์และคณะ. จุลชีววิทยาทางการแพทย์. กรุงเทพมหานคร: กรุงเทพมหานคร-สาร. 2526.
6. นันทวัน อุทัยพันธ์, สุรดา เศรษฐการ, ศิริประภา สารานพคุณ, สมพร ทาบัว, ลัดดาวัลย์ สนิท, วราภรณ์ หมิ่นสัน, มณฑล เลิศคณาวณิชกุล, วรางคณา จุ่งลก. การศึกษาความเป็นพิษของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรีย *Brevibacillus laterosporus* SA14 ต่อเซลล์มะเร็งช่องปากและเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ. การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยครั้งที่ 36; 26-28 ตุลาคม 2553. ศูนย์นิทรรศการและการประชุมไบเทค. กรุงเทพฯ; 2553.
7. ปาริชาติ พุ่มขจร, พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ, และยุภารัตน์ เครือวงษา. ความสามารถในการต่อต้านจุลินทรีย์ของกรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคทีเรียโอซิน ที่ผลิตโดยแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหารหมัก. วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 2543; 28(1): 22-30.
8. ปาริชาติ พุ่มขจร และพงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ. แลคติกแอซิดแบคทีเรีย : สารยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์. วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด 2543; 12(3): 101-107.
9. ปาริชาติ พุ่มขจร และพงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ. การคัดเลือกเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สร้างแบคทีเรียโอซินจากอาหารหมัก. เทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด 2542: 11(2); 65-71.พงษ์เทพ วิไลพันธ์. แบคทีเรียโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติกในอุตสาหกรรมอาหาร. วารสารอาหาร 2546; 3: 173-179.

10. พงษ์เทพ วิไลพันธ์. แบคทีเรียโอซิน. วารสารจารย์พา 2546; 72: 16-25.
11. พรรณกร อิมวิทยา. โรคติดเชื้อรา. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์สำนักเลขาธิการ คณะรัฐมนตรี, 2543: 61-68.
12. ภัทรชัย กীরติสิน. ตำราวิทยาแบคทีเรียการแพทย์. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์ หจก.วี.เจ. พรินติ้ง; 2549.
13. มณฑล เลิศคณาวณิชกุล, วรางคณา จุ่งลก. 2552. การศึกษาคุณสมบัติของชีวสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อปรีเวียซิลลัสเลตเตอโรสปอรัส สายพันธุ์เอสเอ14 ในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อสแตปฟิโลคอคคัสออเรียสที่ดื้อยาเมธิซิลลินและความเป็นพิษของชีวสารต่อเซลล์มะเร็งลำไส้มนุษย์ HT-29 ในหลอดทดลอง, การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยครั้งที่ 35; 15-17 ตุลาคม 2552. โรงแรมเดอะไทด์ รีสอร์ท บางแสน และมหาวิทยาลัยบูรพา.
14. มอลิน จุลศิริ. ยาต้านจุลชีพ (ความรู้พื้นฐานและการประยุกต์). กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์อักษรบัณฑิต. 2532.
15. เมระณี เทียนประสิทธิ์. โรคเชื้อราที่ผิวหนัง. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์กรุงเทพเวชสาร, 2527: 159-177.
16. ยุพิน สังวรินทะ และคณะ. เกษขวิทยา. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพมหานคร : ภาควิชา เกษขวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2539; 538-540.
17. ยาวภา สุวดี. สารกันเสียชีวภาพจาก lactic acid bacteria. เข้าถึงเมื่อวันที่ 9 ธันวาคม พ.ศ.2552 (บริการสารสนเทศออนไลน์) สืบได้จาก home page: url : <http://202.129.59.198/rdi/html/LAB.html>
18. วิชาญ วิทยาศัย และประคอง วิทยาศัย. เวชปฏิบัติของผู้ติดเชื้อเอดส์. กรุงเทพมหานคร : บริษัท โอ.เอส.พรินติ้งเฮาส์ จำกัด, 2540.
19. วิลาวรรณย์ เจริญจิระตระกูล. ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของแบคทีเรียแลคติกที่แยกจากอาหารหมักพื้นบ้านภาคใต้ของไทย. สงขลานครินทร์ วทท. 2543; 22(2): 177-189.
20. ไศภิต ธีราช. การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชสมุนไพรบางชนิดที่มีผลในการยับยั้งเชื้อรา. ภาควิชาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคนิคการแพทย์); คณะเทคนิคการแพทย์. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2542.
21. สุมณฑา วัฒนสินธุ์. จุลชีพเพื่อสุขภาพ. วารสารจารย์พา 2542; 65: 41-44.
22. สุขเมธ เนาว์รุ่งโรจน์ มณฑล เลิศคณาวณิชกุล วรางคณา จุ่งลก ภูวดล บางรักษ์. การแยกและคัดเลือกรวมแบคทีเรียกลุ่ม Actinomycetes จากตัวอย่างดินที่ผลิตชีวสารต้านการเจริญของแบคทีเรีย methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* และฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์. การประชุมวิชาการการนำเสนอผลงานวิจัยระดับ

- บัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 2 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพมหานคร; 23-24 เมษายน 2552: 3-10.
23. อภิราม ส่องศรี และ มณฑล เลิศคณาวณิชกุล. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Candida albicans* และ *Cryptococcus neoformans* ของสารสกัดสมุนไพร. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 2545 (ตุลาคม-ธันวาคม); 44(4): 250-260.
 24. Abbas AK, Litchman AH, and Pillai S. Cellular and Molecular immunology. 6th ed., Philadelphia: Saunder. 2007
 25. Alakomi H-L et. al. Lactic Acid Permeabilizes Gram-Negative Bacteria by disrupting the Outer Membrane. Appl Environ Microbiol 2000; 66(5): 2001-2005.
 26. Araya T, Ishinachi N, Shimamura S, Tanaka T and Takahashi H. Genetic and Molecular analysis of the *rpoD* gene from *Lactobacillus lactis*. Biosc Biotech Biochem 1993; 57: 88-92.
 27. Bade ML and Hickey K. Classification of enzymes hydrolyzing chitins. In : Gudmund S-B, Anthonson T and Sandford P, International Conference on Chitin and Chitosan (4th : 1988 : Trondheim) London : Elsevier Appl Sci 1988; 835 p.
 28. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ et al. Immunobiology of dendritic cells. Annu. Rev. Immunol 2000; 18: 767-811.
 29. Bassler BL, Yu C, Lee YC and Roseman S. Chitin utilization by marine bacteria : degradation and catabolism of chitin oligosaccharides by *Vibrio Furnissii*. J Biol Chem 1991; 266(36): 24276-24286.
 30. Batish VK, Roy U, Lal R and Grover S. Antifungal attributes of lactic acid bacteria – A review. Cri Rev Biotechnol 1997; 17(3): 209-225.
 31. Boot RG, Renkema H, Strijland A and Van Zonneveld AJ. Cloning of a cDNA encoding chitotriosidase, a human chitinase produced by macrophage. J Biol Chem 1995; 44(3): 26252-26256.
 32. Botes M, Loos B, van Reenen C and Dicks L. Adhesion of the probiotic strains *Enterococcus mundtii* ST4SA and *Lactobacillus plantarum* 423 to Caco-2 cells under conditions simulating the intestinal tract, and in the presence of antibiotics and anti-inflammatory medicaments. Arch Microbio 2008; 190: 573-84.

33. Brigidi P, Gonzakez-Veray RA, Rossi M, Matteuzzi D. Study of stability of recombinant plasmids during the continuous culture of *Bacillus sterothermophilus* NUB3621 in nonselective medium. *Biotechnol Bioengineer* 1996; 53: 507-514.
34. Cabo ML, Braber AF and Koenraad P. Apparent antifungal activity of several lactic acid bacteria against *Penicillium discolor* is due to acetic acid in the medium. *J food Protect* 2002; 65: 1309-1316.
35. Christensen HR, Frakiaer H, PestkaJJ, Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *J immunol* 2002; 168: 171-8.
36. Chuang L, Wu KG, Pai C, Hsieh PS, Tsai JJ, Yen JH and Lin MY. Heat-killed cells of lactobacilli skew the immune response toward T helper 1 polarization in mouse splenocytes and dendritic cell-treated T cells. *J. Agric. Food Chem.* 2007; 55: 11080-6.
37. De Sousa FA, Paradella TC, Carvalho YR, Rosa LE. Comparative analysis of the expression of proliferating cell nuclear antigen, p53, bax, and *Bcl-2* in oral lichen planus and oral squamous cell carcinoma. *Ann Diagn Pathol* 2009; 13(5): 308-12.
38. De Vos WM. Gene expression systems for lactic acid bacteria. *Curr Opin Microbiol* 1999; 2: 289-295.
39. Dielbandhoesing KS, Zang H, Carop HL, Varrt DV and Klis MF. Specific cell wall protein confer resistance to nisin upon yeast cell. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64: 4047-4052.
40. Doi RH. Regulation of gene expression; page 15-39. In: Strips UN and Yasbin RE (ed.). *Modern Microbiol Genetics*. USA: John-Wiley&Sons, Inc. 1991, 548 pp.
41. Elmadfa I, Klein P, Meyer AL. Immune-stimulating effects of lactic acid bacteria in vivo and in vitro. *Proc Nutr Soc* 2010; 69(3): 416-20.
42. Escott MG and Adams JD. Chitinase activity in human serum and leukocytes. *Infect Immun* 1995; 63: 4770-4773.
43. Fink LN, Frokiaer H. Dendritic cells from Peyer's patches and mesenteric lymphnodes differ from spleen dendritic cells in their response to commensal gut bacteria. *Scand J Immunol* 2008; 68: 270-9.

44. Felse AP and Panda T. Regulation and cloning of microbial chitinase genes. Appl Microbiol Biotechnol 1999; 51: 141-151.
45. Flach J, Pilet P-E and Jolles P. What's new in chitinase research?. Experientia 1992; 48: 701-716.
46. Foligne B, Zoumpopoulou G, Dewulf J, Younes AB, Chareyre F, Sirard JC. A key role of dendritic cells in probiotic functionality. PLoS ONE 2007; 2(3): e313.
47. Fuchs RL, McPherson SA and Drahos DJ. Cloning of a *Serratia marcescens* gene encoding chitinase. Appl Environ Microbiol 1986; 51(3): 504-509.
48. Galdeano CM, Perdigon G. The probiotic bacterium *Lactobacillus casei* induces activation of the gut mucosal immune system through innate immunity Clin Vaccine Immunol. 2006; 13(2): 219-26.
49. Gamel PH and Piot JC. Characterization and properties of a novel plasmid vector for *Bacillus thuringiensis* displaying compatibility with host plasmids. Gene 1992; 120: 17-26.
50. Gerald W. Tannock. Adherence of lactobacilli to epithelial surfaces 32-34. In: Brian JB., editor. The lactic acid bacteria. Cambridge : Elsevier applied science, 1992.
51. Gruss A. and Ehrlich D. Insertion of foreign DNA into plasmids from Gram-positive bacteria induces formation of high-molecular-weight plasmid multimers. J Bacteriol 1988; 3: 1183-1190.
52. Gill HS, Rutherford KJ, Prasad J, Gopal PK. Enhancement of natural and acquired immunity by *Lactobacillus rhamnosus* (HN0001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019). Brit. J. Nutr 2000; 83: 167–76.
53. Gill HS, Guarner F. Probiotics and human health: a clinical perspective. Postgrad Med J. 2004; 80(947): 516-26.
54. Goldstein DR. Toll-like receptors and other links between innate and acquired alloimmunity Curr Opin in Immunol 2004; 16: 538–544.
55. Hackman RH and Goldberg M. New substrates for use with chitinases. Analyt Biochem 1964; 8: 397-401.

56. Hagenmaier H, Jaschke KH, Santo L, Scheer M, Zähler H. Metabolic products of microorganisms. Tirandamycin B(author's transl)]. Arch Microbiol 1976; 109: 65-74.
57. Hart AL, Lammers K, Brigidi P, Vitali B, Rizzello F, Gionchetti P, et al . Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria.Gut 2004; 53(11): 1602-9.
58. Hiramatsu Y, Hosono A, Takahashi K, Kaminogawa K. Bifidobacterium components have immunomodulatory characteristics dependent on the method of preparation. Cytotechnol 2007; 55: 87-79.
59. Hoskin DW, Ramamoorthy A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. Biochim Biophys Acta 2008; 1778(2): 357-75.
60. Huang X, Tian B, Niu Q, Yang J, Zhang L, Zhang K. An extracellular protease from *Brevibacillus laterosporus* G4 without parasporal crystals can serve as a pathogenic factor in infection of nematodes. Res Microbiol 2005; 156(5-6): 719-27.
61. Iwasaki A, Kelsall BL. Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells.J Exp Med 1999; 190(2): 229-39
62. Jang A, Jo C, Kang Ks, Lee M. Antimicrobial and human cancer cell cytotoxic effect of synthetic angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide. Food- chemistry 2008; 107: 327-36.
63. Jarrossay D, Napolitani G, Colonna M, Sallusto F, Lanzavecchia A. Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. Eur J Immunol 200; 31(11): 3388-93.
64. Jeuniaux C. Chitinase. In : Colowick SP, Kaplan NO (ed.). Meth Enzymol 1966; 8: 645-650.
65. Kaila M, Isolauri E, Soppi E, Virlanen E, Laine S, Arvilommi H. Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human Lactobacillus strain. Pediatr. Res 1992; 32: 141-4.
66. Karrasch T, Jobin C. Wound Healing Responses at the Gastrointestinal Epithelium: a Close Look at Novel Regulatory Factors and Investigative Approaches. Z Gastroenterol 2009;47(12):1221-9.

67. Kern DL, Hokanson GC, French JC, Dalley NK. Guanine 7-N-oxide, A novel antitumor antibiotic. J Antibiot 1985; 38: 572-4.
68. Kim SA, Kim SW, Chang S, Yoon JH, Ahn SG. 5'-nitro-indirubinoxime induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human KB oral carcinoma cells. Cancer Lett 2009; 274(1): 72-7.
69. Kimoto M, Kurisaki J, Tsuji N, Ohmomo S, Okamoto T. Lactococci as probiotic strains: adhesion to human enterocyte-like Caco-2 cells and tolerance to low pH and bile. Lett Appl Microbiol. 1999; 29: 313–6.
70. Kitazawa H, Toba T, Itoh T, Kumano N, Adachi S. Antitumoral activity of smile-forming encapsulated Lactobacillus lactis spp. Cremoris isolated from Scandinavian røp sour milk 'villi'. Zootechnical Science. 1990; 277-83.
71. Kless H, Ditré Y, Chet I and Oppenheim AB. Cloning of the gene encoding for chitinase of *Serratia marcescens*. Mol Gen Genet 1989; 217: 471-473.
72. Kollar R, Petrakova E, Ashwell G, Robbins WP and Cabib E. Architecture of the yeast cell wall : the linkage between chitin and β -(1,3) glucan. J Biol Chem 1995; 270: 1170-1178.
73. Kordel M and Sahl H-G. Susceptibility of bacterial, eukaryotic and artificial membranes to the disruptive action of the cationic peptides Pep5 and nisin. FEMS Microbiol Lett 1986; 34: 139-144.
74. Korynevskaya A, Heffeter P, Matselyukh B, Elbling L, Micksche M, Stoika R, et al. Mechanisms underlying the anticancer activities of the angucycline landomycin E. Biochem Pharmacol 2007; 74: 1713-26.
75. Kramer KJ, Muthukrishnan S. Insect chitinase: Molecular biology and potential used as biopesticides. Insect Biochem Molec Biol 1997; 27(11): 887-900.
76. Lee EM, Park HR, Hwang JH, Park DJ, Chang KS, Kim CJ. Mithramycin inhibits etoposide resistance in glucose-deprived HT-29 human colon carcinoma cells. J Microbiol Biotechnol 2007; 17: 1856-61.
77. Lee Y, Lee TS. Enhancement in ex vivo phagocytic capacity of peritoneal leukocytes in mice by oral delivery of various lactic-acid-producing bacteria. Curr Microbiol 2005; 50(1): 24-7.
78. Lertcanawanichakul M, Wiwat C, Bhumiratana A, Dean DH. Expression of chitinase-encoding genes in *Bacillus thuringiensis* and Toxicity of

- engineered *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* toward *Lymantria dispar*. *Current Microbiology* 2004; 48(3): 175-81.
79. Lewis DL, Hodson RE, Freeman LF. Effect of microbial community interactions on transformation rate of xenobiotic chemical. *Appl Environ Microbiol* 1984; 43: 561-565.
 80. Magnusson J and Schnurer J. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryneformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67(1): 1-5.
 81. Magnusson J, Strom K, Roos, S, Sjogren J and Schnurer J. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 2003; 219: 129-135.
 82. Marcilla A, Valentin E and Sentandreu R. The cell wall structure : developments in diagnosis and treatment of candidiasis. *Internatl Microbiol* 1998; 1: 107-116.
 83. Mari YM, Espinoza AES, Ubieta R., Batista OF and Fernandez MT. Effect of the selection marker on the viability and plasmid stability of two human proteins with neurotrophic action expressed in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commu* 1999; 258: 29-31.
 84. Mohamadzadeh M, Olson S, Kalina WV, Ruthel G, Demmin GL, Warfield KL, et al. Lactobacilli activate human dendritic cells that skew T cells toward T helper 1 polarization. 2005; 102(8) :2880-5.
 85. Molsno J, Duran A and Canbib E. A rapid and sensitive assay for chitinase using tritiated chitin. *Analyt Biochem* 1977; 83: 648-656.
 86. Morris ON. A 2-year study of the efficacy of *Bacillus thuringiensis* –chitinase in a spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*) control. *Can Entomol* 1976; 108: 225-233.
 87. Niess JH and Reinecker HC. Dendritic cells in the recognition of intestinal microbiota. *Cell Microbiol* 2006; 8(4): 558-64.
 88. O'Brien and Colwell RR. A rapid test for chitinase activity that uses 4-Methylumbelliferyl-N-Acetyl- β ,D-Glucosaminide. *Appl Environ Microbiol* 1987; 53: 1718-1720.
 89. Old RW and Primrose SB. Principles of gene manipulations 4th edn. Oxford: Blackwell Scientific Publication. 1989.

90. Ostroff, G.R. and Pene, J.J. 1984. Molecular cloning with bifunctional vector in *Escherichia coli* to *Bacillus subtilis*. Mol Gener Genet 1984; 193: 306-311.
91. Palucka K and Banchereau J. Dendritic cells: a link between innate and adaptive Immunity. J Clin Immunol 1999; 19: 12-25.
92. Park IS, Jo JR, Hong H, Nam KY, Kim JB, Hwang SH, et al. Aspirin induces apoptosis in YD-8 human oral squamous carcinoma cells through activation of caspases, down-regulation of Mcl-1, and inactivation of ERK-1/2 and AKT. Toxicol In Vitro 2010; 24(3): 713-20.
93. Ramiah K, van Reenen CA, Dicks L M.T. Surface-bound protein of *Lactobacillus- plantarum* 423 that contribute to adhesion of Caco-2 cells and their role in competitive exclusion and displacement of *Clostridium sporogenes* and *Enterococcus faecalis*. Res Microbiol. 2008; 159: 470-75.
94. Rast MD, Baumgartner D, Mayer C and Hollenstein OG. Cell wall-associated enzymes in fungi. Phytochemistry 2003; 64: 339-366.
95. Reddy KV, Yedery RD, Aranha C. Antimicrobial peptides: premises and promises. Int J Antimicrob Agents 2004; 24(6): 536-47.
96. Regev A, Keller M, Strizhov N, Sneh B, Prudovsky E, Chet I, Ginzberg I, Koncz-Kalman Z, Koncz C, Schell J and Zilberstein A. Synergistic activity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin and a bacterial endochitinase against *Spodoptera littoralis* larvae. Appl Environ Microbiol 1996; 62: 3581-3586.
97. Resscigno M, Di Sabatino A. Dendritic cells in intestinal homeostasis and disease. J Clin Invest. 2009; 119(9): 2441-50.
98. Richards AG and Richards PA. The Peritrophic membranes of insects. Annu Rev Entomol 1977; 22: 219-140.
99. Richard GE. Organic acid 212-213. In: Brian JB., editor. The lactic acid bacteria. Cambridge: Elsevier applied science, 1992.
100. Roberts WK and Selitrennikoff CP. Plant and Bacterial chitinases differ in antifungal activity. J Gen Microbiol 1988; 134: 169-176.
101. Rook GAW and Brunet LR. Microbes, immunoregulation and the gut. Gut 2005; 54: 317-20

102. Sambrook J., Fritsch Ef and Maniatis T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
103. Selitrennikoff C. Antifungal proteins. Appl Environ Microbiol 2001; 67(7): 2883-2894.
104. Shin HK, Kim J, Lee EJ, Kim SH. Inhibitory effect of curcumin on motility of human oral squamous carcinoma YD-10B cells via suppression of ERK and NF-kappaB activations. Phytother Res 2010; 24(4): 577-82.
105. Shimizu T, Nomoto K, Yokokawa T, Mutai M. Role of colony stimulating activity in antitumor activity of *Lactobacillus casei* in mice. J Leukoc Biol. 1987; 42: 204-12.
106. Smirnoff WA, Randall AP, Martineau R, Haliberton W and Juneau. Field test of the effectiveness of chitinase additive to *Bacillus thuringiensis* Berliner against *Choristoneura fumiferana* (Clem.). Can J For Res 1973; 3: 228-236.
107. Smirnoff WA. Three years of aerial field experiments with *Bacillus thuringiensis* plus chitinase formulation against the spruce bud worm. J Invert Pathol 1974; 24: 344-348.
108. Smirnoff WA. Effect of chitinase on the action of *Bacillus thuringiensis*. Can Entomol 1971; 103: 1829-1831.
109. Smirnoff WA. Results of tests with *Bacillus thuringiensis* and chitinase on larvae of the spruce budworm. J Invert Pathol 1973; 21: 116-118.
110. Smits HH, Engering A, van der Kleij D, de Jong EC, Schipper K, van Capel TM, et al. Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin. J Allergy Clin Immunol 2005; 115(6): 1260-7.
111. Sneh B, Schuster S and Gross S. Improvement of the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* var *entomocidus* on larvae of *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera, Noctuidae) by addition of chitinolytic bacteria, a phagostimulant and UV-protectant. Z Ang Entomol 1983; 96: 77-83.

112. Soto-gil RW and Zyskind JW. N,N'-diacetylchitobiase of *Vibrio harveyi* : primary structure, processing, and evolutionary relationship. J Biol Chem 1989; 264(25): 14778-14783.
113. Spiers AS. Deoxycorymycin (pentostatin): clinical pharmacology, role in the chemotherapy of cancer, and use in other diseases. Haematologia (Budap) 1996; 27: 55-84.
114. Stevens KA, Sheldon BW, Klapes NA and Klaenhammer TR. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* and other gram-negative bacteria. Appl Environ Microbiol 1991; 57: 3316-3315.
115. Streips UN. Regulation system; page 1-13. In: Streips UN and Yasbin RE (ed.). Modern Microbiol Genetics. USA: John-Wiley&Sons, Inc. 1991, 548 pp.
116. Tantaimavanich S, Pantuwatana S, Bhumiratana A and Panbangred W. Cloning of chitinase gene into *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* for enhanced insecticidal activity. J Gen Appl Microbiol 1997; 43(6): 341-347.
117. Tronsmo A and Harman GE. Detection and quantification of N-acetyl- β -D-glucosaminidase, chitobiosidase and exochitinase in solutions and on gels. Analt Biochem 1993; 208: 74-79.
118. Teather RM and Wood PJ. Use of Congo Red-Polysaccharide interaction in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. Appl Environ Microbiol 1982; 43(4); 777-780.
119. Thirabunyanon M, Boonprasom P, Niamsup P. Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from fermented dairy milks on antiproliferation of colon cancer cells. Biotechnol Lett. 2009; 31(4): 571-6.
120. Trudel J and Asselin A. Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. Analyt Biochem 1989; 178:362-366.
121. Ueda M, Kawagushi T and Arai M. Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene encoding chitinase II from *Aeromonas* sp. No. 10S-24. J Ferment Bieng 1994; 78(3): 205-211.
122. Vaarala O. Immunological effects of probiotics with special reference to lactobacilli. Clin Exp Allergy 2003; 33(12): 1634-40.
123. Vassileva-Atanassova A., Mironova R., Nacheva G. and Ivanovl. N-terminal methionine in recombinant proteins expressed in two different *Escherichia coli* strains. J Bacteriol 1999; 69: 63-67.

124. Walzer T, Dalod M, Robbins SH, Zitvogel L, Vivier E. Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". *Blood* 2005; 106(7): 2252-8.
125. Watanabe K, Hamasaki M, Nakashima Y, Kakita Y and Miake F. High-frequency transformation of *Lactobacillus casei* with plasmid pHY300PLK by electroporation. *Curr Microbiol* 1994; 29: 217-222.
126. Wiwat C, Lertcanawanichakul M, Siwayapram P, Pantuwatana S and Bhumiratana A. Expression of chitinase encoding genes from *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas maltophilia* in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Gene* 1996; 179: 119-126.
127. Wortman AT, Somerville CC and Colwell RR. Chitinase determinations of *Vibrio vulnificus*: gene cloning and application of a chitinase probe. *Appl Environ Microbiol* 1986; 52: 142-145.
128. Yoneda K, Yamamoto T, Ueta E, Osaki T. Induction of cyclin-dependent kinase inhibitor *p21* in vesnarinone-induced differentiation of squamous cell carcinoma cells. *Cancer Lett* 1998; 133(1): 35-45.
129. Zheng Z, Takahashi M, Narita M, Toba K, Liu A, Furukawa T, *et al.* Generation of dendritic cells from adherent cells of cord blood by culture with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-4, and tumor necrosis factor-alpha. *J Hematother Stem Cell Res* 2000 ;9(4): 453-64.
130. Zoumpopoulou G, Tsakalidou E, Dewulf J, Pot B, Grangette C. Differential crosstalk between epithelial cells, dendritic cells and bacteria in a co-culture model. *Inter Jof Food Microbiol* 2009; 131: 40–51.

Minimum inhibitory concentration (MIC) of crude preparations of *Brevibacillus laterosporus* SA14 bioactive material compared to vancomycin and oxacillin, against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Kittisak Chawawisit · Monthon Lertcanawanichakul

Received: 23 October 2007 / Accepted: 19 March 2008 / Published online: 29 March 2008
© Springer Science+Business Media B.V. 2008

Abstract Secondary metabolites, particularly bioactive compounds, from probiotic bacteria, are good candidates for replacing antibiotics to which bacteria have become resistant. In order to compare bioactive crude material from strain SA14 of *Brevibacillus laterosporus* with two antibiotics, the MICs of this bioactive crude and those of antibiotics vancomycin and oxacillin, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), were determined. The result indicated that the MIC (3.6–19.2 µg/ml) of bioactive crude was higher than vancomycin (MIC = 1.28–2.56 µg/ml) when tested against MRSA. Interestingly, all tested strains of MRSA were susceptible to bioactive crude and were approximately 5.2-fold more potent than oxacillin (MIC > 100 µg/ml). Its activity against MRSA gives support for further evaluation, and the development of this substance for therapeutic use.

Keywords *Brevibacillus laterosporus* · D-test · MIC · MRSA

Introduction

The gram-positive bacterium, *Staphylococcus aureus*, has emerged as an important cause of hospital-acquired and community-acquired infections (Rathore and Kline 1989; Layton et al. 1995; Herold et al. 1998; Fluckiger and Widmer 1999; O'Brien et al. 1999). Skin and soft-tissue infections are the most common conditions caused by this bacterium (Drinkovic et al. 2001; Dominguez 2004),

followed by nosocomial pneumonia and urinary tract infections, including blood stream infections (NNIS 1998). Widespread use of broad-spectrum antimicrobial agents and the limited potency of some agents has exerted heavy selective pressure in hospital environments; thus, re-emergence of resistant gram-positive pathogens; particularly methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), is of increasing concern. This trend is complicated by the increasing prevalence of MRSA among nosocomial isolates (Holmberg et al. 1987; Shlaes et al. 1997; Abramson and Sexton 1999; Bonten and Weinstein 1999; File 1999; Rubin et al. 1999). Some investigations suggest that MRSA infections are associated with prolonged hospitalizations, increased mortality, and increased costs, compared with infections due to MRSA; however, such comparisons may be confounded by an increased incidence of comorbid conditions among patients with MRSA infection (Abramson and Sexton 1999; Rubin et al. 1999). Unfortunately, therapeutic options for patients with MRSA infections are limited. The primary option is intravenous vancomycin therapy, because other antimicrobials, including the fluoroquinolones and third-generation cephalosporins, are ineffective against MRSA (Fridkin et al. 1999). The recent emergence of *S. aureus* with intermediate resistance to glycopeptides and heteroresistant MRSA (Sieradzki et al. 1998, 1999; Li et al. 2001) suggests that full glycopeptide resistance may soon develop and limit the usefulness of vancomycin (Wong et al. 1999). The macrolide-lincosamide-streptogramin group B (MLS_B) antibiotics have been used to treat patients with MRSA infection. However, widespread use has led to an increase in the number of MRSA strains resistant to MLS_B antibiotics, either constitutive (MLS_{Bc}) or inducible (MLS_{Bi}), (Schreckenberger et al. 2004), which underscores the need for new antibiotics. New antimicrobial agents will thus have to be developed in order to treat MRSA infections. New and

K. Chawawisit · M. Lertcanawanichakul (✉)
School of Allied Health Sciences and Public Health, Walailak
University, Nakhon-Si-Thammarat 80161, Thailand
e-mail: lmonthon@wu.ac.th

more efficient antibiotics will have to be sought continually because of the capacity of microorganisms to survive their action. Many different strategies for finding new antimicrobial agents are actually proposed and the area of antibacterial peptides is under intense investigation. Among the most promising antibacterial peptide are bacteriocins, produced by probiotic bacteria (Wu et al. 2005).

Bacillus is an interesting genus to be investigated for antimicrobial activity because *Bacillus* species produce a large number of peptides with biological activities. For example, thuricin 7, thuricin 439, and entomocidin 9 were isolated from members of the genus *Bacillus* (Cherif et al. 2001; 2003). According to our previous observation, *Brevibacillus laterosporus* SA14, an aerobic spore-forming, gram-positive bacterium, could produce secondary metabolites which could show antibacterial activity, including anti-MRSA activity. The purpose of this study was to compare the efficiency of culture broth or bioactive crude of strain SA14, with those of vancomycin, and oxacillin against 72 strains of clinical isolates of MRSA.

Materials and methods

Bacterial strains, media, and culture conditions

The anti-MRSA-producing strain SA14 was isolated from an air sample at Walailak University Campus, Thailand, and cultured in Luria-Bertani (LB: Scharlau) medium at 37°C. The bacterial strain designated with TISTR number was obtained from the Thailand Institute of Scientific and Technological Research, Bangkok, Thailand. The clinical strains of MRSA were obtained from two hospitals in Thailand, Maharaj Nakhon-Si-Thammarat hospital, and Chumphon Khet Udomsak hospital. All strains, used as indicator strains, were grown in Mueller-Hinton (M-H: Merck) medium, incubated at 37°C.

Antibiotic susceptibility test

Antibiotic susceptibilities of MRSA isolates were determined by the disk diffusion method. Oxacillin susceptibility was performed as previously described by Huang et al. (2000), and *S. aureus* TISTR 517 was used as the control strain for the disk diffusion method. The following antibiotic disks from oxoid were tested at the following concentrations: oxacillin (1 µg), clindamycin (CL)(2 µg) and erythromycin (ER)(15 µg). Antibiotic susceptibilities were studied by disc diffusion methods based on the guidelines from the Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI, formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards) criteria (CLSI 2006).

Identification of MLS_Bi phenotype by D-test

To identify the MLS_Bi phenotype in CL-sensitive (CL^S) and ER-resistant (ER^R) isolates, we performed the D-test. Isolates were eventually plated on a M-H medium plate at a McFarland concentration of 0.5, and disks of CL (2 µg) and ER (15 µg) were placed at a distance of 18 mm apart from the edge as recommended by CLSI (2006). The plates were incubated at 37°C for 18–24 h and observed for blunting of the CL zone of inhibition or D zone. The presence of a D-shaped zone was reported as a positive test for MLS_Bi phenotype, and absence of a D-shaped zone was considered as a negative test.

Detection of anti-MRSA activity

For the detection of anti-MRSA activity, the *Brev. laterosporus* SA14 preserved in 15% glycerol, at –80°C, was first streaked onto the surface of an LB medium plate, and incubated for 24 h at 37°C. A single colony was inoculated in 5 ml of LB medium, and incubated for 24 h at 37°C. The overnight culture was adjusted with sterile phosphate buffer, approximately to a 0.5 McFarland standard (NCCLS 1991). Then, the cell suspension was transferred to a LB medium (40 ml in 250-ml shake flask) at an inoculum of 2% (v/v) for subculture. The experiments were run at a stirring speed of 150 rev/min (orbital-shaker incubator: Cocono), 37°C. Then, after 24 h of incubation, this strain was separated from the culture broth by centrifugation (4°C, 10,000g, 10 min: Eppendorf centrifuge 5804 R) and peptides in the culture broth were precipitated at 4°C overnight with ammonium sulfate of 50% saturation. The resulting precipitate (bioactive crude) was harvested by centrifugation (4°C, 10,000g, 10 min), resuspended in 4 ml of 50 mM phosphate buffer (pH 7.2), dialysed against the same buffer at 4°C for 24 h. The bioactive crude was stored at –80°C for further study. The concentration of protein in the culture broth or bioactive crude was measured by Bradford method, using the Bio-Rad reagent kit. The concentration of protein was plotted against the standard curve [Bovine serum albumin (BSA), 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/ml].

The swab-paper disc technique (Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn 1998) was used for detection of anti-MRSA activity. Approximately 1.5×10^6 cells of the MRSA strains grown in M-H medium were used for the testing. Each strain was spread with a swab on M-H medium plates. Sterile filter paper discs (Albet) of 12 mm diameter were placed on the surface of the agar plates containing the MRSA strains. 60 µl each of culture broth or bioactive crude was dropped on the paper discs. After overnight incubation at 37°C, the plates were checked for inhibition zones around the paper discs.

Anti-MRSA activity was measured by agar well diffusion assay with plates pre-seeded with a clinical isolate of MRSA or *S. aureus* TISTR 517 as described by Cintas et al. (1995). The agar wells were filled with 80 μ l serial two-fold dilutions of culture broth or bioactive crude, and corresponding plates were incubated at 37°C overnight. One arbitrary unit (AU) was defined as the reciprocal of the highest dilution yielding a definite zone of inhibition on the MRSA lawn. The titer was calculated using the formula $AU/ml = 2^x \times 1000/V$; where x is the number of the last dilution showing inhibition and V is the volume of the culture broth or bioactive crude (μ l) (Chumchalova et al. 1995).

Determination of the MIC

Vancomycin hydrochloride and oxacillin sodium salt monohydrate were obtained from Sigma (St. Louis, Mo.). Stock solutions consisted of 200 μ g of vancomycin or oxacillin per ml in sterile double-distilled water and the initial concentration of proteins in culture broth or bioactive crude, were 274 μ g/ml and 156 μ g/ml, respectively.

The MICs were determined by use of a microplate assay (Parrot et al. 1989). The MRSA strains were grown to mid-log phase in M-H medium at 37°C. Each MRSA strain was correspondingly adjusted, approximately to a 0.5 McFarland standard, then a ten-fold serial dilution was made to dilute out the cells, approximately residue of 1.5×10^6 cells.

Two-fold dilutions of culture broth, bioactive crude, vancomycin, and oxacillin were freshly prepared with microtiter plate (Nunc), the wells finally containing 100 μ l of M-H medium with or without (control) and inhibitor. One-hundred microliters of 1.5×10^6 cells MRSA suspension was added to each well to a final volume of 200 μ l. The plates were incubated in moist chamber for 24 h at 37°C. After the incubation period, the optical density (OD) was measured at 690 nm with a microtiter plate reader (Biomérieux). The MIC was calculated from the highest dilution showing complete inhibition of the MRSA strains. The MIC determinations were repeated independently three times, always with *S. aureus* TISTR 517 as a control.

Results

Detection of anti-MRSA activity

ER^R was detected in 100% of the clinical isolates (72 of 72 isolates) in MRSA. The D-test was done to determine the MLS_Bi resistance of the CL^S and ER^R isolates. Among the total 72 clinical isolates of MRSA isolates, 46 (63.9%) were MLS_BC, and the D-test showed that 26 (36.1%) of these clinical isolates had the MLS_Bi phenotype.

The anti-MRSA activity of culture broth or bioactive crude of *Brev. laterosporus* SA14 was determined by using the swab-paper disc technique. Both culture broth and bioactive crude were shown to have anti-MRSA activity against all the clinical isolates of MRSA tested. Therefore, we have confirmed the usefulness of this bioactive crude for further study.

Determination of the MICs

Bioactive crude, (peptides), of strain SA14 was precipitated from the culture broth by ammonium sulfate, and its anti-MRSA activity is shown in Table 1. Against all the strains of MRSA tested, the MIC of culture broth or bioactive crude of strain SA14 was higher than that of vancomycin, but lower than that of oxacillin. As judged by the antimicrobial disk susceptibility test, most of the clinical isolates of MRSA which were more resistant to oxacillin, also demonstrated resistance to clindamycin, either MLS_Bi or MLS_BC, but remained sensitive to culture broth, bioactive crude and vancomycin. The culture broth and bioactive crude showed the MIC range, 3.6–19.2 μ g/ml against all strains of clinical isolates of MRSA (Table 2).

Discussion

Increasing frequency of MRSA infections and changing patterns in antimicrobial resistance have led to renewed interest in the use of antimicrobial agents to treat such infections (Gadepalli et al. 2006). Intravenous vancomycin remains the standard therapy, but concerns about *S. aureus* strains with reduced sensitivity to vancomycin and about emerging prevalence of these organisms in the community (Layton et al. 1995; Herold et al. 1998) may limit the usefulness of vancomycin in the future. Although the new antimicrobial agents may lead to use for curing those MRSA infections, they are only available in some countries in parenteral formulations, which may necessitate prolonged hospitalizations or costly and inconvenient home health care arrangements (Stevens et al. 2002).

In vitro, MLS_Bi can be detected in erythromycin-resistant *S. aureus* through the use of a double disk diffusion assay (D-test) (Weisblum 1995; Schmitz et al. 2000), results in a D-shaped blunting of a circular zone of inhibition around CL disk on the side facing the ER disk. Without the double-disc test, all the *S. aureus* isolates with inducible clindamycin resistance would have been misclassified as CL^S, resulting in an underestimated CL resistance rate (Schreckenberger et al. 2004; Gadepalli et al. 2006). Failure to identify in vitro inducible CL resistance when the ER^R CL^S phenotype is detected may lead to clinical failure of CL therapy (Drinkovic et al. 2001).

Table 1 Anti-MRSA activity recoveries of bioactive crude of strain SA14

Stage	Culture broth	Ammonium sulfate precipitation
Volume (ml)	40	4
Specific activity (AU/ml)	100	400
Total activity (AU)	4000	1600
Recovery (%)	100	40

Table 2 Activities of bioactive crude of strain SA14, vancomycin, and oxacillin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

Organisms (no. of strains)	<i>Staphylococcus aureus</i> TISTR 517	MRSA Inducible CL resistance MLS _{Bi} (26)	MRSA Constitutive CL resistance MLS _{Bc} (46)
MIC ^a (μg/ml) of			
Culture broth	16 (0.25–137)	16 (0.25–137)	16 (0.25–137)
Crude extracts	19.2 (0.15–86)	19.2 (0.15–86)	19.2 (0.15–86)
Vancomycin	1.28 (0.04–100)	1.28 (0.04–100)	2.56 (0.04–100)
Oxacillin	1.28 (0.04–100)	>100	>100

TISTR, Thailand Institute of Scientific and Technological Research, Bangkok, Thailand

CL, Clindamycin

^a The MIC data are expressed as the median (range) obtained from at least three independent repetitions for each strain

Bioactive compounds produced by probiotic bacteria have been developed in order to treat bacterial infections (Cintas et al. 1995; Wu et al. 2005), and are one of many different strategies for finding new antimicrobial agents (Snell et al. 1955; Carr et al. 2002). Interestingly, bacteriocins produced by *Bacillus* and other microorganisms are the most promising antibacterial peptides (Katz and Demain 1977; Jack et al. 1995; Cherif et al. 2001). An antibacterial peptide with cyanolytic activity was isolated from the IGM52 strain of the *Brev. laterosporus* (Loloatin et al. 2002). The bioactive crude of the SA14 strain of *Brev. laterosporus* was shown here to be active in vitro against MRSA. Indeed, *Brev. laterosporus* SA14 inhibited many indicator strains (*Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*) when using a cross-streak method (data not shown). Moreover, the species has long been known to include strains toxic to certain invertebrate organisms (Rivers et al. 1991; Orlova et al. 1998).

The method used here for MIC determination was adopted to compare the activities of the four substances in microtiter plate (Parrot et al. 1989) determinations and the results were not intended for immediate clinical invention, as is often the case in hospital laboratories. The MICs obtained for oxacillin against *S. aureus* TISTR 517 varied from 0.32 to 0.64 μg/ml, within two-fold of the acceptable quality control range (0.2–0.5 μg/ml) recommended by CLSI (2006). For vancomycin, the MICs were 1.28 μg/ml against *S. aureus* and 1.28–2.56 μg/ml against MRSA,

while corresponding proposed acceptable quality control ranges are 0.5–2 μg/ml.

Vancomycin and oxacillin are often used when other antibiotics have failed (Facklam and Washington 1991). However, strains resistant to these antibiotics are now appearing (Leclerc et al. 1988; Kloos and Bannerman 1995). Antibiotic-resistant strains of staphylococci represent a major clinical and epidemiology problem in hospitals, even more since appearance of MRSA (Kloos and Bannerman 1995). The results presented in this paper indicate that bioactive crude of strain SA14 is generally as active as vancomycin and oxacillin against *S. aureus* and is even active against tested MRSA strains (Table 2). The bioactive crude could thus be considered a candidate for eventual use against infections caused by MRSA. However, another steps of purification stages should be concerned.

Certain antimicrobial agents are inactivated in the acidic environment of the stomach. Interestingly, bioactive crude of strain SA14 was very resistant to an acid pH (data not shown) and may be thus good candidates as potential antibacterial agents of choice against infections caused by *Helicobacter pylori*, strongly associated with peptic ulceration and gastric ulcer (Jerris 1995). Furthermore, mutants resistant to clindamycin (MLS_{Bi} or MLS_{Bc}), and oxacillin (MRSA) are still sensitive to bioactive crude of strain SA14, as shown in this paper. The fact that it is active against antibiotic-resistant strains is a factor supporting the development of this crude extracts as an

eventual clinical antibiotic. However, the possibility exists that the bioactive crude may be toxic when administered systemically. It will require further studies to assess the toxicity of the bioactive crude of strain SA14 and then evaluate its ability to be delivered to the site of infection.

Acknowledgements This work was supported by a grant (RSA5080008) from Thailand Research Fund. Partial supported from the Bioresources Research Network, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology is gratefully acknowledgement (BRN 001G-50).

References

- Abramson MA, Sexton DJ (1999) Nosocomial methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* primary bacteremias: at what costs? *Infect Contr Hosp Epidemiol* 20:408–411
- Bonten MJM, Weinstein RA (1999) Bird's-eye view of nosocomial infections in medical ICU: blue bugs, fungi, and device days. *Crit Care Med* 27:853–854
- Carr FJ, Chill D, Maida N (2002) The lactic acid bacteria: a literature survey. *Crit Rev Microbiol* 28:281–370
- Cherif A, Ouzari H, Daffonchio D et al (2001) Thuringin 7: a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* BMG1.7, a new strain isolated from soil. *Lett Appl Microbiol* 32:243–247
- Cherif A, Chehimi S, Limem F et al (2003) Detection and characterization of the novel bacteriocin entomocin 9, and safety evaluation of its producer, *Bacillus thuringiensis* ssp. *Entomocidus* HD9. *J Appl Microbiol* 95:990–1000
- Chumchalova J, Josephsen J, Plockova M (1995) Characterization of acidocin CH5, a saccharolytic sensitive bacteriocin of *Lactobacillus acidophilus* CH5. *Chem Mikrobiol Technol Lebensm* 17:145–150
- Cintas LM, Rodriguez JM, Fernandez MF et al (1995) Isolation and characterization of pediocin L50, a new bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* with a broad inhibitory spectrum. *Appl Environ Microbiol* 61:2643–2648
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2006) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 16th informational supplement M100-S16. CLSI, Wayne, PA
- Dominguez TJ (2004) It's not a spider bite, it's community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *JABFP* 17:220–226
- Drinkovic D, Fuller ER, Shore KP et al (2001) Clindamycin treatment of expressing inducible clindamycin resistance. *J Anticribial Chemother* 48:315–316
- Facklam RR, Washinton II JA (1991) *Streptococcus* and related coagulase-negative gram-positive cocci. In: Balows A, Hausler Jr WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ (eds) *Manual of clinical microbiology*, 5th edn. American Society for Microbiology, Washington, DC, pp 238–257
- File TM Jr (1999) Overview of resistance in the 1990s. *Chest* 115(suppl 3):S3–S8
- Fluckiger U, Windmer AF (1999) Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Chemotherapy* 45:121–134
- Fridkin SK, Steward CD, Edwards JR et al (1999) Surveillance of antimicrobial use and antimicrobial resistance in United State hospitals: project ICARE phase 2. *Clin Infect Dis* 29:245–252
- Gadepalli R, Dhawan B, Mohanty S et al (2006) Inducible clindamycin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Indian J Med Res* 123:571–573
- Herold BC, Immergluck LC, Maranan MC et al (1998) Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with no identified predisposing risk. *JAMA* 279:593–598
- Holmberg SD, Solomon SL, Blake PA (1987) Health and economic impacts of antimicrobial resistance. *Rev Infect Dis* 9:1065–1078
- Huang AH, Yan JJ, Wu JJ (2000) Rapid dissemination of *Staphylococcus aureus* with classic oxacillin resistance phenotype at a new university hospital. *J Hosp Infect* 44:309–315
- Jack RW, Tagg JR, Ray B (1995) Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol Rev* 59:171–200
- Jerris RC (1995) *Helicobacter*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds) *Manual of clinical microbiology*, 6th edn. American Society for Microbiology, Washington, DC, pp 492–498
- Katz E, Demain AL (1977) The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis, and possible functions. *Bacteriol Rev* 41:449–474
- Kloos WE, Bannerman TL (1995) *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds) *Manual of clinical microbiology*, 6th edn. American Society for Microbiology, Washington, DC, pp 282–298
- Layton MC, Hierholzer WJ, Patterson JE (1995) The evolving epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a university hospital. *Infect Contr Hosp Epidemiol* 16:12–17
- Leclerc R, Derlot E, Duval J, Courvalin P (1988) Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N Engl J Med* 319:157–161
- Li J, Willke R, Pinto L et al (2001) Comparison of length of hospital stay for patients with known or suspected methicillin-resistant *Staphylococcus* species infections treated with linezolid or vancomycin: a randomized, multicenter trial. *Pharmacotherapy* 21:263–274
- Loloatin A, Krachkovskii SA, Sobol AG et al (2002) Isolation, biological properties, and spatial structure of antibiotic. *Russian J Bioorganic Chem* 28:269–273
- National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) (1998) System report, data summary from October 1986 through April 1998. Hospital Infections program, National Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (1991) Antimicrobial susceptibility testing, 3rd edn. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa
- O'Brien FG, Pearman JW, Gracey M et al (1999) Community strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* involved in a hospital outbreak. *J Clin Microbiol* 37:2858–2862
- Orlova MV, Simnova TA, Ganushkina LA et al (1998). Insecticidal activity of *Bacillus laterosporus*. *Appl Environ Microbiol* 64:2723–2725
- Parrot M, Charest M, Lavoie MC (1989) Production of mutacin-like substances by *Streptococcus mutans*. *Can J Microbiol* 35:366–372
- Rathore MH, Kline MW (1989) Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in children. *Pediatr Infect Dis J* 8:645–647
- Rattanachaikunsopon P, Phumkhaichorn P (1998) A simple method for detecting bacteriocin production: swab-paper disc. *J Sci KKU* 26:281–288
- Rivers DB, Vann CN, Zimmack HL et al (1991). Mosquitocidal activity of *Bacillus laterosporus*. *J Invertebr Pathol* 58:444–447
- Rubin RJ, Harrington CA, Poon A et al (1999) The economic impact of *Staphylococcus aureus* infection in New York City hospitals. *Emerg Infect Dis* 5:9–17
- Schmitz FJ, Petridou J, Fluit C et al (2000) Distributio of macrolides-resistant genes in *Staphylococcus aureus* blood culture isolates from fifteen German university hospitals. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 19:385–391
- Schreckenberger PC, Ilendo E, Ristow KL (2004) Incidence of constitutive and inducible resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci in a community and a tertiary care hospital. *J Clin Microbiol* 42:2777–2779

- Shlaes DM, Gerding DM, John JF et al (1997) Society for healthcare epidemiology of America and infectious diseases society of America joint committee on the prevention of antimicrobial resistance in hospitals. *Clin Infect Dis* 25:584–599
- Sieradzki K, Villari P, Tomasz A (1998) Low-level teicoplanin resistance and heteroresistance to vancomycin [letter]. *Ann Intern Med* 128:245
- Sieradzki K, Roberts RB, Haber SW et al (1999) The development of vancomycin resistance in a patient with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *N Engl J Med* 340:517–523
- Snell N, Ijichi K, Lewis JC (1955) Paper chromatographic identification of polypeptide gram positive inhibiting antibiotics. *Appl Microbiol* 4:13–17
- Stevens DL, Herr D, Lampiris H et al (2002) Linezolid versus vancomycin for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Clin Infect Dis* 34:1481–1490
- Weisblum B (1995) Insights into erythromycin action from studies of its activity as inducer of resistance. *Antimicrob Agents* 39:797–805
- Wong SSY, Ho PL, Woo PCY et al (1999) Bacteremia caused by staphylococci with inducible vancomycin heteroresistance. *Clin Infect Dis* 29:760–767
- Wu S, Jia S, Sun D et al (2005) Purification and characterization of two novel antimicrobial peptides Subpeptin JM4-A and Subpeptin JM4-B produced by *Bacillus subtilis* JM4. *Curr Microbiol* 51:292–296



ที่ สธ 0928.02 / ๐1217

สำนักที่ปรึกษา กรมอนามัย

ถนนติวานนท์ จังหวัดนนทบุรี 11000

๓ กันยายน 2553

เรื่อง ขอส่งวารสารการส่งเสริมสุขภาพและอนามัยสิ่งแวดล้อม

เรียน นายมนตรี เลิศคณาวินชกุล

สิ่งที่ส่งมาด้วย วารสารการส่งเสริมสุขภาพและสิ่งแวดล้อม ฉบับที่ 3/2553 จำนวน 3 เล่ม

ตามที่ท่านได้ให้ความสนใจส่งบทความวิชาการเรื่อง “การเหลืรอดชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติกในน้ำผลไม้ชนิดต่างๆ” ลงตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารการส่งเสริมสุขภาพและอนามัยสิ่งแวดล้อมนั้น คณะผู้จัดทำวารสารฯ ได้นำบทความของท่าน ลงตีพิมพ์ในวารสารฯ ฉบับที่ 3 ประจำปีที่ 33 (เดือนกรกฎาคม - กันยายน 2553) เรียบร้อยแล้ว จึงขอส่งวารสารฯ ผลงานของท่าน จำนวน 3 เล่ม เพื่อเป็นข้อมูลและใช้ประโยชน์ต่อไป หากท่านประสงค์จะบอกรับเป็นสมาชิกวารสารฯ โปรดกรอกแบบฟอร์มสมัครเป็นสมาชิกตามตัวอย่างที่ปรากฏในวารสารส่งให้ บรรณาธิการบริหารวารสารการส่งเสริมสุขภาพและสิ่งแวดล้อม สำนักที่ปรึกษา กรมอนามัย ถ.ติวานนท์ อ.เมือง จ.นนทบุรี 10000 พร้อมรณาคัดหรือตัวแลกเงิน สำหรับค่าสมัครเป็นสมาชิกจำนวน 360 บาท/ปี เพื่อทางคณะผู้จัดทำจะได้จัดส่งวารสารฯ ฉบับต่อไป ให้ท่านอย่างต่อเนื่องตามประสงค์ต่อไป

จึงเรียนมาเพื่อโปรดทราบและขอขอบคุณที่ท่านได้ให้ความสนใจส่งบทความวิชาการลงตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารฯ คณะผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่าจะได้รับบทความที่น่าสนใจและเป็นประโยชน์จากท่าน เพื่อนำลงตีพิมพ์ในวารสารฯ ฉบับต่อไปเช่นเคย

ขอแสดงความนับถือ

(นายสุคนธ์ เจียสกุล)

บรรณาธิการบริหาร

วารสารการส่งเสริมสุขภาพและอนามัยสิ่งแวดล้อม

งานสารบรรณ

โทร. 0 2590 4153, 58

โทรสาร 0 2965 9247



การเลือกรอดชีวิตของแบคทีเรีย โพรไบโอติกในน้ำผลไม้ชนิดต่างๆ

มณฑล เลิศคนวานิชกุล

กิตติภานต์ ไทยเอื้อ

พิชชานันท์ เชื้อพงษ์พันธ์

วิเชียร เพ็ชรนาจักร

สำนักวิชาสหเวชศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์

มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ จังหวัดนครศรีธรรมราช

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการอยู่รอดชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่คัดแยกได้จากผัก-ผลไม้
นมพาสเจอร์ไรด์หรือหมักในน้ำผลไม้ชนิดต่างๆ โดยสามารถแยกแบคทีเรียโพรไบโอติกออกมาได้ 1 ไอโซเลต
ด้วยเกณฑ์การเกาะติดพื้นผิว และได้วินิจฉัยชนิดเชื้อได้เป็น *Lactobacillus plantarum* 1 ด้วยชุดทดสอบ
ทางชีวเคมี API 50 CHL นอกจากนี้ยังพบว่า *L. plantarum* 1 แสดงคุณลักษณะที่ดีของการเป็นแบคทีเรีย
โพรไบโอติก กล่าวคือ สามารถสร้างสารเมตาบอไลต์ออกมายับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น คือ แบคทีเรีย
Micrococcus luteus TISTR 884, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Salmonella typhimurium* TISTR
292, *Staphylococcus aureus* TISTR 517, *Escherichia coli* TISTR 887 และ *Pseudomonas aeruginosa*
TISTR 1467 สามารถทนกรด-ด่างได้ที่ pH 2-10 สามารถทนต่อยาปฏิชีวนะบางชนิดได้เช่น Oxacillin,
Nitrofurantoin เป็นต้น ซึ่งแบคทีเรียดังกล่าวมีชีวิตรอดได้ในน้ำแดงโมและมะเขือเทศในปริมาณเชื้อเฉลี่ย
5.0-5.4 log CFU/ml จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8 log CFU/ml ตลอดระยะเวลา 21 วันของการเก็บรักษา
ไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แต่แบคทีเรียถูกทำลายจนหมดในวันที่ 9 ของการเก็บรักษาไว้ในน้ำมะพร้าว
ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังพบว่าการเลือกรอดชีวิตของแบคทีเรียดังกล่าวในน้ำผลไม้ที่ผสม
หรือไม่ผสมสารพรีไบโอติกไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p \leq 0.05$) และ
สามารถเก็บรักษาแบคทีเรียดังกล่าวไว้ใน 15% กลีเซอรอลที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส หรือในสารละลาย
0.85% NaCl, อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 30 วัน

คำสำคัญ: การอยู่รอด น้ำผลไม้ โพรไบโอติก



Survival of probiotic bacteria in different kinds of fruit juices

Monthon Lertcanawanichakul

Kittikan Thiauer

Pitchanan Chaopongpan

Wichian Petchnajak

School of Allied Health Sciences and Public Health,
Walailak University, Nakhon-Si-Thammarat

Abstract

Survival of a type of probiotic bacterium isolated from various natural sources including vegetables, fruits, pasteurized milk, Nham and fruit juices was studied. Using API 50 CHL Test Kit, one isolate obtained from tomato was identified as *Lactobacillus plantarum* 1, using colonization as a selection criteria. This bacterium showed the appropriated properties of probiotic bacteria, i.e., inhibited the growth of other types of bacteria including *Micrococcus luteus* TISTR 884, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Salmonella typhimurium* TISTR 292, *Staphylococcus aureus* TISTR 517, *Escherichia coli* TISTR 887 and *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 1467. It could survive and grow at pH 2-10 and resist to some antibiotics such as, Oxacillin, Nitrofurantoin etc. It was found, in the survival study that, the initial amount of $8 \log$ CFU/ml of this bacterium decreased to $5.0-5-4 \log$ CFU/ml at the end of the 21st day keeping at the temperature of 4°C . In addition, its survival was very poor in coconut juice and there was no survival on day 9 of storage at 4°C . Interestingly, the fruit juices with or without prebiotic showed no significant difference effect on the survival of this bacterium ($p \leq 0.05$). Also, the survival of this bacterium stored in 15% glycerol at -20°C or in 0.85% NaCl, MRS at 4°C was determined. It was found that *L. plantarum* 1 could survive in those of conditions longer than 30 days.

Keywords : Survival fruit juices probiotic

■ บทนำ

ในสถานการณ์ปัจจุบันที่เกี่ยวข้องกับมลภาวะที่เป็นพิษในสิ่งแวดล้อมรวมทั้งการแข่งขันกันทางด้านการงานอาชีพเพื่อความอยู่รอดทำให้ไม่มีเวลาว่างในการออกกำลังกาย ก่อเกิด

ภาวะเครียดซึ่งอาจส่งผลให้มีปัญหาเกี่ยวกับสุขภาพ ดังนั้นจึงควรเอาใจใส่กับการรับประทานอาหาร และการออกกำลังกายให้มากขึ้น ซึ่งสิ่งที่ปฏิบัติได้ง่ายที่สุดคือ การเลือกรับประทานอาหาร⁽¹⁾ ให้ครบทั้ง 5 หมู่ และคำนึงถึงสารอาหารที่เพียงพอ

ต่อความต้องการของร่างกายทั้งในด้านปริมาณ และคุณภาพ จึงได้ก่อเกิดกระแสมความนิยมในการหันมาดูแลสุขภาพด้วยการบริโภคผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีคุณค่าทางอาหารครบถ้วน มีความปลอดภัยและส่งผลดีต่อสุขภาพของตัวผู้บริโภคเอง โดยอาหารเสริมเหล่านี้อาจมีส่วนผสมของกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่เรียกว่า “โพรไบโอติก” ที่มีประโยชน์ต่อร่างกายสิ่งมีชีวิตที่มันเข้าไปอาศัยอยู่ ด้วยการปรับสมดุลของเชื้อในระบบทางเดินอาหารของร่างกายและช่วยลดปริมาณเชื้อที่เป็นโทษภายในร่างกายแต่เพิ่มปริมาณเชื้อที่มีประโยชน์ให้มีปริมาณสูงขึ้น⁽²⁾ ซึ่งในกรณีที่ต้องการหาจุลินทรีย์สายพันธุ์ใหม่ๆ มาใช้เป็นโพรไบโอติกจะต้องมีการพิสูจน์ให้เห็นถึงความปลอดภัยอย่างชัดเจนเสียก่อน โดยคุณสมบัติที่ดีของจุลินทรีย์โพรไบโอติกจะต้องมีความทนทานต่อกรดในกระเพาะอาหาร และต่างในลำไส้เล็ก ทำให้สามารถเคลื่อนผ่านไปจนถึงลำไส้ส่วนล่างได้ ขณะที่ยังมีชีวิตอยู่ และควรมีปริมาณมาก (10⁶ ตัว) เพียงพอที่จะสร้างประโยชน์ให้แก่ร่างกาย ช่วยระบบขับถ่ายทำงานได้ดี ช่วยให้จุลินทรีย์ในท้องไม่ผูก เมื่อลงไปถึงลำไส้จะเกาะจับอยู่ที่เยื่อบุลำไส้กลายเป็นตัวป้องกันอีกชั้นหนึ่งทำให้เชื้อก่อโรคไม่สามารถเกาะและฝังตัวที่เยื่อบุลำไส้ เพื่อเข้าสู่ผนังลำไส้⁽³⁾ หรือสามารถผลิตกรดอินทรีย์และสารปฏิชีวนะ (antibiotic) ไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรครดดังกล่าว นอกจากนี้ยังพบว่าจุลินทรีย์โพรไบโอติกยังสามารถช่วยในการย่อยน้ำตาลแลคโทสในนม แก้ปัญหาท้องเสีย ท้องอืด ช่วยย่อยโปรตีนในน้ำนม ช่วยกระตุ้นให้ร่างกายดูดซึมสารอาหาร เช่น แคลเซียม และเหล็กได้ดีขึ้นและยังสามารถผลิตวิตามินบีต่างๆ⁽⁴⁾ ที่สำคัญที่สุดคือช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันตามธรรมชาติของร่างกายมนุษย์ อันจะส่งผลให้สุขภาพแข็งแรงไม่

เจ็บป่วยง่าย ดังนั้นการบริโภคอาหารที่มีโพรไบโอติกก็น่าจะช่วยส่งเสริมการดูแลสุขภาพของผู้บริโภคได้ในระดับหนึ่ง ซึ่งในแหล่งอาหารที่มีบริโภคกันโดยทั่วไป มักจะตรวจพบจุลินทรีย์โพรไบโอติกอยู่แล้ว⁽⁵⁾ และถ้าหากต้องการเพิ่มประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ดังกล่าวก็น่าจะเป็นไปได้โดยการนำเอามาผสมรวมกับจุลินทรีย์โพรไบโอติก เรียกผลิตภัณฑ์อาหารดังกล่าวว่า “โพรไบโอติก/ฟังก์ชันนอลฟู้ด” ดังที่มิวงานกันทั่วไปในท้องตลาด เช่น ผลิตภัณฑ์นมหมักต่างๆ โดยมีรายงานว่าสามารถกระตุ้นร่างกายให้สร้างภูมิต้านทานและฆ่าเชื้อโรคได้⁽⁶⁾ นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับความพยายามใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกไปผสมกับอาหาร/เครื่องดื่มเพื่อเพิ่มคุณค่าของผลิตภัณฑ์อาหารเหล่านั้นให้สูงขึ้น และหนึ่งในผลิตภัณฑ์นั้นคือน้ำผลไม้โพรไบโอติก แต่เนื่องจากคุณลักษณะและองค์ประกอบของสารเคมีที่มีอยู่ในน้ำผลไม้เหล่านั้นอาจเป็นตัวยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ผสมรวมในน้ำผลไม้ทำให้ประสิทธิภาพของน้ำดื่มผลไม้โพรไบโอติกที่ใช้เพื่อปรับปรุงสมดุลของจุลินทรีย์ในร่างกายอาจไม่ดีเท่าที่ควร ดังนั้นทางกลุ่มจึงสนใจศึกษาการอยู่รอดของจุลินทรีย์โพรไบโอติกในน้ำผลไม้ชนิดต่างๆ ที่นิยมบริโภคกันในท้องถิ่นและหาบริโภคได้ง่าย รวมทั้งมีราคาไม่สูงมากเพื่อปรับปรุงคุณสมบัติของน้ำผลไม้มาเป็นน้ำผลไม้โพรไบโอติกที่มีประโยชน์ต่อร่างกายของผู้บริโภคมากยิ่งขึ้นกว่าเดิม

■ วัตถุประสงค์การศึกษา

เพื่อศึกษาการอยู่รอดของจุลินทรีย์โพรไบโอติกในน้ำผลไม้ชนิดต่างๆ ที่นิยมบริโภคกันในท้องถิ่นและหาบริโภคได้ง่าย รวมทั้งมีราคาไม่สูงมากเพื่อปรับปรุงคุณสมบัติของน้ำผลไม้มาเป็นน้ำ



ผลไม้โพไบโอติกที่มีประโยชน์ต่อร่างกายของผู้บริโภคมากยิ่งขึ้นกว่าเดิม

■ วิธีการศึกษา

แบ่งขั้นตอนการศึกษาออกเป็น 2 ส่วน ประกอบด้วย

1. คัดเลือกแบคทีเรียโพไบโอติกและศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียโพไบโอติก
2. ศึกษาการเหลือรอดของแบคทีเรียโพไบโอติกที่คัดเลือกได้ในน้ำผลไม้ 3 ชนิด (น้ำแดงโม น้ามะพร้าว และน้ำมะเขือเทศ)

1. **เกณฑ์คัดเลือกและคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียโพไบโอติก** ดัดแปลงมาจากการคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อใช้เป็น โพไบโอติก ของ รศ. วิเชียร ลีลาวัชรมาศ⁽⁷⁾ ดังนี้ 1) เลือกแบคทีเรียจากแหล่งต่างๆ เช่น ผัก ผลไม้ ผลิตภัณฑ์นม 2) ความสามารถในการเกาะติดพื้นผิว 3) ผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ให้โทษโดยเมตาบอไลต์ต่างๆ 4) แยกกลุ่มและวินิจฉัยแยกชนิดแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบทางชีวเคมี API 50 CHL 5) ทนต่อระดับ pH 2-10 6) ทนทานต่อการทำลายโดยยาปฏิชีวนะ 7) ความคงตัวในสภาวะที่มีสารเสริมต่างๆ ประมาณ 1 เดือน 8) ความคงทนต่อการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิแช่เยือกแข็ง (-20 องศาเซลเซียส) ซึ่งแต่ละข้อมีรายละเอียดดังนี้

1.1 คัดเลือกแบคทีเรียจากแหล่งต่างๆ เช่น ผัก ผลไม้ นมพลาสเจอไรซ์หรือหมนม

การเตรียมผัก-ผลไม้ นมพลาสเจอไรซ์หรือหมนม : ล้างผัก-ผลไม้ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ มะเขือเทศ แดงโม มะพร้าว กะหล่ำปลี ให้สะอาด ส่วนหมนมให้หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ด้วยมีดที่สะอาด ซึ่งตัวอย่างทั้งหมดปริมาณชนิดละ 25 กรัม สำหรับนมพลาสเจอไรซ์ ใช้ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

การเพิ่มจำนวนแบคทีเรีย : เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Mann Rogosa Sharpe (MRS) จำนวน 6 ขวดๆ ละ 225 มิลลิลิตร แล้วนำตัวอย่างทั้งหมดแยกใส่ในแต่ละขวด ปิดฝาให้สนิท นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำแต่ละขวดไปทำเจ็จางแบบ 10 เท่าแล้วนำไปกระจายเชื้อลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS นำจานเพาะเชื้อที่ได้ไปบ่มใน candle jar ที่สภาวะเดิม จากนั้นให้สังเกตลักษณะโคโลนีที่ปรากฏ

การคัดเลือกโคโลนี : คัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะ นูน สีขาวขุ่น ขอบเรียบ ผิวหน้าเรียบเป็นมันวาว ทึบแสง มาทดสอบเอนไซม์อะเลสโดยใช้ไม้จิ้มฟันเขี่ยโคโลนีที่ต้องการทดสอบมาป้ายบนกระຈສໄລດ໌ທີ່สะอาด หยด 3% ของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 1 หยดทับลงบนโคโลนีแล้วสังเกตการเกิดฟองภายใน 10 วินาที หากเกิดฟองแสดงถึงการทดสอบให้ผลบวก แต่หากไม่เกิดฟองแสดงถึงการทดสอบให้ผลลบ ทำการคัดเลือกเฉพาะโคโลนีที่ให้ผลการทดสอบอะเลสลบไปย้อมสีแบบแกรม และเลือกเฉพาะโคโลนีที่ย้อมได้แกรมบวกรูปแท่ง ไปขีดลงบนพื้นผิวอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS แล้วนำไปบ่มเลี้ยงเชื้อใน candle jar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมงหรือจนปรากฏโคโลนีให้เห็น

1.2 ความสามารถในการเกาะติดพื้นผิว

นำเชื้อที่คัดเลือกได้ในตอนต้นประมาณ 100 ไมโครเลต รวมถึงเชื้อ C3, C7 และ *Lactobacillus plantarum* TISTR 050 (เชื้อควบคุมการทดลอง) มาปรับเทียบให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland No. 0.5 แล้วถ่ายสารแขวนลอยเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ปริมาตร 19 มิลลิลิตรที่บรรจุอยู่ในหลอด

ทดลองผ่าเกลียวขนาด 16x150 มิลลิเมตรและ
ภายในบรรจุไม้เสียบลูกชิ้นปราศจากเชื้อ (เติมน้ำ
กลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 1 มิลลิตร ลงใน
หลอดลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS เพื่อ
ใช้เป็นหลอดควบคุมผลลบ) บ่มเพาะเชื้อที่
อุณหภูมิห้อง สังเกตและบันทึกผลการเกิดก๊าซ
และการเกาะติดพื้นผิวบริเวณไม้เสียบลูกชิ้นและ
ผิวด้านในหลอดทดลอง บันทึกผลการเจริญและ
สังเกตการเกาะติดพื้นผิวทุกวันเป็นเวลา 4 วัน
คัดเลือกเชื้อที่มีการเจริญและเกาะติดพื้นผิวเร็วที่สุด
ปริมาณมากที่สุด และเกาะติดแน่นมากที่สุดเพื่อ
นำไปศึกษาการมีชีวิตเหลืรอดในน้ำผลไม้

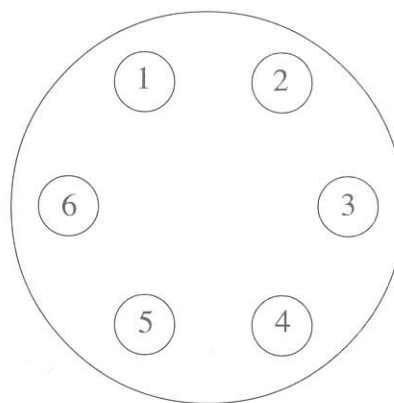
1.3 ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ให้โทษ โดย เมตาบอไลต์ต่าง ๆ

การเตรียมจุลินทรีย์ดัดขึ้น : นำจุลินทรีย์
ดัดขึ้น 7 ชนิด (*Micrococcus luteus* TISTR 884,
Bacillus subtilis ATCC 6633, *Salmonella*
typhimurium TISTR 292, *Staphylococcus*
aureus TISTR 517, *Escherichia coli* TISTR
887, *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 1467,
Candida albicans TISTR 5779) มาปรับเทียบ
ให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland No. 0.5 แล้ว
นำไปแยกป้าย ลงบนพื้นผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ
Muller-Hinton (MH) ที่ผสมสารสกัดจากยีสต์
0.6% วางทิ้งไว้ให้ผิวหน้าแห้ง

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยวิธี
agar well diffusion : เจาะรูในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง
MH ด้วยปลายทึบปราศจากเชื้อให้มีขนาดเส้น
ผ่านศูนย์กลางประมาณ 6 มิลลิเมตร จำนวน 6 หลุม
แล้วเขี่ยเนื้อวุ้นออกจากหลุมให้หมดจากนั้นเติมน้ำ
เลี้ยงเชื้ออายุ 2 วันของเชื้อที่คัดเลือกมาได้ (ปั่น
เหวี่ยงที่ 10,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
เป็นเวลา 30 นาที) ลงในหลุมๆ ละ 100 ไมโครลิตร
ดังนี้ หลุมที่ 1 เติมหาอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS (pH

6.5-6.9); หลุมที่ 2 เติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีการปรับ
pH ให้เท่ากับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS; หลุมที่
3 เติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการปรับ pH; หลุมที่ 4
เติมหาอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการปรับ pH เท่ากับ 4 โดย
ใช้ 0.2 N HCl; หลุมที่ 5 เติมหาอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี
การปรับ pH เท่ากับ 9 โดยใช้ 6 N NaCl และ
หลุมที่ 6 เติมน้ำกลั่น ดังแสดงในรูปที่ 1 นำจาน
เพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็น
เวลา 24 ชั่วโมง สังเกตและบันทึกผลการเกิดโซน
ยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยวิธีรอบหลุมทดสอบ

รูปที่ 1 แสดงหลุมในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง
Mueller Hinton ที่ใช้เพื่อเติมน้ำ
เลี้ยงเชื้อไอโซเลท T9 (อ่านรายละเอียดเพิ่มเติมในหัวข้อ 1.3)



1.4 วินิจฉัยแยกชนิดแบคทีเรียด้วย ชุดทดสอบทางชีวเคมี API 50 CHL

ใช้ชุดทดสอบทางชีวเคมีสำเร็จรูป API
50 CHL (biomerieux)^(a) ในการทดสอบแยก
ชนิดของเชื้อที่คัดเลือกได้โดยปฏิบัติตามคำ
แนะนำของบริษัทโดยมีขั้นตอนโดยย่อต่อไปนี้
เตรียมสารแขวนลอยแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัด
เลือกได้ให้มีความขุ่นเทียบเท่า McFarland No. 2
ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูปที่ให้มาพร้อมกับชุดทดสอบ



API 50 CHL แล้วนำไปหยดใส่ในช่องทดสอบบน strips ทุกช่องจำนวน 50 ช่องๆ ละ ประมาณ 120 ไมโครลิตร โดยระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ จากนั้นหยดปิดทับช่องว่างที่เหลือด้วย mineral oil เพื่อให้เกิดสภาพไร้อากาศ แล้วนำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บันทึกผลการเปลี่ยนสีของอาหารในหลุมเป็นสีเหลืองและสีดำในหลุมที่ทดสอบ esculine ให้บันทึกเป็นบวก หากเป็นสีอื่นให้บันทึกผลเป็นลบ ภายในเวลา 24 ชั่วโมง ไม่เกิน 48 ชั่วโมง นำผลการทดสอบที่ได้ไปวิเคราะห์แยกชนิดของเชื้อโดยใช้ซอฟต์แวร์ API 50 V. 5.1

1.5 ความทนทานต่อระดับ pH 2-10

นำเชื้อที่ต้องการทดสอบมาปรับเทียบความขุ่นเทียบเท่ากับ McFarland No. 0.5 แล้วเติมลงไป ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ปริมาตร 19 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองฝาเกลียว ขนาด 16x150 มิลลิเมตร ที่ปรับ pH เท่ากับ 2-11 แล้วนำหลอดทดลองทั้งหมดไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตและบันทึกผลการเจริญเติบโตโดยดูความขุ่นและตะกอนเชื้อในหลอดทดสอบทุกหลอดที่มี pH ต่างๆ กัน และเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้เติมเชื้อเป็นชุดควบคุมการทดลองเพื่อเปรียบเทียบลักษณะการเจริญ

1.6 ความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ⁽⁹⁾

เตรียมสารแขวนลอยเชื้อที่คัดเลือกได้ รวมทั้ง *L. plantarum* TISTR 050 ให้มีความขุ่นเทียบเท่ากับ McFarland No. 0.5 แล้วนำไปป้ายให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MH ที่เตรียมสารสกัดจากยีสต์ 0.6% จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง แล้วนำแผ่นยาปฏิชีวนะที่ต้องการทดสอบ ได้แก่ sulphamethoxazole trimethoprim 25 (SXT), carbenicillin 100

(CAR), amikacin 30 (AK), oxacillin 1 (OX), ampicillin 10 (AMP), penicillin G 10 (P), nitrofurantoin 300 (F), cephalotin 30 (KF), gentamicin 10 (CN) ไปวางบนผิวหน้าอาหาร แล้วนำไปบ่มเพาะเชื้อใน candle jar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตการเกิดโซนยับยั้งรอบแผ่นยาแต่ละชนิด

1.7 ความคงทนต่อการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิแช่เยือกแข็ง (-20 องศาเซลเซียส)

การเก็บรักษาเชื้อ : ถ่ายสารแขวนลอยเชื้ออายุ 24 ชั่วโมง ปริมาตร 600 ไมโครลิตรลงใน 50% กลีเซอรอล ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือน

การศึกษาการเจริญของเชื้อ : นำเชื้อที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนครบเวลา 1 เดือนแล้วมาขีดลงบนพื้นผิวอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS แล้วนำไปบ่มเพาะเชื้อใน candle jar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บันทึกผลการเจริญบนอาหารแข็ง MRS

2. การเหลืกรดของแบคทีเรียโพรไบโอติกในน้ำผลไม้ 3 ชนิด (น้ำแดงโม น้ำมะพร้าว และน้ำมะเขือเทศ)

2.1 การเตรียมน้ำผลไม้

การล้างผลไม้ 3 ชนิด คือ แดงโม มะเขือเทศ และมะพร้าวให้สะอาดตัดแกนเปลือกและนำเอาเมล็ดออกจากนั้นหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ คั้นเอาเฉพาะส่วนของน้ำผลไม้ชนิดละ 3.5 ลิตร ด้วยถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ วัดความหวานด้วยเครื่อง refractometer บันทึกผลแล้วเติมโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟด์จำนวน 200 ppm ลงไปในน้ำผลไม้แต่ละชนิดและนำมาต้มที่อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส ประมาณ 30 นาที เพื่อทำลายเชื้อปนเปื้อน แยกบรรจุน้ำผลไม้แต่ละชนิดลงใน

ขวดพลาสติกขาวขุ่นที่ปราศจากเชื้อที่ผ่านการ
กลั้วด้วยโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟด์ ขวดละ 225
มิลลิลิตร โดยบรรจุน้ำผลไม้แต่ละชนิดๆ ละ 12 ขวด
รวม 36 ขวด

2.2 การเติมสารพรีไบโอติกลงในน้ำผลไม้

เติมสารพรีไบโอติก⁽¹⁰⁾ ลงในน้ำผลไม้
แต่ละขวดๆ ละ 4.5 กรัม รวม 12 ขวด และชุดที่
ไม่เติมพรีไบโอติกจำนวน 12 ขวด สำหรับชุด
ควบคุมผลลบให้เตรียมเช่นเดียวกับข้างต้นแต่ไม่
ต้องเติมเชื้อลงไป ทำการทดลอง 2 ซ้ำ(ดังตาราง
ที่ 1)

ตารางที่ 1 การเติมสารพรีไบโอติกลงในน้ำผลไม้ชนิดต่าง ๆ

สารที่เติม	น้ำผลไม้		
	แตงโม(ขวด)	มะพร้าว(ขวด)	มะเขือเทศ(ขวด)
เติมสารพรีไบโอติก	4	4	4
ไม่เติมสารพรีไบโอติก	4	4	4
ขวดควบคุมที่เติมสารพรีไบโอติก (เติมโพรไบโอติก)	2	2	2
ขวดควบคุมที่ไม่เติมสารพรีไบโอติก(เติมโพรไบโอติก)	2	2	2
รวม	12	12	12

2.3 การเติมแบคทีเรียโพรไบโอติกลงในน้ำผลไม้

เตรียมเชื้อที่คัดเลือกได้ให้มีปริมาณ
เซลล์เท่ากับ 12×10^8 เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิลิตร
ด้วยการเทียบความขุ่นให้เท่ากับ McFarland No.4
แล้วนำสารแขวนลอยเชื้อเติมลงไปลงในน้ำผลไม้
ทุกขวดๆ ละ 25 มิลลิลิตร ยกเว้นขวดควบคุมผล
ลบ จากนั้นนำน้ำผลไม้ทั้งหมดไปเก็บรักษาไว้ใน
ตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อรอการ
ตรวจนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่เหลืรอดชีวิต

2.4 การตรวจนับปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกที่เหลืรอดในน้ำผลไม้ชนิดต่าง ๆ

นำน้ำผลไม้ที่ต้องการนับจำนวนเซลล์
มาปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาทำเจือจางแบบ 10
เท่าใน 0.85% NaCl จนถึง 10^{-4} นำไปตรวจนับ
แบคทีเรียที่เหลืรอดชีวิตในน้ำผลไม้แต่ละชนิด

ด้วยแผ่นนับสำเร็จรูป 3M PetrifilmTM ⁽¹¹⁾ โดย
ทำการตรวจนับในวันที่ 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18,
21 ของการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
นำผลที่ได้ทั้งหมดมาคำนวณความเกี่ยวข้องของ
สารพรีไบโอติกที่มีต่อปริมาณการอยู่รอดของเชื้อ
ในน้ำผลไม้ชนิดต่าง ๆ

ผลการศึกษา

1. คัดเลือกแบคทีเรียโพรไบโอติกและศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียโพรไบโอติก

1.1 แบคทีเรียจากแหล่งต่างๆ : จาก
การศึกษาเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียโพรไบโอติกจาก
ผัก-ผลไม้ (มะเขือเทศ แตงโม มะพร้าว กะหล่ำ
ปลี) นมวัว และนมแพะ ปรากฏว่าตรวจพบโค
โลนิเจริอูมขึ้นในจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS
จำนวนมาก จากนั้นได้ทำการคัดเลือกรูปแบบของ



โคลนีตามคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งได้แก่ หนู สีสาวขุ่น ขอบเรียบ ผิวหน้าเรียบเป็นมันวาว ทึบแสง และให้ผลทดสอบกะตะเลสเป็นลบ ย้อมติดสีแกรมบวกรูปท่อน โดยได้ทำการคัดเลือกได้ทั้งหมด 106 ไอโซเลท จากนั้นนำไปเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS เพื่อรอทำการทดสอบต่อไป

1.2 ความสามารถในการเกาะติดพื้นผิว

ผิว : ในการทดสอบความสามารถของเชื้อที่คัดเลือกได้จำนวน 106 ไอโซเลทในการเกาะติดพื้นผิวรวมเชื้อควบคุม (C3, C7 และ *Lactobacillus*

plantarum TISTR 050) ปรากฏว่าเชื้อทั้งหมดผลิตก๊าซเมื่อนำไปเลี้ยงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS แต่พบมีเพียงไอโซเลทที่ 9 ที่แยกออกมาได้จากมะเขือเทศ และไอโซเลทที่ 35 ที่แยกออกมาได้จากแฮมเท่านั้นที่สามารถแสดงการเกาะติดผิวหลอดด้านในของหลอดทดลอง จึงได้ตั้งชื่อว่า T9 และ N35 ตามลำดับ แต่พบว่า T9 แสดงการเกาะกลุ่มที่เร็วกว่าและยาวนานกว่า ดังแสดงในตารางที่ 2 ดังนั้นจึงเลือก T9 ไปศึกษาตลอดการทดลอง

ตารางที่ 2 คุณสมบัติในการเกาะติดพื้นผิวของไอโซเลท T9 และไอโซเลท N35

ไอโซเลท	ระยะเวลาที่เริ่มเกาะติดพื้นผิว (ชั่วโมง)	จำนวนวันที่เกาะติดพื้นผิว (วัน)	การคงสภาพเกาะติด
น้ำมะเขือเทศ (T9)	24	>4	มาก
แฮม (N35)	36	2	น้อย

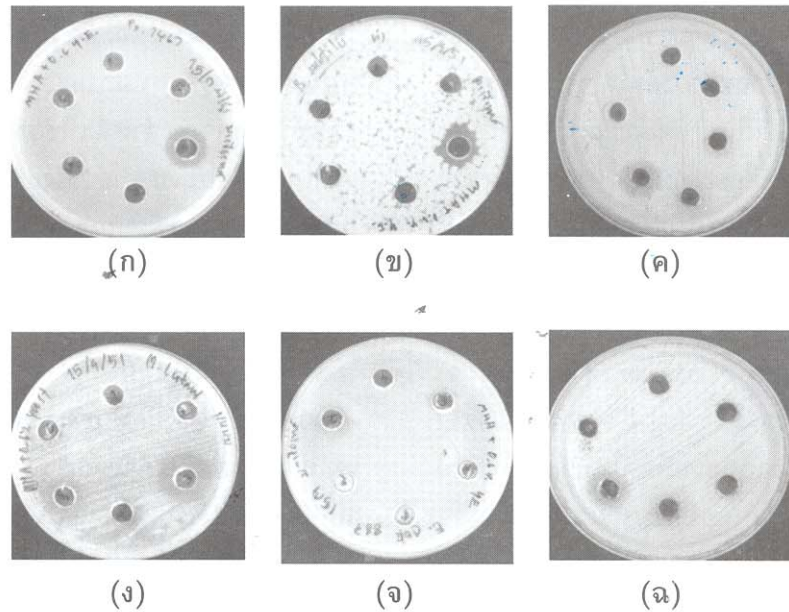
1.3 ผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ให้โทษโดย เมตาบอลิต์ต่างๆ : ไอโซเลท T9 ที่คัดเลือกได้จากมะเขือเทศมีฤทธิ์ทำลาย แบคทีเรียดัดขึ้นที่นำมาทดสอบทั้งหมดจำนวน 6 สายพันธุ์ (*Micrococcus luteus* TISTR 884, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Salmonella typhimurium* TISTR 292, *Staphylococcus aureus* TISTR 517, *Escherichia coli* TISTR 887, *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 1467) แต่ไม่แสดงฤทธิ์ทำลายราดัดขึ้น *Candida albicans* TISTR 5779 เมื่อทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion ดังแสดงในรูปที่ 2

1.4 แยกกลุ่มและวินิจฉัยแยกชนิดแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบทางชีวเคมี API 50

CHL : ในการวิเคราะห์แยกชนิด ไอโซเลท T9 ด้วยชุดทดสอบทางชีวเคมี API 50 CHL และนำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยซอฟต์แวร์ API 50 V.5.1 ปรากฏว่าไอโซเลท T9 ที่แยกได้มาจากมะเขือเทศคือ *Lactobacillus plantarum* 1 ที่ระดับความเชื่อมั่น 99.9% ดังนั้นจึงสรุปว่าเชื้อที่ได้ทำการคัดเลือกมาได้ถูกจัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียโปรไบโอติกและจะเลือกนำไปทดสอบต่อไป

1.5 ความทนทานต่อระดับ pH 2-10: ไอโซเลท T9 สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่ปรับ pH 2-10 และสามารถสังเกตเห็นการเกาะติดพื้นผิวหลอดด้านในของแบคทีเรียดังกล่าวในหลอดทดลอง

รูปที่ 2 ภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อจากแบคทีเรียไอโซเลท T9 ในการยับยั้งแบคทีเรียดัชนี *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 1467 (ก) *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (ข) *Salmonella typhimurium* TISTR 292 (ค) *Micrococcus luteus* TISTR 884 (ง) *Escherichia coli* TISTR 887 (จ) *Staphylococcus aureus* TISTR 517 (ฉ)



ตารางที่ 3 ความไวของแบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum* 1 (T9) และ *L. plantarum* TISTR050 ต่อยาปฏิชีวนะ

แบคทีเรีย	วงใสของการยับยั้งการเจริญ (มิลลิเมตร)								
	CN	CAR	AK	SXT	AMP	F	KF	OX	P
<i>L. plantarum</i> 1	20	9	19	9	20	19	7	0	13
<i>L. plantarum</i> TISTR 050	26	17.5	26	20.5	21	R	11	0	21

1.6 ความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ : ไอโซเลท T9 คือต่อยาปฏิชีวนะที่นำมาทดสอบเกือบทั้งหมดได้ดีกว่าแบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 050 ยกเว้น Nitrofurantoin ดังแสดงในตารางที่ 3

1.7 การเหลืรอดชีวิตหลังจากเก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิแช่เย็นและแช่เยือกแข็ง (-20 องศาเซลเซียส): ไอโซเลท T9 สามารถเจริญเป็นโคโลนีในจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ภายหลังจากการเก็บรักษาไว้ใน 15% กลีเซอรอลที่



อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 เดือน

2. ศึกษาการเหลือรอดของแบคทีเรียโพรไบโอติกในน้ำผลไม้ 3 ชนิด (น้ำแตงโม น้ำมะพร้าว และน้ำมะเขือเทศ)

ไอโซเลท T9 สามารถมีชีวิตรอดได้ในน้ำผลไม้ที่นำมาศึกษาแตกต่างกันโดยพบว่าสามารถมีชีวิตเหลือรอดได้ดีในน้ำแตงโมและน้ำมะเขือเทศในการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 21 วัน ส่วนน้ำมะพร้าวทำให้แบคทีเรียตายทั้งหมดภายหลังการจัดเก็บไว้เพียง 9 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

แบคทีเรีย *L. plantarum* 1 (ไอโซเลท T9) ที่ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 8 log CFU/ml มีอัตราการอยู่รอดโดยเฉลี่ยมากที่สุดที่น้ำแตงโมที่ไม่เติมสารพรีไบโอติกโดยมีปริมาณเซลล์หลงเหลือชีวิตปริมาณ 5.4 ± 0.21 log CFU/ml เมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน รองลงมาคือการอยู่รอดในน้ำมะเขือเทศที่เติมสารพรีไบโอติก (5.3 log CFU/ml), ในน้ำมะเขือเทศที่ไม่เติมสารพรีไบโอติก (5.2 log CFU/ml), ในน้ำแตงโมที่เติมสารพรีไบโอติก (5.0 log CFU/ml) ส่วนในน้ำมะพร้าวทั้งที่เติมสารพรีไบโอติกและไม่เติมสารพรีไบโอติกนั้นเชื้ออยู่รอดได้เพียงประมาณ 6 วัน ดังแสดงในตารางที่ 4 และเมื่อทำการวิเคราะห์ผลข้อมูลที่ได้โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์อัตโนมัติ SPSS โดยใช้การวิเคราะห์สถิติแบบ ONE WAY ในรูปแบบ parametric เพื่อเปรียบเทียบผลของการเติมและไม่เติมสารพรีไบโอติกลงในน้ำผลไม้ต่อการอยู่รอดของแบคทีเรีย *L. plantarum* 1 ปรากฏว่า การเติมและไม่เติมสารพรีไบโอติกไม่มีผลต่ออัตราการอยู่รอดของแบคทีเรียดังกล่าวในน้ำผลไม้ ($p\text{-value} < 0.05$)

■ วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

แบคทีเรียกรดแลคติกพบว่ามีทั้งรูปร่างแท่งและรูปร่างกลม ได้ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มแบคทีเรียโพรไบโอติกซึ่งในความหมายก็คือกลุ่มของจุลินทรีย์ที่มีชีวิตขนาดเล็ก ที่เมื่อเข้าไปอยู่ในร่างกายของมนุษย์และสัตว์แล้ว ก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพร่างกายของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ โดยจุลินทรีย์เหล่านี้ทำหน้าที่ช่วยปรับสมดุลของสภาพแวดล้อมในระบบลำไส้และทำลายจุลินทรีย์ให้โทษ⁽⁵⁾ โดยจะคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกตามธรรมชาติได้ในอาหารหมักหลายชนิด รวมไปถึงมีเป็นปุ๋ยในผลิตผลทางการเกษตร ผัก-ผลไม้และผลิตภัณฑ์นมต่างๆ⁽¹²⁾ ดังเช่นที่สามารถคัดแยก *Lactobacillus plantarum* 1 ออกมาได้จากมะเขือเทศ ซึ่งจัดอยู่สกุล *Lactobacillus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปท่อน ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างเอนไซม์อะไมเลส ไม่สร้างสปอร์⁽¹³⁾ นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียกรดแลคติกอื่นๆอีก ได้แก่ *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* และ *Bifidobacterium*⁽⁵⁾ ที่สามารถให้ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมจากการใช้น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นกรดแลคติก⁽¹⁴⁾ อย่างไรก็ตามสามารถแยกกลุ่มของแบคทีเรียกรดแลคติกออกเป็น 2 กลุ่ม คือ 1) homofermentative เป็นกลุ่มที่สามารถสร้างกรดแลคติกออกมาเพียงแบคทีเรียอื่น และ 2) heterofermentative เป็นกลุ่มที่สร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์อื่นได้หลายชนิดเช่นกรดอะซิติก กรดซิตริก และแบคทีเรียโอซิน รวมทั้ง CO_2 ดังนั้น *L. plantarum* 1 จึงน่าจะเป็นกลุ่ม heterofermentative เพราะให้แก๊สเกิดขึ้นระหว่างการบ่มเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

ตารางที่ 4 ปริมาณเซลล์ของแบคทีเรียโพรไบโอติก ไอโซเลต T9 ในน้ำผลไม้ชนิดต่าง ๆ ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 21 วัน

จำนวนวัน น้ำผลไม้	ปริมาณเซลล์ ¹							
	0	3	6	9	12	15	18	21
น้ำมะเขือเทศ								
1. เดิมโพรไบโอติกและ ไม่เติมสารพรีไบโอติก	7.0±0	7.0±0	7.4±0.23	8.0±0.23	5.7±0.24	5.6±0.32	5.3±0.19	5.2±0.19
2. เดิมโพรไบโอติกและ สารพรีไบโอติก	7.0±0	7.0±0	7.2±0.11	6.0±0.32	5.9±0.11	5.7±0.23	5.3±0.28	5.3±0.23
น้ำแตงโม								
1. เดิมโพรไบโอติกและ ไม่เติมสารพรีไบโอติก	7.0±0	7.0±0	7.2±0.23	6.7±0.2	6.0±0.21	5.2±0.29	5.2±0.27	5.4±0.21
2. เดิมโพรไบโอติกและ สารพรีไบโอติก	7.0±0	7.0±0	6.8±0.18	6.7±0.2	6.0±0.34	5.6±0.32	5.1±0.34	5.0±0.31
น้ำมะพร้าว								
1. เดิมโพรไบโอติกและ ไม่เติมสารพรีไบโอติก	7.0±0	7.0±0	5.4±0.37	0	0	0	0	0
2. เดิมโพรไบโอติกและ สารพรีไบโอติก	7.0±0	7.0±0	5.4±0.22	0	0	0	0	0
0.85 NaCl								
1. เดิมโพรไบโอติกและ ไม่เติมสารพรีไบโอติก	ND	ND	6.8±0.23	6.0±0.14	5.9±0.31	5.8±0.23	5.8±0.26	5.4±0.23
2. เดิมโพรไบโอติกและ สารพรีไบโอติก	ND	ND	6.3±0.25	6.0±0.16	5.8±0.25	5.9±0.24	5.9±0.22	5.3±0.21

ND; ไม่ได้ทำการตรวจนับปริมาณเซลล์

¹ ปริมาณเซลล์แสดงเป็นค่าเฉลี่ยของ log CFU/ml ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean log CFU/ml ± SD) จากการทำงานการทดลอง 2 ซ้ำ (ดูรายละเอียดในข้อ 2 ในหัวข้อวิธีการศึกษา) และตรวจนับทุกๆ 3 วัน จนครบ 21 วัน

MRS⁽⁴⁾ และสอดคล้องกับการจัดแบ่งกลุ่มเชื้อของชุดทดสอบ 3M Petrifilm™ สำหรับแบคทีเรียที่เจริญโดยใช้อากาศที่ประยุกต์มาใช้สำหรับแบคทีเรียกรดแลคติก⁽¹¹⁾

คุณสมบัติของแบคทีเรียที่สามารถนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกที่ดีคือ 1. เกาะติดพื้นผิวได้ดี 2. ทนกรดและด่างได้ 3. สร้างสารเมตาบอไลต์ออกมายับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่น 4. ทนทานต่อยาปฏิชีวนะได้ 5. ทนทานต่อการเก็บรักษาได้นาน⁽¹⁵⁾ ซึ่ง *L. plantarum* 1 มี

คุณสมบัติที่ดีเหมาะแก่การนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกได้ โดยสามารถเกาะติดพื้นผิวแน่นและนานรวมไปถึงมีการสร้างสารเมตาบอไลต์ออกมายับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่น 6 ชนิด (*M. luteus* TISTR 884, *B. subtilis* ATCC 6633, *Salm. typhimurium* TISTR 292, *Staph. aureus* TISTR 517, *E. coli* TISTR 887, *Ps. aeruginosa* TISTR 1467) อีกทั้งมีความทนทานต่อกรดและจุลชีพ เช่น oxacillin และสามารถทนต่อกรดและด่างที่ pH 2-10 ซึ่งอาจมีประโยชน์ในแง่ของ



การนำไปใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะในมนุษย์และ/หรือสัตว์ นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับการนำแบคทีเรียโพรไบโอติกไปใช้ร่วมกับสารพรีไบโอติกที่เรียกว่า “ซินไบโอติก” โดยใช้คุณสมบัติของสารพรีไบโอติกในการช่วยสนับสนุนการเจริญของโพรไบโอติก⁽¹⁶⁾ ซึ่งผักและผลไม้บางชนิด เช่น ถั่วลิสง ถั่วเขียว ถั่วเหลือง มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกที่ดีกล่าวคือเป็นสารที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของโพรไบโอติก⁽¹⁷⁾ แต่จากการทดลองพบว่าน้ำผลไม้ที่เติมและไม่เติมสารพรีไบโอติกไม่มีผลต่อการเหลือรอดชีวิตของ *L. plantarum* 1 อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) เมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสซึ่งอาจเป็นเพราะอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมในการเจริญของแบคทีเรีย แต่อาจจะเจริญได้ดีหากเข้าไปอยู่ในร่างกายของมนุษย์ และมีสารพรีไบโอติกช่วยสนับสนุนการเจริญของแบคทีเรียที่มีประโยชน์เหล่านั้นซึ่งอาจจะช่วยสร้างเสริมสุขภาพที่ดีให้แก่ร่างกายผู้ถูกอาศัย

มีรายงานการนำ *L. plantarum* ไปใช้ประโยชน์ในมุมมองของโพรไบโอติกอย่างแพร่หลายทั้งทางด้านปศุสัตว์⁽¹⁸⁾ และสัตว์น้ำ⁽¹⁹⁾ นอกจากนี้ยังมีการนำแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดอื่นๆ (*L. casei*, *L. delbrueckii*, *L. leichmanii*) มาผสมรวมกันกับอาหารได้แก่ ผลิตภัณฑ์นม นมผง เครื่องดื่ม น้ำผลไม้ เป็นต้น เพื่อเป็นการปรับปรุงคุณภาพของผลิตภัณฑ์ให้มีคุณสมบัติที่ดีต่อร่างกายผู้บริโภคมากขึ้น⁽²⁰⁾ ซึ่งจะเรียกรวมว่า “อาหารฟังก์ชัน” แต่อย่างไรก็ตามองค์ประกอบทางเคมีบางชนิดที่มีอยู่ในอาหารผสมเหล่านั้นอาจเป็นตัวยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ผสมรวมเข้าไป⁽²¹⁾ ซึ่งในการทดลองครั้งนี้พบว่า *L. plantarum* 1 ที่ผสมรวมกับน้ำแตงโม น้ำมะเขือเทศและน้ำมะพร้าว ซึ่งมีระดับความหวานวัดเป็น

องศาบริกซ์ได้เท่ากับ 7.5, 4.2 และ 6.1 ตามลำดับสามารถมีชีวิตเหลือรอดได้มากที่สุดใต้น้ำแตงโม รองลงมาคือ น้ำมะเขือเทศ และต่ำสุดคือน้ำมะพร้าว อันอาจเนื่องมาจากระดับน้ำตาลที่มีมากใต้น้ำแตงโมอาจช่วยส่งเสริมให้เชื้อเหลือรอดอยู่ได้เป็นจำนวนมากและเป็นเวลานานดังเช่นเคยมีรายงานว่าน้ำตาลซูโครสได้ถูกนำมาใช้ในการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียทดแทนการใช้ 15% กลีเซอรอลในการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิแช่เยือกแข็งได้⁽²²⁾ นอกจากนี้ปัจจัยทางด้านปริมาณน้ำตาลแล้ว pH ของน้ำผลไม้และองค์ประกอบทางเคมีอื่นๆ ยังอาจเป็นปัจจัยโดยตรงที่ส่งผลกระทบต่อการมีชีวิตเหลือรอดของแบคทีเรียได้ด้วยเช่นกัน⁽²⁰⁾ ซึ่งควรต้องมีการศึกษาในรายละเอียดนี้ให้มากขึ้นในการวิจัยครั้งต่อไป รวมถึงศึกษาเกี่ยวกับการนำเอาแบคทีเรียที่คัดแยกได้ไปหมักน้ำผลไม้เพื่อให้เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ใหม่ที่มีประโยชน์มากขึ้นกว่าเดิมดังเช่นที่ได้เคยมีการศึกษามาก่อนแล้วในน้ำหมักกะหล่ำปลีเพื่อใช้เป็นอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์โดยพบว่าจุลินทรีย์ก่อโรคหลายชนิดถูกทำลายไปได้อย่างสิ้นเชิง⁽²³⁾

■ สรุปผลการทดลอง

สามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกชนิด *Lactobacillus plantarum* 1 ได้จากมะเขือเทศ และแสดงคุณลักษณะของการเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ดี กล่าวคือมีความสามารถเกาะติดพื้นผิวและทนทานความเป็นกรด-ด่างได้ดี (pH 2-10) อีกทั้งสามารถผลิตสารเมตาบอไลต์ออกมายับยั้ง จุลินทรีย์อื่นๆ ได้แก่ *Micrococcus luteus* TISTR 884, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Salmonella typhimurium* TISTR 292, *Staphylococcus aureus* TISTR 517, *Escherichia coli* TISTR 887, *Pseudomonas aeruginosa*

TISTR 1467 และมีความทนทานต่อยาปฏิชีวนะบางชนิดเช่น *carbenicillin*, *oxacillin* รวมทั้งสามารถเลือกรอดชีวิตได้เป็นเวลาอย่างน้อย 1 เดือน เมื่อเก็บรักษาไว้ใน 15% กลีเซอรอล ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และสามารถเลือกรอดชีวิตได้ดีในน้ำแดงโมและน้ำมะเขือเทศที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลาอย่างน้อย 21 วัน แต่การเลือกรอดชีวิตของแบคทีเรียดังกล่าวในน้ำผลไม้ที่เดิมและไม่เต็มโพรไบโอติกไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%²($p < 0.05$)

■ กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากกองทุนสนับสนุนการวิจัย (RSA5080008) และได้รับทุนสนับสนุนบางส่วนจากงบประมาณแผ่นดิน ปีการศึกษา 2551 (WU51109) จากมหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ จังหวัดนครศรีธรรมราช ขอขอบคุณบริษัทแอมเวย์ (ประเทศไทย) จำกัดที่ได้อนุเคราะห์ผลิตภัณฑ์นิวทริไลท์โพรไบโอติก และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ที่ได้กรุณาอำนวยความสะดวกในการใช้ห้องปฏิบัติการ

เอกสารอ้างอิง

- 1.เพ็ญนา ทวีชัยเจริญ. น้ำสมุนไพร. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์สงเคราะห์ทหารผ่านศึก; 2549; 60, 108, 122
- 2.สุจิตตา เรืองศรี. เรายังรู้จักสารเสริมชีวะ... กันเถอะ. วารสารจารย์พา 2546 ; 72: 32-36.
- 3.เฉลิมขวัญ คำคำ มัลลิกา ชมนาวัง. คุณรู้จักโพรไบโอติกแล้วหรือยัง. วารสารวิชาการ 2548; 35:96-109.
- 4.พงษ์เทพ วิไลพันธ์. แบคทีเรียโพรไบโอติก (ตอนที่ 1). วารสารจารย์พา 2546 ; 72: 16-26.
- 5.ธราวรัตน์ ศุภศิริ. ฟังก์ชันผลิตภัณฑ์ : อาหารเพื่อสุขภาพ. วารสารเศรษฐศาสตร์อุตสาหกรรม 2548; 2 : 56-60.
- 6.หมอมเปรม. มารูจักนมเปรี้ยวกัน. เข้าถึงเมื่อวันที่ 1 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2551 (วารสารสารสนเทศออนไลน์). สืบค้นได้จาก URL: <http://www.agalic.com/board/showthread.php?p=26311>
- 7.วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. การคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อใช้เป็นโพรไบโอติก. เข้าถึงเมื่อวันที่ 5 มกราคม พ.ศ.2552 (วารสารสารสนเทศออนไลน์). สืบค้นได้จาก URL: http://library.uru.ac.th/webdb/images/charpa_probio5.html
- 8.Biomerieux. คู่มือการใช้ชุดทดสอบ API50CHL; 2551.
- 9.Wikipedia The Free Encyclopedia. Kirby-Bauer antibiotic testing (KB testing or disk diffusion antibiotic sensitivity testing). เข้าถึงเมื่อวันที่ 5 มกราคม พ.ศ.2552 (วารสารสารสนเทศออนไลน์). สืบค้นได้จาก URL: http://en.wikipedia.org/wiki/Kirby-Bauer_antibiotic_testing
- 10.บริษัท แอมเวย์ (ประเทศไทย) จำกัด. ผลิตภัณฑ์นิวทริไลท์ โฟเบอร์ พาวเดอร์; 2551.
- 11.3M™Petrifilm™. คู่มือการแปลผล 3M™ Petrifilm™ Aerobic Count Plate Use for Growing Lactic Acid Bacteria. เข้าถึงเมื่อวันที่ 9 มกราคม พ.ศ.2552 (วารสารสารสนเทศออนไลน์). สืบค้นได้จาก URL: <http://multimedia.mmm.com/mws/mediawebserver.dyn?6666660Zjcf6lVs6EVs6665JCOrrMQ-> และสืบค้นได้จาก URL: http://quiro.uab.es/workshopMRAMA/Petrifilm_LAB.pdf
- 12.Hoover G.D., Steenson R.L. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. San Diego California: Academic Press, Inc. 1993; 70-77.
- 13.Norrell A.S., Messley E.K. Microbiological Laboratory Manual: Principle and Application. Upper Saddle River NJ: Prentice-Hall, 1997; 185-191.
- 14.ปาริชาติ พุ่มขจร, พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ. แลคติกแอซิดแบคทีเรีย: สารยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์. วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด 2542; 12(3): 101-107.
- 15.จุฬาทิพย์ บุญเกิด, วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. การคัดเลือกและจำแนกแบคทีเรีย กรดแลคติกจากนํ้านมข้าวเพื่อผลิตโยเกิร์ต. การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 44 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 30 มกราคม-2 กุมภาพันธ์ พ.ศ.2549. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- 16.ศัลยา คงสมบูรณ์เวช. อาหารฟังก์ชันและการส่งเสริมสุขภาพ. วารสารโภชนาบำบัด 2546; 14: 6-17.
- 17.วัลลภ พรเรืองวงศ์. กล้วย ยอดอาหารเสริม. คลังนํ้านมสุขภาพ. เข้าถึงวันที่ 2 พฤศจิกายน พ.ศ.2551 (วารสารสารสนเทศออนไลน์). เข้าถึงได้จาก URL: <http://webmail.wu.ac.th/src/download.php>
- 18.ชัยวุฒิ สุดทองคง. โรคและการป้องกันในการเพาะเลี้ยงกุ้ง. ใน: เอกสารประกอบการสัมมนาวันกุ้งจังหวัดระยอง ครั้งที่ 10. วันที่ 21-22 มกราคม พ.ศ.2549 ณ โรงแรมเคพีแกรนด์ จังหวัดจันทบุรี; หน้า 69-70.
- 19.เขวามาลย์ คำเจริญ. กลยุทธ์ที่สำคัญ 12 ประการในการแปรรูปอาหารสุกรโดยการลดการใช้ยาต้านจุลชีพ และสารเร่งเนื้อแดงในอาหารสุกร. วารสารสุกร ก.ค.-ก.ย. 2545; 6(21): 60-62.
- 20.สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย(วว.). ฝ่ายเทคโนโลยีอาหาร. จุลินทรีย์โพรไบโอติก : การเลือกใหม่ในอุตสาหกรรมอาหาร. Asia Pacific Food Industry Thailand September- October 2006; 31-34.
- 21.อามันนี ปือราเชง. การเลือกรอดชีวิตของเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกในน้ำผลไม้ชนิดต่างๆ. เข้าถึงเมื่อวันที่ 20 ตุลาคม พ.ศ.2551 (วารสารสารสนเทศออนไลน์). สืบค้นได้จาก URL: http://valor.yru.ac.th/~dolah/notes/4605-2-49G20/REPORT/R_404941034.doc
- 22.คณาจารย์ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 4.กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 2546; หน้า 440-453.
- 23.Yoon K.Y., Woodams E.E., Hang Y.D. Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria. Biores Technol 2006; 97: 1427-1430.

การศึกษาความเป็นพิษของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรีย *Brevibacillus laterosporus* SA14 ต่อเซลล์มะเร็งช่องปากและเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ

Investigation of the cytotoxicity of biocompounds produced from *Brevibacillus laterosporus* SA14 on human oral carcinoma cells and normal lymphocytes

นันทวัน อุทัยพันธ์, สุรดา เศรษฐการ, ศิริประภา สารานพคุณ, สมพร ทาบัว, ลัดลาวัลย์ สนิท, วราภรณ์ หมื่นสัน, มณฑล เลิศกณาวนิชกุล, วรางคณา จุ่งลก*

Nantawan Utaipan, Surada Satthakarn, Siriprapa Saranobpakun, Somporn Thabua, Ladlawan Sanit, Waraporn Meensan, Monthon Lertcanawanichakul, Warangkana Chunglok*

School of Allied Health Sciences and Public Health, Walailak University, Thasala, Nakhon Si Thammarat, 80160, Thailand

*e-mail: cwarang@wu.ac.th

บทคัดย่อ: จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าแบคทีเรียในกลุ่ม *Brevibacillus laterosporus* สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ มากมายเช่นฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ลูกน้ำยุงลาย และปรสิต อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติของชีวสารจากแบคทีเรียดังกล่าว การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นพิษของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรีย *Brevibacillus laterosporus* สายพันธุ์ SA14 (*Brev. laterosporus* SA14) ต่อเซลล์มะเร็งช่องปากและเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ โดยใช้โปรตีนชีวสารจากเชื้อที่ผ่านการตกตะกอนโปรตีนด้วย 80% ammonium sulfate ที่ความเข้มข้นในช่วง 10–80 µg protein/ml มาทดสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์โดยวิธี MTT ผลการศึกษาพบว่าโปรตีนชีวสารจาก SA14 สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งช่องปากได้ร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 34 µg protein/ml และโปรตีนชีวสารที่ใช้ทุกความเข้มข้นพบว่าไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียวพบว่าไม่ผลต่อเซลล์มะเร็งช่องปากเพียงเล็กน้อยแต่มีผลกระตุ้นจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ การศึกษาครั้งนี้จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่จะนำสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพไปใช้ประโยชน์ในการแพทย์โดยคำนึงถึงความปลอดภัยของการนำไปใช้เพื่อที่จะนำไปพัฒนาต่อเป็นสารต้นแบบสำหรับการรักษาโรคได้ต่อไปในอนาคต

Abstract: Biocompounds produced from *Brevibacillus laterosporus* strain SA14 (*Brev. laterosporus* SA14) had been documented on their abilities to inhibit a wide range of microorganisms including bacteria, mosquito larva, and parasites. However, there is no report on the effects of biocompounds produced from these bacteria on normal and cancer cells. The objective of this study was aimed to investigate the cytotoxicity of biocompounds produced from *Brev. laterosporus* SA14 on normal lymphocytes and human mouth carcinoma cells. Partially purified protein was obtained from 80% ammonium sulfate precipitation of the culture medium. The concentrations of protein used in this study were at 10–80 µg protein/ml and cytotoxicity was analyzed by MTT assay. The results showed that biocompounds produced from *Brev. laterosporus* SA14 in every concentration used did not cause cytotoxicity on normal lymphocytes. LB medium had a minimal effect on cancer cells but had

stimulatory activity on normal lymphocytes. Thus, non-toxic biocompounds produced from *Brev. laterosporus* SA14 provide a promising source of bioactive agents which may be used in medical procedures in the future.

Introduction: It has been documented that *Bacillus* spp. produces a large number of biocompounds with broad-spectrum activity¹. Especially, *Brevibacillus laterosporus* has been known to inhibit a wide range of organisms including insects², parasites³, and bacteria⁴. Among the strains of *Brev. Laterosporus*, *Brev. laterosporus* SA14 has been known to have anti-methicillin resistance *Staphylococcus aureus* (anti-MRSA) and all strains of clinical isolates of MRSA^{4,5}. However, there is no report on the cytotoxic effects of this bacteria on both normal and cancer cells. Thus, the objective of this study was aimed to investigate cytotoxicity of the biocompounds produced from *Brev. laterosporus* SA14 on both normal and cancer cells.

Methodology:

Preparation of partially purified protein from *Brev. laterosporus* SA14

Brev. laterosporus SA14 was cultured in Luria Bertni (LB) (Scharlau) medium as described previously^{4,5}. The cultured medium was collected and partially purified protein was obtained by using 80% ammonium sulfate precipitation. For control, LB culture medium without *Brev. laterosporus* SA14 was prepared according to the same condition as culture broth from SA14. Protein concentration was determined by using BioRad protein assay kit (Bio-Rad).

Culture of human oral carcinoma cells (CLS-354)

CLS-354 cells (Cell Line Service) at passage number 24 were cultured at a density of 1×10^6 cells/75 cm² in a complete media containing RPMI-1640 (PAA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Biochrome AG), 1% penicillin/streptomycin (PAA) and 2 mM stable glutamine (PAA) for 48 h at 37°C in humidified 5% CO₂ atmosphere. Cells were then trypsinized and plated at a density of 3×10^4 cells/1.88 cm² (24 well plate) for 48 h in order to perform cytotoxicity test.

Preparation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)

EDTA blood was collected from 3 healthy volunteers. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by using Ficoll-Hypaque gradients technique⁶ and cells were suspended in RPMI-1640 supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin and 2 mM stable glutamine. PBMCs were then seeded at a density of 1×10^5 cells/1.88 cm² and incubated at 37°C in humidified 5% CO₂ atmosphere.

Cytotoxicity test

CLS-354 cells and normal lymphocytes were then treated with partially purified protein from *Brev. laterosporus* SA14 at a concentration ranged from 10–80 µg protein/ml. For control, cells were treated with LB culture medium. Cells were incubated for 24 h at 37°C in humidified 5% CO₂ atmosphere. After treatment, cell viability was performed by MTT (3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay⁷. Data were analyzed from three-independent experiment in duplicate.

Results, Discussion and Conclusion: Following treatment of CLS-354 cells with the partially purified protein from SA14 at a concentration of 10, 20, 40 and 80 µg protein/ml, the percentage of cell viability was evaluated by MTT assay. Data were obtained from three-independent experiment in duplicate. The results showed that partially purified protein from SA14 could inhibit growth of cancer cells in a dose-dependent manner with a half maximal inhibitory concentration of 34 µg protein/ml (IC₅₀ = 34 µg protein/ml) as shown in Figure 1. LB had only a minimal effect on cancer cells.

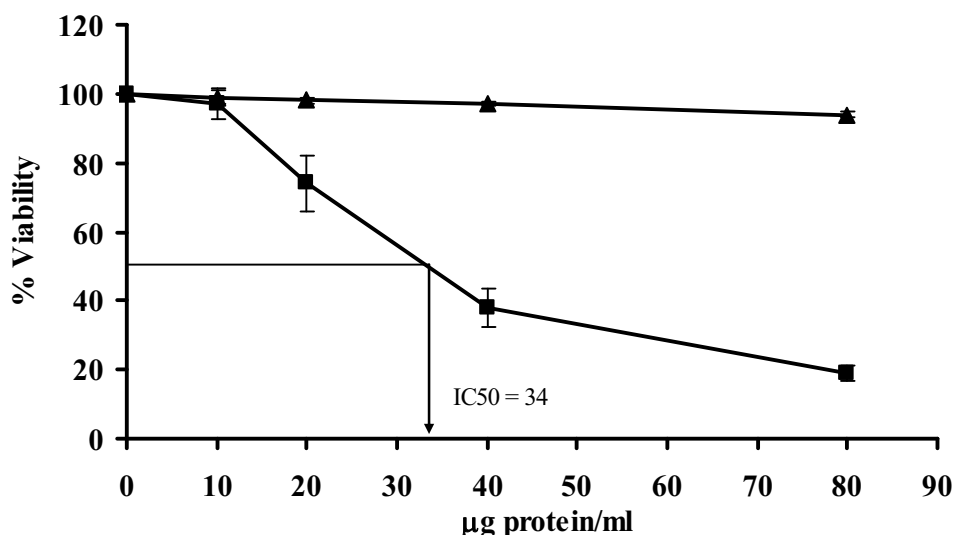


Figure 1. Cell viability of CLS-354 cells upon treatment with partially purified protein from SA 14 (■) and LB (▲).

Partially purified protein from SA14 did not cause toxicity to normal lymphocytes as shown in Figure 2. In addition, normal lymphocytes were markedly stimulated in every concentration used. To determine the adverse effect of LB culture medium on viability of the cells, normal lymphocytes were treated with the same concentration as treated by partially purified protein from SA14. LB was not toxic to normal cells. Thus, biocompounds from SA14 at a concentration used was not toxic to normal cells.

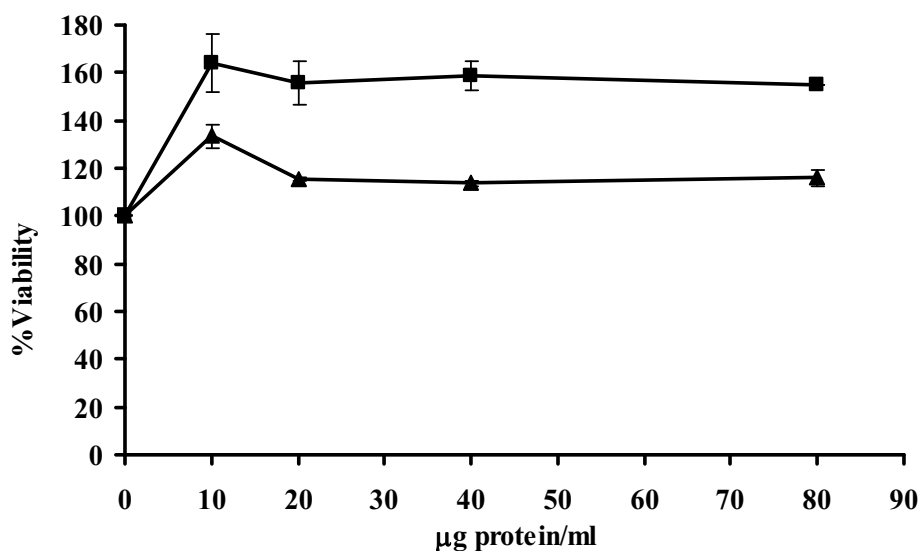


Figure 2. Cell viability of normal lymphocytes upon treatment with partially purified protein from SA 14 (■) and LB (▲).

The present study showed that biocompounds from SA14 displayed antiproliferative activity against cancer cells but exhibited non-cytotoxic effect on normal lymphocytes. The cytotoxicity of biocompounds from bacteria against some cell types has been reported⁸. Culture medium obtained from *Bacillus polyfermenticus* was found to inhibit the growth of

human colon cancer cells⁹. It has been documented that some peptides were cytotoxic to tumor cells¹. The effects of biocompounds produced from SA14 on both normal and cancer cells may be the results of microbial peptides produced by bacteria. This was suggested that cytotoxicity may relate to plasma membrane composition and metabolic activity of target cells which have different sensitivity to the disruptive effects of the biocompounds¹⁰.

It has been reported that the probiotic *B. cereus* var. *toyoi* could stimulate the proliferation of naïve CD21+ cells and affected the immune cell population ratio¹¹. The proliferative response of PBMCs to SA14 may likely from the bacterial antigens.

In conclusion, cytotoxic effects of biocompounds produced by *Brev. laterosporus* SA14 was observed on cancer cells but not normal cells. The specificity toward cancer cells may prompt us to continue our work in identification and characterization of the biocompounds. The biocompounds produced from SA14 may be a promising source of bioactive agents against this type of cancer which need to be further evaluated.

References:

1. Reddy, K. V. R.; Yedery, R. D.; Aranha, C. *Int J Antimicrob Agents*. **2004**, 24, 536–547.
2. Ruiiu, L.; Floris, I.; Satta, A.; Ellar, D. J. *Biological Control*. **2007**, 43, 136–143.
3. Huang, X.; Tian, B.; Niu, Q.; Yang, J.; Zhang, L.; Zhang, K. *Res Microbiol*. **2005**, 156, 719-27.
4. Choopan, A.; Nakbud, K.; Dawveerakul, K.; Chawawist, K.; Lertcanawanichakul, M. *Walailak J Sci & Tech*. **2008**, 5, 47-56.
5. Chawawisit, K.; Lertcanawanichakul, M. *World J Microbiol Biotechnol*. **2008**, 24, 2199–2204.
6. Bennett, S.; Por, S. B. E. R.; Stanley, S. N. *J Immunol Methods*. **1992**, 153, 201-212.
7. Mossmann, T. *J Immunol Methods*. **1983**, 65, 55–63.
8. Vaucher, R. A.; Teixeira, M. L.; Brandelli, A. *Curr Microbiol*. **2010**, 60, 1-5.
9. Ma, E. L.; Choi, Y. J.; Choi, J.; Pothoulakis, C.; Rhee, S. H.; Im, E. *Int J Cancer*. **2010**, 127, 780-90.
10. Mason, A. J.; Marquette, A.; Bechinger, B. *Biophys J*. **2007**, 93, 4289–4299.
11. Schierack, P.; Filter, M.; Scharek, L.; Toelke, C.; Tara, D.; Tedin, K.; Haverson, K.; Lübke-Becker, A.; Wieler, L. H. *Vet Immunol Immunopathol*. **2009**, 127, 26–37.

Acknowledgement: We gratefully acknowledge Institute of Research and Development, Walailak University for financial support (WU51109).

Keywords : *Brevibacillus laterosporus*, cytotoxicity



สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
THE THAILAND RESEARCH FUND

ที่ นร 6809/0160/2553

26 มีนาคม 2553

เรื่อง การลงนามในเอกสารเพื่อใช้ประกอบในการขอรับสิทธิบัตร

เรียน อธิการบดี มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์

ตามที่ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ได้ให้ทุนสนับสนุนแก่โครงการ "การพัฒนาแบบที่เรียกรวดแลคตัสสายพันธุ์ท้องถิ่นเพื่อใช้เป็นผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก" เลขที่สัญญา RSA5080008 ทำให้ได้ผลงานเรื่อง "เจลแถมสปีทที่มีผลต้านแบคทีเรียก่อสปีทที่ประกอบด้วยโปรตีนชีวสารที่บริสุทธิ์" โดยมี ผศ.ดร.มณฑล เลิศคนาวนิชกุลและดร.วรางคณา จุ่งลก สังกัดสำนักวิชาสหเวชศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์ เป็นผู้ประดิษฐ์ มีสกว., และมหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ เป็นผู้ขอรับสิทธิบัตรร่วมกัน

สกว. พิจารณาแล้วเห็นว่าเป็นผลงานที่มีศักยภาพและควรขอรับสิทธิบัตรในประเทศไทย สกว. ได้ยื่นคำขอรับสิทธิบัตรเมื่อวันที่ 25 มีนาคม 2553 และได้รับคำขอเลขที่ 1001000495 จึงขอนำส่งสำเนาคำขอรับสิทธิบัตรมายังท่าน และได้โปรดลงนามในเอกสารดังต่อไปนี้

1. สัญญาโอนสิทธิในการขอรับสิทธิบัตร
2. หนังสือมอบอำนาจ
3. สำเนาบัตรประชาชน/บัตรข้าราชการของท่าน พร้อมรับรองสำเนาถูกต้อง จำนวน 1 ชุด
4. เอกสารการแต่งตั้งพร้อมรับรองสำเนาถูกต้องจำนวน 1 ชุด

จึงเรียนมาเพื่อทราบและโปรดลงนามในเอกสารดังกล่าวพร้อมส่งกลับมายังสกว. ด้วย จักขอขอบคุณยิ่ง

ขอแสดงความนับถือ

(รศ.ดร.พีรเดช ทองอำไพ)

รองผู้อำนวยการสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

งานทรัพย์สินทางปัญญา สำนักผู้อำนวยการสกว.

โทร. 0-2278-8200 ต่อ 8204 (สมิตาภัสร์)

โทรสาร. 0-2298-0476/ e-mail : samitaphat@trf.or.th

"ถ้าคุณต้องการทำวิจัย...biodata ให้โอกาส เชิญลงทะเบียนรับทราบไทยวิจัย ที่ <http://biodata.trf.or.th>"

ชั้น 14 อาคาร เอส เอ็ม ทาวเวอร์ 979/17-21 ถนนพหลโยธิน แขวงสามเสนใน เขตพญาไท กรุงเทพฯ 10400
14th Floor, S M Tower, 979/17-21 Phaholyothin Road, Samsennai, Phayathai, Bangkok 10400, Thailand
Tel : +66 (0) 2278-8200 Fax : +66 (0) 2298-0476 [http:// www.trf.or.th](http://www.trf.or.th) E-mail : trf-info@trf.or.th

สร้างสรรค์ปัญญา เพื่อพัฒนาประเทศ

สำเนา



คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

- ☒ การประดิษฐ์
☐ การออกแบบผลิตภัณฑ์
☐ อนุสิทธิบัตร

ข้าพเจ้าผู้ลงลายมือชื่อในคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้
 ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ตามพระราชบัญญัติสิทธิบัตร พ.ศ 2522
 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติสิทธิบัตร (ฉบับที่ 2) พ.ศ 2535
 และ พระราชบัญญัติสิทธิบัตร (ฉบับที่ 3) พ.ศ 2542

สำหรับเจ้าหน้าที่

วันรับคำขอ 25 ส.ค. 2553

เลขที่คำขอ

วันยื่นคำขอ

1001000495

สัญลักษณ์จำแนกการประดิษฐ์ระหว่างประเทศ

ใช้กับแบบผลิตภัณฑ์

ประเภทผลิตภัณฑ์

วันประกาศโฆษณา

เลขที่ประกาศโฆษณา

วันออกสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

เลขที่สิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

ลายมือชื่อเจ้าหน้าที่

1. ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์/การออกแบบผลิตภัณฑ์

เจลแต้มผิวที่มีผลต้านแบคทีเรียก่อสิวที่ประกอบด้วยโปรตีนชีวสารกึ่งบริสุทธิ์

2. คำขอรับสิทธิบัตรการออกแบบผลิตภัณฑ์นี้เป็นคำขอสำหรับแบบผลิตภัณฑ์อย่างเดียวกันและเป็นคำขอลำดับที่

ในจำนวน คำขอ ที่ยื่นในคราวเดียวกัน

3. ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร และที่อยู่ (เลขที่ ถนน ประเทศ)

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย อยู่เลขที่ 979/17-21 ชั้น 14 อาคาร
 เอส เอ็ม ทาวเวอร์ แขวงสามเสนใน เขตพญาไท กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย
 10400 (ดูต่อที่หน้า 3)

3.1 สัญชาติ ไทย

3.2 โทรศัพท์ 02 278 8204

3.3 โทรสาร 02 298 0476

3.4 อีเมล samitaphat@trf.or.th

4. สิทธิในการขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

☐ ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบ ☒ ผู้รับโอน ☐ ผู้ขอรับสิทธิโดยเหตุอื่น

5. ตัวแทน(ถ้ามี)/ที่อยู่ (เลขที่ ถนน จังหวัด รหัสไปรษณีย์)

5.1 ตัวแทนเลขที่

5.2 โทรศัพท์

5.3 โทรสาร

5.4 อีเมล

6. ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบผลิตภัณฑ์ และที่อยู่ (เลขที่ ถนน ประเทศ)

นายมนทล เลิศคนวานิชกุล และนางสาววรางคณา จังลก อยู่ที่ สำนักวิชาสหเวชศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์
 เลขที่ 222 ตำบลไทยบุรี อำเภอท่าศาลา จังหวัดนครศรีธรรมราช 80160 ประเทศไทย

7. คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้แยกจากหรือเกี่ยวข้องกับคำขอเดิม

ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอให้ถือว่าได้ยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ ในวันเดียวกับคำขอรับสิทธิบัตร
 เลขที่ วันยื่น เพราะคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้แยกจากหรือเกี่ยวข้องกับคำขอเดิมเพราะ

☐ คำขอเดิมมีการประดิษฐ์หลายอย่าง ☐ ถูกคัดค้านเนื่องจากผู้ขอไม่มีสิทธิ ☐ ขอเปลี่ยนแปลงประเภทของสิทธิ

หมายเหตุ ในกรณีที่ไมอาจระบุรายละเอียดได้ครบถ้วน ให้จัดทำเป็นเอกสารแนบท้ายแบบพิมพ์นี้โดยระบุหมายเลขกำกับข้อและหัวข้อที่แสดงรายละเอียด
 เพิ่มเติมดังกล่าวด้วย

8.การยื่นคำขออนุญาตออกนอกราชอาณาจักร				
วันยื่นคำขอ	เลขที่คำขอ	ประเทศ	สัญลักษณ์จำแนกการ ประดิษฐ์ระหว่างประเทศ	สถานะคำขอ
8.1				
8.2				
8.3				

8.4 ☐ ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรขอสิทธิให้ถือว่าได้ยื่นคำขอนี้ในวันที่ได้ยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรในต่างประเทศเป็นครั้งแรกโดย
☐ ได้ยื่นเอกสารหลักฐานพร้อมคำขอนี้ ☐ ขอยื่นเอกสารหลักฐานหลังจากวันยื่นคำขอนี้

9.การแสดงผลการประดิษฐ์ หรือการออกแบบผลิตภัณฑ์ ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรได้แสดงผลการประดิษฐ์ที่หน่วยงานของรัฐเป็นผู้จัด
วันแสดง วันเปิดงานแสดง ผู้จัด

10.การประดิษฐ์เกี่ยวกับจุลชีพ

10.1 เลขทะเบียนฝากเก็บ	10.2 วันที่ฝากเก็บ	10.3 สถาบันฝากเก็บ/ประเทศ
------------------------	--------------------	---------------------------

11.ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอยื่นเอกสารภาษาต่างประเทศก่อนในวันยื่นคำขอนี้ และจะจัดยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ที่จัดทำ
เป็นภาษาไทยภายใน 90 วัน นับจากวันยื่นคำขอนี้ โดยขอยื่นเป็นภาษา

☐ อังกฤษ ☐ ฝรั่งเศส ☐ เยอรมัน ☐ ญี่ปุ่น ☐ อื่นๆ

12.ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอให้อธิบดีประกาศโฆษณาคำขอรับสิทธิบัตร หรือรับจดทะเบียน และประกาศโฆษณาอนุสิทธิบัตรนี้
หลังจากวันที่ เดือน พ.ศ.

☐ ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรขอให้ใช้รูปเขียนหมายเลข ในการประกาศโฆษณา

13.คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ประกอบด้วย

ก. แบบพิมพ์คำขอ 3 หน้า

ข. รายละเอียดการประดิษฐ์
หรือคำพรรณนาแบบผลิตภัณฑ์ 10 หน้า

ค. ข้อถ้อยสิทธิ 1 หน้า

ง. รูปเขียน รูป หน้า

จ. ภาพแสดงแบบผลิตภัณฑ์

☐ รูปเขียน รูป หน้า

☐ ภาพถ่าย รูป หน้า

ฉ. บทสรุปการประดิษฐ์ 1 หน้า

14.เอกสารประกอบคำขอ

☐ เอกสารแสดงสิทธิในการขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

☐ หนังสือรับรองการแสดงผลการประดิษฐ์/การออกแบบ
ผลิตภัณฑ์

☐ หนังสือมอบอำนาจ

☐ เอกสารรายละเอียดเกี่ยวกับจุลชีพ

☐ เอกสารการขอรับวันยื่นคำขอในต่างประเทศเป็นวันยื่น
คำขอในประเทศไทย

☐ เอกสารขอเปลี่ยนแปลงประเภทของสิทธิ

☐ เอกสารอื่นๆ

15. ข้าพเจ้าขอรับรองว่า

☒ การประดิษฐ์นี้ไม่เคยยื่นขอรับสิทธิบัตร/ อนุสิทธิบัตรมาก่อน

☐ การประดิษฐ์นี้ได้พัฒนาปรับปรุงมาจาก.....

6.ลายมือชื่อ (☐ ผู้ขอรับสิทธิบัตร / อนุสิทธิบัตร; ☐ ตัวแทน)



สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย โดย นายสวัสดิ์ ตันตระรัตน์)

หมายเหตุ บุคคลใดยื่นขอรับสิทธิบัตรการประดิษฐ์หรือการออกแบบผลิตภัณฑ์ หรืออนุสิทธิบัตร โดยการแสดงข้อความอันเป็นเท็จแก่พนักงานเจ้าหน้าที่ เพื่อให้
ได้ไปซึ่งสิทธิบัตรหรืออนุสิทธิบัตร ต้องระวางโทษจำคุกไม่เกินหกเดือน หรือปรับไม่เกินห้าพันบาท หรือทั้งจำทั้งปรับ

3. ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร และที่อยู่ (เลขที่ ถนน ประเทศ)

มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์

อยู่ที่ เลขที่ 222 ตำบลไทยบุรี อำเภอท่าศาลา จังหวัดนครศรีธรรมราช 80160 ประเทศไทย

สัญชาติ ไทย