สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

# การศึกษาคุณสมบัติของสารแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลกติกที่แยกจากระบบทางเดินอาหารของปลาสวาย

# Characterization of bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* isolated Striped catfish (*Pangasianodon htpophthalmas*)

T104638

โดย

นางสาว หทัยรัตน์ ญาณฤทธิ์

เลขหมู่.........
เลขทะเบียน 104638
วัน,เดือน,ปี - 5 พ.ย. 2552
b..........
i..........

ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง
คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
กรุงเทพมหานคร 10520

ปีการศึกษา 2551

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ใบรับรองปัญหาพิเศษ**
**ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง**

**เรื่อง** การศึกษาคุณสมบัติของสารแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลกติกที่แยกจากระบบทางเดินอาหารของปลาสวาย

Characterization of bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* isolated Striped catfish (*Pangasianodon htpophthalmas*)

**ชื่อนักศึกษา** นางสาว หทัยรัตน์ ญาณฤทธิ์

**ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา** ดร.จตุพร บัณฑิต

**ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม** ดร. คมแข พิลาสมบัติ

**ได้พิจารณาเห็นชอบโดย**

**อาจารย์ที่ปรึกษา** ..............................................

(ดร. จตุพร บัณฑิต)

**อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม** ..............................................

(ดร.คมแข พิลาสมบัติ)

**ภาควิชารับรองแล้ว**

..............................................

( .............................................. )

หัวหน้าภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง

วันที่ 25 เดือน พ.ค. พ.ศ. 2552

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทคัดย่อปัญหาพิเศษ

## เรื่อง

**การศึกษาคุณสมบัติของสารแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลกติกที่แยกจากระบบทางเดินอาหารของปลาสวาย**

**Characterization of bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* isolated Striped catfish (*Pangasianodon htpophthalmas*)**

ทำการศึกษาถึงคุณสมบัติของแบคทีเรีย *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* P2 ที่ได้จากการคัดแยกจากระบบทางเดินอาหารของปลาสวายที่สามารถผลิตสารแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้อเป้าหมาย โดยทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MRS และนำไปทดสอบกับค่าความเป็นกรดด่างระหว่าง 2 ถึง 10 ซึ่งผลิตสารแบคเทอริโอซินได้มากที่สุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6 - 7 โดยสามารถยับยั้งเชื้อได้ 51,200 Au/ml เมื่อนำไปทดสอบในความเข้มข้นต่างๆ ของเกลือ พบว่าสามารถเจริญเติบโตได้ในความเข้มข้นของเกลือเท่ากับ 1 - 4% โดยสามารถยับยั้งเชื้อได้สูงสุด 51,200 Au/ml เมื่อนำไปทดสอบการทนความร้อนที่ 100 ˚C ได้นานที่สุดเป็นเวลา 60 นาที สามารถยับยั้งเชื้อได้ 51,200 Au/ml และสามารถทนความร้อนที่ 121 ˚C นาน 15 นาที โดยสามารถยับยั้งเชื้อได้ 800 Au/ml และค่าความสัมพันธ์ระหว่างเวลา ค่าการดูดกลืนแสง 600 nm และค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซิน (Au/ml) เพื่อดูอัตราการเจริญเติบโต (Growth curve) ในแต่ละอุณหภูมิ คือ 30°, 37° และ 42°C พบว่าอุณหภูมิที่ 30°C มีการผลิตสารแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้อมากที่สุดถึง 51,200 Au/ml, ที่อุณหภูมิ 37°C มีการผลิตสารแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้อถึง 25,600 Au/ml และที่อุณหภูมิ 42°C มีการผลิตสารแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้อถึง 1,600 Au/ml และทำการทดสอบเชื้อ *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* P2 ที่นำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อดูค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซิน (Au/ml) เป็นเวลา 10 วัน พบว่ามีการผลิตสารแบคเทอริโอซินซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* JCM ได้มากที่สุดถึง 25,600 Au/ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# คำนิยม

ขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษา ดร. จตุพร บัณฑิต ที่คอยแนะนำและสั่งสอนในทุกๆเรื่อง ถึงการทำปัญหาพิเศษในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร. คมแข พิลาสมบัติ อาจารย์ประจำภาควิชาสัตวศาสตร์ที่คอยแนะนำและสั่งสอนในทุกๆเรื่อง และคอยให้ความรู้ถึงการทำปัญหาพิเศษ

ขอขอบคุณพี่ๆปริญญาโท กฤตพร รำจวนเกียรติ และพี่ๆนักวิชาการในห้องปฏิบัติการที่คอยให้ความรู้และคำแนะนำในทุกๆเรื่อง

ขอขอบคุณครอบครัว พ่อแม่ พี่น้อง ที่คอยเป็นกำลังใจให้และคอยเป็นห่วงถึงการทำปัญหาพิเศษในครั้งนี้

ขอขอบคุณเพื่อนๆและ ฐิติรัตน์ รัตนวิวัลย์ ที่ร่วมช่วยกันทำปัญหาพิเศษและคอยเป็นกำลังใจให้กันเสมอมา

นางสาว หทัยรัตน์ ญาณฤทธิ์

22 เมษายน 2552



สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**สารบัญ**

| | หน้า |
|---|---|
| สารบัญ | I |
| สารบัญตาราง | II |
| สารบัญภาพ | III |
| คำนำ | 1 |
| การตรวจเอกสาร | 2 |
| อุปกรณ์และวิธีการ | 11 |
| ผลการทดลองและวิจารณ์ | 15 |
| สรุปและข้อเสนอแนะ | 23 |
| เอกสารอ้างอิง | 24 |
| ภาคผนวก | 26 |

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญตาราง

| ตารางที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | ความสามารถของแบคทีเรียกรดแลกติกในการต้านทานเชื้อก่อโรค | 9 |
| 2 | ความสามารถในการต้านทานเชื้อก่อโรคในปลา | 10 |
| 3 | ความทหนทานของแบคทีเรียกรดแลกติกที่อยู่ในระดับ pH ที่แตกต่างกัน | 10 |
| 4 | การทนต่อความร้อน (Heat stability) ของเชื้อ P2 และค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซิน (Au/ml) | 17 |
| 5 | ความสามารถในการทนต่อกรดและด่างของเชื้อ P2 ต่อเชื้อเป้าหมายและค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซิน (AU/ml) | 18 |
| 6 | ความสามารถในการทนต่อเกลือของเชื้อ P2 ต่อเชื้อเป้าหมายและค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซิน (AU/ml) | 20 |
| 7 | ความสามารถของเชื้อ P2 ที่นำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อดูค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซิน (Au/ml) เป็นเวลา 10 วัน โดยใช้ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 และ *Leuco. mesenteroides* JCM เป็นเชื้อเป้าหมาย | 22 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**สารบัญภาพ**

| ภาพที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | ลักษณะทั่วไปของปลาสวาย | 2 |
| 2 | การสร้างสารแบคเทอริโอซินที่มีการยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei JCM* | 7 |
| 3 | แสดงการเกาะติดของแบคทีเรียกรดแลกติกที่บริเวณลำไส้และผิวหนัง | 8 |
| 4 | แสดงการเกาะติดของเชื้อก่อโรคที่บริเวณลำไส้และผิวหนัง | 8 |
| 5 | การเจริญเติบโตของเชื้อ P2 และค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินที่อุณหภูมิ 30°C | 15 |
| 6 | การเจริญเติบโตของเชื้อ P2 และค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินที่อุณหภูมิ 37°C | 15 |
| 7 | การเจริญเติบโตของเชื้อ P2 และค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินที่อุณหภูมิ 42°C | 16 |

| ภาพผนวกที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | การผลิตสารแบคเทอริโอซินต่อการยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei JCM* | 26 |
| 2 | การผลิตสารแบคเทอริโอซินต่อการยับยั้งเชื้อ *Leuco. mesenteroides* JCM | 26 |
| 3 | ความทนต่อกรด-ด่างที่ pH 2 ของสารแบคเทอริโอซินต่อการยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* JCM | 27 |
| 4 | ความทนต่อกรด-ด่างที่ pH 3 ของสารแบคเทอริโอซินต่อการยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* JCM | 27 |
| 5 | ความทนต่อกรด-ด่างที่ pH 5 ของสารแบคเทอริโอซินต่อการยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* JCM | 28 |
| 6 | ความทนต่อกรด-ด่างที่ pH 7 ของสารแบคเทอริโอซินต่อการยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* JCM | 28 |
| 7 | ความทนต่อกรด-ด่างที่ pH 8 ของสารแบคเทอริโอซินต่อการยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* JCM | 29 |
| 8 | ความทนต่อกรด-ด่างที่ pH 9 ของสารแบคเทอริโอซินต่อการยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* JCM | 29 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# คำนำ

ในปัจจุบันมีการศึกษาถึงคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลกติก โดยแบคทีเรียกรดแลกติกเหล่านี้สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซิน ( bacteriocins ) และได้ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น กระบวนการหมักอาหาร และได้มาจากระบบทางเดินอาหารของสัตว์ชนิดต่างๆ เช่น ลำไส้ไก่ ลำไส้ปลา เป็นต้น สารแบคเทอริโอซินนั้นเป็นสายเปปไทด์ที่มีฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียเชื้อเป้าหมายและเชื้อแบคทีเรียที่พบในอาหารซึ่งอาจทำให้อาหารเน่าเสียได้ โดยแบคเทอริโอซินจะทำให้เกิดการเสียสมดุลย์ภายในเชื้อเป้าหมาย แบคเทอริโอซินจะพบได้ในเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆแต่ที่นิยมทำการศึกษากันมาก คือ ในแบคทีเรียกรดแลกติก ซึ่งมีคุณสมบัติในการสร้างสารแบคเทอริโอซินก็จะนำไปทดสอบกับค่าความเป็นกรดด่าง เกลือและยาปฏิชีวนะ ซึ่งผลที่ได้ก็จะเป็นค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินที่สามารถยับยั้งเชื้อเป้าหมายได้

## วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาถึงคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกในการสร้างสารแบคเทอริโอซินจากระบบทางเดินอาหารของปลาสวาย

## ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เพื่อให้เป็นแนวทางในการศึกษาถึงคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลกติกในการนำมาใช้เป็นแนวทางในการศึกษาทางด้านการประมงต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ตรวจเอกสาร

### 1. ลักษณะทางชีววิทยาของปลาสวาย

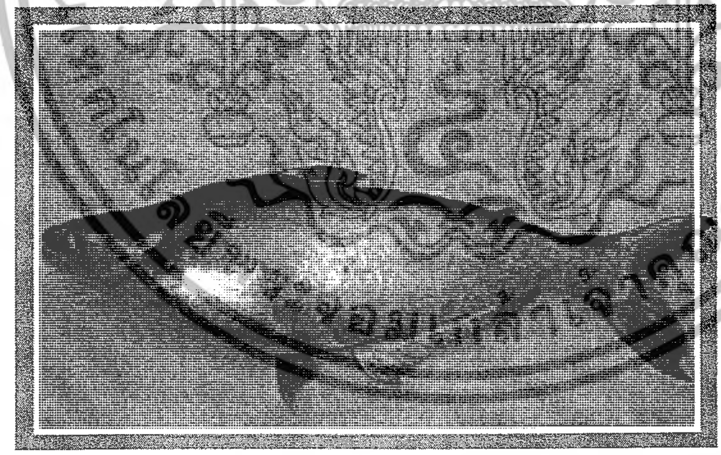
การจำแนกชั้นทางวิทยาศาสตร์

| | |
|---|---|
| อาณาจักร | Animalia |
| ไฟลัม | Chordata |
| ชั้น | Actinopterygii |
| อันดับ | Siluriformes |
| วงศ์ | Pangasiidae |
| สกุล | Pangasianodon |
| สปีชีส์ | *P. hypophthamus* |

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Pangasianodon htpophthalmas*

ชื่อสามัญ Striped catfish

ชื่อไทย ปลาสวาย อ้ายด้อง ปลาซวย



**ภาพที่ 1 ลักษณะทั่วไปของปลาสวาย**

**ที่มา**: http://www.lovelovefish.com/webboard/index.php?topic=15.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ลักษณะทั่วไป

เป็นปลาน้ำจืดที่ไม่มีเกล็ด ชอบอยู่รวมกันเป็นฝูงสกุลเดียวกับปลาเทโพ มีรูปร่างลักษณะความเป็นอยู่คล้ายกับปลาเทโพ ลำตัวยาว มีสันหลังค่อนข้างตรง ส่วนหน้าจะลาดไปถึงบริเวณปาก หน้าทู่ปากกว้างมีหนวด 2 คู่ ลำตัวมีสีนวลขาว บริเวณหลังมีสีเข้ม ครีบมีสีเหลืองอ่อน ปลาสวายขนาดเล็กจะมีแถบสีดำคาดลำตัว ขนาดความยาวประมาณ 20 - 10 เซนติเมตร ถิ่นอาศัยพบในลุ่มแม่น้ำเจ้าพระยาและแม่น้ำโขง

## อาหาร

อาหาร ปลาสวายเป็นปลาที่ไม่เลือกอาหาร กินอาหารง่าย กินได้ทั้งเนื้อสัตว์และพืชผัก ปลาสวายชอบกินอาหารพวกเนื้อสัตว์มากว่าพืชผัก อาหารที่ว่านี้ ได้แก่พวกปลาเล็ก ๆ เช่น ปลาสร้อย หรือปลาไส้ตัน ทั้งสดและที่ตายแล้ว โดยวิธีสับหรือบดให้ละเอียดเสียก่อน

## 2. แบคทีเรียกรดแลกติก

ในธรรมชาติสามารถพบแบคทีเรียได้หลายชนิดและพบได้ในอาหารหลายประเภท เช่น ผัก ผลไม้ แป้ง ไข่ นม และเนื้อสัตว์ เป็นต้น แบคทีเรียบางชนิดทำให้อาหารเน่าเสียเกิดจากการสร้างสารพิษในอาหาร แบคทีเรียบางชนิดก็มีประโยชน์สามารถนำมาใช้ในวงการอุตสาหกรรมอาหาร เช่น แบคทีเรียกรดแลกติก มีความสามารถในการใช้น้ำตาลกลูโคสแล้วเปลี่ยนเป็นกรดแลกติก (lactic acid) และแบคเทอริโอซิน (bacteriocin) เป็นต้น (อัจฉรา, 2549) แบคทีเรียกรดแลกติกมีคุณสมบัติเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่เคลื่อนที่และเป็นผลิตภัณฑ์ของกรดแลกติกที่เกิดจากกระบวนการหมัก สมาชิกในกลุ่มนี้มี 2 รูปแบบคือ แบบแท่ง (lactobacilli และ carnobacteria) และแบบกลม (streptococci) สายพันธุ์ต่างๆของแบคทีเรียกรดแลกติกมีการปรับตัวต่อการเจริญเติบโตในสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกันและมีการแพร่กระจายในธรรมชาติอย่างกว้างขว้าง โดยทั่วไปแล้วแบคทีเรียกรดแลกติกสามารถพบได้ในระบบทางเดินอาหารภายในของสัตว์ชนิดต่างๆ เช่น หนู,หมู, สัตว์ปีกและมนุษย์ และสามารถพบได้ในนมและผลิตภัณฑ์จากนม (Savadogo et al., 2004 ) และผลิตภัณฑ์อาหารทะเล (Ringo and Gatesoupe , 1998) และจากข้าวบาร์เล่ย์ ( Vaughan et al., 2001) และผลิตภัณฑ์จากปลา ไวน์ ผลไม้ และน้ำผลไม้ อีกทั้งยังเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่น (normal flora หรือ normal microbiota ) ในอวัยวะสืบพันธุ์ ช่องปาก และระบบทางเดินอาหาร (อัจฉรา, 2549) โดยทั่วไปแล้วแบคทีเรียกรดแลกติกมีการนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์นม, เนื้อสัตว์, ขนมปังและการหมักผักดอง (Campos et al., 2006) และมีการนำผลผลิตมาใช้และยังมีการเก็บรักษา ซึ่งอยู่ในรูปของเนยแข็ง, กะหล่ำปลีดอง, เนื้อสัตว์, โยเกิร์ต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และอาหารสัตว์ เป็นต้น บทบาทของแบคทีเรียกรดแลกติกที่อยู่ในระบบทางเดินอาหารที่เกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงทางเคมีที่มีการดูดซึมความร้อนของสัตว์ที่มีการตรวจสอบอย่างกว้างขว้าง มีการเปรียบเทียบถึงความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีการเปลี่ยนแปลงทางเคมีที่มีการดูดซึมของสัตว์ ซึ่งมีการศึกษาเพียงเล็กน้อยถึงบางส่วนของแบคทีเรียกรดแลกติกที่พบในลำไส้ของปลา (Ringo and Gatesoupe , 1998) ผลิตภัณฑ์จากปลาอาจไม่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียกรดแลกติกเพราะว่ามีปริมาณของคาร์โบไฮเดรตที่ต่ำ และในสายพันธุ์ปลาน้ำจืดจะพบเชื้อจุลินทรีย์มากมายหลากหลายชนิดหรือพบในระบบทางเดินอาหารของปลา เป็นต้น (Campos et al., 2006) สายพันธุ์ของ *Lactobacillus* spp. ที่พบในระบบทางเดินอาหารของปลาแซลมอนมีการรายงานถึงข้อมูลพื้นฐานของแบคทีเรียกรดแลกติกในระบบทางเดินอาหาร หรือข้อมูลของเชื้อก่อโรคที่เป็นแบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถคัดแยกได้จากอวัยวะภายในของปลา (Ringo and Gatesoupe , 1998) แบคทีเรียกรดแลกติกแต่ละสปีชีส์สามารถปรับตัวเพื่อการเจริญเติบโต ภายใต้สภาวะแวดล้อมแตกต่างกัน จึงทำให้พบเชื้อกลุ่มนี้กระจายอยู่ทั่วไปทั้งในคนและสัตว์ โดยเฉพาะบริเวณช่องปาก ลำไส้ พบในแมลง และในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ (อัจฉรา, 2549)

2.1 แบคทีเรียกรดแลกติกในระบบทางเดินอาหารของปลา

ระบบทางเดินอาหารในระยะตัวอ่อนของปลาจนถึงระยะการฝักออกของไข่ และหลังการฝักออกมาตัวอ่อนของปลาก็จะได้สัมผัสกับสิ่งแวดล้อมภายนอกและอาหารมีชีวิต ซึ่งนำไปสู่ช่วงการรวมตัวของเชื้อจุลินทรีย์ ความอุดมสมบูรณ์ของเชื้อจุลินทรีย์ในบริเวณหนึ่งมีอิทธิพลโดยปัจจัยต่างๆ รวมทั้งอาหาร, สรีรวิทยาของสัตว์และปัจจัยทางด้านภูมิคุ้มกัน การสร้างเชื้อจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารมีความสัมพันธ์กับความอุดมสมบูรณ์ของเอนไซม์ในการย่อยภายใต้สภาวะปกติ ซึ่งมีการขัดขวางและป้องกันเชื้อก่อโรคด้วย แบคทีเรียกรดแลกติกเป็นแบคทีเรียแกรมบวกและพบในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ในระยะที่มีชีวิต อย่างไรก็ตาม แบคทีเรียกรดแลกติกจะมีการเพิ่มจำนวนในทางเดินอาหารของปลาในช่วงระยะนี้จนถึงระยะวัยรุ่น (Ringo and Gatesoupe , 1998)

## 3. คุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลกติก

3.1 การจำแนก

ในการจำแนกแบคทีเรียกรดแลกติกจะใช้อาหารที่เหมาะสมกับชนิดของแบคทีเรียและนำไปบ่มที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม ในการศึกษาพบว่า อาหาร Trypticase soy agar (TSA), Marine-medium หรือ brain-heart infusion agar (BHIA) จะใช้สำหรับเชื้อแบคทีเรียที่มาจากระบบทางเดินอาหารและอวัยวะภายใน เช่น ไต ตับ ม้าม เป็นต้น อย่างไรก็ตาม Ringo and

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Gatesoupe (1998) ได้อ้างถึงรายงานของ Shotts and Teska (1989) ว่า นำ bovine หรือ rabbit blood agar หรือน้ำมะเขือเทศ 5% (v/v) มาเป็นอาหารที่ใช้ในการจำแนกได้ มีปัจจัย 1 ปัจจัยที่สำคัญสำหรับการจำแนกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกจากระบบทางเดินอาหารของปลาคือ อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มต้องสูง ในการบ่มเชื้อแบคทีเรียได้จากการจำแนกจากตับจะใช้บ่มที่อุณหภูมิ 20 - 25°C เป็นเวลา 2 – 3 วัน หรือที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2 การคัดแยก

ในระบบทางเดินอาหารของปลาจะพบแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีลักษณะเป็นแบคทีเรียแกรมบวก,แบบแท่งและแบบกลม แบคทีเรียจะใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งพลังงานและผลิตกรดแลกติกออกมา ในกลุ่มของแบคทีเรียกรดแลกติกจะรวมถึงพวก *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* และ *Pediococcus* (Ringo and Gatesoupe, 1998)

3.3 *Lactobacillus*

*Lactobacilli* มีส่วนประกอบของธาตุอาหาร เช่น คาร์โบไฮเดรต, กรดอะมิโน, เปปไทด์, กรดไขมัน, กรดนิวคลีอิกและวิตามิน มีการจำแนกสายพันธุ์ของ *Lactobacillus* spp. จากระบบทางเดินอาหารของปลาเป็นผลสำเร็จ อย่างไรก็ตามมีการคัดแยกแบคทีเรียที่พบในระบบทางเดินอาหารเป็นจำนวนมาก เช่น ในปลา Atlantic salmon, Cyprinidae เป็นต้น (Ringo and Gatesoupe, 1998)

3.4 *Lactococcus lactis*

*Lactococcus lactis* เป็นแบคทีเรียที่แยกมาจากแบคทีเรียสกุล *Streptococcus* โดยเป็นเชื้อรูปกลม หรือรูปไข่อยู่เดี่ยวๆ เป็นคู่ หรือต่อกันเป็นสายยาว ติดสีแกรมบวก ไม่มีแคปซูล และเคลื่อนที่ไม่ได้ ไม่สร้างเอนไซม์คะตาเลส ต้องการอาหารที่อุดมสมบูรณ์ เติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 10 - 30°C แต่ไม่เติบโตที่อุณหภูมิ 45°C พบได้ในนม และผลิตภัณฑ์ธัญพืชต่างๆ ไนซินผลิตจาก *Lactococcus lactis* ซึ่งไนซินสามารถทำลายแบคทีเรียแกรมบวกทั่วไป และทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบบางชนิด ไนซินทำให้เกิดรูพรุนที่เยื่อหุ้มพลาสมาจึงเกิดการรั่วซึมและรั่วไหลขององค์ประกอบภายในเซลล์ เป็นผลทำให้เซลล์สูญเสียความสามารถในการทำหน้าที่ไป ไนซินเป็นแบคเทอริโอซินที่ได้รับการยอมรับและอนุญาตให้นำมาใช้ (อัจฉรา , 2549) ซึ่งมีความปลอดภัยสำหรับการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์จากนม เช่น การทำชีส เป็นต้น (Cleveland et al., 2001) สายพันธุ์ *L. lactis* ที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรมมี 2 subsp. คือ *L. lactis*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

subsp. *lactis* และ *L. lactis* subsp. *cremoris* ในการจำแนกแบคทีเรีย *L. lactis* จำแนกได้จากสิ่งแวดล้อมต่างๆ เช่น ผลิตภัณฑ์จากนมและผิวของพืช และก็มีการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติก *L. lactis* จากภายในระบบทางเดินอาหารของปลาทะเล เช่น pufferfish (*Takifugu niphobles*) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth และมีการนำไปทดสอบแกรมบวกแกรมลบ, รูปร่างของเซลล์, catalase, oxidase และการหมักน้ำตาล (Itoi et al., 2008) ดังนั้นสายพันธุ์ *L. lactis* ที่ได้จากระบบทางเดินอาหารของปลาทะเลต้องนำไปตรวจสอบถึงการทนทานต่อความเค็มและ pH ต่างๆ เป็นต้น

3.5 แบคเทอริโอซิน (bacteriocin)

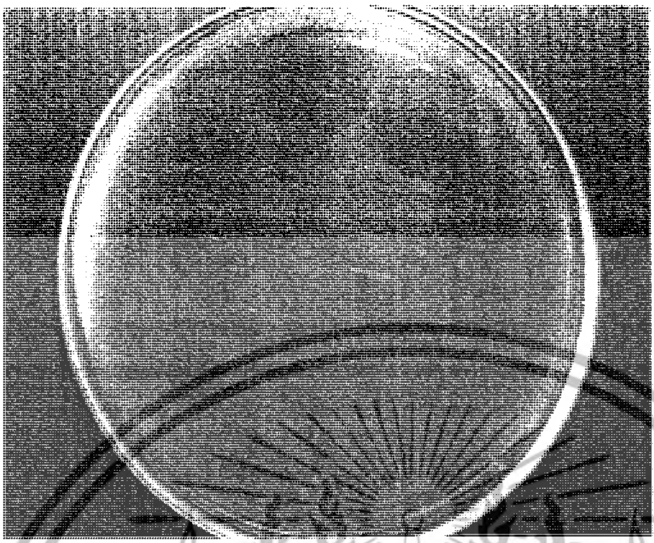
แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) เป็นสารยับยั้งชนิดหนึ่งที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลกติก (อัจฉรา, 2549) มีการกำหนดแบคเทอริโอซินไว้ 6 ข้อ คือ

1. แบคเทอริโอซินเป็นสารพวกโปรตีน ซึ่งถูกทำลายโดยเอนไซม์ที่ย่อยสลายโปรตีน
2. แบคเทอริโอซินจะออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญและทำลายแบคทีเรียได้
3. แบคเทอริโอซินจะมีบริเวณจำเพาะในการจับกับแบคทีเรียก่อโรคต่างๆ
4. ยีนที่ควบคุมการสร้างแบคเทอริโอซินโดยส่วนใหญ่จะพบว่าอยู่บริเวณพลาสมิด
5. แบคทีเรียที่ผลิตแบคเทอริโอซิน เมื่อหลั่งแบคเทอริโอซิน ออกมายอกเซลล์จะทำให้เซลล์ตาย แต่มีแบคทีเรียบางชนิดสามารถผลิตแบคเทอริโอซินในระยะ log ดังนั้นจึงไม่มีการตายของเซลล์
6. แบคเทอริโอซินออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันเท่านั้น

แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) มีสายพันธุ์มากมายและมีการป้องกันที่แตกต่างกันในกลุ่มของแบคทีเรีย (Riley and Wertz, 2002) แบคเทอริโอซินเป็นโปรตีนที่ผลิตขึ้นจากแบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียชนิดอื่น แบคทีเรียกรดแลกติกหลายชนิดสามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินได้ต่างกัน แบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลกติกพบเป็นจำนวนมากจากการหมักของอาหารและแบคเทอริโอซินมีคุณสมบัติเฉพาะทางด้านชีวเคมีและด้านพันธุกรรมและมีโครงสร้างที่เข้าใจได้ยาก โดยทั่วไปในอาหารจะมีการนำเปปไทด์จากโปรตีนมาใช้ในการต่อต้านการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ของอาหารซึ่งมาจากแบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคในอาหารได้ เช่น ในเนื้อและผลิตภัณฑ์นม และแบคเทอริโอซินที่สามรถคัดแยกได้จากอาหารมีคุณสมบัติเป็นแบคทีเรียกรดแลกติก แบคเทอริโอซินมีความปลอดภัยต่ออาหารและมีประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคในอาหารได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งเป็นแนวโน้มสำหรับการนำไปพัฒนาเพื่อใช้ประโยชน์ในการถนอมอาหารด้วยวิธีการทางชีวภาพ จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งนอกเหนือจากการใช้สารเคมี (Cleveland et al., 2001)

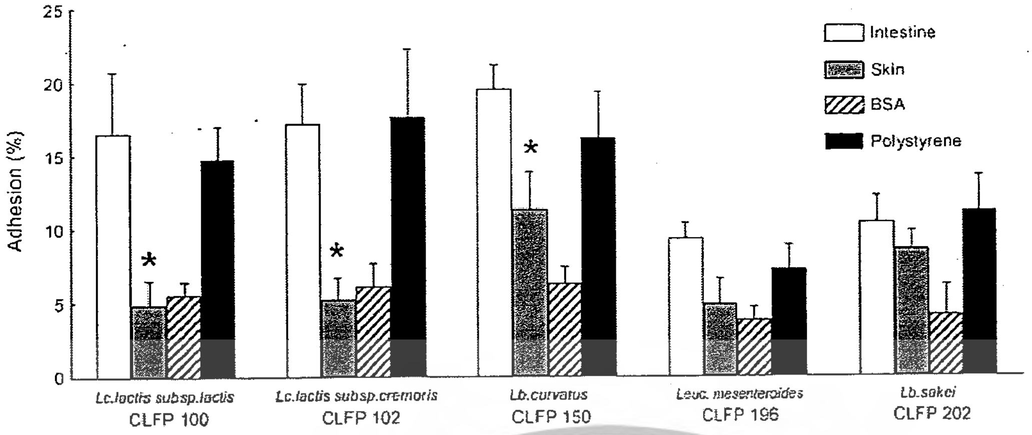


**ภาพที่** 2 **การสร้างสารแบคเทอริโอซินที่มีการยับยั้งเชื้อ** *Lb. sakei* **JCM**

**4. ความสามารถในการต้านทานเชื้อ**

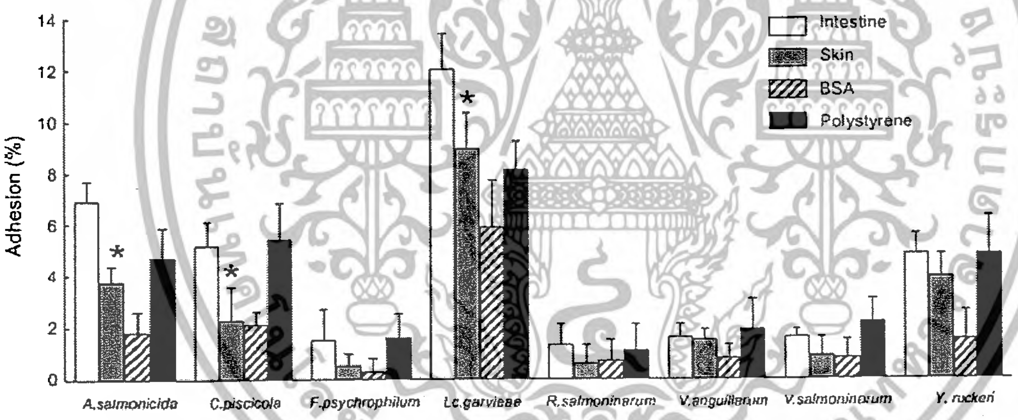
ในปัจจุบันธุรกิจการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นที่นิยมกันอย่างแพร่หลาย ซึ่งสัตว์น้ำที่หาได้ในธรรมชาตินั้นอาจไม่เพียงพอต่อความต้องการของผู้บริโภค จึงมีการนำแบคทีเรียกรดแลกติกมาใช้เป็นโพรไบโอติกในการพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเพื่อให้ได้ผลผลิตที่มากพอซึ่งการทดลองโดย Balcazar *et al.*, (2007) ทำการทดลองเพื่อศึกษาความสามารถของแบคทีเรียกรดแลกติก 5 ชนิด ได้แก่ *Lc. lactis* subsp. *lactis* CLFP100 , *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CLFP 102 , *Lb.curvatus* CLFP150 , *Leuc. mesenteroides* CLFP196 และ *Lb.sakei* CLFP 202 ในการเกาะติดที่บริเวณลำไส้และผิวหนัง ( ภาพที่ 1 ) เพื่อยับยั้งการเกาะติดของเชื้อก่อโรคของปลา rainbow trout ที่บริเวณลำไส้และผิวหนัง ผลการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกมีความสามารถในการยับยั้งการเกาะติดของเชื้อก่อโรค ส่งผลให้เชื้อก่อโรคมีความสามารถในการเกาะติดที่ลดลง ($P<0.05$) ดังข้อมูลแสดงในตารางที่ 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**ภาพที่ 3 แสดงการเกาะติดของแบคทีเรียกรดแลกติกที่บริเวณลำไส้และผิวหนัง**

ที่มา: Balcazar *et al.*, 2007




**ภาพที่ 4 แสดงการเกาะติดของเชื้อก่อโรคที่บริเวณลำไส้และผิวหนัง**

ที่มา: Balcazar *et al.*, 2007

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 1 แสดงถึงความสามารถของแบคทีเรียกรดแลกติกในการต้านทานต่อเชื้อก่อโรค**

| LAB strain | Adhesion reduction (%)[a], mean ± S.D. | | | |
|---|---|---|---|---|
| | *A .salmonicida* | *C. piscicola* | *Lc. garvieae* | *Y. ruckeri* |
| *Lc. lactis* subsp. *lactis* CLFP 100 | 68.15 ± 16.64* | 45.11 ± 13.82* | 48.57 ± 20.07* | 59.09 ± 19.21* |
| *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CLFP 102 | 74.03 ± 16.78* | 51.82 ± 19.96* | 52.98 ± 26.29* | 68.80 ± 9.50* |
| *Lb. curvatus* CLFP 150 | 65.28 ± 10.90* | 49.33 ± 15.93* | 51.02 ± 17.77* | 65.30 ± 8.68* |
| *Leuc. mesenteroides* CLFP 196 | -10.47 ± 14.49 | 27.45 ± 21.88 | 19.33 ± 20.15 | 38.64 ± 10.12* |
| *Lb. sakei* CLFP 202 | 30.70 ± 19.23 | 45.30 ± 11.71* | 13.02 ± 27.11 | 35.54 ± 10.74* |

ที่มา: Balcazar *et al.*, 2007

การทดลองดังกล่าวมีความสอดคล้องกับการทดลองโดย Balcazar *et al.*,(2008) ทำการศึกษาถึงความสามารถของแบคทีเรียกรดแลกติก 3 ชนิด *คือ Lactococcus lactis* CLFP 101 , *Lactobacillus plantatum* CLFP 238 และ *Lactobacillus fermentum* CLFP 242 เพื่อยับยั้งการเกาะติดของเชื้อก่อโรค 4ชนิด คือ *Aeromonas hydrophila* , *Aeromonas salmonicida* , *Yersinia ruckeri* และ *Vibrio anguillarum* ผลการทดลองพบว่า เชื้อ *Lactococcus lactis* CLFP 101 มีความสามารถในการลดการเกาะติดเชื้อก่อโรคได้ทุกชนิด ในขณะที่ เชื้อ *Lactobacillus plantatum* CLFP 238 มีความสามารถในการลดการเกาะติดของเชื้อก่อโรค คือ *Aeromonas hydrophila* และ *Aeromonas salmonicida* ส่วนเชื้อ *Lactobacillus fermentum* CLFP 242 สามารถลดการเกาะติดของเชื้อก่อโรคทุกชนิดที่บริเวณลำไส้ นอกจากนี้ยังพบว่า เชื้อ *คือ Lactococcus lactis* CLFP 101 มีความสามารถในการเป็น antibacterial ( ตารางที่ 2 )และพบว่าแบคทีเรียกรดแลกติกที่นำใช้ในการศึกษาทั้งหมดสามารถมีชีวิตรอดได้เมื่ออยู่ในสภาวะที่มี pH ต่ำ ( ตารางที่ 3 )

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 2 แสดงความสามารถในการต่อต้านเชื้อก่อโรคในปลา**

| Fish pathogens | Activity[a] | | |
|---|---|---|---|
| | *Lc. lactis* | *L. plantarum* | *L. fermentum* |
| *A. hydrophila* | ++ | - | - |
| *A. salmonicida* | ++ | - | - |
| *V. anguillarum* | + | - | - |
| *Y.ruckeri* | + | - | - |

ที่มา: Balcazar *et al.*, 2008

**ตารางที่ 3 แสดงความทนทานของแบคทีเรียกรดแลกติกที่อยู่ในระดับ pH ที่แตกต่างกัน**

| pH | Log CFU/ml (SD)[a] | | |
|---|---|---|---|
| | *Lc. lactis* | *L. plantarum* | *L. fermentum* |
| 1.0 | ND | ND | ND |
| 1.5 | ND | ND | ND |
| 2.0 | ND | 0.69 (0.12) | ND |
| 2.5 | 2.60 (0.43) | 2.82 (0.52) | 2.56 (0.41) |
| 3.0 | 5.12 (0.12) | 5.42 (0.28) | 5.29 (0.31) |
| 3.5 | 5.82 (0.79) | 6.24 (0.87) | 6.17 (0.46) |
| 6.5 | 5.89 (0.63) | 6.18 (1.20) | 6.24 (0.71) |

ที่มา: Balcazar *et al.*, 2008

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# อุปกรณ์และวิธีการ

## อุปกรณ์

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น MRS, TSB, Yeast extract, Agar, เกลือ, แคลเซียมคาร์บอเนต, เปปโตนและกลีเซอรอล
2. ไมโครปิเปต, tip, eppendorf,
3. เครื่องแก้วและหลอดพลาสติก
4. ปลาสวาย
5. ระบบทางเดินอาหารของปลาสวาย
6. ถาด, มีดผ่า
7. ตู้บ่มอุณหภูมิ 30°, 37° และ 42°C , ตู้ Laminar flow
8. เครื่อง vortex, เครื่อง centrifuge และ waterbath
9. ตู้แช่อุณหภูมิ 4°C และ -20°C
10. น้ำกลั่น
11. เครื่องปรับ pH และสารเคมี
12. เครื่องชั่งสาร
13. เครื่อง autoclave

## วิธีการ

**แผนการทดลอง**

ทำการศึกษาถึงคุณสมบัติของเชื้อ *Lactococcus lactis* spp. *Lactis* P2 ที่แยกจากระบบทางเดินอาหารของปลาสวายเพื่อศึกษาถึงความสามารถในการเป็นแบคเทอริโอซิน ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น โดยทดสอบกับเชื้อเป้าหมายทั้งหมด 9 ชนิด ทดสอบการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 30°, 37° และ 42°C ทดสอบการทนความร้อน (Heat stability) ทดสอบความทนต่อกรดและด่าง ทดสอบความทนต่อเกลือและทดสอบการแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 วัน

## วิธีการทดลอง

**การทดสอบ Bacteriocins เพื่อศึกษาอัตราการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 30°, 37° และ 42°C**

ทำการศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมของอัตาการเจริญของเชื้อ *Lc. Lactis* spp. *lactis* P2 ในแต่ละอุณหภูมิ คือ 30°, 37° และ 42°C และการผลิตสารแบคเทอริโอซินออกมายับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* JCM โดยทำการเลี้ยงเชื้อ *Lc. Lactis* spp. *lactis* P2 ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ (MRS broth

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

+ NaCl 1%) ในขวด Duran 300 ml แล้วนำไปบ่มในแต่ละอุณหภูมิ จากนั้นนำเชื้อไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) 600 nm และทำการ spread plate ในแต่ละอุณหภูมิโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar 1.5% ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต 0.5% เพื่อนับจำนวนเชื้อ (Log CFU/ml) และทดสอบแบคเทอริโอซินต่อการยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* JCM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar 1% นำเชื้อดูดใส่หลอดพลาสติกโดยใช้ไมโครปิเปต จากนั้นนำไปตกตะกอน (centrifuge) 4,000 รอบ/นาทีเป็นเวลา 10 นาที โดยนำส่วนใสที่ได้จากการตกตะกอนมาเทลงในหลอดพลาสติกและปรับ pH ประมาณ 5.5 – 6 ดูดส่วนใสใส่ลงใน eppendrof 0.5 ml นำไปต้มนาน 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น นำเชื้อ *Lb. sakei* JCM 0.02 ml ใส่ลงในอาหาร MRS agar 1% ที่นำไปต้มและเทลงใน plate อาหาร MRS ทิ้งไว้ให้แห้ง 75 นาทีจากนั้นนำส่วนใสมาหยดบน MRS agar 1% 0.01 ml แล้วนำไปบ่มในแต่ละอุณหภูมิ และบันทึกผลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

**การทดสอบความทนต่อความร้อน (Heat stability)**

ทำการศึกษาถึงคุณลักษณะของ *Lc. Lactis* spp. *lactis* P2 ในการทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 100°C นาน 5, 10, 30 และ 60 นาที และที่อุณหภูมิ 121°C นาน 15 นาทีและการผลิตสารแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* JCM โดยทำการเลี้ยงเชื้อ *Lc. Lactis* spp. *lactis* P2 ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ (MRS broth + NaCl 1%) 5 ml แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 14 ชั่วโมง ทำการเลี้ยงเชื้อ Inicator คือ *Lb. sakei* JCM ลงในอาหรเหลว MRS 5 ml นำเชื้อ *Lc. Lactis* spp. *lactis* P2 เทใส่หลอดพลาสติกแล้วนำไปตกตะกอน 4,000รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสไปปรับ pH ประมาณ 5.5 – 6 ดูดส่วนใสลงใน eppendrof 0.5 ml นำไปต้มเป็นเวลา 5, 10, 30 และ 60 นาที และนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121°C นาน 15 นาทีที่เครื่อง autoclave แล้วทิ้งไว้ให้เย็น นำอาหาร MRS agar 1% มาต้มแล้วทำให้อุ่นด้วยเครื่อง waterbath นำเชื้อ *Lb. sakei* JCM ใส่ลงในอาหาร 0.02 ml และเทลงในอาหาร MRS agar 1.5% ทำให้แห้ง 75 นาทีในตู้ Laminar flow นำส่วนใสที่ต้มแล้วมาหยดบน plate 0.01 ml แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C แล้วบันทึกผล

**การทดสอบความทนต่อกรดและด่าง**

ทำการศึกษาถึงคุณลักษณะของ *Lc. Lactis* spp. *lactis* P2 ในการทนต่อกรดและด่าง 2 – 10 โดยเลี้ยงเชื้อ *Lc. Lactis* spp. *lactis* P2 ลงในอาหารหลว MRS + NaCl 1% ที่มีการปรับค่า pH 2 – 10 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 14 ชั่วโมง เพื่อศึกษาสารแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้อ ทำการเลี้ยงเชื้อ Inicator คือ *Lb. sakei* JCM, *Leuco. mesenteroides* JCM, *Lb.sakei* 890, *Lb.plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* 942, *Psu.fluorescens*,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*Brochothix, L.innocuo, B.coagulans* 1447 ในอาหารเหลว MRS และ TSB-YE ตามชนิดของเชื้อ 5 ml นำเชื้อ *Lc. Lactis* spp. *lactis* P2 เทใสหลอดพลาสติกแล้วนำไปตกตะกอน 4,000รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสไปปรับ pH ประมาณ 5.5 – 6 ดูดส่วนใสลงใน eppendrof 0.5 ml นำไปต้มเป็นเวลา 5 นาทีแล้วทิ้งไว้ให้เย็น นำอาหาร MRS agar 1% มาต้มแล้วทำให้อุ่นด้วยเครื่อง waterbath นำเชื้อเป้าหมายทั้ง 9 เชื้อใส่ลงในอาหารเหลว MRS, TSB-YE 0.02 ml และเทลงในอาหาร MRS, TSB-YE agar 1.5% ทำให้แห้ง 75 นาทีในตู้ Laminar flow นำส่วนใสที่ต้มแล้วมาหยดบน plate 0.01 ml แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 $^{\circ}$C แล้วบันทึกผล

**การทดสอบความทนต่อเกลือ (NaCl)**

ทำการศึกษาถึงคุณลักษณะของ *Lc. Lactis* spp. *lactis* P2 ในการทนต่อเกลือ (NaCl) ที่ระดับความเข้มข้น 1 – 6% โดยเลี้ยงเชื้อ *Lc. Lactis* spp. *lactis* P2 ลงในอาหารหลว MRS + NaCl 1% ที่ความเข้มข้น 1 – 6% แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 $^{\circ}$C เป็นเวลา 14 ชั่วโมง เพื่อศึกษาสารแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้อ ทำการเลี้ยงเชื้อ Inicator คือ *Lb. sakei* JCM, *Leuco. mesenteroides* JCM, *Lb.sakei* 890, *Lb.plantarum, Leuconostoc mesenteroides* 942, *Psu.fluorescens, Brochothix, L.innocuo, B.coagulans* 1447 ลงในอาหารเหลว MRS และ TSB-YE ตามชนิดของเชื้อ 5 ml นำเชื้อ *Lc. Lactis* spp. *lactis* P2 เทใสหลอดพลาสติกแล้วนำไปตกตะกอน 4,000รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสไปปรับ pH ประมาณ 5.5 – 6 ดูดส่วนใสลงใน eppendrof 0.5 ml นำไปต้มเป็นเวลา 5 นาทีแล้วทิ้งไว้ให้เย็น นำอาหาร MRS agar 1% มาต้มแล้วทำให้อุ่นด้วยเครื่อง waterbath นำเชื้อเป้าหมายทั้ง 9 เชื้อ ใส่ลงในอาหารเหลว MRS, TSB-YE 0.02 ml และเทลงในอาหาร MRS, TSB-YE agar 1.5% ทำให้แห้ง 75 นาทีในตู้ Laminar flow นำส่วนใสที่ต้มแล้วมาหยดบน plate 0.01 ml แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 $^{\circ}$C แล้วบันทึกผล

**การทดสอบการแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$C เป็นเวลา 10 วัน**

ทำการศึกษาถึงคุณลักษณะของ *Lc. Lactis* spp. *lactis* P2 ในการแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$C เป็นเวลา 10 วัน โดยเลี้ยงเชื้อ *Lc. Lactis* spp. *lactis* P2 ลงในอาหารหลว MRS + NaCl 1% แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 $^{\circ}$C เป็นเวลา 14 ชั่วโมง เพื่อศึกษาสารแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* JCM, *Leuco. mesenteroides* JCM ลงในอาหารเหลว MRS 5 ml นำเชื้อ *Lc. Lactis* spp. *lactis* P2 เทใสหลอดพลาสติกแล้วนำไปตกตะกอน 4,000รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสไปปรับ pH ประมาณ 5.5 – 6 ดูดส่วนใสลงใน eppendrof 0.5 ml นำไปต้มเป็นเวลา 5 นาทีแล้วทิ้งไว้ให้เย็น นำอาหาร MRS agar 1% มาต้มแล้วทำให้อุ่นด้วยเครื่อง waterbath

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใส่เชื้อ *Lb. sakei* JCM, *Leuco. mesenteroides* JCM 0.02 ml และเทลงในอาหาร MRS agar 1.5% ทำให้แห้ง 75 นาทีในตู้ Laminar flow นำส่วนใสที่ต้มแล้วมาหยดบน plate 0.01 ml แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C แล้วบันทึกผลเป็นเวลา 10 วัน

**การบันทึกข้อมูล**

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างสารแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียกรดแลกติก เช่น อัตราการเจริญเติบโตของจำนวนเชื้อ *Lc. Lactis* spp. *lactis* P2 ที่อุณหภูมิ 30°, 37° และ 42°C

2. การศึกษาลักษณะของแบคเทอริโอซิน เช่น ความสามารถในการทนต่อความร้อน (Heat stability), ความสามารถในการทนต่อกรดและด่าง, ความสามารถในการทนต่อเกลือและการทดสอบความสามารถของเชื้อ P2 ที่นำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4°C

**การวิเคราะห์ข้อมูล**

ในการวิเคราะห์ข้อมูลกราฟการเจริญเติบโตของเชื้อ P2 และค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินที่อุณหภูมิ 30°, 37° และ 42°C จะใช้โปรแกรม Microsoft Office Excel 2003

**สถานที่ทำการทดลอง**

ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

**ระยะเวลาในการทดลอง**

เดือนตุลาคม 2551 – มีนาคม 2552

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

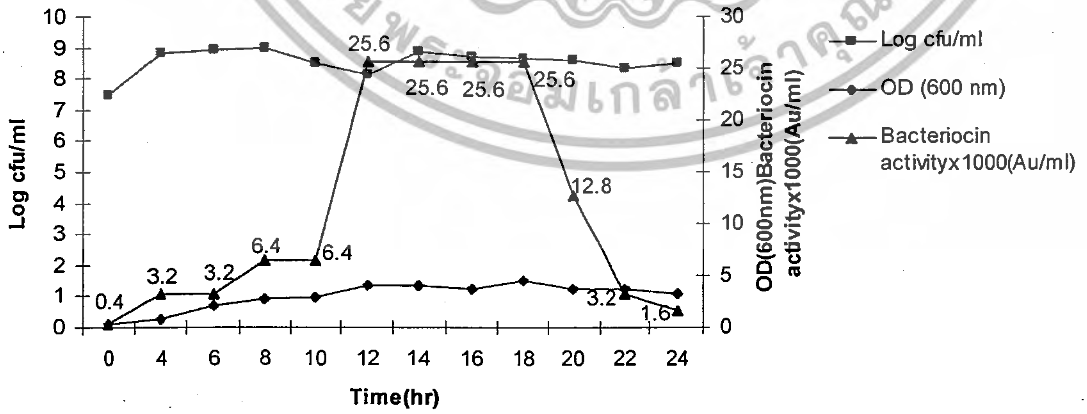
## ผลการทดลองและวิจารณ์

### 1. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างสารแบคเทอริโอซินของ *Lactococcus lactis* spp. *lactis* P2

1.1 ค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซิน (Au/ml)

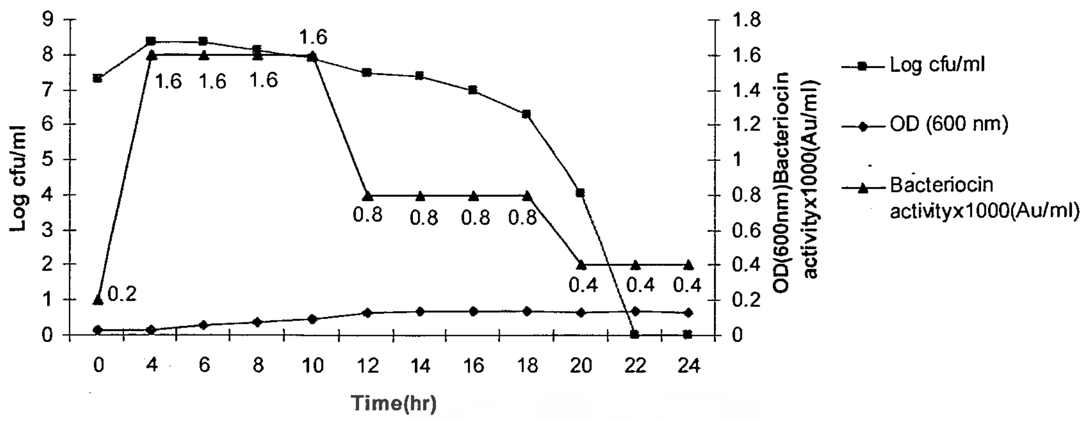
*Lc. lactis* spp. *lactis* P2 จะมีการผลิตสารแบคเทอริโอซินออกมายับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* JCM ทำให้ค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินเพิ่มขึ้นและคงที่เมื่อถึงจุดๆหนึ่งหลังจากนั้นจะลดลงตามลำดับซึ่งพบว่า ที่อุณหภูมิ 30°C สารแบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งเชื้อได้มากที่สุด และจำนวนโคโลนี (Log CFU) จะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เหมาะสมของเชื้อ โดยการวัดค่าดูดกลืนแสง (OD) 600 nm

**ภาพที่ 5** การเจริญเติบโตของเชื้อ P2 และค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินที่อุณหภูมิ 30°C




**ภาพที่ 6** การเจริญเติบโตของเชื้อ P2 และค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินที่อุณหภูมิ 37°C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




***ภาพที่* 7** การเจริญเติบโตของเชื้อ P2 และค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินที่อุณหภูมิ 42°C

จากผลการทดลอง พบว่า ที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 42°C แบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* JCM ได้สูงถึง 51200, 25600 และ 1600 Au/ml ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Powell *et al.*(2007) ที่ทำการศึกษาถึง *Lb. plantarum* ST8KF ทำการคัดแยกจาก kefir ซึ่งมีการศึกษาคุณสมบัติของแบคเทอริโอซินต่อการยับยั้งเชื้อ *Lb. casei*, *Lb. salivarius*, *Lb. curvatus* และ *Listeria innocua* ที่อุณหภูมิ 30°C ถึงความสามารถของแบคเทอริโอซิน (Au/ml) ต่อการยับยั้งเชื้อ ความสามารถของแบคเทอริโอซินต่อการยับยั้งเชื้อได้สูงถึง 51,200 Au/ml ในระยะเวลา 27 ชั่วโมง ส่วนจำนวนโคโลนีก็จะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการเจริญของเชื้อที่เหมาะสม จากการวัดค่าดูดกลืนแสง 600 nm

**2. การศึกษาลักษณะของแบคเทอริโอซิน**

2.1 ความสามารถในการทนต่อความร้อน (Heat stability)

ค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซิน (Au/ml) คือ การผลิตสารยับยั้งจะสัมพันธ์กับการเจริญของเชื้อ คือ ถ้าเชื้อเจริญเพิ่มมากขึ้น การผลิตสารยับยั้งก็จะมากขึ้นด้วย ที่อุณหภูมิ 100°C และ121°C เพื่อศึกษาถึงคุณสมบัติของสารแบคเทอริโอซินต่อการยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* JCM

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง


**ตารางที่ 4** การทนต่อความร้อน (Heat stability) ของเชื้อ P2 และค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซิน (Au/ml)

| Heat stability | P2 |
|---|---|
| Control 100°C 5 นาที | 51200 |
| 100°C 10 นาที | 51200 |
| 100°C 30 นาที | 51200 |
| 100°C 60 นาที | 51200 |
| 121°C 15 นาที | 800 |

จากผลการทดลอง พบว่า เชื้อ *Lc. lactis* spp. *lactis* P2 มีความทนต่อความร้อนได้ถึง 100°C นาน 60 นาทีและ 121°C นาน 15 นาที และสารแบคเทอริโอซิสามารถยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* JCM ได้สูงถึง 51,200 และ 800 Au/ml ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Cheikhyoussef *et al.*(2008) ทำการศึกษาถึง *Bifidobacterium infantis* BCRC 14602 ในการทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 100°C นาน 10 และ 20 นาที และ 121°C นาน 15 นาทีซึ่งแบคเทอริโอซินสามาถยับยั้งเชื้อ *Lactobacillus plantarum* BCRC 11697 ได้ถึง 1,600 Au/ml

ความสามารถในการทนต่อกรดและด่าง

ในการทดสอบความสามารถการทนทานต่อกรดและด่าง 2 - 10 เพื่อศึกษาคุณสมบัติของเชื้อ *Lc. lactis* spp. *lactis* P2 ที่สามารถเจริญได้ในสภาวะ pH ที่เหมาะสมและศึกษาถึงคุณสมบัติของแบคเทอริโอซินต่อการยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* JCM, *Leuco. mesenteroides* JCM, *Lb.sakei* 890, *Lb.plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* 942, *Psu.fluorescens*, *Brochothix*, *L.innocuo*, *B.coagulans* 1447

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
104638

**ตารางที่ 5** ความสามารถในการทนต่อกรดและด่างของเชื้อ P2 ต่อเชื้อเป้าหมายและค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซิน (Au/ml)

| Treatment | OD 600 nm | pH of culture | Antibacterial activity (Au/ml) | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | *Lb. sakei* JCM | *Lb.sakei* 890 | *Lb.plantarum* | *Leuco. mesenteroides* JCM | *Leuco. mesenteroides* 942 | *Psu.fluorescen* | *Brochothix* | *L.innocuo* | *B.coagulans* 1447 |
| Control | 0.83 | 4.75 | 51200 | 51200 | 1600 | 800 | 1600 | 200 | 800 | 200 | 200 |
| pH 2 | 0.05 | 1.86 | 800 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 400 | 0 | 0 |
| pH 3 | 0.10 | 2.87 | 800 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 800 | 0 | 0 |
| pH 4 | 0.04 | 3.91 | 800 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 800 | 0 | 0 |
| pH 5 | 0.69 | 4.83 | 12800 | 400 | 0 | 400 | 0 | 400 | 1600 | 200 | 200 |
| pH 6 | 1.11 | 4.81 | 51200 | 200 | 0 | 400 | 0 | 400 | 3200 | 400 | 400 |
| pH 7 | 1.54 | 4.83 | 51200 | 200 | 0 | 400 | 0 | 400 | 3200 | 400 | 400 |
| pH 8 | 1.82 | 4.90 | 25600 | 200 | 0 | 400 | 0 | 400 | 3200 | 400 | 200 |
| pH 9 | 1.82 | 4.82 | 12800 | 200 | 0 | 200 | 0 | 400 | 1600 | 200 | 200 |
| pH 10 | 1.89 | 4.84 | 2800 | 200 | 0 | 200 | 0 | 200 | 1600 | 200 | 200 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองเชื้อ *Lc. lactis* spp. *lactis* P2 สารแบคเทอริโอซินที่ทนต่อค่าความเป็นกรดและด่าง 2 - 10 พบว่า ที่ pH 2 – 4, pH 6 – 7 และ pH 10 มีสารแบคเทอริโอซินที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* JCM ได้ถึง 800, 51,200 และ 2,800 Au/ml ตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับ Cheikhyoussef *et al.*(2008) ซึ่งทำการศึกษา *Bifidobacterium infantis* BCRC 14602 ที่ pH 2 - 11 ในการยับยั้งเชื้อ *Lactobacillus plantarum* BCRC 11697 พบว่า ที่ pH 2 – 3 สารแบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งเชื้อ *Lactobacillus plantarum* BCRC 11697 ได้ถึง 200 Au/ml, ที่ pH 4 – 10 สารแบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งเชื้อ *Lactobacillus plantarum* BCRC 11697 ได้ถึง 1600 Au/ml และ pH 11 สารแบคเทอริโอซินไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *Lactobacillus plantarum* BCRC 11697 ได้ เพราะเป็นสภาวะที่มีความเป็นด่างสูงอาจส่งผลกระทบต่อขบวนการของ *bifidobacteria* ในกระบวนการหมักอาหาร

ความสามารถในการทนต่อเกลือ (NaCl)

ในการทดสอบความสามารถการทนต่อเกลือ (NaCl) ที่ระดับความเข้มข้น 1 – 6% เพื่อศึกษาคุณสมบัติของเชื้อ *Lc. lactis* spp. *lactis* P2 ที่สามารถเจริญได้ในสภาวะเกลือ (NaCl) ที่เหมาะสมและศึกษาถึงคุณสมบัติของแบคเทอริโอซินต่อการยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* JCM, *Leuco. mesenteroides* JCM, *Lb.sakei* 890, *Lb.plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* 942, *Psu.fluorescens*, *Brochothix*, *L.innocuo*, *B.coagulans* 1447

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 6** ความสามารถในการทนต่อเกลือของเชื้อ P2 ต่อเชื้อเป้าหมายและค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซิน (Au/ml)

| Treatment | OD 600 nm | pH of culture | Antibacterial activity (Au/ml) | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | *Lb. sakei* JCM | *Lb.sakei* 890 | *Lb.plantarum* | *Leuco. mesenteroides* JCM | *Leuco. mesenteroides* 942 | *Psu.fluorescen* | *Brochothix* | *L.innocuo* | *B.coagulans* 1447 |
| Control | 1.07 | 4.86 | 51200 | 51200 | 1600 | 800 | 1600 | 400 | 1600 | 200 | 200 |
| NaCl 1% | 0.94 | 4.73 | 51200 | 400 | 800 | 800 | 800 | 200 | 800 | 200 | 200 |
| NaCl 2% | 0.79 | 4.68 | 51200 | 200 | 400 | 400 | 400 | 400 | 1600 | 200 | 200 |
| NaCl 3% | 0.89 | 4.74 | 51200 | 200 | 200 | 200 | 400 | 200 | 1600 | 100 | 200 |
| NaCl 4% | 0.50 | 4.71 | 51200 | 200 | 200 | 200 | 800 | 0 | 800 | 100 | 100 |
| NaCl 5% | 0.26 | 4.91 | 12800 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 400 | 0 | 0 |
| NaCl 6% | 0.13 | 4.97 | 3200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 400 | 0 | 0 |

จากผลการทดลองในระดับความเข้มข้นของเกลือ 1 – 4% เชื้อ *Lc. lactis* spp. *lactis* P2 จะผลิตสารแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* JCM ได้สูงถึง 51,200 Au/ml และจะผลิตสารแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* JCM เมื่อระดับความเข้มข้นของเกลือ 5 และ 6% ได้เพียง 12,800 และ 3,200 Au/ml ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับ Itoi *et al.*(2008) ที่ทำการศึกษาถึง *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ที่ได้จากระบบทางเดินอาหารของปลา pufferfish ที่มีการคัดแยกได้ 3 ตัว คือ E214, E219 และE230 ต่อความทนทานของระดับความเข้มข้นของเกลือ 0 – 7% โดยมีการผลิตสารแบคเทอริโอซินที่ระดับความเข้มข้น 0 – 6% และลดลงเมื่อระดับความเข้มข้นของเกลือเพิ่มขึ้น

2.4 การทดสอบความสามารถของเชื้อ P2 ที่นำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4°C

ในการทดสอบความสามารถของเชื้อ *Lc. lactis* spp. *lactis* P2 เพื่อศึกษาค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซิน (Au/ml) ที่นำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 วัน โดยใช้เชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 และ *Leuco. mesenteroides* JCM เป็นเชื้อเป้าหมาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 7** ความสามารถของเชื้อ P2 ที่นำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อดูค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซิน (Au/ml) เป็นเวลา 10 วัน โดยใช้ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 และ *Leuco. mesenteroides* JCM เป็นเชื้อเป้าหมาย

| จำนวนวันที่ | Antibacterial activity (AU/ml) | |
|---|---|---|
| | *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 | *Leuco. mesenteroides* JCM |
| 0 | 25600 | 800 |
| 1 | 25600 | 800 |
| 2 | 25600 | 800 |
| 3 | 25600 | 800 |
| 4 | 12800 | 400 |
| 5 | 12800 | 400 |
| 6 | 12800 | 400 |
| 7 | 6400 | 400 |
| 8 | 6400 | 400 |
| 9 | 6400 | 400 |
| 10 | 3200 | 200 |

จากผลการทดลองพบว่า เชื้อ *Lc. lactis* spp. *lactis* P2 ในช่วง 3 วันแรกจะมีการผลิตสารแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 และ *Leuco. mesenteroides* JCM ได้ถึง 25,600 และ 800 Au/ml ตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับ Compos *et al.*(2006) ที่ทำการศึกษาถึง สารแบคเทอริโอซินจาก *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* และ *Enterococcus mundtii* ที่ทำการคัดแยกมาจากปลา turbot (*Psetta maxima*) ต่อการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* และ *Staphylococcus aureus* พบว่า ความสามารถของสารแบคเทอริโอซินต่อการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* และ *Staphylococcus aureus* จะสูงและลดลงตามระยะเวลาของการผลิตสารแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สรุป

ปัจจุบันพบแบคทีเรียกรดแลกติกในปลาชนิดต่างๆได้จำนวนหลายสายพันธุ์ ส่วนมากในการศึกษาแบคทีเรียกรดแลกติกมักเกี่ยวข้องกับการนำไปใช้เป็นโปรไบโอติกมากกว่าแบคเทอริโอซิน ซึ่งใช้สำหรับการพัฒนาในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำให้ดีขึ้น ในการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกแต่ละชนิดนั้นจะขึ้นอยู่กับสภาะแวดล้อมที่แตกต่างกัน เช่น แบคทีเรีย *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* P2 เป็นแบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินได้ซึ่งทำการคัดแยกจากระบบทางเดินอาหารของปลาสวาย และได้มีการนำไปศึกษาถึงคุณสมบัติของเชื้อ P2 โดยนำทดสอบกับค่าความเป็นกรดด่างระหว่าง 2 ถึง 10 สารแบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งเชื้อเป้าหมายได้มากที่สุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6 - 7 โดยสามารถยับยั้งเชื้อได้ 51,200 Au/ml และนำไปทดสอบความเข้มข้นต่างๆ ของเกลือ พบว่าสามารถเจริญเติบโตได้ในความเข้มข้นของเกลือเท่ากับ 1 - 4% โดยสามารถยับยั้งเชื้อได้สูงสุด 51,200 Au/ml และสามารถทนความร้อนที่ 100 °C ได้นานที่สุดเป็นเวลา 60 นาที สามารถยับยั้งเชื้อได้ 51,200 Au/ml และสามารถทนความร้อนที่ 121 °C นาน 15 นาที โดยสามารถยับยั้งเชื้อได้ 800 Au/ml และค่าความสัมพันธ์ระหว่างเวลา ค่าการดูดกลืนแสง 600 nm และค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซิน (Au/ml) เพื่อดูอัตราการเจริญเติบโต (Growth curve) ในแต่ละอุณหภูมิ คือ 30°, 37° และ 42°C พบว่า เชื้อ P2 สารแบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งเชื้อได้มากที่สุด เมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30°c เป็นระยะเวลา 10-14 ชั่วโมง แต่เมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37°c และ 42°c พบว่าสารแบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งเชื้อได้ลดลงและทำการทดสอบเชื้อ P2 ที่นำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อดูค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซิน (Au/ml) เป็นเวลา 10 วัน พบว่า เชื้อ P2 สารแบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 ได้มากที่สุดถึง 25,600 Au/ml และยับยั้งเชื้อ *Leuco. mesenteroides* JCM ได้มากที่สุดถึง 800 Au/ml และลดลงตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# เอกสารอ้างอิง

อัจฉรา เพิ่ม. 2549. แบคทีเรียแลคติก. สงขลา : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา. หน้า 1-59.

Balcazar, J.L., Vendrell, D., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Girones, O., Muzquiz, J.L., 2007. *In vitro* competitive adhesion and production of antagonistic compounds by lactic acid bacteria against fish pathogens. Veterinary Microbiology. 122 : 373-380.

Balcazar, J.L., Vendrell, D., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Muzquiz, J.L., Girones, O., 2008. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. Aquaculture 278 : 188-191.

Campos, C.A., O. Rodriguez, P. Calo-Mata, M. Prado and J. Barros-Velaquez. 2006. Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*). Food Research International 39 : 356-364.

Cheikhyoussef, A., N. Pogori, H. Chen, F. Tian, W. Chen, J. Tang and H. Zhang. 2008. Antimicrobial activity and partial characterization of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by *Bifidobacterium infantis* BCRC 14602. Food Control xxx:xxx-xxx.

Itoi, S., T. Abe, S. Washio, E. Ikuno, Y. Kanomata and H. Sugita. 2008. Isolation of halotolerant Lactococcus lactis subsp. lactis from intestinal tract of coastal fish. International Journal of Food Microbiology 121 : 116-121.

Powell, J.E., R.C. Witthuhn, S.D. Todorov and L.M.T. Dicks. 2007. Characterization of bacteriocin ST8KF produced by a kefir isolate *Lactobacillus plantarum* ST8KF. International Diary Journal 17 : 190-198.

มหาวิทยาลัยราชภัฏพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ringo, E. and F.J. Gatesoupe. 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. Aquaculture 160 : 177-203.

Savadogo, A., C. A.T. Ouattara, I. H.N. Bassole and A. S. traore. 2004. Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains isolated from Burkino Faso fermented milk. Pakistan Journal of Nutrition 3 : 174-179.

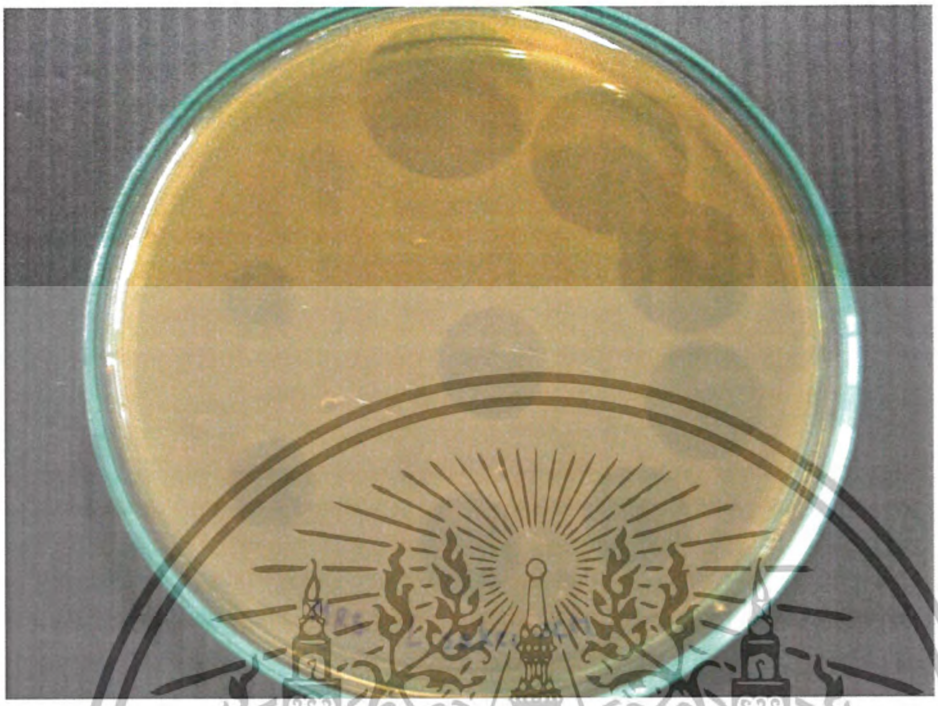
Vaughan, A., V.G.H. Eijsink, T.F. O'Sullivan, K. O'Hanlon and D. van Sinderen. 2001. An analysis of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from malted barley. Journal of Applied Microbiology 91 : 131-138.

http://www.lovelovefish.com/webboard/index.php?topic=15.0

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

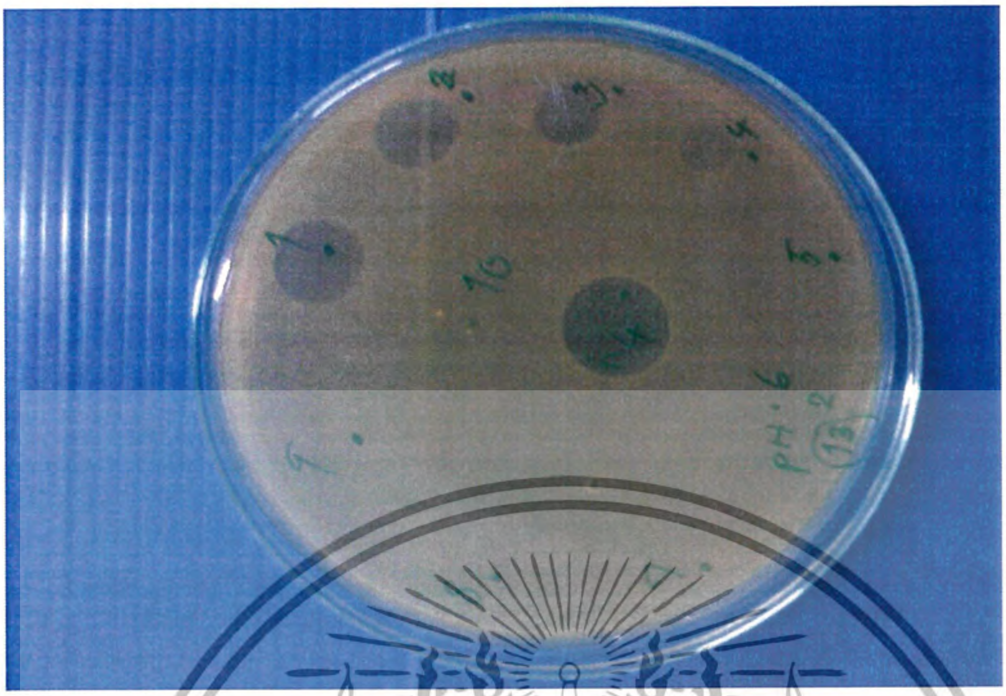
## ภาคผนวก



**ภาพผนวกที่** 1 การผลิตสารแบคเทอริโอซินต่อการยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* JCM

**ภาพผนวกที่** 2 การผลิตสารแบคเทอริโอซินต่อการยับยั้งเชื้อ *Leuco. mesenteroides* JCM

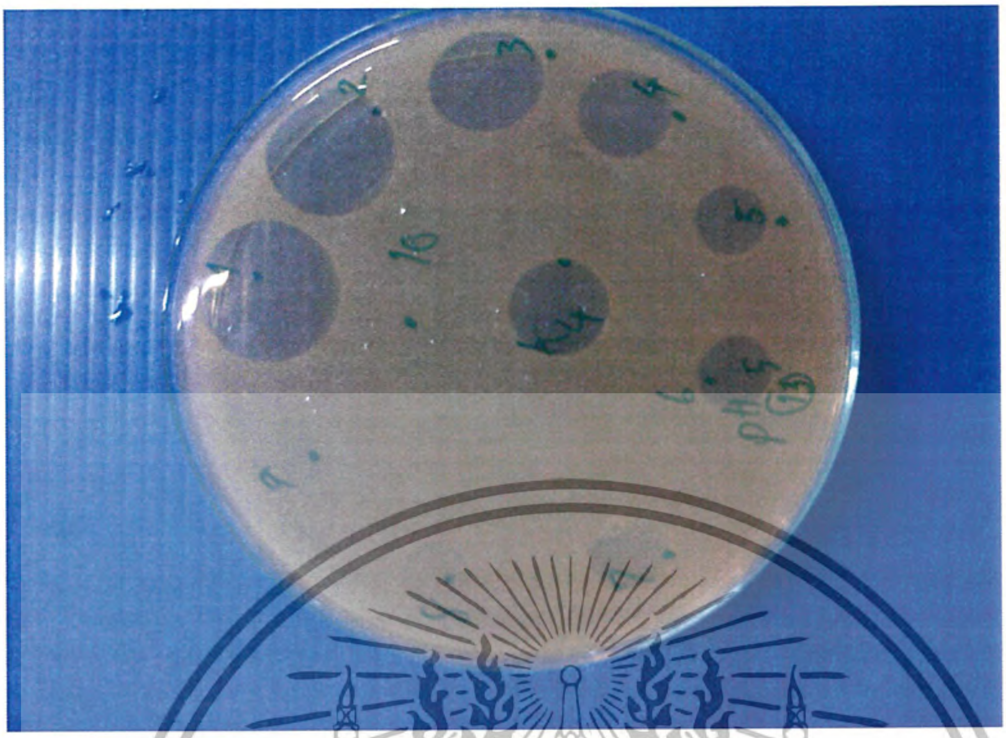
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**ภาพผนวกที่** 3 ความทนต่อกรด-ด่างที่ pH 2 ของสารแบคเทอริโอซินต่อการยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* JCM

**ภาพผนวกที่** 4 ความทนต่อกรด-ด่างที่ pH 3 ของสารแบคเทอริโอซินต่อการยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* JCM

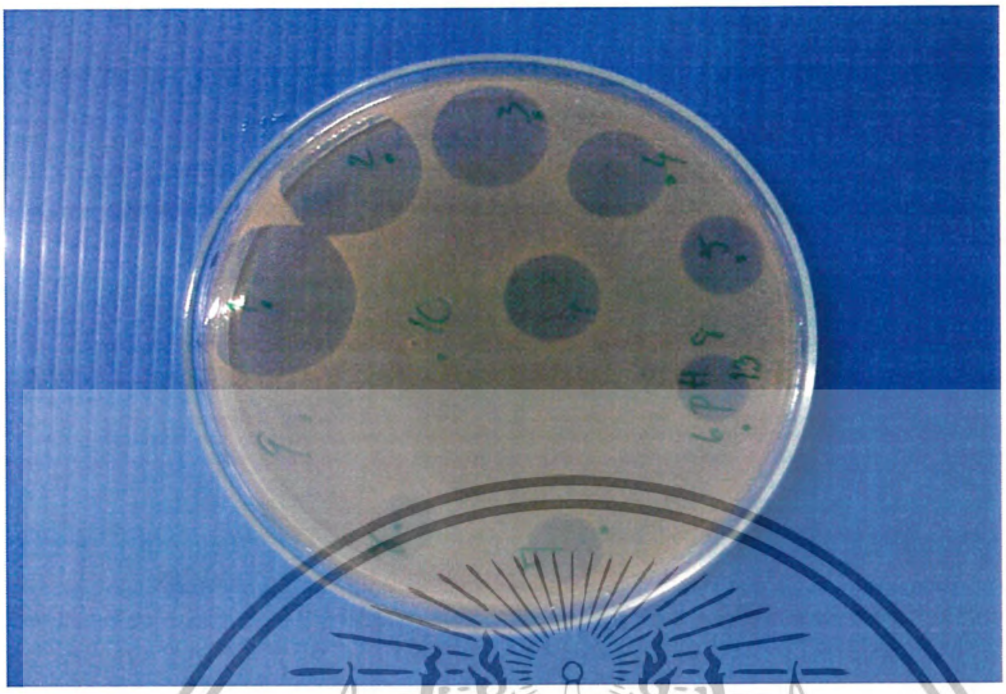
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**ภาพผนวกที่** 5 ความทนต่อกรด-ด่างที่ pH 5 ของสารแบคเทอริโอซินต่อการยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* JCM

**ภาพผนวกที่** 6 ความทนต่อกรด-ด่างที่ pH 7 ของสารแบคเทอริโอซินต่อการยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* JCM

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**ภาพผนวกที่** 7 ความทนต่อกรด-ด่างที่ pH 8 ของสารแบคเทอริโอซินต่อการยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* JCM

**ภาพผนวกที่** 8 ความทนต่อกรด-ด่างที่ pH 9 ของสารแบคเทอริโอซินต่อการยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* JCM

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้