ผลของแบคเทรอโอซินจากแบคทีเรียแลคติกที่มีต่อเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคทันตกรรม

Effect of bacteriocin produced by Lactic Acid Bacteria on dental pathogens

ชญานาถ จีระกิตติโสภณ

ศิรินุช รุ่งเจริญชัยพร

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ.2559

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ผลของแบคเทรอโอซินจากแบคทีเรียแลคติกที่มีต่อเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคทันตกรรม

Effect of bacteriocin produced by Lactic Acid Bacteria on dental pathogens

T148868

ชญานาถ จีระกิตติโสภณ

ศิรินุช รุ่งเจริญชัยพร

สจพม.
เลขทะเบียน 148868
วัน.เดือน.ปี 30 พ.ย. 2560

b 12871409
f

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

ผลของแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแลคติกที่มีต่อเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคทันตกรรม

Effect of bacteriocin produced by Lactic Acid Bacteria on dental pathogens

จัดทำโดย

ชญานาถ จีระกิตติโสภณ รหัสนักศึกษา 55080085

ศิรินุช รุ่งเจริญชัยพร รหัสนักศึกษา 55080123

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

..... 21 / ก.ค. / 2559

(รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์)

อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อปัญหาพิเศษ ผลของแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแลคติกที่มีต่อเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคทันตกรรม

ชื่อนักศึกษา ชญานาถ จีระกิตติโสภณ รหัสนักศึกษา 55080085
ศิรินุช รุ่งเจริญชัยพร รหัสนักศึกษา 55080123

หลักสูตร วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม
พ.ศ. 2559

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแลคติกที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคทางทันตกรรมได้ โดยเริ่มจากทำการหาสภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ทางทันตกรรม ซึ่งก็คือ เชื้อที่ก่อโรคฟันผุ (*Streptococcus mutans*) และเชื้อที่ก่อโรคเหงือกอักเสบ (*Porphyromonas gingivalis*) จากนั้นทำการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคทางทันตกรรม โดยใช้เชื้อแบคทีเรียแลคติกซึ่งสามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินได้ ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้ใช้เชื้อแบคทีเรียแลคติก ได้แก่ *W. cibaria* SI21, *P. pentosaceus* TISTR 536, *P. pentosaceus* M13, *E. faecalis*, *L. lactis* subsp. *lactis* Sb2, *L. lactis* subsp. *lactis* P2, *L. plantarum* NF38 และ *L. plantarum* NHAM58 และเชื้ออินดิเคเตอร์ชนิดต่างๆ ได้แก่ *L. sakei*, *B. cereus*, *S. aureus*, *L. innocua*, *S. mutans*, และ *P. gingivalis* ซึ่งเมื่อทำการทดลองพบว่า มีแบคทีเรียแลคติกหลายชนิดที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินเพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ โดยสังเกตจากโซนใส (Inhibition zone) เมื่อพิจารณาที่เชื้อก่อโรคทางทันตกรรมพบว่าสามารถถูกยับยั้งโดยแบคทีเรียแลคติก *L. lactis* subsp. *lactis* P2 ซึ่งมีความสามารถในการผลิตแบคเทอริโอซินที่เรียกว่า ไนซิน จึงได้นำมาศึกษาผลความเข้มข้นของ Commercial nisin กับเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี spot-on-lawn พบว่า มีความสามารถในการยับยั้งได้ดี เมื่อพิจารณาที่จุลินทรีย์ก่อโรคทางทันตกรรมทั้ง 2 ชนิด พบว่า *S. mutans* สามารถถูกยับยั้งได้ดีกว่า *P. gingivalis* จึงได้นำเชื้อ *S. mutans* มาทำการศึกษาต่อ โดยใช้ความเข้มข้นของไนซิน 250 และ 1000 IU/ml เลี้ยงในหลอดทดลอง แล้วตรวจผลโดยวิธีการ Pour plate นับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตรอดทุกๆ 6 ชั่วโมง จากนั้นทำการยืนยันลักษณะจุลินทรีย์โดยการส่องกล้องจุลทรรศน์ พบว่าไนซินบริสุทธิ์ที่ระดับความเข้มข้น 1000 IU/ml นั้นสามารถทำลายเชื้อ *S. mutans* ได้ดีกว่าความเข้มข้นที่ 250 IU/ml แต่ยังไม่สามารถทำลายได้ทั้งหมด โดยทำลายได้มากที่สุดเพียง 12 ชั่วโมงเท่านั้น หลังจากนั้นมีจำนวนจุลินทรีย์เพิ่มมากขึ้นตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับ Control ที่ไม่ใส่ไนซิน การทดลองในครั้งนี้จึงกล่าวได้ว่า แบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติก สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคทางทันกรรมได้ แต่ควรจะทำการศึกษาปริมาณความเข้มข้นของไนซินในระดับที่สูงขึ้น เพื่อใช้ในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์เพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวกับสุขภาพช่องปากต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: แบคเทอริโอซิน แบคทีเรียแลคติก โรคทันตกรรม ไนซิน

เอกสารนี้สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special problem title: Effect of bacteriocin produced by Lactic Acid Bacteria on dental pathogens

Student name: Chayanart Jeerakittisophon Student ID 55080085

Sirinuch Rungcharoenchaiporn Student ID 55080123

Program: Bachelor of Science in Industrial Fermentation Technology

Year: 2016

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Adisorn Swetwiwathana

ABSTRACT

This research aimed to study about effect of bacteriocin produced by Lactic Acid Bacteria on dental pathogens. The beginning of the study was found the optimal conditions for the cultivation of pathogenic oral microorganisms such as Dental caries (*Streptococcus mutans*), Gingivitis (*Porphyromonas gingivalis*). Then the efficiency of oral pathogens inhibition by using lactic acid bacteria which can create bacteriocin was tested. This study was used lactic acid bacteria including *W. cibaria* SI21, *P. pentosaceus* TISTR 536, *P. pentosaceus* M13, *E. faecalis*, *L. lactis* subsp. *lactis* Sb2, *L. lactis* subsp. *lactis* P2, *L. plantarum* NF38 and *L. plantarum* NHAM58. Microbial indicator including *L. sakei*, *B. cereus*, *S. aureus*, *L. innocua*, *S. mutans* and *P. gingivalis*. The study found that there were many strains of lactic acid bacteria could produce bacteriocin to inhibit microbial pathogens, by the clear zone (Inhibition zone) observation. When considering only the oral pathogens, the results implied that only nisin a producer of *L. lactis* subsp. *lactis* P2 exhibited the inhibitory effect on *S. mutans*. Thus, commercial purified nisin had been studied in the next step by measuring the activity of commercial nisin in various concentrations with only 2 dental pathogens (*P. gingivalis* and *S. mutans*). The results informed that *S. mutans* can be inhibited by the purified nisin better than *P. gingivalis*. Therefore, *S. mutans* had been used in an in vitro study with different purified nisin concentration at 250 and 1000 IU/ml. Then examined the result by Pour plate methods and count the number of cells that have survived every 6 hours. Next, confirm morphology of *S. mutans* by using microscope. The result showed that commercial nisin at a concentration of 1000 IU/ml could inhibit *S. mutans* more than 250 IU/ml but it can inhibit just 12 hours after incubation. After that, the number of *S. mutans* were increased

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

respectively. The result of this study showed that bacteriocin produced from lactic acid bacteria can inhibit oral pathogens. An appropriate concentration of bacteriocin which can inhibit the oral pathogens should be study in the future.

Keyword: Bacteriocin, Nisin, Biopreservative, Lactic Acid Bacteria, Oral pathogens, *S.mutans*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

รายงานปัญหาพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ทางคณะผู้จัดทำนั้น ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร. อดิศร เสวตวิวัฒน์ เป็นอย่างสูงที่กรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาคอยให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อการศึกษาเป็นอย่างมากและช่วยให้คำปรึกษาในเรื่องต่างๆ รวมทั้งดูแลเอาใจใส่ และตรวจแก้ไขปัญหาพิเศษฉบับนี้ตลอดเวลาจนปัญหาพิเศษฉบับนี้เสร็จสมบรูณ์ ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์และเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือสารเคมีต่างๆ รวมทั้งอำนวยความสะดวกสบายในการปฏิบัติงานและขอขอบคุณเพื่อนทุกคนที่คอยให้ความช่วยเหลือทั้งกำลังใจและกำลังกายตลอดมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อคุณแม่ที่คอยเป็นกำลังใจและสนับสนุนกำลังทรัพย์ในการทำปัญหาพิเศษในครั้งนี้มาโดยตลอด

ชญานาถ จีระกิตติโสภณ

ศิรินุช รุ่งเจริญชัยพร

4 พฤษภาคม 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	IV
สารบัญ	V
สารบัญตาราง	VII
สารบัญภาพ	VIII
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา	3
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1เชื้อแบคทีเรียในช่องปาก (Oral Bacteria)	4
2.2 เชื้อก่อโรคฟันผุ *Streptococcus mutans*	5
2.3 เชื้อก่อโรคเหงือกอักเสบ *Porphyromonas gingivalis*	7
2.4 แบคทีเรียแลคติก (lactic acid bacteria)	9
2.5 แบคเทอริโอซิน	10
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	12
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.1 วัตถุดิบและสารเคมี	15
3.2 อุปกรณ์	17
3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง	18
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	22
4.1 การคัดเลือกหาแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแลคติกที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค	22
4.2 ศึกษาผลความเข้มข้นของ Commercial nisin กับเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี spot-on-lawn	24
4.3 ศึกษายืนยันผลของไนซินต่อการยับยั้ง *Streptococcus mutans* ในหลอดทดลอง	27
บทที่ 5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ	29
5.1สรุปผล	29
5.2 ข้อเสนอแนะ	29
บรรณานุกรม	30
ภาคผนวก	32
ภาคผนวก ก แบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแลคติกที่ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค	33
ภาคผนวก ข ความเข้มข้นไนซินกับเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค	37
ภาคผนวก ค ลักษณะสัณฐานของจุลินทรีย์ทางทันตกรรม	39
ภาคผนวก ง อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	41
ประวัติผู้เขียน	44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 ตารางแสดงผลการคัดเลือกหาแบคเทอริโอซินที่ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค	22
4.2 ตารางแสดงผล Commercial nisin กับเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ	24
4.3 ตารางแสดงผลของไนซินต่อการยับยั้ง *Streptococcus mutans* ในหลอดทดลอง	27
ก.1 ตารางแสดงภาพ Inhibition zone ที่เกิดขึ้น	33
ก.2 ตารางแสดงภาพความขุ่นของเชื้อแบคทีเรียแลคติก	34
ข.1 ตารางแสดงภาพความเข้มข้นไนซินกับเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค	37
ค.1 ตารางแสดงลักษณะสัณฐานของจุลินทรีย์ทางทันตกรรม	39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 ลักษณะของแบคทีเรีย *Streptococcus mutans*	6
2.2 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย *Streptococcus mutans*	6
2.3 ภาพของโรคเหงือกอักเสบ	8
2.4 ลักษณะของแบคทีเรีย *Porphyromonas gingivalis*	8
2.5 ลักษณะของแบคทีเรียแลคติก	9
2.6 แบคทีเรียแลคติกสามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ได้หลายชนิด รวมทั้งแบคเทอรีโอซินซึ่งจะให้ผลยับยั้งแบค-ทีเรียที่เกี่ยวข้อง เชื้อที่ผลิตแบคเทอริโอซิน (รูปบน) จะทำ ให้เกิดบริเวณยับยั้งกับแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ (รูปล่าง)	10
2.7 โครงสร้างของไนซิน	11
4.1 แสดง Inhibition zone ที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ก่อโรคชนิดต่างๆรวมทั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคทางทันตกรรม โดยใช้แบคทีเรียแลคติกที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้	23
4.2 แสดงประสิทธิภาพของไนซินบริสุทธิ์ที่จำหน่ายทาง การค้ากับเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี spot-on-lawn โดยสังเกตจาก Inhibition zone	26
4.3 แสดงผลของไนซินต่อการยับยั้ง *Streptococcus mutans* ในหลอดทดลอง โดยใช้ไนซินบริสุทธิ์ที่ความ เข้มข้น 250และ 1000 AU/ml	28
ค.1 ความขุ่นของเชื้อจุลินทรีย์ *S. mutans*	40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เนื่องจากปัจจุบันพบว่ามีผู้ที่ป่วยเป็นโรคทางทันตกรรมเพิ่มมากขึ้น เช่น โรคฟันผุ และโรคเหงือกอักเสบ ซึ่งมีสาเหตุมาจากแบคทีเรียในช่องปากซึ่งเกี่ยวข้องกับสุขภาพ โดยเฉพาะ เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Porphyromonas gingivalis* และ *Streptococcus mutans* ซึ่งโรคฟันผุ เป็นโรคที่มักเกิดกับคนไข้ที่มาพบทันตแพทย์ โรคฟันผุเป็นโรคติดต่อที่เกิดจากเชื้อโรค คือแบคทีเรียชื่อ *Streptococcus mutans* ซึ่งติดต่อได้ทางน้ำลาย โดยโรคฟันผุนี้เกิดจากการที่แบคทีเรียที่ย่อยสลายอาหารประเภทน้ำตาลทำให้เกิดกรดแลคติก ที่มีฤทธิ์ในการการสลายแร่ธาตุเคลือบฟันและเนื้อฟันส่วนที่โผล่ขึ้นมาในช่องปาก ได้แก่ แร่ธาตุแคลเซียม ฟอสฟอรัส ให้ออกจากตัวฟันจึงทำให้เคลือบฟัน ตัวฟัน และรากฟันที่โผล่พ้นออกมาจากเหงือกถูกทำลายจนเกิดเป็นโพรง หรือเป็นรูตามฟันได้โดยง่าย ในสภาวะปกติภายในช่องปากมีกระบวนการเปลี่ยนแร่ธาตุแคลเซียมและฟอสฟอรัสในระหว่างชั้นผิวเคลือบฟัน และแร่ธาตุที่มีอยู่ในน้ำลายตลอดเวลาอย่างสมดุล ทำให้ไม่มีการสูญเสียแร่ธาตุออกจากผิวฟัน แต่ในภาวะที่จุลินทรีย์มีการย่อยสลายอาหารแป้งและน้ำตาล จะเปลี่ยนสภาพแวดล้อมของน้ำลายเป็นกรด ทำให้สูญเสียแร่ธาตุแคลเซียม ฟอสฟอรัสออกจากตัวฟันมากกว่าการได้รับกลับคืน ซึ่งถ้าเกิดขึ้นบ่อยจะทำให้เกิดฟันผุ (คลินิกทันตกรรมราชเทวีสเตชั่น, 2554) และในส่วนของโรคเหงือกอักเสบเป็นปฏิกิริยาที่ร่างกายตอบสนองต่อเชื้อโรคที่สะสมรอบๆ ตัวฟัน พบว่าเกือบทุกคนจะเป็นโรคเหงือกอักเสบ อาจมากบ้างน้อยบ้างแตกต่างกันไป โดยปกติเหงือกจะทำหน้าที่ห่อหุ้มและป้องกันอันตรายให้แก่กระดูกและฟัน โดยมีเอ็นยึดกับรากฟันเอาไว้ ขอบเหงือกที่บริเวณคอฟันจะมีลักษณะบาง ผิวเรียบ ไม่ยึดกับตัวฟัน ทำให้เกิดเป็นร่องเหงือกลึก ถ้าสังเกตดูที่เหงือกของเราจะเห็นว่ามีสีชมพูและซีดแต่ถ้าเกิดโรคมีการอักเสบหรือมีการติดเชื้อจะมีสีแดง เรียบเป็นมันหรือเป็นสีม่วง คล้ำ ช้ำ เมื่อเหงือกมีการอักเสบและติดเชื้อจะมีหนองเกิดขึ้น โดยเฉพาะบริเวณขอบเหงือก ถ้าลองกดดูจะเห็นว่ามีหนองไหลออกมา อย่างไรก็ตามในบางคนอาจจะมีเหงือกสีคล้ำได้เช่นคนผิวดำ คนที่สูบบุหรี่เป็นประจำนานๆ หรืออาจจะพบได้ในคนที่ทำงานสัมผัสกับสารเคมีเป็นประจำนานๆ เชื้อที่เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคอักเสบมักเป็นชื้อแบคทีเรีย *Porphyromonas gingivalis* เมื่อมีการสะสมเป็นเวลานานเข้าก็จะกลายเป็นหินปูนในปาก ถ้าทำความสะอาดฟันและช่องปากไม่ดีพอ แบคทีเรียในแผ่นคราบฟันจะไปยึดติดกับหินปูนเหล่านี้ และไปเกาะตามบริเวณขอบเหงือก ปล่อยสารพิษออกมาทำให้เหงือกอักเสบ (วรวุฒิ เจริญศิริ, 2554)

ดังนั้นจึงถือเป็นเรื่องสำคัญกับทุกคน ปัญหาโดยส่วนมากที่มาจากการมีฟันผุ คือไม่สามารถรับประทานอาหารได้ตามปกติ นอกจากนั้น ยังมีปัญหาด้านการรักษาสภาพอารมณ์ให้เป็นปกติ ปัญหาในการแปรงฟัน ทำความสะอาดช่องปาก ปัญหาในการนอนหลับพักผ่อน การเข้าสังคม ตลอดจนการศึกษาเป็นต้นปัญหาที่เกิดจากโรคฟันผุ คิดเป็นครึ่งหนึ่งของปัญหาคุณภาพชีวิตทั้งหมดที่มาจากช่องปาก ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของการป้องกันไม่ให้เกิดฟันผุมากในปัจจุบัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในปัจจุบันมีการศึกษาถึงการใช้สารยับยั้งทางชีวภาพ ในการลดและยับยั้งแบคทีเรียในช่องปากที่มีผลต่อฟันจนทำให้เกิดโรคฟันผุและเหงือกอักเสบ โดยมากมักจะเน้นในเรื่องการใช้สารสกัดสมุนไพรที่มาจากเปลือก เมล็ดผลไม้ ใบไม้ เช่น โครงการการพัฒนาตำรับสมุนไพรป้องกันฟันผุซึ่งเป็นการพัฒนาผลิตภัณฑ์สมุนไพรป้องกันฟันผุ โดยสมุนไพรหลักในการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อที่ทำให้เกิดฟันผุ หรือเชื้อ *S. mutans* คือ มังคุด (Garcinia mangostana Linn.) และสมุนไพรอีกสองชนิดที่เพิ่มเติมในตำรับคือ ฝรั่ง (Psidium guajava Linn.) เพื่อเพิ่มความสดชื่นและดับกลิ่นปาก บัวบก (Centella asiatica) เพื่อช่วยสมานแผลในปาก ผลการทดลองพบว่าค่า minimum inhibitory concentration (MIC) จากสารสกัดมังคุด Ethanol 80% คือความเข้มข้น 1:256 และในการพัฒนาผลิตภัณฑ์สมุนไพรป้องกันฟันผุโดยเตรียมในรูปแบบแกรนูลฟู่ป้องกันฟันผุ โดยมีส่วนผสมคือสารสกัดมังคุด,สารสกัดใบฝรั่ง,สารสกัดใบบัวบก นำมาทำเป็นแกรนูลเปียกแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จึงนำมาแร่งเพื่อให้ได้แกรนูลที่เล็กลง จากนั้นนำแกรนูลฟู่ที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. mutans* ปรากฏว่าไม่สามารถยับยั้งเชื้อ*S. mutans* ได้ ทั้งนี้พบว่าจากสารสกัดมังคุด Ethanol 80% ไม่สามารถละลายน้ำได้ จึงได้สกัดมังคุดโดยใช้น้ำเป็นสารละลายและได้นำสารสกัดนี้ไปหาค่า MIC ปรากฏว่าไม่มี inhibition zone นั่นคือไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. mutans* อาจสรุปได้ว่าสารสำคัญในการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. mutans* จะละลายได้ไม่ดีในน้ำ เมื่อนำมาทำเป็นแกรนูลฟู่สารสำคัญจึงไม่สามารถละลายได้ ทำให้ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ จึงได้เปลี่ยนรูปแบบผลิตภัณฑ์เป็นน้ำยาบ้วนปากเปลือกมังคุด โดยมีส่วนของสารสกัดในแอลกอฮอล์ของมังคุด,ใบฝรั่ง,ใบบัวบก จากนั้นนำไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. mutans* ปรากฏว่าสามารถยับยั้งเชื้อนี้ได้ นอกจากนี้ได้นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปทดสอบความพึงพอใจของอาสาสมัครด้วย โดยเปรียบเทียบระหว่างสูตรที่1, สูตรที่2 และสูตรที่3 ผลที่ได้คือสูตรที่2 ได้รับความพึงพอใจจากอาสาสมัครมากที่สุด (วัสยามน ชูติวัทก์และวาที รัตนวิสาลนนท์,2544) รวมถึงการใช้สารยับยั้งที่ผลิตขึ้นจากเชื้อแบคทีเรีย เช่น แบคเทอริโอซิน ซึ่งเป็นสารยับยั้งในกลุ่มโปรตีนที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติก ซึ่งพบมากในอาหารหมักพื้นบ้านของนานาประเทศ และในประเทศไทยมีการศึกษาคัดแยกหาเชื้อกลุ่มแบคทีเรียแลคติกที่เกี่ยวข้องกับอาหารหมักไทย และมีรายงานการตรวจพบเชื้อดังกล่าวที่สามารถผลิตแบคทีเรียแลคติกได้หลายชนิด เช่น pediocin PA-1 ผลิตจากเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ซึ่งคัดแยกได้จากแหนม (swetwiwathana, 2008) plantaricin W จากเชื้อ *Lactobacillus plantarum* NF3 ซึ่งแยกได้จากแหนมปลา (swetwiwathana, 2008) เป็นต้น การศึกษานี้จึงได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับผลของแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลคติก ที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค ซึ่งในที่นี้คือ แบคทีเรียที่อยู่ในช่องปากซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคเหงือกอักเสบและโรคฟันผุ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1 ศึกษาคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลคติกกลุ่มที่ผลิตแบคเทอริโอซินจากอาหารหมักไทยที่มีผลในการยับยั้งเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคทันตกรรมในสายพันธุ์ *Porphyromonas gingivalis* และ *Streptococcus mutans*

1.2.2 ทวนสอบแบคเทอริโอซินของเชื้อแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อทันตกรรมในหลอดทดลอง เทียบกับการยับยั้งเชื้อของแบคเทอริโอซินในกลุ่มไนซินที่ผลิตและจำหน่ายทางการค้า

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 ได้ทราบถึงชนิดของแบคเทอริโอซิน ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร รวมถึงโรคทางทันตกรรม

1.3.2 สารแบคเทอริโอซินที่ยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อโรคทางทันตกรรมได้ สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในแง่ของผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องกับสุขภาพช่องปาก

1.3.3 สามารถฝึกกระบวนการคิดวิเคราะห์ การวางแผนการทำงาน และการลงมือปฏิบัติการทำงาน เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่ต้องการรวมถึงการทำงานร่วมกับผู้อื่นได้ดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เชื้อแบคทีเรียในช่องปาก (Oral Bacteria)

ปัญหาเกี่ยวกับสุขภาพของฟัน เช่น ฟันผุและโรคของช่องปากเป็นปัญหาสาธารณสุขของประชากรที่สำคัญอย่างยิ่งฟันผุมีสาเหตุมาจากแบคทีเรียที่มีอยู่ประจำในช่องปากและมีอยู่หลายชนิดด้วยกันจากการที่เชื้อเหล่านี้มีความสามารถผลิตกรด *Streptococcus* เป็นแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่มีคุณสมบัติดังกล่าวและเชื่อว่าเป็นตัวทำให้เกิดฟันผุที่สำคัญจะเห็นได้จากการทดลองของ Orland ซึ่งได้นำเอาเชื้อ *Streptococcus* ที่พบในช่องปากของคนไปใส่ในปากหนูที่ไม่มีเชื้อ (Germfree Rat) ปรากฏว่าสัตว์ทดลองเหล่านั้นมีฟันผุเกิดขึ้นโดยเฉพาะ *Streptococcus mutans* เป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะเฉพาะและคุณสมบัติเด่นบางอย่างที่ไม่พบในแบคทีเรียชนิดอื่นๆซึ่งในปัจจุบันเมื่อกล่าวถึงสาเหตุของฟันผุคนส่วนมากจะนึกถึง *S. mutans* แบคทีเรียตัวนี้จึงถูกนำมาทดลองและศึกษาในแง่มุมต่างๆ มากมาย *S. mutans* ทำให้เกิดฟันผุได้จากความสามารถยึดเกาะบนผิวหน้าฟันที่เรียบ กล่าวคือ ในขั้นตอนแรกจะเกิดการยึดเกาะกันระหว่างสาร glucoprotein ซึ่งเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่มีอยู่ในน้ำลายและกระจายอยู่ในแผ่นคราบฟัน (Acquired pellicle) glucoprotein จะไปจับกับโปรตีนที่ผนังเซลล์ของ *S. mutans* ขั้นที่ 2 เกิดจากการยึดเกาะกันระหว่างเซลล์ต่อเซลล์โดยมีสาร glucan เป็นสื่อช่วยในการยึดเกาะ glucan เป็นสารที่เกิดขึ้นเนื่องจากการรวมตัวกันของน้ำตาลกลูโคสหลายๆ โมเลกุลและมีคุณสมบัติเป็นเมือกเหนียวๆ ไม่ละลายน้ำและที่บริเวณผนังของเซลล์ของ *S. mutans* จะมีที่สำหรับให้ glucan ยึดเกาะ (glucan receptor) นอกจากนี้ยังมีสารอย่างอื่นอีกที่ช่วยในการยึดเกาะเช่น glucosyltransferase (GTF) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ช่วยในการสังเคราะห์ glucan ดังสมการ

ในขั้นตอนนี้ จะทำให้มีจำนวนแบคทีเรียมาสะสมกันอยู่อย่างมากมายและทับถมกันมากเข้าจนกลายเป็นแผ่นคราบแบคทีเรียที่แน่นหนา เมื่อตรวจแผ่นคราบแบคทีเรียที่เกาะอยู่บนตัวฟันที่มีรอยผุจะพบเชื้อ *S. mutans* เป็นจำนวนมากมายบริเวณอื่นที่ไม่มีรอยผุก็ตรวจพบได้เหมือนกันแต่บริเวณที่มีรอยผุจะพบได้มากกว่าและในภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคสอยู่ด้วยจะพบว่ามีจำนวนเชื้อนี้เพิ่มขึ้นอย่างมากมาย *S. mutans* นำน้ำตาลซูโครสไปใช้สร้างสาร extracellutar polysaccharide ได้หลายชนิดโดยการทำงานของเอนไซม์ที่มีอยู่ในตัวมันเองสารดังกล่าวได้แก่ glucan ซึ่งจะทำให้แบคทีเรียยึดเกาะกันได้ดีนอกจากนี้ยังมี fructan หรือ levan ซึ่งเป็นสารที่ละลายน้ำได้จะแตกตัวออกเป็นโมเลกุลเล็กๆและถูกแบคทีเรียนำไปใช้เป็นสารอาหารต่อไปได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Streptococcus mutans สามารถนำน้ำตาลซูโครสไปใช้ได้อีกทางหนึ่งคือเมื่อซึมผ่านผนังเซลล์เข้าไปแล้วจะถูกนำไปเผาผลาญให้กลายเป็นพลังงาน ซึ่งจะได้ผลิตผลออกมาเป็นกรดกรดที่ได้มีหลายชนิดด้วยกันทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อม กล่าวคือ ถ้ามีปริมาณกลูโคสมากเกินพอผลผลิตที่ได้จากการนำไปหมัก (fermentation) จะได้กรดแลคติกแต่ถ้ามีกลูโคสจำนวนจำกัดผลิตผลที่ได้จะเป็นกรดฟอร์มิคกรดอะซิติคและอีทานอลกรดแลคติกที่ผลิตออกมาได้นี้ จะมีความรุนแรงมากกว่ากรดอะซิติคในระดับความเข้มข้นเดียวกันโดยกรดที่ได้นี้จะไปละลายแร่ธาตุ ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเนื้อเยื่อฟันฟอสฟอรัสที่ละลายออกมากก็จะถูกนำไปใช้ในขบวนการ phosphorylation เกิดเป็นกรดออกมาอีกหมุนเวียนอยู่เช่นนี้เรื่อยไปจนเนื้อเยื่อฟันถูกทำลายกลายเป็นแผลที่กว้างขึ้นมากทุกที นั่นคือ สภาพของฟันผุนอกจากนี้กรดแลคติคยังเกิดได้จากปฏิกิริยาการหมักของฟรุคโทส ที่ได้จากปฏิกิริยาการสังเคราะห์ glucan จากซูโครสดังกล่าวมาแล้วกับ streptococcus และแบคทีเรียอื่นที่มีในช่องปาก Streptococcus ที่พบในช่องปากเป็นเชื้อแกรมบวกแบคทีเรียชนิด facultative anaerobic bacteria พบได้ประมาณครึ่งหนึ่งของพวก viable count จากน้ำลายและโคนลิ้นและประมาณ 1 ใน 4 ของ viable count จากโคนลิ้น

2.2 เชื้อก่อโรคฟันผุ *Streptococcus mutans*

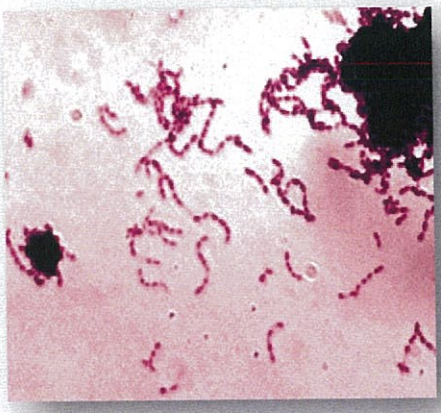
2.2.1 ลักษณะทั่วไป

เป็นเชื้อแบคทีเรียที่พบได้โดยทั่วไปในช่องปาก โดยเฉพาะที่ผิวฟันและเป็นแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุหลักในการทำให้เกิดโรคฟันผุโดยเฉพาะในเด็กและวัยรุ่น เพราะเชื้อสามารถสร้าง extracellular polysaccharide (EPS) ได้ทั้งแบบละลายน้ำ (soluble) และไม่ละลายน้ำ (insoluble) จากการใช้น้ำตาล sucrose ซึ่งเป็นสาเหตุหลักในการก่อให้เกิดคราบจุลินทรีย์ (plaque formation) หรือ biofilm ที่ผิวฟัน นอกจาก *S. mutans* ยังสามารถสร้างกรดจากการใช้น้ำตาลและทนกรดได้ดีจึงทำให้สามารถอยู่รอดได้ในสภาวะที่มีค่าpH ต่ำกรดที่เชื้อสร้างขึ้นภายในช่องปากจะไปสลายผิวฟันเป็นผลให้เกิดฟันผุตามมา

S. mutans เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม (Gram-positive cocci) ขนาด 0.5-0.75 μm เรียงตัวเป็นสายสั้นๆหรือสายยาวปานกลาง ถ้าเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีสภาวะเป็นกรดหรืออาหารแข็งเซลล์จะมีรูปร่างเป็นแท่งสั้นๆ ขนาด 1.5-3.0 μm โดยเฉพาะเชื้อที่แยกได้จากช่องปากจะพบรูปร่างแบบนี้ ได้บ่อยแบคทีเรียชนิดนี้ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ (non-motile) เมื่อทดสอบ catalase ให้ผลลบ

ส่วนใหญ่สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีอากาศ หรือมี N_2 +CO_2 หรือ CO_2 เป็นหลัก แต่จะเจริญได้ดีในสภาวะที่ไม่มีอากาศอุณหภูมิที่ทำให้เชื้อสามารถเจริญได้ดีคือ 37 °c และสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงสุด 45 °c และต่ำสุด 10 °c

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.1 ลักษณะของแบคทีเรีย *Streptococcus mutans*
ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก เมื่อย้อมแกรมติดสีม่วง เป็นเชื้อที่ไม่ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต

ที่มา : http://textbookofbacteriology.net/normalflora.html

ภาพที่ 2.2 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย *Streptococcus mutans*

ที่มา : http://www.pharmacy.mahidol.ac.th/newspdf/specialproject/2549-09.pdf

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 เชื้อก่อโรคเหงือกอักเสบ *Porphyromonas gingivalis*

เมื่อฟันผุจนถึงขั้นเหงือกอักเสบ เชื้อพี จินจิวาลิส (*P. gingivalis*) ที่อาศัยอยู่ในบริเวณเหงือกที่อักเสบ อาจสามารถเข้าสู่กระแสเลือดได้ ซึ่งจะทำให้ผนังหลอดเลือดแดงหนาตัวขึ้น เลือดไหลเวียนไปเลี้ยงหัวใจได้ไม่สะดวก หรืออาจทำให้เกิดการอักเสบที่ผนังหลอดเลือดหัวใจ อาจส่งผลให้เกิดภาวะหัวใจวายได้

2.3.1 โรคเหงือกอักเสบ

เป็นปฏิกิริยาที่ร่างกายตอบสนองต่อเชื้อโรคที่สะสมบริเวณรอบๆ ตัวฟัน พบว่าเกือบทุกคนจะเป็นโรคเหงือกอักเสบ อาจมากบ้างน้อยบ้างแตกต่างกันไป โดยปกติเหงือกจะทำหน้าที่ห่อหุ้ม และป้องกันอันตรายให้แก่กระดูกและฟัน โดยมีเอ็นยึดกับรากฟันเอาไว้ ขอบเหงือกที่บริเวณคอฟันจะมีลักษณะบาง ผิวเรียบ ไม่ยึดกับตัวฟัน ทำให้เกิดเป็นร่องเหงือกลึกประมาณ 2-4 มิลลิเมตร ส่วนของเหงือกที่อยู่ต่ำลงมาจะยึดกับกระดูกเบ้าฟัน ส่วนของเหงือกยึดนี้มีความแข็งแรงกว่าเหงือกที่อยู่บริเวณขอบเหงือกและถ้าสังเกตให้ดีจะเห็นว่ามีลักษณะขรุขระเล็กน้อย ไม่เรียบเหมือนขอบเหงือก ประสิทธิภาพการทำหน้าที่ของฟันขึ้นอยู่กับความแข็งแรงของตัวฟันและอวัยวะที่อยู่รอบๆซึ่งทำหน้าที่ยึดฟันและพยุงฟันให้คงอยู่ในขากรรไกร

อวัยวะที่อยู่รอบๆ ตัวฟัน มีชื่อเรียกรวมกันว่าอวัยวะปริทันต์ ซึ่งประกอบด้วย เหงือก เอ็นยึดปริทันต์ เคลือบรากฟัน และกระดูกเบ้าฟัน ถ้าสังเกตดูที่เหงือกของเราจะเห็นว่ามีสีชมพูและซีดแต่ถ้าเกิดโรคมีการอักเสบหรือมีการติดเชื้อจะมีสีแดง เรียบเป็นมันหรือเป็นสีม่วง คล้ำ ช้ำ เมื่อเหงือกมีการอักเสบและติดเชื้อจะมีหนองเกิดขึ้น โดยเฉพาะบริเวณขอบเหงือก ถ้าลองกดดูจะเห็นว่ามีหนอง ไหลออกมา อย่างไรก็ตามในบางคนอาจจะมีเหงือกสีคล้ำได้เช่นคนผิวดำ คนที่สูบบุหรี่เป็นประจำนานๆหรืออาจจะพบได้ในคนที่ทำงานสัมผัสกับสารเคมีเป็นประจำนานๆ

โรคเหงือกอักเสบ มีสาเหตุเบื้องต้น มาจากเชื้อแบคทีเรียบางชนิดที่มีอยู่ในช่องปากซึ่งสามารถเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนขึ้นในสภาวะที่เหมาะสม ซึ่งกล่าวคือการมีคราบอาหารจำพวกแป้งและน้ำตาลที่เกาะบนผิวฟัน และจากการที่เราทำความสะอาดฟันไม่ดีพอ ทำให้คราบอาหารเหล่านี้กลายเป็นอาหารของแบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรียเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนขึ้นแผ่กระจายไปบนผิวฟัน ที่เราเรียกกันว่า แผ่นคราบจุลินทรีย์ แบคทีเรียพวกนี้เมื่อมีการบริโภคอาหารจำพวกแป้งและน้ำตาลเข้าไปจะปล่อยกรดและสารพิษออกมา เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาการอักเสบ ผลคือทำให้เหงือกบวมแดงอักเสบและมีเลือดออก ทำให้เกิดการทำลายอวัยวะปริทันต์ แผ่นคราบจุลินทรีย์ไม่เพียงแต่จะมีแค่ส่วนตัวฟันที่อยู่เหนือขอบเหงือกเท่านั้น แต่ยังสามารถเกิดขึ้นในส่วนใต้ขอบเหงือกที่เรามองไม่เห็น ส่วนนี้เองที่ทำให้เกิดโรคปริทันต์ลงสู่กระดูกเบ้าฟัน ผลคือทำให้กระดูกเบ้าฟันละลาย ทำให้ล่องเหงือกลึกลงไปเรื่อยๆ ทำให้ฟันไม่ยึดติดกับเหงือกและก่อให้เกิดหนองในร่องปริทันต์ ทำให้รู้สึกเจ็บเหงือกและอาจมีอาการปวดเมื่อเคาะที่ตัวฟันและฟันโยกได้ ถ้าปล่อยทิ้งไว้เหงือกและกระดูกเบ้าฟันจะถูกทำลายลงเรื่อยๆจนในที่สุดก็อาจจะต้องสูญเสียฟันซี่นั้นไปเนื่องจากสูญเสียอวัยวะรอบฟันที่ช่วยในการยึดเกาะฟันไว้กับขากรรไกร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อีกนัยหนึ่ง คือ คราบเชื้อโรคเมื่อเกาะบนผิวฟันนานๆ กลายเป็นคราบหินปูน เมื่อมีคราบหินปูนก็เป็นที่สะสมของคราบเชื้อโรคมากยิ่งขึ้น เมื่อคราบหินปูนและแบคทีเรียสะสมมากขึ้นและนานขึ้น จะเพิ่มปริมาณลึกลงไปใต้ขอบเหงือก ทำให้การอักเสบลุกลามลงไปยังอวัยวะปริทันต์ทั้งหมด จึงเกิดการทำลายอวัยวะปริทันต์ตามมาดังภาพข้างล่าง

ภาพที่ 2.3 ภาพของโรคเหงือกอักเสบ

ที่มา:http://www.manager.co.th/QOL/ViewNews.aspx?NewsID=9570000020932

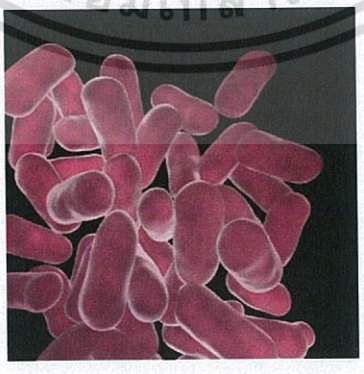
ภาพที่ 2.4 ลักษณะของแบคทีเรีย *Porphyromonas gingivalis*
ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นท่อนสั้นๆ เมื่อย้อมแกรมติดสีแดง
เป็นแบคทีเรียที่ไม่ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต

ที่มา:https://quizlet.com/13227481/infections-flash-cards/

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 แบคทีเรียแลคติก (lactic acid bacteria)

เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างเอนไซม์แคตาเลส ไม่สร้างสปอร์ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า มีทั้งรูปร่างกลม (cocci) หรือท่อน (rods) การจัดเรียงกลุ่มแบคทีเรียแลคติกในสกุลต่างๆ ขึ้นอยู่กับรูปร่างลักษณะรูปแบบของการหมักน้ำตาลกลูโคส การใช้น้ำตาลชนิดต่างๆและการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ การผลิตแลคติก จะเจริญในที่มีเกลือความเข้มข้นสูง และการทนต่อกรดหรือด่าง แบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกเป็นสารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิ พบในอาหารหลายชนิด โดยเฉพาะในนม ผัก และผลไม้ส่วนมากแบคทีเรียนี้เป็นแบคทีเรียที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศ แต่ในสภาวะที่มีอากาศก็ไม่ตายแบคทีเรียแลคติกขาดสารไซโตโครม (cytochromes) และฟอร์ไฟลิน (porphyrins) จึงไม่ให้เอนไซม์แคตาเลสและออกซิเดส แบคทีเรียแลคติกสร้างพลังงานจากการหมักคาร์โบไฮเดรต เกิดกรดแลคติกจากปฏิกิริยา 2 ทาง คือ วิถีทางที่ได้แลคเตทเพียงอย่างเดียว เรียกว่า โฮโมเฟอร์เมนเททีฟ (homofermentative) และวิถีทางที่ได้แลคเตทร่วมกับสารอื่นในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน เรียกว่าเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ (heterofermentative) และมีค่า G + C content น้อยกว่า 55 โมลเปอร์เซ็นต์ ประกอบด้วยจีนัสต่างๆ ได้แก่ *Streptococcus, Lactococcus, Enterococcus, Pediococcus, Leuconostoc, Lactobacillus, Carnobacterium, Aerococcus, Tetragenococcus, Vagococcus, Oenococcus และ Weissella* แบคทีเรียแลคติกจะเปลี่ยนอาหารที่มีน้ำตาลให้เป็นกรดแลคติกประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ และผลิตภัณฑ์อื่น เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดอะเซทิลอะเซโทอิน (acetoin) และกรดอินทรีย์ แบคทีเรียแลคติกได้รับการยอมรับว่าเป็นแบคทีเรียที่ปลอดภัย (generally recognized as safe bacteria; GRAS status) และมักใช้ในการหมักอาหารและถนอมอาหาร ซึ่งอาจหมักตามธรรมชาติโดยใช้แบคทีเรียแลคติกที่มีอยู่ในวัตถุดิบ หรืออาจเติมแบคทีเรียแลคติกในรูปเชื้อตั้งต้น (starter culture) เติมลงในอาหารภายใต้ภาวะควบคุม ตัวอย่างของจีนัสที่ใช้เป็นเชื้อตั้งต้นในกระบวนการหมักผลิตภัณฑ์นม เนื้อ และผัก ได้แก่ *Lactococcus, Streptococcus, Pediococcus, Leuconostoc, Lactobacillus* และ *Carnobacterium*



ภาพที่ 2.5 ลักษณะของแบคทีเรียแลคติก

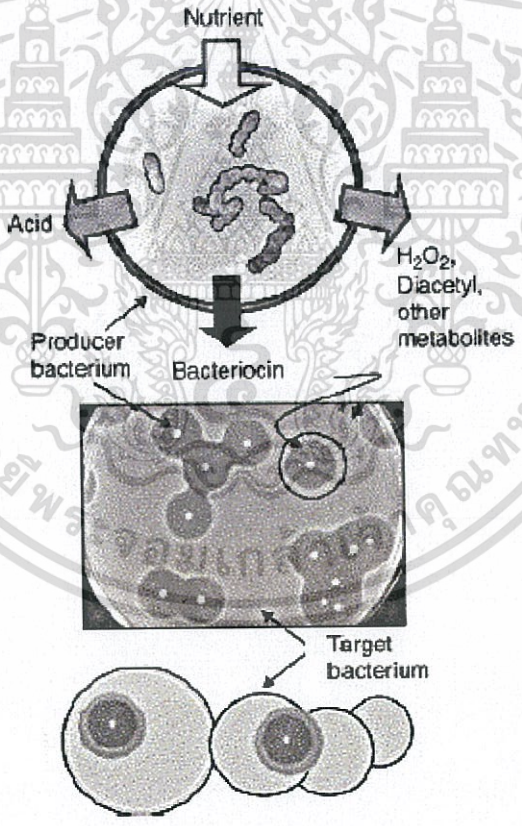
ที่มา : http://www.pw.ac.th/main/website/sci/7_data.htm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 แบคเทอริโอซิน

หมายถึงเปปไทด์หรือโปรตีนที่สังเคราะห์จากไรโบโซม และมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย แบคเทอริโอซินแตกต่างจากสารปฏิชีวนะ (antibiotics) คือแบคเทอริโอซินมีฤทธิ์การยับยั้งแคบและเป็นพิษกับแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันแบคเทอริโอซิน สามารถสร้างได้จากแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบและแกรมบวกหลายสปีชีส์ แต่แบคเทอริโอซินที่สร้างจากกลุ่มแบคทีเรียแลคติก (lactic acid bacteria) กลับเป็นที่ได้รับความสนใจมากที่สุด

กลุ่มแบคทีเรียแลคติกที่สร้างแบคเทอริโอซินได้มักแยกมาจากอาหาร ดังนั้นจึงเหมาะที่จะนำมาใช้ในการประยุกต์ทางด้านอาหาร การสร้างแบคเทอริโอซินนี้มีข้อดีแก่แบคทีเรียแลคติกเองคือแบคเทอริโอซินสามารถฆ่าหรือยับยั้งแบคทีเรียอื่นที่อยู่ในแหล่งอาหารนั้นๆ แบคเทอริโอซินที่สร้างขึ้นโดยแบคทีเรียแลคติกบางชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งค่อนข้างกว้าง การนำแบคเทอริโอซินไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารจะช่วยลดการใช้สารกันเสียที่เป็นสารเคมี รวมทั้งลดการใช้ความร้อน ทำให้อาหารยังคงอุดมไปด้วยคุณค่าของสารอาหารซึ่งเป็นทางเลือกหนึ่งที่ผู้บริโภคต้องการ เนื่องจากมีความปลอดภัย มีรสชาติสดใหม่ และพร้อมรับประทาน

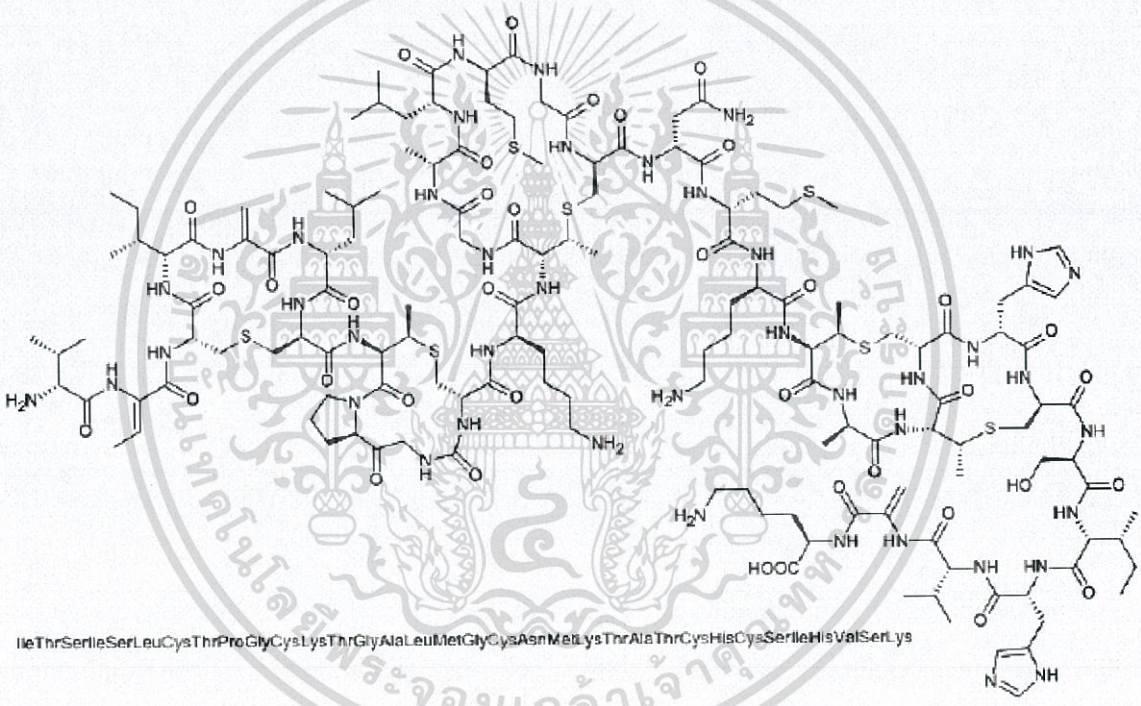


ภาพที่ 2.6 แบคทีเรียแลคติกสามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิด รวมทั้งแบคเทอรีโอซินซึ่งจะให้ผลยับยั้งแบคทีเรียที่เกี่ยวข้อง เชื้อที่ผลิตแบคทีรีโอซิน (รูปบน) จะทำให้เกิดบริเวณยับยั้งกับแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ (รูปล่าง)

ที่มา : http://ejournals.swu.ac.th/index.php/ssj/article/viewFile/100/105

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปัจจุบันแบคทีรีโอซินบางชนิดมีขายในรูปผงแห้ง ที่รู้จักกันดี เช่น ไนซิน (nisin) โดยใช้ชื่อทางการค้าว่า Nisaplin™ (บริษัท Aplin and Barrett Ltd., UK) ซึ่งสร้างจาก *Lactoccocuslactis* และเพดดิโอซิน PA-1/AcH (pediocin PA-1/AcH) โดยใช้ชื่อทางการค้าว่า ALTA™2431 (บริษัท Quest International, Australia) ซึ่งสร้างจาก *Pediococcus acidilactici* ไนซินถูกค้นพบเป็นครั้งแรกโดย Rogers และ Whittier ในปี 1928 ประกอบด้วยเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโน 34 ตัว (รูปที่ 7) ให้ผลในการยับยั้งได้ในอาหารหลายประเภท โดยเฉพาะในผลิตภัณฑ์นมหมักที่มีค่า pH ต่ำ ไนซินมีการใช้แพร่หลายมากกว่า 48 ประเทศ โดยเฉพาะในผลิตภัณฑ์ชีส นม และอาหารกระป๋อง โดยองค์การทางอาหารและยา (Food and Drug Administration) ได้ยอมรับว่า Nisaplin™สามารถใช้ในรูปของสารป้องกันการเน่าเสียที่มาจากธรรมชาติ



ภาพที่ 2.7 โครงสร้างของไนซิน

ที่มา : http://ejournals.swu.ac.th/index.php/ssj/article/viewFile/100/105

แบคเทอริโอซินบางชนิดที่มีฤทธิ์กว้าง เช่น ไนซินจะมีประสิทธิภาพในการใช้มากกว่าโดยพบว่าไนซินมีผลในการยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวกได้หลายชนิด รวมถึงกลุ่มที่ก่อโรคด้วยซึ่งมักจะก่อโรคในอาหารกระป๋องและผลิตภัณฑ์นม โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์นมที่นำมาแปรรูปเป็นเนยซึ่งความร้อนที่ใช้ในการฆ่าเชื้อจะแพร่ผ่านได้ลำบาก ในขณะที่แบคเทอริโอซินที่มีฤทธิ์ยับยั้งแคบ ก็สามารถยับยั้งเชื้อเฉพาะกลุ่มโดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในอาหาร เช่น *Listeria monocytogenes* โดยไม่ก่อให้เกิดอันตรายกับเชื้อประจำถิ่นชนิดอื่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.6.1 ผลของโยเกิร์ตที่มีส่วนผสมของโพรไบโอติกแลคโตบาซิลลัสเฟอเมนตุมเอสดี11 ต่อเชื้อมิวแทนส์สเตรปโตคอคไคและเชื้อราในอาสาสมัคร

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของโยเกิร์ตที่มี *Lactobacillus fermentum* SD11 ต่อเชื้อฟันผุ *mutans streptococci* (MS) และเชื้อราในน้ำลาย โดยทำการศึกษาในอาสาสมัคร 43 คน (อายุเฉลี่ย 21.86 ±0.83 ปี) ถูกสุ่มเป็น 2 กลุ่มคือกลุ่มศึกษาได้รับโยเกิร์ตที่มี *L. fermentum* SD11และกลุ่มควบคุมได้รับโยเกิร์ตที่มี *L. bulgaricus* โดยทั้งสองกลุ่มได้รับโยเกิร์ตวันละ 1 ครั้งทุกวันเป็นเวลา 1 เดือน ทำการเก็บตัวอย่างน้ำลายสำหรับเพาะเลี้ยง *MS, lactobacilli* และเชื้อราก่อนการได้รับโยเกิร์ตและหลังได้รับโยเกิร์ตครบ 1 เดือน ผลการศึกษาพบวาในกลุ่มศึกษาพบปริมาณ MS และเชื้อราลดลงอยางมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับค่าเริ่มต้นและพบ MS ในกลุ่มศึกษาน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้พบการเพิ่มขึ้นของ *lactobacilli* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งในกลุ่มศึกษาและกลุ่มควบคุมและไม่พบวามีผลข้างเคียงใดๆ บ่งชี้ว่าโพรไบโอติก *L. fermentum* SD11 น่าจะมีประโยชน์ในการใช้ป้องกันโรคในช่องปาก (ปาริมา นันทรักษ์ชัยกุล, 2559)

2.6.2 ผลของแลคติกแอซิดแบคทีเรียต่อการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคไค

โรคฟันผุเป็นโรคติดเชื้อที่พบได้บ่อยและเสียค่าใช้จ่ายในการรักษาสูง เนื่องจากแนวคิดของสาเหตุของโรคฟันผุมีการเปลี่ยนแปลง ดังนั้นจึงเกิดแนวคิดการป้องกันโรคฟันผุวิธีใหม่ การใช้โพรไบโอติกเป็นวิธีใหม่ที่รักษาสมดุลของระบบนิเวศของเชื้อจุลินทรีย์ในร่างกาย โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อร่างกายกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นโทษ เชื้อที่ได้รับความสนใจใช้เป็นโพรไบโอติกสำหรับการวิจัยทางทันตกรรมคือเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ เพื่อศึกษาความสามารถของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อกลุ่ม มิวแทนส์สเตรปโตคอคไค โดยนำผลิตผลของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ (เชื้อสเตรปโตคอคคัสเทอร์โมฟิลัส สายพันธุ์ ATCC19258, เชื้อแลคโตบาซิลลัส เดลบรึคคีไอ ซับสปีชีส์บัลแกริคัส สายพันธุ์ ATCC11842, เชื้อแลคโตบาซิลลัส บัลแกริคัส สายพันธุ์ TUA093L และเชื้อแลคโตบาซิลลัส แรมโนซัส สายพันธุ์ ATCC7469) ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว ทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อกลุ่มมิวแทนส์สเตรปโตคอคไค 5สายพันธุ์ (เชื้อสเตรปโตคอคคัสมิวแทนส์ สายพันธุ์ ATCC25175 Ingbritt TPF-1, เชื้อสเตรปโตคอคคัสโซไบรนัส สายพันธุ์ B13 และ 6715) ด้วยวิธีการแพร่ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบวุ้น วัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่ไม่มีเชื้อขึ้น ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ ผลการศึกษาพบว่า เชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่นำมาทดสอบ 3 สายพันธุ์ ให้ผลิตผลที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อกลุ่มมิวแทนส์สเตรปโตคอคไค ดังนี้ เชื้อสเตรปโตคอคคัสเทอร์โมฟิลัส สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคคัสมิวแทนส์ สายพันธุ์ ATCC25175, เชื้อแลคโตบาซิลลัส เดลบรึคคีไอ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคคัสโซไบรนัสสายพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

B13, เชื้อแลคโตบาซิลลัส บัลแกริคัสสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคคัสมิวแทนส์ สายพันธุ์Ingbritt และ TPF-1ได้มากกว่าเชื้อสเตรปโตคอคคัสโซไบรนัส สายพันธุ์ B13 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<.05$) ส่วนเชื้อแลคโต-บาซิลลัส แรมโนซัส ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อกลุ่มมิวแทนส์สเตรปโตคอคไค ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเชื้อสเตรปโตคอคคัสเทอร์โมฟิลัส, เชื้อแลคโตบาซิลลัส เดลบรีคคิไอ และเชื้อแลคโตบาซิลลัส บัลแกริคัส สามารถสร้างสารที่มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อกลุ่มมิวแทนส์สเตรปโตคอคไคได้บางสายพันธุ์ (เบญจวรรณ เลิศปันณะพงษ์, 2551)

2.6.3 ผลิตภัณฑ์ผสมโพรไบโอติก*Lactobacillus paracasei* SD1 เพื่อป้องกันฟันผุ

การพัฒนาโพรไบโอติกเพื่อที่จะนำมาช่วยในการป้องกันโรคฟันผุ คณะผู้วิจัยคัดเลือกสายพันธุ์ของ*Lactobacillus*ที่แยกได้จากช่องปาก พบว่าสายพันธุ์ *L. paracasei* SD1มีข้อดีหลายประการเหมาะที่จะใช้เป็นโพรไบโอติกในช่องปาก กล่าวคือ

1. เป็นสายพันธุ์หนึ่งที่มีความสามารถสูงในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Streptococcus mutans* และ*Streptococcus sobrinus* แบคทีเรียสาเหตุของฟันผุจากผลที่ได้จากการทดลองในห้องปฏิบัติการในข้อดีของ *L. paracasei* SD1 ดังกล่าว จึงมีแนวคิดว่าการต้านจุลชีพของ *L. paracasei* SD1 อาจนำมาใช้ประโยชน์ในการป้องกันการก่อโรคในช่องปาก เช่น ฟันผุ หรือโรคอื่นๆ ได้ คณะผู้วิจัยจึงนำ *L. paracasei* SD1 ไปผสมในผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น นมผง โยเกิร์ต ยาอม โดยทดสอบความสามารถของผลิตภัณฑ์ เพื่อใช้ในการลดเชื้อก่อโรคฟันผุในอาสาสมัคร ผลการศึกษาพบว่า อาสาสมัครที่ได้รับนมผงผสมโพรไบโอติก *L. paracasei* SD1 มีเชื้อสาเหตุฟันผุลดลง

2. *L. paracasei* SD1 สร้างกรดน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ สายพันธุ์อื่นๆที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโต ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของ ฟันผุได้ในระดับที่เท่ากัน

3. *L. paracasei* SD1สามารถเกาะติดเยื่อบุผิวในช่องปากได้ดี

(รวี เถียรไพศาล, 2556)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.4 แบคเทอริโอซินและการประยุกต์ใช้ในอาหาร

ในช่วง 2 ทศวรรษ ความหลากหลายของแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลคติกมันสามารถฆ่าหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ ที่ได้รับการระบุลักษณะและคุณสมบัติทางชีวเคมีและพันธุกรรมได้งานวิจัยนี้มุ่งเน้นไปที่แบคเทอริโอซินการกำหนดกิจกรรมการสังเคราะห์โปรตีนซึ่งก็คือแบคเทอริโอซินและการดำเนินการผลิตแบคทีเรียและการสร้างแบบจำลองของไนซิน แบคเทอริโอซินบริสุทธิ์นั้นได้รับการอนุมัติสำหรับการใช้กับอาหารในประเทศสหรัฐอเมริกา และได้ประสบความสำเร็จเป็นเวลาหลายทศวรรษที่ผ่านมา ซึ่งได้นำมาใช้เป็นสารกันบูดในกว่า 50 ประเทศทั่วโลก สำหรับการทำงานและการประยุกต์ใช้ในอาหารงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงชนิดของแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย lactic acid bacteria (LAB) ให้พัฒนาไปเป็นสารกันบูดในอาหารต่อไป (Chen and Hoover, 2003)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบและสารเคมี

3.1.1เชื้อจุลินทรีย์

3.1.1.1 เชื้อแบคทีเรียแลคติก

เชื้อแบคทีเรียแลคติก ได้รับความอนุเคราะห์จากงานวิจัยในผลิตภัณฑ์อาหารหมักพื้นบ้าน ของคณะอุตสาหกรรมเกษตร สจล. โดยมีสายพันธุ์ดังนี้

1. *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 (คัดแยกได้จากแหนม)
2. *Pediococcus pentosaceus* M13 (คัดแยกได้จากมั้ม)
3. *Weissella cibaria* SI21 (คัดแยกได้จากไส้กรอกอีสาน)
4. *Lactobacillus plantarum* NF38 (คัดแยกได้จากแหนมปลา)
5. *Lactobacillus plantarum* NHAM58 (คัดแยกได้จากแหนม)
6. *L. lactis* subsp. *Lactis* Sb2 (คัดแยกได้จากลำไส้ปลากะพง)
7. *L. lactis* subsp. *Lactis* P2 (คัดแยกได้จากลำไส้ปลาสวาย)

3.1.1.2 เชื้อทางทันตกรรม

เชื้อทางทันตกรรมมี 2 สายพันธุ์ ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ดังนี้

1.เชื้อก่อโรคเหงือกอักเสบ *Porphyromonas gingivalis* ATCC33277

2.เชื้อก่อโรคฟันผุ *Streptococcus mutans* ATCC25175

3.1.1.3 เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

เชื้ออินดิเคเตอร์และเชื้อก่อโรคอาหารเป็นพิษ ได้รับความอนุเคราะห์จาก คณะอุตสาหกรรมเกษตร สจล. โดยมีสายพันธุ์ดังนี้

1. *Staphylococcus aureus*
2. *Listeria innocua*
3. *Lactobacillus sakei*
4. *Bacillus cereus*
5. *Enterococcus faecalis*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.2 สารเคมี

3.1.2.1 แอลกอฮอล์ 95%

3.1.2.2 NaOH 1 N

3.1.2.3 K_2HPO_4

3.1.2.4 KH_2PO_4

3.1.2.5 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

3.1.2.6 $MnSO_4 \cdot 4H_2O$

3.1.2.7 Tween 80

3.1.2.8 Citric acid

3.1.3 Nisin บริสุทธิ์

3.1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1.4.1 MRS broth(De Man Rogosa and Sharpe broth)

3.1.4.2 MRS + 1.5%agar

3.1.4.3 MRS soft agar (MRS + 1%agar)

3.1.4.4 BHI broth (Brain Heart Infusion)

3.1.4.5 BHI soft agar (BHI + 1%agar)

3.1.4.6 Bacteriocin Screening Medium (BSM) (ภาคผนวก ง.5)

3.1.4.7 TSB

3.1.4.8 TSA

3.1.4.9 Nutrient Agar (NA) (ภาคผนวก ง.6)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

3.2เครื่องมือและอุปกรณ์

3.2.1 อุปกรณ์

3.2.1.1 หลอดทดลองขนาด (Test tube) 16x150 มิลลิเมตร

3.2.1.2 หลอดทดลองฝาเกลียวขนาด (Test tube) 16x150 มิลลิเมตร

3.2.1.3 บีกเกอร์ขนาด (Beaker) 50,250,600 และ 1000 มิลลิลิตร

3.2.1.4 กระบอกตวง (Cylinder) ขนาด 100,250 และ1000มิลลิลิตร

3.2.1.5 จานเพาะเชื้อ (Petri dish)

3.2.1.6 จานเพาะเชื้อพลาสติก (Petri dish) ขนาด 15 มิลลิลิตร

3.2.1.7 แท่งแก้ว ขนาด 8 และ 12 นิ้ว

3.2.1.8 ช้อนตักสาร(spatula)

3.2.1.9 ตะเกียงแอลกอฮอล์(turnel)

3.2.1.10 กระบอกปิเปตต์

3.2.1.11 ปิเปตต์ (pipette)

3.2.1.12 ลูกยาง

3.2.1.13 ลูปเขี่ยเชื้อ

3.2.1.14 กระบอกน้ำกลั่น

3.2.1.15 ปี๊บ

3.2.1.16 Anaerobic jar

3.2.1.17 ทิป (tip)

3.2.2 เครื่องมือ

3.2.2.1 เครื่องชั่ง (Balance) (Mettler Toledo, Germany)

3.2.2.2 เครื่องชั่ง (Balance) (Sartorinus, Canada)

3.2.2.3 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (Heraeus, Germany)

3.2.2.4 ตู้บ่มเชื้อ (Incobater) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Heraeus, Germany)

3.2.2.5 ตู้บ่มเชื้อ (Incobater) อุณหภูมิ 30 - 35องศาเซลเซียส (Heraeus, Germany)

3.2.2.6 ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar air flow) (BossTech, Thailand)

3.2.2.7 ไมโครเวฟ (Microwave) (Electrolux, China)

3.2.2.8 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) (Memmert, Germany)

3.2.2.9 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ (Autoclave) (Tommy, Japan)

3.2.2.10 ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 100-1000และ 20-200 ไมโครลิตร (Brand, Germany)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

148868

3.2.2.11 ห้องเย็น (Chill Room) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.2.2.12 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH Meter) (inolab, Germany)

3.2.2.13 กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) (Nikon ECLIPSE E200, China)

3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

3.3.1 ขั้นตอนการคัดเลือกหาแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแลคติกที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค

3.3.1.1 ทำการเลี้ยงเชื้อ lactic acid bacteria ทั้งหมด 7สายพันธุ์ (536, M13, SI21, NF38, NHAM58, Sb2, P2) ลงในอาหาร MRS broth ที่มีปริมาตร 5 มิลลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3.1.2 ทำการเลี้ยงเชื้ออิดิเคเตอร์ทั้งหมด 6 ชนิด ดังต่อไปนี้

1. *Porphyromonas gingivalis* และ *Streptococcus mutans*

ทำการเลี้ยงเชื้อลงในอาหาร BHI broth ที่มีปริมาตร 5 มิลลิลิตรโดย *P. gingivalis* บ่มในปี๊ปเป็นเวลา24-48 ชั่วโมง และ *S. mutans* บ่มใน anaerobic jar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา24 ชั่วโมง

2. *Staphylococcus aureus* และ *Listeria innocua*

ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหาร BHI broth ที่มีปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. *Lactobacillus sakei*

ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหาร MRS broth ที่มีปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4. *Bacillus cereus*

ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหาร TSB ที่มีปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 24 ชั่วโมง

3.3.1.3 นำเชื้อ lactic acid bacteria จากวันที่ 1 ข้างต้นมาโดยใช้ไมโครปิเปตปริมาตร 10 µlทำการ spot ลงบน plate BSM agar (ภาคผนวก ก.1) รอจนหยดเชื้อบนจานเพาะเชื้อแห้ง นำไปบ่มในปี๊ปเป็นเวลา 24ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.1.4 นำเชื้ออินดิเคเตอร์ที่บ่มจากวันที่ 1 ข้างต้น โดยใช้ไมโครปิเปตปริมาตร 10 µl มาใส่ลงในหลอดอาหาร BHI + 1%agar ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่หลอมและอุ่นอยู่ใน Water bath 50 องศาเซลเซียส

3.3.1.5 จากนั้นนำไป vortex เพื่อให้เชื้อกระจายตัวในหลอดแล้วรีบเทหลอดที่มีเชื้อลงบนจานเพาะเชื้อ BSM agar ที่ได้ spot เชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินจากวันที่ 2 เมื่อวุ้นแข็งตัว บ่มเพาะเชื้อทั้งหมดในสภาวะไร้อากาศที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3.1.6 ดูผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ จาก clear zone ที่เกิดขึ้น แล้วบันทึกผล

3.3.2 ศึกษาผลความเข้มข้นของ Commercial nisin กับเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี spot-on-lawn

3.3.2.1 ทำการเลี้ยงเชื้ออิดิเคเตอร์ดังต่อไปนี้

1. *Porphyromonas gingivalis* และ *Streptococcus mutans*

ทำการเลี้ยงเชื้อลงในอาหาร BHI broth ที่มีปริมาตร 5 มิลลิลิตรโดย *P. gingivalis* บ่มในปี๊ปเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง และ *S. mutans* บ่มใน anaerobic jar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. *Staphylococcus aureus* และ *Listeria innocua*

ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหาร BHI broth ที่มีปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. *Lactobacillus sakei* และ *Enterococcus faecalis*

ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหาร MRS broth ที่มีปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4. *Bacillus cereus*

ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหาร TSB ที่มีปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.2.2 นำ Nisin บริสุทธิ์ที่จำหน่ายทางการค้ามาชั่ง 0.02 กรัม ผสมกับน้ำสเตอไรส์2 มิลลิลิตร นำมากรองด้วยตัวกรองขนาด 0.42 ไมครอนทำการ dilution Nisin ให้มีความเข้มข้น 250, 500, 1000, 2500, 5000 และ 10000 ตามลำดับ

3.3.2.3 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ NA เทในเพลทพลาสติก แล้วทำการถ่ายเชื้ออินดิเคเตอร์บ่มจากวันที่ 1 ข้างต้น โดยใช้ไมโครปิเปตปริมาตร 100 µl มาใส่ลงในหลอดอาหาร BHI + 1% agar, MRS + 1% agar, TSA ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่หลอมและอุ่นอยู่ใน Water bath 50 องศาเซลเซียสจากนั้นนำไป vortex ให้เชื้อกระจายตัวในหลอดแล้วรีบเทหลอดที่มีเชื้อลงบนจานเพาะเชื้อพลาสติก NA

3.3.2.4 หลังจากรอให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว แล้วทำการนำ Nisin ที่ระดับความเข้มข้น 250, 500, 1000, 2500, 5000 และ 10000 ตามลำดับมา spot ลงบนจานเพาะเชื้อ รอจนหยดเชื้อบนจานเพาะเชื้อแห้ง นำไปบ่มในปี๊บ ที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3.2.5 ดูผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ จาก clear zone ที่เกิดขึ้นและบันทึกผล

3.3.3 ศึกษายืนยันผลของไนซินต่อการยับยั้ง *Streptococcus mutans* ในหลอดทดลอง

3.3.3.1 ทำการเลี้ยงเชื้อ *Streptococcus mutans* ลงในอาหาร BHI broth ที่มีปริมาตร 10 มิลลิลิตรบ่มใน anaerobic jar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3.3.2 นำ Nisin มาชั่ง 0.03 กรัม ผสมกับน้ำสเตอไรส์ 3 มิลลิลิตร นำมากรองด้วยตัวกรองขนาด 0.42 ไมครอน ทำการเจือจาง Nisin ให้มีระดับความเข้มข้น 250 และ 1000

3.3.3.3 นำเชื้อ *Streptococcus mutans* ที่บ่มได้จากวันที่ 1 ข้างต้น มาใส่ในหลอดอาหาร BHI broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยใช้ไมโครปิเปต 100µ lปิเปตลงในแต่ละหลอด จำนวน 3 หลอดได้แก่

หลอดที่ 1 Nisin ที่ระดับความเข้มข้น 1000

หลอดที่ 2 Nisin ที่ระดับความเข้มข้น 250

และ หลอดที่ 3 Control

3.3.3.4 นำ Nisin ที่ระดับความเข้มข้น 250 และ 1000 ที่ได้ มาใส่ลงในหลอดอาหาร BHI broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ใส่เชื้อ *Streptococcus mutans* ไปแล้ว จากข้อ 3.3.3.3 โดยใส่ Nisin ทั้ง 3 หลอด หลอดละ 1000 ไมโครลิตร ส่วนหลอดที่ 3 ไม่ต้องใส่ให้เป็นหลอด control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.3.5 นำเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้จากการบ่มมาเจือจางที่ระดับการเจือจาง 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} โดยใส่หลอดละ 1 ml แล้วปิเปตลงบนเพลทปริมาตร 1 ml ทำการ pour plate ด้วย BHI + 1.2% agar ทำการบ่มใน anaerobic jar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3.3.6 นำหลอดอาหาร BHI broth ที่มีเชื้อ *Streptococcus mutans* และ Nisin ไปบ่มใน anaerobic jar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3.3.7 เก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง โดยเริ่มจากชั่วโมงที่ 0, 6, 12, 18 และ 24 โดยทำการเจือจางกับสารละลายละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม และใช้วิธีการ pour plate ด้วย BHI + 1.2% agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3.3.8 เมื่อครบกำหนดเวลา นำมาตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตเหลือรอด แล้วยืนยันผลลักษณะจุลินทรีย์โดยการส่องกล้องจุลทรรศน์ นำผลการตรวจนับเชื้อที่ชั่วโมงต่าง ๆ มาประเมินผลของไนซินต่อการยับยั้งเชื้อ *S. mutans*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การคัดเลือกหาแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแลคติกที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค

จากการคัดเลือกหาแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแลคติก ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคโดยการใช้แบคเทอริโอซินที่ได้จากแบคทีเรียแลคติก ในขั้นตอนแรกนี้จะเริ่มที่การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งประกอบไปด้วยแบคทีเรียแลคติก(*W. cibaria* SI21, *P. pentosaceus* TISTR536, *P. pentosaceus* M13, *E. faecalis*, *L. lactis* subsp. *lactis* Sb2, *L. lactis* subsp. *lactis* P2, *L. plantarum* NF38 และ *L. plantarum* NHAM58) ซึ่งเชื้อแบคทีเรียแลคติกเหล่านี้ได้รับการทดสอบแล้วว่าสามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้ส่วนเชื้ออินดิเคเตอร์,จุลินทรีย์ก่อโรคชนิดต่างๆ รวมไปถึงจุลินทรีย์ที่ก่อโรคทางทันตกรรม (*L. sakei*, *B. cereus*, *S. aureus*, *L. innocua*, *S. mutans*, และ *P. gingivalis*) ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ รวมไปถึงสภาวะในการบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อที่ต่างกัน จากนั้นนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค โดยวิธี Spot on lawn ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS Agar ที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรียแลคติก จากนั้นเทเชื้ออินดิเคเตอร์และเชื้อก่อโรคทางทันตกรรมที่ถูกเลี้ยงอยู่ใน 1.2% Soft agar ทับลงบนเพลทที่ได้สปอตไว้แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตผลได้จากการสร้าง Clear zone ซึ่งจะเป็นโซนใสที่สามารถฆ่าเชื้อได้ดังนี้ (ตารางที่ 4.1และภาพที่ 4.1)

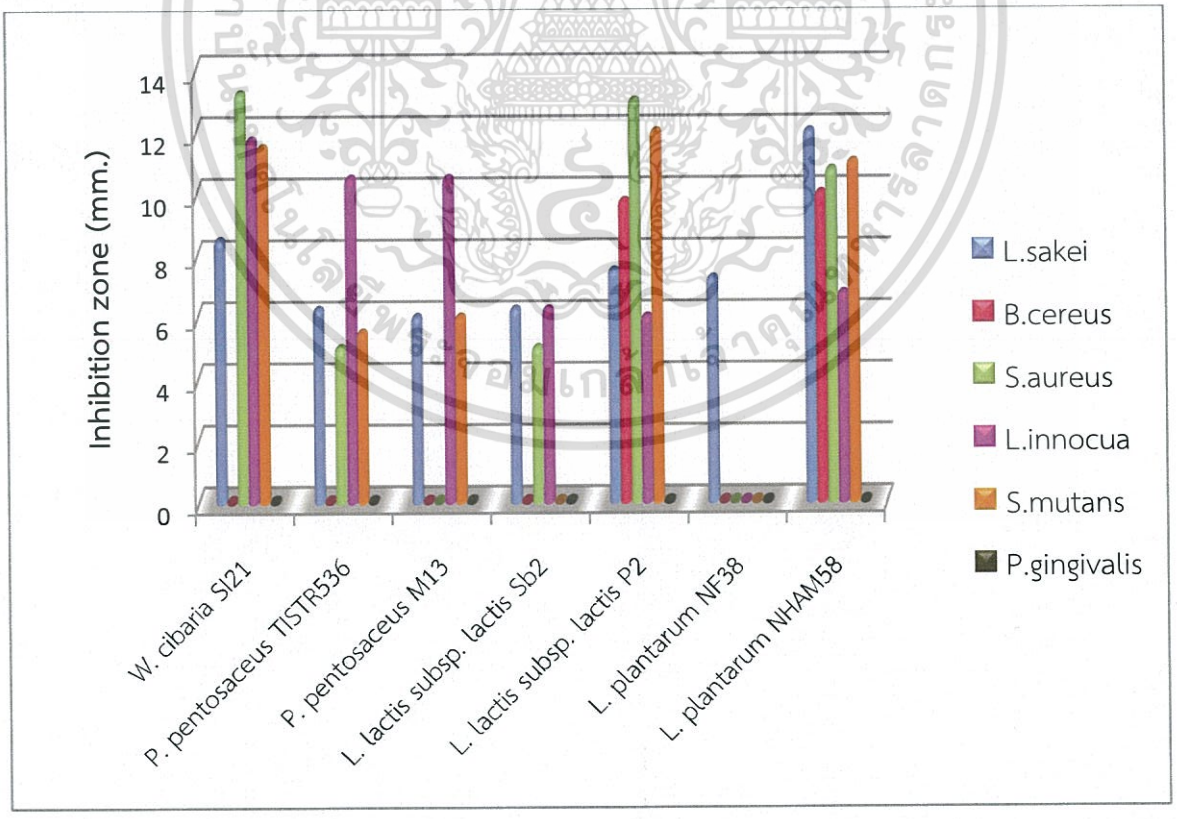
ตารางที่ 4.1 ตารางแสดงผลการคัดเลือกหาแบคเทอริโอซินที่ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

Indicator	Inhibition zone of Lactic Acid Bacteria (mm.)						
	W. cibaria SI21	*P. pentosaceus* TISTR536	*P. pentosaceus* M13	*L. lactis* subsp. *lactis* Sb2	*L. lactis* subsp. *lactis* P2	*L. plantarum* NF38	*L. plantarum* NHAM58
L. sakei	8.50	6.25	6.00	6.25	7.50	7.25	12.00
B. cereus	-	-	-	-	9.75	-	10.00
S. aureus	13.25	5.00	-	5.00	13.00	-	10.75
L. innocua	11.75	10.50	10.50	6.25	6.00	-	6.75
S. mutans	11.50	5.50	6.00	-	12.00	-	11.00
P. gingivalis	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ: - = ไม่มี Inhibition zone

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 4.1 และภาพที่ 4.1 จะเห็นว่าแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติกที่ได้ทำการศึกษานั้น สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคชนิดต่างๆ ในกลุ่มแกรมบวกรวมไปถึงจุลินทรีย์ก่อโรคทางทันตกรรม ซึ่งในการทดลองครั้งนี้พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ *P. gingivalis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อให้เกิดโรคเหงือกอักเสบที่มีแกรมลบนั้นไม่สามารถถูกยับยั้งได้โดยแบคเทอริโอซิน ที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติก ส่วนเชื้อจุลินทรีย์ *S. mutans* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคฟันผุที่มีแกรมบวก แบคทีเรียแลคติกเกือบทุกชนิดที่นำมาใช้ในการทดลอง ได้แก่ *W. cibaria* SI21, *P. pentosaceus* TISTR536, *P. pentosaceus* M13, *L. lactis* subsp. *lactis* P2 และ *L. plantarum* NHAM58 สามารถสร้างแบคเทอริโอซินมายับยั้งสายพันธุ์นี้ได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของนักวิจัยหลายท่านที่รายงานว่าแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติกส่วนมากจะมีผลยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มเดียวกัน คือ แบคทีเรียแลคติกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ดังนั้นแบคเทอริโอซินที่เชื้อผลิตขึ้นจึงมีผลต่อกลุ่มแบคทีเรียก่อโรคในกลุ่มแกรมบวกที่ใช้ในการศึกษานี้ (อรอนงค์ พริ้งศุลกะ,2550) จึงไม่มีผลต่อ*P. gingivalis* ที่เป็นแกรมลบซึ่งมีแนวโน้มใกล้เคียงกับรายงานของ Samot and Badet ในปี 2012 ที่มีผลการศึกษาทดลอง คือ แบคทีเรียแลคติกสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ *S. mutans* ที่มีแกรมบวก ได้ดีกว่า *P. gingivalis* ที่มีแกรมลบ (Samot and Badet, 2012) โดยที่โซนการยับยั้งที่เกิดขึ้นมากที่สุดสำหรับเชื้อ *S. mutans* นั้นมาจาก *L. lactis* subsp. *lactis* P2 ซึ่งมีความสามารถในการผลิตแบคเทอริโอซินที่เรียกว่า ไนซิน ดังนั้น เราจึงนำ *S. mutans* และจุลินทรีย์ก่อโรคชนิดอื่นๆ ไปทำการศึกษาต่อโดยใช้ความเข้มข้นของไนซินที่ระดับต่างๆ ต่อไป



ภาพที่ 4.1 แสดง Inhibition zone (mm.) ที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคชนิดต่างๆ รวมทั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคทางทันตกรรม โดยใช้แบคทีเรียแลคติกที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ศึกษาผลความเข้มข้นของ Commercial nisin กับเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี spot-on-lawn

จากที่ได้ทำการคัดเลือกหาแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแลคติก ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคโดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่ก่อโรคทางทันตกรรม พบว่าแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างไนซินได้นั้นมีโซนการยับยั้งมากที่สุด เราจึงได้นำจุลินทรีย์ก่อโรคทั้งหมดมาศึกษาต่อ โดยการทดสอบกับไนซินที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ คือ 250, 500, 1000, 2500, 5000 และ 10000 IU/ml เริ่มจากการเท 1.2% Soft agar ที่มีเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคผสมอยู่ทับลงในเพลทที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA) ที่ได้เตรียมไว้ จากนั้นทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วนำไนซินบริสุทธิ์มาละลายกับน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วนำมากรองผ่านตัวกรองขนาด 0.42 ไมครอน ทำการเจือจางไนซินที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ เมื่อได้ความเข้มข้นที่ต้องการ นำมาสปอตลงบนเพลทแล้วทิ้งให้แห้ง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตผลความเข้มข้นของไนซินโดยดูจาก Inhibition zone (mm.) ที่เกิดขึ้น (ตารางที่ 4.2 และภาพที่ 4.2)

ตารางที่ 4.2 ตารางแสดงผลCommercial nisinกับเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

Indicator	Nisin Conc. (IU/ml)	Inhibition zone (mm.±SD)		
		ครั้ง 1	ครั้ง 2	เฉลี่ย
L. sakei	250	0	0	0
	500	0	0	0
	1000	10.33 ± 0.50	8.83 ± 0.25	9.58 ± 1.06
	2500	8.83 ± 0.56	8.66 ± 0.23	8.75 ± 0.11
	5000	8.83 ± 0.40	8.50 ± 0.36	8.66 ± 0.23
	10000	9.16 ± 0.35	9.00 ± 0.20	9.08 ± 0.11
B. cereus	250	5.50 ± 0.26	4.83 ± 0.15	5.16 ± 0.47
	500	6.66 ± 0.15	5.66 ± 0.05	6.16 ± 0.70
	1000	7.00 ± 0.30	5.83 ± 0.15	6.41 ± 0.82
	2500	7.00 ± 0.20	7.33 ± 0.41	7.16 ± 0.23
	5000	7.33 ± 0.41	8.16 ± 0.51	7.75 ± 0.58
	10000	8.00 ± 0.10	8.16 ± 0.23	8.08 ± 0.11
S. aureus	250	6.00 ± 0.10	5.66 ± 0.05	5.83 ± 0.23
	500	6.83 ± 0.28	6.16 ± 0.05	6.50 ± 0.47
	1000	9.66 ± 0.32	6.33 ± 0.05	8.00 ± 2.35
	2500	9.33 ± 0.41	7.00 ± 2.71	8.16 ± 1.64

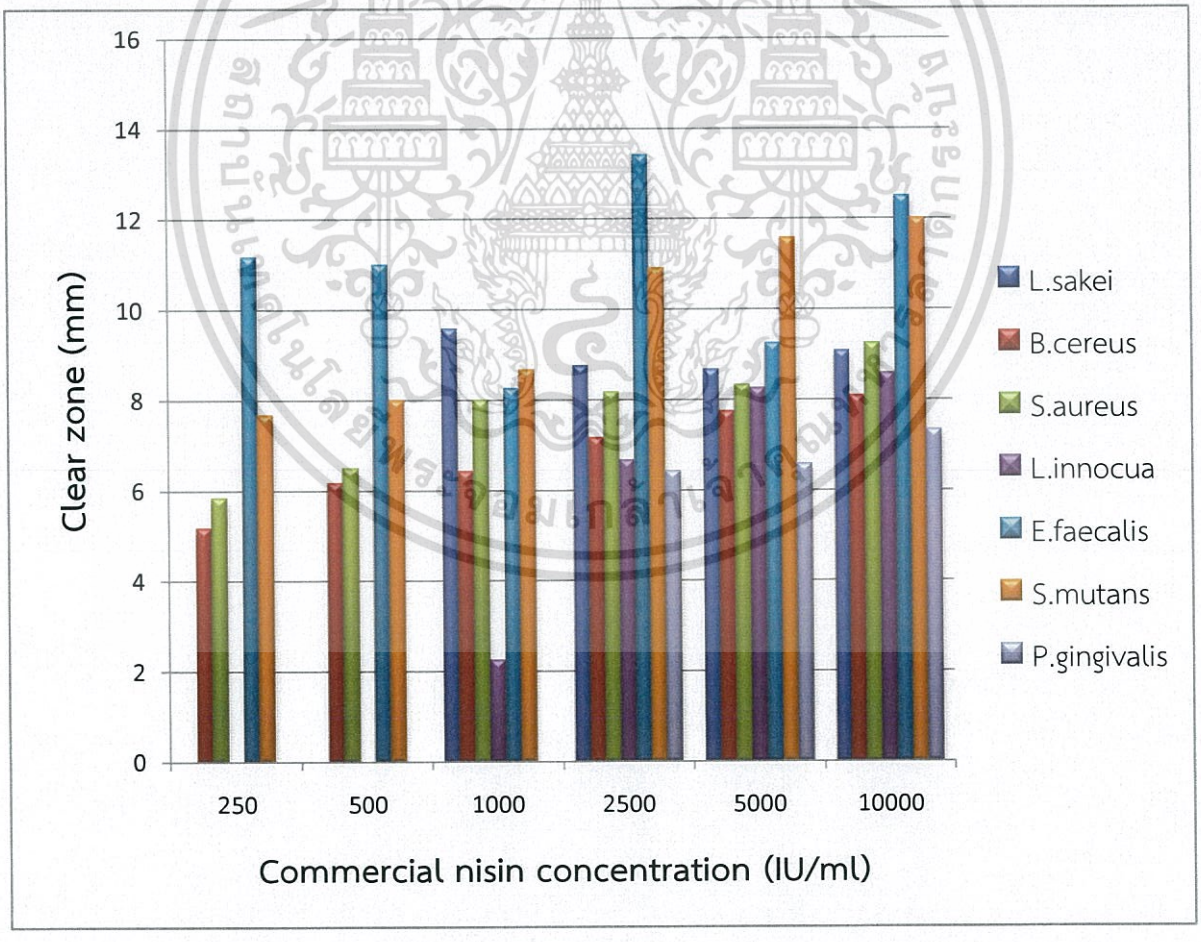
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

Indicator	Nisin Conc. (IU/ml)	Inhibition zone (mm.±SD)		
		ครั้ง 1	ครั้ง 2	เฉลี่ย
S. aureus	5000	9.50 ± 0.40	7.16 ± 0.05	8.33 ± 1.64
	10000	10.83 ± 0.66	7.66 ± 0.05	9.25 ± 2.23
L. innocua	250	0	0	0
	500	0	0	0
	1000	0	4.50 ± 0.26	2.25 ± 3.18
	2500	6.16 ± 0.05	7.16 ± 0.20	6.66 ± 0.70
	5000	7.00 ± 0.10	9.50 ± 0.43	8.25 ± 1.76
	10000	8.00 ± 0.10	9.16 ± 0.49	8.58 ± 0.82
E. faecalis	250	12.16 ± 0.60	10.16 ± 1.06	11.16 ± 1.41
	500	10.50 ± 0.26	11.50 ± 0.26	11.00 ± 0.70
	1000	9.66 ± 0.15	6.83 ± 0.55	8.25 ± 2.00
	2500	13.33 ± 0.57	13.50 ± 0.62	13.41 ± 0.11
	5000	7.50 ± 0.51	11.00 ± 0.17	9.25 ± 2.47
	10000	11.16 ± 0.25	13.83 ± 0.58	12.50 ± 1.80
S. mutans	250	6.66 ± 0.15	8.66 ± 0.55	7.66 ± 1.41
	500	6.83 ± 0.11	9.16 ± 0.25	8.00 ± 1.64
	1000	7.83 ± 0.05	9.50 ± 0.36	8.66 ± 1.17
	2500	11.16 ± 0.23	10.66 ± 0.11	10.91 ± 0.35
	5000	11.33 ± 0.20	11.83 ± 0.11	11.58 ± 0.35
	10000	12.16 ± 0.05	11.83 ± 0.47	12.00 ± 0.23
P. gingivalis	250	0	0	0
	500	0	0	0
	1000	0	0	0
	2500	6.33 ± 0.15	6.50 ± 0.00	6.41 ± 0.11
	5000	5.83 ± 0.05	7.33 ± 0.05	6.58 ± 1.06
	10000	5.33 ± 0.05	9.33 ± 0.35	7.33 ± 2.82

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาในขั้นตอนแรก คือ การคัดเลือกหาแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแลคติกที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค นั้นเป็นแบคทีเรียแลคติกที่มีความสามารถในการผลิตไนซิน เมื่อพิจารณาเฉพาะเชื้อก่อโรคทางทันตกรรม จะเห็นว่าเชื้อ *S. mutans* มีความไวต่อไนซินที่ได้จากแบคทีเรียแลคติกมากกว่าเชื้อ *P. gingivalis* ที่ไม่สามารถยับยั้งได้ อาจเนื่องมาจากมีความเข้มข้นไม่มากพอในการทำลายหรือยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค จึงได้นำมาศึกษาต่อโดยศึกษาประสิทธิภาพของไนซินบริสุทธิ์ที่จำหน่ายทางการค้ากับเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี spot-on-lawn (ตารางที่ 4.2และภาพที่ 4.2) เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคแต่ละชนิดนั้นมี Inhibition zone ที่แตกต่างกันไป เมื่อสังเกตที่เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคทางทันตกรรมทั้ง 2 ชนิด ซึ่งก็คือ *P. gingivalis* และ *S. mutans* พบว่า *P. gingivalis* นั้นแสดงผลโซนการยับยั้งที่ระดับความเข้มข้นของไนซิน 2500, 5000 และ 10000 IU/ml เท่านั้น ส่วน *S. mutans* สามารถวัดโซนการยับยั้งได้ทุกความเข้มข้นของไนซิน โดยที่ความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ใช้ในการทดลอง คือ 250 IU/ml ดังนั้นเราจึงนำเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* ที่มีความไวต่อไนซินมากกว่า มาทำการทวนสอบโดยทำการศึกษายืนยันผลของไนซินต่อการยับยั้ง *S. mutans* ในหลอดทดลอง โดยสังเกตจากจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตรอดในช่วงเวลาต่างๆ ต่อไป



ภาพที่ 4.2 แสดงประสิทธิภาพของไนซินบริสุทธิ์ที่จำหน่ายทางการค้ากับเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี spot-on-lawnโดยสังเกตจาก Inhibition zone (mm.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ศึกษายืนยันผลของไนซินต่อการยับยั้ง *Streptococcus mutans* ในหลอดทดลอง

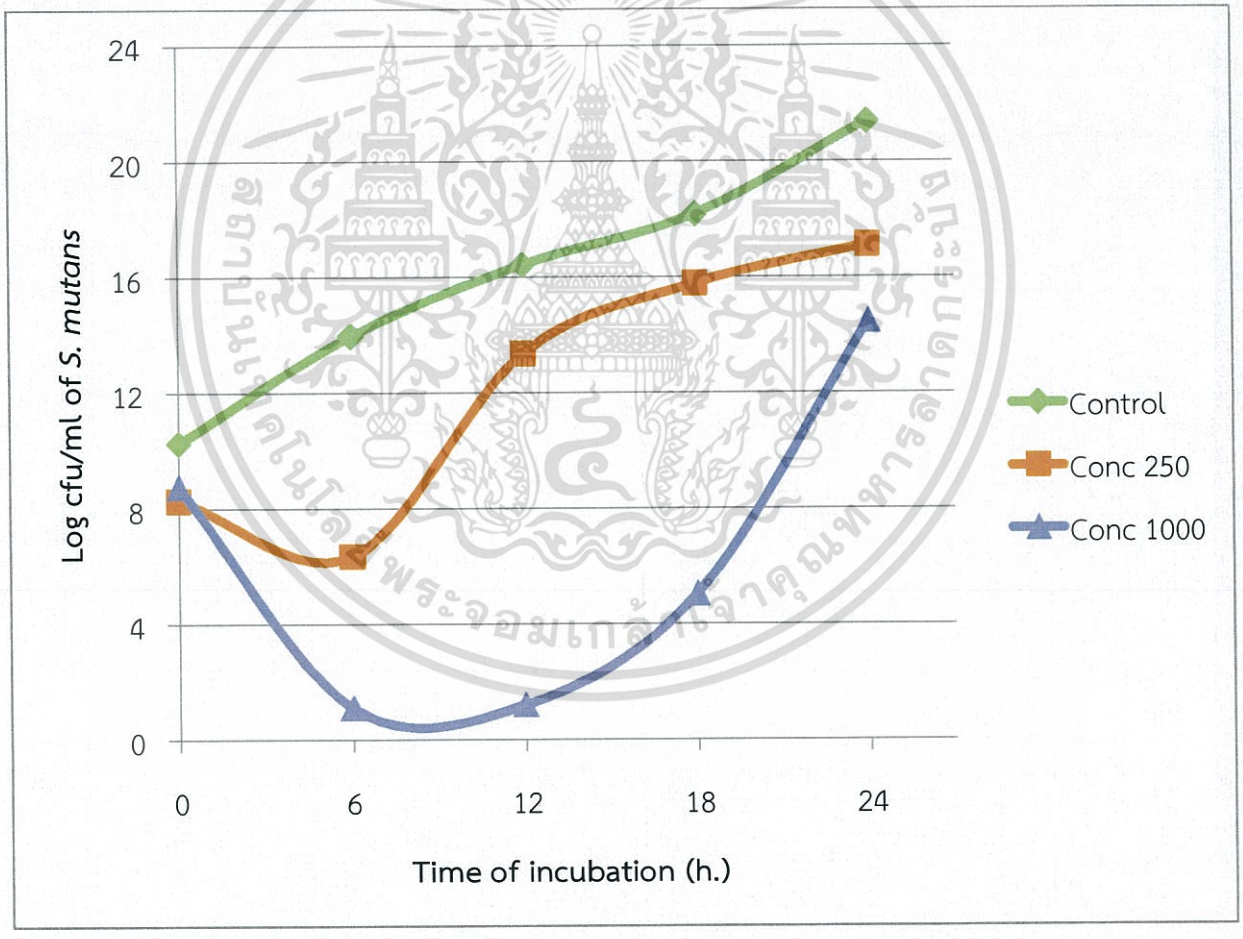
หลังจากศึกษาประสิทธิภาพของไนซินบริสุทธิ์ที่จำหน่ายทางการค้า กับเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคโดยเฉพาะจุลินทรีย์ก่อโรคทางทันตกรรมที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี spot-on-lawn นั้น พบว่า *S. mutans* มี Inhibition zone (mm.) ที่มาก เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคทางทันตกรรมอีกชนิดหนึ่งและเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคชนิดอื่นๆ จึงได้นำ *S. mutans* มาทำการทวนสอบโดยใช้ความเข้มข้นของไนซินที่ระดับความเข้มข้น 250 และ 1000 IU/ml เริ่มจากทำการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI ในหลอดทดลอง แล้วใส่เชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* และไนซินบริสุทธิ์ที่ผ่านตัวกรองขนาด 0.42 ไมครอน นำไปเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 250 และ 1000 IU/ml จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยทำการตรวจผลทุกๆ 6 ชั่วโมง โดยเริ่มจาก 0, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง นำมาทำการนับจำนวนจุลินทรีย์ โดยใช้วิธีการ Pour plate ที่ระดับการเจือจางต่างๆ แล้วยืนยันผลลักษณะจุลินทรีย์โดยการส่องกล้องจุลทรรศน์

ตารางที่ 4.3 ตารางแสดงผลของไนซินต่อการยับยั้ง *Streptococcus mutans* ในหลอดทดลอง

Time of incubation (h.)	Nisin conc. (IU/ml)	*S. mutans* (cfu/ml)	Log cfu/ml of *s. mutans*
0	Control	3.7×10^{-6}	6.56
	250	1.2×10^{-6}	6.07
	1000	1.5×10^{-6}	6.17
6	Control	3.1×10^{-7}	7.49
	250	1.3×10^{-5}	5.11
	1000	1.3×10^{-2}	2.11
12	Control	1.3×10^{-8}	8.11
	250	2.2×10^{-7}	7.34
	1000	1.6×10^{-2}	2.20
18	Control	3.5×10^{-8}	8.54
	250	8.8×10^{-7}	7.94
	1000	3.3×10^{-4}	4.51
24	Control	2.2×10^{-9}	9.34
	250	1.9×10^{-8}	8.27
	1000	4.2×10^{-7}	6.56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 4.3 และภาพที่ 4.3 พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคทางทันตกรรม *S. mutans* ถูกทำลายมากที่สุดที่ความเข้มข้นของไนซินเท่ากับ 1000 IU/ml เมื่อทำการตรวจเช็คผลทุกๆ 6 ชั่วโมง ทำการเปรียบเทียบกับ Control ที่ไม่ใส่ไนซินบริสุทธิ์ พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปมากกว่า 12 ชั่วโมง มีจำนวนจุลินทรีย์เพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ แต่ยังสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ ซึ่งก็คือ มีจำนวนจุลินทรีย์น้อยกว่า Control อยู่นั่นเอง ส่วนที่ระดับความเข้มข้นไนซิน 250 IU/ml นั้น แสดงผลการทำลายจุลินทรีย์ในช่วงแรก คือ ภายในระยะเวลา 6 ชั่วโมงเท่านั้น หลังจากนั้นมีจำนวนจุลินทรีย์เพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ ตามลำดับ แต่ยังสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้เล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนจุลินทรีย์ของ Control จากการศึกษาทดลองพบว่าภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง ไนซินบริสุทธิ์ที่ระดับความเข้มข้น 250และ 1000 IU/ml ที่นำมาใช้ศึกษานั้นสามารถทำลายจุลินทรีย์ก่อโรคทางทันตกรรม (*S. mutans*) ได้ในปริมาณไม่มากจึงควรทำการศึกษาทดลองโดยใช้ไนซินในระดับความเข้มข้นสูงๆ ต่อไป



ภาพที่ 4.3 แสดงผลของไนซินต่อการยับยั้ง *Streptococcus mutans* ในหลอดทดลอง โดยใช้ไนซินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 250และ 1000 IU/ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผล

จากการศึกษาผลของแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลคติก ที่มีผลต่อเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคชนิดต่างๆ รวมไปถึงจุลินทรีย์ที่ก่อโรคทางทันตกรรม ในการทดลองครั้งนี้ได้ใช้เชื้อแบคทีเรียแลคติก ได้แก่ *W. cibaria* SI21, *P. pentosaceus* TISTR 536, *P. pentosaceus* M13, *E. faecalis*, *L. lactis* subsp. *lactis* Sb2, *L. lactis* subsp. *lactis* P2, *L. plantarum* NF38 และ *L. plantarum* NHAM58 และเชื้ออินดิเคเตอร์, จุลินทรีย์ก่อโรคชนิดต่างๆ รวมไปถึงจุลินทรีย์ที่ก่อโรคทางทันตกรรม ได้แก่ *L. sakei*, *B. cereus*, *S. aureus*, *L. innocua*, *S. mutans*, และ *P. gingivalis* เมื่อทำการทดลองพบว่า มีแบคทีเรียแลคติกหลายชนิดที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินเพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ โดยสามารถสังเกตจากโซนใส (Inhibition zone) เมื่อพิจารณาที่เชื้อก่อโรคทางทันตกรรมพบว่าสามารถถูกยับยั้งโดยแบคทีเรียแลคติก *L. lactis* subsp. *lactis* P2 ซึ่งมีความสามารถในการผลิตแบคเทอริโอซินที่เรียกว่า ไนซิน จึงได้นำมาศึกษาต่อโดยการศึกษาผลความเข้มข้นของไนซินบริสุทธิ์กับเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งก็คือ250, 500, 1000, 2500, 5000 และ 10000 IU/ml ด้วยวิธี spot-on-lawn พบว่า มีความสามารถในการยับยั้งได้ดี เมื่อพิจารณาที่จุลินทรีย์ก่อโรคทางทันตกรรมทั้ง 2 ชนิด พบว่า *S. mutans* สามารถถูกยับยั้งได้ดีกว่า *P. gingivalis* จึงได้นำ *S. mutans* มาทำการศึกษาต่อ โดยใช้ความเข้มข้นของไนซินบริสุทธิ์ที่ระดับความเข้มข้น 250 และ 1000 IU/ml เลี้ยงในหลอดทดลอง แล้วตรวจผลโดยวิธีการ Pour plate แล้วนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตเหลือรอดทุกๆ 6 ชั่วโมง ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการยืนยันลักษณะจุลินทรีย์โดยการส่องกล้องจุลทรรศน์ พบว่าไนซินที่ระดับความเข้มข้น 1000 IU/ml นั้นสามารถทำลาย *S. mutans* ได้ดีกว่า 250 IU/ml แต่สามารถทำลายได้มากที่สุดเพียง 12 ชั่วโมงเท่านั้น หลังจากนั้นมีจำนวนจุลินทรีย์เพิ่มมากขึ้นตามลำดับ แต่ยังสามารถยับยั้งได้เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับ Control ที่ไม่ใส่ไนซินดังนั้นจากการทดลองในครั้งนี้จึงสามารถกล่าวได้ว่า แบคเทอริโอซินที่สร้างขึ้นจากแบคทีเรียแลคติกนั้น สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคทางทันกรรมได้ แต่ควรจะทำการศึกษาปริมาณความเข้มข้นที่แน่นอนของการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวกับสุขภาพช่องปากต่อไปในอนาคต

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรใช้ความเข้มข้นของไนซินที่ระดับสูงๆ ในการทำการศึกษาต่อไปในอนาคต

5.2.2 ควรมีการศึกษาปริมาณความเข้มข้นที่แน่นอนของการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อที่จะสามารถพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวกับสุขภาพช่องปาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กรณิศ วิรานุวัตร. 2549. น้ำยาบ้วนปากชนิดแกรนูลฟู่ของสารสกัดชาเขียวที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อในช่องปาก. ปริญญาเภสัชศาสตร์บัณฑิต. คณะเภสัชศาสตร์. มหาวิทยาลัยมหิดล.

คลีนิคทันตกรรมราชเทวีสเตชั่น. 2554. โรคฟันผุ. [ออนไลน์].เข้าถึงได้จาก: http://www.dentalthailandbangkok.com/xn--q3cgh6esb-funpu.html. 22 มิถุนายน 2559

จินตนา ต๊ะย่วน. 2553. แบคทีเรียแลคติกและแบคเทอริโอซิน. [ออนไลน์].เข้าถึงได้จาก: http://www4.csc.ku.ac.th/~research/files/docs/2012066213031.pdf. 10 ธันวาคม 2558.

โฉมไฉไล เอกจิตต์. 2553. โรคฟันผุ. [ออนไลน์].เข้าถึงได้จาก: http://www.si.mahidol.ac.th/sidoctor/e-pl/articledetail.asp?id=99. 10 ธันวาคม 2558.

เบญจวรรณเลิศปันณะพงษ์. 2551. ผลของแลคติกแอซิดแบคทีเรียต่อการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคไค.สาขาวิชาทันตกรรมสำหรับเด็ก.

ปาริมา นันทรักษ์ชัยกุล. 2559. ผลของโยเกิร์ตที่มีส่วนผสมของโพรไบโอติกแลคโตบาซิลลัสเฟอเมนตุมเอสดี11 ต่อเชื้อมิวแทนส์สเตรปโตคอคไคและเชื้อราในอาสาสมัคร. วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพช่องปาก. คณะทันตแพทยศาสตร์. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

แพรวพรรณ สุริวงศ์. 2558. ผลกระทบของฟันผุ. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://www.thaihealth.or.th/Content/27288- ผลกระทบของฟันผุ.html. 22 มิถุนายน 2559.

รวี เถียรไพศาล. 2556. ผลิตภัณฑ์ผสมโพรไบโอติกLactobacillus paracasei SD1เพื่อป้องกันฟันผุ.คณะทันตแพทยศาสตร์. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วรวุฒิ เจริญศิริ. 2554. โรคเหงือกอักเสบ.[ออนไลน์].เข้าถึงได้จาก: http://www.vachiraphuket.go.th/www/publichealth/?name=knowledge&file=readknwledge&id=272. 22 มิถุนายน 2559.

วัสยามน ชูติวัทก์, และวาที รัตนวิสาลนนท์. 2544. การพัฒนาตำรับสมุนไพรป้องกันฟันผุ. ปริญญาเภสัชศาสตร์บัณฑิต. คณะเภสัชศาสตร์. มหาวิทยาลัยมหิดล.

ศิริลักษณ์ หอมละเอียด. 2549. ฤทธิ์การยับยั้งไบโอฟิล์มของเชื้อ *Streptococcus mutans* จากสารสกัดใบกระทุ.ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต.สาขาวิชาจุลชีววิทยา.คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ศูนย์วิจัยสุขภาพกรุงเทพ. 2557. โรคเหงือกอักเสบ. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก:
http://www.bangkokhealth.com/health/article/%E0%B9%82%E0%B8%A3%E0%B8%84%E0%B9%80%E0%B8%AB%E0%B8%87%E0%B8%B7%E0%B8%AD%E0%B8%81%E0%B8%AD%E0%B8%B1%E0%B8%81%E0%B9%80%E0%B8%AA%E0%B8%9A-1617

อรอนงค์พริ้งศุลกะ. 2550. แบคทีรีโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติก.วารสารวิทยาศาสตร์. 23: 145-148.

Samot, J. and Badet, C., 2012. Antibacterial activity of probiotic candidates for oral health. Anaerobe 2013;19:14-38

Silom dental. 2004. โรคเหงือกอักเสบ. [ออนไลน์].เข้าถึงได้จาก:
http://www.silomdental.com/dental_thai/periodontics.html. 10 ธันวาคม 2558.

Chen, H. and Hoover D.G. 2003. Bacteriocins and their Food Application. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2: 83

Swetwiwathana, A., Pilasombut, K.., Sethakul, J., 2008. Screening of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from Thai fermented meat for probiotic prospect. Division of Fermentation Technology Faculty of Agro-industry, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

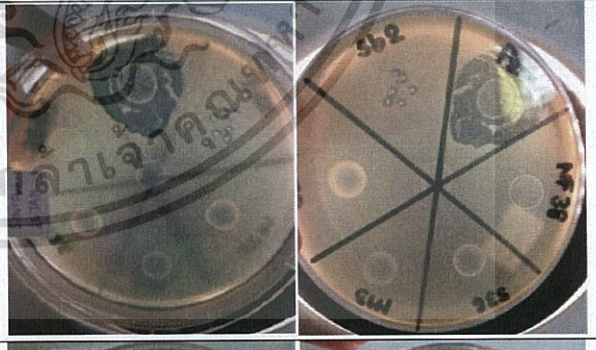
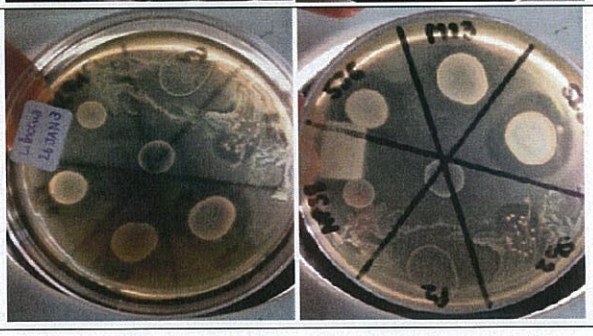
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

แบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแลคติกที่ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค

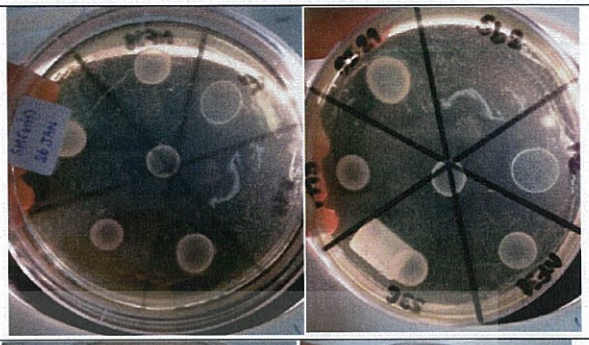
ก.1 ตารางแสดงภาพ Inhibition zone ที่เกิดขึ้น

Inhibition zone ของแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแลคติกที่มีผลต่อจุลินทรีย์ก่อโรคชนิดต่างๆ

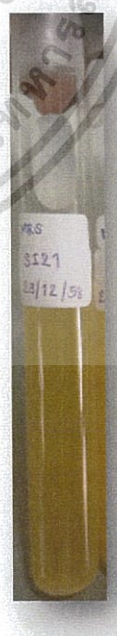
เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค	Inhibition zone
L. sakei	
B. cereus	
S. aureus	
L. innocua	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.1 (ต่อ)

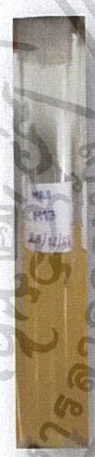
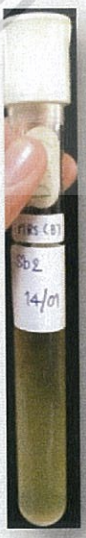
เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค	Inhibition zone
S. mutans	
P. gingivalis	

ก.2 ตารางแสดงภาพความขุ่นของเชื้อแบคทีเรียแลคติก

เชื้อแบคทีเรียแลคติก	ภาพความขุ่นของเชื้อแบคทีเรียแลคติก
W. cibaria SI21	

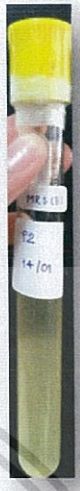
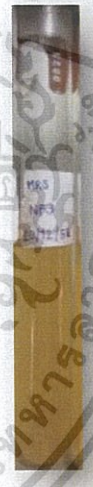
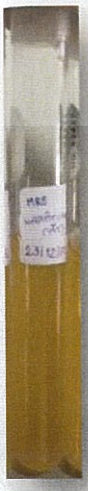
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.2 (ต่อ)

เชื้อแบคทีเรียแลคติก	ภาพความขุ่นของเชื้อแบคทีเรียแลคติก
P. pentosaceus TISTR536	
P. pentosaceus M13	
L. lactis subsp. *lactis* Sb2	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.2 (ต่อ)

เชื้อแบคทีเรียแลคติก	ภาพความขุ่นของเชื้อแบคทีเรียแลคติก
L. lactis subsp. *lactis* P2	
L. plantarum NF38	
L. plantarum NHAM58	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ความเข้มข้นไนซินกับเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

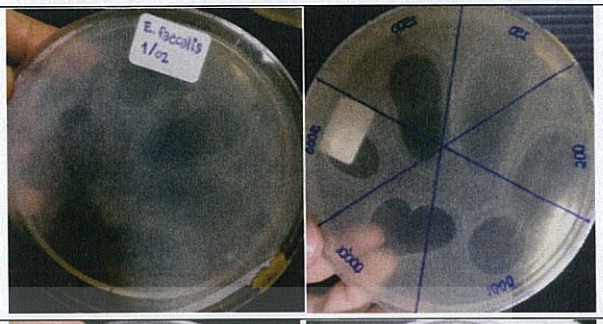
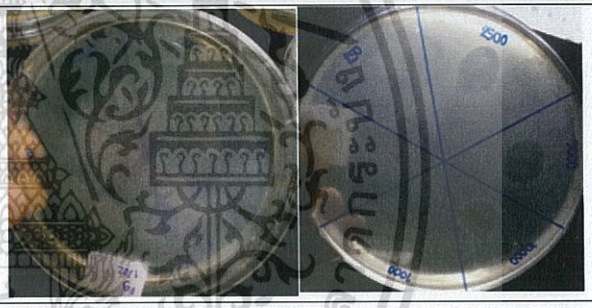
ข.1 ตารางแสดงภาพความเข้นข้นไนซินกับเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

Inhibition zone ระหว่างความเข้มข้นของไนซินที่ระดับต่างๆ ได้แก่ 250, 500, 1000, 2500, 5000และ 10000 IU/ml กับเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคชนิดต่างๆ

เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค	Inhibition zone
L. sakei	
B. cereus	
S. aureus	
L. innocua	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.1 (ต่อ)

เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค	Inhibition zone
E. faecalis	
S. mutans	
P. gingivalis	

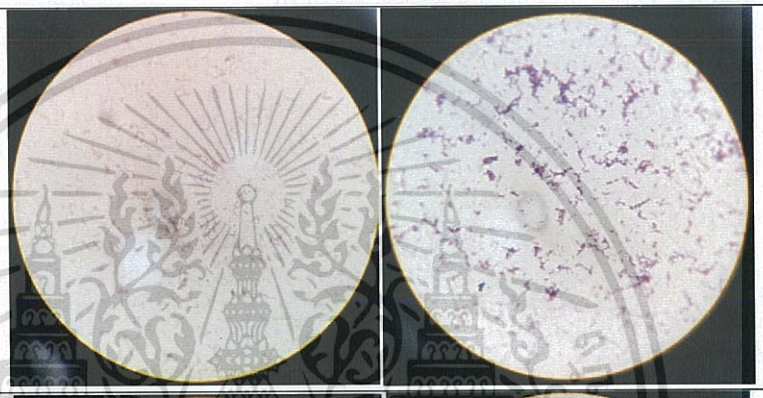
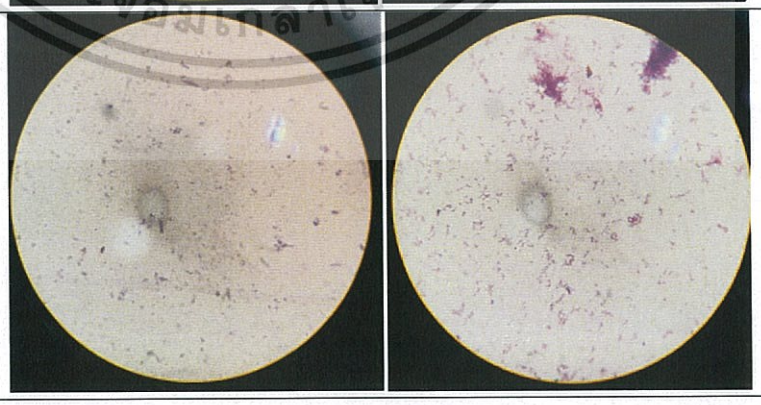
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ลักษณะสัณฐานของจุลินทรีย์ทางทันตกรรม

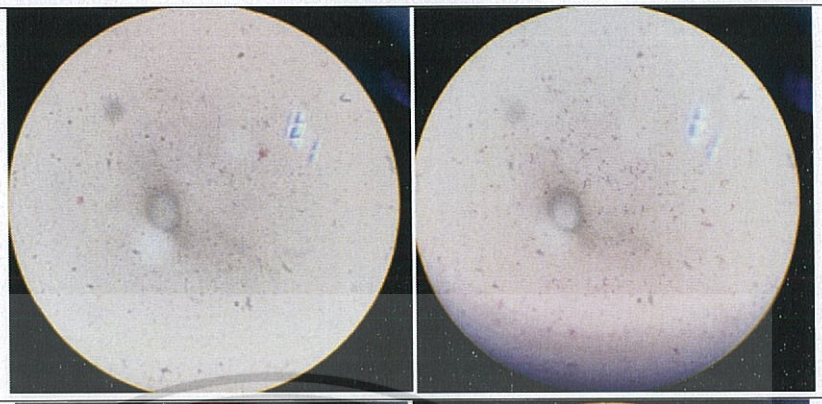
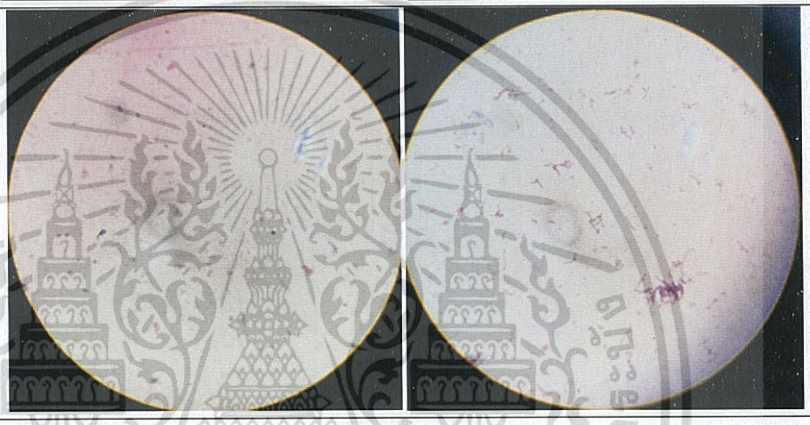
ค.1 ตารางแสดงลักษณะสัณฐานของจุลินทรีย์ทางทันตกรรม

ลักษณะของเชื้อจุลินทรีย์ทางทันตกรรม *Streptococcus mutans* โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อทำการเก็บผลทุกๆ 6 ชั่วโมง โดยเริ่มจากชั่วโมงที่ 0, 6, 12, 18 และ 24

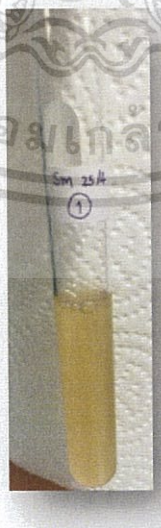
เวลา (ชั่วโมง)	ลักษณะ *S. mutans*
0	
6	
12	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค.1 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	ลักษณะ *S. mutans*
18	
24	

ค.2 ภาพแสดงความขุ่นของจุลินทรีย์ก่อโรค *S. mutans*



ภาพที่ ค.1 ความขุ่นของเชื้อจุลินทรีย์ *S. mutans*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

ง.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ DE Man, Rogosa and Sharpe (MRS broth) (Merck, Germany) ใน 1 Liter

Peptone	10	g
Meat extract	8	g
Yeast extract	4	g
Glucose	20	g
Tween 80	1	g
Di-Ammonium hydrogen citrate	2	g
Di-Potassium hydrogen phosphate	2	g
Sodium citrate	5	g
$MnSO_4.4H_2O$	0.2	g
$MgSO_4.7H_2O$	0.04	g

(ถ้าต้องการให้อาหารแข็งให้เติมAgar15 gต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 Liter)

นำส่วนสารทั้งหมดอุ่นและคนให้เข้ากันจนเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ง.2 Trypicase Soy Agar (TSA) (Difco,USA)

Trypticasepeptone(Tryptone)	15	g
Phytonepeptone(Soytone)	5	g
NaCl	5	g
น้ำกลั่น	1	L
Agar	15	g
Final pH	7.3 ± 0.2	

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดแล้วต้มจนวุ้นละลายปรับพีเอชถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ในหลอดที่มีจุกสาลีหรือฝาปิดเข้าฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ง.3 Trypticase (Tryptic) Soy Broth (Bacto, USA)

Trypticase peptone	17	g
Phytone peptone	3	g
NaCl	5	g
K_2HPO_4	2.5	g
Glucose	2.5	g
น้ำกลั่น	1	L
Final pH	7.3 ± 0.2	

ละลายส่วนผสมทั้งหมดถ่ายอาหารลงในฟลาสก์หรือขวดที่มีจุกสาลีหรือฝาปิดเข้าฆ่าเชื้อใน Autoclaveที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

ง.4 Brain Heart Infusion (BHI)

Brain infusion solids	12.5	g
Beef heart infusion solids	5	g
Glucose	2	g
Sodium chloride	5	g
Proteose peptone	10	g
Di-sodium phosphate	2.5	g
น้ำกลั่น	1	L
Final pH	7.4± 0.2	

ละลายส่วนผสมทั้งหมดแล้วปรับพีเอชถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อใสในหลอดที่มีจุกสาลีหรือฝาปิดเข้าฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

ง.5 Bacteriocin Screening Medium (BSM)

Glucose	2	g
Beef extract	2	g
tryptone	10	g
Yeast extract	4	g
K_2HPO_4	8.7	g
KH_2PO_4	8	g
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	g
$MnSO_4.4H_2O$	0.05	g
Tween 80	1	ml
citric acid diammoniumsalt	2	g
น้ำกลั่น	1	L

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปรับpH	6.8-7.0

นำส่วนสารทั้งหมดอุ่นและคนให้เข้ากันจนเป็นเนื้อเดียวกันจากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ง.6 Nutrient agar (NA) ใน 1 Liter

Peptone	5	g
Beef extract	3	g
Agar	15	g
น้ำกลั่น	1	L

นำส่วนสารทั้งหมดอุ่นและคนให้เข้ากันจนเป็นเนื้อเดียวกันจากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ง.7 Buffer peptone water (Difco, USA)

Petone	10	g
Chlorure de sodium	5	g
Phosphate	1.5	g
Phosphate disodique	3.5	g

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตรถ่ายใส่ในหลอดปริมาตร 10 มิลลิลิตรปิดจุกฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ – นามสกุล	นางสาวชญานาถ จีระกิตติโสภณ
วัน เดือน ปี เกิด	22 ตุลาคม 2536
ประวัติการศึกษา	มัธยมศึกษาตอนปลายที่โรงเรียนเซนต์โยเซฟทิพวัลจ. สมุทรปราการ ปัจจุบันศึกษาอยู่ที่คณะอุตสาหกรรมเกษตรหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ประสบการณ์ทำงาน	ศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์นมและเนื้อสัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ จ.เชียงใหม่
และผลงานวิจัย	ผลของแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแลคติกที่มีต่อเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคทันตกรรม

ชื่อ – นามสกุล	นางสาวศิรินุช รุ่งเจริญชัยพร
วัน เดือน ปี เกิด	9 ตุลาคม 2536
ประวัติการศึกษา	มัธยมศึกษาตอนปลายที่โรงเรียนเซนต์โยเซฟทิพวัลจ. สมุทรปราการ ปัจจุบันศึกษาอยู่ที่ คณะอุตสาหกรรมเกษตร หลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ประสบการณ์ทำงาน	ศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์นมและเนื้อสัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ จ.เชียงใหม่
และผลงานวิจัย	ผลของแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแลคติกที่มีต่อเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคทันตกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้