การคัดแยกและศึกษาคุณสมบัติของสารแบคเทอริโอซินที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลกติกจากระบบทางเดินอาหารของปลา

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF BACTERIOCIN PRODUCED BY LACTIC ACID BACTERIA FROM FISH GASTROINTESTINAL TRACT

กฤตพร รำจวนเกียรติ

KITTAPORN RUMJUANKIAT

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2552

KMITL-2009-AG-M-101-034

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การคัดแยกและศึกษาคุณสมบัติของสารแบคเทอริโอซินที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลกติกจากระบบทางเดินอาหารของปลา

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF BACTERIOCIN PRODUCED BY LACTIC ACID BACTERIA FROM FISH GASTROINTESTINAL TRACT

T105534

กฤตพร รำจวนเกียรติ
KITTAPORN RUMJUANKIAT

เลขหมู่.................................
เลขทะเบียน 105534
วัน.เดือน.ปี 26 พ.ย. 2552

ร. ....
ว. ....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พ.ศ. 2552

KMITL-2009-AG-M-101-034

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF BACTERIOCIN PRODUCED BY LACTIC ACID BACTERIA FROM FISH GASTROINTESTINAL TRACT

KITTAPORN RUMJUANKIAT

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF

THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY

FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2009

KMITL-2009-AG-M-101-034

เอกสารนี้เป็นเอกส ... ชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และ ... อ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2009
FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสาร ... ไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากร ... อิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดแยกและศึกษาคุณสมบัติของสารแบคเทอริโอซินที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลกติกจากระบบทางเดินอาหารของปลา
นักศึกษา	นางสาว กฤตพร รำจวนเกียรติ
รหัสประจำตัว	50065801
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร
พ. ศ.	2552
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ดร.คมแข พิลาสมบัติ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รศ.ดร.สมชาย หวังวิบูลย์กิจ

บทคัดย่อ

การทดลองคัดแยกและศึกษาคุณสมบัติของสารแบคเทอริโอซินที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลกติกจากระบบทางเดินอาหารของปลา โดยทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก จำนวน 400 ไอโซเลท จากปลาจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ *Lates calcarifer* (seabass), *Channa stiata* (striped snake-head fish), *Clarias batrachus* (catfish), *Orcochromis niloticus* (nile tilapia), *Barbonymus gonionotus* (javanese barb) และ *Pangasianodon hypophthalmus* (striped catfish) ซึ่งแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท Sb2 เป็นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากระบบทางเดินอาหารของปลากะพง สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินที่ยับยั้งเชื้อได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ได้แก่ *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917, *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T, *Lb. sakei* TISTR 890, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* TISTR 1344, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124^T, *Leu. mesenteroides* TISTR 942, *Bacillus coagulans* JCM 257^T, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Brochotrix campestris* NBRC 11547, *Pseudomonas fluorescens* JCM 5693^T, *Ps. fluorescens* TISTR 358, *Enterococcus faecalis* JCM 5803^T, *E. faecalis* TISTR 888, *Staphylococcus aureus* TISTR 118 และ *Streptococcus* sp. TISTR 1030 ไอโซเลท Sb2 สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินมากที่สุดเมื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง (12,800 AU/ml) เมื่อทำการจัดจำแนกชนิดของไอโซเลท Sb2 ด้วยวิธีทางกายภาพ ชีวภาพ และวิธี 16s rDNA พบว่า เป็นแบคทีเรียชนิด *Lactococcus lactis* spp. *lactis* ดังนั้นจึงตั้งชื่อว่า *Lc. lactis* spp. *lactis* Sb2 แบคเทอริโอซินที่ผลิตจากสายพันธุ์ดังกล่าว ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ α–

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

chymotrypsin, trypsin และ proteinase K สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และมีความเสถียรต่อความเย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน เมื่อศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของ *Lc. lactis* spp. *lactis* Sb2 พบว่า สามารถเจริญและสร้างสารแบคเทอริโอซิน เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะความเป็นกรดและด่าง 2- 10 โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1-5 เปอร์เซ็นต์ และในน้ำดีความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ โดยเชื้อสามารถเจริญและสร้างสารแบคเทอริโอซินได้มากที่สุดในสภาวะที่ความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 6 (12,800 AU/ml) และโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (12,800 AU/ml) นอกจากนี้ *Lc. lactis* spp. *lactis* Sb2 ยังมีคุณสมบัติในการต้านทานยา gentamycin, kanamycin, naldixic acid, neomycin, norfloxacin, oxolinic acid และ sulfamethoxazole/trimethoprim และเมื่อทำการศึกษายีนของแบคเทอริโอซินพบว่าเป็นยีนชนิด nisin A

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Isolation and Characterization of Bacteriocin Produced by Lactic Acid Bacteria from Fish Gastrointestinal Tract
student	Miss Kittaporn Rumjuankiat
Student ID.	50065801
Degree	Master of Science
Program	Agricultural Biotechnology
Year	2009
Thesis Advisor	Dr. Komkhae Pilasombut
Thesis Co-Advisor	Assoc. Prof. Dr. Somchai Wangwibulkit

ABSTRACT

Screening and characterization of bacteriocin from lactic acid bacteria (LAB) in fish gastrointestinal tract was conducted. Four hundred isolates of LAB were screened from gastrointestinal tract of 6 fish species; *Lates calcarifer* (seabass), *Channa stiata* (striped snake-head fish), *Clarias batrachus* (catfish), *Orcochromis niloticus* (nile tilapia), *Barbonymus gonionotus* (javanese barb) and *Pangasianodon hypophthalmus* (striped catfish). One effective isolate from seabass was able to produce bacteriocin and designated Sb2. Bacteriocin of isolate Sb2 inhibited both gram positive and gram negative bacteria such as *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917, *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^{T}, *Lb. sakei* TISTR 890, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* TISTR 1344, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124^{T}, *Leu. mesenteroides* TISTR 942, *Bacillus coagulans* JCM 2257^{T}, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Brochotrix campestris* NBRC 11547, *Pseudomonas fluorescens* JCM 5693^{T}, *Ps. fluorescens* TISTR 358, *Enterococcus faecalis* JCM 5803^{T}, *E. faecalis* TISTR 888, *Staphylococcus aureus* TISTR 118 and *Streptococcus* sp. TISTR 1030. The maximum bacteriocin activity was obtained at the optimum cultivation condition of 30°C for 18 hr (12,800 AU/ml). Base on morphological, biochemical characteristics (API 50 CHL Kit) and 16s rDNA, the strain Sb2 was identified as *Lactococcus lactis* spp. *lactis*, and therefore designated *Lc. lactis* spp. *lactis* Sb2. The bacteriocin activity was partially inhibited by proteolytic enzyme of trypsin, α-chymotrypsin and proteinase K. It was stable at high temperature up to 100°C for 30 min and at 4°C for 10 days. Probiotic properties of *Lc. lactis* spp. *lactis* Sb2 were investigated. It was found that *Lc. lactis* spp. *lactis*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวน ไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sb2 was able to grow and produce bacteriocin in pH range of 2-10, concentration of bile salts at 0.3, 0.6 and 0.9% and concentration of NaCl at 1-5%. In addition, antibiotic resistance of isolate Sb2 was determined. The results implied that, *Lc. lactis* spp. *lactis* Sb2 was able to grow and produce bacteriocin when culture in pH 2-10, NaCl 1-5% and 0.3% bile salts. The maximum bacteriocin production (12,800 AU/ml) was observed at pH 6 and in 1% NaCl (12,800 AU/ml). In addition, *Lc. lactis* spp. *lactis* Sb2 was resistant to gentamycin, kanamycin, naldixic acid, neomycin, norfloxacin, oxolinic acid and sulfamethoxazole/trimethoprim. Sequencing of this gene showed identical sequences to nisin A.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้อย่างดีโดยได้รับความกรุณาจาก ดร. คมแข พิลาสมบัติ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ รศ.ดร. สมชาย หวังวิบูลย์กิจ สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ ส่งเสริมในเรื่องการเรียน และให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการทำวิทยานิพนธ์มาโดยตลอด ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งในความอนุเคราะห์จากท่านและขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่ง จากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และศูนย์เครือข่ายการวิจัยเทคโนโลยีเนื้อสัตว์ โดยความร่วมมือระหว่างสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) และสำนักกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว)

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์ สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมัก คณะอุตสาหกรรมเกษตร ดร. นวลพรรณ งามยิ่สุ่น สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช และอาจารย์จากสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุกๆ ท่าน ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาให้กับข้าพเจ้า

ขอขอบคุณ คุณอังคณา ทุมดี คุณวิทิดา สาธิตโกวิทชัย คุณพันธิพา แทนกุดเรือ คุณจักรพงษ์ หรั่งเจริญ คุณพรชัย เหลืองวารี คุณอรุณวรรณ อินทร์ช่วย และคุณจิระกุล เรืองแก้วมณี รวมทั้งนักวิจัย และผู้ช่วยนักวิจัยทุกท่าน ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในเรื่องข้อมูล คำปรึกษา คอยให้กำลังใจตลอดจนคำแนะนำต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จได้เป็นอย่างดี

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ในสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร และสาขาอื่นๆ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุกคนที่ให้คำแนะนำต่างๆ และคอยให้กำลังใจเสมอมา

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา พี่สาว และพี่ชาย ที่คอยเป็นกำลังใจ เป็นที่ปรึกษาและให้การสนับสนุนในทุกเรื่องๆ ทำให้ข้าพเจ้าสามารถทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมาจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

กฤตพร รำจวนเกียรติ

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.. I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.. III

กิตติกรรมประกาศ.. V

สารบัญ.. VI

สารบัญตาราง.. X

สารบัญภาพ.. XIII

บทที่ 1 บทนำ.. 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.. 1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.. 2

1.3 สถานที่ดำเนินงาน.. 2

1.4 สมมุติฐานของการศึกษา.. 2

1.5 ขอบเขตงานวิจัย.. 2

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.. 2

บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.. 3

2.1 แบคทีเรียกรดแลกติก.. 3

2.2 อนุกรมวิธานของแบคทีเรียกรดแลกติก.. 3

2.3 สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลกติก.. 8

2.4 แบคทีเรียกรดแลกติกที่พบในปลา.. 16

2.5 อาหารที่ใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียซึ่งผลิตแบคเทอริโอซิน.. 23

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย.. 26

3.1 ตัวอย่างปลา.. 26

3.2 แบคทีเรียทดสอบที่ใช้ทดสอบคุณสมบัติของสารยับยั้งแบคทีเรีย.. 26

3.3 อุปกรณ์ และสารเคมี.. 28

3.4 สรุปขั้นตอนการทดลอง.. 31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.5 วิธีการทดลอง.. 32
3.5.1 การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกจากระบบทางเดินอาหาร.............................. 32
3.5.2 การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกที่สร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย........................ 32
3.5.3 การศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถสร้าง
สารยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย... 33
3.5.3.1 การจำแนกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่สร้างสาร
ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย... 33
3.5.3.2 การทดสอบอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการ
สร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยแบคทีเรียกรดแลกติก................... 40
3.5.3.3 การทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติก.. 40
3.5.4 ศึกษาคุณสมบัติของสารแบคเทอริโอซิน.. 42
3.5.4.1 การทดสอบกับเอนไซม์ย่อยโปรตีน.. 42
3.5.4.2 การทดสอบความเสถียรของสารแบคเทอริโอซิน
ต่ออุณหภูมิสูง... 43
3.5.4.3 การทดสอบความเสถียรของสารแบคเทอริโอซิน
ต่ออุณหภูมิต่ำ... 43
3.5.4.4 การวิเคราะห์หาลำดับเบสของยีนที่สร้างสาร
แบคเทอริโอซิน... 43

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ 45
4.1 การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกที่สร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย
จากระบบทางเดินอาหารของปลาชนิดต่างๆ... 45
4.2 ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ.. 46
4.3 การศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถ
สร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย... 49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.3.1 ผลการจำแนกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่สร้าง
สารแบคเทอริโอซิน 49
4.3.2.1 การศึกษาสัณฐานวิทยาและลักษณะทางกายภาพ........ 49
4.3.2.2 การศึกษาทางชีวเคมี........ 50
4.3.2.3 การยืนยันผลการจำแนกไอโซเลท Sb2 โดยวิธี
16S rDNA........ 55
4.3.2 การทดสอบอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการสร้าง
สารยับยั้งแบคทีเรียโดยแบคทีเรียกรดแลกติก........ 59
4.3.3 การทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติก........ 62
4.3.3.1 การทดสอบความสามารถในการเจริญและสร้างสารยับยั้ง
เชื้อแบคทีเรีย เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะเป็นกรดและด่าง........ 62
4.3.3.2 การทดสอบความสามารถในการเจริญและสร้างสารยับยั้ง
เชื้อแบคทีเรีย เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์........ 66
4.3.3.3 การทดสอบความสามารถในการเจริญและสร้างสารยับยั้ง
เชื้อแบคทีเรีย เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มี bile salts........ 68
4.3.3.4 การทดสอบความสามารถในการมีชีวิตรอดในกระเพาะ
และลำไส้จำลอง........ 69
4.3.4 การทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ........ 75
4.4 ผลการศึกษาคุณสมบัติของสารแบคเทอริโอซิน........ 79
4.4.1 การทดสอบกับเอนไซม์ย่อยโปรตีน........ 79
4.4.2 การทดสอบความเสถียรของสารแบคเทอริโอซินต่ออุณหภูมิสูง........ 80
4.4.3 การทดสอบความเสถียรของสารแบคเทอริโอซินต่ออุณหภูมิต่ำ........ 82
4.4.4 ผลการวิเคราะห์หาลำดับเบสของยีนที่สร้างสารแบคเทอริโอซิน........ 83

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง........ 89

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บรรณานุกรม.................... 91

ภาคผนวก.................... 100

ภาคผนวก ก 101

ภาคผนวก ข 104

ภาคผนวก ค 108

ประวัติผู้เขียน.................... 115

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ | หน้า

2.1 ลักษณะความแตกต่างของแบคทีเรียกรดแลกติก.......... 7

2.2 การจำแนกชนิดของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลกติก.......... 12

2.3 วิเคราะห์แบคทีเรียกรดแลคติกในลำไส้ปลาจำนวน 4 ชนิดจาก silver carp, common carp, chanel catfish และ deep-bodied crucian carp.......... 18

2.4 ชนิดของปลาและบริเวณระบบทางเดินอาหารที่สามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติก.......... 21

2.5 แบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลกติกซึ่งแยกได้จากปลาและผลิตภัณฑ์จากปลา.......... 22

2.6 แสดงส่วนประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรียกรดแลกติก.......... 24

3.1 แบคทีเรียทดสอบ อาหารที่ใช้เลี้ยงและอุณหภูมิสำหรับการเจริญของแบคทีเรีย.......... 27

3.2 ส่วนประกอบของสารละลายในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์.......... 36

4.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจากระบบทางเดินอาหารของปลาชนิดต่างๆ.......... 45

4.2 การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบโดยสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่สร้างโดยไอโซเลท Sb2 ที่คัดแยกได้จากปลากะพง.......... 47

4.3 ลักษณะทั่วไปของเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่สร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย.......... 49

4.4 การจำแนกชนิดของไอโซเลท Sb2 โดยใช้ชุดจำแนกแบคทีเรียสำเร็จรูป API 50 CHL kit (bioMerieux).......... 50

4.5 การเปรียบเทียบชนิดของ ไอโซเลท Sb2 กับ *Lc. lactis* ssp. *lactis* N190 และ *Lc. lactis* ssp. *lactis* R06 โดยใช้ชุดจำแนกแบคทีเรียสำเร็จรูป API 50 CHL kit.......... 52

4.6 ผลการจำแนกชนิดเชื้อไอโซเลท Sb2.......... 59

4.7 ค่าความเป็นกรดและด่างที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์ภายในเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลกติก.......... 64

4.8 กลุ่มแบคทีเรียที่นำมาใช้เป็นโปรไบโอติก.......... 73

4.9 ชนิดและประโยชน์ของแบคทีเรียที่ใช้เป็นโปรไบโอติกในสัตว์น้ำ.......... 75

4.10 ของยาปฏิชีวนะต่อแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยไอโซเลท Sb 2.......... 76

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
4.11	การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างสารยับยั้งที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลกติกกับยาปฏิชีวนะ	78
4.12	ชนิดของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะในอาหาร	79
4.13	ผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่อสารแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2 Sb2 ในการยับยั้งเชื้อ *Lb.* sakei subsp. *sakei* JCM 1157^T	80
4.14	ผลของความเสถียรของสารแบคเทอริโอซินต่ออุณหภูมิสูงและการแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	82
ค1	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และค่าการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียของไอโซเลท Sb2	109
ค2	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และค่าการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียของไอโซเลท Sb2	110
ค3	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และค่าการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียของไอโซเลท Sb2	111
ค4	ผลของค่าความเป็นกรดและด่างต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของ *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2 โดยใช้เชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T เป็นแบคทีเรียทดสอบ	112
ค5	ผลของค่าความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรีย *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2 โดยใช้เชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T เป็นแบคทีเรียทดสอบ	112
ค6	ผลของค่าความเข้มข้น bile salts ต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียของ *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2 โดยใช้เชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T เป็นแบคทีเรียทดสอบ	113

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
ค7	แสดงจำนวนการมีชีวิตรอดในกระเพาะจำลอง เมื่อทดสอบกับค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 2, 3, 4 และ 7 เป็นเวลา 180 นาที และค่าการมีชีวิตรอดในลำไส้จำลอง เมื่อทดสอบกับค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 2, 3, 4 และ 7 เป็นเวลา 180 นาที	113
ค8	แสดงเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดในกระเพาะจำลอง เมื่อทดสอบกับค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 2, 3, 4 และ 7 เป็นเวลา 180 นาที และค่าการมีชีวิตรอดในลำไส้จำลอง เมื่อทดสอบกับค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 2, 3, 4 และ 7 เป็นเวลา 180 นาที	114

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	การสังเคราะห์แบคเทอริโอซิน class II	13
2.2	ช่องว่างที่เยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งเกิดจากโมเลกุลแบคเทอริโอซินรวมตัวกัน	14
2.3	โครงสร้างของแบคเทอริโอซิน Class II และการเข้าจับกับ เยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ เป้าหมาย	15
2.4	การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงจำนวนและองค์ประกอบของแบคทีเรีย กรดแลกติกในลำไส้ปลาคาร์พและน้ำในบ่อการทดลองในรอบปี	17
4.1	ขนาดของดีเอ็นเอของไอโซเลท Sb2 ในการทำพีซีอาร์	55
4.2	ขนาดของพลาสมิดเวคเตอร์และดีเอ็นเอของไอโซเลท Sb2 เมื่อถูกตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* และ *BamHI*	57
4.3	การ alignment ลำดับเบสของไอโซเลท Sb2 ซึ่งมีความเหมือนกับ *Lactococcus lactis* spp. *lactis* Il1403 Accession No. AE005176.1(sbjct) โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์	58
4.4	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิต่างๆ ค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และค่าการสร้างสารแบคเทอริโอซินของไอโซเลท Sb2	61
4.5	ผลของค่าความเป็นกรดและด่างต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของ *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2 โดยใช้เชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T เป็นแบคทีเรียทดสอบ	63
4.6	ผลของค่าความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรีย *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2 โดยใช้เชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T เป็นแบคทีเรียทดสอบ	67
4.7	ผลของค่าความเข้มข้น bile salts ต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียของ *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2 โดยใช้เชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T เป็นแบคทีเรียทดสอบ	69

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.8 แสดงจำนวนการมีชีวิตรอดในกระเพาะจำลอง เมื่อทดสอบกับค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 2, 3, 4 และ 7 เป็นเวลา 180 นาที และค่าการมีชีวิตรอดในลำไส้จำลองเมื่อทดสอบกับค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 2, 3, 4 และ 7 เป็นเวลา 180 นาที 70

4.9 แสดงเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดในกระเพาะจำลอง เมื่อทดสอบกับค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 2, 3, 4 และ 7 เป็นเวลา 180 นาที และค่าการมีชีวิตรอดในลำไส้จำลองเมื่อทดสอบกับค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 2, 3, 4 และ 7 เป็นเวลา 180 นาที 71

4.10 ขนาดของดีเอ็นเอของ *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2 ในการทำพีซีอาร์ 84

4.11 ขนาดของพลาสมิดเวคเตอร์และชิ้นยีนแบคเทอริโอซินของ *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2 เมื่อถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* และ *BamHI* 85

4.12 การ alignment ลำดับเบสของยีนแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2 ซึ่งมีความเหมือนกับยีน *Lactococcus lactis* spp. *lactis* Accession No. AF46535.1 (sbjct)โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ 86

4.13 การ alignment ลำดับกรดอะมิโนของยีนแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2 ซึ่งมีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของ lantibiotic nisin-A Accession NO. P13068.1 โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ 86

4.14 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับของกรดอะมิโนของยีน *nisZ* ที่ได้จาก *Lc. lactis* subsp. *lactis* WN 20 โดยลำดับกรดอะมิโนของยีน *nisZ* มีความแตกต่างจากยีน *nisA* ดังแสดงในกรอบสี่เหลี่ยม ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีการขีดเส้นใต้ คือ ไพรเมอร์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีเครื่องหมายดอกจัน คือ stop codon 87

4.15 ลำดับกรดอะมิโนของยีน nisin F และการเปรียบเทียบความแตกต่างลำดับกรดอะมิโนของยีน nisin A, Z, Q และ F 88

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
ข1	แสดงค่าการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของไอโซเลท Sb2 ที่คัดแยกได้จาก ปลากะพง โดยใช้เชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T เป็นแบคทีเรียทดสอบ..............................	105
ข2	การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลท Sb2 โดยการย้อมสีแกรม....................	106
ข3	การจัดจำแนกชนิดของไอโซเลท Sb2 โดยศึกษากระบวนการหมักน้ำตาล โดยใช้ชุดจำแนกแบคทีเรียสำเร็จรูป API 50 CHL kit (bioMerieux)..................................	106
ข4	แสดงแผนที่ของพลาสมิดเวคเตอร์ pTZ57R/T (Fermentas Inc., U.S.A)	107

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

แบคทีเรียกรดแลกติก (lactic acid bacteria) เป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปตามธรรมชาติ มีบทบาทสำคัญในอาหารหมักชนิดต่างๆ เช่น นมเปรี้ยว โยเกิร์ต ซีอิ๊ว แหนม ไส้กรอก ผักดอง หรือสัตว์น้ำที่แปรรูปโดยผ่านกระบวนการหมักและดอง เช่น ปลาร้า แบคทีเรียกรดแลกติกสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญและทำลายจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเกิดการเน่าเสียและจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค ซึ่งปนเปื้อนมากับอาหารได้ นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแลกติกยังเป็นเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารของสัตว์และมนุษย์ สารที่แบคทีเรียกรดแลกติกสร้างออกมาส่วนใหญ่เป็นกรดแลกติก และกรดอะซิติก นอกจากนี้ยังมีสารชนิดอื่น ๆ ที่เกิดขึ้นในปริมาณน้อย แต่มีผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ได้ เช่น แบคเทอริโอซิน ซึ่งจัดเป็นโมเลกุลของโปรตีนโดยสามารถสร้างจากแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ แบคเทอริโอซินมีคุณสมบัติในการทำลายเฉพาะแบคทีเรียในสายพันธุ์ใกล้เคียงกัน ปัจจุบันแบคเทอริโอซินเป็นสารที่ได้มีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง โดยสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านอุตสาหกรรมอาหาร สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการถนอมอาหารด้วยวิธีการทางชีวภาพ (biopreservation) เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิดที่ปนเปื้อนมากับอาหาร ซึ่งเป็นวิธีการที่เลียนแบบมาจากการรักษาสมดุลของจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆในธรรมชาติ สำหรับในวงการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ แบคทีเรียกรดแลกติกได้มีการนำมาใช้นานแล้ว ในต่างประเทศนั้นได้มีการศึกษาความหลากหลายและประโยชน์ของชนิดแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ต่างๆมากมายและสามารถนำไปประยุกต์ใช้สำหรับเป็นโปรไบโอติกในสัตว์น้ำ โดยผสมกับอาหารที่ให้สัตว์น้ำกิน เพื่อปรับความสมดุลในระบบทางเดินอาหาร หรือเพื่อยับยั้งและทำลายสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคต่างๆในระบบทางเดินอาหาร แต่สำหรับการนำแบคเทอริโอซินมาใช้ในอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ พบว่ายังมีการศึกษาไม่แพร่หลายมากนัก ไม่ว่าจะเป็นในแง่ของสัตว์น้ำหรือผลิตภัณฑ์ของสัตว์น้ำ และเนื่องจากปลาเป็นสัตว์น้ำที่จัดเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งในประเทศไทย แต่บ่อยครั้งที่มักประสบปัญหาในเรื่องของการเจริญ เติบโตและโรคต่างๆ ซึ่งสาเหตุหนึ่งอาจมาจากระบบการย่อยในทางเดินอาหารของปลา ที่เป็นแหล่งรวมเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ มากมายโดยเชื้อจุลินทรีย์นั้นประกอบไปด้วยกลุ่มที่ก่อให้เกิดประโยชน์และกลุ่มที่ก่อให้เกิดโรค (pathogenic bacteria) ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้ จึงมุ่งเน้นในเรื่องของแบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินในระบบทางเดินอาหารของปลาได้ เพื่อศึกษาลักษณะคุณสมบัติของแบคเทอริโอซินที่สามารถคัดแยกได้ ซึ่งสามารถนำมาใช้ในอุตสาหกรรมสัตว์น้ำและอุตสาหกรรมอาหารต่อไปในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อคัดแยกและจำแนกแบคทีเรียกรดแลกติกที่สร้างสารแบคเทอริโอซินจากระบบทางเดินอาหารของปลาชนิดต่างๆ

2. เพื่อศึกษาคุณสมบัติของสารแบคเทอริโอซินที่คัดแยกได้

3. เพื่อศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลกติกที่สร้างสารแบคเทอริโอซิน

1.3 สถานที่ดำเนินงาน

1. ห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์เนื้อสัตว์ ภาควิชาเทคโนโลยีผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

2. ห้องปฏิบัติการโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร

1.4 สมมุติฐานของการศึกษา

แบคทีเรียกรดแลกติกสามารถพบได้ในระบบทางเดินอาหารของปลาชนิดต่างๆ โดยเป็นเชื้อจุลินทรีย์ประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารของปลา แบคทีเรียกรดแลกติกมีคุณสมบัติในการสร้างสารแบคเทอริโอซินซึ่งสามารถยับยั้งและทำลายเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ

1.5 ขอบเขตการวิจัย

ทำการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินจากระบบทางเดินอาหารของปลาชนิดต่างๆ และศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซิน รวมถึงศึกษาคุณสมบัติของสารแบคเทอริโอซิน

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบชนิดของแบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดแยกได้จากระบบทางเดินอาหารของปลาซึ่งสามารถสร้างสารแบคเทอริโอซิน

2. ทราบคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลกติกที่สร้างสารแบคเทอริโอซิน

3. ทราบคุณสมบัติของสารแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดแยกได้จากระบบทางเดินอาหารของปลา

4. สามารถนำสารแบคเทอริโอซินมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมสัตว์น้ำและอาหารต่อไปในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น

บทที่ 2
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แบคทีเรียกรดแลกติก

แบคทีเรียกรดแลกติก เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ที่มีลักษณะสำคัญคือ ไม่สร้างสปอร์ (nonsporing) ไม่เคลื่อนที่ รูปร่างเป็นแท่ง (rod) และกลม (cocci) จัดอยู่ในตระกูล Lactobacillaceae ในการเจริญส่วนใหญ่ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อย (microaerophile) บางชนิดเป็นพวกไม่ต้องการอากาศเลย (strictly anaerobe) เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่ได้พลังงานจากการหมักน้ำตาลโดยไม่ใช้ออกซิเจน จึงมีความต้องการสารอาหารที่ค่อนข้างซับซ้อนและสมบูรณ์ ส่วนใหญ่ต้องการสารอนินทรีย์ในปริมาณค่อนข้างสูง เช่น แมงกานีส แมกนีเซียม และ ฟอสฟอรัส (Axelsson. 2004) ในปัจจุบันมีการศึกษาและคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกจากแหล่งต่างๆมากมาย อาทิเช่น การศึกษาและคัดแยกจากนม ชีส โยเกิร์ต (Herreros *et al.* 2005) ระบบทางเดินอาหารของสัตว์ (Pilasombut *et al.* 2006) อาหารหมักดองพื้นบ้าน เช่น แหนม (Noonpakdee *et al.* 2003; Swetwiwathana. 2005) ขนมจีน (Swetwiwathana *et al.* 2009)

2.2 อนุกรมวิธานของแบคทีเรียกรดแลกติก

การศึกษาอนุกรมวิธานของแบคทีเรียกรดแลกติกนั้นอาศัยลักษณะทางกายภาพ สมบัติทางชีวเคมี ลักษณะสัณฐาน องค์ประกอบของผนังเซลล์ กรดไขมันภายในเซลล์ ไอโซพรีนอยด์ (isoprenoid) ควิโนน (quinone) รวมทั้งการศึกษาระดับโมเลกุล เช่น ปริมาณของ G และ C (mol % G+C) ของดีเอ็นเอ การเข้าคู่กันของดีเอ็นเอ และลำดับเบสบน rRNA ทำให้พบลักษณะที่แตกต่างกันของแบคทีเรียแต่ละสกุล (นงลักษณ์ สุวรรณพินิช และปรีชา สุวรรณพินิช. 2544) แบคทีเรียกรดแลกติก (Lactic acid bacteria) แบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่ม homofermentative และกลุ่ม heterofermentative โดยกลุ่มแรกสามารถสร้างกรดแลกติกจากน้ำตาลกลูโคส หรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 ตัวอื่นๆ ได้กรดแลกติกประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ ที่เหลือจะเปลี่ยนไปเป็นกรดอะซิติกจากน้ำตาลกลูโคส หรือน้ำตาลที่มีคาร์บอนไดออกไซด์อีกเล็กน้อย ส่วนแบคทีเรียกลุ่มหลังสามารถผลิตกรดแลกติกจากน้ำตาลกลูโคส หรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 ตัว ได้กรดแลกติกประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ได้กรดอะซิติกรวมทั้งเอทานอล 20-25 เปอร์เซ็นต์ และคาร์บอนไดออกไซด์ 20-25 เปอร์เซ็นต์ ปัจจุบันสามารถจำแนกแบคทีเรียกรดแลกติกออกได้เป็น 12 สกุล ได้แก่ *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Aerococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Carnobacterium*, *Weissella* และ *Lactobacillus* (Axelsson. 2004)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1 *Streptococcus*

เป็นแบคทีเรียรูปร่างกลมหรือรูปไข่ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8-1.2 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นคู่หรือโซ่ ต้องการสารอาหารหลายชนิด เจริญที่อุณหภูมิ 20-40 องศาเซลเซียส ประกอบด้วย 39 สปีชีส์ มีความสำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น มีการนำ *S. thermophilus* มาใช้ในการผลิตโยเกิร์ตและชีส (Hardie and Whiley. 1995)

2.2.2 *Lactococcus*

เดิมอยู่ในสกุล *Streptococcus* กลุ่ม N มีรูปร่างเป็นรูปไข่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว คู่ หรือต่อกันเป็นสายโซ่ ไม่เคลื่อนที่ เจริญที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มี mol % G+C 34-43 ประกอบด้วย 5 สปีชีส์ (Teuber.1995) มีความสำคัญในอุตสาหกรรม เช่น มีการใช้ *Lactococcus lactis* ในผลิตภัณฑ์จำพวกนม (Axelsson. 2004)

2.2.3 *Vagococcus*

เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ที่แยกมาจาก *Streptococcus* กลุ่ม N เดิมเนื่องจากสามารถเคลื่อนที่ได้ ประกอบด้วย 2 สปีชีส์ คือ *V. fluvialis* และ *V. salmoninarum* ซึ่งแยกได้จากปลาแซลมอนที่เป็นโรค (Stiles and Holzapfel. 1997)

2.2.4 *Enterococcus*

เปลี่ยนชื่อมาจาก *Streptococcus* มีรูปร่างกลม จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวหรือสายโซ่สั้นๆ สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส ระดับความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 9.6 โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 6.5 เปอร์เซ็นต์ และน้ำดีความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ มีลำดับเบสบน 16S rRNA ใกล้เคียงกับ *Carnobacterium* และ *Vagobacterium* มากกว่า *Streptococcus* และ *Lactococcus* มี mol % G+C 37-40 ประกอบด้วย 20 สปีชีส์ (Axelsson. 2004)

2.2.5 *Pediococcus*

มีรูปร่างกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.36 –1.43 ไมครอน มีการแบ่งตัวในลักษณะ 2 ทิศทางบนระนาบเดียวกันทำให้เกิดการเรียงตัวเป็นคู่หรือสี่เซลล์ติดกัน มี mol % G+C 34-44 ประกอบด้วย 6 สปีชีส์ (Stiles and Holzapfel. 1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.6 *Tetragenococcus*

เปลี่ยนมาจาก *Pediococcus halophilus* เดิมมีรูปร่างกลม การแบ่งตัวเหมือนกับ *Pediococcus* และมีลำดับเบสบน 16S rRNA แตกต่างจาก *Pediococci* ต้องการโซเดียมคลอไรด์ในการเจริญถึง 18 เปอร์เซ็นต์ (Stiles and Holzapfel. 1997) ประกอบด้วย 2 สปีชีส์ มีความสำคัญในอุตสาหกรรมการหมักอาหารดองเค็ม ซอสถั่วเหลือง เป็นต้น (Axelsson. 2004)

2.2.7 *Aerococcus*

มีรูปร่างกลม การแบ่งตัวเหมือนกับ *Pediococcus* มีปริมาณ mol % G+C ต่ำ ประกอบด้วย 2 สปีชีส์คือ *Aerococcus viridans* และ *A. urinae* ซึ่งเปลี่ยนมาจาก *P. homari* และ *P. urinae* ตามลำดับ (Stiles and Holzapfel. 1997)

2.2.8 *Leuconostoc*

มีรูปร่างกลม จัดเรียงตัวเป็นคู่หรือเดี่ยว หมักน้ำตาลกลูโคสแบบ heterofermentative ได้ผลิตภัณฑ์คือ D-lactic acid ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และสารหอมระเหย เช่น กรดอะซิติก เมทานอล แต่ไม่ผลิตแอมโมเนียจากอาร์จินิน ประกอบด้วย 8 สปีชีส์ (Axelsson. 2004)

2.2.9 *Oenococcus*

มีรูปร่างกลม เปลี่ยนมาจาก *L. oeos* เดิม เนื่องจากมีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างจาก *Leuconostoc* สามารถทนต่อแอลกอฮอล์และกรดได้ดีกว่า รวมทั้งข้อมูลพันธุกรรมจากดีเอ็นเอ : ดีเอ็นเอไฮบริดไดเซชั่น และลำดับเบสของ 16S rRNA ต่างจากสปีชีส์อื่นในสกุล *Leuconostoc* อย่างเห็นได้ชัด (Dellaglio *et al.* 1995)

2.2.10 *Lactobacillus*

เป็นแบคทีเรียกรดแลกติกกลุ่มใหญ่ที่สุด มีความหลากหลายของลักษณะฟีโนไทป์ชีวเคมี และสรีระวิทยา เนื่องจากมีความแตกต่างของ mol % G+C ภายในสกุลสูงระหว่าง 32-53เปอร์เซ็นต์ เซลล์มีรูปร่างท่อนหรือทรงรี (coccobacilli) ทนต่อกรด และต้องการสารอาหารหลายชนิด ประกอบด้วย 55 สปีชีส์ บางสายพันธุ์สามารถผลิตคะตะเลสเทียม (pseudo-catalase) พบบริเวณลำไส้เล็กของสัตว์มีกระดูกสันหลังและพืช ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกสำหรับมนุษย์และสัตว์ (Axelsson. 2004)

เอกสารนี้เป็นลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยฯ ใช้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.11 *Carnobacterium*

เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างแท่งคล้าย *Lactobacilli* แต่ต่างกันที่ไม่สามารถเจริญบนอาหารอะซีเตต เจริญที่ระดับความเป็นกรดเบส 8.5-9.0 จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวหรือคู่ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-0.7 ไมครอน และยาว 1.0-3.0 ไมครอน ประกอบด้วย 6 สปีชีส์ (Schillinger *et al.* 1996)

2.2.12 *Weissella*

เป็นแบคทีเรียกรดแลกติกสกุลเดียวที่มีทั้งสปีชีส์ที่มีรูปร่างกลม และแท่ง ประกอบด้วย 7 สปีชีส์ ซึ่งเดิมอยู่ในสกุล *Leuconostoc* และ *Lactobacillus* คือ *Weissella paramesenteroides* (*Leuc. paramesenteroides*), *W. confusus* (*Lb. confusus*), *W. halotolerans* (*Lb. halotolerans*), *W. kandleri* (*Lb. kandleri*), *W. minor* (*Lb. minor*), *W. viridescens* (*Lb. viridescens*) และสปีชีส์ใหม่ที่แยกจากไส้กรอกเปรี้ยว คือ *W. hellenica* (Stiles and Holzapfel. 1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 ลักษณะความแตกต่างของแบคทีเรียกรดแลกติก

ลักษณะ	รูปร่างแท่ง		รูปร่างกลม							
	Carnobacterium	*Lacto bacillus*	*Aerococcus*	*Enterococcus*	*Lactococcus, Vagococcus.*	*Leuconostoc, Oenococcus*	*Pediococcus*	*Streptococcus.*	*Tetragenococcus*	*Weissella*
เซลล์ต่อกันเป็น 4 เซลล์	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
ผลิต CO_2 จากกลูโคส[b]	-	±	-	-	-	+	-	-	-	+
เจริญที่อุณหภูมิ 10°C	+	±	+	+	+	+	±	-	+	+
เจริญที่อุณหภูมิ 45°C	-	±	-	+	-	-	±	±	-	-
เจริญใน 6.5%NaCl	ND[d]	±	+	+	-	±	±	-	+	±
เจริญใน18%NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
เจริญที่ pH 4.4	ND	±	-	+	±	±	+	-	-	±
เจริญที่ pH 9.6	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
ชนิดของกรดแลกติก[c]	L	D,L, DL[f]	L	L	L	D	L, DL[f]	L	L	D, DL[f]

หมายเหตุ +, ใช่ ; -, ไม่ใช่ ; ±, ผลขึ้นกับสปีชีส์ ; ND, ไม่ระบุ

[a]*Weissella* บางสายพันธุ์มีรูปร่างเป็นท่อน

[b]+, homofermentative; -, heterofermentative

[c]อาจผลิตคาร์บอนไดออกไซด์ปริมาณเล็กน้อย ขึ้นอยู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อ

[d]ไม่มีการระบุถึงการเจริญในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น8 เปอร์เซ็นต์

[e]ชนิดของกรดแลกติกจากการหมักกลูโคส

[f]ชนิดของกรดแลกติกแตกต่างกันตามสปีชีส์

D, ไอโซเมอร์ของกรดแลกติกซึ่งบ่งบอกถึงการหมุน ระนาบแสงซ้าย

L, ไอโซเมอร์ของกรดแลกติกซึ่งบ่งบอกถึงการหมุน ระนาบแสงขวา

DL, ไอโซเมอร์ของกรดแลกติกซึ่งบ่งบอกถึงการหมุน 2 ทิศทางบนระนาบเดียวกัน

ที่มา : ดัดแปลงจาก Axelsson (2004)

เอกสารนี้ใช้... เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลกติก

แบคทีเรียกรดแลกติกนอกจากจะมีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดกลิ่นเฉพาะตัวในอาหารหมักแล้ว ยังสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญ และทำลายจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเกิดการเน่าเสียและจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค ซึ่งปนเปื้อนมากับอาหาร เช่น *Bacillus cereus, Clostridium botulinum, C. perfringens, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes* เป็นต้น ซึ่งสารที่แบคทีเรียกรดแลกติกสร้างออกมาส่วนใหญ่เป็นกรดแลกติกและกรดอะซิติก นอกจากนี้ยังมีสารชนิดอื่นๆ ที่เกิดขึ้นในปริมาณน้อย แต่มีผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดต่างๆ เช่นกัน ได้แก่ กรดฟอร์มิก กรดไขมันอิสระ แอมโมเนีย เอทานอล ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดอะซีทิล อะซีโตอินอะซีทัลดีไฮด์ เบนโซเอต เอนไซม์ที่มีผลทำให้เซลล์แบคทีเรียแตก และแบคเทอริโอซิน รวมทั้งสารยับยั้งที่ยังไม่สามารถจัดจำแนกได้อีกหลายชนิด (Franz *et al.* 1998)

แบคทีเรียกรดแลกติกสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มต่างๆได้ (Caplice and Fitzgerald. 1999) สารต่างๆที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีการศึกษากันมาก ได้แก่

2.3.1 กรดอินทรีย์ (Organic acid)

กรดอินทรีย์ที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลกติกได้แก่ กรดแลกติก และกรดอะซิติก สำหรับกรดอะซิติกสามารถยับยั้งได้ดีกว่ากรดแลกติกและมีช่วงการยับยั้งที่กว้าง สามารถยับยั้งได้ทั้งยีสต์ รา และแบคทีเรีย การใช้กรดทั้งสองชนิดนี้ร่วมกันสามารถลดอัตราการเจริญของทั้ง *Salmonella* Typhimurium ได้มากกว่าการใช้กรดชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงอย่างเดียว จึงกล่าวได้ว่ากรดทั้งสองมี synergistic activity เมื่อกรดอินทรีย์เข้าไปภายในเซลล์แล้วกรดจะแตกตัวปล่อยโปรตอนเข้าไปใน cytoplasm ทำให้เกิดภาวะที่เป็นกรดจึงทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ (Bojana and Irena. 1998)

2.3.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide; H_2O_2)

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นสารที่ได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึมในระหว่างการเจริญของแบคทีเรียทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีอากาศ สามารถพบได้ในแบคทีเรียกรดแลกติกเนื่องจากไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นพิษต่อจุลินทรีย์ ที่ไม่สามารถผลิตเอนไซม์คะตะเลสมาทำลายฤทธิ์ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เนื่องจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นของการเกิด superoxide radicals (O^{-2}) และ hydroxyl radicals (OH^{-}) ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ เมื่อความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สะสมเป็นจำนวนมาก ก็จะมีฤทธิ์ในการทำลายเซลล์ของจุลินทรีย์อื่นๆ ตลอดจนแบคทีเรียกรดแลกติกกลุ่มรูปร่างกลม และรูปท่อน (Caplice and Fitzgerald. 1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.3 คาร์บอนไดออกไซด์ (Carbon dioxide; CO_2)

Caplice and Fitzgerald (1999) รายงานว่า คาร์บอนไดออกไซด์จะเกิดจากกระบวนการหมักน้ำตาลเฮกโซสให้เป็นกรดแลกติกแบบ heterofermentative นอกจากนี้ King and Nagel (1975) กล่าวว่า วิถีเมตาบอลิซึมอื่นๆ ก็สามารถสร้างคาร์บอนไดออกไซด์ได้ในระหว่างกระบวนการหมักคาร์บอนไดออกไซด์จะไปยับยั้งระบบเอนไซม์ของกระบวนการดีคาร์บอกซีเลชั่น (Decarboxylation) และมีการสะสมของคาร์บอนไดออกไซด์ในชั้นไขมัน จึงเป็นเหตุให้คุณสมบัติในการซึมผ่านของสารเสียไป คาร์บอนไดออกไซด์ที่ความเข้มข้นสูงๆ สามารถป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์บางชนิดได้

การใช้คาร์บอนในแบคทีเรียจะแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม autotrophs และกลุ่ม heterotrophs โดยในกลุ่ม autotrophs แหล่งที่มาของคาร์บอน คือ คาร์บอนไดออกไซด์ สามารถทำ carbon dioxide fixation ได้ ซึ่ง autotrophs ต่างชนิดกัน จะมีวิธีการนำคาร์บอนไปใช้ด้วยวิธีต่างกัน ที่มีการศึกษาและเข้าใจถึงระบบอย่างดีมี 2 วิถี คือ Calvin cycle และ reductive TCA cycle ส่วนการใช้คาร์บอนในกลุ่ม heterotrophs แหล่งที่มาของคาร์บอนมีมากมาย ส่วนใหญ่แล้วจะใช้กลูโคสได้ โดยการที่จะนำไปใช้ตามวิถีใดนั้น จะขึ้นอยู่กับเอนไซม์ที่มีอยู่ในแบคทีเรียนั้นๆ แบคทีเรียส่วนใหญ่จะนำกลูโคสเข้าสู่ Embden-Meyerhof-Parnas หรือ EMP pathway แล้วต่อด้วย TCA cycle แต่ในบางชนิด จะนำกลูโคสไปใช้โดยผ่านกระบวนการ extracytoplasmic oxidation ซึ่งวิถีนี้จะให้พลังงานและสารประกอบที่จะเป็นสารตั้งต้นเพื่อการผลิตส่วนประกอบและโครงสร้างเซลล์ต่อไป (เสาวนีย์ ธรรมสถิติ. 2547)

2.3.4 ไดอะซิทิล (Diacetyl)

Caplice and Fitzgerald (1999) กล่าวว่า ไดอะซิทิลชนิด 2,3-butanedione เป็นผลผลิตสุดท้ายที่ได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียกรดแลกติก ซึ่งสังเคราะห์ขึ้นจากไพรูเวตที่เป็นสารตัวกลาง (intermediate) แบคทีเรียกรดแลกติกทั้ง *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* และ *Streptococcus* สามารถสังเคราะห์ไดอะซิทิลได้ ซึ่งเป็นสารที่ให้กลิ่นเฉพาะในผลิตภัณฑ์นมหมัก และมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ด้วย โดยจะมีการสร้างสารไดอะซิทิลขึ้นในระหว่างการใช้น้ำตาลเฮกโซส (hexose) และบางครั้งอาจเกิดขึ้นจากการใช้ซิเตรต (citrate) โดยซิเตรตจะถูกเปลี่ยนผ่านไพรูเวต ไปเป็นสารไดอะซิทิล และอาจอยู่ในรูปรีดิวซ์คือ อะซิโตอิน (acetoin) Krier *et al.* (1998) รายงานว่า ไดอะซิทิลและแบคเทอริโอซินเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ประเภทโปรตีน หรือ โปรตีนเชิงซ้อน (protein complex) ซึ่งสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร (food-borne pathogen) เช่น *L. monocytogenes*, *C. perfringen*, *B. cereus* และ *S. aureus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.5 ริวเทอรีน (Reuterine)

ริวเทอรีนมีชื่อทางเคมีว่า 3-hydroxypropanol ละลายน้ำได้ดีที่ค่าความเป็นกรดและด่างเป็นกลาง (Axelsson *et al.* 2004) ริวเทอรีนถูกผลิตขึ้นในระยะ stationary phase ของ *Lc. reuteri* ซึ่งมีการเจริญเติบโตแบบไม่อาศัยอากาศ (anaerobic) สร้างจากกลูโคสและกลีเซอรอลหรือกลีเซอรอลดีไฮด์ สามารถยับยั้งกิจกรรมไรโบนิวคลีโอไทด์รีดักเตส (ribonucleotide reductase) เป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการต่อต้านไวรัส ฟังไจและโปรโตซัว (Caplice and Fitzgerald. 1999)

2.3.6 แบคเทอริโอซิน (Bacteriocin)

แบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบสามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้ และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและการถนอมอาหาร แบคเทอริโอซินจะมีขนาดเล็ก ทนต่อความร้อน (Rodríguez *et al.* 2003) ในระยะเริ่มต้นได้มีการศึกษาตัวอย่างของแบคทีเรียแกรมลบที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้ คือ *E. coli* ซึ่งสามารถผลิตสารในกลุ่มโปรตีนออกมายับยั้งการเจริญของ *E. coli* ได้ และเรียกสารดังกล่าวว่า colicins ต่อมามีการค้นพบสารที่มีลักษณะคล้าย colicin ซึ่งสร้างโดยแบคทีเรียแกรมบวกจึงเรียกสารกลุ่มนี้ว่าแบคเทอริโอซิน (bacteriocin) (Riley and Wertz. 2002)

Muyanja *et al.* (2002) กล่าวว่า แบคเทอริโอซินเป็นสารโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียหลายชนิดรวมทั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร โมเลกุลของแบคเทอริโอซินประกอบด้วย กรดอะมิโนหลายร้อยตัวต่อกันแบบ linear chain เนื่องจากไม่มีพันธะไฮโดรเจนและ disulphide bridges (-s-s-) สารแบคเทอริโอซินที่สร้างจากเชื้อต่างชนิดกันจะมีโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกัน และสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้แตกต่างกัน De Vuyst and Vandamme (1994) รายงานว่า แบคเทอริโอซินเป็นโปรตีนที่สร้างจากแบคทีเรียโดยสังเคราะห์จากไรโบโซม ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนการลอกแบบ (transcription) และการแปลรหัส (translation) จากยีนที่ควบคุมการสร้างแบคเทอริโอซิน โดยยีนที่ควบคุมการสร้าง แบคเทอริโอซินบางชนิดอยู่บนโครโมโซม เช่น nisin, lactocin, helveticin J, lactacin B และ F หรืออยู่บนพลาสมิด เช่น diplococcin, lacticin 481, lactococcins, pediocins, sakacin A และ lactocin B คุณสมบัติของแบคเทอริโอซิน จะพิจารณาจากขนาด ความคงตัว ตำแหน่งทางพันธุกรรมการดัดแปลง หลังผ่านกระบวนการแปลรหัสทางพันธุกรรม (Post-translation modification)

2.3.6.1 การจัดแบ่งประเภทของแบคเทอริโอซิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Klaenhammer (1993) ได้แบ่งประเภทของแบคเทอริโอซิน โดยพิจารณาจากชนิดของกรดอะมิโน มวลโมเลกุล (MW) โครงสร้างพื้นฐานและพันธะต่างๆ ภายในโมเลกุล รวมถึงคุณสมบัติด้านอื่นๆ เช่น คุณสมบัติในการทนความร้อน ทำให้สามารถจัดแบ่งแบคเทอริโอซิน

ที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลกติกออกได้เป็น 4 กลุ่ม คือ

กลุ่ม I: Lantibiotic เป็นแบคเทอริโอซินที่มีสายเพปไทด์ขนาดเล็ก ประกอบด้วยจำนวนกรดอะมิโน 19-38 โมเลกุล มวลโมเลกุลน้อยกว่า 5,000 ดาลตัน แบคเทอริโอซินกลุ่มนี้มีคุณสมบัติในการทนต่อความร้อน ซึ่งภายในสายเพปไทด์แต่ละสายจะมีโครงสร้างลักษณะเป็นวงแหวนย่อย ๆ ที่เกิดจากการสร้าง thioether bridge ระหว่าง sulphydryl group ของกรดอะมิโนซีสเทอีนกับกรดอะมิโน didehydroalanine ที่มีชื่อเรียกว่า lanthionine หรือกรดอะมิโนซีสเทอีนกับกรดอะมิโน didehydrobutyrine ที่มีชื่อเรียกว่า β-methyl lanthionine

กลุ่ม II: Non Lantibiotic เป็นแบคเทอริโอซินที่มีขนาดเล็ก โดยประกอบด้วยกรดอะมิโน 20-60 โมเลกุล เป็นแบคเทอริโอซินชนิดที่ทนความร้อนได้ดี และสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเป้าหมายได้น้อยชนิด (narrow spectrum) เมื่อเปรียบเทียบกับแบคเทอริโอซินในกลุ่ม lantibiotic โดยจะสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกที่มีปริมาณของเบส G+C ต่ำ เช่น *Listeria* และ *Clostridium* ได้ดี ซึ่งสามารถแบ่งแบคเทอริโอซินกลุ่มนี้ออกได้เป็น 3 กลุ่มย่อย ได้แก่

IIa. กลุ่มแบคเทอริโอซินที่สามารถทำลาย *Listeria* sp. ได้ดี ซึ่งในบางครั้งถูกเรียกว่ากลุ่ม pediocin-like bacteriocins โดยพบว่าในขั้นตอนแรกแบคเทอริโอซินกลุ่มนี้จะถูกสร้างขึ้นมาในลักษณะที่เป็นสายเพปไทด์ตั้งต้น (precursor peptide) ที่ยังไม่สามารถทำลายเซลล์เป้าหมายได้ แต่หลังจากนั้นจะถูกเปลี่ยนแปลง โดยการตัดสายเพปไทด์ในตำแหน่งที่มีกรดอะมิโนไกลซีน 2 โมเลกุลติดกัน ได้เป็นสายเพปไทด์ที่สมบูรณ์และมีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์เป้าหมาย นอกจากนี้ที่ปลาย N ในสายเพปไทด์ของแบคเทอริโอซินแต่ละชนิดในกลุ่มนี้จะมีลำดับของกรดอะมิโนที่เป็นลักษณะจำเพาะเหมือนกัน (conserved N-terminal sequence) ได้แก่ Try-Gly-Asn-Gly-Val และมีการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ระหว่างกรดอะมิโนซีสเทอีน 2 โมเลกุลที่อยู่ค่อนมาทางปลาย N ของสายเพปไทด์ ซึ่ง Abee (1995) ได้ยกตัวอย่างของแบคเทอริโอซินในกลุ่มนี้ เช่น *pediococcus acidilactici* ซึ่งเป็น pediocin PA-1

IIb. กลุ่มแบคเทอริโอซินที่ประกอบด้วยสายเพปไทด์ 2 สายที่แตกต่างกัน (two-peptide bacteriocin) Klaenhammer (1993) กล่าวว่า สายเพปไทด์อาจแสดงกิจกรรมในการยับยั้งแบคทีเรียเป้าหมายเพียงเส้นใดเส้นหนึ่ง หรือทั้งสองเส้น แต่ในการยับยั้งเซลล์เป้าหมายจะมีประสิทธิภาพสูงสุดต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของสายเพปไทด์ทั้งสองเส้น ซึ่ง Flynn *et al.* (2002) ได้ยกตัวอย่างของแบคเทอริโอซินในกลุ่มนี้ เช่น Abp 118α และ β ที่สร้างจาก *Lb. salivarius* UCC 118

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

IIc. แบคเทอริโอซินขนาดเล็กที่ไม่ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม IIa และ IIb เป็นการทำงานระหว่างเพปไทป์สองสายขึ้นไป หรือเป็นวง (cyclic peptides) Klaenhammer (1993) ได้ยกตัวอย่างของแบคเทอริโอซินในกลุ่มนี้ เช่น Enterocin AS-48 และ Gassericin A แบคเทอริโอซิน

ในกลุ่ม IIc สามารถแบ่งเป็นสองกลุ่ม โดยกลุ่มแรกเป็นแบคเทอริโอซินที่มีกรดอะมิโน cysteine หนึ่ง (thiolbiotics) หรือสองตัว (cystibiotics) เป็นองค์ประกอบ ส่วนกลุ่มที่สองไม่มีกรดอะมิโน cysteine เป็นองค์ประกอบ ได้แก่ lactococcin A และ acidocin B

กลุ่ม III: Non Lantibiotic เป็นแบคเทอริโอซินที่มีขนาดของโมเลกุลใหญ่กว่า 15,000 ดาลตัน และเป็นชนิดที่มีคุณสมบัติไม่ทนต่อความร้อน

กลุ่ม IV: เป็นกลุ่มที่รวมตัวเป็นสารประกอบเชิงซ้อนขนาดใหญ่กับสารอื่นๆ เช่น ไขมันหรือคาร์โบไฮเดรต (Klaenhammer. 1993)

ตารางที่ 2.2 การจำแนกชนิดของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลกติก

class	Subclass	ลักษณะ
I		จัดเป็น Lantibiotic-มีขนาดเล็ก ทนความร้อน มีกรดอะมิโนชนิดผิดปกติรวมอยู่
II		มีขนาดเล็ก (มีกรดอะมิโน 30-100 ตัว) ทนความร้อน จัดเป็น non-Lantibiotic
	IIa	เหมือนแบคเทอริโอซินชนิด pediocin มีผลยับยั้งต่อ listeria
	IIb	เป็นแบคเทอริโอซินสองเปปไทด์
	IIc	ขึ้นอยู่กับการขับออกของแบคเทอริโอซิน
III		มีขนาดใหญ่ (>30kDa) เป็นโปรตีนที่ทนต่อความร้อนที่เปลี่ยนแปลงได้เสมอ
IV		เป็นแบคเทอริโอซินที่ประกอบด้วย glycol- และ/หรือ lipidmoieties

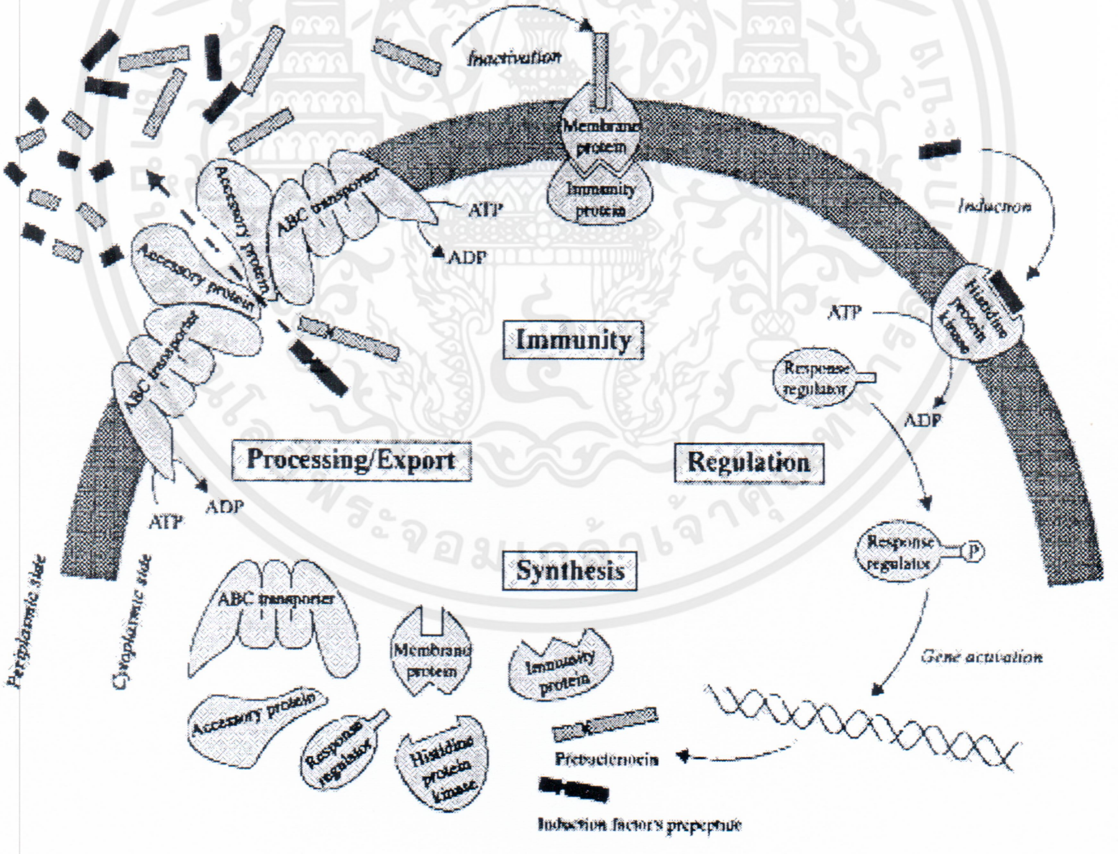
ที่มา : ดัดแปลงจาก Caplice and Fitzgerald (1999)

2.3.6.2 กระบวนการผลิตแบคเทอริโอซิน

กระบวนการผลิตแบคเทอริโอซินจะถูกควบคุมโดยยีนที่อยู่บนโครโมโซมหรือบนพลาสมิด ซึ่งยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์แบคเทอริโอซินนี้ประกอบด้วยยีนโครงสร้าง (structural gene) และยีนภูมิคุ้มกัน (immunity gene) โดยส่วนใหญ่จะอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม (cluster) และยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิต การขนส่งแบคเทอริโอซินออกนอกเซลล์ประกอบด้วย ยีนสำหรับผลิตเปปไทด์ที่ยังไม่พร้อมทำงาน ยีนสำหรับโปรตีนภูมิคุ้มกัน ยีนสำหรับขนส่งโปรตีน และยีนสำหรับโปรตีนที่ช่วยในการจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ (Ennahar *et al.* 2000) กระบวนการผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น รวมทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคเทอริโอซินเกิดจากการทำงานร่วมกันของ histidine protein kinase (HPK), response regulator (RR) และ induction factor's prepeptide (IF) แบคเทอริโอซินถูกสังเคราะห์บนไรโบโซมในรูปของเพปไทด์ที่ยังไม่พร้อมทำงาน และจะถูกแยกส่วน N-terminal leader ออกโดยผ่านการดัดแปลงหลังกระบวนการแปลรหัส (post-translational modification) ซึ่งทำให้เพปไทด์อยู่ในสภาพพร้อมทำงาน ส่วน N-terminal leader ของแบคเทอริโอซินอาจมีลักษณะเป็น double glycine leader peptide หรือ signal peptide (Worobo *et al.* 1995) แบคเทอริโอซินจะถูกสังเคราะห์จากไรโบโซม (ribosome) ต่อจากนั้นก็จะรวมตัวกับ immunity protein ในอัตราส่วน 1 : 1 เกิดเป็นโมเลกุลของสารประกอบเชิงซ้อน ซึ่งจะผ่านเนื้อเยื่อชั้นใน (innermembrane) และสะสมอยู่ในบริเวณช่องว่าง periplasmic ของไซโตพลาสซึมและแผ่ขยายไปถึงบริเวณผิวหน้าของแบคทีเรีย ซึ่งที่บริเวณผิวหน้าของแบคทีเรียนี้ สารประกอบเชิงซ้อนจะจับกับ polysaccharides หรือ O-antigen ของเยื่อหุ้มชั้นนอก และจะทำให้เกิดแบคเทอริโอซินหยาบ (crude bacteriocin) และถูกขับออกสู่ภายนอกเซลล์ (Vincent *et al.* 2002) แสดงดังภาพที่ 2.1

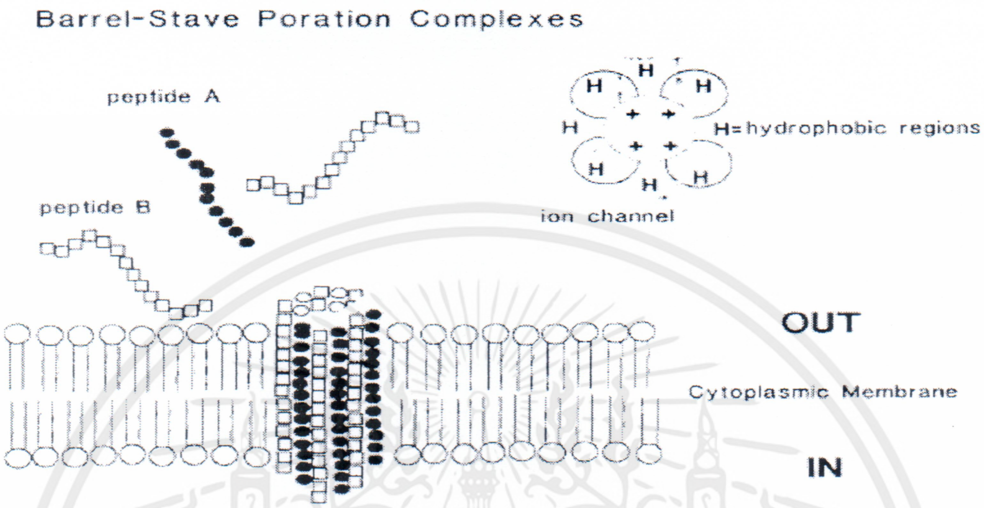


ภาพที่ 2.1 การสังเคราะห์แบคเทอริโอซิน class II (Ennahar *et al.* 2000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากร... สารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.6.3 กลไกในการทำลายเซลล์แบคทีเรียเป้าหมายของแบคเทอริโอซิน

การทำลายเซลล์เป้าหมายของแบคเทอริโอซิน เกิดจากการที่แบคเทอริโอซินแต่ละโมเลกุลมาอยู่ร่วมกันทำให้เกิดเป็นช่องว่างที่เยื่อหุ้มเซลล์เป้าหมาย ซึ่งจะมีลักษณะคล้ายชิ้นไม้ที่มาประกอบกันเป็นผนังด้านข้างของถังไม้ (barrel-stave) แสดงดังภาพที่ 2.2

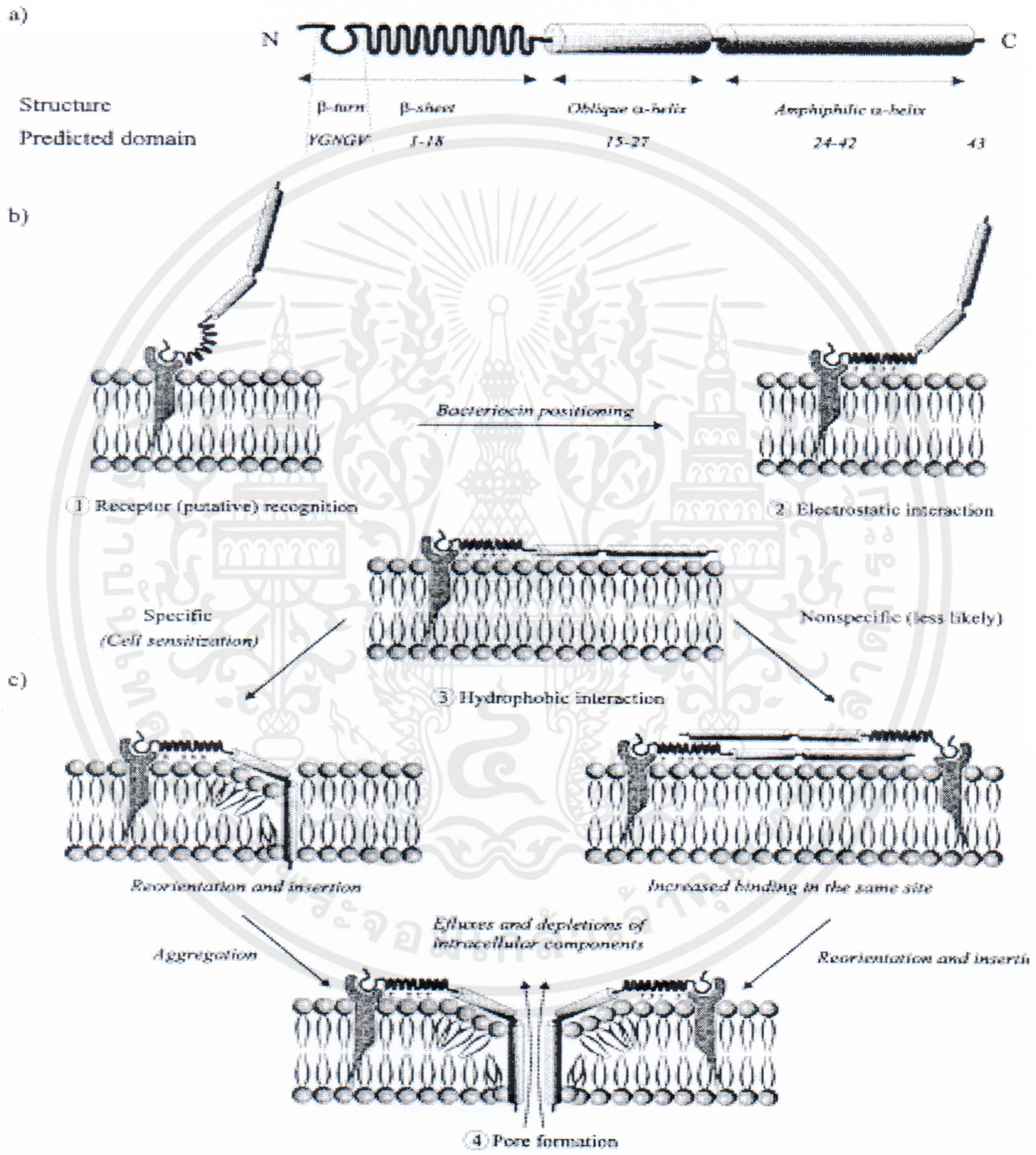


ภาพที่ 2.2 ช่องว่างที่เยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งเกิดจากโมเลกุลแบคเทอริโอซินรวมตัวกัน (Klaenhammer. 1993)

ช่องว่างดังกล่าวทำให้เกิดการเสียสมดุลของไอออน สูญเสียกรดอะมิโนและสารประกอบอนินทรีย์ในกลุ่มฟอสเฟต ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญในการสร้างพลังงานของเซลล์ ดังนั้นกลไกการออกฤทธิ์ของแบคเทอริโอซินจึงสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ขั้นตอน คือ ขั้นแรก แบคเทอริโอซินจะยึดจับกับผิวของเซลล์เป้าหมาย และขั้นต่อไป คือ แบคเทอริโอซินจะสร้างช่องว่างในชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์ (Ennahar *et al.* 1999) ซึ่งในกลุ่มของ lantibiotic แบคเทอริโอซินกลุ่มนี้ไม่ต้องการตำแหน่งจำเพาะสำหรับการดูดซับที่ผิวเซลล์ การออกฤทธิ์ต้องอาศัยพลังงานจากเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เป้าหมาย เพื่อทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดช่อง (Bruno and Montville. 1993) แบคเทอริโอซิน เช่น ไนซินซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินในกลุ่ม lantibiotic ที่สร้างจาก *Lc. lactis* subsp. *lactis* พบว่าเป็นสายเพปไทด์ที่มีประจุสุทธิเป็นบวกและมีขั้นตอนในการเข้าทำลายเซลล์เป้าหมาย คือ การเข้าจับกับเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมายทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกรบกวน ส่งผลให้เกิดการรั่วขององค์ประกอบภายในเซลล์ เช่น กรดอะมิโน สารให้พลังงาน และไอออนของสารที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเซลล์ออกมาสู่ภายนอกเซลล์ (Davidson and Hoover. 1993) ส่วนแบคเทอริโอซินในกลุ่มของ non lantibiotic จะเป็นกลุ่มที่ต้องการตำแหน่งที่มีความจำเพาะสำหรับการดูดซับที่ผิวเซลล์ และการออกฤทธิ์ไม่จำเป็นต้องใช้พลังงาน (Ennahar *et al.* 1999) นอกจากนี้ในแบคเทอริโอซิน class II ที่มีขนาดเล็ก และทนความร้อน พบว่า ในขั้นตอนแรกปลายด้าน N ของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โมเลกุลแบคเทอริโอซิน ซึ่งมีประจุบวกจะเข้าจับส่วนหัวของฟอสโฟลิปิดที่เยื่อหุ้มของแบคทีเรียเป้าหมาย ซึ่งมีประจุลบโดยจับเข้าคู่กัน (Abee. 1995) หลังจากนั้นปลายด้าน C ในโมเลกุลแบคเทอริโอซินซึ่งมีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) จะทำปฏิกิริยากับหมู่เอซิล (acyl group) ของไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดเป็นช่องว่างที่เยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดการสูญเสียความสมดุลของไอออนและสารประกอบฟอสเฟตภายในเซลล์ (Ennahar *et al*. 2000) แสดงดังภาพที่ 2.3



ภาพที่ 2.3 โครงสร้างของแบคเทอริโอซิน Class II และการเข้าจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เป้าหมาย (Ennahar *et al*. 2000)

a) โครงสร้างของแบคเทอริโอซิน

b) การเข้าจับกันของแบคเทอริโอซินกับผิวของเซลล์เป้าหมาย

c) การแทรกตัวของแบคเทอริโอซิน ทำให้เกิดช่องว่าง และเกิดการผ่านเข้าออกของน้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 แบคทีเรียกรดแลกติกที่พบในปลา

ในทศวรรษที่ผ่านมาแบคทีเรียกรดแลกติกได้เข้ามามีบทบาทสำคัญในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและการศึกษาเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค เช่น *Streptococcus iniae* หรือ *Lc. garvieae* เป็นต้น (Michel *et al.* 2007) แบคทีเรียกรดแลกติกพบได้ทั้งในสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์จากสัตว์น้ำ ในต่างประเทศนั้นได้มีการศึกษาความหลากหลายและประโยชน์ของชนิดแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ต่างๆ ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้สำหรับเป็นโปรไบโอติกในสัตว์น้ำได้ รวมถึงการศึกษาแบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถยับยั้งสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคต่างๆ ในปลา แต่สำหรับในปัจจุบันนั้น ยังมีผู้ศึกษาแบคทีเรียกรดแลกติกในระบบทางเดินอาหารของปลาไม่มากนัก เนื่องจากแนวโน้มการศึกษาส่วนใหญ่จะเน้นในเรื่องผลของโปรไบโอติกที่นำไปทดสอบกับสัตว์น้ำมากกว่า (Gatesoupe. 1999)

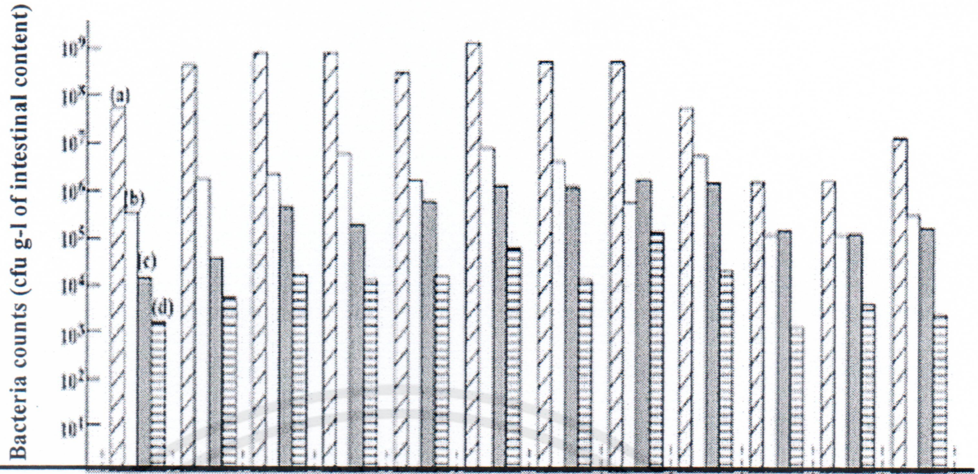
2.4.1 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อชนิดและจำนวนของแบคทีเรียกรดแลกติกในระบบทางเดินอาหารของปลา

2.4.1.1 ฤดูกาล

Horn *et al.* (2007) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับความแปรปรวนของฤดูกาลที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียกรดแลกติก พบว่าฤดูกาลจัดเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อชนิดและปริมาณของแบคทีเรียกรดแลกติก เนื่องจากฤดูกาลในแต่ละรอบปีจะมีช่วงอุณหภูมิที่แตกต่างกัน ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของระดับเมตาบอลิซึม ซึ่งจะส่งผลต่อการกินอาหารของปลา ในช่วงที่ปลามีระดับเมตาบอลิซึมสูง การกินอาหารของปลาก็จะเพิ่มมากขึ้น ทำให้ปริมาณของแบคทีเรียกรดแลกติกสูงตาม แต่ถ้าปลามีระดับเมตาบอลิซึมต่ำ การกินอาหารก็จะลดลง ทำให้ปริมาณของแบคทีเรียกรดแลกติกต่ำลงตามระดับเมตาบอลิซึม ชนิดของแบคทีเรียกรดแลกติกที่เคยเป็นสายพันธุ์ที่พบมาก จะมีจำนวนน้อยลง และอาจมีแบคทีเรียกรดแลกติกชนิดอื่นๆ ขึ้นมาเป็นสายพันธุ์ที่พบเป็นส่วนใหญ่แทนที่แบคทีเรียกรดแลกติกตัวเดิมได้ ซึ่งสอดคล้องกับ Hagi *et al.* (2004) ที่ได้ทำการศึกษาชนิดและความหลากหลายของแบคทีเรียกรดแลกติกจากลำไส้ปลาสายพันธุ์ต่างๆ ในแต่ละฤดูกาลของทะเลสาบ Kasumiguara พบว่า ฤดูกาลที่มีการเปลี่ยนแปลงในแต่ละช่วงรอบปีจะส่งผลต่อปริมาณของแบคทีเรียกรดแลกติก โดยจะพบ *Lc. lactis* ในเดือนกรกฎาคม ซึ่งเป็นช่วงฤดูร้อนที่มีอุณหภูมิสูงกว่า 20 องศาเซลเซียส ส่วน *Lc. raffinolatis* จะพบในเดือนธันวาคม ซึ่งเป็นช่วงฤดูหนาวที่มีอุณหภูมิระหว่าง 4 ถึง 10 องศาเซลเซียส ซึ่งแบคทีเรียกรดแลกติกทั้งสองสายพันธุ์นี้ ถูกค้นพบเป็นส่วนใหญ่ในช่วงฤดูร้อนและฤดูหนาวตามลำดับ ส่วนช่วงฤดูใบไม้ผลิและฤดูใบไม้ร่วงซึ่งมีอุณหภูมิระหว่าง 13 ถึง 17 องศาเซลเซียส พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงชนิดของแบคทีเรียกรดแลกติก เนื่องจากว่าเป็นช่วงคาบเกี่ยวระหว่างการเปลี่ยนเป็นฤดูหนาวและฤดูร้อน แสดงดังภาพที่ 2.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง



Water temp.(°c)	Apr (13.5)	May (16.9)	Jun (22.7)	Jul (22.9)	Aug (28.0)	Sep (23.3)	Oct (20.9)	Nov (15.0)	Dec (9.6)	Jan (3.9)	Feb (4.4)	Mar (7.0)
species	Number of isolates											
Lc. lactis	0	11 (5)	23 (8)	21(8)	22 (8)	19 (8)	22(7)	17(9)	0	0	0	0
Lc. raffinolactis	10 (7)	17 (3)	0	0	0	0	0	2	17(10)	10(9)	12(7)	13 (6)
E. pseudoavium	0	1	0	0	0	0	0 (3)	1	0	0	0	0
Lb. curvatus	0	1	0	0	0	2	0 (1)	0	0	0	0	0
Streptococcus sp.	11	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Carnobacterium sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	4 (2)
Lb. maltaromicus	2 (1)	0	0	0	0	0	0	0(2)	2	6 (2)	6	5 (2)

ภาพที่ 2.4 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงจำนวนและองค์ประกอบของแบคทีเรียกรดแลกติกในลำไส้ปลาคาร์พและน้ำในบ่อการทดลองในรอบปี (a) จำนวนสิ่งมีชีวิตทั้งหมดในลำไส้ (น้ำหนักของสิ่งที่อยู่ในไส้ทั้งหมด 1 กรัม) (b) จำนวนของแบคทีเรียกรดแลกติกในลำไส้ (c) จำนวนสิ่งมีชีวิตทั้งหมดในน้ำ (1 มิลลิลิตร) (d) จำนวนของแบคทีเรียกรดแลกติกในน้ำตัวอย่างอุณหภูมิเฉลี่ยของน้ำมากกว่า 10 วัน จำนวนในวงเล็บในตาราง คือ จำนวนของการจำแนกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่ได้จากบ่อน้ำในการทดลอง ได้แก่ *Lactococcus, Enterococcus* และ *Lactobacillus* (ดัดแปลงจาก Hagi *et al.* 2004)

การศึกษาดังกล่าวยังมีความสอดคล้องกับ Bucio *et al.* (2006) ที่ได้ทำการศึกษา lactobacilli ในลำไส้ของปลาน้ำจืดจากแม่น้ำและบ่อที่มีระบบหมุนเวียนน้ำ พบว่าการที่ฤดูกาลเปลี่ยนไปในแต่ละรอบปีนั้น ทำให้ปริมาณของแบคทีเรียกรดแลกติกในลำไส้ปลาน้ำจืดมีปริมาณที่ไม่เท่ากัน โดยปริมาณของแบคทีเรียกรดแลกติกที่พบในช่วงฤดูร้อน จะพบมากกว่าในช่วงฤดูหนาว ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากอุณหภูมิ อาหารและสภาพแวดล้อม แสดงดังตารางที่ 2.3

105534

ตารางที่ 2.3 วิเคราะห์แบคทีเรียกรดแลคติกในลำไส้ปลาจำนวน 4 ชนิดจาก silver carp, common carp, chanel catfish และ deep-bodied crucian carp

เดือน	ชนิดปลา	TVC[a]	LAB[b]	สายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดแยกได้ (จำนวนเชื้อที่ตรวจพบ)
กรกฎาคม	Silver carp	1.6×10^{8}	9.0×10^{5}	*Lc. lactis* (20)
(27 °C)	Common carp	1.9×10^{9}	3.3×10^{6}	*Lc. lactis* (26), *En. seriolicida* (4)
	Chanel catfish	3.3×10^{8}	4.8×10^{7}	*Lc. lactis* (20)
	Deep-bodied crucian carp	5.2×10^{8}	4.8×10^{7}	*Lc. lactis* (20)
ธันวาคม	Silver carp	7.2×10^{7}	5.2×10^{5}	*Lc. raffinolactis* (20)
(9.8 °C)	Common carp	5.0×10^{7}	8.0×10^{5}	*Lc. raffinolactis* (20)
	Channel catfish	1.8×10^{7}	3.9×10^{6}	*Lc. raffinolactis* (20)
	Deep-bodied crucian carp	1.3×10^{6}	4.4×10^{5}	*Lc. raffinolactis* (20), *Lb. curvatus* (1)

Lc= Lactococcus, *En= Enterococcus* และ *Lb= Lactobacillus*.

ค่าเฉลี่ยของอุณหภูมิน้ำจำนวน 10 วัน ก่อนเก็บตัวอย่างจากทะเลสาบ Kasumiguara

[a]TVC = จำนวนที่นับได้ทั้งหมด

[b]LAB = จำนวนของแบคทีเรียกรดแลกติก

ที่มา : ดัดแปลงจาก Hagi *et al.* (2004)

2.4.1.2 ชนิดของปลา

ได้มีการศึกษา lactobacilli ในลำไส้ของปลาน้ำจืดจากแม่น้ำและบ่อที่มีระบบหมุนเวียนน้ำ โดยทำการศึกษาชนิดของปลาที่เป็นปลากินพืช ปลากินเนื้อและปลาที่กินทั้งพืชและเนื้อ พบว่าในปลากินพืชและปลากินเนื้อจะมีแบคทีเรียกรดแลกติกที่เป็นสกุลเดียวกัน ส่วนในปลาที่กินทั้งพืชและเนื้อจะมีแบคทีเรียกรดแลกติกที่เป็นสายพันธุ์คนละชนิดกัน (Bucio *et al.* 2006) ปลาที่ฟักออกมาในระยะหนึ่ง จะชอบกินอาหารสด จำพวกสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กๆ ตามธรรมชาติ ซึ่งประกอบด้วยพวกจุลินทรีย์ แบคทีเรียที่ปนเปื้อนในอาหาร ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางด้านสรีระเนื่องจากการได้รับสารอาหารเข้าไป อีกทั้งยังก่อให้เกิดระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งในแบคทีเรียแกรมบวกที่ประกอบด้วยแบคทีเรียกรดแลกติกจะมีการเพิ่มจำนวนในทางเดินอาหารของปลาในช่วงระยะนี้จนถึงระยะตัวเต็มวัย (adult) ของปลา (Ringø and Gatesoupe. 1998)

2.4.1.3 แหล่งที่มา

ในการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกในปลาที่เลี้ยงตามธรรมชาติจะมีปริมาณมากกว่าปลาที่เลี้ยงในระบบหมุนเวียน หรือมีการเลี้ยงในบ่อปูน (Bucio *et al.* 2006) เนื่องจากน้ำตามธรรมชาตินั้น จะมีสิ่งมีชีวิตจำพวกจุลินทรีย์และแบคทีเรีย รวมถึงมีสารอาหารและสารอินทรีย์ที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิต ทำให้ปลาที่เลี้ยงในธรรมชาตินั้น สามารถรับสารอาหารต่างๆ ที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กๆ ภายในตัวปลาได้ ก่อให้เกิดระบบการแข่งขันขึ้น ส่วนน้ำที่ใช้เลี้ยงในระบบหมุนเวียนนั้น มักมีความสะอาด เนื่องจากผ่านการฆ่าเชื้อก่อน โดยการใช้รังสีอัลตร้าไวโอเลต (UV) หรือการผ่านโอโซน ทำให้สิ่งมีชีวิตขนาดเล็กไม่สามารถที่จะดำรงชีวิตอยู่ได้ อีกทั้งในระบบการเลี้ยง มักมีการให้ออกซิเจนในปริมาณที่มาก ส่งผลให้แบคทีเรียบางประเภทไม่สามารถที่จะเจริญเติบโตได้ รวมถึงน้ำที่ใช้ในระบบหมุนเวียนนั้น มักมีสารอาหารและสารอินทรีย์น้อยกว่าในธรรมชาติ จากสาเหตุดังกล่าว ทำให้พบปริมาณของแบคทีเรียกรดแลกติกน้อยลง หรือบางครั้งอาจไม่มีการพบเลย (Ringø and Gatesoupe. 1998)

2.4.1.4 ชนิดของอาหาร

ประเภทของอาหารที่ใช้เลี้ยงก็มีความสำคัญต่อปริมาณของแบคทีเรียกรดแลกติก หากมีการเปรียบเทียบกันระหว่างอาหารเม็ดกับอาหารสด พบว่า ในการเลี้ยงปลาด้วยอาหารเม็ดจะพบปริมาณของแบคทีเรียกรดแลกติกน้อยกว่าปลาชนิดที่เลี้ยงด้วยอาหารสด เนื่องจากในอาหารเม็ดนั้นจะมีความสะอาดมากกว่าอาหารสด เพราะส่วนหนึ่งผ่านกรรมวิธีในการฆ่าเชื้อแล้ว ทำให้ขาดองค์ประกอบสำหรับแบคทีเรียที่ใช้ในการย่อย (Bucio *et al.* 2006) การเลี้ยงปลาด้วยอาหารที่มีส่วนประกอบของกรดไขมันไม่อิ่มตัวโดยเฉพาะอย่างยิ่ง cellulolytic และ methangen จะก่อให้เกิดสารพิษต่อแบคทีเรีย เนื่องจากกรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิดดังกล่าวจะไปยับยั้งการเจริญเติบโต ทำให้ไม่พบแบคทีเรียกรดแลกติกในทางเดินอาหารของปลา ส่วนการเลี้ยงปลาด้วยอาหารที่มีกรดไขมันอิ่มตัวเป็นส่วนประกอบ พบว่ามีแบคทีเรียกรดแลกติกเกิดขึ้นและมีการเจริญเติบโตภายในระบบทางเดินอาหารของปลา (Ringø and Gatesoupe. 1998)

2.4.1.5 การแข่งขันการเจริญของจุลินทรีย์

สารอาหารที่ได้มาจากอาหารที่ใช้เลี้ยงปลา โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาหารที่มาจากธรรมชาตินั้น จะมีสิ่งมีชีวิตพวกจุลินทรีย์และแบคทีเรียทำการย่อยสารอาหาร (Bucio *et al.* 2006) ก่อให้เกิดการแข่งขันในระบบทางเดินอาหารตลอดเวลา ซึ่งขึ้นอยู่กับว่าจะมีสิ่งมีชีวิตชนิดใดมากกว่ากัน (Ringø and Gatesoupe. 1998)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวน ไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.1.6 โครมิคออกไซด์ (Chromic oxide : Cr_2O_3)

โครมิคออกไซด์ จะเป็นตัวบ่งชี้ความสามารถของการย่อยสารอาหารในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและปลา หากผสมโครมิคออกไซด์ในอาหารจะมีผลยับยั้งต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมลบ แต่ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตในแบคทีเรียกรดแลกติก ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Ringø. 2004)

2.4.1.7 ความเค็ม

ยังไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับระดับความเค็มที่ส่งผลกระทบต่อปริมาณของแบคทีเรียกรดแลกติก (Ringø and Gatesoupe. 1998)

2.4.1.8 ความเครียด

ความเครียดมีผลต่อปริมาณของแบคทีเรียกรดแลกติก กล่าวคือ หากปลาได้รับความเครียด แบคทีเรียกรดแลกติกที่อยู่ในทางเดินอาหารจะมีปริมาณลดลง เนื่องจากปลาจะหลั่งสาร cortisol steroid ทำให้ทางเดินอาหารขาดความสมดุลได้ (Ringø. 2004)

2.4.2 สายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีการค้นพบในปลา

Ringø (2004) รายงานว่าพบ *Carnobacteriu* เป็นครั้งแรกในลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ของปลา atlantic salmon และ atlantic cod ในระยะวัยรุ่น (juvenile) และระยะตัวเต็มวัย ซึ่งส่วนใหญ่ที่พบมักเป็น *C. divergens* ส่วนในกลุ่มของ *Lactobacilli* สามารถพบได้บนผิวและเหงือกในปลา atlantic cod (*Gadus morhua*) และกลุ่มของ *Aerococcus* สามารถคัดแยกได้จากปลา Atlantic salmon Axelsson *et al.* (2004) รายงานว่า ในการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกในสัตว์น้ำนั้น *Aerococcus* เป็นสายพันธุ์ที่หายากสายพันธุ์หนึ่ง ซึ่งสามารถพบ *Aerococcus* ในทางเดินอาหารของปลา

González *et al.* (2000) ได้ทำการศึกษาลักษณะและคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกจากปลาน้ำจืด สามารถแยกแบคทีเรียกรดแลกติกจำนวนทั้งหมด 249 strains แบ่งเป็นชนิดที่มีรูปร่างเป็นแท่ง ประมาณ 237 strains และเป็นชนิดที่มีรูปร่างกลมประมาณ 12 strains ชนิดของแบคทีเรียกรดแลกติกที่แยกได้ ได้แก่ *Lactobacillus* sp., *Carnobacterium* sp. และ *Enterococcus* sp. โดย *Lactobacillus* sp. สามารถคัดแยกได้จากผิวหนัง เหงือก และลำไส้ของปลา brown trout ส่วน *Carnobacterium* sp. สามารถคัดแยกได้จากผิวหนัง เหงือก และน้ำของปลา rainbow trout และ *Enterococcus* sp. สามารถคัดแยกได้จากเหงือกและน้ำของปลา pike

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ringø and Gatesoupe (1998) รายงานว่า พบกลุ่มของ *Streptococcus* ซึ่งแยกได้จากการเขี่ยเชื้อในกระเพาะอาหาร ลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ของปลาหลายๆ ชนิด เช่น ปลาไหลยุโรป

ปลาทองและปลาคาร์พ เป็นต้น และพบแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ที่เหมือนกับ *Leu. mesenteroides* อยู่ในกระเพาะ ลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ของปลา arctic charr

Campos *et al.* (2006) ได้ทำการศึกษาลักษณะของแบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินได้ โดยคัดแยกจากกล้ามเนื้อของปลา turbot (*Psetta maxima*) ซึ่งชนิดของแบคทีเรียกรดแลกติกที่แยกได้ ได้แก่ *Lc. lactis*, *E. faecium* และ *E. mundtii*

ตารางที่ 2.4 ชนิดของปลาและบริเวณระบบทางเดินอาหารที่สามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติก

แบคทีเรีย	สายพันธุ์ปลา	แหล่งที่แยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก				
		ลำไส้ทั้งหมด	กระเพาะ	ลำไส้เล็ก	ลำไส้ใหญ่	สิ่งขับถ่าย
Lactobacillus sp.	Arctic charr (*S. alphinus*)			+	+	+
	Atlantic cod (*G. morhua*)	+				
L. plantarum	Arctic charr		+	+	+	+
	Saithe (*G. virens*)	+				
Carnobacterium sp.	Arctic charr		+	+	+	+
	Rainbow trout	+				
Streptococcus sp.	Arctic charr	+	+	+	+	
	Salmonid	+				
Leuconostoc sp.	Arctic charr					+

ที่มา : ดัดแปลงจาก Ringø and Gatesoup (1998)

2.4.3 สายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลกติกในปลาที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ในปัจจุบันการศึกษาแบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินในปลาค่อนข้างน้อย ส่วนมากในการศึกษาแบคทีเรียกรดแลกติกมักเกี่ยวข้องกับการนำไปใช้เป็นโปรไบโอติกมากกว่าแบคเทอริโอซิน (Gatesoup. 1999) การศึกษาแบคเทอริโอซินมักจะมุ่งเน้นใน

ผลิตภัณฑ์ของปลามากกว่า เนื่องจากอาจสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้ (ภักดี สุขพันธ์. 2548) แสดงดังตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 แบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลกติกซึ่งแยกได้จากปลาและผลิตภัณฑ์จากปลา

แบคเทอริโอซิน	สายพันธุ์แบคทีเรียที่สร้างแบตเทอริโอซิน	ผลิตภัณฑ์ที่พบ
Carnocin UI49	*Carnobacterium piscicola*	เนื้อปลาสด
Divercin V41	*Carnobacterium divergens* V41	ปลาหมักแช่เย็น
Piscicocin V1	*C. piscicola* V1	ปลาหมักแช่เย็น
Plantaricin F	*Lactobacillus plantarum* BF001	ปลาดุกแปรรูปแช่เย็น

ที่มา : ดัดแปลงจาก พงษ์เทพ วิไลพันธ์ (2546)

Campos *et al.* (2006) ได้ทำการศึกษาการจำแนกลักษณะของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Lc. lactis*, *E. faecium* และ *E. mundtii* ที่แยกได้จากกล้ามเนื้อปลา turbot (*Psetta maxima*) และได้ทำการศึกษาคุณสมบัติของสารแบคเทอริโอซินดังกล่าว พบว่า *Lc. lactis ssp. Lactis* USC-39 สามารถผลิตแบคเทอริโอซินออกมายับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* NCTC11994 ได้มากที่สุดที่ระยะเวลาการเจริญของเชื้อประมาณ 46 ชั่วโมง และสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* LHICA 1010 ได้มากที่สุดที่ระยะเวลาการเจริญของเชื้อประมาณ 21 ชั่วโมง ส่วน *En. faecium* USC-46 สามารถผลิตแบคเทอริโอซินออกมายับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* LHICA 1112 และเชื้อ *S. aureus* ATCC 35845 ได้มากที่สุดที่ระยะเวลาการเจริญของเชื้อประมาณ 21 ชั่วโมง และ *En. mundtii* USC-51 สามารถผลิตแบคเทอริโอซินออกมายับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* ได้มากที่สุดที่ระยะเวลาการเจริญของเชื้อประมาณ 46-55 ชั่วโมง และสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* LHICA 1010 ได้มากที่สุดที่ระยะเวลาการเจริญของเชื้อประมาณ 21 ชั่วโมง และเมื่อนำไปทดสอบกับเอนไซม์ proteinase K พบว่าแบคเทอริโอซินที่สร้างจาก *Lc. lactis* ssp. *lactis* USC-39 , *En. faecium* USC-46 และ *En. mundtii* USC-51 ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ proteinase K

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 อาหารที่ใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียซึ่งผลิตแบคเทอริโอซิน

การคัดเลือกแบคทีเรียซึ่งผลิตแบคเทอริโอซินทำได้ทั้งในอาหารแข็งหรือกึ่งแข็งและอาหารเหลว โดยในอาหารแข็งหรือกึ่งแข็งอาศัยการเกิดบริเวณใสจากการแพร่ของแบคเทอริโอซินไปยับยั้งเชื้อทดสอบ (indicator strain) ส่วนอาหารเหลว การตรวจสอบการยับยั้งทำโดยวัดการเปลี่ยนแปลงความหนาแน่นของเซลล์เชื้อทดสอบ ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) การคัดเลือกด้วยอาหารแข็งหรือกึ่งแข็ง เป็นวิธีที่สะดวกและใช้เวลาสั้น เนื่องจากเชื้อที่ผลิตแบคเทอริโอซินบนผิวอาหารแข็งหรือกึ่งแข็งที่เกลี่ยเชื้อทดสอบไว้ (spot-on-lawn) วิธีนี้เหมาะสมกับเชื้อที่ผลิตแบคเทอริโอซินในช่วงต้นของการเจริญ และเชื้อทดสอบสามารถเจริญได้รวดเร็ว หรือเข้าสู่ระยะ log phase ได้ก่อนแบคเทอริโอซินแพร่และออกฤทธิ์ ส่วนการคัดเลือกด้วยอาหารเหลววิธีนี้ไม่เป็นที่นิยมสำหรับใช้คัดเลือก แต่มีข้อดีในการตรวจสอบผลของแบคเทอริโอซินได้ชัดเจน เนื่องจากสามารถกำจัดปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลในการยับยั้งเชื้อทดสอบได้ เช่น การปรับค่าความเป็นกรดและด่างให้เป็นกลาง เพื่อลดผลของกรด การเติมเอนไซม์คะตะเลส เพื่อลดผลจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สารละลายใสที่ผ่านการเตรียมดังกล่าว นำมาทดสอบการยับยั้งโดยการหยดบนผิวอาหาร โดยเติมสารละลายนี้ลงในหลุมที่เจาะไว้บนอาหารแข็งที่มีเชื้อทดสอบกระจายอยู่ หรือเติมในอาหารเหลวซึ่งมีเชื้อทดสอบและติดตามการยับยั้งโดยวัดการเจริญด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ หรือนับจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเชื้อ การทดสอบด้วยวิธีใดก็ตามควรศึกษาการเปลี่ยนแปลงชนิดของอาหารหรือสภาวะการเพาะเลี้ยงเนื่องจากสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเซลล์อาจไม่ใช่สภาวะที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้สูงสุด ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งผลิตแบคเทอริโอซินได้ในแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน (Hoover and Harlander. 1993)

2.5.1 ความต้องการสารอาหารของแบคทีเรีย

Salminen and Wright (1993) กล่าวว่า แบคทีเรียกรดแลกติกเป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่ต้องการอาหารพิเศษหรือเฉพาะในการเจริญเติบโตและมีความต้องการสารอาหารต่างๆ อัจฉรา เพิ่ม (2550) รายงานว่า แบคทีเรียกรดแลกติกมีความต้องการสารอาหารต่างๆ ดังต่อไปนี้

2.5.1.1 ไนโตรเจน

แบคทีเรียกรดแลกติกสามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีสารอาหารมาก หลายสายพันธุ์ต้องการกรดอะมิโนหลายชนิดและจะเจริญได้น้อยมากหากไม่มีแหล่งไนโตรเจน กรดอะมิโนที่แบคทีเรียต้องการ เช่น serine และ arginine เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.1.2 วิตามิน

วิตามินที่แบคทีเรียกรดแลกติกใช้ในการเจริญเติบโต ได้แก่ thiamine : B1, riboflavin : B2, pyridoxine : B6, cyanocobalamine : B12 และ nicotimic acid นอกจากนี้แบคทีเรียบางสายพันธุ์ต้องการ nicotinic acid, pantothenic acid, biotin, riboflavin และ folinic

2.5.1.3 คาร์โบไฮเดรต

แบคทีเรียกรดแลกติกสามารถใช้น้ำตาลได้หลายประเภทจาก monosaccharide ประเภทน้ำตาล pentose เช่น arabinose, ribose และ xylose น้ำตาล hexose เช่น fructose และ manose น้ำตาล disaccharide เช่น maltose น้ำตาล trisaccharide เช่น maltotriose และยังมี polymer เช่น แป้ง

Hagi *et al.* (2004) ได้ทำการทดลองเปรียบเทียบชนิดของอาหารที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรียกรดแลกติกในลำไส้ปลา silver carp, common carp, chanel catfish และ deep-bodied crucian carp โดยใช้อาหาร 4 ชนิด แสดงดังตารางที่ 2.6 จากการทดลองพบว่า เชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกสามารถเจริญในอาหารแต่ละชนิดได้ โดยมีค่าการเจริญที่ใกล้เคียงกัน (10^6 CFU/ml)

ตารางที่ 2.6 แสดงส่วนประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรียกรดแลกติก

ชนิดอาหาร	ส่วนประกอบ	สัดส่วนต่อน้ำปริมาตร 1 ลิตร
MRS agar	Peptone	10.0 กรัม
	Meat extract	8.0 กรัม
	Yeast extract	4.0 กรัม
	D(+)glucose	20.0 กรัม
	di-potassium hydrogen phosphate	20.0 กรัม
	Tween 80	1.0 กรัม
Tomato juice agar	Tomato juice	400 มิลลิลิตร
	Neopeptone	15.0 กรัม
	Glucose	20.0 กรัม
	NaCl	5.0 กรัม
	Tween 80	1.0 กรัม
	Yeast extract	6.0 กรัม
	Soluble starch	0.5 กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.6 (ต่อ) แสดงส่วนประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรียกรดแลกติก

ชนิดอาหาร	ส่วนประกอบ	สัดส่วนต่อน้ำปริมาตร 1 ลิตร
GYP-BCP agar	D-glucose	10 กรัม
	Yeast extract	10 กรัม
	Polypeptone	5 กรัม
	Nutrient broth	5 กรัม
	Na-acetate trihydrate	2 กรัม
	Nystatin	0.1 กรัม
	$CaCO_3$	5 กรัม
	Bromocresol purple	0.06 กรัม
	Agar	12 กรัม
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O_2$	40 มิลลิกรัม
	$MnSO_4 \cdot 4H_2O_2$	2 มิลลิกรัม
	$FeSO_4 \cdot 7H_2O_2$	7 มิลลิกรัม
	NaCl	2 มิลลิกรัม
	Tween 80	10 มิลลิลิตร
Lactic agar	Tryptone peptone	20 กรัม
	Yeast extract	5 กรัม
	Gealtin	2.5 กรัม
	Glucose	5 กรัม
	Lactose	5 กรัม
	Sucrose	5 กรัม
	NaCl	4 กรัม
	Sodium acetate	1.5 กรัม
	Ascorbic acid	0.5 กรัม

ที่มา : ดัดแปลงจาก Hagi *et al.* (2004)

Itoi *et al.* (2008) รายงานว่า ในการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากระบบทางเดินอาหารของปลา puffer (*Takifugu niphobles*) โดยใช้อาหาร MRS ซึ่งมีการใส่โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-4 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้เชื้อ *Lc. lactis* subs. *lactis* เจริญได้ดีกว่า เมื่อเทียบกับอาหารที่ไม่มีการใส่โซเดียมคลอไรด์ในอาหาร MRS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวน ไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 ตัวอย่างปลา

ระบบทางเดินอาหารของปลาชนิดต่างๆ ได้แก่

1. ปลากะพง จำนวน 26 ตัว จากตลาดบางกะปิ เขตบางกะปิ กรุงเทพมหานคร
2. ปลาช่อน จำนวน 16 ตัว จากตลาดหัวตะเข้ เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร
3. ปลานิล จำนวน 42 ตัว จากตลาดหัวตะเข้ เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร
4. ปลาดุก จำนวน 40 ตัว จากตลาดหัวตะเข้ เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร
5. ปลาตะเพียน จำนวน 9 ตัว จากตลาดหัวตะเข้ เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร
6. ปลาสวาย จำนวน 24 ตัว จากตลาดบางกะปิ เขตบางกะปิ กรุงเทพมหานคร

3.2 แบคทีเรียทดสอบที่ใช้ทดสอบคุณสมบัติของสารยับยั้งแบคทีเรีย ได้มาจากห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์เนื้อสัตว์ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร

แบคทีเรียทดสอบ แสดงดังตารางที่ 3.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 แบคทีเรียทดสอบ อาหารที่ใช้เลี้ยงและอุณหภูมิสำหรับการเจริญของแบคทีเรีย

แบคทีเรียทดสอบ	อาหาร	อุณหภูมิ (°C)
Lactic acid bacteria		
Lactobacillus plantarum ATCC 14917^T	MRS	30
Lactobacillus sakei subsp. *sakei* JCM 1157^T	MRS	30
Lactobacillus sakei TISTR 890	MRS	37
Lactococcus lactis subsp.*cremoris* TISTR 1344	MRS	30
Leuconostoc mesenteroides subsp.*mesenteroides* JCM 6124^T	MRS	30
Leuconostoc mesenteroides subsp.*mesenteroides* TISTR 942	MRS	30
Enterococcus faecalis JCM 5803^T	MRS	37
Enterococcus faecalis TISTR 888	MRS	37
Streptococcus sp. TISTR 1030	MRS	30
Other Gram-positive bacteria		
Bacillus coagulans JCM 2257^T	TSB-YE	37
Bacillus coagulans TISTR 1447	TSB-YE	37
Listeria innocua ATCC 33090^T	TSB-YE	37
Brochotrix campeatris NBRC 11547^T	TSB-YE	26
Staphylococcus aureus TISTR 118	TSB-YE	37
Other Gram-negative bacteria		
Pseudomonas fluorescens JCM 5963^T	TSB-YE	26
Pseudomonas fluorescens TISTR 358	TSB-YE	26
Aeromonas hydrophila TISTR 1321	NB	30

ATCC = American Type Culture Collection, Rockville, Md

JCM = Japanese Culture of Microorganism , Wako, Japan

NBRC = National Institute of Technology and Evaluation (NITE) Biological Resource Center, Japan

TISTR = Thailand Institute of Scientific and Technological Research, Thailand

MRS = de Man, Rogosa and Sharpe (Merck, Germany)

TSB-YE = Tryptic soy broth (Merck, Germany) + 0.6%Yeast extract (BIO BASIC INC, Canada)

NB = Nutrient broth (Merck, Germany)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ ... เมื่อผู้ใช้ ... ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น ... และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 อุปกรณ์ และสารเคมี

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์

1. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร de Man, Rogosa and Sharpe (MRS, Merck, Germany)
2. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Tryptic Soy Broth Yeast Extract (TSB; Merck, Germany + 0.6%Yeast extract; BIO BASIC INC, Canada)
3. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Luria-Bertani broth (LB broth; Biolab India)
4. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Nutrient broth (Merck, Germany)
5. Agar (Criterion, U.S.A.)
6. Peptone from meat (Merck, Germany)

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar Flow Clean, MICH.CITY IND. 46360, U.S.A)
2. ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator, BD395381, Thailannd)
3. เครื่องเขย่า (Shaking Incubator, VS-8408 SFN, Korea)
4. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge, Centrifuge CR 3i, France)
5. เครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter, EUTECH PC 510)
6. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (FX-200i, Japan)
7. ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส (Sanden Intercool SEC1000SBD,Thailand)
8. ไมโครเวฟ (Microwave, TRX-249M, Korea)
9. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave, High-Pressure Steam Sterilizer ES-315, Japan)
10. ตู้อบเครื่องแก้ว (Hot air oven, Memmert series INE-INB, Belgium)
11. เครื่องตีบดตัวอย่าง (Stomucher Bag Mixer 400 interscience, France)
12. เครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ (Spectophotometer, Ultrospec 1100 *pro*, England)
13. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Ultrospec 1100 *pro*, England)
14. ชุดอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophorysis, GelMate 2000, Japan)
15. เครื่องถ่ายภาพเจล (GeneGenius, A division of synoptics LTD)
16. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (MyCycler™ themal cycler, Germany)
17. ไมโครปิเปต (Autopipet, Gilson, Germany)
18. แผ่นกรองปลอดเชื้อ ขนาด 0.2 ไมโครเมตร (Pall, U.S.A)
19. เครื่องแก้วพร้อมอุปกรณ์อื่นๆ ที่จำเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสาร ... นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น ... อิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารเคมี

1. แคลเซียมคาร์บอเนต (Scharlau Chemie S.A., Spain)
2. โซเดียมคลอไรด์ (Ajax Finechem, Australia)
3. กลีเซอรอล (APS Finechem, Australia)
4. น้ำมันพาราฟิน (Prolabo 294365H, Thailand)
5. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Ajax Finechem, Australia)
6. กรดไฮโดรคลอริก (Merck, Germany)
7. แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์
8. อะกาโรสเจล (Vivantis, Malaysia)
9. Bile salts (Sigma, New Zealand)
10. Proteinase K (Sigma, U.S.A)
11. α-chymotrypsin (Sigma, U.S.A)
12. Trypsin (Sigma, U.S.A)
13. Proteinase K (Usbiological, U.S.A)
14. EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt) (Univar, Australia)
15. Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Research Organic Inc., USA)
16. Sodium dodecyl sulfate (SDS, Bio Basic Inc., USA)
17. Lysozyme (Sigma, USA)
18. Phenol (Merk, Germany)
19. Chloroform (Merk, Germany)
20. Isoamyl (Merk, Germany)
21. Isopopanol (Merk, Germany)
22. Sucrose (Bio Basic Inc., USA)
23. Ampicillin (Sigma, USA)
24. Isopropyl-B-D thiogalactoside (IPTG) (Invitrogen, U.S.A)
25. 5-bromo-4-chloro-3 indolyl-B-Dgalactoside (x-gal) (Vivantis,
21. Standard DNA 1 Kb ladder (Vivantis, Malaysia)
26. Standard 100 bp plus DNA ladder (Vivantis, Malaysia)
27. ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (Fermentus, USA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

28. 1X Taq Buffer (Fermentas, U.S.A)
29. 10 มิลลิโมลาร์ dNTP (Fermentas, U.S.A)
30. 2 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$ (Fermentas, U.S.A)

31. 7.5 ยูนิตต่อไมโครลิตร *Taq* DNA Polymerase (Fermentas, U.S.A)

32. QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, U.S.A)

33. QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, U.S.A)

34. InsTAclone™PCR Cloning Kit (Fermentas, U.S.A)

35. DMSO (Merk, Germany)

36. Ethanol (Merk, Germany)

ยาปฏิชีวนะ

1. Amplicillins (AMP 10 µg, Oxoid, England)
2. Chloramphenicol (C 30 µg, Oxoid, England)
3. Cephalothin (KF 30 µg, Oxoid, England)
4. Erythromycin (E15 µg, Oxoid, England)
5. Gentamycin (CN 10 µg, Oxoid, England)
6. Kanamycin (K 30 µg, Oxoid, England)
7. Nalidixic acid (NA 30 µg, Oxoid, England)
8. Neomycin (N 30 µg, Oxoid, England)
9. Nitrofurantoin (F 300 µg, Oxoid, England)
10. Norfloxacin (NOR 10 µg, Oxoid, England)
11. Novobincin (NV 5 µg, Oxoid, England)
12. Oxolinic acid (OA 2 µg, Oxoid, England)
13. Tetracycline (TE 30 µg, Oxoid, England)
14. Sulfamethoxazole/trimethoprim (SXT 25 µg, Oxoid, England)
15. Oxytetracyclin (OT 30 µg, Oxoid, England)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 สรุปขั้นตอนการทดลอง

คัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกจากระบบทางเดินอาหารของปลา

⇩

คัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกที่สร้างสารแบคเทอริโอซิน

⇩

ศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซิน

- การจำแนกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่สร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย
  - การศึกษาสัณฐานวิทยาและลักษณะทางกายภาพ
  - การศึกษาทางชีวเคมี
  - การวิเคราะห์หาลำดับเบสของ 16S rDNA
- การทดสอบอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียโดยแบคทีเรียกรดแลกติก
- การทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติก
  - การทดสอบความสามารถในการเจริญและสร้างสารแบคเทอริโอซิน เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะเป็นกรดและด่าง
  - การทดสอบความสามารถในการเจริญและสร้างสารแบคเทอริโอซิน เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์
  - การทดสอบความสามารถในการเจริญและสร้างสารแบคเทอริโอซิน เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มี bile salts
  - การทดสอบความสามารถในการมีชีวิตรอดในกระเพาะและลำไส้จำลอง
  - การทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ

⇩

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ... ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และ... ถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ศึกษาคุณสมบัติของสารแบคเทอริโอซิน

- การทดสอบกับเอนไซม์ย่อยโปรตีน
- การทดสอบความเสถียรของสารแบคเทอริโอซินต่ออุณหภูมิสูง
- การทดสอบความเสถียรของสารแบคเทอริโอซินต่ออุณหภูมิต่ำ
- การวิเคราะห์หาลำดับเบสของยีนที่สร้างสารแบคเทอริโอซิน

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกจากระบบทางเดินอาหาร

นำตัวอย่างระบบทางเดินอาหารปลาชนิดต่างๆ ทั้งหมดมาทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก โดยการนำเอาของเหลวที่อยู่ภายในระบบทางเดินอาหารน้ำหนัก 10 กรัม มาทำการเจือจางด้วยสารละลายเปปโตน ความเข้มข้น 0.1% เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ระดับความเจือจาง 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000 และ 1:1000000 จากนั้นนำไป spread plate บนอาหารแข็ง MRS ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ และโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ดัดแปลงจาก Itoi *et al.* 2008) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใน candle jar (ดัดแปลงจาก Pilasombut. 2006) จากนั้นสุ่มเลือกโคโลนีที่มีบริเวณใส (clear zone) รอบ ๆ โคโลนี นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เพื่อทำเป็น stock culture โดยใส่กลีเซอรอล ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร รวมกับเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นจึงนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับในการทำการศึกษาครั้งต่อไป

3.5.2 การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกที่สร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

ทำการทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์โดยวิธี spot-on-lawn ที่ดัดแปลงจาก Ennahar *et al.* (1999) เทอาหารเลี้ยงเชื้อ (จากตารางที่ 3.1) ที่มีวุ้น (agar) 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อแล้วทิ้งไว้ให้วุ้นแข็งตัว จากนั้นถ่ายเชื้อทดสอบ (จากตารางที่ 3.1) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีวุ้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่หลอมตัวและมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ผสมให้เข้ากันแล้วเททับลงในจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้ ปล่อยทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เพื่อให้อาหารแข็งตัว จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่ได้จากข้อ 3.5.1 เลี้ยงในอาหาร MRS ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นเวลา 20 นาที นำเฉพาะส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อ ปรับค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 6 จากนั้นทำให้ปลอดเชื้อโดยกรองผ่านแผ่นกรองปลอดเชื้อ ขนาด 0.2 ไมโครเมตร (Pall, U.S.A) แล้วดูดส่วนใสมาทำให้เจือจางลงครั้งละ 2 เท่าอย่างต่อเนื่องกันด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละความเจือจางปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ (จากตารางที่ 3.1) ที่เตรียมไว้รอจนกระทั่งหยดน้ำส่วนใสที่หยดลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง หลังจากนั้นนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ ตามความเหมาะสมของเชื้อทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง การอ่านผลให้ดูจากบริเวณใสที่เกิดขึ้นจากผลการถูกยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในแต่ละความเจือจางลงไป ซึ่งสามารถคำนวณค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินที่อยู่ในน้ำส่วนใสต่อแบคทีเรียทดสอบแต่ละชนิดเป็น arbitrary unit (AU/ml) โดยค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เป็นส่วนใส (cell free supernatant) เท่ากับค่าความเจือจางสูงสุดของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เป็นส่วนใสซึ่งยังสามารถสังเกตเห็นบริเวณใส ที่เกิดจากการถูกยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ โดยคำนวณได้จาก (1000/10)D เมื่อ D เท่ากับค่าความเจือจางสูงสุดของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เป็นส่วนใส (Parente *et al.* 1995)

3.5.3 การศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

3.5.3.1 การจำแนกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่สร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

1) การศึกษาสัณฐานวิทยาและลักษณะทางกายภาพ (ดัดแปลงจาก Kandler *et al.* 1986)

เลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารแข็ง MRS ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นำเชื้อที่ได้โคโลนีเดี่ยวๆ นำมาทดสอบดังนี้

1.1) การตรวจการติดสีแกรม

หยดน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงบนกระจกสไลด์ เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ให้กระจายบนหยดน้ำกลั่น ทิ้งให้แห้ง นำมาผ่านความร้อน (heat fixed) ย้อมด้วยสารละลาย crystal violet เป็นเวลา 1 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น หยดสารละลายไอโอดีน ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นหยดแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ พอทำให้สีของ crystal violet หลุดออก แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นทันที จากนั้นหยดสารละลาย saflanin O ทิ้งไว้ 30 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่น ทิ้งให้แห้ง นำไปตรวจสอบการติดสีแกรม ลักษณะรูปร่างเซลล์ และการจัดเรียงตัวของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

1.2) ทดสอบคะตะเลส

หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ลงบนกระดาษกรองปลอดเชื้อ จากนั้นเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ลงบนกระดาษกรอง ถ้าเกิดฟองอากาศ แสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้ ส่วนโคโลนีที่ไม่เกิดฟองจะให้ผลลบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3) การตรวจสอบการสร้างก๊าซ

เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ลงในอาหารเหลว MRS ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยใส่หลอดดักก๊าซ (durham tube) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หากพบก๊าซในหลอดดักก๊าซ แสดงว่าเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม heterofermentative หากไม่พบก๊าซในหลอดดักก๊าซแสดงว่าเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม homofermentative

1.4) ทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ

เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ลงในอาหารเหลว MRS ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 10, 30, 37, 42, 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญโดยการดูความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.5) ทดสอบความทนเกลือ

เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ลงในอาหารเหลว MRS ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 และ 18 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงตรวจสอบการเจริญโดยการดูความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.6) ทดสอบความสามารถในการเจริญที่ระดับความเป็นกรดและด่างต่างๆ

เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ลงในอาหาร MRS ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปรับค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 4.5 และ 9.6 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญโดยการวัดค่าการดูความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

2) การศึกษาทางชีวเคมี

ศึกษาการหมักคาร์โบไฮเดรตด้วยชุดตรวจสำเร็จรูป API 50 CH (BioMerieux, France) โดยเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารแข็ง MRS ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ loop ที่ปลอดเชื้อ เขี่ยโคโลนีจำนวน 3-5 โคโลนีลงในหลอดอาหารของ API 50 CH medium เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน เตรียมชุดทดสอบ โดยเรียงชุดทดสอบลงบนถาด ดูด API 50 CH medium ที่มีเชื้ออยู่ ใส่สารลงไปในชุดทดสอบทุกช่อง ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศและอย่าให้ปลายทิปสัมผัสกับขอบช่อง เมื่อดูดอาหารใส่ในช่องทุกช่องแล้ว ให้เททับด้วยน้ำมันพาราฟีน จากนั้นนำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส อ่านผลหลังจากบ่ม 24 และ 48 ชั่วโมง นำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม api*web*™ stand alone V 1.2.1 (BioMerieux, France) โดยอ่านผลบวกจากการเปลี่ยนสีของอาหารจากสีม่วงน้ำเงินเป็นเหลือง ยกเว้นช่องที่ 25 ซึ่งเปลี่ยนสีจากม่วงน้ำเงินเป็นสีดำ แสดงว่าเป็นผลบวก ถ้าอาหารเป็นสีม่วงน้ำเงิน แสดงว่าเป็นผลลบ หากอาหารเปลี่ยนเป็นสีเขียว หรืออ่านผลไม่ชัดเจน ให้ใส่เครื่องหมายคำถาม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3) การวิเคราะห์หาลำดับเบสของ 16S rDNA มีขั้นตอนดังนี้

3.1) การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอทั้งหมดของแบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดแยกได้ โดยดัดแปลงจากวิธีของ Carolissen-Mackay *et al.* (1997) โดยนำเชื้อตัวอย่าง 1 โคโลนี มาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS 3 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อจำนวน 2 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหาร MRS หลอดใหม่ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิเดิม เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในหลอดไมโครเซนติฟิวส์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทำการเก็บซ้ำประมาณ 2-3 รอบ โดยสังเกตปริมาณตะกอนเซลล์ที่ได้ เติมสารละลาย A (TE buffer, 6.7% sucrose) 500 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเติมเอนไซม์ lysozyme ความเข้มข้น 70 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แล้วเติม SDS ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมเอนไซม์ RNase ปริมาตร 4 ไมโครลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมสารละลาย phenol ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเพื่อแยกส่วนใสด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ทำการดูดส่วนใสลงในหลอดไมโครเซนติฟิวส์หลอดใหม่ จากนั้นเติม phenol : chloroform (1 : 1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเพื่อแยกส่วนใสด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และดูดส่วนใสลงในหลอดไมโครเซนติฟิวส์หลอดใหม่ แล้วเติม chloroform : isoamyalcohol (24 : 1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนแยกส่วนใสด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และดูดส่วนใสใส่หลอดไมโครเซนติฟิวส์หลอดใหม่ แล้วเติม isopopanol ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรสารละลายดีเอ็นเอ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ประมาณ 16 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนดีเอ็นเอ ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และทำการล้างตะกอนดีเอ็นเอ 2 ครั้ง ด้วยเอทานอล ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร พลิกหลอดกลับไปมา แล้วดูดสารละลายเอทานอลทิ้ง จากนั้นทำให้แห้งโดยการตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

3.2) การตรวจสอบวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟรีซีส

3.2.1) วิธีการเตรียมอะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

ชั่งอะกาโรสเจลน้ำหนัก 2 กรัม ใส่ลงขวดรูปชมพู่ จากนั้นเติม 1X TBE buffer ให้ครบ 200 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนด้วยเครื่องไมโครเวฟจนกว่าอะกาโรสเจลจะละลาย จากนั้นเทใส่ชุดถาดพลาสติกต้นแบบสำหรับเตรียมเจล รอจนเจลแข็งตัวถอดซี่หวีออกจากนั้นนำไปใส่ในเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2) การวิเคราะห์คุณภาพดีเอ็นเอด้วยเครื่องเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

วางแผ่นอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ลงบนแท่นรองในเครื่อง อิเล็กโตรโฟรีซิส เทสารผสม 1X TBE buffer ให้ท่วมแผ่นอะกาโรสเจล จากนั้นผสม gel loading dye ปริมาตร 1 ไมโครลิตรกับ ดีเอ็นเอ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นทำการดูดสารละลายทั้งหมดลงในหลุมที่อยู่ด้านบนของอะกาโรสเจล และใช้ 1 Kb ladder ซึ่งเป็น marker เป็นตัวเปรียบเทียบ จากนั้นทำการรันเจลโดยใช้กระแสไฟ 50 โวลต์ นาน 90 นาที ย้อมแผ่นอะกาโรสเจลในสารละลาย ethidium bromide เป็นเวลา 2 นาที ล้างด้วยน้ำเปล่า นาน 10 นาที ทำการวิเคราะห์คุณภาพดีเอ็นเอที่ปรากฏภายใต้เครื่องถ่ายรูปเจล

3.3) การสังเคราะห์ดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิคเพิ่มขยายจำนวนดีเอ็นเอแบบปฏิกิริยาลูกโซ่หรือเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR)

เพิ่มปริมาณชิ้นส่วน 16S rDNA จากดีเอ็นเอที่สกัดแยกได้ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับแบคทีเรีย BSF8/20 (5’-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3’) และ REVB (5’-GGTTACCTTGTTACGACTT-3’) (Kanokratana *et al.* 2004) ซึ่งเป็น universal primer ของแบคทีเรีย โดยส่วนประกอบของสารละลายสำหรับทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ แสดงดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ส่วนประกอบของสารละลายในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

สาร	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
10x PCR buffer with $(NH_4)_2SO_4$	2.5	1x
25 mM $MgCl_2$	2.0	2 mM
10 mM dNTP	1	400 μM
10 μM Primer BSF8/20	1	0.4 μM
10 μM Primer REVB	1	0.4 μM
5U/μl Taq DNA polymerase	0.25	0.05 μM
100 ng/μl DNA template	1	
น้ำกลั่น	16.25	
รวม	25	

การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์จะใช้เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ (MyCycler^{TM} thermal cycler) ก่อนการทำงานของปฏิกิริยาพีซีอาร์ กำหนดอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที เพื่อเตรียม ดีเอ็นเอต้นแบบให้แยกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวอย่างสมบูรณ์ จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาพีซีอาร์จำนวน 35 รอบ โดยแต่ละรอบจะมีอุณหภูมิต่างๆ ดังนี้คือ อุณหภูมิ 94

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วินาที (ดีเอ็นเอเสียสภาพแยกเป็นสายเดี่ยว) จากนั้นลดอุณหภูมิลงในช่วง 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้สายดีเอ็นเอต้นแบบจับกับไพรเมอร์อย่างเหมาะสม และเพิ่มอุณหภูมิขึ้นที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 45 วินาที ขั้นตอนนี้เพื่อเพิ่มจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์จากการจับตัวกันอย่างเหมาะสมของไพรเมอร์ และดีเอ็นเอต้นแบบ เมื่อปฏิกิริยาพีซีอาร์ทำงานครบ 35 รอบ ก่อนสิ้นสุดปฏิกิริยา ให้คงอุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีจำนวน 1 รอบ ซึ่งถือได้ว่าขั้นตอนการทำปฏิกิริยาเสร็จสิ้นอย่างสมบูรณ์ หลังจากเสร็จสิ้นปฏิกิริยา เก็บดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ (PCR product) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์โดยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซีส โดยใช้ 1 Kb DNA Ladder เป็น marker

3.4) การสกัดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์

สกัดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด QIAquick Gel Extraction Kit โดยการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่อยู่ในเจล (น้ำหนักห้ามเกิน 0.4 กรัม) ใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวส์ จากนั้นใส่บัฟเฟอร์ QG 3 เท่าของน้ำหนักเจล แล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกว่าเจลจะละลายหมด เมื่อเห็นว่าสารละลายเป็นสีเหลือง ใส่ isopropanol 1 เท่าของน้ำหนักเจล จากนั้นให้เทใส่ลงในคอลัมน์ ระวังอย่าให้ล้น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที แล้วเทส่วนล่างทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้นาน 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เทส่วนล่างทิ้ง นำคอลัมน์ใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวส์อันใหม่ พักคอลัมน์ให้แห้งโดยใช้เวลาประมาณ 20 นาที ทำการ elute ดีเอ็นเอ โดยเติมบัฟเฟอร์ EB ตั้งทิ้งไว้นาน 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที ตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากผลผลิตพีซีอาร์โดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีในข้อ 3.2 โดยใช้ 100 bp DNA Ladder เป็น marker

3.5) การเชื่อมต่อผลผลิตพีซีอาร์เข้ากับพลาสมิดเวคเตอร์ (ligation)

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จากข้อ 3.4 มาเชื่อมต่อกับพลาสมิดเวคเตอร์ pTZ57R/T (Fermentas) โดยใช้อัตราส่วนความเข้มข้นเป็นโมลาร์ของผลผลิตพีซีอาร์ต่อพลาสมิดเวคเตอร์เท่ากับ 3:1 ปฏิกิริยาการเชื่อมต่อ 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1X Ligation buffer [40 mM Tris-Hcl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 0.5 mATP (pH 7.8 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส)] พลาสมิดเวคเตอร์ pTZ57R/T ความเข้มข้น 55 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร T4 DNA Ligase ความเข้มข้น 5 ยูนิต ผลผลิตพีซีอาร์และน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำสารละลายทั้งหมดผสมให้เข้ากัน และบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6) การเตรียมเชื้อ *E.coli* DH5α ให้เป็น competent cell

เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *E.coli* DH5α บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง LB (Luria-Bertani) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยโคโลนีที่ได้มา

1 โคโลนี ใส่ในฟลาสก์ขนาด 300 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร LB ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลาประมาณ 20 ชั่วโมง นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่าประมาณ 0.6 (Sambrook *et al.* 2001) จากนั้นถ่ายเชื้อลงหลอดไมโครเซนติฟิวส์ขนาด 50 มิลลิลิตรแล้วตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 15 นาที ต่อมานำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วทิ้งส่วนใส ละลายตะกอนเบาๆ ด้วยสารละลาย TB (ภาคผนวก ก) ที่แช่เย็น (ปริมาตร 40 มิลลิลิตร) จากนั้นตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 10 นาที ทิ้งส่วนใส ละลายตะกอนด้วยสารละลาย TB ที่แช่เย็น 10 มิลลิลิตร แล้วค่อยๆ เติม DMSO 0.7 มิลลิลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 10 นาที แบ่ง competent cell ที่ได้ในหลอดไมโครเซนติฟิวส์แล้วเก็บที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.7) การทรานส์ฟอร์มดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่ competent cell *E.coli* DH5α ด้วยวิธี Heat shock

คัดแปลงตามวิธีของ Sambrook *et al.* (2001) โดยนำ competent cell ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที ต่อจากนั้นดูดสารละลายที่ทำการเชื่อมชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายเข้ากับพลาสมิดเวคเตอร์ในข้อที่ 3.6 ปริมาตร 20 ไมโครลิตรใส่ใน competent cell ผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที แล้วทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วโดยแช่ทิ้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 2-3 นาที ต่อมาเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และนำไปเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่า ควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นแบ่งสารละลายไป spread บนจานเพาะเชื้ออาหารแข็ง LB ที่มี ampicillin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร Isopropyl-B-D thiogalactoside (IPTG) ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ และ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-galactoside (x-gal) ความเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง

3.8) การคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับการทรานส์ฟอร์ม

คัดเลือกโคโลนีสีขาวบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin, x-gal และ IPTG เนื่องจาก pTZ57R/T มีบริเวณยีน *lac*Z ที่ทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์ β-galactosidase โดยจะทำการย่อย x-gal ให้ได้ตะกอนสีฟ้า แต่พลาสมิดเวคเตอร์ที่ถูกแทรกด้วย 16S rDNA ที่บริเวณยีน *lac*Z จะทำให้ไม่สามารถผลิตเอนไซม์นี้ได้และได้ตะกอนสีขาวแทน

3.9) การสกัดพลาสมิด โดยใช้ชุดแยกพลาสมิดสำเร็จรูป QIAprep Spin Miniprep Kit

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำโคโลนีที่มีสีขาวไปเลี้ยงในอาหารเหลว LB จากนั้นนำไปบ่มในตู้ที่มีการเขย่า (incubate shaker) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 14 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง รอให้แห้ง เติมบัฟเฟอร์ P1 ปริมาตร 250

ไมโครลิตร แล้วทำการ vortex จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ P2 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร แล้วทำการพลิกกลับไปกลับมาเบาๆ 4-6 ครั้ง เติมบัฟเฟอร์ N3 ปริมาตร 350 ไมโครลิตร แล้วทำการพลิกกลับไปกลับมาเบาๆ 4-6 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดส่วนใสใส่ลงคอลัมน์นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ทิ้งส่วนเหลวด้านล่างหลอดทิ้ง ล้างคอลัมน์ด้วย บัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที แล้วเทส่วนล่างทิ้ง ทำการล้าง 2 ครั้ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที รอให้คอลัมน์แห้ง ย้ายคอลัมน์ไปใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวส์อันใหม่ ทำการ elute ดีเอ็นเอโดยการเติมบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 10-15 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ตรวจสอบพลาสมิดที่ได้โดยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซีสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีในข้อ 3.2 โดยใช้ 100 bp DNA Ladder เป็น marker

3.10) การตรวจสอบความถูกต้องของพลาสมิดเวคเตอร์ที่ถูกแทรกด้วย 16S rDNA

ทำการตรวจสอบชิ้น 16S rDNA ซึ่งถูกแทรกสู่พลาสมิดเวคเตอร์ด้วยการวิเคราะห์การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* (vivantis) และ *BamHI* (vivantis) โดยเอนไซม์ทั้งสองชนิดทำปฏิกิริยาร่วมกันโดยในปฏิกิริยา 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10x Buffer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* (ความเข้มข้น 20 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 0.3 ไมโครลิตร เอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* (ความเข้มข้น 20 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 0.3 ไมโครลิตร พลาสมิดเวคเตอร์ที่แทรกด้วย 16S rDNA ที่ได้จากข้อ 3.9) ปริมาตร 6 ไมโครลิตร และปรับด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อจนมีปริมาตรสุดท้าย 10 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซีสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีในข้อ 3.2 โดยใช้ 1 Kb DNA Ladder เป็น marker

3.11) วิเคราะห์หาลำดับเบส

ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์จากโคลนที่ได้ว่ามีความเหมือนหรือคล้ายคลึงกับดีเอ็นเอของแบคทีเรียชนิดใดในฐานข้อมูล โดยใช้โปรแกรม BLASTN (Basic Local Alignment Search Tools) จากฐานข้อมูล NCBI ในอินเตอร์เน็ตที่ (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) เพื่อใช้ในการหาค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงหรือความเหมือน (% Identity) และรายละเอียดต่างๆ ของแบคทีเรียที่ปรากฏในผลของการ BLASTN

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.3.2 การทดสอบอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการสร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยแบคทีเรียกรดแลกติก

ทดสอบอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการสร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยแบคทีเรียกรดแลกติก ดัดแปลงจาก Pilasombut (2006) นำเชื้อตัวอย่างจาก stock culture เลี้ยงในอาหารเหลว MRS ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ถ่ายเชื้อตัวอย่าง 2 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเหลว MRS ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 300 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 42 องศาเซลเซียส สุ่มตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ทดสอบหาค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินนของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เป็นส่วนใส (cell free supernatant) และหาปริมาณเชื้อตัวอย่างโดยการ spread plate (Log CFU/ml) ทุก 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.5.3.3 การทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติก

1) การทดสอบความสามารถในการเจริญและสร้างสารแบคเทอริโอซิน เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะเป็นกรดและด่าง

ทดสอบความสามารถในการเจริญและสร้างสารแบคเทอริโอซิน เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะเป็นกรดและด่าง ดัดแปลงจาก Ennahar *et al.* (1999) โดยนำเชื้อตัวอย่าง 2 เปอร์เซ็นต์จาก stock culture เลี้ยงในอาหารเหลว MRS ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหาร MRS ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปรับค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 3, 4, 4.5, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญโดยการวัดค่าการการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ทดสอบหาค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินและหาปริมาณเชื้อตัวอย่างโดยการ spread plate (Log CFU/ml)

2) การทดสอบความสามารถในการเจริญและสร้างสารแบคเทอริโอซิน เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์

การทดสอบความสามารถในการเจริญและสร้างสารแบคเทอริโอซิน เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์ ดัดแปลงจาก ภักดี สุขพันธ์ (2548) โดยนำเชื้อตัวอย่าง 2 เปอร์เซ็นต์จาก stock culture เลี้ยงในอาหารเหลว MRS ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหาร MRS ที่ปรับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 1, 2, 3, 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญโดยการวัดค่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ทดสอบหาค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซิน และหาปริมาณเชื้อตัวอย่างโดยการ spread plate (Log CFU/ml)

3) การทดสอบความสามารถในการเจริญและสร้างสารแบคเทอริโอซิน เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มี bile salts

การทดสอบความสามารถในการเจริญและสร้างสารแบคเทอริโอซิน เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มี bile salts ดัดแปลงจาก Hyronimus *et al.* (2000) โดยนำเชื้อตัวอย่าง 2 เปอร์เซ็นต์จาก stock culture เลี้ยงในอาหารเหลว MRS ซึ่งมี โซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหาร MRS ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และมีการปรับความเข้มข้นของ bile salts 0.3, 0.6 และ 0.9 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญโดยการวัดค่าการการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ทดสอบหาค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซิน และหาปริมาณเชื้อตัวอย่างโดยการ spread plate (Log CFU/ml)

4) การทดสอบความสามารถในการมีชีวิตรอดในกระเพาะและลำไส้จำลอง

การทดสอบความสามารถในการมีชีวิตรอดในกระเพาะและลำไส้จำลอง ดัดแปลงจาก Zárate *et al.* (2000) โดยถ่ายเชื้อ 100 ไมโครลิตรจาก stock culture ลงในอาหารเหลว MRS ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อ 2 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว MRS ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำเชื้อในอาหารเหลว MRS 100 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยง 4,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างเซลล์ 1 ครั้งด้วยโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ 5 มิลลิลิตร แล้วใส่สารละลายเซลล์ลงในน้ำย่อยสังเคราะห์ที่มีค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 2, 3, 4 และ 7 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร วิเคราะห์ปริมาณเชื้อที่เวลา 0 นาที โดยวิธี standard plate count นำเชื้อที่อยู่ในน้ำย่อยสังเคราะห์ไปบ่มในเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วนำที่เวลา 30, 60, 90 และ 180 นาที ไปวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อที่มีชีวิตรอดโดยวิธี standard plate count หลังจากผ่านไป 180 นาที ในกระเพาะอาหารจำลอง นำเชื้อที่อยู่ในน้ำย่อยสังเคราะห์ 50 มิลลิลิตร ไปปั่นเหวี่ยง 4,000 รอบต่อนาที 10 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทน้ำย่อยสังเคราะห์ทิ้ง นำเซลล์ของแบคทีเรียที่ได้ไปละลายลงในของเหลวในลำไส้จำลองที่มีค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 8 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร วิเคราะห์ปริมาณเชื้อที่เวลา 0 นาที โดยวิธี standard plate count จากนั้นนำไปบ่มในเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที 37 องศาเซลเซียส แล้วนำที่เวลา 30, 60, 90 และ 180 นาที ไปวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อที่มีชีวิตรอดโดยวิธี standard plate count รายงานผลจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตรอดเป็นค่า Log CFU/ml แสดงผลเป็นเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด ซึ่งสามารถคำนวณได้โดย

เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด = ปริมาณเชื้อรอดชีวิตในแต่ละช่วงเวลาของการทดสอบ 0, 30, 60, 90 และ 180 นาที (Log CFU/ml) x 100 / ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (Log CFU/ml)

5) การทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ

นำเชื้อตัวอย่าง 2 เปอร์เซ็นต์จาก stock culture ถ่ายลงในอาหารเหลว MRS ซึ่งมี โซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เปรียบเทียบความขุ่นของเชื้อให้มีความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland มาตรฐาน โดยใช้น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วทำการเจือจางเชื้อ จากนั้นนำสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อไป swab บนอาหารแข็ง MRS ซึ่งมี โซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และมีวุ้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ให้ทั่วทั้งจานเพาะเชื้อ ปล่อยไว้ให้แห้ง แล้ววางแผ่นยาปฏิชีวนะไว้ด้านบนอาหารแข็ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ตรวจผลโดยสังเกตบริเวณใส วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐาน แล้วแสดงผลเป็น susceptible (S), intermediate (I) หรือ resistant (R) (ดัดแปลงจาก NCCLS. 1998)

3.5.4 ศึกษาคุณสมบัติของสารแบคเทอริโอซิน

3.5.4.1 การทดสอบกับเอนไซม์ย่อยโปรตีน

ทดสอบกับเอนไซม์ย่อยโปรตีน ดัดแปลงจาก Ennahar *et al.* (1999) นำเชื้อตัวอย่างเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที 20 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทเอาเฉพาะส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ปรับค่าความเป็นกรดและด่างให้เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิด ได้แก่ α-chymotrypsin, trypsin และ proteinase K แล้วปรับค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 7.0 ทุกตัวอย่าง จากนั้นนำส่วนใสดังกล่าวย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้นสุดท้ายของเอนไซม์เท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากครบเวลาที่กำหนดให้กรองโดยใช้แผ่นกรองปลอดเชื้อ แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำสารละลายส่วนใสที่ย่อยด้วยเอนไซม์ไปวัดค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินที่เหลืออยู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.4.2 การทดสอบความเสถียรของสารแบคเทอริโอซินต่ออุณหภูมิสูง

ทดสอบความเสถียรของสารแบคเทอริโอซินต่ออุณหภูมิสูง ดัดแปลงจาก Campos *et al.* (2006) โดยนำเชื้อตัวอย่างเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 18 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เทเอาเฉพาะส่วนใสมาปรับค่า pH เท่ากับ 6 โดยส่วนหนึ่งนำไปต้มในน้ำที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10, 30 และ 60 นาที และอีกส่วนหนึ่งนำไปผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที วัดค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซิน

3.5.4.3 การทดสอบความเสถียรของสารแบคเทอริโอซินต่ออุณหภูมิต่ำ

ทดสอบความคงทนของสารแบคเทอริโอซินต่ออุณหภูมิต่ำ ดัดแปลงจาก Campos *et al.* (2006) นำเชื้อตัวอย่างเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 18 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เทเอาเฉพาะส่วนใสมาปรับค่าความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 6 กรองผ่านแผ่นกรองปลอดเชื้อ จากนั้นนำไปแช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน โดยวัดค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินทุกวัน

3.5.4.4 การวิเคราะห์หาลำดับเบสของยีนที่สร้างสารแบคเทอริโอซิน

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากการวิเคราะห์หาลำดับเบสของยีน 16S rDNA ข้อ 3.1 มาทำการวิเคราะห์หาลำดับเบสของยีนที่สร้างสารแบคเทอริโอซิน โดยมีขั้นตอนดังนี้

1) การสังเคราะห์ดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิคเพิ่มขยายจำนวนดีเอ็นเอแบบปฏิกิริยาลูกโซ่หรือเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR) โดยสังเคราะห์ดีเอ็นเอประมาณ 200 base pair (bp) ของยีนที่สร้างสารแบคเทอริโอซินโดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ แล้วใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับแบคทีเรีย Nisin A Forward (5'- CCGGAATTCATA AGGAGGCACTCAAAATG -3') และ Nisin A Reverse (5'-CGGGGTACCTACTATCCTTTG ATTTGGTT -3') (Swetwiwathana. 2005) โดยส่วนประกอบของสารละลายสำหรับทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ แสดงดังตารางที่ 3.2 การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์จะใช้เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ (MyCycler^{TM} thermal cycler) ก่อนการทำงานของปฏิกิริยาพีซีอาร์ กำหนดอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ เพื่อเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบให้แยกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวอย่างสมบูรณ์ จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาพีซีอาร์จำนวน 30 รอบ ตามวงรอบที่อุณหภูมิต่างๆ กันคือ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที (ดีเอ็นเอเสียสภาพแยกเป็นสายเดี่ยว) จากนั้นลดอุณหภูมิลงในช่วง 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที เพื่อให้สายดีเอ็นเอต้นแบบจับกับไพรเมอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อย่างเหมาะสม และเพิ่มอุณหภูมิขึ้นที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 1 รอบ ขั้นตอนนี้เพื่อเพิ่มจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์จากการจับตัวกันอย่างเหมาะสมของไพรเมอร์และดีเอ็นเอต้นแบบ เมื่อปฏิกิริยาพีซีอาร์ทำงานครบ 30 รอบ ก่อนสิ้นสุดปฏิกิริยา ให้คงอุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที จำนวน 1 รอบ ซึ่งถือได้ว่าขั้นตอนการทำปฏิกิริยาเสร็จสิ้นอย่างสมบูรณ์ หลังจากเสร็จสิ้นปฏิกิริยา เก็บดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ (PCR product) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์โดยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซีส โดยใช้ 100 bp DNA Ladder เป็น marker

2) การสกัดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ ด้วยชุด QIAquick Gel Extraction Kit ตามวิธีในข้อ 3.4

3) การเชื่อมต่อผลผลิตพีซีอาร์เข้ากับพลาสมิดเวคเตอร์ (ligation) โดยนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ทำตามข้อ 3.5

4) การทรานส์ฟอร์มดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่ competent cell *E.coli* DH5α ด้วยวิธี Heat shock โดยทำการทรานส์ฟอร์มดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่ competent cell *E.coli* DH5α ตามข้อ 3.7

5) การคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับการทรานส์ฟอร์ม โดยคัดเลือกโคโลนีสีขาวแล้วทำตามข้อ 3.8

6) การสกัดพลาสมิด โดยใช้ชุดแยกพลาสมิดสำเร็จรูป QIAprep Spin Miniprep Kit ทำตามข้อ 3.9

7) การตรวจสอบความถูกต้องของพลาสมิดเวคเตอร์ที่ถูกแทรกด้วยยีนแบคเทอริโอซิน โดยทำการตรวจสอบชิ้นยีนแบคเทอริโอซินตามข้อ 3.10

8) วิเคราะห์หาลำดับเบส โดยทำการวิเคราะห์หาลำดับเบสตามข้อ 3.11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลอง และวิจารณ์

4.1 การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกที่สร้างสารยับยั้งแบคทีเรียจากระบบทางเดินอาหารของปลาชนิดต่างๆ

จากผลการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกจำนวน 400 โคโลนี เพื่อหาแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีคุณสมบัติในการสร้างสารแบคเทอริโอซินจากระบบทางเดินอาหารของปลาชนิดต่างๆ จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ ปลากะพง (*Lates calcarifer*; seabass) ปลาช่อน (*Channa stiata*; striped snake-head fish) ปลาดุก (*Clarias batrachus*; catfish) ปลาตะเพียน (*Barbonymus gonionotus*; javanese barb) ปลานิล (*Orcochromis niloticus*; nile tilapia) และปลาสวาย (*Pangasianodon hypophthalmus*; striped catfish) ทำการทดสอบสารละลายใสปราศจากเซลล์ (cell free supernatant) ที่ปรับค่าความเป็นกรดและด่างให้เป็นกลางในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเป้าหมาย (ตารางที่ 3.1) ผลการทดลองพบว่าสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งแบคทีเรีย โดยแยกได้จากระบบทางเดินอาหารปลากระพง 1 ไอโซเลท การทดลองครั้งนี้ไม่พบเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียจากระบบทางเดินอาหารปลาช่อน ปลาดุก ปลาตะเพียน ปลานิลและปลาสวาย เชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารปลากระพง ตั้งชื่อว่า Seabass2 (Sb2) ไอโซเลทที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารของปลาชนิดต่างๆ แสดงดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจากระบบทางเดินอาหารของปลาชนิดต่างๆ

ชนิดปลา	จำนวนตัวอย่าง	จำนวน ไอโซเลท	จำนวนแบคทีเรียกรดแลกติกที่สร้างสารแบคเทอริโอซิน
ปลากะพง	26	71	1
ปลาช่อน	16	48	0
ปลาดุก	40	91	0
ปลาตะเพียน	9	50	0
ปลานิล	42	69	0
ปลาสวาย	24	71	0
รวม	157	400	1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ

สารยับยั้งแบคทีเรียที่สร้างจากไอโซเลท Sb2 ที่คัดแยกได้จากปลากะพง สามารถยับยั้งเชื้อได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ได้แก่ *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917, *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^{T}, *Lb. sakei* TISTR 890, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* TISTR 1344, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124^{T}, *Leu. mesenteroides* TISTR 942, *Bacillus coagulans* JCM 2257^{T}, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Brochotrix campestris* NBRC 11547, *Pseudomonas fluorescens* JCM 5693^{T}, *Ps. fluorescens* TISTR 358, *Enterococcus faecalis* JCM 5803^{T}, *E. faecalis* TISTR 888, *Staphylococcus aureus* TISTR 118 และ *Streptococcus* sp. TISTR 1030 ซึ่งไอโซเลท Sb2 สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^{T} ได้มากที่สุด โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 12,800 AU/ml แสดงดังตารางที่ 4.2

สารที่แบคทีเรียกรดแลกติกสร้างออกมาส่วนใหญ่เป็นกรดแลกติกและกรดอะซิติก (Franz *et al.* 1998) ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้ จึงมีการปรับค่าความเป็นกรดและด่างของสารละลายใสปราศจากเซลล์ให้มีสภาวะเป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ก่อนนำมาทดสอบกิจกรรมในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ จึงเป็นการยืนยันได้ว่าผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบไม่ได้เกิดจากอิทธิพลของกรดอินทรีย์ (De Vuyst and Vandamme, 1994)

การทำลายเซลล์เป้าหมายของแบคเทอริโอซิน เกิดจากการที่แบคเทอริโอซินแต่ละโมเลกุลมาอยู่ร่วมกัน ทำให้เกิดเป็นช่องว่างที่เยื่อหุ้มเซลล์เป้าหมาย ช่องว่างดังกล่าวทำให้เกิดการเสียสมดุลของไอออน สูญเสียกรดอะมิโนและสารประกอบอนินทรีย์ในกลุ่มฟอสเฟต ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญในการสร้างพลังงานของเซลล์ กลไกการออกฤทธิ์ของแบคเทอริโอซินแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ ขั้นแรก แบคเทอริโอซินจะยึดจับกับผิวของเซลล์เป้าหมาย และขั้นต่อไป คือ แบคเทอริโอซินจะสร้างช่องว่างในชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์ (Ennahar *et al.* 1999) ซึ่งในกลุ่มของ lantibiotic แบคเทอริโอซิน กลุ่มนี้ไม่ต้องการตำแหน่งจำเพาะสำหรับการดูดซับที่ผิวเซลล์ การออกฤทธิ์ต้องอาศัยพลังงานจากเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เป้าหมาย เพื่อทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดเป็นช่องว่าง ส่วนแบคเทอริโอซินในกลุ่ม non lantibiotic นั้น เป็นกลุ่มที่ต้องการตำแหน่งจำเพาะสำหรับการดูดซับที่ผิวเซลล์ (Bruno and Montville. 1993) สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเป้าหมายได้น้อยชนิด (narrow spectrum) กว่าชนิดแรก (Klaenhammer. 1993)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบโดยสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่สร้างโดยไอโซเลท Sb2 ที่คัดแยกได้จากปลากะพง

แบคทีเรียทดสอบ	ค่ากิจกรรมการยับยั้ง (AU/ml)
Lactic acid bacteria	
Lactobacillus plantarum ATCC 14917^{T}	800
Lactobacillus sakei subsp. *sakei* JCM 1157^{T}	12,800
Lactobacillus sakei TISTR 890	1,600
Lactococcus lactis subsp. *cremoris* TISTR 1344	200
Leuconostoc mesenteroides subsp. *mesenteroides* JCM 6124^{T}	800
Leuconostoc mesenteroides subsp. *mesenteroides* TISTR 942	1,600
Enterococcus faecalis JCM 5803^{T}	800
Enterococcus faecalis TISTR 888	1,600
Streptococcus sp. TISTR 1030	1,600
Other gram-positive bacteria	
Bacillus coagulans JCM 2257^{T}	800
Bacillus coagulans TISTR 1447	0
Listeria innocua ATCC 33090^{T}	1,600
Brochotrix campeatris NBRC 11547^{T}	1,600
Staphylococcus aureus TISTR 118	200
Other gram-negative bacteria	
Pseudomonas fluorescens JCM 5963^{T}	200
Pseudomonas fluorescens TISTR 358	200
Aeromonas hydrophila TISTR 1321	0

ATCC = American Type Culture Collection, Rockville, Md

JCM = Japanese Culture of Microorganism , Wako, Japan

NBRC = National Institute of Technology and Evaluation (NITE) Biological Resource Center

TISTR = Thailand Institute of Scientific and Technological Research, Thailand

จากการทดลองจะเห็นได้ว่า สารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่สร้างจากไอโซเลท Sb2 สามารถยับยั้งเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลกติกได้มากชนิดที่สุด รองลงมาคือแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งสอดคล้องกับ Tagg *et al.* (1976) ที่กล่าวว่า แบคเทอริโอซินเป็นสารประกอบโปรตีน ซึ่งมี

คุณสมบัติในการออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียในชนิดเดียวกันหรือใกล้เคียงกับแบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินออกมา แต่สำหรับในส่วนของแบคทีเรียทดสอบ *Bacillus coagulans* TISTR 1447 ที่ไม่ถูกยับยั้งด้วยสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย เนื่องจากแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิดมีตัวรับที่เยื่อหุ้มเซลล์ไม่เหมาะสม รวมทั้งมีปริมาณของกรดไขมันและฟอสโฟลิพิดในชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์ที่แตกต่างจากแบคทีเรียแกรมบวกที่ถูกทำลาย (Schved *et al.* 1993) แบคทีเรียสามารถป้องกันตัวเองได้โดยอาศัยกลไกที่แตกต่างกันออกไป เช่น ในสายพันธุ์ที่ผลิต nisin จะมีการสร้างโปรตีนป้องกันตัวเอง ได้แก่ lipoprotein บริเวณด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์ โปรตีนสำหรับกำจัด nisin ออกจากเซลล์ (ABC transporter) และโปรตีนสำหรับจับกับ nisin และอุดช่องว่างที่เกิดขึ้น (Klaenhammer. 1993) ส่วนสายพันธุ์ที่ไม่มีการผลิต nisin หรือแบคทีเรียแกรมบวกอื่นๆจะทำลายการออกฤทธิ์ด้วยการผลิตเอนไซม์ nisinase เพื่อรีดิวซ์ dehydroalanyllysine ที่ด้านปลาย C ของ nisin ไปเป็น alanyllysine (Davies *et al.* 1996) ส่วนในแบคทีเรียแกรมลบ *A. hydrophila* TISTR 1321 จะมีองค์ประกอบของผนังเซลล์ที่ซับซ้อนกว่าแบคทีเรียแกรมบวก โดยมีสารประกอบพวก lipoprotein และ lipopolysacharide ทำให้โมเลกุลของแบคเทอริโอซินไม่สามารถแทรกผ่านผนังเซลล์ของแบคทีเรียและไม่ทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ โดยปกติแล้ว nisin ไม่สามารถที่จะยับยั้งได้ แต่ทว่า nisin มีความสามารถในการไปรบกวนต่อผนังเซลล์ภายนอกของแบคทีเรียแกรมลบ ทำให้แบคทีเรียแกรมลบเกิดการ sensitive ต่อ nisin เป็นผลให้ nisin มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อได้หลายชนิด (Klaenhammer. 1993) และการที่สารยับยั้งแบคทีเรียไม่ทำลายการเจริญของตัวมันเอง เนื่องจากแบคทีเรียที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินจะมีระบบภูมิคุ้มกันเพื่อป้องกันตัวเองจากแบคเทอริโอซินที่สร้างขึ้น ซึ่งเป็นคุณสมบัติเฉพาะตัวอีกประการหนึ่งของแบคเทอริโอซิน (Cleveland *et al.* 2001)

ในปัจจุบันการศึกษาแบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินที่แยกได้จากปลาค่อนข้างน้อย ส่วนมากในการศึกษาแบคทีเรียกรดแลกติกมักเกี่ยวข้องกับการนำไปใช้เป็นโปรไบโอติกมากกว่าแบคเทอริโอซิน (Gatesoup. 1999) การศึกษาแบคเทอริโอซินมักจะมุ่งเน้นในผลิตภัณฑ์ของปลามากกว่า เนื่องจากสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้ (ภักดี สุขพันธ์. 2548) มีรายงานการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินจากกล้ามเนื้อปลา turbot (*Psetta maxima*) พบว่าสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่สร้างสารแบคเทอริโอซิน 3 สายพันธุ์ได้แก่ *Lc. lactis* ssp. *lactis* USC-39, *E. faecium* USC-46 and *E. mundtii* USC-51 โดยแบคเทอริโอซินที่เชื้อสร้างขึ้นสามารถยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* และ *S. aureus* (Campos *et al.* 2006) นอกจากนี้ยังมีการรายงานของ de Kwaadsteniet *et al.* (2008) ซึ่งได้ทำการศึกษาลักษณะของกลุ่มยีนที่ผลิต nisin F ซึ่งถือได้ว่าเป็นยีนกลุ่มใหม่ในกลุ่ม lantibiotic ซึ่งยีน nisin F นี้ผลิตจากเชื้อ *Lc. lactis* F10 ที่คัดแยกได้จากปลาดุกน้ำจืด (*Clarias gariepinus*) โดย *Lc. lactis* F10 ที่คัดแยกได้สามารถผลิตแบคเทอริโอซิน (Bac F) ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus*, *S. carnosus*, *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum* และ *Lb. reuteri*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

4.3.1 ผลการจำแนกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่สร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

4.3.1.1 การศึกษาสัณฐานวิทยาและลักษณะทางกายภาพ

เมื่อนำไอโซเลท Sb2 มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาแล้วนำมาเปรียบเทียบกับ Bergey's Manual (Kandler *et al.* 1986) พบว่า ไอโซเลท Sb2 จัดอยู่ในสกุล *Lactococcus* spp. ผลการทดสอบแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ลักษณะทั่วไปของเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่สร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

การทดสอบ	ผลการทดสอบ
การย้อมสีแกรม	บวก
การเกิดคะตะเลส	ไม่เกิดตะตะเลส
ลักษณะสัณฐานวิทยา	กลม
อุณหภูมิที่เจริญเติบโต 10 องศาเซลเซียส	-
30 องศาเซลเซียส	+
37 องศาเซลเซียส	+
42 องศาเซลเซียส	+
45 องศาเซลเซียส	-
50 องศาเซลเซียส	-
ความเข้มข้นของเกลือ 1 เปอร์เซ็นต์	+
2 เปอร์เซ็นต์	+
3 เปอร์เซ็นต์	+
4 เปอร์เซ็นต์	+
5 เปอร์เซ็นต์	+
6 เปอร์เซ็นต์	+
7 เปอร์เซ็นต์	+
8 เปอร์เซ็นต์	+
18 เปอร์เซ็นต์	-
ค่าความเป็นกรดและด่าง 4.5	+
9.6	+

หมายเหตุ + มีการเจริญเติบโต

- ไม่มีการเจริญเติบโต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ห้ามดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.1.2 การศึกษาทางชีวเคมี

ทำการจัดจำแนกชนิดของไอโซเลท Sb2 โดยศึกษากระบวนการหมักน้ำตาล ซึ่งใช้ชุดจำแนกแบคทีเรียสำเร็จรูป API 50 CHL kit (bioMerieux) เมื่ออ่านผลที่เกิดจากการหมักน้ำตาล 49 ชนิดและนำผลที่ได้ไปผ่านการประมวลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป พบว่าไอโซเลท Sb2 สามารถจำแนกได้เป็น *Lc. lactis* ssp. *lactis* ที่ระดับความเหมือน (% Identity) 93.1 เปอร์เซ็นต์ โดยผลการทดสอบแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 การจำแนกชนิดของไอโซเลท Sb2 โดยใช้ชุดจำแนกแบคทีเรียสำเร็จรูป API 50 CHL kit (bioMerieux)

การทดสอบ	ไอโซเลท Sb2	
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง
1. Control	-	-
2. Glycerol	-	-
3. Erythritol	-	-
4. D-arabinose	-	-
5. L-arabinose	-	-
6. D-ribose	+	+
7. D-xylose	+	+
8. L-xylose	-	-
9. D-adonitol	-	-
10. Methyl-βD-xylopyranoside	-	-
11. D-galactose	+	+
12. D-glucose	+	+
13.D-fructose	+	+
14. D-mannose	+	+
15. L-sorbose	-	-
16. L-rhamnose	-	-
17. Dulcitol	-	-
18. Inositol	-	-
19. D-mannitol	-	-
20. D-sorbitol	-	-
21. Methyl-αD-mannopyranoside	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 (ต่อ) การจำแนกชนิดของไอโซเลท Sb2 โดยใช้ชุดจำแนกแบคทีเรียสำเร็จรูป API 50 CHL kit (bioMerieux)

การทดสอบ	ไอโซเลท Sb2	
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง
22. Methyl-αD-glucopyranoside	-	-
23. N-acetylglucosamine	+	+
24. Amygdalin	+	+
25. Arbutin	+	+
26. Esculin ferric citrate	+	+
27. Salicin	+	+
28. D-cellobiose	+	+
29. D-maltose	+	+
30. D-lactose(bovine origin)	+	+
31. D-melibiose	-	-
32. D-saccharose(sucrose)	+	+
33. D-trehalose	+	+
34. Inulin	-	-
35. D-melezitose	-	-
36. D-raffinose	-	-
37. Amidon (starch)	+	+
38. Glycogen	-	-
39. Xylitol	-	-
40. Gentiobiose	+	+
41. D-turanose	-	-
42. D-lyxose	-	-
43. D-tagatose	-	-
44. D-fucose	-	-
45. L-fucose	-	-
46. D-arabitol	-	-
47. L-arabitol	-	-
48. Potassium gluconate	?	?
49. Potassium 2-ketogluconate	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 (ต่อ) การจำแนกชนิดของไอโซเลท Sb2 โดยใช้ชุดจำแนกแบคทีเรียสำเร็จรูป API 50 CHL kit (bioMerieux)

การทดสอบ	ไอโซเลท Sb2	
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง
50. Potassium 5-ketogluconate	-	-

หมายเหตุ + มีการหมักน้ำตาล

- ไม่มีการหมักน้ำตาล

? ไม่สามารระบุได้

จากการทดลองเมื่อทำการเปรียบเทียบการจัดจำแนกชนิดแบคทีเรียโดยศึกษาจากชุดจำแนกแบคทีเรียสำเร็จรูป API 50 CHL kit ของเชื้อไอโซเลท Sb2 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน *Lc. lactis* ssp. *lactis* เท่ากับ 93.1 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับเชื้อ *Lc. lactis* ssp. *lactis* N190 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 93.2 เปอร์เซ็นต์ (Swetwiwathana. 2005) และ *Lc. lactis* ssp. *lactis* R06 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ (Ennahar *et al.* 2003) พบว่า *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2 มีการหมักน้ำตาลที่แตกต่างจาก *Lc. lactis* ssp. *lactis* N190 (Swetwiwathana. 2005) จำนวน 8 ชนิด ได้แก่ D-galactose, D-mannitol, amygdalin, D-lactose, D-melibios, D-raffinose, amidon(starch) และ potassium gluconate และแตกต่างจาก *Lc. lactis* ssp. *lactis* R06 (Ennahar *et al.* 2003) จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ L-arabinos, D-manitol และ starch แสดงดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 การเปรียบเทียบชนิดของ ไอโซเลท Sb2 กับ *Lc. lactis* ssp. *lactis* N190 และ *Lc. lactis* ssp. *lactis* R06 โดยใช้ชุดจำแนกแบคทีเรียสำเร็จรูป API 50 CHL kit

การทดสอบ	ไอโซเลท Sb2	*Lc. lactis* ssp. *lactis* N190[1]	*Lc. lactis* ssp. *lactis* R06[2]
1. Control	-	-	-
2. Glycerol	-	-	-
3. Erythritol	-	-	-
4. D-arabinose	-	-	-
5. L-arabinose	-	-	+
6. D-ribose	+	+	+
7. D-xylose	+	+	+
8. L-xylose	-	-	-
9. D-adonitol	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 (ต่อ) การเปรียบเทียบชนิดของ ไอโซเลท Sb2 กับ *Lc. lactis* ssp. *lactis* N190 และ *Lc. lactis* ssp. *lactis* R06 โดยใช้ชุดจำแนกแบคทีเรียสำเร็จรูป API 50 CHL kit

การทดสอบ	ไอโซเลท Sb2	*Lc. lactis* ssp. *lactis* N190[1]	*Lc. lactis* ssp. *lactis* R06[2]
10. Methyl-βD-xylopyranoside	-	-	-
11. D-galactose	+	?	+
12. D-glucose	+	+	+
13.D-fructose	+	+	+
14. D-mannose	+	+	+
15. L-sorbose	-	-	-
16. L-rhamnose	-	-	-
17. Dulcitol	-	-	-
18. Inositol	-	-	-
19. D-mannitol	-	+	+
20. D-sorbitol	-	-	-
21. Methyl-αD-mannopyranoside	-	-	-
22. Methyl-αD-glucopyranoside	-	-	-
23. N-acetylglucosamine	+	+	+
24. Amygdalin	+	?	+
25. Arbutin	+	+	+
26. Esculin ferric citrate	+	+	+
27. Salicin	+	+	+
28. D-cellobiose	+	+	+
29. D-maltose	+	+	+
30. D-lactose(bovine origin)	+	-	+
31. D-melibiose	-	+	-
32. D-saccharose(sucrose)	+	+	+
33. D-trehalose	+	+	+
34. Inulin	-	-	-
35. D-melezitose	-	-	-
36. D-raffinose	-	+	-
37. Amidon (starch)	+	?	W

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 (ต่อ) การเปรียบเทียบชนิดของ ไอโซเลท Sb2 กับ *Lc. lactis* ssp. *lactis* N190 และ *Lc. lactis* ssp. *lactis* R06 โดยใช้ชุดจำแนกแบคทีเรียสำเร็จรูป API 50 CHL kit

การทดสอบ	ไอโซเลท Sb2	*Lc. lactis* ssp. *lactis* N190[1]	*Lc. lactis* ssp. *lactis* R06[2]
38. Glycogen	-	-	-
39. Xylitol	-	-	-
40. Gentiobiose	+	+	+
41. D-turanose	-	-	-
42. D-lyxose	-	-	-
43. D-tagatose	-	-	-
44. D-fucose	-	-	-
45. L-fucose	-	-	-
46. D-arabitol	-	-	-
47. L-arabitol	-	-	-
48. Potassium gluconate	?	-	W
49. Potassium 2-ketogluconate	-	-	-
50. Potassium 5-ketogluconate	-	-	-

หมายเหตุ + มีการหมักน้ำตาล

- ไม่มีการหมักน้ำตาล

? ไม่สามารระบุได้

W มีการหมักน้ำตาลเล็กน้อย

[1] *Lc. lactis* ssp. *lactis* N190 (Swetwiwathana. 2005)

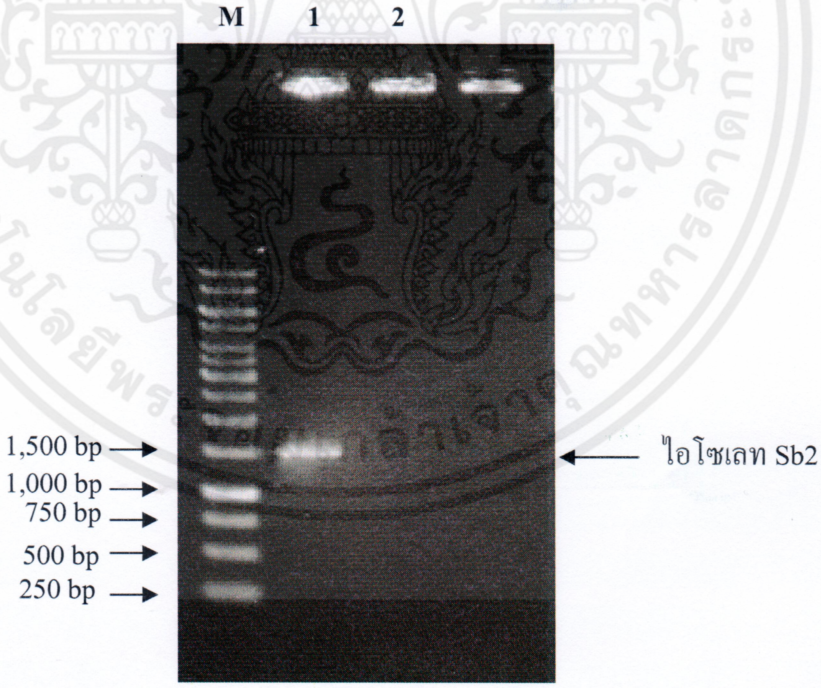
[2] *Lc. lactis* ssp. *lactis* R06 (Ennahar *et al.* 2003)

จากการทดลองจะเห็นได้ว่าไอโซเลท Sb2 มีความเหมือนกับ *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2 93.1 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากว่าการบันทึกผลโดยดูจากการเปลี่ยนสีของอาหารนั้น อาจมีข้อผิดพลาด เพราะสีของอาหารที่มีการเปลี่ยนแปลงอาจมีมากน้อยแตกต่างกันไป ส่งผลให้การตัดสินใจในการบันทึกผลนั้นผิดพลาด จึงจำเป็นต้องมีการยืนยันผลการจำแนกไอโซเลท Sb2 ด้วยวิธี 16S rDNA เนื่องจากว่า การจำแนกโดยศึกษากระบวนการหมักน้ำตาล โดยใช้ชุดจำแนกแบคทีเรียสำเร็จรูป API 50 CHL kit (bioMerieux) ยังเป็นข้อมูลที่ไม่เพียงพอสำหรับการจำแนกเชื้อ ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาโดยวิธี 16S rDNA เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความน่าเชื่อถือมากกว่า เพราะสามารถทราบถึงระดับ interfamily และ interdivision ได้ (Pot *et al.* 1994)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.1.3 การยืนยันผลการจำแนกไอโซเลท Sb2 โดยวิธี 16S rDNA

การจัดจำแนกแบคทีเรียโดยวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA โดยการเปรียบเทียบความเหมือน เนื่องจากในแบคทีเรียหรือสิ่งมีชีวิตทั่วไปจะมีไรโบโซม เป็นองค์ประกอบ โดยไรโบโซมของแบคทีเรียหรือโพรคาริโอต จะมีขนาด 70S ประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 หน่วย คือ หน่วยใหญ่ 50S และหน่วยเล็ก 30S โดยในหน่วยใหญ่ 50S จะประกอบด้วย 23S rRNA ซึ่งมีจำนวนนิวคลีโอไทด์ประมาณ 2,900 นิวคลีโอไทด์ และมี 5S rRNA ซึ่งมีจำนวนนิวคลีโอไทด์ประมาณ 120 นิวคลีโอไทด์ ส่วนในหน่วยเล็ก 30S จะมี 16S rRNA ซึ่งจะมีจำนวนนิวคลีโอไทด์ประมาณ 1,500 นิวคลีโอไทด์ (ลัดดา เอกสมทราเมษฐ์. 2547) โดย rRNA จะทำหน้าที่ผลิตโปรตีนชนิดเดิมเสมอ และพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงน้อยมากในแต่ละช่วงวิวัฒนาการ เนื่องจากว่าเป็นลำดับเบสอนุรักษ์ ดังนั้นจึงนำ 16S rRNA มาใช้ในการเปรียบเทียบความเหมือนหรือความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิต (Madigan and Martino. 2006) โดยผลการทดลองพบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากไอโซเลท Sb2 โดยใช้คู่ ไพรเมอร์ BSF8/20 และ REVB ซึ่งเป็น universal primer ในการทำพีซีอาร์ แล้วนำมาตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ขนาดของผลผลิตดีเอ็นเอตามที่ต้องการ คือมีจำนวนประมาณ 1,500 bp แสดงดังภาพที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 ขนาดของดีเอ็นเอของไอโซเลท Sb2 ในการทำพีซีอาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

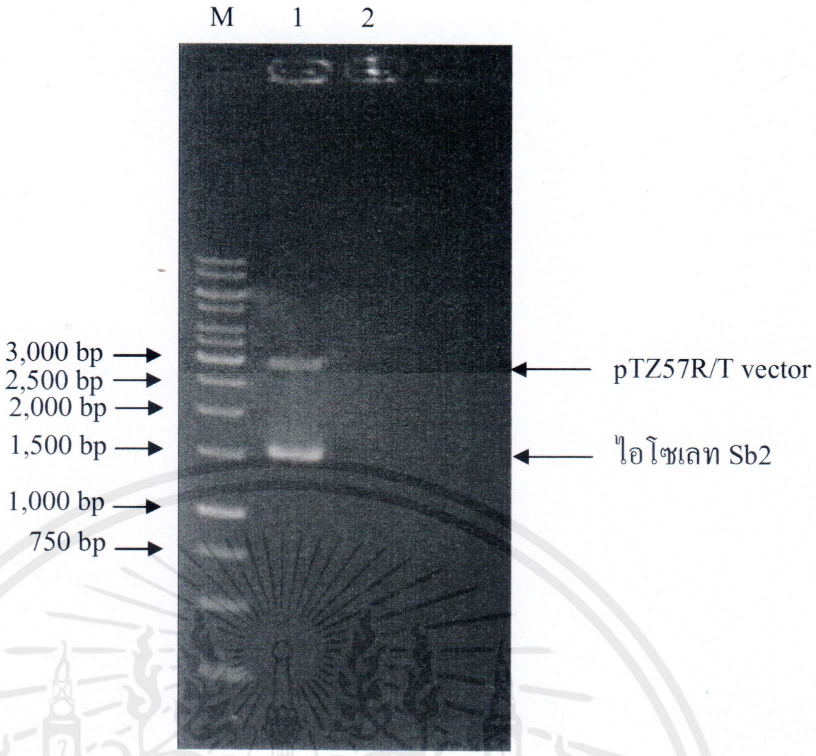
ช่อง M หมายถึง 1 Kb Ladder

ช่องที่ 1 หมายถึง ดีเอ็นเอของไอโซเลท Sb2

ช่องที่ 2 หมายถึง Negative control

นำชิ้นส่วนผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากไพรเมอร์ BSF8/20 และ REVB ที่มีขนาด 1,500 bp และผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุด QIAquick Gel Extraction Kit แล้วมาเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิดเวคเตอร์ pTZ57R/T โดยอาศัยเอนไซม์ T4 DNA ligase และใช้อัตราส่วนความเข้มข้นเป็นโมลลาร์ผลผลิตพีซีอาร์ต่อพลาสมิดเวคเตอร์เท่ากับ 3:1 จากนั้นนำพลาสมิดลูกผสมที่ได้ทั้งหมดมาทำการทรานสฟอร์มเข้าสู่ competent cell *E.coli* DH5α ด้วยวิธี Heat shock และคัดเลือกโคโลนีสีขาวที่เจริญบนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ LB ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin, x-gal และ IPTG เนื่องจากในพลาสมิดเวคเตอร์ pTZ57R/T มียีนต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ ampicillin และมียีน *lac*Z ที่ทำหน้าที่เป็นยีนคัดเลือก สำหรับการทำงานของยีน *lacZ* นั้นจะถูกชักนำด้วยสารละลาย IPTG ให้ผลิตเอนไซม์ β-galactosidase เพื่อย่อย x-gal ซึ่งเป็นสารตั้งต้นได้เป็นตะกอนสีฟ้า แต่ถ้าโคโลนีที่มีการเชื่อมผลผลิตพีซีอาร์เข้ากับพลาสมิดเวคเตอร์จะไปหยุดการแสดงออกของยีน *lac*Z ทำให้ได้โคโลนีเป็นสีขาว ดังนั้นจึงใช้ blue-white screening เป็นวิธีในการตรวจสอบชิ้นยีนเป้าหมาย จากนั้นจึงสุ่มคัดเลือกโคโลนีสีขาวที่คาดว่ามีผลผลิตพีซีอาร์ที่ต้องการ วิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสที่ความเข้มข้นของอะกาโรสเจลเท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ 100 bp plus DNA Ladder เป็นแถบ ดีเอ็นเอมาตรฐาน และมีพลาสมิดเวคเตอร์ที่ไม่ได้รับการแทรก 16S rDNA เป็นตัวเปรียบเทียบ ซึ่งการทดลองพบว่า พลาสมิดเวคเตอร์ที่ถูกแทรกด้วย 16S rDNA มีขนาดมากกว่าพลาสมิดเวคเตอร์ที่ไม่ได้รับการแทรกด้วย 16S rDNA และตรวจสอบพลาสมิดเวคเตอร์ที่ถูกแทรกด้วย 16S rDNA โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* และ *BamHI* พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 1,500 bp (ภาพที่ 4.2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.2 ขนาดของพลาสมิดเวคเตอร์และดีเอ็นเอของไอโซเลท Sb2 เมื่อถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* และ *BamHI*

ช่อง M หมายถึง 1 Kb Ladder

ช่องที่ 1 หมายถึง ขนาดของพลาสมิดเวคเตอร์ pTZ57R/T และดีเอ็นเอของไอโซเลท Sb2

จากนั้นนำผลที่ได้จากการโคลนไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล 16S rDNA ของแบคทีเรียโดยใช้ฐานข้อมูลของ NCBI ในอินเตอร์เน็ต (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) เพื่อใช้ในการหาค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงหรือความเหมือน (% Identity) และรายละเอียดต่างๆ ของแบคทีเรียที่ปรากฏในผลของการ BLASTN ผลการทดลองพบว่า ไอโซเลท Sb2 มีลำดับเบสความเหมือนกับสายพันธุ์ *Lc. lactis* spp. *lactis* Il1403 (sbjct) ถึง 99% (Accession No. AE005176.1 วันที่ 20/07/52) แสดงดังภาพที่ 4.3 ดังนั้นจึงกำหนดชื่อสายพันธุ์ของแบคทีเรียดังกล่าวว่า *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2 ผลสรุปการจำแนกชนิดเชื้อไอโซเลท Sb 2 แสดงดังตารางที่ 4.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
Sb2    2       GGTTACCTTGTTACGACTTCACCCCAGTCATCGGTCTTACCTTAGGAAGCGCCCTCCTTG  61
               || |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  539076  GGCTACCTTGTTACGACTTCACCCCAGTCATCGGTCTTACCTTAGGAAGCGCCCTCCTTG  539017

Sb2    62      CGGTTAGGCAACCTACTTCGGGTACTCCCAACTCCCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACA  121
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  539016  CGGTTAGGCAACCTACTTCGGGTACTCCCAACTCCCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACA  538957

Sb2    122     AGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTC  181
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  538956  AGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTC  538897

Sb2    182     ATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTGAGAATGGTTTTAAGAGATTAGCTAAAC  241
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  538896  ATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTGAGAATGGTTTTAAGAGATTAGCTAAAC  538837

Sb2    242     ATCACTGTCTCGCGACTCGTTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAA  301
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  538836  ATCACTGTCTCGCGACTCGTTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAA  538777

Sb2    302     GGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTATCACCGGCAGTCTCGTT  361
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  538776  GGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTATCACCGGCAGTCTCGTT  538717

Sb2    362     AGAGTGCCCAACTTAATGATGGCAACTAACAATAGGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAA  421
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  538716  AGAGTGCCCAACTTAATGATGGCAACTAACAATAGGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAA  538657

Sb2    422     CCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTATCCCGTGTCCCGA  481
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  538656  CCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTATCCCGTGTCCCGA  538597

Sb2    482     AGGAACTTCCTATCTCTAGGAATAGCACGAGTATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCG  541
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  538596  AGGAACTTCCTATCTCTAGGAATAGCACGAGTATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCG  538537

Sb2    542     TTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAG  601
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  538536  TTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAG  538477

Sb2    602     TTTCAACCTTGCGGTCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTATTGCGTTAGCTGCGATACAGA  661
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  538476  TTTCAACCTTGCGGTCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTATTGCGTTAGCTGCGATACAGA  538417

Sb2    662     GAACTTATAGCTCCCTACATCTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCT  721
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  538416  GAACTTATAGCTCCCTACATCTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCT  538357

Sb2    722     AATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGAGCCTCAGTGTCAGTTACAGGCCAGAGAGCCGCT  781
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  538356  AATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGAGCCTCAGTGTCAGTTACAGGCCAGAGAGCCGCT  538297

Sb2    782     TTCGCCACCGGTGTTCCTCCATATATCTACGCATTTCACCGCTACACATGGAATTCCACT  841
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  538296  TTCGCCACCGGTGTTCCTCCATATATCTACGCATTTCACCGCTACACATGGAATTCCACT  538237

Sb2    842     CTCCTCTCCTGCACTCAAGTCTACCAGTTTCCAATGCATACAATGGTTGAGCCACTGCCT  901
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  538236  CTCCTCTCCTGCACTCAAGTCTACCAGTTTCCAATGCATACAATGGTTGAGCCACTGCCT  538177

Sb2    902     TTTACACCAGACTTAATAAACCACCTGCGCTCGCTTTACGCCCAATAAATCCGGACAACG  961
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  538176  TTTACACCAGACTTAATAAACCACCTGCGCTCGCTTTACGCCCAATAAATCCGGACAACG  538117

Sb2    962     CTCGGGACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTCCCTTTCTGGGTAG  1021
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  538116  CTCGGGACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTCCCTTTCTGGGTAG  538057

Sb2    1022    TTACCGTCACTTGATGAGCTTTCCACTCTCACCAACGTTCTTCTCTACCAACAGAGTTTT  1081
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  538056  TTACCGTCACTTGATGAGCTTTCCACTCTCACCAACGTTCTTCTCTACCAACAGAGTTTT  537997

Sb2    1082    ACGATCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTCAGACTTTCGTCCATTGCC  1141
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  537996  ACGATCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTCAGACTTTCGTCCATTGCC  537937
```

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สง... ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
Sb2    1142    GAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGC  1201
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  537936  GAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGC  537877

Sb2    1202    CGATCACCCTCTCAGGTCGGCTATGTATCATCGCCTTGGTGAGCCTTTACCTCACCAACT  1261
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  537876  CGATCACCCTCTCAGGTCGGCTATGTATCATCGCCTTGGTGAGCCTTTACCTCACCAACT  537817

Sb2    1262    AGCTAATACAACGCGGGATCATCTTTGAGTGATGCAATTGCATCTTTCAGACTTAAAACT  1321
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||
Sbjct  537816  AGCTAATACAACGCGGGATCATCTTTGAGTGATGCAATTGCATCTTTCAAACTTAAAACT  537757

Sb2    1322    TGTGTTTAAAGTTTTTATGCGGTATTAGCATTCGTTTCCAAATGTTGTCCCCCGCTCAAA  1381
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  537756  TGTGTTTAAAGTTTTTATGCGGTATTAGCATTCGTTTCCAAATGTTGTCCCCCGCTCAAA  537697

Sb2    1382    GGCAGATTCCCCACGCGTTACTCACCCGTTCGCTGCTCATCCAGTTGGTACAAGTACCAA  1441
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||
Sbjct  537696  GGCAGATTCCCCACGCGTTACTCACCCGTTCGCTGCTCATCCAGTCGGTACAAGTACCAA  537637

Sb2    1442    CCTTCAGCGCTCAACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCCTGAGCCAGGAT  1501
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  537636  CCTTCAGCGCTCAACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCCTGAGCCAGGAT  537577

Sb2    1502    CAAACTCT  1509
               ||||||||
Sbjct  537576  CAAACTCT  537569
```

ภาพที่ 4.3 การ alignment ลำดับเบสของไอโซเลท Sb2 ซึ่งมีความหมือนกับ *Lc. lactis* ssp. *lactis* II1403 Accession No. AE005176.1 (sbjct) โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.6 ผลการจำแนกชนิดเชื้อไอโซเลท Sb2

การจำแนกเชื้อ	ไอโซเลท Sb2
ลักษณะสัณฐานวิทยา	Cocci
การศึกษาทางชีวเคมี	*Lc. lactis* ssp. *lactis1*
เปอร์เซ็นต์ความเหมือน	93.1%
16s rDNA	*Lc. lactis* ssp. *lactis*
เปอร์เซ็นต์ความเหมือน	99%

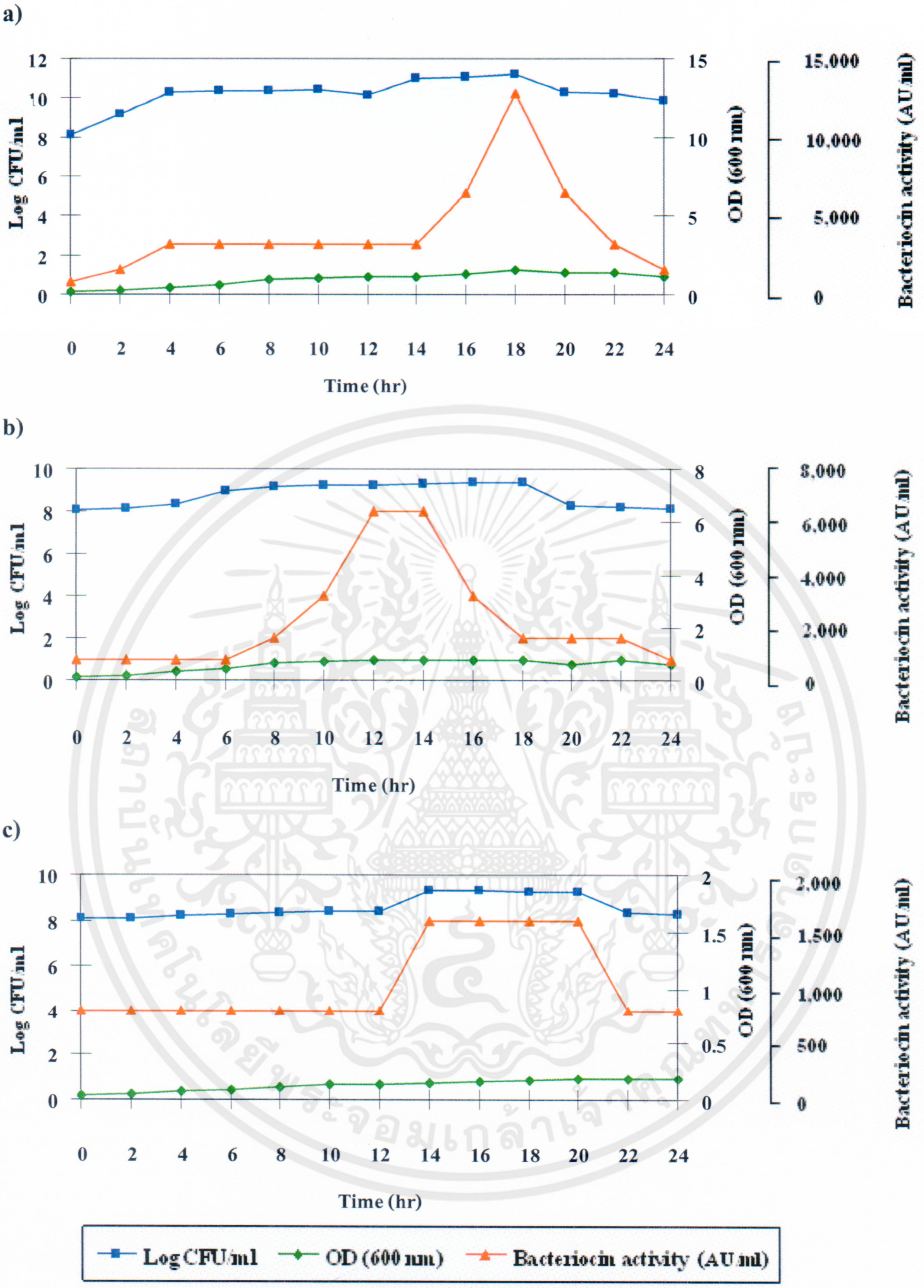
4.3.2 การทดสอบอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการสร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยแบคทีเรียกรดแลกติก

เมื่อนำไอโซเลท Sb2 มาทดสอบการเลี้ยงที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ อุณหภูมิ 30, 37 และ 42 องศาเซลเซียส และหาระยะเวลาที่ไอโซเลท Sb2 สร้างสารยับยั้งแบคทีเรียได้มากที่สุด ผลปรากฏว่า จำนวนเซลล์ที่วัดได้จากค่าการดูดกลืนแสง (OD ที่ช่วงความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร) มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันกับจำนวนเซลล์ในระหว่างการเจริญเติบโต ซึ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ไอโซเลท Sb2 สามารถสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียได้มากที่สุด (12,800 AU/ml) โดยใช้

ระยะเวลาในการเจริญ 18 ชั่วโมง ส่วนที่อุณหภูมิ 37 และ 42 องศาเซลเซียส พบว่า ไอโซเลท Sb2 มีการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียต่ำกว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 6400 และ 1600 AU/ml ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 4.4 (a, b และ c)

จากการทดลองจะเห็นได้ว่า ไอโซเลท Sb2 มีการสร้างสารสารยับยั้งแบคทีเรียในช่วงระยะ exponential phase และจะมีการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียมากที่สุดที่ระยะปลาย exponential phase ซึ่งอยู่ในช่วงระยะเวลาประมาณ 18 ชั่วโมง เมื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียเริ่มลดลง เมื่อพิจารณาการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียของเชื้อที่บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่า ไอโซเลท Sb2 มีการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรีย ในช่วงระยะ exponential phase และจะมีการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียมากที่สุดที่ระยะปลาย exponential phase หรือช่วงเริ่มต้นระยะ stationary phase ซึ่งอยู่ในช่วงระยะเวลาประมาณ 12 ชั่วโมง จากนั้นการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียจะเริ่มคงที่ เมื่อเชื้อเข้าสู่ระยะ stationary phase และการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียจะเริ่มลดลง เมื่อเชื้อเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะปลาย stationary phase หรือช่วงเริ่มต้นระยะ death phase ที่ระยะเวลา 14 ชั่วโมง ส่วนการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียของเชื้อซึ่งบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส พบว่า ไอโซเลท Sb2 มีการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียในช่วงระยะ exponential phase และจะมีการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียมากที่สุดที่ระยะปลาย exponential phase หรือช่วงเริ่มต้น stationary phase ซึ่งอยู่ในช่วงระยะเวลาประมาณ 14 ชั่วโมง หลังจากนั้นการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียจะเริ่มคงที่ เมื่อเชื้อเข้าสู่ระยะ stationary phase และการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียจะเริ่มลดลง เมื่อเชื้อเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะปลาย stationary phase หรือช่วงเริ่มต้นระยะ death phase ที่ระยะเวลา 20 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิต่างๆ ค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และค่าการสร้างสารยับยั้งของไอโซเลท Sb2

a) ความสัมพันธ์ของการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

b) ความสัมพันธ์ของการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

c) ความสัมพันธ์ของการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในช่วงระหว่างการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกรดแลกติก พบว่าจะมีการสร้างสารแบคเทอริโอซิน โดยจะเกิดในช่วงระยะกลาง exponential phase และระดับจะเพิ่มมากที่สุดที่ระยะปลาย exponential phase หรือช่วงเริ่มต้น stationary phase (Cheigh *et al.* 2002) แบคทีเรีย *Lc.lactis* สามารถผลิต nisin ได้ ซึ่ง nisin จัดเป็นแบคเทอริโอซินชนิดหนึ่ง โดย nisin นั้นจะถูกผลิตในช่วงระยะ exponential phase และจะหยุดการสร้าง เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะ stationary phase (de Arauz *et al.* 2009) ส่วนแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Lb. salivarius* K4 และ *Lb. salivarius* K7 พบว่ามีค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อมากที่สุดในระยะปลาย exponential phase และเริ่มมีการลดลง เมื่อเชื้อเข้าสู่ระยะเริ่มต้น stationary phase (Pilasombut. 2006)

การผลิตแบคเทอริโอซินขึ้นอยู่กับการเจริญเติบโตและสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ผลิตแบคเทอริโอซิน ปริมาณของแบคเทอริโอซินที่ปล่อยออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณของเชื้อที่ผลิต (Zamfir *et al.* 2000) ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อ ปัจจัยต่างๆที่มีการเปลี่ยนแปลง ได้แก่ อุณหภูมิ เวลา อากาศ และค่าความเป็นกรดและด่าง ล้วนมีผลต่อการผลิตปริมาณแบคเทอริโอซิน โดยทั่วไปการผลิตแบคเทอริโอซินให้มีปริมาณมาก มักขึ้นอยู่กับอุณหภูมิที่เหมาะสมกับชนิดของสายพันธุ์แบคทีเรียชนิดนั้นๆ ปริมาณของแบคเทอริโอซินที่ถูกผลิตออกมามากที่สุด มักจะเกิดขึ้นในระยะการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันออกไป เช่น streptocin STH_1 จะถูกผลิตมากที่สุดในระยะ exponential phase และจะลดลงอย่างรวดเร็ว เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะ stationary phase ส่วน staphylococcin C55 จะถูกผลิตออกมาในระยะ logarithmic phase และมีการผลิตมากที่สุดเมื่อเชื้อเจริญเติบโตเป็นระยะเวลาประมาณ 24-48 ชั่วโมง หลังจากนั้นปริมาณของ staphylococcin C55 จะเริ่มลดลง เป็นต้น (Tagg *et al.* 1976)

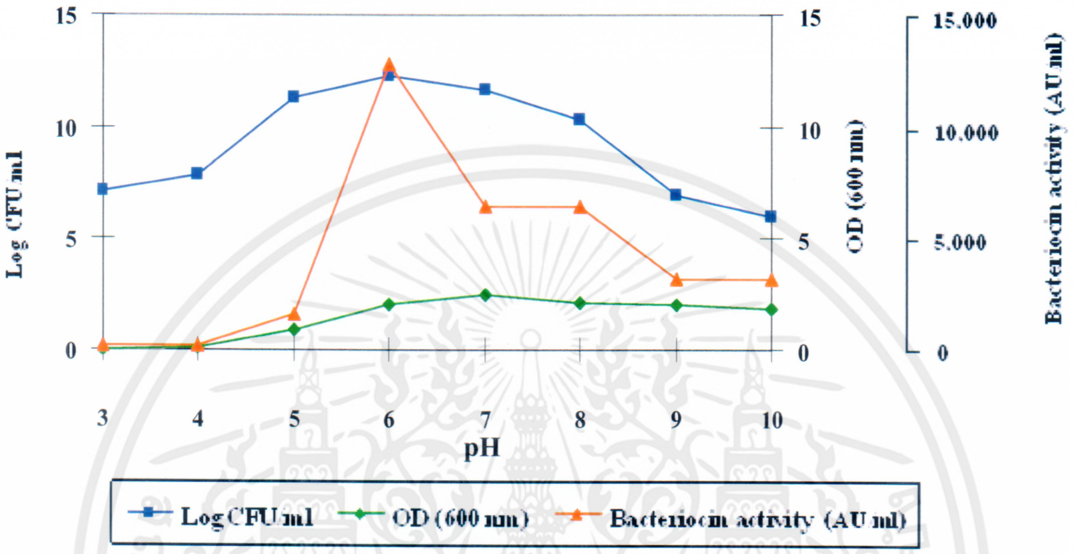
4.3.3 การทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติก

4.3.3.1 การทดสอบความสามารถในการเจริญและสร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะเป็นกรดและด่าง

เมื่อนำ *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2 มาทดสอบความสามารถในการเจริญและสร้างสารยับยั้งแบคทีเรีย โดยเลี้ยงเชื้อในสภาวะเป็นกรดและด่าง ผลปรากฏว่า *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2 มีค่าการเจริญและมีค่าการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียเพิ่มมากขึ้นตามระดับของค่าความเป็นกรดและด่างที่สูงขึ้น (ความเป็นกรดและด่างในช่วงระหว่าง 3.0-6.0) โดยสามารถเจริญและสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียมากที่สุด เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 6.0 ซึ่งมีค่าการเจริญเท่ากับ 12.28 CFU/ml และมีค่ากิจกรรมของสารยับยั้งแบคทีเรียเท่ากับ 12,800 AU/ml แต่เมื่อค่าความเป็นกรดและด่างสูงขึ้น (ความเป็นกรดและด่างในช่วงระหว่าง 7.0-10.0) ผลปรากฏว่า ความสามารถในการเจริญเติบโตและค่ากิจกรรมของสารยับยั้งแบคทีเรียลดลงตามระดับค่าความ เป็นกรดและด่างที่สูงขึ้น แสดงดังภาพที่ 4.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำ *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2 ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ผลปรากฏว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะความเป็นกรดและด่างที่สูงขึ้น (ความเป็นกรดและด่างในช่วงระหว่าง 3.0-6.0) ค่าการดูดกลืนแสงจะมีค่าเพิ่มมากขึ้นตามลำดับ และค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อที่เลี้ยงในสภาวะความเป็นกรดและด่างที่สูงขึ้น (ความเป็นกรดและด่างในช่วงระหว่าง 8.0-10.0) ผลปรากฏว่า มีแนวโน้มลดลง แสดงดังภาพที่ 4.5



ภาพที่ 4.5 ผลของค่าความเป็นกรดและด่างต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของ *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2 โดยใช้เชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^{T} เป็นแบคทีเรียทดสอบ

ค่าความเป็นกรดและด่างที่เหมาะสมสำหรับการสร้างสารแบคเทอริโอซินมักจะมีค่าต่ำกว่าค่าความเป็นกรดและด่างที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต (Cheigh *et al.* 2002)

Hutkins and Nannen. (1993) รายงานว่า โดยทั่วไปจุลินทรีย์สามารถเจริญได้ในช่วงความเป็นกรดและด่างตั้งแต่ 1.0-11.0 ในกลุ่ม streptococci, lactococci และแบคทีเรียกรดแลกติกสามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีค่าความเป็นกรดและด่างระหว่าง 4.5-7.0 เนื่องจากว่ามีเอนไซม์หลายชนิดเข้ามาเกี่ยวข้องในกระบวนการเมตาบอลิซึมของกรดอะมิโนและคาร์โบไฮเดรต ซึ่งความเป็นกรดและด่างที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์เหล่านี้ล้วนอยู่ในช่วงค่าความเป็นกรดและด่างที่เป็นกลาง แสดงดังตารางที่ 4.7 ในช่วงระหว่างการเจริญเติบโต ค่าความเป็นกรดและด่างในอาหารจะมีค่าลดลง เนื่องจากการสะสมของกรดอินทรีย์และสารชนิดต่างๆที่แบคทีเรียกรดแลกติกสร้างออกมา อย่างไรก็ตามค่าความเป็นกรดและด่างในไซโตพลาสซึมของแบคทีเรียกรดแลกติกจะยังมีค่าความเป็นกรดและด่างสูงกว่าค่าความเป็นกรดและด่างในไซโตพลาสซึม เนื่องจากเซลล์จะมีการขับโปรตอนออกสู่นอกเซลล์รวมไปถึงที่ผนังเซลล์ ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ใดได้เห็นการใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผ่านเข้าออกของโปรตอนทางด้านภายนอกเซลล์ตามที่กล่าวมา ความแตกต่างของค่าความเป็นกรดและด่างระหว่างไซโตพลาสซึมและอาหารที่เลี้ยงเชื้อ ค่าแกรเดียนต์ของค่าความเป็นกรดและด่าง (ΔpH) ก็จะเกิดขึ้น ซึ่งจะมีความสำคัญต่อความเป็นกรดและด่างภายในเซลล์ เนื่องจากทำให้เซลล์เกิดสภาวะคงที่ อีกทั้งยังมีความสำคัญต่อการขับเคลื่อนโปรตอน

ตารางที่ 4.7 ค่าความเป็นกรดและด่างที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์ภายในเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลกติก

เอนไซม์	แบคทีเรีย	ค่าความเป็นกรดและด่างที่เหมาะสม
β-D-Phosphogalactoside galactohydrolase	*Lc. lactis* ssp. *cremoris*	7.0
Acylglycerol acylhydrolase (lipase)	*Lc. lactis* ssp. *lactis*	
	Lc. lactis ssp. *cremoris*	7.0-8.5
Pyruvate kinase	*Lc. lactis* ssp. *lactis*	6.9-7.5
D-Tagatose 1,6-diphosphate aldolase	*Lc. lactis* ssp. *lactis*	
	Lc. lactis ssp. *cremoris*	7.0-7.3
Aminopeptidase	*Lc. lactis* ssp. *cremoris*	7.0
Intracellular proteinase	*Lc. lactis* ssp. *lactis*	7.5
X-Prolyl dipeptidyl peptidase	*Lc. lactis* ssp. *lactis*	8.5
X-Prolyl dipeptidyl aminopeptidase	*Lc. lactis* ssp. *cremoris*	7.0

ที่มา : ดัดแปลงจาก Hutkins and Nannen (1993)

ความทนต่อกรด มีกลไกที่เกี่ยวข้องกับการผลิตโปรตีน ซึ่งมีการตอบสนองที่เพิ่มมากขึ้นอย่างรวดเร็วในเซลล์ที่มีการเจริญเติบโตในช่วง log phase ความทนต่อกรดขึ้นอยู่กับระดับความเป็นกรดของอาหารที่ใช้เลี้ยง ซึ่งค่าความเป็นกรดและด่างภายนอกเซลล์จะมีผลต่อความทนต่อกรด โดยจะส่งผลต่อความเป็นกรดและด่างของไซโตพลาสซึมในเซลล์ เซลล์ชนิดเดียวกันแต่มีความเป็นกรดและด่างภายในเซลล์ต่างกัน แม้ว่าจะเลี้ยงในอาหารที่มีค่าความเป็นกรดและด่างเหมือนกัน พบว่ามีระดับความทนต่อกรดที่แตกต่างกัน ในทางกลับกัน เซลล์ที่ต่างสายพันธุ์กันแต่มีค่าความเป็นกรดและด่างภายในเซลล์เท่ากันและแม้ว่าจะเลี้ยงในอาหารที่มีค่าความเป็นกรดและด่างต่างกัน พบว่า ความทนต่อกรดจะมีระดับที่ใกล้เคียงกัน เนื่องจากว่าในไซโตพลาสซึม ความเข้มข้นของ H^+ ขึ้นอยู่กับปริมาณ H^+ ภายในเซลล์ ซึ่งจะคอยทำหน้าที่กระตุ้นการสังเคราะห์ของโปรตีนที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำหน้าที่ป้องกันเซลล์ ในสภาวะที่อาหารไม่ได้มีค่าความเป็นกรดและด่างเป็นกลาง นอกจากนี้ยังมีกลไกอื่นๆ ที่ช่วยป้องกันเซลล์ ได้แก่ การซ่อมแซมดีเอ็นเอ หรืออาจมีกลุ่มโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการป้องกันโปรตีนที่มีความสำคัญไม่ให้ถูกทำลาย รวมไปถึงการป้องกันเซลล์โดยการแทนที่เซลล์ที่มีความ sensitive ต่อกรดด้วยกลุ่มของเซลล์ที่สามารถทนต่อกรดได้ (O'Sullivand and Condon. 1997)

แบคทีเรียกรดแลกติกที่เลี้ยงในอาหารที่มีสภาวะค่าความเป็นกรดและด่างต่ำๆ ปริมาณของแบคทีเรียจะมีค่าลดลง เนื่องจากเซลล์จะตายหรือหยุดการเจริญเติบโต ซึ่งจะส่งผลต่อการสร้างสารแบคเทอริโอซิน เนื่องจากว่า เซลล์ที่ทำหน้าที่ผลิตภูมิคุ้มกันและกลุ่มยีนที่ทำหน้าที่ถ่ายทอดรหัสพันธุกรรมของแบคเทอริโอซินนั้นลดลง ทำให้แบคทีเรียกรดแลกติกหยุดการสร้างแบคเทอริโอซิน (Zamfir *et al.* 2000)

ซึ่งจากการทดลองนี้ *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2 สามารถเจริญเติบโตและมีค่ากิจกรรมของสารยับยั้งแบคทีเรียมากที่สุด ที่ค่าความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 6.0 ซึ่งสอดคล้องกับ Hugenholtz *et al.* (1987) ที่ได้ทำการรายงานว่า อัตราการเจริญเติบโตของ *Lc. lactis* ssp. *cremoris* E8 จะมีอัตราการเจริญเติบโตสูงที่สุดในอาหารที่มีค่าความเป็นกรดและด่างประมาณ 6.2

Campos *et al.* (2006) ได้ทำการศึกษา คุณสมบัติของแบคเทอริโอซินของเชื้อ *Lc. lactis* ssp. *lactis* USC-39, *E. faecium* USC-46 และ *E. mundtii* USC-51 ที่คัดแยกได้จากปลา turbot (*Psetta maxima*) โดยทำการทดลองเลี้ยงเชื้อในช่วงความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 3.5, 4.5, 5.5 และ 6.5 เพื่อพิจารณาช่วงความเป็นกรดและด่างที่มีผลต่อค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซิน เนื่องจากความเป็นกรดและด่างในช่วงนี้จะใช้ในกระบวนการผลิตอาหาร ซึ่งปรากฏว่า *E. faecium* USC-46 สามารถยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* NCTC 11994 และ *L. monocytogenes* LHICA 1112 ในช่วงความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 3.5-6.5 ส่วน *Lc. lactis* ssp. *lactis* USC-39 และ *E. mundtii* USC-51 สามารถยับยั้ง *L. monocytogenes* NCTC 11994 และ *L. monocytogenes* LHICA 1112 ในช่วงความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 3.5-5.5 ในขณะที่ *Lc. lactis* ssp. *lactis* USC-39 และ *E. faecium* USC-46 สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* LHICA 1010 และ *S. aureus* ATCC 35845 ในช่วงความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 3.5-5.5 ส่วน *E. mundtii* USC-51 สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* LHICA 1010 และ *S. aureus* ATCC 35845 ในช่วงความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 3.5-4.5 ซึ่งค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินของ *Lc. lactis* ssp. *lactis* USC-39, *E. faecium* USC-46 และ *E. mundtii* USC-51 มีค่าเพิ่มมากขึ้นในขณะที่ค่าความเป็นกรดนั้นลดลง

Balcázar *et al.* (2008) ได้ทำการศึกษาลักษณะของคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลกติก *Lc. lactis* CLFP 101, *Lb. plantarum* CLFP 238 และ *Lb. fermentum* CLFP 242 ที่คัดแยกได้จากลำไส้ปลา rainbow trout โดยเมื่อทำการทดสอบความคงทนต่อความเป็นกรดและด่างในช่วงระหว่าง 1.0-6.5 แล้วตรวจสอบผลด้วย plate counting (Log CFU/ml) ผลปรากฏว่า *Lc. lactis* CLFP 101, *Lb. plantarum* CLFP 238 และ *Lb. fermentum* CLFP

242 สามารถรอดชีวิตได้ในช่วง ความเป็นกรดและด่าง เท่ากับ 2.5-6.5 แต่ไม่สามารถรอดชีวิตได้ในช่วงความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 1.0-2.0 ยกเว้น *Lb. plantarum* CLFP 238 ที่สามารถรอดชีวิตได้ แต่มีจำนวนน้อย ซึ่งเชื้อ *Lc. lactis* CLFP 101และ *Lb. fermentum* CLFP 242 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 6.5 จะมีค่า Log CFU/ml สูงที่สุด เท่ากับ 5.89 และ 6.24 ตามลำดับ ส่วนเชื้อ *Lb. plantarum* CLFP 238 จะมีค่า Log CFU/ml สูงที่สุด เท่ากับ 6.24 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 3.5

4.3.3.2 การทดสอบความสามารถในการเจริญและสร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์

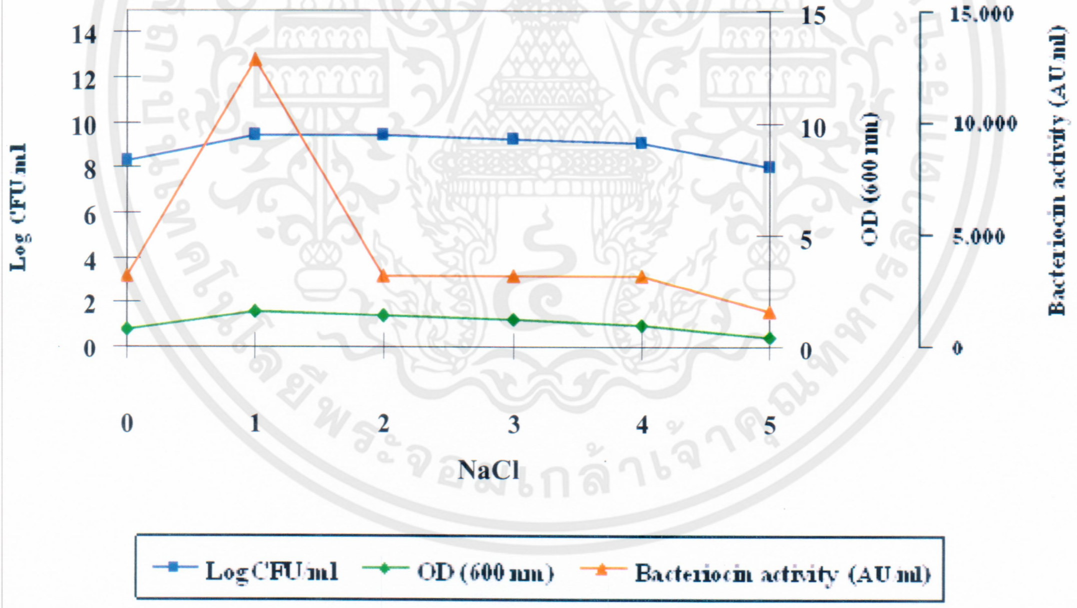
เมื่อนำ *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2 เลี้ยงในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆ ผลปรากฏว่า เชื้อที่เลี้ยงในโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ มีค่าการดูดกลืนแสงมากที่สุด เท่ากับ 1.63 มีค่าการเจริญเติบโตมากที่สุด เท่ากับ 9.46 Log CFU/ml และมีค่ากิจกรรมของสารยับยั้งแบคทีเรียสูงที่สุด เท่ากับ 12,800 AU/ml และเมื่อนำเชื้อไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่สูงเพิ่มขึ้น (2-5 เปอร์เซ็นต์) ผลปรากฏว่าทั้งค่าการดูดกลืนแสง ค่าการเจริญเติบโตและค่ากิจกรรมของสารยับยั้งแบคทีเรียนั้น มีค่าลดลงตามลำดับ ส่วนการเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีโซเดียมคลอไรด์ พบว่า *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2 มีค่าการเจริญเติบโตและมีค่ากิจกรรมของสารยับยั้งแบคทีเรียต่ำกว่าการเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าการเจริญเติบโตเท่ากับ 8.3 Log CFU/ml และมีค่ากิจกรรมของสารยับยั้งแบคทีเรีย เท่ากับ 3,200 AU/ml ดังนั้นจะเห็นได้ว่า การเลี้ยงเชื้อ *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2 ในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นเท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์ สามารถเจริญและสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียได้ดีที่สุด นอกจากนี้ *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2 สามารถเจริญและสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์ได้ในช่วงความเข้มข้น 2-5 เปอร์เซ็นต์ ได้ แสดงดังภาพที่ 4.6

การผลิตแบคเทอริโอซินจะลดลง เมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่สูงขึ้น โดยโซเดียมคลอไรด์จะไปรบกวนการเจริญเติบโตและการผลิตสารแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียกรดแลกติก เนื่องจากว่า กระบวนการเมตาบอลิซึมของแบคทีเรียมีความ sensitive ต่อไอออนของโซเดียมคลอไรด์และน้ำ (Neysen *et al.* 2003)

Verluyten *et al.* (2004) กล่าวว่า โซเดียมคลอไรด์มีผลต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียกรดแลกติกซึ่งในกรณีของการเลี้ยงเชื้อ *L. carvatus* LTH 1174 ในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโต แต่มีการเพิ่มปริมาณการยับยั้งเชื้อ ซึ่งบางครั้ง การเลี้ยงเชื้อในสภาพที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่ำๆ (1-2 เปอร์เซ็นต์) สามารถเพิ่มการเจริญของเชื้อได้ ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่ามีการผลิตสารแบคเทอริโอซินที่เพิ่มขึ้นในสภาพที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่ำๆ เนื่องจากว่า

โซเดียมคลอไรด์จะไปรบกวนโดยการเข้าจับกับ induction factor (IF) ของตัวรับ จากนั้น IF ก็จะถูกขับออกมาและไปจับกับตัวรับของแบคเทอริโอซิน ถึงแม้ว่าความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์จะไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตในบางครั้ง แต่มีผลต่อการผลิตสารแบคเทอริโอซิน

Itoi *et al.* (2008) ได้ทำการคัดแยก *Lc. lactis* subsp. *lactis* ที่สามารถทนความเค็มได้จากลำไส้ของปลาปักเป้า โดยทดลองเลี้ยงเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* E214, E219 และ E230 ที่ได้จากลำไส้ของปลาปักเป้าเปรียบเทียบกับ *Lc. lactis* subsp. *lactis* O-114 ที่มาจากชีส โดยเชื้อทั้งหมดนำมาเลี้ยงในอาหาร MRS ที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 1, 2, 3, 3.5, 4, 5, 6 และ 7 เปอร์เซ็นต์ ผลปรากฏว่า เชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* O-114 สามารถเจริญเติบโตได้มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0-4 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* E214, E219 และ E230 สามารถเจริญเติบโตได้มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์เช่นเดียวกัน เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0-6 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจะเห็นได้ว่า เชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* E214, E219 และ E230 สามารถทนต่อโซเดียมคลอไรด์ได้ดีกว่า *Lc. lactis* subsp. *lactis* O-114



ภาพที่ 4.6 ผลของค่าความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรีย *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2 โดยใช้เชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T เป็นแบคทีเรียทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.3.3 การทดสอบความสามารถในการเจริญและสร้างสารยับยั้งแบคทีเรีย เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มี bile salts

เมื่อนำ *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2 มาทดสอบความสามารถในการเจริญและสร้างสารยับยั้งแบคทีเรีย เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีความเข้มข้นต่างๆ ของ bile salts ผลปรากฏว่าที่ความเข้มข้นของ bile salts 0.3 เปอร์เซ็นต์ มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.17 มีค่าการเจริญเติบโตเท่ากับ 8.3 Log CFU/ml และมีค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินเท่ากับ 200 AU/ml ส่วนที่ความเข้มข้นของ bile salts 0.6-0.9 เปอร์เซ็นต์ ไม่พบค่าการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2 แสดงดังภาพที่ 4.7

คุณสมบัติข้อหนึ่งในการเป็นโปรไบโอติก คือ ความสามารถในการทนต่อน้ำดีในลำไส้เล็ก (Nousiainen *et al.* 2004) ซึ่ง bile salts จะถูกสังเคราะห์จากคอเลสเตอรอลในตับและถูกกักเก็บไว้ที่ถุงน้ำดี จากนั้นก็จะมีการปลดปล่อยเข้าสู่ลำไส้เล็ก หลังจากมีการย่อยอาหารประเภทที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบ ด้วยคุณสมบัติการเป็นดีเทอร์เจนต์นี้เอง ทำให้ผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ ซึ่งมีองค์ประกอบเป็นลิพิดและกรดไขมันเกิดการถูกทำลาย จุลินทรีย์บางชนิดสามารถไฮโดรไลส์ bile salts โดยใช้เอนไซม์ bile salt hydrolase (BSH) ส่วนกลไกในการต้านทาน bile salts ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด (Erkkilä and Petäjä. 2000)

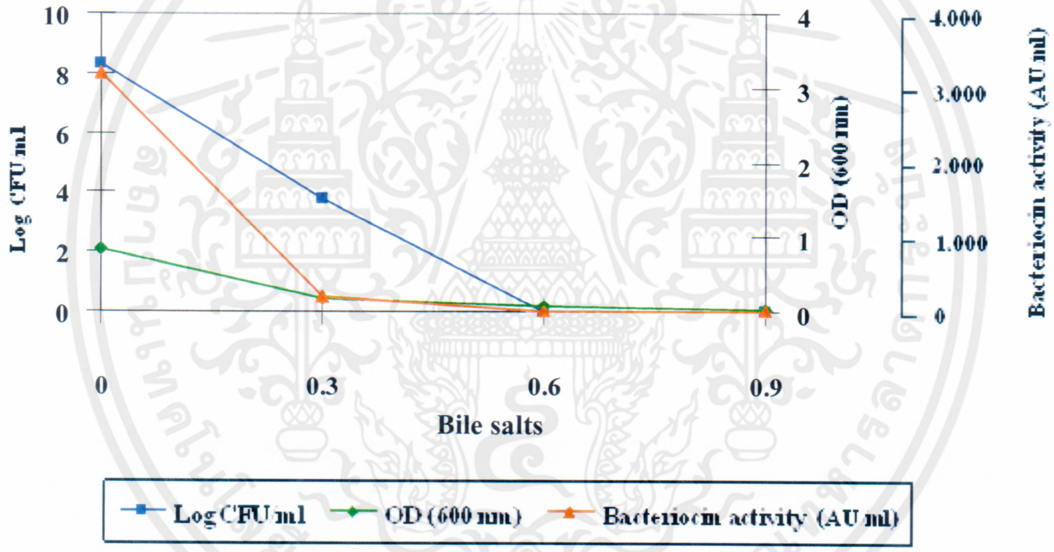
Chateau *et al.* (1994) ได้ทำการทดสอบความสามารถในการทนต่อ bile salts ของ *Lb. reuteri* BFE 1058, *Lb. johnsonii* BFE 1059 และ *L. johnsonii* BFE 1061 พบว่าเชื้อ *Lb. reuteri* BFE 1058 และ *L. johnsonii* BFE 1061 มีความสามารถในการทนต่อ bile salts มากกว่า *Lb. johnsonii* BFE 1059 ดังนั้นสายพันธุ์เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสามารถในการทนต่อ bile salts ด้วย

Balcázar *et al.* (2008) ได้ทำการศึกษาลักษณะของคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลกติก *Lc. lactis* CLFP 101, *Lb. plantarum* CLFP 238 และ *Lb. fermentum* CLFP 242 ที่คัดแยกได้จากลำไส้ปลา rainbow trout โดยเมื่อทำการทดสอบความคงทนต่อน้ำดีที่ได้จากปลา rainbow trout โดยใช้น้ำดีความเข้มข้น 2.5-10 เปอร์เซ็นต์ ผลปรากฏว่าค่า log CFU/ml ของแบคทีเรียกรดแลกติก *Lc. lactis* CLFP 101, *Lb. plantarum* CLFP 238 และ *Lb. fermentum* CLFP 242 แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญ เนื่องจากว่าน้ำดีของปลาจะมีความเข้มข้นประมาณ 0.4-1.3 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น แต่สำหรับในการทดลอง มีการใช้น้ำดีความเข้มข้น 2.5-10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นน้ำดีที่มีความเข้มข้นมากกว่าน้ำดีปกติกที่มีอยู่ในปลาที่นำมาทดสอบ

Erkkilä and Petäjä (2000) ได้ทำการศึกษาการคัดแยกเชื้อที่เลี้ยงในสภาวะความเป็นกรดและด่างต่ำและการรอดชีวิตเมื่อเลี้ยงใน bile salts เพื่อใช้เป็นโปรไบโอติก โดยเมื่อนำเชื้อ *Lb. pentosus*, *Lb. sake*, *Pediococcus acidilactici* และ *P. pentosaceus* ที่คัดแยกได้จากเนื้อ ทำการทดสอบโดยนำไปเลี้ยงในอาหาร MRS ที่มี bile salts ความเข้มข้น 0.15 และ 0.30 เปอร์เซ็นต์

ผลปรากฏว่า bile salts ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.15 เปอร์เซ็นต์ ไม่ได้ส่งผลต่อจำนวนของ lactobacilli ส่วน bile salts ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.30 เปอร์เซ็นต์ นั้นส่งผลต่อการรอดชีวิตของเชื้อที่ทดสอบ ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าวแสดงว่า bile salts ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.30 เปอร์เซ็นต์ เป็นความเข้มข้นที่มากที่สุดที่เชื้อแบคทีเรียสามารถทนมีชีวิตอยู่ได้

Vinderola and Reinheimer (2003) ได้ทำการศึกษาความเป็นโปรไบโอติกของแบคทีเรีย *Lc. lactis* โดยทดสอบความคงทนต่อ bile salts ที่มีการปรับค่าความเข้มข้นเท่ากับ 0.3, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากการทดลองใน bile salts ที่มีค่าความเข้มข้นเท่ากับ 0.3 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีแบคทีเรีย *Lc. lactis* จำนวน 76.6± 5.1 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใน bile salts ที่มีค่าความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีแบคทีเรีย *Lc. lactis* จำนวน 72.8± 6.3 เปอร์เซ็นต์ และใน bile salts ที่มีค่าความเข้มข้นเท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีแบคทีเรีย *Lc. lactis* จำนวน 61.3± 3.7 เปอร์เซ็นต์



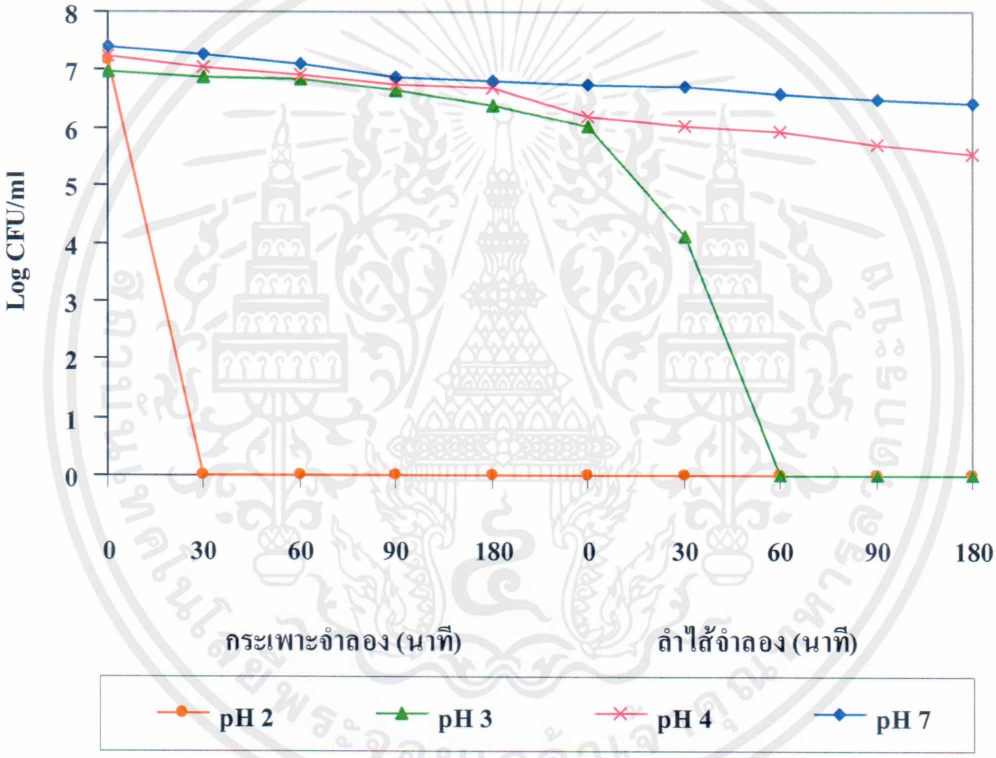
ภาพที่ 4.7 ผลของค่าความเข้มข้น bile salts ต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียของ *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2 โดยใช้เชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157[T] เป็นแบคทีเรียทดสอบ

4.3.3.4 การทดสอบความสามารถในการมีชีวิตรอดในกระเพาะและลำไส้จำลอง

เมื่อนำ *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2 มาทดสอบความสามารถในการมีชีวิตรอดในกระเพาะและลำไส้จำลอง โดยใช้น้ำย่อยจำลองที่มีค่าความเป็นกรดและด่างต่างๆ เท่ากับ 2, 3, 4 และ 7 ผลปรากฏว่า *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2 ไม่สามารถมีชีวิตรอดในน้ำย่อยกระเพาะจำลองที่มีค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 2 แต่เมื่อนำ *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2 ทดสอบกับน้ำย่อยจำลองที่มีค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 3 ผลปรากฏว่า *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2 สามารถมีชีวิตอยู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้นานกว่าในน้ำย่อยจำลองที่ค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 2 โดยสามารถมีชีวิตรอดในกระเพาะจำลองนาน 180 นาที ซึ่งมีค่าเท่ากับ 6.38 Log CFU/ml หลังจากนั้น พบว่าแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท Sb2 มีชีวิตรอดลดลงในลำไส้จำลอง จนกระทั่งไม่พบการมีชีวิตรอด เมื่อเวลาผ่านไป 60 นาที และเมื่อนำ *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2 มาทดสอบกับน้ำย่อยจำลองที่มีค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 4 และ 7 ผลปรากฏว่า *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2 สามารถมีชีวิตอยู่ได้นานกว่าการทดสอบการมีชีวิตรอดในน้ำย่อยจำลองที่ค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 2.5 และ 3 โดยสามารถมีชีวิตรอดในกระเพาะจำลองนาน 180 นาที ซึ่งมีค่าเท่ากับ 6.67 และ 6.83 Log CFU/ml ตามลำดับ และหลังจากนั้นพบว่า *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2 สามารถมีชีวิตรอดในลำไส้จำลอง เมื่อเวลาผ่านไปนาน 180 นาที โดยจำนวนเชื้อมีค่าลดลงเท่ากับ 5.52 และ 6.42 ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 4.8



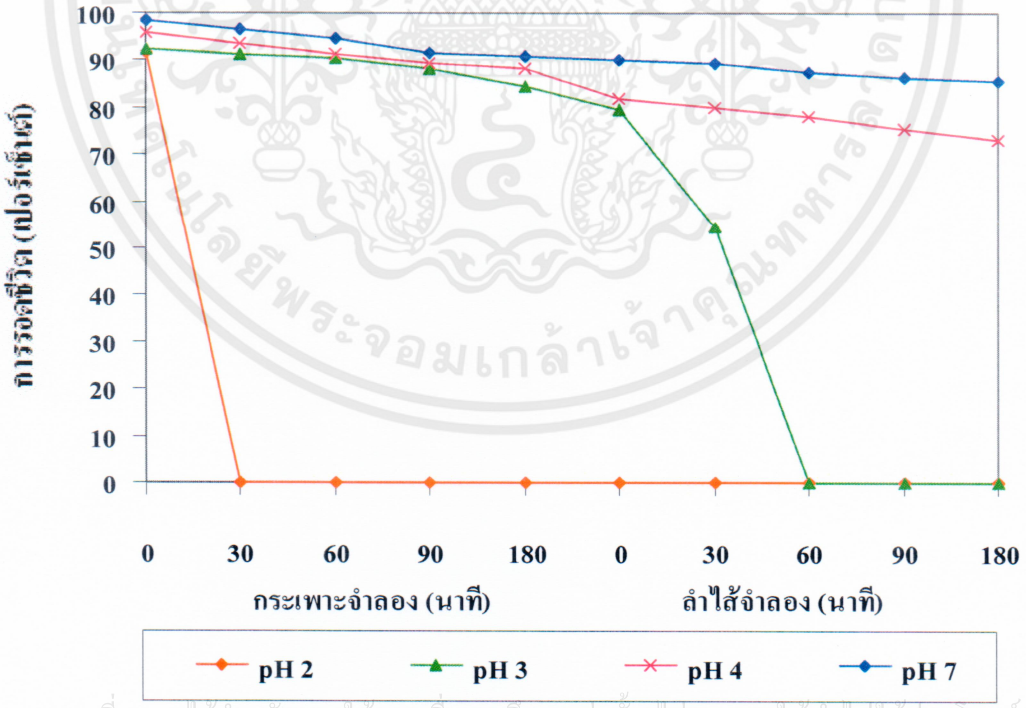
ภาพที่ 4.8 แสดงจำนวนการมีชีวิตรอดในกระเพาะจำลอง เมื่อทดสอบกับค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 2, 3, 4 และ 7 เป็นเวลา 180 นาที และค่าการมีชีวิตรอดในลำไส้จำลอง เมื่อทดสอบกับค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 2, 3, 4 และ 7 เป็นเวลา 180 นาที

เมื่อนำ *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2 มาทดสอบความสามารถในการมีชีวิตรอดในกระเพาะและลำไส้จำลอง โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต พบว่า *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2 สามารถรอดชีวิตในน้ำย่อยจำลองที่มีค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 7 มากที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 85.49 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ในน้ำย่อยจำลองที่มีค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 4 และ 3 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 73.02 และ 54.37 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 4.9

การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีลักษณะการเป็นโปรไบโอติก คุณสมบัติประการหนึ่งคือจะต้องสามารถทนต่อกรดซึ่งมีค่าความเข้มข้นที่สูงในระหว่างที่แบคทีเรียจะต้องพบในกระเพาะและลำไส้ และจะต้องทนต่อน้ำดีที่มีความเข้มข้นสูงเช่นเดียวกันในลำไส้เล็ก (Nousiainen *et al.* 2004) bile salts จะมีความเข้มข้นสูง สามารถละลายไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้โปรตีนที่แทรกอยู่ระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์หลุดออกไป ส่วนประกอบต่างๆที่อยู่ภายในเซลล์จะเกิดการรั่วไหลออกมา ส่งผลให้เซลล์ตายในที่สุด (Begley *et al.* 2005)

ในปัจจุบันแบคทีเรียที่จัดเป็นโปรไบโอติก ได้แก่ *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* อย่างไรก็ตามชนิดของแบคทีเรียที่กำลังศึกษาและพิจารณาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติก ได้แก่ *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Saccharomyces*, *Propionibacterium*, *Streptococcus thermophilus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Vinderola and Reinheimer. 2003) และ *Pediococcus acidilactici* (Nousiainen *et al.* 2004)

Vinderola and Reinheimer. (2003) ได้ทำการศึกษาความเป็นโปรไบโอติกของแบคทีเรีย *Lc. lactis* โดยทดสอบความคงทนต่อน้ำย่อยจำลองที่มีการปรับค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 2 และ 3 เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่า ในน้ำย่อยจำลองที่ค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 2 แบคทีเรีย *Lc. lactis* มีค่าลดลง 3.8± 0.3 log CFU/ml ส่วนในน้ำย่อยจำลองที่ค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 3 แบคทีเรีย *Lc. lactis* มีค่าลดลง >6.0 log CFU/ml



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.9 แสดงเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดในกระเพาะจำลอง เมื่อทดสอบกับค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 2, 3, 4 และ 7 เป็นเวลา 180 นาที และค่าการมีชีวิตรอดในลำไส้จำลอง เมื่อทดสอบกับค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 2, 3, 4 และ 7 เป็นเวลา 180 นาที

จุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการผลิตอาหารประเภทหมักดอง มีทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ และรา แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับอาหารหมักมากที่สุด คือ แบคทีเรียกรดแลกติก ซึ่งมีบทบาทในอาหารหมักมากมาย ส่วนโปรไบโอติกมีการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิด เพราะมีคุณสมบัติที่สามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ และมีความสามารถในการสร้างสารหลายชนิด ซึ่งมีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น ที่ทำให้อาหารเน่าเสียหรือจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร (อัจฉรา เพิ่ม. 2550) โปรไบโอติกที่ใช้กันอยู่ปัจจุบันจะมีจุลินทรีย์หลายชนิดผสมกันอยู่และอาจอยู่ในรูปผง เม็ด หรือรูปแป้งเปียก การให้สัตว์กินอาจจะทำโดยการกรอกให้สัตว์กินโดยตรง หรือผสมกับอาหาร เติมในน้ำ คุณสมบัติของโปรไบโอติกที่ดีจะต้องเตรียมให้ได้เชื้อที่สามารถมีชีวิตอยู่ในสภาพการเก็บรักษาปกติและต้องสามารถคงอยู่ในทางเดินอาหารสัตว์ รวมทั้งต้องให้ผลที่เป็นประโยชน์ต่อสัตว์ด้วย (Fuller. 1993) ซึ่งคุณสมบัติในการเป็นโปรไบโอติกที่ดีนั้นจะต้องประกอบไปด้วยความสามารถในการรอดชีวิต เมื่ออยู่ในกระเพาะอาหารซึ่งมีค่าความเป็นกรดสูง (Nousiainen *et al.* 2004) สามารถทนต่อน้ำดีได้ เนื่องจากน้ำดีจะถูกปล่อยเข้าสู่ลำไส้เล็ก หลังจากมีการย่อยอาหารประเภทที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบ (Erkkilä and Petäjä. 2000) อีกทั้งน้ำดียังมีหน้าที่ขับสารตกค้างในร่างกาย เช่น ยาหรือแร่ธาตุบางตัว (Kontula *et al.* 1998) สามารถแข่งขันกับเชื้อโรคในการยึดเกาะผนังลำไส้ ซึ่งโดยปกติแล้วเชื้อโรคจะเข้าเกาะและต่อต้านการเคลื่อนที่ของลำไส้ที่มีการบีบตัวให้อาหารเคลื่อนที่ในลักษณะลูกคลื่น (peristalsis) อีกทั้งมีความสามารถในการแย่งอาหารของเชื้อก่อโรค (Fuller. 1993) สามารถทนต่อความร้อนในขั้นตอนของการผสมกับอาหาร (Nousiainen *et al.* 2004) มีความสามารถในการทนต่อโซเดียมคลอไรด์ เนื่องจากอาหารประเภทหมักจะมีเกลือเป็นส่วนผสม 2.4-3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในการใส่เกลือจะมีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการและเอื้อต่อการเจริญของแบคทีเรียกรดแลกติก (อัจฉรา เพิ่ม. 2550) ปัจจุบันมีการคัดแยกเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรม เช่น อุตสาหกรรมอาหารคนหรือสัตว์ เป็นต้น (Adnan and Tan. 2007)

Arihara *et al.* (1998) รายงานว่า พบ *Lb. gasseri* ซึ่งเป็นแบคทีเรียกรดแลกติกที่พบได้มากในระบบทางเดินอาหารของคน และมีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก จะช่วยลดการแพร่ของเชื้อ *S. aureus* รวมถึงการสร้าง enterotoxin ในระหว่างการหมักไส้กรอกได้ เนื่องจากการหมักกรดแลกติก ไฮโดรเจนเปอร์ออไซด์ หรือแบคเทอริโอซิน ทำให้เกิดสภาวะที่ไม่เหมาะกับการเจริญของ *S. aureus*

Brennan *et al.* (1993) รายงานว่า *Lactobacillus acidophilus* เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม Lactobacilli ซึ่งอยู่ในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ มีสมบัติทนต่อ bile salts และมีความสำคัญต่อระบบสมดุลจุลินทรีย์ในลำไส้ อาหารเสริมที่มีเซลล์ของ *Lb. acidophilus* จะช่วยปรับปรุงและรักษาสมดุลจุลินทรีย์ในระบบลำไส้ และช่วยรักษาโรคที่เกิดกับลำไส้ด้วย เช่น อาจมีส่วนช่วยใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงแหล่งที่มาของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การรักษาโรค lactose intolerance ได้มีการบรรจุ *Lb. acidophilus* ลงในผลิตภัณฑ์อาหารที่มีขายทั่วไปในร้านค้าปลีก สำหรับใช้เป็นอาหารเสริมของมนุษย์และสัตว์

ตารางที่ 4.8 กลุ่มแบคทีเรียที่นำมาใช้เป็นโปรไบโอติก

แบคทีเรีย	ตัวอย่างสายพันธุ์ที่นิยมใช้เป็นโปรไบโอติก
Bacillus spp.	*B. coagulan*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* และ *B. toysi*
Lactobacillus spp.	*Lb. acidophilus*, *Lb. brevis*, *Lb. casei* และ *Lb. plantarum*
Leuconostoc spp.	*Leu. cremoris*, *Leu. mesenteroides* และ *Leu. dextranicum*
Pediococcus spp.	*P. acidophilus*, *P. halophilus*, *P. cerevisiae* และ *P. pentosaceus*
Streptococcus spp.	*S. cremoris*, *S. diacetylactis*, *S. faecium* และ *S. intermedius*

ที่มา : ดัดแปลงจาก อัจฉรา เพิ่ม (2550)

ส่วนในแง่ของสัตว์น้ำนั้นมีการวิจัยเกี่ยวกับการใช้โปรไบโอติก เพื่อเพิ่มทางเลือกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำไม่ว่าจะเป็นในด้านการส่งเสริมสุขภาพสัตว์น้ำให้แข็งแรง หรือการจัดการทางด้านคุณภาพน้ำ ซึ่งการใช้โปรไบโอติกในสัตว์น้ำนั้น มักจะมีการผสมลงไปในอาหาร เนื่องจากสัตว์น้ำสามารถรับจุลินทรีย์ชนิดต่างๆที่อยู่ในสภาพแวดล้อมที่สัตว์น้ำอาศัยอยู่ ไม่ว่าจะเป็นทางด้านอาหารหรือน้ำ ซึ่งจะมีการไหลผ่านเข้าทางปากหรือมีการกรองผ่าน ส่งผลให้จุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์น้ำมีความหลากหลาย (Gatesoup. 1999) และหากสัตว์น้ำรับจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคเข้าไป ก็จะส่งผลต่อสุขภาพของสัตว์ เพราะอาจจะทำให้สัตว์น้ำเกิดโรคและอาจก่อให้เกิดโรคระบาดในสัตว์น้ำได้ (Ringø and Gatesoup. 1998) ดังนั้นในปัจจุบันนี้ จึงมีการคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียเพื่อนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกในสัตว์น้ำ ซึ่งจะต้องมีคุณสมบัติในการยึดเกาะเยื่อบุผนังลำไส้ สามารถทนต่อสภาวะเป็นกรด สามารถทนต่อน้ำดี สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ (Balcázar *et al.* 2008) สามารถทนต่อสภาวะแวดล้อม เช่น อุณหภูมิและความเค็มระดับต่างๆ ซึ่งจะส่งผลต่อปริมาณของแบคทีเรียเมื่ออยู่ในระบบทางเดินอาหาร (Ringø and Gatesoup. 1998)

Austin *et al.* (1995) รายงานว่า การใช้โปรไบโอติกจะสามารถควบคุมโรคที่เกี่ยวกับปลาแซลมอนในแหล่งน้ำธรรมชาติ โดยมีการใช้ *Vibrio alginolyticus* เป็นโปรไบโอติกที่แยกจากส่วนท้องของกุ้งในการยับยั้งเชื้อ *A. samonicida*, *V. anguillarum* และ *V. ordalii* ซึ่งเป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรคในปลาแซลมอน ในขั้นแรกมีการทดสอบการยับยั้งเชื้อของ *V. alginolyticus* ต่อเชื้อที่ทำให้เกิดโรคในห้องปฏิบัติการพบว่า *V. alginolyticus* สามารถยับยั้งเชื้อ *A. samonicida*, *V. anguillarum* และ *V. ordalii* โดยการผสมเชื้อสดของ *V. alginolyticus* ลงในอาหารที่ใช้เลี้ยงปลา พบว่าภายใน 21 วัน สามารถตรวจเชื้อโปรไบโอติกในปลาที่ได้รับอาหาร และปลาที่เกิดโรคจะมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อัตราการรอดชีวิตเพิ่มขึ้นจาก 10 เปอร์เซ็นต์ เป็น 26 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้รับโปรไบโอติก

Rengpipat *et al.* (1998) รายงานว่า มีการใช้โปรไบโอติกเพื่อป้องกันโรคเรืองแสงในกุ้งกุลาดำที่เกิดจากจุลินทรีย์ *V. harveyi* โดยใช้เชื้อ Bacillus ที่แยกได้จากเครื่องในของกุ้งกุลาดำ นำเซลล์สดของ *Bacillus* ไปใช้ผสมในอาหารเลี้ยงกุ้งให้แก่ลูกกุ้งอายุ 10 วัน จาก 2 สัปดาห์สุ่มลูกกุ้ง 43 ตัวที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกที่ทำการสำรวจเชื้อพอว่า *V. harveyi* ลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการผสมโปรไบโอติกในอาหารจาก 6.35×10^6 CFU/ml เป็น 6.09×10^6 CFU/ml และสามารถเพิ่มการเจริญในกุ้งกุลาดำได้โดยกุ้งมีน้ำหนักเพิ่มขึ้นจาก 26.0 มิลลิกรัม เป็น 43.8 มิลลิกรัม และกุ้งมีลำตัวยาวเพิ่มขึ้นจาก 1.71 เซนติเมตร เป็น 1.83 เซนติเมตร และพบว่ากุ้งที่ได้รับการบำบัดโดยโปรไบโอติกจะมีชีวิตรอดสูงประมาณร้อนละ 13 ส่งผลให้ได้ผลผลิตกุ้งเพิ่มขึ้นร้อยละ 89 เมื่อเปรียบเทียบกันชุดที่ไม่ได้รับโปรไบโอติก โปรไบโอติกในแหล่งธรรมชาติจะลดองค์ประกอบสารเคมี ลดความเข้มข้นของไนโตรเจน และฟอสฟอรัส โดยออกซิเจนจะละลายได้ดีขึ้น และมีผลให้สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเจริญได้ดีขึ้น สามารถควบคุมแอมโมเนีย ไนโตรเจน ไฮโดรเจนซัลไฟด์ มีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของตะกอน ผลกระทบจากเชื้อโรคลดลง การรอดชีวิตของปลาและลูกกุ้งในแหล่งน้ำจึงเพิ่มขึ้น

กมลทิพย์ กาพสมุทร และวัชรี ส้มแก้ว (2542) รายงานว่า โปรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในระบบอาหารของปลาจากแบคทีเรียสร้างกรด 153 ไอโซเลท แยกได้จากเครื่องในปลากะพงเป็นแบคทีเรียแลกติก 87 ไอโซเลท เมื่อทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกพบว่า 16 ไอโซเลท สามารถทนต่อน้ำที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 500 ppm จำนวน 62 ไอโซเลท สามารถทดต่อกรดที่ค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 1, 2 และ 3 ได้ตั้งแต่ 0.5-5 ชั่วโมง เมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการย่อยโปรตีน แป้ง ไขมัน มี 60 ไอโซเลท ที่สามารถย่อยโปรตีน แป้ง ไขมันได้ และแบคทีเรียแลกติก 28 ไอโซเลท สามารถยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus* ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม *Lactobacillus* sp. (homofermentative) 7 ไอโซเลท *Lactobacillus* sp. (homofermentative) 3 ไอโซเลท และ *Lactobacillus* sp. 18 ไอโซเลท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.9 ชนิดและประโยชน์ของแบคทีเรียที่ใช้เป็นโปรไบโอติกในสัตว์น้ำ

แบคทีเรีย	ประโยชน์
Bacillus spp.	เพิ่มผลผลิตและการรอดชีวิตของปลา channel catfish
	ปรับปรุงคุณภาพน้ำ
	กำจัดเชื้อ *Vibrio* sp.
B. subtilis	กำจัดเชื้อ *Vibrio* sp.
B. toyoi	เพิ่มอัตราการอยู่รอดของ japanese eel จากการติดเชื้อ *Edwardsiella* sp.
	เพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของปลา Yellowtail
Streptococcus faecium	เพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโตและการกินอาหารของปู israeli carp

ที่มา : ดัดแปลงจาก Gatesoup (1999)

ดังนั้นในการทดลองนี้ จึงมีการเลี้ยงเชื้อ *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เนื่องจากอุณหภูมิในน้ำที่ใช้สำหรับการเลี้ยงปลาในประเทศไทยจะอยู่ที่ประมาณ 29-30 องศาเซลเซียส (กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2549) จากนั้นจึงนำไปทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติก ไม่ว่าจะเป็นการทดสอบการเจริญและสร้างสารยับยั้งแบคทีเรีย เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะเป็นกรดและด่าง สภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์หรือสภาวะที่มี bile salts รวมไปถึงการทดสอบการรอดชีวิตในกระเพาะและลำไส้จำลอง เนื่องจากเชื้อที่สามารถนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกได้นั้นจะต้องมีการทดสอบคุณสมบัติดังกล่าวก่อน

4.3.4 การทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ

ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมักมีการใช้ยาปฏิชีวนะเข้ามาเกี่ยวข้อง เนื่องจากการเกิดโรคในสัตว์น้ำมักมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อม การใช้ยาปฏิชีวนะจึงเป็นที่แพร่หลายในวงการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ดังนั้นจึงมีการทดสอบความต้านทานของเชื้อโดยใช้วิธีการทดสอบชนิดต่างๆ โดยยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ได้แก่ ampicillins, chloramphenicol, cephalothin, erythomycin, gentamycin, kanamycin, naldixic acid, neomycin, nitrofurantoin, norfloxacin, novabincin, oxolinic acid, tetracyclin, sulfamethoxazole/trimethoprim, oxytetracyclin (Tendencia. 2004)

Lc. lactis ssp. *lactis* Sb2 ที่คัดแยกได้จากปลากะพง มีความสามารถในการต้านทาน gentamycin, kanamycin, naldixic acid, neomycin, norfloxacin, oxolinic acid และ sulfamethoxazole/trimethoprim และเมื่อทดสอบกับ ampicillins, chloramphenicol, cephalothin, erythomycin, nitrofurantoin, novabincin, tetracyclin และ oxytetracyclin ผลปรากฏว่า *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2 ไม่สามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะดังกล่าวได้ (ตารางที่ 4.10)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.10 ผลของยาปฏิชีวนะต่อสารยับยั้งแบคทีเรียที่ผลิตโดย *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2

ยาต้านจุลชีพ	สัญลักษณ์	ความเข้มข้น (µg)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง clear zone (mm.)			*Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2	
			R	I	S	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (mm.)	ค่าการยอมรับการยับยั้งเชื้อ
Ampicillins	AM10	10	≤11	12-13	≥14	36	S
Chloramphenicol	C30	30	≤12	13-17	≥18	34	S
Cephalothin	KF30	30	≤14	15-17	≥18	34	S
Erythomycin	E15	15	≤13	14-22	≥23	28	S
Gentamycin	CN10	10	≤12	13-14	≥15	0	R
Kanamycin	K30	30	≤13	14-17	≥18	10	R
Naldixic acid	NA30	30	≤13	14-18	≥19	0	R
Neomycin	N30	30	≤12	13-16	≥17	0	R
Nitrofurantoin	F300	300	≤14	15-16	≥17	18	S
Norfloxacin	NOR10	10	≤17	18-21	≥22	0	R
Novabincin	NV5	5	≤12	13-16	≥17	18	S
Oxolinic acid	OA2	2	≤10	-	≥11	0	R
Tetracyclin	TE30	30	≤14	15-18	≥19	38	S
Sulfamethoxazole/ Trimethoprim	SXT25	25/1.5	≤10	11-15	≥16	0	R
Oxytetracyclin	OT30	30	≤14	15-18	≥19	38	S

S = Susceptible

I = Intermediate

R = Resistant

Lc. lactis ssp. *lactis* Sb2 ซึ่งมีความสามารถในการต้านทาน gentamycin, kanamycin และ neomycin สอดคล้องกับ Orberg and Sandine (1985) ซึ่งได้รายงานว่า *Lc. lactis* subsp. *cremoris* และ *Lc. lactis* subsp. *lactis* จำนวน 26 สายพันธุ์ สามารถต้านทาน trimethoprim, sulfathiazole, gentamicin, kanamycin, lincomycin, nafcillin, neomycin, nisin, rifampin และ streptomycin ในส่วนของ *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2 ที่ไม่สามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ ได้แก่ ampicillins, chloramphenicol, erythromycin และ tetracycline มีความสอดคล้องกับ De Fabrizio *et*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

al. (1994) ซึ่งได้รายงานว่า *Lactococcus lactis* ไม่สามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ amikacin, ampicillin, 1st generation cephalosporin, chloramphenicol, erythromycin, gentamicin, imipenem, oxacillin, penicillin, pipericillin, sulphonamide, tetracycline, trimethoprim/ sulfomethoxazole และ vancomycin

Mathur and Singh (2005) รายงานว่า ยาปฏิชีวนะที่ *Lc. lactis* สามารถต้านทานได้น้อย ได้แก่ carbenicillin, ciprofloxacin, dicloxacillin และ norfloxacin

ยาปฏิชีวนะ เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่สร้างโดยจุลินทรีย์ สามารถที่จะยับยั้งการเจริญหรือฆ่าจุลินทรีย์อื่นๆได้โดยใช้ในปริมาณที่ต่ำมากและจะไม่รวมถึงสารสกัดจากพืชหรือแหล่งอื่นที่ไม่ใช่จุลินทรีย์ เพราะสารเหล่านี้ในการยับยั้งจุลินทรีย์ต้องใช้ที่ความเข้มข้นสูง ปัจจุบันยาปฏิชีวนะจะรวมถึงสารกึ่งสังเคราะห์ที่ใช้ยาปฏิชีวนะเป็นต้นแบบด้วย (อัจฉรา เพิ่ม. 2550) ยาปฏิชีวนะบางชนิด เช่น tetracycline และ chloramphenicol มีการผสมลงในอาหารสัตว์ จะทำให้สัตว์เติบโตได้เร็วกว่าปกติรวมทั้งเพิ่มปริมาณการผลิตน้ำนม ในระยะเวลาต่อมาจึงปรากฏว่ามีการใช้ยาปฏิชีวนะเป็นอาหารเสริม เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตของสัตว์เลี้ยงอย่างกว้างขวาง ซึ่งบ่อยครั้งเกิดปัญหาขึ้น เนื่องจากการควบคุมที่ไม่ดีพอ การใช้ปริมาณมากเกินกว่าที่กำหนด การใช้นานเกินไปโดยไม่มีมีการหยุดใช้ยาก่อนฆ่า เป็นต้น ทำให้เกิดการตกค้างในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ และเชื้อดื้อยาที่ใช้ยาบางชนิดขึ้น โดยเชื้อบางชนิดอาจทำให้เกิดโรคในคน จึงทำให้เกิดปัญหาการรักษาในภายหลัง นอกจากนี้การที่สัตว์ได้รับยาปฏิชีวนะบ่อยเกินไป ทำให้เสียสมดุลของเชื้อประจำถิ่นในลำไส้ ความผิดปกติสามารถก่อผลร้ายต่อสัตว์ได้ ดังนั้นจึงต้องหาสิ่งทดแทนในลักษณะเดียวกัน คือ โปรไบโอติก ปรากฏว่าใช้เป็นสิ่งส่งเสริมในอาหารสัตว์ที่ให้ประโยชน์ได้เช่นเดียวกับยาปฏิชีวนะ แต่ไม่ก่อให้เกิดการตกค้างและการดื้อยาตามมา (สุวณีย์ สุภเวชย์ และมาลัย วรจิตร. 2536) ส่วนสารที่แบคทีเรียกรดแลกติกสร้างออกมาส่วนใหญ่เป็นกรดแลกติก และกรดอะซิติก นอกจากนี้ยังมีสารชนิดอื่น ๆ ที่เกิดขึ้นในปริมาณน้อย แต่มีผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ เช่นกัน ได้แก่ กรดฟอร์มิก กรดไขมันอิสระ แอมโมเนีย เอทานอล ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดอะซีทิล อะซีโตอิน อะซีทัลดีไฮด์ เบนโซเอต เอนไซม์ที่มีผลทำให้เซลล์แบคทีเรียแตก แบคเทอริโอซิน และริวเทอรีน (Caplice *et al.* 1999) รวมทั้งสารยับยั้งที่ยังไม่สามารถจัดจำแนกได้อีกหลายชนิด แบคทีเรียกรดแลกติกสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มต่างๆได้ (Caplice *et al.* 1999) สารต่างๆ ที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีการศึกษากันมาก ได้แก่ กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ คาร์บอนไดออกไซด์ ไดอะซีทิล ริวเทอรีน และแบคเทอริโอซิน (Axelsson. 2004)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.11 การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างสารยับยั้งที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลกติกกับยาปฏิชีวนะ

สมบัติ	สารยับยั้ง	ยาปฏิชีวนะ
การประยุกต์ใช้	อาหาร	การแพทย์
การสังเคราะห์	Primary metabolite หรือ Secondary metabolite	Secondary metabolite
การดูดซึมในทางเดินอาหาร	ไม่มี	มี
การตกค้างในเนื้อเยื่อ	ไม่มี	มี
การกลายพันธุ์หรือดื้อยา	ไม่เกิด	เกิด
แหล่งที่สร้าง	จุลินทรีย์	จุลินทรีย์หรือสังเคราะห์ทางเคมี
ประเภทของสาร	โปรตีน เช่น แบคเทอริโอซิน สารอื่นที่ไม่ใช่โปรตีน เช่น reuterine	โปรตีน สารอื่นที่ไม่ใช่โปรตีน เช่น tetracycline และ chloramphenicol เป็นต้น
กิจกรรม	ให้ฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อเฉพาะที่ร่างกาย เช่น ระบบทางเดินอาหาร	ให้ฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อได้ทั่วร่างกาย และออกฤทธิ์ต่อเชื้อต่างๆ ได้มากชนิด
กลไกการทำงาน	เกิดช่องที่เยื่อหุ้มเซลล์ทำให้สูญเสียความสามารถในการนำสารผ่านเข้าออก	ขัดขวางการสังเคราะห์ผนังเซลล์ ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ และโปรตีน

ที่มา : ดัดแปลงจาก Cleveland *et al.* (2001)

ในปัจจุบันมีรายงานเกี่ยวกับแบคทีเรียที่มีความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในกลุ่มของปลา แต่มีการศึกษาเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ซึ่งเป็นการศึกษาในห้องทดลองสำหรับประเทศชิลีเอง ซึ่งเป็นประเทศที่มีการส่งออกสินค้าประเภทปลา พบว่ายังไม่มีการศึกษาสายพันธุ์ของแบคทีเรียซึ่งมีความสามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะในทางการค้า (Miranda and Zemelman. 2001) ส่วนใหญ่การศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียที่มีความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ มักมีการศึกษาในอาหาร (ตารางที่ 4.12) และสัตว์บก

ดังนั้นการศึกษาผลการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของ *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2 จึงเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาวิจัยในเรื่องการทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติก ส่วนในขั้นตอนการนำไปใช้นั้นยังต้องทำการศึกษาต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.12 ชนิดของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะในอาหาร

อาหาร	สายพันธุ์แบคทีเรีย	ชนิดยาที่สามารถต้านทาน
Greek cheese	*Lb. acidophilus* ACA-DC 243	Penicillin
Yoghurt starter culture	*S. thermophilus*,	Neomycin, polymyxin B
	Lb. delbruekii ssp. bulgaricus	
Turkish yoghurts	*S. thermophilus*	Vancomycin
European probiotic products	*Lb. acidophilus*, *Lb. rhamnosus*,	Tetracyclin
	Lb casei, *Lb. johnsonnii*,	Penicillin
	Lb. plantarum, *Lb. reuteri*	Erythromycin
Raw ground pork and beef	*Lb. sakei*, *Lb. curvatus*,	Tetracyclin
	Lb. plantarum, *Lb. brevis*,	Chloramphenicol
	Leu. mesenteroides	methicillin

ที่มา : ดัดแปลงจาก Mathur and Singh (2005)

4.4 ผลการศึกษาคุณสมบัติของสารแบคเทอริโอซิน

4.4.1 การทดสอบกับเอนไซม์ย่อยโปรตีน

เมื่อทำการศึกษาผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่อสารยับยั้งแบคทีเรียที่ผลิตโดย *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2 ในการยับยั้งเชื้อ *Lb.* sakei subsp. *sakei* JCM 1157^T โดยใช้เอนไซม์ trypsin, α-chymotrypsin และ proteinase K พบว่า *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2 ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ trypsin, α-chymotrypsin และ proteinase K โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 3200, 400 และ 200 AU/ml ตามลำดับ หรือคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การถูกทำลายเท่ากับ 75, 87.5 และ 93.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การศึกษานี้เป็นการยืนยันผลว่าสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2 สร้างขึ้นนั้นคือ สารแบคเทอริโอซิน เนื่องจากสารแบคเทอริโอซินมีคุณสมบัติเป็นโปรตีน ดังนั้นจึงถูกทำลายด้วยเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน (Klaenhammer, 1988; Vaughan *et al.*, 2001) ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.13

แบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Lc. lactis* spp. *lactis* ได้แก่ lactostrepcin, lacticin 481 และ nisin โดยมี nisin เท่านั้นที่เอนไซม์ trypsin และ pepsin ไม่สามารถทำลายได้ (Nettle and Barefoot. 1993) แต่สามารถถูกทำลายได้โดยเอนไซม์ α-chymotrypsin (Klaenhammer. 1993) ดังนั้นจึงมีการนำ nisin ไปใช้ในกระบวนการอุตสาหกรรม เช่น การใช้ nisin ในอาหารยุโรป จะมีการใส่ nisin ผสมเข้าไปในอาหาร โดยไม่ทำให้อาหารเกิดการเปลี่ยนแปลงทางด้านคุณสมบัติ nisin ที่ถูกผสมเข้าไปในอาหารนั้น สามารถถูกย่อยได้โดยเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยโปรตีน ได้แก่ α-chymotrypsin ที่อยู่ในลำไส้ (de Arauz *et al.* 2009) การศึกษาครั้งนี้ เชื้อที่สร้างสารแบคเทอริโอซินที่คัดแยกได้ คือ *Lc.*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

lactis ssp. *lactis* ดังนั้น ผู้วิจัยคาดว่า แบคเทอริโอซินที่เชื้อสร้างขึ้นอาจอยู่ในกลุ่ม lantibiotic เช่น nisin ซึ่งผลจากการย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน เมื่อเปรียบเทียบกับ nisin แล้ว พบว่า แบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2 ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ trypsin, α-chymotrypsin และ proteinase K ซึ่งการถูกทำลายด้วยเอนไซม์ trypsin นั้น เป็นการถูกทำลายที่ยังไม่มาก เมื่อเทียบกับเอนไซม์ α-chymotrypsin และ proteinase K เนื่องจากว่า nisin แต่ละชนิดมีคุณสมบัติในการต้านทานที่แตกต่างกันไป

ตารางที่ 4.13 ผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่อสารแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2 ในการยับยั้งเชื้อ *Lb.* sakei subsp. *sakei* JCM 1157^T

ทรีทเมนต์	ค่ากิจกรรมการยับยั้ง (AU/ml)
ความคงทนต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีน	
Control pH 6	12,800
Control pH 7	6,400
Trypsin	3,200
α-chymotrypsin	400
Proteinase K	200

Campos *et al.* (2006) รายงานว่า เมื่อทดสอบเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่อสารแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรีย *Lc. lactis* ssp. *lactis* USC-39, *E. faecium* USC-46 และ *E. mundtii* USC-51 พบว่า สารแบคเทอริโอซินถูกทำลายด้วย Proteinase K

Noonpakdee *et al.* (2003) รายงานว่า เอนไซม์ Proteinase K และ α-chymotrypsin สามารถทำลายแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Lc. lactis* WNC 20 ที่คัดแยกได้จากแหนม แต่เอนไซม์ papain, pepsin, trypsin, α-amylase และ lipase ไม่สามารถทำลายแบคเทอริโอซินชนิดนี้ได้

4.4.2 การทดสอบความเสถียรของสารแบคเทอริโอซินต่ออุณหภูมิสูง

เมื่อนำสารแบคเทอริโอซินไปทดสอบความเสถียรที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ผลปรากฏว่า เมื่อให้ความร้อนที่เวลา 30 นาที ค่ากิจกรรมการยับยั้งยังคงที่ (12,800 AU/ml) และเมื่อเวลาผ่านไป 60 นาที ค่ากิจกรรมการยับยั้งลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (6,400 AU/ml) ส่วนการทดสอบความเสถียรที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที ผลปรากฏว่า สารแบคเทอริโอซินสามารถทนต่อความร้อนได้ แต่พบว่ามีค่ากิจกรรมการยับยั้งลดลงเหลือเพียง 3,200 AU/ml แสดงดังตารางที่ 4.14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคเทอริโอซินกลุ่ม lantibiotic เป็นแบคเทอริโอซินที่มีสายเพปไทด์ขนาดเล็ก ประกอบด้วยจำนวนกรดอะมิโน 19-38 โมเลกุล มวลโมเลกุลน้อยกว่า 5,000 ดาลตัน แบคเทอริโอซินกลุ่มนี้มีคุณสมบัติในการทนต่อความร้อน ซึ่งภายในสายเพปไทด์แต่ละสายจะมีโครงสร้างลักษณะเป็นวงแหวนย่อยๆ ที่เกิดจากการสร้าง thioether bridge ระหว่าง sulphydryl group ของกรดอะมิโนซีสเทอีนกับกรดอะมิโน didehydroalanine ที่มีชื่อเรียกว่า lanthionine หรือกรดอะมิโนซีสเทอีนกับกรดอะมิโน didehydrobutyrine ที่มีชื่อเรียกว่า β-methyl lanthionine (Klaenhammer. 1993) ส่วนแบคเทอริโอซินในกลุ่ม non-lantibiotic เป็นแบคเทอริโอซินที่เป็นเพปไทด์ขนาดเล็กกว่า 10 กิโลดาลตัน มีคุณสมบัติในการทนต่ออุณหภูมิตั้งแต่ 100-121 องศาเซลเซียส (Nes *et al.* 1996)

Pilasombut (2006) รายงานว่า *Lb. salivarius* K4 และ K7 สามารถเสถียรต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 1,600 และ 800 AU/ml ตามลำดับ และเมื่อนำเชื้อ *Lb. salivarius* K4 และ K7 ไปทดสอบที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที พบว่า ค่ากิจกรรมการยับยั้งลดลง เหลือเพียง 800 และ 400 AU/ml ตามลำดับ

Noonpakdee *et al.* (2003) รายงานว่า เมื่อนำแบคเทอริโอซินของ *Lc. lactis* ssp. *lactis* WNC 20 ไปปรับค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 7.0 แล้วทดสอบความสามารถเสถียรต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พบว่า มีค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 1,600 AU/ml และเมื่อทดสอบความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ไม่พบว่ามีค่ากิจกรรมการยับยั้ง

แบคเทอริโอซินที่มีคุณสมบัติในการทนต่อความร้อน นอกจากที่สร้างจาก *Lc. lactis* ssp. *lactis* แล้วยังพบในแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์อื่น ๆ อีก เช่น *Lactobacillus plantarum* BFE 905 (Franz *et al.* 1998) *E. faecium* USC-46 และ *E. mundtii* USC-51 (Campos *et al.* 2006) เป็นต้น ซึ่งคุณสมบัติในการเสถียรต่อความร้อนของแบคเทอริโอซินนอกจากจะขึ้นอยู่กับจำนวนและชนิดของกรดอะมิโนยังขึ้นอยู่กับปัจจัยภายนอกอีกหลายประการ เช่น ค่าความเป็นกรดและด่าง (De Vuyst and Vandamme. 1994) ด้วยคุณสมบัตินี้เองจึงมีการนำแบคเทอริโอซินไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและการถนอมอาหาร

nisin ถูกผลิตจาก *Lc. lactis* มีการออกฤทธิ์เช่นเดียวกับแบคเทอริโอซินในกลุ่ม lantibiotic การจับกับเซลล์เป้าหมายเกิดจากแรงไฮโดรโฟบิกและประจุลบ มีคุณสมบัติที่สำคัญได้แก่ การทนต่อกรด ความคงทนที่ค่าความเป็นกรดและด่างต่ำ และความจำเพาะต่อการเข้าทำลายเซลล์เป้าหมาย (de Arauz *et al.* 2009) nisin มีค่ากิจกรรมการยับยั้งสูง ซึ่งสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้หลายชนิด ดังนั้นจึงมีการนำ nisin มาใช้ในกระบวนการถนอมอาหาร (Cheigh *et al.* 2002)

4.4.3 การทดสอบความเสถียรของสารแบคเทอริโอซินต่ออุณหภูมิต่ำ

เมื่อนำสารแบคเทอริโอซินไปทดสอบความเสถียรที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน ผลปรากฏว่า เมื่อเวลาผ่านไป 10 วัน สารแบคเทอริโอซินยังคงมีความเสถียร โดยในวันที่ 5 ค่ากิจกรรมการยับยั้งยังมีค่าคงที่ (12,800 AU/ml) และเมื่อเวลาผ่านไปในวันที่ 7 ค่ากิจกรรมการยับยั้งลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (6,400 AU/ml) และเมื่อทำการทดลองจนถึงวันที่ 10 ผลปรากฏว่า ค่ากิจกรรมการยับยั้งลดลงเหลือเพียง 3,200 AU/ml แสดงดังตารางที่ 4.14

ตารางที่ 4.14 ผลของความเสถียรของสารแบคเทอริโอซินต่ออุณหภูมิสูงและการแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ทรีทเมนต์	ค่ากิจกรรมการยับยั้ง (AU/ml)
ความเสถียรต่อความร้อน	
Control ($100^{\circ}C$ 5 min)	12,800
$100^{\circ}C$ 10 min	12,800
$100^{\circ}C$ 30 min	12,800
$100^{\circ}C$ 60 min	6,400
$121^{\circ}C$ 15 min	3,200
การแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	
วันที่ 0	12,800
1	12,800
3	12,800
5	12,800
7	6,400
10	3,200

Campos *et al.* (2006) รายงานว่า เมื่อนำสารแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรีย *Lc. lactis* ssp. *lactis* USC-39, *E. faecium* USC-46 and *E. mundtii* USC-51 ไปทดสอบความเสถียรที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน ผลปรากฏว่า สารแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรีย *Lc. lactis* ssp. *lactis* USC-39, *E. faecium* USC-46 and *E. mundtii* USC-51 ยังคงแสดงค่ากิจกรรมการยับยั้งอยู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงที่มาของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในวงการอุตสาหกรรมอาหาร มีการนำแบคเทอริโอซินมาใช้ในกระบวนการถนอมอาหาร เช่น อาหารประเภทปลารมควัน จะมีการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดังนั้นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนี้ จึงเป็นอุณหภูมิที่ใช้เก็บรักษาอาหาร และการที่ใส่แบคเทอริโอซินผสม

เข้าไป เพื่อที่จะช่วยลดปริมาณเชื้อก่อโรค ได้แก่ *S. auureus* หรือ *L. monocytogenes* ในอาหาร มีการรายงานว่า มีการใช้ nisin ในอาหารหวาน ซึ่งจะช่วยลดจำนวนการงอกของสปอร์แบคทีเรีย ในระหว่างการเก็บรักษาอาหารที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเช่นเดียวกัน (O'Sullivan *et al.* 2002)

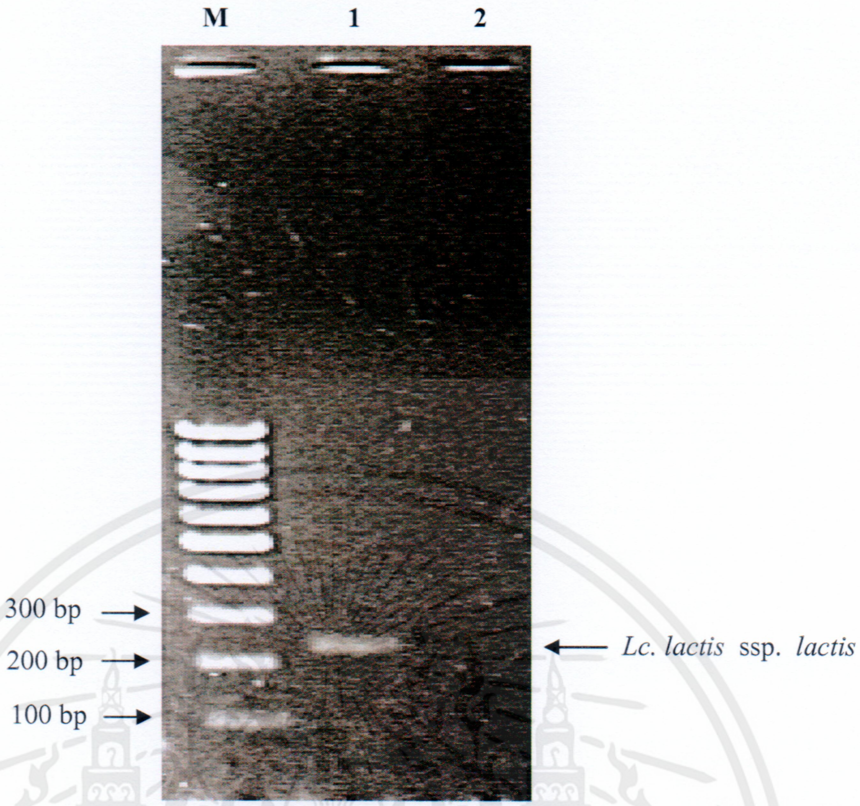
ดังนั้นจากการทดลองจะเห็นได้ว่า แบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรีย *Lc. lactis* ssp. *lactis* มีคุณสมบัติในการแสดงค่ากิจกรรมการยับยั้งอยู่ แม้ว่าเวลาผ่านไปแล้วจำนวน 10 วัน

4.4.4 ผลการวิเคราะห์หาลำดับเบสของยีนที่สร้างสารแบคเทอริโอซิน

ทำการปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2 โดยใช้คู่ไพรเมอร์ Nisin A Forward (5'-CCGGAATTCATAAGGAGGCACTCAAAATG -3') และ Nisin A Reverse (5'-CGGGGTACCTACTATCCTTTGATTTGGTT -3') ซึ่งเป็น specific primer (Swetwiwathana. 2005) เนื่องจากมีการศึกษาเบื้องต้นแล้วว่า แบคทีเรีย *Lc. lactis* ssp. *lactis* สามารถสร้าง nisin ซึ่งจัดเป็นสารแบคเทอริโอซินในกลุ่ม lantibiotic ดังนั้นจึงเลือกใช้ไพรเมอร์ Nisin A Forward และ Nisin A Reverse ซึ่งเป็น specific primer ของยีน nisin

เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดจาก *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2 แล้วนำมาตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ โดยผลผลิตที่ได้มีขนาดประมาณ 200 bp แสดงดังภาพที่ 4.10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



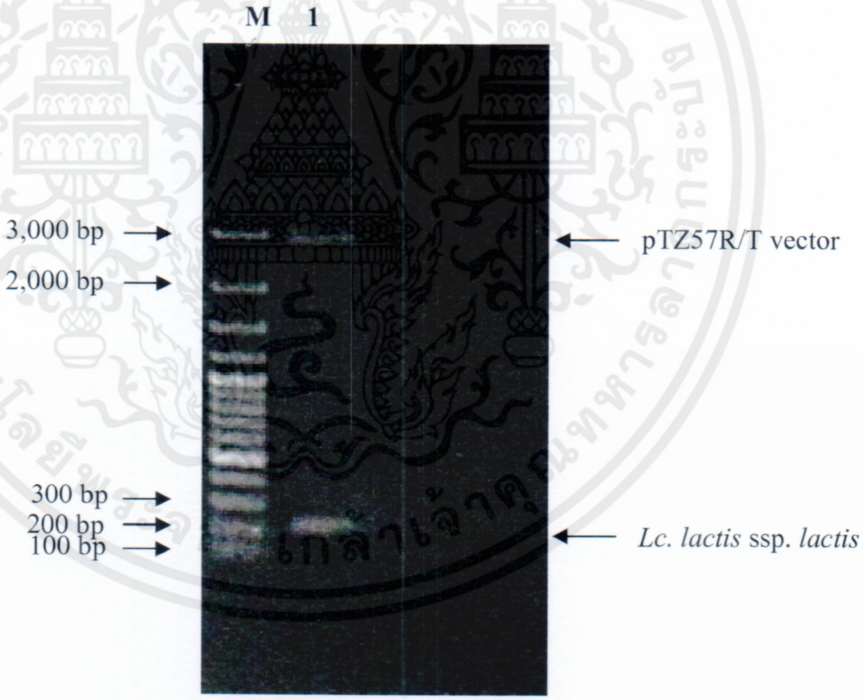
ภาพที่ 4.10 ขนาดของดีเอ็นเอของ *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2 ในการทำพีซีอาร์
ช่อง M หมายถึง 100 bp Ladder
ช่องที่ 1 หมายถึง ดีเอ็นเอของยีนแบคเทอริโอซิน *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2
ช่องที่ 2 หมายถึง Negative control

ซึ่งจากการทดลองนี้ ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากไพรเมอร์ Nisin A Forward และ Nisin A Reverse มีขนาดประมาณ 200 bp โดยไพรเมอร์ที่ใช้นี้เป็นไพร์เมอร์ชนิดเดียวกันกับ Noonpakdee *et al.* (2003) ที่ได้ทำการทดลองคัดแยก nisin ที่ผลิตจาก *Lc. lactis* WNC 20 จากแหนม โดยใช้ไพรเมอร์ 1:5' (5'-CCGGAATTCATAAGGAGGCACTCAAAATG -3') และ ไพรเมอร์ 2 :3' (5'-CGGGG TACCTACTATCCTTTGATTTGGTT -3') ในการทำพีซีอาร์ ซึ่งผลปรากฏว่าสามารถ amplified ยีนจาก จีโนมิกดีเอ็นเอ ของ *Lc. lactis* DL 11 และ *Lc. lactis* WNC 20 ได้โดยมีขนาด 227 bp

จากนั้นนำชิ้นส่วนผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากไพรเมอร์ Nisin A Forward และ Nisin A Reverse ที่มีขนาดประมาณ 200 bp และผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุด QIAquick Gel Extraction Kit แล้วมาเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิดเวคเตอร์ pTZ57R/T โดยอาศัยเอนไซม์ T4 DNA ligase และใช้อัตราส่วนความเข้มข้นเป็นโมลลาร์ผลผลิตพีซีอาร์ต่อพลาสมิดเวคเตอร์เท่ากับ 3:1 จากนั้นนำพลาสมิดลูกผสมที่ได้ทั้งหมดมาทำการทรานสฟอร์มเข้าสู่ competent cell *E.coli* DH5α ด้วยวิธี Heat shock

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และคัดเลือกโคโลนีสีขาวที่เจริญบนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ LB ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin, x-gal และ IPTG เนื่องจากในพลาสมิดเวคเตอร์ pTZ57R/T มียีนต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ ampicillin และมียีน *lacZ* ที่ทำหน้าที่เป็นยีนคัดเลือก สำหรับการทำงานของยีน *lacZ* นั้นจะถูกชักนำด้วยสารละลาย IPTG ให้ผลิตเอนไซม์ β-galactosidase เพื่อย่อย x-gal ซึ่งเป็นสารตั้งต้นได้เป็นตะกอนสีฟ้า แต่ถ้าโคโลนีที่มีการเชื่อมผลผลิตพีซีอาร์เข้ากับพลาสมิดเวคเตอร์จะไปหยุดการแสดงออกของยีน *lacZ* ทำให้ได้โคโลนีเป็นสีขาว ดังนั้นจึงใช้ blue-white screening เป็นวิธีในการตรวจสอบชิ้นยีนเป้าหมาย จากนั้นจึงสุ่มคัดเลือกโคโลนีสีขาวที่คาดว่ามีผลผลิตพีซีอาร์ที่ต้องการ วิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสที่ความเข้มข้นของอะกาโรสเจลเท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ 100 bp plus DNA Ladder เป็นแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน และมีพลาสมิดเวคเตอร์ที่ไม่ได้รับการแทรกยีนแบคเทอริโอซินเป็นตัวเปรียบเทียบ ซึ่งการทดลองพบว่า พลาสมิดเวคเตอร์ที่ถูกแทรกด้วยยีนแบคเทอริโอซินมีขนาดมากกว่า พลาสมิดเวคเตอร์ที่ไม่ได้รับการแทรกด้วยยีนแบคเทอริโอซิน และเมื่อตรวจสอบพลาสมิดเวคเตอร์ที่ถูกแทรกด้วยยีนแบคเทอริโอซิน โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* และ *BamHI* พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 200 bp (ภาพที่ 4.11)



ภาพที่ 4.11 ขนาดของพลาสมิดเวคเตอร์และชิ้นยีนแบคเทอริโอซินของ *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2 เมื่อถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* และ *BamHI*

ช่อง M หมายถึง 100 bp Ladder

ช่องที่ 1 หมายถึง ขนาดของพลาสมิดเวคเตอร์ pTZ57R/T ขนาดชิ้นยีนแบคเทอริโอซินของ *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2

เอกสารนี้เป็นเอกสาร...การศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น...

จากนั้นนำผลที่ได้จากการโคลนไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลยีนของแบคทีเรียโดยใช้ฐานข้อมูลของ NCBI ในอินเตอร์เน็ต (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) เพื่อใช้ในการหาค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงหรือความเหมือน (% Identity) และรายละเอียดต่างๆ ของแบคทีเรียที่ปรากฏในผลของการ BLASTN ผลการทดลองพบว่า ยีนของ *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2 มีลำดับเบสความเหมือนกับยีนแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *Lc. lactis* ssp. *lactis* nisin A (sbjct) ถึง 99% (Accession No AF46535.1 วันที่ 24/09/52) แสดงดังภาพที่ 4.12

```
 nisA  11     TACTATCCTTTGATTTGGTTATTTGCTTACGTGAATACTACAATGACAAGTTGCTGTTTT  70
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1274   TACTATCCTTTGATTTGGTTATTTGCTTACGTGAATACTACAATGACAAGTTGCTGTTTT  1215

nisA   71     CATGTTACAACCCATCAGAGCTCCTGTTTTACAACCGGGTGTACATAGCGAAATACTTGT  130
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1214   CATGTTACAACCCATCAGAGCTCCTGTTTTACAACCGGGTGTACATAGCGAAATACTTGT  1155

 nisA  131    AATGCGTGGTGATGCACCTGAATCTTTCTTCGAAACAGATACCAAGTCCAAGTTAAAATC  190
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||
Sbjct  1154   AATGCGTGGTGATGCACCTGAATCTTTCTTCGAAACAGATACCAAATCCAAGTTAAAATC  1095

 nisA  191    TTTTGTACTCATTTTGAGTGCCTCCTTATGAATT  224
              ||||||||||||||||||||||||||||| ||||
Sbjct  1094   TTTTGTACTCATTTTGAGTGCCTCCTTAT-AATT  1062
```

ภาพที่ 4.12 การ alignment ลำดับเบสของยีนแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *Lc. lactis* ssp. *Lactis* Sb2 ซึ่งมีความเหมือนกับยีน *Lc. lactis* spp. *lactis* nisinA Accession No. AF46535.1 (sbjct) โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์

เมื่อเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์ให้เป็นลำดับกรดอะมิโน พบว่ายีนแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2 มีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของ lantibiotic nisin-A (Accession NO. P13068.1 วันที่ 24/09/52) โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในภาพที่ 4.13 เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนไปคำนวณหาค่าน้ำหนักโปรตีน โดยใช้โปรแกรม http://www.sciencegateway.org/tools/proteinmw.htm พบว่า *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2 มีน้ำหนักเท่ากับ 5.96 กิโลดาลตัน

```
                    10        20        30        40        50        60
            ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Sb2          MSTKDFNLDLVSVSKKDSGASPRITSISLCTPGCKTGALMGCNMKTATCHCSIHVSK
sp|P13068.1| MSTKDFNLDLVSVSKKDSGASPRITSISLCTPGCKTGALMGCNMKTATCHCSIHVSK
Consensus    *********************************************************
```

ภาพที่ 4.13 การ alignment ลำดับกรดอะมิโนของยีนแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2 ซึ่งมีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของ lantibiotic nisin-A Accession NO. P13068.1 โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ห้ามมิให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Noonpakdee *et al.* (2003) รายงานว่า ลำดับกรดอะมิโนของ nisin Z ที่ตำแหน่ง 148 เป็น asparagines (AAT) ส่วนลำดับกรดอะมิโนของ nisin A ที่ตำแหน่ง 148 จะเป็น histidine (CAT) แทน แสดงดังภาพที่ 4.14 ซึ่งสอดคล้องกับ de Kwaasteniet *et al.* (2008) ซึ่งได้รายงานว่า ลำดับกรดอะมิโนของยีน nisin A, Z, Q และ F มีความแตกต่างกันอยู่ 6 ตำแหน่ง คือ nisin A จะมีกรดอะมิโนที่แตกต่างจาก nisin Z เพียงตำแหน่งเดียว คือมี histidine แทน asparagines ส่วนถ้านำ nisin A เปรียบเทียบกับ nisin Q พบว่า มีกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน 6 ตำแหน่ง คือ ใน nisin A จะมีกรดอะมิโน lysine, praline, alanine, methionine, histidine และ isoleucine ส่วนใน nisin Q จะมีกรดอะมิโนเป็น theonine, theonine, valine, leucine, asparagines และ valine ตามลำดับ และถ้านำ nisin A เปรียบเทียบกับ nisin F พบว่า มีกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน 2 ตำแหน่ง คือ ใน nisin A จะมีกรดอะมิโนเป็น histidine และ isoleucine ส่วนใน nisin F จะมีกรดอะมิโนเป็น asparagines และ valine ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 4.15

```
      EcoRI
                -17                        +1
   CC GGA ATT CAT AAG GAG GCA CTC AAA ATG AGT ACA AAA
                                      Met Ser Thr Lys

13 GAT TTT AAC TTG GAT TTG GTA TCT GTT TCG AAG AAA GAT
   Asp Phe Asn Leu Asp Leu Val Ser Val Ser Lys Lys Asp

52 TCA GGT GCA TCA CCA CGC ATT ACA AGT ATT TCG CTA TGT
   Ser Gly Ala Ser Pro Arg Ile Thr Ser Ile Ser Leu Cys

91 ACA CCC GGT TGT AAA ACA GGA GCT CTG ATG GGT TGT AAC
   Thr Pro Gly Cys Lys Thr Gly Ala Leu Met Gly Cys Asn

                          C*
130 ATG AAA ACA GCA ACT TGT AAT TGT AGT ATT CAC GTA AGC
    Met Lys Thr Ala Thr Cys Asn Cys Ser Ile His Val Ser

169 AAA TAA CCA AAT CAA AGG ATA GTA GGT ACC CCG
    Lys  *                      +192
                                    KpnI
```

ภาพที่ 4.14 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับของกรดอะมิโนของยีน *nisZ* ที่ได้จาก *Lc. lactis* subsp. *lactis* WNC 20 โดยลำดับกรดอะมิโนของยีน *nisZ* มีความแตกต่างจากยีน *nisA* ดังแสดงในกรอบสี่เหลี่ยม ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีการขีดเส้นใต้ คือ ไพรเมอร์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีเครื่องหมายดอกจัน คือ stop codon (ดัดแปลงจาก Noonpakdee *et al.* 2003)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```
                            -10          1          10         20         30
                              ↓          ↓          ↓          ↓          ↓
Nisin A   MSTKDFNLDL VSVSKKDSGA SPRITSISLC TPGCKTGALM GCNMKTATCH CSIHVSK
Nisin Z   MSTKDFNLDL VSVSKKDSGA SPRITSISLC TPGCKTGALM GCNMKTATCN CSIHVSK
Nisin Q   MSTKDFNLDL VSVSKTDSGA STRITSISLC TPGCKTGVLM GCNLKTATCN CSVHVSK
Nisin F   MSTKDFNLDL VSVSKKDSGA SPRITSISLC TPGCKTGALM GCNMKTATCN CSVHVSK
```

ภาพที่ 4.15 ลำดับกรดอะมิโนของยีน nisin F และการเปรียบเทียบความแตกต่างลำดับกรดอะมิโนของยีน nisin A, Z, Q และ F (de Kwaasteniet *et al.* 2008)

nisin สังเคราะห์โดยไรโบโซมในรูปของโมเลกุลตั้งต้น เช่นเดียวกับ lantibiotic อื่นๆ โดย nisin ตั้งต้น (pre-nisin) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 57 หน่วย เป็นส่วนที่เป็น nisin 34 หน่วย (มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 3353 ดาลตัน) และเกี่ยวข้องกับการหลั่ง nisin ออกนอกเซลล์ 23 หน่วย (leader sequence) ยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิต nisin ประกอบด้วย 2 กลุ่มยีน (gene cluster) คือ nisA/(Z) BTCIPRK และ nis FEG (Rauch *et al.* 1994)โดยยีนแต่ละยีนมีหน้าที่ คือ *nis A/(Z)* เป็นยีนโครงสร้างของการผลิต nisin โดยกลุ่มยีนโครงสร้างจะผลิต prepeptide ส่วน *nis B* และ *nis C* จะเกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ที่ใช้ดัดแปลงกรดอะมิโน *nis T* เกี่ยวข้องกับโปรตีนในการขนส่ง nisin ออกนอกเซลล์ *nis I* เกี่ยวข้องกับการผลิตโปรตีนภูมิคุ้มกัน *nis P* เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ serine protease ซึ่งตัดเพปไทด์ของ nisin ตั้งต้น *nis R* และ *nis K* เกี่ยวข้องกับโปรตีนควบคุม *nis F, nis E* และ *nis G* เกี่ยวข้องกับโปรตีนในระบบป้องกันตัวเอง ทำงานร่วมกับ *nis I* (de Kwaadsteniet *et al.* 2007)

De Vuyst and Vandamme (1994) กล่าวว่า การที่รูปแบบของ nisin มีความแตกต่างกันนั้น ส่งผลให้เกิดความแตกต่างในด้าน biological activity เช่น nisin A, B, C และ E จะมีความ sensitive ต่อ nisinase ของ *Bacillus cerus* แต่ nisin D จะไม่ sensitive ดังนั้นความแตกต่างของ nisin จะมีความสัมพันธ์กับโพลีเพปไทด์ อย่างไรก็ตามความแตกต่างของรูปแบบ nisin และความแตกต่างในด้าน biological activity อาจจะส่งผลให้เกิดการ degrade ของโปรตีนที่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

แบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท Sb2 เป็นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากระบบทางเดินอาหารของปลากะพง สามารถยับยั้งเชื้อได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ได้แก่ *Lc. plantarum* ATCC 14917, *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^{T}, *Lb. sakei* TISTR 890, *Lc. lactis* subsp: *cremoris* TISTR 1344, *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124^{T}, *Leu. mesenteroides* TISTR 942, *B. coagulans* JCM 2257^{T}, *L. innocua* ATCC 33090, *Br. campestris* NBRC 11547, *Ps. fluorescens* JCM 5693^{T}, *Ps. fluorescens* TISTR 358, *E. faecalis* JCM 5803^{T}, *E. faecalis* TISTR 888, *S. aureus* TISTR 118 และ *Streptococcus* sp. TISTR 1030 โดยสามารถยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^{T} ได้มากที่สุดโดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 12,800 AU/ml

เมื่อทำการจัดจำแนกชนิดของไอโซเลท Sb2 โดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยา พบว่า ไอโซเลท Sb2 จัดอยู่ในสกุล *Lactococcus* spp. และเมื่อใช้ชุดจำแนกแบคทีเรียสำเร็จรูป API 50 CHL kit โดยศึกษาจากกระบวนการหมักน้ำตาล พบว่าไอโซเลท Sb2 สามารถจำแนกได้เป็น *Lc. lactis* ssp. *lactis* จากนั้นทำการยืนยันด้วยวิธี 16s rDNA พบว่า ไอโซเลท Sb2 เป็นแบคทีเรียชนิด *Lc. lactis* ssp. *lactis*

อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการเลี้ยงเชื้อและสร้างสารแบคเทอริโอซินไอโซเลท Sb2 คือ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 18 ชั่วโมง

แบคเทอริโอซินที่ถูกสร้างจาก *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2 ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ trypsin, α –chymotrypsin และ proteinase K โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งลดลง ซึ่งมีค่าเท่ากับ 3200, 400 และ 200 AU/ml ตามลำดับ หรือคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การถูกทำลายเท่ากับ 75, 87.5 และ 93.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แบคเทอริโอซินมีความเสถียรต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อนำไปผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ผลปรากฏว่า กิจกรรมของสารแบคเทอริโอซินลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ สารแบคเทอริโอซินยังมีความเสถียร เมื่อนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน

เมื่อศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลกติก พบว่าสามารถเจริญและสร้างสารแบคเทอริโอซิน เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะความเป็นกรดและด่างในช่วงระหว่าง 2- 10 โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1-5 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเลี้ยงเชื้อใน bile salts ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ โดยเชื้อสามารถเจริญและสร้างสารแบคเทอริโอซินได้มากที่สุดคือ ที่ความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 6 (12,800 AU/ml) โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (12,800 AU/ml)

นอกจากนี้ *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2 ยังมีคุณสมบัติในการต้านทานยา gentamycin, kanamycin, naldixic acid, neomycin, norfloxacin, oxolinic acid และ sulfamethoxazole/trimethoprim

เมื่อทำการวิเคราะห์หาลำดับเบสของยีนที่สร้างสารแบคเทอริโอซิน โดยใช้ specific primer พบว่าเป็นยีนชนิด nisin A ซึ่งเป็นยีนที่มีความสำคัญ เนื่องจากมีการใช้แบคเทอริโอซินชนิด nisin A ในกระบวนการถนอมอาหาร ซึ่งอาจมีประโยชน์ในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กมลทิพย์ กาพสมุทร และวัชรี ส้มแก้ว. 2542. **การแยกแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกจากเครื่องในปลากะพง.** สงขลา : คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2549. **ปลาที่เพาะเลี้ยงง่าย.** กรุงเทพ : โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2544. **จุลชีววิทยาทั่วไป.** ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์.

พงษ์เทพ วิไลพันธ์. 2546. แบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลกติกที่พบในปลาร้า. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ภักดี สุขพันธ์. 2548. การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติกผลิตแบคเทอริโอซินและเจริญได้ดีในสารโอลิโกแซคคาไรด์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ลัดดา เอกสมทราเมษฐ์. 2547. **ชีววิทยาของเซลล์.** กรุงเทพฯ : โอ.เอส.พริ้นติ้ง เฮ้าส์.

สุวณีย์ สุภเวชย์ และมาลัย วรจิตร. 2536. **แบคทีเรียพื้นฐาน.** ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์ศิริยอด.

เสาวนีย์ ธรรมสถิต. 2547. **แบคทีเรียทางเทคโนโลยีชีวภาพเซลล์และผลิตภัณฑ์ของเซลล์.** กรุงเทพ : สถาบันพัฒนาสาธารณสุขอาเซียน มหาวิทยาลัยมหิดล.

อัจฉรา เพิ่ม. 2550. **แบคทีเรียกรดแลคติก.** ครั้งที่ 1. สงขลา : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา.

Abee, T. 1995. "Pore-forming bacteriocins of Gram-positive bacteria and self-protection mechanisms of producer organisms." **FEMS Microbiol. Lett.** 129 : 1-10.

Adnan, A.F.M. and Tan, I.K.P. 2007. "Isolation of lactic acid bacteria from Malaysian foods and assessment of the isolates for industrial potential." **Biores. Technol.** 98 : 1380-1385.

Arihara, K., Ota, H., Itoh, M., Kondo, Y., Sameshima, T., Yamanaha, H., Akimoto, M., Kanai, S. and Miki, T. 1998. "Lactobacillus acidophilus group lactic acid bacteria applied to meat fermentation." **J. Food Sci.** 63 : 544-547.

Austin, B., Stuckey, L.F., Robertson, D.A.W., Effendi, I. and Griffith, D.R.W. 1995. "A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing disease by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*.." **J. Fish disc.** 18 : 93-96.

Axelsson, L. 2004. Lactic Acid Bacteria in Fish and Fish Farming, pp. 1-66. *In* Salminen, S. and Von Wright, A. (eds). **Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดทั้งสิ้น ถือว่าห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงแหล่งที่มาของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Aspects. New York : Marcel Dekker.

Balcázar, J.L., Vendrell, D., de Blas, I., Zarzuela, I.R., Muzquiz, J.L. and Girones, O. 2008. "Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isoslated from intestinal microbiota of fish." **Aquaculture.** 278 : 188-191.

Begley, M., Cormac, G.M.G. and Hill, C. 2005. "The interaction between bacteria and bile." **FEMS Microbiol. REV.** 29 : 625-651.

Bojana, B.M. and R. Irena. 1998. "Bacteriocin complex of Lactobacillus acidophilus LF221-production studies in MRS media at different pH values and effect against *Lactobacillus helvticus* ATCC 15009." **Process Biochem.** 33 : 345-352.

Brennan, M., Wanismail, B., and Ray, B. 1993. "prevalence of viable *Lactobacillus acidophilus* in dried commercial products." **J. Food Prot.** 46 : 887-892.

Bruno, M.E.E. and Montville, T.J. 1993. "Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria." **Appl. Environ. Microbiol.** 59 : 3003-3010.

Bucio, A., Hartemink, R., Schrama, J. W., Verreth, J. and Robbouts, F. M. 2006. "Presence of lactobacilli in the intestinal content of freshwater fish from a river and from a farm with a recirculation system." **Food Microbiol.** 23 : 476-482.

Campos, C.A., Rodríguez, Ó., Calo-Mata, P., Prado, M. and Barrops-Velázquez, J. 2006. "Preliminary characterization of bacteriocin from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus munditii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*)." **Int. Food Res.** 39 : 356-364.

Caplice, E. and Fitzgerald, G.F. 1999. "Food fermentations : role of microorganism in food product and preservation." **Int. J. Food. Microbiol.** 50 : 131-149.

Carolissen-Mackay, V., Arendse, G. and Hasting, J.W. 1997. "Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers." **Int. J. Food Microbiol.** 34 : 1-16.

Chateau, N., Deschamps, A.M. and Sassi, A.H. 1994. "Heterogenetly of bile salts resistance in the *Lactobacillus* isolates of a probiotic consortium." Lett. **Appl. Microbiol.** 18 : 42-44.

Cheigh, C.I., Choi, H.J., Park, H., Kim, S.B., Kook, M.C., Kim, T.S., Hwang, J.K. and Pyun, Y.R. 2002. "Influence of growth conditions on the production of a nisin-like bacteriocin by Lactococcus lactis subsp. lactis A 164 isolated from kimchi." **J. Biotechnol.** 95 : 225-235.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Cleveland, J., T.J. Montville, I.F. Nes, and M.L. Chikindas. 2001. "Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation." **Int. J. Food Microbiol.** 71: 1-20.

Davidson, P.M. and Hoover, D.G. 1993. Antimicrobial components from lactic acid bacteria, pp. 127-160. *In* S. Salminen and A. von Wright, eds. **Lactic Acid Bacteria.** Marcel Dekker, Inc., New York.

Davies, E., Falahee, M.B. and Adams, M.R. 1996. "Involvement of the cell envelope of *Listeria monocytogenes* in the acquisition of nisin resistance." **J. Appl. Bacteriol.** 81 : 139-146.

de Arauz, L.J., Jozala, A.F., Mazzola, P.G. and Penna, T.C.V. 2009. "Nisin biotechnological production and application: review." **Trends Food Sci. Technol.** 20 : 146-154.

De Fabrizio, S.V., Parada, J.L. and Ledford, R.A. 1994. "Antibiotic resistance of *Lactococcus lactis*-an approach of genetic determinants location through a model system." **Microbiol. Aliment. Nutr.** 12 : 307-315.

de Kwaadsteniet, M., ten Doeschate, K. and Dicks, L.M.T. 2008. "Characterization of the structural gene encoding nisin F, a new lantibiotic produced by *a Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolate from freshwater catfish (*Clarias gariepinus*)." **Appl. Environ. Microbiol.** 74 : 547-549.

Dellaglio, F., Dicks, L.M.T. and Torriani, S. 1995. The genus of *Leuconostoc* pp. 235-278. *In* Wood, B.J.B. and Holzafel, W.H. (eds.). **The Genera of Lactic Acid Bacteria.** Chapman and Hall, Glasgow.

De Vuyst, L. and Vandamme, E.J. 1994. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria, pp. 91-142. *In* de Vuyst, L. and Vandamme, E.J. eds. **Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria : Microbiology, Genetic and Application.** Blackie-Academic & Professional, London.

Ennahar, S., Sashihara, T. Sonomoto, K. And Ishizaki, A. 2000. "Class IIa bacteriocins : biosynthesis, structure and activity." **FEMS Microbiol. Rev.** 24 : 85-106.

Ennahar, S., Cai, Y. and Fujita, Y. 2003. "Phylogenetic diversity of lactic acid bacteria associated with paddy rice silage as determined by 16S ribosomal DNA analysis." **Appl. Environ. Microbiol.** 69 : 444-451.

Ennahar, S., Sonomoto, K. and Ishizaki, A. 1999. "Class IIa bacteriocins from Food Preservation." **J. Biosci. Bioeng.** 6 : 705-716.

Erkkilä, S. and Petäjä, E. 2000. "Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use." **Meat Sci.** 55 : 297-300.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Flynn, S., Sinderen, D.V., Thornton, G. M., Holo, H., Nes, I.F. and Collins, J.K. 2002. "Characterization of the genetic locus responsible for the production of ABP-118, a novel bacteriocin produced by the probiotic bacterium *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* UCC118." **Microbiol.** 148 : 973-984.

Franz, C.M.A.P., Du Toit, M., Olasupo, N.A., Schillinger, U. and Holzapfel, W.H. 1998. "Plantaricin D, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* BFE 905 from ready-to-eat salad." **Lett. Appl. Microbiol.** 26 : 231-235.

Fuller, R. 1993. **Probiotic food current use and future developmenteds.** IFI NR. 3 : 23-26.

Gatesoupe, F.J. 1999. "The use of probiotics in aquaculture." **Aquaculture.** 180 : 147-165.

González, C.J., Encinas, J.P., García-LópeZ, M.L. and Otero, A. 2000. "Characterization and identification of lactic acid bacteria from freshwater fishes." **Food Microbiol.** 17 : 383-391.

Hagi, T.H., Tanaka, D., Iwamura, Y. and Hoshimo, T. 2004. "Diversity and seasonal change in lactic acidbacteria in the tract of cultured freshwater fish." **Aquaculture.** 234 : 335-346.

Hardie, J.M. and Whiley, R.A. 1995. The genus of *Streptococcus*, pp. 75-124. *In* Wood, B.J.B. and Holzafel, W.H. (eds.). **The Genera of Lactic Acid Bacteria.** Chapman and Hall, Glasgow.

Herreros, M.A., Sandoval, H., González, L., Castro, J.M., Fresno, J.M. and Tornadijo, M.E. 2005. "Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats'milk cheese)." **Food Microbiol.** 22 : 455-459.

Horn, S.J., Asmo, S.I. and Eijsink, V.G.H. 2007. "Evaluation of different cod viscera fractions and their seasonal variation used in a growth medium for lactic acid bacteria." **Enz. Microbiol. Technol.** 40 : 1328-1334.

Hugenholtz, J., Splint, R., Konings, W.N. and Veldkamp, H. 1987. "Selection of protease-positive and proteas-negative variants of *Streptococcus cremoris*." **Appl. Environ. Microbiol.** 53 : 309-314.

Hutkins, R.W. and Nannen, N.L. 1992. "pH Homeostasis in lactic acid bacteria." **J. Dairy Sci.** 76 : 2354-2365.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hyronimus, B., Marrec, C.L., Sassi, A.H. and Deschamps, A. 2000. "Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria." **Int. J. Food Microbiol.** 61 : 193-197.

Itoi, S., Abe, T., Washio, S. Ikuno, E., Kanomata, Y. and Sugita, H. 2008. "Isolation of halotolerant Lactococcus lactis subsp. Lactis from intestinal tract of coastal fish." **Int. J. Food Microbiol.** 121 : 116-121.

Kandler, O. and Weiss, N. 1986. Regular, nonsporing Gram-positive rods, pp. 1208-1233. *In* Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharp, M.E. and Holt, J.G. (eds.). **Bergey's manual of systematic Bacteriology**, vol.2. Baltimore : The Williams and Wilkins Co.

Kanokratana, P., Chanapan, S., Pootanakit, K. and Eurwililaichitr, L. 2004. "Diversity and abundance of bacteria and archaea in the Bor Khlueng hot spring in Thailand." **J. Basic Microbiol.** 44 : 430-444.

King, A.D.J. and Nagel, C.W. 1975. "Influent of carbon dioxide upon the metabolism of *Pseudomonas aeruginosa*." **J. Food Sci.** 40 : 362-366.

Klaenhammer, T.R. 1988. "Bacteriocins of lactic acid bacteria." **Biochemie**. 70 : 337-349.

Klaenhammer, T.R. 1993. "Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria." **FEMS Microbiol. Rev.** 12 : 39-85.

Kontula, P., Jaskali, J., Nollet, L., Smet, I.D., Wright, A.V., Poutanan, K. and Sandholm, T.M. 1998. "The colonization of a simulator of the human intestinal microbial ecosystem by a probiotic strain in fed on fermented oat bran product effect on gastrointestinal microbiota." **J. Appl Microbiol Biotechnol.** 50 : 246-252.

Krier, F., Revol-Junelles, A.M. and Germain, P. 1998. "Influence of temperature and pH on production of two bacteriocins by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. mesenteroides FR52 during batch fermentation." **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 50 : 359-363.

Madigan, M.T. and Martino, J.M. 2006. **Brock Biology of Microorganism.** 11^{ed}. New Jersey : Pearson Education Inc.

Mathur, S. and Singh, R. 2005. "Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria-a review." **Int. J. Food Microbiol.** 105 : 281-295.

Michel, C., Pelletier, C., Boussaha, M., Douet, D.G., Lautraite, A. and Tailliez, P. 2007. "Diversity of lactic acid bacteria associated with fish and the fish farm environment, established by amplified rRNA gene restriction analysis." **AEM Microbiol.** 73 : 2947-2955.

Meranda, C.D. and Zemelman, R. 2001. "Antibiotic resistant bacteria in fish from the Concepción Bay, Chile." **Marine Pollut. Bulle.** 42 : 1096-1102.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

Muyanja, C.M.B.K., Narvhus, J.A., Treimo, J. and Langsrud, T. 2002. "Isolation, characterization and identification of lactic acid bacteria from busherra: a Ugandan traditional fermented beverage." **Int. J. Food Microbiol.** 80 : 201-210.

NCCLS. 2002. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. 2nd. Wayne. United State of America.

Nes, I.F., Diep, D.B., Havarstein, L.S., Brurberg, M.B., Eijsink, V. and Holo, H. 1996. "Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria." **Antonie van Leeuwenhoek.** 70 : 113-128.

Nettles, C.G. and Barefoot, S.F. 1993. "Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food associated lactic acid bacteria." **J. Food Prot.** 56 : 338-356.

Neysens, P., Messens, W. and De Vuyst, L. 2003. "Effect of sodium chloride on growth and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471." **Int. J. Food Microbiol.** 88 : 29-39.

Noonpakdee, W., Santivarangkna, C., Jumriangrit, P. and Panyim, S. 2003. "Isolation of nisin-producing Lactococcus lactis WNC 20 strain from nham, a tradition Thai fermented sausage." **Int. J. Food Microbiol.** 81 : 137-145.

Nousiainen, J., Javanainen, P., Setälä, J. and von Wright, A. 2004. Lactic acid bacteria as animal probiotics, pp. 547-580. *In* Salminen, S. and Von Wright, A. (eds). **Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects**. New York : Marcel Dekker.

Orberg, P.K. and Sandine, W.E. 1985. "Survey of antimicrobial resistance in lactic streptococci." **Appl. Environ. Microbiol.** 49 : 538-542.

O'sullivan, E. and Condon, S. 1997. "Intracellular pH is a major factor in the induction of tolerance to acid and other stresses in *Lactococcus lactis*." **Appl. Environ. Microbiol.** 63 : 4210-4215.

O'Sullivan, L., Ross, R.P. and Hill, C. 2002. "Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality." **Biochimie.** 84 : 593-604.

Parente, E., Brienza, C., Moles, M. and Ricciardi, A. 1995. "A comparison of methods for the measurement of bacteriocin activity." **J. Microbiol. Methods.** 22 : 95-108.

Pilasombut, K. 2006. "Purification and characterization of bacteriocins by *Lactobacilus salivarius* K4 and K7 isolated from chicken intestine." Ph.D. Thesis, Kasetsart University, Bangkok. Thailand.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Pot, B., Ludwig, W., Kersters, K. and Schleifer, K.H. 1994. Taxonomy of lactic acid bacteria, pp. 14-67. *In* de Vuyst, L. and Vandamme, E.J. eds. **Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria : Microbiology, Genetic and Application.** Blackie-Academic & Professional, London.

Rauch, P.J.G., Kuipers, O.P., Siezen, R. and De Vos, W.M. 1994. Genetics and protein engineering of nisin, pp. 223-250. *In* de Vuyst, L. and Vandamme, E.J. eds. **Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria : Microbiology, Genetic and Application.** Blackie-Academic & Professional, London.

Rengpipat, S., Phianpak, W., Piyatiratitivorakul, S. and Mernasveta, P. 1998. "Effect of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth." **J. Aquaculture**. 167 : 301-313.

Riley, M.A. and Wertz, J.E. 2002. "Bacteriocin diversity : ecological and evolutionary perspective." **Biochimie**. 84 : 357-364.

Ringø, E. 2004. Lactic Acid Bacteria in Fish and Fish Farming, pp. 580-610. *In* Salminen, S. and Von Wright, A. (eds). **Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects**. New York : Marcel Dekker.

Ringø, E. and Gatesoup, F.J. 1998. "Lactic acid bacteria in fish: a review." **Aquaculture**. 160 : 177-203.

Rodríguez, J.M., Martinez, M.I., Horn, N. and Dodd, H.M. 2003. "Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria." **Int. J. Food Microbiol.** 81 : 101-116.

Salminen, S. and Wrigth, A.V. 1993. **Lactic acid bacteria**. New York : Marcel Dekker.

Sambrook, J. and Russell, D. 2001. **Molecular Colining a Laboratory Manual**. 3rd. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.

Schillinger, U., Geisen, R. and Holzapfel, W.H. 1996. "Potential of antagonistic microorganisms for the biological preservation of foods." **Trends Food Sci. Technol.** 7 : 158-164.

Schved, F., Lalazar, A., Henis, Y. and Juven, B.J. 1993. "Purification, partial characterization and plasmid-linkage of pediocin SJ-1, a bacteriocin produced by *Pediococcus. Acidilactici.*" **J. Appl. Bacteriol.** 74 : 67-77.

Stiles, M.E. and Holzapfel, H.W. 1997. "Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy." **Int. J. Food Microbiol.** 36 : 1-29.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Swetwiwathana, A. 2005. "Microbiological quality enhancement of Thai fermented meat product (Nham) using Nham-associated pediocin-producing lactic acid bacteria (*Pediococcus pentosaceus* TISTR 536)." Ph.D. Thesis, Kyushu University, Japan.

Swetwiwathana, A., Zendo, T., Nakayama J. and Sonomoto, K. 2009. "Identification of Nisin Z producing *Lactococcus lactis* N12 associated with traditional Thai fermented rice noodle (Kanom Jien)." **As. J. Food Ag-Ind.** 2 : 116-125.

Tagg, J.R., Dajani, A.S. and Wannamaker, L.W. 1976. "Bacteriocin of gram-positive bacteria." Bacterion. Rev. 40 : 722-756.

Tendencia, E.A. 2004. Disk diffusion method, pp. 13-29. *In* Ruangpan, L. and Tendencia (eds). **Laboratory manual of standardized methods for antimicrobial sensitivity tests for bacteria isolated from aquatic animals and environment.** Philippinnes : Iloilo.

Teuber, M. 1995. The genus *Lactococcus*, pp. 173-174. *In* Wood, B.J.B and Holzafel, W.H. (eds.). **The Genera of Lactic Acid Bacteria**. Chapman and Hall, Glasgow.

Vaughan, A., Eijsink, V.G.H., O'Sullivan, T.E., O'Hanlon, K. and Van Sinderen, D. 2001. "An analysis of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from malted barley." **J. Appl. Microbiol.** 91: 131-138.

Verluyten, J., Messens, W. and De Vuyst, L. 2004. "Sodium chloride reduces production of curvacin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* strain LTH 1174, originating from fermented sausage." **Appl. Environ. Microbiol**. 70 : 2271-2278.

Vincent, G.H.E., Lars, A., Dzung, B.D., Leiv, S.H., Helge, H. and Ingof, F.N. 2002. "Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication." **Antonie van Leuwenhook**. 81 : 639-654.

Vinderola, C.G. and Reinheimer, J.A. 2003. "Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative "in vitro" study of probiotic characteristics and biological barrier resistance." **Food Res. Int**. 36 : 895-904.

Worobo, R.W., Van Belkum, M.J., Sailer, M., Roy, K.L., Vederas, J.C. and Stiles, M.E. 1995. "A signal peptide secretion-dependent bacteriocin from *Carnobacterium divergens*." **J. Bacteriol**. 177 : 3143–3149.

Zamfir, M.R., Callewaert, R, Cornea, P.C. and de Vuyst, L. 2000. "Production kinetics of acidophilin 801. a bacteriocin produced by Lactobacillus acidophilus IBB 801." **FEM Microbiol. Lett.** 190 : 305-308.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Zárate, G., Chaia, A.P., González, S. and Oliver, G. 2000. "Viability and β-galactosidase activity of dairy propionibacteria subjected to digestion by artificial gastric and intestinal fluids." **J. Food Prot.** 63 :1214-1221.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

.

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

MRS (Merck, Germany) / 1,000 ml

MRS	52.5 g

TSBYE (Merck, Germany) / 1,000 ml

TSB	30 g
yest extract	0.5 g

NB (Merck, Germany) / 1,000 ml

NB	30 g

อาหาร LB broth (Biolab India) / 1,000 ml

Tryptone	10 g
yest extract	5 g
NaCl	5 g

2. สารเคมีสำหรับสกัดดีเอ็นเอ

- TE buffer (10mM Tris, 1mM EDTA) pH 8.0
- 0.67% sucrose
- lysozyme (70 mg/ml)
- 20% SDS
- Phenol : Chloroform (1:1)
- Chloroform : Isoamylalcohol (24 :1)
- Isopopanol
- 70% Ethanol

3. สารเคมีสำหรับสกัดพลาสมิด

Alkaline lysis Solution I (Resuspension buffer) /100 ml

50 mM Glucose	2.5 ml
25 mM Tris-Hcl, pH 8	5 ml
10 mM EDTA	2 ml

Alkaline lysis Solution II (Lysis buffer) / 100 ml

0.2 N NaOH	2 ml
1% (w/v SDS)	5 ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Alkaline lysis Solution III / 100 ml

5M Potassium acetate	50 ml
0.2 M Glacial acetic acid	11.5 ml

4. สารเคมีสำหรับตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอ

10X TBE stock solution 1000 ml

Tris base	108 g
Boric acid	55 g
EDTA	5.84 g

DNA Loading dye

0.25% bromophenol blue

30% glycerol ละลายใน TE (pH 8.0)

5. สารเคมีสำหรับเตรียม competent cell (*E. coli* DH5α)

สารละลาย TB

PIPES	10 mM
$MnCl_2$	55 mM
$CaCl_2$	15 mM
KCl	250 mM

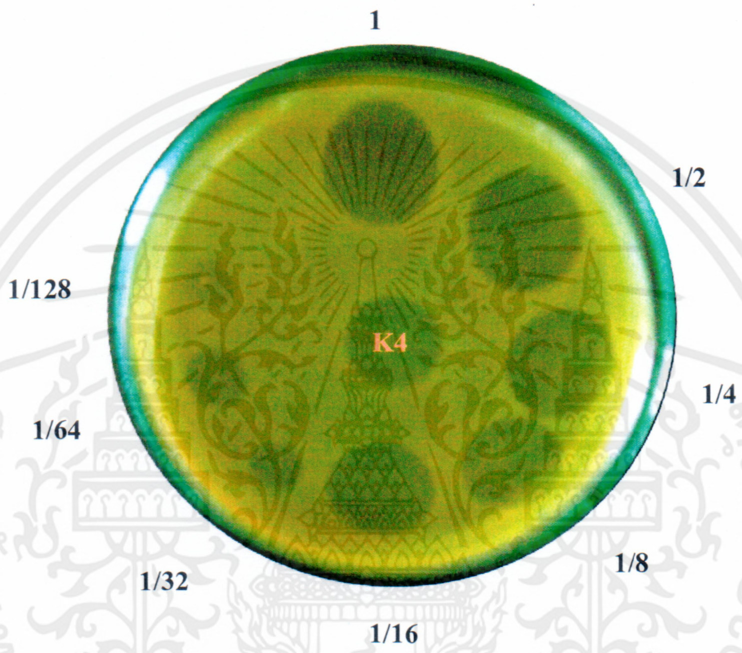
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการคำนวณหาค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซิน

ค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซิน = ค่าความเจือจางสูงสุดของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เป็นส่วนใสซึ่งยังสามารถสังเกตเห็นบริเวณใส (clear zone) ที่เกิดจากการถูกยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ โดยคำนวณได้จาก (1000/10)D เมื่อ D เท่ากับค่าความเจือจางสูงสุดของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เป็นส่วนใส (Parente *et al*. 1995)



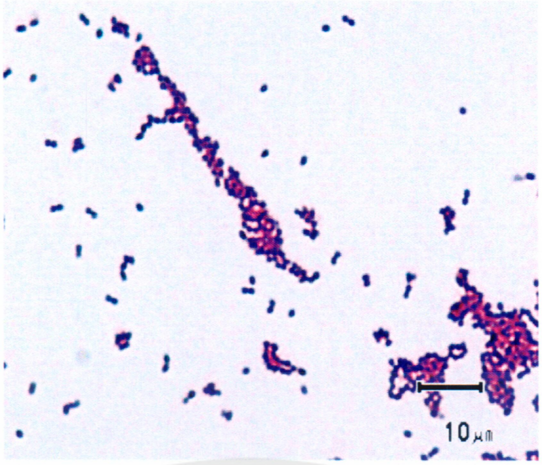
ภาพผนวกที่ ข1 แสดงค่าการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของไอโซเลท Sb2 ที่คัดแยกได้จากปลากะพง โดยใช้เชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^{T} เป็นแบคทีเรียทดสอบ

$$\text{ค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซิน} = \frac{1{,}000 \times 128}{10} \text{ AU/ml}$$

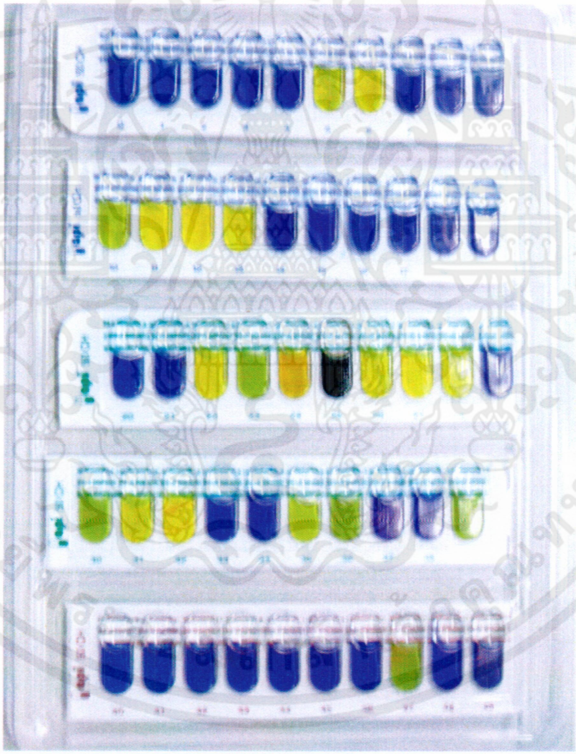
$$= 12{,}800 \text{ AU/ml}$$

หมายเหตุ K4 คือ *Lb. salivarius* K4 ซึ่งใช้เป็น control ในการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพผนวกที่ ข2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลท Sb2 โดยการย้อมสีแกรม



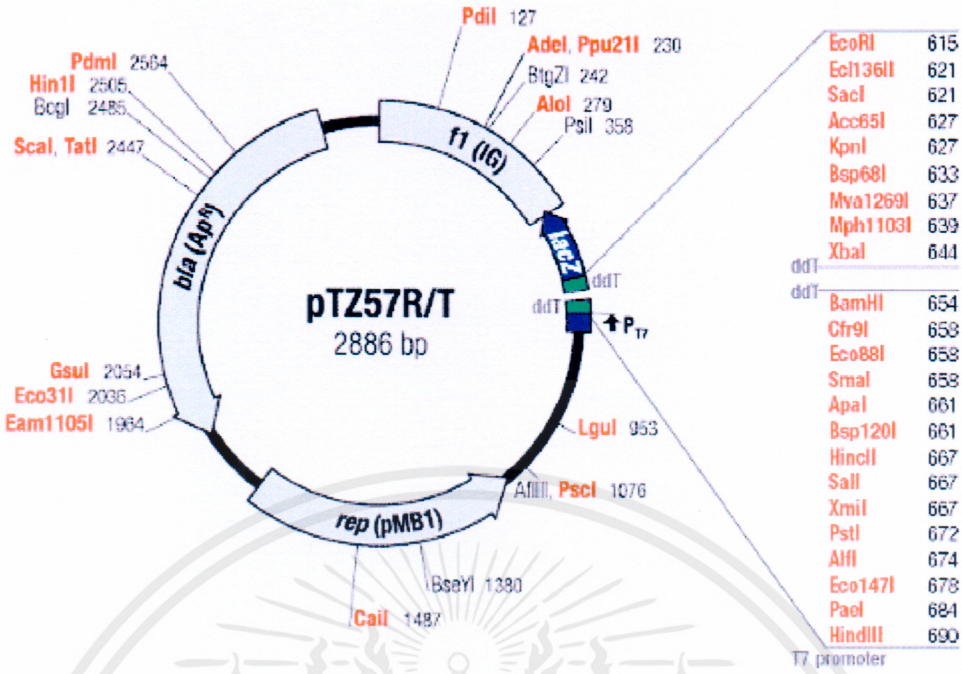
หมายเหตุ + สีเหลือง

\- สีม่วง

? ไม่สามารถระบุได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพผนวกที่ ข3 การจัดจำแนกชนิดของไอโซเลท Sb2 โดยศึกษากระบวนการหมักน้ำตาลโดยใช้ชุดจำแนกแบคทีเรียสำเร็จรูป API 50 CHL kit (bioMerieux)



ภาพผนวกที่ ข4 แสดงแผนที่ของพลาสมิดเวคเตอร์ pTZ57R/T (Fermentas Inc., U.S.A)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ค1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และค่าการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียของไอโซเลท Sb2

เวลา (ชั่วโมง)	OD (600 nm)	Log CFU/ml	ค่ากิจกรรมการยับยั้ง (AU/ml)
0	0.17	8.10	800
2	0.21	9.18	1,600
4	0.36	10.34	1,600
6	0.51	10.36	3,200
8	0.81	10.39	3,200
10	0.88	10.45	3,200
12	0.91	10.16	3,200
14	0.92	11.04	3,200
16	1.07	11.12	6,400
18	1.31	11.20	12,800
20	1.14	10.31	6,400
22	1.12	10.22	3,200
24	0.93	9.91	1,600

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ค2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และค่าการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียของไอโซเลท Sb2

เวลา (ชั่วโมง)	OD (600 nm)	Log CFU/ml	ค่ากิจกรรมการยับยั้ง (AU/ml)
0	0.16	8.10	800
2	0.21	8.17	800
4	0.38	8.37	800
6	0.57	8.94	800
8	0.83	9.17	1,600
10	0.93	9.24	3,200
12	0.93	9.26	6,400
14	0.94	9.28	6,400
16	0.95	9.37	3,200
18	0.96	9.40	1,600
20	0.76	8.26	1,600
22	0.96	8.18	1,600
24	0.72	8.13	800

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ค3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และค่าการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียของไอโซเลท Sb2

เวลา (ชั่วโมง)	OD (600 nm)	Log CFU/ml	ค่ากิจกรรมการยับยั้ง (AU/ml)
0	0.16	8.11	800
2	0.21	8.11	800
4	0.34	8.20	800
6	0.42	8.30	800
8	0.57	8.36	800
10	0.65	8.40	800
12	0.70	8.43	800
14	0.74	9.30	1,600
16	0.79	9.32	1,600
18	0.85	9.28	1,600
20	0.89	9.25	1,600
22	0.95	8.35	800
24	0.94	8.30	800

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ค4 ผลของค่าความเป็นกรดและด่างต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของ *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2 โดยใช้เชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T เป็นแบคทีเรียทดสอบ

ค่าความเป็นกรดและด่าง	OD (600 nm)	Log CFU/ml	ค่ากิจกรรมการยับยั้ง (AU/ml)
3	0.03	7.11	200
4	0.05	7.85	200
5	0.92	11.28	1,600
6	2.05	12.28	12,800
7	2.48	11.67	6,400
8	2.12	10.32	6,400
9	1.99	7.00	3,200
10	1.83	6.00	3,200

ตารางผนวกที่ ค5 ผลของค่าความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรีย *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2 โดยใช้เชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T เป็นแบคทีเรียทดสอบ

เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์	OD (600 nm)	Log CFU/ml	ค่ากิจกรรมการยับยั้ง (AU/ml)
0	0.82	8.3	3,200
1	1.63	9.46	12,800
2	1.45	9.44	3,200
3	1.22	9.26	3,200
4	0.93	9.05	3,200
5	0.42	8.00	1,600

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ค6 ผลของค่าความเข้มข้น bile salts ต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียของ *Lc. lactis* ssp. *lactis* Sb2 โดยใช้เชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T เป็นแบคทีเรียทดสอบ

เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้น bile salts	OD (600 nm)	Log CFU/ml	ค่ากิจกรรมการยับยั้ง (AU/ml)
0	0.82	8.3	3,200
0.3	0.17	3.79	200
0.6	0.09	0.00	0
0.9	0.03	0.00	0

ตารางผนวกที่ ค7 แสดงจำนวนการมีชีวิตรอดในกระเพาะจำลอง เมื่อทดสอบกับค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 2, 3, 4 และ 7 เป็นเวลา 180 นาที และค่าการมีชีวิตรอดในลำไส้จำลอง เมื่อทดสอบกับค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 2, 3, 4 และ 7 เป็นเป็นเวลา 180 นาที

ค่าความเป็นกรดและด่าง	จำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดในกระเพาะจำลอง (Log CFU/ml)						จำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดในลำไส้จำลอง (Log CFU/ml)				
	เวลา (นาที)						เวลา (นาที)				
	เริ่มต้น	0	30	60	90	180	0	30	60	90	180
2	7.81	7.17	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	7.56	6.98	6.89	6.84	6.66	6.38	6.01	4.11	0	0	0
4	7.56	7.24	7.06	6.90	6.75	6.67	6.18	6.04	5.91	5.70	5.52
7	7.51	7.40	7.26	7.10	6.89	6.83	6.76	6.71	6.58	6.49	6.42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ ค8 แสดงเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดในกระเพาะจำลอง เมื่อทดสอบกับค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 2, 3, 4 และ 7 เป็นเวลา 180 นาที และค่าการมีชีวิตรอดในลำไส้จำลอง เมื่อทดสอบกับค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 2, 3, 4 และ 7 เป็นเวลา 180 นาที

ค่าความเป็นกรดและด่าง	จำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดในกระเพาะจำลอง (เปอร์เซ็นต์)						จำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดในลำไส้จำลอง (เปอร์เซ็นต์)				
	เวลา (นาที)						เวลา (นาที)				
	เริ่มต้น	0	30	60	90	180	0	30	60	90	180
2	91.80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	91.80
3	92.32	91.14	90.48	88.10	84.39	79.5	54.37	0	0	0	92.32
4	95.77	93.39	91.27	89.29	88.23	81.75	79.89	78.17	75.40	73.02	95.77
7	98.54	96.67	94.54	91.74	90.95	90.01	89.35	87.62	86.42	85.49	98.54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวกฤตพร รำจวนเกียรติ
วัน เดือน ปีเกิด	15 ตุลาคม พ.ศ. 2527 เกิดจังหวัดสมุทรสาคร
ที่อยู่	1/15 ม. 6 ต.บางหญ้าแพรก อ.เมืองฯ จ.สมุทรสาคร 74000
ประวัติการศึกษา	2549 หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง 2552 หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ความชำนาญพิเศษ	Microbial Biotechnology
ประสบการณ์	พ.ศ. 2548 การฝึกงานด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืด ศูนย์เพาะเลี้ยงประมงน้ำจืด จ.เพชรบุรี และการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเค็ม บรรจงฟาร์ม จ.ฉะเชิงเทรา

ผลงานทางวิชาการ

Rumjuankiat, K., Pilasombut, K., Wangwibulkit, S. and Swetwiwathana, A. 2009. Screening and partial characterization of bacteriocin from lactic acid bacteria in fish gastrointestinal tract. Pp. 1-10. in: Proceeding of the 3 International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products, August 26-28, 2009; Kosa Hotel, Thailand.

ทุนวิจัยที่ได้รับ	ทุนสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ ทุนสนับสนุนจากศูนย์เครือข่ายการวิจัยเทคโนโลยีเนื้อสัตว์ โดยความร่วมมือระหว่างสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) และสำนักกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำ... การค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิใ... ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้