Ubon Rajathanee University

รายงานการวิจัย

การตรวจสอบเชื้อที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินได้

DETECTION FOR BACTERIOCINS FROM MICROORGANISMS

ชุตินันท์ ประสิทธิ์ภูริปรีชา
จันทร์วดี โล่เสถียรกิจ
ศิริมา สุวรรณกูฏ

สนับสนุนโดย ทุนอุดหนุนการวิจัย มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
ประจำปีงบประมาณ 2540
รหัสโครงการวิจัย 03008 638-0004
ISBN 974-609-083-6

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

คำนำ

สารแบคเทอริโอซิน เป็นสารประกอบโปรตีนที่สร้างจากเชื้อแบคทีเรีย มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอื่นในสปีชีส์เดียวกัน หรือสปีชีส์ใกล้เคียงกันได้ Lactic acid bacteria กลุ่ม *Lactobacillus spp.* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินได้ ปัจจุบันได้มีการนำเชื้อนี้ไปใช้ประโยชน์เป็นสารถนอมอาหาร (food preservatives) ในอุตสาหกรรมอาหาร มีการนำเชื้อนี้มาใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตอาหาร เพื่อให้อาหารมีรสชาติที่ดี และสารแบคเทอริโอซินที่เชื้อนี้สร้างขึ้น มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ทำให้อาหารเน่าเสียอีกด้วย ดังนั้น จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจที่จะศึกษาวิจัยหาสารแบคเทอริโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus spp.* ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้ โดยไม่ไปมีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ที่อาศัยอยู่ในร่างกายของผู้บริโภค (normal flora)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกเชื้อ *Lactobacillus spp.* จากอาหารหมักผลิตภัณฑ์นม และผลไม้ ที่มีคุณสมบัติในการสร้างสารแบคเทอริโอซินที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค หรือแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียได้ นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาคุณสมบัติการทนต่อความร้อนของสารแบคเทอริโอซิน และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเชื้อ *Lactobacillus spp.* ในการสร้างสารแบคเทอริโอซิน ผลการศึกษาวิจัยในครั้งนี้อาจนำไปสู่แนวทางในการพัฒนายาด้านจุลชีพและสารถนอมอาหารจากเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพและปลอดภัย คณะผู้ดำเนินการวิจัยหวังว่า งานวิจัยชิ้นนี้อาจเป็นประโยชน์ในทางการแพทย์ และในทางอุตสาหกรรมอาหารต่อไปในอนาคตได้ ทั้งนี้ หากมีข้อบกพร่องใด ๆ ที่อาจเกิดขึ้น ผู้วิจัยขอน้อมรับไว้ปรับปรุงแก้ไขในงานต่อไป

คณะผู้วิจัย

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.บังอร ศรีพานิชกุลชัย คณบดีคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ผู้จุดประกายแนวคิดในการทำงานวิจัยให้แก่คณาจารย์คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี พร้อมทั้งกรุณาให้คำแนะนำ คำปรึกษาที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยในหลายกรณี ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่กรุณาสนับสนุนอุปกรณ์ และเอื้อเฟื้อสถานที่สำหรับทำงานวิจัย ขอขอบคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่มีส่วนสนับสนุนงานวิจัยนี้ และขอขอบคุณนักศึกษาผู้ช่วยวิจัยทั้ง 5 ท่าน คือ นางสาวจุฑารัตน์ โอฬารเสถียร, นางสาวประภาพร ธานี, นางสาวรุ่งธิวา เรืองหงษา, นางสาวสุวรรณี โคตรพันธ์ และนายวรวุฒิ โคตรวิชัย ไว้ ณ โอกาสนี้

คณะผู้วิจัย

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

บทคัดย่อภาษาไทย

เชื้อ Lactic acid bacteria ที่แยกได้จากอาหารหมักดอง ผลไม้ และผลิตภัณฑ์นมหลายชนิดในอำเภอวารินชำราบ จ.อุบลราชธานี จำนวน 73 หมายเลข ถูกนำมาทดสอบคุณสมบัติพื้นฐานทางชีวเคมี เพื่อคัดเลือกเชื้อ *Lactobacillus spp.* ได้จำนวน 21 หมายเลข เมื่อนำเชื้อ *Lactobacillus spp.* มาสกัดสารแบคเทอริโอซิน และนำสารสกัดแบคเทอริโอซินมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อทดสอบ ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคและเชื้อที่มักพบปนเปื้อนในอาหารทำให้อาหารบูดเน่า จำนวน 5 ชนิด คือ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhi* ATCC 13311, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Sarcina lutea* ATCC 9341 ด้วยวิธี agar diffusion พบว่า สารสกัดแบคเทอริโอซินมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อทดสอบต่างกัน สารสกัดแบคเทอริโอซินหมายเลข 55 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อทดสอบทั้ง 5 ชนิดได้ดีที่สุด จึงถูกเลือกเพื่อนำมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเชื้อ *Lactobacillus spp.* ในการสร้างสารแบคเทอริโอซิน และศึกษาคุณสมบัติการทนต่อความร้อนของสารแบคเทอริโอซิน ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างสารแบคเทอริโอซิน พบว่า ระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการผลิต และการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทดสอบของสารแบคเทอริโอซิน ระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุดของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus spp.* หมายเลข 55 คือ 48 ชั่วโมง ผลการศึกษาคุณสมบัติการทนต่อความร้อนของสารแบคเทอริโอซิน พบว่า สารแบคเทอริโอซินที่สร้างจากเชื้อ *Lactobacillus spp.* หมายเลข 55 สามารถทนความร้อนได้ที่อุณหภูมิ 25-37 องศาเซลเซียส ไม่สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และการเพิ่มระยะเวลาการให้ความร้อนแก่สารสกัดแบคเทอริโอซิน จะมีผลทำให้ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อทดสอบลดลง

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

ABSTRACT

Lactic acid bacteria isolated from fermented food, fruits and dairy products in Warinchamrap district, Ubon-Ratchathani were screened for *Lactobacillus* spp. by biochemical tests. From 73 isolates tested, 21 isolates were found to be *Lactobacillus* spp. Bacteriocins, extracted from 21 isolates, were studied for the antimicrobial activities against 5 indicator strains of pathogenic bacteria and spoilage bacteria such as *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhi* ATCC 13311, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 and *Sarcina lutea* ATCC 9341 by agar diffusion assay. The bacteriocins showed different activities. One of the isolates, *Lactobacillus* spp. no.55 showed the strongest inhibitory activity and was chosen for further study. The study was to evaluate the optimal incubation period of growth and the effect of temperature on the antimicrobial activity of bacteriocin. The optimal incubation time of *Lactobacillus* spp. no.55 for producing the effective bacteriocin was 48 hours. The bacteriocin of *Lactobacillus* spp. no.55 was stable in 25-37^{o}C but not 60^{o}C. Its activity was decreased when increasing the heating time.

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
คำนำ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ข
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม	3
แลคติคแอสิดแบคทีเรีย	3
Genus *Lactobacillus*	4
สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่สร้างโดย Lactic acid bacteria	5
แบคเทอริโอซินที่สร้างโดยแลคติคแอสิดแบคทีเรีย	6
แบคเทอริโอซินที่สร้างโดยแลคโตคอคคัส	7
แบคเทอริโอซินที่สร้างโดยพิดิโยคอคคัส	9
แบคเทอริโอซินที่สร้างโดยลิวโคนอสตอก	10
แบคเทอริโอซินที่สร้างโดยแลคโตบาซิลลัส	12
คุณสมบัติของแบคเทอริโอซิน	15
ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตและการออกฤทธิ์ของแบคเทอริโอซิน	19
วิธีการทดสอบฤทธิ์ของแบคเทอริโอซิน	21
การนำแบคเทอริโอซินไปใช้ประโยชน์	22
คุณสมบัติของเชื้อที่ใช้ทดสอบ	24

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

เรื่อง	หน้า
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย	32
อุปกรณ์และสารเคมี	32
เชื้อแบคทีเรีย	33
วิธีทดลอง	34
ตอนที่1 การคัดเลือกเชื้อ *Lactobacillus* spp. ที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินจากอาหาร และการสกัดสารแบคเทอริโอซิน	34
ตอนที่ 2 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทดสอบของสารแบคเทอริโอซิน	36
ตอนที่ 3 การศึกษาคุณสมบัติบางประการของสารแบคเทอริโอซิน	37
บทที่ 4 ผลการทดลอง	39
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	53
เอกสารอ้างอิง	55
ภาคผนวก	62

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

สารบัญตาราง

ตารางที่	เรื่อง	หน้า
ตารางที่ 1	คุณสมบัติของสารแบคเทอริโอซินที่สร้างจากเชื้อ *Lactobacillus* spp.	16
ตารางที่ 2	คุณสมบัติในการทนเอนไซม์ของสารแบคเทอริโอซิน	18
ตารางที่ 3	อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อเพื่อให้สร้างสารแบคเทอริโอซิน	20
ตารางที่ 4	สารแบคเทอริโอซินของเชื้อ *Lactobacillus* spp. ที่แยกได้จากอาหาร กับความกว้างของเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสที่เกิดขึ้นจากการยับยั้งเชื้อทดสอบชนิดต่าง ๆ ด้วยวิธี agar diffusion	40
ตารางที่ 5	ระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus* spp. กับความกว้างของเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสที่เกิดขึ้นจากการยับยั้งเชื้อทดสอบชนิดต่าง ๆ ของสารแบคเทอริโอซินด้วยวิธี agar diffusion	44
ตารางที่ 6	อุณหภูมิ และระยะเวลาต่าง ๆ ที่ให้กับสารแบคเทอริโอซิน กับความกว้างของเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสที่เกิดขึ้นจากการยับยั้งเชื้อทดสอบชนิดต่าง ๆ ของสารแบคเทอริโอซินด้วยวิธี agar diffusion	47

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

สารบัญรูป

รูปที่	เรื่อง	หน้า
รูปที่ 1	ลักษณะของบริเวณใสที่เกิดขึ้นจากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อด้วยวิธี agar diffusion	21
รูปที่ 2	ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของสารแบคเทอริโอซินที่สร้างจากเชื้อ *Lactobacillus* spp. หมายเลขต่างๆ กับความกว้างของเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสที่เกิดขึ้นจากการยับยั้งเชื้อทดสอบ 5 ชนิด	41
รูปที่ 3	ความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus* spp. หมายเลข 55 กับ ความกว้างของเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสที่เกิดขึ้นจากการที่สารแบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ 5 ชนิด	45
รูปที่ 4	ความสัมพันธ์ระหว่าง ระยะเวลาการให้ความร้อนแก่สารแบคเทอริโอซิน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส กับความกว้างของเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสที่เกิดขึ้นจากการที่สารแบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ 5 ชนิด	48
รูปที่ 5	ความสัมพันธ์ระหว่าง ระยะเวลาการให้ความร้อนแก่สารแบคเทอริโอซิน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส กับความกว้างของเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสที่เกิดขึ้นจากการที่สารแบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ 5 ชนิด	49
รูปที่ 6	ความสัมพันธ์ระหว่าง ระยะเวลาการให้ความร้อนแก่สารแบคเทอริโอซิน ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส กับความกว้างของเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสที่เกิดขึ้นจากการที่สารแบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ 5 ชนิด	50

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

รูปที่	เรื่อง	หน้า
รูปที่ 7	ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิที่ให้แก่สารแบคเทอริโอซิน เป็นระยะเวลา 30 นาที กับความกว้างของเส้นผ่าศูนย์กลาง ของโซนใสที่เกิดขึ้นจากการที่สารแบคเทอริโอซินสามารถ ยับยั้งเชื้อทดสอบ 5 ชนิด	51

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

บทที่ 1
บทนำ

สารแบคเทอริโอซิน (Bacteriocin) เป็นสารประกอบประเภทโปรตีนที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย และสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นที่อยู่ในสปีชีส์เดียวกัน หรือสปีชีส์ใกล้เคียงกันได้ (Barefoot et al, 1992; Jack et al, 1995; Montville and Kaiser, 1993; Hoover and Harlander, 1993) จึงมีการนำสารแบคเทอริโอซินมาใช้ประโยชน์ในรูปของสารถนอมอาหาร และสารต้านจุลชีพ สารแบคเทอริโอซินสร้างจากเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิด ปัจจุบันงานวิจัยส่วนใหญ่มักให้ความสนใจในการศึกษาเกี่ยวกับสารแบคเทอริโอซินที่สร้างจากเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย (Lactic acid bacteria : LAB) ซึ่งเป็น microaerophilic bacteria อยู่ในตระกูล Lactobacillaceae เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน และกลม ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส เจริญในบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ สามารถสร้างกรดแลคติก และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแบบไม่จำเพาะ และสามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแบบจำเพาะ ตัวอย่างของเชื้อกลุ่มนี้ได้แก่ *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Carnobacterium* spp. และ *Pediococcus* spp. เป็นต้น เชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียมีประโยชน์ในด้านอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากในการผลิตอาหารหมัก เช่น เนื้อหมัก ไส้กรอกหมัก ไส้กรอกเปรี้ยว ผักดอง หรือผลิตภัณฑ์นม เช่น นมเปรี้ยว โยเกิร์ต เนย เป็นต้น นิยมใช้แลคติคแอสิดแบคทีเรียเป็นหัวเชื้อในการผลิตอาหาร ซึ่งนอกจากจะทำให้อาหารมีรสชาติและเนื้อสัมผัสที่ดีแล้ว ยังสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อโรค และแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียได้ โดยการสร้างสารต่าง ๆ ได้แก่ กรดอินทรีย์, ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และสารแบคเทอริโอซิน (Gilliland and Speck, 1975; Daeschel, 1993)

สารแบคเทอริโอซินที่สร้างจากเชื้อต่างชนิดกัน จะมีโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกัน และสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้แตกต่างกัน งานวิจัยนี้มุ่งศึกษาสารแบคเทอริโอซินที่สร้างจากเชื้อ *Lactobacillus* spp. เนื่องจากแบคเทอริโอซินที่สร้างจากเชื้อ *Lactobacillus* spp. ได้รับการยอมรับจาก GRAS (Generally Recognized as Safe) และ FDA (Food Drug Administration) ประเทศสหรัฐอเมริกา ว่าเป็นสารต้านจุลชีพ (antimicrobial agent) ที่ปลอดภัยและสามารถใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารได้ (Hoover, 1992, Jack et al, 1995) จากปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะของจุลินทรีย์ ทำให้มนุษย์จำเป็นต้องค้นหายาต้านจุลชีพใหม่ๆ เพื่อทดแทนยาต้านจุลชีพชนิดเดิม แบคเทอริโอซิน ซึ่งเป็น antimicrobial protein จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่นับว่ามีศักยภาพสูงในการ

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

ผลิตสารต้านจุลชีพชนิดใหม่ นอกเหนือจากความได้เปรียบในด้านความปลอดภัยแล้ว การพัฒนาการผลิตในระบบอุตสาหกรรม โดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพก็สามารถทำได้ง่าย (Hoover and Harlander, 1993) การคัดเลือกเชื้อตระกูลนี้ สามารถแยกได้หลายสายพันธุ์จากธรรมชาติ เช่น ในอาหารหมัก อาหารกระป๋อง ผลิตภัณฑ์นม ระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์ เป็นต้น

งานวิจัยนี้ได้ทำการคัดเลือกเชื้อ *Lactobacillus spp.* จากอาหารหมัก ผลิตภัณฑ์นม และผลไม้ ที่มีคุณสมบัติในการสร้างสารแบคเทอริโอซิน ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค หรือแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียได้ นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาคุณสมบัติการทนต่อความร้อนของสารแบคเทอริโอซิน และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเชื้อ *Lactobacillus spp.* ในการสร้างสารแบคเทอริโอซินด้วย ผลการศึกษาวิจัยในครั้งนี้อาจนำไปสู่แนวทางในการพัฒนายาต้านจุลชีพและสารถนอมอาหารจากเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพและปลอดภัย

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อคัดเลือกเชื้อ *Lactobacillus* spp. ที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินได้ โดยแยกเชื้อจากอาหารหมัก
2. เพื่อศึกษาความสามารถของสารแบคเทอริโอซินที่สร้างจากเชื้อ *Lactobacillus* spp. ที่แยกได้จากอาหาร ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคที่พบบ่อยในคน
3. เพื่อศึกษาคุณสมบัติที่สำคัญบางประการของสารแบคเทอริโอซิน เช่น การทนต่อความร้อน และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเชื้อ *Lactobacillus* spp. ในการสร้างสารแบคเทอริโอซิน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้เชื้อ *Lactobacillus* spp. ที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค หรือแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียได้ดี
2. ได้ทราบคุณสมบัติที่สำคัญบางประการของสารแบคเทอริโอซิน เช่น การทนต่อความร้อน และสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเชื้อ *Lactobacillus* spp. ในการสร้างสารแบคเทอริโอซิน เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการศึกษาและพัฒนาแบคเทอริโอซินต่อไป
3. แบคเทอริโอซินที่ได้จากการศึกษานี้ สามารถนำไปศึกษาและพัฒนาให้เกิดประโยชน์ในทางการแพทย์ และในทางอุตสาหกรรมอาหารต่อไปในอนาคต

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรม

แลคติคแอสิดแบคทีเรีย (Lactic Acid Bacteria)

Lactic acid bacteria เป็นแบคทีเรียในตระกูล Lactobacillaceae มีลักษณะทั้งที่เป็นท่อนยาว ท่อนสั้น หรือกลม เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่ไม่สร้างสปอร์ ส่วนใหญ่ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อย ในการเจริญเติบโต (microaerophilic bacteria) บางชนิดเป็นพวกที่ไม่ต้องการอากาศเลย (strictly anaerobe) ความต้องการอาหารค่อนข้างซับซ้อน ส่วนมากต้องการสารอนินทรีย์ในปริมาณค่อนข้างสูง เช่น แมงกานีส (Mn), แมกนีเซียม (Mg), ฟอสฟอรัส (P) แหล่งที่สามารถพบ Lactic acid bacteria ได้แก่ เนื้อ ผลิตภัณฑ์นม และอาหารหมักดอง เป็นต้น Lactic acid bacteria สามารถใช้อาหารพวกคาร์โบไฮเดรต และเปลี่ยนให้เป็นกรดแลคติค

Lactic acid bacteria แบ่งตามลักษณะการหมักได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

1. Homofermentative lactic acid bacteria คือ Lactic acid bacteria ที่สามารถหมักน้ำตาลกลูโคส หรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 ตัว ให้กรดแลคติค 85-95 % ส่วนที่เหลืออาจนำไปใช้เพื่อให้พลังงาน เช่น *Lactobacillus acidophilus*

2. Heterofermentative lactic acid bacteria คือ Lactic acid bacteria ที่สามารถหมักน้ำตาลกลูโคส หรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 ตัว ให้กรดแลคติค ประมาณ 50 % ส่วนที่เหลือเป็นกรด acetic acid และ ethyl alcohol 20-25 % และสร้างคาร์บอนไดออกไซด์ 20-25 % เช่น *Lactobacillus mesenteroides*

Lactic acid bacteria แบ่งตามสกุล ได้เป็น 5 สกุล คือ

1. Genus *Streptococcus (Lactococcus)* : Lactic acid bacteria ชนิดนี้มีรูปร่างกลมแบบ cocci หรือรูปรีแบบ oval ขนาดประมาณ 0.5 -1.0 μm จะพบเป็นคู่หรือเป็นสาย มีทั้งพวกที่ต้องการอากาศ (aerobe) หรือพวกต้องการอากาศเล็กน้อย (microaerophile) *Streptococcus* จัดอยู่ในกลุ่ม Homofermentative lactic acid bacteria เป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมนม คือ ใช้ในการเตรียมเนย เนยแข็ง และนมเปรี้ยว ต่อมาในปี ค.ศ. 1988 ได้มีการเสนอให้เปลี่ยนสกุล *Streptococcus* เป็นสกุล *Lactococcus* โดยยังคง species และ subspecies ไว้ตามเดิม ซึ่งได้รับการยอมรับจาก International Union of Microbiology Societies

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

2. Genus *Leuconostoc* : Lactic acid bacteria ชนิดนี้มีรูปร่างกลม จะพบเป็นคู่ หรือเป็นสาย มีทั้งพวกที่ไม่ต้องการอากาศ หรือพวกที่ต้องการอากาศเล็กน้อย *Leuconostoc* จัดอยู่ในกลุ่ม Heterofermentative lactic acid bacteria สามารถพบได้ทั่ว ๆ ไปในธรรมชาติ

3. Genus *Pediococcus* : Lactic acid bacteria ชนิดนี้มีรูปร่างกลม ซึ่งอาจอยู่เป็นคู่หรือเป็นกลุ่ม จัดเป็นพวกที่ต้องการอากาศเล็กน้อย และเป็น Homofermentative lactic acid bacteria แบคทีเรียพวกนี้มักพบในอาหารพวกเนื้อ ผัก และไส้กรอกเปรี้ยว เป็นต้น

4. Genus *Lactobacillus* : Lactic acid bacteria ชนิดนี้อาจพบรูปร่างหลายแบบ เช่น coccobacilli, bent rods, coryne-form หรือ thread-like สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศ หรือต้องการอากาศเพียงเล็กน้อย มีทั้งพวกที่เป็น Homofermentative และ Heterofermentative lactic acid bacteria

5. Genus *Bifidobacterium* : Lactic acid bacteria ชนิดนี้ถูกค้นพบในปี ค.ศ. 1899 โดยแยกได้จากอุจจาระของทารกสุขภาพสมบูรณ์ที่ดื่มนมมารดา แต่เดิมเรียกว่า *Bacillus bifidum* ต่อมาเปลี่ยนชื่อเป็น *Bifidobacterium* สามารถพบได้หลายรูปร่าง เช่น รูปตัว Y, V, bent, club จะไม่พบในลักษณะที่เป็นสายยาว เจริญได้ในสภาวะ obligately anaerobe จัดเป็นพวก Heterofermentative lactic acid bacteria (Sneath, 1986)

Genus *Lactobacillus*

แบคทีเรียใน Genus *Lactobacillus* จัดอยู่ในตระกูล Lactobacillaceae เป็นเชื้อแกรมบวก, ไม่สร้างสปอร์และเอนไซม์คะตะเลส, มีลักษณะเป็นรูปแท่ง, ไม่เคลื่อนที่, ไม่รีดิวซ์ไนเตรท มีทั้งชนิดที่เป็น Homofermentative และ Heterofermentative Lactic Acid Bacteria เชื้อ *Lactobacillus* มีความต้องการอาหารที่ซับซ้อน จำเป็นต้องได้รับคาร์โบไฮเดรต, กรดอะมิโน, เปปไทด์, กรดไขมัน, เกลืออนุพันธ์ของกรดนิวคลีอิกและวิตามิน การสร้าง ATP ได้จากกระบวนการหมักเชื้อ *Lactobacillus* ซึ่งจะเจริญเติบโตในสภาวะที่แตกต่างกันไป มีหลากหลายรูปแบบ แต่จะต้องมีคาร์โบไฮเดรต, โปรตีน, วิตามินในปริมาณที่เพียงพอ และมีปริมาณออกซิเจนที่ต่ำ เชื้อ *Lactobacillus* พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ มีทั้งที่เป็น normal flora ของร่างกาย เช่น *Lactobacillus casei* และ *Lactobacillus fermentum* ที่พบได้ในช่องปาก, *L. acidophilus* และ *L. fermentum* ในกระเพาะอาหาร และลำไส้ใหญ่ *Lactobacillus* ที่เป็นเชื้อก่อโรค เช่น *L. casei* subsp. *rhamnosus* ซึ่งก่อให้เกิดโรค bacterial endocarditis, systemic septicemia และ abscess ได้

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

นอกจากนี้เชื้อ *Lactobacillus* ยังพบได้ในผลิตภัณฑ์นม, เนย, ไส้กรอก, เนื้อและผลิตภัณฑ์จากเนื้อ, อาหารหมักดองต่าง ๆ, ไวน์ และ เบียร์ เป็นต้น (Sneath, 1986)

สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่สร้างโดย Lactic acid bacteria

Lactic acid bacteria สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเกิดการเน่าเสีย และเกิดโรคในผู้บริโภคได้ สารที่ Lactic acid bacteria สร้างขึ้น คือ

1. กรดอินทรีย์

การสะสมของกรดอินทรีย์ มีผลต่อเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถทนกรดบางชนิด เช่น *Bacillus* spp., *E. coli*, *Pseudomonas* spp. เป็นต้น เนื่องจากทำให้ค่าความเป็นกรดด่างลดลงในช่วงเริ่มต้นของการหมัก กรดอินทรีย์จะมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ โดยการยับยั้งกระบวนการเมตาบอลิซึมที่จำเป็นต่อการดำรงชีพ กรดอินทรีย์ที่อยู่ในรูปไม่แตกตัวจะสามารถซึมผ่านเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียได้ และแตกตัวเป็นอิออนภายใน ทำให้ระดับความเป็นกรดด่างภายในเซลล์ลดลง หรืออาจเกิดปฏิกิริยากับเซลล์ มีผลทำลายเซลล์หรือหน่วงเหนี่ยวการเจริญของจุลินทรีย์นั้นๆ ตัวอย่างเช่น *Leuconostoc citrovorum* ซึ่งเป็นเชื้อกลุ่ม Heterofermentative lactic acid bacteria สามารถผลิตกรดอะซิติก และให้ผลการยับยั้งที่ดีกว่ากรดแลคติค

2. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

Lactic acid bacteria สามารถสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ในระหว่างการเจริญเติบโตได้ โดยเฉพาะเมื่อเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่มีอากาศโดยใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน ปฏิกิริยาที่ใช้มีหลายวิธี ได้แก่

$$\text{Pyruvate} + O_2 + PO_4^{3-} \xrightarrow{\text{Pyruvate oxidase}} \text{Acetylphosphate} + CO_2 + H_2O_2$$

$$\text{Lactate} + O_2 \xrightarrow[\text{D - lactate dehydrogenase}]{\text{L - lactate oxidase / or NAD independent}} \text{Pyruvate} + H_2O_2$$

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

$$NADH + H^{+} + O_2 \xrightarrow{\text{NADH oxidase}} NAD + H_2O_2$$

อาหารเลี้ยงเชื้อของ Lactic acid bacteria จะมีปริมาณของ H_2O_2 สะสมอยู่มาก เพราะ Lactic acid bacteria ไม่มีเอนไซม์คะตะเลส การสะสมของ H_2O_2 จะสามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus. aureus, Salmonella typhimurium, Enterogenic E. coli,* และ *Clostridium perfringens* โดยที่ *S. aureus* และ *Cl. Perfringens* จะถูกยับยั้งได้ดีกว่า *S. typhimurium* และ *E. coli* โดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จะเกิดการออกซิไดส์อย่างรุนแรงภายในเซลล์ ทำลายโครงสร้างโมเลกุลของเอนไซม์ภายในเซลล์ นอกจากนี้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ยังสามารถทำปฏิกิริยากับสารอื่น และสร้างสารต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้ เช่น ในน้ำนมดิบไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะทำปฏิกิริยากับ endogenous thiocyanate โดยมีเอนไซม์ lactoperoxidase สร้างสารตัวกลาง (intermediate oxidase) ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ เราเรียกขั้นตอนนี้ว่า lactoperoxidase antibacterial system (Montville and Kaiser, 1993)

3. **แบคเทอริโอซิน** (Bacteriocin)

แบคเทอริโอซิน จัดเป็นสารต้านจุลชีพ (antimicrobial substance) ซึ่งสารต้านจุลชีพต่างชนิดกัน จะมีลักษณะผลการยับยั้งจุลินทรีย์ (antimicrobial spectrum) แตกต่างกันไปทั้งในแง่การทำลาย กลไกการทำงาน และคุณสมบัติทางเคมี แบคเทอริโอซินจัดเป็นสารโมเลกุลขนาดใหญ่ที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ หรือโปรตีนที่มีคาร์โบไฮเดรตร่วมอยู่ด้วย จะมีฤทธิ์ในการฆ่าหรือทำลายแบคทีเรียที่มีภูมิรับไว และจำเพาะต่อบริเวณรับแบคเทอริโอซิน (bacteriocin receptor) บนเซลล์แบคทีเรียด้วย อย่างไรก็ตามแบคเทอริโอซินที่สร้างจากเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียต่างสายพันธุ์กันจะมีผลต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มที่ใกล้เคียงกัน และมีลักษณะทางชีวเคมี พันธุศาสตร์คล้ายคลึงกัน แต่แตกต่างกันในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ต่างชนิดกัน (Hoover et al, 1992; Jack et al, 1995)

แบคเทอริโอซินที่สร้างโดยแลคติคแอสิดแบคทีเรีย

แบคเทอริโอซินที่สร้างโดยแลคติคแอสิดแบคทีเรียสามารถแบ่งเป็น 4 classes คือ

1. Class I Lantibiotics ซึ่งโดยทั่วไปมีฤทธิ์จำเพาะต่อแบคทีเรียแกรมบวก ออกฤทธิ์โดยมีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียอื่นทำให้มีการทำลาย Proton Motive Force (PMF) นอกจากนี้ยังยับยั้งกระบวนการขนส่งกรดอะมิโน และทำให้กรดอะมิโนที่สะสมไว้ภายในเซลล์ถูกปล่อยออก

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

มา โดยส่วนที่ Lantibiotics เข้าไปทำปฏิกิริยา คือ cytoplasmic membrane ของเซลล์แบคทีเรีย ตัวอย่างเช่น Nisin Z ที่สร้างจาก *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strain NIZO 22186 จะมีผลต่อ *Listeria monocytogenes* โดยการทำให้ cytoplasmic membrane ของเชื้อสูญเสียโปตัสเซียมไอออน, เกิด depolarization ของ cytoplasmic membrane จนเกิด hydrolysis และมีการปล่อย ATP ออกนอกเซลล์

2. Class II Small hydrophobic heat-stable peptides แบคเทอริโอซินในกลุ่มนี้มีมวลโมเลกุลน้อยกว่า 13 กิโลดาลตัน และมีคุณสมบัติที่สำคัญ คือ ทนความร้อน ตัวอย่างเช่น Lactocin 27, Carnobacteriocins และ Lactacin B ทนความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที, Lactacin F และ Brevicin 37 ทนความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. Class III Large heat - labile proteins แบคเทอริโอซินในกลุ่มมีโมเลกุลขนาดใหญ่ คือ มวลโมเลกุลมากกว่า 30 กิโลดาลตัน โดยมีคุณสมบัติคือ ไม่ทนความร้อน สามารถถูกทำลายได้ด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 60 - 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 - 15 นาที เช่น Helveticin J, Acidophilucin A, Lacticin A และ Lacticin B

4. Class IV Complex proteins แบคเทอริโอซินในกลุ่มนี้มี คาร์โบไฮเดรต และ ไขมัน เป็นองค์ประกอบสำคัญที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ (Abee,1995; Klaenhammer et al, 1993)

แบคเทอริโอซินที่สร้างโดยแลคโตคอคไค (Bacteriocin of *Lactococci*)

แลคโตคอคไค (*Lactococci*) หรือ สเตรปโตคอคไค (*Streptococci*) ซึ่งมีการนำมาใช้เป็นหัวเชื้อในอุตสาหกรรมนม และแลคติคแอสิดแบคทีเรียในกลุ่มนี้หลายสายพันธุ์ สามารถสร้างสารต่อต้านจุลชีพได้ เช่น *Lactococcus lactis* สามารถสร้าง ดิปโพลคอคซิน (Diplococcin), แลคโตคอคซิน (Lactococcin), แลคโตสเตรปซิน (Lactostrepcins) หรือ ไนซิน (Nisin)

1. **ดิปโพลคอคซิน** (Diplococcin)

ดิปโพลคอคซิน เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strain 346 โดยสร้างในช่วงต้นของ stationary phase ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยกระบวนการทางโครมาโตกราฟี พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 5,300 ดาลตัน ดิปโพลคอคซินจะสลายได้เมื่อตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง, เมื่อถูกความร้อน หรือ ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน (proteolytic enzyme) เช่น chymotrypsin, trypsin, pronase ดิปโพลคอคซินจะมีผลยับยั้งการสร้าง DNA และ RNA ในเซลล์ที่ไวต่อดิปโพลคอคซิน เช่น *L. lactis* subsp *lactis* และ *L. actis* subsp. *cremoris* ซึ่งจะทำให้เซลล์ตายโดยไม่เกิดการ lysis

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

2. แลคโตสเตรปซิน (Lactostrepcins)

แลคโตสเตรปซิน เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. lactis* biovar *diacetylactis* (สายพันธุ์ที่ไม่สร้างไนซิน) และบางสายพันธุ์ของ *L. lactis* subsp. *cremoris* และ *L. lactis* subsp. *diacetylactis* โดยจะสร้างในช่วงต้นของ logarithmic phase แลคโตสเตรปซินสลายได้เมื่อถูกย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน แต่สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แลคโตสเตรปซินสามารถออกฤทธิ์ได้ดีในช่วง pH 4.2 - 5.0 และพบว่าฤทธิ์จะลดลงเมื่อ pH สูงขึ้น และสูญเสียฤทธิ์เมื่ออยู่ใน pH 8 เมื่อผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ พบว่ามีขนาดน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 1,000 ดาลตัน แลคโตสเตรปซิน มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Lactococci*, group A, C, G, *Streptococci*, *Lactobacillus helveticus*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *L. paracitrovorum* และ *Bacillus cereus*

แลคโตสเตรปซิน 5 (Lactostrepcins 5) สร้างโดย *L. lactis* subsp. *cremoris* 202 สามารถทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ และยังรบกวนการขนส่งยูริดีน (uridine) รวมทั้งยับยั้งการสร้าง DNA, RNA และโปรตีนของเซลล์แบคทีเรียอื่นได้

3. แลคโตคอคซิน 1 (Lactococcin 1)

แลคโตคอคซิน 1 เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. lactis* subsp *cremoris* strain AC1 สามารถยับยั้งเชื้อ *Lactobacilli* สายพันธุ์อื่น และ*Clostridia* บางสายพันธุ์ได้ เมื่อผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ พบว่าแลคโตคอคซิน1 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 6,000 ดาลตัน สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 99 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

4. แลคโตคอคซิน เอ (Lactococcin A)

แลคโตคอคซิน เอ เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. lactis* subsp *cremoris* strain LMG 2130 มีฤทธิ์ในการฆ่า *L. lactis* subsp. *L. lactis* เมื่อนำอาหารเลี้ยงเชื้อมาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 28 % นำมาผ่าน cation exchange chromatrography และ reverse phase chromatrography พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 5,778 ดาลตัน มีค่า pI (isoelectric point) เท่ากับ 9.2 ไม่ละลายน้ำ ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน แต่ฤทธิ์ไม่ถูกทำลายเมื่ออยู่ในสารละลาย 60 % เอทธานอล และ 25 mM โซเดียมฟอสเฟต แลคโตคอคซิน เอ จะมีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เกิดการแตกขององค์ประกอบต่าง ๆ ภายในเซลล์ นอกจากนี้แลคโตคอคซิน เอ อาจสร้างโดย *L. lactis* subsp *cremoris* สายพันธุ์อื่น เช่น สายพันธุ์ 9B4, *L.lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* WM4

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

5. ไนซิน (Nisin)

ไนซินเป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. lactis* serological group N ที่มีการศึกษาอย่างกว้างขวางมานาน ไนซินจัดเป็น Lantibiotics ที่เป็นกลุ่มของเปปไทด์ที่มีการต่อกันด้วยพันธะ sulfur ระหว่าง alanine กับ alanine เรียกว่า lanthionine และ aminobutyric acid (ABA) กับ alanine เรียกว่า B - methyllanthionine สร้างในช่วง logarithmic phase มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 3,500 ดาลตัน มีฤทธิ์ต่อแบคทีเรียแกรมบวก lactococci, bacilli, micrococci, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Clostridium botulinum* จากการทดลองของ Lee และ Kim (1996) ได้รายงานว่า ไนซินที่ความเข้มข้น 200 หน่วยสากลต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของ *Streptococcus themophilus* ATCC 10987 ได้อย่างสมบูรณ์และยังพบว่าไนซินสามารถยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นได้ เช่น *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. helveticus*, *L. acidophilus*, *Bacillus subtilis*, และ *B. cereus* นอกจากนี้ไนซินยังทำให้การงอกของสปอร์ลดลง สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทนต่อเอนไซม์ pronase, trypsin และในสภาวะที่เป็นกรด แต่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ chymotrypsin ไนซินจะมีผลโดยตรงต่อเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เกิดการ efflux ของกรดอะมิโน และพวกประจุบวก ทำให้ไม่เกิดกระบวนการ proton motive force และยังรบกวนกระบวนการ cellular biosynthesis ทำให้เกิดการสูญเสีย membrane potential เซลล์จึงตายในที่สุด

6. แลคติซิน 481 (Lacticin 481)

แลคติซิน 481 เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. lactis* subsp *lactis* CNRZ 481 จัดเป็น Lantibiotics เมื่อทำให้แลคติซิน 481 บริสุทธิ์โดยผ่านกระบวนการ ultrafiltration และ gel filtration chromatography พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 5,000 - 10,000 ดาลตัน มีผลต่อ *Lactococci*, *Lactobacilli*, *Leuconostocs* และ *Clostridium tyrobutyricum* (Kok et al,1993; Rodrignez et al,1995)

แบคเทอริโอซินที่สร้างโดยพิดิโอคอคไค (Bacteriocin of *Pediococci*)

พิดิโอคอคไค (*Pediococci*) เป็นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทอย่างมากในอุตสาหกรรมผักดอง, เนย, เนื้อและผลิตภัณฑ์จากเนื้อ พิดิโอซิน (Pediocins) สร้างโดย *Pediococcus* 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *P. acidilactici*, *P. cerevisiae* และ *P. pentosaceus* มีผลต่อแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิด ทั้งแอซิดแบคทีเรีย, *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* และ *Clostridia*

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

1. **พิดิโอซิน** AcH (Pediocins AcH)

พิดิโอซิน AcH เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *P. acidilactici* strain H ที่แยกมาจาก fermented sausage สร้างขึ้นในช่วง stationary phase ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TGE ที่ pH 6.5 เมื่อผ่านการทำให้บริสุทธิ์ พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 2,700 ดาลตัน ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน แต่ทนความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทนความเป็นกรดด่างได้ตั้งแต่ 2.5 - 9.0 พิดิโอซิน AcH มีผลในการยับยั้งการสร้าง ATP ทำให้ระบบขนส่งสาร (transport systems), กระบวนการซึมผ่านเข้าสู่เซลล์ (permeability) ของสารต่าง ๆ เสียไป นอกจากนี้ พิดิโอซิน AcH สามารถถูกดูดกลืนโดยเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ เนื่องจากพิดิโอซิน AcH จะจับกับ non - specific receptor ซึ่งอาจเป็น LTA (lipotechoic acids) บนผนังเซลล์ เมื่อ non - specific site อิ่มตัวด้วยโมเลกุลของพิดิโอซิน AcH แล้ว โมเลกุลที่เหลือจะจับกับ specific receptor แล้วทำให้ผนังเซลล์เปลี่ยนแปลง มีผลทำให้เซลล์สูญเสียโปตัสเซียมไอออน สูญเสียความสามารถในการเพิ่มจำนวนตัวเอง มีผลทำให้ o – nitrophenyl – B – D - galactospyranoside (oNPG) เข้าสู่เซลล์มากเกินไป เซลล์จึงเกิดการ lysis ในที่สุด

2. **พิดิโอซิน** PA - 1 (Pediocins PA - 1)

พิดิโอซิน PA - 1 เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *P. acidilactici* strain PAC - 1 ในช่วง stationary phase เมื่อนำมาผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟต, dialysis, ion exchange chromatography พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 16,500 ดาลตัน ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน แต่ไม่ถูกย่อยโดยเอนไซม์ lipase, phospholipase, lysozyme, Dnase, Rnase สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 80 - 100 องศาเซลเซียสได้ และออกฤทธิ์ได้ดีในช่วง pH 4.0 - 7.0 นอกจากนี้ พิดิโอซิน PA-1 ยังมีฤทธิ์ยับยั้ง *Pediococci, Lactobacilli, L. mesenteroides* และ *L. monocytogenes* (Ray and Hoover,1993; Strasser and Manca, 1993, Cintas et al,1995)

แบคเทอริโอซินที่สร้างโดยลิวโคนอสตอก (Bacteriocins of *Leuconostocs*)

Leuconostoc spp. เป็นแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่พบในผลิตภัณฑ์นม, กะหล่ำปลีดอง และกระบวนการหมักไวน์ สารต่อต้านจุลชีพที่สร้างจากเชื้อพวกนี้มักมีคุณสมบัติเป็น antagonistic compounds ที่ไม่ใช่แบคเทอริโอซิน แต่เป็นสารพวก acetate หรือ diacetyl แต่ *Leuconostic* spp. ที่แยกได้จากไวน์และผลิตภัณฑ์นม สามารถสร้าง bacteriocin-like compound มีฤทธิ์ต่อพวก *L. lactis* subsp. *lactis*

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

1. **มีเซนเทอรอยซิน 5** (Mesenteroicin 5)

มีเซนเทอรอยซิน 5 เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. mesenteroides* strain UL5 ที่แยกได้จากเนย โดยสร้างในช่วง stationary phase เมื่อผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 60 % แล้วนำมาทำ dialyse, ultrafiltration และ SDS-PAGE พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 4,500 ดาลตัน ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ protease ทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที มีเซนเทอรอยซิน 5 มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *L. monocytogenes, Brevibacterium linens* และ *P. pentosaceus*

2. **ลิวโคซิน เอ** (Leucocin A)

ลิวโคซิน เอ เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. gelidum* ที่แยกมาจากเนื้อที่เก็บใน 30 % คาร์บอนไดออกไซด์ โดยสร้างในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวในช่วง log phase ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส pH 6.0 เมื่อผ่านการกำจัดผลของกรดและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (pH 2.5), ผ่าน Amberlite XAD-2, Sephadex G-25 และHPLC พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 2,500-3,000 ดาลตัน ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนหลายตัว เช่น protease, chymotrypsin, trypsin, papain, pepsin และมีความคงตัวที่ pH 2.0 - 3.0 ทนความร้อนที่อุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ลิวโคซิน เอ มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Leuconostocs, Lactobacilli, Pediococci* และ *L. momocytogenes*

3. **ลิวโคโนซิน เอส** (Leuconocin S)

ลิวโคโนซิน เอส เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. paramesenteroides* strain OX ที่แยกได้จากเนื้อโดยสร้างในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว APT broth pH 6.5 12 ชั่วโมง ในช่วง stationary phase ลิวโคโนซิน เอส เป็นสารพวก glycoprotein ที่ทนความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ amylase, trypsin, chymotrypsin, protease, protease K ลิวโคโนซินยังมีผลต่อ *L. monocytogenes, S. aureus, Lactobacillus sake, Aeromonas hydrophila, Yersinia enterocolitica* และบางสายพันธุ์ของ *Cl. botulinum* โดยพบว่า crude bacteriocin จะมีผลต่อ proton motive force ของพวก *L. sake* ซึ่งมีผลทำให้เกิดการยับยั้ง (bacteriostatic) ต่อเซลล์

4. **คาโนซิน** (Canocin)

คาโนซิน เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. carnosum* LA44A ที่แยกได้จาก vacuum packaged Vienna type sausage โดยสร้างในอาหารเหลว modified MRS ซึ่งมี pH 6.5 ในช่วง

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

ปลายของ logarithmic phase ที่ 18 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส หรือที่ 148 ชั่วโมง อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ พบว่าbacteriocin มีน้ำหนักโมเลกุล 2,510 -6,000 ดาลตัน ถูกย่อยโดยเอนไซม์ chymotrypsin, trypsin และ amylase ไม่ทนความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แต่ยังคงตัวที่ pH 2.0-10.0 ทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที คาโนซินมีฤทธิ์ต่อ *Lactobacilli, Carnobacteria, Pediococci, Leuconostocs* และ *Listeria* spp. (Hastings et al, 1994; Stiles, 1993)

แบคเทอริโอซินที่สร้างโดยแลคโตบาซิลไล (Bacteriocins of *Lactobacilli*)

เชื้อ *Lactobacilli* สามารถสร้างสารต่อต้านจุลชีพได้มากมายหลายชนิด เช่น กรดอินทรีย์, lactoperoxidase, ไดอะซิติล และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แต่เมื่อกำจัดผลของสารยับยั้งดังกล่าวข้างต้นพบว่า *Lactobacilli* สามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้ เราแบ่ง *Lactobacilli* ได้เป็นพวกที่ไม่ได้ใช้ในผลิตภัณฑ์นม และพวกที่ใช้ในผลิตภัณฑ์นม

(a) **แบคเทอริโอซินที่สร้างโดยแลคโตบาซิลไลที่ไม่ได้ใช้ในผลิตภัณฑ์นม**

(Bacteriocins of Non-Dairy *Lactobacilli*)

1. **พลาทาริซิน เอ** (Plataricin A)

พลาทาริซิน เอ เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. plantarum* strain C-1 ที่แยกได้จาก silage และผักดอง สร้างขึ้นในช่วงกลางของ logarithmic phase หยุดสร้างในช่วงปลายของ logarithmic phase จัดเป็นโปรตีนที่มีฤทธิ์ฆ่าจุลินทรีย์ (bactericidal protein) แลคติคแอสิดแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 6,000 ดาลตัน คงตัวที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และที่ pH 4.0 - 6.5

2. **พลาทาซิน บี** (Platacin B)

พลาทาซิน บี เป็น bacteriocin-like inhibitor สร้างโดย *L. plantarum* strain NCDO-1193 พลาทาซิน บี ถูกย่อยได้ด้วยเอนไซม์ lipase และ amylase จึงจัดเป็นสารประเภทโปรตีนที่มีคาร์โบไฮเดรตและไขมันเป็นองค์ประกอบ มีฤทธิ์ต่อจุลินทรีย์พวก *L. plantarum* สายพันธุ์อื่น, *L. mesenteroides* และ *P. damnosus* เป็นต้น

3. **ซาคาซิน เอ** (Sakacin A)

ซาคาซิน เอ เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดยเชื้อ *L. sake* strain 706 ในช่วงตอนกลาง หรือตอนปลายของ logarithmic phase เป็นสารที่ทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เมื่อนำมาทดสอบในอาหารเหลวและอาหารแข็ง MRS พบว่า

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

ซาคาซิน เอ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *L. monocytogenes* แต่เมื่อนำมาทดสอบในเนื้อ พบว่าไม่มีการยับยั้งการเจริญของเชื้อดังกล่าว โดยพบว่า ซาคาซิน เอ จะดูดซึมลงในเนื้อส่วนที่เป็นไขมัน และเนื้อ ยังมีเอนไซม์ที่ทำให้ ซาคาซิน เอ สูญเสียความคงตัวไป

4. **ซาคาซิน เอ็ม** (Sakacin M)

ซาคาซิน เอ็ม เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. sake* strain 148 ที่แยกมาจาก spanish dry fermented sausage แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารกึ่งสังเคราะห์ที่เติม 1.5 % tryptone จากนั้นนำส่วนน้ำใส (supernatant) มาทำให้แห้งภายใต้สูญญากาศ แล้วนำไปละลายในยูเรีย ความเข้มข้น 1 M ที่ pH 5.6 ผ่าน gel filtration พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 4,640 ดาลตัน ทนความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 นาที ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ trypsin, pepsin, protease ซาคาซิน เอ็ม มีฤทธิ์ต่อ *Lactobacilli, Leuconostoc, Carnobacteria, L. monocytogenes* และ *S. aureus*

5. **ซาคาซิน พี** (Sakacin P)

ซาคาซิน พี เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. sake* strain LTH 673 ที่แยกมาจากเนื้อ เมื่อผ่านการทำให้บริสุทธิ์ พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 3,000-5,000 ดาลตัน ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ proteinase K และ trypsin แต่ทนต่อเอนไซม์ pepsin และทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที ซาคาซิน พี มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Lactobacilli, Leuconostoc, Carnobacteria, Enterococci, Brochothrix thermosphacta* และ *Listeria* spp.

6. **แลคโตซิน เอส** (Lactocin S)

แลคโตซิน เอส เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. sake* strain L45 ที่แยกได้จาก dry sausage สร้างขึ้นในช่วงปลายของ exponential phase เมื่อนำมาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต จะมีฤทธิ์เพิ่มขึ้น 30 เท่า เมื่อทำให้บริสุทธิ์ พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30,000 ดาลตัน แลคโตซิน เอส เป็นโปรตีนที่ทนความร้อน มีฤทธิ์ต่อ *Pediococcus, Leuconostoc* และ *Lactobacillus* spp.

7. **เคอวาซิน เอ** (Curvacin A)

เคอวาซิน เอ เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. curvatus* strain LTH 1174 ที่แยกได้จากเนื้อ เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาทำให้บริสุทธิ์ พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 3,000-6,000 ดาลตัน ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ proteinase K และ trypsin ทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที เคอวาซิน เอ จะมีฤทธิ์ต่อเชื้อแลคโตบาซิไลสายพันธุ์อื่น, *Leuconostocs, Carnobacteria, L. monocytogenes, L. ivanovii* แต่มีผลยับยั้ง *Micrococci* และ *Staphylococci* ได้น้อยมาก

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

(b) แบคเทอริโอซินที่สร้างโดยแลคโตบาซิไลที่ใช้ในผลิตภัณฑ์นม

(Bacteriocins of Dairy *Lactobacilli*)

1. แลคโตซิน 27 (Lactocin 27)

แลคโตซิน 27 เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดยเชื้อ *L. helveticus* strain LP27 เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาทำให้บริสุทธิ์ พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 12,400 ดาลตัน และเป็นไกลโคโปรตีนที่ทนความร้อน ออกฤทธิ์ต่อเชื้อ *Lactobacilli* โดยจะทำให้เกิดการ efflux ของโปตัสเซียมไอออน และการ influx ของโซเดียมไอออน เนื่องจาก แลคโตซิน 27 จะทำปฏิกิริยากับเยื่อหุ้มเซลล์ แต่ไม่มีผลต่อการสร้าง DNA และ RNA

2. เฮลวิทิซิน เจ (Helveticin J)

เฮลวิทิซิน เจ เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. helveticus* 481 เลี้ยงในถังหมักในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนเป็นเวลา 22 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส pH 5.5 จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาปรับให้มีค่า pH 3.0 นำไปตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 50 % ละลายตะกอนแล้วนำไปทำ dialyse ผ่านลงใน gel chromatography (Sephadex G-200, Sephadex G-25) และ SDS-PAGE พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 37,000 ดาลตัน ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อพวก *Lactobacilli*

3. เฮลวิทิซิน วี-1829 (Helveticin V-1829)

เฮลวิทิซิน วี-1829 เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. helveticus* 1829 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS pH 5.5 โดยจะสร้างในช่วง logarithmic phase เฮลวิทิซิน วี-1829 ถูกย่อยโดยเอนไซม์ proteinase K, trypsin และ pronase ที่มีความร้อน และ pH มากกว่า 7.0 แต่ยังคงตัวที่ pH 2.5-6.5 และทนความร้อนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 นาที เฮลวิทิซิน วี-1829 มีฤทธิ์ต่อเชื้อพวก *Lactobacilli*

4. แลคตาซิน เอฟ (Lactacin F)

แลคตาซิน เอฟ เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. acidophilus* 11088 ในช่วงต้นของ stationary phase หลังจากนั้นนำไปตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 40% หาน้ำหนักโมเลกุลโดยผ่าน gel filtration พบว่ามีขนาด 2,500 ดาลตัน แลคตาซิน เอฟ ถูกย่อยได้ด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนหลายชนิด เช่น proteinase K, trypsin, subtilisin เป็นต้น ทนความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที สามารถยับยั้ง เชื้อ *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* (*L. leichmannii*), *L. helveticus*, *L. acidophilus*, *L. fermentum* และบางสายพันธุ์ของ *S. faecalis*

Ubon Rajathanee University

ฝ่ายหอสมุด สำนักวิทยบริการ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
Ubon Rajathanee University

5. แลคตาซิน บี (Lactacin B)

แลคตาซิน บี เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *L. acidophilus* strain N2 เมื่อทำให้บริสุทธิ์ พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 6,500 ดาลตัน ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ protease K ทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที แลคตาซิน บี มีฤทธิ์ยับยั้ง *L. delbrueckii* subsp. *lactis (L. leichmannii)*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. helveticus* การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่น ได้แก่ *Proteus*, *Bacillus*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Staphyllococcus* และ *Streptococcus* ซึ่งพบว่าสารแลคตาซิน บี สามารถยับยั้งเชื้อดังกล่าวได้ (Kawai et al, 1994; Benoit et al,1994; Schillinger and Lucke,1989)

คุณสมบัติของแบคเทอริโอซิน

กลไกการออกฤทธิ์ต่อเชื้อโดยเป็น bactericidal

แบคเทอริโอซินที่สร้างโดยเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย เป็นสารประเภทโปรตีนโมเลกุลขนาดเล็ก แบคเทอริโอซินออกฤทธิ์ต่อเชื้อจุลินทรีย์อื่น โดยการแทรกโมเลกุลเข้าไปในตัวเชื้อแล้วทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อสูญเสียคุณสมบัติทางชีวเคมีไป แล้วทำให้เซลล์ตายในที่สุด สารแบคเทอริโอซิน จึงจัดเป็นสารต้านจุลชีพประเภท bacteriocidal ยกเว้น lactocin 27 มีฤทธิ์ bacteriostatic ต่อเชื้อ *Lactobacilli* ชนิดอื่น มีการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของ nisin พบว่า nisin มีผลต่อเชื้อจุลินทรีย์อื่นโดยทำให้ cytoplasmic membrane สูญเสียโปตัสเซียมไอออน (K^+), เกิด depolarization ของ cytoplasmic membrane จนเกิด hydrolysis และมีการปล่อย ATP ออกนอกเซลล์ กลไกการออกฤทธิ์อื่น ๆ เช่น Lactacin F มีผลทำให้ membrane permeability ของเซลล์แบคทีเรียเพิ่มขึ้น ทำให้เซลล์มีการสูญเสียโปตัสเซียมไอออน และทำลาย proton motive force ทำให้เซลล์ตายในที่สุด

ขอบเขตการออกฤทธิ์

เป็นที่ทราบกันมานานแล้วว่า แลคติคแอสิดแบคทีเรียมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์อื่น จำพวกเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียและแบคทีเรียก่อโรคได้ nisin ซึ่งจัดเป็นแบคเทอริโอซินที่มีขอบเขตการออกฤทธิ์ที่กว้าง คือ มีฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่ปนเปื้อนในอาหาร เช่น *Listeria*, *Clostridium* และ *Bacillus* species *L.acidophilus* 1108 สร้าง Lactacin F ที่มีฤทธิ์ต่อเชื้อ *L. fermentum*, *L. delbrueckii* และ *L. helveticus* ขอบเขตการออกฤทธิ์ของสารแบคเทอริโอซินที่สร้างจากเชื้อแลคโตบาซิลไล แสดงดังตารางที่ 1 (Jack et al, 1995; Abee,1995; Kok et al,1993)

ใช้เฉพาะใน
ศูนย์ข้อมูลท้องถิ่นเท่านั้น
Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

ตารางที่ 1 คุณสมบัติของสารแบคเทอริโอซินที่สร้างจากเชื้อ *Lactobacillus* spp. (Kawai et al, 1994)

เชื้อ	แบคเทอริโอซิน	ขอบเขตการออกฤทธิ์	มวลโมเลกุล
L. acidophilus	Lactacin B	*L. delbrueckii* *L. helveticus* *L. monocytogenes*	6.3 kilodalton
	Lactacin F	*L. fermentum* *Enterococcus faecalis* *L. delbrueckii* *L. helveticus* *Aeromonas hydrophila* *S. aureus*	6.3 kilodalton
	Acidophilucin A	*L. delbrueckii* *L. helveticus*	-
L. brevis	Brevicin 37	*Pediococcus damnosus* *L. brevis* *Leuconostoc oenos*	-
L. casei	Caseicin 80	*L. casei*	40 kilodalton
L. carnis	Bacteriocin	*Lactobacillus*	-
	Carnocin U149	*Carnobacterium* *Pediococcus* *Enterococcus* *Listeria*	4635 dalton
L. delbrueckii	Lacticin A	*L. delbrueckii* subsp.*lactis* *L. delbrueckii* subsp.*bulgaricus* *L. delbrueckii* subsp.*delbrueckii*	- -
L. fermenti	Bacteriocin	*Lactobacillum fermenti*	-
L. gasseri	Gassericin A	*L. acidophilus* *L. delbrueckii* *L. helveticus* *L. casei* *L. brevis*	3.8 kilodalton

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

เชื้อ	แบคเทอริโอซิน	ขอบเขตการออกฤทธิ์	มวลโมเลกุล
L. helveticus	Lactocin 27	*L. acidophilus* *L. helveticus*	12.4 kilodalton
	Helveticin J	*L. helveticus* *L. delbrueckii* subsp. *lactis* *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*	37 kilodalton
L. plantarum	Plantaricin A	*L. plantarum* *Lactobacillus* spp. *Leuconostoc* spp. *Pediococcus* spp. *Lactococcus* spp. *E. faecalis*	-
	Plantaricin B	*L. plantarum* *Leuconostoc mesenteroides* *Pediococcus damnosus*	-
	Bacteriocin	*Leuconostoc* *Lactobacillus* *Pediococcus* *Lactococcus* *Streptococcus*	-
L. sake	Sakacin A	*Carnobacterium piscicola* *Enterococcus* spp. *L.sake* *Lactobacillus curvatus* *Leuconostoc paramesenteroides* *L. monocytogenes* *Aeromonas hydrophila* *S. aureus*	-
	Lactocin S	*Lactobacillus* *Leuconostoc* *Pediococcus*	-

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

การทนเอนไซม์ย่อยโปรตีน

สารแบคเทอริโอซินส่วนใหญ่ถูกย่อยได้ด้วยเอนไซม์ protease เช่น trypsin, pepsin, protease, papain และ proteinase K ยกเว้น nisin ที่ถูกทำลายได้ด้วย α– chymotrypsin โดยที่เอนไซม์ย่อยโปรตีนอื่น ๆ ไม่สามารถทำลาย nisin ได้ คุณสมบัติของแบคเทอริโอซินในการถูกย่อยโดยเอนไซม์แสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 คุณสมบัติในการทนเอนไซม์ของสารแบคเทอริโอซิน

เชื้อ	แบคเทอริโอซิน	เอนไซม์ที่สามารถย่อยได้
L. acidophilus N2	Lactacin B	proteinase K
L. acidophilus 11088	Lactacin F	ficin
L. lactis subsp. *lactis*	Nisin (A-E)	α-chymotrypsin
L. lactis subsp. *cremoris*	Diplococcin	trypsin, pepsin, α-chymotrypsin
L. *gasseri*	Gassericin A	trypsin
L. *gelidum*	Leucocin A	protease, chymotrypsin, trypsin, papain, pepsin
L. paramesenteroides	Leuconocin S	amylase, trypsin, chymotrypsin, protiase, proteinase K
L.cornosum LA44A	Canocin	chymotrypsin, trypsin, amylase
L. sake strain 148	Sakacin M	trypsin, pepsin, protease
L. curvatus strain LTH1174	Curvacin A	proteinase K, trypsin

การทนความร้อน

แบคเทอริโอซินที่สร้างจากแลคติคแอสิดแบคทีเรีย ส่วนใหญ่ทนความร้อนได้ โดยพบว่าแบคเทอริโอซินบางชนิดทนความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แบคเทอริโอซินจะถูกทำลายฤทธิ์โดยความร้อนมากน้อยเพียงใดนั้นขึ้นอยู่กับความบริสุทธิ์ของแบคเทอริโอซิน, pH, ionic strenght และการมี protective molecules ตัวอย่างเช่น Diplococcin ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ จะสูญเสียฤทธิ์ไป 75 % เมื่อนำมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ในขณะที่ Diplococcin ในรูปกึ่งบริสุทธิ์ (partially purified) จะทนความร้อนได้ที่ pH ต่ำ ๆ แต่เมื่อปรับ pH ให้สูงขึ้น พบว่า คุณสมบัติในการทนความร้อนของ Diplococcin จะลดลง

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตและการออกฤทธิ์ของแบคเทอริโอซิน

1. องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กันมากในการเพาะเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ *Lactococcus* เพื่อให้เชื้อสร้างแบคเทอริโอซินนั้นมีอยู่ 5 ชนิด คือ lactic acid broth, brain heart infusion (BHI), M17 medium, systhetic medium และ litmus milk มีการศึกษาพบว่าเชื้อจะสร้าง Pediocin PA-1 ได้ปริมาณมากที่สุด เมื่อมีการเติมสารสกัดยีสต์ 2 % ลงใน MRS medium นอกจากนี้ยังพบว่าหากในอาหารเลี้ยงเชื้อมี $FeCl_3$ เป็นองค์ประกอบในความเข้มข้นที่สูง จะลดการสร้างแบคเทอริโอซินได้ หรือการเติม Tween 80 ในอาหาร MRS จะช่วยเร่งการเจริญเติบโตของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียได้

2. Phase ของ growth cycle

ปริมาณการสร้างแบคเทอริโอซิน ขึ้นอยู่กับ phase ของ growth cycle ของเชื้อที่ผลิต โดยพบว่าเชื้อจะสร้าง helveticin J, sakacin A และ helveticin V-1829 ได้ดีในช่วงกลางถึงช่วงปลายของ log phase หลังจากช่วงนี้ไปการสร้างแบคเทอริโอซินจะลดลง ในทางตรงกันข้าม พบว่า เชื้อจะสร้าง lactocin 27 และ lactacin B ได้ดีในช่วงต้นของ stationary phase ของ growth cycle เชื้อ streptococci จะสร้างแบคเทอริโอซินในช่วง exponential phase ของ growth cycle และจะหยุดสร้างเมื่อเข้าสู่ stationary phase นอกจากนี้พบว่าหากมีการบ่มเพาะเชื้อเป็นระยะเวลานานเกินไป แบคเทอริโอซินที่สร้างออกมาอาจถูกทำลายได้ด้วยเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน (proteolytic enzymes) ที่สร้างจากเชื้อที่ผลิตแบคเทอริโอซินนั้นได้ ในระยะท้ายของการเจริญเติบโตของเชื้อ แบคเทอริโอซินอาจจะไม่คงตัวเนื่องจากมีการเพิ่มความเป็นกรดมากขึ้น

3. ความเป็นกรดด่าง (pH)

พบว่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อให้สร้างแบคเทอริโอซินนั้น มีผลต่อการสร้างแบคเทอริโอซิน และมีผลต่อความคงตัวของแบคเทอริโอซินที่สร้างออกมาด้วย ตัวอย่างเช่น ฤทธิ์ของ lactacin จะดีที่สุดเมื่อสร้างจากสภาวะที่มี pH ระหว่าง 5.9 - 7.0 และถ้า pH ต่ำกว่า 5.9 ฤทธิ์จะลดลง ในทางตรงข้าม การเลี้ยงเชื้อให้สร้าง helveticin V-1829 ให้ได้ปริมาณสูงสุดควรใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pH 5.5 การเลี้ยงเชื้อเพื่อให้สร้าง lactacin F ในปริมาณสูงสุดควรใช้ MRS broth pH 7.0 (Murina and Luchansky, 1993; Lostienkit, 1995; Salomon and Farias,1994; Parente and Ricciardi,1994)

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

ตารางที่ 3 อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อเพื่อให้สร้างแบคเทอริโอซิน

เชื้อ	แบคเทอริโอซิน	อาหารเลี้ยงเชื้อ
Lactobacillus		
L. acidophillus 11088	Lactacin F	MRS , pH 7.0
L. acidophillus N2	Lactacin B	MRS , pH 6.0
L. acidophillus LAPT1060	Acidophilucin A	MRS (0.5% glucose, 0.5%lactose)
L. brevis B37	Brevicin 37	TIM และ SM-2p (synthetic medium)
L. delbrueckii JCM 1106	Lactacin A	MRS (0.5% glucose , 0.5%lactose)
L. delbrueckii JCM 1248	Lactacin B	MRS (0.5% glucose , 0.5%lactose)
L. helveticus 481	Helveticin J	MRS , pH 5.5
L. helveticus LP 27	Lactocin 27	APT w/o Tween 80
L. plantarum C - 11	Plantaricin A	MRS
L. plantarum NCDO 1193	Plantaricin B	MRS (0.5% glucose)
L. sake Lb 706	Sakacin A	MRS - 0.2 (0.2% glucose)
L. sake L 45	Lactocin S	MRS
Lactococcus		
L. cremoris 346	Diplococcin	M17 broth , M17 agar
L. cremoris LMG 2130	Lactococcin A	M17 broth , M17G agar
L. lactis CNRZ 481	Lacticin 481	Elliker (w/o gelatin) , pH 5.5
L. lactis	Nisin	Commercial preparation
Lenconostoc		
L. mesenteroides UL 5	Messenterocin 5	MRS
L. paramesenteroides OX	Lenconocin S	APT
Pediococcus		
P. acidilactici H	Pediocin AcH	TGE
P. acidilactici PAC 1.0	Pediocin PA-1	MRS
P. pentosaceus FBB61	Pediocin A	MRS

Ubon Rajathanee University

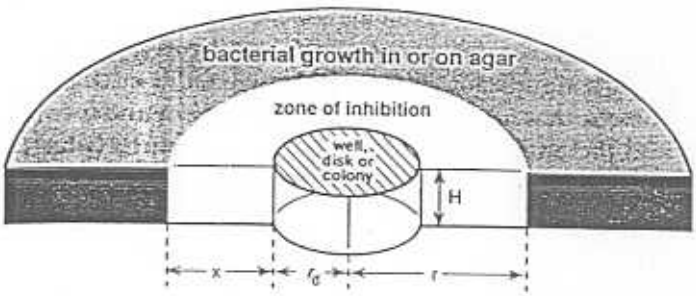
Ubon Rajathanee University

วิธีการทดสอบฤทธิ์ของสารแบคเทอริโอซิน

วิธีการทดสอบฤทธิ์ของสารแบคเทอริโอซินที่นิยมใช้กันมีอยู่หลายวิธี สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 วิธีใหญ่ ๆ คือ

1. Agar Diffusion Methods

ในปี ค.ศ.1924 Fleming เป็นบุคคลแรกที่นำวิธีการนี้มาใช้สำหรับทดสอบฤทธิ์ของ penicillin ต่อเชื้อ *S. aureus* โดยการใช้ wells ที่ตัดให้มีขนาดที่เหมาะสมสำหรับการบรรจุสารที่ต้องการทดสอบฤทธิ์ แล้วนำไปวางในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง ต่อมาก็มีการประยุกต์ใช้ disc, cylinder cup หรือ spot สารสกัดจากเชื้อที่สร้างสารต้านจุลชีพลงบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับวิธีการแปลผลที่นิยมใช้กัน คือ การวัดขนาดของบริเวณใส (clear zone) ที่เกิดขึ้น ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 ลักษณะของบริเวณใส (Clear Zone) ที่เกิดขึ้นจากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อโดยวิธี agar diffusion

ขนาดของบริเวณใสที่เกิดขึ้นจะขึ้นกับการแพร่ (diffuse) ของสารต้านจุลชีพ และอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบ การแพร่ของสารต้านจุลชีพผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง ซึ่งขึ้นกับขนาดโมเลกุล และประจุของสารต้านจุลชีพ รวมทั้งองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและอุณหภูมิที่ใช้สำหรับการบ่มเพาะเชื้อ มีการศึกษาพบว่าปริมาณของสารต้านจุลชีพและระยะเวลาในการบ่มเพาะเชื้อก็มีผลต่อการเกิดบริเวณใส หากสารต้านจุลชีพมีปริมาณมาก ก็จะเกิดการยับยั้งเชื้อ

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

เป็นบริเวณที่กว้างขึ้น และระยะเวลาการบ่มเพาะเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการแพร่ของสารต้านจุลชีพก็มีผลต่อขนาดของบริเวณใสเช่นกัน เนื่องจากสารแบคเทอริโอซินเป็นสารประกอบประเภทโปรตีน จึงมีขนาดโมเลกุลที่ใหญ่กว่าสารต้านจุลชีพทั่ว ๆ ไป ดังนั้นระยะเวลาในการบ่มเพาะเชื้อเพื่อทดสอบฤทธิ์นั้นต้องใช้เวลาไม่ต่ำกว่า 24 ชั่วโมง

2. Liquid Methods

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อของสารต้านจุลชีพด้วยวิธีนี้ เป็นวิธีที่ไม่ค่อยใช้บ่อยนัก เพราะวิธีการค่อนข้างยุ่งยาก และใช้เวลานานกว่า agar diffusion method โดยทั่วไปจะใช้วิธีทดสอบโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวเมื่อต้องการข้อมูลที่ละเอียดยิ่งขึ้น วิธีการทำอย่างคร่าว ๆ คือ การเลี้ยงเซลล์ของจุลินทรีย์ที่ผลิตสารแบคเทอริโอซินในอาหารเหลวตามสภาวะที่เหมาะสม แล้วแยกตัวเซลล์ของเชื้อออก โดยการนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) และกรองผ่านกระดาษกรอง ก็จะได้สารสกัดของแบคเทอริโอซิน (cell supernatant) นำไปปรับ pH ให้เป็นกลาง ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ หลังจากนั้นนำสารสกัดของแบคเทอริโอซินไปเติมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เลี้ยงเชื้อทดสอบ นำไปบ่มเพาะเชื้อที่สภาวะที่เหมาะสม ดูผลโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์เชื้อทดสอบที่แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ระยะเวลาต่าง ๆ (Murina and Luchansky, 1993; Hoover and Harlander, 1993; Graver and Muriana, 1993)

การนำแบคเทอริโอซินไปใช้ประโยชน์

ได้มีการใช้แบคเทอริโอซินมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อการถนอมอาหาร และป้องกันการสูญเสีย เนื่องจากแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค มีนักวิจัยรายงานว่า แบคเทอริโอซินที่สร้างจากแลคติคแอสิดแบคทีเรียสามารถยับยั้งจุลินทรีย์แกรมบวกได้หลายชนิด รวมทั้งแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค เช่น *S. aureus, L. monocytogenes* และ *Cl. Botulinum* และอาจมีผลยับยั้งเชื้อแกรมลบได้บ้าง

แบคเทอริโอซินที่ได้กล่าวมาทั้งหมดนี้จะมี nisin ที่ได้รับการยอมรับจาก GRAS (Generally Recognizeed as Safe) และสามารถใช้ได้ในสหรัฐอเมริกา nisin เป็นสารแบคเทอริโอซินที่สร้างจาก *L. lactis* subsp. *lactis* มีมวลโมเลกุลประมาณ 3,500 ดาลตัน พบได้ในผลิตภัณฑ์นม ซึ่งมนุษย์เราใช้ในการบริโภคมาเป็นเวลานาน โดยที่ไม่มีการรายงานถึงการเกิดพิษจาก nisin แต่ก็ไม่มีการนำมาใช้สำหรับรักษาโรคในมนุษย์หรือสัตว์

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

แบคเทอริโอซินที่จะนำมาใช้เป็นสารถนอมอาหารได้ควรมีคุณสมบัติดังนี้

1. มีความปลอดภัยต่อมนุษย์ในการนำมาบริโภค
2. ราคาไม่แพงเกินไป
3. ใช้ในความเข้มข้นต่ำ
4. ไม่ทำลายคุณสมบัติทางกายภาพของอาหาร
5. มีความคงตัวตลอดอายุ (shelf - life) ของอาหาร
6. ไม่มีการนำมาใช้เป็นยา

การนำแบคเทอริโอซินมาใช้ในอาหาร ยังจำเป็นต้องคำนึงถึงองค์ประกอบอื่น ๆ อีก เช่น โครงสร้าง และองค์ประกอบของอาหาร ปริมาณไขมันในอาหารจะมีผลต่อการออกฤทธิ์ของแบคเทอริโอซิน มีการศึกษาพบว่าแบคเทอริโอซิน รวมทั้ง nisin จะสามารถจับกับไขมัน จึงทำให้ประสิทธิภาพในการทำปฏิกิริยากับแบคทีเรียลดลง นอกจากนี้อุณหภูมิ, ค่าความเป็นกรดด่าง และการมี endogenous enzymes เช่น protease รวมทั้ง endogenous protease หรือ gastrointestinal enzymes เช่น chymotrypsin หรือ trypsin ก็จะมีผลต่อความคงตัวของแบคเทอริโอซินในอาหาร หรือเครื่องดื่ม นอกจาก nisin แล้ว ในปัจจุบันยังไม่มีการนำแบคเทอริโอซินชนิดอื่นมาใช้เป็นสารถนอมอาหาร แต่ก็อยู่ในช่วงของการศึกษาวิจัย มีแบคเทอริโอซินหลายชนิดที่สร้างจากแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค ซึ่งจะนำมาใช้ได้ แต่มีข้อด้อยตรงที่มีขอบเขตการออกฤทธิ์ที่แคบ เช่น lactostrepcins ที่สร้างจาก *L. lactic* subsp. *lactis* มีฤทธิ์จำเพาะต่อเชื้อในกลุ่มแลคติคแอสิดแบคทีเรียด้วยกันเท่านั้น

แบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแกรมบวกได้รับความสนใจในการพัฒนา เพื่อจะนำมาใช้ทางการค้ามากกว่าแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแกรมลบ เพราะแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแกรมบวกมีขอบเขตการออกฤทธิ์ที่กว้างกว่า คือ มีผลต่อทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ตัวอย่างเช่น Propionicin PLG-1จาก *Propionibacterium thoenii* มีฤทธิ์ต่อทั้งแลคติคแอสิดแบคทีเรีย และแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อโรคอื่น ๆ อีกด้วย เช่น *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio parahaemolyticus* และ *Campylobacter jejuni* นอกจากนี้ยังยับยั้งยีสต์และmolds เช่น *Aspergillus wentii*, *Candida utilis*, *Phialophora gregata*, *Saccharomycopsis fibutigera* และ *Trichoderma reesei* propionicin PLG-1 จึงจัดว่าเป็นสารที่น่าสนใจอย่างมาก เพราะมีขอบเขตการออกฤทธิ์ที่กว้าง ซึ่งในความเป็นจริงจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหารก็มีหลากหลายชนิดแตกต่างกันไป เชื้อจุลินทรีย์อื่น ๆ เช่น *S. aureus*, *Yersinia pestis*, *L. monocytogenes*, *Cl. botulinum*, *S. pyrogen* และ *Corynebacterium diphtheriae*

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

ต่างก็ผลิตแบคเทอริโอซินทั้งสิ้น แต่เชื้อดังกล่าวเป็นเชื้อก่อโรคในมนุษย์ หากจะนำสารที่ผลิตจากเชื้อดังกล่าวมาเติมในอาหารเพื่อใช้เป็นสารถนอมอาหารนั้น ก็ยังไม่เป็นที่ยอมรับกัน

อย่างไรก็ตามมักนิยมใช้จุลินทรีย์ที่ผลิตสารต่อต้านจุลชีพเติมลงในอาหารต่าง ๆ มากกว่าการเติมแบคเทอริโอซินเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาเทคโนโลยีทางด้านพันธุศาสตร์ในการ clone ยีนที่เกี่ยวกับการสร้างแบคเทอริโอซินหลาย ๆ ชนิดเข้าไปในเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่ไม่ทำให้เกิดโรค หรือเชื้อ *E. coli* ทำให้สามารถสร้าง hybrid bacteriocin molecules ซึ่งทำให้แบคทีเรียสามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้หลายชนิด ทำให้เรามีจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสร้างแบคเทอริโอซินที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ และทนต่อสภาวะต่าง ๆ ได้มากขึ้น รวมทั้งมีฤทธิ์ทำลายระบบต่าง ๆ ได้กว้างมากขึ้น ขณะเดียวกันยังสามารถสร้างสารต่อต้านจุลชีพหลาย ๆ ชนิดที่มีฤทธิ์ต่อจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสียและเกิดโรคได้ จึงนับได้ว่าเป็นประโยชน์ของการพัฒนาเทคโนโลยีทางด้านพันธุกรรมและอุตสาหกรรมอาหาร

นอกจากสารถนอมอาหารแล้วยังมีการนำแบคเทอริโอซินมาใช้ประโยชน์ในด้านอื่น ๆ ได้ เช่น Ambicin เป็นแบคเทอริโอซินที่มีฤทธิ์ฆ่าแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของคราบหินปูน และฟันผุ จึงมีการพัฒนาเพื่อนำมาใช้ในน้ำยาบ้วนปาก, ยาสีฟัน, สบู่ และผลิตภัณฑ์บำรุงผิวอื่น ๆ ในทางเทคโนโลยีชีวภาพ มีการนำแบคเทอริโอซินมาใช้เป็น genetic markers สำหรับแบคทีเรียบางชนิด และใช้ศึกษาโปรตีนที่สร้างโดยแบคทีเรียได้ (Hoover,1992; Daeschel, 1993; Lostienkit, 1993)

คุณสมบัติของเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ

(Sneath, 1986)

Staphylococcus aureus

เป็นเชื้อในกลุ่ม *Staphylococcus* อยู่ใน Family Micrococcaceae โดยปกติมักพบเชื้อนี้บริเวณผิวหนังและเยื่อเมือกบริเวณลำคอส่วน oropharynx เชื้อ *Staphylococcus* ที่พบว่าทำให้เกิดโรคในคน ได้แก่ *S. aureus, S. epidermidis, S. saprophyticus* ซึ่ง *S. aureus* เป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรคบ่อยที่สุด

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

รูปร่างและคุณสมบัติทั่วไป

เป็นแบคทีเรียรูปร่างกลม เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.7-1.2 μm เป็นเชื้อแกรมบวก มักอยู่กันเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น เรียงตัวจับกันเป็นคู่ (pairs) หรือ คู่สี่ (tetrad) ผลิต enzyme catalase เจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดา อุณหภูมิ 37°C pH 7.4 ทั้งในภาวะที่มีออกซิเจน และมีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย เชื้อสร้าง pigment ที่เป็นสารพวกคาโรทีนอยด์ ที่อุณหภูมิ 37°C เมื่อเลี้ยงนาน 18 -24 ชั่วโมง แต่เชื้อจะสร้าง pigment ได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 20°C ในบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์สูงกว่าปกติ ไม่สร้างpigmentในภาวะที่ไร้ออกซิเจนหรือในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว หากเจริญบนวุ้น โคโลนีจะมีลักษณะกลมนูนเป็นมัน สีเหลืองทอง ขนาด 1 - 2 มิลลิเมตร

การทำให้เกิดโรค

S. aureus ทำให้เกิดโรคได้ทั้งจากตัวเชื้อเอง และจากสารพิษ *S. aureus* ทำให้เกิดโรคในอวัยวะและเนื้อเยื่อเกือบทุกส่วนของร่างกาย แต่ที่พบบ่อยที่สุดคือ การติดเชื้อที่ผิวหนัง เริ่มต้นจะเป็นการอักเสบเฉพาะที่ ต่อมามีการคั่งของเม็ดเลือดขาว เกิดการเน่าตายของเนื้อเยื่อกลายเป็นการอักเสบแบบมีหนอง บางครั้งเชื้อสามารถแพร่กระจายไปทางท่อน้ำเหลือง หรือทางกระแสเลือด ทำให้เกิดการติดเชื้อที่อวัยวะส่วนต่างๆ ของร่างกาย โรคที่เกิดจาก *S. aureus* ได้แก่

1. **การติดเชื้อที่ผิวหนัง** (Cutaneous infection)

1.1 **การเกิดสิวและฝี** (boil, furuncle) เป็นโรคที่พบมากที่สุดในคน ทำให้เกิดขุมขนอุดตันและอักเสบได้บ่อยที่สุด ถ้าเป็นสิวหรือฝี หากได้รับการกระทบกระเทือนจะลุกลามไปสู่ผิวหนังและเนื้อเยื่อชั้นใน กลายเป็นฝีฝักบัว (carbuncle) พบมากที่คอและบริเวณหลัง ประมาณ 3-5 วันต่อมา บริเวณฝีจะนุ่มและแตกออกแล้วค่อยๆ หายไป แต่บางรายอาจเป็นอยู่นาน เพราะจะมีฝีใหม่เกิดขึ้นอีก

1.2 Impetigo มักเป็นในเด็กเล็ก พบเป็นตุ่มหนองเล็กๆ ที่บริเวณจมูก อาจพบร่วมกับ group A *Streptococci* มีน้ำเหลืองและกลายเป็นสะเก็ด ถ้าเอาสะเก็ดออกจะเห็นแผลแดง ติดต่อได้รวดเร็วมาก โดยเฉพาะในสถานเลี้ยงเด็ก

1.3 **ผิวหนังหลุดออก** (Scald skin syndrome) พบบ่อยในทารกแรกคลอดและเด็กอ่อน เกิดจากเชื้อ *S. aureus* ที่สามารถสร้าง erythrogenic toxin บางครั้งเป็น exfoliative dermatitis (Ritter's disease) ซึ่งมีอาการคล้ายกับไข้ดำแดง (scarlet fever) ซึ่งเกิดจากเชื้อ *Streptococcus*

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

2. **กุ้งยิง** (Stye) เป็นการติดเชื้อที่ขอบเปลือกตา เชื่อว่าเกิดจาก *S. aureus* สายพันธุ์ที่ผลิต lipase esterase ได้ดี ทำให้ต่อมบริเวณนั้นอุดตันและอักเสบ

3. **หูอักเสบ** (Otitis media) พบว่าเชื้อนี้ทำให้หูชั้นนอก และหูชั้นกลางอักเสบ โดยมักเกิดร่วมกับการติดเชื้อในลำคอ แล้วลามเข้าหูชั้นกลาง อาจลามไปถึงโพรงกระดูกหลังหูได้ ในบางรายอาจลุกลามไปยังสมอง, เยื่อหุ้มสมองเป็นอันตรายร้ายแรง

4. **ปอดบวม** (Staphylococcal pneumonia) โดยทั่วไปมักติดเชื้อนี้ภายหลังจากเป็นโรคอื่นๆ มาก่อน เช่น ผู้ป่วยหลังผ่าตัด ได้รับยาปฏิชีวนะติดต่อกันเป็นเวลานานๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งภายหลังจากการป่วยเป็นไข้หวัดใหญ่ อาการที่พบ มีไข้ หนาวสั่น เจ็บหน้าอก ลักษณะการอักเสบ อาจเป็นแบบปอดอักเสบรอบหลอดลม หรือปอดอักเสบเฉพาะกลีบ (lobar pneumonia) อาจมีอาการแทรกซ้อน เชื้อลุกลามเข้ากระแสเลือดได้ อัตราการตายของโรคปอดบวมจากเชื้อนี้สูงถึงร้อยละ 50 แม้ว่าจะได้รับยาปฏิชีวนะโดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเชื้อลุกลามเข้ากระแสเลือดแล้ว

5. **เยื่อบุหัวใจอักเสบ** (Endocarditis) ที่เกิดจากเชื้อ *S. aureus* มักมีปัญหายุ่งยากซับซ้อน หากมีการติดเชื้อที่ลิ้นหัวใจเทียม (prosthetic heart valves) ก็ควรจะต้องผ่าตัดเอาส่วนที่ติดเชื้อออกไป สาเหตุอาจเกิดเนื่องจากการลุกลามของเชื้อจากบริเวณอื่น แต่ประมาณ 50% เป็นการติดเชื้อในโรงพยาบาล พบในผู้ป่วยเบาหวาน, cardiovascular disease, granulocyte disorders, ภูมิคุ้มกันบกพร่อง และการคาสายยางหรือเครื่องมือในร่างกาย หรือในผู้ป่วยติดยาเสพติด อาการมักเป็นไข้ หนาวสั่น อาจมี endocarditis เนื่องจากลิ้นหัวใจถูกทำลาย อัตราตาย 40-80%

6. **อาหารเป็นพิษ** (Staphylococcal food poisoning) เกิดเนื่องจาก *S. aureus* ที่สร้าง enterotoxin ซึ่ง toxin นี้ไม่มีสี ไม่มีรสและกลิ่น ทนร้อนได้ถึงแม้จะต้ม หากรับประทานอาหารที่มีสารพิษนี้ปนเปื้อนเข้าไป จะทำให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษ ภายหลังการบริโภคประมาณ 1-6 ชั่วโมง โดยมีอาการท้องร่วงรุนแรง คลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง แต่ไม่มีไข้ อาการจะหายในประมาณ 1 วัน

7. **ลำไส้อักเสบ** (Staphylococcal enteritis) ตามปกติพบเชื้อ *S. aureus* ในลำไส้ได้ไม่มากนัก แต่เชื้อสามารถเพิ่มจำนวนขึ้น หากสมดุลของเชื้อเสียไปเนื่องจากการกินยาปฏิชีวนะประเภท broad spectrum antibiotic นาน ๆ ทำให้เชื้อประจำถิ่นถูกทำลาย เช่น ในผู้ป่วยที่จะผ่าตัดช่องท้องแล้วได้รับยาฆ่าเชื้อก่อนการผ่าตัด ทำให้เกิดการระคายเคือง ทางเดินอาหารอักเสบ ผู้ป่วยจากโรคนี้จะมีอาการท้องเดินเฉียบพลัน อาเจียน มีไข้สูง สูญเสียน้ำและเกลือแร่ ในกรณีที่

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

เชื้อสามารถแบ่งตัวได้รวดเร็วจะอยู่กันเป็นกลุ่มใหญ่ ทำให้เกิด pseudomembranous enterocolitis คล้ายกับเชื้อ *Clostridium difficile* ทำให้ช็อคถึงแก่ชีวิตได้

8. **ไขกระดูกอักเสบ** (Osteomyelitis) มักเป็นกับเด็กชายอายุต่ำกว่า 12 ขวบ เนื่องจากความซุกซนจนได้รับบาดเจ็บ ทำให้เกิดแผลหรือฝี แล้วมีการอักเสบลุกลามไปถึงเยื่อหุ้มกระดูก ผู้ป่วยจะมีอาการไข้ หนาวสั่น เจ็บกระดูก และกล้ามเนื้อหดตัวบริเวณที่อักเสบ ถ้าเกิดใกล้ ๆ ข้อจะทำให้เกิด polyarthritis ในผู้ใหญ่มักเป็นกับคนไข้เบาหวานหรือ peripheral vascular disease

9. **ช็อค** (Toxic shock syndrome) (TSS) มักพบในสตรีขณะที่มีประจำเดือนวันที่ 2-3 ที่ใช้ผ้าอนามัยแบบสอด (Tampon) และมีเชื้อสายพันธุ์ที่สร้าง TSS toxin-1 colonize อยู่บริเวณอวัยวะสืบพันธุ์ มีอาการแสดง คือ มีไข้สูง ท้องเดิน ความดันต่ำ มีผื่นตามผิวหนังและช็อค

Escherichia coli

เป็น Coliform แบคทีเรียที่มีความสำคัญที่สุดทั้งในแง่ของการก่อโรค และสัญลักษณ์แห่งความสกปรกที่ปนเปื้อนด้วยอุจจาระ เนื่องจากเป็นสมาชิกของ Family Enterobacteriaceae ที่พบในลำไส้ของคนทุกคน และจำนวนมากที่สุด ความสำคัญของ *E. coli* ในการก่อโรคปัจจุบันพบเป็นสาเหตุบ่อยที่สุดที่ทำให้เกิดทางเดินปัสสาวะอักเสบ และ traveller's diarrhea นอกจากนั้นยังทำให้เกิดการติดเชื้อในกระแสโลหิต การอักเสบอวัยวะภายในต่างๆ ท้องเดินในเด็ก ผู้ใหญ่ได้บ่อยๆ ปกติจะอาศัยอยู่ในลำไส้ของของคนและสัตว์เลือดอุ่น พบเป็นจำนวนมากในการตรวจอุจจาระ ไม่ทำให้เกิดโรค แต่ฉวยโอกาสได้ในกรณีที่ภูมิคุ้มกันบกพร่อง ดังนั้นจึงเป็นปัญหาที่สำคัญในการติดเชื้อที่โรงพยาบาล *E. coli* บางสายพันธุ์ทำให้เกิดโรคได้ในภาวะปกติ ซึ่งแบ่งเป็น 3 ชนิดใหญ่ ๆ คือ การติดเชื้อที่ทางเดินปัสสาวะ เยื่อหุ้มสมองอักเสบในทารก และท้องร่วง นอกเหนือจากการก่อโรค *E. coli* ยังมีความสำคัญในการตรวจเชื้อเพื่อควบคุมคุณภาพ เพราะเป็นตัวบ่งชี้ (indicator) ว่าอาจมีสิ่งปฏิกูลติดมากับผลิตภัณฑ์หรือไม่ *E. coli* เป็นแม่แบบที่สำคัญในการศึกษาค้นคว้าทางวิทยาศาสตร์มากมาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งทางชีวเคมีและทางพันธุวิศวกรรมศาสตร์

รูปร่างและคุณสมบัติ

เป็นแกรมลบ รูปแท่งตรง หัวท้ายมน ขนาดประมาณ 0.5-1 × 1-4 ไมครอน มักอยู่เดี่ยวหรือคู่ เจริญดีในอาหาร differential ทั่วไป เช่น MacConkey หรือ Eosin methylene blue (EMB) agar และให้ metallic sheen บน EMB agar ใช้น้ำตาลแล้วให้กรดและก๊าซ ใช้น้ำตาลแลคโตส

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

เจริญที่อุณหภูมิ 37° ซ. pH 7.0 และละลายในน้ำได้ง่าย โคโลนีมีขนาดประมาณ 1-3 มิลลิเมตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสมจะแบ่งตัวทุก 20 นาที

คุณสมบัติที่เด่นคือ การเฟอร์เมนท์แลคโตสเร็ว เฟอร์เมนท์กลูโคส ให้กรดและก๊าซ และปฏิกิริยา IMVIC ได้ผล ++- - บน Eosin methylene blue agar จะให้โคโลนีสีเข้มแดงดำ และมี Metallic sheen

การทำให้เกิดโรค

เชื้อ *E. coli* มักพบทำให้เกิดโรคท้องร่วง, โรคติดเชื้อที่ทางเดินปัสสาวะ (UTI) และโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบในทารก นอกจากนี้ยังพบทำให้เกิดโรคอื่น ๆ ได้อีก เช่น Pyelonephritis, cystitis (พบได้บ่อยที่สุด), ช่องท้องอักเสบ, ไส้ติ่งอักเสบ, โลหิตเป็นพิษ, ปอดบวม และหนองฝีในที่ต่างๆ

1. ท้องร่วง

ระยะฟักตัว จะประมาณ 1-2 วัน และระยะท้องเดิน 3-4 วัน โดยทั่วไปอาการไม่รุนแรง แต่พวกที่เป็นมากจะปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน มีไข้ หนาวสั่น และปวดตามข้อได้ เชื้อจะอยู่ในอุจจาระ ประมาณ 5 วัน

2. การติดเชื้อที่ทางเดินปัสสาวะ (UTI)

E. coli ในลำไส้ ในอุจจาระ สามารถเคลื่อนที่ไปยังบริเวณทางเดินปัสสาวะขึ้นไปกระเพาะปัสสาวะ หรือไตได้ จากนั้นแบ่งตัวมากมาย ทำให้เกิดภาวะพบแบคทีเรียในปัสสาวะ (bacteriuria) เป็นจำนวนมากกว่าปกติ (ไม่น้อยกว่า 10^5 ตัว/มิลลิลิตร) การติดเชื้อที่ทางเดินปัสสาวะจะทำให้มีอาการปวดแสบบริเวณถ่ายปัสสาวะ

3. เยื่อหุ้มสมองอักเสบในทารก

อาการ neonatal meningitis มักเกิดกับทารกแรกเกิด โดยติดเชื้อจากมารดาผ่านเข้าทางเดินหายใจ หรือทางเดินอาหาร จากนั้นเชื้อจะผ่านผนังลำไส้เข้าสู่กระแสโลหิตไปยังเยื่อหุ้มสมองในที่สุด

4. การติดเชื้อในโรงพยาบาล

การติดเชื้อในโรงพยาบาลเนื่องจาก *E. coli* จะพบได้บ่อยในคนไข้ที่มีร่างกายอ่อนแอในโรงพยาบาล โดยมีที่มาจากการติดเชื้อในส่วนอื่น เช่น urogenital tract, ทางเดินอาหาร, ทางเดินหายใจ, ผิวหนัง และการชักนำโดยการใช้เครื่องมือสอดใส่เข้าในร่างกาย นอกจากนี้ยังพบเป็นสาเหตุของโรคนิวมอเนีย (pneumonia) ได้ โดยที่มักจะติดเชื้อในโรงพยาบาล ปอดเกิดอักเสบเป็น

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

bronchopneumonia ที่ lobe ส่วนล่างเป็นหนองและเชื้อเข้ากระแสโลหิต สาเหตุอาจเนื่องมาจากการติดเชื้อที่ไต และทางเดินอาหารมาก่อน จะทำให้ตายได้ง่ายประมาณร้อยละ 50

Salmonella typhi

Salmonella เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ชนิด enteric ที่ไม่ ferment lactose มีความสำคัญทางการแพทย์ในการทำให้เกิดโรคท้องร่วง *Salmonella* ประกอบไปด้วย serotypes ต่าง ๆ มากมาย พบทั่วไปในคนและสัตว์ การแพร่ของ *Salmonella* จากสัตว์มาสู่คนเป็นไปได้ง่าย โดยการทานอาหารที่ไม่สุกดีนัก กลุ่มที่ทำให้เกิดโรคในคนคือ *S. typhi* และ *S. paratyphi* ส่วน *S. typhimurium* พบในสัตว์หลายชนิด ติดต่อมายังคน เป็นสาเหตุของท้องร่วงที่พบได้บ่อยที่สุด

รูปร่างและคุณสมบัติ

เป็นเชื้อแกรมลบรูปแท่งตรง ขนาดประมาณ 0.7-1.5 x 2.0 - 5.0 ไมครอน ปกติเชื้อในกลุ่มนี้จะเคลื่อนที่ได้ เจริญได้ทั้งที่มีและไม่มีออกซิเจน ขนาดโคโลนีประมาณ 2-4 มิลลิเมตร ใช้น้ำตาลได้กรดและก๊าซ สร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์เมื่อเลี้ยงใน TSI ไม่สร้าง indole จาก tryptophan ใช้ citrate เป็นแหล่งคาร์บอน

การทำให้เกิดโรค

Salmonella มี virulence factors ที่ช่วยในการทำให้เกิดโรค คือ แอนติเจนที่ผิวเซลล์ที่ช่วยให้เชื้อเกาะเซลล์ได้ดี, มีความสามารถในการรุกล้ำเนื้อเยื่อผ่านเยื่อบุลำไส้เข้าไปภายใน, มี endotoxin ที่ทำให้เกิดไข้, มี enterotoxin ที่มีผลต่อเซลล์ของลำไส้ ทำให้เกิดอาการท้องร่วงรุนแรง และเชื้อมีความสามารถในการอาศัยอยู่ภายในเซลล์แบบ intracellular parasite ทำให้เชื้อรอดพ้นจากการถูกทำลาย และเป็นปัญหาทำให้โรคไม่หายขาด *S. typhi* พบเฉพาะในคน ทำให้เกิดโรคไข้รากสาดน้อย หรือไข้ไทฟอยด์ (Enteric fever, typhoid fever)

เกิดจากการปนเปื้อน น้ำ, อาหาร โดยเข้าทางปาก จำนวนที่เกิดโรคในคนแข็งแรงปกติประมาณ 10^5-10^6 ตัว เชื้อจะถูกทำลายในกระเพาะเกือบครึ่งหนึ่ง ที่เหลือรอดไปถึงลำไส้เข้าสู่ท่อน้ำเหลืองและเข้ากระแสโลหิตระยะหนึ่ง หลังจากได้รับเชื้อ 24-72 ชั่วโมง ก็เกิด bacteremia เชื้อเข้าสู่กระแสโลหิตไปตามเนื้อเยื่อและอวัยวะต่าง ๆ ได้ เช่น ตับ, ม้าม, ปอด, ถุงน้ำดี ทำให้เกิดการติดเชื้อในส่วนต่าง ๆ และมีการอักเสบได้ ต่อจากนั้นเชื้อจะกลับเข้าเจริญแบ่งตัวในลำไส้ในบริเวณ lymphoid tissue แล้วเข้ากระแสเลือดเกิด bacteremia อย่างต่อเนื่อง ที่ถุงน้ำดีเชื้อก็จะ

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

เจริญได้ดี เพราะน้ำดีเป็นตัวทำให้เชื้อเจริญได้ดี ในคนที่เป็นพาหะเรื้อรัง จะมีเชื้อปล่อยมาทางน้ำดีออกมาทางอุจจาระได้ตลอดเวลา การเกิดไข้เกิดจากเมื่อเชื้อเข้าสู่กระแสโลหิตและมีเชื้อส่วนหนึ่งตายไป จะให้ endotoxin ไปกระตุ้นเม็ดเลือดขาวทำให้เกิดอาการไข้ การอักเสบมีแผลภายในเกิด hyperplasia และเนื้อตายของพวกเนื้อเยื่อน้ำเหลืองในลำไส้, ตับ ที่ลำไส้ แผลอาจลึกเข้าไปทำให้เลือดออก หรือลำไส้ทะลุได้

ระยะฟักตัว 7-14 วัน มีปวดศีรษะ เบื่ออาหาร อ่อนเพลีย ปวดเมื่อยตัว มีไข้ หนาวสั่น และมีอาการทางเดินอาหารร่วมด้วย คือ ท้องผูก หรือท้องเดิน ปวดท้อง ตับ ม้ามโต คลื่นไส้ อาเจียน อาการทางเดินหายใจมีไอ บางคนมีเจ็บคอ ลักษณะไข้ ไข้จะค่อย ๆ ขึ้น 5-7 วัน แล้วลอยตัว มีขึ้นลงบ้างอยู่ราว 2-3 สัปดาห์ ไข้สูงถึง 39 -40° ซ. ซึม มึนศีรษะ ชีพจรช้า และเกิด Rose spot จุดแดงที่หน้าอก และท้องส่วนบนเป็นเม็ดเล็ก ๆ ขนาด 2-4 มิลลิเมตร ถ้ากดจุดจะหายไป จุดแดงจะเกิดในระหว่างสัปดาห์ที่สอง

ในคนไข้ที่อาการทรุดหนัก จะพบแผลที่ Payers's patch มาก ลำไส้มีเลือดออกและทะลุได้ พวกนี้จะมีอาการปวดท้องมาก และพบเลือดในอุจจาระ ภาวะแทรกซ้อน มีตกเลือด ลำไส้ทะลุ (พบได้บ่อยที่สุด), ช็อค, acute cholecystitis, toxic psychosis, ข้ออักเสบ, โลหิตจางและตัวเหลืองได้

Bacillus subtilis

Bacillus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน ขนาดค่อนข้างใหญ่ ต่อกันเป็นสาย เป็น aerobe หรือ facultative anaerobe สร้างสปอร์ที่ทนความร้อนภายในเซลล์ (endospore) พบเชื้อนี้ได้ทั่วไปตามธรรมชาติ จึงเป็นตัวปนเปื้อนตามวัตถุดิบต่าง ๆ หรือ อาหาร ถึงแม้ว่าเชื้อ *B. subtilis* จะสามารถดำรงชีวิตเป็นอิสระในธรรมชาติได้ก็ตาม แต่พบว่าเป็นสาเหตุการติดเชื้อได้ โดยเป็นการติดเชื้อซ้ำซ้อนในผู้ป่วยโรคอื่น หรือผู้ที่อ่อนแอ ทำให้เกิดโรคได้ทั่วไปในระบบต่างๆ หรือเป็นสาเหตุของ bacterimia

รูปร่างและคุณสมบัติ

แบคทีเรียเป็นแท่งสี่เหลี่ยม ขนาดใหญ่ประมาณ 3-5 x 1-1.2 ไมโครเมตร เคลื่อนไหวได้ สร้างสปอร์ได้ ในสิ่งส่งตรวจมักพบอยู่เดี่ยว หรือเป็นคู่ เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อปกติที่สภาพแวดล้อมต่างๆ กัน โคโลนีมีสีขาว เทา ทึบแสง ขนาดใหญ่ ขอบโคโลนีจะเป็นชั้นๆ และมีลักษณะเหนียว ผิวไม่เรียบ ไม่มีการทำลายเม็ดเลือดบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมเลือด สปอร์ของเชื้อนี้ทน

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

ต่อสิ่งแวดล้อมภายนอกได้เป็นปี ทนความร้อน ถูกทำลายได้ที่การต้ม 10 นาที หรือใช้ความร้อนแห้ง 140°C เวลา 3 ชั่วโมง สารเคมีที่ใช้ควรเป็นพวก oxidizing เช่น ด่างทับทิม, ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์, ฟอร์มาลดีไฮด์ เป็นต้น

Sarcina lutea

Sarcina เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.8-3 µm ไม่เคลื่อนที่ มักอยู่เป็นเซลล์เดี่ยว หรือเรียงตัวจับกันเป็นกลุ่มไม่เกิน 8 เซลล์ เป็น chemoorganotrophic anerobes มีเมตาบอลิสมแบบ fermentative metabolism ไม่สร้าง enzyme catalase และไม่สร้าง pigment Sarcina พบทั่วไปในธรรมชาติ ในดิน และอาจปนเปื้อนในอาหารที่มีดินปนเปื้อนได้ เมื่อรับประทานอาหารที่มีเชื้อ Sarcina ปนเปื้อน อาจทำให้เกิดอาการผิดปกติในทางเดินอาหารได้ เช่น pyloric ulceration, stenosis เป็นต้น

S. lutea มีความไวต่อยาต้านจุลชีพสูงมาก จึงนำมาใช้ประโยชน์ในการตรวจสอบยาต้านจุลชีพที่ตกค้างในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ และใช้เพื่อการวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะ ampicillin เป็นต้น

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย ประกอบด้วย

Circulating water bath (FALC, 4251, Italy)

Shaking water bath (Polyscience, Dual action shaker, USA)

Water bath (Heto, AT - OB - 40, Holland)

Autoclave (Kokusan Enshinki, H-88L , Japan)

Deep freezer -20°C (Sunyo, MDFU 331, Japan)

Deep freezer -80°C (Forma, 8525, USA)

Compound microscope (Nikon, Alphaphot 2, Japan)

Laminar air flow (Holten, HBB 2460, Denmark)

Hot air oven (Heraeus, T 6200, Germany)

UV Spectrophotometer (Spectronic, Genesys 2, USA)

Incubator (Heraeus, B 6760, Germany)

Analytical balance (Mettler, Mod. AT 200, Switzerland)

Top-load balance (Mettler, Mod. PM 4000, Switzerland)

Centrifuge (ALC, 4236, Italy)

Vortex-mixer (Thermolyne, Type 37600 mixer, USA)

Magnetic stirrer (Thermolyne, mod. SP47230-26 mirak, USA)

Viable count (Stuart, mod. Sc 5, England)

pH meter (Mettler, Delta 340, Switzerland)

Pipette-aids (Socorex, Mod. 822, Switzerland)

นอกจากนี้ อุปกรณ์ที่ใช้อื่นๆ เป็นอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์ทั่วไป ได้แก่

Beakers, Pipettes, Flasks, Petri dishes, Test-tubes, Paper disc, Bunsen lamps,

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

Sterring rods, Forceps, Droppers, Cotton swaps, Inoculating loops, Whatman's filter papers (diameter 45 microns), Slides and cover slips เป็นต้น

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย ประกอบด้วย

Crystal violet (Carlo Erba, France)

Ammonium oxalate (J.T.Baker, USA)

Iodine (Fluka Biochemika, Switzerland)

Potassium iodide (Merck KGaA, Germany)

Safranin solution (Merck KGaA, Germany)

Malachite green solution (Fluka Biochemika, Switzerland)

3% Hydrogen peroxide solution (Carlo Erba, France)

Catalase enzyme (Fluka Biochemika, Switzerland)

Pepsin from hog stomach (Fluka Biochemika, Switzerland)

Buffer solution (BDH , England)

2 N Sodium hydroxide (NaOH) (Merck KGaA, Germany)

0.1N Hydrochloric acid (HCl) (Merck KGaA, Germany)

MRS broth (de Man Rogosa and Sharpe)(Merck KGaA, Germany)

MRS agar (de Man Rogosa and Sharpe) (Merck KGaA, Germany)

Nutrient broth (NB) (Merck KGaA , Germany)

Nutrient agar (NA) (Merck KGaA , Germany)

สารเคมีอื่น ๆ นอกเหนือจากนี้ เป็นสารเคมีที่ใช้ทั่วไปในห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์ทั่วไป

เชื้อแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการวิจัย ประกอบด้วย

- *Lactobacillus spp.* ที่แยกได้จากอาหาร
- เชื้อแบคทีเรียทดสอบ :

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

Staphylococcus aureus ATCC 25923

Escherichia coli ATCC 25922

Salmonella typhi ATCC 13311

Bacillus subtilis ATCC 6633

Sarcina lutea ATCC 9341

เชื้อแบคทีเรียทดสอบเหล่านี้ ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการเภสัชจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี และทำการเพาะเลี้ยงเชื้อรุ่นต่อ ๆ ไป (subculture) ทุก ๆ 2 สัปดาห์ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ คือ nutrient agar

วิธีทดลอง

ตอนที่ 1 การคัดเลือกเชื้อ *Lactobacillus* spp. ที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินจากอาหาร และการสกัดสารแบคเทอริโอซิน

การแยกเชื้อ *Lactobacillus* spp. จากอาหาร

นำตัวอย่างอาหารหมักดอง และผลิตภัณฑ์นมหลายชนิดที่หาได้ในเขตอำเภอวารินชำราบ และเขตอำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี มาบ่มเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ซึ่งเป็น selective media สำหรับเชื้อ *Lactobacillus* spp. ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะคาร์บอนไดออกไซด์ แยกโคโลนีเดี่ยวของเชื้อที่เจริญ แล้วทำการถ่ายเชื้อหลายครั้งจนได้เชื้อที่บริสุทธิ์

การตรวจพิสูจน์เชื้อ *Lactobacillus* spp.

ใช้โคโลนีของเชื้อที่บ่มเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และคุณสมบัติชีวเคมี ดังนี้

1. *การย้อมสีแกรม (Gram's stain)*

ย้อมเชื้อด้วยสีแกรม ส่องดูการติดสีและรูปร่างของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ คัดเลือกเฉพาะเชื้อแกรมบวก รูปแท่ง

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

2. *การย้อมสี endospore*

ย้อมเชื้อด้วยสีเอ็นโดสปอร์ ส่องดูการติดสีของสปอร์และเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ ถ้าเชื้อมีการสร้างสปอร์ สปอร์จะติดสีเขียว และเซลล์แบคทีเรียจะติดสีแดง คัดเลือกเฉพาะเชื้อที่ไม่สร้างสปอร์

3. *การสร้างเอนไซม์คะตะเลส (Catalase enzyme)*

กระจายโคโลนีของเชื้อลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด และหยดสารละลาย 3 % ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงบนเชื้อ ถ้ามีฟองก๊าซเกิดขึ้น แสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้ ถ้าไม่มีฟองก๊าซเกิดขึ้น แสดงว่าเชื้อไม่สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้ ใช้เชื้อ *Bacillus subtilis* เป็นตัวเปรียบเทียบในการให้ผลบวก คัดเลือกเฉพาะเชื้อที่ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส

เมื่อตรวจพิสูจน์เชื้อว่าเป็น *Lactobacillus* spp. แล้วให้ติดฉลากหมายเลข นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus* spp.

1. นำเชื้อ *Lactobacillus* spp. ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาบ่มเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2. ถ่ายเชื้อจากอาหารเลี้ยง MRS broth ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3. ถ่ายเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ใหม่ บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการถ่ายเชื้อหลาย ๆ ครั้งจนได้โคโลนีของเชื้อที่สมบูรณ์ จึงเพาะเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS slant บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อใช้ในขั้นตอนการสกัดสารแบคเทอริโอซินต่อไป

การสกัดสารแบคเทอริโอซิน

1. นำเชื้อ *Lactobacillus* spp. ที่คัดเลือกได้ มาบ่มเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2. ปั่นเหวี่ยงอาหารเลี้ยงเชื้อในข้อ 1 เพื่อแยกเซลล์ออก ด้วยความเร็ว 4000 รอบ / นาที เป็นเวลา 25 นาที

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

3. ดูดเอาเฉพาะส่วนใสด้านบน (supernatant) ปรับความเป็นกรดด่าง (pH) ให้เป็นกลาง (pH 6.8 - 7.0) ด้วย 2 N NaOH และ 0.1 N HCl นำไปกรองผ่านกระดาษกรอง ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

4. เติมเอนไซม์ catalase 0.5 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร เพื่อกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

ตอนที่ 2 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทดสอบของสารแบคเทอริโอซิน

การเตรียมเชื้อทดสอบ

เชื้อทดสอบ คือ *Escherichea coli, Staphylococcus aureus, Sarcina lutea, Bacillus subtilis* และ *Salmonella typhi*

1. ถ่ายเชื้อดังกล่าวลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. เขย่าอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่อง Vortex mixer แล้วปรับความขุ่นให้เท่ากับ 65 % Transmittance ที่ ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร

หมายเหตุ จำนวนเชื้อทดสอบที่ใช้คือ

E.coli	1.47×10^{10} เซลล์/มิลลิลิตร
S.aureus	1.67×10^{12} เซลล์/มิลลิลิตร
S.lutea	1.33×10^{8} เซลล์/มิลลิลิตร
S.typhi	1.44×10^{11} เซลล์/มิลลิลิตร
B.subtilis	1.42×10^{7} เซลล์/มิลลิลิตร

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทดสอบของสารแบคเทอริโอซิน โดยวิธี Agar diffusion

1. ใช้ sterile cotton swab จุ่มลงในอาหารเหลวของเชื้อทดสอบ ที่ผ่านการปรับความขุ่น เพื่อกำหนดจำนวนเซลล์ของเชื้อแล้ว นำมาป้ายบนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agarให้ทั่วผิวหน้า

2. จุ่ม paper disc ลงในสารสกัดของสารแบคเทอริโอซิน โดยใช้ sterile forcep หลังจากนั้นคีบมาวางบน petri dish เพื่อทิ้งไว้ให้หมาด

3. วาง paper disc บนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อในข้อ1 นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตผลโดยการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของ Inhibition zone ที่เกิดขึ้น บันทึกผล

ให้คัดเลือกเชื้อ *Lactobacillus* spp.ที่สารสกัดแบคเทอริโอซินมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทดสอบได้ดี ไปทดสอบคุณสมบัติต่าง ๆ ในตอนที่ 3 ต่อไป

ตอนที่ 3 การศึกษาคุณสมบัติบางประการของสารแบคเทอริโอซิน

สารแบคเทอริโอซินที่ถูกสร้างขึ้นโดยเชื้อ *Lactobacillus* spp. ที่ให้ผลการทดสอบในตอนที่ 2 ว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทดสอบได้ดี จะถูกนำไปศึกษาคุณสมบัติบางประการ เช่น ความทนต่อความร้อน และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเชื้อ *Lactobacillus* spp. ในการสร้างสารแบคเทอริโอซิน

การศึกษาระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการสร้างสารแบคเทอริโอซิน

1. บ่มเพาะเชื้อ *Lactobacillus* spp. ที่สารสกัดแบคเทอริโอซินมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทดสอบได้ดี ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะคาร์บอนไดออกไซด์ ที่ระยะเวลา 24 , 36 , 48 และ 72 ชั่วโมง

2. นำเชื้อ *Lactobacillus* spp. ผ่านการบ่มเพาะที่เวลาต่างๆ กันนี้ นำไปสกัดสารแบคเทอริโอซิน ด้วยวิธีการสกัดในตอนที่ 1

3. นำสารสกัดแบคเทอริโอซิน ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทดสอบด้วยวิธี agar diffusion ดังวิธีการทดสอบในตอนที่ 2 บันทึกผลเพื่อเปรียบเทียบ

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

การศึกษาคุณสมบัติความทนต่อความร้อนของสารแบคเทอริโอซิน

1. นำสารสกัดแบคเทอริโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus* spp. ที่พบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทดสอบได้ดี มาให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นระยะเวลาต่าง ๆ กัน ดังนี้

25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที, 60 นาที และ 90 นาที

37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที, 60 นาที และ 90 นาที

60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที, 30 นาที และ 45 นาที

2. นำสารสกัดแบคเทอริโอซินในข้อ 1 ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทดสอบด้วยวิธี agar diffusion ดังวิธีการทดสอบในตอนที่ 2 บันทึกผลเพื่อเปรียบเทียบ

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

บทที่ 4
ผลการทดลอง

ตอนที่ 1 การคัดเลือกเชื้อ *Lactobacillus* spp. ที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินจากอาหาร และการสกัดสารแบคเทอริโอซิน

การแยกเชื้อ *Lactobacillus* spp. จากอาหาร

เมื่อนำอาหารหมักดอง และผลิตภัณฑ์นมหลายชนิดในเขตอำเภอวารินชำราบ และเขตอำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี อาทิเช่น แหนม, หมูยอ, น้ำผักกาดดอง, น้ำหน่อไม้ดอง, ปลาส้ม, ไส้กรอกอีสาน, นมสด, นมเปรี้ยว, โยเกิร์ต, สัปปะรด, ส้ม, ชมพู่ และขนมจีน รวมทั้งสิ้น 48 ตัวอย่าง มาเพาะเชื้อบน MRS agar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วแยกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียให้บริสุทธิ์ ได้เชื้อแบคทีเรียเป็นจำนวนทั้งสิ้น 73 หมายเลข

การตรวจพิสูจน์เชื้อ *Lactobacillus* spp.

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 73 หมายเลข มาทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นเพื่อตรวจพิสูจน์เชื้อ ซึ่งคุณสมบัติของเชื้อ *Lactobacillus* spp. ต้องเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก รูปแท่ง ไม่สร้างสปอร์ และไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส พบว่าสามารถคัดเลือกเชื้อที่มีคุณสมบัติครบทั้ง 4 ลักษณะได้จำนวน 21 หมายเลข จากนั้นจึงนำเชื้อ *Lactobacillus* spp. ทั้ง 21 หมายเลขมาสกัดสารแบคเทอริโอซิน เพื่อทดสอบฤทธิ์ในตอนที่ 2 ต่อไป

ตอนที่ 2 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทดสอบของสารแบคเทอริโอซิน

การทดสอบความสามารถของสารแบคเทอริโอซินของเชื้อ *Lactobacillus* spp. ทั้ง 21 หมายเลข ในการยับยั้งเชื้อทดสอบ 5 ชนิด คือ *Escherichea coli*, *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea*, *Salmonella typhi* และ *Bacillus subtilis* ด้วยวิธี agar diffusion ผลการทดสอบฤทธิ์แสดงค่าเป็นความกว้างของเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใส (Clear zones or inhibition zones) ที่เกิดขึ้นจากการที่สารแบคเทอริโอซิน จำนวน 21 หมายเลข สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบชนิดต่าง ๆ ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar ดังตารางที่ 4 และรูปที่ 2

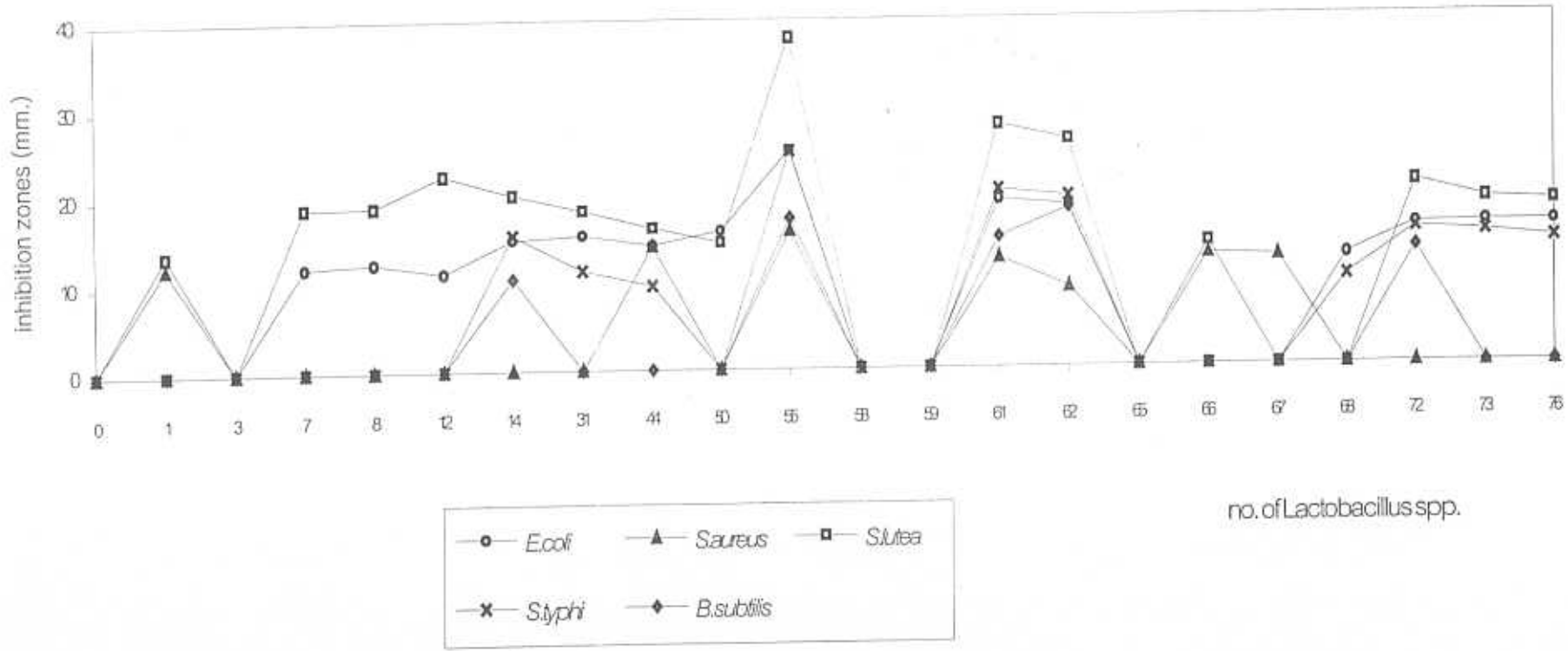
Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

ตารางที่ 4 สารแบคเทอริโอซินของเชื้อ *Lactobacillus* spp. ที่แยกได้จากอาหาร จำนวน 21 หมายเลข กับความกว้างของเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสที่เกิดขึ้นจากการยับยั้งเชื้อทดสอบชนิดต่าง ๆ ด้วยวิธี agar diffusion (มิลลิเมตร)

หมายเลขของเชื้อ *Lactobacillus* spp.	Inhibition zones (mm.)				
	E.coli	*S.aureus*	*S.lutea*	*S.typhi*	*B.subtilis*
Control	0	0	0	0	0
1	0	12.16	13.63	0	0
3	0	0	0	0	0
7	12.03	0	18.80	0	0
8	12.47	0	18.88	0	0
12	11.27	0	22.36	0	0
14	15.02	0	20.15	15.53	10.57
31	15.43	0	18.29	11.43	0
44	14.30	14.17	16.29	9.67	0
50	15.92	0	14.59	0	0
55	25.00	15.83	37.93	24.93	17.31
58	0	0	0	0	0
59	0	0	0	0	0
61	19.30	12.52	27.77	20.35	14.85
62	18.53	9.12	25.97	19.52	18.20
65	0	0	0	0	0
66	0	12.76	14.09	0	0
67	0	12.44	0	0	0
68	12.57	0	0	10.14	0
72	15.97	0	20.88	15.44	13.26
73	16.13	0	18.90	15.03	0
76	16.10	0	18.53	14.19	0

Ubon Rajathanee University



รูปที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของสารแบคเทอริโอซินที่สร้างจากเชื้อ *Lactobacillus* spp. หมายเลขต่างๆ กับความกว้างของเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใส ที่เกิดขึ้นจากการยับยั้งเชื้อทดสอบ 5 ชนิด (มิลลิเมตร)

Ubon Rajathanee University
Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

จากผลการทดลองในตารางที่ 4 และรูปที่ 2 พบว่าสารแบคเทอริโอซินที่สร้างจากเชื้อ *Lactobacillus* spp. ที่แยกได้จากอาหาร จำนวน 21 หมายเลข มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบ 5 ชนิด (*E. coli*, *S. aureus*, *S. lutea*, *S. typhi* และ *B. subtilis*) แตกต่างกัน คือ

สารแบคเทอริโอซินที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ทั้ง 5 ชนิด คือ สารแบคเทอริโอซินที่สร้างจากเชื้อ *Lactobacillus* spp. หมายเลข 55, 61 และ 62

สารแบคเทอริโอซินที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ 4 ชนิด คือ สารแบคเทอริโอซินที่สร้างจากเชื้อ *Lactobacillus* spp. หมายเลข 14, 44 และ 72

สารแบคเทอริโอซินที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ 3 ชนิด คือ สารแบคเทอริโอซินที่สร้างจากเชื้อ *Lactobacillus* spp. หมายเลข 31, 73 และ 76

สารแบคเทอริโอซินที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ 2 ชนิด คือ สารแบคเทอริโอซินที่สร้างจากเชื้อ *Lactobacillus* spp. หมายเลข 1, 7, 8, 12, 50, 66 และ 68

สารแบคเทอริโอซินที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ 1 ชนิด คือ สารแบคเทอริโอซินที่สร้างจากเชื้อ *Lactobacillus* spp. หมายเลข 67

สารแบคเทอริโอซินที่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ทั้ง 5 ชนิด คือ สารแบคเทอริโอซินที่สร้างจากเชื้อ *Lactobacillus* spp. หมายเลข 3, 58, 59 และ 65

เชื้อแบคทีเรียทดสอบ 5 ชนิด มีทั้งแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ รูปร่างต่าง ๆ กัน เป็นแบคทีเรียที่ก่อโรค และเป็นแบคทีเรียที่พบปนเปื้อนในอาหาร ซึ่งเป็นสาเหตุของการทำให้อาหารเน่าเสีย ดังนี้

S. aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม เป็น aerobic bacteria เป็นเชื้อก่อโรค ทำให้เกิดโรคในอวัยวะและเนื้อเยื่อเกือบทุกส่วนของร่างกาย โดยเฉพาะผิวหนัง

S. lutea เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม เป็น anaerobic bacteria พบทั่วไปในธรรมชาติ เป็นแบคทีเรียที่อาจปนเปื้อนในอาหารได้ *S. lutea* มีความไวต่อยาต้านจุลชีพสูงมาก จึงเป็นตัวชี้วัดคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้เป็นอย่างดี

B. subtilis เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน สร้างสปอร์ที่ทนมาก พบทั่วไปในธรรมชาติ เป็นแบคทีเรียที่อาจปนเปื้อนในอาหาร และอาจเป็นสาเหตุการติดเชื้อซ้ำซ้อนในผู้ป่วยที่อ่อนแอและผู้ป่วยที่ภูมิคุ้มกันบกพร่อง

E. coli เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน พบทั่วไปในร่างกายมนุษย์ เป็นแบคทีเรียที่พบบ่อยในการปนเปื้อนในอาหารและน้ำดื่ม นอกจากนี้ ยังก่อโรคทำให้เกิดทางเดินปัสสาวะอักเสบ ท้องเสีย และการติดเชื้อในกระแสเลือด เป็นแบคทีเรียที่ฉวยโอกาสได้ในกรณีที่ภูมิคุ้มกันบกพร่อง

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

S. typhi เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน ก่อโรคไข้รากสาดน้อย หรือไข้ไทฟอยด์ ที่ติดต่อโดยการรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อ

สารแบคเทอริโอซินที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทดสอบได้ดีที่สุด คือ สารแบคเทอริโอซินที่สร้างจากเชื้อ *Lactobacillus* spp. หมายเลข 55 ซึ่งจะนำไปศึกษาคุณสมบัติบางประการของสารแบคเทอริโอซินในการทดลองตอนที่ 3 ต่อไป

การทดลองนี้ได้ควบคุมสารอื่นที่สร้างโดยเชื้อ *Lactobacillus* spp. ที่อาจมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ ด้วยการปรับ pH และเติมเอนไซม์ catalase เพื่อกำจัดกรดอินทรีย์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ในขั้นตอนของการสกัดสารแบคเทอริโอซิน

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

ตอนที่ 3 การศึกษาคุณสมบัติบางประการของสารแบคเทอริโอซิน

เมื่อนำสารแบคเทอริโอซินที่สร้างจากเชื้อ *Lactobacillus* spp. หมายเลข 55 ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทดสอบได้ดี ไปศึกษาคุณสมบัติบางประการ เช่น ความทนต่อความร้อน และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเชื้อ *Lactobacillus* spp. ในการสร้างสารแบคเทอริโอซิน ให้ผลดังนี้

การศึกษาระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus* spp. ที่เหมาะสมต่อการสร้างสารแบคเทอริโอซิน

การศึกษาระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus* spp. ที่เหมาะสมต่อการสร้างสารแบคเทอริโอซิน โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus* sp. หมายเลข 55 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่สภาวะคาร์บอนไดออกไซด์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24, 36, 48 และ 72 ชั่วโมง แล้วจึงนำเชื้อ *Lactobacillus* spp. ที่ผ่านการเพาะบ่มที่ระยะเวลาต่าง ๆ ไปสกัดสารแบคเทอริโอซิน เพื่อนำมาทดสอบหาความสามารถของสารแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้อทดสอบ 5 ชนิด คือ *E.coli, S.aureus, S.lutea, S.typhi* และ *B.subtilis* ด้วยวิธี agar diffusion ได้ผลดังตารางที่ 5

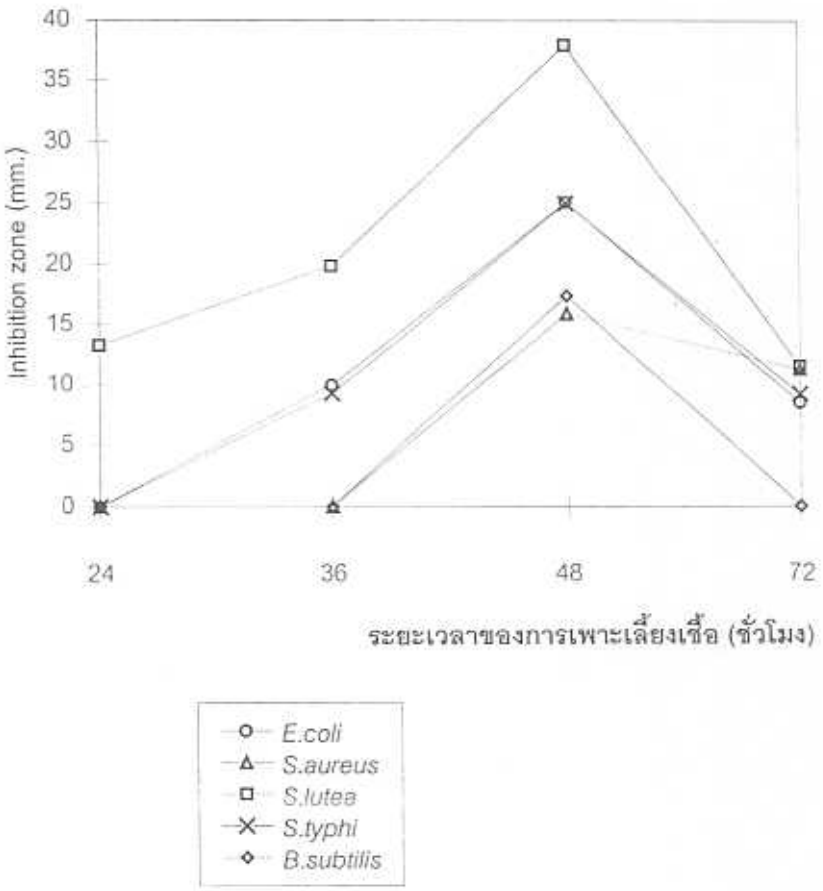
ตารางที่ 5 ระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus* spp. (ชั่วโมง) กับความกว้างของเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสที่เกิดขึ้นจากการที่สารแบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบชนิดต่าง ๆ ด้วยวิธี agar diffusion (มิลลิเมตร)

ระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อ (ชั่วโมง)	Inhibition zones (mm.)				
	E.coli	*S.aureus*	*S.lutea*	*S.typhi*	*B.subtilis*
24	0	0	13.30	0	0
36	9.96	0	19.80	9.24	0
48	25.00	15.83	37.93	24.93	17.31
72	8.46	11.25	11.50	9.18	0

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

เมื่อนำข้อมูลในตารางที่ 5 มาแสดงเป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus* spp. (ชั่วโมง) กับ ความกว้างของเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสที่เกิดขึ้นจากการที่สารแบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบต่าง ๆ (มิลลิเมตร) ดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus* spp. หมายเลข 55 (ชั่วโมง) กับ ความกว้างของเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสที่เกิดขึ้นจากการที่สารแบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ 5 ชนิด (มิลลิเมตร)

จากผลการทดลองในตารางที่ 5 และรูปที่ 3 พบว่าระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อมีผลต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบของสารแบคเทอริโอซิน คือ เมื่อเพิ่มระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อที่ 24, 36 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ พบว่าฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อทดสอบของสารแบคเทอริโอซินเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเพิ่มระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็น 72 ชั่วโมง ฤทธิ์ในการ

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

ยับยั้งเชื้อทดสอบของสารแบคเทอริโอซินกลับลดลง ดังนั้น ระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุดของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus* spp. หมายเลข 55 เพื่อให้สร้างสารแบคเทอริโอซินที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทดสอบได้มีประสิทธิภาพดีที่สุด คือ 48 ชั่วโมง ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Hoover และ Harlander (1993) ที่พบว่า ระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อ (incubation period) เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการผลิตและการออกฤทธิ์ของสารแบคเทอริโอซิน เชื้อแบคทีเรียต่างสายพันธุ์กัน จะมีระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการสร้างสารแบคเทอริโอซินต่างกัน นอกจากนี้ปริมาณการสร้างแบคเทอริโอซิน ขึ้นอยู่กับ phase of growth cycle ของเชื้อที่ผลิตด้วย อาทิเช่น แบคเทอริโอซินชนิด helveticin J, sakacin A และ helvetin V-1829 ถูกสร้างได้ดีในช่วงกลาง ถึงช่วงปลายของ logarithmic phase หลังจากช่วงนี้ไป การสร้างแบคเทอริโอซินจะลดลง ส่วนแบคเทอริโอซินชนิด lactocin 27 และ lactocin B ถูกสร้างได้ดีในช่วงต้นของ stationary phase

การบ่มเพาะเชื้อเป็นระยะเวลานานเกินไป แบคเทอริโอซินที่สร้างออกมาอาจถูกทำลายได้ด้วยเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนที่สร้างจากเชื้อที่ผลิตแบคเทอริโอซินนั้นได้ และในระยะท้ายของการเจริญเติบโตของเชื้อ สารแบคเทอริโอซินอาจจะไม่คงตัว เนื่องจากสภาพแวดล้อมเป็นกรดมากขึ้น

การศึกษาคุณสมบัติในการทนความร้อนของสารแบคเทอริโอซิน

ผลการศึกษาคุณสมบัติในการทนความร้อนของสารแบคเทอริโอซิน โดยการนำสารสกัดแบคเทอริโอซิน จาก เชื้อ *Lactobacillus* spp. หมายเลข 55 มาเพิ่มอุณหภูมิที่ 25, 37 และ 60 องศาเซลเซียส ในเวลาต่าง ๆ กัน แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทดสอบ 5 ชนิด ด้วยวิธี agar diffusion ได้ผลดังตารางที่ 6

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

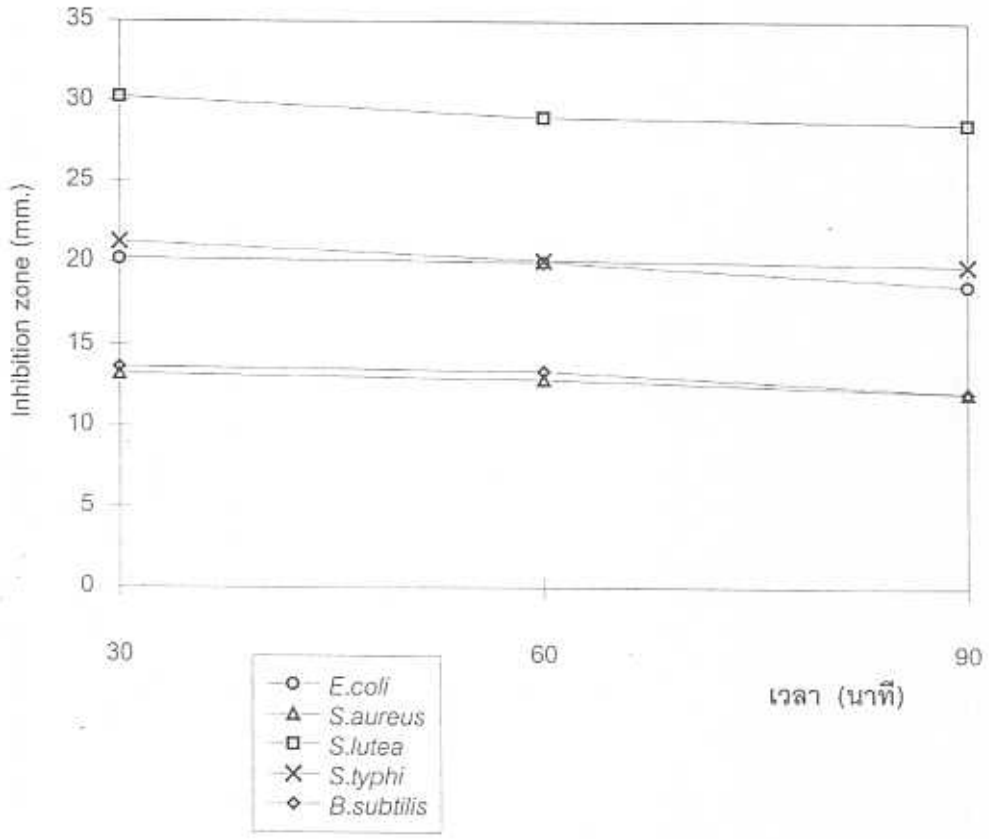
ตารางที่ 6 อุณหภูมิ และระยะเวลาต่าง ๆ ที่ให้กับสารแบคเทอริโอซิน (°C, นาที) กับความกว้างของเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสที่เกิดขึ้นจากการที่สารแบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบชนิดต่าง ๆ ด้วยวิธี agar diffusion (มิลลิเมตร)

อุณหภูมิและระยะเวลา (°C, นาที)	Inhibition zones (mm.)				
	E.coli	*S.aureus*	*S.lutea*	*S.typhi*	*B.subtilis*
25°C 30 นาที	20.20	13.22	30.26	21.24	13.64
60 นาที	20.06	12.88	29.06	20.16	13.40
90 นาที	18.72	12.06	28.74	19.92	12.08
37°C 30 นาที	19.86	13.00	30.24	19.98	13.10
60 นาที	17.07	12.62	30.20	18.86	12.26
90 นาที	15.90	11.06	29.06	16.04	11.82
60°C 15 นาที	14.68	10.70	23.18	15.16	11.10
30 นาที	12.12	9.60	14.08	12.18	10.26
45 นาที	10.10	0	11.12	9.70	0

เมื่อนำข้อมูลในตารางที่ 6 มาแสดงเป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง ระยะเวลาการให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่าง ๆ แก่สารแบคเทอริโอซิน (นาที) กับ ความกว้างของเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสที่เกิดขึ้นจากการที่สารแบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ 5 ชนิด (มิลลิเมตร) จะได้กราฟจำนวน 3 รูป ตามชนิดของอุณหภูมิที่เพิ่มให้แก่สารแบคเทอริโอซิน คือ 25, 37 และ 60°C ดังรูปที่ 4, 5 และ 6 ตามลำดับ

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

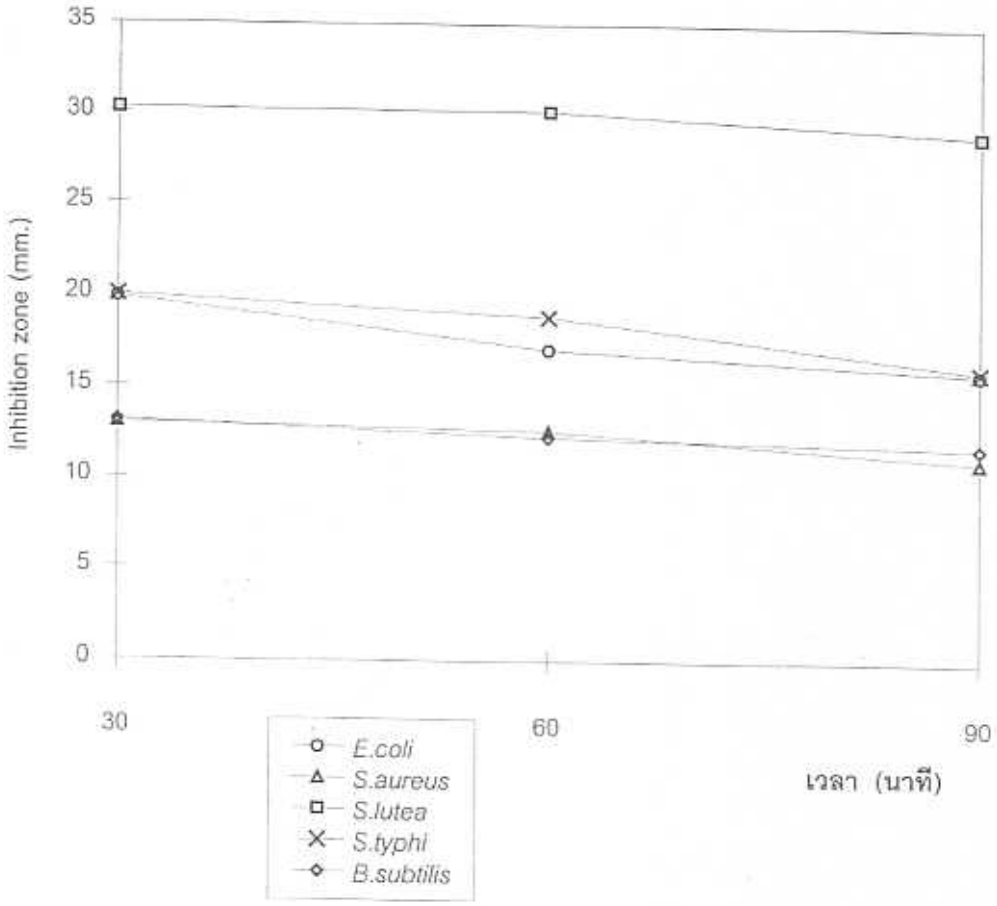


รูปที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่าง ระยะเวลาการให้ความร้อนแก่สารแบคเทอริโอซิน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (นาที) กับความกว้างของเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสที่เกิดขึ้นจากการที่สารแบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ 5 ชนิด (มิลลิเมตร)

จากผลการทดลองในรูปที่ 4 พบว่า เมื่อให้ความร้อนแก่สารแบคเทอริโอซิน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาต่าง ๆ กัน คือ 30, 60 และ 90 นาที ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อทดสอบของสารแบคเทอริโอซินลดลงเล็กน้อย

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

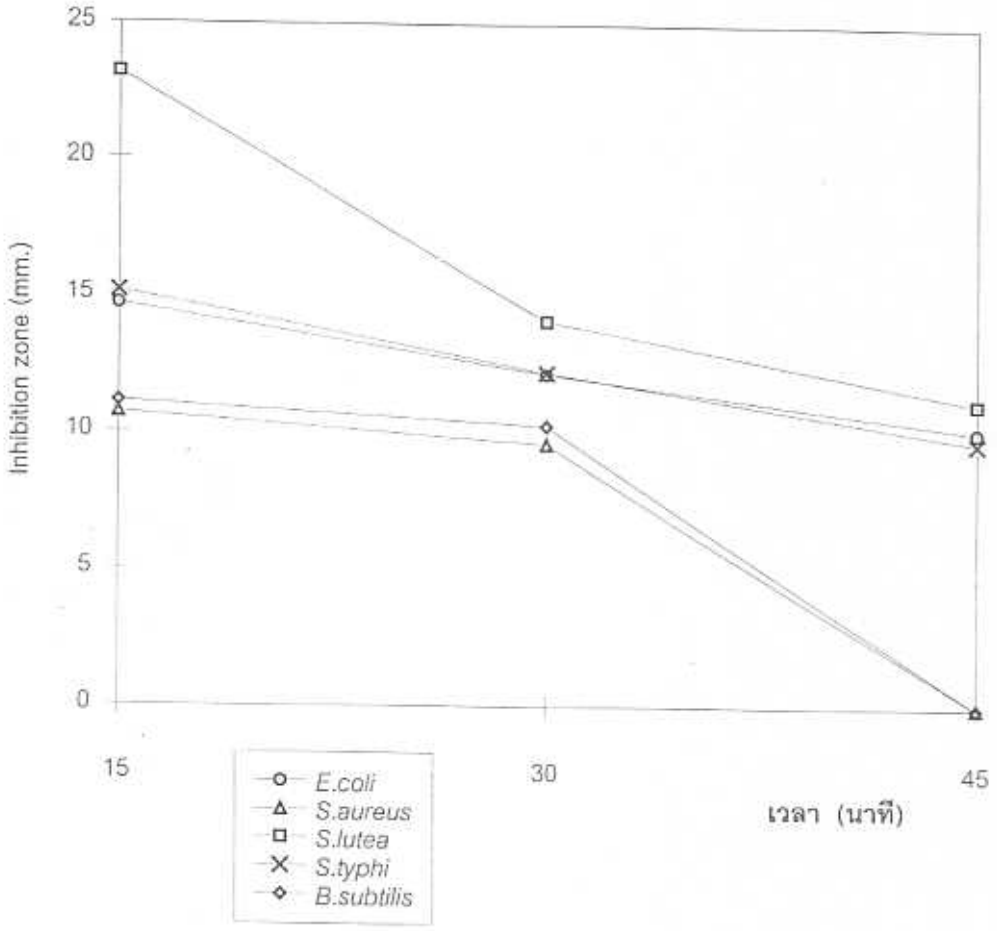


รูปที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่าง ระยะเวลาการให้ความร้อนแก่สารแบคเทอริโอซิน ที่ **อุณหภูมิ** 37 **องศาเซลเซียส** (นาที) กับความกว้างของเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสที่เกิดขึ้นจากการที่สารแบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ 5 ชนิด (มิลลิเมตร)

จากผลการทดลองในรูปที่ 5 พบว่า เมื่อให้ความร้อนแก่สารแบคเทอริโอซิน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาต่าง ๆ กัน คือ 30, 60 และ 90 นาที ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อทดสอบของสารแบคเทอริโอซินลดลงเล็กน้อยเช่นกัน

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University



รูปที่ 6 ความสัมพันธ์ระหว่าง ระยะเวลาการให้ความร้อนแก่สารแบคเทอริโอซิน ที่**อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส** (นาที) กับความกว้างของเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสที่เกิดขึ้นจากการที่สารแบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ 5 ชนิด (มิลลิเมตร)

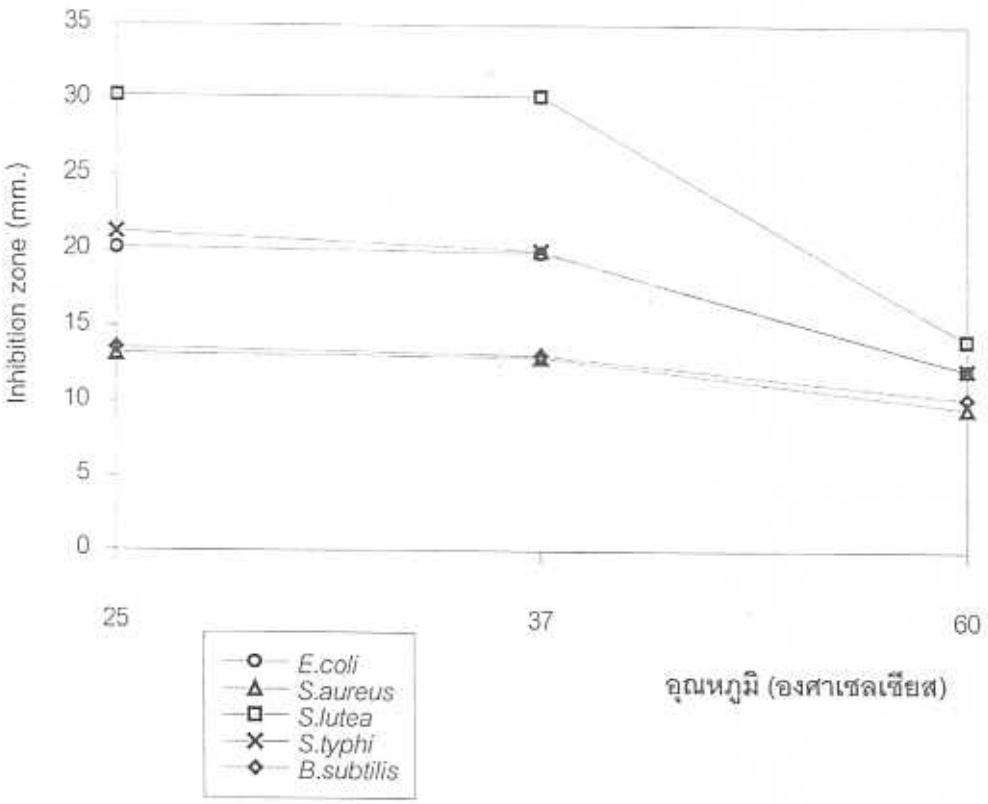
จากผลการทดลองในรูปที่ 6 พบว่า เมื่อให้ความร้อนแก่สารแบคเทอริโอซิน ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาต่าง ๆ กัน คือ 15, 30 และ 45 นาที ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อทดสอบของสารแบคเทอริโอซินลดลงมาก โดยเฉพาะที่เวลา 45 นาที สารแบคเทอริโอซินไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อทดสอบชนิด *S. aureus* และ *B. subtilis* เลย ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับคุณสมบัติของแบคเทอริโอซิน ซึ่งเป็นสารประกอบประเภทโปรตีนที่สูญเสียสภาพธรรมชาติ (denature) ที่อุณหภูมิประมาณ 60-100 องศาเซลเซียส

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

จากผลการทดลองในรูปที่ 4, 5 และ 6 สรุปได้ว่า ที่อุณหภูมิเดียวกัน การเพิ่มระยะเวลาการให้ความร้อนแก่สารแบคเทอริโอซิน จะทำให้ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อทดสอบของสารสกัดแบคเทอริโอซินลดลง

จากตารางที่ 6 เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อทดสอบของสารสกัดแบคเทอริโอซินเมื่อให้ความร้อนที่ระยะเวลาเท่ากัน คือ 30 นาที แต่อุณหภูมิต่างกัน โดยนำข้อมูลมาแสดงเป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิที่ให้แก่สารแบคเทอริโอซิน (องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 30 นาที กับความกว้างของเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสที่เกิดขึ้นจากการที่สารแบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ 5 ชนิด (มิลลิเมตร) ดังรูปที่ 7



รูปที่ 7 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิที่ให้แก่สารแบคเทอริโอซิน (องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 30 นาที กับความกว้างของเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสที่เกิดขึ้นจากการที่สารแบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ 5 ชนิด (มิลลิเมตร)

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

จากผลการทดลองในรูปที่ 7 เมื่อให้ความร้อนแก่สารสกัดแบคเทอริโอซินที่อุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 นาทีเท่ากัน พบว่าฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อทดสอบทั้ง 5 ชนิด ของสารแบคเทอริโอซินไม่เปลี่ยนแปลง แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 60 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 นาที พบว่าฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อทดสอบทั้ง 5 ชนิดของสารแบคเทอริโอซินลดลง

ผลการศึกษาคุณสมบัติในการทนความร้อนของสารสกัดแบคเทอริโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus* spp. หมายเลข 55 พบว่า สารสกัดแบคเทอริโอซินสามารถทนความร้อนได้ที่อุณหภูมิ 25-37 องศาเซลเซียส โดยการเพิ่มระยะเวลาการให้ความร้อนแก่สารสกัดแบคเทอริโอซิน จะมีผลให้ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อทดสอบของสารสกัดแบคเทอริโอซินลดลง แต่สารสกัดแบคเทอริโอซินซึ่งเป็นสารประกอบประเภทโปรตีน จะสูญเสียคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อทดสอบไปเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

การแยกเชื้อ *Lactobacillus* spp. จากอาหารหมักดองและผลิตภัณฑ์นมหลายชนิด ด้วย MRS agar ซึ่งเป็น selective media และทดสอบคุณสมบัติพื้นฐานของเชื้อ ได้เชื้อ *Lactobacillus* spp. จำนวน 21 หมายเลข เป็นที่น่าสังเกตว่า การแยกเชื้อจากอาหารหมักดองที่ผลิตขึ้นในท้องถิ่น มักไม่ใส่สารกันบูดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย จึงทำให้สามารถแยกเชื้อได้เป็นปริมาณมากกว่าอาหารหมักดองที่บรรจุกระป๋อง ส่วนวิธีการทดสอบคุณสมบัติพื้นฐานของเชื้อ *Lactobacillus* spp.ในการวิจัยนี้ เป็นเพียงการตรวจสอบเบื้องต้นเท่านั้น หากมีการวิจัยเพื่อศึกษาและพัฒนาในขั้นตอนต่อไป ควรมีการตรวจสอบเอกลักษณ์ของเชื้อ เพื่อให้ทราบถึงสายพันธุ์ที่ละเอียดยิ่งขึ้น โดยใช้วิธีทดสอบของ Bergey's manual of systemic bacteriology

การทดสอบความสามารถของสารสกัดแบคเทอริโอซินของเชื้อ *Lactobacillus* spp. ทั้ง 21 หมายเลข ในการยับยั้งเชื้อทดสอบ 5 ชนิด คือ *E. coli, S. aureus, S. lutea, S. typhi* และ *B. subtilis* ด้วยวิธี agar diffusion พบว่า สารสกัดแบคเทอริโอซินหมายเลข 55 มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทดสอบทั้ง 5 ชนิดได้ดีที่สุด เนื่องจากสารสกัดแบคเทอริโอซินที่นำมาทดสอบฤทธิ์นั้น ยังเป็น crude extract หากนำสารสกัดไปทำให้บริสุทธิ์และเข้มข้นมากขึ้น ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อทดสอบน่าจะเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม การทดสอบฤทธิ์ด้วยวิธี agar diffusion มีข้อจำกัดในด้านการแพร่ของสารสกัดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และขนาดโมเลกุลของสารแบคเทอริโอซิน ดังนั้น ควรทดสอบเพิ่มเติมด้วยวิธี broth dilution เพื่อเป็นการยืนยันผลการทดสอบ

ระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อ มีผลต่อการผลิตและการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทดสอบของสารแบคเทอริโอซิน เนื่องจากปริมาณการสร้างแบคเทอริโอซิน ขึ้นอยู่กับ phase of growth cycle ของเชื้อที่ผลิต นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียต่างสายพันธุ์กัน จะมีระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการสร้างสารแบคเทอริโอซินต่างกัน ระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุดของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus* spp. หมายเลข 55 เพื่อให้สร้างสารแบคเทอริโอซินที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทดสอบได้มีประสิทธิภาพดีที่สุด คือ 48 ชั่วโมง นอกเหนือจากระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงเชื้อแล้ว ปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่อการต่อการผลิตและการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทดสอบของสารแบคเทอริโอซิน อาทิเช่น องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ, อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงเชื้อ และความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น เป็นข้อมูลสำคัญที่ควรคำนึงถึง และควบคุมสำหรับการศึกษาและพัฒนาแบคเทอริโอซินต่อไป

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

คุณสมบัติในการทนความร้อนของสารสกัดแบคเทอริโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus* spp. หมายเลข 55 พบว่า สามารถทนความร้อนได้ที่อุณหภูมิ 25-37 องศาเซลเซียส โดยการเพิ่มระยะเวลาการให้ความร้อนแก่สารสกัดแบคเทอริโอซิน จะมีผลให้ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อทดสอบของสารสกัดแบคเทอริโอซินลดลง นอกจากนี้ สารสกัดแบคเทอริโอซินซึ่งเป็นสารประกอบประเภทโปรตีน ไม่สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยจะสูญเสียคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อทดสอบไปเมื่อเพิ่มระยะเวลาการให้ความร้อน คุณสมบัติของสารแบคเทอริโอซินเหล่านี้จะเป็นข้อมูลสำคัญสำหรับนักวิทยาศาสตร์และนักวิจัย ใช้เป็นส่วนประกอบในการตัดสินใจที่จะนำเอาแบคเทอริโอซินไปใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ และในทางอุตสาหกรรมอาหารอย่างเหมาะสมและมีประสิทธิภาพสูงสุดต่อไป

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

เอกสารอ้างอิง

Abee T. Spore-forming bacteriocins of gram-positive bacteria and self-protection mechanisms of producer organism. *FEMS Microbiol Lett.* 1995; 129: 1-8.

Ahn C, Stiles ME. Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged meats. *J. Appl. Bacteriol.*1990; 69: 302-310.

Anclair J, Accolas JP. Use of thermophilic lactic starters in the dairy industry. *Antonie van Leeuwenhoek.* 1983; 49: 313-326.

Anderson R. Inhibition of *Staphylococcus aureus* and spheroplasts of gram-negative bacteria by an antagonistic compound produced by a strain of *Lactobacillus plantarum. Int. J. Food Microbiol.* 1986; 3: 149-160.

Andrewes FW, Horder TJ. A study of the *Streptococci* pathogenic for man. *Lancet,* 1906; 2: 708-713, 775-782, 852-855.

Archibald FS, Fridovich I. Manganese, superoxide dismutase and oxygen tolerance in some lactic acid bacteria. *J. Bacteriol.* 1981; 146: 928-936.

Barefoot SF, Harmon KM, Grinsted DA, Nettles CG. Bacteriocins, molecular biology. In: *Encyclopedia of microbiology vol 1.* Academic Press Inc., 1992: 191.

Barreau C, Wagener G. Characterization of *Leuconostoc lactis* strains from human sources. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28: 1728-1733.

Benkerroum N, Ghouati Y, Sandine WE, Tantaoui-Elaraki A. Methods to demonstrate the bacteriocidal activity of bacteriocins. *Lett Appl Microbiol.* 1993; 17: 78-81.

Benoit V, Mathis R, Lefebvre G. Characterization of brevicin 27, a bacteriocin synthetized by *Lactobacillus brevis* SB27. *Cure Microbiol.* 1994; 28: 53-61.

Buckenhuskes HJ. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. *FEMS Microbiol. Rev.* 1993; 12: 253-271.

Buncic S, Avery MS, Moohead MS. Insufficient antilisterial capacity of low inoculum *Lactobacillus* culture on long-term stored meat at 4°C. *Int J of Food Microbiol.* 1997; 34: 157-170.

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

Cintas LM, Rodriguez JM, Fernandez MF. Isolation and characterization of pediocin L50, a new bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* with a broad inhibitory spectrum. *Appl Environ Microbial.* 1995; 61: 2643-8.

Collins MD, Rodrigues UM, Ash C, Aguirre M, Farrow JAE, Martinez-Murcia A, Phillips BA, Williams AM, Wallbanks S. Phylogenetic analysis of the genus Lactobacillus and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *FEMS Microbiol. Lett.* 1991;77: 5-12.

Condon S. Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiol. Rev.* 1987; 46: 269-280.

Daeschel MA. Applications and interactions of bacteriocins from lactic acid bacteria in foods and beverages. In: *Bacteriocin of lactic acid bacteria.* edited by Hoover DG, Steenson LR. New York: Academic Press Inc., 1993: 63-86.

Daeschel MA, Klaenhammer TR. Association of a 13.6-megadalton plasmid in *Pediococcus pentosaceus* with bacteriocin activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 1985; 50; 1538-1541.

Dahiya RS, Speck ML. Hydrogen peroxide formation by lactobacilli and its effect on *Staphylococcus aureus. J. Dairy Sci.* 1968; 51: 1568-1572.

Dicks LMT, van Vuuren HJJ. Relatedness of heterofermentative Lactobacillus species revealed by numerical analysis of total soluble cell protein patterns. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1987; 37: 437-440.

Dicks LMT, van Vuuren HJJ. Differentiation of Leuconostoc species by nicotinamide adenine dinucleotide-dependent d(-) -lactic dehydrogenase profiles. *FEMS Microbiol. Lett.* 1990; 67: 9-14.

Elliot JA, Collins MD, Pigott NE, Facklam RR. Differentiation of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus garviae* from humans by comparison of whole-cell protein patterns. *J. Clin. Microbiol.* 1991; 29: 2731-2734.

Federal Register. Nisin preparation : affirmation of GRAS status as a direct human food ingredient. *Fed. Reg.* 1988; 58: 11247-11250.

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

Fujisawa T, Benno Y, Yaeshima T, Mitsuoka T, Taxonomic study of the *Lactobacillus acidophilus* group, with recognition of *Lactobacillus gallinarum sp.* nov. and *Lactobacillus johnsonii sp.* nov. and synonyme of *Lactobacillus acidophilus* group A3 with the type stain of *Lactobacillus amylovorus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1992; 42: 487-491.

Gasser F. Electrophoretic characterization of lactic dehydrogenases in the genus *Lactobacillus* *J. Gen. Microbiol.* 1970; 62: 223-239.

Gasson MJ. Progress and potential in the biotechnology of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 1993; 12: 3-19.

Gilliland SE, Speck MC. Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* towards intestinal and food-borne pathogens in associative culture. *J. Food Prot.* 1977; 40: 820-823.

Gilliland SE. Concentrated starter cultures. In *bacterial starter cultures for foods*, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, 1986: 145-157.

Grarver KI, Muriana PM. Detection, identification and characterization of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from retail food products. *Int J Food Microbiol.* 1993; 19: 241-58.

Hammes WP, Wiess N, Holzapfel WP. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria : Ecophysiology, Isolation Identification, Applications*. ed. Balows A, Truper HG, Dworkin M, Harder W and Schleifer KH. Springer, New York, 1991: 1535-1594.

Hardie JM. Genus Streptococcus. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2. ed. Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1986: 1043-1071.

Hastings JW, Stiles ME, Holy AV. Bacteriocins of Leuconostocs isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 1994; 24: 75-81.

Hensel R, Mayr U, Stetter KO, Kandler O. Comparative studies of lactic acid dehydrogenase in lactic acid bacteria. I. Purification and kinetics of the alosteric l-lactic acid dehydrogenase from *Lactobacillus casei* ssp. *casei* and *Lactobacillus curvatus*. *Arch. Microbiol.* 1977; 112: 81-93.

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

Hontebeyrie M, Gasser F. Comparative immunological relationships of two distinct sets of isofunctional dehydrogenases in the genus Leuconostoc. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1975; 25: 1-6.

Hoover DG. Bacteriocins: activities and applications. In: *Encyclopedia of microbiology vol 1.* Academic Press Inc., 1992: 181-2.

Hoover DG, Harlander SK. Screening method for detecting bacteriocin activity. In: *Bacteriocin of lactic acid bacteria.* Ed. by Hoover DG, Steenson LR. New York: Academic Press Inc., 1993: 23-36.

Hugenholtz J. Citrate metabolism in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 1993; 12: 165-178.

Ingram M, Ottoway FJH, Coppock JBM. The preservative action of acid substances in food. *Chem. Ind.* 1956; 42: 1154-1165.

Jack RW, Tagg JR, Ray B. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol Rev.* 1995; 59: 171-89.

Jarvis AW, Wolff JM. Grouping of lactic streptococci by gel electrophoresis of soluble cell extracts. *Appl. Environ. Microbiol.* 1979; 37: 391-398.

Juffs HS, Babel FJ. Inhibition of psychrotropic bacteria by lactic cultures in milk stored at low temperature. *J. Dairy Sci.* 1975; 58: 1612-1619.

Kao CT, Frazier WC. Effect of lactic acid bacteria on growth of *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol.* 1966: 14: 251-255.

Kawai Y, Saito T, Toba T, Samant SK, Itoh T. Isolation and characterization of a highly hydrophobic new bacteriocin (Gassericin A) from *Lactobacillus gasseri* LA39. *Biosci Biotech Biochem.* 1994; 58: 1218-21.

Kekessy DA, Piguet JD. New method for detecting bacteriocin production. *Appl Microbiol.* 1970; 20: 282-3.

Kelly JW, Asmunelson VR, Huang MC. Isolation and Characterization of Bacteriocin producing Lactic acid Bacteria from ready-to-eat Food Products. *Int J of Food Microbiol.* 1996; 33: 209-218.

Klaenhammer TR. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie.* 1988; 70: 337-349.

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

Klaenhammer TR, Fremaux C, Ahn C, Milton K. Molecular biology of bacteriocins produced by *Lactobacillus*. In: Bacteriocin of lactic acid bacteria. edited by Hoover DG, Steenson LR. New York: Academic Press Inc., 1993: 151-77.

Kok J, Holo H, Belkum MJV, Haandrikman AJ, Nes IF. Non-nisin bacteriocins in *Lactococci*: biochemistry, genetics, and mode of action. In*: Bacteriocin of lactic acid bacteria*. edited by Hoover DG, Steenson LR. New York: Academic Press Inc., 1993: 121-46.

Lewus CB, Sun S, Montville TJ. Production of an amylase-sensitive bacteriocin by an atypical *Leuconostoc paramesenteroides* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 1992; 5: 143-149.

Lindgren SE, Dobrogosz WJ. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol. Rev.* 1990; 87: 149-164.

Lipinska E. Nisin and its applications. In *Antibiotics and Antibiosis in Agriculture*, ed. Woodbine M, Butterworth, London, 1977: 103-130.

Losteinkit C. Detection and selection of bacteriocin produce strains of *Lactobacillus* spp. from various sources. Mahidol University, Thailand, 1995: 8-25.

Marshall VM. Lactic acid bacteria : starters for flavour. *FEMS Microbiol. Rev.* 1987; 46: 327-336.

Mc Kay LL, Baldwin KA. Applications for biotechnology. Present and future improvements in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 1990; 87: 3-14.

Montville TJ, Kaiser AL. Antimicrobial protein : classification, nomenclature, diversity, and relationship to bacteriocins. In: *Bacteriocin of lactic acid bacteria*. edited by Hoover DG, Steenson LR. New York: Academic Press Inc., 1993: 1-5.

Montville TJ, Bruno MEC. Evidence that dissipation of proton motive force common mechanism of action for bacteriocins and other antimicrobial proteins. *Int J Food Microbiol.* 1994; 24: 53-74.

Murina PM, Luchansky JB. Biochemical methods for purification of bacteriocins. In: *Bacteriocin of lactic acid bacteria*. edited by Hoover DG, Steenson LR. New York: Academic Press Inc., 1993: 41-55.

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

Parente E, Ricciardi A. Influence of pH on the production of enterocin 1146 during batch fermenttation. *Lett Appl Microbiol.* 1994; 19: 12-5.

Pot B, Hertel C, Ludwig W, Descheemaeker P, Kersters K, Schleifer KH. Identification and classification of *Lactobacillus acidophilus*, *L. gasseri*, and *L. johnsonii* strains by SDS-PAGE and rRNA-targeted oligonucleotide probe hybridization. *J. Gen. Microbiol.* 1993; 139: 513-517.

Price RJ, Lee JS. Inhibition of *Pseudomonas* species by hydrogen peroxide producing lactobacilli. *J. Milk Food Technol.* 1970; 33: 13-18.

Ray B, Hoover DG. Pediocins. In: *Bacteriocin of lactic acid bacteria*. edited by Hoover DG, Steenson LR. New York.: Academic Press Inc., 1993: 181-205.

Rodrignez JM, Cintas LM. Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* strains from dry fermented sausages. *J Appl Bacteriol.* 1995; 78: 109-14.

Rogers LA. The inhibitory effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Bacteriol.* 1982; 16: 321-325.

Saad AM, Manca de Nadra MC. Characterization of bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* from wine. *J Appl Bacteriol.* 1993; 74: 406-10.

Salomon RA, Farias RN. Influence of iron on microcin 25 production. *FEMS Microbiol Lett.* 1994; 121: 275-80.

Sandine WE. The streptococci : milk products. In *Bacterial Starter Cultures for Foods* , ed. Gilliland SE, CRC Press Inc. , Boca Raton, Florida, 1986: 5-23.

Sandine WE. Looking backward and forward at the practical applications of genetic researches on lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 1987; 46: 205-220.

Schillinger U, Lucke FK. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl Environ Microbiol.* 1989; 55: 1901-6.

Sharpe ME. A serological classification of lactobacilli. *J.Gen. Microbiol.* 1955; 12:107-122.

Sharpe ME. Cell wall and cell membrane antigens used in the classification of lactobacilli. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1970; 20: 509-518.

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

Sharpe ME. The genus Lactobacillus. In The Prokaryotes. A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria. ed. Starr MP, Stolp H, Truper HG, Balows A, Schlegel HG, Springer, New York, 1981: 1653-1659.

Sneath PHA. *Bergey's Manual of systematic Bacteriology vol 2*. Baltimore: Wilkins, 1986: 1208-19.

Stackebrandt E, Teuber M. Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. *Biochimie*. 1988; 70: 317-324.

Stiles ME. Bacteriocins from *Carnobacterium* and *Leuconostoc*. In: *Bacteriocin of lactic acid bacteria*. edited by Hoover DG, Steenson LR. New York: Academic Press Inc., 1993: 211-7.

Strasser de Saad AM, Manca de Nadra MC. Characterization of bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* from wine. *J Appl Bacteriol*. 1993; 74: 406-10.

Thomas EL. Bacterial hydrogen peroxide production. In *The Lactoperoxidase System* , ed. Pruitt KM, Tenovuo J, Marcel Dekker Inc., New York, 1985: 179-202.

Thunell RK, Sandine WE. Types of starter cultures . In *bacterial starter cultures for foods*, ed. Gilliland SE, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, 1986: 127-144.

Tramer J. Inhibitory effect of *Lactobacillus acidophilus*. *Nature*. 1966; 211: 204-205.

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

ภาคผนวก

1. สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 อาหารเอ็มอาร์เอส (MRS media)

เคซีนเปปโตน	10.00	กรัมต่อลิตร
เนื้อวัวสกัด	8.10	กรัมต่อลิตร
ผงสกัดยีสต์	4.00	กรัมต่อลิตร
(+) กูลโคส	20.00	กรัมต่อลิตร
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	2.00	กรัมต่อลิตร
ทวีน 80	1.00	กรัมต่อลิตร
ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนซิเตรท	2.00	กรัมต่อลิตร
โซเดียมอะซิเตรท	5.00	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.20	กรัมต่อลิตร
แมงกานีสซัลเฟต	0.04	กรัมต่อลิตร

ถ้าต้องการอาหารแข็งให้เติมผงวุ้น 15 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน (15 ปอนด์/ ตารางนิ้ว, 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที)

1.2 อาหารนิวเตรียนท์ (Nutrient media)

เปปโตนจากเนื้อ	5.00	กรัมต่อลิตร
เนื้อวัวสกัด	3.00	กรัมต่อลิตร

ถ้าต้องการอาหารแข็งให้เติมผงวุ้น 15 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

2. สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

2.1 สารละลายคริสตอลไวโอเล็ต (Crystal violet solution)

สารละลาย เอ

คริสตอลไวโอเล็ต (85%)	2.00	กรัม.
เอธานอล (95 %)	50.00	มิลลิลิตร

สารละลาย บี

แอมโมเนียมออกซาเลต	0.80	กรัม.
น้ำกลั่น	80.00	มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย เอ กับสารละลาย บี เข้าด้วยกัน ถ้ามีตะกอนต้องนำไปกรองก่อนนำมาใช้ และถ้าสีเข้มข้นเกินไปอาจเจือจางสารละลาย A ก่อนนำมาผสมกับสารละลาย B

2.2 สารละลายแกรมไอโอดีน (Gram's iodine solution)

ผลึกไอโอดีน	0.80	กรัม
โปแตสเซียมไอโอดีน	2.00	กรัม
น้ำกลั่น	300.00	มิลลิลิตร

ละลายไอโอดีน และโปแตสเซียมไอโอดีน ในน้ำกลั่นปริมาณน้อย ๆ ก่อน แล้วเติมน้ำให้ครบ เก็บไว้ในขวดสีชา

2.3 สารละลายล้างสี (Decolorizer solution)

แอลกอฮอล์ (95%)	250	มิลลิลิตร
อะซีโตน	250	มิลลิลิตร

2.4 สารละลายสีซาฟรานิน (Safranin Staining Stock Solution)

สีซาฟรานิน โอ	2.50	กรัม
เอธานอล (95 %)	100.00	มิลลิลิตร

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

ถ้าจะใช้สีในการย้อมให้เจือจางเป็น 1:10 (stock safranin 10 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร) ถ้ามีตะกอนต้องนำไปกรองก่อนนำมาใช้ทุกครั้ง

2.5 **สารละลายสีมาลาไคท์กรีน** (Malachite green)

มาลาไคท์กรีน	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

เมื่อละลายสีในน้ำกลั่นแล้ว หากมีตะกอน ต้องกรองก่อนการใช้ทุกครั้ง

2.6 **สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์**

สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (3 %)	10.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	90.0	มิลลิลิตร

3. **การย้อมสีแบบแกรม** (Gram' s stain)

3.1 **วิธีการทดลอง**

1. ทำความสะอาดสไลด์ และเช็ดให้แห้ง
2. smear เชื้อแบคทีเรียที่ต้องการย้อมบนสไลด์ ทิ้งไว้ให้แห้งในอากาศแล้ว fix โดยผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง
3. หยดสี crystal violet ให้ท่วมรอย smear นาน 1-2 นาที แล้วเทสีทิ้ง จากนั้นชะด้วยสารละลายไอโอดีน แล้วหยดสารละลายไอโอดีนให้ท่วมรอย smear ทิ้งไว้นาน 1 นาที
4. เทสารละลายไอโอดีนทิ้ง แล้วชะด้วย ethyl alcohol 95 % นานประมาณ 20 วินาที หรือจนกระทั่งไม่มีสีม่วงละลายออกมา แล้วจึงล้างด้วยน้ำ
5. หยดสี safranin ให้ท่วมรอย smear นาน 15-30 วินาที ล้างน้ำซับให้แห้งแล้วตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.2 **การตรวจผล**

แบคทีเรียแกรมบวก จะติดสีน้ำเงิน ส่วน แบคทีเรียแกรมลบ จะติดสีแดง

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

4. การย้อมสี endospore

4.1 วิธีการทดลอง

1. ทำความสะอาดสไลด์และเช็ดให้แห้ง
2. smear เชื้อที่ต้องการย้อมบนสไลด์ ทิ้งให้แห้งในอากาศ แล้ว fix สไลด์โดยผ่านความร้อน 2-3 ครั้ง
3. หยดสี malachite green ให้ท่วมรอย smear แล้วนำไปให้ความร้อนโดยนำไปลนไฟพอมีไอขึ้น หรือนำไปอังน้ำเดือด ใช้เวลาประมาณ 10 นาที โดยคอยเติมสีบนสไลด์ อย่าให้สีแห้งหรือเดือด
4. ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วล้างออกด้วยน้ำ
5. หยดสี safranin ลงไปให้ท่วมรอย smear นาน 1 นาที
6. ล้างด้วยน้ำ ซับให้แห้ง
7. นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100x

4.2 การตรวจผล

endospore จะติดสีเขียวของ malachite green ส่วนอื่น ๆ ของเซลล์จะติดสีแดงของ safranin

Ubon Rajathanee University