รายงานผลงานวิจัย

เรื่อง

# การคัดเลือกเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินจากอาหารหมัก

# Screening of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from fermented foods


โดย

นางปาริชาติ พุ่มขจร

ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

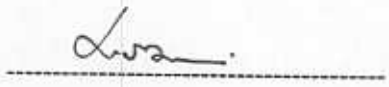


ซึ่งได้รับเงินทุนสนับสนุนการวิจัยประจำปี 2543 จากสภาวิจัยแห่งชาติ

# คำนำ

รายงานฉบับนี้เป็นรายงานผลงานวิจัยเรื่อง "การคัดเลือกเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินจากอาหารหมัก" (Screening of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from fermented foods) ซึ่งได้รับเงินทุนสนับสนุนการวิจัยประจำปี 2543 จากสภาวิจัยแห่งชาติ งานวิจัยดังกล่าวนี้ได้ดำเนินการโดยมี นางปาริชาติ พุ่มขจร เป็นหัวหน้าโครงการ และมีนายพงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ เป็นผู้ร่วมโครงการ

ขอขอบคุณสภาวิจัยแห่งชาติ และคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่สนับสนุนให้งานวิจัยดังกล่าวดำเนินไปได้ด้วยดีตลอดโครงการ



(นางปาริชาติ พุ่มขจร)
หัวหน้าโครงการ

# สารบัญ


| | หน้า |
|---|---|
| บทคัดย่อ | 1 |
| บทนำ | 2 |
| การตรวจเอกสาร | 4 |
| อุปกรณ์และวิธีการ | 14 |
| ผลการทดลอง | 17 |
| วิจารณ์ผลการทดลอง | 24 |
| สรุปผลการทดลอง | 26 |
| เอกสารอ้างอิง | 27 |

# บทคัดย่อ

แลคติคแอสิดแบคทีเรีย 4,673 isolates ที่แยกจากอาหารหมัก 23 ตัวอย่าง เมื่อทำการคัดเลือกเชื้อที่สร้างแบคเทอริโอซินโดยวิธี agar spot assay มีเพียง 10 isolates ที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินมายับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบคือ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 ได้ เมื่อนำ culture supernatant ของเชื้อไปทดสอบการสร้างแบคเทอริโอซินโดยวิธี swab-paper disc method มีเพียง 9 ใน 10 isolates ที่ยังคงยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบได้ แลคติคแอสิดแบคทีเรียที่แยกได้เป็นแบคทีเรียในสกุล *Lactococcus* และ *Pediococcus* แบคเทอริโอซินที่สร้างจากเชื้อที่แยกได้มีคุณสมบัติดังนี้คือ ไวต่อเอนไซม์โปรติเนส K สามารถทนความร้อน 100 องศาเซลเซียสได้นานอย่างน้อย 30 นาที ความสามารถในการยับยั้งเชื้ออื่นมีค่อนข้างแคบ (narrow spectrum of inhibitary) ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นที่นำมาทดสอบได้ ถูกผลิตออกมามากที่สุดที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว และมีกลไกการทำลายเซลล์แบคทีเรียทดสอบเป็นแบบทำให้เซลล์ตายโดยเซลล์ไม่แตกสลาย

# บทนำ

แลคติคแอสิดแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียใน family *Lactobacillaceae* สามารถเจริญได้ดีในที่ที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย (microaerophilic) ติดสีแกรมบวก (gram-positive) ไม่สร้างสปอร์ (non-spore forming) มีรูปร่างหลายแบบขึ้นกับชนิดของแบคทีเรีย บางชนิดอาจมีรูปร่างกลม (cocci) บางชนิดอาจมีรูปร่างเป็นแท่ง (rod) ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) และสามารถผลิตกรดอินทรีย์ได้

ในการผลิตอาหารหมัก เช่น เนื้อหมัก ไส้กรอกเปรี้ยว ผักดอง และผลิตภัณฑ์นม ( เช่น นมเปรี้ยว โยเกิร์ต และเนย) เป็นต้น นิยมใช้แลคติคแอสิดแบคทีเรียเป็นหัวเชื้อ (starter culture) ในขั้นตอนการผลิต จากการศึกษาพบว่าเมื่อใช้แลคติคแอสิดแบคทีเรียเป็นหัวเชื้อในการผลิตอาหาร จะช่วยทำให้อาหารมีรสชาติ (taste) และเนื้อสัมผัส (texture) ที่ดีเป็นที่นิยมกับผู้บริโภค อีกทั้งยังสามารถยับยั้งการเจริญต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรค (pathogenic bacteria) แบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย (spoilage bacteria) ได้แก่ *Bacillus cereus, Bacillus megaterium, Leuconostoc mesenteroides, Escherichia coli, Proteus mirabilis, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Streptococcus feacalis, Clostridium bifermentans, Clostridium histolyticum, Clostridium perfringens* และ *Clostridium sporogenes* เป็นต้น ความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาหารเน่าเสียเป็นผลจากเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียสามารถผลิตสารยับยั้งต่อเชื้อจุลินทรีย์ได้หลายชนิดเช่น กรดอินทรีย์ (กรดแลคติค และกรดอะซิติก) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคเทอริโอซิน

แบคเทอริโอซินเป็นสารที่พบว่าสร้างจากแลคติคแอสิดแบคทีเรียหลายชนิด มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อแบคทีเรียอื่นได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ แบคเทอริโอซินส่วนใหญ่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อได้อย่างจำเพาะจึงแตกต่างไปจากฤทธิ์ของกรดอินทรีย์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ซึ่งออกฤทธิ์แบบไม่จำเพาะ ด้วยเหตุนี้จึงมีนักวิทยาศาสตร์หลายท่านได้ให้ความสนใจในการทำการวิจัยหาเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซิน เพื่อที่จะได้นำเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียดังกล่าวไปใช้ประโยชน์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย โดยไม่ไปมีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ที่อาศัยอยู่ในร่างกาย (normal flora) ของผู้บริโภค

ในการศึกษานี้จะทำการแยกเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียจากอาหารหมักพื้นบ้านทางภาคอีสานของประเทศไทย ได้แก่ ปลาร้า แหนม และผักดอง เป็นต้น จากนั้นเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่แยกได้จะถูกนำไปทดสอบความสามารถในการสร้างแบคเทอริโอซินที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคและ/หรือแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย นอกจากนี้ในการศึกษานี้จะทำการศึกษาคุณสมบัติที่สำคัญบางประการของสารแบคเทอริโอซินดังกล่าวด้วย เชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินไปยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

และ/หรือแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียที่ได้จากการศึกษานี้จะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์และในอุตสาหกรรมต่อไป

# การตรวจเอกสาร

## แลคติคแอสิดแบคทีเรียและอาหารหมัก

แลคติคแอสิดแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ใน family *Lactobacillaceae* ติดสีแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส เจริญได้ดีในที่ที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย สามารถหมักน้ำตาลแล้วให้ผลผลิตหลักคือกรดแลคติค (lactic acid) มีรูปร่างทั้งแบบกลม (*Aerococcus, Alloiococcus, Carnobacterium, Enterococcus, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Streptococcus, Tetragenococcus, Vagococcus*) และแบบแท่ง (*Lactobacillus, Carnobacterium, Bifidobacterium*) (De Vuyst L and Vandamme EJ, 1994)

แลคติคแอสิดแบคทีเรียสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่โดยอาศัยผลผลิตสุดท้ายที่เกิดขึ้นหลังกระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคส ดังนี้ (1) homofermentative lactic acid bacteria คือ แลคติคแอสิดแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติคเป็นผลิตภัณฑ์หลักเพียงอย่างเดียว และ (2) heterofermentative lactic acid bacteria คือแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่นอกจากผลิตกรดแลคติคแล้วยังผลิตสารอื่น ๆ ด้วย เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ และเอทานอล

แลคติคแอสิดแบคทีเรียนับว่ามีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการผลิตอาหารหมักมาตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน ประโยชน์ของแลคติคแอสิดแบคทีเรียต่อการผลิตอาหารหมักคือ ช่วยแปรรูปอาหารทำให้ได้อาหารที่มีลักษณะเนื้อสัมผัสและรสชาติแปลกใหม่แตกต่างไปจากเดิม ช่วยถนอมอาหารทำให้สามารถเก็บอาหารนั้นไว้ได้นานขึ้นโดยคุณค่าทางโภชนาการแทบจะไม่เสียไป นอกจากนี้ความเป็นกรดที่เพิ่มขึ้นของอาหารที่ผ่านกระบวนการหมักยังไปรบกวนการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคบางชนิดที่มีอยู่ในอาหารได้ด้วย

ในอดีตการผลิตอาหารหมักมักเกิดขึ้นจากการสังเกตและความบังเอิญโดยอาศัยเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่มีอยู่แล้วตามธรรมชาติในอาหารเป็นตัวทำให้เกิดกระบวนการหมักและเป็นเพียงอุตสาหกรรมในครัวเรือน เช่น การทำปลาร้า ไส้กรอกเปรี้ยว และแหนม เป็นต้น ต่อมาความรู้และเทคโนโลยีทางด้านการหมักตลอดจนการเก็บรักษาอาหารได้พัฒนาไปอย่างต่อเนื่องทำให้อาหารหมักและอาหารแปรรูปถูกผลิตออกมาเป็นอุตสาหกรรมขนาดใหญ่และมีหลากหลายชนิดจำหน่ายอยู่ในท้องตลาด จนบางครั้งผู้บริโภคแทบจะไม่รู้ตัวว่าอาหารที่บริโภคอยู่นั้นเป็นอาหารที่ได้มาจากกระบวนการหมักของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย เช่น นมเปรี้ยว โยเกิร์ต กาแฟ ขนมปัง และไวน์ เป็นต้น อุตสาหกรรมการผลิตอาหารหมักในปัจจุบันสามารถคัดเลือกและกำหนดสายพันธุ์ของแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่จะเติมลงในอาหารได้ เพื่อให้ได้อาหารหมักที่มีคุณภาพและผลผลิตแต่ละครั้งมีมาตราฐานใกล้เคียงกัน เชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่ใช้เติมลงไปในอาหารเพื่อให้เกิดผลผลิตจากการหมักตามต้องการเรียกว่า หัวเชื้อ เช่น *Lactobacillus brevis* ใช้เป็นหัวเชื้อในการทำขนมปัง *Lactobacillus acidophilus* ใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตนมเปรี้ยว และ *Lactobacillus plantarum* ใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตไวน์ เป็นต้น (De Vuyst L and

Vandamme EJ, 1994) นอกจากนี้หัวเชื้อในอาหารบางชนิดก็อาจประกอบด้วย แลคติคแอสิดแบคทีเรียมากกว่าหนึ่งชนิด หรือใช้แลคติคแอสิดแบคทีเรียร่วมกับเชื้อราหรือแบคทีเรียชนิดอื่นก็ได้

## แบคเทอริโอซิน

แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) เป็นโปรตีนที่ผลิตโดยแบคทีเรีย มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นได้ โดยปกติแบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินมักจะมีภูมิคุ้มกันต่อแบคเทอริโอซินที่ตนเองสร้าง ดังนั้นจึงไม่ถูกยับยั้งการเจริญโดยแบคเทอริโอซินที่ตนเองผลิตออกมา การสร้างแบคเทอริโอซินของเชื้อแบคทีเรียเชื่อว่าเป็นผลจากการปรับตัวเพื่อความอยู่รอดในสิ่งแวดล้อมจำกัดที่มีเชื้อหลายชนิดเจริญอยู่ร่วมกันทำให้เชื้อที่สร้างแบคเทอริโอซินสามารถเจริญแย่งอาหารและพื้นที่เพื่อการเจริญเติบโตและมีชีวิตรอด ส่วนเชื้อที่ไม่สร้างแบคเทอริโอซินก็จะค่อย ๆ ตายและหมดไปในที่สุด (Jack RW *et al*, 1995)

แบคเทอริโอซินถูกค้นพบครั้งแรกเมื่อประมาณปีค.ศ.1925 แบคเทอริโอซินชนิดแรกที่พบมีชื่อว่า โคลิซิน (colicin) ผลิตโดยเชื้อ *Escherichia coli* ต่อมาพบว่าสารที่มีคุณสมบัติคล้ายคลึงกับโคลิซิน (colicin-like substance) สามารถผลิตจากแบคทีเรียอื่นที่เป็นสมาชิกในกลุ่ม Enterobacteriaceae ได้ด้วย หลังจากนั้นก็มีรายงานเกี่ยวกับการค้นพบแบคเทอริโอซินออกมามากขึ้น แบคทีเรียที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้มีทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ (Tagg JR *et al*, 1976; Jack RW *et al*, 1995)

โดยอาศัยการศึกษาคุณสมบัติของโคลิซินและใช้โคลิซินเป็นต้นแบบ (prototype) แบคเทอริโอซินอื่น ๆ ที่ค้นพบภายหลังจึงถูกนำไปเปรียบเทียบกับโคลิซิน หากพบว่ามีคุณสมบัติแตกต่างไปจากโคลิซินก็จะจัดเป็นแบคเทอริโอซินชนิดใหม่ อย่างไรก็ตามการกำหนดคุณสมบัติของสารที่เป็นแบคเทอริโอซินก็ยังไม่ค่อยชัดเจนมากนักเพราะแบคเทอริโอซินผลิตจากแบคทีเรียหลากหลายกลุ่มจึงมีคุณสมบัติแตกต่างกันค่อนข้างมาก จนในที่สุดสามารถสรุปคุณสมบัติที่สำคัญของแบคเทอริโอซินได้เป็น 3 ประการคือ (1) เป็นสารจำพวกโปรตีน (proteinaceous compounds) และโปรตีนนั้นจะต้องถูกกำหนดโดยยีนที่อยู่ภายในเซลล์ยีนที่กำหนดการสร้างแบคเทอริโอซินอาจอยู่ในพลาสมิด (plasmid) หรืออยู่ในโครโมโซม (chromosome) (2) ทนความร้อน (heat stable) เนื่องจากแบคเทอริโอซินส่วนใหญ่เป็นโปรตีนที่มีขนาดเล็กจึงสามารถทนอุณหภูมิสูงได้ แบคเทอริโอซินบางชนิดสามารถทนอุณหภูมิที่สูงถึง 100 องศาเซลเซียสได้ และ (3) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ที่สร้าง (closely related bacteria) แบคเทอริโอซินเท่านั้น ดังนั้นแบคเทอริโอซินจึงมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอื่นได้จำเพาะ (specific) หรือมีขอบเขตของการยับยั้งค่อนข้างแคบ (narrow spectrum of inhibitory) อย่างไรก็ตามคุณสมบัติข้อนี้ก็อาจไม่เป็นจริงใน

แบคเทอริโอซินบางชนิดซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียต่างสกุลหรือต่างกลุ่มได้ (Montville TJ and Kaiser AL, 1993)

การตั้งชื่อแบคเทอริโอซินแม้ว่าจะยังไม่ค่อยมีกฎเกณฑ์แน่นอนแต่ที่นิยมคือ เติมคำว่า "ซิน" (cin) ต่อท้ายชื่อสกุลหรือสปีชีส์ของแบคทีเรียที่ผลิตแบคเทอริโอซินนั้น เช่น โมโนซิน (monocin) เป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *Listeria monocytogenes* ซับทิลิน (subtilin) เป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis* สแตปฟิโลซิน (staphylocin) เป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *Staphylococcus aureus* เป็นต้น (Montville TJ and Kaiser AL, 1993) นอกจากนี้ แบคเทอริโอซินบางชนิดอาจผลิตมาจากแบคทีเรียในสกุลและสปีชีส์เดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์และมีคุณสมบัติต่างไปจากแบคเทอริโอซินเดิมที่เคยรายงานไว้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเติมอักษรต่อท้ายชื่อแบคเทอริโอซินเดิมเพื่อบอกความแตกต่างไว้ด้วย เช่น แลคตาซิน F (lactacin F) เป็นแลคตาซินชนิดที่ 6 ที่ถูกค้นพบ เป็นต้น

กลไกการยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์อื่นโดยแบคเทอริโอซินอาจมีหลายแบบขึ้นกับชนิดของแบคเทอริโอซิน กลไกหนึ่งที่เป็นไปได้คือเซลล์เป้าหมาย (target cell) ที่จะถูกทำลายโดยแบคเทอริโอซินจะต้องมีที่รับ (receptor) สำหรับแบคเทอริโอซินนั้นอยู่บนผิวเซลล์ เมื่อแบคเทอริโอซินจับกับที่รับแล้วจะทำให้เกิดรู (pore) ที่ผิวเซลล์ การผ่านเข้าออกของไอออน (ions) ต่าง ๆ ระหว่างในและนอกเซลล์จึงเสียสมดุลย์ไป ดังนั้นจึงอาจทำให้เซลล์เหี่ยวหรือแตกสลายและตายไปในที่สุด (Tahara T and Kanatani K, 1996) อย่างไรก็ตามแบคเทอริโอซินบางชนิดก็อาจทำให้เซลล์ตายโดยเซลล์ยังคงสภาพเดิม (intact cell) ได้ (Itoh T *et al*, 1995)

## แบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแลคติคแอสิดแบคทีเรีย

แลคติคแอสิดแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่มีการศึกษากันอย่างกว้างขวางเกี่ยวกับความสามารถในการผลิตแบคเทอริโอซินโดยเฉพาะแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่มีอยู่ในอาหารพบว่าสามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้หลายชนิด (Nettles CG and Barefoot SF, 1993) การที่นักวิจัยสนใจศึกษาเกี่ยวกับแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้น่าจะเป็นเพราะว่าเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียเป็นเชื้อที่มีอยู่แล้วในอาหารดังนั้นหากนำกลับไปใช้เป็นหัวเชื้อของการผลิตอาหารจึงน่าจะสะดวกต่อการนำไปใช้และปลอดภัยต่อผู้บริโภค ปัจจุบันงานวิจัยเกี่ยวกับแบคเทอริโอซินจะมุ่งเน้นไปทางด้านการแยกเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้ การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคเทอริโอซิน การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์อื่น กลไกในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์อื่น ตลอดจนกลไกในการสร้างแบคเทอริโอซินโดยแบคทีเรีย (Tahara T and Kanatani K, 1996; Blom H *et al*,1999; Kelly WJ *et al*, 1996)

แบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแลคติคแอสิดแบคทีเรียสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่ม (class) ตามโครงสร้างและคุณสมบัติทางชีวเคมี (Klaenhammer TR, 1993) คือ class I (lantibiotics) หมายถึงแบคเทอริโอซินที่มีกรดอะมิโนในกลุ่มแลนไทโอนีน (lanthionine) เป็นส่วนประกอบ ได้แก่ กรดอะมิโนไดดีไฮโดร (didehydro amino acid) หรือกรดอะมิโนไทโออีเธอร์ (thioether amino acid) เป็นต้น class II หมายถึงแบคเทอริโอซินที่มีขนาดค่อนข้างเล็ก (<10 kDa) และทนความร้อน class II ยังสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มย่อยคือ class IIa class IIb และ class IIc โดยอาศัยความแตกต่างของกรดอะมิโนที่ปลาย N-terminal ลักษณะของรูที่เกิดบนผิวเซลล์เป้าหมาย และการมีหมู่ซัลไฮดริล (sulfhydryl group) ในโครงสร้าง class III หมายถึงแบคเทอริโอซินที่มีขนาดใหญ่ (>30 kDa) และไม่ทนความร้อน class IV หมายถึงแบคเทอริโอซินที่มีสารชีวโมเลกุลอื่นเป็นองค์ประกอบด้วยนอกเหนือจากโปรตีน เช่น ไขมัน หรือคาร์โบไฮเดรต

ในที่นี้จะขอยกตัวอย่างแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแลคติคแอสิดแบคทีเรียมาไว้พอสังเขปดังต่อไปนี้

**แบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแลคโตบาซิลไล (Lactobacilli)**

**เฟอร์เมนติซิน (Fermenticin)**

เป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Lactobacillus fermenti* เป็นโปรตีนที่ไว (sensitive) ต่อทริปซิน (trypsin) และเปปซิน (pepsin) ทนต่อความร้อน ยูเรีย (urea) และไลโซไซม์ (lysozyme) เมื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์พบว่าประกอบด้วยกรดอะมิโน 16 ตัว น้ำตาล 4 ตัว เฮกโซซามีน (hexosamine) และฟอสฟอรัส (DeKlerk HC and Smit JA, 1967)

**แพลนทาริซิน A (Plantaricin A)**

เป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Lactobacillus plantarum* strain C-11 มีฤทธิ์ฆ่าแบคทีเรีย (bactericidal) ในกลุ่มแลคติคแอสิดแบคทีเรียได้หลายชนิด น้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 6,000 ดาลตัน ทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 30 นาทีได้ สามารถทำงานได้เมื่อ pH อยู่ในช่วง 4 ถึง 6.5 ถูกสร้างออกมาในช่วงกลางของ logarithmic phase ของการเจริญเติบโตของเชื้อ (Daeshchel MA *et al*, 1990)

**แพลนทาซิน B (Plantacin B)**

เป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Lactobacillus plantarum* NCDO 1193 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์อื่นค่อนข้างแคบ สามารถยับยั้งการเจริญของ *Lactobacillus plantarum*. *Lactobacillus mesenteroides* และ *Pediococcus damnosus* ถูกทำลายฤทธิ์โดยไลเปส (lipase) และ α-อะไมเลส (α-amylase) จึงเชื่อว่าน่าจะเป็นโปรตีนที่มีไขมันและคาร์โบไฮเดรตเป็นส่วนประกอบ (West CA and Warner PJ, 1988)

**ซาคาซิน A (Sakacin A)**

เป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Lactobacillus sake* 706 เป็นโปรตีนที่ทนความร้อน 100 องศาเซลเซียสนาน 20 นาทีได้ ถูกสร้างออกมาในช่วงกลางและช่วงท้ายของ logarithmic phase ของการเจริญเติบโตของเชื้อ ยีนที่กำหนดการสร้างอยู่ในพลาสมิดขนาด 27.7 กิโลเบส สามารถยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ได้หลายสายพันธุ์ (Schillinger U and Lucke F-K, 1989)

**แลคโตซิน S (Lactocin S)**

เป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Lactobacillus sake* L45 เป็นโปรตีนที่ทนความร้อน มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pediococcus, Leuconostoc* และ *Lactobacillus* ถูกสร้างออกมาในช่วงท้ายของ logarithmic phase ของการเจริญของเชื้อ มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 13,700 ถึง 30,000 ดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 33 ตัว ยีนที่กำหนดการสร้างแบคเทอริโอซินนี้อยู่ในพลาสมิดขนาด 50 กิโลเบส (Mortvedt CI *et al*, 1991)

**เคอวาซิน A (Curvacin A)**

เป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Lactobacillus curvatus* LTH1174 ซึ่งแยกได้จากเนื้อสัตว์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Lactobacilli, Leuconostoc, Carnobacteria, Listeria monocytogenes* และ *Listeria ivanovii* ถูกทำลายฤทธิ์โดยโปรติเนส K (proteinase K) และทริปซิน แต่ไม่ถูกทำลายฤทธิ์โดยเปปซิน ทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสได้นาน 3 นาที มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 3,000 ถึง 5,000 ดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโนตั้งแต่ 38 ถึง 41 ตัว (Tichaczek PS *et al*, 1992)

**เฮลเวทติซิน J (Helveticin J)**

เป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Lactobacillus helveticus* 481 เป็นแบคเทอริโอซินที่ไวต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีน (proteolytic enzyme) หลายชนิดและไม่ทนความร้อน สามารถยับยั้งการเจริญของ *Lactobacilli* สายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันได้ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 37,000 ดาลตัน ยีนที่กำหนดการสร้างอยู่ในโครโมโซม (Joerger MC and Klaenhammer TR, 1986)

**แลคตาซิน F (Lactacin F)**

เป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Lactobacillus acidophilus* 11088 ซึ่งแยกได้จากนม ไวต่อเอนไซม์โปรติเนส K ทริปซิน ฟิซิน (ficin) และซับทิลิซิน (subtilisin) ทนความร้อนอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสนาน 15 นาทีได้ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus, Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis, Lactobacillus helveticus, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus fermentum* และ *Enterococcus faecalis* ถูกสร้างออกมามากที่สุดในช่วงแรกของ stationary phase ของการเจริญเติบโตของเชื้อเมื่อ pH เท่ากับ 7 (Muriana PM and Klaenhammer TR, 1991)

**แบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแลคโตคอคไค (Lactococci)**

**ดิโพคอคซิน (Diplococcin)**

เป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strain 346 ซึ่งนับเป็นแบคเทอริโอซินตัวแรก ๆ ที่ถูกค้นพบว่าผลิตจากแลคติคแอสิดแบคทีเรีย มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 5,300 ดาลตัน ถูกสร้างออกมาในช่วงแรกของ stationary phase ของการเจริญเติบโตของเชื้อในอาหารเหลว M17 ไม่สเถียรที่อุณหภูมิห้องและไม่ทนความร้อน ถูกทำลายฤทธิ์โดยไคโมทริปซิน (chymotrypsin) ทริปซิน และโปรเนส (pronase) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* และ *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* กลไกการทำลายเซลล์เป้าหมายคือยับยั้งการสังเคราะห์ DNA และ RNA ทำให้เซลล์เป้าหมายตายโดยเซลล์ไม่แตกสลาย (Davey GP, 1981)

**แลคโตสเตรปซิน (Lactostrepcin)**

เป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* และ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์อื่นของแบคเทอริโอซินนี้จะดีเมื่อ pH น้อยกว่า 5 ถูกทำลายฤทธิ์ด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน ทนความร้อนที่อุณหภูมิ 121 อาศาเซลลเซียสนาน 10 นาที ถูกสร้างออกมาในช่วงแรกของ logarithmic phase มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 10,000 ดาลตัน สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Lactococci, Streptococci* group A, C และ G, *Bacillus cereus, Lactobacillus helveticus, Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* และ *Leuconostoc paracitrovorum* (Kozak W *et al*, 1978)

**แลคโตคอคซิน I (Lactococcin I)**

เป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strain AC1 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อในกลุ่ม *Lactococci* และ *Clostridia* ทนความร้อนที่อุณหภูมิ 99 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 6,000 ดาลตัน (Geis A *et al*, 1983)

**ไนซิน (Nisin)**

เป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* เป็นแบคเทอริโอซินที่มีการศึกษากันมากที่สุด จัดเป็นแบคเทอริโอซินในกลุ่ม lantibiotic ประกอบด้วยกรดอะมิโน 34 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 3,500 ดาลตัน สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิดเช่น *Lactococci, Bacilli, Micrococci, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes* และ *Clostridium botulinum* สามารถทนความร้อนอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ถูกทำลายฤทธิ์โดยไคโมทริปซิน ถูกสร้างออกมาในช่วง logarithmic phase ของการเจริญเติบโต มีฤทธิ์ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เป้าหมาย ยีนที่กำหนดการสร้างอาจอยู่ที่พลาสมิดหรือโครโมโซมก็ได้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อที่สร้าง (Buchman GW *et al*, 1988)

**แบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเพดดิโอคอคไค (Pediococci)**

**เพดดิโอซิน AcH (Pediocin AcH)**

เป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Pediococcus acidilactici* strain H ซึ่งแยกได้จากไส้กรอก สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Lactobacilli, Leuconostoc, Staphylococcus aureus, Clostridium perfringens, Listeria monocytogenes* และ *Pseudomonas putida* ถูกทำลายฤทธิ์โดยเอนไซม์ย่อยโปรตีน ทนความร้อนอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เสถียรที่ pH ตั้งแต่ 2.5 ถึง 9.0 ถูกสร้างออกมาในช่วง stationary phase ของการเจริญเติบโตของเชื้อในอาหารเหลว TGE (trypticase, glucose, yeast extract) ที่ pH 6.5 มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 2,700 ถึง 50,000 ดาลตัน กลไกการทำลายเซลล์เป้าหมายคือยับยั้งการสังเคราะห์ ATP รบกวนการขนส่งสารภายในเซลล์ และทำลาย permeability ของเยื่อหุ้มเซลล์ (Bhunia AK *et al*, 1988)

**เพดดิโอซิน PA-1 (Pediocin PA-1)**

เป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Pediococcus acidilactici* strain PAC-1.0 ซึ่งสร้างออกมาในช่วง stationary phase ของการเจริญเติบโต สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pediococci, Lactobacilli, Leuconostoc mesenteroides* และ *Listeria monocytogenes* ไวต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีนแต่ไม่ถูกทำลายฤทธิ์โดยไลเปส ฟอสโฟไลเปส (phospholipase) ไลโซไซม์ ดีเอ็นเอส (DNase) หรืออาร์เอ็นเอส (RNase) ทนความร้อนอุณหภูมิ 80 ถึง 100 องศาเซลเซียส และสเถียรที่ pH ตั้งแต่ 4 ถึง 7 มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 16,500 ดาลตัน ยีนที่กำหนดการสร้างอยู่ในพลาสมิด (Henderson JT *et al*, 1992)

**แบคเทอริโอซินที่ผลิตจากลิวโคนอสตอก (Leuconostoc)**

**มีเซนเทอรอยซิน 5 (Mesenteroicin 5)**

เป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Leuconostoc mesenteroides* UL5 ซึ่งแยกได้จากเนยแข็งชนิดหนึ่ง (Swiss-type cheese) ไวต่อโปรติเอส (protease) สามารถทนความร้อนอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ถูกสร้างออกมาในช่วงแรกของ stationary phase ของการเจริญเติบโต สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Listeria monocytogenes, Streptococcus faecalis, Brevibacterium linens* และ *Pediococcus pentosaceus* มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 4,500 ดาลตัน (Daba HS *et al*, 1991)

**ลิวโคซิน A (Leucocin A)**

เป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Leuconostoc gelidum* ซึ่งแยกจากเนื้อสัตว์ ทนความร้อนอุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที สเถียรที่ pH ค่อนข้างต่ำ (2-3) ถูกทำลายฤทธิ์โดยเอนไซม์ย่อยโปรตีนหลายชนิด เช่น โปรติเอส ไคโมทริปซิน ทริปซิน ปาเปน และเปปซิน สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Leuconostoc, Lactobacilli, Pediococci, Enterococcus faecalis* และ *Listeria monocytogenes* ถูกสร้างออกมามากที่สุดในช่วงแรกของ logarithmic

phase ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและ pH เท่ากับ 6.0 มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 2,500 ถึง 3,000 ดาลตัน ยีนที่กำหนดการสร้างอยู่ในพลาสมิด (Hastings JW *et al*,1991)

**คาโนซิน (Carnocin)**

เป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Leuconostoc carnosum* LA44A ซึ่งแยกได้จากไส้กรอกชนิดหนึ่ง (vienna-type sausage) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Lactobacilli, Carnobacteria, Enterococci, Pediococci, Leuconostoc* และ *Listeria* spp. ถูกยับยั้งฤทธิ์โดยไคโมทริปซิน ทริปซิน และอะไมเลส ทนความร้อนอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที สเถียรที่ pH ตั้งแต่ 2 ถึง 10 ถูกสร้างออกในช่วงปลายของ logarithmic phase มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 2,510 ถึง 6,000 ดาลตัน (van Laack RLJM *et al*, 1992)

**แบคเทอริโอซินที่ผลิตจากคาโนแบคทีเรีย (Carnobacteria)**

**คาโนแบคเทอริโอซิน A1, A2, A3 (Carnobacteriocin A1, A2, A3)**

แบคเทอริโอซินทั้ง 3 ชนิดนี้ผลิตจาก *Carnobacterium piscicola* LV17 เป็นโปรตีนที่สามารถทนความร้อนอุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์อื่นค่อนข้างแคบ ถูกสร้างออกมาในช่วงแรกของการเจริญเติบโตของเชื้อและไวต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีน ยีนที่กำหนดการสร้างอยู่ในพลาสมิด คาโนแบคเทอริโอซิน A1, A2 และ A3 มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 5,100, 5,123 และ 5,127 ตามลำดับ (Nettles CG and Barefoot SF, 1993)

**คาโนซิน U149 (Carnocin U149)**

เป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Carnobacterium piscicola* ที่แยกได้จากเนื้อปลา ทนความร้อนอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Carnobacteria, Lactobacilli, Pediococci* และ *Lactococci* ถูกสร้างออกมาในระยะกลางของ logarithmic phase ของการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส เป็นแบคเทอริโอซินที่อยู่ในกลุ่ม lantibiotic ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 35 ถึง 37 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 4,500 ถึง 5,000 ดาลตัน (Stoffels G *et al*, 1992)

**ประโยชน์ของแบคเทอริโอซินและการนำไปใช้**

การที่แลคติคแอสิดแบคทีเรียสามารถผลิตแบคเทอริโอซินไปยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้หลายชนิดทั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย ทำให้แบคเทอริโอซินหรือแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินน่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของการนำไปใช้เป็นสารถนอมอาหาร (food preservative) หรือเป็นหัวเชื้อเติมลงในอาหาร ถึงแม้ว่าแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแลคติคแอสิดแบคทีเรียส่วนใหญ่จะยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกเป็นส่วนใหญ่ เช่น *Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes* และ *Clostridium*

*botulinum* แต่เมื่อนำแบคเทอริโอซินไปรวมกับสารจำพวก chelating agent ก็พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้ (Stevens KA *et al*, 1992)

แบคเทอริโอซินเท่าที่ศึกษากันมาทั้งหมดในปัจจุบันมีเพียงไนซินเท่านั้นที่ถูกนำมาใช้เป็นสารถนอมอาหารโดยเป็นที่ยอมรับของ Food and Drug Administration (FAD) และ World Health Organization (WHO) ว่าปลอดภัยต่อผู้บริโภค นอกจากนี้ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ซึ่งเป็นเชื้อที่ผลิตไนซินก็ยังถูกนำไปใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตเนยแข็งด้วย เมื่อศึกษาคุณสมบัติของไนซินตลอดจนความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์อื่นแล้วเชื่อว่าไนซินน่าจะนำไปใช้กับอุตสาหกรรมอาหารชนิดอื่นได้ด้วย

ปัจจัยที่ควรศึกษาและคำนึงถึงก่อนที่จะนำแบคเทอริโอซินไปใช้เติมลงในอาหารคือสารหรือองค์ประกอบที่มีอยู่ในอาหารชนิดนั้น ๆ ได้แก่ ไขมัน อุณหภูมิ เอนไซม์ และ pH เป็นต้น สิ่งเหล่านี้อาจไปรบกวนการทำงานของแบคเทอริโอซินจนทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์เสียไปหรือได้ผลไม่ดีเท่าที่ควร ยกตัวอย่างเช่น ไนซินสามารถจับกับไขมันได้ค่อนข้างดีและเมื่อไนซินจับกับไขมันแล้วจะมีผลทำให้ความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ลดน้อยลงไป แบคเทอริโอซินบางชนิดสามารถทำงานได้ในช่วง pH ที่ค่อนข้างแคบดังนั้นจึงต้องนำไปใช้กับอาหารที่มี pH ใกล้เคียงกับ pH ที่แบคเทอริโอซินนั้นจะทำงานได้ แบคเทอริโอซินส่วนใหญ่ที่สร้างจากแลคติคแอสิดแบคทีเรียมักเป็นสารจำพวกโปรตีนที่มีขนาดเล็กซึ่งทนความร้อนได้ดีจึงสามารถนำไปใช้กับอุตสาหกรรมอาหารที่ต้องใช้ความร้อนสูงในขั้นตอนการผลิตได้ แต่หากแบคเทอริโอซินใดไม่ทนความร้อนก็ควรหลีกเลี่ยงการนำไปใช้กับอุตสาหกรรมอาหารในลักษณะดังกล่าว อาหารที่มีเอนไซม์ย่อยโปรตีน เช่น โปรติเอส หรือ โปรตีนเนส (proteinase) ควรระมัดระวังอย่างยิ่งหากจะเติมแบคเทอริโอซินลงไปเพราะเอนไซม์เหล่านี้สามารถไปทำลายฤทธิ์ของแบคเทอริโอซินได้ (Schillinger U *et al*, 1991)

การทำให้แบคเทอริโอซินยังคงความสามารถในการทำงานไว้ได้เมื่อเติมลงไปในอาหารนับว่าเป็นสิ่งสำคัญอย่างยิ่ง แต่หลังจากที่รับประทานแบคเทอริโอซินเข้าไปพร้อมกับอาหารแล้วแบคเทอริโอซินนั้นควรจะไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค ข้อดีของแบคเทอริโอซินเมื่อเทียบกับสารถนอมอาหารชนิดอื่นคือจะถูกย่อยหรือทำลายโดยเอนไซม์ในกระเพาะอาหารได้ เช่น ไคโมทริปซิน หรือทริปซิน เป็นต้น อย่างไรก็ตามก่อนที่จะนำแบคเทอริโอซินไปใช้กับอาหารจำเป็นต้องศึกษาเกี่ยวกับอาการข้างเคียงและพิษที่อาจเกิดขึ้นได้ในภายหลังอย่างละเอียด ตลอดจนผลของแบคเทอริโอซินต่อลักษณะทางกายภาพ คุณภาพและรสชาติของอาหารด้วย

แบคเทอริโอซินบางอย่างอาจมีอยู่แล้วในอาหารซึ่งเกิดจากกระบวนการหมักของหัวเชื้อเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่มีอยู่ในอาหารนั่นเอง (Kelly WJ *et al*, 1996; Ahn C and Stiles ME, 1990) เมื่อนำหัวเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียนี้ไปใช้กับอาหารชนิดอื่นและคอยติดตามการสร้างแบคเทอริโอซินออกมายับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์อื่นพบว่าสามารถควบคุมการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการให้มีอยู่ในอาหารได้ ดังนั้นการเติมหัวเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่

ผลิตแบคเทอริโอซินได้ลงในอาหารจึงน่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของการนำไปใช้นอกเหนือจากการเติมเฉพาะแบคเทอริโอซินลงไปในอาหาร

# อุปกรณ์และวิธีการ

## 1. อาหารหมักที่ใช้ในการแยกเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย

อาหารหมักที่ใช้ในการแยกเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย ได้แก่ แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว ผักดองชนิดต่าง ๆ เช่น ผักกาดดอง แดกกวาดอง และต้นหอมดอง เป็นต้น โดยเก็บตัวอย่างมาจากตลาดสด อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี รวมทั้งสิ้นจำนวน 23 ตัวอย่าง

## 2. แบคทีเรียทดสอบ (Indicator organism)

แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบคือ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473, *Streptococcus pneumoniae* DMS 5851, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Klebsiella pneumoniae* ATCC 27736

## 3. การคัดเลือกเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซิน

การคัดเลือกเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้ทำโดยวิธี agar spot assay (Spelhaug SR and Harlander SA, 1989) ดังนี้ นำตัวอย่างอาหารมาทำการเจือจางด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ให้ได้ความเข้มข้นพอเหมาะ แล้วทำ cross streak ลงบนผิวหน้าอาหาร 0.2% glucose MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเททับบนผิวหน้าอาหารด้วย 0.2% glucose MRS soft agar (0.7% agar) ซึ่งผสมอยู่กับ overnight culture ของเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 ($10^8$ colony forming unit (cfu)/มิลลิลิตร) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกต inhibition zone ที่เกิดขึ้นรอบโคโลนีของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย เลือกโคโลนีที่ให้ inhibition zone มาเก็บใน MRS broth ที่มี 20% glycerol สามารถเก็บไว้ได้นานที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

## 4. การเตรียม culture supernatant ของแลคติคแอสิดแบคทีเรีย

เลี้ยงแลคติคแอสิดแบคทีเรียในอาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บของเหลวใส (culture supernatant) ซึ่งปราศจากเซลล์มากรองด้วย sterile membrane filter (ขนาด pore size เท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร) แล้วเก็บไว้ทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อแบคทีเรียทดสอบในขั้นต่อไป

**5. การทดสอบการสร้างแบคเทอริโอซินใน culture supernatant**

การทดสอบการสร้างแบคเทอริโอซินใน culture supernatant ของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียทำโดยวิธี swab-paper disc method (พงศ์ศักดิ์ และปาริชาติ, 2541) โดยนำ culture supernatant ปริมาตร 25 ไมโครลิตรหยดลงบน paper disc ซึ่งวางอยู่บนอาหาร MRS agar ที่ป้ายผิวหน้าอาหารให้ทั่วด้วยเชื้อแบคทีเรียทดสอบแล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกต inhibition zone ที่เกิดขึ้นรอบ paper disc

การหาปริมาณของแบคเทอริโอซินทำได้โดยการนำ cuture supernatant ที่พบว่ามี bacteriocin activity ไปเจือจางแบบ serial two-fold dilution เป็น 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 และ 1:128 ตามลำดับ แล้วจึงนำไปทดสอบโดยวิธี swab-paper disc method รายงานปริมาณของแบคเทอริโอซินเป็นค่า Arbitary unit (AU)/มิลลิลิตร ซึ่งหมายถึงส่วนกลับของค่าความเจือจางสูงสุดที่ยังสามารถตรวจพบ inhibition zone

**6. การทดสอบผลของ proteolytic enzymes และความร้อนต่อแบคเทอริโอซิน**

การทดสอบผลของ proteolytic enzyme ต่อแบคเทอริโอซินทำโดยนำ culture supernatant ที่ผ่านการกรองด้วย sterile membrane filter และทดสอบแล้วว่ามี bacteriocin activity มาเติม proteinase K (1.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 โดยวิธี swab-paper disc method ส่วนการทดสอบผลของความร้อน ทำโดยนำ culture supernatant ที่ผ่านการกรองด้วย sterile membrane filter และทดสอบแล้วว่ามี bacteriocin activity ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10, 20 และ 30 นาที จากนั้นนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 โดยวิธี swab-paper disc method

**7. การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นของแบคเทอริโอซิน**

การทดสอบความสามารถของแบคเทอริโอซินในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นนอกเหนือจากเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 แบคทีเรียที่นำมาทดสอบคือ *Streptococcus pneumoniae* DMS 5851, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Klebsiella pneumoniae* ATCC 27736 โดยใช้วิธี swab-paper disc method โดยนำ overnight culture ของเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดซึ่งเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสม (*Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Escherichia coli* และ *Klebsiella pneumoniae* เลี้ยง nutrient broth ส่วน *Streptococcus pneumoniae* เลี้ยงใน MRS broth) ไปป้ายบนผิวหน้าอาหารแข็งชนิดเดียวกันกับที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียนั้น หยด culture supernatant ของแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินลงบน paper

disc ที่วางอยู่บนผิวหน้าอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกต inhibition zone

**8. การหาระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน**

การหาระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน ทำโดยนำ overnight culture ของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย 100 ไมโครลิตร เติมลงใน 0.2% glucose MRS broth (12 มิลลิลิตร) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง โดยเริ่มจากชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 36, 48 และ 60 ตามลำดับ การเก็บตัวอย่างแต่ละครั้งจะเก็บมาครั้งละ 1.5 มิลลิลิตร นำไปเตรียม culture supernatant กรองด้วย sterile membrane filter แล้วนำไปหาปริมาณของแบคเทอริโอซินโดยวิธี swab-paper disc method และรายงานเป็นค่า AU/มิลลิลิตร

**9. การศึกษากลไกการทำลายเชื้อแบคทีเรียทดสอบโดยแบคเทอริโอซิน**

การศึกษากลไกการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อแบคทีเรียทดสอบทำได้โดยการนำ culture supernatant ที่ผ่านการกรองด้วย sterile membrane filter ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาเติมลงในหลอดที่มี overnight culture ของเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร จากนั้นเก็บตัวอย่างของเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 ที่เวลา 0, 30, 60, 90 และ 120 นาที นำไปวัดค่าความขุ่น (OD เท่ากับ 650 นาโนเมตร) และนับจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตโดยวิธี plate count method ใช้ MRS broth แทน culture supernatant เป็น control

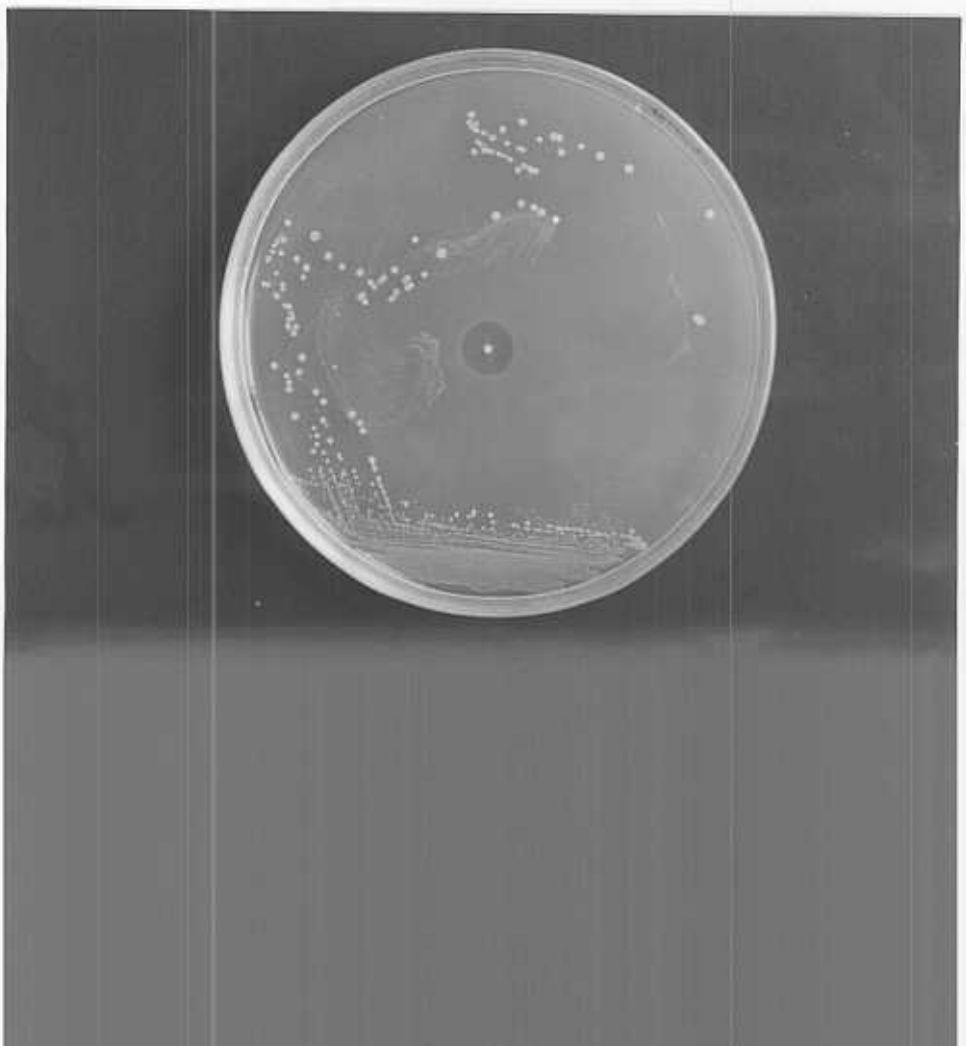
**10. การจำแนกชนิดของแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่ผลิตแบคเทอริโอซิน**

แลคติคแอสิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้จะนำไปจำแนกชนิดในระดับสกุล (genus) ตามวิธีของ Schillinger โดยอาศัยการศึกษาลักษณะรูปร่าง การติดสีแกรม และการทดสอบทางชีวเคมี (Schillinger U and Lucke F-K, 1987)

## ผลการทดลอง

การคัดเลือกเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้จากตัวอย่างอาหารจำนวน 23 ตัวอย่างด้วยวิธี agar spot assay โดยใช้ 0.2% glucose MRS agar เป็น selective media และใช้แบคทีเรียทดสอบคือ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 พบว่ามี 10 isolates จาก 4,673 isolates (0.21%) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบได้ โดยจะพบ inhibition zone เกิดขึ้นรอบโคโลนีของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย (รูปที่ 1) เชื้อที่คัดเลือกได้แยกมาจากอาหาร 2 ชนิดคือ กระหล่ำดอง 7 isolates (SK1.1, SK2.1, SK3.1, SK1.2, SK2.2, SK4.1 และ SK5.1) และหอมดอง 3 isolates (FS1.4, FS2.4 และ FS1.10)

เมื่อนำเชื้อทั้ง 10 isolates ที่ให้ผลบวกในการทดสอบโดยวิธี agar spot assay ไปทดสอบโดยนำ culture supernatant ของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียไปยับยั้งการเจริญต่อเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 โดยวิธี swab-paper disc method พบว่ามี 9 isolates ที่ยังคงยับยั้งการเจริญต่อเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 โดยปรากฏเป็น inhibition zone เกิดขึ้นรอบ paper disc ส่วนอีก 1 isolate (SK2.2) ไม่พบ inhibition zone เกิดขึ้นเลย (ตารางที่ 1)

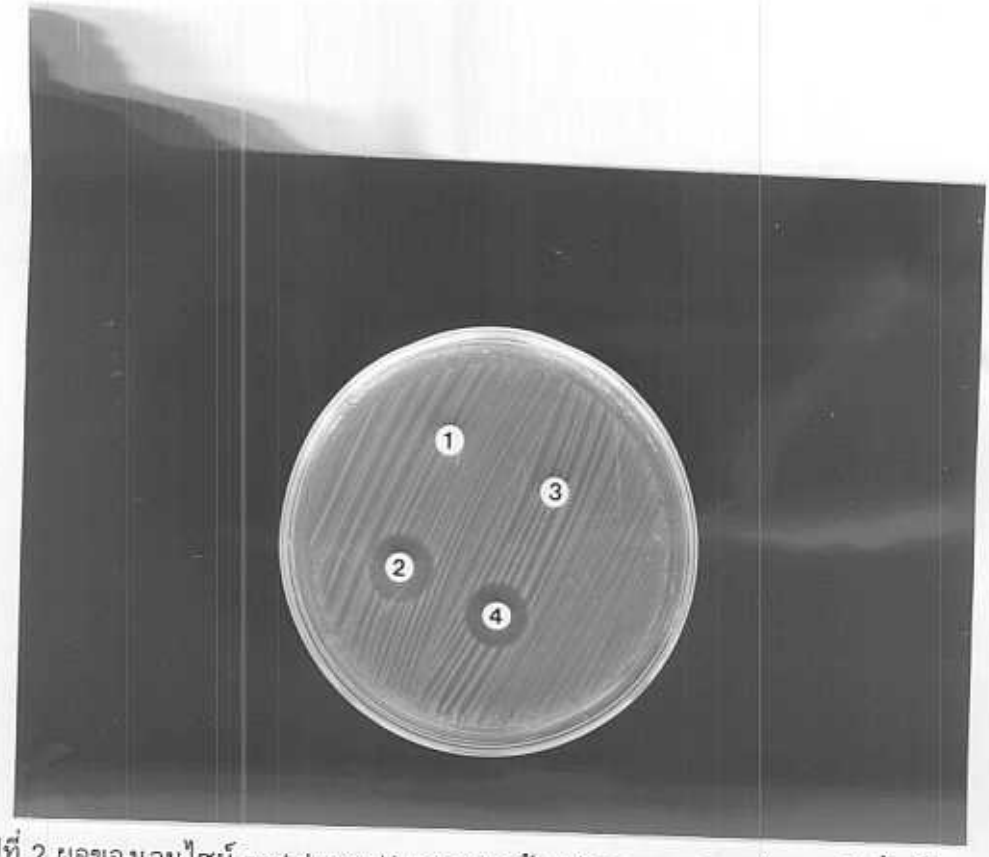


| เชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย | ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone (มิลลิเมตร) |
|---|---|
| SK1.1 | 11 |
| SK2.1 | 12 |
| SK3.1 | 11 |
| SK1.2 | 12 |
| SK2.2 | ไม่เกิด inhibition zone |
| SK4.1 | 10 |
| SK5.1 | 9 |
| FS1.4 | 12 |
| FS2.4 | 10 |
| FS1.10 | 12 |

ตารางที่ 1 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone ที่เกิดขึ้นรอบ paper disc เมื่อทดสอบความสามารถของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 โดยวิธี swab-paper disc method

เมื่อทดสอบความคงตัว (stability) ของแบคเทอริโอซินต่อ proteolytic enzyme โดยนำ culture supernatant ของแลคติคแอสิดแบคทีเรียทั้ง 9 isolates ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบได้ มาเติมเอนไซม์ proteinase K แล้วนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อแบคทีเรียทดสอบอีกครั้งโดยวิธี swab-paper disc method พบว่าความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อแบคทีเรียทดสอบของแบคเทอริโอซินจะสูญเสียไป โดยจะไม่พบ inhibition zone เกิดขึ้นเลย (รูปที่ 2) การทดสอบผลของความร้อนต่อแบคเทอริโอซินโดยนำ culture supernatant ของแลคติคแอสิดแบคทีเรียไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10, 20 และ 30 นาที แล้วนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อแบคทีเรียทดสอบโดยวิธี swab-paper disc method ปรากฏว่าความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อแบคทีเรียทดสอบยังคงมีอยู่เช่นเดิม (รูปที่ 2)

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งของแบคเทอริโอซินใน culture supernatant ของแลคติคแอสิดแบคทีเรียทั้ง 9 isolates ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบชนิดอื่นนอกเหนือจาก *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 ได้แก่ *Streptococcus pneumoniae* DSM 5851, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Klebsiella pneumoniae* ATCC 27736 โดยวิธี swab-paper disc method พบว่าเชื้อแบคทีเรียทุกชนิดไม่ถูกยับยั้งโดยแบคเทอริโอซิน (ตารางที่ 2)




รูปที่ 2 ผลของเอนไซม์ proteinase K และความร้อนต่อความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 ของแบคเทอริโอซินใน culture supernatant ของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย (เชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่ใช้ในที่นี้คือเชื้อ SK2.1)
1 = MRS broth (control); 2 = culture supernatant ของเชื้อ SK2.1; 3 = culture supernatant ของเชื้อ SK2.1 + proteinase K; 4 = culture supernatant ของเชื้อ SK2.1 + heat (100°c, 30 min)

| แบคทีเรียทดสอบ | แลคติคแอสิดแบคทีเรีย | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | SK 1.1 | SK 2.1 | SK 3.1 | SK 1.2 | SK 4.1 | SK 5.1 | FS 1.4 | FS 2.4 | FS 1.10 |
| *L. mesenteroides* TISTR 473 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| *S. pneumoniae* DSM 5851 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| *S. aureus* ATCC 25923 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| *B. cereus* ATCC 11778 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| *E. coli* ATCC 25922 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| *K. pneumoniae* ATCC 27736 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

ตารางที่ 2 การทดสอบความสามารถของแบคเทอริโอซินในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น

เชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้ทั้ง 9 isolates เมื่อนำไปจำแนกชนิดในระดับสกุลตามวิธีของ Schillinger ปรากฏว่า 7 isolates คือ SK1.1, SK2.1, SK3.1, SK1.2, SK5.1, FS1.4 และ FS1.10 เป็นเชื้อในสกุล *Lactococcus* ส่วนอีก 2 isolates คือ SK4.1 และ FS2.4 เป็นเชื้อในสกุล *Pediococcus* (ตารางที่ 3)

| ลักษณะของเชื้อและการทดสอบทางชีวเคมี | แลคติคแอสิดแบคทีเรีย | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | SK 1.1 | SK 2.1 | SK 3.1 | SK 1.2 | SK 4.1 | SK 5.1 | FS 1.4 | FS 2.4 | FS 1.10 |
| gram stain | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| catalase test | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| gas from glucose | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| morphology | cocci | cocci | cocci | cocci | cocci | cocci | cocci | cocci | cocci |
| tetrads | - | - | - | - | + | - | - | + | - |
| growth at 45°C | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| growth at 10°C | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

ตารางที่ 3 ลักษณะของเชื้อและผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้

ในการศึกษาระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน และกลไกการทำลายเชื้อแบคทีเรียของแบคเทอริโอซิน ได้เลือกเฉพาะเชื้อ SK2.1 มาใช้ในการศึกษา โดยเชื้อ SK2.1 เป็นหนึ่งในเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญต่อเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 ได้ดีที่สุด

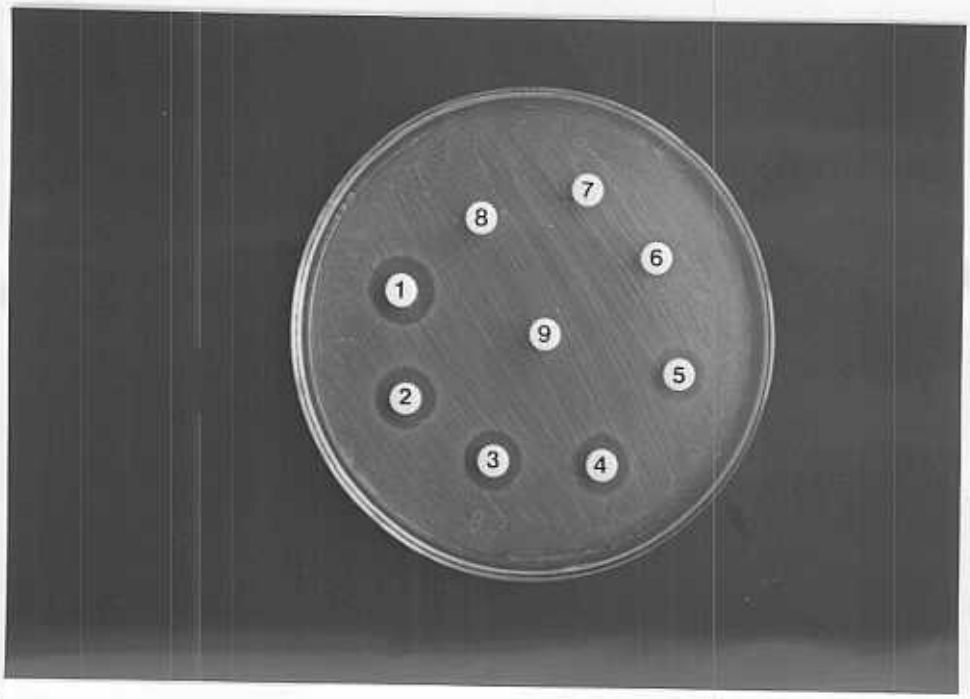
เมื่อนำเชื้อ SK2.1 ไปเลี้ยงในอาหาร MRS broth และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมงโดยเริ่มตั้งแต่ 0 ถึง 60 ชั่วโมง แล้วนำ culture supernatant ที่เวลาต่าง ๆ ไปเจือจางแบบ serial two-fold dilution เพื่อตรวจหาปริมาณแบคเทอริโอซินโดยวิธี swab-paper disc method พบว่าเชื้อ SK2.1 สร้างแบคเทอริโอซินออกมามากที่สุดที่เวลา 24 ชั่วโมง โดยสามารถตรวจพบ inhibition zone ได้ที่ระดับความเจือจางสูงสุดเท่ากับ 1:16 หรือมีปริมาณแบคเทอริโอซินเป็น 640 AU/มิลลิลิตร (ตารางที่ 4 และรูปที่ 3)

การทดสอบกลไกการทำลายเชื้อแบคทีเรียทดสอบโดยแบคเทอริโอซิน โดยการเติม culture supernatant ของเชื้อ SK2.1 ลงไปในหลอดที่มี overnight culture ของเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 แล้วเก็บตัวอย่างที่เวลาต่าง ๆ (0, 30, 60, 90 และ 120 นาที) มาวัดค่าความขุ่น (OD 650 นาโนเมตร) และนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (control) ซึ่งทำเช่นเดียวกันแต่ใช้ MRS broth แทน culture supernatant ของเชื้อ SK2.1 พบว่าทุกช่วงเวลาที่นำตัวอย่างออกมาวัดค่าความขุ่นจะให้ค่า OD ที่ไม่แตกต่าง

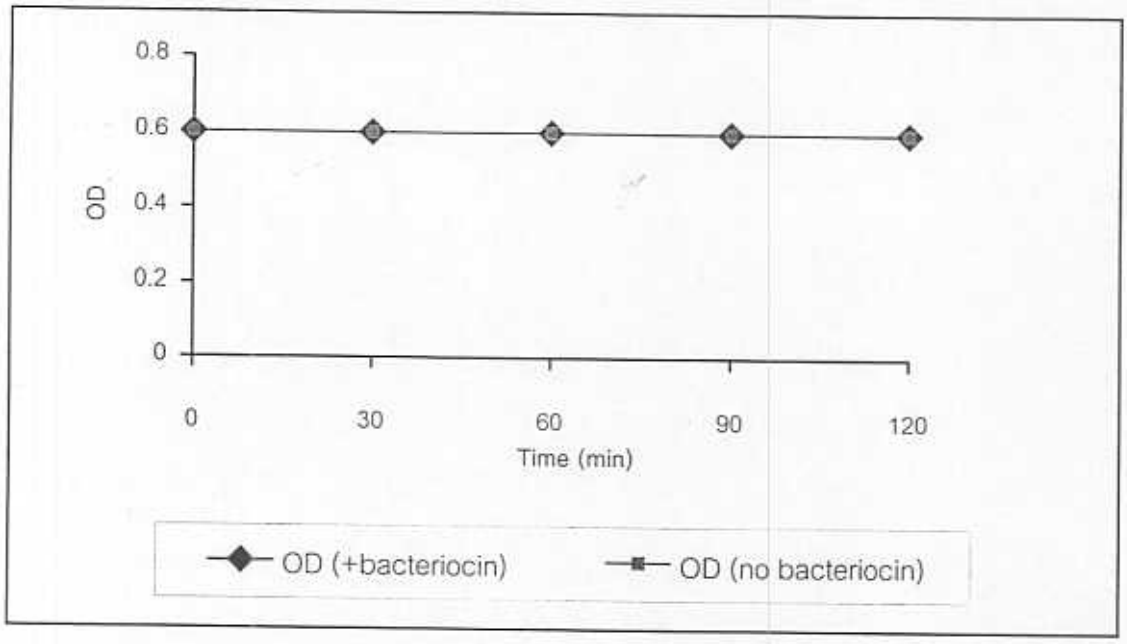
กันและยังให้ค่าเท่ากันกับชุดควบคุมด้วย แต่เมื่อนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตโดยวิธี plate count method กลับพบว่ามีจำนวนเซลล์ลดลงและแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างเห็นได้ชัด (รูปที่ 4 และรูปที่ 5)

| ระดับความเจือจาง | เวลา (ชั่วโมง) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 12 | 24 | 36 | 48 | 60 |
| undiluted | - | + | + | + | - | + |
| 1:2 | - | + | + | + | + | + |
| 1:4 | - | + | + | + | + | + |
| 1:8 | - | + | + | + | + | + |
| 1:16 | - | - | + | - | - | - |
| 1:32 | - | - | - | - | - | - |
| 1:64 | - | - | - | - | - | - |
| 1:128 | - | - | - | - | - | - |

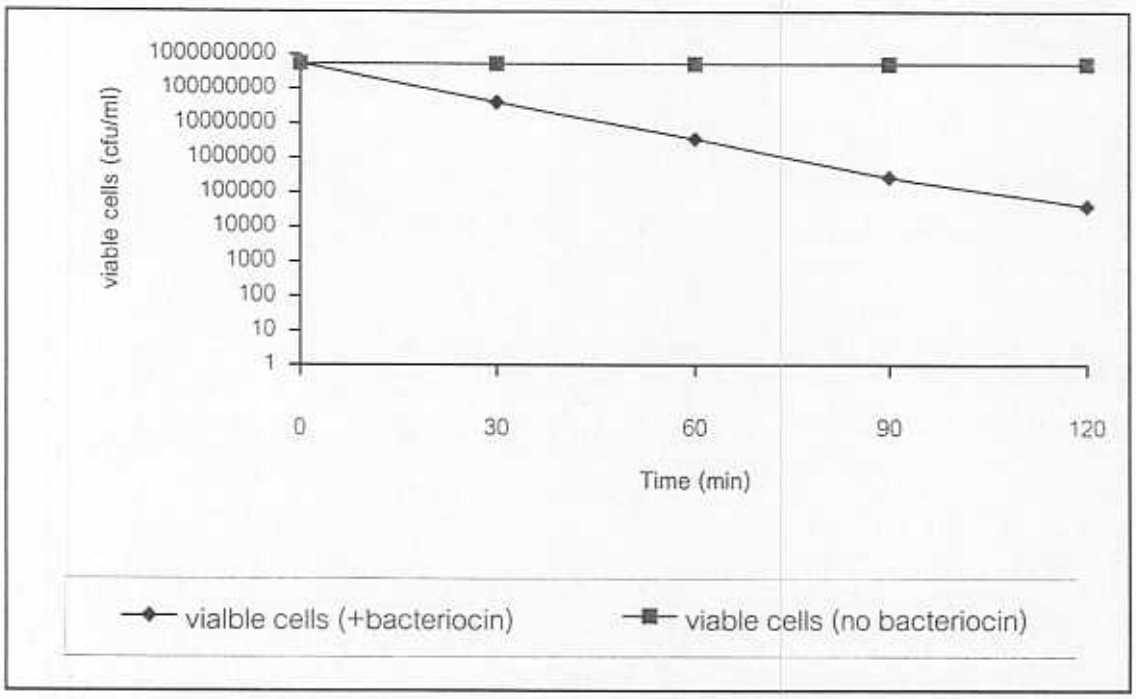
ตารางที่ 4 ผลการยับยั้งเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 โดย culture supernatant ของเชื้อ SK 2.1 ที่บ่มที่เวลาต่าง ๆ :
+ = พบ inhibition zone ; - = ไม่พบ inhibition zone




รูปที่ 3 ความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 โดยแบคเทอริโอซินใน culture supernatant ของเชื้อ SK2.1 ที่บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง : 1 = undiluted; 2 = 1:2; 3 = 1:4; 4 = 1:8; 5 = 1:16; 6 = 1:32; 7 = 1:64; 8 = 1:128 และ 9 = MRS broth (control)




รูปที่ 4 ผลของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดยเชื้อ SK2.1 ต่อความขุ่นของเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473




รูปที่ 5 ผลของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดยเชื้อ SK2.1 ต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473

## วิจารณ์ผลการทดลอง

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการคัดเลือกเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินจากอาหารหมัก เชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่แยกได้จำนวน 4,673 isolates เมื่อทดสอบความสามารถในการสร้างแบคเทอริโอซินโดยวิธี agar spot assay พบว่ามีเพียง 10 isolates เท่านั้นที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินมายับยั้งการเจริญของเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 ซึ่งใช้เป็นแบคทีเรียทดสอบได้ เมื่อคิดเป็นเปอร์เซนต์การตรวจพบ (detection rate) จะได้เท่ากับ 0.21% ซึ่งใกล้เคียงกันมากกับเปอร์เซนต์การตรวจพบที่รายงานโดย Coventry และคณะ (Coventry MJ *et al*, 1997) อย่างไรก็ตามเปอร์เซนต์การตรวจพบเชื้อที่สร้างแบคเทอริโอซินก็อาจแตกต่างกันได้บ้างทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวิธีการที่ใช้ในการตรวจหาและชนิดของอาหารที่นำมาแยกเชื้อ (Garver KI and Muriana PM, 1993)

เมื่อนำเชื้อที่แยกได้ทั้ง 10 isolates ไปทดสอบการสร้างแบคเทอริโอซินโดยวิธี swab-paper disc method พบว่ามี 9 isolates ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 ส่วนเชื้ออีก 1 isolate (SK2.2) ที่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 ได้ การที่ผลการทดสอบการสร้างแบคเทอริโอซินของสองวิธีนี้แตกต่างกันเนื่องจากวิธี swab-paper disc method นำเฉพาะ culture supernatant ของเชื้อมาทดสอบ ดังนั้นเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่สร้างและหลั่งแบคเทอริโอซินออกมานอกเซลล์เท่านั้นจึงจะสามารถตรวจพบว่าสร้างแบคเทอริโอซินได้โดยวิธีนี้ ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Geis และคณะ (Geis A *et al*, 1983) ซึ่งพบว่าจากเชื้อ *Streptococcus lactis* subsp. *cremoris* จำนวน 36 สายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบได้เมื่อทดสอบโดยวิธี agar spot assay มีเพียงสายพันธุ์เดียวเท่านั้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบได้เมื่อนำ culture supernatant ไปทดสอบ

ถึงแม้ว่าเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียจะสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญต่อเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นได้อีกนอกเหนือจากแบคเทอริโอซิน เช่น กรดอินทรีย์ (organic acid) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) (Daeschel MA, 1989) แต่ในการทดลองนี้อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียมีส่วนประกอบของกลูโคสลดลงเหลือเพียงแค่ 0.2% เท่านั้น ความเข้มข้นของกลูโคสในระดับนี้จะทำให้เชื้อสร้างกรดออกมาน้อยมากจนไม่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบได้ แต่สาเหตุที่ทำให้น่าเชื่อว่าสารที่เชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียสร้างและหลั่งออกมายับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบในการทดลองนี้เป็นแบคเทอริโอซินคือ เมื่อนำ culture supernatant ไปเติม proteinase K ซึ่งเป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีนแล้วนำกลับมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อการเจริญของแบคทีเรียทดสอบอีกครั้งปรากฏว่า culture supernatant นั้นกลับสูญเสียความสามารถในการยับยั้งไป แสดงว่าสารยับยั้งดังกล่าวนี้น่าจะเป็นโปรตีนซึ่งเป็นคุณสมบัติของแบคเทอริโอซินไม่ใช่ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Tichaczek PS *et al*, 1992; Muriana PM and Klaenhammer TR, 1991)

เมื่อศึกษาผลของความร้อนต่อแบคเทอริโอซินพบว่าแบคเทอริโอซินที่สร้างจากเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียทั้ง 9 isolates สามารถทนความร้อนอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสได้เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที การที่แบคเทอริโอซินซึ่งเป็นสารจำพวกโปรตีนแต่สามารถทนความร้อนสูงได้น่าจะเป็นเพราะแบคเทอริโอซินนั้นมีขนาดเล็กหรือประกอบด้วยกรดอะมิโนเพียงไม่กี่ตัวจึงไม่มีโครงสร้างซับซ้อน (complex structure) เหมือนกับโปรตีนขนาดใหญ่ ดังนั้นเมื่อถูกความร้อนโครงสร้างของโปรตีนจึงยังไม่เสียสภาพ (denature) และยังสามารถทำงานได้ (Daeschel MA *et al*, 1990; Schillinger U and Lucke F-K, 1989; Daba HS *et al*, 1991)

ความสามารถของแบคเทอริโอซินในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อแบคทีเรียทดสอบจะแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของแบคเทอริโอซิน (Nettles CG and Barefoot SF, 1993) ในการทดลองนี้เมื่อนำแบคเทอริโอซินที่สร้างจากเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียทั้ง 9 isolates ไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบชนิดอื่น ปรากฏว่าไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อที่นำมาทดสอบได้เลย แสดงว่าแบคเทอริโอซินดังกล่าวนี้น่าจะมีความจำเพาะต่อเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 หรือมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ค่อนข้างแคบ (narrow spectrum of inhibitary) (Jack RW *et al*, 1995; Tagg JR *et al*,1976) คุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อได้อย่างจำเพาะนี้ยังช่วยสนับสนุนว่าสารยับยั้งการเจริญที่พบในการทดลองนี้น่าจะเป็นแบคเทอริโอซินไม่ใช่กรดอินทรีย์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Daeschel MA, 1989)

กลไกการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อแบคทีเรียทดสอบของแบคเทอริโอซินส่วนใหญ่เป็นการฆ่าเซลล์ (bactericidal) (Nettles CG and Barefoot SF, 1993) ในการทดลองนี้ได้เลือกเชื้อ *Lactococcus* sp. (SK2.1) ซึ่งให้ inhibition zone กว้างถึง 12 มิลลิเมตร มาศึกษากลไกการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 โดยการวัดความขุ่น (OD) และนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable count) พบว่าแบคเทอริโอซินสามารถทำให้เซลล์แบคทีเรียทดสอบตายโดยเซลล์ไม่แตกสลาย (lysis) เนื่องจากจำนวนเซลล์ลดลงอย่างเห็นได้ชัดในขณะที่ค่าความขุ่นยังคงเดิม แบคเทอริโอซินที่มีกลไกการยับยั้งในลักษณะเดียวกันนี้ได้แก่ gassericin A (Kawai Y *et al*, 1994), pediocin PD-1 (Green G *et al*, 1997) และ plantaricin KW30 (Kelly WJ *et al*, 1996)

*Lactococcus* sp. เป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้หลายชนิด เช่น ดิโพคอคซิน แลคโตสเตรปซิน แลคโตคอคซิน และไนซิน เป็นต้น (Davey GP, 1981; Kozak W *et al*, 1987; Geis A *et al*, 1983; Buchman GW *et al*, 1988) ดังนั้นสิ่งที่น่าจะทำการศึกษาต่อไปคือจำแนกสปีชีส์ของ *Lactococcus* sp. ที่แยกได้ ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและชีวภาพของแบคเทอริโอซินที่เชื้อสร้างและปัจจัยที่มีผลต่อการสร้าง ตลอดจนยีนที่ควบคุมการสร้างแบคเทอริโอซินชนิดนี้

# สรุปผลการทดลอง

ในการศึกษานี้สามารถตรวจพบเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียจำนวน 9 isolates ที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินออกมายับยั้งการเจริญต่อ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 เชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียทั้ง 9 isolates ดังกล่าวเป็นเชื้อ *Lactococcus* sp. จำนวน 7 isolates และเชื้อ *Pediococcus* sp. จำนวน 2 isolates แบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียทั้ง 9 isolates มีคุณสมบัติคล้ายกับแบคเทอริโอซินโดยทั่วไป คือ ไวต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีน ทนต่อความร้อนได้ดี และมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อแบคทีเรียแบบจำเพาะ ในจำนวนเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียทั้ง 9 isolates ดังกล่าว เชื้อ SK2.1 (*Lactococcus* sp.) เป็นเชื้อหนึ่งที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 ได้ดีที่สุด และจากการศึกษาคุณสมบัติบางประการของแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ SK2.1 พบว่าแบคเทอริโอซินดังกล่าวจะถูกผลิตออกมาได้มากที่สุดเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ SK2.1 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเชื้อ SK2.1 สามารถยับยั้งการเจริญต่อ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 ในลักษณะที่ทำให้เซลล์ตายโดยเซลล์ไม่แตกสลาย

# เอกสารอ้างอิง


1. พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ และปาริชาติ พุ่มขจร. 2541. วิธีการอย่างง่ายในการทดสอบการสร้างแบคเทอริโอซิน. วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 26(4): 281-288.
2. Ahn C and Stiles ME. 1990. Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged meats. J. Appl. Bacteriol. 69: 302-310.
3. Bhunia AK, Johnson MC and Ray B. 1988. Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. J. Appl. Bacteriol. 65: 261-268.
4. Blom H, Katla T, Holck A, Sletten K Axelsson L and Holo H. 1999. Characterization, production, and purification of leucocin H, a two-peptide bacteriocin from *Leuconostoc* MF215B. Current Microbiol. 39: 43-48.
5. Buchman GW, Banerjee S and Hansen JN. 1988. Structure, expression and evolution of a gene encoding the precursor of nisin, a small protein antibiotic. J. Biol. Chem. 263: 16260-16266.
6. Coventry MJ, Gordon JB, Wilcock A, Harmark K, Davidson BE, Hickey MW, Hiller AJ and Wan J. 1997. Detection of bacteriocins of lactic acid bacteria isolated from foods and comparison with pediocin and nisin. J. Appl. Microbiol. 83: 248-258.
7. Daba H, Pandian S Gosselin JF Simard RE, Huang J and Lacroix C. 1991. Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*. Appl. Environ. Microbiol. 57: 3450-3455.
8. Daeschel MA. 1989. Antimicrobila substance from lactic acid bacteria for use as food preservatives. Food Tech. 43: 164-167.
9. Daeschel MA, McKenney MC and McDonald LC. 1990. Bactericidal activity of *Lactobacillus plantarum* C-11. Food Microbiol. 7: 91-98.
10. Davey GP. 1981. Mode of action of diplococcin, a bacteriocin from *Streptococcus cremoris* 346. N. Zeal. J. Dairy Sci. Technol. 16: 187-190.
11. DeKlerk HC and Smit JA. 1967. Properties of a *Lactobacillus fermenti* bacteriocin. J. Gen. Microbiol. 48: 309-316.
12. De Vuyst L and Vandamme EJ. 1993. Lactic acid bacteria and bacteriocins : their practical importance. pp 1-12. *In* De Vuyst L and Vandamme EJ (ed.). Bacteriocin of lactic acid bacteria : microbiology, genetics and applications. Academic Press, Inc., California.

13. Garver KI and Muriana PM. 1993. Detection, identification and characterization of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from retail food products. Int. J. Food Microbiol. 19: 241-258.
14. Geis A, Singh J and Teuber M. 1983. Potential of lactic streptococci to produce bacteriocin. Appl. Environ. Microbiol. 45: 205-211.
15. Green G, Dicks LMT, Bruggeman G, Vandamme EJ and Chikindas ML. 1997. Pediocin PD-1, a bactericidal antimicrobial peptide from *Pediococcus damnosus* NCFB 1832. J. Appl. Microbiol. 83: 127-132.
16. Hastings JW, Sailer M, Johnson K, Roy KL, Vederas JC and Stiles ME. 1991. Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidium*. J. Bacteriol. 173: 7491-7500.
17. Henderson JT Chopko AL and van Wassenaar PD. 1992. Purification and primary structure of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC-1.0. Arch. Biochem. Biophysics. 295: 5-12.
18. Itoh T, Fujimoto Y, Kawai Y, Toba T and Saito T. 1995. Inhibition of food-borne pathogenic bacteria by bacteriocin from *Lactobacillus gasseri*. Letter in Appl. Microbiol. 21: 137-141.
19. Jack RW, Tagg JR and Ray B. 1995. Bacteriocin of gram positive bacteria. Microbiol Rev. 59: 171-200.
20. Joerger MC and Klaenhammer TR. 1986. Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. J. Bacteriol. 167: 439-446.
21. Kawai Y, Saito T, Toba T, Samant SK and Itoh T. 1994. Isolation and characterization of a highly hydrophobic new bacteriocin (gassericin A) from *Lactobacillus gasseri* LA 39. Bioscien. Biotech. Biochemis. 58: 1218-1221.
22. Kelly WJ, Asmundson RV and Huang CM. 1996. Isolation and characterization of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from ready-to-eat food products. J. Food Microbiol. 33: 209-218.
23. Klaenhammer TR. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 12: 39-86.
24. Kozak W, Bardwoski J and Dobrzanski WT. 1978. Lactostrepcins-acid bacteriocins produced by lactic streptococci. J. Dairy Res. 45: 247-257.
25. Montville TJ and Kaiser AL. 1993. Antimicrobial proteins : classification, nomenclature, diversity, and relationship to bacteriocins. pp 1-22. *In* Hoover DG and

Steenson LR (ed.). Bacteriocins lactic acid bacteria. Academic Press, Inc., California.

26. Mortvedt CI, Nissen-Meyer J, Stetten K and Nes IF. 1991. Purification and amino acid sequence of lactocin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* L45. Appl. Environ. Microbiol. 57: 1829-1834.
27. Muriana PM and Klaenhammer TR. 1991. Purification and partial characterization of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. Appl. Environ. Microbiol. 57: 114-121.
28. Nettles CG and Barefoot SF. 1993. Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. J. Food Prot. 56(4): 338-356.
29. Schillinger U and Lucke F-K. 1987. Identification of lactobacilli from meat and meat products. Food Microbiol. 4: 199-208.
30. Schillinger U and Lucke F-K. 1989. Antimicrobial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. Appl. Environ. Microbiol. 55: 1901-1906.
31. Schillinger U, Kaya M and Lucke F-K. 1991. Behaviour of *Listeria monocytogenes* in meat and its control by bacteriocin-producing strain of *Lactobacillus sake*. J. Appl. Bacteriol. 70: 473-478.
32. Spelhaug SR and Harlander SA. 1989. Inhibition of food borne bacterial pathogens by bacteriocins from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceus*. J. Food Prot. 52: 856-862.
33. Stevens KA, Sheldon BW, Klapes NA and Klaenhammer TR. 1992. Effect of treatment conditions on nisin inactivation of gram-negative bacteria. J. Food Prot. 55: 763-766.
34. Stoffels G, Nes IF and Gudmundsdottir A. 1992. Isolation and properties of a bacteriocin-producing *Carnobacterium piscicola* isolated from fish. J. Appl. Bacteriol. 73: 309-316.
35. Tagg JR, Dajani AS and Wannamaker LW. 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. Bacteriol. Rev. 40(3): 722-756.
36. Tahara T and Kanatani K. 1996. Isolation, partial characteization and mode of action of acidocin J 1229, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*JCM 1229. J. Appl. Bacteriol. 81: 669-677.
37. Tichaczek PS, Meyer NJ, Nes IF, Vogel RF and Hammes WP. 1992. Characterization of the bacteriocins curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH1174 and sakacin P from *L. sake* LTH673. System. Appl. Microbiol. 15: 460-468.

38. van Laack RLJM, Schillinger U and Holzapfel WH. 1992. Characterization and partial purification of a bacteriocin produced by *Leuconostoc carnosum* LA44A. Int. J. Food Microbiol. 16: 183-195.

39. West CA and Warner PJ. 1988. Plantacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* NCDO 1193. FEMS Microbiol. Lett. 49: 163-165.