Ubon Rajathanee University

รายงานผลงานวิจัย

เรื่อง

การศึกษาสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างแบคเทอริโอซินของเชื้อ *Lactococcus* sp. ที่แยกได้จากอาหารหมัก

Study of cultural conditions for the growth and bacteriocin production of *Lactococcus* sp. isolated from fermented food

โดย

นางปาริชาติ พุ่มขจร

ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ซึ่งได้รับเงินทุนสนับสนุนการวิจัยประจำปี 2544 จากสภาวิจัยแห่งชาติ

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

คำนำ

รายงานฉบับนี้เป็นรายงานผลงานวิจัยเรื่อง "การศึกษาสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างแบคเทอริโอซินของเชื้อ *Lactococcus* sp. ที่แยกได้จากอาหารหมัก" (Study of cultural conditions for the growth and bacteriocin production of *Lactococcus* sp. isolated from fermented food) ซึ่งได้รับเงินทุนสนับสนุนการวิจัยประจำปี 2544 จากสภาวิจัยแห่งชาติ งานวิจัยดังกล่าวนี้ได้ดำเนินการโดยมี นางปาริชาติ พุ่มขจร เป็นหัวหน้าโครงการ และมีนายพงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ เป็นผู้ร่วมโครงการ

ขอขอบคุณสภาวิจัยแห่งชาติ และคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่สนับสนุนให้งานวิจัยดังกล่าวดำเนินไปได้ด้วยดีตลอดโครงการ

.....

(นางปาริชาติ พุ่มขจร)
หัวหน้าโครงการ

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	1
บทนำ	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	14
ผลการทดลอง	16
วิจารณ์ผลการทดลอง	26
สรุปผลการทดลอง	28
เอกสารอ้างอิง	29

Ubon Rajathanee University

บทคัดย่อ

Lactococcus sp. สามารถผลิตแบคเทอริโอซินไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้ การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *Lactococcus* sp. โดยเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่เวลาต่าง ๆ ติดต่อกันเป็นเวลา 60 ชั่วโมง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร แล้วสร้างกราฟการเจริญเติบโตของเชื้อ เชื้อสามารถเจริญได้ทั้ง 3 ระดับอุณหภูมิ โดยเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ส่วนที่อุณหภูมิ 20 และ 25 องศาเซลเซียส เชื้อสามารถเจริญได้ใกล้เคียงกัน การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างแบคเทอริโอซินของเชื้อ *Lactococcus* sp. โดยเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่เวลาต่าง ๆ ติดต่อกันเป็นเวลา 60 ชั่วโมง นำส่วนใสปราศจากเซลล์มาหาค่าแบคเทอริโอซินแอคติวิตี้ โดยวิธี swab-paper disc ทุกอุณหภูมิที่ศึกษาสามารถตรวจวัดแบคเทอริโอซินแอคติวิตี้ได้ตั้งแต่เชื้อเจริญอยู่ในระยะก่อนเข้าสู่ stationary phase โดยมีค่าแบคเทอริโอซินแอคติวิตี้สูงสุดเมื่อเข้าสู่ระยะ stationary phase เท่ากับ 1,067, 1,067 และ 2,133 AU/มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 37 องศาเซลเซียส ตามลำดับ แบคเทอริโอซินแอคติวิตี้จะคงอยู่เป็นระยะเวลาหนึ่งแล้วจึงค่อย ๆ ลดลง

บทนำ

แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) เป็นสารประกอบโปรตีนซึ่งถูกสร้างขึ้นโดยเชื้อจุลินทรีย์และมีฤทธิ์ไปฆ่าหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์อื่นที่อยู่ในสปีชีส์ (species) เดียวกันหรือสปีชีส์ที่ใกล้เคียงกันได้ เนื่องจากแบคเทอริโอซินมีคุณสมบัติเป็นสารยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ทำให้สารดังกล่าวเป็นที่สนใจของนักวิทยาศาสตร์ในช่วงหลายปีที่ผ่านมาในการพัฒนาให้เป็นสารต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อการถนอมอาหาร โดยเฉพาะแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อแลกติกแอสิดแบคทีเรีย (lactic acid bacteria)

เชื้อแลกติกแอสิดแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ รูปร่างเป็นแท่งหรือกลม ส่วนมากจะไม่เคลื่อนที่ ใช้คาร์โบไฮเดรตในการหมักและสร้างกรดแลกติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก เป็นที่ทราบกันดีว่ามีเชื้อแลกติกแอสิดแบคทีเรียหลายชนิดที่มีคุณสมบัติเป็นเชื้อปฏิปักษ์ (antagonist) ต่อเชื้อจุลินทรีย์อื่น เช่น แบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย (food spoilage bacteria) และแบคทีเรียก่อโรค (pathogenic bacteria) เป็นต้น

สารที่แลกติกแอสิดแบคทีเรียสร้างขึ้นเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์อื่น ได้แก่ กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) และแบคเทอริโอซิน เป็นต้น เนื่องจากในบรรดาสารเหล่านี้แบคเทอริโอซินเป็นสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์อื่นได้อย่างจำเพาะ (specific) ดังนั้นแบคเทอริโอซินจึงเป็นที่สนใจในการนำมาใช้เพื่อการถนอมอาหาร โดยการเลือกใช้แบคเทอริโอซินที่สามารถไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย แต่ไม่ไปมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ที่อาศัยอยู่ภายในร่างกาย (normal flora)

ในขั้นตอนการพัฒนาเพื่อที่จะนำเอาแบคเทอริโอซินไปใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ขั้นตอนที่สำคัญขั้นตอนหนึ่งคือขั้นตอนการผลิตแบคเทอริโอซินในปริมาณที่สูงอย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งสามารถทำได้โดยการศึกษาหาสภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างแบคเทอริโอซินของเชื้อจุลินทรีย์ที่สร้างแบคเทอริโอซินที่ต้องการ

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการทดลองเพื่อหาอุณหภูมิ และระยะเวลาการบ่มเชื้อ (incubation time) ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างแบคเทอริโอซินของเชื้อ *Lactococcus* sp. ที่แยกได้จากอาหารหมักและถูกทดสอบแล้วว่าสามารถสร้างแบคเทอริโอซินไปยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่สามารถทำให้อาหารเน่าเสีย

การตรวจเอกสาร

แลกติกแอสิดแบคทีเรีย

แลกติกแอสิดแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้แม้ในสภาวะที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย ประกอบด้วยแบคทีเรียหลายสกุล ได้แก่ *Streptococcus, Enterococcus, Lactococcus, Leuconostoc, Lactobacillus, Pediococcus* และ *Aerococcus* เป็นต้น (De Vusyt and Vandamme, 1994) แลกติกแอสิดแบคทีเรียสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่โดยอาศัยผลผลิตที่เกิดขึ้นหลังเกิดการหมักน้ำตาลกลูโคส คือ homofermentative lactic acid bacteria หมายถึงแลกติกแอสิดแบคทีเรียที่ให้กรดแลกติกเพียงอย่างเดียวหลังการหมักน้ำตาลกลูโคส และ heterofermentative lactic acid bacteria หมายถึงแลกติกแอสิดแบคทีเรียที่ให้ทั้งกรดแลกติก คาร์บอนไดออกไซด์ และเอทธานอลหลังการหมักน้ำตาลกลูโคส แลกติกแอสิดแบคทีเรียมีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมอาหาร โดยใช้เป็นหัวเชื้อ (starter culter) เติมลงในอาหารเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์อาหารหมักตามต้องการ เช่น โยเกิร์ต (yogurt) ชีส (cheese) เนย (butter) ไส้กรอก (sausage) เป็นต้น แลกติกแอสิดแบคทีเรียที่เติมลงไปในอาหารนอกจากจะช่วยในเรื่องกลิ่นและรสชาติของอาหารแล้ว ยังมีบทบาทสำคัญอีกประการหนึ่งคือช่วยยืดอายุของอาหารให้สามารถเก็บไว้ได้นานขึ้น เนื่องจากแลกติกแอสิดแบคทีเรียสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ (antimicrobial substances) ได้แก่ กรดอินทรีย์ (กรดแลกติกและกรดอะซิติก) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ คาร์บอนไดออกไซด์ และแบคเทอริโอซิน เป็นต้น (Daeschel, 1989) แบคเทอริโอซินที่สร้างจากแลกติกแอสิดแบคทีเรียเป็นสารที่นักวิทยาศาสตร์หลายท่านให้ความสนใจ (Garver and Muriana, 1993; Uhlman *et. al.*, 1992; Yildirim and Johnson, 1998) เนื่องจากสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียอื่นได้อย่างจำเพาะ (specific) และสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียได้หลายชนิด (Nettle and Barefoot, 1993) เช่น *Bacillus cereus, Clostridium botulinum, Staphylococcus aureus* และ *Listeria monocytogenes* เป็นต้น ดังนั้นแบคเทอริโอซินหรือแลกติกแอสิดแบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินจึงน่าจะนำไปใช้เป็นสารชีวภาพถนอมอาหาร (food biopreservative) ได้ (Daeschel, 1989) แลกติกแอสิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้ เช่น *Lactococcus lactis, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus brevis, Lactobacillus helveticus, Lactobacillus sake, Streptococcus thermophilus* และ *Pediococcus acidilactici* เป็นต้น

แบคเทอริโอซิน

แบคเทอริโอซินเป็นสารจำพวกโปรตีนหรือมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบซึ่งสร้างจากแบคทีเรีย มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียอื่นได้ (Klaenhammer, 1988) โดยปกติแบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินจะมีภูมิต้านทานต่อฤทธิ์ของแบคเทอริโอซินที่ตนเองสร้าง (Tagg *et. al.*, 1976) การสร้างแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียนั้นเชื่อว่าเพื่อต่อสู้หรือแก่งแย่งในการดำรงชีวิตของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมเดียวกัน แบคทีเรียที่สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญต่อเชื้อแบคทีเรียอื่นได้ก็สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ ส่วนแบคทีเรียอื่นก็จะตายไปในที่สุด (Jack *et. al.*, 1995) แบคเทอริโอซินที่จัดเป็นต้นแบบ (prototype) ที่ใช้ในการศึกษาคือ โคลิซิน (colicin) ซึ่งสร้างจาก *Escherichia coli* (Tagg *et. al.*, 1976) ต่อมาพบว่ามีแบคทีเรียอีกหลายชนิดในวงศ์ *Enterobacteriaceae* สามารถสร้างโคลิซินได้เช่นกัน อย่างไรก็ตามยังมีแบคทีเรียอีกหลายชนิดนอกเหนือจากแบคทีเรียในวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้ แบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียต่างชนิดกันจะมีคุณสมบัติทางเคมีและชีวภาพแตกต่างกัน ปัจจุบันมีแบคเทอริโอซินเพียงชนิดเดียวคือไนซิน (nisin) ซึ่งสร้างจาก *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Buchman *et. al.*, 1988) ถูกนำไปใช้เป็นสารชีวภาพถนอมอาหาร และเป็นที่ยอมรับของทั้ง Food and Drug Administration (FDA) และ World Health Organization (WHO) ว่าปลอดภัยต่อผู้บริโภค ดังนั้นปัจจุบันจึงมีนักวิทยาศาสตร์หลายท่านพยายามที่จะศึกษาเกี่ยวกับแบคเทอริโอซินกันอย่างกว้างขวาง เพื่อจะได้นำแบคเทอริโอซินหรือเชื้อที่สร้างแบคเทอริโอซินมาใช้ประโยชน์ให้มากยิ่งขึ้น

แบคทีเรียหลายสกุลที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้ ได้แก่ *Bacillus, Bacteroides, Brucella, Carnobacterium, Caulobacter, Clostridium, Corynebacterium, Enterobacter, Escherichia, Halobacteria, Klebsiella, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Listeria, Micrococcus, Mycobacterium, Neisseria, Pasteurella, Pediococcus, Propionibacterium, Proteus, Pseudomonas, Salmonella, Sarcina, Serratia, Staphylococcus, Streptococcus* และ *Vibrio* เป็นต้น (Tagg *et. al.*, 1976; Jack *et. al.*, 1995; Nettles and Barefoot, 1993) แบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียเหล่านี้ส่วนใหญ่ได้มีการศึกษาไปบ้างแล้วในด้านคุณสมบัติทางชีวเคมีและการทำให้เป็นแบคเทอริโอซินบริสุทธิ์ (Nettles and Barefoot, 1993) ในช่วง 10 ปีที่ผ่านมาข้อมูลเกี่ยวกับแบคเทอริโอซินในด้านกลไกการทำลายเซลล์จุลินทรีย์หรือจุลินทรีย์เป้าหมาย (target cell) และยีนที่ควบคุมการสร้างและการหลั่งแบคเทอริโอซินออกจากเซลล์ ตลอดจนกลไกการป้องกันตนเองของเซลล์ที่สร้างแบคเทอริโอซินก็เริ่มมีมากขึ้น

การตั้งชื่อและการจัดจำแนกแบคเทอริโอซิน

การตั้งชื่อแบคเทอริโอซินยังไม่ค่อยมีกฎเกณฑ์แน่นอน บางครั้งตั้งชื่อตามชื่อสกุล (genus) แต่บางครั้งตั้งชื่อตามชื่อสปีชีส์ (species) ของเชื้อที่สร้าง (producer strain) แบคเทอริโอซินนั้น เช่น แบคเทอริโอซินที่สร้างจาก *Listeria monocytogenes* อาจมีชื่อว่า ลิสเทอริโอซิน (listeriocins) หรือ โมโนซิน (monocins) แบคเทอริโอซินที่สร้างจาก *Corynebacterium diphtheriae* อาจมีชื่อว่า โครีซิน (corycins) หรือดิพเทอริซิน (diphthericins) แบคเทอริโอซินที่สร้างจาก *Staphylococcus aureus* อาจมีชื่อว่า สแตปไฟโลคอคซิน (staphylococcins) หรือออรีโอซิน (aureocins) เป็นต้น การตั้งชื่อแบคเทอริโอซินบางครั้งอาจลงท้ายด้วยตัวอักษร "e" เช่น สแตปไฟโลคอคซีน (staphylococcine) ลิสเทอริโอซีน (listeriocine) และโครีซีน (corycine) เป็นต้น

แบคทีเรียสปีชีส์เดียวกันบางครั้งอาจสร้างแบคเทอริโอซินต่างชนิดกันได้ ดังนั้นการตั้งชื่อแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียในสปีชีส์เดียวกันจึงจำเป็นต้องเติมชื่อต่อท้ายเพื่อบ่งบอกชนิดหรือที่มาของแบคเทอริโอซินนั้นด้วย ในกรณีนี้คำที่นำมาต่อท้ายชื่อแบคเทอริโอซินอาจเป็นตัวอักษรหรือตัวเลข (Nomura, 1967; Reeves, 1965) ตัวอย่างเช่น โคลิซิน E1-K30 (colicin E1-K30) เป็นแบคเทอริโอซินชนิด (type) E1 ที่สร้างจาก *Escherichia coli* สายพันธุ์ (strain) K30, สเตรปโตคอคซิน A-FF22 (streptococcin A-FF22) เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างจาก group A *Streptococcus* strain FF22 เป็นต้น

แบคทีเรียบางสายพันธุ์อาจสร้างแบคเทอริโอซินมากกว่าหนึ่งชนิด เช่น *Streptococcus faecalis* subsp. *zymogenes* สามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้สองชนิดซึ่งมีคุณสมบัติแตกต่างกัน (Brock *et. al.,* 1963) หรือในทำนองกลับกันแบคเทอริโอซินต่างชนิดกันอาจสร้างจากแบคทีเรียชนิดเดียวกันก็ได้ เช่น เมกาซิน A (megacins A) และ เมกาซิน C (megacins C) สร้างมาจาก *Bacillus megaterium* สายพันธุ์เดียวกัน เป็นต้น (Donoghue, 1972)

แบคเทอริโอซินที่สร้างจากแลกติกแอสิดแบคทีเรียสามารถแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มโดยอาศัยโครงสร้างและคุณสมบัติทางชีวเคมี (Klaenhammer, 1993) คือ (1) class I หรือเรียกว่ากลุ่มแลนไทไบโอติก (lantibiotics) เพราะในโมเลกุลของแบคเทอริโอซินมีแลนไทโอนีน (lantionine) เป็นองค์ประกอบ สามารถแบ่งออกเป็นสองกลุ่มย่อยคือ ชนิด A (type A) และชนิด B (type B) โดยชนิด A มีโครงสร้างเป็นเกลียว (screw-shaped) มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 2,164 ถึง 3,488 ดาลตัน (dalton) ส่วนชนิด B มีโครงสร้างเป็นก้อน (globular-shaped) มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 1,959 ถึง 2,021 ดาลตัน (2) class II เป็นแบคเทอริโอซินที่มีขนาดค่อนข้างเล็ก (น้อยกว่า 10 กิโลดาลตัน) ค่อนข้างทนความร้อน (heat-stable) และไม่มีแลนไทโอนีนเป็นองค์ประกอบ สามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มย่อยคือ class IIa, class IIb และ class IIc โดยอาศัยความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโนที่ปลายทางหมู่อะมิโน (N-terminal) ของสายโพลีเปปไทด์ ลักษณะการทำให้เกิดรู (pore) บนผิวเซลล์เป้าหมาย และการมีหมู่ซัลไฮดริล (sulhydryl group)

เป็นองค์ประกอบในโมเลกุล (3) class III เป็นแบคเทอริโอซินที่มีขนาดค่อนข้างใหญ่ (มากกว่า 30 กิโลดาลตัน) และไม่ทนความร้อน (heat-labile) (4) class IV เป็นแบคเทอริโอซินที่มีสารชีวโมเลกุลอื่นเป็นองค์ประกอบร่วมกับโปรตีน เช่น อาจอยู่ในรูปไลโปโปรตีน (lipoprotein) หรือไกลโคโปรตีน (glycoprotein) เป็นต้น

คุณสมบัติของแบคเทอริโอซิน

องค์ประกอบทางเคมี

แบคเทอริโอซินแต่ละชนิดมีคุณสมบัติแตกต่างกัน ทำให้แบคเทอริโอซินเป็นสารที่มีความหลากหลายค่อนข้างมาก แต่คุณสมบัติที่สำคัญประการหนึ่งของสารที่จัดเป็นแบคเทอริโอซินคือเป็นโปรตีนหรือมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ ดังนั้นการทดสอบว่าสารยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียอื่นนั้นเป็นแบคเทอริโอซินหรือไม่จึงทำได้โดยนำมาทำปฏิกริยากับเอนไซม์ย่อยโปรตีน ได้แก่ ทริปซิน (trypsin) ไคโมทริปซิน (chymotrypsin) โปรเนส (pronase) โปรติเนส K (proteinase K) เปปซิน (pepsin) เป็นต้น (Tagg *et. al.*,1976; Nettles and Barefoot, 1993) หากสารดังกล่าวไวต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีนก็น่าจะมีคุณสมบัติเป็นโปรตีนหรือน่าจะเป็นสารแบคเทอริโอซิน อย่างไรก็ตามแบคเทอริโอซินบางชนิดอาจมีองค์ประกอบอื่นรวมอยู่ในโมเลกุลด้วย เช่น ไขมัน หรือคาร์โบไฮเดรต (Schlegel and Slade, 1972) หากแบคเทอริโอซินไวต่อเอนไซม์ย่อยไขมัน หรือคาร์โบไฮเดรต ก็แสดงว่าน่าจะมีไขมันหรือคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย แบคเทอริโอซินที่มีไขมันและคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบร่วมกับโปรตีน ได้แก่ สแตปไฟโลคอคซิน 414 (staphylococcin 414) และโคลิซิน (colicin) เป็นต้น

การเป็นแอนติเจน

เนื่องจากแบคเทอริโอซินเป็นโปรตีนที่มีขนาดใหญ่หรือมีน้ำหนักโมเลกุลค่อนข้างสูง ดังนั้นจึงมีคุณสมบติเป็นแอนติเจนได้ดี อย่างไรก็ตามการศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติการเป็นแอนติเจนของแบคเทอริโอซินยังมีน้อย แบคเทอริโอซินที่มีการศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติการเป็นแอนติเจนได้แก่ เมกาซิน A-216 (megacin A-216) ซึ่งสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดีได้ (Tagg *et. al.*,1976) นอกจากนี้ยังพบว่าแอนติบอดีที่เกิดขึ้นยังสามารถลบล้างฤทธิ์ (neutralization) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่นของแบคเทอริโอซินนั้นได้ด้วย นอกจากนี้ Tubylewicz ยังสามารถแยกความแตกต่างของแบคเทอริโอซินสี่ชนิดที่สร้างจาก *Clostridium perfringens* ได้โดยอาศัยความแตกต่างของแอนติเจนบนโมเลกุลของแบคเทอริโอซินโดยวิธี double-diffusion test (Tubylewicz, 1970) อย่างไรก็ตามแบคเทอริโอซินบางชนิดก็ไม่มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนหรือไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดีได้ เช่น สเตรปโตคอคซิน A-FF22 (streptococcin A-FF22) (Tagg *et. al.*, 1973) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะโมเลกุลมีขนาดเล็กเกินไป จึงไม่สามารถกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันได้

คุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมี

ขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุลของแบคเทอริโอซินแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันค่อนข้างมาก สามารถแบ่งแบคเทอริโอซินออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่คือ low molegular weight bacteriocin หมายถึงแบคเทอริโอซินที่มีขนาดเล็ก และ high molegular weight bacteriocin หมายถึงแบคเทอริโอซินที่มีขนาดใหญ่ low molegular weight bacteriocin ส่วนใหญ่จะไวต่อเอนไซม์ทริปซิน และสามารถทนความร้อนได้ (Bradley, 1967)

แบคเทอริโอซินบางชนิดอาจมีหลายรูปแบบ (form) เช่น บางชนิดอาจมีสองรูปแบบ หรือบางชนิดมีมากกว่าสองรูปแบบ เป็นต้น แต่ละรูปแบบอาจอยู่แยกกันโดยอิสระ หรืออาจมาเกาะรวมกัน (aggregate) เป็นก้อนหรือโมเลกุลใหญ่ (Tagg *et. al.*, 1976) ทั้งนี้ขึ้นกับ pH และ ionic strength ของสภาวะที่เตรียมแบคเทอริโอซินนั้น

แบคเทอริโอซินบางชนิดอาจมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับคุณสมบัติของแบคเทอริโอฟาจ (bacteriophage) ยาปฏิชีวนะ และเอนไซม์ที่สร้างจากแบคทีเรีย จนทำให้บางครั้งไม่สามารถแยกกันได้อย่างชัดเจน เช่น แบคเทอริโอซินที่สร้างจาก *Clostridium botulinum, Mycobacterium tuberculosis* และ *Listeria monocytogenes* พบว่ามีคุณสมบัติคล้ายกับแบคเทอริโอฟาจ (Inoue and Iida, 1968; Imaeda and Rieber, 1968) เมกาซิน A-216 มีคุณสมบัติคล้ายกับเอนไซม์ฟอสฟอไลเปส A (phospholipase A) (Ozaki *et. al.*, 1966) เป็นต้น นอกจากนี้การตั้งชื่อแบคเทอริโอซินโดยยังไม่ได้ศึกษาในรายละเอียดเกี่ยวกับคุณสมบัติในด้านต่าง ๆ ให้แน่ชัดก็อาจทำให้เกิดการเข้าใจผิดว่าสารนั้นเป็นแบคเทอริโอซิน ทั้งที่แท้จริงแล้วสารดังกล่าวอาจไม่ใช่แบคเทอริโอซินก็เป็นได้

แบคเทอริโอซินที่สร้างจากแลกติกแอสิดแบคทีเรีย

ไนซิน (Nisin) สร้างจาก *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* เป็นแบคเทอริโอซินที่มีการศึกษากันค่อนข้างมาก จัดอยู่ในกลุ่มแลนไทโอดิก ประกอบด้วยกรดอะมิโน 34 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 3,500 ดาลตัน สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้หลายชนิด เช่น *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris, Micrococcus, Staphylococcus aureus, Mycobacterium, Corynebacterium, Listeria monocytogenes* และ *Lactobacillus* สามารถทนความร้อน 100 องศาเซลเซียสได้นานอย่างน้อย 10 นาที ถูกทำลายฤทธิ์โดยไคโมทริปซิน (chymotrypsin) แต่ไม่ถูกทำลายฤทธิ์โดยโปรเนส (pronase) และทริปซิน (trypsin) ในสภาวะที่เป็นกรด อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมได้แก่ milk and buffered complex media แบคเทอริโอซินจะถูกสร้างออกมาในช่วง exponential phase ของการเจริญเติบโตของเชื้อ ในกระบวนการสร้างไนซิน หลังจากผ่านขั้นตอน translation แล้ว ไนซินจะอยู่ในรูปโปรไนซิน (pronisin) ก่อนเมื่อจะถูกส่งออกไปนอกเซลล์จะถูกเอนไซม์ตัดเอาบางส่วนออกไปทำให้กลายเป็นไนซิน ไนซินมี

ฤทธิ์ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เป้าหมาย ยีนที่ควบคุมการสร้างอาจอยู่ในพลาสมิดหรือโครโมโซมก็ได้ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อที่สร้าง (Buchman *et. al.*, 1988)

แลคโตสเตรปซิน (Lactostrepcin) สร้างจาก *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis* สายพันธุ์ที่ไม่สร้างไนซิน, *L. lactis* subsp. *cremoris* บางสายพันธุ์ และ *L. lactis* subsp. *diacetylactis* เกือบทุกสายพันธุ์ แบคเทอริโอซินนี้ทำงานได้ดีที่สุดเมื่ออยู่ในสภาพเป็นกรด (pH น้อยกว่า 5) และไม่ทำงานเมื่ออยู่ในสภาพเป็นกลาง (pH เท่ากับ 7) ถูกทำลายฤทธิ์โดยเอนไซม์ย่อยโปรตีน (proteolytic enzyme) ทนความร้อน 121 องศาเซลเซียสได้นาน 10 นาที ถูกสร้างออกมาในช่วงแรกของ exponential phase ของการเจริญในอาหารเหลว มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 10,000 ดาลตัน สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Lactococci, Streptococci* group A, C และ G, *Bacillus cereus, Lactobacillus helveticus, Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* และ *Leuconostoc paracitrovorum* เคยมีรายงานว่าแลคโตสเตรปซิน 5 (lactostrepcin 5) ซึ่งสร้างจาก *L. lactis* subsp. *cremoris* 202 มีฤทธิ์ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ รบกวนการขนส่งยูริดีน (uridine) และยับยั้งการสร้าง DNA, RNA และโปรตีน ยีนที่ควบคุมการสร้างไม่พบอยู่ในพลาสมิดจึงเชื่อว่าน่าจะอยู่ในโครโมโซม (Kozak *et. al.*,1978)

แลคโตคอคซิน I (Lactococcin I) สร้างจาก *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strain AC1 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Lactococci* และ *Clostridium* บางชนิดได้ สามารถทนความร้อน 99 องศาเซลเซียสได้นาน 30 นาที มีน้ำหนักโมเลกุล 6,000 ดาลตัน ยีนที่ควบคุมการสร้างอยู่ในพลาสมิด (Geis *et. al.*, 1983)

แลคโตคอคซิน A (Lactococcin A) สร้างจาก *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* LMG2130 เมื่อเลี้ยงในอาหาร M17 broth สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *L. lactis* subsp. *lactis* ถูกทำลายฤทธิ์โดยเอนไซม์ย่อยโปรตีน เป็นโปรตีนที่ไม่ละลายในน้ำ มีอะลานีน (alanine) และไกลซีน (glycine) เป็นองค์ประกอบค่อนข้างมาก น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 5,778 ดาลตัน มีฤทธิ์ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เป้าหมาย ยีนที่ควบคุมการสร้างอยู่ในพลาสมิด (Holo *et. al.*, 1991)

แลคติซิน 481 (Lacticin 481) สร้างจาก *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ481 เป็นแบคเทอริโอซินในกลุ่มแลนไทโอดิก สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Lactococci, Lactobacilli, Leuconostoc* และ *Clostridium tyrobutyricum* เชื้อสร้างแบคเทอริโอซินออกมามากที่สุดในสภาวะที่ pH เท่ากับ 5.5 มีคุณสมบัติเป็นโปรตีนที่ทนความร้อน 100 องศาเซลเซียสได้นานถึง 1 ชั่วโมง น้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 5,000 ถึง 10,000 ดาลตัน (Piard *et. al.*, 1992)

เพดดิโอซิน AcH (Pediocin AcH) สร้างจาก *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 ของการเจริญเติบโต

ของเชื้อในอาหารเหลว TGE (trypticase, glucose, yeast extract) ที่ pH 6.5 มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 2,700 ถึง 50,000 ดาลตัน กลไกการทำลายเซลล์เป้าหมายคือยับยั้งการสังเคราะห์ ATP รบกวนการขนส่งสารภายในเซลล์ และทำลายความสามารถในการยอมให้สารผ่านเข้าหรือออก (permeability) ของเยื่อหุ้มเซลล์ (Bhunia *et. al.*, 1988)

ดิโพคอคซิน (Diplococcin) สร้างจาก *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strain 346 ซึ่งนับเป็นแบคเทอริโอซินตัวแรก ๆ ที่ถูกค้นพบว่าผลิตจากแลกติกแอสิดแบคทีเรีย มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 5,300 ดาลตัน ถูกสร้างออกมาในช่วงแรกของ stationary phase ของการเจริญเติบโตของเชื้อในอาหารเหลว M17 ไม่สเถียรที่อุณหภูมิห้องและไม่ทนความร้อน ถูกทำลายฤทธิ์โดยไคโมทริปซิน ทริปซิน และโปรเนส สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* และ *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* กลไกการทำลายเซลล์เป้าหมายคือยับยั้งการสังเคราะห์ DNA และ RNA ทำให้เซลล์เป้าหมายตายโดยเซลล์ไม่แตกสลาย (Davey, 1981)

แพลนทาริซิน A (Plantaricin A) สร้างจาก *Lactobacillus plantarum* strain C-11 มีฤทธิ์ฆ่าแบคทีเรียในกลุ่มแลกติกแอสิดแบคทีเรียได้หลายชนิด น้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 6,000 ดาลตัน ทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 30 นาทีได้ สามารถทำงานได้เมื่อ pH อยู่ในช่วง 4 ถึง 6.5 ถูกสร้างออกมาในช่วงกลางของ exponential phase ของการเจริญเติบโตของเชื้อ (Daeschel *et. al.*, 1990)

แพลนทาซิน B (Plantacin B) สร้างจาก *Lactobacillus plantarum* NCDO 1193 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์อื่นค่อนข้างแคบ สามารถยับยั้งการเจริญของ *Lactobacillus plantarum, Lactobacillus mesenteroides* และ *Pediococcus damnosus* ถูกทำลายฤทธิ์โดยไลเปส (lipase) และ α-อะไมเลส (α-amylase) จึงเชื่อว่าน่าจะเป็นโปรตีนที่มีไขมันและคาร์โบไฮเดรตเป็นส่วนประกอบ (West and Warner, 1988)

เฟอร์เมนติซิน (Fermenticin) สร้างจาก *Lactobacillus fermenti* เป็นโปรตีนที่ไวต่อทริปซินและเปปซิน (pepsin) ทนต่อความร้อน ยูเรีย (urea) และไลโซไซม์ (lysozyme) เมื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์พบว่าประกอบด้วยกรดอะมิโน 16 ตัว น้ำตาล 4 ตัว เฮกโซซามีน (hexosamine) และฟอสฟอรัส (DeKlerk and Smit, 1967)

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

แลคตาซิน F (Lactacin F) สร้างจาก *Lactobacillus acidophilus* 11088 ซึ่งแยกได้จากนม ไวต่อเอนไซม์โปรดิเนส 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 and Klaenhammer, 1991)

แลคโตซิน S (Lactocin S) สร้างจาก *Lactobacillus sake* L45 เป็นโปรตีนที่ทนความร้อน มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pediococcus*, *Leuconostoc* และ *Lactobacillus* ถูกสร้างออกมาในช่วงท้ายของ exponential phase ของการเจริญของเชื้อ มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 13,700 ถึง 30,000 ดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 33 ตัว ยีนที่กำหนดการสร้างแบคเทอริโอซินนี้อยู่ในพลาสมิดที่มีขนาด 50 กิโลเบส (Mortvedt *et. al.*, 1991)

ซาคาซิน A (Sakacin A) สร้างจาก *Lactobacillus sake* 706 เป็นโปรตีนที่ทนความร้อน 100 องศาเซลเซียสนาน 20 นาทีได้ ถูกสร้างออกมาในช่วงกลางและช่วงท้ายของ exponential phase ของการเจริญเติบโตของเชื้อ ยีนที่กำหนดการสร้างอยู่ในพลาสมิดขนาด 27.7 กิโลเบส สามารถยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ได้หลายสายพันธุ์ (Schillinger and Lucke, 1989)

เฮลเวทดิซิน J (Helveticin J) สร้างจาก *Lactobacillus helveticus* 481 เป็นแบคเทอริโอซินที่ไวต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีนหลายชนิดและไม่ทนความร้อน สามารถยับยั้งการเจริญของ *Lactobacilli* สายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันได้ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 37,000 ดาลตัน ยีนที่กำหนดการสร้างอยู่ในโครโมโซม (Joerger and Klaenhammer, 1986)

เพดดิโอซิน PA-1 (Pediocin PA-1) สร้างจาก *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 *et. al.*, 1992)

คาโนซิน U149 (Carnocin U149) เป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Carnobacterium piscicola* ที่แยกได้จากเนื้อปลา ทนความร้อนอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Carnobacteria*, *Lactobacilli*, *Pediococci* และ *Lactococci* ถูกสร้างออกมาในช่วงกลางของ exponential phase ของการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส เป็นแบคเทอริโอซินที่อยู่ในกลุ่ม lantibiotic ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 35 ถึง 37 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 4,500 ถึง 5,000 ดาลตัน (Stoffels *et. al.*, 1992)

คาโนแบคเทอริโอซิน A1, A2, A3 (Carnobacteriocin A1, A2, A3) แบคเทอริโอซินทั้ง 3 ชนิดนี้สร้างจาก *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 and Barefoot, 1993)

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

มีเซนเทอรอยซิน 5 (Mesenteroicin 5) สร้างจาก *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 *et. al.*, 1991)

คาโนซิน (Carnocin) สร้างจาก *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 exponential phase มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 2,510 ถึง 6,000 ดาลตัน (van Laack *et. al.*, 1992)

การคัดเลือกเชื้อแลกติกแอสิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซิน

แลกติกแอสิดแบคทีเรียเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้หลากหลายชนิด และยังเป็นแบคทีเรียที่มีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารค่อนข้างมาก ดังนั้นการคัดเลือกเชื้อแลกติกแอสิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้จากอาหารชนิดต่าง ๆ จึงน่าจะนำกลับไปใช้เป็นหัวเชื้อหรือเตรียมเป็นแบคเทอริโอซินบริสุทธิ์แล้วเติมลงในอาหารได้ดีกว่าการคัดเลือกเชื้อแลกติกแอสิดแบคทีเรียจากแหล่งอื่น อาหารที่นำมาใช้ในการคัดเลือกเชื้อแลกติกแอสิดแบคทีเรียมีทั้งอาหารสดและอาหารหมักซึ่งแตกต่างกันไปในแต่ละท้องถิ่น เช่น เนื้อสัตว์ ผัก แตงกวาดอง (prickle) กระหล่ำปลีดอง (sauerkraut) กิมจิ (kimchi) อาหารที่ได้มาจากผลิตภัณฑ์นม (dairy product) และอาหารบรรจุสุญญากาศ (vacuum-packed food) เป็นต้น

วิธีที่นิยมใช้ในการคัดเลือกแลกติกแอสิดแบคทีเรียที่สามารถแบคเทอริโอซินได้มีอยู่ 2 วิธีคือ simultaneous (direct) method และ deferred method ซึ่งแต่ละวิธีมีรายละเอียดและข้อดีข้อเสียแตกต่างกัน

simultaneous method (Tagg *et. al.*, 1976) เป็นวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายโดยเฉพาะในช่วงการคัดเลือกเชื้อแลกติกแอสิดแบคทีเรียเบื้องต้น วิธีนี้เรียกอีกอย่างหนึ่งว่า "spot-on-lown" ซึ่งมีหลักการคือให้แลกติกแอสิดแบคทีเรีย (tested bacteria) เจริญไปพร้อม ๆ กับแบคทีเรียทดสอบ (indicator bacteria) ที่เจริญอยู่ทั่วไปบนผิวหน้าอาหารแข็ง หากแลกติกแอสิดแบคทีเรียสามารถสร้างแบคเทอริโอซินออกมายับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้ แบคเทอริโอซินที่ผลิตออกมาจากเซลล์ของแลกติกแอสิดแบคทีเรียก็จะซึมผ่าน (diffuse) เข้าไปในเนื้ออาหารเลี้ยงเชื้อแล้วไปทำลายหรือยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบที่อยู่ในบริเวณใกล้เคียง ทำให้มองเห็นบริเวณใส (clear zone) เกิดขึ้นรอบโคโลนีของแลกติกแอสิดแบคทีเรียดังกล่าวได้ โดยวิธีนี้แลกติกแอสิดแบคทีเรียจะต้องสร้างแบคเทอริโอซินและปล่อยออกมาจากเซลล์ตั้งแต่ในระยะแรก ๆ ของการเจริญเติบโต และปริมาณหรือความหนาแน่น (density) ของเชื้อแบคทีเรียทดสอบที่เจริญอยู่ทั่วไปบนอาหารก็มีส่วนสำคัญต่อการมองเห็นบริเวณใสหรือความไว (sensitivity) ของวิธีนี้เช่นเดียวกับการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ (drug sensitivity test) วิธีการทำให้เชื้อแบคทีเรียทดสอบเจริญอยู่ทั่วไปบนผิวหน้าอาหารอาจทำได้หลายวิธีและอาจทำก่อนหรือหลังจากปลูกเชื้อแลกติกแอสิดแบคทีเรียก็ได้ ยกตัวอย่างเช่น เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทดสอบในจานเพาะเลี้ยงโดยวิธี pour plate ก่อน จากนั้นเมื่ออาหารแข็งตัวแล้วจึงเจาะเนื้ออาหารให้เป็นรู แล้วค่อยเติมแลกติกแอสิดแบคทีเรียลงในรูที่เจาะไว้ หรือเลี้ยงเชื้อแลกติกแอสิดแบคทีเรียในอาหารให้ได้โคโลนีเดี่ยวก่อน แล้วจึงพ่นเชื้อแบคทีเรียทดสอบให้ทั่วจานเพาะเลี้ยง เป็นต้น

deferred method (Hoover and Harlander, 1993) วิธีนี้จะปล่อยให้แลกติกแอสิดแบคทีเรียเจริญอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนโดยลำพัง แล้วฆ่าเซลล์แลกติกแอสิดแบคทีเรียให้ตายโดยใช้ความร้อนหรือสารเคมี เช่น คลอโรฟอร์ม เป็นต้น จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียทดสอบที่เจริญอยู่ในวุ้นที่หลอมเหลวมาเททับลงบนผิวหน้าอาหารอีกชั้นหนึ่ง deferred method มีความไวกว่าวิธี simultaneous method และเหมาะสำหรับใช้ทดสอบเมื่อแลกติกแอสิดแบคทีเรียและแบคทีเรียทดสอบเจริญได้ดีในสภาะการเพาะเลี้ยงและในอาหารที่แตกต่างกัน เพราะวิธีนี้แลกติกแอสิดแบคทีเรียและแบคทีเรียทดสอบไม่ได้เจริญไปพร้อม ๆ กัน แต่ข้อเสียคือแบคเทอริโอซินที่แลกติกแอสิดแบคทีเรียสร้างอาจถูกทำลายหรือสูญเสียความสามารถในการยับยั้งไปเมื่อแลกติกแอสิดแบคทีเรียได้รับความร้อนหรือสารเคมี เช่น แบคเทอริโอซินที่สร้างจาก *Streptococcus faecalis* subsp. *zymogenes* ถูกทำลายได้โดยคลอโรฟอร์ม เป็นต้น ปัญหาที่เกิดขึ้นเช่นนี้จึงมีผู้พยายามแก้ไขหรือพัฒนาวิธีนี้โดยไม่ต้องฆ่าหรือทำลายแลกติกแอสิดแบคทีเรียก่อนที่จะเททับด้วยแบคทีเรียทดสอบ

ในการคัดเลือกเชื้อแลกติกแอสิดแบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินถ้าเป็นไปได้ควรใช้ทั้งสองวิธีร่วมกัน อีกทั้งยังควรทดสอบการสร้างแบคเทอริโอซินในสภาวะการเพาะเลี้ยงและใน

อาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันด้วย นอกจากนี้อีกสิ่งหนึ่งที่ควรระลึกไว้เสมอคือสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการเจริญของแลกติกแอสิดแบคทีเรียไม่จำเป็นต้องเป็นสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการสร้างแบคเทอริโอซินเสมอไป

Ubon Rajathanee University

อุปกรณ์และวิธีการ

1. เชื้อจุลินทรีย์และอาหารเลี้ยงเชื้อ

เชื้อแลกติกแอสิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินที่ใช้ศึกษาในการทดลองนี้คือ *Lactococcus* sp. ซึ่งแยกได้จากอาหารหมัก เลี้ยงเชื้อในอาหาร 0.2% glucose MRS agar หรือ MRS broth และเก็บเชื้อในอาหาร MRS broth ที่มี 20% glycerol ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

แบคทีเรียทดสอบ (indicator organism) คือ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 ใช้สำหรับทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของแบคเทอริโอซินที่สร้างจาก *Lactococcus* sp. อาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อคือ 0.2% glucose MRS agar หรือ MRS broth และเก็บเชื้อในอาหาร MRS broth ที่มี 20% glycerol ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2. การเตรียมส่วนใสปราศจากเซลล์ (culture supernatant) ของแลกติกแอสิดแบคทีเรีย

เลี้ยงเชื้อแลกติกแอสิดแบคทีเรียในอาหาร 0.2% glucose MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บของเหลวใสปราศจากเซลล์มากรองด้วยกระดาษกรองปราศจากเชื้อ (ขนาดรูของกระดาษกรองเท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร) แล้วเก็บไว้ทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบในขั้นตอนต่อไป

3. การทดสอบความสามารถของ *Lactococcus* sp. ในการยับยั้งการเจริญของ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 โดยวิธี swab-paper disc

เลี้ยงเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 ในอาหาร 0.2 % glucose MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหาร 0.2% glucose MRS agar โดยใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อ (sterile swab) ป้ายเชื้อให้เป็นระนาบทั่วจานเพาะเชื้อ ทิ้งไว้ 2-3 นาที นำกระดาษกรองปราศจากเชื้อ (sterile paper disc) วางบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วหยดส่วนใสปราศจากเซลล์ของเชื้อ *Lactococcus* sp. ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นกระดาษกรอง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตบริเวณใส (inhibition zone) ที่เกิดขึ้นรอบแผ่นกระดาษกรอง

Ubon Rajathanee University

4. การหาอุณหภูมิและระยะเวลาการบ่มที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Lactococcus* sp.

ทำการถ่ายเชื้อ *Lactococcus* sp. ที่เลี้ยงไว้ข้ามคืนปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 0.2% glucose MRS broth ที่มีปริมาตร 50 มิลลิลิตร จำนวน 3 หลอด นำเชื้อแต่ละหลอดไปบ่มแยกกันที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างจากหลอดทดลองดังกล่าวทั้งสามหลอดที่เวลาต่าง ๆ นับจากเริ่มถ่ายเชื้อลงในหลอด ดังนี้ 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 6, 9, 12, 24, 36, 48 และ 60 ชั่วโมง การเก็บตัวอย่างจะเก็บมาครั้งละ 2 มิลลิลิตร จากนั้นนำตัวอย่างไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่เวลาต่าง ๆ ไปสร้างกราฟการเจริญ (growth curve) ของเชื้อ *Lactococcus* sp. ที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 37 องศาเซลเซียส

5. การหาอุณหภูมิและระยะเวลาการบ่มที่เหมาะสมต่อการสร้างแบคเทอริโอซินของ *Lactococcus* sp.

ทำการถ่ายเชื้อ *Lactococcus* sp. ที่เลี้ยงไว้ข้ามคืนปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 0.2% glucose MRS broth ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จำนวน 3 หลอด นำเชื้อแต่ละหลอดไปบ่มแยกกันที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างจากหลอดทดลองดังกล่าวทั้งสามหลอดที่เวลาต่าง ๆ นับจากเริ่มถ่ายเชื้อลงในหลอด ดังนี้ 0, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48 และ 60 ชั่งโมง การเก็บตัวอย่างแต่ละครั้งจะเก็บมา 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปเตรียมส่วนใสปราศจากเซลล์ นำส่วนใสปราศจากเซลล์ที่ได้ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตรไปเจือจางครั้งละสองเท่า (serial two-fold dilution) เป็น 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 ตามลำดับ จากนั้นนำส่วนใสปราศจากเซลล์ที่มีระดับความเจือจางต่าง ๆ เหล่านี้ไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 โดยวิธี swab-paper disc วัดขนาดของบริเวณใสที่เกิดขึ้นรอบแผ่นกระดาษกรองในหน่วยเซนติเมตร และรายงานความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 เป็นหน่วย arbitrary unit (AU)/มิลลิลิตร

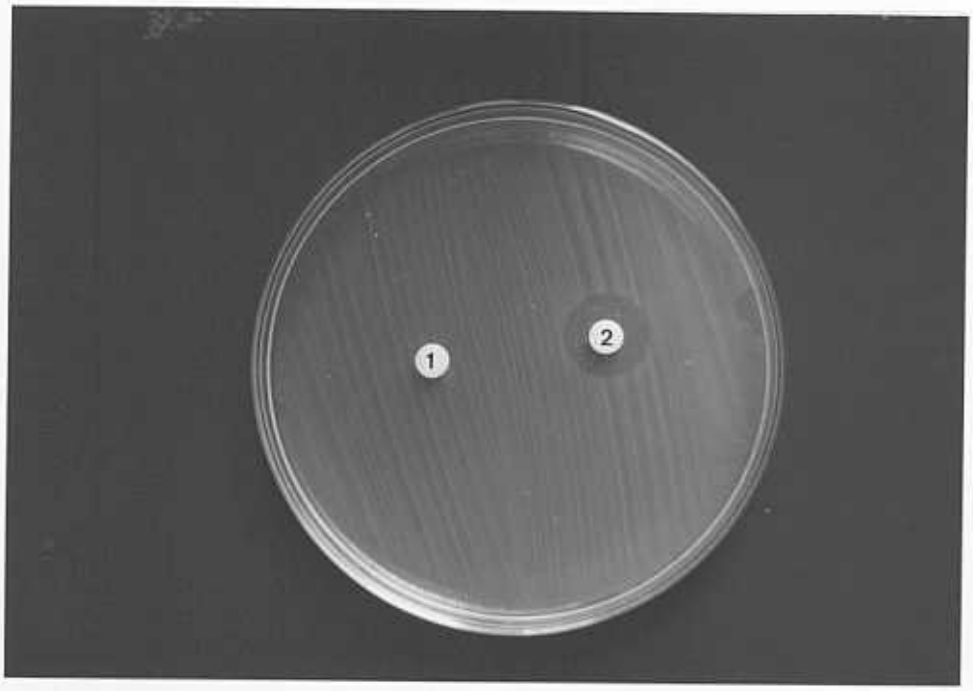
ค่าความสามารถของเชื้อ *Lactococcus* sp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 ในหน่วย arbitrary unit สามารถหาได้จากค่าส่วนกลับของระดับความเจือจางสูงสุดของส่วนใสปราศจากเซลล์ของ *Lactococcus* sp. ที่ยังสามารถตรวจพบบริเวณใสรอบแผ่นกระดาษกรอง

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

ผลการทดลอง

Lactococcus sp. สามารถสร้างแบคเทอริโอซินไปยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบคือ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 ได้เมื่อทดสอบโดยวิธี swab-paper disc (รูปที่ 1) เมื่อนำเชื้อ *Lactococcus* sp. ไปเลี้ยงที่อุณหภูมิแตกต่างกันคือ 20, 25 และ 37 องศาเซลเซียส แล้วทำการเก็บตัวอย่างเชื้อซึ่งเลี้ยงในแต่ละอุณหภูมิที่เวลา 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 6, 9, 12, 24, 36, 48 และ 60 ชั่วโมง ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงและเวลาไปสร้างกราฟการเจริญของเชื้อ *Lactococcus* sp. พบว่า ที่อุณหภูมิ 20 และ 25 องศาเซลเซียส ให้ผลการทดลองไม่แตกต่างกันมากนัก คือเชื้อจะเจริญอย่างช้า ๆ ในช่วงแรก (lag phase) และใช้เวลา 4.5-12 ชั่วโมง เชื้อจะเข้าสู่ exponential phase เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมงเชื้อจะเจริญเข้าสู่ระยะ statinary phase ส่วนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส การเจริญของเชื้อช่วง lag phase จะสั้นกว่า และเชื้อจะเจริญเข้าสู่ระยะ exponential phase ใช้เวลาเพียง 4-6 ชั่วโมงเท่านั้น และหลังจากชั่วโมงที่ 9 เชื้อจะเจริญเข้าสู่ระยะ stationary phase (ตารางที่ 1 และรูปที่ 2)



รูปที่ 1 การทดสอบ swab-paper disc แสดงความสามารถของเชื้อ *Lactococcus* sp. ที่สร้างแบคเทอริโอซินไปยับยั้งการเจริญของ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473
1 = MRS broth (comtrol); 2 = culture supernatant ของเชื้อ *Lactococcus* sp.

Ubon Rajathanee University

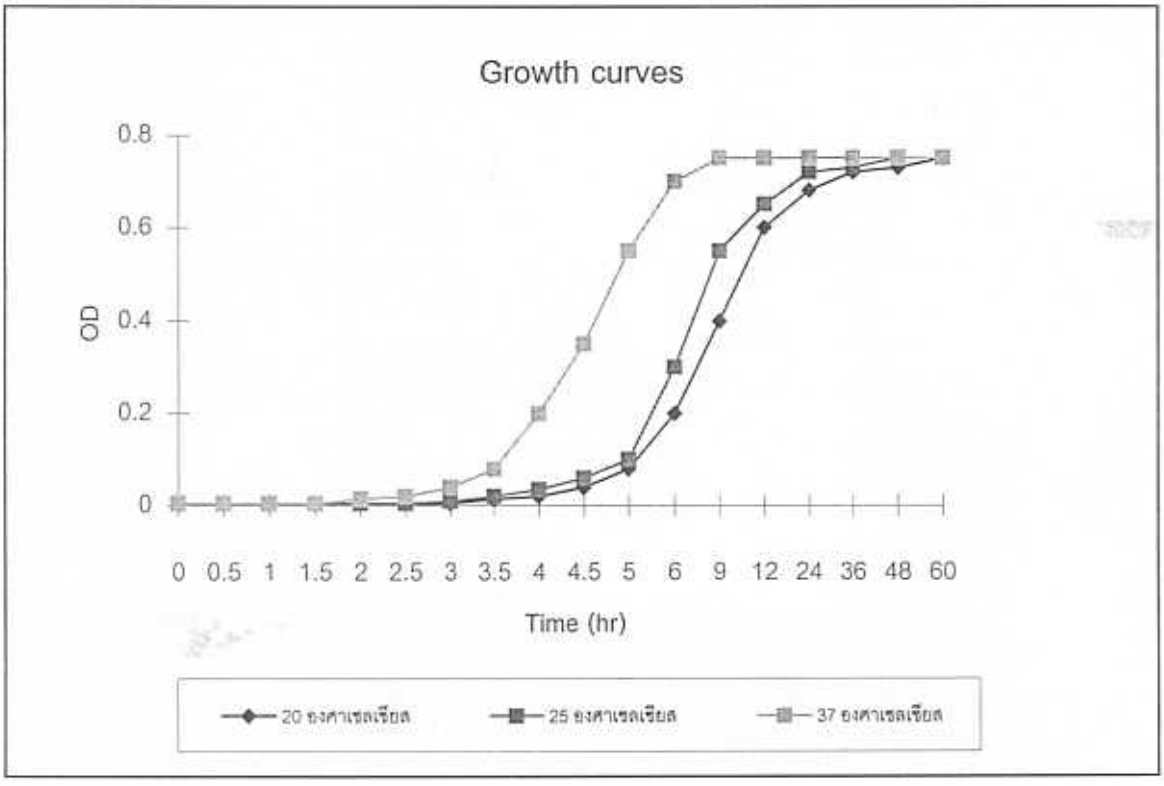
Ubon Rajathanee University

เวลา (hr)	ค่า OD (600 nm)		
	20°C	25°C	37°C
0	0.005	0.005	0.005
0.5	0.005	0.005	0.005
1	0.005	0.005	0.005
1.5	0.005	0.005	0.005
2	0.005	0.005	0.015
2.5	0.005	0.005	0.02
3	0.005	0.01	0.04
3.5	0.015	0.02	0.08
4	0.02	0.035	0.2
4.5	0.04	0.06	0.35
5	0.08	0.1	0.55
6	0.2	0.3	0.7
9	0.4	0.55	0.75
12	0.6	0.65	0.75
24	0.68	0.72	0.75
36	0.72	0.73	0.75
48	0.73	0.75	0.75
60	0.75	0.75	0.75

ตารางที่ 1 ค่า OD ของเชื้อ *Lactococcus* sp. ที่เวลาต่าง ๆ เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 37 องศาเซลเซียส

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University



รูปที่ 2 การเจริญของเชื้อ *Lactococcus* sp. เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 37 องศาเซลเซียส

Ubon Rajathanee University

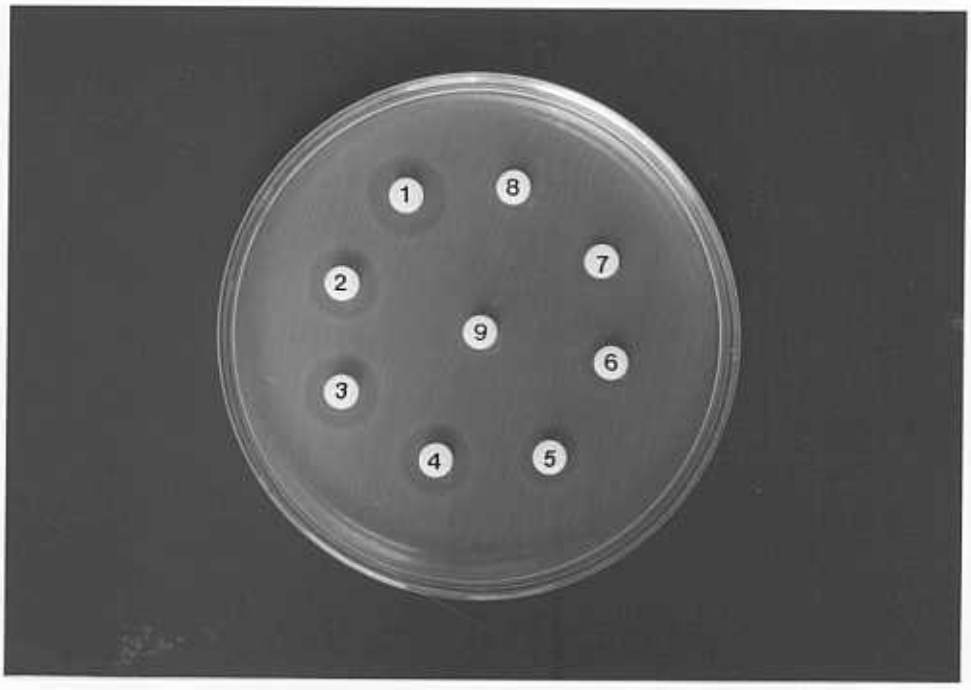
Ubon Rajathanee University

จากการศึกษาอุณหภูมิและระยะเวลาในการบ่มเชื้อที่เหมาะสมต่อการสร้างแบคเทอริโอซินของ *Lactococcus* sp. โดยนำเชื้อ *Lactococcus* sp. ไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 37 องศาเซลเซียส แล้วเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 45 และ 60 ชั่วโมง นำไปเตรียมเป็นส่วนใสปราศจากเซลล์ นำส่วนใสปราศจากเซลล์ที่ได้ไปเจือจางเป็น 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 และ 1:128 ตามลำดับ นำแต่ละความเจือจางไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ โดยวิธี swab-paper disc แล้วสังเกต inhibition zone ที่เกิดขึ้นรอบแผ่นกระดาษกรอง การบอกปริมาณแบคเทอริโอซินในตัวอย่างจะรายงานเป็นค่าแบคเทอริโอซินแอคติวิตี้ (bacteriocin activity) ซึ่งมีหน่วยเป็น AU/มิลลิลิตร โดยค่านี้ได้มาจากส่วนกลับของระดับความเจือจางสูงสุดของตัวอย่าง ซึ่งยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ (รูปที่ 3) ผลการทดลองพบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Lactococcus* sp. ที่อุณหภูมิ 20 และ 25 องศาเซลเซียส จะเริ่มตรวจวัดค่าแบคเทอริโอซินแอคติวิตี้ได้ในชั่วโมงที่ 9 โดยมีค่าเป็น 267 และ 533 AU/มิลลิลิตร ตามลำดับ แบคเทอริโอซินแอคติวิตี้จะมีค่ามากที่สุดในชั่วโมงที่ 12-24 (1,067 AU/มิลลิลิตร) ในชั่วโมงที่ 36-60 ค่าแบคเทอริโอซินแอคติวิตี้จะค่อย ๆ ลดลง โดยในชั่วโมงที่ 60 เหลือเพียง 133 AU/มิลลิลิตร แต่เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Lactococcus* sp. ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จะเริ่มตรวจวัดแบคเทอริโอซินแอคติวิตี้ได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 (267 AU/มิลลิลิตร) และมีค่าสูงสุดในชั่วโมงที่ 9 (2,133 AU/มิลลิลิตร) แบคเทอริโอซินแอคติวิตี้จะคงที่ไปจนถึงชั่วโมงที่ 24 หลังจากนั้นแบคเทอริโอซินแอคติวิตี้จะค่อย ๆ ลดลงเหลือ 533, 267 และ 267 AU/มิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 36, 48 และ 60 ตามลำดับ (ตารางที่ 2 และรูปที่ 4)

เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของเชื้อ *Lactococcus* sp. และการสร้างแบคเทอริโอซิน พบว่าในทุกอุณหภูมิที่ทำการทดสอบ เชื้อ *Lactococcus* sp. จะเริ่มตรวจวัดค่าแบคเทอริโอซินแอคติวิตี้ได้ตั้งแต่ก่อนที่เชื้อจะเจริญเข้าสู่ระยะ stationary phase โดยแบคเทอริโอซินแอคติวิตี้จะสูงสุดเมื่อเชื้อเจริญอยู่ในระยะ stationary phase และแบคเทอริโอซินแอคติวิตี้จะคงอยู่จนถึงชั่วโมงที่ 24 ของการบ่มเชื้อ (รูปที่ 5, 6 และ 7) หลังจากนั้นก็จะค่อย ๆ ลดลง

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University



รูปที่ 3 การหาค่าแบคเทอริโอซินแอคติวิตี้ (bacteriocin activity) ของเชื้อ *Lactococcus* sp. บ่ม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ในกรณีนี้อ่านค่าได้เท่ากับ 64 AU/30 ไมโครลิตร (2133 AU/มิลลิลิตร)

1 = culture supernatant ที่ไม่ได้เจือจาง

2 = culture supernatant ที่เจือจางเป็น 1:2

3 = culture supernatant ที่เจือจางเป็น 1:4

4 = culture supernatant ที่เจือจางเป็น 1:8

5 = culture supernatant ที่เจือจางเป็น 1:16

6 = culture supernatant ที่เจือจางเป็น 1:32

7 = culture supernatant ที่เจือจางเป็น 1:64

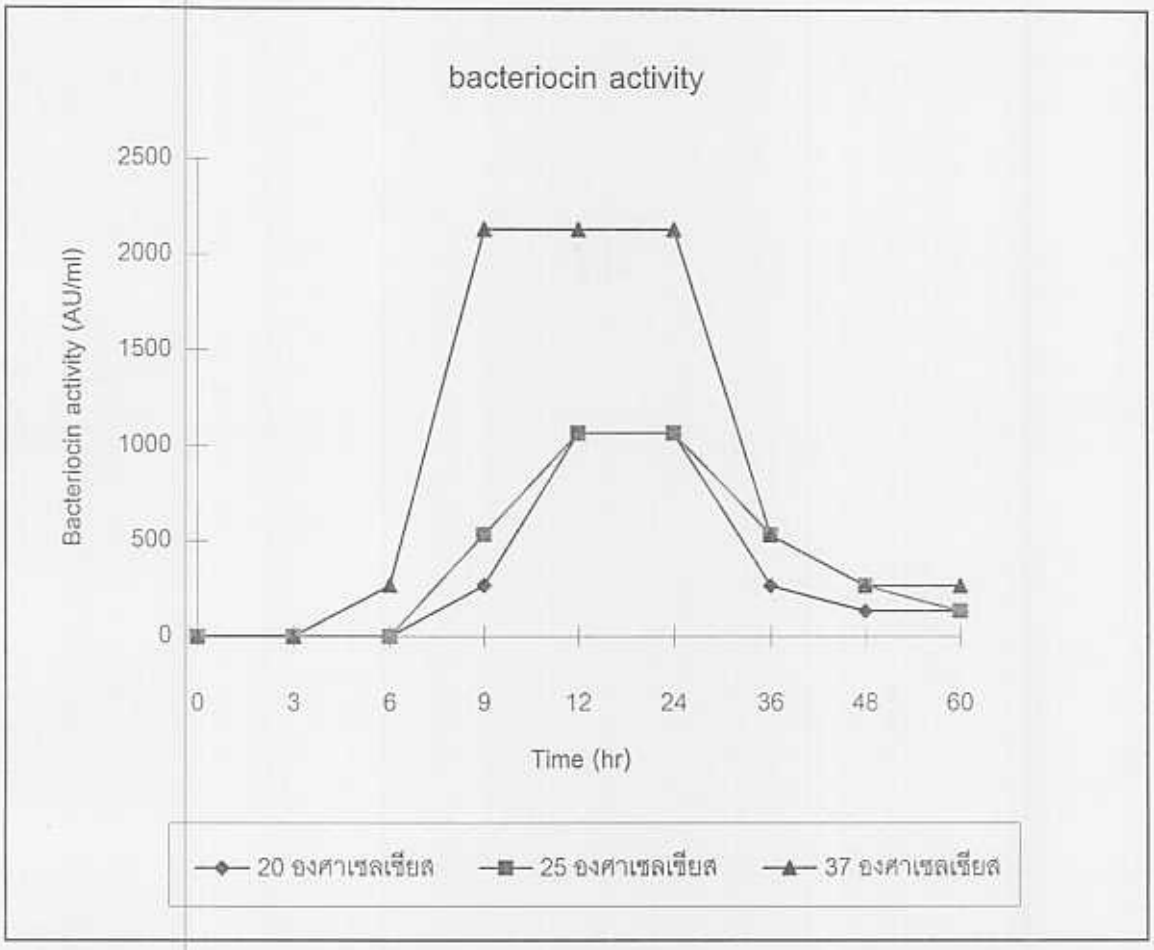
8 = culture supernatant ที่เจือจางเป็น 1:128

9 = MRS broth (control)

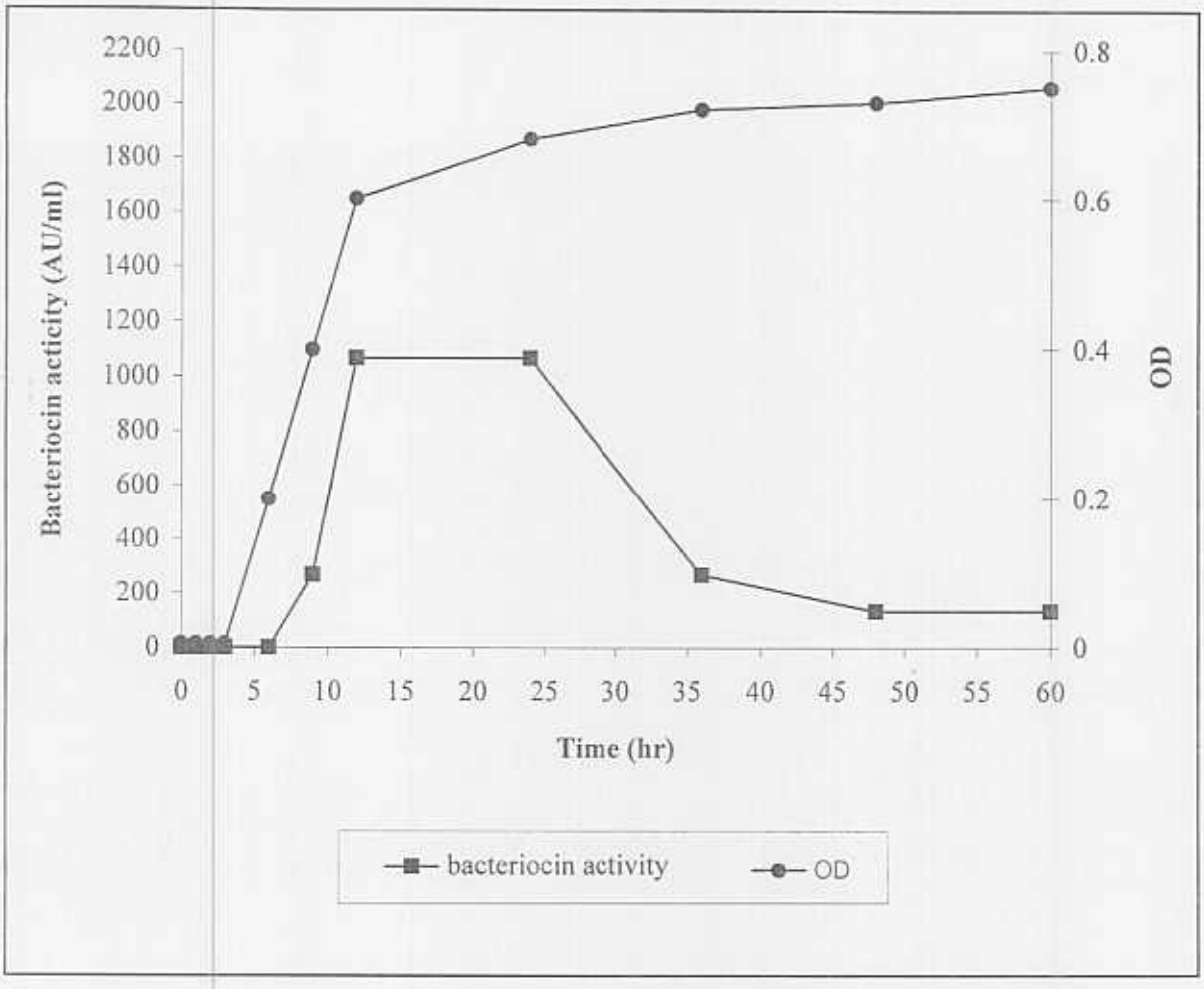
Ubon Rajathanee University

เวลา (hr)	AU/มิลลิลิตร		
	20°C	25°C	37°C
0	0	0	0
3	0	0	0
6	0	0	267
9	267	533	2133
12	1067	1067	2133
24	1067	1067	2133
36	267	533	533
48	133	267	267
60	133	133	267

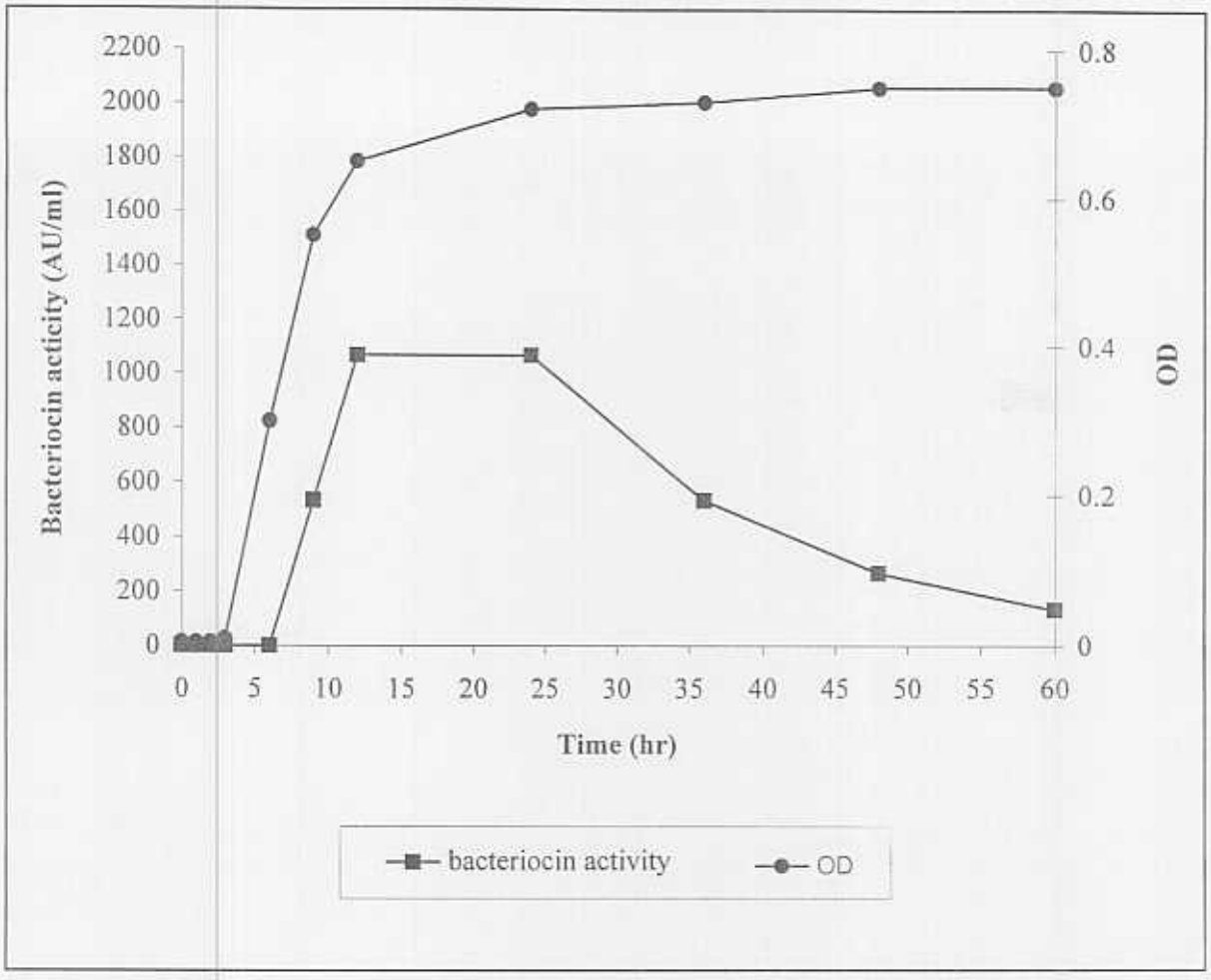
ตารางที่ 2 แบคเทอริโอซินแอคติวิตี้ของเชื้อ *Lactococcus* sp. ที่เวลาต่าง ๆ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 37 องศาเซลเซียส



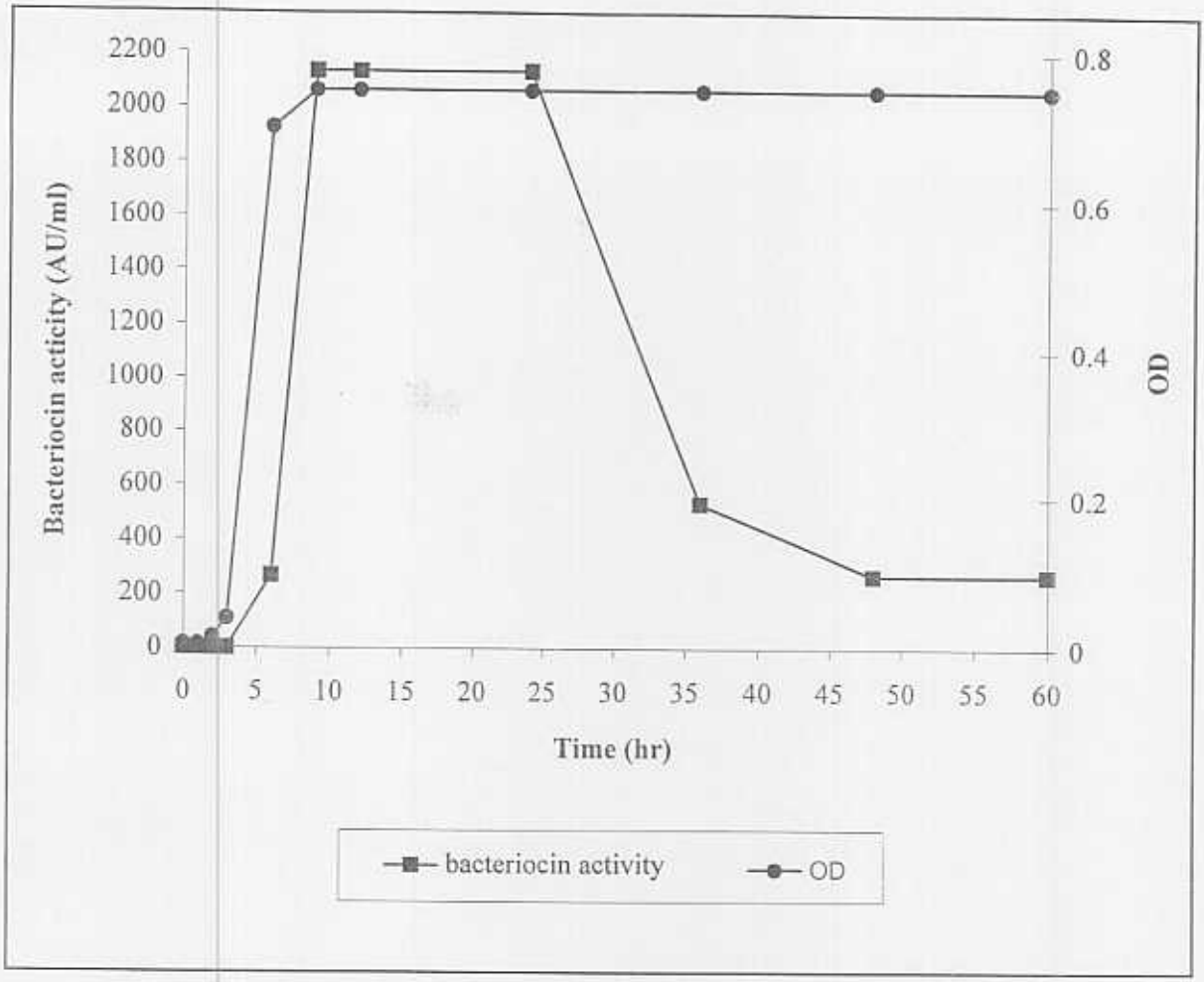
รูปที่ 4 เปรียบเทียบแบคเทอริโอซินแอคติวิตี้ของเชื้อ *Lactococcus* sp. เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 37 องศาเซลเซียส



รูปที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการสร้างแบคเทอริโอซินของเชื้อ *Lactococcus* sp. เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส



รูปที่ 6 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการสร้างแบคเทอริโอซินของเชื้อ *Lactococcus* sp. เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส



รูปที่ 7 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการสร้างแบคเทอริโอซินของเชื้อ *Lactococcus* sp. เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

วิจารณ์ผลการทดลอง

ในการทดลองนี้ได้ทำการศึกษาสภาวะการเจริญเติบโตและการสร้างแบคเทอริโอซินของเชื้อ *Lactococcus* sp. โดยเชื้อแบคทีเรียทดสอบคือ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 จากผลการทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อ *Lactococcus* sp. ที่ 3 ระดับอุณหภูมิ คือ 20, 25 และ 37 องศาเซลเซียส แล้วเก็บตัวอย่างที่เวลาต่าง ๆ มาสร้างกราฟการเจริญเติบโตของเชื้อ ปรากฏว่าเชื้อ *Lactococcus* sp. สามารถเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะ exponential phase ได้อย่างรวดเร็วและให้ปริมาณเซลล์มากที่สุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ส่วนที่อุณหภูมิ 20 และ 25 องศาเซลเซียส เชื้อสามารถเจริญได้ค่อนข้างจะใกล้เคียงกันแต่เจริญได้ช้ากว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณเซลล์สูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 20 และ 25 องศาเซลเซียสไม่แตกต่างจากการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเพียงแต่ต้องใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงนานกว่า การที่เชื้อ *Lactococcus* sp. สามารถเจริญได้ในทั้ง 3 ระดับอุณหภูมิเพราะเชื้อจัดอยู่ในกลุ่มมีโซฟิลิกแลกติกแอสิดแบคทีเรีย (mesophilic lactic acid bacteria) ซึ่งสามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 10-42 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญจะขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อ เช่น *Lactococcus lactis* KCA 2386 สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Ko and Ahn, 2000), *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* R เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Yildirim and Johnson, 1998), *Lactobacillus brevis* VB286 เจริญได้ดีที่อุณหภูมิตั้งแต่ 30-37 องศาเซลเซียส (Coventry *et. al.*,1996) และ *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Lejeune *et. al.*, 1998) เป็นต้น

เมื่อศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างแบคเทอริโอซินของเชื้อ *Lactococcus* sp. โดยปริมาณแบคเทอริโอซินที่เชื้อสร้างจะวัดจากค่าแบคเทอริโอซินแอคติวิตี้ในส่วนใสปราศจากเซลล์ของเชื้อ *Lactococcus* sp. เมื่อบ่มที่เวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ พบว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Lactococcus* sp. ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จะวัดค่าแบคเทอริโอซินแอคติวิตี้ได้สูงสุดที่เวลา 9-24 ชั่วโมง คือ 2,133 AU/มิลลิลิตร ในขณะที่เมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 20 และ 25 องศาเซลเซียส ที่เวลา 12-24 ชั่วโมง ค่าแบคเทอริโอซินแอคติวิตี้สูงสุดมีค่าเพียง 1,067 AU/มิลลิลิตร หรือลดลงเป็นครึ่งหนึ่งของแบคเทอริโอซินแอคติวิตี้สูงสุดที่วัดได้เมื่อเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส แสดงว่าเชื้อ *Lactococcus* sp. น่าจะสร้างแบคเทอริโอซินออกมามากที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่เพาะเลี้ยงเชื้อมีผลอย่างมากต่อปริมาณแบคเทอริโอซินที่เชื้อสร้าง แลกติกแอสิดแบคทีเรียชนิดอื่นที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้มากที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ได้แก่ *Lactobacillus delbruecki* ssp. *bulgaricus* CFR 2028 (Balasubramanyam and Varadaraj, 1998), *Lactobacillus amylivorus* DCE 471 (Lejeune *et. al.*, 1998) และ *Leuconostoc mesenteroides* (Daba *et. al.*,1993) เป็นต้น สาเหตุที่เชื้อ *Lactococcus* sp. สามารถสร้างแบคเทอริโอซินออกมาได้มากที่สุดที่อุณหภูมิ 37 องศา

เซลเซียส อาจเป็นเพราะเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างแบคเทอริโอซินอาจทำงานได้ดีที่อุณหภูมิดังกล่าว

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการสร้างแบคเทอริโอซินของเชื้อ *Lactococcus* sp. ผลปรากฏว่าทั้ง 3 ระดับอุณหภูมิที่ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ แบคเทอริโอซินแอคติวิตี้จะเริ่มตรวจวัดได้ก่อนที่เชื้อจะเจริญเข้าสู่ระยะ stationary phase และแบคเทอริโอซินแอคติวิตี้จะมากที่สุดเมื่อเชื้อเจริญอยู่ในระยะ stationary phase จากความสัมพันธ์ดังกล่าวนี้แสดงให้เห็นว่าแบคเทอริโอซินที่เชื้อสร้างน่าจะเป็น secondary metabolite หลังจากที่เชื้อเจริญเข้าสู่ระยะ stationary phase เป็นระยะเวลาหนึ่ง คือประมาณ 15 ชั่วโมง แบคเทอริโอซินแอคติวิตี้ก็จะเริ่มลดลง ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องจากฤทธิ์ของเอนไซม์โพรติเอส (protease) ที่เชื้อสร้างขึ้นในระยะนี้ของการเจริญ ถูกปล่อยออกมาจากเซลล์และทำลายแบคเทอริโอซิน ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* R และแบคเทอริโอซินที่เชื้อสร้างซึ่งมีชื่อว่า lactococcin R (Yildirim and Johnson, 1998)

สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการสร้างแบคเทอริโอซินของเชื้อ *Lactococcus* sp. ที่ศึกษาในการทดลองนี้เป็นสภาวะเดียวกันคือ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และระยะเวลาการบ่มเชื้ออยู่ในช่วง 9-24 ชั่วโมง โดยจะให้แบคเทอริโอซินแอคติวิตี้สูงสุด (2,133 AU/มิลลิลิตร) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับสภาวะการสร้าง amylovorin L471 ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างจากเชื้อ *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 (Lejeune *et. al.*,1998) และ lactococcin K2386 ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างจากเชื้อ *Lactococcus lactis* KCA 2386 (Ko and Ahn, 2000) อย่างไรก็ตามอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการสร้างแบคเทอริโอซินของเชื้อแลกติกแอสิดแบคทีเรียตัวอื่นไม่จำเป็นต้องเป็นอุณหภูมิเดียวกันเสมอไป เช่น เชื้อ *Lactobacillus brevis* VB286 สามารถสร้างแบคเทอริโอซิน brevicin 286 ได้มากที่สุดที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส แต่เชื้อกลับเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส ซึ่งที่อุณหภูมิที่เชื้อสามารถเจริญได้ดีมากนี้ ปริมาณแบคเทอริโอซินกลับลดลง (Coventry *et. al.*,1996)

สรุปผลการทดลอง

เชื้อ *Lactococcus* sp. มีความสามารถในการสร้างแบคเทอริโอซิน และสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบคือ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 ได้ สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactococcus* sp. เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MRS คือ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเชื้อจะใช้เวลาเพียง 4-6 ชั่วโมง ก็จะเจริญเข้าสู่ระยะ exponential phase และหลังจากชั่วโมงที่ 9 เชื้อจะเจริญเข้าสู่ระยะ stationary phase ที่อุณหภูมิ 20 และ 25 องศาเซลเซียส ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อจะใกล้เคียงกัน แต่จะเจริญได้ช้ากว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ส่วนสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างแบคเทอริโอซินของเชื้อ *Lactococcus* sp. คือ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยแบคเทอริโอซินแอคติวิตี้จะสูงสุด (2,133 AU/มิลลิลิตร) เมื่อบ่มเชื้อเป็นเวลา 9-24 ชั่วโมง และเป็นช่วงที่เชื้อเจริญอยู่ในระยะ stationary phase

เอกสารอ้างอิง

1. Balasubramanyam, B. V. and Varadaraj, M. C. (1998). Cultural conditions for the production of bacteriocin by *Lactobacillus delbruecki* ssp. *bulgaricus* CFR 2028 in milk medium. J. Appl. Microbiol. 84: 97-102.
2. Bhunia, A. K., Johnson, M. C and Ray. B. (1988). Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. J. Appl. Bacteriol. 65: 261-268.
3. Bradley, D. E. (1967). Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. Bacteriol. Rev. 31: 230-314.
4. Brock, T. D., Peacher B. and Pierson, D. (1963). Survey of the bacteriocins of enterococci. J. Bacteriol. 86: 702-707.
5. Buchman, G. W, Banerjee, S. and Hansen, J. N. (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, M. J., Wan, J., Gordon, J. B., Mawson, R. F. and Hickey, M. W. (1996). Production of brevicin 286 by *Lactobacillus brevis* VB286 and partial characterization. J. Appl. Bacteriol. 80: 91-98.
7. Daba, H., Pandian, S., Gosselin, J. F., Simard, R. E., Huang, J. and Lacroix, C. (1991). Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*. Appl. Environ. Microbiol. 57: 3450-3455.
8. Daba, H., Lacroix, C., Huang, J. and Simard, R. E. (1993). Influence of growth conditions on production and activity of mesenterocin 5 by a strain of *Leuconostoc mesenteroides*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 39: 166-173.
9. Daeschel, M. A. (1989). Antimicrobila substance from lactic acid bacteria for use as food preservatives. Food Tech. 43: 164-167.
10. Daeschel, M. A., McKenney, M. C. and McDonald, L. C. (1990). Bactericidal activity of *Lactobacillus plantarum* C-11. Food Microbiol. 7: 91-98.
11. Davey, G. P. (1981). Mode of action of diplococcin, a bacteriocin from *Streptococcus cremoris* 346. N. Zeal. J. Dairy Sci. Technol. 16: 187-190.
12. DeKlerk, H. C. and Smit, J. A. (1967). Properties of a *Lactobacillus fermenti* bacteriocin. J. Gen. Microbiol. 48: 309-316.

13. De Vuyst, L. and Vandamme, E. J. (1993). Lactic acid bacteria and bacteriocins : their practical importance. *In* De Vuyst, L. and Vandamme, E. J. (eds.). Bacteriocin of Lactic Acid Bacteria. Glasgow: Blackie Academic & Professional. p. 1-12.
14. Donoghue, H. D. (1972). Properties and comparative starch-gel electrophoresis of megacins from several *Bacillus megaterium* strains. J. Gen. Microbiol. 72: 473-483.
15. Garver, K. I. and Muriana, P. M. (1993). Detection, identification and characterization of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from retail food products. Int. J. Food Microbiol. 19: 241-258.
16. Geis, A., Singh, J. and Teuber, M. (1983). Potential of lactic streptococci to produce bacteriocin. Appl. Environ. Microbiol. 45: 205-211.
17. Hastings, J. W., Sailer, M., Johnson, K., Roy, K. L., Vederas, J. C. and Stiles, M. E. (1991). Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidium*. J. Bacteriol. 173: 7491-7500.
18. Henderson, J. T., Chopko, A. L. and van Wassenaar, P. D. (1992). Purification and primary structure of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC-1.0. Arch. Biochem. Biophysics. 295: 5-12.
19. Holo, H., Nilssen, O. and Nes, J. F. (1991). Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactobacillus lactis* subsp. *cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene. J. Bacteriol. 173: 3879-3887.
20. Hoover, D. G. and Harlander, S. K. (1993). Screening methods for detecting bacteriocin activity. *In*: Hoover, D. G. and Steenson, L. R. (eds.). Bacteriocin of Lactic Acid Bacteria. Calofornia: Academic Press, Inc. p. 23-39.
21. Imaeda, T. and Rieber, M. (1968). Mitomycin C-induced phage-like particles in a mutant of *Mycobacterium tuberculosis* BCG. J. Bacteriol. 96: 557-559.
22. Inoue, K. and Iida, H. (1968). Bacteriophages of*Clostridium botulinum*. J. Vorol. 2: 537-540.
23. Jack, R.W., Tagg, J. R. and Ray, B. (1995). Bacteriocin of gram positive bacteria. Microbiol Rev. 59 (2): 171-200.
24. Joerger, M. C. and Klaenhammer, T. R. (1986). Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. J. Bacteriol. 167: 439-446.
25. Klaenhammer, T. R. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochimie. 70: 337-349.
26. Kleanhammer, T. R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 12: 39-86.

Ubon Rajathanee University

27. Ko, S-H. and Ahn, C. (2000). Bacteriocin production by *Lactococcus lactis* KCA2386 isolated from white kimchi. Food Sci. Biotechnol. 9 (4): 263-269.
28. Kozak, W., Bardwoski, J. and Dobrzanski, W. T. (1978). Lactostrepcins-acid bacteriocins produced by lactic streptococci. J. Dairy Res. 45: 247-257.
29. Lejeune, R., Callewaert, R., Crabbe, K. and De Vuyst, L. (1998). Modelling the growth and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 in batch cultivation. J. Appl. Microbiol. 84: 159-168.
30. Mortvedt, C. I., Nissen-Meyer, J., Stetten, K. and Nes, I. F. (1991). Purification and amino acid sequence of lactocin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* L45. Appl. Environ. Microbiol. 57: 1829-1834.
31. Muriana, P. M. and Klaenhammer, T. R. (1991). Purification and partial characterization of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. Appl. Environ. Microbiol. 57: 114-121.
32. Nettles, C. G. and Barefoot, S. F. (1993). Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. J. Food Prot. 56(4): 338-356.
33. Nomura, M. (1967). Colicins and related bacteriocins. Annu. Rev. Microbiol. 21: 257-284.
34. Ozaki, M., Higashi, Y.,Saito, H., An, T. and Amano, T. (1966). Identification of megacin A with phospholipase A. Biken J. 9: 201-213.
35. Piard, J-C., Muriana, P. M., Desmazeaud, M. J. and Klaenhammer, T. R. (1992). Purification and partial characterization of lacticin 481, a lanthionine-containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ 481. Appl. Environ. Microbiol. 58: 279-284.
36. Reeves, P. (1965). The bacteriocins. Bacteriol. Rev. 29: 24-45.
37. Schillinger, U. and Lucke, F-K. (1989). Antimicrobial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. Appl. Environ. Microbiol. 55: 1901-1906.
38. Schlegel, R. and Slade, H. D. (1972). Bacteriocin production by transformable group H streptococci. J. Bacteriol. 112: 824-829.
39. Stoffels, G., Nes, I. F. and Gudmundsdottir, A. (1992). Isolation and properties of a bacteriocin-producing *Carnobacterium piscicola* isolated from fish. J. Appl. Bacteriol. 73: 309-316.
40. Tagg, J. R., Dajani, A. S., Wannamaker, L. W. and Gray, E. D. (1973). Group A streptococcal bacteriocin. Production, purification and mode of action. J. Exp. Med. 138: 1168-1183.

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

41. Tagg, J. R., Dajani, A. S. and Wannamaker, L. W. (1976). Bacteriocins of gram-positive bacteria. Bacteriol. Rev. 40(3): 722-756.

42. Tichaczek, P. S., Meyer, N. J., Nes, I. F., Vogel, R. F. and Hammes, W. P. (1992). Characterization of the bacteriocins curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 and sakacin P from *L. sake* LTH673. System. Appl. Microbiol. 15: 460-468.

43. Tubylewicz, H. (1970). Antigenic properties of the bacteriocine preparations obtained from type A *Clostridium perfringens* strains. Bull. Acad. Pol. Sci. (Biol). 18: 253-256.

44. Uhlman, L., Schillinger, U., Rupnow, J. R. and Holzapfel, W. H. (1992). Identification and characterization of two bacteriocin-producing strains of *Lactococcus lactis* isolated from vegetables. J. Food Microbiol. 16 : 141-151.

45. van Laack, R. L. J. M., Schillinger, U. and Holzapfel, W. H. (1992). Characterization and partial purification of a bacteriocin produced by *Leuconostoc carnosum* LA44A. Int. J. Food Microbiol. 16: 183-195.

46. West, C. A. and Warner, P. J. (1988). Plantacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* NCDO 1193. FEMS Microbiol. Lett. 49: 163-165.

47. Yildirim, Z. and Johnson, M. G. (1998). Characterization and antimicrobial spectrum of Bifidocin B, a bacteriocin produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. J. Food Prot. 61(1): 47-51.

48. Yildirim, Z. and Johnson, M. G. (1998). Detection and characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* R isolated from radish. Lett. In Appl. Microbiol. 26: 297-304.

Ubon Rajathanee University