



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุฬารัตนาบัณฑิต)

ปริญญา

จุฬารัตนาบัณฑิต

จุฬารัตนาบัณฑิต

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การแยกและคัดเลือกรวมของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตสารเมแทบอลิซึมยับยั้งการเจริญของยีสต์
Candida albicans BCC6120

Isolation and Selection of Anti *Candida albicans* BCC6120 Metabolites Producing
Lactic Acid Bacteria

นามผู้วิจัย นายธนศ สัจจศิริ

ได้พิจารณาเห็นชอบ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(อาจารย์พัชรกรรณ์ ศิวายพราหมณ์, ปร.ด.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(รองศาสตราจารย์ ร้อยเอกชัยวัฒน์ กิตติกุล, วท.ม.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์ ร้อยเอกชัยวัฒน์ กิตติกุล, วท.ม.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กาญจนา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

สืบศิริ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตสารเมแทบอไลต์
ยับยั้งการเจริญของยีสต์ *Candida albicans* BCC6120

Isolation and Selection of Anti *Candida albicans* BCC6120 Metabolites
Producing Lactic Acid Bacteria

โดย

นายธนศ สัจจ์ศรี

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

พ.ศ. 2556

ธนศ สังข์ศรี 2556: การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติกที่ผลิตสารเมแทบอลิท์ยับยั้งการเจริญของยีสต์ *Candida albicans* BCC6120 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา) สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์พัชรภรณ์ ศิวยพรพราหมณ์, ประ.ด. 139 หน้า

การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกจากอาหารหมักดอง ผลไม้สด และน้ำทิ้งจากโรงงานจำนวน 46 ตัวอย่าง โดยนำตัวอย่างเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง Mann Rogosa Sharpe (MRS) สามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกได้จำนวน 552 ไอโซเลท เมื่อตรวจสอบการสร้างสารยับยั้งการเจริญของยีสต์ *C. albicans* BCC6120 ด้วยวิธีเทป พบ 51 ไอโซเลทสามารถสร้างสารเมแทบอลิท์ยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* BCC6120 ได้คิดเป็นร้อยละ 9.24 จากนั้นทดสอบความสามารถในการเกาะติดพื้นผิวโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MRS ที่มีแท่งไม้ไผ่เป็นแกนกลาง และสังเกตการเกาะติดของเชื้อที่แท่งไม้ไผ่และผิวหลอดทดลอง พบว่าไอโซเลท L47-2 สามารถเกาะติดพื้นผิวได้ดีที่สุดเมื่อศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* BCC6120 ด้วยวิธี agar well diffusion โดยปรับ pH ของส่วนใสของน้ำเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียกรดแลกติกเป็น 3, 5, 7, 9 และ 11 พบว่ามีฤทธิ์การยับยั้งอยู่ในช่วง pH 3.0-5.0 แต่จะสูญเสียฤทธิ์ในการยับยั้งเมื่อปรับ pH ให้สูงขึ้น จากนั้นศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา การทดสอบทางชีวเคมี และการใช้ชุดทดสอบ API 50 CHL Medium รวมทั้งยืนยันผลการจัดจำแนกโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA พบว่าไอโซเลท L47-2 ใกล้เคียงกับ *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* ร้อยละ 99.65 จากนั้นปรับปรุงสายพันธุ์ L47-2 โดยการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตรเป็นเวลา 1 นาที พบว่าเชื้อมีอัตราการรอดตายร้อยละ 10 และสายพันธุ์กลาย L47-2UV116 ผลิตสารยับยั้งการเจริญของยีสต์ *C. albicans* BCC6120 ได้สูงสุดคือ มีค่าผลต่างระหว่างวงใสรอบโคโลนีและขนาดของโคโลนีเท่ากับ 13 มิลลิเมตร ซึ่งมากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลายดังกล่าวยังคงมีความสามารถในการเกาะติดพื้นผิวดังเดิม

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Tanes Sangsri 2013: Isolation and Selection of Anti *Candida albicans* BCC6120 Metabolites Producing Lactic Acid Bacteria. Master of Science (Microbiology), Major Field: Microbiology, Department of Microbiology. Thesis Advisor: Miss Patcharaporn Siwayaprahm, Ph.D. 139 pages.

Five hundred and fifty-two isolates of lactic acid bacteria (LAB) have been isolated and screened from fermented foods, fruits and dairy effluents on De Mann Rogosa Sharpe (MRS) agar. Fifty-one isolates, in the percentile of 9.24, produced the secondary metabolites that could inhibit the growth of *Candida albicans* BCC6120 by using overlay method. The broth culture supernatant of LAB showed anti-*C. albicans* activity in acidic condition at pH range of 3.0-5.0 by using agar well diffusion method. Interestingly, the isolate L47-2 showed the best colonization surrounding the surface of sterile bamboo stick and test tube when growing in MRS broth. The isolate L47-2 was identified on the basis of morphological and biochemical characteristics and API 50 CHL Test Kit. The identification was confirmed by 16S rRNA gene sequence analysis revealed that isolate L47-2 was similar to *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* with 99.65 % nucleotide identity. The isolate L47-2 was subsequently mutated by ultraviolet (UV) radiation at the wavelength of 254 nm for 1 min which only 10% survival could be obtained. The mutant strain, L47-2UV116 exhibited the highest anti-*C. albicans* activity. The results demonstrated that the mutant strain produced the maximum clear zone were 13 millimeter. The mutant strain, L47-2UV116 can still colonize surrounding the surface of sterile bamboo stick and test tube.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลงได้ด้วยดีด้วยความกรุณาจากหลายท่าน ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ
อาจารย์ ดร.พัชรภรณ์ ศิวยพราหมณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
รองศาสตราจารย์ร้อยเอกชัยวัฒน์ กิตติกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม และผู้ช่วยศาสตราจารย์
ดร.มณฑล เลิศคณาวณิชกุล ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ และแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณคณาจารย์และบุคลากรในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านที่มีส่วนในการให้ความรู้
ช่วยเหลือและให้คำแนะนำด้วยดีตลอดการศึกษา

ขอขอบคุณเพื่อน พี่ น้อง ทั้งปริญญาตรี-โท และปริญญาเอกของภาควิชาจุลชีววิทยาทุกคน ที่มีน้ำใจ
และเป็นกำลังใจซึ่งกันและกันตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ที่ทำให้ข้าพเจ้ามีกำลังใจ และสนับสนุนการศึกษา
ตลอดมา

สุดท้ายขอขอบคุณความดีและประโยชน์ที่พึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ แก่บิดา มารดา ผู้มีพระคุณ
สูงสุด และคณาจารย์ผู้ประสาทวิชาความรู้ทุกๆ ท่านตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน

ธเนศ สังข์ศรี
กุมภาพันธ์ 2556

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	29
อุปกรณ์	29
วิธีการ	31
ผลและวิจารณ์	45
สรุปและข้อเสนอแนะ	92
สรุป	92
ข้อเสนอแนะ	94
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	96
ภาคผนวก	114
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	115
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมี	119
ภาคผนวก ค ข้อมูลการทดลอง	123
ภาคผนวก ง การจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท L47-2 ด้วยชุดทดสอบ API 50 CHL Medium	128
ภาคผนวก จ การเกาะติดพื้นผิวของ L47-2 และสายพันธุ์กลาย L47-2UV และ L47-2UV116	136
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	139

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ตัวอย่างแบคทีเรียกรดแลกติกในกลุ่ม Homofermentation	7
2 ตัวอย่างแบคทีเรียกรดแลกติกในกลุ่ม Heterofermentation	8
3 เอนไซม์จากแบคทีเรียกรดแลกติกที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์	15
4 เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียโอซินและสารปฏิชีวนะ	18
5 สภาวะที่ใช้ในการทำ PCR ของชิ้นยีน 16S rRNA	37
6 ส่วนประกอบของปฏิกิริยา Ligation	39
7 ส่วนประกอบของปฏิกิริยา Digestion	41
8 จำนวนแบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดแยกได้ทั้งหมดจากตัวอย่างทดสอบต่างๆ	46
9 ค่าผลต่างระหว่างขนาดของวงใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนีของแบคทีเรียกรดแลกติก (clear zone diameter, CZ) และเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (colony diameter, CO)	50
10 การยับยั้งการเจริญของ <i>C. albicans</i> BCC6120 โดยแบคทีเรียกรดแลกติกด้วยวิธี agar well diffusion	55
11 คุณสมบัติในการเกาะติดพื้นผิวของไอโซเลท L46-3 และ L47-2	62
12 คุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดแยกได้จากตัวอย่างทดสอบต่างๆ	66
13 ผลการหมักคาร์โบไฮเดรตทั้ง 49 ชนิดของแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท L47-2 โดยชุดทดสอบสำเร็จรูป API 50 CHL	69
14 การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของไอโซเลท L47-2 กับลำดับเบสในฐานข้อมูล EzTaxon server version 2.1	75
15 ค่าผลต่างระหว่างขนาดของวงใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนีของแบคทีเรียกรดแลกติก (clear zone diameter, CZ) และเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (colony diameter, CO)	87
16 คุณสมบัติในการเกาะติดพื้นผิวของแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย	89

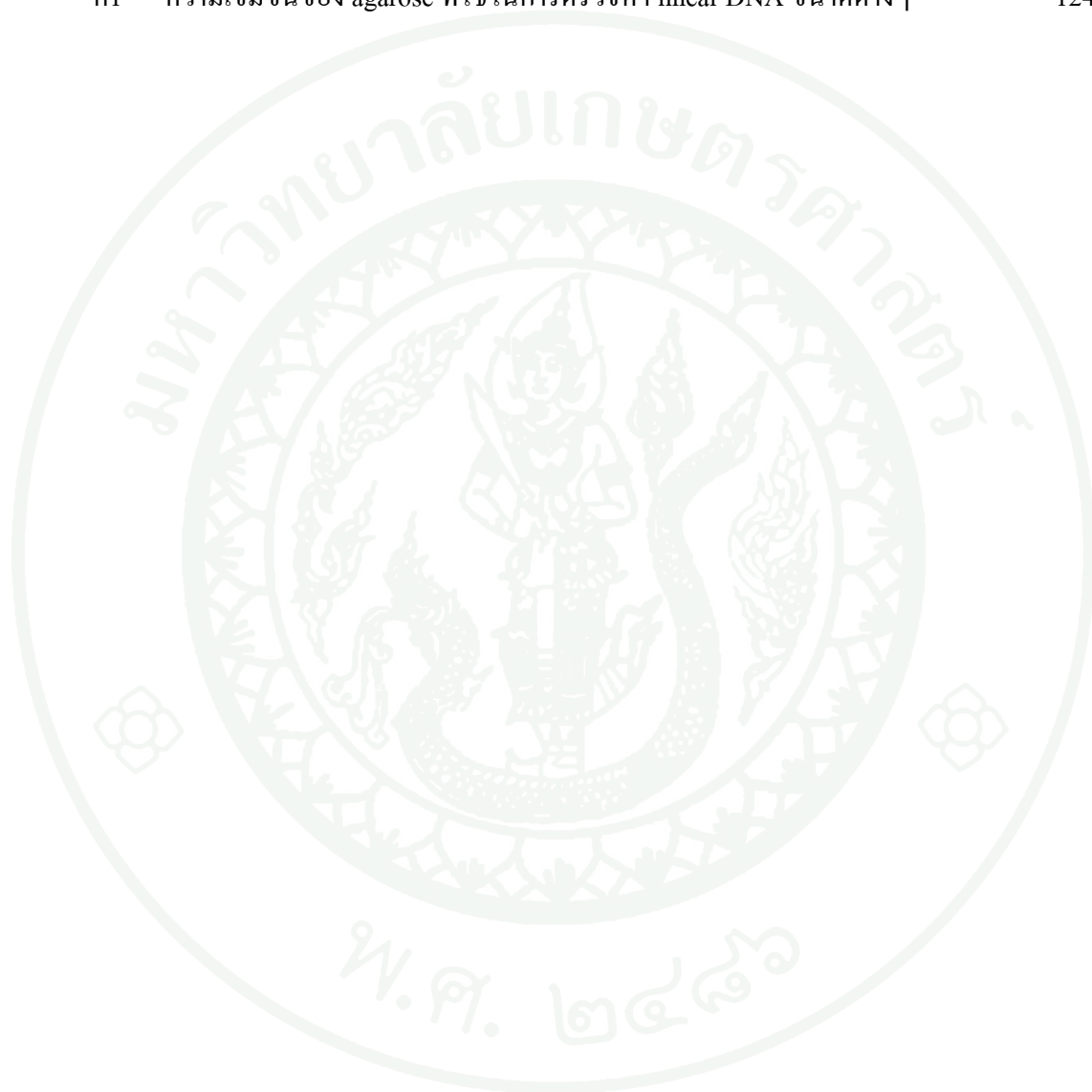
สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่

หน้า

ค1 ความเข้มข้นของ agarose ที่ใช้ในการตรวจหา linear DNA ขนาดต่างๆ

124



สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 โครงสร้างของกรดแลกติกชนิด D-Lactic acid และ L-Lactic acid	5
2 กระบวนการหมักของแบคทีเรียกรดแลกติกแบบ Homofermentation	6
3 ผลิตภัณฑ์จากการหมักแบบ heterofermentation	8
4 กระบวนการหมักของแบคทีเรียกรดแลกติกแบบ Heterofermentation	9
5 กลไกการสร้างโพรงที่เชื่อมเซลล์ของเชื้อเป้าหมายโดยแบคทีเรียโอซินจากแบคทีเรียกรดแลกติก	17
6 แบบจำลองการยึดเกาะของแบคทีเรียที่เป็นโปรไบโอติกส์และแบคทีเรียก่อโรค	20
7 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของยีสต์ <i>C. albicans</i>	23
8 ตัวอย่างการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของยีสต์ <i>C. albicans</i> BCC6120 ของแบคทีเรียกรดแลกติกโดยวิธีซิดเชื้อ	33
9 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียกรดแลกติกที่เจริญบนอาหารแข็ง MRS	48
10 การทำ replica plating ของแบคทีเรียกรดแลกติกบนอาหารแข็ง MRS	49
11 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของยีสต์ <i>C. albicans</i> BCC6120 โดยวิธีเทป	50
12 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของ <i>C. albicans</i> BCC6120 ด้วยวิธีซิดเชื้อบนอาหารแข็ง TGE	53
13 ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของ <i>C. albicans</i> BCC6120 ด้วยวิธี agar well diffusion	56
14 ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของ <i>C. albicans</i> BCC6120 ของแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท L47-2 ที่ปรับ pH เป็น 3, 5, 7, 9 และ 11 ด้วยวิธี agar well diffusion และส่วนของแบคทีเรียกรดแลกติกที่ไม่ปรับ pH (3.76)	57
15 ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของ <i>C. albicans</i> BCC6120 ของอาหารเหลว MRS ที่ไม่ผ่านการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลกติกที่ปรับเป็น pH 3, 3.76, 5, 7, 9 และ 11 ด้วย 1 N HCl และ 1 N NaOH ทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion	58
16 โครงสร้างของ L-phenyllactic acid และ D- phenyllactic acid	59
17 โครงสร้างของกรดไขมัน 4 ชนิด ที่แยกได้จากส่วนของ <i>L. plantrum</i> strain MiLAB 14	60

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
18	โครงสร้างของ cyclic dipeptides ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งรา	61
19	สารต้านราชนิดต่างๆ ที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลกติก	61
20	การเกาะติดพื้นผิวของแบคทีเรียกรดแลกติกที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS และมีแท่งไม้ไผ่ปราศจากเชื้อเป็นแกนกลางหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน	63
21	รูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรียกรดแลกติกภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายของภาพเท่ากับ 1,000 เท่า	65
22	การทดสอบการสร้างเอนไซม์แคตาเลสของแบคทีเรียกรดแลกติก	66
23	ลักษณะจีโนมิกส์ดีเอ็นเอที่ตรวจสอบด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis	72
24	ลักษณะดีเอ็นเอของชิ้นยีน 16S rRNA ที่ตรวจสอบด้วย 1.2% agarose gel electrophoresis	73
25	การตัดพลาสมิดลูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoR</i> I ตรวจสอบผลด้วย 1% agarose gel electrophoresis	74
26	การเปรียบเทียบลำดับเบสของชิ้นยีน 16S rRNA ของไอโซเลท L47-2 กับลำดับเบสของชิ้นยีน 16S rRNA ของสายพันธุ์อ้างอิงในสกุล <i>Lactobacillus</i> โดยใช้ ClustalW	76
27	แผนภูมิต้นไม้ของแบคทีเรียกรดแลกติก L47-2 กับสายพันธุ์อ้างอิงโดยใช้ neighbor-joining method ด้วยโปรแกรม Mega4 (bootstrap test 1,000 replicates)	84
28	เปอร์เซ็นต์การรอดตายของเซลล์แบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท L47-2 ที่ผ่านการฉายรังสีอัลตราไวโอเลต ณ เวลาต่างๆ	85
29	การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์กลายที่สามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์ <i>C. albicans</i> BCC6120 โดยวิธีเทป	86
30	การศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของยีสต์ <i>C. albicans</i> BCC6120 ของแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย L47-2UV10 โดยวิธี agar well diffusion	87
31	การศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของยีสต์ <i>C. albicans</i> BCC6120 ของแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย L47-2UV116 โดยวิธี agar well diffusion	88

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
32 การเกาะติดพื้นผิวของแบคทีเรียกรดแลกติกที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่มี แท่งไม้ไผ่ปราศจากเชื้อเป็นแกนกลางหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน	89
ภาพผนวกที่	
ก1 การนับจำนวนเซลล์ในแต่ละช่องเล็กโดยใช้ Haemocytometer	126
ก2 แผนที่ของยีนพลาสมิด pGEM®-T Vector ขนาด 3.015 กิโลเบส ที่ประกอบด้วยยีนต้านยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน และยีน <i>lacZ</i> (Promega, 2010)	127
ง1 ขั้นตอนการทดสอบด้วยชุด API 50 CHL Medium	132
ง2 ตารางเปรียบเทียบแบคทีเรียกรดแลกติกชนิดต่างๆ	133
ง3 การทดสอบด้วยชุด API 50 CHL Medium ในชั่วโมงที่ 0	134
ง4 การทดสอบด้วยชุด API 50 CHL Medium ในชั่วโมงที่ 48	135
จ1 การเกาะติดพื้นผิวของแบคทีเรียกรดแลกติกที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS โดยมีแท่งไม้ไผ่ปราศจากเชื้อเป็นแกนกลางตั้งแต่วันที่ 1-7	137

การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตสารเมแทบอลิไทต์ที่ยับยั้ง

การเจริญของยีสต์ *Candida albicans* BCC6120

Isolation and Selection of Anti *Candida albicans* BCC6120 Metabolites

Producing Lactic Acid Bacteria

คำนำ

Candida albicans เป็นยีสต์ในกลุ่มราที่อาศัยในช่องปาก ทางเดินอาหาร ช่องคลอด ผิวหนัง และเยื่อเมือกของมนุษย์ สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อที่เล็บ ผิวหนังหรือใต้ผิวหนัง ทำให้เกิดการอักเสบในช่องคลอด และช่องปาก (Beck-Sague and Jarvis, 1993) นอกจากนี้ยังเป็นเชื้อฉวยโอกาส โดยเฉพาะอย่างยิ่งทำให้เกิด oropharyngeal candidiasis (OPC) ซึ่งพบบ่อยในผู้ป่วยติดเชื้อไวรัส (human immunodeficiency virus; HIV) และโรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง (acquired immunodeficiency syndrome; AIDS) ในผู้ป่วยที่ได้รับยาปฏิชีวนะแบบครอบจักรวาล หรือผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัด และผู้ป่วยโรคมะเร็งที่รักษาด้วยยาเคมีบำบัด (Wenzel, 1995) การรักษาโดยทั่วไปใช้ยาปฏิชีวนะในกลุ่ม azole และ imidazole (Odds, 1993; Rex *et al.*, 1995) แต่ *C. albicans* สามารถต้านทานต่อยา fluconazole ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ป่วยที่ได้รับยาปฏิชีวนะติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน ทำให้ *C. albicans* สามารถเจริญได้ดีกว่าเชื้อประจำถิ่น (Odds, 1993; white *et al.*, 1998)

ในปัจจุบันมีการพบโรคติดเชื้อที่รักษาไม่ได้ (untreatable infectious disease) ที่ไม่ใช่โรคเอดส์เพิ่มขึ้นตลอดเวลา โดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ป่วยเอดส์เพิ่มขึ้นพบการติดเชื้อ *C. albicans* สาเหตุของโรค Candidiasis ได้ถึงร้อยละ 71.26 ของโรคติดเชื้อฉวยโอกาสที่พบ (นลินี และคณะ, 2540) ในด้านการรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อ *C. albicans* ได้มีการพัฒนายาชนิดต่างๆ เพื่อใช้ในการรักษา แต่มีรายงานการดื้อยาของ *C. albicans* ออกมาเช่นกัน (Odds, 1993; Rex *et al.*, 1995) ซึ่งทำให้ต้องมีการคิดค้นและพัฒนาตัวยาเพื่อการรักษาอย่างต่อเนื่อง ดังนั้นวิธีควบคุมอัตราการดื้อยาที่ดีที่สุดคือ การเลือกใช้ยาต้านจุลชีพอย่างเหมาะสมทั้งชนิดและระยะเวลา รวมทั้งหาทางเลือกใหม่ในการรักษาโรคติดเชื้อชนิดนี้ เช่น การใช้สารจากพืชสมุนไพร และ/หรือสารจากจุลินทรีย์ที่ผลิตสารต้านจุลชีพ เช่น แบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria, LAB) (Duarte *et al.*, 2005; Naeini *et al.*, 2009; Wynne *et al.*, 2004) เป็นต้น

แบคทีเรียกรดแลคติกถูกนำไปใช้ในกระบวนการหมักเพื่อรักษาคุณภาพทางโภชนาการของอาหารต่างๆ โดยผลผลิตของการหมักคือ กรดแลคติก ทำให้ pH ของอาหารลดลงสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ นอกจากนี้ยังสามารถผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ เช่น กรดอินทรีย์ กรดไขมัน cyclic dipeptides คาร์บอนไดออกไซด์ เอทานอล ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แบคทีเรียไอซิน diacetyl และยาปฏิชีวนะ (Corsetti *et al.*, 1998) เป็นต้น ในกลุ่มของกรดอินทรีย์ เช่น กรดแลคติก กรดแอซิดิก phenyllactic acid (PLA) และ hydroxyphenyllactic acid (OH-PLA) ที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติกมีบทบาทในการยับยั้งการเจริญของราและแบคทีเรียชนิดต่างๆ (Lavermicocca *et al.*, 2003; Valerio *et al.*, 2008) และมีรายงานเกี่ยวกับการผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นโดยแบคทีเรียกรดแลคติกก่อนหน้านี้หลายฉบับ แต่พบว่ามีรายงานจำนวนน้อยเกี่ยวกับการยับยั้งยีสต์และราเส้นใย (Magnusson และ Schnurer, 2001)

สารยับยั้งราจากแบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีมวลโมเลกุลต่ำ เช่น capric acid และ short-chain fatty acid นอกจากจุลินทรีย์เป้าหมายในกลุ่มแบคทีเรียยังพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถผลิตกรดอินทรีย์ที่ออกฤทธิ์ต่อราเส้นใยและยีสต์ โดย Corsetti *et al.* (1998) พบว่า *Lactobacillus sanfrancisco* CB1 สามารถผลิต caproic acid ซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้งราได้ และงานวิจัยของ Lavermicocca *et al.* (2000) พบสารกลุ่มใหม่ที่ผลิตจาก *Lactobacillus plantarum* สายพันธุ์ 21B ได้แก่ phenyllactic acid และ 4-hydroxy-phenyllactic acid ซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้งราในกลุ่มกว้างได้แก่ *Aspergillus niger* FTDC3227 และ IDM1, *A. flavus* FTDC3226, *Eurotium repens* IBT18000, *E. rubrum* FTDC3228, *Endomyces fibuliger* IBT605 และ IDM3812, *Fusarium graminearum* IDM623, *Monilia sitophila* IDM/FS5, *Penicillium corylophilum* IBT6978, *P. roqueforti* IBT18687 และ *P. expansum* IDM/FS2 จากการศึกษาที่ผ่านมาพบสารยับยั้งราที่ผลิตโดย *Lactobacillus casei* ซึ่งสามารถยับยั้งได้ทั้งการเจริญและการผลิต aflatoxin จาก *A. parasiticus* (El-Gendy and Marth, 1981; Silva *et al.*, 1987)

มีรายงานการนำแบคทีเรียกรดแลคติกมาใช้เป็นโปรไบโอติกส์ (probiotics) เพื่อปรับปรุงอัตราการเจริญของไก่ และเป็นผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพมนุษย์ได้ ปัจจุบันได้มีการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกอย่างแพร่หลายเพื่อศึกษาชีวสารที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ซึ่งอาจนำมาทดแทนสารเคมีสังเคราะห์เพื่อผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในมนุษย์ (วิลาวณิช, 2543; ชุตินันท์ และคณะ, 2545) ดังนั้นงานวิจัยฉบับนี้จึงมุ่งเน้นในการแยกและคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของยีสต์ *C. albicans* และเพื่อเป็นแนวทางในการนำไปพัฒนาเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทดแทนการใช้สารเคมีสังเคราะห์ในอนาคตต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกจากแหล่งต่างๆ
2. เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของยีสต์ *Candida albicans* BCC6120
3. เพื่อจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลกติกที่ผลิตสารยับยั้งการเจริญของยีสต์ *Candida albicans* BCC6120
4. เพื่อปรับปรุงสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดเลือกได้ให้มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของยีสต์ *C. albicans* BCC6120 สูงขึ้นด้วยวิธีอัลตราไวโอเลต

การตรวจเอกสาร

1. แบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria, LAB)

แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive) มีรูปร่างกลมหรือเป็นแท่ง (cocci or rods) ไม่สร้างสปอร์ (non spore forming) ส่วนใหญ่ไม่เคลื่อนที่ (non-motile) หรือถ้ามีการเคลื่อนที่จะใช้แฟลกเจลลา สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจน จึงจัดเป็น facultative anaerobe และสามารถผลิตกรดแลคติกได้โดยใช้คาร์บอนเป็นแหล่งสารอาหารจากการหมักน้ำตาล ได้แก่ กลูโคส และแลคโทส แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีรูปร่างกลม ได้แก่ *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Streptococcus*, *Oenococcus*, *Weissella* และ *Enterococcus* และรูปร่างแท่ง ได้แก่ *Lactobacillus* และ *Carnobacterium* เป็นต้น (Axelsson, 1993; De Vuyst and Vandamme, 1994; Stiles and Holzapfel, 1997)

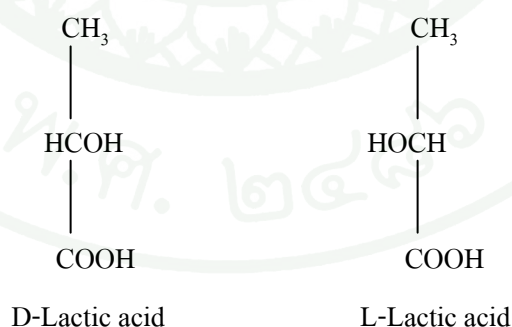
ปัจจุบันได้มีการนำแบคทีเรียกรดแลคติกมาใช้ในการหมักอาหารชนิดต่างๆ เช่น ผลิตภัณฑ์จากนม ชีส ผักดอง และ sour dough bread กรดแลคติกได้ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น เป็นสารที่ให้ความเป็นกรด (acidulant) และสารถนอมอาหาร เป็นต้น (Francis, 2000) ในทางการแพทย์ได้มีการนำกรดแลคติกมาใช้ในการปรับ pH ของการผลิตพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้เพื่อใช้ในการเชื่อมต่อกระดูกหรือใช้เป็นไหมสำหรับเย็บแผล เกลือแคลเซียมของกรดแลคติกทั้งที่อยู่ในรูปเม็ดและผง เช่น calcium lactate trihydrate เป็นแหล่งแคลเซียมสำหรับผู้ป่วย และเป็นสารช่วยตกตะกอนเลือดในระหว่างการทำฟัน เป็นต้น (มิชัย, 2546)

1.1 การจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติก

การสร้างกรดแลคติกของแบคทีเรียกรดแลคติกเกิดจากการใช้สารประกอบคาร์โบไฮเดรตในกระบวนการเมแทบอลิซึมได้กรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์ ดังนั้นเมื่อพิจารณาผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมสามารถจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ homofermentative และ heterofermentative lactic acid bacteria (Holzapfel and Wood, 1995)

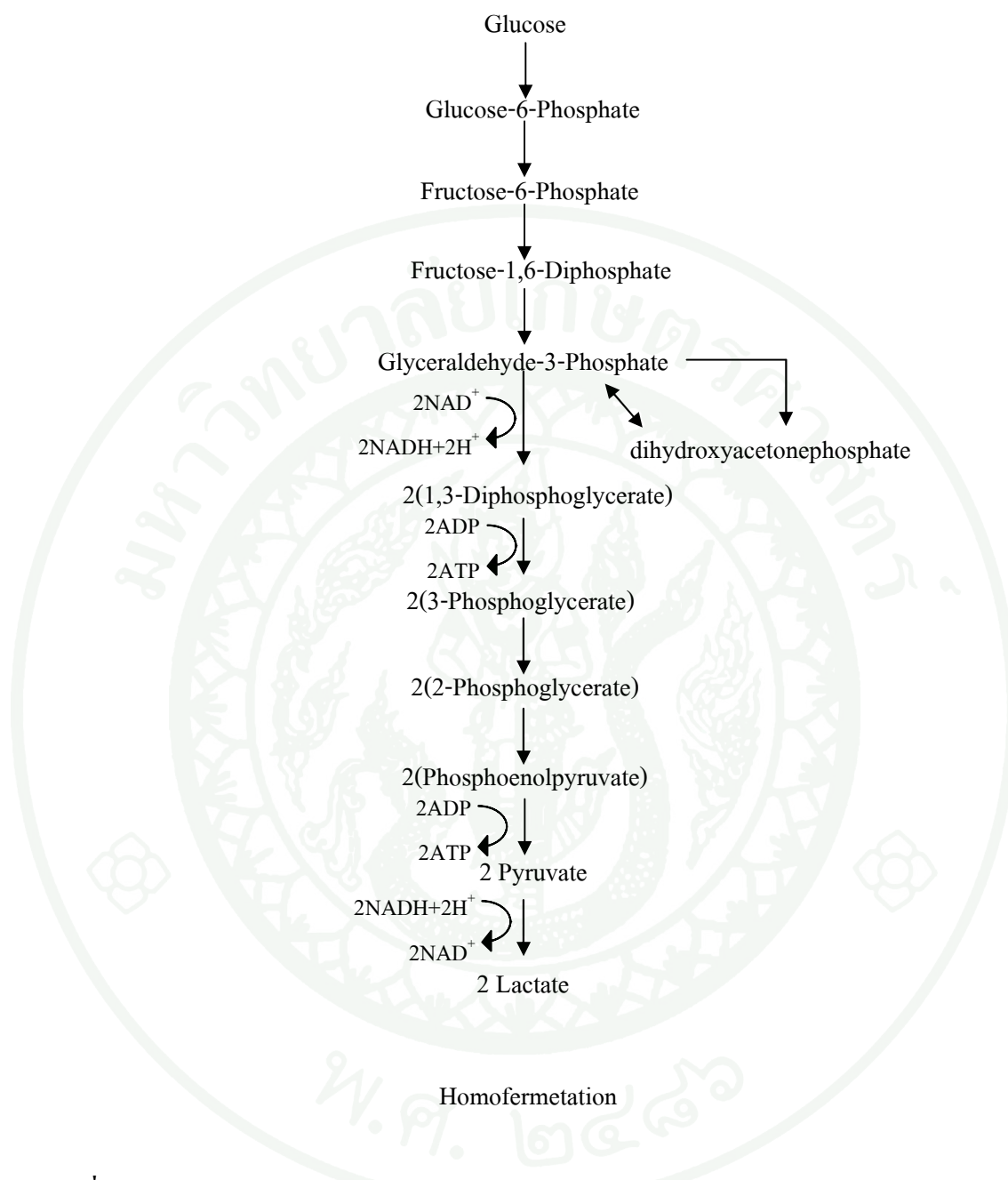
1.1.1 Homofermentation

กระบวนการเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียกรดแลกติกกลุ่มนี้เกิดขึ้นโดยผ่านวิถี Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) หรือ glycolysis pathway สามารถผลิตกรดแลกติกได้ประมาณร้อยละ 95 ซึ่งกรดแลกติกที่เกิดขึ้นพบทั้ง D-Lactic acid และ L-Lactic acid แสดงดังภาพที่ 1 โดยเปลี่ยนกลูโคสเป็นกรดแลกติก ในขั้นตอนแรกของปฏิกิริยามีการใช้พลังงานจาก ATP จำนวน 2 โมเลกุลเพื่อเปลี่ยนกลูโคสเป็นกลูโคส-6-ฟอสเฟต และเปลี่ยนฟรุกโตส-6-ฟอสเฟตเป็นฟรุกโตส-1,6-ไดฟอสเฟตโดยอาศัยเอนไซม์เฮกโซไคเนสและฟอสโฟฟรุกโตไคเนส ตามลำดับ จากนั้น ฟรุกโตส-1,6-ไดฟอสเฟตถูกเปลี่ยนเป็นสารประกอบคาร์บอน 3 อะตอม ได้แก่ กลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟตและไดไฮดรอกซีอะซิโตนฟอสเฟต จากนั้นกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟตเกิดปฏิกิริยา เอสเทอริฟิเคชันควบคู่กับการรีดิวซ์ NAD เป็น 1,3-ไดฟอสโฟกลีเซอเรต และ 1,3-ไดฟอสโฟกลีเซอเรตถ่ายทอดคอนมูลฟอสเฟตไปยัง ADP เพื่อสังเคราะห์ ATP และเปลี่ยนเป็น 3-ฟอสโฟกลีเซอเรต จากนั้นเปลี่ยนรูปเป็น 2-ฟอสโฟกลีเซอเรต และฟอสโฟอินอลไพรูเวต ตามลำดับ ฟอสโฟอินอลไพรูเวตเปลี่ยนเป็นไพรูเวตพร้อมกับการถ่ายทอดคอนมูลฟอสเฟตไปยัง ADP เพื่อสังเคราะห์ ATP ไพรูเวตที่เกิดขึ้นเข้าสู่กระบวนการหมักซึ่งมีบทบาทสำคัญในการรักษาสสมดุลของสภาวะออกซิเดชันและรีดักชันในเซลล์ โดย NADH ที่เกิดขึ้นถูกออกซิไดซ์เพื่อเปลี่ยนไพรูเวตเป็นแลกเตทโดยตรง จากกระบวนการดังกล่าวนี้ได้พลังงานสุทธิ 2 โมเลกุล และกรดแลกติก 2 โมเลกุลต่อกลูโคส 1 โมเลกุล (Cooper, 2000) แสดงดังภาพที่ 2 แบคทีเรียกรดแลกติกที่มีการหมักแบบ homofermentation มีทั้งรูปร่างกลมและเป็นแท่ง แสดงดังตารางที่ 1



ภาพที่ 1 โครงสร้างของกรดแลกติกชนิด D-Lactic acid และ L-Lactic acid

ที่มา: พวงพร (2547)



ภาพที่ 2 กระบวนการหมักของแบคทีเรียกรดแลคติกแบบ Homofermentation

ที่มา: Cooper (2000); Axelsson (1998)

ตารางที่ 1 ตัวอย่างแบคทีเรียกรดแลคติกในกลุ่ม Homofermentation

Cocci	Rod
Streptococci	Lactobacilli
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>	Thermobacteria
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส
var. <i>diacetalactis</i>	ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>
<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Lactobacillus salivarius</i>
	Streptobacteria
	เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส
	และเจริญได้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส
	<i>Lactobacillus casei</i>
	<i>Lactobacillus alimentaris</i>
	<i>Lactobacillus coryniformis</i>
	<i>Lactobacillus plantarum</i>

ที่มา: Schlegel (1993)

1.1.2 Heterofermentation

กระบวนการเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่มนี้เกิดขึ้นโดยผ่านวิธีฟอสโฟคีโตเลส (phosphoketolase) ผลิตภัณฑ์หลักที่ได้จากกระบวนการหมักคือ กรดแลคติก ประมาณร้อยละ 70 คาร์บอนไดออกไซด์ และเอทานอล หรือกรดแอซิติก แสดงดังภาพที่ 3

แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีวิธีการหมักแบบนี้ ได้แก่ สกุล *Lactobacillus* บางสปีชีส์ และสกุล *Leuconostoc* ตัวอย่างของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 สกุล แสดงดังตารางที่ 2

กระบวนการหมักเริ่มต้นจากกลูโคสถูกเปลี่ยนเป็นกลูโคส-6-ฟอสเฟต และ กลูโคส-6-ฟอสเฟต เปลี่ยนเป็น 6-ฟอสโฟกลูโคเนต และไรบูโลส-5-ฟอสเฟตโดยการทำงานของ เอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส และ 6-ฟอสโฟกลูโคเนตดีไฮโดรจีเนส ตามลำดับ จากนั้นไรบูโลส-5-ฟอสเฟต เปลี่ยนเป็นไซคลูโลส-5-ฟอสเฟตโดยเอนไซม์เพนโตสฟอสเฟตไอโซเมอเรส และ ไซคลูโลส-5-ฟอสเฟต เปลี่ยนเป็นอะซีติลฟอสเฟต และกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต จากนั้น กลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต เปลี่ยนเป็นไพรูเวต และแลคเตต ตามลำดับ ส่วนอะซีติลฟอสเฟตถูก เปลี่ยนเป็นเอทานอล หรือกรดแอซิดขึ้นอยู่กับความสมดุลของสภาวะออกซิเดชันและรีดักชัน ผลิตภัณฑ์สุทธิได้พลังงาน จำนวน ATP 1 โมเลกุล ต่อกลูโคส 1 โมเลกุล (Kandler and Weiss, 1986) แสดงดังภาพที่ 4



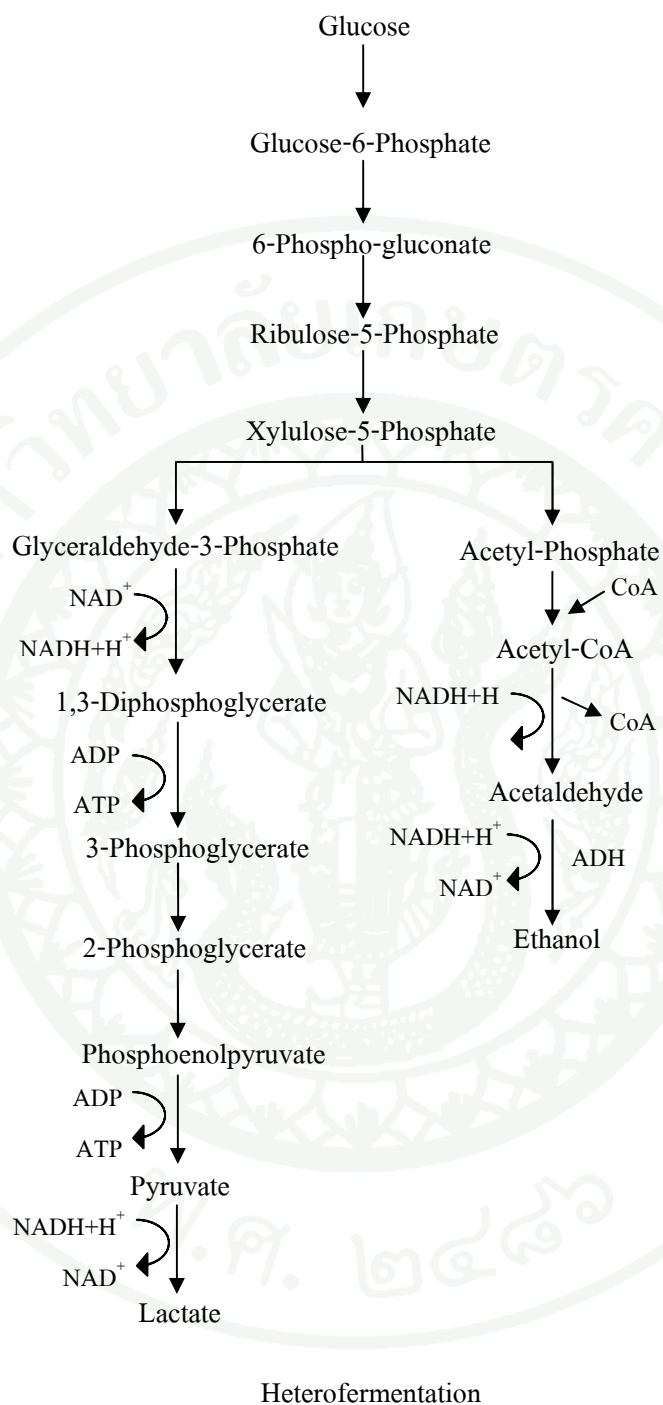
ภาพที่ 3 ผลิตภัณฑ์จากการหมักแบบ Heterofermentation

ที่มา: พวงพร (2547)

ตารางที่ 2 ตัวอย่างแบคทีเรียกรดแลคติกในกลุ่ม Heterofermentation

Cocci	Rod
Streptococci	Lactobacilli
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	<i>Lactobacillus bif fermentans</i>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>
<i>Leuconostoc lactis</i>	<i>Lactobacillus kandleri</i>
	<i>Lactobacillus viredescens</i>

ที่มา: Schlegel (1993)



ภาพที่ 4 กระบวนการหมักของแบคทีเรียกรดแลคติกแบบ Heterofermentation

ที่มา: Cooper (2000); Axelsson (1998)

1.2 แบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก

De Vuyst and Vandamme (1994) จัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกได้เป็น 12 สกุล คือ *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* และ *Weissella* แต่ละสกุลมีลักษณะดังนี้

1.2.1 *Aerococcus*

เซลล์มีรูปร่างกลม ไม่เคลื่อนที่ มีการแบ่งตัวแบบ 2 ระนาบ จึงพบเซลล์อยู่เป็นคู่หรือ 4 เซลล์ สามารถเจริญได้ดีในสภาพที่มีอากาศเพียงเล็กน้อย เป็นกลุ่ม homofermentation ไม่สร้างเอนไซม์แคตาเลส แต่มีบางสายพันธุ์ผลิตเอนไซม์แคตาเลสเทียม (pseudocatalase) แบคทีเรียที่พบในสกุลนี้มี 2 สปีชีส์ คือ *Aerococcus urinae* และ *A. viridans* (Stiles and Holzapfel, 1997)

1.2.2 *Carnobacterium*

เซลล์มีรูปร่างเป็นแท่งคล้าย lactobacilli ซึ่งก่อนหน้านี้ถูกจำแนกไว้ใน lactobacilli ไม่สร้างเอนไซม์แคตาเลส เป็นกลุ่ม heterofermentation ส่วนใหญ่เจริญได้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส บางสายพันธุ์สร้างแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์จากการใช้น้ำตาลกลูโคส ไม่สามารถเจริญบนอาหารที่มีแอสซิเตท และไม่สร้างกรดโพลิอิก มี GC content ประมาณ 33.0-37.2 โมลเปอร์เซ็นต์ พบได้ในเนื้อสัตว์ที่บรรจุสภาพสุญญากาศ และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ปีก แบคทีเรียที่พบอยู่ในสกุลนี้ได้แก่ *Carnobacterium alterfunditum*, *C. divergens*, *C. funditum*, *C. gallinarum*, *C. mobile* และ *C. piscicol* (Schillinger and Holzapfel, 1995)

1.2.3 *Enterococcus*

เซลล์เป็นรูปไข่ การจัดเรียงตัวของเซลล์เป็นเซลล์เดี่ยวหรือคู่ อาจพบเป็นโซ่สายสั้นๆ สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส และในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 6.5 น้ำดีร้อยละ 40 และที่ความเป็นกรด-เบส 9.6 มี GC content ประมาณ 37-45 โมลเปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียที่จัดอยู่ในสกุลนี้ได้แก่ *Enterococcus avium*, *E. cecorum*, *E. faecium*, *E. faecalis*, และ *E. gallinarum* (Devriese and Pot, 1995)

1.2.4 *Lactobacillus*

เป็นกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่มใหญ่ที่สุด มีความหลากหลายของลักษณะทางฟีโนไทป์ ลักษณะทางชีวเคมี และลักษณะทางสรีรวิทยา เนื่องจากมีความแตกต่างของ GC content ภายในสกุลค่อนข้างสูง โดยอยู่ระหว่าง 32-53 โมลเปอร์เซ็นต์ (Axelsson, 1998) เซลล์มีรูปร่างเป็นแท่งหรือทรงแท่ง มีการจัดเรียงตัวเป็นเชลล์เดี่ยวๆ หรือเป็นโซ่ ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างเอนไซม์แคตาเลส บางสายพันธุ์สร้างเอนไซม์แคตาเลสเทียม มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกส์ได้เป็นอย่างดี มักพบทั่วไปในมนุษย์ สัตว์ นม ผลิตภัณฑ์นม อาหารหมักชนิดต่างๆ และเครื่องดื่ม พบในพืชบางชนิด เช่น หน่อหนักรักและผักคอง Hammes และ Vogel (1995) แบ่งแบคทีเรียสกุลนี้โดยพิจารณาจากกระบวนการหมักออกเป็น 3 กลุ่ม คือ

ก. Obligately homofermentative lactobacilli: หมักน้ำตาลแลคโทสได้เป็นกรดแลคติกมากกว่าร้อยละ 85 โดยผ่านวิถี EMP ผลิตเอนไซม์ fructose-1,6-bisphosphate aldolase ได้ แต่ไม่ผลิตเอนไซม์ phosphoketolase ดังนั้นแบคทีเรียกลุ่มนี้จึงไม่สามารถหมักน้ำตาลเพนโทสได้ เช่น *Lactobacillus acidophilus*, *L. delbrueckii* และ *L. salivarius* (Stiles and Holzapfel, 1997)

ข. Facultative heterofermentative lactobacilli: หมักน้ำตาลเฮกโซสได้เป็นกรดแลคติกโดยผ่านวิถี EMP ผลิตได้ทั้งเอนไซม์ aldolase และ phosphoketolase จึงสามารถหมักน้ำตาลเพนโทสได้ เช่น *L. plantarum* และ *L. spicheri* (Tannock, 1992; Meroth *et al.*, 2004)

ค. Obligately heterofermentative lactobacilli: หมักน้ำตาลเฮกโซส และน้ำตาลเพนโทสได้โดยผ่านวิถี phosphogluconate ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดแลคติก เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ เช่น *L. siliginis*, *L. vaginalis* และ *L. zymae* (Embley *et al.*, 1989; Vancanneyt *et al.*, 2005; Aslam *et al.*, 2006)

1.2.5 *Lactococcus*

เป็นแบคทีเรียที่พบได้ในผลิตภัณฑ์นมหลายชนิด มีเซลล์เป็นรูปไข่ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1 ไมโครเมตร ไม่เคลื่อนที่ มีการจัดเรียงตัวเป็นเชลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรือต่อกันเป็นสายโซ่ มีกระบวนการหมักได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดแลคติก (L-lactic acid) เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 10

องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส มี GC content ประมาณ 34-43 โมลเปอร์เซ็นต์ ได้แก่ *Lactococcus garvieae*, *L. lactis*, *L. piscium*, *L. plantarum* และ *L. raffinolactis* (Teuber, 1995)

1.2.6 *Leuconostoc*

เป็นแบคทีเรียที่พบได้ในผลิตภัณฑ์นมหลายชนิด เครื่องดื่มที่ได้จากการหมัก และผักดองหลายชนิด ลักษณะของเซลล์มีรูปร่างกลม มีการจัดเรียงตัวเป็นคู่ หรือเป็นสายโซ่ จัดเป็นกลุ่ม heterofermentation อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ระหว่าง 20-30 องศาเซลเซียส เป็นกลุ่มที่ไม่สร้างเอนไซม์แคตาเลส มักพบอยู่ร่วมกับ lactobacilli มี GC content ประมาณ 38-44 โมลเปอร์เซ็นต์ ประกอบด้วย 8 สปีชีส์ คือ *Leuconostoc argentinum*, *L. carnosum*, *L. citreum*, *L. fallax*, *L. gelidum*, *L. lactis*, *L. mesenteroides* และ *L. pseudomesenteroides* (Dellaglio et al., 1995)

1.2.7 *Oenococcus*

มีรูปร่างกลม ซึ่งเปลี่ยนชื่อมาจาก *Leuconostoc oenus* เดิม เนื่องจากมีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างจาก *Leuconostoc* และทนต่อกรดและเอทานอลได้ดีกว่า นอกจากนี้ลำดับเบสของ 16S rRNA ต่างจากสปีชีส์อื่นในสกุล *Leuconostoc* อย่างชัดเจน (Dellaglio et al., 1995)

1.2.8 *Pediococcus*

มีรูปร่างกลม การแบ่งตัวเป็นแบบ 2 ทิศทางบนระนาบเดียวกัน พบการจัดเรียงตัวอยู่เป็นคู่หรืออยู่เป็น 4 เซลล์ติดกัน เป็นกลุ่ม homofermentation ต้องการสารอาหารที่มีความซับซ้อน มักพบร่วมกับพืชที่นำมาหมัก เช่น ผักดองเค็ม นอกจากนี้ยังพบว่าการปนเปื้อนในเครื่องดื่มที่หมักด้วยยีสต์ มี GC content ประมาณ 34-44 โมลเปอร์เซ็นต์ ได้แก่ *Pediococcus acidilactici*, *P. damnosus*, *P. dextrinicus*, *P. inopinatus*, *P. parvulus* และ *P. pentosaceus* (Simpson and Taguchi, 1995)

1.2.9 *Streptococcus*

เซลล์มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8-1.2 ไมโครเมตร มีการจัดเรียงตัวเป็นคู่หรือเป็นสายโซ่ ต้องการสารอาหารหลายชนิด เจริญได้ที่อุณหภูมิ 20-40 องศาเซลเซียส เป็นทั้ง homofermentation และ heterofermentation พบในอาหารเป็นส่วนใหญ่ นิยมใช้เป็นก้ำเชื้อในอุตสาหกรรมนมหมัก ได้แก่ *Streptococcus cremoris*, *S. diacetylactis* และ *S. lactis* (Hardie and Whiley, 1995)

1.2.10 *Tetragenococcus*

เป็นสกุลที่เปลี่ยนชื่อมาจาก *Pediococcus halophilus* เดิม ลักษณะส่วนใหญ่จึงเหมือนกัน มีรูปร่างกลม ต้องการโซเดียมคลอไรด์ในการเจริญ สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์สูงถึงร้อยละ 18 และมีลำดับของ 16S rRNA ต่างจาก *Pediococcus* (Simpson and Taguchi, 1995)

1.2.11 *Vagococcus*

เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งเคลื่อนที่ได้แต่ไม่ทุกสปีชีส์ ประกอบด้วย 2 สปีชีส์ คือ *Vagococcus fluvialis* ซึ่งเดิมอยู่ในสกุล *Streptococcus* ที่แยกได้จากอุจจาระของไก่ และ *V. salmonmarum* ซึ่งแยกได้จากปลาแซลมอน (Stiles and Holzapfel, 1997)

1.2.12 *Weissella*

เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกสกุลเดียวที่มีทั้งรูปร่างกลมและแท่ง ประกอบด้วย 7 สปีชีส์ ซึ่งเดิมจำแนกอยู่ในสกุล *Lactobacillus* และ *Leuconostoc* คือ *Weissella cofusus* (*Lactobacillus cofusus*), *W. halotolerans* (*L. halotolerans*), *W. kandleri* (*L. kandleri*), *W. minor* (*L. minor*), *W. paramenteroides* (*Leuconostoc paramenteroides*), *W. viridescens* (*L. viridescens*) และสปีชีส์ใหม่ที่แยกได้จากไส้กรอกเปรี้ยว คือ *W. hellenica* (Stiles and Holzapfel, 1997)

2. สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก

การนำแบคทีเรียกรดแลคติกมาใช้ประโยชน์ส่วนใหญ่เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักแบบออลิซิมทั้งชนิดที่เป็นผลิตภัณฑ์ปฐมภูมิและผลิตภัณฑ์ทุติยภูมิ โดยผลิตภัณฑ์เหล่านี้มีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้หลายชนิด เช่น *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *C. perfringens*, *Staphylococcus aureus* และ *Listeria monocytogenes* รวมทั้งแบคทีเรียกรดแลคติกบางชนิด (De Vuyst and Vandamme, 1994) ซึ่งสารที่แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างออกมายับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าว ส่วนใหญ่เป็นกรดแลคติกและกรดแอซีติก รวมทั้งยังมีสารชนิดอื่นๆ ที่เกิดขึ้นในปริมาณที่น้อยกว่ากรดแลคติก และกรดแอซีติก แต่มีผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดต่างๆ เช่นกัน ได้แก่ กรดฟอร์มิก กรดไขมันอิสระ แอมโมเนีย ไดอะซีทิล อะซีทาลดีไฮด์ เอทานอล เบนโซเอต ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ อะซีโตอิน เอนไซม์ที่มีผลทำให้เซลล์แบคทีเรียแตก (bacteriolytic enzyme) และแบคทีริโอซิน (bacteriocin) (Kelly *et al.*, 1996) นอกจากนี้การมีแบคทีเรียกรดแลคติกเจริญอยู่ร่วมกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ถือเป็นการควบคุมแบคทีเรียเหล่านั้นทางอ้อมคือ ทำให้เกิดการแข่งขันกันในการใช้สารอาหาร และการใช้พื้นที่สำหรับการเจริญ โดยสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ ที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีการศึกษากันแพร่หลาย ได้แก่

2.1 กรดอินทรีย์

กรดอินทรีย์ที่เกิดจากแบคทีเรียกรดแลคติก คือ กรดแลคติกและกรดแอซีติก มีการศึกษาพบว่ากรดแอซีติกมีความสามารถในการยับยั้งราเส้นใย ยีสต์ และแบคทีเรียได้ โดยพบว่ากรดแลคติกและกรดแอซีติกเมื่อทำงานร่วมกันสามารถลดการเจริญของ *Salmonella typhimurium* ทั้งกรดแลคติกและกรดแอซีติกที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกมีผลทำให้ค่า pH ของผลิตภัณฑ์อาหารหมักลดลง กรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ส่วนใหญ่พบว่าเป็นกรดแลคติก มีกรดแอซีติกเพียงเล็กน้อย และพบว่ากรดแลคติกสามารถแทรกผ่านเข้าไปภายในเซลล์จุลินทรีย์ได้เมื่อพบสภาพภายในเซลล์ที่มีค่า pH สูงกว่าภายนอกเซลล์ (De Vuyst and Vandamme, 1994) การยับยั้งจึงเกิดขึ้นเนื่องจากการลดลงของ pH และการสะสมของกรดอินทรีย์ โดยปกติเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์มีหน้าที่เป็นเยื่อเลือกผ่าน กรดอินทรีย์ในรูปที่ไม่แตกตัวสามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้โดยวิธีแพร่ผ่าน (Diffusion method) เมื่อเข้าสู่ภายในเซลล์ กรดอินทรีย์เกิดการแตกตัวและปลดปล่อยโปรตอนเข้าสู่ภายในไซโตพลาสซึม ทำให้เกิดการสะสมของกรดภายในเซลล์และทำลายสมดุลความต่างศักย์ที่เยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้แรงขับเคลื่อนโปรตอนถูกทำลาย ซึ่งไปขัดขวางกระบวนการ

เมแทบอลิซึมที่สำคัญภายในเซลล์ ยับยั้งกลไกการขนส่งอาหาร และกระบวนการสร้างพลังงาน ทำให้เซลล์ไม่สามารถเจริญและอยู่รอดได้ (Cherrington, 1990)

2.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

ในภาวะที่มีออกซิเจน แบคทีเรียกรดแลคติกบางกลุ่มโดยเฉพาะ lactobacilli สามารถสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่สามารถทำลายเซลล์แบคทีเรีย โดย sulfhydryl group ของโปรตีน และไขมันที่เชื่อมเซลล์จะถูกออกซิไดส์อย่างรุนแรง ทำให้ไม่สามารถควบคุมการผ่านเข้าออกของสารได้ (Lindgren and Dobrogosz, 1990) การสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เกี่ยวข้องกับกระบวนการส่งผ่านอิเล็กตรอน (electron transport) อาศัยเอนไซม์ในกลุ่ม Flavin และมีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน แสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 เอนไซม์จากแบคทีเรียกรดแลคติกที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

ปฏิกิริยา		เอนไซม์
$\text{NADH} + \text{H}^+ + \text{O}_2$	$\longrightarrow \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}_2$	NADH:H ₂ O ₂ oxidase
$2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+$	$\longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$	superoxide dismutase
$\text{Pyruvate} + (\text{PO}_4)^{3-} + \text{O}_2$	$\longrightarrow \text{Acetyl-phosphate} + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$	pyruvate oxidase
$\alpha\text{-glycerophosphate} + \text{O}_2$	$\longrightarrow \text{Dihydroxyacetone phosphate} + \text{H}_2\text{O}_2$	$\alpha\text{-glycerophosphate}$ oxidase
$\text{Lactate} + \text{O}_2$	$\longrightarrow \text{Pyruvate} + \text{H}_2\text{O}_2$	L-lactate oxidase
$\text{NADH} + \text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}_2$	$\longrightarrow \text{NAD}^+ + 2\text{H}_2\text{O}$	NADH peroxidase
$2\text{H}_2\text{O}_2$	$\longrightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$	Mn ²⁺ -pseudocatalase

ที่มา: Vuyst and Vandamme (1994)

กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์โดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เกิดขึ้นโดยการออกซิไดส์อย่างรุนแรงบนเซลล์ของจุลินทรีย์เป้าหมาย โดยจะเข้าทำปฏิกิริยาที่หมู่ sulfhydryl group ของโปรตีนในเซลล์ โครงสร้างชั้นนอกของกรดนิวคลีอิกและไขมันที่เชื่อมเซลล์ ในบางปฏิกิริยามีการจับออกซิเจนทำให้จุลินทรีย์เป้าหมายอยู่ในสภาวะไร้อากาศจึงไม่สามารถเจริญได้ (Salminen and

Wright, 1998) ในสภาวะที่มีไฮโอไซยาเนต (thiocyanate, SCN⁻) และเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส (lactoperoxidase) พบว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์แสดงผลการยับยั้งจุลินทรีย์มากขึ้น เนื่องจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้าทำปฏิกิริยากับไฮโอไซยาเนตโดยอาศัยเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสเกิดผลิตภัณฑ์เป็นไฮโปไธยานีน (hypothyanite, OSCN⁻) ซึ่งไฮโปไธยานีนมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้เช่นกัน กลไกหลักในการยับยั้งจุลินทรีย์คือ ขัดขวางกระบวนการไกลโคไลซิส โดยยับยั้งการขนส่งกลูโคส และเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับหมู่ซัลไฮดริลของเอนไซม์เฮกโซไคเนส (hexokinase) และกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) นอกจากนี้ยังพบว่าไฮโปไธยานีนออกฤทธิ์ต่อแบคทีเรียแกรมบวกในลักษณะยับยั้งการเจริญแต่ไม่ทำลาย (bacteriostatic) และออกฤทธิ์ต่อแบคทีเรียแกรมลบในลักษณะทำลายอย่างรวดเร็ว (bactericidal) (Ouwehand, 1998)

2.3 ไดอะซีทิล (Diacetyl)

เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์ไพรูเวต ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถใช้ชีตรเป็นแหล่งคาร์บอนได้ เช่น *Lactobacillus cremoris* และ *L. lactis* subsp. *lactis* var. *diacetyl* (Hugenholtz, 1993) ในสภาวะที่มีชีตร และพลังงานจากกระบวนการเมแทบอลิซึมจะเหนี่ยวนำให้เกิดการสังเคราะห์ไพรูเวตจำนวนมาก ไพรูเวตส่วนเกินจะถูกเปลี่ยนเป็นไดอะซีทิลและอะซิโตน ซึ่งสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของการเน่าเสียของอาหารได้หลายชนิด (Motlagh *et al.*, 1991)

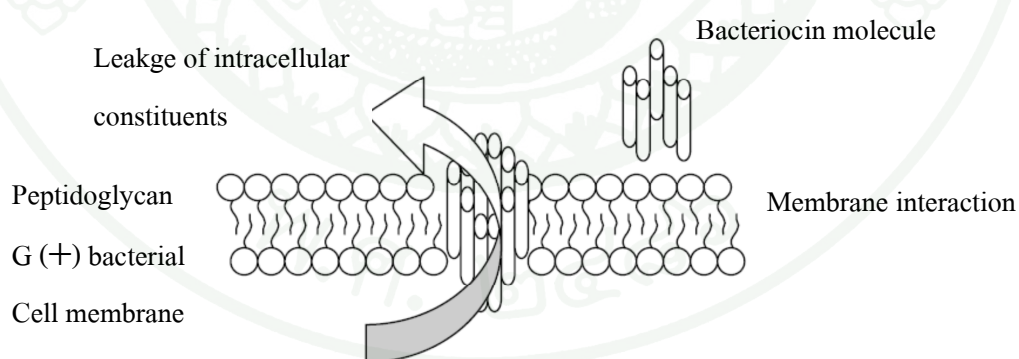
2.4 คาร์บอนไดออกไซด์

เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการหมักน้ำตาลแบบ heterofermentation ซึ่งแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นจะไปแทนที่แก๊สออกซิเจนในสภาวะแวดล้อมทำให้เกิดสภาวะ anaerobe จึงไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ โดยเฉพาะในกลุ่มของรา นอกจากนี้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ยังทำให้ค่า pH ภายในเซลล์ และรอบๆ เซลล์ลดลง มีผลทำให้เชื้อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย (De Vuyst and Vandamme, 1994)

2.5 แบคทีเรียโอซิน

เป็นสารประกอบโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ (proteinaceous antimicrobial substance) ชนิดหนึ่ง ผลิตจากแบคทีเรียบางชนิดสามารถยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ในสปีชีส์หรือสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกัน กลไกการทำลายมีความจำเพาะต่อเซลล์เป้าหมายที่แน่นอน แบคทีเรียโอซินบางชนิดทนความร้อนได้ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จึงใช้ร่วมกับการแปรรูปอาหารที่ใช้ความร้อนได้ แบคทีเรียโอซินสามารถถูกยับยั้งด้วยเอนไซม์ที่ย่อยสลายโปรตีน เช่น ทริปซิน (Trypsin) เป็นต้น ตัวอย่างของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกและอนุญาตให้ใช้ผสมในอาหาร ได้แก่ ไนซิน (Nisin) (De Vuyst and Vandamme, 1994)

กลไกการออกฤทธิ์ของแบคทีเรียโอซินเริ่มจากการทำให้เกิดโพรงบนเยื่อหุ้มเซลล์ (Bruno *et al.*, 1992; Bruno and Montville, 1993) แสดงดังภาพที่ 5 ส่งผลให้มีการเคลื่อนย้ายไอออนอย่างอิสระและสูญเสียแรงเคลื่อนของโปรตอน (proton motive force) จึงทำให้ความต่างศักย์ลดลงและไม่มีการสร้างพลังงานเกิดขึ้น ดังนั้นเมื่อเซลล์ไม่สามารถนำสารอาหารขนาดใหญ่เข้าสู่เซลล์ได้ แต่น้ำสามารถไหลเข้าพร้อมกับการไหลออกของสารโมเลกุลขนาดเล็กจึงทำให้เซลล์แตกจากแรงดันออสโมติก (Sahl *et al.*, 1995)



ภาพที่ 5 กลไกการสร้างโพรงที่เยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อเป้าหมายโดยแบคทีเรียโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติก

ที่มา: Ruhr *et al.* (1985)

คำนิยามของแบคทีเรียโอซินคือ สารประกอบโปรตีนที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่มีความไวต่อสารดังกล่าวและไม่เป็นพิษต่อเซลล์ที่ผลิต (De Vuyst and Vandamme, 1994) โดย Cleveland *et al.* (2001) ได้สรุปความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียโอซินและสารปฏิชีวนะแสดงดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียโอซินและสารปฏิชีวนะ

ลักษณะและคุณสมบัติ	แบคทีเรียโอซิน	สารปฏิชีวนะ
การนำไปใช้งาน	ทางอาหาร	ทางการแพทย์
กระบวนการสังเคราะห์	ผลิตจากไรโบโซม	ผลิตผ่านกระบวนการที่เป็น secondary metabolism
ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียเป้าหมายที่มีความหลากหลาย	น้อย	มาก
การสร้างระบบภูมิคุ้มกันตนเองของเซลล์ผู้ผลิต	มี	ไม่มี
กลไกในการต่อต้านของเซลล์เป้าหมาย	ปรับสภาพองค์ประกอบเยื่อหุ้มเซลล์	การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม
ลักษณะของปฏิกิริยาบนเซลล์เป้าหมาย	เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์	ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์หรือโครงสร้างภายในเซลล์

ที่มา: Cleveland *et al.* (2001)

2.6 อะซีทัลดีไฮด์ (Acetaldehyde)

เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักแบบออลิซิมของคาร์โบไฮเดรตแบบ heterofermentation ในสภาวะที่ไม่มีเอนไซม์ alcohol dehydrogenase ทำให้เกิดการสร้างและขับอะซีทัลดีไฮด์ออกมาภายนอกเซลล์ ผลของอะซีทัลดีไฮด์ต่อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ นั้นยังไม่มีการศึกษามากนัก แต่มีรายงานว่าอะซีทัลดีไฮด์ที่มีความเข้มข้นระหว่าง 10-100 ส่วนในล้านส่วน สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคที่มักพบเป็นในอาหาร เช่น *E. coli*, *S. aureus* และ *S. typhimurium* ได้ (De Vuyst and Vandamme, 1994)

3. การใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียกรดแลคติก

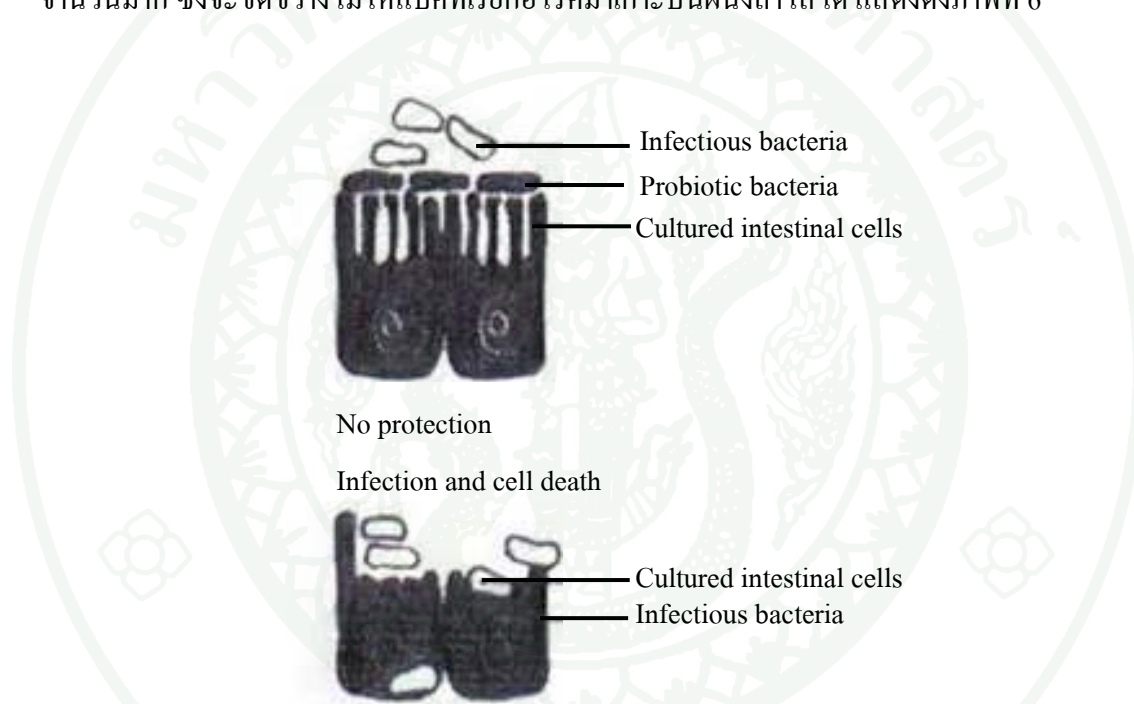
แบคทีเรียกรดแลคติกถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางเพื่อเป็นหัวเชื้อในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก นอกจากประโยชน์ในการปรับปรุงคุณลักษณะของอาหารให้ดีขึ้นแล้ว แบคทีเรียกรดแลคติกยังสามารถผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ในระหว่างกระบวนการหมักได้แก่ กรดแลคติก เอทานอล ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดอะซีติล และแบคเทอรีโอซิน ปัจจุบันแบคเทอรีโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติกได้รับความสนใจอย่างสูงในการนำไปใช้เป็นสารกันเสียโดยตรง (Cintas *et al.*, 1998) ใช้เป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ (Claypool, 1996) โปรไบโอติกส์ (Saarela *et al.*, 2000) และเป็นเครื่องหมายสำหรับ Food-grade cloning vector (Allison and Klaenhammer, 1996; Takala and Saris, 2002) และป้องกันโรคด้านมอัสในวัว (Ryan, 1998) เป็นต้น

3.1 ความสามารถในการเป็นโปรไบโอติกส์

ในธรรมชาติแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สามารถผลิตแบคเทอรีโอซินได้ โดยเฉพาะ *Lactobacillus* ซึ่งพบมากในลำไส้ใหญ่ของมนุษย์และสัตว์ แบคทีเรียกลุ่มนี้มีอิทธิพลต่อความสมดุลในระบบทางเดินอาหาร โดยจะช่วยป้องกันการเกาะของแบคทีเรียก่อโรคที่ผนังลำไส้ เช่น *E. coli* (Saarela *et al.*, 2000) ช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันทำให้ร่างกายแข็งแรง ช่วยยับยั้งการทำงานของสารที่มีสมบัติเป็นสารก่อมะเร็ง (Adachi, 1992) และสารก่อกลายพันธุ์ (Park and Rhee, 2001) นอกจากนี้ยังช่วยลดคอเลสเตอรอลได้อีกด้วย (Shun *et al.*, 1989) พบว่าจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ผลิตแบคเทอรีโอซินจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารได้ดีกว่าจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในระบบทางเดินอาหารปกติ Balcazar *et al.* (2006) อธิบายกลไกการทำงานของโปรไบโอติกส์ดังนี้

3.1.1 การสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ (production of inhibitory compounds) พบว่าแบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถสร้างแบคเทอรีโอซิน กรดอินทรีย์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นต้น ซึ่งสารดังกล่าวมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ได้

3.1.2 การยึดเกาะที่เยื่อผิวเซลล์ (competition for adhesion sites) การยึดเกาะของโปรไบโอติกส์ที่ครอบครองพื้นที่ของเซลล์เยื่อในระบบทางเดินอาหารเป็นกลไกหนึ่งในการป้องกันหรือขัดขวางการเกาะติดของแบคทีเรียก่อโรค เช่น *E. coli* และ *Salmonella* sp. โดยกลไกการยึดเกาะเริ่มต้นแบคทีเรียที่เป็นโปรไบโอติกส์เจริญบนผนังลำไส้ และเพิ่มจำนวนเซลล์ได้เป็นจำนวนมาก ซึ่งจะขัดขวางไม่ให้แบคทีเรียก่อโรคมายึดเกาะบนผนังลำไส้ได้ แสดงดังภาพที่ 6



ภาพที่ 6 แบบจำลองการยึดเกาะของแบคทีเรียที่เป็นโปรไบโอติกส์และแบคทีเรียก่อโรค

ที่มา: Nestle (2002)

Nikoskelainen *et al.* (2001) ได้นำแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ *Bifidobacterium lactis* Bb12, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus bulgaricus*, *L. casei*, *L. johnsonii* La1, *L. rhamnosus* LC705 และ *L. rhamnosus* ATCC53103 ซึ่งใช้เป็นโปรไบโอติกส์ในมนุษย์มาศึกษาการแข่งขันการยึดเกาะกับแบคทีเรียที่ก่อโรคในปลาคือ *Aeromonas salmonicida* ที่เมื่อบริเวณผิวหนังและลำไส้ของปลา โดยการตรวจแบคทีเรียชนิดต่างๆ ด้วยวิธีการติดฉลากสารกัมมันตรังสี

บนเซลล์ของแบคทีเรีย (radioactively labeled bacteria) และวัดกิจกรรมของสารกัมมันตรังสี (radioactivity) ด้วยวิธี liquid scintillation พบว่า *L. rhamnosus* ATCC53103 และ *L. bulgaricus* สามารถยึดเกาะกับเมือกบริเวณหลอดอาหาร กระเพาะอาหาร ลำไส้ เหงือก ผิวหนัง และสามารถแข่งขันการยึดเกาะกับ *A. salmonicida* ที่บริเวณเมือกของผิวหนังและลำไส้ได้ดีที่สุด

3.2 แบคทีเรียโอซินมีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการนำมาใช้เป็นสารกันเสียในอาหาร กล่าวคือ

- 3.2.1 เป็นที่ยอมรับว่าเป็นสารที่ปลอดภัย
- 3.2.2 ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ยูคาริโอต
- 3.2.3 สามารถถูกยับยั้งได้ด้วยน้ำย่อยประเภทโปรติเอส จึงมีผลน้อยมากกับแบคทีเรียที่อยู่ในระบบทางเดินอาหาร
- 3.2.4 มักทนต่อ pH และความร้อน
- 3.2.5 มีฤทธิ์ในการยับยั้งกว้าง สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค และแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในอาหาร เช่น *Listeria monocytogenes* และ *Clostridium botulinum* เป็นต้น
- 3.2.6 มีกิจกรรมจำเพาะ (specific activity) สูง (Holzapfel *et al.*, 1995)
- 3.2.7 ปัจจุบันมีการนำแบคทีเรียโอซินมาใช้ในผลิตภัณฑ์เพื่อรักษาสุขภาพปากและฟัน เช่น ยาสีฟันและน้ำยาบ้วนปาก เพื่อป้องกันฟันผุและโรคที่เกิดขึ้นในช่องปาก (Claypool, 1996)

3.3 หัวเชื้อจุลินทรีย์ในอุตสาหกรรมอาหาร

การนำจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ผลิตแบคทีเรียโอซินมาใช้เป็นหัวเชื้อในกระบวนการหมักนั้นเป็นการเพิ่มความปลอดภัยแก่ผู้บริโภค เนื่องจากแบคทีเรียโอซินสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคหลายชนิด เช่น *C. botulinum*, *L. monocytogenes* และ *S. aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ถูกเฝ้าระวังในผลิตภัณฑ์อาหารทั้งสิ้น (Cleaveland, 2001) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จึงมีความปลอดภัยกว่าผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากหัวเชื้อจุลินทรีย์ปกติ นอกจากแบคทีเรียก่อโรคแล้ว *Lactobacillus plantarum* 21B สายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตโดเปรี้ยว (sour dough) และยังสามารถผลิตสารยับยั้งเชื้อราได้ (Lavermicocca *et al.*, 2000) ทำให้สามารถยืดอายุการเก็บได้นานยิ่งขึ้น

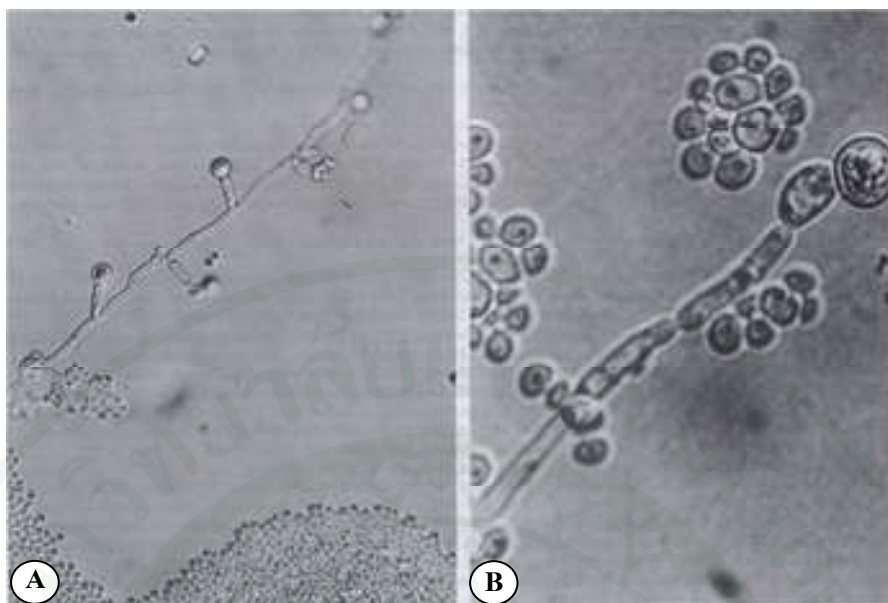
3.4 การใช้แบคทีเรียโอซินเป็นสารกันเสียในผลิตภัณฑ์อาหาร

ปัจจุบันได้มีการนำผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติเข้ามาทดแทนการใช้สารเคมีในการควบคุมจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของอาหารเน่าเสียและจุลินทรีย์ก่อโรค ไนซิน (Nisin) เป็นแบคทีเรียโอซินเพียงชนิดเดียวที่ได้รับการยอมรับจากองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (Food and Drug Association; FDA) สามารถใช้เป็นสารกันเสียในผลิตภัณฑ์อาหาร (Delves-Broughton *et al.*, 1996) และยังมีงานวิจัยจำนวนมากรายงานถึงการนำแบคทีเรียโอซินชนิดอื่นมาใช้ในผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น ผลิตภัณฑ์นม (Laukova *et al.*, 1999; McAuliffe *et al.*, 1999) ผลิตภัณฑ์เนื้อ (Aymerich *et al.*, 2000; Callewart *et al.*, 2000) ผลิตภัณฑ์กุ้ง (Einarsson and Laucon, 1995) และผลิตภัณฑ์ปลา (Nilsson *et al.*, 1999) ไนซินสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้หลายสายพันธุ์ เช่น *B. stearothermophilus*, *L. monocytogenes* และยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *B. subtilis*, *C. botulinum* และ *C. butyricum* (Thomas, 2000) แต่ประสิทธิภาพของแบคทีเรียโอซินในการเป็นสารกันเสียในผลิตภัณฑ์อาหารแต่ละชนิดนั้นไม่เหมือนกัน จึงจำเป็นต้องหาปริมาณแบคทีเรียโอซินที่เหมาะสม และคำนวณปริมาณแบคทีเรียโอซินที่จะนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ ภายใต้อาณัติการเก็บรักษาที่หลากหลาย โดยต้องคำนึงถึงค่าการละลาย ความเสถียร รสสัมผัส ค่า pH และความร้อน รวมถึงสายพันธุ์และจำนวนจุลินทรีย์ที่ถูกลบยับยั้ง

4. ยีสต์ *Candida albicans*

4.1 สันฐานวิทยา

เชื้อในสกุล *Candida* จัดเป็น Yeast-like fungi คือ เป็นยีสต์เซลล์ มีรูปร่างกลมหรือรีสืบพันธุ์โดยการแตกหน่อ (budding) ได้เป็น blastoconidia และสามารถสร้างได้ทั้ง true hyphae และ pseudohyphae ส่วนปลายมักสร้าง chlamydospores รูปร่างกลม แสดงดังภาพที่ 7 ยีสต์ *Candida* มีหลายสปีชีส์ที่เป็นสาเหตุของโรคที่พบบ่อย คือ *C. albicans* (ประมาณร้อยละ 90) รองลงมาได้แก่ *C. tropicalis*, *C. stellatoidea*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* และ *C. guilliermondii* เป็นต้น (พรพรรณ, 2535)



ภาพที่ 7 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของยีสต์ *C. albicans*

A: budding cells กำลังขยาย 600 เท่า

B: chlamydospores กำลังขยาย 1500 เท่า

ที่มา: Hoog *et al.* (2000)

4.2 สรีรวิทยา

เป็นยีสต์ที่มีรูปร่างทั้งแบบ yeast form และ mycelium form ขึ้นอยู่กับระยะเวลาของการเจริญอาหารเพาะเลี้ยง และสภาวะแวดล้อม เมื่อเจริญบนอาหารแข็ง Sabouraud dextrose agar ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน รูปร่างเซลล์มีลักษณะกลมหรือรูปไข่ ขนาด 5-7 ไมโครเมตร บางชนิดค่อนข้างยาว เพิ่มจำนวนด้วยการสร้าง blastoconidia ถ้าเลี้ยงบนอาหารแข็ง Cornmeal ที่อุณหภูมิห้อง มีรูปร่างเป็น mycelium และ pseudomycelium ส่วนปลายมักสร้าง chlamydoconidia รูปร่างกลมผนังหนา ขนาด 8-12 ไมโครเมตร สร้าง blastoconidia จาก hyphae หรือ pseudohyphae ตรงบริเวณที่มีผนังกันเซลล์ ถ้าอยู่ในสภาวะที่มีอากาศน้อยภายใต้แผ่น cover slip สามารถสร้าง mycelia และ chlamydoconidia ได้เร็วขึ้น (พรรณกร, 2535)

4.3 นิเวศวิทยา

C. albicans เป็นเชื้อประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหาร และตามเยื่อต่างๆ ของมนุษย์ เช่น ปาก และช่องคลอด เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบในลำไส้ของนกและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ส่วน *Candida* ชนิดอื่นๆ พบตามผิวหนังของมนุษย์ปกติ โดยเฉพาะบริเวณระหว่างนิ้วเท้า ได้เล็บเท้า สะดือ และยังพบอยู่ตามพืชผัก และดิน อย่างไรก็ตามเชื้อนี้ไม่สามารถเจริญอยู่ในธรรมชาติได้ ถ้าพบแสดงว่าถูกปนเปื้อนด้วยอุจจาระของมนุษย์หรือสัตว์ โดยเฉพาะจำนวนเชื้อที่อยู่ในปากจะมากขึ้น ถ้าไม่รักษาความสะอาดในช่องปาก ส่วนเชื้อที่อยู่ในลำไส้ขึ้นอยู่กับจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ที่คอยแย่งอาหาร หรือปล่อยสารยับยั้งต่างๆ ออกมา เช่น กรดแลคติกทำให้ *C. albicans* ไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ (พรณกร, 2535)

4.4 การก่อโรค

4.4.1 โรคติดเชื้อ *Candida* ในปาก (Candidiasis of oral cavity)

ภายในช่องปากมีสภาพเปียกชื้นและเป็นแหล่งรวมของจุลินทรีย์หลายชนิด เมื่อเนื้อเยื่อภายในช่องปากมีภูมิคุ้มกันต้านต่อเชื้อน้อยลง เชื้อต่างๆ โดยเฉพาะ *Candida* จะสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้เป็นจำนวนมาก ลักษณะทางคลินิกของโรคติดเชื้อ *Candida* ในปากมีหลายแบบที่พบบ่อย คือ ฝ้าขาว (oral thrush) มักพบในทารก เนื่องจากภูมิคุ้มกันต่อเชื้อยังเกิดขึ้นไม่เพียงพอ ติดเชื้อจากหัวนม ขวดนม และน้ำนมที่ใช้เลี้ยงทารก ติดเชื้อจากช่องคลอดมารดาที่เป็นโรคตกขาวจากเชื้อ *Candida* นอกจากนี้ยังพบในผู้สูงอายุ ผู้ป่วยโรคมะเร็ง ผู้ป่วยที่ได้รับยาจำพวกสเตอรอยด์ และผู้ป่วยโรคเรื้อรังอื่นๆ เช่น ผู้ป่วยติดเชื้อ human immunodeficiency virus (HIV) และโรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง (acquired immunodeficiency syndrome; AIDS) ในผู้ป่วยที่ได้รับยาปฏิชีวนะแบบครอบจักรวาล (Hoepelmana and Dupont, 1996) ลักษณะเป็นแผ่นฝ้าสีขาว หนาพอประมาณบริเวณกระพุ้งแก้ม ลิ้น เหงือก เพดานปาก ตลอดจนทอนซิล เมื่อใช้ปากคีบจับจะอ่อนนุ่มคล้ายฝ้าน้ำนม ขูดออกได้ง่ายโดยเลือดไม่ออก อีกแบบหนึ่งคือ ปากนกกระจอก (angular cheilitis) ผิวหนังตรงมุมปากที่เป็นโรคข้างใดข้างหนึ่งหรือทั้ง 2 ข้าง มีลักษณะเปื่อยยุ่ย เป็นคราบสีขาว และเห็นรอยปริ อาจพบน้ำเหลืองจับกรังเป็นสะเก็ดสีเหลืองอยู่ที่ขอบ ในสภาวะที่ภูมิคุ้มกันต่ำมากๆ อาจกลายเป็น candida granuloma ได้ คือ มีลักษณะเป็นก้อนนูนแข็งสีแดง มีสะเก็ดสีเหลืองปกคลุม ผู้ที่ใส่ฟันปลอมอาจทำให้เกิดแผลขึ้นก่อนแล้วเชื้อ *Candida* ที่มีอยู่ในช่องปากลุกลามก่อโรคขึ้น

เรียกว่า denture stomatitis มีการอักเสบของเนื้อเยื่อชั้นใต้เยื่อเมือก เกิดแผลอักเสบเรื้อรังที่รอยต่อของเหงือกกับฟันปลอม (พรรณกร, 2535)

4.4.2 โรคติดเชื้อ *Candida* บริเวณผิวหนังและเล็บ (cutaneous candidiasis)

บริเวณรอยพับ เช่น ขาหนีบ รักแร้ ซอกนิ้วมือ นิ้วเท้า โดยเฉพาะในเด็ก คนอ้วน ผู้ป่วยเบาหวาน ผู้ที่ได้รับยาสเตียรอยด์จะติดเชื้อ *Candida* ได้ง่าย (Beck-Sague and Jarvis, 1993) ลักษณะทางคลินิกจะเห็นเป็นตุ่มอักเสบสีแดงบริเวณผิวหนังที่ติดเชื้อ ต่อมาตุ่มเหล่านี้จะกลายเป็นหนองและแตกออกเป็นแผลตื้นๆ และมีฝ้าขาวของผิวหนังที่ตายติดอยู่ ตุ่มเหล่านี้จะขยายตัวรวมกันเป็นแผ่นฝ้าขนาดใหญ่ มีอาการคันและแสบ ในผู้ป่วยที่เป็นอยู่นานแผ่นฝ้าจะค่อยๆ จางหายไปเอง แต่ผิวหนังบริเวณที่เป็นโรคจะหนาขึ้นมีสีคล้ำพบรอยปริปรากอยู่ตรงซอกหลังรอยพับ ลักษณะของโรคชนิดนี้เรียกว่า candida intertrigo ในกรณีเป็นที่เล็บ เนื้อข้างเล็บจะบวมแดง มีอาการอักเสบร่วมด้วยต่างจากโรคกลากที่เล็บ ซึ่งจะพบโรคที่เล็บเท่านั้น เล็บที่เกิดโรคมักมีสีเหลือง ผิวของแผ่นเล็บจะกลายเป็นระลอกคลื่นในแนวขวาง (พรรณกร, 2535)

4.4.3 โรคติดเชื้อ *Candida* บริเวณผิวหนังและเยื่อเมือกเรื้อรัง (Chronic mucocutaneous candidiasis)

มักเกิดที่ผิวหนังชั้นนอกสุดและเยื่อเมือกเท่านั้น และพบที่ผิวหนังรอยพับในผู้ป่วยบางรายที่มีภูมิคุ้มกันของร่างกายต่ำ เช่น โรคต่อมไทรอยด์ เชื้อ *Candida* จะลุกลามไปได้ทั่วร่างกาย เช่น ลำตัว ศีรษะ ปาก ช่องปาก ลิ้น อวัยวะเพศ และเล็บ เกิดเป็นกลุ่มอาการที่เรียกว่า โรคติดเชื้อ *Candida* บริเวณผิวหนังและเยื่อเมือกเรื้อรัง (Chronic mucocutaneous candidiasis) ซึ่งพบได้ในเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 10 ปี และในผู้ป่วยบางรายโรคมีอาการรุนแรงมากจนทำให้เสียชีวิตได้ เริ่มแรกลักษณะทางคลินิกจะเป็นตุ่มน้ำหนองเม็ดเล็กๆ สีแดงเกิดขึ้นหลายตุ่มรวมกันเป็นกลุ่ม มีอาการเจ็บๆ คันๆ ต่อมาตุ่มเหล่านี้จะแตกออกแล้วรวมกันเป็นแผ่นฝ้าปนกับสะเก็ดสีเหลือง ผิวหนังรอบๆ แผ่นฝ้าจะมีอาการอักเสบ และค่อยๆ ขยายตัวออกไปโดยรอบเกิดโรคขนาดเล็กขึ้นที่ขอบเดิมของผิวหนังยกตัวเป็นแผ่นแข็งนูนขึ้น และมีสะเก็ดสีเหลืองปิดอยู่คล้ายเปลือกเรียกว่า crusty granuloma เมื่อใช้ปากคีบดึงสะเก็ดออกมาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์พบเชื้อ *Candida* จำนวนมาก ถ้าโรคนี้เกิดที่หนังศีรษะสามารถทำให้ผมร่วงได้ นอกจากนี้ผู้ป่วยยังมีไข้ เบื่ออาหาร ผอมแห้ง มีอาการขาดอาหารและโลหิตจาง ตับ ม้าม และต่อมน้ำเหลืองขยายใหญ่ เม็ดเลือดขาวมีจำนวนสูงขึ้น เม็ดเลือดแดงตกตะกอนเร็วขึ้น (พรรณกร, 2535)

4.4.4 โรคติดเชื้อ *Candida* บริเวณอวัยวะเพศ (Candidiasis of the genitalia)

ในผู้หญิงการเกิดตกขาวจากเชื้อ *Candida* (vaginal thrush) พบได้บ่อยและมีอาการคันรุนแรง มีสาเหตุเสริมหลายประการ เช่น การมีครรภ์ การร่วมเพศ ตกขาวมีลักษณะเป็นเมือกข้นสีขาว มีกลิ่นเปรี้ยว ภายในช่องคลอดพบว่าผิวเยื่อที่เป็นโรคมักมีลักษณะเป็นแผ่นฝ้าสีขาว เปื้อนอยู่ และมีแผลคันๆ ขนาดเล็ก ในผู้ป่วยที่เป็นมาก เมื่อตกขาวจะไหลออกมาจากช่องคลอด ลูกลามไปถึงทวารหนักและขาหนีบ (Odds, 1979) อวัยวะเพศของผู้ชายก็อาจเกิดโรคจากเชื้อ *Candida* ได้ (Candida balanitis) ลักษณะทางคลินิกเกิดที่ด้านบนของปลายองคชาติ เมื่อเริ่มเกิดเป็นจุดสีแดงขนาดเล็กเท่าหัวเข็มหมุดกระจายอยู่ทั่วไป ต่อมาตุ่มเหล่านี้แตกออกกลายเป็นฝ้าขาวอยู่เต็มผิวหนังบริเวณที่เป็นโรค เมื่อฝ้าเหล่านี้หลุดออกไปหมดผิวหนังเนื้อจะมีสีแดงสดมีอาการแสบและคัน (พรรณกร, 2535)

4.4.5 โรค *Candida* ตามระบบ (Systemic candidiasis)

ในสถานะที่ภูมิคุ้มกันของร่างกายต่ำ เช่น ผู้ป่วยเด็ก ผู้ป่วยโรคมะเร็ง อาจเกิดโรคติดเชื้อ *Candida* ได้ และอาจเกิดร่วมกับโรคอื่นๆ จากการวิเคราะห์ข้อมูลการตรวจศพของโรงพยาบาลศิริราช จำนวน 16,219 ราย ภายในระยะเวลา 21 ปี ระหว่าง พ.ศ. 2502-2522 พบว่ามีโรคติดเชื้อตามระบบ จำนวน 165 ราย คิดเป็นร้อยละ 1 เชื้อที่พบได้บ่อยคือ *Aspergillus*, *Candida* และ *Cryptococcus* คิดเป็นร้อยละ 37.29, 35.03 และ 12.99 ตามลำดับ ระบบต่างๆ ที่มักเกิดโรคติดเชื้อ *Candida* ได้แก่

1. ระบบทางเดินปัสสาวะ พบได้ประมาณ 1 ใน 3 ของผู้ป่วยโรคติดเชื้อ *Candida* ตามระบบ มักพบในผู้ป่วยที่มีสายสวนคาท่อปัสสาวะ กระเพาะปัสสาวะอักเสบ แล้วเชื้อลุกลามขึ้นไปก่อโรคที่ไต บางรายเชื้อกระจายไปตามหลอดเลือด ทำให้มีอาการไข้และหนาวสั่น
2. ระบบหัวใจ เกิดการอักเสบที่กล้ามเนื้อหัวใจ ผนังหรือเยื่อหุ้มหัวใจ มีอาการคล้ายกับที่เกิดจากแบคทีเรีย เช่น มีไข้ เสียงหัวใจเต้นผิดปกติ หัวใจล้มเหลว ม้ามโต มักพบในผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดหัวใจ โดยเฉพาะการเปลี่ยนลิ้นหัวใจ ผู้ป่วยที่มีสายสวนคาอยู่หรือได้รับน้ำเกลือทางหลอดเลือดดำเป็นเวลานาน ผู้ป่วยติดยาเสพติดชนิดฉีดเข้าหลอดเลือดดำ

3. ระบบประสาท อาจก่อให้เกิดโรคเชื้อหุ้มสมองอักเสบ เกิดฝีขนาดต่างๆ ขึ้นในสมอง ซึ่งเกิดจากการกระจายของเชื้อตามหลอดเลือด หรือเชื้อเข้าโดยตรง เช่น ในการเจาะหลัง หรือได้รับการผ่าตัดระบบประสาท (พรณกร, 2535)

5. การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างแบคทีเรียโอซิน

Hoover and Harlander (1993) ได้สรุปเทคนิคที่ใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างแบคทีเรียโอซินออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

5.1 การคัดเลือกด้วยอาหารแข็งหรือกึ่งแข็ง สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 แบบ คือ

5.1.1 วิธีเชื้อเจริญไม่พร้อมกัน (deferred method) เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการตรวจหาการสร้างแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรียกรดแลคติกในเบื้องต้นโดยการเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งภายใต้สภาวะที่เหมาะสมแล้วเททับด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแบบกึ่งแข็งกึ่งเหลว (semi-solid agar) ที่มีแบคทีเรียทดสอบผสมอยู่ ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อแบบกึ่งแข็งกึ่งเหลวจะช่วยลดการแพร่กระจายของโคโลนีแบคทีเรียกรดแลคติกได้ดีกว่าการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง หรืออาจฆ่าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่เจริญอยู่ด้วยสารเคมี เช่น คลอโรฟอร์มหรือความร้อนเพื่อป้องกันการแพร่กระจายดังกล่าว แต่ในบางครั้งพบว่าการใช้สารเคมีและความร้อนในการทำลายแบคทีเรียที่สร้างแบคทีเรียโอซินอาจทำให้แบคทีเรียโอซินเสียสภาพได้ นอกจากนี้อาจเลือกใช้วิธีการทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อด้านที่มีแบคทีเรียกรดแลคติกเจริญอยู่คว่ำลงบนฝาด้านบนของจานเพาะเชื้อด้วยวิธีการที่ปลอดเชื้อ แล้วเททับด้านบน (บริเวณก้นจานเพาะเชื้อเดิม) ด้วยแบคทีเรียทดสอบ ซึ่งวิธีการแบบนี้โคโลนีของแบคทีเรียทดสอบและแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างแบคทีเรียโอซินจะไม่สัมผัสกันโดยตรง เนื่องจากมีชั้นของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งกั้นอยู่เพื่อลดการยับยั้งที่เกิดจากอิทธิพลของกรดอินทรีย์ ส่วนการอ่านผลสังเกตจากบริเวณใสที่เกิดขึ้นจากการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบเหมือนวิธีการตรวจสอบทั่วไป

5.1.2 วิธีเชื้อเจริญพร้อมกัน (simultaneous method หรือ direct assay) เป็นวิธีที่ทำได้ง่ายและใช้เวลาน้อยกว่า deferred method สามารถทำได้ด้วยเทคนิคที่เรียกว่า spot on lawn โดยการเกลี่ยแบคทีเรียทดสอบบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง แล้วนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่ต้องการทดสอบการสร้างแบคทีเรียโอซินมาปลูกเชื้อโดยจุดลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เกลี่ยแบคทีเรียทดสอบดังกล่าว วิธีการนี้จะใช้ได้ผลดีกับแบคทีเรียที่สร้างแบคทีเรียโอซินได้อย่าง

รวดเร็วในระดับของการเจริญ ในขณะที่วิธีการแบบ deferred method จะใช้ได้ผลดีกับแบคทีเรียที่สร้างแบคทีเรียโอซินในระยะหลังๆ ของการเจริญ ในกรณีที่แบคทีเรียที่ต้องการตรวจสอบการสร้างแบคทีเรียโอซินเป็นกลุ่มที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญหรือต้องการเพียงเล็กน้อย อาจใช้วิธีการ stab เชื้อดังกล่าวลงในแบคทีเรียทดสอบที่เตรียมอยู่ในจานเพาะเชื้อด้วยวิธี pour plate หรือ surface streaked agar แต่วิธีการทดสอบโดยการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งและอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวนี้พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกนอกจากผลิตแบคทีเรียโอซินแล้วยังสามารถผลิตสารชนิดอื่นๆ ออกมายับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบด้วย เช่น กรดแลคติก ซึ่งจะทำให้ผลการทดสอบเกิดความผิดพลาดได้ ดังนั้นจึงควรเลือกวิธีที่เหมาะสมกับการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ต้องการ

5.2 การคัดเลือกด้วยอาหารเหลว

วิธีนี้ไม่นิยมใช้ในการตรวจหาแบคทีเรียที่สามารถสร้างแบคทีเรียโอซินในขั้นต้น เนื่องจากวิธีการเพาะเชื้อบนอาหารแข็งจะทำให้สะดวกและรวดเร็วกว่า แต่วิธีนี้มักใช้ในการตรวจวัดกิจกรรมของแบคทีเรียโอซิน เนื่องจากสามารถกำจัดปัจจัยอื่นๆ ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้ โดยเริ่มจากขั้นตอนการแยกเซลล์แบคทีเรียที่สามารถสร้างแบคทีเรียโอซินออกมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวด้วยวิธีการกรองหรือเหวี่ยงแยก จากนั้นนำของเหลวที่ได้มาแยกกรดหรือสารในกลุ่ม dialyable compound ออกด้วยวิธีการ dialysis หรือการปรับค่า pH ให้เป็นกลางเพื่อลดผลของกรด การเติมเอนไซม์แคตาเลสเพื่อลดผลจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ รวมทั้งกำจัดสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ที่มีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ นำของเหลวที่ได้มาทดสอบผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบโดยการเติมลงในหลุมที่เจาะไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีแบคทีเรียทดสอบผสมอยู่ด้วยวิธี agar well diffusion แล้วตรวจผลโดยดูจากบริเวณใสที่เกิดขึ้น หรืออาจใช้วิธีการเติมลงไปในการแขวนลอยของแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ แล้วตรวจผลโดยการวัดค่าความขุ่นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ หรือวิธีการนับจำนวนแบคทีเรียทดสอบที่เหลืออยู่ด้วยวิธีการเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งวิธีการนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาถึงปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการทำงานของแบคทีเรียโอซินที่ต้องการศึกษาได้อีกด้วย โดยสิ่งที่ต้องคำนึงถึงในการนำเทคนิคแบบนี้มาใช้คือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่นำมาใช้ในการเพาะเชื้อต้องมีความเหมาะสมกับการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ และในสารแขวนลอยผสมที่ใช้ทดสอบจะต้องมีอาหารเพียงพอต่อการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

ตัวอย่างจากดิน ดอกไม้ ผลไม้สด น้ำทิ้งจากโรงนม และอาหารหมักดอง เช่น ปลาร้า แหนม ผลไม้ดอง ผักดอง

2. จุลินทรีย์

2.1 ยีสต์ *Candida albicans* BCC6120 เป็นสายพันธุ์บ่งชี้ (indicating strain) จาก ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (National Center for Genetic Engineering and Biotechnology) ประเทศไทย

2.2 แบคทีเรียเจ้าบ้าน (competent cell) ที่ใช้ในการโคลนยีนคือ *E. coli* DH5 α เลี้ยงใน อาหาร LB ผสมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Sambrook *et al.*, 1989) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บเชื้อบริสุทธิ์ที่เลี้ยงในอาหารเหลว LB ผสมกลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 20 โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1 De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) Agar

3.2 Luria-Burtani (LB) medium

3.3 Sabouraud Dextrose Agar (SDA)

3.4 Tryptone Glucose Extract (TGE)

3.5 Super optical broth with catabolite repression (SOC) medium

4. เครื่องมือ

4.1 เครื่องชั่งสารทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Precision Balance รุ่น FX-300i)

4.2 เครื่องเขย่า (Vortex-Genie II mixer)

4.3 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (autoclave)

4.4 เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Thermo Block, DaiDaiki Sciences Company Limited)

4.5 ชุดดูดสารละลายอัตโนมัติ (Autopipette)

4.6 เครื่องแก้ว ได้แก่ แท่งแก้วรูปตัวแอล (spreader) จานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลอดทดลอง ปิเปต ฟลาสก์ บีกเกอร์ และกระบอกตวง

4.7 กล้องจุลทรรศน์

4.8 กล้องถ่ายภาพ

4.9 ตู้เขี่ยเชื้อจุลินทรีย์

4.10 ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

4.11 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

4.12 เครื่องวัด pH (Consort C830)

4.13 เครื่องเซนตริฟิวส์ (Labnet และ Sigma-202-M-Cen)

4.14 ตู้อบลมร้อน

4.15 เตาไมโครเวฟ

4.16 อ่างควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (water bath shaker)

4.17 เครื่อง thermal cycler PCR (MyGenie[®], 32 Thermal block)

4.18 เครื่อง gel document system

4.19 เครื่อง hot plate stirrer

4.20 เครื่อง UV transilluminator

4.21 ตู้แช่เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.22 ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Sanyo รุ่น SF-C992, Thailand)

4.23 ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

4.24 อุปกรณ์อื่นๆ ได้แก่ เข็มเขี่ยเชื้อ ตะเกียงแอลกอฮอล์ จุกยาง ตำลี ช้อนตักสาร

กระดวยฟอยด์ แผ่นพาราฟิน tip และ eppendorf

5. สารเคมี

5.1 95% alcohol

5.2 Glycerol

5.3 NaOH

5.4 Hydrogen peroxide

5.5 Tris-HCl

5.6 NaCl

5.7 Cetyl trimethyl ammonium bromine (CTAB)

5.8 Tris-EDTA buffer

- 5.9 Agarose power
- 5.10 Ethidium bromide
- 5.11 Sodium dodecyl sulfate
- 5.12 Chloroform
- 5.13 Isoamyl alcohol
- 5.14 Isopropanol
- 5.15 Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)
- 5.16 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactoside (X-Gal)
- 5.17 Disodium ethylenediamine tetraacetate
- 5.18 CaCl_2
- 5.19 STE solution
- 5.20 Alkaline lysis solution I
- 5.21 Alkaline lysis solution II
- 5.22 Alkaline lysis solution III
- 5.23 สีย้อมสำหรับการย้อมสีแบบแกรม

6. ชุดทดสอบสำเร็จรูป

- 6.1 API 50 CHL Medium Kit (Biomerieux)
- 6.2 GeneJET™ Gel Extraction Kit (Fermentas, *European Union*)
- 6.3 FastPlasmid™ Mini Kit (Fermentas, *European Union*)
- 6.4 pGEM® -T Easy Vector (Promega, USA)

วิธีการ

1. การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติก

1.1 การเก็บรวบรวมตัวอย่างเพื่อคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติก

โดยเก็บตัวอย่างจากดอกไม้ดิน อาหารหมักดอง และผลไม้ที่วางจำหน่ายในตลาด
อมรพันธ์แยกเกษตร ตลาดบางกะปิ ตัวอย่างดินบริเวณโรงนมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
วิทยาเขตบางเขน และตัวอย่างดินบริเวณมหาวิทยาลัยรามคำแหง วิทยาเขตหัวหมาก

1.2 การเตรียมตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่างหนัก 10 กรัม ใส่ถุงพลาสติก บดให้ละเอียด ถ่ายตัวอย่างลงในสารละลาย normal saline ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 90 มิลลิลิตร เขย่าสารละลายตัวอย่างให้เข้ากัน ทำให้ได้ตัวอย่างที่มีความเจือจาง 10 เท่า จากนั้นเปิดสารละลายตัวอย่าง และเจือจางต่อไปจนได้ความเข้มข้นที่ต้องการ

1.3 การหาจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติก

ใช้ปิเปตปราศจากเชื้อดูดสารละลายตัวอย่างที่เตรียมได้จากข้อ 1.2 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานอาหารแข็ง MRS จากนั้นใช้แท่งแก้วรูปตัวแอลที่ปราศจากเชื้อกระจายเชื้อให้ทั่วผิวหน้าอาหาร นำจานเพาะเชื้อบ่มในสภาวะที่มี CO₂ ร้อยละ 5-10 โดยใช้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตและนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารที่มีจำนวน 30-300 โคโลนี

1.4 การแยกและเก็บแบคทีเรียกรดแลคติก

หลังจากนับจำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้ไมจัมพินปราศจากเชื้อเลือกเก็บโคโลนีเดี่ยวๆ เพื่อเป็นตัวแทนของเชื้อที่คัดแยกได้ จากนั้นนำมาจุดลงบนอาหารแข็ง MRS ทำ 2 ซ้ำ โดยใช้เทคนิค replica plating จานเพาะเชื้อที่ 1 นำไปทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของยีสต์ *C. albicans* BCC6120 อีกจานเพาะเชื้อเก็บไว้เพื่อเป็นตัวแทนของเชื้อในการทดลองข้อ 2.1 จากนั้นเก็บแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ในกลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 20 ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2. การทดสอบการสร้างสารต้านยีสต์ *C. albicans* BCC6120

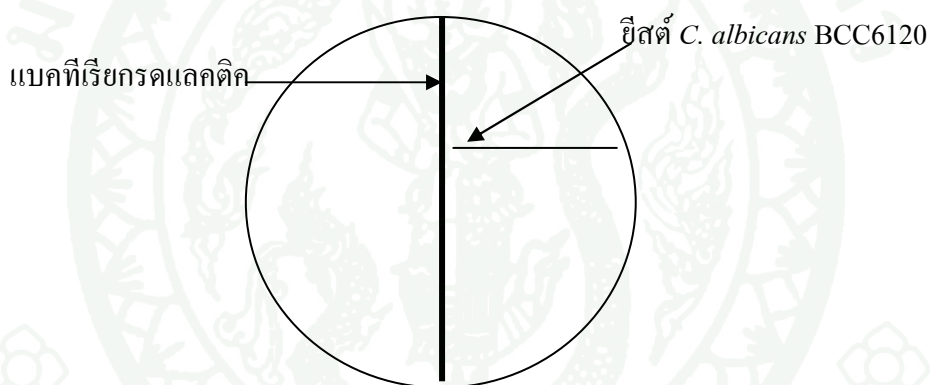
2.1 วิธีเททับ (Overlay method) ดัดแปลงจากวิธีการของ Fleming *et al.* (1985)

นำยีสต์ *C. albicans* BCC6120 มาขีดลงบนอาหาร SDA จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวๆที่ได้เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว SDB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ปรับความขุ่นของเซลล์ด้วยอาหารเหลว SDB ปราศจากเชื้อเป็น 10⁷ เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยการนับจำนวนเซลล์แบบ direct count ด้วย haemocytometer จากนั้นเปิดเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ถ่ายลงในอาหาร SDA กึ่งแข็ง (semi-solid agar ที่เติมวุ้นร้อยละ 0.7) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่หลอมไว้ประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำมาเททับลงบนอาหารแข็ง MRS ที่มีแบคทีเรียกรดแลคติก บ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บันทึกผลโดยวัดขนาดของวงใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนีของแบคทีเรียกรดแลคติก (clear zone diameter, CZ)

และเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (colony diameter, CO) นำมาหาค่าผลต่าง (CZ-CO) ระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (CZ) และเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (CO) ที่เกิดขึ้น

2.2 วิธีขีดเชื้อ (Streak method) ทำตามวิธีการของ Monthon (2005)

เชื้อโคโลนีของแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของยีสต์ *C. albicans* BCC6120 ที่ได้จากข้อ 2.1 ขีดเป็นเส้นตรงกลางอาหารแข็ง TGE จากขอบด้านหนึ่งไปอีกด้านหนึ่งของจานเพาะเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มี CO₂ ร้อยละ 5-10 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเชื้อโคโลนีเดี่ยวของยีสต์ *C. albicans* BCC6120 มาขีดเป็นเส้นตรงเริ่มจากริมของเส้นแบคทีเรียกรดแลกติกไปยังขอบของจานเพาะเชื้อที่อยู่ข้างเดียวกัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของยีสต์ *C. albicans* BCC6120 ที่ติดกับแบคทีเรียกรดแลกติกว่ามีการเจริญเกิดขึ้นหรือไม่ แสดงดังภาพที่ 8



ภาพที่ 8 ตัวอย่างการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของยีสต์ *C. albicans* BCC6120 ของแบคทีเรียกรดแลกติกโดยวิธีขีดเชื้อ

2.3 วิธี agar well diffusion คัดแปลงจากวิธีการของ Magnusson and Schnurer (2001)

สุ่มเลือกแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของยีสต์ *C. albicans* BCC6120 ได้มากกว่า 3 มิลลิเมตร จากการทดลองในข้อ 2.1 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS และ TGE ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มี CO₂ ร้อยละ 5-10 จากนั้นปรับความขุ่นของเซลล์ให้เท่ากับ MacFarland No. 0.5 และปิเปตเซลล์ซัสเพนชันปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ถ่ายลงในอาหารเหลว MRS และ TGE ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพื่อทำเป็น 1 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มี CO₂ ร้อยละ 5-10 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

กรองส่วนใสด้วยกระดาษกรองที่มีขนาดรูผ่านเท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นหยอดส่วนใสที่ได้ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ในอาหารแข็ง SDA ที่ป้ายเชื้อ *C. albicans* BCC6120 ไว้ก่อนหน้า ควบคุมการทดลองโดยหยอดอาหารเหลว MRS และ TGE ที่ไม่ผ่านการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรด-แลคติกลงในหลุมทดสอบ จากนั้นตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งอาหารเลี้ยงเชื้อซึมผ่านเนื้ออุ่นจนหมด นำบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกผลของวงใสที่เกิดขึ้นรอบหลุมทดสอบ

2.4 การศึกษาผลของ pH ต่อการยับยั้งการเจริญของยีสต์ *C. albicans* BCC6120 คัดแปลง จากวิธีการของ Rojo-Bezares *et al.* (2007)

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกจากหัวข้อ 2.3 ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มี CO₂ ร้อยละ 5-10 จากนั้นปรับความเข้มข้นของเซลล์ให้เท่ากับ MacFarland No. 0.5 และปิเปตเซลล์ซัสเพนชันปริมาตร 1 มิลลิลิตร ถ่ายลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เพื่อทำเป็น 1 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มี CO₂ ร้อยละ 5-10 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำซัสเพนชันของเชื้อมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ปิเปตส่วนใสผ่านกระดาษกรองที่มีรูผ่านเท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นนำส่วนใสที่ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดปราศจากเชื้อ 5 หลอด นำมาปรับ pH ด้วย 1 N HCl หรือ 1 N NaOH ให้ได้ pH เท่ากับ 3, 5, 7, 9 และ 11 ตามลำดับ จากนั้นหยอดส่วนใสที่ปรับ pH ต่างๆ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ในอาหารแข็ง SDA ที่ป้ายเชื้อ *C. albicans* BCC6120 ไว้ก่อนหน้า บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกผลเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดขึ้น

3. การศึกษาการเกาะติดพื้นผิวของแบคทีเรียกรดแลคติก (Colonization)

ความสามารถในการเกาะติดพื้นผิว (colonization) ทดสอบโดยนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากโคลินี่ที่เกิดบริเวณใสจากการทดลองในข้อ 2.1 มาปรับเทียบความเข้มข้นของเซลล์ให้เท่ากับ McFarland No. 0.5 จากนั้นถ่ายเซลล์ซัสเพนชันปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 16×150 มิลลิเมตร ภายในบรรจุแท่งไม้ไผ่ปราศจากเชื้อ เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ลงในหลอดอาหารเหลว MRS เพื่อเป็นหลอดควบคุมผลลบ สังเกตและบันทึกผลการเกาะติดพื้นผิวบริเวณแท่งไม้ไผ่ และผิวด้านในหลอดทดลองทุกวัน เป็นเวลา 5 วันติดต่อกัน คัดเลือกเชื้อที่เกาะติดพื้นผิวได้เร็วที่สุด

ปริมาณมากที่สุด และเกาะติดแน่นที่สุด จากนั้นนำเชื้อที่ได้ขีดลงบนอาหารแข็ง MRS ให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ เก็บเชื้อในกลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 20 ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (ทำซ้ำ 2 หลอด)

4. การศึกษาอนุกรมวิธานของแบคทีเรียกรดแลกติก

4.1 การทดสอบการติดสีแกรม (Beishier, 1991)

ทำความสะอาดสไลด์และเช็ดให้แห้ง เตรียมรอยสเมียร์ของเชื้อ ตั้งไว้ให้รอยสเมียร์แห้ง จากนั้น heat fix โดยผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง หยดสี crystal violet ให้ทั่วรอยสเมียร์ ตั้งไว้นาน 1 นาที เทสีที่เหลือล้างบนสไลด์ทิ้ง หยดสารละลายไอโอดีนให้ทั่วรอยสเมียร์ ตั้งไว้นาน 1 นาที เทสารละลายไอโอดีนทิ้ง จากนั้นชะด้วยสารละลายแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 จนกระทั่งไม่มีสีม่วงละลายออกมา ล้างน้ำทันที โดยให้น้ำผ่านเบาๆ ชับให้แห้ง ย้อมทับด้วยสี safranin O ให้ทั่วรอยสเมียร์ ตั้งไว้นาน 1 นาที เทสีทิ้ง ล้างด้วยน้ำ และซับให้แห้ง จากนั้นศึกษารูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

4.2 การทดสอบเอนไซม์แคตาเลส (Johnson and Case, 1989)

หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ความเข้มข้นร้อยละ 3 ลงบนสไลด์ 1 หยด ใช้ลวดเช็บบริสุทธิ์ที่ต้องการทดสอบสเมียร์ลงบนสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ถ้าเกิดฟองอากาศขึ้นแสดงว่าให้ผลบวกคือ แบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์แคตาเลสได้ ส่วนโคโลนีที่ไม่เกิดฟองอากาศแสดงว่าให้ผลลบคือ แบคทีเรียไม่สามารถสร้างเอนไซม์แคตาเลสได้

4.3 การทดสอบการสร้างแก๊ส (Johnson and Case, 1989)

เช็บบริสุทธิ์ลงในอาหารเหลว MRS ที่มีหลอดดักแก๊ส (durham tube) บ่มในสภาวะที่มี CO_2 ร้อยละ 5-10 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-72 ชั่วโมง ถ้ามีช่องว่างแทนที่อาหารเหลวในหลอดดักแก๊สแสดงว่าเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม heterofermentation แต่ถ้าไม่มีช่องว่างแสดงว่าเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม homofermentation

4.4 การศึกษาความสามารถในการหมักคาร์โบไฮเดรตของแบคทีเรียกรดแลกติกด้วยชุด

ทดสอบ API 50 CHL Medium (Biomérieux)

โดยทดสอบความสามารถในการหมักคาร์โบไฮเดรต 49 ชนิด เริ่มจากเลี้ยงเช็บบริสุทธิ์บนอาหารแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มี CO_2 ร้อยละ 5-10 เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นเช็บบริสุทธิ์ลงใน API 50 CHL medium ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อ

เดียวกัน ปรับความขุ่นของเซลล์ให้เทียบเท่ากับ McFarland No. 2 และเตรียมชุดทดสอบโดยการเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อลงในถาดเพื่อให้เกิดความชื้นในขณะบ่ม เรียงชุดตรวจสอบลงบนถาดหยอด API 50 CHL medium ที่มีเชื้ออยู่ลงในหลุมทดสอบ (strip) ทุกหลุมจำนวน 50 หลุมๆ ละ 12 ไมโครลิตร ระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ จากนั้นปิดทับผิวหน้าทุกหลุมด้วย mineral oil เพื่อป้องกันอากาศเข้าไป นำบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บันทึกผลหลังจากบ่มเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง นำผลที่ได้วิเคราะห์ด้วยซอฟต์แวร์ API 50 V.5.1 (BioMerieux) โดยอ่านผลจากการเปลี่ยนแปลงสีอาหารในหลุม ถ้าเปลี่ยนจากสีน้ำเงินม่วงเป็นสีเหลือง และสีดำในหลุมที่ทดสอบ esculin แสดงว่าให้ผลเป็นบวก หากอาหารไม่เปลี่ยนสีบันทึกผลเป็นลบ

4.5 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA

4.5.1 การสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรียกรดแลคติก

สกัดดีเอ็นเอทั้งหมดของแบคทีเรียกรดแลคติกตามวิธีที่ได้ดัดแปลงจากวิธีการของ Zhou *et al.* (1994) โดยเฉพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ลงในหลอด microcentrifuge นำปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง เติมน้ำละลาย TE buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ลงบนตะกอนเซลล์ผสมให้เข้ากัน และเติมเอนไซม์ lysozyme (50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 8 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที และเติมเอนไซม์ proteinase K (20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 4 ไมโครลิตร SDS ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และเอนไซม์ RNase A (100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม 5 M NaCl ปริมาตร 70 ไมโครลิตร CTAB ความเข้มข้นร้อยละ 10 (10% CTAB/0.7 M NaCl) ปริมาตร 55 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นสกัดด้วย chloroform : isoamyl alcohol (24:1) โดยใช้ปริมาตร 1 เท่าของสารละลาย กลับหลอดไปมาเบาๆ และนำปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ปิเปตสารละลายชั้นบนด้วยไมโครปิเปตใส่ microcentrifuge หลอดใหม่ ทำซ้ำอีกครั้งโดยเติม chloroform : isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 1 เท่าของสารละลาย กลับหลอดไปมาเบาๆ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ปิเปตสารละลายชั้นบนใส่ microcentrifuge หลอดใหม่ จากนั้นตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol ปริมาตร 0.6 เท่าของสารละลายเดิม กลับหลอดไปมาเบาๆ นำปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอลเย็นความเข้มข้นร้อยละ 70

ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย nuclease free water ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้วัดความบริสุทธิ์ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ค่าที่ได้ควรแสดงอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 ต่อ 280 นาโนเมตร และ 260 ต่อ 230 นาโนเมตรอยู่ในช่วง 1.8-2.0 และ 2.0-2.2 (Harry *et al.*, 1999) ตามลำดับ จากนั้นวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Sambrook and Russell, 2001)

4.5.2 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิคการเพิ่มปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase Chain Reaction, PCR)

นำดีเอ็นเอของแบคทีเรียกรดแลคติกที่สกัดได้จากข้อ 4.5.1 มาเพิ่มปริมาณขึ้นยีน 16S rRNA โดยใช้ไพรเมอร์ 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') และไพรเมอร์ 1389R (5'-ACG GGC GGT GTG TAC AAG- 3') (Hongoh *et al.*, 2003) สารเคมีในปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วยเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 1 ยูนิต สารละลาย 10X PCR buffer แมกนีเซียมคลอไรด์ 25 มิลลิโมลาร์ นิวคลีโอไทด์ 4 ชนิดๆ ละ 2.5 มิลลิโมลาร์ ไพรเมอร์ 27F ปริมาณ 10 พิโคโมลาร์ ไพรเมอร์ 1389R ปริมาณ 10 พิโคโมลาร์ ดีเอ็นเอต้นแบบ 125 นาโนกรัม ปรับปริมาตรสุทธิเป็น 25 ไมโครลิตร ด้วยน้ำดีไอออไนซ์ปราศจากเชื้อ สภาวะในการทำปฏิกิริยาดังกล่าวด้วยเครื่อง Thermal cycler PCR (MyGenie,[®] 32 Thermal block) โดยตั้งโปรแกรมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเป้าหมายดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 สภาวะที่ใช้ในการทำ PCR ของยีน 16S rRNA

Condition	Temperature (°C)	Time (sec.)
Initial Denaturation	95	180
Denaturation	95	30
Annealing	50	30
Extension	72	120
Final Extension	72	240

} 35 รอบ

4.5.3 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอเล็กโตรโฟริซิส

ปีเปตสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมกับ 2X loading dye ปริมาตร 1 ไมโครลิตร หยอดลงหลุมอะกาโรสเจลความเข้มข้นร้อยละ 1 ในสารละลาย 0.5X TBE buffer โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 35 นาที ย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 10 นาที และล้างเอธิเดียมโบรไมด์ส่วนเกินออกด้วยน้ำเปล่าเป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวีเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler™ 1 Kb DNA ladder

4.5.4 การทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ด้วย GeneJET™ Gel Extraction Kit

(Fermentas, European Union)

นำผลิตภัณฑ์ PCR ปริมาตร 20 ไมโครลิตร มาแยกด้วยวิธีอะกาโรสเจลอเล็กโตรโฟริซิส ตัดแถบ PCR ชั่งน้ำหนัก เติม Binding Buffer ปริมาตร 1 เท่าของน้ำหนักดีเอ็นเอ (ปริมาตรต่อน้ำหนัก) บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที กลับหลอดไปมาทุกๆ 1 นาที ถ่ายสารละลายดีเอ็นเอลงใน GeneJET™ Purification Column นำปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม Wash Buffer ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง นำคอลัมน์ใส่ใน microcentrifuge หลอดใหม่ เติม Elution Buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เก็บส่วนใสที่ได้ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

4.5.5 การเตรียม competent cell ของ *E. coli* DH5α โดยการใช้แคลเซียมคลอไรด์

(Cohen *et al.*, 1972)

ฉีดเชื้อ *E. coli* DH5α บนอาหารแข็ง LB บ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ถ่ายโคโลนีเดียวลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ถ่ายเซลล์ซัสเพนชันปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ในอาหารเหลว LB ปริมาตร 40 มิลลิลิตร (คิดเป็น 1 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อ) ในฟลาस्कขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง ให้ได้ค่า OD₆₀₀ ~ 0.4 ซึ่งจะได้เซลล์ไม่เกิน 10⁸ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ถ่ายเซลล์ซัสเพนชันลงในหลอดปั่นเหวี่ยงปราศจากเชื้อ (steriled centrifuge tube) ขนาด 50 มิลลิลิตร นำปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง เก็บตะกอนเซลล์ เติมน้ำแข็งเป็นระยะเวลา 45 นาที นำเซลล์ซัสเพนชันปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง เก็บตะกอน

ของ competent cell ไว้ เติมสารละลายที่เย็นของ 50 mM CaCl₂ ที่ผสมกลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 20 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ค่อยๆ ชะตะกอน competent cell ออกมา (ทุกขั้นตอนทำในอ่างน้ำแข็ง) แชน้ำแข็งต่ออีกเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นแบ่ง competent cell ใส่ใน microtube หลอดละ 100 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำออกมาใช้งาน

4.5.6 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอเป้าหมายกับพลาสมิด pGEM[®]-T Easy Vector

คำนวณปริมาณของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ต้องการแทรกในอัตราส่วน 1:1 จากโปรแกรม <http://www.promega.com/techserv/tools/biomath/calc06.htm> เชื่อมต่อดีเอ็นเอเป้าหมายกับ pGEM[®]-T Easy Vector ด้วยปฏิกิริยา ligation ซึ่งมีส่วนประกอบแสดงดังตารางที่ 6 จากนั้นผสมสารละลายให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

ตารางที่ 6 ส่วนประกอบของปฏิกิริยา Ligation

Reagents	Standard Reaction (μl)	Positive Control (μl)	Background Control (μl)
2X Rapid Ligation Buffer	5	5	5
pGEM [®] -T Easy Vector (50 ng/μl)	1	1	1
PCR Product	1	-	-
Control Insert DNA	-	2	-
T4 DNA Ligase (3 Weiss units/μl)	1	1	1
Deionized water	2	1	3
Total	10	10	10

ที่มา: Promega (2010)

4.5.7 การทำ Transformation ด้วยวิธี heat shock ตามวิธีการของ Sambrook and Russell (2001)

นำ competent cell ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาแช่ในอ่างน้ำแข็งเพื่อให้เซลล์หลอมละลาย จากนั้นเติม ligation reaction ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงใน competent cell ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ นำแช่ในน้ำแข็งที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที (ห้ามเขย่า

หลอด) จากนั้นแช่ในน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 2 นาที เติม SOC medium ปริมาตร 900 ไมโครลิตร และ บ่มในเครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นนำเซลล์ซึ่งเพิ่งกระจายลงบนอาหารแข็ง LB ที่ผสมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน IPTG และ X-gal ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อจานเพาะเชื้อ นำเซลล์ซึ่งเพิ่งที่หล่อปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนใสทิ้ง ผสมตะกอนเซลล์ใน หลอดเบาๆ จากนั้นนำเซลล์ซึ่งเพิ่งกระจายลงบนอาหารแข็ง LB ผสมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน IPTG และ X-gal นำจานเพาะเชื้อทั้งหมดบ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นคัดเลือก โคโลนีสีขาว ซึ่งเป็นทรานส์ฟอร์มเมอร์ (transformant) ที่ได้

4.5.8 สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยวิธี Alkaline extraction ตามวิธีการของ Sambrook and Russell (2001)

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว LB ผสมยาแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่ใน microtube นำปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติมน้ำสะอาดละลาย STE แช่เย็น ปริมาตร 0.25 เท่า ลงบนตะกอนเซลล์ ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่าหรือปิเปตขึ้นลง ปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง และเทส่วนใสทิ้ง จากนั้นเติมน้ำละลาย Alkaline lysis solution I ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex เติม Alkaline lysis solution II ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาจำนวน 5 ครั้ง (ห้ามปั่น เหวี่ยง และไม่ควรบ่มนานเกิน 5 นาที เพราะจะทำให้ supercoiled plasmid DNA เสียสภาพ) เติม Alkaline lysis solution III ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา นำแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที นำปั่น เหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ปิเปตสารละลาย ขึ้นบนใส่ microtube หลอดใหม่ จากนั้นสกัดดีเอ็นเอด้วย chloroform : isomyl alcohol (24:1) ปริมาตร 1 เท่า ผสมโดยการเขย่าด้วย vortex และปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที เก็บส่วนใสด้านบนใส่หลอดทดลองใหม่ ตกตะกอนพลาสมิด ดีเอ็นเอด้วย absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่า ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที นำปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติมน้ำสะอาดความ เข้มข้นร้อยละ 70 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนใสทิ้ง และตกตะกอนดีเอ็นเอที่อุณหภูมิห้องเพื่อระเหย เอทานอลเป็นเวลา 5-10 นาที ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลาย TE buffer (pH 8.0) ที่มีเอนไซม์ RNase A ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นนำสารละลาย ดีเอ็นเอที่สกัดได้ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ดังตารางที่ 7 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และหยุดปฏิกิริยาโดยบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำมาวิเคราะห์โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสด้วยอะกาโรสเจลความเข้มข้นร้อยละ 1.2

ตารางที่ 7 ส่วนประกอบของปฏิกิริยา Digestion

Reagents	Volume (μl)
Deionized water	16
10X Rapid digestion Buffer	2
DNA (1 μg/μl)	1
<i>EcoRI</i> (10 U/μl)	1
Total	20

4.5.9 การทำพลาสมิดดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์

นำพลาสมิดดีเอ็นเอมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสำเร็จรูป FastPlasmid™ Mini Kit (Fermentas, European Union) ตามคำแนะนำของผลิตภัณฑ์ โดยเฉพาะเลี้ยงทรานส์ฟอร์มแมนต์ในอาหารเหลว LB ผสมแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เช่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่ใน microtube และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนใสทิ้ง เติม lysis solution ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที ปิเปตสารละลายใส่ใน spin column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เติม wash buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง และนำปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นนำ spin column ใส่ใน microtube หลอดใหม่ เติม elution buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ปิเปตสารละลายพลาสมิดดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ใส่ใน microtube หลอดใหม่ เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4.5.10 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA

โดยการวิเคราะห์หาลำดับเบสของ 16S rDNA โดยบริษัทไบโอดีไซน์ จำกัด (BioDesign Co.,Ltd.) ด้วยไพรเมอร์ T7 (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3') และ SP6 (5'-ATT TAG GTG ACA CTA TAG-3') นำข้อมูลลำดับเบสที่ได้มาเปรียบเทียบกับความเหมือน (% identity) กับเบคทีเรียทั้งหมดที่อยู่ในฐานข้อมูล EzTaxon server 2.1 ผ่านเว็บไซต์ <http://www.eztaxon.org/>

จากนั้นทำ alignment ลำดับเบสของ 16S rDNA จากแบคทีเรียกรดแลกติกเปรียบเทียบกับเชื้อที่มีความคล้ายคลึงกันโดยใช้โปรแกรม BioEdit (Sequence Alignment Editor) และ Clastal W

4.5.11 การสร้างแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree)

โดยเทคนิค Neighbor Joining (NJ) เปรียบเทียบความสัมพันธ์ของสายพันธุ์ที่คัดแยกได้กับสายพันธุ์อ้างอิง โดยการจัดเรียงลำดับเบสหลายสายพันธุ์พร้อมกัน (multiple alignment) ด้วยโปรแกรม Clastal W และนำข้อมูลที่ได้มาสร้างแผนภูมิต้นไม้ โดยใช้ N-J method และใช้ *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* NCIB 3610 เป็นตัวนอกกลุ่ม (outgroup) (Heilig *et al.*, 202) จากนั้นประเมินแผนภูมิต้นไม้ด้วยวิธีบูทสตร้าป (bootstrapping) จำนวน 1,000 ครั้ง เพื่อความน่าเชื่อถือของแผนภูมิ โดยกิ่งใดที่มีค่าบูทสตร้าปมาก แสดงถึงความน่าเชื่อถือสูงที่จะเกิดการจับกลุ่มของลำดับเบสนั้นจริง

5. การปรับปรุงสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดเลือกได้ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต

5.1 การหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของแบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดเลือกได้หลังจากฉายรังสีอัลตราไวโอเลตที่ระยะเวลาต่างๆ ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Arihara and Makoto (2000)

โดยนำโคโลนีเดี่ยวของไอโซเลท L47-2 เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มี CO₂ ร้อยละ 5-10 นำมาเตรียมเซลล์ซัสเพนชันใน 0.85% normal saline ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยปรับความขุ่นของเซลล์ให้เทียบเท่ากับ MacFarland No. 0.5 (มีเชื้อประมาณ 1.5×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ถ่ายเซลล์ซัสเพนชันลงในจานเพาะเชื้อ จานละ 3 มิลลิลิตร นำฉายรังสีอัลตราไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร โดยมีระยะห่างจากจุดกำเนิดแสงเท่ากับ 50 เซนติเมตร โดยจับเวลาในแต่ละช่วงตั้งแต่ 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20 และ 30 นาที จากนั้นเปิดซัสเพนชันของเชื้อจากแต่ละจานเพาะเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร เจือจางแบบ 10 เท่าไปจนถึงความเจือจางที่ 10^{-7} จากนั้นเปิดเชื้อในแต่ละความเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร กระจายเชื้อลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง MRS ความเจือจางละ 3 จานเพาะเชื้อ บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มี CO₂ ร้อยละ 5-10 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนโคโลนีที่เจริญ และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด (จากค่าเฉลี่ยการทดลอง 3 ซ้ำ) เพื่อสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาและเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด เพื่อให้ได้ killing curve สำหรับใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์กลายโดยเลือกระยะเวลาใดเวลาหนึ่งที่เหมาะสม ซึ่งก่อให้เกิดการกลายด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตในระยะเวลาที่ทำให้เซลล์มีเปอร์เซ็นต์การรอดตายร้อยละ 10

5.2 การคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของยีสต์

C. albicans BCC6120

นำเซลล์ยีสต์ของไอโซเลต L47-2 ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ MacFarland No. 0.5 มาฉายรังสีอัลตราไวโอเลต เป็นเวลา 1 นาที ซึ่งทำให้เชื้อมีเปอร์เซ็นต์รอดตายที่ร้อยละ 10 จากนั้นเจือจางแบบ 10 เท่าไปจนถึงความเจือจางที่ 10^{-7} และปิเปตเชื้อในแต่ละความเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร กระจายลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง MRS ความเจือจางละ 3 จานเพาะเชื้อ บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มี CO_2 ร้อยละ 5-10 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำแต่ละโคโลนีที่เจริญมาจุดลงบนอาหารแข็ง MRS จำนวน 8 โคโลนีต่อจานเพาะเชื้อ โดยจุดไอโซเลต L47-2 สายพันธุ์ดั้งเดิมลงบนจานเพาะเชื้อเดียวกัน เพื่อเปรียบเทียบขนาดของวงใส เมื่อครบเวลาที่กำหนด เททับด้วยเซลล์ยีสต์ *C. albicans* BCC6120 ที่ปรับความเข้มข้นของเซลล์เป็น 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยการนับจำนวนเซลล์แบบ direct count ด้วย haemocytometer จากนั้นถ่ายเซลล์ยีสต์ลงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง SDA (เติมวุ้นความเข้มข้นร้อยละ 0.7) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่หลอมไว้ที่ 45 องศาเซลเซียส เขย่าให้เข้ากัน เททับลงบนอาหารแข็ง MRS ที่มีแบคทีเรียกรดแลคติกเจริญ นำบ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บันทึกผลโดยวัดขนาดของวงใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนี (clear zone diameter, CZ) และเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (colony diameter, CO) นำมาหาค่าผลต่างระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (CZ) กับเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (CO) โดยมีไอโซเลต L47-2 สายพันธุ์ดั้งเดิมเป็นตัวเปรียบเทียบ

5.3 การเปรียบเทียบคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของยีสต์ *C. albicans* BCC6120 ของไอโซเลต L47-2 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายด้วยวิธี agar well diffusion

นำไอโซเลต L47-2 สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้จากข้อ 5.2 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มี CO_2 ร้อยละ 5-10 จากนั้นปรับความเข้มข้นของเซลล์ให้เทียบเท่ากับ MacFarland No. 0.5 และปิเปตเซลล์ยีสต์ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ถ่ายลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพื่อทำเป็น 1 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มี CO_2 ร้อยละ 5-10 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที กรองส่วนใสผ่านกระดาษกรองที่มีขนาดรูผ่าน 0.45 ไมโครเมตร นำส่วนใสที่ได้ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของยีสต์ *C. albicans* BCC6120 ที่ปรับความเข้มข้นของเซลล์เป็น 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยการนับจำนวนเซลล์ด้วย haemocytometer จากนั้นนำเชื้อไปยี้ให้ทั่วผิวหน้าอาหารแข็ง SDA ตั้งไว้ให้ผิวหน้าอาหารแห้งเป็นเวลา 5 นาที เจาะหลุมให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร หยอดส่วนใสลงในหลุมที่เจาะไว้ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร ตั้งไว้

ที่อุณหภูมิห้องจนส่วนใสซึมผ่านเนื้อวุ้นจนหมด จากนั้นนำบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลการยับยั้งการเจริญของยีสต์ *C. albicans* BCC6120 โดยสังเกตบริเวณใสที่เกิดขึ้นรอบหลุมทดสอบ



ผลและวิจารณ์

1. การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติก

1.1 การคัดแยกและตรวจนับจำนวนแบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดแยกได้จากดิน น้ำทิ้งจากโรงนม ดอกไม้ ผลไม้สด และอาหารหมักดองชนิดต่างๆ

จากการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีชีวิตทั้งหมดจากตัวอย่างดิน น้ำทิ้งจากโรงนม ดอกไม้ ผลไม้สด ผลไม้ดอง ผักดอง ปลาาร้า และแหนม เป็นต้น โดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง MRS พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกได้จากตัวอย่างทั้งหมด 46 ชนิด ซึ่งพบปริมาณแบคทีเรียกรดแลกติกทั้งหมดอยู่ระหว่าง 10^4 - 10^7 โคโลนีต่อกรัมตัวอย่างทดสอบ มีบางตัวอย่างที่ไม่สามารถนับจำนวนได้ เนื่องจากการปนเปื้อนของยีสต์และราในจานเพาะเชื้อ

จากการทดลองพบว่าแบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดแยกได้จากตัวอย่างแต่ละชนิดจะมีปริมาณที่ต่างกัน เนื่องจากความแตกต่างของวัตถุดิบและความแตกต่างของจุลินทรีย์ประจำถิ่นของแต่ละตัวอย่างทดสอบ ซึ่งจุลินทรีย์ที่พบในแหล่งอาหารมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น แหล่งอาศัย คุณภาพอาหาร และระยะเวลาในการเก็บรักษาอาหาร จากตารางที่ 8 จะเห็นได้ว่าตัวอย่างอาหารที่มีปริมาณของแบคทีเรียกรดแลกติกบนอาหารแข็ง MRS มากที่สุดคือ แหนมและกากถั่วเหลือง ซึ่งพบจำนวน 10^7 โคโลนีต่อกรัมตัวอย่างทดสอบ ทั้งนี้เป็นผลมาจากในอาหารประเภทเนื้อหมักและผลิตภัณฑ์เนื้อหมักรวมทั้งกากถั่วเหลืองมีส่วนประกอบของโปรตีน ไขมัน และมีความชื้นสูง ทำให้แบคทีเรียกรดแลกติกสามารถเจริญได้ดี โดยในหน่อไม้ดองและปลาร้าพบแบคทีเรียกรดแลกติกจำนวน 10^4 โคโลนีต่อกรัมตัวอย่างทดสอบ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ สุริยรัตน์ (2545) โดยให้เหตุผลว่าอาจเป็นเพราะตัวอย่างเหล่านี้มีการเติมเกลือในปริมาณสูงทำให้ปริมาณน้ำที่จำเป็นต่อการเจริญของแบคทีเรียน้อย (a_w ต่ำ) ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ หรือมีการเติมสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ นอกจากนี้อาจเป็นผลมาจากการที่เกิขึ้นมีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกรดแลกติกด้วย และยังมีจุลินทรีย์ประจำถิ่นชนิดอื่นที่เจริญในหน่อไม้ดองทำให้มีการแข่งขันและใช้แหล่งอาหารร่วมกัน

ตารางที่ 8 จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ทั้งหมดจากตัวอย่างทดสอบต่างๆ

ชนิดของอาหาร	รหัส	แหล่งที่มา	จำนวนเชื้อบนอาหารแข็ง MRS (CFU/ml)
1. เาะ	L1	ตลาดอมรพันธ์	7.2×10^4
2. ดอกเข็ม	L2	ม. เกษตรศาสตร์	2.8×10^6
3. ดิน 1	L3	ม. รามคำแหง	5.4×10^4
4. ดิน 2	L4	ม. รามคำแหง	-
5. อุ่นดอง	L5	ตลาดอมรพันธ์	4.2×10^6
6. พุทธาดอง	L6	ตลาดอมรพันธ์	1.7×10^6
7. ฝรั่งดอง	L7	ตลาดอมรพันธ์	-
8. หน่อไม้ดอง	L8	ตลาดอมรพันธ์	3.1×10^6
9. ฝรั่งน้ำ	L9	รถขายผลไม้	2.9×10^5
10. ฝรั่งดอง	L10	รถขายผลไม้	2.8×10^4
11. อุ่นน้ำ	L11	ตลาดอมรพันธ์	4.2×10^6
12. สับปะรด	L12	ตลาดอมรพันธ์	1.7×10^5
13. อุ่น	L13	ตลาดบางกะปิ	-
14. อุ่นดอง	L14	รถขายผลไม้	-
15. แดงโมเน่า	L15	ตลาดบางกะปิ	5.4×10^6
16. สับปะรด	L16	ตลาดบางกะปิ	2.8×10^4
17. ดิน 3	L17	ม. รามคำแหง 2	-
18. ดิน 4	L18	ม. รามคำแหง 2	-
19. ดิน 5	L19	ม. รามคำแหง 2	2.9×10^4
20. สับปะรด 1	L20	ตลาดบางกะปิ	8.3×10^5
21. สับปะรด 2	L21	ตลาดบางกะปิ	2.2×10^5
22. เต้าเจี้ยว	L22	ตลาดบางกะปิ	-
23. ฟักกาดอง 1	L23	ตลาดบางกะปิ	5.5×10^6
24. ฟักกาดอง 2	L24	ตลาดอมรพันธ์	4.3×10^6
25. แหนม 1	L25	ตลาดอมรพันธ์	-

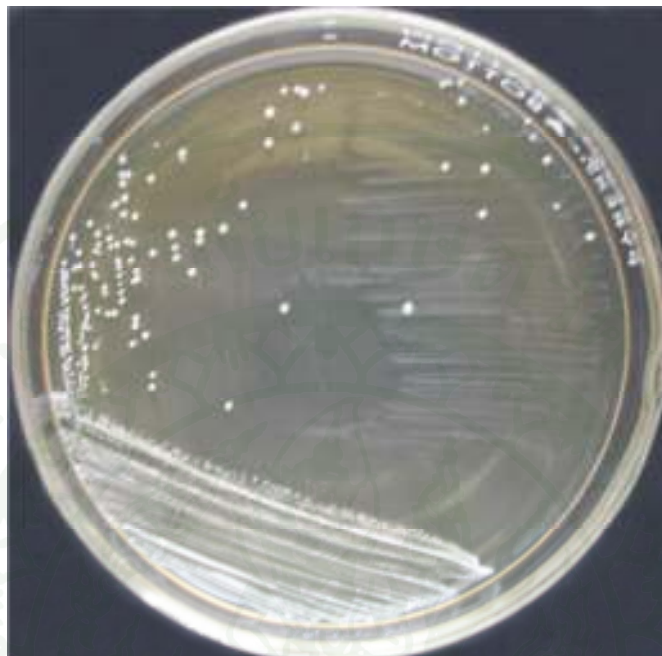
ตารางที่ 8 (ต่อ)

ชนิดของอาหาร	รหัส	แหล่งที่มา	จำนวนเชื้อบนอาหารแข็ง MRS (CFU/ml)
26. แหนม 2	L26	ตลาดอมรพันธ์	2.6×10^7
27. แหนม 3	L27	ตลาดอมรพันธ์	4.6×10^6
28. แหนม 4	L28	ตลาดอมรพันธ์	3.2×10^7
29. ดิน 6	L29	โรงนมเกษตร	-
30. ดิน 7	L30	โรงนมเกษตร	3.6×10^5
31. ดิน 8	L31	โรงนมเกษตร	-
32. ดิน 9	L32	โรงนมเกษตร	5.6×10^5
33. ปลาแร่	L33	ตลาดอมรพันธ์	5.0×10^4
34. น้ำทิ้งจากโรงนม	L34	โรงนมเกษตร	1.7×10^5
35. น้ำทิ้งจากโรงนม	L35	โรงนมเกษตร	2.5×10^5
36. กากถั่วเหลือง 1	L36	ตลาดอมรพันธ์	-
37. กากถั่วเหลือง 2	L37	ตลาดอมรพันธ์	-
38. กากถั่วเหลือง 3	L38	ตลาดอมรพันธ์	5.5×10^7
39. กากถั่วเหลือง 4	L39	ตลาดอมรพันธ์	1.7×10^7
40. กากถั่วเหลือง 5	L40	ตลาดอมรพันธ์	3.0×10^5
41. ปลาแร่	L41	ตลาดอมรพันธ์	5.0×10^4
42. หน่อไม้สด 2	L42	ตลาดอมรพันธ์	1.5×10^4
43. กระเทียมดอง 1	L43	ตลาดอมรพันธ์	5.0×10^5
44. กระเทียมดอง 2	L44	ตลาดอมรพันธ์	-
45. หน่อไม้ดอง 1	L45	ตลาดอมรพันธ์	5.0×10^4
46. หน่อไม้ดอง 2	L46	ตลาดอมรพันธ์	1.4×10^4

หมายเหตุ - ไม่สามารถนับจำนวนโคโลนีได้ เนื่องจากปนเปื้อนยีสต์และรา

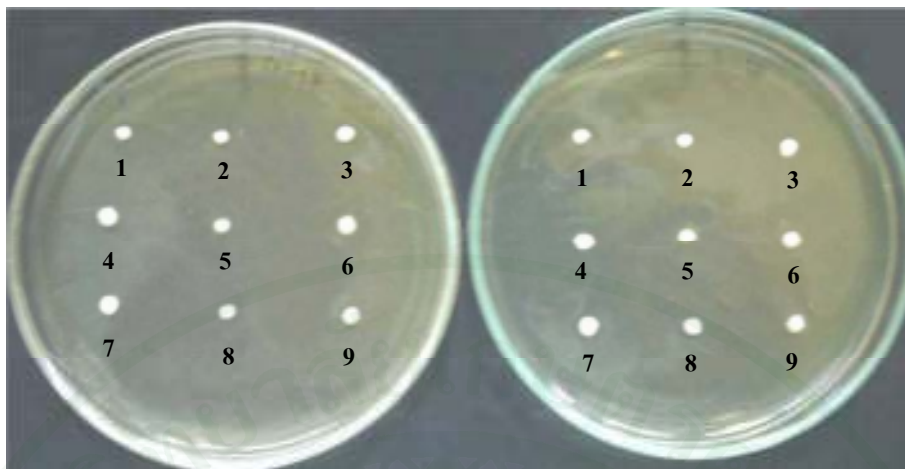
คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้จากตัวอย่างจำนวน 552 ไอโซเลท จากนั้นนำโคโลนีของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จัดลงบนอาหารแข็ง MRS เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ พบว่า

หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มี CO₂ ร้อยละ 5-10 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบลักษณะโคโลนีมีสีขาวขุ่น กลมมนูน ขอบเรียบ แสดงดังภาพที่ 9



ภาพที่ 9 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียกรดแลคติกที่เจริญบนอาหารแข็ง MRS

จากนั้นเก็บโคโลนีเดี่ยวๆ เพื่อเป็นตัวแทนของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ และนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของยีสต์ โดยใช้ไม้จิ้มฟันปราศจากเชื้อจูดลงบนอาหารแข็ง MRS จำนวน 9 โคโลนีต่อจานเพาะเชื้อ ทำ 2 ซ้ำ โดยใช้เทคนิค replica plating จานเพาะเชื้อหนึ่งนำไปทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของยีสต์ *C. albicans* BCC6120 อีกจานเพาะเชื้อเก็บไว้เพื่อเป็นตัวแทนของโคโลนีที่สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของยีสต์ได้ เนื่องจากจานเพาะเชื้อทั้งสองมีโคโลนีที่เหมือนกัน แสดงดังภาพที่ 10

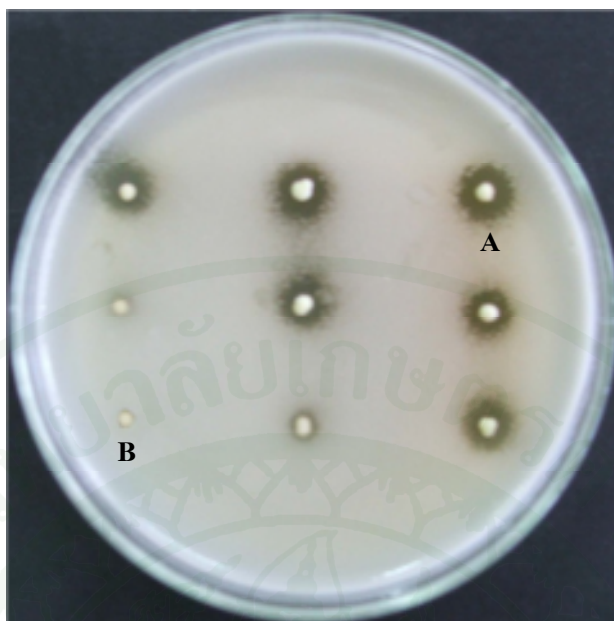


ภาพที่ 10 การทำ replica plating ของแบคทีเรียกรดแลคติกบนอาหารแข็ง MRS

2. การทดสอบการสร้างสารยับยั้งการเจริญของยีสต์ *C. albicans* BCC6120 โดยแบคทีเรียกรดแลคติก

2.1 วิธีเททับ (Overlay method)

นำแบคทีเรียกรดแลคติกที่ได้จากการทดลองในข้อ 1 มาทดสอบการสร้างสารยับยั้งการเจริญของยีสต์ *C. albicans* BCC6120 โดยนำเชื้อที่คัดแยกได้เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MRS จำนวน 9 โคโลนีต่อจานเพาะเชื้อ เพื่อให้โคโลนีของเชื้อติดกันมากจนเกินไป โดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* BCC6120 ได้นั้นจะสร้างวงใสรอบโคโลนี ซึ่งให้ผลการทดสอบ แสดงดังภาพที่ 11 สามารถคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* BCC6120 ได้ทั้งหมด 51 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 9.24 ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ทั้งหมด และจากการตรวจสอบพบว่าทั้ง 51 ไอโซเลทมีค่า CZ-CO ที่แตกต่างกัน โดยไอโซเลท L47-2 มีค่า CZ-CO มากที่สุดคือ 9 และรองลงมาคือ ไอโซเลท L46-3 มีค่าเท่ากับ 7 มิลลิเมตร ดังตารางที่ 9



ภาพที่ 11 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของยีสต์ *C. albicans* BCC6120 โดยวิธีเททับ
 A: แบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* BCC612
 B: แบคทีเรียกรดแลกติกที่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* BCC6120

ตารางที่ 9 ค่าผลต่างระหว่างขนาดของวงใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนีของแบคทีเรียกรดแลกติก (clear zone diameter, CZ) และเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (colony diameter, CO)

ลำดับ	รหัส	CZ-CO (มิลลิเมตร)
1	L 8-7	5
2	L 8-8	2
3	L 8-9	1
4	L 8-10	5
5	L 8-11	2
6	L 8-12	1.5
7	L24-1	2
8	L24-2	4

ตารางที่ 9 (ต่อ)

ลำดับ	รหัส	CZ-CO (มิลลิเมตร)
9	L24-3	2.0
10	L24-4	2.0
11	L24-5	1.0
12	L24-6	2.0
13	L24-7	2.0
14	L24-8	2.0
15	L24-9	2.5
16	L24-10	4.5
17	L24-11	2.0
18	L24-12	2.0
19	L40-1	2.0
20	L40-3	2.0
21	L40-5	2.0
22	L40-6	5.5
23	L40-7	1.0
24	L40-8	1.0
25	L40-10	5.0
26	L41-4	1.0
27	L41-7	5.0
28	L42-7	1.5
29	L42-9	1.3
30	L42-12	1.1
31	L43-1	2.1
32	L43-2	2.0
33	L43-3	1.0
34	L43-4	2.0
35	L43-5	1.0

ตารางที่ 9 (ต่อ)

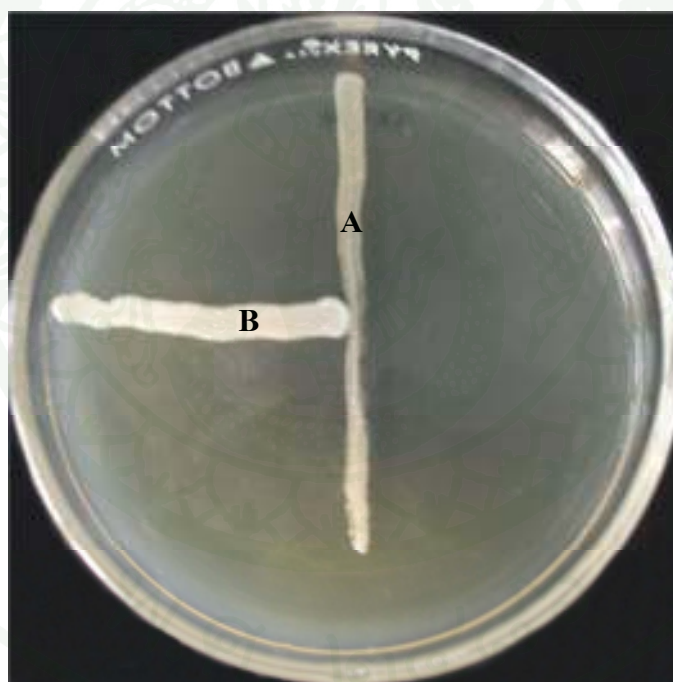
ลำดับ	รหัส	CZ-CO (มิลลิเมตร)
36	L43-6	2.2
37	L43-9	1.0
38	L43-11	2.0
39	L43-12	1.0
40	L45-1	1.1
41	L45-4	1.0
42	L45-8	1.0
43	L45-10	2.4
44	L45-11	6.0
45	L46-1	1.0
46	L46-3	7.0
47	L46-8	1.0
48	L46-9	1.0
49	L46-10	1.0
50	L46-12	2.0
51	L47-2	9.0

ผลจากการทดสอบด้วยวิธีเทปพบแบคทีเรียกรดแลกติกจำนวน 10 ไอโซเลตที่มีค่า CZ-CO มากกว่า 3 มิลลิเมตร คือ L8-7, L8-10, L24-2, L24-10, L40-6, L40-10, L41-7, L45-11, L46-3 และ L47-2 จากนั้นจึงเก็บแบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์ *C. albicans* BCC612 ทั้งหมดในกลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 20 ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อเป็นการรักษาไม่ให้เซลล์ถูกทำลายด้วยเกล็ดน้ำแข็ง และป้องกันการกลายพันธุ์ที่อาจเกิดขึ้นจากการถ่ายเชื้อหลายๆ ครั้ง ซึ่งอาจทำให้ฤทธิ์ของการยับยั้งการเจริญของยีสต์หายไป

2.2 วิธีฉีดเชื้อ (Streak method)

เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลกติกที่ให้ผลบวกจากข้อ 2.1 มาทดสอบการยับยั้งการเจริญของยีสต์ *C. albicans* BCC6120 โดยวิธีฉีดเชืบนอาหารแข็ง TGE เพื่อเปรียบเทียบกับวิธีการคัดเลือกใน

ขั้นตอนแรก เนื่องจากการทดสอบในข้อ 2.1 ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นส่วนประกอบความเข้มข้นร้อยละ 2 ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมกับการเจริญของแบคทีเรียในกลุ่ม lactobacilli (De Man *et al.*, 1960) แต่อาหารเลี้ยงเชื้อ TGE มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 1 ซึ่งอาจไม่เพียงพอในการสร้างกรดแลคติกส่งผลทำให้ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นกรด และมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของยีสต์ได้ ดังนั้นหากมีการยับยั้งเกิดขึ้นอาจเกิดจากสารอื่นที่ไม่ใช่กรดอินทรีย์ เช่น สารที่มีคุณสมบัติคล้ายแบคทีริโอซิน (bacteriocin-like peptide) (Okkers *et al.*, 1999) หรือสารประกอบโปรตีนที่มีฤทธิ์ยับยั้งรา Proteinaceous Antifungal Compound (Atanassova *et al.*, 2003; Magnusson and Schnurer, 2001) จากผลการทดลองพบว่าทุกไอโซเลทไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* BCC6120 ได้ แสดงว่าฤทธิ์ของการยับยั้งหายไปเนื่องจากเหตุผลที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น โดยบริเวณรอยขีดระหว่างแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์ไม่พบการยับยั้งเกิดขึ้น แสดงดังภาพที่ 12



ภาพที่ 12 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* BCC6120 ด้วยวิธีขีดเชื้อบนอาหารแข็ง TGE

A: เชื้อที่ขีดในแนวกวางคือ Lactic acid bacteria (LAB)

B: เชื้อที่ขีดในแนวตั้งฉากคือ *C. albicans* BCC6120

2.3 วิธี agar well diffusion

การทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion เป็นการตรวจสอบการสร้างสารยับยั้งการเจริญของยีสต์ *C. albicans* BCC6120 ในอาหารเหลวของแบคทีเรียกรดแลกติก โดยคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติกจำนวน 10 ไอโซเลทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของยีสต์ได้มากกว่า 3 มิลลิเมตร คือ L8-7, L8-10, L24-2, L24-10, L40-6, L40-10, L41-7, L45-11, L46-3 และ L47-2 โดยนำส่วนใสที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงและกรองเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลกติกที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว 2 ชนิดคือ ส่วนใสของแบคทีเรียกรดแลกติกที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TGE และส่วนใสของแบคทีเรียกรดแลกติกที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS หยอดลงในหลุมของอาหารแข็ง SDA ที่ป้ายเชื้อ *C. albicans* BCC6120 ไว้ก่อนหน้านี้ เพื่อศึกษาว่าอาหารทั้งสองชนิดนั้นให้ผลของการยับยั้งเหมือนกันหรือไม่เมื่อทดสอบโดยปราศจากการเจริญของเซลล์แบคทีเรียกรดแลกติก ผลการทดลองพบว่าส่วนใสจากอาหารเหลว TGE ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* BCC6120 ได้ทั้ง 10 ไอโซเลท ในขณะที่ส่วนใสของแบคทีเรียกรดแลกติกที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS สามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์ได้ทุกไอโซเลท แสดงดังตารางที่ 10 และผลการยับยั้งด้วยวิธีดังกล่าว แสดงดังภาพที่ 13 โดยพบว่าแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของยีสต์ *C. albicans* BCC6120 ได้ดีที่สุด คือ รหัส L47-2

ในการทดสอบนี้เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีเทปจะเห็นได้ว่าบริเวณยับยั้งลดลงอย่างมากเนื่องจากในอาหารแข็งนั้นเมื่อแบคทีเรียกรดแลกติกสร้างสารยับยั้งขึ้น สารจะแพร่ออกรอบๆ โคลินี โดยมีความเข้มข้นมากกว่าในอาหารเหลว หรือวิธี agar well diffusion นั้น สารเมแทบอไลต์ในอาหารเหลวจะต้องซึมผ่านวุ้นจึงทำให้เจือจางฤทธิ์ของสารยับยั้งมากกว่าวิธีเทปซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ostergaard *et al.* (1998) ที่กล่าวว่าการทดสอบการยับยั้งเมื่อเชื่อมิชีวิตสัมผัสกับเชื้อทดสอบโดยตรงมักให้ผลการตรวจสอบสูงกว่าไม่มีการสัมผัสกันของเชื้อ หรืออธิบายผลของสถานะอาหารดังที่พบใน *Staphylococcus epidermis* ซึ่งผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดแบคทีเรียโอซินในอาหารกึ่งแข็งสูงกว่าอาหารเหลวถึง 20 เท่า (Jetten *et al.*, 1972) และพบว่า *Lactobacillus plantarum* NCDO1193 และ *L. plantarum* BF001 สามารถผลิตสารยับยั้งชนิดแบคทีเรียโอซินเมื่อเจริญในอาหารกึ่งแข็งเท่านั้น (West and Warner, 1988; Fricourt *et al.*, 1994)

ตารางที่ 10 การยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* BCC6120 โดยแบคทีเรียกรดแลคติก
ด้วยวิธี agar well diffusion

ไอโซเลข	รหัส	อาหารเหลว	
		TGE	MRS
1	L8-7	-	+
2	L8-10	-	+
3	L24-2	-	+
4	L24-10	-	+
5	L40-6	-	+
6	L40-10	-	+
7	L41-7	-	+
8	L45-11	-	+
9	L46-3	-	+
10	L47-2	-	++

หมายเหตุ - ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* BCC6120 ได้

+ มีวงใสไม่เกิน 10 มิลลิเมตร (รวมขนาดหลุม 6 มิลลิเมตร)

++ มีวงใสมากกว่า 10 มิลลิเมตร (รวมขนาดหลุม 6 มิลลิเมตร)



ภาพที่ 13 การยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* BCC6120 ด้วยวิธี agar well diffusion

A: อาหารเหลว MRS (หลุมควบคุม)

B: อาหารเหลว TGE (หลุมควบคุม)

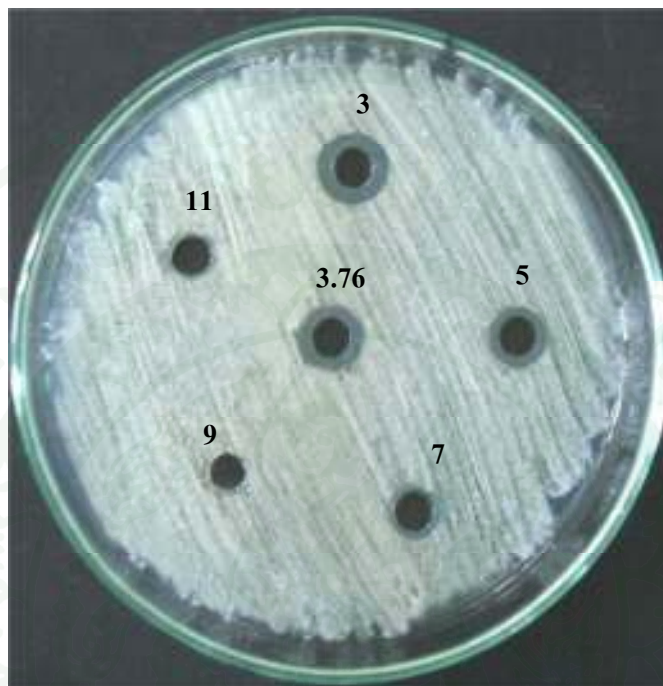
C: ส่วนใสจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ของแบคทีเรียกรดแลคติก

D: ส่วนใสจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TGE ของแบคทีเรียกรดแลคติก

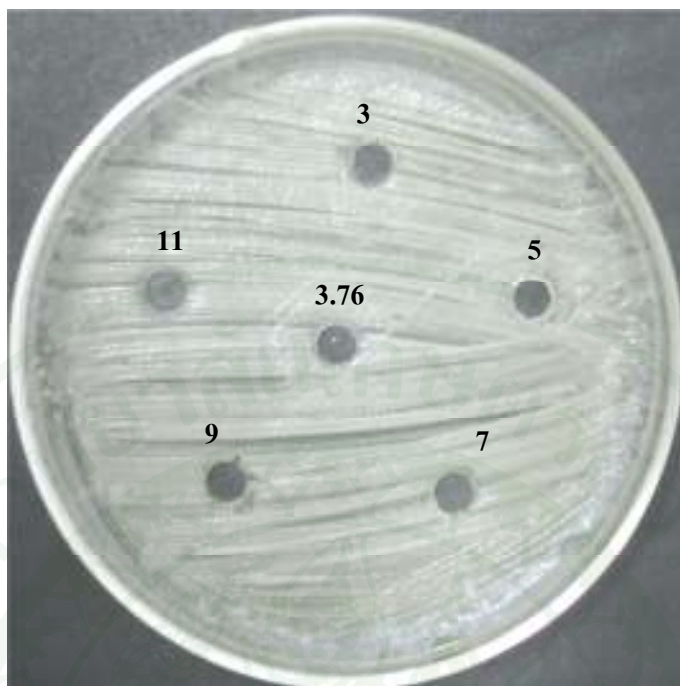
2.4 การศึกษาผลของ pH ต่อการยับยั้งยีสต์ *C. albicans* BCC6120

เนื่องจากมีรายงานว่ากรดอินทรีย์ที่ได้จากแบคทีเรียกรดแลคติกมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอื่นๆ รวมทั้งรา (ปาริชาติ และคณะ 2543; ชูตินันท์ และคณะ 2545; Niku-paavola *et al.*, 1999; Cabo *et al.*, 2002) ดังนั้นเพื่อยืนยันข้อความดังกล่าวจึงนำส่วนใสของอาหารเหลว MRS ที่เพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นเวลา 48 ชั่วโมง มาปรับ pH เป็น 3, 5, 7, 9 และ 11 ด้วย 1 N HCl และ 1 N NaOH เปรียบเทียบกับอาหารเหลว MRS ที่ไม่ผ่านการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกที่ปรับ pH เช่นเดียวกัน จากนั้นนำไปหยดลงในหลุมเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.4 ผลการทดลองพบว่าฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* BCC6120 ของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต L47-2 จากเดิมที่ไม่ปรับ pH คือ 3.76 แต่เมื่อปรับเป็น pH 3 ฤทธิ์ของการยับยั้งเพิ่มขึ้นจากเดิมเล็กน้อย แต่ที่ pH 5, 7, 9 และ 11 ฤทธิ์ของการยับยั้งจะค่อยๆ ลดลง และหายไปตามลำดับ ในขณะที่

อาหารเหลว MRS ที่ปรับ pH ดังกล่าวไม่พบวงใสเกิดขึ้น ดังภาพที่ 14-15 ดังนั้นฤทธิ์ของการยับยั้งอาจเกิดจากกรดอินทรีย์และ/หรือชีวสารอื่นๆ ซึ่งมีการทำงานร่วมกันทำให้เมื่อ pH เปลี่ยนไปสารเหล่านั้นจึงสูญเสียฤทธิ์ของการยับยั้งไปด้วย (Magnusson and Schnurer, 2001)



ภาพที่ 14 ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* BCC6120 ของแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต L47-2 ที่ปรับ pH เป็น 3, 5, 7, 9 และ 11 ด้วยวิธี agar well diffusion และส่วนของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ไม่ปรับ pH (3.76)

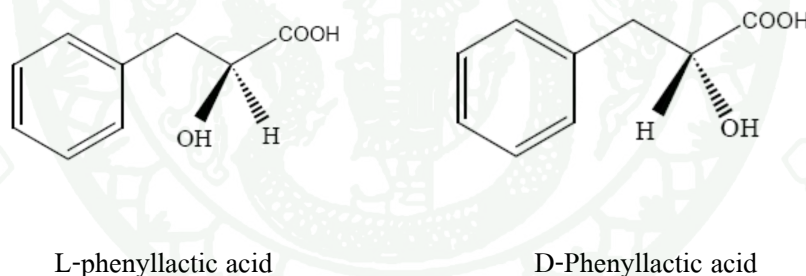


ภาพที่ 15 ภาพการยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* BCC6120 ของอาหารเหลว MRS ที่ไม่ผ่านการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลกติกที่ปรับเป็น pH 3, 3.76, 5, 7, 9 และ 11 ด้วย 1 N HCl และ 1 N NaOH ทดสอบโดยวิธี agar well diffusion

เนื่องจากการทดสอบด้วยวิธีเทปไม่สามารถบอกได้ว่าวงใสที่เกิดขึ้นเป็นผลจากกรดอินทรีย์หรือไม่ ดังนั้นการทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion เป็นการศึกษาฤทธิ์ของสารยับยั้งด้วยการปรับ pH ของสาร ซึ่งผลการทดลองพบว่าฤทธิ์ของสารยับยั้งยีสต์ *C. albicans* BCC6120 ของแบคทีเรียกรดแลกติกอยู่ในช่วง pH 3.0-5.0 และฤทธิ์ค่อยๆ หายไปเมื่อ pH สูงขึ้น ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Magnusson และ Schnurer (2001) โดยแบคทีเรียกรดแลกติกสามารถผลิตสารเมแทบอลิท์ เช่น กรดแลกติก กรดแอซีติก ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ กรดฟอर्मิก กรดโพรพิโอนิก และไดอะซีทิล สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ โดยกรดแลกติกเป็นสารเมแทบอลิท์สำคัญที่แบคทีเรียกรดแลกติกสร้างขึ้น เนื่องจากทำให้ค่า pH ลดลง และมีผลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่ทนกรดได้ (Eklund, 1989) ในขณะเดียวกันกรดแลกติก กรดแอซีติก และกรดโพรพิโอนิก ทำปฏิกิริยากับเชื้อหุ้มเซลล์ทำให้เกิด electrochemical proton gradient แต่การทำงานของกรดทั้ง 3 ชนิดนั้นขึ้นอยู่กับค่า pH โดยกรดแลกติกเป็นตัวการสำคัญ (Eklund, 1989; Freese *et al.*, 1973; De Vuyst and Vandamme, 1994; Lindgren and Dobrogosz, 1990) ซึ่งกรดโพรพิโอนิกจะมีผลกระทบต่อเชื้อหุ้มเซลล์ของราและสามารถยับยั้งการ

เจริญของราได้โดยเฉพาะที่ pH ต่ำกว่า 4.5 (Hunter and Segel, 1973; Woolford, 1984) ดังนั้นจากผลของ pH ต่อฤทธิ์ของสารในการยับยั้งการเจริญของยีสต์ *C. albicans* BCC6120 จำกัดอยู่ในช่วง pH 3.0-5.0 เท่านั้น อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงค่า pH ของส่วนใสของแบคทีเรียกรดแลคติกสูงกว่า 5.0 ส่งผลให้ฤทธิ์ของสารยับยั้งหายไป (Magnusson and Schnurer, 2001)

สาเหตุที่แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์ *C. albicans* BCC6120 ได้นั้น มีผู้ศึกษาพบว่า การยับยั้งการเจริญเกิดจากกรดแลคติกมีผลทำให้ pH ในไซโตพลาสซึมลดลง ไม่เหมาะสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่ทนกรด (Russell, 1992) และยังเกิดจากการทำงานร่วมกันระหว่างกรดแลคติกและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ด้วย (Dahiya and Speck, 1968; Collins and Aramaki, 1980) เมื่อกล่าวถึงกลุ่มของกรดอินทรีย์ เช่น กรดแลคติก กรดแอซีติก phenyllactic acid (PLA) และ hydroxyphenyllactic acid (OH-PLA) ที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติกนั้นมีบทบาทในการยับยั้งการเจริญของราและแบคทีเรียชนิดต่างๆ ได้ (Lavermicocca *et al*, 2003; Valerio *et al*, 2008; Magnusson, 2005) โดยสารที่จัดเป็นอนุพันธ์ของกรดแลคติกดังกล่าวมีโครงสร้างดังภาพที่ 16

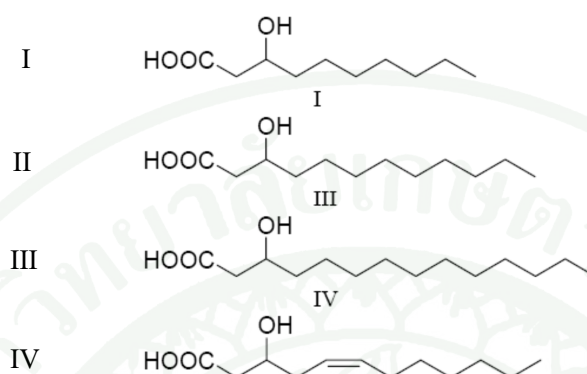


ภาพที่ 16 โครงสร้างของ L-phenyllactic acid และ D- phenyllactic acid

ที่มา: Strom *et al.* (2002)

แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถสร้างสารเมแทบอไลต์ชนิดอื่นนอกเหนือจากกรดแลคติกและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เช่น รูเทอริน หรือ 3-hydroxypropionaldehyde (reuterin, 3-HPA) ซึ่งมีคุณสมบัติที่สำคัญคือ มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ละลายน้ำ สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ โดยรูเทอรินมีฤทธิ์ค่อนข้างกว้างสามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์และราได้ (Axelsson *et al.*, 1989; Chung *et al.*, 1989; Magnusson *et al.*, 2003; Nakanishi *et al.*, 2002; Talarico *et al.*, 1988) นอกจากนี้สารในกลุ่มกรดไขมันที่มีองค์ประกอบของคาร์บอน 12-16 อะตอม (C_{12} - C_{16}) ซึ่งมี

คุณสมบัติเหมือนสารชักฟอก (Kabra, 1983) สามารถยับยั้งยีสต์และรา แต่กรดไขมันที่มีคาร์บอน 12 อะตอม สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับกรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอนอะตอมมากกว่า (Sjogren *et al.*, 2003) โดยมีโครงสร้างดังภาพที่ 17

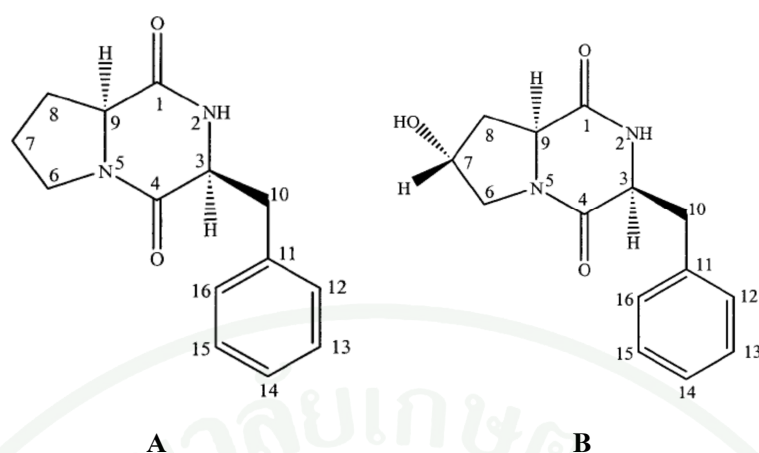


ภาพที่ 17 โครงสร้างของกรดไขมัน 4 ชนิด ที่แยกได้จากส่วนไขมันของ *L. plantarum* strain MiLAB 14

- I: 3-hydroxydecanoic acid (myrmicacin, 3-HDA)
- II: 3-hydroxydodecanoic acid
- III: 3-hydroxytetradecanoic acid
- IV: 3-hydroxy-5-cis-dodecenoic acid

ที่มา: Magnusson *et al.* (2003)

จากงานวิจัยของ Strom *et al.* (2002) พบสารในกลุ่ม cyclic dipeptides เช่น cyclo (L-Phe-L-Pro) และ cyclo (L-Phe-*trans*-4-OH-L-Pro) ที่แยกได้จาก *L. plantarum* strain MiLAB 393 สามารถยับยั้งได้ทั้งการเจริญของราและยีสต์ โดยมีโครงสร้างดังภาพที่ 18 นอกจากนี้ยังมีสารยับยั้งราที่พบจากแบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งเป็นสารที่จัดอยู่ในกลุ่ม cyclic dipeptides เช่น benzoic acid, 5-methyl-2,4-imidazolidinedione (methylhydantoin), tetrahydro-4-hydroxy-4-methyl-2H-pyran-2-one (mevalonolactone) และ cyclo (glycyl-L-leucyl) (Niku-Paavola *et al.*, 1999; Ganzle *et al.*, 2000; Graz *et al.*, 1999; Graz *et al.*, 2001; Magnusson *et al.*, 2003)



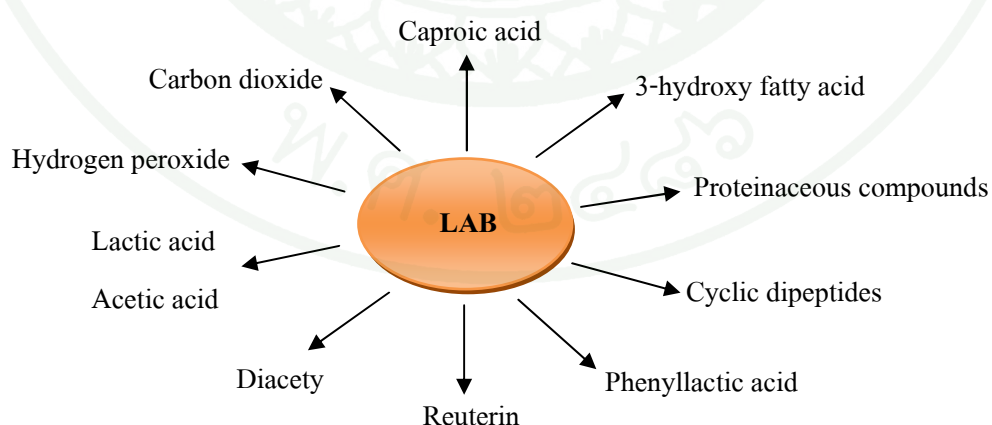
ภาพที่ 18 โครงสร้างของ cyclic dipeptides ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งรา

A: cyclo (Phe-Pro)

B: cyclo (L-Phe-*trans*-4-OH-L-Pro)

ที่มา: Strom *et al.* (2002)

จากการรายงานเกี่ยวกับสารเมแทบอไลต์ต่างๆ ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของรานั้น ส่วนใหญ่เป็นสารที่มีมวลโมเลกุลต่ำ เช่น phenyllactic acids, cyclic dipeptides หรือ short chain fatty acid และสารชนิดอื่นๆ ที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลคติก โดยสรุปไว้ดังภาพที่ 19



ภาพที่ 19 สารต้านราชนิดต่างๆ ที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลคติก

ที่มา: Magnusson (2005)

3. ความสามารถในการเกาะติดพื้นผิว

แบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกส์ ซึ่งคุณสมบัติประการหนึ่งของโปรไบโอติกส์คือ มีความสามารถในการเกาะติดพื้นผิว (Nousiainen and Setälä, 1993; Tuomola and Salminen, 1998) ดังนั้นจึงได้ทดสอบการเกาะติดพื้นผิวของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 51 ไอโซเลท ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของยีสต์ เพื่อคัดเลือกไอโซเลทที่สามารถเกาะติดพื้นผิวได้ดีที่สุด มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่มีแท่งไม้ไผ่ปราศจากเชื้อเป็นแกนกลาง และบ่มเป็นเวลา 5 วัน จากการตรวจผลการเกาะติดของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผิวแท่งไม้ไผ่ทุกๆ วัน พบ 2 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท L46-3 และ L47-2 ที่แยกได้จากหน่อไม้ต้องสามารถยึดเกาะผิวแท่งไม้ไผ่และผิวหลอดทดลองได้ โดยเชื้อทั้งสองไอโซเลทแสดงการเกาะติดพื้นผิวได้เร็วและยาวนาน แสดงดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 คุณสมบัติในการเกาะติดพื้นผิวของไอโซเลท L46-3 และ L47-2

ไอโซเลท	ระยะเวลาที่เริ่มเกาะติด พื้นผิว (วัน)	จำนวนวันที่เกาะติด พื้นผิว (วัน)	การคงสภาพเกาะติด พื้นผิว
L46-3	2	>5	น้อย
L47-2	2	>5	มาก

จากการตรวจสอบด้วยสายตาพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท L47-2 มีการเกาะติดพื้นผิวได้ดีกว่า L46-3 โดยเริ่มเกาะติดในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง สังเกตได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อมีลักษณะใสเนื่องจากเซลล์แบคทีเรียเกาะผิวแท่งไม้ไผ่ แต่ในหลอดอาหารที่เพาะเลี้ยง L46-3 มีลักษณะขุ่นมากกว่า เนื่องจากมีเซลล์เกาะที่ผิวแท่งไม้ไผ่ได้น้อยกว่า แสดงดังภาพที่ 20



ภาพที่ 20 การเกาะติดพื้นผิวของแบคทีเรียกรดแลคติกที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS และมี
แท่งไม้ไผ่ปราศจากเชื้อเป็นแกนกลางหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน
หลอดทดลองที่ 1: อาหาร MRS ที่ไม่มีการเลี้ยงเชื้อ
หลอดทดลองที่ 2: แบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต L47-2
หลอดทดลองที่ 3: แบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต L46-3
หลอดทดลองที่ 4: แบคทีเรียกรดแลคติกที่ไม่เกาะติดผิวแท่งไม้ไผ่

แบคทีเรียกรดแลคติกบางชนิดสามารถเกาะติดผิวของระบบทางเดินอาหารได้ โดยที่ผนังมี lectin เป็นส่วนประกอบ ซึ่ง lectin คือ สารประกอบคาร์โบไฮเดรตที่จับกับโปรตีนหรือไกลโคโปรตีน (Slifkin and Doyle, 1990) ปัจจัยสำคัญที่ควบคุมการเกาะติดพื้นผิวคือ ความจำเพาะของจุลินทรีย์ต่อ ชนิดของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ ซึ่งเป็นข้อบ่งชี้ว่าการคัดแยกแบคทีเรียจากที่ต่างๆ นั้นไม่จำเป็นต้องมีการ เกาะติดพื้นผิวบริเวณเดียวกัน จากงานวิจัยของ Morata de Ambrosioni *et al.* (1999) พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติก *Lactobacillus casei* ที่แยกได้จากมนุษย์มีความสามารถในการเกาะติดพื้นผิว สูงกว่า *L. casei* ที่แยกได้จากนม และสามารถเกาะติดได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งจาก งานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติก *L. acidophilus* ที่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญของ

Salmonella cholera, *S. enteritidis*, *S. typhimurium* และยีสต์ *Yersinia enterocolitica* นั้นยังมีความสามารถในการเกาะติดพื้นผิวได้ด้วย (Gusils *et al.*, 2002)

จากงานวิจัยของ Ouwehand *et al.* (2001) พบแบคทีเรียในกลุ่มกรดแลคติกที่มีความสามารถในการเกาะติดผิวของผนังลำไส้ ได้แก่ *L. brevis* PEL1, *L. johnsonii*, *L. reuteri* ING1, *L. paracasei*, *L. rhamnosus* E-800, *L. rhamnosus* LC-705 และ *L. salivarius* ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวเป็นผลจากการเป็น hydrophobicity ของเชื้อที่มีบทบาทสำคัญทำให้แบคทีเรียสามารถเกาะติดพื้นผิวได้ (Wadstrom, 1988; Harty and Knox, 1991; Kirjavainen *et al.*, 1998) จากรายงานต่างๆ พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกโดยเฉพาะในสกุล *Lactobacillus* มีความสามารถในการเกาะติดพื้นผิว ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบที่พบแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท L46-3 และ L47-2 ที่สามารถเกาะติดพื้นผิวได้

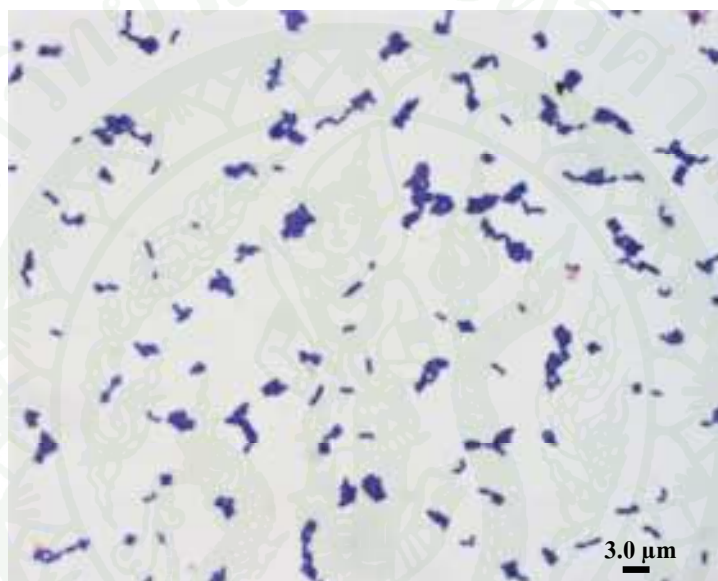
จากการศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากแหล่งต่างๆ และทดสอบด้วยวิธีเทปสามารถคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ทั้งหมด 51 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 9.24 และจากการทดสอบผลของ pH ต่อฤทธิ์ของสารยับยั้งการเจริญของยีสต์ด้วยวิธี agar well diffusion พบว่าฤทธิ์ของสารดังกล่าวอยู่ในช่วง pH 3.0-5.0 และจะสูญเสียฤทธิ์ไปเมื่อปรับ pH ให้สูงขึ้น จากการทดสอบการเกาะติดพื้นผิวในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีแท่งไม้ไผ่เป็นแกนกลาง พบว่าไอโซเลท L47-2 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของยีสต์ได้สูงที่สุดและสามารถเกาะติดพื้นผิวได้ดีที่สุดอีกด้วย

4. การศึกษาอนุกรมวิธานของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้

การจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกในระดับสกุลสามารถทำได้โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี เช่น รูปร่าง การจัดเรียงตัวของเซลล์ การผลิตคาร์บอนไดออกไซด์จากกระบวนการหมักกลูโคส และการจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป API 50 CHL ซึ่งสามารถจำแนกได้ในระดับสปีชีส์ แต่เพื่อความแม่นยำในการจัดจำแนกในระดับสปีชีส์จึงต้องอาศัยเทคนิคขั้นสูงทางชีวโมเลกุล เช่น การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA (Woese, 1987)

4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

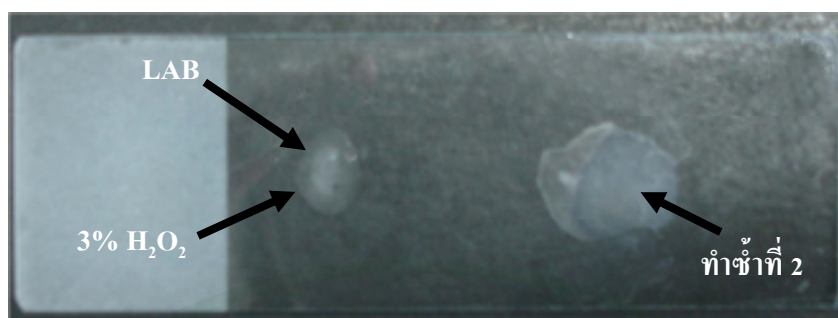
จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกทั้งหมด 51 ไอโซเลท โดยปัดเชื้อลงบนอาหารแข็ง MRS เพื่อทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยการย้อมสีแบบแกรม และตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่าทุกไอโซเลทเป็นแบคทีเรียแกรมบวก โดยติดสีม่วงของ crystal violet มีรูปร่างเป็นแท่งยาว และไม่สร้างเอนโดสปอร์ ดังภาพที่ 21



ภาพที่ 21 รูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายของภาพเท่ากับ 1,000 เท่า

4.2 การทดสอบการสร้างเอนไซม์แคตาเลส

การทดสอบการสร้างเอนไซม์แคตาเลสของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 51 ไอโซเลท พบว่าทุกไอโซเลทให้ผลเป็นลบคือ ไม่มีฟองแก๊สเกิดขึ้นหลังจากเชื้อทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 3 ดังภาพที่ 22



ภาพที่ 22 การทดสอบการสร้างเอนไซม์แคตาเลสของแบคทีเรียกรดแลกติก

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของยีสต์ *C. albicans* BCC612 จำนวน 51 ไอโซเลต พบว่าทุกไอโซเลตเป็นแบคทีเรียแกรมบวก และไม่สร้างเอนไซม์แคตาเลส โดยสรุปลักษณะต่างๆ ดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 คุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดแยกได้จากตัวอย่างทดสอบ

ลำดับ	รหัส	ลักษณะโคโลนี	การติดสีแกรม	การทดสอบแคตาเลส
1	L 8-7	สีขาวขุ่น กลมมนูน ขอบเรียบ	แกรมบวก	-
2	L 8-8	สีขาวขุ่น กลมมนูน ขอบเรียบ	แกรมบวก	-
3	L 8-9	สีขาวขุ่น กลมมนูน ขอบเรียบ	แกรมบวก	-
4	L 8-10	สีขาวขุ่น กลมมนูน ขอบเรียบ	แกรมบวก	-
5	L 8-11	สีขาวขุ่น กลมมนูน ขอบเรียบ	แกรมบวก	-
6	L 8-12	สีขาวขุ่น กลมมนูน ขอบเรียบ	แกรมบวก	-
7	L24-1	สีขาวขุ่น กลมมนูน ขอบเรียบ	แกรมบวก	-
8	L24-2	สีขาวขุ่น กลมมนูน ขอบเรียบ	แกรมบวก	-
9	L24-3	สีขาวขุ่น กลมมนูน ขอบเรียบ	แกรมบวก	-
10	L24-4	สีขาวขุ่น กลมมนูน ขอบเรียบ	แกรมบวก	-
11	L24-5	สีขาวขุ่น กลมมนูน ขอบเรียบ	แกรมบวก	-
12	L24-6	สีขาวขุ่น กลมมนูน ขอบเรียบ	แกรมบวก	-
13	L24-7	สีขาวขุ่น กลมมนูน ขอบเรียบ	แกรมบวก	-
14	L24-8	สีขาวขุ่น กลมมนูน ขอบเรียบ	แกรมบวก	-

ตารางที่ 12 (ต่อ)

ลำดับ	รหัส	ลักษณะโคโลนี	การติดสีแกรม	การทดสอบแคตาเลส
15	L24-9	สีขาวขุ่น กลมมนูน ขอบเรียบ	แกรมบวก	-
16	L24-10	สีขาวขุ่น กลมมนูน ขอบเรียบ	แกรมบวก	-
17	L24-11	สีขาวขุ่น กลมมนูน ขอบเรียบ	แกรมบวก	-
18	L24-12	สีขาวขุ่น กลมมนูน ขอบเรียบ	แกรมบวก	-
19	L40-1	สีขาวขุ่น กลมมนูน ขอบเรียบ	แกรมบวก	-
20	L40-3	สีขาวขุ่น กลมมนูน ขอบเรียบ	แกรมบวก	-
21	L40-5	สีขาวขุ่น กลมมนูน ขอบเรียบ	แกรมบวก	-
22	L40-6	สีขาวขุ่น กลมมนูน ขอบเรียบ	แกรมบวก	-
23	L40-7	สีขาวขุ่น กลมมนูน ขอบเรียบ	แกรมบวก	-
24	L40-8	สีขาวขุ่น กลมมนูน ขอบเรียบ	แกรมบวก	-
25	L40-10	สีขาวขุ่น กลมมนูน ขอบเรียบ	แกรมบวก	-
26	L41-4	สีขาวขุ่น กลมมนูน ขอบเรียบ	แกรมบวก	-
27	L41-7	สีขาวขุ่น กลมมนูน ขอบเรียบ	แกรมบวก	-
28	L42-7	สีขาวขุ่น กลมมนูน ขอบเรียบ	แกรมบวก	-
29	L42-9	สีขาวขุ่น กลมมนูน ขอบเรียบ	แกรมบวก	-
30	L42-12	สีขาวขุ่น กลมมนูน ขอบเรียบ	แกรมบวก	-
31	L43-1	สีขาวขุ่น กลมมนูน ขอบเรียบ	แกรมบวก	-
32	L43-2	สีขาวขุ่น กลมมนูน ขอบเรียบ	แกรมบวก	-
33	L43-3	สีขาวขุ่น กลมมนูน ขอบเรียบ	แกรมบวก	-
34	L43-4	สีขาวขุ่น กลมมนูน ขอบเรียบ	แกรมบวก	-
35	L43-5	สีขาวขุ่น กลมมนูน ขอบเรียบ	แกรมบวก	-
36	L43-6	สีขาวขุ่น กลมมนูน ขอบเรียบ	แกรมบวก	-
37	L43-9	สีขาวขุ่น กลมมนูน ขอบเรียบ	แกรมบวก	-
38	L43-11	สีขาวขุ่น กลมมนูน ขอบเรียบ	แกรมบวก	-
39	L43-12	สีขาวขุ่น กลมมนูน ขอบเรียบ	แกรมบวก	-
40	L45-1	สีขาวขุ่น กลมมนูน ขอบเรียบ	แกรมบวก	-
41	L45-4	สีขาวขุ่น กลมมนูน ขอบเรียบ	แกรมบวก	-

ตารางที่ 12 (ต่อ)

ลำดับ	รหัส	ลักษณะโคโลนี	การติดสีแกรม	การทดสอบแคตาเลส
42	L45-8	สีขาวขุ่น กลมมนูน ขอบเรียบ	แกรมบวก	-
43	L45-10	สีขาวขุ่น กลมมนูน ขอบเรียบ	แกรมบวก	-
44	L45-11	สีขาวขุ่น กลมมนูน ขอบเรียบ	แกรมบวก	-
45	L46-1	สีขาวขุ่น กลมมนูน ขอบเรียบ	แกรมบวก	-
46	L46-3	สีขาวขุ่น กลมมนูน ขอบเรียบ	แกรมบวก	-
47	L46-8	สีขาวขุ่น กลมมนูน ขอบเรียบ	แกรมบวก	-
48	L46-9	สีขาวขุ่น กลมมนูน ขอบเรียบ	แกรมบวก	-
49	L46-10	สีขาวขุ่น กลมมนูน ขอบเรียบ	แกรมบวก	-
50	L42-12	สีขาวขุ่น กลมมนูน ขอบเรียบ	แกรมบวก	-
51	L47-2	สีขาวขุ่น กลมมนูน ขอบเรียบ	แกรมบวก	-

หมายเหตุ - ไม่สามารถสร้างเอนไซม์แคตาเลสได้

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และการทดสอบเอนไซม์แคตาเลส ทำให้ทราบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 51 ไอโซเลท จัดอยู่ในสกุล *Lactobacillus* (Atanassova *et al.*, 2003) ดังนั้นจึงเก็บรักษาเชื้อทุกไอโซเลทไว้ในที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บเชื้อไว้ได้นานยิ่งขึ้น

เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท L47-2 มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* BCC6120 และมีความสามารถในการเกาะติดพื้นผิวได้ดีที่สุด จึงเป็นไอโซเลทที่ถูกเลือกเพื่อใช้จัดจำแนกในระดับสปีชีส์ต่อไป

4.3 การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกด้วยชุดทดสอบ API 50 CHL Medium

จากการตรวจสอบสมบัติการหมักคาร์โบไฮเดรต 49 ชนิด โดยชุดทดสอบสำเร็จรูป API 50 CHL แสดงผลการทดสอบดังตารางที่ 13 โดยไอโซเลท L47-2 สามารถสร้างกรดได้จากการหมัก Amygdalin, Arbutin, Cellubiose, D-Turanose, D-Tagalose, Esculin, Fructose, Galactose, Glucose, Gluconate, Glucosamine, Inulin, Lactose, Maltose, Mannose, Mannitol, Melezitose,

N-Acetyl-Glucosamine, Ribose, Sorbitol, Salicin, Sucrose และ Trehalose ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนได้ เมื่อนำข้อมูลดังกล่าวมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม API 50 CHL V. 5.1 พบว่าไอโซเลท L47-2 คือ *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* ร้อยละ 99.9 แสดงถึงภาพภาคผนวก ค

ตารางที่ 13 ผลการหมักคาร์โบไฮเดรตทั้ง 49 ชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท L47-2 โดยชุดทดสอบสำเร็จรูป API 50 CHL

ลำดับ	คาร์โบไฮเดรต	ผลการหมัก
0	Control	-
1	Glycerol	-
2	Erythritol	-
3	D-Arabinose	-
4	L-Arabinose	-
5	Ribose	+
6	D-Xylose	-
7	L-Xylose	-
8	Adonitol	-
9	β -Methyl-D-Xyloside	-
10	Galactose	+
11	Glucose	+
12	Fructose	+
13	Mannose	+
14	Sorbose	+
15	Rhamnose	-
16	Dulcitol	-
17	Inositol	-
18	Mannitol	+
19	Sorbitol	+
20	α -Methyl-D-Mannoside	-
21	α -Methyl-D-Glucoside	-

ตารางที่ 13 (ต่อ)

ลำดับ	คาร์โบไฮเดรต	ผลการหมัก
22	N-Acetyl-Glucosamine	+
23	Amygdalin	+
24	Arbutin	+
25	Esculin	+
26	Salicin	+
27	Cellubiose	+
28	Maltose	+
29	Lactose	+
30	Melibiose	-
31	Sucrose	+
32	Trehalose	+
33	Inulin	+
34	Melezitose	+
35	Raffinose	-
36	Starch	-
37	Glycogen	-
38	Xylitol	-
39	Gentiobiose	-
40	D-Turanose	+
41	D-Lyxose	-
42	D-Tagalose	+
43	D-Fucose	-
44	L-Fucose	-
45	D-Arabitol	-
46	L-Arabitol	-
47	Gluconate	+

ตารางที่ 13 (ต่อ)

ลำดับ	คาร์โบไฮเดรต	ผลการหมัก
48	2-keto-gluconate	-
49	5-keto-gluconate	-

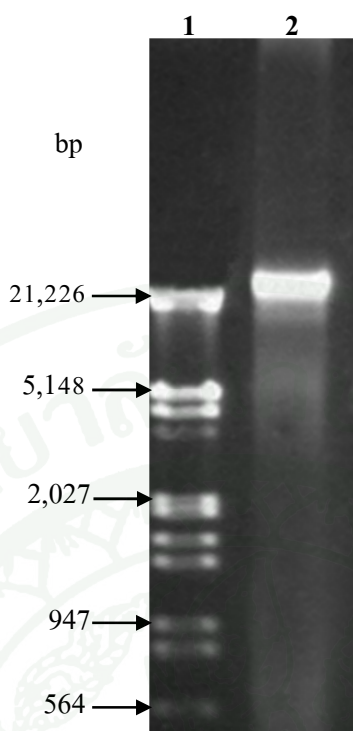
หมายเหตุ + ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้
- ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนไม่ได้

4.4 การวิเคราะห์หาลำดับเบสของยีน 16S rRNA

ความก้าวหน้าอย่างรวดเร็วของเทคโนโลยีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในสิ่งมีชีวิตส่งผลให้การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จำเพาะเป็นวิธีการมาตรฐานในการศึกษาความสัมพันธ์ทางอนุกรมวิธานและสายวิวัฒนาการระหว่างจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ (Towner and Cockayne, 1993) การระบุสายพันธุ์จุลินทรีย์โดยการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA เป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวาง เนื่องจากเป็นวิธีการที่รวดเร็วและแม่นยำ นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มประสิทธิภาพได้ด้วยการใช้ร่วมกับเทคนิค PCR (Steffan and Atlas, 1988; Stackebrandt and Goodfellow, 1991)

4.4.1 การสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท L47-2

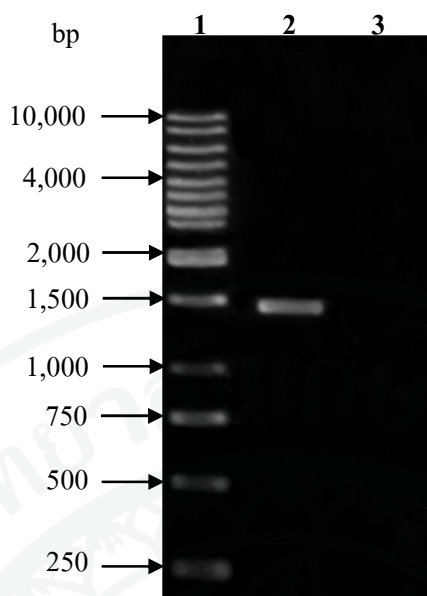
สกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท L47-2 ตามวิธีของ Zhou *et al.* (1996) จากนั้นตรวจสอบโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ความเข้มข้นเจลร้อยละ 0.8 พบว่าแบคทีเรียกรดแลกติกมีจีโนมิกส์ดีเอ็นเอขนาดใหญ่มากกว่า 21 กิโลเบส ดังภาพที่ 23 เมื่อนำมาวิเคราะห์ความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 230, 260 และ 280 นาโนเมตร และคำนวณความเข้มข้นของดีเอ็นเอตามวิธีของ Sambrook *et al.* (1989) พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้จากไอโซเลท L47-2 มีความเข้มข้น 445 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีอัตราส่วนระหว่าง $A_{260/280}$ เท่ากับ 1.94 แสดงว่าสารละลายดีเอ็นเอมีการปนเปื้อนของโปรตีนในปริมาณน้อย และมีค่า $A_{260/230}$ เท่ากับ 2.24 ซึ่งบ่งชี้ว่าสารละลายดีเอ็นเอมี chloroform หรือสารเคมีชนิดอื่นปนเปื้อนในปริมาณต่ำ (Hampicharnchai *et al.*, 2007) จากอัตราส่วนดังกล่าวทำให้ทราบว่าดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์เพียงพอในการนำไปใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำปฏิกิริยา PCR ต่อไป



ภาพที่ 23 ลักษณะจีโนมิกส์ดีเอ็นเอที่ตรวจสอบด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis
 เลนที่ 1: ดีเอ็นเอมาตรฐานของ Lambda DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *HindIII*
 เลนที่ 2: Genomic DNA ของไอโซเลท L47-2

4.4.2 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR

หลังจากได้สารละลายดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์จึงนำไปเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA โดยอาศัยเทคนิค PCR จากไพรเมอร์ 27F และ 1389R โดยในชุด negative control มีน้ำดีไอออไนซ์ ปราศจากเชื้อแทนดีเอ็นเอต้นแบบ ผลการทดลองพบว่าได้ผลิตภัณฑ์ PCR จำนวน 1 แถบ มีขนาดประมาณ 1.4 กิโลเบส ซึ่งผลิตภัณฑ์ PCR ที่ควรได้มีขนาด 1,362 bp ใกล้เคียงกับขนาดยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย (Klijn *et al.*, 1991) จากนั้นนำจีโนมดีเอ็นเอเป้าหมายมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป GeneJET™ Gel Extraction และตรวจสอบด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ความเข้มข้นเจลร้อยละ 1.2 ปริมาตร 1 ไมโครลิตร พบผลิตภัณฑ์ PCR มีความบริสุทธิ์มากขึ้น เมื่อเทียบกับผลิตภัณฑ์ PCR ที่ไม่ได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ดังภาพที่ 24 จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่บริสุทธิ์เชื่อมต่อกับเวกเตอร์ในขั้นตอนต่อไป

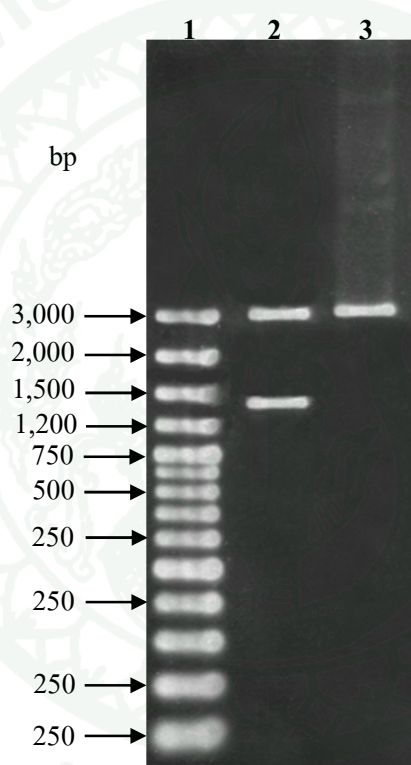


ภาพที่ 24 ลักษณะดีเอ็นเอของชิ้นชิ้น 16S rRNA ที่ตรวจสอบด้วย 1.2% agarose gel electrophoresis
 เลนที่ 1: GeneRuler™ 1 kb DNA ladder ปริมาตร 0.7 ไมโครลิตร
 เลนที่ 2: Purified PCR product (L47-2) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร
 เลนที่ 3: Neative control ปริมาตร 1 ไมโครลิตร

4.4.3 การโคลนดีเอ็นเอเป้าหมาย

เชื่อมต่อดีเอ็นเอเป้าหมายกับพลาสมิด pGEM®-T Easy Vector ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* เนื่องจากบริเวณปลายของเวกเตอร์ชนิดนี้มีเบส 3' ที่มีไฮดรอกซิลที่สามารถเข้าคู่กับเบสอะดีนีนที่อยู่บริเวณปลายของผลิตภัณฑ์ PCR ได้ นอกจากนี้ยังประกอบด้วยยีนต้านยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน และยีน *lacZ* ซึ่งแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ β -galactosidase ทำให้สามารถคัดเลือกโคลนได้ง่าย หลังจากถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ที่มีสภาพเป็น competent cell ด้วยวิธี heat shock transformation จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน IPTG และ X-Gal เพื่อคัดเลือกโคลน โดยเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมจะเจริญเป็นโคโลนีสีขาวบนอาหารคัดเลือก ส่วนเซลล์ที่ไม่ได้รับชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายจะเจริญเป็นโคโลนีสีฟ้า เนื่องจากชิ้นดีเอ็นเอจะแทรกอยู่บริเวณยีน *lacZ* ทำให้เซลล์ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมไม่สามารถแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ β -galactosidase ได้ ดังนั้นจึงไม่สามารถย่อย X-Gal ทำให้ได้โคโลนีสีขาว (สุรินทร์, 2543)

จากนั้นนำโคลนที่คัดเลือกได้มาสกัดพลาสมิดเพื่อตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอ เป้าหมายโดยอาศัยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ผลการตัดด้วยเอนไซม์พบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ คือ แถบบนมีขนาดประมาณ 3.0 กิโลเบส ซึ่งเท่ากับขนาดของเวกเตอร์ pGEM[®]-T Easy Vector (ภาพภาคผนวกที่ ค1) และแถบล่างมีขนาดประมาณ 1.4 กิโลเบส ซึ่งเท่ากับขนาดของดีเอ็นเอเป้าหมาย แสดงดังภาพที่ 25 จากผลการทดลองดังกล่าวสามารถยืนยันได้ว่า โคลนที่คัดเลือกได้มีชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายอยู่จริง จึงนำพลาสมิดดีเอ็นเอมาทำให้บริสุทธิ์ และนำส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายไปยังบริษัทไบโอดีไซน์ จำกัด



ภาพที่ 25 การตัดพลาสมิดลูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ตรวจสอบด้วย 1% agarose gel electrophoresis

เลนที่ 1: ดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler[™] 100 bp DNA Ladder

เลนที่ 2: พลาสมิดลูกผสมจากโคลน L47-2 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI*

เลนที่ 3: พลาสมิด pGEM[®]-T Easy Vector

4.4.4 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA

ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA โดยบริษัทไบโอดีไซน์ จำกัด พบว่าลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของไอโซเลต L47-2 มีความยาวประมาณ 1.4 กิโลเบส จากนั้นนำลำดับเบสดังกล่าวมาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียบนฐานข้อมูล EzTaxon server version 2.1 (Chun *et al.*, 2007) ผ่านเครือข่ายอินเทอร์เน็ต http://147.47.212.35:8080/2_identify.jsp

ผลการวิเคราะห์พบว่าลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของไอโซเลต L47-2 มีความใกล้เคียงกับลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของ *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* ร้อยละ 99.65 ผลการเปรียบเทียบลำดับความเหมือนใน 5 ลำดับแรก แสดงดังตารางที่ 14 โดยมีความคล้ายคลึงกับยีน 16S rRNA ของ *L. paracasei* subsp. *paracasei* มากที่สุด โดยมี % identity แสดงการเปรียบเทียบลำดับเบสดังภาพที่ 23

ตารางที่ 14 การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของไอโซเลต L47-2 กับลำดับเบสในฐานข้อมูล EzTaxon server version 2.1

Strains	Accession No.	% Identity	reference
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> ATCC 25302 (T)	ACGY01000162	99.65	Collins <i>et al.</i> (1989)
<i>Lactobacillus zeae</i> ATCC 15820 (T)	D86516	96.70	Dicks <i>et al.</i> (1996)
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393 (T)	AF469172	96.55	Hansen and Lessel (1971)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> JCM1136 (T)	D16552	96.24	Hansen (1968)
<i>Lactobacillus saniviri</i> YIT 12363 (T)	AB602569	95.76	Oki <i>et al.</i> (2012)

หมายเหตุ T: Type strain

จากการนำลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของไอโซเลท L47-2 เปรียบเทียบกับ
ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของสายพันธุ์อ้างอิงในสกุล *Lactobacillus* โดยใช้ Clustal W เพื่อ
ระบุสปีชีส์ที่ใกล้ชิดกับสายพันธุ์ L47-2 ผลดังภาพที่ 26

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

L47-2          AGAGTTTGATCATGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAG-TCGAA 59
ACGY01000162   AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAG-TCGAA 59
D86516         -----GATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAG-TCGAA 39
AF469172       -----TCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAG-TCGAA 50
D16552         -----GRTSAACGCTSGCGGCGTGCCTAATACATGCAAG-TCGAA 39
AB602569       -----GATCATGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAG-TCGAA 52
AB257864       -----AGCCTAATACATGCAAGGTTCAA 23
AF000162       AGAGTTTGATCATGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAG-TCGAA 59
AF264701       -----CAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAG-TCGAA 42
AB205055       ----TTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAG-TCGAA 55
AB366389       AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAG-TCGAA 59
AB262734       -----ACATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAG-TCGAA 50
ACGP01000200   AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAG-TCGAA 59
AB262731       -----ATCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAG-TCGAA 51
AY733084       -----ATGAACGCTGGCGGTATGCCTAATACATGCAAG-TCGAA 38
AY204893       -----ACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAG-TCGAA 38
                *****

L47-2          CGAGTTCTCGTTGAT-GAT--CGGTGCTTGCACC---GAGATTCAAC-ATGGAACGAGTG 112
ACGY01000162   CGAGTTCTCGTTGAT-GAT--CGGTGCTTGCACC---GAGATTCAAC-ATGGAACGAGTG 112
D86516         CGAGTTTGGTTCGAT-GAA--CGGTGCTTGCATC---GTGATTCAAC-TTAAACGAGTG 92
AF469172       CGAGTTTGGTTCGAT-GAA--CGGTGCTTGCATC---GAGATTGAC- TTAACGAGTG 103
D16552         CGAGTTCTGATTATT-GAA--AGGTGCTTGCATC---TTGATTTAAT-TTTGAACGAGTG 92
AB602569       CGAGTTCTGTTAAT-GATGGCGGTGCTTGCACCA-ATAGATTTAACATTTGAACGAGTG 110
AB257864       CGAGGNGTTGATGATTGACTGAGGTGCTTGCACCG-AAGGATTTTAT-TAACACGAGTG 81
AF000162       CGAGATTTTATTAATTGATTA----CTT---CGG-TATGATTTTTC-TAAATCGAGTG 109
AF264701       CGCGTCTTGGTCAATGATTTTAGGTGCTTGCACCTGAATGATTTGACATTAAGACGAGTG 102
AB205055       CGCGTCTCCGTGATGATTTTAGGTGCTTGCACCTGAAGATTTAACATTGAGACGAGTG 115
AB366389       CGCGTCTTGGTTAAAGATTTTAGGTGCTTGCATTTAAATGATTTAACATTGAGACGAGTG 119
AB262734       CGCGTCTTGGTTAATGATGTTAGGTGCTTGCATTTAAGTATTTAACATTGAGACGAGTG 110
ACGP01000200   CGCGTCTTGGTCAATGAAGTTGAGTGCTTGCATTTAAGTATTTGACATTTAAGACGAGTG 119
AB262731       CGCGTCCCCTGATGAAGTTGAGTGCTTGCACCTGATTGATTCAACTTGGTGACGAGTG 111
AY733084       CGCATCTCTGTTTTTCGATTGAAGGTGCTTGCACCTAGATTGAAAAACATTGGAATGAGTG 98
AY204893       CGCACTCTCGTTTA-GATTGAAGGAGCTTGCTCCTGATTGATAAA-CATTTGAGTGAGTG 96
                **          ***          **          *****

L47-2          GCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCT-TAAGTGGGGGATAACATTTGGAAA 171
ACGY01000162   GCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCT-TAAGTGGGGGATAACATTTGGAAA 171
D86516         GCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCT-TAAGTGGGGGATAACATTTGGAAA 151
AF469172       GCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCT-TAAGTGGGGGATAACATTTGGAAA 162
D16552         GCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCT-TAAGTGGGGGATAACATTTGGAAA 151
AB602569       GCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCT-AAAGTGGGGGATAACATTTGGAAA 169
AB257864       GCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCT-TAAGTGGGGGATAACATTTGGAAA 140
AF000162       GCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCT-TAAGTAGGGGATAACATTTGGAAA 168
AF264701       GCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTGAAGTAGAGGATAACACTTGGAAA 162
AB205055       GCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTGAAGTAGGGGATAACACTTGGAAA 175
AB366389       GCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTGAAGTAGGGGATAACACTTGGAAA 179
AB262734       GCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCT-GAAGTGGGGGATAACACTTGGAAA 169
ACGP01000200   GCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCT-GAAGCGGGGATAACATTTGGAAA 178
AB262731       GCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCT-GAAGCGGGGATAACATTTGGAAA 170
AY733084       GCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCA-AAAGTGGGGGATAACATTTGGAAA 157
AY204893       GCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCT-AAAGTGGGGGATAACATTTGGAAA 155
                *** * *****

```

ภาพที่ 26 การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของไอโซเลท L47-2 กับลำดับเบสของ
ยีน 16S rRNA ของสายพันธุ์อ้างอิงในสกุล *Lactobacillus* โดยใช้ ClustalW

L47-2	CAGATGCTAATACCGCATAGATCCAAGAACCGCATGGTTCTTGGCTGAAAGATGGCGT--	229
ACGY01000162	CAGATGCTAATACCGCATAGATCCAAGAACCGCATGGTTCTTGGCTGAAAGATGGCGT--	229
D86516	CAGATGCTAATACCGCATAAATCCAAGAACCGCATGGTTCTTGGCTGAAAGATGGCGT--	209
AF469172	CAGATGCTAATACCGCATAAATCCAAGAACCGCATGGTTCTTGGCTGAAAGATGGCGTC-	221
D16552	CAGATGCTAATACCGCATAAATCCAAGAACCGCATGGTTCTTGGCTGAAAGATGGCGT--	209
AB602569	CAGATGCTAATACCGCATAAATCTTGAACCTCATGGTTCCAAGCTGAAAGATGGCGT--	227
AB257864	CAGATGCTAATACCGCATAAACCCCTTAGACCACATGGTCTTTGGTTGAAAGATGGCGT--	198
AF000162	CAGATGCTAATACCGTATAAATCTCAGAAACACATGTTTCTGAGCTGAAAGGCGGCTTTC	228
AF264701	CAGGTGCTAATACTGCATAACAACGAAACCGCCTGGTTTTCGTTTGAAGATGGCTTC-	221
AB205055	CAGGTGCTAATACCGTATAACAACCAAAACACCTGGTTTGGTTTAAAAGACGGCTTC-	234
AB366389	CAGGTGCTAATACCGTATAACAACCTCAAACACATGGTTTGAGTTTGAAGATGGCTTC-	238
AB262734	CAGGTGCTAATACCGCATAAACAACGAAACACATGGTTTTCGTTTGAAGATGGCTTC-	228
ACGP01000200	CAGGTGCTAATACCGCATAAACAACCAAAACACATGGTTTTCGTTTAAAAGATGGTTTC-	237
AB262731	CAGGTGCTAATACCGCATAAACAACCAAAACACCTGGTTTGGTTTGAAGACGGCTTC-	229
AY733084	CAAAATGCTAATACCGCATAAATAGTTAGAACCGCATGGTTCTAATTTGAAAGATGGTTTC-	216
AY204893	CAGATGCTAATACCGCATAAACCTAACACCGCATGGTGTAGGTTGAAGATGGTTTC-	214
	** *	
L47-2	AAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGCGCTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCAC	289
ACGY01000162	AAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGCGCTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCAC	289
D86516	AAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGCGCTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCAC	269
AF469172	AAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGCGCTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCAC	281
D16552	AAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGCGCTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCAC	269
AB602569	AAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGCGCTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGCTCAC	287
AB257864	AAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGCGCTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCAC	258
AF000162	GAGCTGTCGCTTTTGGATGGACCCGCGCGCTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGCTCAC	288
AF264701	-GGCTATCGCTTTTAGGATGGACCCGCGCGCTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCAC	280
AB205055	-GGCTGTCACTTTAGGATGGACCCGCGCGCTATTAGCTTGTGGTAGGTAACGGCTCAC	293
AB366389	-GGCTGTCACTTTAGGATGGACCCGCGCGCTATTAGCTTGTGGTAGGTAACGGCTCAC	297
AB262734	-GGCTGTCACTTTTGGATGGACCCGCGCGCTATTAGCTTGTGGTAGGTAACGGCTCAC	287
ACGP01000200	-GGCTATCACTTTTGGATGGACCCGCGCGCTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCAC	296
AB262731	-GGCTGTCACTTTTGGATGGACCCGCGCGCTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCAC	288
AY733084	-GGCTATCACTTTTGGATGGACCCGCGCGCTATTAGTTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCAC	275
AY204893	-GGCTATCACTTTTAGGATGGACCCGCGGTGCATTAGTTAGTTGGTGAGGTAAGGCTCAC	273
	*** ** *	
L47-2	CAAGGCGATGATACGTAGCCGAACCTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACG	349
ACGY01000162	CAAGGCGATGATACGTAGCCGAACCTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACG	349
D86516	CAAGGCGATGATACGTAGCCGAACCTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACG	329
AF469172	CAAGGCGATGATACGTAGCCGAACCTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACG	341
D16552	CAAGGCAATGATACGTAGCCGAACCTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACG	329
AB602569	CAAGGCGATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACATTGGGACTGAGACACG	347
AB257864	CAAGGCAATGATACGTAGCCGAACCTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACG	318
AF000162	CAAGGCAGTGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACATTGGGACTGAGACACG	348
AF264701	CAAGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACATTGGGACTGAGACACG	340
AB205055	CAAGGCGATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACATTGGGACTGAGACACG	353
AB366389	CAAGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACATTGGGACTGAGACACG	357
AB262734	CAAGGCCATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACATTGGGACTGAGACACG	347
ACGP01000200	CAAGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACATTGGGACTGAGACACG	356
AB262731	CAAGGCGATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACATTGGGACTGAGACACG	348
AY733084	CAAGACAATGATACGTAGCCGAACCTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACG	335
AY204893	CAAGACCGTGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACATTGGGACTGAGACACG	333
	***** *	
L47-2	GCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATG	409
ACGY01000162	GCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATG	409
D86516	GCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATG	389
AF469172	GCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATG	401
D16552	GCCCAAACCTC-TACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATG	388
AB602569	GCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATG	407
AB257864	GCCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATG	378
AF000162	GCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATG	408
AF264701	GCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATG	400
AB205055	GCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATG	413
AB366389	GCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATG	417
AB262734	GCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATG	407
ACGP01000200	GCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATG	416
AB262731	GCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATG	408
AY733084	GCCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATG	395
AY204893	GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATG	393
	***** *	

L47-2 GAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTTCGGGTCGTA AAACTCTGTTGTTGGAGAAGA 469
 ACGY01000162 GAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTTCGGGTCGTA AAACTCTGTTGTTGGAGAAGA 469
 D86516 GAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTTCGGGTCGTA AAACTCTGTTGTTGGAGAAGA 449
 AF469172 GAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTTCGGGTCGTA AAACTCTGTTGTTGGAGAAGA 461
 D16552 GAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTTCGGGTCGTA AAACTCTGTTGTTGGAGAAGA 448
 AB602569 GAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTTCGGGTCGTA AAACTCTGTTGTTGGAGAAGA 467
 AB257864 GAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTTCGGGTCGTA AAACTCTGTTGTTGGAGAAGA 438
 AF000162 GAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTTCGGGTCGTA AAACTCTGTTGTTGGAGAAGA 468
 AF264701 GAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTTCGGGTCGTA AAACTCTGTTGTTGGAGAAGA 460
 AB205055 GAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTTCGGGTCGTA AAACTCTGTTGTTGGAGAAGA 473
 AB366389 GAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTTCGGGTCGTA AAACTCTGTTGTTGGAGAAGA 477
 AB262734 GAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTTCGGGTCGTA AAACTCTGTTGTTGGAGAAGA 467
 ACP01000200 GAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTTCGGGTCGTA AAACTCTGTTGTTGGAGAAGA 476
 AB262731 GAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTTCGGGTCGTA AAACTCTGTTGTTGGAGAAGA 468
 AY733084 GAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTTCGGGTCGTA AAACTCTGTTGTTGGAGAAGA 455
 AY204893 GAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTTCGGGTCGTA AAACTCTGTTGTTGGAGAAGA 453

L47-2 ATGGTCGGCAGAGTAACGTGTTGTCGGCGTGACGGTATCCAAC CAGAAAGCCACGGCTAAC 529
 ACGY01000162 ATGGTCGGCAGAGTAACGTGTTGTCGGCGTGACGGTATCCAAC CAGAAAGCCACGGCTAAC 529
 D86516 ATGGTCGGCAGAGTAACGTGTTGTCGGCGTGACGGTATCCAAC CAGAAAGCCACGGCTAAC 509
 AF469172 ATGGTCGGCAGAGTAACGTGTTGTCGGCGTGACGGTATCCAAC CAGAAAGCCACGGCTAAC 521
 D16552 ATGGTCGGCAGAGTAACGTGTTGTCGGCGTGACGGTATCCAAC CAGAAAGCCACGGCTAAC 508
 AB602569 ACGTACGTGAGAGTAACGTGTTACGTAGTGACGGTATCCAAC CAGAAAGCCACGGCTAAC 527
 AB257864 ACACGTTTGAGAGTAACGTGTTACAGACGTGACGGTATCCAAC CAGAAAGCCACGGCTAAC 498
 AF000162 ACACGTTTGAGAGTAACGTGTTACAGACGTGACGGTATCCAAC CAGAAAGCCACGGCTAAC 528
 AF264701 ACGGGTGTGAGAGTAACGTGTTGACATCGTGACGGTATCCAAC CAGAAAGCCACGGCTAAC 520
 AB205055 ACAGGTGTGAGAGTAACGTGTTGACATCTTGACGGTATCCAAC CAGAAAGCCACGGCTAAC 533
 AB366389 ACAGGTGTGAGAGTAACGTGTTACATCTTGACGGTATCCAAC CAGAAAGCCACGGCTAAC 537
 AB262734 ACAGGTGATAGAGTAACGTGTTATCATCTTGACGGTATCCAAC CAGAAAGCCACGGCTAAC 527
 ACP01000200 ACGGGTGTGAGAGTAACGTGTTGACATCGTGACGGTATCCAAC CAGAAAGCCACGGCTAAC 536
 AB262731 ACGGGTGTGAGAGTAACGTGTTGACATCGTGACGGTATCCAAC CAGAAAGCCACGGCTAAC 528
 AY733084 ACGTATGTGATAGTAACGTGATCATGTAGTGACGGTATCCAAC CAGAAAGCCACGGCTAAC 515
 AY204893 ATGTATCTGATAGTAACGTGATCAGGTAGTGACGGTATCCAAC CAGAAAGCCACGGCTAAC 513
 * * * * *

L47-2 TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTATTGGGCGT 589
 ACGY01000162 TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTATTGGGCGT 589
 D86516 TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTATTGGGCGT 569
 AF469172 TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTATTGGGCGT 581
 D16552 TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTATTGGGCGT 568
 AB602569 TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTATTGGGCGT 587
 AB257864 TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTATTGGGCGT 558
 AF000162 TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTATTGGGCGT 588
 AF264701 TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTATTGGGCGT 580
 AB205055 TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTATTGGGCGT 593
 AB366389 TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTATTGGGCGT 597
 AB262734 TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTATTGGGCGT 587
 ACP01000200 TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTATTGGGCGT 596
 AB262731 TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTATTGGGCGT 588
 AY733084 TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTATTGGGCGT 575
 AY204893 TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTATTGGGCGT 573

L47-2 AAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAG 649
 ACGY01000162 AAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAG 649
 D86516 AAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAG 629
 AF469172 AAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAG 641
 D16552 AAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAG 628
 AB602569 AAAGCGAGCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAG 647
 AB257864 AAAGCGAGCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAG 618
 AF000162 AAAGCGAGCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAG 648
 AF264701 AAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTAGGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAG 640
 AB205055 AAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTAGGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAG 653
 AB366389 AAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTAGGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAG 657
 AB262734 AAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTAGGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAG 647
 ACP01000200 AAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTAGGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAG 656
 AB262731 AAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTAGGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAG 648
 AY733084 AAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAG 635
 AY204893 AAAGCGAGCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAG 633

```

L47-2 CGCATCGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGG 709
ACGY01000162 CGCATCGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGG 709
D86516 CGCATCGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGG 689
AF469172 CGCATCGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGG 701
D16552 TGCATCGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGG 688
AB602569 TGCATCGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGG 707
AB257864 TGCATCGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGG 678
AF000162 TGCATCGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGG 708
AF264701 TGCATCGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGG 700
AB205055 TGCATCGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGG 713
AB366389 TGCATCGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGG 717
AB262734 TGCATCGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGG 707
ACGP01000200 TGCATCGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGG 716
AB262731 TGCATCGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGG 708
AY733084 TGCATCGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGG 695
AY204893 TGCATCGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGG 693
*****

L47-2 TGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAC 769
ACGY01000162 TGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAC 769
D86516 TGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAC 749
AF469172 TGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAC 761
D16552 TGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAC 748
AB602569 TGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAC 767
AB257864 TGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAC 738
AF000162 TGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAC 768
AF264701 TGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAC 760
AB205055 TGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAC 773
AB366389 TGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAC 777
AB262734 TGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAC 767
ACGP01000200 TGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAC 776
AB262731 TGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAC 768
AY733084 TGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAC 755
AY204893 TGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAC 753
**

L47-2 GACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCATGCC 829
ACGY01000162 GACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCATGCC 829
D86516 GACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCATGCC 809
AF469172 GACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCATGCC 821
D16552 GACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCATGCC 808
AB602569 GACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCATGCC 827
AB257864 GACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCATGCC 798
AF000162 GACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCATGCC 828
AF264701 GACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCATGCC 820
AB205055 GACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCATGCC 833
AB366389 GACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCATGCC 837
AB262734 GACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCATGCC 827
ACGP01000200 GACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCATGCC 836
AB262731 GACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCATGCC 828
AY733084 GACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCATGCC 815
AY204893 GACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCATGCC 813
*****

L47-2 GTAAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCAT 889
ACGY01000162 GTAAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCAT 889
D86516 GTAAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCAT 869
AF469172 GTAAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCAT 881
D16552 GTAAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCAT 868
AB602569 GTAAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCAT 887
AB257864 GTAAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCAT 858
AF000162 GTAAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCAT 888
AF264701 GTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCAT 880
AB205055 GTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCAT 893
AB366389 GTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCAT 897
AB262734 GTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCAT 887
ACGP01000200 GTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCAT 896
AB262731 GTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCAT 888
AY733084 GTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCAT 875
AY204893 GTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCAT 873
*****

```


L47-2	AACCCCTTATGACTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAGTAAGACTGCCGGTGACAA	1188
ACGY01000162	AACCCCTTATGACTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAGTAAGACTGCCGGTGACAA	1188
D86516	AACCCCTTATGACTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAGTAAGACTGCCGGTGACAA	1168
AF469172	AACCCCTTATGACTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAGTAAGACTGCCGGTGACAA	1180
D16552	AACCCCTTATGACTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAGTAAGACTGCCGGTGACAA	1167
AB602569	AACCCCTTATGACTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAGTAAGACTGCCGGTGACAA	1186
AB257864	AACCCCTTATGACTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAGTAAGACTGCCGGTGACAA	1157
AF000162	AACCCCTTATGACTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAGTAAGACTGCCGGTGACAA	1187
AF264701	AACCCCTTATGACTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAGTAAGACTGCCGGTGACAA	1179
AB205055	AACCCCTTATGACTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAGTAAGACTGCCGGTGACAA	1192
AB366389	AACCCCTTATGACTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAGTAAGACTGCCGGTGACAA	1196
AB262734	AACCCCTTATGACTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAGTAAGACTGCCGGTGACAA	1186
ACGP01000200	AACCCCTTATGACTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAGTAAGACTGCCGGTGACAA	1195
AB262731	AACCCCTTATGACTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAGTAAGACTGCCGGTGACAA	1187
AY733084	AACCCCTTATGACTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAGTAAGACTGCCGGTGACAA	1174
AY204893	AACCCCTTATGACTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAGTAAGACTGCCGGTGACAA	1173

L47-2	ACCGGAGGAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAC	1248
ACGY01000162	ACCGGAGGAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAC	1248
D86516	ACCGGAGGAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAC	1228
AF469172	ACCGGAGGAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAC	1240
D16552	ACCGGAGGAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAC	1227
AB602569	ACCGGAGGAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAC	1246
AB257864	ACCGGAGGAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAC	1217
AF000162	ACCGGAGGAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAC	1247
AF264701	ACCGGAGGAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAC	1239
AB205055	ACCGGAGGAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAC	1252
AB366389	ACCGGAGGAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAC	1256
AB262734	ACCGGAGGAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAC	1246
ACGP01000200	ACCGGAGGAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAC	1255
AB262731	ACCGGAGGAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAC	1247
AY733084	ACCGGAGGAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAC	1234
AY204893	ACCGGAGGAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAC	1233

L47-2	GTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTCGCGAGACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAG	1308
ACGY01000162	GTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTCGCGAGACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAG	1308
D86516	GTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTCGCGAGACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAG	1288
AF469172	GTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTCGCGAGACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAG	1300
D16552	GTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTCGCGAGACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAG	1287
AB602569	GTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTCGCGAGACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAG	1306
AB257864	GTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTCGCGAGACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAG	1277
AF000162	GTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTCGCGAGACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAG	1307
AF264701	GTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTCGCGAGACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAG	1299
AB205055	GTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTCGCGAGACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAG	1312
AB366389	GTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTCGCGAGACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAG	1316
AB262734	GTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTCGCGAGACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAG	1306
ACGP01000200	GTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTCGCGAGACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAG	1315
AB262731	GTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTCGCGAGACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAG	1307
AY733084	GTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTCGCGAGACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAG	1294
AY204893	GTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTCGCGAGACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAG	1293

L47-2	CCATTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAA	1368
ACGY01000162	CCATTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAA	1368
D86516	CCATTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAA	1348
AF469172	CCATTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAA	1360
D16552	CCATTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAA	1347
AB602569	CCATTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAA	1366
AB257864	CCGGTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAA	1337
AF000162	CCATTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAA	1367
AF264701	CCGTTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTTGGAATCGCTAGTAA	1359
AB205055	CCGTTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTTGGAATCGCTAGTAA	1372
AB366389	CCGTTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTTGGAATCGCTAGTAA	1376
AB262734	CCGTTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTTGGAATCGCTAGTAA	1366
ACGP01000200	CCGTTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTTGGAATCGCTAGTAA	1375
AB262731	CCGTTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTTGGAATCGCTAGTAA	1367
AY733084	CCGTTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTTGGAATCGCTAGTAA	1354
AY204893	CCATTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTTGGAATCGCTAGTAA	1353
	** *****	

```

L47-2          TCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGT---- 1424
ACGY01000162  TCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACA 1428
D86516        TCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACA 1408
AF469172      TCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACA 1420
D16552        TCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACA 1407
AB602569      TCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACA 1426
AB257864      TCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACA 1397
AF000162      TCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACA 1427
AF264701      TCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG----- 1401
AB205055      TCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACA 1432
AB366389      TCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACA 1436
AB262734      TCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACA 1426
ACGP01000200  TCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACA 1435
AB262731      TCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACA 1427
AY733084      TCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACA 1414
AY204893      TCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCC----- 1406
*** *****

L47-2          -----
ACGY01000162  CCATGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGCCGGTGGCGTAACCTTTTAGGGAGCGAGCCGTCT 1488
D86516        CCATGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGCCGGTGGCGTAACCTTTTAGGGAGCGAGCCGTCT 1468
AF469172      CCATGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGCCGGTGGCGTAACCTTTTAGGGAGCGAGCCGTCT 1480
D16552        CCATGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGCCGGTGGCGTAACCTTTTAGGGAGCGAGCCGTCT 1467
AB602569      CCATGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGCCGGTGGGGTAACCTTTT--AGGAGCTAGCCGTCT 1484
AB257864      CCATGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGCCGGTGGGGTAACCTTTT--AGGAGCTAGCCGTCT 1457
AF000162      CCATGAGAATTGTAAACACCCGAAGCCGGTGGGGTAACCTTTT--AAGAACTAGCCGTCT 1485
AF264701      -----
AB205055      CCATGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGCCGGTGGAGTAACCTTC---GGGGACCAGCCGTCT 1489
AB366389      CCATGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGCCGGTGGAGTAACCTTC---GGGAACCAACCGTCT 1493
AB262734      CCATGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGCCGGTGGAGTAACCTTC---GGGAACCAACCGTCT 1483
ACGP01000200  CCATGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGCCGGTGGAGTAACCTTC---GGGGGCCAGCCGTCT 1492
AB262731      CCATGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGCCGGTGGAGTAACCTTC---GGGGGCCAGCCGTCT 1484
AY733084      CCATGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGGGGTAACCTTC---GGGAGCCAGCCGCCT 1470
AY204893      -----

L47-2          -----
ACGY01000162  AAGGTGGGACAAATGATTAGGGTGAAGTCGTAACAAGGTA 1528
D86516        AAGGTGGGACAAATGATTAGGGTGAAGTCGTAACAAGGTA 1508
AF469172      AAGGTGGGACAAATGATTAGGGTGAAGTCGTAACAAG--- 1517
D16552        AAGGTGGGNCAATGATTAGGGTGAAGTCGTAACAAGGTA 1507
AB602569      AAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTAACAAGGTA 1524
AB257864      AAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTAACAAGGTA 1497
AF000162      AAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTAACAAGGTA 1525
AF264701      -----
AB205055      AAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTAACAAGGTA 1529
AB366389      AAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTAACAAGGTA 1533
AB262734      AAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTAACAAGGTA 1523
ACGP01000200  AAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTAACAAGGTA 1532
AB262731      AAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCG----- 1514
AY733084      AAGGTGGGACAGATGATTAGG----- 1491
AY204893      -----

```

ภาพที่ 26 (ต่อ)

ภาพที่ 26 (ต่อ)

หมายเหตุ ACGY01000162 คือ *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* ATCC 25302^T

D86516 คือ *Lactobacillus zeae* ATCC 15820^T

AF469172 คือ *Lactobacillus casei* ATCC 393^T

D16552 คือ *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136^T

AB602569 คือ *Lactobacillus saniviri* YIT 12363^T

AB257864 คือ *Lactobacillus camelliae* MCH3-1^T

AF000162 คือ *Lactobacillus manihotivorans* OND 32^T

AF264701 คือ *Lactobacillus diolivorans* JKD6^T

AY733084 คือ *Lactobacillus oligofermentans* AMKR18^T

ACGP01000200 คือ *Lactobacillus hilgardii* ATCC 8290^T

AB205055 คือ *Lactobacillus buchneri* JCM 1115^T

AB262731 คือ *Lactobacillus farraginis* NRIC 0676^T

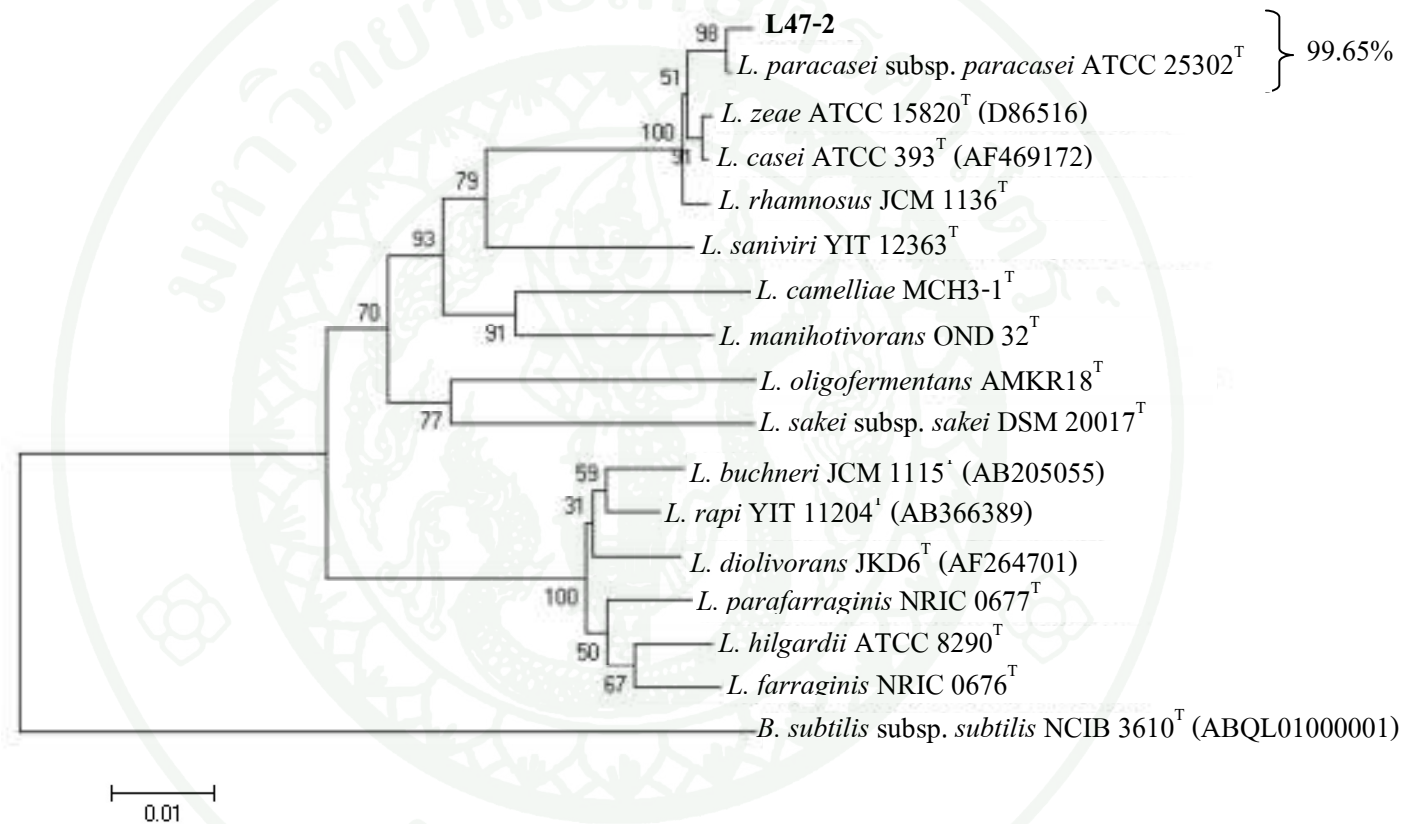
AB262734 คือ *Lactobacillus parafarraginis* NRIC 0677^T

AB366389 คือ *Lactobacillus rapi* YIT 11204^T

AY204893 คือ *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* DSM 20017^T

เมื่อนำลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของไอโซเลท L47-2 เปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของสายพันธุ์อ้างอิงโดยใช้ ClustalW และนำมาสร้างแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) โดยใช้วิธี Neighbor-Joining พบว่าไอโซเลทดังกล่าวใกล้เคียงกับ *L. paracasei* subsp. *paracasei* และเมื่อนำลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของไอโซเลท L47-2 เปรียบเทียบกับลำดับเบสของสายพันธุ์อ้างอิงด้วยโปรแกรม EzTaxon server 2.1 พบว่ามีความคล้ายคลึงกันร้อยละ 99.65 แสดงดังภาพที่ 27

จากการพิจารณาผลการวิเคราะห์ทางพันธุศาสตร์ชีวเคมี คุณสมบัติการหมักคาร์โบไฮเดรต และการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของไอโซเลท L47-2 พบว่ามีความสอดคล้องกัน จึงสามารถระบุได้ว่าไอโซเลท L47-2 อยู่ในสปีชีส์ *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*

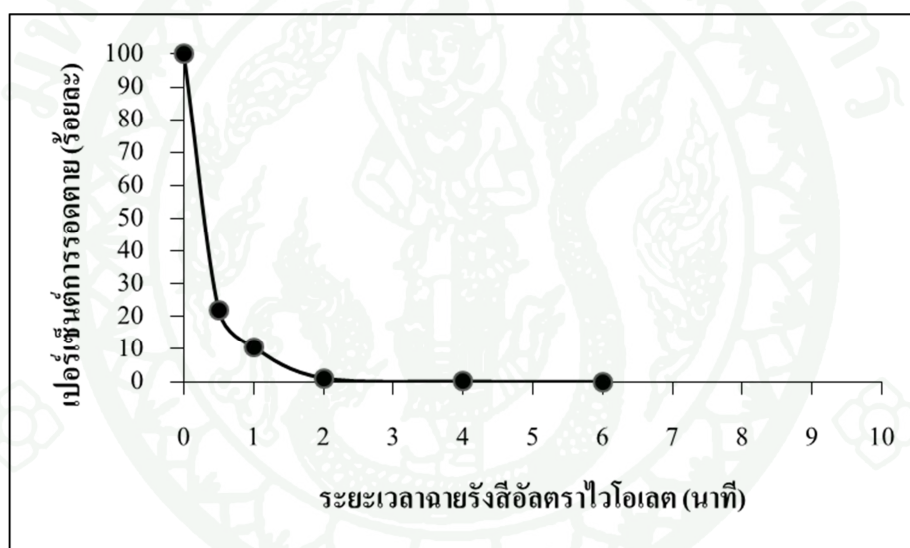


ภาพที่ 27 แผนภูมิต้นไม้ของแบคทีเรียกรดแลคติก L47-2 กับสายพันธุ์อ้างอิงโดยใช้ neighbor-joining method ด้วยโปรแกรม Mega4 (bootstrap test 1,000 replicates)

5. การปรับปรุงสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท L47-2 ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต

5.1 การหาเปอร์เซ็นต์การรอดตายของเชื้อหลังจากฉายรังสีอัลตราไวโอเลต

จากการทดลองนำแบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดเลือกได้ไอโซเลท L47-2 ฉายรังสีอัลตราไวโอเลตที่มีความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ที่ระยะเวลาต่างๆ พบว่า ณ เวลา 0.5, 1, 2, 4 และ 6 นาที มีเปอร์เซ็นต์การรอดตายเท่ากับ 21.9, 10.6, 1.1, 0.1 และ 0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การรอดตายกับระยะเวลาที่ได้รับรังสีอัลตราไวโอเลต แสดงดังภาพที่ 28 พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การรอดตายของแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท L47-2 หลังจากฉายรังสีอัลตราไวโอเลตเป็นระยะเวลา 1 นาที เท่ากับร้อยละ 10.6

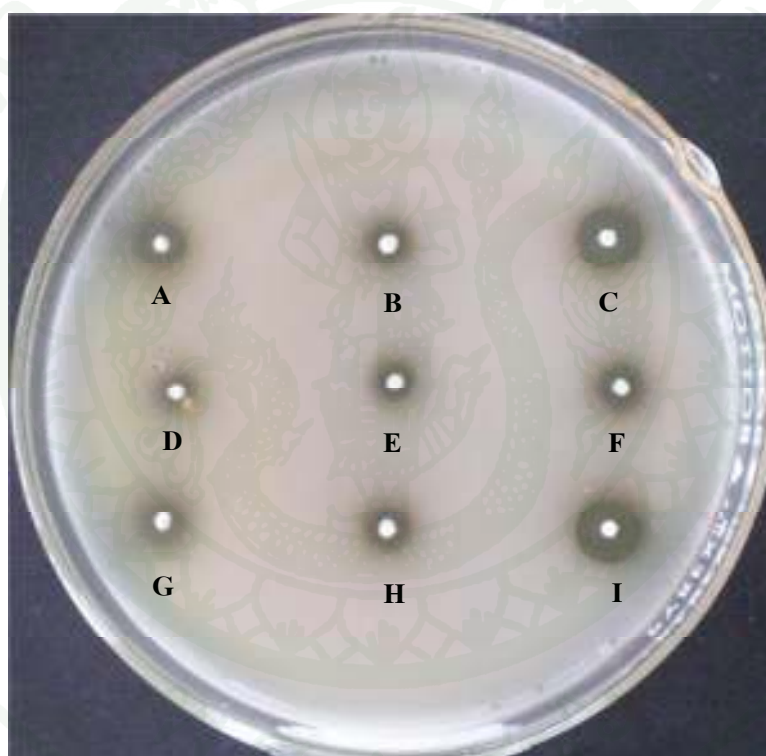


ภาพที่ 28 เปอร์เซ็นต์การรอดตายของเซลล์แบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท L47-2 ที่ผ่านการฉายรังสีอัลตราไวโอเลต ณ เวลาต่างๆ

5.2 การคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่สามารถผลิตสารเมแทบอลิท์ยับยั้งการเจริญของยีสต์ *C. albicans* BCC6120 โดยวิธีเทป

จากการเหนี่ยวนำแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท L47-2 ให้เกิดการกลายด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตที่มีความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร โดยมีระยะห่างจากจุดกำเนิดแสง 50 เซนติเมตร เป็นระยะเวลา 1 นาที พบว่าเชื้อมีเปอร์เซ็นต์การรอดตายร้อยละ 10.6 จากนั้นได้คัดเลือกเชื้อที่รอดตายมาทำ replica plating เพื่อทดสอบความสามารถในการสร้างสารเมแทบอลิท์ยับยั้งยีสต์

C. albicans BCC6120 โดยวิธีเททับ พบเชื้อสายพันธุ์กลายมีค่า CZ-CO น้อยกว่าหรือเท่ากับสายพันธุ์ดั้งเดิม และบางสายพันธุ์สูญเสียฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของยีสต์ไป แสดงว่าเชื้อที่รอดตายในกลุ่มนี้ไม่เกิดการกลาย หรืออาจเกิดการกลายขึ้นในชิ้นส่วนที่ควบคุมลักษณะอื่นของเชื้อ ส่วนเชื้อที่รอดตายจำนวนสองสายพันธุ์ คือ L47-2UV10 และ L47-2UV116 มีค่า CZ-CO มากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม โดยมีค่า CZ-CO มากกว่า 9 มิลลิเมตร ดังภาพที่ 29 ซึ่งแสดงว่าเชื้อสองสายพันธุ์นี้มีการเปลี่ยนแปลงในส่วนที่ควบคุมการสร้างสารเมแทบอลิท์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* BCC6120 โดยสายพันธุ์กลายรหัส L47-2UV10 และ L47-2UV116 มีค่า CZ-CO สูงสุด คือ 12 และ 13 มิลลิเมตร ตามลำดับ ดังตารางที่ 15 ดังนั้นจึงนำทั้งสองสายพันธุ์มาศึกษาการผลิตสารยับยั้งการเจริญด้วยวิธี agar well diffusion ต่อไป



ภาพที่ 29 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์กลายที่สามารถผลิตสารเมแทบอลิท์ยับยั้งการเจริญของยีสต์ *C. albicans* BCC6120 โดยวิธีเททับ

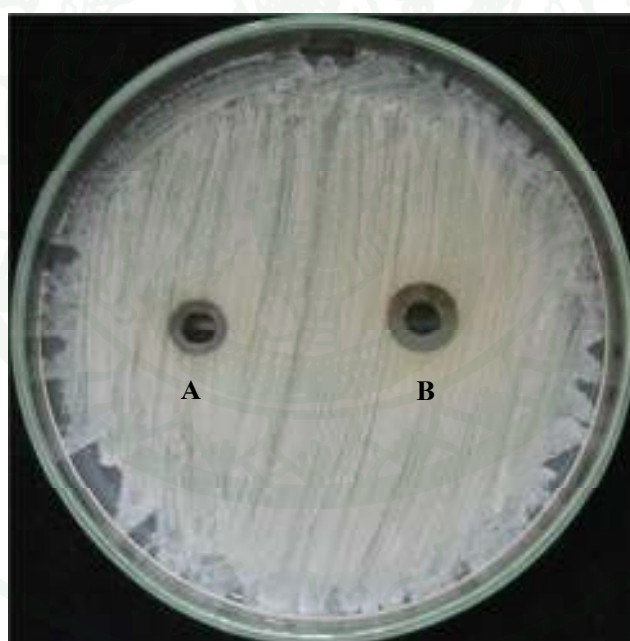
A: สายพันธุ์ดั้งเดิม L47-2

B-I: สายพันธุ์กลายไอโซเลต L47-2

ตารางที่ 15 ค่าผลต่างระหว่างขนาดของวงใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนีของแบคทีเรียกรดแลกติก (clear zone diameter, CZ) และเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (colony diameter, CO)

แบคทีเรีย	CZ-CO (หน่วยมิลลิเมตร)
สายพันธุ์ดั้งเดิม L47-2	9
สายพันธุ์กลาย L47-2UV10	12
สายพันธุ์กลาย L47-2UV116	13

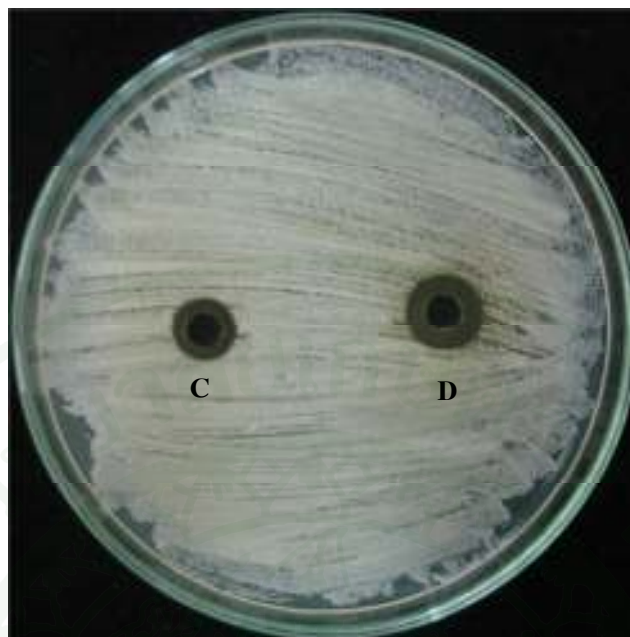
จากการทดสอบความสามารถในการสร้างสารเมแทบอลิซึมที่ยับยั้งการเจริญของยีสต์ *C. albicans* BCC6120 ด้วยวิธี agar well diffusion เปรียบเทียบกันระหว่างสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย พบว่าแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์กลาย L47-2UV10 และ L47-2UV116 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสกว้างกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมอย่างเห็นได้ชัด แสดงดังภาพที่ 30-31



ภาพที่ 30 การศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของยีสต์ *C. albicans* BCC6120 ของแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย L47-2UV10 โดยวิธี agar well diffusion

A: สายพันธุ์ดั้งเดิม L47-2 มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 11 มิลลิเมตร

B: สายพันธุ์กลาย L47-2UV10 มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 14 มิลลิเมตร



ภาพที่ 31 การศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของยีสต์ *C. albicans* BCC6120 ของแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย L47-2UV116 โดยวิธี agar well diffusion
 C: สายพันธุ์ดั้งเดิม L47-2 มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 11 มิลลิเมตร
 D: สายพันธุ์กลาย L47-2UV116 มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 มิลลิเมตร

จากการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลต L47-2 ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นโดยเฉพาะการยับยั้งการเจริญของยีสต์ *C. albicans* BCC6120 ที่มีฤทธิ์เพิ่มขึ้น แต่อาจมีผลทำให้ลักษณะอื่นเปลี่ยนแปลงไป เช่น การเกาะติดพื้นผิว ดังนั้นจึงได้ทดสอบคุณสมบัติในการเกาะติดพื้นผิวของแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลต L47-2 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์กลาย L47-2UV10 และ L47-2UV116 พบว่าสายพันธุ์กลายทั้งสองยังคงสามารถเกาะติดพื้นผิวได้ดี เหมือนกับสายพันธุ์ดั้งเดิม สังกัดได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีลักษณะใส เนื่องจากเซลล์แบคทีเรียเกาะที่ผิวแท่งไม้ไผ่ และผิวด้านในหลอดทดลอง ดังภาพที่ 32 ซึ่งทั้งสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายมีการเกาะติดพื้นผิวในวันที่สองของการเพาะเลี้ยง และสามารถเกาะติดพื้นผิวได้นานกว่า 5 วัน ดังตารางที่ 16 โดยสังเกตการเกาะติดพื้นผิวของเชือนับตั้งแต่วันที่ 1 จนถึงวันที่ 7 (ภาพภาคผนวก ง)



ภาพที่ 32 การเกาะติดพื้นผิวของแบคทีเรียกรดแลคติกที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่มีแท่งไม้ไผ่ปราศจากเชื้อเป็นแกนกลางหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน
 หลอดทดลองที่ 1: ไอโซเลต L47-2
 หลอดทดลองที่ 2: สายพันธุ์กลาย L47-2UV10
 หลอดทดลองที่ 3: สายพันธุ์กลาย L47-2UV116
 หลอดทดลองที่ 4: แบคทีเรียกรดแลคติกที่ไม่เกาะติดผิวแท่งไม้ไผ่
 หลอดทดลองที่ 5: อาหาร MRS ที่ไม่ผ่านการเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 16 คุณสมบัติในการเกาะติดพื้นผิวของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย

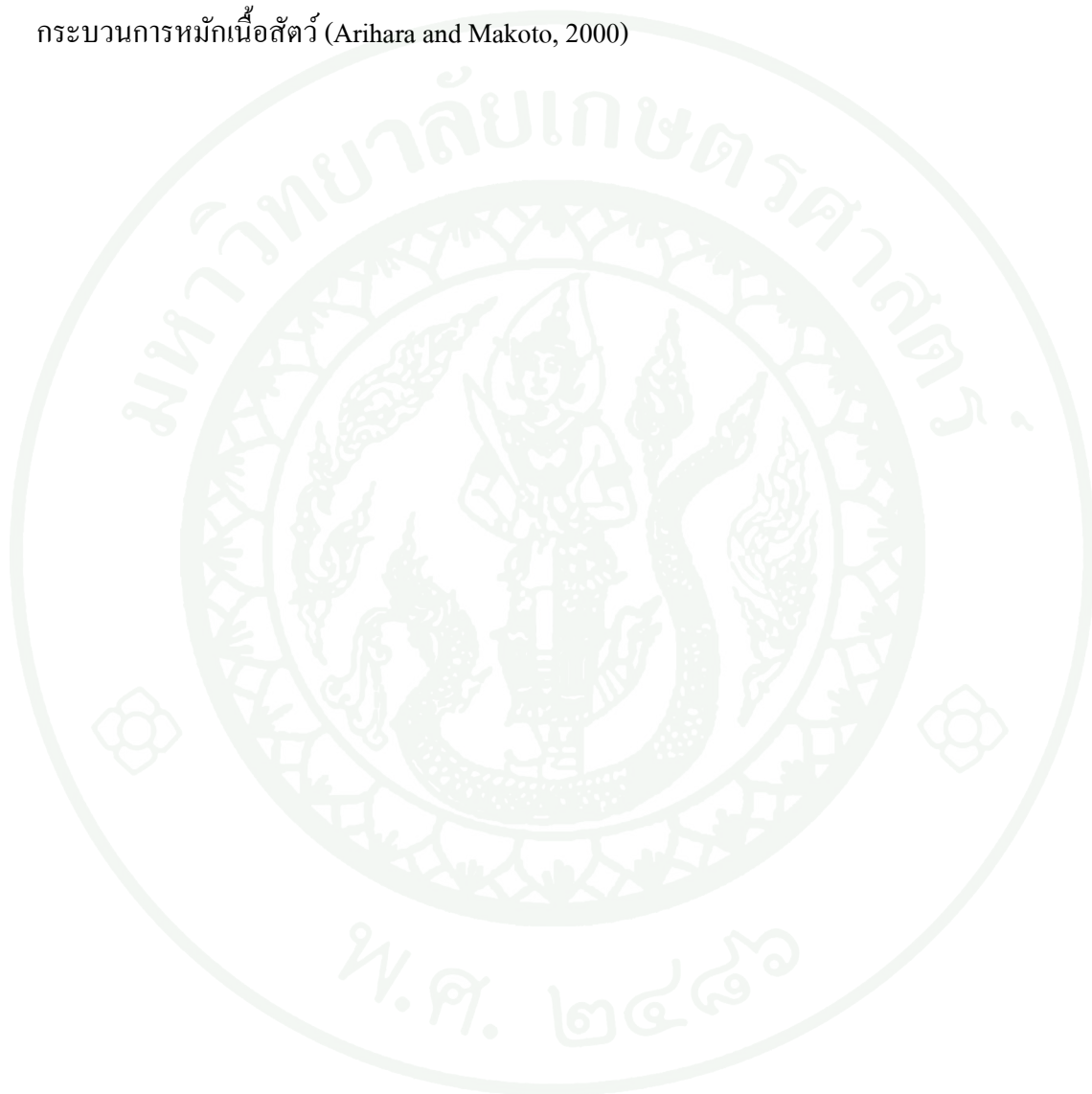
ไอโซเลต	ระยะเวลาที่เริ่มเกาะติดพื้นผิว (วัน)	จำนวนวันที่เกาะติดพื้นผิว (วัน)	การคงสภาพการเกาะติด
L47-2	2	>5	มาก
L47-2UV10	2	>5	มาก
L47-2UV116	2	>5	มาก

การกลาย (Mutation) เป็นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในสายพันธุ์กรรมหรือยีน ทำให้เกิดการแสดงออกของลูกหลานผิดไปจากสายพันธุ์เดิม การกลายมี 2 แบบ คือ การกลายที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ (Spontaneous mutation) มีอัตราการเกิดระหว่าง 10^{-5} ถึง 10^{-10} ต่อเซลล์ต่อรุ่น และการกลายที่เกิดขึ้นโดยการเหนี่ยวนำ (Induced mutation) เป็นการเร่งให้เกิดการกลายในอัตราที่สูงขึ้นทำได้โดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลต รังสีเอกซ์ รังสีแกมมา และสารเคมี ซึ่งอาจทำให้เกิดการกลายในลักษณะที่มีประโยชน์หรือโทษต่อสิ่งมีชีวิตนั้นๆ เช่น การเหนี่ยวนำให้แบคทีเรีย *Streptomyces fradiae* เกิดการกลายด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต เพื่อให้มีความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะ tylosin ได้มากขึ้น (Khaliq *et al.*, 2009)

แบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท L47-2 สามารถผลิตสารเมแทบอลิท์และปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของยีสต์ *C. albicans* BCC6120 ฤทธิ์ดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของยีสต์โดยมีวงใสของการยับยั้งเท่ากับ 9.0 มิลลิเมตร และเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Atanassova ในปี 2003 ที่คัดแยก *L. paracasei* subsp. *paracasei* สายพันธุ์ M3 ที่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* NBIMCC 72 ได้โดยมีวงใสของการยับยั้งเท่ากับ 12 มิลลิเมตร ซึ่งฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของยีสต์ของไอโซเลท L47-2 มีประสิทธิภาพน้อยกว่า ดังนั้นจึงได้นำไอโซเลท L47-2 มาปรับปรุงลักษณะดังกล่าวโดยเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของยีสต์ให้สูงขึ้น ดังที่เคยมีการรายงานเกี่ยวกับการเหนี่ยวนำ *Streptomyces fradiae* ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตเพื่อให้มีความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะ tylosin ได้มากขึ้น (Khaliq *et al.*, 2009) โดยมีรายงานว่ารังสีอัลตราไวโอเลตมีผลต่อ thymine dimer ซึ่งมีผลทำให้เบสมีโครงสร้างเปลี่ยนแปลงไปไม่สามารถทำหน้าที่เป็นต้นแบบในการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ได้ ทำให้สายดีเอ็นเอที่สร้างขึ้นใหม่มีเบสที่เข้าคู่กับตำแหน่งดังกล่าวผิดพลาด ซึ่งมีความจำเพาะต่อการเกิดการกลายที่ตำแหน่งของเบส purine (ภัทรชัย, 2549) ซึ่งทำให้เกิดการกลายของแบคทีเรียได้ จากการศึกษาดังกล่าวสามารถคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์กลายได้จำนวน 2 ไอโซเลท ซึ่งแสดงฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของยีสต์ *C. albicans* BCC6120 ได้ดีกว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ดั้งเดิม

แบคทีเรียสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้ยังคงมีลักษณะ โคลิโคนี่เหมือนกับไอโซเลท L47-2 คือ มีโคลิโคนี่สีขาวขุ่น ขอบเรียบ กลมนูน และยังคงมีความสามารถในการเกาะติดพื้นผิวที่เหมือนกัน แต่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะบางประการคือ ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของยีสต์ โดยพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์กลาย L47-2UV10 และ L47-2UV116 ที่ถูกทำให้เกิดการกลายด้วย

รังสีอัลตราไวโอเลตสามารถผลิตสารเมแทบอลิท์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของยีสต์ *C. albicans* BCC6120 ได้ดีที่สุด จากการทดสอบด้วยวิธีเททัป และ agar well diffusion เนื่องจาก รังสีอัลตราไวโอเลตอาจทำให้เกิดการกลายในส่วนที่ทำให้แบคทีเรียมีการปลดปล่อยชีวสารออกมา ภายนอกเซลล์ได้ง่าย นอกจากนี้ยังมีรายงานการเหนี่ยวนำแบคทีเรียกรดแลคติก *L. gasseri* ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตเพื่อให้ทนต่อโซเดียมคลอไรด์และโซเดียมไนไตรท์ได้มากขึ้น เพื่อใช้ในการ กระบวนการหมักเนื้อสัตว์ (Arihara and Makoto, 2000)



สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. ผลการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกจากตัวอย่างทดสอบ เช่น ดิน ดอกไม้ เาะ สับปะรด แดงโม หน่อไม้ดอง ผักกาดดอง แหนม กากถั่วเหลือง ปลาร้า และน้ำทิ้งจากโรงนม รวมทั้งหมด 46 ตัวอย่าง โดยเฉพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MRS พบว่ามีจำนวนแบคทีเรียกรดแลกติกอยู่ในช่วง 10^4 - 10^7 โคโลนีต่อกรัมตัวอย่างทดสอบ โดยพบแบคทีเรียกรดแลกติกในตัวอย่างอาหารที่แยกได้จากกากถั่วเหลืองและแหนมมากที่สุด จากนั้นได้คัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกไว้จำนวน 552 ไอโซเลท เพื่อทดสอบการสร้างสารยับยั้งการเจริญของยีสต์ *C. albicans* BCC6120 โดยวิธีเททับ (overlay method) และ agar well diffusion ตามลำดับ

2. การทดสอบการยับยั้งการเจริญของยีสต์ *C. albicans* BCC6120 ของแบคทีเรียกรดแลกติก ด้วยวิธีเททับ พบแบคทีเรียกรดแลกติกจำนวน 51 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* BCC6120 ได้ คิดเป็นร้อยละ 9.24 ของแบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดแยกได้ทั้งหมด โดยผลจากการทดสอบพบแบคทีเรียกรดแลกติกจำนวน 10 ไอโซเลทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งยีสต์ *C. albicans* BCC6120 ได้มากกว่า 3 มิลลิเมตร คือ L8-7, L8-10, L24-2, L24-10, L40-6, L40-10, L41-7, L45-11, L46-3 และ L47-2

3. เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* BCC6120 จำนวน 10 ไอโซเลทมาทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion โดยเฉพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลกติกทั้งในอาหารเหลว TGE และ MRS พบว่าส่วนโสมที่เพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลกติกในอาหารเหลว TGE ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* BCC6120 ได้ ในขณะที่ส่วนโสมของแบคทีเรียกรดแลกติกที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS สามารถยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* BCC6120 ได้ทั้งหมด สรุปได้ว่าฤทธิ์ของการยับยั้งนั้นเป็นผลมาจากกรดอินทรีย์โดยเฉพาะกรดแลกติก เนื่องจากในอาหารเหลว TGE มีน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 1 ซึ่งมีผลทำให้แบคทีเรียกรดแลกติกสร้างกรดแลกติกได้น้อย ทำให้ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นกรดน้อยลง และมีผลทำให้ฤทธิ์ของการยับยั้งการเจริญของยีสต์หายไป

4. เมื่อนำส่วนโสมจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลกติกในอาหารเหลว MRS จำนวน 10 ไอโซเลทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของยีสต์ได้มากกว่า 3 มิลลิเมตร คือ ไอโซเลท L8-7, L8-10,

L24-2, L24-10, L40-6, L40-10, L41-7, L45-11, L46-3 และ L47-2 มาปรับ pH เป็น 3, 5, 7, 9 และ 11 ด้วย 1 N HCl และ 1 N NaOH ก่อนทดสอบการยับยั้งยีสต์ด้วยวิธี agar well diffusion พบว่าเมื่อปรับ pH เป็น 3 ฤทธิ์ของการยับยั้งเพิ่มขึ้นจากเดิมเล็กน้อย แต่ที่ pH 5, 7, 9 และ 11 ฤทธิ์ของการยับยั้งจะค่อยๆ ลดลง และหายไปตามลำดับ ในขณะที่อาหารเหลว MRS ที่ปรับ pH ดังกล่าวไม่พบวงใสเกิดขึ้น ดังนั้นฤทธิ์ของการยับยั้งอาจเกิดจากกรดอินทรีย์ และ/หรือชีวสารอื่นๆ ซึ่งมีการทำงานร่วมกันทำให้เมื่อ pH เปลี่ยนไป สารเหล่านั้นจึงสูญเสียฤทธิ์ของการยับยั้งไปด้วย

5. จากการทดสอบการเกาะติดพื้นผิวของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 51 ไอโซเลท เพื่อคัดเลือกไอโซเลทที่สามารถเกาะติดพื้นผิวได้ดีที่สุด โดยเฉพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารเหลว MRS ที่มีแท่งไม้ไผ่ปราศจากเชื้อเป็นแกนกลาง และบ่มเป็นเวลา 5 วัน พบแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถเกาะติดผิวแท่งไม้ไผ่และผิวหลอดทดลองได้จำนวน 2 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท L46-3 และ L47-2 ที่แยกได้จากหน่อไม้ดองเช่นเดียวกัน เมื่อเปรียบเทียบทั้งสองไอโซเลทแล้วพบว่า L47-2 มีการเกาะติดพื้นผิวได้ดีที่สุด

6. จากการจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท L47-2 โดยศึกษาลักษณะพื้นฐาน วิทยา ชีวเคมี และการใช้ชุดทดสอบ API 50 CHL Medium พบว่าสามารถสร้างกรดได้จากการหมักโดยใช้ Amygdalin, Arbutin, Cellubiose, D-Turanose, D-Tagalose, Esculin, Fructose, Galactose, Glucose, Gluconate, Glucosamine, Inulin, Lactose, Maltose, Mannose, Mannitol, Melezitose, N-Acetyl-Glucosamine, Ribose, Sorbitol, Salicin, Sucrose และ Trehalose เป็นแหล่งคาร์บอนได้ เมื่อนำข้อมูลดังกล่าวมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม API 50 CHL V. 5.1 พบว่าไอโซเลท L47-2 คือ *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*

7. เมื่อนำลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท L47-2 เปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของสายพันธุ์อ้างอิงโดยใช้ ClustalW และนำมาสร้างแผนภูมิต้นไม้โดยใช้วิธี Neighbor-Joining พบว่าไอโซเลท L47-2 ใกล้เคียงกับ *L. paracasei* subsp. *paracasei* มากที่สุด และเมื่อนำลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของไอโซเลท L47-2 เปรียบเทียบกับลำดับเบสของสายพันธุ์อ้างอิงด้วยโปรแกรม EzTaxon server 2.1 พบว่ามีความคล้ายคลึงกันร้อยละ 99.65

8. การหาเปอร์เซ็นต์การรอดตายหลังจากฉายรังสีอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ที่ระยะเวลาต่างๆ พบว่า ณ เวลา 0.5, 1, 2, 4 และ 6 นาที พบว่าหลังจากจากเซลล์

แบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท L47-2 ได้รับรังสีอัลตราไวโอเลตมีเปอร์เซ็นต์การรอดตายเท่ากับ ร้อยละ 21.9, 10.6, 1.1 และ 0.1 และ 0 ตามลำดับ จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การรอดตายกับระยะเวลาที่ได้รับรังสีอัลตราไวโอเลต พบว่าเปอร์เซ็นต์การรอดตายของแบคทีเรียกรดแลกติก หลังจากฉายรังสีอัลตราไวโอเลตเท่ากับร้อยละ 10.6 ณ เวลา 1 นาที จึงเลือกระยะเวลาดังกล่าวเพื่อ ทดสอบในขั้นตอนต่อไป

9. จากการเหนี่ยวนำไอโซเลท L47-2 ให้เกิดการกลายด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต พบว่า สามารถคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์กลายได้จำนวน 2 สายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการ เจริญของยีสต์ *C. albicans* BCC6120 เพิ่มขึ้น โดยวิธีเทปคือ L47-2UV10 และ L47-2UV116 โดยมี ค่า CZ-CO มากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม คือ 12 และ 13 มิลลิเมตร ตามลำดับ ในขณะที่สายพันธุ์ดั้งเดิม มี ค่า CZ-CO เท่ากับ 9.0 มิลลิเมตร

10. จากการทดสอบการสร้างสารยับยั้งการเจริญของยีสต์ *C. albicans* BCC6120 ด้วยวิธี agar well diffusion เปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลาย พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ กลาย L47-2UV10 และ L47-2UV116 มีเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสกว้างกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมอย่าง ชัดเจน

11. การทดสอบความสามารถในการเกาะติดพื้นผิวของไอโซเลท L47-2 สายพันธุ์กลาย L47-2UV10 และ L47-2UV116 พบว่าสายพันธุ์กลายทั้งสองยังคงสามารถเกาะติดพื้นผิวได้ดี เหมือนกับสายพันธุ์ดั้งเดิม สังเกตได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อมีลักษณะใส เนื่องจากเซลล์แบคทีเรียเกาะ ที่ผิวแท่งไม้ไผ่และผิวหลอดทดลอง ซึ่งทั้งสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายมีการเกาะติดพื้นผิว ของเชื้อในวันที่สองของการเพาะเลี้ยง และสามารถเกาะติดพื้นผิวได้ดินานกว่า 5 วัน

ข้อเสนอแนะ

1. การทดลองนี้เป็นเพียงจุดเริ่มต้นของการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกจากดอกไม้ดิน ผลไม้สด และอาหารหมักดองชนิดต่างๆ ที่สามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์ *C. albicans* BCC6120 ได้ต่อไปควรศึกษาคุณสมบัติของการนำไปใช้เป็นโปรไบโอติกส์ในมนุษย์ เนื่องจากแบคทีเรีย กรดแลกติกส่วนใหญ่มีคุณสมบัติในการเป็นโปรไบโอติกส์ได้

2. ควรศึกษาความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคอื่นๆ เช่น เชื้อก่อโรคที่เป็นสาเหตุ ทำให้อาหารเน่าเสีย และ/หรือการศึกษาสารสำคัญจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่ได้เพื่อนำไปใช้ใน อุตสาหกรรมอาหาร เป็นต้น

3. ควรศึกษาลักษณะการเกาะติดพื้นผิวของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้บนวัสดุชนิดอื่น เช่น แท่งพลาสติกเปรียบเทียบกับแท่งไม้ไผ่ เป็นต้น

4. ควรศึกษาลักษณะโครงสร้างของแบคทีเรียกรดแลคติกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM) เพื่อให้เห็น โครงสร้างที่แบคทีเรียกรดแลคติกใช้ในการเกาะติดพื้นผิว

5. สายพันธุ์กลาย L47-2UV10 และ L47-2UV116 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของยีสต์ *C. albicans* BCC6120 สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม และยังคงมีคุณสมบัติในการเกาะติดพื้นผิวได้ดี ดังนั้นจึงควรศึกษาเพิ่มเติมถึงคุณสมบัติอื่นๆ เพื่อนำไปพัฒนาเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทดแทน การใช้สารเคมีสังเคราะห์ในอนาคตต่อไป

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

ชุดินันท์ ประสิทธิ์ภูริปรีชา, จันทรวดี โล่เสถียรกิจ และศิริมา สุวรรณภู. 2545. สารแบคทีเรียโอซินของเชื้อ *Lactobacillus* sp. ที่แยกได้จากอาหาร. วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 4(2): 10-20.

นลินี อัสวโกที. 2540. **ประสบการณ์ด้านโรคติดเชื้อในประเทศไทย**. สมาคมโรคติดเชื้อแห่งประเทศไทย (WC100 ป392 2540), กรุงเทพฯ.

ปาริชาติ พุ่มขจร, พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ และยุภารัตน์ เครือวงษา. 2543. ความสามารถในการต่อต้านจุลินทรีย์ของกรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหารหมัก. วารสารวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 28(1): 22-30.

พรรณกร อิมวิทยา. 2535. **เชื้อราก่อโรคในคน**. มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ.

พวงพร โชติโกกร. 2547. **สรีรวิทยาของแบคทีเรีย**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง, กรุงเทพฯ.

ภัทรชัย กิรติสิน. 2549. **ตำราวิทยาแบคทีเรียการแพทย์**. มหาวิทยาลัยมหิดล. สำนักพิมพ์ห้างหุ้นส่วนจำกัดพรินต์ติ้ง, กรุงเทพฯ.

มีชัย ลัดดี. 2546. **การผลิตกรดแลคติกด้วยการหมักต่อเนื่องสองขั้นตอน**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2543. **ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกจากอาหารหมักพื้นบ้านภาคใต้ของไทย**. สงขลานครินทร์ วทท: 177-189.

สุรินทร์ ปิยะ โชคณากุล. 2543. **พันธุ์วิศวกรรมเบื้องต้น**. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุริยรัตน์ เงินดวง. 2545. การศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินจากอาหารหมัก.
วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Adachi, S. 1992. Lactic acid bacteria and the control of tumors. pp. 233-261. *In* B.J.B Wood, ed.
The Lactic acid bacteria in Health and Disease. London: Elsevier Applied Science.

Allison, G.E. and T.R. Klaenhammer. 1996. Functional analysis of the gene encoding immunity
to lactacin F, *lafI*, and its use as a *Lactobacillus*-specific, food-grade genetic marker.
Applied and Environmental Microbiology 62: 4450-4460.

Arihara, K. and M. Itoh. 2000. UV-induced *Lactobacillus gasseri* mutants resisting sodium
chloride and sodium nitrite for meat fermentation. **International Journal of Food
Microbiology** 56: 227-230.

Aslam, Z., W.T. Im, L.N. Ten, M.J. Lee, K.H. Kim and S.T. Lee. 2006. *Lactobacillus siliginis* sp.
nov., isolated from wheat sourdough in South Korea. **International Journal of
Systematic and Evolutionary Microbiology** 56: 2209-2213.

Atanassova, M., Y. Choiset, M. Dalgalarroondo, J.M. Chobert, X. Douset, I. Ivanova and T.
Hertle. 2003. Isolation and partial biochemical characterization of a proteinaceous
antibacteria and anti-yeast compound produced by *L. paracasei* subsp. *Paracasei* strain
M3. **International Journal of Food Microbiology** 87: 63-73.

Axelsson, L.T., T.C. Chung, W.J. Dobrogosz, and S.E. Lindgren. 1989. Production of a broad
spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. **Microbial Ecology in Health
and Disease** 2: 131-136.

_____. 1998. Lactic acid bacteria: classification and physiology, pp. 1-23 *In* S. Salminen and
A.V. Wright, eds. **Lactic Acid Bacteria.** Marcel Dekker, Inc., New York.

- Aymerich, M. Garriga, J. Ylla, J. Vallier, J.M. Monfort and M. Hugas. 2000. Application of enterocins as biopreservatives against *Listeria innocua* in meat products. **Journal of Food Protection** 63: 721-726.
- Beck-Sague, C. and W.R. Jarvis. 1993. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. **Journal of Infectious Diseases** 167: 1247-1251.
- Beisheir, L. 1991. **Microbiology in Practice** 5th ed. Harper Collins publisher, Inc. New York.
- Bruno, M.E.C., A. Kaiser and T.J. Montville. 1992. Depletion of proton motive force by nisin in *Listeria monocytogenes* cells. **Applied and Environmental Microbiology** 58: 2255-2259.
- _____ and T.J. Montville. 1993. Common mechanistic action of bacteriocin from lactic acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology** 59: 3003-3010.
- Cabo, M.L., A.F. Breber and P. Koenraad. 2002. Apparent antifungal activity of several lactic acid bacteria against *Penicillium discolor* is due to acetic acid in the medium. **Journal of Food Protection** 65: 1309-1316.
- Callewart, R., M. Hugas and L. De Vuyst. 2000. Competitiveness and bacteriocin production of *Enterococci* in the production of Spanish style fermented sausages. **International Journal of Food Microbiology** 57: 33-42.
- Cherrington, C.A., M. Hinton and I. Chopra. 1990. Effect of short-chain organic acids on macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. **Journal of Applied Bacteriology** 68: 69-74.

Chun, J., Jae-Hak Lee, Y. Jung, M. Kim, S. Kim, B.K. Kim and Young-Woon Lim. 2007.

EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 57: 2259-2261.

Chung, T.C., L. Axelsson, S.E. Lindgren and W.J. Dobrogosz. 1989. In vitro studies on reuterin synthesis by *Lactobacillus reuteri*. **Microbial Ecology in Health and Disease** 2: 137-144.

Cintas, L.M., P. Casaus, M.F. Fernandez and P.E. Hernandez. 1998. Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A and lactocin S against spoilage and foodborne pathogenic bacteria. **Food Microbiology** 15: 289-298.

Claypool, L., B. Heinemann, L. Voris and C.R. Stumbo. 1966. Residence time of nisin in the cavity following consumption of chocolate milk containing nisin. **Journal of Dairy Science** 49: 314-316.

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

Cohen, S.N., A.C.Y. Chang and L. Hsu. 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA, pp. 2110-2114. In J. Sambrook and D.W. Russell, eds. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3rd ed., Cold Spring Harbor CSHL Press, New York.

Collins, E.B. and K. Aramaki. 1980. Production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Dairy Science** 63: 353-357.

- Collins, M.D., B.A. Phillips, and P. Zanoni. 1989. Deoxyribonucleic acid homology studies of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* sp. nov., subsp. *paracasei* and subsp. *tolerans*, and *Lactobacillus rhamnosus* sp. nov., comb. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology** 39(2): 105-108.
- Cooper, G.M. 2000. **The Cell: Molecular Approach**. 2nd ed. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, USA.
- Corsetti, A.M.G., J. Rossi and P. Damiani. 1998. Anti-mould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. **Applied Microbiology and Biotechnology** 50: 253-256.
- Dahiya, R.S. and M.L. Speck. 1968. Hydrogen peroxide formation by lactobacilli and its effect on *Staphylococcus aureus*. **Journal of Dairy Science** 52(10): 1568-1572.
- Dellagio, F.L., M.T. Dicks and S. Torriani. 1995. The genus *Leuconostoc*, pp. 235-278. In B.J.B. Wood and W.H. Holzapfel., eds. **The Lactic Acid Bacteria vol. 2: The Genera of Lactic Acid Bacteria**. Chapman & Hall, Glasgow, United Kingdom.
- Delves-Broughton, J., P. Blackburn, R.J. Evans and J. Hugenholtz. 1996. Applications of the bacteriocin, nisin. **Antonie Van Leeuwenhoek** 69: 193-202.
- Devriese, L.A. and B. Pot. 1995. The genera of *Enterococcus*, pp. 327-367. In B.J.B. Wood and W.H. Holzapfel., eds. **The Lactic Acid Bacteria vol. 2: The Genera of Lactic Acid Bacteria**. Chapman & Hall, Glasgow, United Kingdom.
- De Man, J.C., M. Rogosa and M.E. Sharpe. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. **Journal of Applied Bacteriology** 23: 130-135.
- De Vuyst, L. and E.J. Vandamme. 1994. **Bacteriocins of lactic acid bacteria**. Blackie Academic & Professional, New York.

- Dicks, L.M.T., E.M. Du Plessis, F. Dellaglio and E. Lauer. 1996. Reclassification of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 393 and *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 15820 as *Lactobacillus zeae* norm. rev., designation of ATCC 334 as the neotype of *L. casei* subsp. *casei*, and rejection of the name *Lactobacillus paracasei*. **International Journal of Systematic Bacteriology** 46(1): 337-340.
- Duarte, M.C.T., G.M. Figueira, A. Sartoratto, V.L.G. Rehder and C. Delarmelina. 2005. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology** 97: 305-311.
- Einarsson, H. and H.L. Laucon. 1995. Biopreservative of brined shrimp (*Pandalus borealis*) by bacteriocin from lactic acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology** 61: 669-676.
- Eklund, T. 1989. Organic acids and esters, pp. 161-200. In G. W. Gould., ed., **Mechanisms of action of food preservation procedures** Elsevier Science Publishers, New York.
- El-Gendy, S.M. and E.H. Marth. 1981. Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in the presence of *Lactobacillus casei*. **Journal of Food Protection** 44: 211-212.
- Embley, T.M., N. Faquir, W. Bossart and M.D. Collin. 1989. *Lactobacillus vaginalis* sp. nov. from the Human Vagina. **International Journal of Systematic Bacteriology** 39: 368-370.
- Fleming, H.P., J.L. Etchells and R.L. Costilow. 1985. Microbial inhibition by an isolate of *Pediococcus* from cucumber brines. **Journal of Applied Microbiology** 30: 1040-1042.
- Francis, F.J. 2000. **Encyclopedia of Food Science and Technology**. 2nd ed., upp. John Wiley and Sons, Inc., New York.

- Freese, E., C.W. Sheu and E. Galliers. 1973. Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives. **Nature** 241: 321-325.
- Fricourt, B.V., S.F. Barefoot, R.F. Tensis and S.S. Hayasaka. 1994. Detection and activity of plantaricin F, an antimicrobial substance from *Lactobacillus plantarum* BF001 isolated from processed channel catfish. **Journal of Food Protection** 57: 698-702.
- Ganzle, M.G., A. Holtzel, J. Walter, G. Jung and W.P. Hammes. 2000. Characterization of reuterocyclin produced by *Lactobacillus reuteri* LTH2584. **Applied and Environmental Microbiology** 66: 4325-4333.
- Graz, M., A. Hunt, H. Jamie and P. Milne. 1999. Antimicrobial activity of selected cyclic peptides. **Pharmazie** 54: 772-775.
- _____, M., H. Jamie, C. Versluis and P. Milne. 2001. Mechanism of an anti-fungal action of selected cyclic peptides. **Pharmazie** 56: 900-901.
- Gusils, C., M. Bujazha and S. Gonzales. 2002. Preliminary studies to design a probiotic for use in swine feed. **Interciencia** 27: 409-413.
- Hammes, W.P. and R.F. Vogel. 1995. The genus *Lactobacillus*, pp. 19-54. In B.J.B. Wood and W.H. Holzapfel., eds. **The Lactic Acid Bacteria vol. 2: The Genera of Lactic Acid Bacteria**. Blackie Academic & Professional, London.
- Hansen, P.A. 1968. Type strains of *Lactobacillus* species. American Type Culture Collection, Rockville, Md.
- _____ and E.F. Lessel. 1971. *Lactobacillus casei* (Orla-Jensen) comb. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology** 21: 69-71.

- Hardie, J.M. and R.A. Whiley. 1995. The genus *Streptococcus*, pp. 55-125. In B.J.B. Wood and W.H. Holzapfel, eds. **The Lactic Acid Bacteria vol. 2: The Genera of Lactic Acid Bacteria**. Chapman & Hall, Glasgow, United Kingdom.
- Harnpicharnchai, P., T. Thongaram, R. Sriprang, V. Champreda, S. Tanapongpipat and L. Eurwilaichitr. 2007. An efficient purification and fractionation of genomic DNA from soil by modified troughing method. **Letters in Applied Microbiology** 45: 387-391.
- Harry, M., B. Gambier, Y. Bourezgui and E. Garnier-Sillam. 1999. Evaluation of purification procedures for DNA extracted from organic rich samples: Interference with humic substances. **Analusis** 27: 439-442.
- Harty, D.W.S. and K.W. Knox. 1991. An in vitro study of adhesion of various *Lactobacillus* species. **Microbial Ecology in Health and Disease** 4: 19-28.
- Heilig, H.G.H.J., E.G. Zoetendal, E.E. Vaughan, P. Marteau, A.D.L. Akkermans and W.M. de Vos. 2002. Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. **Applied and Environmental Microbiology** 68: 114-123.
- Hoepelmana, I.M. and B. Dupont. 1996. Oral candidiasis: the clinical challenge of resistance and management. **International Journal of Antimicrobial Agents** 6: 155-159.
- Holzapfel, W.H. and B.J.B. Wood. 1995. Lactic acid bacteria in contemporary perspective, pp. 1-6. In W.H. Holzapfel and B.J.B. Wood., eds. **The Genera of Lactic Acid Bacteria**. Blackie Academic & Professional, London.
- _____, R. Geisen and U. Schillinger. 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. **International Journal of Food Microbiology** 24: 343-362.

- Hongoh, Y., H. Yuzawa, M. Ohkuma and T. Kudo. 2003. Evaluation of primers and PCR conditions for the analysis of 16S rRNA genes from a natural environment. **FEMS Microbiology Letters** 221: 299-304.
- Hoover, D.G. and S.K. Harlander. 1993. Screening methods for detecting bacteriocin activity, pp. 23-40. *In* D.G. Hoover and L.R. Steenson, eds. **Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria**. Academic Press, Inc., New York.
- Hugenholtz, J. 1993. Citrate metabolism in lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews** 12: 165-178.
- Hunter, D.R., and I.H. Segel. 1973. Effect of weak acids on amino acid transport by *Penicillium chrysogenum*: evidence for a proton or charge gradient as the driving force. **Journal of Bacteriology** 113: 1184-1192.
- Jetten, A.M., G.D. Vogels and F. De Windt. 1972. Production and purification of a *Staphylococcus epidermis* bacteriocin. *Journal of Bacteriology* 112: 235-242.
- Johnson, T.R. and C.L. Case. 1989. **Laboratory experiment in microbiology brief**, 2nd ed. Benjamin cumming publisher company, Inc. Rewood City.
- Kabra, J.J. 1983. Medium chain fatty acids and esters, pp. 109-140. *In* M.P. Davidson and A.L. Branen., eds. **Antimicrobials in foods**. Marcel Dekker, New York.
- Kandler, O. and N. Weiss. 1986. Regular, non-sporing gram-positive rods, pp. 1208-1234. *In* P.H.A. Sneath., ed. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 2**. Williams and Wilkins, Baltimore, United States of America.
- Kanokratana, P., .S. Chanapan, K. Pootanakit and L. Eurwilaichitr. 2004. Diversity and abundance of *Bacteria* and *Archaea* in the Bor Khlueng Hot Spring in Thailand. **Journal of Basic Microbiology** 44(6): 430-444.

- Khaliq, S., K. Akhtar, M.A. Ghauri, R. Iqbal, A.M. Khalid and M. Muddassar. 2009. Change in colony morphology and kinetics of tylosin production after UV and gamma irradiation mutagenesis of *Streptomyces fradiae* NRRL-2702. **Microbiological Research** 164 (4): 469-477.
- Kelly, R.W.J., R.V. Asmundson and C.M. Huang. 1996. Isolation and characterization of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from ready-to-eat food products. **International Journal of Food Microbiology** 33: 209-218.
- Kirjavainen, P.V., A.C. Ouwehand, E. Isolauri and S.J. Salminen. 1998. The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. **FEMS Microbiology Letters** 167:185-189.
- Klijn, N., A.H. Weerkamp and W.M. de Vos. 1991. Identification of mesophilic lactic acid bacteria by using polymerase chain reaction-amplified variable regions of 16S rRNA and specific DNA probes. **Applied and Environmental Microbiology** 57: 3390-3393.
- Krooneman, J., F. Faber, A.C. Alderkamp, S.J.H.W. Oude Elferink, F. Driehuis, I. Cleenwerck, J. Swings, J.C. Gottschal and M. Vancanneyt. 2002. *Lactobacillus diolivorans* sp. nov., a 1,2-propanediol-degrading bacterium isolated from aerobically stable maize silage. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 52: 639-646.
- Lavermicocca, P., F. Valerio, A. Evidente, S. Lazzaroni, A. Corsetti and M. Gobbetti. 2000. Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. **Applied and Environmental Microbiology** 66: 4084-4090.
- _____, _____ and A. Visconti. 2003. Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products. **Applied and Environmental Microbiology** 69: 634-640.

- Laukova, A., S. Czikkova, T. Dobransky and O. Burdova. 1999. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* by enterocin CCM4231 in milk products. **Food Microbiology** 16: 93-99.
- Lindgren, S.E. and W.J. Dobrogosz. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. **FEMS Microbiology Reviews** 87: 149-164.
- Magnusson, J. 2005. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. **Trends in Food Science and Technology** 16: 70-78.
- _____ and J. Schnurer. 2001. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad spectrum proteinaceous compound. **Applied and Environmental Microbiology** 67: 1-5.
- _____, K. Strom, S. Roos, J. Sjogren and J. Schnurer. 2003. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Letters** 219: 129-135.
- McAuliffe, O., C. Hill and R.P. Ross. 1999. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese manufactured with lactacin 3147-producing starter culture. **Journal of Applied Microbiology** 86: 251-256.
- Meroth, C.B., W.P. Hammes and C. Hertel. 2004. Characterization of the microbiota of rice sourdoughs and description of *Lactobacillus spicheri* sp. nov. **Systemic and Applied Microbiology** 27: 151-159.
- Monthon, L. 2005. Isolation and selection of anti-*Candida albicans* producing lactic acid bacteria. **Journal of Science and Technology** 2(2): 179-187.

- Morata de Ambrosini, V., S. Gonzales and G. Oliver. 1999. Study of adhesion of *Lactobacillus casei* CRL 431 to ileal epithelial cells of mice. **Journal of Food Protection** 62: 1430-1434.
- Motlagh, A.M., M.C. Johnson and B. Ray. 1991. Viability loss of food-borne pathogens by starter culture metabolites. **Journal of Food Protection** 54: 873-878.
- Naeini, A., A.R. Khosravi, M. Chitsaz, H. Shokri and M. Kamlnejad. 2009. Anti-*Candida albicans* activity of some Iranian plants used in traditional medicine. **Journal de Mycologie Médicale** 19: 168-172.
- Nakanishi, K., H. Tokuda, T. Ando, M. Yajima, T. Nakajima, O. Tanaka, and S. Ohmomo. 2002. Screening of lactic acid bacteria having the ability to produce reuterin. **Japanese Journal of Lactic Acid Bacteria** 13: 37-45.
- Nestle. 2002. **A yoghurt with many quality**. In Nestle Cininical Nurtition course, Lausanne, Switzerland.
- Nikoskelainen, S., S. Salminen, G. Bylund and A.C. Ouwehand. 2001. Characterization of the properties of human and dairy derived probiotics for prevention of infectious diseases in fish. **Applied and Environmental Microbiology** 67: 2430-2435.
- Niku-Paavola, M.L., A. Laitila, T. Mattila-Sandholm and A. Haikara. 1999. New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Applied Microbiology** 86: 29-35.
- Nilsson, L., L. Gram and H.H. Huss. 1999. Growth control of *Listeria monocytogenes* on coldsmoked salmon using a competitive lactic acid bacteria flora. **Journal of Food Protection** 62: 336-342.

- Nousiainen, J. and J. Setälä. 1993. Lactic acid bacteria as animal probiotics. pp. 315-356. *In* Salminen, S. and A.V. Wright., eds. **Lactic Acid Bacteria**. Marcel Dekker, New York.
- Odds, F.C. 1979. Vulvovaginal candidiasis, p. 16. **Candida and Candidiasis**. University Park Press, Baltimore.
- _____. 1993. Resistance of yeasts to azole-derivative antifungals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 31: 463-471.
- Oki, K., Y. Kudo, K. Watanabe. 2012. *Lactobacillus saniviri* sp. nov. and *Lactobacillus senioris* sp. nov., isolated from human faeces. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 62(3): 601-607.
- Okkers, D.J., L.M.T. Dicks, M. Silvester, J.J. Joubert and H.J. Odendaal. 1999. Characterization of pentocin TV35b, a bacteriocin-like peptide isolated from *Lactobacillus pentosus* with a fungistatic effect on *Candida albicans*. **Journal of Applied Microbiology** 87: 726-734.
- Ostergaard, A., P.K.B. Embarek, C. Wedell-Neer-gaard, H.H. Huss and L. Gram. 1998. Characterization of anti-listerial lactic acid bacteria isolates from Thai fermented fish products. **Food Microbiology** 15: 223-233.
- Ostling, C.E. and S.E. Lindgren. 1993. Inhibition of enterobacteria and *Listeria* growth by lactic, acetic and formic acids. **Journal of Applied Bacteriology** 75: 18-24.
- Ouwehand, A.C. 1998. Antimicrobial components from lactic acid bacteria, pp. 139-160. *In* S. Salminen and A.V. Wright., eds. **Lactic Acid Bacteria**. Marcel Dekker, Inc., New York.
- _____, E.M. Tuomola, S. Tolkkö and S. Salminen. 2001. Assessment of adhesion properties of novel probiotic strains to human intestinal mucus. **International Journal of Food Microbiology** 64: 119-126.

Park, H.D. and C.H. Rhee. 2001. Antimutagenic activity of *Lactobacillus plantarum* KLAB21 isolated from kimchi Korean fermented vegetables. **Biotechnology Letters** 23: 1583-1589.

Promega. 2010. pGEM[®]-T and pGEM[®]-T Easy vector systems. Available Source: www.promega.com/tbs, February 10, 2011.

Rex, J.H., M.G. Rinaldi and M.A. Pfaller. 1995. Resistance of *Candida* species to fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 39: 1-8.

Rojo-Bezares, B., Y.S. enz, L. Navarro, M. Zarazaga, F. Ruiz-Larrea and C. Torres. 2007. Coculture-inducible bacteriocin activity of *Lactobacillus plantarum* strain J23 isolated from grape must. **Food Microbiology** 24: 482-491.

Russell, J.B. 1992. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling. **Journal of Applied Bacteriology** 73: 363-370.

Ryan, M.P., W.J. Meaney, R.P. Ross and C. Hill. 1998. Evaluation of lacticin 3147 and a teat seal containing this bacteriocin for inhibition of mastitis pathogens. **Applied and Environmental Microbiology** 21: 237-246.

Saarela, M., G. Mogensen, R. Fonden, J. Matto and T. Mattila-Sandholm. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology** 84: 197-215.

Sahl, H.G., R.W. Jack and G. Bierbaum. 1995. Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translational modification. **European Journal of Biochemistry** 230: 827-853.

Salminen, S. and V.A. Wright. 1998. **Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects**. 2nd ed. CRC Press, New York.

- Sambrook, J. and D.W. Russell. 2001. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3rd ed., Cold Spring Harbor CSHL Press, New York.
- Schillinger, U. and W.H. Holzapfel. 1995. The genus *Carnobacterium*, pp. 307-326. In B.J.B. Wood and W.H. Holzapfel., eds. **The Lactic Acid Bacteria Vol. 2: The Genera of Lactic Acid Bacteria**. Chapman & Hall, Glasgow, United Kingdom.
- Schlegel, H.G. 1993. Lactic acid fermentation and Lactobacteriaceae, pp. 300-305. **General Microbiology**. 7th ed. Cambridge University Press, New York.
- Shun, Y.L., J.A. Ayres, W. Winkler and W.E. Sandine. 1989. *Lactobacillus* effect on cholesterol: *in vitro* and *in vivo* results. **Journal of Dairy Science** 72: 2884-2889.
- Siliker, J.H., R.P. Elliott, A.C. Baird Parker, F.L. Bryan, J.H.B. Christian, D.S. Clark, J.C. Olson and T.A. Reberdseds. 1980. **Microbiology of Food vol. 1: Factor Affecting Life and Death of Microorganism**. Acedamic Press. London.
- Silva, M., N.V. Jacobus, C. Deneke and S.L. Gorbach. 1987. Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 8: 1231-1233.
- Simpson, W.J. and H. Taguchi. 1995. The genus *Pediococcus* with notes on the genera *Tetragenococcus* and *Aerococcus*, pp. 126-164. In B.J.B. Wood and W. H. Holzapfel., eds. **The Lactic Acid Bacteria Vol. 2: The Genera of Lactic Acid Bacteria**. Chapman and Hall, Glasgow, United Kingdom.
- Sjogren, J., J. Magnusson, A. Broberg, J. Schnurer and L. Kenne. 2003. Antifungal 3-hydroxy fatty acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14. **Applied and Environmental Microbiology** 69: 7554-7557.
- Slifkin, M. and R. Doyle. 1990. Lectins and their application to clinical microbiology. **Clinical Microbiological Review** 3: 197-218.

- Steffan, R..J. and R.M. Atlas. 1988. DNA amplification to enhance detection of genetically engineered bacteria in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* 54: 2185-2191.
- Stiles, M.E. and W.H. Holzapfel. 1997. Lactic acid bacteria of food and their current taxonomy. **International Journal of Food Microbiology** 36: 1-29.
- Strom, K. J. Sjogren, A. Broberg and J. Schnurer. 2002. *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo (L-Phe-L-Pro) and cyclo (L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-Phenyllactic acid. **Applied and Environmental Microbiology** 68 (9): 4322-4327.
- Takala, T.M. and P.E.J. Saris. 2002. A food-grade cloning vector for lactic acid bacteria based on nisin immunity gene *nisI*. **Applied Microbiology and Biotechnology** 59: 467-471.
- Talarico, T.L., I.A. Casas, T.C. Chung and W.J. Dobrogosz. 1988. Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 32: 1854-1858.
- Tannock, G.W. 1992. The lactic microflora of pigs, mice and rats. pp. 21-48. In B.J.B. Wood., ed. **The Lactic Acid Bacteria Vol. 1: The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease**. Elsevier Applied Science, London.
- Teuber, M. 1995. The genus *Lactococcus*, pp. 173-174. In B.J.B. Wood and W.H. Holzapfel, eds. **The Lactic Acid Bacteria Vol. 2: The Genera of Lactic Acid Bacteria**. Chapman & Hall, Glasgow, United Kingdom.
- Thomas, L.V., M.R. Clarkson and J. Delves-Broughton. 2000. Nisin, pp. 525-565. In A.S. Naidu., eds. **Natural Food Antimicrobial System**. CRC Press, Boca Raton, Florida, U.S.A.

- Towner, K.T. and A. Cockayne. 1993. **Molecular methods for microbial identification and typing**. Chapman & Hall. Cambridge, United Kingdom.
- Tuomola, E.M. and S.J. Salminen. 1998. Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. **International Journal of Food Microbiology** 41: 45-51.
- Valerio, F., P. DeBellis, S.L. Lonigro, A. Visconti and P. Lavermicocca. 2008. Use of *Lactobacillus plantarum* fermentation products in bread making to prevent *Bacillus subtilis* ropy spoilage. **International Journal of Food Microbiology** 122: 328-332.
- Vancanneyt, M., P. Neysens, M.D. Wachter, K. Engelbeen, C. Snauwaert, I. Cleenwerck, R.V.D. Meulen, B. Hoste, E. Tsakalidou, L.D. Vuyst and J. Swings. 2005. *Lactobacillus acidifarinae* sp. nov. and *Lactobacillus zymae* sp. nov., from wheat sourdoughs. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 55: 615-620.
- Vuyst, D.L. and E.J. Vandamme. 1994. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria, pp. 91-142. In L.D. Vuyst and E.J. Vandamme., eds. **Bacteriocin of lactic acid bacteria**. Chapman & Hall, Glasgow, United Kingdom.
- Wadstrom, T. 1988. Adherence traits and mechanisms of microbial adhesion in the gut. **Bailliere's Clinical Tropical Medicine & Communicable Diseases** 3: 417-433.
- Wenzel, R.P. 1995. Nosocomial candidemia: risk factors and at tributable mortality. **Clinical Infectious Diseases** 20: 1531-1534.
- West, C.A and P.J. Warner. 1988. Plantaricin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* NCDO1193. **FEMS Microbiology Letters** 49: 163-165.
- White T.C., K.A. Marr and R.A. Bowden. 1998. Clinical, cellular and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. **Clinical Microbiology Reviews** 11: 382-402.

Wistreich, G.A. and M.D. Lechtman. 1980. **Laboratory exercise in microbiology**. 4th ed.
Macmillan publishing Co., Inc., New York.

Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution. *Cited by* L. Axelsson. 1998. Lactic Acid Bacteria: classification and physiology, p. 3. *In* S. Salminen and A. von Wright., eds. **Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects**. Marcel Dekker, Inc., New York.

Woolford, M. K. 1984. The antimicrobial spectra of organic compounds with respect to their potential as hay preservatives. **Grass and Forage Science** 39: 75-79.

Wynne, A.G., A.L. McCartney, J. Brostoff, B.N. Hudspith and G.R. Gibson. 2004. An *in vitro* assessment of the effects of broad-spectrum antibiotics on the human gut microflora and concomitant isolation of a *Lactobacillus plantarum* with anti-*Candida* activities. **Food Microbiology** 10: 165-169.

Zhou, J., M.A. Bruns and J.M. Tiedje. 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. **Applied and Environmental Microbiology** 62(2): 316-322.





ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. De Man, Rogosa and Sharpe (MRS)

Peptone	10	กรัม
Beef extract	10	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Polysorbate 80	1.0	กรัม
Ammonium citrate	2.0	กรัม
Sodium acetate	5.0	กรัม
Magnesium sulfate	0.1	กรัม
Manganese sulfate	0.05	กรัม
Dipotassium phosphate	2.0	กรัม

เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 12 นาที

หมายเหตุ การเตรียมอาหารแข็งต้องเติมผงวุ้นร้อยละ 1.5

2. Sabouraud Dextrose broth (SDB)

Peptone	20	กรัม
Dextrose	40	กรัม

เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

หมายเหตุ การเตรียมอาหารแข็งต้องเติมผงวุ้นร้อยละ 1.5

3. Tryptone Glucose Extract (TGE)

Tryptone	10	กรัม
Yeast extract	10	กรัม
Glucose	10	กรัม
Magnesium sulfate	0.01	กรัม
Manganese sulfate	0.01	กรัม
Tween 80	2-3	หยด

เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

หมายเหตุ การเตรียมอาหารแข็งต้องเติมผงวุ้นร้อยละ 1.5

4. Luria-Burtani (LB) medium

Peptone	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Sodium Chloride	10.0	กรัม

เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

หมายเหตุ การเตรียมอาหารแข็งต้องเติมผงวุ้นร้อยละ 1.5

5. LB agar/ampicillin/IPTG/X-gal

นำอาหารแข็ง LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร อุณหภูมิประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส ผสม stock solution ของยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เข้าให้เข้ากัน แล้วเทลงจานเพาะเชื้อ

ปีเปตสารละลาย IPTG ปริมาตร 40 ไมโครลิตร และ X-gal ปริมาตร 40 ไมโครลิตร จาก stock solution ลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง LB plate จากนั้นกระจายให้ทั่วผิวหน้าจนสารละลายซึมเข้าสู่เนื้อวุ้น ตั้งไว้ให้ผิวหน้าอาหารแห้งก่อนนำไปใช้

6. Super optimal broth added glucose (SOC) medium

Tryptone	2.0	กรัม
Yeast extract	0.5	กรัม
1 M NaCl	1.0	มิลลิลิตร
1 M KCl	0.25	มิลลิลิตร
2 M Mg ²⁺	1.0	มิลลิลิตร
2 M glucose	1.0	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นรอให้อุณหภูมิประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส แล้วเติม 2 M Mg²⁺ และ 2 M glucose



1. Lysozyme solution (50 mg/ml)

Lysozyme	50	มิลลิกรัม
TE buffer (10 mM, pH 8.0)	1	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2. 10 % SDS

Sodium dodecyl sulfate	2	กรัม
Distilled water	20	มิลลิลิตร

ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านเมมเบรนที่มี pore size ขนาด 0.45 ไมโครเมตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

3. 10X Tris-Borate-EDTA buffer (TBE) pH 8.0

Trizma base	108	กรัม
Boric acid	55	กรัม
EDTA	7.4	กรัม
NaOH	1.0	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง

4. Tris-EDTA buffer (TE; 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0)

Tris-HCl (1 M, pH 8.0)	10	มิลลิลิตร
EDTA (0.5 M, pH 8.0)	2	มิลลิลิตร
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง

5. Alkaline Lysis Solution I

Dextrose	0.99	กรัม
1 M Tris-Cl (pH 8.0)	2.5	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA (pH 8.0)	2	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร นำนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6. Alkaline Lysis Solution II

0.4 N NaOH	100	ไมโครลิตร
2% (w/v) SDS	100	ไมโครลิตร

เตรียมใช้ในทันทีที่อุณหภูมิห้อง

7. Alkaline Lysis Solution III

5 M potassium acetate	60	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	11.5	มิลลิลิตร
Distilled water	28.5	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

8. X-Gal stock solution (40 mg/ml)

X-gal	0.4	กรัม
Dimethylformamide	10	มิลลิลิตร

แบ่งใส่ eppendorf หลอดละ 1 มิลลิลิตร เก็บให้พ้นแสง ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

9. 0.1 M IPTG stock solution

IPTG	0.238	กรัม
Deionized water	10	มิลลิลิตร

กรองผ่านเมมเบรนที่มี pore size ขนาด 0.45 ไมโครเมตร แบ่งใส่ eppendorf หลอดละ 1 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

10. 3% hydrogen peroxide solution

35% ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์	8.6	กรัม
Distilled water	100	มิลลิลิตร

11. Stock ethidium bromide

Ethidium bromide	1	กรัม
Distilled water	100	มิลลิลิตร

นำใส่ขวดสีชา เก็บที่อุณหภูมิห้อง

12. 0.8 % agarose gel

Agarose	0.16	กรัม
0.5X TBE buffer	20	มิลลิลิตร

หลอม agarose ให้ละลาย ตั้งไว้ให้สารละลาย agarose อุณหภูมิร้อนเท่าที่ทนได้



1. ความเข้มข้นของ agarose

ดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ผ่านรูผ่าน (pore) ภายในเจล ถ้ารูพรุนมีขนาดใหญ่อัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอก็จะสูง ซึ่งขนาดรูผ่าน (pore size) ภายในเจลจะเปลี่ยนแปลงตามความเข้มข้นของ agarose และการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอใน agarose gel จะแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของ agarose ดังตารางที่ 1

ตารางผนวกที่ ๑1 ความเข้มข้นของ agarose ที่ใช้ในการตรวจหา linear DNA ขนาดต่างๆ

Agarose concentration in Gel (%)	Range of separation of linear DNA molecules (kb)
0.3	5-60
0.6	1-20
0.7	0.8-10
0.9	0.5-7
1.2	0.4-6
1.5	0.2-3
2.0	0.1-2

2. การทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

นำถาดเจลวางใน chamber โดยให้ด้านที่มี wells อยู่ใกล้ขั้วลบ จากนั้นเท electrophoresis buffer (0.5X TBE buffer) ลงใน chamber ให้ท่วมเจล ให้ผิวเจลอยู่ได้บัพเฟอร์ประมาณ 0.1-0.3 เซนติเมตร ผสม loading dye กับสารละลายดีเอ็นเอแล้วหยอดลงใน well ปิดฝา chamber และต่อขั้วไฟฟ้า แล้วจึงปล่อยกระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ 100 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 30 นาที เมื่อเห็นสีของ tracking dye เคลื่อนไปอยู่ปลายเจลอีกด้านหนึ่ง จึงหยุดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า

3. การคำนวณปริมาณของดีเอ็นเอต่อเวกเตอร์ในปฏิกิริยา ligation อัตราส่วนระหว่างผลิตภัณฑ์ PCR: เวกเตอร์ (1:1)

$$\text{ng of insert needed for a 1:1 ratio} = \frac{\text{length of insert (in kb)} \times \text{ng of vector}}{\text{length of vector (in kb)}}$$

$$\text{ng of insert} = \frac{1.362 \times 50}{3.015} = 22.59$$

4. การตรวจนับเซลล์ยีสต์ด้วย Haemocytometer

Haemocytometer เป็นอุปกรณ์ที่ใช้นับปริมาณเม็ดเลือด ต่อมาได้นำมาประยุกต์ใช้ในการนับจำนวนเซลล์แบคทีเรีย ยีสต์ และสปอร์ของรา สามารถใช้ตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ในอาหารเหลวได้ อุปกรณ์นี้มีลักษณะคล้ายแผ่นสไลด์ทั่วไป ขนาดยาวและกว้างกว่าเล็กน้อย แต่หนากว่าประมาณ 3 เท่า ตรงกลางมีช่องแบ่งเป็น 2 ส่วน ทำให้ตรวจนับได้ครั้งละ 2 ตัวอย่าง แต่ละส่วนมีตารางรูปสี่เหลี่ยมจตุรัส แบ่งเป็น $5 \times 5 = 25$ ช่องใหญ่ ในแต่ละช่องใหญ่มีพื้นที่เท่ากับ 0.2×0.2 ตารางมิลลิเมตร และในแต่ละช่องใหญ่มี $4 \times 4 = 16$ ช่องเล็ก แต่ละช่องเล็กมีพื้นที่เท่ากับ 0.05×0.05 ตารางมิลลิเมตร เนื่องจากขีดตารางแบ่งช่องมีขอบยกสูงจากสไลด์ขึ้นมา เมื่อปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ (cover slip) ที่ใช้กับ Haemocytometer ที่มีความจำเพาะจึงเกิดช่องว่างระหว่างสไลด์และกระจกปิดสไลด์ประมาณ 0.1 มิลลิเมตร ดังนั้นปริมาตรตัวอย่างของเหลวที่ใส่ในหนึ่งช่องใหญ่เท่ากับ $0.1 \times 0.2 \times 0.2$ ลูกบาศก์มิลลิเมตร และในหนึ่งช่องเล็กเท่ากับ $0.1 \times 0.05 \times 0.05 = 0.00025$ ลูกบาศก์มิลลิเมตร

นับจำนวนเซลล์ในหนึ่งช่องเล็กรวม 10 ช่อง หาค่าเฉลี่ยจำนวนที่ได้จะเป็นต่อปริมาตรหนึ่งช่องเล็กซึ่งเท่ากับ 0.00025 มิลลิเมตร และคำนวณหาจำนวนเซลล์ต่อตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร (ลูกบาศก์เซนติเมตร) คูณกลับด้วยระดับความเจือจางจะได้ปริมาณเซลล์ต่อตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร (1 ลูกบาศก์เซนติเมตร) ตามวิธีดังนี้

ตัวอย่างปริมาตร 0.00025 มิลลิเมตร	มีจำนวนเซลล์จุลินทรีย์เฉลี่ยเท่ากับ	A	เซลล์
1 ลูกบาศก์เซนติเมตร		$A \times 10 \times 10 \times 10 \times (1/0.00025)$	เซลล์
		$= A \times 4 \times 10^6$	เซลล์ต่อมิลลิลิตร

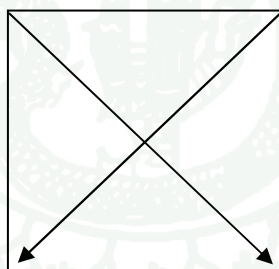
การนับจำนวนเซลล์ยีสต์โดยคำนวณจาก Haemocytometer

1. เจือจางเซลล์ยีสต์เพนชันของยีสต์กับน้ำยาไอโอดีนในอัตราส่วน 1:1 (น้ำยาไอโอดีนช่วยให้เซลล์หยุดการเคลื่อนที่และทำให้สังเกตเซลล์ยีสต์ได้ง่ายขึ้น) ถ้าปริมาณเซลล์ยังหนาแน่นเกินไปไม่สามารถนับจำนวนได้ ให้เจือจางปริมาณเซลล์ลงจนสามารถนับจำนวนเซลล์อยู่ระหว่าง 1-10 ต่อหนึ่งช่องเล็ก

2. ล้างและเช็ดแผ่น Haemocytometer ให้แห้ง ปิดทับบริเวณช่องแบ่งด้วยกระจกปิดสไลด์

3. เปิดตัวอย่างให้เต็มกระเปาะกลาง และปลายเปิดที่ช่องระหว่างกระจกปิดสไลด์ และแผ่น Haemocytometer เป่าตัวอย่างให้ซึมเข้าไปเต็มบริเวณพื้นที่สี่เหลี่ยมที่มีช่องแบ่งอยู่ระหว่างกระจกปิดสไลด์และแผ่น Haemocytometer

4. นับจำนวนเซลล์ยีสต์ที่อยู่ในช่องเล็กรวม 10 ช่อง โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 40 เท่า ให้นับแบบทะแยงมุมซ้ายไปขวาและขวาไปซ้ายตามภาพที่ 1 จากนั้นหาจำนวนเฉลี่ยต่อช่อง



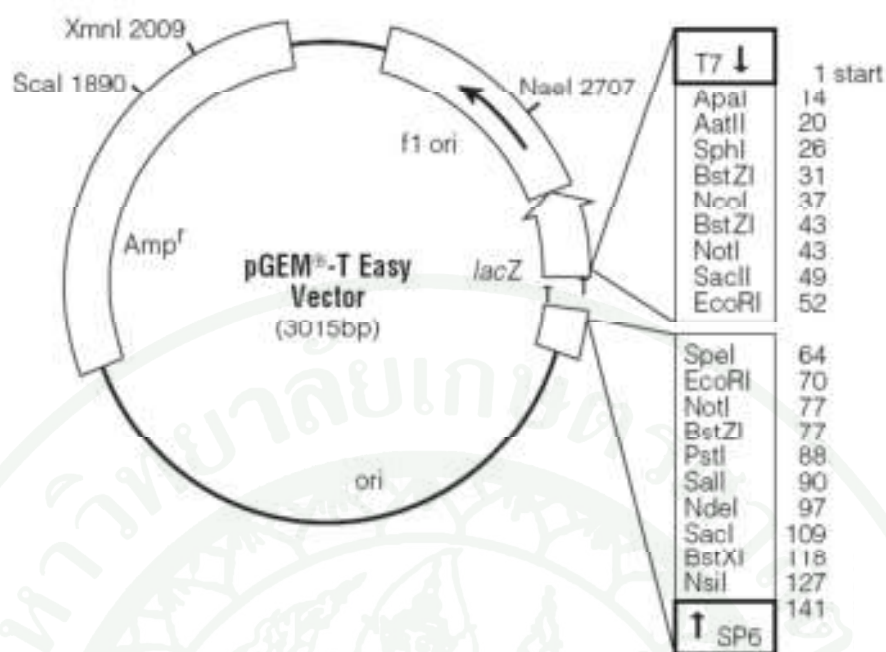
ภาพผนวกที่ ค1 การนับจำนวนเซลล์ในแต่ละช่องเล็กแบบทะแยงมุมโดยใช้ Haemocytometer

5. คำนวณจำนวนเซลล์ต่อตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร

จากสูตร

จำนวนเซลล์ต่อตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร

$$= 4 \times 10^6 \times \text{จำนวนเซลล์เฉลี่ยต่อช่อง} \times \text{ระดับความเจือจางของน้ำยาไอโอดีน}$$



ภาพผนวกที่ ค2 แผนที่ของยีน pGEM®-T Vector ขนาด 3.015 กิโลเบส ที่ประกอบด้วยยีนต้านยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน และยีน *lacZ*

ที่มา: Promega (2010)



ภาคผนวก ง
การจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท L47-2
ด้วยชุดทดสอบ API 50 CHL Medium

การจัดจำแนกแบบที่เรียกรวดเล็ดคักด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป API 50 CHL Medium

1. API 50 CHL Medium บรรจุกล่องแบบ 10 tests ประกอบด้วย
 - 1.1 strip API 50 CHL Medium จำนวน 10 strip
 - 1.2 กล่องสำหรับบ่มเชื้อ (incubation boxes) จำนวน 10 ชุด
 - 1.3 แผ่นบันทึกผลจำนวน 10 ชุด
 - 1.4 คู่มือแนะนำการใช้จำนวน 1 เล่ม
2. สารเคมีและวัสดุอื่นๆ
 - 2.1 สารเคมี
 - 2.1.1 อาหารเหลว API 50 CHL Medium ปริมาตร 10 มิลลิลิตร
 - 2.1.2 Oxidase reagent
 - 2.1.3 Mineral Oil
 - 2.1.4 McFarland Standard No. 2
 - 2.1.5 MRS medium
 - 2.2 วัสดุอื่นๆ
 - 2.2.1 Pipette
 - 2.2.2 Ampoule Protector
 - 2.2.3 Rack วาง Ampoule
 - 2.2.4 ไม้พันสำลี
 - 2.2.5 เครื่องมือปฏิบัติการทางจุลชีววิทยาทั่วไป
 - 2.2.6 API 50 CH Analytical Profile Index (คู่มือเปรียบเทียบผล) หรือ Identification software
 - 2.3 คำเตือนและข้อควรระวัง
 - 2.3.1 ใช้ API 50 CHL Medium สำหรับการวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการและการควบคุมทางจุลชีววิทยา
 - 2.3.2 ผู้ใช้จะต้องมีความชำนาญทางจุลชีววิทยา
 - 2.3.3 ไม่ควรใช้ strip และ reagent ที่หมดอายุ
 - 2.3.4 บรรจุภัณฑ์และส่วนประกอบต้องอยู่ในสภาพสมบูรณ์เท่านั้นก่อนใช้งาน

2.3.5 ไม่ควรใช้ strip ที่ได้รับความเสียหาย เช่น หลุมทดสอบผิวดรูปราง

2.3.6 การเปลี่ยนแปลงหรือไม่ปฏิบัติตามรายละเอียดหรือขั้นตอนในการใช้ชุดทดสอบอาจมีผลต่อการทดสอบที่ได้

3. API 50 CHL Medium

3.1 แยกจุลินทรีย์ที่ต้องการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญเพื่อให้ได้เชื้อโคโลนีเดี่ยวๆ

3.2 นำโคโลนีเดี่ยวๆ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MRS และบ่มที่สภาวะไร้อากาศ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

3.3 ตรวจสอบให้มั่นใจว่าเชื้อที่จะนำมาทดสอบคือ เชื้อในกลุ่ม Lactic Acid Bacteria ซึ่งต้องเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ให้ผลการทดสอบเอนไซม์แคตาเลสเป็นลบ

4. การใช้ชุดทดสอบ

4.1 การเตรียม strip

4.1.1 เตรียมกล่องสำหรับบ่ม (ถาดล่างและฝาปิด) โดยเติมน้ำกลั่นหรือน้ำ demineralized หรือน้ำที่ไม่มีสารเคมีหรือสารเจือปนที่อาจจะปล่อยแก๊สออกมา เช่น CO₂ เป็นต้น ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในทุกหลุมของถาดล่างเพื่อให้มีความชื้น

4.1.2 บันทึกรหัส หรือลักษณะของเชื่อบริเวณพลาสติกที่ยื่นออกมา (ไม่ควรบันทึกไว้ที่ฝาปิดของกล่อง เพราะอาจเกิดการสับสนได้)

4.1.3 นำแถบของ strip API 50 CHL ชุดที่ 1 (0 - 19) และชุดที่ 2 (20 - 39) มาตัดแยกออก strip ละสองส่วน ซึ่งจะได้เป็น 4 strip คือ 0 - 9, 10 - 19, 20 - 29 และ 30 - 39 แล้วจึงนำไปวางในกล่องสำหรับบ่ม

4.1.4 นำแถบของ strip ที่เหลือ (40 - 49) วางในกล่องสำหรับบ่มอีกอัน

5. การเตรียมเชื้อตั้งต้น

5.1 เปิดฝาขวด ampoule API 50 CHL Medium (10 มิลลิลิตร) ตามรายละเอียดในคำเตือนและข้อควรระวัง

5.2 เชื้อเชื้อโคโลนีเดี่ยวๆ จากงานอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ใส่ลงใน API 50 CHL Medium และปรับความขุ่นให้ได้เทียบเท่ากับ McFarland No. 2

5.3 ใช้ปิเปตค่อยๆ ละลายเซลล์ให้เป็นเนื้อเดียวกัน

5.4 ซัสเพนชันของเชื้อที่เตรียมขึ้นจะต้องนำไปใช้ทดสอบทันที

6. การหยอดเชื้อตั้งต้นลง strip

- 6.1 ปิเปตซ์สเฟนชั้นของเชื้อลงในหลุมของ strip
- 6.2 เติมชั้นสเฟนชั้นของเชื้อลงในหลุมทั้ง 50 หลุม
- 6.3 หยอด mineral oil ลงในหลุมทดสอบทั้ง 50 หลุม เพื่อป้องกันอากาศเข้า
- 6.4 ปิดฝากล่อง และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

7. การอ่านผลและแปลผล

7.1 การอ่านผล

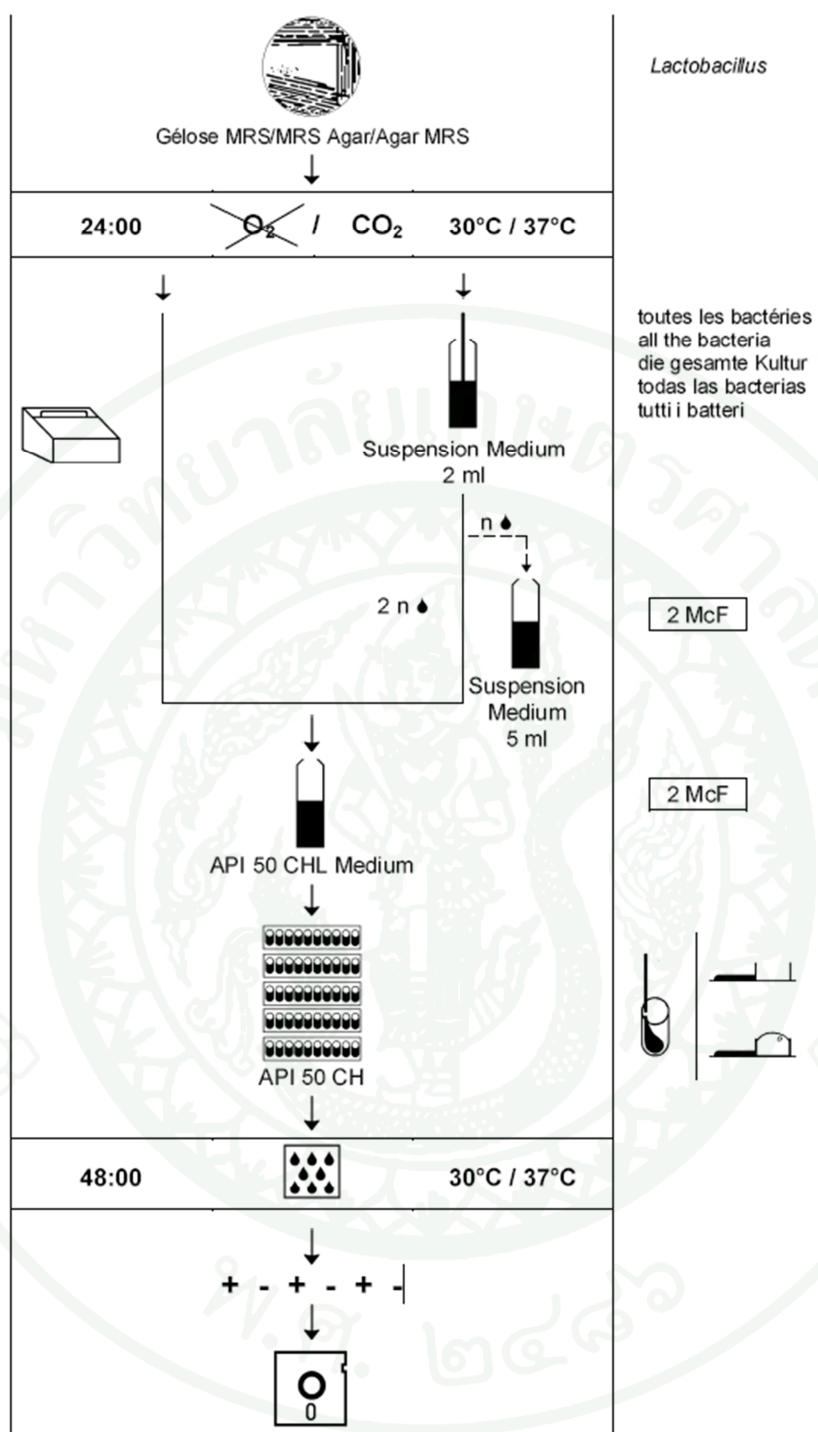
7.1.1 หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมงแล้ว (เวลาในการอ่านผลขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อและชนิดของการทดสอบในแต่ละหลุม)

7.1.2 วิธีอ่านผลว่าเป็นบวกหรือไม่ โดยสังเกตการเปลี่ยนแปลง 2 ลักษณะคือ การเปลี่ยนแปลงสีของสารชีวเคมี และความขุ่นของสารละลาย

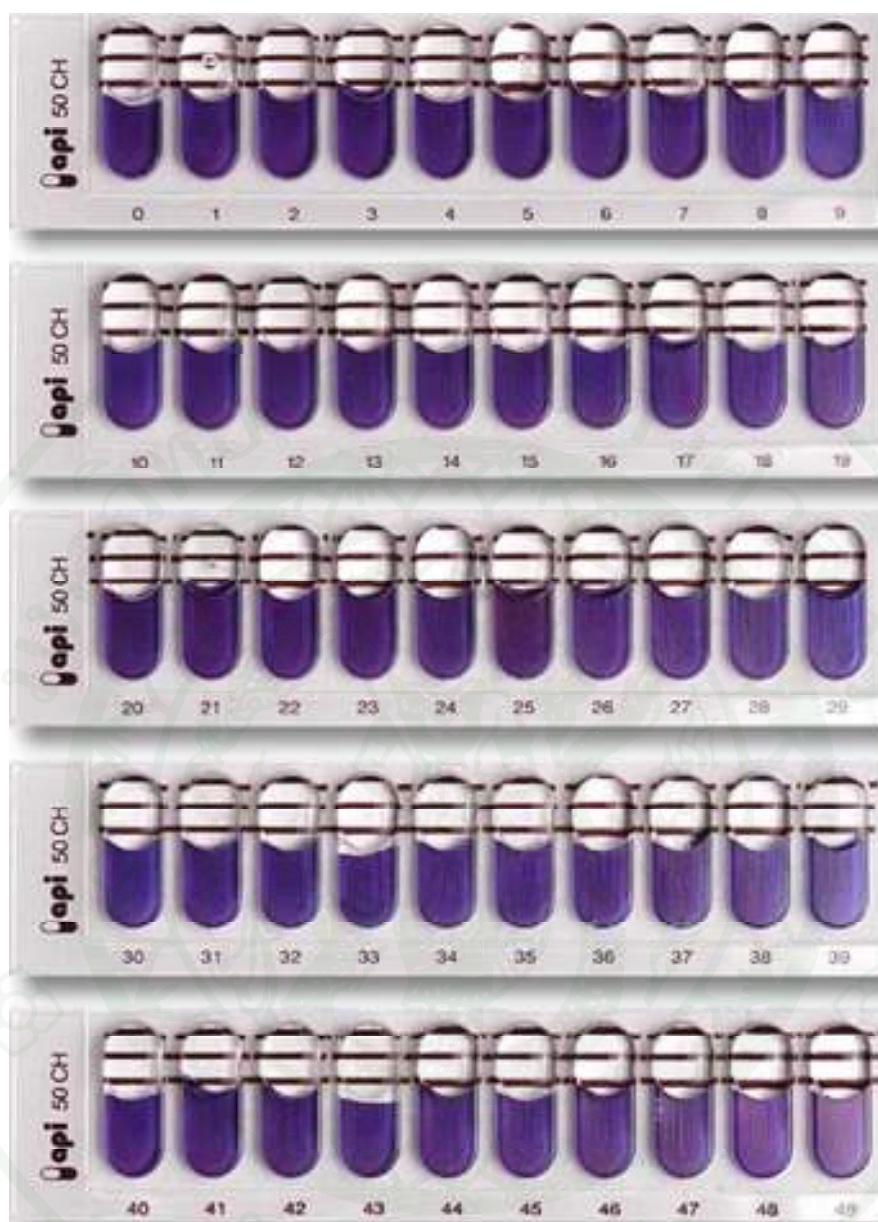
7.1.3 การทดสอบที่ให้ผลบวกคือ เปลี่ยนจากสีน้ำเงินม่วงเป็นสีเหลือง ยกเว้นในหลุมที่ 25 หากเปลี่ยนจากสีน้ำเงินม่วงเป็นสีดำให้ถือว่าเป็นบวก

7.2 การแปลผล

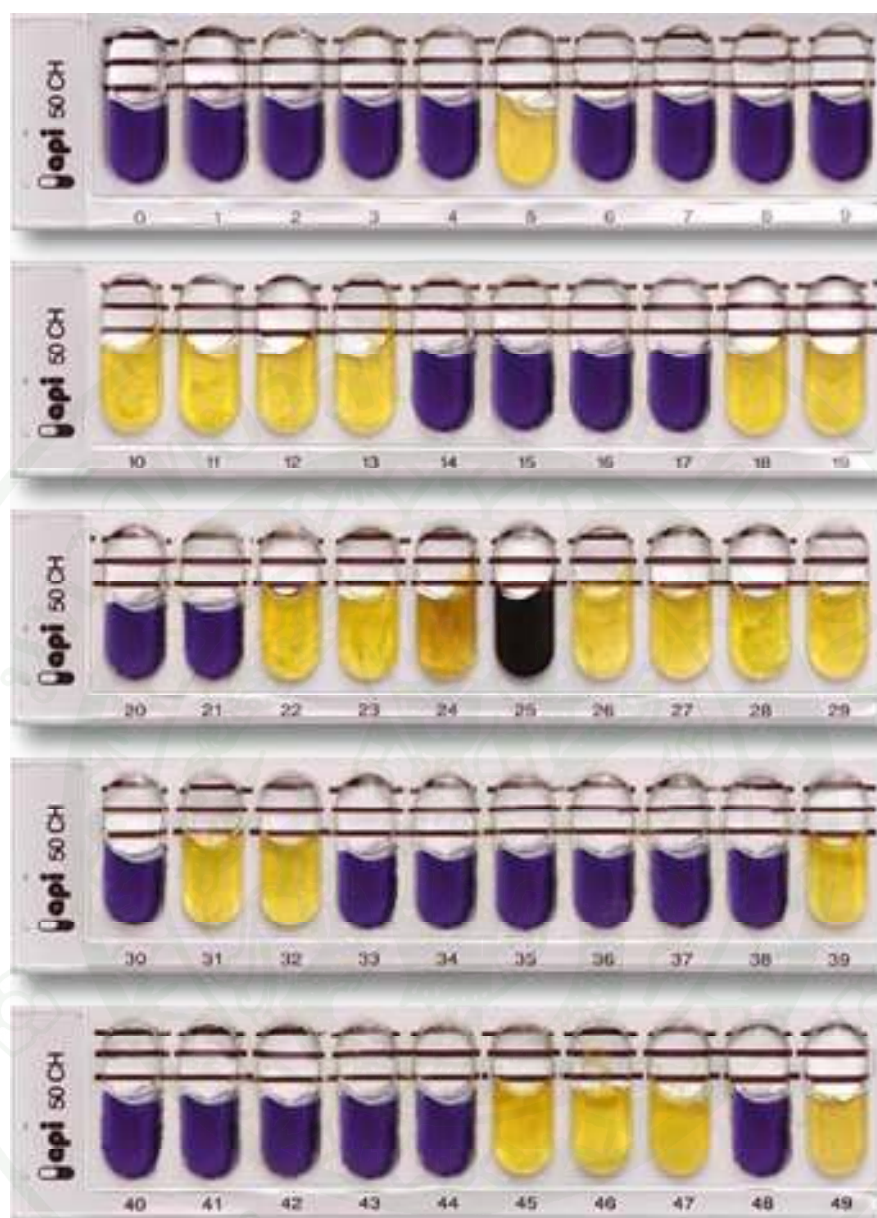
ใช้ software ช่วยแปลผล โดยใส่เป็นเครื่องหมาย +, – หรือ numerical profile (ใส่เป็นตัวเลข) ซึ่งตัวเลขสามารถคำนวณได้ดังนี้ คือ ในกระดวยบันทึกผลจะแบ่งการทดสอบเป็นกลุ่มๆ โดยใน 1 กลุ่มประกอบด้วย 3 การทดสอบ ให้ค่าเป็น 1, 2 และ 4 เหมือนกันทุกกลุ่ม จากนั้นให้นำตัวเลขของผลการทดสอบในช่องที่เป็นบวกมารวมกัน



ภาพผนวกที่ ๑1 ขั้นตอนการทดสอบด้วยชุด API 50 CHL Medium



ภาพผนวกที่ 33 การทดสอบด้วยชุด API 50 CHL Medium ในชั่วโมงที่ 0

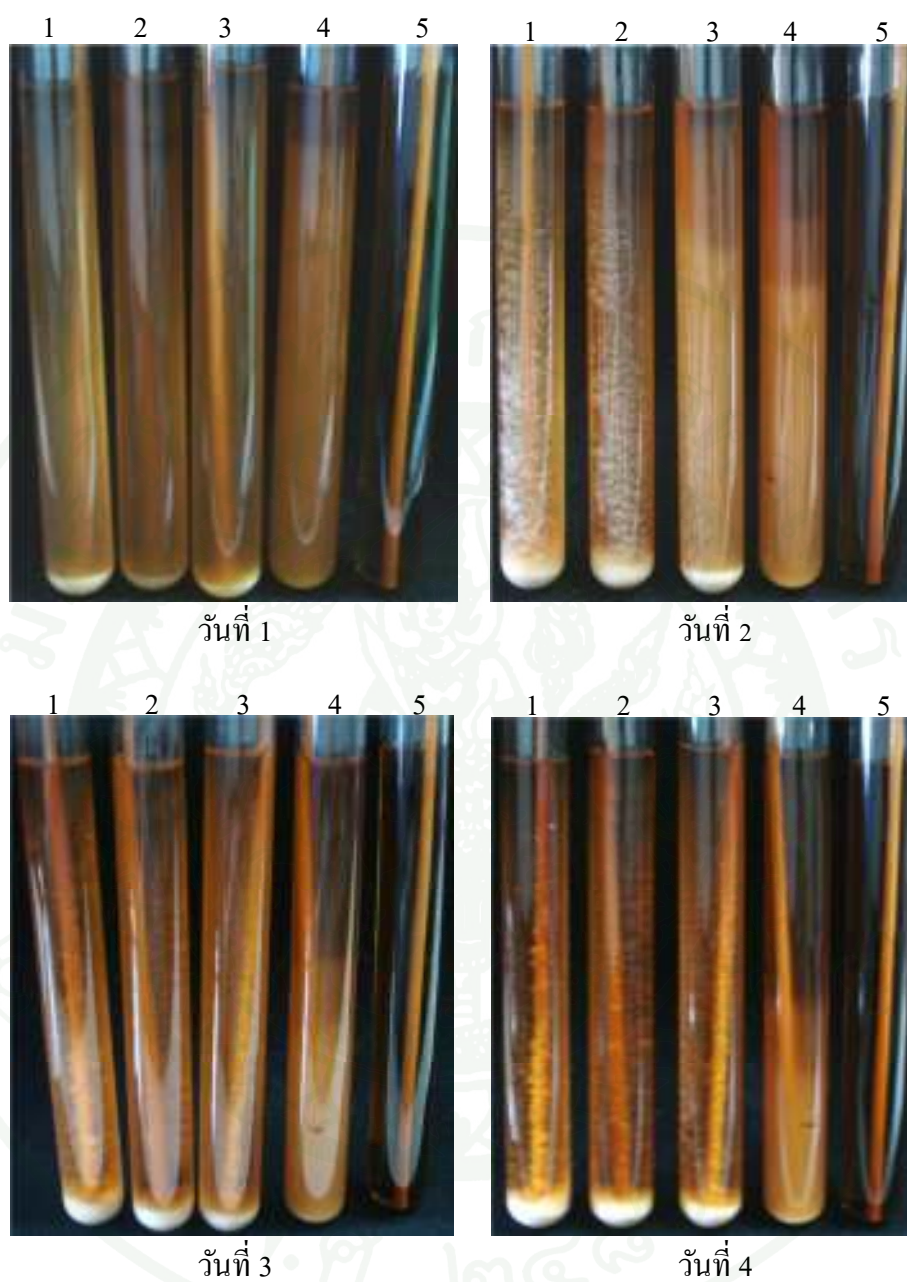


ภาพผนวกที่ ๔๔ การทดสอบด้วยชุด API 50 CHL Medium ในชั่วโมงที่ 48



ภาคผนวก จ
การเกาะติดพื้นผิวของ L47-2
และสายพันธุ์กลาย L47-2UV10 และ L47-2UV116

การเกาะติดพื้นผิว



ภาพผนวกที่ จ1 การเกาะติดพื้นผิวของแบคทีเรียกรดแลคติกที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS โดยมีแท่งไม้ไผ่ปราศจากเชื้อเป็นแกนกลางตั้งแต่วันที่ 1-7

หลอดทดลองที่ 1: ไอโซเลต L47-2

หลอดทดลองที่ 2: สายพันธุ์กลาย L47-2UV10

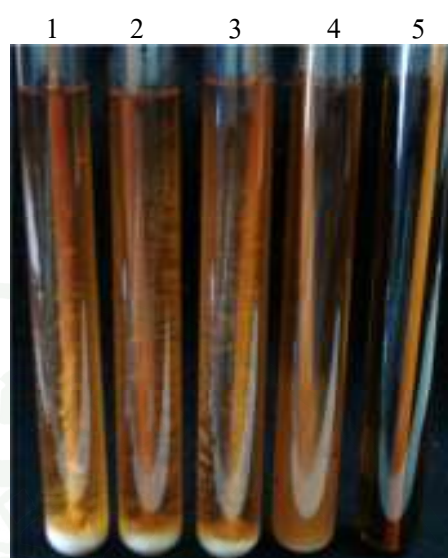
หลอดทดลองที่ 3: สายพันธุ์กลาย L47-2UV116

หลอดทดลองที่ 4: หลอดทดลองควบคุม (ไม่มีการเกาะติดที่ผิวแท่งไม้ไผ่)

หลอดทดลองที่ 5: อาหาร MRS ที่ไม่ผ่านการเลี้ยงเชื้อ



วันที่ 5



วันที่ 6



วันที่ 7

ภาพผนวกที่ จ1 (ต่อ)

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ	นายธนศ สัจจ์ศรี
เกิดวันที่	16 สิงหาคม พ.ศ. 2526
สถานที่เกิด	อำเภอทุ่งสง จังหวัดนครศรีธรรมราช
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (วิทยาศาสตร์) มหาวิทยาลัยรามคำแหง
ตำแหน่งปัจจุบัน	ผู้เชี่ยวชาญผลิตภัณฑ์
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	บริษัทไซแอนติฟิค โปรโมชั่น จำกัด
การนำเสนอผลงาน	Sungsri, T., M. Lertcanawanichakul and P. Siwayaprahm. Isolation and Selection of Anti- <i>Candida albicans</i> Metabolites Producing Lactic Acid Bacteria from Various Sources. The 4 th International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agriculture Products (FerVAAP2011) August 29 th -31 st , 2011. Kosa Hotel, Khon Kaen, Thailand.
ผลงานตีพิมพ์	Sungsri, T., M. Lertcanawanichakul and P. Siwayaprahm. 2012. Isolation and Selection of Anti- <i>Candida albicans</i> Metabolites Producing Lactic Acid Bacteria from Various Sources. KKU Research Journal . 17(4): 630-638.