บทที่ 1
บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

เนื่องจากในปัจจุบันแบคทีเรียมีการพัฒนาสายพันธุ์อย่างรวดเร็ว จนทำให้มีการดื้อต่อการถูกทำลายด้วยสารปฏิชีวนะหรือ “การดื้อยา (antibiotic resistance)” ซึ่งการดื้อยานี้เกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรม (mutation) ของแบคทีเรีย และเมื่อเกิดการดื้อของเชื้อต่อยาชนิดหนึ่ง อาจทำให้มีการดื้อต่อยาหลายๆ กลุ่มไปด้วย ทำให้มียาที่จะใช้ในการรักษาโรคน้อยลง ส่งผลให้ค่าใช้จ่ายในการรักษามากขึ้น เกิดโรคติดเชื้อที่รักษาไม่ได้มากขึ้น ยากต่อการควบคุมโรค อัตราการป่วยรุนแรงขึ้น และอัตราการเสียชีวิตสูงขึ้น ซึ่งถ้าเป็นเช่นนี้ต่อไปอาจทำให้โลกเราย้อนเข้าสู่ “ยุคก่อนยาปฏิชีวนะ” อีกครั้งหนึ่ง ดังนั้นการศึกษาเพื่อค้นหาสารที่มีฤทธิ์ในการกำจัดจุลินทรีย์จึงมีความจำเป็น นอกจากปัญหาในด้านการรักษาโรคแล้วปัญหาด้านสุขอนามัยของการบริโภคอาหารก็ส่งผลต่อสุขภาพโดยตรง เนื่องจากการใช้สารเคมีเพื่อเป็นสารถนอมอาหารและยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค ในอาหารสด อาหารแปรรูป เครื่องดื่ม รวมทั้งบรรจุภัณฑ์อาหาร ทำให้เกิดปัญหาการตกค้างของสารเคมีในผลิตภัณฑ์อาหารที่สามารถส่งผลเสียต่อสุขภาพของผู้บริโภค และสารเคมีหลายชนิดมีคุณสมบัติเป็นสารก่อมะเร็ง ดังนั้นจึงได้มีความพยายามในการศึกษาค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อทดแทนการใช้สารเคมีดังกล่าว ซึ่งสารแบคเทอริโอซิน จัดเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจทั้งในด้านการรักษาโรคและสุขอนามัยของผู้บริโภค

แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) จัดเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพประเภทโปรตีนที่มีขนาดเล็กและผลิตโดยแบคทีเรียบางชนิด คุณสมบัติพิเศษของแบคเทอริโอซิน คือเป็นสารที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของการเน่าเสียของอาหารและจุลินทรีย์ก่อโรคหลายชนิดที่ปนเปื้อนในอาหาร นอกจากนี้ยังเป็นสารที่มีความเสถียรสูงต่ออุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่างและเอนไซม์ย่อยโปรตีนบางชนิด จากคุณสมบัติดังกล่าวจึงได้มีการศึกษาวิจัยกันอย่างกว้างขวางเพื่อพัฒนาเทคโนโลยีในการนำสารแบคเทอริโอซินมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารในการถนอมอาหารและผสมในบรรจุภัณฑ์อาหาร เพื่อทดแทนการใช้สารเคมี และยังเป็นการช่วยลดต้นทุนในการผลิตด้วย เนื่องจากการใช้สารแบคเทอริโอซิน จะช่วยลดกระบวนการอื่นๆ เช่น การใช้ความร้อน ความดัน รังสี เป็นต้น ที่นำมาใช้ในระหว่างการผลิต การแปรรูปและการถนอมอาหาร ซึ่งเป็นการรักษาคุณค่าของสารอาหาร รสชาติ รวมทั้งองค์ประกอบด้านกายภาพของผลิตภัณฑ์อาหารให้คงคุณสมบัติเดิมมากที่สุด

ในการวิจัยครั้งนี้เป็นการทดสอบถึงความสามารถของสารแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus* spp. ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค 3 ชนิด ได้แก่ *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella S*.1-2261 และศึกษากระบวนการทำให้บริสุทธิ์และคุณสมบัติทางเคมีบางประการของสารแบคเทอริโอซิน

2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

2.1 ศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคของสารแบคเทอริโอซิน ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Bacillus* spp.

2.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแบคเทอริโอซิน อย่างมีประสิทธิภาพ
2.3 ศึกษาวิธีการประยุกต์ใช้แบคเทอริโอซินในผลิตภัณฑ์อาหารหรือในระหว่างการเก็บรักษา
2.4 ศึกษาวิธีการประยุกต์ใช้แบคเทอริโอซินในบรรจุภัณฑ์อาหาร
(ข้อที่ 2.3 และ 2.4 ยังไม่ได้ทำ)

3. ขอบเขตของการวิจัย

3.1 ศึกษากิจกรรมของสารแบคเทอริโอซินในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค
3.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมผลต่อการผลิตและกิจกรรมของสารแบคเทอริโอซิน
3.3 ศึกษาการประยุกต์ใช้สารแบคเทอริโอซินในการถนอมอาหาร และการเก็บรักษาอาหาร
(ข้อที่ 3.3 ยังไม่ได้ทำ)

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ใช้เป็นแหล่งข้อมูลพื้นฐานของงานวิจัยที่เกี่ยวกับคุณสมบัติของสารแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus* spp. เพื่อการนำแบคเทอริโอซิน ไปประยุกต์ใช้ในการถนอมอาหารต่อไป

บทที่ 2
วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แบคทีเรีย *Bacillus* spp.

บาซิลลัสเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน มีความสามารถในการสร้างสปอร์ภายในเซลล์ ที่เรียกว่า เอนโดสปอร์ จีนัส บาซิลลัส เป็นจีนัสที่พบมากในดินอีกทั้งยังมีความสามารถในการสร้างสปอร์ ทำให้สามารถทนหรือปรับตัวให้อยู่ในสิ่งแวดล้อมที่สภาวะต่างๆได้ ซึ่งการจัดกลุ่มของบาซิลลัส ต้องอาศัยพื้นฐานทางการทดสอบด้านชีวเคมี และการวิเคราะห์ลำดับเบส 16S rDNA

การจัดหมวดหมู่ของแบคทีเรียสกุล *Bacillus*

Domain	Bacteria
Phylum	Firmicutes
Class	Bacilli
Order	Bacillales
Family	Bacillaceae
Genus	Bacillus

2.2 แบคเทอริโอซิน (Bacteriocin)

แบคเทอริโอซิน หมายถึงเปปไทด์หรือโปรตีนที่สังเคราะห์จากไรโบโซม และมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย ซึ่งแบคเทอริโอซินมีคุณสมบัติที่แตกต่างจากสารปฏิชีวนะ (Antibiotics) คือแบคเทอริโอซินมีฤทธิ์ในการยับยั้งแคบและมักเป็นพิษกับแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกัน (Klaenhammer, 1988) ปกติแบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินจะมีภูมิคุ้มกันต่อแบคเทอริโอซินที่ตนสร้างออกมา ดังนั้นจึงทำให้ไม่ถูกยับยั้งจากแบคเทอริโอซินของตนเอง การสร้างแบคเทอริโอซินของเชื้อแบคทีเรีย เชื่อว่าเกิดจากการปรับตัวเพื่อความอยู่รอดในสภาพแวดล้อมที่มีเชื้อหลายชนิดเจริญอยู่ร่วมกัน ทำให้เชื้อที่สร้างแบคเทอริโอซินสามารถแย่งอาหารและพื้นที่ใช้ในการเจริญเติบโต ส่วนเชื้อที่ไม่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้ก็ตายลงไปในที่สุด (Cladera-Olivera et al., 2004)

แบคเทอริโอซินเป็นเปปไทด์สายสั้นๆ ดังนั้น การใช้เอนไซม์ในกลุ่มที่มีความสามารถในการย่อยโปรตีน (Proteolytic enzyme) สามารถทำลายโครงสร้างที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียของแบคเทอริโอซินได้ ดังนั้นการใช้เอนไซม์ย่อยโปรตีนดังกล่าวจึงเป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ทดสอบสมบัติทางกายภาพ ชีวภาพของแบคเทอริโอซิน เอนไซม์ส่วนใหญ่ที่ใช้ไม่ว่าจะเป็นโปรติเนสเค (Proteinase K) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถตัดกรดอะมิโนด้านปลาย C (C terminal) ตำแหน่งหมู่คาร์บอกซิล (Carboxyl group) ของกรดอะมิโนกลุ่มอะลิฟาติก (Aliphatic) ไฮโดรโฟบิก (Hydrophobic) และอะโรมาติก (Aromatic) ส่วนเอนไซม์โปรติเอส (Protease) ตัดที่ตำแหน่งจำเพาะของกรดกลูตามิค (Glutamic acid) หรือกรดแอสปาติก (Aspatic acid)

ตัวอย่างสารยับยั้งในน้ำหมักของแบคทีเรียกรดแลคติก ที่สร้างสารยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ โดยมีโครงสร้างเป็นสารประกอบประเภทโปรตีน สามารถถูกทำลายด้วยเอนไซม์ในกลุ่มย่อยโปรตีนได้แก่ เอนเทอโร

ซิน จีเอ็ม 1 (Enterocin GM1) (อาภา สุเวชวัฒนกุล, 2549) ถูกทำลายด้วยกิจกรรมการยับยั้งของเอนไซม์ปาเปน เปปซิน ทริปซิน และโปรติเนสเค นอกจากนี้ยังพบว่า ซูกาซิน เอ็ม (Sukacin M) มีความไวต่อเอนไซม์ปาเปน โปรติเอส XI, V และโปรติเอส II (Sobrino, 1992)

สมบัติทางชีวภาพด้านการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ โดยทั่วไปแบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกัน (Narrow spectrum) แต่ไม่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ข้ามสายพันธุ์ได้ เนื่องจากการทำงานของแบคเทอริโอซินเป็นการจับกันระหว่างความเป็นไฮโดรโฟบิกของโมเลกุลของแบคเทอริโอซินกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกแต่ในแบคทีเรียแกรมลบ ผนังเซลล์จะเป็นองค์ประกอบของลิโปโพลีแซคคาไรด์ ที่สามารถป้องกันสารแบคเทอริโอซินไม่ให้จับกับผนังเซลล์ แต่อย่างไรก็ตาม พบว่าการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียต่างสายพันธุ์ (Board spectrum) ก็เกิดขึ้นได้ โดยเกิดกระบวนการทำลายลิโปโพลีแซคคาไรด์บนผนังเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมาย เช่น ทำให้แบคทีเรียอยู่ในรูปเปลือย (Spheroplast form) ซึ่งเซลล์ดังกล่าวสามารถถูกทำลายได้ง่ายโดยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ (Hydrolytic enzyme)

แบคเทอริโอซินบางชนิดที่มีฤทธิ์กว้าง เช่น ไนซินจะมีประสิทธิภาพในการประยุกต์ใช้มากกว่า โดยพบว่ามีผลในการยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวกได้หลายชนิด รวมถึงกลุ่มที่ก่อโรคด้วย (J. R. et al., 1976) ซึ่งมักจะก่อโรคในอาหารกระป๋องและผลิตภัณฑ์นม โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์นมที่นำมาแปรรูปเป็นเนย ซึ่งความร้อนที่ใช้ในการฆ่าเชื้อจะแพร่ผ่านได้ลำบาก ในขณะที่แบคเทอริโอซินที่มีฤทธิ์แคบ ก็สามารถยับยั้งเชื้อเฉพาะกลุ่ม โดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในอาหาร เช่น *Listeria monocytogenes* โดยไม่ก่อให้เกิดอันตรายกับเชื้อประจำถิ่นชนิดอื่น (Galvez et al., 2000)

2.3 คุณสมบัติที่จัดว่าเป็นแบคเทอริโอซิน

แบคเทอริโอซินถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ.1925 โดย Gratia เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างโดยแบคทีเรีย *Escherichia coli* v หรือ *Escherichia coli* CA7 ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ϕ หรือ *E.coli* CA81 ด้วยเหตุที่แบคเทอริโอซินดังกล่าวดังถูกสร้างโดยเชื้อ *E. coli* ดังนั้นจึงถูกตั้งชื่อว่า colicin หลังจากที่มีการค้นพบ colicin แล้ว ก็มีการค้นพบแบคเทอริโอซินอีกหลายชนิดในเวลาต่อมา โดยอาศัยคุณสมบัติจาก colicin หากพบว่ามีคุณสมบัติต่างออกไปก็จัดเป็นแบคเทอริโอซินชนิดใหม่อย่างไรก็ตามการกำหนดคุณสมบัติของสารที่เป็นแบคเทอริโอซินยังไม่แน่ชัด เพราะแบคเทอริโอซินผลิตมาจากแบคทีเรียหลายกลุ่ม จึงทำให้มีคุณสมบัติที่แตกต่างกันค่อนข้างมาก ซึ่งจะสรุปคุณสมบัติที่สำคัญของสารที่จัดว่าเป็นแบคเทอริโอซินดังนี้

2.3.1 แบคเทอริโอซินเป็นโปรตีน

การทดสอบว่าสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่สนใจเป็นแบคเทอริโอซินหรือไม่ มักจะนำสารดังกล่าวมาทดสอบกับเอนไซม์ย่อยโปรตีน (Proteolytic enzyme) ถ้าเอนไซม์ย่อยโปรตีนสามารถทำลายสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่น่าสนใจได้ ก็แสดงว่าสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์นั้นเป็นโปรตีน สารดังกล่าวจึงน่าจะเป็นแบคเทอริโอซิน แต่เอนไซม์ย่อยโปรตีนทั้งหมดก็ไม่สามารถย่อยแบคเทอริโอซิน ได้ทั้งหมด เช่น nisin ไม่ถูกย่อยด้วย pepsin หรือ trypsin แต่ถูกย่อยด้วย α-chymotrypsin (Hurst and Hoover, 1993)

2.3.2 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อชนิดอื่นได้อย่างจำเพาะ

คุณสมบัติข้อนี้ทำให้แบคเทอริโอซินแตกต่างจากสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น เช่น H_2O_2 หรือ รูเทอริน เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้จะไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์แบบไม่จำเพาะ การยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์แบบจำเพาะของแบคเทอริโอซิน คือสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์สายพันธุ์เดียวกันหรือสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกัน (narrow spectrum) เช่น แบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแกรมบวกก็สามารถยับยั้งการเจริญได้เฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก ตัวอย่างเช่น diplococin ที่สร้างจาก *Streptococcus cremoris* จะสามารถยับยั้งการเจริญของ *Streptococcus lactis* ได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบชนิดอื่นได้ เช่น pediocin ที่สร้างจาก *Pediococcus pentosaceus* และ pediocin AcH ที่สร้างจาก *P. acidilactici* สามารถยับยั้งได้เฉพาะ *Staphylococcus aureus* และ *Clostridium perfingens* เท่านั้น (Bhunia et al., 1988) แต่ปัจจุบันได้มีรายงานว่าแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแกรมบวกอื่นๆ สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *E. coli* ได้

2.3.3 ทนความร้อน

เนื่องจากแบคเทอริโอซินส่วนใหญ่เป็นโปรตีนที่มีขนาดเล็ก จึงสามารถทำให้ทนต่อความร้อนได้ การทนความร้อนของแบคเทอริโอซินขึ้นอยู่กับการเตรียมแบคเทอริโอซินโดยที่ crude bacteriocin จะทนความร้อนได้ดีกว่า purified bacteriocin (Devey and Richard, 1981) นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆ เช่น pH ซึ่งแบคเทอริโอซินบางชนิด เช่น enteric DPC1146 ที่ pH 7 อุณหภูมิ 100 °C เวลา 10 นาที จะสูญเสีย activity ถึง 70% (Parente and Hill, 1992) และ piscicolin 126 สามารถทนความร้อนได้สูงในสภาวะที่เป็นกรด ทำให้สามารถนำเอาแบคเทอริโอซินมาใช้ประโยชน์ในการหมักดองต่างๆ และยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมที่ต้องใช้ความร้อนสูงอีกด้วย

2.3.4 ความแตกต่างระหว่างแบคเทอริโอซินกับสารปฏิชีวนะ

แบคเทอริโอซินเป็นสารประกอบประเภทโปรตีน ซึ่งถูกสังเคราะห์โดยการถอดรหัสพันธุกรรมจากยีนสำหรับแบคเทอริโอซิน ส่วนสารปฏิชีวนะเป็นสารที่มีโครงสร้างทางเคมีได้หลายรูปแบบ และมักถูกสังเคราะห์โดยการเปลี่ยนแปลงจาก primary metabolite ไปเป็น secondary metabolite ก่อนที่จะหลั่งออกภายนอกเซลล์ นอกจากนี้แบคเทอริโอซินจะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อย่างจำเพาะ โดยส่วนใหญ่แล้วจุลินทรีย์ที่ถูกยับยั้งการเจริญโดยแบคเทอริโอซิน มักจะเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันกับแบคทีเรียที่ผลิตแบคเทอริโอซิน ส่วนสารปฏิชีวนะจะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ทั้งแบบจำเพาะและไม่จำเพาะ (Lancini and Lorenzetti, 1993)

2.4 การจัดจำแนกแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติก

แบคเทอริโอซินโดยส่วนใหญ่ที่มีการศึกษาจะผลิตจากแบคทีเรียแลคติก และมีคุณสมบัติแตกต่างจากสารปฏิชีวนะจำพวกเปปไทด์อื่นๆ คือสร้างมาจากไรโบโซม (ribosomally synthesized) และจัดเป็นเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites) (Hurst A., 1981) รวมทั้งยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างจะพบเป็นคลัสเตอร์ (Cluster) ใน operon (Jack et al., 1995) ในปัจจุบันมีการจัดจำแนกแบคเทอริโอซินออกเป็น 4 class ซึ่งส่วนใหญ่แบคเทอริโอซินที่พบมักจัดอยู่ใน class I และclass II

2.4.1 Class I

แบคเทอริโอซินชนิด **class I** มีโครงสร้างเป็นเปปไทด์ ที่ทนความร้อนและมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (น้อยกว่า 5 KDa) (Chatterjee, 2005) ซึ่งหลังจากผ่านกระบวนการแปลรหัสแล้วจะเข้ารวมตัวกับกรดอะมิโนแลนไธโอนีน (Lanthionine; Lan) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีไธโออีเทอร์ (thioether) อยู่ในโมเลกุล และเมธิลแลนไธโอนีน (Methyllanthionine; MeLan) (Hurst A., 1981) ในบางครั้งจึงเรียก class I นี้ว่าแลนติไบโอติก(Lantibiotics) แบ่งออกเป็น 2 type หรือ 2 subclass โดยอาศัยความคล้ายคลึงกันทางโครงสร้างเป็นหลักดังนี้

Type A หรือ **subclass Ia** ซึ่งเป็นสารที่มีโครงสร้างเป็นเปปไทด์ที่มีประจุเป็นบวก มีสายยาว ไม่คงรูป และออกฤทธิ์โดยทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียบางสปีชีส์ตัวอย่างของกลุ่มนี้คือ ไนซิน

Type B หรือ **subclass Ib** มีโครงสร้างเป็นเปปไทด์ที่เป็นก้อน (globular) ซึ่งคงรูป และมีประจุลบหรือไม่มีประจุ (Delves-Broughton and J., 1990; Klaenhammer and T. R., 1993) มีฤทธิ์ในการรบกวนการทำงานของเอนไซม์ที่จำเป็นต่อเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียบางชนิด ตัวอย่างของกลุ่มนี้คือ เมอซาซิดิน (Mersacidin) ซึ่งออกฤทธิ์รบกวนการสร้างผนังเซลล์โดยการเข้าเชื่อมต่อกับสารตั้งต้นในการสร้างเปปติโดไกลแคน (Peptidoglycan) ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถสร้างผนังเซลล์ได้ (Brotz et al., 1998)

อย่างไรก็ตามเมื่อเร็วๆ นี้ได้มีการจำแนก subclass ของแลนติไบโอติกเพิ่มขึ้นโดยอาศัยกลไกการออกฤทธิ์ ซึ่งมักจะเกิดความสับสนเนื่องจากสารบางชนิดสามารถออกฤทธิ์ได้หลายแบบ เช่น สามารถทำให้เกิดรู และยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ (Breukink et al., 1999) ในบางครั้งจึงแบ่งแลนติไบโอติกออกเป็น 11 subclass โดยอาศัยความคล้ายคลึงกันของโครงสร้างทางเปปไทด์ (Cotter et al., 2005) ซึ่งแต่ละกลุ่มมีชื่อดังนี้ คือ ไนซิน (Nisin), อีพิเดอมิน (Epidermin), สเตรปติน (Streptin), เปป 5 (pep 5), แลคติซิน 481 (Lacticin 481), เมอซาซิดิน (Mersacidin), แอลทีเอ็นเอ 2 (LtnA 2), ไซโตไลซิน (Cytolysin), แลคโตซิน S (Lactocin S), ซินนามัยซิน (Cinnamycin) และ ซับแลนซิน (Sublancin)

2.4.2 Class II

Class II มีโครงสร้างเป็นเปปไทด์ที่ทนความร้อนและมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (น้อยกว่า 10 KDa) แต่ไม่มีอนุพันธ์ของกรดอะมิโนแลนไธโอนีน ปัจจุบันที่พบมากมี 2 subclass ดังนี้

Subclass IIa มีชื่อว่า Pediocin-like (หรือเรียกว่า *Listeria*-active) (Eijsink et al., 1998) เป็นแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Listeria* ได้ดี ตัวอย่างของแบคเทอริโอซินกลุ่มนี้ได้แก่ Pediocin AcH, Pediocin PA1, Mesentericin Y105, Enteriocin A, และ Sakacin P เป็นต้น (Tichaczek et al., 1992) ตัวที่มีการศึกษามากที่สุด คือ เพดดิโอซิน AcH/PA-1 สารที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้มีความคล้ายคลึงกันทางลำดับของกรดอะมิโน 40-60 เปอร์เซ็นต์ โดยบริเวณ N-terminal ของโครงสร้าง จะมีลำดับของกรดอะมิโนเป็น YGNGVXCXXXXCXV หรือเรียกว่า pediocin box ต่อกับกรดอะมิโนซีสเตอีน 2 ตัว ด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (disulphide bridge) (Eijsink et al., 1998) เนื่องจากฤทธิ์ในการยับยั้งไม่กว้างเหมือนไนซิน โดยจะยับยั้งเฉพาะเชื้อ *Listeria* เท่านั้น จึงไม่ยับยั้งเชื้อตั้งต้นที่ใช้ในหมักอาหาร แต่อย่างไรก็ตามข้อจำกัดก็คือไม่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคชนิดนี้ได้อย่างสมบูรณ์ในอาหาร (Ennahar et al., 1999)

Subclass IIb เป็นแบคเทอริโอซินที่มีโครงสร้างประกอบด้วยองค์ประกอบ 2 ส่วน ประกอบด้วยเปปไทด์ 2 ชนิดที่ทำงานเสริมฤทธิ์กัน (Nissen-Meyer et al., 1992) ถ้าเหลือตัวใดตัวหนึ่งมักจะไม่มีแอคติวิตีหรือมีแอคติวิตีเหลือเล็กน้อยเท่านั้น ตัวอย่างของกลุ่มนี้ คือ แลคตาซินเอฟ (Lactacin F) และแลคโตคอกซินจี (Lactococcin G)

Subclass IIc (*Sec*-dependent bacteriocin) ตัวอย่างเช่น อะซิโดซิน B (Aidocin B), ไดเวอจิซิน A (Divergicin A), แบคทีริโอซิน 31 และเอนเทอโรซิน P (Enterocin P)

Subclass IId ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนที่แตกต่างจาก subclass อื่นๆ ตัวอย่าง เช่น แลคโตคอกซิน A และ B (Lactococcin A & B), ไดอะเซติน B (Diacetin B), อะซิโดซิน 8912 (Acidocin 8912) เป็นต้น (Klaenhammer, 1988)

2.4.3 Class III

ประกอบด้วยแบคเทอริโอซินขนาดใหญ่ ไม่ทนความร้อน จึงแตกต่างจาก class I และ II ตัวอย่างของกลุ่มนี้คือ เฮลเวติซิน J (Helveticin J) และเอนเทอโรไลซิน A (Enterolysin A) (Delves-Broughton & J., 1990)

2.4.4 Class IV

Klaenhammer (1993) ได้เสนอให้มีการแบ่งกลุ่มแบคเทอริโอซินเพิ่มขึ้นอีก 1 class คือ class IV ซึ่งแบคเทอริโอซินในกลุ่มนี้จะมีหมู่กลูซิดิค (Glucidic) และ/หรือลิปิดในโครงสร้างด้วยนอกเหนือจากส่วนที่เป็นโปรตีน ตัวอย่างของแบคเทอริโอซินกลุ่มนี้ เช่น ลิวโคซิน S (Leucocin S) และแลคโตซิน 27 ซึ่งจะมีส่วนของไกลโคโปรตีนในโครงสร้าง หรือมีเซ็นเทอริซิน 52 (Mesenterocin 52) ซึ่งจะพบส่วนของลิโพโปรตีนในโครงสร้าง เป็นต้น (Delves-Broughton., 1990; Klaenhammer, 1993)

2.5 แบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างสารแบคเทอริโอซิน

สารแบคเทอริโอซินที่สังเคราะห์โดยแบคทีเรียบาซิลลัสจะสร้างโดยอาศัยไรโบโซม (Ribosomal mechanism) ซึ่งมีการสร้างขึ้นในระหว่างที่เซลล์อยู่ในช่วงของการเจริญเติบโต และมีรายงานวิจัยที่บ่งชี้ว่า *Bacillus* spp. หลายชนิดที่สามารถผลิตสารแบคเทอริโอซินได้ และคุณสมบัติที่น่าสนใจคือลักษณะการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเป็นแบบ broad spectrum คือยับยั้งได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ซึ่งแตกต่างจากแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก lactic acid bacteria (LAB) ซึ่งมักมีฤทธิ์ยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ใกล้ชิดกันเท่านั้น (Settanni and Corsetti, 2008) ซึ่งผลงานวิจัยของสาร baceriocin ที่ผลิตโดยแบคทีเรีย *Bacillus* spp. สามารถสรุปได้ดังต่อไปนี้

Lebbadi และคณะ (1994) ได้มีการศึกษาสารแบคเทอริโอซินประเภท hydrophilic peptide ชื่อ fungicin ที่สร้างโดย *Bacillus licheniformis* M-4 โดยพบว่าเป็นสารที่มีมวลโมเลกุล 3.4 KDa และมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* และ *Corynebacterium glutamicin* และเชื้อรา *Microsporum canis*, *Mucor mucedo* และ *Sporothrix schenckii*

Paik และคณะ (1998) ได้ศึกษาคุณสมบัติของสารแบคเทอริโอซิน sublancin 168 ซึ่งผลิตโดย *B. subtilis* 168 และพบว่าเป็นสารที่มีคุณสมบัติในการทำลายแบคทีเรียแกรมบวกได้หลายชนิด คือ *B. cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megateriums*, *Staphlococcus aureus* และ *Streptococcus pyrogenes*

Marrec และคณะ (2000) ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีและลักษณะทางพันธุกรรมของสารแบคเทอริโอซิน coagulin ซึ่งผลิตโดย *Bacillus coagulans* และพบว่ายีนที่ควบคุมการแสดงออกของ coagulin จะพบอยู่บนพลาสมิด และลำดับของกรดอะมิโนและคุณสมบัติทางชีวเคมีก็มีความคล้ายคลึงมากกับ pediocin ที่ผลิตจาก *Pediococcus acidilactis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม lactic acid bacteia (LAB) ซึ่งคณะผู้วิจัยได้เสนอแนวคิดว่าอาจจะเกิดจากการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมของ bacteriocin operon ระหว่างแบคทีเรียต่างสายพันธุ์ในธรรมชาติ

Tamehiro และคณะ (2002) ได้ทำการศึกษาสารแบคเทอริโอซิน bacilysocin ซึ่งผลิตโดยแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* โดยจัดเป็นสารประเภท lipopeptide ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์หลายชนิดทั้งแบคทีเรีย *S. aureus*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *B. subtilis*, *Mycobacterium smegmatis* และ เชื้อรา *Candida* spp., *Aspergillus niger*, *Cryptococcus* spp., *Saccharomyces* spp.

Phister และคณะ (2004) ได้รายงานว่าแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่คัดแยกจากแป้งข้าวโพดหมัก (pozol) ของชาว Mayans ในประเทศเม็กซิโกนั้น สามารถผลิตสารแบคเทอริโอซินได้ถึง 3 ชนิด คือ Bacilysin, Chlorotetaine, and Iturin A ซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้ง *E. coli* และ *Absidia* sp. ซึ่ง pozol นั้นได้ถูกใช้ในการรักษาโรคท้องร่วง ลดอาการไข้และรักษาโรคติดเชื้อที่ผิวหนัง มาตั้งแต่อดีตประมาณ 3,500 ปีก่อน

He และคณะ (2005) คัดแยกเชื้อ *Bacillus licheniformis* ZJU12 จากดิน โดยสามารถผลิตสาร bacteriocin-like peptides ที่แสดงกิจกรรมการยับยั้งในช่วงที่กว้าง โดยสามารถยับยั้งได้ทั้ง แบคทีเรียแกรมบวกและเชื้อราที่ก่อโรค แต่ไม่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ ยกเว้น *Xanthomonas oryzae pv. Oryzae* ที่ก่อโรคในข้าว ซึ่ง bacteriocin-like peptides นี้ มีความไวต่อ proteinase K และ trypsin กิจกรรมการยับยั้งเสถียรเมื่อทดสอบด้วยอุณหภูมิ 100 °C เวลา 30 นาที แต่ไม่เกิดกิจกรรมเมื่อทดสอบด้วยอุณหภูมิ 121 °C เวลา 15 นาที และยังสามารถแสดงกิจกรรมได้เมื่อทดสอบด้วย pH 2–9 ซึ่งมี pH ที่เหมาะสมประมาณ 6.5 ไม่มีผลในการต่อต้านของสารต่อหนู แม้จะทดสอบสารพิษรุนแรงด้วยขนาดยาสูงสุดถึง 0.8 mg/20 g

Lisboa และคณะ (2006) ได้ทำการคัดแยกเชื้อจากดินที่มีความสามารถในการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ทำการจำแนกสายพันธุ์ได้เป็น *Bacillus* spp. จากนั้นทำการจัดจำแนกโดยวิธีทางชีวเคมีและการวิเคราะห์ลำดับ 16S rDNA รวมทั้งการวิเคราะห์ทางด้าน Phylogenetic ได้เป็นเชื้อ *B. amyloliquefaciens* และเมื่อทดสอบคุณสมบัติของสารพบว่า สารที่ได้จะสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและก่อให้เกิดอาหารเน่าเสีย เช่น *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *Serratia mercescens* และ *Pasteurella haemolytica* และสารที่ได้จะมีความเสถียรในช่วงอุณหภูมิที่กว้าง และกิจกรรมมากที่สุดในสภาวะที่เป็นกรด และกลาง แต่กิจกรรมสูญเสียเมื่ออุณหภูมิที่ 121°C และไวต่อการทำงานของเอนไซม์ trypsin, papain, proteinase K และ pronase E

Powell และคณะ (2007) คัดแยก *Lactobacillus plantarum* ST8KF ที่สามารถผลิต bacteriocin (bacST8KF) จาก kefir โดยมีขนาดโมเลกุล 3.5 kDa และมีกิจกรรมยับยั้งเชื้อ *L. casei, L. salivarius, L. curvatus* และ *Listeria innocua* โดยสารนี้มีความไวต่อ proteolytic enzymes แต่มีความเสถียรที่ pH 2.0 และ 10.0 และทนต่อความร้อน (121 °C เวลา 20 นาที) พบกิจกรรมสูงสุด (25,600 AU/mL) ในอาหาร MRS broth, MRS broth ที่ใช้ sucrose แทน glucose และ ใน MRS broth ที่มี glucose และเติม KH_2PO_4 บ่ม 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 °C ส่วนการเติม Tri-ammonium citrate และ glycerol มากกว่า 5.0 g/L มีผลต่อการผลิต bacST8KF และ เมื่อหมักที่ 30 °C ในอาหาร MRS broth หลัง 3 ชั่วโมง กิจกรรมจะเพิ่มขึ้นเป็น 800 AU/mL ส่วนหลัง 9 ชั่วโมงมีกิจกรรมเพิ่มเป็น 12,800 AU/mL และหลัง 27 ชั่วโมงมีกิจกรรมเพิ่มเป็น 51,200 AU/mL ซึ่งผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า bacST8KF อาจจะผลิตมาจากช่วง secondary metabolite และมีกลไกการยับยั้งของสารเป็นแบบ bacteriostatic

Cherifa และคณะ (2008) มีการค้นพบแบคเทอริโอซินชนิดใหม่ที่แยกได้จากเชื้อ *B. thuringiensis* subsp. และถูกจัดจำแนกว่าเป็น entomocidus ความสามารถในการเกิดกิจกรรมของสารตัวใหม่นี้จะคล้ายกับ entomocin 110 ซึ่งผลิตมาจากเชื้อช่วง mid-logarithmic growth phase และจะมีการสร้างมากที่สุดในช่วงใกล้ stationary phase ซึ่งแบคเทอริโอซินจะได้มาจากส่วนของ supernatant โดยจะมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Listeria monocytogenes, Paenibacillus larvae* และ*Bacillus* species ซึ่ง entomocin 110 จะมีความทนทานต่อความร้อน และ pH ที่แตกต่าง รวมไปถึงสารละลายอินทรีย์ต่างๆ แต่กิจกรรมของสารจะถูกยับยั้งได้โดยเอนไซม์ proteinase K กลไกการยับยั้งของสารต่อแบคทีเรียจะเป็นแบบ bacteriolytic จากนั้นจึงนำสารที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์บางส่วน โดยตกตะกอนกับ ammonium sulphate ตามด้วยการแยกลำดับส่วน โดยใช้ butanol ทำให้ได้เปปไทด์ที่มีขนาด 4.8 KDa และเมื่อนำข้อมูลของสารที่แยกได้ไปเทียบเคียง เห็นว่ามีความใกล้เคียง entomocin 110 จึงกำหนดให้สารที่ได้เป็น entomocin HD110

Huang และคณะ (2009) ได้ทำการคัดเลือกเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* 05-10 จากผักดอง ซึ่งมีความสามารถในการสร้าง bacteriocin (Pediocin 05-10) ในการยับยั้งเชื้อ *Listeria, Lactobacillus, Streptococcus, Enterococcus, Pediococcus* และ *Leuconostoc* ซึ่ง pediocin 05-10 นี้มีความไวต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีน (proteolytic enzyme) แต่คงที่เมื่อ pH 2-10 และทนความร้อนที่ 121 °C เวลา 15 นาที มันไม่จับที่ผิวของ producer cells แต่มันจะดูดซับทั้งเซลล์ที่ต้านทานและเซลล์ที่มีความไว ผลผลิตของแบคเทอริโอซิน จะได้จากการเจริญเชื้อในระยะ early exponential phase และได้ผลผลิตสูงที่สุดในช่วง early stationary phase ด้วยเหตุผลข้อนี้ทำให้เกิดความเห็นว่า การผลิต pediocin 05-10 ขึ้นอยู่กับช่วงเวลาของการเจริญ ทำให้มันสามารถฆ่าแบคทีเรียได้ นั่นคือเชื้อ *L. monocytogenes* 54002 โดย pediocin 05-10 นี้ มีขนาดโมเลกุลต่ำกว่า 6.5 KDa โดยใช้วิธี tricine SDS-PAGE ในการแยกขนาด ซึ่งการทดลองนี้สามารถนำไปประยุกต์ในการนับจำนวนเชื้อ *L. monocytogenes* 54002 ที่ขึ้นบนหมูแฮม ที่เก็บในอุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 วัน ดังนั้น pediocin 05-10 สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการถนอมอาหารได้ โดยเฉพาะอุตสาหกรรมที่เกี่ยวกับเนื้อสัตว์

2.6 การประยุกต์ใช้สารแบคเทอริโอซินในการถนอมอาหาร

การถนอมอาหาร หมายถึงกระบวนการเก็บและรักษาอาหาร เพื่อชะลอการเน่าเสียของอาหาร หรือป้องกันโรคอาหารเป็นพิษที่มีสาเหตุมาจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรค ในขณะที่ยังรักษาคุณค่าทางโภชนาการ สีสัน และกลิ่นให้คงอยู่ การถนอมอาหารมักจะเกี่ยวข้องกับ การยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรีย เชื้อรา และจุลินทรีย์อื่นๆ และการหน่วงปฏิกิริยาระหว่างไขมันกับออกซิเจนในอากาศ ซึ่งเป็นสาเหตุของการเน่าเสีย (rancidity) ของอาหาร การถนอมอาหารนี้อาจรวมถึงการรักษาอายุตามธรรมชาติและสีสันของอาหารซึ่งเกิดจากการปรุงอาหาร เช่น การเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลของเนื้อแอปเปิลเมื่อสัมผัสกับอากาศ และการถนอมอาหารบางประเภทจำเป็นต้องปิดผนึกอาหารหลังจากที่ผ่านกระบวนการต่างๆ เพื่อป้องกันการเกิดปัจจัยของการเน่าเสีย ทำให้อาหารนั้นสามารถเก็บไว้ได้นานมากกว่าปกติ (Settanni and Corsetti, 2008)

กระบวนการถนอมอาหารอาจประกอบด้วยการให้ความร้อนเพื่อกำจัดหรือทำให้จุลินทรีย์เสื่อมสภาพ เช่น การต้ม การใช้สารเคมีเพื่อให้เกิดปฏิกิริยากับออกซิเจน เช่น ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ การยับยั้งการเกิดสารพิษ เช่น การรมควัน การใช้ คาร์บอนไดออกไซด์ น้ำส้มสายชู แอลกอฮอล์ ฯลฯ การขจัดน้ำออกจากอาหาร เช่น การตากแห้ง การยับยั้งการดูดซึมสารอาหารของจุลินทรีย์ เช่น การเชื่อม การดอง การเก็บรักษาอาหารในอุณหภูมิต่ำ เช่น การแช่แข็ง หรือใช้กระบวนการถนอมอาหารหลายๆ วิธีร่วมกัน

จากสาเหตุที่จุลินทรีย์เป็นสาเหตุสำคัญของการเน่าเสียของอาหารและผลิตภัณฑ์อาหารเองก็เป็นแหล่งที่มีการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคหลายชนิด ทำให้องค์การอนามัยโลก (World Health Organization; WHO) ได้วางกรอบนโยบายที่ต้องนำมาใช้พิจารณาในเรื่องความปลอดภัยของอาหาร (food safety) ไว้ 2 แนวทางคือ (1) การบริโภคอาหารเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดจุลินทรีย์ก่อโรคชนิดใหม่ และ (2) จุลินทรีย์มีความสามารถในการปรับตัวและเปลี่ยนแปลงตัวเอง ซึ่งจะทำให้มีผลกระทบโดยตรงต่อวิธีการผลิตอาหาร การถนอมอาหาร และการผลิตบรรจุภัณฑ์อาหาร (Galvez et al., 2007)

การใช้สารแบคเทอริโอซินในการถนอมอาหารนั้นได้มีการปฏิบัติกันมาตั้งแต่สมัยโบราณ และปัจจุบันก็ได้มีการศึกษาและพัฒนาความรู้ดังกล่าวมาโดยตลอด และพบว่ามีข้อดีหลายประการ คือ (1) เก็บรักษาอาหารไว้ได้นานขึ้น (2) ป้องกันการทำลายสารอาหารด้วยความร้อน (3) ลดความเสี่ยงของการปนเปื้อนจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารผ่านทางห่วงโซ่อาหาร (4) ลดความสูญเสียจากการเน่าเสียของอาหาร (5) ลดการใช้สารเคมี (6) รักษาองค์ประกอบของอาหารได้อย่างสมบูรณ์ เช่น สารอาหาร ไวตามิน และสารอินทรีย์ (7) เกิดผลิตภัณฑ์อาหารประเภทใหม่ เช่น มีความเป็นกรดน้อยลง มีปริมาณเกลือน้อยลง แต่มีปริมาณน้ำมากขึ้น (8) เป็นแรงจูงใจให้อุตสาหกรรมอาหารสามารถผลิตอาหารที่ตรงต่อความต้องการของผู้บริโภค เช่น ไม่มีการใส่สารเคมีกันบูด อาหารมีคุณภาพใกล้เคียงอาหารสดที่ยังไม่ได้ผ่านกระบวนการถนอมอาหาร เป็นต้น (Thomas et al., 2000; Settanni and Corsetti, 2008)

การใช้แบคเทอริโอซินในการถนอมอาหาร ก็มีปัจจัยหลายอย่างที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการทำงานของแบคเทอริโอซิน ได้แก่ ปัจจัยที่เกี่ยวข้องโดยตรงกับอาหาร จุลินทรีย์ทั้งหมดที่อยู่ในอาหาร จุลินทรีย์จำเพาะที่เป็นเป้าหมายของสารแบคเทอริโอซิน (ตารางที่ 2) และสิ่งที่สำคัญอีกประการหนึ่งคือ ความปลอดภัยของสารแบคเทอริโอซินต่อผู้บริโภค ซึ่งในปัจจุบันชนิดของสารแบคเทอริโอซินที่ได้รับการยอมรับและผ่านการรับรองโดยองค์การอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกา (US Food and Drug Administration (FDA)) และมีการใช้เป็นสารถนอมอาหารในอาหารหลายชนิด คือ nisin ซึ่งเป็นสารแบคเทอ

ริโอซินชนิดแรกที่ค้นพบเมื่อปี พ.ศ. 2471 และผลิตโดย LAB ชื่อ *Lactococcus lactis* และมีชื่อทางการค้าว่า Nisaplin™ นอกจากนี้ยังมีการใช้ pediocin PA-1 ซึ่งผลิตโดย LAB ชื่อ *Pediococcus acidilactici* และมีชื่อทางการค้าว่า ALTA™ 2431 (Settanni and Corsetti, 2008) อย่างไรก็ตามการเกิดปรากฏการณ์ดื้อต่อสารแบคเทอริโอซินก็จัดเป็นปัจจัยสำคัญ ที่ต้องมีการศึกษาวิจัยให้มากขึ้น (Galvez et al., 2007) ดังนั้นการค้นคว้าหาสารแบคเทอริโอซินชนิดใหม่จึงมีความสำคัญยิ่งสำหรับการพัฒนาทางด้านเทคโนโลยีถนอมอาหาร

2.7 การประยุกต์ใช้สารแบคเทอริโอซินในบรรจุภัณฑ์อาหาร

จากการตระหนักในเรื่องความปลอดภัยของแบคเทอริโอซินที่ผสมอยู่ในอาหาร ทำให้แนวคิดในการนำแบคเทอริโอซินมาใช้เป็นส่วนประกอบของบรรจุภัณฑ์อาหาร เช่น แผ่นฟิลม์สำหรับห่อหุ้มอาหาร ภาชนะบรรจุอาหาร เป็นต้น ซึ่งได้มีการศึกษาถึงการผสมแบคเทอริโอซินกับโพลิเมอร์หลายชนิด ได้แก่ calcium alginate, gelatin, cellulose, chitosan, soy protein, corn zein, collagen casings, polysaccharide based film, cellophane, polyethylene, nylon เป็นต้น (Pranoto et al., 2005; Cutter, 2006; Galvez et al., 2007; Coma, 2008) โดยเฉพาะอาหารสด เช่น เนื้อ ผักสด ที่ต้องเก็บรักษาในตู้เย็น นั้นมักมีการปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์ก่อโรคที่ทนต่ออุณหภูมิต่ำๆได้ *เช่น P. aeruginosa, Listeria monocytogenes, Yersinia enterolitica, Escherichia coli* O157:H7 ดังนั้นการใช้บรรจุภัณฑ์ที่เป็นแผ่นฟิลม์ที่ผสมสารแบคเทอริโอซิน จะเป็นแนวทางหนึ่งที่ช่วยยืดอายุการเก็บรักษาอาหารไว้ได้ยาวนานขึ้น (Coma, 2008)

2.8 การประยุกต์ใช้แบคทีเรียที่ผลิตสารแบคเทอริโอซินเป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ (probiotics)

จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ (probiotics) หมายถึง จุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่เมื่อได้รับในปริมาณที่เหมาะสมจะทำให้เกิดผลดีต่อสุขภาพของคนหรือสัตว์ (host) โดยการรักษาสมดุลของจุลินทรีย์ประจำถิ่น (normal flora) ภายในร่างกาย ซึ่งเกณฑ์ในการนำมาพิจารณาเพื่อพัฒนาจุลินทรีย์ให้เป็น probiotics นั้น จะต้องคำนึงถึง (1) ความปลอดภัยต่อ host เช่น แหล่งที่มาของจุลินทรีย์ การไม่ก่อโรค (2) เทคโนโลยีในการผลิต เช่น มีความเสถียรทางพันธุกรรม สามารถผลิตได้ปริมาณมาก (3) คุณสมบัติที่ทำให้เป็น probiotics เช่น ทนต่อน้ำย่อยในทางเดินอาหาร เกาะติดกับ mucosa ในระบบทางเดินอาหารได้ (4) คุณสมบัติที่เกี่ยวข้องกับการทำให้ host มีสุขภาพดี เช่น กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของ host ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค ต้านสารก่อมะเร็ง เป็นต้น (Rodgers, 2008; Vasiljevic และ Shah, 2008) จากคุณสมบัติในการผลิตสารแบคเทอริโอซินของ bacteriocinogenic bacteria ซึ่งจัดเป็นคุณสมบัติที่สำคัญประการหนึ่งในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคของ probiotics ทำให้แบคทีเรียดังกล่าว มักมีการศึกษาเพื่อพัฒนาและนำไปใช้เป็น probiotics หลายชนิด โดยเฉพาะแบคทีเรียในกลุ่ม LAB ซึ่งโดยส่วนใหญ่จะมีการคัดแยกมาจากระบบทางเดินอาหารของคนหรือสัตว์ เช่น *Lactobacillus acidophillus, Bifidobacterium lactis* เป็นต้น อย่างไรก็ตามแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* spp. ก็มีการนำไปใช้ประยุกต์เป็น probiotics หลายชนิด ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวมีคุณสมบัติที่น่าสนใจหลายประการ เช่น ความทนทานต่อสภาวะแวดล้อม การสร้างสปอร์ ความสามารถในการผลิตและขับสารหลายชนิดออกมานอกเซลล์ เช่น extracellular enzymes, bacteriocin, antibiotics เป็นต้น ตัวอย่างของ extracellular enzymes ที่ผลิตโดย alkalophilic *Bacillus* spp.ได้แก่ xylanase,

cellulase, amylase, protease (Senesi et al., 2001) ซึ่งจะมีส่วนที่ช่วยส่งเสริมการย่อยสลายสารอาหารที่หลากหลายและทำให้แบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตในสภาพแวดล้อมต่างๆ ได้ดี

ตารางที่ 1 ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการทำงานของสารแบคเทอริโอซินในการถนอมอาหาร (Galvez et al., 2007)

Table 1
Bacteriocin efficacy in foods: limiting factors

Food-related factors
–Food processing conditions
–Food storage temperature
–Food pH, and bacteriocin unstability to pH changes
–Inactivation by food enzymes
–Interaction with food additives/ingredients
–Bacteriocin adsorption to food components
–Low solubility and uneven distribution in the food matrix
–Limited stability of bacteriocin during food shelf life
The food microbiota
–Microbial load
–Microbial diversity
–Bacteriocin sensitivity
–Microbial interactions in the food system
The target bacteria
–Microbial load
–Bacteriocin sensitivity (Gram-type, genus, species, strains)
–Physiological stage (growing, resting, starving or viable but non-culturable cells, stressed or sub-lethally injured cells, endospores...)
–Protection by physico-chemical barriers (microcolonies, biofilms, slime)
–Development of resistance/adaptation

มีการรายงานผลการวิจัยว่าสารแขวนลอยสปอร์ (Enterogermina) ของ *B. cereus, B. clausii, B. pumillus, B. subtilis* ที่หนูทดลองกินเข้าไปนั้น สามารถงอก เกาะติดที่ระบบทางเดินอาหาร (colonization) และกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในหนูได้ (Green et al., 1999; Senesi et al., 2001; Due et al., 2004)

Ziaei-Nejad และคณะ (2006) ได้รายงานผลการศึกษาที่ *Bacillus* spp. สามารถทำหน้าที่เป็น probiotics และส่งเสริมการเจริญและการอยู่รอดของกุ้งขาว (Indian white shrimp: *Fenneropenaeus indicus*) โดยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ amylase, lipase และ protease ในระบบทางเดินอาหารของ

กุ้ง จากคุณสมบัติดังกล่าวทำให้ *Bacillus* spp. เริ่มมีบทบาทสำคัญในการนำมาประยุกต์ใช้เป็น probiotics โดยสามารถใช้รับประทานโดยตรงสำหรับคนและอาจใช้ผสมกับอาหารสำหรับเลี้ยงสัตว์

บทที่ 3
อุปกรณ์ สารเคมี และอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อุปกรณ์

1. จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Petri dish)
2. หลอดทดลอง (Tube) ขนาด 16×150 มิลลิเมตร
3. ขวดรูปชมพู่ (Flask) ขนาด 125, 250 และ500 มิลลิลิตร
4. ปิเปต (Pipette) ขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร
5. บีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 250 มิลลิลิตร
6. ขวดใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ
7. ตัวกรองแบคทีเรีย
8. หลอดปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
9. คีมคีบ (Forcep)
10. จุกสำลี
11. Loop
12. Cork Borer
13. Auto pipette
14. Rack
15. Disc
16. Magnetic stirrer

2. สารเคมี

1. Alcohol 70% และ 95%
2. Crystal violet
3. Methylene blue
4. Safranin
5. Gram iodine
6. Ammonium sulfate
7. Phosphate Buffer Saline pH 7.4
8. Phosphate Buffer pH 7.4
9. SDS gel loading buffer
10. Tris HCl pH 6.8
11. Tris HCl pH 8.8
12. Tris glycine electrophoresis buffer
13. Coomassie gel staining solution

14. Coomassie gel destaining solution
15. Tris-glycine Native polyacrylamide gel running buffer

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Luria-Bertani broth (LB broth)
2. Luria-Bertani agar (LB agar)
3. Cassava starch agar
4. Rice starch agar

4. แบคทีเรีย

1. *Bacillus* spp. BA 145 และ BA 213
2. *Bacillus cereus*
3. *Escherichia coli*
4. *Staphylococcus aureus*
5. *Staphylococcus aureus* (S1-2261)

บทที่ 4
วิธีการดำเนินงานวิจัย

4.1 ศึกษาสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติบางประการของแบคทีเรียสกุล *Bacillus* spp.

4.1.1 การย้อมแกรม

ทำความสะอาดสไลด์ด้วยผงซักฟอก และเช็ดให้แห้ง จากนั้นสเมียร์เชื้อ *Bacillus* spp. ลงบนสไลด์ที่สะอาด ทิ้งไว้ให้แห้งในอากาศแล้วจึงทำการตรึงตัวเซลล์ด้วยการผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง หยด Crystal violet ลงบนเชื้อที่สเมียร์ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วเทสีที่ค้างบนสไลด์ทิ้ง และล้างออกด้วยการผ่านน้ำประปาเบา ๆ หยด Gram's iodine นาน 1 นาที แล้วเททิ้ง สารละลายไอโอดีนจะช่วยให้เซลล์ย้อมติดสีได้ดีขึ้น จากนั้น decolorized โดยการล้างสีด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 95% นาน 30 วินาที ล้างน้ำกลั่นตาม หยดสี safranin บนเชื้อนาน 15-30 วินาที แล้วล้างสีออกด้วยน้ำกลั่น จากนั้น นำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100 เท่า

4.1.2 ทดสอบการย่อยแป้ง

ทำการ Cross streak แบคทีเรีย *Bacillus* spp. แต่ละไอโซเลตลงในอาหาร Rice starch agar และ Cassava starch agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นหยด Gram's iodine ลงบนอาหาร สังเกตการเกิดโซนใสรอบๆ โคโลนีเชื้อ ถ้ามีบริเวณโซนใส แสดงว่าแบคทีเรียมีความสามารถในการย่อยแป้ง

4.2 ศึกษาเวลาที่เหมาะสมกับการเจริญ และการผลิตสาร แบคเทอริโอซิน ของ *Bacillus* spp. ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์แกรมบวกและแกรมลบ

ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทดสอบ 4 ชนิด ได้แก่ *B. cereus*, *E. coli*, *S. aureus* และ *S.*1-2261 ในอาหาร LB broth บ่มเขย่าที่ 30 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำ cell suspension ไปวัดค่า OD_{600}=0.1 แล้วนำมาทำการ swab plate เชื้อทดสอบแต่ละตัวลงบนอาหาร LB agar โดยแบ่งจานอาหารเลี้ยงเชื้อออกเป็น 2 ส่วน จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เจาะหลุมอาหารเลี้ยงเชื้อส่วนละ 2 หลุม จากนั้นเตรียมส่วนใสของ *Bacillus* spp. ที่ได้จากการบ่มเขย่าเป็นเวลา 24, 36 และ 48 ชั่วโมง ในอาหาร LB broth นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำการกรองส่วนใสที่ได้ด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร ดูดส่วนใสที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 50 ไมโครลิตร ของ BA 145 และ BA 213 ลงในอาหารที่ทำการเจาะหลุมไว้ จากนั้นนำไปบ่มที่ 30 °C เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone

4.3 การทำให้ bacteriocin ที่ได้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น

นำส่วนใสปราศจากเชื้อที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus* spp. ในสภาวะที่เหมาะสมไปทำการตกตะกอนโปรตีน โดยการเติม ammonium sulphate ที่ความเข้มข้นเกลือ 20, 30, 40 และ 50% (w/v) ทิ้งไว้ให้เกิดการตกตะกอนโปรตีนที่ 4 °C โดยทำการกวนตลอดเวลาบน magnetic stirrer จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 18000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้งแล้วเก็บตะกอนโปรตีนที่ได้ โดยละลายด้วยน้ำกลั่น

ปลอดเชื้อ 1 มิลลิลิตร นำสารละลายโปรตีนที่ได้บรรจุลงใน dialysis tubing แล้วทำการ dialysis ข้ามคืนที่ 4 °C ทำการกวนตลอดเวลาบน magnetic stirrer นำสารละลายโปรตีนที่ได้ไปทดสอบกิจกรรมในการยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยวิธี agar disc-diffusion assay ใช้ปริมาตร 30 ไมโครลิตร หยดใส่แผ่น disc ขนาด 9 มิลลิลิตร

4.4 ทดสอบผลของอุณหภูมิ, pH และเอนไซม์ที่มีต่อ แบคเทอริโอซิน

นำส่วนใสที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนด้วย 40% ammonium sulphate มาทำการทดสอบด้วยปัจจัยต่างๆ ดังต่อไปนี้

4.4.1 ทดสอบผลของอุณหภูมิต่อ แบคเทอริโอซิน โดยบ่มส่วนใสที่อุณหภูมิ 60 °C และ 100 °C เป็นเวลา 15 นาที

4.4.2 ทดสอบผลของ pH โดยนำส่วนใสมาปรับ pH ให้ได้ 4 และ 10 ด้วย 1N HCl และ 1N NaOH จากนั้นบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 20 นาที

4.4.3 ทดสอบกิจกรรมของ แบคเทอริโอซิน โดยการนำส่วนใส บ่มกับเอนไซม์ trypsin และ pepsin ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml แล้วนำไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

จากนั้นนำทั้งหมดที่กล่าวมาข้างต้นไปทดสอบกิจกรรมในการยับยั้งจุลินทรีย์โดยวิธี agar-disc diffusion assay

4.5 SDS-PAGE

นำส่วน crude bacteriocin ที่ตกตะกอนด้วย 40% ammonium sulphate มาวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลโปรตีนด้วยเทคนิคการแยกโปรตีนตามความแตกต่างของขนาดมวลโมเลกุลด้วยกระแสไฟฟ้าใน polyacrylamide gel ที่มี sodium dodecyl sulfate (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE) โดยเตรียมเจลที่ความเข้มข้นของ 15% separating gel และ 4% stacking gel แล้วทำการโหลดตัวอย่างที่ผสม 6X gel loading dye ที่มีปริมาตรสุดท้าย 25 ไมโครลิตร (1X) แยกโปรตีนโดยใช้ศักย์ไฟฟ้า 150 โวลต์ เป็นเวลา 45-60 นาที โดยเทียบกับมวลโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานชนิดมวลโมเลกุลต่ำ SM 0671 นำเจลที่ได้มาทำการย้อมสีด้วย Coomassie Blue Stain เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทำการล้างสีย้อมออกด้วย Destaining Solution แล้วสังเกตแถบที่เกิดขึ้น ส่วนที่สองที่มีแบคเทอริโอซินของ BA 145 และ BA 213 นำไปล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2-3 รอบ แล้วทดสอบกิจกรรมของแบคเทอริโอซิน ทั้ง 2 เชื้อ โดยนำไป overlay กับเชื้อทดสอบ

4.6 Native-PAGE

นำส่วน crude bacteriocin ที่ตกตะกอนด้วย 40% ammonium sulphate มาวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลโปรตีนด้วยเทคนิคการแยกโปรตีนตามความแตกต่างของขนาดมวลโมเลกุลด้วยกระแสไฟฟ้าใน polyacrylamide gel ที่ไม่มี sodium dodecyl sulfate (Native polyacrylamide gel electrophoresis; Native-PAGE) โดยเตรียมเจลคล้ายกับ SDS-PAGE แต่ต่างที่ไม่เติม 10% SDS แล้วทำการโหลดตัวอย่างที่ผสม loading dye ที่มีปริมาตรสุดท้าย 25 ไมโครลิตร แยกโปรตีนโดยใช้ศักย์ไฟฟ้า 150 โวลต์ เป็นเวลา 45-60 นาที โดยเทียบกับมวลโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานชนิดมวลโมเลกุลต่ำ SM 0671 นำ

เจลส่วนแรกที่มี Protein Marker, bacteriocin ของ BA 145 และ BA 213 มาทำการย้อมสีด้วย Coomassie Blue Stain เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทำการล้างสีย้อมออกด้วย Destaining Solution แล้วสังเกตแถบที่เกิดขึ้น ส่วนที่สองที่มี แบคเทอริโอซิน ของ BA 145 และ BA 213 นำไปล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2-3 รอบ แล้วทดสอบกิจกรรมของ แบคเทอริโอซิน ทั้ง 2 เชื้อ โดยนำไป overlay กับเชื้อทดสอบ

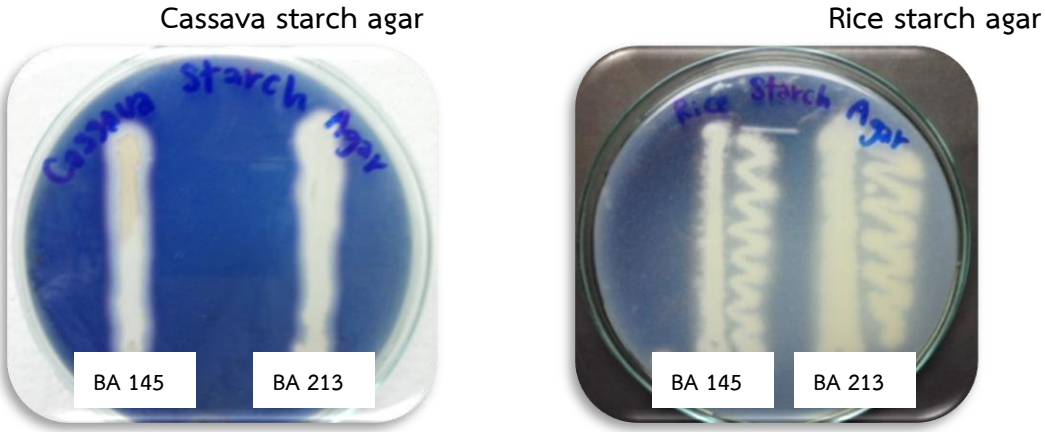
บทที่ 5
ผลการวิจัย

5.1 ผลการบ่งชี้เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย

จากการบ่งชี้เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย 4 ไอโซเลต ได้แก่ BA 145, BA 151, BA 213 และ BA 344 โดยใช้การย้อมสีแกรม รูปร่างและชุดทดสอบทางชีวเคมี API 50 CHB พบว่าเป็นแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลตเป็นแกรมบวก รูปร่างเป็นแท่ง น่าจะจัดอยู่ใน species *Bacillus licheniformis* (85%), *Bacillus licheniformis* (87%) , *Bacillus subtilis* (94%) หรือ *Bacillus amyloliquefaciens* (89%) ตามลำดับ และไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (รูปที่ 1) แบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลต สามารถย่อยแป้งได้ดี (รูปที่ 2) ซึ่งอาจนำไปพัฒนาเพื่อเพาะเลี้ยงในวัตถุดิบที่เป็นแป้งที่มีราคาถูกได้ และการที่แบคทีเรียไม่สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดแดงบนอาหาร blood agar เป็นการบ่งชี้เบื้องต้นว่าแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลต ไม่น่าจะเป็นสายพันธุ์ที่อันตรายหรือก่อโรค

ก ข ค

รูปที่ 1 (ก) ลักษณะการติดสีแกรมของ BA 213 (ข) ผลการทดสอบทางชีวเคมี API 50 CHB ของ BA 213 (ค) ผลการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ของ *Bacillus* spp.



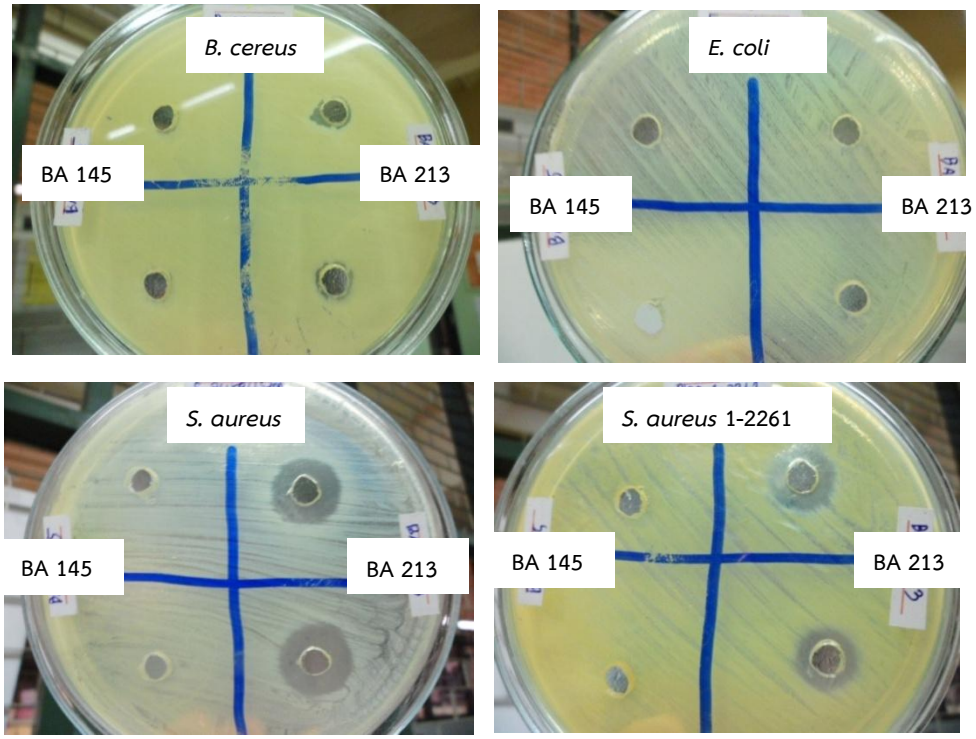
รูปที่ 2 ลักษณะการย่อยแป้งมันสำปะหลัง (cassava starch) และแป้งข้าวเจ้า (rice starch) ของ *Bacillus* spp. BA 145 และ BA 213

5.2 ผลการศึกษาคุณสมบัติของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

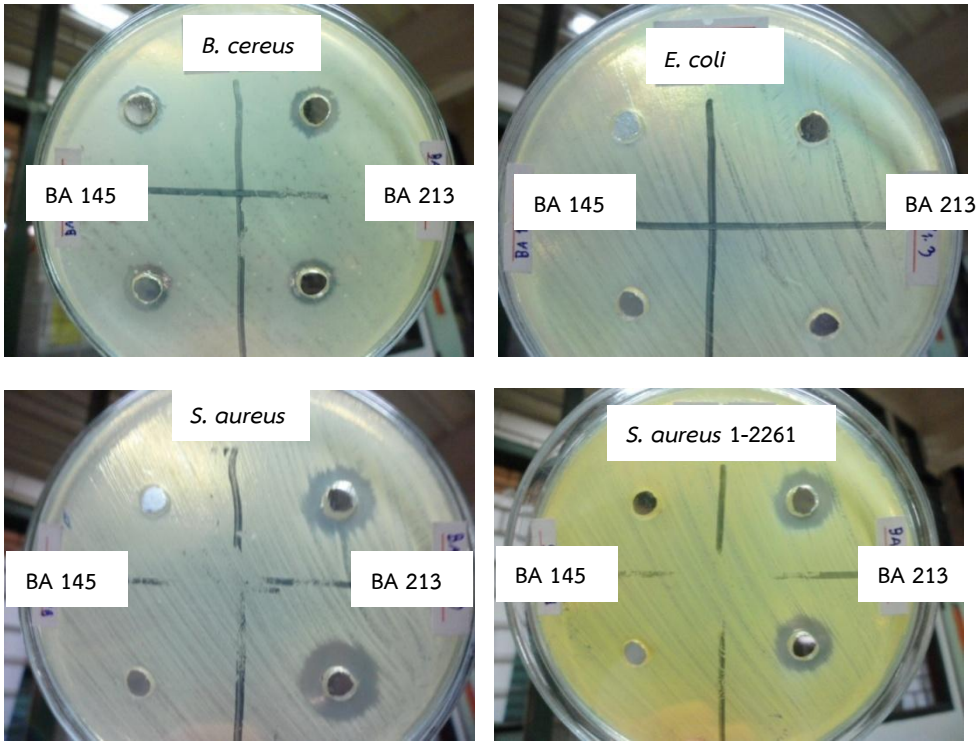
จากการศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดหยาบที่มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลต ด้วยวิธี agar well diffusion พบว่า BA 145 และ BA 213 มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคชนิดแกรมบวก 2 ชนิดได้ดี คือ *Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus* จึงคัดเลือกแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลต เพื่อนำไปศึกษาต่อไป

5.3 เวลาที่เหมาะสมเพื่อคัดเลือก *Bacillus* spp. ที่มีความสามารถในการผลิตสารแบคเทอริโอซิน

เมื่อเพาะเลี้ยง BA 145 และ BA 213 ในอาหารเหลว LB เป็นเวลา 24, 36 และ 48 ชั่วโมง และนำส่วนใส (cell free supernantant) มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus*, *E. coli*, *S. aureus* และ *S. aureus* (*S.*1-2261) โดยวิธี agar-well diffusion assay และสังเกตการเกิด inhibition zone ในช่วงเวลาของการบ่มที่ 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าทั้ง BA 145 และ BA 213 มีความสามารถในการผลิตสารแบคเทอริโอซินได้ดี โดยสารแบคเทอริโอซินของ BA 145 สามารถยับยั้งได้เฉพาะ *B. cereus* ในขณะที่ สารแบคเทอริโอซินของ BA 213 สามารถยับยั้งได้ทั้ง *B. cereus, S. aureus* และ *S.*1-2261 ซึ่งทั้ง 2 ไอโซเลตให้กิจกรรมสูงสุดที่เวลา 48 ชั่วโมง (รูปที่ 3 และตารางที่ 3) แต่เนื่องจาก inhibition zone ที่ได้ในแต่ละช่วงเวลามีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่ไม่แตกต่างกัน จึงเลือกที่เวลา 24 ชั่วโมง มาใช้เป็นเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อทดสอบการผลิตสารแบคเทอริโอซินต่อไป



รูปที่ 3 ฤทธิ์ของสารแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Bacillus* spp. BA 145 และ BA 213 ที่มีต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *B. cereus E. coli S. aureus* และ *S. aureus* 1-2261 หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 4 ฤทธิ์ของสารแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Bacillus* spp. BA 145 และ BA 213 ที่มีต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *B. cereus E. coli S. aureus* และ *S. aureus* 1-2261 หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ตารางที่ 2 ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *B. cereus*, *E. coli*, *S. aureus* และ *S. aureus* 1-2261ของสารแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Bacillus* spp. BA 145 และ BA 213

Incubation Time (hr.)	Tested organism	Inhibition zone (mm)			
		BA 145		BA 213	
		24	48	24	48
24	*B. cereus*	7.75	7.75	9.00	9.00
	E. coli	-	-	-	-
	S. aureus	-	-	15.25	15.00
	S. aureus 1-2261	-	-	12.75	10.75
36	*B. cereus*	10.00	10.00	9.75	9.75
	E. coli	-	-	-	-
	S. aureus	-	-	14.25	13.50
	S. aureus 1-2261	-	-	14.00	11.50
48	*B. cereus*	10.75	10.75	10.50	11.25
	E. coli	-	-	-	-
	S. aureus	-	-	15.75	14.25
	S. aureus 1-2261	-	-	13.50	11.50

5.4 การทำให้ แบคเทอริโอซิน ที่ได้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น

จากการนำส่วนใสไปตกตะกอนโปรตีนด้วย 30, 40 และ 50% (w/v) ammonium sulphate แล้วนำไปกำจัดเกลือออกด้วยวิธี dialysis จากนั้นนำไปทดสอบ activity โดยวิธี disc-diffusion assay โดยใช้ปริมาตร 30 µl พบว่าส่วนใสของ BA 145 และ BA 213 ที่ตกตะกอนโปรตีนด้วยความเข้มข้น 40% ammonium sulphate (AS) สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ และพบว่า 40% AS bacteriocin ของ BA 145 จะให้ inhibition zone กว้างที่สุดเมื่อทดสอบกับเชื้อ *B. cereus* ส่วน 40% AS bacteriocin ของ BA 213 จะเกิด inhibition zone กว้างที่สุดเมื่อทดสอบกับเชื้อ *S. aureus*

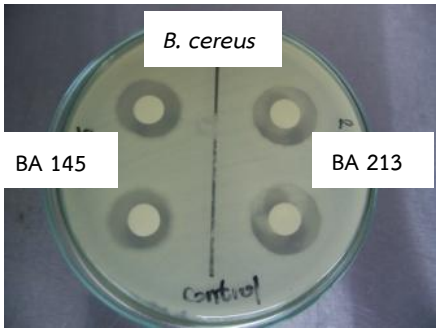
ตารางที่ 3 ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *B. cereus*, *E. coli*, *S. aureus* และ *S. aureus* 1-2261ของ BA 145 และ BA 213 ที่ตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือที่มีความเข้มข้น 30%, 40%, 50% ammonium sulphate เมื่อเทียบกับส่วนใสที่ไม่ได้ตกตะกอน (control)

Tested organism	Inhibition zone (mm)							
	BA 145				BA 213			
	Control	30%AS	40% AS	50% AS	Control	30% AS	40% AS	50% AS
B. cereus	10.50	15.50	19.00	13.00	10.00	13.00	12.00	15.00
E. coli	-	-	-	-	-	-	-	-
S. aureus	-	-	13.75	10.00	15.25	20.50*	20.50	19.50
S. aureus 1-2261	-	-	13.75	10.25	12.75	17.50	18.50	18.00

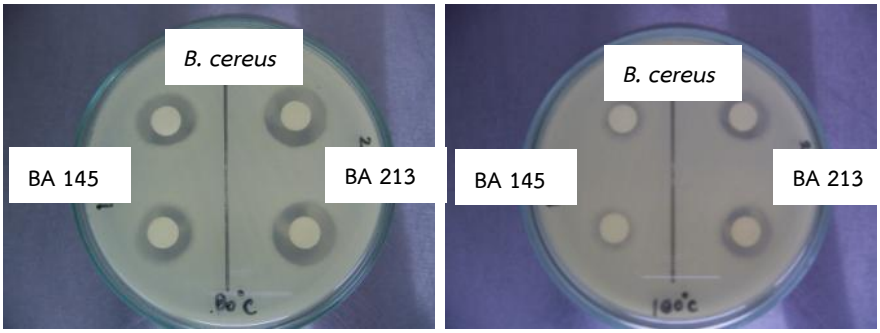
*หมายเหตุ: มี colony ของเชื้อกว้างกว่า 40%AS

5.5 ผลของอุณหภูมิ, pH และเอนไซม์ที่มีต่อ แบคเทอริโอซิน

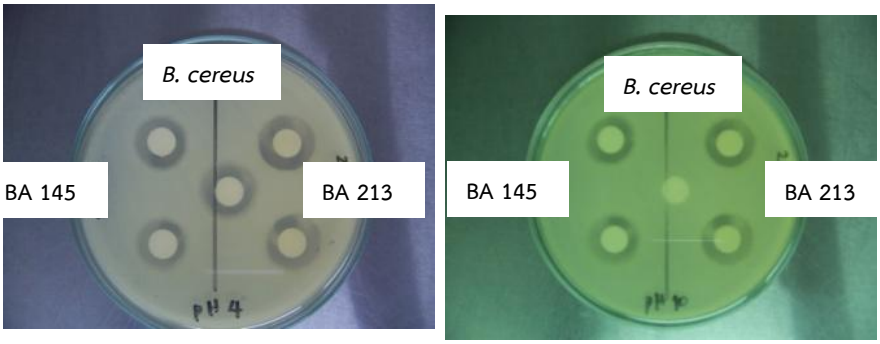
จากการนำส่วนที่ตกตะกอนโปรตีนด้วย 40% ammonium sulphate มาทำการทดสอบด้วยปัจจัยต่างๆ พบว่า 40% AS bacteriocin ของ BA 145 เมื่อทดสอบด้วยอุณหภูมิ 60 °C และ 100 °C เป็นเวลา 15 นาที และ ทดสอบด้วย pH 4 และ 10 บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 20 นาที สามารถยับยั้ง *B. cereus* ได้แต่ที่อุณหภูมิ 60 °C และ 100 °C เป็นเวลา 15 นาที และ pH 4 และ10 กลับไม่สามารถเกิด inhibition zone กับเชื้อ *S. aureus* ส่วนที่ทดสอบด้วยเอนไซม์ 1 mg/ml trypsin และ pepsin ยังสามารถพบ inhibition zone ได้เพียงเล็กน้อย และ 40% AS bacteriocin ของ BA 213 มีความเสถียรเมื่อทดสอบกับทุกปัจจัย โดยสามารถเกิด inhibition zone ได้ดีกับเชื้อทดสอบทั้ง 2 ชนิด โดยเฉพาะกับเชื้อ *S. aureus* เกิด inhibition zone ได้กว้างที่สุด



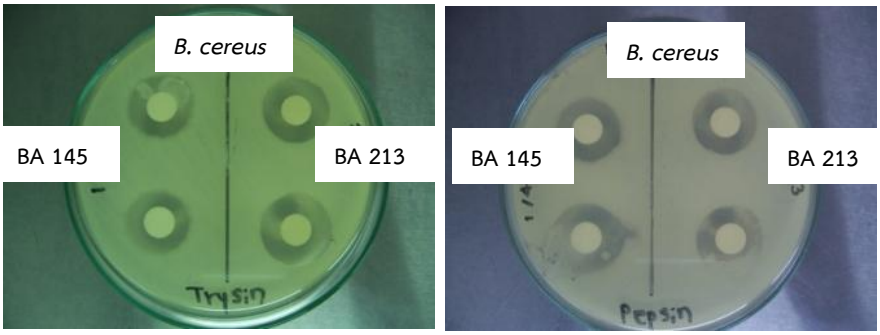
Control ของ BA145 และ BA 213 ในการยับยั้งเชื้อ *B. cereus*



60 °C 100 °C

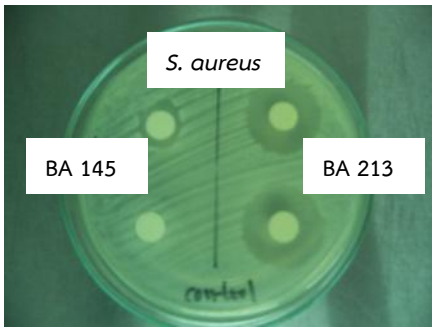


pH 4 pH 10

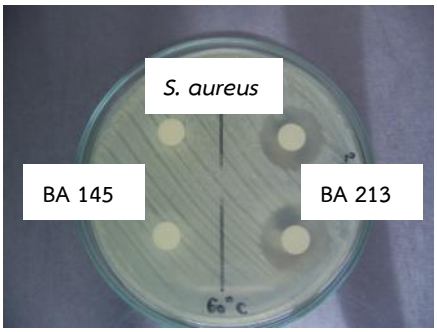


Trypsin Pepsin

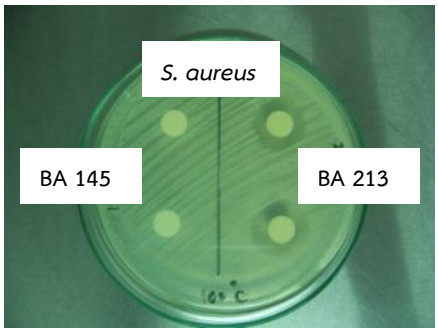
รูปที่ 5 ลักษณะ inhibition zone ของ BA 145 และ BA 213 ในการยับยั้ง *B. cereus* เมื่อทดสอบด้วยปัจจัยต่างๆ เทียบกับส่วนใสที่ตกตะกอนโปรตีนด้วย 40% ammonium sulphate ที่ไม่ได้ทดสอบด้วยปัจจัยดังกล่าว (control)



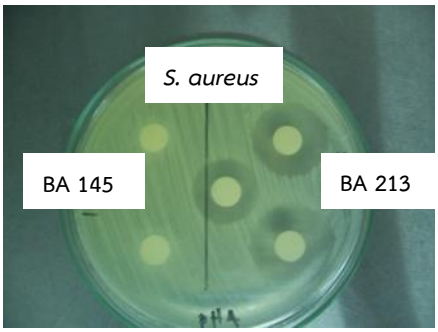
Control ของ BA145 และ BA 213 ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus*



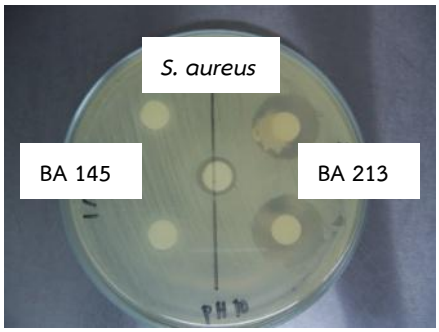
60 °C



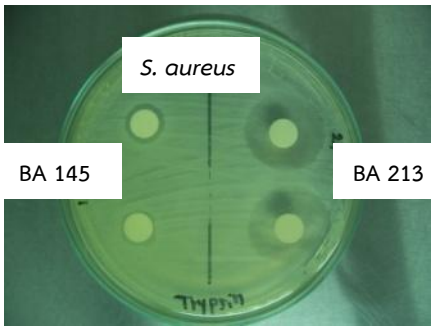
100 °



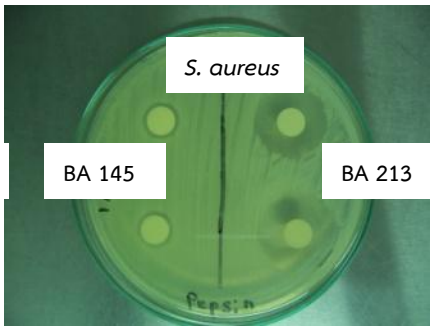
pH 4



pH 10



Trypsin



Pepsin

รูปที่ 6 ลักษณะ inhibition zone ของ BA 145 และ BA 213 ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* เมื่อทดสอบด้วยปัจจัยต่างๆ เทียบกับส่วนใสที่ตกตะกอนโปรตีนด้วย 40% ammonium sulphate ที่ไม่ได้ทดสอบด้วยปัจจัยดังกล่าว (control)

ตารางที่ 4 ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* และ *S. aureus* ของ BA 145 เมื่อทดสอบด้วยปัจจัยต่างๆ เทียบกับส่วนใสที่ตกตะกอนโปรตีนด้วย 40% ammonium sulphate ที่ไม่ได้ทดสอบด้วยปัจจัยดังกล่าว (control)

เชื้อ	Inhibition zone (mm.) ของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก BA 145						
	Control	60 ℃	100 ℃	pH 4	pH 10	Trypsin	Pepsin
B. cereus	15.67	14.75	14.00	15.00	13.75	17.25	15.75
S. aureus	14.00	-	-	-	-	11.50	11.00

ตารางที่ 5 ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* และ *S. aureus* ของ BA 213 เมื่อทดสอบด้วยปัจจัยต่างๆ เทียบกับส่วนใสที่ตกตะกอนโปรตีนด้วย 40% ammonium sulphate ที่ไม่ได้ทดสอบด้วยปัจจัยดังกล่าว (control)

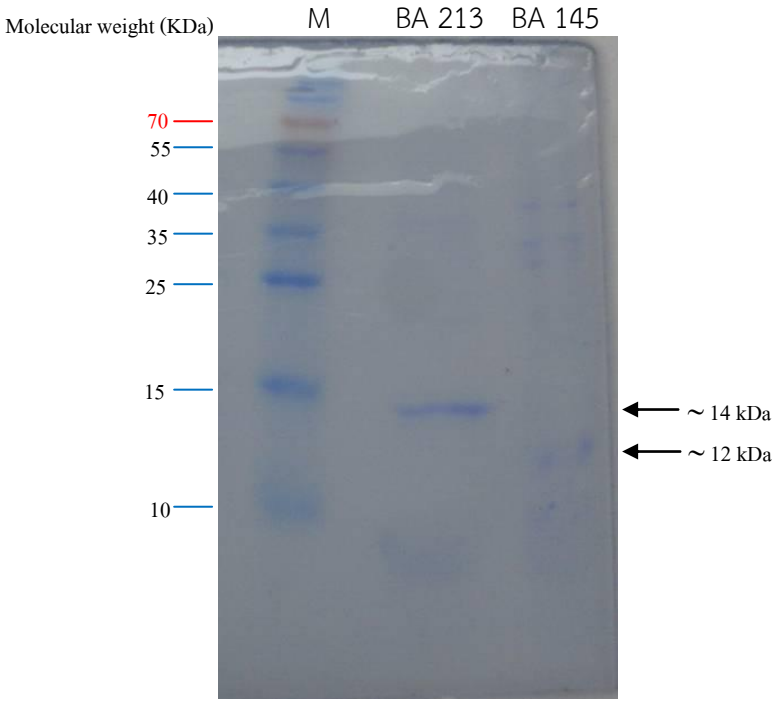
เชื้อ	Inhibition zone (mm.) ของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก BA 213						
	Control	60 ℃	100 ℃	pH 4	pH 10	Trypsin	Pepsin
B. cereus	18.13	17.75	13.75	17.00	15.50	17.75	16.75
S. aureus	25.63	23.25	23.00	24.00	19.00	22.75	24.00

5.6 SDS-PAGE

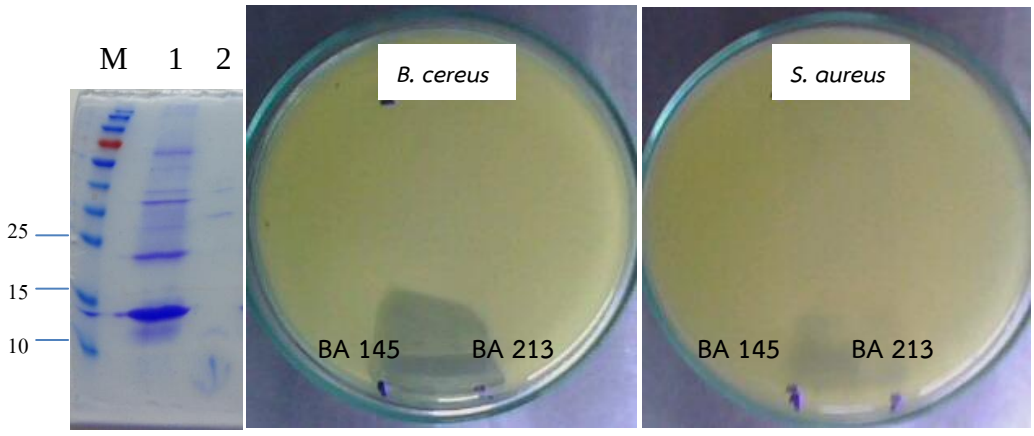
จากผลการทดสอบพบว่า เกิดแถบโปรตีนของแบคเทอริโอซิน ขึ้น โดยพบว่า BA 145 เกิดแถบโปรตีนหลายแถบ แต่แถบที่สนใจมีมวลโมเลกุลประมาณ 12 kDa ส่วน BA 213 มีมวลโมเลกุลประมาณ 14 kDa (รูปที่ 7)และนำไปทดสอบด้วยวิธี overlay พบ inhibition zone ที่มีแถบโปรตีนขนาด 12-14 kDa เมื่อทดสอบกับ *B. cereus* และ *S. aureus* (รูปที่ 8)

5.7 Native-PAGE

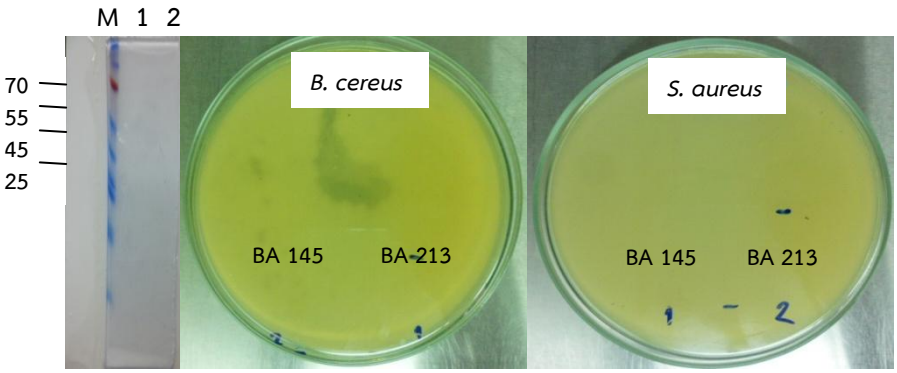
จากผลการย้อมด้วยสี coomassie blue ไม่พบแถบโปรตีนเกิดขึ้น แต่เมื่อนำไปทดสอบด้วยวิธี Overlay พบว่าเกิด inhibition zone ในจานอาหารที่ทดสอบด้วยเชื้อ *B. cereus* ซึ่งมีช่วงมวลโมเลกุลอยู่ในช่วงประมาณ 25-70 kDa และแถบที่ 2 อยู่ในช่วงประมาณ 25-40 kDa (รูปที่ 9)



รูปที่ 7 การวิเคราะห์ขนาดของโปรตีนที่ตกตะกอนโปรตีนด้วย 40% ammonium sulphate ด้วยวิธี SDS-PAGE M: Protein Marker #SM 0671



รูปที่ 8 การวิเคราะห์ขนาดโปรตีนที่ตกตะกอนโปรตีนด้วย 40% ammonium sulphate ด้วยวิธี SDS-PAGE 1: 40% AS bacteriocin ของ BA 213, 2: 40% AS bacteriocin ของ BA 145, M: Protein Marker #SM 0671 และ inhibition zone ที่เกิดจากการ overlay ด้วย *B. cereus* และ *S. aureus*



รูปที่ 9 การวิเคราะห์ขนาดโปรตีนที่ตกตะกอนโปรตีนด้วย 40% ammonium sulphate ด้วยวิธี Native-PAGE 1: 40% AS bacteriocin ของ BA 213, 2: 40% AS bacteriocin ของ BA 145 และ M: Protein Marker #SM 0671 และ inhibition zone ที่เกิดจากการ overlay ด้วย *B. cereus* และ *S. aureus*

บทที่ 6
สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

จากการทดลองเพื่อศึกษาคุณสมบัติในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรค (Pathogens) โดยเชื้อ *Bacillus* spp. พบว่ามี 2 ไอโซเลต ได้แก่ BA 145 และ BA 213 มีการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งสูงสุด จึงนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป

ในการศึกษาเวลาที่เหมาะสมเพื่อคัดเลือก *Bacillus* spp. ที่มีความสามารถในการผลิตสาร แบคเทอริโอซิน พบว่า ทั้ง BA 145 และ BA 213 มีความสามารถในการผลิตสาร แบคเทอริโอซิน ซึ่งทั้ง 2 ไอโซเลต ให้กิจกรรมสูงสุดที่เวลา 48 ชั่วโมง แต่เนื่องจาก inhibition zone ที่ได้ในแต่ละช่วงเวลามีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางที่ไม่แตกต่างกันมากนัก จึงเลือกที่เวลา 24 ชั่วโมง มาใช้ในการเลี้ยงเชื้อ และใช้เป็นเวลาในการบ่มเชื้อเพื่ออ่านผลการทดลองในการทดลองต่อไป

จากการนำส่วนใส ที่ปราศจากเชื้อ (cell free supernatant) ที่มี crude bacteriocin ไปตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือ ammonium sulphate ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า BA 145 และ BA 213 ที่ตกตะกอนโปรตีนด้วยความเข้มข้น 40% (w/v) ammonium sulphate มีกิจกรรมในการยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ โดยพบว่า crude bacteriocin ของ BA 1/4.5 จะให้ inhibition zone กว้างที่สุดเมื่อทดสอบกับ *B. cereus* แต่ไม่เกิด inhibition zone กับ *S. aureus* ส่วน crude bacteriocin ของ BA 213 จะเกิด inhibition zone กว้างที่สุดเมื่อทดสอบกับเชื้อ *S. aureus* ดังนั้นจึงเลือกเชื้อทดสอบ 2 ชนิดนี้ ไปใช้ในการทดลองครั้งต่อไป

จากการนำส่วนที่ตกตะกอนโปรตีนด้วย 40% ammonium sulphate มาศึกษาผลของ ปัจจัยต่างๆ พบว่า แบคเทอริโอซิน ของ BA 145 เมื่อทดสอบด้วยอุณหภูมิ 60 °C และ 100 °C เป็นเวลา 15 นาที และ ทดสอบด้วย pH 4 และ 10 บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 20 นาที สามารถยับยั้ง *B. cereus* ได้ แต่ที่อุณหภูมิ 60 °C และ 100 °C เป็นเวลา 15 นาที และที่ pH 4 และ10 ไม่สามารถยับยั้งกับเชื้อ *S. aureus* ได้ และการทดสอบด้วย 1 mg/ml trypsin และ pepsin จะพบ inhibition zone เพียงเล็กน้อย และส่วนแบคเทอริโอซิน ของ BA 213 มีความเสถียรเมื่อทดสอบกับทุกปัจจัย โดยสามารถเกิด inhibition zone ได้ดีกับเชื้อทดสอบทั้ง 2 ชนิด โดยเฉพาะกับเชื้อ *S. aureus* เกิด inhibition zone ได้กว้างที่สุด แต่ก็พบว่า 1N HCl ที่ใช้เป็น control เกิด inhibition zone กับทดสอบได้เช่นกัน ซึ่งก็อาจเป็นไปได้ว่า inhibition zone ที่เกิดขึ้นอาจมาจากผลของกรดด้วย ส่วน 1N NaOH สามารถเกิด inhibition zone กับเชื้อ *S. aureus* แต่เมื่อนำ 1N HCl และ 1N NaOH ทดสอบร่วมกับ BA 145 ที่ pH 4 และ 10 กลับไม่เกิด inhibition zone กับเชื้อ *S. aureus* อาจเป็นไปได้ว่า BA 145 สามารถกดการทำงานของกรดและเบสได้ ซึ่งควรใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาในงานวิจัยต่อไป

จากผลการทดสอบการแยกโปรตีนโดย SDS-PAGE พบว่าโปรตีนของ BA 145 เกิดแถบโปรตีนหลายแถบ แต่แถบที่สนใจมีมวลโมเลกุลประมาณ 12 kDa ส่วน BA 213 มีมวลโมเลกุลประมาณ 14 kDa เมื่อเทียบกับ Protein Marker และนำไปทดสอบด้วยวิธี Overlay พบ inhibition zone ที่มีแถบโปรตีนขนาด 12-14 kDa เมื่อทดสอบกับ *B. cereus* และ *S. aureus*

จากผลการทดสอบการแยกโปรตีนด้วย Native-PAGE พบว่า ไม่พบแถบโปรตีนเกิดขึ้น แต่เมื่อนำไปทดสอบด้วยวิธี Overlay กลับพบ inhibition zone ในจานอาหารที่ทดสอบด้วยเชื้อ *B. cereus* ซึ่งมีช่วงมวลโมเลกุลอยู่ในช่วงประมาณ 25-70 kDa และแถบที่ 2 อยู่ในช่วงประมาณ 25-40 kDa ซึ่งมีขนาดโมเลกุลที่ค่อนข้างใหญ่เกินไปสำหรับสารแบคเทอริโอซิน แสดงว่าสารแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากทั้ง BA 145 และ BA 213 อาจมีความทนทานต่อการเกิด denaturation จาก SDS detergent จึงควรมีการทดสอบกับสาร detergents ชนิดอื่นๆ เพิ่มเติม

เอกสารอ้างอิง

Ananou, S., Maqueda, M., Martinez-Bueno, M. Galvez, A., and Valdivia, E. 2005. Control of *Staphylococcus aureus* in sausages by enteriocin AS-48. *Meat Sci.* 71: 549-556.

Arakawa, K., Kawai, Y., Lioka, H., Tanioka, M., Nishimura, J. Kitazawa, H., Tsurumi, K., and Saito, T. 2009. Effects of gassericins A and T, baceriocins produced by *Lactobacillus gasseri*, with glycine on custard cream preservation. *J. Daily Sci.* 92: 2365-2372.

Bhunia, A, Johnson, M.C. Ray and B. 1988. Purification characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*, *Appl. Bacteriol*. 65: 261- 268.

Chatterjee, C., Paul, M., Xie, L. and van der Donk, W.A. 2005. Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. *Chemistry Reviews* 105: 633-683.

Cladera-Olivera, F., Caron, G.R., and Brandelli, A. 2004. Bacteriocin-like substance production by Bacillus licheniformis strain P40. *Letters in Applied Microbiology* 38, 251–256.

Cutter, C.N. 2006. Opportunities for bio-based packaging technologies to improve the quality nad safety of fresh and further processed muscle foods. *Meat Sci*. 74: 131-142.

Coma, V. 2008. Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. *Meat Sci.* 78: 90-103.

Due, L.H., Hong, H.A., Barbosa, T.M., Henriques, A. O., and Cutting, S. 2004. Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. *App. Env. Micro.* 70(4): 2161-2171.

Eijsink, V. G. H., Skeie, M., Middelhoven, P. H., Brurberg, M. B. and Nes, I.F. 1998. Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 3275-3281.

Ennahar, S., Sonomoto, K. and Ishizaki, A. 1999. Class IIa bacteriocins from lactic acid bacteria: antibacterial activity and food preservation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 87: 705-716.

Galvez, A., Abriouel, H., Lopez, R.L., and Omar, N.B. 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Micro*. 120: 51-70.

Grande, M.J. et al. 2006. Inhibition of toxigenic *Bacillus cereus* in rive-based foods by enterocin AS-48. *Int. J. Food. Microbiol*. 106: 185-194.

Green, D.H. et al. 1999. Characterization of two *Bacillus* probiotics. App. Env. Micro. 65(9): 4288-4291.

He, L., Chen W. and Liu Y. 2005. Production and partial characterization of bacteriocin-like pepitdes by *Bacillus licheniformis* ZJU12. *Microbiological Research* 161: 321-326.

Huang, Y., Luo, Y., Zhai, Z., Zhang, H., Yang, C., Tian, H., Li, Z., Feng, J., Liu, H. and Hao, Y. 2009. Characterization and application of an anti-Listeria bacteriocin produced by

Pediococcus pentosaceus 05-10 isolated from Sichuan Pickle, a traditionally fermented vegetable product from China, *Food Control* 20: 1030-1035.

Jack, R. W., Tagg, J. R. and Ray, B. 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiological Reviews* 59: 171-200.

Klaenhammer, T. R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 12: 39-86.

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

Leal-Sanchez, M.V., Jimenes-Diaz, R., Maldonado-Barragan, A., Garrido-Fernandez, A., and Ruiz-Barba, J.L. 2002. Optimization of bacteriocin production by batch fermentation of *Lactobacillus plantarum* LPCO10. *App. Env. Micro.* 68(9): 4465-4471.

Lebbadi, M., Gálvez, A., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M. and Valdivia, E. 1994. Fungicin M4: a narrow spectrum peptide antibiotic from *Bacillus licheniformis* M-4. *J. Applied Bact.* 77(1):49-53.

Lisboa, M. P., Bonatto, D., Bizani, D., Henriques, J. A., and Brandelli, A. 2006. Characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from the Brazilian atlantic forest. *Int. Microbiol*. 9:111-118.

Marrec, C.L., Hyronimus, B., Bressollier, P., Verneuil, B. and Urdaci, M.C. 2000. Biochemical and genetic charaterization of coagulin, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocin, produced by *Bacillus coagulans* I_4. *App. Envi. Micro.* 66(12): 5213-5220.

Molinos, A. C., Abriouel, H., Lopez, R. L., Omar, N. B., and Valdivia, E. 2008. Inhibition of *Bacillus cereus* and *Bacillus weihenstephanensis* in raw vegetables by application of washing solutions containing enterocin AS-48 alone and in combination with other antimicrobials. *Food Microbiol.* 25: 762-770.

Paik, S. H., Chakicherla, A., and Hansen, J. N. 1998. Identification and characterization of the structural and transporter genes for, and the chemical and biological properties of sublancin 168, a novel lantibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. *J. Biol. Chem.* 273(36): 23134-23142.

Parente, E. and Hill, C., 1992. Characterization of enterocin 1146, a bacteriocin from *Enterococcus faecium* inhibitory to *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 55, 497–502.

Phister, T. G., O'Sullivan, D. J., and McKay, L. 2004. Identification of bacilysin, chlorotetaine, and iturin A produced by *Bacillus* sp. strain CS93 isolated from Pozol, a Mexican fermented maize dough. *App. Env. Micro*.70(1): 631-634.

Pranoto, Y., Rakshit, S. K. and Salokhe, V. M. 2005. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. *LWT* 38: 859-865.

Powella J. E., Witthuhna R. C., Todorovb S. D. and Dicks, L. M. T. 2007. Characterization of bacteriocin ST8KF produced by a kefir isolate *Lactobacillus plantarum* ST8KF. *International Dairy Journal* 17: 190–198.

Rodgers, S. 2008. Novel applications of live bacteria in food services: probiotics and protective cultures. Trends Food Sci. Tech. 19: 188-197.

Senesi, S., Celandroni, F., Tavanti, A., and Ghelardi, E. 2001. Molecular characterization and identification of *Bacillus clausii* strains merketed for use in oral bacteriotherapy. *App. Env. Micro*. 67(2): 834-839.

Settanni, L. and Corsetti, L. 2008. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *Int. J. Food Micro*. 121: 123-138.

Tamehiro, N., Okamoto-Hosoya, Y., Okamoto, S., Ubukata, M., Hamada, M., Naganawa, H. and Ochi, K. Bacilysocin, a novel phospholipid antibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. *Antimicro. Agents Chemo*. 46(2): 315-320.

Thomas, L.V., Clarkson, M.R., and Delves-Broughton, J. 2000. Nisin. In: Naidu A.S. (Ed.), Natural food antimicrobial system. CRC. Press. Boca-Raton, FL, pp. 463-524.

Tichaczek, P. S., Meyer, N. J., Nes, I. F., Vogel, R. F. and Hammes, W. P. 1992. Characterization of the bacteriocins curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH1174 and sakacin P from *Lactobacillus sake* LTH673. *Systematic and applied microbiology* 15: 460-468.

Vasiljevic, T. and Shah, N. P. 2008. Probiotics-From Metchnikoff to bioactives. *Int. Dairy J.* 18: 714-728.

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารทุกสูตรใช้น้ำกลั่นในการปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร

1. Luria-Bertani broth (LB broth)

Tryptone	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Sodium Chloride	10.0	กรัม

2. Luria-Bertani agar (LB agar)

Tryptone	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Sodium Chloride	10.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

3. Cassava Starch Agar

Cassava starch	15.0	กรัม
Peptone	2.0	กรัม
Glucose	2.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

4. Rice Starch Agar

Rice starch	15.0	กรัม
Peptone	2.0	กรัม
Glucose	2.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

ภาคผนวก ข
สารเคมี

1. Crystal violet

0.1M citric acid	100.0	มิลลิลิตร
Crystal violet	0.1	กรัม

2. Safranin

Safranin	0.25	กรัม
Ethyl alcohol	10.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้	100.0	มิลลิลิตร

3. Gram's iodine

Iodine	1.0	กรัม
Potassium Iodine (KI)	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	300.0	มิลลิลิตร

4. 0.5 M Tris-HCl pH 6.8

Tris-base	6.06	กรัม
ปรับ pH ให้ได้ 6.8 ด้วย 1N HCl		
เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้	100.0	มิลลิลิตร

5. 1.5 M Tris-HCl pH 8.8

Tris-base	18.17	กรัม
ปรับ pH ให้ได้ 8.8 ด้วย 1N HCl		
เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้	100.0	มิลลิลิตร

6. 15% separating gel

น้ำกลั่น	3490	ไมโครลิตร
30% acryramide	7500	ไมโครลิตร
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	3750	ไมโครลิตร
10% SDS	150	ไมโครลิตร
10% APS	100	ไมโครลิตร
TEMED	10	ไมโครลิตร
Total	15	มิลลิลิตร

7. 4% stacking gel

น้ำกลั่น	2366	ไมโครลิตร
30% acryramide	530	ไมโครลิตร
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	1000	ไมโครลิตร

10% SDS	40	ไมโครลิตร
10% APS	60	ไมโครลิตร
TEMED	4	ไมโครลิตร
Total	4	มิลลิลิตร

8. 6X gel loading dye #R0611

10 mM Tris-HCl pH 7.6
0.03% bromophenol blue
0.03% xylene cyarol FF
60% glycerol
60 mM EDTA

9. 5X Tris glycine electrophoresis running buffer

Tris-base	15.1	กรัม
Glycine	94.0	กรัม
10% SDS	50.0	มิลลิลิตร

10. 10X Tris-glycine Native polyacrylamide gel running buffer

Tris-base	144.0	กรัม
Glycine	30.3	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

11. Coomassie blue staining solution

Coomassie Brilliant Blue R-250	0.04	กรัม
Methanol	100.0	มิลลิลิตร
Acetic acid	15.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	85.0	มิลลิลิตร

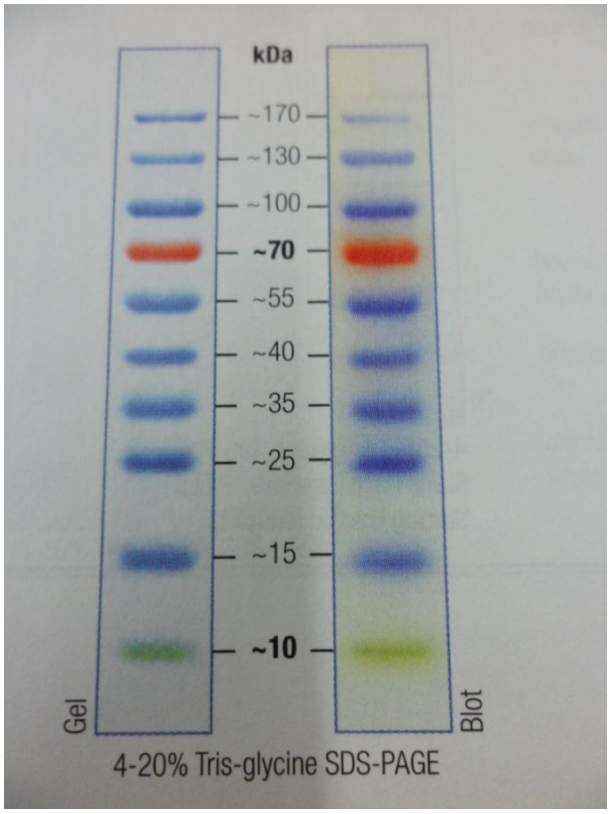
12. Destaining solution

Methanol	400.0	มิลลิลิตร
Acetic acid	100.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	500.0	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค

Protein Marker

Protein Marker PageRuler™



#SM0671 ยี่ห้อ Prestianed