

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การโคลนยีนและคุณลักษณะของแบคทีเรียโอซินจากแบคทีเรีย *Enterococcus faecium*
CE5-1 ที่แยกจากทางเดินอาหารไก่พื้นเมือง

Bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* CE5-1 isolated from Thai
indigenous chicken intestinal tract: gene cloning and characterization

รองศาสตราจารย์ ดร. สุภศิลป์ มณีรัตน์

ดร. สิริวรรณ แก้วสุวรรณ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประจำปีงบประมาณ 2555-2556 รหัสโครงการ AGR550004S

ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาไทย)

การโคลนนิ่งและคุณลักษณะของแบคทีเรียโอซินจาก
แบคทีเรีย *Enterococcus faecium* CE5-1 ที่แยกจากทางเดิน
อาหารไก่พื้นเมือง

Bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* CE5-1
isolated from Thai indigenous chicken intestinal tract: gene
cloning and characterization

ชื่อคณะผู้วิจัย:

หัวหน้าโครงการ:

รองศาสตราจารย์ ดร. ศุภศิลป์ มณีรัตน์
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม
คณะอุตสาหกรรมเกษตร
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่
โทรศัพท์ : 66-74-446728
E-mail : suppasil.m@psu.ac.th

ผู้ร่วมโครงการวิจัย:

ดร. สิริวรรณ แก้วสุวรรณ
ภาควิชาเกษตรและเกษตรพันธุศาสตร์
คณะเกษตรศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่
โทรศัพท์ : 66-74-288893
E-mail : songsri.k@psu.ac.th

สารบัญ

	หน้าที่
สารบัญ.....	(3)
รายการตาราง.....	(4)
รายการภาพประกอบ.....	(5)
กิตติกรรมประกาศ.....	(7)
บทคัดย่อ.....	(8)
บทที่	
1. บทนำ	
ปัญหาและที่มาของการวิจัย.....	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย.....	2
การตรวจเอกสาร.....	3
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	
วัสดุ และอุปกรณ์.....	38
วิธีการทดลอง.....	42
3. ผลการทดลอง	
การศึกษาศักยภาพการเป็น โปรไบโอติกของเชื้อ <i>E. faecium</i> CE5-1.....	55
การศึกษาคูณลักษณะของแบคทีเรียโอซินที่ได้จากเชื้อ <i>E. faecium</i> CE5-1.....	65
การโคลนนิ่งที่ควบคุมการสร้างแบคทีเรียโอซิน.....	74
การแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างแบคทีเรียโอซิน.....	77
การศึกษายีนที่ควบคุมการแสดงออกแบคทีเรียโอซินในเชื้อ <i>E. faecium</i> CE5-1 (wide-type strain).....	82
4. สรุปผลการทดลอง.....	97
เอกสารอ้างอิง.....	98
ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยต่อไป.....	114
ภาคผนวก.....	115

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1. ความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียโอซินกับสารปฏิชีวนะ.....	19
2. แบคทีเรียโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติก.....	20
3. การจัดกลุ่มของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียแกรมบวก.....	24
4. สภาพที่ทำให้ PCR สำหรับตรวจหาชิ้นที่ควบคุมการสร้างแบคทีเรียโอซิน.....	47
5. ไพรมเมอร์ที่ใช้สำหรับหาชิ้นที่ควบคุมการสร้างแบคทีเรียโอซิน.....	48
6. ไพรมเมอร์ที่ใช้สำหรับตรวจหาชิ้นที่ควบคุมการสร้างแบคทีเรียโอซิน.....	54
7. การรอดชีวิตของเชื้อ <i>E. faecium</i> CE5-1 ภายหลังจากบ่มในสถานะจำลองทางเดินอาหารของไก่.....	57
8. การต้านทานยาปฏิชีวนะในเชื้อกลุ่ม Enterococci.....	60
9. กิจกรรมการยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ของสารละลายส่วนใสที่ได้จากเชื้อ <i>E. faecium</i> CE5-1 ที่ผ่านการปรับพีเอชให้อยู่ในช่วง 6.5-7.0 โดยวิธีการ agar well diffusion assay.....	63
10. ผลของเอนไซม์ต่อกิจกรรมการยับยั้งของ enterocin CE5-1.....	66
11. ผลของพีเอชต่อกิจกรรมการยับยั้งของ enterocin CE5-1.....	67
12. กิจกรรมการยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ของ enterocin CE5-1 โดยวิธีการ agar well diffusion assay.....	73
13. ผลจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นที่ควบคุมการสร้าง enterocin A ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล Genbank ด้วยโปรแกรม Nucleotide BLAST.....	83
14. ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่ได้กับลำดับกรดอะมิโนที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank.....	95

รายการภาพประกอบ

ภาพที่	หน้า
1. เปรียบเทียบการบวนการเมแทบอลิซึมของน้ำตาลกลูโคสระหว่างแบคทีเรีย แลกติกในกลุ่มโฮโมเฟอร์เมนเททีฟกับแบคทีเรียแลกติกในกลุ่มเฮเทอโร เฟอร์เมนเททีฟ.....	17
2. การสังเคราะห์ Lantibiotic.....	23
3. กลไกการยับยั้งของ Lacticin 2134.....	26
4. วงโคจรของการยับยั้งของแบคทีเรีย โอซินที่เกิดจากการแผ่เข้าไปในอาหารแข็ง....	27
5. พลาสมิด pGEM®-T.....	49
6. พลาสมิด pBS-ldhGFP.....	51
7. แผนผังตำแหน่งการจับของไพรเมอร์ที่ออกแบบ.....	54
8. การเลี้ยงร่วมกันระหว่างเชื้อ <i>E. faecium</i> CE5-1 ที่กับเชื้อกลุ่ม Enterococci ที่ดื้อยาปฏิชีวนะในอาหาร MRS broth.....	64
9. ผลของอุณหภูมิต่อการยับยั้งของ enterocin CE5-1.....	69
10. ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษา enterocin CE5-1.....	71
11. ผลจากการทำ PRC ในตรวจหาชิ้นที่ควบคุมการสร้างแบคทีเรีย โอซิน.....	74
12. ขนาดของยีน enterocin A ที่ได้จากเชื้อ <i>E. faecium</i> CE5-1.....	75
13. โคลนที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยใช้เทก้า blue/white colony screening.....	76
14. ผลของการทำ colony PCR ของพลาสมิด pGEM/entA.....	76
15. ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน <i>entA</i> จากพลาสมิด pGEM/entA กับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล Genbank ด้วยโปรแกรม Nucleotide BLAST.....	77
16. ผลจากการตัดดีเอ็นเอกับเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bam</i> HI ร่วมกับ <i>Eco</i> RI.....	78
17. ผลของการทำ colony PCR ของพลาสมิด pBS-ldh/entA.....	79
18. ลำดับกรดอะมิโนของ enterocin A จากพลาสมิด pBS-ldh/entA.....	80

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
19. ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ enterocin A จากพลาสมิด pBS-ldh/entA กับลำดับกรดอะมิโนในฐานข้อมูล Genbank ด้วยโปรแกรม Protein BLAST.....	81
20. แสดงตำแหน่งของ PCR product ที่ได้จากการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับส่วนต่างๆ ของยีนที่ควบคุมการสร้าง enterocin A.....	82
21. ผลจากการทำ PCR หาเอ็นที่ควบคุมการแสดงออกของ enterocin A ในเชื้อ <i>E. faecium</i> CE5-1.....	83
22. ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเอ็นที่ควบคุมการสร้าง enterocin A ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล Genbank ด้วยโปรแกรม Nucleotide BLAST.....	89
23. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเอ็นที่ควบคุมการสังเคราะห์ enterocin A ทั้งหมด 8,037 bp.....	93
24. ผลจากการทำนาย open reading frame (ORF) จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของเอ็นที่ควบคุมการสังเคราะห์ enterocin A.....	94
25. ลำดับนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโนของ enterocin A ในบริเวณส่วนของยีน entA ถึงยีน imentA.....	96

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่ให้ทุนอุดหนุนในการทำวิจัยและ
ขอขอบคุณคณะอุตสาหกรรมเกษตรที่อำนวยความสะดวกในการทำวิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร. ศุภศิลป์ มณีรัตน์
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม
คณะอุตสาหกรรมเกษตร
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

บทคัดย่อ

การใช้ยาปฏิชีวนะเป็นสารเร่งการเจริญเติบโตในไก่ก่อให้เกิดการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อก่อโรคและเชื้ออื่นในไก่ นอกจากนี้แล้วยังมีการห้ามใช้ยาปฏิชีวนะในการเลี้ยงไก่ในสหภาพยุโรปและสหรัฐอเมริกา การใช้แบคทีเรียโอซินจึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการแก้ปัญหาดังกล่าว การทดลองครั้งนี้มีความสนใจในเชื้อ *Enterococcus faecium* CE5-1 ที่ผลิตแบคทีเรียโอซินที่แยกได้จากทางเดินอาหารไก่พื้นบ้านของประเทศไทยมาศึกษาศักยภาพการเป็นโปรไบโอติก พบว่าเชื้อ *E. faecium* CE5-1 ทนได้ต่อสภาวะที่มีพีเอช 3.0 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และในที่มีความเข้มข้นของน้ำดีที่ 7 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แต่การเจริญจะลดลงประมาณ 2-3 log CFU/ml ภายหลังการบ่มที่พีเอช 2.5 เป็นเวลา 2 ชั่วโมงเชื้อ *E. faecium* CE5-1 มีความไวต่อยาปฏิชีวนะ ได้แก่ เตตราไซคลีน อิริโทรมัยซิน เพนนิซิลลินจี และแวนโคมัยซิน นอกจากนี้ยังพบว่าสารละลายส่วนใสที่ได้จากเชื้อ *E. faecium* CE5-1 แสดงกิจกรรมการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ *Listeria monocytogenes* DMST17303, *Pediococcus pentosaceus* 3CE27, *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM1157 และกลุ่มของเชื้อ Enterococci ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ เมื่อศึกษาการเจริญร่วมกันระหว่างเชื้อ *E. faecium* CE5-1 กับเชื้อกลุ่ม Enterococci ที่ดื้อยาปฏิชีวนะ (*E. faecalis* VanB หรือ *E. gallinarum* VanC) การเจริญของเชื้อ *E. faecalis* VanB (จาก 6.68 เหลือ 4.29 log CFU/ml) และ *E. gallinarum* VanC (จาก 6.76 เหลือ 4.31 log CFU/ml) จะลดลงอย่างรวดเร็วภายใน 12 ชั่วโมงของการบ่ม จากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *E. faecium* CE5-1 สามารถนำไปใช้เป็นเชื้อโปรไบโอติกในควบคุมการเจริญของกลุ่มของเชื้อ Enterococci ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะในการเลี้ยงไก่ได้

การศึกษาคุณลักษณะของ Enterocin CE5-1 พบว่า Enterocin CE5-1 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์เบื้องต้นมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อในช่วงแคบ โดยมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ เชื้อกลุ่ม *Enterococcus*, *P. pentosaceus* 4Ce27, *Bacillus cereus* DMST5040, *Staphylococcus aureus* DMST8840 และ *L. sakei* subsp. *sakei* JCM1157 นอกจากนี้ Enterocin CE5-1 มีความคงตัวต่อพีเอชในช่วงกว้างตั้งแต่ 2.2-10.6 และทนต่อความร้อนตั้งแต่ 30-100 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามการเติมเอนไซม์ย่อยโปรตีน และเอนไซม์ α -amylase จะยับยั้งกิจกรรมของ Enterocin CE5-1 อย่างสมบูรณ์

การศึกษาการโคลน และแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้าง enterocin A สามารถตรวจพบเพียงยีนที่ควบคุมการสร้างแบคทีเรียโอซินชนิด enterocin A (*entA* gene) ในเชื้อ *E. faecium*

CE5-1 เมื่อออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *entA* แล้วเชื่อมต่อยีน *entA* ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR กับพลาสมิด pGEM[®]-T Vector แล้วจึงถ่ายรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้หรือพลาสมิด pGEM/*entA* เข้าสู่เชื้อ *E. coli* JM109 ตรวจสอบวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *entA* พบว่ายีน *entA* จากเชื้อ *E. faecium* CE5-1 มีความคล้ายคลึงกับยีน *entA* ของพลาสมิด p5753cA จากเชื้อ *E. faecium* (NC_013317.1) ที่มีอยู่ในฐานข้อมูลจาก NCBI จากนั้นเชื่อมต่อยีน *entA* (153 bp) ที่ได้จากการตัดพลาสมิด pGEM/*entA* ด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *BamHI* กับ พลาสมิด pBS-ldh แล้วจึงถ่ายรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้หรือพลาสมิด pBS-ldh/*entA* เข้าสู่ *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* JCM16167 พบว่าไม่พบเชื้อ *L. lactis* subsp. *cremoris* JCM16167 เจริญบนอาหาร อาจเป็นเพราะโปรตีนที่ผลิตออกมามีความเป็นพิษต่อเชื้อ *L. lactis* subsp. *cremoris* JCM16167

เมื่อศึกษาการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้าง enterocin A ในเชื้อ *E. faecium* CE5-1 พบว่าจากนิวคลีโอไทด์ที่ได้ทั้งหมดขนาดประมาณ 8,037 bp สามารถทำนายได้ open reading frame (ORF) อย่างน้อยประมาณ 12 ORF แต่มีเพียง 7 ORF ที่มีบทบาทต่อการสังเคราะห์ enterocin A ประกอบด้วย enterocin A structural gene (*entA*), enterocin A immunity gene (*imentA*), induction factor of enterocin A (*entF*), histidine protein kinase gene (*entK*), response regulator gene (*entR*), ABC transporter gene (*entT*) และ accessory factor gene (*entD*).

ABSTRACT

The use of antibiotic as growth promoter in feed for chicken causes the evolution of antibiotic resistance in both pathogen and commensal bacteria in chicken. In addition, the subtherapeutic antibiotic usage for chicken production has been banned in Europe and the United State. Using bacteriocin might be the way to solve these problems. Bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* CE5-1 was isolated from the gastrointestinal tract of Thai indigenous chickens. It was used to investigate its probiotic potential. The competition between the bacteriocin-like substance (BLS) producing probiotic strain and antibiotic-resistant enterococci was also studied. *E. faecium* CE5-1 exhibited a good tolerance to pH 3.0 after 2 h and in 7% fresh chicken bile after 6 h, but the viability of *E. faecium* CE5-1 decreased about 2-3 log CFU/ml after 2 h incubation in pH 2.5. It was susceptible to the antibiotics tested consisting of tetracycline, erythromycin, penicillin G and vancomycin. The culture supernatant of *E. faecium* CE5-1 showed activity against *Listeria monocytogenes* DMST17303, *Pediococcus pentosaceus* 3CE27, *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM1157 and antibiotic resistant enterococci. *E. faecium* CE5-1 showed the highest inhibitory activity against two antibiotic resistant *E. faecalis* VanB (from 6.68 to 4.29 log CFU/ml) and *E. gallinarum* VanC (from 6.76 to 4.31 log CFU/ml) after 12 h of co-cultivation. The results show the future possible use of *E. faecium* CE5-1 as probiotic strain for livestock to control antibiotic-resistant enterococci.

The partially purified enterocin CE5-1 exhibited a narrow spectrum of activity against *Enterococcus* strains, *P. pentosaceus* 4Ce27, *Bacillus cereus* DMST5040, *Staphylococcus aureus* DMST8840 and *L. sakei* subsp. *sakei* JCM1157. Moreover, the bacteriocin activity of enterocin CE5-1 was active in the wide pH range (2.2-10.6) after 1 h of incubation at 37 °C and stable to heating at 30-100 °C for 15 min and 2 h of incubation. However, bacteriocin activity of enterocin CE5-1 could be inactivated when treated with proteolytic and α -amylase enzyme.

Only enterocin A gene (*entA*) was detected in the genomic DNA of *E. faecium* CE5-1. After that the specific primers were designed based on alignment of the structural *entA* gene. PCR products of structural *entA* gene were cloned into pGEM-T easy vector (pGEM/*entA*) and transformed into *E. coli* JM109. The nucleotide sequence of structural *entA* gene was similar to a

nucleotide sequence also found in enterocin A gene of *E. faecium* plasmid p5753cA (NC_013317.1), derived from NCBI database. The 153 bp fragment was cut with *Eco*RI and *Bam*HI from pGEM/*entA* vector and ligated with the *Eco*RI-*Bam*HI digested expression vector pBS-ldhGFP (pBS-ldh/*entA*). After transformation of pBS-ldh/*entA* vector into *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* JCM16167, no colony was detected on the plate because the expression protein has a toxic effect to the host *L. lactis* subsp. *cremoris* JCM16167.

The sequence of a 8-kb DNA fragment of *entA* gene cluster was determined and sequenced. The *entA* gene cluster containing 12 open reading frame (ORF), 7 of which are predicted and obviously related to play a role in enterocin A biosynthesis consisting of enterocin A structural gene (*entA*), enterocin A immunity gene (*imentA*), induction factor of enterocin A (*entF*), histidine protein kinase gene (*entK*), response regulator gene (*entR*), ABC transporter gene (*entT*) and accessory factor gene (*entD*).

บทที่ 1

บทนำ

ปัญหาและที่มาของการวิจัย

ประเทศไทยเป็นผู้ส่งออกไก่เป็นอันดับที่สี่ของโลก ประมาณ 90% ส่งออกไปยังสหภาพยุโรปและญี่ปุ่น (Thai Broiler Processing Exporters Association, 2009) มีการใช้ยาปฏิชีวนะในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์เพื่อใช้เป็นสารเร่งการเจริญเติบโต อย่างไรก็ตามการใช้ยาปฏิชีวนะปริมาณมากเป็นเวลานานจะก่อให้เกิดการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อก่อโรคและเชื้อในระบบทางเดินอาหารของไก่ส่งผลให้การรักษาโรคทำได้ยากขึ้น จากเหตุผลดังกล่าวทำให้มีการห้ามใช้ยาปฏิชีวนะในระดับต่ำๆ ที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ในสหภาพยุโรปและมีแนวโน้มการห้ามใช้สำหรับอเมริกา ทำให้มีความพยายามในการหาสารยับยั้งเชื้อชนิดอื่นแทนยาปฏิชีวนะ ซึ่งแบคทีเรียโอซินเป็นทางเลือกหนึ่งในการเป็นสารทดแทนยาปฏิชีวนะ

ผู้วิจัยได้คัดแยกแบคทีเรียแลคติกคือ *Enterococcus faecium* CE5-1 จากทางเดินอาหารไก่พื้นเมืองซึ่งมีคุณสมบัติสามารถผลิตแบคทีเรียโอซิน อย่างไรก็ตามมีรายงานการวิจัยพบว่าแบคทีเรียแลคติกกลุ่ม *Enterococcus* spp. มีโอกาสในการถ่ายทอดยีนดื้อยาปฏิชีวนะไปสู่แบคทีเรียอื่นได้ (Abriouel *et al.*, 2005) นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียแลคติกกลุ่ม *Enterococcus* spp. มักก่อให้เกิดภาวะเยื่อหัวใจอักเสบ (infective endocarditis) และการติดเชื้อที่ระบบปัสสาวะ รวมไปถึงการติดเชื้อในกระแสโลหิต ดังนั้นหากต้องการนำไปประยุกต์ใช้จึงควรต้องศึกษาความปลอดภัยของเชื้อ *E. faecium* CE5-1 นอกจากนี้อาจทำการศึกษาค้นคว้าโคลนยีนที่ควบคุมการสร้างแบคทีเรียโอซินไปยังเชื้ออื่นเพื่อป้องกันปัญหาการถ่ายทอดยีนดื้อยาปฏิชีวนะไปสู่เชื้อแบคทีเรียอื่นๆ ซึ่งอาจเกิดปัญหาในการรักษาโรคต่อไปในอนาคตได้

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคูสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของเชื้อ *E. faecium* CE5-1 และการโคลนยีนที่ควบคุมการสร้างแบคทีเรียโอซินจากเชื้อแบคทีเรีย *E. faecium* CE5-1 ผู้เชื้อเจ้าบ้าน (host) ที่เหมาะสมและตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างแบคทีเรียโอซิน

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาสัณยภาพการเป็นโปรไบโอติกจากเชื้อ *E. faecium* CE5-1
2. เพื่อศึกษาคูณลักษณะของแบคทีเรียโอซินที่ได้จากเชื้อ *E. faecium* CE5-1
3. เพื่อศึกษาการโคลน และแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างแบคทีเรียโอซินจากเชื้อ *E. faecium* CE5-1
4. เพื่อศึกษาหาวิธีที่ควบคุมการแสดงออกของ enterocin A จากเชื้อ *E. faecium* CE5-1

การตรวจเอกสาร

1. แบคทีเรียแลคติก

แบคทีเรียแลคติก (Lactic Acid Bacteria; LAB) เป็นกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์อะตาเลส (catalase) ไม่มีไซโตโครม (cytochromes) ทนต่อการขาดอากาศ ส่วนใหญ่ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อย (microaerophile) บางชนิดเป็นพวกไม่ต้องการอากาศ (strictly anaerobe) เนื่องจากแบคทีเรียแลคติกเป็นกลุ่มที่ได้รับพลังงานจากการหมักน้ำตาลโดยไม่ใช้ออกซิเจนจึงมีความต้องการสารอาหารค่อนข้างซับซ้อนและสมบูรณ์ (fastidious microorganism) เช่น ใช้กรดอะมิโนเป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อจะเจริญได้ดีในอาหารที่มี growth factor และวิตามินหลายชนิด เช่น ไบโอติน (biotin) ไรโบฟลาวิน (riboflavin) และส่วนใหญ่ต้องการสารอินทรีย์ในปริมาณค่อนข้างสูง เช่น แมงกานีส แมกนีเซียม เป็นต้น ประกอบด้วยกลุ่มของแบคทีเรียในจีนัส (genus) ได้แก่ *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, และ *Weissella* (Salminen and von Wright, 1998) แบคทีเรียแลคติกสามารถแบ่งเป็นกลุ่มใหญ่ๆ ได้ 2 กลุ่ม (Axelsson, 1993) ได้แก่

1. กลุ่มโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ (homofermentative LAB) คือ แบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างกรดแลคติกจากน้ำตาลกลูโคส หรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 ตัวอื่นๆ แล้วได้กรดแลคติกประมาณ 90-95 เปอร์เซ็นต์ ที่เหลือจะเป็นกรดอะซิติก และคาร์บอนไดออกไซด์อีกเล็กน้อย ไม่ต้องการไทอามีน (thiamine) ในการเจริญ ผลิตเอนไซม์อัลโดเลส (aldolase) และเอนไซม์เฮกโซสไอโซเมอเรส (hexose isomerase) แต่ไม่ผลิตเอนไซม์ฟอสโฟคีโตเลส (phosphoketolase) กลไกการเกิดกรดแลคติก คือ การเปลี่ยนกลูโคสเป็นกรดไพรูวิก โดยเอนไซม์ dehydrogenase โดยใช้ Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) pathway แล้วจึงเปลี่ยนกรดไพรูวิกเป็นกรดแลคติก ทำให้ได้กรดแลคติก 2 โมเลกุลต่อกลูโคส 1 โมเลกุล ตัวอย่างแบคทีเรียแลคติกในกลุ่มนี้ได้แก่ *Lactobacillus acidilactici*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus cerevisiae* และ *Streptococcus lactis* เป็นต้น (ปาริชาติ พุ่มขจร และคณะ, 2543)

2. กลุ่มเฮเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ (heterofermentative lactic acid bacteria) คือ แบคทีเรียแลคติกที่สามารถผลิตกรดแลคติกจากน้ำตาลกลูโคส หรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 ตัว ได้กรดแลคติกประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ที่เหลือได้เป็นกรดอะซิติกรวมทั้งเอทานอล 20-25 เปอร์เซ็นต์ และ

คาร์บอนไดออกไซด์ 20-25 เปอร์เซ็นต์ ใช้โทอะมินในการเจริญและสร้างเอ็นไซม์เฮกโซสไอโซเมอเรส ใช้ hexose monophosphate หรือ pentose pathway ได้แก่ *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus brevis* และ *Lactobacillus fermentum* เป็นต้น (ปาริชาติ พุ่มขจร และคณะ, 2543)

การศึกษานุกรมวิธานของแบคทีเรียแลกติกโดยอาศัยลักษณะทางกายภาพ สมบัติทางชีวเคมี ลักษณะพื้นฐาน องค์ประกอบของผนังเซลล์ กรดไขมันภายในเซลล์ ไอโซพรีนอยด์ (isoprenoid) ควิโนน (quinone) รวมทั้งการศึกษาระดับโมเลกุล เช่น mol เปอร์เซ็นต์ G+C ของดีเอ็นเอ การเข้าคู่กันของดีเอ็นเอ ลำดับเบสบน rRNA ทำให้พบลักษณะที่แตกต่างของแบคทีเรียแต่ละสกุล ปัจจุบันสามารถจำแนกแบคทีเรียแลกติกออกได้เป็น 12 สกุล (Axelsson, 1993) ได้แก่

1. *Streptococcus*

เป็นแบคทีเรียรูปร่างกลม หรือไข่ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8-1.2 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นคู่หรือโซ่ ต้องการสารอาหารหลายชนิด เจริญได้ที่อุณหภูมิ 20-30 องศาเซลเซียส ประกอบด้วย 39 สปีชีส์ รวมทั้งสปีชีส์ที่ทำให้เกิดโรค และสปีชีส์ที่มีการใช้เป็นก้านเชื้อในอุตสาหกรรมการหมัก (Hardie and Whiley, 1995)

2. *Lactococcus*

เดิมอยู่ในสกุล *Streptococcus* กลุ่ม N มีรูปร่างเป็นรูปไข่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นเชลล์เดี่ยว คู่ หรือต่อกันเป็นสายโซ่ ไม่เคลื่อนที่ เจริญได้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิสูงกว่า 45 องศาเซลเซียส มี mol เปอร์เซ็นต์ G+C 34-43 ประกอบด้วย 5 สปีชีส์ คือ *Lactococcus plantarum*, *L. garvieae*, *L. raffinolactis*, *L. piscium*, *L. lactis* (Teuber, 1995)

3. *Vagococcus*

เป็นแบคทีเรียที่แยกมาจาก *Streptococcus* กลุ่ม N เดิมเนื่องจากสามารถเคลื่อนที่ได้ ประกอบด้วย 2 สปีชีส์ คือ *Vagococcus fluvialis* และ *V. salmoninarum* ซึ่งแยกได้จากปลาแซลมอนที่เป็นโรค (Stiles and Holzapfel, 1997)

4. *Enterococcus*

เปลี่ยนชื่อมาจาก *Streptococcus* กลุ่ม D เดิม มีรูปร่างกลม จัดเรียงตัวเป็นเชลล์เดี่ยว หรือสายโซ่สั้นๆ สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 10 ถึง 45 องศาเซลเซียส มีลำดับเบสบน 16S rRNA ใกล้เคียงกับ *Carnobacterium* และ *Vagobacterium* มากกว่า *Streptococcus* และ *Lactococcus* มี mol เปอร์เซ็นต์ G+C 37-40

5. *Pediococcus*

มีรูปร่างกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.36-1.43 ไมครอน มีการแบ่งตัวในลักษณะ 2 ทิศทางบนระนาบเดียวกันทำให้เกิดการเรียงตัวเป็นคู่หรือสี่เซลล์ติดกัน มี mol เปอร์เซ็นต์ G+C 34-44 (Simpson and Taguchi, 1995) ประกอบด้วย 6 สปีชีส์ คือ *Pediococcus pentosaceus*, *P. dextrinicus*, *P. acidilactici*, *P. parvulus*, *P. damonosus*, *P. inopinatus* (Stiles and Holzapfel, 1997)

6. *Tetragenococcus*

เปลี่ยนมาจาก *Pediococcus halophilus* เดิมมีรูปร่างกลม การแบ่งตัวเหมือนกับ *Pediococcus* และมีลำดับเบสบน 16S rRNA แตกต่างจาก *Pediococcus* ต้องการโซเดียมคลอไรด์ในการเจริญถึง 18 เปอร์เซ็นต์ (Simpson and Taguchi, 1995)

7. *Aerococcus*

มีรูปร่างกลม การแบ่งตัวเหมือนกับ *Pediococcus* มีปริมาณ mol เปอร์เซ็นต์ G+C ต่ำ ประกอบด้วย 2 สปีชีส์คือ *Aerococcus viridans* และ *A. urinae* ซึ่งเปลี่ยนมาจาก *Pediococcus homari* และ *Pediococcus urinae* ตามลำดับ (Stiles and Holzapfel, 1997)

8. *Leuconostoc*

มีรูปร่างกลม จัดเรียงตัวเป็นคู่หรือเดี่ยว หมักน้ำตาลกลูโคสแบบ heterofermentative ได้ผลิตภัณฑ์คือ กรดแลกติก ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และสารระเหย เช่น กรดอะซิติก เมธานอล ประกอบด้วย 8 สปีชีส์ *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc lactis*, *L. gelidum*, *L. carnosum*, *L. pseudomesenteroides*, *L. citreum*, *L. argentinum* และ *L. fallax* (Stiles and Holzapfel, 1997)

9. *Oenococcus*

มีรูปร่างกลม เปลี่ยนมาจาก *Leuconostoc oenos* เดิม เนื่องจากมีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างจาก *Leuconostoc* และทนต่อแอลกอฮอล์และกรดได้ดีกว่า รวมทั้งข้อมูลทางพันธุกรรมจาก ดีเอ็นเอ: ดีเอ็นเอไฮบริโดเซชัน และลำดับเบสของ 16s rRNA ต่างจากสปีชีส์อื่นในสกุล *Leuconostoc* อย่างเห็นได้ชัด (Dellaglio et al., 1995)

10. *Lactobacillus*

เป็นแบคทีเรียแลคติกกลุ่มใหญ่ที่สุดมีความหลากหลายของลักษณะฟีโนไทป์ชีวเคมีและสรีรวิทยา เนื่องจากมีความแตกต่างของ mol เปอร์เซ็นต์ G+C ภายในสกุลสูงระหว่าง 32-53 เปอร์เซ็นต์ เซลล์มีรูปร่างท่อนหรือทรงแท่ง (coccobacilli) ทนต่อกรดและต้องการสารอาหารหลายชนิด ประกอบด้วย 55 สปีชีส์ บางสายพันธุ์สามารถผลิตเอนไซม์เทียม (pseudo-catalase) พบบริเวณลำไส้เล็กของสัตว์มีกระดูกสันหลัง พืช มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกสำหรับมนุษย์และสัตว์ สามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้ดังนี้

10.1 Obligately homofermentative lactobacilli

สามารถหมักน้ำตาลแลคโทสได้เป็นกรดแลกติกมากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) ผลิตเอนไซม์ 1,6-biphosphate-aldolase จึงไม่สามารถหมักน้ำตาลเพนโทสและกลูโคเนท

10.2 Facultative heterofermentative lactobacilli

หมักน้ำตาลเฮกโซสเป็นกรดแลกติกผ่านวิธี EMP มีทั้งกิจกรรมของเอนไซม์ aldolase และ phosphoketolase จึงสามารถหมักน้ำตาลเพนโตสได้

10.3 Obligately heterofermentative lactobacilli

หมักน้ำตาลเฮกโซสและเพนโทสโดยวิธี phosphogluconate ได้ผลิตภัณฑ์เป็น แลกเตทและคาร์บอนไดออกไซด์

11. *Carnobacterium*

เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างแท่งคล้าย *Lactobacilli* แต่วางตัวที่ไม่สามารถเจริญบนอาหารที่มีอะซิเตต เจริญที่ระดับพีเอช 8.5-9.0 จัดเรียงตัวเป็นเชลล์เดี่ยวหรือคู่ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-0.7 ไมครอน และยาว 1.0-3.0 ไมครอน (Schillinger and Holzapfel, 1995)

12. *Weissella*

เป็นแบคทีเรียแลกติกสกุลเดียวที่มีทั้งสปีชีส์ที่มีรูปร่างกลมและแท่งประกอบด้วย 7 สปีชีส์ ซึ่งเดิมอยู่ในสกุล *Leuconostoc* และ *Lactobacillus* คือ *Weissella confusa* (*Lactobacillus confusa*), *W. paramesenteroides* (*Leuconostoc paramesenteroides*), *W. halotolerans* (*Lactobacillus halotolerans*), *W. kandleri* (*Lactobacillus kandleri*) *W. minor* (*Lactobacillus minor*) *W. viridescens* (*Lactobacillus viridescens*) และ *W. hellenica* (Stiles and Holzapfel, 1997)

ส่วนใหญ่แบคทีเรียแลกติกจะพบมากในผลิตภัณฑ์อาหารหมักจำพวกเนื้อ ผัก และนม (Flórez *et al.*, 2005) นอกจากนี้ยังพบได้โดยทั่วไป เช่น น้ำทิ้ง (sewage) และวัสดุต่างๆ ในโรงงาน (Adebayo-tayo and Onilude, 2008) ป่าชายเลน (Annamalai *et al.*, 2009) ดิน ส่วนของลำต้น ใบ และดอกของพืช (Magnusson *et al.*, 2003) ในระบบทางเดินหายใจ และระบบทางเดินอาหารของคน และสัตว์ (Stromfova and Laukova, 2007; Nitisinprasert *et al.*, 2000) เป็นต้น แบคทีเรียแลกติกที่มักพบในทางเดินอาหารของไก่ ประกอบด้วยกลุ่มของแบคทีเรียในจินัส ได้แก่ *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* และ *Streptococcus*

Stromfova และ Laukova (2007) คัดแยกเชื้อกลุ่มของแบคทีเรีย Enterococci จากทางเดินอาหารไก่กระตัง สามารถคัดแยกแบคทีเรียแลกติกในกลุ่มของแบคทีเรีย Enterococci ได้ 17 ไอโซเลต

และพบว่ามียีสต์ 5 ไอโซเลตที่มีคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกที่ดี และผลิตสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบ เมื่อนำไปจำแนกสายพันธุ์ พบว่าแบคทีเรียแลคติกทั้งหมด 5 ไอโซเลต คือสายพันธุ์ *E. faecium*

Torshizi และคณะ (2008) คัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากทางเดินอาหารของไก่ได้ 650 สายพันธุ์ นำแบคทีเรียแลคติกทั้งหมดไปทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรค คือ *Escherichia coli* และ *Salmonella* sp. พบว่ามี 3 สายพันธุ์ คือ TMU121, 094 และ 457 มีกิจกรรมการยับยั้งสูงสุด นอกจากนี้ยังพบว่าทั้ง 3 สายพันธุ์ มีคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้นที่ดีและสามารถผลิตแบคทีเรียโอซิน เมื่อนำทั้ง 3 สายพันธุ์ ไปเทียบเคียงสายพันธุ์ พบว่า เป็น *P. pentosaceus* TMU457, *L. rhamnosus* TMU094 และ *L. fermentum* TMU121 ตามลำดับ

Musikasang และคณะ (2009) สามารถแยกแบคทีเรียแลคติกได้ทั้งหมด 322 ไอโซเลต จากไก่กระทง 10 ตัว และได้ 226 ไอโซเลต จากไก่พื้นเมือง 8 ตัว พบว่าได้แบคทีเรียแลคติกที่มีคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกที่ดีทั้งหมด 5 ไอโซเลต ซึ่งประกอบด้วย *E. faecalis* (1 ไอโซเลต), *E. durans* (1 ไอโซเลต), *E. faecium* (2 ไอโซเลต) และ *P. pentosaceus* (1 ไอโซเลต)

Heravi และคณะ (2011) แยกกลุ่มของแบคทีเรีย Lactobacilli จากทางเดินอาหารของไก่กระทง พบว่าสามารถแยกได้เชื้อกลุ่ม Lactobacilli ได้แก่ *L. reuteri*, *L. crispatus*, *L. salivarius*, *L. agilis*, *L. johnsonii* และ *L. oris*

Musikasang และคณะ (2012) คัดเลือกแบคทีเรียแลคติกจากทางเดินอาหารของไก่กระทง พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียแลคติกได้ทั้งหมด 307 ไอโซเลต จากไก่กระทง 6 ตัว นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียแลคติกทั้งหมด 14 ไอโซเลต มีคุณสมบัติสร้างแบคทีเรียโอซิน ประกอบด้วย *L. salivarius* 14 ไอโซเลต และ *L. agilis* 1 ไอโซเลต

แบคทีเรียแลคติกมีคุณสมบัติในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้หลายชนิด โดยกิจกรรมการยับยั้งส่วนใหญ่เป็นผลมาจากกรดแลคติกและกรดอินทรีย์ (organic acid) อื่นๆ ที่เชื้อผลิตขึ้นมา กรดอินทรีย์ที่ถูกผลิตจะมีผลทำให้พีเอชในระบบเปลี่ยนแปลงไปหรือมีฤทธิ์เป็นกรด ซึ่งส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์บางชนิด (Caplice and Fitzgerald, 1999) นอกจากนี้แบคทีเรียแลคติกยังผลิตสารอื่นๆ ได้แก่ อะซิตัลดีไฮด์ (acetaldehyde) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) ไดอะซีทิล (diacetyl) แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (carbon dioxide) โพลีแซคคาไรด์ (polysaccharides) และแบคทีเรียโอซิน (bacteriocins) (Caplice and Fitzgerald, 1999; De

Vuyst and Degeest, 1999; Rodrigues *et al.*, 2003) ปัจจุบันมีการนำสารที่เชื้อแบคทีเรียแลคติกผลิตไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น ใช้เป็นสารกันเสียจากชีวภาพในผลิตภัณฑ์ด้านอาหาร เป็นต้น (Chen and Hoover, 2003)

2. โพรไบโอติก

โพรไบโอติกเป็นคำที่มีรากศัพท์มาจากภาษากรีก-ลาติน หมายถึง เพื่อชีวิต (for life) ในปี ค.ศ. 1955 ได้เริ่มมีการนำเอาคำว่าโพรไบโอติกมาใช้เป็นครั้งแรกแต่ยังไม่มีใครให้คำจำกัดความของโพรไบโอติกไว้อย่างชัดเจน ต่อมา Lilly และ Stillwell (1965) ได้ให้คำจำกัดความของโพรไบโอติกไว้เป็นคนแรกว่า โพรไบโอติก คือสารที่ผลิตขึ้นจากจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งและสารนั้นสามารถกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆได้ คำจำกัดความของโพรไบโอติกที่นำมาใช้มากที่สุดเป็นของ Fuller (1989) ซึ่งได้ให้คำจำกัดความไว้ว่า โพรไบโอติก คือ อาหารเสริมที่เป็นจุลินทรีย์มีชีวิต ส่งผลให้เกิดประโยชน์ต่อสัตว์ที่จุลินทรีย์นั้นเข้าไปอาศัยอยู่ โดยอาหารเสริมช่วยเพิ่มความสมดุลของจุลินทรีย์ภายในทางเดินอาหารของสัตว์

จุลินทรีย์โพรไบโอติกไม่จำเป็นต้องเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ แต่ควรเป็นจุลินทรีย์ที่ส่งผลให้เกิดประโยชน์ต่อมนุษย์และสัตว์ (Fuller, 1989; Havenaar *et al.*, 1992; Salminen *et al.*, 1998) ดังนั้นจึงมีการศึกษาจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆที่สามารถส่งเสริมสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ให้ดีขึ้น ได้แก่ แบคทีเรียแลคติก Bifidobacteria และยีสต์ (Fuller, 1992) โดยแบคทีเรียแลคติกเป็นแบคทีเรียที่มีสมบัติเป็นโพรไบโอติกมากที่สุด แบคทีเรียแลคติกเป็นแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่อยู่ในระบบทางเดินอาหารและส่งผลให้เกิดประโยชน์ในระบบนิเวศน์วิทยาของสัตว์ ดังนั้นแบคทีเรียแลคติกจึงมีความเหมาะสมเป็นอย่างยิ่งที่จะนำมาใช้เป็นโพรไบโอติก (Holzapfel and Schillinger, 2002)

โพรไบโอติกประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์หลายชนิดซึ่งช่วยรักษาสมดุลจุลินทรีย์ภายในระบบทางเดินอาหารและป้องกันไม่ให้เชื้อก่อโรคเจริญ โดยเมื่อสัตว์ได้รับโพรไบโอติกเข้าสู่ร่างกายจะผ่านกระเพาะอาหารและไปเจริญและแข่งขันกับเชื้อก่อโรคในการยึดเกาะกับเยื่อทางเดินอาหารและมีการเพิ่มจำนวนบนเยื่อผนังลำไส้โดยเฉพาะผนังลำไส้เล็กทุกส่วน โดยแทรกตัวอยู่ที่ร่องผนังลำไส้ (villi) จึงช่วยลดการเกาะกลุ่มและทำให้เกิดการขับเชื้อก่อโรคออกจากทางเดินอาหาร (Karpinska *et al.*, 2001) และการที่โพรไบโอติกแปลกปลอมนี้เองจึงสามารถดึงดูดให้แมคโครฟาจเดินทางมาก จึงเป็นการกระตุ้นให้มีระบบภูมิคุ้มกันเฉพาะแห่งได้ดีขึ้น นอกจากนี้โพรไบโอติกยังสามารถสร้างสารซึ่งสามารถทำลายหรือยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ (Mead,

2000) โดยสร้างสารเมตาบอไลต์ที่มีผลยับยั้งปฏิกิริยาการสร้างสารพิษหรือสารที่ก่อให้เกิดมะเร็ง และกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ในปฏิกิริยาการกำจัดสารพิษ (ชรินทร์ เขียวจรัส, 2539)

การคัดเลือกจุลินทรีย์โปรไบโอติกในการนำมาใช้ไม่มีข้อกำหนดตายตัว แต่มักจะเอาวัตถุประสงค์ในการนำไปใช้เป็นข้อกำหนดหรือคัดเลือก ถ้าหากนำไปใช้ในอาหารควมมีเรื่องของความปลอดภัย การเลือกรอดในลำไส้ การยับยั้งเชื้อก่อโรค การคงทนต่อกระบวนการผลิตอาหาร อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์ที่จะนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกควรมีคุณสมบัติดังนี้

1. จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโปรไบโอติกต้องได้รับการยอมรับแล้วว่าเป็นสายพันธุ์ที่ปลอดภัย (GRAS; Generally Recognized As Safe) ซึ่งจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่ปลอดภัยต้องมีลักษณะดังต่อไปนี้ (Salminen *et al.*, 2000)

- แหล่งที่มาในการแยกเชื้อต้องเป็นแหล่งที่มีความปลอดภัย เมื่อตรวจสอบสกุล (genus) และสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ในเบื้องต้นต้องพบว่าเป็นสายพันธุ์ที่ปลอดภัย
- เป็นจุลินทรีย์ที่ไม่สร้างสารพิษ
- จุลินทรีย์สายพันธุ์ที่จะเป็นโปรไบโอติกต้องมีความสัมพันธ์เกื้อกูลหรือเป็นสายพันธุ์ชนิดเดียวกับแบคทีเรียประจำถิ่นในสัตว์เจ้าบ้าน

2. สามารถทนต่อน้ำดีและความเป็นกรดภายในระบบทางเดินอาหารของสัตว์เจ้าบ้าน รวมทั้งสามารถดำรงชีวิตอยู่ในระบบทางเดินอาหารได้ โปรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่ต้องทนผ่านและอาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ที่บริโภคโปรไบโอติก สภาวะแวดล้อมแรกที่ส่งผลกระทบต่อการรอดชีวิตของโปรไบโอติกคือสภาวะแวดล้อมในกระเพาะอาหารที่มีความเป็นกรดสูง (Lankaputhra and Shah, 1995) และการหลั่งน้ำดีในลำไส้เล็กสามารถทำลายผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ซึ่งมีส่วนประกอบส่วนใหญ่เป็นสารประเภทไลปิดและกรดไขมัน ดังนั้นโปรไบโอติกจึงต้องสามารถทนต่อน้ำดีและความเป็นกรดในทางเดินอาหารของสัตว์ได้ (Reuter, 2001)

3. สามารถยึดติดกับผนังลำไส้ของสัตว์เจ้าบ้านและแข่งขันการยึดติดกับจุลินทรีย์ก่อโรค การยึดติดของจุลินทรีย์กับผนังลำไส้ของสัตว์เจ้าบ้านเป็นปัจจัยหนึ่งในการคัดเลือกจุลินทรีย์โปรไบโอติกนอกเหนือจากคุณสมบัติการทนต่อกรดและน้ำดีและการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค (Mattila-Sandholm *et al.*, 1999) เนื่องจากการยึดติดกับลำไส้ทำให้เชื้อจุลินทรีย์โปรไบโอติก สามารถเพิ่มจำนวนได้ภายในระบบทางเดินอาหารและกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์เจ้าบ้าน (Ouwehand *et al.*, 1999) ช่วยในการซ่อมแซมผนังทางเดินอาหารและต่อต้านจุลินทรีย์ก่อโรค (Reid and Burton, 2002)

4. มีความสามารถในการเพิ่มจำนวนในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ได้มาก
5. ผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคที่เป็นจุลินทรีย์ภายในระบบทางเดินอาหาร

6. ป้องกันการรุกรานของจุลินทรีย์ก่อโรคและช่วยเพิ่มระดับของภูมิคุ้มกัน

- แบคทีเรียที่สามารถยึดติดกับผนังลำไส้ เช่น *L. johnsonii* Lj1 และ *B. lactis* Bb12 ทำให้เพิ่มความสามารถในการกำจัด *E. coli* ด้วยกระบวนการ phagocyte ของเซลล์เม็ดเลือดขาว (Schiffrin *et al.*, 1994) การยึดติดผนังลำไส้สัตว์เจ้าถิ่นของจุลินทรีย์โปรไบโอติกมีอิทธิพลต่อการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน โดยกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่อยู่ในเนื้อเยื่อน้ำเหลืองบริเวณลำไส้ โดยเนื้อเยื่อน้ำเหลืองนี้แพร่กระจายอยู่ระหว่างชั้นของเซลล์เยื่อบุผิว (epithelial cells) และถัดมาจนถึงชั้นของกล้ามเนื้อ (Mardara, 1997) โปรไบโอติกสามารถกระตุ้นเนื้อเยื่อน้ำเหลืองบริเวณลำไส้โดยตัวโปรไบโอติกหรือชิ้นส่วนโปรไบโอติกหรือสารเมตาบอไลต์ที่โปรไบโอติกผลิตขึ้น เรียกสิ่งเหล่านี้ว่า แอนติเจน (antigen) เมื่อแอนติเจนเข้าไปในลำไส้จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเยื่อบุผิวเป็น M-cells เรียกว่า follicle associated epithelium (FAE) ที่ต่อมน้ำเหลืองภายในลำไส้หรือ Payer's patches (Laissue *et al.*, 1993) ซึ่ง M-cells สามารถรับแอนติเจนได้

- แบคทีเรียที่ไม่ยึดติดกับผนังลำไส้ของสัตว์เจ้าถิ่นสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันของสัตว์ได้โดยตรง เช่น เพิ่มแบคทีเรียประจำถิ่นในลำไส้ของสัตว์ กระตุ้นการดูดซึมแอนติเจนของสัตว์ และผลิตสารช่วยเสริมภูมิคุ้มกัน เช่น อินเตอร์เฟอรอน (interferon) เป็นต้น (Ouweland *et al.*, 1999) โดยการทดลองใน *in vitro* พบว่า การบริโภคแบคทีเรียแลคติกสามารถเพิ่มการหมุนเวียนของแอนติบอดี (antibody) ในร่างกาย เพิ่มกิจกรรมของมาโครฟาจ (macrophage) และเพิ่มจำนวน natural killer cells (NK-cells) (Perdigon *et al.*, 2000) Payer's patches แทรกระหว่างเยื่อบุลำไส้ Villi FAE

7. มีความคงตัวสูง โดยเมื่อเซลล์อิสระของแบคทีเรียผ่านกระบวนการผลิตแล้วตัวสามารถที่จะมีชีวิตอยู่และเก็บรักษาได้นาน (Holzapfel *et al.*, 1998)

8. ผลิตเอนไซม์สำหรับย่อยสลายอาหารบางชนิดได้ เช่น β -galactosidase เพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ เช่น ส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ β -galactosidase ในคน โดยแบคทีเรียแลคติกจะส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ β -galactosidase ในการช่วยย่อยน้ำตาลกาแลคโตสในน้ำนม (Marteau *et al.*, 1997) ลดการทำงานของเอนไซม์บางชนิด เช่น β -glucuronidase และ azoreductase ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้เป็นเอนไซม์ที่แรงหรือกระตุ้นให้เกิดมะเร็ง (Rowland *et al.*, 1992)

Jin และคณะ (2000) ใช้ *L. acidophilus* เสริมในอาหารไก่กระทง 2 แบบคือ เสริม *L. acidophilus* อย่างเดียวในอาหาร และใช้เชื้อ *Lactobacillus* ผสมกัน 12 สายพันธุ์เสริมลงในอาหารไก่กระทง พบว่า หลังจากไก่กระทงกินอาหารที่เสริม *Lactobacillus* แล้วจะมีปริมาณของเอนไซม์ amylase ในลำไส้เล็กสูงขึ้น แต่เอนไซม์ proteolytic และ lipolytic คงที่ นอกจากนี้พบว่าไก่กระทงที่กินอาหารเสริมที่มี *Lactobacillus* ผสมกัน 12 สายพันธุ์ จะทำให้มีเอนไซม์ β -galactosidase และ β -glucuronidase ในมูลลดลง

9. ทนต่ออุณหภูมิสูง การผลิตโปรไบโอติกในระดับอุตสาหกรรมโดยส่วนใหญ่จะใช้วิธีการ spray-drying ผสมกับอาหารและส่วนประกอบต่างๆ เนื่องจากสะดวกในการเก็บรักษาและขนส่ง (Ross *et al.*, 2005) ซึ่งในกระบวนการผลิตจะใช้อุณหภูมิสูง ส่งผลให้เซลล์เกิดการสูญเสียน้ำและตายทำให้ประสิทธิภาพของโปรไบโอติกลดลง (Teixeira *et al.*, 1995) ดังนั้นคุณสมบัติการทนอุณหภูมิสูงของแบคทีเรียที่จะนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกจึงเป็นคุณสมบัติที่สำคัญปัจจัยหนึ่งของแบคทีเรียโปรไบโอติก (กิจการ ศุภมาตย์, 2544)

2.1 การทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของโปรไบโอติก

3. โปรไบโอติกคือจุลินทรีย์ที่มีชีวิตและเข้าไปอยู่ในเจ้าบ้าน เป็นอาหารเสริมประโยชน์ต่อสุขภาพของเจ้าบ้านโดยจะช่วยให้การปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ (Adhikari *et al.*, 2000) ดังนั้นโปรไบโอติกจึงต้องมีคุณสมบัติทนต่อสภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหารและทนต่อเกลือในลำไส้ ขั้นตอนของการทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้นที่ทดสอบกันมีดังนี้

4. 2.1.1 ทดสอบการทนต่อกรด

ภายในกระเพาะอาหารจะมีสภาพเป็นกรดเนื่องจากการหลั่งกรดไฮโดรคลอริกออกมาเพื่อทำให้โปรตีนเสียสภาพและง่ายต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยเอนไซม์ที่สาคัญที่หลั่งออกมาในกระเพาะอาหารเพื่อย่อยโปรตีนคือเอนไซม์ pepsin ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีในสภาวะกรดพีเอชอยู่ในช่วง 2-3 การทำงานร่วมกันของกรดไฮโดรคลอริกและเอนไซม์นี้สามารถก่อให้เกิดความเสียหายต่อผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกทำให้แบคทีเรียไม่สามารถรอดชีวิตได้ (Johnson *et al.*, 2006) การทดสอบการทนต่อกรดของโปรไบโอติกในห้องปฏิบัติการจึงนิยมทดสอบโปรไบโอติกในสภาวะที่เป็นกรดพีเอช 2-3 และมีเอนไซม์ pepsin ร่วมกัน ซึ่งระยะเวลาในการทดสอบจะขึ้นอยู่กับการนำไปใช้กับสิ่งมีชีวิตใด เมื่อเปรียบเทียบกับกับมนุษย์และสัตว์จำพวกสุกรและโคแล้วทางเดินอาหารของไก่จะสั้นกว่า ดังนั้นระยะเวลาที่อาหารผ่านเข้าไปในทางเดินอาหารก็สั้นด้วย คือประมาณ 2 ชั่วโมง 30 นาที (รุจา มาลัยพวง, 2544)

Mojgani และคณะ (2007) คัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากทางเดินอาหารของไก่สามารถคัดแยกแบคทีเรียแลคติก 75 ไอโซเลต หลังจากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้ไปทดสอบคุณสมบัติการทนกรดที่พีเอช 1, 2, 3, 4 และ 5 พบว่าแบคทีเรียแลคติกส่วนใหญ่ทนกรดได้ในช่วงของพีเอช 4-5 มีเพียง 3 สายพันธุ์ คือ *L. acidophilus* RNL 26, *L. fermentum* RNL 44 และ *L. salivarius* RNL 49 ที่สามารถทนต่อสภาวะกรดที่พีเอช 3 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยจำนวนเซลล์ลดลง 1-2 log CFU/ml จากจำนวนเซลล์เริ่มต้นประมาณ 9 log CFU/ml และสายพันธุ์ *L. fermentum*

RNL 44 ทนต่อการได้ในช่วงพีเอชที่ต่ำกว่า 2 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง มีจำนวนเซลล์ลดลง 3 log CFU/ml

Shin และคณะ (2008) ศึกษาสมบัติการทนต่อสภาวะกรดของแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคทีเรียโอซิน 3 สายพันธุ์ คือ *E. faecium* SH 528, *E. faecium* SH 632 และ *P. pentosaceus* SH 740 ที่สภาวะกรดพีเอช 2.0, 2.3, 2.5 และ 3.0 ที่ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่า *E. faecium* SH 528 สามารถทนต่อสภาวะกรดได้ดีกว่าอีก 2 สายพันธุ์ โดยที่สภาวะกรดพีเอช 3.0 มีจำนวนเซลล์ลดลง 1-2 log CFU/ml และจำนวนเซลล์จะลดลง 4-5 log CFU/ml เมื่อทดสอบที่สภาวะกรดพีเอช 2.0 โดยทุกสายพันธุ์มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นประมาณ 8 log CFU/ml

Musikasang และคณะ (2009) ศึกษาความสามารถในการทนกรดและเอนไซม์ pepsin ของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากไก่กระตาง 226 ไอโซเลต โดยทำการทดสอบในสภาวะกรดพีเอช 2.5 และมีเอนไซม์ pepsin ปริมาตร 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ 41°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบมีเพียง 20 ไอโซเลต ทนต่อการและเอนไซม์ pepsin ได้ดี โดยจำนวนเซลล์ลดลง 1-2 log CFU/ml โดยทุกสายพันธุ์มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นประมาณ 9 log CFU/ml

Guo และคณะ (2010) ศึกษาความสามารถในทนต่อสภาวะกรดของแบคทีเรียแลกติก 15 ไอโซเลต ที่คัดแยกได้จากทางเดินอาหารสุกร โดยทำการทดสอบในสภาวะกรดพีเอช 3.0 และ 2.0 ที่ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่า แบคทีเรียแลกติกเกือบทุกไอโซเลตไม่มีการลดลงของเซลล์ที่สภาวะกรดพีเอช 3.0 แต่เมื่อนำแบคทีเรียแลกติกทดสอบที่สภาวะกรดพีเอช 2.0 จำนวนเซลล์จะลดลง 4-5 log CFU/ml โดยทุกสายพันธุ์มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นประมาณ 8 log CFU/ml

โดยทั่วไปผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกจะหนากว่าแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งประกอบด้วย peptidoglycan, teichoic acid และ churonic acid และมากกว่า 50%) โดยน้ำหนักของ peptidoglycan (peptidoglycan) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์สายตรงของ disaccharide pentapeptide ประกอบด้วยน้ำตาล 2 ชนิดคือ N-acetylglucosamine (NAG) และ N-acetylmuramic acid (NAM) โดยมีกรดอะมิโน 4 กลุ่ม (tetrapeptide) เชื่อม NAG และ NAM เข้ากัน NAM ยังเชื่อมกับโปรตีน (protein crystal) S-layer แทรกอยู่ ซึ่งแบคทีเรียแกรมบวกมีชั้นเปปติโดไกลแคนหนาถึงประมาณ 20-80 นาโนเมตร (Firtel et al., 2004; Johnon et al., 2006) สำหรับผนังเซลล์ของแบคทีเรียเมื่อผ่านเข้าสู่กระเพาะอาหารในสภาวะที่มีทั้งกรดและเอนไซม์ pepsin ซึ่งจะเข้าไปทำลายชั้นเปปติโดไกลแคน NAG และ NAM แยกออกจากกัน เมื่อผนังเซลล์ถูกทำลายลงทั้งนี้ความสามารถในการทนต่อการของแบคทีเรียแลกติกอาจเนื่องมาจากเชื้อแบคทีเรียแลกติกแต่ละไอโซเลตที่คัดแยกได้จากระบบทางเดิน

ซึ่งมีการสัมผัสและทำปฏิกิริยากับกรดตลอดเวลา (Franz *et al.*, 1999) นอกจากนี้การทนต่อกรดของแบคทีเรียยังเกี่ยวข้องกับโปรตีนกลุ่มหนึ่งคือ heat shock protein เป็นโปรตีนที่จะแสดงออก (expression) เมื่อเซลล์สัมผัสกับ heat shock factor เช่น ความร้อน กรดและสารเคมี เป็นต้น โปรตีนที่อยู่ในกลุ่มนี้ เช่น methionine sulfoxide reductase, F1F0-ATPase heat shock protein 3 Family Hsp60, Hsp70 Hsp90 ซึ่งในแต่ละ family F1F0-ATPase Hsp60 เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ adenosine triphosphate (ATP) adenosine diphosphate (ADP) ATP จะทำหน้าที่ดึง phosphate ATP ADP heat shock protein ได้ในสิ่งมีชีวิต เอนไซม์ ATPase จะถูกสร้างขึ้นโดยมีกรดเป็น heat shock factor แบ่งออกตามโครงสร้างได้ 5 ชนิด คือ F-ATPase, V-ATPase, A-ATPase, P-ATPase E-ATPase ซึ่งเอนไซม์ ATPase ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการทนกรดของแบคทีเรียคือ F-ATPase เอนไซม์นี้เป็น transmembrane protein ที่พบได้ในผนังเซลล์ของแบคทีเรียซึ่งเกี่ยวข้องกับ ATP (proton) (Na⁺) (K⁺) มาอยู่ที่ผิวเซลล์ของแบคทีเรีย ทำให้ ภาวะที่ผิวเซลล์เป็นด่าง ดังนั้นเมื่อแบคทีเรียอยู่ในสภาวะที่เป็นกรด เช่น กระเพาะอาหาร แบคทีเรียก็จะสามารถอยู่รอดได้เนื่องจากเกิดสภาวะที่เป็นกลางบริเวณผนังเซลล์ (Schlesinger, 1990) พันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ชนิดนี้ได้ เช่น *L. acidophilus* (Kullen and Klaenhammer, 1999) *L. lactis* (Koebmann *et al.*, 2000)

2.1.2 ทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดี

น้ำดีสังเคราะห์จากโคเลสเตอรอลโดยเซลล์ pericentral hepatocytes ลักษณะเป็นของเหลวสีเหลืองอมเขียว โดยทั่วไปมีพีเอชอยู่ในช่วง 7.5-8.0 องค์ประกอบหลักของน้ำดีประกอบด้วย กรดน้ำดี (bile acids) cholesterol phospholipids biliverdin นอกจากนี้ยังมีการหลั่ง Immunoglobulin A mucus เข้าสู่ น้ำดีเพื่อช่วยในการป้องกัน น้ำดีที่สร้างแล้วจะถูกกักเก็บไว้ในถุงน้ำดี (gall bladder) และน้ำดี 80% ของถุงน้ำดีจะถูกปล่อยเข้าสู่ลำไส้ส่วน duodenum jejunum เมื่อได้รับการกระตุ้นจากอาหารที่เดินทางมาถึง โดยอาหาร นั้นจะกระตุ้นการหลั่งฮอร์โมน secretin cholecystikinin ซึ่งฮอร์โมนทั้งสองนี้มีความสำคัญต่อการหลั่งและการไหลเวียนของน้ำดีในท่อน้ำดี (Hofmann, 1999) หน้าที่หลักของน้ำดีคือทำให้ไขมันแตกตัวและเข้ากับน้ำได้ดีขึ้น น้ำดียังมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในทางเดินอาหาร เนื่องจากเกลือน้ำดี (bile salt) ซึ่งเป็นกรดน้ำดีชนิดหนึ่งจะไปทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเสียหายโดยไปละลายไขมันในส่วนโครงสร้างฟอสโฟลิปิด

Musikasang (2009) ศึกษาความสามารถในการทนเกลือน้ำดีของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากไก่กระทุง โดยทำการทดสอบในสภาวะที่มีน้ำดีสดของไก่กระทุงและมี pancreatin ที่สภาวะต่าง ๆ ที่ 8.0 ที่ 41°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่าจำนวนเซลล์เริ่มต้น 10^3 กลายเป็น $7 \log \text{ CFU/ml}$ จำนวนเซลล์เริ่มต้น $8 \log \text{ CFU/ml}$

Taheri et al. (2009) ศึกษาคุณสมบัติการทนต่อสภาวะน้ำดีของแบคทีเรียแลคติกที่มีคุณสมบัติในการยืดเกาะผนังลำไส้ 62 สายพันธุ์ ผลพบว่าสายพันธุ์ที่ทนทานต่อการยับยั้งโดยกรดไขมันอิสระได้ดีที่สุดคือ Lactobacillus acidophilus ATCC 35289 และ Lactobacillus casei ATCC 392 สามารถทนต่อการยับยั้งโดยกรดไขมันอิสระได้ดีกว่า 0.075, 0.15, 0.3 และ 1.0% ผสมอยู่ในอาหารหมักที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยไม่เจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำดีมากกว่า 0.3% ในขณะที่ Lactobacillus casei ได้เติบโตบนอาหารที่มีน้ำดีต่ำกว่า 0.15%

ความสามารถในการทนต่อน้ำดีของแบคทีเรียที่เรียนั้นอาจจะมีเกี่ยวข้องกัน
 กับการผลิต bile salt hydrolases (BSH) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่แบคทีเรียผลิตขึ้น โดย BSH สามารถ

น้ำดีและทำลายความเป็นพิษของน้ำดี โดยการเข้าไปรวมตัว (conjugated) กับน้ำดี (Moser and Savage, 2001)

Hosseini *et al.* (2009) ศึกษาความสามารถในการทนเกลือน้ำดีของ *E. faecium* 4 สายพันธุ์ (*E. faecium* LHICA28-4, *E. faecium* LHICA 34-5, *E. faecium* LHICA 40-4, *E. faecium* LHICA 46) ซึ่งคัดแยกจากอาหารสัตว์ทางการค้า พบว่า ทั้ง 4 สายพันธุ์สามารถทนต่อสภาวะน้ำดีได้และเมื่อนำทั้ง 4 สายพันธุ์ไปทดสอบกับ bile salt hydrolase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการย่อยเกลือน้ำดี พบว่าทั้ง 4 สายพันธุ์สามารถผลิต bile salt hydrolase ได้เช่นกัน ซึ่งคือเหตุผลที่ทำให้ *E. faecium* 4 สายพันธุ์สามารถทนต่อสภาวะน้ำดีได้

Guo *et al.* (2010) ศึกษาความสามารถในการทนต่อสภาวะเกลือน้ำดีของ *E. faecium* 15 ไอโซเลต ที่คัดแยกได้จากทางเดินอาหารของสัตว์ปีก พบว่า ทั้ง 15 ไอโซเลตสามารถทนต่อสภาวะเกลือน้ำดีได้และเมื่อทดสอบความสามารถในการทนต่อสภาวะเกลือน้ำดี พบว่า ทุกสายพันธุ์สามารถทนต่อสภาวะเกลือน้ำดีได้เช่นกัน

2.1.3 ทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

โปรไบโอติกที่ดีจำเป็นต้องสามารถสร้างสารประกอบออกมายับยั้งแบคทีเรียก่อโรคซึ่งสารประกอบต่างๆที่โปรไบโอติกผลิตออกมามีผลต่อแบคทีเรียได้ 2 ลักษณะคือ มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญ (bacteriostatic) และฤทธิ์ในการฆ่า (bactericidal) (González *et al.*, 2007) โปรไบโอติกที่ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของโปรไบโอติกอาจเป็นผลมาจากกรดอินทรีย์ที่ผลิตออกมาทำให้พีเอชในสภาวะแวดล้อมลดลงหรืออาจเกิดจากสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งที่แบคทีเรียสร้างขึ้น เช่น แบคทีเรียโอซิน (bacteriocins) เป็นต้น

Shin *et al.* (2008) ศึกษาความสามารถในการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของ *E. faecium* SH 528, *E. faecium* SH 632 และ *P. pentosaceus* SH740 สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรค ได้แก่ *Clostridium perfringens* และ *L. monocytogenes*

Musikasang *et al.* (2009) ศึกษาความสามารถในการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากไก่กระทอง 20 สายพันธุ์ พบว่า แบคทีเรีย 10 สายพันธุ์ทั้งหมดสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคคือ *E. coli*, *Salmonella* sp. และ *S. aureus* ซึ่งการยับยั้งที่เกิดขึ้นเกิดจากกรดอินทรีย์

Hosseini *et al.* (2009) ศึกษาการยับยั้ง *B. cereus* ATCC 11040, *Carnobacterium maltaromaticum*, *L. monocytogenes* และ *S. aureus* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคของ *E.*

faecium 4 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคทั้งหมดได้ ซึ่งการยับยั้งที่เกิดขึ้นเกิดจากแบคทีเรียโอซิน

Taheri *et al.* (2009) คัดแยกแบคทีเรียแลคติก 291 สายพันธุ์ จาก [] สายพันธุ์ สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรค คือ *Salmonella* Enteritidis, *S. Typhimurium* และ *E. coli* O78:K80

Guo *et al.* (2010) ศึกษาความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *E. coli* O55, *S. Typhimurium* ST302 และ *S. aureus* ATCC 25923 โดยสายพันธุ์ 15 สายพันธุ์ ซึ่งแยกได้จาก [] สายพันธุ์ สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ทุกชนิดที่ทดสอบ ซึ่งเมื่อทำการทดสอบพบว่า การยับยั้งที่เกิดขึ้นเกิดจาก []

2.2 สารต่อต้านจุลินทรีย์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลคติก

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เชื้อแบคทีเรียแลคติกผลิตขึ้น ได้แก่ กรดอินทรีย์ โคอรีซินลิน (reuterin) และ [] (Corsetti and Settanni, 2007) อย่างไรก็ตามคุณลักษณะของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพแต่ละชนิดก็ออกฤทธิ์ที่ต่างกัน

2.2.1 กรดอินทรีย์ (organic acid)

แบคทีเรียแลคติกในกลุ่มโคโนเฟอร์เมนเททิฟจะหมักน้ำตาลกลูโคสให้เป็น [] Embden-Meyerhof-Parnas pathway (EMP) ในขณะที่ [] จะหมักน้ำตาลกลูโคสได้เป็นกรดแลคติก เอทานอล กรดคาร์บอนไดออกไซด์ และบาง [] 6-phosphogluconate pathway (De Moss *et al.*, 1951) กระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคสของแบคทีเรียแลคติกแสดงดังภาพที่ 1 กรดแลคติกที่เชื้อผลิตจะมีผลทำให้พีเอชของระบบมีค่าลดลงหรือมีพีเอชเป็นกรด ซึ่งพีเอชที่เป็นกรดจะส่งผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด ไม่ว่าจะเป็นแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ เชื้อรา และเชื้อยีสต์บางชนิด (Saminen and von Wright, 1998) โดยฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ของกรดอินทรีย์นั้นเกิดขึ้นจากการลดลงของพีเอชและกรดอินทรีย์รูปแบบที่ไม่แตกตัว (undissociated form) (Podolak *et al.*, 1996) ซึ่งกรดอินทรีย์จะผ่านเข้าไปใน [] (cytoplasm) ที่เป็นกรดและสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ (Kashket, 1987) [] ที่จำเป็นต่อการดำรง [] (Snijders *et al.*, 1985; Goncalves *et al.*, 1997)

ไฮดรอกซิลเรดิคัล (hydroxyl radicals, $\text{OH}\cdot$) (Byczkowski and Gessner, 1988) ซึ่งสามารถทำลายกรดนิวคลีอิก โปรตีนและชีวโมเลกุลอื่นๆ ของจุลินทรีย์ได้

2.2.3 คาร์บอนไดออกไซด์ (carbon dioxide; CO_2)

เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการหมักน้ำตาลคาร์บอน 6 น้ำตาลเฮกโซส (hexose) คาร์บอนไดออกไซด์มีฤทธิ์ต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์โดยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จะทำให้เกิดระบบไร้อากาศเกิดขึ้นในสิ่งแวดล้อม ซึ่งจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มที่ทำให้เกิด decarboxylation ในชั้นของไขมัน (lipid bilayer) สภาวะที่มีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์อยู่น้อยก็อาจส่งเสริมการเจริญต่อจุลินทรีย์บางกลุ่ม แต่ คาร์บอนไดออกไซด์มากเกินไปก็อาจไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์บางกลุ่ม (Salminen and von Wright, 1998)

2.3.4 ไดอะซีทิล (diacetyl)

2,3-butanedione ส่วนใหญ่จะพบในเชื้อแบคทีเรียแลคติกใน *Lactobacillus*, *Leuconostoc* และ *Streptococcus* โดยมากจะมีผลต่อแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ และรา มากกว่าเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งไปมีผลต่ออาร์จินีน (arginine) ที่เชื่อมต่อกับปลายของโปรตีนในแบคทีเรียแกรมลบ (Jay, 1982)

2.2.5 แบคทีริโอซิน (bacteriocin)

ซึ่งขึ้นที่ถอดรหัสมาจากไรโบโซมที่มีฤทธิ์ต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (ribosomally synthesized antimicrobial peptides) 30-60 อะมิโน มีฤทธิ์ต่อการยับยั้ง (bactericidal) เชื้อแบคทีเรียใน (bacteriostatic) เชื้อแบคทีเรียใน (Garneau *et al.*, 2002)

3. แบคทีริโอซิน

แบคทีริโอซินถูกค้นพบครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1925 จากเชื้อ *E. coli* V มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ϕ หลังจากนั้นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้ง (colicin) (Crupper *et al.*, 1997) คือสารที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ และมีฤทธิ์ต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกัน ในขณะที่สารปฏิชีวนะจะเป็นสารที่ผลิตจากสิ่งมีชีวิตหนึ่ง (โปรคาริโอต และยูคาริโอต) ที่มีฤทธิ์ต่อ

การยับยั้งสิ่งมีชีวิตอื่น (ไม่ว่าจะเป็นโปรคาริโอต และยูคาริโอต) ในระดับความเข้มข้นต่ำ ซึ่งความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียโอซินกับสารปฏิชีวนะแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบคุณสมบัติของแบคทีเรียโอซินและสารปฏิชีวนะ

คุณสมบัติ	แบคทีเรียโอซิน	สารปฏิชีวนะ
1. การยับยั้ง (Application)	ยับยั้งการเจริญเติบโต	ยับยั้งการเจริญเติบโต
2. การสังเคราะห์ (Synthesis)	สังเคราะห์โดยแบคทีเรีย	สังเคราะห์โดยสิ่งมีชีวิตอื่น
3. กิจกรรม (Activity)	ยับยั้งในช่วงแคบ	ยับยั้งในช่วงกว้าง
4. การป้องกันจากเซลล์ที่ผลิต (Host cell immunity)	มี	ไม่มี
5. กลไกการยับยั้งเซลล์เป้าหมาย (Mechanism of target cell)	ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน	ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน
6. การต้านทานหรือการทน (Resistance or tolerance)	องค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์	ขึ้นอยู่กับกลไกการยับยั้ง
7. ข้อกำหนดการมีปฏิสัมพันธ์ (Interaction requirements)	ต้องกึ่งโมเลกุลบางชนิด	ไม่มีข้อกำหนด
8. กลไกการยับยั้ง (Mode of action)	ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน	มีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ หรือยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน
9. ความเป็นพิษ/ผลข้างเคียง (Toxicity/side effects)	ไม่มี	มี

ที่มา: Cleveland และคณะ (2001)

การยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียโดยแบคทีเรียโอซินนั้นมีความปลอดภัยสูง เนื่องจากแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียที่ปลอดภัย (Generally Recognized As Safe; GRAS) นอกจากนี้แล้วแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียที่ปลอดภัยก็มีความปลอดภัยสูงเช่นกัน

เซลล์ (eukaryotic cell) เซลล์ของสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวหรือหลายเซลล์ที่มีเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มนิวเคลียส (Gálvez *et al.*, 2007) แบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียส่วนใหญ่เป็นโปรตีนที่มีประจุเป็นบวก (cationic) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 3-60 กิโลดาลตัน มีค่าจุดไอโซอิเล็กทริกที่สูง (high isoelectric point) (Lima and Filho, 2005)

ตารางที่ 2 แบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติก

ชื่อแบคทีเรีย	ชื่อแบคเทอริโอซิน	กลุ่มที่
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Nisin	I
	Lacticin 3147	I
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	Acidocin CH5	II
	Lactacin F	II
	Lactacin B	II
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	Lactobin A	II
<i>Lactobacillus casei</i>	Lactocin 705	II
<i>Leuconostoc gelidum</i>	Leucocin A	II
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Mesentericin Y105	II
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Pediocin F	II
	Pediocin PA-1	II
	Pediocin AcH	II
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Pediocin A	II
<i>Enterococcus faecium</i>	Enterocin A	II
<i>Lactobacillus sake</i>	Lactocin S	I
	Sakacin P	II
<i>Lactobacillus curvatus</i>	Curvacin A	II
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Helveticin J	III

ที่มา: Parada *et al.* (2007)

3.1 การตั้งชื่อของแบคทีเรีย

การตั้งชื่อของแบคทีเรียโดยปกติจะตั้งโดยใช้ชื่อของจีนัสหรือสปีชีส์ "cin" ตัวอย่างการตั้งชื่อแบคทีเรียโดยใช้ชื่อของจีนัส ได้แก่ plantaricin, sakacin และ caseicin และตัวอย่างการตั้งชื่อแบคทีเรียโดยใช้ชื่อของจีนัส lactococcin, lactocin และ pediocin แต่อย่างไรก็ตามก็มีการตั้งชื่อแบคทีเรียที่ไม่ใช้ชื่อของจีนัสหรือสปีชีส์ เช่น เรียกแบคทีเรียที่ผลิตจากกลุ่มของเชื้อ *Lactococcus* lactostrepcin, nisin และ diplococcin ครั้งหนึ่งมีการใช้ตัวอักษรภาษาอังกฤษตามหลังชื่อของแบคทีเรีย ซึ่งมีความหมายถึงลำดับของการค้นพบ เช่น lactacin F ที่ผลิตจากเชื้อ *Lactobacillus* sp. ค้นพบเป็นลำดับที่ 6 จากที่มีการรายงานมา (Lima and Filho, 2005)

3.2 การจัดกลุ่มของแบคทีเรีย

Klaenhammer (1993) ได้แบ่งแบคทีเรียออกเป็น 3 กลุ่มตามลักษณะโครงสร้างของผนังเซลล์ ดังนี้

I. Lantibiotic เป็นแบคทีเรียที่มีขนาดเล็กและมีกรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบ 19-37 โมเลกุล ซึ่งเป็นกรด α, β -unsaturated dehydroalanine dehydrobutyrine thioether ซึ่งประกอบด้วย lanthionine β -methylanthionine thioether 5 ทำให้มีความแตกต่างจากแบคทีเรียชนิดอื่นๆ 2

- lantibiotic A ซึ่งมีลักษณะโครงสร้างเป็น screw-shaped 2,164-3,488 nisin จากเชื้อ *L. lactis* ssp. *lactis* lactacin F จากเชื้อ *L. sake* L45

- lantibiotic B ซึ่งมีลักษณะโครงสร้างเป็น globular-shaped 1,959-2,014 ancovonin จากเชื้อ *Streptomyces* sp.

เนื่องจากแบคทีเรียในกลุ่มนี้มีความสามารถในการทนความร้อนได้ ดังนั้นจึงเป็นที่สนใจเพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร โดยแบคทีเรียในกลุ่มนี้จะมีขนาดเล็กกว่า 5 และมีโครงสร้างที่เป็นวงแหวนซึ่งเกิดจากการสร้างพันธะอีเทอร์ระหว่างกรดอะมิโน lanthionine methyl lantionine แบคทีเรียในกลุ่มนี้ถูกสังเคราะห์โดยการถอดรหัส โครงสร้างที่เฉพาะตัวและมีกรดอะมิโนชนิด lanthionine องค์ประกอบ นอกจากนี้ lanthionine serine threonine cysteine โดยการดึงน้ำออก (dehydration) (ภาพที่ 2) α, β -unsaturated didehydroalanine (Dha Ser)

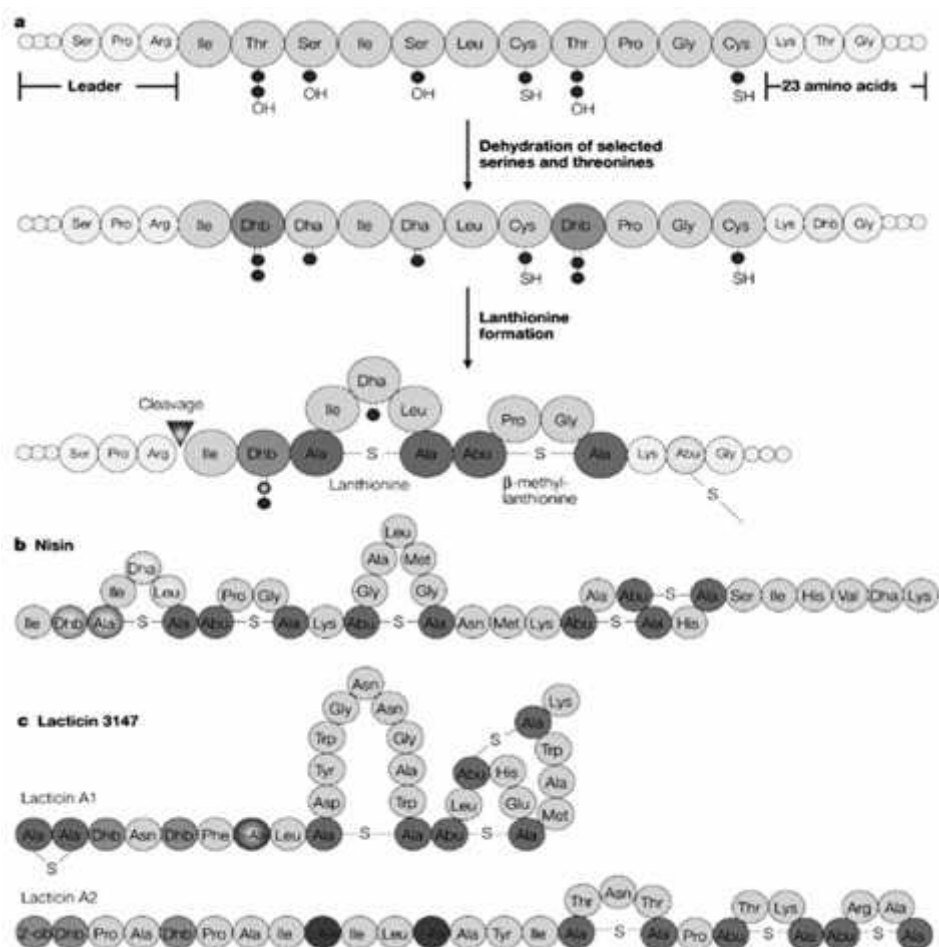
didehydrobutyrine (Dhb) Thr) Dha thioether cysteine lantionine Dhb thioether cysteine methyl lantionine

II. Non-lantibiotic ขนาดเล็ก เป็นแบคทีเรียโอซินที่มีมวลโมเลกุลน้อยกว่า 15,000 ดาลตัน มีความคงตัวต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 100 °C 30 lactacin B จากเชื้อ *L. acidophilus* N2 *L. lactis* ssp. *cremoris* 346 หรือที่อุณหภูมิ 121 °C 15 lactacin F จากเชื้อ *L. acidophilus* 11088 3 กลุ่มย่อยดังนี้

- IIa. เป็นแบคทีเรียโอซินที่มีขนาดเล็กกว่า 10 เปปไทด์ที่ทนร้อน โดยแบคทีเรียโอซินในกลุ่มนี้จะประกอบด้วยลำดับของกรดอะมิโนที่มีกิจกรรมการยับยั้งเชื้อในกลุ่ม *Listeria* YGNGVXC pediocin AcH/PA1, merentericin Y 105, sakasin A, sakasin P carnobactreiocin B2 แบคทีเรียโอซินในกลุ่มนี้จะ cytoplasmic membrane ส่งผลให้เกิดความไม่สมดุลของไอออนและเกิดการรั่วไหล (Abee *et al.*, 1995)

- IIb. แบคทีเรียโอซินในกลุ่มนี้จะยับยั้งเชื้อโดยทำให้เกิดรูที่ผนังเซลล์ เป็นแบคทีเรียโอซินที่ประกอบด้วยเปปไทด์ 2 ชนิด ซึ่งชนิดหนึ่งจะยับยั้งการยับยั้งเสริมกันเมื่อทำงานร่วมกัน เช่น enterocins L50A L50B (Cintas *et al.*, 1998) และมีบางชนิดที่ต้องมีเปปไทด์ทั้งสองชนิดจึงสามารถมีกิจกรรมการยับยั้งได้ เช่น lactococcins Gα/Gβ, lactococcins M/N plantaricins EF JK (Nissen-Meyer *et al.*, 1992; Van Belkum *et al.*, 1991; Diep *et al.*, 1996)

- IIc. แบคทีเรียโอซินในกลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่รวมแบคทีเรียโอซินตัวอื่นๆที่ IIa IIb ส่วนใหญ่พบได้สองลักษณะดังนี้ กลุ่มแรกเป็นกลุ่มที่มีกิจกรรมการยับยั้งเกิดจากกรดอะมิโนคือ cysteine 1 thiolbiotics cysteine 2 cystibiotics เป็นองค์ประกอบ และอีกกลุ่มเป็นพวกที่ไม่มีกรดอะมิโนชนิด cysteine lactococcin A acidocin B โดยแบคทีเรียโอซินในกลุ่มนี้จะมี sec (sec-dependent pathway) ซึ่งแตกต่างจากแบคทีเรียโอซินในกลุ่มอื่นๆ



ภาพที่ 2 Lantibiotic

(a) (lanthionine) ถูกสร้างขึ้นจากการ dehydrated serine (Dehydroalanine; Dha) (sulfhydryl group) (cysteine; Cys)

(b) nisin

(c) lactacin 3174

ที่มา: Cotter (2005)

III. non-lantibiotic ขนาดใหญ่ เป็นแบคทีเรียโอซินที่มีมวลโมเลกุลมากกว่า 30,000 ดาลตัน ไวต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 60-100 °C 10-15 caseicin 80 จากเชื้อ *L. casie* B80 *Lactobacillus* (Klaenhammer, 1993)

IV. complex bacteriocin เป็นแบคทีเรียโอซินที่มีโครงสร้างเปปไทด์และไขมันหรือ lactacin 27 จากเชื้อ *L. helveticus* LP27 ซึ่งเป็นแบคทีเรียโอซินชนิดไกลโค ตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การจัดกลุ่มของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรีย

ประเภท	ชื่อแบคทีเรียโอซิน
I. Lantibiotics	เปปไทด์ที่สร้างจากไรโบโซม และผ่านกระบวนการ post-translational modification น้ำหนักโมเลกุล (< 5 kDa) ประกอบด้วย lanthionine และ β -methyl lanthionine Ia. โมเลกุลที่ยืดหยุ่น (Flexible molecules) Ib. โมเลกุลที่กลม (Globular peptides)
II. Non-lantibiotic, small molecular weight	เปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (< 10 kDa) ถูกสร้างขึ้นโดยไม่จำเป็นต้องผ่านกระบวนการเปลี่ยนแปลง โมเลกุลที่ไม่ออกฤทธิ์ prepeptides active peptides โดย post-translational cleavage IIa. เปปไทด์สายเดี่ยว โดยมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>Listeria</i> N (N terminal) YGNGVXC IIb. โมเลกุลที่ประกอบด้วยไขมัน
III. Non-lantibiotic, large molecular weight	IIc. แบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากกระบวนการ sec-pathway เปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (> 10 kDa)
IV. Complex bacteriocin	แบคทีเรียโอซินที่มีโครงสร้างซับซ้อนอาจค่ออยู่กับไขมัน

ที่มา: Garneau (2002)

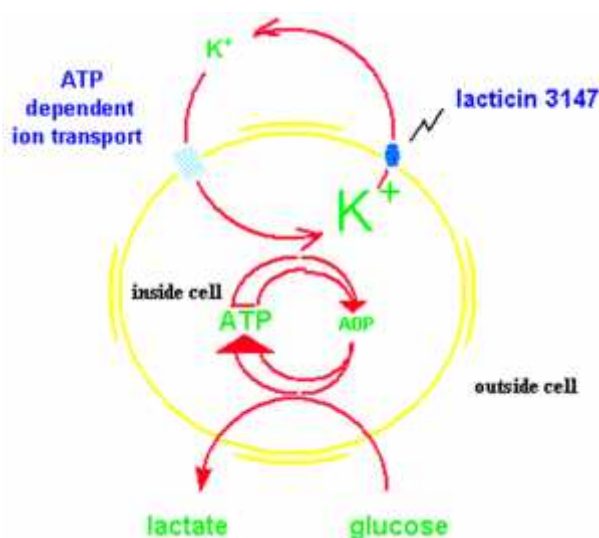
3.3 การทำงานของแบคทีเรียโอซิน

เนื่องจากแบคทีเรียโอซินมีหลายชนิดซึ่งแต่ละชนิดมีองค์ประกอบและโครงสร้างที่แตกต่างกันดังนั้นการทำงานในการยับยั้งเชื้อจึงมีความแตกต่างกันออกไป เช่น ยับยั้งกระบวนการ transcription, translation, replication, ยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์แต่กิจกรรมที่พบมากที่สุดคือการทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เป้าหมายเกิดรู เช่น โอซินมีความสามารถในการยับยั้งได้ในช่วงกว้าง ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวกและสามารถยับยั้ง *Bacillus* spp. *Clostridium* spp. (Gross and Morell, 1971) ในขณะที่ lactococcin A มีความสามารถยับยั้งในช่วงแคบ คือ ยับยั้งเฉพาะ lactococci สายพันธุ์อื่นเท่านั้น (Stoddard *et al.*, 1992)

กระบวนการทำให้เกิดรูบนเซลล์เป้าหมายจะเกิดปฏิกิริยาระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์กับแบคทีเรียโอซิน เนื่องจากโมเลกุลของแบคทีเรียโอซินซึ่งมีประจุบวกและประกอบด้วยส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic patches) จึงเกิดการจับกันกับหมู่ฟอสเฟตของเยื่อหุ้มเซลล์ของเป้าหมายซึ่งมีประจุลบ (Chen *et al.*, 1997a,b) และส่งผลให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดรูและไปรบกวนกระบวนการส่งผ่านโปรตอน (proton motive force) การยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์โดย lantibiotics ที่มีกลไกการทำให้เกิดรูบนเยื่อหุ้มเซลล์รวมถึง lactacin 3147, pep5, subtilin และ epidermin (Lucy *et al.*, 2006)

นอกจากนี้โอซินยังมีผลต่อการสังเคราะห์ผนังเซลล์ ซึ่งเป็นส่วนที่อยู่นอกสุดของเซลล์และแข็งแรงที่สุดของเซลล์ ทำหน้าที่ป้องกันสิ่งที่อยู่ในเซลล์ โครงสร้างพื้นฐานของแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด ที่ต่างกัน คือ peptidoglycan แบคทีเรียแกรมบวกจะมีส่วนนี้หนากว่าแบคทีเรียแกรมลบ 3 เท่า lipopolysaccharide หุ้มอีกชั้นหนึ่ง peptidoglycan polysaccharide ซึ่งสลับกันระหว่าง *N*-acetylglucosamine (GlcNAC) และ *N*-acetylmuramate (MurNAC) side chain (Brock *et al.*, 2533) แบคทีเรียโอซินสามารถยับยั้งการสร้าง peptidoglycan lipid II ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการผลิต peptidoglycan ยับยั้งต่อการสังเคราะห์ผนังเซลล์ (Breukink *et al.*, 1999) และเนื่องจากผนังเซลล์เป็นส่วนที่มีผลต่อการรักษาความดันออสโมติก (osmotic barrier) โดยมีหน้าที่ควบคุมการผ่านเข้า-ออกของน้ำและไอออนต่างๆจากเซลล์ นอกจากนี้แบคทีเรียโอซินยังสามารถยับยั้งการไหลของโปรตอน (Proton motive force) ของเยื่อหุ้ม

ภายในและภายนอกเซลล์เปลี่ยนแปลงไป K^+ เข้าไปในเซลล์มากขึ้นและเกิดการสะสมทำให้แรงดันในเซลล์ไม่สมดุล ในที่สุด (ภาพที่ 3) Hoover (1993) เกิดจากการที่เชื้อหุ้มเซลล์ดูดซับ (adsorption) sulfhydryl groups (inactivation)



ภาพที่ 3 กลไกการยับยั้งของ Lactacin 2134 โดยไปมีบทบาทกระตุ้นบริเวณเชื้อหุ้มเซลล์ ทำให้เกิด K^+ ภายในและภายนอกเซลล์เปลี่ยนแปลงไป ATP ภายในเซลล์ขึ้น ซึ่ง ATP มีบทบาทต่อการรักษากลไกของเซลล์ เช่น ความคุมพีเอชที่เชื้อหุ้มเซลล์ เป็นต้น เมื่อกลไกของเซลล์ถูกทำลาย จะส่งผลในที่สุด ที่มา : McAuliffe (1998)

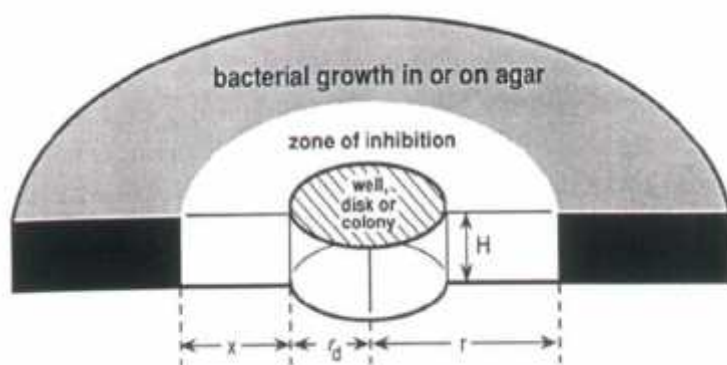
นอกจากนี้ยังมีกิจกรรมการยับยั้งแบบอื่นๆซึ่งพบได้น้อยเช่น การยับยั้งการสร้างกรด deoxyribonucleic acid (DNA) ribonucleic acid (RNA) ในการเจริญและแบ่งตัวของเซลล์ขึ้นกับการสังเคราะห์ DNA ซึ่งเป็นสารพันธุกรรม RNA (2549) mRNA ขั้นตอน translation กระบวนการนี้เกิดขึ้นใน ribosome ribosome 70S (2 subunits 30S 50S) การยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนจะเกิดจากแบคทีเรีย ไอซันที่มีโครงสร้างแบบ aminoglycoside amino sugar glycosidic ซึ่งมี 30S ribosomal subunit ทำให้ไปยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนและลด

นอกจากนี้ยังทำให้การอ่านรหัสในการสร้าง mRNA ส่งผลให้ความสามารถในการสร้างโปรตีนที่เป็นเอนไซม์ เมื่อไม่พบแบคทีเรียอินดิเคเตอร์นั้นสามารถกลับสู่สภาพเดิมได้เมื่อลดความเข้มข้นลง ด้วยเหตุนี้แบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนส่วนใหญ่จึงมีกิจกรรมแบบยับยั้ง (bacteriostatic)

สภาพเดิมได้เมื่อปริมาณแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ลดลง ดังนั้นแบคทีเรียอินดิเคเตอร์นี้จึงมีกิจกรรมการยับยั้ง (bactericidal)

3.4 การแยกเชื้อแบคทีเรียแลกดิกที่ผลิตแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

การคัดเลือกแบคทีเรียแลกดิกที่ผลิตแบคทีเรียอินดิเคเตอร์มักจะใช้วิธีการแพร่ผ่านของสารในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (agar plate diffusion) ซึ่งมีหลายวิธี ได้แก่ agar spot test, disc assay, agar well diffusion triple agar test วงใสที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์นั้นๆ ได้ ซึ่งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์จะซึมผ่านอาหารกึ่งแข็งและยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ (ภาพที่ 4) ซึ่งความกว้างของวงใสจะมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ปริมาณของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ความหนา จำนวนเชื้ออินดิเคเตอร์เริ่มต้น (Hoover and Steenson, 1993)



ภาพที่ 4 วงใสของการยับยั้งของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่เกิดจากการแพร่
ที่มา : Hoover และ Steenson (1993)

agar spot test ทำได้โดยการเลี้ยงแบคทีเรียอินดิเคเตอร์และแบคทีเรียแลกดิกที่ต้องการทดสอบการผลิตแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ในอาหาร

เหลวที่เหมาะสม จากนั้น spread เชื้ออินดิเคเตอร์บนอาหารแข็งและ spot เชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ทำ การทดสอบลงด้านบน บ่มและวัดวงใสของการยับยั้ง (Dykes *et al.*, 2003)

spot agar test ทำได้โดยหยดเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ต้องการทดสอบการผลิต กรดแลคติกลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารสำหรับให้แบคทีเรีย 5 ไมโครลิตรลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารสำหรับให้แบคทีเรีย 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเททับด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง (soft agar) ที่มี แบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยให้มีเชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^6 log CFU/ml 24 ชั่วโมง และวัด ความกว้างวงใสของการยับยั้ง (Chimane, 2008) agar spot test spot agar test เป็นวิธีที่สามารถทำได้ง่ายแต่เหมาะสำหรับการคัดเลือกเบื้องต้นเท่านั้น เนื่องจากการทดสอบ แตกต่างจากวิธีอื่นๆก็จะใช้เชื้อที่มีชีวิตในการทดสอบทำให้ผลการยับยั้งที่ได้อาจจะเกิดจากสาร ยับยั้งชนิดอื่นหรือสารอื่นร่วมกับสารที่ต้องการทดสอบทำให้ผลการทดลองที่ได้อาจคลาดเคลื่อน

paper disc assay ทดสอบโดยเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกที่ต้องการทดสอบการผลิต แบคทีเรียอินดิเคเตอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อแยกตัวเซลล์ออก นำสารละลายส่วนใสมาปรับพีเอชให้เป็น 7 จากนั้นนำแผ่นดิส (paper disc) ที่มาเชื้อแล้วมาทำการดูดซับสารละลายใส ของแบคทีเรียแลคติกแล้วนำไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการ spread ด้วยเชื้อแบคทีเรียแลคติก และวัดความกว้างวงใสของการยับยั้ง (Sewan and Manivannan, 2000)

paper disc assay มีข้อดีคือสามารถเพิ่มปริมาณสารที่ต้องการ ทดสอบได้เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี agar well diffusion assay โดยการใช้แผ่นดิสจะสามารถเพิ่มความ เข้มข้นของสารที่ใช้ทดสอบ เนื่องจากแผ่นดิสมีประสิทธิภาพในการดูดซับสารได้ 2-3 เท่า น้ำหนักแผ่นดิสจึงสามารถเพิ่มความเข้มข้นสำหรับเชื้อที่มีการผลิตสารในปริมาณน้อยๆ ได้ (Lorian, 1980)

paper disc assay คือข้อจำกัดในการแพร่ของสารในอาหารเลี้ยงเชื้อ แข็งที่แตกต่างกัน นอกจากนี้การทดสอบโดยการใช้แผ่นดิสเหมาะกับการทดสอบเพื่อยับยั้งเชื้อที่มี อัตราการเจริญสูงเนื่องจากการเจริญของเชื้อจะต้องสัมพันธ์กับการแพร่ของสารในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Lorian, 1980)

agar well diffusion ทำได้โดยเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกที่ต้องการทดสอบการผลิต แบคทีเรียอินดิเคเตอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อแยกตัวเซลล์ออก นำสารละลายส่วนใสมาปรับพีเอชให้เป็น 7 จากนั้นเติมสารละลายที่กรองแล้วลงในรูที่เจาะ บ่มและวัดความ กว้างวงใสของการยับยั้ง (Fichaczek *et al.*, 1992) agar well diffusion

วิธีการทดสอบที่สามารถทำและวัดผลได้ง่ายไม่ต้องการเครื่องมือที่ซับซ้อนแต่อาจจะมีปัญหากับสารที่มีประจุลบซึ่งสามารถจับกับกลุ่มซัลเฟตของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งได้ทำให้ประสิทธิภาพการแพร่ในอาหารแข็งลดลงทำให้วงใสของการยับยั้งมีขนาดเล็กซึ่งอาจส่งผลต่อผลการทดลองที่อาจคลาดเคลื่อนได้ (Lorian, 1980) นอกจากนี้การทดสอบโดยวิธี agar plate diffusion เรื่องปริมาณของสารที่ใช้ทดสอบซึ่งได้ไม่เกินขนาดของหลุมที่ทำการเจาะไว้ หากสารมีความเข้มข้นต่ำอาจไม่สามารถแสดงกิจกรรมได้ด้วยวิธีนี้

Triple agar test spread plate เชื้อที่ต้องการทดสอบการผลิต แคเทอรีโอซินจากนั้นเททับด้วยอาหาร MRS agar ที่เติม deivocid 50 /ลิตร เพื่อยับยั้งยีสต์ (De Kwaadsteniet *et al.*, 2005) ทำการบ่มและเลือกจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโคโลนีของแบคทีเรียแลคติกต่ำกว่า 50 semi-solid agar ที่มีเชื้ออินดิเคเตอร์ที่ต้องการทดสอบการยับยั้งประมาณ 10^6 log CFU/ml 10 การยับยั้ง (Todorov and Dicks, 2005)

แบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่ใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตแคเทอรีโอซินในขั้นต้นนิยมใช้เชื้อในกลุ่มแบคทีเรียแลคติก โดยเชื้อที่นิยมใช้ในการคัดเลือกได้แก่ *L. sakei* JCM 1157, *L. sakei* ATCC 15521, *L. sakei* DSM 20017, *L. casei* LHS, *Leuconostoc* sp. แบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่เป็นแบคทีเรียก่อโรค เช่น *S. aureus* *Listeria* sp. (Jumriangrit, 2004)

Ohmomo (1998) คัดเลือกเชื้อที่ผลิตแคเทอรีโอซินโดยใช้ paper disc 8 มิลลิเมตร ซึ่งสามารถดูดซับสารละลายได้ 30 ไมโครลิตร จากนั้นวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้ออินดิเคเตอร์จำนวน 10^6 log CFU/ml พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *E. faecium* *E. faecalis*

Noonpakdee (2002) 14,020 เพื่อหาเชื้อที่ผลิตแคเทอรีโอซินโดยการ pour plate MRS ที่ 30 ชั่วโมง จากนั้นเททับด้วยแบคทีเรียอินดิเคเตอร์สายพันธุ์ต่างๆ (*L. curvatus* ATCC 25601, *L. plantarum* TISTR 850, *P. pentosaceus* TISTR 374 *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446) 18-24 ชั่วโมง เก็บโคโลนีที่มีวงใสไปเลี้ยงในอาหารเหลว แล้วนำไปทดสอบต่อโดยการปรับพีเอชสารละลายเป็น 6.5 ทดสอบกับเชื้ออินดิเคเตอร์อีกครั้งพบว่ามียีสต์ *L. lactis* WNC 20 ที่ผลิตแคเทอรีโอ

Jumriangrit (2004) ตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียแลกดิกจำนวน 59,509 สกัดเชื้อแบคทีเรีย 10 ตัวอย่างที่สามารถผลิตสารยับยั้งเชื้อก่อโรค direct plating 0.27 เปอร์เซ็นต์เท่านั้นที่สามารถผลิตสารยับยั้งและพบว่า *L. plantarum* PMU33 ผลิตสารยับยั้งเชื้อสายรวมทั้ง *E. faecalis*, *S. aureus* และ *Listeria* สารยับยั้งนี้มีคุณสมบัติเป็นโปรตีนเนื่องจากถูกยับยั้งด้วยเอนไซม์ proteinase K, α -chymotrypsin, trypsin, pepsin และ papain 2-10

Todorov และ Dicks (2005) คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลกดิกที่ผลิตแบคทีเรียโอซินจากกากน้ำตาล โดยใช้วิธี triple agar layer และใช้เชื้อ *L. casei* LHS 2 สายพันธุ์ *L. plantarum* ST28MS และ ST26MS ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ได้ โดย *L. plantarum* ST26MS สามารถยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ 14 สายพันธุ์ *L. casei*, *L. sakei*, *E. faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *E. coli* ในขณะที่ *L. plantarum* ST28MS สามารถยับยั้งได้ 6 สายพันธุ์ *L. casei*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Acinetobacter baumannii* และ *E. faecalis*

Mirhosaini และคณะ (2006) คัดเลือกแบคทีเรียแลกดิกที่ผลิตแบคทีเรียโอซินจากนมโดยใช้ agar spot test ซึ่งใช้ *L. delbrueckii* ATCC 1333 spot เชื้อที่ต้องการทดสอบการผลิตแบคทีเรียโอซิน ปริมาณ 20 ไมโครลิตร แบคทีเรียแลกดิกที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์นม 53 สายพันธุ์ 1 โอซิลเลค ที่ผลิตแบคทีเรียโอซินคือเชื้อ *L. lactis* ที่แยกได้จากเนยแข็ง

Todorov และคณะ (2007b) แยกแบคทีเรียแลกดิกที่ผลิตแบคทีเรียโอซินจากนมหมักโดยใช้ agar spot test และ agar well diffusion method พบการยับยั้งต่อเชื้อ *E. faecalis*, *E. mundtii*, *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. casei*, *L. curvatus*, *L. sakei*, *E. faecium*, *L. innocua*, *L. monocytogenes* และ *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* ซึ่งรวมถึง *E. coli* และ *Klebsiella pneumoniae*

Srionnual และคณะ (2007) แยกแบคทีเรียแลกดิกที่ผลิตแบคทีเรียโอซินจากปลาโดยใช้ agar well diffusion และ Weissellicin 110 ซึ่งผลิตจากเชื้อ *W. cibaria* 110 มีกิจกรรมยับยั้งต่อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ คือ *L. sakei* JCM 1157

Chimane (2008) แยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินจากตัวอย่างน้ำนมดิบจากโคปกติและโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ โดยใช้ spot agar test นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง แล้วนำมาทดสอบหลังจากนั้นนำมาทดสอบด้วย

1. 100% BHI กึ่งเหลว (soft agar) ซึ่งประกอบด้วยขุ่น 0.7 (w/v) โดยใช้เชื้ออินลิเคเตอร์ 4
 2. 100% *S. aureus* RMB203, *S. aureus* RMB1601, *S. dysgalactiae* DMST10953 100% *S.*
agalactiae DMST 11366 พบว่าเชื้อ *Leuconostoc* sp. RMM701, *S. bovis* RMM703 100% *S. bovis*
 RMM902 ที่แยกได้จากน้ำนมดิบมีความสามารถในการผลิตแบคทีเรียโอซินยับยั้งแบคทีเรีย *S.*
dysgalactiae DMST 10953 ที่เป็นสาเหตุโรคเต้านมอักเสบใน โคนมได้

Todorov และ Dicks (2009) แยกแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินจากผลไม้ (marula) ซึ่งเป็นผลไม้จากประเทศแอฟริกาใต้ ด้วยวิธี agar spot test โดยใช้เชื้อ *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* ATCC 19119 เป็นเชื้ออินดิเคเตอร์ โดยใช้เวลา 6.0 เพื่อกำจัดอิทธิพลของกรดและให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 °C นาน 10 นาที พบว่าเชื้อ *P. pentosaceus* มีกิจกรรมการยับยั้งต่อเชื้ออินดิเคเตอร์และมีกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซิน โดยแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *P. pentosaceus* marula 6.5 มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *L. ivanovii* 2

Hata ¹ *et al.* (2010) ² *et al.* ³ *et al.* ⁴ *et al.* ⁵ *et al.* ⁶ *et al.* ⁷ *et al.* ⁸ *et al.* ⁹ *et al.* ¹⁰ *et al.* ¹¹ *et al.* ¹² *et al.* ¹³ *et al.* ¹⁴ *et al.* ¹⁵ *et al.* ¹⁶ *et al.* ¹⁷ *et al.* ¹⁸ *et al.* ¹⁹ *et al.* ²⁰ *et al.* ²¹ *et al.* ²² *et al.* ²³ *et al.* ²⁴ *et al.* ²⁵ *et al.* ²⁶ *et al.* ²⁷ *et al.* ²⁸ *et al.* ²⁹ *et al.* ³⁰ *et al.* ³¹ *et al.* ³² *et al.* ³³ *et al.* ³⁴ *et al.* ³⁵ *et al.* ³⁶ *et al.* ³⁷ *et al.* ³⁸ *et al.* ³⁹ *et al.* ⁴⁰ *et al.* ⁴¹ *et al.* ⁴² *et al.* ⁴³ *et al.* ⁴⁴ *et al.* ⁴⁵ *et al.* ⁴⁶ *et al.* ⁴⁷ *et al.* ⁴⁸ *et al.* ⁴⁹ *et al.* ⁵⁰ *et al.* ⁵¹ *et al.* ⁵² *et al.* ⁵³ *et al.* ⁵⁴ *et al.* ⁵⁵ *et al.* ⁵⁶ *et al.* ⁵⁷ *et al.* ⁵⁸ *et al.* ⁵⁹ *et al.* ⁶⁰ *et al.* ⁶¹ *et al.* ⁶² *et al.* ⁶³ *et al.* ⁶⁴ *et al.* ⁶⁵ *et al.* ⁶⁶ *et al.* ⁶⁷ *et al.* ⁶⁸ *et al.* ⁶⁹ *et al.* ⁷⁰ *et al.* ⁷¹ *et al.* ⁷² *et al.* ⁷³ *et al.* ⁷⁴ *et al.* ⁷⁵ *et al.* ⁷⁶ *et al.* ⁷⁷ *et al.* ⁷⁸ *et al.* ⁷⁹ *et al.* ⁸⁰ *et al.* ⁸¹ *et al.* ⁸² *et al.* ⁸³ *et al.* ⁸⁴ *et al.* ⁸⁵ *et al.* ⁸⁶ *et al.* ⁸⁷ *et al.* ⁸⁸ *et al.* ⁸⁹ *et al.* ⁹⁰ *et al.* ⁹¹ *et al.* ⁹² *et al.* ⁹³ *et al.* ⁹⁴ *et al.* ⁹⁵ *et al.* ⁹⁶ *et al.* ⁹⁷ *et al.* ⁹⁸ *et al.* ⁹⁹ *et al.* ¹⁰⁰ *et al.* ¹⁰¹ *et al.* ¹⁰² *et al.* ¹⁰³ *et al.* ¹⁰⁴ *et al.* ¹⁰⁵ *et al.* ¹⁰⁶ *et al.* ¹⁰⁷ *et al.* ¹⁰⁸ *et al.* ¹⁰⁹ *et al.* ¹¹⁰ *et al.* ¹¹¹ *et al.* ¹¹² *et al.* ¹¹³ *et al.* ¹¹⁴ *et al.* ¹¹⁵ *et al.* ¹¹⁶ *et al.* ¹¹⁷ *et al.* ¹¹⁸ *et al.* ¹¹⁹ *et al.* ¹²⁰ *et al.* ¹²¹ *et al.* ¹²² *et al.* ¹²³ *et al.* ¹²⁴ *et al.* ¹²⁵ *et al.* ¹²⁶ *et al.* ¹²⁷ *et al.* ¹²⁸ *et al.* ¹²⁹ *et al.* ¹³⁰ *et al.* ¹³¹ *et al.* ¹³² *et al.* ¹³³ *et al.* ¹³⁴ *et al.* ¹³⁵ *et al.* ¹³⁶ *et al.* ¹³⁷ *et al.* ¹³⁸ *et al.* ¹³⁹ *et al.* ¹⁴⁰ *et al.* ¹⁴¹ *et al.* ¹⁴² *et al.* ¹⁴³ *et al.* ¹⁴⁴ *et al.* ¹⁴⁵ *et al.* ¹⁴⁶ *et al.* ¹⁴⁷ *et al.* ¹⁴⁸ *et al.* ¹⁴⁹ *et al.* ¹⁵⁰ *et al.* ¹⁵¹ *et al.* ¹⁵² *et al.* ¹⁵³ *et al.* ¹⁵⁴ *et al.* ¹⁵⁵ *et al.* ¹⁵⁶ *et al.* ¹⁵⁷ *et al.* ¹⁵⁸ *et al.* ¹⁵⁹ *et al.* ¹⁶⁰ *et al.* ¹⁶¹ *et al.* ¹⁶² *et al.* ¹⁶³ *et al.* ¹⁶⁴ *et al.* ¹⁶⁵ *et al.* ¹⁶⁶ *et al.* ¹⁶⁷ *et al.* ¹⁶⁸ *et al.* ¹⁶⁹ *et al.* ¹⁷⁰ *et al.* ¹⁷¹ *et al.* ¹⁷² *et al.* ¹⁷³ *et al.* ¹⁷⁴ *et al.* ¹⁷⁵ *et al.* ¹⁷⁶ *et al.* ¹⁷⁷ *et al.* ¹⁷⁸ *et al.* ¹⁷⁹ *et al.* ¹⁸⁰ *et al.* ¹⁸¹ *et al.* ¹⁸² *et al.* ¹⁸³ *et al.* ¹⁸⁴ *et al.* ¹⁸⁵ *et al.* ¹⁸⁶ *et al.* ¹⁸⁷ *et al.* ¹⁸⁸ *et al.* ¹⁸⁹ *et al.* ¹⁹⁰ *et al.* ¹⁹¹ *et al.* ¹⁹² *et al.* ¹⁹³ *et al.* ¹⁹⁴ *et al.* ¹⁹⁵ *et al.* ¹⁹⁶ *et al.* ¹⁹⁷ *et al.* ¹⁹⁸ *et al.* ¹⁹⁹ *et al.* ²⁰⁰ *et al.* ²⁰¹ *et al.* ²⁰² *et al.* ²⁰³ *et al.* ²⁰⁴ *et al.* ²⁰⁵ *et al.* ²⁰⁶ *et al.* ²⁰⁷ *et al.* ²⁰⁸ *et al.* ²⁰⁹ *et al.* ²¹⁰ *et al.* ²¹¹ *et al.* ²¹² *et al.* ²¹³ *et al.* ²¹⁴ *et al.* ²¹⁵ *et al.* ²¹⁶ *et al.* ²¹⁷ *et al.* ²¹⁸ *et al.* ²¹⁹ *et al.* ²²⁰ *et al.* ²²¹ *et al.* ²²² *et al.* ²²³ *et al.* ²²⁴ *et al.* ²²⁵ *et al.* ²²⁶ *et al.* ²²⁷ *et al.* ²²⁸ *et al.* ²²⁹ *et al.* ²³⁰ *et al.* ²³¹ *et al.* ²³² *et al.* ²³³ *et al.* ²³⁴ *et al.* ²³⁵ *et al.* ²³⁶ *et al.* ²³⁷ *et al.* ²³⁸ *et al.* ²³⁹ *et al.* ²⁴⁰ *et al.* ²⁴¹ *et al.* ²⁴² *et al.* ²⁴³ *et al.* ²⁴⁴ *et al.* ²⁴⁵ *et al.* ²⁴⁶ *et al.* ²⁴⁷ *et*

Rivas ^{๑๒๓๔} (2012) ศึกษาถึงกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *E. faecium* ซึ่งแยกได้จากน้ำนมจากแกะและชีสจากประเทศอาร์เจนตินา ด้วยวิธี agar well- diffusion assay พบว่ามีกิจกรรมการยับยั้งคือเชื้อ *L. monocytogenes*, *L. innocua* ^{๑๒๓} *S. aureus* ^{๑๒๓๔๕๖๗๘๙} โอซินสามารถทนอุณหภูมิสูงที่ 100 ^{๑๒๓๔๕๖๗๘๙} 30 นาทีได้และมีกิจกรรมที่พีเอชตั้งแต่ 2.5-9.5

3.5 การผลิตแบบเคเทอรีโอชิน

ซึ่งแบคทีเรียแลคติกส่วนใหญ่ที่พบจะผลิตแบคทีเรียโอซินพร้อมกับการเจริญของเชื้อ แต่มักจะมีกิจกรรมลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเข้าสู่ระยะ stationary phase ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการทำงานของ protein aggregation complex formation (Paynter *et al.*, 1997; O'keeffe and Hill, 1999) สายพันธุ์มีการผลิตแบคทีเรียโอซินตั้งแต่ช่วงต้นของระยะ log phase และจะมีกิจกรรมสูงขึ้นเมื่อเข้าสู่ stationary phase ระยะเวลาหนึ่งได้ (Todorov *et al.*,

2007b) นอกจากนี้การผลิตแบคทีเรียโอซินมักถูกกระตุ้นโดยปัจจัยที่กดดันต่างๆ เช่น ในสภาวะที่มีอุณหภูมิต่ำ การแข่งขันกับจุลินทรีย์ชนิดอื่น และปัจจัยทางด้านองค์ประกอบของอาหารซึ่งจะมีผลต่อการผลิต (O'Keeffe and Hill, 1999)

L. plantarum 423 ผลิต plantaricin 423 แบบ exponential growth กิจกรรมสูงสุดเมื่อเข้าสู่ช่วงต้นของระยะ stationary คือที่เวลา 15 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ โดยมี 6,000 AU/ml กิจกรรมจะคงที่อยู่ประมาณ 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นกิจกรรมจะลดลงเหลือ 2,600 AU/ml เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงที่เวลา 31 ชั่วโมง นอกจากนี้กิจกรรมที่เพิ่มขึ้นจะสัมพันธ์กับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ลดลงจาก 5.8 เป็น 4.0 ภายใน 15 ชั่วโมงแรก อย่างไรก็ตามกิจกรรมของ plantaricin 423 จะสูงที่สุดเมื่อพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ที่ 4.9 นอกจากนี้กิจกรรมของ plantaricin 423 จะเพิ่มขึ้นจาก 6,000 AU/ml เป็น 9,600, 12,800 และ 19,200 เมื่อเลี้ยงเชื้อใน MRS ที่ meat extract 1.9%, casamino acid 3.4%, tryptone 1.9%, peptone 1.7% (Verellen *et al.*, 1998)

L. plantarum NCIM 2084 ผลิตแบคทีเรียโอซินที่ยับยั้งทั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (*B. cereus* F4810, *S. aureus* FRI 722, *B. licheniformis* CFR 1621, *B. subtilis* CFR 1604, *B. amylovorus* DSM 20531) และเชื้อรา (*E. coli* D21, *P. aeruginosa* CFR 1704) เมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 36 ชั่วโมง ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นองค์ประกอบ (glucose medium) late log และ stationary phase เมื่อนำ culture supernatant มาทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการระเหยน้ำออกด้วย rotary evaporator และผ่านคอลัมน์และอะซิโตน หลังจากนั้นนำไปผ่านคอลัมน์ Sephadex G-25 โอซินมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 1-5 กิโลดาลตัน แบคทีเรียโอซินที่ได้ทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 20 นาที และถูกยับยั้งโดย trypsin และ chymotrypsin (Suma *et al.*, 1998)

L. plantarum 423 และ *L. curvatus* DF126 ผลิต curvacin DF126 ตามลำดับ โดยเมื่อนำเชื้อทั้งสองชนิดมาใช้ในการผลิต Ostrich meat salami แบคทีเรียโอซินทั้ง 2 ชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของ *Micrococcus* sp. MC50 และ *L. monocytogenes* ใน salami ได้ภายใน 15 ชั่วโมงพบว่า *L. monocytogenes* LM1 มีจำนวนเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจจะเป็นผลจากการที่ salami มีพีเอชต่ำลงและส่งผลกระทบต่อกิจกรรมของแบคทีเรียโอซิน (Dicks *et al.*, 2004)

L. plantarum ที่แยกได้จากกากน้ำตาลผลิตแบคทีเรียโอซิน 2 ชนิด ST28MS และ ST26MS โดยเชื้อ *L. plantarum* ST28MS (12,800 AU/ml) สามารถยับยั้ง

ST26MS (6400 AU/ml) แต่เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า เมื่ออยู่ในสถานะที่มีพีเอชต่ำกว่า 4.0 ST28MS 50 ตัวมากขึ้นในช่วงพีเอชนี้และพบว่าการผลิตแบคทีเรียไอซิน ST28MS จะเพิ่มขึ้นเมื่อมีการเติม tryptone KH_2PO_4 K_2HPO_4 ที่ 5 10 g/l นอกจากนี้พบว่า ascorbic acid, vitamins B1 B12 ST28MS (Todorov and Dicks, 2004a)

ST712BZ ที่ผลิตจากเชื้อ *L. pentosus* ST712BZ ซึ่งแยกได้จาก Boza สามารถยับยั้งการเจริญของ *L. casei*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae* *L. curvatus* 12,800 AU/ml เมื่อเลี้ยงในอาหาร MRS 24 ชั่วโมง (Todorov and Dicks, 2007)

3.6 คุณสมบัติที่ดีของแบคทีเรียไอซิน

แบคทีเรียไอซินได้รับการศึกษาและสนใจเนื่องจากแบคทีเรียไอซินเป็นสารที่ใช้ยับยั้งเชื้อที่มีคุณสมบัติที่ดีหลายด้าน ซึ่งสามารถนำไปต่อยอดใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้ โดยทั่วไป (cationic) และมีความไม่ชอบน้ำสูง (hydrophobic) โปรตีนที่มีขนาดเล็กและมีกิจกรรมได้ในช่วงพีเอชที่กว้าง (pH 3.0-9.0) สถานะพีเอชที่มีความรุนแรงได้เช่น พีเอช 1.0 11.0 acidocin B bavaricin A (Oscariz and Pisabarro, 2001) นอกจากนี้แบคทีเรียไอซินมีค่าไอโซอิเล็กทริก (isoelectric point) ที่สูง ทำให้มีความสามารถในการเกาะติดกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียซึ่งมีประจุเป็นลบได้ดี สามารถส่งผ่านสารยับยั้งซึ่งมีคุณสมบัติที่ไม่ชอบน้ำไปยังเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียและก่อให้เกิดรูพรุนบนเยื่อหุ้มเซลล์ (pore formation) เหล่านี้เพื่อใช้ในการทำบริสุทธิ์แบคทีเรียไอซินด้วย เช่น การยึดจับโดยการไม่ชอบน้ำ (hydrophobic interaction) หรือการยึดจับโดยการแลกเปลี่ยนประจุบวก (cationic exchange)

3.6.1 คุณสมบัติการทนร้อนของแบคทีเรียไอซิน

คุณสมบัติเด่นด้านหนึ่งของแบคทีเรียไอซินคือ ทนร้อน เนื่องจากแบคทีเรีย 1 2 เป็นเปปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนโดยเฉพาะ cysteine ซึ่ง (di-sulfide bond) ได้เมื่อมีการต่อกันของ cysteine (Sælensminde *et al.*, 2009) เนื่องจากพันธะไดซัลไฟด์เป็นพันธะที่มีความแข็งแรง ถูกทำลายได้ยาก ดังนั้นจึงส่งผลให้ทนต่อ อุณหภูมิสูงได้ นอกจากนี้แบคทีเรียไอซินมีคุณสมบัติความไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) เนื่องจากประกอบด้วยกรดอะมิโนในกลุ่มที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic amino acid) เกี่ยวกับบทบาทของกรดอะมิโนในกลุ่มนี้ว่ามีผลต่อความคงตัวของโปรตีนสามารถทนสถานะที่มีอุณหภูมิสูงได้ (Sælensminde *et al.*, 2009)

Messi *et al.* (2001) ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งของแบคทีเรียโอซินจาก *Lactobacillus plantarum* 134 สายพันธุ์ที่แยกได้จากไส้กรอกแบบอิตาลีพบว่า 6 สายพันธุ์มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ที่ผลิตแบคทีเรียโอซิน คือ *L. plantarum* 35d มีกิจกรรมการยับยั้ง 320 AU/ml และสามารถยับยั้งแบคทีเรียแลคติก รวมถึง *S. aureus*, *L. monocytogenes* และ *Aeromonas hydrophila* โดยการออกฤทธิ์เป็นแบบ bacteriocidal ภายใน 80 นาที และสามารถเก็บรักษาที่ 4 °C ได้ 6 เดือน และพบว่าแบคทีเรียโอซินที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 4.5 kDa *L. plantarum* ที่แยกได้จากกากน้ำตาลผลิตแบคทีเรียโอซิน 2 สายพันธุ์ ST28MS และ ST26MS สามารถยับยั้งการเจริญของ *L. casei*, *L. sakei*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *E. coli* และ *Acinetobacter baumannii* โดยการออกฤทธิ์เป็นแบบ bacteriostatic แบคทีเรียโอซินทั้ง 2 สายพันธุ์มีขนาดโมเลกุลประมาณ 121 kDa (Todorov and Dicks, 2005)

Rivas *et al.* (2012) ทดลองให้ความร้อนสารละลายส่วนใสจากเชื้อ *E. faecium* TW15, *E. faecium* TW20 และ *E. faecium* TW22 ซึ่งสามารถผลิตแบคทีเรียโอซิน โดยเมื่อผ่านการให้ความร้อนที่ 100 °C เป็นเวลา 5, 15 และ 30 นาที กิจกรรมการยับยั้งลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดลอง ในขณะที่เมื่อให้ความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 และ 30 นาทีพบว่ายังคงมีกิจกรรมการยับยั้ง

Jie *et al.* (2012) ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *L. sakei* LSJ618 โดยทำการทดสอบที่อุณหภูมิ 60, 80, 100 และ 121 °C เป็นเวลา 30 นาที พบว่าประสิทธิภาพการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินที่ 121 °C ได้ โดยมียังคงมีกิจกรรมการยับยั้งมากกว่า 80%

เชื้อ *P. acidilactici* ที่แยกได้จากหมัมนม ผลิตแบคทีเรียโอซินที่มีฤทธิ์การยับยั้ง *S. aureus* 100% ภายใน 30 นาที และมีความคงตัวอยู่ในช่วงพีเอชตั้งแต่ 3.0-10.0 การยับยั้งของแบคทีเรียโอซินจะถูกทำลายโดยเอนไซม์ trypsin (Stonsaovapak *et al.*, 1994)

3.6.2 คุณสมบัติมีความคงตัวในช่วงพีเอชกว้าง

คุณสมบัติความคงตัวของพีเอชด้วย โดยสามารถมีกิจกรรมการยับยั้งได้ในช่วงพีเอชที่กว้าง โดย Oscariz *et al.* Pisabarro (2001) ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินที่รุนแรงคือที่พีเอชค่า 1.0 ถึง 11.0 ได้ ในขณะที่ Pringsulaka *et al.* (2012) พบว่าแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจาก

เชื้อ *W. confusa* N31 สามารถคงกิจกรรมการยับยั้งได้ในช่วงพีเอชตั้งแต่ 2.0 ถึง 8.0 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

แบคทีเรียโอซินที่ผลิตจาก *L. lactis* WNC 20 ซึ่งแยกได้จากແໝ່ມີความคงตัวที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที มีความคงตัวในช่วงพีเอชตั้งแต่ 2-10 และมีฤทธิ์การยับยั้งในช่วงกว้าง ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อสายพันธุ์ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ที่ผลิตแบคทีเรียโอซินและเชื้อก่อโรค คือ *L. monocytogenes*, *C. perfringens*, *B. cereus* และ *S. aureus* โปรตีน *proteinase K* และ α -chymotrypsin ในขณะที่เอนไซม์ papain, pepsin, trypsin, α -amylase และ lipase ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ (Noonpakdee et al., 2002)

L. plantarum ST8KF ที่แยกได้จากคีเฟอร์ (kefir) สามารถยับยั้ง *L. casei*, *L. salivarius*, *L. curvatus* และ *L. innocua* โดยแบคทีเรียโอซินมีความไวต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีน มีความคงตัวในสภาวะที่มีพีเอช 2.0-10.0 เป็นเวลา 121 °C เป็นเวลา 20 นาที (Powell et al., 2007)

โอสเอดจากน้ำนมดิบจำนวน 43 ตัวอย่าง มี 3 ตัวอย่าง คือ *Leuconostoc* sp. RMM701, *S. bovis* RMM703 และ *S. bovis* RMM902 ที่สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินยับยั้งแบคทีเรีย *S. dysgalactiae* DMST 10953 ซึ่งเป็นแบคทีเรียสาเหตุโรคเต้านมอักเสบได้ 40, 40 และ 20 AU/ml แบคทีเรียโอซินที่ผลิตได้จากแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถคงทนต่อความร้อนได้สูงที่สุดที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 60 นาที แบคทีเรียโอซินที่ผลิตจาก *Leuconostoc* sp. RMM701 และ *S. bovis* RMM902 สามารถคงตัวในช่วงพีเอช 2.0-7.0 และ *S. bovis* RMM703 สามารถคงตัวในช่วงพีเอช 2.0-6.0 นอกจากนี้กิจกรรมของแบคทีเรียโอซินเหล่านี้ถูกทำลายได้โดยเอนไซม์กลุ่มที่ย่อยโปรตีน เช่น *proteinase K* และ *protease* (Chimane, 2008)

จากคุณสมบัติที่คิดเหล่านี้ทำให้แบคทีเรียโอซินเหมาะสมต่อการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมได้หลากหลายไม่ว่าจะเป็นอาหารหมักที่มีพีเอชที่ต่ำ หรือการใช้ในอุตสาหกรรมที่ต้องการมีการใช้อุณหภูมิสูงในการผลิต ซึ่งแบคทีเรียโอซินจะยังคงกิจกรรมเหลืออยู่ในระหว่างขั้นตอนการแปรรูป ประสิทธิภาพในการนำไปใช้เพื่อยืดอายุการเก็บรักษา ลดการใช้สารยับยั้งที่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคหรือใช้เป็นกลไกเชื้อในการหมักอาหารหมักต่างๆ ได้ (Ross et al., 2002; Deegan et al., 2006)

3.7 การโคลน และการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์แบคทีเรียโอซิน

แบคทีเรียบางชนิดที่อาจถูกพิจารณาว่าอาจก่อโรค หรือทำให้อาหารเน่าเสียได้ *Enterococcus* เชื้อในระบบทางเดินอาหารที่ไม่เป็นอันตราย แม้ว่าจะมีบางรายงานพบว่า *E. faecium* *E. faecalis* เป็นเชื้อที่พบได้ในการติดเชื้อในโรงพยาบาล (Riuz-Barba *et al.*, 2007) เกี่ยวข้องในการถ่ายถอดยีนดื้อยาปฏิชีวนะในห่วงโซ่อาหาร (Abriouel *et al.*, 2005) *enterococci* สามารถแยกได้จากแหล่งต่างๆ เช่น มนุษย์ สัตว์ น้ำ ดิน พืช อาหาร/อาหาร และของเสียต่างๆ รวมทั้งจากสัตว์ปีก (Strompfová and Lauková, 2007) แบคทีเรียโอซินที่ผลิตจาก *enterococci* มีคุณลักษณะโดยทั่วไปเหมือนกับแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติกกลุ่มอื่นๆ เช่น มีความคงตัวต่ออุณหภูมิและพีเอชในช่วงกว้าง มีการยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิด (broad spectrum) ทั้งกลุ่มที่มีความใกล้เคียงและแตกต่างจากกลุ่ม *enterococci* ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *C. perfringens* *C. botulinum* (Strompfová and Lauková, 2007) ดังนั้นแนวทางในการใช้เชื้อกลุ่ม *enterococci* คือการโคลนยีนที่ควบคุมการสร้างแบคทีเรียโอซินไปใส่ยังเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ได้รับการยอมรับว่าปลอดภัย (Generally Recognized as Safe, GRAS)

Wilaipun (2004) ศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *E. faecium* NKR-5-3 ที่แยกได้จากปลาร้า พบว่าแบคทีเรียโอซินที่ได้มีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ เมื่อผ่านกระบวนการทำบริสุทธิ์พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียโอซิน *enterocin* NKR-5-3A *enterocin* NKR-5-3B *enterocin* NKR-5-3A 5,241 N-terminal Tyr-Ser-Ser-Lys-Asp-Cys-Leu-Lys-Asp-Ile-Gly-Lys-Gly-Ile-Gly-Ala-Gly-Thr-Val-Ala-Gly-Ala-Ala-Gly *enterocin* NKR-5-3B 6,320 N-terminal ได้เนื่องจาก N-terminal (blocked N-terminal) เมื่อนำเอาแบคทีเรียโอซินทั้งสองมาผสมกัน 1 จะทำให้มีกิจกรรมการยับยั้งเพิ่มขึ้น 64 เท่า

Martín (2007) *enterocin* A (*EntA*) genomic DNA ของเชื้อ *E. faecium* PLBC21 และเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pMG36c ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะคือ *HindIII* หลังจากนั้นทรานสฟอร์มพลาสมิดเข้าสู่เชื้อ *L. lactis* พบว่า เชื้อ *L. lactis* *enterocin* A *E. faecium* *L. lactis* ที่มี *EntA* สามารถยับยั้งเชื้อ *Listeria* spp.

Sánchez *et al.* (2007, 2008) ได้สร้าง *HirJM* จากเชื้อ *E. hirae* DCH5 และเชื่อมต่อกับ *pMG36c* หลังจากนั้นทรานสฟอร์มพลาสมิดเข้าสู่เชื้อ *L. lactis* ssp. *lactis* IL1403 แล้วตรวจสอบการผลิตแบคทีเรียโอซินและหาลำดับเบสของยีนที่ใส่เข้าไป พบว่า *L. lactis* ssp. *lactis* IL1403 สามารถผลิต *HirJM79* ได้ หลังจากนั้นสกัดพลาสมิดที่ควบคุมการสร้างแบคทีเรียโอซินใส่เข้าสู่เชื้อต่างๆ คือ *L. lactis*, *L. sakei*, *E. faecium*, *E. faecalis* และ *Pichia pastoris* พบว่า *HirJM79* structural gene ที่ใส่เข้าไปจะมีและไม่มี *HirJM79* immunity gene (*hiriJM79*) โดยเชื่อมต่อกับพลาสมิด *pMG36c* ที่มี constitutive promoter P_{32} หรือ *pNZ8048* ที่ inducible P_{NISA} promoter ยกเว้นสำหรับเชื้อ *Pichia pastoris* ที่ใช้ *pPICZαA* พบว่า เชื้อ *HirJM79* สามารถผลิต *E. hirae* DCH5

Kumer *et al.* (2009) ได้สร้าง *enterocin LR/6* ที่ผลิตจากเชื้อ *E. faecium* LR/6 ซึ่งสามารถผลิต *enterocin LR/6* ได้ 60-100 หน่วย/เซลล์ และมีความคงตัวของยีนประมาณ 30 ปี และอุณหภูมิที่ใช้สำหรับการฆ่าเชื้อ (121 °C) สามารถฆ่าเชื้อได้ภายใน 15 นาที และมีความคงตัวของยีนประมาณ 2.0-8.0 ปี เมื่อนำไปผ่านการทำบริสุทธิ์ พบว่า *enterocin LR/6* มีขนาดโมเลกุลประมาณ 6.1 kDa และมีความคงตัวของยีนประมาณ 6.1 ปี N-terminal มีลำดับกรดอะมิโนเป็น GSLXEKQXDI

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ และอุปกรณ์

1. เชื้อจุลินทรีย์

1.1 *E. faecium* CE5-1 เป็นเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตแบคทีเรียโอสตินแยกได้จากทางเดินอาหารไก่พื้นบ้าน (Saelim *et al.*, 2012)

1.2 *E. durans* 3L20, *E. faecalis* 2L24, *E. faecium* 4S13, *E. faecium* 8S16, *E. faecium* L7-45 และ *P. pentosaceus* 3CE27 เป็นเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกแยกจากนมเปรี้ยว (Musikasang *et al.*, 2009)

1.3 *L. plantarum* D6SM3 เป็นเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกจากนมเปรี้ยว (Hwanhlem *et al.*, 2010)

1.4 *E. faecalis* VanB, *E. faecium* 139, *E. faecium* 174, *E. faecium* 348 และ *E. gallinarum* VanC เป็นเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตจากเชื้อโรคอาหารเป็นพิษโดยศูนย์ติดตามการดื้อยาของเชื้อโรคอาหารเป็นพิษโดยกรมควบคุมโรค

1.5 *B. cereus* DMST5040, *E. coli* DMST4212, *L. monocytogenes* DMST17303, *P. pentosaceus* DMST18752, *S. Typhimurium* DMST16809, *S. Enteritidis* DMST15676, *S. aureus* DMST8840 และ *V. parahaemolyticus* DMST5665 เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ส่งเชื้อจากศูนย์ติดตามการดื้อยาของเชื้อโรคอาหารเป็นพิษโดยกรมควบคุมโรค

1.6 *L. sakei* subsp. *sakei* JCM1157 เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ส่งเชื้อจากศูนย์เก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ (Japan Collection of Microorganisms) ประเทศญี่ปุ่น

1.7 *L. lactis* subsp. *cremoris* JCM16167 เป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นหัวเชื้อในอุตสาหกรรมนม การทดลองครั้งนี้ใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการผลิตนมเปรี้ยว แสดงออกของยีนที่ควบคุมการผลิตแลคติก (Japan Collection of Microorganisms) ประเทศญี่ปุ่น

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 2.1 MRS medium (de Man Rogosa and Sharpe) บริษัท HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India
- 2.2 BHI medium (Brain Heart Infusion) บริษัท HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India
- 2.3 LB medium (Luria Bertani or Lysogeny Broth) บริษัท Hardy Diagnostics, USA
- 2.4 SOC medium (Super Optimal broth with Catabolite repression) บริษัท Bio Basic, Canada
- 2.5 M17 medium บริษัท Merck, Germany

3. สารเคมี

- 3.1 โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride; NaCl) บริษัท Ajax FinChem. Pty Ltd., Australia
- 3.2 โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Sodium dihydrogen phosphate; NaH_2PO_4) บริษัท Carlo Erba, Italy
- 3.3 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (disodium hydrogen phosphate; Na_2HPO_4) บริษัท Carlo Erba, Italy
- 3.4 ไฮโดรเจนคลอไรด์ (Hydrogen chloride; HCl) บริษัท Labscan Asia Co., Ltd., Thailand
- 3.5 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide; NaOH) บริษัท Ajax FinChem. Pty Ltd., Australia
- 3.6 แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) บริษัท Labscan Asia Co., Ltd., Thailand
- 3.7 ไกลซีน (glycine; $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$) บริษัท Applichem Inc., Germany
- 3.8 กรดซิตริก (citric acid; $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) บริษัท BDH Analar, England
- 3.9 โซเดียมซิเตรต (sodium citrate; $\text{NaH}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) บริษัท Carlo Erba, Italy
- 3.10 ไตรส-ไฮโดรคลอไรด์ (tris-hydrochloride; $\text{C}_4\text{H}_{12}\text{ClNO}_3$) บริษัท Bio Basic Inc., Canada
- 3.11 กลูตาไรัลดีไฮด์ (glutaraldehyde; $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$) บริษัท TCI, Belgium
- 3.12 เอทานอล (ethanol; $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$) บริษัท Labscan Asia Co., Ltd., Thailand

3.13 ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (deoxyribonucleotide triphosphate; dNTP) บริษัท RBC Bioscience, Taiwan

3.14 แอการอส (agarose gel) บริษัท ISC Bioexpress, USA

3.15 แมกนีเซียมคลอไรด์ (magnesium chloride; $MgCl_2$) บริษัท Bio Basic Inc., Canada

3.16 แคลเซียมคลอไรด์ (calcium chloride; $CaCl_2$) บริษัท Bio Basic Inc., Canada

3.17 ไอโซพโรพิล β-D-1-ไทโกลาक्टอไพรานอสاید (IPTG) บริษัท Bio Basic Inc., Canada

3.18 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside; x-gal) บริษัท Bio Basic Inc., Canada

3.19 น้ำตาลกลูโคส (glucose; $C_6H_{12}O_6$) บริษัท Ajax FinChem. Pty Ltd., Australia

3.20 น้ำตาลซูโครส (sucrose; $C_{12}H_{22}O_{11}$) บริษัท Bio Basic Inc., Canada

3.21 กลีเซอรอล (glycerol; $C_3H_8O_3$) บริษัท Ajax FinChem. Pty Ltd., Australia

4. เอนไซม์

4.1 เปปซิน (pepsin) บริษัท Sigma-Aldrich Pte Ltd., USA

4.2 เพนเคราติน (pancreatin) บริษัท Sigma-Aldrich Pte Ltd., USA

4.3 โปรตีนเอส (proteinase K) บริษัท Sigma-Aldrich Pte Ltd., USA

4.4 ทริปซิน (trypsin) บริษัท Sigma-Aldrich Pte Ltd., USA

4.5 α-ไคโมทริปซิน (α-chymotrypsin) บริษัท Sigma-Aldrich Pte Ltd., USA

4.6 โปรนาเอส (pronase E) บริษัท Sigma-Aldrich Pte Ltd., USA

4.7 α-อะไมเลส (α-amylase) บริษัท Sigma-Aldrich Pte Ltd., USA

4.8 ลิพาส (lipase) บริษัท Amano บริษัท Amano Enzyme Inc., Japan

4.9 แท็ก DNA พอลิเมอเรส (Tag DNA polymerase) บริษัท RBC Bioscience, Taiwan

4.10 T4 DNA ligase) บริษัท Fermentas, Canada

4.11 *Bam*HI บริษัท Fermentas, Canada

4.12 *Eco*RI บริษัท Fermentas, Canada

5. ยาปฏิชีวนะ

5.1 คลอรามเฟนิคอล (Chloramphenicol) บริษัท Sigma-Aldrich Pte Ltd., USA

5.2 อิริโทรไมซิน (Erytromycin) บริษัท Sigma-Aldrich Pte Ltd., USA

- 5.3 เพนิซิลลินจี (Penicillin G) Sigma-Aldrich Pte Ltd., USA
- 5.4 สเตรปโตมัยซิน (Streptomycin) Bio Basic Inc., Canada
- 5.5 เตตราไซคลีน (Tetracycline) ยี่ห้อ Fluka Sigma-Aldrich Pte Ltd.
- 5.6 แวนคอมัยซิน (Vancomycin) Bio Basic Inc., Canada
- 5.7 แอมพิซิลลิน (Ampicillin) Bio Basic Inc., Canada

6. อุปกรณ์ และเครื่องมือ

- 6.1 ตู้บ่มเชื้อ (incubator) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส TOKYO RIKAKIKAI Co., Ltd., Japan
- 6.2 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (autoclave) TOMMY Seiko Co., Ltd., Japan
- 6.3 เตาอบแห้ง (hot air oven) Memmert, Germany
- 6.4 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) Memmert, Germany
- 6.5 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) Orion Research Inc., USA
- 6.6 เครื่องชั่งละเอียด 2 ตำแหน่ง A&D, Japan
- 6.7 เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง Sartorius, Germany
- 6.8 เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) Eppendorf, Germany
- 6.9 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) Thermo Electron Co., USA
- 6.10 เครื่องอ่านค่าบนไมโครเพลต (microplate reader) BioTek, USA
- 6.11 เครื่องล้างไต (dialysis) Spectrum Medical. Industries Inc., USA
- 6.12 เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dryer) FTS Systems Inc., USA
- 6.13 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR machine) Techne, United Kingdom
- 6.14 เครื่องถ่ายภาพเจล (Gel documentation; gel doc) Uvitec Ltd., United Kingdom
- 6.15 เครื่องถ่ายโอนยีนโดยใช้กระแสไฟฟ้า (electroporation) Bio-Rad, USA
- 6.16 เครื่องแก้วสำหรับวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

วิธีการทดลอง

1. การศึกษาศักยภาพการเป็นโปรไบโอติกของเชื้อ *Enterococcus faecium* CE5-1

1.1 การทดสอบความสามารถในการทนต่อกรดและน้ำดี

เลี้ยงเชื้อ *E. faecium* CE5-1 ใน MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C 10 นาที นำเซลล์ที่ได้มาล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85% (0.85% NaCl) 2 ครั้ง ในกรณีการศึกษาการทนต่อกรด นำเซลล์ที่ล้างด้วย 0.85% NaCl ที่มีพีเอชเป็น 2.5 หรือ 3.0 3 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C 2 ชั่วโมง ตรวจสอบการรอดชีวิตโดยวิธีการ drop plate (Madureira *et al.*, 2005) ในขณะที่การศึกษาการทนต่อน้ำดี จะนำเซลล์ที่ผ่านการล้างด้วยสารละลาย 0.85% NaCl 2 ครั้ง มาบ่มใน phosphate buffer (pH 8.0 ที่มีเอนไซม์ penicillin) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีน้ำดีไก่ที่ผ่านการทำแห้งแบบ freeze dry 1, 3, 5 หรือ 7 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปบ่มที่ 37 °C 6 ชั่วโมง ตรวจสอบการรอดชีวิตโดยวิธีการ drop plate (Madureira *et al.*, 2005)

การศึกษาความสามารถในการทนต่อกรดและน้ำดีแบบต่อเนื่อง จะนำเซลล์ที่ผ่านการล้างด้วย 0.85% NaCl 2 ครั้ง มาบ่มใน 0.85% NaCl ที่มีพีเอช 3.0 หรือ 3.0 3 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C 10 นาที ล้างเซลล์ที่ได้ด้วยสารละลาย 0.85% NaCl 2 ครั้ง แล้วนำเซลล์ที่ได้มาบ่มใน phosphate buffer (pH 8.0 ที่มีเอนไซม์ penicillin) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีน้ำดีไก่ที่ผ่านการทำแห้งแบบ freeze dry 7 เปอร์เซ็นต์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C 6 ชั่วโมง ตรวจสอบการรอดชีวิตโดยวิธีการ drop plate (Madureira *et al.*, 2005)

1.2 การทดสอบการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ

เลี้ยงเชื้อ *E. faecium* CE5-1 หรือเชื้อกลุ่ม Enterococci ที่ดื้อยาปฏิชีวนะ (ตารางที่ 8) ใน MRS broth 24 ชั่วโมง ทำการเจือจางเชื้อแต่ละชนิดให้มีปริมาณเซลล์

10^5 CFU/ml) จากนั้นทำการเจือจางยาปฏิชีวนะต่างๆ ได้แก่ Chloramphenicol, Erythromycin, Penicillin G, Streptomycin, Tetracycline และ Vancomycin ใน MRS broth ให้มีความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะสุดท้ายตั้งแต่ 0.625 ถึง 1,282 μ g/ml ทำ two-fold serial dilutions และเติมลงใน 96-well microtiter plate เติมเชื้อแต่ละชนิดที่มีปริมาณเซลล์เริ่มต้น 10^6 CFU/ml ในไมโครลิตร ลงในสารละลายยาปฏิชีวนะที่เจือจางแล้ว จะได้ปริมาณเซลล์สุดท้าย 10^4 CFU/ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดการเจริญโดยนำไปวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 nm (OD_{660}) ด้วยเครื่อง microplate reader นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของการยับยั้งของยาปฏิชีวนะจากสมการ

$$\text{การยับยั้ง (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{OD_{660} \text{ ในชุดควบคุม} - OD_{660} \text{ ของเซลล์ที่ตาย}}{OD_{660} \text{ ในชุดควบคุม}} \times 100$$

ชุดควบคุมคือชุดที่ประกอบด้วยอาหาร MRS broth ที่ไม่มีการเติมยาปฏิชีวนะ 100 ไมโครลิตร และเติมเชื้อที่ต้องการทดสอบปริมาตร 100 ไมโครลิตร

ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ (Minimal inhibitory concentration; MIC) หมายถึง ความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบได้มากกว่าหรือเท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ (Minimal Bactericidal concentration; MBC) ใช้ 96-well microtiter plate ที่ให้ค่าการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบได้มากกว่าหรือเท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์ ใน MRS agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบการเจริญของเชื้อโดยค่า MBC คือความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ (100 เปอร์เซ็นต์) ใน MRS agar (24-48 ชั่วโมง)

การทดสอบการต้านทานของเชื้อแบคทีเรีย 3 ชนิด (D'Aimmo *et al.*, 2007) มีดังนี้

1. เชื้อแบคทีเรียที่อ่อนแอ (susceptible) มี MIC ต่ำกว่า 8 μ g/ml
2. เชื้อแบคทีเรียที่ต้านทานปานกลาง (moderate resistant) มี MIC สูงกว่า 8 μ g/ml ถึง 32 μ g/ml

3. เชื้อ *E. faecium* (clinically resistant) เชื้อ MIC 32 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต

1.3 กิจกรรมการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

เชื้อ *E. faecium* CE5-1 มาเลี้ยงในอาหาร MRS broth 5 มิลลิตร นำไปบ่มที่ 37 °C 15 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C 10 นาที นำส่วนใสที่ได้มาปรับให้มีพีเอชอยู่ระหว่าง 6.5-7.0 แล้วเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ (0.1 N NaOH) เพื่อลดอิทธิพลของกรดอินทรีย์ และนำไปคัมที่ 95 องศาเซลเซียส เพื่อลดอิทธิพลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide; H_2O_2) ที่เชื้อผลิตขึ้น จากนั้นนำส่วนใสที่ได้ นำไปทดสอบกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียอินโนวเอท Agar well diffusion assay แสดงในตารางที่ 9 เพื่อหาอาหารกึ่งแข็งที่เหมาะสมกับแบคทีเรีย *L. sakei* subsp. *sakei* JCM1157 (indicator) 20 มิลลิตร ซึ่งมีเชื้อแบคทีเรียอินโนวเอทจำนวน 10^6 CFU/ml วางทิ้งไว้ให้แข็งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเจาะหลุมให้มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 5 มิลลิเมตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 °C 24 ชั่วโมง วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดขึ้น (Schillinger and Lücke, 1989, Ammor *et al.*, 2006)

1.4 การทดสอบความสามารถในการเจริญร่วมกันระหว่างเชื้อ *E. faecium* CE5-1 กับเชื้อกลุ่ม Enterococci ที่ดื้อยาปฏิชีวนะ

เลี้ยงเชื้อ *E. faecium* CE5-1 หรือเชื้อกลุ่ม Enterococci ที่ดื้อยาปฏิชีวนะ (*E. faecalis* VanB *E. gallinarum* VanC) ใน MRS broth 24 ชั่วโมง เดิมกล้าเชื้อที่ MRS broth 200 ไมโครลิตร 10^6 CFU/ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C 6 ชั่วโมง หากการรอดชีวิตของเชื้อกลุ่ม Enterococci ที่ดื้อยาปฏิชีวนะ (*E. faecalis* VanB *E. gallinarum* VanC) drop plate MRS agar ที่มี tetracycline 100 ไมโครลิตร มิลลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญของแบคทีเรียทั้งหมดบนอาหาร MRS agar

2. การศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียอินโนวเอทที่ได้จากเชื้อ *E. faecium* CE5-1

เชื้อ *E. faecium* CE5-1 มาเลี้ยงในอาหาร MRS broth 1,000 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 37 °C 15 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000

รอบค่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C 10 นาที นำส่วนใสที่ได้มาทำบริสุทธิ์แบบ
คเทอรีโอซินเบื้องต้น โดยการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นอิ่มตัว 60 เปอร์เซ็นต์ นำไปปั่นที่
100,000 x g 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเอาตะกอนที่ความเร็ว 10,000 x g
10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C 10 นาที ละลายตะกอนที่ได้กับสารละลายฟอสเฟต
0.5 M (dialysis) (dialysis) (lyophilization)

2.1 วิธีการวิเคราะห์กิจกรรมของแบคทีเรียโอซิน โดยวิธีการ Agar well diffusion assay

เทอาหารกึ่งแข็งที่เหมาะสมกับแบคทีเรีย *L. sakei* subsp. *sakei* JCM1157 20
มิลลิลิตร ให้มีปริมาณเชื้อสุดท้ายเท่ากับ 10^6 CFU/ml วางทิ้งไว้ให้แข็งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเจาะ
รู (culture supernatant) 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 °C
24 ชั่วโมง สังเกตผลโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดขึ้น (Ammol et al.,
2006) Arbitrary unit (AU/ml)

$$\text{AU/ml} = \frac{D}{50} \times 1000$$

เมื่อ D คือ อัตราการเจือจางสูงสุดที่ทำให้เกิดวงใส

2.2 ผลของเอนไซม์ต่อกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซิน

ละลายตะกอนแบคทีเรียโอซินที่ทำบริสุทธิ์เบื้องต้นกับสารละลายบัฟเฟอร์ที่ pH
7.5 ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml proteinase K, trypsin, α -
chymotrypsin, pronase E, α -amylase lipase 1 มิลลิลิตร
นำปั่นที่อุณหภูมิ 37 °C 3 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 x g
5 นาที ไปคั่นน้ำเค็มเป็นระยะเวลา 5 นาที กิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซิน
Agar well diffusion assay

2.3 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมการยับยั้ง และความคงตัวของแบคทีเรียโอซิน

ละลายตะกอนแบคทีเรียโอซินที่ทำบริสุทธิ์เบื้องต้นมาละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอช
glycine-HCl buffer ที่พีเอช 2.2 - 3.6 citric acid-sodium citrate
buffer ที่พีเอช 3.0 - 6.2 phosphate buffer ที่พีเอช 5.7 - 8.0 tris-HCl buffer
7.0 - 9.0 glycine-NaOH buffer ที่พีเอช 8.6 - 10.6 ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิลิตร
นำปั่นที่อุณหภูมิ 37 °C 1 ชั่วโมง ขณะที่การศึกษาความคง

ตัวของแบคทีเรียโอซินจะบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ใน 24 ชั่วโมง การ
 การยับยั้งของแบคทีเรียโอซิน Agar well diffusion assay

2.4 ผลของอุณหภูมิต่อการยับยั้งและความคงตัวของแบคทีเรียโอซิน

ละลายตะกอนแบคทีเรียโอซินที่ทำบริสุทธิ์เบื้องต้นกับสารละลาย glycine-HCl buffer pH 3.0 phosphate buffer pH 6.5 glycine-NaOH buffer pH 8.6 ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120 และ 121 °C ใน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 110 °C ใน 20 นาที และที่อุณหภูมิ 121 °C ใน 15 นาที การยับยั้งของแบคทีเรียโอซิน โดย Agar well diffusion assay

2.5 ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อความคงตัวของแบคทีเรียโอซิน

ละลายตะกอนแบคทีเรียโอซินที่ทำบริสุทธิ์เบื้องต้นกับสารละลาย glycine-HCl buffer pH 3.0 phosphate buffer pH 6.5 glycine-NaOH buffer pH 8.6 ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง, 4 °C -20 °C และ 3 °C ใน 3 นาที การยับยั้งของแบคทีเรียโอซิน โดย Agar well diffusion assay

2.6 ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของแบคทีเรียโอซินที่ได้

ละลายตะกอนแบคทีเรียโอซินที่ทำบริสุทธิ์เบื้องต้นกับสารละลาย glycine-HCl buffer pH 6.5 ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การยับยั้งของแบคทีเรียโอซิน โดย Agar well diffusion assay โดยใช้แบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ดังแสดงในตารางที่ 12

2.7 การศึกษาการกลายพันธุ์ของการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินที่ได้ต่อเชื้อ *E. faecalis* VanB

เลี้ยงเชื้อ *E. faecalis* VanB ใน MRS broth ใน 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อที่ได้ลงใน MRS broth 50 µl ใน 10⁶ CFU/ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ใน 6 ชั่วโมง จากนั้นเติมแบคทีเรียโอซินที่ทำบริสุทธิ์เบื้องต้นลงใน 2,560 AU/ml ใน 37 °C ใน 37 นาที เก็บตัวอย่างที่ได้นำไปวิเคราะห์การรอดชีวิตของเชื้อ *E. faecalis* VanB drop plate MRS agar

2.8 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

เลี้ยงเชื้อ *E. faecalis* VanB ใน MRS broth ใน 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อที่ได้ลงใน MRS broth 50 µl ใน 10⁶ CFU/ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ใน 6 ชั่วโมง จากนั้นเติมแบคทีเรียโอซินที่ทำ

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR (PCR product) agarose gel electrophoresis

ตารางที่ 5 ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับหาชิ้นที่ควบคุมการสร้างแบคทีเรีย

ชื่อโปรตีน	ตำแหน่ง	ลำดับนิวคลีโอไทด์
EntA	F	5'-GGTACCACTCATAGTGGAAA-3'
	R	5'-CCCTGGAATTGCTCCACCTAA-3'
EntB	F	5'-GCTACGCGTTCATATGGTAAT-3'
	R	5'-TCCTGCAATATTCTCTTTAGC-3'
EntP	F	5'-CAAAATGTAAAAGAATTAAGATCG-3'
	R	5'-AGAGTATACATTTGCTAACCC-3'
EntL50B	F	5'-ATGGGAGCAATCGCAAAATTA-3'
	R	5'-TAGCCATTTTCAATTTGATC-3'
EntIIa	F	5'-TAYGGIAAYGGIGTITAYTG-3'
	R	5'-CYTCDATNGCRRTRTC-3'

4. การโคลนยีนที่ควบคุมการสร้างแบคทีเรีย

4.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA) จากแบคทีเรีย

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E. faecium* CE5-1 ใน MRS broth 5 มิลลิกรัม บ่มที่ 37 °C 24 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงเอาตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C 10 นาที นำตะกอนเซลล์ที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงใน Geneaid จากประเทศไต้หวัน จากนั้นตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอที่ได้ด้วย agarose gel electrophoresis

4.2 การเพิ่มจำนวนยีนที่ควบคุมการสร้างแบคทีเรีย *ent A* ด้วยเทคนิค PCR

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา *entA* ที่ควบคุมการสร้างแบคทีเรีย

Ent-F1 5'-CTGGAATTCATGACCACTCATAG-3'

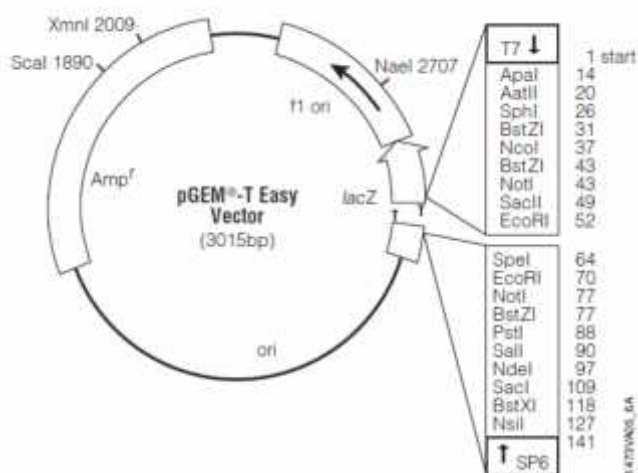
Ent-R1 5'-TATGGATCCTTAGCACTTCCCT-3'

โดยที่ GAATTC เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของ EcoRI ขณะที่ GATCC เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของ BamHI ขณะที่ตัวอักษรตัวหนาแสดงตำแหน่ง start codon

จากนั้นเพิ่มจำนวนยีน *entA* ที่ควบคุมการสร้างแบคทีเรียโอซิน โดยใช้ไพรเมอร์ที่
 0.25 μl (DNA
 template) 0.25 μl Tag DNA polymerase 1.25 μl 0.25 μl dNTP 0.1 μl
 0.2 μl 10X PCR 2.5
 จากนั้นปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำให้ได้ 25 ไมโครลิตร นำไปใส่ในเครื่อง PCR
 system 5 Pre PCR ที่อุณหภูมิ 94 5
 PCR 30 (Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 30
 Annealing ที่อุณหภูมิ 46 30
 Extension ที่อุณหภูมิ 72 5
 30), Post PCR ที่อุณหภูมิ 72 5
 Cooling ที่อุณหภูมิ 4 จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR (PCR
 product) ทั้งระดับคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีการ agarose gel electrophoresis
 จากนั้นแยกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์จาก agarose gel RBC

4.3 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอที่ได้กับ vector

PCR product ที่ได้จากข้อ 4.2 มาทำการเชื่อมต่อกับพลาสมิด pGEM®-T Promega จากประเทศอเมริกา (ภาพที่ 5) โดยใส่ชิ้นดีเอ็นเอ 1 (50) pGEM®-T 1 2X ligation 5 T4 DNA ligase 1 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4



ภาพที่ 5 pGEM®-T

4.4 การเตรียมคอมพิเทนท์เซลล์ของเชื้อ *E. coli* JM109

เลี้ยงเชื้อ *E. coli* JM109 ใน LB broth ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้ค่า OD₆₀₀ 0.3-0.5 นำไปแช่น้ำแข็ง เป็นระยะเวลา 30 นาที ปิเปตสารละลายเชื้อที่ได้มา 1.5 มิลลิเมตร (microcentrifuge tube) 1.5 มิลลิเมตร ปั่นเหวี่ยงเอาตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 4,000 rpm นานที่ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 10 นาที นำตะกอนเซลล์ที่ได้ละลายในสารละลาย ice-cold MgCl₂-CaCl₂ 900 มิลลิเมตร นำไปแช่น้ำแข็ง เป็นระยะเวลา 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเอาตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 4,000 rpm นานที่ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 10 นาที นำตะกอนเซลล์ที่ได้ละลายใน 0.1 M ice-cold CaCl₂ 50 มิลลิเมตร

4.5 การถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่เชื้อ *E. coli* JM109 โดยการกระตุ้นด้วยความร้อน (heat shock)

นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้จากข้อ 4.3 คอมพิเทนท์เซลล์ของเชื้อ *E. coli* JM109 ที่ได้จากข้อ 4.4 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส 45-50 นาที นำไปแช่น้ำแข็งทันที เป็นระยะเวลา 2 นาที SOC medium 950 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1.5 ชั่วโมง นำไปเกลี่ย (spread) บน LB agar ที่มีแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม IPTG 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัม X-gal 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 16-20 ชั่วโมง ตรวจสอบโคลนที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยเลือกโคโลนีที่มีสี (blue/white colony screening) colony PCR

4.6 การศึกษาการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *enta*

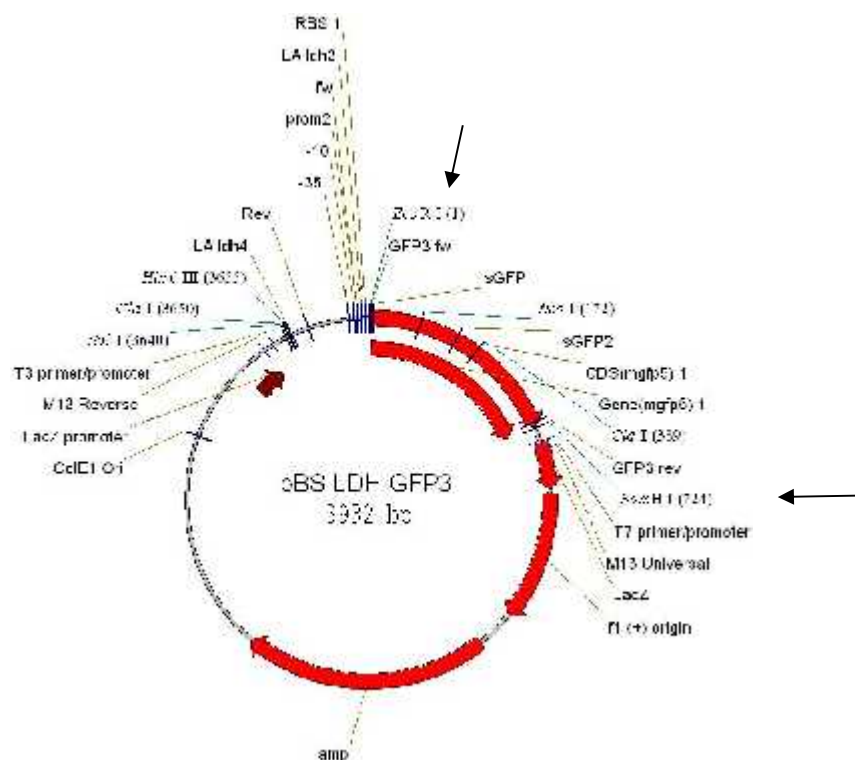
นำโคลนที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้จากข้อ 4.5 Geneaid ลำดับนิวคลีโอไทด์ และทำการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank

5. การแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างแบคทีเรีย

5.1 การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้จากข้อ 4.6 pBS-lacGFP (expression vector) (ภาพที่ 6) BamHI EcoRI 10 มิลลิเมตร Tango 4 มิลลิเมตร จากนั้นปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำให้ได้ 20 มิลลิเมตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

2 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 80 °C ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตัดด้วย agarose gel electrophoresis



ภาพที่ 6 pBS-LdhGFP

- pBS-LdhGFP 3,932 bp ประกอบด้วยยีนคือยาลูกวัว (amp) และยีน GFP (green fluorescent protein) จาก *Lactococcus lactis* LdhL
- รายละเอียดอื่นๆ สามารถค้นข้อมูลได้จาก <http://www.addgene.org/27170/>

5.2 การเชื่อมต่อยีน ent ที่ได้จากพลาสมิด pBS-LdhGFP

ยีน ent ที่ได้จากข้อ 5.1 มาทำการเชื่อมต่อกับพลาสมิด pBS-LdhGFP ขึ้นดีเอ็นเอของยีน ent 1 (50 bp) pBS-LdhGFP 1 2X ligation 5 T4 DNA ligase 1 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 °C

5.3 การเตรียมคอมพิเทนท์เซลล์ของเชื้อ E. coli DH5α

เลี้ยงเชื้อ E. coli DH5α LB broth ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้ค่า OD₆₀₀ 0.3-0.5 นำไปแช่น้ำแข็ง เป็นระยะเวลา 30 นาที ปิเปตสารละลายเชื้อที่ได้มา

1.5 ml (microcentrifuge tube) 1.5 ml บ้วนทิ้ง
ปั่นเหวี่ยงเอาตะกอนเซลล์ด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C 10 นาที นำตะกอนเซลล์ที่ได้ละลายในสารละลาย ice-cold $MgCl_2$ - $CaCl_2$ 900 μ l นำไปแช่น้ำแข็ง เป็นระยะเวลา 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเอาตะกอนเซลล์ด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C 10 นาที นำตะกอนเซลล์ที่ได้ละลายใน 0.1 M ice-cold $CaCl_2$ 50 μ l

5.4 การถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่เชื้อ *E. coli* DH5 α โดยการกระตุ้นด้วยความร้อน (heat shock)

นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้จากข้อ 2.2 ผสมเข้ากับคอมพิเทนท์เซลล์ของเชื้อ *E. coli* DH5 α ที่ได้จากข้อ 2.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 °C 45-50 นาที ไปแช่ในน้ำแข็งทันที เป็นระยะเวลา 2 นาที SOC medium 950 μ l ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C 1.5 ชั่วโมง นำไปเกลี่ยบนอาหาร LB agar ที่มีแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C 16-20 ชั่วโมง ตรวจสอบโคโลนีที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยใช้ colony PCR จากนั้นนำโคโลนีที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด Geneaid วิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ และทำการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank

5.5 การเตรียมคอมพิเทนท์เซลล์ของเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* JCM16167

เลี้ยงเชื้อ *L. lactis* subsp. *cremoris* JCM16167 ใน SGM17 broth (M17 broth ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส 0.5 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลซูโครส 0.5 เปอร์เซ็นต์ 100 มิลลิกรัม บ่มในสภาวะไร้อากาศ ที่อุณหภูมิ 30 °C 24 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงเอาตะกอนเซลล์ด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C 10 นาที ล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายที่ใช้เพื่อล้าง (washing solution) ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 0.5 เปอร์เซ็นต์ 10 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำตะกอนเซลล์ที่ได้ washing solution 1 ml

5.6 การถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่เชื้อ *L. lactis* subsp. *cremoris* JCM16167 โดยวิธี electroporation

นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้จากข้อ 5.4 ผสมเข้ากับคอมพิเทนท์เซลล์ของเชื้อ *L. lactis* subsp. *cremoris* JCM16167 ที่ได้จากข้อ 5.5

(electroporation) โดย Holo Nes (1989) โดยคลอคอมพิเทนท์เซลล์ของเชื้อ *L. lactis* subsp. *cremoris* JCM16167 ที่เคมรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ลงใน electroporation cuvettes (ความกว้าง 2 มิลลิเมตร) นำไปแช่ในน้ำแข็ง เป็นระยะเวลา 30 นาที แล้วนำไปถ่ายขึ้นด้วยเครื่อง BIO-RAD Gene Pulser II Electroporation 2.0 200 โอห์ม จากนั้นเติมอาหาร SGM17MC broth (SGM17 broth ที่ประกอบด้วย $MgCl_2$ 20 มิลลิโมลาร์ $CaCl_2$ 2 มิลลิโมลาร์) นำไปแช่ในน้ำแข็ง 5 นาที แล้วจึงนำไปบ่มในสภาวะไร้อากาศ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง นำไปเกลี่ยบนอาหาร M17 agar ที่มีแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 48-72 ชั่วโมง ตรวจสอบโคลนที่ colony PCR จากนั้นนำโคลนที่ได้รับรีคอมบิแนนท์ Geneaid

6. การศึกษาขึ้นที่ควบคุมการแสดงออกแบคทีเรียอินในเชื้อ *E. faecium* CE5-1 (wide-type strain)

6.1 การสกัดจีโนมดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E. faecium* CE5-1 ใน MRS broth 5 มิลลิกรัม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงเอาตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 10 นาที นำตะกอนเซลล์ที่ได้ไป Geneaid จากประเทศไต้หวัน จากนั้นตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอที่ได้ด้วย agarose gel electrophoresis

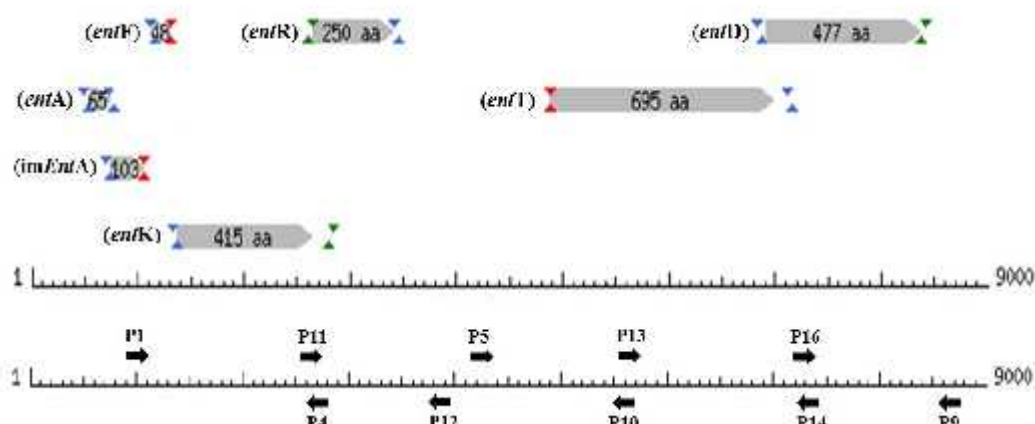
6.2 การหาขึ้นที่ควบคุมการแสดงของแบคทีเรียอิน

นำจีโนมดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปตรวจหาขึ้นที่ควบคุมการสร้างแบคทีเรียอิน โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบดังแสดงในตารางที่ 6 และภาพที่ 7 PCR Tag DNA polymerase 1.25 dNTP 0.1 ไมโครโมลาร์ ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้อย่างละ 0.2 10X PCR 2.5 จากนั้นปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำให้ได้ 25 เครื่อง PCR system Pre PCR ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 10 นาที PCR 30 (Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 Annealing ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส 1 Extention ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 3 Post PCR ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10

การ Cooling ที่อุณหภูมิ 4 °C จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ทั้งระดับคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอที่ได้ด้วย agarose gel electrophoresis จากนั้นแยกดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์จาก agarose gel โดยใช้ RBC PCR product ที่ได้จะอยู่ในหลอดที่มีอยู่ใน GenBank

ตารางที่ 6 ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับตรวจหาชิ้นที่ควบคุมการสร้างเบคเทอริโอซิน

ลำดับ	ทิศทาง	ลำดับเบส	หมายเหตุ
P1	F	5'-GAAATTGGAAGAACTGCTGGA-3'	การทดลองครั้งแรก
P5	F	5'-TGCCCCAGAAAAAGTAGTGC-3'	การทดลองครั้งแรก
P11	F	5'-GTTGTTTTGAGGGAAGGAGGA-3'	การทดลองครั้งแรก
P13	F	5'-TCTCGTTTTCTTGATGCCAGT-3'	การทดลองครั้งแรก
P16	F	5'-CGATGTGTTGGTTAGATTGGA-3'	การทดลองครั้งแรก
P17	F	5'-TCAGGAGGGGATCTCTTGATT-3'	การทดลองครั้งแรก
P4	R	5'-CTTGCTTTGGTCGGAATTGT-3'	การทดลองครั้งแรก
P10	R	5'-CCCCTGATTTTCTCGTAGCA-3'	การทดลองครั้งแรก
P14	R	5'-CTGTCATCCGTTGAAAACAAA-3'	การทดลองครั้งแรก
P9	R	5'-CTTCTAAGCTTTCTTCTGTGATTTC-3'	O'Keeffe <i>et al.</i> (1999)
P18	R	5'-TCCTCCTTCCCTCAAAACAA-3'	การทดลองครั้งแรก



ภาพที่ 7 แผนผังตำแหน่งการจับของไพรเมอร์ที่ออกแบบ

บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. การศึกษาศักยภาพการเป็นโปรไบโอติกของเชื้อ *Enterococcus faecium* CE5-1

1.1 การทดสอบความสามารถในการทนต่อกรดและน้ำดี

ระบบทางเดินอาหาร (gastrointestinal tract) เป็นอวัยวะที่มีความสำคัญต่อสุขภาพของมนุษย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในส่วนของกระเพาะอาหารที่มีสภาวะความเป็นกรด (pH 2.79-3.54) (Král *et al.*, 2012) ซึ่งแบคทีเรียส่วนใหญ่ไม่สามารถเจริญได้ในสภาวะความเป็นกรด (Lin *et al.*, 2006) นอกจากนี้แล้วในส่วนของกระเพาะอาหารยังมีเอนไซม์เปปซิน เป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยโปรตีน ซึ่งสามารถก่อให้เกิดความเสียหายต่อผนังเซลล์ของแบคทีเรียได้

ผลการทดสอบการทนต่อกรดที่พีเอช 2.5, 3.0 และ 7.0 พบว่าเชื้อ *E. faecium* CE5-1 สามารถทนต่อกรดได้ในระดับดีในพีเอชที่มากกว่า 3.0 โดยให้ปริมาณการรอดชีวิตของเชื้อเท่ากับ $9.38 \log \text{CFU/ml}$ ภายหลังจากการบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ขณะที่พีเอช 2.5 เชื้อ *E. faecium* CE5-1 สามารถทนต่อกรดได้ในระดับดีในพีเอชที่มากกว่า 2.5 โดยให้ปริมาณการรอดชีวิตของเชื้อเท่ากับ $7.46 \log \text{CFU/ml}$ ซึ่งลดลงจากเริ่มต้นประมาณ $2 \log \text{CFU/ml}$ (ตารางที่ 7) ถึงแม้ว่าเชื้อ *E. faecium* CE5-1 จะทนต่อกรดที่พีเอช 2.5 ได้ แต่การรอดชีวิตของเชื้ออาจเพิ่มขึ้นได้ เนื่องจากการอยู่ร่วมกันระหว่างเชื้อจุลินทรีย์กับอาหารที่กินเข้าไป สารอาหารบางชนิดอาจช่วยในการป้องกันอิทธิพลจากกรดในกระเพาะได้

ความสามารถในการทนต่อกรดของแบคทีเรียจะขึ้นอยู่กับกิจกรรมของเอนไซม์ H^+ -ATPase (cytoplasmic membrane) ของเชื้อจุลินทรีย์ ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ อาหารที่ใช้เลี้ยง และสภาวะในการบ่ม (Hood and Zoitola, 1988; Charteris *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1999; Zárate *et al.*, 2000; Huang and Adams, 2004)

ลำไส้เล็กเป็นส่วนหนึ่งของระบบทางเดินอาหารที่ต่อจากส่วนของกระเพาะอาหาร มี pH ประมาณ 5.7-8.4 (Král *et al.*, 2012) นอกจากนี้

ยังมีเอนไซม์หลายชนิดและน้ำดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำดีที่ถูกหลั่งออกมาเพื่อทำให้ไขมันแตกตัว และเข้ากับน้ำได้ดี นอกจากนี้ น้ำดียังมีผลต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลคติกในลำไส้เล็กอีกด้วย (Park *et al.*, 1998; Hosseini *et al.*, 2009) เนื่องจากเกลือน้ำดีซึ่งเป็นกรดน้ำดีชนิดหนึ่ง จะทำให้เชื้อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเสียโดยการไปละลายไขมันในส่วนของโครงสร้างฟอสโฟของเชื้อหุ้มเซลล์ส่งผลให้เกิดการแยกออกจากกันบริเวณผิวเซลล์ ความเข้มข้นของน้ำดีในไก่อโตปกติจะมีการเปลี่ยนแปลงขึ้นอยู่กับอายุของไก่ และอาหารที่ไก่ได้รับเข้าไป (Lin *et al.*, 2007) ดังนั้นการทดลองครั้งนี้จึงศึกษาผลของปริมาณความเข้มข้นของน้ำดีไก่ต่อการรอดชีวิตของเชื้อ *E. faecium* CE5-1 จากผลการทดลองพบว่าเชื้อ *E. faecium* CE5-1 มีอัตราการรอดชีวิตที่ลดลงตามความเข้มข้นของน้ำดีไก่ นอกจากนี้ยังสามารถทนต่อความเข้มข้นของน้ำดีที่ 1, 3, 5 และ 7 เปอร์เซ็นต์ โดยให้ปริมาณการรอดชีวิตของเชื้อเท่ากับ 9.16, 9.39, 9.27 และ 9.14 log CFU/ml ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 7 การรอดชีวิตของเชื้อแบคทีเรียในความเข้มข้นของน้ำดีในปริมาณสูงๆ อาจเนื่องมาจากการผลิตเอนไซม์ bile salt hydrolase (BSH) ซึ่งมีบทบาทในการย่อยกรดน้ำดีและทำให้ความเป็นพิษลดลง (Moser and Savage, 2001; Taranto *et al.*, 2006)

ผลศึกษาการทนต่อกรดและน้ำดีแบบต่อเนื่องต่อการรอดชีวิตของเชื้อ *E. faecium* CE5-1 พบว่าเชื้อ *E. faecium* CE5-1 มีอัตราการรอดชีวิตที่ลดลงตามความเข้มข้นของน้ำดีไก่ โดยให้ปริมาณการรอดชีวิตของเชื้อเท่ากับ 8.78 log CFU/ml เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารและลำไส้เล็กของไก่แบบต่อเนื่อง ถือว่าเป็นเชื้อที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกที่ดี

ตารางที่ 7 การรอดชีวิตของเชื้อ *Enterococcus faecium* CE5-1 ในสภาวะกรดที่ pH 7.0, 3.0 และ 2.5 ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของน้ำดีไก่ (0-7%) และการทดสอบแบบค้อนเนื่อง (7% FCB) ในสภาวะกรดที่ pH 7.0, 3.0 และ 2.5

สภาวะ		การรอดชีวิตของเชื้อ (log CFU/ml)				
		สภาวะกรดที่ pH 7.0		สภาวะกรดที่ pH 3.0		
		0 h.	2 h.	0 h.	3 h.	6 h
pH	pH 7.0	9.14±0.10	9.38±0.04	.*	-	-
	pH 3.0	9.18±0.08	9.38±0.04	-	-	-
	pH 2.5	9.14±0.09	7.46±0.08	-	-	-
ความเข้มข้นของน้ำดีไก่ (0-7%)	0	-	-	8.93±0.05	9.04±0.03	9.06±0.02
	1	-	-	8.73±0.11	9.20±0.13	9.16±0.02
	3	-	-	9.32±0.03	9.45±0.03	9.39±0.03
	5	-	-	9.47±0.03	9.39±0.04	9.27±0.02
	7	-	-	9.41±0.04	9.28±0.02	9.14±0.03
การทดสอบแบบค้อนเนื่อง	แบบค้อนเนื่อง**	9.25±0.02	9.36±0.05	9.36±0.05	9.44±0.02	9.42±0.01
	7% FCB	9.28±0.03	9.21±0.01	9.21±0.01	8.84±0.07	8.78±0.06

*การรอดชีวิตของเชื้อ

**การบ่มแบบค้อนเนื่อง ศึกษาในสภาวะกรดที่ pH 3.0 ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของน้ำดีไก่ 3% ที่มีการเติมเอนไซม์เพนทรีเอดินความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีน้ำดีไก่ที่ผ่านการทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็ง (FCB) ในสภาวะกรดที่ pH 7.0 และ pH 2.5 ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของน้ำดีไก่ 0-8.0

1.2 การทดสอบการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ

การศึกษาคือการคัดเลือดยาปฏิชีวนะของเชื้อจุลินทรีย์ที่บ่งชี้หนึ่งที่มีส่วนสำคัญต่อการเป็นโปรไบโอติกที่ดี แม้ว่าแบคทีเรียแลคติกส่วนใหญ่จะเป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกที่ดี อย่างไรก็ตามเชื้อกลุ่ม Enterococci ซึ่งจัดเป็นกลุ่มของแบคทีเรียแลคติก บางสายพันธุ์ก็เป็นสายพันธุ์ที่ก่อโรคต่างๆ ใน โรคลิ้นหัวใจอักเสบ (endocarditis) โลหิตเป็นพิษจากเชื้อแบคทีเรีย (bacteraemia) โรคติดเชื้อของทางเดินปัสสาวะ (urinary tract) โรคติดเชื้อในเด็กทารกแรกเกิด (neonatal) โรคติดเชื้อในระบบประสาทส่วนกลาง (central nervous system) (Franz *et al.*, 1999) นอกจากนี้เชื้อกลุ่ม Enterococci มักเป็นสายพันธุ์ที่คัดเลือดยาปฏิชีวนะหลายๆ ชนิด เช่น aminoglycoside glycopeptide (MLS antibiotics ซึ่งประกอบด้วยแมโครไลด์ (macrolide) lincosamide streptogramin of the B type) Chloramphenicol Tetracycline quinolone oxazolidinone everninomicin (Klare *et al.*, 2003) นอกจากนี้เชื้อกลุ่ม Enterococci ยังมีความสามารถในการถ่ายทอดยีนดื้อยาปฏิชีวนะไปสู่จุลินทรีย์ชนิดอื่น อาจเป็นสาเหตุทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะเพิ่มขึ้นได้ (Klare *et al.*, 2003; Abriouel *et al.*, 2005)

จากการทดลองพบว่าเชื้อกลุ่ม Enterococci โดยส่วนใหญ่คัดเลือดยาปฏิชีวนะ ได้แก่ ampicillin, ampicillin-sulbactam, cefazolin, ceftriaxone, ciprofloxacin, clindamycin, erythromycin, fusidic acid, gentamicin, rifampin, vancomycin, teicoplanin จากการทดลองยังพบว่าเชื้อ *E. faecalis* VanB *E. gallinarum* VanC เป็นเชื้อที่มีคุณสมบัติคัดเลือดยาปฏิชีวนะทุกชนิดที่นำมาทดสอบในครั้งนี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อ *E. faecalis* VanB ที่มีคุณสมบัติคัดเลือดยาแวนโคไมซินอย่างมาก หรือที่รู้จักในชื่อ vancomycin-resistant enterococci (VRE) เป็นเชื้อที่คัดเลือดยาปฏิชีวนะแวนโคไมซิน ยาปฏิชีวนะอื่นๆ หลายชนิด โดยส่วนใหญ่เชื้อในกลุ่ม VRE จะเป็นเชื้อฉวยโอกาสในผู้ป่วยที่มีร่างกายอ่อนแอ ทำให้ยากต่อการรักษา อีกทั้งหากจะรักษาก็ต้องใช้ยาปฏิชีวนะชนิดอื่นซึ่งมีราคาแพง เชื้อในกลุ่ม VRE พบได้ทั่วไป เช่น โรงพยาบาล ใกล้เคียง เป็นต้น โดยเฉพาะในไก่พบเชื้อในกลุ่ม VRE Robredo (2000) พบเชื้อกลุ่ม VRE ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์จากไก่ ประกอบด้วยเชื้อ *E. duran* (11) *E. faecalis* (10) *E. faecium* (10) *E. hirae* (2 ไอโซเลต) สาเหตุของการดื้อยาในแบคทีเรียหลายชนิดในฟาร์มเลี้ยงไก่อาจเนื่องมาจากการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างแพร่หลายในการฟาร์มเลี้ยงไก่ เพื่อ

(Apata, 2009) ซึ่งแยก
 ปฏิชีวนะ ส่งผลให้พบเชื้อดื้อยาหลายชนิดในไก่ อย่างไรก็ตามเชื้อ *E. faecium* CE5-1 ซึ่งแยก
 มาจากไก่พื้นเมืองจากการทดลองครั้งนี้ เมื่อนำไปทดสอบการดื้อยา
 ปฏิชีวนะ พบว่าเชื้อ *E. faecium* CE5-1 มีความไวต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดสอบครั้งนี้เมื่อ
 เปรียบเทียบกับเชื้อกลุ่ม Enterococci อื่นๆ ที่ใช้ทดสอบด้วยกัน แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *E. faecium*
 CE5-1 ลอดคัย อาจนำมาใช้เป็นเชื้อโปรไบโอติกในการเลี้ยงไก่ได้

ตารางที่ 8 การต้านทานยาปฏิชีวนะ ในเชื้อกลุ่ม Enterococci

สายพันธุ์	ยาปฏิชีวนะ (Antibiotics)											
	Vancomycin		Linezolid		Daptomycin		Teicoplanin		Cloxacillin		Ampicillin	
	MIC ^a	MBC ^b	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>E. faecium</i> 139	10	320	1.25	40	1.25	5	80	160	<0.625	40	1.25	40
<i>E. faecium</i> 174	80	1,282	5	40	20	20	>1,282	>1,282	160	>1,282	2.5	80
<i>E. faecium</i> 348	80	>1,282	2.5	80	10	40	>1,282	>1,282	>1,282	>1,282	1.25	40
<i>E. faecalis</i> VanB	80	80	320	>1,282	10	80	1,282	>1,282	40	>1,282	160	>1,282
<i>E. gallinarum</i> VanC	160	>1,282	160	>1,282	10	40	>1,282	>1,282	80	>1,282	10	80
<i>E. faecium</i> CE5-1	10	320	2.5	40	1.25	2.5	320	640	<0.625	40	1.25	40

^a MIC (minimum inhibitory concentration) คือ ความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

^b MBC (minimum bactericidal concentration) คือ ความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะที่สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์

1.3 กิจกรรมการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

จากการทดลองพบว่าสารละลายส่วนใสที่ได้จากเชื้อ *E. faecium* CE5-1 ที่ผ่านการปรับที่ 6.5-7.0 (culture supernatant; CS) แสดงกิจกรรมการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในช่วง (narrow spectrum) CS จากเชื้อ *E. faecium* CE5-1 มีกิจกรรมการยับยั้งเชื้อในกลุ่มของแบคทีเรียแลคติก และแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิด ได้แก่ เชื้อ Enterococci, *P. pentosaceus* 3CE27, *L. sakei* subsp. *sakei* JCM1157, *L. monocytogenes* DMST17303 CS จากเชื้อ *E. faecium* CE5-1 มีกิจกรรมในการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* DMST5040, *L. plantarum* D6SM3, *P. pentosaceus* DMST18752, *S. aureus* DMST8840 และแบคทีเรียแกรมลบทุกสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ การไม่พบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบถือเป็นเรื่องปกติที่พบ (Rehaim (2010) ศึกษากิจกรรมการยับยั้งของสารละลาย CS จากเชื้อ *E. faecium* MMRA CS จากเชื้อ *E. faecium* MMRA มีกิจกรรมการยับยั้งต่อสายพันธุ์ของเชื้อ *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Listeria* แต่ไม่พบกิจกรรมการยับยั้งต่อเชื้อ (*Hafnia*, *Serratia*, *E. coli*) การไม่พบกิจกรรมการยับยั้งกับเชื้อแบคทีเรียแกรมลบอาจเนื่องมาจากสารไม่มีคุณสมบัติในการซึมผ่านเยื่อหุ้มชั้นนอกของเซลล์ (outer membrane) (Jack *et al.*, 1995) เนื่องจากการทดลองพบว่า CS จากเชื้อ *E. faecium* CE5-1 แสดงกิจกรรมการยับยั้งสูงสุดต่อเชื้อ *L. sakei* subsp. *sakei* JCM1157 ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงเลือกใช้เชื้อ *L. sakei* subsp. *sakei* JCM1157 เป็นเชื้ออินดิเคเตอร์สำหรับการวัดกิจกรรม

นอกจากนี้ยังพบว่าสารละลาย CS จากเชื้อ *E. faecium* CE5-1 แสดงกิจกรรมการยับยั้งต่อเชื้อในกลุ่มของเชื้อ Enterococci ที่คือต่อยาปฏิชีวนะ ได้แก่ *E. faecium* 174, *E. faecium* 348, *E. gallinarum* VanC, *E. faecalis* VanB ยกเว้นเชื้อ *E. faecium* 139 CS จากเชื้อ *E. faecium* CE5-1 ไม่มีกิจกรรมการยับยั้งต่อเชื้อ *E. faecium* CE5-1 พบกิจกรรมการยับยั้งเชื้อที่ผลิตเองนั้นเป็นสิ่งปกติที่พบเจอในเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตแบคทีริโอซิน เนื่องจากโดยปกติเชื้อที่ผลิตแบคทีริโอซินนอกจากจะพบยีนที่ควบคุมการผลิตแบคทีริโอซิน ยังพบยีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน หรือ immunity gene of bacteriocin ครั้งนี้ในเรื่องศึกษาการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้าง enterocin A (5) จากเชื้อ *E. faecium* CE5-1 ได้ให้ผลตรงกัน กล่าวคือตรวจพบยีนที่ควบคุมการสร้าง enterocin A enterocin A immunity gene ที่ได้จากเชื้อ *E. faecium* CE5-1

จากคุณสมบัติทั้งหมดที่ได้พบว่าสารละลาย CS ที่ได้จากเชื้อ *E. faecium* CE5-1 นำไปใช้ในการควบคุมการเจริญของเชื้อในกลุ่มของเชื้อ Enterococci ที่คือคอตายาปฏิชีวนะ เพื่อลดการแพร่กระจายของเชืดังกล่าว ทำให้เราอาจควบคุมการแพร่กระจายของการคอตายาปฏิชีวนะ

1.4 การทดสอบความสามารถในการเจริญร่วมกันระหว่างเชื้อ *E. faecium* CE5-1 กับเชื้อกลุ่ม Enterococci ที่คือคอตายาปฏิชีวนะ

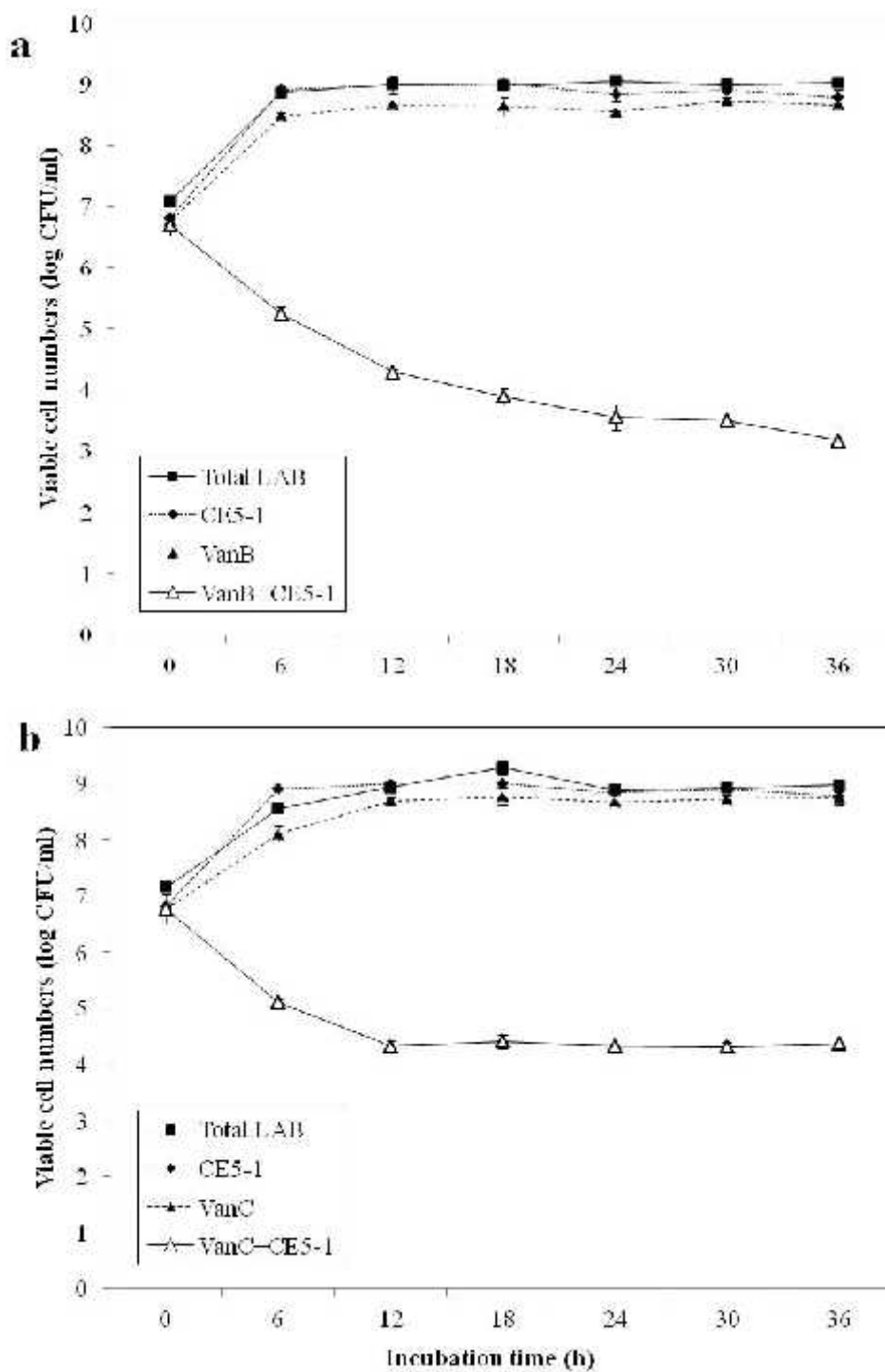
การศึกษาการแข่งขันในการเจริญระหว่างเชื้อ *E. faecium* CE5-1 ที่มีคุณสมบัติในการ enterocin A กับเชื้อกลุ่ม Enterococci ที่คือคอตายาปฏิชีวนะ (*E. faecalis* VanB *E. gallinarum* VanC) MRS broth 200 บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C 24 ชั่วโมง แสดงผลดังภาพที่ 8 จากการทดลองพบว่าการเจริญของเชื้อ *E. faecalis* VanB *E. gallinarum* VanC 12 ชั่วโมงของการบ่ม โดยการ 6.68 6.76 4.29 4.31 log CFU/ml 12 ชั่วโมง การเจริญจะลดลงอย่างช้าๆ การทดลองในครั้งนี้ถือว่าเป็นการศึกษาครั้งแรกในการนำเอาเชื้อโปรไบโอติกที่ได้หรือเชื้อ *E. faecium* CE5-1 เชื้อกลุ่ม Enterococci ที่คือคอตายาปฏิชีวนะ ซึ่งโดยส่วนใหญ่งานวิจัยที่ผ่านมาจะมุ่งเน้นการนำเอาสารสกัดที่ได้จากเชื้อหรือเอาเชื้อโปรไบโอติกไปใช้ในการควบคุมแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค (pathogens) หรือเชื้อที่ทำให้อาหารเน่าเสีย (food spoilage) Rehaieem (2010) นำสารละลายส่วนใสจากเชื้อ *E. faecium* MMRA ในการเจริญของเชื้อ *L. ivanovii* BUG496 ในขณะที่ Todorov Dicks (2009) ศึกษาการใช้เชื้อ *E. mundtii* ST4SA การเจริญของเชื้อ *L. innocua* LMG 13568 พบว่าเชื้อ *L. innocua* LMG 13568 4.8×10^3 CFU/ml 2.0×10^2 CFU/ml ภายหลังการเลี้ยงร่วมกันเป็นระยะเวลา 32 ชั่วโมง

ตารางที่ 9 กิจกรรมการยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ของสารละลายส่วนใสที่ได้จากเชื้อ *E. faecium* CE5-1 ที่ผ่านการปรับพีเอชให้อยู่ในช่วง 6.5-7.0 agar well diffusion assay

เชื้ออินดิเคเตอร์	แหล่งที่มา**	รัศมีของการยับยั้ง (mm)
<i>Bacillus cereus</i> DMST5040	DMST	0
<i>Enterococcus durans</i> 3L20	Our strain collection	1.5
<i>Enterococcus faecalis</i> 2L24	Our strain collection	1.0
<i>Enterococcus faecalis</i> VanB*	CU	2.0
<i>Enterococcus faecium</i> 139*	CU	0
<i>Enterococcus faecium</i> 174*	CU	1.5
<i>Enterococcus faecium</i> 348*	CU	1.5
<i>Enterococcus faecium</i> 4S13	Our strain collection	1.5
<i>Enterococcus faecium</i> 8S16	Our strain collection	2.0
<i>Enterococcus faecium</i> CE5-1	Our strain collection	0
<i>Enterococcus faecium</i> L7-45	Our strain collection	2.2
<i>Enterococcus gallinarum</i> VanC*	CU	2.0
<i>Escherichia coli</i> DMST4212	DMST	0
<i>Lactobacillus plantarum</i> D6SM3	Our strain collection	0
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> JCM1157	JCM	6.0
<i>Listeria monocytogenes</i> DMST17303	DMST	5.0
<i>Pediococcus pentosaceus</i> 3CE27	Our strain collection	3.0
<i>Pediococcus pentosaceus</i> DMST18752	DMST	0
<i>Salmonella</i> Typhimurium DMST16809	DMST	0
<i>Salmonella</i> Enteritidis DMST15676	DMST	0
<i>Staphylococcus aureus</i> DMST8840	DMST	0
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> DMST5665	DMST	0

* เชื้อในกลุ่มของเชื้อ Enterococci ที่ติดต่อยาปฏิชีวนะได้รับจากศูนย์ติดตามการดื้อยาของเชื้อโรคอาหารเป็นพิษโดยความร่วมมือ
 ของกรมวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข และกรมการแพทย์

** DMST: Department of Medical Sciences; CU: The WHO Global Salm-Surv Regional Centre of Excellence: South-East Asia and Western Pacific, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Thailand; JCM: Japan Collection of Microorganisms.



ภาพที่ 8 การเลี้ยงร่วมกันระหว่างเชื้อ *E. faecium* CE5-1 ที่ กับเชื้อกลุ่ม Enterococci ที่คือ
 MRS broth

(a) การเลี้ยงร่วมกันระหว่างเชื้อ *E. faecium* CE5-1 กับเชื้อ *E. faecalis* VanB

(b) การเลี้ยงร่วมกันระหว่างเชื้อ *E. faecium* CE5-1 กับเชื้อ *E. gallinarum* VanC

2. การศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียโอซินที่ได้จากเชื้อ *E. faecium* CE5-1

2.1 ผลของเอนไซม์ต่อกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซิน

proteinase K, trypsin, α -chymotrypsin, pronase E, pepsin, α -amylase lipase ต่อความคงตัวของกิจกรรมการยับยั้งของ enterocin CE5-1 ที่ทำบริสุทธิ์เบื้องต้น พบว่าการเติมเอนไซม์ trypsin, α -chymotrypsin, Proteinase K, Pronase E α -amylase กิจกรรมการยับยั้งของ enterocin CE5-1 ขณะที่เอนไซม์ lipase การยับยั้งของ enterocin CE5-1 (ตารางที่ 10) โดยที่การเติมเอนไซม์ย่อยโปรตีนมีผลต่อการยับยั้ง enterocin CE5-1 แสดงให้เห็นว่ากิจกรรมของการยับยั้งเกิดจากสารที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบซึ่ง Gupta (2010) พบว่าความคงตัวของกิจกรรมการยับยั้งของ enterocin FH99 พบว่ากิจกรรมการยับยั้งของ enterocin FH99 ถูกยับยั้งโดยสมบูรณ์ หลังจากทดสอบด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน ได้แก่ proteinase K, pepsin, papain, trypsin, pronase E, ficin, protease XIII, chymotrypsin protease I ขณะที่การเติม lipase, catalase rennin ไม่มีผลต่อกิจกรรมการยับยั้งของ enterocin FH99

อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้พบว่าการเติมเอนไซม์ lipase ไม่มีผลต่อกิจกรรมการยับยั้ง enterocin CE5-1 α -amylase มีผลทำให้กิจกรรมการยับยั้งของ enterocin CE5-1 ถูกยับยั้งโดยสมบูรณ์ แสดงให้เห็นว่ากิจกรรมของการยับยั้งเกิดจากสารที่มีโปรตีนและมีคาร์ไฮเดรตเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในการออกฤทธิ์ ซึ่งแบคทีเรียโอซินที่ได้อาจจัดอยู่ในกลุ่ม IV คือ complex bacteriocin (Garneau *et al.*, 2002) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Lee Kim (2010) enterocin DB1 จากเชื้อ *E. faecium* DB1 α -amylase นอกจากนี้ Ohmomo (2000) α -amylase มีผลยับยั้งกิจกรรมของ enterocin ON-157 จากเชื้อ *E. faecium* ON-157

ตารางที่ 1) กิจกรรมการยับยั้งของ enterocin CE5-1

สาร	ค่า	ค่า (AU/ml)
Control*	7.5	80
Trypsin	7.5	0
α -chymotrypsin	7.5	0
Proteinase K	7.5	0
Pronase E	7.5	0
α -amylase	7.5	0
Lipase	7.5	80

* Control

2.2 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมการยับยั้ง และความคงตัวของแบคทีเรียโอซิน

การทดสอบกิจกรรมการยับยั้งของ enterocin CE5-1 ที่ทำบริสุทธิ์เบื้องต้น enterocin CE5-1 มีกิจกรรมการยับยั้งในช่วงกว้างของพีเอช ตั้งแต่พีเอช 2.2-10.6 จากการบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ในสารละลายบัฟเฟอร์ 1 ชั่วโมง (ตารางที่ 1) ซึ่งสอดคล้องกับการทดสอบของ Franz (1996) ที่พบ enterocin 900 จากเชื้อ *E. faecium* BFE900 มีกิจกรรมการยับยั้งที่พีเอช 2-10 ขณะที่ enterocin A จากเชื้อ *E. faecium* MMRA มีกิจกรรมการยับยั้งในช่วงกว้างที่พีเอช 2-12 (Rehaie et al., 2010) นอกจากนี้ยังพบว่ากิจกรรมการยับยั้งของ enterocin CE5-1 สูงสุดเมื่อละลาย enterocin CE5-1 ที่ทำบริสุทธิ์เบื้องต้นในสารละลาย glycine-HCl buffer ที่พีเอช 3.0-3.6 phosphate buffer ที่พีเอช 5.7-6.5 glycine-NaOH buffer ที่พีเอช 8.6-9.6 (ตารางที่ 1) enterocin CE5-1 ที่ผลิตจากเชื้อ *E. faecium* CE5-1

การทดสอบกิจกรรมการยับยั้งของ enterocin CE5-1 ที่ทำบริสุทธิ์เบื้องต้น ภายหลังจากการบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ในสารละลายบัฟเฟอร์ 24 ชั่วโมง สารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่างๆ พบว่ากิจกรรมการยับยั้งของ enterocin CE5-1 โดยส่วนใหญ่จะลดลง แต่กิจกรรมการยับยั้งจะหมดไปเมื่อละลาย enterocin CE5-1 ใน phosphate buffer ที่พีเอช 6.5 - 8.0 tris-HCl buffer ที่พีเอช 7.0 glycine-NaOH buffer ที่พีเอช 10.6 ภายหลังจากการบ่มที่ 37 °C ในสารละลายบัฟเฟอร์ 24 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่าที่พีเอชเป็นกรดจะให้ enterocin CE5-1 ดีกว่าที่พีเอชที่เป็นกลางและด่าง

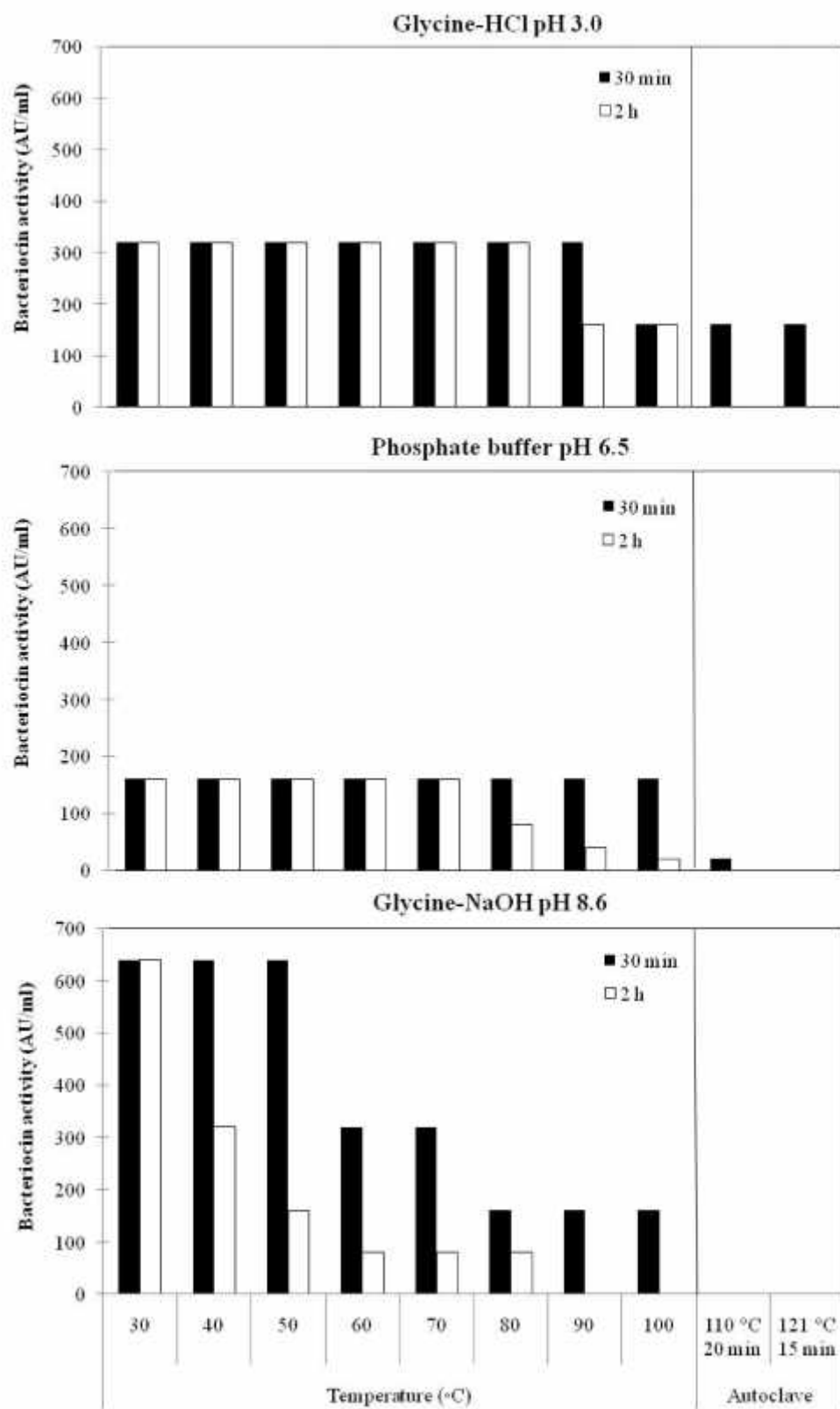
ตารางที่ 11 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมการยับยั้งของ enterocin CE5-1

อุณหภูมิ (°C)	pH	กิจกรรมการยับยั้ง (AU/ml)	
		1 h	24 h
Glycine-HCl buffer	2.2	160	160
	3.0	320	160
	3.6	320	40
Citric buffer	3.0	160	160
	4.2	160	80
	6.2	160	40
Phosphate buffer	5.7	320	80
	6.5	320	0
	8.0	80	0
tris-HCl buffer	7.0	160	0
	8.0	80	20
	9.0	80	80
Glycine-NaOH buffer	8.6	320	80
	9.6	320	80
	10.6	160	0

2.3 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซิน

การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมการยับยั้งของ enterocin CE5-1 ที่ทำบริสุทธิ์ เบื้องต้นที่ละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ต่างๆ (ภาพที่ 9) glycine-HCl buffer pH 3.0 phosphate buffer pH 6.5 glycine-NaOH buffer pH 8.6 กิจกรรมการยับยั้งของ enterocin CE5-1 อยู่ที่ 30-100 AU/ml 2 ชั่วโมง ยกเว้น enterocin CE5-1 ที่ละลายใน glycine-NaOH buffer pH 8.6 ที่บ่มที่ 90-100 AU/ml 2 ชั่วโมง นอกจากนี้เมื่อศึกษาความคงตัวของ กิจกรรมการยับยั้งของ enterocin CE5-1 ที่ทำบริสุทธิ์เบื้องต้นภายใต้อุณหภูมิในการฆ่าเชื้อ

(sterilization condition) ที่อุณหภูมิ 110 °C 20 นาที และที่อุณหภูมิ 121 °C 15 นาที พบว่ากิจกรรมการยับยั้งของ enterocin CE5-1 ที่ละลายใน glycine-HCl buffer pH 3.0 50 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่กิจกรรมการยับยั้ง enterocin CE5-1 ที่ละลายในสารละลาย phosphate buffer pH 6.5 3 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังการบ่มที่อุณหภูมิ 110 °C 20 นาที enterocin CE5-1 ที่ละลายในสารละลาย phosphate buffer pH 6.5 glycine-NaOH buffer pH 8.6 ที่บ่มที่อุณหภูมิ 121 °C 15 นาที พบว่ากิจกรรมถูกยับยั้ง (ภาพที่ 9) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของแบคทีเรียโอซินและความคงตัวของแบคทีเรียโอซินขึ้นกับชนิดของแบคทีเรียโอซิน และสายพันธุ์ที่ผลิต เช่น จากการทดลองของ Franz (1996) พบว่ายังคงมีกิจกรรมการยับยั้งของ enterocin 900 ภายหลังการบ่มที่ 121 °C 15 นาที ขณะที่ Bacteriocin ST15 จะถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์ ภายหลังการบ่มที่อุณหภูมิ 121 °C 20 นาที (De Kwaadsteniet *et al.*, 2005)



ภาพที่ 9 กิจกรรมการยับยั้งของ enterocin CE5-1

2.4 ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซิน

การทดสอบการยับยั้งของ enterocin CE5-1 ที่ทำบริสุทธิ์เบื้องต้นที่ละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ต่างๆ ได้แก่ สารละลาย glycine-HCl buffer pH 3.0 phosphate buffer pH 6.5 glycine-NaOH buffer pH 8.6 enterocin CE5-1 ที่อุณหภูมิสามารถรักษากิจกรรมการยับยั้งของ enterocin CE5-1 ได้ดีกว่าที่อุณหภูมิสูง (ภาพที่ 10) เมื่อเปรียบเทียบกับสารละลาย enterocin CE5-1 ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (29±2 องศาเซลเซียส) Solichová *et al.* (2012) ได้รายงานการยับยั้งคล้าย enterocin (enterocin-like substance) ที่ผลิตจากเชื้อ *E. mundtii* 1282 ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส พบว่ากิจกรรมการยับยั้งของสารยับยั้งคล้าย enterocin ตัวต่ออุณหภูมิการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 6 องศาเซลเซียส -20 องศาเซลเซียส 8 องศาเซลเซียส

นอกจากนี้ยังพบว่า การเก็บรักษาที่อุณหภูมิเดียวกัน การเก็บ enterocin CE5-1 ในสารละลายที่มีพีเอชที่เป็นกรดจะให้ผลดีกว่าการเก็บในสารละลายที่มีพีเอชเป็นด่าง และสารละลายที่เป็นกลาง ตามลำดับ (ภาพที่ 10) การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส enterocin CE5-1 นานที่สุด 2 เดือน เมื่อละลาย enterocin CE5-1 ใน glycine-HCl buffer pH 3.0 enterocin CE5-1 ที่ละลายในสารละลาย glycine-NaOH buffer pH 8.6 phosphate buffer pH 6.5 ให้การเก็บรักษาที่ตรงลงมา โดย enterocin CE5-1 ที่ละลายในสารละลาย glycine-NaOH buffer pH 8.6 ให้การเก็บรักษานานที่สุด 1 เดือน enterocin CE5-1 ที่ละลายในสารละลาย phosphate buffer pH 6.5 ให้การเก็บรักษานานที่สุด 2 เดือน

2.5 ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของแบคทีเรียโอซินที่ได้

enterocin CE5-1 ที่ทำบริสุทธิ์เบื้องต้นต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ชนิดต่างๆ พบว่า enterocin CE5-1 สามารถยับยั้งเฉพาะแบคทีเรีย *Enterococcus* strains, *P. pentosaceus* 4Ce27, *B. cereus* DMST5040, *S. aureus* DMST8840 *L. sakei* subsp. *sakei* JCM1157 ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *E. coli* DMST4212, *S. Typhimurium* DMST16809, *S. Enteritidis* DMST15676 *V. parahaemolyticus* DMST5665 นอกจากนี้พบว่า enterocin CE5-1 ยับยั้งการเจริญของตัวเอง (*E. faecium* CE5-1) (ตารางที่ 12) เนื่องจากโดยส่วนใหญ่แบคทีเรียที่ผลิตแบคทีเรียโอซินจะมีชั้นที่ควบคุมระบบภูมิคุ้มกัน เพื่อป้องกันตัวเองจากแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจาก *Rehaiem* (2010) (supernatant) จากการเลี้ยงเชื้อ *E. faecium* MMRA สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบได้ ซึ่งอาจมาจากสามารถซึมผ่านชั้น outer membranes (Jack et al., 1995)

จากผลการยับยั้งถึงแม้ว่า enterocin CE5-1 มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อในช่วงแคบ (narrow spectrum) โดยมีกิจกรรมยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียแลคติก และแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิด แต่พบว่า enterocin CE5-1 สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Enterococcus* ที่คือยาปฏิชีวนะ เช่น *E. faecium* 174, *E. faecium* 348, *E. faecalis* VanB *E. gallinarum* VanC ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำ enterocin CE5-1 *Enterococcus* ที่คือยาปฏิชีวนะในไก่ได้ในอนาคต

ตารางที่ 12 กิจกรรมการยับยั้งเชื้ออินคิเคเตอร์ของ enterocin CE5-1 agar well diffusion assay

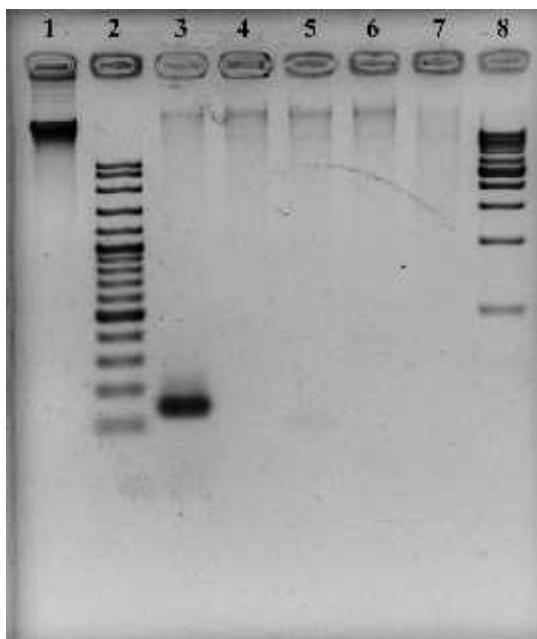
Indicator stains	รัศมีของการยับยั้ง (mm)	
	CS ^a	1 mg/ml ^b
<i>Bacillus cereus</i> DMST5040	0	5.7
<i>Enterococcus durans</i> 3L20	1.5	4.6
<i>Enterococcus faecalis</i> 2L24	1.0	2.2
<i>Enterococcus faecalis</i> VanB	2.0	4.9
<i>Enterococcus faecium</i> 139	0	0
<i>Enterococcus faecium</i> 174	1.5	3.8
<i>Enterococcus faecium</i> 348	1.5	3.7
<i>Enterococcus faecium</i> 4S13	1.5	3.8
<i>Enterococcus faecium</i> 8S16	2.0	4.7
<i>Enterococcus faecium</i> CE5-1	0	0
<i>Enterococcus faecium</i> L7-45	2.2	4.6
<i>Enterococcus gallinarum</i> VanC	2.0	4.0
<i>Escherichia coli</i> DMST4212	0	0
<i>Lactobacillus plantarum</i> D6SM3	0	6.0
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> JCM1157	6.0	6.0
<i>Listeria monocytogenes</i> DMST17303	5.0	5.0
<i>Pediococcus pentosaceus</i> 3CE27	3.0	2.7
<i>Pediococcus pentosaceus</i> DMST18752	0	1.0
<i>Salmonella</i> Typhimurium DMST16809	0	0
<i>Salmonella</i> Enteritidis DMST15676	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> DMST8840	0	5.6
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> DMST5665	0	0

^a สารละลายส่วนโสมจากเชื้อ *E. faecium* CE5-1 ที่ผ่านการปรับพีเอชให้อยู่ในช่วง 6.5-7.0

^b enterocin CE5-1 ที่ทำบริสุทธิ์เบื้องต้น

3. การโคลนยีนที่ควบคุมการสร้างแบคทีเรียโอซิน

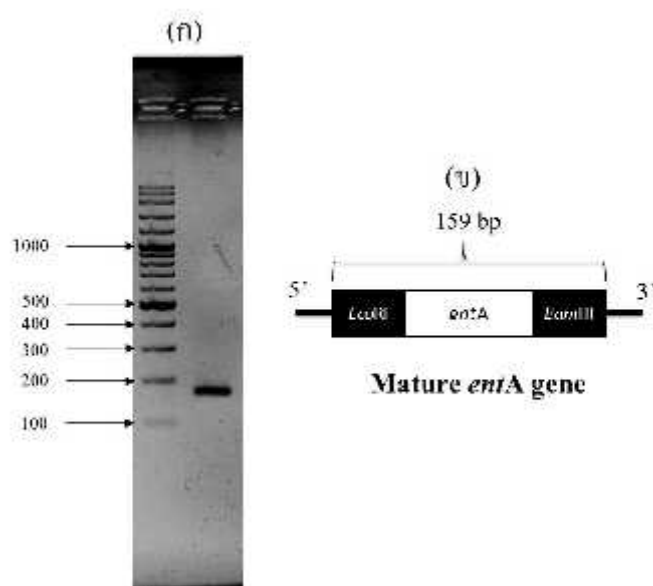
จากการสกัดจีโนมดีเอ็นเอจากเชื้อ *E. faecium* CE5-1 เมื่อนำจีโนมดีเอ็นเอไปตรวจหาชิ้นที่  EntA ที่ตรวจพบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR (PCR product) ซึ่งมีขนาดประมาณ 138 bp (ภาพที่ 11) ซึ่งตรงกับขนาดของยีนที่ควบคุมการ  enterocin A (*entA* gene) ดังนั้นอาจสรุปได้ว่า *E. faecium* CE5-1 ที่แยกได้จากไก่พื้นบ้าน ผลิตแบคทีเรียโอซินชนิด enterocin A



ภาพที่ 11  PCR ในตรวจหาชิ้นที่ควบคุมการสร้างแบคทีเรียโอซิน

- | | | |
|-----|---|---|
| 1 |  | จีโนมดีเอ็นเอจากเชื้อ <i>E. faecium</i> CE5-1 |
| 2 |  |  (100 bp Leader DNA) |
| 3-7 |  |  PCR   EntA, EntB, EntP, EntL50B  EntIIa  |
| 8 |  |  (1 kb Leader DNA) |

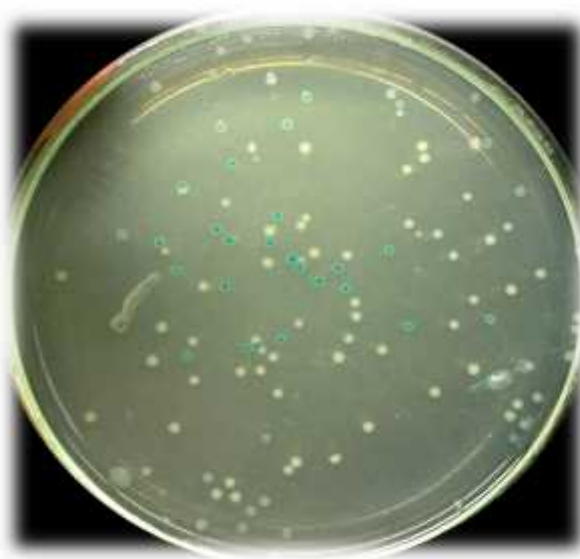
เมื่อพบว่า จีโนมิกดีเอ็นเอจากเชื้อ *E. faecium* CE5-1 มี enterocin A (*entA*) จากนั้นทำการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *entA* โดยใช้ *EcoRI* start codon (ATG) และ *BamHI* stop codon ทำการเพิ่มจำนวนยีน *entA* โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ด้วยเทคนิค PCR พบผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก PCR 171 bp (ภาพที่ 12)



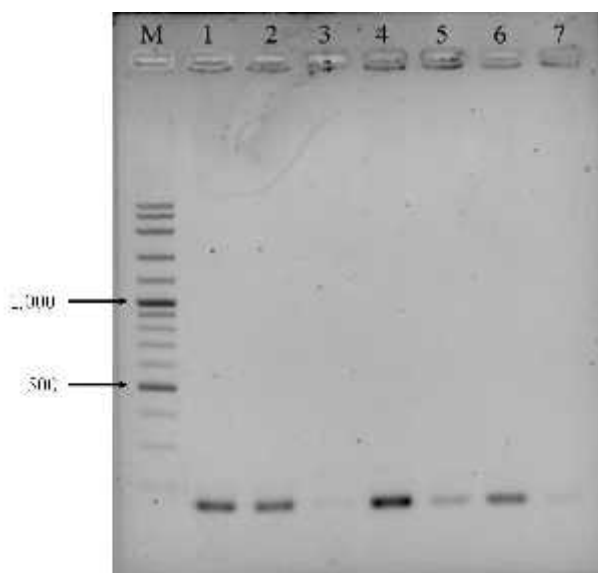
ภาพที่ 12 (ก) enterocin A ที่ได้จากเชื้อ *E. faecium* CE5-1 โดยที่ (ข) PCR enterocin A ที่ได้จากเชื้อ *E. faecium* CE5-1 (ค) ภาพแผนที่ของ PCR product ที่ได้ของยีน enterocin A

จากนั้นเชื่อมต่อยีน *entA* ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR กับ pGEM[®]-T Vector แล้วจึงถ่ายรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้หรือพลาสมิด pGEM/*entA* เข้าสู่เชื้อ *E. coli* JM109 ตรวจสอบโคลนที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยเลือกโคโลนีที่มีสีขาว (blue/white colony screening) บน LB agar ที่มีแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 µg/ml และ IPTG 0.5 mM และ X-gal 80 µg/ml colony PCR คัดเลือกโคโลนีที่มีสีขาวบนอาหาร LB agar (ภาพที่ 13) PCR product ของ colony PCR (ภาพที่ 14) pGEM/*entA* pGEM/*entA* ที่ได้ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ และทำการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล

GenBank แสดงผลดังภาพที่ 15  *entA* จากเชื้อ *E. faecium* CE5-1  *entA* ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank  100 



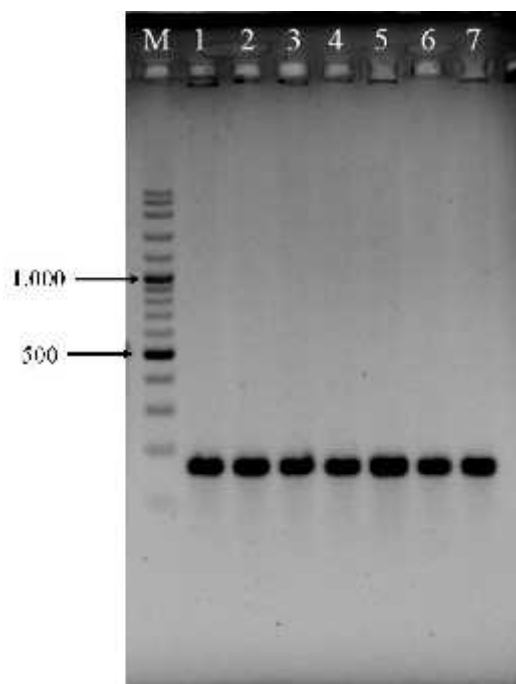
ภาพที่ 13 โคลนที่ได้รับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยใช้เทคนิค blue/white colony screening



ภาพที่ 14  colony PCR  pGEM/*entA*

M  (1 kb Leader DNA)

1-7  PCR product ที่ได้จากโคลนที่ 1-7



ภาพที่ 17 colony PCR ของ pBS-ldh/*entA*
 M DNA ladder (1 kb Leader DNA)
 1-7 PCR product ที่ได้จากโคลนที่ 1-7

เมื่อนำลำดับ nucleotide sequence ของ *entA* ที่ได้จาก pBS-ldh/*entA* ไปทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน ดังแสดงในภาพที่ 18 กับ enterocin A ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank (ภาพที่ 19) พบว่าลำดับกรดอะมิโนที่ตรงกับ enterocin A มีอยู่ 48 กรดอะมิโน (MTTHSGKYNGVYCTKNKCTVDWAKATTTCIAGMSI GGFLGGAIPGKC) อย่างไรก็ตามเมื่อนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้ไปทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Protein BLAST (ภาพที่ 19) พบว่า enterocin A ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank มีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนที่ได้นี้ประมาณ 100% (47 กรดอะมิโน) ซึ่งจากการทดลองครั้งนี้ได้เพิ่มตำแหน่ง start codon (ATG) ลงในส่วนต้นเพื่อเป็นจุดเริ่มต้นของการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน

5'-AAAaggagaCTTGAATTC ATG ACC ACT CAT AGT GGA AAA TAT TAT GGA AAT
 M T T H S G K Y Y G N
 GGA GTG TAT TGC ACT AAA AAT AAA TGT ACG GTC GAT TGG GCC AAG GCA ACT
 G V Y C T K N K C T V D W A K A T
 ACT TGT ATT GCA GGA ATG TCT ATA GGT GGT TTT TTA GGT GGA GCA ATT CCA
 T C I A G M S I G G F L G G A I P
 GGG AAG TGC TAA
 G K C Stop
 GGATCC-3'

ภาพที่ 18  enterocin A  pBS-ldh/*entA*

5'  *aggaga*  *Lactococcus lactis*  *ldhL* promoter, GAATTC  *EcoRI*, GGATCC  *BamHI*, ATG  start codon  TAA  stop codon

► See 1 more title(s)

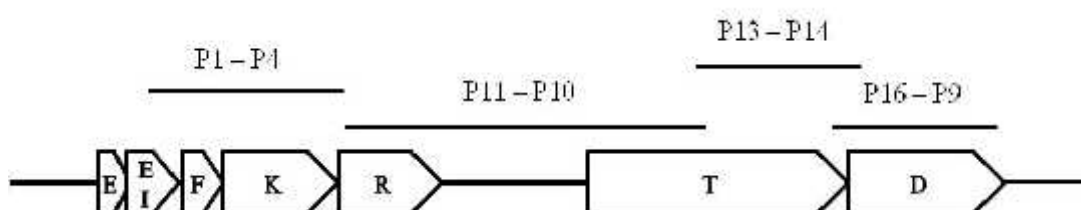
▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
97.4 bits(241)	3e-25	Compositional matrix adjust.	47/47(100%)	47/47(100%)	0/47(0%)
Query 2	TTHSGKYVNGVYCTKNKCTVDWAKATTCTAGMSTGGFLLGGATPGKC				48
	TTHSGKYVNGVYCTKNKCTVDWAKATTCTAGMSTGGFLLGGATPGKC				
Sp ot 19	TTHSGKYVNGVYCTKNKCTVDWAKATTCTAGMSTGGFLLGGATPGKC				65

pBS-*Idh/entA* ที่อยู่ในเชื้อ *E. coli* DH5α จากนั้นทำการสกัดพลาสมิด pBS-*Idh/entA* จากเชื้อ *E. coli* DH5α และนำ pBS-*Idh/entA* ที่ได้ถ่ายโอนเข้าสู่เชื้อ *L. lactis* subsp. *cremoris* JCM16167 โดยใช้วิธีการ (electroporation) พบว่าไม่พบเชื้อ *L. lactis* subsp. *cremoris* JCM16167 ที่ขึ้นบน M17 agar ที่มีแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 µg/ml ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากเปปไทด์ enterocin A ที่ถูกผลิตจากพลาสมิด pBS-*Idh/entA* มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *L. lactis* subsp. *cremoris* JCM16167 โดยในขณะที่ยังผลิตเปปไทด์ enterocin A อยู่

5. การศึกษายีนที่ควบคุมการแสดงออกแบคทีเรียโอซินในเชื้อ *E. faecium* CE5-1 (wide-type strain)

เพื่อความเข้าใจและประสพผลสำเร็จในศึกษาการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้าง enterocin A การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการหาพื้นที่ควบคุมการแสดงออกของ enterocin A ในเชื้อ *E. faecium* CE5-1 โดยการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับส่วนต่างๆ ของยีนที่ควบคุมการสร้าง enterocin A ซึ่งได้จากฐานข้อมูล Genbank (Accession number AF099088.1, AB292463.1, AM746970.1, AB038464.1) ไพรเมอร์ดังแสดงในตารางที่ 6 และภาพที่ 20 ซึ่งครอบคลุม PCR product 1,824, 3,100, 1,784 และ 1,320 bp ในภาพที่ 21 ซึ่งครอบคลุมในส่วนของยีนที่มีบทบาทต่อการสังเคราะห์ enterocin A Induction factor (F), Histidine protein kinase (K), Response regulator (R), ABC transporter (T) Accessory factor (D) เมื่อนำ PCR product ที่ได้วิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ และทำการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank แสดงผลดังภาพที่ 22 เมื่อนำนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเชื่อมต่อกัน จะได้นิวคลีโอไทด์ขนาดประมาณ 8,037 bp (ภาพที่ 23) เมื่อเปรียบเทียบลำดับของนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล Genbank Nucleotide BLAST (ตารางที่ 13 และภาพที่ 14) ส่วนของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์ enterocin A ในเชื้อ *E. faecium* DPC1146 (Accession number AF099088.1) 99 เปอร์เซ็นต์ แสดงดังภาพที่ 22



ภาพที่ 20 แสดง PCR product ที่ได้จากการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับส่วนต่างๆ ของยีนที่ควบคุมการสร้าง enterocin A

Enterococcus faecium enterotoxin A (entA), EntI (entI), EntII (entII), EntK (entK), EntR (entR), Enterolysin-like protein, EntT (entT), EntD (entD), and protease B (homing genes, complete cds, and unknown genes)

Sequence ID: gb|AF099088.1|AF099088 Length: 10175 Number of Matches: 2

Range: 26,545-86,170 (100%)		Link	Graphics	Best Match	Score	Strand	First Match
Score	Expect	Ident. (bits)	Gap	Strand	Plus/Minus		
4041 hits (21%)	1.0	324.4 - 256 (91.5%)	0/3245 (0%)				
Query	1	AGGGGTGATTAGATTATGAACATTAAAAATTTTCTCTATTAAAGAGACACACTTATC	60				
Subject	528	AGGGGTGATTAGATTATGAACATTAAAAATTTTCTCTATTAAAGAGACACACTTATC	587				
Query	61	TATGGGGTACCACTGCTGTTGGATATATATGGATGGAATGATGCACTTAAAT	120				
Subject	588	TATGGGGTACCACTGCTGTTGGATATATATGGATGGAATGATGCACTTAAAT	647				
Query	121	ATATGACGCTTATATGGGCTACCTCACTTCTTCTATTCCTCACTTCTCTATCTCT	180				
Subject	140	AAATTTATGCTTATATGGGCTACCTCACTTCTTCTATTCCTCACTTCTCTATCTCT	707				
Query	181	TTTTTGGTGGAGCATTCCTGAGGAGTGTCTAAATGGAATGGAATGGAATGGAAT	240				
Subject	708	TTTTTGGTGGAGCATTCCTGAGGAGTGTCTAAATGGAATGGAATGGAATGGAAT	767				
Query	241	TCATCAATTATATATATATATATCTATATCTATATATATATATATATATATATAT	300				
Subject	768	TCATCAATTATATATATATATATCTATATCTATATATATATATATATATATATAT	827				
Query	301	TTTTTAAAGAAATTTATATTTTAAATTTTAAATTTTAAATTTTAAATTTTAAAT	360				
Subject	820	TTTTTAAAGAAATTTATATTTTAAATTTTAAATTTTAAATTTTAAATTTTAAAT	887				
Query	361	TTTAT	420				
Subject	888	TTTAT	947				
Query	421	CACTGAT	480				
Subject	948	CACTGAT	1007				
Query	481	AAATGTTTAT	540				
Subject	1008	AAATGTTTAT	1067				
Query	541	TTTAT	600				
Subject	1068	TTTAT	1127				
Query	601	AT	660				
Subject	1128	AT	1187				
Query	661	AAATTTAT	720				
Subject	1188	AAATTTAT	1247				
Query	721	AAATGTCAT	780				
Subject	1248	AAATGTCAT	1307				
Query	781	TTTTTAT	840				
Subject	1308	TTTTTAT	1367				
Query	841	ATCTAT	900				
Subject	1368	ATCTAT	1427				
Query	901	CTCTAT	960				
Subject	1428	CTCTAT	1487				
Query	961	TTGAAT	1020				
Subject	1488	TTGAAT	1547				
Query	1021	AGGAT	1080				
Subject	1548	AGGAT	1607				
Query	1081	ATGATTTTAT	1140				
Subject	1608	ATGATTTTAT	1667				
Query	1141	TAAAT	1200				
Subject	1668	TAAAT	1727				
Query	1201	TTTTTGGTGGAGCATTCCTGAGGAGTGTCTAAATGGAATGGAATGGAATGGAAT	1260				
Subject	1728	TTTTTGGTGGAGCATTCCTGAGGAGTGTCTAAATGGAATGGAATGGAATGGAAT	1787				
Query	1261	TTATCTAT	1320				
Subject	1788	TTATCTAT	1847				

Query	1321	ATCAATATCAAGTATTTGATCATTTTGGGTTGGGTGCTTAATATTTTAAATCATTCAAA	1380
Subject	1848	ATCAATATCAAGTATTTGATCATTTTGGTGTGGTGTCTTAATATTTTAAATCATTCAAA	1907
Query	1381	TGTTTGTGTTCTATTTTATTTATTAGAATAACTATTAGGCAACGAGAACAAATTTGAAC	1440
Subject	1908	TGTTTGTGTTCTATTTTATTTATTAGAATAACTATTAGGCAACGAGAACAAATATGAC	1967
Query	1441	AGCAATTGAAAAAGAAAGAAATTGGTTTATCTAAAAAATATATACTGATTCACTGGAAAAAG	1500
Subject	1968	AGCAATTGAAAAAGAAAGAAATTGGTTTATCTAAAAAATATATACTGATTCACTGGAAAAAG	2027
Query	1501	ATCAAGAAAAATTTGCCAGATTTAGACATGACTATAAAAAATTTATTGCTGAGTTTAAAG	1560
Subject	2028	ATCAAGAAAAATTTGCCAGATTTAGACATGACTATAAAAAATTTATTGCTGAGTTTAAAG	2087
Query	1561	AAATCGCTAATCAAAACCATGATTGGATATTGGAAAAAGAAATAAAGAAATTAGAGATCT	1620
Subject	2088	AAATCGCTAATCAAAACCATGATTGGATATTGGAAAAAGAAATAAAGAAATTAGAGATCT	2147
Query	1621	ATTCTAATTCCTTATCTAACCAATAGTTTGAATATCGTTATTTAAAAAATATAAAAAATG	1680
Subject	2148	ATTCTAATTCCTTATCTAACCAATAGTTTGAATATCGTTATTTAAAAAATATAAAAAATG	2207
Query	1681	AAATTTGAAAAAGTTTGTGATAGCGAGCTATACCAAGCAAAATAACAATAAGATTTGTT	1740
Subject	2208	AAATTTGAAAAAGTTTGTGATAGCGAGCTATACCAAGCAAAATAACAATAAGATTTGTT	2267
Query	1741	GTAAATTCGAATGTCCAAGTACTATTATTGAAGTTCCTGTTCCAATATTTGACTGTATTA	1800
Subject	2268	GTAAATTCGAATGTCCAAGTACTATTATTGAAGTTCCTGTTCCAATATTTGACTGTATTA	2327
Query	1801	GGGTGCTTGGAAATTATCTCGATAATGCAATTGAAGCATCTATAGAGAGTCAAGATAGAG	1860
Subject	2328	GGGTGCTTGGAAATTATCTCGATAATGCAATTGAAGCATCTATAGAGAGTCAAGATAGAG	2387
Query	1861	AACGTGCTCTAGCTATTTACCGAGATGATAAACAGATAGAAATTCGATATCGAATAGTT	1920
Subject	2388	AACGTGCTCTAGCTATTTACCGAGATGATAAACAGATAGAAATTCGATATCGAATAGTT	2447
Query	1921	GTAGAGAGTACTACTCTCTATAGATACTCTAATGAAAAAGGAATACCAACAAAAAGG	1980
Subject	2448	GTAGAGAGTACTACTCTCTATAGATACTCTAATGAAAAAGGAATACCAACAAAAAGG	2507
Query	1981	GACATCAAGGGTTAGGTTTATCTAGTATAGAGGAATCAATAAAAAAGAAATCCCAATATGT	2040
Subject	2508	GACATCAAGGGTTAGGTTTATCTAGTATAGAGGAATCAATAAAAAAGAAATCCCAATATGT	2567
Query	2041	TTGTGAATATCAAAACGATCCGTATCAATTTACTACTCAAGTTATTTTGTGTTTTGAG	2100
Subject	2568	TTGTGAATATCAAAACGATCCGTATCAATTTACTACTCAAGTTATTTTGTGTTTTGAG	2627
Query	2101	GGAAGGAGGATTTATGAGTTATCCAATAATATTATGTGAAGATCAAAATTATACAATTAAA	2160
Subject	2628	GGAAGGAGGATTTATGAGTTATCCAATAATATTATGTGAAGATCAAAATTATACAATTAAA	2687
Query	2161	TCAGTTAGAACGAATTATTGATAATTTCAATTCITTTTTCACGATAAAGTATTTAAGATAGT	2220
Subject	2688	TCAGTTAGAACGAATTATTGATAATTTCAATTCITTTTTCACGATAAAGTATTTAAGATAGT	2747
Query	2221	ATTGAAAAACAAAGTCCGTTAGAAATTAAAAAATACCTCAAACAATTCCGACCAAGCA	2280
Subject	2748	ATTGAAAAACAAAGTCCGTTAGAAATTAAAAAATACCTCAAACAATTCCGACCAAGCA	2807
Query	2281	AGGAATATATTTCTTAGATATTGATTTAAATCATGAAGTTAACGSTATAGAAATTAGCAGA	2340
Subject	2808	AGGAATATATTTCTTAGATATTGATTTAAATCATGAAGTTAACGSTATAGAAATTAGCAGA	2867
Query	2341	AGTAATCAGAAATATGATGTTCAAGCAAAATCATTTTACAACTACTCATGATGAGAT	2400
Subject	2868	AGTAATCAGAAATATGATGTTCAAGCAAAATCATTTTACAACTACTCATGATGAGAT	2927
Query	2401	GTTACCCGTAAACAAATAAAAGAAAGATTGAACGTTAGGATTTGTAAACAAAGATCAAAAC	2460
Subject	2928	GTTACCCGTAAACAAATAAAAGAAAGATTGAACGTTAGGATTTGTAAACAAAGATCAAAAC	2987
Query	2461	ACTAGATGAGTATCGAAACGAGATTGCTGAGTTATTGTTATTAGCGCAAGAAAGGATAGA	2520
Subject	2988	ACTAGATGAGTATCGAAACGAGATTGCTGAGTTATTGTTATTAGCGCAAGAAAGGATAGA	3047
Query	2521	TTCAACAAACATAGGTTACGAATCAAGCAATTTGTTTTCATAGGTTTCACAAATTTAC	2580
Subject	3048	TTCAACAAACATAGGTTACGAATCAAGCAATTTGTTTTCATAGGTTTCACAAATTTAC	3107
Query	2581	TTTTGATATTAATGACATTTATTTGTAGAGGCTTCAAAATACCACTATGATTTATCAT	2640
Subject	3108	TTTTGATATTAATGACATTTATTTGTAGAGGCTTCAAAATACCACTATGATTTATCAT	3167
Query	2641	GTGTACTTAAAGTTGGGCGATACGAAATTTATGGAGAGATTAGTGAGCTTGAAAGAAAT	2700
Subject	3168	GTGTACTTAAAGTTGGGCGATACGAAATTTATGGAGAGATTAGTGAGCTTGAAAGAAAT	3227
Query	2701	TCCTATCTTACAAACATTTAGTCCACCTCTTTAGTAAATATCTTTACCTTAAACAAAT	2760
Subject	3228	TCCTATCTTACAAACATTTAGTCCACCTCTTTAGTAAATATCTTTACCTTAAACAAAT	3287

Query	3781	AGATTTTATLMAALCGTTCCGCTATATTTTGGATTCAGAGTTGGCCAGAGTCTTACTTTAGG	2820
Subject	3288	AGATTTTATLMAALCGTTCCGCTATATTTTGGATTCAGAGTTGGCCAGAGTCTTACTTTAGG	3847
Query	2021	GAAAGCAGAAAAATTAAGGAGAGATTGAAGGAGAGCTCTGTTTAGTGGTTTTCTCTTA	2000
Subject	3099	GAAAGCAGAAAAATTAAGGAGAGATTGAAGGAGAGCTCTGTTTAGTGGTTTTCTCTTA	3409
Query	2001	GGAGATTCGATTTTCTTAATAAATAATATTCCTTCATAGTGCAGATTTTCTTGAACTC	2940
Subject	3108	CGCAGATTCGATTTTCTTAATAAATAATATTCCTTCATAGTGCAGATTTTCTTGAACTC	3167
Query	2941	TATTAAAGTTGTACCAATTTTITKINGCTGTATTATTAGTACGGTATACAGCAATATTAG	3000
Subject	3460	TATTAAAGTTGTACCAATTTTITAGCTGTATTATTAGTACGGTATACAGCAATATTAG	3027
Query	3001	TTACTGAGGAAATATTTCTATGCTCTGACACCAAAAAAGGCCAATGAATAGTCTCTTT	3060
Subject	3029	TTACTGAGGAAATATTTCTATGCTCTGACACCAAAAAAGGCCAATGAATAGTCTCTTT	3039
Query	3041	CTTCTTTTATTTACTACGCTGAGAGCGATTTAAATTTAAATCTATCTGCTGACATCGCA	3120
Subject	3588	CTTCTTTTATTTACTACGCTGAGAGCGATTTAAATTTAAATCTATCTGCTGACATCGCA	3547
Query	3121	AAGATTGGCAAAATCTACTAATTTTTAGAAAGTGTTTTTCATTTTTTAGTTAAGAAATT	3180
Subject	3640	AAGATTGGCAAAATCTACTAATTTTTAGAAAGTGTTTTTCATTTTTTAGTTAAGAAATT	3707
Query	3101	TGTCTTGGCAAGTGCATATCCAGAGATTGGACTTGATAGGATTTGAGTAATAACTTTCT	3240
Subject	3768	TGTCTTGGCAAGTGCATATCCAGAGATTGGACTTGATAGGATTTGAGTAATAACTTTCT	3767
Query	3241	CTTTTAAAGATTTTAA	3256
Subject	3768	CTTTTAAAGATTTTAA	3783

[illegible]

Query	4457	AAAAGACATTTGAAJAAATTTGCTTTTGAATGATAGGCTATTCAAGCAGATAGTGAATCT	4516
Subject	4384	AAAAGACATTTGAAJAAATTTGCTTTTGAATGATAGGCTATTCAAGCAGATAGTGAATCT	5043
Query	4517	GGAAAGAAAGAGATCTTATCTTACCATTTAATGGCAGATATTTGGTTGATACAGCTATA	4576
Subject	5048	GGAAAGAAAGAGATCTTATCTTACCATTTAATGGCAGATATTTGGTTGATACAGCTATA	5103
Query	4577	TGCCTACCTTGTATTTATTAACAGAGGGAACCTACTATGGATTGCAGATCCCGCTA	4636
Subject	5101	TGCCTACCTTGTATTTATTAACAGAGGGAACCTACTATGGATTGCAGATCCCGCTA	5163
Query	4637	ATTCGAAAGATTAAGAAATTAATTAAGATTTTGAAGATTAATTAAGATTAATTAATTAAT	4696
Subject	5164	ATTCGAAAGATTAAGAAATTAATTAAGATTTTGAAGATTAATTAAGATTAATTAATTAAT	5223
Query	4697	TACCTATCCCTACGCAACTTATATTCCTATTAAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT	4756
Subject	5224	TACCTATCCCTACGCAACTTATATTCCTATTAAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT	5283
Query	4757	TTTTGCCATTAATTTGGAAACAAAGAGATTAATTTCCACATCGTTTTCATCGATTT	4816
Subject	5284	TTTTGCCATTAATTTGGAAACAAAGAGATTAATTTCCACATCGTTTTCATCGATTT	5343
Query	4817	TCATTACCTTTTTTCCCATAGCAAGCTCATATTATTTTCACCTATTCTTCATTTTTCA	4876
Subject	5344	TCATTACCTTTTTTCCCATAGCAAGCTCATATTATTTTCACCTATTCTTCATTTTTCA	5403
Query	4877	TCCTTAATCAAGCAGCTTCAACTTTAAATAAATTTCCATTGGCTTGAATCGCTGTCTAT	4936
Subject	5404	TCCTTAATCAAGCAGCTTCAACTTTAAATAAATTTCCATTGGCTTGAATCGCTGTCTAT	5463
Query	4937	TAATTCGGGTATTGTTGAATATAGTCGTAGTATCTTCTATTTATTTAGGACAGCGAA	4996
Subject	5464	TAATTCGGGTATTGTTGAATATAGTCGTAGTATCTTCTATTTATTTAGGACAGCGAA	5523
Query	4997	TGATATGGCAATATGTTTCAATATTTCAAACTTGTATATTTTACATTAATTAATTTT	5056
Subject	5524	TGATATGGCAATATGTTTCAATATTTCAAACTTGTATATTTTACATTAATTAATTTT	5583
Query	5057	TTTCTACGAGAAATTAAGGAAATTAATTTTCTGTTTCTTGAATGCTAGAAATTAAT	5116
Subject	5584	TTTCTACGAGAAATTAAGGAAATTAATTTTCTGTTTCTTGAATGCTAGAAATTAAT	5643
Query	5117	ATGCTTGAAGAAATTAAGGAAATTAATTTTCTGTTTCTTGAATGCTAGAAATTAAT	5176
Subject	5644	ATGCTTGAAGAAATTAAGGAAATTAATTTTCTGTTTCTTGAATGCTAGAAATTAAT	5703
Query	5177	TTTCTACGAGAAATTAAGGAAATTAATTTTCTGTTTCTTGAATGCTAGAAATTAAT	5240
Subject	5704	TTTCTACGAGAAATTAAGGAAATTAATTTTCTGTTTCTTGAATGCTAGAAATTAAT	5763
Query	5237	TTTCTACGAGAAATTAAGGAAATTAATTTTCTGTTTCTTGAATGCTAGAAATTAAT	5296
Subject	5764	TTTCTACGAGAAATTAAGGAAATTAATTTTCTGTTTCTTGAATGCTAGAAATTAAT	5823
Query	5297	TGGACGCGGTGAGGCTGTATTTCTAGTATCATAGGAGCTTTAGAGGATTAATTAAT	5356
Subject	5824	TGGACGCGGTGAGGCTGTATTTCTAGTATCATAGGAGCTTTAGAGGATTAATTAAT	5883
Query	5357	TTTATGATTAATTAAGGAAATTAATTTTCTGTTTCTTGAATGCTAGAAATTAAT	5416
Subject	5884	TTTATGATTAATTAAGGAAATTAATTTTCTGTTTCTTGAATGCTAGAAATTAAT	5943
Query	5417	TAATGAAATTAATTAAGGAAATTAATTTTCTGTTTCTTGAATGCTAGAAATTAAT	5476
Subject	5944	TAATGAAATTAATTAAGGAAATTAATTTTCTGTTTCTTGAATGCTAGAAATTAAT	6003
Query	5477	TGATTAATTAATTAAGGAAATTAATTTTCTGTTTCTTGAATGCTAGAAATTAAT	5536
Subject	6004	TGATTAATTAATTAAGGAAATTAATTTTCTGTTTCTTGAATGCTAGAAATTAAT	6063
Query	5537	ATATTAATTAATTAAGGAAATTAATTTTCTGTTTCTTGAATGCTAGAAATTAAT	5596
Subject	6064	ATATTAATTAATTAAGGAAATTAATTTTCTGTTTCTTGAATGCTAGAAATTAAT	6123
Query	5597	CTTACAAACATTAATTAATTTTACAAATTAATTTTACAAATTAATTTTACAAATTAAT	5656
Subject	6124	CTTACAAACATTAATTAATTTTACAAATTAATTTTACAAATTAATTTTACAAATTAAT	6183
Query	5657	GTATTAATTAATTTTGGCAATTAATTTTGGCAATTAATTTTGGCAATTAATTTTGGCAAT	5716
Subject	6184	GTATTAATTAATTTTGGCAATTAATTTTGGCAATTAATTTTGGCAATTAATTTTGGCAAT	6243
Query	5717	TTTCTGACATTAATTTTACAAATTAATTTTACAAATTAATTTTACAAATTAATTTTACAAAT	5776
Subject	6244	TTTCTGACATTAATTTTACAAATTAATTTTACAAATTAATTTTACAAATTAATTTTACAAAT	6303
Query	5777	TCAGGCGCGCAAGCTTGAAGCAATTTTCACTACAAATTTTCACTACAAATTTTCACTACAAAT	5836
Subject	6304	TCAGGCGCGCAAGCTTGAAGCAATTTTCACTACAAATTTTCACTACAAATTTTCACTACAAAT	6363

Query	7217	GGAGTAAACAGTATAGTCAGAAAAAGCTAAATTAGTTAAACCAACTACTTCTAGAAAT	7276
Subject	7774	TAAATTGTAAGTATTATTAATTATGAAAGATGTAAGTTATGTAAGTATGTTATTTTATTAAT	7804
Query	7277	GACATGATTAGTCCAPATCCGAAAPTCGAAATGATAGCTAGTACATCCATTAACCACTGTA	7336
Subject	7804	GACATGATTAGTCCAAACGGAAAAAGGAAAGCAGAGCTAGAAACAGCAATTAACCACTGTA	7863
Query	7327	AAACAAACAGTTACAGAGCTAAATGAAAGAACAGAGAAAGAACAGTCACTTATCAAAAGT	7386
Subject	7824	AAACAAACAGTTATCAAGTTAAATGAAAAACAGAGAAAGAACAGTCACTTATCAAAAGT	7923
Query	7327	ITGACCATTCAGCTTTCAAACATATCTAAAGCTCTCTCTCTCTCCACCGCTTCATTTA	7456
Subject	7924	ITGGACCATTCAGCTTTCATAGGAAATCTAAAGCTCTCTCTCTCTGGACGGTTCATTTA	7983
Query	7427	AAATGAAGAAACAAAGGGAACAGGCAAGACTAGTCAAAAGGAATAGTGTGTTGAGAAATTTAT	7516
Subject	7904	AAATGAAGAAACAAAGGGAACAGGCAAGACTAGTCAAAAGGAATAGTGTGTTGAGAAATTTAT	8043
Query	7517	TTTATTTTATTAAGAAATTAAGAAATTAAGAAATTAAGAAATTTTATTTTATTTTATTTTATTTT	7576
Subject	8044	CCGATCCCGGAAATATCATAATGAAATTTACAGGCTTTTACCTCCGATGGAAGTACC	8103
Query	7577	TAATATTAAGAGAGAGATGAGAGCTTCTTTTAAATTTGGATCGAAAGAGTGGGGCTCCGATT	7636
Subject	8104	TATATTAAGAGAGAGATGAGAGCTTCTTTTAAATTTGGATCGAAAGAGTGGGGCTCCGATT	8163
Query	7627	ATATATTAAGTAAATTTATATTAAGTATTAAGTATTAAGTATTAAGTATTAAGTATTAAGTAT	7686
Subject	8144	AGCATCCGACGACCTTTAGATCAGATTTTCAAGAAATTTCTACTCCGATTCGACGATCTCTT	8203
Query	7687	TTTTATGCAGTGAAGAGAACSTTAAAGAACACTCAATCTGTTCCGTTTCGTTATGGAATTA	7756
Subject	8224	TTTTATGCAGTGAAGAGAACSTTAAAGAACACTCAATCTGTTCCGTTTCGTTATGGAATTA	8283
Query	7727	AGTTTAAATTTTATTTTATTTTATTTTATTTTATTTTATTTTATTTTATTTTATTTTATTTT	7786
Subject	8284	ACTCCACAGTTCTCTTAAATCTAGCAGAAAAACATATTCCGACAAATTCCTCTCTCTC	8343
Query	7817	TTTCTAATTAATTAATTAATTTTATTTTATTTAGAAATATAGGAGAGTTTATATGAAATTA	7876
Subject	8344	TTTCTAATTAATTAATTTTATTTTATTTATTAATATAGGAGAGTTTATATGAAATTA	8403
Query	7877	GAATATTAATTTTATTTTATTTTATTTTATTTTATTTTATTTTATTTTATTTTATTTTATTTT	7936
Subject	8404	GGAGTGGATTGCTGTGGAGTAGCGTGCGGATTAATTTTATCTATCCATTTATCTCTCGGC	8463
Query	7937	TATTTCCGGAATAGATTAAGAGAGAGAGTCAATACACCCCTAACAGGAATATAATAGAG	7996
Subject	8464	TATTTCCGGAATAGATTAAGAGAGAGAGTCAATACACCCCTAACAGGAATATAATAGAG	8523
Query	7997	TTTTTTGCGGATCTACCAATTCACAGACAGACCTTACAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG	8056
Subject	8524	TTTTTTGCGGATCTACCAATTCACAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG	8583

ภาพที่ 22 ██████████ นิวคลีโอไทด์ของยีนที่ควบคุมการสร้าง enterocin A █████
 ██████████ Genbank ██████████ Nucleotide BLAST

```

----- 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
CE5-1 1 AGGGGTGATTAGATTATGAACATTTAAAAATTTTGTCTATTAAAGAGACACAACCTTATCTATGGGGTACCACCTCATAGTGGAAAATATTATGGAAATG 100
----- 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
CE5-1 101 GAGTGTATTGCCACTAAAAATAAATGTACGTCGATTGGGCCAAGGCAACTACTTGTATTCAGGAATGCTATAGCTGGTTTTTATGGTGGAGCAATTC 200
----- 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
CE5-1 201 AGGGAAGTGTCTAAATGAAAAAAATGCTAAGCAAAATTTTTCATGAATTATATATGATATATCTATAAGTAAAGATCCTAAATATTCTGATATTCTTGA 300
----- 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
CE5-1 301 CGTTTTACAAAAGGTATATTTAAAAATTAGAAAAACAAAAATATGAATTAGATCCACTCCCTTAAATAAATAGATTGCTGAATTATCTATATTTTACTGCT 400
----- 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
CE5-1 401 TATACTAATAAAATAAGATTCACTGAATATCAACAGCAATTAAATAAGAAATTTGAGTGAATTCGAGAACTGCTCCAATAAAATCGTTTATATCCAGCAG 500
----- 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
CE5-1 501 ATTATCGAGATAAATCTCAATTTTAAATGATACTTATAATATTAATATATGCTCAAAAATTTTTCATTAGAAAAATAGCTATATTGAATCAGTGACATAAA 600
----- 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
CE5-1 601 AGTATTTATAGTTTGTAGGGGGAATCGTAATGGAAAGAAAAAATAGACTAAATGCTAAACAATGTTCAAGATCAAGAGCTTAAAAAAATTAAGGAGGTGC 700
----- 710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
CE5-1 701 TGGAACAAAACCTCAAGGAAAACCGGCATCAAAATTTAGTGGAAATGTGTTTTTCATTATTTAAAAAGTGTAACATAAAATTTTTTATGATATCTAAAA 800
----- 810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
CE5-1 801 TCAGGAGCGGATCTCTTGATTACTATCGATACAAAAGCTTATCTATTAAGAAATGTTCTGCGGAAACTTTTTCTTTTTCTTTATTTATGACTAATA 900
----- 910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000
CE5-1 901 CTCATCTTAAACAAAAGAAAATATCTTTTTGTATGTTTTATTGATACCACCTACTTTTTTGTTCATTAATTTACTGATCTTCCGACGCTATACCTATAAT 1000
----- 1001 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100
CE5-1 1001 CGGAACCTATTTTTATATTAAAGCAAAAGCAAAACTAATATAGTCTTTTAAATAAATTAATTAATGATGCTTAATGATGATTTAGATCTAATTAT 1100
----- 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
CE5-1 1101 ACTTCATGCTTATGACCTATATGTTTTCAATTGAAAGGATAAAAAGGCTATGGTTATGTAGTATTCAGATAATGCTTGATTCCTTTGCTTGTATGT 1200
----- 1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300
CE5-1 1201 TTATTTGGTTATATAGAAAATTAGCTATAAATAGGATTTGTGAACAGTCCAGTTCTAAACCTACTGCTATATTATGATTTATTTACTTACAAATAGTTT 1300
----- 1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
CE5-1 1301 ATTTGTGTTCTATGTGCTCATCAATATCAAGTATTTGATCATTTTGGGTGGGTGTCTTAATATTTTAAATCATTCAAAATGTTTGTGTTCTATTTTTA 1400
----- 1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500
CE5-1 1401 TTTATTAGATAACTATTAGGCAACGAGAACAAATTTGAACAGCAATTTGAAAAGCAAAAGAAATTCGTTTATCTAAAAAATATACTGATTCAGTCCGAAAAA 1500
----- 1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600
CE5-1 1501 ATCAAGAAAAATTTGCCAGATTTAGACATGACTATAAAAATTTATGCTGAGTTTAAAAAGAAATCGCTAATCAAAACCATGATTCCGATATTCGAAAAAGA 1600
----- 1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700
CE5-1 1601 AATAAAGAAATTAGAGATCTATTCTAATTCTTATCTAACCAATAAGCTTTGAATATCGTTAATTTAAAAAATATAAAAAATGAATATTTCAAAACCTTGCTG 1700
----- 1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800
CE5-1 1701 ATAGCGAAGCTATACCAAGCAATAACAATAAGATTTGTTGTAATTCGAATGTCCAAGTACTATTATTGAAGTTCCTGTTCCAAATATTTGACTGTATTA 1800
----- 1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890 1900
CE5-1 1801 GGGTGTCTGGAAATTAATCTCGATAATGCAATTGAAGCATCTATAGAGAGTCAAGATAGAGAACTGTCTAGCTAATTTACCGAGATGATAAACAGATAGA 1900
----- 1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000
CE5-1 1901 AATTTGATATCGAATAGTTGTAGAGAGATACTACTCTCTATAGATACTCTAATGAAAAAGGAATAACAACAAAAAGGACATCAAGGGTTAGGTTTA 2000
----- 2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080 2090 2100
CE5-1 2001 TCTAGTATAGAGCAAAATCAATAAAAAAGAAATCCCAATATGTTTGTGAACATTCAAAACGATCCGTATCAATTTTACTACTCAAGTTATTTTGTGTTTGTAG 2100
----- 2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170 2180 2190 2200
CE5-1 2101 CGAAGCAGGATTTATGACTTATCCAATAATATTATCTGAAGATCAAAATATACAAATTAATCAGTTAGAACCAATTAATGATAATTTCTCTTTTCTAC 2200
----- 2210 2220 2230 2240 2250 2260 2270 2280 2290 2300
CE5-1 2201 GATAAAGTATTTAAGATAGTATTGAAAACACAAAGTCCGTTAGAACTTAAAAAATACCTCAACAATTCGACCAAGCAAGGAATATATTCTTAGATA 2300

```




ภาพที่ 23 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์ enterocin A ทั้งหมด 8,037 bp

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์ enterocin A 8,037 bp ไปวิเคราะห์ open reading frame (ORF) พบว่าจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ทั้งหมด 8,037 bp มี ORF ทั้งหมดประมาณ 12 ORF ซึ่งมี 7 ORF ที่มีลักษณะคล้ายคลึงกับ enterocin A นอกจากนี้เมื่อนำเอาลำดับกรดอะมิโนของทั้ง 7 ORF ไปเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม Protein BLAST แสดงในตารางที่ 14 และภาพที่ 24 พบว่าทั้ง 7 ORF มีลักษณะดังนี้

1. enterocin A structural gene (*entA*) มีลักษณะคล้ายคลึงกับ enterocin A ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank 100% (Figure 24)
2. Enterocin A immunity gene (*imentA*) มีลักษณะคล้ายคลึงกับ probable immunity protein ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank 100% (Figure 24)

3. Induction factor of enterocin A (*entF*) มีขนาด 48 กราโมเมอร์ EntF ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank มีขนาด 100 กราโมเมอร์
4. Histidine protein kinase gene (*entK*) มีขนาด 415 กราโมเมอร์ histidine protein kinase ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank มีขนาด 99 กราโมเมอร์
5. Response regulator gene (*entR*) มีขนาด 250 กราโมเมอร์ EntR ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank มีขนาด 99 กราโมเมอร์
6. ABC transporter gene (*entT*) มีขนาด 695 กราโมเมอร์ ABC transporter ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank มีขนาด 99 กราโมเมอร์
7. Accessory factor gene (*entD*) มีขนาด 477 กราโมเมอร์ EntD ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank มีขนาด 99 กราโมเมอร์



ภาพที่ 24 กราโมเมอร์ open reading frame (ORF) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์ enterocin A

ตารางที่ 14 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่ได้กับลำดับกรดอะมิโนที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank

โปรตีน	ลำดับกรดอะมิโน	โปรตีน
(ตำแหน่งเริ่มต้น-สิ้นสุด)	ตำแหน่ง	โปรตีน
<i>entA</i> (65)	100	enterocin A (ZP_05660016.1)
<i>imentA</i> (103)	100	probable immunity protein (ZP_00603732.1)
<i>entF</i> (48)	100	EntF (AAD29134.1)
<i>entK</i> (415)	99	histidine protein kinase (ZP_05661870.1)
<i>entR</i> (250)	99	EntR (ZP_06679718.1)
<i>entT</i> (695)	99	ABC transporter CbaT (ZP_06679721.1)
<i>entD</i> (477)	99	EntD (ZP_06702002.1)

เมื่อนำลำดับเบสของ *entA* ทั้งหมด 240 bp ไปเทียบกับลำดับเบสของ *enterocin A* มีลำดับกรดอะมิโนทั้งหมดประมาณ 65 กรดอะมิโน ภาพที่ 25(ก) เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของ *enterocin A* ทั้งหมด 65 กรดอะมิโน ไปเทียบกับลำดับเบสของ *enterocin A* พบว่ามี Leader peptide 18 กรดอะมิโน MKHLKILSIKETQLIYGG กรดอะมิโน 47 กรดอะมิโน TTHSGKYYGNGVYCTKNKCTVDWAKATTTCIAGMS IGGFLGGAIPGKC แสดงดังภาพที่ 25 (ก)

นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์ลำดับเบสของ *imentA* พบว่ามีลำดับเบส ATGAAAAAAATGCTAAGCAAATTGTTTCATGAA TTATATAA แต่อย่างไรก็ตามเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน พบว่า *enterocin A* immunity protein frame 1 กรดอะมิโน *enterocin A* แสดงดังภาพที่ 25 (ก)

(ก) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *entA*

5'- ATGAAACATTTAAAAATTTTGTCTATTAAAGAGACACAACCTTATCTATGGGGGTACC
ACTCATAGTGGAAAATATTATGGAAATGGAGTGTATTGCACIAAAAAATAAATGTACGGT
CGATTGGGCCAAGGCCAACTACTTGTATTGCAGGAATGCTATAGGTGGTTTTTTAGGT
GGAGCAATTCCAGGGAAGTGCTAAAAATGAAAAAAAAATGCTAAGCAAATTGTTTATGAAT
TATATAAGATATAICTATAAGTAAAGATCTAAATATCTGATACTTTGAGGTTTTACAAAAG
GTATATTTAAAAATTAGAAAAACAAAAATATGAATTAGATCCCAGTCCTTTAATAAATAGATTG
GTGAATTATCTATATTTTACTGCTTATACTAATAAAATAAGATTCACCTGAATATCAAGAGGCAAT
TAATAAGAAATTGAGTGAAATTGGAAGAACTGCTGGAATAAATGGTTTATATCGAGCAGAT
TATGGAGATAAACTCTCAATTTAATGATAC-3'

(ข) ลำดับกรดอะมิโนของ enterocin A จาก frame 1

MKHLKILSIKETQLIYGGTTHISGKYYGNGVYCTKNKCTVDWAKATTCIAGMSIG
GFLGGAIPGKC

(ค) ลำดับกรดอะมิโนของ enterocin A immunity protein จาก frame 2

MKKNKQIVHELYNDISISKDPKYSDILEVLQKVYLKLEKQKYELDPSPLINRLVNY
LYFTAYTNKIRFTEYQEELIRNLSEIGRTAGINGLYRADYGDKSQF

ภาพที่ 25 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *entA* และลำดับกรดอะมิโนของ enterocin A

และ immunity protein

(ก) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *entA* และลำดับกรดอะมิโนของ enterocin A โดยที่ตัวอักษรหนาแสดงตำแหน่งของยีน *entA* และตัวอักษรที่มีเส้นใต้แสดงตำแหน่งของยีน immunity protein

(ข) ลำดับกรดอะมิโนของ enterocin A โดยที่ตัวอักษรหนาแสดงส่วน leader peptide และตัวอักษรที่มีเส้นใต้แสดงส่วน active peptide ของ enterocin A

(ค) ลำดับกรดอะมิโนของ enterocin A immunity protein

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

เชื้อ *E. faecium* CE5-1 เป็นแบคทีเรียแลคติกที่แยกมาจากทางเดินอาหารของไก่พื้นบ้าน นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติในการผลิตแบคทีเรียโอซิน ที่ดี เนื่องจากมีความทนต่อสภาวะจำลองของสารยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้บางชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อกลุ่ม enterococci ที่คือต่อยาปฏิชีวนะ และไวต่อยาปฏิชีวนะทุกชนิดที่นำมาทดสอบ นอกจากนี้เชื้อ *E. faecium* CE5-1 มีความปลอดภัยสามารถนำไปใช้เป็นเชื้อโปรไบโอติกได้ นอกจากนี้ยัง Enterocin CE5-1 ที่ผลิตจากเชื้อ *E. faecium* CE5-1 มีกิจกรรมการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในช่วงแคบซึ่งเหมาะสมต่อการใช้ในการยับยั้งเชื้อที่ต้องการเฉพาะกลุ่ม โดยเฉพาะเชื้อ enterococci ที่คือต่อยาปฏิชีวนะเท่านั้น และถูกยับยั้งโดย α -amylase

เมื่อศึกษาการโคลน entA ไม่พบการเจริญของเชื้อ *L. lactis* subsp. *cremoris* JCM16167 pBS-ldh/entA เข้าไป อาจเนื่องมาจากการแสดงออกของโปรตีนที่ถูกผลิตออกมาหรือแบคทีเรียโอซิน ส่งผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ *L. lactis* subsp. *cremoris* JCM16167 อย่างไรก็ตามเมื่อศึกษาการแสดงออกของยีนที่ควบคุม enterocin A จากเชื้อ *E. faecium* CE5-1 พบว่าจากนิวคลีโอไทด์ที่ได้ทั้งหมดประมาณ 8,037 bp ORF ทั้งหมดประมาณ 12 ORF 7 ORF ที่มีบทบาทต่อการ Enterocin A ซึ่งประกอบด้วยส่วนของยีน entA, imentA, entF, entK, entR, entT entD

เอกสารอ้างอิง

- กิจการ สุภมาตย์. 2544. การฝึกรอบรรมเชิงปฏิบัติการเรื่องจุลินทรีย์กับการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. ศูนย์วิจัยคุณภาพสัตว์น้ำ. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. หน้า 51.
- กิตติ กิตติคุณ. 2539. การศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียที่ผลิตโดยแลกโตบาซิลลัส. 6 : 23-37.
- กิตติ กิตติคุณ, พงศักดิ์ รัตนชัยกุล และบุษารัตน์ เครือวงษา. 2543. การศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียที่ผลิตโดยแลกโตบาซิลลัส. 6 : 23-37.
- กิตติ กิตติคุณ, พงศักดิ์ รัตนชัยกุล และบุษารัตน์ เครือวงษา. 2543. การศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียที่ผลิตโดยแลกโตบาซิลลัส. 6 : 23-37.
- กิตติ กิตติคุณ. 2544. การศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียที่ผลิตโดยแลกโตบาซิลลัส. 6 : 23-37.
- กิตติ กิตติคุณ. 2549. การพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและทำบริสุทธิ์แบคทีเรียโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus casei* ssp. *rharmnosus* SN 11. 6 : 23-37.
- กิตติ กิตติคุณ. 2533. การศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียที่ผลิตโดยแลกโตบาซิลลัส. 6 : 23-37.
- Abee, T., Krockel, L. and Hill, C. 1995. Bacteriocins: Modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. Int. J. Food Microbiol. 28 : 169-185.
- Abriouel, H., Lucas, R., Omar, N. B., Valdivia, E., Maqueda, M., Martínez-Cañamero, M. and Gálvez, A. 2005. Enterocin AS-48RJ: a variant of Enterocin AS-48 chromosomally encoded by *Enterococcus faecium* RJ16 isolated from food. Syst. Appl. Microbiol. 28 : 383-397.
- Adebayo-tayo, B. C. and Onilude, A. A. 2008. Screening of lactic acid bacteria strains isolated from some nigerian fermented foods for EPS production. World Appl. Sci. J. 4 : 741-747.
- Adhikari, K., Mustapha, A., Grun, I. U. and Fernando, L. 2000. Viability of microencapsulated bifidobacteria in set yogurt during refrigerated storage. J. Dairy Sci. 83 : 1946-1951.
- Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E. and Chevalier, I. 2006. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale

- facility 1 screening and characterization of the antibacterial compounds. Food Control. 17 : 454-461.
- Annamalai, N., Manivasagan, P., Balasubramanian, T. and Vijayalakshmi, S. 2009. Enterocin from *Enterococcus faecium* isolated from mangrove environmE. Afr. J. Biotechnol. 8 : 6311-6316.
- Apata D.F. 2009. Antibiotic resistance in poultry. Int. J. Poult. Sci. 8 : 404-408.
- Atrih, A., Rekhif, N., Michel, M. and Lefebvre, G. 1993. Detection of bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* strains isolated from different foods. Microbiol. 75 : 117-123.
- Begley, M., Cormac, G. M. G. and Hill, C. 2005. The interaction between bacteria and bile. FEMS Microbiol. Rev. 29: 625-651.
- Breukink, E., Weidemann, I., van Kraaij, C., Kuipers, O. P., Sahl, H. G. and de Kruijff, B. 1999. Use of cell wall precursor lipid II by a poreforming peptide antibiotic. Science. 286 : 2361-2364.
- Byczkowski, J. and Gessner, T. 1988. Biological role of superoxide ion-radical. Int. J. Biochem. 20: 569-580.
- Caplice, E. and Fitzgerald, G. F. 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. Int. J. Food Microbiol. 50 : 131-149.
- Charteris W.P., Kelly P.M., Morelli L. and Collins J.K. 1998. Development and application of an *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. J. Appl. Microbiol. 84 : 759-768.
- Chen, Y., Ludescher, R. D. and Montville, T. J. 1997a. Electrostatic interactions, but not the YGNGV consensus motif, govern the binding of pediocin PA-1 and its fragments to phospholipid vesicles. Appl. Environ. Microbiol. 63 : 4770-4777.
- Chen, Y., Shapira, R., Eisenstein, M. and Montville, T. J. 1997b. Functional characterization of pediocin PA-1 binding to liposomes in the absence of a protein receptor and its relationship to a predicted tertiary structure. Appl. Environ. Microbiol. 63 : 524-531.
- Chen, H. and Hoover. D. G. 2003. Bacteriocins and their food applications. Compr. Rev. Food Sci. F. 2 : 82-100.

- Chimane, W. 2008. Screening of bacteriocin producing bacteria capable to inhibit the growth of bovine mastitis pathogens. Dissertation of Master Degree of Science. Maejo University.
- Cintas, L. M., Casaus, P., Holo, H., Hernandez, P. E., Nes, I. F. and Håvarstein, L. S. 1998. Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to *Staphylococcal hemolysins*. J. Bacteriol. 180 : 1988-1994.
- Cleveland J., Montville T. J., Nes I. F. and Chikinda, M. L. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. Int. J. Food Microbiol. 71 : 1–20.
- Coleman, R., Lowe, P. J. and Billington, D. 1980. Membrane lipid composition and susceptibility to bile salt damage. Biochim. Biophys. Acta. 588 : 294-300.
- Corsetti, A. and Settanni, L. 2007. Lactobacilli in sourdough fermentation. Food Res. Int. 40 : 539-558.
- Cotter, P. D., Hill, C. and Ross, R. P. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. Nat. Rev. 3 : 777-788.
- Crupper, S. S., Gies, A. J. and Iandolo, J. J. 1997. Purification and characterization of Staphylococcin BACR1, a broad-spectrum bacteriocin. Appl. Environ. Microbiol. 63 : 4185-4190.
- D'Aimmo, M. R., Modesto, M. and Biavati, B. 2007. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* spp. isolate from dairy and pharmaceutical product. Int. J. Food Microbiol. 155: 35-42.
- Dallaglio, F., Dicks, L. M. T. and Torriani, S. 1995. The Genus *Leuconostoc*. In The Genera of Lactic Acid Bacteria vol. 2 The Genera of Lactic Acid Bacteria: (Wood, B. J. B. and Holzapfel, W. H. eds.). p. 235-238. Blackie Academic & Professional, London.
- Deegan, L. H., Cotter, P. D., Hill, C. and Ross, P. 2006. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. Int. Dairy J. 16 : 1058-1071.
- De Kwaadsteniet, M., Todorov, S. D., Knoetze, H. and Dicks, L. M. T. 2005. Characterization of a 3944 Da bacteriocin, produced by *Enterococcus mundtii* ST15, with activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. Int. J. Food Microbiol. 105: 433-444.
- De Moss, R. D., Bard, R. C. and Gunsalus, I. C. 1951. The mechanism of the heterolactic fermentation: a new route of ethanol formation. J. Bacteriol. 62 : 499-511.

- De Vuyst, L. and Degeest, B. 1999. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 23 : 153-177.
- Dicks, L. M. T., Mellett, F. D. and Hoffman, L. C. 2004. Use of bacteriocin-producing starter cultures of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus curvatus* in production of ostrich meat salami. *Meat Sci.* 66 : 703-708.
- Diep, D. B., Havastein, L. S. and Nes, I. F. 1996. Characterization of locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11. *J. Bacteriol.* 178 : 4472-4483.
- Dykes, G. A., Amarowicz, R. and Pegg, R. B. 2003. Enhancement of nisin antibacterial activity by a bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi*) leaf extract. *Food Microbiol.* 20 : 211-216.
- Firtel, M., Henderson, G. and Sokolov, I. 2004. Nanosurgery: observation of petidoglycan strands in *Lactobacillus helveticus* cell walls. *Ultramicroscopy.* 101: 105-109.
- Flórez, A. B., Delgado, S. and Mayo, B. 2005. Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from a cheese environmE. *Can. J. Microbiol.* 51 : 51-58.
- Franz, C. M. A. P., Holzapfel, W. H. and Stiles, M. E. 1999. Enterococci at the crossroads of food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 47: 1-24.
- Franz, C. M. A. P., Schillinger, U. and Holzapfel, W.H. 1996. Production and characterization of enterocin 900, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* BFE900 from black olives. *Food Microbiol.* 29 : 255-270.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66 : 365-378.
- Fuller, R. 1992. History and Development of Probiotics. *In* Probiotics : The Scientific Basic. 1st ed (Fuller, R.,ed) pp. 1-8. Chapman & Hall. London.
- Gálvez, A., Abriouel, H., López, R. L. and Omar, N. B. 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* 120 : 51-70.
- Garneau, S., Martin, N. I. and Vederas, J. C. 2002. Two-peptides bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie.* 84 : 577-592.
- Goncalves, L. M. D., Ramos, A., Almeida, J. S., Xavier, A. M. R. B. and Carrondo, M. J. T. 1997. Elucidation of the mechanism of lactic acid growth inhibition and production in batch cultures of *Lactobacillus rhamnosus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48 : 346-350.

- González, L., Sandoval, H., Sacristán, N., Castro, J. M., Fresno, J. M. and Tornadijo, M. E. 2007. Identification of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity. *Food Control*. 18 : 716-722.
- Gross, E. and Morell, J. L. 1971. The structure of nisin. *J. Am. Chem. Soc.* 93 : 4634-4635.
- Guo, X. H., Kim, J. M., Nam, H. M., Park, S. Y. and Kim, J. M. 2010. Screening lactic acid bacteria from swine origins for multistrain probiotics based on *in vitro* functional properties. *Anaerobe*. 16 : 321-326.
- Gupta, H., Malik, R. K., Bhardwaj, A., Kaur, G., De, S. and Kaushik, J. K. 2010. Purification and characterization of enterocin FH99 produced by a faecal isolate *Enterococcus faecium* FH99. *Indian J. Microbiol.* 50 : 145-145.
- Hardie, J. M. and Whiley, R. A. 1995. The Genus *Streptococcus*. In *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. (Wood, B. J. B. and Holzapfel, W. H., eds.). p. 75-124. Chapman and Hall, Glasgow.
- Heravi, R. M., Hermanshahi, H., Sankian, M., Nassiri, M. R., Moussavi, A. H., Nasirai, L. R. and Varasteh, A. R. 2011. Screening of lactobacilli bacteria isolated from gastrointestinal tract of broiler chickens for their use as probiotic. *African J. Microb. Res.* 5 : 1858-1868.
- Hata, T., Tanaka, R. and Ohmomo, S. 2010. Isolation and characterization of plantaricin ASM1: A new bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* A-1. *Int. J. Food Microbiol.* 137 : 94-99.
- Havenaar, R. and Huis in't Veld, J. H. J. 1992. Probiotics: A General View. In *The Lactic Acid Bacteria in Health & Disease*. 1st ed. (Wood, B. J. B, ed). p. 151-170. Elsevier Applied Science. London.
- Hofmann, A. F. 1999. Bile acids: the good, the bad, and the ugly. *News Physiol. Sci.* 14: 24-29.
- Holo, H. and Nes, I. F. 1989. High-frequency transformation, by electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* grown with glycine in osmotically stabilized media. *Appl. Environ. Microbiol.* 55 : 3119-3123.
- Holzapfel, W. H. and Schillinger, U. 2002. Introduction to prebiotic and probiotics. *Food Res. Int.* 35 : 109-116.

- Holzapel, W. H., Haberer, P. J., Snel, U. and Huis in't Veld, J. H. J. 1998. Overview of gut flora and probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 4 : 85-101.
- Hood, S. K. and Zoitola, E. A. 1988. Effect of low pH on the ability of *Lactobacillus acidophilus* to survive and adhere to human intestinal cells. *J. Food Sci.* 53 : 1514-1516.
- Hoover, D. G. and Steenson, L. R. 1993. *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*. Academic Press, New York.
- Hosseini, S. V., Arlindo, S., Bohme, K., Fernandez-No, C., Calo-Mata, P. and Barros-Velázquez, J. 2009. Molecular and probiotic characterization of bacteriocin producing *Enterococcus faecium* strains isolated from nonfermented animal foods. *J. Appl. Microbiol.* 107: 1392-1403.
- Hwanhlem, N., Watthanasakphuban, N., Riebroy, S., Benjakul, S., H-kittikun, A. and Maneerat, S. 2010. Probiotic lactic acid bacteria from Kung-Som: isolation, screening, inhibition of pathogenic bacteria. *Int. J. Food Sci. Technol.* 45 : 594-601.
- Huang, Y. and Adams, M. C. 2004. *In vitro* assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 9: 253-260.
- Jack, R. W., Tagg, J. R. and Ray, B. 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* 59 : 171-200.
- Jay, J. M. 1982. Antimicrobial properties of diacetyl. *Appl. Environ. Microbiol.* 44 : 525-532.
- Jie, J., Bo, S., Deqiang, Z., Qingxia, C., Yiran, C., Jinnian, L., Kezong, Q. and Ming, Z. 2012. Characterization of a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* LSJ618 isolated from traditional Chinese fermented radish. *Food Control.* 23 : 338-344.
- Jin, L. Z., Ho, Abdullah, Y. W. N. and Jalaludin, S. 2000. Digestive and bacterial enzyme activities in broilers fed diets supplemented with *Lactobacillus* cultures. *Poultry Sci.* 79 : 886-891.
- Johnson, K. J., Cygan, R. T. and Fein, J. B. 2006. Molecular simulations of metal adsorption to bacterial surfaces. *Geochim. Cosmochim. Ac.* 70 : 5075-5088.
- Jumriangrit, P. 2004. Characterization and purification of a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* PMU33 strain from fermented fish products. Dissertation of Master Degree of Science. Mahidol University.

- Karpinska, E., Blaszcak, B., Kosowska, G., Degorski, A. and Borzemski, B. W. 2001. Growth of the intestinal anaerobic in the newly hatched chicks according to the feeding and proving with normal gut flora. B. Vet. I. Pulawy. 45: 105-109.
- Kashket, E. R. 1987. Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. FEMS Microbiol. Rev. 46: 233-244.
- Klaenhammer, T. R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 12 : 39-85.
- Klare I., Konstabel C., Badstübner D., Werner G. and Witte W. 2003. Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. Int. J. Food Microbiol. 88: 269-290.
- Koebmann, B. J., Nilsson, D., Kuipers, O. P. and Jensen, P. R. 2000. The membrane-bound H⁺-ATPase complex is essential for growth of *Lactococcus lactis*. J. Bacteriol. 182 : 4738-4743.
- Kong, S. and Davison, A. J. 1980. The role of interactions between O₂, H₂, OH[•], e⁻ and O₂^{•-} in free radical damage to biological systems. Arch. Biochem. Biophys. 204 : 18-29.
- Král, M., Angelovičová, M. and Mrázová, L. 2012. Application of probiotics in poultry production. Sci. P. Anim. Sci. Biotechnol. 45:55-57.
- Kullen, M. J. and Klaenhammer, T. R. 1999. Identification of the pH-inducible, proton-translocating F₁F₀-ATPase (*atpBEFHAGDC*) operon of *Lactobacillus acidophilus* by differential display: gene structure, cloning and characterization. Mol. Microbiol. 33 : 1152-1161.
- Kumer, M., Tiwari, S. K. and Srivastava, S. 2010. Purification and characterization of enterocin LR/6, a bacteriocin from *Enterococcus faecium* LR/6. Appl. Biochem. Biotechnol. 160 : 40-49.
- Laissue, J. A., Chappuis, B. B., Muller, C., Reubi, J. C. and Gebbers, J. O. 1993. The intestinal immune system and its relation to disease. Digest. Dis. 11: 298-312.
- Lankaputha, W. E. V. and Shah, N. P. 1995. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* sp. in the presence of acid and bile salt. Cult. Dairy Prod. J. 51: 65-70.

- Lee, H. J. and Kim, W. J. 2010. Isolation and characterization of anti-listerial and amylase sensitive enterocin producing *Enterococcus faecium* DB1 from Gajami-sikhae, a fermented flat fish in Korea. Food Sci. Biotechnol. 19 : 373-381.
- Lilly, D. M., and Stillwell, R. H. 1965. Probiotic : growth promoting factors produced by microorganisms. Science. 147: 744-748.
- Lin W.H., Hwang C.F., Chen L.W. and Tsen H.Y. 2006. Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products. Food Microbiol. 23 : 74-81.
- Lin, W. H., Yu, B., Jang, S. H. and Tsen, H. Y. 2007. Different probiotic properties for *Lactobacillus fermentum* strains isolated from swine and poultry. Anaerobe. 13 : 107-113.
- Lima, E. T. D. and Filho, R. L. A. 2005. Bacteriocin: nomenclature, detection, mechanism of action and potential use in poultry production. J. Food Agric. Environ. 3 : 62-66.
- Lorian, V. 1980. Antibiotics in Laboratory Medicine. Waverly Press, Inc. USA.
- Lucy, H. D., Paul, D. C., Colin, H. and Paul, R. 2006. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. Int. Dairy J. 16 : 1058-1071.
- Madara, J. L. 1997. The chameleon within: improving antigen delivery. Science. 277 : 910-911.
- Madureira, A.R., Pereira, C.I., Truszkowska, K., Gomes, A.M., Pintado, M.E. and Malcata, F.X. 2005. Survival of probiotic bacteria in a whey cheese vector submitted to environmental conditions prevailing in the gastrointestinal tract. Int. Dairy J. 15 : 921-927.
- Magnusson, J., Ström, K., Roos, S. Sjögren, J. and Schnürer, J. 2003. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Lett. 219 : 129-135.
- Marteau, P., Vaerman, J. P., Dehennin, J. P., Bord, S., Brassart, D., Pochart, P., Desjeux, J. F. and Rambeau, J. C. 1997. Effects of intrajejunal perfusion and chronic ingestion of *Lactobacillus johnsonii* strain La1 on serum concentrations and jejunal secretions of immunoglobulins and serum proteins in healthy humans. Gastroenterol. Clin. Biol. 21: 293-298.
- Martin, M., Gutiérrez, J., Criado, R., Herranz, C., Cintas, L. M. and Hernández, P. E. 2007. Cloning, production and expression of the bacteriocin enterocin A produced by

- Enterococcus faecium* PLBC21 in *Lactococcus lactis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 76 : 667-675.
- Mattila-Sandholm, T., Matto, J. and Saarela, M. 1999. Lactic acid bacteria with health claims - interactions and interference with gastrointestinal flora. Int. Dairy J. 9 : 25-35.
- McAuliffe, O., Ryan, M. P., Ross, R. P., Hill, C., Breeuwer, P. and Abee, T. 1998. Lacticin 3147: a broad spectrum bacteriocin which selectively dissipates the membrane potential. Appl. Environ. Microbiol. 64: 439-445.
- Mead, G. C. 2000. Prospects for "competitive exclusion" treatment to control *salmonellas* and other foodborne pathogens in poultry. Vet. J. 159 : 111-123.
- Messi, P., Bondi, M., Sabia, C., Battini, R. and Manicardi, G. 2001. Detection and preliminary characterization of a bacteriocin (plantaricin 35d) produced by a *Lactobacillus plantarum* strain. J. Food Microbiol. 64: 193-198.
- Mirhosaini, M., Nahvi, I., Kermanshahi, R. K. and Tavassoli, M. 2006. Isolation of bacteriocin producing *Lactococcus lactis* strain from dairy products. Int. J. Dairy. Sci. 1 : 51-56.
- Mojgani, N., Torshizi, M. A. K. and Rahimi, S. 2007. Screening of locally isolate lactic acid bacteria for use as probiotic in poultry in Iran. J. Poult. Sci. 44 : 357-365.
- Moser, S. A. and Savage, D. C. 2001. Bile salt hydrolase activity and resistance to toxicity of conjugated bile salts are unrelated properties in lactobacilli. Appl. Environ Microbiol. 67 : 3476-3480.
- Musikasang, H., Tani, A., H-kittikun, A. and Maneerat, S. 2009. Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from chicken gastrointestinal digestive tract. World J. Microbiol. Biotechnol. 25: 1337-1345.
- Nissen-Meyer, J., Larsen, A. G., Slerren, K., Daeschel, M. and Nes, I. F. 1992. Purification and characterization of plantaricin A, a *Lactobacillus plantarum* bacteriocin whose activity depends on the action of two peptides. J. Gen. Microbiol. 139 : 1973-1978.
- Nitisinprasert, S., Nilphai, V., Bunyun, P., Sukyai, P., Doi, K. and Sonomoto, K. 2000. Screening and identification of effective thermotolerant lactic acid bacteria producing antimicrobial activity against *Escherichia coli* and *Salmonella* sp. resistant to antibiotics. Kasetsart J. (Nat. Sci). 34 : 387-400.

- Noonpakdee, W., Santiwarangkna, C., Jumriangrit, P., Nakayama, J., Sonomoto, K. and Panyim, S. 2002. Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC 20 strain from *nham*, a traditional Thai fermented sausage. *Int. J. Food Microbiol.* 81 : 137-145.
- Ohmomo, S., Kobayashi, M., Yajima, M., Suyanandana, P., Budka, P. and Somchai, P. 1998. Screening of thermophilic lactic acid bacteria producing bacteriocins in the tropics. *Jpn. Agric. Res. Q.* 33: 125-131.
- Ohmomo, S., Murata, S., Katayama, N., Nitisinprasart, S., Kobayashi, M., Nakajima, T., Yajima, M. and Nakanishi, K. 2000. Purification and some characteristics of enterocin ON0157, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* NIAI 157. *J. Appl. Microbiol.* 88 : 81-89.
- O'Keeffe, T. and Hill, C. 1999. Bacteriocins/Potential in Food Preservation. *In* Encyclopedia of Food Microbiology. (Robinson, R. K., Batt, C. A. and Patil, P. D., eds.) p. 183-191. Academic press, New York.
- O'Keeffe, T., Hill, C. and Ross, R. P. 1999. Characterization and heterologous expression of the genes encoding enterocin A production, immunity, and regulation in *Enterococcus faecium* DPC1146. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 : 1506-1515.
- Oscariz, J. C. and Pisabarro, A. G. 2001. Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produces by gram-positive bacteria. *Int. Microbiol.* 4 : 13-19.
- Ouwehand, A. C., Kirjavainen, P. V., Shortt, C. and Salminen, S. 1999. Probiotics: mechanisms and established effects. *Int. Dairy J.* 9 : 43-52.
- Parada, J. L., Caron, C. R., Medeiros, A. B. P. and Socol, C. R. 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 50 : 521-542.
- Park H.S., Lee S.H. and Uhm T.B. 1998. Selection of microorganisms for probiotics and their characterization. *Korean J. Food Sci. Nutr.* 27 : 433-440.
- Paynter, M. J. B., Brown, K. A. and Hayasaka, S. S. 1997. Factors affecting the production of an antimicrobial agent, plantaricin F, *Lactobacillus plantarum* BF001. *Lett. Appl. Microbiol.* 24 : 159-165.

- Perdigon, G., Medina, M., Vintini, E. and Valdez, J. C. 2000. Intestinal pathway of internalization of lactic acid bacteria and gut mucosal immune stimulation. *Int. J. Immunopath. Ph.* 13 : 141-150.
- Podolak, P. K., Zayas, J. F., Kastner, C. L. and Fung, D. Y. C. 1996. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 on beef by application of organic acids. *J. Food Prot.* 59 : 370-373.
- Powell, J. E., Witthuhn, R. C., Todorov, S. D. and Dicks, L. M. T. 2007. Characterization of bacteriocin ST8KF produced by a kefir isolate *Lactobacillus plantarum* ST8KF. *Int. Dairy J.* 17 : 190-198.
- Pringsulaka, O., Thongngam, N., Suwannasai, N., Atthakor, W., Pothivetkul, K. and Rangsiruji, A. 2012. Partial characterisation of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Thai fermented meat and fish products. *Food Control.* 23 : 547-551.
- Raghavendra, P. and Halami, P. M. 2009. Screening, selection and characterization of phytic acid degrading lactic acid bacteria from chicken intestine. *Int. J. Food Microbiol.* 133 : 129-134.
- Reddy, G., Altaf, Md., Naveena, B. J., Venkateshwar, M. and Kumer E. V. 2008. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation-a review. *Biotechnol. Advance.* 26 : 22-34.
- Rehaïem A., Martínez B., Manai M. and Rodríguez A. 2010: Production of enterocin A by *Enterococcus faecium* MMRA isolated from 'Rayeb', a traditional Tunisian dairy beverage. *J. Appl. Microbiol.* 108 : 1685-1993
- Reid, G. and Burton, J. 2002. Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. *Microbe. Infect.* 4 : 319-324.
- Reuter, G. 2001. The *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* microflora of the human intestine: Composition and succession. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 2 : 43-53.
- Rivas, F. P., Castro, M. P., Vallejo, M., Marguet, E. and Campos, C. A. 2012. Antibacterial potential of *Enterococcus faecium* strains isolated from ewes' milk and cheese. *LWT-Food Sci. Technol.* 46 : 428-436.
- Robredo B., Singh K., Baquero F., Murray B. and Torres C. 2000: Vancomycin-resistant enterococci isolated from animal and food. *Int. J. Food Microbiol.* 54 : 197-204.

- Rodríguez, E., Arqués, J. L., Rodríguez, R., Nuñez, M. and Medina, M. 2003. Reuterin production by lactobacilli isolated from pig feces and evaluation of probiotic traits. *Lett. Appl. Microbiol.* 37 : 259-263.
- Ross, R. P., Desmond, C., Fitzgerald, G. F. and Stanton, C. 2005. Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. *J. Appl. Microbiol.* 98 : 1410-1417.
- Ross, R. P., Morgan, S. and Hill, C. 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. *Int. J. Food Microbiol.* 79 : 3-16.
- Rowland, S. S., Falker Jr., W. A. and Bashirelahi, N. 1992. Identification of an estrogen-binding protein in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 42 : 721-727.
- Ruiz-Barba, J. L., Floriano, B., Maldonado-Barragá, A and Jiménez-Díaz, R. 2007. Molecular analysis of the 21-kb bacteriocin-encoding plasmid pEF1 from *Enterococcus faecium* 6T1a. *Plasmid.* 57 : 175-181.
- Saelim, K., Sohsomboon, N., Kaewsuwan, S. and Maneerat, S. 2012. Probiotic properties of *Enterococcus faecium* CE5-1 producing a bacteriocin-like substance and its antagonistic effect against antibiotic-resistant enterococci *in vitro*. *Czech J. Anim. Sci.* 57 : 529-539.
- Sælensminde, G., Halskau, Ø. and Jonassen, I. 2009. Amino acid contacts in proteins adapted to different temperatures: hydrophobic interactions and surface charges play a key role *Extremophiles*. 13: 11-20.
- Salminen, E., Rintala, J., Lokshina, L. Y. and Vavilin, V. A. 2000. Anaerobic batch degradation of solid poultry slaughterhouse waste. *Water Sci. Technol.* 41 : 33-41.
- Salminen, S. and von Wright, A. 1998. *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*. 2nd ed. Marcel Dekker, Inc. USA.
- Salminen, S., Wright, A. V., Morelli, L., Marteau, P., Brassarte, D., de Vos, W. M., Fondén, R., Saxelin, M., Collinsi, K., Mogensen, G., Birkeland, S. E. and Mattila-Sandholm, T. 1998. Demonstration of safety of probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 44 : 93-106.
- Sánchez, J., Borrero, J., Gómez-Sala, B., Basanta, A., Herranz, C., Cintas, L. M. and Hernández, P. E. 2008. Cloning and heterologous production of hiracin JM79, a sec-dependent

- bacteriocin produced by *Enterococcus hirae* DCH5, in lactic acid bacteria and *Pichia pastoris*. Appl. Environ. Microbiol. 74 : 2471-2479.
- Sánchez, J., Diep., D. B., Herranz, C., Nes, I. F., Cintas, L. M. and Hernández, P. E. 2007. Amino acid and nucleotide sequence, adjacent genes, and heterologous expression of hiracin JM79, a sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus hirae* DCH5, isolated from Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). FEMS Microbiol. Lett. 270 : 227-236.
- Sawan, S. P. and Manivannan, G. 2000. Antimicrobial/Anti-Infective Materials. Technomic Publishing Company, Inc, New York.
- Schiffrin, E. J., Rochat, F., Link-Amster, H., Aeschlimann, J. M. and Donnet-Hughes, A. 1994. Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. J. Dairy Sci. 78: 491-497.
- Schillinger, U. and Holzapfel, W. H. 1995. The Genus *Carnobacterium*. In The Genera of Lactic Acid Bacteria. (Wood, B. J. B. and Holzapfel, W. H., eds.) p. 307-326. Blackie Academic and Professional, London.
- Schillinger, U. and Lücke, F. K. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sakei* isolated from meat. Appl. Environ. Microbiol. 55: 1901-1906.
- Schlesinger, M. J. 1990. Heat shock proteins. J. Biol. Chem. 265: 12111-12114.
- Simpson, W. J. and Taguchi, H. 1995. The Genus *Pediococcus*, with Notes on the Genera *Tetratogenococcus* and *Aerococcus*. In The Genera of Lactic Acid Bacteria. (Wood, B. J. B. and Holzapfel, W. H., eds.) p. 125-172. Chapman and Hall, London.
- Shin, M.S., Han, S.K., Ji, A.R., Kim, K.S. and Lee, W.K. 2008. Isolation and characterization of bacteriocin-producing bacteria from the gastrointestinal tract of broiler chickens for probiotic use. J. Appl. Microbiol. 105 : 2203-2212.
- Snijders, J. M., van Logtestijn, J. G., Mossel, D. A. A. and Smulders, F. J. M. 1985. Lactic acid as a decontaminant in slaughter and processing procedures. Vet. Quart. 7 : 277-282.
- Solichová, K., Složilová, I., Jebravá, I., Uhrová, B. and Plocková, M. 2012. Characterisation of antilisterial bacteriocin-like substance produced by *Enterococcus mundtii*. Czech J. Food Sci. 30 : 89-97.

- Srionnual, S., Yanagida, F., Lin, L. H., Hsiao, K. N. and Chen, Y. S. 2007. Weissellicin 110, a newly discovered bacteriocin from *Weissella cibaria* 110 isolated from Plaa-Som, a fermented fish product from Thailand. *Appl. Environ. Microbiol.* 73 : 2247-2250.
- Stiles, E. M. and Holzapfel, H. W. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food. Microbiol.* 36 : 1-29.
- Stoddard, G. W., Petzel, J. P., van Belkum, M. J., Kok, J. and McKay, L. L. 1992. Molecular analyses of the lactococcin A gene cluster from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* WM4. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 : 1952-1961.
- Strompfová, V. and Lauková, A. 2007. *In vitro* study on bacteriocin production of enterococci associated with chickens. *Anarobe* 13 : 228-237.
- Strompfová V., Lauková A., Simonová M. and Marciňáková M. 2008. Occurrence of the structural enterocin A, P, B, L50B genes in enterococci of different origin. *Vet. Microbiol.* 132 : 293-301.
- Stonsaovapak, P., Kaneko, J. and Izaki, K. 1994. Characterization of bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* isolated from fermented pork in Thailand. *Kasetsart J.* 28 : 310-313.
- Suma, K., Misra, M. C. and Varadaraj, M. C. 1998. Plantaricin LP84, a broad spectrum heat-stable bacteriocin of *Lactobacillus plantarum* NCIM 2084 produced in a simple glucose broth medium. *Int. J. Food Microbiol.* 40 : 17-25.
- Taheri, H. R., Moravej, H., Tabandeh, F., Zaghari, M. and Shivazad, M. 2009. Screening of lactic acid bacteria toward their selection as a source of chicken probiotic. *Poultry Sci.* 88: 1586-1593.
- Taranto M.P., Perez-Martinez G. and de Valdez G.F. 2006. Effect of bile acid on the cell membrane functionality of lactic acid bacteria for oral administration. *Res. Microbiol.* 157 : 720-725.
- Teixeira, P. C., Castro, M. H., Malcata, F. X. and Kirby, R. M. 1995. Survival of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* following spray-drying . *J. Dairy Sci.* 78 : 1025-1031.
- Teuber, M. 1995. The Genus *Lactococcus*. In *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. (Wood, B. J. B. and Holzapfel, W. H., eds.). p. 134-173. Chapman and Hall, Glasgow.

- Tichazek, P. S., Meyer, J. N., Nes, I. F., Vogel, R. F. and Hammes, W. P. 1992. Characterization of the bacteriocins curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 and sakacin P from *L. sake* LTH 673. Syst. Appl. Microbiol. 15 : 460-468.
- Todorov, S. D. and Dicks, L. M. T. 2005. *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria. Enzyme Microb. Technol. 36 : 318-326.
- Todorov, S. D. and Dicks, L. M. T. 2007. Bactreiocin production by *Lactobacillus pentosus* ST712BZ isolated from Boza. Braz. J. Microbiol. 38 : 166-172.
- Todorov, S. D. and Dicks, L. M. T. 2009. Bacteriocin production by *Pediococcus pentosaceus* isolated from marula (*Scerocarya birrea*). Int. J. Food Microbiol. 132 : 117-126.
- Todorov, S. D., Nyati, H., Meincken, M. and Dicks, L. M. T. 2007b. Partial characterization of bacteriocin AMA-K, produced by *Lactobacillus plantarum* AMA-K isolated from naturally fermented milk from Zimbabwe. Food Control. 18 : 656-664.
- Todorov, S. D., Reenen, C. A. V. and Dicks, L. M. T. 2004. Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST13BR, a strain isolated from barley beer. J. Gen. Appl. Microbiol. 50 : 149-157.
- Todorov, S. D., Reenen, C. A. V. and Dicks, L. M. T. 2007a. Pre-treatment of growth medium with Amberlite XAD-1180 produces higher levels of bacteriocin plantaricin 423. CE. Eur. J. Biol. 4 : 588-596.
- Torshizi, M. A. K., Rahimi, S. H., Mojgani, N., Esmaeilkhani, S. and Grimes, J. L. 2008. Screening of indigenous strains of lactic acid bacteria for development of a probiotic for poultry. J. Anim. Sci. 21 : 1495-1500.
- Van Belkum, M. J., Kok, J., Venema, G., Holo, H., Nes, I. F., Konings, W. N. and Abee, T. 1991. The bacteriocin lactococcin A specifically increases permeability of lactococcal cytoplasmic membranes in a voltage-independent, protein-mediated manner. J. Bacteriol. 173 : 7934-7941.
- Verellen, T. L. J., Bruggeman, G., Van Reenen, C. A., Dicks, L. M. T. and Vandamme, E. J. 1998. Fermentation optimization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* 423. J. FermE. Bioeng. 86 : 174-179.

- Wang X., Brown, I.L., Evans A.J. and Conway P.L. 1999. The protective effects of high amylose maize (amylomaize) starch granules on the survival of *Bifidobacterium* spp. in the mouse intestinal tract. J. Appl. Microbiol. 87 : 631-639.
- Wilaipun, P., Zendo, T., Sangjindavong, M., Nitisinprasert, S., Leelawatcharamas, V., Nakayama, J. and Sonomoto, K. 2004. The two-synergistic peptide bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* NKR-5-3 isolated from Thai. ScienceAsia. 30 : 115-122.
- Zárate G., Chaia A.P., González S. and Oliver G. 2000. Viability and beta-galactosidase activity of dairy propionibacteria subjected to digestion by artificial gastric and intestinal fluids. J. Food Protect. 63 : 1214-1221.

ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยต่อไป

1. เพื่อการเป็นโปรไบโอติกที่ดีต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในอนาคต ควรมีการศึกษาคุณลักษณะของโปรไบโอติกเพิ่มเติม เช่น ศึกษาการยึดเกาะผนังลำไส้ ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ และความสามารถในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค
2. เนื่องจากแบคทีเรียโอสซินเป็นเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ส่งผลให้จากการทดลองพบว่าโอสซินสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้ เพื่อเป็นการแก้ปัญหาดังกล่าว อาจพิจารณาใช้โอสซินร่วมกับสารอื่นที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค
3. เนื่องจากการศึกษาการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์ enterocin A ของ *Enterococcus faecalis* ORF ที่มีบทบาทต่อการสังเคราะห์ enterocin A เพื่อให้ทราบถึงกลไกการควบคุมการสังเคราะห์ enterocin A ดังนั้นควรศึกษากลไกการทำงานของยีนต่างๆ ที่มีบทบาทต่อการสังเคราะห์ enterocin A

ภาคผนวก
บทความที่ตีพิมพ์แล้ว

Probiotic properties of *Enterococcus faecium* CE5-1 producing a bacteriocin-like substance and its antagonistic effect against antibiotic-resistant enterococci *in vitro*

K. SÆELIM¹, N. SOHSOMBOON¹, S. KÆEWSUWAN², S. MANEERAT¹

¹Department of Industrial Biotechnology, Faculty of Agro-Industry, Prince of Songkla University, Hat Yai, Thailand

²Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Prince of Songkla University, Hat Yai, Thailand

ABSTRACT: A bacteriocin-like substance (BLS) producing *Enterococcus faecium* CE5-1 was isolated from the gastrointestinal tract (GIT) of Thai indigenous chickens. Investigations of its probiotic potential were carried out. The competition between the BLS probiotic strain and antibiotic-resistant enterococci was also studied. *Ent. faecium* CE5-1 exhibited a good tolerance to pH 3.0 after 2 h and in 7% fresh chicken bile after 6 h, but the viability of *Ent. faecium* CE5-1 decreased by about 2–3 log CFU/ml after 2 h incubation in pH 2.5. It was susceptible to the antibiotics tested (tetracycline, erythromycin, penicillin G, and vancomycin). The maximum BLS production from *Ent. faecium* CE5-1 was observed at 15 h of cultivation. It showed activity against *Listeria monocytogenes* DMST17303, *Pediococcus pentosaceus* 3CE27, *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM1157, and antibiotic-resistant enterococci. The detection by polymerase chain reaction (PCR) in the enterocin structural gene determined the presence of enterocin A gene in *Ent. faecium* CE5-1 only. *Ent. faecium* CE5-1 showed the highest inhibitory activity against two antibiotic-resistant *Ent. faecalis* VanB (from 6.68 to 4.29 log CFU/ml) and *Ent. gallinarum* VanC (from 6.76 to 4.31 log CFU/ml) after 12 h of co-cultivation. The results show the future possible use of *Ent. faecium* CE5-1 as a probiotic strain for livestock to control antibiotic-resistant enterococci.

Keywords: chicken; gastrointestinal tract; bile salt; acid tolerance; *Enterococcus*

Several years ago, antibiotics were used in feed for chickens to promote growth and this caused the evolution of antibiotic resistance in both pathogen and commensal bacteria in chickens. In addition, the subtherapeutic antibiotics usage for chicken production is banned in Europe and the United States except for the use of ionophoric antibiotics in EU until 2013. In recent years, due to the increased use of antibiotics in animals and humans, enterococci have become a major concern worldwide.

Enterococci are widespread in nature and found in the gastrointestinal tract (GIT) of humans and

animals (Franz et al., 2007). Although they belong to a group of microorganisms known as lactic acid bacteria (LAB) and are useful in cheeses or other fermented foods production, several of them are not considered as “Generally Recognized As Safe” (GRAS) (Ogier and Serror, 2008). Some enterococci were isolated from patients possessing virulent genes. They are the second to third most frequent bacterial genus in hospital infections. They cause endocarditis, bacteraemia, urinary tract, neonatal, central nervous system and other infections (Franz et al., 1999). Moreover, they are known to

Supported by the Office of the Higher Education Commission (grant fund “Strategic Scholarships for Frontier Research Network for the Thai Doctoral Ph.D. Degree Program, Thailand”), by the International Foundation for Science (research grant agreement No. F/4091-2), and by the Graduate School of Prince of Songkla University.

be resistant to most antibiotics including penicillin, aminoglycosides, glycopeptides, MLS_B antibiotics (macrolides, lincosamides, and streptogramins of the B type), chloramphenicol, tetracyclines, quinolones, oxazolidinones, and everninomicins (Klare et al., 2003). In addition, the genus *Enterococcus* can transfer the antibiotic-resistant encoding gene to pathogens and may be involved in the spreading of antibiotic resistance into the environment and food chains (Klare et al., 2003; Abriouel et al., 2005).

Probiotics is a live microbial feed supplement which affects the host animal beneficially by improving its intestinal microbial balance (Fuller, 1989). Probiotic strains are widely used in the food and feed industry to enhance the health of humans and animals because they produce various antibacterial compounds, such as organic acids, hydrogen peroxide, diacetyl, and bacteriocin (De Vuyst and Degeest, 1999). The most common probiotic strains from the GIT of chickens belong to the genera *Enterococcus* (Strompfová and Lauková, 2007; Musikasang et al., 2009), *Pediococcus* (Shin et al., 2008; Musikasang et al., 2009), and *Lactobacillus* (Souza et al., 2007). *Ent. faecalis* KT2L24, *Ent. durans* KT3L20, *Ent. faecium* KT4S13, *Ent. faecium* KT8S16, and *P. pentosaceus* KT3CE27 (Musikasang et al., 2009) are considered to be the best probiotic strains from GIT of broiler and Thai indigenous chickens. Tolerance to acid and bile salts in the GIT is usually considered one of the main criteria required for LAB strains to be used as probiotics.

Enterococi belong to the group of LAB and are well-known producers of antimicrobial peptides called bacteriocins, with the ability to inhibit (bacteriostatic) or kill (bactericidal) the growth of similar or closely related bacterial strains (Cleveland et al., 2001). Several strains of *Ent. faecium* are reported to produce more than one enterocin. The examples include enterocin A from *Ent. faecium* CTC492 (Aymerich et al., 1996), enterocin B from *Ent. faecium* T136 (Casaus et al., 1997), enterocin P from *Ent. faecium* P13 (Cintas et al., 1997), and enterocins L50A and L50B from *Ent. faecium* L50 (Cintas et al., 1998). Several researchers dealing with the application of bacteriocins have focused on the use of bacteriocins or probiotics to control the spoilage microorganisms and foodborne pathogens, displaying a potential application in food preservation and in prevention or treatment of other diseases in hosts. The aim of the present study was to evaluate the primary probiotic properties of bacteriocin-like substance (BLS) producer

Ent. faecium CE5-1 isolated from GIT of Thai indigenous chickens and its usage in the control of antibiotic-resistant enterococci.

MATERIAL AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions

Ent. faecium CE5-1 was isolated from the GIT of Thai indigenous chickens (not fed with commercial feed). The procedure is described further in the following text. Parts of organs containing crop (small intestine, caecum, and large intestine) were homogenized with sterile normal saline (0.85% NaCl) and spread onto MRS agar (MRS broth, Hi Media Laboratory Pvt. Ltd., Mumbai, India) (pH 6.5). After 24 h of incubation at 37°C, the plates were overlaid with 10 ml of soft MRS agar containing *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM1157 as an indicator strain and incubated at 37°C for 24 h under anaerobic conditions. Colonies exhibiting the inhibition zone were isolated and purified by 2–3 times re-streaking on MRS agar. To verify bacteriocin-like substance (BLS) production, the supernatants of each strain were adjusted to pH 6.5–7.0, treated with catalase and proteolytic enzyme and used for antibacterial determination by agar well diffusion assay. Only the strain CE5-1 produced BLS and it was identified as *Ent. faecium* based on 16S rDNA sequence analysis. The 16S rDNA sequence was deposited in the DNA Data Bank of Japan (DDBJ) with accession No. DDBJ ID: AB512765.

The bacterial strains used as indicator for the inhibition study are listed in Table 1. All the LAB strains were grown in MRS broth (pH 6.5 ± 0.2) at 37°C for 24 h. Other indicator strains were grown in Brain heart infusion broth (BHI broth; Hi Media Laboratory Pvt. Ltd., Mumbai, India) at 37°C for 24 h. All the strains were maintained at –20°C in a medium containing 25% glycerol. Working cultures were grown at 37°C in appropriate media at least twice before use.

Characterization of primary probiotic properties of *Ent. faecium* CE5-1

The effects of simulated gastric juice and bile on the growth of *Ent. faecium* CE5-1 were tested. Briefly, 1 mm of overnight culture of *Ent. faecium* CE5-1 was centrifuged in an Eppendorf

Table 1. Antagonistic activity of cell-free supernatants of *Enterococcus faecium* CE5-1 determined by agar well diffusion assay

Species	Strain code	Source	Radius of inhibition zone (mm)
<i>Bacillus cereus</i>	DMST5040	DMST	0
<i>Enterococcus durans</i>	3L20	our strain collection	1.5
<i>Enterococcus faecalis</i>	2L24	our strain collection	1.0
<i>Enterococcus faecalis</i>	VanB*	CU	2.0
<i>Enterococcus faecium</i>	139*	CU	0
<i>Enterococcus faecium</i>	174*	CU	1.5
<i>Enterococcus faecium</i>	348*	CU	1.5
<i>Enterococcus faecium</i>	4S13	our strain collection	1.5
<i>Enterococcus faecium</i>	8S16	our strain collection	2.0
<i>Enterococcus faecium</i>	CE5-1	our strain collection	0
<i>Enterococcus faecium</i>	L7-45	our strain collection	2.2
<i>Enterococcus gallinarum</i>	VanC*	CU	2.0
<i>Escherichia coli</i>	DMST4212	DMST	0
<i>Lactobacillus plantarum</i>	D6SM3	our strain collection	0
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp <i>sakei</i>	JCM1157	JCM	6.0
<i>Listeria monocytogenes</i>	DMST17303	DMST	5.0
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	3CE27	our strain collection	3.0
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	DMST18752	DMST	0
<i>Salmonella</i> Typhimurium	DMST16809	DMST	0
<i>Salmonella</i> Enteritidis	DMST15676	DMST	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	DMST8840	DMST	0
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	DMST5665	DMST	0

DMST = Department of Medical Sciences, CU = The WHO Global Salm-Surv Regional Centre of Excellence: South-East Asia and Western Pacific, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Thailand, JCM = Japan Collection of Microorganisms

*antibiotic resistant *Enterococcus* strains

Centrifuge 5415R (Eppendorf, Hamburg, Germany) at 12 000 *g* for 10 min. Pellets were washed twice with sterile saline before being re-suspended in either simulated gastric juice containing 3 mg/ml pepsin (Fluka, Steinheim, Germany) at pH 2.5 and 3.0 for 2 h or in simulated intestinal fluid. Simulated intestinal fluid containing 1 mg/ml pancreatin (Sigma-Aldrich GmbH, Hamburg, Germany) and various concentrations of fresh chicken bile (1, 3, 5, and 7%) were used at pH 8.0 for 6 h. The viable counts were determined by the drop plate method on MRS agar (modified from Madureira et al., 2005).

Survival of *Ent. faecium* CE5-1 in simulated intestinal juice after incubation in simulated gastric juice was tested. 1 mm of the selected strains was centrifuged in an Eppendorf centrifuge at 12 000 *g* for 10 min. This was then washed twice with sterile saline before being re-suspended in simulated

gastric juice with a pH value of 3.0. The tubes were incubated at 37°C for 2 h. After incubation, viable bacterial counts were determined by the drop plate method on MRS agar. After gastric digestion, cells were harvested and suspended in simulated intestinal fluid which contained 7% of fresh chicken bile at pH 8.0. The suspension was incubated at 37°C for 6 h and the viable counts were determined by the drop plate method on MRS agar (modified from Madureira et al., 1993).

Antibiotic resistance of *Ent. faecium* CE5-1

The antibiotic resistance of *Ent. faecium* CE5-1 and *Enterococcus* strains is listed in Table 4. This was detected by broth microdilution assay following the method described by Parente et al. (1995).

A two-fold dilution of each antibiotics listed in Table 4 was prepared in a 96-well microtiter plate by using MRS broth as the diluents (final volume was 100 ml). Then, 100 ml of culture broths of each enterococci were added into each well (final concentration was 10^4 CFU/ml). The microtiter plate cultures were incubated at 37°C and after 24 h the growth inhibition of the indicator strain was measured by optical density at 660 nm (OD_{660}) in a microplate reader Powerwave X (BioTek Instruments, Winooski, USA). A positive control was obtained by the use of 100 ml of MRS broth and 100 ml of each culture broth. A negative control contained 200 ml of MRS broth without the LAB strain. The percentage of inhibition was expressed by the following equation:

Inhibition (%) = $[(OD_{660}$ in the positive control group – OD_{660} in the group)/ OD_{660} in the positive control group] $\times$ 100

Minimal inhibitory concentration (MIC) is defined as the lowest concentration of the sample tested that could restrict bacterial growth at an inhibition rate higher than 90%. To determine minimal bactericidal concentration (MBC), aliquots (10 ml) of each well at MIC and higher than the MIC were subcultured on MRS agar. MBC is defined as the lowest concentration that allowed no visible growth on the MRS agar (Almeida et al., 2008).

It was observed that bacteria develop antibiotic resistance. The following may be considered in terms of resistance to the antibiotics: when MICs are < 8 mg/ml, the bacteria may be classified as “susceptible”; when the MICs are $\geq$ 8 mg/ml, they may be classified as “moderately resistant”; and when the MICs are above 32 mg/ml, they may be classified as “clinically resistant” (D’Aimmo et al., 2007).

Growth curve and BLS production of *Ent. faecium* CE5-1

1 l of MRS broth was inoculated with 2.5% of an overnight culture of *Ent. faecium* CE5-1 and incubated at 37°C with agitation at 100 rpm. At 3 h intervals, pH and growth by absorbance at 660 nm were measured. The antimicrobial activity was calculated as arbitrary units (AU/ml) defined as the inverse of the highest twofold dilution showing a growth inhibition divided by the sample volume.

Effect of antibacterial activity of BLS against bacterial indicators

Ent. faecium CE5-1 was grown in MRS broth at 37°C for 15 h. Cells were removed by centrifugation at 12 000 g at 4°C for 10 min and supernatant was collected. The cell-free supernatants (CS) of *Ent. faecium* CE5-1 were adjusted to pH 6.5–7.0 with 0.1N NaOH and used for the determination of the antibacterial activity of the BLS using the method of agar well diffusion assay as described by Schillinger and Lücke (1989).

PCR detection of enterocin structural gene

The genomic DNA of *Ent. faecium* CE5-1 was extracted and purified using the Genomic DNA Mini Kit (Geneaid, Tao-Yuan, Taiwan). The sequences of primers used for PCR-amplification of the structural genes of enterocin A (*entA*), enterocin B (*entB*), enterocin P (*entP*), enterocin L50B (*entL50B*), and

Table 2. Primers used in the study

Primers	Sequence	Reference
EntA	F 5'-GGTACCACTCATAGTGGAAA-3' R 5'-CCCTGGAAATTGCTCCACCTAA-3'	Aymerich et al. (1996)
EntB	F 5'-GCTACGCGTTTCATATGGTAAT-3' R 5'-TCCTGCAATATCTCTTTAGC-3'	Casaus et al. (1997)
EntP	F 5'-CAAAATGTAAAAGAATTAAGATCG-3' R 5'-AGAGTATACATTTGCTAACCC-3'	Cintas et al. (1997)
EntL50B	F 5'-ATGGGAGCAATCGCAAAATTA-3' R 5'-TAGCCATTTTCAATTTGATC-3'	Cintas et al. (1998)
EntIIa	F 5'-TAYGGIAAYGGIGTITAYTG-3' R 5'-CYTCDATNGCRTTRTC-3'	Yi et al. (2010)

F = forward primer, R = reverse primer

enterocin IIa (*entIIa*) are shown in Table 2. The PCR reaction of *entA* detection was composed of the following steps: initial denaturation at 95°C for 5 min and then performed in 30 cycles of denaturation at 95°C for 30 s; annealing at 58°C for 30 s and extension at 72°C for 30 s; and a final extension at 72°C for another 5 min, then immediate cooling at 4°C. The same profile was used for *entB*, *entP*, and *entL50B* detection, but the annealing temperature was 56°C (Lauková et al., 2008). For *entIIa*, the amplification program was as follows: 94°C for 5 min; 30 cycles at 94°C for 1 min; and 51°C for 40 s, 72°C for 3 min with a final extension at 72°C for 10 min (Yi et al., 2010). After PCR amplification, PCR products were separated by 2% agarose gel electrophoresis and visualized under UV light after staining with SYBR® Gold nucleic acid gel stain (Invitrogen, Eugene, USA). The PCR product was then gel-purified before sequencing. Finally, the nucleotide sequences were compared to the sequence database of GenBank through a BLAST search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Effect of co-culturing of *Ent. faecium* CE5-1 with antibiotic-resistant *Enterococcus* in MRS broth

The overnight cultures of BLS producer (*Ent. faecium* CE5-1) and each antibiotic-resistant *Enterococcus* (*Ent. faecalis* VanB or *Ent. gallina-*

rum VanC) were added to 200 ml of MRS broth. The initial cell density of each strain was approximately 10⁶ CFU/ml. Then the mixture of cultures was incubated at 37°C. Samples were taken at 6 h intervals. The viability of the antibiotic-resistant enterococci was assessed by using the drop plate method in triplicate onto MRS agar containing 100 mg/ml of tetracycline and incubated at 37°C for 24–48 h. The total LAB of the mixture cultures were determined in MRS agar. Similarly, the control consisted of the separate strain in 200 ml of MRS broth and incubated under the same conditions.

RESULTS AND DISCUSSION

Characterization of primary probiotic properties of *Ent. faecium* CE5-1

The GIT is the major location affecting the viability of LAB cells. Most bacteria do not survive well at low pH values (Lin et al., 2006). Consequently, the application of LAB as feed additives should be tested for the probiotics profiles such as tolerance to acid and bile salt conditions, adhesion to the intestine epithelium of the hosts, and antimicrobial activity against pathogenic bacteria. In this sense, the low pH of the stomach and the antimicrobial action of pepsin are known to provide an effective

Table 3. Survival of *Enterococcus faecium* CE5-1 in the simulated gastric and intestinal juice

Treatment		Viable count (log CFU/ml)				
		simulated gastric juice		simulated intestinal juice		
		0 h	2 h	0 h	3 h	6 h
pH	pH 7.0	9.14 ± 0.10	9.38 ± 0.04	nd	nd	nd
	pH 3.0	9.18 ± 0.08	9.38 ± 0.04	nd	nd	nd
	pH 2.5	9.14 ± 0.09	7.46 ± 0.08	nd	nd	nd
Fresh chicken bile concentration (%)	0	nd	nd	8.93 ± 0.05	9.04 ± 0.03	9.06 ± 0.02
	1	nd	nd	8.73 ± 0.11	9.20 ± 0.13	9.16 ± 0.02
	3	nd	nd	9.32 ± 0.03	9.45 ± 0.03	9.39 ± 0.03
	5	nd	nd	9.47 ± 0.03	9.39 ± 0.04	9.27 ± 0.02
	7	nd	nd	9.41 ± 0.04	9.28 ± 0.02	9.14 ± 0.03
Sequential incubation in the simulated gastric and intestinal juice	control*	9.25 ± 0.02	9.36 ± 0.05	9.36 ± 0.05	9.44 ± 0.02	9.42 ± 0.01
	7% FCB	9.28 ± 0.03	9.21 ± 0.01	9.21 ± 0.01	8.84 ± 0.07	8.78 ± 0.06

*sequential incubation in the simulated gastric juice at pH 3.0 and in the intestinal juice without fresh chicken bile (FCB)
nd = not detected

barrier against the entry and survival of bacteria in the intestinal tract (Huang and Adams, 2004).

In the present study, the viability of the *Ent. faecium* CE5-1 was determined after a 2 h incubation in simulated gastric juice (pH 2.5 and 3.0) containing pepsin. *Ent. faecium* CE5-1 exhibited good survival (9.38 log CFU/ml) at pH 3.0 and retained a moderate rate of survival (7.46 log CFU/ml) at pH 2.5 after 2 h of incubation (Table 3). The acid tolerance of LAB depends on the pH profile of H⁺-ATPase and on the composition of the cytoplasmic membrane. This is largely influenced by the type of bacterium, the growth medium, and the incubation conditions (Hood and Zoitola, 1988).

Bacterial resistance to acid in the pH range of 2.5–3.0 is desirable for probiotic cultures. What should also be born in mind is that the combination of probiotic bacteria with other food ingredients present in food products may improve the viability of microorganisms during gastric transit. This is because of the protection exerted by certain food components leading to an enhanced gastric survival (Charteris et al., 1998; Wang et al., 1999; Zárate et al., 2000; Huang and Adams, 2004).

Bile salt tolerance is considered to be one of the essential properties required for LAB to survive in the small intestine (Park et al., 1998; Hosseini et al., 2009). The concentration of bile salt is the key factor which affects the viability of LAB. The concentration of bile intestinal contents of animals is dependent on the age and the foods or feeds taken in (Lin et al., 2007). Most *Lb. fermentum* isolated from swine and poultry were acid tolerant in the pH 2.6–3.2 gastric juice but less strains were bile intolerant (Lin et al., 2007). *Ent. faecium* SH328, *Ent. faecium* SH632, and *P. pentosaceus* SH740 isolated from GIT of broiler chickens were resistant to 0.5% bile salts and remained viable after 2 h at pH 3.0 (Shin et al., 2008).

In the present study, *Ent. faecium* CE5-1 showed good survival in the presence of 1, 3, 5, and 7% fresh chicken bile (Table 3). The probable reason for this was that the bacteria isolated from animal intestines have had more chance to be exposed to bile salts (Tanaka et al., 1999). Bile salts at high concentrations can rapidly dissolve membrane lipids and cause dissociation of integral membrane proteins resulting in the leakage of cell contents and cell death (Begley et al., 2005). It has been suggested that the major effect of bile acids would be the disaggregation of the lipid bilayer structure of the cell membrane. The tolerance to bile salts was initially associated

with the presence of bile salt hydrolase activity (Moser and Savage, 2001; Taranto et al., 2006).

The two stresses resulting from stomach transit and small intestinal transit might interact and thereby affect the viability of the strains in a synergistic fashion. Therefore, it is important to evaluate all components (enzymes, low pH, bile salts, and food vehicle) in one system, rather than to evaluate the effect of each component in separate experiments. In this investigation the effect of exposure to gastric juice was combined with the following effects of exposure to bile salts on the viability of the probiotic strain. *Ent. faecium* CE5-1 could survive in the sequential study by showing a survival of 8.78 log CFU/ml (Table 3). These results indicate that *Ent. faecium* CE5-1 may resist the effects of pepsin during gastric transit and may also be intrinsically resistant to the action of pancreatin during the small intestinal transit. Overall, *Ent. faecium* CE5-1 showed high capacity of upper gastrointestinal transit tolerance and could provide an alternative source to enterococci for future probiotic development.

Antibiotic resistance of *Ent. faecium* CE5-1

Our enterococci were observed to be clinically resistant to chloramphenicol, streptomycin, and tetracycline (Table 4). On the other hand, they were susceptible to erythromycin, penicillin G, and vancomycin. *Ent. faecalis* VanB and *Ent. gallinarum* VanC were strongly resistant to almost all antibiotics tested in this study. In addition, *Ent. faecium* 139 was strongly susceptible to almost all tested antibiotics. However, *Ent. faecium* CE5-1 isolated from the GIT of Thai indigenous chicken was less resistant to tested antibiotics when compared with other strains. Robredo et al. (2000) established that vancomycin-resistant enterococci (VRE) were found in chicken products and were identified as *Ent. duran* ($n = 11$), *Ent. faecalis* ($n = 10$), *Ent. faecium* ($n = 10$), and *Ent. hirae* ($n = 2$). The increased use of antibiotics in poultry production to treat infection and as a growth promoter in feed has led to the problem of the development of antibiotic resistance in recent years (Apata, 2009).

Growth curve and BLS production from *Ent. faecium* CE5-1

The highest antimicrobial activity of *Ent. faecium* CE5-1 (320 AU/ml) was reached at 15 h during

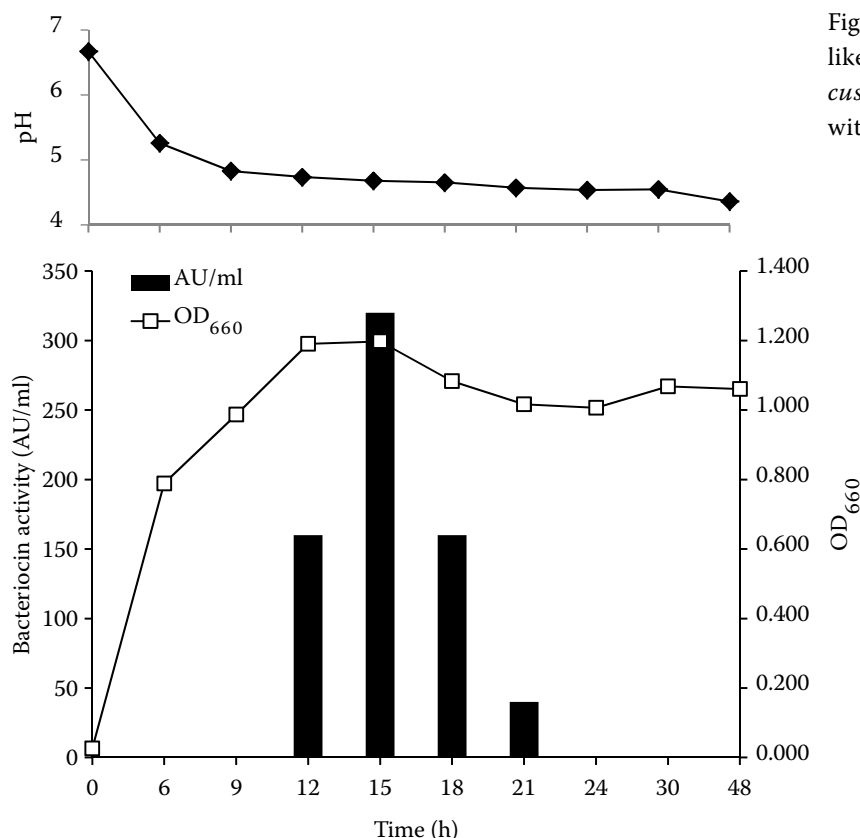


Figure 1. Growth curve and bacteriocin-like substance production of *Enterococcus faecium* CE5-1 in 1 l of MRS broth with agitation (100 rpm) at 37°C

the early stationary phase (Figure 1). However, it sharply decreased after 15 h of cultivation. This may be because of the digestion of the antagonistic compound by proteolytic enzyme released from the cells (He et al., 2006) or the binding of bacteriocin to producer cells (Todorov and Dicks, 2009). A decrease in the bacteriocin activity has also been observed for bacteriocins produced by *Ent. faecium* MMRA (Rehaïem et al., 2009), *Leuconostoc mesenteroides* E131 (Xiraphi et al., 2008), and *Lb. acidophilus* (Karthikeyan and Santhosh, 2009). On the other hand, bacteriocin production of *Ent. faecium* MMT21 was detected from the early logarithmic phase of growth; this reached a maximum at the end of exponential phase and remained constant until 34 h of incubation (Ghraiiri et al., 2008).

In the same way, the pH strongly decreased from the initial pH 6.7 to around 4.8 in 9 h during the logarithmic growth and slightly decreased towards the end of incubation (pH 4.3 at 28 h). The decreasing of pH during the growth rate was usually found in the fermentation of LAB, the most common being lactic acid, acetic acid, propionic acid, and carbon dioxide (Salminen and Wright, 1998). Similar results have been reported for bacteriocin ST311LD production by *Ent. faecium* ST311LD, where the pH decreased from 6.2 to 4.4 (Todorov and Dicks, 2005).

Effect of antibacterial activity of BLS against bacterial indicators

The CS of *Ent. faecium* CE5-1 adjusted to pH 6.5–7.0 were observed to show a narrow spectrum of activity towards the strains tested (Table 1). It could inhibit almost all LAB strains and some Gram-positive bacteria such as *Enterococcus* strains, *P. pentosaceus* 3CE27, *Lb. sakei* subsp *sakei* JCM1157, and *L. monocytogenes* DMST17303. However, no activity was observed against *B. cereus* DMST5040, *Lb. plantarum* D6SM3, *P. pentosaceus* DMST18752, *Stap. aureus* DMST8840, and all tested Gram-negative bacteria. That no activity was shown against Gram-negative bacteria may be due to the relative impermeability of their outer membranes (Jack et al., 1995). Rehaïem et al. (2009) reported that CS of *Ent. faecium* MMRA could inhibit *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, and *Listeria* species, but there was no inhibition of Gram-negative bacteria, *Hafnia*, *Serratia*, and *E. coli*. Moreover, the largest inhibition zones were observed against *Lb. subsp sakei* JCM1157. Thus, *Lb. sakei* subsp *sakei* JCM1157 was used as an indicator for the determination of antimicrobial activity for our study.

Furthermore, CS of *Ent. faecium* CE5-1 showed inhibition against antibiotic-resistant enterococci

Antibiotics ($\mu\text{g/ml}$)

Bacterial species	Chloramphenicol		Erythromycin		Penicillin G		Streptomycin		Tetracycline		Vancomycin	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Ent. faecium</i> 139	10	320	1.25	40	1.25	5	80	160	< 0.625	40	1.25	40
<i>Ent. faecium</i> 174	80	1.282	5	40	20	20	> 1.282	> 1.282	160	> 1.282	2.5	80
<i>Ent. faecium</i> 348	80	> 1.282	2.5	80	10	40	> 1.282	> 1.282	> 1.282	> 1.282	1.25	40
<i>Ent. faecalis</i> VanB	80	80	320	> 1.282	10	80	1.282	> 1.282	40	> 1.282	160	> 1.282
<i>Ent. gallinarum</i> VanC	160	> 1.282	160	> 1.282	10	40	> 1.282	> 1.282	80	> 1.282	10	80
<i>Ent. faecium</i> CE5-1	10	320	2.5	40	1.25	2.5	320	640	< 0.625	40	1.25	40

strains including *Ent. faecium* 174, *Ent. faecium* 348, *Ent. gallinarum* VanC, and *Ent. faecalis* VanB except for *Ent. faecium* 139 and *Ent. faecium* CE5-1 itself. However, it was normally observed that bacteriocin from the producer's organism had no inhibitory effect on the organism producing it. This was due to the presence of structural enterocin A gene (*entA* gene) and the immunity enterocin A gene (*imentA* gene) located on the genomic DNA of *Ent. faecium* CE5-1 (data not shown). These results suggest that a BLS from *Ent. faecium* CE5-1 could possibly be used to control antibiotic-resistant enterococci infections.

The results indicate that only the enterocin A gene was successfully detected in *Ent. faecium* CE5-1 (Figure 2). The PCR product was approximately 138 bp. After sequencing of the 138 bp PCR product, it exhibited 100% homology with the enterocin A gene of *Ent. faecium* E9 in the GenBank sequence database. Similar results showing the presence of structural *entA* gene in *Enterococcus* strains isolated from animal, food, and feed were observed by Strompfová et al. (2008). Enterocin A was first characterized by Aymerich et al. (1996). It was grouped in the class IIa subgroup of class II bacteriocin, otherwise known as pediocin-like bacteriocin, and had high anti-listerial activity (O’Keeffe et al., 1999). However, the presence of structural *entA* gene in genomic DNA of *Ent. faecium* CE5-1 does not necessarily mean the production of the corresponding enterocin A. In order to confirm the production of enterocin A from *Ent. faecium* CE5-1 it would be necessary to purify antimicrobial peptide in the future.

Competition between *Ent. faecium* CE5-1 and the antibiotic-resistant *Ent. faecalis* VanB and *Ent. gallinarum* VanC was brought during their co-culture in 200 ml of MRS broth at 37°C. The results showed that the viability of both *Ent. faecalis* VanB and *Ent. gallinarum* VanC strongly declined from an initial 6.68 to 4.29 log CFU/ml (Figure 3a) and 6.76 to 4.31 log CFU/ml (Figure 3b), respectively. This was after

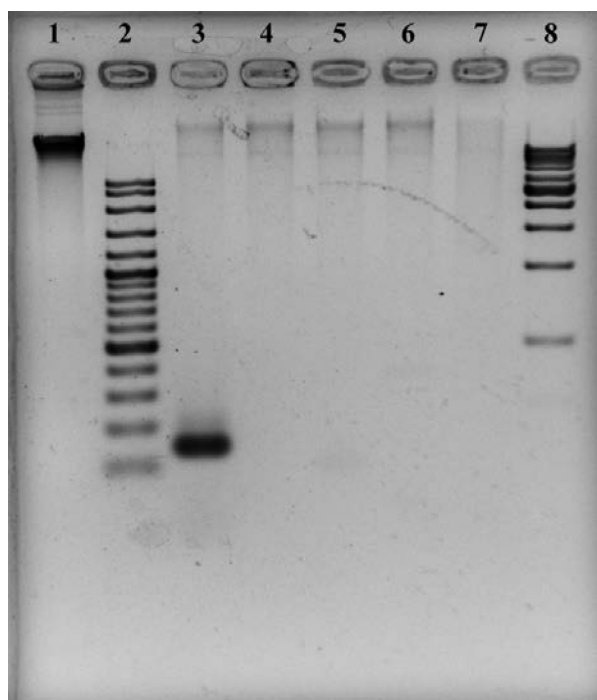


Figure 2. Agarose gel electrophoresis of polymerase chain reaction products of the bacteriocin encoding gene from *Enterococcus faecium* CE5-1 obtained using enterocins specific primer

1 = chromosomal DNA of *Enterococcus faecium* CE5-1, 2 = 100 bp DNA ladder, 3 = enterocin A, 4 = enterocin B, 5 = enterocin P, 6 = enterocin L50B, 7 = enterocin IIa, 8 = 1 kb DNA ladder

12 h of cultivation and the count decreased slightly after 12 h of cultivation in a co-culture.

This is the first report on using *Ent. faecium* as a probiotic strain to control antibiotic-resistant enterococci. Almost all researchers have been interested in using *Ent. faecium* or enterocin to control food-borne pathogens such as *L. monocytogenes*. *Ent. faecium* MMRA supernatant reduced *L. ivanovii* BUG 496 at 60 AU/ml (Rehaiem et al., 2009). In the same way, the number of cells of *L. innocua* LMG 13568 decreased from 4.8×10^3 CFU/ml to 2.0×10^2 CFU/ml for 32 h in a co-culture of *Ent. mundtii* ST4SA and *L. innocua* LMG 13568 (Todorov and Dicks, 2009).

CONCLUSION

This study suggests that BLS-producing *Ent. faecium* CE5-1 showed better tolerance to simulate

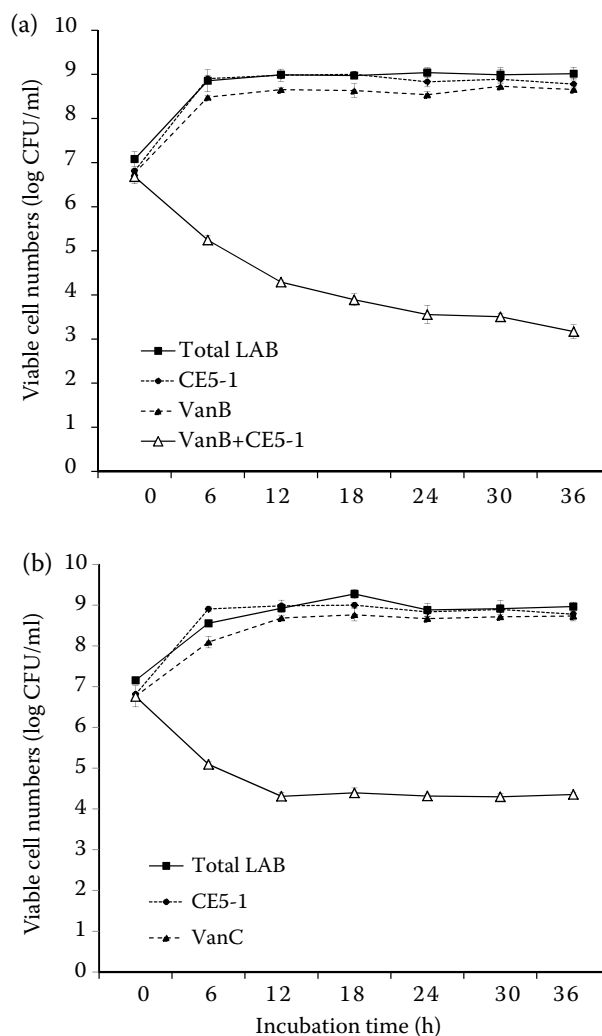


Figure 3. Growth of the inoculated indicators in *Enterococcus faecium* CE5-1 culture

(a) growth of the *Ent. faecalis* VanB in MRS broth with *Ent. faecium* CE5-1, (b) growth of the *Ent. gallinarum* VanC in MRS broth with *Ent. faecium* CE5-1

gastric juice in pH 2.5 and to simulate intestinal juice which contained 7% of fresh chicken bile at pH 8.0. It was sensitive to tetracycline, erythromycin, penicillin G, and vancomycin. The culture supernatant showed activity against *L. monocytogenes* DMST17303, *P. pentosaceus* 3CE27, *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM1157, and antibiotic-resistant enterococci strains. It may be concluded that *Ent. faecium* CE5-1 can be used as a probiotic strain for antibiotic-resistant enterococci control in chickens in the future. However, biochemical and genetic characteristics of the BLS produced from *Ent. faecium* CE5-1 should be studied, too.

REFERENCES

- Abriouel H., Lucas R., Omar N.B., Valdivia E., Maqueda M., Martínez-Cañamero M., Gálvez A. (2005): Enterocin AS-48RJ: A variant of enterocin AS-48 chromosomally encoded by *Enterococcus faecium* RJ16 isolated from food. *Systematic and Applied Microbiology*, 28, 387–397.
- Almeida L.S.B., Murata R.M., Yatsuda R., Dos Santos M.H., Nagem T.J., Alencar S.M., Koo H., Rosalen P.L. (2008): Antimicrobial activity of *Rheedia brasiliensis* and 7-epiclusianone against *Streptococcus mutans*. *Phytomedicine*, 15, 886–891.
- Apata D.F. (2009): Antibiotic resistance in poultry. *International Journal of Poultry Science*, 8, 404–408.
- Aymerich T., Holo H., Havarstein L.S., Hugas M., Garriga M., Nes I. (1996): Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 1676–1682.
- Begley M., Gahan C.M.G., Hill C. (2005): The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 625–651.
- Casaus P., Nilsen T., Cintas L.M., Nes I.F., Hernandez P.E., Holo H. (1997): Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology*, 143, 2287–2294.
- Charteris W.P., Kelly P.M., Morelli L., Collins J.K. (1998): Development and application of an *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, 84, 759–768.
- Cintas L.M., Casaus P., Havarstain L.V., Hernandez P.E., Nes I.F. (1997): Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with abroad antimicrobial spectrum. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 4321–4330.
- Cintas L.M., Casaus P., Holo H., Hernandez P.E., Nes I.F., Havarstain L.S. (1998): Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50 are related to staphylococcal haemolysins. *Journal of Bacteriology*, 180, 1988–1994.
- Cleveland J., Montville T.J., Nes I.F., Chikinda M.L. (2001): Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 71, 1–20.
- D'Aimmo M.R., Modesto M., Biavati B. (2007): Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* spp. isolated from dairy and pharmaceutical products. *International Journal of Food Microbiology*, 115, 35–42.
- De Vuyst L., Degeest B. (1999): Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 23, 153–177.
- Franz C.M.A.P., Holzapfel W.H., Stiles M.E. (1999): Enterococci at the crossroads of food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 47, 1–24.
- Franz C.M.A.P., van Belkum M.J., Holzapfel W.H., Abriouel H., Gálvez A. (2007): Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiology Reviews*, 31, 293–310.
- Fuller R. (1989): Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66, 365–378.
- Ghrai T., Frere J., Berjeaud J.M., Manai M. (2008): Purification and characterisation of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* from Tunisian rigouta cheese. *Food Control*, 19, 162–169.
- He L., Chen W., Liu Y. (2006): Production and partial characterization of bacteriocin-like peptides by *Bacillus licheniformis* ZJU12. *Microbiology Research*, 161, 321–326.
- Hood S.K., Zoitola E.A. (1988): Effect of low pH on the ability of *Lactobacillus acidophilus* to survive and adhere to human intestinal cells. *Journal of Food Science*, 53, 1514–1516.
- Hosseini S.V., Arlindo S., Böhme K., Fernández-No C., Calomata P., Barros-Velázquez J. (2009): Molecular and probiotic characterization of bacteriocin producing *Enterococcus faecium* strains isolated from nonfermented animal foods. *Journal of Applied Microbiology*, 107, 1392–1403.
- Huang Y., Adams M.C. (2004): *In vitro* assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 91, 253–260.
- Jack R.W., Tagg J.R., Ray B. (1995): Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiology Reviews*, 59, 171–200.
- Karthikeyan V., Santhosh S.W. (2009): Study of bacteriocin as a food preservative and the *L. acidophilus* strain as probiotic. *Pakistan Journal of Nutrition*, 8, 335–340.
- Klare I., Konstabel C., Badstübner D., Werner G., Witte W. (2003): Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 269–290.
- Lauková A., Stropfová V., Simonová M., Štyriak I., Swiecicka I. (2008): Species of *Enterococcus faecalis* associated with free-living rodents. *Folia Microbiologica*, 53, 173–178.
- Lin W.H., Hwang C.F., Chen L.W., Tsen H.Y. (2006): Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products. *Food Microbiology*, 23, 74–81.
- Lin W.H., Yu B., Jang S.H., Tsen H.Y. (2007): Different probiotic properties for *Lactobacillus fermentum* strains isolated from swine and poultry. *Anaerobe*, 13, 107–113.

- Madureira A.R., Pereira C.I., Truszkowska K., Gomes A.M., Pintado M.E., Malcata F.X. (2005): Survival of probiotic bacteria in a whey cheese vector submitted to environmental conditions prevailing in the gastrointestinal tract. *International Dairy Journal*, 15, 921–927.
- Moser S.A., Savage D.C. (2001): Bile salt hydrolase activity and resistance to toxicity of conjugated bile salts are unrelated properties in lactobacilli. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 3476–3480.
- Musikasang H., Tani A., H-kittikun A., Maneerat S. (2009): Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from chicken gastrointestinal digestive tract. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, 1337–1345.
- Ogier J.C., Serror P. (2008): Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus. *International Journal of Food Microbiology*, 126, 291–301.
- O’Keeffe T., Hill C., Ross R.P. (1999): Characterization and heterologous expression of the genes encoding enterocin A production, immunity, and regulation in *Enterococcus faecium* DPC1146. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 1506–1515.
- Parente E., Brienza C., Moles M., Ricciardi A. (1995): A comparison of methods for the measurement of bacteriocin activity. *Journal of Microbiological Methods*, 22, 95–108.
- Park H.S., Lee S.H., Uhm T.B. (1998): Selection of microorganisms for probiotics and their characterization. *Korean Journal of Food Science and Nutrition*, 27, 433–440.
- Rehaïem A., Martínez B., Manai M., Rodríguez A. (2009): Production of enterocin A by *Enterococcus faecium* MMRA isolated from ‘Rayeb’, a traditional Tunisian dairy beverage. *Journal of Applied Microbiology*, 108, 1685–1993.
- Robredo B., Singh K., Baquero F., Murray B., Torres C. (2000): Vancomycin-resistant enterococci isolated from animal and food. *International Journal of Food Microbiology*, 54, 197–204.
- Salminen S., Wright A. (1998): Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects. 2nd Ed. Marcel Dekker, Inc., New York, USA.
- Schillinger U., Lücke F.K. (1989): Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 1901–1906.
- Shin M.S., Han S.K., Ji A.R., Kim K.S., Lee W.K. (2008): Isolation and characterization of bacteriocin-producing bacteria from the gastrointestinal tract of broiler chickens for probiotic use. *Journal of Applied Microbiology*, 105, 2203–2212.
- Souza M.R., Moreira J.L., Barbosa F.H.F., Cerqueira M.M.O.P., Nunes A.C., Nicoli J.R. (2007): Influence of intensive and extensive breeding on lactic acid bacteria isolated from *Gallus gallus domesticus* ceca. *Veterinary Microbiology*, 120, 142–150.
- Strompfová V., Lauková A. (2007): *In vitro* study on bacteriocin production of *Enterococci* associated with chickens. *Anaerobe*, 13, 228–237.
- Strompfová V., Lauková A., Simonová M., Marciňáková M. (2008): Occurrence of the structural enterocin A, P, B, L50B genes in enterococci of different origin. *Veterinary Microbiology*, 132, 293–301.
- Tanaka H., Doesburg K., Iwasaki T., Mierau I. (1999): Screening of lactic acid bacteria for bile salt hydrolase activity. *Journal of Dairy Science*, 82, 2530–2535.
- Taranto M.P., Perez-Martinez G., de Valdez G.F. (2006): Effect of bile acid on the cell membrane functionality of lactic acid bacteria for oral administration. *Research in Microbiology*, 157, 720–725.
- Todorov S.D., Dicks L.M.T. (2005): Optimization of bacteriocin ST311LD production by *Enterococcus faecium* ST311LD, isolated from spoiled black olives. *Journal of Microbiology*, 43, 370–374.
- Todorov S.D., Dicks L.M.T. (2009): Effect of modified MRS medium on production and purification of antimicrobial peptide ST4SA produced by *Enterococcus mundtii*. *Anaerobe*, 15, 65–73.
- Wang X., Brown I.L., Evans A.J., Conway P.L. (1999): The protective effects of high amylose maize (amylomaize) starch granules on the survival of *Bifidobacterium* spp. in the mouse intestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, 87, 631–639.
- Xiraphi N., Georgalaki M., Rantsiou K., Cocolin L., Tsakalidou E., Drosinos E.H. (2008): Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* E131. *Meat Science*, 80, 194–203.
- Yi H., Zhang L., Tuo Y., Han X., Du M. (2010): A novel method for rapid detection of class IIa bacteriocin-producing lactic acid bacteria. *Food Control*, 21, 426–430.
- Zárate G., Chaia A.P., González S., Oliver G. (2000): Viability and beta-galactosidase activity of dairy propionibacteria subjected to digestion by artificial gastric and intestinal fluids. *Journal of Food Protection*, 63, 1214–1221.

Received: 2011–12–02

Accepted after corrections: 2012–03–30

Corresponding Author

Dr. Suppasil Maneerat, Prince of Songkla University, Faculty of Agro-Industry, Department of Industrial Biotechnology, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand
Tel. +66 74 286 379, fax +66 74 558 866, e-mail: suppasil.m@psu.ac.th
