บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การแยกแบคทีเรียกรดแลคติกเบื้องต้นที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินจากระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์

ผลการแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์ ที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซิน โดยทำการเก็บตัวอย่างจากอุจจาระคนและมูลสัตว์ชนิดต่าง ๆ เช่น มูลโค มูลไก่ และ มูลสุกร จำนวนทั้งสิ้น 25 ตัวอย่าง โดยวิธี direct plating แสดงผลดังภาพ 4 จากแบคทีเรียบนอาหารแข็งสูตร MRS ทั้งสิ้นจำนวน 26,765 โคโลนี พบว่า มีโคโลนีที่เกิดวงใสต่อเชื้อทดสอบจำนวน 66 โคโลนี (คิดเป็น 0.25 % เทียบกับจำนวนโคโลนีทั้งหมด) โดยพบผลบวกต่อเชื้อแบคทีเรียทดสอบ *Lactobacillus fermentum* JCM 1173, *Lactobacillus casei* JCM 1134, *Enterococcus durans* JCM 8725 และ *Pediococcus pentosaceus* MJU 78 จำนวน 27, 11, 12 และ 16 โคโลนี ตามลำดับ แสดงผลดังตาราง 3

ภาพ 4 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหาร บนอาหารแข็งสูตร MRS ที่มีวงใสต่อเชื้อทดสอบโดยวิธี direct plating ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

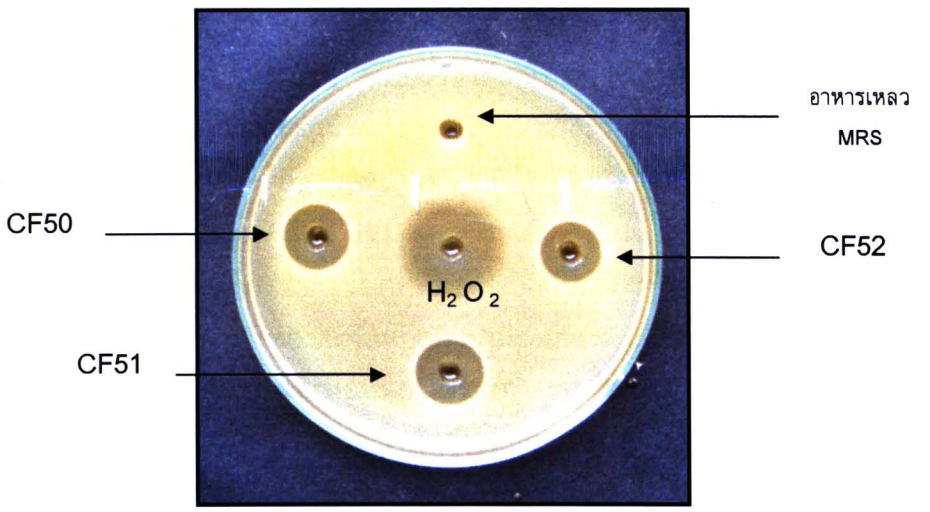
ตาราง 3 จำนวนส่วนโคโลนีที่เกิดวงใสเทียบกับจำนวนโคโลนีทั้งหมด

แหล่งตัวอย่าง	จำนวนโคโลนีทั้งหมด	จำนวนโคโลนีที่เกิดวงใสต่อแบคทีเรียทดสอบ			
		Lb. fermentum JCM 1173	*Lb. casei* JCM 1134	*E. faecium* JCM 8725	*P. pentosaceus* MJU 78
มนุษย์	7,251	-	3	5	8
ไก่	11,113	9	-	-	4
โค	697	16	7	5	1
สุกร	7,704	2	1	2	3
ทั้งหมด	26,765	27	11	12	16
%	100	จำนวนทั้งสิ้น 66 โคโลนี (0.25 %*)			

* % คำนวณจากจำนวนโคโลนีที่เกิดวงใสต่อเชื้อทดสอบเทียบกับจำนวนโคโลนีทั้งหมด x 100

2. การทดสอบฤทธิ์ของแบคเทอริโอซินในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ

เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 66 ไอโซเลท ที่เกิดวงใสต่อเชื้อทดสอบ มาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งของแบคเทอริโอซินต่อเชื้อทดสอบ จำนวน 36 ชนิด โดยวิธี well diffusion assay พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท CF50, CF51 และ CF52 ซึ่งแยกมาจากตัวอย่างมูลโค มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ 11 ชนิด ดังภาพ 5 และ ตาราง 4 แสดงการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งของแบคเทอริโอซิน โดยพบว่า มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติกในกลุ่มใกล้เคียงกัน เช่น *Lb. fermentum* JCM 1173 และ *E. durans* JCM 8725 เป็นต้น และแบคทีเรียแกรมบวกก่อโรคบางชนิด เช่น *L. monocytogenes* DMST 1327 และ *B. cereus* MJU เป็นต้น ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ Oh *et al.* (2000) ที่ได้ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Lb. acidophilus* 30SC พบว่า สามารถยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดอื่นในกลุ่มเดียวกันหรือกลุ่มใกล้เคียงกัน รวมทั้งแบคทีเรียก่อโรคแกรมบวกบางชนิดได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ อย่างไรก็ตาม จากรายงานผลวิจัยที่ผ่านมา พบว่า แบคเทอริโอซินบางชนิดมีฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ เช่น Enterocin 012 ผลิตโดยเชื้อ *E. gallinarum* ที่แยกมาจากลำไส้นกกระจอกเทศ มีฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ คือ *Clostridium perfringens*, *E. coli* OVI9476, *Pseudomonas aeruginosa* OVI2770 และ *S. typhimurium* OVI2812 (Jennes *et al.*, 2000) ซึ่ง แบคเทอริโอซินแต่ละชนิด มีฤทธิ์ในการยับยั้งต่อแบคทีเรียเป้าหมายต่างกัน



ภาพ 5 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งของแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียไอโซเลท CF50, CF51 และ CF52 ในการยับยั้ง *Lb. fermentum* JCM 1173 โดยวิธี well diffusion assay

ตาราง 4 ฤทธิ์การยับยั้งของแบคเทอริโอซินต่อเชื้อทดสอบโดยวิธี well diffusion assay

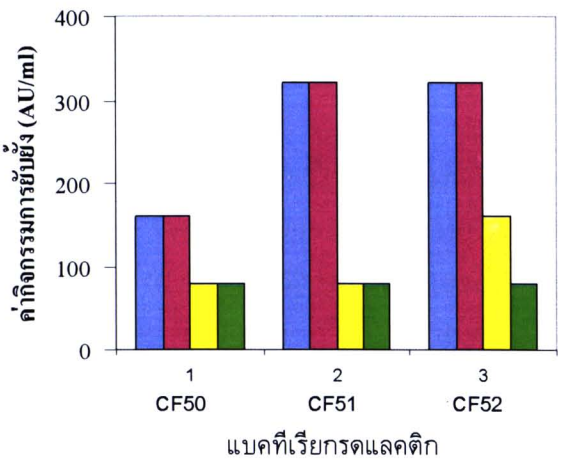
เชื้อทดสอบ	ฤทธิ์การยับยั้งของแบคเทอริโอซินต่อเชื้อทดสอบ		
	CF50	CF51	CF52
Lb. fermentum JCM 1173	+++	+++	+++
E. durans JCM 8725	++	++	++
E. gallinarum JCM 8728	++	++	+++
E. faecium MJU 92	+++	+++	+++
P. pentosaceus MJU 78	++	+++	+++
L. monocytogenes DMST 1327	+	++	+++
L. monocytogenes DMST 1783	+	++	++
L. monocytogenes DMST 2871	++	++	++
L. monocytogenes DMST 4553	++	++	++
B. cereus MJU	++	++	++
M. luteus MJU	+++	+++	+++

หมายเหตุ : Inhibition zone (mm): +++ (11-15); ++ (6-10) ; + (1-5) ; - (no inhibition)

3. การศึกษาลักษณะความคงตัวของแบคเทอริโอซิน

3.1 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซิน

ทำการทดสอบผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซิน โดยนำแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท CF50, CF51 และCF52 มาทดสอบคุณสมบัติการทนความร้อน 3 ระดับ คือ ที่อุณหภูมิ 65, 95 และ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40, 20 และ 20 นาที ตามลำดับ พบว่า แบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 3 ไอโซเลท สามารถทนความร้อนได้ทั้ง 3 อุณหภูมิ ซึ่งจะเห็นได้ว่า เมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงขึ้นเรื่อย ๆ กิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินมีค่าลดลงตามลำดับ และแบคเทอริโอซินสามารถทนความร้อนได้ที่ระดับอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ซึ่งมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 80 AU/ml แสดงผลดังภาพ 6 จะเห็นได้ว่า แบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 3 ไอโซเลท มีความสามารถทนความร้อนได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ Oh *et al.* (2000) ที่รายงานว่าแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Lb. acidophilus* 30SC มีความสามารถทนความร้อนที่ได้ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เช่นเดียวกัน แบคเทอริโอซินที่สามารถทนความร้อนได้ดีส่วนใหญ่เป็นแบคเทอริโอซินที่อยู่ใน Class IIa และ Class IIb เช่น leucocin A, mesentericin Y105 และ pediocin AcH (Sablon *et al.*, 2000) เนื่องจากแบคเทอริโอซินมีโครงสร้างที่ซับซ้อนคือ ประกอบด้วยส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic region) อยู่ภายในโครงสร้าง และมีไกลซีนที่เชื่อมต่อด้วยพันธะที่แข็งแรง (s-s bridge) อยู่ในโครงสร้างของเปปไทด์ (N-terminal) ปริมาณมาก จึงไม่ถูกทำลายได้ง่ายด้วยความร้อน (Cleveland *et al.*, 2001) แบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรด แลคติกทั้ง 3 ไอโซเลท สามารถทนความร้อนได้ดี น่าจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอาหารที่ผ่านกระบวนการความร้อนสูง ๆ โดยไม่ทำให้แบคเทอริโอซินเสียสภาพ



ภาพ 6 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินโดยวิธี well diffusion assay โดยใช้ *Lb. fermentum* JCM 1173 เป็นเชื้อทดสอบ

( )ไม่ให้ความร้อน, ( ) 65 °C/40 นาที, ( ) 95 °C/20 นาที และ ( ) 121 °C/20 นาที

3.2 ผลของพีเอชต่อค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซิน

จากการศึกษาผลของพีเอชต่อค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซิน โดยนำแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียไอโซเลท CF50, CF51 และ CF52 มาทำการปรับพีเอชให้มีความแตก ต่างกันคือ 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 และ 10.0 บ่มที่อุณหภูมิ 3 7 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และปรับพีเอชกลับคืนเป็น 6.5 และเติมเอนไซม์คะตะเลส นำมากรองผ่านชุดกรองชนิดไนลอน จากนั้นนำไปทดสอบค่ากิจกรรมยับยั้งของแบคเทอริโอซินที่เหลืออยู่โดยวิธี well diffusion assay โดยใช้ *Lb. fermentum* JCM 1173 เป็นเชื้อทดสอบ พบว่า แบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท มีความคงทนต่อพีเอชแบบกว้าง ตั้งแต่ 3.0-10.0 โดยค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินจะมีความเสถียรที่พีเอช 5.0-6.0 แต่เมื่อพีเอชที่มีความเป็นกรดมากขึ้น (พีเอช 3.0-4.0) กิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินจะมีค่าลดลง แต่จะลดลงน้อยกว่าช่วงพีเอชที่เป็นด่าง (พีเอช 8.0-10.0) แสดงผลดังตาราง 5 แบคเทอริโอซินส่วนใหญ่จะมีความเสถียรที่พีเอชเป็นกรด และค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินจะลดลง เมื่อพีเอชมีความเป็นด่างมาก ๆ (Hill, 1995) เนื่องจากแบคเทอริโอซินมีโครงสร้างโปรตีนทุติยภูมิ ความเป็นด่างไปทำลายโครงสร้างส่วนนี้ ทำให้กิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินมีค่าลดลง (Osmanagaoglu *et al.*, 1998) แบคเทอริโอซินที่มีความคงทนต่อพีเอชแบบกว้าง และมีความเสถียรช่วงพีเอชเป็นกรดได้จากแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท ในการทดลองนี้ น่าจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารในอาหารที่ในกระบวนผลิตอาหารหมักซึ่งมีค่าพีเอชเป็นกรด เช่น นมเปรี้ยว แหนมผักดอง เป็นต้น ซึ่งน่าจะยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ดี แต่อย่างไรก็ตามมีแบคเทอริโอซินบางชนิดมีกิจกรรมการยับยั้งสูงสุดอยู่ในช่วงพีเอชเป็นเป็นด่าง ซึ่งงานทดลองของ Pilasombut *et al.* (2006) พบว่าแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Lb. salivarius* K7 ที่แยกมาจากลำไส้ไก่ กิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินมีความเสถียรที่พีเอชเป็นกรด แต่ค่ากิจรรมการยับยั้งสูงสุดอยู่ในช่วงพีเอช 8.0-10.0 น่าจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นโปรไบโอติก เนื่องจากสามารถผลิตแบคเทอริโอซินที่ทนต่อสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะอาหารได้ และทนต่อสภาวะความเป็นด่างในลำไส้เล็ก

3.3 ผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่อกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซิน

จากการศึกษาเอนไซม์ต่อกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซิน โดยนำส่วนใสที่ได้มาจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลท CF50, CF51 และ CF52 มาปรับพีเอชเป็น 6.5 และเติมเอนไซม์คะตะเลสก่อนนำมาทดสอบกับ proteinase K และ protease พบว่า แบคเทอริโอซินที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท เสียสภาพด้วยเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนทั้ง 2 ชนิด คือ proteinase K และ protease แสดงดังตาราง 6 แสดงว่า กิจกรรมการยับยั้งต่อเชื้อทดสอบเกิดจากสารประเภทโปรตีน หรือแบคเทอริโอซิน ไม่ใช่เกิดจากสารอื่น เช่น กรดอินทรีย์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เนื่องจากถูกกำจัดไปโดยการปรับพีเอชให้เป็นกลาง เพื่อกำจัดอิทธิพลจากกรดอินทรีย์ และเติมเอนไซม์คะตะเลสเพื่อกำจัดอิทธิพลจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ Jennes *et al.* (2000) คือ

Enterocin 012 ผลิตโดยแบคทีเรีย *E. gallinarum* ที่แยกมาจากลำไส้นกกระจอกเทศ ถูกทำให้เสียสภาพโดยเอนไซม์ proteinase K, α-chymotrypsin, trypsin และ pepsin แต่ไม่ทำให้เสียสภาพโดย lysozyme

ตาราง 5 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินโดยวิธี well diffusion assay โดยใช้ *Lb. fermentum* JCM 1173 เป็นเชื้อทดสอบ

พีเอช	ค่ากิจกรรมการยับยั้ง (AU/ml)		
	CF50	CF51	CF52
3.0	80	160	160
4.0	160	160	160
5.0	320	320	320
6.0	320	320	320
7.0	160	160	160
8.0	80	160	160
9.0	80	80	80
10.0	80	80	80

ตาราง 6 ผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่อกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินโดยวิธี well diffusion assay โดยใช้ *Lb. fermentum* JCM 1173 เป็นเชื้อทดสอบ

เอนไซม์	ค่ากิจกรรมการยับยั้ง (AU/ml)		
	CF50	CF51	CF52
Proteinase K	0	0	0
protease	0	0	0

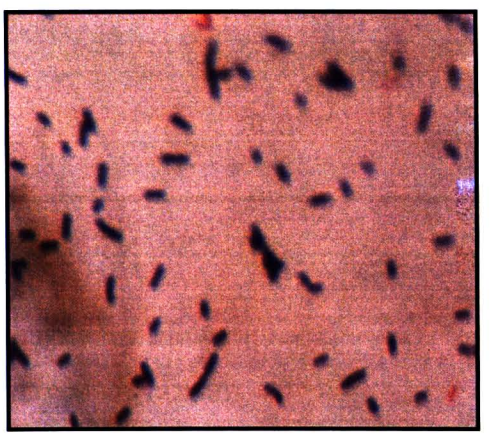
จากผลการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งต่อเชื้อทดสอบ และความคงตัวของแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียไอโซเลท CF50, CF51 และ CF52 พบว่า แบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียไอโซเลท CF52 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อทดสอบ และมีความสามารถในการทนความร้อนได้ดีกว่า

แบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียไอโซเลท CF50 และ CF51 ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกแบคทีเรียไอโซเลท CF52 ไปจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรีย โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาเบื้องต้น คุณสมบัติทางชีวเคมีโดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CH (Biomèrieux) และหาลำดับเบสของ DNA ในส่วนยีน 16S rRNA

4. การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียไอโซเลท CF52

4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา

นำแบคทีเรียไอโซเลท CF52 มาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศา-เซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน เพื่อศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหารแข็งสูตร MRS ของแบคทีเรียไอโซเลท CF52 พบว่า มีโคโลนีขนาดเล็ก ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีประมาณ 1-2 มิลลิเมตร โคโลนีมีสีขาว ขอบโคโลนีเรียบ และโคโลนีมีผิวหน้าเกลี้ยง เมื่อนำมาย้อมสีแบบแกรมแล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่า ติดสีแกรมบวก มีรูปร่างท่อน การจัดเรียงตัวเป็นเซลเดี่ยวและอยู่เป็นคู่ (ภาพ 7) และจากการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยา พบว่า ไม่สร้างก๊าซ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส เมื่อนำแบคทีเรียไอโซเลท CF52 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MRS บ่มที่อุณหภูมิ 30, 37, 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า แบคทีเรียสามารถเจริญได้ในอาหารเหลวสูตร MRS บ่มที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 45 องศา-เซลเซียส แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MRS ประกอบด้วยโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เข้มข้น 1.0-5.0 %, 6.5 % และ 18.0 % พบว่า แบคทีเรียสามารถเจริญในอาหารเหลวสูตร MRS ประกอบด้วย NaCl เข้มข้น 1.0-5.0 % สามารถเจริญในอาหารที่ประกอบด้วย NaCl เข้นข้น 6.5 % และ 18.0 % และ พบว่า แบคทีเรียสามารถเจริญในอาหารเหลวสูตร MRS ที่มีพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 4.5 และ 9.6 ผลการทดลองดังตาราง 7



ภาพ 7 รูปร่างและการติดสีแกรมของแบคทีเรียไอโซเลท CF52 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ กำลังขยาย 1,000 เท่า

ตาราง 7 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของแบคทีเรียไอโซเลท CF52 เปรียบเทียบกับ *Lb. salivarius* K7

การทดสอบ		ผลการทดสอบ	
		Lb. salivarius K7*	ไอโซเลท CF52
ย้อมแกรม		แกรมบวก	แกรมบวก
รูปร่าง		ท่อนสั้น	ท่อนสั้น
การจัดเรียงตัว		เดี่ยว/คู่	เดี่ยว/คู่
การผลิตก๊าซ		-	-
เอนไซม์คะตะเลส		-	-
การเจริญของเซลล์			
อุณหภูมิ	5-15°C	-	NT
	30 °C	+	+
	37 °C	+	+
	45 °C	+	+
	50 °C	-	-
NaCl	1.0-5.0%	+	+
	6.5 %	-	-
	18.0%	-	-
pH 4.5		+	+
pH 9.6		+	+

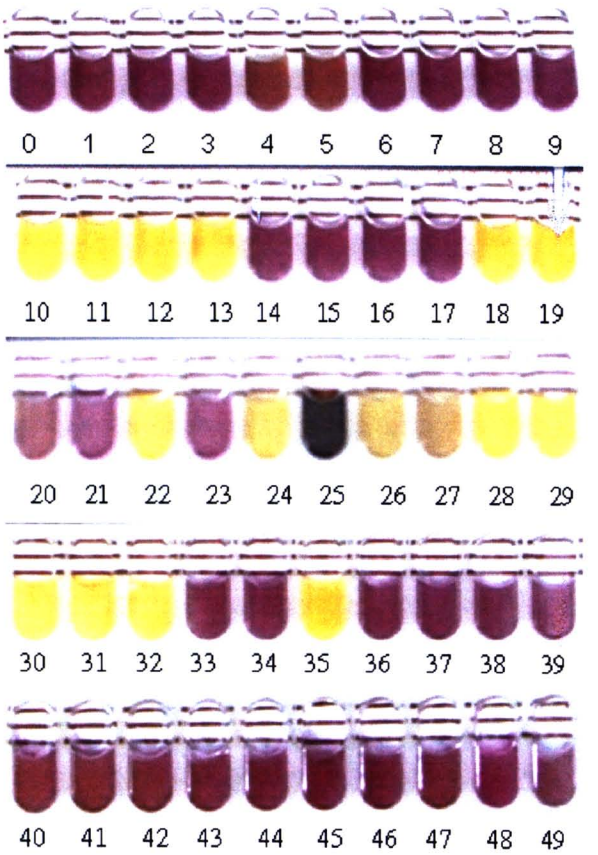
* ที่มา : Pilasombut *et al.* (2006)

หมายเหตุ : + หมายถึง ผลการทดสอบให้ผลบวก
- หมายถึง ผลการทดสอบให้ผลลบ
- NT หมายถึง ไม่ได้ทำการทดสอบ

จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาเบื้องต้นของแบคทีเรียไอโซเลท CF52 พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างเป็นท่อน ไม่ผลิตเอนไซม์คะตะเลส เจริญได้โดยไม่ต้องการอากาศในการเจริญ สามารถเจริญได้ในอาหารเหลวสูตร MRS ที่มีค่าพีเอช 4.5 และ 9.6 สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิระหว่าง 30-45 องศาเซลเซียส และสามารถเจริญได้ใน NaCl ที่มีความเข้มข้น 5.0 % ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับ *Lb. salivarius* K และปรียบเทียบลักษณะพื้นฐานตามคู่มือ Bergey's manual of determinative bacteriology แล้วนำไปศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีโดยชุดทดสอบ API 50 CH ต่อไป

4.2 ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีโดยชุดทดสอบ API 50 CH

จากการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีโดยใช้ชุดทดสอบแบบสำเร็จ ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก และรวดเร็ว ในการจำแนกแบคทีเรีย ซึ่งแบคทีเรียไอโซเลท CF52 มีลักษณะคล้ายแบคทีเรียกรดแลคติกในกลุ่ม *Lactobacillus* จึงเลือกใช้ชุดทดสอบ API 50 CHL ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีโดยชุดทดสอบ API 50 CHL เพื่อจำแนกแบคทีเรียไอโซเลท CF52 พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อ API 50 CHL หลอดที่ให้เป็นผลบวก เปลี่ยนสีอาหารจากสีม่วงเป็นเหลืองมีทั้งหมด 16 หลอด คือ หลอดที่ 10, 11, 12, 13, 18, 19, 22, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 และ 35 และหลอดที่เปลี่ยนสีม่วงเป็นสีดำ คือ หลอดที่ 25 แสดงดังภาพ 8 พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท CF52 สามารถหมักน้ำตาลได้ 17 ชนิดคือ galactose, glucose, fructose, mannose, sorbitol, N-Acetyl-glucosamine, arbutin, esculin, salicin, cellobiose, maltose, lactose, melibiose, sucrose, trehalose, insulin และ raffinose แสดงผลดังตาราง 8 จากนั้นนำผลการทดลองไปวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม API web™ (http://apiweb.biomerieux.com) พบว่า คุณสมบัติในการหมักน้ำตาลที่ได้มีความคล้ายกับแบคทีเรีย *Lb. salivarius* ถึง 99.9 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น จึงสรุปว่า แบคทีเรียไอโซเลท CF52 เป็นแบคทีเรีย *Lb. salivarius* จากนั้นทำการยืนยันผลการจำแนกอีกครั้งด้วยการหาลำดับเบสของ DNA ในส่วนยีน 16S rRNA



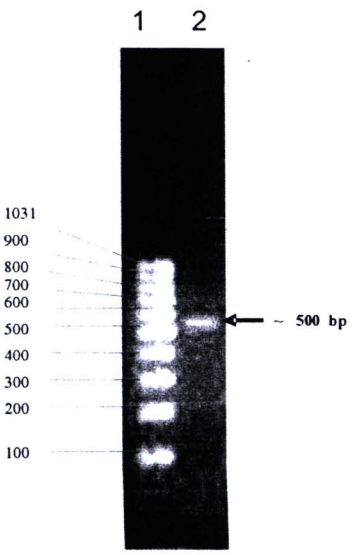
ภาพ 8 ผลการหมักคาร์บอนไฮเดรตของแบคทีเรียไอโซเลท CF52 ด้วย API 50 CH

ตาราง 8 คุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียไอโซเลท CF52

คุณสมบัติทางชีวเคมี	ชนิดน้ำตาล
Fermentable sugar	Galactose Glucose Fructose Mannose Sorbitol N-Acetyl-Glucosamine Arbutin Esculin Salicin Cellobiose Maltose Lactose Melibiose Sucrose Trehalose Insulin Raffinose
Non-Fermentable sugar	Glycerol Erythritol D-ArAbinose L-Arabinose Ribose D-Xylose L-Xylose Adonitol β-Methyl-Xyloside Melezitose Starch Glycogen Xylitol Gentiobiose D-Turanose D- Lyxose D-Tagatose D- Fucose L-Fucose D-Arabitol L-Arabitol 2-Keto-Gluconnate 5-Keto-Gluconnate

4.3 การหาลำดับเบสของ DNA ในส่วนยีน 16S rRNA

จากการนำเทคนิคทางด้านชีววิทยาโมเลกุล โดยการหาลำดับเบสในส่วนยีน 16S rRNA โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลท CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน นำไปสกัด DNA โดยใช้ชุดสกัด DNA สำเร็จรูป จากนั้นนำ Genomic DNA ความเข้มข้นประมาณ 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร มาทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณลำดับเบส DNA ในส่วนยีน 16S rRNA ที่ลำดับเบสในตำแหน่ง V_1-V_3 โดยใช้ universal primer 2 ชนิด คือ 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') และ 520R (5'-ACCGCGGCKGCTGGC-3') และทำ PCR product ให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุด TaKaRa SUPREC™ – PCR จากนั้นตรวจสอบขนาดของชิ้น DNA พบว่า มีขนาดประมาณ 500 คู่เบส แสดงผลดังภาพ 9 จากนั้นนำ PCR product ไปหาลำดับเบส DNA ในส่วนยีน 16S rRNA โดยหน่วยบริการชีวภาพ (BSU) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ แล้วนำลำดับเบสของยีน 16S rRNA ไปเทียบกันในโปรแกรม BioEdit แสดงดังภาพ 10 และนำไปเทียบความคล้ายจากฐานข้อมูลลำดับเบสใน GenBank โดยใช้ BLASTn ของ The National Center for Biotechnolgy Information (NCBI) (http://www.ncbi.nlm.nil.gov/) พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท CF52 มีลำดับเบส DNA ในส่วนของยีน 16S rRNA ที่คล้ายกับ *Lb. salivarius* 99.2 เปอร์เซ็นต์ (accession no. DQ444477) แสดงดังภาพ 11 ดังนั้น จึงสรุปได้ว่า แบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท CF52 เป็น *Lb. salivarius* ในการทดลองนี้ กำหนดชื่อแบคทีเรียไอโซเลท CF52 เป็น *Lb. salivarius* CF 52



ภาพ 9 ขนาดของ DNA ที่ได้จากการทำ PCR ในส่วนของยีน 16S rDNA ตำแหน่งลำดับเบสบริเวณ V_1-V_3ของแบคทีเรียไอโซเลท CF52

หมายเหตุ : Lane 1 คือ DNA Marker (O'GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder)
Lane 2 คือ ผลผลิตที่ได้จากการทำ PCR

5'TACCGCGGCGGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGACNTGCTGGTTAGATACCGTCATCGAATGAACAGTTAC
TCTCACTCGGTGTTCTTCTCTAACAACAGAGTTTTACGATCCGAAGACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCT
CCATCAGACTTGCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAG
TCCCAATGTGGCCGATCAACCTCTCAGTTCGGCTACGTATCATCACCTTGGTAGGCCGTTACCCCACCAACT
AGTTAATACGCCGCGGGTCCATCTAAAAGCGATAGCAGAACCATCTTTCATCTAAGGATCATGCGATCCTTA
GAGATATACGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCCTTCTTTTAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCA
CCCGTCCGCCACTCAACTTCTTACGGTGAATGCAAGCATTCGGTGTAAGAAAGTTTCGTTCGACTTGCATGT
ATTAGGCACGCCGCCA3'

ภาพ 10 ลำดับของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลท CF52 เกิดจากการนำลำดับเบสของ primer 27F และ primer 520R ไปเทียบกันในโปรแกรม BioEdit

Gb/DQ444477/*Lactobacillus salivarius* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length=1527 Score = 981 bits (495), Expect = 0.0 Identities = 514/518 (99.2 %), Gaps = 2/518 (0 %) Strand=Plus/Minus

```
Query  1    TACCGCGGCGGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGACNTGCTGGTTAGATACCGTCATCGAAT  60
            ||||||||| ||||||||||||||||||||| || ||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  545  TACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTG-ACTTGCTGGTTAGATACCGTCATCGAAT  487

Query  61   GAACAGTTACTCTCACTCGGTGTTCTTCTCTAACAACAGAGTTTTACGATCCGAAGACCT  120
            |||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  486  GAACAGTTACTCTCACTCG-TGTTCTTCTCTAACAACAGAGTTTTACGATCCGAAGACCT  428

Query  121  TCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCCATCAGACTTGCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTG  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  427  TCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCCATCAGACTTGCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTG  368

Query  181  CTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATCAACCTCTCAG  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  367  CTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATCAACCTCTCAG  308

Query  241  TTCGGCTACGTATCATCACCTTGGTAGGCCGTTACCCCACCAACTAGTTAATACGCCGCG  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  307  TTCGGCTACGTATCATCACCTTGGTAGGCCGTTACCCCACCAACTAGTTAATACGCCGCG  248

Query  301  GGTCCATCTAAAAGCGATAGCAGAACCATCTTTCATCTAAGGATCATGCGATCCTTAGAG  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  247  GGTCCATCTAAAAGCGATAGCAGAACCATCTTTCATCTAAGGATCATGCGATCCTTAGAG  188

Query  361  ATATACGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCCTTCTTTTAGGCAGGTTACCCAC  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  187  ATATACGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCCTTCTTTTAGGCAGGTTACCCAC  128

Query  421  GTGTTACTCACCCGTCCGCCACTCAACTTCTTACGGTGAATGCAAGCATTCGGTGTAAGA  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  127  GTGTTACTCACCCGTCCGCCACTCAACTTCTTACGGTGAATGCAAGCATTCGGTGTAAGA  68

Query  481  AAGTTTCGTTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCA  518
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  67   AAGTTTCGTTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCA  30
```

ภาพ 11 แบคทีเรียที่มีลำดับเบสในส่วนยีน 16S rRNA คล้ายกับแบคทีเรียไอโซเลท CF52

5. ผลการศึกษาส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตแบคเทอริโอซิน

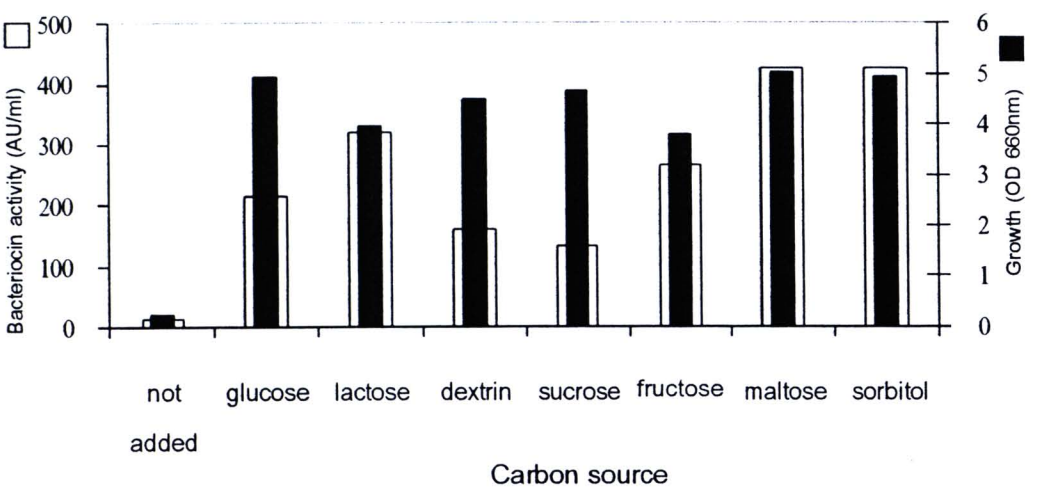
5.1 ผลการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS มีส่วนประกอบของแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน 7 ชนิด คือ glucose, lactose, dextrin, fructose, maltose, sucrose และ sorbitol ความเข้มข้ม 2.0 % (w/v) แทน glucose นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน พบว่า แบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 สามารถเจริญได้ดีในอาหารเหลวสูตร MRS ที่มี glucose, lactose, dextrin, fructose, maltose, sucrose และ sorbitol เป็นแหล่งคาร์บอน ดังนั้น แหล่งคาร์บอนจำนวนทั้ง 7 ชนิดนี้ถือได้ว่ามีความเหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย แต่แบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 สามารถผลิตแบคเทอริโอซินที่มีกิจกรรมการยับยั้งสูงสุดในอาหารเหลวสูตร MRS ที่มี maltose หรือ/และ sorbitol เป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีค่ามีกิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 426.67 AU/ml เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดอื่น ๆ คือ glucose, lactose, dextrin, sucrose และ fructose ซึ่งมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 213.33, 320.00, 160.00, 133.33 และ 266.66 AU/ml ตามลำดับ และในอาหารเหลวสูตร MRS ที่ไม่มีแหล่งคาร์บอน แบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้น้อยมาก โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 13.33 AU/ml แสดงดังตาราง 9 และภาพ 12 ดังนั้น maltose หรือ sorbitol เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 แต่เมื่อคำนึงในเชิงเศรษฐศาสตร์ พบว่า เมื่อใช้ maltose เป็นแหล่งคาร์บอนมีต้นทุนต่ำกว่า ซึ่ง Toddorov *et al.* (2004) มีรายงานผลการทดลองหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรีย *Lb. plantarum* ST13BR พบว่า maltose ให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินสูงสุด โดยค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 6,4000 AU/ml และต่อมา Toddorov and Dicks (2006) มีรายงานการผลิตแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรีย *Lb. plantarum* ST23LD โดยใช้ maltose เป็นแหล่งคาร์บอน ทำให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงถึง 12,800 AU/ml ดังนั้น ในการทดลองนี้จึงเลือกใช้ maltose เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อใช้ในการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

ตาราง 9 แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52

แหล่งคาร์บอน (2 % w/v)	ค่าดูดกลืนแสง (OD_{660nm})	ค่ากิจกรรมการยับยั้ง* (AU/ml)
not added	0.229	13.33
glucose	4.961	213.33
lactose	3.984	320.00
dextrin	4.508	160.00
sucrose	4.649	133.33
fructose	3.808	266.66
maltose	5.038	426.67
sorbitol	4.958	426.67

หมายเหตุ : * ข้อมูลที่ได้มาจากหาค่าเฉลี่ยในการทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ



ภาพ 12 แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตแบคเทอริโอซินของของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมงในสภาวะไร้ออกซิเจน

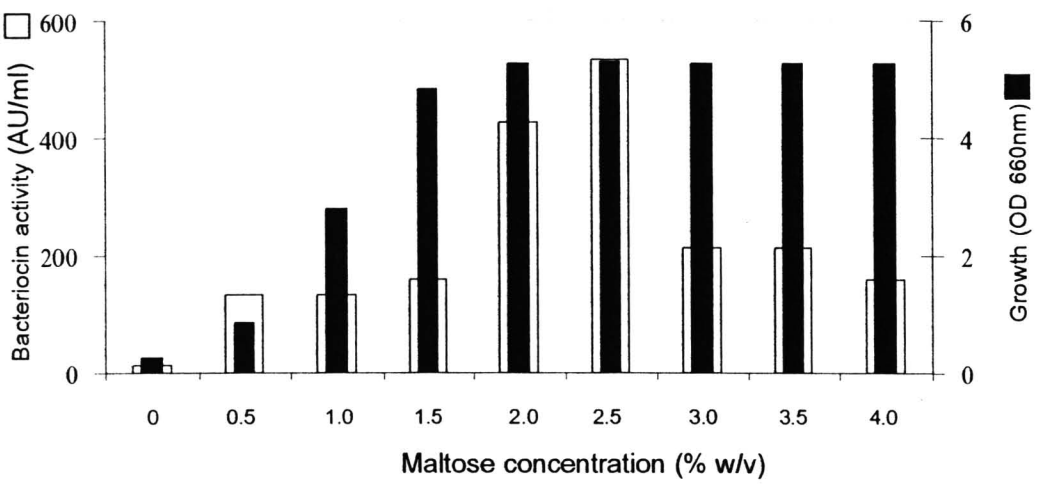
5.2 ผลการศึกษาความเข้มข้นของ maltose ที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52

จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS ที่มี maltose เป็นแหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 และ 4.0 % (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ maltose ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ระดับความเข้มข้นของ maltose 0.5-2.5 % (w/v) ส่งผลให้แบคทีเรียมีการเจริญและการผลิตแบคเทอริโอซินมีค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงขึ้น แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ maltose ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ระดับความเข้มข้น 3.0-4.0 % (w/v) จะเห็นได้ว่า แบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 มีการเจริญและมีค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินลดลงตามลำดับ และ maltose ที่ระดับความเข้มข้น 2.5 % (w/v) แบคทีเรียมีการเจริญและผลิตแบคเทอริโอซินให้ค่ากิจกรรมยับยั้งดีที่สุด คือ มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เท่ากับ 5.301 และมีกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินเท่ากับ 533.33 AU/ml ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงในตาราง 10 และ ภาพ 13 จากผลการทดลองนี้ พบว่า maltose ที่ระดับความเข้มข้น 2.5 % (w/v) เป็นความเข้มข้นที่มีความเหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 มีรายงานการศึกษาผลของความเข้นข้นของ maltose ที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน ได้แก่การผลิตแบคเทอริโอซินผลิตจากแบคทีเรีย *Lb. plantarum* ST13BR พบว่า maltose ที่ระดับความเข้มข้น 0-0.5 % (w/v) ส่งผลให้แบคทีเรียไม่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้ maltose ที่ระดับความเข้มข้น 2.0-3.0 % (w/v) ให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินสูงสุด โดยค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 6,400 AU/ml แต่เมื่อทำการเพิ่ม maltose ระดับความเข้มข้น 4.0 % ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่งผลให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินลดลงเหลือ 3,200 AU/ml (Todorov *et al.*, 2004) จากรายงานที่ผ่านมา การอธิบายถึงผลของความเข้มข้นของ maltose ต่อการผลิตแบคเทอริโอซินยังมีน้อย แต่อาจสันนิษฐานได้ว่า มีส่วนเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนที่ผลิตแบคเทอริโอซินด้วย ดังนั้น การทดลองนี้ทำการเลือก maltose ที่ระดับความเข้มข้น 2.5 % (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อทำการทดลองในขั้นตอนต่อไป

ตาราง 10 ผลของ maltose ที่ระดับความเข้มต่าง ๆ ต่อการผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52

ความเข้มข้นของ maltose (% w/v)	ค่าดูดกลืนแสง (OD_{660})	ค่ากิจกรรมการยับยั้ง* (AU/ml)
0.0	0.246	13.33
0.5	0.855	133.33
1.0	2.782	133.33
1.5	4.839	160.00
2.0	5.284	426.67
2.5	5.301	533.33
3.0	5.281	213.33
3.5	5.278	213.33
4.0	5.258	160.00

หมายเหตุ : * ข้อมูลที่ได้มาจากหาค่าเฉลี่ยในการทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ



ภาพ 13 ผลของ maltose ที่ระดับความเข้มต่าง ๆ ต่อการผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน

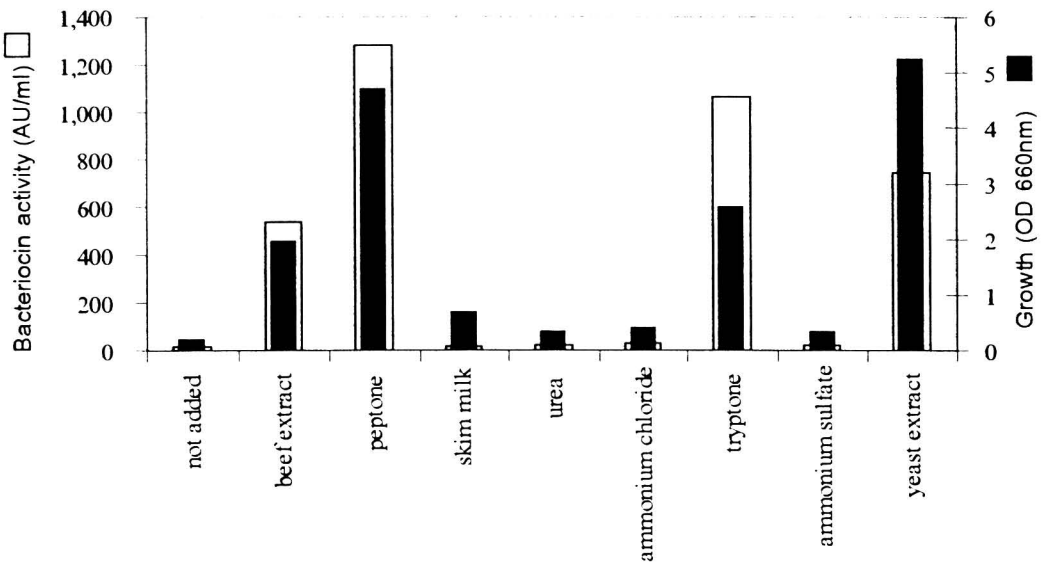
5.3 ผลการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน

จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น maltose เข้มข้น 2.5 % (w/v) และมีแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน 8 ชนิด คือ beef extract, peptone, skim milk, urea, NH_4Cl, tryptone, ammonnium sulfate และ yeast extract เข้มข้น 1.0 % (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน พบว่า แบคทีเรียสามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มี peptone, beef extract, tryptone และ yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน จะเห็นได้ว่า อาหารเหลวสูตร MRS ที่มี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน แบคทีเรียสามารถเจริญได้ดีที่สุด แต่แบคทีเรียสามารถผลิตสารแบคเทอริโอซินที่มีค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงสุดในอาหารที่มี peptone เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินเท่ากับ 1,280 AU/ml รองลงมาคือ tryptone, yeast extract และ beef extract โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซิน เท่ากับ 1,066.67, 746.67 และ 533.33 AU/ml ตามลำดับ ส่วนแหล่งไนโตรเจนชนิดอื่น ๆ คือ skim milk, urea, ammonium chloride และ ammonium sulfate ส่งผลให้แบคทีเรียผลิตแบคเทอริโอซินมีค่ากิจกรรมการยับยั้งน้อยมาก แสดงดังตาราง 11 และภาพ 14 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 สามารถใช้แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์และสามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้ดีกว่าแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์ ซึ่งจากการทดลองนี้ พบว่า yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย แต่ส่งผลให้มีการผลิตแบคเทอริโอซินน้อยกว่าการใช้ peptone ซึ่ง peptone เป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีความเหมาะสมมากที่สุดต่อการผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 ซึ่งมีรายงานการใช้ peptone เป็นแหล่งไนโตรเจนทำให้แบคทีเรีย *Lb. plantarum* 423 สามารถเพิ่มผลผลิต plantaricin 423 ได้ (Verellen *et al.*, 1998) และสามารถเพิ่มผลผลิตแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Lactococcus lactis* มากขึ้น (Li *et al.*, 2002) นอกจากนี้ Todorov *et al.* (2004) รายงานว่า การใช้แหล่งไนโตรเจนหลาย ๆ ชนิดรวมเข้าด้วยกัน จะช่วยส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรีย และแบคทีเรียสามารถผลิตแบคเทอริโอซินเพิ่มมากขึ้นมากกว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว

ตาราง 11 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52

แหล่งไนโตรเจน (1% w/v)	ค่าดูดกลืนแสง (OD_{660})	ค่ากิจกรรมการยับยั้ง* (AU/ml)
not added	0.209	13.33
beef extract	1.965	533.33
peptone	4.686	1,280.00
skim milk	0.700	13.33
urea	0.355	26.67
ammonium chloride	0.405	33.33
tryptone	2.555	1,066.67
ammonium sulfate	0.333	26.67
yeast extract	5.236	746.67

หมายเหตุ : * ข้อมูลที่ได้มาจากหาค่าเฉลี่ยในการทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ



ภาพ 14 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น maltose เข้มข้น 2.5 % (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน

5. 4 ผลการศึกษาของการเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

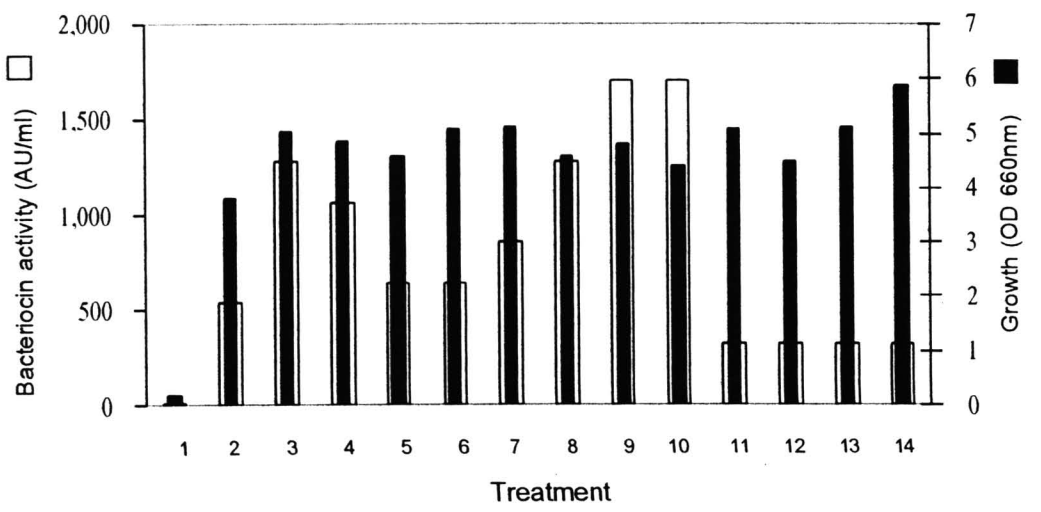
ผลการศึกษาของการเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น maltose เข้มข้น 2.5 % (w/v) และมีการรวมแหล่งไนโตรเจน 4 ชนิดเข้าด้วยกัน คือ peptone, tryptone, yeast extract และ beef extract โดยมีความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนแต่ละชนิดแสดงดังตารางที่ 2 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน พบว่า การเติมแหล่งไนโตรเจนหลาย ๆ ชนิด โดยมี peptone เป็นแหล่งไนโตรเจนหลัก ส่งผลให้การเจริญของแบคทีเรียมีแนวโน้มสูงขึ้นมากกว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว โดยแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 สามารถเจริญได้ดีที่สุด ในอาหารที่เติม peptone เข้มข้น 0.5 % (w/v), tryptone เข้มข้น 1.0 % (w/v), yeast extract เข้มข้น 0.5 % (w/v) และ beef extract เข้มข้น 0.5 % (w/v) ผสมเข้าด้วยกันเป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่แบคทีเรียสามารถผลิตแบคเทอริโอซินมีกิจกรรมการยับยั้งสูงสุด ที่มี peptone เข้มข้น 0.5 % (w/v) ร่วมกับ beef extract เข้มข้น 1.0 % (w/v) หรือ peptone เข้มข้น 0.5 % (w/v), trytone เข้มข้น 1.0 % (w/v) และ yeast extract เข้มข้น 0.5 % (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินเท่ากับ 1,706.67 AU/ml ดังตาราง 12 และ ภาพ 15 การทดลองนี้ทำการเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี peptone เข้มข้น 0.5 % (w/v) ร่วมกับ beef extract เข้มข้น 1.0 % (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซินเพื่อใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป เนื่องจากประกอบด้วยแหล่งไนโตรเจนเพียง 2 ชนิด แต่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินที่มีค่ากิจกรรมการยับยั้งได้เท่ากับแหล่งไนโตรเจน 3 ชนิด ซึ่งช่วยประหยัดต้นทุนในการทดลองขั้นตอนต่อไป

ตาราง 12 ผลของการเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ต่อการผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52

หลอดที่	แหล่งไนโตรเจน	ค่าดูดกลืนแสง (OD 660nm)	ค่ากิจกรรมการยับยั้ง* (AU/ml)
1	Not added	0.201	13.33
2	0.5 % PP	3.828	533.33
3	1.0 % PP	5.041	1,280.00
4	0.5 % PP+0.5 % TP	4.841	1,066.67
5	0.5 % PP+1.0 % TP	4.594	640.00
6	0.5 % PP+0.5 % YE	5.066	640.00
7	0.5 % PP+1.0 % YE	5.125	853.33
8	0.5 % PP+0.5 % BE	4.596	1,280.00
9	0.5 % PP+1.0 % BE	4.802	1,706.67
10	0.5 % PP+1.0 % TP+0.5 % YE	4.412	1,706.67
11	0.5 % PP+0.5 % BE+0.5 % YE	5.052	320.00
12	0.5 % PP+0.5 % TP+0.5 % BE	4.505	320.00
13	0.5 % PP+0.5 % TP+0.5 % YE	5.131	320.00
14	0.5 % PP+1.0 %TP+0.5 %YE+0.5 %BE	5.885	320.00

หมายเหตุ : PP : peptone, TP : tryptone, BE : beef extract และ YE : yeast extract

* ข้อมูลที่ได้มาจากหาค่าเฉลี่ยในการทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ



ภาพ 15 ผลของการเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ต่อการผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น maltose เข้มข้น 2.5 % (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน

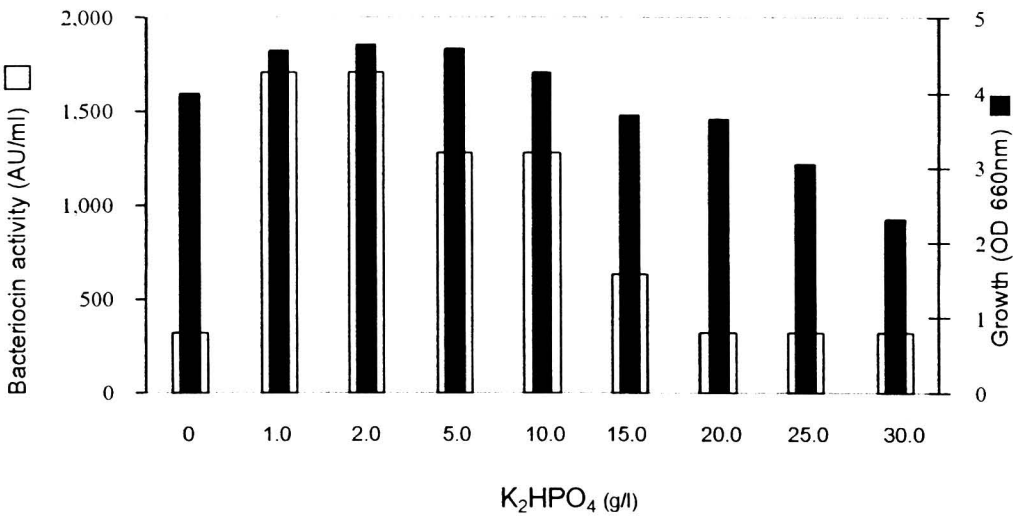
5.5 ผลการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของฟอสเฟตอนินทรีย์ (inorganic phosphate) ต่อการผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52

ผลการศึกษาความเข้มข้นของฟอสเฟตอนินทรีย์ต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน โดยทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น maltose เข้มข้น 2.5 % (w/v) มี peptone เข้มข้น 0.5 % (w/v) และ beef extract เข้มข้น 1.0 % (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน และมี K_2HPO_4 ที่มีระดับความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0, 1.0, 2.0 , 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0 และ 30.0 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งฟอสเฟส บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้น K_2HPO_4 ที่ระดับความเข้มข้น 1.0-5.0 กรัมต่อลิตร ไม่สามารถช่วยให้แบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 เจริญเพิ่มมากขึ้น แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นสูงขึ้นเรื่อย ๆ ที่ระดับหนึ่ง (ความเข้มข้น 10.0-30.0 กรัมต่อลิตร) จะส่งผลยั้บยั้งการเจริญของผลิตแบคเทอริโอซินลดลงเช่นกัน แบคทีเรียผลิตแบคเทอริโอซินมีค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงสุดที่ความเข้มข้น 1.0-2.0 กรัมต่อลิตร โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินเท่ากับ 1,706.67 AU/ml เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ K_2HPO_4 ที่ระดับสูงขึ้นคือความเข้นข้น 10.0, 15.0, 20.0, 25.0 และ 30.0 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้การผลิตแบคเทอริโอซินมีค่ากิจกรรมการยับยั้งลดลง โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินเท่ากับ 1,280, 1,280, 640, 320, 320 และ 320 AU/ml ตามลำดับ ดังตาราง 13 และภาพ 16 ซึ่งมีรายงานที่เกี่ยวกับผลของฟอสเฟตอนินทรีย์ต่อการผลิตแบคเทอริโอซินมากมาย เช่น K_2HPO_4 เข้มข้น 5 และ 10 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้แบคทีเรีย *Lb. plantarum* ผลิตแบคเทอริโอซินให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงสุด (Todorov and Dicks, 2004) และ Enan *et al.* (1996) มีรายงานว่า K_2HPO_4 เข้มข้น 7 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้แบคทีเรีย *Lb. plantarum* UG1 ให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงสุด นอกจากนี้ ยังมีรายงานผลเกี่ยวกับการเปรียบเทียบฟอสเฟสอนินทรีย์ที่อยู่ในรูปต่างกันต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน เช่น K_2HPO_4 สามารถกระตุ้นให้แบคทีเรีย *Lb. plantarum* UG1 ผลิตแบคเทอริโอซินให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงกว่า K_2HPO_4 ที่ความเข้มข้นเท่ากัน (Todorov *et al.*, 2004) ในการทดลองนี้ทำการเลือก K_2HPO_4 เข้มข้น 1.0-2.0 กรัมต่อลิตร เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

ตาราง 13 ผลความเข้มข้นของ K_2HPO_4 ต่อการผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52

ความเข้มข้นของ K_2HPO_4 (กรัมต่อลิตร)	ค่าดูดกลืนแสง (OD_{660})	ค่ากิจกรรมการยับยั้ง* (AU/ml)
Not added	3.995	320.00
1.0	4.567	1,706.67
2.0	4.635	1,706.67
5.0	4.597	1,280.00
10.0	4.278	1,280.00
15.0	3.712	640.00
20.0	3.642	320.00
25.0	3.061	320.00
30.0	2.321	320.00

หมายเหตุ : * ข้อมูลที่ได้มาจากหาค่าเฉลี่ยในการทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ



ภาพ 16 ผลของความเข้มข้นของ K_2HPO_4 ที่เหมาะสม ต่อการผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS ประกอบด้วย maltose เข้มข้น 2.5 %(w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน และมี peptone เข้มข้น 0.5 % (w/v) ร่วมกับ beef extract เข้มข้น 1.0 % (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน

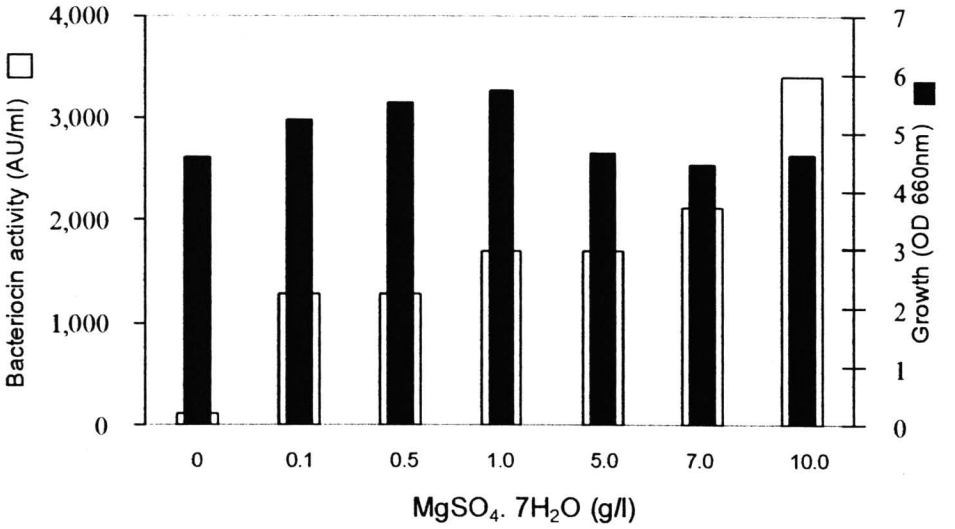
5.6 ผลของแมกนีเซียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน

ผลการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแมกนีเซียมซัลเฟตต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน โดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS ประกอบด้วย maltose ที่มีเข้มข้น 2.5 % (w/v) แหล่งคาร์บอนเป็น มี peptone เข้มข้น 0.5 % (w/v) ร่วมกับ beef extract เข้มข้น 1.0 % (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน และ K_2HPO_4 เข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งฟอสเฟส และมี $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 7.0 และ 10.0 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งแมกนีเซียม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแมกนีเซียม ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1.0 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้แบคทีเรียมีการเจริญสูงขึ้นเล็กน้อย แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแมกนีเซียมสูงขึ้นเรื่อย ๆ ที่ระดับความเข้มข้น 5.0, 7.0 และ 10.0 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้แบคทีเรียมีการเจริญลดลงตามลำดับ แต่แบคทีเรียสามารถผลิตแบคเทอริโอซินมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเพิ่มมากขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้นเข้นของแมกนีเนียมสูงขึ้นเรื่อยๆ ส่งผลให้การผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียเพิ่มมากขึ้นด้วย โดยค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงสุดของแบคเทอริโอซินมีค่าเท่ากับ 3,413 AU/ml (แมกนีเซียมความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร) ดังตาราง 14 และภาพ 17 ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kim *et al.* (2006) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อมากขึ้น ส่งผลให้แบคทีเรีย *Micrococcus* sp. ผลิตแบคเทอริโอซินชนิด micrococcus GO5 เพิ่มขึ้น และ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ เข้มข้น 5-10 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้แบคทีเรียผลิตแบคเทอริโอซินให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงสุด โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 4,096 AU/ml นอกจากนี้ Li *et al.* (2002) รายงานว่า $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ เข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้แบคทีเรีย *Lactococcus lactis* ผลิตแบคเทอริโอซินให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงสุด จากผลการทดลองนี้ จึงเลือก $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ เข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร เพื่อใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

ตาราง 14 ผลความเข้มข้นของ $MgSO_4.7H_2O$ ต่อการผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52

$MgSO_4.7H_2O$ (กรัมต่อลิตร)	ค่าดูดกลืนแสง (OD_{660})	ค่ากิจกรรมการยับยั้ง* (AU/ml)
Not added	4.595	106.67
0.1	5.227	1,280.00
0.5	5.534	1,280.00
1	5.744	1,706.67
5	4.659	1,706.67
7	4.454	2,133.33
10	4.607	3,413.00

หมายเหตุ : * ข้อมูลที่ได้มาจากหาค่าเฉลี่ยในการทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ



ภาพ 17 ผลของ $MgSO_4.7H_2O$ ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS ประกอบด้วย maltose เข้มข้น 2.5 % (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน และมี peptone เข้มข้น 0.5 % (w/v) ร่วมกับ beef extract เข้มข้น 1.0 % (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน และมี K_2HPO_4 เข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน

จากการทดลองเพื่อหาองค์ประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 สามารถสรุปองค์ประกอบต่าง ๆ ของอาหารเลี้ยงที่เหมาะสม ดังตารางที่ 15

ตาราง 15 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52

Composition	MRS (%)	Modified MRS (%)
Glucose	2.0	-
Maltose	-	2.5
Peptone	1.0	0.5
Yeast extract	0.5	-
Beef extract	1.0	1.0
K_2HPO_4	0.2	0.1-0.2
$MgSO_4.7H_2O$	0.002	1.0
+ 0.5 % CH_3COONa, 0.2 % $(NH_4)_2C_6H_6O_7$, 0.004 % $MnSO_4.H_2O$, 0.1 % Tween 80		
Activity (AU/ml)	320	3,413

6. ผลของสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52

6.1 ผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน

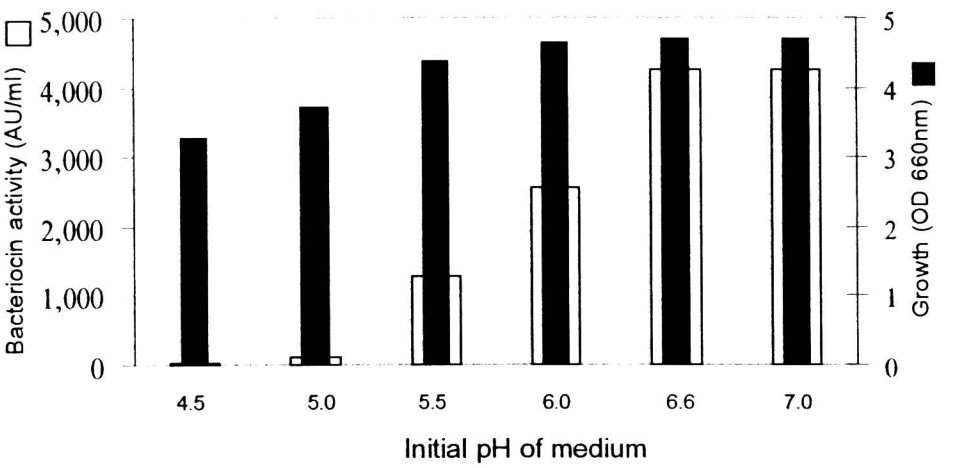
จากผลการศึกษาพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน โดยทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS ประกอบด้วย maltose ที่มีความเข้มข้น 2.5 % (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน มี peptone เข้มข้น 0.5 % (w/v) ร่วมกับ beef extract เข้มข้น 1.0 % (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน มี K_2HPO_4 เข้มข้น 0.1 % (w/v) เป็นแหล่งฟอสเฟส มี $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ความเข้มข้น 1.0 % (w/v) เป็นแหล่งแมกนีเซียม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน พบว่า แบคทีเรียสามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4.5-7.0 และเจริญได้ดีที่สุดที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7 แต่แบคทีเรียสามารถผลิตแบคเทอริโอซินให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งมากที่สุดที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 และ 7.0 โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 4,266.67 AU/ml ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่พีเอชเริ่มต้นอื่น ๆ คือ 4.5, 5.0 และ 6.0 โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินคือ 40, 106.67, 1,280 และ 2,560 AU/ml ตามลำดับ ดังตาราง 16 และภาพ 18 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่พีเอชเริ่มต้นมีความเป็นกรดมากและความเป็น

ต่างมาก ส่งผลทำให้แบคทีเรีย Lb. salivarius CF52 ผลิตแบคเทอริโอซินให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งลดลง และอาหารเลี้ยงเชื้อที่พีเอชเริ่มต้นเป็นกรดอ่อนหรือเป็นกลางมีความเหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน มีรายงานเกี่ยวกับผลของพีเอชเริ่มต้นอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน ที่สอดคล้องกับผลการทดลองนี้มากมาย เช่น การผลิตแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรีย *Lb. plantarum* ST23MS โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 มีผลทำให้แบคทีเรียสามารถผลิตแบคเทอริโอซินให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงสุด โดยค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 2,930 AU/ml (Todorov and Dicks, 2006)

ตาราง 16 ผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52

พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ	ค่าดูดกลืนแสง (OD_{660})	ค่ากิจกรรมการยับยั้ง* (AU/ml)
4.5	3.272	40.00
5.0	3.715	106.67
5.5	4.383	1280.00
6.0	4.630	2,560.00
6.5	4.695	4,266.67
7.0	4.705	4,266.67

หมายเหตุ : * ข้อมูลที่ได้มาจากหาค่าเฉลี่ยในการทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ



ภาพ 18 ผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน

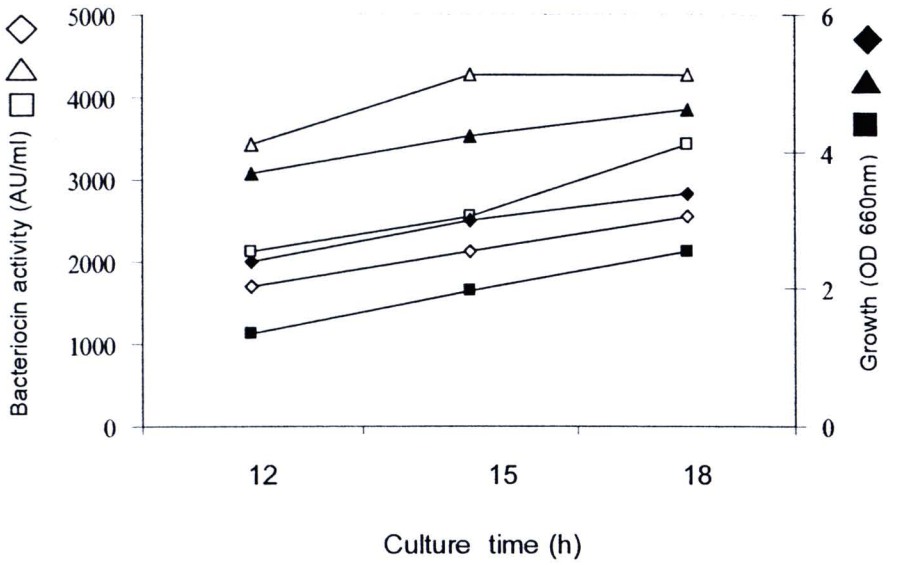
6.2 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52

จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS ดัดแปลง โดยมีองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน และปรับอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส โดยแต่ละอุณหภูมิบ่มเป็นเวลา 12, 15 และ 18 ชั่วโมง พบว่า แบคทีเรียเจริญเติบโตได้ดีที่สุดคืออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บ่มเป็นเวลา 15-18 ชั่วโมง ให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งการยับยั้งของแบคเทอริโอซินสูงสุด อุณหภูมิ 30 และ 45 องศาเซลเซียส บ่มเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินสูงสุด เมื่อเปรียบเทียบทั้ง 3 อุณหภูมิ พบว่า ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อทดสอบที่สูงสุด คือ 4,266.67 (AU/ml) แสดงดังตาราง 17 และ ภาพ 19 จากการทดลองนี้ พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญจะเป็นอุณหภูมิเดียวกับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซินซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับการผลิต lactocin A (Parent *et al.*, 1994) enterocin 1146 (Parent and Ricciandi, 1999) amylovorin 1471 (De Vuyst *et al.*, 1996) และ nisin Z (Matsusaki *et al.*, 1996)

ตาราง 17 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52

อุณหภูมิ	บ่ม 12 ชั่วโมง		บ่ม 15 ชั่วโมง		บ่ม 18 ชั่วโมง	
	A*	B*	A*	B*	A*	B*
30	1.352	2133.33	1.972	2,560.00	2.55	3,413.33
37	3.687	3,413.33	4.216	4,266.67	4.632	4,266.67
45	2.388	1,706.67	2.99	2133.33	3.402	2,560.00

หมายเหตุ : A* = ค่าดูดกลืนแสง (OD_{660}) B* = ค่ากิจกรรมการยับยั้ง (AU/ml)
* = ข้อมูลที่ได้มาจากหาค่าเฉลี่ยในการทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ



สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ภาพ 19 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS ที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 บ่มที่ (□, ■) อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (△, ▲) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ (◇, ◆) อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้ออกซิเจน

6.3 ผลของระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่มีต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน

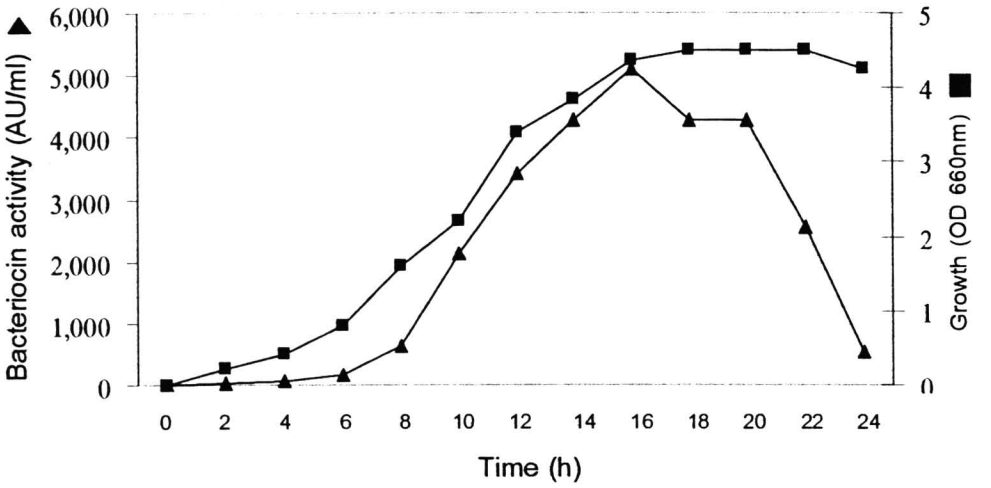
จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS ดัดแปลง โดยองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน และมีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้ออกซิเจน ทำการเก็บตัวอย่างทุก ๆ 2 ชั่วโมง จนครบชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย พบว่า แบคเทอริโอซินเริ่มมีการผลิตออกมาในชั่วโมงที่ 2 ของการเจริญของแบคทีเรีย (lag phase) หลังจากนั้นการผลิตแบคเทอริโอซินเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ตามลำดับ หลังจากชั่วโมงที่ 10 ของการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย (log phase) ค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินเพิ่มอย่างรวดเร็ว และในชั่วโมงที่ 16 ของการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย (early stationary phase) พบว่า แบคทีเรียผลิตแบคเทอริโอซินให้มีค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงสุด โดยค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินเท่ากับ 5,120.00 AU/ml หลังจากนั้นกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินมีค่าลดลงตามลำดับ แสดงดังตาราง 18 และ ภาพ 20 ซึ่งมีรายงานมากมายเกี่ยวกับ ผลของระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่มีต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน เช่น Schlegel and Slade (1973) ได้มีการศึกษาผลผลิตของ streptococcin AFF22 พบว่า แบคทีเรียผลิตแบคเทอริโอซินมีกิจกรรมการยับยั้งสูงสุดอยู่ในช่วง log phase ของการเจริญของแบคทีเรีย หลังจากนั้นผลผลิตค่อย ๆ ลดลงก่อนเข้าสู่ช่วง

stationary phase ซึ่งแตกต่างกับ streptococcin AFF22 ที่มีการเริ่มผลิตในช่วงปลายของ log phase และจะค่อย ๆ ลดลงอย่างช้า ๆ ในช่วง stationary phase ของการเพาะเลี้ยง Lachowicz (1965) ได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงผลผลิตของ staphtlococcin A-1262a บนอาหารแข็ง พบว่าค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินเพิ่มขึ้นหลังจากการบ่มเป็นเวลา 8 ชั่วโมง และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียนาน 18-24 ชั่วโมง พบว่า ให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินสูงสุด หลังจากนั้นค่อย ๆ ลดลงตามลำดับ นอกจากนี้ Noonpakdee *et al.* (2003) รายงานผลการศึกษาผลผลิตของ nisin จากแบคทีเรีย *Lactococcus lactis* WNC20 พบว่า แบคทีเรียผลิตแบคเทอริโอซินให้ค่ากิจกรรมยับยั้งสูงสุดในช่วง early stationary ของการเจริญของแบคทีเรีย และค่ากิจกรรมการยับยั้งค่อย ๆ ลดลงตามลำดับ Parente *et al.* (1994) ได้อธิบายการสูญเสียกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซิน เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเป็นระยะเวลานานมาก สิ่งเหล่านี้อาจขึ้นอยู่กับความจำเพาะของแบคเทอริโอซินในการสูญเสียกิจกรรมการยับยั้ง หรือการถูกย่อยโดยเอนไซม์ หรือ คุณสมบัติในการดูดซึมของบคเทอริโอซินของเซลล์ผู้ผลิต

ตาราง 18 ผลของระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่มีต่อการผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52

เวลาในการบ่มเชื้อแบคทีเรีย (ชั่วโมง)	ค่าดูดกลืนแสง (OD_{660})	ค่ากิจกรรมการยับยั้ง* (AU/ml)
0	0.01	0.00
2	0.22	20.00
4	0.415	53.33
6	0.812	160.00
8	1.589	640.00
10	2.213	2,133.33
12	3.585	3,413.33
14	3.833	4,266.67
16	4.254	5,120.00
18	4.499	4,266.67
20	4.501	4,266.67
22	4.502	2,560.00
24	4.245	533.33

หมายเหตุ : *ข้อมูลที่ได้มาจากหาค่าเฉลี่ยในการทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ



ภาพ 20 ผลของระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่มีต่อการผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS ที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน

7. ผลการทำแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 ให้บริสุทธิ์บางส่วน

จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 โดยใช้ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.2 % (v/v) ในอาหารเหลวสูตร MRS สูตรดัดแปลง ที่มีความเหมาะสมในการผลิตแบคเทอริโอซิน ปริมาตร 500 มิลลิลิตร มีพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.5 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนใสออกจากเซลล์ ด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำของเหลวใสมาทำการปรับค่าพีเอชเป็น 6.5 พบว่า แบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 มีการผลิต แบคเทอริโอซินมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 1,280 AU/ml มีปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 1,988 มิลลิกรัม และมีค่ากิจกรรมการยับยั้งจำเพาะเท่ากับ 321.93 AU/mg จากนั้นนำของเหลวใสที่เหลือไปตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต จำนวน 472 กรัมต่อลิตร (70 % NH_4SO_4 saturation) กวนทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อแยกตะกอนโปรตีนออกจากของเหลวใส นำตะกอนโปรตีนที่ได้ซึ่งมีลักษณะสีน้ำตาลเข้ม มาละลายในโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ ปริมาตร 6 มิลลิลิตร พบว่า แบคเทอริโอซินมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเพิ่มขึ้นเป็น 40,960 AU/ml มีปริมาณโปรตีนทั้งหมด 59.04 มิลลิกรัม และมีค่ากิจกรรมการยับยั้งจำเพาะเท่ากับ 4162.6 AU/mg ดังนั้น ขั้นตอนการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตทำให้แบคเทอริโอซินมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 12.93 เท่า การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต เป็นวิธีที่ง่ายในการทำให้

แบคเทอริโอซินเข้มข้นเพิ่มขึ้น ซึ่ง Mao และคณะ (2001) ได้รายงานว่า การทำแบคเทอริโอซินให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีนี้สามารถทำให้ lacticin FS 92 มีกิจกรรมการยับยั้งจำเพาะสูงขึ้นเป็น 40 เท่า และจากนั้นนำแบคเทอริโอซินมาทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้น โดยนำมาผ่านคอลัมน์ CENTRI-SEP (Gel filtration) เพื่อทำการแยกเกลือและองค์ประกอบอื่น ๆ ออกจากแบคเทอริโอซิน พบว่า แบคเทอริโอซินมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 5,4613 AU/ml มีปริมาณโปรตีนทั้งหมด 4.896 มิลลิกรัม และมีค่ากิจกรรมการยับยั้งจำเพาะเท่ากับ 66,927.69 AU/mg ขั้นตอนการแยกเกลือและสารประกอบอื่น ๆ ออกจากแบคเทอริโอซินทำให้ แบคเทอริโอซินมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 207.89 เท่า ดังตาราง 19 วิธีการแยกเกลือและองค์ประกอบอื่น ๆ ออกจากแบคเทอริโอซิน มีหลายวิธีด้วยกัน เช่น การใช้ถุงไดอะไลซิส (dialysis) ที่มีขนาด cut-off เท่ากับ 1 kDa, cation exchange chromatography, hydrophobic interaction chromatography และ reverse-phace high performance liquid chromatography (Nes *et al*, 1996)

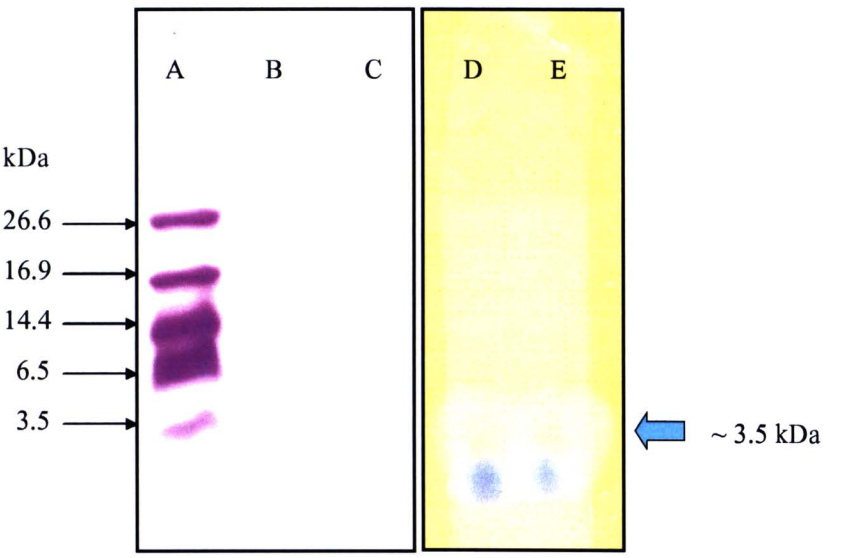
ตาราง 19 การทำให้แบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 บริสุทธิ์บางส่วน

Step	Volume (ml)	Activity (AU/ml)	Total activity (AU)	Total protein (mg)	Specific activity (AU/mg)	Fold of purification (fold)
I. Culture supernatant	500	1,280	64,000	1,988	321.93	1
II. Ammoniun sufate precipitation	6	40,960	245,760	59.04	4,162.60	12.93
III. Gel filtration	6	54,613	327,678	4.896	66,927.69	207.89

8. **การแยกสารแบคเทอริโอซินโดยวิธี tricine sodium dodecyl suphate polyacrylamide gel electrophoresis (Tricine-SDS-PAGE)**

จากการนำตัวอย่างแบคเทอริโอซินที่ผ่านกระบวนการ gel filtration มาทำการวิเคราะห์หามวลโมเลกุลโปรตีน โดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซีสบนเจลสำเร็จรูป Ready Gel® Precast Gels (BIO-RAD) ประกอบด้วย 16.5 % Tricine-SDS polyacrylamide gel ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นแบ่งเจลออกเป็น 2 ส่วน คือ เจลส่วนแรกทำการตรึงตัวอย่างด้วย สารละลาย destaining เป็นเวลา 30 นาที ต่อมาย้อม Coomassie blue stain และล้างออกด้วย destaining เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่า เกิดแถบโปรตีน 1 แถบ และเจลส่วนที่สองทำการตรึงตัวอย่างด้วยสารละลาย destaining เป็น

เวลา 30 นาที ล้างด้วยน้ำปราศจากอิออนครั้งละ 30 นาที จำนวน 4 ครั้ง เพื่อนำไปทดสอบหาบริเวณการยับยั้งของแบคเทอริโอซิน พบว่าบริเวณที่เกิดการยับยั้งต่อแบคทีเรียทดสอบเกิดขึ้นตรงตำแหน่งเดียวกับที่เกิดแถบโปรตีนของเจลส่วนแรก แสดงว่า แบคเทอริโอซินชนิดนี้มีมวลโมเลกุลโปรตีนประมาณ 3.5 kDa ดังภาพ 21 ซึ่งผลการทดลองนี้ให้ผลเช่นเดียวกับ Oh *et al.* (2000) วิเคราะห์มวลโมเลกุลโปรตีนของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Lb. acidophilus* 30SC โดยวิธี 16.5 % Tricine-SDS-PAGE พบว่า มีมวลโมเลกุลโปรตีนของแบคเทอริโอซินเท่ากับ 3.5 kDa แบคเทอริโอซินชนิดนี้อาจจัดอยู่ใน Class IIa เนื่องจากมีขนาดโมเลกุลโปรตีนขนาดเล็ก สามารถทนความร้อนได้ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที โดยเฉพาะมีค่ากิจกรรมยับยั้งแบคทีเรียกลุ่ม literial เป็นหลัก ซึ่งมีรายงานเกี่ยวกับแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Lb. salivarius* เช่น bacteriocin OR7 ผลิตจากแบคทีเรีย *Lb. salivarius* มีมวลโมเลกุลประมาณ 6 kDa สามารถทนความร้อนได้ดี มีความจำเพาะในการยับยั้งแบคทีเรียกลุ่ม literial ซึ่งถูกจัดอยู่ใน Class IIa (Stern *et al.*, 2006) นอกจากนี้ salivarisin B ผลิตจากแบคทีเรีย *Lb. salivarius* M7 ถูกจัดอยู่ใน Class IIa เช่นเดียวกัน (Cataloluk and Gurakan, 2003)



ภาพ 21 ผลการแยกแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 โดยวิธี 16.5 % Tricine-SDS-PAGE

Lane A	โปรตีนมาตรฐาน
Lane B และ C	แถบแบคเทอริโอซินที่ย้อมด้วยสี Coomassie brilliant blue
Lane D และ E	บริเวณเกิด clear zone การยับยั้งของแบคเทอริโอซินต่อ *Lb. fermentum* JCM 1173