MRG4780015 ผศ.ดร. ปิยะนุช เนียมทรัพย์ (บุญคุ้มเกล้า)

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
246117

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การผลิตสารต้านจุลชีพจากแลคติกแอสิดแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหาร

Production of bacteriocin by lactic acid bacteria in the intestinal tract

โดย ผศ.ดร.ปิยะนุช เนียมทรัพย์ และคณะ

ตุลาคม 2553

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
246117
b00251145

สัญญาเลขที่ MRG4780015

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

การผลิตสารต้านจุลชีพจากแลคติกแอสิดแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหาร

Production of bacteriocin by lactic acid bacteria in the intestinal tract

คณะผู้วิจัย	สังกัด
ผศ.ดร.ปิยะนุช เนียมทรัพย์	สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
รศ.ดร.อภิญญา อัศวนิก	ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา
และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) ที่ให้การสนับสนุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานของอาจารย์รุ่นใหม่ในครั้งนี้

การวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี จากความอนุเคราะห์อุปกรณ์และเครื่องมือในสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ และห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้และภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล คณะผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

ปิยะนุช เนียมทรัพย์
อภิญญา อัศวนิก
คณะผู้วิจัย

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ MRG4780015

ชื่อโครงการ การผลิตสารต้านจุลชีพจากแลคติกแอสิดแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหาร

ชื่อนักวิจัย ผศ.ดร.ปิยะนุช เนียมทรัพย์
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
รศ.ดร.อภิญญา อัศวนิก
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

Email address piyanuch@mju.ac.th

ระยะเวลาโครงการ กรกฎาคม 2547-ธันวาคม 2549

246117

การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์ ที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้ โดยวิธี direct plating จำนวน 26,765 โคโลนี พบว่า มีโคโลนีที่เกิดวงใสต่อเชื้อทดสอบ จำนวน 66 ไอโซเลท เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ของแบคเทอริโอซินในการยับยั้งต่อเชื้อทดสอบ โดยวิธี well diffusion assay พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท CF50, CF51 และ CF52 มีฤทธิ์การยับยั้งต่อแบคทีเรียกรดแลคติกที่อยู่ในกลุ่มใกล้เคียง และแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดในอาหารได้ แบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท สามารถทนความร้อนได้ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที สามารถทนพีเอชได้ในช่วง 3.0-10.0 และกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินถูกทำลายได้โดยเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน เช่น proteinase k และ protease จากการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งต่อทดสอบ และการทนความร้อนของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท CF52 ให้ผลการทดสอบดีที่สุด เมื่อนำไปจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CH และหาลำดับเบสของ DNA ในส่วนของยีน 16S rRNA พบว่า เป็นแบคทีเรีย *Lactobacillus salivarius* CF52 จากการทดสอบหาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 พบว่า แบคทีเรียชนิดนี้สามารถผลิตแบคเทอริโอซินที่มีค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงสุดเท่ากับ 5,120 AU/ml ในอาหาร MRS สูตรดัดแปลง ซึ่งประกอบด้วย maltose เข้มข้น 2.5 % (w/v), peptone เข้มข้น 0.5 % (w/v), beef extract เข้มข้น 1.0 % (w/v), K_2HPO_4 เข้มข้น 0.1-0.2 % (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ เข้มข้น 1.0 % (w/v), CH_3COONa เข้มข้น 0.5 % (w/v), $(NH_4)_2C_6H_6O_7$ เข้มข้น 0.2 % (w/v), $MnSO_4.H_2O$ เข้มข้น 0.004 % (w/v) และ Tween 80 เข้มข้น 0.1 % (w/v) พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจนและทำให้แบคเทอ-ริโอซินบริสุทธิ์บางส่วนโดยตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และ gel filtration ทำให้ แบคเทอริโอซินมีกิจกรรมการยับยั้งจำเพาะสูงขึ้น 207 เท่า และมีน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนประมาณ 3.5 kDa โดยวิธี 16.5 % Tris-Tricine-SDS-PAGE

คำสำคัญ: แบคทีเรียกรดแลคติก แบคเทอริโอซิน ระบบทางเดินอาหาร

Abstract

Project code	MRG4780015
Project title	Production of bacteriocin by lactic acid bacteria in the intestinal tract
Investigator	Assistant Professor Dr.Piyanuch Niamsup
	Program in Biotechnology, Faculty of Science, Maejo University
	Associate Professor Dr.Apinya Assavanig
	Department of Biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University
Email address	piyanuch@mju.ac.th
Project period	July 2004-December 2006

246117

The isolation of 26,765 colonies of lactic acid bacteria (LAB) from human and animal gastrointestinal tracts to test for their bacteriocidin production through direct plating, resulted to only 66 isolates which were able to produce bacteriocin. Later when these isolates were tested for the antimicrobial spectrum of bacteriocin against indicator strains using the well diffusion assay, it was found that CF50, CF51 and CF52 isolates were able to inhibit not only closely related LAB but also some food-borne pathogens. Bacteriocin produced by these three strains was found to be heat resistant at 121°C for 20 minutes and pH range of 3.0-10.0 but bacteriocin was also found to be inactivated by enzymes, proteinase k and protease. Based on the study of the antimicrobial spectrum of the bacteriocin and heat resistance of these isolates, results indicated that bacterial isolate CF52 gave the best findings and later, when tested for classification of bacterial strain by API 50 CH and of DNA base sequencing in terms of 16S rRNA, this isolate was identified as *Lactobacillus salivarius* CF52. Further study on media composition and suitable culture conditions for bacteriocin production, results showed that this *Lb. salivarius* CF52 displayed optimum bacterial inhibition activity (5,120 AU/ml) when cultured with modified MRS medium containing maltose (2.5%), peptone (0.5%), beef extract (1.0%) K_2HPO_4 (0.1-0.2%), $MgSO_47H_2O$ (1.0%), Na-acetate (0.5%), $(NH_4)_2C_6H_6O_7$ (0.2%), $MnSO_4H_2O$ (0.004%) and Tween 80 (0.1%), with an initial pH of 6.5 and incubated anaerobically at 37°C for 16 hours. In addition, when bacteriocin was partially purified using ammonium sulfate precipitation and gel filtration, results indicated a 270-fold increase of its specific activity and a molecular weight of about 3.5 kDa.

Keywords: lactic acid bacteria, bacteriocin, gastrointestinal tract

Executive summary

แบคทีเรียกรดแลคติก จำนวน 66 ไอโซเลท ซึ่งคัดแยกจากระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์ เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ของแบคเทอริโอซินในการยับยั้งต่อเชื้อทดสอบ 36 ชนิด พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท CF50 CF51 และ CF52 มีฤทธิ์การยับยั้งต่อแบคทีเรียกรดแลคติกที่อยู่ในกลุ่มใกล้เคียง และแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดได้ แบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท มีความเสถียรต่อความร้อน มีกิจกรรมการยับยั้งในช่วงพีเอชกว้าง และเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนทำลายกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซิน ซึ่งแสดงว่า แบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท เป็นสารประกอบประภทโปรตีน และพบว่า แบคทีเรียไอโซเลท CF52 ผลิตแบคเทอริโอซินมีฤทธิ์การยับยั้งต่อทดสอบและทนต่อความร้อนได้ดีที่สุด เมื่อนำไปจำแนกชนิดของแบคทีเรียในระดับสปีชีส์ พบว่าเป็นแบคทีเรีย *Lactobacillus salivarius* CF52 จากการทดสอบหาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 พบว่า แบคทีเรียชนิดนี้ สามารถผลิตแบคเทอริโอซินที่มีค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงสุดเท่ากับ 5,120 AU/ml ในอาหาร MRS สูตรดัดแปลง ซึ่งประกอบด้วย maltose เข้มข้น 2.5 % (w/v), peptone เข้มข้น 0.5 % (w/v), beef extract เข้มข้น 1.0 % (w/v), K_2HPO_4 เข้มข้น 0.1-0.2 % (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ เข้มข้น 1.0 % (w/v), CH_3COONa เข้มข้น 0.5 % (w/v), $(NH_4)_2C_6H_6O7$ เข้มข้น 0.2 % (w/v), $MnSO_4.H_2O$ เข้มข้น 0.004 % (w/v) และ Tween 80 เข้มข้น 0.1 % (w/v) พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน และทำให้แบคเทอริโอซินบริสุทธิ์บางส่วนโดยตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และ gel filtration ทำให้แบคเทอริโอซินมีกิจกรรมการยับยั้งจำเพาะสูงขึ้น 207 เท่า และเมื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของแบคเทอริโอซินด้วยวิธี 16.5 % Tris-Tricine-SDS-PAGE พบว่าแบคเทอริโอซินชนิดนี้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 3.5 KDa

จากผลการวิจัย พบว่า แบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 เป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่ง หากได้มีการศึกษาข้อมูลต่าง ๆ เพิ่มเติม ซึ่งน่าจะมีความเป็นไปได้ในการนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารถนอมอาหาร หรือใช้เป็นเชื้อตั้งต้นในการผลิตอาหารหมัก หรือนำไปใช้เป็นโปไบโอติกในอาหารสัตว์ ซึ่งจะช่วยส่งเสริมสุขภาพสัตว์ และช่วยลดการเกิดโรคติดเชื้อในสัตว์เศรษฐกิจ

สารบัญเรื่อง

หน้า

กิตติกรรมประกาศ ก
บทคัดย่อ ข
ABSTRACT ค
Executive summary ง
สารบัญเรื่อง จ
สารบัญตาราง ช
สารบัญภาพ ฌ
สารบัญตารางภาคผนวก ฎ
สารบัญภาพภาคผนวก ฎ
บทที่ 1 บทนำ 1
ความสำคัญของปัญหา 1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร 3
ระบบทางเดินอาหาร 3
จุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร 5
แบคทีเรียกรดแลคติก 7
แบคทีเรียกรดแลคติกในระบบทางเดินอาหาร 8
สารต้านทานจุลชีพจากแบคทีเรียกรดแลคติก 9
คำจำกัดความของแบคเทอริโอซิน 12
ระบบการตั้งชื่อของแบคเทอริโอซิน 13
การจำแนกชนิดของแบคเทอริโอซิน 13
แหล่งของแบคเทอริโอซิน 15
การสังเคราะห์แบคเทอริโอซิน 16
กิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซิน 16
การผลิตแบคเทอริโอซิน 17
การทำแบคเทอริโอซินให้บริสุทธิ์ 18
การประยุกต์ใช้แบคเทอริโอซินในอาหาร 18
แบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้จากระบบทางเดินอาหาร 19

หน้า

กรอบแนวความคิด 21
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง 22
อุปกรณ์การทดลอง 22
วิธีการทดลอง 26
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ 42
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง 74
ข้อเสนอแนะ 75
Output ที่ได้ของโครงการ 75
บรรรณานุกรม 76
ภาคผนวก
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ 85
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมี 89
ภาคผนวก ค ลำดับเบสของ DNA ในส่วนของยีน 16S rRNA 94
ภาคผนวก ง กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีน 96
ภาคผนวก จ มวลโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน 105
ภาคผนวก ฉ บทความสำหรับการเผยแพร่ทางวิชาการ 101

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1	แสดงสายพันธุ์แบคทีเรียทดสอบและสภาวะในการเลี้ยง	28
2	ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ	37
3	จำนวนส่วนโคโลนีที่เกิดวงใสเทียบกับจำนวนโคโลนีทั้งหมด	43
4	ฤทธิ์การยับยั้งของแบคเทอริโอซินต่อเชื้อทดสอบ โดยวิธี well diffusion assay	44
5	ผลของพีเอชต่อกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซิน โดยวิธี well diffusion assay โดย ใช้ *Lb. fermentum* JCM 1173 เป็นเชื้อทดสอบ	47
6	ผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่อกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินโดยวิธี well diffusion assay โดย ใช้ *Lb. fermentum* JCM 1173 เป็นเชื้อทดสอบ	47
7	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของแบคทีเรียไอโซเลท CF52 เปรียบเทียบกับ *Lb. salivarius* K7	49
8	คุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียไอโซเลท CF52	51
9	ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52	55
10	ผลของ maltose ที่ระดับความเข้มต่าง ๆ ต่อการผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52	57
11	ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52	59
12	ผลของการเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ต่อการผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52	61
13	ผลความเข้มข้นของ K_2HPO_4 ต่อการผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52	63
14	ผลความเข้มข้นของ $MgSO_4.7H_2O$ ต่อการผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52	65
15	องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52	66

ตาราง (ต่อ) หน้า

16	ผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน ของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52	67
17	ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52	68
18	ผลของระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่มีต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน ของแบคทีเรีย *Lactobacillus salivarius* CF52	70
19	การทำให้แบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 บริสุทธิ์บางส่วน	72

สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
1	แสดงส่วนประกอบของท่อทางเดินอาหารของสัตว์	4
2	แสดงชนิดจุลินทรีย์ประจำถิ่นของระบบทางเดินอาหารมนุษย์	6
3	แสดงลักษณะผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักน้ำตาลกลูโคสของแบคทีเรียกรดแลคติก	8
4	ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งของแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียไอโซเลท CF50, CF51 และ CF52 ในการยับยั้ง *Lb. fermentum* JCM 1173 โดยวิธี well diffusion assay	42
5	แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ของสารแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียไอโซเลท CF50, CF51 และ CF52 ในการยับยั้งเชื้อ *Lb. fermentum* JCM 1173 โดยวิธี well diffusion assay	44
6	ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซิน โดยวิธี well diffusion assay โดยใช้ *Lb. fermentum* JCM 1173 เป็นเชื้อทดสอบ	45
7	รูปร่างและการติดสีแกรมของแบคทีเรียไอโซเลท CF52 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ กำลังขยาย 1,000 เท่า	48
8	ผลการหมักคาร์บอนไฮเดรตของแบคทีเรียไอโซเลท CF52 ด้วย API 50 CH	51
9	ขนาดของ DNA ที่ได้จากการทำ PCR ในส่วนของยีน 16S rDNA ตำแหน่งลำดับเบส บริเวณ V_1-V_3ของแบคทีเรียไอโซเลท CF52	52
10	ลำดับของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลทCF52 เกิดจากการนำลำดับเบสของ primer 27F และprimer 520Rไปเทียบกันในโปรแกรม BioEdit	53
11	แบคทีเรียที่มีลำดับเบสในส่วนยีน 16S rRNA คล้ายกับแบคทีเรียไอโซเลท CF52	53
12	แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตแบคเทอริโอซินของของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน	55
13	ผลของ maltose ที่ระดับความเข้มต่าง ๆ ต่อการผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52ใน อาหารเหลวสูตร MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน	57
14	ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น maltose เข้มข้น 2.5 % (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน	59

ภาพ (ต่อ) หน้า

15 ผลของการเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน ของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น maltose เข้มข้น 2.5 % (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน 61

16 ผลของความเข้มข้นของ K_2HPO_4 ที่เหมาะสม ต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน ของแบคทีเรีย *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 63

17 ผลความเข้มข้นที่เหมาะสมของ $MgSO_4.7H_2O$ ต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน ของแบคทีเรีย *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 66 67

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

19 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS ที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 บ่มที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้ออกซิเจน 69

20 ผลของระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่มีต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน ของแบคทีเรีย *Lactobacillus salivarius* CF52 ในอาหารเหลวสูตร MRS ที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน 71

21 ผลการแยกแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Lb. salivarius* CF52 โดยใช้วิธี 16.5 % Tricine-SDS-PAG 73

สารบัญตารางภาคผนวก

ตารางภาคผนวก		หน้า
1	แสดงปริมาณของสารละลายต่าง ๆ ที่ใช้สำหรับหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry	97
2	แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน	98
3	มวลโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน (Polypeptide SDS-PAGE standards)	100

สารบัญภาพภาคผนวก

ภาพภาคผนวก		หน้า
1	ลำดับเบสของยีน16S rRNAของแบคทีเรียไอโซเลท CF52 ที่ได้จาก primer 27F	94
2	ลำดับเบสของดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย ไอโซเลท CF52 ที่ได้จาก primer 520R	95
3	แสดงกราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry	99