คุณสมบัติของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดยแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหารหมัก

Characterization of a Bacteriocin Produced by Lactic Acid Bacteria Isolated from Fermented Foods

วรายุทธ สุระนรากุล (Warayut Suranarakhun)* ดร. สัมภาษณ์ คุณสุข (Dr. Sumpars Khunsook)**
ปาริชาติ พุ่มขจร (Parichat Phumkhachorn)***
ดร. พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ (Dr. Pongsak Rattanachaikunsopon)****

บทคัดย่อ

จากการคัดเลือกเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้จากตัวอย่างแหนมโดยวิธี agar spot assay พบว่ามีเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียจำนวน 49 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 ได้ เมื่อนำเชื้อทั้ง 49 ไอโซเลต ไปทำการสกัดพลาสมิดพบว่ามีเพียงเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย รหัส NO5 เท่านั้นที่มีพลาสมิดขนาด 2.5 kb โดยเชื้อดังกล่าวถูกตรวจสอบว่าเป็นเชื้อ *Lactococcus* เมื่อทำการศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบของแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียรหัส NO5 โดยวิธี swab- paper disc พบว่า แบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งได้เฉพาะเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกเท่านั้น ซึ่งได้แก่ *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus subtilis* TISTR 008, *Streptococcus pneumoniae* DMS 5851, *Streptococcus pyogenes* ATCC 12384, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 จากศึกษากลไกการทำงานของแบคเทอริโอซินโดยการนำเซลล์ของ *L. mesenteroides* TISTR 473 ที่ถูกยับยั้งการเจริญโดยแบคเทอริโอซินมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องกราด (SEM) พบว่าเซลล์ดังกล่าวไม่มีการเปลี่ยนแปลง เมื่อทำการศึกษาคุณสมบัติของแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียรหัส NO5 พบว่าแบค เทอริโอซินดังกล่าวเป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 10 kDa สามารถทนความร้อนได้ที่อุณหภูมิ 121˚C เป็นเวลาอย่างน้อย 15 นาที เชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียรหัส NO5 สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้สูงสุดซึ่งมีค่าเท่ากับ 1,280 AU/ml หลังจากที่ทำการบ่มเชื้อดังกล่าวเป็นเวลา 7 ถึง 8 ชั่วโมง เมื่อตรวจหาตำแหน่งยีนสำหรับแบคเทอริโอซินของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียรหัส NO5 พบว่ายีนดังกล่าวเป็นยีนที่น่าจะอยู่บนพลาสมิด

---

* *มหาบัณฑิต หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*

** *อาจารย์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*

*** *ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี*

**** *รองศาสตราจารย์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี*

ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB) isolated from Nham were screened for bacteriocin production by agar spot assay. Forty nine isolates of LAB were found to be able to inhibit *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473. Of all selected bacterial isolates, only one isolate, designated as NO5, harbored a plasmid of 2.5 kb in size. The bacterial isolate was identified as *Lactococcus*. LAB NO5 was tested for its inhibitory activity against a variety of indicator organism. It was found that the bacterial isolate inhibited only gram positive bacteria including *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus subtilis* TISTR 008, *Streptococcus pneumoniae* DMS 5851, *Streptococcus pyogenes* ATCC 12384, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *L. mesenteroides* TISTR 473. By using scanning electron microscopy, no change was observed in cells of *L. mesenteroides* TISTR 473 treated with bacteriocin of LAB NO5. The bacteriocin was shown to be a protein with a molecular weight of approximately 10 kDa. It was resistant to heat treatment at 121°C for at least 15 min. The highest bacteriocin activity 1,280 AU/ml, was detected after the culture of LAB NO5 was grown for 7 and 8 h. The localization of bacteriocin gene was also studied. It was found that the gene was likely to be located on the plasmid.

คำสำคัญ : แลคติคแอสิดแบคทีเรีย พลาสมิด
Key Words : Lactic acid bacteria, Plasmid

บทนำ

แลคติคแอสิดแบคทีเรีย (lactic acid bacteria) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเซลล์มีลักษณะแท่งหรือกลม ไม่สร้างสปอร์ พบทั่วไปในธรรมชาติ อาหารหมักดองทั่วไป เช่น ผักดอง ผลไม้ดอง ผลิตภัณฑ์เนื้อต่างๆ นอกจากนี้ยังพบได้ในระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินอาหาร และลำไส้เล็กของมนุษย์และสัตว์ กระบวนการหมักที่เกิดขึ้นจะช่วยแปรรูปทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ชนิดใหม่ๆ ที่มีเอกลักษณ์เฉพาะตัวทั้ง กลิ่น รสชาติ และเนื้อสัมผัส เช่น การเปลี่ยนจากนมให้กลายเป็นโยเกิร์ต เนย นมเปรี้ยว (Gonzalez *et al*., 1994) ทั้งยังช่วยถนอมอาหารทำให้ยืดระยะเวลาในการเก็บรักษาอาหารได้นานขึ้น นอกจากนี้ แลคติคแอสิดแบคทีเรียยังมีส่วนสำคัญในการสร้างสารยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียหรือเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ปนเปื้อนอยู่ในอาหาร สารที่แลคติคแอสิดแบคทีเรียสร้างขึ้นและไปมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ดังกล่าว ได้แก่ กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดอะซิติล และ แบคเทอริโอซิน เป็นต้น

แบคเทอริโอซินเป็นโปรตีนที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้อย่างจำเพาะ โดยแบคเทอริโอซินจะไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีบริเวณรับจำเพาะ (specific receptor) ต่อแบคเทอริโอซินเท่านั้น จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าแบคเทอริโอซินหลายชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียหรือจุลินทรีย์ก่อโรคได้ (Farias *et al*.,1994) ทำให้นักวิทยาศาสตร์จำนวนมากหันมาให้ความสนใจในการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาแบคเทอริโอซินดังกล่าวให้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารหรือในทางการแพทย์ แต่การที่จะนำแบคเทอริโอซินไปใช้ประโยชน์ จำเป็นต้องมีข้อมูลต่างๆ เกี่ยวกับคุณสมบัติของแบคเทอริโอซินมากเพียงพอเพื่อที่จะสามารถกำหนดแนวทางการใช้แบคเทอริโอซินให้เป็นไปอย่างเหมาะสมและมีประสิทธิภาพสูงสุด

ตัวอย่างของข้อมูลเกี่ยวกับคุณสมบัติของแบคเทอริโอซินที่มีประโยชน์ต่อการนำไปใช้พิจารณากำหนดแนวทางการใช้แบคเทอริโอซิน เช่น ความสามารถในการทนต่อความร้อน การทนต่อสารเคมี กลไกการทำงานของแบคเทอริโอซิน สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของแบคเทอริโอซินในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ และสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน รวมทั้งคุณสมบัติในระดับโมเลกุล (molecular properties) ของแบคเทอริโอซิน เช่น น้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) ลำดับกรดอะมิโน (amino acid sequence) ลำดับเบส (nucleotide sequence) และตำแหน่งของยีนที่สร้างแบคเทอริโอซิน (bacteriocin gene) เป็นต้น ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ของแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียเพื่อที่จะนำข้อมูลดังกล่าวไปพัฒนาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารหรือในทางการแพทย์ต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

อาหารหมักที่ใช้ในการทดลอง

อาหารหมักที่ใช้ในการทดลองได้แก่ แหนม โดยสุ่มเก็บตัวอย่างจากร้านค้าในอำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี

เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ (indicator organism)

Eschericia coli O157: H7, *Listeria monocytogenes* DMS 20600, *Streptococcus pneumoniae* DMS 5851, *Streptococcus pyogenes* ATCC 12384, *Salmonella typhi* ATCC 5784 เพาะเลี้ยงในอาหาร brain heart infusion (BHI) *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus subtilis* TISTR 008, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 27736, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 เพาะเลี้ยงในอาหาร nutrient broth (NB) และ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR473 เพาะเลี้ยงในอาหาร 0.2% glucose MRS

1. การแยกเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียจากอาหารหมักโดยวิธี agar spot assay

ชั่งตัวอย่างแหนมใส่ในสารละลาย phosphate buffer pH 7.0 ทำให้ตัวอย่างกระจายตัวดีขึ้นด้วยเครื่องตีป่น นำมา streak บนอาหาร 0.2% glucose MRS agar บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเทอาหารกึ่งแข็งที่มีเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ *L. mesenteroides* TISTR 473 ที่บ่มข้ามคืนทับบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแลคติคแอสิดแบคทีเรียเจริญอยู่ นำไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบและเก็บแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินโดยสังเกต inhibition zone ที่เกิดขึ้นรอบๆ โคโลนี

2. การทดสอบความสามารถของแบคเทอริโอซินในการยับยั้งต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยวิธี swab-paper disc

การเตรียม culture supernatant ของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียทำโดยนำเชื้อที่เจริญไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 rpm และเก็บส่วนใสหรือ culture supernatant ไว้ใช้ในการทดสอบต่อไป

นำเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบแต่ละชนิดมาป้ายบนจานเลี้ยงเชื้อซึ่งบรรจุอาหารชนิดเดียวกันกับที่ใช้เลี้ยงเชื้อนั้นๆ วางแผ่น paper disc sterile จำนวน 2 แผ่น ลงบนผิวหน้าอาหาร หยด culture supernatant ของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย ลงบนแผ่น paper disc sterile แผ่นที่ 1 ส่วนอีกแผ่นหยด 0.2% glucose MRS broth เพื่อใช้เป็น control นำไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกต inhibition zone ที่เกิดขึ้นรอบๆ แผ่น paper disc

3. การศึกษาคุณสมบัติแบคเทอริโอซิน

3.1 การทนต่อเอนไซม์ นำ culture supernatant มาผสมกับเอนไซม์ชนิดต่างๆ เช่น pepsin,

lyzozyme, α-amylase, RNase (final concentration 1 mg/ml)

3.2 การทนต่อความร้อน นำ culture supernatant ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60˚C, 80˚C, 100˚C เป็นเวลา 60 นาที และที่อุณหภูมิ 121˚C เป็นเวลา 15 นาที

จากนั้นนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยวิธี swab-paper disc โดยใช้ *L. mesenteroides* TISTR 473 เป็นเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

4. การตรวจหาตำแหน่งยีนที่สร้างแบคเทอริโอซิน

นำแลคติคแอสิดแบคทีเรียไปสกัดพลาสมิด (Anderson and Mckay, 1983) และตรวจสอบด้วย agarose gel electrophoresis จากการทดลองถ้าพบว่าไม่มีพลาสมิดแสดงว่ายีนที่สร้างแบคเทอริโอซินน่าจะเป็นยีนที่อยู่บนโครมโซม แต่ถ้าจากการทดลองพบว่ามีพลาสมิดต้องทำการตรวจสอบต่อไปว่ายีนดังกล่าวเป็นยีนที่อยู่บนพลาสมิดหรือเป็นยีนที่อยู่บนโครมโซม โดยวิธี plasmid curing (Ruiz-Barba *et al*., 1991) ซึ่งมีวิธีการดังนี้

นำเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่บ่มข้ามคืนใส่ลงในหลอดทดลองที่มี 0.2% glucose MRS broth ผสมกับ ethidium bromide 3 หลอด (final concentration ของ ethidium bromide เท่ากับ 30, 40 และ 50 μg/μl ตามลำดับ) นำไปบ่มที่ 37˚C เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง มา spread plate และทำ replica plate นำ original plate มาเททับด้วยอาหารกึ่งแข็งที่มีเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ นำไปบ่มทำการตรวจสอบและเก็บโคโลนีที่สูญเสียความสามารถในการยับยั้งต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

5. การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสร้างแบคเทอริโอซินของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย

เลี้ยงเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียในอาหาร 0.2% glucose MRS broth ที่ 37˚C จากนั้นเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างครั้งละ 3 ml แบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนแรกนำไปวัดค่า optical density ที่ 600 nm (OD_{600}) เพื่อสร้างกราฟการเจริญ ส่วนที่สองนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 rpm ที่ 4˚C เป็นเวลา 10 นาที นำ culture supernatant ที่ได้ไปทำการเจือจางด้วย 0.2% glucose MRS broth ในอัตราส่วน 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 และ 1:128 ตามลำดับ แล้วนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยวิธี swab-paper disc จากนั้นนำผลที่ได้มาคำนวณค่า bacteriocin activity ในหน่วย AU/ml

6. การศึกษากลไกการทำงานของแบคเทอริโอซินในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ (mode of action)

นำ culture supernatant ของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย 1 ml ใส่ลงในเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ *L. mesenteroides* TISTR 473 ที่บ่มข้ามคืน 10 ml นำไปบ่มที่ 37˚C เก็บตัวอย่างในช่วงเวลา 0, 60 และ 120 นาที ไปวัดค่า OD600 นับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต โดยวิธี plate count method และศึกษาลักษณะเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนชนิดส่องกราด (SEM) ส่วนชุด control ใช้ 0.2% glucose MRS broth แทน culture supernatant

7. การทำให้แบคเทอริโอซินบริสุทธิ์ (Yang *et al*., 1992)

นำเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่บ่มข้ามคืนมาปรับ pH ให้เท่ากับ 7 นำไปให้ความร้อนที่ 70˚C เป็นเวลา 25 นาที และปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 rpm ที่ 4˚C เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนที่เป็นตะกอนไปล้างด้วย 5 mM sodium phosphate pH 6.5 ปริมาตร 100 ml นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง เก็บส่วนที่เป็นตะกอนไปละลายด้วย 100 mM sodium chloride pH 2 ปริมาตร 50 ml mixed ด้วย magnetic stirrer ที่ 4˚C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วย

ความเร็ว 15,000 rpm ที่ 4 ˚C เป็นเวลา 20 นาที ทำการเก็บ supernatant ที่มีแบคเทอริโอซินละลายอยู่

นำตัวอย่างไปหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี Tricine-SDS-PAGE โดยเตรียม 10% separating gel และ 5% stacking gel นำตัวอย่าง 10 µl ผสมกับ 2X loading buffer 10 µl จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที แล้ว load ลงบน polyacrylamide gel โดยใช้ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าเท่ากับ 200 โวลท์ เป็นเวลา 45 นาที จึงนำไปย้อมด้วยสี coomassie brilliant blue R-250 และล้างสีส่วนที่เกินออกด้วย destaining solution จนเห็นแถบโปรตีน

ผลการวิจัย

จากการคัดเลือกเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียในตัวอย่างแหนมจำนวน 27 ตัวอย่าง สามารถคัดเลือกเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียได้จำนวน 49 ไอโซเลต และเมื่อนำเชื้อทั้งหมดไปทำการสกัดพลาสมิด พบว่ามีเพียงเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย NO5 เท่านั้นที่มีพลาสมิด ดังนั้นจึงเลือกเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย NO5 ใช้ในการทดลองในขั้นตอนต่อไป

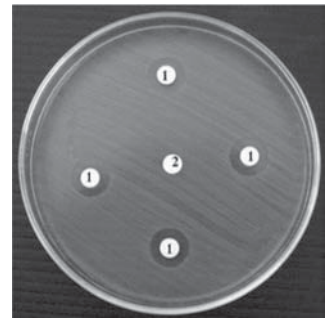
ตารางที่ 1 การยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบชนิดต่าง ๆ ของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย NO5

จุลินทรีย์ทดสอบ	ผลการทดลอง
E. coli O157:H7	-
S. pneumoniae DMS 5851	+
S. pyogenes ATCC 12384	+
S. typhi ATCC 5784	-
B. cereus ATCC 11778	+
B. subtilis TISTR 008	+
K. pneumoniae ATCC 27736	-
P. aeroginosa ATCC 27853	-
S. aureus ATCC 25923	+
L. mesenteroides TISTR 473	+
L. monocytogenes DMS 20600	-

+ = สามารถยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

- = ไม่สามารถยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

เมื่อนำ culture supernatant ของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย NO5 มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยวิธี swab-paper disc พบว่า culture supernatant สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* ATCC 11778, *B. subtilis* TISTR 008, *S. pneumoniae* DMS 5851, *S. pyogenes* ATCC 12384, *S. aureus* ATCC 25923 และ *L. mesenteroides* TISTR 473 ได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* O157:H7, *S. typhi* ATCC 5784, K. pneumoniae ATCC 27736, *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *L. monocytogenes* DMS 20600 (ภาพที่ 1 และ ตารางที่ 1)



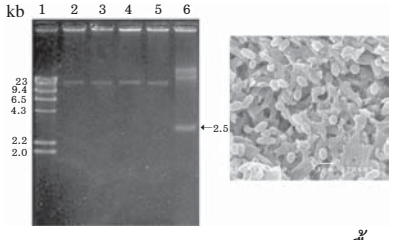
ภาพที่ 1 การยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย NO5 โดยวิธี swab- paper disc (1: culture supernatant, 2: control)

เมื่อศึกษาการทนต่อความร้อนและเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย NO5 พบว่า แบคเทอริโอซินสามารถทนต่อความร้อนที่ใช้ในการทดลองได้ทั้งหมด และสามารถทนต่อเอนไซม์ α-amylase, RNase และ lysozyme ได้ แต่ไม่สามารถทนต่อเอนไซม์ protenase K, pepsin และ trypsin ได้ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ผลของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย NO5 ในการทนต่อสภาวะต่าง ๆ

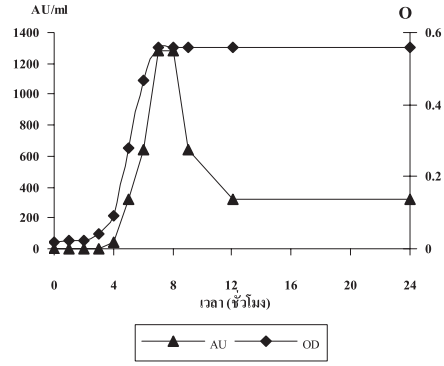
	การทดสอบ	ผลการทดลอง
เอนไซม์	pepsin	–
	trypsin	–
	proteinase K	–
	α- amylase	+
	RNase	+
	lysozyme	+
ความร้อน	60˚C 60 นาที	+
	80˚C 60 นาที	+
	100˚C 60 นาที	+
	121˚C 15 นาที	+

จากการศึกษาเบื้องต้น พบว่าเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย NO5 มีพลาสมิด ขนาด 2.5 kb (ภาพที่ 2) ดังนั้นจึงได้ทำการตรวจสอบต่อไปว่ายีนที่สร้างแบคเทอริโอซินเป็นยีนที่อยู่บนพลาสมิดหรือเป็นยีนที่อยู่บนโครโมโซมโดยการทำ plasmid curing จากการทดลอง พบว่าสามารถคัดเลือกเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย NO5 ที่ไม่สามารถสร้าง แบคเทอริโอซินได้ทั้งหมด 13 ไอโซเลต เมื่อนำเชื้อทั้ง 13 ไอโซเลตไปทำการสกัดพลาสมิดพบว่า เชื้อทั้ง 13 ไอโซเลตไม่มีพลาสมิด



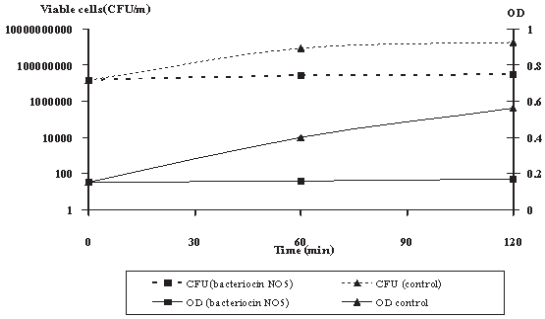
ภาพที่ 2 แสดง plasmid profile ของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย NO5 Lane 1: λ Hind III digest (DNA marker) Lane 2, 3, 4, 5: plasmid profile ของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย NO5 ที่ผ่านการ plasmid curing Lane 6: plasmid profile ของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย NO5 ที่ไม่ผ่านการ plasmid curing

เมื่อนำเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย NO5 มาหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสร้างแบคเทอริโอซิน พบว่าเชื้อจะใช้เวลาประมาณ 3 ชั่วโมงในระยะ lag phase จากนั้นจะเข้าสู่ระยะ exponential phase ในชั่วโมงที่ 4 และเข้าสู่ระยะ stationary phase ในชั่วโมงที่ 7 ส่วน แบคเทอริโอซินจะถูกสร้างขึ้นเมื่อเชื้อเริ่มเข้าสู่ระยะ exponential phase และจะถูกสร้างสะสมเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนมีปริมาณสูงสุดในช่วงตอนต้นของระยะ stationary phase ซึ่งใช้เวลาประมาณ 7 ถึง 8 ชั่วโมง โดยค่า bacteriocin activity สูงสุดที่วัดได้มีค่าเท่ากับ 1,280 AU/ml จากนั้นจะค่อย ๆ ลดลงเหลือ 640, 320 และ 320 AU/ml ในชั่วโมงที่ 9, 12 และ 24 ตามลำดับ (ภาพที่ 3)



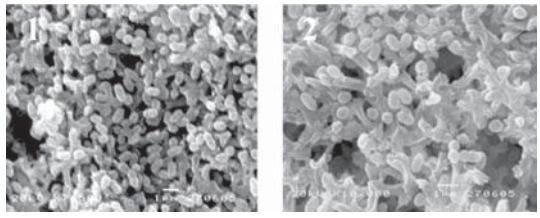
ภาพที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตกับการสร้างแบคเทอริโอซินของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย NO5

จากการศึกษากลไกการทำงานของแบคเทอริโอซินในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ *L. mesenteroides* TISTR 473 พบว่าค่า OD_{600} ที่วัดได้เพิ่มขึ้นเล็กน้อยและเมื่อนับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบพบว่าเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบมีการเพิ่มจำนวนขึ้นเล็กน้อยจาก 1.4×10^7 เป็น 3.1×10^7 CFU/ml ส่วนชุด control พบว่าค่า OD600 ที่วัดได้เพิ่มขึ้นจาก 0.15 เป็น 0.56 และจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบเพิ่มขึ้นจากเดิม 1.4×10^7 เป็น 1.7×10^9 CFU/ml (ภาพที่ 4)



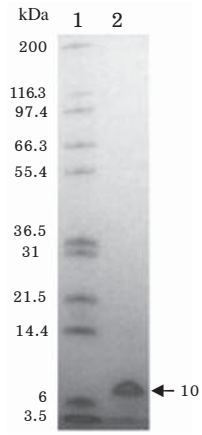
ภาพที่ 4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD600 กับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ *L. mesenteroides* TISTR 473 เมื่อนำมาทดสอบกับแบคเทอริโอซินของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย NO5

และเมื่อนำตัวอย่างของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนชนิดส่องกราด พบว่าลักษณะเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ *L. mesenteroides* TISTR 473 ไม่มีการเปลี่ยนแปลง (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 ลักษณะเซลล์ของเชื้อ *L. mesenteroides* TISTR 473 ที่บ่มในสภาวะที่มี culture supernatant ของแลคติคแอสิดแบคทีเรีย NO5 (1: ที่เวลา 0 นาที 7,500X, 2: ที่เวลา 60 นาที 7,500X และ 3: ที่เวลา 120 นาที 10,000X)

เมื่อนำแบคเทอริโอซินที่สร้างโดยเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย NO5 ไปทำให้ให้บริสุทธิ์ตามวิธีการของ Yang et al. (1992) และนำโปรตีนดังกล่าวมาวิเคราะห์โดยวิธี Tricine-SDS-PAGE พบว่ามีแถบโปรตีนหนึ่งแถบซึ่งมีขนาดประมาณ 10 kDa (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 แสดง Tricine-SDS-PAGE ของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย NO5 Lane 1: Mark 12 markers, Lane 2: แบคเทอริโอซินของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย NO5

และจากการจัดจำแนกชนิดของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย NO5 ตามวิธี Schillinger and Lucke. (1989) พบว่าเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย NO5 เป็นเชื้อในสกุล *Lactococcus*

สรุปและการอภิปรายผลการวิจัย

ในการคัดเลือกเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซิน มักใช้แลคติคแอสิดแบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ทดสอบ ทั้งนี้เนื่องจากคุณสมบัติประการหนึ่งของแบคเทอริโอซิน คือ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกับจุลินทรีย์ที่สร้างแบคเทอริโอซินได้ดีกว่าจุลินทรีย์กลุ่มอื่น ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกใช้ *L. mesenteroides* TISTR 473 เป็นเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ และเนื่องจากแลคติคแอสิดแบคทีเรียสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้หลายชนิด เช่น กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ หรือแบคเทอริโอซิน ดังนั้นในการทดลองจึงได้พยายามควบคุมไม่ให้แลคติคแอสิดแบคทีเรีย

สามารถสร้างกรดอินทรีย์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์หรือสร้างได้น้อยมากจนไม่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ ในการศึกษาครั้งนี้ได้ควบคุมไม่ให้เชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียสร้างกรดอินทรีย์โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีกลูโคสเพียง 0.2 % ซึ่งเป็นการจำกัดแหล่งคาร์บอนที่แลคติคแอสิดแบคทีเรียจะนำไปใช้ในการสร้างกรดอินทรีย์ ส่วนการควบคุมการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ทำโดยการบ่มเชื้อในสภาวะไร้ออกซิเจน (anaerobic condition) ซึ่งในสภาวะดังกล่าวจะทำให้ไม่มีการถ่ายทอดอิเลคตรอน ให้กับออกซิเจนเพื่อเปลี่ยนเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (De Vuyst and Vandamme, 1994)

จากการคัดเลือกเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้ในตัวอย่างแหนมโดยวิธี agar spot assay พบว่ามีเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียจำนวน 49 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ เมื่อนำเชื้อทั้ง 49 ไอโซเลตไปทำการตรวจสอบพลาสมิด พบว่ามีเพียงแลคติคแอสิดแบคทีเรีย NO5 เท่านั้นที่มีพลาสมิด ดังนั้นจึงเลือกเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย NO5 ใช้ในการทดลองในขั้นต่อไป สาเหตุที่เลือกเชื้อที่มีพลาสมิด เนื่องจากหากมีการทดสอบว่ายีนสำหรับแบคเทอริโอซินอยู่บนพลาสมิดจะทำให้การทำวิจัยในขั้นตอนไป เช่น การโคลนยีนดังกล่าว สะดวกยิ่งขึ้น

จากการศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียรหัส NO5 โดยวิธี swab- paper disc พบว่า แบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งได้เฉพาะเชื้อแบคทีเรียที่เป็นแกรมบวกเท่านั้น ได้แก่ *B. cereus* ATCC 11778, *B. subtilis* TISTR 008, *S. pneumoniae* DMS 5851, *S. pyogenes* ATCC 12384, *S. aureus* ATCC 25923 และ *L. mesenteroides* TISTR 473 แสดงให้เห็นว่าการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบของแบคเทอริโอซินเป็นการยั้บยั้งแบบจำเพาะ และเมื่อศึกษากลไกการทำงานของแบคเทอริโอซินโดยใช้ *L. mesenteroides* TISTR 473 เป็นเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ พบว่าแบคเทอริโอซินที่สร้างโดย แลคติคแอสิดแบคทีเรีย NO5 สามารถทำให้จำนวนเซลล์และค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบมีค่าเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุมที่ทั้งจำนวนเซลล์และค่าการดูดกลืนแสงดังกล่าวเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด และเมื่อนำตัวอย่างของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบไปศึกษาลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนชนิดส่องกราด พบว่า เซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบไม่มีการเปลี่ยนแปลงใดๆ จากผลการทดลองดังกล่าวทำให้สรุปได้ว่าแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย NO5 อาจไปมีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ *L. mesenteroides* TISTR 473 โดยที่เซลล์ไม่มีการแตกสลาย ตัวอย่างของแบคเทอริโอซินที่มีกลไกการทำงานคล้ายกับแบคเทอริโอซินของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย NO5 เช่น diplococcin ที่สร้างจาก *Lactobacillus lactis* subsp. *cremoris* 346 (Davey, 1981)

เมื่อศึกษาการทนต่อความร้อน และเอนไซม์ชนิดต่างๆ พบว่าแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย NO5 สามารถทนความร้อนได้สูงถึง 121 ˚C เป็นเวลาอย่างน้อย 15 นาที แต่เมื่อนำไปทดสอบกับกลุ่มเอนไซม์ย่อยโปรตีน ซึ่งได้แก่ proteinase K, pepsin และ trypsin พบว่าเอนไซม์ดังกล่าวสามารถทำลายความสามารถของแบคเทอริโอซินในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ จากผลการทดลองจึงสรุปได้ว่าแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย NO5 เป็นสารประเภทโปรตีนและทนความร้อน

จากการตรวจหาตำแหน่งยีนที่สร้างแบคเทอริโอซิน พบว่า เชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย NO5 มีพลาสมิดขนาด 2.5 kb จึงทำการตรวจสอบต่อไปโดยวิธี plasmid curing และพบว่าแลคติคแอสิดแบคทีเรีย NO5 ที่กลายพันธุ์ จนไม่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้ทั้ง 13 ไอโซเลต ไม่มี พลาสมิด

จากผลการทดลองดังกล่าวจะเห็นได้ว่าความสามารถในการสร้างแบคเทอริโอซินของแลคติคแอสิดแบคทีเรีย NO5 สูญหายไปพร้อมกับ พลาสมิด ดังนั้นจึงพอจะคาดคะเนได้ว่ายีนสำหรับแบคเทอริโอซินน่าจะอยู่บนพลาสมิด ตัวอย่างของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่มียีนสำหรับแบคเทอริโอซินที่อยู่บน plasmid เช่น sakacin A ที่สร้างจาก *Lactobacillus sake* 706 (Schillinger and Lucke, 1989)

เมื่อนำเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย NO5 มาหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสร้างแบคเทอริโอซิน พบว่าเชื้อจะเริ่มสร้างแบคเทอริโอซินในชั่วโมงที่ 4 และจะสร้างสะสมเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนมีปริมาณสูงสุดในชั่วโมงที่ 7 - 8 ซึ่งเป็นช่วงตอนต้นของระยะ stationary phase โดยค่า bacteriocin activity สูงสุดที่วัดได้มีค่าเท่ากับ 1,280 AU/ml จากนั้นจะค่อยๆ ลดลง ค่า bacteriocin activity ที่ลดลงอาจเกิดจากการที่เชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียสร้างสารบางชนิดออกมายับยั้งแบคเทอริโอซิน หรืออาจเกิดจากความไม่เสถียรตัวของแบคเทอริโอซินเอง ตัวอย่างของแบคเทอริโอซินที่มีการผลิตในลักษณะเดียวกับแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย NO5 เช่น แบคเทอริโอซินที่สร้างจาก *Lactobacillus curvatus* IFPL 105 (Casla *et al*., 1996)

จากการหาน้ำหนักโมเลกุลของแบคเทอริโอซิน บริสุทธิ์ที่สร้างจากเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย NO5 โดยนำโปรตีนดังกล่าวมาวิเคราะห์ด้วยวิธี Tricine-SDS-PAGE พบว่าแบคเทอริโอซินดังกล่าวมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 10 kDa และเมื่อจัดจำแนกชนิดของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย NO5 พบว่าเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย NO5 เป็นเชื้อในสกุล *Lactococcus*

เชื้อแลคติคแอสิแบคทีเรีย NO5 ที่ได้จากการศึกษานี้สามารถนำไปใช้ในการศึกษาวิจัยต่อไปได้หลายประการ เช่น การโคลนยีนสำหรับแบคเทอริโอซิน การหาลำดับกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบของแบคเทอริโอซินเพื่อใช้ในการจัดจำแนกชนิดของแบคเทอริโอซิน หรือการนำไปพัฒนาเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ (starter culture) ในอุตสาหกรรมการหมักอาหารประเภทต่างๆ รวมทั้งการนำไปศึกษาต่อเพื่อใช้ในทางการแพทย์ เป็นต้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ทุนอุดหนุนส่งเสริมการทำวิทยานิพนธ์ ปีการศึกษา 2547

เอกสารอ้างอิง

Anderson, D.G. and Mckay, L.L. 1983. Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic Streptococci. Applied and Environmental Microbiology. 46: 549-552.

Buchman, G.W, Banerjee, S. and Hansen, J.N. 1988. Structure, expression and evolution of a gene encoding the precursor of nisin, a small protein antibiotic. Journal of Biological Chemistry. 263: 16260-16266.

Casla, D., Requenna, T. and Gomez, R. 1996. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from goat's milk and artisanal cheeses: Characteristics of a bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* IFLP 105. Journal of Applied Bacteriology. 81: 35-41.

Davey, G.P. and Richardson, B.C. 1981. Purification and some properties of diplococcin from *Streptococcus cremoris* 346. Applied and Environmental Microbiology. 41: 84-89.

De Vuyst, L. and Vandamme, E.J. 1994. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. In: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Applications. De Vuyst, L. and Vandamme, E.J. (Eds.), pp. 91-142. Blackie Academic and Professional, London.

Farias, M.E., Holgado-Ruiz, A.A. and Sesma, F. 1994. Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from regional cheese: inhibition of foodborne pathogens. Journal of Food Protection. 57: 1013-1015.

Geis, A., Singh, J. and Teuber, M. 1983. Potential of lactic streptococci to produced bacteriocin. Applied and Environmental Microbiology. 45: 205-211.

Gonzalez, B., Area, P., Mayo, B. and Suarez, J.E. 1994. Detection, purification and partial characterization of plantaricin C, a bacteriocin produced by a *Lactobacillus plantarum* strain of dairy origin. Applied and Environmental Microbiology. 60: 2158-2163.

Ruiz-Barba, J.L., Piard, J.C. and Jimenez-Diaz, R. 1991. Plasmid profile and curing of plasmid in *Lactobacillus plantarum* strain isolated from green olive fermentations. Journal of Applied Bacteriology. 71: 417-421.

Schillinger, U. and Lucke, F.K. 1989. Antimicrobial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat Applied and Environmental Microbiology. 55: 1901-1906.

Yang, R., Johnson, M.C. and Ray, B. 1992. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. Applied and Environmental Microbiology. 58: 3355-3359.