บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 การคัดเลือกเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้จากอาหารหมัก

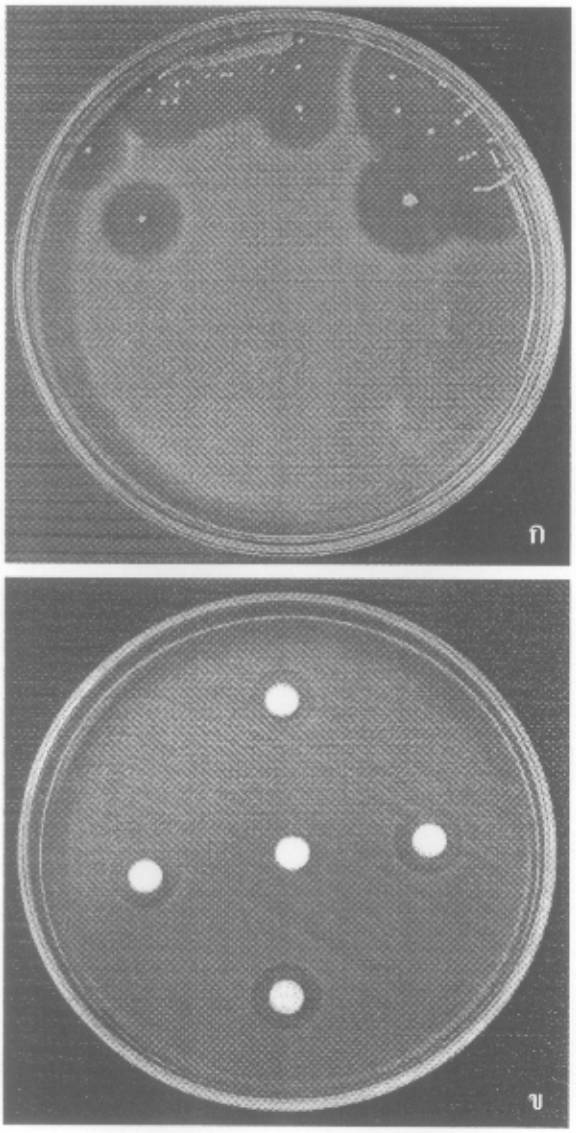
การคัดเลือกเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้จากตัวอย่างแหนมจำนวน 27 ตัวอย่าง ด้วยวิธีการ agar spot assay โดยใช้ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 เป็นเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ พบว่ามีเชื้อจำนวน 102 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ (ภาพที่ 4ก) จากนั้นนำเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียทั้งหมดไปทำการทดสอบอีกครั้งด้วยวิธีการ swab-paper disc พบว่ามีเชื้อจำนวน 49 ไอโซเลตเท่านั้นที่ยังคงสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ *L. mesenteroides* TISTR 473 (ตารางที่ 3 และภาพที่ 4ข)

ตารางที่ 3 รหัสเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย 49 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ *L. mesenteroides* TISTR 473 โดยวิธี swab-paper disc

รหัสเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย	*L. mesenteroides* TISTR 473
111-1,115-2, 115-4, 115-5, 115-30,115-31	+
Dt-4, Dt-6 ,Dt-12, Dt-14	+
F3.10, FS1, FS1.10, FS2.4, FS3.10	+
FS5.10, FS6.10, FS8, FS11	+
K1,Mh-3, Mh-4, Mh-7, Mh-10, MP	+
N17, NAM17, NO5, Oc-1, Oc-3, Oc-9	+
P5, P6, P9, P13, P14, P19, P22, P25, P26, PS5.1	+
SK1.1, SK2.1, SK3.1, SK4.1, SK5.1, SK7.1, SK8.1, SK9.1	+

\+ = สามารถยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

\- = ไม่สามารถยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ



ภาพที่ 4 บริเวณยับยั้งของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473

ก. การยับยั้งโดยวิธี agar spot assay

ข. การยับยั้งโดยวิธี swab-paper disc

เมื่อนำเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียทั้ง 49 ไอโซเลตไปทำการสกัด plasmid ตามวิธีการของ Anderson and Mckay. (1983) พบว่ามีเพียงเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียรหัส NO5 เท่านั้นที่มี plasmid ดังนั้นจึงเลือกเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียรหัส NO5 ใช้ในการทดลองในขั้นตอนต่อไป

4.2 การทดสอบความสามารถของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียรหัส NO5 ในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยวิธี swab-paper disc

เมื่อนำ culture supernatant ของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียรหัส NO5 มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยวิธี swab-paper disc พบว่า culture supernatant ของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียรหัส NO5 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Streptococcus pneumoniae* DMS 5851, *Streptococcus pyogenes* ATCC 12384, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus subtilis* TISTR 008, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 ได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhi* ATCC 5784, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 27736, *Pseudomonas aeroginosa* ATCC 27853 และ *Listeria monocytogenes* DMS 20600 (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ผลของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียรหัส NO5 ในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยวิธี swab- paper disc

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

4.3 การศึกษาผลของสภาวะต่างๆ ต่อความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์ของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียรหัส NO5

4.3.1 การทนต่อเอนไซม์

เมื่อนำ culture supernatant ของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียรหัส NO5 มาทดสอบกับเอนไซม์ชนิดต่างๆ ได้แก่ proteinase K, pepsin, trypsin, lysozyme, α-amylase, RNase และปรับให้เอนไซม์มีความเข้มข้นสุดท้าย (final concentration) เท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วจึงนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ *L. mesenteroides* TISTR 473 โดยวิธี swab-paper disc พบว่า culture supernatant ที่นำมาทดสอบกับเอนไซม์ α-amylase, RNase และ lysozyme สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ *L. mesenteroides* TISTR 473 ได้ แต่ culture supernatant ที่นำมาทดสอบกับเอนไซม์ protenase K, pepsin และ trypsin ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ *L. mesenteroides* TISTR 473 (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ผลของการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียรหัส NO5 เมื่อนำไปทดสอบกับเอนไซม์ชนิดต่างๆ

Enzyme	ผลการทดลอง
pepsin	-
trypsin	-
proteinase K	-
α- amylase	+
RNase	+
lysozyme	+

+ = สามารถยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

- = ไม่สามารถยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

4.3.2 การทนต่อความร้อน

เมื่อนำ culture supernatant ของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียรหัส NO5 ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 40, 60, 80, 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10, 30, 60 นาที ตามลำดับ และที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ *L. mesenteroides* TISTR 473 โดยวิธี swab-paper disc พบว่า culture supernatant ที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ *L. mesenteroides* TISTR 473 ได้ (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 ผลของการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียรหัส NO5 เมื่อนำไปทดสอบกับความร้อนที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ

ความร้อน (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	ผลการทดลอง
40	10	+
	30	+
	60	+
60	10	+
	30	+
	60	+
80	10	+
	30	+
	60	+
100	10	+
	30	+
	60	+
121	15	+

+ = สามารถยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

- = ไม่สามารถยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

4.3.3 การทนต่อ pH

เมื่อนำ culture supernatant ของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียรหัส NO5 มาปรับ pH ให้อยู่ในช่วงระหว่าง 2 ถึง 12 ด้วยสารละลาย NaOH หรือ HCl จากนั้นนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ *L. mesenteroides* TISTR 473 โดยวิธี swab-paper disc พบว่า culture supernatant ของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียรหัส NO5 ยังคงสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ *L. mesenteroides* TISTR 473 ได้ หลังจากถูกปรับให้อยู่ในสภาวะที่มี pH ตั้งแต่ 2 ถึง 9 (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 ผลของการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียรหัส NO5 เมื่อนำไปทดสอบที่สภาวะ pH ต่างๆ

pH	ผลการทดลอง
2	+
3	+
4	+
5	+
6	+
7	+
8	+
9	+
10	-
11	-
12	-

\+ = สามารถยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

\- = ไม่สามารถยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

4.3.4 การทนต่อสารเคมีต่างๆ

เมื่อนำ culture supernatant ของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียรหัส NO5 มาทดสอบด้วยการเติมสารชนิดต่างๆ เช่น toluene, acetone, acetic acid, 95 เปอร์เซ็นต์ ethanol, isopropanol, chloroform, EDTA และ sodium dodecyl sulphate (SDS) โดยปรับให้ความเข้มข้นสุดท้าย (final concentration) ของสารเคมีชนิดต่างๆ เท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ *L. mesenteroides* TISTR 473 โดยวิธี swab-paper disc พบว่า culture supernatant ที่นำมาทดสอบกับสารชนิดต่างๆ ยังคงสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ *L. mesenteroides* TISTR 473 ได้ทั้งหมด (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 ผลของการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียรหัส NO5 เมื่อนำไปทดสอบกับสารเคมีชนิดต่างๆ

สารเคมี	ผลการทดลอง
toluene	+
acetone	+
acetic acid	+
95 เปอร์เซ็นต์ ethanol	+
isopropanol	+
chloroform	+
EDTA	+
SDS	+

+ = สามารถยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

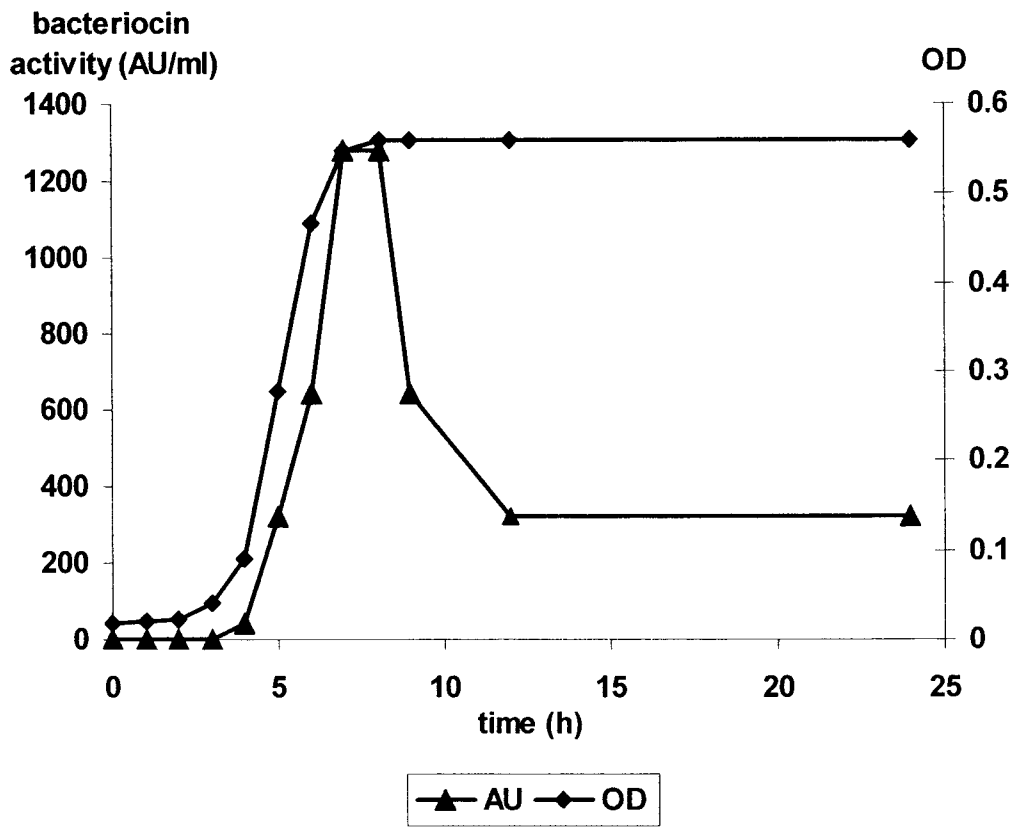
- = ไม่สามารถยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

4.4 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสร้างแบคเทอริโอซินของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย รหัส NO5

เมื่อนำเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย รหัส NO5 มาหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสร้างแบคเทอริโอซิน พบว่าเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียรหัส NO5 จะใช้เวลาประมาณ 3 ชั่วโมงในระยะ lag phase จากนั้นจะเข้าสู่ระยะ exponential phase ในชั่วโมงที่ 4 และเข้าสู่ระยะ stationary phase ในชั่วโมงที่ 7 ส่วนแบคเทอริโอซินจะถูกสร้างขึ้นเมื่อเชื้อเริ่มเข้าสู่ระยะ exponential phase และแบคเทอริโอซินจะถูกสร้างสะสมเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนมีปริมาณสูงสุดในช่วงตอนต้นของระยะ stationary phase ซึ่งใช้เวลาประมาณ 7 ถึง 8 ชั่วโมงหลังจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ โดยค่า bacteriocin activity สูงสุดที่วัดได้มีค่าเท่ากับ 1,280 AU/มิลลิลิตร จากนั้นค่า bacteriocin activity จะค่อยๆลดลงเหลือ 640, 320 และ 320 AU/มิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 9, 12 และ 24 ตามลำดับ (ตารางที่ 9 และ ภาพที่ 5)

ตารางที่ 9 ค่า OD_{600} และค่า bacteriocin activity (AU/มิลลิลิตร) ในช่วงระยะเวลาต่างๆ ของการเจริญของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย รหัส NO5

เวลา (ชั่วโมง)	OD_{600}	bacteriocin activity (AU/มิลลิลิตร)
0	0.019	0
1	0.021	0
2	0.022	0
3	0.041	0
4	0.091	40
5	0.278	320
6	0.468	640
7	0.56	1280
8	0.56	1280
9	0.56	640
12	0.56	320
24	0.56	320



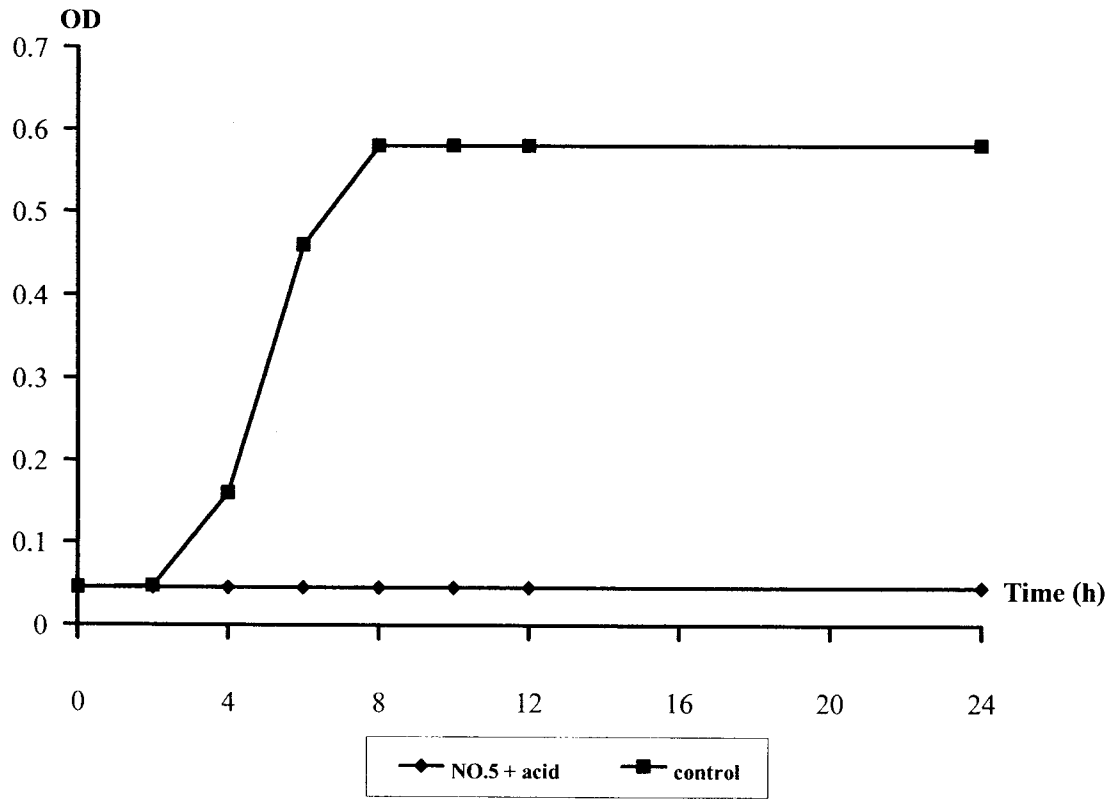
ภาพที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตกับการสร้างแบคเทอริโอซินของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย รหัส NO5

4.5 การทดสอบความสามารถของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียในการทนต่อสภาวะคล้ายกรดในกระเพาะอาหาร (artificial gastric juice)

เมื่อนำเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย รหัส NO5 มาเพาะเลี้ยงในอาหาร 0.2 เปอร์เซ็นต์ glucose MRS broth ที่มีส่วนผสมของสารละลายกรด จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างและวัดค่า OD_{600} ในช่วงเวลาต่างๆ จากการทดลองพบว่า ค่า OD_{600} ที่วัดได้ในแต่ละช่วงเวลาไม่มีการเปลี่ยนแปลง (ตารางที่ 10 และภาพที่ 6) แสดงว่าเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย รหัส NO5 ไม่สามารถเจริญได้ในสภาวะแวดล้อมที่คล้ายกรดในกระเพาะอาหาร

ตารางที่ 10 ค่า OD_{600} ในช่วงระยะเวลาต่างๆ ของการเพาะเลี้ยงเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย รหัส NO5 ในการทนต่อสารละลายกรด

เวลา (ชั่วโมง)	control	NO5 + สารละลายกรด
0	0.045	0.045
2	0.047	0.045
4	0.16	0.045
6	0.46	0.045
8	0.58	0.045
10	0.58	0.045
12	0.58	0.045
24	0.58	0.045



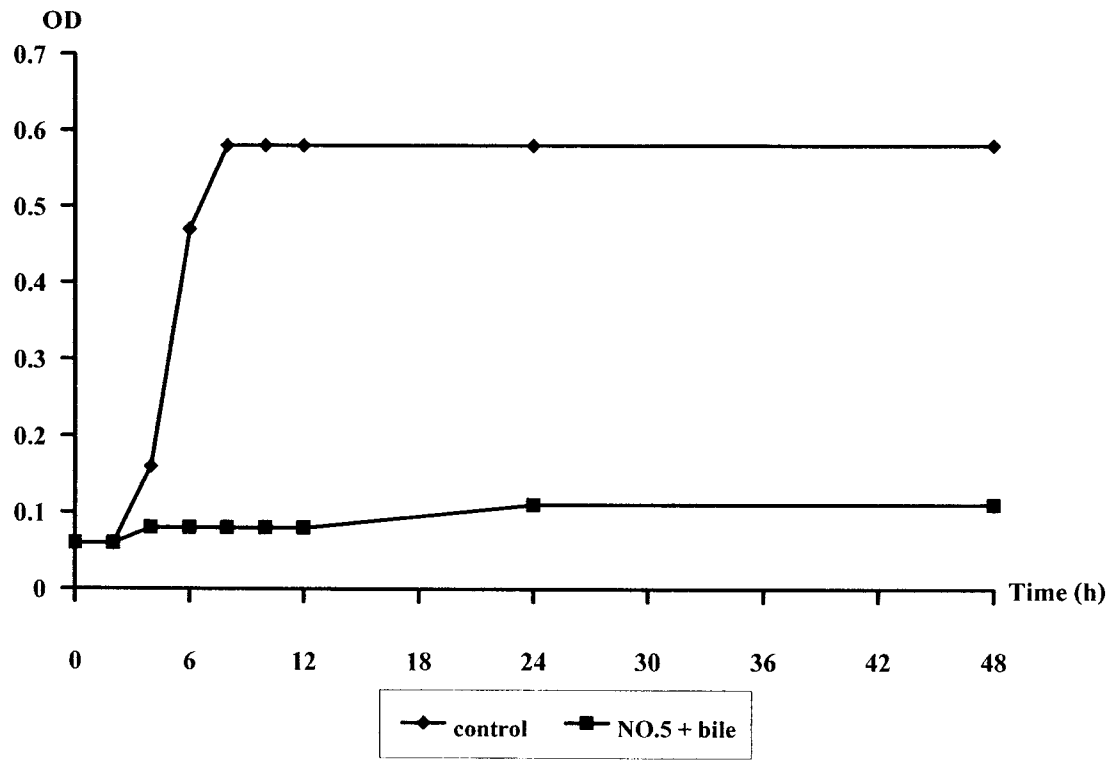
ภาพที่ 6 การเจริญเติบโตของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย รหัส NO5 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีส่วนผสมของสารละลายกรดเมื่อเปรียบเทียบกับชุด control

4.6 การทดสอบความสามารถของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียในการทนต่อสารละลายน้ำดี (bile acid)

เมื่อนำเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย รหัส NO5 มาเพาะเลี้ยงในอาหาร 0.2 เปอร์เซ็นต์ glucose MRS broth ที่มีส่วนผสมของสารละลายน้ำดี จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างและวัดค่า OD_{600} ในช่วงเวลาต่างๆ จากการทดลองพบว่า ค่า OD_{600} ที่วัดได้ในแต่ละช่วงเวลามีค่าเพิ่มขึ้นน้อยมาก (ตารางที่ 11 และภาพที่ 7) แสดงว่าเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย รหัส NO5 สามารถเจริญได้เพียงเล็กน้อยในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของสารละลายน้ำดี

ตารางที่ 11 ค่า OD_{600} ในช่วงระยะเวลาต่างๆ ของการเพาะเลี้ยงเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย รหัส NO5 ในการทนต่อสารละลายน้ำดี

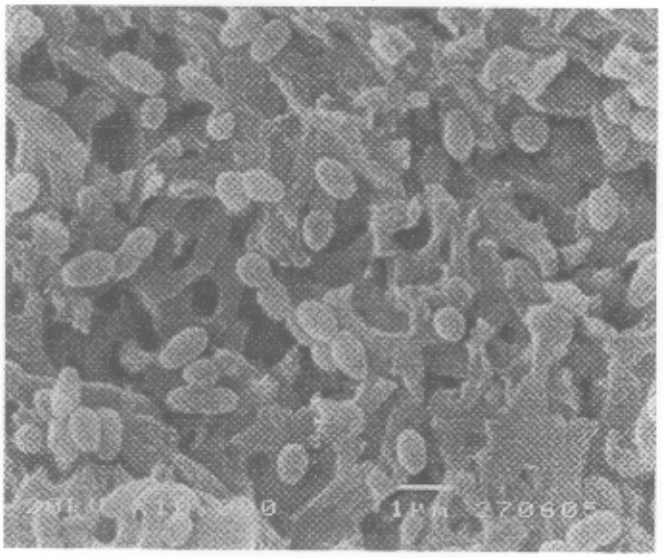
เวลา (ชั่วโมง)	control	NO5 + สารละลายน้ำดี
0	0.06	0.06
2	0.06	0.06
4	0.16	0.08
6	0.47	0.08
8	0.58	0.08
10	0.58	0.08
12	0.58	0.08
24	0.58	0.11
48	0.58	0.11



ภาพที่ 7 การเจริญเติบโตของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย รหัส NO5 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีส่วนผสมของสารละลายน้ำดีเมื่อเปรียบเทียบกับชุด control

4.7 การศึกษาลักษณะเซลล์ของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนชนิดส่องกราด (scanning electron microscopy : SEM)

เมื่อนำเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย รหัส NO5 ไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนชนิดส่องกราด พบว่า เชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย รหัส NO5 มีลักษณะกลม (ภาพที่ 8)



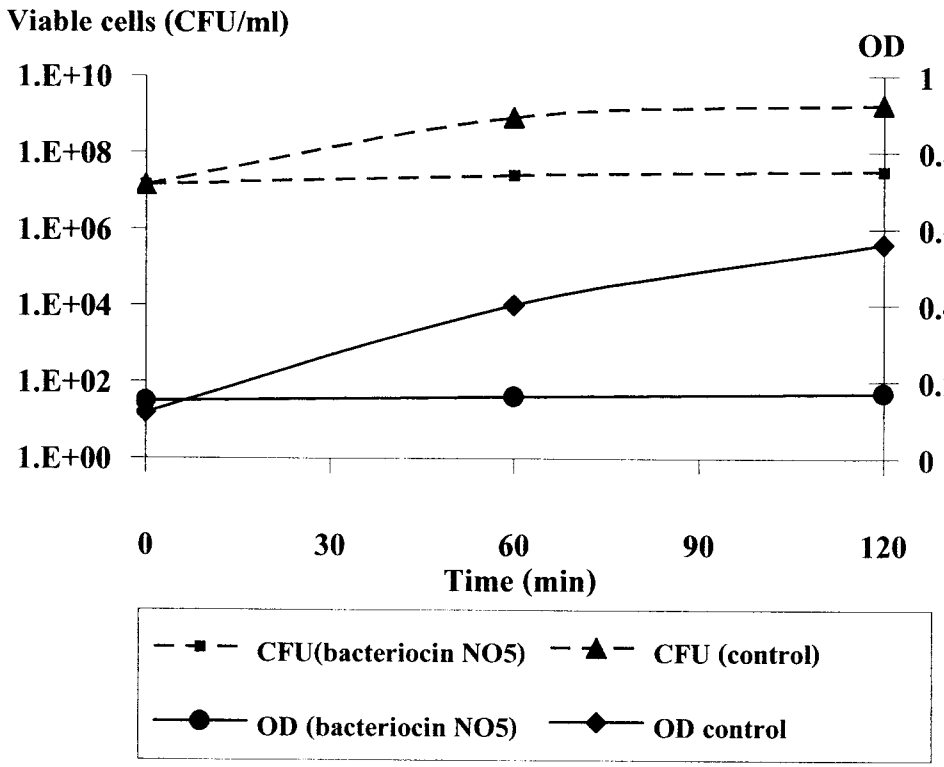
ภาพที่ 8 ลักษณะเซลล์ของแลคติคแอสิดแบคทีเรีย รหัส NO5 ที่กำลังขยาย 10,000 เท่า

4.8 การศึกษากลไกการทำงานของแบคเทอริโอซินในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ (mode of action)

เมื่อนำ culture supernatant ของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย รหัส NO5 ใส่ลงในเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ *L. mesenteroides* TISTR 473 ที่บ่มข้ามคืน จากนั้นเก็บตัวอย่างที่ช่วงเวลา 0, 60 และ 120 นาที นำตัวอย่างที่ได้ไปวัดค่า OD_{600} และนับจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ พบว่าค่า OD_{600} ที่วัดได้มีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยและเมื่อนับจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบมีการเพิ่มจำนวนขึ้นเล็กน้อยจาก 1.4×10^7 เป็น 3.1×10^7 CFU/มิลลิลิตร ส่วนชุด control ที่ใช้ 0.2 เปอร์เซ็นต์ glucose MRS broth แทน culture supernatant พบว่าค่า OD_{600} ที่วัดได้เพิ่มขึ้นจาก 0.15 เป็น 0.56 และจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบเพิ่มขึ้นจากเดิม 1.4×10^7 เป็น 1.7×10^9 CFU/มิลลิลิตร (ตารางที่ 12 และภาพที่ 9)

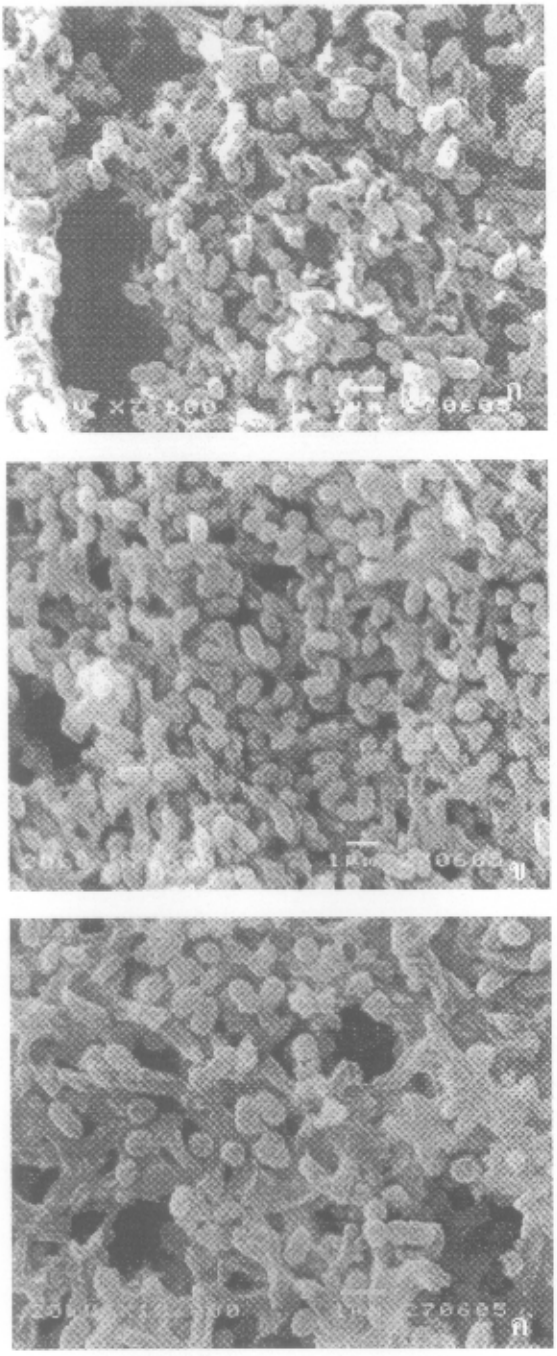
ตารางที่ 12 ค่า OD_{600} และจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ *L. mesenteroides* TISTR 473 ในช่วงระยะเวลาต่างๆ เมื่อนำมาทดสอบกับแบคเทอริโอซินของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย รหัส NO5

เวลา (นาที)	OD_{600}		จำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิต (CFU/มิลลิลิตร)	
	NO5	control	NO5	control
0	0.15	0.15	1.4×10^7	1.4×10^7
60	0.16	0.40	2.5×10^7	8×10^8
120	0.17	0.56	3.1×10^7	1.7×10^9



ภาพที่ 9 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD_{600} กับจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ *L. mesenteroides* TISTR 473 ในช่วงระยะเวลาต่างๆ เมื่อนำมาทดสอบกับ culture supernatant ของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย รหัส NO5

เมื่อนำตัวอย่างของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ *L. mesenteroides* TISTR 473 ที่ทดสอบกับ culture supernatant ของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย รหัส NO5 ไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนชนิดส่องกราด พบว่าลักษณะเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ *L. mesenteroides* TISTR 473 ไม่มีการเปลี่ยนแปลง (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 10 ลักษณะเซลล์ของเชื้อ *L. mesenteroides* TISTR 473 ที่บ่มในสภาวะที่มี culture supernatant ของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย รหัส NO5

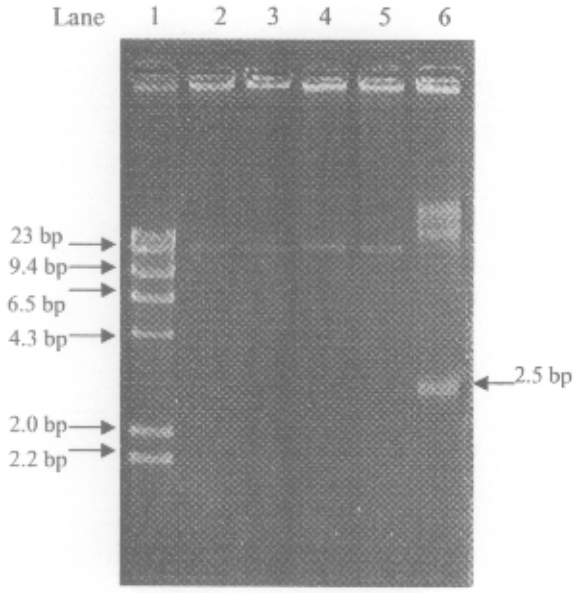
ก. ที่เวลา 0 นาที (กำลังขยาย 7,500 เท่า)

ข. ที่เวลา 60 นาที (กำลังขยาย 7,500 เท่า)

ค. ที่เวลา 120 นาที (กำลังขยาย 10,000 เท่า)

4.9 การตรวจหาตำแหน่งยีนที่สร้างแบคเทอริโอซิน

เมื่อนำเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย รหัส NO5 มาสกัด plasmid ตามวิธีการของ Anderson and Mckay. (1983) และตรวจสอบด้วย agarose gel electrophoresis พบว่า เชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย รหัส NO5 มี plasmid ขนาด 2.5 กิโลเบส (ภาพที่ 11) ดังนั้นจึงได้ทำการตรวจสอบต่อไปว่ายีนที่สร้างแบคเทอริโอซินดังกล่าวเป็นยีนที่อยู่บน plasmid หรือเป็นยีนที่อยู่บนโครโมโซมโดยการทำให้แลคติคแอสิดแบคทีเรีย รหัส NO5 สูญเสียความสามารถในสร้างแบคเทอริโอซินที่สามารถยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ *L. mesenteroides* TISTR 473 ซึ่งวิธีการดังกล่าวทำได้โดยเลี้ยงเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียในอาหาร 0.2 เปอร์เซ็นต์ glucose MRS ที่มี ethidium bromide ผสมอยู่ จากการทดลองสามารถคัดเลือกเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย รหัส NO5 ที่ไม่สามารถสร้างแบคเทอริโอซิน ได้ทั้งหมด 13 ไอโซเลต เมื่อนำเชื้อทั้ง 13 ไอโซเลต ไปทำการสกัด plasmid พบว่า เชื้อทั้ง 13 ไอโซเลต ไม่มี plasmid



ภาพที่ 11 แสดง plasmid profile ของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย รหัส NO5

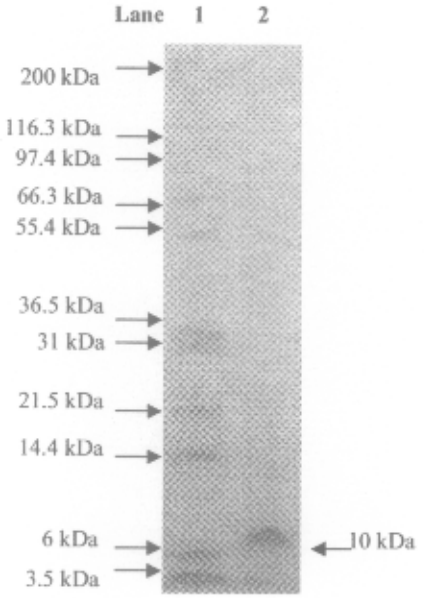
Lane 1 : λ Hind III digest (DNA marker)

Lane 2,3,4,5 : plasmid profile ของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย รหัส NO5 ที่ผ่านการทำ plasmid curing

Lane 6 : plasmid profile ของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย รหัส NO5

4.10 การทำให้แบคเทอริโอซินบริสุทธิ์

จากการแยกแบคเทอริโอซินที่สร้างโดยเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย รหัส NO5 ให้บริสุทธิ์ตามวิธีการของ Yang *et al.* (1992) และนำโปรตีนดังกล่าวมาวิเคราะห์โดยวิธี Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (Tricine-SDS-PAGE) พบว่ามีแถบโปรตีนหนึ่งแถบซึ่งมีขนาดประมาณ 10 กิโลดาลตันเมื่อเปรียบเทียบกับแถบโปรตีนมาตรฐาน Mark 12 (ภาพที่ 12)



ภาพที่ 12 แสดง Tricine-SDS-PAGE ของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย รหัส NO5

Lane 1 : Mark 12 markers

Lane 2 : แบคเทอริโอซินของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย รหัส NO5

4.11 การตรวจสอบสายพันธุ์ของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียรหัส NO5 ในระดับสกุล

จากการจัดจำแนกชนิดของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย รหัส NO5 พบว่า เป็นแบคทีเรียแกรมบวกมีรูปร่างลักษณะกลม (cocci) ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส ไม่สามารถสร้างก๊าซจากกระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคส ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส แต่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ10 องศาเซลเซียส และเมื่อนำผลการทดลองไปเทียบเคียงชนิดของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียพบว่าเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย รหัส NO5 เป็นเชื้อในสกุล *Lactococcus*