# บทที่ 5
# สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

จากการคัดเลือกเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้ในตัวอย่างแหนมโดยใช้วิธี agar spot assay พบว่ามีเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียจำนวน 102 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 ได้ แต่เนื่องจากแบคเทอริโอซินที่จะสามารถนำไปใช้ศึกษาต่อได้ จำเป็นต้องเป็นแบคเทอริโอซินที่คงสภาพได้ใน culture supernatant ดังนั้นจึงต้องนำเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียทั้ง 102 ไอโซเลต มาทำการทดสอบความสามารถในการสร้างแบคเทอริโอซินโดยวิธี swab-paper disc โดยใช้ *L. mesenteroides* TISTR 473 เป็นเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ ซึ่งจากผลการทดลองพบว่ามีเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียจำนวน 49 ไอโซเลต เท่านั้นที่ยังคงแสดงความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ ในการคัดเลือกเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้มักใช้แลคติคแอสิดแบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ทดสอบ ทั้งนี้เนื่องจากคุณสมบัติประการหนึ่งของแบคเทอริโอซิน คือ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกับจุลินทรีย์ที่สร้างแบคเทอริโอซินได้ดีกว่าจุลินทรีย์กลุ่มอื่น ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกใช้ *L. mesenteroides* TISTR 473 เป็นเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบในการคัดเลือกเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่แยกได้จากแหนมและสามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้

ด้วยเหตุที่แลคติคแอสิดแบคทีเรียสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้หลายชนิด เช่น กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และ แบคเทอริโอซิน เป็นต้น ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้พยายามควบคุมให้แลคติคแอสิดแบคทีเรียที่นำมาทดสอบความสามารถในการสร้างแบคเทอริโอซินไม่สามารถสร้างกรดอินทรีย์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์หรือสร้างได้น้อยมากจนไม่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ ในการศึกษาครั้งนี้ได้ควบคุมไม่ให้เชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียสร้างกรดอินทรีย์โดยการเลี้ยงเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี glucose เพียง 0.2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นการจำกัดแหล่งคาร์บอนที่แลคติคแอสิดแบคทีเรียจะนำไปใช้ในการสร้างกรดอินทรีย์ (Schillinger and Lucke 1989, Gonzalez *et al.*, 1994) ส่วนการควบคุมไม่ให้แลคติคแอสิดแบคทีเรียสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ทำโดยการบ่มเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียในสภาวะไร้ออกซิเจน (anaerobic condition) ซึ่งในสภาวะดังกล่าวจะทำให้ไม่มีการถ่ายทอดอิเลคตรอน (electron) ให้กับออกซิเจนเพื่อเปลี่ยนเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (De Vuyst and Vandamme, 1994)

เมื่อนำเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียทั้ง 49 ไอโซเลตไปทำการสกัด plasmid ตามวิธีการของ Anderson and Mckay. (1983) พบว่ามีเพียง 1 ไอโซเลตเท่านั้นที่มี plasmid ซึ่งไอโซเลตดังกล่าวมีชื่อรหัสว่า NO5 และในการทดลองนี้ได้เลือกเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียรหัส NO5 เป็นตัวแทนในการทดลองในขั้นตอนต่อไป สาเหตุที่เลือกเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่มี plasmid ไว้ใช้ในขั้นตอนต่อไป เนื่องจากหากมีการทดสอบว่ายีนสำหรับแบคเทอริโอซินอยู่บน plasmid จะทำให้การทำวิจัยในขั้นตอนไป เช่น การโคลนยีนดังกล่าว สะดวกยิ่งขึ้น

จากการศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียรหัส NO5 โดยวิธี swab- paper disc พบว่าแบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งได้เฉพาะเชื้อแบคทีเรียที่เป็นแกรมบวกเท่านั้น ได้แก่ *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 แสดงให้เห็นว่าการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบของแบคเทอริโอซินเป็นการยั้บยั้งแบบจำเพาะ

เมื่อศึกษากลไกการทำงาน (mode of action) ของแบคเทอริโอซินโดยใช้ *L. mesenteroides* TISTR 473 เป็นเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ พบว่าแบคเทอริโอซินที่สร้างโดยแลคติคแอสิดแบคทีเรียรหัส NO5 สามารถทำให้จำนวนเซลล์ของ *L. mesenteroides* TISTR 473 และค่าการดูดกลืนแสงของ culture ของ *L. mesenteroides* TISTR 473 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร มีค่าเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุมที่มีทั้งจำนวนเซลล์และค่าการดูดกลืนแสงดังกล่าวเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด และเมื่อนำตัวอย่างของ *L. mesenteroides* TISTR 473 ไปศึกษาลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนชนิดส่องกราด พบว่า เซลล์ของ *L. mesenteroides* TISTR 473 ไม่มีการเปลี่ยนแปลงใดๆ จากผลการทดลองดังกล่าวทำให้สรุปได้ว่าแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียรหัส NO5 อาจไปมีผลในการยับยั้งการเจริญของ *L. mesenteroides* TISTR 473 โดยที่เซลล์ของจุลินทรีย์ทดสอบไม่มีการแตกสลาย ตัวอย่างของแบคเทอริโอซินที่มีกลไกการทำงานคล้ายกับแบคเทอริโอซินของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียรหัส NO5 เช่น diplococcin ที่สร้างจาก *Lc. lactis* subsp. *cremoris* 346 (Davey, 1981), pediocin PD-1 ที่สร้างจาก *P. damnosus* NCFB 1832 (Green *et al.*, 1997) และ lactostrepcin 5 ที่สร้างจาก *S. cremoris* 202 (Zajdei *et al.*, 1985) นอกจากนี้ยังมีแบคเทอริโอซินบางชนิดที่สามารถยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์โดยการทำให้เซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่ถูกยับยั้งแตกสลาย เช่น nisin สร้างจาก *Lc. lactis* subsp. *lactis* (Buchman *et al.*, 1988), lactococcin A สร้างจาก *Lc. lactis* subsp. *cremoris* LMG2130 (Holo *et al.*, 1991) และ pediocin AcH สร้างจาก *P. acidilactici* H (Bhunia *et al.*, 1988)

เมื่อศึกษาการทนต่อความร้อน การทนต่อ pH การทนต่อเอนไซม์และการทนต่อสารเคมีชนิดต่างๆ ของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียรหัส NO5 พบว่าแบคเทอริโอซินสามารถทนความร้อนได้ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 15 นาที สามารถทำงานได้ในช่วง pH ที่ค่อนข้างกว้าง คือ ตั้งแต่ 2 ถึง 9 และทนต่อสารเคมีได้ทุกชนิดที่ใช้ในการทดลองที่มีความเข้มข้น 1 mg/ml ได้ แต่เมื่อนำไปทดสอบกับเอนไซม์ชนิดต่างๆ พบว่าเอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่มเอนไซม์ย่อยโปรตีน (proteolytic enzyme) ซึ่งได้แก่ proteinase K, pepsin และ trypsin สามารถทำลายความสามารถของแบคเทอริโอซินในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ *L. mesenteroides* TISTR 473 ได้ จากผลการทดลองทำให้สรุปได้ว่าแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียรหัส NO5 เป็นสารประเภทโปรตีนที่ทนความร้อน ทนต่อสารเคมี และสามารถทำงานได้ในช่วง pH ที่ค่อนข้างกว้าง ตัวอย่างของแบคเทอริโอซินที่สามารถทนความร้อนและทำงานได้ในช่วง pH ที่ค่อนข้างกว้าง เช่น pediocin AcH ที่สร้างจากเชื้อ *P. acidilactici* H สามารถยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ที่ pH ตั้งแต่ 2 ถึง 9 และทนความร้อนได้ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (Bhunia *et al.*, 1988) carnocin ที่สร้างจาก *Leu. carnosum* LA44A สามารถยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ที่ pH ตั้งแต่ 2 ถึง 10 และทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (van Laack *et al.*, 1992)

ผลจากการศึกษาหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสร้างแบคเทอริโอซินของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียรหัส NO5 พบว่า เชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย รหัส NO5 จะเริ่มสร้างแบคเทอริโอซินเมื่อเชื้ออยู่ในระยะ exponential phase และแบคเทอริโอซินจะถูกสร้างสะสมเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนมีปริมาณสูงสุดในช่วงตอนต้นของระยะ stationary phase โดยค่า bacteriocin activity สูงสุดที่วัดได้มีค่าเท่ากับ 1,280 AU/มิลลิลิตร จากนั้นค่า bacteriocin activity จะค่อยๆลดลง ค่า bacteriocin activity ที่ลดลงอาจเกิดจากการที่เชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียสร้างสารบางชนิดออกมายับยั้งแบคเทอริโอซิน หรืออาจเกิดจากความไม่เสถียรตัวของแบคเทอริโอซินเอง ตัวอย่างของแบคเทอริโอซินที่มีการผลิตในลักษณะเดียวกับแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียรหัส NO5 เช่น แบคเทอริโอซินที่สร้างจาก *Lb. curvatus* IFPL 105 (Casla *et al.*, 1996)

ผลจากการศึกษาความสามารถในการทนต่อสารละลายกรด (artificial gastric juice) และการทนต่อสารละลายน้ำดี (bile acid) ของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียรหัส NO5 พบว่าเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียรหัส NO5 ไม่สามารถเจริญได้ในสารละลายที่มีสภาพคล้ายกรดในกระเพาะอาหารและเจริญได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้นในสารละลายน้ำดี ข้อมูลที่ได้จากการทดลองนี้ทำให้ทราบว่าเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียดังกล่าวไม่เหมาะสมที่จะนำไปใช้เป็นโปรไบโอติก ทั้งนี้เนื่องจาก

คุณสมบัติที่สำคัญประการหนึ่งของเชื้อที่จะนำไปใช้เป็นโปรไบโอติกต้องสามารถทนต่อสภาวะแวดล้อมที่เป็นกรดในกระเพาะอาหารและต้องสามารถทนต่อสภาวะที่มีน้ำดีในลำไส้เล็กได้

จากการตรวจหาตำแหน่งยีนที่สร้างแบคเทอริโอซินของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียรหัส NO5 พบว่า เชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย รหัส NO5 มี plasmid ที่มีขนาด 2.5 กิโลเบส จึงทำการตรวจสอบต่อไปว่ายีนดังกล่าวเป็นยีนที่อยู่บน plasmid หรือเป็นยีนที่อยู่บนโครโมโซมด้วยวิธี plasmid curing โดยใช้ ethidium bromide จากการคัดเลือก ซึ่งพบว่าแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่กลายพันธุ์จากแลคติคแอสิดแบคทีเรีย รหัส NO5 จนไม่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้ทั้ง 13 ไอโซเลต ไม่มี plasmid จากผลการทดลองดังกล่าวจะเห็นได้ว่าความสามารถในการสร้างแบคเทอริโอซินจากแลคติคแอสิดแบคทีเรีย รหัส NO5 สูญหายไปพร้อมกับ plasmid ดังนั้นจึงพอจะคาดคะเนได้ว่ายีนสำหรับแบคเทอริโอซินน่าจะอยู่บน plasmid ตัวอย่างของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่มียีนสำหรับแบคเทอริโอซินที่อยู่บน plasmid เช่น lactococcin I ที่สร้างจาก *Lc. lactis* subsp. *cremoris* AC1 (Geis *et al.*, 1983) lactococcin A ที่สร้างจาก *Lc. lactis* subsp. *cremoris* LMG2130 (Holo *et al.*, 1991) lactocin S ที่สร้างจาก *Lb. sake* L45 (Mortvedt *et al.*, 1991) และ sakacin A ที่สร้างจาก *Lb. sake* 706 (Schillinger and Lucke, 1989)

จากการหาน้ำหนักโมเลกุลของแบคเทอริโอซินที่สร้างจากเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย รหัส NO5 โดยนำโปรตีนดังกล่าวมาวิเคราะห์ด้วยวิธี Tricine sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (Tricine-SDS-PAGE) พบว่าแบคเทอริโอซินดังกล่าวมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 10 กิโลดาลตันและเมื่อจัดจำแนกชนิดของเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย รหัส NO5 พบว่าเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย รหัส NO5 เป็นเชื้อในสกุล *Lactococcus*

เชื้อแลคติคแอสิแบคทีเรีย NO5 ที่ได้จากการศึกษานี้สามารถนำไปใช้ในการศึกษาวิจัยต่อไปได้หลายประการ เช่น การโคลนยีนสำหรับแบคเทอริโอซิน การหาลำดับกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบของแบคเทอริโอซินเพื่อใช้ในการจัดจำแนกชนิดของแบคเทอริโอซิน และการพัฒนาเพื่อนำเชื้อดังกล่าวไปใช้เป็นหัวเชื้อ (starter culture) ในการหมักอาหารต่าง ๆ เป็นต้น