

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
คำอุทิศ	ค
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 สถานที่ทำการวิจัย	2
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 แลกติกแอซิดแบคทีเรีย	3
2.2 การจัดจำแนกชนิดของแลกติกแอซิดแบคทีเรีย	6
2.3 กระบวนการหมักกรดแลกติก (lactic acid fermentation)	11
2.4 สารยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่สร้างจากแลกติกแอซิดแบคทีเรีย	15
2.5 คุณสมบัติที่สำคัญของสารที่จัดเป็นแบคเทอริโอซิน	18
2.6 การตั้งชื่อแบคเทอริโอซิน	20
2.7 การจัดจำแนกแบคเทอริโอซิน (classification of bacteriocin)	21
2.8 แบคเทอริโอซินที่สร้างจากแลกติกแอซิดแบคทีเรีย	23
2.9 การคัดเลือกแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซิน	28
2.10 การตรวจหาตำแหน่งของยีนที่สร้างแบคเทอริโอซิน	29

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.11 การแยกแบคทีเรียโอสซินให้บริสุทธิ์ (purification of bacteriocin)	32
2.12 การนำแบคทีเรียโอสซินไปใช้ประโยชน์	33
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	36
3.1 การคัดเลือกเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียจากอาหารหมัก	36
3.2 การเตรียม culture supernatant ของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย	37
3.3 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียโอสซินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ โดยวิธี swab– paper disc	37
3.4 การศึกษาผลของแบคทีเรียโอสซินที่ทดสอบความทนต่อสภาวะต่างๆ ต่อความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ	37
3.5 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสร้างแบคทีเรียโอสซินของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย	38
3.6 การทดสอบการเจริญของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียในสภาวะต่างๆ	39
3.7 การศึกษาเซลล์ของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (scanning electron microscopy : SEM)	39
3.8 การศึกษากลไกการทำงานของแบคทีเรียโอสซินในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ (mode of action)	39
3.9 การตรวจหาตำแหน่งยีนที่สร้างแบคทีเรียโอสซิน	40
3.10 การทำให้แบคทีเรียโอสซินบริสุทธิ์	41
3.11 การตรวจสอบสายพันธุ์ของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียรหัส NO5 ในระดับสกุล	42
บทที่ 4 ผลการวิจัย	43
4.1 การคัดเลือกเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างแบคทีเรียโอสซินได้จากอาหารหมัก	43

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.2 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียรหัส NO5 ในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ โดยวิธี swab-paper disc	45
4.3 การศึกษาผลของสภาวะต่างๆ ต่อความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียรหัส NO5	46
4.4 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสร้างแบคทีเรียโอซินของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียรหัส NO5	50
4.5 การทดสอบความสามารถของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียในการทนต่อสภาวะคล้ายกรดในกระเพาะอาหาร (artificial gastric juice)	52
4.6 การทดสอบความสามารถของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียในการทนต่อสารละลายน้ำดี (bile acid)	54
4.7 การศึกษาลักษณะเซลล์ของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (scanning electron microscopy : SEM)	56
4.8 การศึกษากลไกการทำงานของแบคทีเรียโอซินในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ (mode of action)	57
4.9 การตรวจหาคำแหน่งยีนที่สร้างแบคทีเรียโอซิน	60
4.10 การทำให้แบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์	61
4.11 การตรวจสอบสายพันธุ์ของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียรหัส NO5 ในระดับสกุล	61
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการวิจัย	62
เอกสารอ้างอิง	66
ภาคผนวก	76

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก ก	วัสดุอุปกรณ์และอาหารเลี้ยงเชื้อ
ภาคผนวก ข	การเตรียมสารสำหรับสกัด plasmid DNA
ภาคผนวก ค	การเตรียมสารสำหรับ Tricine-SDS-PAGE
ภาคผนวก ง	การคำนวณค่า bacteriocin activity ในหน่วย arbitrary unit (AU/ml)
ประวัติผู้เขียน	
	85

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1	10
ลักษณะสำคัญเปรียบเทียบแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ในสกุล (genus) ต่างๆ	
ตารางที่ 2	34
การนำแบคทีเรียโอซินไปใช้ร่วมกับวิธีการต่างๆ เพื่อยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคและเชื้อจุลินทรีย์ ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย	
ตารางที่ 3	43
รหัสเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย 49 ไอโซเลตที่สามารถ ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ <i>L. mesenteroides</i> TISTR 473 โดยวิธี swab-paper disc	
ตารางที่ 4	45
ผลของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากเชื้อแลคติกแอซิด แบคทีเรียรหัส NO5 ในการยับยั้งการเจริญต่อ เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยวิธี swab- paper disc	
ตารางที่ 5	46
ผลของการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบของ แบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย รหัส NO5 เมื่อนำไปทดสอบกับเอนไซม์ชนิดต่างๆ	
ตารางที่ 6	47
ผลของการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบของ แบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย รหัส NO5 เมื่อนำไปทดสอบกับความร้อนที่อุณหภูมิ และเวลาต่างๆ	
ตารางที่ 7	48
ผลของการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบของ แบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย รหัส NO5 เมื่อนำไปทดสอบที่สภาวะ pH ต่างๆ	
ตารางที่ 8	49
ผลของการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบของ แบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย รหัส NO5 เมื่อนำไปทดสอบกับสารเคมีชนิดต่างๆ	

สารบัญตาราง (ต่อ)

		หน้า
ตารางที่ 9	ค่า OD ₆₀₀ และค่า bacteriocin activity (AU/มิลลิลิตร) ในช่วงระยะเวลาต่างๆ ของการเจริญของเชื้อ แลคติกแอซิดแบคทีเรีย รหัส NO5	50
ตารางที่ 10	ค่า OD ₆₀₀ ในช่วงระยะเวลาต่างๆ ของการเพาะเลี้ยง เชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย รหัส NO5 ในการทน ต่อสารละลายกรด	52
ตารางที่ 11	ค่า OD ₆₀₀ ในช่วงระยะเวลาต่างๆ ของการเพาะเลี้ยง เชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย รหัส NO5 ในการทน ต่อสารละลายน้ำดี	54
ตารางที่ 12	ค่า OD ₆₀₀ และจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ ทดสอบ <i>L. mesenteroides</i> TISTR 473 ในช่วงระยะเวลา ต่างๆ เมื่อนำมาทดสอบกับแบคทีเรียโอซินของ เชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย รหัส NO5	57

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	กระบวนการหมักของ homofermentative lactic acid bacteria	13
ภาพที่ 2	กระบวนการหมักของ heterofermentative lactic acid bacteria	14
ภาพที่ 3	ขั้นตอนการระบุสายพันธุ์ของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย	42
ภาพที่ 4	บริเวณยับยั้งของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากเชื้อ แลคติกแอซิดแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อ จุลินทรีย์ทดสอบ <i>Leuconostoc mesenteroides</i> TISTR 473	44
ภาพที่ 5	ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตกับการสร้าง แบคทีเรียโอซินของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย รหัส NO5	51
ภาพที่ 6	การเจริญเติบโตของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย รหัส NO5 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีส่วนผสมของสารละลายกรด เมื่อเปรียบเทียบกับชุด control	53
ภาพที่ 7	การเจริญเติบโตของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย รหัส NO5 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีส่วนผสมของสารละลายน้ำดี เมื่อเปรียบเทียบกับชุด control	55
ภาพที่ 8	ลักษณะเซลล์ของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย รหัส NO5 ที่กำลังขยาย 10,000 เท่า	56
ภาพที่ 9	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD ₆₀₀ กับจำนวนเซลล์ที่ยังมี ชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ <i>L. mesenteroides</i> TISTR 473 ในช่วงระยะเวลาต่างๆ เมื่อนำมาทดสอบกับ culture supernatant ของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย รหัส NO5	58
ภาพที่ 10	ลักษณะเซลล์ของเชื้อ <i>L. mesenteroides</i> TISTR 473 ที่บ่ม ในสภาวะที่มี culture supernatant ของเชื้อ แลคติกแอซิดแบคทีเรีย รหัส NO5	59
ภาพที่ 11	แสดง plasmid profile ของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย รหัส NO5	60
ภาพที่ 12	แสดง Tricine-SDS-PAGE ของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจาก เชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย รหัส NO5	61