

## บทที่ 4

### ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

#### 4.1 ผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของหัวเชื้อคีเฟอร์

การศึกษาศักยภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคของหัวเชื้อคีเฟอร์ เปรียบเทียบกับการใช้ยาปฏิชีวนะ Ampicilin และ Penicillin พบว่าหัวเชื้อคีเฟอร์ และยาปฏิชีวนะ สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ทั้ง 4 ชนิด คือ *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus subtilis* ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ และแบคทีเรียแกรมบวกได้ โดยเชื้อ Kefir DA 500 I สามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ได้สูงสุดเท่ากับ  $14.3 \pm 0.58$  มิลลิเมตร Kefir DC 500 I ยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* และ *S. aureus* ได้เท่ากับ  $12.60 \pm 0.58$  มิลลิเมตร Kefir DG 500 I ยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ได้สูงสุดเท่ากับ  $14.00 \pm 1.00$  มิลลิเมตร เชื้อ Kefir DG 500 I และ Kefir BT 1 ยับยั้งเชื้อ *P. fluorescens* ได้สูงสุดเท่ากับ  $16.33 \pm 0.58$  และ  $10.00 \pm 0.00$  มิลลิเมตร ตามลำดับ ดังตาราง 4.1 และภาพประกอบ 4.1

ตาราง 4.1 บริเวณที่มีการยับยั้งเชื้อก่อโรคโดยหัวเชื้อคีเฟอร์ และยาปฏิชีวนะ ที่ 24 ชั่วโมง

ตัวอย่าง	ขนาดของโซนยับยั้งเชื้อทดสอบที่ 24 ชั่วโมง (มิลลิเมตร)			
	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. fluorescens</i>
Kefir DA 500 I	$10.67 \pm 1.54^{Aa}$	$14.33 \pm 0.58^{Ba}$	$10.67 \pm 1.52^{Aa}$	$9.33 \pm 0.58^{Ca}$
Kefir DC 500 I	$6.00 \pm 0.00^{Aa}$	$12.67 \pm 0.58^{Ba}$	$12.67 \pm 0.58^{Ba}$	$10.33 \pm 0.58^{Ca}$
Kefir DG 500 I	$10.33 \pm 0.58^{Aa}$	$14.00 \pm 1.00^{Ba}$	$9.33 \pm 1.52^{Ca}$	$11.33 \pm 0.58^{Da}$
Kefir DT 500 I	$10.33 \pm 1.15^{Aa}$	$14.33 \pm 0.58^{Ba}$	$12.00 \pm 1.00^{Ca}$	$16.33 \pm 0.58^{Da}$
Kefir BT1	$8.33 \pm 0.58^{Aa}$	$9.00 \pm 0.00^{Ba}$	$7.33 \pm 0.58^{Ca}$	$10.00 \pm 0.00^{Da}$
Ampicilin	$28.33 \pm 1.15^{Ab}$	$30.67 \pm 0.58^{Bb}$	$33.67 \pm 1.15^{Cb}$	$24.33 \pm 0.58^{Db}$
Penicillin	$22.33 \pm 1.15^{Ab}$	$26.33 \pm 0.58^{Bb}$	$30.33 \pm 0.58^{Cb}$	$23.33 \pm 0.58^{Db}$

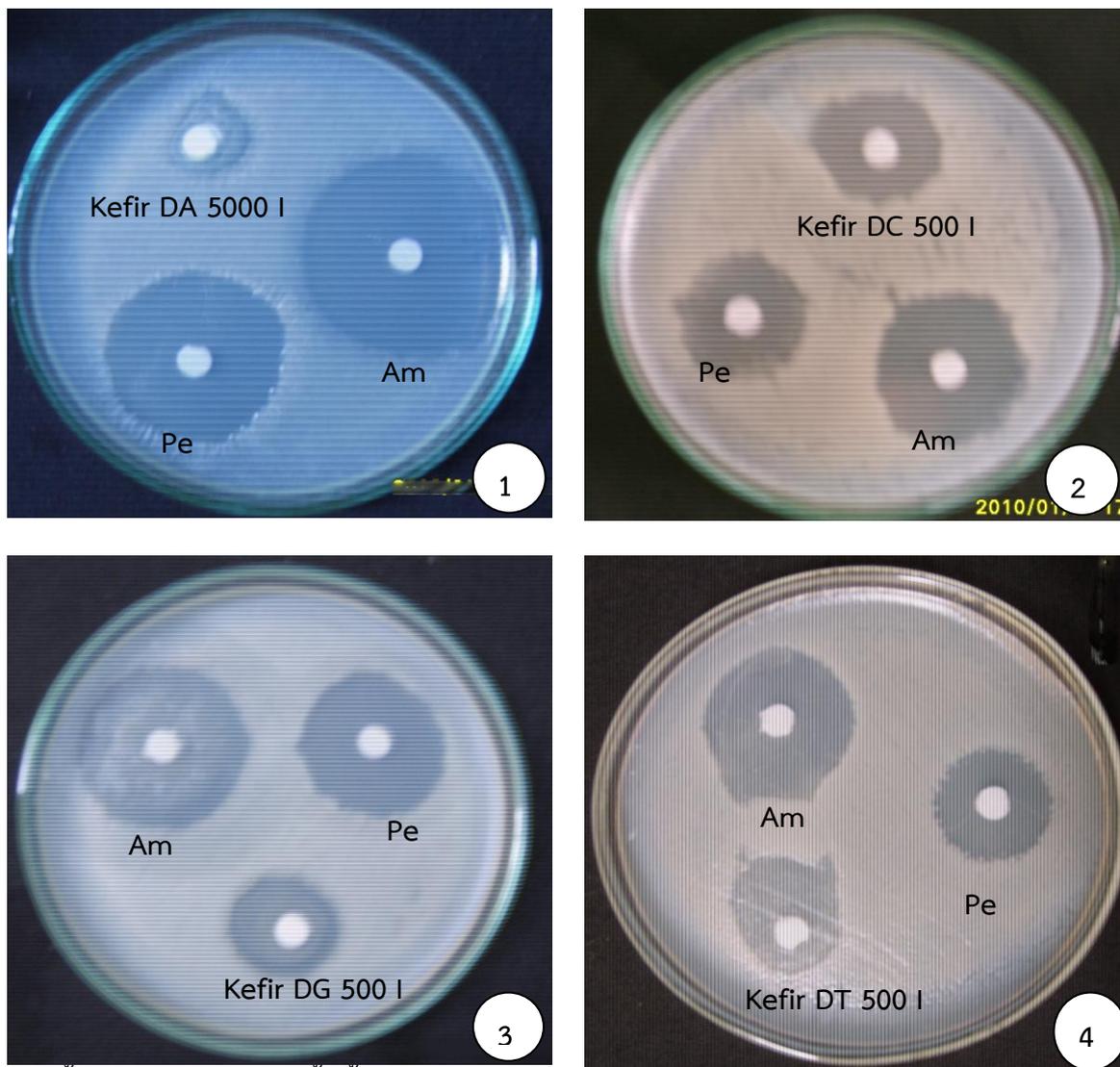
หมายเหตุ: ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้ง ลบเส้นผ่านศูนย์กลาง Paper disc (6 มิลลิเมตร)

<sup>ABCD</sup> คือค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในแนวนอน

<sup>ab</sup> คือค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในแนวตั้ง

เมื่อพิจารณาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อก่อโรคทั้ง 4 ชนิดของหัวเชื้อคีเฟอร์ 5 ชนิด พบว่าหัวเชื้อคีเฟอร์ต่างชนิดกัน สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ 0.05 โดยเชื้อ Kefir DT 500 I ยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุด (ตารางภาคผนวก 9)

ผลจากการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของหัวเชื้อคีเฟอร์ที่ 24 ชั่วโมงพบว่าเชื้อ Kefir DT 500 I มีการยับยั้งเชื้อทั้ง 4 ชนิดได้มากที่สุดผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการนำเชื้อคีเฟอร์มาทดสอบในขั้นต่อไป



- 1: เชื้อ Kefir DA 500 I ยับยั้งเชื้อ *P. fluorescens*
- 2: เชื้อ Kefir DC 500 I ยับยั้งเชื้อ *S. aureus*
- 3: เชื้อ Kefir DG 500 I ยับยั้งเชื้อ *E. coli*
- 4: เชื้อ Kefir DT 500 I ยับยั้งเชื้อ *B. subtilis*

ภาพประกอบ 4.1 บริเวณโซนยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของเชื้อคีเฟอร์ และยาปฏิชีวนะ Ampicillin (Am) และ Penicillin (Pe) บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar

หลังจากการทดสอบผ่านไป 48 ชั่วโมง พบว่าเชื้อคีเฟอร์ทั้ง 5 ตัวอย่าง มีบริเวณโซนยับยั้งลดลง โดยเฉพาะเชื้อ Kefir grain ที่ชั่วโมงที่ 48 พบว่าไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* *B. subtilis* และ *P. fluorescens* รวมทั้ง ยาปฏิชีวนะ penicillin ที่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* และ *P. fluorescens* ได้ที่ 48 ชั่วโมง ดังตาราง 4.2

ตาราง 4.2 บริเวณที่มีการยับยั้งเชื้อก่อโรคโดยหัวคีเฟอร์ และยาปฏิชีวนะ ที่ 48 ชั่วโมง

ตัวอย่าง	ขนาดของโซนยับยั้งเชื้อทดสอบที่ 48 ชั่วโมง (มิลลิเมตร)			
	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. fluorescens</i>
Kefir DA 500 I	4.67±0.58 <sup>Aa</sup>	8.33±0.58 <sup>Ba</sup>	6.00±1.00 <sup>Ca</sup>	7.00±1.00 <sup>Ba</sup>
Kefir DC 500 I	6.00±0. <sup>Aa</sup>	7.33±0.58 <sup>Ba</sup>	8.00±0.00 <sup>Ba</sup>	10.33±0.58 <sup>Cb</sup>
Kefir DG 500 I	9.33±1.15 <sup>Aa</sup>	12.67±0.58 <sup>Bb</sup>	9.00±0.00 <sup>Aa</sup>	8.67±0.58 <sup>Ba</sup>
Kefir DT 500 I	7.33±0.58 <sup>Aa</sup>	7.67±0.58 <sup>Aa</sup>	8.33±0.58 <sup>Aa</sup>	12.00±0.00 <sup>Bb</sup>
Kefir BT1	-	-	7.00±0.58 <sup>Ba</sup>	-
Ampicilin	22.33±0.58 <sup>Ac</sup>	27.67±0.58 <sup>Bd</sup>	30.67±0.58 <sup>Cb</sup>	23.33±0.58 <sup>Ad</sup>
Penicillin	-	26.67±0.58 <sup>Bd</sup>	30.0±0.00 <sup>Bb</sup>	-

หมายเหตุ: ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้ง ลบเส้นผ่านเส้นผ่านศูนย์กลาง Paper disc (6 มิลลิเมตร)  
- ไม่มีการยับยั้งการเจริญ

เมื่อพิจารณาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อเชื้อโรคทั้ง 4 ชนิดของหัวคีเฟอร์ 5 ชนิด พบว่าหัวคีเฟอร์ต่างชนิดกัน สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ 0.05 (ตารางภาคผนวก 10)

ยาปฏิชีวนะ Penicillin ยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวกเท่านั้น ซึ่งได้แก่ *S. aureus* และ *B. subtilis* เพนนิซิลินเป็นยาที่ออกฤทธิ์ในการฆ่าแบคทีเรีย (bactericidal) แต่ออกฤทธิ์ได้ไม่ดี กับแบคทีเรียที่สามารถสร้างเพนนิซิลินเนส (Penicillinase bacteria) หรือ เบตาแลคตาเมส (Beta-lactamase bacteria) รวมทั้งแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative bacteria) ทั้งหมด (คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2544)

มีรายงานว่าแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *Lactobacillus Lactis* subsp. *Lactis* A7 สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบของแบคทีเรียโอซินเป็นการยับยั้งที่จำเพาะ (Gonzalez et al., 1994) ความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกของ แบคทีเรียโอซินเป็นการจับตัวของแบคทีเรียโอซินกับไลปิด ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสร้างผนังเซลล์ ของแบคทีเรีย สารประกอบของแบคทีเรียโอซินไลปิดจะแทรกตัวเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้รบกวนการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดช่องหรือรู ซึ่งทำให้แบคทีเรียตาย เนื่องจากเกิดการสูญเสียสารที่อยู่ภายในเซลล์ นอกจากนี้ในบางสายพันธุ์อาจมีการแตกสลายของเซลล์

สำหรับการที่แบคทีเรียโอสตินมีความต้านทานต่อแบคทีเรียโอสติน เนื่องจากผนังเซลล์มีชั้นของไขมันหนายากต่อการซึมผ่านหรือซึมผ่านได้น้อยกว่าแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งมีผนังเซลล์ที่บางกว่าแบคทีเรียแกรมลบ (Delves-Broughton, 2005) Al-Allaf *et al.*, (2009) ทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ST8KF โดยการใช้เทคนิค agar well diffusion บนอาหาร MRS พบว่าเชื้อ *Lactobacillus* sp. สามารถมีกิจกรรมการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ต่างกัน จากการทดสอบพบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *Bacillus cereus* ได้สูงสุด ที่ 2.8 มิลลิเมตร และยับยั้งเชื้อ *Corynebacterium* spp. ได้น้อยสุดที่ 0.6 มิลลิเมตร โดยตรวจสอบจากบริเวณการยับยั้งด้วยการวัดรอบโซนใส Karthikeyan และ Santhosh (2009) ได้ทดสอบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค 10 สปีชีส์ของแบคทีเรียโอสตินที่ผลิตจากเชื้อ *L. acidophilus* พบว่าแบคทีเรียโอสตินที่ผลิตจากเชื้อ *L. acidophilus* สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ 9 สปีชีส์ คือ *Lactobacillus bulgaricus*, *Samonella typhimurium*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Samonella typhimurium*, *Samonella paratyphi B*, *Serratia marsecence*, *Pseudomonas aeruginosa* การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบของ แบคทีเรียโอสตินที่ผลิตจากเชื้อ *L. lactis* มีกิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella shiga* และ *Shigella boydii* และกิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* และ *Pseudomonas aeruginosa* และ กิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *Shigella boydii* (Rajaram *et al.*, 2010)

การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้อย่างจำเพาะ คือสามารถสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์เดียวกัน หรือสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันได้ ซึ่งทำให้แบคทีเรียโอสตินแตกต่างจากสารยับยั้งการเจริญของของจุลินทรีย์ที่สร้างจากแลคติกแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ เช่น กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ หรือรูเทอรินการที่แบคทีเรียโอสตินสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นได้อย่างจำเพาะเกิดจากแบคทีเรียโอสตินสามารถจับกับบริเวณที่เป็นตำแหน่งจำเพาะ (Specific binding site หรือ Specific receptor) ซึ่งอยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ที่ไวต่อแบคทีเรียโอสติน เมื่อแบคทีเรียโอสตินจับกับบริเวณที่รับแล้วจะทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ ทำลายการผ่านเข้าออกของไอออน และสารต่าง ๆ ทำให้เซลล์เสียความสมดุลจนเซลล์แตก หรือเหี่ยวตายในที่สุด (วราวุฑฒ สุระนรากุล, 2549)

วันดี เกตุแก้ว และคณะ (2548) ได้ศึกษาความสามารถของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย 170 ไอโซเลท ที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์ รวม 33 ตัวอย่าง ที่ผลิตสารแบคทีเรียโอสตินในการยับยั้งต่อแบคทีเรียทดสอบ 22 ชนิดได้แก่ กลุ่มของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย และกลุ่มของแบคทีเรียก่อโรคทั้งแกรมบวกและแกรมลบ โดยทดสอบโดยวิธี Well diffusion assay พบว่ามีเพียงไอโซเลทเดียวเท่านั้นคือไอโซเลท HF84 ที่แสดงผลการยับยั้งต่อแบคทีเรียทดสอบคือ *Enterococcus durans* JCM 8725

นิภาภรณ์ แสนคุณท้าว และคณะ (2548) นำแบคทีเรียโอสตินที่ผลิตโดย *Streptococcus* รหัส SK 5.1 มาทำการศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบหลายชนิด โดยวิธี swab-paper disc พบว่า แบคทีเรียโอสตินดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญของ *Leuconostoc mesenteroides*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhi* และ *Proteus vulgaris*

## 4.2 การศึกษาคุณสมบัติบางประการของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยหัวเชื้อคีเฟอร์

### 4.2.1 ความสามารถในการทนต่อความร้อน

จากการศึกษาผลของความร้อนต่อความสามารถของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยหัวเชื้อคีเฟอร์ ทั้ง 5 ชนิด ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค โดยวิธี swab-paper disk พบว่าหลังจากให้ความร้อนที่ 50, 60, 70, 80, 90, 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5, 10, 20 และ 30 นาที ยังคงสามารถยับยั้งการเจริญต่อเชื้อทดสอบได้ แต่เมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที พบว่าไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ (ตาราง 4.3-4.7 และภาพประกอบ 4.2)

ซึ่งงานวิจัยนี้สอดคล้องกับกับการศึกษาของ Powell (2006) ที่พบว่าแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจาก *Lactobacillus plantatum* ST8KF ที่แยกจากคีเฟอร์ และ Kefir grain สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และยังสามารถสอดคล้องกับรายงานของ Noonpakdee *et al.* (2003) ที่พบว่า โนซินที่ผลิตโดยเชื้อ *Lactobacillus lactis* WNC 20 จะถูกทำลายไปเมื่ออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และยังมีรายงานที่พบว่าแบคทีเรียโอซิน Carnocin ที่ผลิตโดยเชื้อ *Leuconostoc carnosum* LA44A สามารถยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ *Listeria* spp. ได้ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ที่เป็นอย่างนี้เนื่องจากแบคทีเรียโอซินเป็นโปรตีนที่มีขนาดเล็กจึงสามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิสูงได้ และทนต่อความเป็นกรดได้มาก ดังนั้นทำให้สามารถนำแบคทีเรียโอซินไปใช้ประโยชน์ในการถนอมอาหารที่เป็นกรดได้ เช่น อาหารหมักดองต่าง ๆ และยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมที่ต้องใช้ความร้อนสูงในกระบวนการผลิตได้ด้วย

สมใจ ศิริโชค และคณะ (2550) ได้ศึกษาความสามารถของแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่เรียศึกษาสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตได้จากเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* FFL17-2 พบว่าสามารถทนความร้อน 100 องศาเซลเซียส ได้นาน 10 นาที เช่นเดียวกับ วันดี เกตุแก้ว และคณะ (248) แบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์นี้มีกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ *E. durans* JCM 8725 สูงสุดอยู่ในช่วงปลาย log phase และทนอุณหภูมิที่ 65 องศาเซลเซียส ได้ แต่ไม่สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส และ 121 องศาเซลเซียส ได้ และ Kwadsteniet *et al* (2005) ได้ศึกษาคุณสมบัติของ cell free supernatant ของเชื้อ *Enterococcus mundtii* ST15 พบว่า ความสามารถในการทนต่อความร้อนของ cell free supernatant ของเชื้อ *E. mundtii* ST15 สามารถทนอุณหภูมิได้ทุกอุณหภูมิ ยกเว้นที่ 121 องศาเซลเซียส เวลา 20 นาที ซึ่งมีผลเป็นลบ

ตาราง 4.3 บริเวณยับยั้งของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ Kefir DA 500 I ที่อุณหภูมิและเวลาต่าง ๆ

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	เส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้ง (มิลลิเมตร)			
		<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. fluorescens</i>
50	5	2.00±0.00	2.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	10	2.00±0.00	2.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	20	2.00±0.00	2.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	30	2.00±0.00	2.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
60	5	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	10	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	20	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	30	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
70	5	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	10	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	20	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	30	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
80	5	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	10	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	20	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	30	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
90	5	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	10	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	20	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	30	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
100	5	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	10	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	20	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	30	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
121	15	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
Control		2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00

หมายเหตุ: ตัวเลขในตาราง คือ ค่า  $\bar{X} \pm \text{standard error}$

ตาราง 4.4 พื้นที่ยับยั้งของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ Kefir DC 500 I ที่อุณหภูมิและเวลาต่าง ๆ

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	เส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้ง (มิลลิเมตร)			
		<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. fluorescens</i>
50	5	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	10	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	20	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	30	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
60	5	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	10	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	20	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	30	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
70	5	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	10	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	20	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	30	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
80	5	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	10	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	20	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	30	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
90	5	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	10	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	20	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	30	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
100	5	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	10	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	20	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	30	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
121	15	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
Control		2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00

หมายเหตุ: ตัวเลขในตาราง คือ ค่า  $\bar{X} \pm$  standard error

ตาราง 4.5 บริเวณยับยั้งของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ Kefir DG 500 I ที่อุณหภูมิและเวลาต่าง ๆ

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	เส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้ง (มิลลิเมตร)			
		<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. fluorescens</i>
50	5	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	10	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	20	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	30	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
60	5	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	10	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	20	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	30	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
70	5	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	10	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	20	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	30	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
80	5	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	10	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	20	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	30	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
90	5	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	10	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	20	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	30	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
100	5	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	10	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	20	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	30	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
121	15	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
Control		2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00

หมายเหตุ: ตัวเลขในตาราง คือ ค่า  $\bar{X} \pm$  standard error

ตาราง 4.6 บริเวณยับยั้งของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ Kefir DT 500 I ที่อุณหภูมิและเวลาต่าง ๆ

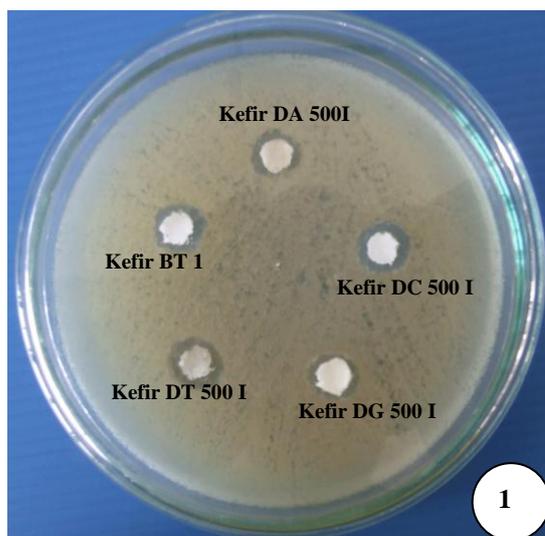
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	เส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้ง (มิลลิเมตร)			
		<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. fluorescens</i>
50	5	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00
	10	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00
	20	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00
	30	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00
60	5	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00
	10	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00
	20	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00
	30	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00
70	5	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00
	10	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00
	20	2.00±0.00	1.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00
	30	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
80	5	1.00±0.00	1.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00
	10	1.00±0.00	1.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00
	20	1.00±0.00	1.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00
	30	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
90	5	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	10	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	20	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	30	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
100	5	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	10	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	20	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	30	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
121	15	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
Control		2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00

หมายเหตุ: ตัวเลขในตาราง คือ ค่า  $\bar{X} \pm$  standard error

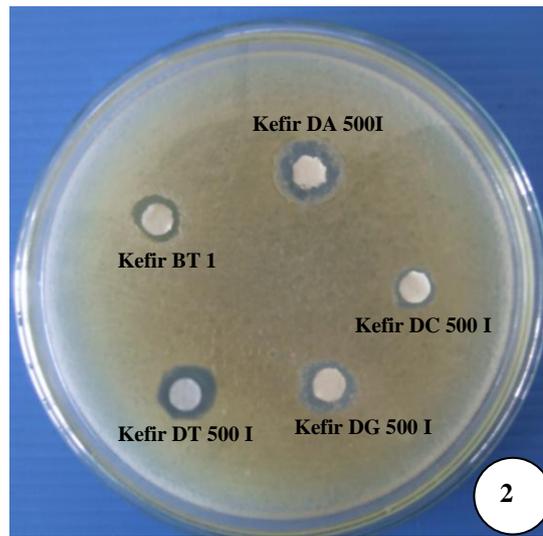
ตาราง 4.7 บริเวณยับยั้งของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ Kefir BT 1 ที่อุณหภูมิและเวลาต่าง ๆ

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	เส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้ง (มิลลิเมตร)			
		<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. fluorescens</i>
50	5	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	10	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	20	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	30	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
60	5	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	10	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	20	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	30	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
70	5	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	10	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	20	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	30	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
80	5	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	10	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	20	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	30	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
90	5	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	10	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	20	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	30	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
100	5	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	10	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	20	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
	30	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
121	15	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
Control		2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00

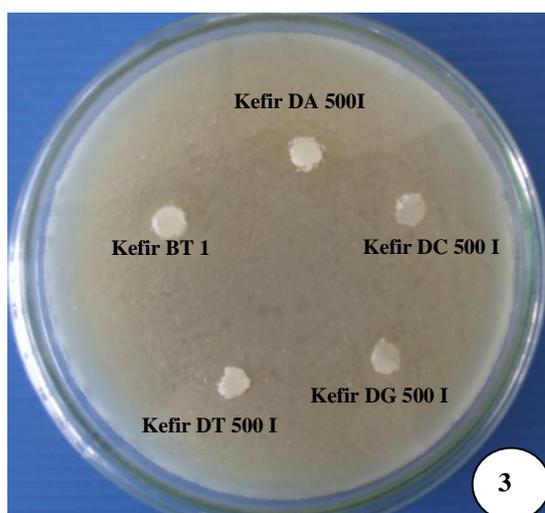
หมายเหตุ: ตัวเลขในตาราง คือ ค่า  $\bar{X} \pm$  standard error



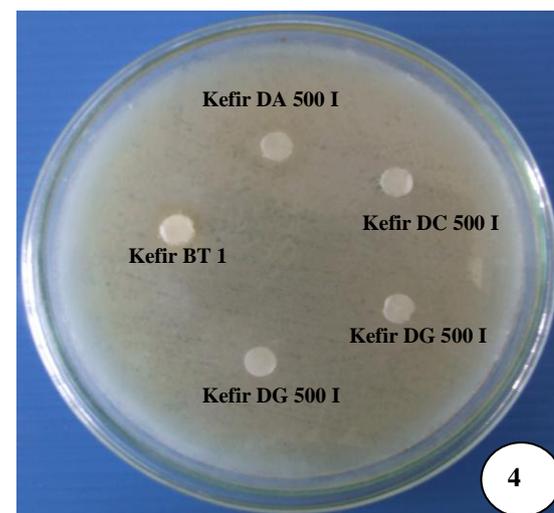
*Staphylococcus aureus*



*Pseudomonas fluorescens*



*Staphylococcus aureus*



*Pseudomonas fluorescens*

- 1: บริเวณการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ของเชื้อคีเฟอร์ทั้ง 5 ชนิด ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
- 2: บริเวณการยับยั้งเชื้อ *P. fluorescens* ของเชื้อคีเฟอร์ทั้ง 5 ชนิด ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
- 3: บริเวณการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ของเชื้อคีเฟอร์ทั้ง 5 ชนิด ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
- 4: บริเวณการยับยั้งเชื้อ *P. fluorescens* ของเชื้อคีเฟอร์ทั้ง 5 ชนิด ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาพประกอบ 4.2 บริเวณการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *P. fluorescens* ของเชื้อคีเฟอร์ทั้ง 5 ชนิด

#### 4.2.2 ความสามารถในการทนต่อ pH ที่ต่างกัน

จากการศึกษาผลของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยเชื้อคีเฟอร์ในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อทดสอบ *E. coli*, *P. fluorescens*, *S. aureus* และ *B. subtilis* โดยวิธี swab-paper disk พบว่าแบคทีเรียโอซินสามารถยับยั้งการเจริญสามารถยับยั้งการเจริญต่อเชื้อทดสอบได้ หลังจากปรับ pH ตั้งแต่ 2 ถึง 10 แต่ไม่พบสามารถยับยั้งการเจริญต่อเชื้อทดสอบ หลังจากปรับสภาวะ pH ที่ 11 และ 12 การที่เชื้อคีเฟอร์ไม่สามารถทนต่อค่า pH ที่สูงทั้งนี้เป็นเพราะเชื้อคีเฟอร์เป็นแบคทีเรียที่ชอบกรดเล็กน้อย หรือเป็นแบคทีเรียในกลุ่มแลคติกแบคทีเรีย

ผลการทดสอบแบคทีเรียโอซินที่มีความสามารถในการทนต่อ pH ที่ต่างกันที่ผลิตจากเชื้อ Kefir DA 500 I ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคพบว่าในสภาวะที่ค่า pH ที่ 6 สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้มากที่สุด 2.00 มิลลิเมตร ดังตาราง 4.8

ตาราง 4.8 บริเวณยับยั้งของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ Kefir DA 500 I ที่ pH ต่างกัน

pH	เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)			
	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. fluorescens</i>
2	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
3	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
4	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
5	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
6	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00
7	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
8	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
9	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
10	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
11	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
12	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
Control	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00

หมายเหตุ: ตัวเลขในตาราง คือค่า standard error

การทดสอบแบคทีเรียโอซินที่มีความสามารถในการทนต่อ pH ที่ต่างกันที่ผลิตจากเชื้อ Kefir DC 500 I ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคพบว่าในสภาวะที่ค่า pH ที่ 6 และ 7 สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้มากที่สุด คือ 2.00 มิลลิเมตร ดังตาราง 4.9

ตาราง 4.9 บริเวณยับยั้งของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ Kefir DC 500 I ที่ pH ต่างกัน

pH	เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)			
	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. fluorescens</i>
2	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
3	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
4	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
5	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
6	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00
7	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00
8	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
9	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
10	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
11	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
12	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
Control	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00

หมายเหตุ: ตัวเลขในตาราง คือ ค่า  $\bar{X} \pm$  standard error

จากการศึกษาความสามารถในการทนต่อ pH ที่ต่างกันของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากเชื้อ Kefir DG 500 I ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคพบว่าในสภาวะที่ค่า pH ที่ 6 สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้มากที่สุด คือ 2.00 มิลลิเมตร ดังตาราง 4.10

ตาราง 4.10 บริเวณยับยั้งของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ Kefir DG 500 I ที่ pH ต่างกัน

pH	เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)			
	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. fluorescens</i>
2	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
3	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
4	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
5	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
6	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00
7	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
8	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
9	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
10	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
11	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
12	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
Control	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00

หมายเหตุ: ตัวเลขในตาราง คือ ค่า  $\bar{X} \pm \text{standard error}$

การทดสอบแบคทีเรียโอซินที่มีความสามารถในการทนต่อ pH ที่ต่างกันที่ผลิตจากเชื้อ Kefir DT 500 I ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคพบว่าในสภาวะที่ค่า pH ที่ 7 สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้มากที่สุด คือ 2.00 มิลลิเมตร ดังตาราง 4.11

ตาราง 4.11 บริเวณยับยั้งของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ Kefir DT 500 I ที่ pH ต่างกัน

pH	เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)			
	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. fluorescens</i>
2	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
3	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
4	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
5	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
6	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
7	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00
8	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
9	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
10	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
11	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
12	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
Control	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00

หมายเหตุ: ตัวเลขในตาราง คือ ค่า  $\bar{X} \pm$  standard error

การทดสอบแบคทีเรียโอซินที่มีความสามารถในการทนต่อ pH ที่ต่างกันที่ผลิตจากเชื้อ Kefir BT 1 ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคพบว่าในสภาวะที่ค่า pH ที่ 2-10 สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ใกล้เคียงกันที่ 1.00 มิลลิเมตร ดังตาราง 4.12 การที่เชื้อคีเฟอร์ไม่สามารถทนต่อค่า pH ที่สูง ทั้งนี้เป็นเพราะเชื้อคีเฟอร์เป็นแบคทีเรียที่ชอบกรด หรือเป็นแบคทีเรียในกลุ่มแลคติกแบคทีเรีย

ตาราง 4.12 บริเวณยับยั้งของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ Kefir BT 1 ที่ pH ต่างกัน

pH	เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)			
	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. fluorescens</i>
2	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
3	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
4	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
5	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
6	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
7	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
8	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
9	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
10	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
11	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
12	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
Control	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00

หมายเหตุ: ตัวเลขในตาราง คือ ค่า  $\bar{X} \pm$  standard error

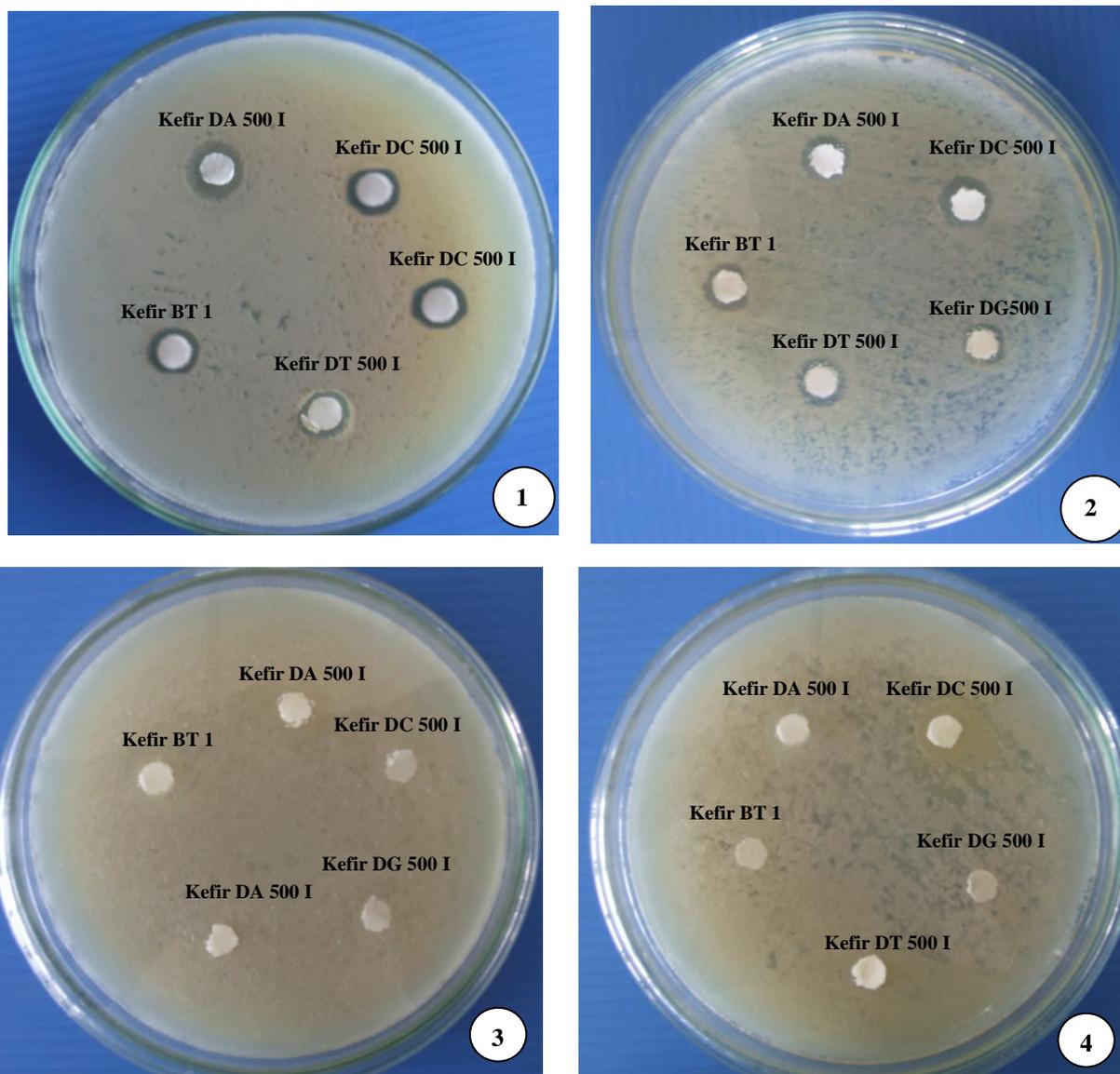
ซึ่งสอดคล้องกับกับการศึกษาของ Powell (2006) ที่พบว่าแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจาก *Lactobacillus plantatum* ST8KF ที่แยกจากคีเฟอร์ และ Kefir grain สามารถยับยั้งการเจริญต่อเชื้อทดสอบได้ที่ pH 2-10 และไม่สามารถยับยั้งเชื้อที่ pH 11 และ 12 ได้

Noonpakdee et al (2003) ที่ศึกษาแบคทีเรียโอซิน Carnocin ที่ผลิตโดยเชื้อ *Leuconostoc carnosum* LA44A สามารถยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ *Listeria* spp. ได้ที่ PH ตั้งแต่ 2 ถึง 9

Rajaram et al (2010) ศึกษาผลของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *L. lactis* ในการทนต่อ pH ที่ต่างกันพบว่า ค่าสูงสุดของ pH อยู่ที่ pH 6.0 และต่ำสุดที่ pH 9.0 คือ 1969 AU/ml

De Kwaadsteniet et al (2005) ได้ศึกษาคุณสมบัติของ cell free supernatant ของเชื้อ *Enterococcus mundtii* ST15 พบว่า ความสามารถในการทนต่อพีเอช ของ cell free supernatant ของเชื้อ *E. mundtii* ST15 พบว่า ช่วงของพีเอช ที่แบคทีเรียโอซินมีกิจกรรมการยับยั้งได้อยู่ในช่วง pH 2.0 ถึง 12.0 ซึ่งผลจากการทดลองพบว่ามีผลเป็นบวก และ สมใจ ศิริโชค และคณะ

(2550) ศึกษาสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตได้จากเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* FFL17-2 พบว่าสามารถทนความร้อน 100 องศาเซลเซียส ได้นาน 10 นาที มีความคงตัวดีในช่วง pH 4-7



- 1: บริเวณการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ของเชื้อคีเฟอร์ทั้ง 5 ชนิด ที่ pH 7
- 2: บริเวณการยับยั้งเชื้อ *P. fluorescens* ของเชื้อคีเฟอร์ทั้ง 5 ชนิด ที่ 7
- 3: บริเวณการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ของเชื้อคีเฟอร์ทั้ง 5 ชนิด ที่ 12
- 4: บริเวณการยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ของเชื้อคีเฟอร์ทั้ง 5 ชนิด ที่ pH 12

ภาพประกอบ 4.3 แสดงบริเวณการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ของเชื้อคีเฟอร์ทั้ง 5 ชนิด ที่ pH ต่างกัน

#### 4.2.3 การหาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ และการสร้างแบคทีเรียโอซินของหัวเชื้อคีเฟอร์

การหา Bacteriocin activity ที่เหมาะสมในการสร้างแบคทีเรียโอซินของหัวเชื้อคีเฟอร์ โดยเลี้ยงหัวเชื้อคีเฟอร์ในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 300 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้อากาศ เก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง ในช่วงเวลาที่ 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 และ 24 ตามลำดับโดยเก็บตัวอย่างครั้งละ 10 มิลลิลิตร แบ่งออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนแรกนำไปวัดค่า optical density (O.D) ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ส่วนที่สองนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสมาปรับ pH ให้ได้ 6.5 ด้วย 5 M HCl หรือ 5 M NaOH จากนั้นนำมากรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วนำมาเจือจางด้วยอาหารเหลว MRS ในอัตราส่วน 1:1, 1:2, 1:4, 1:6, 1:8, 1:16 และ 1:32 ตามลำดับ ต่อจากนั้นนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณค่า Bacteriocin activity ในหน่วย AU/มิลลิลิตร

Arbitrary unit (AU) คือ หน่วยของค่าระดับความเจือจางต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้

ตัวอย่างเช่น

ในช่วงเวลาที่ 10 มีระดับความเจือจางต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ (*S. aureus*) ได้คือ 1:4 โดยใช้ cell free supernatant ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ดังนั้น bacteriocin activity จะเท่ากับ

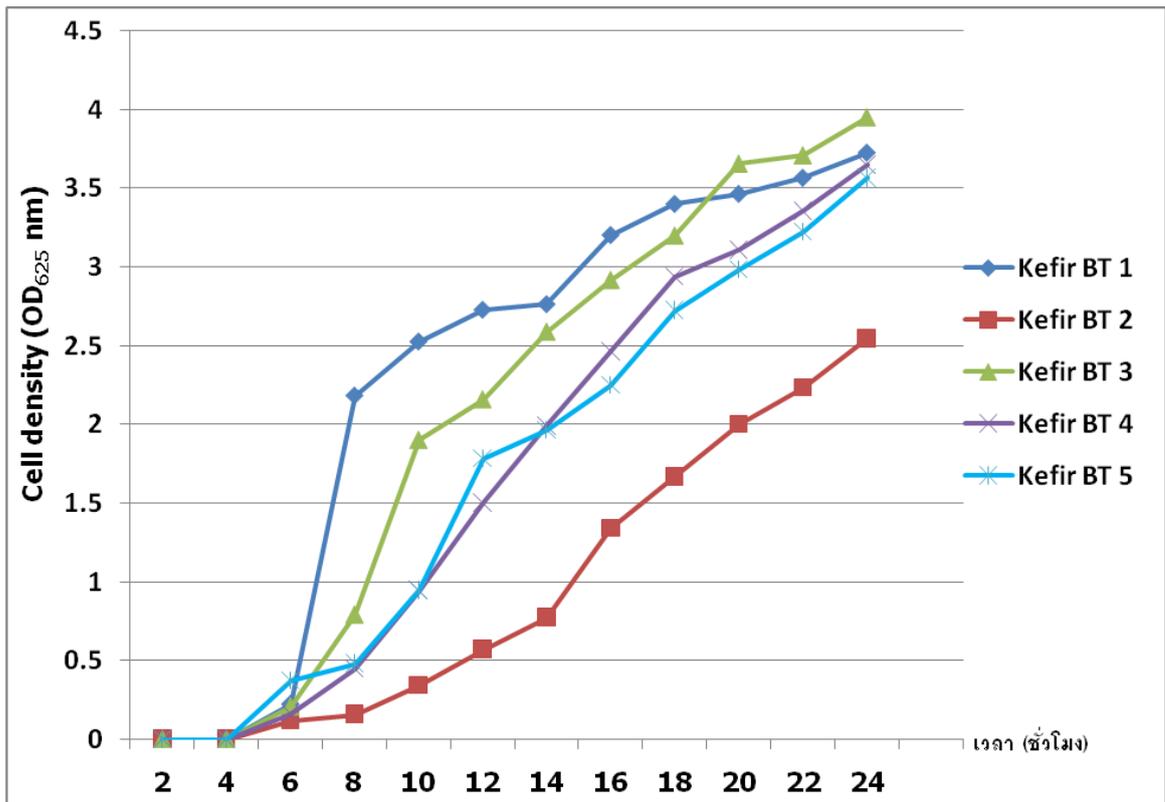
Cell free supernatant 25 ไมโครลิตร วัดค่า bacteriocin activity ได้เท่ากับ 4 AU

ถ้าใช้ Cell free supernatant 1,000 ไมโครลิตร วัดค่า bacteriocin activity ได้เท่ากับ

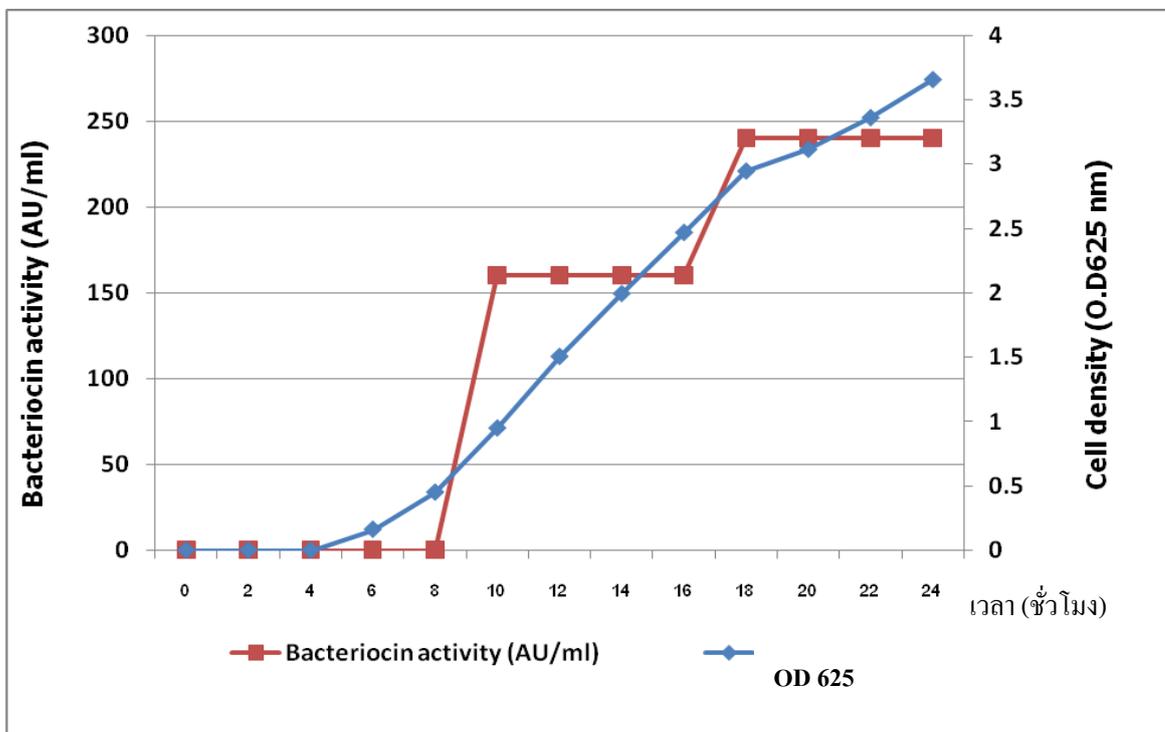
$$(1,000 \times 4) / 25 = 160 \text{ AU/มิลลิลิตร}$$

ดังนั้นค่า Bacteriocin activity ได้เท่ากับ 160 AU/มิลลิลิตร

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการสร้างแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรียโอซิน ที่ผลิตโดยเชื้อ Kefir DA 500 I พบว่าเชื้อ Kefir DA 500 I จะใช้เวลาประมาณ 6 ชั่วโมง ในระยะ lag phase ซึ่งยังไม่มีการผลิตแบคทีเรียโอซินในช่วงนี้ เชื้อจะเริ่มผลิตแบคทีเรียโอซินในระยะ logarithmic phase ซึ่งตรวจพบในช่วงเวลาที่ 10 มีกิจกรรมของแบคทีเรียโอซินเท่ากับ 160 AU/มิลลิลิตร ซึ่งมีค่า O.D เท่ากับ 0.946 และพบว่าเชื้อมีการผลิตแบคทีเรียโอซินได้สูงสุดในช่วงเวลาที่ 18 ซึ่งมีกิจกรรมของแบคทีเรียโอซินเท่ากับ 240 AU/มิลลิลิตร และยังคงมีกิจกรรมการยับยั้งจนถึงช่วงเวลาที่ 24 ซึ่งพบว่ามีค่า O.D เท่ากับ 3.653 ในช่วงเวลาที่ 24



ภาพประกอบ 4.4 การเจริญของเชื้อคีเฟอร์ทั้ง 5 ชนิด ในช่วงเวลาต่าง ๆ

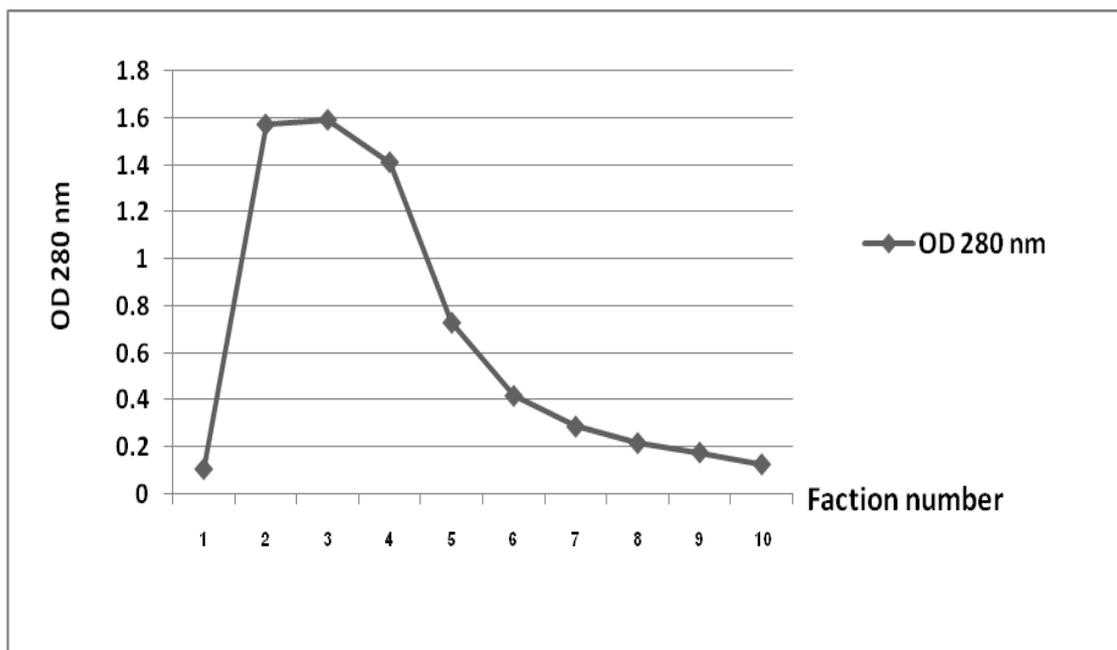


ภาพประกอบ 4.5 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตแบคทีริโอซินของเชื้อ Kefir DT 500 I

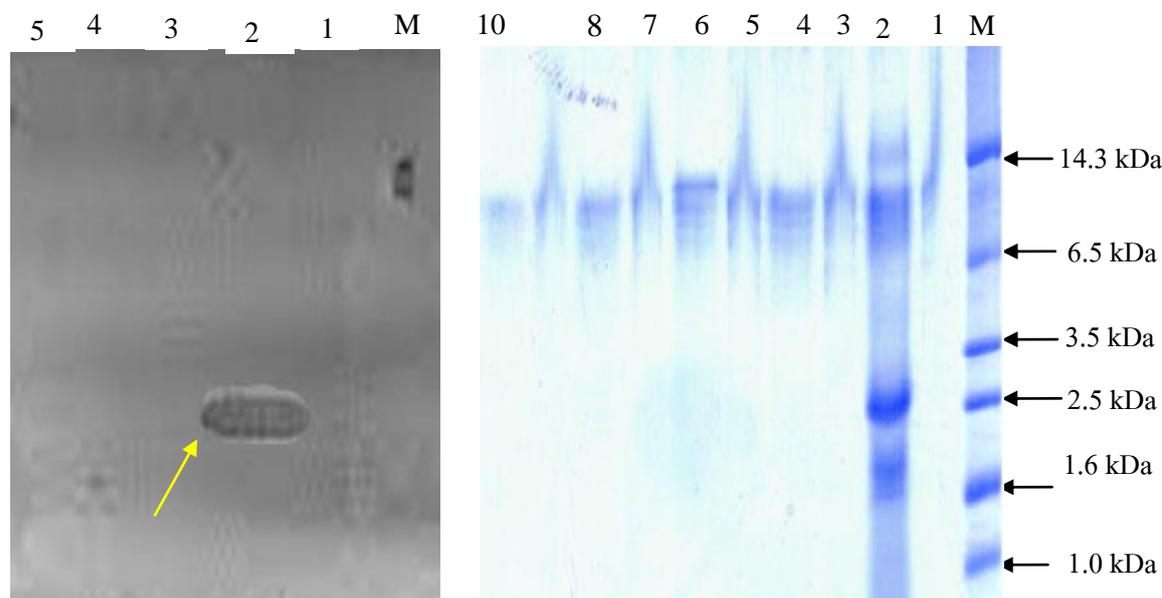
จากภาพประกอบ 4.4 สังเกตเส้นกราฟของค่า OD ที่วัดได้พบว่าที่ 24 ชั่วโมง ยังมีการเจริญของเชื้อทั้งนี้อาจเป็นเพราะในการวัดการเจริญครั้งนี้เป็นการวัดทั้งเชื้อเป็นและเชื้อตายจึงทำให้เส้นกราฟหลังชั่วโมงที่ 24 มีลักษณะชันขึ้น

#### 4.3 การทำให้แบคทีเรียโอสินบริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี

จากการศึกษาการทำให้แบคทีเรียโอสินบริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วย แอมโมเนียมซัลเฟต และใช้เทคนิคเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี โดยใช้คอลัมน์ Seppadex gel G-50 หลังจากนั้นนำไปล้างด้วยบัฟเฟอร์ แล้วนำโปรตีนที่ได้ไหลลงในคอลัมน์ เลือก fraction ละ 5 มิลลิลิตร ได้ทั้งหมด 10 fraction โดยปรับอัตราการไหลเท่ากับ 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง จากนั้นนำ fraction ที่ได้ไปวัดหาโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร พบว่าปริมาณโปรตีนใน fraction ที่ 2 เมื่อนำ fraction ไปหาน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้วิธี SDS-PAGE และนำเจลที่ได้จากการทำ SDS-PAGE ไปทำสอบหาแบคทีเรียโอสินกับเชื้อ *S. aureus* พบว่าแบคทีเรียโอสินที่ผลิตจากเชื้อ Kefir DA 500 I มีน้ำหนักโมเลกุล 2.5 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 4.6 และ 4.7)



ภาพประกอบ 4.6 ค่า OD<sub>280</sub> นาโนเมตร ของ fraction แต่ละส่วนที่เก็บได้จากการทำให้แบคทีเรียโอสินบริสุทธิ์ โดยใช้คอลัมน์ Sephadex gel G-50



1  
 1: บริเวณการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* Lane1-5 โปรตีนที่ทำให้บริสุทธิ์จาก fraction 1-5  
 2: การทำ SDS-PAGE Lane1-10 โปรตีนที่ทำให้บริสุทธิ์จาก fraction 1-10 M: Marker protein

ภาพประกอบ 4.7 การทำ SDS-PAGE ของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ Kefir DT 500 I

De Kwaadsteniet *et al* (2005) ได้ศึกษาลักษณะของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* ที่เลี้ยงในนม แล้วนำไปหาน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้วิธี SDS-PAGE พบว่าแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *E. mundtii* มีน้ำหนักโมเลกุล 2.5 กิโลดาลตัน ซึ่งมีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ Kefir BT 4 เช่นเดียวกับ Karthikeyan และ Santhosh (2009) ได้ศึกษาการทำให้บริสุทธิ์และหาน้ำหนักโมเลกุลของแบคทีเรียโอซิน โดยใช้วิธี SDS-PAGE พบว่าแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *L. acidophilus* มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 2.5 กิโลดาลตัน

Hemalatha และ Shanthi (2010) ได้ศึกษาลักษณะของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* ที่เลี้ยงในนม แล้วนำไปหาน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้วิธี SDS-PAGE พบว่าแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *B. subtilis* มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 62 กิโลดาลตัน

Powell *et al.* (2007) ได้ศึกษาการทำให้บริสุทธิ์และหาน้ำหนักโมเลกุลของแบคทีเรียโอซิน โดยใช้วิธี SDS-PAGE พบว่าแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ST8KS มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 3.5 กิโลดาลตัน

Rajaram *et al.* (2010) ได้ศึกษาการทำให้บริสุทธิ์ของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยเชื้อมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 94 กิโลดาลตัน มีการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากเชื้อต่าง ๆ หลายชนิด เช่น การทำให้แบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วย แอมโมเนียมซัลเฟต และใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ โดยใช้คอลัมน์ DEAE cellulose และนำตะกอนที่ได้ไปหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน พบว่าแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจาก *L. brevis* มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ

93.74 กิโลดาลตัน เป็น แบคทีเรียโอซินใน class III (Gautam and Sharma 2009) แบคทีเรียโอซินที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* LFB 112 มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 6.3 กิโลดาลตัน เป็นแบคทีเรียโอซินใน class II (Xie *et al.*, 2009) และ แบคทีเรียโอซินที่ผลิตจาก *L. plantarum* มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 3.8 กิโลดาลตัน เป็นแบคทีเรียโอซินใน class I