

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. ผลการแยกและคัดเลือกแลคติกแอซิดแบคทีเรีย

จากอาหารหมักคอง 153 ตัวอย่าง แยกเป็นอาหารหมักคองจากพืชและหญ้าหมัก 83 ตัวอย่าง อาหารหมักคองจากสัตว์ 51 ตัวอย่าง นมและผลิตภัณฑ์นม 19 ตัวอย่าง นำมาแยก thermotolerant lactic acid bacteria โดยใช้อาหาร MRS broth และ MRS agar ที่มี bromocresol green เป็นอินดิเคเตอร์ในสภาวะที่มี 5-10% CO₂ โดยใช้ Candle Jar ที่ 45°C 24-48 ชั่วโมง ได้เชื้อบริสุทธิ์ 117 ไอโซเลท เชื้อที่ได้มีลักษณะติดสีแกรมบวก รูปกลม แท่ง หรือกึ่งแท่ง ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์ catalase เจริญได้ทั้งที่อุณหภูมิ 45°C และอุณหภูมิห้อง เปลี่ยนสีของอาหารทั้ง MRS broth และ MRS agar จากสีเขียวเป็นสีเหลือง (รูป 2 และ 3) เก็บเชื้อลักษณะดังกล่าวไว้ใน 20% glycerol triptose broth, Litmus milk และ MRS agar ที่เติม 2% CaCO₃ ไว้เป็น stock เชื้อเพื่อทำการศึกษาในขั้นตอนต่อไป



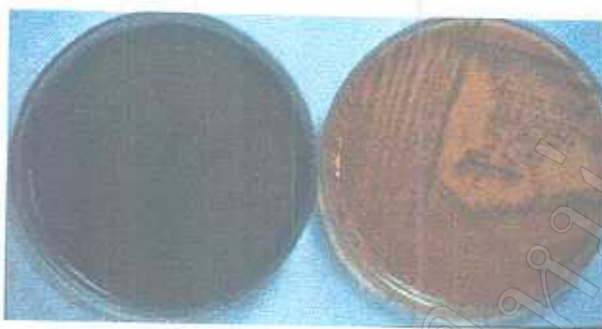
ก.

ข.

รูป 2 การเปลี่ยนสีของอาหาร MRS broth จากสีเขียวเป็นสีเหลือง หลังจากเพาะเลี้ยงเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ที่อุณหภูมิ 45°C 24 ชั่วโมง

ก : MRS broth

ข : MRS broth ที่มีเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียเจริญ



ก.

ข.

รูป 3 การเปลี่ยนสีของอาหาร MRS agar ที่ถ่ายเชื้อจาก MRS broth และนมที่อุณหภูมิ 45°C 24 ชั่วโมง อาหารจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลือง

ก : MRS agar

ข : MRS agar ที่มีเชื้อ แลคติกแอซิดแบคทีเรีย เจริญ

2. ผลการคัดเลือกแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบโดยวิธีแพร่จากแผ่นกระดาษกลม (Paper disc diffusion method)

2.1 ผลการคัดเลือกแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบในส่วนของน้ำเลี้ยงที่มีเซลล์

จากการคัดเลือกแลคติกแอซิดแบคทีเรียในส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีตัวเซลล์ จำนวน 117 ไอโซเลท นำมายับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบและเชื้อทดสอบอ้างอิง 7 ชนิด ได้แก่ *E. coli*, *S. aureus*, *S. enteritidis*, *V. parahaemolyticus*, *B. cereus*, *Sacch. cerevisiae* และ *A. flavus* พบว่ามีแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกได้ 29 ไอโซเลทที่ให้ผลในการยับยั้งเชื้อทดสอบและเชื้อทดสอบอ้างอิง ซึ่งแต่ละไอโซเลทที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบและชนิดของอาหารที่แยก เช่น ไอโซเลท CT10 แยกได้จากใบเมี่ยง ไอโซเลท CT16 แยกได้จากหน่อไม้ดอง ไอโซเลท CT33 แยกได้จากเหวมหม้อสุพิน ไอโซเลท CT62 แยกได้จากผักกาดดอง ไอโซเลท CT109 แยกได้จากเหวมหม้อ เป็นต้น (ตาราง 3) และผลการยับยั้งของแลคติกแอซิดแบคทีเรียในส่วนของน้ำเลี้ยงที่มีตัวเซลล์ ที่ให้ผลยับยั้งต่อเชื้อทดสอบและเชื้อทดสอบอ้างอิง ได้แก่ *E. coli* 5 ไอโซเลท *S. aureus* 19 ไอโซเลท *S. enteritidis* 3 ไอโซเลท *V. parahaemolyticus* 4 ไอโซเลท และ *B. cereus* 18 ไอโซเลท (ตาราง 4) ไอโซเลทที่ให้ผลการยับยั้งเชื้อทดสอบได้ดีที่สุดและให้ผลการยับยั้งเชื้อทดสอบได้ไม่ต่ำกว่า 3 ชนิด ได้แก่ CT10, CT16, CT33, CT62 และ CT109 (ตาราง 5) ซึ่งให้ผลการยับยั้งต่อ gram positive bacteria คือ *S. aureus* และ *B. cereus* ได้ดีที่สุด ดังแสดงในรูป 4 และรูป 5 ไอโซเลทที่ให้ผล

ยับยั้ง *Sacch. cerevisiae* ได้บางส่วน (intermediate inhibition zone) มี 6 ไอโซเลท ได้แก่ CT24, CT67, CT79, CT87, CT107, CT131 (รูป 6) ไอโซเลทที่สามารถยับยั้ง *A. flavus* ได้เฉพาะในตอนที่ยีสต์กำลังสร้างเส้นใยมี 3 ไอโซเลท ได้แก่ CT47, CT80 และ CT147 (รูป 7)

ตาราง 3 ไอโซเลทของแลคติกแอซิดแบคทีเรียซึ่งแยกได้จากตัวอย่างอาหารชนิดต่าง ๆ และสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้

ลำดับที่	ไอโซเลท	ชนิดของอาหาร
1	CT5	แมงมันจ่อม
2	CT7	ปลาต้ม
3	CT10	ใบเมี่ยง
4	CT16	หน่อไม้คอง
5	CT24	น้ำผักคอง
6	CT29	โยเกิร์ต Dacheeso
7	CT33	แหนมหม้อสุพิน
8	CT38	ไส้กรอกอีสานเปรี้ยว
9	CT44	ผักกุ่มคอง
10	CT47	หญ้าหมัก
11	CT55	ข้าวโพดหมัก
12	CT62	ผักกาดคอง
13	CT67	แหนมใบโอบเชย
14	CT73	ปลาต้มผักแก่น้อย
15	CT77	แหนมหม้อลำปาง
16	CT79	หน่อไม้คอง
17	CT80	Pankuramin (ญี่ปุ่น)
18	CT84	Biofermins (ญี่ปุ่น)
19	CT87	น้ำปู
20	CT95	นมเปรี้ยวดัชมิลล์เน่า
21	CT101	ใบเมี่ยง
22	CT109	แหนมหม้อ
23	CT116	ปลาต้ม
24	CT123	ผักกาดคอง
25	CT131	กระเทียมคอง
26	CT138	หอยแมลงภู่คอง
27	CT140	ไคปลา
28	CT142	ใบเมี่ยง
29	CT147	ผักกาดคอง

ตาราง 4 ผลการยับยั้งของแลคติกแอซิกแบคทีเรียในส่วนองน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีตัวเซลล์ต่อเชื้อทดสอบ และเชื้อทดสอบอ้างอิง

ไอโซเลข	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>Sacch. cerevisiae</i>	<i>A. flavus</i>
CT5	-	+	-	-	+	-	-
CT7	-	+	-	-	+	-	-
CT10	-	+	-	+	+	-	-
CT16	+	+	+	-	+	-	-
CT24	-	+	-	-	-	+	-
CT29	-	+	-	-	+	-	-
CT33	-	+	+	-	+	-	-
CT38	-	-	-	-	+	-	-
CT44	-	+	-	-	+	-	-
CT47	-	-	-	-	+	-	+
CT55	-	+	-	-	-	-	-
CT62	+	+	-	-	+	-	-
CT67	-	-	-	-	+	+	-
CT73	-	+	-	-	-	-	-
CT77	-	-	-	-	+	-	-
CT79	+	-	-	-	-	+	-
CT80	-	+	-	-	-	-	+
CT84	-	+	-	+	-	-	-
CT87	-	+	-	-	-	+	-
CT95	-	-	+	-	-	-	-
CT101	+	-	-	-	-	+	-
CT109	-	+	-	+	+	-	-
CT116	-	+	-	-	+	-	-
CT123	-	+	-	-	+	-	-
CT131	-	-	-	-	+	+	-
CT138	+	-	-	-	+	-	-
CT140	-	+	-	+	-	-	-
CT142	-	+	-	-	-	-	-
CT147	-	-	-	-	+	-	+

เชื้อทดสอบได้แก่ *E. coli*, *S. aureus*, *Sacch. cerevisiae* และ *A. flavus*

เชื้อทดสอบอ้างอิงได้แก่ *S. enteritidis*, *V. parahaemolyticus* และ *B. cereus*

*ไอโซเลขที่ให้ผลยับยั้งเชื้อทดสอบและเชื้อทดสอบอ้างอิงอย่างน้อย 3 ชนิด

ตาราง 5 ผลการยับยั้งของแลกติกแอซิคแบคทีเรียในส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีตัวเซลล์คือเชื้อทดสอบ และเชื้อทดสอบอ้างอิงได้ไม่ต่ำกว่า 3 ชนิด

ไอโซเลทแลกติกแอซิคแบคทีเรีย	เชื้อทดสอบ						
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>Sacch. cerevisiae</i>	<i>A. flavus</i>
CT10	-	+	-	+	+	-	-
CT16	+	+	+	-	+	-	-
CT23	-	+	+	-	+	-	-
CT62	+	+	-	-	+	-	-
CT109	-	+	-	+	+	-	-



รูป 4 ผลการยับยั้งของน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีตัวเซลล์ คือ *Staphylococcus aureus*

1= negative control (MRS broth pH 7)

2= แลกติกแอซิคแบคทีเรีย ไอโซเลท CT10

3= แลกติกแอซิคแบคทีเรีย ไอโซเลท CT16

4= แลกติกแอซิคแบคทีเรีย ไอโซเลท CT33

5= แลกติกแอซิคแบคทีเรีย ไอโซเลท CT62

6= แลกติกแอซิคแบคทีเรีย ไอโซเลท CT109

7= Positive control (4% lactic acid pH 2.5)



รูป 5 ผลการยับยั้งของน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีตัวเซลล์คือ *Bacillus cereus*

1= negative control

2= แลคติกแอซิดแบคทีเรีย ไอโซเลท CT10

3= แลคติกแอซิดแบคทีเรีย ไอโซเลท CT16

4= แลคติกแอซิดแบคทีเรีย ไอโซเลท CT33

5= แลคติกแอซิดแบคทีเรีย ไอโซเลท CT62

6= แลคติกแอซิดแบคทีเรีย ไอโซเลท CT109

7= แลคติกแอซิดแบคทีเรีย positive control



รูป 6 ผลการยับยั้งของน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีตัวเซลล์คือ *Saccharomyces cerevisiae*

1= แลคติกแอซิดแบคทีเรีย ไอโซเลท CT24

2= แลคติกแอซิดแบคทีเรีย ไอโซเลท CT67

3= แลคติกแอซิดแบคทีเรีย ไอโซเลท CT79

4= แลคติกแอซิดแบคทีเรีย ไอโซเลท CT87

5= แลคติกแอซิดแบคทีเรีย ไอโซเลท CT101

6= แลคติกแอซิดแบคทีเรีย ไอโซเลท CT131

7= positive control (50% lactic acid)



รูป 7 ผลการยับยั้งของน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีตัวเซลล์ต่อ *Aspergillus flavus*

- | | |
|---------------------------------------|---------------------------------------|
| 1= แลกคิคแอสิคแบคทีเรีย ไอโซเลท A7 | 5= แลกคิคแอสิคแบคทีเรีย ไอโซเลท CT147 |
| 2= แลกคิคแอสิคแบคทีเรีย ไอโซเลท A15/1 | 6= positive contrl (50% lactic acid) |
| 3= แลกคิคแอสิคแบคทีเรีย ไอโซเลท CT47 | 7= negative control (MRS broth pH 7) |
| 4= แลกคิคแอสิคแบคทีเรีย ไอโซเลท CT80 | |

2.2 ผลการยับยั้งของแลกคิคแอสิคแบคทีเรียในส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการปรับ pH

และกรองเอาตัวเชื้อออก (cell-free culture filtrate) คคือการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ

เพื่อเป็นการทดสอบว่าการยับยั้งไม่ได้เกิดขึ้นเนื่องจากกรดหรือตัวเชื้อ จึงได้ทดสอบโดยการนำน้ำเลี้ยงเชื้อปั่นที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที 4 °C 15 นาที น้ำ supernatant ปรับ pH ด้วย 2 N NaOH ให้มี pH 6.5-7.0 กรองด้วยกระดาษกรอง Cellulose acetate ขนาด 0.2 μm จะได้ส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการปรับ pH และไม่มีตัวเซลล์ (cell-free culture filtrate) นำไปทดสอบกับเชื้อทดสอบ พบว่า จากแลกคิคแอสิคแบคทีเรีย 29 ไอโซเลทที่ให้ผลยับยั้งเชื้อทดสอบในส่วนของน้ำเลี้ยงที่มีตัวเซลล์ มีเพียง 2 ไอโซเลท คือ CT16 และ CT62 ที่ยังคงให้ผลการยับยั้งต่อเชื้อทดสอบ โดย CT16 ให้ผลการยับยั้งต่อเชื้อ *E. coli*, *S. aureus* และ *B. cereus* ส่วน CT62 ให้ผลยับยั้งต่อ *S. aureus* และ *B. cereus* (รูป 8 และ 9)



รูป 8 ผลการยับยั้งของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการปรับ pH และกรองเอาตัวเซลล์ออก (cell-free culture filtrate) คือ *Staphylococcus aureus*

1= negative control

4= แลคติกแอซิดแบคทีเรีย ไอโซเลท CT62

2= แลคติกแอซิดแบคทีเรีย ไอโซเลท A15/1

5= แลคติกแอซิดแบคทีเรีย ไอโซเลท CT16

3= แลคติกแอซิดแบคทีเรีย ไอโซเลท A7

6= positive control



รูป 9 ผลการยับยั้งของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการปรับ pH และกรองเอาตัวเซลล์ออก (cell-free culture filtrate) คือ *Bacillus cereus*

1= negative control

5= แลคติกแอซิดแบคทีเรีย ไอโซเลท A7

2= แลคติกแอซิดแบคทีเรีย ไอโซเลท A15/2

6= แลคติกแอซิดแบคทีเรีย ไอโซเลท CT109

3= แลคติกแอซิดแบคทีเรีย ไอโซเลท CT62

7= positive control

4= แลคติกแอซิดแบคทีเรีย ไอโซเลท CT16

2.3 ผลการเปรียบเทียบการยับยั้งโดยวิธีเจาะหลุม (well diffusion method) และแบบใช้ถ้วยทรงกระบอก (cup diffusion method)

จากการเปรียบเทียบผลการยับยั้งโดยวิธีเจาะหลุมและแบบใช้ถ้วยทรงกระบอก stainless steel cup โดยเลือกเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่เรียที่ให้การยับยั้งเชื้อทดสอบตั้งแต่ 3 ชนิดขึ้นไป ได้แก่ ไอโซเลท CT10, CT16, CT33, CT62 และ CT109 มาทำการทดสอบเปรียบเทียบผลการทดลองพบว่าไอโซเลทดังกล่าวยังคงให้การยับยั้งได้ในวิธีการเจาะหลุมและการใช้ถ้วยทรงกระบอกอยู่ แต่จะให้วงใส (clear zone) ที่แคบลงกว่าวิธีแพร่จากแผ่นกระดาษกลม

3. การศึกษาคุณสมบัติบางประการของสารยับยั้ง

3.1 ผลการศึกษาถึงอิทธิพลของกรดที่ได้จากการหมักน้ำตาลและอิทธิพลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อไอโซเลท CT10, CT16, CT33, CT62 และ CT109 โดยใช้ MRS broth ซึ่งมีกลูโคส 2% (อาหารสำเร็จรูป : MECRK) พบว่า pH ของ culture media ทั้ง 5 ไอโซเลทมี pH ต่ำกว่า 4.5 ดังนั้นเพื่อลดอิทธิพลของกรดที่ได้จากการหมักและอิทธิพลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จึงเลี้ยงเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลทในอาหาร MRS broth ที่มีกลูโคส 0.2% (ภาคผนวก ก) และบ่มในสภาวะไร้อากาศโดยใช้ anaerobic incubator (Hirayama รุ่น FA 5148) นำน้ำเลี้ยงเชื้อ CT10, CT16, CT33, CT62 และ CT109 วัด pH ได้ 6.2, 6.1, 6.5, 6.3 และ 6.4 ตามลำดับ นำไปปั่นที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที 4°C supernatant ที่ได้กรองด้วยกระดาษกรอง cellulose acetate ขนาด 0.2 μ m จะได้ cell-free culture filtrate นำไปทดสอบผลการยับยั้งต่อเชื้อทดสอบ พบว่ามีเพียง 2 ไอโซเลทที่ให้การยับยั้งคือ CT16 และ CT62 โดยให้ผลการยับยั้งต่อเชื้อ *S. aureus* และ *B. cereus* ดังนั้นจึงนำ cell-free culture filtrate ของไอโซเลท CT16 และ CT62 ไปศึกษาถึงคุณสมบัติต่าง ๆ ต่อไป

3.2 ผลการศึกษาคุณสมบัติการทนความร้อนของสารยับยั้ง

นำ cell-free culture filtrate ที่เตรียมได้ในข้อ 3.1 ของไอโซเลท CT16 และ CT62 ไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5, 10, 15 และ 20 นาทีแล้วนำไปทดสอบการยับยั้งกับเชื้อทดสอบได้ผลดังนี้คือ ทั้ง 2 ไอโซเลทเมื่อผ่านการต้ม 10 นาที ยังสามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* และ *Sacch. cerevisiae* ได้ ส่วนแบคทีเรียและเชื้อราที่เรียไอโซเลทอื่น ๆ พบว่า เมื่อผ่านการต้มเพียง 5 นาที ไม่สามารถยับยั้งการเจริญได้ (ตาราง 6)

ตาราง 6 ผลยับยั้งของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อ CT16 และ CT62 ที่ผ่านการต้ม 5, 10, 15 และ 20 นาที

เชื้อทดสอบ	ต้ม 5 นาที		ต้ม 10 นาที		ต้ม 15 นาที		ต้ม 20 นาที	
	CT16	CT62	CT16	CT62	CT16	CT62	CT16	CT62
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>S. enteritidis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>V. parahaemolyticus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. cereus</i>	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Sacch. cerevisiae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
หมายเหตุ	+ = ยับยั้ง		- = ไม่ยับยั้ง					

3.3 ผลการศึกษาคุณสมบัติการถูกทำลายสารยับยั้งโดยเอนไซม์โปรติเอส

จาก cell-free culture filtrate ของไฮโซเลท CT16 และ CT62 ที่ให้ผลบวกจากการทดสอบหลังจากที่ได้ลดเปอร์เซ็นต์น้ำตาลกลูโคสให้เหลือเพียง 0.2% เพื่อลดอิทธิพลของกรดที่ได้จากการหมักน้ำตาลและลดอิทธิพลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยการนำไปต้มในสภาวะไร้อากาศ โดยใช้ anaerobic incubator และยังให้ผลการยับยั้งต่อ *S. aureus* และ *B. cereus* เมื่อนำไปต้มนาน 10 นาที จากผลการทดลองดังกล่าวคาดว่าสารยับยั้งน่าจะเป็นสารประเภทโปรตีนที่ทนความร้อนได้นาน 10 นาที จึงทดสอบต่อว่าสารยับยั้งนั้นถ้าเป็นโปรตีนน่าจะถูกทำลายด้วยเอนไซม์โปรติเอส จึงนำไปทดสอบโดยการเติมเอนไซม์โปรติเอส 20 มก.ต่อ cell-free culture filtration 1 มล. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3-4 ชั่วโมงแล้วนำไปทดสอบการยับยั้งต่อเชื้อ *S. aureus* และ *B. cereus* เทียบกับ negative control คือ cell-free culture filtration ที่ไม่เติมเอนไซม์โปรติเอส พบว่า cell-free culture filtration ที่เติมเอนไซม์โปรติเอสไม่ให้ผลการยับยั้งต่อ *S. aureus* และ *B. cereus* ซึ่งคาดว่าสารยับยั้งที่เป็นโปรตีนน่าจะถูกเอนไซม์โปรติเอสทำลาย เมื่อเทียบกับส่วนที่ไม่เติมเอนไซม์โปรติเอส หรือ negative control ยังคงให้ผลการยับยั้งต่อ *S. aureus* และ *B. cereus* (รูป 10)



รูป 10 ผลการศึกษาคุณสมบัติของ cell-free culture filtrate ที่ถูกทำลายโดย เอนไซม์โปรตีนเอสต่อการยับยั้ง *Staphylococcus aureus*

- 1= negative control (MRS broth pH 7)
 2= แลคติกแอซิดแบคทีเรีย ไอโซเลท CT16 ที่เติมเอนไซม์โปรตีนเอส
 3= แลคติกแอซิดแบคทีเรีย ไอโซเลท CT16 ที่ไม่เติมเอนไซม์โปรตีนเอส
 4= แลคติกแอซิดแบคทีเรีย ไอโซเลท CT62 ที่ไม่เติมเอนไซม์โปรตีนเอส
 5= แลคติกแอซิดแบคทีเรีย ไอโซเลท CT62 ที่เติมเอนไซม์โปรตีนเอส
 6= positive control (2% lactic acid)

3.4 ผลการศึกษาการยับยั้งต่อเชื้ออ้างอิง (แลคติกแอซิดแบคทีเรียสายพันธุ์ใกล้เคียงกัน)

cell-free culture filtrate ของไอโซเลท CT16 และ CT62 มาทำการทดสอบการยับยั้งต่อเชื้ออ้างอิงซึ่งได้แก่ *Lactobacillus lactis* TISTR452, *Streptococcus lactis* TISTR457, *Pediococcus* sp. A7 และ A67/2 (อิจจรว, 2541) ซึ่งทั้งหมดเป็นเชื้อ แลคติกแอซิดแบคทีเรีย พบว่า ทั้ง CT16 และ CT62 สามารถยับยั้ง *Pediococcus* sp. A7 และ *Pediococcus* sp. A67/2 แต่ไม่สามารถยับยั้ง *L. lactis* และ *Strep. lactis* ได้ (ตาราง 7)

ตาราง 7 ผลยับยั้งของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อ CT16 และ CT62 ต่อเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียอ้างอิง

ไอโซเลท	<i>L. lactis</i>	<i>Strep. lactis</i>	<i>Pediococcus</i> sp. A7	<i>Pediococcus</i> sp. A67/2
CT16	-	-	+	+
CT62	-	-	+	+
หมายเหตุ += ยับยั้งได้ -= ไม่ยับยั้ง				

4. การทำให้โปรตีนบริสุทธิ์บางส่วน

4.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยผงถ่าน (activated charcoal)

ผลการศึกษาหาเปอร์เซ็นต์ที่เหมาะสมต่อการตกตะกอนโปรตีนด้วยผงถ่านของ cell-free culture filtrate ไอโซเลท CT16 และ CT62 ที่ความเข้มข้นของผงถ่าน 0.5, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เวลาในการตกตะกอน 3 ชั่วโมงพบว่า ตะกอนของผงถ่านที่ความเข้มข้น 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ของ CT62 ให้ผลการยับยั้งต่อ *B. cereus* ได้ (รูป 11) แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ เมื่อเปรียบเทียบกับส่วนของ supernatant ก็ไม่สามารถยับยั้งทั้ง *B. cereus* และ *S. aureus* ซึ่งคาดว่าผงถ่านน่าจะสามารถตกตะกอนโปรตีนได้ ส่วนตะกอนของ CT16 ไม่สามารถยับยั้งทั้ง *B. cereus* และ *S. aureus* ซึ่งอาจจะต้องเพิ่มความเข้มข้นและเวลาในการตกตะกอนให้มากกว่านี้ แต่เนื่องจากเมื่อเพิ่มปริมาณของผงถ่านซึ่งผงถ่านไม่สามารถละลายน้ำได้หมดจึงทำให้ไม่สะดวกต่อการนำมาใช้ในการตกตะกอนโปรตีนครั้งนี้



รูป 11 ผลการตกตะกอนโปรตีนด้วยผงถ่านของ CT62 ต่อการยับยั้ง *Bacillus cereus*

- | | |
|-------------------------|-------------------------------------|
| 1 ตะกอนผงถ่าน 1% | 5 supernatant ผงถ่าน 2% |
| 2 ตะกอนผงถ่าน 2% | 6 supernatant ผงถ่าน 3% |
| 3 ตะกอนผงถ่าน 3% | 7 positive control (lactic acid 2%) |
| 4 supernatant ผงถ่าน 1% | |

4.2 ผลการศึกษาการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

นำ supernatant ของไอโซเลท CT16 และ CT62 ไปทดลองหาเปอร์เซ็นต์ความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมต่อการตกตะกอนโปรตีนที่ความเข้มข้น 20, 30, 40, 50, 60, 70 และ 80% ตามลำดับ พบว่า เปอร์เซ็นต์ความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 40-80% ตะกอนของไอโซเลท CT16 และ CT62 สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ โดยจะให้วงใสกว้างและชัดเจนที่ความเข้มข้น 70% ซึ่งที่ความเข้มข้น 70% นี้จะใช้เป็นเปอร์เซ็นต์ในการตกตะกอนโปรตีนของการทดลองครั้งนี้ต่อไป

ดังนั้นจึงทำการตกตะกอนโปรตีนไอโซเลท CT16 และ CT62 อีกครั้งหนึ่งที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 70% (รูป 12) โดยใช้ supernatant ปริมาตร 200 มล. มาทำการตกตะกอนตะกอนที่ได้แบ่งเป็น 3 ส่วน ได้แก่ ส่วนที่ 1 เป็นตะกอนที่ไม่คั่ง ส่วนที่ 2 ตะกอนที่คั่ง 10 นาที ส่วนที่ 3 ตะกอนที่เติมเอนไซม์โปรติเอส และนำไปทดสอบผลการยับยั้งอีกครั้งหนึ่งกับเชื้อ *S. aureus*, *B. cereus* และ *Pediococcus* sp. A7 พบว่า ตะกอนส่วนที่ไม่คั่งให้ผลการยับยั้งต่อ *S. aureus*, *B. cereus* และ *Pediococcus* sp. A7 แต่ตะกอนส่วนที่คั่งนาน 10 นาที จะให้วงใสที่แคบกว่าตะกอนที่ไม่คั่ง และตะกอนส่วนที่เติมเอนไซม์โปรติเอสจะไม่ให้ผลการยับยั้งต่อเชื้อทดสอบและเชื้อทดสอบอ้างอิง (ตาราง 8)

ตาราง 8 ผลการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 70% ของไอโซเลท CT16 และ CT62 ค่อยการยับยั้งเชื้อทดสอบ

ตะกอนไอโซเลท CT16 และ CT62	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>Pediococcus</i> sp. A7
ส่วนที่ไม่คั่ง	+	w	+
ส่วนที่คั่ง 10 นาที	+	w	+
ส่วนที่เติมเอนไซม์โปรติเอส	-	-	-
หมายเหตุ	- ยับยั้งไม่ได้	+ ยับยั้งได้	w ยับยั้งได้เล็กน้อย



รูป 12 ผลการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 40-80% ของ CT62 ค่อยการยับยั้ง *Staphylococcus aureus*

- | | |
|------------------------|-------------------------------------|
| 1 40% แอมโมเนียมซัลเฟต | 4 70% แอมโมเนียมซัลเฟต |
| 2 50% แอมโมเนียมซัลเฟต | 5 80% แอมโมเนียมซัลเฟต |
| 3 60% แอมโมเนียมซัลเฟต | 6 positive control (lactic acid 4%) |

4.3 ผลการทำไดอะไลซิส (dialysis)

จากการนำตะกอนที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 70% ของ CT16 และ CT62 โดยใช้ตะกอน 3 มล. ละลายใน 10 mM KPB pH 7 (10 mM Potassium phosphate buffer pH 7) ที่เย็นจัดประมาณ 5-7 มล. ทำการไดอะไลซิสโดยในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ถุงไดอะไลซิสที่มีขนาดรูพรุนของมวลโมเลกุลในช่วง 8,000-10,000 และขนาดรูพรุน 10,000-12,000 ทำการไดอะไลซิสใน 10 mM KPB pH 7 นาน 6-8 ชั่วโมงและตั้งทิ้งไว้ในตู้เย็น 4°C ค้างคืน นำทั้งส่วนของ supernatant และส่วนของตะกอน โดยในส่วนของตะกอนจะแบ่งออกเป็น 3 ส่วนคือ ส่วนที่ 1 ตะกอนที่ไม่คั่ง ส่วนที่ 2 ตะกอนที่คั่งนาน 10 นาที ส่วนที่ 3 ตะกอนที่เติมเอนไซม์โปรติเอส นำไปทดสอบผลการยับยั้งกับเชื้อ *S. aureus*, *B. cereus* และ *Pediococcus* sp A7 พบว่า การใช้ถุงไดอะไลซิสที่มีขนาดรูพรุน 10,000-12,000 ทั้งส่วนของ supernatant และส่วนของตะกอนไม่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ เมื่อทำการเปลี่ยนถุงไดอะไลซิสเป็นขนาดรูพรุน 8,000-10,000 พบว่าตะกอนของ CT16 ที่ไม่คั่งให้ผลยับยั้งต่อ *S. aureus* และตะกอนของ CT62 ในส่วนที่ไม่คั่งให้ผลการยับยั้งต่อ *S. aureus*, *B. cereus* และ *Pediococcus* sp. A7 และเมื่อนำตะกอนของ CT62 ไปคั่งนาน 10 นาที ยังคงให้ผลการยับยั้งต่อ *S. aureus* อยู่ ตะกอนส่วนที่เติมเอนไซม์โปรติเอส ทั้งตะกอนของ CT16 และ CT62 ไม่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ (ตาราง 9 และรูป 13)

ตาราง 9 ผลการยับยั้งเชื้อทดสอบของ CT62 ที่ผ่านการโคอะไลซิส

เชื้อทดสอบ	ตะกอน CT16			ตะกอน CT62		
	ไม่ต้ม	ต้มนาน 10 นาที	เติม โปรติเอส	ไม่ต้ม	ต้มนาน 10 นาที	เติม โปรติเอส
<i>S. aureus</i>	w	-	-	+	w	-
<i>B. cereus</i>	-	-	-	w	-	-
<i>Pediococcus</i> sp. A7	-	-	-	w	-	-
หมายเหตุ	- ไม่ยับยั้ง	+ ยับยั้งได้	w ยับยั้งได้เล็กน้อย			



รูป 13 ผลการโคอะไลซิสของ CT62 ต่อการยับยั้ง *Staphylococcus aureus*

1= ตะกอนที่ผ่านการต้ม 10 นาที

2= negative control

3= supernatant หลังการทำโคอะไลซิส

4= ตะกอนที่ผ่านการโคอะไลซิส

5= ตะกอนที่เติมเอนไซม์โปรติเอส

6= positive control

(ตะกอนที่ผ่านการตกตะกอนโปรตีนด้วย
แอมโมเนียมซัลเฟตอื่นตัว 70%)

4.4 ผลการแยก การวิเคราะห์ และหามวลโมเลกุลของสารยับยั้งโดยวิธีเอส ดี เอส โพลีอครีลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส (SDS-PAGE)

เมื่อนำตะกอนของไอโซเลท CT16 และ CT62 ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 70% และทำไดอะไลซิส มาทำการแยกวิเคราะห์ และหามวลโมเลกุลของโปรตีน ซึ่งคาดว่าเป็นสารยับยั้งโดยวิธี SDS-PAGE โดยใช้ bovine serum albumin (BSA) ซึ่งมีมวลโมเลกุลอยู่ในช่วง 65,000-67,000 เป็นตัวเปรียบเทียบการเกิดแถบโปรตีน จากผลการนำตะกอนของ CT16 และ CT62 มาทำการแยกโปรตีน ผลการทดลองไม่สามารถเห็นแถบโปรตีนที่เกิดขึ้นในแผ่นเจลได้ เมื่อเปรียบเทียบกับแถบโปรตีนของ BSA ซึ่งสามารถเห็นแถบโปรตีนได้ชัดเจน แสดงว่าผลการทดลองนี้ไม่สามารถแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ได้ ดังนั้นจึงไม่สามารถวิเคราะห์และหามวลโมเลกุลของสารยับยั้งนี้ได้

5. ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา และการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของ ไอโซเลท CT16 และ CT62

จากการตรวจสอบคุณสมบัติในการติดสี โดยการย้อมสีแกรม พบว่าทั้งไอโซเลท CT16 และ ไอโซเลท CT62 ย้อมติดสีม่วงซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.0-1.5 ไมโครเมตร การเรียงตัวอยู่คู่ หรือเป็นแบบเรียง 4 (Tetrad) ไม่สร้างสปอร์ ซึ่งผลการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของไอโซเลท CT16 และ CT62 เทียบเคียงกับจีแนส *Pediococcus* sp. เทียบเคียงคำบรรยายใน Bergey's Manual of Determinative Bacteriology ฉบับพิมพ์ครั้งที่ 9 (Holt *et al.*, 1994) และ Axelsson (1998) พบว่า ไอโซเลท CT16 และ CT62 อยู่ในสกุล *Pediococcus* โดยให้ผลการทดลองดังตาราง 10

ตาราง 10 ผลการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของไอโซเลท CT16 และ CT62 เทียบเคียงกับจีโนส *Pediococcus* sp. (Holt *et al.*, 1994)

ลักษณะที่ตรวจสอบ	ไอโซเลท CT16	ไอโซเลท CT62	<i>Pediococcus</i> sp.
การติดสีแกรม	ติดสีม่วง แกรมบวก	ติดสีม่วง แกรมบวก	ติดสีม่วง แกรมบวก
เส้นผ่าศูนย์กลางเซลล์, μm	1.0-1.5	1.0-1.5	1.0-2.0
รูปร่างเซลล์	spherical	spherical	Spherical
การจัดเรียงเซลล์	Pair, tetrad	Pair, tetrad	Pair, tetrad
การทดสอบ catalase	-	-	-
การเจริญที่อุณหภูมิ			
10°C	w	w	±
25°C	+	+	+
37°C	+	+	+
45°C	+	+	±
55°C	w	w	w
ปฏิกิริยาใน litmus milk	สร้างกรดและเกิด acid curd	สร้างกรดและเกิด acid curd	N.R.
การทดสอบ O-F	fermentative	fermentative	fermentative
การทดสอบการสร้างก๊าซ (homofermentative หรือ heterofermentative)	heterofermentative	homofermentative	homofermentative
การสร้างอิน โคล	-	-	±
การเคลื่อนที่	-	-	-
การทนเกลือ			
2%	+	+	+
4%	+	+	+
6%	+	+	+
8%	-	-	±
10%	-	-	±
18%	-	-	-
การใช้น้ำตาลและการเกิดกรดใน			
glucose	+	+	+
lactose	+	+	+
galactose	+	+	+
maltose	+	+	+
sucrose	+	+	+
fructose	+	+	+
D-manitol	-	-	±
D-sorbitol	+	+	+