



วิทยานิพนธ์

การคัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สร้างแบคทีริโอซินจาก
ระบบทางเดินอาหารของปลาสวยงาม

**ISOLATION OF BACTERIOCIN-PRODUCING LACTIC ACID
BACTERIA FROM GASTROINTESTINAL TRACT OF
ORNAMENTAL FISH**

นายปรีชา ภูมิพินผล

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2550



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (ผลิตภัณฑ์ประมง)

ปริญญา

ผลิตภัณฑ์ประมง

ผลิตภัณฑ์ประมง

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การคัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สร้างแบคเทอริโอซินจากระบบทางเดินอาหารของ
ปลาสวยงาม

Isolation of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria from Gastrointestinal Tract of
Ornamental Fish

นามผู้วิจัย นายปรีชา ภูมิพิณผล

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์พงษ์เทพ วิไลพันธ์, วท.ค.)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์นงนุช รักสกุลไทย, Ph.D.)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ, D.Sc.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วันชัย วรวัฒนเมธิกุล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์วินัย อัจฉกหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การคัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สร้างแบคทีริโอซินจากระบบทางเดินอาหารของ
ปลาสวยงาม

Isolation of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria from Gastrointestinal Tract of
Ornamental Fish

โดย

นายปรีชา ภูมิพินผล

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ผลิตภัณฑ์ประมง)
พ.ศ. 2550

ปรีชา ภูมิพินผล 2550: การคัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สร้างแบคทีเรียโอซินจากระบบ
ทางเดินอาหารของปลาสาวยงาม ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ผลิตภัณฑ์ประมง)
สาขาผลิตภัณฑ์ประมง ภาควิชาผลิตภัณฑ์ประมง ภาควิชาผลิตภัณฑ์ประมง ภาควิชาผลิตภัณฑ์ประมง
ผู้ช่วยศาสตราจารย์พงษ์เทพ วิไลพันธ์, วท.ด. 100 หน้า

การคัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถสร้างแบคทีเรียโอซินจากระบบทางเดินอาหารของ
ปลาสาวยงาม พบว่าแบคทีเรียกรดแล็กติกเพียง 2 สายพันธุ์ จากจำนวน 102 สายพันธุ์ สามารถสร้างสาร
ยับยั้งจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ได้ จึงคัดเลือกสายพันธุ์ MGM30-8.22 ซึ่งคัดแยกได้จาก
ปลาทองโคมี่ท (*Carassius auratus* สายพันธุ์ comet) และมีกิจกรรมของสารดังกล่าวสูงสุดมาจัดจำแนก
ชนิดด้วยชุดทดสอบ API 20 Strep และการเปรียบเทียบลำดับเบสของ 16S rDNA รวมทั้งศึกษา
คุณสมบัติต่าง ๆ ของสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ผลิตขึ้น พบว่าสายพันธุ์ MGM30-8.22 จัดเป็น
Enterococcus raffinosus โดยสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้นมีคุณสมบัติเป็นโปรตีนซึ่งเป็นลักษณะจำเพาะ
ที่สำคัญของแบคทีเรียโอซิน นอกจากนี้สารยับยั้งจุลินทรีย์ดังกล่าวยังมีคุณสมบัติทนต่อความร้อน คงตัว
ได้ดีภายใต้สภาวะค่าความเป็นกรดต่างระหว่าง 2-11 มีรูปแบบกิจกรรมในการยับยั้งการเจริญของ
Enterococcus faecium JCM 5804 แบบฆ่าทำลายเซลล์ (bactericidal mode of action) รวมทั้งมีการสร้าง
แบคทีเรียโอซิน ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในลักษณะที่มี
ความสัมพันธ์โดยตรงกับการเจริญของเซลล์ (primary metabolite production) โดยมีปริมาณ
แบคทีเรียโอซินในน้ำเลี้ยงเชื้อสูงสุดในช่วงปลายของการเจริญระยะ log หลังจากบ่มเชื้อเป็นเวลา 14
ชั่วโมง ส่วนการศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นในการเป็นโปรไบโอติกด้านการทนต่อสภาวะภายในระบบ
ทางเดินอาหารของปลา พบว่า *E. raffinosus* MGM30-8.22 สามารถทนต่อไฮโดรคลอไรด์ความเข้มข้น
ระหว่าง 1-7 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ทนกลื่อน้ำดีความเข้มข้นระหว่าง 0.1-0.2 เปอร์เซ็นต์
(น้ำหนักต่อปริมาตร) ทนต่อน้ำดีสดตลอดเชื้อจากปลาความเข้มข้นระหว่าง 10, 30 และ 50 เปอร์เซ็นต์
(ปริมาตรต่อปริมาตร) สามารถรอดชีวิตหรือเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ที่ค่าความเป็นกรดต่างระหว่าง 3-11
ในช่วงระยะเวลา 6 ชั่วโมง และสามารถเจริญทั้งภายใต้สภาวะมีออกซิเจนและปราศจากออกซิเจนได้
นอกจากนี้ยังสามารถทนต่อ nalidixic acid, oxolinic acid และ sulphamethoxazole ได้ จากคุณสมบัติ
ข้างต้นแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการนำ *E. raffinosus* MGM30-8.22 ไปศึกษาวิจัยและพัฒนา
เพื่อประยุกต์ใช้เป็น โปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำหรือปลาสาวยงาม

Preecha Poompuenpon 2007: Isolation of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria from Gastrointestinal Tract of Ornamental Fish. Master of Science (Fishery Products), Major Field: Fishery Products, Department of Fishery Products. Thesis Advisor: Assistant Professor Pongtep Wilaipun, Ph.D. 100 pages.

One hundred and two strains of lactic acid bacteria (LAB) were isolated from various kinds of ornamental fish gastrointestinal tract and only two LAB strains produced antimicrobial substance in MRS broth. Strain MGM30-8.22, isolated from goldfish (*Carassius auratus*, comet), with the highest antimicrobial activity against indicator bacteria was selected for further studies. According to API 20 Strep and homology of 16S rDNA base sequences results, strain MGM30-8.22 was identified to be *Enterococcus raffinosus*. The antimicrobial substance produced by *E. raffinosus* MGM30-8.22 exhibited a proteinaceous in nature, which is the most important property of bacteriocin. Moreover, *E. raffinosus* MGM30-8.22 produced heat and pH tolerant bacteriocin with bactericidal mode of action to *Enterococcus faecium* JCM 5804. Bacteriocin production of *E. raffinosus* MGM30-8.22 in MRS broth reached the maximum level at the end of log phase after 14 hr of incubation which indicated a primary metabolite production. Preliminary probiotic properties on toleration in fish gastrointestinal tract of *E. raffinosus* MGM30-8.22 were studied. It could grow at 1-7% (w/v) NaCl, 0.1-0.2% (w/v) ox-bile salt, 10-50% (v/v) fresh fish bile, anaerobic condition as well as survive or grow at pH 3 to 11 after incubation for 6 hr. Moreover, it resisted to nalidixic acid, oxolinic acid and sulphamethoxazole. Consequently, these indicated that *E. raffinosus* MGM30-8.22 had a potential for research and probiotic application in aquaculture or ornamental fish culture.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

____ / ____ / ____

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.พงษ์เทพ วิไลพันธ์ ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่ได้ช่วยเหลือในการวางแผนงานวิจัยในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ตลอดจนการให้คำปรึกษาแนะนำและตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.นงนุช รักสกุลไทย กรรมการที่ปรึกษา วิชาเอก รศ.ดร.สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ กรรมการที่ปรึกษาวิชาการ และ ผศ.ดร.อรพินท์ จินตสถาพร ผู้แทนบัณฑิต ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำและช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ทุนอุดหนุนในการศึกษาและทำวิจัยตลอดหลักสูตรการศึกษา

ขอขอบคุณความมีน้ำใจและความช่วยเหลือจากบุคลากรของภาควิชาผลิตภัณฑ์ประมงทุกท่าน รวมถึง พี่น้องๆ พี่ๆ และน้องๆ ภาควิชาผลิตภัณฑ์ประมง และพี่น้องดีกพักชายที่ 5 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ท้ายที่สุดขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อประพาส และคุณแม่จรรย์ ภูมิพินผล ครอบครัว ภูมิพินผล และครอบครัวผลสุข ตลอดจนผู้มีพระคุณทุกท่านที่ร่วมสร้างและให้โอกาสในการศึกษาจนส่งเสริมให้ข้าพเจ้าประสบความสำเร็จในการศึกษา

ปรีชา ภูมิพินผล
มีนาคม 2550

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	33
อุปกรณ์	33
วิธีการ	37
ผลและวิจารณ์	47
สรุปและข้อเสนอแนะ	75
สรุป	75
ข้อเสนอแนะ	76
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	77
ภาคผนวก	89

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียโอซินและสารปฏิชีวนะ	10
2	ชนิดของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่พบในระบบทางเดินอาหารและมูลปลา	23
3	แบคทีเรียกรดแล็กติกที่ใช้เป็นโปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	27
4	สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารของปลา	29
5	แบคทีเรียทดสอบและการเลี้ยงเชื้อที่ใช้ตรวจสอบการผลิตและการออกฤทธิ์ของสารยับยั้งจุลินทรีย์	34
6	ค่าความเป็นกรดค่าและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิด	42
7	ผลการคัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกจากระบบทางเดินอาหารของปลาสวยงาม	47
8	ผลการยับยั้งการเจริญแบคทีเรียทดสอบโดยสารยับยั้งจุลินทรีย์จากแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้	50
9	ค่ากิจกรรมของสารยับยั้งจุลินทรีย์ในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีสภาวะเป็นกลางและปลอดเชื้อของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดเลือกได้	51
10	คุณลักษณะทางสรีระวิทยาบางประการของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ซึ่งคัดแยกได้จากตัวอย่างของระบบทางเดินอาหารของปลาสวยงาม	52
11	ผลการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ MGM30-8.22 ด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป API 20 Strep	55
12	ผลของเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ต่อกิจกรรมของสารยับยั้งจุลินทรีย์ในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีสภาวะเป็นกลางและปลอดเชื้อของ <i>E. raffinosus</i> MGM30-8.22	58
13	ผลของการให้ความร้อนต่อกิจกรรมของแบคทีเรียโอซินในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีสภาวะเป็นกลางและปลอดเชื้อของ <i>E. raffinosus</i> MGM30-8.22	59
14	การคงตัวของแบคทีเรียโอซินที่สร้างจาก <i>E. raffinosus</i> MGM30-8.22 ภายใต้สภาวะที่มีค่าความเป็นกรดต่าง ๆ	61

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
15	การเจริญของ <i>E. raffinosus</i> MGM30-8.22 และแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์อื่น ๆ ที่คัดเลือกได้ในอาหาร MRS broth ที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่าง ๆ	68
16	การเจริญของ <i>E. raffinosus</i> MGM30-8.22 และแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์อื่น ๆ ที่คัดเลือกได้ในอาหาร MRS broth ที่ผสมเกลือแร่ความเข้มข้นต่าง ๆ	70
17	การทดสอบสารปฏิชีวนะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของ <i>E. raffinosus</i> MGM30-8.22	74
ตารางผนวกที่		
1	การคัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกจากระบบทางเดินอาหารของปลาสวยงามชนิดต่าง ๆ	93
2	การยับยั้งการเจริญของ <i>E. faecium</i> JCM 5804 แบบฆ่าทำลายเซลล์โดยแบคทีเรียโอซินที่สร้างจาก <i>E. raffinosus</i> MGM30-8.22	98
3	การเปลี่ยนแปลงปริมาณเซลล์ ค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อและการสร้างแบคทีเรียโอซินของ <i>E. raffinosus</i> MGM30-8.22 เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	99
4	การมีชีวิตรอดที่ค่าความเป็นกรดต่าง ๆ ของ <i>E. raffinosus</i> MGM30-8.22	100
5	การเจริญของ <i>E. raffinosus</i> MGM30-8.22 และ <i>S. agalactiae</i> ใน phosphate buffer saline (PBS) ผสมน้ำดีสดปลอดเชื้อของปลาช่อนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	100

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	กระบวนการสร้างแบคทีเรียโอซิน กลุ่ม non-lantibiotic	14
2	แบบจำลองการทำให้เกิดโรคในชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์เป้าหมายโดยแบคทีเรียโอซิน	16
3	แบบจำลองแสดงการยึดเกาะของแบคทีเรียที่เป็นโปรไบโอติกและแบคทีเรียก่อให้เกิดโรค	31
4	การวัดและคำนวณค่ากิจกรรมของสารยับยั้งจุลินทรีย์ในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีสถานะเป็นกลางและปลอดเชื้อของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดเลือกได้ด้วยวิธี critical dilution assay	40
5	ลักษณะการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบด้วยวิธี direct method	49
6	ผลการยับยั้งการเจริญของ <i>E. faecium</i> JCM 5804 แบบการทำลายเซลล์ (bactericidal) ของแบคทีเรียโอซินที่สร้างจาก <i>E. raffinosus</i> MGM30-8.22	64
7	การเจริญ (OD ₆₀₀) และค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อรวมถึงการสร้างแบคทีเรียโอซินของ <i>E. raffinosus</i> MGM30-8.22 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	66
8	การเจริญของ <i>E. raffinosus</i> MGM30-8.22 และ <i>S. agalactiae</i> ใน phosphate buffer saline (PBS) ที่ผสมน้ำคอกเทลของปลาช่อนความเข้มข้นต่าง ๆ	71
9	การรอดชีวิตของ <i>E. raffinosus</i> MGM30-8.22 ที่ระดับค่าความเป็นกรดต่าง ๆ	73

การคัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สร้างแบคเทอริโอซินจากระบบทางเดินอาหารของ ปลาสวยงาม

Isolation of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria from Gastrointestinal Tract of Ornamental Fish

คำนำ

ปลาสวยงามนอกจากเป็นปลาที่นิยมเลี้ยงเพื่อการนันทนาการแล้วยังมีความสำคัญทางเศรษฐกิจอีกด้วย โดยในปี พ.ศ. 2548 มีการส่งออกนับเป็นมูลค่าทางเศรษฐกิจสูงถึง 123 ล้านบาท (สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ กรมประมง, 2548) ซึ่งมีรายงานว่าปลาสวยงามและปลาชนิดอื่น ๆ ที่มีสุขภาพแข็งแรงมักจะพบแบคทีเรียกรดแล็กติก (Lactic acid bacteria) เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหาร (ศิริ, 2545) แบคทีเรียกรดแล็กติกที่พบมากในบริเวณระบบทางเดินอาหารของปลา เช่น *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Streptococcus* และ *Leuconostoc* เป็นต้น (Ringo and Gatesoupe, 1998) ซึ่งพบว่าแบคทีเรียดังกล่าวบางสายพันธุ์สามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ (antimicrobial agent) ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ เช่น กรดอินทรีย์ (organic acid) ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) เอทานอล (ethanol) อะซีตัลดีไฮด์ (acetaldehyde) และแบคเทอริโอซิน (bacteriocin) เป็นต้น โดยสารกลุ่มดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคซึ่งปนเปื้อนมากับอาหาร เช่น *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens* รวมทั้งแบคทีเรียกรดแล็กติกบางชนิด (Cleveland *et al.*, 2001)

ปัจจุบันแบคทีเรียกรดแล็กติกและแบคเทอริโอซินได้รับความสนใจและศึกษากันอย่างกว้างขวาง โดยสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการถนอมอาหารด้วยวิธีการทางชีวภาพ (biopreservation) ในอุตสาหกรรมอาหารหลายชนิด เช่น เนื้อสัตว์ นม เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เป็นต้น โดยการใช้งานอาจใช้ในรูปแบบของแบคเทอริโอซินบริสุทธิ์ กึ่งบริสุทธิ์ หรือใช้เซลล์จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินเป็นเชื้อตั้งต้น (starter culture) ในกระบวนการผลิต (Field, 1996) นอกจากนี้ยังมีการนำแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ไปประยุกต์เป็นโปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เช่น การใช้เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อโรคในสัตว์น้ำ

การใช้ผลิตภัณฑ์ที่สกัดได้จากแบคทีเรียกรดแล็กติกใส่ลงในน้ำหรืออาหารเพื่อป้องกันการเกิดโรค และเพื่อกระตุ้นให้สัตว์น้ำเจริญเติบโตได้ดีขึ้น (สนธิและลิลา, 2541) ซึ่งจะช่วยลดการใช้ สารปฏิชีวนะ (antibiotic) ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ อันจะเป็นส่วนสำคัญที่จะช่วยลดการตกค้างของ สารปฏิชีวนะในเนื้อสัตว์น้ำและสิ่งแวดล้อม (Gatesoupe, 1999a)

ดังนั้นการคัดแยกและศึกษาแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถสร้างแบคทีเรียโอซินจาก ปลาสร้อยขาว การศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียโอซินที่ได้ เช่น การทนต่อความร้อนและ ค่าความเป็นกรดต่าง สภาพที่เหมาะสมในการผลิต การทำแบคทีเรียโอซินให้เป็นสารบริสุทธิ์ รวมถึงการศึกษาคูสมบัติในการใช้เป็นโปรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดแยกได้ เช่น การทนต่อโซเดียมคลอไรด์ การทนต่อเกลือแร่ การทนต่อค่าความเป็นกรดต่าง การเจริญภายใต้ สภาพมีและไม่มีออกซิเจน จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจสำหรับการควบคุมโรคสัตว์น้ำด้วย วิธีการทางชีวภาพ เพื่อเพิ่มทางเลือกของการนำไปประยุกต์ใช้ในการกระตุ้นการเจริญและควบคุม การเกิดโรคในปลาสร้อยขาวในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกจากตัวอย่างอวัยวะระบบทางเดินอาหารของ ปลาสร้อยขาว
2. เพื่อคัดเลือกและจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถสร้างแบคทีเรียโอซิน ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ
3. เพื่อศึกษาคูสมบัติทางด้านกายภาพ ชีวภาพและเคมีของแบคทีเรียโอซินที่พบ
4. เพื่อศึกษาคูสมบัติในการเป็นโปรไบโอติกด้านการทนต่อสภาวะภายในระบบทางเดิน อาหารของปลาของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดเลือกได้

การตรวจเอกสาร

1. แบคทีเรียกรดแล็กติก

คำนิยามของแบคทีเรียกรดแล็กติก (Lactic Acid Bacteria; LAB) มีการเปลี่ยนแปลงอย่างต่อเนื่องโดยเฉพาะในช่วงระยะเวลา 10–20 ปีที่ผ่านมา ในอดีตนั้นแบคทีเรียกรดแล็กติกหมายถึงกลุ่มแบคทีเรียที่ทำให้น้ำนมมีรสเปรี้ยวเนื่องจากการสร้างกรดออกมา ซึ่งรวมเอาแบคทีเรียแกรมลบกลุ่มโคลิฟอร์มไว้ด้วย (Stiles and Holzapfel, 1997) ในปัจจุบันการจัดกลุ่มแบคทีเรียกรดแล็กติกจะมีลักษณะที่สำคัญ ได้แก่ เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์คาตาเลส ไม่สร้างไซโตโครม ทนต่อสภาวะมีออกซิเจน (aerotolerant) ทนกรด มีทั้งลักษณะรูปร่างกลม ได้แก่ *Lactococcus* (Lc.), *Vagococcus* (V.), *Leuconostoc* (Ln.), *Pediococcus* (P.), *Aerococcus* (A.), *Tetragenococcus* (T.), *Streptococcus* (S.), *Oenococcus* (O.), *Weissella* (W.) และ *Enterococcus* (E.) และที่เป็นรูปร่างท่อน ได้แก่ *Lactobacillus* (Lb.) และ *Carnobacterium* (C.) แบคทีเรียกรดแล็กติกส่วนใหญ่ต้องการออกซิเจนสำหรับการเจริญเพียงเล็กน้อย (microaerophile) บางชนิดเป็นพวกที่ไม่ต้องการออกซิเจนอย่างยิ่ง (strictly anaerobe) ในการเจริญ รวมทั้งได้แหล่งพลังงานจากกระบวนการหมัก (fermentation) น้ำตาลชนิดต่าง ๆ โดยเฉพาะน้ำตาลกลูโคสและแล็กโตส นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแล็กติกยังมีลักษณะที่สำคัญอีกประการหนึ่ง คือ ความสามารถในการย่อยน้ำตาลให้เป็นกรดซึ่งทำให้เกิดรสชาติที่ต้องการในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิด เช่น ผักดอง แหนม เนยแข็ง นมเปรี้ยว เป็นต้น (Stiles and Holzapfel, 1997; De Vuyst and Vandamme, 1994) โดยแบคทีเรียกรดแล็กติกสามารถพบได้ในสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ทั่วไป รวมถึงในระบบทางเดินอาหารของสิ่งมีชีวิต เช่น มนุษย์ หนู หมู สัตว์ปีก และสัตว์น้ำ เป็นต้น (De Vuyst and Vandamme, 1994)

1.1 อนุกรมวิธานของแบคทีเรียกรดแล็กติก

Orla-Jensen (1919) เป็นผู้เริ่มจัดอนุกรมวิธานของแบคทีเรียกรดแล็กติกอย่างเป็นระบบโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ความสามารถในการหมักน้ำตาลชนิดต่าง ๆ รูปแบบของกระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคส ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ และชนิดของไอโซเมอร์ของกรดแล็กติกที่สร้างขึ้น โดยได้แบ่งแบคทีเรียกรดแล็กติกออกเป็น 6 สกุล คือ

Betabacterium, *Thermobacterium*, *Streptococcus*, *Betacoccus*, *Microbacterium* และ *Tetracoccus* ซึ่งต่อมาในปี ค.ศ. 1937 Sherman (Sherman, 1937) ได้แยกกลุ่มที่เจริญเฉพาะในสภาวะไร้ออกซิเจน (strictly anaerobe) และ กลุ่ม pneumococci ออกจากสกุล *Streptococcus* และแบ่งส่วนที่เหลือในสกุลดังกล่าวเป็น 4 กลุ่ม คือ pyogenic, viridans, lactic และ enterococci

De Vuyst and Vandamme (1994) จัดจำแนกแบคทีเรียกรดแล็กติกออกเป็น 12 สกุล ได้แก่

1.1.1 *Streptococcus* เซลล์มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8-1.2 ไมครอน บางชนิดสามารถสร้างแคปซูลได้ จัดเรียงตัวเป็นสายโซ่หรือคู่ หมักน้ำตาลกลูโคสหรือคาร์โบไฮเดรตอื่น ๆ ได้ กรดแล็กติกชนิด L(+) เป็นผลิตภัณฑ์หลัก (homofermentative) มีโมเลกุลเปอร์เซ็นต์ G+C ระหว่าง 34-46 เปอร์เซ็นต์ มีหลายชนิดเป็นปรสิตในคนหรือสัตว์ ซึ่งบางชนิดสามารถทำให้เกิดโรคได้ สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิระหว่าง 20-41 องศาเซลเซียส โดยประกอบด้วย 39 ชนิด (species) (Hardie and Whiley, 1995)

1.1.2 *Vagococcus* เป็นแบคทีเรียกรดแล็กติกซึ่งส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้ประกอบด้วย 2 ชนิด คือ *Vagococcus flauvialis* ซึ่งเดิมถูกจัดอยู่ในกลุ่ม streptococci แยกได้จากอุจจาระของไก่ และ *V. salmoninarum* ซึ่งแยกได้จากปลาแซลมอนที่เป็นโรค (Stiles and Holzapfel, 1997)

1.1.3 *Lactococcus* เซลล์มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1.0 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่หรือต่อกันเป็นสายโซ่ ผลิตกรดแล็กติกชนิด L(+) จากการหมักแล็กโตส มักใช้เป็นก๊อแล็คเชอร์ (starter) ในผลิตภัณฑ์นม สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิระหว่าง 10-30 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีโมเลกุลเปอร์เซ็นต์ G+C ระหว่าง 34-43 เปอร์เซ็นต์ พบได้ในแหล่งต่าง ๆ เช่น ผักกาด ถั่ว หนุ่ย น้ำมันฝรั่ง น้านมดิบ เป็นต้น ประกอบด้วย 5 ชนิด ได้แก่ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, *Lc. lactis* subsp. *hordniae*, *Lc. garvieae*, *Lc. plantarum*, *Lc. raffinolactis* และ *Lc. piscium* (Teuber, 1995)

1.1.4 *Enterococcus* เซลล์มีรูปร่างกลมรี จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว สายโซ่สั้น ๆ หรือคู่ หมักน้ำตาลกลูโคสได้กรดแล็กติกชนิด L(+) สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส บางสายพันธุ์ผลิตเอนไซม์คาตาเลสเทียม (pseudocatalase) ได้ และบางชนิดสามารถทำให้เกิดโรค

มีโมเลกุลเปอร์เซ็นต์ G+C ระหว่าง 37–40 เปอร์เซ็นต์ ประกอบด้วย 28 ชนิด (Foulquie Moreno *et al.*, 2006)

1.1.5 *Pediococcus* เซลล์มีรูปร่างกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.36–1.43 ไมครอน การเรียงตัวของเซลล์มีลักษณะเฉพาะเป็นเซลล์ 4 เซลล์ติดกันแบบจตุรัส (tetrad formation) ในสภาวะไร้ออกซิเจนผลิตกรดแล็กติกชนิด DL และ L(+) จากการหมักกลูโคส สามารถสร้างเอนไซม์คาตาเลสเทียมได้ มีโมเลกุลเปอร์เซ็นต์ G+C ระหว่าง 34–44 เปอร์เซ็นต์ ประกอบด้วย 6 ชนิด ได้แก่ *Pediococcus acidilactici*, *P. damonusus*, *P. dextrinicus*, *P. inopinatus*, *P. parvulus* และ *P. pentosaceus* (Simpson and Taguchi, 1995)

1.1.6 *Tetragenococcus* เซลล์มีการเรียงตัวแบบจตุรัส เหมือนกับสกุล *Pediococcus* เดิมคือ *P. halophilus* แต่ถูกจัดจำแนกใหม่เนื่องจากสามารถเจริญในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์สูงถึง 18 เปอร์เซ็นต์ และมีลำดับเบสบน 16S rRNA ใกล้เคียงกับสกุล *Enterococcus* และ *Carnobacterium* มากกว่าสกุลเดิม (Simpson and Taguchi, 1995)

1.1.7 *Aerococcus* เซลล์มีการเรียงตัวแบบจตุรัส คล้ายกับ *Pediococcus* ประกอบด้วย 2 ชนิด คือ *Aerococcus viridans* (เปลี่ยนแปลงชื่อมาจาก *P. homari*) โดยเป็นสาเหตุของโรคในกุ้งล็อบสเตอร์และมนุษย์ อีกชนิดหนึ่งคือ *A. urinae* (เปลี่ยนแปลงชื่อมาจาก *P. urinaequi*)

1.1.8 *Leuconostoc* สกุลนี้มีฟีโนไทป์คล้ายกับสกุล *Lactobacillus* และ *Pediococcus* รูปร่างของเซลล์จะขึ้นอยู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อที่เจริญอยู่ ในอาหารที่มีกลูโคส เซลล์จะมีรูปร่างชีคออกคล้ายกลุ่ม *lactobacilli* แต่ในน้ำนม เซลล์จะมีรูปร่างกลม การจัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวหรือสายโซ่สั้นถึงปานกลาง ผลิตกรดแล็กติกชนิด D(-) เอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์และสารหอมระเหยจากการหมักกลูโคส (heterofermentative) มีโมเลกุลเปอร์เซ็นต์ G+C ระหว่าง 37–40 เปอร์เซ็นต์ ประกอบด้วย 8 ชนิด ได้แก่ *Leuconostoc mesenteroides*, *Ln. lactis*, *Ln. gelidum*, *Ln. carnosum*, *Ln. pseudomesenteroides*, *Ln. citreum*, *Ln. argentinum* และ *Ln. fallax* (Delliaglio *et al.*, 1995)

1.1.9 *Oenococcus* สกุลนี้มีเพียงชนิดเดียวคือ *Oenococcus oeni* โดยเปลี่ยนชื่อมาจาก *Ln. oenos* เนื่องจากมีคุณสมบัติการทนต่อกรดและเอทานอลได้ในปริมาณสูง รวมทั้งข้อมูลทางพันธุกรรมจากดีเอ็นเอ เช่น ดีเอ็นเอไฮบริไดเซชัน และลำดับเบสของ 16S rRNA แตกต่างจากชนิดอื่น ๆ ในสกุล *Leuconostoc* อย่างชัดเจน (Delliaglio *et al.*, 1995)

1.1.10 *Weissella* เชลล์มีรูปร่างกลมและท่อน ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับสกุล *Leuconostoc* (*Leuconostoc*-like bacteria) เดิมสกุลนี้จัดอยู่ในสกุล *Leuconostoc* และ *Lactobacillus* ประกอบด้วย 7 ชนิด คือ *Weissella paramesenteroides*, *W. confuses*, *W. halotolerans*, *W. kandleri*, *W. minor*, *W. viridescens* และ *W. hellenica* (Stile and Holzapfel, 1997)

1.1.11 *Lactobacillus* เป็นแบคทีเรียกรดแล็กติกกลุ่มใหญ่ที่สุด มีความหลากหลายของลักษณะทางฟีโนไทป์ สมบัติทางชีวเคมีและสรีรฯ เนื่องจากมีความแตกต่างของโมเลกุลเปอร์เซ็นต์ G+C ภายในโมเลกุลสูงระหว่าง 32–53 เปอร์เซ็นต์ (Axelsson, 1998) พบได้ในแหล่งต่าง ๆ ที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบ เช่น เยื่อเมือกของมนุษย์ สัตว์ พืช น้ำทิ้ง อาหารที่เน่าเสีย เป็นต้น บางชนิดเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในมนุษย์ เชลล์มีรูปร่างท่อนหรือท่อนสั้น (*coccobacilli*) *Lactobacillus* ประกอบด้วย 55 ชนิด ซึ่งถูกแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม (Stile and Holzapfel, 1997) ได้แก่

ก) กลุ่ม obligate homofermentative lactobacilli เป็นกลุ่มที่สามารถหมักน้ำตาลแล็กโทสได้เป็นกรดแล็กติกได้มากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์ โดยวิถี Embden–Meyerhof–Parnas (EMP) ผลิตเอนไซม์ 1,6 biphosphate–aldolase แต่ไม่ผลิตเอนไซม์ phosphoketolase จึงหมักน้ำตาลเพนโทสและกลูโคเนตไม่ได้

ข) กลุ่ม obligate heterofermentative lactobacilli สามารถหมักน้ำตาลเฮกโซสและเพนโทสผ่านวิถีฟอสโฟกลูโคเนต ได้ แล็กเทต เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์

ค) กลุ่ม facultative heterofermentative lactobacilli เป็นกลุ่มที่สามารถหมักน้ำตาลเฮกโซสได้เป็นกรดแล็กติกผ่านวิถี EMP มีการผลิตเอนไซม์ aldolase และ phosphoketolase จึงสามารถหมักน้ำตาลเพนโทสได้

1.1.12 *Carnobacterium* เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนตรงขนาดสั้นถึงปานกลางหรือท่อนเรียว (slender rod) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5–0.7 ไมครอน และยาว 1.1–3.0 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวหรือคู่ มักไม่พบการเรียงตัวเป็นสายโซ่ สามารถหมักน้ำตาลเฮกโซสได้เป็นกรดแล็กติก ชนิด L(+) คาร์บอนไดออกไซด์ แอซิเทต และเอทานอล มีโมเลกุลเปอร์เซ็นต์ G+C ระหว่าง 31.6–37.2 เปอร์เซ็นต์ ประกอบด้วย 6 ชนิด คือ *Carnobacterium divergens*, *C. piscicola*, *C. gallinarum*, *C. mobile*, *C. funditum* และ *C. alterfunditum* (Schillinger and Holzapfel, 1995)

2. สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแล็กติก

แบคทีเรียกรดแล็กติกเป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมหมักและทำให้เกิดกลิ่นรสเฉพาะตัวในอาหารหมักดอง นอกจากนี้ยังสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้อาหารเกิดเน่าเสียและจุลินทรีย์ก่อโรคซึ่งปะปนมากับอาหาร เช่น *B. cereus*, *C. botulinum*, *C. perfringens*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* รวมทั้งแบคทีเรียกรดแล็กติกบางชนิดได้ (O' Sullivan *et al.*, 2002) ซึ่งสารที่แบคทีเรียกรดแล็กติกสร้างขึ้นมาเพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวส่วนใหญ่เป็นกรดแล็กติกและกรดอะซิติก รวมทั้งยังมีสารชนิดอื่น ๆ ที่สร้างขึ้นในปริมาณที่น้อยกว่ากรดแล็กติกและกรดอะซิติกแต่มีผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ เช่นกัน ได้แก่ กรดฟอร์มิก (formic acid), แอมโมเนีย (ammonia), เอทานอล (ethanol), ไดอะซีทิล (diacetyl), ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide), อะซีทัลดีไฮด์ (acetaldehyde), เบนโซเอต (benzoate), เอนไซม์แบคทีริโอไลติก (bacteriolytic enzyme) และแบคทีริโอซิน (bacteriocin) รวมถึงสารที่ยังไม่สามารถจัดจำแนกได้อีกหลายชนิด โดยสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สำคัญและศึกษากันมาก ได้แก่

2.1 กรดอินทรีย์ โดยกรดอินทรีย์ชนิดที่มีความสำคัญ ได้แก่ กรดแล็กติก ซึ่งเป็นผลผลิตที่เกิดขึ้นในกระบวนการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต โดยจะมีการเปลี่ยนไพรูเวตไปเป็นกรดแล็กติกด้วยเอนไซม์ lactic dehydrogenase ซึ่งกรดที่เกิดขึ้นเมื่อมีการสะสมมากขึ้นจะทำให้ค่าความเป็นกรดต่างในบริเวณนั้นลดลง ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ โดยพบว่ากรดแล็กติกสามารถแทรกผ่านเข้าไปภายในเซลล์จุลินทรีย์ได้ และเมื่อเจอสภาพภายในเซลล์ที่มีค่าความเป็นกรดต่างสูงกว่าภายนอกเซลล์ กรดแล็กติกจะเกิดการแตกตัวได้เป็นไฮโดรเจนไอออน ซึ่งจะไปมีผลต่อกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) ต่าง ๆ ภายในเซลล์ (De Vuyst and Vandamme, 1994)

2.2 ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ แบคทีเรียกรดแล็กติกจะผลิตไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์เมื่อเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจน โดยไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์จะเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการถ่ายเทอิเล็กตรอน ซึ่งพบว่าไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์จะทำปฏิกิริยากับไขมันที่อยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้ไม่สามารถควบคุมการผ่านเข้าออกของสารได้ นอกจากนี้ยังมีผลในการทำลายโครงสร้างของกรดนิวคลีอิกและโปรตีนที่อยู่ภายในเซลล์ โดยยังพบอีกว่าไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์นอกจากจะสามารถทำลายจุลินทรีย์ได้โดยตรงแล้วยังสามารถไปรวมตัวกับสารอื่น ๆ และเกิดเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดใหม่ขึ้นมาได้อีกด้วย (De Vuyst and Vandamme, 1994)

2.3 คาร์บอนไดออกไซด์ โดยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลผลิตที่เกิดจากกระบวนการหมักน้ำตาลแบบ heterofermentation ของแบคทีเรียกรดแล็กติก ซึ่งก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นจะไปแทนที่ก๊าซออกซิเจนในสภาวะแวดล้อมรอบ ๆ ทำให้เกิดสภาวะ anaerobe ซึ่งไม่เหมาะสมสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ที่ต้องการใช้ออกซิเจน โดยเฉพาะในกลุ่มของเชื้อรา นอกจากนี้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ยังทำให้ค่าความเป็นกรดต่างภายในเซลล์ และรอบ ๆ เซลล์ ลดลงมีผลทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย (De Vuyst and Vandamme, 1994)

2.4 ไดอะซีทิล หรือ 2,3-butanedione เป็นผลผลิตจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของไพรูเวตโดยแบคทีเรียกรดแล็กติกในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน ซึ่งพบว่าจะมีการสร้างไพรูเวตออกมาในปริมาณมาก โดยสารดังกล่าวนี้จะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็นไดอะซีทิลและอะซีโตอิน โดยไดอะซีทิลสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคและทำให้อาหารเกิดการเน่าเสีย ซึ่งผลในการยับยั้งของสารกลุ่มนี้จะมีผลต่อแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์และรามมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก เนื่องจากไดอะซีทิลจะไปขัดขวางการใช้อาร์จินีนของแบคทีเรียแกรมลบโดยไปแทนที่อาร์จินีนในการรวมตัวกับ arginine-binding protein (De Vuyst and Vandamme, 1994)

2.5 อะซีทัลดีไฮด์ โดยสารดังกล่าวนี้จะเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตแบบ heterofermentation ของแบคทีเรียกรดแล็กติกในสภาวะที่ไม่มีเอนไซม์ alcohol dehydrogenase ทำให้เกิดการสร้างและขับอะซีทัลดีไฮด์ออกมาภายนอกเซลล์ ส่วนผลของอะซีทัลดีไฮด์ต่อจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ นั้นยังไม่มีรายงานการศึกษามากนัก เพียงแต่มีการรายงานว่าอะซีทัลดีไฮด์ที่มีความเข้มข้นระหว่าง 10-100 ส่วนในล้านส่วน สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคในอาหาร เช่น *E. coli*, *S. aureus* และ *Salmonella Typhimurium* ได้ (De Vuyst and Vandamme, 1994)

3. แบคทีเรียโอซิน

คำนิยามของแบคทีเรียโอซินที่นิยามใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน คือ สารประกอบโปรตีน ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่มีความไวต่อสารดังกล่าวและไม่เป็นพิษต่อเซลล์ที่ผลิต (De Vuyst and Vandamme, 1994) การศึกษาสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยทั่วไปมักจะมีความสับสนกันระหว่างแบคทีเรียโอซินและสารปฏิชีวนะ โดย Cleveland *et al.* (2001) ได้สรุปความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียโอซินและสารปฏิชีวนะไว้ดังแสดงในตารางที่ 1

แบคทีเรียโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแกรมลบจะมีโมเลกุลขนาดใหญ่และมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้น้อยชนิดกว่าที่สร้างจากแบคทีเรียแกรมบวก โดยพบว่าแบคทีเรียโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแกรมบวกมีคุณสมบัติที่น่าสนใจกว่าที่สร้างจากแบคทีเรียแกรมลบ คือ มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่แตกต่างกันได้หลายชนิด รวมทั้งเซลล์เป้าหมายจะมีความต้านทานน้อยและไม่ต้องการตำแหน่งเฉพาะเจาะจงบนเซลล์เป้าหมายเพื่อการเข้าทำลายโดยแบคทีเรียโอซิน

ในกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวก พบว่าแบคทีเรียกรดแล็กติกมีบทบาทสำคัญในการสร้างสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มต่าง ๆ ได้หลายชนิด โดยเฉพาะแบคทีเรียโอซิน ซึ่งพบว่าสารดังกล่าวเป็นสายเพปไทด์หรือโปรตีนขนาดเล็กและในบางครั้งอาจพบ กรดอะมิโนที่ไม่ค่อยพบในโปรตีนทั่วไป เช่น dehydroalanine, dehydrobutyrine ดังที่พบในไนซิน (nisin) โดยแบคทีเรียโอซินแต่ละชนิดจะมีจำนวนและชนิดของกรดอะมิโนภายในโมเลกุลที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังถูกทำลายได้ด้วยเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน (proteolytic enzyme) ซึ่งจากการศึกษาพบว่าแบคทีเรียโอซินนอกจากถูกสร้างโดยแบคทีเรียกรดแล็กติกแล้วยังถูกสร้างขึ้นโดยแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ อีก ได้แก่ *Acetobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Clostridium*, *Erwinia*, *Haemophilus*, *Haloferax*, *Listeria*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Propionibacterium*, *Shigella*, *Staphylococcus* และ *Yersinia* (Montville and Kaiser, 1993)

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียโอซินและสารปฏิชีวนะ

คุณลักษณะและคุณสมบัติ	แบคทีเรียโอซิน	สารปฏิชีวนะ
การนำไปใช้งาน	ทางอาหาร	ทางการแพทย์
กระบวนการสังเคราะห์	ผลิตจากไรโบโซม	ผลิตผ่านกระบวนการที่เป็น secondary metabolism
ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียเป้าหมายที่มีความหลากหลาย	น้อย	มาก
การสร้างระบบภูมิคุ้มกันตนเองของเซลล์ผู้ผลิต	มี	ไม่มี
กลไกในการต่อต้านของเซลล์เป้าหมาย	โดยปรับสภาพองค์ประกอบเยื่อหุ้มเซลล์	โดยการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม
ลักษณะของปฏิกิริยาบนเซลล์เป้าหมาย	ทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์	ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์หรือโครงสร้างภายในเซลล์
ความเป็นพิษหรือผลข้างเคียง	ยังไม่มีรายงาน	มี

ที่มา: Cleveland *et al.* (2001)

3.1 คุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของแบคทีเรียโอซิน (Hamon, 1988)

3.1.1 ความมีประจุ เป็นสมบัติที่มีความสำคัญมากเพราะแบคทีเรียโอซินที่ดีควรมีส่วนที่ละลายน้ำได้ ซึ่งมีความจำเป็นอย่างมากในการออกฤทธิ์ของแบคทีเรียโอซิน เพราะส่วนที่เป็นน้ำมักจะเป็นส่วนที่มีจุลินทรีย์อาศัยอยู่ อย่างไรก็ตามด้านที่ละลายน้ำได้น้อย (hydrophobic) ก็มีความจำเป็นเช่นกันเพราะจะเป็นส่วนที่เข้าทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ ดังนั้นแบคทีเรียโอซินที่มีคุณสมบัติเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (emulsifier) จึงสามารถออกฤทธิ์ได้ดี

3.1.2 จุดเดือด จะมีอิทธิพลต่อการออกฤทธิ์และความเสถียรของแบคทีเรียโอซิน เนื่องจากในกระบวนการผลิตอาหารถ้าจำเป็นต้องใช้ความร้อน ก็อาจทำให้แบคทีเรียโอซินสูญเสียฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และทำให้เกิดกลิ่นรสที่ไม่ดีกับอาหารอีกด้วย

3.1.3 การแตกตัวเป็นไอออน จะขึ้นอยู่กับระดับความเป็นกรดของอาหารชนิดนั้น ๆ โดยปกติค่าความเป็นกรดที่ทำให้แบคทีเรียโอซินมีประจุจะส่งผลให้แบคทีเรียโอซินออกฤทธิ์ได้น้อยลง แต่ถ้าแบคทีเรียโอซินไม่มีประจุเลยก็ไม่สามารถผ่านผนังเซลล์เข้าไปทำปฏิกิริยากับเยื่อหุ้มเซลล์และทำลายจุลินทรีย์หรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้เช่นกัน

3.1.4 ปฏิกิริยาทางเคมีของแบคทีเรียโอซินกับสารประกอบอื่น ๆ ในอาหาร แบคทีเรียโอซินสามารถทำปฏิกิริยากับส่วนประกอบของอาหาร เช่น ไขมัน โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และสารปรุงแต่งอาหารอื่น ๆ ซึ่งอาจมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ของแบคทีเรียโอซินลดลงและอาจเกิดกลิ่นรสที่ไม่ต้องการได้

3.2 การจัดแบ่งประเภทของแบคทีเรียโอซิน

Klaenhammer (1993) ได้แบ่งประเภทของแบคทีเรียโอซินโดยพิจารณาจากโครงสร้างพื้นฐานของโมเลกุล มวลโมเลกุล รวมถึงคุณสมบัติด้านอื่น ๆ เช่น คุณสมบัติในการทนต่อความร้อน ทำให้สามารถจัดแบ่งแบคทีเรียโอซินออกได้เป็น 4 กลุ่ม คือ

3.2.1 กลุ่มแลนทิไบโอติก (lantibiotic) เป็นแบคทีเรียโอสินกลุ่มที่ลักษณะเป็นสายเพปไทด์ขนาดเล็ก ประกอบด้วยจำนวนกรดอะมิโนระหว่าง 19–38 โมเลกุล โดยทั่วไปมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 5,000 ดาลตัน มีชนิดของกรดอะมิโนที่แตกต่างจากกรดอะมิโนทั่วไป เช่น dehydrobutyrine, dehydroalanine มีวงแหวนที่เกิดจากพันธะระหว่างโมเลกุลของสารประกอบซัลเฟอร์ภายในโมเลกุลที่เรียกว่า lanthionine และ β -methyl lanthionine เป็นแบคทีเรียโอสินที่มีคุณสมบัติในการทนต่อความร้อน ซึ่งแบคทีเรียโอสินกลุ่มนี้แบ่งได้ออกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มย่อย A เพปไทด์มีประจุบวกและมีคุณสมบัติชอบน้ำ (hydrophilic) มีโครงสร้างเกลียว ขี้ดออกได้ เช่น nisin และกลุ่มย่อย B มีโครงสร้างเป็นก้อนกลม ไม่มีประจุทางไฟฟ้า เช่น mersacidin (Cleveland *et al.*, 2001)

3.2.2 กลุ่ม non lantibiotic ที่มีขนาดเล็กและทนความร้อน เป็นแบคทีเรียโอสินกลุ่มที่มีขนาดของโมเลกุลเล็กกว่า 15,000 ดาลตัน และทนความร้อนได้ดีตั้งแต่ 100–121 องศาเซลเซียส สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มย่อย ได้แก่

ก) กลุ่มแบคทีเรียโอสินที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Listeria* sp. ได้ดี ถูกสร้างขึ้นในลักษณะที่เป็นสายเพปไทด์ตั้งต้น (precursor peptide) ที่ยังไม่สามารถทำลายเซลล์เป้าหมายได้ แต่จะถูกดัดแปลงโดยการตัดสายเพปไทด์ในตำแหน่งที่มีกรดอะมิโนไกลซีน 2 โมเลกุลติดกัน ได้เป็นสายเพปไทด์ที่สมบูรณ์และมีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์เป้าหมาย เช่น pediocin PA-1, sakacin A, leucocin A

ข) กลุ่มแบคทีเรียโอสินที่ประกอบด้วยสายเพปไทด์ 2 สายที่แตกต่างกัน (two-peptide bacteriocin) และในการทำลายเซลล์เป้าหมายอย่างมีประสิทธิภาพสูงสุดต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของสายเพปไทด์ดังกล่าว เช่น lactococcins G และ F, lactacin F, plantaricin EF และ JK

3.2.3 กลุ่ม non lantibiotic ที่มีขนาดใหญ่และไม่ทนความร้อน มีขนาดของโมเลกุลใหญ่กว่า 15,000 ดาลตัน และไม่ทนความร้อน เช่น helveticins J และ V-1829, acidophilucin A, lactacins A และ B

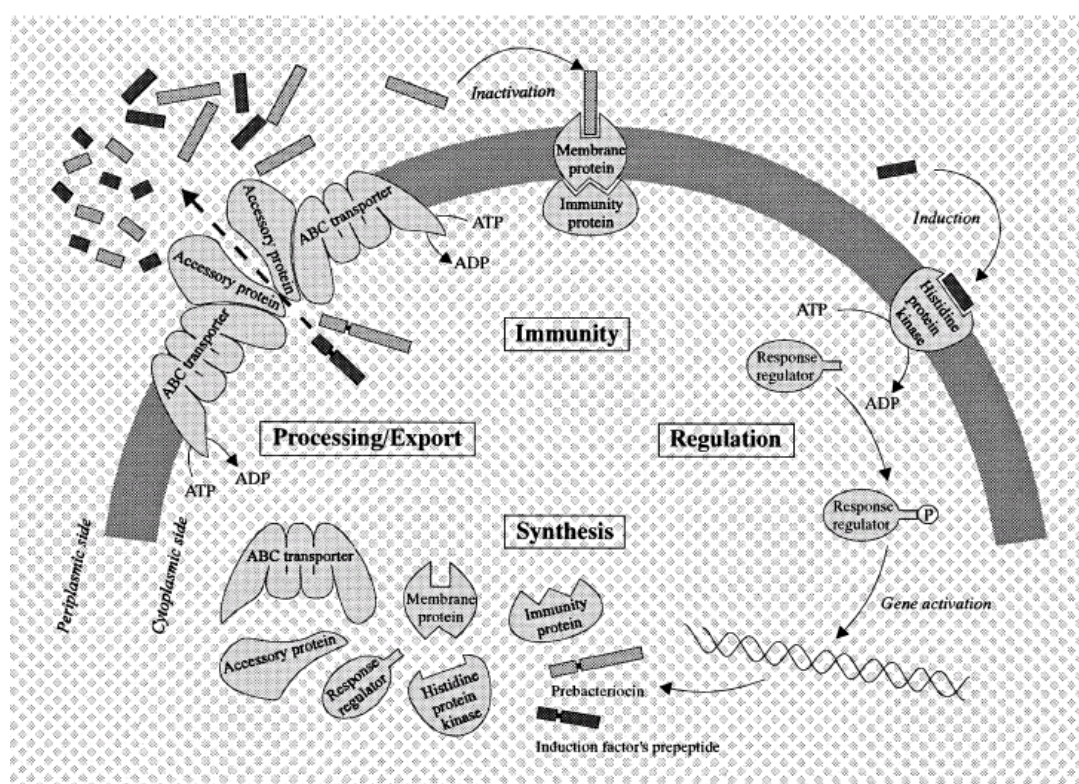
3.2.4 กลุ่มที่รวมตัวเป็นสารประกอบเชิงซ้อนขนาดใหญ่กับสารอื่น ๆ เช่น ไขมัน หรือคาร์โบไฮเดรต เช่น lactocin 27

3.3 กระบวนการสร้างแบคทีริโอซินภายในเซลล์ของแบคทีเรีย

แบคทีริโอซินซึ่งมีคุณสมบัติเป็นโปรตีน จะถูกสร้างจากไรโบโซม โดยผ่านกระบวนการถอดรหัส (transcription) และการแปลรหัส (translation) เหมือนกระบวนการสร้างโปรตีนทั่วไป โดยยีนที่ควบคุมการสร้างแบคทีริโอซินอาจอยู่บนโครโมโซม เช่น nisin, lactocin 27, lactocin B, lactacin F, helveticin J เป็นต้น หรืออาจอยู่บนพลาสมิด เช่น diplococcin, lacticin 481, lactococcin, pediocin เป็นต้น แต่มีแบคทีริโอซินบางชนิด เช่น carnobacteriocin B1 ซึ่งมียีนที่ควบคุมการสร้างแบคทีริโอซินอยู่ทั้งบนโครโมโซมและพลาสมิด (De Vuyst and Vandamme, 1994) ยีนที่ควบคุมการสร้างแบคทีริโอซินส่วนใหญ่จะเป็นโอเปรอน (operon) โดยจะสร้างเป็น precursor protein หรือ pre-peptide หรือ pre-bacteriocin ก่อน จากนั้นจะผ่านกระบวนการ post-translation จนได้ mature bacteriocin แล้วขนส่งไปยังชั้น periplasmic membrane ของเซลล์แบคทีเรียและในที่สุดจะถูกขนส่งออกนอกเซลล์ นอกจากนี้ยังมียีนที่ควบคุมการสร้าง immunity protein (มีกรดอะมิโน 18–114 โมเลกุล) ซึ่งจะช่วยป้องกันแบคทีริโอซินเข้าทำลายเซลล์ของแบคทีเรียเจ้าบ้านที่ผลิตแบคทีริโอซิน (De Vuyst and Vandamme, 1994; Ennahar *et al.*, 2000)

การสร้างแบคทีริโอซินจะมีการชักนำให้เกิดกระบวนการ transcription ของยีนเป้าหมายที่ควบคุมการสร้างแบคทีริโอซิน เช่น แบคทีริโอซินในกลุ่ม non-lantibiotic ซึ่งมีขนาดโมเลกุลเล็กและทนต่อความร้อน เช่น leucocin A, mundticin, enterocin A และ P, pediocin PA-1 จะมีโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการชักนำให้เกิดกระบวนการ transcription ของยีนที่ควบคุมการสร้างแบคทีริโอซิน 3 ชนิด ได้แก่ induction factor (IF), histidine protein kinase (HPK) และ response regulator (RR) (Ennahar *et al.*, 2000) โดย Nilsen *et al.* (1998) รายงานว่าการสร้างแบคทีริโอซินของแบคทีเรียกรดแล็กติกมาจากการกระตุ้นโดยปัจจัยต่าง ๆ เช่น องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ค่าความเป็นกรดค่าของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิที่ใช้บ่มเชื้อ เป็นต้น ซึ่งจะไปมีผลต่อการชักนำการจับตัวกันระหว่าง IF กับ HPK หรือทำให้เกิดการสมดุลของปฏิกิริยา phosphorylation ทำให้กระตุ้นปฏิกิริยาของ RR ให้เกิดกระบวนการ transcription ของยีนที่ควบคุมการสร้างแบคทีริโอซิน (ภาพที่ 1) โดยแบคทีริโอซิน (pre-peptide หรือ pre-bacteriocin) จะเข้าสู่กระบวนการ post-translation เช่น การเปลี่ยน serine และ threonine ไปเป็น dehydroalanine และ

dehydrobutyrine ตามลำดับ หรือการเพิ่ม cysteine thiol group เป็นต้น จนกระทั่งได้ mature bacteriocin จากนั้นแบคทีเรียโอซินจะถูกขนส่งไปยังชั้น periplasmic membrane โดยการขนส่งแบคทีเรียโอซินจะใช้ระบบ ABC transport system (ภาพที่ 1) แบคทีเรียโอซินจะสะสมอยู่ในบริเวณดังกล่าวไปจนถึงบริเวณพื้นผิวหน้าของเซลล์แบคทีเรีย ที่บริเวณพื้นผิวหน้าของแบคทีเรียแบคทีเรียโอซินจะจับกับโพลีแซคคาไรด์ หรือ O-antigen สุดท้ายสารเชิงซ้อนนี้จะทำให้เกิด crude bacteriocin และขับสู่ภายนอกเซลล์ (Ennahar *et al.*, 2000)



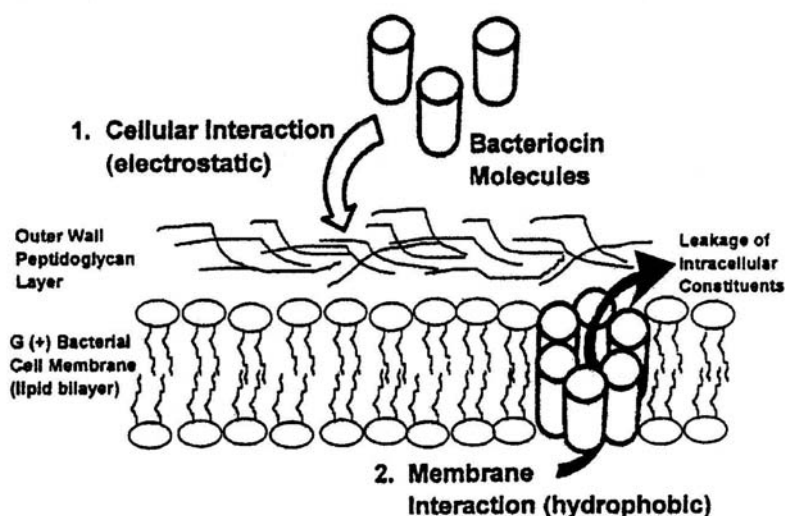
ภาพที่ 1 กระบวนการสร้างแบคทีเรียโอซิน กลุ่ม non-lantibiotic
ที่มา: Ennahar *et al.* (2000)

3.4 กลไกการออกฤทธิ์ของแบคทีเรียโอซิน

การทำลายเซลล์เป้าหมายของแบคทีเรียโอซินเกิดจากการที่แบคทีเรียโอซินแต่ละโมเลกุลมารวมกันทำให้เกิดเป็นรูหรือช่องว่างบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์เป้าหมาย โดยจะมีลักษณะคล้ายซี่ไม้ที่มาประกอบกันเป็นผนังด้านข้างของถังไม้ (barrel-stave) รูดังกล่าวจะทำให้เกิดการเสียสมดุลของไอออน กรดอะมิโนและสารประกอบอินทรีย์ในกลุ่มฟอสเฟตซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญในการสร้างพลังงานของเซลล์ ซึ่งขั้นตอนและกลไกในการทำลายเซลล์เป้าหมายจะแตกต่างกันไปตามชนิดของแบคทีเรียโอซิน โดยแบคทีเรียโอซินในกลุ่ม lantibiotic ที่สร้างจาก *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* พบว่าเป็นสายเปปไทด์ที่มีประจุสุทธิเป็นบวกจะเข้าจับกับเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมายทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกรบกวน ส่งผลให้เกิดการรั่วขององค์ประกอบภายในเซลล์ออกสู่ภายนอก เช่น กรดอะมิโน สารให้พลังงาน และไอออนของสารที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเซลล์

ในกรณีที่เปปไทด์ของแบคทีเรียพบว่าเยื่อหุ้มเซลล์จะถูกทำลายอย่างรวดเร็ว ในระหว่างที่เปปไทด์เกิดการงอกออกมาและพบว่าในชั้นที่ความเข้มข้นสูง ๆ สามารถยับยั้งการสร้าง peptidoglycan ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญในผนังเซลล์ของ *Bacillus stearothermophilus* และ *E. coli* ได้

ส่วนในแบคทีเรียโอซินที่มีขนาดเล็กและทนความร้อน เช่น pediocin PA-1, sakacin A พบว่าในขั้นตอนแรกปลายด้าน N-terminal ของโมเลกุลแบคทีเรียโอซินซึ่งมีประจุบวกจะเข้าจับส่วนหัวของฟอสโฟลิปิดที่เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมายซึ่งมีประจุลบโดยแรงทางไฟฟ้าสถิตย์ (electrostatic binding) หลังจากนั้นปลายด้าน C-terminal ในโมเลกุลแบคทีเรียโอซินที่มีคุณสมบัติเป็น hydrophobic จะทำปฏิกิริยากับหมู่อะซิลของไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดเป็นรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ส่งผลให้เกิดการสูญเสียสมดุลของไอออนและสารประกอบฟอสเฟตภายในเซลล์ (Ennahar *et al.* , 2000) ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 แบบจำลองการทำให้เกิดรูในชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์เป้าหมายโดยแบคทีริโอซิน
ที่มา: Muriana (1996)

การยับยั้งการเจริญของเซลล์เป้าหมายโดยแบคทีริโอซินนอกจากจะมีผลในการยับยั้งเซลล์เป้าหมายแบบฆ่าทำลาย (bactericidal) แล้วยังอาจมีผลทำให้เกิดการหยุดการเจริญของเซลล์ (bacteriostatic) ได้ด้วย ดังเช่นที่พบใน leuconocin S โดยแบคทีริโอซินจะมีผลต่อเซลล์ในลักษณะใดนั้นมักขึ้นอยู่กับความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของแบคทีริโอซิน สภาพแวดล้อม รวมถึงชนิดและปริมาณของเซลล์เป้าหมาย (พงษ์เทพ, 2546ก)

3.5 ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของแบคทีริโอซิน

การศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของแบคทีริโอซิน ส่วนใหญ่ ทำการศึกษากันมากในไนซิน ซึ่งเป็นแบคทีริโอซินทางการค้าที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหาร ซึ่ง Daeschel (1993) ได้สรุปปัจจัยดังกล่าวไว้ดังนี้

3.5.1 ชนิดของแบคทีเรียเป้าหมาย โดยแบคทีริโอซินแต่ละชนิดจะสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่แตกต่างกันไป เช่น ไนซินสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้หลายชนิด enterocin 1146 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Lactobacillus sake* และ *Listeria* sp. ส่วน piscicocin V1 และ divercin V41 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Listeria innocua*, *L. monocytogenes* และ *Clostridium tyrobutyricum* ได้

3.5.2 สภาวะที่ก่อให้เกิดการเสียสภาพทางชีวภาพของแบคทีเรียโอซินนั้นจะเหมือนกับโปรตีนทั่วไป ได้แก่ อุณหภูมิ เอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน การเกิดปฏิกิริยาการเติมออกซิเจน โลหะหนัก การกวนที่รุนแรงและมากเกินไป การฉีดขาดของโมเลกุลแบคทีเรียโอซิน เนื่องจากการแช่แข็งและการละลาย เช่น ไนซินถูกทำลายด้วยเอนไซม์ α -chymotrypsin และ nisinase สำหรับ lactocin 27 ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ trypsin และ pronase ส่วน lactacin B ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ proteinase K เป็นต้น (De Vuyst and Vandamme, 1994)

3.5.3 การรวมตัวกันของแบคทีเรียโอซินกับองค์ประกอบของอาหารหรือส่วนประกอบอื่น ๆ ของอาหารที่เติมลงไป โดยพบว่าเกลือ ไนไตรต์ กรดอินทรีย์ สารจับโลหะ และสารอิมัลซิไฟเออร์ มีส่วนช่วยให้ไนซินสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเป้าหมายได้ดีขึ้น ส่วนไขมัน ฟอสโฟลิปิด โปรตีน และสารในกลุ่มฟีนอลจะมีผลในการลดกิจกรรมของไนซิน

3.5.4 ค่าความเป็นกรดต่างของสารละลายหรือตัวกลางซึ่งจะมีผลต่อความสามารถในการละลายและกิจกรรมของแบคทีเรียโอซิน เช่น ไนซินสามารถละลายและคงตัวได้ดีในสภาพที่เป็นกรด โดยที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 2.5 และ 5 ไนซินจะสามารถละลายได้ 12 และ 4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ไม่สามารถละลายได้ในสภาพที่เป็นกลางหรือด่าง นอกจากนี้ในสภาพที่เป็นกรด ไนซินยังสามารถทนต่อความร้อนได้ดี โดยที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 2.5 ไนซินสามารถทนต่อการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส โดยไม่สูญเสียกิจกรรมและที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส จะมีการสูญเสียกิจกรรมเพียงเล็กน้อย ส่วน lactacin 481 มีกิจกรรมและคงตัวได้ดีที่ค่าความเป็นกรดต่าง 4.5 หรือ 7 แต่ไม่คงตัวที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 2 นอกจากนี้ diplococcin จะมีการสูญเสียกิจกรรมและคงตัวได้ดีที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5 โดยสามารถทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ได้นานถึง 1 ชั่วโมง

3.6 ประโยชน์ของแบคทีเรียโอซินและแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สร้างแบคทีเรียโอซิน

3.6.1 สารกันเสีย ไนซินเป็นแบคทีเรียโอซินที่ผลิตขายเป็นการค้าและมีการใช้เป็นสารกันเสียอย่างแพร่หลาย ส่วนใหญ่แบคทีเรียโอซินจะได้มาจากแบคทีเรียกรดแล็กติกซึ่งแยกจากอาหารหมักแล้วผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ โดยพบว่าแบคทีเรียโอซินสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคร้ายได้และมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค โดยเฉพาะไนซินได้มีการผลิตขายภายใต้ชื่อทางการค้าว่า Nisaplin เป็นแบคทีเรียโอซินเพียงชนิดเดียวในปัจจุบันที่ได้รับการยอมรับ

ในด้านความปลอดภัยจากองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (Food and Drug Administration หรือ FDA) และองค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ (Food and Agriculture Organization หรือ FAO) (พงษ์เทพ, 2546ก)

3.6.2 ผลิตภัณฑ์ดูแลสุขภาพ แบคทีเรียโอซิน เช่น ไนซิน สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้หลากหลายชนิด จึงนำไปใช้เป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์รักษาสุขภาพในช่องปาก เช่น ยาสีฟัน หรือ น้ำยาบ้วนปากเพื่อป้องกันโรคที่เกิดในช่องปาก สนับสนุนผลิตภัณฑ์บำรุงผิวและผลิตภัณฑ์ป้องกันผิว (De Vuyst and Vandamme, 1994)

3.6.3 กล้าเชื้อ (starter culture) แบคทีเรียกรดแล็กติกส่วนใหญ่มีบทบาทสำคัญในการผลิตอาหารหมักจากเนื้อและผัก ดังนั้นแบคทีเรียโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแล็กติกที่นำมาใช้เป็นกล้าเชื้อในกระบวนการผลิตจะช่วยเพิ่มความปลอดภัยสำหรับผลิตภัณฑ์เหล่านี้ได้เนื่องจากสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกที่ก่อให้เกิดโรคได้ เช่น *L. monocytogenes*, *S. aureus* และ *C. botulinum* (O' Sullivan et al., 2002)

3.6.4 โพรไบโอติก (probiotic) จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกส่วนใหญ่จะอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียกรดแล็กติก เนื่องจากแบคทีเรียเหล่านี้ทนกรดและเกลือน้ำดีทำให้สามารถอยู่รอดในระบบทางเดินอาหารของสิ่งมีชีวิตได้ รวมทั้งสามารถสร้างกรด เปอร้ออกไซด์และแบคทีเรียโอซินที่ต่อต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคได้ จึงมีการนำแบคทีเรียกรดแล็กติกที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกไปใช้ผสมอาหารสำหรับมนุษย์และนำไปใช้ประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงสัตว์ (Ringo and Gatesoupe, 1998)

4. การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถสร้างแบคทีเรียโอซิน

Hoover and Harlander (1993) ได้สรุปเทคนิคที่ใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถสร้างแบคทีเรียโอซินออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

4.1 การคัดเลือกด้วยอาหารแข็งหรือกึ่งแข็ง โดยวิธีการนี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 แบบ คือ

4.1.1 วิธีคู่เชื้อเจริญไม่พร้อมกัน (deferred method) วิธีการนี้เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการตรวจหาการสร้างแบคทีเรียของแบคทีเรียกรดแล็กติกในเบื้องต้น โดยการเลี้ยงแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถสร้างแบคทีเรียโชนบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งภายใต้สภาวะที่เหมาะสมแล้วเททับด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแบบกึ่งแข็งกึ่งเหลว (soft agar) ที่มีแบคทีเรียทดสอบผสมอยู่ ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อแบบกึ่งแข็งกึ่งเหลวจะช่วยลดการแพร่กระจายของโคโลนีแบคทีเรียกรดแล็กติกได้ดีกว่าการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง หรืออาจทำการฆ่าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกที่เจริญอยู่ด้วยสารเคมี เช่น คลอโรฟอร์มหรือความร้อนเพื่อป้องกันการแพร่กระจายดังกล่าว แต่ในบางครั้งพบว่าการใช้สารเคมีและความร้อนในการทำลายแบคทีเรียที่สร้างแบคทีเรียโชนอาจทำให้แบคทีเรียโชนเกิดการเสียสภาพได้ นอกจากนี้อาจเลือกใช้วิธีการทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อด้านที่มีแบคทีเรียกรดแล็กติกเจริญอยู่ คว่ำลงบนผาผ้าบนของจานเพาะเชื้อด้วยวิธีการที่ปลอดเชื้อ แล้วเททับด้านบน (บริเวณก้นจานเพาะเชื้อเดิม) ด้วยแบคทีเรียทดสอบ ซึ่งวิธีการแบบนี้โคโลนีของแบคทีเรียทดสอบและแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สร้างแบคทีเรียโชนจะไม่สัมผัสกันโดยตรง เนื่องจากมีชั้นของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งกึ่งอยู่เพื่อลดการยับยั้งที่เกิดจากอิทธิพลของกรดอินทรีย์ ส่วนการอ่านผลสังเกตจากบริเวณใสที่เกิดขึ้นจากการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบเหมือนวิธีการตรวจสอบทั่วไป

4.1.2 วิธีคู่เชื้อเจริญพร้อมกัน (simultaneous method หรือ direct assay) ซึ่งเป็นวิธีการที่ทำได้ง่ายและใช้เวลาน้อยกว่าวิธี deferred method วิธีการนี้สามารถทำได้ด้วยเทคนิคที่เรียกว่า spot on lawn โดยการเกลี่ยแบคทีเรียทดสอบบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง แล้วนำแบคทีเรียกรดแล็กติกที่ต้องการทดสอบการสร้างแบคทีเรียโชนมาปลูกเชื้อโดยจุดลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เกลี่ยแบคทีเรียทดสอบดังกล่าว วิธีการนี้จะใช้ได้ผลดีกับแบคทีเรียที่สร้างแบคทีเรียโชนได้อย่างรวดเร็วในระยะต้นของการเจริญหรือก่อนที่จะยับยั้งการแพร่กระจายของแบคทีเรียโชน เช่น แบคทีเรียโอฟาจ จะทำงาน ในขณะที่วิธีการแบบ deferred method จะใช้ได้ผลดีกับแบคทีเรียที่สร้างแบคทีเรียโชนในระยะหลัง ๆ ของการเจริญ ในกรณีที่แบคทีเรียที่ต้องการตรวจสอบการสร้างแบคทีเรียโชนเป็นกลุ่มที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญหรือต้องการเพียงเล็กน้อย อาจใช้วิธีการ stab เชื้อดังกล่าวลงในแบคทีเรียทดสอบที่เตรียมอยู่ในจานเพาะเชื้อด้วยวิธี pour plate หรือ surface-streaked agar

แต่วิธีการทดสอบโดยการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งและอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวนี้พบว่า นอกจากแบคทีเรียโอซินแล้วแบคทีเรียกรดแล็กติกยังสามารถผลิตสารชนิดอื่น ๆ ออกมายับยั้ง การเจริญของแบคทีเรียทดสอบด้วยเช่น กรดแล็กติก ซึ่งจะทำให้ผลการทดสอบเกิดความผิดพลาด ได้

4.2 การคัดเลือกด้วยอาหารเหลว

วิธีนี้ไม่เป็นที่นิยมใช้ในการตรวจหาแบคทีเรียที่สามารถสร้างแบคทีเรียโอซินใน ขั้นต้น เนื่องจากวิธีการเพาะเชื้อบนอาหารแข็งจะทำให้สะดวกและรวดเร็วกว่า แต่วิธีนี้มักใช้ในการ ตรวจวัดกิจกรรม (activity) ของแบคทีเรียโอซินเนื่องจากสามารถกำจัดปัจจัยอื่น ๆ ที่สามารถยับยั้ง การเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้ โดยเริ่มจากขั้นตอนการแยกเซลล์แบคทีเรียที่สามารถสร้าง แบคทีเรียโอซินออกมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวด้วยวิธีการกรองหรือเหวี่ยงแยก นำของเหลวที่ได้ ไปแยกเอากรดหรือสารในกลุ่ม dialyable compound ออกด้วยวิธีการ dialysis หรือการปรับค่าความเป็น กรดด่างให้เป็นกลางเพื่อลดผลของกรด การเติมเอนไซม์คาตาเลสเพื่อลดผลจาก ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ รวมทั้งกำจัดสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ที่มีผลยับยั้งการเจริญของ แบคทีเรียทดสอบ นำของเหลวที่ได้ไปทดสอบผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบโดยการ เติมนลงในหลุมที่เจาะไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีแบคทีเรียทดสอบผสมอยู่ (agar well diffusion) แล้วตรวจผลโดยดูจากบริเวณใสที่เกิดขึ้น หรืออาจใช้วิธีการเติมนลงในสารแขวนลอยของ แบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ แล้วตรวจผลโดยการวัดค่าความขุ่นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ หรือวิธีการนับจำนวนแบคทีเรียทดสอบที่เหลืออยู่ด้วยวิธีการเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งวิธีการ นี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการทำงานของแบคทีเรียโอซินที่ ต้องการศึกษได้อีกด้วย โดยสิ่งที่ต้องคำนึงถึงในการนำเทคนิคแบบนี้มาใช้คือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ นำมาใช้ในการเพาะเชื้อต้องมีความเหมาะสมกับการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ และใน สารแขวนลอยผสมที่ทำทดสอบจะต้องมีอาหารเพียงพอต่อการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ

5. แบคทีเรียกรดแล็กติกในระบบทางเดินอาหารของปลา

ปลาเป็นสัตว์เลือดเย็นที่อาศัยอยู่ในน้ำ ซึ่งปลาสวยงามจัดเป็นทรัพยากรประมงที่นิยมเลี้ยง เพื่อการนันทนาการและการค้า โดยชนิดและจำนวนของแบคทีเรียที่อยู่ในระบบทางเดินอาหารจะมี ผลต่อสุขภาพของปลา (กีรี, 2545) เนื่องจากจะช่วยการดูดซับสารอาหาร การปรับสมดุลของ

จุลินทรีย์ (microbial balance) และแบคทีเรียบางชนิดจะยึดเกาะที่เซลล์เยื่อในระบบทางเดินอาหาร (mucosal barrier fortification) ซึ่งเป็นกลไกในการขัดขวางการเกาะยึดของแบคทีเรียก่อโรค เช่น *E. coli* และ *Salmonella* sp. (Hagi *et al.*, 2004) โดยมีรายงานว่าพบกลุ่มแบคทีเรียกรดแล็กติกเป็น จุลินทรีย์ประจำถิ่น (microflora) ในลำไส้ของปลาที่มีสุขภาพแข็งแรง (Ringo and Gatesoupe, 1998)

5.1 แบคทีเรียกรดแล็กติกที่พบในระยะการเจริญต่าง ๆ ของปลา

5.1.1 ระยะวัยอ่อน (larval stages) ในระยะดังกล่าวนี้ระบบย่อยอาหารของสัตว์น้ำยังพัฒนาไม่สมบูรณ์และชนิดของจุลินทรีย์ประจำถิ่นขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมที่สัตว์น้ำระยะตัวอ่อนอาศัยอยู่ ดังนั้นในระยะนี้ควรมีการจัดการคุณภาพของน้ำในการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนสัตว์น้ำให้ดี นอกจากนี้ในระยะวัยอ่อนของสัตว์น้ำเหมาะแก่การให้โปรไบโอติกซึ่งจะทำให้ตัวอ่อนของสัตว์น้ำแข็งแรงขึ้น ส่วนแบคทีเรียกรดแล็กติกจะพบน้อยมากในระยะวัยอ่อนของสัตว์น้ำ (Ringo and Gatesoupe, 1998) โดย Strom and Ringo (1993) รายงานว่าพบ *Lb. plantarum* ในตัวอย่างตัวอ่อนของปลา cod และในน้ำที่ใช้เลี้ยงตัวอ่อนของปลา cod

5.1.2 ระยะวัยรุ่น (juveniles and ongrowing fish) เป็นระยะที่อวัยวะของปลามีการแบ่งแยกออกจากกันอย่างชัดเจน ระบบทางเดินอาหารจะประกอบด้วย หลอดอาหาร กระเพาะอาหาร ลำไส้ ลำไส้ใหญ่และลำไส้เล็ก โดย Ringo (1993) ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ จากเฉพาะส่วนกระเพาะอาหารของปลา Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) มีค่าความเป็นกรดต่างระหว่าง 3.5-4.5 พบว่ามีจำนวนแบคทีเรียกรดแล็กติกอยู่เพียงประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากแบคทีเรียกรดแล็กติกที่อยู่ในระบบย่อยอาหารนี้ถูกทำลายด้วยกรดในกระเพาะอาหาร

Ringo and Gastesoupe (1998) ได้รวบรวมผลการศึกษาดังชนิดของแบคทีเรียกรดแล็กติกในบริเวณอวัยวะส่วนต่าง ๆ ของปลาแต่ละชนิด ซึ่งพบว่าในบริเวณระบบทางเดินอาหารของปลามักจะพบแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Streptococcus* และ *Leuconostoc* อาศัยอยู่ (ดังแสดงในตารางที่ 2) นอกจากนี้ยังพบว่าในกลุ่มแบคทีเรียกรดแล็กติกเหล่านี้มีหลายชนิดที่ทำให้เกิดโรคในสัตว์น้ำ ได้แก่ *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Vagococcus* และ *Carnobacterium* โดยแบคทีเรียเหล่านี้จะทำให้เกิดโรคที่อวัยวะภายในของสัตว์น้ำ เช่น ไต ตับ ม้าม ซึ่งแบคทีเรียกรดแล็กติกแต่ละสกุลจะทำให้เกิดโรคในสัตว์น้ำแต่ละชนิดที่ต่างกันออกไป

Gonzalez *et al.* (2000) ทำการคัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกจากปลาน้ำจืด brown trout ซึ่งจับจากธรรมชาติ ได้จำนวน 249 ไอโซเลต โดยเป็นแบคทีเรียรูปร่างท่อนจำนวน 237 ไอโซเลต และรูปร่างกลมจำนวน 12 ไอโซเลต ในจำนวนนี้ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ (226 ไอโซเลต) อยู่ในสกุล *Carnobacterium* ส่วนอีก 22 ไอโซเลตอยู่ในสกุล *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* และ *Vagococcus* และมี 1 ไอโซเลตที่ไม่สามารถจัดจำแนกในระดับสกุลได้

Heo and Yang (2002) ทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกจาก กลุ่มแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดแยกมาจากลำไส้ปลา ปลาหมักและกิมจิ (kimchi) ซึ่งจากจำนวนของ แบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดแยกได้ 20 ไอโซเลต พบว่า *Lactobacillus sakei* BK19 มีความสามารถ ทนกรดได้ดีและสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อโรคในปลา ได้แก่ *Vibrio alginolyticus*, *V. salmonicida*, *V. parahaemolyticus*, *V. harvei*, *V. minicus* และ *V. vulnificus*

Hagi *et al.* (2004) ทำการจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกจากระบบทางเดิน อาหารของปลา 4 ชนิด คือ silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*), common carp (*Cyprinus carpio*), channel catfish (*Ictalurus punctatus*) และ deep-bodied crucian carp (*Carassius cuvieri*) ที่เพาะเลี้ยงในทะเลสาบ พบแบคทีเรียกรดแล็กติกที่มีอยู่ในปริมาณมาก 2 สายพันธุ์ คือ *Lactococcus lactis* และ *Lc. raffinolactis* รองลงมาคือ *Enterococcus seriolicida* และ *Lactobacillus curvatus*

ตารางที่ 2 ชนิดของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่พบในระบบทางเดินอาหารและมูลปลา

ชนิดของแบคทีเรียกรดแล็กติก	ชนิดของปลา
<i>Lactobacillus</i> sp.	Arctic charr, Atlantic salmon, Atlantic cod, Cyprinidae, Escocidae, Percidae, herring
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Arctic charr, Saithe
<i>Carnobacterium</i> sp.	Arctic charr , Atlantic salmon, Rainbow trout
<i>Carnobacterium divergens</i>	Arctic charr, Atlantic salmon, Atlantic cod, Saithe, Wolffish
<i>Carnobacterium piscicola</i>	Arctic charr, Atlantic salmon, Rainbow trout
<i>Streptococcus</i> sp.	Arctic charr, Salmonids, European eel, Carp, Goldfish, Yellowtail, Turbot
<i>Leuconostoc</i> sp.	Arctic charr
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Arctic charr

ที่มา: Ringo and Gatesoupe (1997)

6. การศึกษาแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ในสัตว์น้ำ

จินตลา (2544) ทำการคัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สร้างแบคทีเรียโอซินจากผลิตภัณฑ์ประมงที่ผ่านการแปรรูปด้วยกระบวนการหมัก โดยสามารถคัดแยก *E. faecalis* ที่สามารถสร้างแบคทีเรียโอซินได้ โดยแบคทีเรียโอซินดังกล่าวนี้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 3,800 ดาลตัน อีกทั้งมีคุณสมบัติทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซิน แต่เมื่อให้ความร้อน 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินจะสูญเสียไปทั้งหมด นอกจากนี้ยังพบว่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินจะลดลงประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อถูกทำลายด้วยเอนไซม์ทริปซินและเปปซิน รวมถึงแบคทีเรียโอซินดังกล่าวยังสามารถยับยั้งการเจริญของ *Listeria ivanovii* ในเนื้อปูแช่เย็นได้อีกด้วย

วลัยพร (2544) ทำการคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างลำไส้สัตว์น้ำจืด ลำไส้ไก่ มูลสุกร มูลวัว ผลิตภัณฑ์นม ผลิตภัณฑ์หมักคองจากเนื้อสัตว์และผักต่าง ๆ โดยนำเฉพาะไอโซเลตที่ติดสีแกรมบวกไปทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งก้ามกราม 2 ชนิด คือ *Aeromonas sorbria* และ *Vibrio alginolyticus* จากนั้นนำไปศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกโดยการทดสอบการย่อยเม็ดเลือดแดง การทนต่อเกลือ (0-10 เปอร์เซ็นต์) การทนต่อเกลือน้ำดี (1-7 เปอร์เซ็นต์) การเจริญในสภาวะความเป็นกรดต่างตั้งแต่ 2-10 รวมถึงการเจริญภายใต้สภาวะมีและไม่มีออกซิเจน ซึ่งพบว่ามีแบคทีเรียกรดแล็กติก 4 สายพันธุ์ คือ *Lb. plantarum*, *Lb. casei*, *E. faecium* และ *Lc. lactis* ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก เมื่อนำแบคทีเรียกรดแล็กติกทั้ง 4 สายพันธุ์ มาผสมกับอาหารกุ้งสำเร็จรูป พบว่าไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของกุ้งแต่มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของลูกกุ้งสูงกว่าการให้อาหารกุ้งสำเร็จรูปเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ยังพบว่า *Lc. lactis* ซึ่งในการทดลองนี้คัดแยกได้จากตัวอย่างปลานิล ทำให้อัตราการรอดชีวิตของลูกกุ้งดีที่สุด

Stoffels et al. (1992a) ทำการคัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถสร้างแบคทีเรียโอซินซึ่งเจริญได้ดีที่อุณหภูมิต่ำจากเนื้อปลาสดและสิ่งขับถ่ายของปลา พบว่าสามารถคัดแยก *Carnobacterium piscicola* ซึ่งสร้าง carnocin UI49 ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในสกุล *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* และ *Lactococcus* ได้ นอกจากนี้ carnocin UI49 ยังแสดงรูปแบบกิจกรรมในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบแบบฆ่าทำลายเซลล์ (bactericidal mode of action) ได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส

Ben Embarek *et al.* (1994) ทำการคัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกจากเนื้อปลาสดแช่แข็ง นำมาหมักและเก็บรักษาภายใต้สภาวะสุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 3 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 และ 8 สัปดาห์ พบว่าสามารถคัดแยก *E. faecium* ได้จำนวน 19 สายพันธุ์ โดยในจำนวนนี้ 14 สายพันธุ์ สามารถสร้างสารในกลุ่มโปรตีนซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* และแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคชนิดอื่น ๆ รวมทั้งแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเกิดการเสื่อมเสียได้ นอกจากนี้ยังพบอีกว่า *E. faecium* ที่คัดเลือกได้ไม่ทำให้เกิดกลิ่นที่ผิดปกติในผลิตภัณฑ์หมักที่ผลิตขึ้นในห้องปฏิบัติการ จึงสามารถนำแบคทีเรียดังกล่าวมาใช้ในการถนอมอาหารด้วยวิธีการทางชีวภาพได้

Pilet *et al.* (1995) ทำการคัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สร้างแบคทีเรียโอซินจากเนื้อปลาสด ปลารมควัน ปลาดอง และลำไส้ของปลา ซึ่งพบว่าสามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติตามที่ต้องการได้ 2 สายพันธุ์ คือ *Carnobacterium piscicola* และ *C. divergens* ซึ่งแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ มีคุณสมบัติที่ทนต่อความร้อน ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน มีอัตราการสร้างแบคทีเรียโอซินสูงสุดเมื่อเซลล์เจริญอยู่ในช่วงต้นของการเจริญในระยะ stationary phase เมื่อเจริญอยู่ในอาหาร MRS broth ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และยังพบว่ามีการสร้างแบคทีเรียโอซินสูงกว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นอกจากนี้แบคทีเรียโอซินดังกล่าวยังสามารถยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ได้อีกด้วย

Cai *et al.* (1998) สามารถคัดแยก *Weissella hellenica* DS-12 จากตัวอย่างลำไส้ของปลาลิ้นหมา (*Paralichthys olivaceus*) ซึ่งเพาะเลี้ยงในฟาร์มของประเทศเกาหลีใต้ และพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อโรคในปลาได้ รวมทั้งเจริญได้ภายใต้สภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ น้ำดี (bile) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับค่าความเป็นกรด่าง เท่ากับ 3 หลังจากการบ่มเชื้อไปแล้วเป็นเวลา 90 นาที ซึ่งจากคุณสมบัติดังกล่าวจึงมีแนวโน้มที่จะสามารถนำ *W. hellenica* DS-12 ไปใช้เป็นโปรไบโอติกในการเลี้ยงปลาลิ้นหมาได้

7. การใช้แบคทีเรียกรดแล็กติกเป็นโปรไบโอติก (probiotic) ในสัตว์น้ำ

โปรไบโอติก (probiotic) มาจากภาษากรีก แปลว่า “เพื่อชีวิต” และถูกนำมาใช้เป็นครั้งแรก ในรายงานวิจัยของ Lilly and Stillwell (1965) ที่ได้กล่าวถึงสารที่จุลินทรีย์ชนิดหนึ่งผลิตออกมา และช่วยกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่ง โดยเป็นการทำงานที่ตรงข้ามกับการทำงานของ สารปฏิชีวนะ ซึ่งจะทำลายจุลินทรีย์เกือบทุกชนิด นอกจากนี้ Parker (1974) ได้ให้คำจำกัดความไว้ ว่า โปรไบโอติก คือสิ่งมีชีวิตและสารเคมีที่มีผลต่อสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ ต่อมาได้มีคำจำกัด ความที่มีความเหมาะสมเสนอโดย Fuller (1989) ซึ่งได้ให้คำจำกัดความไว้ว่า โปรไบโอติก คือ อาหาร (เสริม) ซึ่งประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิตอยู่ และยังก่อให้เกิดประโยชน์ต่อร่างกายของ สิ่งมีชีวิตที่มันอาศัยอยู่ (host) โดยช่วยปรับระดับความสมดุลของจุลินทรีย์ภายในระบบ ทางเดินอาหารของสิ่งมีชีวิตนั้น

แบคทีเรียกรดแล็กติกเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในลำไส้ของสัตว์น้ำโดยเฉพาะปลา ซึ่งชนิด และปริมาณของแบคทีเรียดังกล่าวจะส่งผลโดยตรงต่อสุขภาพของสัตว์น้ำ จึงมีความพยายามเพิ่ม จำนวนของแบคทีเรียกรดแล็กติกภายในระบบทางเดินอาหารของสัตว์น้ำ (Ringo and Gatesoupe, 1998) ซึ่งอาจทำได้ 3 วิธี คือ (1) การเติมแบคทีเรียกรดแล็กติกลงไปในพื้นที่ใช้เลี้ยงปลา (2) นำ แบคทีเรียกรดแล็กติกผสมกับอาหารสัตว์น้ำ และ (3) การให้อาหารสัตว์น้ำซึ่งมีสารอาหารที่ช่วย ส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียกรดแล็กติกและเพิ่มประสิทธิภาพการยึดเกาะเยื่อเมือกของแบคทีเรีย กรดแล็กติก (Ringo *et al.*, 1998) นอกจากนี้ยังมีการคัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ใหม่ ๆ เพื่อนำไปใช้เป็นโปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเพื่อลดการใช้สารปฏิชีวนะซึ่งมีผลเสียด้าน การตกค้างของสารปฏิชีวนะในเนื้อสัตว์น้ำและสิ่งแวดล้อม (Gatesoupe, 1999a)

การประยุกต์ใช้โปรไบโอติกในสัตว์น้ำนั้นจะมีหลักการที่แตกต่างจากการใช้โปรไบโอติก ในสัตว์บกและมนุษย์ คือ การพัฒนาตัวอ่อนของมนุษย์และสัตว์บกจะอยู่ในรก (amnion) ในขณะที่ ตัวอ่อนของสัตว์น้ำจะพัฒนาตัวอ่อนอยู่ภายในสภาวะแวดล้อมภายนอก ซึ่งในระยะดังกล่าวนี้ ระบบย่อยอาหารและระบบภูมิคุ้มกันยังไม่สมบูรณ์ ดังนั้นการให้โปรไบโอติกในระยะดังกล่าวจึง เหมาะสมที่สุด (Gatesoupe, 1999a) ซึ่งชนิดของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่ใช้เป็นโปรไบโอติกใน สัตว์น้ำชนิดต่าง ๆ แสดงไว้ในตารางที่ 3 นอกจากนี้ Moriaty (Moriaty, 1998) ได้เพิ่มคำจำกัดความ ของโปรไบโอติกในสัตว์น้ำว่า “water additive” ซึ่งความหมายดังกล่าวจะรวมถึงการปรับปรุง คุณภาพน้ำที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงด้วย ในขณะที่ Gatesoupe (Gatesoupe, 1999b) รายงานว่า แบคทีเรีย

กลุ่ม nitrifying จะช่วยลดปริมาณแอมโมเนียและไนไตรท์ในน้ำ รวมถึงการเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของกุ้ง

ตารางที่ 3 แบคทีเรียกรดแล็กติกที่ใช้เป็นโปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

แบคทีเรียกรดแล็กติกที่ใช้เป็น โปรไบโอติก	สัตว์น้ำ	วิธีประยุกต์ใช้
<i>Streptococcus lactis</i> และ <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Turbot larvae (<i>Scophthalmus maximus</i>)	เพิ่มจำนวนในอาหารที่มีชีวิต
<i>Lactobacillus</i> sp. และ <i>Carnobacterium</i> sp.	Turbot larvae	เพิ่มจำนวนในโรติเฟอร์ (rotifers)
<i>Carnobacterium divergens</i>	Atlantic cod fry	ผสมในอาหารสัตว์
<i>Carnobacterium</i> sp.	Atlantic salmon	ผสมในอาหารสัตว์
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 53103	Rainbow trout	ผสมในอาหารสัตว์
<i>Carnobacterium</i> sp.	Rainbow trout	ผสมในอาหารสัตว์
<i>Enterococcus faecium</i> SF68	<i>Anguilla anguilla</i>	ผสมในอาหารสัตว์
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> JCM 1136	Rainbow trout	ผสมในอาหารสัตว์

ที่มา: Balcazar *et al.* (2006)

7.1 คุณสมบัติของจุลินทรีย์ที่จะใช้เป็นโปรไบโอติก โดยจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่จะใช้เป็นโปรไบโอติกควรมีคุณสมบัติที่สำคัญดังนี้ (Havenaar and Huijnt'Veld, 1992)

- 1) เป็นจุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดเลือกกว่าเป็นที่ยอมรับและมีความปลอดภัย (GRAS = Generally Recognized As Safe) โดยไม่ทำให้เกิดโรคและไม่เป็นพิษ
- 2) ต้องมีความทนทานต่อสภาวะความเป็นกรดของน้ำย่อยที่กระเพาะอาหารและทนน้ำดีที่ลำไส้เล็กภายในระบบทางเดินอาหารของเจ้าบ้านได้ โดยในระบบการย่อยอาหารของปลาประกอบด้วยอวัยวะหลัก 3 ส่วนคือ กระเพาะอาหาร (stomach) ลำไส้ (intestine) และไส้ติ่ง (pyloric caeca) ค่าความเป็นกรดต่างในกระเพาะอาหารของปลามีสภาวะเป็นกรด (ค่าความเป็นกรดต่างอยู่ในช่วง 2-4) ซึ่งเป็นสภาวะเหมาะแก่การทำงานของเอนไซม์เปปซิน (pepsin) สำหรับในส่วน of ลำไส้มีสภาวะเป็นกลางถึงด่าง (ค่าความเป็นกรดต่างอยู่ในช่วง 7-11) และพบเอนไซม์อยู่ในอวัยวะดังกล่าว เช่น เอนไซม์ทริปซิน (trypsin) ไคโมทริปซิน (chymotrypsin) อะไมเลส (amylase) เป็นต้น ชนิดของเอนไซม์ที่พบในระบบย่อยอาหารของปลาจะขึ้นอยู่กับพฤติกรรมการกินอาหารของปลา (ดังแสดงในตารางที่ 4) สำหรับไส้ติ่งของปลาจะทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์และช่วยดูดซึมสารอาหาร นอกจากนี้ยังมีน้ำดี (bile) ซึ่งผลิตจากตับ (liver) ถูกเก็บไว้ในถุงน้ำดี (gall bladder) ของระบบย่อยอาหาร โดยน้ำดีมีหน้าที่ส่งเสริมให้เอนไซม์ไลเปส (lipase) เข้าไปย่อยไขมันในบริเวณลำไส้ (Jobling, 1995)
- 3) ต้องเป็นเซลล์ที่มีชีวิตและมีจำนวนมากพอที่จะเดินทางไปจนถึงระบบทางเดินอาหารส่วนท้ายได้ รวมถึงสามารถมีชีวิตและกิจกรรมของเซลล์ในระบบทางเดินอาหารได้
- 4) สามารถแข่งขันกับจุลินทรีย์ก่อโรคในการยึดเกาะบริเวณเยื่อเมือกของระบบทางเดินอาหารได้
- 5) มีความสามารถในการผลิตสารต่าง ๆ ที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นที่บุกรุกหรือก่อให้เกิดโรค และสารที่สร้างขึ้นสามารถเพิ่มความต้านทานต่อภาวะการติดเชื้อภายในลำไส้ได้

ตารางที่ 4 สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารของปลา

แหล่งที่ผลิตเอนไซม์	เอนไซม์	ค่าความเป็นกรดต่าง	อวัยวะที่เอนไซม์ มีกิจกรรม
กระเพาะอาหาร	Pepsins	2-4	กระเพาะอาหาร
ตับอ่อน	Trypsin Chymotrypsin Carboxypeptidase Lipase Esterases Amylase	7-11	ลำไส้
ลำไส้	Di-/tripeptidase Aminopeptidase Disaccharidases	7-11	ลำไส้
ตับอ่อนและ จุลินทรีย์ประจำถิ่น ในลำไส้	Chitinase	7-11	ลำไส้
จุลินทรีย์ประจำถิ่นใน ลำไส้	Cellulase	7-11	ลำไส้

ที่มา: Jobling (1995)

6) กระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันในตัว ทำให้สัตว์สร้างแอนติบอดี (antibody) มากขึ้น
ส่งผลดีให้สัตว์นำมีความทนทานต่อแบคทีเรียก่อโรค

7) จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโปรไบโอติกซึ่งอยู่ในรูปผลิตภัณฑ์ต้องมีชีวิตอยู่ได้นาน
เก็บรักษาได้ง่ายและมีชีวิตได้นานจนกว่าจะนำมาใช้งาน

8) มีชีวิตอยู่ได้นานในอาหารสัตว์ เนื่องจากในกระบวนการผลิตอาหารสัตว์มีปัจจัยที่ส่งผลต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น กระบวนการให้ความร้อน แรงอัด สภาพความเป็นกรด การเติมสารบางชนิดลงในอาหารสัตว์เพื่อช่วยในการถนอมคุณภาพของอาหารสัตว์ รวมไปถึงการเติมสารปฏิชีวนะ

9) ไม่เป็นสาเหตุให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม ไม่ทำให้เกิดอาการแพ้

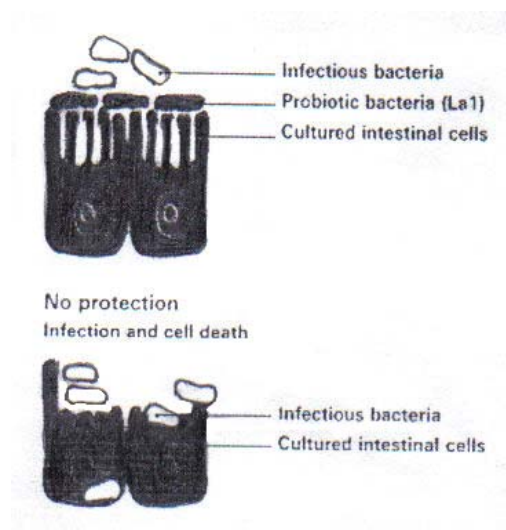
10) เป็นสายพันธุ์ที่สามารถใช้ผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้ โดยต้องเพาะเลี้ยงง่าย เพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว และราคาไม่แพง

7.2 กลไกการทำงานของโปรไบโอติกในสัตว์น้ำ

สำหรับกลไกของโปรไบโอติกในสัตว์น้ำ ที่ช่วยให้สัตว์น้ำทนต่อโรคและส่งเสริมให้มีสุขภาพแข็งแรงขึ้นนั้น สามารถแบ่งออกได้ดังนี้ (Balcazar *et al.*, 2006)

1) การสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ (production of inhibitory compounds) ซึ่งพบว่าแบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรียกรดแล็กติกสามารถสร้าง แบคเทอริโอซิน กรดอินทรีย์และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ เป็นต้น ซึ่งสารดังกล่าวมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ได้

2) การยึดเกาะที่เยื่อบุผิวเซลล์ (competition for adhesion sites) การยึดเกาะของโปรไบโอติกที่ครอบครองพื้นที่ของเซลล์เยื่อในระบบทางเดินอาหารเป็นกลไกหนึ่งในการป้องกันหรือขัดขวางการยึดเกาะติดของแบคทีเรียก่อโรค เช่น *E. coli* และ *Salmonella* sp. โดยกลไกการยึดเกาะจะเริ่มตั้งแต่ แบคทีเรียที่เป็นโปรไบโอติกเจริญบนผนังลำไส้ แล้วแบคทีเรียดังกล่าวสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ได้จำนวนมาก ซึ่งจะขัดขวางไม่ให้แบคทีเรียก่อโรคมายึดเกาะบนผนังลำไส้ ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 แบบจำลองแสดงการยึดเกาะของแบคทีเรียที่เป็น โปรไบโอติกและแบคทีเรียก่อให้เกิดโรค
ที่มา: Nestle (2002)

Nikoskelainen *et al.* (2001) ได้นำแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ *Lactobacillus rhamnosus* LC 705, *Lb. bulgaricus*, *Lb. rhamnosus* ATCC 53103, *Lb. johnsonii* La1, *Lb. casei*, *Enterococcus faecium* และ *Bifidobacterium lactis* Bb12 ซึ่งใช้เป็นโปรไบโอติกในมนุษย์ มาศึกษาการแข่งขันการยึดเกาะกับแบคทีเรียที่ก่อโรคในปลาคือ *Aeromonas salmonicida* ที่เมื่อกบบริเวณผิวหนังและลำไส้ของปลา โดยการตรวจแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ด้วยวิธีการติดฉลากกัมมันตรังสีบนเซลล์ของแบคทีเรีย (radioactively labeled bacteria) และวัดกิจกรรมของกัมมันตรังสี (radioactivity) ด้วยวิธี liquid scintillation พบว่า *Lb. rhamnosus* ATCC 53103 และ *Lb. bulgaricus* สามารถยึดเกาะกับเมื่อกบบริเวณ หลอดอาหาร กระเพาะอาหาร ลำไส้ เหงือก ผิวหนัง และสามารถแข่งขันการยึดเกาะกับ *A. salmonicida* ที่บริเวณเมื่อกของผิวหนังและลำไส้ ได้ดีที่สุด

3) การเพิ่มภูมิคุ้มกัน (enhancement of the immune response) เป็นการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำให้มีความทนทานต่อการก่อโรคของ ไวรัส แบคทีเรีย รา และปรสิต โดยเฉพาะในระยะวัยอ่อนของสัตว์น้ำ ซึ่งมีระบบภูมิคุ้มกันที่ยังมีประสิทธิภาพต่ำ

Nikoskelainen *et al.* (2003) ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพของระบบภูมิคุ้มกันในปลา rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) โดยให้อาหารปลาที่ผสมแบคทีเรียกรดแล็กติกที่ใช้เป็นโปรไบโอติก (*Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103) เปรียบเทียบกับปลาที่ได้รับอาหารปลาที่ไม่

ผสมแบคทีเรียกรดแล็กติกที่ใช้เป็นโปรไบโอติก ซึ่งพบว่าหลังจากให้อาหารปลาเป็นเวลา 1 สัปดาห์ จะพบ *Lb. rhamnosus* ATCC 53103 ในตัวอย่างลำไส้ของปลา rainbow trout จำนวน 9.0×10^9 โคโลนีต่อกรัม ในขณะที่ชุดควบคุมพบจำนวนเซลล์น้อยกว่า 10 โคโลนีต่อกรัม ส่วนตัวอย่างเมื่อเก็บบริเวณผิวหนังของปลาดังกล่าวมีจำนวนเซลล์ 1.0×10^3 - 5.0×10^7 โคโลนีต่อกรัม ในขณะที่ชุดควบคุมจะไม่พบแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าว และน้ำที่ใช้เลี้ยงมีจำนวนเซลล์ 3.9×10^3 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ชุดควบคุมจะไม่พบแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าว นอกจากนี้ยังพบว่า ค่าที่ใช้วัดประสิทธิภาพระบบภูมิคุ้มกันของปลา คือ respiratory burst (RB), Immunoglobulin (Ig) และ serum bactericidal activity (Sb) มีค่าเพิ่มสูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับปลาที่ไม่ได้รับ โปรไบโอติก แสดงให้เห็นว่าโปรไบโอติกสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของระบบภูมิคุ้มกันของปลา rainbow trout ได้

4) การปรับปรุงคุณภาพน้ำ (improvement of water quality) ซึ่งมักพบว่าแบคทีเรียแกรมบวกโดยเฉพาะแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* sp. สามารถเปลี่ยนสารอินทรีย์ในน้ำไปเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ โดย Dalmin *et al.* (2001) ได้ศึกษาการใช้แบคทีเรียสกุล *Bacillus* sp. ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) พบว่า สามารถปรับปรุงคุณภาพน้ำที่ใช้เลี้ยงให้ดีขึ้น เพิ่มอัตราการรอดและการเจริญเติบโตของกุ้งได้ดี นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถลดจำนวนแบคทีเรียที่ก่อโรค เช่น *Vibrio* sp. ได้อีกด้วย

จากที่กล่าวมาแล้วในข้างต้นจะเห็นได้ว่าแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ได้มีส่วนสำคัญในการใช้เป็นสารถนอมอาหารด้วยวิธีทางชีวภาพ นอกจากนี้ยังใช้เป็นวิธีชีวภาพบำบัดหรือการควบคุมและป้องกันการเกิดโรคในสิ่งมีชีวิต เช่น การใช้แบคทีเรียที่มีประโยชน์บางชนิดไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อโรคในสัตว์น้ำ การใช้ผลิตภัณฑ์ที่สกัดได้จากแบคทีเรียใส่ลงในน้ำหรืออาหารเพื่อป้องกันโรคและเพื่อกระตุ้นให้สัตว์น้ำเจริญเติบโตได้ดีขึ้น ดังนั้นการคัดแยกและศึกษาแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์จากตัวอย่างปลาสวยงาม จึงเป็นอีกแหล่งตัวอย่างหนึ่งที่น่าสนใจ นอกจากนี้การศึกษาคูสมบัติด้านต่าง ๆ ของสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่สร้างขึ้น รวมถึงศึกษาคูสมบัติและแนวโน้มในการประยุกต์ใช้เป็นโปรไบโอติกของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้สำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ จึงเป็นพื้นฐานสำคัญในการนำแบคทีเรียกรดแล็กติกดังกล่าวไปใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างอวัยวะภายในของปลาสวยงาม

ตัวอย่างปลาสวยงามจำนวน 10 ตัวอย่าง ได้แก่ ปลาทองออแล้นดา (*Carassius auratus* สายพันธุ์ oranda) จำนวน 4 ตัวอย่าง ปลาทองหัวสิงห์ (*Carassius auratus* สายพันธุ์ lion head) จำนวน 1 ตัวอย่าง ปลาทองโคเม็ต (*Carassius auratus* สายพันธุ์ comet) จำนวน 1 ตัวอย่าง ปลาทองรักเกล้า (*Carassius auratus* สายพันธุ์ moor) จำนวน 1 ตัวอย่าง ปลาคะเพียนทอง (*Puntius altus*) จำนวน 1 ตัวอย่าง และปลาคาร์พ (*Cyprinus carpio*) จำนวน 2 ตัวอย่าง ซึ่งเก็บจากตลาดปลาสวยงามหลาย ๆ แห่งในกรุงเทพมหานคร โดยนำตัวอย่างปลาสวยงามที่มีชีวิตมาทำให้สลบด้วยการแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นผ่าเอาอวัยวะระบบทางเดินอาหารออกจากช่องท้องของปลาสวยงาม มาทำการคัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกต่อไป

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 2.1 Peptone (Merck)
- 2.2 Yeast extract (Difco)
- 2.3 Tryptone (Merck)
- 2.4 Tryptic soy agar (TSA) (Merck)
- 2.5 Tryptic soy broth (TSB) (Merck)
- 2.6 Tryptic soy agar + 0.6% Yeast extract (TSAYE)
- 2.7 Tryptic soy broth + 0.6% Yeast extract (TSBYE)
- 2.8 Tryptic soy broth + 0.6% Yeast extract + 0.75% agar (TSBYE soft agar)
- 2.9 MRS (Man Rogosa and Sharpe) agar (Merck)
- 2.10 MRS (Man Rogosa and Sharpe) broth (Merck)
- 2.11 Glucose (Fisher Chemicals)
- 2.12 Agar powder (Difco)

2.13 Ox-bile (Fluka)

2.14 Sheep blood agar (Difco)

3. แบคทีเรียทดสอบ

แบคทีเรียทดสอบที่ใช้สำหรับตรวจสอบและการวัดกิจกรรมของสารยับยั้งจุลินทรีย์ ได้แก่ แบคทีเรียกรดแล็กติก แบคทีเรียก่อโรคและทำให้อาหารเน่าเสีย ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แบคทีเรียทดสอบและการเลี้ยงเชื้อที่ใช้ตรวจสอบการผลิตและการออกฤทธิ์ของ สารยับยั้งจุลินทรีย์

สายพันธุ์	อาหารเลี้ยงเชื้อ	อุณหภูมิบ่มเชื้อ (องศาเซลเซียส)
1) แบคทีเรียกรดแล็กติก		
<i>Enterococcus faecalis</i> JCM 5803	MRS broth	30
<i>Enterococcus faecium</i> JCM 5804	MRS broth	30
<i>Pediococcus pentosaceus</i> JCM 5885	MRS broth	30
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 19435	MRS broth	30
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> JCM 6124	MRS broth	30
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 14917	MRS broth	30
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> JCM 1157	MRS broth	30
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> ATCC 19257	MRS broth	30
2) แบคทีเรียก่อโรคและทำให้อาหารเน่าเสีย		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12600	TSBYE	37
<i>Escherichia coli</i> JCM 109	TSBYE	37
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	TSBYE	37
3) แบคทีเรียทดสอบชนิดอื่น ๆ		
<i>Micrococcus luteus</i> IFO 12708	TSBYE	30
<i>Bacillus subtilis</i> JCM 1465	TSBYE	37
<i>Bacillus circulans</i> JCM 2504	TSBYE	37
<i>Bacillus coagulans</i> JCM 2257	TSBYE	37

4. เอนไซม์

- 4.1 เอนไซม์โปรตีนเนส เค (proteinase K) ; Sigma
- 4.2 เอนไซม์เปปซิน (pepsin) ; Sigma
- 4.3 เอนไซม์ทริปซิน (trypsin) ; Sigma
- 4.4 เอนไซม์ไลเปส (lipase) ; Sigma
- 4.5 เอนไซม์อัลฟา-อะไมเลส (α -amylase) ; Sigma
- 4.6 เอนไซม์ไลโซไซม์ (lysozyme) ; Sigma
- 4.7 เอนไซม์อัลฟา-ไคโมทริปซิน (α -chymotrypsin) ; Sigma

5. สารเคมี

- 5.1 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
- 5.2 ไฮโดรคลอริก แอซิด (HCl)
- 5.3 แคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3)
- 5.4 แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- 5.5 แมงกานีสซัลเฟต ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)
- 5.6 ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)
- 5.7 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)
- 5.8 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)
- 5.9 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)
- 5.10 สารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์
- 5.11 เฟอริกแอมโมเนียมซัลเฟต [$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$]
- 5.12 Tween 80
- 5.13 กลีเซอรอล (glycerol)
- 5.14 สีย้อมสำหรับการย้อมสีแบบแกรม
- 5.15 ชุดจำแนกชนิดแบคทีเรียแบบสำเร็จรูป API 20 Sterp (bioMerieux)
- 5.16 oxytetracycline (30 ไมโครกรัมต่อแผ่น ; Oxoid)
- 5.17 nalidixic acid (30 ไมโครกรัมต่อแผ่น ; Oxoid)
- 5.18 oxolinic acid (2 ไมโครกรัมต่อแผ่น ; Oxoid)

5.19 sulphamethoxazole (25 ไมโครกรัมต่อแผ่น ; Oxoid)

5.20 tetracycline (30 ไมโครกรัมต่อแผ่น ; Oxoid)

5.21 trimethoprim (5 ไมโครกรัมต่อแผ่น ; Oxoid)

6. เครื่องมือ

6.1 เครื่องแก้วที่จำเป็นในการทดลอง เช่น หลอดทดลอง จานเพาะเชื้อ

6.2 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (Sartorius รุ่น 1219 MP, Germany)

6.3 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (AND รุ่น GR-200, Japan)

6.4 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (Cyberscan รุ่น 1000, Switzerland)

6.5 เครื่องตีผสมตัวอย่าง (Seward รุ่น BA 7021, England)

6.6 ตู้บ่มเชื้อ (Mettler รุ่น Model 600, Germany)

6.7 ตู้ควบคุมอุณหภูมิต่ำ (Sanyo Growth Cabinet, Japan)

6.8 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อระบบความดัน (Hirayama รุ่น 240/300 MIV, Japan)

6.9 ตู้อบฆ่าเชื้อ (Sibata รุ่น WT-Binder F24, Japan)

6.10 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Mettler รุ่น WB 14, Germany)

6.11 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส (Precision รุ่น Model 253, USA.)

6.12 เครื่องผสมอาหารในหลอดแก้ว (Scientific Industries รุ่น Vortex-Genie 2, USA.)

6.13 กล้องจุลทรรศน์ (Olympus รุ่น CH-2, Japan)

6.14 เครื่องนับจำนวนโคโลนี (Suntex รุ่น 560, Taiwan)

6.15 เครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลางควบคุมอุณหภูมิได้ (Hettich รุ่น Universal 32 R,

Germany)

6.16 เครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง (Hettich รุ่น MIKRO 20, Germany)

6.17 เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Shimadzu รุ่น UV-1700 CE pharmaSpec, Japan)

6.18 ชุดกรองจุลินทรีย์ (Sartorius รุ่น Minisart®, Germany)

6.19 ตู้บ่มเชื้อแบบปราศจากก๊าซออกซิเจน (Shel Lab รุ่น Bactron I, USA.)

6.20 เครื่องเขย่า (GFL รุ่น 3005, Germany)

6.21 ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Sanyo รุ่น SF-C992, Thailand)

วิธีการ

1. การคัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกจากอวัยวะระบบทางเดินอาหารของปลาซวงงาม

นำตัวอย่างอวัยวะระบบทางเดินอาหารของปลาซวงงาม ได้แก่ ปลาทองออแลนดา (*Carassius auratus* สายพันธุ์ oranda) ปลาทองหัวสิงห์ (*Carassius auratus* สายพันธุ์ lion head) ปลาทองโคเม็ต (*Carassius auratus* สายพันธุ์ comet) ปลาทองรักเล่ย์ (*Carassius auratus* สายพันธุ์ moor) ปลาตะเพียนทอง (*Puntius altus*) และปลาคาร์พ (*Cyprinus carpio*) โดยใช้น้ำหนักของอวัยวะระบบทางเดินอาหารของปลาซวงงามแต่ละชนิดจำนวน 10 กรัม ผสมลงใน 0.1 เปอร์เซ็นต์ สารละลายเปปโตน (peptone water) ปริมาตร 90 มิลลิลิตร แล้วนำไปตีปั่นให้เข้ากัน โดยใช้เครื่องตีปั่นอาหาร (stomacher) จากนั้นทำเจือจางลงครั้งละ 10 เท่า ด้วย 0.1 เปอร์เซ็นต์ สารละลายเปปโตน จนมีความเจือจางที่เหมาะสม คูดตัวอย่างจากในแต่ละความเจือจางปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานแก้วเพาะเชื้อความเจือจางละ 2 จาน แล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่ผสม 0.5 % แคลเซียมคาร์บอเนต ซึ่งมีอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส ลงไปจานละประมาณ 15-20 มิลลิลิตร รอให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คัดแยกโคโลนีที่สร้างบริเวณใส (clear zone) รอบโคโลนีมาทำให้เป็นเช็อบริสุทรีด้วยวิธี cross streak ตรวจสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของเช็อบริสุทรีที่คัดแยกได้ เช่น การติดสีแกรมและสัณฐานวิทยาของเซลล์ รวมถึงการสร้างเอนไซม์คาตาเลส โดยใช้สารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ทำการเก็บรักษาเช็อบริสุทรีที่ได้ไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ซึ่งมีกลีเซอรอล (glycerol) ผสมอยู่ 15 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2. การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์

2.1 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ใช้วิธี Direct method (Schillinger and Lucke, 1989) โดยนำเช็อบริสุทรีที่ติดสีแกรมบวกและไม่สามารถสร้างเอนไซม์คาตาเลส ซึ่งสันนิษฐานว่าน่าจะเป็นแบคทีเรียกรดแล็กติกที่ได้จากการทดลองขั้นตอนแรก มาปลูกเชื้อแบบจุด (spot inoculate) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Modified MRS agar (M-MRS agar) ซึ่งเตรียมตามสูตรของ Tichaczek *et al.* (1992) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเททับหน้าด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแบบกึ่งแข็ง Tryptic soy broth + 0.6% Yeast extract +

0.75% agar (TSBYE soft agar) อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ซึ่งมีแบคทีเรียทดสอบที่เจริญอยู่ในระยะ log (log phase) ผสมอยู่ประมาณ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร รอให้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เททับหน้าแข็งตัวจึงนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิซึ่งเหมาะสมสำหรับการเจริญของแบคทีเรียทดสอบแต่ละชนิด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบบริเวณใสซึ่งเกิดขึ้นจากการที่แบคทีเรียกรดแล็กติกสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ คัดเลือกแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ที่ได้ไว้ใช้ในการทดลองต่อไป

2.2 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ได้ในอาหารเหลว ด้วยวิธี Spot on lawn method โดยนำแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ ซึ่งคัดเลือกได้จากขั้นตอนข้างต้นมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้มาปั่นแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลางที่ความเร็วรอบ 6,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แยกเอาน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใส (supernatant) ไปทำให้มีสภาพเป็นกลาง (neutralize) และปลอดเชื้อ (sterile) โดยผ่านการทำลายหรือกำจัดสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบซึ่งไม่ต้องการศึกษา เช่น กรดอินทรีย์และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ โดยใช้วิธีการดังนี้

ก. กรดอินทรีย์ โดยการปรับค่าความเป็นกรด่างของน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสให้เป็น 6.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 2 นอร์มัล

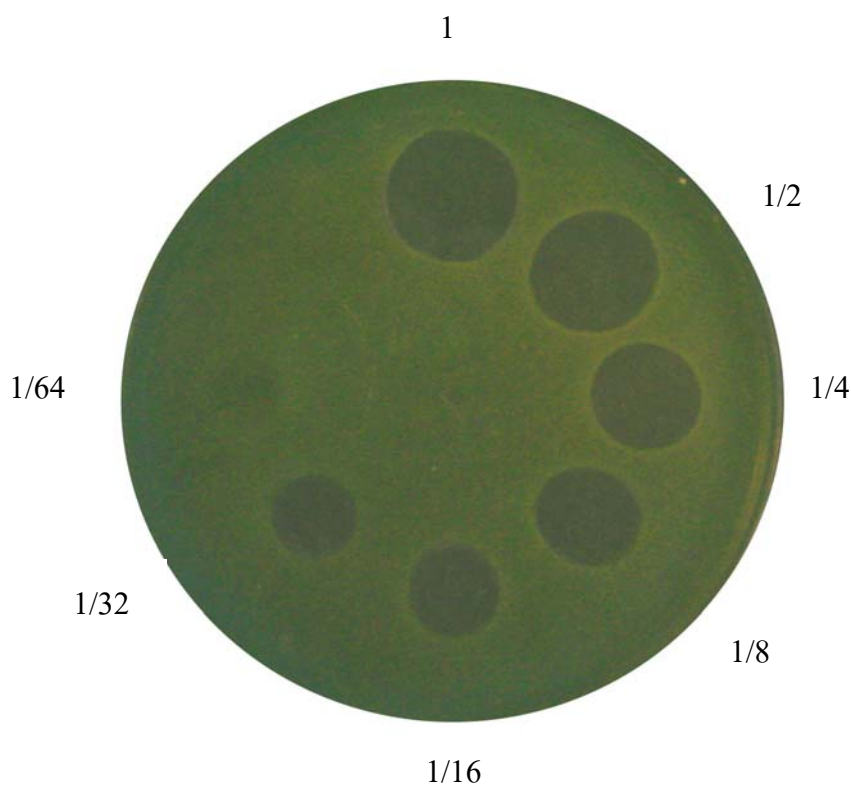
ข. เซลล์จุลินทรีย์ที่มีชีวิต โดยการกรองผ่านแผ่นเยื่อกรอง (membrane) ที่มีรูขนาด 0.20 ไมโครเมตร

ค. ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ โดยการเติมเอนไซม์คาตาเลสลงไปในน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 500 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

นำน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสซึ่งมีสภาพเป็นกลางและปลอดเชื้อ (cell-free neutralized supernatant หรือเรียกย่อว่า CFNS) จากขั้นตอนที่ผ่านมาไปวัดค่ากิจกรรมของสารยับยั้งจุลินทรีย์ (antimicrobial activity) ต่อแบคทีเรียทดสอบที่ถูกยับยั้งการเจริญจากวิธี Direct method โดยใช้วิธี critical dilution assay หลังจากนั้นทำการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ซึ่งมีค่ากิจกรรมสูงสุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ เพื่อใช้ไว้ในการทดลองต่อไป

3. การวัดกิจกรรมของสารยับยั้งจุลินทรีย์

การวัดและคำนวณค่ากิจกรรมของสารยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยวิธี critical dilution assay เป็นวิธีการที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Mayr-Harting *et al.* (1972) โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสที่มีสถานะเป็นกลางและปลอดเชื้อมาทำให้เจือจางลงครึ่งละ 2 เท่า อย่างต่อเนื่องกันด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ นำน้ำส่วนใสในแต่ละความเจือจางปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนจานอาหาร TSAYE agar ที่เททับหน้าด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ TSBYE soft agar อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ปริมาตร 5 มิลลิตร ซึ่งมีแบคทีเรียทดสอบที่เจริญอยู่ในระยะ log (log phase) ผสมอยู่ประมาณ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิตร รอนจนกระทั่งหยดน้ำส่วนใสที่หยดลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง หลังจากนั้นนำจานเพาะเชื้อไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิซึ่งเหมาะสมสำหรับการเจริญของแบคทีเรียทดสอบแต่ละชนิด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การอ่านผลดูจากบริเวณใสที่เกิดขึ้นจากผลการถูกยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบในบริเวณที่หยดน้ำส่วนใสที่มีสถานะเป็นกลางและปลอดเชื้อในแต่ละความเจือจางลงไป (ภาพที่ 4) ซึ่งสามารถคำนวณค่ากิจกรรมของสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่อยู่ในน้ำส่วนใสที่มีสถานะเป็นกลางและปลอดเชื้อต่อแบคทีเรียทดสอบแต่ละชนิดเป็นยูนิตต่อมิลลิตร ($AU\ ml^{-1}$) โดยใช้ส่วนกลับของค่าความเจือจางสูงสุดของน้ำส่วนใสที่มีสถานะเป็นกลางและปลอดเชื้อ ซึ่งยังสามารถสังเกตเห็นบริเวณใสที่เกิดจากการถูกยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบและคูณด้วย 100



$$\begin{aligned}
 \text{ค่ากิจกรรมของสารยับยั้งจุลินทรีย์ในน้ำเลี้ยงเชื้อ} &= 32/1 \times 100 \\
 &= 3,200 \text{ AU ml}^{-1}
 \end{aligned}$$

ภาพที่ 4 การวัดและคำนวณค่ากิจกรรมของสารยับยั้งจุลินทรีย์ในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีสถานะเป็นกลาง และปลอดเชื้อของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดเลือกได้ด้วยวิธี critical dilution assay

4. การจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดเลือกได้

4.1 การจัดจำแนกเบื้องต้นในระดับสกุล (genus) นำแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ซึ่งคัดแยกได้มาทำการจัดจำแนกเบื้องต้นในระดับสกุล ตามวิธีการของ Axelsson (1998) โดยการศึกษาลักษณะทางสรีระวิทยา การเจริญของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะการบ่มเชื้อที่แตกต่างกัน ได้แก่

4.1.1 การติดสีแกรม รูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์ การสร้างก้ำขี้เมื่อเจริญอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth

4.1.2 การเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth อุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส

4.1.3 การเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่มีโซเดียมคลอไรด์ผสมอยู่ 6.5 และ 18 เปอร์เซ็นต์

4.1.4 การเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่ปรับค่าความเป็นกรด่างเริ่มต้นเป็น 4.4 และ 9.6

4.2 การจัดจำแนกในระดับชนิด (species) นำแบคทีเรียกรดแล็กติกที่ผ่านการจัดจำแนกในระดับสกุล ที่สร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ซึ่งมีค่ากิจกรรมสูงสุดในการยับยั้งการเจริญแบคทีเรียทดสอบ ซึ่งได้แก่ สายพันธุ์ MGM30-8.22 มาจัดจำแนกในระดับชนิด โดยนำสายพันธุ์ดังกล่าวมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ sheep blood agar เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ไม้ที่ส่วนปลายพันด้วยสำลีซึ่งผ่านการทำให้ปลอดเชื้อแล้วมาถ่ายเชื้อลงใน API GP medium แล้วทำตามขั้นตอนที่ระบุในคู่มือที่แนบมากับชุดจำแนกแบคทีเรียชนิดสำเร็จรูปแบบ API 20 Strep (bioMerieux) รวมถึงนำผลการทดสอบที่ได้มาแปรผลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปของชุดจำแนกแบคทีเรียชนิดสำเร็จรูปดังกล่าว

4.3 การยืนยันผลการจัดจำแนกในระดับชนิดโดยการศึกษาลำดับเบสของ 16S rDNA ดำเนินการ โดยนำส่งแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ MGM30-8.22 ไปศึกษาลำดับเบสขนาดประมาณ 1,500 เบส ที่ห้องปฏิบัติการ Microbial Technology, Faculty of Agriculture, Kyushu University ประเทศญี่ปุ่น แล้วนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสใน 16S rDNA ของเชื้ออ้างอิงมาตรฐานในฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information (NCBI), National Institutes of Health ประเทศสหรัฐอเมริกา

5. การศึกษาคุณสมบัติของสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่สร้างจาก *Enterococcus raffinosus* MGM30-8.22

นำน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสซึ่งมีสภาวะเป็นกลางและปลอดเชื้อ มาทดสอบคุณสมบัติของสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ได้ซึ่งอยู่ในสารละลายส่วนใส ดังนี้

5.1 การทนต่อเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ นำน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสซึ่งมีสภาวะเป็นกลางและปลอดเชื้อที่ได้มาปรับค่าความเป็นกรดต่าง ให้เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิดดังแสดงในตารางที่ 6 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์หรือสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 2 นอร์มัล จากนั้นเติมเอนไซม์ที่ต้องการทดสอบลงไปให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่สภาวะซึ่งเหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากครบเวลาที่กำหนดทำการหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยการนำไปต้มในน้ำเดือดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อทำลายกิจกรรมของเอนไซม์ส่วนที่เหลือ วัดค่ากิจกรรมของสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่เหลืออยู่ ด้วยวิธี critical dilution assay โดยใช้ *E. faecium* JCM 5804 เป็นแบคทีเรียทดสอบ เปรียบเทียบกับน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสซึ่งมีสภาวะเป็นกลางและปลอดเชื้อชุดควบคุม (control) ที่ไม่ผ่านการเติมเอนไซม์ ซึ่งถ้ากิจกรรมของสารยับยั้งจุลินทรีย์ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน แสดงว่าสารยับยั้งจุลินทรีย์ดังกล่าวมีคุณสมบัติเป็นโปรตีน ซึ่งสอดคล้องกับคำจำกัดความของแบคทีริโอซิน

ตารางที่ 6 ค่าความเป็นกรดต่างและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิด

เอนไซม์	ค่าความเป็นกรดต่าง	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)
โปรติเนส เค (proteinase K)	7.5	37
เปปซิน (pepsin)	2.0	37
ทริปซิน (trypsin)	7.6	25
ไลเปส (lipase)	7.7	37
อัลฟา-อะไมเลส (α -amylase)	6.9	20
ไลโซไซม์ (lysozyme)	6.2	25
อัลฟา-ไคโมทริปซิน (α -chymotrypsin)	7.0	37

ที่มา: Sigma (2000)

5.2 การทนต่อความร้อน นำน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสซึ่งมีสภาวะเป็นกลางและปลอดเชื้อที่ได้มาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ด้วยอ่างน้ำร้อนเป็นเวลา 5, 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 นาที ตามลำดับ และที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อระบบความดัน (autoclave) เมื่อครบเวลาที่กำหนดทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วด้วยน้ำแข็ง หลังจากนั้นนำไปวัดค่ากิจกรรมที่เหลือของสารยับยั้งจุลินทรีย์ เปรียบเทียบกับน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสซึ่งมีสภาวะเป็นกลางและปลอดเชื้อที่ไม่ผ่านการให้ความร้อน

5.3 การศึกษาความคงตัวของสารยับยั้งจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะที่มีค่าความเป็นกรดต่างต่าง ๆ นำน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสซึ่งมีสภาวะเป็นกลางและปลอดเชื้อที่ได้มาปรับค่าความเป็นกรดต่างให้เป็น 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 และ 11.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์หรือสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 2 นอร์มัล แบ่งทำการทดลองในทุกค่าความเป็นกรดต่างออกเป็น 2 ชุด โดยนำหลอดชุดแรกไปให้ความร้อนในน้ำเดือดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ส่วนหลอดทดลองชุดที่ 2 นำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำหลอดทดลองแต่ละชุดมาวัดกิจกรรมของสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่เหลืออยู่โดยทำการปรับค่าความเป็นกรดต่างของน้ำเลี้ยงเชื้อให้เป็น 6.5 ก่อนการวัดค่ากิจกรรมที่เหลือของสารยับยั้งจุลินทรีย์

5.4 การศึกษารูปแบบกิจกรรม (mode of action) ของสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่สร้างจาก *E. raffinosus* MGM30-8.22 ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ โดยนำ *E. faecium* JCM 5804 ซึ่งใช้เป็นแบคทีเรียทดสอบ มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ปริมาตร 200 มิลลิลิตร จำนวน 3 ขวด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าความขุ่น (OD_{600}) ประมาณ 0.2 จากนั้นเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่สร้างจาก *E. raffinosus* MGM30-8.22 ที่ผ่านการทำให้เป็นกลางและปลอดเชื้อแล้วลงไปให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของกิจกรรมของสารยับยั้งจุลินทรีย์เป็น 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (ขวดที่ 1) และ 200 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (ขวดที่ 2) ตามลำดับ จากนั้นทำการสุ่มตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง มาวัดการเจริญของแบคทีเรียทดสอบโดยวัดความขุ่น (OD_{600}) ด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์และหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (Total viable count) โดยวิธีการ spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่ผสม 0.5% แคลเซียมคาร์บอเนต ทำการทดลองเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (control) ซึ่งไม่ได้มีการเติมสารยับยั้งจุลินทรีย์ (ขวดที่ 3) และพิจารณาว่ารูปแบบกิจกรรมของสารยับยั้งจุลินทรีย์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบว่าเป็นแบบ bactericidal หรือ bacteriostatic

5.5 ศึกษาการเจริญและการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ในสภาวะที่กำหนด โดยเติม *E. raffinosus* MGM30-8.22 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ปริมาตร 1 ลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยไม่มีการเติมออกซิเจนและควบคุมค่าความเป็นกรดต่างในขณะเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นสุ่มตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง เพื่อนำไปวัดการเจริญของเชื้อโดยการวัดค่าความขุ่น (OD_{600}) ค่าความเป็นกรดต่างของน้ำเลี้ยงเชื้อ และค่ากิจกรรมของสารยับยั้งจุลินทรีย์ในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการทำให้เป็นกลางและปลอดเชื้อแล้ว

6. การศึกษาคุณสมบัติในการเป็นโปรไบโอติกด้านการทนต่อสภาวะภายในระบบทางเดินอาหารของปลาของ *E. raffinosus* MGM30-8.22

6.1 การทนต่อโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยเลี้ยง *E. raffinosus* MGM30-8.22 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นระหว่าง 1–10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดการเจริญโดยวัดความขุ่น (OD_{600}) เปรียบเทียบกับการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่ไม่ได้ผสมโซเดียมคลอไรด์ซึ่งใช้เป็นชุดควบคุม

6.2 การทนต่อเกลือน้ำดี (ox-bile salt) และน้ำดีสดปลอดเชื้อของปลาช่อน

6.2.1 การทนต่อเกลือน้ำดี โดยเลี้ยง *E. raffinosus* MGM30-8.22 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่ผสมเกลือน้ำดีจากวัว (ox-bile salt) ความเข้มข้นระหว่าง 0.1–1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดความขุ่น (OD_{600}) เปรียบเทียบกับการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่ไม่ได้ผสมเกลือน้ำดีซึ่งใช้เป็นชุดควบคุม

6.2.2 การทนต่อน้ำดีที่เตรียมจากน้ำดีสดของปลาช่อน (*Channa striata*) โดยเติม

E. raffinosus MGM30-8.22 และ *Streptococcus agalactiae* เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ถูกยับยั้งการเจริญด้วยน้ำดีสดของปลาช่อน (negative control) ซึ่งเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth นาน 18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงใน phosphate buffer saline (PBS) ผสมน้ำดีสดปลอดเชื้อของปลาช่อน ความเข้มข้น 10, 30 และ 50 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาตร 5 มิลลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการสุมตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง มาวัดจำนวนเซลล์ของ *E. raffinosus* MGM30-8.22 และ *S. agalactiae* ด้วยวิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่ผสม 0.5 % แคลเซียมคาร์บอเนต เปรียบเทียบกับจำนวนเซลล์ใน phosphate buffer saline ที่ไม่ได้ผสมน้ำดีสดปลอดเชื้อของปลาช่อนซึ่งใช้เป็นชุดควบคุม

6.3 การเจริญที่ความเป็นกรดต่างที่ระดับต่าง ๆ โดยเลี้ยง *E. raffinosus* MGM30-8.22 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดิม ที่ปรับค่าความเป็นกรดต่างระหว่าง 2-11 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์หรือสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 2 นอร์มัล นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สุ่มตัวอย่างที่ 0 และ 6 ชั่วโมง มาวัดจำนวนเซลล์ของ *E. raffinosus* MGM30-8.22 โดยวิธีการ spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่ผสม 0.5 % แคลเซียมคาร์บอเนต

6.4 ศึกษาความต้องการก๊าซออกซิเจนในการเจริญ โดยเลี้ยง *E. raffinosus* MGM30-8.22 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดิม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะดังนี้ (1) สภาวะปราศจากออกซิเจน ในตู้บ่มแบบปราศจากก๊าซออกซิเจน (anaerobe incubator) (2) สภาวะการเติมออกซิเจนโดยการเขย่าที่ 100 rpm และ (3) ในสภาวะบรรยากาศปกติโดยไม่มีการเขย่า ซึ่งทั้ง 3 สภาวะจะบ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อในแต่ละสภาวะมาวัดการเจริญโดยวัดความขุ่น (OD_{600})

6.5 การทนต่อสารปฏิชีวนะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ *E. raffinosus* MGM30-8.22 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ใช้ไม้ที่ส่วนปลายพันด้วยลวดซึ่งผ่านการทำให้ปลอดเชื้อแล้ว เชื้อเชื้อให้ทั่วบนหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ TSAYE จากนั้นนำแผ่นยาปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ จำนวน 6 ชนิด (oxytetracycline, nalidixic acid, oxolinic acid, trimethoprim, tetracycline และ sulphamethoxazole) วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบผล

โดยการดูบริเวณใสรอบ ๆ แผ่นยาปฏิชีวนะซึ่งเกิดขึ้นจากการยับยั้งการเจริญของ *E. raffinosus*
MGM30-8.22

7. สถานที่ทำการวิจัย

ภาควิชาผลิตภัณฑ์ประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

8. ระยะเวลาในการทดลอง

การทดลองครั้งนี้เริ่มตั้งแต่เดือนเมษายน พ.ศ. 2547 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2550

ผลและวิจารณ์

1. การคัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกจากอวัยวะระบบทางเดินอาหารของปลาสวยงาม

จากการนำตัวอย่างอวัยวะระบบทางเดินอาหารของปลาสวยงามน้ำจืด ได้แก่ ปลาทอง
ออแลนดา (*Carassius auratus* สายพันธุ์ oranda) ปลาทองหัวสิงห์ (*Carassius auratus* สายพันธุ์ lion
head) ปลาทองโคเม็ต (*Carassius auratus* สายพันธุ์ comet) ปลาทองรักเลห์ (*Carassius auratus*
สายพันธุ์ moor) ปลาตะเพียนทอง (*Puntius altus*) และปลาคาร์พ (*Cyprinus carpio*) จำนวนทั้งหมด
10 ตัวอย่าง มาคัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกซึ่งเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่ผสม 0.5 %
แคลเซียมคาร์บอเนต บ่มที่อุณหภูมิ 30 และ 45 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียที่มี
คุณสมบัติตรงตามคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียกรดแล็กติก คือ เซลล์ติดสีแกรมบวกและไม่
สร้างเอนไซม์คาตาเลสได้จำนวน 102 สายพันธุ์ (ดังแสดงในตารางที่ 7) โดยในจำนวนนี้เป็น
แบคทีเรียรูปร่างท่อนจำนวน 87 สายพันธุ์ และรูปร่างกลมจำนวน 15 สายพันธุ์ ในขณะเดียวกัน
พบว่าเป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จำนวน 90 สายพันธุ์ และเป็นแบคทีเรีย
ที่เจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จำนวน 12 สายพันธุ์ โดยผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้อง
กับรายงานของ Gonzalez *et al.* (2000) ซึ่งทำการคัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกจากปลาน้ำจืด brown
trout จากธรรมชาติ พบแบคทีเรียกรดแล็กติกจำนวน 249 สายพันธุ์ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นรูปร่างท่อน
จำนวน 237 สายพันธุ์ และรูปร่างกลมจำนวน 12 สายพันธุ์

ตารางที่ 7 ผลการคัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกจากระบบทางเดินอาหารของปลาสวยงาม

แบคทีเรียกรดแล็กติกเจริญที่อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	รูปร่าง		
	ท่อน (rod)	กลม (cocci)	
30	79	11	
45	8	4	
จำนวนแบคทีเรียกรดแล็กติก (สายพันธุ์)	87	15	102

2. การคัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์

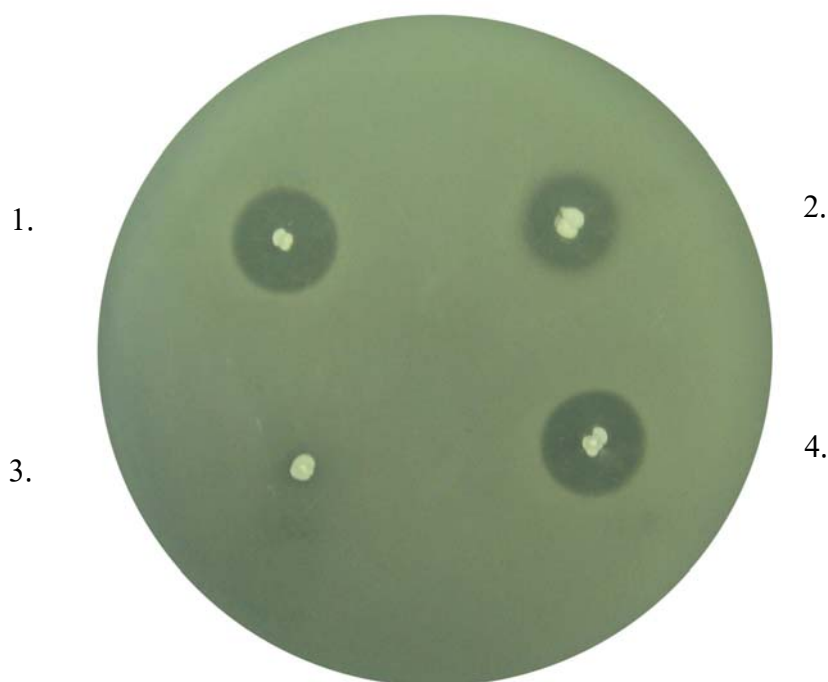
2.1 การคัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบด้วยวิธี Direct method

จากการนำแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดเลือกได้ทั้งหมด 102 สายพันธุ์ มาทดสอบการสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบจำนวน 15 สายพันธุ์ โดยการปลูกเชื้อแบบจุด (spot method) (ภาพที่ 5) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ M-MRS agar พบว่ามีแบคทีเรียกรดแล็กติกจำนวน 8 สายพันธุ์ ที่สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบบางสายพันธุ์ได้ ซึ่งผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 8 ซึ่งแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ทั้งหมดคัดแยกได้จากระบบทางเดินอาหารของปลาทอง แต่ไม่พบแบคทีเรียดังกล่าวในตัวอย่างระบบทางเดินอาหารของปลาการ์ปและปลาตะเพียนทอง ที่นำมาศึกษา

จากการคัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ได้ ยังไม่พบรายงานถึงการคัดแยกแบคทีเรียดังกล่าวจากปลาทองหรือปลาสวยงามชนิดอื่น ๆ แต่มีรายงานการคัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ได้จากสัตว์น้ำชนิดอื่น ๆ เช่น คัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ *Lc. Lactis* USC-39, *E. faecium* USC-46 และ *E. mundtii* USC-51 จากปลา turbot (*Psetta maxima*) ที่สร้างสารยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* และ *S. aureus* ได้ (Campos et al., 2006) คัดแยก *Weissella* sp. จากทางเดินอาหารของปลากะพงขาว ซึ่งสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของ *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio vulnificus* และ *Vibrio flurialis* ได้ (ทศพร, 2547) คัดแยก *Carnobacterium* sp. จากลำไส้ของปลา Atlantic salmon ซึ่งสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของ *Aeromonas salmonicida*, *A. hydrophila*, *Flavobacterium psychrophilum*, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, *Streptococcus milleri*, *Vibrio anguillarum* และ *Vibrio ordalii* ได้ (Robertson et al., 2000) เป็นต้น

ในการทดลองนี้ใช้วิธี direct method บนอาหารเลี้ยงเชื้อ M-MRS agar สำหรับการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ เนื่องจากวิธีดังกล่าวสามารถช่วยลดผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบที่เกิดจากกรดอินทรีย์ได้ เพราะว่าการเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ M-MRS agar ของ Tichaczek et al. (1992) จะช่วยลดผลการยับยั้งที่เกิดจากกรดอินทรีย์ที่

เกิดขึ้น เนื่องจากในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวมีปริมาณของน้ำตาลกลูโคสเพียง 0.2 เปอร์เซ็นต์ และมีปริมาณของสารประกอบบัพเฟอร์มากกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ปกติ



แบคทีเรียทดสอบ : *E. faecium* JCM 5804

1. สายพันธุ์ MGM30-8.22
2. สายพันธุ์ MG30-2.5
3. สายพันธุ์ MG30-2.15 (negative control)
4. สายพันธุ์ HD45-6

ภาพที่ 5 ลักษณะการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบด้วยวิธี direct method

ตารางที่ 8 ผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบโดยสารยับยั้งจุลินทรีย์จากแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

สายพันธุ์	แหล่งตัวอย่าง	บ่มที่อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	แบคทีเรียทดสอบ														
			Bc	Bs	Bi	Ml	Li	Ec	Ef	Es	St	Pe	Ll	Lc	Lp	Ls	Lm
MG30-2.5	ปลาทอง	30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MGM30-8.22	ปลาทองโคเม็ท	30	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
MG30-2.2	ปลาทอง	30	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MG30-2.15	ปลาทอง	30	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
MG30-2.8	ปลาทอง	30	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MGM30-8.5	ปลาทองโคเม็ท	30	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HG45-2.1	ปลาทอง	45	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HD45-6	ปลาทอง	45	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ + = เกิดการยับยั้ง - = ไม่เกิดการยับยั้ง

Bc. = *Bacillus coagulans* JCM 2257, Bs. = *Bacillus subtilis* JCM 1465, Bi. = *Bacillus circulans* JCM 2504, Ml. = *Micrococcus luteus* IFO 12708,
Li = *Listeria innocua* ATCC 33090, Ec. = *Enterococcus faecalis* JCM 5803, Ef. = *Enterococcus faecium* JCM 5804, Es. = *Escherichia coli* JCM 109,
St. = *Staphylococcus aureus* ATCC 12600, Pe. = *Pediococcus pentosaceus* JCM 5885, Ll. = *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435,
Lc. = *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ATCC 19257, Ls. = *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM 1157, Lp. = *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917,
Lm. = *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124

2.2 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ได้ในอาหารเหลว MRS broth ด้วยวิธี Spot on lawn method

เมื่อนำแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ ซึ่งคัดเลือกได้จากวิธี Direct method มาศึกษาความสามารถในการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ในอาหารเหลวโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้ววัดและคำนวณค่ากิจกรรมของสารยับยั้งจุลินทรีย์ (antimicrobial activity) ในน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสที่มีสถานะเป็นกลางและปราศจากเชื้อ (cell-free neutralized supernatant: CFNS) ด้วยเทคนิค critical dilution assay พบว่า มีแบคทีเรียกรดแล็กติกเพียง 2 สายพันธุ์ คือ MG30-2.5 และ MGM30-8.22 ที่สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้ ดังผลการทดลองซึ่งแสดงในตารางที่ 9 นอกจากนี้ยังพบว่าสายพันธุ์ MGM30-8.22 แสดงค่ากิจกรรมของสารยับยั้งจุลินทรีย์ในการยับยั้งการเจริญของ *E. faecium* JCM 5804 ได้สูงกว่าสายพันธุ์ MG30-2.5 ดังนั้นจึงคัดเลือกสายพันธุ์ MGM30-8.22 ซึ่งคัดแยกได้จากอวัยวะระบบทางเดินอาหารของปลาทองโคเม็ต (*Carassius auratus* สายพันธุ์ comet) และใช้ *E. faecium* JCM 5804 เป็นแบคทีเรียทดสอบในการทดลองขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 9 ค่ากิจกรรมของสารยับยั้งจุลินทรีย์ในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีสถานะเป็นกลางและปลอดเชื้อของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดเลือกได้

แบคทีเรียทดสอบ	ค่ากิจกรรมของสารยับยั้งจุลินทรีย์ (AU ml ⁻¹) ^a	
	MGM30-8.22	MG30-2.5
<i>E. faecium</i> JCM 5804	800	100
<i>E. faecalis</i> JCM 5803	200	200
<i>Lb. plantarum</i> ATCC 14917	400	200

^aวัดและคำนวณค่ากิจกรรมของสารยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยวิธี critical dilution assay

3. การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์

3.1 การจัดจำแนกในระดับสกุล (genus)

เมื่อนำแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์สายพันธุ์ MGM30-8.22 มาจัดจำแนกชนิดตามวิธีของ Axelsson (1998) พบว่าได้ผลดังแสดงในตารางที่ 10 โดยเมื่อนำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับแบคทีเรียกรดแล็กติกสกุลต่าง ๆ พบว่า สายพันธุ์ MGM30-8.22 จำแนกอยู่ในสกุล *Enterococcus*

ตารางที่ 10 คุณสมบัติทางสรีระวิทยาบางประการของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ซึ่งคัดแยกได้จากตัวอย่างของระบบทางเดินอาหารของปลาชวยงาม

การทดสอบ	<i>Enterococcus</i> (Axelsson, 1998)	ผลการทดสอบของสายพันธุ์ MGM30-8.22
รูปร่างของแบคทีเรีย	กลม	กลม
การติดสีแกรม	แกรมบวก	แกรมบวก
เอนไซม์คาตาเลส	-ve	-ve
เจริญที่ 10 °C	+ve	+ve
เจริญที่ 45 °C	+ve	+ve
เจริญที่ 6.5% NaCl	+ve	+ve
เจริญที่ 18.0% NaCl	-ve	-ve
เจริญที่ pH 4.4	+ve	+ve
เจริญที่ pH 9.6	+ve	+ve
การสร้างก๊าซจากน้ำตาลกลูโคส	-ve	-ve

-ve = การทดสอบเป็นลบ

+ve = การทดสอบเป็นบวก

โดยแบคทีเรียสกุล *Enterococcus* มีคุณลักษณะทางสรีระวิทยาที่แตกต่างอย่างชัดเจนจากแบคทีเรียกรดแล็กติกที่มีรูปร่างกลมชนิดอื่น ๆ ในสกุล *Aerococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Leuconostoc*, *Oneococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Weissella* และ *Tetragenococcus* คือสกุล *Enterococcus* ไม่มีการจัดวางเรียงเซลล์ต่อกันเป็น 4 เซลล์ สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส รวมถึงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรดต่าง 4.4 และ 9.6 ในขณะที่ *Tetragenococcus*, *Pediococcus* และ *Aerococcus* มีการจัดวางเรียงเซลล์ต่อกันเป็น 4 เซลล์ ส่วน *Aerococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Leuconostoc*, *Oneococcus*, *Tetragenococcus* และ *Weissella* ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Leuconostoc*, *Oneococcus*, *Streptococcus*, *Weissella* และ *Pediococcus* ไม่สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรดต่าง 9.6 ได้

ในการทดลองนี้สามารถคัดแยก *Enterococcus* สายพันธุ์ MGM30-8.22 ได้จากตัวอย่างอวัยวะของระบบทางเดินอาหารของปลาทองโคเม็ต (*Carassius auratus* สายพันธุ์ comet) ซึ่งพบว่า มีรายงานที่สามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกในสกุลดังกล่าวได้จากตัวอย่างสัตว์น้ำ เช่น สามารถคัดแยก *Enterococcus* sp. จากปลา brown trout (Gonzalez *et al.*, 2000) *E. faecalis* จากปลาในประเทศไอซ์แลนด์ (Iceland) (Nilsen *et al.*, 2003) *E. faecium* จากกุ้งก้ามกราม (พวงเพ็ญ และคณะ, 2543) สามารถคัดแยก *E. durans*, *E. faecium* และ *E. avium* จากปลา *Prochilodus argenteus* Agassiz (Silva *et al.*, 2005) นอกจากนี้ยังสามารถคัดแยก *E. casseliflavus*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. mundtii* และ *E. raffinosus* จากตัวอย่างลำไส้ปลาจากฟาร์มปลาในประเทศไทย (Petersen and Dalsgaard, 2003) เป็นต้น ในการศึกษาครั้งนี้แบคทีเรียสายพันธุ์ MGM30-8.22 ที่คัดแยกได้สามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ได้ ในขณะที่เดียวกันได้มีรายงานการศึกษาถึงการคัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์โดยเฉพาะแบคทีเรียโอซินได้จากตัวอย่างสัตว์น้ำ เช่น carnocin U149 ผลิตจาก *Carnobacterium* sp. (Stoffels *et al.*, 1992b) enterolysin A ผลิตจาก *E. faecalis* (Nilsen *et al.*, 2003) แบคทีเรียโอซินที่ผลิตจาก *Lc. lactis*, *E. faecium* และ *E. mundtii* คัดแยกได้จากปลา turbot (*Psetta maxima*) (Campos *et al.*, 2006) นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ที่สามารถสร้างแบคทีเรียโอซินซึ่งคัดแยกได้จากตัวอย่างสัตว์น้ำ เช่น *Vibrio* sp. คัดแยกได้จากปลา spotnape ponyfish (*Leiognathus nuchalis*) (Sugita *et al.*, 1997) *Bacillus* sp. คัดแยกได้จากปลาแถบชายฝั่งประเทศญี่ปุ่น (Sugita *et al.*, 1998) *Bacillus licheniformis* คัดแยกได้จากปลา *Leporinus* sp. (Cladera-Olivera *et al.*, 2004) เป็นต้น

3.2 การจัดจำแนกในระดับชนิด (species)

จากการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ MGM30-8.22 โดยใช้ชุดทดสอบทางชีวเคมีสำเร็จรูปแบบ API 20 Strep (bioMerieux) ซึ่งเหมาะสมสำหรับการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียในสกุล *Enterococcus* พบว่าได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 11 โดยเมื่อนำผลที่ได้จากการสร้างและย่อยสลายสารชนิดต่าง ๆ ในชุดทดสอบ ไปผ่านการประมวลผลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูปที่ใช้สำหรับชุดจำแนก API 20 Strep พบว่าแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ MGM30-8.22 ถูกจัดจำแนกเป็น *Enterococcus avium* ที่ระดับความถูกต้องของการจัดจำแนก (% of identification) 90.6 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นผลการจัดจำแนกที่ยังไม่อยู่ในระดับที่น่าเชื่อถือ ดังนั้นจึงต้องนำผลการจัดจำแนกโดยใช้ลำดับเบสของ 16S rDNA มาเพื่อประกอบการพิจารณาด้วย

ตารางที่ 11 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ MGM30-8.22 ด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป API 20 Strep

API 20 Strep (bioMerieux)	สายพันธุ์ MGM30-8.22	Manero and Blanch (1999)	
		<i>E. avium</i>	<i>E. raffinosus</i>
Voges-Proskauer	+ve	d	d
Hippurate hydrolysis	+ve	d	d
Esculin hydrolysis	+ve	+ve	+ve
Pyrrolidonyl aminopeptidase	+ve	+ve	+ve
α -Galactosidase	-ve	-ve	d
β -Glucuronidase	-ve	-ve	-ve
β -Galactosidase	-ve	d	-ve
Alkaline phosphatase	-ve	-ve	-ve
Leucine arylamidase	-ve	+ve	+ve
Arginine dihydrolase	-ve	-ve	-ve
Ribose	+ve	+ve	+ve
Arabinose	+ve	+ve	+ve
Mannitol	+ve	+ve	+ve
Sorbitol	+ve	+ve	+ve
Lactose	+ve	+ve	+ve
Trehalose	+ve	+ve	+ve
Inulin	-ve	d	-ve
D-Raffinose	+ve	-ve	+ve
Hydrolyse amidon	-ve	-ve	V
Glycogen	-ve	-ve	-ve
β -haemolysis	-ve	-ve	-ve

-ve = การทดสอบเป็นลบ

+ve = การทดสอบเป็นบวก

d = ผลการทดสอบขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ที่นำมาทดลอง V = ให้ผลทดสอบเป็นบวกระหว่าง 26-47%

3.3 การยืนยันผลการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ MGM30-8.22 โดยการศึกษาลำดับเบสของ 16S rDNA แล้วนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล 16S rDNA ของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ที่ได้เคยมีการศึกษากันมาแล้ว โดยใช้ฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information (NCBI), National Institutes of Health ประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่าลำดับเบสบน 16S rDNA ของแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ MGM30-8.22 ที่สามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ซึ่งคัดเลือกได้มีความเหมือน (homology) กับ *E. avium* และ *E. raffinosus* ถึง 99 เปอร์เซ็นต์ แต่จากการเปรียบเทียบผลการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่าทั้ง 2 สายพันธุ์ให้ผลการทดลองที่ใกล้เคียงกันมาก ยกเว้นการใช้น้ำตาล raffinose โดยพบว่า *E. avium* ไม่สามารถใช้น้ำตาล raffinose ได้ ในขณะที่ *E. raffinosus* สามารถใช้น้ำตาลดังกล่าวได้ (Manero and Blanch, 1999) ซึ่งจากผลการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ MGM30-8.22 พบว่าสามารถใช้น้ำตาล raffinose ได้ จึงจัดจำแนกและกำหนดชื่อสายพันธุ์ของแบคทีเรียดังกล่าวว่า *E. raffinosus* MGM30-8.22

มีรายงานถึงการคัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ *E. raffinosus* ได้จากแหล่งตัวอย่างอื่น ๆ เช่น ปุ๋ยและน้ำจากสระว่ายน้ำ (Pinto *et al.*, 1999) ตัวอย่างเลือดของหมูจากโรงงานฆ่าสัตว์ โดย *E. raffinosus* ที่คัดแยกได้สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus*, *Pseudomonas fluorescens* และ *Bacillus* sp. ได้ (Davila *et al.*, 2006) นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบ *E. raffinosus* จากตัวอย่างน้ำจากโรงอาบน้ำ (Arvanitidou *et al.*, 2001) จากตัวอย่างอาหาร เช่น นมดิบ (Citak *et al.*, 2005) อีกทั้งมีการประยุกต์ใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวเป็นกล้าเชื้อในการผลิต Armada cheese ในประเทศสเปน (Herrerola *et al.*, 2007) อีกด้วย

4. การศึกษาคุณสมบัติของสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่สร้างจาก *E. raffinosus* MGM30-8.22

4.1 การทนต่อเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ

จากการนำสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบที่สร้างจาก *E. raffinosus* MGM30-8.22 ไปย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ พบว่าได้ผลดังแสดงในตารางที่ 12 โดยเอนไซม์ย่อยโปรตีน ได้แก่ เอนไซม์เปปซิน ทริปซิน อัลฟา-ไคโมทริปซิน และโปรติเนส เค สามารถลดค่ากิจกรรมของสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเอนไซม์ที่ไม่

สามารถย่อยโปรตีนได้ ได้แก่ เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ไลเปสและไลโซไซม์ ไม่สามารถลดค่ากิจกรรมของสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้

จากผลการทดลองที่ได้เป็นการยืนยันได้ว่าสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบที่สร้างจาก *E. raffinosus* MGM30-8.22 เป็นสารที่มีคุณสมบัติเป็นโปรตีน เนื่องจากว่าสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบดังกล่าวถูกทำลายด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ใช้ในการทดลอง ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวจัดเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของแบคทีเรียโอซิน (De Vuyst and Vandamme, 1994) ประกอบกับในการทดลองมีการปรับค่าความเป็นกรดต่างของน้ำเลี้ยงเชื้อให้มีสภาวะเป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ก่อนนำมาทดสอบกิจกรรมในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ จึงเป็นการยืนยันได้ว่าผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบไม่ได้เกิดจากอิทธิพลของกรด แต่เกิดจากสารที่มีคุณสมบัติเป็นโปรตีน ซึ่งอาจเรียกว่าสารในกลุ่มแบคทีเรียโอซินนั่นเอง ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานที่พบว่าแบคทีเรียโอซินถูกทำลายด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน เช่น แบคทีเรียโอซินที่ผลิตจาก *E. faecium* และ *E. faecalis* ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน papain, pepsin, pronase, proteinase K และ trypsin แต่ไม่ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ catalase, lipase และ lysozyme (Du Toit *et al.*, 2000) แบคทีเรียโอซินที่ผลิตจาก *Lb. plantarum* ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน proteinase K, pronase, papain, trypsin และ pepsin แต่ไม่ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ catalase และ α -amylase (Todorov *et al.*, 2007) หรือแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจาก *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MM19 และ *Pediococcus acidilactici* MM33 ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน pronase E, proteinase K, pepsin, trypsin และ α -chymotrypsin แต่ไม่ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ catalase และ lipase (Millette *et al.*, 2007)

ตารางที่ 12 ผลของเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ต่อกิจกรรมของสารยับยั้งจุลินทรีย์ในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีสถานะเป็นกลางและปลอดเชื้อของ *E. raffinosus* MGM30-8.22

เอนไซม์	ค่ากิจกรรมของสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่เหลือ (AU ml ⁻¹) ^a
ชุดควบคุม (control)	400
เปปซิน (pepsin)	0
อัลฟา-ไคโมทริปซิน (α -chymotrypsin)	0
โปรติเนส เค (proteinase K)	0
ทริปซิน (trypsin)	0
อัลฟา-อะไมเลส (α -amylase)	400
ไลเปส (lipase)	400
ไลโซไซม์ (lysozyme)	400

^a ค่ากิจกรรมที่เหลือของสารยับยั้งจุลินทรีย์ซึ่งวัดด้วยวิธี critical dilution method และใช้ *E. faecium* JCM 5804 เป็นแบคทีเรียทดสอบ

4.2 การทนต่อความร้อน

จากการทดลองนำแบคทีเรียโอซินที่สร้างจาก *E. raffinosus* MGM30-8.22 ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่าง ๆ และที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที พบว่าได้ผลดังแสดงในตารางที่ 13 โดยค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินลดลงไปจากเดิมหลังผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส โดยเมื่อให้ความร้อนนาน 5 และ 10 นาที ค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินยังคงเหลืออยู่ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อให้ความร้อนนาน 20, 30 และ 40 นาที ยังคงมีกิจกรรมของแบคทีเรียโอซินเหลืออยู่ 25 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อให้ความร้อนเป็นเวลา 50 และ 60 นาที ยังคงมีกิจกรรมของแบคทีเรียโอซินเหลืออยู่ 12.5 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่าการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ไม่สามารถทำลายกิจกรรมของแบคทีเรียโอซินให้หมดไปได้แต่สามารถลดค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินลงเหลือ 25 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 13 ผลของการให้ความร้อนต่อกิจกรรมของแบคทีเรียโอซินในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีสถานะเป็นกลางและปลดเชื้อของ *E. raffinosus* MGM30-8.22

สถานะการทดลอง	ค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซิน (AU ml ⁻¹) ^a
ชุดควบคุม	800
5 นาที ที่ 100 °C	400
10 นาที ที่ 100 °C	400
20 นาที ที่ 100 °C	200
30 นาที ที่ 100 °C	200
40 นาที ที่ 100 °C	200
50 นาที ที่ 100 °C	100
60 นาที ที่ 100 °C	100
15 นาที ที่ 121 °C	200

^a ค่ากิจกรรมที่เหลือของแบคทีเรียโอซินซึ่งวัดด้วยวิธี critical dilution method และใช้ *E. faecium* JCM 5804 เป็นแบคทีเรียทดสอบ

การที่แบคทีเรียโอซินซึ่งสร้างจาก *E. raffinosus* MGM30-8.22 ยังคงมีกิจกรรมเหลืออยู่หลังผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 และ 121 องศาเซลเซียส แสดงว่าแบคทีเรียโอซินดังกล่าวมีคุณสมบัติทนความร้อนในระดับหนึ่ง ซึ่งเป็นคุณสมบัติสำคัญที่ใช้ในการจัดกลุ่มของแบคทีเรียโอซินร่วมกับคุณสมบัติด้านอื่น ๆ นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียโอซินที่มีคุณสมบัติทนต่อความร้อนที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแล็กติกอื่น ๆ อีก เช่น แบคทีเรียโอซิน bacST8KF ที่ผลิตจาก *Lb. plantarum* ST8KF ทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีและที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที (Powell *et al.*, 2007) acidocin D20079 ที่ผลิตจาก *Lb. acidophilus* DSM 20079 ทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (Deraz *et al.*, 2005) leucocin OZ ที่ผลิตจาก *Ln. carnosum* OZ ทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (Osmanagaoglu, 2007) แบคทีเรียโอซินที่ผลิตจาก *E. mundtii* ST15 ทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที แต่แบคทีเรียโอซินดังกล่าวไม่สามารถทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาทีได้ (De Kwaadsteniet

et al., 2005) enterocin RJ-11 ผลิตจาก *E. faecalis* RJ-11 ทนต่อความร้อนได้ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 และ 30 นาที (Yamamoto *et al.*, 2003) เป็นต้น

คุณสมบัติในการทนต่อความร้อนของแบคทีเรียโอซินนอกจากจะขึ้นอยู่กับจำนวน และชนิดของกรดอะมิโน เช่น การมีกรดอะมิโนไกลซีนปริมาณมากภายในโมเลกุลดังที่พบใน diplococcin, lactacin F, lactocin 27 การมีลักษณะโครงสร้างของโมเลกุลที่แข็งแรง เช่น การมีโครงสร้างที่เป็นทรงกลม การมีพันธะที่แข็งแรงระหว่างกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำภายใน โมเลกุลดังที่พบใน nisin, lactococcin A รวมถึงการมีพันธะไดซัลไฟด์ที่เกิดจากกรดอะมิโนที่มี ซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบภายใน โมเลกุลดังที่พบใน nisin, lactocin S แล้วยังขึ้นอยู่กับปัจจัย ภายนอกอีกหลายประการ เช่น ค่าความเป็นกรดและองค์ประกอบของสารละลาย เป็นต้น (Liu and Hansen 1990; De Vuyst and Vandamme, 1994) โดยคุณลักษณะในการทนต่อความร้อน ของแบคทีเรียโอซินถือเป็นข้อได้เปรียบในการนำแบคทีเรียโอซินดังกล่าวไปประยุกต์ใช้งานกับ อาหาร การผลิตอาหารสัตว์น้ำ หรือผลิตภัณฑ์ที่ต้องนำไปแปรรูปด้วยกระบวนการให้ความร้อน รวมถึงการทำแบคทีเรียโอซินดังกล่าวให้อยู่ในลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่สะดวกในการใช้งานและ การเก็บรักษา เช่น การทำแห้งในลักษณะต่าง ๆ เป็นต้น

4.3 การศึกษาความคงตัวของแบคทีเรียโอซินภายใต้สภาวะที่มีค่าความเป็นกรดต่าง ๆ

จากผลการทดลองที่แสดงในตารางที่ 14 พบว่าในสภาวะที่มีอุณหภูมิต่ำ (4 องศาเซลเซียส) แบคทีเรียโอซินที่สร้างจาก *E. raffinosus* MGM30-8.22 ภายใต้การเก็บรักษาใน สภาวะที่มีค่าความเป็นกรดต่างระหว่าง 2.0–11.0 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะมีกิจกรรมอยู่ที่ระดับต่าง ๆ โดยแบคทีเรียโอซินมีความคงตัวสูงสุดในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรดต่าง 6.0 และ 7.0 ซึ่ง ความคงตัวจะลดลงที่ค่าความเป็นกรดต่างสูงหรือต่ำกว่า 6.0 และ 7.0 โดยความคงตัวของ แบคทีเรียโอซินจะน้อยที่สุดเมื่อแบคทีเรียโอซินถูกเก็บรักษาไว้ที่ค่าความเป็นกรดต่างระหว่าง 8.0–11.0 ส่วนการคงตัวต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีค่าความเป็น กรดต่างต่าง ๆ พบว่าแบคทีเรียโอซินที่สร้างจาก *E. raffinosus* MGM30-8.22 มีความคงตัวต่อความ ร้อนได้ดีที่สุดภายใต้ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.0 และความคงตัวจะลดลงเมื่อค่าความเป็นกรดต่าง สูงหรือต่ำกว่า 7.0 โดยความคงตัวของแบคทีเรียโอซินจะสูญเสียกิจกรรมหมดไปที่ค่าความเป็น กรดต่างระหว่าง 10.0-11.0

ตารางที่ 14 การคงตัวของแบคทีเรียโอซินที่สร้างจาก *E. raffinosus* MGM30-8.22 ภายใต้สภาวะที่มีค่าความเป็นกรดต่าง ๆ

pH	ค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินที่เหลือ (AU ml ⁻¹) ^a	
	4 °C นาน 24 ชั่วโมง	100 °C นาน 60 นาที
2.0	200	100
3.0	200	100
4.0	200	100
5.0	200	100
6.0	400	200
7.0	400	400
8.0	100	200
9.0	100	100
10.0	100	0
11.0	100	0

^aค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินที่เหลือซึ่งวัดด้วยวิธี critical dilution method และใช้ *E. faecium* JCM 5804 เป็นแบคทีเรียทดสอบ

จากผลการทดลองในตารางที่ 14 พบว่าแบคทีเรียโอซินที่สร้างจาก *E. raffinosus* MGM30-8.22 มีความคงตัวสูงสุดในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรดต่าง 6.0 และ 7.0 ภายใต้การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงนั้นพบว่า สอดคล้องกับ enterocin 900 ที่สร้างจาก *E. faecium* BFE 900 ซึ่งมีความคงตัวได้ดีที่สุดในสภาวะค่าความเป็นกรดต่าง 6.0 หลังจากเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Franz *et al.*, 1996) ส่วนการทดลองที่พบว่าแบคทีเรียโอซินที่สร้างจาก *E. raffinosus* MGM30-8.22 มีความคงตัวสูงสุดในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรดต่าง 7.0 เมื่อนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และสูญเสียกิจกรรมของแบคทีเรียโอซินไปจำนวนมากในสภาพที่เป็นด่างนั้น สอดคล้องกับ lacticin 481 ที่สร้างจาก *Lc. lactis* subsp. *lactis* CNRZ 481 พบว่าค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินจะไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ภายใต้สภาวะที่มีค่าความเป็นกรดต่าง 4.5 หรือ 7.0 (Piard, 1994) สำหรับการสูญเสียกิจกรรมของ

แบคทีเรียโอซินไปจำนวนมากนั้นในสภาพที่เป็นด่างนั้น สอดคล้องกับแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจาก *Lb. gasseri* KT7 ภายใต้สภาวะค่าความเป็นกรดต่าง 10 พบว่าค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินลดลง 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (Zhu *et al.*, 2000) นอกจากนี้ enterocin ON-157 ที่ผลิตจาก *E. faecium* NIAI 157 ภายใต้สภาวะที่มีค่าความเป็นกรดต่าง 8 พบว่าค่ากิจกรรมของ enterocin ON-157 ลดลง 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที (Ohmomo *et al.*, 2000)

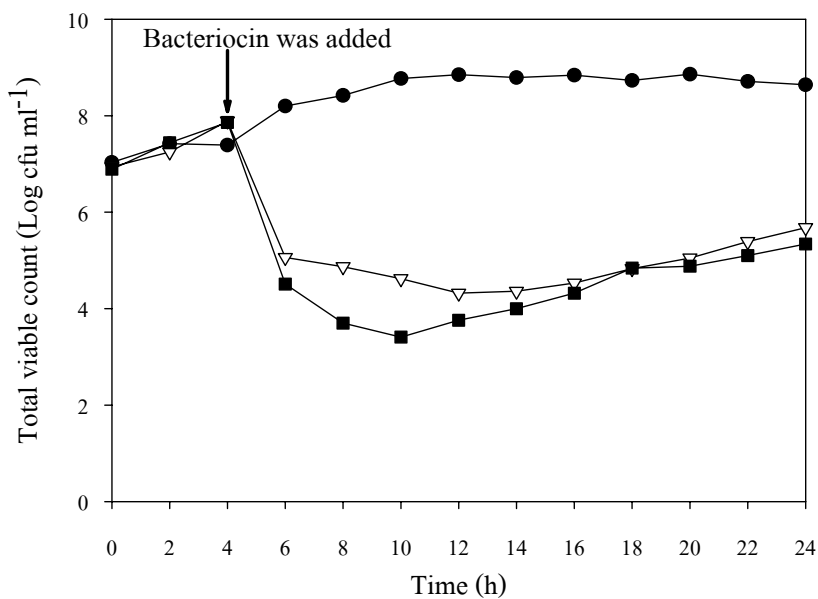
การคงตัวของแบคทีเรียโอซินในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรดต่าง ๆ นั้น อาจเกิดจากการที่แบคทีเรียโอซินมีจำนวนและชนิดของกรดอะมิโน รวมถึงโครงสร้างของโมเลกุลที่แตกต่างกันหรืออาจเกิดจากค่าความเป็นกรดต่างของสารละลายหรือตัวกลางที่แบคทีเรียโอซินผสมอยู่ การคงตัวได้น้อยที่สภาวะเป็นกรดหรือด่างนั้น อาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลของแบคทีเรียโอซินให้อยู่ในลักษณะซึ่งไม่มีกิจกรรมและเป็นการเปลี่ยนแปลงแบบที่ไม่สามารถกลับสู่สภาพเดิมได้ (พงษ์เทพ, 2546; De Vuyst and Vandamme, 1994)

4.4 รูปแบบกิจกรรม (mode of action) ของแบคทีเรียโอซินที่สร้างจาก *E. raffinosus* MGM30-8.22 ในการยับยั้งการเจริญของ *E. faecium* JCM 5804

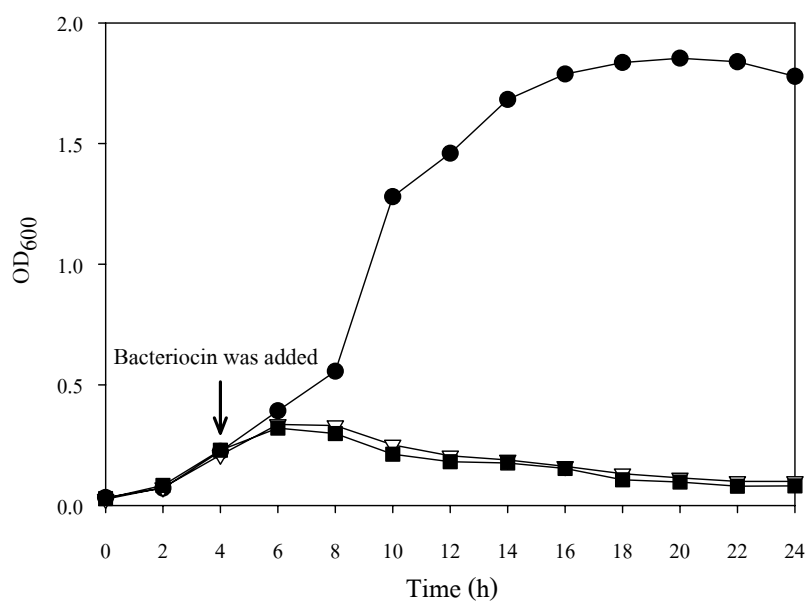
การศึกษารูปแบบในการยับยั้งการเจริญของ *E. faecium* JCM 5804 โดยแบคทีเรียโอซินที่สร้างจาก *E. raffinosus* MGM30-8.22 ซึ่งเติมสารดังกล่าวลงไปในการเลี้ยงเชื้อที่มี *E. faecium* JCM 5804 เจริญอยู่ ได้ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 6 โดยในการเลี้ยงเชื้อที่มีแบคทีเรียโอซินผสมอยู่ 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จำนวนเซลล์ของ *E. faecium* JCM 5804 จะลดลงอย่างช้า ๆ จากจำนวนที่ 7.85×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงมาเหลือ 2.15×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ภายในระยะเวลา 8 ชั่วโมง หลังจากที่ได้เติมแบคทีเรียโอซิน ส่วนในสภาวะที่มีแบคทีเรียโอซินผสมอยู่ 200 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จำนวนเซลล์ของ *E. faecium* JCM 5804 จะลดลงจาก 7.25×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงมาเหลือ 2.60×10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ภายในระยะเวลา 6 ชั่วโมง หลังจากที่ได้เติมแบคทีเรียโอซิน (ดังแสดงในภาพที่ 6A) ในขณะที่ชุดควบคุมซึ่งไม่มีแบคทีเรียโอซินผสมอยู่ จำนวนเซลล์ของ *E. faecium* JCM 5804 เพิ่มขึ้นจาก 1.06×10^7 ไปเป็น 4.35×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมงที่ทำการศึกษา ส่วนค่าความขุ่น (OD_{600}) ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแบคทีเรียโอซินผสมอยู่ 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 200 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในทั้ง 2 สภาวะพบว่า

ค่าความขุ่น (OD_{600}) ลดลงจาก 0.3 เหลือประมาณ 0.1 หลังจากเติมแบคทีเรียโอซิน ในขณะที่ชุดควบคุมซึ่งไม่มีแบคทีเรียโอซินผสมอยู่ ค่าความขุ่น (OD_{600}) ของอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้นจาก 0.03 ไปเป็น 1.80 (ดังแสดงในภาพที่ 6B) ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมงที่ทำการศึกษา

จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียโอซินที่สร้างจาก *E. raffinosus* MGM30-8.22 มีรูปแบบปฏิกิริยาในการยับยั้งการเจริญของ *E. faecium* JCM 5804 แบบการฆ่าทำลายเซลล์ (bactericidal) ในทั้งสองความเข้มข้นที่เลือกใช้ ซึ่งมีรายงานถึงการศึกษารูปแบบกิจกรรมของแบคทีเรียโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแล็กติกอีกหลายสายพันธุ์ที่มีการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเป้าหมายแบบการฆ่าทำลายเซลล์ เช่น leucocin OZ ที่ผลิตจาก *Ln. carnosum* OZ (Osmanagaoglu, 2007) lactococcin MMT24 ที่ผลิตจาก *Lc. lactis* MMT24 (Ghraiiri *et al.*, 2005) bovicin HC5 ที่ผลิตจาก *Streptococcus bovis* HC5 (Mantovani and Russell, 2003) แบคทีเรียโอซินที่ผลิตจาก *Lactobacillus paracasei* HL32 (Pangsomboon *et al.*, 2006) เป็นต้น



(A) จำนวนเซลล์ของ *E. faecium* JCM 5804 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแบคทีริโอซิน



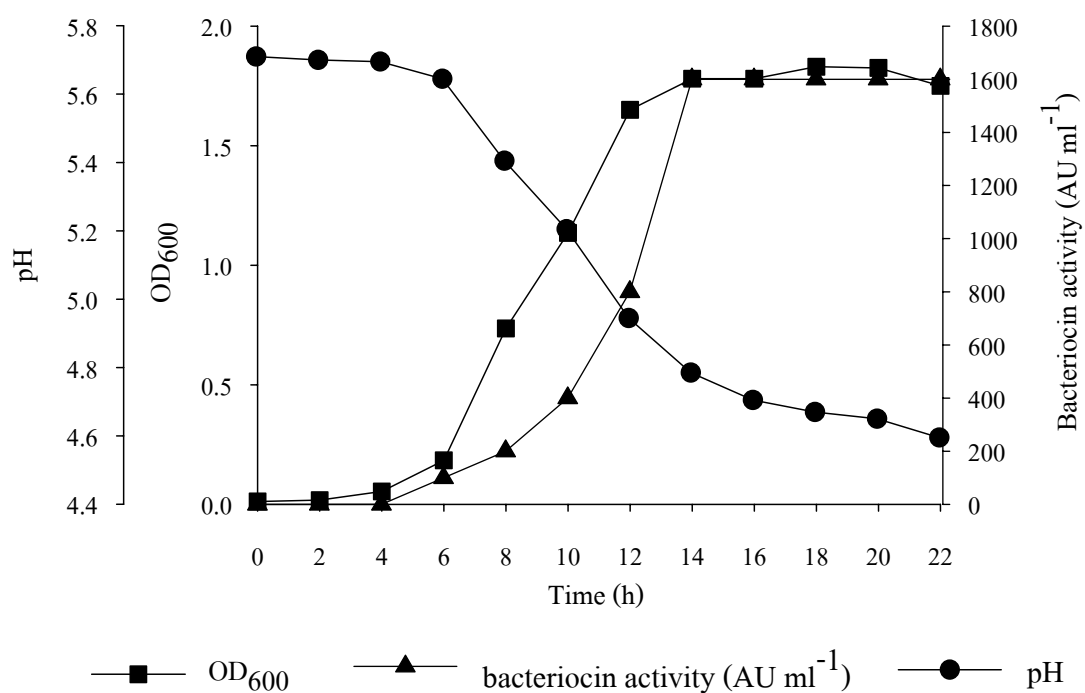
(B) การเจริญ (OD₆₀₀) ของ *E. faecium* JCM 5804 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแบคทีริโอซิน

● = ไม่เติมแบคทีริโอซิน (control) ▽ = เติมแบคทีริโอซิน 100 AU ml⁻¹
 ■ = เติมแบคทีริโอซิน 200 AU ml⁻¹

ภาพที่ 6 ผลการยับยั้งการเจริญของ *E. faecium* JCM 5804 แบบการฆ่าทำลายเซลล์ (bactericidal) ของแบคทีริโอซินที่สร้างจาก *E. raffinosus* MGM30-8.22

4.5 การศึกษาการเจริญและการสร้างแบคทีเรียโอซินในสภาวะที่กำหนด

จากผลการศึกษาการเจริญและการสร้างแบคทีเรียโอซินของ *E. raffinosus* MGM30-8.22 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่มีค่าความเป็นกรด่างเริ่มต้น 5.71 และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าได้ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 7 โดยค่าความเป็นกรด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ลดลงจาก 5.71 เป็น 4.60 เมื่อเวลาของการบ่มเชื้อผ่านไป 22 ชั่วโมง โดย *E. raffinosus* MGM30-8.22 จะมีระยะพักตัว (lag phase) ประมาณ 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะเพิ่มปริมาณขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะ log และเข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) โดยมีค่าความขุ่น (OD_{600}) สูงสุดเท่ากับ 1.83 เมื่อเวลาบ่มเชื้อผ่านไป 18 ชั่วโมง ส่วนการสร้างแบคทีเรียโอซิน พบว่าค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ทำให้มีสภาวะเป็นกลางและปลอดเชื้อ จะเพิ่มขึ้นตามการเจริญของ *E. raffinosus* MGM30-8.22 ที่เพิ่มขึ้น โดยมีค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินสูงสุด 1,600 หน่วยต่อมิลลิเมตร เมื่อบ่มเชื้อเป็นเวลา 14 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงเริ่มต้นการเจริญของเซลล์ในระยะคงที่และคงอยู่ในระดับดังกล่าวจนกระทั่งครบ 22 ชั่วโมงของระยะเวลาการบ่มเชื้อ แสดงให้เห็นว่าการสร้างแบคทีเรียโอซินของ *E. raffinosus* MGM30-8.22 เป็นแบบที่มีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเจริญของเซลล์ (primary metabolite production) นอกจากนี้ยังพบการสร้างแบคทีเรียโอซินแบบที่มีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเจริญของเซลล์ในแบคทีเรียกรดแล็กติกอีกหลายชนิด เช่น plantaricin TF711 ที่ผลิตจาก *Lb. plantarum* TF711 (Hernandez *et al.*, 2005) enterocin A ที่ผลิตจาก *E. faecium* FAIR-E 406 (Van der Berghe *et al.*, 2006) bacteriocin ST13BR ที่ผลิตจาก *Lb. plantarum* ST13BR (Todorov *et al.*, 2004) และ acidophilin 801 ที่ผลิตจาก *Lb. acidophilus* IBB 801 (Zamfir *et al.*, 2000) เป็นต้น ในทางตรงกันข้ามพบว่าแบคทีเรียกรดแล็กติกบางชนิดที่มีการสร้างแบคทีเรียโอซินในแบบที่ไม่มีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเจริญของเซลล์ (secondary metabolite production) โดยจะเริ่มมีการสร้างแบคทีเรียโอซินเมื่อเซลล์เจริญอยู่ในระยะคงที่ เช่น bacteriocin ST8KF ที่ผลิตจาก *Lb. plantarum* ST8KF (Powell *et al.*, 2007) gassericin KT17 ที่ผลิตจาก *Lb. gasseri* KT17 (Zhu *et al.*, 2000) bacteriocin ST28MS และ ST26MS ที่ผลิตจาก *Lb. plantarum* (Todorov and Dicks, 2005) เป็นต้น



ภาพที่ 7 การเจริญ (OD₆₀₀) และค่าความเป็นกรดค้างของอาหารเลี้ยงเชื้อรวมถึงการสร้างแบคทีเรียโอซินของ *E. raffinosus* MGM30-8.22 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

5. การศึกษาคุณสมบัติในการเป็นโปรไบโอติกด้านการทนต่อสภาวะภายในระบบทางเดินอาหารของปลาสมองของ *E. raffinosus* MGM30-8.22

การคัดเลือกแบคทีเรียเพื่อใช้เป็นโปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำนั้นควรคัดเลือกแบคทีเรียมาจากแหล่งตัวอย่างสัตว์น้ำที่จะนำโปรไบโอติกไปใช้ อีกทั้งต้องคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เมื่อเข้าสู่ปากและระบบทางเดินอาหารแล้วจะต้องรอดชีวิตและเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ เช่น ในกระเพาะอาหารต้องสามารถทนต่อสภาวะความเป็นกรด ส่วนบริเวณลำไส้แบคทีเรียต้องสามารถทนต่อเกลือแร่และสามารถเจริญแข่งขันกับแบคทีเรียก่อโรคหรือสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้ นอกจากนี้ยังต้องสามารถยึดเกาะกับเยื่อของอวัยวะต่าง ๆ ได้ เช่น เยื่อบุลำไส้ เป็นต้น อีกทั้งการนำโปรไบโอติกไปใช้ในการเพาะเลี้ยงปลาต้องใช้ร่วมกับอาหารปลาดังนั้นแบคทีเรียดังกล่าวต้องสามารถทนต่อสภาวะในกระบวนการผลิตอาหารปลาหรือส่วนผสมของอาหารปลาที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียที่ใช้เป็นโปรไบโอติก เช่น เกลือ สารปฏิชีวนะ เป็นต้น (วลัยพร, 2544; Balcazar *et al.*, 2006) ซึ่งผลการทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นสำหรับการประยุกต์ใช้เป็นโปรไบโอติกของ *E. raffinosus* MGM30-8.22 ได้ผลดังนี้

5.1 การทนต่อโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

จากการศึกษาการทนต่อโซเดียมคลอไรด์ โดยเลี้ยง *E. raffinosus* MGM30-8.22 และแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบด้วยวิธี direct method จำนวน 8 สายพันธุ์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นระหว่าง 1–10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 15 โดยพบว่า *E. raffinosus* MGM30-8.22 สามารถเจริญได้ที่โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นสูงกว่าแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์อื่น ซึ่งสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถเจริญได้ที่โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นระหว่าง 1–7 เปอร์เซ็นต์ โดยค่าความขุ่น (OD_{600}) ของเชื้อลดลงจาก 1.805 เหลือ 0.082 ตามความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เพิ่มขึ้น การที่ *E. raffinosus* MGM30-8.22 สามารถทนต่อโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นสูงสุดที่ 7 เปอร์เซ็นต์ จะเป็นข้อได้เปรียบในการนำแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวไปประยุกต์ใช้งานร่วมกับโซเดียมคลอไรด์ เช่น ในอาหารปลาสมองซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์อยู่ประมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ (ศรีน้อย, 2542) นอกจากนี้การป้องกันหรือรักษาโรคของปลาสมองรวมถึงการลดความเครียดของปลา นิยมใช้โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นระหว่าง 0.5–3.0 เปอร์เซ็นต์ (ธนากร, 2544; กิริ, 2545) ดังนั้นจึงสามารถนำ *E. raffinosus* MGM30-8.22 ไป

ประยุกต์ใช้งานร่วมกับอาหารปลาและโซเดียมคลอไรด์เพื่อส่งเสริมให้ปลาสวยงามมีสุขภาพแข็งแรงขึ้นได้

ตารางที่ 15 การเจริญของ *E. raffinosus* MGM30-8.22 และแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์อื่น ๆ ที่คัดเลือกได้ในอาหาร MRS broth ที่ผสมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้น NaCl (%น้ำหนัก/ปริมาตร)	การเจริญ (OD ₆₀₀)							
	MGM	MG	MG	MG	MGM	MG	HG	HD
	30-8.22 ^a	30-2.5	30-2.8	30-2.15	30-8.5	30-2.2	45-2.1	45-6
0	1.805	1.790	1.825	1.790	1.820	1.860	1.835	1.870
1	1.400	1.405	1.505	1.413	1.648	1.440	1.653	1.675
2	1.335	1.390	1.505	1.398	1.495	1.210	1.560	1.510
3	1.253	1.203	1.278	1.260	1.330	1.195	1.305	1.365
4	1.033	0.988	0.878	1.018	0.768	1.008	0.903	0.905
5	0.590	0.534	0.627	0.556	0.367	0.776	0.412	0.430
6	0.300	0.036	0.021	0.043	0.082	0.389	0.011	0.062
7	0.082	0	0	0	0.016	0.011	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0

^aMGM30-8.22 คือแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ *E. raffinosus* MGM30-8.22

5.2 การทนต่อเกลือน้ำดี (ox-bile salt) และน้ำดีสไปดออกซ์ของปลาช่อน

5.2.1 การทนต่อเกลือน้ำดี

จากการศึกษาการทนต่อเกลือน้ำดี โดยเลี้ยง *E. raffinosus* MGM30-8.22 และแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์อื่น ๆ ที่คัดเลือกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่ผสมเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.1-1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่

16 โดยพบว่า *E. raffinosus* MGM30-8.22 สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นของเกลือแร่สูงกว่าแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์อื่น โดยสามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือแร่ 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าความขุ่น (OD_{600}) เท่ากับ 0.975 และ 0.096 ตามลำดับ ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานของ ทศพร (2547) ซึ่งคัดเลือก *Weissella* sp. จากระบบทางเดินอาหารของปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) และพบว่าสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถทนต่อเกลือแร่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการรอดชีวิตของ *Weissella* sp. ในระบบทางเดินอาหารของปลา โดยแบ่งเป็นชุดการทดลอง 3 ชุด คือ (1) อาหารปลาที่ผสม *Weissella* sp. ความเข้มข้น 10^7 เซลล์ต่อกรัมอาหาร (2) อาหารปลาที่ผสม *Weissella* sp. ความเข้มข้น 10^7 เซลล์ต่อกรัมอาหาร และ (3) อาหารปลาที่ไม่ผสม *Weissella* sp (กลุ่มควบคุม) พบว่า สามารถตรวจพบแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวในลำไส้ของกลุ่มปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารปลาผสม *Weissella* sp. ทั้ง 2 ความเข้มข้น และไม่พบสายพันธุ์ดังกล่าวในลำไส้ของปลากะพงขาวในกลุ่มควบคุม

5.2.2 การทนต่อน้ำดีที่เตรียมจากน้ำดีสดของปลาช่อน

จากการศึกษาการทนต่อน้ำดีสดปลอดเชื้อของปลาช่อน โดยเติม

E. raffinosus MGM30-8.22 และ *S. agalactiae* ลงใน phosphate buffer saline (PBS) ที่ผสมน้ำดีสดปลอดเชื้อความเข้มข้นต่าง ๆ ได้ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 8 โดยพบว่าใน PBS ที่ไม่ผสมน้ำดีสดปลอดเชื้อ จำนวนเซลล์ของ *E. raffinosus* MGM30-8.22 เพิ่มขึ้นจาก 1.65×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ไปเป็น 2.32×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และจำนวนเซลล์ของ *S. agalactiae* เพิ่มขึ้นจาก 1.60×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ไปเป็น 1.33×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 8A) ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง ที่ทำการศึกษา ส่วนใน PBS ที่ผสมน้ำดีสดปลอดเชื้อความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) จำนวนเซลล์ของ *S. agalactiae* จะลดลงอย่างช้า ๆ จาก 1.20×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลดลงมาเหลือน้อยกว่า 10 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 24 ของระยะเวลาที่ทำการศึกษา ในขณะที่จำนวนเซลล์ของ *E. raffinosus* MGM30-8.22 เพิ่มขึ้นจาก 2.39×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ไปเป็น 1.35×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 8B) นอกจากนี้ PBS ที่ผสมน้ำดีสดปลอดเชื้อความเข้มข้น 30 และ 50 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) พบว่าในทั้ง 2 ความเข้มข้น จำนวนเซลล์ของ *S. agalactiae* จะลดลงอย่างรวดเร็วจาก 5.30×10^7 และ 6.20×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงมาเหลือน้อยกว่า 10 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 18 ของระยะเวลาที่ทำการศึกษา ในขณะที่จำนวนเซลล์ของ *E. raffinosus* MGM30-8.22 จะเพิ่มขึ้นจาก 1.20×10^7 และ 1.60×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ไปเป็น 1.92×10^8 และ 8.60×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 8C และ D)

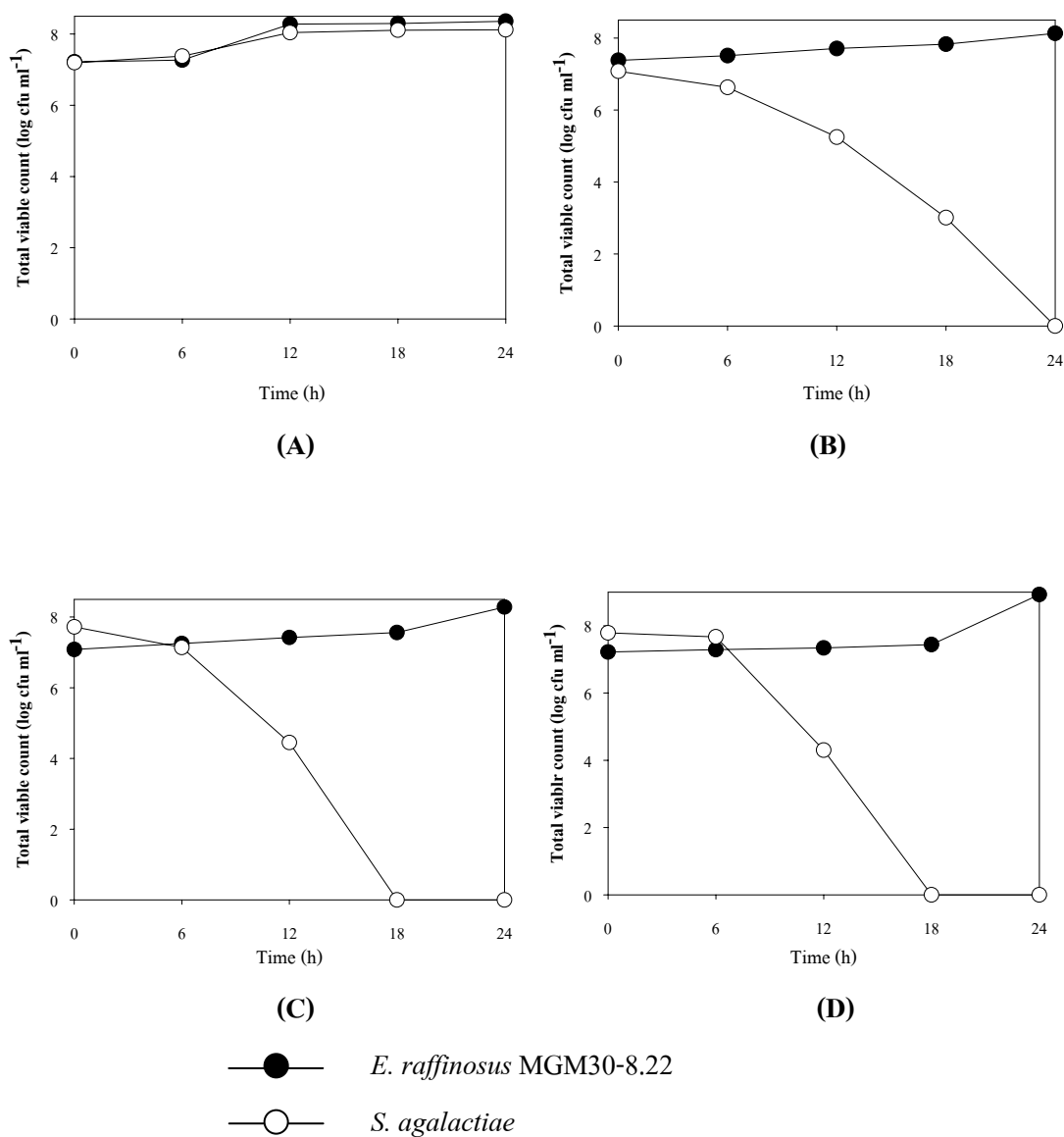
จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า *E. raffinosus* MGM30-8.22 สามารถรอดชีวิตและเจริญได้ใน PBS ที่ผสมน้ำดีสลดตลอดเชื้อความเข้มข้น 10, 30 และ 50 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ในขณะที่ *S. agalactiae* ถูกยับยั้งการเจริญด้วยน้ำดีสลดตลอดเชื้อ แสดงว่าน้ำดีสลดที่ใช้ยังมีคุณสมบัติในการเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่มีความไวต่อสารดังกล่าว

การทนต่อเกลือน้ำดีและน้ำดีสลดเชื้อจากปลาช่อน ของ *E. raffinosus* MGM30-8.22 แสดงว่าสายพันธุ์ดังกล่าวมีแนวโน้มที่จะสามารถรอดชีวิตและเจริญอยู่ภายในลำไส้ของปลาได้ ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญอีกประการหนึ่งของโปรไบโอติกสำหรับการนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

ตารางที่ 16 การเจริญของ *E. raffinosus* MGM30-8.22 และแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์อื่น ๆ ที่คัดเลือกได้ในอาหาร MRS broth ที่ผสมเกลือน้ำดีความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้น เกลือน้ำดี (%น้ำหนัก/ปริมาตร)	การเจริญ (OD ₆₀₀)							
	MGM	MG	MG	MG	MGM	MG	HG	HD
	30-8.22 ^a	30-2.5	30-2.8	30-2.15	30-8.5	30-2.2	45-2.1	45-6
0	1.780	1.735	1.838	1.780	1.682	1.878	1.855	1.853
0.1	0.957	0.131	0.098	0.129	0.322	0.108	0.280	0.638
0.2	0.096	0	0	0	0	0	0	0.035
0.3	0	0	0	0	0	0	0	0
0.4	0	0	0	0	0	0	0	0
0.5	0	0	0	0	0	0	0	0
0.6	0	0	0	0	0	0	0	0
0.7	0	0	0	0	0	0	0	0
0.8	0	0	0	0	0	0	0	0
0.9	0	0	0	0	0	0	0	0
1.0	0	0	0	0	0	0	0	0

^aMGM30-8.22 คือแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ *E. raffinosus* MGM30-8.22



ภาพที่ 8 การเจริญของ *E. raffinosus* MGM30-8.22 และ *S. agalactiae* ใน phosphate buffer saline (PBS) ที่ผสมน้ำดีสคปลดเชื้อของปลาช่อนความเข้มข้นต่าง ๆ

(A) PBS ไม่ผสมน้ำดีสคปลดเชื้อ (ชุดควบคุม)

(B) PBS ที่ผสมน้ำดีสคปลดเชื้อความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร)

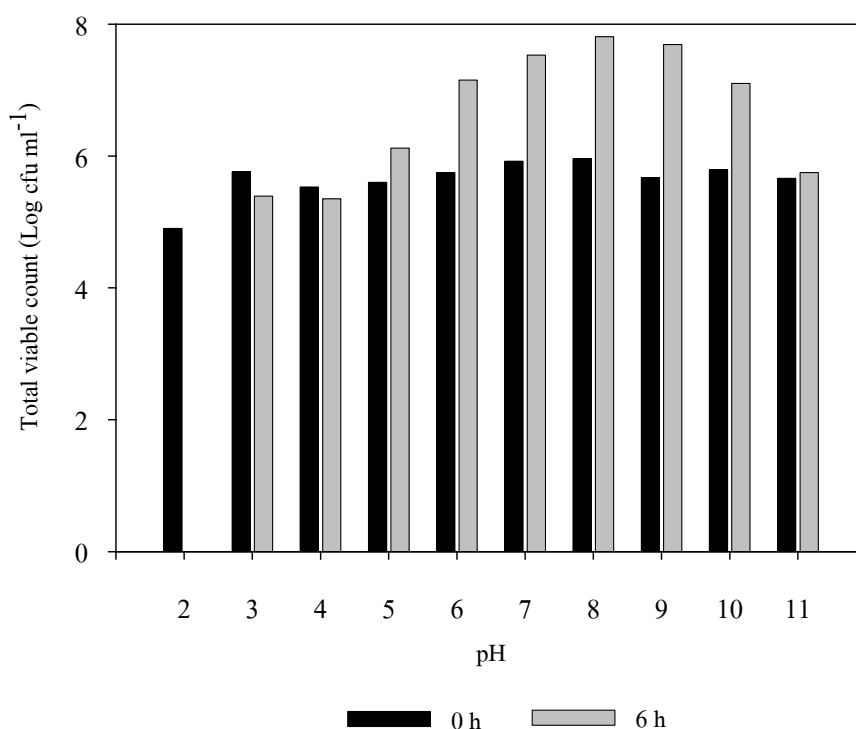
(C) PBS ที่ผสมน้ำดีสคปลดเชื้อความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร)

(D) PBS ที่ผสมน้ำดีสคปลดเชื้อความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร)

5.3 การเจริญที่ความเป็นกรดต่างที่ระดับต่าง ๆ

จากการศึกษาการเจริญของ *E. raffinosus* MGM30-8.22 ที่ค่าความเป็นกรดต่าง ๆ โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่ปรับค่าความเป็นกรดต่างให้เป็น 2 ถึง 11 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์หรือสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 2 นอร์มัล บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการสุมตัวอย่างที่ 0 และ 6 ชั่วโมง เพื่อบันทึกจำนวนของ *E. raffinosus* MGM30-8.22 ด้วยวิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่ผสม 0.5% แคลเซียมคาร์บอเนต ซึ่งผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 9 โดยพบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสภาวะเป็นกรด ซึ่งมีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 2 แบคทีเรียสายพันธุ์ *E. raffinosus* MGM30-8.22 ไม่สามารถรอดชีวิตและเจริญได้หลังจากบ่มเชื้อไปแล้ว 6 ชั่วโมง ในขณะที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 3 และ 4 มีจำนวนของ *E. raffinosus* MGM30-8.22 ที่เวลา 0 ชั่วโมงเท่ากับ 5.76 และ 5.53 log โคโลนีต่อมิลลิเมตร ตามลำดับ และภายหลังจากบ่มเชื้อไป 6 ชั่วโมง จำนวนของ *E. raffinosus* MGM30-8.22 ลดลงเหลือ 5.39 และ 5.35 log โคโลนีต่อมิลลิเมตร ตามลำดับ สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสภาวะเป็นกลางและด่าง พบว่าที่ค่าความเป็นกรดต่างที่ 5 ถึง 10 หลังจากบ่มเชื้อไปแล้ว 6 ชั่วโมง จำนวนของ *E. raffinosus* MGM30-8.22 เพิ่มขึ้นประมาณ 2 log โคโลนีต่อมิลลิเมตร แต่ที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 11 มีจำนวนของ *E. raffinosus* MGM30-8.22 ที่ 0 ชั่วโมง เท่ากับ 5.66 log โคโลนีต่อมิลลิเมตร หลังจากบ่มเชื้อไป 6 ชั่วโมง จำนวนของ *E. raffinosus* MGM30-8.22 เพิ่มขึ้นเล็กน้อยไปเป็น 5.75 log โคโลนีต่อมิลลิเมตร

จากผลการทดลองแสดงว่า *E. raffinosus* MGM30-8.22 สามารถรอดชีวิตภายใต้สภาวะเป็นกรดหรือสภาวะในกระเพาะอาหารของปลา ซึ่งมีค่าความเป็นกรดต่างระหว่าง 2-4 และสามารถรอดชีวิตภายใต้สภาวะเป็นกลางถึงด่างหรือสภาวะในลำไส้ของปลา ซึ่งมีค่าความเป็นกรดต่างระหว่าง 7-11 (Jobling, 1995) โดยคุณสมบัติดังกล่าวเป็นคุณสมบัติที่สำคัญประการหนึ่งของโปรไบโอติกที่ต้องรอดชีวิตและเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ในระบบทางเดินอาหารของปลา (Balcazar *et al.*, 2006)



ภาพที่ 9 การรอดชีวิตของ *E. raffinosus* MGM30-8.22 ที่ระดับค่าความเป็นกรดต่าง ๆ

5.4 ความต้องการก๊าซออกซิเจนสำหรับการเจริญของ *E. raffinosus* MGM30-8.22

จากการศึกษาความต้องการก๊าซออกซิเจนสำหรับการเจริญของ *E. raffinosus* MGM30-8.22 โดยเลี้ยงสายพันธุ์ดังกล่าวในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth และนำไปบ่มภายใต้สภาวะ 3 สภาวะ คือ (1) สภาวะปราศจากออกซิเจน ในตู้บ่มแบบปราศจากก๊าซออกซิเจน (anaerobe incubator) (2) สภาวะการเติมออกซิเจนโดยการเขย่าที่ 100 rpm และ (3) ในสภาวะบรรยากาศปกติ โดยไม่มีการเขย่า พบว่าการบ่มภายใต้สภาวะทั้ง 3 สภาวะ มีค่าความขุ่น (OD_{600}) เท่ากับ 1.80, 1.79 และ 1.73 ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า *E. raffinosus* MGM30-8.22 สามารถเจริญได้ดีทั้งใน 3 สภาวะที่ทำการทดลอง โดยสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถเจริญภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและสภาวะปราศจากออกซิเจนได้ ซึ่งจะเป็นข้อได้เปรียบในการนำ *E. raffinosus* MGM30-8.22 ไปใช้เป็นโปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงปลา เนื่องจากสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถเจริญได้หลากหลายสภาวะและสามารถเจริญได้ในลำไส้ของปลาซึ่งมีสภาวะปราศจากก๊าซออกซิเจน (Jobling, 1995)

5.5 การทดสอบสารปฏิชีวนะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

การทดสอบสารปฏิชีวนะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของ *E. raffinosus* MGM30-8.22 ดังแสดงผลการทดลองในตารางที่ 17 โดยพบว่า *E. raffinosus* MGM30-8.22 สามารถทนต่อสารปฏิชีวนะได้ คือ nalidixic acid, oxolinic acid และ sulphamethoxazole แต่สายพันธุ์ดังกล่าวถูกยับยั้งการเจริญด้วยสารปฏิชีวนะ oxytetracycline, tetracycline และ trimethoprim ซึ่งในปัจจุบันสารปฏิชีวนะที่นิยมใช้ในการรักษาโรคของปลาสวยงาม คือ oxytetracycline และสารปฏิชีวนะในกลุ่ม sulfonamides เช่น sulfamerazine, sulfadimidine, sulphamethoxazole เป็นต้น (ศิริ, 2544) โดยการใช้สารปฏิชีวนะในการรักษาโรคของปลาสวยงามมักจะใช้ผสมกับอาหารปลาในอัตราความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะที่เหมาะสมกับโรคของปลา (ชนากร, 2544) คุณสมบัติการทนต่อสารปฏิชีวนะบางชนิดที่นิยมใช้ในการรักษาโรคในปลาสวยงามของ *E. raffinosus* MGM30-8.22 จะเป็นข้อได้เปรียบในการนำสายพันธุ์ดังกล่าวไปใช้งานร่วมกับสารปฏิชีวนะซึ่งจะเป็นการช่วยส่งเสริมสุขภาพของปลาให้แข็งแรงพร้อมกับรักษาปลาให้หายจากโรคที่เกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็ว

ตารางที่ 17 การทดสอบสารปฏิชีวนะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของ *E. raffinosus* MGM30-8.22

สารปฏิชีวนะ	การยับยั้งการเจริญ (เส้นผ่านศูนย์กลาง; ซม.)
nalidixic acid	-ve
oxolinic acid	-ve
sulphamethoxazole	-ve
oxytetracycline	+ve (1.5)
trimethoprim	+ve (3.0)
tetracycline	+ve (1.0)

-ve = ไม่เกิดบริเวณใสรอบแผ่นสารปฏิชีวนะ

+ve = เกิดบริเวณใสรอบแผ่นสารปฏิชีวนะ

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

จากผลการคัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกในตัวอย่างอวัยวะระบบทางเดินอาหารของปลาชวงม จำนวน 10 ตัวอย่าง พบว่าสามารถคัดแยกได้จำนวน 102 สายพันธุ์ โดยในจำนวนนี้มี 12 สายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เมื่อทดสอบบน modified MRS agar ด้วยวิธี direct method และพบว่ามีเพียง 2 สายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ใน MRS broth เมื่อทดสอบด้วยวิธี spot on lawn method โดยได้คัดเลือกสายพันธุ์ MGM30-8.22 ที่คัดแยกได้จากระบบทางเดินอาหารของปลาทองโคมี่ท (*Carassius auratus* สายพันธุ์ comet) และแสดงค่ากิจกรรมในการยับยั้งการเจริญของ *E. faecium* JCM 5804 สูงกว่าสายพันธุ์อื่น ๆ ไปใช้ในการศึกษาต่อไป

จากผลการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแล็กติก สายพันธุ์ MGM30-8.22 ด้วยชุดจำแนกสำเร็จรูป API 20 Strep ร่วมกับการเปรียบเทียบความเหมือนกันของลำดับเบสของ 16S rDNA พบว่าสายพันธุ์ดังกล่าวถูกจัดจำแนกเป็น *Enterococcus raffinosus* นอกจากนี้ ผลการศึกษาคุณสมบัติของสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่สร้างจาก *E. raffinosus* MGM30-8.22 พบว่า กิจกรรมในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบของสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ได้เกิดจากสารที่มีคุณสมบัติเป็น โปรตีนซึ่งถูกทำลายด้วยเอนไซม์ เปปซิน ทริปซิน อัลฟา-ไคโมทริปซิน และโปรติเนส เค ซึ่งจัดเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของสารยับยั้งจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียโอซิน รวมทั้งมีคุณสมบัติในการทนต่อความร้อนในระดับหนึ่ง เนื่องจากยังคงมีกิจกรรมเหลืออยู่หลังผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที มีความคงตัวสูงสุดที่ค่าความเป็นกรดต่าง 6.0 และ 7.0 เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และที่ค่าความเป็นกรดต่าง 7.0 เมื่อนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที นอกจากนี้แบคทีเรียโอซินดังกล่าวยังแสดงรูปแบบกิจกรรมในการยับยั้งการเจริญของ *E. faecium* JCM 5804 แบบฆ่าทำลายเซลล์ (bactericidal) ส่วนการศึกษาการเจริญและการสร้างแบคทีเรียโอซินของ *E. raffinosus* MGM30-8.22 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth พบว่ามีการสร้างแบคทีเรียโอซินในแบบที่มีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเจริญของเซลล์ (primary metabolite production)

การทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของ *E. raffinosus* MGM30-8.22 สำหรับประยุกต์ใช้เป็นโปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ พบว่าสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถทนต่อโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นระหว่าง 1-7 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ทนต่อสารปฏิชีวนะบางชนิด ได้แก่ nalidixic acid, oxolinic acid และ sulphamethoxazole นอกจากนี้ยังสามารถทนต่อเกลือน้ำดีความเข้มข้น 0.1-0.2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และน้ำดีสดปลอดเชื้อของปลาช่อนความเข้มข้น 10, 30 และ 50 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) สามารถรอดชีวิตหรือเจริญได้ที่ค่าความเป็นกรดต่างระหว่าง 3-11 หลังจากบ่มเชื้อเป็นเวลา 6 ชั่วโมง อีกทั้งยังสามารถเจริญภายใต้สภาวะมีออกซิเจนและปราศจากออกซิเจนได้ แสดงว่า *E. raffinosus* MGM30-8.22 มีแนวโน้มในการรอดชีวิตหรือเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์น้ำ จากคุณสมบัติข้างต้นแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการนำ *E. raffinosus* MGM30-8.22 ไปศึกษาวิจัยและพัฒนาเพื่อประยุกต์ใช้เป็นโปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำหรือปลาสวยงามได้

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาหาสภาวะที่จะช่วยกระตุ้นการเจริญและการสร้างแบคทีเรียโอซินของ *E. raffinosus* MGM30-8.22 ให้มีปริมาณมากเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในด้านการเพาะเลี้ยงปลาสวยงามและการลงทุนในเชิงพาณิชย์
2. ควรมีการศึกษาถึงการนำ *E. raffinosus* MGM30-8.22 ไปประยุกต์ใช้เป็นโปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงปลาสวยงามในระดับห้องปฏิบัติการ

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

ศิริ กอนันตกุล. 2545. โรคของปลาสวยงามน้ำจืด. เอกสารวิชาการฉบับที่ 1/2545. กรมประมง, กรุงเทพฯ.

จินตลา ลิ้มภักดี. 2544. การคัดเลือกและศึกษาลักษณะเฉพาะของแบคทีเรียแล็กติกที่ผลิตสารยับยั้งจุลชีพจากผลิตภัณฑ์ประมงซึ่งแปรรูปโดยกระบวนการหมักและการนำไปใช้ประโยชน์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ทศพร เรืองรักษลิขิต. 2547. แล็กติกแอซิดแบคทีเรียที่ใช้เป็นโพรไบโอติกสำหรับปลากะพงขาว *Lates calcarifer*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ชนากร ฤทธิ์ไธสง. 2544. สายพันธุ์และการเลี้ยงปลาทองเชิงธุรกิจ ฉบับสมบูรณ์. หจก. เพชรกะรัตสดีโอ, กรุงเทพฯ.

พงษ์เทพ วิไลพันธ์. 2546ก. แบคทีเรียโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติกในอุตสาหกรรมอาหาร. *อาหาร*. 33(3): 173-180.

_____. 2546ข. แบคทีเรียโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในปลาร้า. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พวงเพ็ญ สุระนันท์, เปรมสุดา สมาน, ดำรัสศิริ กรายแก้ว, พรสวรรค์ ดิษยบุตร, สรียา สาสนรักกิจ, ประสงค์ บุญส่ง, ไพพวรรณ บุตกะ, จักรพงษ์ ลิ้มปณัสสรณ์, ยมิณ ไช และโยชิมิ เบนโน. 2543. ผลของแล็กติกแอซิดแบคทีเรียชนิดใหม่ต่อการเจริญเติบโตของปลา. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ.

วลัยพร ทิมบุญธรรม. 2544. การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศรีน้อย ชุ่มคำ. 2542. คุณภาพอาหารปลาสวยงามตามระยะเวลาหลังการผลิตในบรรจุภัณฑ์ต่าง
ลักษณะ. คณะเกษตรและอุตสาหกรรม, สถาบันราชภัฏเพชรบุรีวิทยาการฉนวนในพระบรม
ราชูปถัมภ์.

สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ กรมประมง. 2548. มูลค่าการส่งออกปลาสวยงามที่ขอใบรับรอง.
แหล่งที่มา: http://www.fisheries.go.th/aahri/aahri-new/thai/value_total_thF00.htm#t0107.

สนธิ แดงสกุล และ ลีลา เรืองเป็ง. 2541. ประสิทธิภาพของโปรไบโอติกที่ผลิตจาก *Bacillus* เพื่อ
การเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. วารสารกรมประมง. 51(5): 446-456.

Arvanitidou, M., V. Katsouyannopoulos and A. Tsakris. 2001. Antibiotic resistance patterns of
enterococci isolated from coastal bathing water. **J. Med. Microbiol.** 50: 1001-1005.

Axelsson, L. 1998. Lactic acid bacteria : classification and physiology, pp. 1-72. In S. Salminen
and A. Von Wright, eds. **Lactic Acid Bacteria : Microbiology and Functional
Aspects.** Marcel Dekker, Inc., New York.

Balcazar, J.L., I. Blas, I.R. Zarzuela, D. Cunningham, D. Vendrell and L. Muzquia. 2006. The
role of probiotic in aquaculture. **Veter. Microbial.** 114: 173-186.

Ben Embarek, P.K., V.F. Jeppesen and H.H. Huss. 1994. Antibacterial potential of
Enterococcus faecium strain isolated from sous-vide cooked fish fillets. **Food
Microbiol.** 11: 525-536.

Cai, Y., Y. Benno, T. Nakase and T.K. Oh. 1998. Specific probiotic characterization of
Weissella hellenica DS-12 isolated from flounder intestine. **J. Gen. Appl. Microbiol.**
44: 311-316.

- Campos, C.A., O. Rodriguez, P. Calo-Mata, M. Prado and J. Barros-Velazquez. 2006. Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*). **Food Res. Int.** 39: 356–364.
- Citak, S., N. Yucel and A. Mendi. 2005. Antibiotic resistance of enterococcal isolates in raw milk. **J. Food Proc. and Pres.** 29: 183–195.
- Cladera-Olivera, F., G.R. Caron and A. Brandelli. 2004. Bacteriocin-like substance production by *Bacillus licheniformis* strain P40. **Lett. Appl. Microbiol.** 38: 251-256.
- Cleveland, J., T.J. Montville, I.F. Nes and M.L. Chikindas. 2001. Bacteriocins : safe, natural antimicrobial for food preservation. **Int. J. Food Microbiol.** 71: 1-20.
- Daeschel, M.A. 1993. Application and interactions of bacteriocins from lactic acid bacteria in foods and beverages, pp. 63-91. *In* D.G. Hoover and L.R. Steenson, eds. **Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria.** Academic Press, Inc., New York.
- Dalmin, G., K. Kathiresan and A. Purushothaman. 2001. Effect of probiotics on bacteria population and health status of shrimp in culture pond ecosystem. **Indian J. Exp. Biol.** 39: 939-942.
- Davila, E., L.M. Zamora, M. Pla, C. Carretero and D. Pares. 2006. Identification and antagonistic activity of lactic acid bacteria occurring in porcine blood from industrial slaughterhouses - a preliminary study. **Int. J. Food Microbiol.** 107: 207– 211.
- De Kwaadsteniet, M., S.D. Todorov, H. Knoetze and L.M.T. Dicks. 2005. Characterization of a 3944 Da bacteriocin, produced by *Enterococcus mundtii* ST15, with activity against gram-positive and gram-negative bacteria. **Int. J. Food Microbiol.** 105: 433–444.

Delliaglio, F., L.M.T. Dicks and S. Torriani. 1995. The genus *Leuconostoc*, pp. 235-278.

In B.J.B. Wood and W.H. Holzapfel, eds. **The Genera of Lactic Acid Bacteria.**

Chapman and Hall, Glasgow.

Deraz, S.F., E.N. Karlsson, M. Hedstrom, M.M. Andersson and B. Mattiasson. 2005.

Purification and characterization of acidocin D20079, a bacteriocin produced by

Lactobacillus acidophilus DSM 20079. **J. Biotechnol.** 117: 343–354.

De Vuyst, L. and E.J. Vandamme. 1994. **Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria.** Blackie

Academic & Professional, New York.

Du Toit, M., C.M. Franz, L.M. Dicks and W.H. Holza. 2000. Preliminary characterization of

bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from

pig faeces. **J. Appl. Microbiol.** 88: 428-494.

Ennahar, S., T. Sashihara, K. Sonomoto and A. Ishizaki. 2000. Class II a bacteriocins :

biosynthesis, structure and activity. **FEMS Microbiol. Rev.** 24: 85-106.

Field, F.O. 1996. Use of bacteriocins in food: regulatory considerations. **J. Food Prot.**

59: 72-77.

Foulquie Moreno, M.R., P. Sarantinopoulos, E. Tsakalidou and L. De Vuyst. 2006. The role and

application of enterococci in food and health. **Int. J. Food Microbiol.** 106: 1–24.

Franz, C.M.A.P., U. Schillinger and W.H. Holzapfel. 1996. Production and characterization of

enterocin 900, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* BFE 900 from

black olives. **Int. J. Food Microbiol.** 29: 255-270.

Fuller, R. 1989. Probiotic in man and animal. **J. Appl. Bacteriol.** 66: 365-378.

Gatesoupe, F.J. 1999a. The use of probiotics in aquaculture. **Aquaculture**. 180: 147–165.

_____. 1999b. The use of probiotics in aquaculture. **Aquaculture**. 180: 147–165. Cited R.S. Porubcan. 1991. Reduction of ammonia nitrogen and nitrite in tanks of *Penaeus monodon* using floating biofilters containing processed diatomaceous earth media pre-inoculated with nitrifying bacteria. **Program and Abstracts of the 22nd Annual Conference and Exposition World Aquaculture Society**, Puerto Rico.

Ghrai, T., J. Frere, J.M. Berjeaud and M. Manai. 2005. Lactococcin MMT24, a novel two-peptide bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* isolated from rigouta cheese. **Int. J. Food Microbiol.** 105: 389–398.

Gonzalez, C.J., J.P. Encinas, M.L. Garcia-Lopez and A. Otero. 2000. Characterization and identification of lactic acid bacteria from freshwater fishes. **Food Microbiol.** 17: 383-391.

Hagi, T., D. Tanaka, Y. Iwamura and T. Hoshino. 2004. Diversity and seasonal changes in lactic acid bacteria in the intestinal tract of cultured freshwater fish. **Aquaculture**. 234: 335-346.

Hamon, Y. 1988. Bacteriocin, pp. 331-369. In C.M. Hardegree and T.T. Antony, eds. **Handbook of Natural Toxin Vol 4**. Marcel Dekker, New York.

Hardie, J.M. and R.A. Whiley. 1995. The genus of *Streptococcus*, pp. 75-124. In B.J.B. Wood and W.H. Holzapfel, eds. **The Genera of Lactic Acid Bacteria**. Chapman and Hall, Glasgow.

Havenaar, R. and J.H.J. Hui int’Veld. 1992. Probiotics: a general view, pp. 209-224. In B.J.B. Wood, ed. **The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease**. Chapman & Hall, New York.

- Heo, M.S. and B.K. Yang. 2002. Screening of probiotic strains for use in aquaculture. **J. Fish. Sci. Tech.** 5: 200-205.
- Hernandez, D., E. Cardell and V. Zarate. 2005. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. **J. Appl. Microbiol.** 99: 77-84.
- Herrerosa, M.A., R. Arenasa, M.H. Sandovalb, J.M. Castrob, J.M. Fresnoa and M.E. Tornadijo. 2007. Effect of addition of native cultures on characteristics of Armada cheese manufactured with pasteurized milk: A preliminary study. **Int. Dairy J.** 17: 328-335.
- Hoover, D.G. and S.K. Harlander. 1993. Screening methods for detecting bacteriocin activity, pp. 23-29. In D.G. Hoover and L.R. Steenson, eds. **Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria**. Academic Press, Inc., New York.
- Jobling, M. 1995. **Environmental Biology of Fishes**. Chapman & Hall, London.
- Klaenhammer, T.R. 1993. Genetic of bacteriocin produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiol. Rev.** 12: 39-86.
- Lilly, D.M. and R.H. Stillwell. 1965. Probiotics : growth promoting factors produced by microorganisms. **Science.** 147: 747-748.
- Liu, W. and J.N. Hansen. 1990. Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. **Appl. Environ. Microbiol.** 56: 2551-2558.
- Manero, A. and A.R. Blanch. 1999. Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key. **Appl. Environ. Microbiol.** 65: 4425-4430.

- Mantovani, H.C. and J.B. Russell. 2003. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bovicin HC5, a bacteriocin produced by *Streptococcus bovis* HC5. **Int. J. Food Microbiol.** 89: 77–83.
- Mayr-Harting, A., A.J. Hedges and R.C.W. Berkeley. 1972. Method for studying bacteriocins, Vol. 7A, pp. 315-422. In T. Bergen and J.R. Norris, eds. **Methods in Microbiology**. Academic Press, Inc., London.
- Millette, M., C. Dupont, D. Archambault and M. Lacroix. 2007. Partial characterization of bacteriocins produced by human *Lactococcus lactis* and *Pediococcus acidilactici* isolates. **J. Appl. Microbiol.** 102: 274–282.
- Montville, T.J. and A.L. Kaiser. 1993. Antimicrobial protein : classification, nomenclature, diversity and relationship to bacteriocins, pp. 1-22 In D.G. Hoover and L.R. Steenson, eds. **Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria**. Academic Press, Inc., New York.
- Moriarty, D.J.W. 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. **Aquaculture**. 164: 351-358.
- Muriana, P.M. 1996. Bacteriocins for control of *Listeria* spp. in food. **J. Food Prot.** 59: 54-63.
- Nestle. 2002. **A Yoghurt with many Quality**. In Nestle Cininical Nurtition course, Lausanne.
- Nikoskelainen, S., A.C. Ouwehand, G. Bylund, S. Salminen and E.M. Lilius. 2003. Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). **Fish & Shellfish Immunol.** 15: 443-452.

- Nikoskelainen, S., S. Salminen, G. Bylund and A.C. Ouwehand. 2001. Characterization of the properties of human- and dairy-derived probiotics for prevention of infectious diseases in fish. **Appl. Environ. Microbiol.** 67: 2430-2435.
- Nilsen, T., I.F. Nes and H. Holo. 1998. An exported inducer peptide bacteriocin production in *Enterococcus faecium* CTC492. **J. Bacteriol.** 180: 1848-1854.
- _____. 2003. Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. **Appl. Environ. Microbiol.** 69: 2975-2984.
- Ohmomo, S., S. Murata, N. Katayama, S. Nitisinprasart, M. Kobayashi, T. Nakajima, M. Yajima and K. Nakanishi. 2000. Purification and some characteristics of enterocin ON-157, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* NIAI 157. **J. Appl. Microbiol.** 88: 81-89.
- Orla-Jensen, R. 1919. **The Lactic Acid Bacteria.** Fred Host and Son, Copenhagen.
- Osmanagaoglu, O. 2007. Detection and characterization of Leucocin OZ, a new *anti-listerial* bacteriocin produced by *Leuconostoc carnosum* with a broad spectrum of activity. **Food Control.** 18: 118–123.
- O' Sullivan, L., R.P. Ross and C. Hill. 2002. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. **Biochimie.** 84: 593-604.
- Pangsomboon, K., S. Kaewnopparat, T. Pitakpornpreecha and T. Srichana. 2006. Antibacterial activity of a bacteriocin from *Lactobacillus paracasei* HL32 against *Porphyromonas gingivalis*. **Archives Oral Biology.** 51: 784-793.
- Parker, R.B. 1974. Probiotics, the other half of the antibiotic story. **Anim. Nutr. Health.** 29: 4-5.

- Petersen, A. and A. Dalsgaard. 2003. Species composition and antimicrobial resistance genes of *Enterococcus* spp., isolated from integrated and traditional fish farms in Thailand. **Environ. Microbiol.** 5: 395–402.
- Piard, J.C. 1994. Lacticin 481: a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ 481, pp. 251-271. In L. De Vuyst and E.J. Vandamme, eds. **Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria : Microbiology, Genetic and Application**. Blackie-Academic & Professional, London.
- Pilet, M.F., X. Dousset, R. Barre, G. Nivel, M. Desmazeaud and J.C. Piard. 1995. Evidence for two bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* and *Carnobacterium divergens* isolated from fish and active against *Listeria monocytogenes*. **J. Food Prot.** 58: 256-262.
- Pinto, B., R. Pierotti, G. Canale and D. Reali. 1999. Characterization of ‘faecal streptococci’ as indicators of faecal pollution and distribution in the environment. **Lett. Appl. Microbiol.** 29: 258–263.
- Powell, J.E., R.C. Witthuhn, S.D. Todorov and L.M.T. Dicks. 2007. Characterization of bacteriocin ST8KF produced by a kefir isolate *Lactobacillus plantarum* ST8KF. **Int. Dairy J.** 17: 190–198.
- Ringo, E. 1993. Dose chromic oxide (Cr₂O₃) affect faecal lipid and intestinal bacteria flora in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). **Aqua. Fish Manage.** 24: 767-776.
- _____ and F.J. Gatesoupe. 1998. Lactic acid bacteria in fish : review. **Aquaculture.** 160: 177-203.

- Ringo, E., H.R. Bendiksen, S.J. Gausen, A. Sundsfjord and R.E. Olsen. 1998. The effect of dietary fatty acid on lactic acid bacteria associated with the epithelial mucosa and from faecalia of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.). **J. Appl. Microbiol.** 85 : 855-864.
- Robertson, P.A.W., C. O'Dowd, C. Burrells, P. Williams and B. Austin. 2000. Use of *Carnobacterium* sp. as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). **Aquaculture.** 185: 235–243.
- Schillinger, U. and F.K. Lucke. 1989. Antimicrobial activity of *Lactobacillus sakei* isolated from meat. **Appl. Environ. Microbiol.** 55: 1901-1908.
- _____ and W.H. Holzapfel. 1995. The genus *Carnobacterium*, pp. 307-326. In B.J.B. Wood and W.H. Holzapfel, eds. **The Genera of Lactic Acid Bacteria.** Chapman and Hall, Glasgow.
- Sherman, J.M. 1937. The Streptococci. **Bacteriol. Rev.** 1: 3-97.
- Sigma. 2000. **Biochemicals and Reagent for Life Science Research**, Singapore
- Silva, F.C.P., M.F.G. Brito, L.M. Farias and J.R. Nicoli. 2005. Composition and antagonistic activity of the indigenous intestinal microbiota of *Prochilodus argenteus* Agassiz. **J. Fish Biol.** 67: 1686–1698.
- Simpson, W.J. and H. Taguchi. 1995. The genus *Pediococcus*, with notes on the genera *Tetragenococcus* and *Aerococcus*, pp. 125-172. In B.J.B. Wood and W.H. Holzapfel, eds. **The Genera of Lactic Acid Bacteria.** Chapman and Hall, Glasgow.
- Stiles, M.E. and W.H. Holzapfel. 1997. Lactic acid bacteria of food and their current taxonomy. **Int. J. Food Microbiol.** 36: 1-29.

- Stoffels, G., I.F. Nes and A. Guomundsdottir. 1992a. Isolation and properties of a bacteriocin-producing *Carnobacterium piscicola* isolated from fish. **J. Appl. Bacteriol.** 73: 309-316.
- _____, J. Nissen-meyer, A. Gudmundsdottir, K. Sletten, H. Holo and I.F. Nes. 1992b. Purification and characterization of a new bacteriocin isolated from a *Carnobacterium* sp. **Appl. Environ. Microbiol.** 69: 2975-2984.
- Strom, E. and E. Ringo. 1993. Changes in the bacterial composition of early developing cod, *Gadus morhua* (L.) larvae following inoculation of *Lactobacillus plantarum* into the water, pp. 226-228. In B.T. Walther and H.J. Fyhn, eds. **Physiology and Biochemical Aspects of Fish Development.** University of Bergen, Bergen, Norway.
- Sugita, H., N. Matsuo, Y. Hirose, M. Iwato and Y. Deguchi. 1997. *Vibrio* sp. strain NM 10, isolated from the intestine of a Japanese coastal fish, has an inhibitory effect against *Pasteurella piscicida*. **Appl. Environ. Microbiol.** 63: 4986-4989.
- _____, Y. Hirose, N. Matsuo and Y. Deguchi. 1998. Production of the antibacterial substance by *Bacillus* sp. strain NM 12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish. **Aquaculture.** 165: 269-280.
- Teuber, M. 1995. The genus *Lactococcus*, pp. 173-230. In B.J.B. Wood and W.H. Holzapfel, eds. **The Genera of Lactic Acid Bacteria.** Chapman and Hall, Glasgow.
- Tichaczek, P.S., J. Nissen-Meyer, I.F. Nes, R.F. Vogel and W.P. Hammes. 1992. Characterization of the bacteriocins curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 and sakacin P from *L. sake* LTH 673. **System. Appl. Microbiol.** 15: 460-468.

- Todorov, S.D. and L.M.T. Dicks. 2005. *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against gram-negative bacteria. **Enzyme Microbial Technol.** 36: 318–326.
- _____, C.A. van Reenen and L.M.T. Dicks. 2004. Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST13BR, a strain isolated from barley beer. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 50: 149–157.
- _____, H. Nyati, M. Meincken and L.M.T. Dicks. 2007. Partial characterization of bacteriocin AMA-K, produced by *Lactobacillus plantarum* AMA-K isolated from naturally fermented milk from Zimbabwe. **Food Control.** 18: 656–664.
- Van den Berghe, E., T. De Winter and L. De Vuyst. 2006. Enterocin A production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 406 is characterised by a temperature- and pH-dependent switch-off mechanism when growth is limited due to nutrient depletion. **Int. J. Food Microbiol.** 107: 159–170.
- Yamamoto, Y., Y. Togawa, M. Shimosaka and M. Okazaki. 2003. Purification and characterization of a novel bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* strain RJ-11. **Appl. Environ. Microbiol.** 69: 5746–5753.
- Zamfir, M., R. Callewaert, P.C. Cornea and L. De Vuyst. 2000. Production kinetics of acidophilin 801, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801. **FEMS Microbiol. Lett.** 190: 305–308.
- Zhu, W.M., W. Liu and D.Q. Wu. 2000. Isolation and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus gasseri* KT7. **J. Appl. Microbiol.** 88: 877–886.

ภาคผนวก

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth

Peptone	10	กรัม
Meat extract	8	กรัม
Yeast extract	4	กรัม
Glucose	20	กรัม
Tween 80	1	กรัม
di-Ammonium hydrogen citrate	2	กรัม
di-Potassium hydrogen phosphate	2	กรัม
Sodium citrate	5	กรัม
Magnesium sulfate	0.2	กรัม
Manganese sulfate	0.04	กรัม

ถ้าต้องการให้อาหารแข็งให้เติมผงวุ้น 15 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.2 Modified - De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth (Trichaczek *et al.*, 1992)

Tryptone	10	กรัม
Meat extract	2	กรัม
Yeast extract	4	กรัม
Dextrose	2	กรัม
di-Potassium hydrogen phosphate	8.7	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate	8	กรัม
Tween 80	1	กรัม
di-Ammonium hydrogen citrate	2	กรัม
Magnesium sulfate	0.2	กรัม
Manganese sulfate	0.05	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ค่าความเป็นกรด-เบส

6.5

ถ้าต้องการให้อาหารแข็งให้เติมผงวุ้น 15 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อ
ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.3 Tryptic soy broth (TSB)

Peptone from casein	17.0	กรัม
Peptone from soymeal	3.0	กรัม
Dextrose	2.5	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
di-Potassium hydrogen phosphate	2.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
ค่าความเป็นกรดต่าง	7.3	

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.4 Tryptic soy agar (TSA)

Peptone from casein	15.0	กรัม
Peptone from soymeal	5.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
ค่าความเป็นกรดต่าง	7.3	

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.5 Tryptic soy broth+Yeast extract soft agar (TSBYE soft agar)

Peptone from casein	17.0	กรัม
Peptone from soymeal	3.0	กรัม
Dextrose	2.5	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
di-Potassium hydrogen phosphate	2.5	กรัม
Yeast extract	6.0	กรัม
Agar	7.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
ค่าความเป็นกรดต่าง	7.3	

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. สารเคมี

2.1 Phosphate buffer saline (PBS)

Sodium chloride	8.06	กรัม
Potassium chloride	0.22	กรัม
di-Sodium hydrogen phosphate	0.85	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate	0.20	กรัม
Sodium acetate	1.00	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

2.2 การเตรียมน้ำดิสตพลอดเชื้อของปลาช่อน

นำถุงน้ำดีของปลาช่อน มาล้างคราบเลือดและสิ่งเจือปนต่าง ๆ ด้วยน้ำกลั่น
แยกเอาน้ำดีสดออกจากถุงน้ำดีโดยการบีบถุงน้ำดีด้วยมือ นำน้ำดีสดที่ได้ไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5 (Whatman No.5) จากนั้นทำให้น้ำดีสดพลอดเชื้อด้วยการกรองผ่านแผ่นกรองขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร เก็บรักษาน้ำดีสดพลอดเชื้อที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ตารางผนวกที่ 1 การคัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกจากระบบทางเดินอาหารของ
ปลาสวยงามชนิดต่าง ๆ

รหัสสายพันธุ์	แหล่งตัวอย่าง	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	การทดสอบเอนไซม์คาตาเลส
MG45-1	ปลาทอง	รูปร่างกลม แกรมบวก	-ve
MG45-1.1	ปลาทอง	รูปร่างกลม แกรมบวก	-ve
MG30-2.1	ปลาทอง	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MG30-2.2	ปลาทอง	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MG30-2.3	ปลาทอง	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MG30-2.5	ปลาทอง	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MG30-2.6	ปลาทอง	รูปร่างกลม แกรมบวก	-ve
MG30-2.7	ปลาทอง	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MG30-2.8	ปลาทอง	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MG30-2.9	ปลาทอง	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MG30-2.10	ปลาทอง	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MG30-2.11	ปลาทอง	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MG30-2.12	ปลาทอง	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MG30-2.13	ปลาทอง	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MG30-2.14	ปลาทอง	รูปร่างกลม แกรมบวก	-ve
MG30-2.15	ปลาทอง	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MG30-2.16	ปลาทอง	รูปร่างกลม แกรมบวก	-ve
HG45-2.1	ปลาทอง	รูปร่างกลม แกรมบวก	-ve
HH45-3	ปลาทองออแล้นดา	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MP30-4	ปลาตะเพียนทอง	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

รหัสสายพันธุ์	แหล่งตัวอย่าง	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	การทดสอบเอนไซม์คาตาเลส
HC45-5.1	ปลาการ์ฟ	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
HC45-5.5	ปลาการ์ฟ	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
HC45-5.6	ปลาการ์ฟ	รูปร่างท่อนยาว แกรมบวก	-ve
HC45-5.7	ปลาการ์ฟ	รูปร่างท่อนยาว แกรมบวก	-ve
MD30-6.1	ปลาทอง	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MD30-6.2	ปลาทอง	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MD30-6.3	ปลาทอง	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MD30-6.4	ปลาทอง	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MD30-6.5	ปลาทอง	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MD30-6.6	ปลาทอง	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MD30-6.7	ปลาทอง	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MD30-6.8	ปลาทอง	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MD30-6.9	ปลาทอง	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MD30-6.10	ปลาทอง	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MD30-6.11	ปลาทอง	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MD30-6.12	ปลาทอง	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MD30-6.13	ปลาทอง	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MD30-6.14	ปลาทอง	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MD30-6.15	ปลาทอง	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MD30-6.16	ปลาทอง	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MD30-6.17	ปลาทอง	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MD30-6.18	ปลาทอง	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MD30-6.19	ปลาทอง	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MD30-6.20	ปลาทอง	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

รหัสสายพันธุ์	แหล่งตัวอย่าง	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	การทดสอบเอนไซม์คาตาเลส
MD30-6.21	ปลาทอง	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MD30-6.23	ปลาทอง	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MD30-6.24	ปลาทอง	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MD30-6.26	ปลาทอง	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MD30-6.27	ปลาทอง	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MD30-6.28	ปลาทอง	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MD30-6.29	ปลาทอง	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MD30-6.30	ปลาทอง	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MD30-6.31	ปลาทอง	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MD30-6.32	ปลาทอง	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MD30-6.33	ปลาทอง	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
HD45-6	ปลาทอง	รูปร่างกลม แกรมบวก	-ve
MGM30-8.1	ปลาทองโคเม็ท	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MGM30-8.2	ปลาทองโคเม็ท	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MGM30-8.4	ปลาทองโคเม็ท	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MGM30-8.5	ปลาทองโคเม็ท	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MGM30-8.11	ปลาทองโคเม็ท	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MGM30-8.12	ปลาทองโคเม็ท	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MGM30-8.13	ปลาทองโคเม็ท	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MGM30-8.14	ปลาทองโคเม็ท	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MGM30-8.15	ปลาทองโคเม็ท	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MGM30-8.16	ปลาทองโคเม็ท	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MGM30-8.17	ปลาทองโคเม็ท	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MGM30-8.19	ปลาทองโคเม็ท	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

รหัสสายพันธุ์	แหล่งตัวอย่าง	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	การทดสอบเอนไซม์คาตาเลส
MGM30-8.21	ปลาทองโคเม็ท	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MGM30-8.22	ปลาทองโคเม็ท	รูปร่างกลม แกรมบวก	-ve
MGM30-8.23	ปลาทองโคเม็ท	รูปร่างกลม แกรมบวก	-ve
MGM30-8.26	ปลาทองโคเม็ท	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
HGS45-9.1	ปลาทองหัวสิงห์	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
HGS45-9.2	ปลาทองหัวสิงห์	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
HGS45-9.3	ปลาทองหัวสิงห์	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MGR30-10.2	ปลาทองรักเล่ย์	รูปร่างกลม แกรมบวก	-ve
MGR30-10.3	ปลาทองรักเล่ย์	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MGR30-10.4	ปลาทองรักเล่ย์	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MGR30-10.5	ปลาทองรักเล่ย์	รูปร่างท่อนยาว แกรมบวก	-ve
MGR30-10.6	ปลาทองรักเล่ย์	รูปร่างกลม แกรมบวก	-ve
MGR30-10.7	ปลาทองรักเล่ย์	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MGR30-10.10	ปลาทองรักเล่ย์	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MGR30-10.11	ปลาทองรักเล่ย์	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MGR30-10.12	ปลาทองรักเล่ย์	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MGR30-10.13	ปลาทองรักเล่ย์	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MGR30-10.14	ปลาทองรักเล่ย์	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MGR30-10.17	ปลาทองรักเล่ย์	รูปร่างกลม แกรมบวก	-ve
MGR30-10.18	ปลาทองรักเล่ย์	รูปร่างกลม แกรมบวก	-ve
MGR30-10.19	ปลาทองรักเล่ย์	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MGR30-10.21	ปลาทองรักเล่ย์	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MGR30-10.22	ปลาทองรักเล่ย์	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MGR30-10.23	ปลาทองรักเล่ย์	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MGR30-10.24	ปลาทองรักเล่ย์	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

รหัสสายพันธุ์	แหล่งตัวอย่าง	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	การทดสอบเอนไซม์คาตาเลส
MGR30-10.29	ปลาทองรักเล่ย์	รูปร่างกลม แกรมบวก	-ve
MGR30-10.30	ปลาทองรักเล่ย์	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MC30-11.2	ปลาการ์ฟ	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MC30-11.3	ปลาการ์ฟ	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MC30-11.4	ปลาการ์ฟ	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MC30-11.7	ปลาการ์ฟ	รูปร่างกลม แกรมบวก	-ve
MC30-11.6	ปลาการ์ฟ	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MC30-11.8	ปลาการ์ฟ	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve
MC30-11.9	ปลาการ์ฟ	รูปร่างท่อนสั้น แกรมบวก	-ve

-ve = การทดสอบเป็นลบ

ตารางผนวกที่ 2 การยับยั้งการเจริญของ *E. faecium* JCM 5804 แบบฆ่าทำลายเซลล์โดย
แบคทีเรียโอซินที่สร้างจาก *E. raffinosus* MGM30-8.22

เวลา (ชั่วโมง)	MRS broth (control)		MRS broth ผสม แบคทีเรียโอซิน		MRS broth ผสม แบคทีเรียโอซิน	
			100 AU ml ⁻¹		200 AU ml ⁻¹	
	OD ₆₀₀	Log CFU ml ⁻¹	OD ₆₀₀	Log CFU ml ⁻¹	OD ₆₀₀	Log CFU ml ⁻¹
0	0.033	7.02	0.027	6.94	0.029	6.89
2	0.072	7.42	0.075	7.25	0.084	7.44
4 ^a	0.225	7.39	0.210	7.89	0.230	7.86
6	0.393	8.20	0.337	5.06	0.321	4.51
8	0.557	8.42	0.332	4.87	0.299	3.70
10	1.280	8.77	0.252	4.62	0.213	3.41
12	1.460	8.85	0.207	4.32	0.182	3.76
14	1.683	8.79	0.190	4.36	0.177	4.00
16	1.788	8.84	0.163	4.53	0.154	4.32
18	1.836	8.73	0.132	4.83	0.107	4.84
20	1.854	8.86	0.115	5.05	0.098	4.88
22	1.839	8.71	0.100	5.39	0.081	5.10
24	1.779	8.64	0.100	5.68	0.082	5.34

^a เติมแบคทีเรียโอซินลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ซึ่งมี *E. faecium* JCM 5804 เจริญอยู่

ตารางผนวกที่ 3 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเซลล์ ค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อและการ
สร้างแบคทีเรียโอซินของ *E. raffinosus* MGM30-8.22 เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ
MRS broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เวลา (ชั่วโมง)	การเจริญ (OD ₆₀₀)	ค่าความเป็นกรดต่างของ อาหารเลี้ยงเชื้อ	ค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซิน (AU ml ⁻¹)
0	0.013	5.71	0
2	0.018	5.70	0
4	0.054	5.69	0
6	0.184	5.65	100
8	0.736	5.41	200
10	1.135	5.21	400
12	1.650	4.95	800
14	1.780	4.79	1,600
16	1.780	4.71	1,600
18	1.830	4.67	1,600
20	1.825	4.65	1,600
22	1.750	4.60	1,600

ตารางผนวกที่ 4 การมีชีวิตรอดที่ค่าความเป็นกรดต่าง ๆ ของ *E. raffinosus* MGM30-8.22

pH	การเจริญของ <i>E. raffinosus</i> MGM30-8.22 (log CFU ml ⁻¹)	
	0 (ชั่วโมง)	6 (ชั่วโมง)
2	4.90	0
3	5.76	5.39
4	5.53	5.35
5	5.60	6.12
6	5.75	7.15
7	5.92	7.53
8	5.96	7.81
9	5.67	7.69
10	5.79	7.10
11	5.66	5.75

ตารางผนวกที่ 5 การเจริญของ *E. raffinosus* MGM30-8.22 และ *S. agalactiae* ใน phosphate buffer saline (PBS) ผสมน้ำดีสลดของปลาช่อนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

เวลา (ชม.)	การเจริญของแบคทีเรีย (log CFU ml ⁻¹)							
	<i>E. raffinosus</i> MGM30-8.22				<i>S. agalactiae</i>			
	(% น้ำดีสลดของปลาช่อน; v/v)				(% น้ำดีสลดของปลาช่อน; v/v)			
	0	10	30	50	0	10	30	50
0	7.22	7.38	7.08	7.22	7.20	7.08	7.72	7.79
6	7.27	7.51	7.25	7.29	7.38	6.63	7.14	7.67
12	8.28	7.71	7.42	7.34	8.04	5.25	4.45	4.30
18	8.30	7.83	7.56	7.44	8.11	3.01	0.00	0.00
24	8.36	8.13	8.28	8.93	8.12	0.00	0.00	0.00