บทที่ 4
ผลการวิจัยและวิจารณ์

4.1 การผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียกรดแลคติก

4.1.1 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารแบคเทอริโอซิน

ก) ผลการศึกษาระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตแบคเทอริโอซิน

จากการทดสอบหาระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตแบคเทอริโอซินต่อกิจกรรมของแบคเทอริโอซินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* โดยเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก 2 ไอโซเลต คือ *Lactobacillus plantarum* LS0602 และ *Lactobacillus brevis* LT 0904 ที่ระดับอุณหภูมิต่างกัน 6 ระดับ คือ 25, 30, 35, 37, 39 และ 42 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิทั้ง 6 ระดับนั้นเชื้อ *L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT 0904 ผลิตแบคเทอริโอซินที่มีกิจกรรมของแบคเทอริโอซินต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* เท่ากับ 12,800 AU ต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตามจากการเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งสองชนิดที่อุณหภูมิต่าง ๆ กันพบว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อที่ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีผลทำให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งสูงที่สุด คือ 21.0 และ 18.0 มิลลิลิตรตามลำดับ (ตารางที่ 4.1) ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสร้างแบคเทอริโอซินต่อกิจกรรมของแบคเทอริโอซินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* คือ 34 องศาเซลเซียส

จากการทดลองนี้พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างแบคเทอริโอซินโดยแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT 0904 คือ 37 องศาเซลเซียสซึ่งที่ระดับอุณหภูมินี้ให้กิจกรรมของแบคเทอริโอซินสูงสุดผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Karthileyan และ Santosh (2009) ที่พบว่าเชื้อ *L. plantarum* มีกิจกรรมของแบคเทอริโอซินสูงสุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (12,800 AUต่อมิลลิลิตร) Altuntas และคณะ (2010) รายงานว่า *Pediococcus acidilactici* 13 มีกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินมากที่สุดถึง 204,800 AUต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งต่างจาก Drosinos และคณะ (2006) ที่พบว่าเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* E131 ผลิตแบคเทอริโอซินที่มีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

ข) ผลการศึกษาระดับพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตแบคเทอริโอซิน

สำหรับทดสอบหาระดับพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตแบคเทอริโอซินต่อกิจกรรมของแบคเทอริโอซินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* โดยเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารเหลว MRS ที่มีระดับพีเอชต่างกัน 5 ระดับ คือ พีเอช 4-8 พบว่าที่เชื้อ *L. plantarum*

LS0602 และ *L. brevis* LT 0904 ที่เพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MRS ที่มีระดับพีเอช 4-8 พบว่าสามารถผลิตแบคเทอริโอซินที่มีกิจกรรมของแบคเทอริโอซินต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* เท่ากับ 12,800 AU ต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อเปรียบเทียบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งพบว่าเชื้อ เชื้อ *L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT 0904 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งสูงที่สุด คือ 10.50 และ 12.0 มิลลิลิตรตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร MRS ที่มีพีเอช 6 และ พีเอช 7 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2)

ค่าพีเอชที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 6-7 เช่นเดียวกับการรายงานโดยนักวิจัยท่านอื่นซึ่งได้พบว่าแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *L. plantarum* สายพันธุ์ ST23LD มีกิจกรรมสูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่มีพีเอชเริ่มต้นคือ 6.5 ขณะที่ *L. plantarum* สายพันธุ์ ST341LD มีกิจกรรมสูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นคือ 6.0 (Todorov และ Dicks. 2006) อย่างไรก็ตาม Mataragas และคณะ. 2003 ได้รายงานว่าเชื้อ *L.curuatus* L442 และ *Leuconostoc mesenteroides* L124 มีกิจกรรมได้สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS ที่มีพีเอช 5.5 ทั้งนี้ De Vuyst และคณะ (1996) และ Mataragas และคณะ (2003) ได้กล่าวว่าการผลิตแบคเทอริโอซินถูกส่งเสริมในสภาวะแวดล้อมระดับที่ต่ำกว่าสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมทั้งนี้อาจเนื่องมาจากกระบวนการสังเคราะห์แบคเทอริโอซินเกิดขึ้นได้ดีขณะที่มีอัตราการเจริญค่อนข้างต่ำ อัตราการเจริญที่สูงขึ้นไม่ได้มีผลทำให้การผลิตแบคเทอริโอซินเกิดได้ดีขึ้นเสมอไป แต่อย่างไรก็ตามยังมีรายงานว่าการผลิตแบคเทอริโอซินเกิดขึ้นได้ดีที่อุณหภูมิใกล้เคียงกันกับอุณภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ (Daba และคณะ. 1993)

ตารางที่ 4.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการสร้างแบคเทอริโอซินต่อการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes*

อุณหภูมิที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ (องศาเซลเซียส)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส (มิลลิเมตร)/ กิจกรรมของแบคเทอริโอซิน (AUต่อมิลลิลิตร)	
	Lactobacillus plantarum LS0602	*Lactobacillus brevis* LT0904
25	13.0 (12,800)	11.0 (12,800)
30	15.0 (12,800)	15.0 (12,800)
35	19.0 (12,800)	16.0 (12,800)
37	21.0 (12,800)	18.0 (12,800)
39	18.25 (12,800)	15.0 (12,800)
42	10.83 (12,800)	12.0 (12,800)

ตารางที่ 4.2 พีเอชที่เหมาะสมในการสร้างสารแบคเทอริโอซินต่อการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes*

พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส (มิลลิเมตร)/ กิจกรรมของแบคเทอริโอซิน (AUต่อมิลลิลิตร)	
	Lactobacillus plantarum LS0602	*Lactobacillus brevis* LT0904
4	8.67 (12,800)	6.0 (12,800)
5	9.0 (12,800)	8.0 (12,800)
6	10.50 (12,800)	9.0 (12,800)
7	9.50 (12,800)	12.0 (12,800)
8	9.0 (12,800)	8.50 (12,800)

ค) ผลการศึกษาส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงที่เหมาะสมในการผลิตแบคเทอริโอซิน

จากการทดลองหาส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตแบคเทอริโอซินต่อกิจกรรมของแบคเทอริโอซินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* โดยเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้คือ เชื้อ *L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT0904 ในอาหารเหลว MRS (Difco) ชุดควบคุมเปรียบเทียบกับอาหารเหลว MRS ที่มีการเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบในอาหารเหลว MRS เช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ตลอดจนสารที่ส่งเสริมการเจริญของเชื้อ พบว่าเมื่อพิจารณาผลการเติมสารประกอบที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* LS0602 พบว่าการมีกลูโคส จำนวน 20 กรัมต่อลิตรใน MRS ชุดควบคุม มีกิจกรรมของแบคเทอริโอซินเท่ากับ 12,800 AUต่อมิลลิลิตร (ตามตารางที่ 4.9) แต่เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงสารประกอบที่เป็นแหล่งคาร์บอนให้ต่างไปจากชุดควบคุมพบว่า การเติมฟรุกโตส แมนโนส แลคโตส มอลโตส และซูโครส มีกิจกรรมของแบคเทอริโอซินสูงกว่าสูตรควบคุม และเมื่อเติมกลูโคส จำนวน 30 กรัมต่อลิตร ทำให้เชื้อดังกล่าวมีกิจกรรมของแบคเทอริโอซินสูงสุดถึง 102,400 AUต่อมิลลิลิตร ส่วนเชื้อ *L. brevis* LT 0904 ได้ผลแตกต่างกันคือ เมื่อเติมฟรุกโตส แมนโนส แลคโตส และมอลโตส จำนวน 20 กรัมต่อลิตร พบว่ามีกิจกรรมของแบคเทอริโอซินเท่ากับสูตรควบคุมซึ่งเติมกลูโคส จำนวน 20 กรัมต่อลิตร แต่ค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินสูงถึง 25,600 AUต่อมิลลิลิตร เมื่อเติมน้ำตาลซูโครส และเมื่อเติมกลูโคส จำนวน 40 กรัมต่อลิตร จะทำให้เชื้อมีกิจกรรมของแบคเทอริโอซินสูงที่สุดถึง 102,400 AUต่อมิลลิลิตร เมื่อพิจารณาแหล่งไนโตรเจนของส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าการเติมทริปโตน จำนวน 10 และ 20 กรัมต่อลิตรแทนโปรติโอสเปปโตน เบอร์3 สำหรับเชื้อ *L. plantarum* LS0602 ทำให้มีกิจกรรมของแบคเทอริโอซินสูงกว่าสูตรควบคุม โดยปริมาณทริปโตน จำนวน 10 กรัมต่อลิตร มีผลทำให้กิจกรรมของแบคเทอริโอซิน

สูงที่สุด (51,200 AUต่อมิลลิลิตร) แต่การเพิ่มปริมาณยีสต์สกัด จำนวน 10 และ 20 กรัมต่อลิตร (จากเติม 5 กรัมต่อลิตร) ไม่มีผลทำให้กิจกรรมของแบคเทอริโอซินเพิ่มขึ้น สำหรับการเติมทริปโตนร่วมกับยีสต์สกัดไม่ว่าที่ความเข้มข้นใดก็ตามก็ไม่มีผลในการทำให้กิจกรรมของแบคเทอริโอซินเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมเช่นเดียวกับเชื้อ *L. brevis* LT 0904 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MRS ที่เติมทริปโตนแทนโปรติโอสเปปโตน เบอร์3 พบว่า การเติมทริปโตน จำนวน 10 กรัมต่อลิตร มีผลทำให้กิจกรรมของแบเทอริโอซินสูงกว่าการเติมทริปโตน 20 กรัมต่อลิตร แต่การเติมยีสต์สกัด 20 กรัมต่อลิตร จะทำให้กิจกรรมของแบคเทอริโอซินสูงสุด 25,600 AUต่อมิลลิลิตร ส่วนการเติมทริปโตนร่วมกับยีสต์สกัดไม่ว่าที่ความเข้มข้นใดก็ตามก็ไม่มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมของแบคเทอริโอซินเช่นเดียวกัน และเมื่อพิจารณาการเติมสารที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของเชื้อเช่น การเติมไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตมากถึง จำนวน 5 กรัมต่อลิตรแทนไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต จำนวน 2 กรัมต่อลิตร สำหรับเชื้อ *L. plantarum* LS0602 พบว่าทำให้กิจกรรมของแบคเทอริโอซินสูงที่สุดคือ 25,600 AUต่อมิลลิลิตร ซึ่งต่างกับเชื้อ *L. brevis* LT 0904 ที่การเติมไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต จำนวน 20 กรัมต่อลิตร มีผลทำให้กิจกรรมของแบคเทอริโอซินสูงที่สุดคือ 25,600 AUต่อมิลลิลิตร สำหรับการเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต จำนวน 2 กรัมต่อลิตรเพิ่มในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ *L. brevis* LT 0904 พบว่ามีกิจกรรมของแบคเทอริโอซินสูงที่สุด 51,200 AUต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าสูตรควบคุมที่เติมไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต จะเห็นได้ว่าการเพิ่มโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟสที่ระดับสูงกว่า 2 กรัมต่อลิตรไม่มีผลต่อกิจกรรมของแบคเทอริโอซินเพิ่มขึ้น เมื่อพิจารณาสูตรอาหารเหลว MRS ที่เติมวิตามินบี 1 และวิตามินบี 12 เทียบกับชุดควบคุมซึ่งไม่ได้เติมวิตามินดังกล่าว พบว่าเชื้อ *L. plantarum* LS0602 และเชื้อ *L. brevis* LT 0904 มีกิจกรรมของแบแบคเทอริโอซินเท่ากับสูตรควบคุมที่ไม่ได้เติมวิตามินคือ 12,800 AUต่อมิลลิลิตร รวมทั้งการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตและแมงกานีสซัลเฟตในระดับความเข้มข้นที่เพิ่มสูงขึ้นกว่าในอาหารชุดควบคุมที่เติมแมกนีเซียมซัลเฟต จำนวน 0.1 กรัมต่อลิตร และแมงกานีสซัลเฟต จำนวน 0.05 กรัมต่อลิตร ก็ไม่มีผลทำให้กิจกรรมของแบคเทอริโอซินสูงขึ้น ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* LS0602 เพื่อให้มีการสร้างแบเทอริโอซินที่มีกิจกรรมการยั้บยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดีที่สุดคือ อาหารเหลว MRS ปกติที่เติมกลูโคสจำนวน 30 กรัมต่อลิตร ทริปโตน 10 กรัมต่อลิตร และไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต จำนวน 5 กรัมต่อลิตร สำหรับเชื้อ *L. brevis* LT 0904 ควรเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ปกติที่เติมกลูโคส 40 กรัมต่อลิตร ทริปโตน 10 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 20 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต จำนวน 2 กรัมต่อลิตร เพื่อให้มีกิจกรรมของแบคเทอริโอซินสูงสุด ตามตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการสร้างสารแบคเทอริโอซิน

ลำดับที่ของสูตรอาหาร	ชนิดและปริมาณของส่วนประกอบอาหาร (กรัมต่อลิตร)		กิจกรรมของแบคเทอริโอซิน (AU/มิลลิลิตร)	
	ส่วนประกอบที่เติมเพิ่ม[a]	ทดแทนส่วนประกอบในอาหารMRS สูตรควบคุม	*Lactobacillus plantarum* LS0602	*Lactobacillus brevis* LT0904
1	ชุดควบคุม (MRS, Difco)[b]	-	12,800	12,800
2	Fructose (20)	Glucose (20)	25,600	12,800
3	Mannose (20)	Glucose (20)	51,200	12,800
4	Lactose (20)	Glucose (20)	25,600	12,800
5	Maltose (20)	Glucose (20)	51,200	12,800
6	Sucrose (20)	Glucose (20)	25,600	25,600
7	Glucose (30)	Glucose (20)	102,400	51,200
8	Glucose (40)	Glucose (20)	51,200	102,400
9	Glucose (50)	Glucose (20)	25,600	25,600
10	Tryotone (10)	Proteose peptone (10)	51,200	25,600
11	Tryotone (20)	Proteose peptone (10)	25,600	12,800
12	Yeast extract (10)	Yeast extract (5)	12,800	12,800
13	Yeast extract (20)	Yeast extract (5)	12,800	25,600
14	Tryotone (12.5)+Yeast extract (7.5)	Proteose peptone (10)+Yeast extract (5)	12,800	12,800
15	Tryotone (20)+Yeast extract (10)	Proteose peptone (10)+Yeast extract (5)	12,800	12,800
16	Tryotone (10)+Yeast extract (20)	Proteose peptone (10)+Yeast extract (5)	12,800	12,800
17	K_2HPO_4 (5)	K_2HPO_4 (2)	25,600	12,800
18	K_2HPO_4 (10)	K_2HPO_4 (2)	12,800	12,800
19	K_2HPO_4 (20)	K_2HPO_4 (2)	12,800	25,600
20	KH_2PO_4 (2)	K_2HPO_4 (2)	6,400	51,200
21	KH_2PO_4 (5)	K_2HPO_4 (2)	12,800	6,400
22	KH_2PO_4 (10)	K_2HPO_4 (2)	12,800	12,800
23	KH_2PO_4 (20)	K_2HPO_4 (2)	12,800	12,800
24	วิตามินบี1 (0.001)	0	12,800	12,800
25	วิตามินบี12 (0.001)	0	12,800	12,800
26	$MgSO_4$ (2)	$MgSO_4$ (0.1)	12,800	12,800
27	$MgSO_4$ (5)	$MgSO_4$ (0.1)	12,800	12,800
28	$MgSO_4$ (10)	$MgSO_4$ (0.1)	12,800	12,800
29	$MnSO_4$ (2)	$MnSO_4$ (0.05)	12,800	12,800
30	$MnSO_4$ (5)	$MnSO_4$ (0.05)	12,800	6,400
31	$MnSO_4$ (10)	$MnSO_4$ (0.05)	12,800	6,400

[a] ส่วนประกอบที่เติมเพิ่มทดแทนส่วนประกอบบางอย่างในสูตรอาหาร MRS

[b] อาหาร MRS ประกอบด้วย Proteose peptone no 3 จำนวน 10 กรัมต่อลิตร Beef extract จำนวน 10 กรัมต่อลิตร Yeast extract จำนวน 5 กรัมต่อลิตร Dextrose จำนวน 20 กรัมต่อลิตร Sodium acetate จำนวน 5 กรัมต่อลิตร Tween 80 จำนวน 1 กรัมต่อลิตร Dipotassium hydrogen phosphate จำนวน 2 กรัมต่อลิตร Ammonium citrate จำนวน 2 กรัมต่อลิตร Magnesium sulfate จำนวน 0.1 กรัมต่อลิตร Manganese sulfate จำนวน 0.05 กรัมต่อลิตร Agar จำนวน 10 กรัมต่อลิตร

การที่พบว่าการเติมปริมาณกลูโคสเพิ่มสูงขึ้นในอาหารเหลว MRS ส่งผลให้กิจกรรมของแบคเทอริโอซินเพิ่มขึ้นอาจเนื่องมาจากปริมาณกลูโคสที่สูงขึ้นส่งผลต่อสภาวะเครียด (เกิดจากความดันออสโมติกที่เพิ่มสูงขึ้น) De Vuyst และVandamme (1994) สอดคล้องกับการทดลองของ Todorov และคณะ (2006) ที่พบกิจกรรมของแบคเทอริโอซินสูงสุด 102,400 AUต่อมิลลิลิตร ที่ผลิตจากเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ST16Pa เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่เติมกลูโคส 30 กรัมต่อลิตร ส่วนการทดลองของ Enan และคณะ (1996) กล่าวว่ากลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตแบคเทอริโอซินชนิด plantaricin UG1 ได้ดี นอกจากนี้การใช้แหล่งคาร์บอนอย่างอื่นก็สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้ดีเช่นกันโดยการศึกษาของ Cheigh และคณะ (2002) ได้เพาะเลี้ยงเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซูโครสและไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อผลิตแบคเทอริโอซินที่ให้กิจกรรมการยับยั้งได้ดี แต่ถ้าใช้มอลโตสจะพบว่ามีกิจกรรมของแบคเทอริโอซินสูงกว่า และParente และRicciardi (1994) กล่าวว่าซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีกว่ากลูโคสสำหรับการผลิตแบคเทอริโอซินอย่าง enterocin 1146 นอกจากนี้แหล่งไนโตรเจนก็ช่วยส่งเสริมในการผลิตแบคเทอริโอซินด้วยเช่นกัน จากการศึกษาของ Kim และคณะ (1997) โดยเปลี่ยนแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นทริปโตนหรือยีสต์สกัดก็ส่งเสริมให้เชื้อสามารถผลิตแบคเทอริโอซิน ขณะที่ Todorov และ Dicks (2006) ได้เพาะเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ST341LD ในอาหารเหลว MRS ที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นทริปโตน 12.5กรัมต่อลิตร ร่วมกับยีสต์สกัด 7.5 กรัมต่อลิตร และเป็นทริปโตน 12.5กรัมต่อลิตร ร่วมกับมีทสกัด 7.5 กรัมต่อลิตร พบว่าได้แบคเทอริโอซินที่มีกิจกรรมสูงกว่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินที่ใช้เปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหาร MRS สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ และการเติมสารอนินทรีย์อย่างหมู่ฟอสเฟสอย่างเช่นไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟส หรือ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟส ก็มีส่วนช่วยกระตุ้นให้เกิดการสร้างแบคเทอริโอซิน แต่อาจขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และชนิดของเชื้อเช่นการทดลองของ Matsusaki และคณะ (1996) ซึ่งเติมไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร ทำให้แบคเทอริโอซินมีกิจกรรมสูงแต่ก็ไม่ใช่เชื้อทุกสายพันธุ์

4.1.2 การศึกษาการทำแบคเทอริโอซินให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีต่าง ๆ ต่อกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารแบคเทอริโอซิน

จากการศึกษาการนำแบคเทอริโอซินมาทำให้บริสุทธิ์ในแต่ละขั้นตอนดังนี้คือ การนำส่วนใสซึ่งปราศจากเซลล์ (cell-free supernatant) มาผ่านขั้นตอนการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต แล้วนำตะกอนที่ละลายด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์มาทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยการทำไดอะไลซิส และนำมาตกตะกอนอีกครั้งด้วยกรดไตรคลอโรแอซิติก พบว่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินจะเพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ ในขั้นตอนสุดท้ายคือ การตกตะกอนด้วยกรดไตรคลอโรแอซิติก (Fraction 2) โดยเชื้อ *L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT 0904 มีกิจกรรมของแบคเทอริโอซิน

ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* ที่ 819,200 AUต่อมิลลิลิตร และ 409,600 AUต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.4) สอดคล้องกับค่ากิจกรรมจำเพาะ (Specific activity) ที่เพิ่มสูงขึ้นจาก 80.3 AUต่อไมโครกรัมของโปรตีนเป็น 1,853.4 AUต่อไมโครกรัมของโปรตีนเป็นสำหรับการผลิตแบคเทอริโอซินของเชื้อ *L. plantarum* LS0602 โปรตีนในแบคเทอริโอซินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ใน Fraction 2 และเพิ่มเป็น 1,163.6 AUต่อไมโครกรัมของโปรตีนในส่วน Fraction 2 ของเชื้อ *L. brevis* LT 0904 และให้ปริมาณการได้กลับคืน (Recovery) เท่ากับ ร้อยละ 34.7 และ ร้อยละ 29.3 ของเชื้อ *L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT 0904 ตามลำดับ เมื่อกล่าวถึงปัจจัยของการทำให้บริสุทธิ์ (purification factor) แล้วจะเท่ากับ 2.9 สำหรับเชื้อ *L. plantarum* LS0602 และเท่ากับ 3.4 สำหรับเชื้อ *L. brevis* LT 0904

การทำให้แบคเทอริโอซินบริสุทธิ์มีหลายขั้นตอนและจากการทดลองพบว่าการตกตะกอนด้วยไตรคลอโรแอซิติก ส่งผลต่อกิจกรรมของแบคเทอริโอซินสูงสุดสอดคล้องกับการทดลองของ Ogunbanwo และคณะ (2003) พบว่าแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Lactobacillus plantarum* F1 และ *Lactobacillus brevis* OG1 มีกิจกรรมของแบคเทอริโอซินสูงสุดเมื่อผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนโปรตีนด้วยกรดไตรคลอโรแอซิติก ต่างจาก Rajarm และคณะ. 2010 พบว่าส่วนใสที่ปราศจากเซลล์ของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *Lactobacillus lactis* มีกิจกรรมของแบคเทอริโอซินสูงสุด (7,350 AUต่อมิลลิลิตร) Copeland (1994) กล่าวว่าโปรตีนส่วนใหญ่จะตกตะกอนออกจากสารละลายเมื่ออยู่ในสภาพที่มีกรดไตรคลอโรแอซิติกความเข้มข้นสูง วิธีการนี้ทำให้โปรตีนเสียสภาพซึ่งไม่สามารถกลับคืนสภาพเดิมได้ ด้วยเหตุนี้จึงควรใช้วิธีการตกตะกอนด้วยกรดไตรคลอโรแอซิติกเพียงเพื่อวิเคราะห์โปรตีนที่ไม่จำเป็นต้องให้มีการเปลี่ยนกลับไปเป็นโปรตีนรูปร่างเดิม ขณะที่ Carolissen-Mackay (1997) วิธีการทำให้แบคเทอริโอซินบริสุทธิ์นั้นทำได้หลายวิธี เช่น การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulphate precipitation) อิออนเอ็กซ์เชนจ์โครมาโตกราฟี (ion-exchange chromatography) แรงที่เกิดจากปฏิกิริยาของสารที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic interaction) และ การแยกสารโดยวิธี reverse phase HPLC เพื่อความบริสุทธิ์ของ curvacin A, sakacin P, lactosin S และbavaricin A ส่วนแบคเทอริโอซินอย่าง helveticin J and lactacin F ถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ขณะที่ lactacin B ใช้เทคนิคเจลเพอมีแอชั่นโครมาโตกราฟี (gel permeation chromatography)

ตารางที่ 4.4 การทำแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการต่าง ๆ

ชนิดของจุลินทรีย์	ขั้นตอนการทำให้สารแบคเทอริโอซินบริสุทธิ์	ปริมาตรแบคเทอริโอซิน (มล.)	กิจกรรมของแบคเทอริโอซิน (AU/มล.)	กิจกรรมทั้งหมด (Total activity: AV)$_a$	ความเข้มข้นของโปรตีน (Protein)$_b$ (ไมโครกรัม/มล.)	กิจกรรมจำเพาะ (Specific activity)$_c$ (AU/ไมโครกรัม)	ปัจจัยของการทำให้บริสุทธิ์ (Purification factor)$_d$	ปริมาณการได้กลับคืน (% Recovery)$_e$
L. plantarum LS0602	ส่วนใส	200	102,400	20,480,000	1,275	80.3	1	100
	ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต	50	204,800	10,240,000	953	214.9	2.7	74.7
	ไดอะไลซีส (Fraction 1) (ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต)	30	409,600	12,288,000	642	638.0	3.0	50.4
	ตกตะกอนด้วยกรดไตรคลอโรแอซิติก (Fraction 2)	2	819,200	1,638,400	442	1,853.4	2.9	34.7

$_a$ กิจกรรมรวม (Total activity) คือ ผลคูณระหว่างปริมาตรแบคเทอริโอซินกับกิจกรรมของแบคเทอริโอซินที่ได้

$_b$ ความเข้มข้นของโปรตีนคำนวณจากวิธีการของแบรดฟอร์ด (Bradford method) (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

$_c$ กิจกรรมจำเพาะ (Specific activity) หาได้จากการนำกิจกรรมของแบคเทอริโอซินมาหารด้วยความเข้มข้นโปรตีน (AU/ไมโครกรัม)

$_d$ ปัจจัยของการทำให้บริสุทธิ์ (Purification factor) คือการนำค่า Specific activity ที่เพิ่มขึ้นมาหารกัน

$_e$ ปริมาณร้อยละของการได้กลับคืน (% Recovery) คือค่าความเข้มข้นของโปรตีนคิดเป็นร้อยละหารด้วยความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้น

ตารางที่ 4.4 การทำแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *Lactobacillus brevis* ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการต่าง ๆ (ต่อ)

ชนิดของจุลินทรีย์	ขั้นตอนการทำให้สารแบคเทอริโอซินบริสุทธิ์	ปริมาตรแบคเทอริโอซิน (มล.)	กิจกรรมของแบคเทอริโอซิน (AU/มล.)	กิจกรรมทั้งหมด (Total activity: AV)$_a$	ความเข้มข้นของโปรตีน (Protein)$_b$ (ไมโครกรัม/มล.)	กิจกรรมจำเพาะ (Specific activity)$_c$ (AU/ไมโครกรัม)	ปัจจัยของการทำให้บริสุทธิ์ (Purification factor)$_d$	ปริมาณการได้กลับคืน (% Recovery)$_e$
L. brevis	ส่วนใส	200	51,200	10,240,000	1,202	42.6	1	100
LT0602	ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต	50	102,400	5,120,000	910	112.5	2.6	75.7
	ไดอะไอซีส (Fraction 1) (ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต)	30	204,800	6,144,000	598	342.5	3.0	49.8
	ตกตะกอนด้วยกรดไตรคลอโรแอซิติก (Fraction 2)	2	409,600	819,200	352	1,163.6	3.4	29.3

$_a$ กิจกรรมรวม (Total activity) คือ ผลคูณระหว่างปริมาตรแบคเทอริโอซินกับกิจกรรมของแบคเทอริโอซินที่ได้

$_b$ ความเข้มข้นของโปรตีนคำนวณจากวิธีการของแบรดฟอร์ด (Bradford method) (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

$_c$ กิจกรรมจำเพาะ (Specific activity) หาได้จากการนำกิจกรรมของแบคเทอริโอซินมาหารด้วยความเข้มข้นโปรตีน (AU/ไมโครกรัม)

$_d$ ปัจจัยของการทำให้บริสุทธิ์ (Purification factor) คือการนำค่า Specific activity ที่เพิ่มขึ้นมาหารกัน

$_e$ ปริมาณร้อยละของการได้กลับคืน (% Recovery) คือค่าความเข้มข้นของโปรตีนคิดเป็นร้อยละหารด้วยความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้น

4.1.3 ผลของอุณหภูมิ พีเอช และเอนไซม์ต่อความคงตัวของแบคเทอริโอซิน

จากการทดสอบหาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของกิจกรรมแบคเทอริโอซินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* โดยนำแบคเทอริโอซินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยกรดไตรคลอโรแอซิติก (Fraction 2) มาให้ความร้อนที่อุณหภูมิและเวลาที่ต่างกัน 8 ระดับดังนี้คือ ที่อุณหภูมิ 37, 63, 72, และ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และที่อุณหภูมิ 72, 85, 100, และ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที พบว่าแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *L. plantarum* LS0602 มีค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินไม่ลดลงเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่ำกว่าหรือเท่ากับ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (ค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินเท่ากับ 819,200 AUต่อมิลลิลิตร) แต่จะมีการสูญเสียกิจกรรมเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่าหรือเท่ากับ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (ตารางที่ 4.5) ส่วนแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *L. brevis* LT 0904 มีค่ากิจกรรมต่ำกว่าและมีความคงตัวต่อความร้อนน้อยกว่าแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *L. plantarum* LS0602 คือมีกิจกรรมแบคเทอริโอซินไม่ลดลงหากให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่ำกว่าหรือเท่ากับ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (มีค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินเท่ากับ 409,600 AU ต่อมิลลิลิตร) แต่จะสูญเสียกิจกรรมเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่าหรือเท่ากับ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีขึ้นไป

สำหรับการศึกษาผลของพีเอชที่ระดับพีเอช 2-10 ต่อความคงตัวของกิจกรรมแบคเทอริโอซิน พบว่าแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 สายพันธุ์มีความคงตัว (ค่ากิจกรรมไม่ลดลง) เมื่ออยู่ในสภาพที่มีพีเอชในช่วงพีเอช 2-7 โดยแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *L. plantarum* LS0602 มีค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินเท่ากับ 819,200 AUต่อมิลลิลิตรซึ่งสูงกว่าค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *L. brevis* LT 0904 (มีค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินเท่ากับ 409,600 AUต่อมิลลิลิตร) ตามตารางที่ 4.5 แต่ค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อทั้งสองสายพันธุ์จะค่อย ๆ ลดลงเมื่ออยู่ในสภาพที่มีพีเอชสูงกว่าพีเอช 8

เมื่อศึกษาผลของเอนไซม์ α-amylase เอนไซม์ lipase เอนไซม์ papain เอนไซม์ pepsin และเอนไซม์ trypsin ที่ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อความคงตัวของกิจกรรมของแบคเทอริโอซินของเชื้อ *L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT 0904 พบว่าเอนไซม์ดังกล่าวไม่มีผลทำให้แบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 สายพันธุ์สูญเสียกิจกรรม (ตารางที่ 4.5)

จากการทดสอบหาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของกิจกรรมแบคเทอริโอซินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* โดยนำแบคเทอริโอซินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยกรดไตรคลอโรแอซิติก (Fraction 2) มาให้ความร้อนที่อุณหภูมิและเวลาที่ต่างกัน 8 ระดับดังนี้คือ ที่อุณหภูมิ 37, 63, 72, และ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และที่อุณหภูมิ 72, 85, 100, และ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที พบว่าแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *L. plantarum* LS0602 มีค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินไม่ลดลงเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่ำกว่า

หรือเท่ากับ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (ค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินเท่ากับ 819,200 AUต่อมิลลิลิตร) แต่จะมีการสูญเสียกิจกรรมเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่าหรือเท่ากับ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (ตารางที่ 4.5) ส่วนแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *L. brevis* LT 0904 มีค่ากิจกรรมต่ำกว่าและมีความคงตัวต่อความร้อนน้อยกว่าแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *L. plantarum* LS0602 คือมีกิจกรรมแบคเทอริโอซินไม่ลดลงหากให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่ำกว่าหรือเท่ากับ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (มีค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินเท่ากับ 409,600 AU ต่อมิลลิลิตร) แต่จะสูญเสียกิจกรรมเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่าหรือเท่ากับ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีขึ้นไป

สำหรับการศึกษาผลของพีเอชที่ระดับพีเอช 2-10 ต่อความคงตัวของกิจกรรมแบคเทอริโอซิน พบว่าแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 สายพันธุ์มีความคงตัว (ค่ากิจกรรมไม่ลดลง) เมื่ออยู่ในสภาพที่มีพีเอชในช่วงพีเอช 2-7 โดยแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *L. plantarum* LS0602 มีค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินเท่ากับ 819,200 AUต่อมิลลิลิตรซึ่งสูงกว่าค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *L. brevis* LT 0904 (มีค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินเท่ากับ 409,600 AUต่อมิลลิลิตร) ตามตารางที่ 4.5 แต่ค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อทั้งสองสายพันธุ์จะค่อย ๆ ลดลงเมื่ออยู่ในสภาพที่มีพีเอชสูงกว่าพีเอช 8

เมื่อศึกษาผลของเอนไซม์ α-amylase, lipase, papain, pepsin และtrypsin ที่ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อความคงตัวของกิจกรรมของแบคเทอริโอซินของเชื้อ *L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT 0904 พบว่าเอนไซม์ดังกล่าวไม่มีผลทำให้แบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 สายพันธุ์สูญเสียกิจกรรม

การที่แบคเทอริโอซินไม่สูญเสียกิจกรรมในสภาวะที่เป็นพีเอชกรด ทนต่อสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงแต่ไม่ถึงจุดเดือด และทนต่อสภาวะที่มีเอนไซม์ต่าง ๆ ที่นำมาทดสอบสอดคล้องกับการทดลองของ Ogunbanwo และคณะ (2003) พบว่าแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ L. *plantarum* F1 และ L. *brevis* OG1 มีกิจกรรมของแบคเทอริโอซินสูง (6,400 AUต่อมิลลิลิตร) ขณะอยู่ในสภาวะที่มีพีเอช 2-6 แต่เมื่อพีเอชเพิ่มขึ้น (ตั้งแต่พีเอช 8) กลับพบว่ามีการสูญเสียกิจกรรมของแบคเทอริโอซิน ทั้งนี้เมื่อนำแบคเทอริโอซินมาทดสอบด้วยเอนไซม์ต่าง ๆ คือ เอนไซม์ lipase, pronase E, catalase, lysozyme, α-amylase แล้ว แบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *L. plantarum* F1 มีกิจกรรมของแบคเทอริโอซินลดลงเมื่อทดสอบด้วยเอนไซม์ pronase E ขณะที่แบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *L. brevis* OG1 กลับไม่สูญเสียกิจกรรมของแบคเทอริโอซินเลย

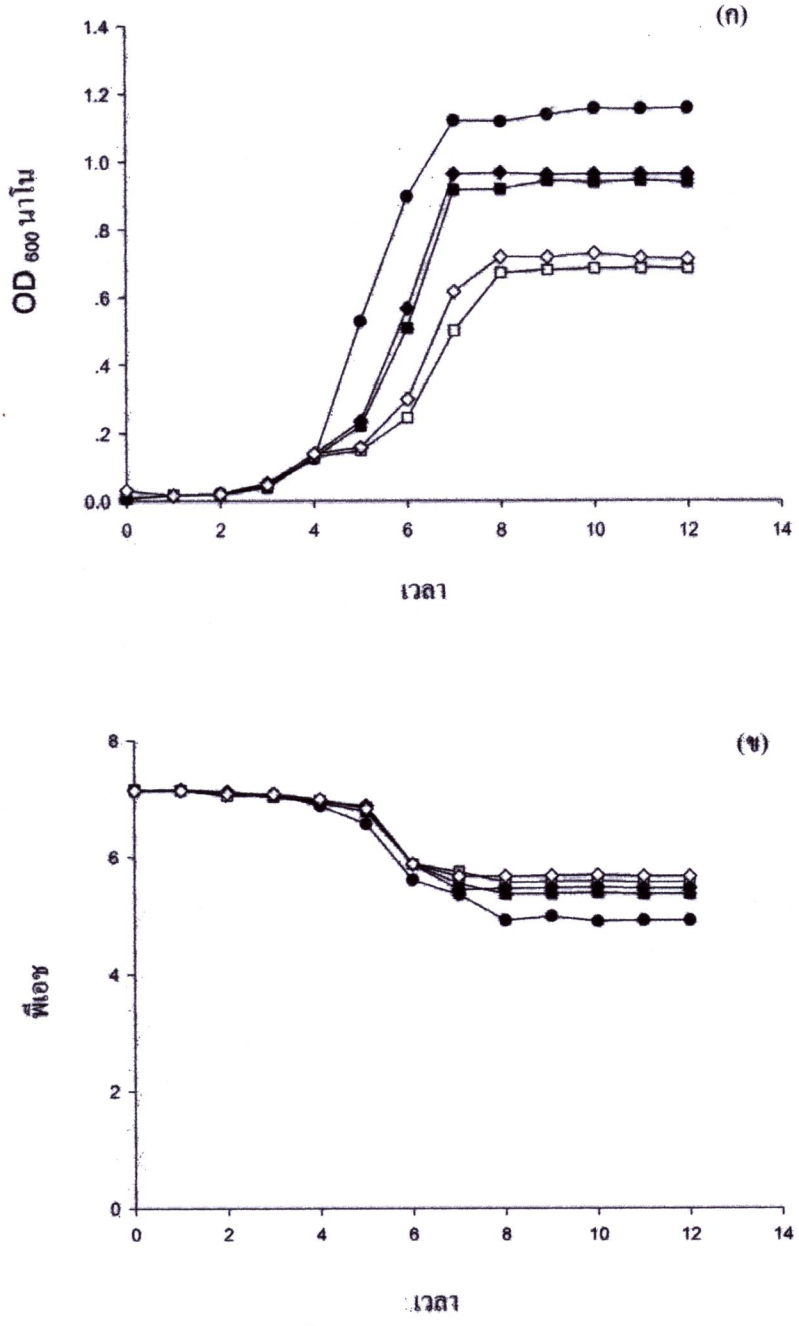
ตารางที่ 4.5 ผลของความคงตัวของสารแบคเทอริโอซินต่ออุณหภูมิ พีเอช และเอนไซม์

ทรีทเมนต์	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส (มิลลิเมตร)/ กิจกรรมของแบคเทอริโอซิน (AU/มิลลิลิตร)	
	Lactobacillus plantarum LS0602	*Lactobacillus brevis* LT0904
อุณหภูมิ/เวลา (นาที)	819,200	409,600
30 °C/30 (ชุดควบคุม)	819,200	409,600
37 °C/30	819,200	409,600
63 °C/30	819,200	409,600
72 °C/15	819,200	409,600
72 °C/30	819,200	409,600
85 °C/15	819,200	0
85 °C/30	819,200	0
100 °C/15	0	0
121 °C/15	0	0
พีเอช		
2	819,200	409,600
3	819,200	409,600
4	819,200	409,600
5	819,200	409,600
6	819,200	409,600
7	819,200	409,600
8	409,600	204,800
9	204,800	102,400
10	102,400	25,600
เอนไซม์		
ชุดควบคุม (ไม่เติมเอนไซม์)		
α-amylase	819,200	409,600
Lipase	819,200	409,600
Papain	819,200	409,600
Pepsin	819,200	409,600
Trypsin	819,200	409,600

ส่วนการทดลองของ Noonpaldee และคณะ (2002) ที่ผลิตไนซินจากเชื้อ *Lactococcus lactis* ซึ่งแยกมาจากแหนม ไส้กรอกหมักของไทย พบว่าไนซินมีกิจกรรมถึง 12,800 AUต่อมิลลิลิตรที่พีเอช 2-7 และเมื่อทดสอบกิจกรรมของไนซินที่พีเอช 8-10 ไนซินมีกิจกรรมลดลงอยู่ในช่วง 6400-3200 AU ต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้เมื่อนำไนซินมา ทดสอบที่พีเอช 3 ระดับคือ พีเอช 3, 5 และ7 ตามลำดับโดยที่พีเอชแต่ละระดับมีการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทั้งนี้ที่พีเอช 3 พบว่าไนซินยังคงมีกิจกรรมปกติ (12,800 AU ต่อมิลลิลิตร) เมื่อให้อุณหภูมิทั้ง 2 ระดับ แต่เมื่อทดสอบซินที่พีเอช 5 และ 7 ที่อุณหภูมิทั้งสองระดับทำให้กิจกรรมของแบคเทอริโอซินลดลง นอกจากนี้ไนซินจะสูญเสียกิจกรรมเมื่อทดสอบความคงทนต่อเอนไซม์ proteinase K และ α-chymotrypsin นอกจากนี้มีรายงานจากนักวิจัยท่านอื่นที่พบว่าสารแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *L. acidophilus* AC1 สูญเสียกิจกรรมเมื่อทดสอบด้วยเอนไซม์ trypsin และ α-chymotrypsin แต่จะทนต่อเอนไซม์ pepsin มีกิจกรรมเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีพีเอชระหว่างพีเอช 4.0-7.5 แต่จะไม่มีกิจกรรมของแบคเทอริโอซินเลยเมื่อให้อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที (Mehta และคณะ 1983) และ แบคเทอริโอซินที่มีโครงสร้างแบบแมคโครโมเลกุล (macromolecule) จะไม่ทนต่อเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน (เอนไซม์ pepsin และ trypsin) และทนต่อสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงถึง 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (Andersson และคณะ. 1988)

4.2 ผลการนำแบคเทอริโอซินมาใช้ในการยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ในอาหารเหลว

จากการนำแบคเทอริโอซิน (ร้อยละ16.7 และร้อยละ 23.1) ที่ผลิตจาก *L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT0904 เติมลงในอาหารเหลว TSB เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* พบว่า หลังจากเติม แบคเทอริโอซินเมื่อเข้าสู่ระยะ exponential phase ช่วงต้น (เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 4) ค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรของอาหารเหลว TSB ที่เติมแบคเทอริโอซินร้อยละ 23.1 ที่ผลิตจากเชื้อ *L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT0904 มีค่าต่ำกว่าค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรของอาหารเหลว TSB ชุดการทดลองอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และการเจริญของเชื้อ *List. monocytogenes* จะเริ่มคงที่เมื่อตั้งแต่ชั่วโมงที่ 8 จนถึงชั่วโมงสุดท้ายของการทดสอบ (ชั่วโมงที่ 12) พบว่าอาหารเหลว TSB ที่เติมแบคเทอริโอซิน (ร้อยละ 23.1) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *List. monocytogenes* ได้ดีกว่า อาหารเหลว TSB ที่เติมแบคเทอริโอซิน (ร้อยละ 16.7) คืออยู่ที่ 0.77-0.80 และ 0.85-0.97 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช พบว่าค่าพีเอชของอาหารเหลว TSB ที่เติมแบคเทอริโอซินที่ทั้ง 2 ระดับมีค่าพีเอชลดลงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ในทุกช่วงเวลาของการบ่มและเมื่อถึงชั่วโมงที่ 12 พบว่ามีค่าพีเอชลดลงอยู่ในช่วงพีเอช 5.4-5.6 จากพีเอชเริ่มต้นคือพีเอช 7.1 ขณะที่พีเอชของอาหาร TSB ชุดควบคุมมีค่าพีเอชลดลงมากที่สุด (พีเอช 4.9) ซึ่งมีพีเอชน้อยกว่าค่าพีเอชของอาหารเหลว TSB ที่เติมแบคเทอริโอซินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) รูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในอาหารเหลว Tryptic Soy broth (TSB) ที่เติมแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *Lactobacillus plantarum* LS0602 และ *Lactobacillus brevis* LT0904 (รูป ก) การเปลี่ยนแปลงค่าความขุ่น (OD_{600} นาโนเมตร) และ(รูป ข) การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหาร TSB ขณะบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สัญลักษณ์ : ● ชุดควบคุม (ไม่เติมแบคเทอริโอซิน) ■ อาหาร TSB ที่เติมแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *L. plantarum* LS0602 ร้อยละ16.7 □ อาหาร TSB ที่เติมแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *L. plantarum* LS0602 ร้อยละ23.1 ♦ อาหาร TSB ที่เติมแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *L. brevis* LT0904 ร้อยละ16.7 ◊ อาหาร TSB ที่เติมแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *L. brevis* LT0904 ร้อยละ23.1

การที่แบคเทอริโอซินมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *List. monocytogenes* ได้ดีสอดคล้องกับการทดลองของ Pinto และคณะ (2009) ที่เติมแบคเทอริโอซินคือ bacALP7 (มีกิจกรรมแบคเทอริโอซินที่ 25, 600 AUต่อมิลลิลิตร) และ bacALP57 (มีกิจกรรมแบคเทอริโอซินที่ 12, 800 AUต่อมิลลิลิตร) ที่เติมเมื่อเข้าสู่ระยะ exponential phase ช่วงต้น พบว่าแบคเทอริโอซินทั้งสองชนิดมีฤทธิ์ในการเชื้อยับยั้งเชื้อในสายพันธุ์ *Listeria* ได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมแบคเทอริโอซิน ทั้งนี้ Lücke (2000) ได้กล่าวว่าแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของชนิดอื่นที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกัน เช่น *Listeria*, *Bacillus*, *Clostridium* และ *Staphylococcus* ทั้งนี้แบคเทอริโอซินมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบเนื่องจาก cytoplasmic membrane ของแบคทีเรียแกรมบวกไวกว่าจึงถูกแบคเทอริโอซินทำลายได้ง่าย

4.3 การควบคุมการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ในหมูบดแช่เย็นโดยใช้แบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติก

4.3.1 การศึกษาผลของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในหมูบดแช่เย็น

ก) การเปลี่ยนแปลงของจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด และจำนวนจุลินทรีย์ก่อโรคทั้งหมดในเนื้อหมูบดแช่เย็นระหว่างการเก็บรักษา

จากการศึกษาผลของแบคเทอริโอซิน (ร้อยละ 2 และ ร้อยละ 4) ที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 สายพันธุ์คือ *Lactobacillus plantarum* LS0602 และ *Lactobacillus brevis* LT0904 ต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและจำนวนจุลินทรีย์ก่อโรคทั้งหมดในหมูบดแช่เย็นระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 วัน พบว่าจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในหมูบดทุกชุดการทดลองลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากเก็บรักษาครบ 3 วัน โดยจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในหมูบดชุดควบคุมที่ไม่เติมสารใด ๆ ลดลงน้อยที่สุด (0.59 log cycle) เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนจุลินทรีย์ในหมูบดชุดอื่นที่เติมสารแบคเทอริโอซิน ทั้งนี้หมูบดที่เติมแบคเทอริโอซินร้อยละ 4 ที่ผลิตจากเชื้อ *L. plantarum* LS0602 มีจำนวนจุลินทรีย์ลดลงมากที่สุด (1.42 log cycle) หลังจากเก็บรักษาครบ 3 วัน (รูปที่ 4.2 ก) และเมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษาเพิ่มขึ้นจำนวนจุลินทรีย์ในแต่ละชุดการทดลองเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยที่ทุกช่วงเวลาของการเก็บรักษา โดยพบว่าจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในหมูบดชุดควบคุมลดลงน้อยกว่าจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในหมูบดที่เติมแบคเทอริโอซินทุกชุดการทดลองเช่นเดียวกัน และเมื่อเก็บรักษาจนครบ 10 วัน หมูบดที่เติมแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *L. plantarum* LS0602 มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดลดลง 0.85 log cycle ซึ่งลดลงมากกว่าจำนวนจุลินทรีย์ในหมูบดของชุดการทดลองอื่น ๆ (ได้แก่ หมูบดที่เติมไนซินความเข้มข้น

50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดลดลง 0.25 log cycle และหมูบดที่เติมแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *L. brevis* LT0904 ที่ทั้ง 2 ระดับความเข้มข้นมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดลดลง 0.28-0.29 log cycle) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อพิจารณาระดับความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินที่เติมในหมูบดที่ผลิตจากเชื้อ *L. plantarum* LS0602 พบว่าหมูบดที่เติมสารแบคเทอริโอซินร้อยละ 4 มีจำนวนจุลินทรีย์น้อยกว่าจำนวนจุลินทรีย์ในหมูบดที่เติมแบคเทอริโอซินร้อยละ 2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

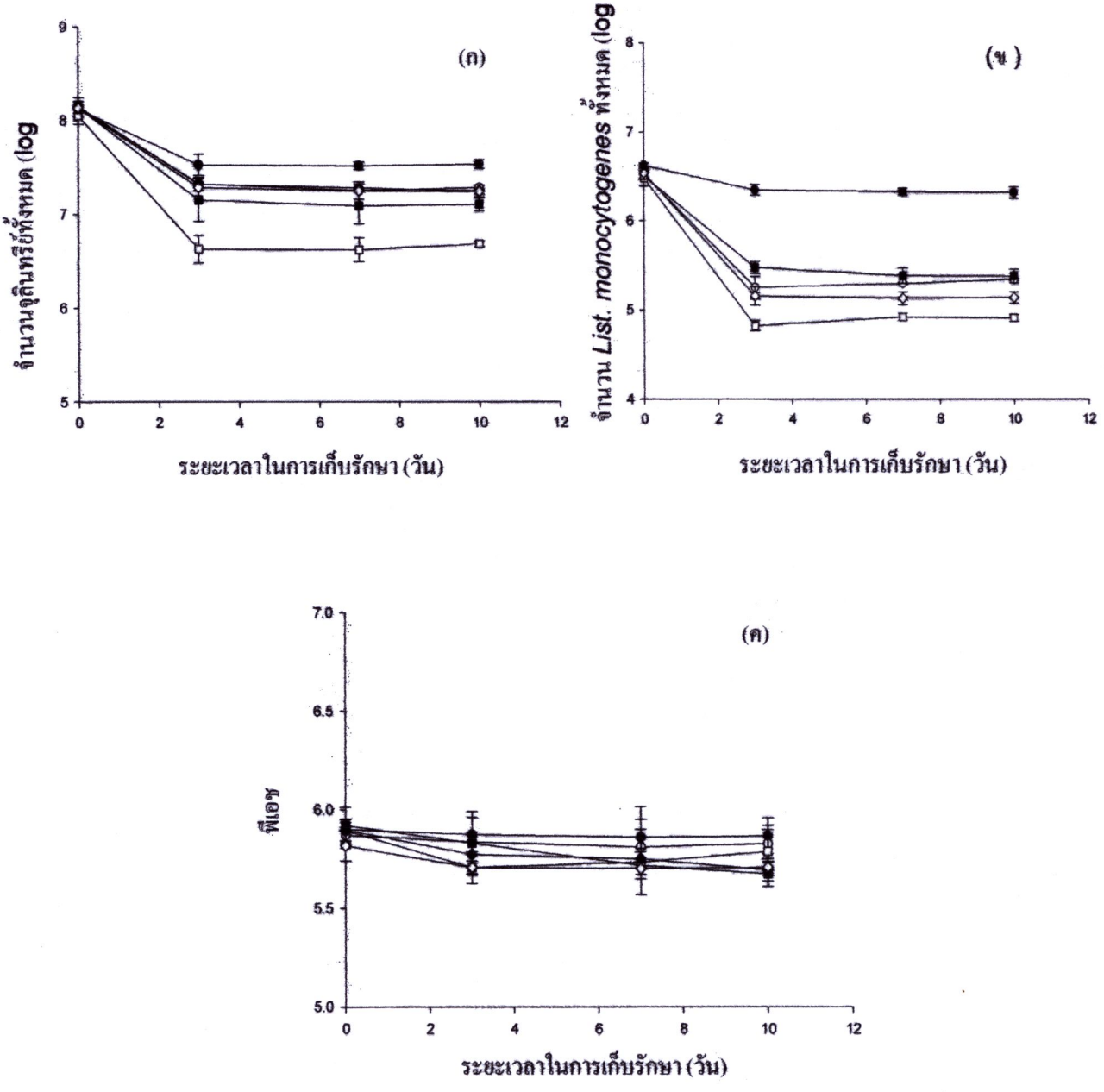
เมื่อพิจารณาจำนวน *Listeria monocytogenes* พบว่าหลังจากเก็บหมูบดแช่เย็นครบ 3 วัน จำนวนเชื้อ *List. monocytogenes* ในหมูบดชุดควบคุมลดลงน้อยกว่าจำนวน *L. monocytogenes* ในหมูบดที่เติมแบคเทอริโอซินทุกชุดการทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (รูปที่ 4.2ข) โดยหมูบดที่เติมแบคเทอริโอซินร้อยละ 4 ที่ผลิตจากเชื้อ *L. plantarum* LS0602 มีจำนวนเชื้อ *List. monocytogenes* ลดลงมากที่สุดถึง 1.7 log cycle หลังจากนั้นจำนวน *L. monocytogenes* ในหมูบดทุกชุดการทดลองมีจำนวนค่อนข้างคงที่เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้นจนครบ 10 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับวันแรกที่เก็บรักษา พบว่าเมื่อสิ้นสุดการเก็บรักษาจำนวน *L. monocytogenes* ในหมูบดชุดควบคุมมีจำนวนลดลงเพียง 0.31 log cycle จากจำนวนเริ่มต้นซึ่งลดลงน้อยกว่าจำนวนเชื้อ *L. monocytogenes* ในหมูบดที่เติมแบคเทอริโอซินทุดชุดการทดลอง (ลดลงมากถึง 1.40-1.58 log cycle) โดยหมูบดที่เติมแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *L. plantarum* LS0602 ให้ผลดีกว่าหมูบดที่เติมแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *L. brevis* LT0904 ในการลดจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดและจำนวนเชื้อ *List. monocytogenes* ทั้งหมด

ข) การเปลี่ยนแปลงพีเอชของเนื้อหมูบดแช่เย็นระหว่างการเก็บรักษา

ค่าพีเอชของหมูบดทุกชุดการทดลองเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาโดยพีเอชเริ่มต้นอยู่ในช่วงพีเอช 5.7-6.0 (รูปที่ 4.2 ค) และเมื่อเก็บรักษาต่อไปจนครบ 10 วันหมูบดทุกชุดการทดลองมีพีเอชลดลงเพียงเล็กน้อย (พีเอช 5.5-5.8) เมื่อพิจารณาค่าพีเอชของหมูบดตลอดระยะเวลาของการทดลองในแต่ละชุดการทดลอง พบว่าการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของหมูบดในแต่ละชุดการทดลองไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

พีเอชเปลี่ยนแปลงไม่มากนักเพราะหมูบดไม่ได้อยู่ในสภาวะของการหมักเนื่องจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำดังนั้นจึงมีเพียงเชื้อ *List. monocytogenes* ที่สามารถเจริญได้ในสภาวะดังกล่าวเท่านั้น เช่นเดียวกับการทดลองของ Vignolo และคณะ (1996) ที่ทดลองเติม Lactocin 705 ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *L. casei* CRL 705 เพื่อยับยั้งการเจริญของ *List. monocytogenes* ในเนื้อวัวที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียสโดยเติมแบคเทอริโอซินที่มีกิจกรรม 2 ระดับคือ 8,400 และ 16,800 AU ต่อมิลลิลิตร พบว่าแบคเทอริโอซินที่ทั้งสองระดับสามารถลดการเจริญของเชื้อ *List. monocytogenes* ได้อย่างน้อย 1 log cycle โดยที่แบคเทอริโอซินที่ความเข้มข้นสูงสุดสามารถลดจำนวนเชื้อ *List. monocytogenes* ในเนื้อวัวได้ร้อยละ 40 หลังจากเก็บรักษาเนื้อที่อุณหภูมิ -30 องศา

เซลเซียส เป็นเวลา 1 วันและการที่แบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งการเจริญของ *List. monocytogenes* อาจเนื่องมาจาก cytoplasmic membrane ไวต่อการถูกทำลายด้วยแบคเทอริโอซิน (Lücke. 2000)



รูปที่ 4.2 ผลการเปลี่ยนแปลง (ก) จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (ข) จำนวน *List. monocytogenes* ทั้งหมด (ค) พีเอช ของหมูบดที่เติมแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก สัญลักษณ์ : ● ชุดควบคุม (ไม่เติมแบคเทอริโอซิน) ○ หมูบดที่เติมไนซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ■ หมูบดที่เติมแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *L. plantarum* LS0602 ร้อยละ 2 □ หมูบดที่เติมแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *L. plantarum* LS0602 ร้อยละ 4 ◆ หมูบดที่เติมแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *L. brevis* LT0904 ร้อยละ 2 ◊ หมูบดที่เติมแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *L. brevis* LT0904 ร้อยละ 4