การศึกษาลักษณะบางประการของแบคทีริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์อาหารเนื้อและปลาหมักของไทย

ปริญญานิพนธ์

ของ

นฤมล ทองงาม

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

ตุลาคม 2553

การศึกษาลักษณะบางประการของแบคทีริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์อาหารเนื้อและปลาหมักของไทย

ปริญญานิพนธ์

ของ

นฤมล ทองงาม

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

ตุลาคม 2553

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การศึกษาลักษณะบางประการของแบคทีริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์อาหารเนื้อและปลาหมักของไทย

บทคัดย่อ

ของ

นฤมล ทองงาม

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

ตุลาคม 2553

นฤมล ทองงาม. (2553). *การศึกษาลักษณะบางประการของแบคทีริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์อาหารเนื้อและปลาหมักของไทย*. ปริญญานิพนธ์ กศ.ม. (ชีววิทยา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรอนงค์ พริ้งศุลกะ, อาจารย์ ดร. ณัฏฐิกา สุวรรณาศรัย.

จากการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารเนื้อและปลาหมักของไทยจำนวน 93 ตัวอย่าง พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ทั้งหมด 152 ไอโซเลท เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดมาทำการคัดเลือกเชื้อที่สามารถสร้างสารยับยั้งแบคทีเรีย โดยวิธี agar spot test และวิธี agar well diffusion พบว่ามีเชื้อจำนวน 7 ไอโซเลท คือ A8, N8, N23, 11, 14, 24 และ 26 ที่สามารถสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียได้ เมื่อใช้ *Weissella confusa* N31 เป็นเชื้อทดสอบ และจากการจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติก โดยการเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA กับฐานข้อมูล GenBank พบว่า ไอโซเลท A8, N8, 11, 14, 24 และ 26 มีความคล้ายคลึงร้อยละ 100 กับ *Lactobacillus plantarum* (GenBank accession number AB494717.1, EU789400.1, GU451063.1, GU253892.1, FJ542291.1, FJ542291.1 ตามลำดับ) และไอโซเลท N23 มีความคล้ายคลึงร้อยละ 99 กับ *W. cibaria* (GenBank accession number AB494716.1) จากนั้นทำการทดสอบว่าสารยับยั้งที่สร้างขึ้นเป็นแบคทีริโอซิน โดยใช้เอนไซม์คะตะเลสและเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน 7 ชนิด คือ trypsin, actinase, protease XIII, facin, trypsin from porcine pancreas, α-chymotrypsin และ pepsin พบว่า *Lb. plantarum* A8, N8, 11, 14, 24, 26 และ *W. cibaria* N23 จะยังคงมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อเมื่อใช้เอนไซม์คะตะเลสแต่จะสูญเสียแอคติวิตีในการยับยั้งเชื้อเมื่อใช้เอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน ยกเว้น *Lb. plantarum* 11 และ 24 ยังคงมีความสามารถในการยับยั้งเมื่อใช้เอนไซม์ protease XIII ซึ่งแสดงว่าสารยับยั้งที่สร้างจากเชื้อทั้งหมดมีคุณสมบัติเป็นโปรตีนและเป็นแบคทีริโอซิน จากนั้นคัดเลือก *Lb. plantarum* ที่สามารถสร้างแบคทีริโอซินสูงสุดได้แก่ *Lb. plantarum* 14 และ *W. cibaria* N23 มาศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคทีริโอซินที่ผลิตได้ พบว่าแบคทีริโอซินที่สร้างจาก *Lb. plantarum* 14 และ *W. cibaria* N23 สามารถสร้างแบคทีริโอซินสูงสุดที่ 16 ชม. และ 20 ชม. ตามลำดับ สามารถทนความร้อนได้ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นอกจากนี้แบคทีริโอซินที่สร้างจาก *Lb. plantarum* 14 สามารถมีแอคติวิตีที่ค่าความเป็นกรดด่างในช่วง 2.0 ถึง 10.0 ส่วนแบคทีริโอซินที่สร้างจาก *W. cibaria* N23 มีแอคติวิตีในการยับยั้งได้ที่ค่าความเป็นกรดด่างในช่วง 2.0 ถึง 8.0 และเมื่อนำมาศึกษา antibacterial spectrum ของแบคทีริโอซิน พบว่าแบคทีริโอซินที่สร้างจาก *Lb. plantarum* 14 มีแอคติวิตีในการยับยั้งการทำงานของเชื้อทดสอบคือ *Streptococcus salivarius* 57077, *Lb. plantarum*, *Lb. sakei*, *Pediococcus pentosaceus* JCM 5885, *P. pentosaceus*

JCM 5890 และ *Listeria innocua* ATCC 33090 แต่แบคทีริโอซินที่สร้างจาก *W. cibaria* N23 ไม่สามารถยับยั้งการทำงานของเชื้อทั้งหมดที่ทำการทดสอบได้ เมื่อนำมาศึกษาการดูดซับของแบคทีริโอซินบนแบคทีเรียที่สร้าง (producer cell) พบว่า แบคทีริโอซินที่สร้างจากทั้ง 2 เชื้อ ไม่มีการดูดซับแบคทีริโอซินที่ตัวเองสร้างขึ้น และเมื่อนำมาศึกษาการดูดซับของแบคทีริโอซินบนแบคทีเรียที่ไวต่อแบคทีริโอซิน พบว่าแบคทีริโอซินที่สร้างจาก *Lb. plantarum* 14 สามารถดูดซับบนผนังเซลล์ของแบคทีเรียที่ไวต่อการยับยั้งของแบคทีริโอซิน คือ *S. salivarius* 57077, *Lb. plantarum*, *Lb. sakei*, *P. pentosaceus* JCM 5885, *P. pentosaceus* JCM 5890 และ *L. innocua* ATCC 33090 ได้ ส่วนแบคทีริโอซินที่สร้างจาก *W. cibaria* N23 ไม่สามารถดูดซับบนผนังเซลล์ของแบคทีเรียที่ไวต่อการดูดซับของแบคทีริโอซินได้

PARTIAL CHARACTERIZATION OF BACTERIOCINS PRODUCED BY LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM THAI FERMENTED MEAT AND FISH PRODUCTS

AN ABSTRACT

BY

NARUMON THONGNGAM

Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the

Master of Education in Degree in Biology

at Srinakharinwirot University

October 2010

Narumon Thongngam. (2010). *Partial characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Thai fermented meat and fish products*. Master Thesis. M.Ed. (Biology). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Assist. Prof. Dr. Onanong Pringsulaka, Dr. Nuttika Suwannasai.

Lactic acid bacteria (LAB) from Thai fermented meat and fish products were isolated. From a total of 93 samples, 152 isolates of lactic acid bacteria were obtained. Antimicrobial activity screening was performed by using the agar-spot test and the agar diffusion method. Seven isolates designated A8, N8, N23, 11, 14, 24 and 26 which exhibited the production of antimicrobial activities against *Weissella confusa* N31, were identified by 16S rDNA sequence analyses. BLAST searches against the GenBank database revealed that A8, N8, 11, 14, 24 and 26 possessed 100% similarities to *Lactobacillus plantarum* (GenBank accession number AB494717.1, EU789400.1, GU451063.1, GU253892.1 and FJ542291.1 and FJ542291.1, respectively), N23 was close to *W. cibaria* (GenBank accession number AB494716.1) with 99% similarity. Complete inactivation of antimicrobial activity was observed after treatment of the bacteriocins with trypsin, actinase, protease XIII, facin, trypsin from porcine pancreas, α-chymotrypsin and pepsin, with the exception of *Lb. plantarum* 11 and 24 which retained their activities after treatment with protease XIII. In addition, the inhibitory activities were not affected by the addition of catalase. Taken together, these results indicated that all inhibitory compounds produced by the 7 strains were confirmed to be proteinaceous in nature and possessed typical characteristics of bacteriocins. Among the 7 strains tested, *Lb. plantarum* 14 and *W. cibaria* N23 which displayed the highest bacteriocin activities were selected for further study. The highest yield of bacteriocin produced by *Lb. plantarum* 14 and *W. cibaria* N23 was recorded at 16 h and 20 h, respectively. The bacteriocins produced by *Lb. plantarum* 14 remained stable after 2 h of incubation at pH values between 2.0 and 10.0 and for 15 min at 121 °C whereas the bacteriocins produced by *W. cibaria* N23 were stable in the range of pH 2.0 to 8.0 and for 15 min at 121 °C. Antibacterial spectrum of bacteriocin produced by *Lb. plantarum* 14 could inhibit the growth of *Streptococcus salivarius* 57077, *Lb. plantarum*, *Lb. sakei*, *P. pentosaceus* JCM 5885, *P. pentosaceus* JCM 5890 and *L. innocua* ATCC 33090 whereas *W. cibaria* N23 did not

inhibit any bacterial strains used. Both bacteriocins did not adhere to the surface of the producer cells. However, the adsorption of the bacteriocin from *Lb. plantarum* 14 to sensitive bacterial strains (*S. salivarius* 57077, *Lb. plantarum*, *Lb. sakei*, *P. pentosaceus* JCM 5885, *P. pentosaceus* JCM 5890 and *L. innocua* ATCC 33090) was recorded. On the other hand, the adsorption of the bacteriocin from *W. cibaria* N23 did not adhere to the sensitive strains.

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาลักษณะบางประการของแบคทีริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก
ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์อาหารเนื้อและปลาหมักของไทย

ของ

นฤมล ทองงาม

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.สมชาย สันติวัฒนกุล)
วันที่ ..... เดือน ..... พ.ศ. 2553

คณะกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์

.....ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรอนงค์ พริ้งศุลกะ)

.....กรรมการ
(อาจารย์ ดร.ณัฏฐิกา สุวรรณาศรัย)

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

.....ประธาน
(รองศาสตราจารย์ธวัช ดอนสกุล)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรอนงค์ พริ้งศุลกะ)

.....กรรมการ
(อาจารย์ ดร.ณัฏฐิกา สุวรรณาศรัย)

.....กรรมการ
(อาจารย์ ดร.ศิรพรรณ สุคนธสิงห์)

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุน

จาก

เงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554

และทุนสนับสนุนการทำปริญญานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษา

คณะวิทยาศาสตร์ ประจำปี พ.ศ. 2553

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์นี้สำเร็จได้ด้วยดีเป็นเพราะผู้วิจัยได้รับความกรุณาอย่างยิ่งจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรอนงค์ พริ้งศุลกะ ประธานกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ และอาจารย์ ดร.ณัฏฐิกา สุวรรณาศรัย คณะกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ ผู้ซึ่งเสียสละเวลาอันมีค่าเพื่อให้คำปรึกษาและคำแนะนำในการจัดทำงานวิจัย ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี รวมทั้งรองศาสตราจารย์ ธวัช ดอนสกุลและอาจารย์ ดร.ศิรพรรณ สุคนธสิงห์ ที่ร่วมเป็นกรรมการในการสอบ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ผู้วิจัยขอกราบขอบคุณอาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้แก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาการศึกษา ซึ่งทำให้ผู้วิจัยนำความรู้มาประยุกต์ใช้ในการจัดทำงานวิจัยครั้งนี้ และยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการพัฒนาประเทศ ตามเจตนารมณ์ของการศึกษาตามหลักสูตรชีววิทยาต่อไป

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554 และทุนสนับสนุนการทำปริญญานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษาคณะวิทยาศาสตร์ ประจำปี พ.ศ. 2553 ผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ ที่นี้ ที่สนับสนุนทุนการศึกษาให้กับผู้วิจัย ท้ายที่สุดขอน้อมรำลึกถึงคุณบิดามารดา และขอบคุณพี่ๆ น้องๆ ที่ให้กำลังใจ ให้การสนับสนุนในด้านการศึกษาแก่ผู้วิจัยด้วยดีตลอดมา และขอขอบคุณผู้มีพระคุณท่านอื่นๆ ที่มิได้กล่าวนามในที่นี้ที่ให้ความช่วยเหลือในทุกๆ ด้านจนปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จเรียบร้อยด้วยดี

นฤมล ทองงาม

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	**บทนำ**.....	1
	ภูมิหลัง.....	1
	วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
	ความสำคัญของการวิจัย.....	2
	ขอบเขตของการวิจัย.....	3
2	**เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**.....	4
	ผลิตภัณฑ์อาหารหมัก.....	4
	แบคทีเรียกรดแลคติก.....	8
	การจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติก.....	8
	กระบวนการหมักกรดแลคติก.....	12
	สารเมแทบอไลท์ (metabolite) อื่นที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก.....	14
	แบคทีริโอซิน.....	16
	แบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างแบคทีริโอซิน.....	20
	การจัดจำแนกแบคทีริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก.....	28
	กลไกการออกฤทธิ์ของแบคทีริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก.....	30
	ปัจจัยที่มีผลต่อในการสร้างแบคทีริโอซินของแบคทีเรียกรดแลคติก.....	32
	การนำแบคทีริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกมาประยุกต์ใช้ในอาหาร.....	36
3	**วิธีดำเนินการวิจัย**.....	38
	อุปกรณ์การทดลอง.....	38
	วิธีการทดลอง.....	40
	การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก.....	40
	การคัดเลือกเชื้อที่สามารถสร้างสารยับยั้งแบคทีเรีย.....	40
	การจัดจำแนกเชื้อที่สามารถสร้างสารยับยั้งแบคทีเรีย.....	41
	การทดสอบสารยับยั้งแบคทีเรียว่าเป็นแบคทีริโอซิน.....	43
	การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสร้างแบคทีริโอซิน.....	44

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ **หน้า**

3 **วิธีดำเนินการวิจัย (ต่อ)**

วิธีการทดลอง (ต่อ)

การศึกษาสมบัติเบื้องต้นของแบคทีริโอซินที่ผลิตได้..... 44

การศึกษามวลโมเลกุลของแบคทีริโอซิน..... 45

การศึกษาการดูดซับของแบคทีริโอซินบนแบคทีเรียที่สร้าง (producer cell)..... 46

การศึกษาการดูดซับของแบคทีริโอซินบนแบคทีเรียที่ไวต่อ
การยับยั้งของแบคทีริโอซิน..... 46

4 **ผลการศึกษา**..... 48

5 **สรุปและอภิปรายผลการทดลอง**..... 103

บรรณานุกรม..... 109

ภาคผนวก..... 122

ประวัติย่อผู้วิจัย..... 145

บัญชีตาราง

ตาราง **หน้า**

1 แบคทีริโอซินที่ได้มีการศึกษา..... 17

2 ความแตกต่างระหว่างแบคทีริโอซินและสารปฏิชีวนะ..... 19

3 แบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างแบคทีริโอซิน..... 20

4 การจัดจำแนก class ของแบคทีริโอซิน..... 28

5 การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีบริเวณใสรอบโคโลนีบนอาหารแข็ง MRS ที่เติม $CaCO_3$ ร้อยละ 0.5..... 49

6 การคัดเลือกเชื้อที่สามารถสร้างสารยับยั้งแบคทีเรีย..... 60

7 ลักษณะบางประการของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้..... 66

8 ความสามารถในการยับยั้งหลังจากใช้เอนไซม์คะตะเลสและเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนทั้ง 7 ชนิด..... 90

9 ผลการศึกษา antibacterial spectrum..... 96

10 ผลการดูดซับของแบคทีริโอซินบนแบคทีเรียที่ไวต่อแบคทีริโอซิน..... 102

11 ตารางสรุปผลการศึกษา antibacterial spectrum ที่ได้จาก *Lb. plantarum* และ *Weissella* สายพันธุ์ต่างๆ..... 105

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ **หน้า**

1 การผลิตกรดแลคติกโดยกระบวนการหมักแบบ homofermentation และ heterofermentation…… 13

2 แบบจำลองการทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์เป้าหมายโดยแบคทีริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก…….... 32

3 ลักษณะรูปร่างของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์ปลาหมัก……..... 48

4 ผลการเทียบเคียงลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลท A8 กับ type strain ของ *Lactobacillus plantarum* NBRC 15891 (GenBank accession number AB326351.1)……... 69

5 ผลการเทียบเคียงลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลท N8 กับ type strain ของ *Lactobacillus plantarum* NBRC 15891 (GenBank accession number AB326351.1)……... 72

6 ผลการเทียบเคียงลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลท N23 กับ type strain ของ *Weissella cibaria* LMG 17699 (GenBank accession number AJ295989)…….…. 75

7 ผลการเทียบเคียงลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลท 11 กับ type strain ของ *Lactobacillus plantarum* NBRC 15891 (GenBank accession number AB326351.1)…….. 78

8 ผลการเทียบเคียงลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลท 14 กับ type strain ของ *Lactobacillus plantarum* NBRC 15891 (GenBank accession number AB326351.1)…….. 81

9 ผลการเทียบเคียงลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลท 24 กับ type strain ของ *Lactobacillus plantarum* NBRC 15891 (GenBank accession number AB326351.1)……... 84

10 ผลการเทียบเคียงลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลท 26 กับ type strain ของ *Lactobacillus plantarum* NBRC 15891 (GenBank accession number AB326351.1)…….. 87

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ **หน้า**

11 ผลการวัดค่าความขุ่นของ *Lb. plantarum* 14 และ *W. cibaria* N23 ที่ OD 600 nm..... 91

12 ผลการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสร้างแบคทีริโอซิน..... 92

13 ผลการทดสอบค่าความเป็นกรดด่างต่อแอคติวิตีของแบคทีริโอซิน..... 93

14 แอคติวิตีของแบคทีริโอซินหลังจากให้ความร้อนที่ 60 องศาเซลเซียสที่เวลาต่างๆ..... 94

15 แอคติวิตีของแบคทีริโอซินหลังจากให้ความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียสที่เวลาต่างๆ..... 94

16 แอคติวิตีของแบคทีริโอซินหลังจากให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียสที่เวลาต่างๆ..... 95

17 แอคติวิตีของแบคทีริโอซินหลังจากให้ความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที..... 95

18 การวิเคราะห์มวลโมเลกุลของแบคทีริโอซินของ *W. cibaria* N23 โดยวิธี tricine- SDS-PAGE..... 98

19 การวิเคราะห์มวลโมเลกุลของแบคทีริโอซินของ *Lb. plantarum* 14 โดยวิธี tricine-SDS-PAGE..... 99

20 ผลการดูดซับของแบคทีริโอซินต่อแบคทีเรียที่สร้าง..... 101

บทที่ 1
บทนำ

ภูมิหลัง

ปัจจุบันภาคอุตสาหกรรมอาหารได้หันมาให้ความสนใจในการผลิตอาหารปลอดภัยโดยใช้สารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่มาจากธรรมชาติและหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีเติมลงไปในกระบวนการผลิตอาหาร อาหารหมักประเภทเนื้อของไทย เช่น แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว และปลาร้า ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายตั้งแต่ในอดีตจนถึงปัจจุบัน โดยพบว่าในอดีตอาหารหมักเหล่านี้มักใช้แบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria; LAB) ที่มีอยู่ตามธรรมชาติที่ติดมากับวัตถุดิบในการหมัก และควบคุมสภาวะการหมักให้เหมาะสม เพื่อให้แบคทีเรียกรดแลคติกชนิดที่ต้องการเจริญได้ดี ต่อมาได้มีการริเริ่มการผลิตในระดับกึ่งอุตสาหกรรมและระดับอุตสาหกรรม โดยพบว่าผู้ผลิตได้หันมาใช้หัวเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก (lactic starter culture) กันมากขึ้น (นภา โล่ห์ทอง. 2535: 159)

แบคทีเรียกรดแลคติก เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ เป็นพวก microaerophilic หรือ facultatively anaerobe ไม่มีไซโตโครม (cytochrome) และไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) มีค่าปริมาณ G + C น้อยกว่า 55 โมลเปอร์เซ็นต์ ทนกรด และต้องการสารอาหารซับซ้อนเพื่อใช้ในการเจริญ สามารถสร้างกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายในการหมักคาร์โบไฮเดรต โดยทั่วไปมักพบในแหล่งที่มีสารอาหารมาก โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น นม เนื้อ เครื่องดื่ม บางชนิดพบเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในปาก ลำไส้ และระบบสืบพันธุ์ ในปัจจุบันแบคทีเรียกรดแลคติกได้ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการหมักอาหารอย่างแพร่หลาย เนื่องจากจัดเป็นแบคทีเรียที่ยอมรับว่าปลอดภัย (Generally recognized as safe; GRAS) และสามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย เช่น แบคทีริโอซิน กรดแลคติก ไดอะเซทิล และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นต้น (Daeschel. 1989: 164-167; Schillinger; Geisen; & Holzapfel. 1996: 158-164)

แบคทีริโอซินเป็นเปปไทด์ที่สังเคราะห์มาจากไรโบโซมซึ่งโดยทั่วไปจะไม่ทำให้เกิดการตายของเซลล์ตั้งต้นที่ผลิตแบคทีริโอซินนั้น (Montville; & Kaiser. 1993: 1-22) และส่วนใหญ่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียในกลุ่มสายพันธุ์ใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตามมีแบคทีริโอซินบางชนิดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียอื่นได้ด้วย การนำแบคทีริโอซิน รวมทั้งจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตแบคทีริโอซินมาใช้นั้นเป็นที่ยอมรับกันอย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากผู้บริโภคในปัจจุบันได้หันมาให้ความสนใจในการใช้ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ และตระหนักถึงโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจากการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหาร แบคทีริโอซินได้เข้ามามีบทบาทอย่างน้อย 3 ทางในการควบคุมความปลอดภัยใน

อาหาร คือ การใช้แบคทีริโอซินที่บริสุทธิ์หรือบริสุทธิ์บางส่วนในการเติมเป็นส่วนประกอบหนึ่งในอาหาร การใช้สายพันธุ์ของเชื้อที่สร้างแบคทีริโอซินผสมกับองค์ประกอบที่ใช้เตรียมอาหาร หรือการใช้สายพันธุ์ที่สร้างแทนสายพันธุ์เดิมที่ใช้เป็นหัวเชื้อตั้งต้นในอาหารหมัก (Deegan; et al. 2006: 1058-1071)

งานวิจัยที่เกี่ยวกับการแยกแบคทีริโอซินจากอาหารหมักในประเทศนั้นมีผู้รายงานไว้มากมาย รวมถึงการแยกแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ใหม่จากอาหารหมัก เนื่องจากประเทศไทยมีความหลากหลายของผลิตภัณฑ์อาหารหมักในแต่ละภาค อย่างไรก็ตามงานวิจัยที่เน้นถึงการศึกษาลักษณะต่างๆ ของแบคทีริโอซินที่ผลิตได้ เช่น การศึกษาถึงมวลโมเลกุลของแบคทีริโอซินที่ผลิต การศึกษาถึงผลของการเข้าเกาะติดของแบคทีริโอซินต่อเชื้อสร้างแบคทีริโอซินได้ หรือการศึกษาถึงการเกาะติดกับเชื้อที่ทนและเชื้อที่ไวต่อแบคทีริโอซินยังไม่มีรายงานมากนัก จากความสำคัญดังกล่าวในโครงการวิจัยนี้จึงทำการศึกษาลักษณะของแบคทีริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกจากอาหารหมักของประเทศ โดยคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างแบคทีริโอซินจากอาหารหมักในแหล่งต่างๆ และเน้นเชื้อที่ไม่เคยมีการรายงานถึงการสร้างแบคทีริโอซินมาก่อน เนื่องจากในปัจจุบันได้มีเชื้อที่ทำให้เกิดอาหารเน่าเสียและอาหารเป็นพิษดื้อต่อการยับยั้งโดยแบคทีริโอซินหลายชนิด เช่น ไนซิน ดังนั้นจึงทำให้การแยกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างแบคทีริโอซินชนิดที่แตกต่างไปจากรายงานวิจัยเดิมจึงเป็นองค์ความรู้ที่ยังคงดำเนินไปอย่างต่อเนื่องทั้งในต่างประเทศและในประเทศ จากนั้นทำการศึกษาลักษณะของแบคทีริโอซินที่สร้างขึ้นทั้งความเสถียรต่ออุณหภูมิ และค่าความเป็นกรดด่าง การศึกษาการเข้าเกาะติดของแบคทีริโอซินในเชื้อที่สร้างตลอดจนเชื้อที่ทนและเชื้อที่ไวต่อแบคทีริโอซินที่ผลิตได้ โดยคาดว่าข้อมูลที่ได้จะทำให้ทราบถึงลักษณะของแบคทีริโอซิน และความเป็นไปได้ในการนำไปใช้ในการผลิตอาหารนั้นๆ ต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากอาหารหมักของประเทศ
2. เพื่อจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างแบคทีริโอซินได้ในระดับสปีชีส์
3. เพื่อศึกษาลักษณะของแบคทีริโอซินที่ผลิตได้

ความสำคัญของการวิจัย

ทำให้ได้แบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างแบคทีริโอซินได้ซึ่งอาจนำไปใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการผลิตอาหารหมักให้มีความปลอดภัย หรืออาจนำแบคทีริโอซินที่สร้างได้ไปประยุกต์ใช้ในการถนอมอาหารต่อไป

ขอบเขตของการวิจัย

1. ทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สร้างแบคทีริโอซิน
2. จัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างแบคทีริโอซินได้ในระดับสปีชีส์
3. ศึกษาลักษณะของแบคทีริโอซินที่ผลิตได้ ได้แก่ การศึกษาผลของค่าความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของแบคทีริโอซิน
4. การศึกษาขนาดมวลโมเลกุลของแบคทีริโอซิน
5. การศึกษาการดูดซับของแบคทีริโอซินบนแบคทีเรียที่สร้าง (producer cell)
6. การศึกษาการดูดซับของแบคทีริโอซินบนแบคทีเรียที่ไวต่อแบคทีริโอซินที่ผลิตได้

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ผลิตภัณฑ์อาหารหมัก

การหมักเป็นวิธีการถนอมอาหารที่รู้จักกันมาเป็นระยะเวลายาวนาน โดยในช่วงแรกมีวัตถุประสงค์เพียงเพื่อยืดอายุการเก็บรักษา และป้องกันการเน่าเสียของอาหาร ซึ่งอาศัยหลักที่ว่าการเก็บเกี่ยวและการเก็บรักษาที่ถูกวิธีจะทำให้ผลิตภัณฑ์นั้นไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและเคมีหรือมีการเปลี่ยนแปลงน้อย มีลักษณะเฉพาะทางประสาทสัมผัสอยู่ในเกณฑ์เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค อาหารหมักของไทยมีมากมายหลายชนิด โดยมักอาศัยการหมักที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ และใช้เชื้อที่ปนมากับวัตถุดิบที่ใช้ โดยต้องควบคุมภาวะการเจริญให้เหมาะสม (วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. 2534: 5-17) ต่อมาได้มีการผลิตอาหารหมักระดับขยายส่วนมากขึ้น โดยใช้เชื้อบริสุทธิ์เติมลงในวัตถุดิบเพื่อลดระยะเวลาในการหมัก ตัวอย่างเช่น การเติมเชื้อ *Pediococcus cerevisiae* ในการหมักปลาจะทำให้ปลาเจ่าที่หมักเป็นเวลา 5 วัน มีค่าความเป็นกรดด่างและปริมาณกรดใกล้เคียงกับปลาเจ่าที่หมักโดยวิธีธรรมชาติเป็นเวลา 10 วัน นอกจากนี้การเติม *P. cerevisiae* หรือ *Lactobacillus brevis* ลงไปในปลาส้ม พบว่า สามารถทำให้หมักปลาส้มได้เร็วขึ้น (นาถสุดา วิศววงศ์. 2522)

ผลิตภัณฑ์แปรรูปจากกระบวนการหมักหรืออาหารหมักดองได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายในประเทศแถบตะวันออกมากกว่าในประเทศแถบตะวันตก โดยเฉพาะประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น เวียดนาม ลาว กัมพูชา และไทย สำหรับในประเทศไทยนอกจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมักแล้วยังมีการนำสัตว์น้ำ เช่น ปลา มาแปรรูปโดยผ่านกระบวนการหมัก เช่น ปลาร้า ปลาเจ่า ปลาจ่อม ปลาส้ม เป็นต้น (Beddows. 1985: 2-23) โดยตัวอย่างของอาหารหมักประเภทเนื้อและปลาได้แก่

1.1 แหนม

แหนม (Nham) หรือ Thai fermented pork เป็นผลิตภัณฑ์เนื้อหมักพื้นบ้านของไทย มีรสเปรี้ยว แหนมเป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโปรตีนสูงและมีปริมาณไขมันต่ำ กระบวนการผลิตแหนมสามารถทำได้ง่าย ไม่ซับซ้อน และไม่ต้องผ่านความร้อน โดยมีสัดส่วนและองค์ประกอบของวัตถุดิบที่แตกต่างกันไปตามแต่ละท้องถิ่น ซึ่งโดยส่วนใหญ่ผลิตจากเนื้อหมูบดละเอียด หนังหมู ข้าวสุกบด กระเทียมบด และเครื่องปรุงต่างๆ ได้แก่ โซเดียมไนไตรท์ (sodium nitrite) น้ำตาล เกลือ พริกไทย หรือบางครั้งอาจมีการเติมสมุนไพรบางชนิด วิธีการหมักแหนมทำโดยการนำเอาส่วนผสมทั้งหมดมาผสมคลุกเคล้าให้เข้ากัน และบรรจุในถุงพลาสติกหรือห่อด้วยใบตอง ทำการบ่มเป็นเวลา 3-4 วัน เพื่อให้เกิดการหมักจนมีรสเปรี้ยว (Adams; & Moss. 1995: 245-246) โดยแหนมที่ทำเสร็จใหม่ๆ มีค่าความเป็น

กรดด่างอยู่ระหว่าง 6.2-6.5 ความชื้นร้อยละ 70-80 แหนมที่หมักจนบริโภคได้จะมีความเป็นกรดด่างอยู่ระหว่าง 4.5-5.3 และความชื้นจะลดลงเหลือร้อยละ 65-70 สำหรับคุณค่าทางอาหารพบว่า แหนมมีโปรตีนประมาณร้อยละ 20-25 ไขมันประมาณร้อยละ 5-8 รวมถึงวิตามินบีและแร่ธาตุเล็กน้อย (Twiddy; & Reilly. 1987: 197-203)

1.1.1 กระบวนการหมักแหนมสามารถทำได้ 2 วิธี ดังนี้

1.1.1.1 กระบวนการหมักตามธรรมชาติ (natural fermentation)

เป็นการหมักโดยภาวะต่างๆ ในการหมักจะขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม และแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีอยู่ตามธรรมชาติ จากการแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากตัวอย่างแหนมที่หมักโดยวิธีธรรมชาติพบว่า พบแบคทีเรียกรดแลคติกที่ทราบสายพันธุ์ในแหนมหลายสปีชีส์ ได้แก่ *Lactobacillus bavaricus, Lb. curvatus, Lb. farciminis, Lb. plantarum, Lb. sakei, Pediococcus damnosus, P. acidilactici, P. pentosaceus* และ *Leuconostoc* sp. (ปิ่นมณี ขวัญเมือง. 2546) อย่างไรก็ตามการหมักตามธรรมชาติกิจกรรมการหมักมักไม่คงที่ ทำให้ไม่สามารถควบคุมคุณภาพของแหนมที่ผลิตได้ เทคโนโลยีการผลิตแหนมในประเทศไทยส่วนใหญ่ยังนิยมการหมักโดยอาศัยเชื้อตามธรรมชาติและใช้ดินประสิวเข้าช่วยเพื่อให้ได้แหนมที่น่ารับประทาน

1.1.1.2 กระบวนการหมักด้วยหัวเชื้อ

วิธีนี้จะมีการเติมหัวเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกลงไปในส่วนผสมที่ใช้ในการผลิต (Jay. 1996: 110-113) โดยหัวเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่นิยมใช้ได้แก่ *Lb. plantarum*, *Lb. curvatus, Pediococcus pentosaceus* และ *P. acidilactici* ซึ่งหัวเชื้อเหล่านี้ได้คัดเลือกมาจากการหมักตามธรรมชาติ (Hammes; & Knauf. 1994: 155-168) ประโยชน์ของแบคทีเรียกรดแลคติกพบว่า ช่วยในการสร้างกรดทำให้ผลิตภัณฑ์มีรสเปรี้ยว และส่งผลต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ (อรนุช อุดรภิชาติ. 2530) เช่น เชื้อก่อโรคหรือเชื้อที่ทำให้อาหารเน่าเสีย นอกจากนี้ยังผลิตสารบางชนิดที่มีคุณสมบัติเป็นสารกันบูดชีวภาพ (Kelly; Asmundson; & Huang. 1996: 657-662) จากการศึกษาพบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกที่เกิดขึ้นในผลิตภัณฑ์การหมักนั้นนอกจากจะช่วยยืดอายุการเก็บรักษาและทำให้คุณภาพของอาหารดีขึ้นแล้ว ยังช่วยรักษาคุณภาพเนื้อสัมผัสของอาหารหมักอีกด้วย (Twiddy; & Reilly. 1987: 197-203)

1.2 ปลาส้ม

ปลาส้มหรือปลาข้าวสุก หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ทำจากปลาที่ผ่านกรรมวิธีการหมักด้วยเกลือ ข้าวสวยหรือข้าวเหนียวนึ่ง และกระเทียม จากนั้นนำส่วนผสมต่างๆ มาทำการหมักจนมีรสเปรี้ยว (Adams. 1986: 179-193) ปลาส้มจัดเป็นผลิตภัณฑ์ปลาหมักชนิดหนึ่งที่มีการผลิตมากในแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือ อาจทำจากปลาทั้งตัวหรือเฉพาะเนื้อปลาก็ได้ ถ้าทำจากปลาทั้งตัวจะทำได้โดยนำปลามาล้างทำความสะอาดและควักเอาไส้และพุงปลาออก จากนั้นจึงใส่ส่วนผสมต่างๆ แล้วหมักจนมีรสเปรี้ยว นอกจากนี้ยังมีผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากปลาที่ได้จากการบดเนื้อปลากับส่วนผสมอื่นๆ แล้วห่อด้วยใบตองหรือบรรจุภัณฑ์ที่ปิดสนิททำการหมักจนเกิดรสเปรี้ยว เรียกว่า ส้มฟัก หรือ ส้มปลา (Saisithi; et al. 1986: 87) ปลาส้มนอกจากจะมีคุณค่าทางโภชนาการสูงแล้วยังเป็นแหล่งโปรตีนที่ดี ปลาที่นิยมมาผลิตเป็นปลาส้มส่วนใหญ่เป็นปลาน้ำจืด ได้แก่ ปลาตะเพียน ปลานิล หรืออาจใช้ปลาตัวเล็กๆ เช่น ปลาขาวสร้อย ปลาแก ปลาอีไทย ปลาซิว เป็นต้น (Phitakpol. 1993: 155-166)

ผลิตภัณฑ์ปลาส้มทางภาคใต้ของไทย เช่น ในจังหวัดสงขลา มีลักษณะพิเศษและแตกต่างจากผลิตภัณฑ์ปลาส้มทางภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือคือ ไม่ใส่กระเทียมและข้าวสวย แต่จะใส่น้ำเชื่อมและข้าวคั่วแทน โดยการนำปลาน้ำจืดมาขอดเกล็ดและเอาไส้ออก ล้างน้ำให้สะอาด เมื่อสะเด็ดน้ำ นำไปคลุกเคล้ากับเกลือ น้ำเชื่อม และข้าวคั่ว ในอัตราส่วนปลา 0.6 กิโลกรัม เกลือ 100 กรัม น้ำเชื่อม 125 มิลลิลิตร และข้าวคั่ว 80 กรัม หลังจากนั้นนำไปบรรจุในถุงพลาสติก ปิดปากถุงให้สนิท หมักที่อุณหภูมิห้อง (30-38 องศาเซลเซียส) นาน 8-12 วัน (Paludan; et al. 2002: 61-70)

1.2.1 การจำแนกชนิดของปลาส้ม ในปัจจุบันแบ่งออกเป็น 4 ชนิด ดังนี้

1.2.1.1 ปลาส้มตัว คือ ปลาส้มที่ใช้ปลาตัวโต เช่น ปลาตะเพียน ปลานวลจันทร์ ปลาสูด เครื่องปรุง ได้แก่ ข้าวเหนียวนึ่งสุกหรือข้าวสวย เกลือ และกระเทียมบด

1.2.1.2 ปลาส้มชิ้น (ปลาส้มสับ) คือ ปลาส้มที่ทำจากเนื้อปลาล้วนที่หั่นเป็นชิ้นตามขวางของลำตัวปลา ทำได้ทั้งปลาหนังและปลามีเกล็ด ปลาหนังที่นิยมนำมาทำปลาส้ม ได้แก่ ปลาสวาย ส่วนปลามีเกล็ดที่นิยม ได้แก่ ปลานวลจันทร์

1.2.1.3 ปลาส้มเส้น คือ ปลาส้มที่ทำจากเนื้อปลาล้วนที่หั่นเป็นเส้น

1.2.1.4 ปลาส้มฟัก หรือแหนมปลา คือ ปลาส้มที่ทำจากเนื้อปลาล้วนที่บดหรือสับโดยการนำมาปลามาสับให้ละเอียด ส่วนใหญ่นิยมใช้ปลากราย ปลาชะโด หรือปลาช่อน

1.3 ปลาร้า

ปลาร้า หรือ ปลาแดก ในภาษาอีสาน เป็นผลิตภัณฑ์ที่นิยมบริโภคกันมากในเกือบทุกภาคของประเทศไทยและมีคุณค่าทางอาหารสูง ซึ่งส่วนใหญ่จะนิยมรับประทานกันมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย นอกจากนี้ในประเทศลาว และบางส่วนของประเทศเวียดนามยังนิยมรับประทานด้วย โดยมักทำจากปลาน้ำจืดขนาดเล็ก เช่น ปลาสร้อยขาว ปลากระดี่ มาหมักกับรำข้าวและเกลือ แล้วบรรจุใส่ไห โดยทั่วไปจะหมักไว้ 7-8 เดือน แล้วจึงนำมารับประทานได้ หรืออาจนำไปปรุงอาหารชนิดอื่น เช่น ส้มตำ เป็นต้น โดยส้มตำที่ใส่ปลาร้านั้นจะเรียกว่า ส้มตำลาว หรือ ส้มตำปลาร้า ปัจจุบันการทำปลาร้าได้พัฒนาขึ้นไปสู่ระดับสากลมากขึ้น มีปลาร้าพาสเจอร์ไรซ์หรือปลาร้าอนามัยเพื่อฆ่าเชื้อโรค แต่ส่วนใหญ่การทำปลาร้าก็คงยังนิยมทำแบบดั้งเดิม โดยมีการตักขายตามน้ำหนักตามตลาดสดต่างๆ (อาหารการกินแห่งลุ่มทะเลสาบ. 2551: 32-33)

1.3.1 การจำแนกชนิดของปลาร้า (แพรวพรรณ ห้องทองแดง. 2522)

การแบ่งประเภทของปลาร้าตามคุณลักษณะที่ปรากฏและวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตสามารถจำแนกออกได้ 2 ประเภท ดังนี้

1.3.1.1 ปลาร้าข้าวคั่ว คือ ปลาหมักเกลือที่ใส่ข้าวคั่ว มีลักษณะเปียก เนื้อปลาอ่อนนุ่ม สีเหลืองเข้ม มีกลิ่นหอมเฉพาะตัว ปลาร้าประเภทนี้ส่วนมากผลิตจากปลาช่อน ปลากระดี่ ปลานิล ปลาตะเพียน ปลาหมอเทศ แหล่งผลิตที่สำคัญจะอยู่ในจังหวัดบริเวณภาคกลาง ได้แก่ อ่างทอง พระนครศรีอยุธยา สิงห์บุรี ชัยนาท และนครสวรรค์

1.3.1.2 ปลาร้ารำ คือ ปลาหมักเกลือที่ใส่รำหรือรำผสมข้าวคั่ว มีลักษณะเป็นน้ำใสๆ สีคล้ำ แต่ปลายังคงเป็นตัว มีกลิ่นรุนแรงมากกว่าปลาร้าข้าวคั่ว โดยมากทำจากปลาที่มีขนาดเล็ก เช่น ปลาสร้อย ปลาซิว และปลาเบญจพรรณชนิดต่างๆ แหล่งผลิตที่สำคัญอยู่ในจังหวัดบริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เช่น ยโสธร กาฬสินธุ์ ขอนแก่น

2. แบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria)

แบคทีเรียกรดแลคติก เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างกลม (cocci) หรือท่อน (rod) ไม่สร้างสปอร์จัดเป็นพวก microaerophilic หรือ facultative anaerobe ไม่มีไซโตโครม (cytochrome) ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) มีค่าปริมาณ G+C น้อยกว่า 55 โมลเปอร์เซ็นต์ ประกอบด้วยจีนัสต่างๆได้แก่ *Streptococcus, Lactococcus, Enterococcus, Pediococcus, Tetragenococcus Leuconostoc, Lactobacillus, Carnobacterium, Aerococcus, Vagococcus, Oenococcus* และ *Weissella* (Stiles; & Holzapfel. 1997: 1-29) แบคทีเรียกรดแลคติกจะเปลี่ยนอาหารที่มีน้ำตาลให้เป็นกรดแลคติกประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ และผลิตภัณฑ์อื่น เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดอะเซทิล อะเซโทอิน (acetoin) และกรดอินทรีย์ (Stiles; & Holzapfel. 1997: 1-29) แบคทีเรียกรดแลคติกได้รับการยอมรับว่าเป็นแบคทีเรียที่ปลอดภัย (generally recognized as safe bacteria; GRAS bacteria) และมักใช้ในการหมักอาหารและถนอมอาหาร ซึ่งอาจหมักตามธรรมชาติโดยใช้แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีอยู่ในวัตถุดิบหรืออาจเติมแบคทีเรียกรดแลคติกในรูปเชื้อตั้งต้น (starter culture) เติมลงในอาหารภายใต้ภาวะควบคุม ตัวอย่างของจีนัสที่ใช้เป็นเชื้อตั้งต้นในกระบวนการหมักผลิตภัณฑ์นม เนื้อ และผัก ได้แก่ *Lactococcus, Streptococcus, Pediococcus, Leuconostoc, Lactobacillus* และ *Carnobacterium* (Stiles; & Hastings. 1991: 247-251)

3. การจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติก

ในปี ค.ศ. 1919 ออร์ลา-เจนสัน ได้ริเริ่มจัดอนุกรมวิธานแบคทีเรียกรดแลคติก โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชนิดของกระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคส ความสามารถในการใช้น้ำตาลแต่ละชนิดและความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ สามารถแบ่งแบคทีเรียกรดแลคติกออกเป็น 7 จีนัส ได้แก่ *Betabacterium, Thermobacterium, Streptobacterium, Streptococcus, Betacoccus, Microbacterium* และ *Tetranococcus* (พิเชษฐ์ สุวรรณ์. 2548: 4-36)

ต่อมา วูดและฮอลแซบเฟล (Wood และ Holzapfel) ในปี ค.ศ. 1995 ได้จัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกเป็น 9 จีนัส ได้แก่ *Bacillus, Betabacterium, Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Streptococcus* และ *Sporolactobacillus* (Wood; & Holzapfel. 1995: 161-162)

ในปัจจุบันนี้ได้มีการนำความรู้ทางด้านอณูพันธุศาสตร์เข้ามาใช้ในการจัดจำแนกแบคทีเรียในระดับจีนัสและสปีชีส์ โดยพิจารณาความแตกต่างของชนิดกรดนิวคลีอิกบนดีเอ็นเอ (DNA-DNA homology) และความใกล้ชิดทางสายวิวัฒนาการ (phylogeny) โดยดูจากลำดับเบสบน

ribosomal RNA ทำให้การจัดจำแนกมีความถูกต้องมากยิ่งขึ้น ซึ่งโดยสามารถจัดจำแนกแบคทีเรีย-กรดแลคติก ออกเป็น 12 จีนัส ดังนี้

3.1 *Streptococcus*

เซลล์มีรูปร่างกลมหรือไข่ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8-1.2 ไมครอน เซลล์จัดเรียงตัวเป็นคู่หรือต่อกันเป็นสายโซ่ ผลิตกรดแลคติกชนิด L (+) เป็นผลิตภัณฑ์หลักเท่านั้นจากการหมักกลูโคส (homofermentative) ต้องการอาหารที่ซับซ้อนในการเจริญ มีหลายสปีชีส์ที่ก่อโรคในคนหรือสัตว์ เจริญที่อุณหภูมิ 20-42 องศาเซลเซียส ปัจจุบันประกอบด้วย 39 สปีชีส์ มีปริมาณ G + C ระหว่าง 34- 46 โมลเปอร์เซ็นต์ (Hardie; & Whiley. 1995: 55-124)

3.2 *Vagocoocus*

เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่แยกออกมาจากจีนัส *Streptococcus* เนื่องจากสามารถเคลื่อนที่ได้ ประกอบด้วย 5 สปีชีส์ ได้แก่ *Vagococcus fluvialis*, *V. carniphilus*, *V. fessus*, *V. lutrae* และ *V. salmoninarum* (Ali Al-Ahmad; et al. 2008: 235-238) และ *V. elongates* (Lawson; et al. 2007: 751 - 754)

3.3 *Lactococcus*

เซลล์มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่หรือต่อกันเป็นสายโซ่ มักใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตนม สามารถเจริญได้ที่ 10 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส มีปริมาณ G+C ระหว่าง 34-43 โมลเปอร์เซ็นต์ ประกอบด้วย 5 สปีชีส์ ได้แก่ *Lactococcus garvieae*, *Lc. plantarum*, *Lc. raffinolactis*, *Lc. piscium* และ *Lc. lactis* ซึ่งมี 3 subspecies ได้แก่ subsp. *lactis*, subsp. *cremoris*, subsp. *hordniae* (Teuber. 1995: 173-234)

3.4 *Aerococcus*

เป็นกลุ่มแบคทีเรียใน Family Streptococaceae เซลล์มีรูปร่างกลม ไม่มีการเคลื่อนที่ มีการแบ่งตัวแบบ 2 ระนาบ โดยทั่วไปจึงพบเซลล์อยู่เป็นคู่หรือ 4 เซลล์ สามารถเจริญได้ดีในสภาพที่มีอากาศเพียงเล็กน้อย เป็นพวก homofermentative แต่มีบางสายพันธุ์มีการสร้างเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติคล้ายเอนไซม์คะตะเลส (pseudocatalase) แบคทีเรียที่พบในจีนัสนี้ประกอบด้วย 7 สปีชีส์ คือ *Aerococcus viridans* (Williams; Hirch; & Cowan. 1953: 475 - 480), *A. urinae* (Aguirre; & Collins. 1992: 401 - 405), *A. christensenii* (Collins; et al. 1999: 1125 - 1128), *A. sanguinicola* (Lawson; et al. 2001a: 475 - 479), *A. urinaehominis* (Lawson; et al. 2001b: 683 - 686), *A. urinaeequi* (Felis; Torriani; & Dellaglio. 2005: 1325 - 1327) และ *A. suis* (Vela; et al. 2007: 1291 - 1294)

3.5 *Leuconostoc*

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ขึ้นอยู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีกลูโคส เซลล์มีลักษณะยืดออกคล้ายกลุ่ม lactobacilli แต่เมื่อเจริญในน้ำนมเซลล์จะมีลักษณะกลม การจัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรือเป็นสายโซ่สั้นถึงปานกลาง จัดเป็นแบคทีเรียกลุ่ม heterofermentative การเจริญต้องการอาหารที่ซับซ้อน มีปริมาณ G+C ระหว่าง 37-40 โมลเปอร์เซ็นต์ (Dellaglio; Dicks; & Torriani. 1995: 235-278)

3.6 *Pediococcus*

เซลล์มีรูปร่างกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.36-1.43 ไมครอน สามารถแบ่งตัวในลักษณะ 2 ทิศทางบนระนาบเดียวกัน โดยแบ่งครั้งที่ 2 ในทิศทางตั้งฉากของครั้งแรกทำให้เกิดลักษณะเฉพาะเป็น 4 เซลล์ติดกันคล้ายจตุรัส (tetrad formation) ทนต่อความเข้มข้นเกลือสูงบางสปีชีส์ทำให้เกิดการเสื่อมสภาพในเบียร์และไวน์ มีปริมาณ G+C ระหว่าง 34-44 โมลเปอร์เซ็นต์ ประกอบด้วย 6 สปีชีส์ ได้แก่ *Pediococcus acidilactici*, *P. domonosus*, *P. dextranicus*, *P. inopinatus*, *P. parvulus* และ *P. pentosaceus* (Stlies; & Holzapfel. 1997: 1-29)

3.7 *Tetragenococcus*

มีลักษณะการแบ่งตัวเหมือน *Pediococcus* สปีชีส์เดิมคือ *P. halophilus* อย่างไรก็ตามได้นำมาจัดจำแนกใหม่เนื่องจากความสามารถในการเจริญในอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงถึง 18 เปอร์เซ็นต์ และมีลำดับเบสบนยีน 16S rRNA ใกล้เคียงกับจีนัส *Enterococcus* และ *Carnobacterium* มากกว่าสกุลเดิม (Stlies; & Holzapfel. 1997: 1-29)

3.8 *Oenococcus*

ประกอบด้วยสปีชีส์เดียว คือ *Oenococcus oeni* ซึ่งเปลี่ยนมาจาก *Leuconostoc oenos* ด้วยคุณสมบัติการทนกรด และผลิตเอทานอลในปริมาณสูง รวมทั้งข้อมูลพันธุกรรมจากดีเอ็นเอโดยการศึกษา DNA hybridization และลำดับเบสของยีน 16S rRNA พบว่าแตกต่างจากสปีชีส์อื่นของ *Leuconostoc* อย่างชัดเจน (Dellaglio; Dicks; & Torriani. 1995: 235-278)

3.9 *Lactobacillus*

เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่มใหญ่ที่สุด และมีความหลากหลายของลักษณะทางฟีโนไทป์ สมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยา เนื่องจากมีปริมาณ G+C ภายในสปีชีส์แตกต่างกันมาก คือ ระหว่าง 32-53 โมลเปอร์เซ็นต์ เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนหรือทรงรี มีการจัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวๆ หรือเป็นโซ่ ในการเจริญต้องการอาหารที่ซับซ้อน บางสายพันธุ์มีการสร้างเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติคล้ายเอนไซม์คะตะเลส สามารถใช้เป็นโพรไบโอติกได้เป็นอย่างดี พบได้ทั่วไปในมนุษย์และสัตว์ นมและผลิตภัณฑ์

นม อาหารหมักชนิดต่างๆ และเครื่องดื่ม พบในพืชเพียงเล็กน้อย เช่น หญ้าหมักและผักดอง โดยทั่วไปไม่เป็นพิษ (Harrigan. 1998: 346-348)

3.10 *Carnobacterium*

เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างเป็นท่อนคล้าย lactobacilli ซึ่งก่อนหน้านี้เคยจำแนกไว้ในกลุ่ม lactobacilli ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 - 0.7 ไมครอน ยาว 1.1 - 3.0 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวหรือเป็นคู่ เป็นกลุ่ม heterofermentative บางสายพันธุ์สามารถสร้างก๊าซจากการใช้น้ำตาลกลูโคส ไม่สามารถเจริญบนอาหารที่มีอะซิเตท และไม่สร้างกรดโอลิอิก มีปริมาณ G+C ประมาณ 33.0-37.2 โมลเปอร์เซ็นต์ พบได้ตามเนื้อสัตว์ที่บรรจุในสภาพสุญญากาศ ปลา และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ปีก (Jay. 1996: 110-113; Schleifer; & Ludwing. 1995)

3.11 *Enterococcus*

เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีเซลล์เป็นรูปไข่ พบการจัดเรียงตัวของเซลล์เป็นเซลล์เดี่ยว เซลล์คู่ หรือเป็นสายโซ่สั้นๆ ต้องการอาหารซับซ้อนสำหรับการเจริญ สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10 – 45 องศาเซลเซียส บางสปีชีส์สามารถทำให้เกิดโรคได้ เจริญได้ในสภาพที่มีโซเดียมคลอไรด์ 6.5 เปอร์เซ็นต์ เจริญได้ที่ความเป็นกรดด่าง 9.6 ประกอบด้วย 20 สปีชีส์ มีปริมาณ G+C ระหว่าง 37-40 โมลเปอร์เซ็นต์ (Jay. 1996: 110-113)

3.12 *Weissella*

เป็นกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกจีนัสเดียวที่มีทั้งรูปร่างทรงกลม และเป็นท่อน ซึ่งเดิมจำแนกอยู่ในจีนัส *Leuconostoc* และ *Lactobacillus* ได้แก่ *Weissella paramesenteroides* (*Leuconostoc paramesenteroides*), *W. confusus* (*Lb. confusus*), *W. halotolerans* (*Lb. halotolerans*), *W. kandleri* (*Lb. kandleri*), *W. minor* (*Lb. minor*), *W. viridescens* (*Lb. viridescens*) นอกจากนี้ยังมีสปีชีส์ที่แยกได้ใหม่คือ *W. hellenica* (Stlies; & Holzapfel. 1997: 1-29), *W. thailandensis* (Tanasupawat; et al. 2000: 1479-1485), *W. cibaria* (Bjorkroth; et al. 2002: 141-148), *W. kimchii* (Choi; et al. 2002: 507-511), *W. soli* (Magnusson; et al. 2002: 831-834) และ *W. koreensis* (Lee; et al. 2002: 1257-1261)

4. กระบวนการหมักกรดแลคติก (lactic acid fermentation)

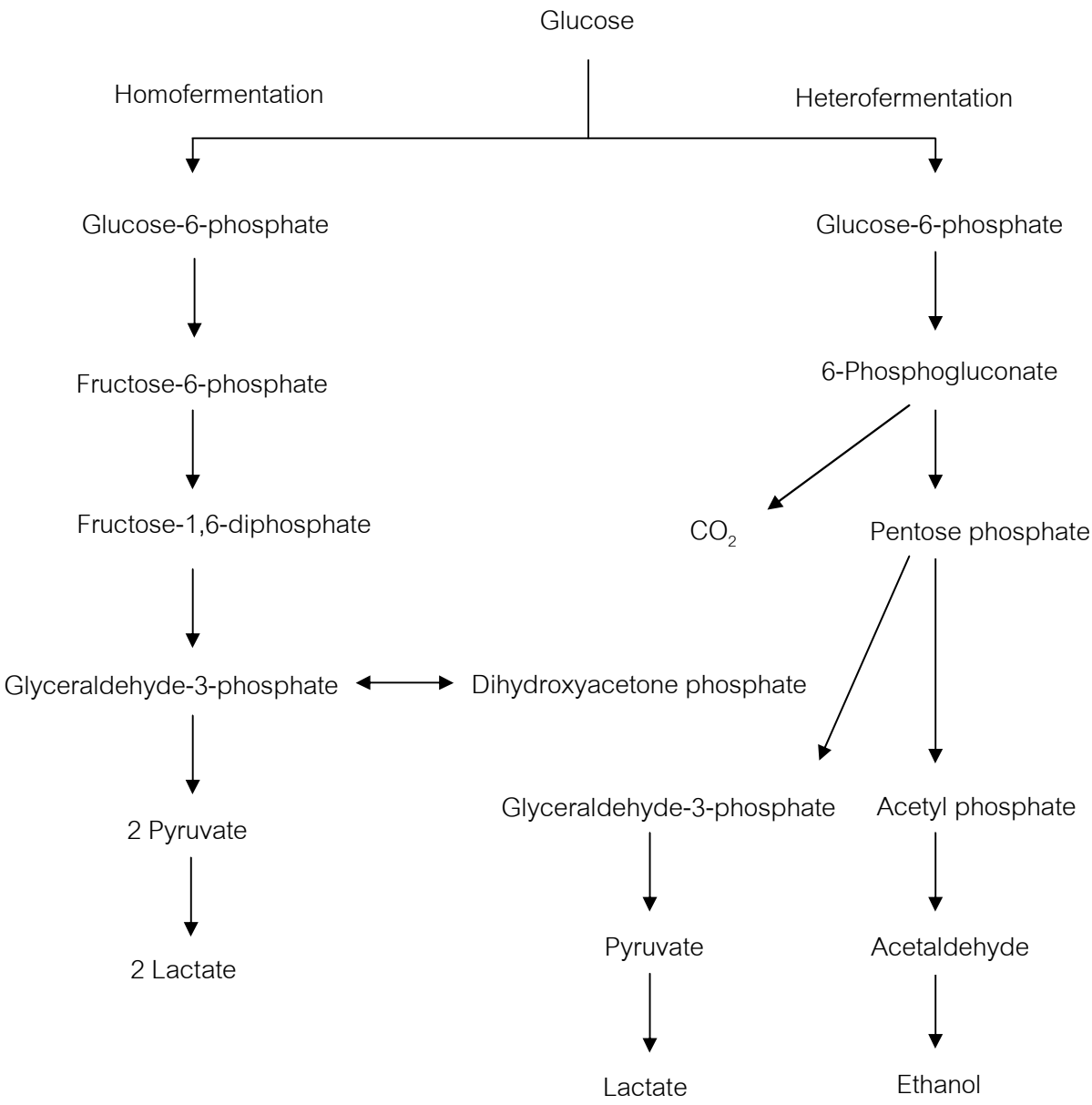
แบคทีเรียกรดแลคติก ต้องการพลังงานสำหรับการเจริญจากกระบวนการหมัก (fermentation) คาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆ เช่น น้ำตาลกลูโคส ซึ่งกระบวนการหมักคาร์โบไฮเดรตสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กระบวนการ (Litchfield. 1996: 45-95; Holzapfel; & Wood. 1995: 1-6) ดังนี้

4.1 homofermentation

เป็นกระบวนการหมักกลูโคสแล้วได้ผลผลิตส่วนใหญ่เป็นกรดแลกติก คือ ได้ประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ ตัวอย่างของแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีกระบวนการหมักแบบนี้ เช่น *E. faecalis*, *Lb. casei, Lb. delbrueckii, Lb. plantarum, Lc. lactis* subsp*. lactis* ซึ่งกลไกการเกิดกรดแลคติกจะเป็นไปตาม glycolysis (Embden-Meyerhof-Parnas) pathway คือ มีการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นกรดไพรูวิก (pyruvic acid) แล้วจึงเปลี่ยนต่อไปเป็นกรดแลคติกโดยเอนไซม์แลคเตทดีไฮโดรจีเนส (lactate dehydrogenase) (Schlegel. 1993; Holzapfel; & Wood. 1995: 1-6) (ภาพประกอบ 1)

4.2 heterofermentation

เป็นกระบวนการหมักกลูโคสและแลคโตสโดยแบคทีเรียกรดแลคติกไปเป็นผลิตภัณฑ์หลายชนิด ได้แก่ กรดแลคติก กรดแอซีติก เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ ตัวอย่างของแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีกระบวนการหมักแบบนี้ เช่น *Lb. brevis, Lb. bifermentans, Lb. fermentum, Lc. lactis*, *Lc. mesenteroides* ซึ่งกลไกการเกิดกรดแลคติกและสารอื่นๆ นั้นจะเป็นไปตาม pentose phosphate pathway และ glycolysis pathway (Schlegel. 1993; Holzapfel; & Wood. 1995: 1-6) (ภาพประกอบ 1)



ภาพประกอบ 1 การผลิตกรดแลคติกโดยกระบวนการหมักแบบ homofermentation และ heterofermentation

ที่มา: Forsythe. (2000). *The Microbiology of Safe Food*. p. 124.

5. สารเมแทบอไลท์ (metabolite) อื่นที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติกนอกจากจะมีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดกลิ่นรสเฉพาะตัวในอาหารหมักแล้ว ยังสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญและทำลายจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเกิดการเน่าเสียและจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคซึ่งปะปนมากับอาหาร เช่น *B. cereus, Clostridium botulinum, C. perfringens, S. aureus, Listeria monocytogenes* รวมทั้งแบคทีเรียกรดแลคติกบางชนิด (Abee; et al. 1995: 1-10; Freaz; et al. 1998: 231-235; De Vuyst; & Vandamme. 1994a: 91-142) ซึ่งสารที่แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างออกมายับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวส่วนใหญ่เป็นกรดแลคติกและกรดอะซิติก รวมทั้งยังมีสารชนิดอื่นๆ ที่เกิดขึ้นในปริมาณที่น้อยกว่ากรดแลคติก และกรดอะซิติกแต่มีผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดต่างๆ เช่นกัน ได้แก่ กรดฟอร์มิก (formic acid) กรดไขมันอิสระ (free fatty acid) แอมโมเนีย (ammonia) เอทานอล (ethanol) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) ไดอะซีทิล (diacetyl) อะซีโตอิน (acetoin) อะซีทัลดีไฮด์ (acetaldehyde) เบนโซเอต (benzoate) เอนไซม์ที่มีผลทำให้เซลล์แบคทีเรียแตก (bacteriolytic enzyme) และแบคทีริโอซิน (bacteriocin) รวมทั้งสารยับยั้งที่ยังไม่สามารถจัดจำแนกได้อีกหลายชนิด (De Vuyst; & Vandamme. 1994a: 91-142; Abee; et al. 1995: 1-10; Freaz; et al. 1998: 231-235; McMullen; & Stiles. 1996: 64-71; Schillinger; Geisen; & Holzapfel. 1996: 158-164; Eckner. 1992: 204-209) นอกจากนี้การที่มีแบคทีเรียกรดแลคติกเจริญอยู่ร่วมกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ จะเป็นการควบคุมการเจริญของแบคทีเรียเหล่านั้นโดยทางอ้อมกล่าวคือ จะทำให้เกิดการแข่งขันในการใช้สารอาหารและการใช้พื้นที่สำหรับการเจริญ (Adams. 1999: 171-178) โดยสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ ซึ่งสร้างโดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีการศึกษากันมาก ได้แก่

5.1 กรดอินทรีย์

กรดอินทรีย์ชนิดที่มีความสำคัญ ได้แก่ กรดแลคติก ซึ่งเป็นสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดหนึ่ง โดยเป็นผลผลิตที่เกิดขึ้นในกระบวนการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตซึ่งจะมีการเปลี่ยนไพรูเวตไปเป็นกรดแลคติกโดยเอนไซม์แลคเตทดีไฮโดรจีเนส ซึ่งกรดที่เกิดขึ้นเมื่อมีการสะสมมากขึ้นจะทำให้ค่าความเป็นกรดด่างในบริเวณนั้นลดลง ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญของทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ โดยพบว่ากรดแลคติกสามารถแทรกผ่านเข้าไปภายในเซลล์จุลินทรีย์ได้ และเมื่อพบสภาพภายในเซลล์ที่มีค่าความเป็นกรดด่างสูงกว่าภายนอกเซลล์ กรดแลคติกจะเกิดการแตกตัวได้เป็นไฮโดรเจนไอออน ซึ่งจะไปมีผลต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆ ภายในเซลล์ (De Vuyst; & Vandamme. 1994a: 91-142)

5.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

แบคทีเรียกรดแลคติกจะสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เมื่อเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจน โดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการถ่ายเทอิเล็กตรอน ซึ่งพบว่าไฮโดรเจนเปอร์-ออกไซด์จะทำปฏิกิริยากับไขมันที่อยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ไม่สามารถควบคุมการผ่านเข้าออกของสารได้ นอกจากนี้ยังมีผลในการทำลายโครงสร้างของกรดนิวคลีอิกและโปรตีนที่อยู่ภายในเซลล์ ทั้งนี้ยังพบว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์นอกจากจะสามารถทำลายจุลินทรีย์ได้โดยตรงแล้วยังสามารถไปรวมตัวกับสารอื่นๆ และเกิดเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดใหม่ได้อีกด้วย (De Vuyst; & Vandamme. 1994a: 91-142)

5.3 ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

เป็นผลผลิตที่เกิดจากกระบวนการหมักน้ำตาลแบบ heterofermentation โดยแบคทีเรียกรด-แลคติก ซึ่งก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นจะไปแทนที่ก๊าซออกซิเจนในสภาวะแวดล้อมรอบๆ ทำให้เกิดสภาวะไม่มีออกซิเจน ซึ่งไม่เหมาะสมสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ที่ต้องการใช้ออกซิเจน โดยเฉพาะในกลุ่มของเชื้อรา นอกจากนี้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ยังทำให้ค่าความเป็นกรดด่างภายในเซลล์ และรอบๆ เซลล์ลดลง มีผลทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย (De Vuyst; & Vandamme. 1994a: 91-142)

5.4 ไดอะซีทิล หรือ 2, 3-butanedione

เป็นผลผลิตจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของไพรูเวตโดยแบคทีเรียกรดแลคติกในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน ซึ่งพบว่าเมื่อแบคทีเรียกรดแลคติกเจริญในสภาวะที่มีซิเตรตอยู่ด้วยจะสร้างไพรูเวตออกมาในปริมาณมาก ซึ่งสารนี้จะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็นไดอะซีทิลและอะซีโตอิน โดยไดอะซีทิลสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคและทำให้อาหารเกิดการเน่าเสีย ซึ่งผลในการยับยั้งของสารกลุ่มนี้จะมีต่อแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ และรามากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก เนื่องจากไดอะซีทิลจะไปขัดขวางการใช้อาร์จินีนของแบคทีเรียแกรมลบโดยไปแทนที่อาร์จินีนในการรวมตัวกับ arginine-binding protein (De Vuyst; & Vandamme. 1994a: 91-142)

5.5 อะซีทัลดีไฮด์

เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตแบบ heterofermentation ของแบคทีเรียกรดแลคติกในสภาวะที่ไม่มีเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydro-genase) ทำให้เกิดการสร้างและขับอะซีตัลดีไฮด์ออกมาภายนอกเซลล์ ส่วนผลของอะซีตัลดีไฮด์ต่อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ นั้นยังไม่มีรายงานการศึกษามากนัก อย่างไรก็ตามมีการรายงานว่าอะซีทัลดีไฮด์ที่มีความเข้มข้นระหว่าง 10-100 ส่วนในล้านส่วน สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคใน

อาหาร เช่น *E. coli, S. aureus* และ *Salmonella typhimurium* ได้ (De Vuyst; & Vandamme. 1994a: 91-142)

5.6 แบคทีริโอซิน

เป็นสารประเภทโปรตีนที่สร้างจากแบคทีเรียมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียอื่นได้ โดยทั่วไปแบคทีเรียที่สร้างแบคทีริโอซินจะมีภูมิคุ้มกันต่อแบคทีริโอซินที่ตัวเชื้อเองสร้างขึ้น จึงทำให้ไม่ถูกยับยั้งจากแบคทีริโอซินของตนเอง การสร้างแบคทีริโอซินของเชื้อแบคทีเรียเชื่อว่าเกิดจากการปรับตัวเพื่อความอยู่รอดในสภาพแวดล้อมที่มีเชื้อหลายชนิดเจริญอยู่ร่วมกัน ทำให้เชื้อที่สร้างแบคทีริโอซินสามารถแย่งอาหารและพื้นที่เพื่อใช้ในการเจริญเติบโต ส่วนเชื้อชนิดอื่นที่ไม่สามารถสร้างแบคทีริโอซินได้ก็จะตายในที่สุด (Jack; et al. 1995: 793-802)

6. แบคทีริโอซิน

แบคทีริโอซินถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1925 โดย กราเทีย (Gratia. 1925: 1040-1042) ซึ่งเป็นแบคทีริโอซินที่ผลิตโดย *E. coli* V (*E. coli* CA7) สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* Φ (*E. coli* CA81) ได้ และเรียกสารดังกล่าวว่า colicins ต่อมามีการค้นพบสารที่มีลักษณะคล้าย colicins ซึ่งสร้างโดยแบคทีเรียแกรมบวกจึงมีการเรียกสารกลุ่มโปรตีนที่มีคุณสมบัติดังกล่าวว่า แบคทีริโอซิน โดยในระยะแรกพบว่า แบคทีริโอซินมีโครงสร้างเป็นโปรตีน ซึ่งสร้างได้จากทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบมีคุณสมบัติในการทำลายเฉพาะแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ในสปีชีส์เดียวกันเท่านั้น (Jacob; et al. 1953: 222-224) ต่อมาในปี ค.ศ. 1976 แทก ดาจานิ และ วานนามากเกอร์ (Tagg; Dajani; & Wannamaker. 1976: 722-756) ได้ให้คำจำกัดความของแบคทีริโอซินว่าเป็นสารประกอบโปรตีนที่มีลักษณะดังนี้

1) มีการออกฤทธิ์ยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียในชนิดเดียวกันหรือที่ใกล้เคียงกับแบคทีเรียที่สร้างแบคทีริโอซินออกมา

2) การออกฤทธิ์ทำให้แบคทีเรียที่ต้องการยับยั้งเกิดการตาย (bactericidal mode of action)

3) มีตำแหน่งที่จำเพาะในการยึดจับกับเซลล์เป้าหมาย

4) ยีนที่ควบคุมการสร้างและการต้านทานของเซลล์ต่อแบคทีริโอซินที่สร้างขึ้นอยู่บนพลาสมิด (plasmid)

5) เซลล์ที่สร้างจะถูกทำลายขณะที่มีการปลดปล่อยแบคทีริโอซินออกนอกเซลล์

อย่างไรก็ตามต่อมาพบว่ามีรายงานเกี่ยวกับแบคทีริโอซินชนิดต่างๆ ที่ให้ผลที่ไม่สอดคล้องกับคำจำกัดความข้างต้น เช่น leucocin A-UAL 187 และ leucocin S สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียทดสอบได้หลายชนิด (Hastings; & Stiles. 1991: 127-134; Lewus; Sun; & Montville. 1992: 143-149) ไนซินซึ่งสร้างจาก *Lc. lactis* สามารถทำลาย *S. aureus* และเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบที่ไม่มีผนังเซลล์ได้ (Anderson. 1986: 149-160) นอกจากนี้ยังพบว่าการสร้างแบคทีริโอซินภายในเซลล์ของแบคทีเรียเหมือนกับการสร้างโปรตีนทั่วไปที่ผลิตจากไรโบโซมซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนการถอดรหัส (transcription) และการแปลรหัส (translation) จากยีนที่ควบคุมการสร้างแบคทีริโอซิน โดยยีนที่ควบคุมการสร้างแบคทีริโอซินบางชนิดอยู่บนโครโมโซม เช่น ไนซิน lactocin, helveticin J, lactacin B และ F หรืออยู่บนพลาสมิด เช่น diplococcin, lacticin 481, lactococcins, pediocins, sakacin A และ lactocin B (De Vuyst; & Vandamme. 1994a: 91-142; Joerger; & Klaenhammer. 1986: 439-446)

ดังนั้นคำนิยามของแบคทีริโอซินซึ่งเป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน คือ แบคทีริโอซินเป็นสารประกอบโปรตีนซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่มีความไวต่อสารดังกล่าวและไม่เป็นพิษต่อเซลล์ที่ผลิต (De Vuyst; & Vandamme. 1994a: 91-142) โดยตัวอย่างแบคทีริโอซินที่ได้มีการศึกษาแสดงดังตาราง 1

ตาราง 1 ตัวอย่างแบคทีริโอซินที่ได้มีการศึกษา

แบคทีริโอซิน	**จุลินทรีย์ที่สร้าง**	**แหล่งอ้างอิง**
Helveticin J	*Lactobacillus helveticus* 481	Joerger; & Klaenhammer. 1986
Pediocin AcH	*Pediococcus acidilactici* H	Bhunia; Johnson; & Ray. 1998
Plantaricin SIK-83	*Lactobacillus plantarum*	Anderson; Daeschel; & Hassam. 1988
Sakacin A	*Lactobacillus sake* 706	Schillinger; & Lucke. 1989
Lactocin S	*Lactobacillus sake* L45	Mortvedt; et al. 1991
Leuconocin A-UAL	*Leuconostoc gelidium*	Hastings; et al. 1991
Mesenteroicin 5	*Leuconostoc mesenteroides* UL5	Daba; et al. 1991
Carnocin U 149	*Carnobacterium piscicola*	Stoffels; Nes; & Gudmundsdottir. 1992

ตาราง 1 (ต่อ)

แบคทีริโอซิน	จุลินทรีย์ที่สร้าง	แหล่งอ้างอิง
Lacticin 481	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ	Piard; et al. 1992
Propionicin PLG-1	*Propionibacteriium thoenii*	Lyon; & Glatz. 1993
Gassericin A	*Lactobacillus gasseri* LA 39	Itoh; et al. 1995
Acidocin J 1229	*Lactobacillus acidophilus* JCM 1229	Tahara; & Kanatani. 1996
Plantaricin KW 30	*Lactobacillus plantarum* KW 30	Kelly; Asmundson; & Huang. 1996
Plantaricin D	*Lactobacillus plantarum* BFE 905	Freaz; et al. 1998
Coagulin	*Bacillus coagulans* I_4	Hyronimus; Le Marrec; & Urdaci. 1998
Lactococcin R	*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* R	Yildirim; & Johnson. 1998

ปัจจุบันแบคทีริโอซินบางชนิดได้มีการขายในรูปของการค้าในรูปผงแห้ง ที่รู้จักกันดี เช่น ไนซิน ขายอยู่ในรูปการค้าโดยใช้ชื่อว่า Nisaplin™ (บริษัท Aplin and Barrett Ltd., UK) ซึ่งสร้างจาก *Lactococcus lactis* และเพดดิโอซิน PA-1/AcH (pediocin PA-1/AcH) ขายอยู่ในรูปการค้าโดยใช้ชื่อว่า ALTA™ 2431 ซึ่งสร้างจาก *Pediococcus acidilactici* ไนซินถูกค้นพบเป็นครั้งแรกในปี 1928 โดยโรเจอร์และริทเทียร์ (Rogers; & Whittier. 1928: 211-229) ซึ่งประกอบด้วยเปปไทด์ที่มีกรด-อะมิโน 34 ตัว ให้ผลในการยับยั้งได้ในอาหารหลายประเภท โดยเฉพาะในผลิตภัณฑ์นมหมักที่มีค่าความเป็นกรดด่างต่ำ (O'Sullivan; Ross; & Hill. 2002: 593-604) ไนซินมีการใช้แพร่หลายมากกว่า 48 ประเทศ โดยเฉพาะในผลิตภัณฑ์ชีส นม และอาหารกระป๋อง (Delves-Broughton. 1990: 100-117) โดยองค์การทางอาหารและยา (Food; & Drug Administration) ได้ยอมรับว่า Nisaplin™ สามารถใช้จำหน่ายในรูปของสารป้องกันการเน่าเสียที่มาจากธรรมชาติ (O'Sullivan; Ross; & Hill. 2002: 593-604)

จากการศึกษาทางด้านสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยทั่วไปมักเกิดความสับสนระหว่างแบคทีริโอซินและสารปฏิชีวนะ ซึ่งในปี ค.ศ. 2001 คลีฟแลนด์ และคนอื่นๆ (Cleveland; et al. 2001: 1-20) ได้สรุปความแตกต่างระหว่างแบคทีริโอซินและสารปฏิชีวนะไว้ ดังแสดงในตาราง 2

ตาราง 2 ความแตกต่างระหว่างแบคทีริโอซินและสารปฏิชีวนะ

ลักษณะและคุณสมบัติ	แบคทีริโอซิน	สารปฏิชีวนะ
1. การนำไปใช้	ทางอาหาร	ทางการแพทย์
2. ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียเป้าหมายที่มีความหลากหลาย	น้อย	มาก
3. การสร้างระบบภูมิคุ้มกันตนเองของเซลล์ผู้ผลิต	มี	ไม่มี
4. ลักษณะปฏิกิริยาบนเซลล์เป้าหมาย	ทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์	ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์หรือโครงสร้างภายในเซลล์

ที่มา: Cleveland; et al. (2001). Bacteriocin: Safe, Natural Antimicrobials for Food Preservation. *International Journal of Food Microbiology* 71: 1-20.

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าแบคทีริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแกรมลบจะมีโครงสร้างโมเลกุลขนาดใหญ่และมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียได้น้อยชนิดกว่าแบคทีริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแกรมบวก (Jack; Tagg; & Ray. 1995: 171-200) โดยแบคทีริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแกรมลบได้มีการศึกษากันในด้านต่างๆ ได้แก่ โครงสร้างของโปรตีน กิจกรรมในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเป้าหมาย กระบวนการสังเคราะห์ภายในเซลล์ที่ผลิต กลไกการเข้าทำลายและตำแหน่งของการเข้าทำลายเซลล์เป้าหมายรวมถึงระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์เป้าหมาย ตัวอย่างเช่น colicins ซึ่งผลิตโดย *E. coli* มีผลในการยับยั้งแบคทีเรียในกลุ่ม Enterobacteriaceae หรือ microcins ซึ่งสร้างโดยแบคทีเรียในกลุ่ม Enterobacteriaceae มีผลในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบชนิดต่างๆ เป็นต้น (De Vuyst; & Vandamme. 1992: 571-578) ส่วนแบคทีริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียแกรมบวกพบว่ามีคุณสมบัติที่น่าสนใจกว่าที่ผลิตจากแบคทีเรียแกรมลบคือ มีคุณสมบัติในการทำลายแบคทีเรียที่แตกต่างกัน รวมทั้งเซลล์เป้าหมายจะมีการต้านทานน้อยและไม่ต้องการตำแหน่งเฉพาะเจาะจงบนเซลล์เป้าหมายเพื่อการเข้าทำลาย นอกจากนี้การควบคุมการผลิตภายในเซลล์ถูกควบคุมได้ทั้ง

จากพลาสมิดและโครโมโซม (Tagg; Dajani; & Wannamaker. 1976: 722-756) โดยแบคทีริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแกรมบวกที่สำคัญ คือ แบคทีริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก ซึ่งพบว่าสารดังกล่าวเป็นเปปไทด์หรือโปรตีนขนาดเล็ก และในแบคทีริโอซินบางชนิด เช่น ไนซิน อาจพบกรดอะมิโนที่ไม่ค่อยพบในโปรตีนปกติทั่วไป เช่น dehydroalanine และ dehydrobutyrine โดยแบคทีริโอซินแต่ละชนิดจะมีจำนวนและชนิดของกรดอะมิโนภายในโมเลกุล รวมถึงมีโครงสร้างของโมเลกุลที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังสามารถถูกทำลายได้ด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน (proteolytic enzymes) ที่แตกต่างกันด้วย (Kleinkauf; & von Dohren. 1987: 259-289) โดยในปี ค.ศ. 1993 มองทวิลล์และไคเซอร์ (Montville; & Kaiser 1993: 1-22) ได้รวบรวมชนิดของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบชนิดต่างๆ ที่สามารถสร้างแบคทีริโอซินได้ในขณะนั้น ได้แก่ *Acetobacter*, *Actinobacillus, Bacillus, Brevibacterium, Clostridium, Enterococcus, Erwinia, Haemophilus, Lactobacillus, Lactococcus, Listeria, Leuconostoc*, *Pseudomonas*, *Pediococcus, Salmonella, Propionibacterium, Serratia, Staphylococcus, Shigella, Streptococcus* และ *Yersinia*

7. แบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างแบคทีริโอซิน

แบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักหลายชนิด สามารถผลิตแบคทีริโอซินซึ่งเป็นโปรตีนที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกสายพันธุ์ที่ใกล้ชิดกับแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดที่สร้างแบคทีริโอซินนั้น รวมทั้งแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเสีย และทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ เช่น *Listeria monocytogenes, Staphylococcus* spp., *Clostridium botulinum, Enterococcus* spp. และ *Bacillus* spp. ตัวอย่างแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างแบคทีริโอซิน แสดงในตาราง 3

ตาราง 3 แบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างแบคทีริโอซิน

สายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติก	**Bacteriocin (like) compound**
Lactococcus (Lc.)	
Lc . lactis subsp. *lactis*	
ATCC 11454	nisin A
NIZO 22186	nisin Z
10	lactostrepcin 1
300	lactostrepcin 2 and 3

ตาราง 3 (ต่อ)

สายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติก	Bacteriocin (like) compound
Lactococcus (Lc.)	
Lc . lactis subsp. *lactis*	
71	lactostrepcin 4
6F3	bac V , VI and VII
CNRZ 481	lacticin 481
DRC1	dricin
ADRIA 85LO30	lactococcin DR
Lc. lactis subsp. *cremoris*	
346	diplococcin
202	lactostrepcin 5
9B4, 4G6	bac I , II, III and IV
LMG 2130	lactococcin A
9B4	lactococcin A ,B and M
LMG2081	lactococcin G
Lactobacillus (Lb.)	
Lb. acidophilus	
DDS1	acidophilin
2181	acidolin
N2	lactacin B
11088	lactacin F
M46	bacteriocin M46
LAPT 1060	acidophilucin A
TK8912	acidocin 8912
Lb. brevis B37	brevicin 37
Lb. casei	
B80	caseicin 80
LHS	caseicin LH

ตาราง 3 (ต่อ)

สายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติก	Bacteriocin (like) compound
Lactobacillus (Lb.)	
Lb. curvatus LTH 1174	curvacin A
Lb. delbrueckii subsp. *bulgaricus* DDS 14	bulgarican
Lb. delbrueckii subsp. *lactis*	
JCM 1106, JCM 1107	lacticin A
JCM 1248	lacticin B
Lb. fermentum 466	bacteriocin 466
Lb. gasseri	gassericin A
Lb. helveticus	
LP27	lactocin 27
481	helveticin J
1829	helveticin V-1829
Lb. plantarum	
A2	lactolin
NCDO 1193	plantacin B
C-11	plantaricin A
BN	plantacin BN
LPCO-10	plantaricin S
MI 406	plantaricin 406
Lb. reuteri LA6	reutericin 6
Lb. sake	
Lb 706	sakacin A
L45	lactocin S
LTH 673	sakacin P

ตาราง 3 (ต่อ)

สายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติก	Bacteriocin (like) compound
***Carnobacterium* (*C.*)**	
C. piscicola	
LV17	carnobacteriocin A, B1 and B2
C. piscicola	piscicolin 61
LV61	carnocin UI49
UI49	
***Pediococcus* (*P.*)**	
P. acidilactici	pediocin AcH
H, E, F, M	pediocin PA-1
PAC 1.0	pediocin J
JD1-23*P. pentosaceus*	pediocin A
FBB-61, L-7230	pediocin N5p
N5p	
***Leuconostoc* (*Leuc.*)**	leuconocin Lcm1
Leu. carnosum Lm1	leucocin A-UAL 187
Leu. gelidium UAL 187	
Leu. mesenteroides subsp. *mesenteroides*	mesentericin 5
UL5	mesentericin Y105
Y105	mesentericin 52
FR52	leuconocin S
Leu. paramesenteroides OX	
***Streptococcus* (*S.*)**	
S. thermophilus	
STB40	bacteriocin STB40
St10	bacteriocin St10
SFi13	thermophilin 13

ตาราง 3 (ต่อ)

สายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติก	Bacteriocin (like) compound
Enterococcus (En.)	
En. faecalis	
S-48	bacteriocin Bc-48
En. faecalis	
226	enterocin 226 NWC
En. faecium DPC 1146	enterocin 1146
Enterococcus spp.	enterococcins (I-V)

ที่มา: De Vuyst; & Vandamme. (1994b). *Bacteriocin of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Applications.* p. 110-112.

นอกจากนี้ยังมีรายงานการค้นพบแบคทีเรียกรดแลคติกอีกหลายชนิดที่สามารถสร้างแบคทีริโอซินได้ ดังนี้

อาภัสรา กอบกัยกิจ. (2537: บทคัดย่อ) ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากผัก ผลไม้-ดอง แหนม ไส้กรอกเปรี้ยวได้ จำนวน 50 สายพันธุ์ โดยทั้งหมดจัดอยู่ในสกุล *Lactobacillus* เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli*, *B. subtilis* และ *S. aureus* โดยปรับค่าความเป็นกรดด่างของน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีอายุ 36 ชั่วโมง ให้เป็นกลาง พบว่า *Lactobacillus* ที่แยกได้จากหน่อไม้ดอง สามารถลดอัตราการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้เมื่อทดสอบด้วยวิธี tube test และเมื่อนำสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์พบว่า สารดังกล่าวเป็นลิโพโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 33,000 และ 43,000 ดาลตัน รวมทั้งเมื่อนำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ไปใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตโยเกิร์ตพบว่า จะให้ผลการยอมรับทางประสาทสัมผัสสูงกว่าโยเกิร์ตที่จำหน่ายในท้องตลาด

ศิรินาถ หนูเอก. (2539: บทคัดย่อ) ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างแบคทีริ-โอซินจากอาหารหมักดองประเภทต่างๆ 4 ชนิด เช่น ผลิตภัณฑ์อาหารทะเลที่ผ่านกระบวนการหมัก ผักดอง แหนม ไส้กรอก นมเปรี้ยวและโยเกิร์ต บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar และตรวจวัดกิจกรรมของแบคทีริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้กับแบคทีเรียทดสอบที่เป็นแบคทีเรียแกรม-ลบและแกรมบวก จำนวน 6 สายพันธุ์ ด้วยวิธี spot on lawn และ agar well diffusion พบว่าสามารถคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างแบคทีริโอซินโดยสามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ดีจำนวน

5 สายพันธุ์ได้แก่ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*, *Streptococcus lactis* SN33, *S. lactis* SN48, *Streptococcus* sp. SN61 และ *S. lactis* SN62 โดยแบคทีริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ ที่คัดเลือกได้เป็นโปรตีนที่ทนต่อความร้อนแต่ถูกยับยั้งกิจกรรมโดยเอนไซม์ pronase-E, proteinase K, trypsin และ γ-chymotrypsin นอกจากนี้ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* ยังสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ *S. aureus* ในส้มฟักได้ภายในระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล และอังคณา สุขบุญ. (2541: บทคัดย่อ) คัดแยกแบคทีเรียกรด-แลคติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของ *Salmonella* จากไส้กรอกเปรี้ยว พบว่าคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ 83 สายพันธุ์ โดยเป็น *Lactobacillus* 57 สายพันธุ์ และ *Pediococcus* 26 สายพันธุ์ ในจำนวนนี้มี 81 สายพันธุ์ ที่สร้างสารยับยั้งการเจริญของ *Salmonella typhimurium* 3292 และ *Salmonella enteritidis* 3294 ได้ เมื่อทดสอบด้วยวิธี agar spot test แต่เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อที่คัดแยกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวแล้วแยกส่วนใสมาปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เป็นกลางและกำจัดผลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ด้วยเอนไซม์คะตะเลส พบว่าไม่มีสายพันธุ์ใดที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Salmonella* ที่นำมาทดสอบได้ เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion assay

มงคล เพ็ญสายใจ และคนอื่นๆ (2544: 47-57) ทำการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียจากผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์หมักได้ 56 ไอโซเลท จากนั้นนำมาทดสอบการสร้างบริเวณใสรอบโคโลนี พบ ไอโซเลทที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสขนาดใหญ่ บนอาหารแข็ง Glucose Yeast extract Peptone, (GYP) โดยเชื้อที่แยกได้จัดอยู่ในสกุล *Lactobacillus* และ *Pediococcus* และเมื่อนำเชื้อทั้งหมดมาทดสอบความสามารถในสร้างสารยับยั้งแบคทีเรีย 6 ชนิดคือ *Vibrio* sp., *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *B. cereus* และ *Salmonella* sp. พบว่า เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MRS มาทดสอบการยับยั้งโดยตรงมีประสิทธิภาพสูงสุด ขณะที่การนำอาหารเหลว MRS ที่ผ่านการกรองเซลล์ออกด้วยเซลลูโลสไนเตรต 0.45 ไมโครเมตร และการนำน้ำเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MRS ที่ผ่านการให้ความร้อน 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที มีประสิทธิภาพลดลงตามลำดับ แบคทีเรียที่ถูกยับยั้งมากที่สุดคือ *B. subtilis* การประยุกต์ใช้แบคทีเรีย *Lactobacillus* sp. และ *Pediococcus* sp. ที่คัดเลือกได้เพื่อเป็นหัวเชื้อตั้งต้นนั้นมีความเป็นไปได้เนื่องจากสามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบหลายชนิดได้ดี

กรรณิการ์ กำลัง. (2549: บทคัดย่อ) ได้ทำการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างสารต้านจุลชีพได้จากผลิตภัณฑ์อาหารหมักประเภทเนื้อสัตว์และศึกษาสมบัติบางประการของสารต้านจุลชีพ พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ 174 ไอโซเลท และเมื่อนำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกมาทดสอบความสามารถในการยับยั้ง *S. aureus* และ *Lb. sakei* 912 ด้วยวิธี agar spot assay พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* และ *Lb. sakei* 912 ได้จำนวน 44 ไอโซเลท และ 12 ไอโซเลท

ตามลำดับ และเมื่อทดสอบโดยวิธี agar well diffusion assay พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* และ *Lb. sakei* 912 ได้จำนวน 18 ไอโซเลท และ 1 ไอโซเลท ตามลำดับ จากการศึกษาสมบัติของสารยับยั้งที่ได้จากแบคทีเรียกรดแลคติกเหล่านี้ พบว่าสารต้านจุลชีพที่สร้างจากเชื้อ SC3, SC4 (แยกจากไส้กรอกปลา) และ SK2 (แยกจากแหนมปลา) มีสมบัติเป็นโปรตีน โดยสารต้านจุลชีพที่สร้างจากเชื้อ SC3 และ SC4 ทนความร้อนได้ไม่เกิน 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ในขณะที่สารต้านจุลชีพที่สร้างจากเชื้อ SK2 ทนความร้อนได้ไม่เกิน 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และมีค่าคงตัวที่ค่าความเป็นกรดด่าง 4.0-7.0 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งของสารต้านจุลชีพที่สร้างจากเชื้อ SK2 พบว่าสามารถยับยั้ง *S. aureus*, *Lb. sakei* 912, *B. cereus, En. aerogenes, Leu. mesenteroides, Lc. lactis* subsp. *cremoris* และ *L. monocytogenes* ได้ โดยยับยั้ง *S. aureus* และ *Lb. sakei* 912 ได้ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ของ commercial nisin ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (2500 IU) และเมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ SK2 มาจัดจำแนกโดยใช้ API 20 Strep (bioMerieux) พบว่าเป็น *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

ศรัณย์ พรหมสาย. (2549: บทคัดย่อ) ทำการแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากอาหารหมักดอง ลำไส้สัตว์ และผลไม้ โดยใช้อาหาร MRS พบว่า สามารถแยกได้ทั้งสิ้น 155 ไอโซเลท เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ทั้งหมดไปทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหาร 6 ชนิด คือ *En. faecalis, E. coli, L. monocytogenes, Salmonella typhi, Shigella flexneri* และ *S. aureus* โดยวิธี paper disc diffusion พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติก 2 ไอโซเลท คือ SR36 และ SR37 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ได้ดีที่สุด จากการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการบ่งบอกว่าไอโซเลท SR36 และ SR37 จัดอยู่ในจีนัส *Enterococcus* โดยเชื้อทั้งสองสามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.0 และ 4.5 ที่มีการเติม bile salt 2% (น้ำหนักต่อปริมาตร) แต่ไม่สามารถเจริญในอาหารที่มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 2.0 สภาวะที่เหมาะสมในการสร้างสารยับยั้งของไอโซเลท SR36 และ SR37 คือ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหาร MRS ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 ที่มีส่วนประกอบของกลูโคส 2% (น้ำหนักต่อปริมาตร) และ yeast extract 1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) จากการตรวจสอบคุณสมบัติของสารยับยั้งที่ได้ พบว่าสามารถทนต่อความร้อนได้สูงสุดที่ 60 องศาเซลเซียส และสามารถถูกย่อยด้วย trypsin, papain และ proteinase K ดังนั้นสารยับยั้งที่ได้จึงจัดเป็นแบคทีริโอซิน เมื่อนำ SR36 และ SR37 ไปทดสอบความสามารถในการผลิตโยเกิร์ต พบว่าเชื้อทั้งสองไอโซเลทไม่สามารถผลิตโยเกิร์ตให้เป็นที่ยอมรับต่ออาสาสมัครได้ นอกจากนี้ปริมาณของเชื้อทั้งสองในผลิตภัณฑ์จะลดลง 10 - 20% เมื่อเวลาผ่านไป 10 ชั่วโมง จากการทดสอบความสามารถในการผลิตโยเกิร์ตของเชื้อผสมระหว่างไอโซเลท SR36 หรือ SR37 กับ *Lb. acidophilus* พบว่า

เชื้อผสมสามารถผลิตโยเกิร์ตให้เป็นที่ยอมรับต่ออาสาสมัครได้ จำนวนเชื้อผสมของ SR36 และ SR37 จะลดลง 20 - 30% เมื่อเวลาผ่านไป 10 ชั่วโมง ในขณะที่ปริมาณของ *Lb. acidophilus* จะเพิ่มขึ้น 30 - 40%

มูเรียนาและแคลนแฮมเมอร์ (Muriana; & Klaenhammer. 1991: 114-121) ได้ค้นพบสาร lactacin F ซึ่งผลิตจาก *Lb. acidobacillus* 110088 สามารถทนความร้อนได้สูงและสามารถยับยั้งแบคทีเรียกลุ่ม lactobacilli และ *En. faecalis* ได้ สารดังกล่าวจะสูญเสียประสิทธิภาพในการยับยั้งเมื่อถูกย่อยด้วยเอนไซม์ ficin, proteinase K, trypsin และ subtilisin แต่คงตัวต่อเอนไซม์ lipase, lysozyme, α-amylase และ mutanolysin

ฮาสติง และคนอื่นๆ (Hastings; et al. 1994: 75-81) ได้รายงานว่า สามารถแยก *Leu. gelidium* UAL 187, *Leu. paramesenteroides* La7a, *Leu. carnosum* Ta11a และ *Leu. carnosum* La54a จากเนื้อ แบคทีเรียกรดแลคติกเหล่านี้สามารถผลิตแบคทีริโอซินได้ที่อุณหภูมิต่ำในช่วงค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.0-7.0 แบคทีริโอซินที่ผลิตได้นี้สามารถทนความร้อนได้ดีในสภาวะที่เป็นกรด และยับยั้ง *L. monocytogenes* รวมทั้งแบคทีเรียกรดแลคติกอื่นๆ ที่ทำให้เนื้อเกิดการเน่าเสีย

อีนาน และคนอื่นๆ (Enan; et al. 1996: 189-215) รายงานว่า *Lb. plantarum* UG1 ที่แยกได้จาก dry sausage สามารถผลิต plantaricin UG1 ปริมาณมากในระยะ exponential ถึง early stationary phase เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 6.5 อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส และจากการศึกษาสมบัติเบื้องต้นของ plantaricin UG1 พบว่ามีความคงตัวที่ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5-7.0 ถูกทำลายได้โดยเอนไซม์ α-amylase และ dextranase สามารถยับยั้ง *Lactobacillus*, *Lactococcus* และจุลินทรีย์ก่อโรคทางอาหารบางชนิด เช่น *L. monocytogenes, B. cereus, Clostridium perfringens* และ *C. sporogenes*

ศรีนวล และคนอื่นๆ (Srionnual; et al. 2007: 2247-2250) ทำการศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากปลาส้ม พบว่าเชื้อ *Weissella cibaria* 110 สามารถสร้างสาร weissellicin 110 ได้ ซึ่งเป็นแบคทีริโอซินที่อยู่ใน class II มีขนาดโมเลกุล 2.5 กิโลดาลตัน และ weissellicin 110 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Lb. sakei* แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหารที่ใช้ทดสอบ คือ *L. monocytogenes*

โทโดรอฟ และคนอื่นๆ (Todorov; et al. 2010: 334-343) ทำการศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างแบคทีริโอซินจาก beloura และ chourico พบ *Lb. plantarum* 2 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์ ST202Ch และ ST216Ch ซึ่งสามารถสร้างแบคทีริโอซิน bacST202Ch มีขนาดโมเลกุล 3.5 กิโลดาล-ตัน และ bacST216Ch มีขนาดโมเลกุล 10.0 กิโลดาลตัน

8. การจัดจำแนกแบคทีริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีริโอซินแตกต่างจากสารปฏิชีวนะจำพวกเปปไทด์อื่น คือสร้างมาจากไรโบโซม (ribosomally synthesized) และจัดเป็นเมแทบอไลท์ทุติยภูมิ (secondary metabolites) (Hurst. 1981: 85-123) รวมทั้งยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างจะพบเป็นคลัสเตอร์ (cluster) ในโอเปอรอน (Jack; et al. 1995: 793-802) ในปัจจุบันมีการจัดจำแนกแบคทีริโอซินออกเป็น 4 class ซึ่งส่วนใหญ่แบคทีริโอซินที่พบมักจัดอยู่ใน class I และ class II

ตาราง 4 การจัดจำแนก class ของแบคทีริโอซิน

การจัดจำแนก	ลักษณะของแบคทีริโอซิน
Class I	Lantibiotics (<5 กิโลดาลตัน)
Class II	Small (<10 กิโลดาลตัน) non-modified peptides, moderate (100 องศาเซลเซียส) to high (120 องศาเซลเซียส) heat-stable
Class III	Large (>30 กิโลดาลตัน) heat-labile proteins
Class IV	Complex bacteriocins: protein with lipid and/or carbohydrate

ที่มา: Klaenhammer. (1993). Genetics of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria. *FEMS Microbiological Review* 12: 39-86.

8.1 class I (Lantibiotics)

แบคทีริโอซินใน class I มีโครงสร้างเป็นเปปไทด์ที่ทนความร้อนและมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (น้อยกว่า 5 กิโลดาลตัน) (Chatterjee; et al. 2005: 633-683) ซึ่งหลังจากผ่านกระบวนการแปลรหัสแล้ว จะเข้ารวมตัวกับกรดอะมิโนแลนไธโอนีน (lanthionine; Lan) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีไธโออีเทอร์ (thioether) อยู่ในโมเลกุล และเมธิลแลนไธโอนีน (methyllanthionine; MeLan) (Hurst. 1981: 85-123) ในบางครั้งจึงเรียก class I นี้ว่าแลนติไบโอติก (lantibiotics) แลนติไบโอติกมักแบ่งออกเป็น 2 type หรือ 2 subclass โดยอาศัยความคล้ายคลึงกันทางโครงสร้างเป็นหลักคือ type A หรือ subclass Ia ซึ่งเป็นสารที่มีโครงสร้างเป็นเปปไทด์ที่มีประจุเป็นบวก มีสายยาว ไม่คงรูป และออกฤทธิ์โดยทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียบางสปีชีส์ ตัวอย่างของกลุ่มนี้คือ ไนซิน อีกกลุ่มหนึ่งคือ type B หรือ subclass Ib มีโครงสร้างเป็นเปปไทด์ที่เป็นก้อน (globular) ซึ่งคงรูป และมีประจุลบหรือไม่มีประจุ (Delves-Broughton. 1990: 100-117; Klaenhammer. 1993: 39-86) มีฤทธิ์ในการรบกวนการทำงานของเอนไซม์ที่จำเป็นต่อเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียบางชนิด ตัวอย่างของกลุ่มนี้คือ

mersacidin ซึ่งออกฤทธิ์รบกวนการสร้างผนังเซลล์โดยการเข้าเชื่อมต่อกับสารตั้งต้นในการสร้างเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถสร้างผนังเซลล์ได้ (Brotz; et al. 1998: 154-160) อย่างไรก็ตามเมื่อเร็วๆ นี้ได้มีการจำแนก subclass ของแลนติไบโอติกเพิ่มขึ้นโดยอาศัยกลไกการออกฤทธิ์ ซึ่งมักจะเกิดความสับสนเนื่องจากสารบางชนิดสามารถออกฤทธิ์ได้หลายแบบ เช่น สามารถทำให้เกิดรู และยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ (Breukink; et al. 1999: 2361-2364) ในบางครั้งจึงแบ่งแลนติไบโอติกออกเป็น 11 subclasses โดยอาศัยความคล้ายคลึงกันของโครงสร้างทางเปปไทด์ (Cotter; Hill; & Ross. 2005: 61-75) ซึ่งแต่ละกลุ่มมีชื่อดังนี้ คือ ไนซิน, epidermin, streptin, pep 5, lacticin 481, mersacidin, ltnA 2, cytolysin, lactocin S, cinnamycin และ sublancin

แบคทีริโอซินที่พบมากในกลุ่มนี้คือ ไนซิน ซึ่งได้รับการยอมรับและนำไปใช้ในการถนอมอาหารกันอย่างแพร่หลาย ปัจจุบันนี้ในหลายประเทศมีการนำมาผลิตในอุตสาหกรรมทางด้านการค้า สายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตส่วนใหญ่จะพบในกลุ่ม *Lc. lactis* subsp. *lactis* ซึ่งสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกที่ก่อโรค โดยที่สามารถป้องกันการเจริญและการสร้างสปอร์ของ *Bacillus* และ *Clostridium* (Delves-Broughton. 1990: 100-117)

8.2 class II (small non-modified peptides)

class II มีโครงสร้างเป็นเปปไทด์ที่ทนความร้อนและมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (น้อยกว่า 10 กิโลดาลตัน) แต่ไม่มีอนุพันธ์ของกรดอะมิโนแลนไธโอนีน ปัจจุบันที่พบมากมี 2 subclasses คือ subclass IIa มีชื่อว่า pediocin-like (หรือเรียกว่า *Listeria*-active) และ subclass IIb หรือ แบคทีริโอซินที่มี 2 องค์ประกอบ (two-component bacteriocins) ใน class IIa ตัวที่มีการศึกษามากที่สุด คือ เพดดิโอซิน AcH/PA-1 สารที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้มีความคล้ายคลึงกันทางลำดับของกรดอะมิโน 40-60 เปอร์เซ็นต์ โดยบริเวณ N-terminal ของโครงสร้าง จะมีลำดับของกรดอะมิโนเป็น YGNGVXCXXXXCXV หรือเรียกว่า pediocin box ต่อกับกรดอะมิโนซีสเตอีน 2 ตัว ด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (disulphide bridge) (Eijsink; et al. 1998: 3275-3281) subclass IIa ปัจจุบันได้รับความสนใจมาก เนื่องจากฤทธิ์ในการยับยั้งไม่กว้างเหมือนไนซิน โดยจะยับยั้งเฉพาะเชื้อ *Listeria* เท่านั้น จึงไม่ยับยั้งเชื้อตั้งต้นที่ใช้ในหมักอาหาร อย่างไรก็ตามข้อจำกัดก็คือไม่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคชนิดนี้ได้อย่างสมบูรณ์ในอาหาร (Ennahar; Sonomoto; & Ishizaki. 1999: 705-716) subclass IIb หมายถึงแบคทีริโอซินที่มีโครงสร้างประกอบด้วยองค์ประกอบ 2 ส่วน ประกอบด้วย เปปไทด์ 2 ชนิดที่ทำงานเสริมฤทธิ์กัน (Nissen-Meyer; et al. 1992: 5686-5692) ถ้าขาดตัวใดตัวหนึ่งมักจะไม่มีแอคติวิตีหรือมีแอคติวิตีเหลือเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ตัวอย่างของกลุ่มนี้ คือ lactacin F และ lactococcin G นอกจากนี้ยังมี subclass IIc (*sec*-dependent bacteriocins) ตัวอย่างเช่น acidocin B, divergicin A, bacteriocin

31 และ enterocin P และ subclass IId ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนที่แตกต่างจาก subclass อื่น ตัวอย่างเช่น lactococcin A และ B, diacetin B และ acidocin 8912 เป็นต้น (Klaenhammer. 1988: 337-349)

8.3 class III (large heat-labile proteins)

class III ประกอบด้วยแบคทีริโอซินขนาดใหญ่ ไม่ทนความร้อน จึงแตกต่างจาก class I และ II ตัวอย่างของกลุ่มนี้ คือ helveticin J และ enterolysin A (Delves-Broughton. 1990: 100-117)

8.4 class IV (complex bacteriocin)

แคลนแฮมเมอร์ (Klaenhammer. 1993: 39-86) ได้เสนอให้มีการแบ่งกลุ่มแบคทีริโอซินเพิ่มขึ้นอีก 1 class คือ class IV ซึ่งแบคทีริโอซินในกลุ่มนี้จะมีหมู่กลูซิดิค (glucidic) และ/หรือลิปิดในโครงสร้างด้วยนอกเหนือจากส่วนที่เป็นโปรตีน ตัวอย่างของแบคทีริโอซินกลุ่มนี้ เช่น leucocin S และ lactocin 27 ซึ่งจะมีส่วนของไกลโคโปรตีนในโครงสร้าง หรือ mesentericin 52 ซึ่งจะพบส่วนของลิโพโปรตีนในโครงสร้าง เป็นต้น (Delves-Broughton. 1990: 100-117; Klaenhammer. 1993: 39-86)

9. กลไกการออกฤทธิ์ของแบคทีริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก มีกลไกในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้แตกต่างกัน โดยทั่วไปมักออกฤทธิ์ทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ (ภาพประกอบ 2) โดยรูดังกล่าวจะทำให้เกิดการเสียสมดุลของไอออน สูญเสียกรดอะมิโน และสารประกอบอนินทรีย์ในกลุ่มฟอสเฟตซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญในการสร้างพลังงานของเซลล์ (Klaenhammer. 1993: 39-86; Jack; Tagg; & Ray. 1995: 171-200) นอกจากนี้ยังมีกลไกของแบคทีริโอซินในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ เช่น

9.1 รบกวนหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์

เยื่อหุ้มเซลล์เป็นส่วนที่อยู่ถัดจากผนังเซลล์ หน้าที่โดยทั่วไปของเยื่อหุ้มเซลล์ คือ osmotic barrier ที่ทำหน้าที่เลือกผ่านให้สารต่างๆ เข้าหรือออกจากเซลล์ หรือทำหน้าที่ในการขนส่งเพื่อนำสารเข้าหรือออกจากเซลล์ โดยแบคทีริโอซินมีผลต่อกระบวนการ Proton motive force ของเยื่อหุ้มเซลล์ และทำให้ความสมดุลของโพแทสเซียมไอออน (K^+) ของเซลล์เปลี่ยนแปลงไป โดยมีการผ่านเข้าเซลล์มากขึ้นและเกิดการสะสม ทำให้แรงดันภายในเซลล์ไม่สมดุล เซลล์จะแตกในที่สุด

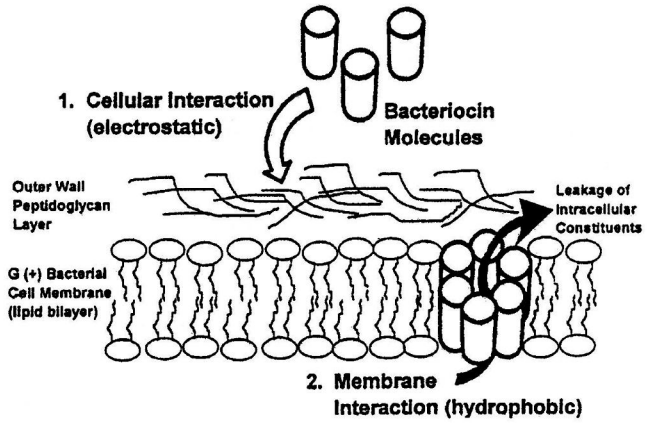
9.2ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน

เกิดจากแบคทีริโอซินที่มีโครงสร้างแบบ aminoglycoside หรือมี amino sugar ในโมเลกุลทำให้เกิดพันธะ glycosidic ซึ่งมีความสามารถจับกับ 30S ribosomal subunit ทำให้ไปยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนและลดความสามารถในการขนส่งสารพันธุกรรม นอกจากนี้ยังทำให้การอ่านรหัสในการสร้าง RNA ผิดพลาด เพราะบางตำแหน่งถูกบดบัง ส่งผลให้ความสามารถในการสร้างโปรตีนที่เป็นเอนไซม์ผิดพลาด เมื่อไม่มีเอนไซม์การทำงานของเซลล์จะผิดปกติไปในกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนหลายขั้นตอนที่แบคทีริโอซินยับยั้งได้นั้น สามารถกลับสู่สภาพเดิมได้เมื่อลดความเข้มข้นลง ด้วยเหตุนี้แบคทีริโอซินที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนส่วนใหญ่จะเป็นเพียงการยับยั้งเท่านั้น (bacteriostatic)

9.3รบกวนกระบวนการเมแทบอลิซึม

การรบกวนกระบวนการเมแทบอลิซึมโดยแบคทีริโอซินสามารถกลับเข้าสู่สภาพเดิมได้เมื่อปริมาณของแบคทีริโอซินลดลง ดังนั้น แบคทีริโอซินพวกนี้จึงจัดเป็นเพียงการยับยั้งเท่านั้น

ส่วนไนซินซึ่งเป็นแบคทีริโอซินในกลุ่มแลนติไบโอติกที่สร้างจาก *Lc. lactis* subsp. *lactis* พบว่าเป็นสายเปปไทด์ที่มีประจุสุทธิเป็นบวก และมีขั้นตอนในการเข้าทำลายเซลล์เป้าหมายคือ การเข้าจับกับเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมายทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกรบกวน ส่งผลให้เกิดการรั่วขององค์ประกอบภายในเซลล์ เช่น กรดอะมิโน สารให้พลังงาน และไอออนของสารที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเซลล์ออกมาสู่ภายนอกเซลล์ ในกรณีที่เป็นสปอร์พบว่าเยื่อหุ้มสปอร์จะถูกทำลายอย่างรวดเร็วในระหว่างที่สปอร์เกิดการงอก และยังพบว่าไนซินที่ความเข้มข้นสูงๆ สามารถยับยั้งการสร้างเปปติโดไกลแคน ในผนังเซลล์ของ *B. stearothermophilus* และ *E. coli* ได้ (Davidson; & Hoover. 1993: 127-160; De Vuyst; & Vandamme. 1994a: 91-142)



ภาพประกอบ 2 แบบจำลองการทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์เป้าหมายโดยแบคทีริโอซินที่สร้างจากแบคที-เรียกรดแลคติก

ที่มา: Muriana. (1996). Bacteriocins for Control of *Listeria* spp. in Food. *Journal Food Protection* 59: 54-63

10. ปัจจัยที่มีผลต่อในการสร้างแบคทีริโอซินของแบคทีเรียกรดแลคติก

ในการสร้างแบคทีริโอซิน อาหารเลี้ยงเชื้อควรมีสารอาหารที่จำเป็นอย่างครบถ้วน เพื่อที่จะทำให้เชื้อสามารถผลิตแบคทีริโอซินได้ในปริมาณสูงสุด ไม่ขัดขวางต่อการปลดปล่อยแบคทีริ-โอซินออกจากเซลล์ และอาหารเลี้ยงเชื้อต้องไม่มีผลต่อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ (Tagg; Dajani; & Wannamaker. 1976: 722-756) ดังนั้นจึงมีปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงในการสร้างแบคทีริโอซินดังต่อไปนี้

10.1 ชนิดของจุลินทรีย์

แบคทีริโอซินสามารถผลิตได้จากแบคทีเรียกรดแลคติกหลายสายพันธุ์ ในปี ค.ศ. 1994 ยังและเรย์ (Yang; & Ray. 1994: 281-291) ค้นพบแบคทีริโอซิน 2 ชนิดคือ ไนซิน และ Leuconocin Lcm 1 ซึ่งแบคทีริโอซินดังกล่าวได้มาจากแบคทีเรียกรดแลคติกต่างสายพันธุ์ นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างเพดดิโอซิน AcH ต่อมาในปีเดียวกัน เดอวุสต์และแวนแดมม์ (De Vuyst; & Vandamme. 1992: 571-578) ได้คัดแยก *Lc. lactis* พบว่ามี 21 สายพันธุ์สามารถสร้างแบคทีริ-โอซินได้และอีก 6 สายพันธุ์ไม่สร้างแบคทีริโอซิน ซึ่งสายพันธุ์ที่สร้างแบคทีริโอซินได้นั้นจะมีภูมิคุ้มกันเพื่อไม่ให้แบคทีริโอซินที่ผลิตออกมาทำลายตัวเอง นอกจากนี้ยังมีการตรวจสอบความต้านทานของไนซิน (nisin resistance) โดยนำแบคทีเรียกรดแลคติก 2 สายพันธุ์ คือ *Lc. lactis* N 8 และ *Lc. lactis* LAC 48 มาทำให้กลายพันธุ์โดยใช้พลาสมิดที่มียีนไนซิน (*nis* gene) ใส่ในแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง

2 ชนิด เมื่อทำการทดสอบพบว่า ความต้านทานของไนซินเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (Quiao; et al. 1997: 199-202)

10.2 องค์ประกอบต่างๆ ของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในการผลิตแบคทีริโอซินจะต้องคำนึงถึงแหล่งและปริมาณคาร์บอน ปริมาณไนโตรเจนและปริมาณฟอสเฟต ตลอดจนปริมาณสารยับยั้งและสารลดแรงตึงผิวต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยสารที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อแบคทีริโอซิน ดังนี้

10.2.1 แหล่งคาร์บอน

แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถใช้แหล่งคาร์บอนในการสร้างแบคทีริโอซินได้แตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น ไนซิน Z ที่สร้างขึ้นจาก *Lc. lactis* IO-I เมื่อทำการทดสอบการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส ซูโครส และไซโลส (Matsusaki; et al. 1996: 36-40; Chinachoti; et al. 1997: 171-181) พบว่าเมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสจะให้แอคติวิตีของไนซิน Z สูงสุดเท่ากับ 4,000 IU/ml เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้น้ำตาลไซโลสจะให้ค่าแอคติวิตีของไนซิน Z เท่ากับ 3,000 IU/ml ส่วนแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดในการผลิตเพดดิโอซิน AcH (Pediocin AcH) ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส ซูโครส ไซโลส และกาแลคโตส (Biswas; et al. 1991: 1265-1267)

10.2.2 แหล่งไนโตรเจน

คิม ฮอลล์ และดัน (Kim; Hall; & Dunn. 1997: 429-433) ได้ทำการศึกษาพบว่า ปริมาณการผลิตไนซินจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณไนโตรเจน ถึงแม้อัตราการเจริญของเชื้อจะลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณไนโตรเจนก็ตาม นอกจากนี้ยังพบว่าชนิดของแหล่งไนโตรเจนมีผลต่อการผลิตแบคทีริโอซินด้วย โดย เดอวุสต์ และแวนแดมม์ (De Vuyst; & Vandamme. 1992: 571-578) ได้ทำการทดลองเปรียบเทียบผลของแหล่งไนโตรเจนโดยใช้ cotton-seed meal, yeast extract และ fish meal พบว่าการใช้ cotton-seed meal จะให้แอคติวิตีของแบคทีริโอซิน 2,500 IU/ml และเมื่อใช้ yeast extract และ fish meal จะให้แอคติวิตีของแบคทีริโอซิน 2,000 IU/ml

10.2.3 สารอนินทรีย์ต่างๆ

โดยพบว่า ทั้งไอออนที่มีประจุลบ เช่น สารประกอบฟอสเฟต และไอออนที่มีประจุบวก เช่น แมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) และ แคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) มีผลต่อการสร้างแบคทีริโอซิน โดยขึ้นกับชนิดและสายพันธุ์ด้วย ซึ่งมีรายงานการใช้สารอนินทรีย์ต่างๆ ดังนี้

10.2.3.1 ฟอสเฟต

จากการทดลองของ เดอวุสต์และ แวนแดมม์ (De Vuyst; & Vandamme. 1992: 571-578) พบว่า ฟอสเฟตช่วยเพิ่มปริมาณการสร้างไนซินจากเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* NIZO 22186

โดยการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 6.8 จะให้แอคติวิตีของไนซินสูงสุด แต่จะไม่มีผลต่อการสร้างไนซินจากสายพันธุ์ *Lc. lactis* subsp. *lactis* IO-1 (Matsusaki; et al. 1996: 36-40)

10.2.3.2 แมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+})

แมกนีเซียมไอออน สามารถเพิ่มการสร้างเพดดิโอซิน AcH (Biswas; et al. 1991: 1265-1267) และการสร้างไนซินของเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 (Moreno; et al. 2000: 184-192) แต่ไม่สามารถเพิ่มการสร้างไนซินของเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* IO-1 ได้ (Matsusaki; et al. 1996: 36-40) นอกจากนี้การเติมแคลเซียมคลอไรด์ 0.1 โมลต่อลิตร ยังช่วยเพิ่มปริมาณไนซิน Z แต่ไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ หรือการสร้างแลคเตทจากน้ำตาลไซโลสและกลูโคสในการเพาะเลี้ยงแบบงวดเดียวที่มีการควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง

10.2.3.3 tween 80

tween 80 สามารถส่งเสริมการสร้างแบคทีริโอซินได้ในบางสภาวะ โดย tween 80 จะมีคุณสมบัติในการลดแรงตึงผิวโดยจะป้องกันการดูดซับของแบคทีริโอซินบนผิวเซลล์และการรวมกันของแบคทีริโอซิน บีสวาสและคนอื่นๆ (Biswas; et al. 1991: 1265-1267) พบว่าในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและมีการเติม tween 80 รวมทั้งแมกนีเซียมไอออน พบว่า ชีวมวลและ แอคติวิตีของเพดดิโอซิน AcH ที่สร้างจากเชื้อ *P. acidilactici* จะได้ปริมาณสูงสุด นอกจากนี้ tween 80 ยังช่วยเพิ่มการสร้าง lactocin S (Mortvedt; et al. 1991: 1829-1834) และ amylovorin L 471 (De Vuyst; Callewaert; & Crabbe. 1996: 817-827)

10.2.3.4 เอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน (protease)

โดยพบว่า ไนซินจะถูกทำลายด้วยเอนไซม์ γ -chymotrypsin, nisinase และ lactocin 27 จะถูกทำลายด้วยเอนไซม์ trypsin และ pronase ส่วน lactacin B จะถูกทำลายด้วยเอนไซม์ proteinase K และ helveticin J จะถูกทำลายด้วยเอนไซม์ trypsin, pronase, ficin, proteinase K, pepsin และ subtilisin (De Vuyst; & Vandamme. 1994b: 110-112) นอกจากนี้ piscicocin V1 และ divercin V41 จะถูกทำลายด้วยเอนไซม์ pronase E, proteinase K และ trypsin เป็นต้น

10.3 ภาวะในการหมัก (Effect of fermentation condition)

การหมักเป็นกระบวนการที่สำคัญในการผลิตแบคทีริโอซิน สิ่งที่ควรคำนึงถึงในกระบวนการหมักเพื่อให้ได้แบคทีริโอซินสูงสุด คือ ค่าความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ และการให้อากาศ เป็นต้น โดยสามารถจำแนกภาวะในการหมักที่มีผลต่อการสร้างแบคทีริโอซินดังนี้

10.3.1 อุณหภูมิ

พบว่า fiscicocin V1 และ divercin V41 สามารถทนต่อความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที (Pilet; et al. 1995: 256-262) ส่วน acidocin J1132 จะสามารถทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 80-100 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที (Tahara; & Kanatani. 1996: 669-677)

10.3.2 ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อหรือสารละลาย

ค่าความเป็นกรดด่างเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญมากในการผลิตแบคทีริโอซิน เนื่องจากค่าความเป็นกรดด่างเป็นตัวกลางในการควบคุมการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งมีผลต่อการผลิตแบคทีริโอซิน โดยพบว่า ภาวะค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการผลิตแบคทีริโอซินส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 5.5 - 6.0 (Parente; & Ricciardi. 1994: 35-39) และพบว่าค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการผลิตแบคทีริโอซินจะมีความสัมพันธ์กับการเจริญของจุลินทรีย์ในช่วงแรกของการเจริญ อย่างไรก็ตามค่าความเป็นกรดด่างที่มีผลต่อการสร้างแบคทีริโอซินจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และสปีชีส์ของจุลินทรีย์ด้วย เช่น เพดดิโอซิน AcH จาก *Lb. plantarum* WHE2 จะมีค่าความเป็นกรดด่างเหมาะสมเท่ากับ 6.0 (Ennahar; Sonomoto; & Ishizaki. 1999: 705-716) และไนซิน Z จะมีค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการสร้างไนซิน Z จาก *Lc. lactis* subsp. *lactis* IO-1 เท่ากับ 6.0 เมื่อใช้น้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Chinachoti; et al. 1997: 171-181) และเมื่อเปลี่ยนมาใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในการสร้างไนซิน Z พบว่าค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมจะเท่ากับ 5.5 (Matsusaki; et al. 1996: 36-40) นอกจากนี้ค่าความเป็นกรดด่างจะมีผลต่อความสามารถในการละลายและแอคติวิตีของแบคทีริโอซินด้วย เช่น ไนซินสามารถละลายและคงตัวได้ดีในสภาพที่เป็นกรด โดยที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 2.5 และ 5.0 ไนซินสามารถละลายได้ 12 และ 4 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แต่ไม่สามารถละลายได้ในสภาวะที่เป็นกลางหรือด่าง นอกจากนี้ในสภาพที่เป็นกรดไนซินยังสามารถทนต่อความร้อนได้ดี (Hurst; & Hoover. 1993: 369-394; Hurst. 1981: 85-123) โดยที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 2.5 ไนซินสามารถทนต่อการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสได้โดยไม่สูญเสียแอคติวิตี และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 121 องศาเซลเซียสจะมีการสูญเสียแอคติวิตีเพียงเล็กน้อย ส่วน lacticin 481 มีแอคติวิตีและคงตัว (stable) ได้ดีที่ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 หรือ 7.0 แต่ไม่คงตัวที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2.0 (Piard. 1994: 251-271) diplococcin มีแอคติวิตีและคงตัวได้ดีที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.0 (Davey. 1994: 273-290)

11. การนำแบคทีริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกมาประยุกต์ใช้ในอาหาร

แบคทีริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกนั้นมีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการนำมาใช้เป็นสารถนอมในอาหาร กล่าวคือ

1. เป็นที่ยอมรับว่าเป็นสารที่ปลอดภัย
2. ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ยูคาริโอต
3. สามารถถูกยับยั้งได้ด้วยน้ำย่อยประเภทโปรติเอส จึงมีผลน้อยมากกับแบคทีเรียที่อยู่ในระบบทางเดินอาหาร
4. มักจะทนต่อความเป็นกรดด่าง และความร้อน
5. มักมีฤทธิ์ในการยับยั้งกว้าง สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในอาหาร เช่น *L. monocytogenes* และ *Clostridium botulinum*
6. มักถูกควบคุมการสร้างโดยพลาสมิด จึงง่ายต่อการทำ genetic manipulation
7. ช่วยให้ผลิตภัณฑ์อาหารมีคุณภาพดีขึ้น เช่น เพิ่มความปลอดภัย และรสชาติดีขึ้น
8. มีแอคติวิตีจำเพาะ (specific activity) สูง (Holzapfel; Geisen; & Schillinger. 1995: 343-362; O'Sullivan; Ross; & Hill. 2002: 593-604)

การประยุกต์ใช้แบคทีริโอซินในการใช้เป็นสารกันบูดในอาหาร มีข้อดีหลายประการ คือ

1. ช่วยยืดอายุการเก็บของอาหาร
2. ช่วยในการรักษาอาหารที่อุณหภูมิต่างๆ
3. ลดความเสี่ยงจากการแพร่กระจายของเชื้อก่อโรคในอาหาร
4. ลดค่าใช้จ่ายจากการเน่าเสียของอาหาร
5. ลดการใช้สารเคมีในการถนอมอาหาร
6. ช่วยลดการใช้ความร้อนในการทำลายเชื้อในอาหาร ทำให้รักษาคุณค่าของสารอาหารและวิตามินในอาหาร
7. เป็นที่ต้องการของโรงงานและผู้บริโภค โดยแนวที่โรงงานอุสาหกรรมอาหารในยุโรปนิยมในปัจจุบัน คือ ไม่ใช้สารปรุงแต่ง ลดกระบวนการประกอบอาหาร เพื่อให้อาหารสดใหม่ (Hurst. 1981: 85-123)

การนำแบคทีริโอซินมาใช้ในการเพิ่มคุณภาพอาหารและรสชาติ พบว่า แบคทีริโอซินสามารถใช้เพิ่มคุณภาพของอาหารและรสชาติได้ในกระบวนการผลิตชีส แบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างแบคทีริโอซินจะถูกใช้ในการควบคุมจุลินทรีย์ประจำถิ่น ซึ่งได้แก่ กลุ่มที่ไม่ใช่หัวเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ในการผลิตชีส (non-starter lactic acid bacteria; NSLAB) และเหนี่ยวนำให้เซลล์แตก ซึ่งจะช่วยเพิ่มการย่อยสลายโปรตีนในชีสได้ เชื้อ NSLAB ที่พบในระหว่างกระบวนการบ่มชีสนี้ยังไม่ทราบหน้าที่แน่ชัด แต่พบว่ามักจะเกิดผลเสียต่อผลิตภัณฑ์ เช่น ทำให้เกิดการรวมตัวของผลึกแคลเซียมแลคเตท เนื่องจากสามารถเปลี่ยนรูป L-lactate ไปเป็น D-lactate ได้ ทำให้เกิดรู และอาจทำให้เกิดรสชาติที่ผิดปกติ การเติมแบคทีริโอซินในชีส จะช่วยควบคุมการปนเปื้อนของ NSLAB ได้ ตัวอย่างเช่น การใช้ lacticin 3147 เติมลงไปในการผลิตชีสเช็ดดาร์ไขมันต่ำพบว่ามีประสิทธิภาพในการควบคุม NSLAB ได้เป็นอย่างดีในระหว่างการบ่ม (O'Sullivan; Ross; & Hill. 2002: 593-604)

การใช้ lactococcin ABM (จัดอยู่ใน subclass IIa) ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งแคบ โดยมีผลในการยับยั้งในกลุ่ม lactococci เท่านั้น การใช้แลคโตคอกซินที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแคบนั้น ถึงแม้ว่าจะไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ แต่ช่วยเพิ่มคุณภาพของชีสและรสชาติให้ดี เนื่องจาก lactococcin ABM จะช่วยให้เกิดการแตกสลายของหัวเชื้อเริ่มต้นทำให้เกิดการปล่อยเอนไซม์โปรติเนสและเปปติเดสที่อยู่ภายในเซลล์ของเชื้อตั้งต้น โดยเฉพาะในกรณีที่หัวเชื้อเริ่มต้นไวต่อแบคทีริโอซินนั้นๆ แต่ก็ทำให้การสร้างกรดโดยเชื้อลดลงด้วย จึงเป็นการยากที่จะควบคุมเชื้อให้มีการสร้างกรดเหมาะสมพอดีกับการแตกสลายของเชื้อ อย่างไรก็ตามอาจแก้ไขได้โดยการใช้หัวเชื้อเริ่มต้นหลายชนิดร่วมกัน เช่น การใช้เชื้อ *Lc. lactis* HP, *Lc. lactis* DPC 3286 ร่วมกับเชื้อ *Streptococcus thermophilus* DPC 1842 ซึ่งไม่ไวต่อ lactococcin ABM และยังคงสร้างกรด พบว่า ชีสมีคุณภาพดีขึ้น (Morgan; et al. 2002: 985-993) ถึงแม้ว่าจะมีเอนไซม์ที่ช่วยให้เซลล์แตกจำหน่ายทางการค้ามากมายแต่ก็มีราคาแพงและประสิทธิภาพไม่ดี การใช้สายพันธุ์ที่สร้างแบคทีริโอซินนอกจากจะไม่มีค่าใช้จ่ายดังกล่าวแล้วยังช่วยให้คุณภาพรวมและรสชาติของชีสดีขึ้น (Deegan; et al. 2006: 1058-1071)

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์การทดลอง

1. วัสดุและเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

ตู้บ่มเพาะเชื้อ (incubator) (SHEL-LAB)

ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) (Science Tech)

หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) (Astell)

ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot–air sterilizing oven) (Fisher Scientific)

เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) (Precisa)

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิได้ (water bath) (Heto HMT 200)

เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) (Du Pont)

เครื่องอิเล็กโทรโฟเรซิส (electrophoresis apparatus) (Bio-Rad)

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Jenway)

กล้องจุลทรรศน์ (microscope) (Olympus)

เครื่อง Polymerase Chain Reaction (authorized thermal cycler) (Eppendoft)

2. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

Escherichia coli JM 109 เลี้ยงในอาหารเหลว TSB

Listeria innocoa ATCC 33090 เลี้ยงในอาหารเหลว BHI

Lactobacillus sakei JCM 1157 เลี้ยงในอาหารเหลว MRS

Lactobacillus plantarum ATCC 8014 เลี้ยงในอาหารเหลว MRS

Lactococcus lactis JCM 7638 เลี้ยงในอาหารเหลว MRS

Lactococcus lactis subsp. *cremoris* TUA 1344L เลี้ยงในอาหารเหลว MRS

Leuconostoc mesenteroides JCM 6124 เลี้ยงในอาหารเหลว MRS

Pediococcous pentosaceus JCM 5885 เลี้ยงในอาหารเหลว MRS

Pediococcous pentosaceus JCM 5890 เลี้ยงในอาหารเหลว MRS

Streptococcus salivarius JCM 57077 เลี้ยงในอาหารเหลว MRS

3. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

MRS agar (Hi-media)

MRS broth (Hi-media)

Nutrient broth (Hi-media)

Brain heart infusion (BHI) broth (Hi-media)

Tryptic soy broth (TSB) (Hi-media)

Sodium chloride (Labscan)

Sodium dodecyl sulfate (Sigma)

Absolute ethanol (Merck)

Ethidium bromide (BIO-RAD)

Loading dye (Fermentas)

Trizma base (Riedel-de Haen)

Sucrose (UNIVAR)

Tricine buffer (BIO BASIC INC)

Bromophenol blue (BIO BASIC INC)

Ammonium persulfate (BIO BASIC INC)

Acrylamide (4X) (BIO BASIC INC)

N,N-bisacrylamide (BIO BASIC INC)

N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED) (BIO BASIC INC)

DL-dithiothreitol (DTT) (BIO BASIC INC)

Protein marker (PageRuler^{TM} Unstained Protein Ladder)

2-Log DNA Ladder (New England Biolabs)

วิธีการทดลอง

1. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

แยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากตัวอย่างอาหารหมักในประเทศ โดยนำมา streak ลงบนอาหาร MRS agar (ภาคผนวก ก ข้อ 1) ที่มีแคลเซียมคาร์บอเนต 0.5 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ใน candle jar เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นคัดเลือกโคโลนีที่เกิดวงใสรอบโคโลนีอันเนื่องมาจากการสร้างกรดของเชื้อ ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของแบคทีเรียกรดแลคติก นำไปย้อมสีแกรมเพื่อดูลักษณะรูปร่าง และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียต่อไป

2. การคัดเลือกเชื้อที่สามารถสร้างสารยับยั้งแบคทีเรีย

นำแบคทีเรียที่แยกได้จากข้อ 1 มาคัดเลือกเชื้อที่สามารถสร้างสารยับยั้งแบคทีเรีย โดยวิธี agar spot test และ วิธี agar well diffusion โดยวิธี agar spot test ทำโดยจุด (spot) ลงบนอาหาร BSM agar ที่มี agar 1.5 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก ข้อ 3) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ใน candle jar เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จนกระทั่งเชื้อเจริญเห็นเป็นโคโลนี จากนั้นนำมาเททับด้วยอาหาร MRS soft agar ที่มี agar 0.5 เปอร์เซ็นต์ที่ผสมเชื้อทดสอบ (indicator strains) คือ *Weissella confusa* N31 ปริมาณ 10^7 CFU/ml เททับลงบน BSM agar ที่เตรียมไว้ข้างต้น แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ใน candle jar เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เมื่อได้เชื้อที่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อทดสอบได้ให้นำมาทดสอบยืนยันด้วยวิธี agar well diffusion โดยเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียที่สร้างสารยับยั้งในอาหาร MRS broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำน้ำเลี้ยงเชื้อไปเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,244xg อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนน้ำใสมาปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 7.0 ด้วย 1 M HCl หรือ 1 M NaOH แล้วนำมากรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำส่วนน้ำใสที่ผ่านการกรองแล้วปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาหยอดลงหลุมที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตรในอาหาร MRS agar ที่เติมเชื้อทดสอบไว้ก่อนหน้านี้ โดยอาหารดังกล่าวเตรียมจากการผสมเชื้อทดสอบกับอาหาร MRS soft agar ที่มี agar 0.5 เปอร์เซ็นต์ (ในอัตราส่วน 30 ไมโครลิตรต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร) ปริมาตร 7 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ใน candle jar เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการตรวจสอบและวัดขนาดวงใสที่เกิดขึ้น (Todorov; & Dicks. 2005: 318–326)

3. การจัดจำแนกเชื้อที่สามารถสร้างสารยับยั้งแบคทีเรีย

3.1 การจำแนกจีนัสโดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมี (Hoang-Dung TRAN and friends)

3.1.1 ตรวจสอบความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิ 10, 30 และ 45 องศาเซลเซียส

นำเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียกรดแลคติก ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหาร MRS broth ซึ่งมีค่าความเป็นกรดด่าง เท่ากับ 6.5 นำไปบ่มใน candle jar ที่อุณหภูมิต่างกันคือ ที่ 10 องศาเซลเซียส 30 องศาเซลเซียส และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน บันทึกผลจากการสังเกตว่าเชื้อเจริญได้หรือไม่

3.1.2 ตรวจสอบความสามารถในการเจริญที่สภาวะค่าความเป็นกรดด่าง 4.4, 6.5 และ 9.6

นำเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียกรดแลคติก ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหาร MRS broth ที่ปรับค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเป็น 4.4, 6.5 และ 9.6 นำไปบ่มใน candle jar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน บันทึกผลจากการสังเกตว่าเชื้อเจริญได้หรือไม่

3.1.3 ตรวจสอบความสามารถในการเจริญที่สภาวะมีเกลือเข้มข้นร้อยละ 6.5 และ 18

นำเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียกรดแลคติก ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหาร MRS broth ที่ไม่มี NaCl และมี NaCl ร้อยละ 6.5 และ 18 นำไปบ่มใน candle jar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน บันทึกผลจากการสังเกตว่าเชื้อเจริญได้หรือไม่

3.1.4 ตรวจสอบการสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากการใช้กลูโคส

นำเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียกรดแลคติก ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหาร MRS broth ที่มีหลอดดักก๊าซ 1 หลอด นำไปบ่มใน candle jar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน บันทึกผลจากการเกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ

3.2 การจำแนกสปีชีส์โดยอาศัยลำดับเบสในยีน 16S rRNA

3.2.1 การสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรีย

นำแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีจำนวนเซลล์ $5x10^6$ CFU/ml ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,025xg เป็นเวลา 3 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ แล้วล้างเซลล์ด้วย TE buffer pH 8 (ภาคผนวก ข ข้อ 1) จากนั้นนำเซลล์แขวนลอยใน TE buffer pH 8.0 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ lysozyme 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติม sodium dodecyl sulfate ร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) (ภาคผนวก ข ข้อ 2) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมสารละลายฟีนอล: คลอโรฟอร์ม อัตราส่วนปริมาตร 1 ต่อ 1 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,244xg เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วทำซ้ำอีกครั้งหนึ่ง จากนั้นแยกส่วนใสด้านบนมาทำการตกตะกอน

ดีเอ็นเอ โดยนำส่วนใสมาเติมโซเดียมอะซิเตท 3 โมลาร์ (ภาคผนวก ข ข้อ 3) ในอัตราส่วนปริมาตร 1 ต่อ 10 และเอทานอล ร้อยละ 95 (ที่แช่เย็น) ในอัตราส่วนปริมาตร 2 ต่อ 1 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,244xg เป็นเวลา 10 นาที ล้างดีเอ็นเออีกครั้งด้วยเอทานอลร้อยละ 70 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,244xg เป็นเวลา 1 นาที ดูดเอทานอลทิ้ง จากนั้นนำไประเหยเอทานอลออก แขวนลอยดีเอ็นเอด้วย nuclease-free dH_2O ปริมาตร 30-50 ไมโครลิตร แล้วนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาวิเคราะห์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟเรซิส (electrophoresis) โดยชั่งอะกาโรส 0.5 กรัม ผสมกับ 1X TAE 50 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข ข้อ 4) นำมาหลอมให้ละลาย แล้วเทลงใน gel apparatus เมื่อเจลแข็งตัวนำมาใส่ใน chamber จากนั้นเท 1X TAE ให้ท่วมเจล นำดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่สกัดได้ผสมกับ loading dye แล้วนำมาใส่ช่องภายในเจล ให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำเจลมาย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide (0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างน้ำเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นตรวจดูเจลภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต ดีเอ็นเอจะปรากฏให้เห็นเป็นแถบสีส้ม การตรวจสอบด้วยวิธีนี้ต้องเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (2-Log DNA Ladder, New England Biolabs) ทุกครั้ง

3.2.2 การเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอนเอบริเวณ 16S rRNA ของแบคทีเรีย

นำ DNA ที่สกัดได้มาเป็น template ในการทำ Polymerase Chain Reaction (PCR) เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียโดยใช้ primers ที่มีลำดับเบสดังนี้ (Erko; & Michael. 1991)

forward primer (8-27f): 5’ AGAGTTTGATC(A/C)TGGCTCAG 3’

reverse primer (1525r): 5’ TACGG(C/T)TACCTTGTTACGACTT 3’

โดยส่วนผสมของ PCR reaction ปริมาตรรวมทั้งหมด 50 ไมโครลิตร มีดังนี้ 10X *Taq* buffer 5 ไมโครลิตร dNTP mix 1 มิลลิโมลาร์ forward primer 15 พิโคโมล reverse primer 15 พิโคโมล ดีเอ็นเอที่สกัดจากเชื้อแบคทีเรีย 40 นาโนกรัม *Taq* DNA polymerase 0.2 ไมโครลิตร $MgCl_2$ 2 มิลลิโมลาร์ และ 5X Q solution 10 ไมโครลิตร

นำหลอด PCR tubes ที่ผสมสารต่างๆ เรียบร้อยแล้วใส่ในเครื่อง Authorized Thermal Cycler โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาสำหรับเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอนเอบริเวณ 16S rRNA โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. preheating	อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 5 นาที
2. denaturing	อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1 นาที
3. annealing	อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1 นาที

4. extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที

5. ทำซ้ำขั้นที่ 2-4 เป็นจำนวน 35 รอบ

6. final extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

7. คงอุณหภูมิไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปทำการวิเคราะห์ต่อไป

แล้วนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR นี้มาวิเคราะห์ขนาดด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟเรซิส เช่นเดียวกับข้อ 3.2.1 โดยชิ้นดีเอ็นเอจะมีขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส

3.2.3 การทำให้ชิ้นดีเอ็นเอบริสุทธิ์

ใช้ FAVORGEN® GEL/PCR PURIFICATION kit (ภาคผนวก ค ข้อ 1)

3.2.4 การเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA กับลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ในฐานข้อมูล

นำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ส่งไปหาลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA (ห้างหุ้นส่วนจำกัดวอร์ดเมดิก) จากนั้นนำลำดับเบสที่ได้มาตรวจสอบความถูกต้องด้วยตาเปล่าโดยใช้โปรแกรม Chromas version 2.0.1 (Technelysium Pty Limited, Australia) และจัดเรียงต่อสายดีเอ็นเอที่ได้ด้วยโปรแกรม Bioedit version 7.0.9 (Tom Hall, North Carolina State University) แล้วนำลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอไปเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ในฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information: GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (http://www.ncbi. nlm.nih.gov/BLAST)

4. การทดสอบสารยับยั้งแบคทีเรียว่าเป็นแบคทีริโอซิน

นำแบคทีเรียกรดแลคติกที่ทำการจัดจำแนกแล้วในข้อ 3.2 มาเลี้ยงในอาหาร MRS broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำน้ำเลี้ยงเชื้อไปเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,244xg อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนน้ำใสมาปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เท่ากับ 7.0 แล้วนำมากรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำส่วนน้ำใสที่ผ่านการกรองแล้วมาทดสอบว่าเป็นแบคทีริโอซินหรือไม่ โดยการนำไปบ่มกับเอนไซม์คะตะเลสและเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนดังนี้ trypsin, actinase, protease XIII, facin, trypsin from porcine pancreas, α-chymotrypsin และ pepsin (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำไปทดสอบแอคติวิตีในการยับยั้งแบคทีเรีย โดยวิธี agar well diffusion เปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้เติมเอนไซม์ โดยสารยับยั้งที่ถูกย่อยได้ด้วยเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน และยังคงแอคติวิตีภายหลังการบ่มด้วยเอนไซม์คะตะเลสจะจัดว่าเป็นแบคทีริโอซิน

5. การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสร้างแบคทีริโอซิน

นำแบคทีเรียกรดแลคติกที่ทำการจัดจำแนกในข้อ 3.2 มาเลี้ยงในอาหาร MRS broth ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ทำการเก็บตัวอย่างเป็นเวลา 4, 8, 12, 16, และ 24 ชั่วโมง โดยแบ่งการเก็บตัวอย่างออกเป็น 2 ชุด โดยชุดที่ 1 นำไปวัดอัตราการเจริญของเชื้อโดยค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ชุดที่ 2 นำไปเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 13,244xg อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสมาปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เท่ากับ 7.0 แล้วนำมากรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นจึงนำไปทดสอบแอคติวิตีในการยับยั้งแบคทีเรีย โดยวิธี agar well diffusion และคำนวณค่าแอคติวิตีของแบคทีริโอซินในรูปของ Arbitrary unit ต่อมิลลิลิตร (AU/ml) ซึ่งคำนวณได้จาก

$$\text{แอคติวิตีของแบคทีริโอซิน (AU/ml)} = \text{ความกว้างในการยับยั้งเชื้อทดสอบ (มม.)} \times \frac{1{,}000}{\text{ปริมาตรที่ใช้ (µl)}}$$

6. การศึกษาสมบัติเบื้องต้นของแบคทีริโอซินที่ผลิตได้

6.1 การทดสอบค่าความเป็นกรดด่างต่อแอคติวิตีของแบคทีริโอซิน

นำแบคทีริโอซินที่ได้จากการนำส่วนน้ำใสมาปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เท่ากับ 7.0 แล้วนำมากรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำส่วนน้ำใสที่ผ่านการกรองแล้วมาศึกษาผลของค่าความเป็นกรดด่าง โดยบ่มแบคทีริโอซินในอาหาร MRS broth ที่มีการปรับค่าความเป็นกรดด่างที่ 2.0, 4.0, 6.0, 7.0, 8.0 และ 10.0 ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปรับความเป็นกรดด่างกลับเป็น 7.0 แล้วจึงนำไปทดสอบแอคติวิตีในการยับยั้งแบคทีเรีย โดยวิธี agar well diffusion

6.2 การทดสอบผลของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของแบคทีริโอซิน

นำแบคทีริโอซินที่ได้จากการนำส่วนน้ำใสมาปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เท่ากับ 7.0 แล้วนำมากรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำส่วนน้ำใสที่ผ่านการกรองแล้วมาศึกษาผลของอุณหภูมิ โดยบ่มแบคทีริโอซินในอาหาร MRS broth ที่อุณหภูมิ 60, 80 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10, 20, 30 และ 60 นาที แล้วจึงนำไปทดสอบแอคติวิตีในการยับยั้งแบคทีเรีย โดยวิธี agar well diffusion

6.3 การศึกษา antibacterial spectrum

นำแบคทีริโอซินที่ได้จากการนำส่วนน้ำใสมาปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เท่ากับ 7.0 แล้วนำมากรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำส่วนน้ำใสที่ผ่านการกรองแล้วนำมาทดสอบแอคติวิตีในการยับยั้งแบคทีเรีย ด้วยวิธี agar well diffusion โดยการใช้ indicator strain ชนิดต่างๆ ได้

แก่ *Escherichia coli* JM 109, *Listeria innocoa* ATCC 33090, *Streptococcus salivarius, Leuconostoc mesenteroides, Lactococcus lactis*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, *Lactobacillus sakei, Lb. plantarum*, *Pediococcus pentosaceus* JCM 5885 และ *P. pentosaceus* JCM 5890

7. การศึกษามวลโมเลกุลของแบคทีริโอซิน

7.1 การตกตะกอนแบคทีริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติก

นำแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างแบคทีริโอซินมาทำการเลี้ยงในอาหาร MRS broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นำน้ำเลี้ยงเชื้อไปเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,244xg อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำแบคทีริโอซินที่ได้จากการนำส่วนน้ำใสมาปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เท่ากับ 7.0 แล้วนำมากรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร มาทำการตกตะกอนด้วย saturated ammonium sulphate (Huang; et al. 2009: 1030-1035) 60 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำตะกอนที่ได้มาละลายใน 25 mM ammonium acetate (ค่าความเป็นกรดด่าง 6.5) นำเอาเกลือออกด้วยวิธีไดอะไลซิส (ภาคผนวก ง ข้อ 1)

7.2 การแยกมวลโมเลกุลของโปรตีนด้วยวิธี tricine–SDS–PAGE (Schägger; & Von Jagow. 1987: 368-379)

7.2.1 การเตรียมตัวอย่างสำหรับการแยกมวลโมเลกุลของแบคทีริโอซิน

นำตัวอย่างแบคทีริโอซินที่ได้จากการทำไดอะไลซิสแล้วมาผสมกับ 2X tricine sample buffer (ภาคผนวก ข ข้อ 11) ในอัตราส่วนปริมาตร 1 ต่อ 1 จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

7.2.2 การเตรียมเจลสำหรับการแยกมวลโมเลกุลของแบคทีริโอซิน

นำอุปกรณ์สำหรับเตรียมเจลมาทำการติดตั้งให้พร้อมสำหรับการใช้งาน จากนั้นนำ separating gel (15% gel) (ภาคผนวก ข ข้อ 5) มาทำการหยอดเจลลงบนกระจกให้ปริมาณเจลห่างจากด้านบน 1.5 เซนติเมตร แล้วจึงเติมน้ำกลั่นจนเต็มแผ่นกระจก ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เพื่อให้เจลเกิดการแข็งตัว จากนั้นจึงนำ stacking gel (ภาคผนวก ข ข้อ 6) มาหยอดลงด้านบนจนเต็มเจลแล้วจึงนำหวีมาใส่ทางด้านบน รอจนกระทั่งเจลแข็งตัวประมาณ 30 ถึง 40 นาที

7.2.3 การแยกมวลโมเลกุลของแบคทีริโอซินด้วย tricine-SDS-PAGE

นำเจลที่เตรียมได้จากข้อ 6.2.2 มาใส่ลงในเครื่อง SDS-PAGE จากนั้นจึงใส่ cathode buffer (ภาคผนวก ข ข้อ 16) ทางด้านบน และใส่ anode buffer (ภาคผนวก ข ข้อ 15) ทางด้านล่าง จากนั้นจึงทำการหยอด protein marker (PageRuler^{TM} Unstained Protein Ladder) และตัวอย่างแบคทีริโอซินที่เตรียมไว้แล้ว ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงไปในแต่ละหลุม ทำการเปิดเครื่องโดยให้

กระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 150 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อสารเคลื่อนที่มาห่างจากขอบเจลอีกด้านประมาณ 1 เซนติเมตร จึงปิดเครื่อง นำเจลที่ได้มาตัดเป็น 2 ส่วน ส่วนที่หนึ่งนำไปตรึงด้วย fixing solution (ภาคผนวก ข ข้อ 14) เป็นเวลา 25 ถึง 30 นาที จากนั้นล้างเจลด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที แล้วจึงนำเจลไปย้อมด้วยสีย้อม coomassie blue (stainer) (ภาคผนวก ข ข้อ 12) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำเจลล้างด้วย destainer (ภาคผนวก ข ข้อ 13) จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 4 ชั่วโมง ตรวจสอบแถบของโปรตีนที่เกิดขึ้น โดยเทียบกับ protein marker (PageRuler™ Unstained Protein Ladder) ส่วนเจลอีกครึ่งหนึ่งนำไปตรึงด้วยไอโซโพรพานอล 20 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) และกรดอะซิติก 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 4 ชั่วโมง (Daba, H.; et al. 1991: 3450-3455) จากนั้นจึงนำเจลมาเททับด้วยเชื้อทดสอบ (*W. confusa* N31) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตบริเวณใสอันเนื่องมาจากการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบบนแถบของโปรตีนที่เกิดขึ้น

8. การศึกษาการดูดซับของแบคทีริโอซินบนแบคทีเรียที่สร้าง (producer cell)

การศึกษาการดูดซับของแบคทีริโอซินบนแบคทีเรียที่สร้างทำได้โดยนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างแบคทีริโอซินมาเลี้ยงในอาหาร MRS broth เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำน้ำเลี้ยงเชื้อไปปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เท่ากับ 7.0 แล้วนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,244xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นแยกส่วนตะกอนเซลล์ มาล้างด้วย 0.1 M phosphate buffer (ค่าความเป็นกรดด่าง 6.5) เก็บตะกอนเซลล์มาละลายใน 100 mM NaCl (pH 2.0) ทำการกวนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำมาแยกตะกอนเซลล์อีกครั้ง เก็บส่วนน้ำใสมาปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เท่ากับ 7.0 ด้วย 1 M NaOH จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาแอคติวิตีของแบคทีริโอซิน (Yang; Johnson; & Ray. 1992: 3355-3359)

9. การศึกษาการดูดซับของแบคทีริโอซินบนแบคทีเรียที่ไวต่อการยับยั้งของแบคทีริโอซิน

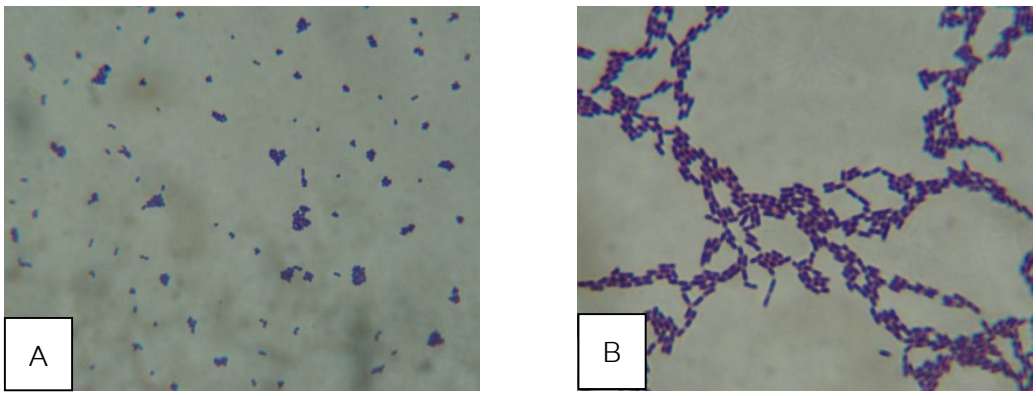
การศึกษาการดูดซับของแบคทีริโอซินบนแบคทีเรียที่ไวต่อการยับยั้งของแบคทีริโอซินทำโดยนำแบคทีเรียกรดแลคติก *Lb. plantarum* ATCC 8014, *Lb. sakei* JCM 1157, *P. pentosaceus* JCM 5885, *P. pentosaceus* JCM 5890, *S. salivarius* JCM 57077, *L. innocua* ATCC 33090 มาเลี้ยงในอาหาร MRS broth เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,244xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นแยกส่วนตะกอนเซลล์มาแล้วเติมแบคทีริโอซิน (ค่าความเป็นกรดด่าง 6.0) ลงไป ทำการบ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,244xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นแยก

ส่วนตะกอนเซลล์มาล้างด้วย 0.1 M phosphate buffer (ค่าความเป็นกรดด่าง 6.5) เก็บตะกอนเซลล์มาละลายใน 100 mM NaCl (pH 2.0) ทำการกวนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำมาแยกตะกอนเซลล์อีกครั้ง เก็บส่วนน้ำใสมาปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เท่ากับ 7.0 ด้วย 1 M NaOH จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาแอคติวิตีของแบคทีริโอซินโดยใช้ *W. confusa* N31 เป็นเชื้อทดสอบ

บทที่ 4
ผลการศึกษา

1. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

จากการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารเนื้อและปลาหมักของไทย จำนวน 93 ตัวอย่าง โดยเลือกโคโลนีเดี่ยวที่มีบริเวณใสรอบโคโลนีบนอาหาร MRS ที่เติม $CaCO_3$ ร้อยละ 0.5 นำมาย้อมสีแกรม แล้วตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ คัดเลือกเชื้อที่ติดสีแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ (ภาพประกอบ 3) จากนั้นนำมาทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส คัดเลือกเชื้อที่ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ทั้งหมด 152 ไอโซเลท โดยมีรูปร่างเป็นท่อน 79 ไอโซเลท และรูปไข่ 73 ไอโซเลท ดังแสดงในตาราง 5



ภาพประกอบ 3 ลักษณะรูปร่างของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์ปลาหมัก

A. ไอโซเลท 24 เซลล์รูปไข่ B. ไอโซเลท 14 เซลล์รูปท่อน (กำลังขยาย 1,000 เท่า)

ตาราง 5 การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีบริเวณใสรอบโคโลนีบนอาหารแข็ง MRS ที่เติม $CaCO_3$ ร้อยละ 0.5

วัน/เดือน/ปี ที่เก็บ ตัวอย่าง	ชนิดของ ตัวอย่าง	สถานที่เก็บ	ไอโซเลท ที่แยกได้	รูปร่าง
20/4/52	ปลาส้ม	ห้างสรรพสินค้าเทสโก้ โลตัส สาขาฟอร์จูน จ. กรุงเทพมหานคร	F1	รูปไข่
20/4/52	ปลาส้ม	ห้างสรรพสินค้าเทสโก้ โลตัส สาขาฟอร์จูน จ. กรุงเทพมหานคร	F2	รูปท่อน
20/4/52	ปลาส้ม	ห้างสรรพสินค้าเทสโก้ โลตัส สาขาฟอร์จูน จ. กรุงเทพมหานคร	F3	รูปท่อน
20/4/52	ปลาส้ม	ห้างสรรพสินค้าเทสโก้ โลตัส สาขาฟอร์จูน จ. กรุงเทพมหานคร	F4	รูปไข่
20/4/52	ปลาส้ม	ห้างสรรพสินค้าเทสโก้ โลตัส สาขาฟอร์จูน จ. กรุงเทพมหานคร	F5	รูปท่อน
20/4/52	ปลาส้ม	ห้างสรรพสินค้าเทสโก้ โลตัส สาขาฟอร์จูน จ. กรุงเทพมหานคร	F6	รูปท่อน
20/4/52	ปลาส้ม	ห้างสรรพสินค้าเทสโก้ โลตัส สาขาฟอร์จูน จ. กรุงเทพมหานคร	F7	รูปท่อน
21/4/52	ปลาส้ม	ห้างสรรพสินค้าคาร์ฟูร์ สาขาฉะเชิงเทรา จ. ฉะเชิงเทรา	F8	รูปไข่
21/4/52	ปลาส้ม	ห้างสรรพสินค้าคาร์ฟูร์ สาขาฉะเชิงเทรา จ. ฉะเชิงเทรา	F9	รูปไข่
21/4/52	ปลาส้ม	ห้างสรรพสินค้าคาร์ฟูร์ สาขาฉะเชิงเทรา จ. ฉะเชิงเทรา	F10	รูปท่อน

ตาราง 5 (ต่อ)

วัน/เดือน/ปี ที่เก็บ ตัวอย่าง	ชนิดของ ตัวอย่าง	สถานที่เก็บ	ไอโซเลท ที่แยกได้	รูปร่าง
21/4/52	ปลาส้ม	ห้างสรรพสินค้าคาร์ฟูร์ สาขาฉะเชิงเทรา จ. ฉะเชิงเทรา	F11	รูปท่อน
21/4/52	ปลาส้ม	ห้างสรรพสินค้าคาร์ฟูร์ สาขาฉะเชิงเทรา จ. ฉะเชิงเทรา	F12	รูปท่อน
21/4/52	ปลาส้ม	ห้างสรรพสินค้าคาร์ฟูร์ สาขาฉะเชิงเทรา จ. ฉะเชิงเทรา	F13	รูปท่อน
21/4/52	ปลาส้ม	ห้างสรรพสินค้าคาร์ฟูร์ สาขาฉะเชิงเทรา จ. ฉะเชิงเทรา	F14	รูปท่อน
21/4/52	ปลาส้ม	ตลาด อตก. จ. กรุงเทพมหานคร	F15	รูปท่อน
21/4/52	ปลาส้ม	ตลาด อตก. จ. กรุงเทพมหานคร	F16	รูปท่อน
21/4/52	ปลาส้ม	ตลาด อตก. จ. กรุงเทพมหานคร	F17	รูปท่อน
21/4/52	ปลาส้ม	ตลาด อตก. จ. กรุงเทพมหานคร	F18	รูปท่อน
21/4/52	ปลาส้ม	ตลาด อตก. จ. กรุงเทพมหานคร	F19	รูปท่อน
21/4/52	ปลาส้ม	ตลาด อตก. จ. กรุงเทพมหานคร	F20	รูปไข่
21/4/52	ปลาส้ม	ตลาด อตก. จ. กรุงเทพมหานคร	F21	รูปท่อน
21/4/52	ปลาส้ม	ตลาด อตก. จ. กรุงเทพมหานคร	F22	รูปไข่
21/4/52	ปลาส้ม	ตลาด อตก. จ. กรุงเทพมหานคร	F23	รูปไข่
21/4/52	ปลาส้ม	ตลาด อตก. จ. กรุงเทพมหานคร	F24	รูปไข่
21/4/52	ปลาส้ม	ตลาด อตก. จ. กรุงเทพมหานคร	F25	รูปไข่
27/4/52	ปลาส้ม	ตลาดหน้าโรงงานคอร์ตินาร์ จ. ฉะเชิงเทรา	F26	รูปไข่

ตาราง 5 (ต่อ)

วัน/เดือน/ปี ที่เก็บ ตัวอย่าง	ชนิดของ ตัวอย่าง	สถานที่เก็บ	ไอโซเลท ที่แยกได้	รูปร่าง
27/4/52	ปลาส้ม	ตลาดหน้าโรงงานคอร์ตินาร์ จ. ฉะเชิงเทรา	F27	รูปไข่
27/4/52	ปลาส้ม	ตลาดหน้าโรงงานคอร์ตินาร์ จ. ฉะเชิงเทรา	F28	รูปไข่
27/4/52	ปลาส้ม	ตลาดหน้าโรงงานคอร์ตินาร์ จ. ฉะเชิงเทรา	F29	รูปไข่
27/4/52	ปลาส้ม	ตลาดหน้าโรงงานคอร์ตินาร์ จ. ฉะเชิงเทรา	F30	รูปไข่
27/4/52	ปลาส้ม	ตลาดหน้าโรงงานคอร์ตินาร์ จ. ฉะเชิงเทรา	F31	รูปไข่
3/5/52	ปลาส้ม	ตลาดหน้าวัดพราหมณ์มณี จ. นครนายก	F32	รูปท่อน
3/5/52	ปลาส้ม	ตลาดหน้าวัดพราหมณ์มณี จ. นครนายก	F33	รูปท่อน
4/5/52	ปลาส้ม	ตลาดริมถนน อ. กลางดง จ. นครราชสีมา	F34	รูปไข่
4/5/52	ปลาส้ม	ตลาดริมถนน อ. กลางดง จ. นครราชสีมา	F35	รูปไข่
4/5/52	ปลาส้ม	ตลาดริมถนน อ. กลางดง จ. นครราชสีมา	F36	รูปท่อน

ตาราง 5 (ต่อ)

วัน/เดือน/ปี ที่เก็บ ตัวอย่าง	ชนิดของ ตัวอย่าง	สถานที่เก็บ	ไอโซเลท ที่แยกได้	รูปร่าง
4/5/52	ปลาส้ม	ตลาดริมถนน อ. กลางดง จ. นครราชสีมา	F37	รูปท่อน
4/5/52	ปลาส้ม	ตลาดริมถนน อ. กลางดง จ. นครราชสีมา	F38	รูปท่อน
4/5/52	ปลาส้ม	ตลาดริมถนน อ.กลางดง จ. นครราชสีมา	F39	รูปไข่
4/5/52	ปลาส้ม	ตลาดริมถนน อ. กลางดง จ. นครราชสีมา	F40	รูปท่อน
4/5/52	ปลาส้ม	ตลาดดอนเจดีย์ จ. สุพรรณบุรี	F41	รูปท่อน
7/5/52	ปลาส้ม	ตลาดนัด มศว จ. กรุงเทพมหานคร	F42	รูปท่อน
7/5/52	ปลาส้ม	ตลาดนัด มศว จ. กรุงเทพมหานคร	F43	รูปท่อน
7/5/52	ปลาส้ม	ตลาดนัด มศว จ. กรุงเทพมหานคร	F44	รูปท่อน
7/5/52	ปลาส้ม	ตลาดนัด มศว จ. กรุงเทพมหานคร	F45	รูปท่อน
9/5/52	ปลาส้ม	ตลาดบางจาก จ. กรุงเทพมหานคร	F46	รูปท่อน
9/5/52	ปลาส้ม	ตลาดบางจาก จ. กรุงเทพมหานคร	F47	รูปท่อน
9/5/52	ปลาส้ม	ตลาดบางจาก จ. กรุงเทพมหานคร	F48	รูปท่อน
9/5/52	ปลาส้ม	ตลาดบางจาก จ. กรุงเทพมหานคร	F49	รูปท่อน
10/5/52	ปลาส้ม	ร้านพรทิพย์ ตลาดหน้าย่าโม จ. นครราชสีมา	F50	รูปไข่
10/5/52	ปลาส้ม	ร้านพรทิพย์ ตลาดหน้าย่าโม จ. นครราชสีมา	F51	รูปท่อน

ตาราง 5 (ต่อ)

วัน/เดือน/ปี ที่เก็บ ตัวอย่าง	ชนิดของ ตัวอย่าง	สถานที่เก็บ	ไอโซเลท ที่แยกได้	รูปร่าง
15/5/52	ปลาส้ม	ตลาดมืด อ. จอมบึง จ. ราชบุรี	F52	รูปท่อน
15/5/52	ปลาส้ม	ตลาดนัดหลังกระทรวงการคลัง จ. กรุงเทพมหานคร	F53	รูปไข่
24/5/52	ปลาส้ม	ตลาดริมถนน อ. กลางดง จ. นครราชสีมา	F54	รูปท่อน
25/5/52	ปลาส้ม	ตลาดหน้าโรงงานคอร์ตินาร์ จ. ฉะเชิงเทรา	F55	รูปไข่
25/5/52	ปลาส้ม	ตลาดหน้าโรงงานคอร์ตินาร์ จ. ฉะเชิงเทรา	F56	รูปไข่
28/5/52	ปลาส้ม	ตลาดนัดหลังกระทรวงการคลัง จ. กรุงเทพมหานคร	F57	รูปท่อน
4/6/52	ปลาส้ม	ตลาดหน้าโรงงานคอร์ตินาร์ จ. ฉะเชิงเทรา	F58	รูปท่อน
4/6/52	ปลาส้ม	ตลาดหน้าโรงงานคอร์ตินาร์ จ. ฉะเชิงเทรา	F59	รูปท่อน
7/6/52	ปลาส้ม	ตลาดกบินทร์บุรี จ. ปราจีนบุรี	F60	รูปท่อน
4/5/52	ปลาร้า	ตลาดโคกหม้อ จ. สุพรรณบุรี	A1	รูปไข่
4/5/52	ปลาร้า	ตลาดดอนเจดีย์ จ. สุพรรณบุรี	A2	รูปไข่
4/5/52	ปลาร้า	ตลาดดอนเจดีย์ จ. สุพรรณบุรี	A3	รูปไข่
15/5/52	ปลาร้า	ตลาดหน้าโรงงานคอร์ตินาร์ จ. ฉะเชิงเทรา	A4	รูปไข่

ตาราง 5 (ต่อ)

วัน/เดือน/ปี ที่เก็บ ตัวอย่าง	ชนิดของ ตัวอย่าง	สถานที่เก็บ	ไอโซเลท ที่แยกได้	รูปร่าง
15/5/52	ปลาร้า	ตลาดหน้าโรงงานคอร์ตินาร์ จ. ฉะเชิงเทรา	A5	รูปท่อน
25/5/52	ปลาร้า	ตลาดหน้าโรงงานคอร์ตินาร์ จ. ฉะเชิงเทรา	A6	รูปท่อน
25/5/52	ปลาร้า	ตลาดหน้าโรงงานคอร์ตินาร์ จ. ฉะเชิงเทรา	A7	รูปไข่
25/5/52	ปลาร้า	ตลาดหน้าโรงงานคอร์ตินาร์ จ. ฉะเชิงเทรา	A8	รูปไข่
27/5/52	ปลาร้า	ตลาดนัดหลังกระทรวงการคลัง จ. กรุงเทพมหานคร	A9	รูปไข่
27/5/52	ปลาร้า	ตลาดนัดหลังกระทรวงการคลัง จ. กรุงเทพมหานคร	A10	รูปไข่
1/6/52	ปลาร้า	ตลาดนัดพึ่งมี 36 จ. กรุงเทพมหานคร	A11	รูปไข่
1/6/52	ปลาร้า	ตลาดนัดพึ่งมี 36 จ. กรุงเทพมหานคร	A12	รูปไข่
8/6/52	ปลาร้า	ตลาดนัดพึ่งมี 36 จ. กรุงเทพมหานคร	A13	รูปไข่
10/9/50	แหนมปลา	ตลาดปลาเหมือด จ. เชียงใหม่	1	รูปท่อน
10/9/50	แหนมปลา	ตลาดปลาเหมือด จ. เชียงใหม่	2	รูปไข่
11/9/50	แหนมหมู	ตลาดเจดีย์หลวง จ. เชียงใหม่	3	รูปท่อน
11/9/50	แหนมหมู	ตลาดเจดีย์หลวง จ. เชียงใหม่	4	รูปท่อน
11/9/50	แหนมปลา	ตลาดเจดีย์หลวง จ. เชียงใหม่	5	รูปท่อน
11/9/50	แหนมปลา	ตลาดเจดีย์หลวง จ. เชียงใหม่	6	รูปท่อน

ตาราง 5 (ต่อ)

วัน/เดือน/ปี ที่เก็บ ตัวอย่าง	ชนิดของ ตัวอย่าง	สถานที่เก็บ	ไอโซเลท ที่แยกได้	รูปร่าง
11/9/50	แหนมหมู	ตลาดเจดีย์หลวง จ. เชียงใหม่	7	รูปไข่
11/9/50	แหนมหมู	ตลาดเจดีย์หลวง จ. เชียงใหม่	8	รูปท่อน
11/9/50	แหนมหมู	ตลาดเจดีย์หลวง จ.เชียงใหม่	9	รูปไข่
11/9/50	แหนมปลากราย	ตลาดเจดีย์หลวง จ. เชียงใหม่	10	รูปท่อน
11/9/50	แหนมปลากราย	ตลาดเจดีย์หลวง จ. เชียงใหม่	11	รูปท่อน
11/9/50	แหนมหมู	ตลาดเจดีย์หลวง จ. เชียงใหม่	12	รูปท่อน
23/9/50	แหนมหมู	ตลาดบางขุนนนท์ จ. กรุงเทพมหานคร	13	รูปไข่
6/11/50	แหนมหมู	หน้าห้างสรรพสินค้าแม็คโคร สาขาจรัญ-สนิทวงศ์ จ. กรุงเทพมหานคร	14	รูปท่อน
6/11/50	แหนมหมู	หน้าห้างสรรพสินค้าแม็คโคร สาขาจรัญ-สนิทวงศ์ จ. กรุงเทพมหานคร	15	รูปท่อน
22/11/50	แหนมหมู	หน้าห้างสรรพสินค้าเซ็นทรัล พลาซ่า สาขาปิ่นเกล้า จ. กรุงเทพมหานคร	16	รูปไข่
21/12/50	แหนมหมู	ตลาดหน้ามหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ. เชียงใหม่	17	รูปท่อน
21/12/50	แหนมหมู	ตลาดหน้ามหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ. เชียงใหม่	18	รูปไข่
21/12/50	แหนมหมู	ตลาดหน้ามหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ. เชียงใหม่	19	รูปไข่

ตาราง 5 (ต่อ)

วัน/เดือน/ปี ที่เก็บ ตัวอย่าง	ชนิดของ ตัวอย่าง	สถานที่เก็บ	ไอโซเลท ที่แยกได้	รูปร่าง
21/12/50	แหนมปลา กราย	ตลาดหน้ามหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ. เชียงใหม่	20	รูปไข่
21/12/50	แหนมปลา กราย	ตลาดหน้ามหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ. เชียงใหม่	21	รูปท่อน
21/12/50	แหนมปลา กราย	ตลาดหน้ามหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ. เชียงใหม่	22	รูปท่อน
21/12/50	แหนมหมู	ตลาดหน้ามหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ. เชียงใหม่	23	รูปท่อน
9/3/51	แหนมหมู	ตลาดบางขุนศรี จ. กรุงเทพมหานคร	24	รูปไข่
16/3/51	แหนมหมู	ตลาดบางขุนนนท์ จ. กรุงเทพมหานคร	25	รูปไข่
23/3/51	แหนมหมู	ตลาดบางขุนนนท์ จ. กรุงเทพมหานคร	26	รูปท่อน
23/3/51	แหนมหมู	ตลาดบางขุนนนท์ จ. กรุงเทพมหานคร	27	รูปท่อน
28/3/51	แหนมหมู	หน้าห้างสรรพสินค้า เทสโก้ โลตัส สาขาปิ่นเกล้า จ. กรุงเทพมหานคร	28	รูปไข่
30/3/51	แหนมหมู	หน้าร้าน Seven eleven สาขาชัยพฤกษ์ จ. กรุงเทพมหานคร	29	รูปไข่
30/3/51	แหนมหมู	หน้าร้าน Seven eleven สาขาชัยพฤกษ์ จ. กรุงเทพมหานคร	30	รูปท่อน
30/3/51	แหนมหมู	หน้าร้าน Seven eleven สาขาชัยพฤกษ์ จ. กรุงเทพมหานคร	31	รูปท่อน

ตาราง 5 (ต่อ)

วัน/เดือน/ปี ที่เก็บ ตัวอย่าง	ชนิดของ ตัวอย่าง	สถานที่เก็บ	ไอโซเลท ที่แยกได้	รูปร่าง
30/3/51	แหนมหมู	หน้าร้าน Seven eleven สาขาชัยพฤกษ์ จ. กรุงเทพมหานคร	32	รูปท่อน
17/5/51	แหนมหมู	หน้าห้างสรรพสินค้า เทสโก้ โลตัส สาขาปิ่นเกล้า จ. กรุงเทพมหานคร	33	รูปท่อน
20/5/51	แหนมหมู	ตลาดบางขุนศรี จ. กรุงเทพมหานคร	34	รูปไข่
20/5/51	แหนมหมู	ตลาดบางขุนศรี จ. กรุงเทพมหานคร	35	รูปท่อน
20/5/51	แหนมหมู	ตลาดบางขุนศรี จ. กรุงเทพมหานคร	36	รูปท่อน
25/5/51	แหนมหมู	ตลาดบางขุนนนท์ จ. กรุงเทพมหานคร	37	รูปไข่
25/5/51	แหนมหมู	ตลาดบางขุนนนท์ จ. กรุงเทพมหานคร	38	รูปท่อน
25/5/51	แหนมเนื้อ	ตลาดบางขุนนนท์ จ. กรุงเทพมหานคร	39	รูปท่อน
30/6/51	แหนมเนื้อ	ตลาดบางขุนนนท์ จ. กรุงเทพมหานคร	40	รูปไข่
30/6/51	แหนมหมู	หน้าห้างสรรพสินค้าแม็คโคร สาขาจรัญ-สนิทวงศ์ จ. กรุงเทพมหานคร	41	รูปท่อน
4/5/52	แหนมหมู	ตลาดริมถนน อ.กลางดง จ. นครราชสีมา	N1	รูปไข่
10/5/52	แหนมปลากราย	ร้านพรทิพย์ ตลาดหน้าย่าโม จ. นครราชสีมา	N2	รูปท่อน
10/5/52	แหนมปลากราย	ร้านพรทิพย์ ตลาดหน้าย่าโม จ. นครราชสีมา	N3	รูปท่อน
10/5/52	แหนมหมู	ร้านพรทิพย์ ตลาดหน้าย่าโม จ. นครราชสีมา	N4	รูปท่อน

ตาราง 5 (ต่อ)

วัน/เดือน/ปี ที่เก็บ ตัวอย่าง	ชนิดของ ตัวอย่าง	สถานที่เก็บ	ไอโซเลท ที่แยกได้	รูปร่าง
10/5/52	แหนมหมู	ร้านพรทิพย์ ตลาดหน้าย่าโม จ. นครราชสีมา	N5	รูปไข่
10/5/52	แหนมหมู	ร้านพรทิพย์ ตลาดหน้าย่าโม จ. นครราชสีมา	N6	รูปไข่
20/5/52	แหนมหมู	ตลาดสุพรรณบุรี จ. สุพรรณบุรี	N7	รูปท่อน
25/5/52	แหนมหมู	ตลาดสุพรรณบุรี จ. สุพรรณบุรี	N8	รูปไข่
25/5/52	แหนมหมู	ตลาดสุพรรณบุรี จ. สุพรรณบุรี	N9	รูปไข่
25/5/52	แหนมหมู	ตลาดสุพรรณบุรี จ. สุพรรณบุรี	N10	รูปท่อน
25/5/52	แหนมหมู	ตลาดสุพรรณบุรี จ. สุพรรณบุรี	N11	รูปไข่
25/5/52	แหนมหมู	ตลาดสุพรรณบุรี จ. สุพรรณบุรี	N12	รูปไข่
25/5/52	แหนมหมู	ตลาดบางจาก จ. กรุงเทพมหานคร	N13	รูปไข่
25/5/52	แหนมหมู	ตลาดบางจาก จ. กรุงเทพมหานคร	N14	รูปไข่
25/5/52	แหนมหมู	ตลาดบางจาก จ. กรุงเทพมหานคร	N15	รูปไข่
25/5/52	แหนมหมู	ตลาดนัดพึ่งมี 36 จ. กรุงเทพมหานคร	N16	รูปไข่
25/5/52	แหนมหมู	ตลาดนัดพึ่งมี 36 จ. กรุงเทพมหานคร	N17	รูปไข่
25/5/52	แหนมหมู	ตลาดนัดพึ่งมี 36 จ. กรุงเทพมหานคร	N18	รูปไข่
1/6/52	แหนมหมู	ตลาดนัดพึ่งมี 36 จ. กรุงเทพมหานคร	N19	รูปไข่
1/6/52	แหนมหมู	ตลาดนัดพึ่งมี 36 จ. กรุงเทพมหานคร	N20	รูปไข่
1/6/52	แหนมเนื้อ	ตลาดนัดพึ่งมี 36 จ. กรุงเทพมหานคร	N21	รูปไข่
1/6/52	แหนมหมู	ตลาดพระโขนง จ. กรุงเทพมหานคร	N22	รูปไข่
1/6/52	แหนมหมู	ตลาดพระโขนง จ. กรุงเทพมหานคร	N23	รูปท่อน

ตาราง 5 (ต่อ)

วัน/เดือน/ปี ที่เก็บ ตัวอย่าง	ชนิดของ ตัวอย่าง	สถานที่เก็บ	ไอโซเลท ที่แยกได้	รูปร่าง
5/6/52	แหนมหมู	ตลาดริมถนน อ. กลางดง จ. นครราชสีมา	N24	รูปท่อน
20/6/52	แหนมหมู	ร้านริมถนน หน้ากองสลากกินแบ่ง-รัฐบาล จ. กรุงเทพมหานคร	N25	รูปไข่
20/6/52	แหนมหมู	ร้านริมถนน หน้ากองสลากกินแบ่ง-รัฐบาล จ. กรุงเทพมหานคร	N26	รูปไข่
22/6/52	แหนมหมู	ตลาดกบินทร์บุรี จ. ปราจีนบุรี	N27	รูปท่อน
22/6/52	แหนมหมู	ตลาดกบินทร์บุรี จ. ปราจีนบุรี	N28	รูปท่อน
22/6/52	แหนมหมู	ตลาดกบินทร์บุรี จ. ปราจีนบุรี	N29	รูปไข่
22/6/52	แหนมหมู	ร้านริมถนน หน้ากองสลากกินแบ่ง-รัฐบาล จ. กรุงเทพมหานคร	N30	รูปไข่
22/6/52	แหนมหมู	ตลาดนัดหลังกระทรวงการคลัง จ. กรุงเทพมหานคร	N31	รูปไข่
4/5/52	ปลาจ่อม	ตลาดดอนเจดีย์ จ. สุพรรณบุรี	J1	รูปท่อน
4/5/52	ปลาจ่อม	ตลาดดอนเจดีย์ จ. สุพรรณบุรี	J2	รูปท่อน
4/5/52	ปลาจ่อม	ตลาดดอนเจดีย์ จ. สุพรรณบุรี	J3	รูปท่อน
4/5/52	ปลาจ่อม	ตลาดดอนเจดีย์ จ. สุพรรณบุรี	J4	รูปไข่
7/5/52	ปลาจ่อม	ตลาดนัด มศว จ. กรุงเทพมหานคร	J5	รูปไข่
7/5/52	ปลาจ่อม	ตลาดนัด มศว จ. กรุงเทพมหานคร	J6	รูปไข่
7/5/52	ปลาจ่อม	ตลาดบางจาก จ. กรุงเทพมหานคร	J7	รูปท่อน

2. การคัดเลือกเชื้อที่สามารถสร้างสารยับยั้งแบคทีเรีย

นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 152 ไอโซเลทที่แยกได้มาทำการคัดเลือกเชื้อที่สามารถสร้างสารยับยั้งแบคทีเรีย โดยวิธี agar spot test และวิธี agar well diffusion เพื่อยืนยันความสามารถในการสร้างสารยับยั้ง ซึ่งผลแสดงในตาราง 6 จากการทดลองพบว่า มีเชื้อจำนวน 7 ไอโซเลท คือ A8, N8, N23, 11, 14, 24 และ 26 ที่สามารถสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียทดสอบคือ *Weissella confusa* N31 ได้ จากนั้นนำเชื้อทั้ง 7 ไอโซเลท มาทำการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

ตาราง 6 การคัดเลือกเชื้อที่สามารถสร้างสารยับยั้งแบคทีเรีย

ไอโซเลท	การทดสอบความสามารถสร้างสารยับยั้งแบคทีเรีย (มม.)	
	agar spot test	agar well diffusion
F1	-	-
F2	-	-
F3	-	-
F4	-	-
F5	-	-
F6	-	-
F7	-	-
F8	-	-
F9	-	-
F10	-	-
F11	-	-
F12	-	-
F13	-	-
F14	-	-
F15	-	-
F16	-	-
F17	2	-
F18	-	-
F19	2	-

ตาราง 6 (ต่อ)

ไอโซเลท	การทดสอบความสามารถในการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรีย (มม.)	
	agar spot test	agar well diffusion
F20	2	-
F21	-	-
F22	1	-
F23	2	-
F24	2	-
F25	2	-
F26	2	-
F27	-	-
F28	-	-
F29	2	-
F30	1	-
F31	2	-
F32	-	-
F33	1	-
F34	2	-
F35	-	-
F36	-	-
F37	-	-
F38	-	-
F39	-	-
F40	-	-
F41	-	-
F42	-	-
F43	-	-
F44	-	-

ตาราง 6 (ต่อ)

ไอโซเลท	การทดสอบความสามารถในการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรีย (มม.)	
	agar spot test	agar well diffusion
F45	5	-
F46	-	-
F47	-	-
F48	1	-
F49	1	-
F50	-	-
F51	1	-
F52	-	-
F53	-	-
F54	-	-
F55	-	-
F56	-	-
F57	-	-
F58	-	-
F59	-	-
F60	-	-
A1	-	-
A2	-	-
A3	2	-
A4	-	-
A5	-	-
A6	-	-
A7	-	-
A8	4	3
A9	-	-

ตาราง 6 (ต่อ)

ไอโซเลท	การทดสอบความสามารถในการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรีย (มม.)	
	agar spot test	agar well diffusion
A10	-	-
A11	-	-
A12	-	-
A13	-	-
1	-	-
2	1	-
3	-	-
4	-	-
5	1	-
6	-	-
7	-	-
8	2	-
9	2	-
10	2	-
11	3	2
12	-	-
13	-	-
14	4	3
15	-	-
16	-	-
17	-	-
18	-	-
19	1	-
20	1	-
21	2	-

ตาราง 6 (ต่อ)

ไอโซเลท	การทดสอบความสามารถในการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรีย (มม.)	
	agar spot test	agar well diffusion
22	-	-
23	1	-
24	3	2
25	-	-
26	3	2
27	-	-
28	-	-
29	-	-
30	-	-
31	-	-
32	-	-
33	-	-
34	-	-
35	-	-
36	-	-
37	-	-
38	5	-
39	2	-
40	-	-
41	-	-
N1	2	-
N2	-	-
N3	1	-
N4	-	-
N5	-	-

-

ตาราง 6 (ต่อ)

ไอโซเลท	การทดสอบความสามารถในการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรีย (มม.)	
	agar spot test	agar well diffusion
N6	-	-
N7	-	-
N8	3	2
N9	-	-
N10	1	-
N11	-	-
N12	-	-
N13	2	-
N14	1	-
N15	1	-
N16	-	-
N17	-	-
N18	1	-
N19	-	-
N20	-	-
N21	-	-
N22	-	-
N23	2	1
N24	1	-
N25	-	-
N26	-	-
N27	-	-
N28	-	-
N29	-	-
N30	1	-

ตาราง 6 (ต่อ)

ไอโซเลท	การทดสอบความสามารถในการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรีย (มม.)	
	agar spot test	agar well diffusion
N31	-	-
J1	-	-
J2	-	-
J3	-	-
J4	-	-
J5	1	-
J6	1	-
J7	-	-

3. การจัดจำแนกเชื้อที่สามารถสร้างสารยับยั้งแบคทีเรีย

3.1 การจำแนกจีนัสโดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมี

เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 7 ไอโซเลท คือ A8, N8, N23, 11, 14, 24 และ 26 ที่สามารถสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียได้ มาทดสอบการสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคส และการเจริญในสภาวะต่างๆ ตามวิธีของ Hoang-Dung TRAN and friends พบว่าได้ผลดังแสดงในตาราง 7

ตาราง 7 ลักษณะบางประการของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้

ไอโซเลท	Catalase test	Gram stain	Gas from glucose	Temperature (°C)		NaCl (%)				pH			
				10	45	4.0	6.5	8	18	4.4	7.0	8.5	9.6
A8	-	positive	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
N8	-	positive	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
N23	-	positive	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
11	-	positive	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+

ตาราง 7 (ต่อ)

ไอโซเลท	Catalase test	Gram stain	Gas from glucose	Temperature (°C)		NaCl (%)				pH			
				10	45	4.0	6.5	8	18	4.4	7.0	8.5	9.6
14	-	positive	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
24	-	positive	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
26	-	positive	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+

หมายเหตุ: + = ให้ผลบวก, - = ให้ผลลบ

3.2 การจำแนกสปีชีส์โดยศึกษาลำดับเบสในบริเวณ 16S rDNA

เมื่อทำการสกัดดีเอ็นเอของไอโซเลท A8, N8, N23, 11, 14, 24 และ 26 แล้วนำไปเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA โดยการทำ PCR พบว่าชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR มีขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส (base pair; bp) และเมื่อนำมาจำแนกสปีชีส์โดยเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ในฐานข้อมูล GenBank ได้ผลดังนี้

1. ไอโซเลท A8 (1,426 คู่เบส) มีความคล้ายคลึงกับ *Lactobacillus plantarum* (GenBank accession number AB494717.1) ร้อยละ 100 (ภาคผนวก จ ข้อ 1) และเมื่อนำลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของ A8 มาเทียบเคียงกับ type strain ของ *Lactobacillus plantarum* NBRC 15891 (GenBank accession number AB326351.1) ผลการเทียบเคียงแสดงดังภาพประกอบ 4

2. ไอโซเลท N8 (1,432 คู่เบส) มีความคล้ายคลึงกับ *Lactobacillus plantarum* (GenBank accession number EU789400.1) ร้อยละ 100 (ภาคผนวก จ ข้อ 2) และเมื่อนำลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของ N8 มาเทียบเคียงกับ type strain ของ *Lactobacillus plantarum* NBRC 15891 (GenBank accession number AB326351.1) ผลการเทียบเคียงแสดงดังภาพประกอบ 5

3. ไอโซเลท N23 (1,437 คู่เบส) มีความคล้ายคลึงกับ *Weissella cibaria* (GenBank accession number AB494716.1) ร้อยละ 99 (ภาคผนวก จ ข้อ 3) และเมื่อนำลำดับเบสบริเวณ 16S

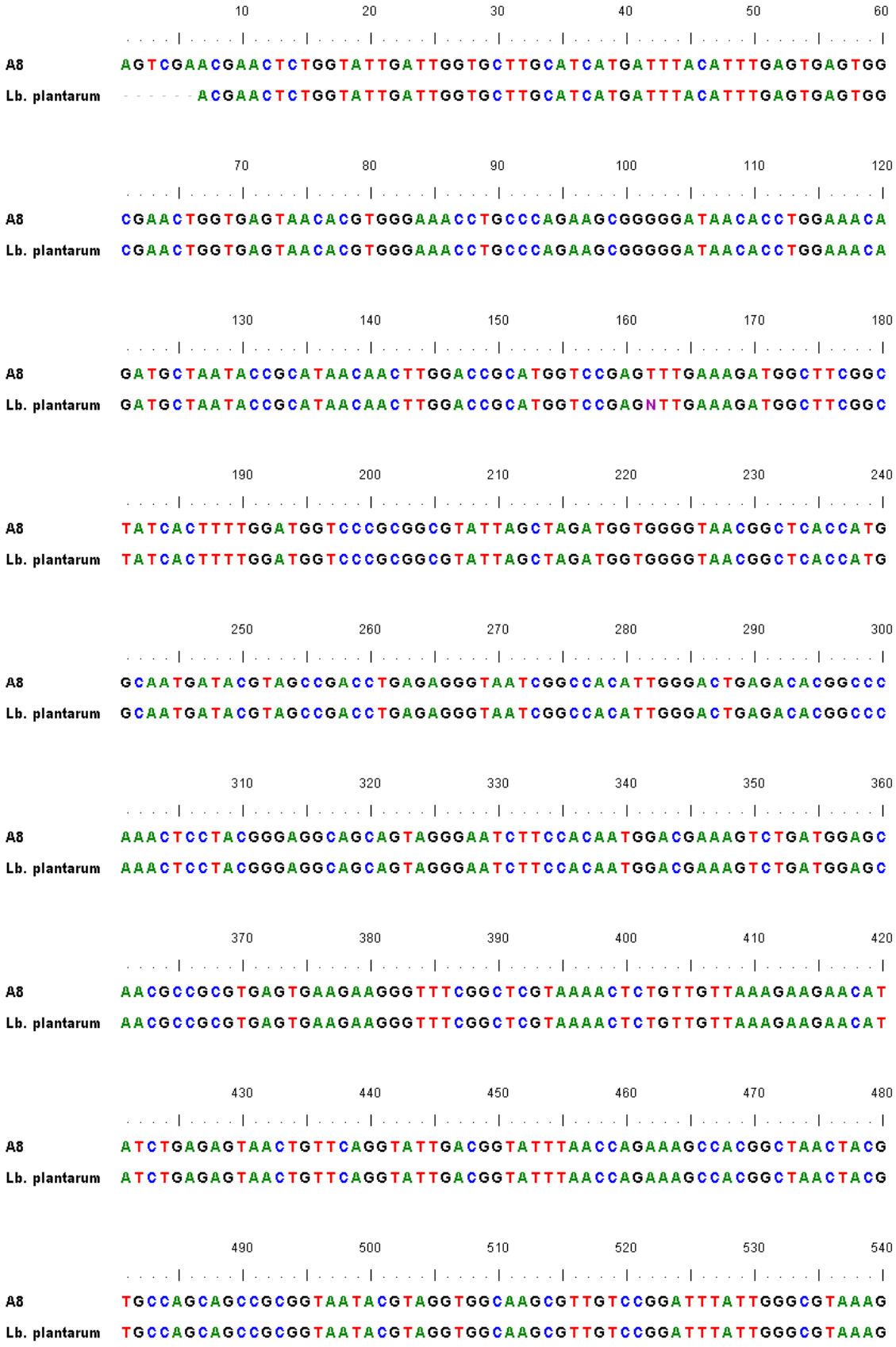
rDNA ของ N23 มาเทียบเคียงกับ type strain ของ *Weissella cibaria* LMG 17699 (GenBank accession number AJ295989) ผลการเทียบเคียงแสดงดังภาพประกอบ 6

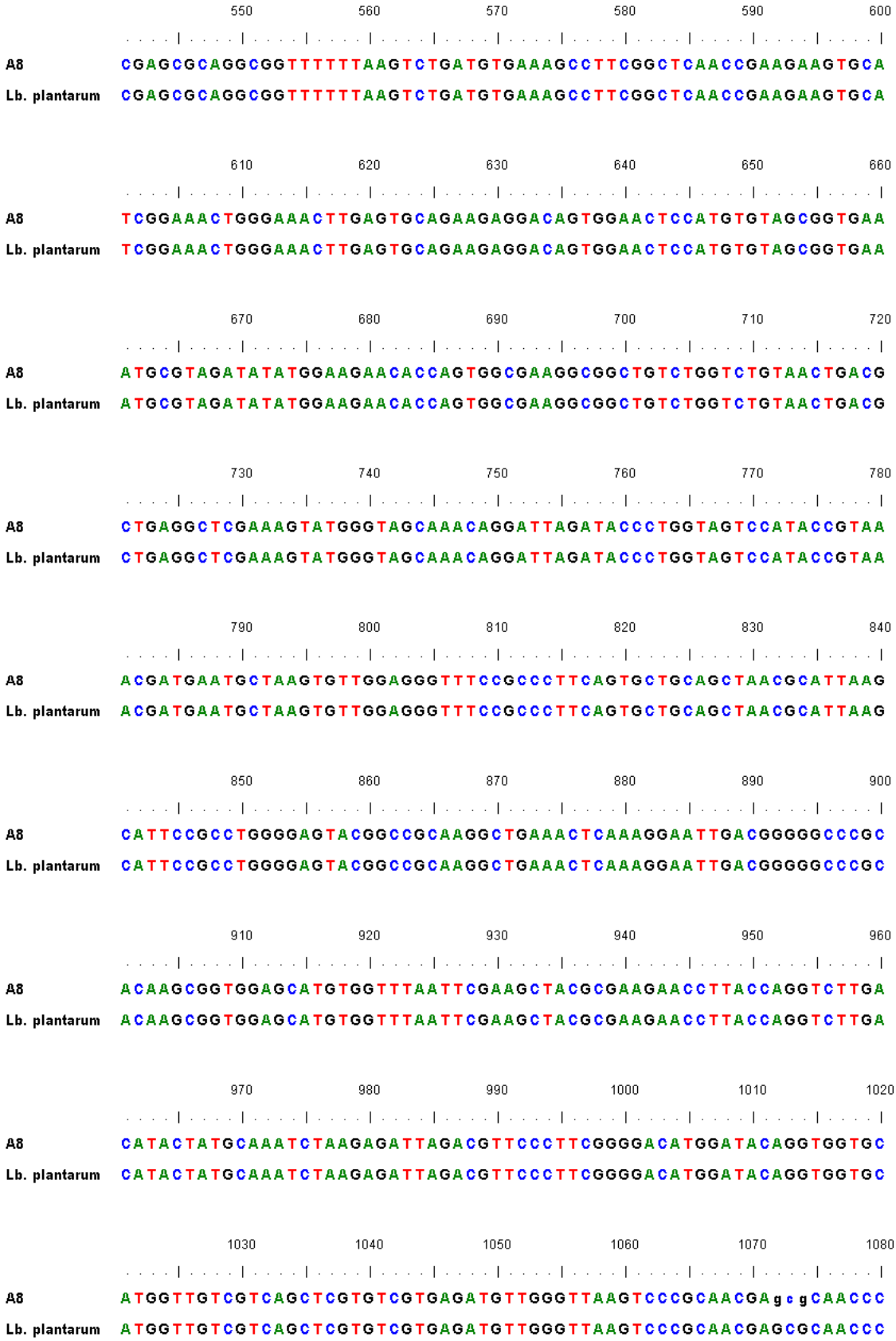
4. ไอโซเลท 11 (1,418 คู่เบส) มีความคล้ายคลึงกับ *Lactobacillus plantarum* (GenBank accession number GU451063.1) ร้อยละ 100 (ภาคผนวก จ ข้อ 4) และเมื่อนำลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของ 11 มาเทียบเคียงกับ type strain ของ *Lactobacillus plantarum* NBRC 15891 (GenBank accession number AB326351.1) ผลการเทียบเคียงแสดงดังภาพประกอบ 7

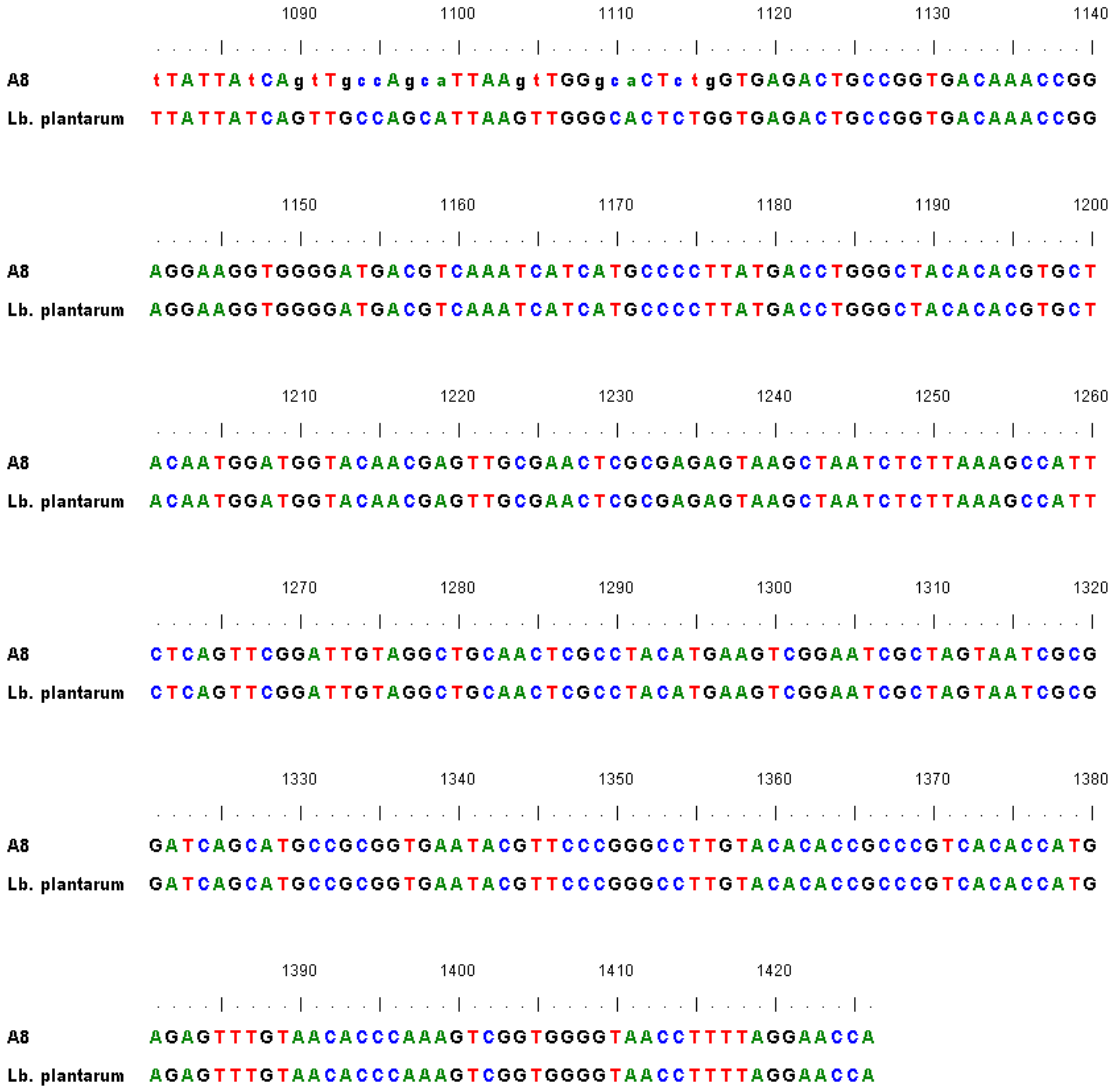
5. ไอโซเลท 14 (1,421 คู่เบส) มีความคล้ายคลึงกับ *Lactobacillus plantarum* (GenBank accession number GU253892.1) ร้อยละ 100 (ภาคผนวก จ ข้อ 5) และเมื่อนำลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของ 14 มาเทียบเคียงกับ type strain ของ *Lactobacillus plantarum* NBRC 15891 (GenBank accession number AB326351.1) ผลการเทียบเคียงแสดงดังภาพประกอบ 8

6. ไอโซเลท 24 (1,427 คู่เบส) มีความคล้ายคลึงกับ *Lactobacillus plantarum* (GenBank accession number FJ542291.1) ร้อยละ 100 (ภาคผนวก จ ข้อ 6) และเมื่อนำลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของ 24 มาเทียบเคียงกับ type strain ของ *Lactobacillus plantarum* NBRC 15891 (GenBank accession number AB326351.1) ผลการเทียบเคียงแสดงดังภาพประกอบ 9

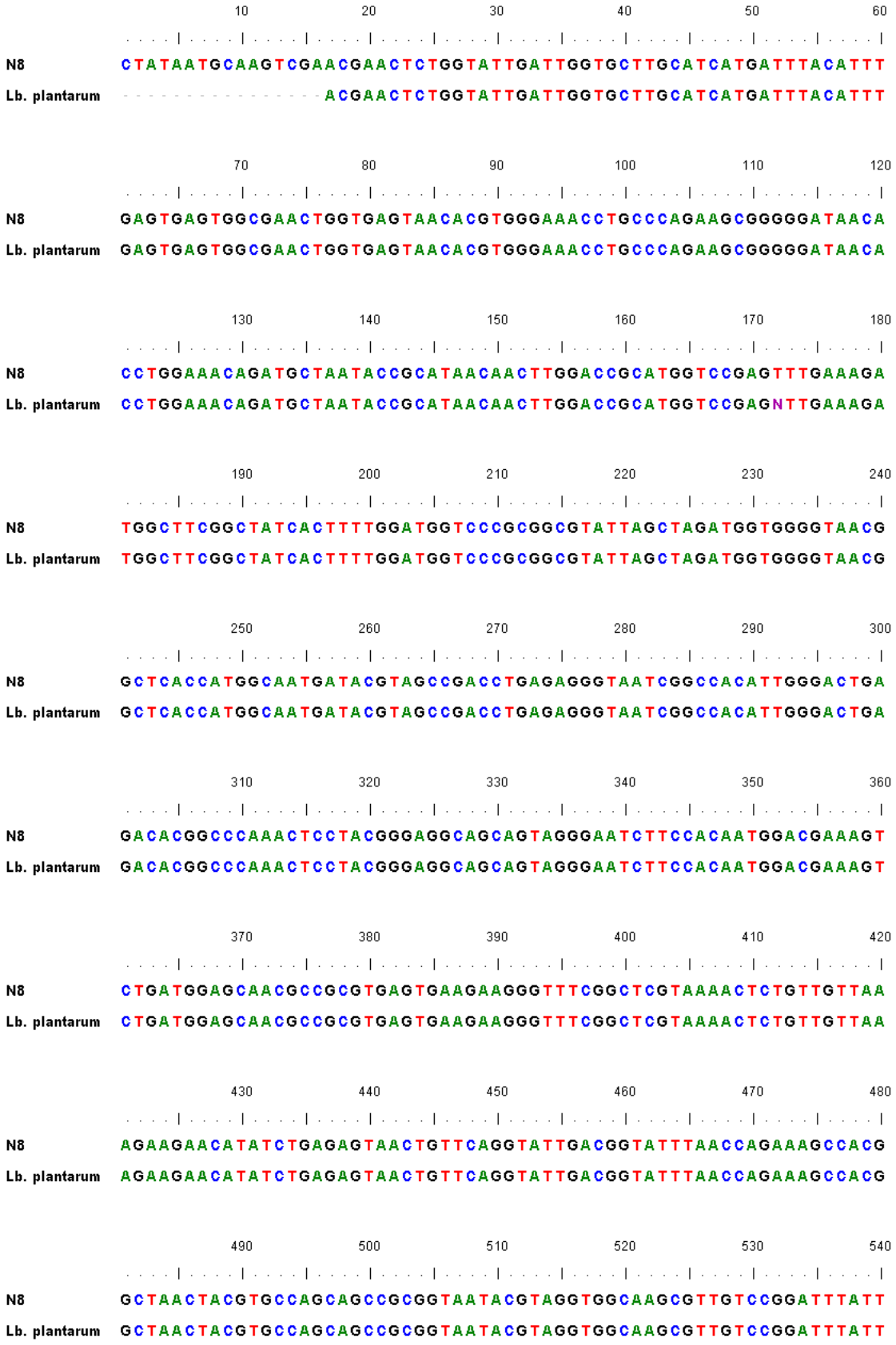
7. ไอโซเลท 26 (1,428 คู่เบส) มีความคล้ายคลึงกับ *Lactobacillus plantarum* (GenBank accession number FJ542291.1) ร้อยละ 100 (ภาคผนวก จ ข้อ 7) และเมื่อนำลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของ 26 มาเทียบเคียงกับ type strain ของ *Lactobacillus plantarum* NBRC 15891 (GenBank accession number AB326351.1) ผลการเทียบเคียงแสดงดังภาพประกอบ 10

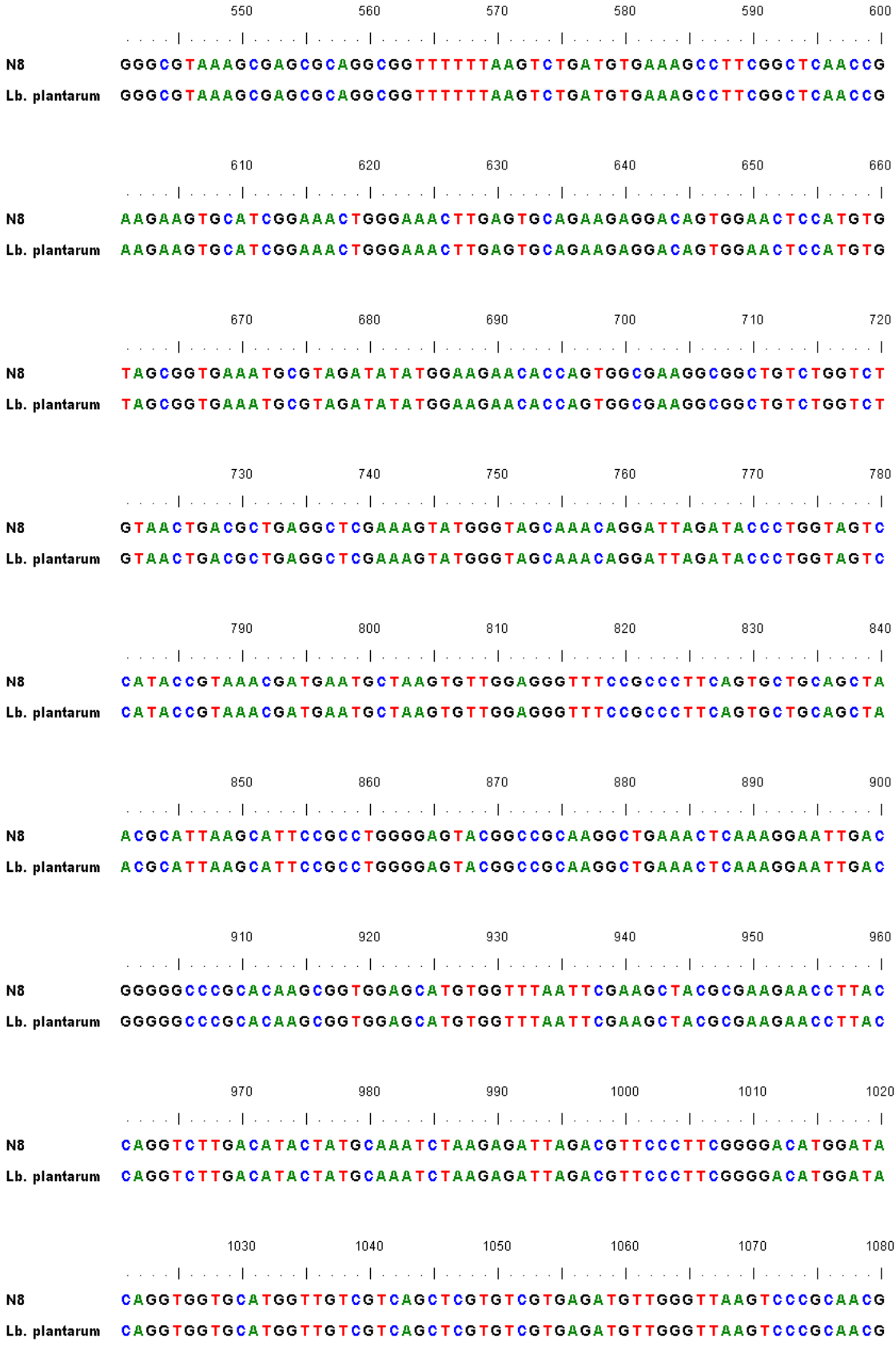

10 20 30 40 50 60
A8 AGTCGAACGAACTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGG
Lb. plantarum ACGAACTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGG
70 80 90 100 110 120
A8 CGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACA
Lb. plantarum CGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACA
130 140 150 160 170 180
A8 GATGCTAATACCGCATAACAACTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGC
Lb. plantarum GATGCTAATACCGCATAACAACTTGGACCGCATGGTCCGAGNTTGAAAGATGGCTTCGGC
190 200 210 220 230 240
A8 TATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATG
Lb. plantarum TATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATG
250 260 270 280 290 300
A8 GCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCC
Lb. plantarum GCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCC
310 320 330 340 350 360
A8 AAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGC
Lb. plantarum AAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGC
370 380 390 400 410 420
A8 AACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACAT
Lb. plantarum AACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACAT
430 440 450 460 470 480
A8 ATCTGAGAGTAACTGTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACG
Lb. plantarum ATCTGAGAGTAACTGTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACG
490 500 510 520 530 540
A8 TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAG
Lb. plantarum TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAG

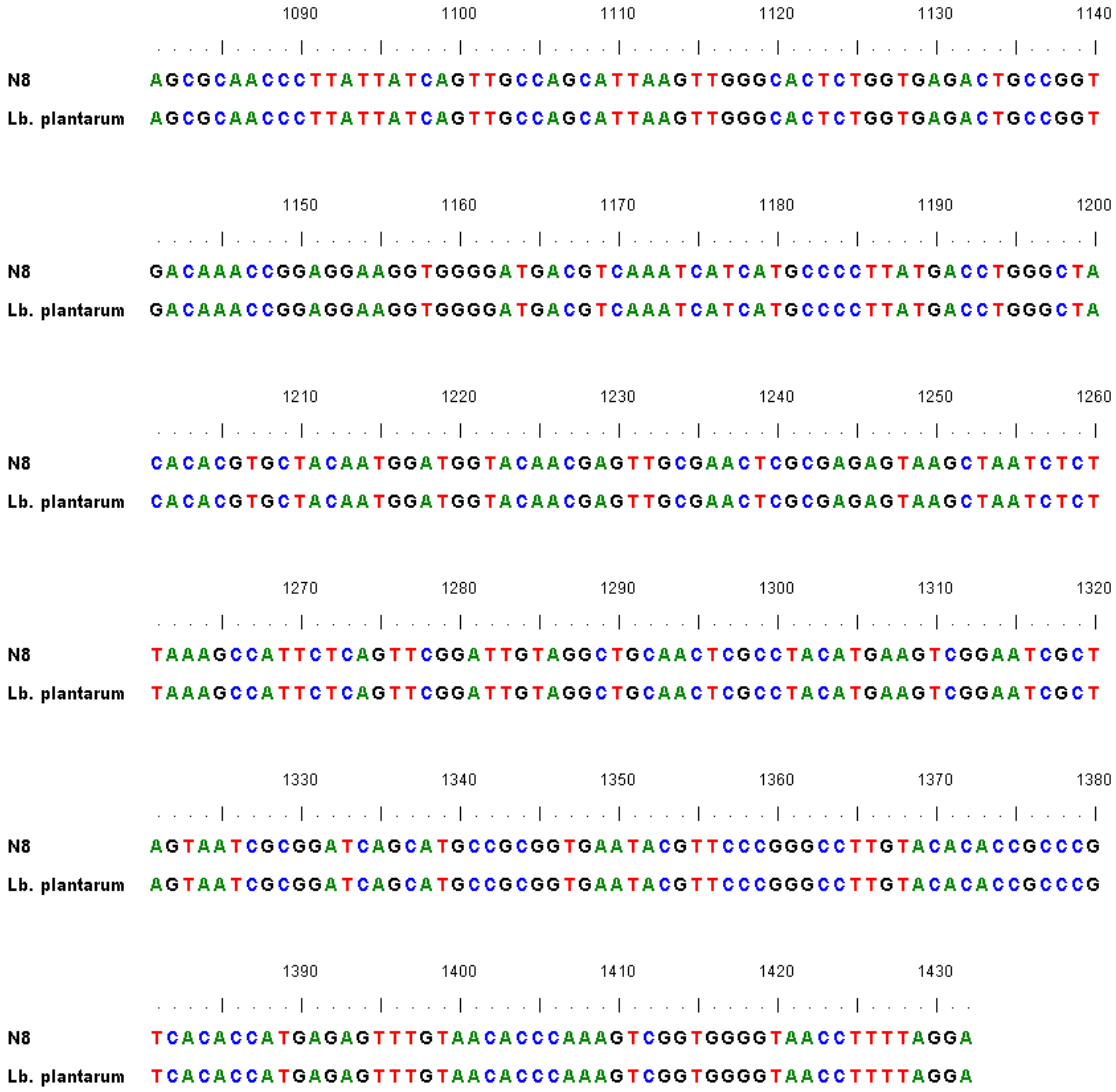

550 560 570 580 590 600
A8 CGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCA
Lb. plantarum CGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCA
610 620 630 640 650 660
A8 TCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAA
Lb. plantarum TCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAA
670 680 690 700 710 720
A8 ATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACTGACG
Lb. plantarum ATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACTGACG
730 740 750 760 770 780
A8 CTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAA
Lb. plantarum CTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAA
790 800 810 820 830 840
A8 ACGATGAATGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAG
Lb. plantarum ACGATGAATGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAG
850 860 870 880 890 900
A8 CATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGC
Lb. plantarum CATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGC
910 920 930 940 950 960
A8 ACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGA
Lb. plantarum ACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGA
970 980 990 1000 1010 1020
A8 CATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGC
Lb. plantarum CATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGC
1030 1040 1050 1060 1070 1080
A8 ATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAgcgCAACCC
Lb. plantarum ATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC



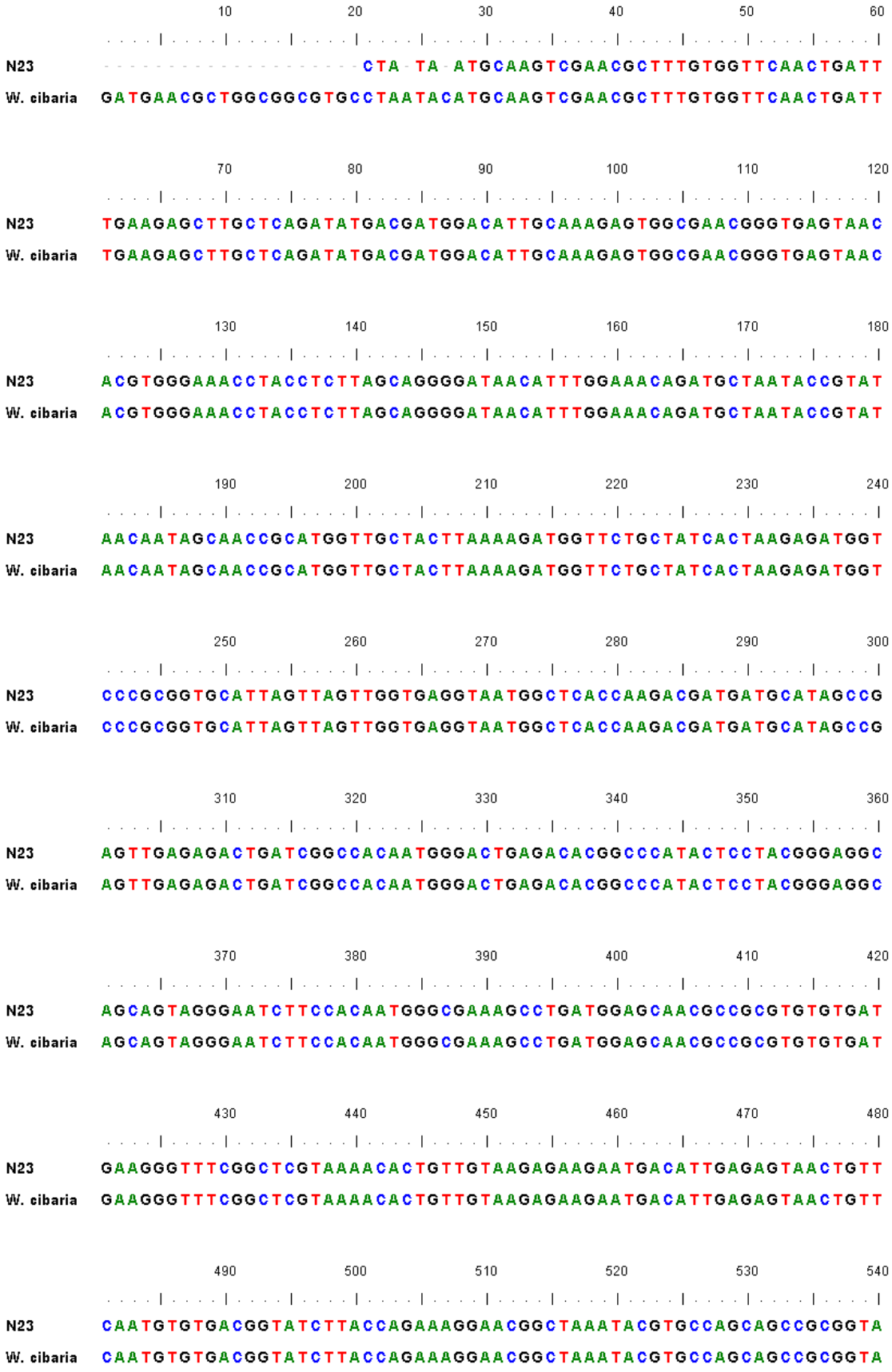
ภาพประกอบ 4 ผลการเทียบเคียงลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท A8 กับ type strain ของ *Lactobacillus plantarum* NBRC 15891 (GenBank accession number AB326351.1)

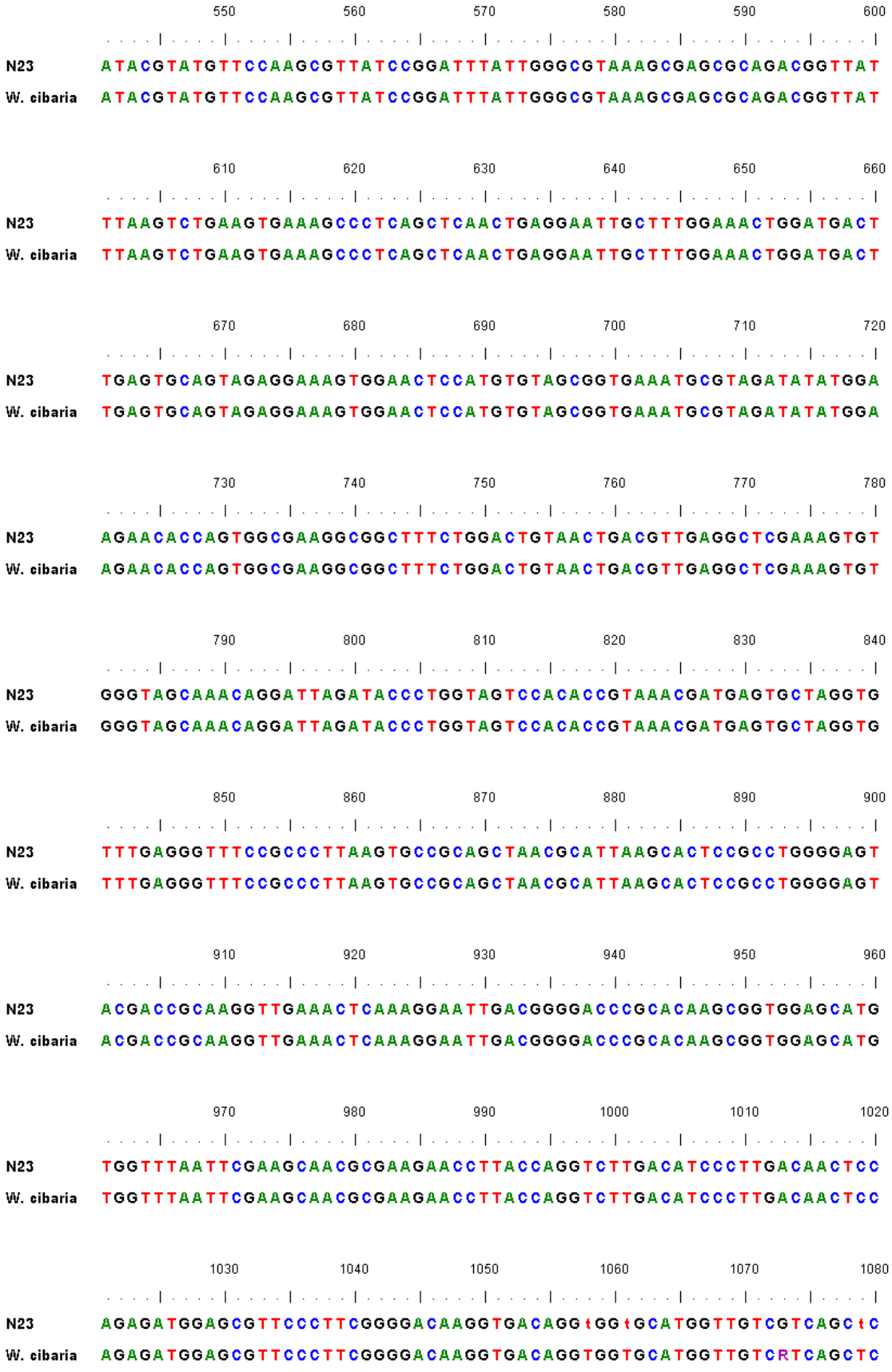

10 20 30 40 50 60
N8 CTATAATGCAAGTCGAACGAACTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTT
Lb. plantarum ACGAACTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTT
70 80 90 100 110 120
N8 GAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACA
Lb. plantarum GAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACA
130 140 150 160 170 180
N8 CCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGA
Lb. plantarum CCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACTTGGACCGCATGGTCCGAGNTTGAAAGA
190 200 210 220 230 240
N8 TGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACG
Lb. plantarum TGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACG
250 260 270 280 290 300
N8 GCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGA
Lb. plantarum GCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGA
310 320 330 340 350 360
N8 GACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGT
Lb. plantarum GACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGT
370 380 390 400 410 420
N8 CTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTAA
Lb. plantarum CTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTAA
430 440 450 460 470 480
N8 AGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACG
Lb. plantarum AGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACG
490 500 510 520 530 540
N8 GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATT
Lb. plantarum GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATT

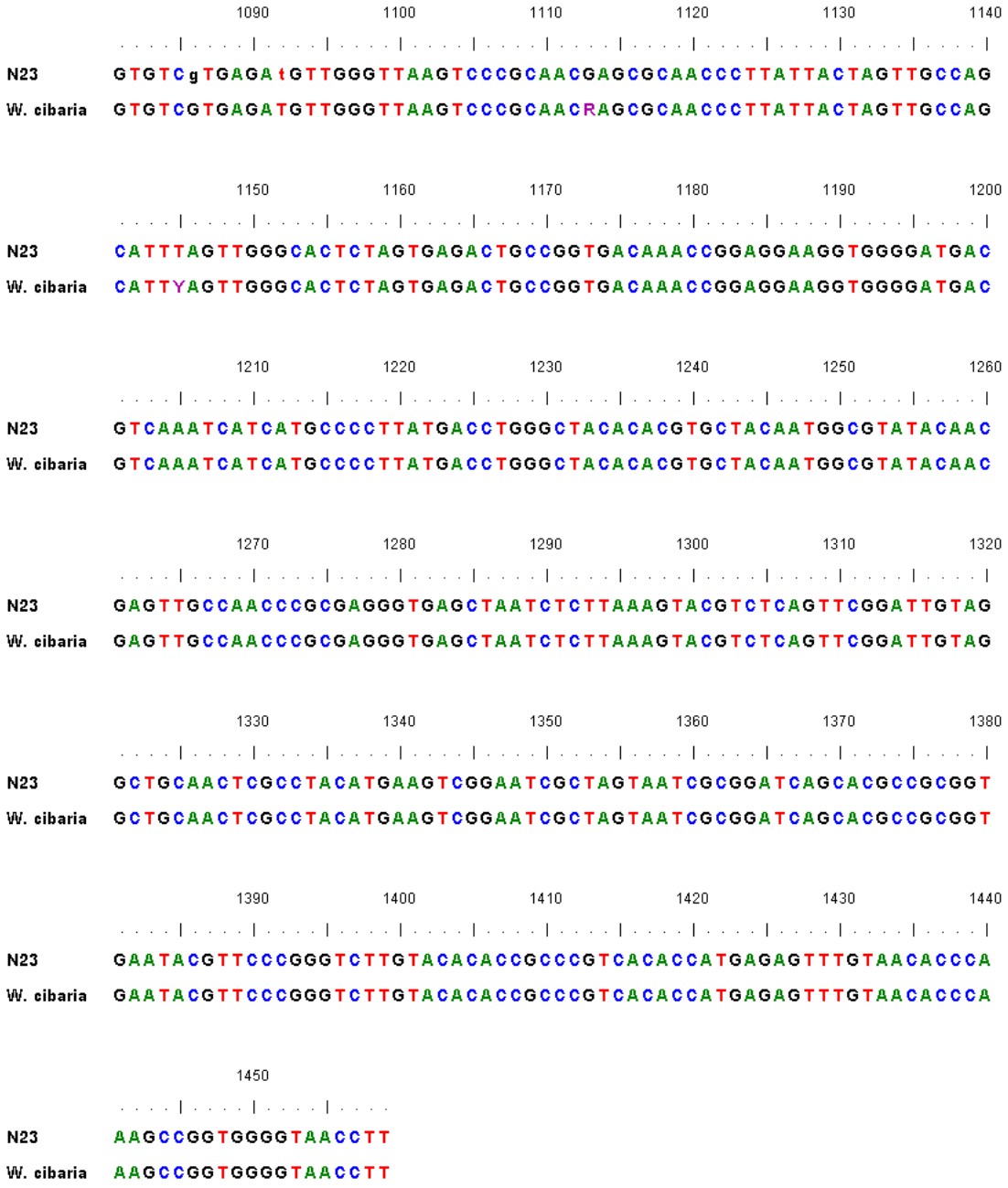

550 560 570 580 590 600
N8 GGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCG
Lb. plantarum GGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCG
610 620 630 640 650 660
N8 AAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTG
Lb. plantarum AAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTG
670 680 690 700 710 720
N8 TAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCT
Lb. plantarum TAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCT
730 740 750 760 770 780
N8 GTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC
Lb. plantarum GTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC
790 800 810 820 830 840
N8 CATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTA
Lb. plantarum CATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTA
850 860 870 880 890 900
N8 ACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGAC
Lb. plantarum ACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGAC
910 920 930 940 950 960
N8 GGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTAC
Lb. plantarum GGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTAC
970 980 990 1000 1010 1020
N8 CAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATA
Lb. plantarum CAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATA
1030 1040 1050 1060 1070 1080
N8 CAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG
Lb. plantarum CAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG



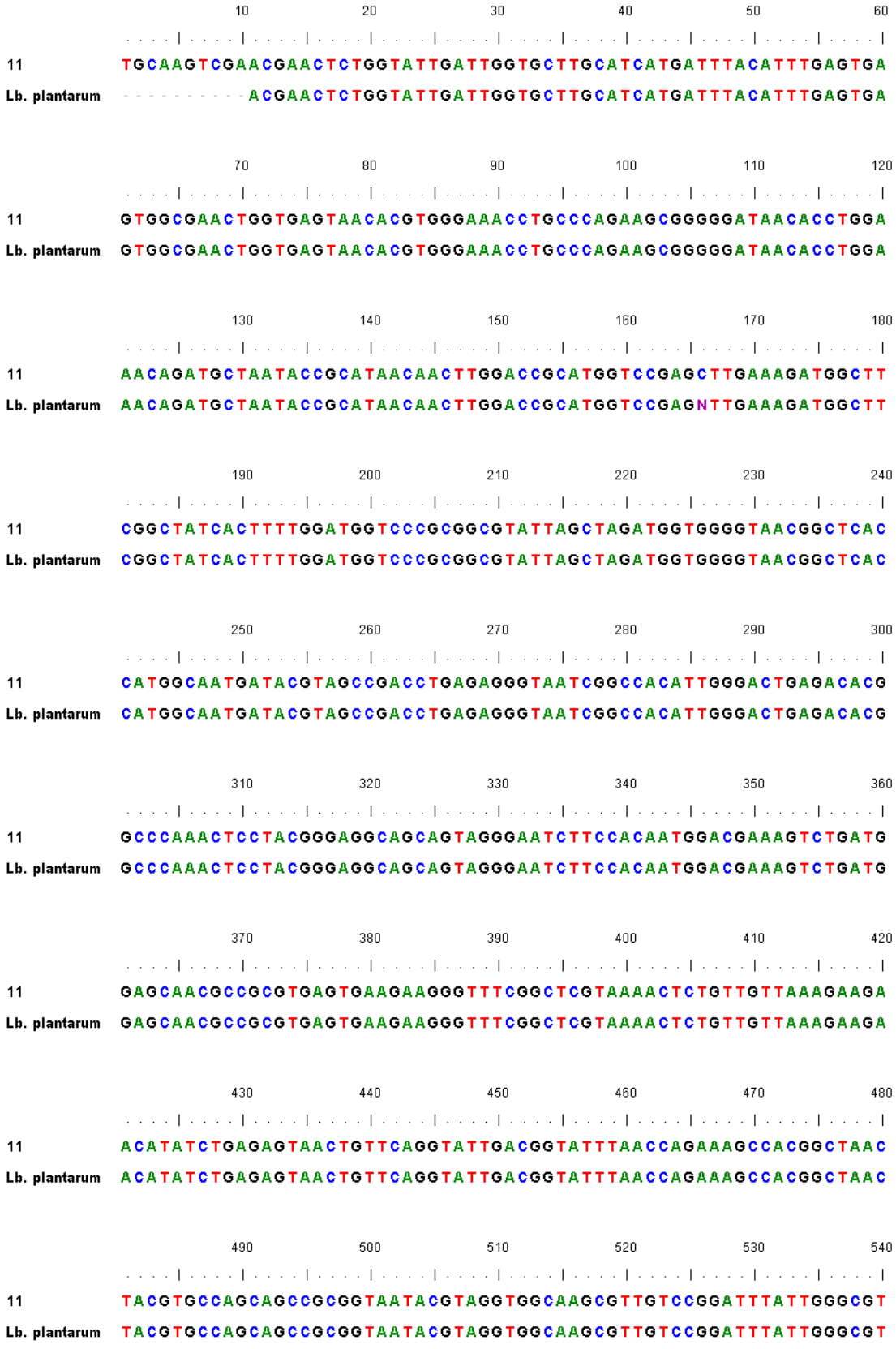
ภาพประกอบ 5 ผลการเทียบเคียงลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท N8 กับ type strain ของ *Lactobacillus plantarum* NBRC 15891 (GenBank accession number AB326351.1)

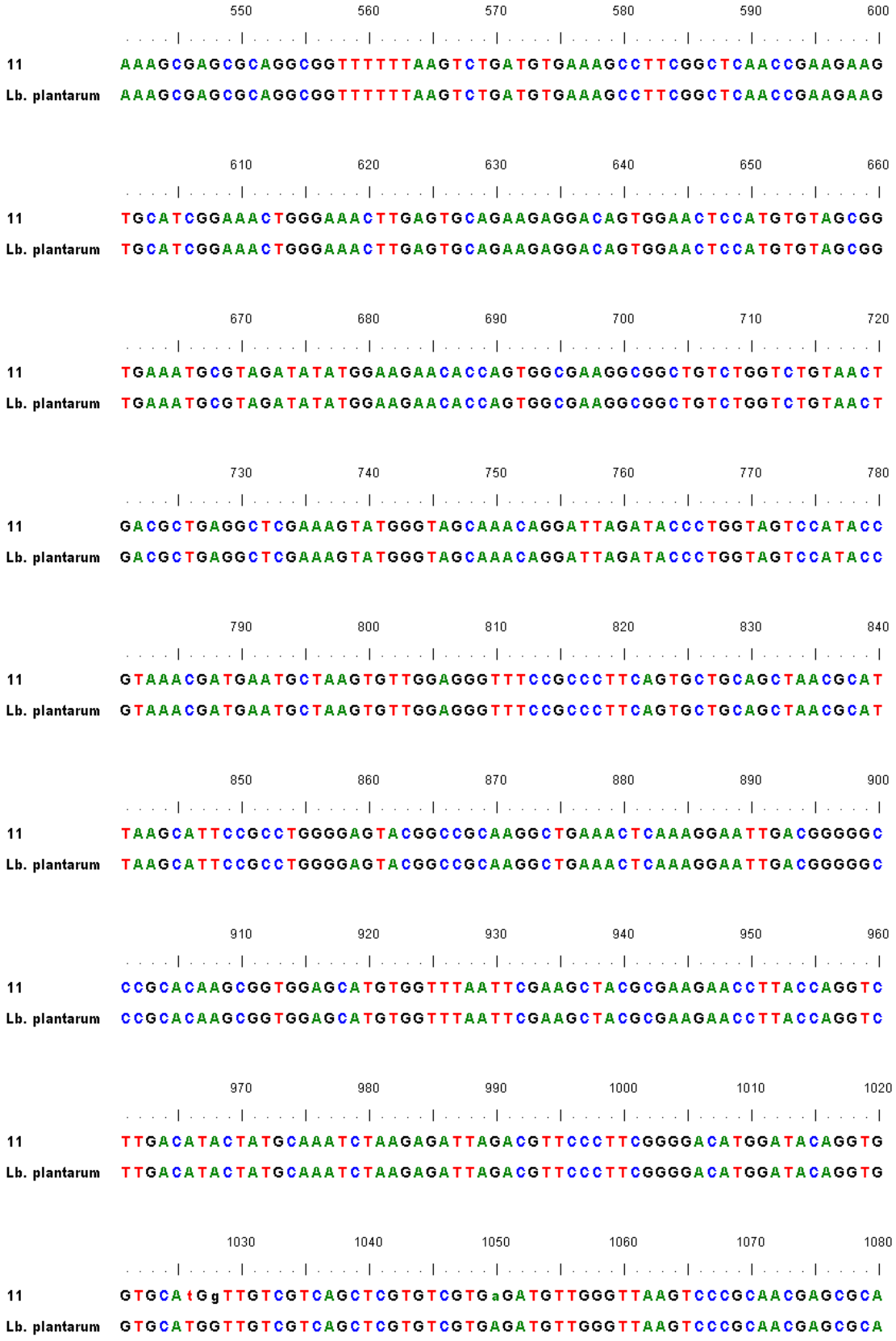

10 20 30 40 50 60
N23 - CTA - TA - ATGCAAGTCGAACGCTTTGTGGTTCAACTGATT
W. cibaria GATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGCTTTGTGGTTCAACTGATT
70 80 90 100 110 120
N23 TGAAGAGCTTGCTCAGATATGACGATGGACATTGCAAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAAC
W. cibaria TGAAGAGCTTGCTCAGATATGACGATGGACATTGCAAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAAC
130 140 150 160 170 180
N23 ACGTGGGAAACCTACCTCTTAGCAGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGTAT
W. cibaria ACGTGGGAAACCTACCTCTTAGCAGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGTAT
190 200 210 220 230 240
N23 AACAATAGCAACCGCATGGTTGCTACTTAAAAGATGGTTCTGCTATCACTAAGAGATGGT
W. cibaria AACAATAGCAACCGCATGGTTGCTACTTAAAAGATGGTTCTGCTATCACTAAGAGATGGT
250 260 270 280 290 300
N23 CCCGCGGTGCATTAGTTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGACGATGATGCATAGCCG
W. cibaria CCCGCGGTGCATTAGTTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGACGATGATGCATAGCCG
310 320 330 340 350 360
N23 AGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCCATACTCCTACGGGAGGC
W. cibaria AGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCCATACTCCTACGGGAGGC
370 380 390 400 410 420
N23 AGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTGTGAT
W. cibaria AGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTGTGAT
430 440 450 460 470 480
N23 GAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACACTGTTGTAAGAGAAGAATGACATTGAGAGTAACTGTT
W. cibaria GAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACACTGTTGTAAGAGAAGAATGACATTGAGAGTAACTGTT
490 500 510 520 530 540
N23 CAATGTGTGACGGTATCTTACCAGAAAGGAACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTA
W. cibaria CAATGTGTGACGGTATCTTACCAGAAAGGAACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTA

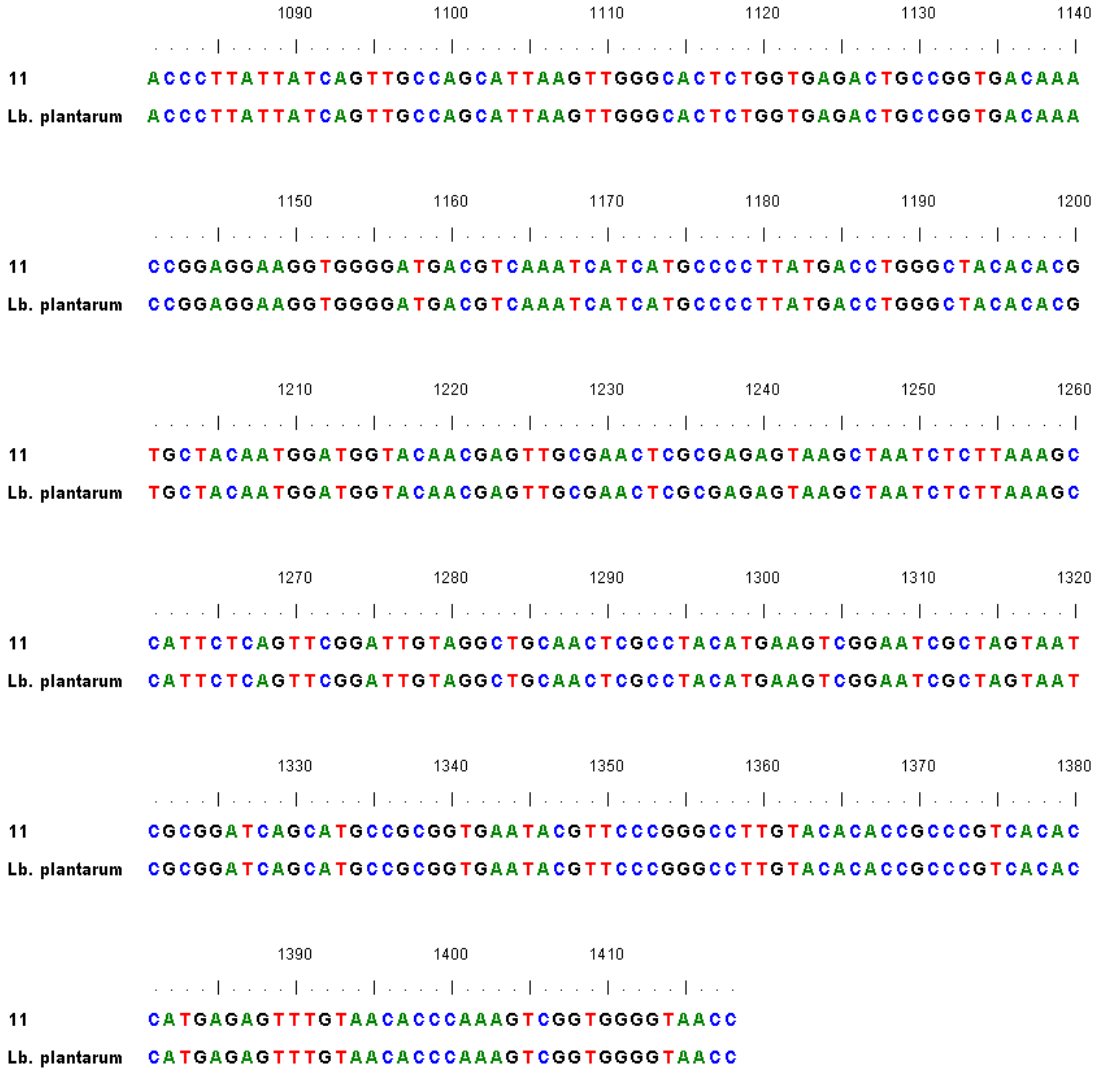

550 560 570 580 590 600
N23 ATACGTATGTTCCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTAT
W. cibaria ATACGTATGTTCCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTAT
610 620 630 640 650 660
N23 TTAAGTCTGAAGTGAAAGCCCTCAGCTCAACTGAGGAATTGCTTTGGAAACTGGATGACT
W. cibaria TTAAGTCTGAAGTGAAAGCCCTCAGCTCAACTGAGGAATTGCTTTGGAAACTGGATGACT
670 680 690 700 710 720
N23 TGAGTGCAGTAGAGGAAAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGA
W. cibaria TGAGTGCAGTAGAGGAAAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGA
730 740 750 760 770 780
N23 AGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTCTGGACTGTAACTGACGTTGAGGCTCGAAAGTGT
W. cibaria AGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTCTGGACTGTAACTGACGTTGAGGCTCGAAAGTGT
790 800 810 820 830 840
N23 GGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACCGTAAACGATGAGTGCTAGGTG
W. cibaria GGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACCGTAAACGATGAGTGCTAGGTG
850 860 870 880 890 900
N23 TTTGAGGGTTTCCGCCCTTAAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGT
W. cibaria TTTGAGGGTTTCCGCCCTTAAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGT
910 920 930 940 950 960
N23 ACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATG
W. cibaria ACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATG
970 980 990 1000 1010 1020
N23 TGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCTTGACAACTCC
W. cibaria TGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCTTGACAACTCC
1030 1040 1050 1060 1070 1080
N23 AGAGATGGAGCGTTCCCTTCGGGGACAAGGTGACAGGtGGtGCATGGTTGTCGTCAGCtC
W. cibaria AGAGATGGAGCGTTCCCTTCGGGGACAAGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCRTCAGCTC



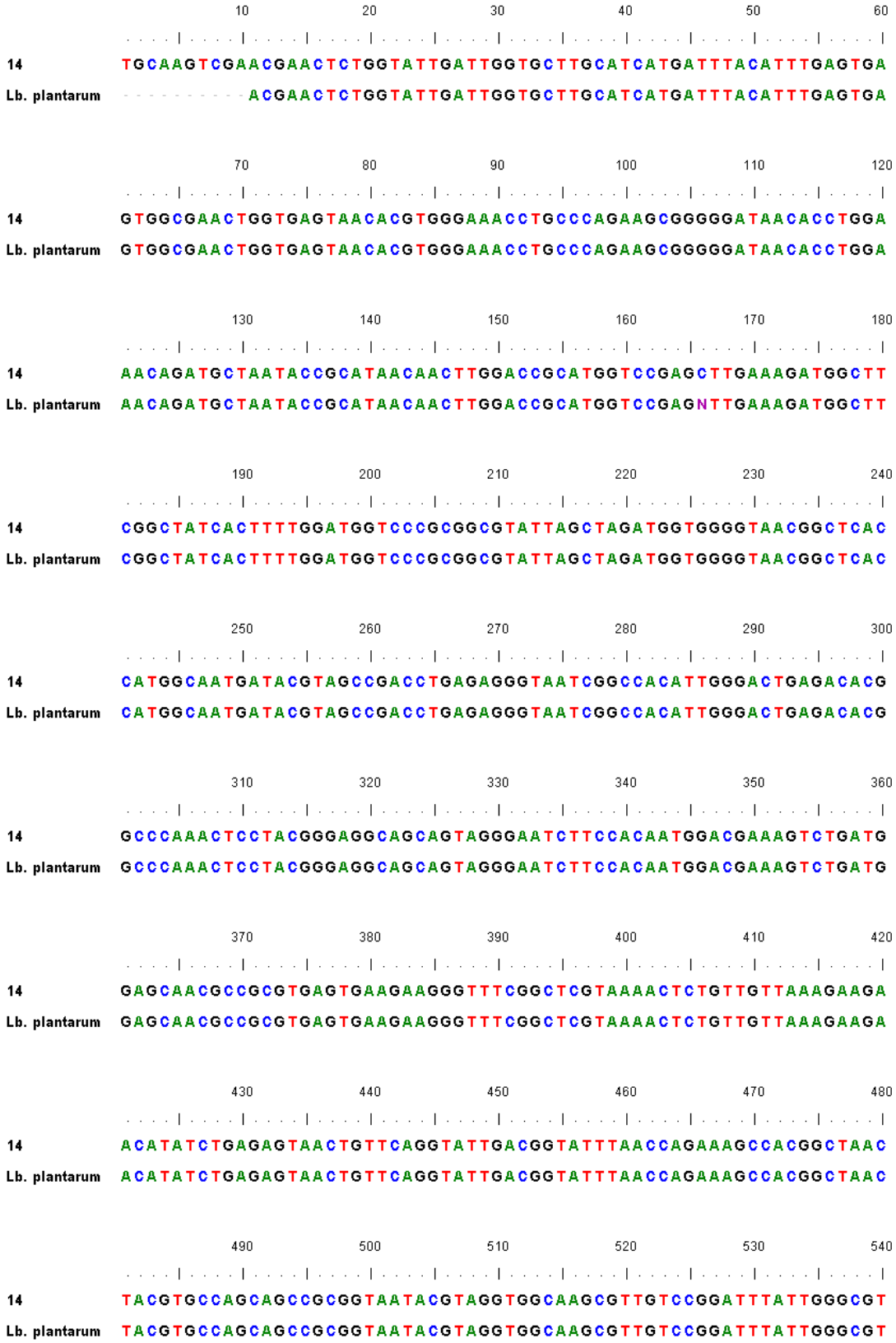
ภาพประกอบ 6 ผลการเทียบเคียงลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท N23 กับ type strain ของ *Weissella cibaria* LMG 17699 (GenBank accession number AJ295989)

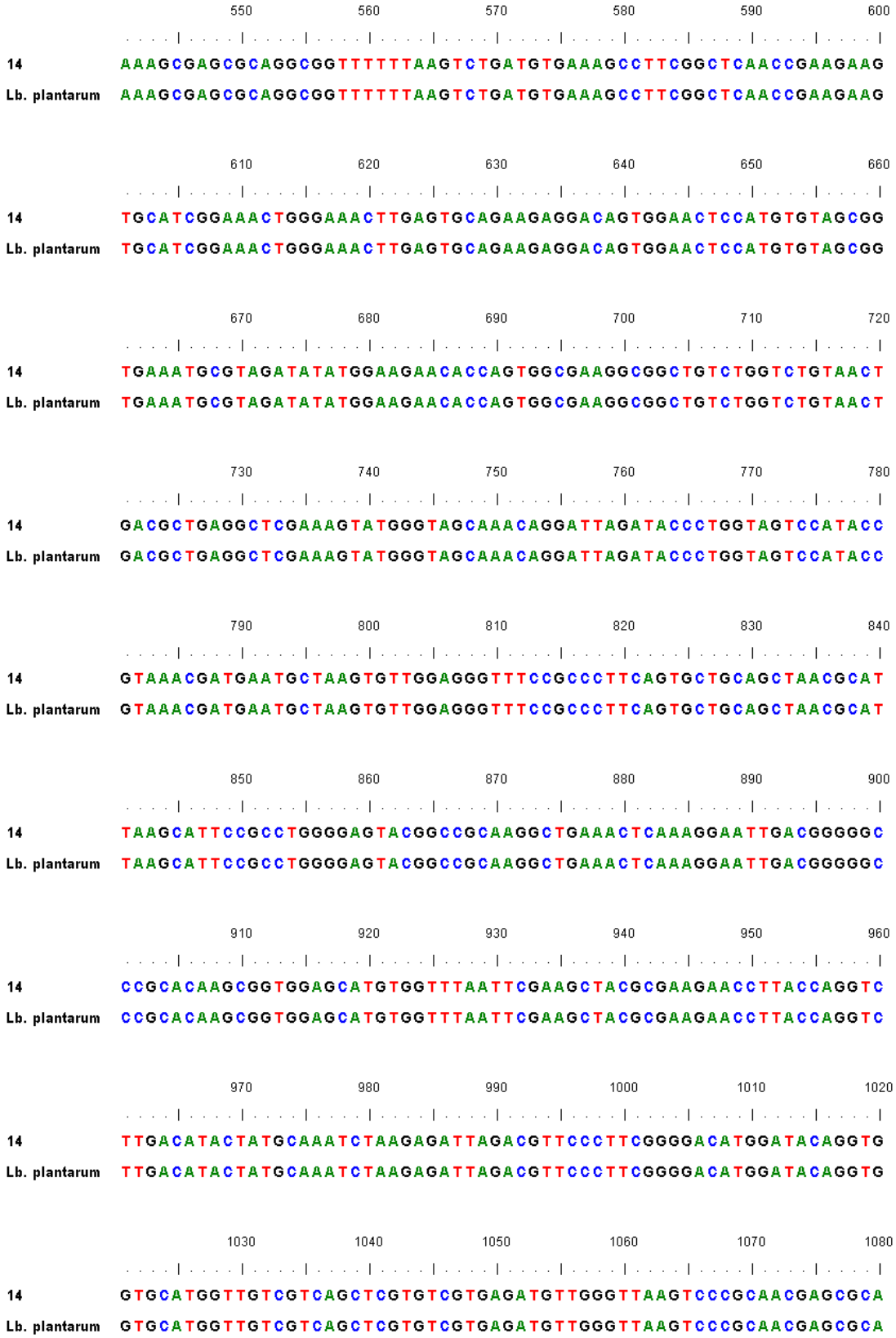

10 20 30 40 50 60
11 TGCAAGTCGAACGAACTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGA
Lb. plantarum ----------ACGAACTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGA
70 80 90 100 110 120
11 GTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGA
Lb. plantarum GTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGA
130 140 150 160 170 180
11 AACAGATGCTAATACCGCATAACAACTTGGACCGCATGGTCCGAGCTTGAAAGATGGCTT
Lb. plantarum AACAGATGCTAATACCGCATAACAACTTGGACCGCATGGTCCGAGNTTGAAAGATGGCTT
190 200 210 220 230 240
11 CGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCAC
Lb. plantarum CGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCAC
250 260 270 280 290 300
11 CATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACG
Lb. plantarum CATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACG
310 320 330 340 350 360
11 GCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATG
Lb. plantarum GCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATG
370 380 390 400 410 420
11 GAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTAAAGAAGA
Lb. plantarum GAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTAAAGAAGA
430 440 450 460 470 480
11 ACATATCTGAGAGTAACTGTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAAC
Lb. plantarum ACATATCTGAGAGTAACTGTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAAC
490 500 510 520 530 540
11 TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGT
Lb. plantarum TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGT

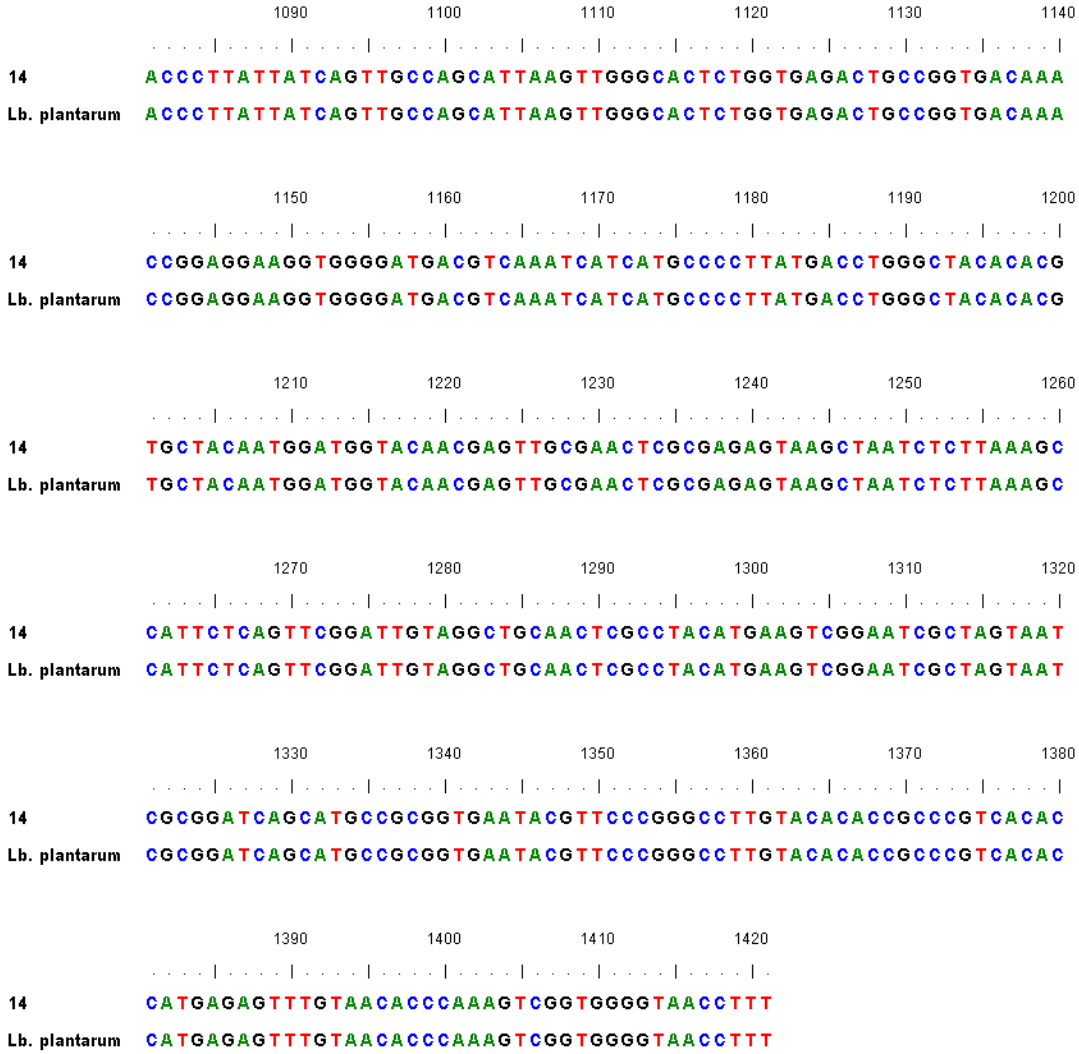

550 560 570 580 590 600
11 AAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAG
Lb. plantarum AAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAG
610 620 630 640 650 660
11 TGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGG
Lb. plantarum TGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGG
670 680 690 700 710 720
11 TGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACT
Lb. plantarum TGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACT
730 740 750 760 770 780
11 GACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACC
Lb. plantarum GACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACC
790 800 810 820 830 840
11 GTAAACGATGAATGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCAT
Lb. plantarum GTAAACGATGAATGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCAT
850 860 870 880 890 900
11 TAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGC
Lb. plantarum TAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGC
910 920 930 940 950 960
11 CCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTC
Lb. plantarum CCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTC
970 980 990 1000 1010 1020
11 TTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTG
Lb. plantarum TTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTG
1030 1040 1050 1060 1070 1080
11 GTGCAtGgTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGaGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA
Lb. plantarum GTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA



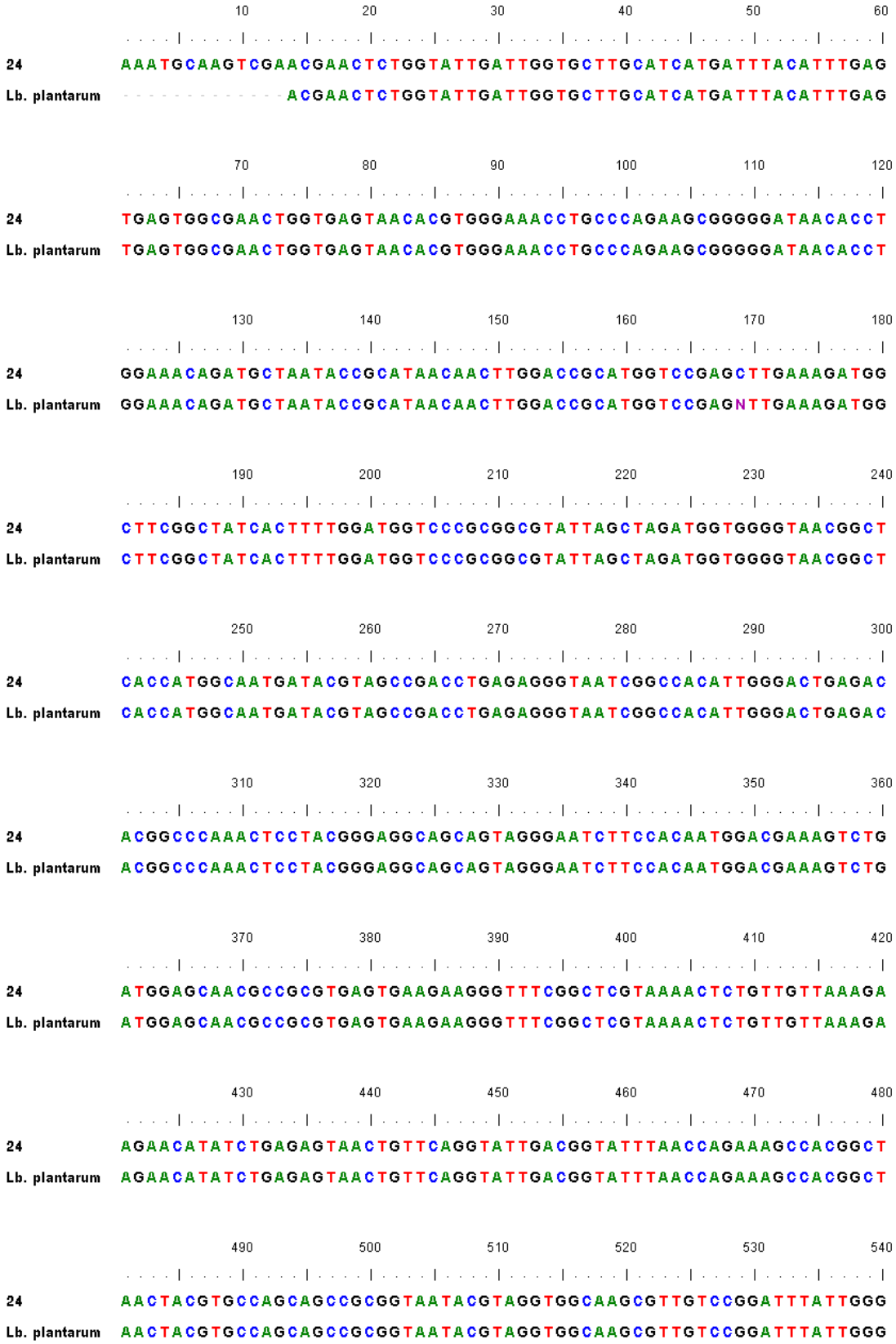
ภาพประกอบ 7 ผลการเทียบเคียงลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท 11 กับ type strain ของ *Lactobacillus plantarum* NBRC 15891 (GenBank accession number AB326351.1)

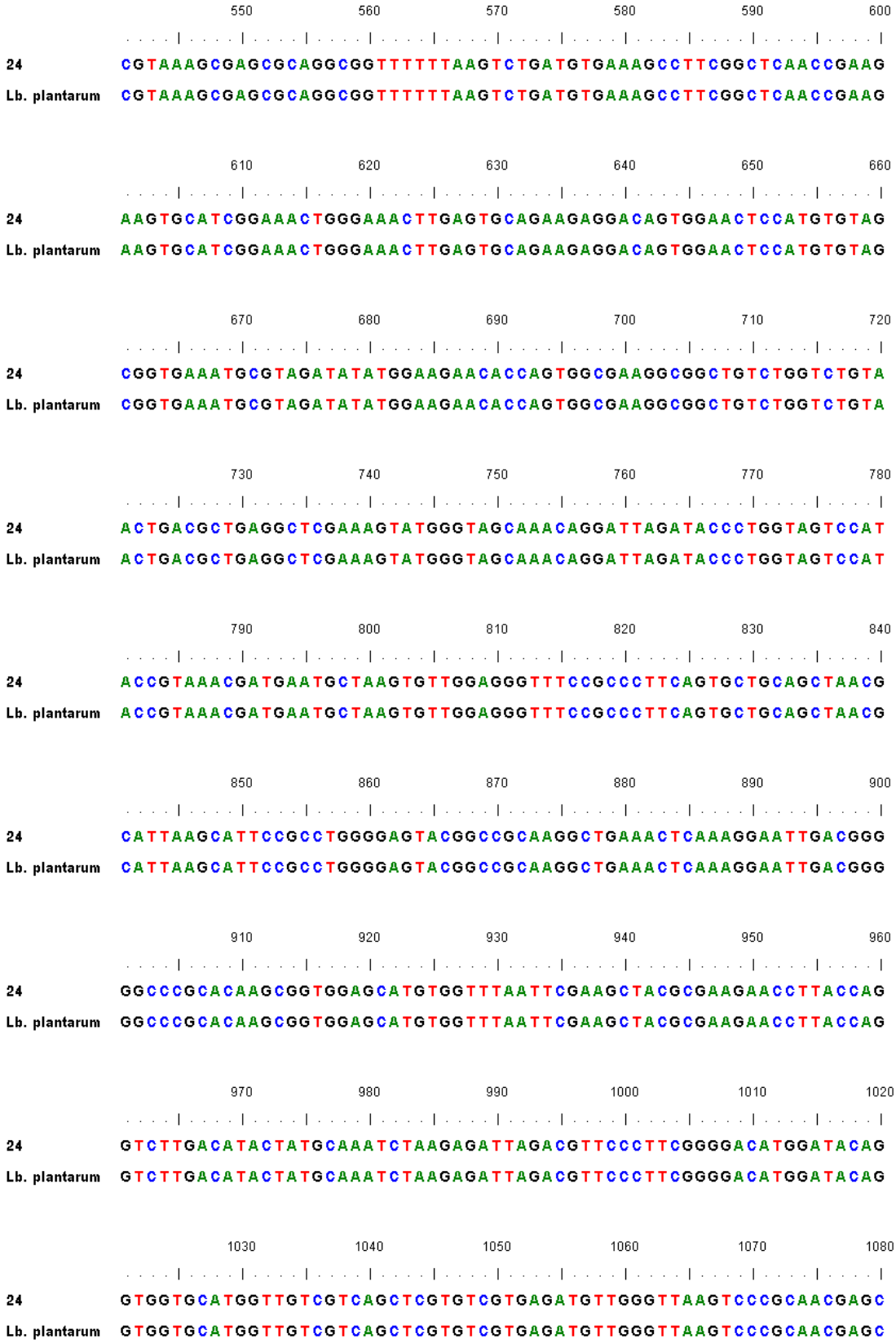

10 20 30 40 50 60
14 TGCAAGTCGAACGAACTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGA
Lb. plantarum ----------ACGAACTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGA
70 80 90 100 110 120
14 GTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGA
Lb. plantarum GTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGA
130 140 150 160 170 180
14 AACAGATGCTAATACCGCATAACAACTTGGACCGCATGGTCCGAGCTTGAAAGATGGCTT
Lb. plantarum AACAGATGCTAATACCGCATAACAACTTGGACCGCATGGTCCGAGNTTGAAAGATGGCTT
190 200 210 220 230 240
14 CGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCAC
Lb. plantarum CGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCAC
250 260 270 280 290 300
14 CATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACG
Lb. plantarum CATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACG
310 320 330 340 350 360
14 GCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATG
Lb. plantarum GCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATG
370 380 390 400 410 420
14 GAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTAAAGAAGA
Lb. plantarum GAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTAAAGAAGA
430 440 450 460 470 480
14 ACATATCTGAGAGTAACTGTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAAC
Lb. plantarum ACATATCTGAGAGTAACTGTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAAC
490 500 510 520 530 540
14 TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGT
Lb. plantarum TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGT

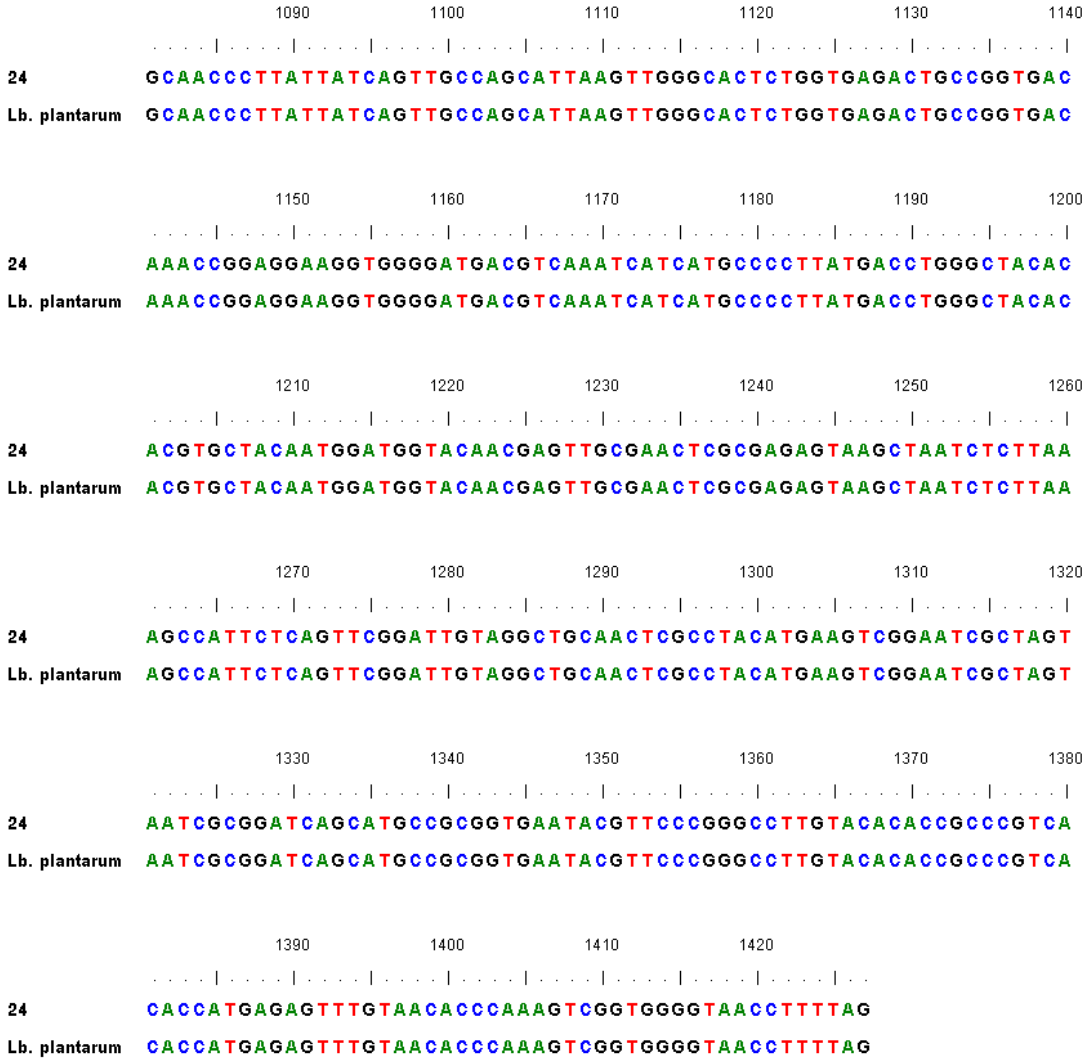

550 560 570 580 590 600
14 AAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAG
Lb. plantarum AAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAG
610 620 630 640 650 660
14 TGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGG
Lb. plantarum TGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGG
670 680 690 700 710 720
14 TGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACT
Lb. plantarum TGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACT
730 740 750 760 770 780
14 GACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACC
Lb. plantarum GACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACC
790 800 810 820 830 840
14 GTAAACGATGAATGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCAT
Lb. plantarum GTAAACGATGAATGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCAT
850 860 870 880 890 900
14 TAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGC
Lb. plantarum TAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGC
910 920 930 940 950 960
14 CCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTC
Lb. plantarum CCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTC
970 980 990 1000 1010 1020
14 TTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTG
Lb. plantarum TTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTG
1030 1040 1050 1060 1070 1080
14 GTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA
Lb. plantarum GTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA



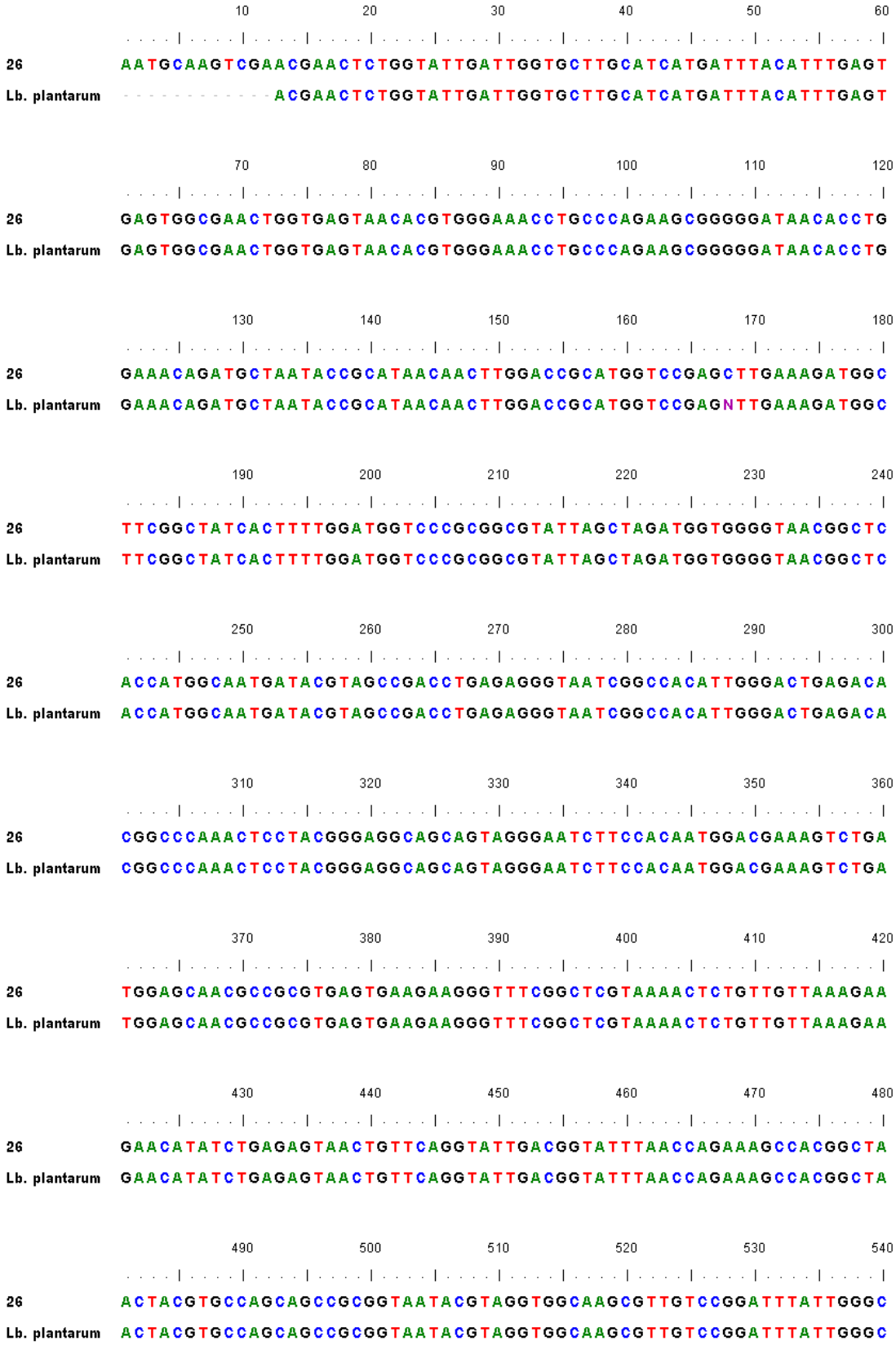
ภาพประกอบ 8 ผลการเทียบเคียงลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท 14 กับ type strain ของ *Lactobacillus plantarum* NBRC 15891 (GenBank accession number AB326351.1)

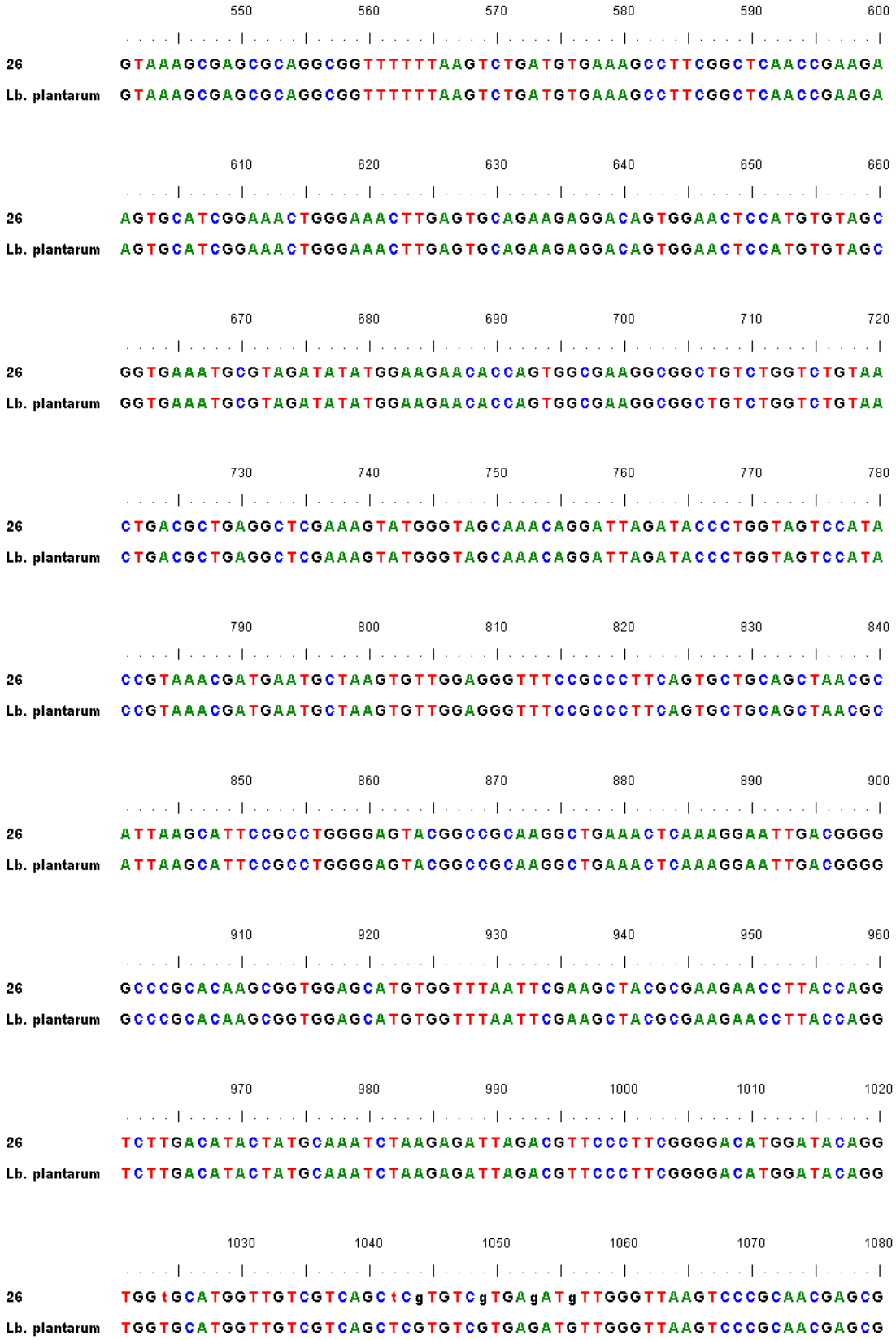

10 20 30 40 50 60
24 AAATGCAAGTCGAACGAACTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAG
Lb. plantarum ACGAACTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAG
70 80 90 100 110 120
24 TGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCT
Lb. plantarum TGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCT
130 140 150 160 170 180
24 GGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACTTGGACCGCATGGTCCGAGCTTGAAAGATGG
Lb. plantarum GGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACTTGGACCGCATGGTCCGAGNTTGAAAGATGG
190 200 210 220 230 240
24 CTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCT
Lb. plantarum CTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCT
250 260 270 280 290 300
24 CACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGAC
Lb. plantarum CACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGAC
310 320 330 340 350 360
24 ACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTG
Lb. plantarum ACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTG
370 380 390 400 410 420
24 ATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTAAAGA
Lb. plantarum ATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTAAAGA
430 440 450 460 470 480
24 AGAACATATCTGAGAGTAACTGTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCT
Lb. plantarum AGAACATATCTGAGAGTAACTGTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCT
490 500 510 520 530 540
24 AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGG
Lb. plantarum AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGG

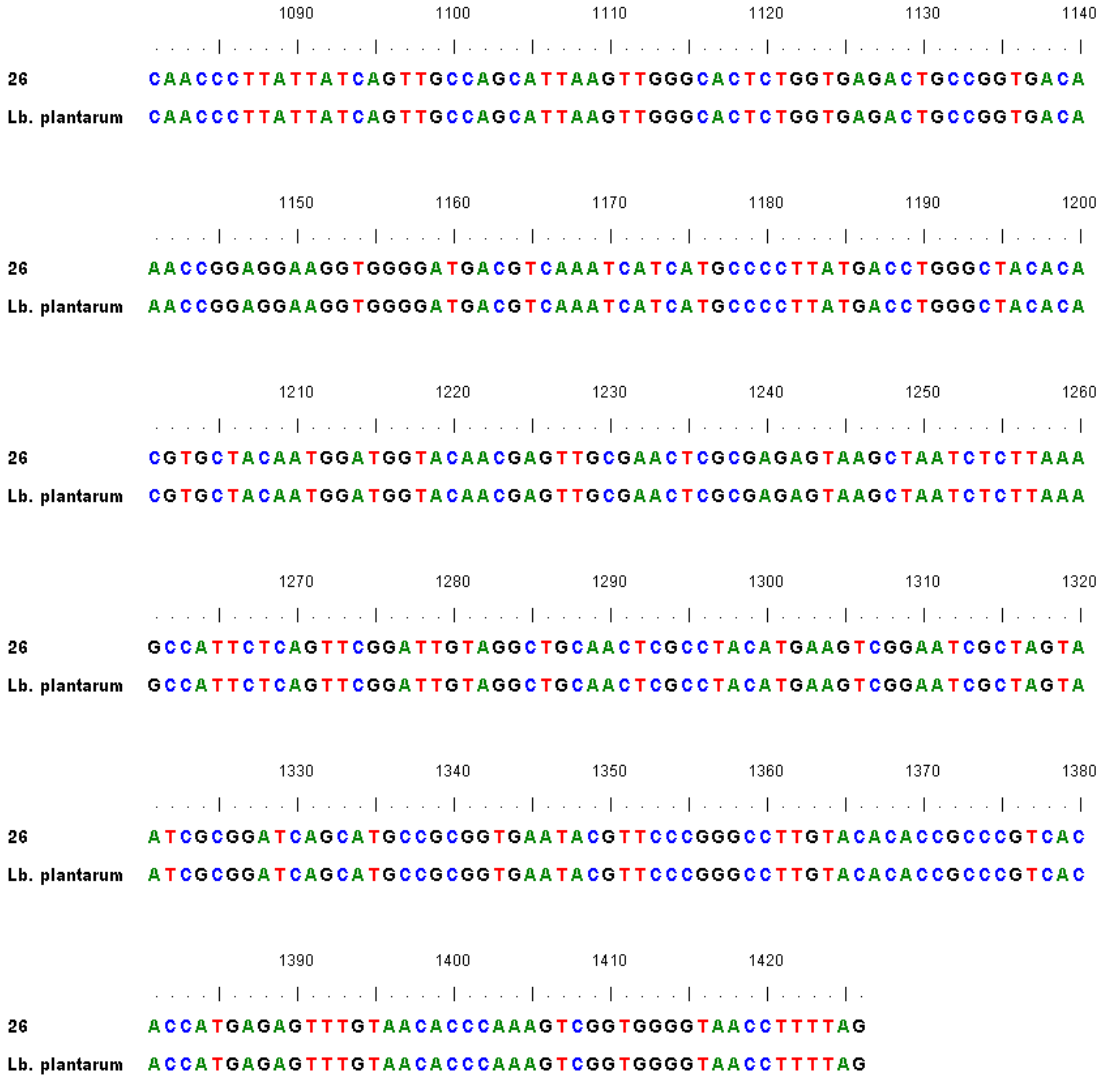

550 560 570 580 590 600
24 CGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAG
Lb. plantarum CGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAG
610 620 630 640 650 660
24 AAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAG
Lb. plantarum AAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAG
670 680 690 700 710 720
24 CGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTA
Lb. plantarum CGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTA
730 740 750 760 770 780
24 ACTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAT
Lb. plantarum ACTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAT
790 800 810 820 830 840
24 ACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACG
Lb. plantarum ACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACG
850 860 870 880 890 900
24 CATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGG
Lb. plantarum CATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGG
910 920 930 940 950 960
24 GGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAG
Lb. plantarum GGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAG
970 980 990 1000 1010 1020
24 GTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAG
Lb. plantarum GTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAG
1030 1040 1050 1060 1070 1080
24 GTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGC
Lb. plantarum GTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGC



ภาพประกอบ 9 ผลการเทียบเคียงลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท 24 กับ type strain ของ *Lactobacillus plantarum* NBRC 15891 (GenBank accession number AB326351.1)


10 20 30 40 50 60
26 AATGCAAGTCGAACGAACTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGT
Lb. plantarum ACGAACTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGT
70 80 90 100 110 120
26 GAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTG
Lb. plantarum GAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTG
130 140 150 160 170 180
26 GAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACTTGGACCGCATGGTCCGAGCTTGAAAGATGGC
Lb. plantarum GAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACTTGGACCGCATGGTCCGAGNTTGAAAGATGGC
190 200 210 220 230 240
26 TTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTC
Lb. plantarum TTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTC
250 260 270 280 290 300
26 ACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACA
Lb. plantarum ACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACA
310 320 330 340 350 360
26 CGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGA
Lb. plantarum CGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGA
370 380 390 400 410 420
26 TGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTAAAGAA
Lb. plantarum TGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTAAAGAA
430 440 450 460 470 480
26 GAACATATCTGAGAGTAACTGTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTA
Lb. plantarum GAACATATCTGAGAGTAACTGTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTA
490 500 510 520 530 540
26 ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGC
Lb. plantarum ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGC


550 560 570 580 590 600
26 GTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGA
Lb. plantarum GTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGA
610 620 630 640 650 660
26 AGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGC
Lb. plantarum AGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGC
670 680 690 700 710 720
26 GGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAA
Lb. plantarum GGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAA
730 740 750 760 770 780
26 CTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATA
Lb. plantarum CTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATA
790 800 810 820 830 840
26 CCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGC
Lb. plantarum CCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGC
850 860 870 880 890 900
26 ATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGG
Lb. plantarum ATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGG
910 920 930 940 950 960
26 GCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGG
Lb. plantarum GCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGG
970 980 990 1000 1010 1020
26 TCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGG
Lb. plantarum TCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGG
1030 1040 1050 1060 1070 1080
26 TGGtGCATGGTTGTCGTCAGCtCgTGTCgTGAgATgTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCG
Lb. plantarum TGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCG



ภาพประกอบ 10 ผลการเทียบเคียงลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท 26 กับ type strain ของ *Lactobacillus plantarum* NBRC 15891 (GenBank accession number AB326351.1)

4. การทดสอบสารยับยั้งแบคทีเรียว่าเป็นแบคทีริโอซิน

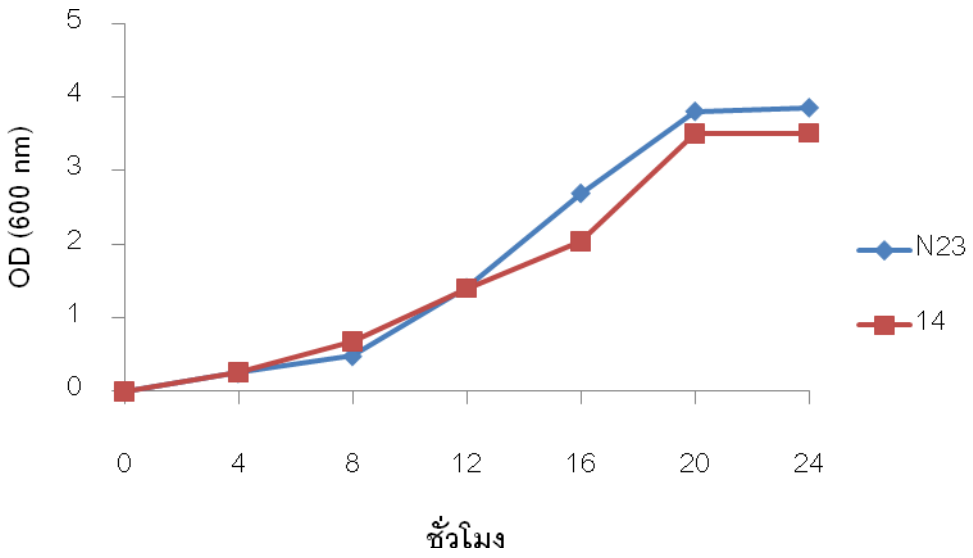
การทดสอบสารยับยั้งแบคทีเรียว่าเป็นแบคทีริโอซินโดยอาศัยการย่อยของเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน ทำได้โดยนำ *Lactobacillus plantarum* A8, N8, 11, 14, 24 และ 26 และ *Weissella cibaria* N23 มาทำการทดสอบโดยใช้เอนไซม์คะตะเลสและเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน 7 ชนิด คือ trypsin, actinase, protease XIII, facin, trypsin from porcine pancreas, α-chymotrypsin และ pepsin แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำไปทดสอบแอคติวิตีในการยับยั้งแบคทีเรีย โดยวิธี agar well diffusion เปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้เติมเอนไซม์ (control) โดยเชื้อทดสอบที่ใช้คือ *W. confusa* N31 จากการทดลองพบว่า เมื่อนำสารยับยั้งของ *Lb. plantarum* A8, N8, 11, 14, 24 และ 26 และ *W. cibaria* N23 มาทำปฏิกิริยากับเอนไซม์คะตะเลส พบว่ายังคงมีความสามารถในการยับยั้งแต่เมื่อนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนทั้ง 7 ชนิด พบว่า ความสามารถในการยับยั้งของเชื้อทดสอบหมดไป จึงสรุปได้ว่า สารยับยั้งที่สร้างจากเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลทเป็นแบคทีริโอซิน อย่างไรก็ตามสารยับยั้งที่สร้างจาก *Lb. plantarum* 11 และ 24 ยังคงมีความสามารถในการยับยั้งเมื่อใช้เอนไซม์ protease XIII ซึ่งอาจเกิดจากสารยับยั้งมีกรดอะมิโนบริเวณ active site ที่ไม่จำเพาะต่อการย่อยของเอนไซม์ protease XIII ซึ่งผลจากการทดลองแสดงดังตาราง 8

ตาราง 8 ความสามารถในการยับยั้งหลังจากใช้เอนไซม์คะตะเลสและเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนทั้ง 7 ชนิด

เชื้อ	ความสามารถในการยับยั้ง (มม.) หลังจากใช้เอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน								
	control	catalase	trypsin	actinase	protease XIII	facin	trypsin from porcine pancreas	α-chymotrypsin	pepsin
Lb. plantarum A8	3	3	-	-	-	-	-	-	-
Lb. plantarum N8	2	2	-	-	-	-	-	-	-
Lb. plantarum 11	1	1	-	-	1	-	-	-	-
Lb. plantarum 14	1	1	-	-	-	-	-	-	-
Lb. plantarum 24	1	1	-	-	0.5	-	-	-	-
Lb. plantarum 26	1	1	-	-	-	-	-	-	-
W. cibaria N23	2	2	-	-	-	-	-	-	-

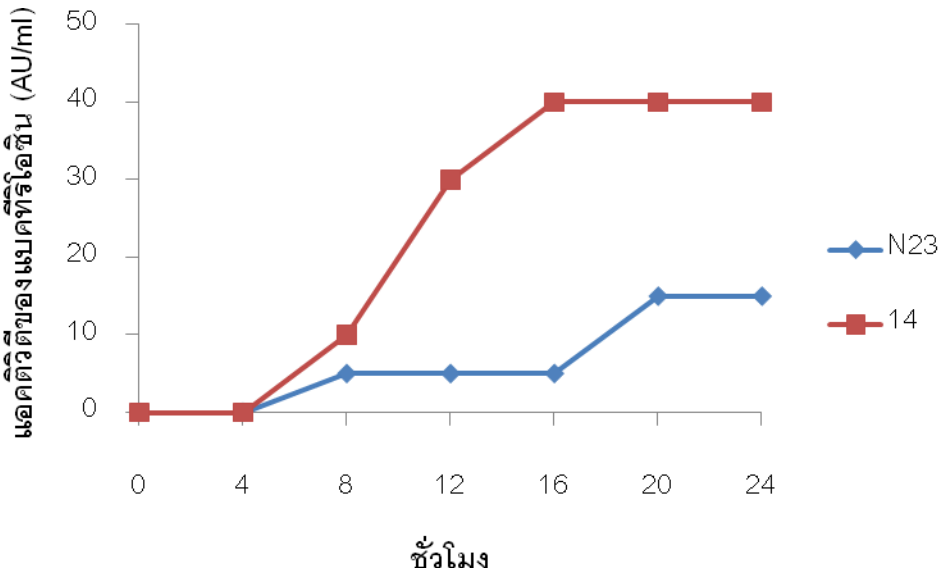
5. การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสร้างแบคทีริโอซิน

คัดเลือก *Lb. plantarum* ที่สามารถสร้างแบคทีริโอซินสูงสุดและ *W. cibaria* มาอย่างละ 1 ไอโซเลท คือ *Lb. plantarum* 14 และ *W. cibaria* N23 มาศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสร้างแบคทีริโอซิน โดยนำส่วนน้ำใสที่มีแบคทีริโอซินของ *Lb. plantarum* 14 และ *W. cibaria* N23 ที่ทำการเก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ โดยแบ่งการเก็บตัวอย่างออกเป็น 2 ชุด ชุดที่ 1 นำไปวัดอัตราการเจริญของเชื้อโดยดูจากค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ผลการทดลองแสดงดังภาพประกอบ 11 โดยเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลทจะมีการเจริญสูงสุดที่เวลา 20 ชั่วโมง ชุดที่ 2 นำไปทดสอบแอคติวิตีในการยับยั้งแบคทีเรีย โดยวิธี agar well diffusion ซึ่งเชื้อทดสอบที่ใช้คือ *W. confusa* N31 ผลการทดลองแสดงดังภาพประกอบ 12 จากการทดลองพบว่า แบคทีริโอซินของ *Lb. plantarum* 14 สามารถสร้างแบคทีริโอซินได้สูงสุดเป็น 40 AU/ml เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 16 ชั่วโมง และ *W. cibaria* N23 สามารถสร้างแบคทีริโอซินได้สูงสุดเป็น 15 AU/ml เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 20 ชั่วโมง



ภาพประกอบ 11 ผลการวัดค่าความขุ่นของ *Lb. plantarum* 14 และ *W. cibaria* N23 ที่ OD 600 nm

หมายเหตุ: *W. cibaria* N23 *Lb. plantarum* 14



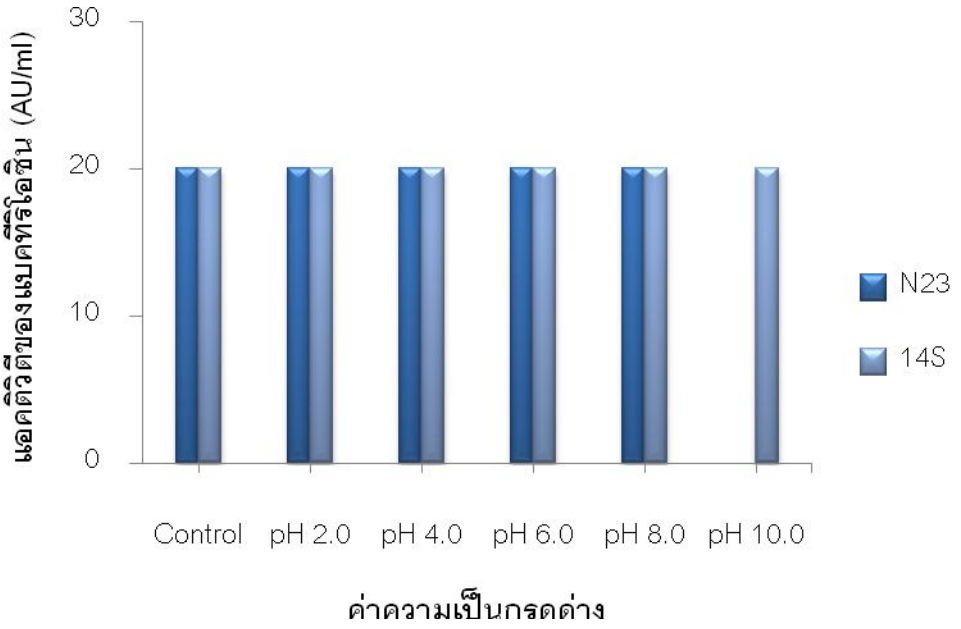
ภาพประกอบ 12 ผลการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสร้างแบคทีริโอซิน

หมายเหตุ: *W. cibaria* N23 *Lb. plantarum* 14

6. การศึกษาสมบัติเบื้องต้นของแบคทีริโอซินที่ผลิตได้

6.1 การทดสอบค่าความเป็นกรดด่างต่อแอคติวิตีของแบคทีริโอซิน

นำส่วนใสที่มีแบคทีริโอซินของ *Lb. plantarum* 14 และ *W. cibaria* N23 มาปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เท่ากับ 7.0 แล้วนำมากรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำส่วนน้ำใสที่ผ่านการกรองแล้วมาศึกษาผลของค่าความเป็นกรดด่างต่อแอคติวิตีของแบคทีริโอซิน โดยปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 และ 10.0 เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (pH 7.0) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปรับค่าความเป็นกรดด่างกลับเป็น 7.0 แล้วจึงนำไปทดสอบแอคติวิตีของแบคทีริโอซินในการยับยั้งโดยวิธี agar well diffusion โดยใช้เชื้อทดสอบคือ *W. confusa* N31 จากการทดลองพบว่า แบคทีริโอซินของ *Lb. plantarum* 14 สามารถทนค่าความเป็นกรดด่างได้ในช่วงกว้างคือ ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 2.0 ถึง 10.0 ส่วนแบคทีริโอซินของ *W. cibaria* N23 สามารถทนค่าความเป็นกรดด่างได้ในช่วงกว้างเช่นกันคือ ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 2.0 ถึง 8.0 ผลจากการทดลองแสดงดังภาพประกอบ 13

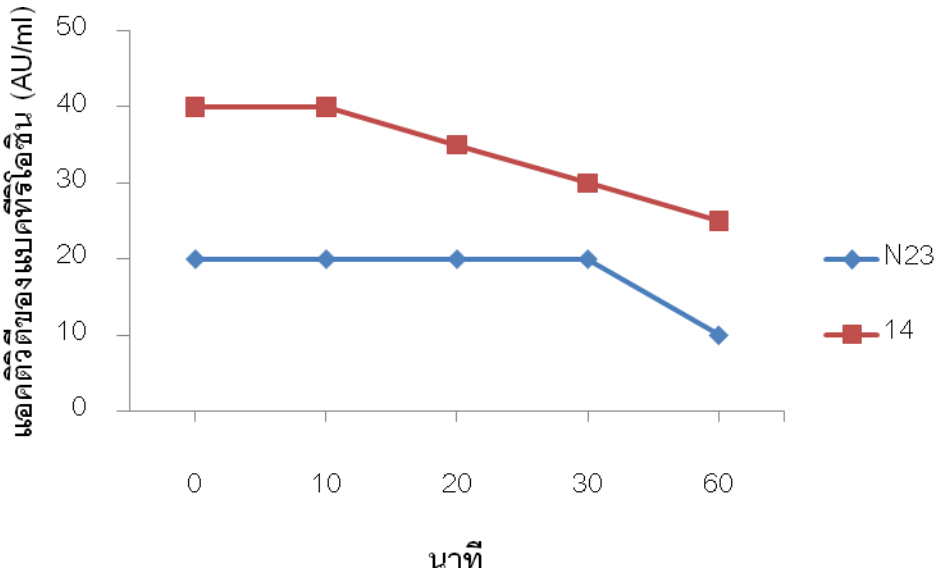


ภาพประกอบ 13 ผลการทดสอบค่าความเป็นกรดด่างต่อแอคติวิตีของแบคทีริโอซิน

หมายเหตุ: *W. cibaria* N23 *Lb. plantarum* 14

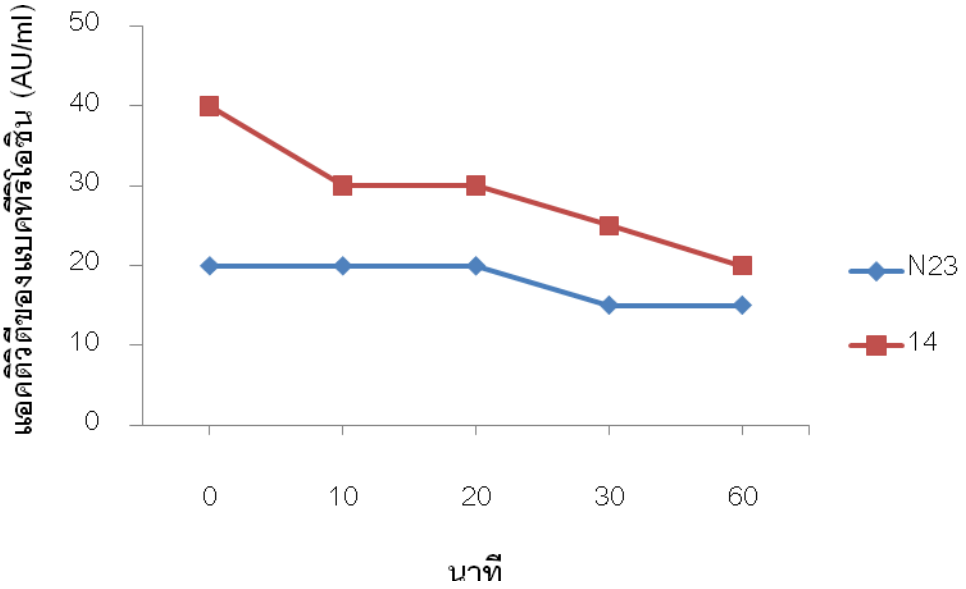
6.2 การทดสอบผลของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของแบคทีริโอซิน

นำแบคทีริโอซินของ *W. cibaria* N23 และ *Lb. plantarum* 14 มาปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 7.0 แล้วนำมากรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำมาศึกษาผลของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของแบคทีริโอซิน โดยบ่มแบคทีริโอซินในอาหาร MRS broth ที่อุณหภูมิ 60, 80 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10, 20, 30 และ 60 นาที และที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปทดสอบแอคติวิตีในการยับยั้งแบคทีเรีย โดยวิธี agar well diffusion โดยใช้ *W. confusa* N31 เป็นเชื้อทดสอบ จากการทดลองพบว่า แบคทีริโอซินที่สร้างจาก *Lb. plantarum* 14 และ *W. cibaria* N23 มีความสามารถในการทนความร้อนได้สูง คือที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ซึ่งผลจากการทดลองแสดงดังภาพประกอบ 14, 15, 16 และ17



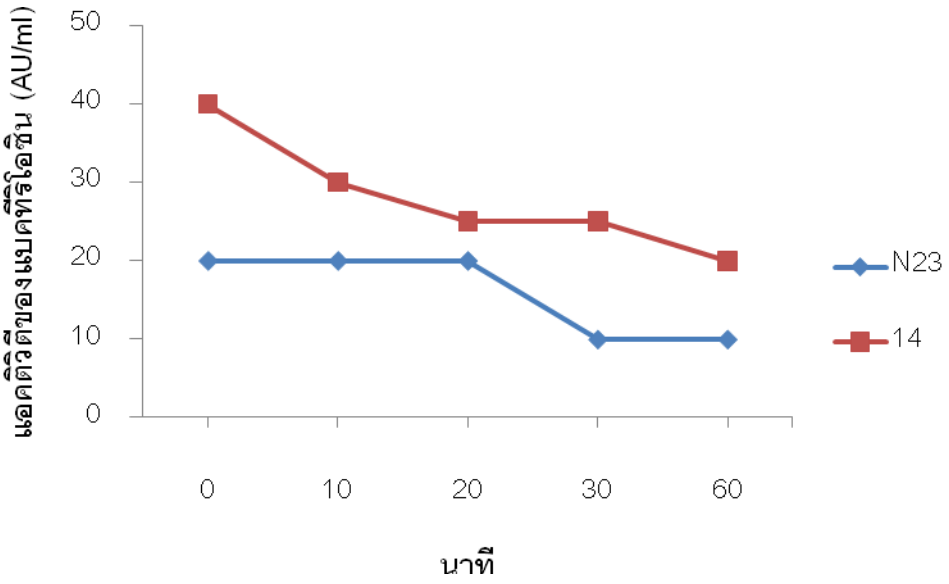
ภาพประกอบ 14 แอคติวิตีของแบคทีริโอซินหลังจากให้ความร้อนที่ 60 องศาเซลเซียสที่เวลาต่างๆ

หมายเหตุ: *W. cibaria* N23 *Lb. plantarum* 14



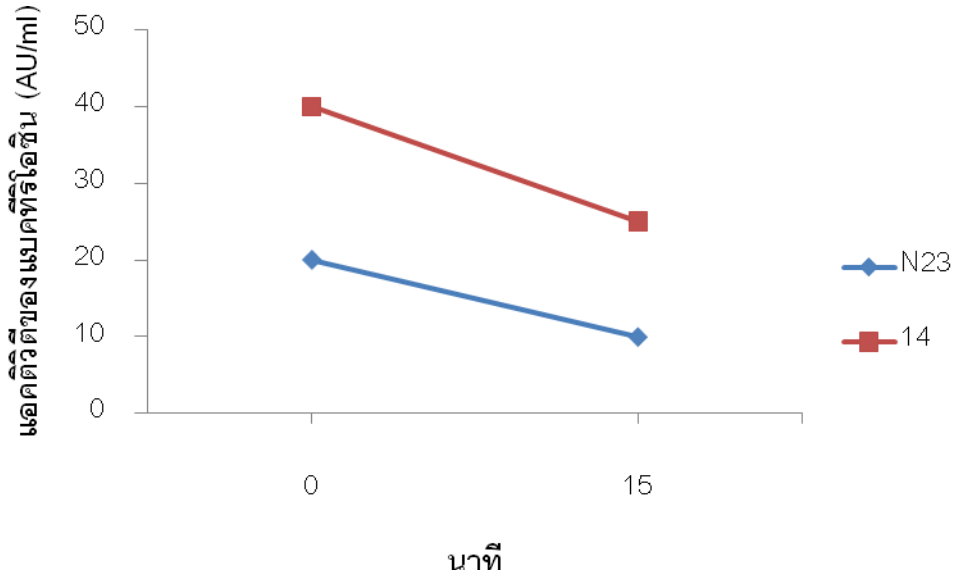
ภาพประกอบ 15 แอคติวิตีของแบคทีริโอซินหลังจากให้ความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียสที่เวลาต่างๆ

หมายเหตุ: *W. cibaria* N23 *Lb. plantarum* 14



ภาพประกอบ 16 แอคติวิตีของแบคทีริโอซินหลังจากให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียสที่เวลาต่างๆ

หมายเหตุ: *W. cibaria* N23 *Lb. plantarum* 14



ภาพประกอบ 17 แอคติวิตีของแบคทีริโอซินหลังจากให้ความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

หมายเหตุ: *W. cibaria* N23 *Lb. plantarum* 14

6.3 การศึกษา antibacterial spectrum

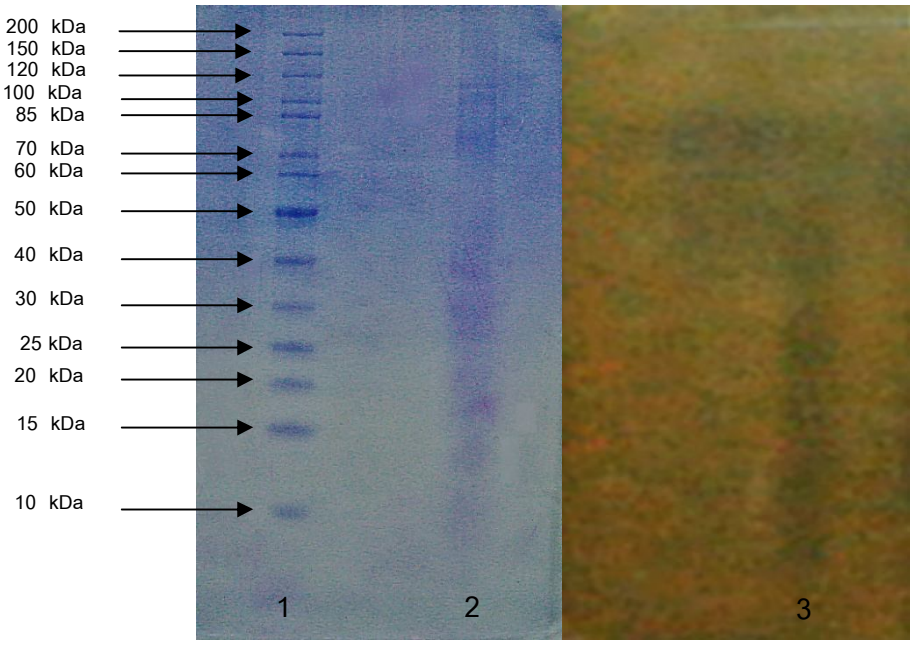
นำแบคทีริโอซินของ *W. cibaria* N23 และ *Lb. plantarum* 14 มาศึกษา antibacterial spectrum โดยนำไปทดสอบแอคติวิตีในการยับยั้งแบคทีเรีย ด้วยวิธี agar well diffusion โดยการใช้เชื้อทดสอบ (indicator strain) ชนิดต่างๆ ได้แก่ *E. coli* JM 109, *L. innocoa* ATCC 33090, *S. salivarius, Leu. mesenteroides, Lc. lactis*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, *Lb. sakei, Lb. plantarum*, *P. pentosaceus* JCM 5885 และ *P. pentosaceus* JCM 5890 จากการทดลองพบว่า แบคทีริโอซินของ *Lb. plantarum* 14 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเชื้อทดสอบคือ *S. salivarius* 57077, *Lb. plantarum*, *Lb. sakei*, *P. pentosaceus* JCM 5885, *P. pentosaceus* JCM 5890 และ *L. innocua* ATCC 33090 แต่แบคทีริโอซินของ *W. cibaria* N23 ไม่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบทั้ง 10 ชนิดได้ ซึ่งผลจากการทดลองแสดงดังตาราง 9

ตาราง 9 ผลการศึกษา antibacterial spectrum

เชื้อทดสอบชนิดต่างๆ	แอคติวิตีของแบคทีริโอซิน (AU/ml)	
	W. cibaria N23	*Lb. plantarum* 14
S. salivarius	-	10
Leu. mesenteroides	-	-
Lc. lactis	-	-
Lc. lactis subsp. *cremoris*	-	-
Lb. sakei	-	30
Lb. plantarum	-	10
P. pentosaceus JCM 5885	-	25
P. pentosaceus JCM 5890	-	10
E. coli JM 109	-	-
L. innocoa ATCC 33090	-	30

7. การศึกษามวลโมเลกุลของแบคทีริโอซิน

จากการนำแบคทีริโอซินของ *W. cibaria* N23 และ *Lb. plantarum* 14 มาหามวลโมเลกุลโดยใช้วิธี tricine-SDS-PAGE โดยแบ่งเจลออกเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 นำไปย้อมด้วย coomassie blue ตรวจสอบแถบของโปรตีนที่เกิดขึ้น โดยเทียบกับแถบโปรตีนมาตรฐาน (PageRuler™ Unstained Protein Ladder) ส่วนที่ 2 นำมาเททับด้วยเชื้อทดสอบ คือ *W. confusa* N31 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตบริเวณใสอันเนื่องมาจากการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบบนแถบของโปรตีนที่เกิดขึ้น จากการทดลองพบว่า แถบโปรตีนของแบคทีริโอซินของเชื้อ *W. cibaria* N23 ที่เททับด้วยเชื้อทดสอบนั้นเกิดบริเวณใสเป็นแถบยาวและเมื่อเทียบกับแถบโปรตีนที่ย้อมด้วยสี coomassie blue เพื่อหามวลโมเลกุลของแบคทีริโอซิน พบว่าไม่สามารถแยกแถบโปรตีนได้จึงไม่สามารถบอกมวลโมเลกุลได้ (ภาพประกอบ 18) ส่วนแถบโปรตีนของแบคทีริโอซินของ *Lb. plantarum* 14 ที่ย้อมด้วยสี coomassie blue เพื่อหามวลโมเลกุลของแบคทีริโอซิน พบว่า มีแถบโปรตีนเกิดขึ้นหลายแถบคือ 115, 65, 47, 40 และ 17 กิโลดาลตัน แต่เมื่อเททับด้วยเชื้อทดสอบ พบว่าจะเกิดบริเวณใสเป็นแถบยาว จึงไม่สามารถบอกได้ว่าแถบโปรตีนแถบใดเป็นมวลโมเลกุลของแบคทีริโอซินเช่นกัน (ภาพประกอบ 19)



ภาพประกอบ 18 การวิเคราะห์มวลโมเลกุลของแบคทีริโอซินของ *W. cibaria* N23 โดยวิธี tricine-SDS-PAGE

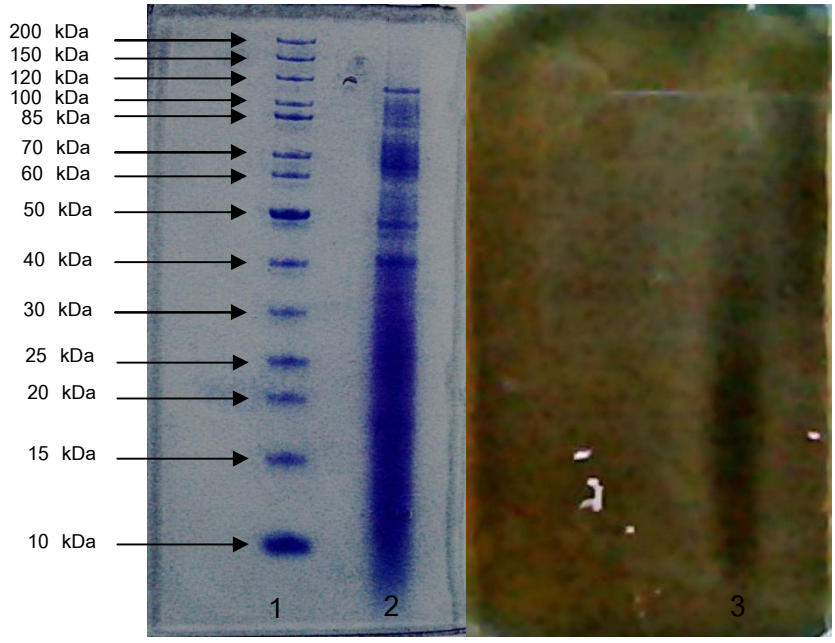
หมายเหตุ: A = เจลส่วนที่ 1 ย้อมทับด้วยสี coomassie blue

B = เจลส่วนที่ 2 เททับด้วยเชื้อทดสอบ

Lane 1 = แถบโปรตีนมาตรฐาน (PageRuler™ Unstained Protein Ladder)

Lane 2 = แถบของแบคทีริโอซินของ *W. cibaria* N23

Lane 3 = บริเวณยับยั้งของแบคทีริโอซินของ *W. cibaria* N23



A B

ภาพประกอบ 19 การวิเคราะห์มวลโมเลกุลของแบคทีริโอซินของ *Lb. plantarum* 14 โดยวิธี tricine-SDS-PAGE

หมายเหตุ: A = เจลส่วนที่ 1 ย้อมทับด้วยสี coomassie blue

B = เจลส่วนที่ 2 เททับด้วยเชื้อทดสอบ

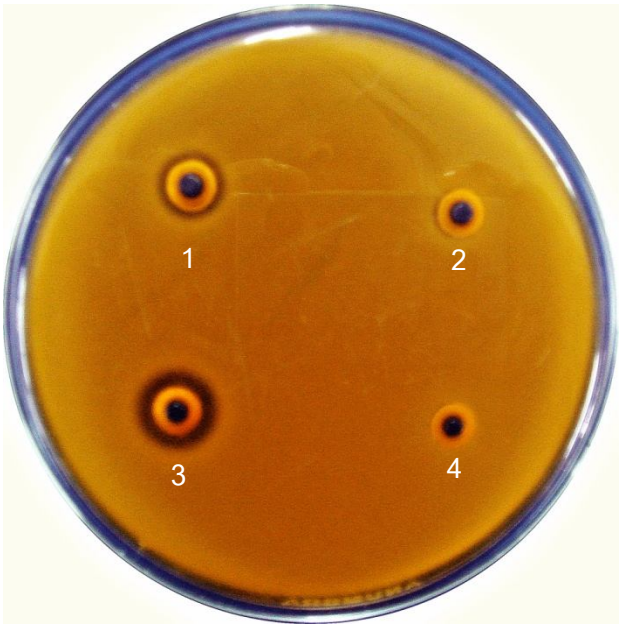
Lane 1 = แถบโปรตีนมาตรฐาน (PageRuler™ Unstained Protein Ladder)

Lane 2 = แถบของแบคทีริโอซินของ *Lb. plantarum* 14

Lane 3 = บริเวณยับยั้งของแบคทีริโอซินของ *Lb. plantarum* 14

8. การศึกษาการดูดซับของแบคทีริโอซินบนแบคทีเรียที่สร้าง (producer cell)

โดยทั่วไป แบคทีริโอซินสามารถดูดซับบนผนังเซลล์แบคทีเรียได้ดีที่ค่าความเป็นกรดด่าง 6.0 แต่จะไม่สามารถดูดซับได้ที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 2.0 (Yang; Johnson; & Ray. 1992: 3355-3359) ซึ่งในการศึกษาการดูดซับของแบคทีริโอซินบนแบคทีเรียที่สร้างทำโดยเพาะเลี้ยง *W. cibaria* N23 และ *Lb. plantarum* 14 ที่สร้างแบคทีริโอซินมาเลี้ยงในอาหาร MRS broth เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำน้ำเลี้ยงเชื้อไปปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เท่ากับ 6.0 แล้วนำเข้าเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,244xg อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ซึ่งในขั้นตอนนี้หากแบคทีริโอซินสามารถดูดซับบนผนังเซลล์ของเชื้อได้จะยึดเกาะอยู่กับตะกอนเซลล์ จากนั้นแยกส่วนตะกอนเซลล์ มาล้างด้วย 0.1 M phosphate buffer (ค่าความเป็นกรดด่าง 6.5) เก็บตะกอนเซลล์มาละลายใน 100 mM NaCl (pH 2.0) ทำการกวนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ซึ่งในขั้นตอนนี้แบคทีริโอซินที่เกาะอยู่กับตะกอนเซลล์จะหลุดออก นำมาแยกตะกอนเซลล์อีกครั้ง เก็บส่วนน้ำใสซึ่งมีแบคทีริโอซินที่หลุดออกจากเซลล์แล้วมาปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เท่ากับ 7.0 จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาแอคติวิตีของแบคทีริโอซิน โดยถ้ามีการดูดซับแบคทีริโอซินหลังจากทำการทดสอบแอคติวิตีจะพบว่ามีบริเวณใสเกิดขึ้นรอบๆ หลุมแต่จากการทดลองพบว่า หลังจากทำการศึกษาการดูดซับบนแบคทีเรียที่สร้างทั้ง 2 ชนิดแล้วไม่พบบริเวณใสเกิดขึ้นแสดงว่า แบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดที่สร้างแบคทีริโอซินไม่มีการดูดซับแบคทีริโอซินที่ตัวเองสร้างขึ้น ผลการทดลองแสดงดังภาพประกอบ 20



ภาพประกอบ 20 ผลการดูดซับของแบคทีริโอซินต่อแบคทีเรียที่สร้าง

หมายเหตุ 1 = *W. cibaria* N23 ก่อนทำการดูดซับแบคทีริโอซิน

2 = *W. cibaria* N23 หลังจากทำการดูดซับแบคทีริโอซิน

3 = *Lb. plantarum* 14 ก่อนทำการดูดซับแบคทีริโอซิน

4 = *Lb. plantarum* 14 หลังจากทำการดูดซับแบคทีริโอซิน

9. การศึกษาการดูดซับของแบคทีริโอซินบนแบคทีเรียที่ไวต่อการยับยั้งของแบคทีริโอซิน

จากผลการทดลองข้อ 6.3 พบว่าแบคทีเรียที่ไวต่อการยับยั้งของแบคทีริโอซินที่สร้างจาก *W. cibaria* N23 และ *Lb. plantarum* 14 ได้แก่ *S. salivarius*, *Lb. sakei*, *Lb. plantarum*, *P. pentosaceus* JCM 5885, *P. pentosaceus* JCM 5890 และ *L. innocoa* ATCC 33090 ดังนั้นเพื่อศึกษาการดูดซับของแบคทีริโอซินบนแบคทีเรียที่ไวต่อการยับยั้งของแบคทีริโอซิน จึงนำแบคทีเรียดังกล่าวทั้ง 6 สายพันธุ์มาศึกษา เช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 8 เปรียบเทียบกับเชื้อทดสอบที่ใช้คือ *W. confusa* N31 (control) โดยจากการศึกษาการดูดซับของแบคทีริโอซินบนแบคทีเรียที่ไวต่อการยับยั้งของแบคทีริโอซินพบว่า แบคทีริโอซินของ *Lb. plantarum* 14 สามารถดูดซับบนผนังเซลล์ของแบคทีเรียที่ไวต่อการยับยั้งของแบคทีริโอซิน คือ *S. salivarius* 57077, *Lb. plantarum*, *Lb. sakei*, *P. pentosaceus* JCM 5885, *P. pentosaceus* JCM 5890 และ *L. innocua* ATCC 33090 ได้

ส่วนแบคทีริโอซินของ *W. cibaria* N23 ไม่สามารถดูดซับบนแบคทีเรียที่ไวต่อการยับยั้งของแบคทีริ-โอซินทั้ง 6 ชนิดได้ ซึ่งผลจากการทดลองแสดงดังตาราง 10

ตาราง 10 ผลการดูดซับของแบคทีริโอซินบนแบคทีเรียที่ไวต่อแบคทีริโอซิน

แบคทีเรียที่ไวต่อการยับยั้งแบคทีริโอซิน	แอคติวิตีของแบคทีริโอซิน (AU/ml)			
	W. cibaria N23 (ก่อน)	*W. cibaria* N23 (หลัง)	*Lb. plantarum* 14 (ก่อน)	*Lb. plantarum* 14 (หลัง)
S. salivarius 57077	-	-	20	10
Lb. sakei	-	-	30	15
Lb. plantarum	-	-	30	20
P. pentosaceus JCM 5885	-	-	25	10
P. pentosaceus JCM 5890	-	-	20	10
L. innocoa ATCC 33090	-	-	30	15
control	15	10	35	30

บทที่ 5
สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

จากการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารเนื้อและปลาหมักของไทย จำนวน 93 ตัวอย่าง พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ทั้งหมด 152 ไอโซเลท โดยมีรูปร่างเป็นท่อน 79 ไอโซเลท และรูปไข่ 73 ไอโซเลท จากนั้นนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ทั้ง 152 ไอโซเลทมาทำการคัดเลือกเชื้อที่สามารถสร้างสารยับยั้งแบคทีเรีย โดยวิธี agar spot test และวิธี agar well diffusion โดยใช้ *W. confusa* N31 เป็นเชื้อทดสอบ เพื่อยืนยันความสามารถในการสร้างสารยับยั้ง พบว่ามีเชื้อจำนวน 7 ไอโซเลท คือ A8, N8, N23, 11, 14, 24 และ 26 ที่สามารถสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียได้ จากนั้นนำเชื้อทั้ง 7 ไอโซเลทมาทำการจัดจำแนกโดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมีและศึกษาลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA พบว่า ไอโซเลท A8 มีความคล้ายคลึงกับ *Lb. plantarum* (GenBank accession number AB494717.1) ร้อยละ 100 ไอโซเลท N8 มีความคล้ายคลึงกับ *Lb. plantarum* (GenBank accession number EU789400.1) ร้อยละ 100 ไอโซเลท 11 มีความคล้ายคลึงกับ *Lb. plantarum* (GenBank accession number GU451063.1) ร้อยละ 100 ไอโซเลท 14 มีความคล้ายคลึงกับ *Lb. plantarum* (GenBank accession number GU253892.1) ร้อยละ 100 ไอโซเลท 24 และไอโซเลท 26 มีความคล้ายคลึงกับ *Lb. plantarum* (GenBank accession number FJ542291.1) ร้อยละ 100 และไอโซเลท N23 มีความคล้ายคลึงกับ *W. cibaria* (GenBank accession number AB494716.1) ร้อยละ 99 โดย *W. cibaria* ได้มีการแยกและศึกษาครั้งแรกในปี ค.ศ. 2002 ในครั้งนั้นสามารถแยกเชื้อได้จากวัตถุดิบที่ใช้ทำอาหารหมักในประเทศมาเลเซีย (Bjorkroth; et al. 2002: 141-148) และจากการศึกษาต่อมาพบว่า สามารถแยกเชื้อ *W. cibaria* ได้จากแหล่งอื่นๆ ด้วย เช่น แป้งหมัก (sourdoughs) (De Vuyst; et al. 2002: 6059-6069) ไส้กรอกเลือด (Morcilla de Burgos) (Santos; et al. 2005: 285-296) และ ปลาส้ม (Paludan; et al. 2002: 61-70) เป็นต้น

จากการนำ *Lb. plantarum* A8, N8, 11, 14, 24 และ 26 และ *W. cibaria* N23 มาทำการทดสอบโดยใช้เอนไซม์คะตะเลสและเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน 7 ชนิด คือ trypsin, actinase, protease XIII, facin, trypsin from porcine pancreas, α-chymotrypsin และ pepsin เพื่อทดสอบว่าสารยับยั้งที่สร้างขึ้นเป็นแบคทีริโอซิน โดยเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้เติมเอนไซม์ พบว่า

Lb. plantarum A8, N8, 11, 14, 24 และ 26 และ *W. cibaria* N23 ยังคงมีฤทธิ์ในการยับยั้งเมื่อใช้เอนไซม์คะตะเลส แต่จะสูญเสียแอคติวิตีในการยับยั้งเชื้อเมื่อใช้เอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน อย่างไรก็ตาม สารยับยั้งที่ได้จาก *Lb. plantarum* 11 และ 24 ยังคงมีความสามารถในการยับยั้งเมื่อใช้เอนไซม์ protease XIII ซึ่งอาจเกิดจากสารยับยั้งมีกรดอะมิโนบริเวณ active site ที่ไม่จำเพาะต่อการย่อยของเอนไซม์ protease XIII ซึ่งแสดงว่าสารยับยั้งที่สร้างจาก *Lb. plantarum* A8, N8, 11, 14, 24 และ 26 และ *W. cibaria* N23 มีคุณสมบัติเป็นโปรตีนและเป็นแบคทีริโอซิน

การคัดเลือก *Lb. plantarum* ที่สามารถสร้างแบคทีริโอซินสูงสุดได้แก่ *Lb. plantarum* 14 และ *W. cibaria* N23 มาศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสร้างแบคทีริโอซิน โดยทำการเก็บตัวอย่างเป็นเวลา 4, 8, 12, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 และ 24 ชั่วโมง นำไปวัดอัตราการเจริญจากค่าความขุ่นของเซลล์และทดสอบแอคติวิตีของแบคทีริโอซินพบว่า เมื่อเซลล์มีการเจริญเพิ่มขึ้นจะมีการสร้างแบคทีริโอซินเพิ่มมากขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแบคทีริโอซินที่สร้างจาก *Lb. plantarum* 14 และ *W. cibaria* N23 นั้นเป็น primary metabolite และในการทดลองนี้ยังพบว่า การสร้างแบคทีริโอซินมีปริมาณไม่คงที่ โดยจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า ยีนที่ควบคุมการสร้างแบคทีริโอซินอาจอยู่ที่พลาสมิด (Cleveland; et al. 2001: 1-20) หรืออยู่บนโครโมโซม (Huang; et al. 2009: 1030-1035) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่ายีนที่ควบคุมการสร้างแบคทีริโอซินในการทดลองนี้อาจอยู่ที่พลาสมิด ซึ่งอาจมีการสูญเสียพลาสมิดในระหว่างการทดลองได้ ทำให้เชื้อสูญเสียแอคติวิตีของแบคทีริโอซินด้วย

ผลของการทดสอบค่าความเป็นกรดด่างต่อแอคติวิตีของแบคทีริโอซิน พบว่าแบคทีริโอซินที่สร้างจาก *Lb. plantarum* 14 มีแอคติวิตีในการยับยั้งในช่วงกว้างคือ สามารถยับยั้งได้ที่ค่าความเป็นกรดด่างในช่วง 2.0 ถึง 10.0 ส่วน *W. cibaria* N23 มีแอคติวิตีในการยับยั้งได้ที่ค่าความเป็นกรดด่างในช่วงกว้างเช่นกันคือ 2.0 ถึง 8.0 แต่ที่ค่าความเป็นกรดด่างสูงกว่านี้แอคติวิตีในการยับยั้งของแบคทีริโอซินจะหมดไป ซึ่งอาจเกิดจากแบคทีริโอซินที่สร้างจาก *W. cibaria* N23 ไม่อยู่ตัวในที่เป็นด่างจึงทำให้แอคติวิตีของแบคทีริโอซินนั้นหมดไปและเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีริโอซินชนิดอื่น พบว่าให้ผลดังตาราง 11

การศึกษาผลอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของแบคทีริโอซินโดยทำการทดลอง ที่อุณหภูมิ 60, 80 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10, 20, 30 และ 60 นาที และที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที พบว่าแบคทีริโอซินที่สร้างจาก *Lb. plantarum* 14 และ *W. cibaria* N23 มี

ความสามารถในการทนความร้อนได้สูงถึง 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที ซึ่งสอดคล้องกับ Huang (Huang; et al. 2009: 1030-1035) ที่ได้ศึกษาคุณสมบัติของแบคทีริโอซินที่สร้างจาก *P. pentosaceus* 05-10 ที่แยกได้จาก Sichuan Pickle ซึ่งพบ Pediocin 05-10 ที่ยังคงมีแอคติวิตีที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที และจากการศึกษา antibacterial spectrum ของแบคทีริโอซินที่สร้างจาก *W. cibaria* N23 และ *Lb. plantarum* 14 พบว่าแบคทีริโอซินที่สร้างจาก *Lb. plantarum* 14 มีแอคติวิตีในการยับยั้งการทำงานของเชื้อทดสอบคือ *S. salivarius* 57077, *Lb. plantarum*, *Lb. sakei*, *P. pentosaceus* JCM 5885, *P. pentosaceus* JCM 5890 และ *L. innocua* ATCC 33090 แต่แบคทีริโอซินที่สร้างจาก *W. cibaria* N23 ไม่สามารถยับยั้งการทำงานของเชื้อทั้งหมดที่ทำการทดสอบได้ ซึ่งแสดงว่าแบคทีริโอซินที่สร้างจาก *W. cibaria* N23 มีแอคติวิตีในการยับยั้งเชื้อแคบ ซึ่งผลการเปรียบเทียบ antibacterial spectrum กับแบคทีริโอซินที่ได้จาก *Lb. plantarum* และ *Weissella* สายพันธุ์อื่นที่เคยมีรายงาน แสดงดังตาราง 11

ตาราง 11 ตารางสรุปผลการศึกษา antibacterial spectrum ที่ได้จาก *Lb. plantarum* และ *Weissella* สายพันธุ์ต่างๆ

สายพันธุ์	ความสามารถในการยับยั้งเชื้อ	แอคติวิตีของแบคทีริโอซินที่สร้างได้สูงสุด (AU/ml)	ค่าความเป็นกรดด่างที่แสดงแอคติวิตีในการยังยั้ง	เอกสารอ้างอิง
Lb. plantarum ST28MS และ ST26MS	*Lb. casei, Lb. sakei, S. aureus, En. faecalis, Ps. aeruginosa, E. coli* และ *A. baumanii*	12,800 และ 6,400	2.0-12.0 4.0-12.0	Todorov; & Dicks. 2005: 318-326
Lb. plantarum 35d	*Lb. plantarum* 64E *Lb. curvatus* 766 และ F8 *S. aureus* ATCC 25923 *E. faecalis* ATCC 29218 *L. monocytogenes* NCTC 10890 *B. subtilis* ATCC 6051	320	3.0-9.0	Messi, P.; et al. 2001: 193-198

ตาราง 11 (ต่อ)

สายพันธุ์	ความสามารถในการยับยั้งเชื้อ	แอคติวิตีของแบคทีริโอซินที่สร้างได้สูงสุด (AU/ml)	ค่าความเป็นกรดด่างที่แสดงแอคติวิตีในการยังยั้ง	เอกสารอ้างอิง
Lb. plantarum AMA-K	*En. faecalis*, *En. mundtii*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. sakei*, *Lb. salivarius*, *L. monocytogenes* *L. innocua*, *S. caprinus*, *S. pneumoniae* และ *Streptococcus* sp.	12,800	2.0-12.0	Todorov, S.D.; et al. 2007: 656–664
Lb. plantarum 14	*S. salivarius* 57077, *Lb. plantarum*, *Lb. sakei*, *P. pentosaceus* JCM 5885, *P. pentosaceus* JCM 5890 และ *L. innocua* ATCC 33090	40	2.0-10.0	การศึกษานี้
W. cibaria 110	*Lb. sakei* JCM 1157, *Lb. sanfranciscensis* JCM 5668, *Lb. coryniformis* subsp., *Lb. acetotolerans* JCM 3825, *W. kandleri* JCM 5817, *W. halotolerans* JCM 1114, *W. paramesenteroides* JCM 9890, *Leu. lactis* JCM 6123	5,120	-	Srionnual; et al. 2007: 2247-2250

ตาราง 11 (ต่อ)

สายพันธุ์	ความสามารถในการยับยั้งเชื้อ	แอคติวิตีของแบคทีริโอซินที่สร้างได้สูงสุด (AU/ml)	ค่าความเป็นกรดด่างที่แสดงแอคติวิตีในการยังยั้ง	เอกสารอ้างอิง
W. confusa CP3-1	*B. cereus*	ไม่ระบุ	4.0-6.0	Chavasirikunton; Vatanyoopaisarn; & Phalakornkule. 2006: 64-72
W. cibaria N23	*W. confusa* N31	15	2.0-8.0	การศึกษานี้

การศึกษามวลโมเลกุลของแบคทีริโอซินที่สร้างจาก *Lb. plantarum* 14 และ *W. cibaria* N23 พบว่าแบคทีริโอซินของ *Lb. plantarum* 14 มีแถบโปรตีนเกิดขึ้นหลายแถบคือที่ 115, 65, 47, 40 และ 17 กิโลดาลตัน แต่เมื่อทำการเททับด้วยเชื้อทดสอบ พบว่าเกิดบริเวณยับยั้งเป็นแนวยาว ซึ่งไม่สามารถบอกได้ว่าแถบโปรตีนแถบใดเป็นมวลโมเลกุลของแบคทีริโอซิน สำหรับการศึกษาแถบโปรตีนของแบคทีริโอซินที่ได้จาก *W. cibaria* N23 พบว่ามีแถบโปรตีนที่เป็นแนวยาวและเมื่อทำการเททับด้วยเชื้อทดสอบก็พบบริเวณยับยั้งเป็นแนวยาวเช่นกันทำให้ไม่สามารถหามวลโมเลกุลของแบคทีริโอซินได้

ผลการศึกษาการดูดซับของแบคทีริโอซินบนแบคทีเรียที่สร้าง (producer cell) พบว่า *Lb. plantarum* 14 และ *W. cibaria* N23 ที่สร้างแบคทีริโอซินไม่มีการดูดซับแบคทีริโอซินที่ตัวเองสร้างขึ้น ซึ่งน่าจะเกิดจากเซลล์ผู้สร้างมีระบบภูมิคุ้มกันซึ่งเป็นกลไกในการหลบหลีกหรือป้องกันการดูดซับของแบคทีริโอซิน (Barefoot; & Klaenhammer. 1983: 1808-1815)

ผลการศึกษาการดูดซับของแบคทีริโอซินบนแบคทีเรียที่ไวต่อแบคทีริโอซิน พบว่า แบคทีริโอซินที่สร้างจาก *Lb. plantarum* 14 สามารถดูดซับบนผนังเซลล์ของแบคทีเรียที่ไวต่อการยับยั้งของแบคทีริโอซิน คือ *S. salivarius* 57077, *Lb. plantarum*, *Lb. sakei*, *P. pentosaceus* JCM 5885, *P. pentosaceus* JCM 5890 และ *L. innocua* ATCC 33090 ได้ ส่วนแบคทีริโอซินที่สร้างจาก *W. cibaria* N23 ไม่สามารถดูดซับบนผนังเซลล์ของแบคทีเรียที่ไวต่อการดูดซับของแบคทีริโอซินได้

จากการศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคทีริโอซินที่สร้างจาก *Lb. plantarum* 14 และ *W. cibaria* N23 ที่ได้จากการทดลองนี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานต่องานวิจัยทางด้านแบคทีริโอซิน โดยเฉพาะการค้นพบแบคทีริโอซินที่สร้างจาก *W. cibaria* N23 โดยก่อนหน้านี้ได้มีรายงานการค้นพบแบคทีริโอซินจาก *W. cibaria* น้อยมาก ซึ่งมีรายงานการค้นพบครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 2007 โดย ศรีนวล และคณะ ซึ่งพบแบคทีริโอซิน 110 ที่สร้างจาก *W. cibaria* 110 ที่แยกได้จากปลาส้ม อย่างไรก็ตาม การนำแบคทีริโอซินที่สร้างไปประยุกต์ใช้ในการผลิตอาหารหมัก ยังคงต้องทำการศึกษาต่อไปในอนาคต

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

กรรณิการ์ กำลัง. (2549). *การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่สร้างสารต้านจุลชีพได้จากผลิตภัณฑ์อาหารหมักประเภทเนื้อสัตว์และศึกษาสมบัติบางประการของสารต้านจุลชีพ.* ปริญญานิพนธ์ วท.ม (ชีววิทยา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.

นภา โล่ห์ทอง. (2535). *กล้าเชื้ออาหารหมักและเทคโนโลยีการผลิต*. กรุงเทพฯ: ฟันนี่พับบลิชชิ่ง, 159 หน้า. ถ่ายเอกสาร.

นาถสุดา วิศวงศ์. (2522). *การศึกษาจุลชีววิทยาของอาหารหมักพื้นเมือง ปลาเจ่า ปลาส้ม และส้มฟัก*. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ) กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ถ่ายเอกสาร.

ปิ่นมณี ขวัญเมือง. (2546). *การแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากตัวอย่างแหนมของประเทศไทยเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อ*. ปริญญานิพนธ์ วท.ด. (เทคโนโลยีชีวภาพ). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ถ่ายเอกสาร.

พิเชษฐ์ สุวรรณ์. (2548). *การผลิตกรดแลกติกจากไคตินโดยเซลล์ตรึงแบคทีเรียกรดแลกติก*. ปริญญานิพนธ์ วท.ม. (ชีววิทยา). เชียงใหม่: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. ถ่ายเอกสาร.

แพรวพรรณ ห้องทองแดง. (2522). *การศึกษาจุลชีววิทยาของอาหารหมักพื้นเมือง: ปลาร้า*. วิทยานิพนธ์ วท.ม. กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ถ่ายเอกสาร.

มงคล เพ็ญสายใจ และคนอื่นๆ. (2544). การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียจากผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์หมัก. *วารสารเกษตรพระจอมเกล้า* 19(3): 47-57.

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล และอังคณา สุขบุญ. (2541). ผลการยับยั้งซัลโมเนลลาของแบคทีเรียกรดแลคติคที่แยกจากไส้กรอกเปรี้ยว. *วารสารสงขลานครินทร์* 20(4): 429-436.

วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. (2534). *อาหารจากแลคติกแอซิดแบคทีเรียในประเทศไทย, แลคติกแอซิดแบคทีเรียในอุตสาหกรรมอาหารของไทย.* กรุงเทพฯ: คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 5-17.

ศรัณย์ พรหมสาย. (2549). *การแยกและการคัดกรองแบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถผลิตแบคทีริโอซิน*. ปริญญานิพนธ์ วท.ม. (ชีววิทยา). เชียงใหม่: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. ถ่ายเอกสาร.

ศิรินาถ หนูเอก. (2539). *การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติคที่สร้างสารแบคเทอริโอซินจากอาหารหมัก*. วิทยานิพนธ์ วท.ม. สงขลา: มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. ถ่ายเอกสาร.

อรนุช อุดรภิชาติ. (2530). *การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติคที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อซัลโมเนลลาและการผลิตกล้าเชื้อผงในการหมักแหนม*. วิทยานิพนธ์ วท.ม. กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ถ่ายเอกสาร.

อาภัสรา กอบกัยกิจ. (2537). *การแยกแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่ผลิตสารต่อต้านจุลชีพจากอาหารหมัก*. วิทยานิพนธ์ วท.ม. กรุงเทพ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ถ่ายเอกสาร.

อาหารการกินแห่งลุ่มทะเลสาบ. (2551). สงขลา: เครือข่ายสตรีรอบทะเลสาบ. หน้า 32-33.

Abee, T. (1995). Pore - Forming Bacteriocins of Gram - Positive Bacteria and Self-Protection Mechanisms of Producer Organisms. *FEMS Microbiological Letter* 129: 1-10.

Adams, M.R. (1986). Fermented Fish Products, In: Adams, M.R. (Ed.), *Microorganisms in the Production of Food*. Amsterdam: Elsevier. pp. 179-193.

-------. (1999). Safety of Industrial Lactic Acid Bacteria. *Journal of Biotechnology* 68: 171-178.

Adams, M.R.; & Moss, M.O. (1995). *Food Microbiology*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry. pp. 245-246.

Aguirre, M.; & Collins, M.D. (1992). Phylogenetic Analysis of Some *Aerococcus*-like Organisms for Urinary Tract Infections: Description of *Aerococcus urinae* sp. nov. *Journal of General Microbiology* 138: 401-405.

Ali Al-Ahmad; et al. (2008). Characterization of the First Oral *Vagococcus* Isolated from a Root-Filled Tooth with Periradicular Lesions. *Current Microbiology* 57: 235-238.

Anderson, R. (1986). Inhibition of *Staphylococcus aureus* and Spheroplasts of Gram-Negative Bacteria by an Antagonistic Compound Produced by a Strain of *Lactobacillus plantarum*. *International Journal Food Microbiology* 3: 149-160.

Anderson, R.E.; Daeschel, M.A.; & Hassam, H.M. (1988). Antibacterial Activity of Plantaricin SIK-83, a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus plantarum*. *Biochimie* 70: 381-390.

Barefoot, S. F.; & Klaenhammer, T. R. (1983). Detection and Activity of lactacin B, a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology* 45(6): 1808-1815.

Beddows, C.G. (1985). Fermented Fish and Fish Products, In: Wood, B.J.B., (Ed.). *Microbiology of Fermented Foods*. 2nd Ed. London: Elsevier Applied Science Publishers. pp. 2-23.

Bhunia, A.K.; Johnson, M.C.; & Ray, B. (1998). Purification, Characterization and Antimicrobial Spectrum of a Bacteriocin Produced by *Pediococcus acidilactici* H.J. *The Journal of Applied Bacteriology* 65: 261-268.

Biswas, S.R.; et al. (1991). Influence of Growth Conditions on the Production of a Bacteriocin, Pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici* H. *Applied and Environmental Microbiology* 57(4): 1265-1267.

Bjorkroth, K.J.; et al. (2002). Taxonomic Study of *Weissella confusa* and Description of *Weissella cibaria* sp. Nov., Detected in Food and Clinical Samples. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 141-148.

Breukink, E.; et al. (1999). Use of Cell Wall Precursor Lipid II by a Pore-Forming Peptide Antibiotic. *Science* 286: 2361-2364.

Brotz, H.; et al. (1998). The Lantibiotic Mersacidin Inhibits Peptidoglycan Synthesis by Targeting Lipid II. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42: 154-160.

Chatterjee, C.; et al. (2005). Biosynthesis and Mode of Action of Lantibiotics. *Chemistry Reviews* 105: 633-683.

Chavasirikunton, V.; Vatanyoopaisarn, S.; & Phalakornkule, C. (2006). Bacteriocin - Like Activity from *Weissella confusa* and *Pediococcus acidilactici* Isolated from Traditional Thai Fermented Sausages. *Journal of Culture Collections* 5: 64-72.

Chinachoti, N.; et al. (1997). Utilization of Xylose as an Alternative Carbon Source for Nisin Z Production by *Lactococcus lactis* IO-1. *Journal of Faculty of Agriculture, Kyushu University* 42: 171-181.

Choi, H.J.; et al. (2002). *Weissella kimchii* sp. Nov., a Novel Lactic Acid Bacterium from Kimchi. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 507-511.

Cleveland, J.; et al. (2001). Bacteriocins: Safe, Natural Antimicrobials for Food Preservation. *International Journal of Food Microbiology* 71: 1-20.

Collins, M.D.; et al. (1999). *Aerococcus christensenii* sp. nov., from the Human Vagina. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49: 1125-1128.

Cotter, P. D.; Hill, C.; & Ross, R.P. (2005). Bacterial Lantibiotics: Strategies to Improve Therapeutic Potential. *Current Protein and Peptide Science* 6: 61-75.

Daba, H.; & et al. (1991). Detection and Activity of a Bacteriocin Produced by *Leuconostoc mesenteroides*. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 3450-3455.

Daeschel, M.A. (1989). Antimicrobial Substances from Lactic Acid Bacteria for Use As Food Preservatives. *Food Technology* 43(1): 164-167.

Davey, G.P. (1994). Diplococcin Produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. In: De Vuyst; L.; & Vandamme, E.J. Eds. *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetic and Application.* London: Blackie-Academic & Professional, pp. 273-290.

Davidson, P.M.; & Hoover, D.G. (1993). Antimicrobial Components from Lactic Acid Bacteria, In: Salminen, S.; & von Wright, A., Eds. *Lactic Acid Bacteria.* New York: Marcel Dekker, Inc. pp. 127-160.

Deegan, L.H.; et al. (2006). Bacteriocins: Biological Tools for Bio-Preservation and Shelf-Life Extension. *International Dairy Journal* 16(9): 1058-1071.

Dellaglio, F.; Dicks, L.M.T.; & Torriani, S. (1995). The Genus *Leuconostoc*, In: Wood B.J.B.; & Holzapfel, W.H. (Eds.). *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. 2nd Ed. London: Blackie Academic & Professional. pp. 235-278.

Delves-Broughton, J. (1990). Nisin and Its Uses As a Food Preservative. *Food Technology* 44: 100-117.

De Vuyst, L.; & Vandamme, E.J. (1992). Influence of the Carbon Source on Nisin Production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Batch Fermentations. *Journal of General Microbiology* 138: 571-578.

De Vuyst, L.; & Vandamme, E.J. (1994a). Antimicrobial Potential of Lactic Acid Bacteria, In: De Vuyst, L.; & Vandamme, E.J., Eds. *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetic and Application.* London: Blackie-Academic & Professional. pp. 91-142.

-------. (1994b). *Bacteriocin of Lactic Acid Bacteria: Micro-biology, Genetics and Applications.* London: Blackie- Academic & Professional. pp. 110-112.

De Vuyst, L.; Callewaert, R.; & Crabbe, K. (1996). Primary Metabolite Kinetics of Bacteriocin Biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and Evidence for Stimulation of Bacteriocin Production under Unfavorable Growth Conditions. *Microbiology* 142: 817-827.

De Vuyst, L.; et al. (2002). The Biodiversity of Lactic Acid Bacteria in Greek Traditional Wheat Sourdoughs is Reflected in Both Composition and Metabolite Formation. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 6059-6069.

Eckner, K.F. (1992). Bacteriocins and Food Application. *Dairy, Food and Environmental Sanitation* 12: 204-209.

Eijsink, V.G.H.; et al. (1998). Comparative Studies of Class IIa Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 3275-3281.

Enan, G.; et al. (1996). Antibacterial Activity of *Lactobacillus plantarum* UG1 Isolated from Dry Sausage: Characterization, Production and Bactericidal Action of Plantaricin UG1. *International Journal of Food Microbiology* 30: 189-215.

Ennahar, S.; Sonomoto, K.; & Ishizaki, A. (1999). Class IIa Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Antibacterial Activity and Food Preservation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 87: 705-716.

Erko, S.; & Michael, G. (1991). *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. The United States of America: John Wiley & Sons.

Felis, G.E.; Torriani, S.; & Dellaglio, F. (2005). Reclassification of *Pediococcus urinaeequi* (*ex* Mees 1934) Garvie 1988 as *Aerococcus urinaeequi* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 1325-1327.

Forsythe, S.J. (2000). *The Microbiology of Safe Food*. Oxford: Blackwell Science, Ltd. pp. 124.

Freaz; et al. (1998). Plantaricin D, a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus plantarum* BFE 905 from Ready-To-Eat Salad. *Letter in Applied Microbiology* 26: 231-235.

Gratia, A. (1925). Sur un Remarquable Example d' Antagonisme Entre Deux Souches de Colibacille. *Comptes Rendus Society Biology* 93: 1040-1042.

Hammes, W. P.; & Knauf, H.J. (1994). Starter in the Processing of Meat Products. *Meat Science* 36: 155-168.

Hardie, J.M.; & Whiley, R.A. (1995). The Genus *Streptococcus*. In: Wood, B.J.B.; & Holzapfel, W.H. (Eds.). *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. 2nd Ed. Glasgow: Blackie Academic & Professional. pp. 55-124.

Harrigan, W.F. (1998). *Laboratory Method in Food Microbiology*. 3rd Ed. New York: Academic Press. pp. 346-348.

Hastings, J.W.; & M.E. Stiles. (1991). Antibiosis of *Leuconostoc gelidum* Isolated from Meat. *Journal of Applied Bacteriology* 70: 127-134.

Hastings, J.W.; et al. (1991). Characterization of Leuconocin A-UAL 187 and Cloning of Bacteriocin Gene from *Leuconostoc gelidium*. *Journal of Bacteriology* 173: 7491-7500.

-------. (1994). Bacteriocins of *Leuconostoc* Isolated from Meat. *International Journal of Food Microbiology*. 24: 75-81.

Holzapfel, W.H.; & Wood, B.J.B. (1995). Lactic Acid Bacteria in Contemporary Perspective, In: Holzapfel, W.H.; & Wood, B.J.B. (Eds.). *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. London: Blackie Academic & Professional. pp.1-6.

Holzapfel, W.H.; Geisen, R.; & Schillinger, U. (1995). Biological Preservation of Foods with Reference to Protective Cultures, Bacteriocins and Food-Grade Enzymes. *International Journal of Food Microbiology* 24: 343-362.

Huang, Y.; et al. (2009). Characterization and Application of an Anti-*Listeria* Bacteriocin Produced by *Pediococcus pentosaceus* 05-10 Isolated from Sichuan Pickle, a Traditionally Fermented Vegetable Products from China. *Food control* 20: 1030-1035.

Hurst, A. (1981). Nisin. *Advances in Applied Microbiology* 27: 85-123.

Hurst, A.; & Hoover, D.G. (1993). Nisin, In: Branen, A.L.; & Davidson, P.M. (Eds.). *Antimicrobial in Foods.* New York: Marcel Dekker. pp. 369-394.

Hyronimus, B.; Le Marrec, C.; & Urdaci, M.C. (1998). Coagulin, a Bacteriocin-Like Inhibitory Substance Produced by *Bacillus coagulans* I_4. *Journal of Applied Microbiology* 85: 42-50.

Itoh, T.; et al. (1995). Inhibition of Food-Borne Pathogenic Bacteria by Bacteriocin from *Lactobacillus gasseri*. *Letter in Applied Microbiology* 21: 137-141.

Jack, R.W.; Tagg, J.R.; & Ray, B. (1995). Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. *Microbiological Review* 59: 171-200.

Jack, R. W.; et al. (1995). The Genetics of Lantibiotic Biosynthesis. *Bioessays* 17: 793-802.

Jacob, F.A.; et al. (1953). Definition de Quelques Termes Relatifs a La Lysogenie. *Annales de l' Institut Pasteur Paris* 84: 222-224.

Jay, J.M. (1996). *Modern Food Microbiology*. New York: International Thomson Publishing. pp. 110-113.

Joerger, M.C.; & Klaenhammer, T.R. (1986). Characterization and Purification of Helveticin and Evidence for a Chromosomally Determined Bacteriocin Produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *Journal of Bacteriology* 167: 439-446.

Kelly, W.J.; Asmundson, R.V.; & Huang, C.M. (1996). Characterization of Plantaricin KW 30, a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus plantarum*. *The Journal of Applied Bacteriology* 81: 657-662.

Kim, W.S.; Hall, R.J.; & Dunn, N.W. (1997). Improving Nisin Production by Increasing Nisin Immunity/Resistance Genes in the Producer Organism *Lactococcus lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 50: 429-433.

Klaenhammer, T.R. (1988). Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Biochimie* 70: 337-349.

-------. (1993). Genetics of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria. *FEMS Microbiology Review* 12: 39-86.

Kleinkauf, H.; & von Dohren, H. (1987). Biosynthesis of Peptide Antibiotics. *Annual Review of Microbiology* 41: 259-289.

Lawson, P.A.; et al. (2001a). *Aerococcus sanguicola* sp. nov., Isolated from a Human Clinical Source. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 475- 479.

-------. (2001b). *Aerococcus urinaehominis* sp. nov., Isolated from Human Urine. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 683- 686.

-------. (2007). *Vagococcus elongatus* sp. nov., Isolated from a Swine-manure Storage Pit. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 751-754.

Lee, J.S.; et al. (2002). *Weissella koreensis* sp. Nov., Isolated from Kimchi. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 1257-1261.

Lewus, S.; Sun, S.; & Montville, T.J. (1992). Production of an Amylase-Sensitive Bacteriocin by an Atypical *Leuconostoc paramesenteroides* Strain. *Applied and Environmental Microbiology* 58:143-149.

Litchfield, J.H. (1996). Microbiological Production of Lactic Acid Bacteria. *The Journal of Applied Microbiology* 42: 45-95.

Lyon, W.J.; & Glatz, B.A. (1993). Isolation and Purification of Propionicin PLG-1, a Bacteriocin Produced by a Strain of *Propionibacterium thoenii*. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 83-88.

Magnusson, J.; et al. (2002). *Weissella soli* sp. Nov., a Lactic Acid Bacterium Isolated from Soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 831-834.

Matsusaki, H.; et al. (1996). Lantibiotic Nisin Z Fermentative Production by *Lactococcus lactis* IO-1: Relationship between Production of the Lantibiotic and Lactate and Cell Growth. *Applied Microbiology and Biotechnology* 45: 36-40.

McMullen, L.M.; & Stiles, M.E. (1996). Potential for Use of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria in the Preservation of Meats. *Journal Food Protection* 59: 64-71.

Messi, P.; et al. (2001). Detection and Preliminary Characterization of a Bacteriocin (Plantaricin 35d) Produced by a *Lactobacillus plantarum* Strain. *International Journal of Food Microbiology* 64: 193–198.

Montville, T.J.; & Kaiser, A.L. (1993). Antimicrobial Proteins: Classification, Nomenclature, Diversity and Relationship to Bacteriocins. *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*. New York: Academic Press, Inc. pp. 1-22.

Moreno, I.; et al. (2000). Characterization of Bacteriocins Produced by *Lactococcus lactis* Strains. *Brazilian Journal of Microbiology* 31: 184-192.

Morgan, S. M.; et al. (2002). The Design of a Three Strain Starter System for Cheddar Cheese Manufacture Exploiting Bacteriocin-Induced Starter Lysis. *International Dairy Journal* 12: 985-993.

Mortvedt, C.I.; et al. (1991). Purification and Amino Acid Sequence of Lactocin S, a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus sake* L45. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 1829-1834.

Muriana, P.M.; & Klaenhammer, T.R. (1991). Purification and Partial Characterization of Lactacin F, a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. *Applied and Environmental Microbiology* 57:114-121.

Muriana, P.M. (1996). Bacteriocins for Control of *Listeria* spp. in Food. *Journal of Food Protection* 59: 54-63.

Nissen-Meyer, J.; et al. (1992). A Novel Lactococcal Bacteriocin Whose Activity Depends on the Complementary Action of Two Peptides. *Journal of Bacteriology* 174: 5686-5692.

Orla-Jensen, S. (1919). *The Lactic Acid Bacteria*. Copenhagen: Host and Son.

O'Sullivan, L.; Ross, R.P.; & Hill, C. (2002). Potential of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria for Improvements in Food Safety and Quality. *Biochimie* 84(5-6): 593-604.

Paludan, M.C.; et al. (2002). Fermentation and Microflora of Plaa–som, a Thai Fermented Fish Product Prepared with Different Salt Concentrations. *Journal of Food Microbiology* 73: 61-70.

Parente, E.; & Ricciardi, A. (1994). Effect of Nitrogen and Carbohydrate Sources on Lactic Acid and Bacteriocin Production by *Enterococcus faecium* DPC1146. *Agro-Industry Hi-Tech* 5: 35-39.

Piard, J.C.; et al. (1992). Purification and Partial Characterization of Lactacin 481, a Lanthionine-Containing Bacteriocin Produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ481. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 279-284.

Piard, J.C. (1994). Lacticin 481: a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ 481, In: De Vuyst, L.; & Vandamme, E.J. (Eds.). *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetic and Application.* London: Blackie-Academic & Professional. pp. 251-271.

Pilet, M.F.; et al. (1995). Evidence for Two Bacteriocins Produced by *Carnobacterium piscicola* and *Carnobacterium divergens* Isolated from Fish and Active against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 58: 256-262.

Phitakpol, B. (1993). Fish Fermentation Technology in Thailand, In: Lee, C.H. & Stein-Kraus, K.H. (Eds.). *Fermentation Technology*. Tokyo, United Nation University Press. pp. 155-166.

Quiao, M.; et al. (1997). Isolation of a *Lactococcus lactis* Strain with High Resistance to Nisin and Increased Nisin Production. *Biotechnology Lette*r 19: 199-202.

Rogers, L.A.; & Whittier, E.D. (1928). Limiting Factors in Lactic Fermentation. *Journal of Bacteriology* 16: 211-229.

Saisithi, P.; et al. (1986). *Improvement of a Thai Traditional Fermented Fish Product: Som-Fug*. Institute of Food Research and Product Development. Bangkok: Kasetsart University. pp. 87.

Santos, E.M.; et al. (2005). Characterization and Identification of Lactic Acid Bacteria in ''morcilla de Burgos''. *International Journal of Food Microbiology* 97: 285-296.

Schägger, H; & Von Jagow, G. (1987). Tricine-Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacry-lamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa. *Annals of Biochemistry*. 166: 368-379.

Schillinger, U.; & Lucke, F.K. (1989). Antibacterial Activity of *Lactobacillus sake* Isolated from Meat. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 1901-1906.

Schillinger, U.; Geisen, R.; & Holzapfel, W.H. (1996). Potential of Antagonistic Microorganisms and Bacteriocins for the Biological Preservation of Foods. *Trends in Food Science and Technology* 7: 158-164.

Schlegel, H.G. (1993). *General Microbiology*. 7th Ed. New York: Cambridge University Press.

Schleifer, K.H.; & Ludwing, W. (1995). Phylogenetic Relationship of Lactic Acid Bacteria, In: Wood, B.J.B.; & Holzapfel, W.H. (Eds.). *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. 2nd Ed. Glasgow: Blackie Academic & Professional.

Srionnual, S.; et al. (2007). Weissellicin 110, a Newly Discovered Bacteriocin from *Weissella cibaria* 110, Isolated from Plaa-Som, a Fermented Fish Product from Thailand. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 2247-2250.

Stiles, M.E.; & Hastings, J.W. (1991). Bacteriocin Production by Lactic Acid Bacteria: Potential for Use in Meat Preservation. *Trends in Food Science and Technology* 2: 247-251.

Stiles, M.E.; & Holzapfel, W.H. (1997). Lactic Acid Bacteria of Foods and their Current Taxonomy. *International Journal of Food Microbiology* 36: 1-29.

Stoffels, G.; Nes, I.F.; & Gudmundsdottir, A. (1992). Isolation and Properties of a Bacteriocin producing *Carnobacterium piscicola* Isolated from Fish. *The Journal of Applied Bacteriology* 73: 309-316.

Tagg, J.R.; Dajani, A.S.; & Wannamaker, L.W. (1976). Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. *Bacteriological Review* 40: 722-756.

Tahara, T.; & Kanatani, K. (1996). Isolation, Partial Characterization and Mode of Action of Acidocin J 1229, a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus acidophilus* JCM 1229. *The Journal of Applied Bacteriology* 81: 669-677.

Tanasupawat, S.; et al. (2000). *Lactobacillus acidipiscis* sp. Nov. and *Weissella thailandensis* sp. Nov., Isolated from Fermented Fish in Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 1479-1485.

Teuber, M. (1995). The Genus *Lactococcus*, In: Wood, B.J.B.; & Holzapfel, W.H. (Eds.). *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. 2nd Ed. London: Blackie Academic & Professional. pp. 173-234.

Todorov, S.D.; & Dicks, L.M.T. (2005). *Lactobacillus plantarum* Isolated from Molasses Produces Bacteriocins Active against Gram-Negative Bacteria. *Enzyme and Microbial Technology* 36: 318-326.

Todorov, S.D.; et al. (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.

--------. (2010). Characterization of Bacteriocins Produced by Two Strains of *Lactobacillus plantarum* Isolated from *Beloura* and *Chourico*, Traditional Pork Products from Portugal. *Meat Science* 84(3): 334-343.

Twiddy, P.J.A.; & Reilly, L. (1987). *Lactobacillus in Health and Disease*. Kyoto: Yakult Honsha Co. pp. 197-203.

Vela, A.I.; et al. (2007). *Aerococcus suis* sp. nov., Isolated from Clinical Specimens from Swine. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 1291- 1294.

Williams, R.E.O.; Hirch, A.; & Cowan, S.T. (1953). *Aerococcus*, a New Bacterial Genus. *Journal of General Microbiology* 8: 475-480.

Wood, B.J.B.; & Holzapfel, W. H. (1995). *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. London: Chapman & Hall. pp. 161-162.

Yang, R.; Johnson, M.C.; & Ray, B. (1992). Novel Method to Extract Large Amounts of Bacteriocin from Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 58(10): 3355-3359.

Yang, R.; & Ray, B. (1994). Factors Influencing Production of Bacteriocins by Lactic Acid Bacteria. *Food Microbiology* 11: 281-291.

Yildirim, Z.; & Johnson, M.G. (1998). Detection and Characterization of a Bacteriocin Produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* R Isolated from Radish. *Letter in Applied Microbiology* 26: 297-304.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth

peptone	10	g
beef extract	10	g
yeast extract	5	g
glucose	20	g
dipotassium hydrogen phosphate	2	g
tween 80	1	g
diammonium hydrogen citrate	2	g
sodium acetate	5	g
magnesium sulfate	0.1	g
manganese sulfate	0.05	g
น้ำกลั่น	1,000	ml

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ในกรณีที่ต้องการเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ให้เตรียมวุ้นผงลงไป 15 กรัม แต่ถ้าเตรียมเป็น MRS soft agar ให้เติมผงวุ้นลงไป 0.5 กรัม

2. Nutrient Broth (NB)

peptone	5	g
beef extract	3	g
น้ำกลั่น	1,000	ml

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ในกรณีที่ต้องการเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar ให้เตรียมวุ้นผงลงไป 15 กรัม แต่ถ้าเตรียมเป็น NA soft agar ให้เติมผงวุ้นลงไป 0.5 กรัม

3. Bacteriocin screening medium (BSM)

(Developed on the basic of MRS medium)

tryptone	10	g
beef extract	2	g
yeast extract	4	g
glucose	2	g
dipotassium hydrogen phosphate	8.7	g
potassium dihydrogen phosphate	8	g
tween 80	1	g
diammonium hydrogen citrate	2	g
magnesium sulfate	0.2	g
manganese sulfate	0.05	g
น้ำกลั่น	1,000	ml

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ในกรณีที่ต้องการเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ BSM agar ให้เตรียมวุ้นผงลงไป 15 กรัม

4. Brain Heart Infusion (BHI) broth

calf brain infusion	200	g
beef infusion	250	g
proteose peptone	10	g
dextrose	2	g
sodium chloride	5	g
disodium phosphate	2.5	g

ใช้เป็นอาหารสูตรสำเร็จ โดยใช้ BHI broth 37 กรัม เติมน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. Tryptic Soy Broth (TSB)

pancreatic digest of casein	17	g
enzymatic digest of soybean meal	3	g
dextrose	2.5	g
sodium chloride	5	g
dipotassium phosphate	2.5	g

ใช้เป็นอาหารสูตรสำเร็จ โดยใช้ TSB broth 30 กรัม เติมน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

ภาคผนวก ข

สารเคมี

1. TE-buffer

Tris-HCl	0.1	M
EDTA	1.0	mM

ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ได้ 8.0 และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. 10% sodium dodecyl sulfate (SDS)

sodium dodecyl sulfate	100	g
น้ำกลั่น	500	ml

ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3. 3 M sodium acetate

sodium acetate	408.3	g
น้ำกลั่น	800	ml

ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ได้ 5.2 โดยใช้ glacial acetic acid เข้มข้น และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. 50X TAE buffer

Tris-base	242.0	g
glacial acetic acid	57.1	g
0.5 M EDTA pH 8.0	1.0	ml

ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่อจะใช้ให้ทำการเจือจางเป็น 1X ด้วยน้ำกลั่น

5. Separating gel (15% gel)

30% acrylamide/ 0.8% N,N-bisacrylamide	9.8	ml
Tris-Cl/ SDS pH 8.45	10	ml
น้ำกลั่น	7.03	ml
glycerol	3.17	ml
10%(w/v) ammonium persulfate	50	µl (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)
TEMED	10	µl

6. Stacking gel

30% acrylamide/ 0.8% N,N-bisacrylamide	1.62	ml
Tris-Cl/ SDS pH 8.45	3.10	ml
น้ำกลั่น	7.78	ml
10%(w/v) ammonium persulfate	25	µl (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)
TEMED	5	µl

7. 30% acrylamide/, 0.8% bisacrylamide

acrylamide	30	g
N,N-methylenebisacrylamide	0.8	g
น้ำกลั่น	100	ml

ทำการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร และเก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

8. 10% (w/v) ammonium persulfate

ammonium persulfate	1	g
น้ำกลั่น	10	ml

9. Tris-Cl/ SDS pH 8.45

Tris base	182	g
น้ำกลั่น	300	ml

ปรับความเป็นกรดด่างให้เป็น 8.45 ด้วย 1M HCl และปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ทำการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นเติม SDS 1.5 กรัม และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

10. 4X Tris-Cl/SDS pH 6.8

Tris base	6.05	g
น้ำกลั่น	40	ml

ปรับความเป็นกรดด่างให้เป็น 6.8 ด้วย 1N HCl และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ทำการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นเติม SDS 0.4 g และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

11. 2X Tricine sample buffer

1M Tris-Cl pH 6.8	1	ml
glycerol	2	ml
SDS	0.4	g
bromophenol blue	0.02	g
DTT	0.31	g

ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ทำการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

12. stainer (500 ml)

40% methanol	200	ml
10% acetic acid	50	ml
น้ำกลั่น	250	ml
0.1% coomassie blue	0.5	g

ทำการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

13. destainer (500 ml)

10% methanol	50	ml
10% acetic acid	50	ml
น้ำกลั่น	400	ml

ทำการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

14. fixing solution

methanol	50	ml
glacial acetic acid	10	ml

ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ทำการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

15. anode buffer

Tris base	121.1	g
น้ำกลั่น	500	ml

ปรับความเป็นกรดด่างให้เป็น 8.9 ด้วย 1N HCl และปรับปริมาตรเป็น 5 ลิตรด้วยน้ำกลั่น ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

16. cathode buffer

Tris base	12.11	g
tricine	17.92	g
SDS	1	g

ปรับความเป็นกรดด่างให้เป็น 8.25 ด้วย 1N HCl และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ค

ภาคผนวก ค

1. การทำให้ PCR product บริสุทธิ์ (PCR product purification) โดยใช้ FAVORGEN® GEL/PCR PURIFICATION kit

นำ PCR product มาใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม FADF buffer ในอัตราส่วนปริมาตร 1 ต่อ 5 (PCR product ต่อ FADF buffer) ผสมให้เข้ากัน แล้วดูดส่วนผสมมาใส่ใน column นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,356xg เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนใสที่อยู่ข้างล่างของ column แล้วเติม wash buffer ปริมาตร 700 ไมโครลิตร นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,356xg เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนใสที่อยู่ข้างล่างของ column นำมาปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง นำ column มาวางบนหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ แล้วเติม elution buffer ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ลงตรงกลางของ column ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,356xg เป็นเวลา 1 นาที นำส่วนใสที่ได้มาตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟเรซิส

ภาคผนวก ง

ภาคผนวก ง

1. ขั้นตอนการทำไดอะไลซิส

1.1 การเตรียมถุงสำหรับการทำไดอะไลซิส

ตัดถุงไดอะไลซิส ยาว 20 เซนติเมตร แล้วต้มใน 2% sodium bicarbonate และ 1mM EDTA (ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8.0) เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างถุงด้วยน้ำกลั่น จากนั้นจึงนำถุงไปต้มใน 1mM EDTA (ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8.0) เป็นเวลา 10 นาที อีกครั้งหนึ่ง นำไปเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะมีการใช้งาน

1.2 การนำเกลือออกจากของแบคทีริโอซิน

นำตะกอนโปรตีนแขวนลอยอยู่ใน 25 mM ammonium acetate (ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.5) มาใส่ในถุงที่เตรียมไว้ในข้อ 1.1 (cut off 12,000) จากนั้นมัดถุงให้แน่น แล้วนำไปแช่ลงใน 20 mM Tris buffer บน magnetic stirrer ที่มีการกวนตลอดเวลา โดยเปลี่ยนสารสะลายทุก 4 ชั่วโมง ทำจนสีของสารละลายกับตะกอนโปรตีนมีสีใกล้เคียงกัน จากนั้นจึงนำไปแช่ลงในสารละลายซูโครส 50 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมงตัดถุงแล้วเก็บตะกอนโปรตีนที่ได้เพื่อนำไปศึกษามวลโมเลกุลของแบค-ทีริโอซินต่อไป

ภาคผนวก จ

ภาคผนวก จ

1. ผลการเทียบเคียงลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ในแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท A8 กับลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ในฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST

Descriptions

Legend for links to other resources: U UniGene E GEO G Gene S Structure M Map Viewer

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
FN667291.1	Uncultured compost bacterium partial 16S rRNA gene, clone FS1698	2634	2634	100%	0.0	100%
AB494717.1	Lactobacillus plantarum gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: KC31	2634	2634	100%	0.0	100%
GU253891.1	Lactobacillus pentosus strain N3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2634	2634	100%	0.0	100%
GU138600.1	Lactobacillus plantarum IMAU:10272 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2634	2634	100%	0.0	100%
GU138594.1	Lactobacillus plantarum IMAU:10266 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2634	2634	100%	0.0	100%
GU138590.1	Lactobacillus plantarum IMAU:10262 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2634	2634	100%	0.0	100%
GU138589.1	Lactobacillus plantarum IMAU:10261 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2634	2634	100%	0.0	100%
GU138584.1	Lactobacillus plantarum IMAU:10256 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2634	2634	100%	0.0	100%
GU138583.1	Lactobacillus plantarum IMAU:10255 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2634	2634	100%	0.0	100%
GU138550.1	Lactobacillus plantarum IMAU:10222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2634	2634	100%	0.0	100%

2. ผลการเทียบเคียงลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ในแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท N8 กับลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ในฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST

Descriptions

Legend for links to other resources: U UniGene E GEO G Gene S Structure M Map Viewer

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
EU789400.1	Lactobacillus plantarum strain M01210 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2645	2645	100%	0.0	100%	
GU253891.1	Lactobacillus pentosus strain N3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2639	2639	100%	0.0	99%	
FJ763580.1	Lactobacillus plantarum strain lp-15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2639	2639	100%	0.0	99%	
FJ542304.1	Lactobacillus pentosus strain MH92 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2639	2639	100%	0.0	99%	
FJ542291.1	Lactobacillus plantarum strain MH19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2639	2639	100%	0.0	99%	
EU626013.1	Lactobacillus plantarum strain KLDS 1.0728 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2639	2639	100%	0.0	99%	
EU600909.1	Lactobacillus sp. KLDS 1.0705 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2639	2639	100%	0.0	99%	
EU600907.1	Lactobacillus sp. KLDS 1.0703 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2639	2639	100%	0.0	99%	
EU419597.1	Lactobacillus plantarum strain KLDS 1.0607 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2639	2639	100%	0.0	99%	
AB368909.1	Lactobacillus plantarum gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: T10-14	2638	2638	99%	0.0	99%	

3. ผลการเทียบเคียงลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ในแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท N23 กับลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ในฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST

Descriptions

Legend for links to other resources: U UniGene E GEO G Gene S Structure M Map Viewer

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
AB494716.1	Weissella cibaria gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: DH8	2649	2649	100%	0.0	99%	
EU600924.1	Weissella sp. KLDS 7.0701 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2649	2649	100%	0.0	99%	
GU138616.1	Weissella cibaria IMAU:10288 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2645	2645	99%	0.0	99%	
GU138615.1	Weissella cibaria IMAU:10287 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2645	2645	99%	0.0	99%	
GU138603.1	Weissella cibaria IMAU:10275 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2645	2645	99%	0.0	99%	
GU138580.1	Weissella cibaria IMAU:10252 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2645	2645	99%	0.0	99%	
GU138579.1	Weissella cibaria IMAU:10251 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2645	2645	99%	0.0	99%	
GU138554.1	Weissella cibaria IMAU:10226 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2645	2645	99%	0.0	99%	
GU138547.1	Weissella cibaria IMAU:10219 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2645	2645	99%	0.0	99%	
AB362617.1	Weissella cibaria gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NRIC 0136	2645	2645	99%	0.0	99%	

4. ผลการเทียบเคียงลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ในแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท 11 กับลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ในฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST

Descriptions

Legend for links to other resources: U UniGene E GEO G Gene S Structure M Map Viewer

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
GU451063.1	Lactobacillus fermentum strain 6-1-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2619	2619	100%	0.0	100%	
GU253892.1	Lactobacillus plantarum strain Bom 816 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2619	2619	100%	0.0	100%	
GU138605.1	Lactobacillus plantarum IMAU:10277 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2619	2619	100%	0.0	100%	
GU138604.1	Lactobacillus plantarum IMAU:10276 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2619	2619	100%	0.0	100%	
GU138601.1	Lactobacillus plantarum IMAU:10273 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2619	2619	100%	0.0	100%	
GU138595.1	Lactobacillus plantarum IMAU:10267 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2619	2619	100%	0.0	100%	
GU138586.1	Lactobacillus plantarum IMAU:10258 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2619	2619	100%	0.0	100%	
GU138551.1	Lactobacillus plantarum IMAU:10223 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2619	2619	100%	0.0	100%	
GU138549.1	Lactobacillus plantarum IMAU:10221 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2619	2619	100%	0.0	100%	
GU138545.1	Lactobacillus plantarum IMAU:10217 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2619	2619	100%	0.0	100%	

5. ผลการเทียบเคียงลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ในแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท 14 กับลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ในฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST

Descriptions

Legend for links to other resources: U UniGene E GEO G Gene S Structure M Map Viewer

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
GU451063.1	Lactobacillus fermentum strain 6-1-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2625	2625	100%	0.0	100%	
GU253892.1	Lactobacillus plantarum strain Bom 816 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2625	2625	100%	0.0	100%	
GU138605.1	Lactobacillus plantarum IMAU:10277 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2625	2625	100%	0.0	100%	
GU138604.1	Lactobacillus plantarum IMAU:10276 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2625	2625	100%	0.0	100%	
GU138601.1	Lactobacillus plantarum IMAU:10273 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2625	2625	100%	0.0	100%	
GU138595.1	Lactobacillus plantarum IMAU:10267 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2625	2625	100%	0.0	100%	
GU138586.1	Lactobacillus plantarum IMAU:10258 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2625	2625	100%	0.0	100%	
GU138551.1	Lactobacillus plantarum IMAU:10223 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2625	2625	100%	0.0	100%	
GU138549.1	Lactobacillus plantarum IMAU:10221 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2625	2625	100%	0.0	100%	
GU138545.1	Lactobacillus plantarum IMAU:10217 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2625	2625	100%	0.0	100%	

6. ผลการเทียบเคียงลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ในแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท 24 กับลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ในฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST

Descriptions

Legend for links to other resources: U UniGene E GEO G Gene S Structure M Map Viewer

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
FJ542291.1	Lactobacillus plantarum strain MH19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2634	2634	99%	0.0	100%	
HM051157.1	Lactobacillus sp. T23/3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2632	2632	99%	0.0	100%	
GU451063.1	Lactobacillus fermentum strain 6-1-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2632	2632	99%	0.0	100%	
GU253892.1	Lactobacillus plantarum strain Bom 816 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2632	2632	99%	0.0	100%	
GU138605.1	Lactobacillus plantarum IMAU:10277 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2632	2632	99%	0.0	100%	
GU138604.1	Lactobacillus plantarum IMAU:10276 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2632	2632	99%	0.0	100%	
GU138601.1	Lactobacillus plantarum IMAU:10273 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2632	2632	99%	0.0	100%	
GU138595.1	Lactobacillus plantarum IMAU:10267 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2632	2632	99%	0.0	100%	
GU138586.1	Lactobacillus plantarum IMAU:10258 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2632	2632	99%	0.0	100%	
GU138551.1	Lactobacillus plantarum IMAU:10223 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2632	2632	99%	0.0	100%	

7. ผลการเทียบเคียงลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ในแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท 26 กับลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ในฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST

Descriptions

Legend for links to other resources: U UniGene E GEO G Gene S Structure M Map Viewer

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
FJ542291.1	Lactobacillus plantarum strain MH19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2634	2634	99%	0.0	100%	
HM051157.1	Lactobacillus sp. T23/3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2632	2632	99%	0.0	100%	
GU451063.1	Lactobacillus fermentum strain 6-1-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2632	2632	99%	0.0	100%	
GU253892.1	Lactobacillus plantarum strain Bom 816 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2632	2632	99%	0.0	100%	
GU138605.1	Lactobacillus plantarum IMAU:10277 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2632	2632	99%	0.0	100%	
GU138604.1	Lactobacillus plantarum IMAU:10276 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2632	2632	99%	0.0	100%	
GU138601.1	Lactobacillus plantarum IMAU:10273 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2632	2632	99%	0.0	100%	
GU138595.1	Lactobacillus plantarum IMAU:10267 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2632	2632	99%	0.0	100%	
GU138586.1	Lactobacillus plantarum IMAU:10258 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2632	2632	99%	0.0	100%	
GU138551.1	Lactobacillus plantarum IMAU:10223 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2632	2632	99%	0.0	100%	

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ – ชื่อสกุล	นางสาวนฤมล ทองงาม
วันเดือนปีเกิด	22 ตุลาคม 2527
สถานที่เกิด	สุพรรณบุรี
ที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 448 ม. 2 ต.หนองสาหร่าย อ.ดอนเจดีย์
	จ.สุพรรณบุรี 72170
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2546	ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย
	จากโรงเรียนบรรหารแจ่มใสวิทยา 1
พ.ศ. 2550	วท.บ. (ชีววิทยาประยุกต์)
	จากมหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม
พ.ศ. 2553	กศ.ม. (ชีววิทยา)
	จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ