



การทำบริสุทธิ์และการศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียโอซินที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ
STREPTOCOCCUS SUIS ที่ผลิตจาก *LACTIPLANTIBACILLUS*
PLANTARUM RB01-SO และการนำไปประยุกต์ใช้ในลาบหมูดิบ



วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
วิทยาลัยนวัตกรรมการเกษตรและเทคโนโลยีอาหาร

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยรังสิต
ปีการศึกษา 2566



**PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF ANTI-*STREPTOCOCCUS*
SUIS BACTERIOCIN PRODUCED BY *LACTIPLANTIBACILLUS*
PLANTARUM RB01-SO AND ITS APPLICATION IN THAI
SPICY MINCED RAW PORK (LARB-MOO-DIB)**

BY

KITTIYA SHOWPANISH

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENTS FOR

THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY

COLLEGE OF AGRICULTURAL INNOVATION AND FOOD

GRADUATE SCHOOL, RANGSIT UNIVERSITY

ACADEMIC YEAR 2023

วิทยานิพนธ์เรื่อง

การทำบริสุทธิ์และการศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียโอซินที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ

STREPTOCOCCUS SUI ที่ผลิตจาก *LACTIPLANTIBACILLUS*

PLANTARUM RB01-SO และการนำไปประยุกต์ใช้ในลาบหมูดิบ

โดย

กิตติยา ไชว์พานิช

ได้รับการพิจารณาให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยรังสิต

ปีการศึกษา 2566

ดร.วรรณพ วิเศษสงวน
ประธานกรรมการสอบ

ดร.หทัยรัตน์ อุไรรงค์
กรรมการ

ดร.กฤตพร รำจวนเกียรติ
กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา

ดร.วีระพงษ์ วรประโชชน์
กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว

(ผศ. ร.ต. หญิง ดร. วรรณิ์ สุขสาตร)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

31 สิงหาคม 2566

Thesis entitled

**PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF ANTI-*STREPTOCOCCUS*
SUIS BACTERIOCIN PRODUCED BY *LACTIPLANTIBACILLUS*
PLANTARUM RB01-SO AND ITS APPLICATION IN THAI
SPICY MINCED RAW PORK (LARB-MOO-DIB)**

by

KITTIYA SHOWPANISH

was submitted in partial fulfillment of the requirements
for the degree of Master of Science in Biotechnology

Rangsit University
Academic Year 2023

Wonnop Visessanguan, Ph.D.
Examination Committee Chairperson

Hathairat Urairong, Ph.D.
Member

Kittaporn Rumjuankiat, Ph.D.
Member and Advisor

Weerapong Woraprayote, Ph.D.
Member and Co-Advisor

Approved by Graduate School

(Asst.Prof.Plt.Off. Vannee Sooksatra, D.Eng.)

Dean of Graduate School

August 31, 2023

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ประสบความสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีโดยได้รับความกรุณาจาก ดร.กฤตพร รำจวนเกียรติ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ดร.วิระพงษ์ วรประโยชน์ นักวิจัยและอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้ความอนุเคราะห์ช่วยเหลือให้คำปรึกษา ด้วยความทุ่มเทและความเอาใจใส่อย่างดีมาโดยตลอด รวมถึงตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความถูกต้องสมบูรณ์ ผู้วิจัยจึงขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ ดร.วรรณพ วิเศษสงวน ผู้อำนวยการศูนย์พันธุ์พืชวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ และประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ดร.หทัยรัตน์ อุไรรงค์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้แนวคิด คำแนะนำ และข้อเสนอแนะ อันมีส่วนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ดร.สุกัญญา ขงเกียรติตระกูล นักวิจัยประจำศูนย์พันธุ์พืชวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ที่ได้ความอนุเคราะห์เชื้อ *Streptococcus suis* คุณจินทิมา จเรสิทธิกุลชัย และคุณจิตพร จรรยาภิรักษ์ รวมถึงนักวิจัยทุก ๆ ท่าน ที่ให้ความอนุเคราะห์ช่วยเหลือในการใช้สารเคมี อุปกรณ์ สถานที่ ให้ความรู้ ข้อมูล และคำแนะนำ รวมถึงการติดตามดูแลด้วยความเอาใจใส่เป็นอย่างดี

วิทยานิพนธ์นี้ ผู้วิจัยได้รับทุนต้นกล้าไบโอเทคซึ่งเป็นทุนการศึกษาเต็มจำนวน จากหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยรังสิต

อนึ่ง ผู้วิจัยหวังว่า งานวิจัยฉบับนี้จะมีประโยชน์อยู่ไม่น้อย จึงขอมอบส่วนดีทั้งหมดนี้ให้แก่เหล่าคณาจารย์ ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาจนทำให้ผลงานวิจัยบรรลุผลสำเร็จและขอมอบความกตัญญูตเวทิตาคุณ แด่บิดา มารดา และผู้มีพระคุณทุกท่าน สำหรับข้อบกพร่องต่าง ๆ ที่อาจจะเกิดขึ้นนั้น ผู้วิจัยต้องขออภัยมา ณ ที่นี้ และขออนุญาตรับความผิดไว้แต่เพียงผู้เดียว รวมถึงยินดีที่จะรับฟังคำแนะนำจากทุกท่านที่ได้เข้ามาศึกษา เพื่อเป็นประโยชน์ในการพัฒนางานวิจัยต่อไป

กิตติยา โสวัพานิช

ผู้วิจัย

6204940 : กิตติยา โชว์พานิช
ชื่อวิทยานิพนธ์ : การทำบริสุทธิ์และการศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียโอซินที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Streptococcus suis* ที่ผลิตจาก *Lactiplantibacillus plantarum* RB01-SO และการนำไปประยุกต์ใช้ในลาบหมูดิบ
หลักสูตร : หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา : ดร.กฤตพร รำจวนเกียรติ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : ดร.วีระพงษ์ วรรณประโยชน์

บทคัดย่อ

แบคทีเรียกรดแลคติกโอโซเลท RB01-SO ซึ่งคัดแยกได้จากต้นหอมแดงสามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อ *Streptococcus suis* อันเป็นสาเหตุก่อให้โรคที่สำคัญต่อหมูและผู้บริโภค เมื่อจำแนกสายพันธุ์ของโอโซเลท RB01-SO ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS พบว่า เป็นแบคทีเรียชนิด *Lactiplantibacillus plantarum* โดยสามารถผลิตแบคทีเรียโอซินที่มีค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *S. suis* P1/7 ได้สูงสุดเท่ากับ 400 AU/mL เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่เติม NaCl ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยมวลต่อปริมาตร (pH 7) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง จากนั้นนำแบคทีเรียโอซินมาทำบริสุทธิ์ผ่าน 3 ขั้นตอน ได้แก่ การตกตะกอนด้วย Ammonium Sulfate ความเข้มข้นร้อยละ 20 และ 75 โดยมวลต่อปริมาตร การทำบริสุทธิ์ด้วยวิธี Cation-Exchange Chromatography และ RP-HPLC จากการทดลองพบว่า มีแบคทีเรียโอซินจำนวน 2 เปปไทด์ ได้แก่ RB01-SOA และ RB01-SOB ซึ่งมีความเหมือนกับ Plantaricin Wα และ Plantaricin Wβ (มวลโมเลกุลเท่ากับ 3,222 และ 3,098 ดาลตัน ตามลำดับ) แบคทีเรียโอซินทั้งสองชนิดนี้ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน แต่มีความเสถียรต่อตัวทำละลายอินทรีย์และสารลดแรงตึงผิว สามารถคงทนได้ที่ค่า pH 2-12 และอุณหภูมิ 80, 100, 121 องศาเซลเซียส แบคทีเรียโอซิน RB01-SOA และ RB01-SOB สามารถยับยั้งได้ทั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ และมีการออกฤทธิ์แบบเสริมฤทธิ์กัน โดยมีกลไกการยับยั้งเชื้อ *S. suis* P1/7 แบบ Bactericidal เมื่อทดลองโดยเติมผงแบคทีเรียโอซินหยาบความเข้มข้น 372,192 AU/ลาบหมูดิบ 300 กรัม สามารถลดปริมาณเชื้อ *S. suis* P1/7 ในลาบหมูลงเหลือ 2.0 log CFU/g ภายในเวลา 120 นาที ในขณะที่การเติมผงแบคทีเรียโอซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์เบื้องต้นความเข้มข้น 1,188,642 AU/ลาบหมูดิบ 300 กรัมสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. suis* P1/7 ในเลือดหมู เนื้อหมู และลาบหมูดิบจนต่ำกว่าขีดจำกัดของการวิเคราะห์ภายในระยะเวลา 40, 60 และ 60 นาที ตามลำดับ

(วิทยานิพนธ์มีจำนวนทั้งสิ้น 135 หน้า)

คำสำคัญ: แบคทีเรียกรดแลคติก, แบคทีเรียโอซิน, การทำบริสุทธิ์, *Streptococcus suis*, ลาบหมูดิบ

ลายมือชื่อนักศึกษาลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

6204940 : Kittiya Showpanish
 Thesis Title : Purification and Characterization of Anti-*Streptococcus suis* Bacteriocin
 Produced by *Lactiplantibacillus plantarum* RB01-SO and its Application
 in Thai Spicy Minced Raw Pork (Larb-Moo-Dib)
 Program : Master of Science in Biotechnology
 Thesis Advisor : Kittaporn Rumjuankiat, Ph.D.
 Thesis Co-Advisor : Weerapong Woraprayote, Ph.D.

Abstract

Lactic acid bacteria RB01-SO, isolated from spring onion (Ton-Hom-Dong), produced antibacterial activity against *Streptococcus suis* which was an important foodborne pathogen causing serious disease in swine and consumers. The isolate RB01-SO was identified as *Lactiplantibacillus plantarum* by using MALDI-TOF MS analysis. *L. plantarum* RB01-SO could produce the highest anti-*S. suis* P1/7 activity about 400 AU/mL when cultured in MRS broth contained with 1% (w/v) NaCl (pH 7) and incubated at 30°C for 12 h. The bacteriocin was purified by a three-step purification procedure including 20 and 75% (w/v) ammonium sulfate precipitation, cation-exchange chromatography, and RP-HPLC. Two bacteriocins of RB01-SOA and RB01-SOB were similar with Plantaricin W α and Plantaricin W β (molecular masses of 3,222 and 3,098 Da, respectively). Both bacteriocins were completely destroyed by proteolytic enzymes, but they were stable in organic solvents and surfactants. Moreover, bacteriocins RB01-SOA and RB01-SOB were stable at pH 2-12 and at 80°C, 100°C, 121°C, and room temperatures. These bacteriocins showed broad inhibitory activities against Gram-positive and Gram-negative bacteria. Additionally, the bacteriocins exhibited synergistic activity with the bactericidal inhibition mechanism of *S. suis* P1/7. However, the addition of crude bacteriocin powder at the concentration of 372,192 AU/300 g Larb-Moo-Dib was able to reduce the viability of *S. suis* P1/7 in Thai Spicy Minced Raw Pork (Larb-Moo-Dib) to 2.0 log CFU/g within 120 minutes, whereas the partial purified bacteriocin powder, 1,188,642 AU/300 g Larb-Moo-Dib, could reduce the viability of *S. suis* P1/7 bacteria in pork blood, pork meat, and Thai Spicy Minced Raw Pork to under the detection limit within 40, 60, and 60 min, respectively.

(Total 135 pages)

Keywords: Lactic acid bacteria, Bacteriocin, Purification, *Streptococcus suis*, Thai Spicy Minced Raw Pork

Student's Signature Thesis Advisor's Signature

Thesis Co-Advisor's Signature

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
สัญลักษณ์และคำย่อ	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย	2
บทที่ 2 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 แบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic Acid Bacteria)	3
2.2 การสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของแบคทีเรียกรดแลคติก	5
2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ของแบคทีเรียกรดแลคติก	7
2.4 แบคทีเรียโอซิน	8
2.5 การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างแบคทีเรียโอซิน	14
2.6 การทำบริสุทธิ์แบคทีเรียโอซิน	20
2.7 การวิเคราะห์มวลโมเลกุลของแบคทีเรียโอซิน	26
2.8 การใช้แบคทีเรียโอซินในอาหาร	27
2.9 <i>Streptococcus suis</i>	28
2.10 อาหารที่ปรุงจากเนื้อหมูสด	32
บทที่ 3 ระเบียบวิธีการวิจัย	34
3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ	34

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์	35
3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	37
3.4 วิธีการทดลอง	39
บทที่ 4 ผลการวิจัย	54
4.1 ผลการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตแบคทีเรียโอซิน	54
4.2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรียกรดแลคติก	58
4.3 ผลการทำบริสุทธิ์แบคทีเรียโอซิน	65
4.4 ผลการศึกษาประสิทธิภาพการใช้แบคทีเรียโอซินยับยั้งและ พังแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์บางส่วนในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>S. suis</i>	80
บทที่ 5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ	89
5.1 สรุปผลการวิจัย	89
5.2 ข้อเสนอแนะ	90
บรรณานุกรม	92
ภาคผนวก	124
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	125
ภาคผนวก ข การทดสอบย่อยที่เกี่ยวข้อง	129
ภาคผนวก ค การเตรียมลาบหมูดิบ	133
ประวัติผู้วิจัย	135

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1	แบคทีเรียกรดแลกติกที่ผลิตแบคทีเรียโอซินที่คัดแยกได้จากแหล่งต่าง ๆ กัน
2.2	ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์แบคทีเรียโอซินที่สร้างจากเชื้อ <i>L. plantarum</i>
3.1	ตารางแสดงแบคทีเรียเป้าหมายที่ใช้ทดสอบ
4.1	แหล่งที่มาและจำนวนของแบคทีเรียกรดแลกติกที่ผลิตสารยับยั้ง ที่คัดแยกได้
4.2	ความสามารถในการผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียของแบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดแยกได้
4.3	ผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่อฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย
4.4	ผลของการจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลกติกด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS
4.5	ผลของชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการสร้างแบคทีเรียโอซิน
4.6	ผลของ pH และความเข้มข้นของ NaCl ของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตแบคทีเรียโอซิน
4.7	ตารางแสดงการเปรียบเทียบร้อยละของผลผลิตที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ในแต่ละขั้นตอน
4.8	ผลการทำบริสุทธิ์แบคทีเรียโอซิน ที่ผลิตจากเชื้อ <i>L. plantarum</i> RB01-SO
4.9	ผลการทดสอบความไวของแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์ต่อเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน
4.10	ผลความคงทนของแบคทีเรียโอซินต่อตัวทำละลายอินทรีย์และสารลดแรงตึงผิว
4.11	ผลการทดสอบความคงทนของแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์ต่อ pH และความร้อน
4.12	ผลการวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของแบคทีเรียของแบคทีเรียโอซิน RB01-SOA และ RB01-SOB ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเป้าหมาย
4.13	ตารางแสดงผลการศึกษาการเสริมฤทธิ์ของแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1	ภาพแสดงกลไกการออกฤทธิ์ของแบคทีเรียโอซินต่อเซลล์แบคทีเรียแกรมบวก
2.2	ภาพแสดงกลไกการออกฤทธิ์ของแบคทีเรียโอซินต่อเซลล์แบคทีเรียแกรมลบ
4.1	ผลของอุณหภูมิและเวลาต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>L. plantarum</i> RB01-SO และการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>S. suis</i> P1/7
4.2	การทำบริสุทธิ์แบคทีเรียโอซิน ด้วยวิธี Reversed Phase-HPLC
4.3	การทำบริสุทธิ์แบคทีเรียโอซินซ้ำด้วยวิธี Reversed Phase-HPLC ของแบคทีเรียโอซิน A (ก) และแบคทีเรียโอซิน B (ข) ของแบคทีเรียโอซิน RB01-SO
4.4	มวลโมเลกุลของแบคทีเรียโอซิน RB01-SOA (ก) และแบคทีเรียโอซิน RB01-SOB (ข) ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS
4.5	กลไกการออกฤทธิ์ของแบคทีเรียโอซิน RB01-SOA (ก) และ RB01-SOB (ข)
4.6	ผลการออกฤทธิ์ของผงแบคทีเรียโอซินหยาบ ต่อปริมาณเชื้อ <i>S. suis</i> P1/7 ในหลอดทดลอง
4.7	ผลการออกฤทธิ์ของผงแบคทีเรียโอซินหยาบ ต่อปริมาณเชื้อ <i>S. suis</i> P1/7 ในลาบหนูคิบ
4.8	ผลการออกฤทธิ์ของผงแบคทีเรียโอซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน ต่อปริมาณเชื้อ <i>S. suis</i> P1/7 ในหลอดทดลอง
4.9	ผลการออกฤทธิ์ของผงแบคทีเรียโอซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน ต่อปริมาณเชื้อ <i>S. suis</i> P1/7 ในเนื้อหมูคิบ
4.10	ผลการออกฤทธิ์ของผงแบคทีเรียโอซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน ต่อปริมาณเชื้อ <i>S. suis</i> P1/7 ในเลือดหมูคิบ
4.11	ผลการออกฤทธิ์ของผงแบคทีเรียโอซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน ต่อปริมาณเชื้อ <i>S. suis</i> P1/7 ในลาบหมูคิบ

สัญลักษณ์และคำย่อ

สัญลักษณ์	ความหมาย
AU	Arbitrary Unit หรือหน่วยของค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อ
CFS	Cell Free Supernatant หรือส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ภายหลังการกำจัดเซลล์ของแบคทีเรียออก
CFU	Colony Forming Unit
FICI	Fractional Inhibitory Concentration Index
g	กรัม
h	ชั่วโมง
mg	มิลลิกรัม
MIC	Minimum Inhibitory Concentration หรือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถ ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย
min	นาที
mL	มิลลิลิตร
MPN	Most Probable Number
OD	Optical Density หรือค่าการดูดกลืนแสง
pH	ค่าความเป็นกรดหรือด่างของสารละลาย
RP-HPLC	Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

โรคไขหูดับหรือโรคติดเชื้อสแตฟิโลค็อกคัส ซูอิส เป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus suis* โดยเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้โดยปกติจะพบอยู่ในระบบทางเดินหายใจของหมูและจะก่อโรคต่อหมูเมื่อภูมิคุ้มกันของหมูลดต่ำลง กล่าวคือเมื่อหมูอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่แออัด เครียด และร่างกายอ่อนแอ และจะสามารถแพร่เชื้อไปสู่หมูตัวอื่นในโรงเลี้ยงเดียวกันได้ รวมถึงสามารถแพร่เชื้อจากหมูสู่คนได้ โดยเมื่อผู้ป่วยได้รับเชื้อนี้แล้วจะมีอาการปวดศีรษะ ปวดเมื่อยตามตัว ไข้สูง บางรายอาจติดเชื้อในกระแสเลือด และอาจรุนแรงถึงขั้นเสียชีวิต ในกรณีบางรายที่รอดชีวิต ส่วนใหญ่มักพบความผิดปกติตามมาในภายหลัง เช่น กล้ามเนื้ออ่อนแรง สูญเสียการทรงตัว รวมถึงสูญเสียการได้ยินจนถึงขั้นหูหนวกถาวร โดยการติดเชื้อสแตฟิโลค็อกคัส ซูอิส ในคนนั้นมักมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อผ่านทางบาดแผล ทางเยื่อตา และการสัมผัสใกล้ชิดกับหมูที่ติดโรค เช่น คนงานที่ทำงานในโรงเลี้ยง โรงฆ่า และคนขายเนื้อหมู รวมถึงการบริโภคเนื้อหรือผลิตภัณฑ์จากเนื้อหมูที่ไม่ผ่านการปรุงสุก ซึ่งการติดเชื้อที่เกิดจากการบริโภคเนื้อถือเป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรคติดเชื้อสแตฟิโลค็อกคัส ซูอิส โดยเฉพาะในประเทศไทยที่มีวัฒนธรรมการบริโภคเนื้อและเลือดหมูดิบ หรือกึ่งสุกกึ่งดิบ เช่น การบริโภคหู้ ก้อย ลาบหมูดิบ รวมไปถึงหมูกระทะ ในระยะ 10 ปีที่ผ่านมา ประเทศไทยพบอัตราการติดเชื้อสแตฟิโลค็อกคัส ซูอิส สูงมากถึงประมาณ 200-350 คนต่อปี มีอัตราการเสียชีวิตสูงถึงประมาณร้อยละ 5-10 และอัตราการติดเชื้อนี้ยังไม่มีแนวโน้มที่จะลดลง

จากสถานการณ์การปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่เกิดขึ้น ถึงแม้จะมีความพยายามและป้องกันไม่ให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อ ทั้งการจัดการด้านสุขาภิบาล การผลิต การขนส่ง และการจัดจำหน่าย รวมถึงการใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อป้องกันและลดการแพร่กระจายโรค ก็ยังไม่เป็นผล ช้ำยังก่อให้เกิดปัญหาร้ายแรงตามมาในอนาคต เช่น การดื้อต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ ทำให้ทางเลือกในการใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อรักษาน้อยลง เนื่องจากยาที่เคยใช้อยู่ประสิทธิภาพในการรักษาลดลงหรือไม่สามารถใช้รักษาต่อไปได้ รวมถึงเกิดการดื้อยาของยาปฏิชีวนะในเนื้อหมู โดยความปลอดภัยในอาหารถือเป็นเรื่องที่สำคัญ เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว การใช้สารที่ผลิตจากจุลินทรีย์เพื่อยับยั้ง

เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคถือเป็นวิธีการหนึ่งที่มีความสนใจเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียโอซิน ซึ่งเป็นสารที่ผลิตได้จากแบคทีเรียกรดแลคติก เนื่องจากมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับยาปฏิชีวนะ แต่มีความปลอดภัยมากกว่า โดยได้รับการยอมรับจากทั่วโลกว่ามีความปลอดภัย (Generally Recognized as Safe; GRAS) ไม่เป็นอันตรายต่อร่างกาย เนื่องจากสามารถถูกย่อยด้วยน้ำย่อยในระบบทางเดินอาหารได้ อีกทั้งยังมีคุณสมบัติออกฤทธิ์ทำลายเฉพาะเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดเท่านั้น ไม่ได้ออกฤทธิ์ทำลายทุกชนิด ส่งผลทำให้จุลินทรีย์ชนิดดียังคงรอดชีวิต ในระบบทางเดินอาหาร

จากคุณสมบัติดังกล่าวทำให้เกิดแนวคิดในการนำสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตได้จากแบคทีเรียกรดแลคติก มาใช้ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารประเภทลาบที่ปรุงจากเนื้อหมูดิบในรูปแบบผงคลุกลาบ เพื่อช่วยลดอันตรายที่อาจเกิดขึ้นจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์และพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ผงคลุกลาบในอนาคตต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์งานวิจัย

1.2.1 เพื่อคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตสารแบคทีเรียโอซินจากผักดองพื้นบ้านของไทย

1.2.2 เพื่อศึกษาหาสูตรอาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ *Lactiplantibacillus plantarum* RB01-SO

1.2.3 เพื่อทำบริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *Lactiplantibacillus plantarum* RB01-SO

1.2.4 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการใช้แบคทีเรียโอซินในรูปแบบผงคลุกลาบและการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Streptococcus suis* ในลาบหมูดิบ

บทที่ 2

ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

2.1 แบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic Acid Bacteria)

แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีรูปร่างเป็นท่อน (Rod Shape) หรือเป็นทรงกลม (Cocci Shape) ไม่สร้างสปอร์ (Non-Spore Forming) ไม่เคลื่อนที่ (Non-Motile) ไม่สร้างเอนไซม์คะตาเลส (Catalase Negative) ทนต่อสภาวะที่เป็นกรด สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย (Microaerophile) หรือบางสายพันธุ์สามารถเจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (Strictly Anaerobe) (Ringø et al., 2018) ต้องการธาตุอาหารที่ซับซ้อนและเหมาะสมต่อการเจริญเติบโต โดยมีคาร์โบไฮเดรตซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานหลัก ร่วมกับกรดอะมิโน แร่ธาตุ วิตามิน และสารอนินทรีย์หลายชนิด (Saeed & Salam, 2013) รวมถึงสามารถผลิตกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก หลังจากกระบวนการหมักน้ำตาล (Reis, Paula, Casarotti, & Penna, 2012) โดยสามารถจำแนกแบคทีเรียที่สร้างกรดได้เป็น 2 กลุ่ม ตามผลิตภัณฑ์ที่สร้างขึ้นระหว่างกระบวนการหมัก ได้แก่ กลุ่ม Homofermentative และกลุ่ม Heterofermentative โดยในกลุ่มแรกแบคทีเรียกรดแลคติกจะสร้างผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการหมักและย่อยน้ำตาล ได้เป็นกรดแลคติกร้อยละ 95 กรดอะซิติก (Acetic Acid) ร้อยละ 5 และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (Carbon Dioxide) อีกเล็กน้อย ส่วนกลุ่มที่สองนั้น แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถผลิตกรดแลคติกได้ร้อยละ 50 จากกระบวนการย่อยน้ำตาล ส่วนที่เหลือจะเปลี่ยนไปเป็นกรดอะซิติก กรดฟอร์มิก (Formic Acid) เอทานอล (Ethanol) และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (Pessione, 2012)

แบคทีเรียกรดแลคติก จัดอยู่ใน Phylum *Firmicutes* จัดอยู่ใน Class *Bacilli* และ Order *Latobacillales* โดยแบ่งออกเป็น 6 วงศ์ 38 จีนัส โดยจีนัสของแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบโดยทั่วไป ได้แก่ *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactosphaera*, *Melissococcus*, *Microbacterium*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* และ *Weissella* (Agriopoulou, Stamatelopoulou, Sachadyn-Król, & Varzakas, 2020; Djadouni & Kihal, 2012; Singh, 2018) จากรายงานของ Agriopoulou et al. (2020) พบว่าจีนัส *Lactobacillus* เป็นแบคทีเรีย

กรดแลคติกที่พบมากที่สุด จำนวน 261 สปีชีส์ (สำรวจเมื่อเดือนมีนาคม พ.ศ. 2563) ต่อมา *Lactobacillus* ได้รับการจัดกลุ่มใหม่ (Reclassification) โดยแบ่งออกเป็น 25 จินัส ได้แก่ กลุ่ม *Lactobacillus delbrueckii*, *Paralactobacillus* และอีก 23 จินัส ใหม่ ได้แก่ *Acetilactobacillus*, *Agrilactobacillus*, *Amylolactobacillus*, *Apilactobacillus*, *Bombilactobacillus*, *Companilactobacillus*, *Dellaglioia*, *Fructilactobacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Holzapfelia*, *Lacticaseibacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Latilactobacillus*, *Lentilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Liquorilactobacillus*, *Loigolactobacillus*, *Paucilactobacillus*, *Schleiferilactobacillus* และ *Secundilactobacillus* (Zheng et al., 2020)

แบคทีเรียกรดแลคติกพบได้โดยทั่วไปทั้งในผลิตภัณฑ์นม เนื้อสัตว์ ผัก และผลไม้ นอกจากนี้ยังสามารถพบได้ในเยื่อเมือกของระบบทางเดินหายใจ ลำไส้ และส่วนต่างๆ ของร่างกายของมนุษย์และสัตว์ รวมไปถึงในพืชน้ำเสีย ดิน หรือมูลสัตว์ (Liu, Pang, Zhang, & Cai, 2014) ปัจจุบันแบคทีเรียกรดแลคติกถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่อาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์ ช่วยเพิ่มกลิ่นรสเฉพาะตัวของผลิตภัณฑ์นั้น ๆ รวมถึงช่วยเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ และยังได้รับการยอมรับว่ามีความปลอดภัยต่อการบริโภค (Kheadr et al., 2010; Silva, C., Silva, S., & Ribeiro, 2018) ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ใช้แบคทีเรียกรดแลคติกในการหมัก ได้แก่ ผลิตภัณฑ์นม เช่น นมเปรี้ยว โยเกิร์ต และชีส โดยสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกที่นิยมใช้ในการผลิต ได้แก่ *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* และ *Streptococcus* (Leroy & De Vuyst, 2004; Settanni & Moschetti, 2010; Teshome, 2015; Zamfir et al., 2006) ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ เช่น แฮม ซาลามิ และไส้กรอก มักใช้สายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติก ได้แก่ *Lactobacillus* และ *Pediococcus* (Ammor & Mayo, 2007; Mogensen et al., 2002; Talon & Leroy, 2011) ส่วนกลุ่มของผลิตภัณฑ์ปลาหมัก อาทิ ปลาซึ่ม น้ำปลา มักนิยมใช้สายพันธุ์ *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus* และ *Staphylococcus* (Han et al., 2020; Kuda et al., 2012; Saithong, Panthavee, Boonyaratanakornkit, & Sikkhamondhol, 2010; Wakinaka et al., 2019) และผลิตภัณฑ์ในกลุ่มผักดองเปรี้ยว เช่น กิมจิ นิยมใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, และ *Weissella* เป็นต้น (Di Cagno, Coda, De Angelis, & Gobbetti, 2013; Lee et al., 2020)

2.2 การสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของแบคทีเรียกรดแลกติก

แบคทีเรียกรดแลกติกสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารได้หลายชนิด ด้วยเหตุนี้แบคทีเรียกรดแลกติกจึงมีบทบาทสำคัญในด้านการถนอมอาหารและการเพิ่มความปลอดภัยในอาหาร (Guimaraes, Abrunhosa, Pastrana, & Cerqueira, 2018) โดยสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่แบคทีเรียกรดแลกติกผลิตขึ้น ได้แก่

2.2.1 กรดอินทรีย์ (Organic Acid)

แบคทีเรียกรดแลกติกจะเจริญและสร้างกรดอินทรีย์ ที่เป็นสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (Secondary Metabolites) ได้หลายชนิด ได้แก่ กรดอะซิติก กรดแลกติก กรดซิตริก (Citric Acid) กรดซักซินิก (Succinic Acid) และกรดโพรพิโอนิก (Propionic Acid) เป็นต้น (Bangar, Suri, Trif, & Ozogul, 2022; Rattanachaikunsopon & Phumkhachorn, 2010) ซึ่งจะส่งผลทำให้ค่า pH ของซับสเตรด (Substrate) ลดต่ำลง ทั้งนี้เนื่องจากกรดอินทรีย์เป็นกรดอ่อนเมื่อแพร่เข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ จุลินทรีย์แล้วจะแตกตัวปล่อยโปรตอน (Proton) เข้าไปในไซโทพลาสซึม (Cytoplasm) แล้วจะทำให้ภายในเซลล์มีสภาพเป็นกรด จึงมีผลไปยับยั้งกระบวนการเมตาบอลิซึม (Metabolism) ที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์และมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์นั้น ๆ ได้ (Hauser, Thielmann, & Muranyi, 2016)

2.2.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen Peroxide)

แบคทีเรียกรดแลกติกสามารถสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ในสภาวะที่มีออกซิเจน เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลกติกจะไม่สร้างเอนไซม์คะตาเลส โดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์นี้เป็นพิษต่อจุลินทรีย์ ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นในการเกิดซูเปอร์ออกไซด์แรดิคัล (Superoxide Radicals; O_2^-) และไฮดรอกซิลแรดิคัล (Hydroxyl Radicals; $OH^\cdot$) ที่เป็นพิษต่อเซลล์ของจุลินทรีย์ (Byczkowski & Gessner, 1988; Imlay, 2019) ดังนั้นเมื่อมีปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สะสมเป็นจำนวนมากและจุลินทรีย์นั้นไม่สามารถผลิตเอนไซม์คะตาเลสมาทำลายได้ ก็จะส่งผลให้เซลล์ของจุลินทรีย์ถูกทำลายในที่สุด (Virtanen, Pihlanto, Akkanen, & Korhonen, 2007) จากรายงานของ Dike and Sanni (2010) พบว่า ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ผลิตจากเชื้อ *Lactobacillus casei* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus niger* ในอาเกิดิ (Agidi) ซึ่งเป็นอาหาร

หมักจากธัญพืชของชาวแอฟริกัน นอกจากนี้ยังพบว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่แบคทีเรียกรดแลคติกสังเคราะห์ขึ้น สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียของอาหารระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำได้ ได้แก่ *Alcaligenes*, *Shewanella*, *Brochotrix*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* และ *Pseudomonas* ได้อีกด้วย (Abbas, Luo, Zhu, Zou, & Tang, 2010; Ito et al., 2003)

2.2.3 คาร์บอนไดออกไซด์

คาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลิตภัณฑ์หลักที่เกิดจากกระบวนการหมักของแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกในกลุ่ม Heterofermentative โดยคาร์บอนไดออกไซด์จะเข้าไปแทนที่โมเลกุลของออกซิเจนทำให้เกิดสภาวะไร้อากาศ อันส่งผลทำให้ค่า pH ทั้งภายในและภายนอกเซลล์ของจุลินทรีย์ลดลง นอกจากนี้คาร์บอนไดออกไซด์ยังสามารถทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนและไขมันบนเยื่อหุ้มเซลล์ รวมถึงยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ อันมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์หลายชนิดที่ทำให้อาหารเน่าเสียได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวกที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ (Sharma, Modi, & Saxena, 2014; Szutowaska, 2020)

2.2.4 ไดอะซีทิล (Diacetyl)

ไดอะซีทิลหรือ 2,3-Butanediol เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึม โดยสังเคราะห์ขึ้นจากการเปลี่ยนไพรูเวต (Pyruvate; $\text{CH}_3\text{COCOO}^-$) ไปเป็นไดอะซีทิล ในวัฏจักรเครบส์ (Krebs Cycle) ของแบคทีเรียกรดแลคติกบางสปีชีส์ ได้แก่ *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* และ *Streptococcus* (Gupta, C., Prakash, & Gupta, S., 2015) โดยไดอะซีทิลจะเข้าไปทำปฏิกิริยากับหมู่อาร์จินีน (Arginine; Arg) ส่งผลรบกวนการใช้อาร์จินีนของเซลล์แบคทีเรียแกรมลบ อันเป็นผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย จากรายงานของ da Silva Ferrari et al. (2016) พบว่า ปริมาณไดอะซีทิลที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลในการยับยั้งยีสต์และแบคทีเรียแกรมลบ โดยนิยมนำไดอะซีทิลไปใช้ประโยชน์ในแง่ของการใช้เป็นสารทำความสะอาดภาชนะหรือเครื่องมือต่าง ๆ ในอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากสามารถระเหยได้เร็ว (Olaoye & Ntuen, 2011)

2.2.5 ริวเทอร์ริน (Reuterin)

แบคทีเรียกรดแลคติกจะผลิตริวเทอร์รินขึ้นในระยะ Stationary Phase ของการเจริญเติบโต โดยริวเทอร์รินจะไปยับยั้งกิจกรรมไรโบนิวคลีโอไทด์รีดักเตส (Ribonucleotide Reductase) ส่งผลให้ไม่เกิดการจับกันของเอนไซม์กับสารตั้งต้น อันเป็นผลให้เชื้อจุลินทรีย์ไม่สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้ โดยริวเทอร์รินสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ รวมทั้งยังสามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์ รา และโปรโตซัวได้อีกด้วย (da Silva Ferrari et al., 2016)

2.2.6 แบคเทอริโอซิน

แบคเทอริโอซินเป็นสารที่มีโครงสร้างเป็นโพรตีน หรือโพลีเปปไทด์ (Polypeptides) ถูกสังเคราะห์จากไรโบโซมระหว่างการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอื่นที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกันกับสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซิน (Zacharof & Lovitt, 2012) นอกจากนี้แบคเทอริโอซินยังมีความสามารถในการทนความร้อนและสามารถทำงานได้ในช่วง pH ที่กว้างกว่ายาปฏิชีวนะ (Linares et al., 2017) ออกฤทธิ์จำเพาะกับเชื้อเป้าหมาย และมีความปลอดภัยมากกว่า เนื่องจากสามารถถูกทำลายด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน (Proteolytic Enzymes) อย่างไรก็ตามปัจจุบันแบคเทอริโอซินที่อนุญาตให้นำไปใช้ในอาหารและนำไปใช้ทางการค้า มีเพียง Nisin ที่สร้างจากเชื้อ *Lactococcus lactis* ซึ่งจำหน่ายภายใต้ชื่อ Nisaplin™ และ Pediocin PA-1 ที่สร้างจากเชื้อ *Pediococcus acidilactici* ที่จำหน่ายโดยใช้ชื่อ Alta 2341® (Papagianni & Anastasiadou, 2009; Perez, R., Perez, M., & Elegado, 2015) ทั้งนี้ในอนาคตอาจมีการพิจารณาอนุญาตให้นำ Enterocin AS-48 หรือ Lacticin 3147 มาใช้ในอาหารได้ (Alvarez-Sieiro, Montalbán-Lopez, & Kuipers, 2016; Sánchez-Hidalgo et al., 2011; Srinivas, Paul, Colin, & Ross, 2012)

2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ของแบคทีเรียกรดแลคติก

ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะแวดล้อมการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกมีความสำคัญต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน จากการศึกษาพบว่าแบคเทอริโอซินเป็นสารประกอบโพรตีนที่แบคทีเรียสร้างขึ้น โดยอาจมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามการเจริญของแบคทีเรียผู้ผลิต เช่น จากการศึกษาของ Mirhosseini and Emtiazi (2011) พบว่าการผลิต Enterocin A จาก *Enterococcus*

faecium สายพันธุ์ a_2 , a_5 , a_{17} และ a_{19} สามารถเจริญได้ในอาหารที่ใช้เนยแข็ง 70 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอน แต่ไม่สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินได้ ทว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ใช้เนยแข็ง 70 มิลลิกรัมต่อลิตร ผสมกับยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าเชื้อสามารถผลิตแบคทีเรียโอซินได้สูงสุด ส่วนอุณหภูมินั้นมียุทธศาสตร์สำคัญในการผลิตแบคทีเรียโอซินเช่นกัน จากการศึกษาพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก อาจไม่ใช่อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตแบคทีเรียโอซิน (Abbasilasi et al., 2017) เช่น อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *L. curvatus* LTH 1174 คือ 34.5 องศาเซลเซียส ในขณะที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียโอซิน มีค่าประมาณ 20-27 องศาเซลเซียส (Messens, Verluyten, Leroy, & De Vuyst, 2003) เช่นเดียวกับเชื้อ *L. acidophilus* AA11 ซึ่งเจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียโอซิน คือ 30 องศาเซลเซียส (Abo-Amer, 2011)

แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถทนต่อสภาวะที่เป็นกรด สามารถเจริญและผลิตแบคทีเรียโอซินได้ในช่วงของค่า pH ที่กว้างกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น โดยจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และกระบวนการเมแทบอลิซึมของแบคทีเรีย ซึ่งค่า pH ที่เหมาะสมกับการผลิตแบคทีเรียโอซินมักอยู่ในช่วง pH 5.5-6.0 (Iyapparaj et al., 2013) อาทิ *L. plantarum* PM4 และ *L. plantarum* AMA-K สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินได้มากที่สุด เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีค่า pH เท่ากับ 5.5 (Elyass, Shigidi, Attitalla, & Mahdi, 2017; Todorov, 2008) ในขณะที่ *L. plantarum* LF1 สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินได้มากที่สุดเมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า pH เท่ากับ 6.5 (Jie, Liu, Zhang, & Xie, 2016)

2.4 แบคทีเรียโอซิน

แบคทีเรียโอซินถูกค้นพบโดย Gratia เมื่อปี ค.ศ. 1925 โดยพบว่า *Escherichia coli* ๐ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* V โดยสารที่มีชื่อว่า Colicin ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นโปรตีนและสารอื่น ๆ อีก 17 ชนิด ต่อมา มีการค้นพบสารที่มีคุณสมบัติคล้าย Colicin ซึ่งสร้างจากแบคทีเรียแกรมบวก จึงเกิดเป็นสมมติฐานที่ว่าแบคทีเรียโอซิน คือ สารเปปไทด์ หรือสารประกอบโปรตีน ที่สร้างขึ้นจากแบคทีเรีย มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกับแบคทีเรียที่สร้างแบคทีเรียโอซิน หรือแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่มีความไวต่อแบคทีเรียโอซิน (Gratia, 1925; Negash & Tschai, 2020; Zacharof & Lovitt, 2012)

2.4.1 การจำแนกประเภทของแบคทีเรียโอซิน

การจำแนกแบคทีเรียโอซินมักอาศัยหลักเกณฑ์ที่แตกต่างกัน โดยอาจพิจารณาจากลักษณะโครงสร้างของกรดอะมิโน คุณสมบัติทางชีวเคมี มวลโมเลกุล รวมถึงกลไกการออกฤทธิ์ (Zouhir, Hammami, Fliss, & Hamida, 2010) โดยการจำแนกประเภทของแบคทีเรียโอซินที่ใช้กันทั่วโลกครั้งแรกกำหนดขึ้นโดย Klaenhammer (1993) และมีการปรับเปลี่ยนเรื่อยมา เนื่องจากการค้นพบแบคทีเรียโอซินชนิดใหม่เพิ่มมากขึ้น ล่าสุดจากรายงานของ Alvarez-Sieiro et al. (2016) และ Choi, Holzapfel, and Todorov (2022) ได้มีการรายงานการจัดจำแนกกลุ่มแบคทีเรียโอซินใหม่ โดยมีการจำแนกกลุ่มแบคทีเรียโอซินได้เป็น ดังนี้

2.4.1.1 กลุ่ม I: Ribosomally Produced and Post-Translationally Modified Peptides (RiPPs)

แบคทีเรียโอซินที่อยู่ในกลุ่มนี้โดยทั่วไปจะเป็นแบคทีเรียโอซินที่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนหลังกระบวนการแปลรหัส มีมวลโมเลกุลน้อยกว่า 10 กิโลดาลตัน และทนความร้อน นอกจากนี้ยังเกิดการเปลี่ยนแปลงของเอโนไซม์ระหว่างการสังเคราะห์ทางชีวภาพ ทำให้สายเปปไทด์ที่ได้มีโครงสร้างของกรดอะมิโนที่ผิดปกติไป ได้แก่ กรดอะมิโน Lanthionine (Lan), β -methyllanthionine (MeLan), Dehydroalanine (Dha), Dehydrobutyrine (Dhb) และ Labyrinthine ส่งผลทำให้โครงสร้าง และคุณสมบัติของแบคทีเรียโอซินเปลี่ยนแปลงไป (Arnison et al., 2013) โดยแบคทีเรียโอซินในกลุ่ม I ยังถูกแบ่งย่อยออกเป็นอีก 6 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มย่อย Ia หรือ Lantibiotics แบคทีเรียโอซินในกลุ่มย่อยนี้ประกอบด้วยเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนที่ผิดปกติไป เช่น Lanthionine และ/หรือ (Methyl)Lanthionine (Arnison et al., 2013) ตัวอย่างแบคทีเรียโอซินในกลุ่มย่อยนี้ได้แก่ Nisin ที่ผลิตโดยเชื้อ *Lactococcus lactis* (Lubelski, Rink, Khusainov, Moll, & Kuipers, 2008) กลุ่มย่อย Ib หรือ Head-to-Tail Circular Peptides หรือ Cyclized Peptides โครงสร้างแบคทีเรียโอซินของกลุ่มย่อยนี้จะมีลักษณะต่อกันเป็นวงกลม ตัวอย่างแบคทีเรียโอซินในกลุ่ม Ib ได้แก่ Enterocin AS-48 (Cebrián et al., 2015; Cruz, Ramos, Melo, & Martinez-Salazar, 2013) กลุ่มย่อย Ic หรือ Sactipeptides หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Sactibiotics (เมื่อมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย) แบคทีเรียโอซินในกลุ่มย่อยนี้โครงสร้างจะประกอบด้วยหมู่กำมะถัน (Sulphur) ที่มาเกาะที่ตำแหน่งแอลฟาคาร์บอน (α -carbon) แบคทีเรียโอซินในกลุ่มย่อยนี้ได้แก่ Streptolysin S ที่สร้างจากเชื้อ *Streptococcus* (Murphy et al., 2011; Nizet et al., 2000) กลุ่มย่อย Id หรือ Linear Azol(in)e-Containing Peptides (LAPs) แบคทีเรียโอซินในกลุ่มย่อยนี้จะเป็นเปปไทด์ที่

เกิดจากการร่วมกันของวงแหวนเฮเทอโรไซคลิก (Heterocyclic Rings) ของ Thiazole และ (Methyl)oxazole (Melby, Nard, & Mitchell, 2011) แบคทีเรียโอซินในกลุ่มย่อยนี้ ได้แก่ Subtilisin A ที่สร้างจากเชื้อ *Bacillus subtilis* (Kawulka et al., 2003; Maqueda et al., 2008) กลุ่มย่อย Ie หรือ Glycocins เป็นแบคทีเรียโอซินที่ในโครงสร้างพบ Glycosylated แบคทีเรียโอซินในกลุ่มย่อยนี้ ได้แก่ Glycocin F ที่สร้างจาก *Lactobacillus plantarum* โดยโครงสร้างของ Glycocin F จะประกอบด้วยเกลียวแอลฟา (Alpha Helices) สองตัว ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (Disulfide Bond) (Arnison et al., 2013; Venugopal et al., 2011) และกลุ่มย่อย If หรือ Lasso Peptides เป็นเปปไทด์ที่เชื่อมกันด้วยพันธะเอไมด์ (Amide Bond) ระหว่างกรดอะมิโนตัวแรกของสายเปปไทด์หลักและมีประจุลบตกค้างในตำแหน่ง +7 ถึง +9 และจะสร้างวงแหวนที่โอบรับส่วนเชิงเส้นที่ปลาย C ของสายโพลีเปปไทด์ (Arnison et al., 2013; Hegemann, Zimmermann, Xie, & Marahiel, 2015) แบคทีเรียโอซินในกลุ่มย่อยนี้ ได้แก่ Microcin J25 ที่สร้างจากเชื้อ *E. coli* (Yan et al., 2012)

2.4.1.2 กลุ่ม II: Unmodified Bacteriocins

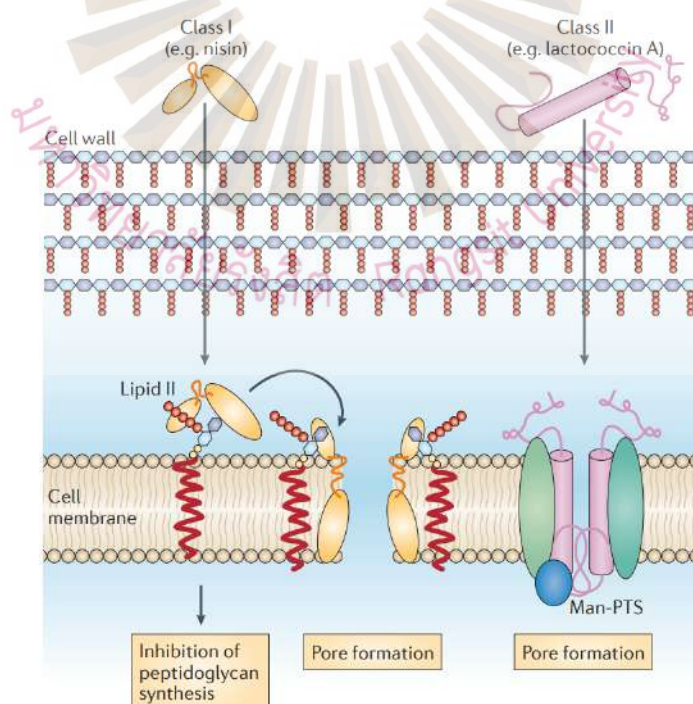
แบคทีเรียโอซินในกลุ่มนี้จะไม่มีการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างที่ผิดปกติ หลังจากกระบวนการแปลรหัส เป็นแบคทีเรียโอซินที่มีมวลโมเลกุลน้อยกว่า 10 กิโลดาลตัน (Alvarez-Sieiro et al., 2016) โดยแบคทีเรียโอซินในกลุ่ม II ยังสามารถแบ่งออกได้เป็นอีก 4 กลุ่มย่อย ได้แก่ กลุ่มย่อย IIa หรือ Pediocin-Like Bacteriocins แบคทีเรียโอซินในกลุ่มย่อยนี้จะมีลักษณะคล้าย Pediocin มีกรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบประมาณ 35-50 โมเลกุล โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria* spp. ได้เป็นอย่างดี ตัวอย่างแบคทีเรียโอซินในกลุ่มย่อยนี้ ได้แก่ Pediocin PA-1 (Kjos, Nes, & Diep, 2009) กลุ่มย่อย IIb หรือ Two-Peptide Bacteriocins แบคทีเรียโอซินในกลุ่มย่อยนี้เป็นแบคทีเรียโอซินที่โครงสร้างประกอบด้วยเปปไทด์ 2 ชนิด ที่ทำงานเสริมฤทธิ์กัน กล่าวคือ หากมีเพียงเปปไทด์ตัวใดตัวหนึ่งจะไม่แสดงกิจกรรมการยับยั้งเชื้อหรือความสามารถในการยับยั้งเชื้อจะลดลง ตัวอย่างแบคทีเรียโอซินในกลุ่มย่อยนี้ ได้แก่ Lactococcin G, Lactacin F, Plantaricin S และ Plantaricin W เป็นต้น (Balciunas et al., 2013) กลุ่มย่อย IIc หรือ Leaderless Bacteriocins แบคทีเรียโอซินในกลุ่มย่อยนี้จะไม่มีการมี Leader Peptides กล่าวคือ แบคทีเรียโอซินซึ่งถูกสังเคราะห์เป็นเปปไทด์ จะสามารถออกฤทธิ์ได้โดยไม่ต้องมีลำดับตัวนำที่ปลาย N ตัวอย่างแบคทีเรียโอซินในกลุ่มย่อยนี้ ได้แก่ Lactacin Q (Perez, Zendo, & Sonomoto, 2022) และกลุ่มย่อย IId หรือ Non-Pediocin-Like หรือ Single-Peptide Bacteriocins แบคทีเรียโอซินในกลุ่มย่อยนี้จะมีลำดับกรดอะมิโนที่แตกต่างจากแบคทีเรียโอซินในกลุ่มย่อยอื่น ๆ คือ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของ

โครงสร้าง แบคเทอริโอซินมีโครงสร้างเป็นเส้นตรง และไม่ใช่ Pediocin ยกตัวอย่างเช่น Lactococcin 972, Lactococcin A และ Enterocin B (Franz, Van Belkum, Holzapfel, Abriouel, & Gálvez, 2007)

2.4.2 กลไกการออกฤทธิ์ของแบคเทอริโอซิน

2.4.2.1 การออกฤทธิ์รบกวนการสร้างผนังเซลล์

แบคเทอริโอซินในกลุ่ม Lantibiotic โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Nisin รวมไปถึงแบคเทอริโอซินบางชนิดในกลุ่ม II สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ Lipid II ของเซลล์แบคทีเรียเป้าหมาย (Bierbaum & Sahl, 2009; Breukink & de Kruijff, 2006) ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์เพปทิโดไกลแคน (Peptidoglycan) ของแบคทีเรียเป้าหมาย (รูปที่ 2.1) เนื่องจาก Lipid II ทำหน้าที่เป็นตัวกลางสำคัญในกลไกการสังเคราะห์เพปทิโดไกลแคน (Peptidoglycan) ภายในเซลล์ของแบคทีเรีย (Piper, Draper, Cotter, Ross, & Hill, 2009) ส่งผลให้แบคทีเรียเป้าหมายหยุดการสร้างผนังเซลล์และเมื่อผนังเซลล์ของแบคทีเรียไม่สมบูรณ์หรือถูกทำลายลง ความสามารถในการปกป้องสิ่งที่อยู่ภายในเซลล์ของแบคทีเรียจะลดลงไปด้วย จึงทำให้แบคทีเรียนั้นตายได้ (Barreteau et al., 2009)



รูปที่ 2.1 ภาพแสดงกลไกการออกฤทธิ์ของแบคเทอริโอซินต่อเซลล์แบคทีเรียแกรมบวก

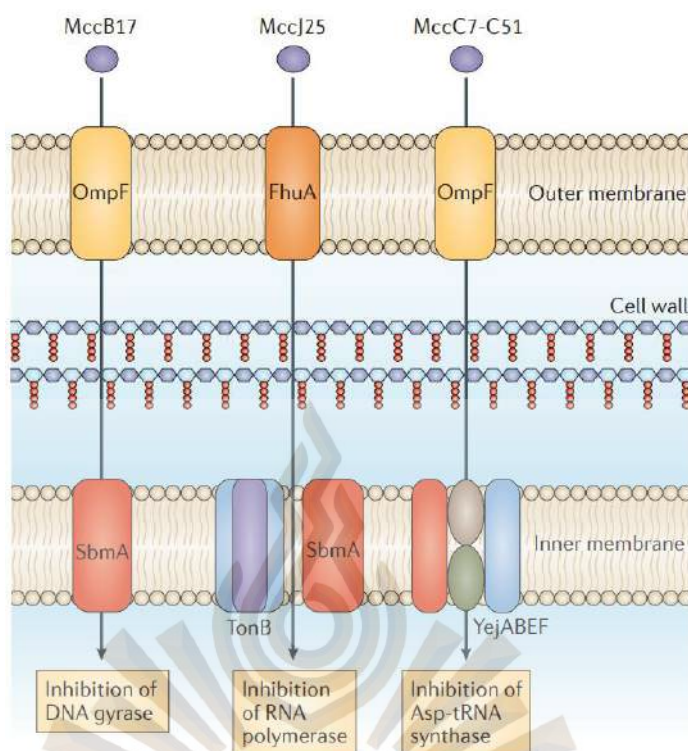
ที่มา: Cotter, Ross, & Hill, 2013

2.4.2.2 การออกฤทธิ์โดยการรบกวนการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์

แบคทีเรียโอสินจำพวก Lantibiotic จะออกฤทธิ์รบกวนการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยอาศัย Lipid II ที่เยื่อหุ้มเซลล์ให้ทำหน้าที่เป็นโมเลกุลยัดให้เกิดบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ในขณะที่แบคทีเรียโอสินในกลุ่ม II จะทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ โดยกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ Mannose Phosphotransferase System (Man-PTS) (Destoumieux-Garzón, Peduzzi, Thomas, Djediat, & Rebuffat, 2006; Diep, Skaugen, Salehian, Holo, & Nes, 2007) ส่งผลทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ไม่สามารถควบคุมการผ่านเข้าออกของสารได้ตามปกติและเมื่อมีสารผ่านเข้าไปสะสมในเซลล์ของแบคทีเรียมากขึ้น อาจส่งผลให้เซลล์แตกและแบคทีเรียนั้นตายลงไปในที่สุด ดังแสดงในรูปที่ 2.1 (Balciunas et al., 2013)

2.4.2.3 การออกฤทธิ์รบกวนการสร้างกรดนิวคลีอิก

แบคทีเรียโอสินสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างกรดนิวคลีอิกได้ 2 ชนิด คือ Ribonucleic Acid (RNA) และ Deoxyribonucleic Acid (DNA) ซึ่งหากแบคทีเรียไม่สามารถสร้างสารดังกล่าวได้ ย่อมส่งผลให้แบคทีเรียนั้นไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีนและเอนไซม์ตลอดจนไม่สามารถทำการแบ่งตัวและเจริญเติบโตได้ (Cavera, Arthur, Kashtanov, & Chikindas, 2015) ตัวอย่างเช่น Microcin B17 ใช้ Outer Membrane Porin F (OmpF) ที่เยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (Outer Membrane) เป็นช่องทางเข้าสู่ Periplasmic Space ของเซลล์แบคทีเรียเป้าหมาย แล้วใช้โปรตีน SbmA (โปรตีนตัวรับจำเพาะในเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นใน) เพื่อผ่านเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ชั้นใน (Inner Membrane) แล้วยับยั้งการทำงานของ DNA Gyrase-Mediated, DNA Supercoiling และรบกวนกระบวนการ DNA Replication (Parks, Bottrill, Pierrat, Durrant, & Maxwell, 2007) แสดงดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 ภาพแสดงกลไกการออกฤทธิ์ของแบคทีเรียโอซินต่อเซลล์แบคทีเรียแกรมลบ

ที่มา: Cotter et al., 2013

2.4.2.4 การออกฤทธิ์รบกวนการสังเคราะห์โปรตีน

แบคทีเรียโอซินที่มีโครงสร้างเป็นแบบ Aminoglycoside คือมี Amino Sugar ที่เป็นส่วนประกอบในโมเลกุล จึงสามารถเกิดพันธะ Glycosidic กับ Ribosome ส่วน 30S ซึ่งทำให้มีผลยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของแบคทีเรีย เนื่องจากความสามารถในการขนส่งรหัสพันธุกรรมลดลง รวมถึงการอ่านรหัส mRNA ในการสังเคราะห์โปรตีนเกิดความผิดพลาด (Wescombe, Heng, Burton, & Tagg, 2010) ยกตัวอย่างเช่น แบคทีเรียโอซิน Microcin J25 ใช้ตัวรับจำเพาะ Iron Siderophore Receptor FhuA ที่เชื่อมกับเซลล์ชั้นนอก แล้วใช้โปรตีน TonB (โปรตีนตัวรับที่เชื่อมกับเซลล์ชั้นนอก) และโปรตีน SbmA ที่เชื่อมกับเซลล์ชั้นใน เพื่อผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมาย แล้วยับยั้งกระบวนการ RNA Polymerase ของเซลล์แบคทีเรียเป้าหมาย และแบคทีเรียโอซิน Microcin C7-C51 ถูกขนส่งเข้าสู่เชื่อมกับเซลล์ชั้นในของแบคทีเรียเป้าหมายโดยใช้ ABC Transporter YejABEF แล้วจะกระตุ้นให้เกิดการยับยั้งกระบวนการ Aspartyl-tRNA Synthetase ที่ส่งผลยับยั้งการสังเคราะห์ mRNA ของเซลล์แบคทีเรียเป้าหมาย (Kazakov et al., 2008; Metlitskaya et al., 2006; Novikova et al., 2007) ดังแสดงในรูปที่ 2.2

2.4.2.5 การออกฤทธิ์รบกวนกระบวนการเมแทบอลิซึม

แบคทีเรียโอซินที่ออกฤทธิ์โดยการรบกวนกระบวนการเมแทบอลิซึมจัดเป็นแบคทีเรียโอซินจำพวก Bacteriostatic กล่าวคือ เมื่อปริมาณแบคทีเรียโอซินที่ออกฤทธิ์ลดลง กระบวนการเมแทบอลิซึมที่ถูกรบกวนก็จะกลับเข้าสู่สภาวะปกติ (Cavera et al., 2015)

2.5 การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างแบคทีเรียโอซิน

แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถพบได้โดยทั่วไปในธรรมชาติ รวมถึงสามารถคัดแยกได้จากผลิตภัณฑ์อาหารหมักดองทั่วไป เช่น ผัก ผลไม้ เนื้อสัตว์ นม และธัญพืช นอกจากนี้ยังสามารถพบได้ในระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินอาหาร รวมไปถึงสิ่งขับถ่ายของทั้งมนุษย์และสัตว์อีกด้วย โดยเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อม ลักษณะ และวิธีการหมัก รวมไปถึงแหล่งที่มาของวัตถุดิบ (Leroy & De Vuyst, 2004; Settanni & Moschetti, 2010) โดยตัวอย่างของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตแบคทีเรียโอซิน แสดงดังตารางที่ 2.1



ตารางที่ 2.1 แบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตแบคทีเรียโอซินที่คัดแยกได้จากแหล่งต่าง ๆ กัน

แหล่งที่มา	ชนิดแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตแบคทีเรียโอซิน	ชนิดแบคทีเรียโอซินที่ผลิต	ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย
ผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์			
ไส้กรอกหมัก	<i>Pediococcus acidilactici</i> HA-6111-2 และ HA-5692-3	Bacteriocins HA-6111-2 และ HA-5692-3	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Listeria innocua</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>L. ivanovii</i> subsp. <i>ivanovii</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Ent. faecium</i> และ <i>Streptococcus caprinus</i>
แหนมหมู	<i>Lactococcus garvieae</i> BCC 43578	Garvieacin Q	<i>Lactococcus garvieae</i> , <i>Enterococcus faecium</i> และ <i>Listeria monocytogenes</i>
เนื้อเค็มแดดเดียว	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 69	Nisin Z	<i>Listeria monocytogenes</i> และ <i>Staphylococcus aureus</i>
แหนมหมู	<i>Weissella hellenica</i> BCC 7293	Bacteriocin 7293A และ 7293B	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella</i> Typhimurium, <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> และ <i>Aeromonas hydrophila</i>
ผลิตภัณฑ์จากผัก			
กิมจิ	<i>Lactococcus lactis</i> KC24	Bacteriocin KC24	<i>Listeria monocytogenes</i>
จิงจูฉ่ายดอง	<i>Lactobacillus coryniformis</i> MXJ 32	Lactocin MXJ 32A	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella</i> sp., <i>Listeria monocytogenes</i> และ <i>Cronobacter sakazakii</i>

ตารางที่ 2.1 แบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตแบคทีริโอซินที่คัดแยกได้จากแหล่งต่าง ๆ กัน (ต่อ)

แหล่งที่มา	ชนิดแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตแบคทีริโอซิน	ชนิดแบคทีริโอซินที่ผลิต	ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย
แตงกวาดอง	<i>Lactococcus garvieae</i> LG34	Garviecin LG34	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Shigella flexneri</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Sarcina flava</i> และ <i>Salmonella</i> Typhimurium
กิมจิ	<i>Lactococcus casei</i> Cab-18, <i>Lactobacillus saniviri</i> Cuc-1 และ <i>Leuconostoc mesenteroides</i> Com-54	Bacteriocin ¹	<i>Salmonella enterica</i> serotypes: <i>S. enteritidis</i> , <i>S. heidelberg</i> , <i>S. newport</i> และ <i>S. Typhimurium</i>
กะหล่ำปลีดอง	<i>Lactobacillus plantarum</i> JLA-9	Pantaricin JLA-9	<i>Bacillus</i> sp., <i>Clostridium</i> sp., <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> และ <i>S. Typhimurium</i>
มะละกอ	<i>Lactobacillus plantarum</i> ST16Pa	Bacteriocin ST16PA	<i>Enterobacter</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> และ <i>Listeria</i> spp.

ตารางที่ 2.1 แบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตแบคทีเรียโอซินที่คัดแยกได้จากแหล่งต่าง ๆ กัน (ต่อ)

แหล่งที่มา	ชนิดแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตแบคทีเรียโอซิน	ชนิดแบคทีเรียโอซินที่ผลิต	ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย
ผลิตภัณฑ์จากธัญพืช			
ข้าวมอลต์	<i>Lactobacillus sakei</i> D98	Sakacin D98a, sakacin D98b และ sakacin D98c	<i>Bacillus circulans</i> , <i>Listeria innocua</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> และ <i>Lactobacillus sakei</i> ssp. <i>sakei</i>
เครื่องดื่มหมักจากธัญพืช	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> BZ	Lactococcin BZ	<i>Lactobacillus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Listeria</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Yersinia</i> และ <i>Citrobacter</i> spp.
ถั่วเหลือง	<i>Enterococcus mundtii</i> QU 2	Mundticin KS	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Ent. hirae</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>L. sakei</i> ssp. <i>sakei</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> และ <i>Listeria innocua</i>
มนุษย์และสัตว์			
คราบจุลินทรีย์ที่อยู่อ่เหนือเหงือก	<i>Streptococcus mutans</i> N	Mutacin N	<i>Streptococcus pyogenes</i> และ Oral <i>Streptococci</i>
สารคัดหลั่งจากช่องคลอดของมนุษย์	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> HV219	Bacteriocin HV219	แบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ

ตารางที่ 2.1 แบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตแบคทีเรียโอซินที่คัดแยกได้จากแหล่งต่าง ๆ กัน (ต่อ)

แหล่งที่มา	ชนิดแบคทีเรียกรดแลคติกที่ ผลิตแบคทีเรียโอซิน	ชนิดแบคทีเรียโอซิน ที่ผลิต	ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย
ทางเดินอาหารม้า	<i>Lactococcus lactis</i> QU 14	Lacticin Z	<i>Bacillus</i> spp., <i>Lactobacillus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp. และ <i>Lactococcus</i> spp.
ผลิตภัณฑ์นม			
น้ำนมโคดิบ	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 194-K	Bacteriocin 194-D	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. coagulans</i> , <i>B. mycoides</i> และ <i>Micrococcus</i> <i>luteus</i>
ชีส	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 1AA17 และ 2BB9	Nisin Z	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria innocua</i> , <i>Lactobacillus sakei</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> และ <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> บางสายพันธุ์
ชีส	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Cremoris</i> 2A27	Lactococcin G	<i>Lactobacillus sakei</i> และ <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> บางสายพันธุ์
คีเฟอร์	<i>Lactobacillus plantarum</i> ST8KF	Bacteriocin ST8KF	<i>Lactobacillus casei</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. curvatus</i> และ <i>Listeria</i> <i>innocua</i>

¹ ยังไม่ได้มีการระบุชื่อแบคทีเรียโอซิน

ที่มา: ดัดแปลงจาก Kaškonienė et al., 2017

เมื่อทำการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากแหล่งที่มาต่าง ๆ ได้แล้ว ก็จะเข้าสู่กระบวนการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถผลิตแบคเทอรีโอซิน โดย Kaškonienė et al. (2017) สรุปขั้นตอนการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตแบคเทอรีโอซินเป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้

2.5.1 การทดสอบความสามารถในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

ขั้นตอนนี้จะเป็นการแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ออกจากแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดอื่น โดยวิธีการที่นิยมใช้ในการทดสอบ คือ วิธี Spot-on-Lawn Assay, Microtiter Plate Assay และ Agar Well Diffusion Assay (Pingitore, Salvucci, Sesma, & Nader-Macias, 2007) โดยวิธีการทดสอบดังกล่าวขึ้นอยู่กับการทำปฏิกิริยาระหว่างสารออกฤทธิ์กับแบคทีเรียที่นำมาใช้ทดสอบ วิธีการทดสอบที่กล่าวมาข้างต้น ยกเว้นวิธี Microtiter Plate Assay มีวัตถุประสงค์เพื่อวัดส่วนใสหรือขอบเขตการยับยั้งของสารออกฤทธิ์ ที่เกิดขึ้นรอบจุดที่ทำการทดสอบ ในขณะที่การทดสอบด้วยวิธี Microtiter Plate Assay นั้นมีวัตถุประสงค์เพื่อวัดความขุ่นของสารละลายแบคเทอรีโอซินและแบคทีเรียที่นำมาใช้ทดสอบ โดยทำการวัดความขุ่นที่ค่าความยาวคลื่นเท่ากับ 600 นาโนเมตร หลังจากทำการบ่มสารละลายไปแล้ว 24 ชั่วโมง (Vijayakumar & Muriana, 2015) อย่างไรก็ตามการทดสอบความสามารถในการผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียตามวิธีการต่าง ๆ ที่กล่าวมาข้างต้น สิ่งที่สำคัญคือควรเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียเป้าหมายที่จะนำมาใช้ทดสอบด้วย (Pingitore et al., 2007)

2.5.2 การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติก

หลังจากการทดสอบความสามารถในการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้แล้ว ขั้นตอนสำคัญต่อมา คือ การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรีย โดยการระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถทำได้ โดยการระบุจากรูปแบบของกระบวนการหมักน้ำตาลและการระบุสายพันธุ์จากการทำ 16S rDNA Sequence หรือ 16S rRNA Gene Sequence (Biscola et al., 2013; Iwatani, Zendo, Yoneyama, Nakayama, & Sonomoto, 2007; Kabuki, Uenishi, Watanabe, Seto, & Nakajima, 2007; Zendo et al., 2005; Zhao et al., 2016)

2.5.3 การทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของสารยับยั้งแบคทีเรีย

การนำสารออกฤทธิ์ที่ได้ไปใช้ประโยชน์หรือทำการศึกษาอื่นเพิ่มเติมในอนาคต จำเป็นต้องมีการศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นก่อน เช่น การทดสอบความคงตัวของสารออกฤทธิ์ ต่อ pH อุณหภูมิ และเอนไซม์ย่อยโปรตีนชนิดต่าง ๆ เช่น Trypsin, α -chymotrypsin, Ficin, Papain หรือ Proteinase K รวมไปถึงการทดสอบความคงตัวหลังจากผ่านความร้อน และการแช่แข็ง (Castro, Palavecino, Herman, Garro, & Campos, 2011; Kabuki et al., 2007; Zendo et al. 2005) เป็นต้น

2.6 การทำบริสุทธิ์แบคทีเรียโอซิน

การทำบริสุทธิ์แบคทีเรียโอซินที่ละลายปะปนอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อหรือเซลล์ของแบคทีเรีย ถือเป็นขั้นตอนที่สำคัญและซับซ้อนที่สุด ที่เกิดขึ้นหลังจากการคัดแยกและระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ผลิตแบคทีเรียโอซิน โดยปัจจุบันการเลือกใช้วิธีทำบริสุทธิ์แบคทีเรียโอซินมักพิจารณาจากมวลโมเลกุลและคุณสมบัติของประจุของแบคทีเรียโอซิน (Zou, Jiang, Cheng, Fang, & Huang, 2018) โดยวิธีการที่นิยมใช้ในการทำบริสุทธิ์แบคทีเรียโอซิน ได้แก่

2.6.1 การปั่นเหวี่ยง (Centrifugation)

การปั่นเหวี่ยงเป็นเทคนิคที่ใช้แยกเซลล์ของแบคทีเรียออกจากส่วนใส (Supernatant) ด้วยการตกตะกอนเซลล์ โดยอาศัยหลักการ Sedimentation ภายใต้แรงหนีศูนย์กลาง โดยอัตราการตกตะกอนของสารจะขึ้นอยู่กับขนาด น้ำหนักโมเลกุล และความอัดแน่นของโมเลกุลหรืออนุภาค (Beveridge, 2000)

2.6.2 การตกตะกอนโดยใช้ Ammonium Sulfate (Ammonium Sulfate Precipitation)

การตกตะกอนด้วย Ammonium Sulfate เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการตกตะกอนแบคทีเรียโอซิน โดยอาศัยคุณสมบัติการละลายของเกลือแยกโปรตีนออกจากสารผสม โดยอาศัยหลักการ Salting Out กล่าวคือเมื่อความเข้มข้นของเกลือในสารละลายเพิ่มขึ้น เกลือจะแตกตัวเป็นประจุบวกและประจุลบ และแย่งจับกับโมเลกุลของน้ำที่อยู่ล้อมรอบโมเลกุลของโปรตีน จึงทำให้โปรตีนตกตะกอนลงมาและสามารถแยกตะกอนออกได้ง่ายโดยการปั่นเหวี่ยง (Gautam & Sharma, 2009)

2.6.3 ไคอะไลซิส (Dialysis)

วิธีการไคอะไลซิสเป็นวิธีการแยกโมเลกุลสารชนิดต่าง ๆ ออกจากกัน โดยอาศัยความแตกต่างของขนาดโมเลกุล เป็นการแยกสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กออกจากสารผสม ด้วยถุงไคอะไลซิส (Dialysis Bag) ที่มีคุณสมบัติเป็น Semipermeable Membrane โดยที่เมมเบรนจะมีรูพรุนและจะยอมให้สารที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก เช่น เกลือ ผ่านเข้าออกได้ ส่วนโมเลกุลของสารที่มีขนาดใหญ่กว่ารูพรุนของเมมเบรนจะยังคงอยู่ภายในถุงไคอะไลซิส โดยไคอะไลซิสเมมเบรนที่นิยมใช้ ได้แก่ เซลโลเฟน (Cellophane) เซลลูโลสอะซิเตด (Cellulose Acetate) และไนโตรเซลลูโลส (Nitrocellulose) (Borzenkov, Surovtsev, & Dyatlov, 2014) เป็นต้น

2.6.4 โครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ (Column Chromatography)

การทำบริสุทธิ์โดยใช้โครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ เป็นวิธีการที่ใช้แยกสารผสม เช่น โปรตีน โดยการผ่านสารละลายโปรตีนผสมเข้าไปในคอลัมน์ที่บรรจุด้วยตัวกลาง หรือเมทริกซ์ (Matrix) ซึ่งเป็นของแข็งที่มีรูพรุน โดยอาศัยความแตกต่างของ ขนาด ประจุ หรือความสามารถที่จะจับกับหมู่เคมีที่เฉพาะของโปรตีนตัวอย่างกับตัวกลาง ทำให้โปรตีนชนิดต่าง ๆ สามารถแยกออกจากกันและสามารถเก็บโปรตีนแต่ละชนิดได้ที่ปลายสุดของคอลัมน์ (Godawat et al., 2012)

2.6.4.1 Hydrophobic Interaction Chromatography

Hydrophobic Interaction Chromatography หรือ HIC เป็นวิธีการแยกสารโดยอาศัยคุณสมบัติความไม่ชอบน้ำของโปรตีนตัวอย่าง โดย Ligand หรือโมเลกุลที่ล้อมรอบตัวกลาง หรือเรซินที่ใช้จะมีค่า Hydrophobicity สูง ดังนั้นสารที่มีความเป็น Hydrophobicity สูงจะมาจับกับ Ligand โดยเกลื่อที่ใช้ในระบบจะมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการจับกับ Ligand กล่าวคือ หากในระบบมีเกลื่อที่ความเข้มข้นสูง (ค่า Ionic Strength สูง) จะทำให้สารที่มี Hydrophobicity สูง ยึดจับกับ Ligand ได้ดี และหากความเข้มข้นของเกลื่อในระบบลดลง จะส่งผลให้สารที่เคยจับกับ Ligand ค่อย ๆ หลุดออกมา โดยสารที่มีความสามารถในการละลายน้ำได้ดีหรือมีความชอบน้ำมากกว่าจะหลุดออกมาก่อน (Arakawa & Narhi, 1991; Jandera, 2011)

2.6.4.2 โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (Ion-Exchange Chromatography)

โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุเป็นวิธีที่ใช้แยกสารที่มีประจุ โดยอาศัยหลักการของการดูดซับแบบผันกลับได้ (Reversible Adsorption) โดยไอออนในสารละลายจะแทนที่กับไอออนอื่น ที่มีประจุชนิดเดียวกันกับหมู่ที่มีประจุบนตัวกลางแลกเปลี่ยนไอออนด้วยแรงทางไฟฟ้า (Electrostatic Force) ซึ่งโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุยังสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท (Acikara, 2013) คือ Anion Exchange Chromatography หรือโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบ อาศัยหลักการทำงาน คือ เรซินที่ใช้ในคอลัมน์จะมีประจุสุทธิเป็นบวกและเมื่อสารตัวอย่างที่มีประจุเป็นลบผ่านเข้าไปในคอลัมน์ก็จะไปจับกับประจุบวกบน Ligand ส่วนสารตัวอย่างที่มีประจุเป็นบวกจะไม่จับกับเรซินและจะหลุดออกมาก่อน ส่วนสารที่มีประจุเป็นลบที่จับอยู่กับ Ligand จะหลุดออกมาภายหลัง โดยการใส่บัฟเฟอร์ที่มีค่า Ionic Strength สูงในการชะสารที่เกาะอยู่กับเรซินออกมา (Cummins, Dowling, & O'Connor, 2011) และ Cation Exchange Chromatography หรือโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุบวก อาศัยหลักการทำงานคือ เรซินที่ใช้ในคอลัมน์จะมีประจุสุทธิเป็นลบและเมื่อสารตัวอย่างที่มีประจุเป็นบวกผ่านเข้าไปในคอลัมน์ก็จะไปจับกับประจุลบบน Ligand ส่วนสารตัวอย่างที่มีประจุเป็นลบจะไม่จับกับเรซินและจะหลุดออกมาก่อน ส่วนสารที่มีประจุเป็นบวกที่จับอยู่กับ Ligand จะหลุดออกมาภายหลัง โดยการใส่บัฟเฟอร์ที่มีค่า Ionic Strength สูงในการชะสารที่เกาะอยู่กับเรซินออกมา (Fekete, Beck, Veuthey, & Guilleme, 2015)

2.6.4.3 โครมาโตกราฟีแบบเจลฟิเตรชัน (Gel-Filtration Chromatography)

โครมาโตกราฟีแบบเจลฟิเตรชันจะเป็นการทำบริสุทธิ์โดยอาศัยความแตกต่างของขนาดโมเลกุล วิธีการนี้คอลัมน์จะบรรจุด้วยเจลที่ประกอบด้วยโพลิเมอร์ที่เชื่อมโยงกันเป็นตาข่ายร่างแห มีคุณสมบัติเฉื่อยไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่กำลังจะวิเคราะห์และไม่มีประจุ รวมถึงทำหน้าที่เป็นตะแกรงร่อนโมเลกุล โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบเจลฟิเตรชันเป็นวิธีที่นิยมนำมาใช้ในการกำจัดเกลือออกจากสารละลายโปรตีน เช่น การกำจัดเกลือ Ammonium Sulfate หลังจากการกระบวน การตกตะกอนโปรตีน โดยทำการละลายตะกอนโปรตีนที่ตกได้ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม แล้วผ่านสารละลายเข้าสู่คอลัมน์ที่บรรจุด้วยเจลที่มีรูพรุนขนาดเล็กกว่าขนาดโมเลกุลของโปรตีน จากนั้นชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ โดยโปรตีนจะออกจากคอลัมน์ก่อน Ammonium Sulfate โดยเจลที่นิยมใช้ คือ Sephadex G-25 Medium เนื่องจากสามารถกำจัดเกลือได้อย่างมีประสิทธิภาพ เป็นต้น (Ó'Fágáin, Cummins, & O'Connor, 2017)

2.6.4.4 โครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC)

โครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูงเป็นการแยกและวิเคราะห์สารโดยอาศัยหลักการ การดูดซับ การแลกเปลี่ยนไอออน หรือขนาด วิธีนี้จะใช้คอลัมน์ขนาดเล็กแต่มีความยาว บรรจุด้วยตัวกลางที่ทำด้วยพลาสติกหรือแก้วที่เคลือบด้วยตัวทำละลายอยู่กับที่ เป็นชั้นบาง ๆ ส่วนตัวทำละลายเคลื่อนที่ ที่เป็นตัวทำละลายจะถูกดันให้เข้าสู่คอลัมน์ที่บรรจุด้วยตัวกลางแบบอัดแน่น สารละลายที่ต้องการวิเคราะห์จะถูกผ่านเข้าไปในคอลัมน์ แล้วผ่านตัวกลางที่เคลื่อนที่ด้วยแรงดันสูง การตรวจสอบสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ทำได้โดยอาศัยการวัดการดูดกลืนแสงในช่วงอัลตราไวโอเลต (Refractive Index) หรือ Fluorescent โดยเทคนิค HPLC นี้จะช่วยลดระยะเวลาการแยกและการวิเคราะห์สารอย่างมาก นอกจากนี้ยังสามารถตรวจสอบสารที่มีความเข้มข้นน้อยกว่า Picomole ได้ (Jandera, 2011; Reuhs, 2017)

2.6.4.5 โครมาโตกราฟีแบบ Reverse-Phase (Reverse-Phase Chromatography; RPC)

โครมาโตกราฟีแบบ RPC นี้ จัดเป็นโครมาโตกราฟีแบบแบ่งการละลาย (Liquid-Liquid Partition Chromatography) โดยตัวทำละลายอยู่กับที่ หรือ Stationary Phase จะประกอบด้วยของเหลวที่ไม่มีขั้ว (Nonpolar) ซึ่งจะเคลือบอยู่บนของแข็งที่เฉื่อย ส่วนตัวทำละลายเคลื่อนที่หรือ Mobile Phase จะเป็นของเหลวที่มีความเป็นขั้วมากกว่า (Jandera, 2011)

โดยตัวอย่างขั้นตอนในการทำบริสุทธิ์แบคทีเรียโอซินที่สร้างจากเชื้อ *L. plantarum* แสดงดังตารางที่ 2.2 ซึ่งจะเห็นได้ว่า ขั้นตอนในการทำบริสุทธิ์ที่เหมาะสมของแบคทีเรียโอซินจะแตกต่างกันไป แม้ว่าสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตแบคทีเรียโอซินจะเป็นสายพันธุ์เดียวกัน

ตารางที่ 2.2 ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์แบคทีเรียโอซินที่สร้างจากเชื้อ *L. plantarum*

แบคทีเรียโอซิน	ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์	มวลโมเลกุล (ดาลตัน)	อ้างอิง
Plantaricin A α	Culture Supernatant	2,426 และ	Nissen-Meyer,
และ A β	50% Ammonium Sulfate Precipitation	2,497	Larsen, Sletten,
	SP-Sepharose Fast-Flow Column		Daeschel, & Nes,
	Octyl-Sepharose CL-4B Column		1993

ตารางที่ 2.2 ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์แบคทีเรียโอซินที่สร้างจากเชื้อ *L. plantarum* (ต่อ)

แบคทีเรียโอซิน	ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์	มวลโมเลกุล (ดาลตัน)	อ้างอิง
Plantaricin S	Culture Supernatant 80% Ammonium Sulfate Precipitation SP-Sepharose Fast-Flow Column Phenyl-Sepharose CL-4B FPLC (C ₂ /C ₁₈ Reverse Phase)	2,500	Jiménez-Díaz et al., 1995
Plantaricin E และ F	Culture Supernatant 40% Ammonium Sulfate Precipitation Octyl-Sepharose CL-4B Column RP-HPLC	3,703 และ 3,545	Anderssen, Diep, Nes, Eijsink, & Nissen-Meyer, 1998
Plantaricin C19	Culture Supernatant Release of Adsorbed Bacteriocin from Producing Cells RP-HPLC	3,845.3	Atrih, Rekhif, Moir, Lebrihi, & Lefebvr, 2001
Plantaricin NC8 α และ NC8 β	Culture Supernatant 80% Ammonium Sulfate Precipitation SP-Sepharose Fast-Flow Column Phenyl-Sepharose CL-4B FPLC (C ₂ /C ₁₈ Reverse Phase)	3,587 และ 4,000	Maldonado, Ruiz-Barba, & Jiménez-Díaz, 2003
Plantaricin W α และ W β	Culture Supernatant Amberlite XAD-16 SP-Sepharose Fast-Flow Column RP-HPLC	3,222 และ 3,099	Noonpakdee et al., 2009
Plantaricin ASM1	Culture Supernatant 40% Ammonium Sulfate Precipitation SP-Sepharose Fast-Flow Column Octyl-Sepharose CL-4B Column RP-HPLC	5,045.7	Hata, Tanaka, & Ohmomo, 2010

ตารางที่ 2.2 ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์แบคทีเรียโอซินที่สร้างจากเชื้อ *L. plantarum* (ต่อ)

แบคทีเรียโอซิน	ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์	มวลโมเลกุล (ดาลตัน)	อ้างอิง
Plantaricin MG	Culture Supernatant 70% Ammonium Sulfate Precipitation Gel-Filtration Chromatography RP-HPLC	2,180	Gong, Meng, & Wang, 2010
Plantaricin ZJ008	Culture Supernatant Macroporous Resin Column HiPrep Q HP 16/10 Column Gel-Filtration Chromatography HPLC	1,334.77	Zhu, Zhao, Sun, & Gu, 2014
Plantaricin KL-1X, KL-1Y และ KL-1Z	Culture Supernatant 85% Ammonium Sulfate Precipitation SP-Sepharose Fast-Flow Column RP-HPLC	3,053.82, 3,498.16 และ 3,533.16	Rumjuankiat et al., 2015
Plantaricin JLA-9	Culture Supernatant Butanol Extraction Gel-Filtration Chromatography RP-HPLC	1,044	Zhao et al., 2016
Plantaricin DL3	Culture Supernatant Ethyl Acetate Extraction Sephadex G50 Column RP-HPLC	2,149	Lv et al., 2018
Plantaricin LPL-1	Culture Supernatant 70% Ammonium Sulfate Precipitation SP-Sepharose Fast-Flow Column Sephadex G25 Column RP-HPLC	4,347.85	Wang et al., 2018

ตารางที่ 2.2 ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์แบคทีเรียโอซินที่สร้างจากเชื้อ *L. plantarum* (ต่อ)

แบคทีเรียโอซิน	ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์	มวลโมเลกุล (ดาลตัน)	อ้างอิง
Plantaricin J และ K	Culture Supernatant	2,929.32	Xu, Yang, Li, & Gu, 2019
	Macroporous Resin Column	และ	
	HiPrep SP XL Cation Column	3,502.89	
	HPLC		

ที่มา: ผู้วิจัย

2.7 การวิเคราะห์มวลโมเลกุลของแบคทีเรียโอซิน

2.7.1 เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบ SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis; SDS-PAGE)

วิธีการ SDS-PAGE เป็นวิธีการที่นิยมใช้ในการเตรียมสารและแยกสารที่มีประจุให้บริสุทธิ์ รวมถึงยังสามารถใช้เป็นวิธีการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารละลายได้อีกด้วย ภายใต้หลักการที่ว่าสารใดที่มีประจุไฟฟ้าจะเคลื่อนที่ไปยังตำแหน่งที่มีประจุไฟฟ้าตรงข้ามกันในสนามไฟฟ้า โดยเมื่อสารมีประจุเท่ากัน สารที่มีมวลโมเลกุลขนาดเล็กกว่าจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าสารที่มีมวลโมเลกุลขนาดใหญ่ (Yan & Forster, 2011)

2.7.2 แมสสเปกโตรเมตรี (Mass Spectrometry)

แมสสเปกโตรเมตรี เป็นเทคนิคที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์โปรตีน ซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ ตัวอย่างเช่น การระบุขนาดและชนิดของโปรตีน หรือการทำนายลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน เป็นต้น โดยอาศัยหลักการวัดมวลต่อประจุ (Mass to Charge Ratio; m/z) ที่จำเพาะของโปรตีนหรือเปปไทด์ของตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ (Proungvitaya, Klinthong, Janan, & Proungvitaya, 2012)

เทคนิคแมสสเปกโตรเมตรีที่นิยมใช้ในปัจจุบัน มีอยู่ 2 เทคนิค คือ Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry หรือ MALDI-TOF MS และเทคนิค Liquid

Chromatography Mass Spectrometry หรือ LC-MS (Bantscheff, Schirle, Sweetman, Rick, & Kuster, 2007) โดยเทคนิค MALDI-TOF MS เป็นเทคนิคที่อาศัยหลักการ การทำให้สารตัวอย่างแตกตัวเป็น ไอออนก่อนแล้วทำการวิเคราะห์อัตราส่วนมวลต่อประจุ โดยการผสมสารตัวอย่างกับสารเมทริกซ์ เช่น α -cyano-4-hydroxycinnamic Acid (CHCA) และ 2,5-Dihydroxybenzoic Acid (DHB) เป็นต้น โดยสารดังกล่าวจะมีการคหรือต่างเป็นองค์ประกอบซึ่งจะเป็นสารที่ทำให้ตัวอย่างมีประจุ จากนั้นสาร ผสมจะถูกนำไปหยดลงบนแผ่นโลหะหรือ MALDI Plate แล้วทิ้งไว้ให้ส่วนผสมระเหยจนเหลือเป็น ผลึกสาร จากนั้นนำไปยิงด้วยแสงเลเซอร์ เมทริกซ์จะทำหน้าที่เป็นตัวกลางในการถ่ายทอดพลังงาน จากเลเซอร์ไปยังโปรตีนหรือเปปไทด์ที่มีประจุ แล้วเกิดการแตกตัวเป็นไอออน ส่งผลให้โปรตีนเกิด การเคลื่อนที่ แล้วนำไปวิเคราะห์มวลสารด้วย Mass Analyzer ชนิด Time-of-Flight (TOF) โดย โปรตีนที่มีมวลน้อยกว่าจะมีการเคลื่อนที่ไปยังตัวรับ (Detector) ได้เร็วกว่าโปรตีนที่มีมวลมาก ดังนั้นจึงสามารถคำนวณระยะเวลาที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่และคำนวณเป็นมวลของสารตัวอย่างได้ (Wieser, Schneider, Jung, & Schubert, 2012) และเทคนิค LC-MS เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยก โปรตีนที่อยู่ในสถานะของเหลวภายใต้หลักการของ Liquid Chromatography และการทำให้เกิด Ion Source แบบ Electrospray Ionization (ESI) โดยเทคนิคนี้จะสามารถระบุชนิดของโปรตีนได้ด้วย วิธีแมสสเปกโตรเมตรี รวมถึงยังสามารถวิเคราะห์ผลเปรียบเทียบกับเชิงปริมาณได้ (Becker & Bern, 2011)

2.8 การใช้แบคทีเรียโอซินในอาหาร

การนำแบคทีเรียโอซินไปใช้ในอาหารสามารถทำได้ 3 วิธี คือ การใช้แบคทีเรียโอซิน บริสุทธิ์หรือบริสุทธิ์บางส่วนในการเติมเป็นส่วนประกอบอาหาร (Purified/Partially Purified Bacteriocin) การใช้เชื้อที่สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินผสมกับองค์ประกอบที่ใช้เตรียมอาหาร (Protective Culture) และการใช้เชื้อที่สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินเป็นกล้ำเชื้อร่วมกับสายพันธุ์ อื่น ๆ ในการหมัก (Starter Culture) (Deegan, Cotter, Hill, & Ross, 2004)

Hashimoto, Bari, Inatsu, Kawamoto, and Shima (2011) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการถนอม คามาโบโกะหรือซูริมิหนึ่งด้วยวิธีทางชีวภาพ โดยการใช้ Piscicolin KH1 ที่ผลิตจาก *Carnobacterium maltalomaticum* KH1 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการโครมาโตกราฟี ในการยับยั้งการ เจริญของ *Enterococcus* sp. และ *Leuconostoc* sp. ที่เป็นสาเหตุทำให้ผลิตภัณฑ์เป็นเมือก ซึ่งไม่เป็น ที่ยอมรับของผู้บริโภค นอกจากนี้จากการศึกษายังพบว่า Piscicolin KH1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง

เชื้อ *E. faecalis* และ *L. mesenteroides* ที่ปนเปื้อนในคามาโบโกะหรือซูริมิ่งได้มากกว่า Nisin ในขณะที่ Cobo Molinos et al. (2009) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการส่งเสริมกิจกรรมการทำลายจุลินทรีย์โดยใช้ Enterocin AS-48 ร่วมกับน้ำมันหอมระเหย สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และสารกันเสีย เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* จากการศึกษาพบว่าการใช้สาร Enterocin AS-48 (30-60 ไมโครกรัม) ที่สร้างจาก *E. faecalis* A-48-32 ร่วมกับน้ำมันหอมระเหยชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ไทม์ เวอร์บีนา เรด ออริกาโนสเปน อังเวน ต้นชา กานพลู และน้ำมันดอกเสจ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตรต่อปริมาตร และน้ำมันหอมระเหยโรสแมรี่ ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตรต่อปริมาตร สามารถลดปริมาณเชื้อ *L. monocytogenes* ในน้ำสลัดสำเร็จรูปพร้อมรับประทาน ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ได้มากกว่า 3.5 log CFU/g

Anacarso et al. (2014) ได้ทำการศึกษาการลดปริมาณเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ATCC 14715 และเชื้อ *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 ระหว่างการเก็บรักษาเนื้อปลาแซลมอน ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 144 ชั่วโมง โดยแช่เนื้อปลาแซลมอนในตะกอนของเชื้อ *Lactobacillus pentosus* 39 ที่ละลายอยู่ในสารละลาย Peptone เป็นระยะเวลา 5 นาที พบว่า สามารถลดปริมาณเชื้อ *A. hydrophila* ATCC 14715 ได้ 2.1 log CFU/g และสามารถลดเชื้อ *L. monocytogenes* ATCC 19117 ได้ 3.6 log CFU/g นอกจากนี้จากการศึกษาของ Dortu et al. (2008) ยังพบว่าการเติมเชื้อ *L. curvatus* CWBI-B28 ที่ผลิต Sakacin P ร่วมกับเชื้อ *L. sakei* CWBI-B1365 ที่ผลิต Sakacin G ลงบนพื้นผิวของเนื้อวัวและเนื้อไก่ดิบ แล้วเก็บใส่ถุงปิดผนึก เก็บที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *L. monocytogenes* CWBI-B715 ได้ดีกว่าการใช้เชื้อใดเชื้อหนึ่งเพียงเชื้อเดียว

2.9 Streptococcus suis

2.9.1 แบคทีเรียวิทยา

เชื้อ *Streptococcus suis* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ที่ถูกจัดอยู่ในสกุล *Streptococcus* ในตระกูล *Streptococcaceae* เจริญเติบโตแบบไม่ใช้ออกซิเจน ให้ α -hemolytic บน Sheep Blood Agar เมื่อเลี้ยงในสภาวะไร้อากาศ รูปร่างกลม ลักษณะเซลล์ของแบคทีเรียจะเรียงตัวเป็นคู่หรือสายยาวขนาดต่าง ๆ (Yongkiettrakul et al., 2019) ไม่สร้างเอนไซม์อะตาเลส และไม่เคลื่อนที่ เชื้อ *S. suis* เป็นเชื้อที่พบได้ทั่วไปในสุกร โดยมักพบได้ในระบบทางเดินหายใจส่วนต้น เช่น โพรงจมูก ต่อม

ทอนซิล ต่อมน้ำลาย ระบบทางเดินอาหาร และในบางครั้งอาจพบอยู่ในช่องคลอดของสุกร (Padungtod et al., 2010; Thayawiwat, Wichaikam, & Painpringam, 2012)

2.9.2 ระบาดวิทยา

เชื้อ *S. suis* จะก่อโรคในสุกรที่อ่อนแอ โดยเฉพาะสุกรหย่านมและลูกสุกรแรกคลอด รวมไปถึงสุกรที่อยู่ในสถานที่แออัด บริเวณที่อากาศชื้น หรือหนาวจากฝนตกหนัก โดยเมื่อภูมิคุ้มกันของสุกรลดลง เชื้อดังกล่าวที่เกาะตัวที่เยื่อเมือก (Mucosal Membrane) โดยเฉพาะช่องเล็ก ๆ บริเวณต่อมทอนซิล (Tonsillar Crypt) จะฉวยโอกาสเพิ่มจำนวนแล้วแพร่ผ่านไปยังทางเดินน้ำเหลืองและเข้าสู่กระแสเลือดส่งผลให้สุกรป่วยหรือตายได้ (Haas & Grenier, 2018) ปัจจุบันมีการจัดแบ่งเชื้อตามลักษณะของ Capsular Antigen เป็นซีโรไทป์ (Serotype) ต่าง ๆ โดยอาศัยความแตกต่างของแอนติเจนบนผิวของผนังเซลล์ ได้ถึง 35 ซีโรไทป์ โดยแต่ละซีโรไทป์จะมีความรุนแรงในการก่อโรคแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับสาร Muramidase-Released Protein (MRP) และ Extracellular Protein (EP) โดยซีโรไทป์ที่มักก่อให้เกิดโรคในสุกร ได้แก่ ซีโรไทป์ 12, 2, 14 และ 19 (Gottschalk, Xu, Calzas, & Segura, 2010)

เชื้อ *S. suis* นอกจากจะก่อโรคและแพร่กระจายเชื้อในสุกรได้แล้ว ยังสามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อจากสุกรไปสู่มนุษย์ได้อีกด้วย ทั้งนี้กระบวนการเกิดโรคติดเชื้อสเตฟโตค็อกคัส ซูอิส หรือโรคไขหูดับ ในมนุษย์ยังไม่มีคำอธิบายที่ชัดเจน แต่มีการคาดการณ์ลำดับการเกิดโรค คือหลังจากผู้ป่วยได้รับเชื้อ *S. suis* เข้าสู่ร่างกายทั้งจากการได้รับเชื้อโดยตรงจากสุกรที่ป่วย สุกรที่เป็นพาหะ หรือได้รับเชื้อจากเนื้อสุกรที่มีการปนเปื้อนของเชื้อ ผ่านเข้าสู่ทางบาดแผลโดยการสัมผัสหรือได้รับเชื้อผ่านการบริโภคเนื้อและเลือดสุกรสด เชื้อ *S. suis* จะเพิ่มจำนวน (Colonized) ก่อน ณ บริเวณที่มีการสัมผัสหรือรับเชื้อเข้าสู่ร่างกาย จากนั้นเชื้อจะมีการหลบหลีกภูมิคุ้มกันของมนุษย์ แล้วแพร่กระจายทางกระแสโลหิต ผ่านภูมิคุ้มกันของระบบประสาทและเข้าสู่สมอง โดยซีโรไทป์ที่มีความรุนแรงในการก่อโรคในมนุษย์คือ ซีโรไทป์ 2 (Mueang & Nakhon, 2015; Rayanakorn, Goh, Lee, Khan, & Saokaew, 2018) โรคติดเชื้อสเตฟโตค็อกคัส ซูอิส หรือโรคไขหูดับ มีการรายงานการติดเชื้อในมนุษย์ครั้งแรกที่ประเทศเดนมาร์ก เมื่อปี พ.ศ. 2511 จากรายงานพบว่าผู้ป่วย 2 ราย ติดเชื้อที่เยื่อหุ้มสมอง และ 1 ราย ติดเชื้อในกระแสเลือด (Perch, Kristjansen, & Skadhauge, 1968) และพบรายงานผู้ป่วยติดเชื้อนี้ในประเทศแถบทวีปยุโรป อเมริกา ออสเตรเลีย และเอเชียในเวลาต่อมา (Kay, Cheng, & Tse, 1995) จนกระทั่งพบการระบาดครั้งใหญ่ประเทศแถบเอเชีย เมื่อปี พ.ศ. 2548 ใน

มณฑลเสฉวน ประเทศจีน จากรายงานพบผู้ป่วยติดเชื้อสเต็ปโตค็อกคัส ซูอิส 215 ราย และเสียชีวิตมากถึง 39 ราย โดยสาเหตุเกิดจากการฆ่าและชำแหละสุกรที่ป่วยตายโดยไม่ทราบสาเหตุแบบไม่ถูกสุขลักษณะ (Yu et al., 2006) สำหรับประเทศไทยพบรายงานการติดเชื้อสเต็ปโตค็อกคัส ซูอิส ครั้งแรกในปี พ.ศ. 2530 (Phuapradit et al., 1987) และพบการรายงานผู้ป่วยติดเชื้อมากขึ้นเรื่อยมา โดยส่วนมากมักเป็นผู้ป่วยติดเชื้อจากจังหวัดในแถบภาคเหนือ (Kerdsin, 2022) และส่วนใหญ่เป็นผู้ป่วยเพศชายที่มีประวัติสัมผัสกับสุกรและบริโภคเนื้อหรือเลือดสุกรดิบ โดยร้อยละ 75 ของปริมาณผู้ป่วยทั้งหมดพบประวัติว่ามีการดื่มสุราร่วมด้วย ก่อนเกิดอาการเจ็บป่วย (นิมิตร เลิศพัฒนสุวรรณ 2555; Suankratay, Intalapaporn, Nunthapisud, Arunyingmongkol, & Wilde, 2004) ในปี พ.ศ. 2564 ข้อมูลจากกองระบาดวิทยา กรมควบคุมโรคได้ รายงานจำนวนผู้ติดเชื้อ *S. suis* ซึ่งพบผู้ติดเชื้อสูงถึง 557 ราย และพบจำนวนผู้เสียชีวิต 24 ราย ทั้งนี้โรคติดเชื้อดังกล่าวยังคงมีแนวโน้มการระบาดเพิ่มมากขึ้นและถึงแม้จะมีการรายงานอันตรายของโรคที่เกิดจากการบริโภคเนื้อและส่วนอื่น ๆ ของหมูที่ไม่ผ่านการปรุงสุก การรณรงค์ให้ความรู้ รวมถึงติดตามสถานการณ์การแพร่ระบาดอย่างใกล้ชิด ก็ยังไม่สามารถลดอัตราการติดเชื้อ *S. suis* เนื่องจากวิถีการบริโภคดังกล่าวเป็นส่วนหนึ่งของวัฒนธรรมและพิธีกรรมของท้องถิ่น โดยเฉพาะจังหวัดในแถบภาคเหนือของไทยมาอย่างยาวนาน (Takeuchi et al., 2017; Takeuchi et al., 2012) นอกจากนี้ Brizuela et al. (2023) ยังได้รายงานพบผู้ป่วยติดเชื้อ *S. suis* ในอำเภอดานขุนทด จังหวัดนครราชสีมา ในระหว่างวันที่ 28 มีนาคม-8 เมษายน พ.ศ. 2564 โดยพบผู้ป่วยทั้งสิ้น 199 ราย และพบผู้เสียชีวิต 2 ราย โดยสาเหตุการติดเชื้อเกิดจากการรับประทานอาหารที่ปรุงจากเนื้อหมูและเนื้อปลาดิบร่วมกันในงานอุปสมบท นอกจากสถานการณ์การระบาดของโรคที่เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง ปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อถือเป็นปัญหาสำคัญที่ไม่ควรเพิกเฉย ดังนั้นการใช้สารออกฤทธิ์ที่ได้จากธรรมชาติที่ไม่ก่อให้เกิดการดื้อยาของจุลินทรีย์ถือเป็นทางเลือกหนึ่งที่สำคัญ

2.9.3 การแสดงอาการจากการติดเชื้อ *S. suis*

สุกรที่ติดเชื้อ *S. suis* จะส่งผลให้สุกรตายเฉียบพลัน โดยมีสาเหตุจากการเกิดสภาวะเลือดเป็นพิษ เชื้อหุ้มสมองอักเสบ มีไข้สูง และข้ออักเสบ ทั้งนี้สุกรบางตัวอาจตายโดยไม่แสดงอาการของโรคมาก่อน ในกรณีของลูกสุกรหย่านมอาการที่สังเกตได้ เช่น ลักษณะเคลื่อนไหวของขาที่ไม่สัมพันธ์กัน การนอนขดตัว การมีอาการชัก เหยียดเกร็ง อาการกรอกตาไปมา เยื่อตาบวม ตรวจพบอาการปอดบวม และข้ออักเสบเนื่องจากเลือดเป็นพิษ หรือในบางกรณีอาจตรวจพบลิ้นหัวใจ

อวัยวะมีฝีหนองและระบบสืบพันธุ์ล้มเหลว ซึ่งอาการเหล่านี้ยังเป็นตัวบ่งชี้ถึงการติดเชื้อ *S. suis* ในฝูงได้ (Pallarés et al., 2003)

ส่วนในมนุษย์ที่ติดเชื้อ *S. suis* ระยะเวลาเฉลี่ยของการแสดงอาการเจ็บป่วยจะแตกต่างกัน โดยมากมักอยู่ระหว่าง 3 วัน ถึง 2 สัปดาห์ โดยอาการที่พบบ่อย ได้แก่ มีไข้ ปวดศีรษะ รวมทั้งอาการอื่น ๆ คือ ท้องเสีย คลื่นไส้ อาเจียน วิงเวียนศีรษะ และคอแข็ง ในรายที่มีการติดเชื้ออย่างรุนแรงจะพบผื่นผิวหนังจุดเลือดออก ร่วมกับภาวะแทรกซ้อนที่พบได้ ได้แก่ ภาวะช็อก ระบบหายใจล้มเหลว ไตวายเฉียบพลัน ภาวะเลือดแข็งตัวผิดปกติ หรือเยื่อหุ้มสมองอักเสบเฉียบพลัน ในผู้ป่วยบางรายอาจไม่พบภาวะเยื่อหุ้มสมองอักเสบ แต่จะพบภาวะการติดเชื้อในกระแสเลือด หรือบางรายอาจติดเชื้อในเยื่อหุ้มหัวใจแบบกึ่งเฉียบพลัน และอาจรุนแรงถึงขั้นเสียชีวิต ทั้งนี้ในผู้ป่วยที่รอดชีวิตบางรายจะพบความพิการจากการเกิดโรคหลงเหลืออยู่ ได้แก่ การหูหนวกทั้งสองข้าง และการเป็นอัมพาตครึ่งซีก (Choi et al., 2012)

2.9.4 แนวทางการรักษาเนื่องจากการติดเชื้อ *S. suis*

การวินิจฉัยโรคสามารถทำได้โดยการสืบประวัติจากการสัมผัสโรค สังเกตจากลักษณะอาการของผู้ป่วย การตรวจร่างกายผู้ป่วยอย่างละเอียด รวมถึงการตรวจเชื้อในระดับห้องปฏิบัติการ โดยเก็บตัวอย่างจากเลือด น้ำไขสันหลัง และของเหลวภายในข้อ ส่วนในสุกรจะเก็บตัวอย่างจากอวัยวะที่ได้รับผลกระทบจากการติดเชื้อและเกิดความผิดปกติ เช่น ปอด หัวใจ ม้าม ไต สมอง ต่อม น้ำเหลือง หนองในข้อ รก ตัวอ่อนในแม่สุกรอุ้มท้อง และนมจากเต้านมที่อักเสบ เป็นต้น จากนั้นนำตัวอย่างทั้งหมดมาเพาะเชื้อและส่งตรวจหาเชื้อ ซึ่งปัจจุบันนิยมตรวจเชื้อโดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ตรวจหาชิ้นที่จำเพาะต่อเชื้อ (Meekhanon, 2016) หลังจากนั้นแพทย์จะทำการรักษาตามอาการหรือการรักษาแบบประคับประคอง เช่น การให้สารน้ำที่เหมาะสมเมื่อพบการติดเชื้อในกระแสเลือด การช่วยในการหายใจเมื่อเกิดภาวะการหายใจล้มเหลว รวมถึงการฟอกไตเมื่อพบภาวะไตวายเฉียบพลัน เป็นต้น และทำการรักษาจำเพาะด้วยยาปฏิชีวนะในกลุ่ม β -Lactams ได้แก่ Penicillin และ Cephalosporin และยาปฏิชีวนะในกลุ่ม Fluoroquinolones เช่น Norfloxacin, Ciprofloxacin และ Levofloxacin เป็นต้น ซึ่งเป็นยาที่นิยมใช้ในการรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ *S. suis* ทั้งในมนุษย์และสุกร (Seitz, Valentin-Weigand, & Willenborg, 2016) ทั้งนี้จากรายงานของ Yongkiettrakul et al. (2019) พบการรายงานการเริ่มเกิดภาวะคือยาปฏิชีวนะของเชื้อ *S. suis* ที่คัดแยก

จากสุกรจากภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย ส่วนเชื้อ *S. suis* ซีโรไทป์ 2 ที่แยกได้จากมนุษย์ยังไม่พบ การรายงานว่ามีความไวต่อยาปฏิชีวนะที่นิยมใช้ทุกกลุ่ม

2.10 อาหารที่ปรุงจากเนื้อหมูสด

ลาบจัดเป็นอาหารพื้นเมือง ในแถบจังหวัดภาคเหนือและภาคอีสานของประเทศไทย โดยเฉพาะชาวล้านนา โดยลาบมีความหมายถึงการสับให้ละเอียด โดยมากมักปรุงมาจากเนื้อสัตว์หลายชนิด เช่น เนื้อไก่ เนื้อเป็ด เนื้อวัว เนื้อควาย เนื้อปลา รวมถึงเนื้อหมู ที่นำมาสับให้ละเอียดรวมกับพริกและเลือดสด โดยพริกลาบจะประกอบด้วยเครื่องเทศหลายชนิด ได้แก่ ลูกผักชี มะแขว่น ดีปลี ลูกจันทน์ ใบยี่เก็ก เทียนข้าวเปลือก ยี่ห่วย เมล็ดผักชีลาว อบเชย กระวาน เปราะหอม พริกไทยดำ หมากรุก เป็นต้น นอกจากนี้ลาบยังนิยมรับประทานคู่กับสมุนไพรที่มีกลิ่นแรง เช่น ปืบ กระถิน ยอดมะกอก เล็บครุฑ และผักลาวทอง เป็นต้น (รัตนา พรหมพิชัย, 2542) ส่วนลาบในแถบจังหวัดภาคอีสาน จะปรุงจากเนื้อสัตว์ที่สับละเอียด ปรุงรสด้วยน้ำปลา มะนาว ข้าวคั่ว พริกป่น ใบสะระแหน่ ต้นหอม และหอมแดง ในบางกรณีอาจมีการเติมเลือดและไข่เพียงลงไปด้วย โดยอาหารจำพวกลาบนี้ จะนิยมรับประทานกันในโอกาสพิเศษหรือในเทศกาลต่าง ๆ เนื่องจากสามารถรับประทานได้หลายคนและจากพฤติกรรมการบริโภคดังกล่าว จึงเสี่ยงต่อการเกิดโรคที่เกิดจากการปนเปื้อนเป็นจุลินทรีย์ในอาหารและมักพบรายงานผู้ป่วยพร้อมกันครั้งละจำนวนมาก ๆ (จิราภรณ์ หลาบคำ, อมาวสี พิทักษ์, และฤทธิไกร แสนยานันต์, 2561)

Cheung et al. (2008) รายงานการพบเชื้อ *S. suis* ที่ปนเปื้อนในเนื้อหมูดิบ โดยมีจำนวนเชื้อ *S. suis* อยู่ระหว่าง <3 -4600 MPN/g นอกจากนี้ Khantasup et al. (2022) รายงานการตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อ *S. suis* ในเนื้อหมูและเลือดหมูในจังหวัดนครสวรรค์ ระหว่างเดือนธันวาคม พ.ศ. 2563-มกราคม พ.ศ. 2564 โดยพบการปนเปื้อนของเชื้อ *S. suis* ในเนื้อหมูและเลือดหมูจากโรงฆ่าสัตว์ มีปริมาณเชื้อเท่ากับ 6.8×10^{-3} CFU/g และ 6.83 CFU/mL ตามลำดับ ในขณะที่ปริมาณเชื้อ *S. suis* ที่ตรวจพบในเนื้อหมูและเลือดหมูที่ขายปลีกมีปริมาณเท่ากับ 2.3×10^{-3} CFU/g และ 2.3 CFU/mL ตามลำดับ และจากรายงานการสำรวจการปนเปื้อนเชื้อ *S. suis* ในกรุงเทพมหานคร ฯ ระหว่างเดือนพฤษภาคม-ธันวาคม พ.ศ. 2559 ของ Wongnak, Wiratsudakul, and Nuanualsuwan (2020) พบการปนเปื้อนของเชื้อ *S. suis* ในเลือดหมูจากโรงงานฆ่าสัตว์ ปริมาณเฉลี่ย 2.7 CFU/mL และพบเชื้อปนเปื้อนในเนื้อหมูปริมาณ 2.9-5.4 log CFU/g

นอกจากนี้ Rattanadilok na Phuket, Tongsakulpanis, and Direksin (2016a) รายงานพบการปนเปื้อนของเชื้อ *S. suis* ในลาบ โดยการสุ่มเก็บตัวอย่างลาบหมูดิบ จากร้านอาหารและตลาดสดในจังหวัดขอนแก่น ร้อยเอ็ด มหาสารคาม สกลนคร และนครพนม โดยพบการปนเปื้อนเชื้อ ร้อยละ 13.3 นอกจากนี้ Rattanadilok na Phuket et al. (2016b) ยังได้ทำการสำรวจการปนเปื้อนของเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus suis*, *Salmonella* spp. และ *Escherichia coli* ในแฮมหมูที่ผลิตและจำหน่ายในจังหวัดแถบภาคอีสานตอนบนของประเทศไทย โดยจากการสำรวจพบเพียงการปนเปื้อนของเชื้อ *S. aureus*, *Salmonella* spp. และ *E. coli* แต่ไม่พบเชื้อ *S. suis* โดยสาเหตุที่ไม่พบ *S. suis* อาจเนื่องจากเชื้อกลุ่ม *S. suis* อาจตายในระหว่างกระบวนการหมัก หรือถูกยับยั้งจากสารที่ผลิตจากเชื้อกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก



บทที่ 3

ระเบียบวิธีการวิจัย

3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบคุณสมบัติของสารยับยั้งแบคทีเรีย ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางอาหาร ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค สวทช.) แสดงดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ตารางแสดงแบคทีเรียเป้าหมายที่ใช้ทดสอบ

แบคทีเรียเป้าหมาย ¹	อาหารเลี้ยงเชื้อ ²	อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยง (องศาเซลเซียส)
Gram-Positive Bacteria		
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	TSB	30
<i>Bacillus subtilis</i> JCM 1465 ^T	TSB	30
<i>Enterococcus faecalis</i> JCM 5803 ^T	MRS	37
<i>Lactobacillus sakei</i> JCM 1157 ^T	MRS	30
<i>Lactococcus lactis</i> ATCC 19435	MRS	30
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	TSB	37
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	TSB	37
<i>Micrococcus luteus</i> NBRC 12708	TSB	30
<i>Staphylococcus aureus</i> DMST 20635	TSB	37
<i>Streptococcus suis</i> NaH	THY	37
<i>Streptococcus suis</i> P1/7	THY	37
<i>Streptococcus agalactiae</i> 1611	TSB	30

ตารางที่ 3.1 ตารางแสดงแบคทีเรียเป้าหมายที่ใช้ทดสอบ (ต่อ)

แบคทีเรียเป้าหมาย ¹	อาหารเลี้ยงเชื้อ ²	อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยง (องศาเซลเซียส)
Gram-Negative Bacteria		
<i>Aeromonas veronii</i> 1755	TSB	30
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	TSB	37
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35401	TSB	37
<i>Escherichia coli</i> F18	TSB	37
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	TSB	37
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	TSB	37
<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 13311	TSB	37
<i>Vibrio harveyi</i> AQVH 01	TSB+1.5% NaCl	30

¹ ATCC = American Type Culture Collection, Rockville, Md, USA; JCM = Japan Collection of Microorganisms, Wako, Japan; DMST = Department of Medical Sciences, Thailand; NBRC = NITE Biological Resource Center, Chiba, Japan

² MRS = De man, Rogosa and Sharpe (Difco™, USA), TSB = Tryptic Soy Broth (Difco™, USA), THY = Todd-Hewitt Broth (Oxoid, England) Supplemented with 2% Yeast Extract (Difco™, USA)

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.2.1 MALDI Target Plate (MTP 384 Steel Target, Bruker Daltonics, Bremen, Germany)

3.2.2 Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (Ultraflex III MALDI-TOF/TOF, BrukerDaltonics, Bremen, Germany)

3.2.3 Microplate Reader (SpectraMax® 340PC384, Molecular Devices, USA)

3.2.4 Reverse Phase Column (Resource RPC3-mL, GE Healthcare, Sweden)

3.2.5 Sep-Pak® C₁₈ Cartridges (Waters, USA)

3.2.6 Sterile Membrane Filter ขนาด 0.2 ไมโครเมตร (0.2 µm Hydrophilic PTFE Syringe Filters, Advantec, Japan)

3.2.7 คอลัมน์โครมาโตกราฟี (BIO-RAD Econo-Column®, USA)

3.2.8 เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Büchi R-114 Rotavapor, Switzerland)

- 3.2.9 เครื่องกวนสารละลาย (IKA[®] C-MAG HS 7, Germany)
- 3.2.10 เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Waters, USA)
- 3.2.11 เครื่องชั่งไฟฟ้าชนิดละเอียด (Shimadzu S321, Japan)
- 3.2.12 เครื่องชั่งไฟฟ้าชนิดหยาบ (Shimadzu UX8200S, Japan)
- 3.2.13 เครื่องตีบดอาหาร (Stomacher[™] Model 400 Circulator Lab Blender, Seward[™], England)
- 3.2.14 เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (FreeZone 4.5 Liter -84C Benchtop Freeze Dryers, Labconco[™] Corporation, USA)
- 3.2.15 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Microcentrifuge Models 5418/5418R, Eppendorf, Germany)
- 3.2.16 เครื่องปั่นเหวี่ยงสุญญากาศ (Concentrator Plus 5305, Eppendorf, Germany)
- 3.2.17 เครื่องผสมสารละลาย (Scientific Industries G560E, USA)
- 3.2.18 เครื่องวัดค่า pH (Toledo[™] 30019033, Switzerland)
- 3.2.19 เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิความเร็วสูง (TOMY MX-370, Japan)
- 3.2.20 ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ -80 องศาเซลเซียส (Thermo Scientific[™] TLE Ultra-Low Freezers TLE60086A, USA)
- 3.2.21 ตู้ดูดควัน (ProLAB Model FH120, UK)
- 3.2.22 ตู้บ่มเชื้อจุลินทรีย์ (Mettler BE 600, Germany)
- 3.2.23 ตู้ปลอดเชื้อ (Nuaire NU-440-600 Series 17/6 Biological Safety Cabinet, UAE)
- 3.2.24 ถาดหลุม (96-well Polystyrene Microplates, Falcon[®], USA)
- 3.2.25 ปั๊มดูดจ่ายสารละลาย (BIO-RAD EP-1 Econo Pump Peristaltic Fluid Pump, USA)
- 3.2.26 เรซิน Amberlite XAD-16 (Sigma-aldrich, USA)
- 3.2.27 เรซิน Q-Sepharose Resin (GE Healthcare, USA)
- 3.2.28 เรซิน SP-Sepharose (GE Healthcare, Sweden)
- 3.2.29 หม้อต้มเครื่องมือแพทย์ (BMS BS-8L, Thailand)
- 3.2.30 หม้อนิ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (Tomy SX-700, Digital Biology, Japan)
- 3.2.31 ออโต้ปีเปต (Gilson, France)
- 3.2.32 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Mettler WNE 14, Germany)
- 3.2.33 อ่างหมุนวนทำความเย็น (FreeZone Benchtop Shell Freezers, Labconco[™] Corporation, USA)
- 3.2.34 อุปกรณ์เครื่องแก้วชนิดต่าง ๆ

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

3.3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 3.3.1.1 Agar Powder (Difco™, USA)
- 3.3.1.2 Beef Extract (Difco™, USA)
- 3.3.1.3 Brain Heart Infusion (BHI, Difco, USA)
- 3.3.1.4 de Man, Rogosa and Sharpe (MRS, Difco™, USA)
- 3.3.1.5 Dextrose Monohydrate (Merck, Germany)
- 3.3.1.6 D(+)-Glucose Anhydrous (Merck, Germany)
- 3.3.1.7 Lactose (Oxoid™, USA)
- 3.3.1.8 M17 Broth (Oxoid™, USA)
- 3.3.1.9 Meat Extract (Merck, Germany)
- 3.3.1.10 Nutrient Broth (NB, Difco™, USA)
- 3.3.1.11 Proteose Peptone, No.3 (Bacto™, USA)
- 3.3.1.12 Sheep Blood (Envimed, Thailand)
- 3.3.1.13 Todd-Hewitt Broth (THY, Oxoid, UK)
- 3.3.1.14 Tryptic Soy Broth (TSB, Difco™, USA)
- 3.3.1.15 Tryptone Peptone (Difco™, USA)
- 3.3.1.16 Yeast Extract (Difco™, USA)

3.3.2 สารเคมี

- 3.3.2.1 Acetone (Merck, Germany)
- 3.3.2.2 Acetonitrile (Merck, Germany)
- 3.3.2.3 Ammonium Sulfate (RCI Labscan, Thailand)
- 3.3.2.4 Barium Chloride (Merck, Germany)
- 3.3.2.5 Calcium Carbonate (Sigma-aldrich, USA)
- 3.3.2.6 Colistin Sulfate (Sigma-aldrich, USA)
- 3.3.2.7 Copper (II) Sulfate Pentahydrate (QRĖC® , Newzealand)

- 3.3.2.8 Crystal Violet (Merck, Germany)
- 3.3.2.9 Di-ammonium Hydrogen Citrate (Merck, Germany)
- 3.3.2.10 Di-potassium Hydrogen Phosphate (Merck, Germany)
- 3.3.2.11 Ethanol (Merck, Germany)
- 3.3.2.12 Ethylenediaminetetraacetic Acid (Merck, Germany)
- 3.3.2.13 Folin-ciocalteu Phenol (Merck, Germany)
- 3.3.2.14 Glycerol (NZYTech, Turkey)
- 3.3.2.15 Hydrochloric Acid (Merck, Germany)
- 3.3.2.16 Isopropanol (Merck, Germany)
- 3.3.2.17 Magnesium Sulfate (Sigma-aldrich, USA)
- 3.3.2.18 Manganese Sulfate (CARLO ERBA, Milano, Italy)
- 3.3.2.19 Nalidixic Acid (Sigma-aldrich, USA)
- 3.3.2.20 Phosphate (Merck, Germany)
- 3.3.2.21 Sodium Acetate (Sigma-aldrich, USA)
- 3.3.2.22 Sodium Azide (Merck, Germany)
- 3.3.2.23 Sodium Carbonate (Ajax Finechem, Australia)
- 3.3.2.24 Sodium Chloride (Merck, Germany)
- 3.3.2.25 Sodium Citrate (QRĖC[®], Newzealand)
- 3.3.2.26 Sodium Dodecyl Sulfate (Merck, Germany)
- 3.3.2.27 Sodium Hydroxide (Ajax Finechem, Australia)
- 3.3.2.28 Sodium Phosphate Dibasic (Merck, Germany)
- 3.3.2.29 Sodium Phosphate Monobasic (CARLO ERBA, Milano, Italy)
- 3.3.2.30 Sulfuric Acid (Merck, Germany)
- 3.3.2.31 Trifluoroacetic Acid (Sigma-aldrich, USA)
- 3.3.2.32 Tris Base (NZYTech, Turkey)
- 3.3.2.33 Triton X-100 (Merck, Germany)
- 3.3.2.34 Tween 20 (Merck, Germany)
- 3.3.2.35 Tween 80 (Merck, Germany)
- 3.3.2.36 Urea (QRĖC[®], Newzealand)
- 3.3.2.37 α -cyano-4-hydroxycinnamic (Thermo Fisher Scientific, USA)

3.3.3 เอนไซม์

- 3.3.3.1 Amylase (Sigma-aldrich, USA)
- 3.3.3.2 Lipase (Sigma-aldrich, USA)
- 3.3.3.3 Pepsin (Sigma-aldrich, USA)
- 3.3.3.4 Proteinase K (Sigma-aldrich, USA)
- 3.3.3.5 Trypsin (Sigma-aldrich, USA)
- 3.3.3.6 α -chymotrypsin (Sigma-aldrich, USA)

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตแบคทีเรียโอซิน

3.4.1.1 การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความสามารถในการผลิตสารยับยั้งแบคทีเรีย

ทำการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์อาหารหมักประเภทผักดองพื้นบ้านของไทย ได้แก่ ต้นหอมดอง ผักกาดดอง ผักเสี้ยนดอง ผักกุ่มดอง หน่อไม้ดอง และผักหนามดอง โดยนำตัวอย่างผักดองแต่ละชนิด น้ำหนัก 25 กรัม ผสมกับสารละลาย Normal Saline (Sodium Chloride (NaCl) ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 โดยมวลต่อปริมาตร) ปริมาตร 225 มิลลิลิตร จากนั้นตีบดให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องตีบดอาหาร แล้วทำการเจือจางต่อด้วยวิธี 10-Fold Serial Dilution แล้วเปิดสารละลายปริมาตร 100 ไมโครลิตร ไป Spread Plate ลงบนอาหารแข็ง MRS ที่เติม Calcium Carbonate (CaCO_3) ร้อยละ 0.5 โดยมวลต่อปริมาตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Bautista-Gallego et al., 2013; Hwanhlem, Chobert, & Aran, 2014) จากนั้นทำการสุ่มเลือกโคโลนีที่มีบริเวณใส (Clear Zone) รอบ ๆ โคโลนี นำมาเลี้ยงต่อในอาหารเหลว MRS เพื่อทำเป็น Stock Culture โดยเก็บในอาหารเหลวที่เติม Glycerol ที่ความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 20 โดยปริมาตรต่อปริมาตร แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทำการศึกษารุ่นต่อไป

จากนั้นทำการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี Spot-on-Lawn ที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Ennahar, Asou, Zendo, Sonomoto, and Ishizaki (2001) โดยการนำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ มาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่อุณหภูมิ 30

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วนำมากำจัดเซลล์แบคทีเรียออกโดยการปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เลือกเก็บเฉพาะส่วนใส (Cell Free Supernatant; CFS) ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่าน Sterile Membrane Filter ขนาด 0.2 ไมโครเมตร จากนั้นนำส่วนที่ได้มาทำการเจือจางด้วยวิธี Two-Fold-Dilution แล้วเปิดสารละลาย ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการ Swab Plate ด้วยแบคทีเรียเป้าหมายที่ต้องการใช้ทดสอบ (ตารางที่ 3.1) ที่ถูกปรับความเข้มข้นให้เท่ากับ 0.5 McFarland (Lalitha, 2004) นำไปบ่มตามสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเป้าหมายแต่ละชนิด สังเกตและบันทึกผล หากสารยับยั้งสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเป้าหมายที่ใช้ทดสอบได้จะเกิดวงใส (Clear Zone) ให้บันทึกค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อ (Inhibition Activity) ในหน่วย AU (Arbitrary Unit) ต่อมิลลิลิตร (AU/mL) ซึ่งสามารถคำนวณได้จากค่าส่วนกลับของระดับความเจือจางสูงสุดของส่วนใสที่ปราศจากเซลล์ ที่ยังสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเป้าหมายที่ใช้ทดสอบได้ต่อมิลลิลิตร (Todorov & Dicks, 2007) ดังสมการ

$$\text{กิจกรรมการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (AU/mL)} = 2^N \times 100$$

โดยที่ N คือ ค่าการเจือจางสูงสุดของส่วนใสที่ใช้ทดสอบที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเป้าหมาย

3.4.1.2 การทดสอบผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่อฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย

นำสารยับยั้งแบคทีเรียที่แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างขึ้นมาทดสอบด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน ได้แก่ Trypsin (pH 7.5), α -chymotrypsin (pH 7.5) และ Pepsin (pH 3.0) โดยเติมเอนไซม์ดังกล่าวให้ความเข้มข้นสุดท้ายในสารละลายเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 นาที (Gao, Y., Jia, Gao, Q., & Tan, 2010) แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียที่เหลืออยู่ (Residual Antimicrobial Activity) ด้วยเทคนิค Spot-on-Lawn Method (Ennahar et al., 2001) โดยใช้เชื้อ *S. suis* P1/7 ในการทดสอบ

3.4.1.3 การจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS

นำแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความสามารถสร้างสารยับยั้งแบคทีเรีย มาจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียด้วยเทคนิค Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight

Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) ซึ่งส่งวิเคราะห์ที่ บริษัท ศูนย์วิทยาศาสตร์เบทาโกร จำกัด จังหวัดปทุมธานี ประเทศไทย โดยนำโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียไป Smear ลงบน MALDI-TOF Target Plate หยดทับด้วย Matrix Solution ปริมาตร 1 ไมโครลิตร จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MALDI-TOF Mass Spectrometer (Microflex, Bruker, Germany) ซึ่งข้อมูลที่ได้จะถูกนำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Biotyper โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลในระบบ (Somsri, Pilasombut, Ngamyeesoon, & Rumjuankiat, 2017)

3.4.2 การศึกษาสถานะที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรียกรดแลคติก

3.4.2.1 การทดสอบผลความแตกต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ pH และความเข้มข้นของ NaCl ต่อการสร้างสารแบคทีเรียโอซิน

ทำการเปรียบเทียบหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการสร้างแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรียกรดแลคติก ด้วยการเติมเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่เลี้ยงในอาหารเหลว MRS ความเข้มข้นประมาณ $9 \log \text{CFU/mL}$ ปริมาตรร้อยละ 1 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่แตกต่างกัน ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว M17, BHI, LAPT, MRS และอาหารสูตร MRS ที่ไม่เติม Tween 80 (Modified MRS; mMRS) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วนำไปทดสอบหาฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย ด้วยวิธี Spot-on-Lawn Method (Ennahar et al., 2001) โดยใช้เชื้อ *S. suis* P1/7 ในการทดสอบ

ทดสอบผลความแตกต่างของ pH และความเข้มข้นของ NaCl ต่อการผลิตแบคทีเรียโอซิน ซึ่งวิธีการทดสอบดัดแปลงจากวิธีการของ Mahrous, Mohamed, Abd El-Mongy, El-Batal, and Hamza (2013) และ Sarika, Lipton, and Aishwarya (2010) ตามลำดับ โดยการปรับค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีค่าเท่ากับ 2-10 ด้วยสารละลาย Hydrochloric Acid (HCl) ความเข้มข้น 1 นอร์มอล และสารละลาย Sodium Hydroxide (NaOH) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ และปรับความเข้มข้นของ NaCl ในอาหารเลี้ยงเชื้อให้เท่ากับร้อยละ 1-12 โดยมวลต่อปริมาตร จากนั้นเติมเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ต้องการทำการทดสอบลงไปปริมาตรร้อยละ 1 โดยปริมาตรต่อปริมาตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทดสอบหาฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย ด้วยวิธี Spot-on-Lawn Method (Ennahar et al., 2001) โดยใช้เชื้อ *S. suis* P1/7 ในการทดสอบ

3.4.2.2 การศึกษาหาผลของอุณหภูมิต่อระยะเวลาที่เหมาะสมในการสร้างแบคทีเรียโอซิน

การทดสอบหาอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมของการสร้างแบคทีเรียโอซิน ทำการทดสอบโดยดัดแปลงวิธีการจาก Huang et al. (2009) โดยการเติมเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก ปริมาตรร้อยละ 1 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ลงในอาหาร MRS ที่เติม NaCl ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยมวลต่อปริมาตร และปรับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีค่าเท่ากับ 7 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง โดยแบ่งเก็บตัวอย่างทุก ๆ 3 ชั่วโมง เพื่อทำการวัดค่า การดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร วิเคราะห์ปริมาณเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกโดยใช้ วิธี Drop Plate Method ลงบนอาหารแข็ง MRS (Herigstad, Hamilton, & Heersink, 2001) และ ทดสอบหาฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย ด้วยวิธี Spot-on-Lawn Method (Ennahar et al., 2001) โดยใช้ เชื้อ *S. suis* P1/7 ในการทดสอบ

3.4.3 การทำบริสุทธิ์แบคทีเรียโอซิน

3.4.3.1 การทำบริสุทธิ์แบคทีเรียโอซินขั้นที่หนึ่ง (Preliminary Purification) โดยใช้วิธีที่แตกต่างกัน 3 วิธี เพื่อทำการเปรียบเทียบและคัดเลือกวิธีที่ดีที่สุดสำหรับการทำบริสุทธิ์แบคทีเรียโอซินเบื้องต้น ดังนี้

(1) การใช้เรซิน Amberlite XAD-16

ทำบริสุทธิ์แบคทีเรียโอซินด้วยวิธี Hydrophobic Interaction โดยใช้ เรซิน Amberlite-XAD 16 ซึ่งดัดแปลงวิธีการจาก Masuda et al. (2012) ด้วยการนำส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* RB01-SO ปริมาตร 1 ลิตร มาผสมกับเรซิน Amberlite-XAD 16 น้ำหนัก 20 กรัม (ผ่านการ Reactivated ด้วยการแช่ใน Isopropanol ความเข้มข้นร้อยละ 70 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง และล้าง Isopropanol ออกด้วยน้ำกลั่น) จากนั้นนำไปเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง บรรจุสารผสมลงในคอลัมน์และเก็บตัวอย่างที่ออกจากคอลัมน์ แล้วล้างเรซินด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จำนวน 4 รอบ เก็บตัวอย่างที่ออกจากคอลัมน์ จากนั้นล้างเรซินต่อด้วย Ethanol ความเข้มข้นร้อยละ 40 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จำนวน 4 รอบ ทำการเก็บตัวอย่างที่ออกจากคอลัมน์ ขั้นตอนสุดท้ายชะโปรตีนตัวอย่างออกจากเรซินด้วย Isopropanol ความเข้มข้นร้อยละ 70 โดยปริมาตรต่อปริมาตร (ที่เติม Trifluoroacetic Acid หรือ TFA ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับร้อยละ 0.1 โดยปริมาตรต่อปริมาตร) นำตัวอย่างที่เก็บได้ไปกำจัด Isopropanol ออกด้วยเครื่อง

กลั่นระเหยแบบหมุน นำตัวอย่างทั้งหมดที่เก็บได้จากทุกขั้นตอนไปหาค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Spot-on-Lawn Method (Ennahar et al., 2001) โดยใช้เชื้อ *S. suis* P1/7 ในการทดสอบและวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry Method (Lowry, Rosebrough, Farr, & Randall, 1951)

(2) การตกตะกอนด้วย Acetone

การตกตะกอนแบคทีเรียโอซินด้วย Acetone โดยดัดแปลงวิธีการจาก Rumjuankiat et al. (2015) ด้วยการนำตัวอย่างส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* RB01-SO ปริมาตร 200 มิลลิลิตร มาผสมกับ Acetone ในอัตราส่วน 1 ต่อ 3 โดยปริมาตรต่อปริมาตร จากนั้นนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เก็บเฉพาะตะกอนไปละลายด้วย Phosphate Buffer (pH 5.6) ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ค่ากิจกรรมการยับยั้ง *S. suis* P1/7 ด้วยวิธี Spot-on-Lawn Method (Ennahar et al., 2001) และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยเทคนิค Lowry Method (Lowry et al., 1951)

(3) การตกตะกอนด้วย Ammonium Sulfate

ตกตะกอนแบคทีเรียโอซินด้วย Ammonium Sulfate โดยทำการตกตะกอนโปรตีนออกจากส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* RB01-SO ซึ่งดัดแปลงวิธีการจาก Sankar et al. (2012) โดยค่อย ๆ เติม Ammonium Sulfate ที่ผ่านการบดให้เป็นผงละเอียด ลงในส่วนใส ปริมาตร 1 ลิตร โดยตกตะกอนด้วย Ammonium Sulfate ที่ความเข้มข้นร้อยละ 20, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80 และ 85 โดยมวลต่อปริมาตร ตามลำดับ (เติม Ammonium Sulfate ตามน้ำหนักที่แสดงในตารางภาคผนวก ข) กวนทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เพื่อแยกตะกอนออกจากส่วนใส นำตะกอนที่ได้มาละลายด้วย Phosphate Buffer (pH 5.6) ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ แล้วนำไปหาค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Spot-on-Lawn Method (Ennahar et al., 2001) โดยใช้เชื้อ *S. suis* P1/7 ในการทดสอบและวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry Method (Lowry et al., 1951)

3.4.3.2 การทำบริสุทธิ์แบคทีเรียโอซินขั้นที่สองด้วยโครมาโตกราฟี (Secondary Purification by Chromatography) นำสารละลายแบคทีเรียโอซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในขั้นที่หนึ่งมาทำให้บริสุทธิ์ในขั้นที่สอง โดยทดลองเปรียบเทียบการทำบริสุทธิ์ของสารที่ได้ด้วยวิธีการต่าง ๆ ดังนี้

(1) การแยกโปรตีนด้วยวิธีแลกเปลี่ยนประจุบวก (Cation-Exchange)

การทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีแลกเปลี่ยนประจุบวก คัดแปลงวิธีการจาก Yi et al. (2016) นำสารละลายลายแบคทีเรียโอซิน ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ผ่านเข้าสู่คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 มิลลิเมตร ยาว 100 มิลลิเมตร ที่บรรจุด้วยเรซิน SP-Sepharose Fast Flow (ผ่านการชะด้วย Phosphate Buffer ที่มีค่า pH เท่ากับ 5.6 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร) ด้วยอัตราการไหล (Flow Rate) 1 มิลลิลิตรต่อนาที เมื่อผ่านตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์เรียบร้อยแล้ว ให้ทำการล้างคอลัมน์โดยการผ่าน Phosphate Buffer ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 40 มิลลิลิตร จากนั้นชะตัวอย่างออกจากเรซินด้วยการผ่าน Phosphate Buffer ที่เติม NaCl ความเข้มข้น 0.25, 0.5, 0.75 และ 1.0 โมลาร์ ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ตามลำดับ เก็บตัวอย่างที่ออกจากคอลัมน์ในทุกขั้นตอนเพื่อนำไปหาค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Spot-on-Lawn Method (Ennahar et al., 2001) โดยใช้เชื้อ *S. suis* P1/7 ในการทดสอบและทดสอบหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry Method (Lowry et al., 1951)

(2) การแยกโปรตีนด้วยวิธีแลกเปลี่ยนประจุลบ (Anion-Exchange)

การทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีแลกเปลี่ยนประจุลบ คัดแปลงจาก Weghoff et al. (2015) โดยการนำสารละลายลายแบคทีเรียโอซิน ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ผ่านเข้าสู่คอลัมน์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 มิลลิเมตร ยาว 100 มิลลิเมตร ที่บรรจุด้วยเรซิน Q-Sepharose Fast Flow (ผ่านการชะด้วย Tris HCl ที่มีค่า pH เท่ากับ 8.0 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 40 มิลลิลิตร) ด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที เมื่อผ่านตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์เรียบร้อยแล้วให้ทำการล้างคอลัมน์ ด้วย Tris HCl (pH 8.0) ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 40 มิลลิลิตร จากนั้นชะตัวอย่างออกจากเรซินด้วยสารละลาย Tris HCl ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ที่เติม NaCl ความเข้มข้น 0.25, 0.5, 0.75 และ 1.0 โมลาร์ ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ตามลำดับ เก็บตัวอย่างที่ออกจากคอลัมน์ในทุกขั้นตอนเพื่อนำไปหาค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Spot-on-Lawn Method (Ennahar et al., 2001) โดยใช้เชื้อ *S. suis* P1/7 ในการทดสอบและทดสอบหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry Method (Lowry et al., 1951)

(3) การแยกโปรตีนด้วย Sep-Pak[®] C₁₈ Cartridge

การทำบริสุทธิ์โดยใช้ Sep-Pak[®] C₁₈ Cartridges คัดแปลงจากวิธีการจาก Müller, Carrasco, Tonarelli, and Simonetta (2009) โดยนำสารละลายลายแบคทีเรียโอซิน ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ผ่านเข้าสู่คอลัมน์ แล้วชะตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นที่เติม TFA (ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับร้อยละ 1 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร) ด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตามด้วย Acetonitrile ความเข้มข้นร้อยละ 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 โดยปริมาตรต่อ

ปริมาตร ที่เติม TFA ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับร้อยละ 1 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ตามลำดับ แล้วนำตัวอย่างที่เก็บได้ไประเหยเพื่อกำจัด Acetonitrile ออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงสุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บตัวอย่างที่ออกจากคอลัมน์ในทุกขั้นตอนนำไปหาค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Spot-on-Lawn Method (Ennahar et al., 2001) โดยใช้เชื้อ *S. suis* P1/7 ในการทดสอบและวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry Method (Lowry et al., 1951)

3.4.3.3 การทำบริสุทธิ์โดยใช้ Reversed-Phase Chromatography (RP-HPLC)

การทำบริสุทธิ์ในขั้นตอนนี้เป็นการนำแบคทีเรียโอซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในขั้นที่สองมาทำบริสุทธิ์ต่อ โดยผ่านตัวอย่างเข้าสู่ Reverse Phase Column (Resource RPC3-mL) จากนั้นจะตัวอย่างออกจากคอลัมน์แบบ Gradient ด้วยร้อยละของอัตราส่วนน้ำต่อ Acetonitrile ที่เติม TFA ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที แล้วจะตัวอย่างออกจากคอลัมน์ด้วยเวลาและอัตราส่วน ดังนี้ 0-10 นาที, 20-80%; 10-40 นาที, 80-100%; 40-45 นาที, 0-100% จากนั้นนำตัวอย่างที่เก็บได้ไประเหยเพื่อกำจัด Acetonitrile ออก ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงสุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แล้วนำไปทดสอบหาค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Spot-on-Lawn Method (Ennahar et al., 2001) โดยใช้ *S. suis* P1/7 เป็นเชื้อแบคทีเรียเป้าหมายในการทดสอบและวิเคราะห์ปริมาณ โปรตีนด้วยวิธี Lowry Method (Lowry et al., 1951) จากนั้นนำ Fraction ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียมาทำบริสุทธิ์ซ้ำอีกครั้งด้วย RP-HPLC ด้วยวิธีการเดียวกัน เพื่อให้ได้แบคทีเรียโอซินที่มีความบริสุทธิ์ขึ้น

3.4.3.4 การวิเคราะห์มวลโมเลกุลของสารด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS

วิเคราะห์มวลโมเลกุลของแบคทีเรียโอซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้ว ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS โดยเตรียมแบคทีเรียโอซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ ให้มีปริมาณโปรตีนความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร จากนั้นนำไปผสมกับสารละลาย MALDI Matrix ด้วยปริมาตรที่เท่ากัน แล้วนำไปหยดลงบน MTP384 Target Plate ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง Ultraflex III MALDI-TOF/TOF Mass Spectrometer และวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม Flex Analysis 3.3 Software

3.4.3.5 การศึกษาคุณสมบัติบางประการของแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์

(1) การทดสอบความไวของแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์ต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีน

ศึกษาผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่อความไวของแบคทีเรียโอซินโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Castro et al. (2011) โดยเอนไซม์ที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ α -chymotrypsin (pH 7.5), Trypsin (pH 7.5), Proteinase K (pH 7.5), Pepsin (pH 3.0), Amylase (pH 7.5) และ Lipase (pH 7.5) นำแบคทีเรียโอซินมาเติมด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน โดยให้ปริมาณเอนไซม์ในสารผสมมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง แล้วให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ แล้วนำไปหาลอยละค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เหลืออยู่ด้วยวิธี Spot-on-Lawn Method (Ennahar et al., 2001) โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus sakei* ssp. *sakei* JCM 1157^T เป็นแบคทีเรียเป้าหมายที่ใช้ทดสอบ โดยกำหนดให้แบคทีเรียโอซินที่ไม่มีการเติมเอนไซม์ย่อยโปรตีนและเติมน้ำกลั่นด้วยปริมาตรที่เท่ากัน มีค่าร้อยละของกิจกรรมการยับยั้งที่เหลืออยู่เท่ากับร้อยละ 100 เป็นชุดทดลองควบคุม

(2) การทดสอบความคงทนของแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์ต่อตัวทำละลายอินทรีย์และสารลดแรงตึงผิว

การศึกษาผลของสารเคมีในกลุ่มตัวทำละลายอินทรีย์ (Organic Solvents) และสารลดแรงตึงผิว (Surfactant) ต่อคุณสมบัติของแบคทีเรียโอซิน (ดัดแปลงวิธีการจาก Woraprayote et al. (2015)) โดยสารในกลุ่มตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ Acetone, Acetonitrile, Ethanol และ Isopropanol ด้วยการผสมแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์กับสารเคมีดังกล่าวมาในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 โดยปริมาตรต่อปริมาตร และกำหนดให้แบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์ที่เติมน้ำกลั่นในอัตราส่วนที่เท่ากันเป็นชุดทดลองควบคุม จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 ชั่วโมง แล้วนำไปทดสอบหาลอยละค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ด้วยวิธี Spot-on-Lawn Method (Ennahar et al., 2001) โดยใช้เชื้อ *L. sakei* JCM 1157^T เป็นแบคทีเรียเป้าหมายที่ใช้ทดสอบ

การศึกษาผลของสารลดแรงตึงผิวต่อคุณสมบัติของแบคทีเรียโอซิน โดยสารลดแรงตึงผิวที่นำมาใช้ทำการทดสอบ ได้แก่ สารลดแรงตึงผิวที่ไม่มีประจุ (Non-Ionic Surfactant) ได้แก่ Triton X-100, Tween 20 และ Tween 80 สารลดแรงตึงผิวที่มีประจุลบ (Anionic Surfactant) ได้แก่ Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA) และ Urea นำสารทดสอบดังกล่าวมาผสมกับแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์ โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารทดสอบมีค่าเท่ากับร้อยละ 1 โดยปริมาตรต่อปริมาตร และกำหนดให้แบคทีเรียโอซินที่เติมน้ำกลั่นในอัตราส่วนและปริมาตรที่เท่ากันเป็นการทดลองชุดควบคุม จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง (Wang et al., 2018; Woraprayote et al., 2015) แล้วนำไปทดสอบหา

ค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ด้วยวิธี Spot-on-Lawn Method (Ennahar et al., 2001) โดยใช้เชื้อ *L. sakei* JCM 1157^T เป็นแบคทีเรียเป้าหมายที่ใช้ทดสอบ

(3) การทดสอบความคงตัวของแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์ต่อ pH และความร้อน

ปรับค่า pH ของแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์ให้มีค่าเท่ากับ 2-12 โดยใช้สารละลาย NaOH ความเข้มข้น 1 โมลาร์ และสารละลาย HCl ความเข้มข้น 1 นอร์มอล จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 24 ชั่วโมง อุณหภูมิ 80 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วนำไปหาค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เหลืออยู่ ด้วยวิธี Spot-on-Lawn Method (Ennahar et al., 2001) โดยใช้เชื้อ *L. sakei* JCM 1157^T เป็นแบคทีเรียเป้าหมายที่ใช้ทดสอบ และกำหนดให้แบคทีเรียโอซินที่อุณหภูมิห้อง เป็นการทดลองชุดควบคุม

(4) การวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเป้าหมาย (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) ของแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์

วิเคราะห์ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์ ด้วยวิธี Spot-on-Lawn Method ที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Ennahar et al. (2001) โดยนำแบคทีเรียโอซินมาทำการเจือจางด้วยวิธี Two-Fold-Dilution แล้วเปิดสารละลายปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการ Swab Plate ด้วยแบคทีเรียเป้าหมายที่ต้องการใช้ทดสอบ (ตารางที่ 3.1) นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียเป้าหมายที่ใช้ทดสอบ สังเกตและบันทึกผลค่าความเข้มข้นต่ำสุดของแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเป้าหมายที่ใช้ทดสอบในหน่วยไมโครโมลาร์

(5) การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์

ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์ต่อเชื้อ *S. suis* P1/7 โดยเลี้ยงเชื้อ *S. suis* P1/7 ในอาหารเหลว THY ที่เติม Yeast Extract ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยมวลต่อปริมาตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมแบคทีเรียโอซินลงไปในช่วงกลางของการเจริญ (Mid-Logarithmic Growth Phase) ของเชื้อ *S. suis* P1/7 (4 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ) โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของแบคทีเรียโอซินมีค่าเท่ากับ 1xMIC และเลี้ยงเชื้อต่อไปจนครบ 24 ชั่วโมง โดยระหว่างการเลี้ยงเชื้อ ให้ทำการวัดความเข้มข้นของเชื้อ *S. suis* P1/7 โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาว 600 นาโนเมตร และวัดปริมาณเชื้อด้วยวิธี Drop Plate Method (Herigstad et al., 2001) โดยทำการวัดทุก ๆ 2 ชั่วโมง (Wang et al., 2018)

(6) การศึกษาการเสริมฤทธิ์ของแบคทีเรียโอสินบริสุทธิ์ ในการยับยั้ง

เชื้อ *S. suis*

ศึกษาประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ร่วมกันของแบคทีเรียโอสินบริสุทธิ์ ด้วยวิธี Checkerboard Assay ที่ดัดแปลงวิธีการจาก Draper, Cotter, Hill, and Ross (2013) โดยนำแบคทีเรียโอสิน RB01-SOA และ RB01-SOB ที่ความเข้มข้น 2 เท่าของค่า MIC มาทำการเจือจางให้ระดับความเข้มข้นลดลงครึ่งละ 2 เท่า ในถาดหลุม 96-Well Microplate โดยคำนวณให้ความเข้มข้นของแบคทีเรียโอสินทั้งสองชนิดลดลงตามแกน X และแกน Y ตามลำดับ แล้วนำไปหยดลงบนอาหารแข็งที่ทำการ Swab Plate ด้วยเชื้อ *S. suis* P1/7 ที่ปรับความเข้มข้นให้เท่ากับ 0.5 McFarland จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตวงใส แล้วนำมาวิเคราะห์ประสิทธิภาพการเสริมฤทธิ์กันของแบคทีเรียโอสิน ด้วยตัวชี้วัดที่เรียกว่า Fractional Inhibitory Concentration Index หรือ FICI (Odds, 2003; Padalia & Chanda, 2015) ดังสมการ

$$FIC = FIC_A + FIC_B$$

เมื่อ

$$FIC_A = \frac{\text{MIC ของสาร A ในสารผสม}}{\text{MIC ของสาร A เดี่ยว ๆ}}$$

$$FIC_B = \frac{\text{MIC ของสาร B ในสารผสม}}{\text{MIC ของสาร B เดี่ยว ๆ}}$$

โดยที่ ค่า FIC_A คือ ค่ากิจกรรมการยับยั้งต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ของสาร A ในสารผสมหารด้วยค่ากิจกรรมการยับยั้งต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ของสาร A เดี่ยว ๆ และค่า FIC_B คือ ค่ากิจกรรมการยับยั้งต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ของสาร B ในสารผสมหารด้วยค่ากิจกรรมการยับยั้งต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ของสาร B เดี่ยว ๆ และสามารถวิเคราะห์ประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ร่วมกันของแบคทีเรียโอสิน ได้ดังนี้

ถ้า ค่า $FICI < 0.5$ แสดงว่าสารทั้งสองเสริมฤทธิ์กัน (Synergistic)

ค่า $0.5 < FICI < 1$ แสดงว่าทั้งสองเสริมฤทธิ์กันบางส่วน (Partial Synergistic)

ค่า $FICI = 1$ แสดงว่าสารทั้งสองมีแนวโน้มเสริมฤทธิ์ (Additive)

ค่า $1 < FICI < 4$ แสดงว่าสารทั้งสองออกฤทธิ์ไม่แตกต่างจากการใช้สารตัวเดียว

(Indifferent)

ค่า $FICI > 4$ แสดงว่าสารทั้งสองต้านฤทธิ์กัน (Antagonistic)

3.4.4 การศึกษาประสิทธิภาพการใช้ผงแบคทีเรียโอซินยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. suis*

3.4.4.1 การเตรียมแบคทีเรียโอซินยับยั้งในรูปแบบผงแห้งด้วยวิธีทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze Dry)

นำส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* RB01-SO มาทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ด้วยเครื่อง Freeze Dryer โดยเติมส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงในขวด Freeze Drying Flask ขนาด 1,200 มิลลิลิตร จากนั้นนำขวดไปกึ่งในอ่างหมวนวนทำความเย็นให้แบคทีเรียโอซินมีลักษณะเป็นชั้นบาง ๆ รอบก้นขวด แล้วเก็บตัวอย่างแบคทีเรียโอซินไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง นำเข้าเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งจนกระทั่งแบคทีเรียโอซินมีลักษณะเป็นของแข็งแห้ง โดยใช้เวลาประมาณ 18-20 ชั่วโมง เก็บผงแบคทีเรียโอซิน บรรจุลงในถุงสุญญากาศเก็บไว้ใน Desiccator Cabinet ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดปริมาณโปรตีนวิธี Lowry Method (Lowry et al., 1951)

3.4.4.2 การเตรียมแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์บางส่วนในรูปแบบผงแห้งด้วยวิธีทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

นำส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* RB01-SO มาทำบริสุทธิ์เบื้องต้นด้วยเทคนิค Hydrophobic Interaction โดยใช้เรซิน Amberlite-XAD 16 (ตามข้อที่ 3.4.3.1 ข้อ (1)) จากนั้นนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ตามวิธีข้อที่ 3.4.4.1 นำตัวอย่างแบคทีเรียโอซินที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งไปวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry Method (Lowry et al., 1951)

3.4.4.3 ศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. suis* ของผงแบคทีเรียโอซิน

ทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของผงแบคทีเรียโอซินยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. suis* P1/7 โดยนำผงแบคทีเรียโอซินมาละลายในน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาทำการเจือจางด้วยวิธี Two-Fold-Dilution แล้วเติมเชื้อ *S. suis* P1/7 ปริมาณ 9 log CFU/mL ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 โดยปริมาตรต่อปริมาตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้ววิเคราะห์ปริมาณเชื้อ *S. suis* P1/7 ด้วยวิธี Spread plate (Herigstad et al., 2001) ลงบนอาหาร THY ที่เติม Yeast Extract ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยมวลต่อปริมาตร โดยค่า MIC ของ

ผงแบคทีเรียโอซินเท่ากับค่าความเข้มข้นต่ำสุดของผงแบคทีเรียโอซินที่สามารถลดปริมาณเชื้อ *S. suis* P1/7 จนต่ำกว่าขีดจำกัดของการวิเคราะห์ รายงานในหน่วยมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่ากิจกรรมการยับยั้งจำเพาะ (Specific activity) ในหน่วย AU/mg

3.4.4.4 การศึกษาการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. suis* ของผงแบคทีเรียโอซินหยาบ

(1) ศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *S. suis* ของผงแบคทีเรียโอซินหยาบในหลอดทดลอง

ศึกษาการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. suis* P1/7 ของผงแบคทีเรียโอซินหยาบ โดยการเติมผงแบคทีเรียโอซิน 77.54 AU/mL (1×MIC), 155.08 AU/mL (2×MIC) และ 310.16 AU/mL (4×MIC) ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว THY โดยให้เชื้อ *S. suis* P1/7 (มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 8 log CFU/g) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ *S. suis* ที่เวลา 0, 20, 40, 60, 80, 100 และ 120 นาที โดยทำการเจือจางเชื้อด้วยสารละลาย Normal Saline ด้วยวิธี 10-Fold Serial Dilution จากนั้นเปิดสารละลายปริมาตร 100 ไมโครลิตร ไป Spread Plate ลงบนอาหาร THY ที่เติม Yeast Extract ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยมวลต่อปริมาตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนับปริมาณเชื้อแล้วบันทึกผลในหน่วย log CFU/mL (Kataoka, Sugimoto, Nakazawa, & Kashiwazaki, 1991)

(2) ศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *S. suis* ของผงแบคทีเรียโอซินหยาบในลาบหมูดิบ

ศึกษาการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. suis* P1/7 ของผงแบคทีเรียโอซินหยาบในลาบหมูดิบ โดยการเติมเชื้อ *S. suis* P1/7 ลงในลาบหมูดิบน้ำหนัก 300 กรัม (เตรียมตามวิธีการดังแสดงในภาคผนวก ก) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของเชื้อเท่ากับ 8 log CFU/g จากนั้นเติมผงแบคทีเรียโอซินที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 9 ชุด ได้แก่

(2.1) ชุดการทดลองที่ 1 ลาบหมูที่เติมเชื้อ *S. suis* P1/7 (ชุดทดลองควบคุม)

(2.2) ชุดการทดลองที่ 2 ลาบหมูดิบที่เติมเชื้อ *S. suis* P1/7 และเติมผงแบคทีเรียโอซิน 46,524 AU/ลาบหมูดิบ 300 กรัม (2×MIC)

(2.3) ชุดการทดลองที่ 3 ลาบหมูดิบที่เติมเชื้อ *S. suis* P1/7 และเติมผงแบคทีเรียโอซิน 93,048 AU/ลาบหมูดิบ 300 กรัม (4×MIC)

(2.4) ชุดการทดลองที่ 4 ลาบหมูดิบที่เติมเชื้อ *S. suis* P1/7 และเติมผงแบคทีเรียโอซิน 139,572 AU/ลาบหมูดิบ 300 กรัม (6×MIC)

(2.5) ชุดการทดลองที่ 5 ลาบทดสอบที่เติมเชื้อ *S. suis* P1/7 และเติมผงแบคทีเรียไอซอิน 186,096 AU/ลาบทดสอบ 300 กรัม (8×MIC)

(2.6) ชุดการทดลองที่ 6 ลาบทดสอบที่เติมเชื้อ *S. suis* P1/7 และเติมผงแบคทีเรียไอซอิน 232,620 AU/ลาบทดสอบ 300 กรัม (10×MIC)

(2.7) ชุดการทดลองที่ 7 ลาบทดสอบที่เติมเชื้อ *S. suis* P1/7 และเติมผงแบคทีเรียไอซอิน 279,144 AU/ลาบทดสอบ 300 กรัม (12×MIC)

(2.8) ชุดการทดลองที่ 8 ลาบทดสอบที่เติมเชื้อ *S. suis* P1/7 และเติมผงแบคทีเรียไอซอิน 325,668 AU/ลาบทดสอบ 300 กรัม (14×MIC)

(2.9) ชุดการทดลองที่ 9 ลาบทดสอบที่เติมเชื้อ *S. suis* P1/7 และเติมผงแบคทีเรียไอซอิน 372,192 AU/ลาบทดสอบ 300 กรัม (16×MIC)

จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (25 ± 2 องศาเซลเซียส) แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ *S. suis* ที่เวลา 0, 20, 40, 60, 80, 100 และ 120 นาที โดยนำตัวอย่างลาบทดสอบน้ำหนัก 25 กรัม ผสมกับสารละลาย Normal Saline ปริมาตร 225 มิลลิลิตร จากนั้นตีบดให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องตีบดอาหาร แล้วทำการเจือจางต่อด้วยวิธี 10-Fold Serial Dilution ปิเปตสารละลายปริมาตร 100 ไมโครลิตร ไป Spread Plate ลงบนอาหาร NNCC แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนับปริมาณเชื้อแล้วบันทึกผลในหน่วย log CFU/g (Kataoka et al., 1991)

3.4.4.5 การศึกษาการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. suis* ของผงแบคทีเรียไอซอินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน

(1) ศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *S. suis* ของผงแบคทีเรียไอซอินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนในหลอดทดลอง

ศึกษาการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. suis* P1/7 ของผงแบคทีเรียไอซอินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน โดยการเติมผงแบคทีเรียไอซอิน 283.01 AU/mL (1×MIC), 566.02 AU/mL (2×MIC) และ 1,132.04 AU/mL (4×MIC) ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว THY ที่มีเชื้อ *S. suis* P1/7 (ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 8 log CFU/g) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ *S. suis* ที่เวลา 0, 20, 40, 60, 80, 100 และ 120 นาที โดยทำการเจือจางเชื้อด้วยสารละลาย Normal Saline ด้วยวิธี 10-Fold Serial Dilution จากนั้นปิเปตสารละลายปริมาตร 100 ไมโครลิตร ไป Spread Plate ลงบนอาหาร THY ที่เติม Yeast Extract ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยมวลต่อปริมาตร

นำไปป้อนที่อุณหภูมิตั้งที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วนับปริมาณเชื้อและบันทึกผลในหน่วย log CFU/mL (Kataoka et al., 1991)

(2) ศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *S. suis* ของผงแบคทีเรียโอซิน ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนในเนื้อหมูดิบ

เตรียมเนื้อหมูโดยใช้ส่วนสันในหมูสไลด์ นำมาหั่นให้มีขนาด 5 x 5 ตารางเซนติเมตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อโดยการให้แสง UV ในตู้ปลอดเชื้อนานด้านละ 15 นาที (Woraprayote et al., 2013) แล้วเติมเชื้อ *S. suis* P1/7 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ลงไปในเนื้อหมูแต่ละด้าน โดยให้เชื้อมีความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 8 log CFU/cm² หลังจากนั้นเติมสารละลายผงแบคทีเรียโอซิน 566.02 AU/mL (2xMIC), 1,132.04 AU/mL (4xMIC), 1,698.06 AU/mL (6xMIC), 2,264.08 AU/mL (8xMIC), 2,830.10 AU/mL (10xMIC), 3,396.12 AU/mL (12xMIC), 3,962.14 AU/mL (14xMIC) และ 4,528.16 AU/mL (16xMIC) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ลงไปในเนื้อหมูที่เตรียมไว้ก่อนหน้านี้ โดยกำหนดให้เนื้อหมูที่เติมเชื้อ เชื้อ *S. suis* P1/7 และน้ำกลั่นเป็นชุดทดลองควบคุม จากนั้นนำไปป้อนที่อุณหภูมิตั้งที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนับปริมาณเชื้อแล้วบันทึกผลในหน่วย log CFU/cm² (Kataoka et al., 1991)

(3) ศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *S. suis* ของผงแบคทีเรียโอซิน ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนในเลือดหมูดิบ

ทำการศึกษาความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. suis* P1/7 ในเลือดหมูดิบของผงแบคทีเรียโอซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน โดยการเติมผงแบคทีเรียโอซิน 566.02 AU/mL (2xMIC), 1,132.04 AU/mL (4xMIC), 1,698.06 AU/mL (6xMIC), 2,264.08 AU/mL (8xMIC), 2,830.10 AU/mL (10xMIC), 3,396.12 AU/mL (12xMIC), 3,962.14 AU/mL (14xMIC) และ 4,528.16 AU/mL (16xMIC) ลงไปในเลือดหมูดิบที่เติมเชื้อ *S. suis* P1/7 (ให้เชื้อมีความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 8 log CFU/mL) จากนั้นนำไปป้อนที่อุณหภูมิตั้งที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนับปริมาณเชื้อและบันทึกผลในหน่วย log CFU/mL (Kataoka et al., 1991)

(4) ศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *S. suis* ของผงแบคทีเรียโอซิน ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนในลาบหมูดิบ

ทำการศึกษาความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. suis* P1/7 ของผงแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์บางส่วนในลาบหมูดิบ โดยการเติมเชื้อ *S. suis* P1/7 ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ $8 \log \text{CFU/g}$ ลงในลาบหมูดิบ 300 กรัม (เตรียมตามวิธีการดังแสดงในภาคผนวก ค) แล้วเติมผงแบคทีเรียโอซินที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 9 ชุด ได้แก่

(4.1) ชุดการทดลองที่ 1 ลาบหมูที่เติมเชื้อ *S. suis* P1/7 (ชุดทดลองควบคุม)

(4.2) ชุดการทดลองที่ 2 ลาบหมูดิบที่เติมเชื้อ *S. suis* P1/7 และเติมผงแบคทีเรียโอซิน 169,806 AU/ลาบหมูดิบ 300 กรัม ($2 \times \text{MIC}$)

(4.3) ชุดการทดลองที่ 3 ลาบหมูดิบที่เติมเชื้อ *S. suis* P1/7 และเติมผงแบคทีเรียโอซิน 339,612 AU/ลาบหมูดิบ 300 กรัม ($4 \times \text{MIC}$)

(4.4) ชุดการทดลองที่ 4 ลาบหมูดิบที่เติมเชื้อ *S. suis* P1/7 และเติมผงแบคทีเรียโอซิน 509,418 AU/ลาบหมูดิบ 300 กรัม ($6 \times \text{MIC}$)

(4.5) ชุดการทดลองที่ 5 ลาบหมูดิบที่เติมเชื้อ *S. suis* P1/7 และเติมผงแบคทีเรียโอซิน 679,224 AU/ลาบหมูดิบ 300 กรัม ($8 \times \text{MIC}$)

(4.6) ชุดการทดลองที่ 6 ลาบหมูดิบที่เติมเชื้อ *S. suis* P1/7 และเติมผงแบคทีเรียโอซิน 849,030 AU/ลาบหมูดิบ 300 กรัม ($10 \times \text{MIC}$)

(4.7) ชุดการทดลองที่ 7 ลาบหมูดิบที่เติมเชื้อ *S. suis* P1/7 และเติมผงแบคทีเรียโอซิน 1,018,836 AU/ลาบหมูดิบ 300 กรัม ($12 \times \text{MIC}$)

(4.8) ชุดการทดลองที่ 8 ลาบหมูดิบที่เติมเชื้อ *S. suis* P1/7 และเติมผงแบคทีเรียโอซิน 1,188,642 AU/ลาบหมูดิบ 300 กรัม ($14 \times \text{MIC}$)

(4.9) ชุดการทดลองที่ 9 ลาบหมูดิบที่เติมเชื้อ *S. suis* P1/7 และเติมผงแบคทีเรียโอซิน 1,358,448 AU/ลาบหมูดิบ 300 กรัม ($16 \times \text{MIC}$)

จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ *S. suis* ที่เวลา 0, 20, 40, 60, 80, 100 และ 120 นาที โดยนำตัวอย่างลาบหมู น้ำหนัก 25 กรัม ผสมกับสารละลาย Normal Saline ปริมาตร 225 มิลลิตร จากนั้นตีบดให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องตีบดอาหาร แล้วทำการเจือจางต่อด้วยวิธี 10-Fold Serial Dilution จากนั้นเปิดสารละลายปริมาตร 100 ไมโครลิตร ไป Spread Plate ลงบนอาหาร NNCC แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นับปริมาณเชื้อและบันทึกผลในหน่วย $\log \text{CFU/g}$ (Kataoka et al., 1991)

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ผลการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกที่ผลิตแบคทีเรียโอซิน

4.1.1 ผลการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีความสามารถในการผลิตสารยับยั้งแบคทีเรีย

ผลการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกจากอาหารจำพวกผักดองพื้นบ้านของไทยจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ ต้นหอมดอง ผักกาดดอง ผักเสี้ยนดอง ผักกุ่มดอง หน่อไม้ดอง และผักหนามดอง พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกได้ทั้งหมด 120 โคโลนี โดยคัดแยกได้จากต้นหอมดอง จำนวน 57 โคโลนี ผักเสี้ยนดองจำนวน 32 โคโลนี ผักกุ่มดองจำนวน 19 โคโลนี และผักหนามดอง จำนวน 12 โคโลนี ในขณะที่ผักกาดดองและหน่อไม้ดอง ไม่สามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกได้จากตัวอย่างเหล่านี้ อย่างไรก็ตามจากการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีความสามารถในการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรีย พบว่ามีแบคทีเรียกรดแลกติกจำนวน 4 ไอโซเลท ที่คัดแยกได้จากต้นหอมดองและผักเสี้ยนดอง โดยตั้งชื่อเรียกไอโซเลทเหล่านี้ว่า RB01-SO, RB08-SO, RSU-SO2 และ RB01-SW แสดงดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แหล่งที่มาและจำนวนของแบคทีเรียกรดแลกติกที่ผลิตสารยับยั้ง ที่คัดแยกได้

ตัวอย่างผักดอง	จำนวนแบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดแยกได้	จำนวนแบคทีเรียกรดแลกติกที่ผลิตสารยับยั้ง	ชื่อไอโซเลท
	(ไอโซเลท)	(ไอโซเลท)	
ต้นหอมดอง	57	3	RB01-SO, RB08-SO, RSU-SO2
ผักกาดดอง	0	0	-
ผักเสี้ยนดอง	32	1	RB01-SW
ผักกุ่มดอง	19	0	-
หน่อไม้ดอง	0	0	-
ผักหนามดอง	12	0	-

ผลการทดสอบความสามารถในการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียพบว่า แบคทีเรียกรดแลกติก ทั้ง 4 ไอโซเลท ที่คัดแยกได้มีความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ โดยสามารถผลิตสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ แบคทีเรียแกรมบวกได้จำนวน 12 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *B. subtilis* JCM 1465^T, *Enterococcus faecalis* JCM 5803^T, *Lactobacillus sakei* JCM 1157^T, *Lactococcus lactis* ATCC 19435, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, *Micrococcus luteus* NBRC 12708, *Staphylococcus aureus* DMST 20635, *Streptococcus suis* NaH, *S. suis* P1/7 และ *Streptococcus agalactiae* 1611 รวมถึงสามารถสร้างสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ แบคทีเรียแกรมลบได้จำนวน 8 สายพันธุ์ ประกอบด้วย *Aeromonas veronii* 1755, *Escherichia coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35401, *E. coli* F18, *E. coli* O157:H7, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 และ *Vibrio harveyi* AQVH 01 แสดงดังตารางที่ 4.2 โดยพบว่าไอโซเลท RB01-SO สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *L. lactis* ATCC 19435 ได้ดีที่สุด โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 6,400 AU/mL นอกจากนี้ไอโซเลทดังกล่าวยังเป็นไอโซเลทเดียวที่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. suis* NaH และ *S. suis* P1/7 ได้ โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 200 และ 400 AU/mL ตามลำดับ และยังสามารถสร้างสารยับยั้ง การเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* F18, *E. coli* O157:H7 และ *V. harveyi* AQVH 01 ได้ ในขณะที่ ไอโซเลท RB08-SO สามารถสร้างสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *L. sakei* JCM 1157^T ได้ดีที่สุด โดยมีค่า กิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 3,200 AU/mL ส่วนไอโซเลท RSU-SO2 สามารถสร้างสารยับยั้งการ เจริญเติบโตของเชื้อ *E. faecalis* JCM 5803^T ได้ดีที่สุด โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 4,800 AU/mL และไอโซเลท RB01-SW สามารถสร้างสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *L. sakei* JCM 1157^T และ *L. lactis* ATCC 19435 ได้ดีที่สุด โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 3,200 AU/mL

ตารางที่ 4.2 ความสามารถในการผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียของแบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดแยกได้

แบคทีเรียเป้าหมาย ¹	ค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (AU/mL) ²			
	RB01-SO	RB08-SO	RSU-SO2	RB01-SW
Gram-Positive Bacteria				
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	400	100	100	200
<i>Bacillus subtilis</i> JCM 1465 ^T	1,600	100	100	200
<i>Enterococcus faecalis</i> JCM 5803 ^T	1,600	800	4,800	400
<i>Lactobacillus sakei</i> JCM 1157 ^T	3,200	3,200	1,600	3,200

ตารางที่ 4.2 ความสามารถในการผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ (ต่อ)

แบคทีเรียเป้าหมาย ¹	ค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (AU/mL) ²			
	RB01-SO	RB08-SO	RSU-SO2	RB01-SW
<i>Lactococcus lactis</i> ATCC 19435	6,400	1,600	3,200	3,200
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	400	200	200	200
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	800	100	100	0
<i>Micrococcus luteus</i> NBRC 12708	800	100	100	100
<i>Staphylococcus aureus</i> DMST 20635	400	200	200	200
<i>Streptococcus suis</i> NaH	400	0	0	0
<i>Streptococcus suis</i> P1/7	200	0	0	0
<i>Streptococcus agalactiae</i> 1611	800	100	200	100
Gram-Negative Bacteria				
<i>Aeromonas veronii</i> 1755	200	100	100	100
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	200	400	200	400
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35401	200	100	100	0
<i>Escherichia coli</i> F18	100	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	200	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	100	100	100	100
<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 13311	200	100	100	200
<i>Vibrio harveyi</i> AQVH 01	100	0	0	0

¹ ATCC = American Type Culture Collection, Rockville, Md, USA; JCM = Japan Collection of Microorganisms, Wako, Japan; DMST = Department of Medical Sciences, Thailand; NBRC = NITE Biological Resource Center, Chiba, Japan

² ทดสอบโดยใช้ส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก ด้วยวิธี Spot-on-Lawn

4.1.2 ผลการทดสอบผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่อฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย

จากการทดสอบผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่อสารยับยั้งแบคทีเรียที่ผลิตจากเชื้อ RB01-SO ด้วยเอนไซม์ Trypsin, α -chymotrypsin และ Pepsin โดยใช้เชื้อ *S. suis* P1/7 เป็นแบคทีเรียเป้าหมายที่ใช้ทดสอบ พบว่าสารยับยั้งแบคทีเรียที่ผลิตจากเชื้อ RB01-SO ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ย่อย

โปรตีนทั้ง 3 ชนิด ในขณะที่สารยับยั้งของชุดควบคุมมีค่าการยับยั้งเชื้อ *S. suis* P1/7 เท่ากับ 200 AU/mL (ตารางที่ 4.3) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สารยับยั้งแบคทีเรียที่เชื้อ RB01-SO สร้างขึ้นคือแบคทีเรียโอซิน เนื่องจากแบคทีเรียโอซินเป็นสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่มีโครงสร้างเป็นโปรตีนหรือเปปไทด์ ดังนั้นเมื่อแบคทีเรียโอซินถูกทำให้เสียสภาพด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน จึงส่งผลให้เกิดความสูญเสียความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Shin, Han, Ryu, Kim, & Lee, 2008; Srimark & Khunajakr, 2015) โดยวิธีการดังกล่าวมานี้ เป็นวิธีที่นิยมนำมาใช้เพื่อคัดกรองและยืนยันชนิดของสารที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (ศรีสุดา กวาศกุล, 2563; Faye, Brede, Langsrud, Nes, & Holo, 2002)

ตารางที่ 4.3 ผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่อฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

เอนไซม์	ค่ากิจกรรมการยับยั้งที่เหลืออยู่ ¹ (AU/mL)
ส่วนใสที่ปราศจากเซลล์ (ชุดควบคุม)	200
บัฟเฟอร์ pH 3.0	200
บัฟเฟอร์ pH 7.5	200
Trypsin	0
α -chymotrypsin	0
Pepsin	0

¹ ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียที่เหลืออยู่ ด้วยเทคนิค Spot-on-Lawn Method โดยใช้เชื้อ *S. suis* P1/7 ในการทดสอบ

4.1.3 ผลการจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS

ผลของการจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท RB01-SO, RB08-SO, RSU-SO2 และ RB01-SW ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS พบว่ามีคะแนนความน่าเชื่อถือในระดับเดียวกัน คือ ระดับจนถึงสปีชีส์ (มีคะแนนความน่าเชื่อถือ หรือ Identification Score มากกว่าหรือเท่ากับ 2.00-2.29) ดังแสดงในตารางที่ 4.4 และอาจสรุปได้ว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 ไอโซเลท ที่คัดแยกได้เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Lactiplantibacillus plantarum* (ชื่อเดิม *Lactobacillus plantarum*)

ตารางที่ 4.4 ผลของการจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลกติกด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS

ตัวอย่าง	คะแนนความน่าเชื่อถือ	สายพันธุ์แบคทีเรีย
RB01-SO	2.028	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
RB08-SO	2.107	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
RSU-SO2	2.212	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
RB01-SW	2.202	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>

จากผลการจำแนกสายพันธุ์ร่วมกับผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียที่สามารถสรุปได้ว่ารายงานนี้เป็นรายงานแรกที่พบค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *S. suis* ของสารออกฤทธิ์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *L. plantarum* โดยจากรายงานการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ามีเพียงเชื้อ *Lactobacillus pentosus* (Zhang, Chang, Liu, Wu, & Li 2012), *Lactococcus lactis* (LeBel, Piché, Frenette, Gottschalk, & Grenier, 2013; Srimark & Khunajakr, 2015), *Staphylococcus aureus* (Crupper, Gies, & Iandolo, 1997) และ *Streptococcus suis* (Melancon & Grenier, 2003) ที่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. suis* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญทั้งในหมู่มนุษย์และคนได้

4.2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรียกรดแลกติก

4.2.1 ผลการทดสอบความแตกต่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ pH และความเข้มข้นของ NaCl ต่อการสร้างแบคทีเรียโอซิน

เมื่อทดสอบการเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* RB01-SO ในอาหาร 5 ชนิดที่แตกต่างกัน ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร M17, BHI, LAPT, MRS และอาหารสูตร mMRS ต่อความสามารถในการผลิตสารยับยั้งเชื้อ *S. suis* P1/7 พบว่า การเลี้ยงเชื้อเชื้อ *L. plantarum* RB01-SO ในอาหารสูตร MRS และ mMRS สามารถผลิตสารยับยั้งเชื้อได้สูงที่สุด โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 200 AU/mL ในขณะที่การเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* RB01-SO ในอาหารสูตร M17, BHI และ LAPT ไม่สามารถผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียได้ แม้ว่าจะมีปริมาณเชื้อที่เจริญเติบโตใกล้เคียงกัน (ประมาณ 9 log CFU/mL) ดังแสดงในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ผลของชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการสร้างแบคทีเรียโอซิน

อาหารเลี้ยงเชื้อ	ค่า pH ของ CFS	ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (log CFU/mL)	ค่ากิจกรรมการยับยั้ง เชื้อแบคทีเรีย (AU/mL)
M17	6.22±0.02 ¹	9.16±0.10	0
BHI	4.99±0.05	9.28±0.09	0
LAPT	3.98±0.01	9.26±0.04	0
Commercial MRS	3.75±0.01	9.64±0.07	200
Modified MRS (mMRS)	3.86±0.02	9.65±0.12	200

¹ ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

จากรายงานการศึกษาพบว่า โดยทั่วไปแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถเจริญเติบโตและสร้างแบคทีเรียโอซินได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิด ทั้งนี้อาหาร MRS เป็นอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรียกรดแลคติก เนื่องจากอุดมไปด้วยแหล่งไนโตรเจน คาร์บอน วิตามิน และแร่ธาตุ (Cheigh et al., 2002; Han, Yu, Liu, Ma, & Zhang, 2011; Li, Bai, Cai, & Ouyang, 2002; Woraprayote et al., 2015) นอกจากนี้จากรายงานของ Todorov and Dicks (2005) และ Mollendorff, Todorov, and Dicks (2009) พบว่าอาหาร MRS ยังเป็นอาหารที่เหมาะสมกับการผลิตแบคทีเรียโอซินของเชื้อ *L. plantarum* สายพันธุ์อื่นอีกด้วย จากการศึกษาเปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่าง MRS, BHI และ M17 ของ Todorov, Reenen, and Dicks (2004) พบว่าเชื้อ *L. plantarum* ST13BR สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหาร MRS สอดคล้องกับรายงานของ Todorov and Dicks (2006) และรายงานของ Todorov (2008) ซึ่งพบว่าเชื้อ *L. plantarum* ST23LD, ST194BZ และ AMA-K สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินได้ดีที่สุดในอาหาร MRS แม้จะสามารถเจริญเติบโตได้ดีทั้งในอาหาร MRS และ M17 ในขณะที่เชื้อ *L. plantarum* B21 ไม่สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินได้เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ M17 (Parlindungan, Dekiwadia, & Jones, 2021)

นอกจากนี้จากรายงานของ Sarika et al. (2010) พบว่าการเติม Tween 80 ความเข้มข้น 0.1 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ช่วยส่งผลให้เชื้อ *L. rhamnosus* GP1 ผลิตแบคทีเรียโอซินได้มากขึ้น ในขณะที่จากรายงานของ Han et al. (2011) และ Thirumurugan, Ramachandran, and Gobikrishnan (2015) ได้รายงานว่า การนำ Tween 80 ออกจากองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ไม่ส่งผลต่อการผลิตแบคทีเรียโอซินของเชื้อ *L. plantarum* YJG และ *L. plantarum* ATM11 โดยจากการทดลอง

พบว่า การไม่เติม Tween 80 ในอาหารเลี้ยงเชื้อส่งผลต่อความเสถียรในการผลิตแบคทีเรียโอซินของเชื้อ *L. plantarum* RB01-SO ทั้งนี้ผลของ Tween 80 ต่อการผลิตแบคทีเรียโอซินยังไม่มีคำอธิบายที่ชัดเจนและยังไม่ได้มีการยืนยัน แต่อาจเนื่องมาจาก Tween 80 เป็นสารที่ไม่แตกตัวเป็นไอออนเมื่ออยู่ในน้ำและประกอบด้วยกรดโอเลอิก (Oleic Acid) ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกหลาย ๆ สายพันธุ์ โดยเมื่อกรดโอเลอิกผ่านเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติกและเปลี่ยนรูปเป็น Cyclopropane Fatty Acid ซึ่งจะส่งผลช่วยให้เชื้อทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ในสภาวะที่มีความเป็นกรดสูงหรือมีออกซิเจนมาก เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจึงสามารถเจริญเติบโตได้ดีและสามารถผลิตแบคทีเรียโอซินได้ดีขึ้น (Broadbent et al., 2014; Dey, Rai, Das, Mandal, & Mandal, 2019) หรืออาจเนื่องมาจาก Tween มีส่วนช่วยในการปลดปล่อยแบคทีเรียโอซินออกจากเซลล์ของแบคทีเรีย รวมถึงมีส่วนช่วยให้แบคทีเรียโอซินผ่านเข้าไปในเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมายและออกฤทธิ์ได้ดีขึ้น (Parlindungan et al., 2021)

จากผลการทดสอบความแตกต่างของค่า pH และความเข้มข้นของ NaCl ต่อการผลิตแบคทีเรียโอซินของเชื้อ *L. plantarum* RB01-SO พบว่า เชื้อสามารถผลิตแบคทีเรียโอซินได้สูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร MRS ที่มีค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 7 โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 400 AU/mL ในขณะที่เชื้อ RB01-SO ไม่สามารถผลิตสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร MRS ที่มีค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 2 และเมื่อทดสอบผลของ NaCl ต่อการผลิตสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของเชื้อ RB01-SO พบว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีความเข้มข้นของ NaCl ร้อยละ 1 โดยมวลต่อปริมาตร เชื้อ *L. plantarum* RB01-SO สามารถผลิตแบคทีเรียโอซิน ที่มีค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 400 AU/mL ในขณะที่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ NaCl ในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า ความสามารถในการสร้างแบคทีเรียโอซินของเชื้อ RB01-SO ลดลง แสดงดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ผลของค่า pH และความเข้มข้นของ NaCl ของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตแบคทีเรียโอซิน

ตัวอย่าง	ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (log CFU/mL)	ค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (AU/mL)
ชุดควบคุม pH (ไม่เติม NaCl)	9.75±0.13 ¹	200
2	N.D.	0
3	6.19±0.04	100
4	9.00±0.14	100
5	9.78±0.07	200
6	10.05±0.02	200
7	9.70±0.22	400
8	9.67±0.19	200
9	9.85±0.29	200
10	9.44±0.07	100
ร้อยละความเข้มข้นของ NaCl (pH 7)		
1	10.09±0.15	400
2	10.21±0.08	200
3	10.11±0.06	200
4	10.46±0.02	200
5	9.78±0.07	100
6	9.56±0.07	100
7	9.64±0.15	100
8	6.97±0.10	100
9	7.36±0.08	100
10	7.15±0.03	100
11	6.95±0.05	100
12	7.11±0.10	100

¹ ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ; N.D. (Not Detected) คือ ตรวจไม่พบเนื่องจากปริมาณจุลินทรีย์น้อยกว่าขีดจำกัดการตรวจนับ (จำนวนโคโลนีของแบคทีเรียน้อยกว่า 3 โคโลนีต่อ 10 ไมโครลิตร)

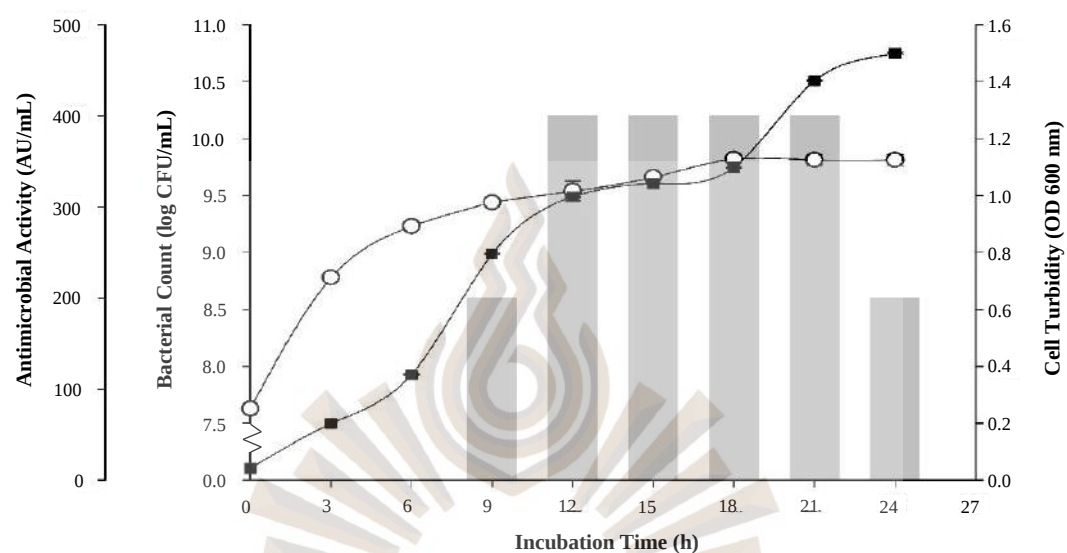
ค่า pH และความเข้มข้นของ NaCl ในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลสำคัญต่อการผลิตแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรียกรดแลกติก (Jiménez-Díaz, Rios-Sanchez, Desmazeaud, Ruiz-Barba, & Piard, 1993; Kelly, Asmundson, & Huang, 1996; Todorov, Gotcheva, Dousset, Onno, & Ivanova, 2000) โดยค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นส่งผลกระทบต่อขั้นตอนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แบคทีเรียโอซินและการดูดซึมของแบคทีเรียกรดแลกติก (Yang et al., 2018) ซึ่งค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรียกรดแลกติกจะอยู่ในช่วงระหว่าง pH 5.5-5.6 (Abbasiliasi et al., 2017) นอกจากนี้ จากรายงานของ Herranz, Martinez, Rodriguez, Hernandez, and Cintas (2001) และ Iyapparaj et al. (2013) พบว่าความเข้มข้นของ NaCl ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เพิ่มสูงขึ้น อาจมีผลทำให้เชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกบางสายพันธุ์ผลิตแบคทีเรียโอซินได้ลดลง ในขณะที่จากรายงานของ Abbasiliasi et al. (2017) พบว่าความเข้มข้นของ NaCl ที่เหมาะสม จะทำให้เกิดสถานะเครียดซึ่งส่งผลทำให้แบคทีเรียกรดแลกติกสามารถผลิตแบคทีเรียโอซินได้เพิ่มมากขึ้น ทั้งนี้ผลของความเข้มข้นของ NaCl ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตแบคทีเรียโอซินขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และแหล่งที่มาที่สามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกได้ (Delgado, Brito, Fevereiro, Tenreiro, & Peres, 2005; Delgado et al., 2007; Leal-Sánchez, Jiménez-Díaz, Maldonado-Barragán, Garrido-Fernández, & Ruiz-Barba, 2002)

4.2.2 ผลการศึกษาอุณหภูมิต่อระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตแบคทีเรียโอซิน

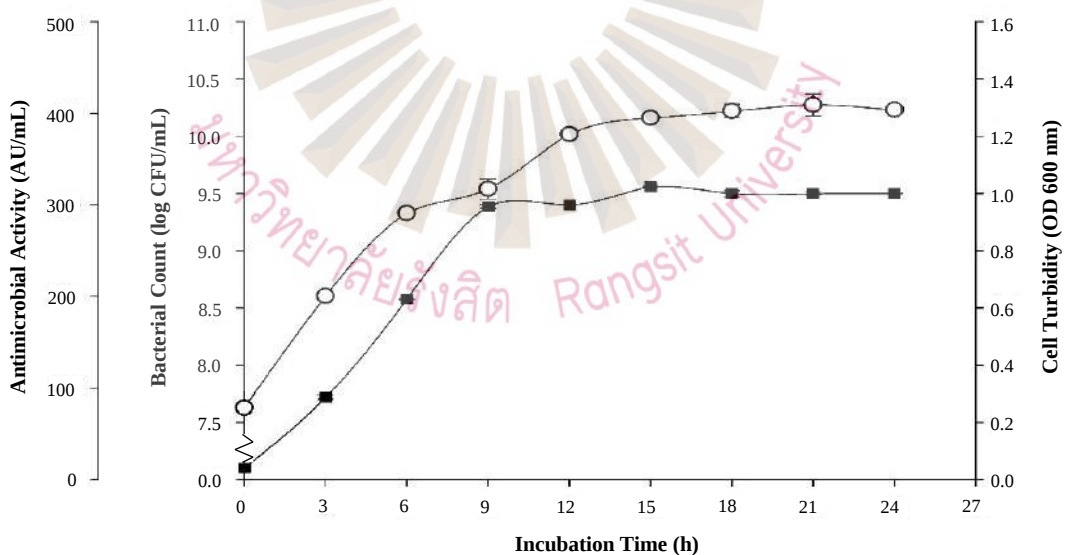
เมื่อทดสอบอุณหภูมิต่อระยะเวลาที่เหมาะสมของ *L. plantarum* RB01-SO ในการสร้างสารยับยั้งเชื้อ *S. suis* P1/7 โดยการเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* RB01-SO ในอาหารเหลว MRS ที่ปรับให้มีความเข้มข้นของ NaCl ร้อยละ 1 โดยมีมวลต่อปริมาตร และมีค่า pH เท่ากับ 7 แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส พบว่าปริมาณเชื้อ *L. plantarum* RB01-SO มีจำนวนเพิ่มขึ้นจาก 7.62 log CFU/mL เป็น 9.81 log CFU/mL หลังจากเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง นอกจากนี้เชื้อ *L. plantarum* RB01-SO ยังผลิตสารแบคทีเรียโอซินในช่วงระยะปลาย Exponential Growth Phase ต่อเนื่องจนถึงช่วงระยะ Stationary Growth Phase (9-24 ชั่วโมง) โดยสามารถผลิตแบคทีเรียโอซินได้สูงสุด ที่เวลา 12 ชั่วโมง และคงที่ไปจนถึงชั่วโมงที่ 21 ก่อนจะลดลง โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงสุดเท่ากับ 400 AU/mL (รูปที่ 4.1 ก) ในขณะที่เชื้อ *L. plantarum* RB01-SO สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยพบปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นจาก 7.62 log CFU/mL เป็น 10.23 log CFU/mL แต่ไม่มีการผลิตแบคทีเรียโอซินแต่อย่างใด

(รูปที่ 4.1 ข) เช่นเดียวกับที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พบปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นจาก 7.62 log CFU/mL เป็น 9.04 log CFU/mL (รูปที่ 4.1 ค)

(ก)

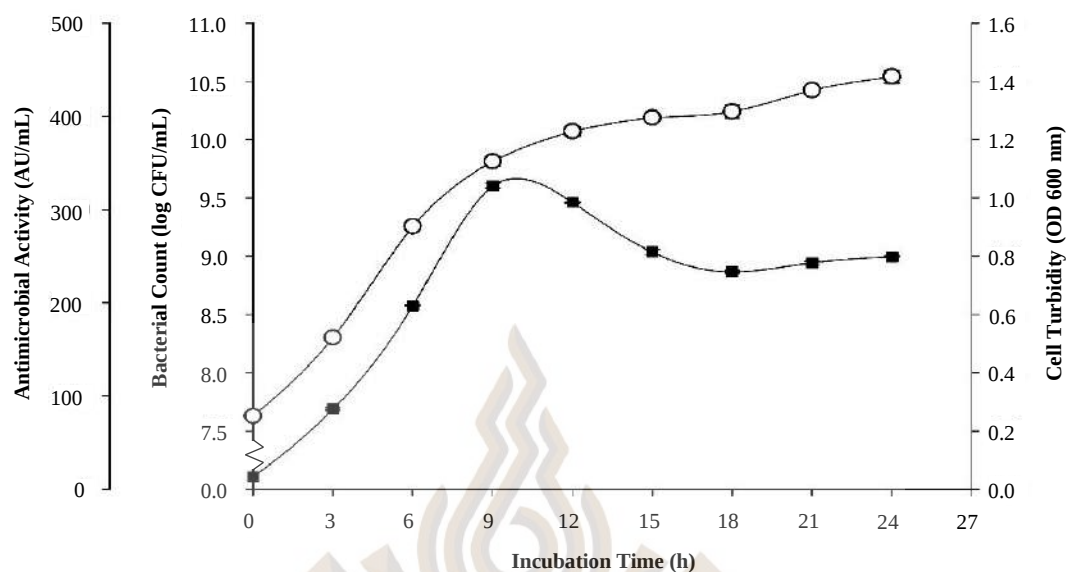


(ข)



รูปที่ 4.1 ผลของอุณหภูมิและเวลาต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *L. plantarum* RB01-SO และการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. suis* P1/7 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (ก) 37 องศาเซลเซียส (ข) และ 40 องศาเซลเซียส (ค) โดยแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อ (-O-) ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (-■-) และค่ากิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรีย (กราฟแท่ง)

(ค)



รูปที่ 4.1 ผลของอุณหภูมิและเวลาต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *L. plantarum* RB01-SO และการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. suis* P1/7 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (ก) 37 องศาเซลเซียส (ข) และ 40 องศาเซลเซียส (ค) โดยแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อ (-O-) ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (-■-) และค่ากิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรีย (กราฟแท่ง) (ต่อ)

การเปลี่ยนแปลงของปัจจัยแวดล้อมโดยเฉพาะอย่างยิ่งอุณหภูมิส่งผลต่อการผลิตแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรียกรดแลคติกอย่างมีนัยสำคัญ (Delgado, Brito, Peres, Noe-Arroyo, & Garrido-Fernández, 2005; Leal-Sánchez et al., 2002; Mataragas, Drosinos, Tsakalidou, & Metaxopoulos, 2004) ทั้งนี้จากการศึกษาพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรียกรดแลคติก มักจะเป็นอุณหภูมิเดียวกันกับอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (Abo-Amer, 2011; Mataragas, Metaxopoulos, Galiotou, & Drosinos, 2003; Rajaram, Manivasagan, Thilagavathi, & Saravanakumar, 2010) นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่ออุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงเชื้อสูงขึ้นจะส่งผลทำให้เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกผลิตแบคทีเรียโอซินได้ลดลง และที่อุณหภูมิต่ำพบว่าอัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจะลดลง ซึ่งจะส่งผลให้กระบวนการสังเคราะห์แบคทีเรียโอซินลดลงไปด้วย (Abbasiliasi et al., 2107)

การผลิตแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรียกรดแลคติกส่วนมากจะอยู่ในช่วงปลาย Log Growth Phase หรือช่วงต้น Stationary Growth Phase ของการเจริญเติบโต (Martinez, Balciunas,

Converti, Cotter, & Oliveira, 2013; Sabo, Vitolo, González, & Oliveira, 2014) โดยในการศึกษานี้ เชื้อ *L. plantarum* RB01-SO สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. suis* P1/7 ได้สูงสุดที่เวลา 12 ชั่วโมง และเมื่อเลี้ยงเชื้อนานเกินกว่า 24 ชั่วโมง พบว่าเชื้อผลิตแบคทีเรียโอซินได้ลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก เมื่อเลี้ยงเชื้อนานเกินกว่า 24 ชั่วโมง หรือเกินระยะ Stationary Growth Phase เชื้ออาจสร้างสารจำพวกเอนไซม์ย่อยโปรตีนขึ้น ส่งผลทำให้แบคทีเรียโอซินถูกทำลาย (Abanoz & Kunduhoglu, 2018; Todorov & Dicks, 2006)

4.3 ผลการทำบริสุทธิ์แบคทีเรียโอซิน

4.3.1 ผลการเปรียบเทียบวิธีการทำบริสุทธิ์แบคทีเรียโอซิน

เมื่อทดลองเปรียบเทียบการทำบริสุทธิ์แบคทีเรียโอซินขั้นที่หนึ่ง ของแบคทีเรียโอซินที่สร้างจากเชื้อ *L. plantarum* RB01-SO ด้วยวิธีการที่ต่างกันจำนวน 3 วิธี ได้แก่ การใช้เรซิน Amberlite XAD-16 การตกตะกอนด้วย Acetone และการตกตะกอนด้วย Ammonium Sulfate พบว่าการใช้เรซิน Amberlite XAD-16 ได้ร้อยละของผลผลิตที่ได้ (%Yield) มากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 60 ในขณะที่ร้อยละของผลผลิตที่ได้จากการตกตะกอนด้วย Acetone และการตกตะกอนด้วย Ammonium Sulfate คิดเป็นร้อยละ 10 และ 40 ตามลำดับ (แสดงดังตารางที่ 4.7)

ตารางที่ 4.7 ตารางแสดงการเปรียบเทียบร้อยละของผลผลิตที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ในแต่ละขั้นตอน

ตัวอย่าง	ปริมาตร	ค่ากิจกรรม	กิจกรรมการ	ร้อยละของผลผลิตที่ได้
		การยับยั้งเชื้อ	ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด	
		เชื้อแบคทีเรีย (AU/mL)	ทั้งหมดยุติ (AU)	
การทำบริสุทธิ์ขั้นที่หนึ่ง				
CFS	1,000	400	4×10^5	100
การใช้เรซิน Amberlite XAD-16	150	1600	2.4×10^5	60
การตกตะกอนด้วย Acetone	100	400	4×10^4	10
การตกตะกอนด้วย Ammonium Sulfate	200	800	1.6×10^5	40

ตารางที่ 4.7 ตารางแสดงการเปรียบเทียบร้อยละของผลผลิตที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ในแต่ละขั้นตอน (ต่อ)

ตัวอย่าง	ปริมาตร	ค่ากิจกรรม การยับยั้ง เชื้อ แบคทีเรีย (AU/mL)	กิจกรรมการ ยับยั้งเชื้อ แบคทีเรีย ทั้งหมด (AU)	ร้อยละ ของ ผลผลิตที่ ได้
การทำบริสุทธิ์ขั้นที่สอง				
การตกตะกอนด้วย Ammonium Sulfate	200	800	1.6×10^5	100
SP-Sepharose	40	400	1.6×10^4	10
Q-Sepharose	40	0	0	0
Sep-Pak [®] C ₁₈ Cartridge	10	200	2×10^3	1.25
การทำบริสุทธิ์ขั้นสุดท้าย				
SP-Sepharose	40	400	1.6×10^4	100
Reverse phase HPLC (RB01-SOA)	1	400	4×10^2	2.5
Reverse phase HPLC (RB01-SOB)	1	1600	1.6×10^3	10

ทั้งนี้ในการทดลองนี้จำเป็นต้องเลือกวิธีการตกตะกอนด้วย Ammonium Sulfate มาใช้เป็นวิธีการสำหรับการทำบริสุทธิ์ขั้นที่หนึ่ง เนื่องจากการทำบริสุทธิ์ด้วยการใช้เรซิน Amberlite XAD-16 ส่งผลต่อการทำบริสุทธิ์ในขั้นตอนของการใช้ SP-Sepharose และ Q-Sepharose เนื่องจากพบว่าแบคทีเรียโอซินไม่สามารถจับกับเรซินทั้งสองชนิดได้ ทั้งนี้เมื่อสิ่งปนเปื้อน อาทิ สารจำพวกโปรตีนและสารลดแรงตึงผิว เช่น Tween 80 ในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่ได้ถูกกำจัดออก จะส่งผลต่อการทำบริสุทธิ์ในขั้นตอน RP-HPLC รวมทั้งการวิเคราะห์มวลโมเลกุลของแบคทีเรียโอซิน (Garsa, Kumariya, Sood, Kumar, & Kapila, 2014; Kawai, Saito, Toba, Samant, & Itoh, 1994; Saavedra & Sesma, 2011) สอดคล้องกับการทดลองของ Deraz, Karlsson, Hedström, Andersson, and Mattiasson (2005) พบว่าแมสสเปกตรัม (Mass Spectrum) ของ Tween 80 บดบังแมสสเปกตรัมที่แท้จริงของแบคทีเรียโอซินในระหว่างการวิเคราะห์มวลโมเลกุลด้วย MALDI-TOF MS ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงเลือกวิธีการตกตะกอนด้วย Ammonium Sulfate ที่ความเข้มข้นต่างกัน 2 ระดับ คือ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 โดยมวลต่อปริมาตร แล้วเก็บเฉพาะส่วนใสที่ได้ (เนื่องจากที่ความเข้มข้นนี้ไม่พบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *S. suis* P1/7 จากตะกอนที่ตกได้) มาตกตะกอนต่อด้วย Ammonium Sulfate ที่

ความเข้มข้นร้อยละ 75 โดยมวลต่อปริมาตร อีกครั้ง โดยแบคทีเรียโอซินที่ได้จากการตกตะกอนด้วยความเข้มข้นนี้ มีค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อจำเพาะเท่ากับ 52.40 AU/mg ในขณะที่ค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อจำเพาะของ CFS มีค่าเท่ากับ 37.54 AU/mg สำหรับวิธีการตกตะกอนด้วย Ammonium Sulfate โดยใช้ความเข้มข้นต่างกัน 2 ระดับ มีส่วนในการเพิ่มประสิทธิภาพในการลดสารปนเปื้อนต่าง ๆ ในระหว่างการทำบริสุทธิ์ เนื่องจากการเป็นกาจัดสิ่งปนเปื้อนออกไปได้ส่วนหนึ่งจากตะกอนที่ตกด้วย Ammonium Sulfate ในความเข้มข้นแรก จากรายงานของ Rekhif, Atrih, and Lefebvre (1994) ที่ทำการตกตะกอนแบคทีเรียโอซินที่สร้างจากเชื้อ *Lactobacillus plantarum* LC74 ด้วย Ammonium Sulfate ที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 และ 40 โดยมวลต่อปริมาตร พบว่ามีค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อจำเพาะเท่ากับ 447 AU/mg เมื่อเทียบกับ CFS (79.4 AU/mg) นอกจากนี้ Das and Goyal (2014) ยังได้รายงานการตกตะกอนแบคทีเรียโอซินที่สร้างจากเชื้อ *Lactobacillus plantarum* DM5 ด้วย Ammonium Sulfate ที่ความเข้มข้นร้อยละ 40 และ 80 โดยมวลต่อปริมาตร และมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อจำเพาะเท่ากับ 2,196 AU/mg เมื่อเทียบกับ CFS ที่มีค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อเท่ากับ 410 AU/mg ทั้งนี้เนื่องจากการตกตะกอนด้วย Ammonium Sulfate จะช่วยแยกโปรตีนออกจากสารละลายโดยเมื่อความเข้มข้นของเกลือในสารละลายสูงขึ้นเกลือจะเกิดการแตกตัวเป็นประจุบวกและประจุลบ ซึ่งประจุเหล่านี้จะไปแย่งจับกับโมเลกุลของน้ำที่อยู่ล้อมรอบโมเลกุลของโปรตีน ส่งผลให้โมเลกุลของโปรตีนแยกตัวออกจากน้ำและรวมตัวตกเป็นตะกอนลงมา ดังนั้นโปรตีนที่ได้จะมีความเข้มข้นมากขึ้น อีกทั้งยังสามารถเพิ่มฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียได้อีกด้วย (Jamaluddin, Stuckey, Ariff, & Faizal Wong, 2018; Sharma, Kapoor, Gautam, & Kumari, 2011)

การทำบริสุทธิ์ในขั้นที่สองเป็นการทำบริสุทธิ์ด้วยโครมาโตกราฟีโดยใช้เรซินชนิดต่าง ๆ กัน ได้แก่ เรซินที่แยกโปรตีนด้วยการแลกเปลี่ยนประจุบวก (SP-Sepharose) เรซินที่แยกโปรตีนด้วยการแลกเปลี่ยนประจุลบ (Q-Sepharose) และเรซินที่แยกโปรตีนโดยอาศัยคุณสมบัติ Hydrophobic interaction (Sep-Pak[®] C₁₈ Cartridge) ทั้งนี้พบว่าการทำบริสุทธิ์โดยใช้เรซิน SP-Sepharose ได้ร้อยละของผลผลิตที่ได้มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 10 ในขณะที่การใช้เรซิน Q-Sepharose และ Sep-Pak[®] C₁₈ Cartridge ได้ร้อยละของผลผลิตที่ได้ เท่ากับร้อยละ 0 และ 1.25 ตามลำดับ (แสดงดังตารางที่ 4.7) ดังนั้นการทำบริสุทธิ์ในขั้นที่สองนี้จึงเลือกใช้เรซิน SP-Sepharose ในการทำบริสุทธิ์ เนื่องจากแบคทีเรียโอซินส่วนใหญ่จะมีประจุเป็นบวกที่ค่า pH ใกล้เคียงความเป็นกลาง (Pingitore et al., 2007)

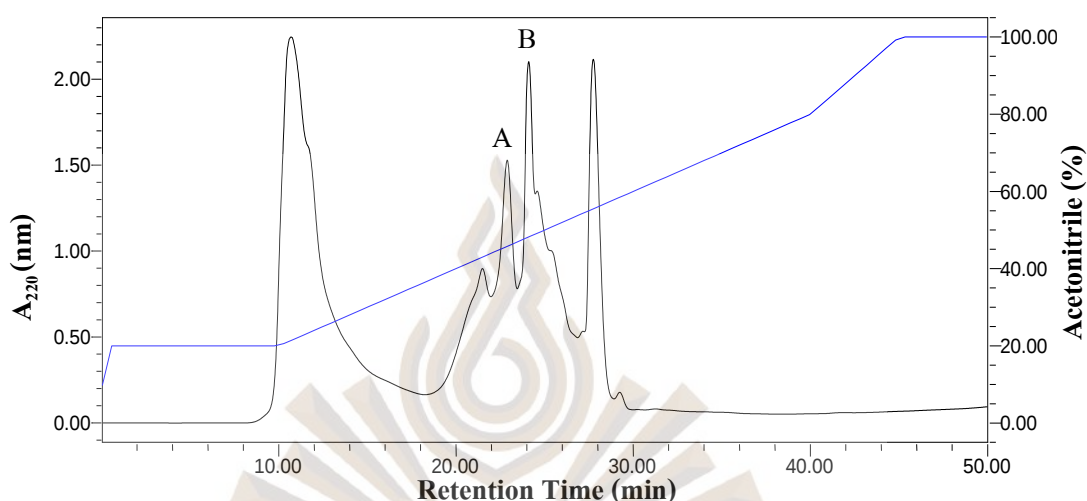
ผลการทำบริสุทธิ์ในขั้นตอนสุดท้ายด้วย RP-HPLC พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียโอซินออกมาได้ 2 ชนิด คือ แบคทีเรียโอซิน RB01-SOA และ RB01-SOB โดยแบคทีเรียโอซินที่แยก

ออกมาได้มีค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดเท่ากับ 4×10^2 และ 1.6×10^3 AU ตามลำดับ และได้ร้อยละของผลผลิตที่ได้ เท่ากับร้อยละ 2.5 และ 10.0 ตามลำดับ (แสดงดังตารางที่ 4.7) โดยการทำบริสุทธิ์ด้วย RP-HPLC มักถูกใช้เป็นขั้นตอนสุดท้ายของการทำบริสุทธิ์ เนื่องจากการทำบริสุทธิ์ในขั้นตอนนี้ไม่เพียงแต่เพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อนในขั้นตอนสุดท้าย แต่ยังสามารถใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของแบคทีเรียโอซินได้อีกด้วย (Saavedra & Sesma, 2011)

ดังนั้นการทำบริสุทธิ์แบคทีเรียโอซิน ที่ผลิตจากเชื้อ *L. plantarum* RB01-SO จำเป็นต้องทำบริสุทธิ์ด้วยขั้นตอนที่แตกต่างกัน 3 ขั้นตอน ได้แก่ การตกตะกอนด้วย Ammonium Sulfate การใช้ Cation-Exchange Chromatography และ RP-HPLC อันเนื่องมาจากโครงสร้างของแบคทีเรียโอซินดังกล่าวประกอบด้วยส่วนที่เป็นประจุบวกและส่วนที่ไม่ชอบน้ำ โดยการทำบริสุทธิ์แบคทีเรียโอซินด้วย 3 ขั้นตอนดังกล่าว สอดคล้องกับรายงานของ Rekhif et al. (1994) ที่ทำบริสุทธิ์ Plantaricin EC174 ด้วยการตกตะกอนด้วย Ammonium Sulfate ความเข้มข้นร้อยละ 20 และ 40 โดยมวลต่อปริมาตร ต่อด้วยการผ่านเข้าสู่ Cation-Exchange Column และ RP-HPLC ตามลำดับ นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับรายงานของ Song, Zhu, and Gu (2014) ซึ่งได้ทำบริสุทธิ์ Plantaricin ZJ5 โดยใช้วิธีการตกตะกอนด้วย Ammonium Sulfate ความเข้มข้นร้อยละ 80 โดยมวลต่อปริมาตร ตามด้วยการผ่านเข้าสู่ Cation-Exchange Column โดยใช้เรซิน SP-Sepharose Fast Flow (ชะตัวอย่างออกจากคอลัมน์ด้วย NaCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์) และการทำบริสุทธิ์โดยใช้ RP-HPLC เช่นเดียวกับการทำบริสุทธิ์ Plantaricin KL-1X, KL-1Y และ KL-1Z ด้วยวิธีการตกตะกอนโดยใช้ Ammonium Sulfate ความเข้มข้นร้อยละ 85 โดยมวลต่อปริมาตร ในขั้นตอนแรกตามด้วยการผ่านเข้าสู่ Cation-Exchange Column โดยใช้เรซิน SP-Sepharose Fast Flow (ชะตัวอย่างออกจากคอลัมน์ด้วย NaCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์) แล้วทำบริสุทธิ์ด้วย RP-HPLC ในขั้นตอนสุดท้าย (Rumjuankiat et al., 2015) เป็นต้น

ผลการทำบริสุทธิ์แบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *L. plantarum* RB01-SO สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 4.8 แบคทีเรียโอซินถูกทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนโปรตีนออกจากส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* RB01-SO ด้วย Ammonium Sulfate ที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 และ 75 โดยมวลต่อปริมาตร โดยแบคทีเรียโอซินที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ในขั้นตอนนี้ มีค่ากิจกรรมการยับยั้งจำเพาะ เท่ากับ 52.40 AU/mg จากนั้นแบคทีเรียโอซินถูกทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยการผ่านเข้าสู่ Cation-Exchange Chromatography โดยใช้เรซิน SP-Sepharose ในขั้นตอนนี้แบคทีเรียโอซินถูกชะออกมาด้วย NaCl ในสารละลาย Phosphate Buffer ความเข้มข้น 0.50 โมลาร์ แบคทีเรียโอซินที่ได้

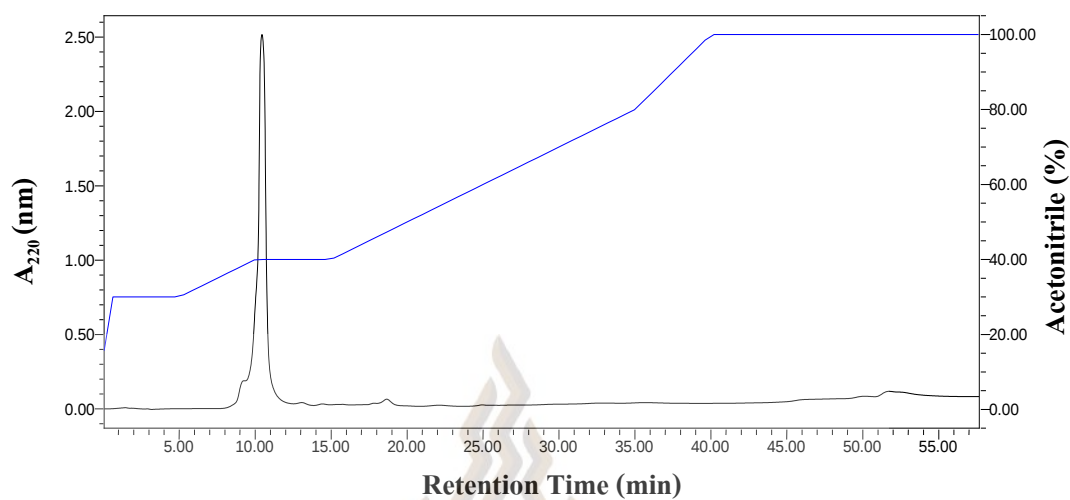
จากการทำบริสุทธิ์ในขั้นตอนนี้มีค่า กิจกรรมการยับยั้งจำเพาะเท่ากับ 125 AU/mg และถูกทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนสุดท้ายด้วย RP-HPLC โดยแบคทีเรียโอซินถูกชะออกจากคอลัมน์ ที่เวลาประมาณ 23 นาที ณ จุด A และที่เวลาประมาณ 24 นาที ณ จุด B ดังแสดงในรูปที่ 4.2



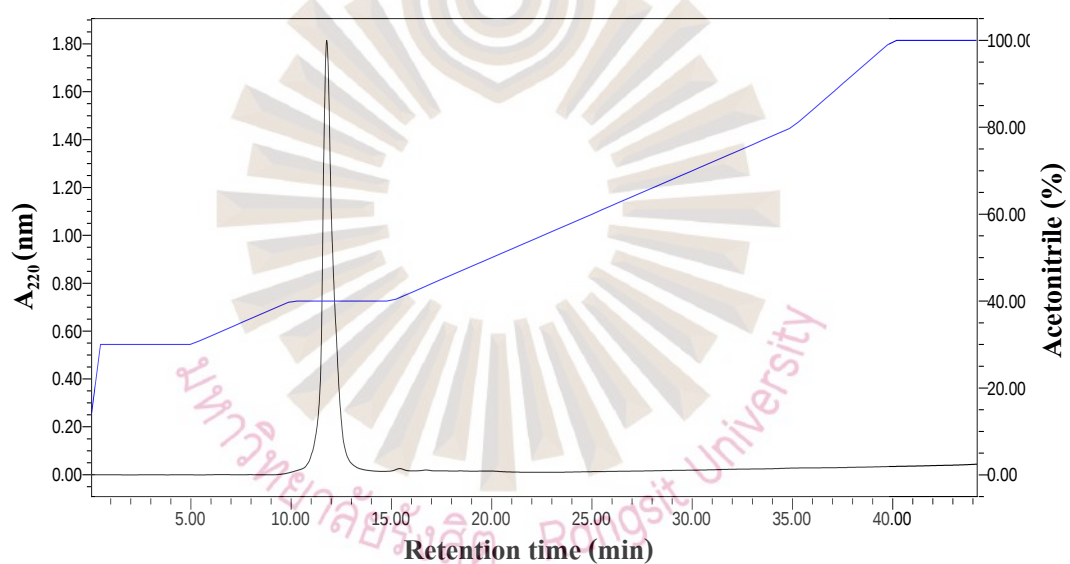
รูปที่ 4.2 การทำบริสุทธิ์แบคทีเรียโอซิน ด้วยวิธี Reversed Phase-HPLC โดยพบแบคทีเรียโอซินที่มีค่ากิจกรรมการยับยั้ง ณ จุด A และ B ของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *L. plantarum* RB01-SO

เมื่อนำแบคทีเรียโอซินที่ได้ ณ จุด A และ B มาทำบริสุทธิ์ซ้ำในรอบที่สองด้วย RP-HPLC แบคทีเรียโอซินถูกชะออกจากคอลัมน์ ที่เวลาประมาณ 10 นาที (รูปที่ 4.3 ก) และที่เวลา 12 นาที (รูปที่ 4.3 ข) โดยแบคทีเรียโอซินที่แยกออกมาได้ มีค่ากิจกรรมการยับยั้งจำเพาะเท่ากับ 769.23 AU/mg และ 1,818.18 AU/mg ตามลำดับ และมีค่าร้อยละของผลผลิตที่ได้ เท่ากับร้อยละ 0.1 และ 0.4 รวมถึงมีค่า Purifications Fold เท่ากับ 20.69 และ 48.43 ตามลำดับ

(ก)



(ข)



รูปที่ 4.3 การทำบริสุทธิ์แบคทีเรียไอซินด้วยวิธี Reversed Phase-HPLC ของแบคทีเรียไอซิน A (ก) และแบคทีเรียไอซิน B (ข) ของแบคทีเรียไอซิน RB01-SO

ตารางที่ 4.8 ผลการทำบริสุทธิ์แบคทีเรียโอซิน ที่ผลิตจากเชื้อ *L. plantarum* RB01-SO

ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์	ปริมาตร (mL)	ค่ากิจกรรมการ ยับยั้งเชื้อ แบคทีเรีย (AU/mL) ¹	ค่ากิจกรรมการ ยับยั้งเชื้อ แบคทีเรียทั้งหมด (AU)	ร้อยละของ ผลผลิตที่ ได้	ปริมาณโปรตีน ทั้งหมด (mg) ²	ค่ากิจกรรมการยับยั้ง เชื้อจำเพาะ (AU/mg)	ความ บริสุทธิ์ (-fold)
CFS	1,000	400	4×10^5	100	1.06×10^4	37.73	1.00
ตกตะกอน Ammonium Sulfate	200	800	1.6×10^5	40	3.05×10^3	52.46	1.40
SP-Sepharose (0.5 M NaCl)	40	400	1.6×10^4	4	1.28×10^2	1.25×10^2	3.33
RP-HPLC							
RB01-SOA	1	400	4×10^2	0.1	0.52	7.69×10^2	20.49
RB01-SOB	1	1,600	1.6×10^3	0.4	0.88	1.82×10^3	48.43

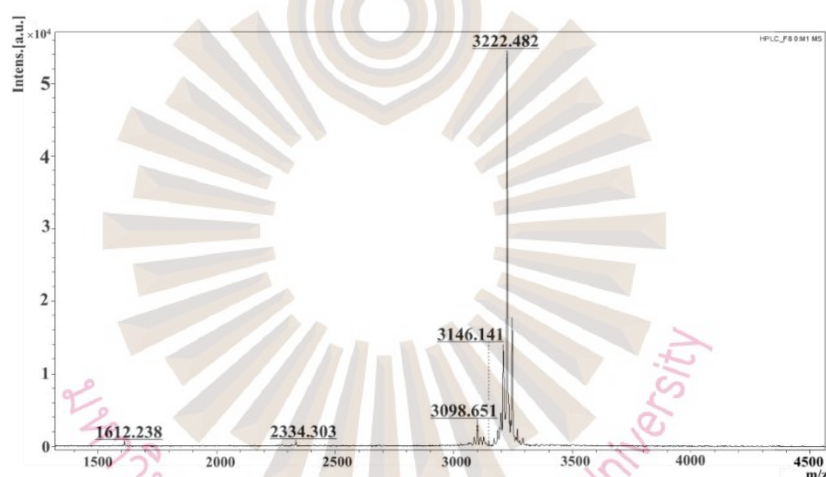
¹ ค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ในหน่วย AU/mL ที่ทดสอบด้วยวิธี Spot-on-Lawn Method โดยใช้เชื้อ *S. suis* P1/7 ในการทดสอบ

² ปริมาณโปรตีน ในหน่วย มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่วัดโดยใช้วิธี Lowry Method

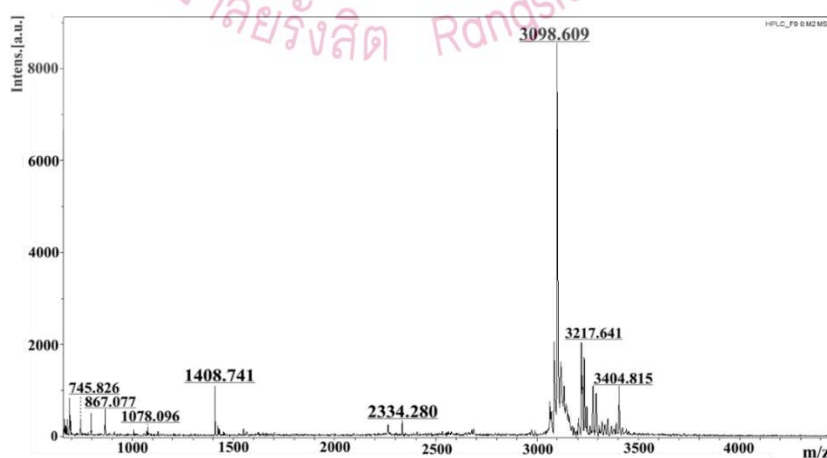
4.3.2 ผลการวิเคราะห์มวลโมเลกุลของแบคทีเรียโอซินด้วย MALDI-TOF MS

มวลโมเลกุลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS ของแบคทีเรียโอซิน A และ B ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *L. plantarum* RB-SO1 พบว่ามีมวลโมเลกุลเท่ากับ 3,222 (รูป 4.4 (ก)) และ 3,098 คาลตัน (รูป 4.4 (ข)) ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบจากฐานข้อมูลพบว่ามวลโมเลกุลของแบคทีเรียโอซินทั้งสองชนิดใกล้เคียงกับ Two-Peptide Plantaricin W (Plw) ซึ่งประกอบไปด้วยแบคทีเรียโอซิน Plantaricin W α (Plw α) (มวลโมเลกุลเท่ากับ 3,222 คาลตัน) และ Plantaricin W β (Plw β) (มวลโมเลกุลเท่ากับ 3,099 คาลตัน) ตามลำดับ (Noonpakdee et al., 2009)

(ก)



(ข)



รูปที่ 4.4 มวลโมเลกุลของแบคทีเรียโอซิน RB01-SOA (ก) และแบคทีเรียโอซิน RB01-SOB (ข) ที่
ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS

4.3.3 ผลการศึกษาคุณสมบัติบางประการของแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์

4.3.3.1 ผลการทดสอบความไวของแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์ต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีน

ผลการทดสอบผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่อแบคทีเรียโอซิน RB01-SOA และ RB01-SOB ด้วยเอนไซม์ α -chymotrypsin, Trypsin, Proteinase K, Pepsin, Amylase และ Lipase ต่อความไวของแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งเชื้อ *L. sakei* JCM 1157^T พบว่าแบคทีเรียโอซิน RB01-SOA และ RB01-SOB ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนทั้ง 4 ชนิด ในขณะที่การทดลองหาคะบวน และเอนไซม์ Amylase และ Lipase มีร้อยละของค่ากิจกรรมการยับยั้งที่เหลืออยู่หลังการทดสอบเท่ากับ 100 (ตารางที่ 4.9) อันเนื่องมาจากโครงสร้างของส่วนออกฤทธิ์ของแบคทีเรียโอซินดังกล่าวเป็นโปรตีน รวมถึงไม่มีไขมัน และคาร์โบไฮเดรตเป็นส่วนประกอบในโครงสร้าง (Jamaluddin et al., 2018) และจากผลการทดลองดังกล่าวยังช่วยให้มั่นใจในความปลอดภัยสำหรับการบริโภค เนื่องจากแบคทีเรียโอซินเหล่านี้สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติในระบบทางเดินอาหาร (Woraprayote et al., 2015) อย่างไรก็ตามเมื่อศึกษาเปรียบเทียบกับ Plantaricin อื่น ๆ เช่น จากรายงานของ Pei, Li, Han, and Tao (2018) พบว่า Plantaricin SLG1 สูญเสียความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียเมื่อถูกทำลายด้วยเอนไซม์ Proteinase K, Pepsin, Papain และ α -chymotrypsin ในขณะที่เอนไซม์ α -amylase และ Lipase ไม่มีผลต่อการทำงานของแบคทีเรียโอซิน และ Plantaricin ZJ008 ไม่สูญเสียความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียเมื่อทดสอบด้วย Proteinase K แต่จะไม่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้ เมื่อทดสอบด้วยเอนไซม์ α -chymotrypsin, Trypsin, Pepsin และ Papain (Zhu et al., 2014) เป็นต้น

ตารางที่ 4.9 ผลการทดสอบความไวของแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์ต่อเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน

การทดสอบ	ร้อยละของค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เหลืออยู่หลังการทดสอบ	
	RB01-SOA	RB01-SOB
แบคทีเรียโอซิน (ชุดควบคุม)	100	100
บัฟเฟอร์ pH 3.0	100	100
บัฟเฟอร์ pH 7.5	100	100
α -chymotrypsin	0	0
Trypsin	0	0
Pepsin	0	0
Amylase	100	100
Lipase	100	100

4.3.3.2 ผลการทดสอบความคงทนของแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์ต่อตัวทำละลายอินทรีย์และสารลดแรงตึงผิว

จากการศึกษาผลของสารเคมีในกลุ่มตัวทำละลายอินทรีย์และสารลดแรงตึงผิวต่อคุณสมบัติของแบคทีเรียโอซิน โดยใช้เชื้อ *L. sakei* JCM 1157^T เป็นแบคทีเรียเป้าหมายที่ใช้ทดสอบ โดยทดสอบกับตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ Acetonitrile, Ethanol และ Isopropanol พบว่าสารทั้งหมดที่ใช้ทดสอบไม่มีผลทำให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซิน RB01-SOA และ RB01-SOB ลดลง เช่นเดียวกับสารในกลุ่มสารลดแรงตึงผิว ได้แก่ Triton X-100, Tween 20, Tween 80, SDS, EDTA และ Urea ที่ไม่มีผลต่อการทำงานของแบคทีเรียโอซินเช่นกัน ในทางตรงกันข้ามแบคทีเรียโอซิน RB01-SOA และ B มีค่ากิจกรรมการยับยั้งเพิ่มขึ้นเมื่อรวมกับ Tween 20, Tween 80, SDS และ EDTA แสดงดังตารางที่ 4.10 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก Tween 20 และ Tween 80 มีผลช่วยลดแรงตึงผิวที่เชื่อมหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมายและช่วยให้แบคทีเรียโอซินสามารถซึมผ่านเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมายได้ดีขึ้น (Vignolo, de Kairuz, de Ruiz Holgado, & Oliver, 1995) นอกจากนี้ SDS และ EDTA ยังเป็นสารที่มีส่วนทำให้เชื่อมหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมายถูกรบกวนจึงมีส่วนเพิ่มโอกาสในการออกฤทธิ์ของแบคทีเรียโอซิน (Alakomi et al., 2000; Shafa & Salton, 1960; Woraprayote et al., 2015)

ตารางที่ 4.10 ผลความคงทนของแบคทีเรียโอซินต่อตัวทำละลายอินทรีย์และสารลดแรงตึงผิว

สารเคมีที่ใช้ทดสอบ	ค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (AU/mL)				
	ชุดทดลองควบคุม			การทดสอบ	
	สารเคมี	RB01-SOA	RB01-SOB	RB01-SOA	RB01-SOB
ตัวทำละลายอินทรีย์					
Acetonitrile	0	800	6,400	800	6,400
Ethanol	0	800	6,400	800	6,400
Isopropanol	0	800	6,400	800	6,400
สารลดแรงตึงผิว					
Triton X-100	0	800	6,400	3,200	6,400
Tween 20	0	800	6,400	1,600	6,400
Tween 80	0	800	6,400	1,600	12,800
SDS	400	800	6,400	6,400	51,200
EDTA	0	800	6,400	1,600	6,400
Urea	0	800	6,400	800	6,400

4.3.3.3 ผลการทดสอบความคงทนของแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์ต่อ pH และความร้อน

จากผลการศึกษาค่าความคงทนของแบคทีเรียโอซิน RB01-SOA และ B ต่อค่า pH ที่ 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 ที่อุณหภูมิ 80, 100, 121 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง นาน 30, 30, 15 นาที และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยใช้เชื้อ *L. sakei* JCM 1157^T เป็นแบคทีเรียเป้าหมายที่ใช้ทดสอบ พบว่า ที่ค่า pH เท่ากับ 2 แบคทีเรียโอซิน RB01-SOA และ B สามารถคงทนได้ที่อุณหภูมิ 80, 100, 121 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง ในขณะที่แบคทีเรียโอซิน RB01-SOA ที่ค่า pH 4-10 สามารถคงทนได้ถึงอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ส่วนแบคทีเรียโอซิน RB01-SOB ที่ค่า pH 4-8 สามารถคงทนได้ถึงอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ทั้งนี้ที่ค่า pH เท่ากับ 10 แบคทีเรียโอซิน RB01-SOB ยังคงทนได้ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส และที่ค่า pH เท่ากับ 12 แบคทีเรียโอซิน RB01-SOA และ B สามารถคงทนได้ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง ตามลำดับ อย่างไรก็ตามแบคทีเรียโอซิน RB01-SOA และ B ไม่สามารถคงทนได้ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ค่า pH 6-12 ดังแสดงในตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 ผลการทดสอบความคงทนของแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์ต่อ pH และความร้อน

pH	ร้อยละของค่ากิจกรรมการยับยั้งที่เหลืออยู่หลังการทดสอบ			
	อุณหภูมิห้อง (24 ชั่วโมง) (ชุดทดลองควบคุม)	80 องศาเซลเซียส (30 นาที)	100 องศาเซลเซียส (30 นาที)	121 องศาเซลเซียส (15 นาที)
RB01-SOA				
2	100	100	100	100
4	100	50	50	25
6	50	50	25	0
8	25	6.25	6.25	0
10	25	6.25	6.25	0
12	12.5	6.25	0	0

ตารางที่ 4.11 ผลการทดสอบความคงทนของแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์ต่อ pH และความร้อน (ต่อ)

pH	ร้อยละของค่ากิจกรรมการยับยั้งที่เหลืออยู่หลังการทดสอบ			
	อุณหภูมิห้อง (24 ชั่วโมง)	80 องศาเซลเซียส (30 นาที)	100 องศาเซลเซียส (30 นาที)	121 องศาเซลเซียส (15 นาที)
	(ชุดทดลองควบคุม)			
RB01-SOB				
2	100	100	100	100
4	100	50	25	12.5
6	25	25	12.5	0
8	12.5	6.25	6.25	0
10	12.5	6.25	0	0
12	6.25	0	0	0

4.3.3.4 ผลการวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์ ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเป้าหมาย (Minimum Inhibitory Concentration; MIC)

ผลค่าความเข้มข้นต่ำสุดของแบคทีเรียโอซิน RB01-SOA และ B ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเป้าหมาย แสดงดังตารางที่ 4.12 โดยแบคทีเรียโอซิน RB01-SOA และ B สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ ทั้งนี้จากการทดสอบพบว่าแบคทีเรียโอซิน RB01-SOA และ B สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacillus* ได้ดีที่สุด จึงสามารถยืนยันลักษณะทั่วไปของแบคทีเรียโอซินในด้านความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ผู้ผลิตได้ดี (Srionnual, Yanagida, Lin, Hsiao, & Chen, 2007) นอกจากนี้แบคทีเรียโอซิน RB01-SOA และ B ยังสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Streptococcus suis* ได้ และจากการศึกษารายงานอื่น ๆ พบว่ามีแบคทีเรียโอซินที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. suis* ได้ อาทิ Suicin 3908 (Vaillancourt, LeBel, Frenette, Gottschalk, & Grenier, 2015), Suicin 65 (Vaillancourt et al., 2015), Suicin 90-1330 (LeBel, Vaillancourt, Frenette, Gottschalk, & Grenier, 2014), Bacteriocin WX153 (Srimark & Khunajakr, 2015), Pentocin LPL1-5 (Zhang et al., 2012), Nisin (LeBel et al., 2013) และ Pluranimalicin 2N12 (Vaillancourt et al., 2022) อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการรายงานเกี่ยวกับ Plantaricin ที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. suis* ได้ ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่า รายงานฉบับนี้เป็นรายงานแรกที่มีการรายงานเกี่ยวกับการยับยั้งเชื้อ *S. suis* โดย Plantaricin Wα และ Wβ

ตารางที่ 4.12 ผลการวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของแบคทีเรียของแบคทีเรียโอซิน RB01-SOA และ RB01-SOB ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเป้าหมาย

แบคทีเรียเป้าหมาย ¹	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (ไมโครโมลาร์)	
	RB01-SOA ²	RB01-SOB ³
Gram-Positive bacteria		
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	80.70	35.51
<i>Bacillus subtilis</i> JCM1465 ^T	20.17	2.22
<i>Enterococcus faecalis</i> JCM 5803	161.39	4.44
<i>Lactobacillus sakei</i> JCM1157 ^T	10.09	1.11
<i>Lactococcus lactis</i> ATCC 19435 ^T	20.17	1.11
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	161.39	17.75
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	161.39	17.75
<i>Micrococcus luteus</i> NBRC 12708	161.39	8.88
<i>Staphylococcus aureus</i> DMST 20635	161.39	17.75
<i>Streptococcus suis</i> NaH	161.39	17.75
<i>Streptococcus suis</i> P1/7	161.39	17.75
<i>Streptococcus agalactiae</i> 1611	40.35	4.44
Gram-Negative bacteria		
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35401	161.39	142.03
<i>Escherichia coli</i> F18	161.39	142.03
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	80.70	35.51
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	80.70	35.51
<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 13311	80.70	142.03
<i>Vibrio harveyi</i> AQVH 01	40.35	8.88

¹ ATCC = American Type Culture Collection, Rockville, Md, USA; JCM = Japan Collection of Microorganisms, Wako, Japan; DMST = Department of Medical Sciences, Thailand; NBRC = NITE Biological Resource Center, Chiba, Japan

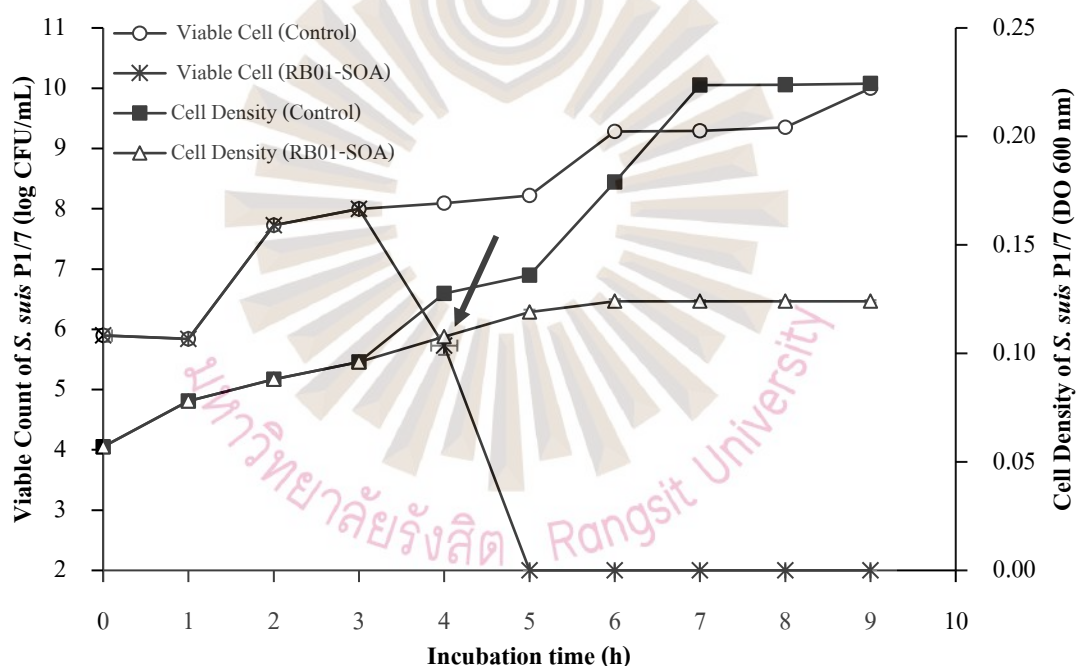
² ความเข้มข้นเริ่มต้นของแบคทีเรียโอซิน ที่ใช้ในการทดสอบมีค่าเท่ากับ 161.39 ไมโครโมลาร์

³ ความเข้มข้นเริ่มต้นของแบคทีเรียโอซิน ที่ใช้ในการทดสอบมีค่าเท่ากับ 284.05 ไมโครโมลาร์

4.3.3.5 ผลการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของแบคทีเรียโอสินบริสุทธิ์

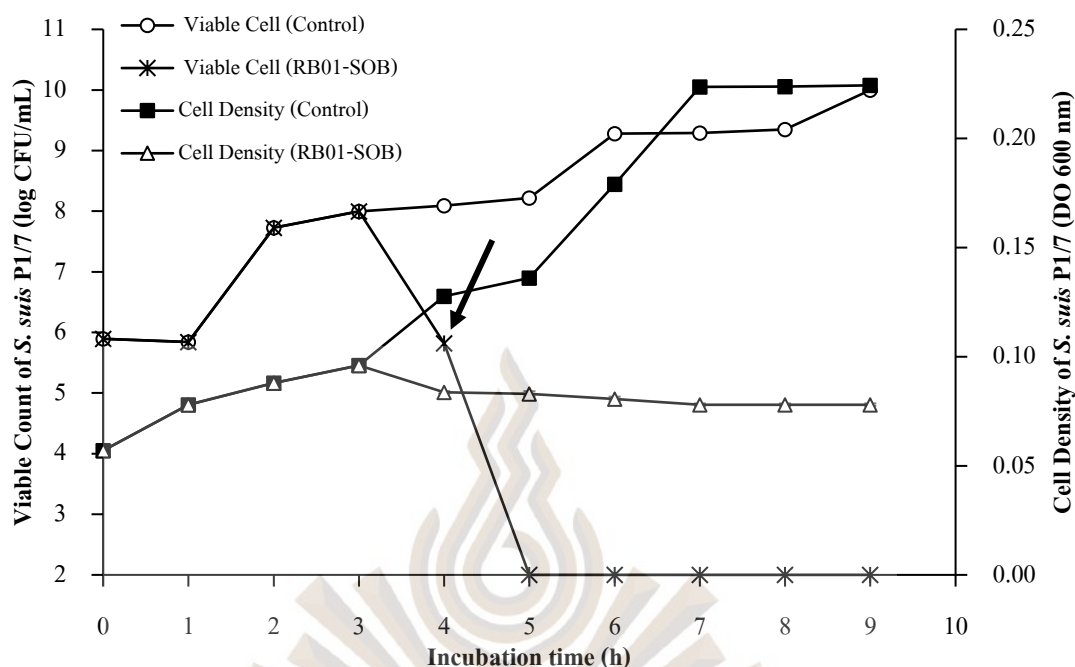
แบคทีเรียโอสิน RB01-SOA และ B มีกลไกการออกฤทธิ์ที่เหมือนกัน คือ แบบ Bactericidal คือ ออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *S. suis* P1/7 โดยไม่ทำให้เกิดการสลายของแบคทีเรีย (Bacteriolytic Activity) โดยเมื่อเติมแบคทีเรียโอสิน RB01-SOA และ B ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายของแบคทีเรียโอสินเท่ากับ 1 เท่าของ MIC ลงไปในช่วงกลางของการเจริญของเชื้อ *S. suis* P1/7 (ชั่วโมงที่ 4) พบว่าแบคทีเรียโอสิน RB01-SOA (รูปที่ 4.5 ก) และ B (รูปที่ 4.5 ข) สามารถลดปริมาณของเชื้อ *S. suis* P1/7 ลงทันที และสามารถลดปริมาณเชื้อได้ต่ำกว่าขีดจำกัดของการวิเคราะห์ (Detection Limit ที่ $2 \log \text{CFU/mL}$) ภายในชั่วโมงที่ 5 ของการทดสอบ ในขณะที่ค่าความขุ่นของเชื้อลดลงและคงที่ตลอดการทดลอง

(ก)



รูปที่ 4.5 กลไกการออกฤทธิ์ของแบคทีเรียโอสิน RB01-SOA (ก) และ RB01-SOB (ข) ต่อเชื้อ *S. suis* P1/7 โดยแบคทีเรียโอสิน RB01-SOA และ RB01-SOB จะถูกเติมไปที่เวลา 4 ชั่วโมง (→) ของการเลี้ยงเชื้อ โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของแบคทีเรียโอสินมีค่าเท่ากับ 1 MIC

(ข)



รูปที่ 4.5 กลไกการออกฤทธิ์ของแบคทีเรีย RB01-SOA (ก) และ RB01-SOB (ข) ต่อเชื้อ

S. suis P1/7 โดยแบคทีเรีย RB01-SOA และ RB01-SOB จะถูกเติมไปที่เวลา 4 ชั่วโมง

(→) ของการเลี้ยงเชื้อ โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ
แบคทีเรียมีค่าเท่ากับ 1 MIC (ต่อ)

4.3.3.6 ผลการศึกษาการเสริมฤทธิ์ของแบคทีเรียบริสุทธิ์ ในการยับยั้งเชื้อ

S. suis

ผลการศึกษาประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ร่วมกันของแบคทีเรีย RB01-SOA และ B ในการยับยั้งเชื้อ *S. suis* P1/7 พบว่า ผลค่าความเข้มข้นต่ำสุดของแบคทีเรีย RB01-SOA และ B เดี่ยว ๆ มีค่าเท่ากับ 161.39 และ 17.75 ไมโครโมลาร์ ในขณะที่ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของแบคทีเรีย RB01-SOA และ B ในสารผสม มีค่าเท่ากับ 40.35 และ 4.44 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าแบคทีเรีย RB01-SOA และ B ในสารผสมให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *S. suis* P1/7 เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียเดี่ยว ๆ โดยที่เมื่อคำนวณค่า FICI ได้ผลลัพธ์เท่ากับ 0.5 จึงสามารถยืนยันได้ว่าแบคทีเรีย RB01-SOA และ B มีกลไกการออกฤทธิ์แบบเสริมฤทธิ์กัน (Odds, 2003; Padalia & Chanda, 2015) ดังแสดงในตารางที่ 4.13 นอกจากนี้จากผลการทดลองยังสามารถสรุปได้ว่า แบคทีเรีย RB01-SOA และ B เป็น

แบคทีเรียโอซินที่จัดอยู่ในกลุ่ม II หรือกลุ่ม Unmodified Bacteriocins และจัดอยู่ในกลุ่มย่อย IIb หรือ Two-Peptide Bacteriocins เนื่องจากโครงสร้างเป็นเปปไทด์สองชนิดที่ทำงานเสริมฤทธิ์กัน (Fimland, Rogne, Fimland, Nissen-Meyer, & Kristiansen, 2008) โดยแบคทีเรียโอซินในกลุ่มย่อย IIb ที่สร้างจากเชื้อ *L. plantarum* ที่มีรายงานมาก่อนหน้า ได้แก่ Plantaricin EF (Moll et al., 1999), Plantaricin JK (Anderssen et al., 1998), Plantaricin S (Jiménez-Díaz et al., 1995) และ Plantaricin W (Holo, Jeknic, Daeschel, Stevanovic, & Nes, 2001) เป็นต้น

ตารางที่ 4.13 ตารางแสดงผลการศึกษาการเสริมฤทธิ์ของแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์

แบคทีเรียโอซิน	MIC เดี่ยว	MIC ในสารผสม	FIC	FICI	การแปลผล
RB01-SOA	161.39	40.35	0.25	0.5	กลไกการออกฤทธิ์แบบเสริมฤทธิ์กัน
RB01-SOB	17.75	4.44	0.25		

4.4 ผลการศึกษาประสิทธิภาพการใช้ผงแบคทีเรียโอซินหยาบและผงแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์บางส่วนในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. suis*

4.4.1 ผลการศึกษาการใช้ผงแบคทีเรียโอซินหยาบในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. suis*

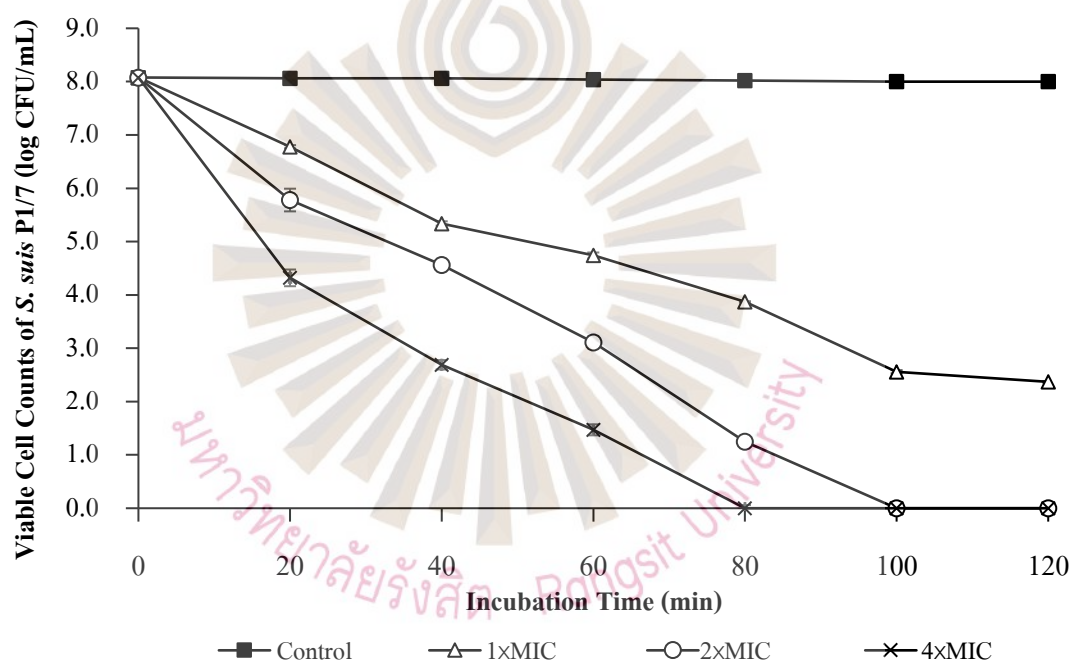
4.4.1.1 ผลการผลิตผงแบคทีเรียโอซินหยาบ

ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อของผงแบคทีเรียโอซิน ที่ได้จากส่วนใสจากการเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* RB01-SO พบว่าหลังจากผ่านกระบวนการทำให้เป็นผงด้วยการแช่เยือกแข็งแล้ว ความเข้มข้นของสารในระดับต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. suis* P1/7 ได้มีค่าเท่ากับ 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่ากิจกรรมการยับยั้งจำเพาะ เท่ากับ 77.54 AU/mg

4.4.1.2 ผลการศึกษาการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. suis* ของผงแบคทีเรียโอซินหยาบ

(1) ผลการศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *S. suis* ของผงแบคทีเรียโอซินหยาบในหลอดทดลอง

ผลการศึกษาการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. suis* P1/7 ของผงแบคทีเรียโอซิน
 หยาดที่ผลิตจากเชื้อ *L. plantarum* RB01-SO โดยการเติมผงแบคทีเรียโอซิน 77.54 AU/mL (1xMIC),
 155.08 AU/mL (2xMIC) และ 310.16 AU/mL (4xMIC) ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว THY ที่มีเชื้อ
S. suis P1/7 (ปริมาณเริ่มต้นเท่ากับ 8 log CFU/mL) จากการทดลอง พบว่าที่เวลา 20 นาที ของการ
 ทดลองผงแบคทีเรียโอซินสามารถลดปริมาณเชื้อ *S. suis* P1/7 ลงเหลือ 6.8, 5.8 และ 4.3 log CFU/mL
 โดยผงแบคทีเรียโอซินที่ความเข้มข้น 2x และ 4xMIC สามารถลดปริมาณเชื้อได้จนต่ำกว่าขีดจำกัด
 ของการวิเคราะห์ (Detection Limit ที่ 1 CFU/mL) ที่เวลา 100 และ 80 นาทีของการทดลอง ตามลำดับ
 ในขณะที่ผงแบคทีเรียโอซินหยาดที่ความเข้มข้น 1xMIC สามารถลดเชื้อลงเหลือ 2.37 log CFU/mL
 ในนาที่ที่ 120 ของการทดลอง แสดงดังรูปที่ 4.6

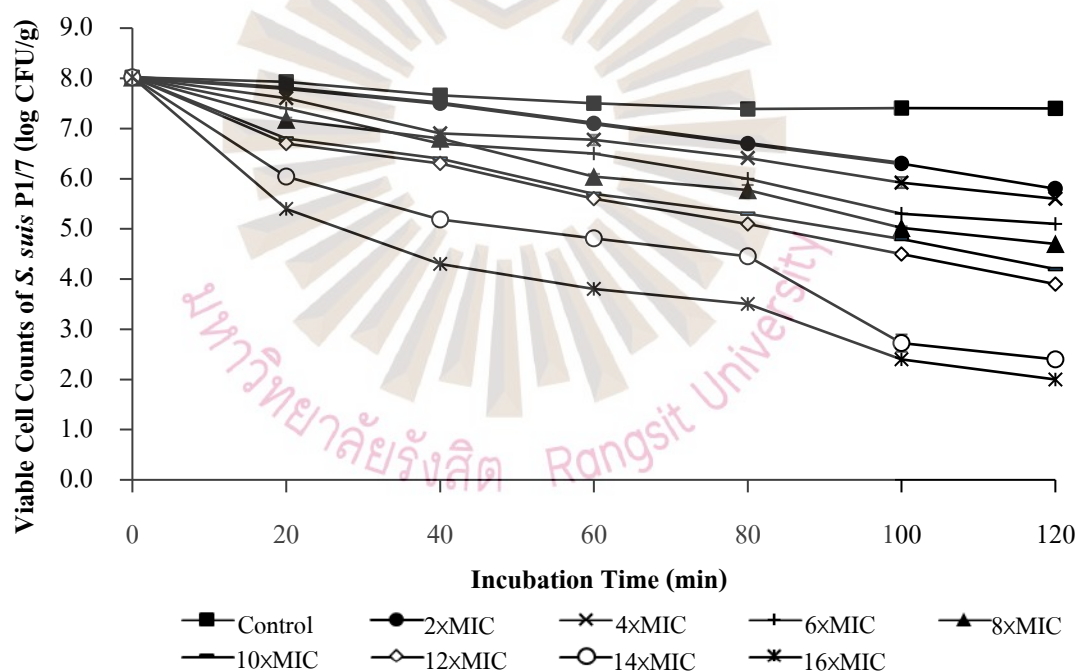


รูปที่ 4.6 ผลการออกฤทธิ์ของผงแบคทีเรียโอซินหยาด ต่อปริมาณเชื้อ *S. suis* P1/7 ในหลอดทดลอง
 โดยการเติมผงแบคทีเรียโอซินหยาดที่ความเข้มข้น 1x, 2x และ 4xMIC ที่เวลาเริ่มต้นของการ
 ทดลอง โดยที่ขีดจำกัดของการวิเคราะห์เท่ากับ 1 CFU/mL

(2) ผลการศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *S. suis* ของผง
 แบคทีเรียโอซินหยาดในลาบหมูดิบ

ผลการศึกษาการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. suis* P1/7 ของผงแบคทีเรียโอซิน
 หยาดที่ผลิตจากเชื้อ *L. plantarum* RB01-SO โดยการเติมผงแบคทีเรียโอซิน 46,524 AU/ลาบหมูดิบ

300 กรัม (2xMIC), 93,048 AU/ลาบหมูดิบ 300 กรัม (4xMIC), 139,572 AU/ลาบหมูดิบ 300 กรัม (6xMIC), 186,096 AU/ลาบหมูดิบ 300 กรัม (8xMIC), 232,620 AU/ลาบหมูดิบ 300 กรัม (10xMIC), 279,144 AU/ลาบหมูดิบ 300 กรัม (12xMIC), 325,668 AU/ลาบหมูดิบ 300 กรัม (14xMIC) และ 372,192 AU/ลาบหมูดิบ 300 กรัม (16xMIC) ลงไปในลาบหมูดิบที่มีเชื้อ *S. suis* P1/7 จากผลการทดลองพบว่าผงแบคทีเรียโอซินที่ความเข้มข้น 16xMIC สามารถลดปริมาณเชื้อได้มากที่สุด จากปริมาณเชื้อ *S. suis* P1/7 เริ่มต้น 8 log CFU/g ลดเหลือเพียง 5.4 log CFU/g ที่เวลา 20 นาที และเมื่อทดลองจนถึงนาทีที่ 120 พบว่า ปริมาณเชื้อลดลงเหลือเพียง 2.0 log CFU/g แต่หากเปรียบเทียบการทดลองระหว่างการใช้แบคทีเรียโอซินหยาบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และการทดลองของชุดควบคุม จะเห็นว่า เมื่อทดสอบจนถึงนาทีที่ 120 การใช้แบคทีเรียโอซินหยาบที่ความเข้มข้น 2x, 4x, 6x, 8x, 10x, 12x, 14x และ 16xMIC สามารถลดปริมาณเชื้อลงเหลือเพียง 5.8, 5.6, 5.1, 4.7, 4.2, 3.9, 2.4 และ 2.0 log CFU/g ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 4.7



รูปที่ 4.7 ผลการออกฤทธิ์ของผงแบคทีเรียโอซินหยาบ ต่อปริมาณเชื้อ *S. suis* P1/7 ในลาบหมูดิบ โดยการเติมผงแบคทีเรียโอซินหยาบที่ความเข้มข้น 2x, 4x, 6x, 8x, 10x, 12x, 14x และ 16xMIC ที่เวลาเริ่มต้นของการทดลอง โดยที่ขีดจำกัดของการวิเคราะห์เท่ากับ 1 CFU/g

4.4.2 ผลการศึกษาการใช้ผงแบคทีเรียโอซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน

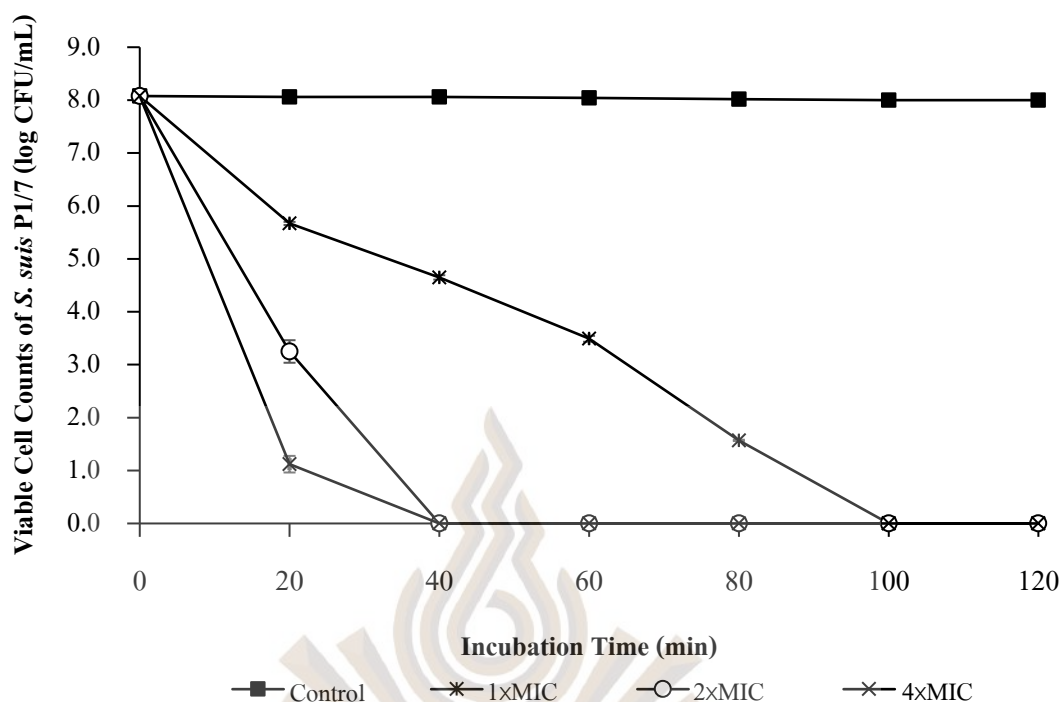
4.4.2.1 ผลการผลิตผงแบคทีเรียโอซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน

ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อของผงแบคทีเรียโอซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนโดยใช้เรซิน Amberlite-XAD 16 แล้วนำมาทำให้เป็นผงด้วยการแช่เยือกแข็ง พบว่าปริมาณความเข้มข้นของสารในระดับต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. suis* P1/7 ได้ มีค่าเท่ากับ 1.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่ากิจกรรมการยับยั้งจำเพาะ เท่ากับ 283.01 AU/mg

4.4.2.2 ผลการศึกษาการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อของผงแบคทีเรียโอซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนต่อเชื้อ *S. suis*

(1) ผลการศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *S. suis* ของผงแบคทีเรียโอซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนในหลอดทดลอง

ผลการศึกษาการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. suis* P1/7 ของผงแบคทีเรียโอซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน ที่ผลิตจากเชื้อ *L. plantarum* RB01-SO โดยการเติมผงชนิดนี้ลงไป ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว THY ที่มีเชื้อ *S. suis* P1/7 (ปริมาณเริ่มต้นเท่ากับ 8 log CFU/mL) จากผลการทดลองจนถึงนาที่ที่ 20 พบว่า การเติมผงแบคทีเรียโอซิน 283.01 AU/mL (1xMIC), 566.02 AU/mL (2xMIC) และ 1,132.04 AU/mL (4xMIC) สามารถลดปริมาณเชื้อลงเหลือ 5.7, 3.2 และ 1.1 log CFU/mL โดยผงแบคทีเรียโอซินที่ความเข้มข้น 2x และ 4xMIC สามารถลดปริมาณเชื้อได้จนต่ำกว่าขีดจำกัดของการวิเคราะห์ (1 CFU/mL) ที่เวลา 40 นาทีของการทดลอง ส่วนผงแบคทีเรียโอซินที่ความเข้มข้น 1xMIC สามารถลดปริมาณเชื้อได้จนต่ำกว่าขีดจำกัดของการวิเคราะห์ที่เวลา 100 นาทีของการทดลอง ในขณะที่ปริมาณเชื้อ *S. suis* P1/7 ของการทดลองของชุดควบคุมยังคงที่ แสดงดังรูปที่ 4.8

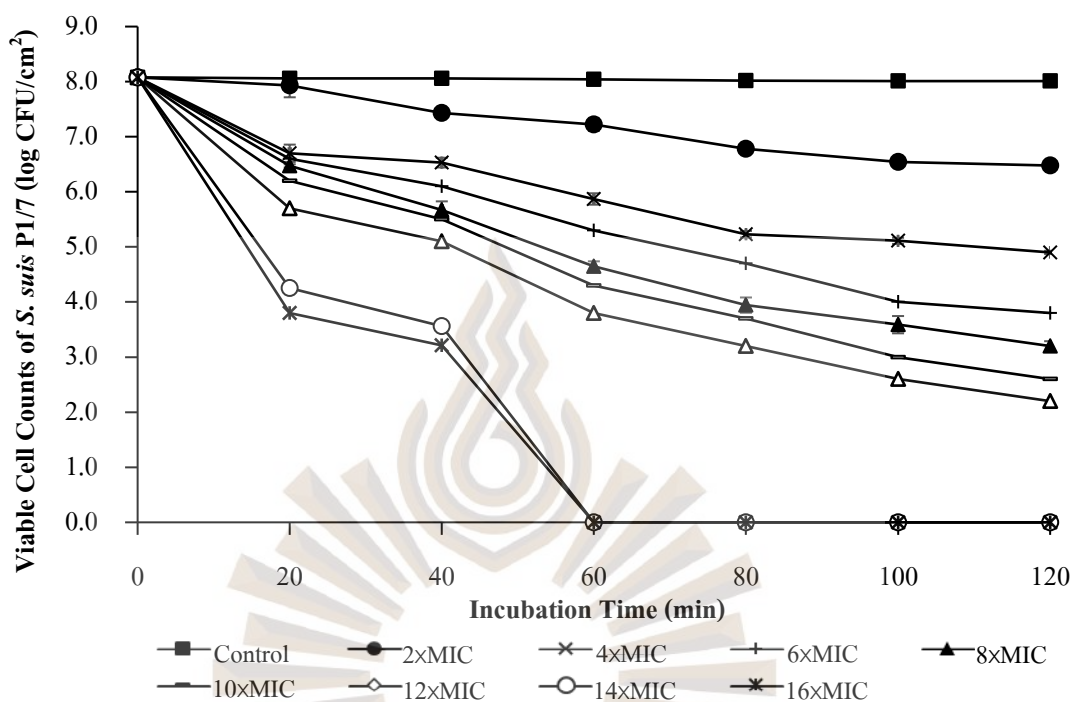


รูปที่ 4.8 ผลการออกฤทธิ์ของผงแบคทีเรียโอซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน ต่อปริมาณเชื้อ *S. suis* P1/7 ในหลอดทดลอง โดยเติมผงแบคทีเรียโอซินที่ความเข้มข้น 1x, 2x และ 4xMIC ที่เวลาเริ่มต้นของการทดลอง โดยที่ขีดจำกัดของการวิเคราะห์เท่ากับ 1 CFU/mL

(2) ผลการศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *S. suis* ของผงแบคทีเรียโอซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนในเนื้อหมูดิบ

ผลการศึกษาการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. suis* P1/7 ของผงแบคทีเรียโอซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนที่ผลิตจากเชื้อ *L. plantarum* RB01-SO โดยการเติมสารละลายผงแบคทีเรียโอซิน 566.02 AU/mL (2xMIC), 1,132.04 AU/mL (4xMIC), 1,698.06 AU/mL (6xMIC), 2,264.08 AU/mL (8xMIC), 2,830.10 AU/mL (10xMIC), 3,396.12 AU/mL (12xMIC), 3,962.14 AU/mL (14xMIC) และ 4,528.16 AU/mL (16xMIC) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ลงไปในเนื้อหมูดิบ ขนาดพื้นที่ 5 x 5 ตารางเซนติเมตร ที่มีเชื้อ *S. suis* P1/7 จากผลการทดลองพบว่าที่ เวลา 40 นาที ของการทดสอบสารละลายแบคทีเรียโอซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนความเข้มข้น 14x และ 16xMIC สามารถลดปริมาณเชื้อ *S. suis* P1/7 ลงเหลือ 3.6 และ 3.2 log CFU/cm² ตามลำดับ และสามารถลดปริมาณเชื้อลงจนต่ำกว่าขีดจำกัดของการวิเคราะห์ (1 CFU/cm²) ในนาทีที่ 60 ของการทดลอง จากปริมาณเชื้อ *S. suis* P1/7 เริ่มต้นเท่ากับ 8 log CFU/cm² ในขณะที่เมื่อทดลองจนถึงนาทีที่ 120 พบว่าความเข้มข้น 2x, 4x, 6x, 8x, 10x และ 12xMIC สามารถลดปริมาณเชื้อลงเหลือเพียง 6.5, 4.9, 3.8, 3.2,

2.6 และ 2.2 log CFU/cm² ตามลำดับ เมื่อเทียบกับการทดลองของชุดควบคุม (8 log CFU/cm²) แสดงดังรูปที่ 4.9

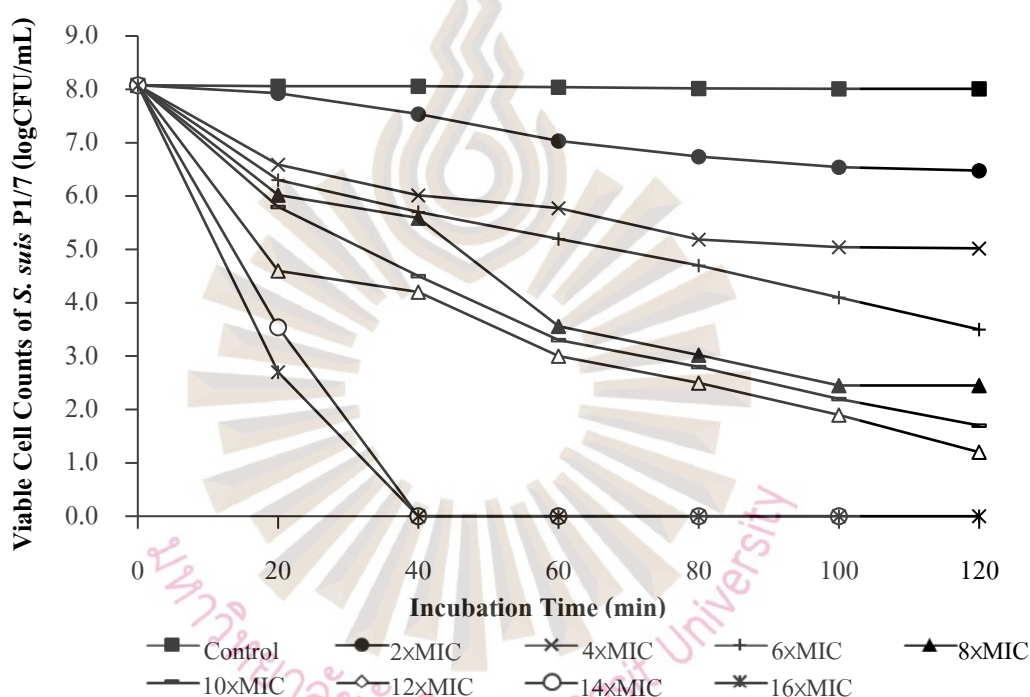


รูปที่ 4.9 ผลการออกฤทธิ์ของผงแบคทีเรียโอซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน ต่อปริมาณเชื้อ *S. suis* P1/7 ในเนื้อหมูดิบ โดยการเติมผงแบคทีเรียโอซินที่ความเข้มข้น 2x, 4x, 6x, 8x, 10x, 12x, 14x และ 16xMIC ที่เวลาเริ่มต้นของการทดลอง โดยที่ขีดจำกัดของการวิเคราะห์เท่ากับ 1 CFU/cm²

(3) ผลการศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *S. suis* ของผงแบคทีเรียโอซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนในเนื้อหมูดิบ

ผลการศึกษาการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. suis* P1/7 ของผงแบคทีเรียโอซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน ที่ผลิตจากเชื้อ *L. plantarum* RB01-SO โดยการเติมผงแบคทีเรียโอซิน 566.02 AU/mL (2xMIC), 1,132.04 AU/mL (4xMIC), 1,698.06 AU/mL (6xMIC), 2,264.08 AU/mL (8xMIC), 2,830.10 AU/mL (10xMIC), 3,396.12 AU/mL (12xMIC), 3,962.14 AU/mL (14xMIC) และ 4,528.16 AU/mL (16xMIC) ลงไปในเนื้อหมูดิบที่เติมเชื้อ *S. suis* P1/7 (ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8 log CFU/mL) จากผลการทดลอง พบว่า ผงแบคทีเรียโอซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนความเข้มข้น 16xMIC สามารถลดปริมาณเชื้อได้มากที่สุด โดยที่เวลา 20 นาที ของการทดลอง พบว่า

ผงแบคทีเรียโอซินสามารถลดปริมาณเชื้อ *S. suis* P1/7 ลงเหลือ 2.7 log CFU/mL ในขณะที่ผงแบคทีเรียโอซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนที่ความเข้มข้น 14x และ 16xMIC สามารถลดปริมาณเชื้อได้จนต่ำกว่าขีดจำกัดของการวิเคราะห์ (1 CFU/mL) ภายในระยะเวลา 40 นาที ของการทดลอง แต่หากทดสอบจนถึงนาทีที่ 120 พบว่า การเติมผงแบคทีเรียโอซินที่ความเข้มข้น 2x, 4x, 6x, 8x, 10x และ 12xMIC สามารถลดปริมาณเชื้อลงได้แต่ยังคงเหลืออยู่ เท่ากับ 6.5, 5.0, 3.5, 2.5, 1.7 และ 1.2 log CFU/mL ตามลำดับ ในขณะที่ปริมาณเชื้อ *S. suis* P1/7 ของการทดลองชุดควบคุมยังคงที่ แสดงดังรูปที่ 4.10

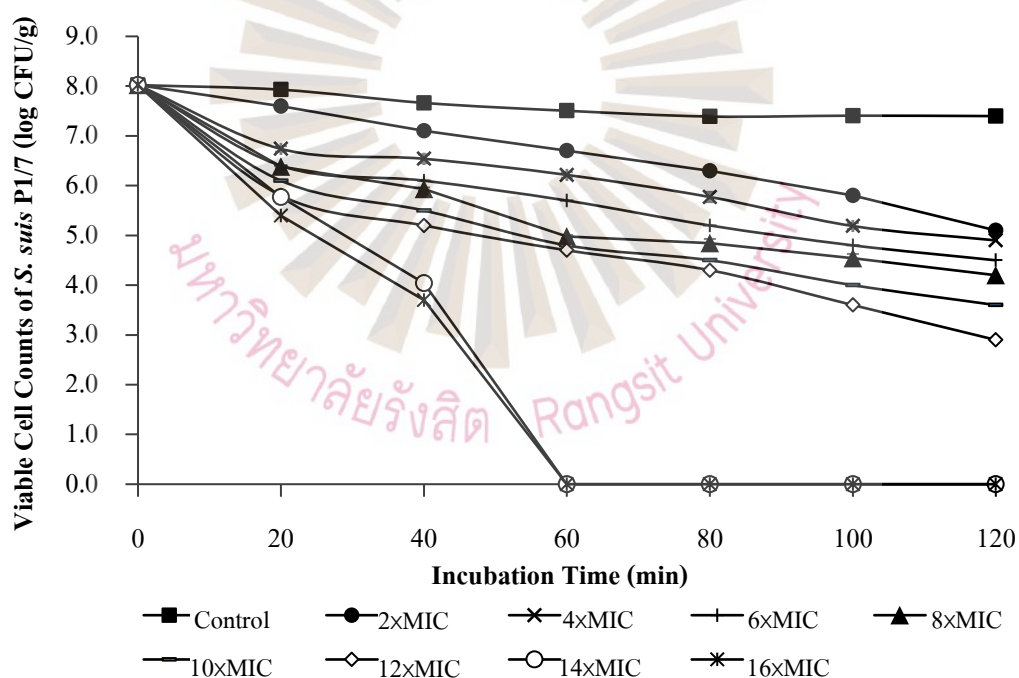


รูปที่ 4.10 ผลการออกฤทธิ์ของผงแบคทีเรียโอซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน ต่อปริมาณเชื้อ *S. suis* P1/7 ในเลือดหมูดิบ โดยการเติมผงแบคทีเรียโอซินความเข้มข้น 2x, 4x, 6x, 8x, 10x, 12x, 14x และ 16xMIC ที่เวลาเริ่มต้นของการทดลอง โดยที่ขีดจำกัดของการวิเคราะห์ เท่ากับ 1 CFU/mL

(4) ผลการศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *S. suis* ของผงแบคทีเรียโอซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนในลาบหมูดิบ

ผลการศึกษาการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. suis* P1/7 ของผงแบคทีเรียโอซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน ที่ผลิตจากเชื้อ *L. plantarum* RB01-SO โดยการเติมผงแบคทีเรียโอซิน

169,806 AU/ลาบหมูดิบ 300 กรัม (2xMIC), 339,612 AU/ลาบหมูดิบ 300 กรัม (4xMIC), 509,418 AU/ลาบหมูดิบ 300 กรัม (6xMIC), 679,224 AU/ลาบหมูดิบ 300 กรัม (8xMIC), 849,030 AU/ลาบหมูดิบ 300 กรัม (10xMIC), 1,018,836 AU/ลาบหมูดิบ 300 กรัม (12xMIC), 1,188,642 AU/ลาบหมูดิบ 300 กรัม (14xMIC) และ 1,358,448 AU/ลาบหมูดิบ 300 กรัม (16xMIC) ลงไปในลาบหมูดิบที่เติมเชื้อ *S. suis* P1/7 จากการทดลองพบว่า ในช่วงเวลาเริ่มต้นของการทดลองจนถึงการทดลองในนาที่ที่ 20 พบว่า ผงแบคทีเรียโอซินทั้ง 8 ความเข้มข้น สามารถลดปริมาณเชื้อ *S. suis* P1/7 ลงเหลือ 7.6, 6.7, 6.4, 6.4, 6.1, 5.8, 5.8 และ 5.4 log CFU/g ตามลำดับ จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น 8 log CFU/g และที่เวลา 60 นาที่ของการทดลองพบว่า ผงแบคทีเรียโอซินที่ความเข้มข้น 14x และ 16xMIC สามารถลดปริมาณเชื้อ *S. suis* P1/7 ได้ต่ำกว่าขีดจำกัดของการวิเคราะห์ (1 CFU/g) ในขณะที่เมื่อทดสอบจนถึงนาที่ที่ 120 พบว่าที่ความเข้มข้น 2x, 4x, 6x, 8x, 10x และ 12xMIC สามารถลดปริมาณเชื้อลงได้แต่ยังคงเหลืออยู่ที่ประมาณ 5.1, 4.9, 4.5, 4.2, 3.6 และ 2.9 log CFU/g ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองชุดควบคุม (8 log CFU/g) ดังแสดงในรูปที่ 4.11



รูปที่ 4.11 ผลการออกฤทธิ์ของผงแบคทีเรียโอซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน ต่อปริมาณเชื้อ *S. suis* P1/7 ในลาบหมูดิบ โดยการเติมผงแบคทีเรียโอซินความเข้มข้น 2x, 4x, 6x, 8x, 10x, 12x, 14x และ 16xMIC ที่เวลาเริ่มต้นของการทดลอง โดยที่ขีดจำกัดของการวิเคราะห์เท่ากับ 1 CFU/g

จากรายงานการสำรวจการปนเปื้อนของเชื้อ *S. suis* ในเนื้อหมูพบปริมาณเชื้อปนเปื้อนอยู่ระหว่าง 2.9-5.4 log CFU/g (Wongnak et al., 2020) และพบการปนเปื้อนของเชื้อ *S. suis* ในเลือดหมูอยู่ระหว่าง 2.3-6.83 CFU/mL (Khantasup et al., 2022) ทั้งนี้ปริมาณเชื้อ *S. suis* ที่ก่อโรคในมนุษย์ยังไม่มีรายงานอย่างแน่ชัด (เนื่องจากเทคนิคการตรวจนับเชื้อทางห้องปฏิบัติการ) จากรายงานของ Wongnak et al. (2020) ระบุว่าการบริโภคเนื้อหมูที่มีเชื้อ *S. suis* ปริมาณ 4.21 log CFU/g มีความน่าจะเป็นที่จะก่อให้เกิดโรคจากการติดเชื้อ *S. suis* ในแบบจำลองเบื้องต้นเพื่อประเมินความเสี่ยงของจุลินทรีย์เชิงปริมาณ (Quantitative Microbial Risk Assessment) ดังนั้นเพื่อลดความเสี่ยงในการติดเชื้อดังกล่าว การลดปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อ *S. suis* ในเนื้อหมูหรืออาหารที่ปรุงจากเนื้อหมูรวมถึงส่วนอื่น ๆ ของหมู ให้น้อยกว่า 4.21 log CFU/g อาจช่วยลดความเสี่ยงจากการติดเชื้อ *S. suis* ได้ นอกจากนี้ จากรายงานของ Khantasup et al. (2022) พบว่า เชื้อ *S. suis* ปริมาณ 0.002-6.83 CFU/mL ที่ปนเปื้อนในเนื้อหมู สามารถส่งผลให้เกิดการติดเชื้อ *S. suis* ในมนุษย์ได้ ในขณะที่ Wongnak et al. (2020) พบว่า เชื้อ *S. suis* ในเนื้อหมูที่ปรุงสุกที่สามารถรับประทานได้อย่างปลอดภัยและไม่ก่อให้เกิดโรค โดยมีปริมาณเชื้ออยู่ที่ ≤ 0 log CFU/mL หรือ ≤ 1 CFU/mL ดังนั้น จากผลการศึกษาในครั้งนี้อาจสรุปได้ว่า การเติมผงแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์บางส่วน ช่วยให้การบริโภคเนื้อหมู เลือดหมู และลาบหมูดิบ มีความปลอดภัยและลดความเสี่ยงในการติดเชื้อ *S. suis* ได้ เนื่องจากผงแบคทีเรียโอซินดังกล่าวสามารถลดปริมาณเชื้อ *S. suis* ได้ต่ำกว่าขีดจำกัดของการวิเคราะห์ที่ 1 CFU/mL ทั้งนี้จากรายงานการศึกษาพบ Pentocin LPL1-5 (Zhang et al., 2012), Nisin (LeBel et al., 2013), Suicin 90-1330 (LeBel et al., 2014), Bacteriocin WX153 (Srimark, & Khunajakr, 2015), Suicin 65 (Vaillancourt et al., 2015), Suicin 3908 (Vaillancourt et al., 2015) และ Pluranimalicin 2N12 (Vaillancourt et al., 2022) และสารสกัดจากธรรมชาติ เช่น สารสกัดจากพืชที่ใช้ในการเลี้ยงหนอนไหมมูก้า (Muga Silkworm) (Choudhury, Parbin, Pegu, Banik, & Das, 2023) เหลืยขเนืยว (*Forsythiae Fructus*) (Sheng, Li, Y., & Li, J., 2011) ซิงริงก้า (*Syringa oblata* Lindl) (Tang et al., 2021) น้ำมันหอมระเหยจากกานพลู (Wongsawan, Chaisri, Tangtrongsup, & Mektrirat, 2019) และรูปาร์บ (*Rheum rhababarum*) (Bai et al., 2019) เป็นต้น ที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. suis* ได้ อย่างไรก็ตามการทดลองครั้งนี้จัดเป็นการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *S. suis* ด้วยแบคทีเรียโอซินในอาหารเป็นครั้งแรก

บทที่ 5

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากอาหารจำพวกผักดองพื้นบ้านของไทยทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ ต้นหอมดอง ผักกาดดอง ผักเสี้ยนดอง ผักกุ่มดอง หน่อไม้ดอง และผักหนามดอง พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ทั้งหมด 120 โคลน แต่มีเพียง 4 ไอโซเลท ที่คัดแยกได้จาก ต้นหอมดองและผักเสี้ยนดอง สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้ ซึ่งตั้งชื่อไอโซเลทเหล่านี้ว่า RB01-SO, RB08-SO, RSU-SO2 และ RB01-SW แต่มีเพียงไอโซเลท RB01-SO ที่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Streptococcus suis* NaH, *S. suis* P1/7, *Escherichia coli* F18 และ *E. coli* O157:H7 ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญในมนุษย์ได้ และสามารถสรุปได้ว่าสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เชื้อ RB01-SO สร้างขึ้นเป็นแบคทีเรียโอซิน เนื่องจากถูกทำให้เสียสภาพและสูญเสียความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน เมื่อทำการจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกดังกล่าว พบว่าเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ *Lactiplantibacillus plantarum* โดย *Lactiplantibacillus plantarum* RB01-SO นี้สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินได้ดีที่สุด (ค่ากิจกรรมการยับยั้ง เท่ากับ 400 AU/mL) เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่เติม NaCl ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยมวลต่อปริมาตร และมีค่า pH เท่ากับ 7 โดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง

แบคทีเรียโอซินที่สร้างจากเชื้อ *L. plantarum* RB01-SO สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ โดยผ่านกระบวนการทำบริสุทธิ์ 3 ขั้นตอน ได้แก่ การตกตะกอนโปรตีนด้วย Ammonium Sulfate ที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 และ 75 โดยมวลต่อปริมาตร ต่อด้วยการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธี Cation-Exchange Chromatography โดยใช้เรซิน SP-Sepharose Fast Flow และการทำบริสุทธิ์ด้วย RP-HPLC จะได้แบคทีเรียโอซิน 2 ชนิด คือ RB01-SOA และ RB01-SOB เมื่อวิเคราะห์มวลโมเลกุลด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS พบว่าแบคทีเรียโอซินทั้งสองชนิดมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 3,222 และ 3,098 ดาลตัน ตามลำดับ ซึ่งมีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียโอซิน Plantaricin W α และ Plantaricin W β ที่มีการรายงานมาก่อนหน้านี้ เมื่อทำการศึกษาคูสมบัติบางประการของแบคทีเรียโอซิน พบว่า

แบคทีเรียโอซิน RB01-SOA และ RB01-SOB ถูกทำลายได้ด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน แต่ไม่ถูกยับยั้งด้วย Lipase และ Amylase มีความคงตัวต่อสารเคมีในสารกลุ่มตัวทำละลายอินทรีย์และสารลดแรงตึงผิว สามารถคงตัวได้ในสภาวะที่มีค่า pH และอุณหภูมิในช่วงกว้าง นอกจากนี้แบคทีเรียโอซินทั้งสองชนิดยังออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ รวมถึงออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *S. suis* P1/7 โดยไม่ทำให้เซลล์แตกและแบคทีเรียทั้งสองชนิดยังออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. suis* P1/7 แบบเสริมฤทธิ์กันอีกด้วย

เมื่อทำการศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. suis* P1/7 โดยการใช้ผงแบคทีเรียโอซินหยาบ (CFS ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* RB01-SO) และผงแบคทีเรียโอซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน (ทำบริสุทธิ์โดยใช้เรซิน Amberlite XAD-16) แล้วทำแห้งด้วยการ Freeze-Drying จากผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อในหลอดทดลอง พบว่า ผงแบคทีเรียโอซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *S. suis* P1/7 ได้ดีกว่าผงแบคทีเรียโอซินหยาบ เนื่องจากใช้ความเข้มข้นและเวลาที่น้อยกว่าในการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจนต่ำกว่าขีดจำกัดของการวิเคราะห์ นอกจากนี้การเติมผงแบคทีเรียโอซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนความเข้มข้น 14xMIC ยังสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. suis* P1/7 ในเลือดหมูดิบ ในเนื้อหมูดิบ และในลาบหมูดิบ ได้จนต่ำกว่าขีดจำกัดของการวิเคราะห์ ที่เวลา 40, 60 และ 60 นาที ตามลำดับ ดังนั้นแบคทีเรียโอซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนที่สร้างจากเชื้อ *L. plantarum* RB01-SO มีความเป็นไปได้ในการนำไปใช้ในรูปแบบผงแบคทีเรียโอซินเพื่อเพิ่มความปลอดภัยในอาหารที่อาจมีการปนเปื้อนของเชื้อ *S. suis* P1/7 รวมถึงการนำไปใช้ในรูปแบบของสารกันเสียตามธรรมชาติในอุตสาหกรรมอาหาร และอาหารสัตว์ต่อไป

5.2 ข้อเสนอแนะ

หากต้องการผลิตแบคทีเรียโอซินเพื่อนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมอาหาร พบว่าอาจต้องพิจารณาหาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียโอซินเพิ่มเติม เนื่องจากต้องใช้ต้นทุนสูงหากใช้อาหาร MRS ในการเลี้ยงเชื้อในระดับอุตสาหกรรม รวมถึงการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหาร MRS จะส่งผลทำให้ผงแบคทีเรียโอซินหยาบและผงแบคทีเรียโอซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนที่ได้มีสีเข้ม อันเป็นลักษณะที่ไม่พึงประสงค์เมื่อนำไปใช้ในอาหาร นอกจากนี้อาจต้องมีการทดลองหาวิธีการและขั้นตอนในการทำบริสุทธิ์แบคทีเรียโอซินเพิ่มเติม เพื่อลดต้นทุนการผลิตและอัตราการสูญเสียแบคทีเรียโอซินที่อาจเกิดขึ้นระหว่างกระบวนการทำบริสุทธิ์ รวมถึงเพิ่มการศึกษาเชิงลึก

เกี่ยวกับแบคทีเรียโอชิน เช่น การศึกษาลำดับกรดอะมิโน การศึกษาหาชนิดยาปฏิชีวนะ และการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ทั้งของมนุษย์และสัตว์ เป็นต้น เพื่อเป็นการยืนยันว่าสามารถนำแบคทีเรียโอชินนี้ไปใช้งานได้อย่างปลอดภัยในอนาคต

จากการศึกษาการนำผงแบคทีเรียโอชินเพื่อนำไปใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. suis* ในลาบหมูดิบ พบว่าอาจต้องพิจารณาการใช้แบคทีเรียโอชินบริสุทธิ์ หรือการใช้แบคทีเรียโอชินร่วมกับสารสกัดอื่น ๆ เช่น สารสกัดจากสมุนไพร เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ *S. suis* ในลาบหมูดิบ อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าการเติมผงแบคทีเรียโอชินลงในลาบหมูดิบจะสามารถลดปริมาณเชื้อ *S. suis* ได้ แต่ก็ยังเป็นเพียงการแก้ปัญหาโอกาสการเกิดโรคติดเชื้อสเตฟโตค็อกคัส ซูอิส ที่ปลายเหตุเท่านั้น ดังนั้นผู้บริโภคว่าควรตระหนักและคำนึงถึงความเสี่ยง รวมทั้งอันตรายที่อาจเกิดขึ้นจากการบริโภคเนื้อและเลือดหมูดิบ



บรรณานุกรม

- จิราภรณ์ หลาบคำ, อมาวสี พิทักษ์, และฤทธิไกร แสนยานต์. (2561). การสุกัภิบาลสถานที่
จำหน่ายเนื้อสัตว์ในพื้นที่เทศบาลนครอุบลราชธานี อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี.
วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, 20(3), 40-49.
- นิมิตร เลิศพัฒนสุวรรณ. (2555). การติดเชื้อ สเตรปโตคอกคัส ซูอิส ในกระแสเลือดและภาวะเชื้อหุ้ม
สมองอักเสบ: รายงานผู้ป่วย. วารสารการแพทย์โรงพยาบาลศรีสะเกษ สุรินทร์ บุรีรัมย์,
27(2), 129-136.
- รัตนา พรหมพิชัย. (2542). หลู้. ใน สารานุกรมวัฒนธรรมไทย ภาคเหนือ (เล่ม 14, น. 7482).
กรุงเทพฯ: มูลนิธิ สารานุกรมวัฒนธรรมไทย ธนาคารไทยพาณิชย์.
- ศรีสุดา กวาศกุล. (2563). การยับยั้ง *Listeria monocytogenes* โดยสารคัดล่ายแบคทีเรียโอซินที่ผลิต
โดย *Leuconostoc lactis* BAN1.1. *Thai Science and Technology Journal*, 28, 2273-2292.
- Abanoz, H. S., & Kunduhoglu, B. (2018). Antimicrobial activity of a bacteriocin produced by
Enterococcus faecalis KT11 against some pathogens and antibiotic-resistant bacteria.
Korean Journal for Food Science of Animal Resources, 38, 1064-1079.
doi:10.5851/kosfa.2018.e40
- Abbas, M. E., Luo, W., Zhu, L., Zou, J., & Tang, H. (2010). Fluorometric determination of
hydrogen peroxide in milk by using a Fenton reaction system. *Food Chemistry*, 120(1),
327-331. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.10.024>
- Abbasiliasi, S., Tan, J. S., Ibrahim, T. A. T., Bashokouh, F., Ramakrishnan, N. R., Mustafa, S., &
Ariff, A. B. (2017). Fermentation factors influencing the production of bacteriocins by
lactic acid bacteria: a review. *Rsc Advances*, 7(47), 29395-29420.
doi:10.1039/C6RA24579J
- Abo-Amer, A. E. (2011). Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus acidophilus*
AA11, a strain isolated from Egyptian cheese. *Annals of Microbiology*, 61(3), 445-452.
<https://doi.org/10.1007/s13213-010-0157-6>
- Acikara, Ö. B. (2013). Ion-exchange chromatography and its applications. In *Column*
chromatography (pp. 32-58). doi:10.5772/55744

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Agriopoulou, S., Stamatelopoulou, E., Sachadyn-Król, M., & Varzakas, T. (2020). Lactic acid bacteria as antibacterial agents to extend the shelf life of fresh and minimally processed fruits and vegetables: Quality and safety aspects. *Microorganisms*, 8(6), 1-24.
doi:10.3390/microorganisms8060952
- Alakomi, H. L., Skytta, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kala, K., & Helander, I. M. (2000). Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), 2001-2005.
<https://doi.org/10.1128/AEM.66.5.2001-2005.2000>
- Alvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Mu, D., & Kuipers, O. P. (2016). Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(7), 2939-2951. doi:10.1007/s00253-016-7343-9
- Ammor, M. S., & Mayo, B. (2007). Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. *Meat Science*, 76(1), 138-146. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.10.022>
- Anacarso, I., Messi, P., Condò, C., Iseppi, R., Bondi, M., Sabia, C., & de Niederhäusern, S. (2014). A bacteriocin-like substance produced from *Lactobacillus pentosus* 39 is a natural antagonist for the control of *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* in fresh salmon fillets. *LWT-Food Science and Technology*, 55(2), 604-611.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.10.012>
- Anderssen, E. L., Diep, D. B., Nes, I. F., Eijsink, V. G., & Nissen-Meyer, J. (1998). Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: two new two-peptide bacteriocins, plantaricins EF and JK, and the induction factor plantaricin A. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(6), 2269-2272.
- Arakawa, T., & Narhi, L. O. (1991). Solvent modulation in hydrophobic interaction chromatography. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 13(2), 151-172.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Arnison, P. G., Bibb, M. J., Bierbaum, G., Bowers, A. A., Bugni, T. S., Bulaj, G., . . . Van Der Donk, W. A. (2013). Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature. *Natural Product Reports*, 30(1), 108-160. doi:10.1039/C2NP20085F
- Atrih, A., Rekhif, N., Moir, A. J. G., Lebrihi, A., & Lefebvre, G. (2001). Mode of action, purification and amino acid sequence of plantaricin C19, an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* C19. *International Journal of Food Microbiology*, 68(1-2), 93-104. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00482-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00482-2)
- Bai, J. W., Chen, X. R., Tang, Y., Cui, W. Q., Li, D. L., Godspower, B. O., & Yang, Y. (2019). Study on microwave assisted extraction of chrysophanol and its intervention in biofilm formation of *Streptococcus suis*. *RSC advances*, 9(50), 28996-29004. doi:10.1039/c9ra04662c
- Balciunas, E. M., Martinez, F. A. C., Todorov, S. D., de Melo Franco, B. D. G., Converti, A., & de Souza Oliveira, R. P. (2013). Novel biotechnological applications of bacteriocins: a review. *Food Control*, 32(1), 134-142. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.025>
- Bangar, S. P., Suri, S., Trif, M., & Ozogul, F. (2022). Organic acids production from lactic acid bacteria: A preservation approach. *Food Bioscience*, 46, 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101615>
- Bantscheff, M., Schirle, M., Sweetman, G., Rick, J., & Kuster, B. (2007). Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389(4), 1017-1031. doi:10.1007/s00216-007-1486-6
- Barreteau, H., Bouhss, A., Fourgeaud, M., Mainardi, J. L., Touzé, T., Gérard, F., . . . Mengin-Lecreulx, D. (2009). Human-and plant-pathogenic *Pseudomonas* species produce bacteriocins exhibiting colicin M-like hydrolase activity towards peptidoglycan precursors. *Journal of Bacteriology*, 191(11), 3657-3664. <https://doi.org/10.1128/JB.01824-08>

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Bautista-Gallego, J., Arroyo-López, F., Rantsiou, K., Jiménez-Díaz, R., Garrido-Fernández, A., & Cocolin, L. (2013). Screening of lactic acid bacteria isolated from fermented table olives with probiotic potential. *Food Research International*, 50(1), 135-142.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.10.004>
- Becker, C. H., & Bern, M. (2011). Recent developments in quantitative proteomics. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 722(2), 171-182.
[doi:10.1016/j.mrgentox.2010.06.016](https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2010.06.016)
- Beveridge, T. (2000). Large-scale centrifugation. In I. D. Wilson, E. R. Adlard, M. Cooke, & C. F. Poole (Eds.), *Encyclopedia of Separation Science* (pp. 320-342). United States: Academic Press.
- Bierbaum, G., & Sahl, H. G. (2009). Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and ioengineering. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 10(1), 2-18. <https://doi.org/10.2174/138920109787048616>
- Biscola, V., Todorov, S. D., Capuano, V. S. C., Abriouel, H., Gálvez, A., & Franco, B. D. G. D. M. (2013). Isolation and characterization of a nisin-like bacteriocin produced by a *Lactococcus lactis* strain isolated from charqui, a Brazilian fermented, salted and dried meat product. *Meat Science*, 93(3), 607-613. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.11.021>
- Borzenkov, V., Surovtsev, V., & Dyatlov, I. (2014). Obtaining bacteriocins by chromatographic methods. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 5(5), 446-451.
[doi:10.4236/abb.2014.55054](https://doi.org/10.4236/abb.2014.55054)
- Breukink, E., & de Kruijff, B. (2006). Lipid II as a target for antibiotics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5(4), 321-323. <https://doi.org/10.2217/17460913.2.5.513>
- Brizuela, J., Kajeekul, R., Roodsant, T. J., Riwoad, A., Boueroy, P., Pattanapongpaibool, A., . . . Kerdsin, A. (2023). *Streptococcus suis* outbreak caused by an emerging zoonotic strain with acquired multi-drug resistance in Thailand. *Microbial Genomics*, 9(2), 1-14.
[doi:10.1099/mgen.0.000952](https://doi.org/10.1099/mgen.0.000952)

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Broadbent, J. R., Oberg, T. S., Hughes, J. E., Ward, R. E., Brighton, C., Welker, D. L., & Steele, J. L. (2014). Influence of polysorbate 80 and cyclopropane fatty acid synthase activity on lactic acid production by *Lactobacillus casei* ATCC 334 at low pH. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41(3), 545-553. doi:0.1007/s10295-013-1391-2
- Byczkowski, J. Z., & Gessner, T. (1988). Biological role of superoxide ion-radical. *International Journal of Biochemistry*, 20(6), 569-580. [https://doi.org/10.1016/0020-711X\(88\)90095-X](https://doi.org/10.1016/0020-711X(88)90095-X)
- Castro, M. P., Palavecino, N. Z., Herman, C., Garro, O. A., & Campos, C. A. (2011). Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages: characterization of antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin production. *Meat Science*, 87(4), 321-329. doi:10.1016/j.meatsci.2010.11.006
- Cavera, V. L., Arthur, T. D., Kashtanov, D., & Chikindas, M. L. (2015). Bacteriocins and their position in the next wave of conventional antibiotics. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 46(5), 494-501. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.07.011>
- Cebrián, R., Martínez-Bueno, M., Valdivia, E., Albert, A., Maqueda, M., & Sánchez-Barrena, M. J. (2015). The bacteriocin AS-48 requires dimer dissociation followed by hydrophobic interactions with the membrane for antibacterial activity. *Journal of Structural Biology*, 190(2), 162-172. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2015.03.006>
- Cheigh, C. I., Choi, H. J., Park, H., Kim, S. B., Kook, M. C., Kim, T. S., . . . Pyun, Y. R. (2002). Influence of growth conditions on the production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from kimchi. *Journal of Biotechnology*, 95(3), 225-235. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(02\)00010-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(02)00010-X)
- Cheung, P. Y., Lo, K. L., Cheung, T. T., Yeung, W. H., Leung, P. H., & Kam, K. M. (2008). *Streptococcus suis* in retail markets: How prevalent is it in raw pork. *International Journal of Food Microbiology*, 127(3), 316-320. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.08.006

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Choi, G. H., Holzapfel, W. H., & Todorov, S. D. (2022). Diversity of the bacteriocins, their classification and potential applications in combat of antibiotic resistant and clinically relevant pathogens. *Critical Reviews in Microbiology*, 48, 1-20.
doi:org/10.1080/1040841X.2022.2090227
- Choi, S. M., Cho, B. H., Choi, K. H., Nam, T. S., Kim, J. T., Park, M. S., . . . Cho, K. H. (2012). Meningitis caused by *Streptococcus suis*: case report and review of the literature. *Journal of Clinical Neurology*, 8(1), 79-82. <https://doi.org/10.1007/BF01645260>
- Choudhury, M., Parbin, S., Pegu, S., Banik, S., & Das, P. J. (2023). Comparative analysis of natural bioactive metabolites of the indigenous host plants of Muga Silkworm for antioxidant and antibacterial properties against swine diseases. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 85(1), 64-75.
- Cobo Molinos, A., Abriouel, H., Locas Lopez, R., Ben omar, N., Valdivia, E., & Galvez, a. (2009). Enhanced bactericidal activity of enterocin AS-48 in combination with essential oil, natural bioactive compounds and chemical preservatives against *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat salad. *Food and Chemical Toxicology*, 47(9), 2216-2223.
doi:10.1016/j.fct.2009.06.012
- Cotter, P. D., Ross, R. P., & Hill, C. (2013). Bacteriocins-a viable alternative to antibiotics. *Nature Reviews Microbiology*, 11(2), 95-105. doi:10.1038/nrmicro2937
- Crupper, S. S., Gies, A. J. & Iandolo, J. J. (1997). Purification and characterization of staphylococcin BacR1, a broad-spectrum bacteriocin. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(11), 4185-4190. <https://doi.org/10.1128/aem.63.11.4185-4190.1997>
- Cruz, V. L., Ramos, J., Melo, M. N., & Martinez-Salazar, J. (2013). Bacteriocin AS-48 binding to model membranes and pore formation as revealed by coarse-grained simulations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1828(11), 2524-2531.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.05.036>

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Cummins, P. M., Dowling, O., & O'Connor, B. F. (2011). Ion-exchange chromatography: basic principles and application to the partial purification of soluble mammalian prolyl oligopeptidase. In D. Walls & S. T. Loughran (Eds.), *Protein Chromatography: Methods and Protocols* (pp. 215-228). Totowa, New Jersey: Humana Press.
- da Silva Ferrari, I., de Souza, J. V., Ramos, C. L., da Costa, M. M., Schwan, R. F., & Dias, F. S. (2016). Selection of autochthonous lactic acid bacteria from goat dairies and their addition to evaluate the inhibition of *Salmonella typhi* in artisanal cheese. *Food Microbiology*, 60, 29-38. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2016.06.014>
- Das, D., & Goyal, A. (2014). Characterization of a noncytotoxic bacteriocin from probiotic *Lactobacillus plantarum* DM5 with potential as a food preservative. *Food and Function*, 5(10), 2453-2462. doi:10.1039/c4fo00481g
- Dey, B. C., Rai, N., Das, S., Mandal, S., & Mandal, V. (2019). Partial purification, characterization and mode of action of bacteriocins produced by three strains of *Pediococcus* sp. *Journal of Food Science and Technology*, 56(5), 2594-2604. doi:10.1007/s13197-019-03744-3
- Deegan, L. H., Cotter, P.D., Hill, C., & Ross, P. (2004). Bacteriocin: biological tools for biopreservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal*, 16(9), 1058-1071. doi:10.1016/j.idairyj.2005.10.026
- Delgado, A., Brito, D., Fevereiro, P., Tenreiro, R., & Peres, C. (2005). Bioactivity quantification of crude bacteriocin solutions. *Journal of Microbiological Methods*, 62(1), 121-124. doi:10.1016/j.mimet.2005.01.006
- Delgado, A., Brito, D., Peres, C., Noe-Arroyo, F., & Garrido-Fernández, A. (2005). Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* B96 can be expressed as a function of temperature and NaCl concentration. *Food Microbiology*, 22(6), 521-528. doi:10.1016/j.fm.2004.11.015

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Delgado, A., López, F. N. A., Brito, D., Peres, C., Fevereiro, P., & Garrido-Fernández, A. (2007). Optimum bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* 17.2b requires absence of NaCl and apparently follows a mixed metabolite kinetics. *Journal of Biotechnology*, 130(2), 193-201. doi:10.1016/j.jbiotec.2007.01.041
- Deraz, S. F., Karlsson, E. N., Hedström, M., Andersson, M. M., & Mattiasson, B. (2005). Purification and characterisation of acidocin D20079, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079. *Journal of Biotechnology*, 117(4), 343-354. doi:10.1016/j.jbiotec.2005.02.005
- Destoumieux-Garzón, D., Peduzzi, J., Thomas, X., Djediat, C., & Rebuffat, S. (2006). Parasitism of iron-siderophore receptors of *Escherichia coli* by the siderophore-peptide microcin E492m and its unmodified counterpart. *BioMetals*, 19, 181-191. <https://doi.org/10.1007/s10534-005-4452-9>
- Di Cagno, R., Coda, R., De Angelis, M., & Gobbetti, M. (2013). Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiology*, 33(1), 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.09.003>
- Diep, D. B., Skaugen, M., Salehian, Z., Holo, H., & Nes, I. F. (2007). Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(7), 2384-2389. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608775104>
- Dike, K. S., & Sanni, A. I. (2010). Influence of starter culture of lactic acid bacteria on the shelf life of agidi, an indigenous fermented cereal product. *African Journal of Biotechnology*, 9(46), 7922-7927. doi:10.5897/AJB09.1203
- Djadouni, F., & Kihal, M. (2012). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria and the spectrum of their biopeptides against spoiling germs in foods. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 55(3), 435-444. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132012000300015>
- Dortu, C., Huch, M., Holzapfel, W. H., Franz, C. M. A. P., & Thonart, P. (2008). Anti-listerial activity of bacteriocin-producing *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 and *Lactobacillus sakei* CWBI-B1365 on raw beef and poultry meat. *Letters in Applied Microbiology*, 47(6), 581-586. doi:10.1111/j.1472-765X.2008.02468.x

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Draper, L. A., Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P. (2013). The two peptide lantibiotic lactacin 3147 acts synergistically with polymyxin to inhibit Gram negative bacteria. *BMC Microbiology*, 13(1), 1-8. doi:10.1186/1471-2180-13-212
- Duong-Ly, K. C., & Gabelli, S. B. (2014). Salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation. In *Methods in enzymology* (pp. 85-94). United States: Academic Press.
- Elyass, M. E., Shigidi, M. T., Attitalla, I. H., & Mahdi, A. A. (2017). Characterization and optimization of bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* isolated from fermented beef (shermout). *Open Journal of Applied Sciences*, 7(03), 83-97.
https://doi.org/10.4236/ojapps.2017.73008
- Ennahar, S., Asou, Y., Zendo, T., Sonomoto, K., & Ishizaki, A. (2001). Biochemical and genetic evidence for production of enterocins A and B by *Enterococcus faecium* WHE 81. *International Journal of Food Microbiology*, 70(3), 291-301.
https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00565-7
- Faye, T., Brede, D. A., Langsrud, T., Nes, I. F., & Holo, H. (2002). An antimicrobial peptide is produced by extracellular processing of a protein from *Propionibacterium jensenii*. *Journal of Bacteriology*, 184(13), 3649-3656. https://doi.org/10.1128/JB.184.13.3649-3656.2002
- Fekete, S., Beck, A., Veuthey, J., & Guilleme, D. (2015). Ion-exchange chromatography for the characterization of biopharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 113, 43-55. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.02.037
- Fimland, N., Rogne, P., Fimland, G., Nissen-Meyer, J., & Kristiansen, P. E. (2008). Three-dimensional structure of the two peptides that constitute the two-peptide bacteriocin plantaricin EF. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1784(11), 1711-1719. doi:10.1016/j.bbapap.2008.05.003
- Franz, C. M., Van Belkum, M. J., Holzapfel, W. H., Abriouel, H., & Gálvez, A. (2007). Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(3), 293-310. doi:10.1111/j.1574-6976.2007.00064.x

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Gao, Y., Jia, S., Gao, Q., & Tan, Z. (2010). A novel bacteriocin with a broad inhibitory spectrum produced by *Lactobacillus sake* C2, isolated from traditional Chinese fermented cabbage. *Food Control*, 21(1), 76-81. doi:10.1016/j.foodcont.2009.04.003
- Garsa, A. K., Kumariya, R., Sood, S. K., Kumar, A., & Kapila, S. (2014). Bacteriocin production and different strategies for their recovery and purification. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 6, 47-58. doi:10.1007/s12602-013-9153-z
- Gautam, N., & Sharma, N. (2009). Bacteriocin: safest approach to preserve food products. *Indian Journal of Microbiology*, 49(3), 204-211. doi:10.1007/s12088-009-0048-3
- Godawat, R., Brower, K., Jain, S., Konstantinov, K., Riske, F., & Warikoo, V. (2012). Periodic counter-current chromatography-design and operational considerations for integrated and continuous purification of proteins. *Biotechnology Journal*, 7(12), 1496-1508. doi:10.1002/biot.201200068
- Gong, H. S., Meng, X. C., & Wang, H. (2010). Plantaricin MG active against Gram-negative bacteria produced by *Lactobacillus plantarum* KLDS1. 0391 isolated from “Jiaoke”, a traditional fermented cream from China. *Food control*, 21(1), 89-96. doi:10.1016/j.foodcont.2009.04.005
- Gottschalk, M., Xu, J., Calzas, C., & Segura, M. (2010). *Streptococcus suis*: a new emerging or an old neglected zoonotic pathogen. *Future Microbiology*, 5(3), 371-391. <https://doi.org/10.2217/fmb.10.2>
- Gratia, A. (1925). Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de coillbacille. *CR Seances Soc. Biol. Fil.*, 93, 1040-1041.
- Guimaraes, A., Abrunhosa, L., Pastrana, L. M., & Cerqueira, M. A. (2018). Edible films and coatings as carriers of living microorganisms: A new strategy towards biopreservation and healthier foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(3), 594-614. doi:10.1111/1541-4337.12345
- Gupta, C., Prakash, D., & Gupta, S. (2015). A biotechnological approach to microbial based perfumes and flavours. *Journal of Microbiology and Experimentation*, 2(1), 1-8. doi:10.15406/jmen.2015.01.00034

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Haas, B., & Grenier, D. (2018). Understanding the virulence of *Streptococcus suis*: a veterinary, medical, and economic challenge. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 48(3), 159-166. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2017.10.001>
- Han, B., Yu, Z., Liu, B., Ma, Q., & Zhang, R. (2011). Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* YJG, isolated from the mucosa of the gut of healthy chickens. *African Journal of Microbiology Research*, 5(10), 1147-1155. doi:10.5897/AJMR10.643
- Han, J., Zhang, J., Lin, X., Liang, H., Li, S., Yu, C., . . . Ji, C. (2020). Effect of autochthonous lactic acid bacteria on fermented Yucha quality. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 123, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109060>
- Hashimoto, K., Bari, M. L., Inatsu, Y., Kawamoto, S., & Shima, J. (2011). Biopreservation of Kamaboko (Streamed Surimi) using piscicolin KH1 produced by *Carnobacterium maltalomaticum* KH1. *Japanese Journal of Food Microbiology*, 28(3), 193-200. <https://doi.org/10.5803/jsfm.28.193>
- Hata, T., Tanaka, R., & Ohmomo, S. (2010). Isolation and characterization of plantaricin ASM1: a new bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* A-1. *International Journal of Food Microbiology*, 137(1), 94-99. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.10.021>
- Hauser, C., Thielmann, J., & Muranyi, P. (2016). Organic acids: Usage and potential in antimicrobial packaging. In J. Barros-Velázquez (Ed.), *Antimicrobial food packaging* (pp. 563-580). United States: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800723-5.00046-2>
- Hegemann, J. D., Zimmermann, M., Xie, X., & Marahiel, M. A. (2015). Lasso peptides: an intriguing class of bacterial natural products. *Accounts of Chemical Research*, 48(7), 1909-1919. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.5b00156>
- Herigstad, B., Hamilton, M., & Heersink, J. (2001). How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 44(2), 121-129. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00241-4](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00241-4)

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Herranz, C., Martinez, J., Rodriguez, J., Hernandez, P., & Cintas, L. (2001). Optimization of enterocin P production by batch fermentation of *Enterococcus faecium* P13 at constant pH. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56, 378-383.
<https://doi.org/10.1007/s002530100656>
- Holo, H., Jeknic, Z., Daeschel, M., Stevanovic, S., & Nes, I. F. (2001). Plantaricin W from *Lactobacillus plantarum* belongs to a new family of two-peptide lantibiotics. *Microbiology*, 147(3), 643-651.
- Huang, Y., Luo, Y., Zhai, Z., Zhang, H., Yang, C., Tian, H., . . . Hao, Y. (2009). Characterization and application of an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* 05-10 isolated from Sichuan Pickle, a traditionally fermented vegetable product from China. *Food Control*, 20(11), 1030-1035. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.12.008>
- Hwanhlem, N., Chobert, J. M., & Aran, H. (2014). Bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from mangrove forests in southern Thailand as potential bio-control agents in food: Isolation, screening and optimization. *Food Control*, 41, 202-211.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.01.021>
- Imlay, J. A. (2019). Where in the world do bacteria experience oxidative stress. *Environmental Microbiology*, 21(2), 521-530. doi:10.1111/1462-2920.14445
- Ito, A., Sato, Y., Kudo, S., Sato, S., Nakajima, H., & Toba, T. (2003). The screening of hydrogen peroxide-producing lactic acid bacteria and their application to inactivating psychrotrophic food-borne pathogens. *Current Microbiology*, 47, 0231-0236.
doi:10.1007/s00284-002-3993-1
- Iwatani, S., Zendo, T., Yoneyama, F., Nakayama, J., & Sonomoto, K. (2007). Characterization and structure analysis of a novel bacteriocin, lacticin Z, produced by *Lactococcus lactis* QU 14. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71(8), 1984-1992.
<https://doi.org/10.1271/bbb.70169>

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Iyapparaj, P., Maruthiah, T., Ramasubburayan, R., Prakash, S., Kumar, C., Immanuel, G., & Palavesam, A. (2013). Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus* sp. MSU3IR against shrimp bacterial pathogens. *Aquatic Biosystems*, 9(1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/2046-9063-9-12>
- Jamaluddin, N., Stuckey, D. C., Ariff, A. B., & Faizal Wong, F. W. (2018). Novel approaches to purifying bacteriocin a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(14), 2453-2465. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1328658>
- Jandera, P. (2011). Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review. *Analytica Chimica Acta*, 692(1-2), 1-25. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.02.047>
- Jie, L. X., Liu, H., Zhang, H. X., & Xie, Y. H. (2016). Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* LF1. In *Medicine and Biopharmaceutical: Proceedings of the 2015 International Conference* (pp. 1218-1225). https://doi.org/10.1142/9789814719810_0156
- Jiménez-Díaz, R., Rios-Sanchez, R., Desmazeaud, M., Ruiz-Barba, J. L., & Piard, J. C. (1993). Plantaricins S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 isolated from a green olive fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(5), 1416-1424. <https://doi.org/10.1128/aem.59.5.1416-1424.1993>
- Jiménez-Díaz, R., Ruiz-Barba, J. L., Cathcart, D. P., Holo, H., Nes, I. F., Sletten, K. H., & Warner, P. J. (1995). Purification and partial amino acid sequence of plantaricin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10, the activity of which depends on the complementary action of two peptides. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(12), 4459-4463.
- Kabuki, T., Uenishi, H., Watanabe, M., Seto, Y., & Nakajima, H. (2007). Characterization of a bacteriocin, Thermophilin 1277, produced by *Streptococcus thermophilus* SBT1277. *Journal of Applied Microbiology*, 102(4), 971-980. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03159.x>

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Kaškonienė, V., Stankevičius, M., Bimbraitė-Survilienė, K., Naujokaitytė, G., Šernienė, L., Mulkytė, K., Malakauskas, M., & Maruška, A. (2017). Current state of purification, isolation and analysis of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(4), 1323-1335. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8088-9>
- Kataoka, Y., Sugimoto, C., Nakazawa, M., & Kashiwazaki, M. (1991). Detection of *Streptococcus suis* type 2 in tonsils of slaughtered pigs using improved selective and differential media. *Veterinary Microbiology*, 28(4), 335-342. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(91\)90068-Q](https://doi.org/10.1016/0378-1135(91)90068-Q)
- Kawai, Y., Saito, T., Toba, T., Samant, S. K., & Itoh, T. (1994). Isolation and characterization of a highly hydrophobic new bacteriocin (gassericin A) from *Lactobacillus gasseri* LA39. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 58(7), 1218-1221. [doi:10.1271/bbb.58.1218](https://doi.org/10.1271/bbb.58.1218)
- Kawulka, K., Sprules, T., McKay, R. T., Mercier, P., Diaper, C. M., Zuber, P., & Vederas, J. C. (2003). Structure of subtilisin A, an antimicrobial peptide from *Bacillus subtilis* with unusual posttranslational modifications linking cysteine sulfurs to α -carbons of phenylalanine and threonine. *Journal of the American Chemical Society*, 125(16), 4726-4727. <https://doi.org/10.1021/ja029654t>
- Kay, R., Cheng, A. F., & Tse, C. Y. (1995). *Streptococcus suis* infection in Hong Kong. *QJM: An International Journal of Medicine*, 88(1), 39-47. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.qjmed.a068981>
- Kazakov, T., Vondenhoff, G. H., Datsenko, K. A., Novikova, M., Metlitskaya, A., Wanner, B. L., & Severinov, K. (2008). *Escherichia coli* peptidase A, B, or N can process translation inhibitor microcin C. *Journal of Bacteriology*, 190(7), 2607-2610. <https://doi.org/10.1128/JB.01956-07>
- Kelly, W., Asmundson, R., & Huang, C. (1996). Characterization of plantaricin KW30, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Bacteriology*, 81(6), 657-662. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1996.tb03561.x>

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Kerdsin, A. (2022). Human *Streptococcus suis* infections in Thailand: epidemiology, clinical features, genotypes, and susceptibility. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 7(359), 1-12. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed7110359>
- Khantasup, K., Tungwongjulaniam, C., Theerawat, R., Lamaisri, T., Piyalikit, K., Nuengjamnong, C., & Nuanualsuwan, S. (2022). Cross-sectional risk assessment of zoonotic *Streptococcus suis* in pork and swine blood in Nakhon Sawan Province in northern Thailand. *Zoonoses and Public Health*, 69(6), 625-634. doi:10.1111/zph.12951
- Kheadr, E., Zihler, A., Dabour, N., Lacroix, C., Le Blay, G., & Fliss, I. (2010). Study of the physicochemical and biological stability of pediocin PA-1 in the upper gastrointestinal tract conditions using a dynamic in vitro model. *Journal of Applied Microbiology*, 109(1), 54-64. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04644.x>
- Kjos, M., Nes, I. F., & Diep, D. B. (2009). Class II one-peptide bacteriocins target a phylogenetically defined subgroup of mannose phosphotransferase systems on sensitive cells. *Microbiology*, 155(9), 2949-2961. <https://doi.org/10.1099/mic.0.030015-0>
- Klaenhammer, T. R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12(1-3), 39-85.
- Kuda, T., Izawa, Y., Ishii, S., Takahashi, H., Torido, Y., & Kimura, B. (2012). Suppressive effect of *Tetragenococcus halophilus*, isolated from fish-nukazuke, on histamine accumulation in salted and fermented fish. *Food Chemistry*, 130(3), 569-574. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.074>
- Lalitha, M. (2004). Manual on antimicrobial susceptibility testing. In *Performance standards for antimicrobial testing: Twelfth Informational Supplement* (pp. 454-456). Wayne, Pennsylvania, USA : CLSI.
- Leal-Sánchez, M. V., Jiménez-Díaz, R., Maldonado-Barragán, A., Garrido-Fernández, A., & Ruiz-Barba, J. L. (2002). Optimization of bacteriocin production by batch fermentation of *Lactobacillus plantarum* LPCO10. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9), 4465-4471. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.9.4465-4471.2002>

บรรณานุกรม (ต่อ)

- LeBel, G., Piché, F., Frenette, M., Gottschalk, M., & Grenier, D. (2013). Antimicrobial activity of nisin against the swine pathogen *Streptococcus suis* and its synergistic interaction with antibiotics. *Peptides*, 50, 19-23. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2013.09.014>
- LeBel, G., Vaillancourt, K., Frenette, M., Gottschalk, M., & Grenier, D. (2014). Suicin 90-1330 from a nonvirulent strain of *Streptococcus suis*: a nisin-related lantibiotic active on gram-positive swine pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(17), 5484-5492. <https://doi.org/10.1128/AEM.01055-14>
- Lee, J. J., Choi, Y. J., Lee, M. J., Park, S. J., Oh, S. J., Yun, Y. R., . . . Lee, M. A. (2020). Effects of combining two lactic acid bacteria as a starter culture on model kimchi fermentation. *Food Research International*, 136, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109591>
- Leroy, F., & De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology*, 15(2), 67-78. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.004>
- Li, C., Bai, J., Cai, Z., & Ouyang, F. (2002). Optimization of a cultural medium for bacteriocin production by *Lactococcus lactis* using response surface methodology. *Journal of Biotechnology*, 93(1), 27-34. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00377-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00377-7)
- Linares, D. M., Gomez, C., Renes, E., Fresno, J. M., Tornadijo, M. E., Ross, R. P., & Stanton, C. (2017). Lactic acid bacteria and bifidobacteria with potential to design natural biofunctional health-promoting dairy foods. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1-11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00846>
- Liu, W., Pang, H., Zhang, H., & Cai, Y. (2014). Biodiversity of lactic acid bacteria. In H. Zhang & Y. Cai (Eds.), *Lactic Acid Bacteria: Fundamentals and Practice* (pp. 103–203). Dordrecht: Springer.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Lubelski, J., Rink, R., Khusainov, R., Moll, G. N., & Kuipers, O. P. (2008). Biosynthesis, immunity, regulation, mode of action and engineering of the model lantibiotic nisin. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(3), 455-476.
<https://doi.org/10.1007/s00018-007-7171-2>
- Lv, X., Lin, Y., Jie, Y., Sun, M., Zhang, B., Bai, F., . . . Li, J. (2018). Purification, characterization, and action mechanism of plantaricin DL3, a novel bacteriocin against *Pseudomonas aeruginosa* produced by *Lactobacillus plantarum* DL3 from Chinese Suan-Tsai. *European Food Research and Technology*, 244, 323-331. doi:10.1007/s00217-017-2958-3
- Mahrous, H., Mohamed, A., Abd El-Mongy, M., El-Batal, A., & Hamza, H. (2013). Study bacteriocin production and optimization using new isolates of *Lactobacillus* spp. isolated from some dairy products under different culture conditions. *Food and Nutrition Sciences*, 4, 342-356. <http://dx.doi.org/10.4236/fns.2013.43045>
- Maldonado, A., Ruiz-Barba, J. L., & Jiménez-Díaz, R. (2003). Purification and genetic characterization of plantaricin NC8, a novel coculture-inducible two-peptide bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* NC8. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(1), 383-389. doi:10.1128/AEM.69.1.383-389.2003
- Maqueda, M., Sánchez-Hidalgo, M., Fernández, M., Montalbán-López, M., Valdivia, E., & Martínez-Bueno, M. (2008). Genetic features of circular bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(1), 2-22.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00087.x>
- Martinez, F. A. C., Balciunas, E. M., Converti, A., Cotter, P. D., & Oliveira, R. P. D. S. (2013). Bacteriocin production by *Bifidobacterium* spp. A review. *Biotechnology Advances*, 31(4), 482-488. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.01.010>
- Masuda, Y., Zendo, T., Sawa, N., Perez, R. H., Nakayama, J., & Sonomoto, K. (2012). Characterization and identification of weissellicin Y and weissellicin M, novel bacteriocins produced by *Weissella hellenica* QU 13. *Journal of Applied Microbiology*, 112(1), 99-108. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05180.x>

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Mataragas, M., Drosinos, E., Tsakalidou, E., & Metaxopoulos, J. (2004). Influence of nutrients on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. *Antonie van Leeuwenhoek*, 85, 191-198. <https://doi.org/10.1023/B:ANTO.0000020291.01957.a2>
- Mataragas, M., Metaxopoulos, J., Galiotou, M., & Drosinos, E. (2003). Influence of pH and temperature on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. *Meat Science*, 64(3), 265-271. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(02\)00188-2](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(02)00188-2)
- Meekhanon, N. (2016). Loss of Capsule in *Streptococcus suis*. *Journal of Mahanakorn Veterinary Medicine*, 11(1), 57-68.
- Melancon, D., & Grenier, D. (2003). Production and properties of bacteriocin-like inhibitory substances from the swine pathogen *Streptococcus suis* serotype 2. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8), 4482-4488. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.4482-4488.2003>
- Melby, J. O., Nard, N. J., & Mitchell, D. A. (2011). Thiazole/oxazole-modified microcins: complex natural products from ribosomal templates. *Current Opinion in Chemical Biology*, 15(3), 369-378. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.02.027>
- Messens, W., Verluyten, J., Leroy, F., & De Vuyst, L. (2003). Modelling growth and bacteriocin production by *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 in response to temperature and pH values used for European sausage fermentation processes. *International Journal of Food Microbiology*, 81(1), 41-52. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00168-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00168-X)
- Metlitskaya, A., Kazakov, T., Kommer, A., Pavlova, O., Praetorius-Ibba, M., Ibba, M., . . . Severinov, K. (2006). Aspartyl-tRNA synthetase is the target of peptide nucleotide antibiotic Microcin C. *Journal of Biological Chemistry*, 281(26), 18033-18042. <https://doi.org/10.1074/jbc.M513174200>
- Mirhosseini, M., & Emtiazi, G. (2011). Optimisation of enterocin a production on a whey base substrate. *World Applied Sciences Journal*, 14(10), 1493-1499.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Mogensen, G., Salminen, S., O'brien, J., Ouwenhand, A., Holzapfel, W., Shortt, C., . . . Zink, R. (2002). Food microorganisms-health benefits, safety evaluation and strains with documented history of use in foods. *International Dairy Federation*, 377, 4-9.
- Moll, G. N., van den Akker, E., Hauge, H. H., Nissen-Meyer, J., Nes, I. F., Konings, W. N., & Driessen, A. J. (1999). Complementary and overlapping selectivity of the two-peptide bacteriocins plantaricin EF and JK. *Journal of Bacteriology*, 181(16), 4848-4852. doi:10.1128/jb.181.16.4848-4852.1999
- Mollendorff, J. W. V., Todorov, S. D., & Dicks, L. M. T. (2009). Optimization of growth medium for production of bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* JW3BZ and JW6BZ, and *Lactobacillus fermentum* JW11BZ and JW15BZ isolated from boza. *Trakia Journal of Sciences*, 7(1), 22-33.
- Mueang, A., & Nakhon, S. (2015). A Study of some pathogenic bacteria contamination in beef slaughterhouse and products dispensed in Sakon Nakhon. *Sakon Nakhon Rajabhat University Journal*, 7(13), 1-10.
- Müller, D. M., Carrasco, M. S., Tonarelli, G. G., & Simonetta, A. C. (2009). Characterization and purification of a new bacteriocin with a broad inhibitory spectrum produced by *Lactobacillus plantarum* lp 31 strain isolated from dry-fermented sausage. *Journal of Applied Microbiology*, 106(6), 2031-2040. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04173.x>
- Murphy, K., O'Sullivan, O., Rea, M. C., Cotter, P. D., Ross, R. P., & Hill, C. (2011). Genome mining for radical SAM protein determinants reveals multiple bacteriocin-like gene clusters. *PLoS ONE*, 6(7), 1-12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020852>
- Negash, A. W., & Tsehai, B. A. (2020). Current applications of bacteriocin. *International Journal of Microbiology*, Article ID 4374891, 1-7. <https://doi.org/10.1155/2020/4374891>
- Nissen-Meyer, J., Larsen, A. G., Sletten, K., Daeschel, M., & Nes, I. F. (1993). Purification and characterization of plantaricin A, a *Lactobacillus plantarum* bacteriocin whose activity depends on the action of two peptides. *Microbiology*, 139(9), 1973-1978.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Nizet, V., Beall, B., Bast, D. J., Datta, V., Kilburn, L., Low, D. E., & De Azavedo, J. C. (2000). Genetic locus for streptolysin S production by group A *streptococcus*. *Infection and Immunity*, 68(7), 4245-4254. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.7.4245-4254.2000>
- Noonpakdee, W., Jumriangrit, P., Wittayakom, K., Zendo, J., Nakayama, J., Sonomoto, K., & Panyim, S. (2009). Two-peptide bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* PMU 33 strain isolated from som-fak, a Thai low salt fermented fish product. *Asia Pasific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 17(1), 19-25.
- Novikova, M., Metlitskaya, A., Datsenko, K., Kazakov, T., Kazakov, A., Wanner, B., & Severinov, K. (2007). The *Escherichia coli* Yej transporter is required for the uptake of translation inhibitor microcin C. *Journal of Bacteriology*, 189(22), 8361-8365. <https://doi.org/10.1128/JB.01028-07>
- Odds, F. C. (2003). Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(1), 1-1. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg301>
- Ó'Fágáin, C., Cummins, P.M., O'Connor, B.F. (2017). Gel-filtration chromatography. In D. Walls & S. Loughran (Eds.), *Protein Chromatography. Methods in Molecular Biology* (pp. 15-25). New York, USA: Humana Press.
- Olaoye, O. A., & Ntuen, I. G. (2011). Spoilage and preservation of meat: a general appraisal and potential of lactic acid bacteria as biological preservatives. *International Research Journal of Biotechnology*, 2(1), 033-046.
- Padalia, H., & Chanda, S. (2015). Antimicrobial efficacy of different solvent extracts of *Tagetes erecta* L. flower, alone and in combination with antibiotics. *Applied Microbiology*, 1(1), 1-10. doi:10.4172/2471-9315.1000106
- Padungtod, P., Tharavichitkul, P., Junya, S., Chaisowong, W., Kadohira, M., Makino, S., & Sthitmatee, N. (2010). Incidence and presence of virulence factors of *Streptococcus suis* infection in slaughtered pigs from Chiang Mai, Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 41(6), 1454-1461.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Pallarés, F. J., Halbur, P. G., Schmitt, C. S., Roth, J. A., Opriessnig, T., Thomas, P. J., . . . Hoffman, L. J. (2003). Comparison of experimental models for *Streptococcus suis* infection of conventional pigs. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 67(3), 225-228.
- Papagianni, M., & Anastasiadou, S. (2009). Pediocins: the bacteriocins of *Pediococci*. Sources, production, properties and applications. *Microbial Cell Factories*, 8(1), 1-16.
<https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-3>
- Parks, W. M., Bottrill, A. R., Pierrat, O. A., Durrant, M. C., & Maxwell, A. (2007). The action of the bacterial toxin, microcin B17, on DNA gyrase. *Biochimie*, 89(4), 500-507.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.12.005>
- Parlindungan, E., Dekiwadia, C., & Jones, O. A. (2021). Factors that influence growth and bacteriocin production in *Lactiplantibacillus plantarum* B21. *Process Biochemistry*, 107, 18-26. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.05.009>
- Pei, J., Li, X., Han, H., & Tao, Y. (2018). Purification and characterization of plantaricin SLG1, a novel bacteriocin produced by *Lb. plantarum* isolated from yak cheese. *Food Control*, 84, 111-117. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.07.034>
- Perch, B., Kristjansen, P., & Skadhauge, K. N. (1968). Group R *Streptococci* pathogenic for man. Two cases of meningitis and one fatal case of sepsis. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, 74(1), 69-76.
- Perez, R., Perez, M. T., & Elegado, F. (2015). Bacteriocins from lactic acid bacteria: a review of biosynthesis, mode of action, fermentative production, uses, and prospects. *International Journal of Philippine Science and Technology*, 8(2), 61-67.
- Perez, R. H., Zendo, T., & Sonomoto, K. (2022). Multiple bacteriocin production in lactic acid bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 134(4), 277-287.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2022.07.007>
- Pessione, E. (2012). Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2, 1-15.
[doi:10.3389/fcimb.2012.00086](https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00086)

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Phuapradit, P., Boongird, P., Boonyakarnkul, S., Niramarnsakul, S., Ponglikitmongkol, S., Vorachit, M., & Jayanetra, P. (1987). Meningitis caused by *Streptococcus suis*. *Internal Medicine Journal*, 3, 120-2.
- Rattanadilok na Phuket, N., Tongsakulpanis, N., & Direksin, K. (2016a). Bacterial contamination in fermented pork sausage (Nham-mooh) sold at local markets in the upper northeastern Thailand. *KKU Veterinary Journal*, 26(2), 132-151.
- Rattanadilok na Phuket, N., Tongsakulpanis, N., & Direksin, K. (2016b). *Streptococcus suis* contamination in raw pork meat, fresh pig blood, visceral organs, fermented pork (Nham-mooh), and raw spicy minced pork salad (Larb) in the upper part of northeastern Thailand. *KKU Veterinary Journal*, 26(2), 152-174.
- Pingitore, E. V., Salvucci, E., Sesma, F., & Nader-Macias, M. E. (2007). Different strategies for purification of antimicrobial peptides from lactic acid bacteria (LAB). In A. Méndez-Vilas (Ed.), *Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology* (pp. 557-568). Badajoz: Formatex.
- Piper, C., Draper, L. A., Cotter, P. D., Ross, R. P., & Hill, C. (2009). A comparison of the activities of lacticin 3147 and nisin against drug-resistant *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* species. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64(3), 546-551.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkp221>
- Proungvitaya, S., Klinthong, W., Janan, M., & Proungvitaya, T. (2012). Proteomics tools for medical researches. *Journal of Medical Technology and Physical Therapy*, 24(2), 120-127.
- Rajaram, G., Manivasagan, P., Thilagavathi, B., & Saravanakumar, A. (2010). Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus lactis* isolated from marine environment. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 2(2), 138-144.
- Rattanachaikunsopon, P., & Phumkhachorn, P. (2010). Lactic acid bacteria: their antimicrobial compounds and their uses in food production. *Annals of Biological Research*, 1(4), 218-228.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Rayanakorn, A., Goh, B. H., Lee, L. H., Khan, T. M., & Saokaew, S. (2018). Risk factors for *Streptococcus suis* infection: A systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*, 8(1), 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31598-w>
- Reis, J. A., Paula, A. T., Casarotti, S. N., & Penna, A. L. B. (2012). Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: characteristics and applications. *Food Engineering Reviews*, 4(2), 124-140. <https://doi.org/10.1007/s12393-012-9051-2>
- Rekhif, N., Atrih, A., & Lefebvre, G. (1994). Characterization and partial purification of plantaricin LC74, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LC74. *Biotechnology Letters*, 16, 771-776.
- Reuhs, B. L. (2017). High-performance liquid chromatography. In *Food analysis* (pp. 213-226). Cham: Springer.
- Ringø, E., Hoseinifar, S. H., Ghosh, K., Doan, H. V., Beck, B. R., & Song, S. K. (2018). Lactic acid bacteria in finfish-An update. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1-37. doi:10.3389/fmicb.2018.01818
- Rumjuankiat, K., Perez, R. H., Pilasombut, K., Keawsompong, S., Zendo, T., Sonomoto, K., & Nitisinprasert, S. (2015). Purification and characterization of a novel plantaricin, KL-1Y, from *Lactobacillus plantarum* KL-1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(6), 983-994. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1851-0>
- Saavedra, L., & Sesma, F. (2011). Purification techniques of bacteriocins from lactic acid bacteria and other Gram-positive bacteria. In D. Drider & S. Rebuffat (Eds.), *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: from Genes to Applications* (pp. 99-113). New York: Springer.
- Sabo, S. D. S., Vitolo, M., González, J. M. D., & Oliveira, R. P. d. S. (2014). Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. *Food Research International*, 64, 527-536. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.07.041>
- Saeed, A. H., & Salam, A. I. (2013). Current limitations and challenges with lactic acid bacteria: a review. *Food and Nutrition Sciences*, 2013(4), 73-87. <http://dx.doi.org/10.4236/fns.2013.411A010>

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Saithong, P., Panthavee, W., Boonyaratanakornkit, M., & Sikkhamondhol, C. (2010). Use of a starter culture of lactic acid bacteria in plaas-som, a Thai fermented fish. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110(5), 553-557. doi:10.1016/j.jbiosc.2010.06.004
- Sánchez-Hidalgo, M., Montalbán-López, M., Cebrián, R., Valdivia, E., Martínez-Bueno, M., & Maqueda, M. (2011). AS-48 bacteriocin: close to perfection. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(17), 2845-2857. https://doi.org/10.1007/s00018-011-0724-4
- Sankar, N. R., Priyanka, V. D., Reddy, P. S., Rajanikanth, P., Kumar, V. K., & Indira, M. (2012). Purification and characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* isolated from cow milk. *International Journal of Microbiology*, 3(2), 133-137.
- Sarika, A., Lipton, A., & Aishwarya, M. (2010). Bacteriocin production by a new isolate of *Lactobacillus rhamnosus* GP1 under different culture conditions. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 2(5), 291-297.
- Seitz, M., Valentin-Weigand, P., & Willenborg, J. (2016). Use of antibiotics and antimicrobial resistance in veterinary medicine as exemplified by the swine pathogen *Streptococcus suis*. In M. Stadler & P. Dersch (Eds.), *How to Overcome the Antibiotic Crisis* (pp. 103-121). Cham: Springer.
- Settanni, L., & Moschetti, G. (2010). Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiology*, 27(6), 691-697. doi:10.1016/j.fm.2010.05.023
- Shafa, F., & Salton, M. R. J. (1960). Disaggregation of bacterial cell walls by anionic detergents. *Microbiology*, 23(1), 137-141. https://doi.org/10.1099/00221287-23-1-137
- Sharma, M., Modi, D. R., & Saxena, M. (2014). Role of lactic acid bacteria as probiotics in health and disease. *Prevention*, 82, 1-9. http://dx.doi.org/10.4172/lpma.1000147
- Sharma, N., Kapoor, R., Gautam, N., & Kumari, R. (2011). Purification and characterization of bacteriocin produced by *Bacillus subtilis* R75 isolated from fermented chunks of mung bean (*Phaseolus radiatus*). *Food Technology and Biotechnology*, 49(2), 169-176.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Sheng, Z. L., Li, Y. H., & Li, J. C. (2011). *In vitro* antibacterial activity of medicinal herb extracts against five drug-resistant *Streptococcus suis* strains. In *2011 5th International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering* (pp. 1-4). doi:10.1109/icbbe.2011.5780293
- Shin, M., Han, S., Ryu, J., Kim, K., & Lee, W. (2008). Isolation and partial characterization of a bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* K23-2 isolated from Kimchi. *Journal of Applied Microbiology*, 105, 331-339. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03770.x
- Silva, C. C., Silva, S. P., & Ribeiro, S. C. (2018). Application of bacteriocins and protective cultures in dairy food preservation. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1-15. doi:10.3389/fmicb.2018.00594
- Singh, V. P. (2018). Recent approaches in food bio-preservation-a review. *Open Veterinary Journal*, 8(1), 104-111. doi:10.4314/ovj.v8i1.16
- Somsri, A., Pilasombut, K., Ngamyeesoon, N., & Rumjuankiat, K. (2017). Detection and identification of bacterial contamination in meat by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry. *International Journal of Agricultural Technology*, 13(7.1), 1487-1504.
- Song, D. F., Zhu, M. Y., & Gu, Q. (2014). Purification and characterization of plantaricin ZJ5, a new bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ZJ5. *PLoS ONE*, 9(8), 1-8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105549>
- Srimark, N., & Khunajakr, N. (2015). Characterization of the bacteriocin-like substance from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* WX153 against swine pathogen *Streptococcus suis*. *Journal of Health Research*, 29(4), 259-267. doi:10.14456/jhr.2015.16
- Srinivas, S., Paul, D. C., Colin, H., & Ross, R. P. (2012). Lacticin 3147-biosynthesis, molecular analysis, immunity, bioengineering and applications. *Current Protein and Peptide Science*, 13(3), 193-204. <https://doi.org/10.2174/138920312800785021>

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Srionnual, S., Yanagida, F., Lin, L. H., Hsiao, K. N., & Chen, Y. S. (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(7), 2247-2250. <https://doi.org/10.1128/AEM.02484-06>
- Suankratay, C., Intalapaporn, P., Nunthapisud, P., Arunyingmongkol, K., & Wilde, H. (2004). *Streptococcus suis* meningitis in Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 35(4), 1-9.
- Szutowska, J. (2020). Functional properties of lactic acid bacteria in fermented fruit and vegetable juices: A systematic literature review. *European Food Research and Technology*, 246(3), 357-372. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03425-7>
- Takeuchi, D., Kerdsin, A., Akeda, Y., Chiranairadul, P., Loetthong, P., Tanburawong, N., . . . Oishi, K. (2017). Impact of a food safety campaign on *Streptococcus suis* infection in humans in Thailand. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 96(6), 1370-1377. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0456>
- Takeuchi, D., Kerdsin, A., Pienpringam, A., Loetthong, P., Samerchea, S., Luangsuk, P., . . . Oishi, K. (2012). Population-based study of *Streptococcus suis* infection in humans in Phayao Province in northern Thailand. *PLoS ONE* 7(2): 1-7. doi:10.1371/journal.pone.0031265
- Talon, R., & Leroy, S. (2011). Diversity and safety hazards of bacteria involved in meat fermentations. *Meat Science*, 89(3), 303-309. doi:10.1016/j.meatsci.2011.04.029
- Tang, Y., Bai, J., Yang, Y., Bai, X., Bello-Onaghise, G. S., Xu, Y., & Li, Y. (2021). Effect of syringopicroside extracted from *Syringa Oblata* lindl on the biofilm formation of *Streptococcus suis*. *Molecules*, 26(5), 1-19. <https://doi.org/10.3390/molecules26051295>
- Teshome, G. (2015). Review on lactic acid bacteria function in milk fermentation and preservation. *African Journal of Food Science*, 9(4), 170-175.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Thayawiwat, C., Wichaikham, O., & Painpringam, A. (2012). *Streptococcus suis* infection in the patients of Chiang Kham hospital, Chiang Kham District, Phayao Province 2009-2011: screening test for *Streptococcus suis* infection. *Journal of Preventive Medicine Association of Thailand*, 2(2), 119-134.
- Thirumurugan, A., Ramachandran, S., & Gobikrishnan, S. (2015). Optimization of medium components for maximizing the bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ATM11 using statistical design. *International Food Research Journal*, 22(3), 1272-1279.
- Todorov, S. D. (2008). Bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* AMA-K isolated from Amasi, a Zimbabwean fermented milk product and study of the adsorption of bacteriocin AMA-K to *Listeria* sp. *Brazilian Journal of microbiology*, 39(1), 178-187.
<https://doi.org/10.1590/S1517-83822008000100035>
- Todorov, S. D., & Dicks, L. (2006). Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria: comparison of the bacteriocins. *Process Biochemistry*, 41(1), 11-19. doi:10.1016/j.procbio.2005.01.026
- Todorov, S. D., & Dicks, L. M. (2007). Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* ST712BZ isolated from boza. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(1), 166-172.
<https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000100034>
- Todorov, S. D., & Dicks, L. M. T. (2005). Effect of growth medium on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST194BZ, a strain isolated from boza. *Food Technology and Biotechnology*, 43(2), 165-173.
- Todorov, S. D., Gotcheva, B., Dousset, X., Onno, B., & Ivanova, I. (2000). Influence of growth medium on bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* ST31. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 14(1), 50-55. doi:10.1080/13102818.2000.10819062
- Todorov, S. D., Reenen, C. A. V., & Dicks, L. M. (2004). Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST13BR, a strain isolated from barley beer. *Journal of General and Applied Microbiology*, 50, 149-157. <https://doi.org/10.2323/jgam.50.149>

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Vaillancourt, K., LeBel, G., Fittipaldi, N., Frenette, M., Gottschalk, M., & Grenier, D. (2022). Identification and characterization of a two-peptide class IIb bacteriocin in *Streptococcus phuranimalium* isolated from the nasal cavity of a healthy pig. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 14(1), 204-215. <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09887-0>
- Vaillancourt, K., LeBel, G., Frenette, M., Fittipaldi, N., Gottschalk, M., & Grenier, D. (2015). Purification and characterization of suicin 65, a novel class I type B lantibiotic produced by *Streptococcus suis*. *PLoS ONE*, 10(12), 1-12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145854>
- Vaillancourt, K., LeBel, G., Frenette, M., Gottschalk, M., & Grenier, D. (2015). Suicin 3908, a new lantibiotic produced by a strain of *Streptococcus suis* serotype 2 isolated from a healthy carrier pig. *PLoS ONE*, 10(2), 1-13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117245>
- Venugopal, H., Edwards, P. J., Schwalbe, M., Claridge, J. K., Libich, D. S., Stepper, J., . . . Pascal, S. M. (2011). Structural, dynamic, and chemical characterization of a novel S-glycosylated bacteriocin. *Biochemistry*, 50(14), 2748-2755. <https://doi.org/10.1021/bi200217u>
- Vignolo, G. M., de Kairuz, M. N., de Ruiz Holgado, A. A., & Oliver, G. (1995). Influence of growth conditions on the production of lactocin 705, a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL 705. *Journal of Applied Bacteriology*, 78(1), 5-10. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1995.tb01665.x>
- Vijayakumar, P. P., & Muriana, P. M. (2015). A microplate growth inhibition assay for screening bacteriocins against *Listeria monocytogenes* to differentiate their mode-of-action. *Biomolecules*, 5(2), 1178-1194. <https://doi.org/10.3390/biom5021178>
- Virtanen, T., Pihlanto, A., Akkanen, S., & Korhonen, H. (2007). Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 102(1), 106-115. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03072.x>

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Wakinaka, T., Iwata, S., Takeishi, Y., Watanabe, J., Mogi, Y., Tsukioka, Y., & Shibata, Y. (2019). Isolation of halophilic lactic acid bacteria possessing aspartate decarboxylase and application to fish sauce fermentation starter. *International Journal of Food Microbiology*, 292, 137-143. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.12.013>
- Wang, Y., Qin, Y., Xie, Q., Zhang, Y., Hu, J., & Li, P. (2018). Purification and characterization of plantaricin LPL-1, a novel class IIa bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPL-1 isolated from fermented fish. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1-12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02276>
- Weghoff, M. C., Bertsch, J., & Müller, V. (2015). A novel mode of lactate metabolism in strictly anaerobic bacteria. *Environmental Microbiology*, 17(3), 670-677. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12493>
- Wescombe, P. A., Heng, N. C., Burton, J. P., & Tagg, J. R. (2010). Something old and something new: an update on the amazing repertoire of bacteriocins produced by *Streptococcus salivarius*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2(1), 37-45. <https://doi.org/10.1007/s12602-009-9026-7>
- Wieser, A., Schneider, L., Jung, J., & Schubert, S. (2012). MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(3), 965-974. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3783-4>
- Wongnak, P., Wiratsudakul, A., & Nuanualsuwan, S. (2020). A risk assessment of pathogenic *Streptococcus suis* in pork supply chains and markets in Thailand. *Food Control*, 118, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107432>
- Wongsawan, K., Chaisri, W., Tangtrongsup, S., & Mektrirat, R. (2019). Bactericidal effect of clove oil against multidrug-resistant *Streptococcus suis* isolated from human patients and slaughtered pigs. *Pathogens*, 9(1), 1-12. doi:10.3390/pathogens9010014

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Woraprayote, W., Kingcha, Y., Amonphanpokin, P., Kruenate, J., Zendo, T., Sonomoto, K., . . . Visessanguan, W. (2013). Anti-listeria activity of poly (lactic acid)/sawdust particle biocomposite film impregnated with pediocin PA-1/AcH and its use in raw sliced pork. *International Journal of Food Microbiology*, 167(2), 229-235.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.09.009>
- Woraprayote, W., Pumpuang, L., Tosukhowong, A., Roytrakul, S., Perez, R. H., Zendo, T., . . . Visessanguan, W. (2015). Two putatively novel bacteriocins active against Gram-negative food borne pathogens produced by *Weissella hellenica* BCC 7293. *Food Control*, 55, 176-184. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.02.036>
- Xu, Y., Yang, L., Li, P., & Gu, Q. (2019). Heterologous expression of Class IIb bacteriocin plantaricin JK in *Lactococcus lactis*. *Protein Expression and Purification*, 159, 10-16.
[doi:https://doi.org/10.1016/j.pep.2019.02.013](https://doi.org/10.1016/j.pep.2019.02.013)
- Yan, K. P., Li, Y., Zirah, S., Goulard, C., Knappe, T. A., Marahiel, M. A., & Rebuffat, S. (2012). Dissecting the maturation steps of the lasso peptide microcin J25 in vitro. *ChemBioChem*, 13(7), 1046-1052. doi:10.1002/cbic.201200016
- Yan, L. J., & Forster, M. J. (2011). Chemical probes for analysis of carbonylated proteins: a review. *Journal of Chromatography B*, 879(17-18), 1308-1315.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.08.004>
- Yang, E., Fan, L., Yan, J., Jiang, Y., Doucette, C., Fillmore, S., & Walker, B. (2018). Influence of culture media, pH and temperature on growth and bacteriocin production of bacteriocinogenic lactic acid bacteria. *Amb Express*, 8, 1-14.
<https://doi.org/10.1186/s13568-018-0536-0>
- Yi, L., Dang, Y., Wu, J., Zhang, L., Liu, X., Liu, B., Zhou, Y., & Lu, X. (2016). Purification and characterization of a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus crustorum* MN047 isolated from koumiss from Xinjiang, China. *Journal of Dairy Science*, 99(9), 7002-7015.
<https://doi.org/10.3168/jds.2016-11166>

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Yongkiettrakul, S., Maneerat, K., Arechanajan, B., Malila, Y., Srimanote, P., Gottschalk, M., & Visessanguan, W. (2019). Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolated from diseased pigs, asymptomatic pigs, and human patients in Thailand. *BMC Veterinary Research*, 15(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1732-5>
- Yu, H., Jing, H., Chen, Z., Zheng, H., Zhu, X., Wang, H., . . . Yang, W. (2006). Human *streptococcus suis* outbreak, Sichuan, China. *Emerging Infectious Diseases*, 12(6), 914-920. doi:10.3201/eid1206.051194
- Zacharof, M. P., & Lovitt, R. W. (2012). Bacteriocins produced by lactic acid bacteria a review article. *APCBEE Procedia*, 2, 50-56. doi:10.1016/j.apcbee.2012.06.010
- Zamfir, M., Vancanneyt, M., Makras, L., Vaningelgem, F., Lefebvre, K., Pot, B., . . . De Vuyst, L. (2006). Biodiversity of lactic acid bacteria in Romanian dairy products. *Systematic and Applied Microbiology*, 29(6), 487-495. doi:10.1016/j.syapm.2005.10.002
- Zendo, T., Eungruttanagorn, N., Fujioka, S., Tashiro, Y., Nomura, K., Sera, Y., . . . Sonomoto, K. (2005). Identification and production of a bacteriocin from *Enterococcus mundtii* QU 2 isolated from soybean. *Journal of Applied Microbiology*, 99(5), 1181-1190. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02704.x>
- Zhang, X., Chang, X., Liu, G., Wu, P., & Li, P. (2012). A newly anti-*Streptococcus suis* bacteriocin producing strain from unweaned piglets fecal matter: isolation, preliminary identification, and optimization of medium composition for enhanced bacteriocin production. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 42(5), 393-405. <https://doi.org/10.1080/10826068.2011.635738>
- Zhao, S., Han, J., Bie, X., Lu, Z., Zhang, C., & Lv, F. (2016). Purification and characterization of plantaricin JLA-9: a novel bacteriocin against *Bacillus* spp. produced by *Lactobacillus plantarum* JLA-9 from Suan-Tsai, a traditional Chinese fermented cabbage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(13), 2754-2764. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05717>

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M., Harris, H. M., Mattarelli, P., . . . Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), 2782-2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>
- Zhu, X., Zhao, Y., Sun, Y., & Gu, Q. (2014). Purification and characterization of plantaricin ZJ008, a novel bacteriocin against *Staphylococcus* spp. from *Lactobacillus plantarum* ZJ008. *Food Chemistry*, 165, 216-223. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.034>
- Zou, J., Jiang, H., Cheng, H., Fang, J., & Huang, G. (2018). Strategies for screening, purification and characterization of bacteriocins. *International Journal of Biological Macromolecules*, 117, 781-789. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.233>
- Zouhir, A., Hammami, R., Fliss, I., & Hamida, J. B. (2010). A new structure-based classification of gram-positive bacteriocins. *The Protein Journal*, 29(6), 432-439. <https://doi.org/10.1007/s10930-010-9270-4>





1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

1.1 การเตรียมอาหารเหลว Modified MRS

Proteose Peptone No.3	10.0	กรัม
Beef Extract	10.0	กรัม
Yeast Extract	5.0	กรัม
Dextrose	20.0	กรัม
Polysorbate 80	1.0	กรัม
Ammonium Citrate	2.0	กรัม
Sodium Acetate	5.0	กรัม
Magnesium Sulfate	0.1	กรัม
Manganese Sulfate	0.05	กรัม
Dipotassium Phosphate	2.0	กรัม

ละลายส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นระยะเวลา 15 นาที

หมายเหตุ กรณีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Modified MRS ให้เติม Ager Powder เพิ่ม 15 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นระยะเวลา 15 นาที

1.2 การเตรียมอาหารเหลว M17

Pancreatic Digest of Casein	5.0	กรัม
Soy Peptone	5.0	กรัม
Beef Extract	5.0	กรัม
Yeast Extract	2.5	กรัม
Ascorbic Acid	0.5	กรัม
Magnesium Sulfate	0.25	กรัม
Disodium- β -glycerophosphate	19.0	กรัม

ละลายส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 950 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็น

ระยะเวลา 15 นาที นำมาลดอุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อลงให้เหลือประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส แล้วเติม Sterile Lactose Solution ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

หมายเหตุ กรณีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง M17 ให้เติม Ager Powder เพิ่ม 15 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 950 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นระยะเวลา 15 นาที

1.3 การเตรียมอาหารเหลว LAPT

Yeast Extract	10.0	กรัม
Peptone	15.0	กรัม
Tryptone	10.0	กรัม
Tween 80	1.0	มิลลิลิตร
Glucose	10.0	กรัม

ละลายส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นระยะเวลา 15 นาที

หมายเหตุ กรณีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LAPT ให้เติม Ager Powder เพิ่ม 15 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นระยะเวลา 15 นาที

1.4 การเตรียมอาหารแข็ง NNCC

Todd-Hewitt Broth	36.4	กรัม
Sheep Blood	50	มิลลิลิตร
Sodium Azide	50	มิลลิกรัม
Nalidixic Acid	25	มิลลิกรัม
Colistin Sulfate	12.5	มิลลิกรัม
Crystal Violet	2	มิลลิกรัม
Agar Powder	15	กรัม

ละลาย Todd-Hewitt Broth และ Agar Powder ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็น

ระยะเวลา 15 นาที นำมาลดอุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อลงให้เหลือประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส แล้วเติม Sheep Blood, Sodium Azide, Nalidixic Acid, Colistin Sulfate และ Crystal Violet ลงไป กวนผสมเบา ๆ ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ แล้วนำไปเทลงในจานเพาะเชื้อ

หมายเหตุ ให้เตรียม Sodium Azide, Nalidixic Acid, Colistin Sulfate และ Crystal Violet เป็น Stock Solution โดยละลายสารดังกล่าวในน้ำกลั่น ยกเว้น Nalidixic Acid ให้ละลายใน สารละลาย NaOH ความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ จากนั้นกรองสารละลายผ่าน Sterile Membrane Filter ขนาด 0.2 ไมโครเมตร เพื่อให้ปลอดเชื้อก่อนนำไปเติมในอาหารเลี้ยงเชื้อ

2. การเตรียมสารเคมี

2.1 การเตรียมสารละลาย Normal Saline

เตรียม NaCl 0.85 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

2.2 การเตรียมสารละลาย Tris Buffer ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 8.0

เตรียมสารละลาย Tris (Hydroxyl Methyl) Aminomethane ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ละลายสารดังกล่าวโดยใช้น้ำกลั่นที่ผ่านการทำให้ปลอดเชื้อแล้ว จากนั้นปรับค่า pH ของ บัฟเฟอร์ให้มีค่า pH เท่ากับ 8.0 ด้วยสารละลาย HCl ความเข้มข้น 0.05 นอร์มอล

2.3 การเตรียมสารละลาย Phosphate Buffer ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 5.6

ผสมสารละลาย Monobasic sodium phosphate ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่ปรับค่า pH เป็น 5.6 ปริมาตร 46 มิลลิลิตร กับสารละลาย Dibasic Sodium Phosphate ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่ปรับค่า pH เป็น 5.6 ประมาณ 4 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

2.4 การเตรียมสารมาตรฐาน 0.5 McFarland

ผสมสารละลาย Sulfuric Acid ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร กับสารละลาย Barium Chloride ความเข้มข้นร้อยละ 1.175 โดยมวลต่อ ปริมาตร ปริมาตร 9.95 มิลลิลิตร โดยสารมาตรฐาน 0.5 McFarland จะนำมาใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงใน การวัดความขุ่นของเชื้อแบคทีเรีย เพื่อให้จำนวนของเชื้อแบคทีเรียมีปริมาณเท่ากับ $8 \log \text{CFU/mL}$



1. การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้

- 1) นำเชื้อที่แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ มา Streak ลงบนอาหารแข็ง MRS ที่เติม Calcium Carbonate (CaCO_3) ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยมวลต่อปริมาตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง
- 2) เลือกโคโลนีเดี่ยวที่ได้ มาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อที่เลี้ยงได้จากอาหารเหลวในรอบแรกปริมาตรร้อยละ 1 โดยปริมาตรต่อปริมาตร มาเลี้ยงลงในอาหารเหลว MRS อีกครั้ง และบ่มในสภาวะและเวลาเดียวกัน
- 3) ผสมสารละลาย Glycerol ความเข้มข้นร้อยละ 40 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ในอัตราส่วน 1:1 กับเชื้อที่จะทำการเก็บ แล้วเก็บลงใน Cryotube
- 4) เก็บเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

2. การตรวจสอบเพื่อยืนยันความสามารถในการสร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของแบคทีเรียโอซิน

- 1) เตรียมเชื้อแบคทีเรียเป้าหมายที่จะใช้สำหรับการทดสอบ และอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียเป้าหมาย
- 2) เตรียมแบคทีเรียโอซิน โดยการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง โดยให้ทำการเลี้ยงเชื้อ 2 รอบ จากนั้นเก็บส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เลือกเก็บเฉพาะส่วนใส นำไปปรับค่า pH ของสารละลายให้มีค่า pH เท่ากับ 6.0 โดยใช้สารละลาย NaOH ความเข้มข้น 1 โมลาร์
- 3) นำสารละลายที่ปรับค่า pH แล้วไปทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่าน Sterile Membrane Filter ขนาด 0.2 ไมโครเมตร แล้วนำไปทำการเจือจางแบบ Two-Flow-Dilution จากนั้นหยดสารละลายปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการ Swab Plate ด้วยแบคทีเรียเป้าหมายที่ต้องการใช้ทดสอบ ที่ถูกปรับความเข้มข้นให้เท่ากับ 0.5 McFarland บ่มที่อุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเป้าหมายที่ใช้ทดสอบ สังเกตและบันทึกผล Clear Zone ที่ได้เปรียบเทียบกับส่วนใสที่ไม่ได้ทำการปรับ pH

3. การตกตะกอนโปรตีนด้วย Ammonium Sulfate

ความเข้มข้นของ Ammonium Sulfate ที่ใช้ในการตกตะกอนจำเป็นต้องอ้างอิงตามสูตรมาตรฐาน ดังตารางภาคผนวก ข

ตารางภาคผนวก ข ความเข้มข้นของ Ammonium Sulfate ที่ใช้ในการตกตะกอน

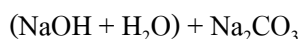
ปริมาณ เกลือ เริ่มต้น (%)	ความเข้มข้นสุดท้ายของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (ร้อยละ โดยมวลต่อปริมาตร)																
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
	เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (กรัม)																
0	113	144	176	208	242	277	314	351	390	430	472	516	561	608	675	708	761
5	85	115	146	179	212	246	282	319	357	397	439	481	526	572	621	671	723
10	57	86	117	149	182	216	251	287	325	364	405	447	491	537	584	634	685
15	28	58	88	119	151	185	219	255	292	331	371	413	456	501	548	596	647
20	0	29	59	89	121	154	188	223	260	298	337	378	421	465	511	559	609
25		0	29	60	91	123	157	191	227	265	304	344	386	429	475	522	571
30			0	30	61	92	126	160	195	232	270	309	351	393	438	485	533
35				0	30	62	94	128	163	199	236	275	316	358	402	447	495
40					0	31	63	96	130	166	202	241	281	322	365	410	457
45						0	31	64	97	132	169	206	245	286	329	373	419
50							0	32	65	99	135	172	210	250	292	335	381
55								0	33	66	101	138	175	215	256	298	343
60									0	33	67	103	140	179	219	261	305
65										0	34	69	105	143	183	224	266
70											0	34	70	107	146	186	228
75												0	35	72	110	149	190
80													0	36	73	112	152
85														0	37	75	114
90															0	37	76
95																0	38

ที่มา: ดัดแปลงจาก Duong-Ly and Gabelli, (2014)

4. การวัดปริมาณโปรตีนด้วยเทคนิค Lowry Method

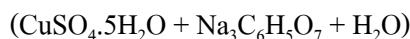
1) เตรียมสารเคมีสำหรับที่ใช้ในการทดสอบดังนี้

Reagent A; เตรียมสารละลาย Sodium Carbonate (Na_2CO_3) ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยมวลต่อปริมาตร ผสมกับสารละลาย Sodium Hydroxide ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์



(1 กรัม + 250 มิลลิลิตร) + 5 กรัม

Reagent B; เตรียมสารละลาย Copper Sulfate Pentahydrate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยมวลต่อปริมาตร สารละลาย Sodium Citrate ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยมวลต่อปริมาตร



(0.05 กรัม + 0.1 กรัม + 10 มิลลิลิตร)

Reagent C; เตรียมสารละลาย Folin-ciocalteu Phenol

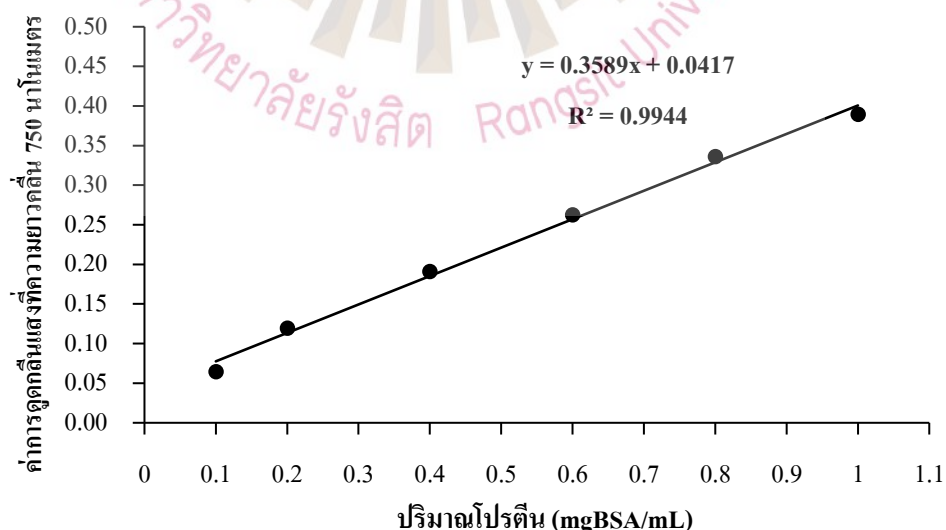


อัตราส่วน 1 : 1

Reagent D; ผสมสารละลาย Reagent A + Reagent B

อัตราส่วน 50 : 1

2) ทำการเตรียมสารละลายมาตรฐาน Bovine Serum Albumin (BSA) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 0.0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 0.7 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วเติม Reagent D ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที จากนั้นเติม Reagent C ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้ไปสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน ดังรูปภาคผนวก ข



รูปภาคผนวก ข กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน

Bovine Serum Albumin ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร



ส่วนผสม

1. เนื้อหมูดิบ	300	กรัม
2. เลือดหมูดิบ	300	มิลลิลิตร
3. พริกตาบเหนือสำเร็จรูป	30	กรัม
4. กระเทียม	10	กรัม
5. หัวหอม	10	กรัม
6. ข่า	10	กรัม
7. ผักชี	20	กรัม
8. ต้นหอม	20	กรัม
9. ข้าวคั่ว	30	กรัม
10. น้ำปลา	20	มิลลิลิตร
11. น้ำมะนาว	30	มิลลิลิตร

ขั้นตอนการทำ

ขั้นตอนแรกนำกระเทียมสับ หัวหอมซอย และข่าสับละเอียด มาคั่วในกระทะนาน 5 นาที จากนั้นนำมาสวมรวมกับเนื้อหมูหั่นชิ้น เลือดหมู ข้าวคั่ว และพริกตาบเหนือ ขั้นตอนสุดท้ายคนผสมให้เข้ากัน แล้วเติมน้ำปลาและน้ำมะนาว หลังจากนั้นเติมผักชีและต้นหอม

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ	กิตติยา โชว์พานิช
วัน เดือน ปีเกิด	20 มิถุนายน 2540
สถานที่เกิด	จังหวัดกำแพงเพชร ประเทศไทย
ประวัติการศึกษา	มหาวิทยาลัยรังสิต ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, 2562 มหาวิทยาลัยรังสิต ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, 2566
ทุนการศึกษา	ทุนต้นกล้าไบโอเทค
ที่อยู่ปัจจุบัน	24/62 หมู่ที่ 9 ตำบลบางพูด อำเภอปากเกร็ด จังหวัด นนทบุรี

