บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

แบคเทอริโอซิน คือ สารเปปไทด์ หรือสารประกอบโปรตีนที่สร้างจากแบคทีเรียมีประสิทธิภาพในการยังยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกับแบคทีเรียที่ผลิตแบคเทอริโอซินหรือสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่มีความไวต่อแบคเทอริโอซิน (Brink *et. al*., 1994)

Lactobacillus casei ssp. *rhamnosus* SN 11 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์แยกได้จากอาหารประเภทส้มฟัก สามารถสร้างแบคเทอริโอซินที่ทนความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที และสามารถทนต่อสภาวะเป็นกรดได้โดยยังคงมีกิจกรรมที่พีเอช 5 (ศิรินาถ หนูเอก, 2540) จากคุณสมบัติและความสามารถต่างๆ ประกอบกับในปัจจุบันผู้บริโภคหันมาให้ความสำคัญและเอาใจใส่ในด้านสุขภาพมากขึ้นและพยายามหลีกเลี่ยงอาหารที่มีการใช้สารเคมีในการถนอมอาหารทำให้แบคเทอริโอซินถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารมากยิ่งขึ้น และการผลิตแบคเทอริโอซินเพื่อให้ได้ในปริมาณสูงจึงจำเป็นมากต่อการนำไปใช้ ซึ่งการผลิตแบคเทอริโอซินสามารถทำได้โดยการเลี้ยงแบคทีเรียแลกติกในอาหารที่มีองค์ประกอบต่างๆ ที่จำเป็นครบถ้วน เช่น น้ำตาล วิตามิน และแหล่งไนโตรเจน เป็นต้น โดยทั่วไปการใช้อาหารสังเคราะห์หรืออาหารสำเร็จรูปจะมีราคาค่อนข้างแพง ทำให้การผลิตแบคเทอริโอซินในระดับอุตสาหกรรมไม่มีความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์

ในการศึกษาเกี่ยวกับแบคเทอริโอซินจากเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN 11 นอกจากการศึกษาคุณสมบัติบางประการของแบคเทอริโอซิน เช่น ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ความคงตัวของแบคเทอริโอซินต่ออุณหภูมิ ความคงตัวต่อพีเอชและความคงตัวต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีน (ศิรินาถ หนูเอก, 2540) ในน้ำหมักแล้ว ภัทรพล จันทราภรณ์ (2543) ได้ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซินโดย

ทดลองเลี้ยงเชื้อในอาหารดัดแปลงจากอาหาร MRS โดยใช้น้ำตาล ซูโครส ร้อยละ 1 และใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าเจือจางร้อยละ 50 แทนที่แหล่งไนโตรเจนทั้งหมดในอาหาร MRS (Medium I) โดยพบว่ามีกิจกรรมการยับยั้งเป็น 30 AU/ml เท่ากับในอาหาร MRS นอกจากนี้นิติเนตร ขำทวี (2544) ได้ทำการศึกษากลไกการทำลายแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของแบคเทอริโอซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน จากการทดลองพบว่าแบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Listeria murrayi* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่า *Escherichia coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ โดยแบคเทอริโอซินจะเข้าไปมีผลต่อผนังเซลล์แบคทีเรียอินดิเคเตอร์ โดยทำให้ผนังเซลล์เกิดรูพรุน บางส่วนเกิดการฉีกขาดทำให้เกิดการสูญเสียสารประกอบภายในเซลล์ที่มีขนาดเล็กกว่ารูพรุน

จากความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค การทนความร้อน และทนกรดต่ำได้ จึงเป็นข้อดีของแบคเทอริโอซินในการนำไปประยุกต์ใช้ในการแปรรูปเพื่อทดแทนสารสังเคราะห์ น้อมจิตต์ อ่อนแก้ว (2544) นำเอาแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN 11 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนมาใช้ร่วมกับระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส ซึ่งเป็นระบบป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติที่พบในน้ำนมดิบ เพื่อเป็นเทคโนโลยีร่วม (Hurdle Technology) จากการทดลองพบว่าการใช้เทคโนโลยีร่วมสามารถใช้ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ และช่วยในการยืดอายุการเก็บรักษานมดิบและผลิตภัณฑ์ได้

จากการทดลองที่ผ่านมาแบคเทอริโอซินจากเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN 11 ที่นำมาทดสอบเป็นแบคเทอริโอซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนโดยการเหวี่ยงแยกเซลล์ออกแล้วกรองผ่าน Ultrafiltration membrane และตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตเท่านั้น ซึ่งทำให้ผลการทดลองที่ผ่านมาแสดงถึงประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซินได้ไม่เต็มที่ ดังนั้นเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภคและเพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดในการนำไปใช้งาน การทดลองในครั้งนี้จึงเน้นในด้านเทคนิคการทำบริสุทธิ์สาร เพื่อให้ทราบถึงคุณลักษณะและองค์ประกอบของสาร ตลอดจนสามารถจำแนกชนิดและประเภทของแบคเทอริโอซินที่ได้ เพื่อนำมาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับ

การศึกษาในขั้นต่อไป เช่น การศึกษาในด้านพันธุวิศวกรรม เพื่อการปรับปรุงและดัดแปลงสายพันธุ์เพื่อเพิ่มผลิตผลของแบคเทอริโอซินให้ได้ปริมาณที่มากยิ่งขึ้นอีกด้วย

ตรวจเอกสาร

1. แบคเทอริโอซิน (Bacteriocin)

แบคเทอริโอซินมีการค้นพบตั้งแต่ปี ค.ศ. 1925 โดย Gratia พบว่า *Escherichia coli* ϕ สามารถยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* V โดยสร้างสารที่ชื่อว่า colicin และสารต่างๆ อีก 17 ชนิด ต่อมามีการค้นพบสารคล้าย colicin ที่สร้างจากแบคทีเรียแกรมบวกจึงรวบรวมสมมติฐานว่าแบคเทอริโอซิน คือ สารเปปไทด์ หรือสารประกอบโปรตีนที่สร้างจากแบคทีเรียมีประสิทธิภาพในการยังยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกับแบคทีเรียที่ผลิตแบคเทอริโอซินหรือสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่มีความไวต่อแบคเทอริโอซิน

Klaenhammer (1988) แบ่งแบคเทอริโอซินตามความสามารถในการยับยั้งเป็น 2 ชนิด คือ

1. แบคเทอริโอซินที่มีผลในการยับยั้งในช่วงแคบ (narrow inhibition spectrum)

เป็นแบคเทอริโอซินที่มีผลยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียในจีนัสเดียวกัน เช่น lactocin 27 จากเชื้อ *Lactobacillus helveticus* LP27 ยับยั้งเฉพาะ *Lactobacilli* diplococcin จากเชื้อ *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* 346 ยับยั้งเฉพาะ *Lactococci* หรือยับยั้งแบคทีเรียในจีนัสอื่นได้เล็กน้อย เช่น lactacin F ยับยั้ง *Lactobacilli* และ *Enterococcus faecalis*

2. แบคเทอริโอซินที่มีผลยับยั้งในช่วงกว้าง (broad inhibition spectrum)

เป็นแบคเทอริโอซินที่มีผลยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกอื่นๆ เช่น ไนซิน จากเชื้อ *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก นอกจากนี้ pediocin AcH จากเชื้อ *Pediococcus acidilactici* ยับยั้ง *Pediococci Lactobacilli Leuconostocs Bacilli Enterococci Staphylococci Listeriae* และ *Clostridia*

Klaenhammer (1993) แบ่งแบคเทอริโอซินตามลักษณะโครงสร้าง มวลโมเลกุล และความคงตัวต่อความร้อน ได้เป็น 4 ชนิด

1. lantibiotic เป็นแบคเทอริโอซินที่มีขนาดเล็ก และมีกรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบประมาณ 19-37 โมเลกุล ซึ่งเป็นกรดอะมิโนชนิด α,β–unsaturated ซึ่งประกอบด้วย dehydroalanine และ dehydrobutyrine และกรดอะมิโนชนิด thioether ซึ่งประกอบด้วย lanthionine และ β-methyllanthionine โดยไม่มีกรดอะมิโนชนิดวงแหวนเป็นองค์ประกอบ มีพันธะ thioether 5 พันธะ ทำให้มีความแตกต่างจากแบคเทอริโอซินชนิดอื่นๆ แบ่งได้เป็น 2 ชนิดย่อยๆ คือ

1.1 lantibiotic ชนิด A ซึ่งจะมีลักษณะโครงร่างเป็น screw-shaped มีมวลโมเลกุลประมาณ 2,164-3,488 ดาลตัน เช่น ไนซิน จากเชื้อ *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* และ lactacin F จากเชื้อ *Lactobacillus sake* L45

1.2 lantibiotic ชนิด B ซึ่งจะมีลักษณะโครงร่างเป็น globular-shaped มีมวลโมเลกุลประมาณ 1,959-2,014 ดาลตัน เช่น ancovonin จากเชื้อ *Streptomyces sp.*

2. non-lantibiotic ขนาดเล็ก เป็นแบคเทอริโอซินที่มีมวลโมเลกุลน้อยกว่า 15,000 ดาลตัน มีความคงตัวต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส มากกว่า 30 นาที เช่น lactacin B จากเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* N2 และ *Lactobacillus lactis* ssp. *cremolis* 346 หรือที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที เช่น lactacin F จากเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* 11088

3. non-lantibiotic ขนาดใหญ่เป็นแบคเทอริโอซินที่มีมวลโมเลกุลมากกว่า 15,000 ดาลตัน ไวต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 60-100 องศาเซลเซียส 10-15 นาที เช่น caseicin 80 จากเชื้อ *Lactobacillus casei* B80

4. complex bacteriocin เป็นแบคเทอริโอซินที่มีโครงสร้างเปปไทด์ที่มีไขมันหรือคาร์โบไฮเดรตเกาะอยู่ เช่น lactacin 27 จากเชื้อ *Lactobacillus helveticus* LP27 ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซิน ชนิดไกลโคโปรตีน

ความแตกต่างของแบคเทอริโอซินกับสารปฏิชีวนะในการออกฤทธิ์ยับยั้ง คือ แบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียแกรมบวกจะออกฤทธิ์ยับยั้งเฉพาะกับแบคทีเรียแกรมบวก และแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียแกรมลบจะออกฤทธิ์ยับยั้งเฉพาะกับ

แบคทีเรียแกรมลบ ในขณะที่สารปฏิชีวนะ คือ สารที่ผลิตจากสิ่งมีชีวิตทั้ง procaryotes และ eucaryotes ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งสิ่งมีชีวิตทั้ง procaryotes และ eucaryotes โดยที่ระดับความเข้มข้นต่ำ และจะไม่ยับยั้งตัวมันเองและการใช้สารปฏิชีวนะสามารถใช้ได้เฉพาะการรักษาโรคเท่านั้น และหากใช้ติดต่อกันเป็นเวลานานจะทำให้แบคทีเรียในลำไส้เปลี่ยนแปลงทั้งยังมีผลต่อการดื้อยาของแบคทีเรียอีกด้วย (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล และคณะ, 2539)

2. การทำงานของแบคเทอริโอซิน

แบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียต่างชนิดกันจะมีคุณสมบัติต่างกัน ความสามารถในการยับยั้งหรือการทำลายจะแตกต่างกันด้วย สำหรับกลไกการออกฤทธิ์ของแบคเทอริโอซินชนิดต่างๆ พอจะแบ่งได้ดังนี้

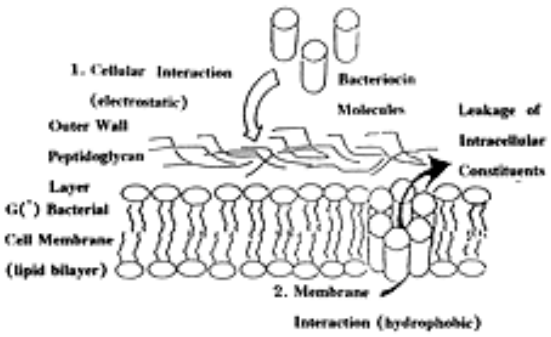
1. ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ ซึ่งเป็นส่วนที่อยู่นอกสุดของเซลล์ มีความแข็งแรงทำหน้าที่ป้องกันสิ่งที่อยู่ในเซลล์ สำหรับแบคทีเรียผนังเซลล์เป็นส่วนสำคัญที่ใช้ในการจำแนกแบคทีเรียเป็นแกรมบวก แกรมลบ

โครงสร้างพื้นฐานของแบคทีเรียทั้ง 2 พวก ที่ต่างกัน คือ peptidoglycan (อาจเรียกว่า glycopeptide หรือ mucopeptide หรือ murein) พวกแกรมบวกมีส่วนนี้หนามาก ในแกรมลบจะบางกว่า และแกรมลบจะมีส่วนของ lipopolysaccharide หุ้มอีกชั้นหนึ่ง peptidoglycan ของแบคทีเรียทั้งหลายจะมีโครงสร้างหลักเป็น polysaccharide ซึ่งสลับกันระหว่าง N-acetylglucosamine (GlcNAC) และ N-acetylmuramate (MurNAC) แต่มี side chain แตกต่างกันไปบ้าง (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2533)

แบคเทอริโอซินจะไปยับยั้งการสร้าง peptidoglycan ซึ่งส่งผลให้หยุดการสร้างผนังเซลล์ เนื่องจากผนังเซลล์มีความสำคัญมากหากถูกทำลายหรือสร้างไม่สมบูรณ์แบคทีเรียจะตายได้ แบคเทอริโอซินพวกนี้จึงจัดเป็น bacteriocidal

2. รบกวนหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งเป็นส่วนที่ถัดจากผนังเซลล์เข้ามา หน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ทั่วไป คือ osmotic barrier ที่ช่วยป้องกันไม่ให้สารต่างๆ เข้าหรือออกจากเซลล์ง่ายเกินไป อีกหน้าที่หนึ่งเกี่ยวข้องกับระบบขนส่งเพื่อนำสารเข้า – ออก เซลล์ โดยมีผลต่อ Proton motive force ของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ความสมดุลของ K^+ ของ

เซลล์เปลี่ยนแปลงไป โดยมีการผ่านเข้าไปในเซลล์มากขึ้นและเกิดการสะสมทำให้แรงดันในเซลล์ไม่สมดุล เซลล์จะแตกและตายในที่สุด



ภาพที่ 1 แสดงกลไกการทำลายแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของโมเลกุลของแบคเทอริโอซิน

Figure 1 Mode of action of bacteriocin

source : Murina และคณะ (1996)

Hoover และคณะ (1993) พบว่า การทำลายแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยใช้ไนซินเกิดจากการการที่เยื่อหุ้มเซลล์ดูดซับ (adsorption) ไนซินไปยังตามด้วยการทำลายกิจกรรม (inactivation) ของ sulphydryl groups และจากภาพที่ 1 แสดงกลไกการทำลายแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของโมเลกุลของแบคเทอริโอซินที่มีโครงสร้างแบบ α-helical หรือ β-sheet ซึ่งจะทำให้เกิด poration complex ในเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดการฉีกขาด และสูญเสียความสามารถในการควบคุมการผ่านเข้าออกของสารต่างๆ มีผลทำให้เซลล์แบคทีเรียที่ไวต่อแบค เทอริโอซิน ถูกทำลายได้ (Murina, 1996)

3. ยับยั้งการสร้างกรดนิวคลีอิก กรดนิวคลีอิกมี 2 ชนิด คือ deoxyribonucleic acid (DNA) และ ribonucleic acid (RNA) ในการเจริญและแบ่งตัวของเซลล์ขึ้นกับการ

สังเคราะห์DNA ซึ่งเป็นสารพันธุกรรม แต่ RNA มีความจำเป็นสำหรับเซลล์เพราะเป็นแม่พิมพ์ในการสังเคราะห์โปรตีนและเอนไซม์

4. ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน กระบวนการสังเคราะห์โปรตีนได้จากการแปรรหัสบน mRNA หรือเรียกว่า ขั้นตอน translation กระบวนการนี้เกิดขึ้นใน ribosome สำหรับ ribosome ของแบคทีเรียจะเป็นชนิด 70S (ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย คือ 30S และ 50S) การยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน จะเกิดจากแบคเทอริโอซินที่มีโครงสร้างแบบ aminoglycoside คือมี amino sugar ในโมเลกุลทำให้เกิดพันธะ glycocidic ซึ่งมีความสามารถจับกับ 30S ribosomal subunit ทำให้ไปยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนและลดความสามารถในการขนส่งรหัสทางพันธุกรรม นอกจากนี้ยังทำให้การอ่านรหัสในการสร้าง mRNA ผิดพลาด เพราะบางตำแหน่งถูกบดบัง ส่งผลให้ความสามารถในการสร้างโปรตีนที่เป็นเอนไซม์ผิดพลาด เมื่อไม่มีเอนไซม์การทำงานของเซลล์จะผิดปกติไป ในกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนหลายขั้นตอนที่แบคเทอริโอซินยับยั้งได้นั้น สามารถกลับสู่สภาพเดิมได้เมื่อลดความเข้มข้นลง ด้วยเหตุนี้แบคเทอริโอซินที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนส่วนใหญ่เป็น bacteriostatic

5. รบกวนกระบวนการเมตาบอลิซึม กระบวนการเมตาบอลิซึมสามารถกลับเข้า สู่สภาพเดิมได้เมื่อปริมาณแบคเทอริโอซินลดลง ดังนั้น แบคเทอริโอซินพวกนี้จึงจัดเป็น bacteriostatic

สารแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากแหล่งต่างๆ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ได้ Lewus และคณะ (1991) ทำการแยกแบคทีเรียแลกติกที่สร้างแบคเทอริโอซินจากเนื้อวัวพบว่าสารแบคเทอริโอซินที่แยกได้สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค และเจริญที่อุณหภูมิต่ำ ได้แก่ *Listeria monocytogenes* 4 สายพันธุ์ *Aeromonas hydrophila* 2 สายพันธุ์ *Staphylococcus aureus* 2 สายพันธุ์ ในขณะที่ Okereke และ Montville (1991) ทดสอบการใช้สารแบคเทอริโอซินที่ได้จากแบคทีเรียแลกติก 23 สายพันธุ์ จากอาหารหมัก พบว่า *Pediococcus pentosaceus* ATCC 43200 *P. pentosaceus* ATCC 43201 *Lactobacillus lactis* ssp. *lactis* ATCC 11454 *L. acidophilus* N2 และ *L. plantarum* BN สามารถยับยั้ง *Clostridium botulinum* ได้ 11 สายพันธุ์

Voughan และคณะ (1994) ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย และทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ โดยนำแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้ประมาณ 1,000 ไอโซเลต มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ได้แก่ *Staphylococcus aureus Listeria innoca Pseudomonas fragi* และ *Lactobacillus bulgaricus* ผลการทดลองพบว่าส่วนใหญ่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ 1 ชนิด มีเพียงบางชนิดเท่านั้นที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้มากกว่า 1 ชนิด

Brink และคณะ (1994) ทำการแยกเชื้อจากอาหารหมักหลายประเภทพบ *Lactobacillus Salivaricus* M7 และ *L. acidophilus* M46 ที่สามารถผลิตสารแบคเทอริโอซิน salivacin B ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* ได้ ในขณะที่ acidocin B สามารถยับยั้งเชื้อ *Clostridium sporogenes* ได้

Ming และคณะ (1997) ศึกษาการใช้แบคเทอริโอซิน nisin และ pediocin จากแบคทีเรียแลกติก *Lactobacillus lactis* 7962 และ *Pediococcus acidilactici* K ตามลำดับ โดยนำไปประยุกต์ใช้ในการเคลือบฟิล์มบรรจุอาหารประเภทเนื้อสัตว์ทั้งที่ผ่านการแปรรูปแล้วและเนื้อสด พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์ดังกล่าวได้ นอกจากนี้ Hone และคณะ (1998) ทำการศึกษา pediocin PA-1 ซึ่งได้จาก *Pediococcus acidilactici* และLactococcin จากเชื้อ *Lactobacillus lactis* ssp. d*iacetylactis* NW4 ซึ่งจัดเป็นแบคเทอริโอซินกลุ่ม non-lantionine (Jack *et al*., 1995; Klanehammer, 1993) พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญที่อุณหภูมิและพีเอชต่ำได้

McAuliffe และคณะ (1998) ทำการศึกษา lactacin 3147 ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus lactis* ssp. *lactis* DPC 3147 ที่แยกได้จากเมล็ด Irish kefir พบว่า lactacin 3147 จัดเป็นแบคเทอริโอซินชนิดที่มีความสามารถในการยับยั้งในช่วงกว้าง (broad spectrum) และมีความคงตัวต่อความร้อน สามารถยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes Lactobacillus lactis* และ *Bacillus subtilis* ได้ถึงแม้จะใช้ที่ความเข้มข้นต่ำ ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับไนซิน นอกจากนี้ Ryan และคณะ (1998) นำ lactacin 3147 ไปใช้ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคเต้านมอักเสบที่ปนเปื้อนใน

น้ำนม แทนการใช้สารปฏิชีวนะ พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* *Streptocoocus agalactiae* และ *Streptocoocus uberis* นอกจากนี้ Oumer และคณะ (2001) ทำการแยกแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแลกติก 6 สายพันธุ์ คือ nisin A nisin Z lactacin 481 enterocin AS-48 และ novel plantacin พบว่าสามารถยับยั้งแบคทีเรียพวก mesophilic ได้ เช่น แบคทีเรียก่อโรคที่เจริญบนเนื้อแข็ง

3. แบคทีเรีย *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* SN 11 และแบคเทอริโอซินที่สร้าง

L. casei ssp. *rhamnosus* SN 11 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เซลล์รูปร่างเป็นท่อน ไม่สร้างสปอร์ เป็นพวก Homofermentative แยกได้จากอาหารประเภทส้มฟัก สามารถเจริญและสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ดีเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MRS พีเอชเริ่มต้นของอาหารอยู่ที่ระดับ 5.5 สามารถเจริญและผลิตแบคเทอริโอซินได้ทั้งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ 35 องศาเซลเซียส แบคเทอริโอซินที่เชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN 11 สร้างขึ้นสามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที และสามารถทนต่อสภาวะเป็นกรดได้โดยยังคงมีกิจกรรมที่พีเอช 5 แบคเทอริโอซินที่ผลิตขึ้นจะถูกทำลายกิจกรรมการยับยั้งได้ด้วยเอนไซม์ Pronase-E Proteinase-K Trypsin และ α-Chymotrypsin แต่ทนต่อเอนไซม์ Catalase และจากการทดลองเมื่อนำเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN 11 มาเพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ได้แก่ *Staphylococcus aureus* *Lactobacillus sake* *Escherichia coli* *Escherichia coli* O157 : H7 *Lactobacillus plantarum* *Listeria monocytogen* O18 และ *Carnobacterium* sp. M 114-25 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอช 5.5 เป็นเวลา 18 ชั่วโมง พบว่าสามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้สูงถึงร้อยละ 89-99 (ศิรินาถ หนูเอก, 2540)

ภัทรพล จันทราภรณ์ (2543) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซินโดยเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN 11 ที่ถูกตรึง จากการทดลองได้ศึกษาการแทนแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในอาหาร MRS ด้วยวัสดุราคาถูกและผลขององค์ประกอบอื่นๆ ต่อการผลิตแบคเทอริโอซินเพื่อเป็นการทดแทนอาหารสังเคราะห์ที่มีราคาสูง นอกจากนี้ยังอาศัยเทคนิคการตรึงจุลินทรีย์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ

ในการผลิต โดยจากการทดลองแทนแหล่งต่างๆ ในอาหาร MRS โดยใช้ซูโครสแทนแหล่งคาร์บอนและน้ำนึ่งปลาทูน่าที่ผ่านการแยกไขมันและตกตะกอนโปรตีนเจือจางแทนแหล่งไนโตรเจน จะได้เป็นอาหาร Medium I ที่มีส่วนประกอบ ดังนี้

Sucrose	10	กรัม
Tween 80	1.0	มิลลิลิตร
Ammonium citrate	2.0	กรัม
Sodium acetate	5.0	กรัม
Dipotassium phosphate	2.0	กรัม
Distilled water	500	มิลลิลิตร
น้ำนึ่งปลาทูน่า	500	มิลลิลิตร

โดยมีพีเอชเริ่มต้นเป็น 5.5 โดยสูตรอาหารดังกล่าวทำให้เชื้อมีการเจริญและสามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้ในปริมาณเท่ากับอาหาร MRS สูตรปกติ โดยวัดกิจกรรมการยับยั้งได้ 30 AU/ml. ที่ชั่วโมงที่ 24 นอกจากนี้ยังพบว่าการเลือกวิธีตรึงเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN11 โดยวิธีการดูดซับบน sintered glasses ที่ผ่านการเคลือบด้วย polyethynemine (PEN) สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้เท่ากับการหมักโดยเซลล์อิสระและวัดค่ากิจกรรมการยับยั้งได้ 30 AU/ml

น้อมจิตต์ อ่อนแก้ว (2543) ได้ศึกษาผลของการใช้แบคเทอริโอซินและระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสร่วมกันในเทคโนโลยีร่วม (Hurdle Technology) ในการผลิตนมพาสเจอร์ไรส์ เพื่อใช้ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ เพื่อช่วยยืดอายุการเก็บรักษานมดิบและผลิตภัณฑ์ โดยเตรียมแบคเทอริโอซินจากอาหารที่เลี้ยงเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN11 โดยการเหวี่ยงแยกเซลล์ออกที่ 4,500 X g เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วกรองผ่าน Ultrafiltration ขนาด 100 กิโลดาลตัน ตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตแบบ 2 ระดับ ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 40 และ 80 พบว่าเมื่อตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 80 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส กิจกรรมการยับยั้งในส่วนตะกอนที่ได้สูงขึ้นเป็น 160 AU/ml หลังจากนั้นกรองผ่าน Ultrafiltration ขนาด 10 กิโลดาลตัน เพื่อกำจัดเกลือออกไปโดยการใช้วิธีไดอะไลซีส ถุงไดอะไลซีสที่ใช้มีขนาดโมเลกุลผ่าน 3,500 ดาลตัน

แบคเทอริโอซินที่ได้มีขนาดโมเลกุลอยู่ในช่วง 3,500-10,000 ดาลตัน และพบว่าหลังจากทำแห้งโดยการ Freeze dry จะสามารถเพิ่มความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินได้ 14.22 เท่า และจะได้แบคเทอริโอซินที่มีกิจกรรมการยับยั้ง 320 AU/mg เมื่อนำมาใช้กับผลิตภัณฑ์นม พบว่าปริมาณการใช้แบคเทอริโอซินที่เหมาะสมกับนมดิบ คือ 80 AU/ml โดยสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทั้งหมดในนมดิบที่เก็บที่อุณหภูมิห้องได้ 6 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้ 6 วัน นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus cereus* จำนวน 10^5 CFU/ml ที่เติมลงในนมดิบที่เก็บที่อุณหภูมิห้องได้นาน 6 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้ 6 วัน โดยพบว่าความคงตัวของกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินที่อุณหภูมิห้องลดลงเหลือ 10 AU/ml ในชั่วโมงที่ 24 แต่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส กิจกรรมการยับยั้งลดลงเหลือ 40 AU/ml ในวันที่ 15 ของการเก็บ

จากการศึกษาการใช้แบคเทอริโอซินร่วมกับการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส (ระบบของการควบคุมและยับยั้งแบคทีเรียในน้ำนมที่มีอยู่แล้วตามธรรมชาติ) ในนมดิบพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทั้งหมดและเชื้อ *B. cereus* ได้นานกว่าการใช้แบคเทอริโอซินหรือการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสอย่างใดอย่างหนึ่งเพียงอย่างเดียว และยังพบว่าการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดสก่อนเติมแบคเทอริโอซินเป็นเวลา 2 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ดีกว่าการเติมแบคเทอริโอซินก่อนการกระตุ้นและพร้อมกับการกระตุ้นระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส

นิติเนตร ขำทวี (2544) ศึกษาการทำลายเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ *Escherichia coli Staphylococcus aureus* และ *Listeria murrayi* DMS 4580 ของแบคเทอริโอซินจาก *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN11 พบว่าแบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ *S. aureus* และ *L. murrayi* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่า *Escherichia coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ โดยจะเข้าไปมีผลต่อผนังเซลล์แบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ทำให้ผนังเซลล์เกิดรูพรุน บางส่วนเกิดการฉีกขาดทำให้เกิดการสูญเสียสารประกอบภายในเซลล์ที่มีขนาดเล็กกว่ารูพรุนและเกิดการสูญเสีย โปแตสเซียมอิออนออกมานอกเซลล์และรบกวนการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยจะมีผลต่อการสังเคราะห์ ATP ทำให้ปริมาณ ATP ภายในเซลล์ลดลง แต่เมื่อเวลาผ่านไปเซลล์

แบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่เกิดการบาดเจ็บสามารถซ่อมแซมตัวเองได้จึงจัดแบคเทอริโอซินชนิดนี้เป็น Bacteriostatic

4. ปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงในการผลิตแบคเทอริโอซิน

ในการผลิตแบคเทอริโอซิน อาหารเลี้ยงเชื้อควรมีสารอาหารที่จำเป็นอย่างครบถ้วนเพื่อที่จะสามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้ในปริมาณสูงสุด ไม่ขัดขวางต่อการปลดปล่อยแบคเทอริโอซินออกจากตัวเซลล์ และอาหารเลี้ยงเชื้อต้องไม่มีผลต่อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ (Tagg *et al*., 1976) ดังนั้นจึงมีปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงในการผลิตแบคเทอริโอซิน ดังต่อไปนี้

4.1 ชนิดของจุลินทรีย์

แบคเทอริโอซินสามารถผลิตได้จากแลกติกแอสิดแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ การสังเคราะห์แบคเทอริโอซินจะต้องประกอบด้วยกระบวนการถอดรหัส (Transcription) และกระบวนการแปลรหัส (Translation) เพื่อถอดรหัสทางพันธุกรรมจากยีนสำหรับแบคเทอริโอซิน โดยยีนสำหรับแบคเทอริโอซินอาจเป็นยีนที่อยู่ในพลาสมิด (Plasmid) หรือเป็นยีนที่อยู่ในโครโมโซม (Chromosome) ก็ได้ Yang และ Ray (1994) พบว่าไนซิน และ Leuconisin Lcm 1 สามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ ในขณะที่ Pediocin AcH ผลิตได้จากบางสายพันธุ์เท่านั้น Devuyst (1994) ทำการคัดแยกเชื้อ *Lactobacillus lactis* พบว่ามี 21 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตไนซินได้ โดยปริมาณไนซินที่ผลิตได้มีตั้งแต่ 1 – 1886 IU/ml และพบว่าการผลิตไนซินไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณ nis ยีนในกระบวนการถอดรหัสหรือกระบวนการแปลรหัส โดยความแตกต่างของสายพันธุ์จะขึ้นกับการแสดงออกของยีนต์และกิจกรรมของเอนไซม์ รวมถึงระบบอิมมูนิตี้ (Immunity) ของไนซิน Quiao และคณะ (1997 อ้างโดย Parente และ Ricciardi, 1999) พบว่าการแสดงออกของ nisin resistance มีผลต่อการผลิตไนซิน จากสายพันธุ์ LAC 48 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ดัดแปลงของ *Lc. lactis* NS ซึ่งจะให้การผลิตที่ดีกว่าสายพันธุ์เดิม ถึงแม้ว่าการแสดงออกของ ยีนต์จะเหมือนกันก็ตาม การเพิ่ม nisin resistance โดยการชักนำพลาสมิดที่มีระบบอิมมูนจะช่วยเพิ่มปริมาณการผลิต และเร่งการเจริญเติบโตให้เร็วขึ้นเมื่อเทียบกับสายพันธุ์เดิม

4.2 องค์ประกอบต่างๆ ของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในการผลิตแบคเทอริโอซินจะต้องคำนึงถึงแหล่งและปริมาณคาร์บอน ปริมาณไนโตรเจนและปริมาณฟอตเฟส ตลอดจนปริมาณสารยับยั้งและสารลดแรงตึงผิวต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ

แบคเทอริโอซินสามารถผลิตได้ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนต่างๆ กัน การผลิต Nisin Z จากเชื้อ *Lc. lactis* IO-1 สามารถผลิตได้โดยใช้น้ำตาล กลูโครส ซูโครส และ xylose เป็นแหล่งคาร์บอน โดยการใช้น้ำตาล กลูโครส จะให้ผลดีที่สุด (4000 IU/ml) เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้น้ำตาล xylose (3000 IU/ml) (Matsusaki และคณะ 1996)

Biswas และคณะ (1991) ทำการทดลองผลิต Pediocin AcH ในอาหารที่มีการใช้น้ำตาลต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าน้ำตาลกลูโครส ให้ผลการผลิตดีที่สุด ตามด้วยซูโครส ไซโลส และกาแลกโทรส แต่ในกรณีของ Enterocin 1146 การใช้น้ำตาล ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนกลับให้ผลการผลิตที่ดีกว่าการใช้น้ำตาลกลูโครส ในขณะที่การใช้ฟรุกโทรส หรือแลกโทสในการผลิต จะให้อัตราการเจริญเท่ากับซูโครส และกลูโครส แต่จะให้ผลผลิตแบคเทอริโอซินในปริมาณต่ำ (Parente and Ricciardi, 1994b)

ในการผลิตแบคเทอริโอซินโดยใช้การหมักแบบกะแบบควบคุมอุณหภูมิ พบว่าการเจริญของเชื้อและการผลิตแบคเทอริโอซินขึ้นอยู่กับปริมาณคาร์โบไฮเดรตเริ่มต้น จากการทดลองของ Devuyst และ Vandamme (1992) พบว่าเมื่อใช้ซูโครส 30 กรัมต่อลิตร จะให้ปริมาณไนซินสูงสุดและเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของซูโครสเป็น 40 กรัมต่อลิตร ปริมาณไนซินที่ได้จะลดลงเป็น 10.9 มิลลิกรัมต่อกรัม แสดงว่าแหล่งคาร์บอน มีผลต่อการสังเคราะห์หรือมีผลต่อกิจกรรมของ Prenisin-modifying เอนไซม์ โดยซับสเตรตที่ใช้และผลิตภัณฑ์ที่ได้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อและลดการผลิต Enterocin 1146 ได้เช่นกัน (Parente และคณะ 1997) ในการผลิต amylovorin L471 พบว่ากิจกรรมการยับยั้งสูงสุดที่ได้ไม่ได้เกิดจากการเพิ่มปริมาณ กลูโครส (20-60 กรัมต่อลิตร) แต่ในทางตรงกันข้ามการใช้น้ำตาล กลูโครส ในปริมาณสูงกลับทำให้เกิดการสลายตัวของแบคเทอริโอซินด้วยเช่นกัน

นอกจากแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการผลิตแบคเทอริโอซินแล้ว แหล่งไนโตรเจนก็มีผลมากต่อการผลิตเช่นกัน Kim และคณะ (1997) พบว่า ปริมาณการผลิตไนซินจะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณไนโตรเจน ถึงแม้ว่าอัตราการเจริญของเชื้อจะลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณไนโตรเจนก็ตาม นอกจากนี้ยังพบว่าชนิดของแหล่งไนโตรเจนก็มีผลต่อการผลิตแบคเทอริโอซินเช่นกัน De Vuyst และ Vandamme (1993) ทำการทดลองเปรียบเทียบผลของแหล่งไนโตรเจน (10 กรัมต่อลิตร) ในการผลิตไนซิน พบว่าการใช้ cotton-seed meal จะให้ผลผลิตดีที่สุด (2500 IU/ml) ในขณะที่การใช้ yeast extract และ fish meal ก็ให้ผลผลิตสูงเช่นกัน (น้อยกว่า 2000 IU/ml) ในการผลิตแบคเทอริโอซินจากเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 ใน filtered stillage-based medium เปรียบเทียบกับอาหาร LTB พบว่าปริมาณไนซิน ใน filtered stillage-based medium สูงกว่าในอาหาร LTB

สารอนินทรีย์ต่างๆ ทั้ง anions (สารประกอบฟอตเฟส) และ cations จำพวกแมกนีเซียม (Mg^{2+}) และ แคลเซี่ยม (Ca^{2+}) ก็มีผลต่อการผลิตแบคเทอริโอซินเช่นกัน แต่ทั้งนี้จะขึ้นกับชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ด้วย จากการทดลองของ Devuyst และ Vandamme (1993) พบว่าฟอสเฟตช่วยเพิ่มปริมาณการผลิตไนซินจากเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* NIZO 22186 โดยการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอช 6.8 จะให้ผลการผลิตดีที่สุด แต่จะไม่มีผลต่อการผลิตแบคเทอริโอซินจากสายพันธุ์ *Lc. lactis* IO-1 (Matsusaki *et.al.,* 1996)

แมกนีเซียม (Mg^{2+}) สามารถเพิ่มการผลิต Pediocin AcH (Biswas *et. al.*, 1991) และช่วยเพิ่มการผลิตและลดการเกาะตัวกันของไนซิน จากเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 (Mcghrous *et. al*., 1992) แต่ไม่สามารถเพิ่มการผลิตไนซิน จากเชื้อ *Lc. lactis* IO-1 ได้ (Matsusaki *et.al.,* 1996) นอกจากนี้การเติม $CaCl_2$ ปริมาณ 0.1 โมลต่อลิตร ยังช่วยเพิ่มปริมาณ nisin Z แต่ไม่มีผลใดๆ ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อหรือการผลิต lactate จากน้ำตาลไซโลส และกลูโครส ในการผลิตแบบกะที่มีการควบคุมพีเอช

Tween 80 สามารถส่งเสริมการผลิตได้ในแบคเทอริโอซินบางชนิด ถึงแม้ว่า Tween 80 จะมีคุณสมบัติในการป้องกันการดูดซับบนพื้นผิว แต่จะสามารถเพิ่ม

ประสิทธิภาพในการผลิตได้ Biswas และคณะ (1995) พบว่าอาหารที่มีกลูโครส เป็นแหล่งคาร์บอนและมีการเติม tween 80 และ Mg^{2+} ให้ปริมาณมวลชีวภาพและปริมาณการผลิต pediocin ACH จากเชื้อ *Pediococcus acidilactici* สูงสุดและยังช่วยเพิ่มการผลิต Lactocin S (Mortvede-Abildgaard *et al.*,1995) และ Amylovorin L 471 (De Vuyst *et al.*, 1996) อีกด้วย สารเหล่านี้จะเข้าไปมีผลต่อการแสดงออกของยีนต์ช่วยป้องกันการเกาะรวมกันของแบคเทอริโอซินและยังช่วยเพิ่มผลิตผลภายใต้สภาวะควบคุมต่างๆ ได้

4.3 สภาวะที่ใช้ในการหมัก

อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียแลกติก Rammelsberg และ Dadler (1990) ศึกษาผลของอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงต่อการผลิต caseicin 80 จากเชื้อ *Lactobacillus casei* B80 ที่อุณหภูมิ 15 20 25 และ 30 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสสามารถผลิต caseicin 80 ได้สูงสุด ในขณะที่ Graciela และคณะ (1995) ศึกษาการผลิต lactocin 705 จากเชื้อ *L. casei* CRL705 พบว่าที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงสุด

ภัทรพล จันทราภรณ์ (2543) ทำการศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงต่อการเจริญของเชื้อ บนตัวดูดซับ และการผลิตแบคเทอริโอซินจากเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN11 โดยทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง ถึง อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมแก่การเจริญและการผลิตแบคเทอริโอซิน คือ ที่อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส สามารถวัดกิจกรรมการยับยั้งสูงสุดได้ที่ชั่วโมงที่ 20

De Vuyst และ Vandamme (1995) ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิในการผลิตไนซิน จากเชื้อ *Lactococcus lactis* พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับ 28-30 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Matsusaki และคณะ (1996) พบว่าการผลิตไนซิน จากเชื้อ *Lactococcus lactis* 10-1 ให้กิจกรรมการผลิตแบคเทอริโอซินสูงสุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อใน

ขณะที่การผลิตกรดแลกติกจากเชื้อชนิดเดียวกันจะให้ปริมาณสูงสุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Ishisaki and Ohta, 1989)

ค่าพีเอชเริ่มต้น และสุดท้ายของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการเจริญ การผลิตและความเสถียรของแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแลกติก Barefoot และ Klaenhammer (1983) พบว่า *Lactobacillus acidophilus* N2 สามารถผลิต lactacin B ได้มากขึ้นเมื่อมีการเพิ่มพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจาก 5.9 เป็น 7.0 และการผลิตจะลดลงเมื่อพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำกว่า 5.9 ตรงกันข้ามกับการทดลองของ Joerger และ Klaenhammer (1986) พบว่า *Lactobacillus helveticus* 481 ผลิต helveticin J ได้สูงสุดเมื่อพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5.5

De Vuyst และ Vandamme (1992) ได้ศึกษาการผลิตไนซินจากเชื้อ *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* NIZO 221656 ในอาหารที่มีการควบคุมพีเอชเท่ากับ 6.8 และไม่มีการควบคุมพีเอช พบว่าปริมาณไนซินสูงสุดที่ผลิตได้จะเท่ากัน โดยในการทดลองที่มีการควบคุมพีเอชปริมาณไนซิน ที่ผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 1800 IU/ml ที่ชั่วโมงที่ 8 ในการเจริญช่วงปลาย log phase และหลังจากนั้นปริมาณการผลิตจะคงที่ แต่ในการทดลองที่ไม่มีการควบคุมพีเอชปริมาณการผลิตจะลดลงทันทีเมื่อการผลิตเกิดขึ้นสูงสุด ที่เวลาเดียวกัน Yang และ Ray (1994) ศึกษาเปรียบเทียบการผลิต ไนซินจากเชื้อ *Lactococcus lactis* ในอาหาร TGE และ TGE buffer พบว่าปริมาณไนซินในอาหาร TGE buffer จะสูงกว่าในอาหาร TGE อันเป็นผลมาจากค่าพีเอชในอาหาร TGE ระหว่างการหมักจะลดลงต่ำจนเกินค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อขั้นตอนการเปลี่ยนรูปจาก inactive nisin มาอยู่ในรูป active nisin

Kaiser และ Montville (1993) ศึกษาการผลิต bavaricin จากเชื้อ *Lactobacillus bavaricin* ในอาหาร APT ที่มีการควบคุมพีเอชตลอดการหมักเป็น 6.0 และ 6.5 พบว่า ที่พีเอช 6.0 ให้ปริมาณการผลิตสูงสุดเมื่อเชื้อเจริญถึงช่วงปลาย log phase และจะคงที่ตลอดการหมัก ที่พีเอช 5.5 ปริมาณการผลิตจะเกิดขึ้นเพียงเล็กน้อย แต่ที่พีเอช 6.5 ปริมาณสูงสุดที่ผลิตจะเท่ากับที่พีเอช 6.0 แต่หลังจากที่จุดสูงสุดการผลิตจะลดลงอย่างรวดเร็ว ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Parente และ Hill (1992) ซึ่งศึกษาการผลิต enterocin 1146 จากเชื้อ *Enterococcus faecium*

DPC1146 ในการผลิตแบบกะ โดยศึกษาการควบคุมพีเอชตลอดการหมักเป็น 5.0 5.5 6.0 และ 6.5 พบว่าการควบคุมพีเอชเป็น 5.5 ให้การผลิต enterocin 1146 ต่อน้ำหนักเซลล์สูงสุด นอกจากนี้ที่พีเอช 5.5 แบคเทอริโอซินที่ผลิตได้มีการดูดซับกับอาหารหรือตัวเซลล์และเกิดการเสื่อมสลายสูงกว่าที่ค่าพีเอชอื่น ในขณะที่ค่าพีเอชระหว่าง 6.0-6.5 เชื้อจะมีการเจริญเติบโตดีที่สุด

Graciela และคณะ (1995) ศึกษาผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารต่อการผลิต lactocin 705 จากเชื้อ *Lactobacillus casei* CRL705 พบว่า เมื่อทำการหมักในอาหาร MRS ที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.5-7.5 โดยไม่มีการควบคุมพีเอช ให้การผลิต lactocin 705 สูงสุด และเมื่อ พีเอชเริ่มต้นสูงหรือต่ำกว่านี้การผลิตจะลดลง

Baker และคณะ (1996) ศึกษาผลการควบคุมพีเอชเท่ากับ 6.0 6.5 7.0 และ 7.5 ในการผลิต leuconocin S จากเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* OX พบว่าเมื่อทำการควบคุม พีเอชเท่ากับ 7.0 เชื้อจะมีการเจริญเติบโตดีที่สุด แต่เมื่อทำการควบคุมพีเอชเท่ากับ 6.5 จะให้การผลิต leuconocin S สูงสุด

ภัทรพล จันทราภรณ์ (2542) ทำการศึกษาผลของพีเอชต่อการผลิตแบคเทอริโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* SN11 ในถังหมักขนาด 3 ลิตร โดยใช้อาหาร medium I และมีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 พบว่าเมื่อพีเอชลดลงเป็น 4.5 แล้วทำการควบคุมพีเอชที่ค่านี้ไว้ เชื้อมีการเจริญดีที่สุดโดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 3.48 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลงอย่างรวดเร็วตั้งแต่ 12 ชั่วโมงแรกของการหมัก และมีการผลิตแบคเทอริโอซินสูงสุดโดยวัดกิจกรรมการยับยั้งได้เท่ากับ 60 AU/ml ที่ชั่วโมงที่ 16

5. การผลิตแบคเทอริโอซินโดยใช้แหล่งสารอาหารที่เป็นวัสดุเศษเหลือ

โดยทั่วไปการผลิตแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแลกติกจะใช้ต้นทุนค่อนข้างสูงเนื่องจากอาหารสำเร็จที่ใช้มีราคาค่อนข้างสูง ดังนั้นในการผลิตในระดับอุตสาหกรรมจำเป็นต้องศึกษาหาแหล่งของสารอาหารที่มีราคาถูกมาใช้ในการผลิต แต่ทั้งนี้ต้องคำนึงถึงปริมาณสารอาหารต่างๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญและการผลิตแบคเทอริโอซินของเชื้อว่ามีครบถ้วนหรือไม่ และในสารอาหารนั้นต้องไม่มีสารพิษที่เป็นอันตรายต่อเชื้อ และจะ

ต้องมีปริมาณที่มากพอและสามารถจัดหาได้ง่าย ตัวอย่างการนำสารที่มีราคาถูกมาใช้ในการผลิตแบคเทอริโอซิน เช่น

De Vuyst และคณะ (1990) ศึกษาการผลิตไนซินจากเชื้อ *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ในอาหาร cotton seed meal ความเข้มข้นร้อยละ 3 พบว่าจะให้การผลิตไนซิน 2500 IU/ml. Hugenholtz และ De Veer (1991, อ้างโดย De Vuyst และ Vandamme, 1994) ศึกษาการผลิตไนซินจากเชื้อ *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* NIZO 22186 ในอาหาร milk medium และ whey medium จะให้การผลิตไนซิน 13 และ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

Chii-Cherng และคณะ (1993) ศึกษาการผลิต pediocin PO2 จากเชื้อ *Pediococcus acidilactici* PO2 ในน้ำเวย์ พบว่าจะไม่มีการผลิตแบคเทอริโอซิน แต่เมื่อเติมยีสต์สกัดร้อยละ 2 และ tween 80 ร้อยละ 1 จะให้ปริมาณการผลิต pediocin PO2 เท่ากับในอาหาร MRS ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับการผลิต lactocin 705 จากเชื้อ *Lactobacillus casei* CRL 705 (Graciela *et al.*, 1995)

Daba และคณะ (1993) ศึกษาการผลิต mesenterocin 5 จากเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* ในน้ำเวย์ พบว่าไม่มีการผลิต และเมื่อเลี้ยงในอาหาร whey permeate จะให้การผลิตเพียงเล็กน้อย แต่เมื่อเติมยีสต์สกัดร้อยละ 2 และ tween 80 ร้อยละ 1 จะให้การผลิต mesenterocin 5 เป็นกึ่งหนึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับอาหาร MRS

Hsieh และคณะ (1996) ศึกษาการผลิต propionicin จากเชื้อ *Propionibacterium thoenii* พบว่าในอาหารที่ประกอบด้วยโมลาส (beet mplasses) ร้อยละ 12.5 และน้ำแช่ข้าวโพด (corn steep liquor) ร้อยละ 9 ในอัตราส่วน 3 : 1 จะให้การผลิตแบคเทอริโอซินมากกว่าอาหารมาตรฐานถึง 5 เท่า

Tom และคณะ (1998) ศึกษาผลของการใช้น้ำแช่ข้าวโพด เนื้อสกัด ยีสต์สกัด และเปปโตน เป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหาร MRS ต่อการเจริญและการผลิต plantaricin 243 โดย *Lactobacillus plantarun* 243 พบว่าเชื้อมีการเจริญไม่แตกต่างกัน แต่การผลิต plantaricin 243 ในอาหารที่มีน้ำแช่ข้าวโพดเป็นแหล่งไนโตรเจนจะให้ปริมาณต่ำสุด ทั้งนี้อาจเป็นเพราะในน้ำแช่ข้าวโพดมีกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการผลิตน้อย

ภัทรพล จันทราภรณ์ (2543) ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* (SN11) โดยใช้กากน้ำตาลและ ซูโครส แทนที่ กลูโครส และใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าแทนไนโตรเจนทั้งหมดในอาหาร MRS จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำนึ่งปลาทูน่า พบว่ามีองค์ประกอบดังแสดงในตารางที่ 1

โดยจากการวิเคราะห์องค์ประกอบต่างๆ พบว่ามีปริมาณไนโตรเจนร้อยละ 7.0 เมื่อแยกโปรตีนออกพบว่ายังมีปริมาณไนโตรเจนเหลืออีกร้อยละ 4.0 ใกล้เคียงกับในอาหาร MRS ที่มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดร้อยละ 4.8 และจากการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมพบว่าการใช้ซูโครสร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน และการใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าเจือจาง ร้อยละ 50 เป็นแหล่งไนโตรเจน (Medium I) เชื้อมีการเจริญสูงสุด และพบว่าการไม่เติมแมงกานีสซัลเฟตและแมกนีเซียมซัลเฟตในอาหาร Medium I ไม่มีผลต่อการเจริญและการผลิตแบคเทอริโอซิน แต่อย่างไรก็ตามเมื่อไม่เติมสารประกอบบัฟเฟอร์ (แอมโมเนียมอะซีเตท โซเดียมซิเตรท และ ไดโพตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต) และ tween 80 จะทำให้การเจริญและการผลิตแบคเทอริโอซินลดลง

แหล่งอาหารราคาถูกที่มีความเป็นไปได้สำหรับการผลิตแบคเทอริโอซินอีกชนิดหนึ่ง คือ น้ำมะพร้าว เนื่องจากในน้ำมะพร้าวมีปริมาณสารอาหารต่างๆ มากมายที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตและใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อในการผลิตน้ำส้มสายชูและวุ้นมะพร้าว ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำนึ่งปลาทูน่า

Table 1 Chemical composition of tuna condensate

Composition	**Before separated protein and lipid**	**After separated protein and lipid**
pH	5.8	4.5
COD (mg/l)	116,573	90,000
Total solid (mg/l)	83,450	68,450
Colloides (mg/l)	7,760	5,840
Ash (mg/l)	3.10	2.44
Protein (%)	7.0	4.0
Oil and grease (%)	2.1	1.0
Total sugar (%)	18	18
Megnesium (mg/l)	NA	0.07
Manganis (mg/l)	NA	63.66
Phosphorus (mg/l)	NA	45.05
Iron (mg/l)	NA	6.89

Source : ภัทรพล จันทราภรณ์ (2543)

NA : Not Available

ตารางที่ 2 องค์ประกอบต่างๆ ในน้ำมะพร้าว

Table 2 The chemical composition of coconut water

Chemical composition	Green coconut water	Mature coconut water
Total solids (%)	5.4	6.5
Reducing sugars (%)	0.2	4.4
Minerals (%)	0.5	0.6
Protein (%)	0.1	0.01
Fat (%)	0.1	0.01
Acidity (mg)	60.0	120.0
pH	5.2	4.5
Potassium (mg)	247	290
Sodium (mg)	48	42
Calcium (mg)	40	44
Magnesium (mg)	15	10
Phosphorous (mg)	6.3	9.2
Iron μg	79	106
Copper μg	26	26

Source : Krishnankutty (1987)

6. การทำบริสุทธิ์แบคเทอริโอซินจากแลกติกแอสิดแบคทีเรีย

นอกจากแบคเทอริโอซิน ซึ่งเป็นสารประกอบโปรตีนที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่นๆ ได้แล้ว สารประกอบที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียหรือจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลกติกมีดังนี้ (Dasechel, 1989)

1. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogenperoxide : H_2O_2) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถทำปฏิกิริยากับสารอื่นได้เพื่อสร้างสารยับยั้ง โดยแบคทีเรียแลกติกสามารถทำ

ปฏิกิริยากับ endogenous thiocyanate ซึ่งเร่งปฏิกิริยาโดย lactoperoxidase เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ Intermediary oxidation ซึ่งสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ ขบวนการดังกล่าว เรียกว่า lactoperoxidase antibacterial ซึ่งสามารถนำไปใช้ยืดอายุการเก็บรักษานมสดได้โดยไม่ต้องแช่ตู้เย็น

2. ไดอะซีทิล (Diacetyl or 2,3-butanedione) เป็นผลจากการย่อยสารอาหารจากแลกติกแอสิดแบคทีเรียบางสปีชีส์ เป็นสารให้กลิ่น butter aroma ในผลิตภัณฑ์นมหมัก และยังมีคุณสมบัติยับยั้งจุลินทรีย์ แต่ต้องใช้ในปริมาณมาก และทำให้มีกลิ่นรบกวน

3. รูเทอร์รีน (Reuterin) เป็นสารโมเลกุลต่ำที่ไม่ใช่โปรตีนสามารถละลายได้ดีที่พีเอชเป็นกลาง สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ยีสต์ รา รวมทั้งโปรโตซัว จึงสามารำนำไปใช้ในการถนอมอาหารเพื่อลดจำนวนจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคและทำให้อาหารเน่าเสีย

4. ไมโครเกรด (Micrograd) สามารถต่อต้านแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์และรา แต่ไม่ต่อต้านแบคทีเรียแกรมบวก ประกอบด้วย กรดโพรพิโอนิก กรดอะซิติก และกรดแลกติก

เนื่องจากแบคเทอริโอซินเป็นสารประกอบโปรตีน ดังนั้นเทคนิคหรือขั้นตอนการทำบริสุทธิ์จึงอาศัยเทคนิคพื้นฐานในการทำบริสุทธิ์โปรตีนทั่วไป โดยวิธีการทำบริสุทธิ์แบคเทอริโอซินเพื่อแยกเอาสารที่ไม่ต้องการออกจะมีหลากหลายขึ้นกับชนิด ขนาด และองค์ประกอบต่างๆ ของแบคเทอริโอซิน

6.1 การหมุนเหวี่ยงหรือการเซนตริฟิวจ์ (Centrifugation)

ในการทำบริสุทธิ์แบคเทอริโอซินการหมุนเหวี่ยงหรือการเซนตริฟิวจ์เป็นวิธีการที่ใช้ในการแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก และใช้ในการแยกตะกอนโปรตีนจากการตกตะกอนโดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตออกจากน้ำหมัก (Verna *et. Al.*, 1997) เช่น ในการทำบริสุทธิ์ Acidocin D20079 จากเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079 (Deras *et. al.*, 2005) และการทำบริสุทธิ์บางส่วนของแบคเทอริโอซิน จากเชื้อ *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* SN 11 (น้อมจิตต์ อ่อนแก้ว, 2544) โดยเทคนิคการหมุนเหวี่ยงหรือการเซนตริฟิวจ์จะอาศัยหลักการเซดิเมนท์ (Sedimentation) ภายใต้แรงเหวี่ยงหรือแรงหนีศูนย์กลาง อัตราการตกตะกอนของสารจะมีค่ามากน้อยขึ้นอยู่กับ

ขนาดน้ำหนักโมเลกุล และความอัดแน่นของโมเลกุลหรืออนุภาค โมเลกุลหรืออนุภาคขนาดใหญ่มีความหนาแน่นสูงจะเคลื่อนออกจากศูนย์กลางด้วยความเร็วสูงกว่าโมเลกุลหรืออนุภาคขนาดเล็ก ดังนั้นสารที่มีความหนาแน่นสูงหรือมีขนาดโมเลกุลใหญ่จะตกตะกอนก่อน (อาภัสสรา ชมิดท์, 2537)

6.2 อัลตร้าฟิวเตชั่น (Ultrafiltration)

อัลตร้าฟิวเตชั่นเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้แยกสารที่มีมวลโมเลกุลต่ำออกจากสารที่มีโมเลกุลสูงและเป็นวิธีที่ทำให้สารละลายโมเลกุลใหญ่มีความเข้มข้นขึ้น ภายใต้สภาวะที่ใช้แรงดันเหนือสารละลาย โดยตัวทำละลายและตัวถูกละลายขนาดเล็กๆ ในสารละลายจะถูกดันผ่านเยื่อกึ่งซึมได้ ทำให้ตัวทำละลายและตัวถูกละลายถูกกำจัดออกจากสารโมเลกุลใหญ่อย่างรวดเร็วและทำให้สารละลายโมเลกุลใหญ่มีความเข้มข้นมากขึ้น (อาภัสสรา ชมิดท์, 2537) Holo และคณะ (1991) ได้เพิ่มความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินที่แยกได้จาก *Lactobacillus acidophilus* LF221 โดยการนำน้ำหมักที่ได้หลังจากแยกเซลล์ออกแล้วมากรองด้วยกระดาษกรอง โดยมีขนาด 10 กิโลดาลตัน สามารถเพิ่มความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินได้ 20 เท่า

6.3 การตกตะกอนโดยใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (Ammoniumsulfate Precipitate)

การตกตะกอนเป็นวิธีหนึ่งที่จะแยกโปรตีนออกมาโดยอาศัยคุณสมบัติในการละลายของโปรตีน สารละลายที่ใช้ในการตกตะกอนอาจเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น แอลกอฮอล์ อีเทอร์ อะซีโตน หรือสารละลายเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต การเติมเกลือลงไปในปริมาณเล็กน้อยเพื่อทำให้โปรตีนละลายได้ดียิ่งขึ้น เพราะเกลือจะเกาะกับโปรตีนแล้วรวมกับน้ำได้ดี กระบวนการนี้ เรียกว่า Salting in ในขณะเดียวกันการเติมเกลือในปริมาณที่มากเพื่อให้โปรตีนตกตะกอนเรียกว่า Salting out (Klaenhammer *et. al.*, 1993)

การตกตะกอนแบคเทอริโอซินส่วนใหญ่มักใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต เนื่องจาก เป็นการเพิ่มการไม่ละลายระหว่างโปรตีนกับโปรตีน (hydrophobic protein-protein interaction) การมีทั้งส่วนที่ละลายน้ำได้และไม่ได้ จะทำให้โปรตีนจำเพาะตกตะกอนในช่วงความเข้มข้นเกลือในช่วงแคบ เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตมีความสามารถ

ในการละลายสูง (70.6 กรัม/ลิตร) และมีไอออนที่มีประจุ 4 ประจุ/โมเลกุล สารละลายอิ่มตัวมีความหนืดและความหนาแน่นต่ำ ทำให้แยกตะกอนออกได้ง่ายโดยการหมุนเหวี่ยง การตกตะกอนด้วยวิธีนี้จะต้องทำที่อุณหภูมิต่ำเพื่อป้องกันการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน จากความร้อนที่ถูกปล่อยออกมาในระหว่างการผสมสารละลาย

ตะกอนโปรตีนที่ได้จากการเหวี่ยงแยก จะมีความบริสุทธิ์เล็กน้อย จำเป็นต้องผ่านกระบวนการอื่นต่อไป Lee และคณะ (1999) ได้ทำบริสุทธิ์แบคเทอริโอซินจาก *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* H-S59 ซึ่งแยกได้จากกิมจิ โดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 75 และกำจัดเกลือออกโดยการ ไดอะไลซีสข้ามคืน พบว่ากิจกรรมการยับยั้งจำเพาะเพิ่มขึ้นจาก 4.3 เท่า เป็น 5.3 เท่า และความบริสุทธิ์ของแบคเทอริโอซินเพิ่มขึ้น 1.2 เท่า

Matijasic และคณะ (1998) แยกแบคเทอริโอซิน 2 ชนิด คือ Acidocin LF221 A และ Acidocin LF221 B ได้จาก *Lactobacillus acidophilus* LF 221 โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 300 กรัมต่อลิตร เก็บเกี่ยวแบคเทอริโอซินได้ร้อยละ 80 แต่ Holo และคณะ (1991) ได้ทำบริสุทธิ์ Lactococcin A จาก *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 280 กรัมต่อลิตร เก็บเกี่ยวแบคเทอริโอซินได้ร้อยละ 87

6.4 ไดอะไลซิส (Dialysis)

ไดอะไลซิสเป็นวิธีการแยกโมเลกุลชนิดต่างๆ ออกจากกัน โดยอาศัยความแตกต่างของขนาดโมเลกุล ในการแยกโปรตีนออกจากสารโมเลกุลเล็กๆ ด้วยถุงไดอะไลซิส (dialysis bag) ซึ่งเป็น semipermeable membrane ที่มีรูพรุนจะยอมให้สารโมเลกุลเล็กๆ เช่น เกลือ แพร่ผ่านเข้าออกเมมเบรนได้และโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่กว่าเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนจะคงอยู่ภายในถุงไดอะไลซิส เยื่อหรือเมมเบรนกึ่งซึมได้ที่นิยมใช้ ได้แก่ เซลโลเฟน (cellophane) หรือเซลลูโลสอะซิเตด (cellulose acetate) และไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose)

นอกจากจะใช้ในการแยกโมเลกุลต่างๆ ออกจากกันแล้ว วิธีนี้ยังใช้ในการทำให้สารละลายมีความเข้มข้นขึ้น เมื่อใส่สารโมเลกุลใหญ่ลงในถุงไดอะไลซิสแล้วใช้สารดูดความชื้น เช่น โพลีเอธิลีนไกลคอล (polyethylene glycol) หรือ คาร์บอก

ซีเมทธีลเซลลูโลส (carboxymethylcellulose) ซึ่งไม่สามารถผ่านเข้าออกรูพรุนของเมมเบรนได้ น้ำที่อยู่ภายในถุงไดอะไลซิสจะถูกดูดด้วยพอลิเมอร์เหล่านี้ทำให้สารละลายโมเลกุลใหญ่มีความเข้มข้นขึ้น

6.5 โครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (Column chromatography)

เป็นวิธีการที่ใช้ในการแยกสาร เช่น โปรตีน โดยการผ่านสารละลายโปรตีนผสมเข้าไปในคอลัมน์ที่บรรจุด้วยตัวกลางหรือเมทริกซ์ (matrix) ที่เป็นของแข็งมีรูพรุน อาศัยคุณสมบัติของโปรตีนที่มีความแตกต่างกันที่ขนาดประจุและความสามารถที่จะจับกับหมู่เคมีที่เฉพาะบนตัวกลางนี้ ทำให้โปรตีนชนิดต่างๆ แยกออกจากกันและสามารถเก็บโปรตีนแต่ละชนิดได้ที่ปลายสุดของคอลัมน์ (อาภัสสรา ชมิดท์, 2537)

ในการทำบริสุทธิ์แบคเทอริโอซินนิยมนำเทคนิคทางโครมาโทกราฟีมาช่วยในการแยกสาร โดยการเลือกใช้คอลัมน์จะขึ้นกับคุณลักษณะ ชนิด และขนาดของแบคเทอริโอซิน ซึ่งเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์นี้สามารถแบ่งเป็นหลายชนิดตามความแตกต่างของตัวกลางที่ใช้บรรจุในคอลัมน์

6.5.1 โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (Ion-exchange chromatography) เป็นวิธีที่ใช้แยกสารที่มีประจุโดยอาศัยหลักของกี่ดูดซับแบบผันกลับได้ (reversible adsorption) ไอออนในสารละลายจะแทนที่กับไอออนอื่นที่มีประจุชนิดเดียวกันที่จับกับหมู่ที่มีประจุบนตัวกลางแลกเปลี่ยนไอออนด้วยแรงทางไฟฟ้า (electrostatic force)

6.5.2 โครมาโทกราฟีแบบเจลฟิวเตชั่น (Gel-filtration chromatography) เป็นวิธีการแยกพวกโมเลกุลใหญ่ เช่น โปรตีนให้บริสุทธิ์โดยอาศัยความแตกต่างของมวลโมเลกุล มีข้อดี คือ สามารถแยกสารที่ไม่เสถียรได้ สูญเสียสารน้อย ได้ผลดี ใช้เวลาน้อยและอุปกรณ์ที่ใช้ราคาค่อนข้างถูก วิธีนี้คอลัมน์ถูกบรรจุด้วยเจล เจลทำหน้าที่เป็นตะแกรงร่อนโมเลกุลประกอบด้วยโพลิเมอร์ที่เชื่อมโยงกันเป็นตาข่ายร่างแห มีคุณสมบัติเฉื่อยไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่กำลังวิเคราะห์และไม่มีประจุ ช่องว่างในรูพรุนของเจลที่มีของเหลวแทรกตัวอยู่จะเป็นปริมาตรของเจลเกือบทั้งหมด

เทคนิคเจลฟิวเตชั่นนิยมใช้ในการกำจักเกลือออกจากสารละลายโปรตีน ตัวอย่างเช่นเมื่อตกตะกอนโปรตีนโดยใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต การกำจัดเกลือชนิดนี้ออกจากสารละลายโปรตีน ทำได้โดยละลายตะกอนโปรตีนในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมปริมาตรน้อยที่สุดแล้วปล่อยสารละลายนี้ลงในคอลัมน์ที่บรรจุด้วยเจลที่มีรูพรุนขนาดเล็กกว่าโมเลกุลของโปรตีน เมื่อชะล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ โปรตีนจะออกจากคอลัมน์ก่อนเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต การกำจัดเกลือชนิดนี้ใช้เซฟาเดก G-25 medium สามารถกำจัดเกลือได้อย่างมีประสิทธิภาพ

6.5.3 โครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography : HPLC) การแยกและการวิเคราะห์สารด้วยวิธีนี้อาศัยหลักของการดูดซับ การแลกเปลี่ยนไอออน และขนาด วิธีนี้ใช้คอลัมน์ขนาดเล็กแต่มีความยาวบรรจุด้วยตัวกลางที่ทำด้วยแก้วหรือพลาสติกที่เคลือบด้วยตัวทำละลายอยู่กับที่เป็นชั้นบางๆ ส่วนตัวทำละลายเคลื่อนที่เป็นระบบตัวทำละลายที่ถูกดันให้เข้าสู่คอลัมน์ที่บรรจุด้วยตัวกลางอย่างแน่น สารละลายที่ต้องการวิเคราะห์ถูกผ่านไปในคอลัมน์ แล้วผ่านตัวทำละลายเคลื่อนที่ด้วรแรงดันสูง ซึ่งทำให้ลดเวลาการแยกและการวิเคราะห์สารอย่างมาก การตรวจสอบสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ทำได้โดยอาศันการวัดการดูดกลืนแสงในช่วงอัลตราไวโอเลตดรรชนีหักเห (refractive index) หรือการวัดฟลูออเรสเซนซ์

ข้อดีของเทคนิค HPLC คือสามารถแยกสารได้ภายในเวลาน้อยกว่า 1 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพสูงสามารถตรวจสอบปริมาณสารที่น้อยกว่า picomole ได้ แต่ข้อเสียคือราคาค่อนข้างสูง

6.5.4 โครมาโทกราฟีแบบ Reverse-phase (Reverse-phase chromatography : RPC) เป็นชนิดหนึ่งของโครมาโทกราฟีแบบการแบ่งละลาย (liquid-liquid partition chromatography) ตัวทำละลายอยู่กับที่ประกอบด้วยของเหลวที่นอนโพลาร์ (non polar) ที่เคลือบอยู่บนของแข็งที่เฉื่อย และตัวทำละลายเคลื่อนที่เป็นของเหลวที่มีความเป็นโพลาร์มากกว่า เทคนิคนี้ใช้แยกสารพวกนอนโพลาร์ เช่น ลิปิด และมีประสิทธิภาพในการแยกสารพวกโพลาร์ เช่น โอลิโกนิวคลีโอไทด์ (Oligonucleotide) อีกด้วย

ตารางที่ 3 ตัวอย่างขั้นตอนการทำบริสุทธิ์แบคเทอริโอซิน

Table 3 Purification steps of some bacteriocin

Microorganism	Bacteriocin	Purification steps	MW. (Da)	Reference
Lactobacillus brevis SB27	Brevicin 27	- Ammonium sulphate precipitate - Cation exchange chromatography - Hydrophobic interaction chromatography - Reverse-phase HPLC	5,200	Benoit *et. al.,* 1997
Staphylococcus aureus UT0007	Staphylococcin BacR1	- Ammonium sulphate precipitate - Cation exchange chromatography - C4 Reverse-phase chromatography	3,338	Crupper *et. al.,*1997
Lactobacillus acidophilus LF221	Acidocin LF221A and LF 221 B	- Ammonium sulphate precipitate - Ion exchange chromatography - Hydrophobic interaction chromatography - Reverse-phase HPLC	3,500 and 5,000	Bogovic-Matijasic *et. al.,*1998

ตารางที่ 3 (ต่อ) ตัวอย่างขั้นตอนการทำบริสุทธิ์แบคเทอริโอซิน

Table 3 (Continue) Purification steps of some bacteriocin

Microorganism	Bacteriocin	Purification steps	MW. (Da)	Reference
Lactococcus lactis subsp. *lactis* B14	Bozacin 14	- Ammonium sulphate precipitate - Sep-pack 18 cartridges - Reverse-phase HPLC	6,200	Ivanova *et. al.* ,2000
Lactococcus lactis MMFII	Lactococcin MMFII	- Ammonium sulphate precipitate - Cation exchange chromatography - Sep-pack chromatography - Reverse-phase chromatography	4,142.6	Ferchichi *et. al.,*2001
Pediococcus pentosaceus ACCEL	Pediocin ACCEL	- Cell adsorption – desorption - Superose 12 FPLC	17,500	Chien *et. al.,*2004
Propionibacterium thoenii 447	Thoeniicin 447	- Ammonium sulphate precipitate - SP-Sepharose cation exchange chromatography	6,000	Van der Merwe *et.al.,* 2004

7. การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสาร

7.1 อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบ SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulphate-polyacrylamide-gel electrophoresis : SDS-PAGE)

เป็นวิธีที่ดีที่สุดวิธีหนึ่งในการแยกและเตรียมสารที่มีประจุให้บริสุทธิ์ นอกจากนี้ยังใช้ในการพิสูจน์ความบริสุทธิ์ของสารละลาย โดยอาศัยหลักที่ว่าสารที่มีประจุไฟฟ้าจะเคลื่อนที่ไปในสนามไฟฟ้า โดยเคลื่อนที่ไปยังขั้วไฟฟ้าที่มีประจุตรงข้ามกัน และโมเลกุลขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าโมเลกุลขนาดใหญ่ที่มีประจุเท่ากัน

โซเดียมโดดิซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulphate : SDS) เป็นสารละลายที่มีแอนไอออนิกดีเทอร์เจนท์ (anionic detergent) ชนิดหนึ่งที่มีประจุลบ โดย SDS จะจับกับโปรตีนตรงบริเวณที่เป็นไฮโดรโฟบิก (Hydrophobic) ของโมเลกุลทำให้โปรตีนคลายการขดม้วนออกเป็นสายยาวที่มีรูปร่างเป็นแท่ง และทำให้โมเลกุลของโปรตีนเป็นอิสระจากการรวมตัวกันกับโปรตีนอื่นๆหรือกับไขมันตัวกลางที่ใช้ค้ำจุน (inert matrix)

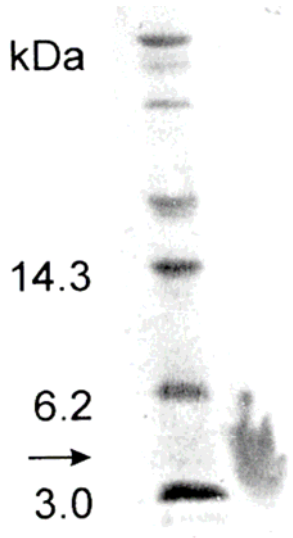
เมื่อโปรตีนถูกจับด้วย SDS ที่มีประจุลบ จะทำให้โปรตีนมีประจุลบด้วย และการจับของโมเลกุลโปรตีนกับ SDS จะเป็นอัตราส่วนที่คงที่ (1 โมเลกุลของ SDS ต่อทุกๆ กรดอะมิโน 2 ตัว หรือ 1.42 กรัม SDS/กรัมโปรตีน) เมื่อให้สนามไฟฟ้าโปรตีนแต่ละชนิดจะเคลื่อนที่เข้าหาขั้วบวก แต่จะแยกออกจากกันโดยอาศัยความแตกต่างของขนาดของโมเลกุลหรือน้ำหนักโมเลกุล วิธีนี้ใช้ในการหาน้ำหนักโมเลกุลโดยประมาณของสายโพลีเพปไทด์เช่นเดียวกับหน่วยย่อยของโปรตีน และเป็นวิธีที่ให้ผลเร็วมีประสิทธิภาพในการแยกสูง การทำอิเล็กโทรโฟรีซิสและการย้อมสามารถทำเสร็จภายใน 1 วัน โปรตีนที่แยกออกจากกันสามารถหาตำแหน่งได้โดยการย้อมสี ถ้าโปรตีนมีความเข้มข้นประมาณ 0.1 ไมโครกรัม สามารถให้แถบที่ชัดเมื่อย้อมด้วยโคแมสซีบลู (Coomassie Brilliant Blue) ถ้าความเข้มข้นของโปรตีนต่ำกว่า 10 นาโนกรัม ต้องใช้การย้อมด้วยวิธีการย้อมด้วยซิลเวอร์ (silver staining) (อาภัสสรา ชมิดท์, 2537)

7.2 แมสสเปกโทรเมตรี (Mass Spectrometry)

เป็นเทคนิคการตรวจสอบโครงสร้างและมวลโมเลกุลของสารประกอบ โดยอาศัยหลักการทำให้โมเลกุลของสารแตกตัวเป็นไอออนและไอออนที่เกิดขึ้นจะถูก

วัดตามอัตราส่วนของมวลต่อประจุของไอออนนั้นๆ การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแมสสเปกโทเมตรี สารตัวอย่างจะสูญเสียไปแต่ข้อดีของเทคนิคนี้ คือ มีความไว (Sensitivity) ในการวัดสูงทำให้ใช้สารตัวอย่างปริมาณน้อยมาก (พิมพ์จิต ดามพวรณ และ วัชรินทร์ รุกขไชยศิริกุล, 2548)

ในการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของแบคเทอริโอซินนิยมใช้วิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบ SDS-PAGE ในการวิเคราะห์เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย และรวดเร็ว แต่อาจเป็นปัญหาสำหรับแบคเทอริโอซินบางชนิด เช่น ในการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของ leucocin A-UAL 187 (Hasting *et. al*., 1991) Mesenteriocin Y105 (Piard *et. al*., 1992) และ Lactobin A (Contreras *et. al*., 1997) โดยวิธี SDS-PAGE หลังจากการย้อมสีด้วยสารละลาย Coomassei brilliant blue จะเกิดเป็นแถบโปรตีนที่กระจายตัวกว้าง (ดังภาพที่ 4) เนื่องมาจากแบคเทอริโอซินมีขนาดเล็ก และมีคุณสมบัติการเป็น Hydrophobic ทำให้แบคเทอริโอซินกระจายออกจากแผ่นเจลได้ ในขณะที่แบคเทอริโอซินบางชนิดไม่สามารถมองเห็นแถบโปรตีนเลย จากปัญหาเหล่านี้ทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของแบคเทอริโอซินได้ เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวจึงมีการใช้สีย้อมตัวอื่น เช่น silver stain มาใช้หรือใช้วิธีการแช่แผ่นเจลลงในสารละลาย formaldehyde เพื่อเพิ่มความไวในการติดสีของแถบโปรตีน (Verna *et. al*., 1997) หรือใช้เทคนิคอื่นในการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุล เช่น ในการทำบริสุทธิ์ Lactobin A จากเชื้อ *Lactobacillus amylovorus* LMG P-13139 ซึ่งเกิดปัญหาในการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี SDS-PAGE จึงนำเทคนิค Electrospray mass spectrometry (EMS) มาช่วยในการวิเคราะห์ (Contreras *et. al*., 1997) นอกจากนี้ Benoit และคณะ (1997) ยังใช้เทคนิค EMS เพื่อช่วยในการยืนยันผลการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลจากวิธี SDS-PAGE อีกด้วย



ภาพที่ 2 ลักษณะการกระจายตัวของแบคเทอริโอซินในการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของสาร

Figure 2 Bacteriocins appear to diffuse out of the polyacrylamide gel during the staining

Source : Contreras และคณะ (1997)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อพัฒนาสูตรอาหารในการผลิตแบคเทอริโอซินจากเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN 11 โดยใช้น้ำมะพร้าวและน้ำนึ่งปลาทูน่า โดยให้อาหารสำเร็จ MRS และอาหารดัดแปลง Medium I เป็นตัวเปรียบเทียบ

2. เพื่อศึกษาขั้นตอนการทำบริสุทธิ์แบคเทอริโอซินจากเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN 11

3. เพื่อทราบถึงคุณสมบัติบางประการของแบคเทอริโอซินที่ได้จากเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN 11