กิจกรรมการต้านจุลินทรีย์ของสารโมเลกุลเล็กที่ผลิตโดยแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่แยกจากอาหารหมัก

Antimicrobial Activity of Low Molecular Weight Compounds Produced by Lactic Acid Bacteria Isolated from Fermented Food

นิขจิตร คลองดี

Nikkajit Klongdee

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาวิทยา
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of
Master of Science in Microbiology
Prince of Songkla University
2555

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ กิจกรรมการต้านจุลินทรีย์ของสารโมเลกุลเล็กที่ผลิตโดยแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่แยกจากอาหารหมัก

ผู้เขียน นางสาวนิขจิตร คลองดี

สาขาวิชา จุลชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ดวงพร คันธโชติ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....

(รองศาสตราจารย์ วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล)

คณะกรรมการสอบ

..... ประธานกรรมการ

(ดร.ผุสดี ตังวัชรินทร์)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ดวงพร คันธโชติ)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรียานุช บวรเรืองโรจน์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา จุลชีววิทยา

.....

(ศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้เป็นผลมาจาการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และขอขอบคุณผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องทุกท่านไว้ ณ ที่นี้

ลงชื่อ.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ดวงพร คันธโชติ)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....
(นางสาวนิขจิตร คลองดี)
นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....
(นางสาวนิขจิตร คลองดี)
นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ กิจกรรมการต้านจุลินทรีย์ของสารโมเลกุลเล็กที่ผลิตโดยแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่แยกจากอาหารหมัก
ผู้เขียน นางสาวนิขจิตร คลองดี
สาขาวิชา จุลชีววิทยา
ปีการศึกษา 2555

บทคัดย่อ

การแยก แลคติกแอสิดแบคทีเรียจากอาหารหมักของไทยชนิดต่าง ๆ 51 ตัวอย่าง ได้จำนวน 320 ไอโซเลท พบว่ามีแลคติกแอสิดแบคทีเรียจำนวน 151 ไอโซเลท (47.19%) ที่เจริญได้ดีเยี่ยมในอาหาร MRS (OD_{660} nm > 1.5) เมื่อเลี้ยงครบ 18 ชั่วโมง จึงนำเชื้อดังกล่าวมาคัดเลือกต่อโดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ มาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารโดยวิธี agar well diffusion กับแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร 2 ชนิด คือ *Staphylococcus aureus* ATCC25923 และ *Salmonella* Typhi. PSSCMI0034 กรณีที่ไม่มีการปรับ pH (ค่าเฉลี่ย pH 3.83 ± 0.32) พบว่ามี 76 ไอโซเลท ที่ยับยั้ง *S.* Typhi PSSCMI0034 แต่มีเพียง 34 ไอโซเลท ที่ยับยั้ง *S. aureus* ATCC25923 และกรณีที่นำน้ำเลี้ยงเชื้อ ที่แยกเซลล์ออกมาปรับ pH เป็น 6.5 แล้วกรองผ่านแผ่นกรองขนาดรูพรุน 0.22 และ 0.45 ไมโครเมตร พบว่ามี แลคติกแอสิดแบคทีเรียเพียง 5 ไอโซเลท เท่านั้น คือ ไอโซเลท N2, YA031, NCB3, NCB15 และ NNA7 ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *S.* Typhi PSSCMI0034 หรือ *S. aureus* ATCC25923 ได้ โดยที่ไอโซเลท N2 และไอโซเลท NCB3 มีความสามารถดีกว่าไอโซเลทอื่นๆจึงนำไปศึกษาต่อ อย่างไรก็ตามน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ที่ปรับ pH เป็น 6.5 ของทั้งสองไอโซเลทไม่สามารถยับยั้ง ยีสต์และเชื้อราที่ทดสอบ (*Candida albicans* ATCC10231, *Rhodotorula* sp., *Aspergillus* sp. และ *Penicillium* sp.) แต่กรณีที่ทำให้เข้มข้นเป็น 10 เท่าในรูป freeze dried sample ที่ปรับ pH เป็น 6.5 ของไอโซเลท N2 พบว่าสามารถยับยั้ง *Aspergillus* sp. *C. albicans* ATCC10231, *Rhodotorula* sp. ได้เล็กน้อยเมื่อเทียบกับชุดควบคุม จากการศึกษาการเจริญของ แลคติกแอสิดแบคทีเรียไอโซเลท N2 และ NCB3 พบว่าทั้ง 2 ไอโซเลทเข้าสู่ช่วง log phase ในชั่วโมงที่ 5-20 และเข้าสู่ช่วง stationary phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 20-35 และพบว่าสารตัวอย่าง (Freeze dried sample) ความเข้มข้น 10 เท่า ที่ปรับ pH เป็น 6.5 ของทั้ง 2 ไอโซเลท แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S.* Typhi PSSCMI0034 ได้ในชั่วโมงที่ 15-20 (late log phase) ผลการเทียบเคียงเชื้อ ทั้งสองโดยอาศัยลักษณะทางด้านพันธุ์ศาสตร์โมเลกุล ของ 16S rRNA gene พบว่าไอโซเลท N2 จัดอยู่ในสกุล *Lactobacillus namurensis* strain Ln-15 และไอโซเลท NCB3 จัดอยู่ในสกุล *Lactobacillus farciminis* strain NBRC 107150

เมื่อนำสารตัวอย่าง ที่เข้มข้น 10 เท่า (10X Freeze dried sample) ของไอโซเลท N2 ปรับ pH ให้เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ มา treat ด้วยเอนไซม์ pronase E และ catalase พบว่าไม่เกิดการยับยั้งเชื้อทดสอบ *S.* Typhi PSSCMI0034 แสดงว่าสารที่ได้จาก ไอโซเลท N2 เป็นสารกลุ่มโปรตีน และมี H_2O_2 ร่วมด้วย และพบว่าสารตัวอย่าง (Freeze dried sample) ของไอโซเลท N2 มีความคงตัวดีในช่วง pH 2-6 สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 63ºC เป็นเวลา นาน 30 นาที โดยมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *S.* Typhi PSSCMI0034 ในช่วง pH และอุณหภูมิดังกล่าว และเทคนิค SDS-PAGE ถูกนำมาใช้เพื่อ วิเคราะห์หาโปรตีน ในสารตัวอย่าง (Freeze dried sample) ของไอโซเลท N2 โดยแยกได้ 1 แบนเป็นโปรตีนที่มี น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 47 KDa ซึ่งจากคุณสมบัติที่กล่าวมาแสดงว่าเชื้อผลิต แบคเทอริโอซิน โมเลกุลต่ำที่ไม่ทนความร้อนจัดอยู่ในกลุ่มแบคเทอริโอซิน class III จากนั้นยังได้นำสารตัวอย่าง (Freeze dried sample) ของไอโซเลท N2 สกัดด้วย ethyl acetate พบว่าค่า MIC ของสารสกัด ต่อการยับยั้ง *Clostridium perfringens* และ *Listeria monocytogenes* มีค่าเท่ากับ 79 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่กับ *Shigella sonneii* และ *S.* Typhi PSSCMI0034 เท่ากับ 635 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่กรณีของ ยีสต์ *Rhodotorula* sp. และ *C. albican* ATCC10231 มีค่า เท่ากับ 2.54 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แ ต่สำหรับ *Saccharomyces cerevisiae* เท่ากับ 0.159 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับค่า MBC ของสารสกัดต่อ *C. perfringen, S. sonneii* และ *S.* Typhi PSSCMI0034 เท่ากับ 1.27 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่กรณียีสต์ *Rhodotorula* sp. และ *C. albican* ATCC10231 มีค่าเท่ากับ 2.54 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่ง มีค่าเท่ากับ MIC เช่นเดียวกับ *L. monocytogenes* ที่ค่า MIC เท่ากับค่า MBC แต่ยีสต์ *S. cere visiae* มีค่า MBC 635 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อตรวจหาชนิดของสารสกัดจากตัวอย่างโดยใช้เครื่อง GC-MS โดยสาร ที่พบ ปริมาณ มากที่สุด คือ pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4dione, hexahydro-3-(pheny lmethyl) โดยมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 244.289 และเมื่อนำสารที่สกัด ด้วย ethyl acetate ของ เชื้อดังกล่าวมาแยกโดยใช้เทคนิค TLC แล้วนำแบนที่แยกได้ไปทดสอบการยับยั้งเชื้อพบว่ามี 3 แบนจาก 9 แบนที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *S.* Typhi PSSCMI 0034 และเมื่อนำไปวิเคราะห์หาชนิด ของสารโดยใช้เครื่อง GC-MS สามารถ วิเคราะห์บ่งชี้ชนิดของสาร ได้เพียง 1 แบน คือ Octadecenamide ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 281.477

ดังนั้นจากผลการทดลองพบว่า *Lactobacillus namurensis* N2 ผลิตสารโมเลกุลขนาด เล็กหลายชนิดที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค รวมทั้งยีสต์และราเส้นใย

คำสำคัญ : แลคติกแอสิดแบคทีเรีย , อาหารหมักไทย , ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย , ฤทธิ์ต้านเชื้อรา, แบคเทอริโอซิน

Thesis Title	Antimicrobial Activity of Low Molecular Weight Compounds Produced by Lactic Acid Bacteria Isolated from Fermented Food
Author	Miss Nikkajit Klongdee
Major Program	Microbiology
Academic Year	2012

Abstract

A total of 320 lactic acid bacteria (LAB) strains were isolated from 51 samples of Thai fermented food. Over 18 hr incubation, only 151 isolates (47.19%) of LAB were able to grow very well in MRS medium (OD660nm > 1.5) and they were secondary screened for their production of compounds that inhibited the growth of foodborne pathogens, *Staphylococcus aureus* ATCC25923 and *Salmonella* Typhi PSSCMI0034 using an agar well diffusion assay. There were 76 LAB isolates that their cell free supernatants without adjustment of pH (average pH 3.83 ± 0.32) inhibited *S.* Typhi PSSCMI0034 but only 34 isolates inhibited *S. aureus* ATCC25923. In case culture supernatant of LAB were adjusted to pH 6.5 and then filtration using membrane filters with a pore size of either 0.45 μm or 0.22 μm found that only the following 5 LAB isolates; N2, NCB3, NCB15, NNA7 and YA031 exhibited antibacterial activity against *S.* Typhi PSSCMI0034 or *S. aureus* ATCC25923. However, there were only 2 isolates (N2 and NCB3) were selected for further studies due to their higher antibacterial activities. Cell free supernatant of both isolates after adjustment pH to 6.5 could not inhibit the following fungi; *Candida albicans* ATCC10231, *Rhodotorula* sp., *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. but 10X culture filtrate (freeze dried sample) of isolate N2 had a little antifungal activity toward *Aspergillus* sp. *C. albicans* ATCC10231 and *Rhodotorula* sp. when compared with the control. According to the growth curve of both isolates in MRS medium, they reached their log phase in a range of 5-20 hr and after that to stationary phase until 35 hr of incubation. Antibacterial activity of both isolates against the growth of *S.* Typhi PSSCMI0034 was observed when cells grew in a late log phase (15-20 hr). The analysis of 16S rRNA sequence was used for bacterial identification. The results showed that, N2 and NCBC3 isolates were identified as *Lactobacillus namurensis* strain Ln-15 and *Lactobacillus farciminis* strain NBRC 107150, respectively.

A 10X freeze dried sample from isolate N2 was adjusted pH corresponding to optimal pH of each enzyme activity as treating with pronase E and catalase. After treatment by both enzymes, no antibacterial activity remained as no inhibition of *S.* Typhi PSSCMI0034 was observed. This suggested that antibacterial substances could be protein and a little hydrogen peroxide. The freeze dried sample from isolate N2 showed that its antibacterial activity was stable at pH 2-6 and the temperature at 63 ๐C for 30 min by inhibiting the growth of *S.* Typhi PSSCMI0034. Sodium Dodecyl Sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was used to determine molecular masses of proteins in the freeze dried sample of isolate N2 and obtained one band with the molecular mass 47 KDa. Based on characteristics of freeze dried sample as described above the detected protein should be classified as bacteriocin class III due to its low molecular weight and heat labile. In addition, the freeze dried sample of isolate N2 was also extracted with ethyl acetate and the extract (EtOAc) was used to determine MIC and MBC values. The MIC value of EtOAC against the growth of *C. perfringens* and *L. monocytogenes* was 79 µg/ml but it was higher for *S. sonneii, S.* Typhi PSSCMI0034 (635 µg/ml). In contrast, a higher of MIC value was found in yeasts (*C. albicans* ATCC10231 and *Rhodotorula* sp.) as 2.54 mg/ml but it was only 0.159 mg/ml for *S. cerevisiae*. The MBC value of EtOAc extract to control *C. perfringen, S. sonneii* and *S.* Typhi PSSCMI0034 was 1.27 mg/ml while it was 2.54 mg/ml in case of yeasts (*C. albicans* ATCC10231 and *Rhodotorula* sp.). However*, S. cerevisiae* was sensitive to EtOAc extract as its MBC was 635 µg/ml. *L. monocytogenes* was also sensitive to EtOAc extract as the values of MIC and MBC was equal. The EtOAc extract was further analyzed for antimicrobial compounds by GC-MS analysis. The major component of the EtOAc extract was identified as pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4 dione, hexa hydro-3-(phenylmethyl) (molecular weight 244.289). Moreover, the EtOAc-N2 was also separated by thin layer chromatography (TLC) and three of the nine bands showed ability to inhibit the growth of *S.* Typhi PSSCMI0034 and the compounds were identified by GC-MS analysis. However, only one band could identify as octadecenamide (MW. 281.477). It can conclude that *L. namurensis* N2 produced low molecular weight com pounds to inhibit bacterial pathogens, yeasts and filamentous fungi.

Keyword : lactic acid bacteria, Thai fermented food, antibacterial activity, antifungal activity, bacteriocins

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รศ .ดร. ดวงพร คันธโชติ ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ. วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผศ.ดร. ปรียานุช บวรเรืองโรจน์ ประธานกรรมก าร สอบวิทยานิพนธ์ และ ดร. ผุสดี ตังวัชรินทร์ อาจารย์จากคณะเทคโนโลยี และการพัฒนาชุ มชน มหาวิทยาลัยทักษิณ กรรมการผู้ ทรงคุณวุฒิ ที่ให้ความรู้ คำแนะนำและตรวจทานแก้ไข วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้นทำให้วิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ ศ.ดร.สุทธวัฒน์ เบญจกุล ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร รศ.ดร. ประภาพ ร อุทารพันธุ์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ และ ศ. ดร.วิมล ตันติไชยากุล คณะเภสัชศาสตร์ ที่ให้คำปรึกษาและเอื้อเฟื้ออำนวยความสะดวกด้านอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทำงานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณพี่และน้อง เพื่อนๆ ปริญญาโทและปริญญาเอกภาคจุลชีววิทยาทุก ท่านที่ให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือ

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่คอยให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจให้กันเสมอมา

นิขจิตร คลองดี

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(10)
รายการตาราง	(11)
รายการรูป	(12)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(15)
บทที่	
1. บทนำ	
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	22
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	
วัสดุและอุปกรณ์	23
วิธีการทดลอง	26
3. ผลการทดลอง	39
4. วิจารณ์ผลการทดลอง	65
5. สรุป	72
รายการเอกสารอ้างอิง	74
ภาคผนวก ก	79
ภาคผนวก ข	83
ประวัติผู้เขียน	113

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
3-1	จำนวนไอโซเลทของแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่สามารถแยกได้จากอาหารหมักของไทย	39
3-2	การเจริญของแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่คัดแยกจากอาหารหมักชนิดต่างๆ เมื่อเลี้ยงในอาหาร MRS broth เป็นเวลา 18 ชั่วโมง	40
3-3	ฤทธิ์ต้าน *Salmonella* Typhi. PSSCMI0034 ของน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์แลคติกแอสิดแบคทีเรียที่ไม่ผ่านการปรับ pH	42
3-4	ฤทธิ์ต้าน *Staphylococcus aureus* ATCC25923 ของน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์แลคติกแอสิดแบคทีเรียที่ไม่ผ่านการปรับ pH	42
3-5	ฤทธิ์ต้าน *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Salmonella* Typhi. PSSCMI 0034 ของไอโซเลทที่คัดแยกได้โดยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ปรับ pH เป็น 6.5	43
3-6	ผลของอุณหภูมิต่อฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารตัวอย่าง (Freeze dried Sample) ความเข้มข้น 10 เท่า ที่ได้จากแลคติกแอสิดแบคทีเรียไอโซเลท N2 ในการยับยั้งการเจริญของ *Salmonella* Typhi. PSSCMI0034 เมื่อทดสอบโดยวิธี agar well diffusion assay	51
3-7	ผลของ pH ต่อฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารตัวอย่าง (Freeze dried Sample) ที่มีความเข้มข้น 10 เท่า ที่ได้จากแลคติกแอสิดแบคทีเรียไอโซเลท N2 ในการยับยั้งการเจริญของ *Salmonella* Typhi. PSSCMI0034 เมื่อทดสอบโดยวิธี agar well diffusion assay	52
3-8	การเทียบเคียงโดยวิธีการแบบดั้งเดิมตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 2 (1986)	55
3-9	การเทียบเคียงแลคติกแอสิดแบคทีเรียโดยใช้ API 50 CH (BioMerieux, France)	56
3-10	เปอร์เซ็นต์บ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียแลกติกโดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CH	57
3-11	การเทียบเคียงสายพันธุ์แลคติกแอสิดแบคทีเรียไอโซเลท N2 และไอโซเลท NCB3 โดยใช้ 16S rDNA sequence analysis	57
3-12	ค่า MIC, MBC และ MFC ของสารสกัดหยาบของ *L. namurensis* N2	59
13	แสดงส่วนประกอบเจล (polyacrylamide gel)	83

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1-1	วิถี Phosphoketolase ของแลคติกแอสิดแบคทีเรียกลุ่ม Heterofermentative	6
1-2	วิถี Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) ของแบคทีเรียแลกติกกลุ่ม Obligately Homofermentative	7
3-1	ฤทธิ์ต้าน *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Salmonella* Typhi. PSSCMI0034 (a: 19.4 และ b: 24.3 มิลลิเมตร) จากน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของไอโซเลท NN13 ที่ไม่มีการปรับ pH (3.6)	44
3-2	ฤทธิ์ต้าน *Salmonella* Typhi. PSSCMI0034 จากน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ก่อนและหลังปรับ pH เป็น 6.5 และกรองผ่านแผ่นกรองขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร ตามลำดับ โดยไอโซเลท N2 (a, 21.6: c, 19.0 มิลลิเมตร) และ YA031 (b, 20.5: d, 18.5 มิลลิเมตร)	44
3-3	ฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Aspergillus* sp. จากสารตัวอย่าง (Freeze dried Sample) ความเข้มข้น 10 เท่า ของไอโซเลท N2 โดยกรองผ่านแผ่นกรองขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร (a; 4% 10xMRS, b; 4% 10xFDS ที่ไม่ปรับ pH, c-d; 3 และ 4% 10xFDS pH 6.5)	45
3-4	ฤทธิ์ต้าน *Candida albicans* ATCC 10231 จากสารตัวอย่าง (Freeze dried Sample) ความเข้มข้น 10 เท่า ของเชื้อไอโซเลท N2 โดยกรองผ่านแผ่นกรองขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร (a; 4%10xMRS, b; 4% 10xFDS ที่ไม่ปรับ pH, c-d; 3 และ 4% 10xFDS pH 6.5)	46
3-5	ฤทธิ์ต้าน *Rhodotorula* sp. จากสารตัวอย่าง (Freeze dried Sample) ความเข้มข้น 10 เท่า ของเชื้อไอโซเลท N2 โดยกรองผ่านแผ่นกรองขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร (a; 4%10xMRS, b; 4% 10xFDS ที่ไม่ปรับ pH, c-d; 3 และ 4% 10xFDS pH 6.5)	46
3-6	การเจริญและค่าพีเอชของแลคติกแอสิดแบคทีเรีย N2 และ NCB3 ที่เลี้ยงในอาหาร MRS broth	47
3-7	ผลของเอนไซม์ต่อฤทธิ์ต้าน *Salmonella* Typhi. PSSCMI0034 ในช่วงชั่วโมงที่ 15 (a) และ 20 (b) ของ Freeze dried sample ที่ได้จากไอโซเลท N2 (1; 10xMRS, 2; 10xFDS (12 มิลลิเมตร), 3; 10xFDS pH 6.5 (14 มิลิเมตร), 4; 10xFDS pH7.0 + Catalase, 5; 10xFDS pH7.8+ Pronase)	48

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
3-8	ผลของเอนไซม์ต่อ ฤทธิ์ต้าน *Salmonella* Typhi. PSSCMI0034 (a) และ *Staphylo coccus aureus* ATCC 25923 (b) ของ Freeze dried sample ที่ได้จากไอโซเลท NCB3 (1; 10xMRS, 2; 10xFDS, 3; 10xFDS pH 6.5, 4; 10xFDS pH7.0 + Cata lase, 5; 10xFDS pH7.8 + Pronase)	49
3-9	ผลการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสารตัวอย่าง (Freeze dried sample) ความเข้มข้น 10 เท่า ของ *Lactobacillus namurensis* N2 โดยใช้เทคนิค SDS-PAGE แถบที่: M, Low Molecular Weight markers; 1, 2 และ 3 สารตัวอย่าง (Freeze dried sample) ละลายด้วย 50 mM Tris-HCl pH 6.8	53
3-10	แผนภูมิต้นไม้ (Phylogenic tree) จากลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของแลคติกแอสิดแบคทีเรียไอโซเลท N2 และไอโซเลท NCB3	58
3-11	ลักษณะของแถบบนแผ่น Thin Layer Chromatography (TLC) ซึ่งทดสอบการสร้างสาร สารต้านจุลินทรีย์ แถบที่ 1; MRS, 2; 10xFDS, 3; 10xFDS pH 6.5, 4; supernatant pH 5.2, 5; supernatant pH 6.5	60
3-12	ลักษณะของแถบบนแผ่น Thin Layer Chromatography (TLC) ซึ่งทดสอบความสามารถ ในการผลิตสารต้านจุลินทรีย์ (แถบที่ 1,2 และ 3; สารสกัดของ แลคติกแอสิดแบคทีเรียไอโซเลท N2, 4; สารสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth)	61
3-13	ฤทธิ์ต้าน *Salmonella* Typhi. PSSCMI0034 ของสารที่แยกได้บนแผ่น TLC (c; สารสกัดของแลคติกแอสิดแบคทีเรียไอโซเลท N2, b7, b8 และ b9; สารสกัดจุดที่ 7, 8 และ 9 ตามลำดับ)	62
3-14	โครมาโตแกรมของสารสกัดด้วย ethyl acetate ของ *Lactobacillus namurensis* N2 ที่ผ่านการแยกชนิดของสารโดยใช้เทคนิค TLC ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS	63
3-15	โครงสร้างของสาร pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione,hexahydro-3(phenylmethyl)	63

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
3-16	โครมาโตแกรมของสารสกัดด้วย ethyl acetate ของ *Lactobacillus namurensis* N2 ที่ผ่านการแยกชนิดของสารโดยใช้เทคนิค TLC ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS	64
3-17	โครงสร้างของสาร Octadecenamide	64

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

CFU	=	Colony forming unit
°C	=	Degree Celsius
g	=	Gram
GC-MS	=	Gas chromatography mass spectrometry
LAB	=	Lactic Acid Bacteria
L	=	Liter
mg	=	Milligram
ml	=	Milliliter
Rf	=	Retardation factor
rpm	=	Revolution Per Minute
TLC	=	Thin-Layer Chromatography
SDS-PAGE	=	Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
µl	=	Microliter
%	=	Percentage

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ในปัจจุบันนี้การใช้ยาปฏิชีวนะยังคงมีมากขึ้นเรื่อยๆ และปัญหาหนึ่งที่เกิดกับการใช้คือการดื้อยาของ แบคทีเรียมากขึ้น ดังนั้นการศึกษาหาสารที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ซึ่งมีสมบัติต้านจุลินทรีย์ที่ก่อโรคเพื่อให้ได้สารชนิดใหม่จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่จะมีประโยชน์อย่างมากในการต่อสู้กับโรคติดเชื้อและลดปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะ สำหรับสารยับยั้งจุลินทรีย์กลุ่มเพปไทด์ซึ่งเป็นสารที่มีโมเลกุลเล็กรวมถึงสารโมเลกุลเล็กอื่นๆ ซึ่งมีการค้นพบมาเป็นระยะโดยสารในกลุ่มนี้สามารถผลิตได้จากพืชและจุลินทรีย์จึงอาจมีศักยภาพที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์และอุตสาหกรรมอาหารในลักษณะของสารถนอมกันเสียชีวภาพ (biopreservative compounds) ได้ในอนาคตและจะช่วยลดปัญหาการดื้อยาของเชื้อได้ จากการปนเปื้อนของ ยาปฏิชีวนะในอาหาร และจากการที่อาหารเป็นแหล่งของจุลินทรีย์โดยเฉพาะอาหารหมักเป็นแหล่งของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ เช่น แลคติกแอสิดแบคทีเรีย

แลคติกแอสิดแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียที่พบได้ตามธรรมชาติและพบมากในอาหารหมักที่ทำมาจาก ผัก ผลไม้ ธัญพืช และเนื้อสัตว์ แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถสังเคราะห์สารอินทรีย์โดยบางสายพันธุ์สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซิน (bacteriocins) รวมทั้งโปรตีนหรือเพปไทด์หรือสารที่มีโมเลกุลเล็กอื่นๆ ที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์หลายชนิด โดยแลคติกแอสิดแบคทีเรียเหล่านี้มักแยกมาจากอาหารหมัก สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดได้ โดยเฉพาะเชื้อก่อโรคทางเดินอาหาร (Nes, Yoon, and Diep, 2007) ดังนั้นจึงมีความปลอดภัยและเหมาะที่จะนำไปประยุกต์ใช้ได้ อาหารหมักของไทยที่นิยมบริโภคกันมาก เช่น แหนม ซึ่งมักมีการตรวจพบเชื้อก่อโรค เช่น *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* spp. ทำให้ผลิตภัณฑ์ดังกล่าวอาจเกิดความเสี่ยงต่อผู้บริโภคได้ (นิภา, 2552) นอกจากนี้แลคติกแอสิดแบคทีเรียยังได้รับการยอมรับว่าเป็นแบคทีเรียที่ปลอดภัย (Generally Recognized As Safe ; GRAS status) (Duangjitcharoen *et al.*, 2009) ดังนั้นจึงมีความปลอดภัยและเหมาะที่จะนำไปประยุกต์ใช้เป็นกล้าเชื้อเพื่อผลิตอาหารต่างๆได้ เช่น อาหารหมักดองหรือผลิตภัณฑ์จากนม เป็นต้น เพื่อเป็นการป้องกันโรคติดเชื้อของระบบทางเดินอาหาร

แบคเทอริโอซิน (Bacteriocin) เป็นสารกลุ่มโปรตีนที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่น มีการจัดจำแนกออกเป็นหลายกลุ่มแบ่งตามลักษณะโครงสร้างและกลไกการออกฤทธิ์ สำหรับสาร แบคเทอริโอซินที่สร้างจากแลคติกแอสิดแบคทีเรียส่วนใหญ่จะเป็นเชื้อที่แยกมาจากอาหาร มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอื่นและทนความร้อน ดังนั้นจึงเหมาะแก่การนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ซึ่งปัจจุบันแบคเทอริโอซินที่นิยมนำมา ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น ไนซิน (nisin) มีการนำไปใช้ในอาหารเป็นสารกันเสียทางชีวภาพช่วยยืดอายุของอาหารและเพิ่มความปลอดภัยในอาหาร Coppola *et al*., (2000) พบว่า *Lactobacillus sakei* หรือ *Lactobacillus curvatus* ถูกนำมาใช้เป็นกล้าเชื้อทางการค้าสำหรับใช้ในอาหารหมักจำพวกเนื้อสัตว์ เช่น ไส้กรอกโดยที่เชื้อดังกล่าวสามารถผลิตแบคเทอริโอซิน Budde *et al*., (2005) ได้คัดแยกแลคติกแอสิดแ บคทีเรียจากอาหารหมักประเภทเนื้อ พบ ว่ามี 2 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้ง *S. aureus* และมีความ ในการสร้างแบคเทอริโอซิน เมื่อเทียบเคียงแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่แยกได้พบว่าเป็นเชื้ อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* และ *Pediococcus pentosaceus* ซึ่งสามารถผลิตไนซินและเพดดิโอซินได้ตามลำดับ โดยแบคเทอริโอซินที่เชื้อสร้างขึ้นมีสมบัติในการทนคว ามร้อนได้ดีและมีความคงตัวในช่วง pH 4-6 เหมาะแก่การนำไปเป็นกล้าเชื้อในอาหารหมัก

Kantachote *et al*., (2010) ได้คัดแยกแลคติกแอสิดแบคทีเรียจากน้ำหมักชีวภาพจากพืชและอาหารหมักชนิดต่าง ๆ พบว่าเชื้อ *Lactobacillus plantarum* DW3 ที่คัดแยกได้มีความสามารถยับยั้งยีสต์ *Rhodotorula mucilaginosa* DKA ที่ปนเปื้อนในน้ำหมักชีวภาพจากพืชได้ดี และยังสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่พบในอาหารได้ จากการศึกษาด้วยเทคนิค Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) พบว่าสารที่เชื้อดังกล่าวสร้างคือสาร phenyllactic acid (PLA) ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย ยีสต์ และราบางชนิดได้ โดยเชื้อผลิต PLA ได้ 31 mg/ml ในอาหาร MRS และเมื่อใช้เ ป็นกล้าเชื้อในการทำน้ำหมักสาหร่ายผมนาง พบว่าเชื้อมีบทบาทในการควบคุมปริมาณยีสต์ที่ปบเปื้อนมากับวัตถุดิบโดยสามารถควบคุมยีสต์ให้ต่ำกว่า 100 CFU/ml เมื่อสิ้นสุดการหมักที่ 60 วัน

ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งศึกษาคัดเลือกแลคติกแอสิดแบคทีเรียจากอาหารหมักที่ผลิตสารกลุ่มเพปไทด์หรือสารโมเลกุลเล็กที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรค ในระบบทางเดินอาหาร และทำให้อาหารเน่าเสียเพื่อควบคุมการเจริญของเชื้อก่อโรคที่อาจพบได้โดยเฉพาะในอาหารเพื่อเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมโดยเฉพาะอาหารหมักต่อไป

การตรวจเอกสาร

1. แลคติกแอสิดแบคทีเรีย

ลักษณะทั่วไป

แลคติกแอสิดแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียย้อมติดสีแกรมบวก มีรูปร่างกลม หรือรูปท่อน บางชนิดเรียงตัวกันสี่เซลล์ ไม่สร้างสปอร์ โดยทั่วไปไม่เคลื่อนที่แต่ถ้ามีการเคลื่อนที่ใช้แฟลกเจลลารอบตัว ไม่สร้างเอนไซม์ catalase ต้องการอาหารที่ซับซ้อนในการเจริญ (วิลาวัณย์, 2539) นอกจากนี้ยังพบว่าแลคติกแอสิด แบคทีเรียบางชนิดอาจสร้างเอนไซม์ catalase เทียม (pseudocatalase) และการจัดเรียงตัวจะต่อไปในทิศทางเดียวกัน ยกเว้น *Pediococcus* sp. ที่ต่อกันเป็นคู่ ต้องการอากาศเล็กน้อย (microaerophilic) หรือ ไม่ต้องการอากาศ (facultative anaerobe) ในการเจริญ ใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอน ทนกรด อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ระหว่าง 30-44 องศาเซลเซียส pH ที่เหมาะสม 5.58-6.2 แต่โดยทั่วไปเจริญได้ที่ pH 5 อัตราการเจริญลดลงเมื่ออยู่ ในสภาวะที่ เป็นกลางหรือเป็นด่าง ผลิตกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักในกระบวนการหมัก (Salminen and Wright, 1993) แลคติกแอสิดแบคทีเรียเข้ามามีบทบาทในการผลิตอาหารหมักชนิดต่าง ๆอย่างมากโดยกิจกรรมหลักของแลคติกแอสิดแบคทีเรียต่อผลิตภัณฑ์อาหารคือหมักคาร์โบไฮเดรตในส่วนผสมของอาหารให้ เป็นกรดแลค ติก กรดอะซิติก เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งสารเหล่านี้ทำให้ผลิ ตภัณฑ์หมักที่ได้มีกลิ่นรสเฉพาะ นอกจากนั้นยังอาจมีการสารผลิตภัณฑ์บางอย่างที่มีคุณสมบัติเป็นสารต่อต้านจุลินทรีย์ชนิดอื่น เช่น แบคเทอริโอซิน (Hammers, 1987 อ้างโดย อนุสรา, 2550)

แหล่งที่พบ

แลคติกแอสิดแบคทีเรียมักพบได้ในอาหารหมักหลายชนิด ซึ่งส่วนใหญ่เป็นแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่ปนเปื้อนมาจากผลิตผลทางการเกษตร และเครื่องมือที่เกี่ยวข้องกับการแปรรูปผลิตผลทางการเกษตร นอกจากนี้ยังพบแลคติกแอสิดแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์นม ธัญพืช ปลา ไวน์ ผลไม้ น้ำผลไม้ และผัก ผลไม้ดอง และยังพบว่าเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในช่องปาก ทางเดินอาหารและอวัยวะสืบพันธุ์ (สุพรรษา, 2550) ได้มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องในการใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียกลุ่มนี้ เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตอาหารหมักหลายชนิด เช่น ไส้กรอกหมัก ผลิตภัณฑ์นมหมัก (ปิ่นมณี, 2547)

ความต้องการสารอาหาร

แลคติกแอสิดแบคทีเรียเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่ต้องการอาหารที่ซับซ้อนในการเจริญ (fastidious microorganism) สามารถใช้น้ำตาลได้หลายประเภท เช่น monosaccharide ประเภท pentose (arabinose ribose และ xylose) และ hexose (fructose glucose และ mannose) disaccharide (maltose และ lactose) นอกจากนี้ยังสามารถใช้คาร์โบไฮเดรต พวก oligosaccharide ซึ่งเป็นพรีไบโอติก (prebiotic) เช่น fructooligosacchairde ซึ่งในระบบทางเดินอาหารไม่มีเอนไซม์ที่จะย่อยคาร์โบไฮเดรตชนิดนี้ได้ จึงเหลือเป็ นอาหารให้แลค ติกแอสิดแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่ได้ นอกจากนี้แลคติกแอสิดแบคทีเรียต้องการอาหารที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ หากในอาหารขาดแหล่งไนโตรเจนจะทำให้แลคติกแอสิดแบคทีเรียเจริญได้น้อยมาก สำหรับกรดอะมิโนที่เชื้อ ต้องการ คือ serine และ arginine วิตามินที่เชื้อใช้ในการเจริญได้แก่ thiamine (B1) riboflavin (B2) pyriodoxin (B6) cyanocobalamine (B12) และ nicotinic acid (สุพรรษา, 2550)

การจัดจำแนกแลคติกแอสิดแบคทีเรีย

การจัดกลุ่มของแลคติกแอสิดแ บคทีเรียในสกุลต่างๆ ขึ้นอยู่กับ รูปร่างลักษณะรูปแบบการหมักน้ำตาลกลูโคส กา รใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ การใช้อะซิเต ต การสร้างแอมโมเนียจากอาร์จินีน การเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ การผลิตกรดแลกติก การเจริญในที่มีเก ลือความเข้มสูง การทนกรดหรือด่าง (Axelsson, 2004) เมื่อพิจารณาจากการใช้น้ำตาลของแลคติกแอสิดแบคทีเรียสามารถจำแนกได้เป็น 3 กลุ่ม (Hammes and Vogel, 1995; Axelsson, 2004) คือ

1. Facultatively heterofermentative

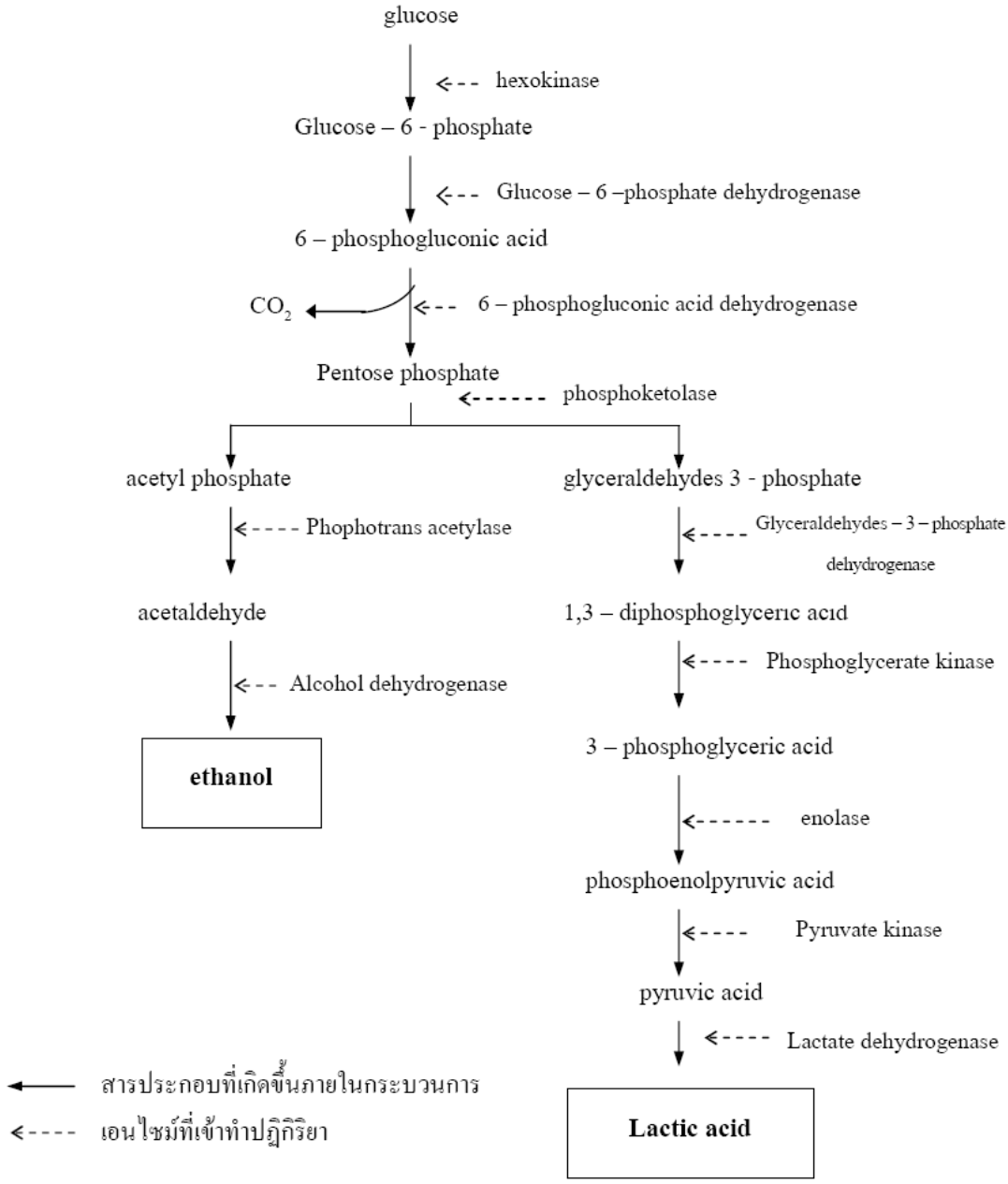
คือ แลคติกแอสิดแบคทีเรียที่หมักน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาล pentose เช่น ara binose ribose และ xylose แล้วให้ผลผลิตเป็นกรดแลคติก กรดอะซิติกหรือเอทานอลและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ได้ทั้งในสภาพที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน แลคติกแอสิดแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถผลิตกรดแลคติกผ่านวิถี phosphoketolase เพราะมีเอนไซม์ phosphoketolase (รูปที่ 1-1) และแบคทีเรียในกลุ่มนี้ยังมีเอนไซม์ aldolase ที่ผลิตกรดแลคติกจากน้ำตาล hexose ได้โดยผ่านวิถี Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) (รูปที่ 1-2) ตัวอย่างแบคทีเรียในกลุ่มนี้ได้แก่ *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentose*, *Pediococcus acidilactici* และ *Entero coccus faecium*

2. Obligately heterofermentative

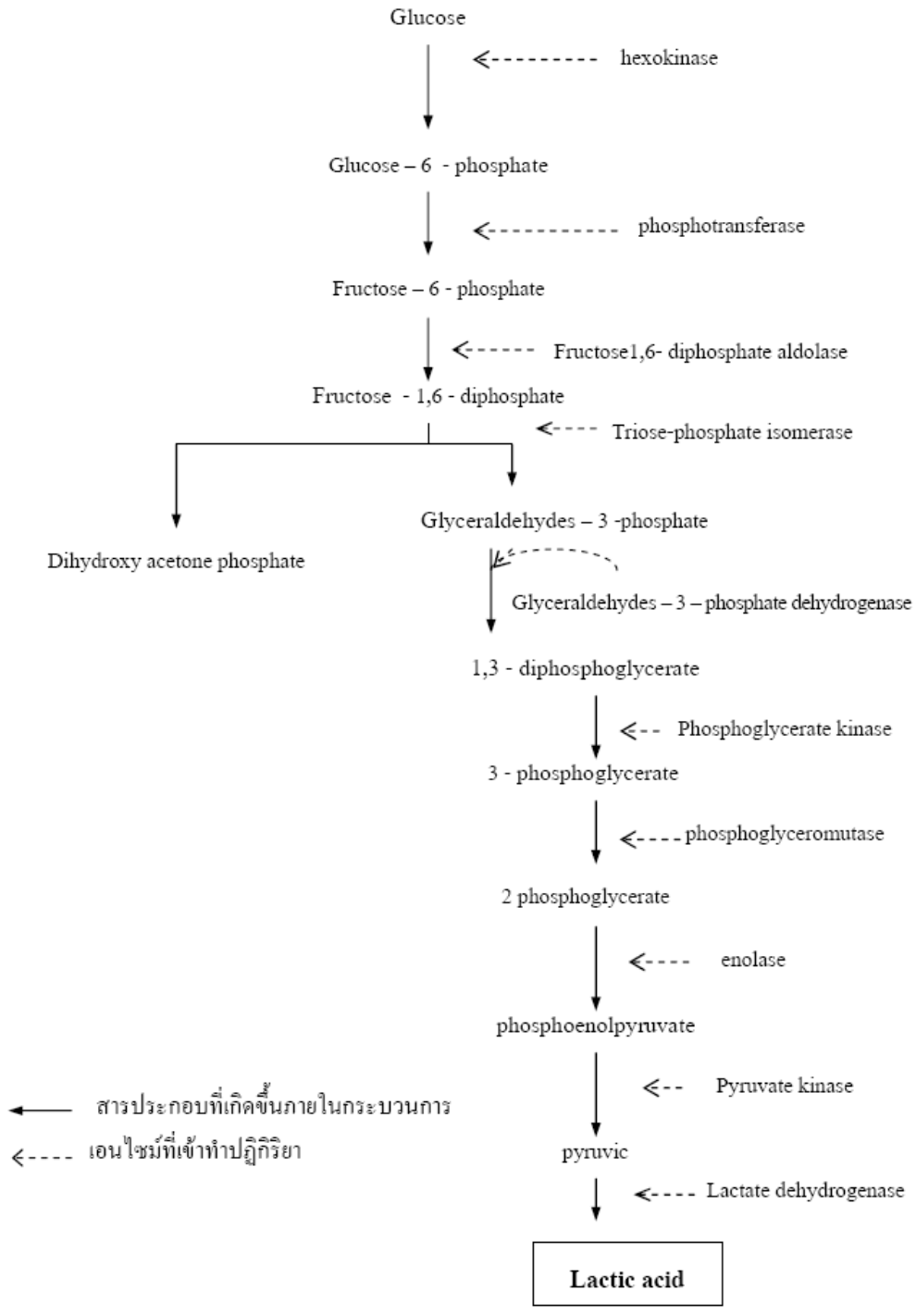
คือ แลคติกแอสิดแบคทีเรียที่หมักน้ำตาลกลูโคสให้ผลผลิตเป็นกรด แลคติก กรดอะซิติกหรือเอทานอล และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ สำหรับแลคติกแอสิดแบคทีเรียในกลุ่มนี้จะใช้น้ำตาลผ่านวิถี phosphogluconate หรือ phosphoketolase (รูปที่ 1-1) เท่านั้น เนื่องจากไม่มีเอนไซม์ aldolase จึงไม่สามารถใช้น้ำตาลผ่านวิถี Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) ได้ ตัวอย่างแลคติกแอสิดแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้แก่ กลุ่มของ Leuconostoc และกลุ่มของ Lacto bacillus บางชนิด เช่น *L. brevis* และ *L. buchneri* ซึ่งแลคติกแอสิดแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถใช้น้ำตาล hexose และ pentose ได้ดี

3. Obligately homofermentative

คือ แลคติกแ อสิดแบคทีเรียที่หมักน้ำตาลกลูโคสผ่านวิถี Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) (รูปที่ 1-2) แล้วให้ผลผลิตเป็นกรดแลคติกเพียงอย่างเดียว โดยใช้เอนไซม์ 1,6-biphosphate aldolase สำหรับแลคติกแอสิดแบคทีเรียในกลุ่มนี้สามารถผลิตกรดแลคติกได้มากกว่า 85% จากน้ำตาล hexose ตัวอย่างแลคติกแอสิดแบคทีเรียในกลุ่มนี้ ได้แก่ *Pedio coccus danosus* และ *L. ruminis* เป็นต้น และเนื่องจากแลคติกแอสิดแบคทีเรียกลุ่มนี้ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ phosphoketolase จึงไม่สามารถใช้น้ำตาล pentose และ gluconate ได้



รูปที่ 1-1 วิถี Phosphoketolase ของแลคติกแอสิดแบคทีเรียกลุ่ม Heterofermentative (Aarnikunnas, 2006 ดัดแปลงจาก Axelsson, 2004)



รูปที่ 1-2 วิถี Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) ของแบคทีเรียแลกติกกลุ่ม Obligately Homofermentative (Salminen et al., 1998)

2. สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive Compounds)

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แลคติกแอสิดแบคทีเรียผลิตออกมายับยั้งการเจริญของแบคทีเรียหรือจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ได้แก่

2.1 กรดอินทรีย์ (organic acids)

กรดอินทรีย์ที่สร้างจากแลคติกแอสิดแบคทีเรียสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้หลายชนิด โดยกรดอินทรีย์ที่เชื้อสร้างขึ้นจะแพร่เข้าสู่เยื่อหุ้มเ ซลล์ เกิดการแตกตัวในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ทำให้เกิดสภาวะที่เป็นกรด ยับยั้งกระบวนการเมแทบอลิซึมที่จำเป็นต่อเซลล์จึงทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Fuller, 1989)

2.1.1 กรดแลคติก (lactic acid)

กรดแลคติกเป็นกรดที่เกิดจากการที่แลคติกแอสิ ดแบคทีเรียเปลี่ยนน้ำตาลในอาหาร ทำให้ pH ของอาหารลดลงมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ทำให้อาหารเน่าเสีย นอกจากนี้ยังใช้ในทางเภสัชกรรมและอุตสาหกรรมอื่นๆอีกด้วย กรดแลคติกที่เกิดจากกระบวนการหมักอาจอยู่ในรู ป L หรือ D เป็นกรดที่นิยมนำมาใช้ในอาหารโดยเฉพาะในผลิตภัณฑ์อาหารหมักดองประเภทต่างๆ เพื่อเป็นสารให้กลิ่นรส ควบคุม pH ของอาหาร และช่วยในการถนอมอาหาร (อรวินทร์, 2532) ได้มีรายงานของเยาวลักษณ์ (2536) พบว่าผลิตภัณฑ์พวกไส้กรอกที่เติมโซเดียมแลกเตท ร้อยละ 1.0 จะช่วยยืดอายุการเก็บรักษาได้เมื่อใช้ในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์สามารถลดจำนวนจุลินทรีย์พวก *Samonella* sp. ได้เป็นอย่างดี

2.1.2 กรดอะซิติก (acetic acid)

กรดอะซิติกนี้มีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ จากรายงานของเยาวลักษณ์ (2536) พบว่า การใช้กรดอะซิติกใช้ในผลิตภัณฑ์หมักดองต่างๆ เช่น ไส้กรอกเปรี้ยว โดยกรดอะซิติกมีคุณสมบัติเป็นสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย เช่นการทดลองของ Dickson (1992) ได้ใช้เนื้อวัวที่มีการเติม *S. typhimurium* มาทดสอบกับกรดอะซิติกที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2 พบว่ามีผลการลดจำนวนของแบคทีเรียดังกล่าวได้

2.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide)

ในสภาวะที่มีออกซิเจนแลคติกแอสิดแบคทีเรียสามารถสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เชื้อสร้างขึ้นสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นได้ โดยทำให้เยื่อหุ้มเซลล์สูญเสียความสามารถในการซึมผ่ านเข้าและออกของสารต่างๆ และยังมีผลทำให้เกิดการทำลายสารอื่นๆภายในเซลล์ด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าเ มื่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ รวมกับ thiocyanate ภายในเซลล์และมีเอนไซม์ lactoperoxidase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะทำให้เกิดสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ เรียกกระบวนการเกิดสารยับยั้งดังกล่าวว่า lactoperoxidase antibacterial system (อรวินทร์, 2532) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่สร้างจาก *L. acidophilus* สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียได้เนื่องจากไม่สร้างเอนไซม์ catalase (ที่ไปเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์อ อกไซด์เป็นน้ำและออกซิเจน) ทำให้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่สร้างขึ้นถูกสะสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และมีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆได้ (Gilland and Speck,1997) แต่สำหรับ *Lactobacilli* สามารถต้านทานต่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Daeschel, 1998)

2.3 คาร์บอนไดออไซด์ (CO_2)

คาร์บอนไดออกไซด์เป็นเผลิตภัณฑ์หลักของ heterofermentative lactic acid bacteria กลไกการยับยั้งเชื้อของ CO_2 ปัจจุบันยังไม่ทราบแน่ชัด แต่อย่างไรก็ตาม CO_2 อาจมีบทบาทในการเพิ่มสภาวะไร้ออกซิเจนซึ่งส่งผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กลุ่ม enzymatic decarboxylation และทำให้เกิดการสะสมของ CO_2 บริเวณ membrane lipid bilayer เป็นสาเหตุที่ทำให้การควบคุมการเข้าออกของสารมีความผิดพลาด จึงมีผลเสียต่อการเจริญของเชื้อได้

2.4 ไดอะซิทิล (Diacetyl)

ไดอะซิทิล หรือ 2,3-butanedione เป็นผลผลิตสุดท้ายที่ได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึมของแลคติกแอสิดแบคทีเรีย ซึ่งเป็นสารเฉพาะที่ให้กลิ่นในนมหมัก (อรวินทร์, 2532) สามารถยับยั้งการเจริญได้ทั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย โดยเกิดจากการไปรบกวนการใช้อาร์จินิน (arginine) โดยไดอะซิทิลจะไปทำปฏิกิริยากับ arginine - binding protein ภายในเซลล์ (Ouwehand and Vesterlund, 2004)

2.5 รูเทอริน (Reuterin)

รูเทอรินเป็นสารที่มีการศึกษากันมากเป็นสารที่สร้างจากเชื้อ *Lactobacillus reuteri* รูเทอรินมีคุณสมบัติที่สำคัญคือ มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ละลายน้ำได้ แต่ไม่ใช่โปรตีนเพราะไม่ถูกทำลายฤทธิ์โดย proteolytic enzyme จึงทำให้รูเทอรินแตกต่างจากแบ คเทอริโอซิน เมื่อศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของรูเทอรินพบว่าเป็น ß-hydropropionaldehydeซึ่งอาจอยู่ในรูป monomer หรือ dimers โดยเกิดขึ้นในกระบวนการเมทาบอลิซึมของกลีเซอรอล ความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ค่อนข้างกว้าง สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งแกรมบว กและแกรมลบ ยีสต์ รา และโปรโตซัว แบคทีเรียที่ถูกยับยั้งการเจริญโดยรูเทอริน ได้แก่ *Salmonella* sp., *Shige*lla sp., *Clostridium* sp., *Staphylococcus* sp. และ *Listeria* sp. เป็นต้น โดยเชื่อว่ารูเทอรินมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บางชนิด เช่น ribonucleotide reductase จึงทำให้การสังเคราะห์ DNA เสียไป

2.6 เพปไทด์ (peptide)

เพปไทด์เป็นสารโมเลกุลเล็ก ของโปรตีนที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย กลไกการทำงานของเพปไทด์มีฤทธิ์ในการต้าน จุลลินทรีย์ โดยเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์แบค ทีเรียเหนี่ยวนำให้โครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์เปลี่ยนแปลงทำให้เกิดรูบนเยื่อหุ้มเซลล์และทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแตกส่งผลให้แบคทีเรียถูกทำลาย โดยแลคติกแอสิดแบคทีเรียสามารถผลิตสารเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ได้ (Garneau *et al*., 2002)

จากรายงาน Broberg *et al*., (2002) พบว่า *Lactobacillus plantarum* ที่แยกได้จากน้ำหมักสามารถผลิต cyclic dipeptides cyclo (L-Phe–L-Pro) และ cyclo (L-Phe–*trans*-4-OH-L-Pro) และมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราได้ และพบว่า *L. plantarum* MiLAB393 ที่แยกได้มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราในอาหารและเชื้อ ราที่ปนเปื้อนในอาหารสัตว์ และยีสต์ เช่น *Fusarium sporotrichioides Aspergillus fumigates* ตามลำดับ

จากรายงาน Magnusson *et al*., (2003) พบว่า cyclic dipeptides, cyclo (Phe-Pro) และ cyclo(Phe-OH-Pro) ที่ *P. pentosaceus* และ *L. coryniformis* ผลิตได้มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราในระดับความเข้มข้น µg/ml

2.7 กรดไขมันชนิดสายสั้น (short chain fatty acid)

กรดไขมันชนิดสายสั้น โครงสร้างโมเลกุลมีจำนวนคาร์บอน 2-4 อะตอม ตัวอย่างกรดไขมันชนิดสายสั้นที่จุลินทรีย์สามารถสร้างได้ เช่น acetic acid (acetate) propionic acid (propi onate) butyric acid (butyrate) เป็นต้น

จากรายงาน Sjogren *et al*., (2003) พบว่า *L. plantarum* MiLAB14 สร้างกรดไขมันชนิดสายสั้น ได้แก่ 3-hydroxytetradecanoic acid, 3-hydroky-5-cisdodecenoic, 3-hydrokylate fatty acid, 3-hydroxydocecanoic acid, และ 3-hydroxydecanoic acid (myrmi cacin, 3-HAD) มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราและยีสต์ โดย 3-hydroxydecanoic acid ให้ค่า MIC ในช่วง 10 และ 100 μg/ml 3-hydroxydocecanoic acid ให้ค่า MIC ในช่วง 10 และ 50 μg/ml และ 3-hydroxytetradecanoic acid ให้ค่า MIC ในช่วง 10 และ >100 μg/ml เมื่อเทียบกับยามาตรฐาน (amphoteracin B) ที่ใช้ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

จากรายงาน Bergsson *et al*., (2001) ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราของกรดไขมันขึ้นกับความยาวของจำนวนคาร์บอนในโครงสร้างโมเลกุล โดย *Candida albicans* ที่ถูก treat ด้วยกรดไขมันชนิดต่างๆ 10 mM พบว่ากรดไขมันชนิด capric acid (C10) และ lauric acid (C12) มีฤทธิ์ในการยับยั้งแต่ในขณะที่ monoglycerides ไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ

2.8 แบคเทอริโอซิน (bacteriocins)

แบคเทอริโอซินเป็นสารที่ผลิตได้จากแบคทีเรียโดยเป็นสารประกอบของโปรตีน จึงถูกทำลายได้ด้วยเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน และมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่มีความใกล้ชิดกัน โดยแบคเทอริโอซินจัดเป็นสารยับยั้งการเจริญของแบ คทีเรียที่แตกต่างจากสารปฏิชีวนะ (antibiotic) เนื่องจากมีฤทธิ์การยับยั้งแคบและเป็นพิษกับแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกัน (Hill *et al*., 2002) แลคติกแอสิดแบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินได้มีหลายชนิด (Choi *et al*., 2000) แบคทีริโอซินที่สร้างจาก แบคทีเรียมีกลไกในการยับยั้ง จุลินทรีย์ได้แตกต่างกันโดยทั่วไปมักออกฤทธิ์ต่อเยื่อหุ้มเซลล์ กลไกการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยแบคเทอริโอซินอาจมีหลายแบบขึ้นอยู่กับชนิดของแบคเทอริโอซิน กลไกลหนึ่ง คือ เยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์เป้าหมายที่ถูกทำลายโดยแบคเทอริโอซินจะต้องมีที่สำหรับแบคเทอริโอซินนั้นเกาะอยู่บนผิวเซลล์ เมื่อแบคเทอริโอซินจับกับตัว รับแล้วจะทำให้เกิดรูที่ผิวเซลล์ ทำให้การผ่านเข้าออกของไอออนต่างๆระหว่างในและนอกเซลล์เสียสมดุลไปทำให้เซลล์ตายไปในที่สุด (Zacharof *et al*., 2012) อย่างไรก็ตามแบคเทอริโอซินบางชนิดก็อาจทำให้เซลล์ตายโดยเซลล์ยังคงสภาพ

เดิมได้ ทั้งนี้เซลล์ที่สร้างแบคเทอริโอซินจะมีภูมิคุ้มกันต่อแบคเทอริโอซินชนิดที่ตนสร้าง ด้วยเหตุนี้จึงทำให้แบคเทอริโอซินที่สร้างออกมานั้ นไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ที่สร้าง แบคเทอริโอซินนอกจากถูกสร้างโดยแลคติกแอสิดแบคทีเรียแล้วยังถูกสร้างโดยแบคทีเรียชนิดอื่นๆอีก เช่น *Acetobacter* sp.*, Bacillus* sp., *Brevibacterium* sp.*, Clostridium* sp.และ *Staphylococcus* sp. เป็นต้น (Deegan *et al*., 2006)

แบคเทอริโอซินแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่

กลุ่มที่1

แบคเทอริโอซินในกลุ่มนี้จะมีโครงสร้างเป็นเพปไทด์ มีคุณสมบัติที่ทนต่อความร้อน น้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 5 กิโลดาลตัน (Chatterjee *et al*., 2005) ลักษณะโครงสร้างมีอนุพันธ์ของ กรดอะมิโนแลนไธโอนีน (lanthionine) กลไกลการออกฤทธิ์ของแบคเทอริโอซิน ในกลุ่มนี้มีหลายแบบ เช่น สามารถทำให้เกิดรูพรุนที่เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ ตัวอย่างแบคเทอริโอซินในกลุ่มนี้ ได้แก่ ไนซิน (nisin) แลคติซิน (lacticin) อีพิเดอมิน (epidermin) เมอซาซิดิน (mersacidin) สเตรปติน (streptin) และ ซินนามัยซิน (cinnamycin) เป็นต้น (Cleeveland *et al*., 2001, Deegan *et al*., 2006)

กลุ่มที่ 2

แบคเทอริโอซิน ในกลุ่มนี้มีโครงสร้างเป็น เพปไทด์ มีคุณสมบัติที่ทนต่อความร้อน น้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 10 กิโลดาลตัน ลักษณะโครงสร้างไม่มีอนุพันธ์ของกรดอะมิโนแลนไธโอนีน (lanthionine) ตัวอย่างแบคเทอริโอซิน ในกลุ่มนี้ที่มีการศึกษามากที่สุด คือ เพดดิโอซิน (pediocin) เนื่องจากฤทธิ์ในการยับยั้งไม่กว้างเหมือนไนซิน (nisin) โดยจะยับยั้งเฉพาะ *Listeria* sp. เท่านั้น จึงไม่ยับยั้งเชื้อตั้งต้นที่ใช้ในการหมักอาหาร แต่อย่างไรก็ตามข้อจำกัดก็คือไม่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคชนิดนี้ได้อย่างสมบูรณ์ในอาหาร (Sonomoto *et al*., 1999)

กลุ่มที่ 3

ประกอบด้วยแบคเทอริโอซินขนาดใหญ่ น้ำหนักโมเลกุล มากกว่า 30 กิโลดาลตัน มีคุณสมบัติไม่ทนความร้อน ตัวอย่าง ของกลุ่มนี้ เช่น helveticin I สร้างโดย *Lactobacillus helveticus* และ Enterolysin สร้างโดย *Enterococcus faecium* (Todorov *et al*., 2005, Lovit and Zacha rof, 2012)

กลุ่มที่ 4

โครงสร้างของ แบคเทอริโอซิน ในกลุ่มนี้จะส่วนที่เป็นโปรตีนและมีหมู่กลูซิดิค (glucidic) หรือ ลิปิด ในโครงสร้างด้วย ตัวอย่างของ แบคเทอริโอซิน กลุ่มนี้ เช่น มีเซ็นเทอริซิน 52 (mesenterocin 52) ซึ่งจะพบส่วนของลิโพโปรตีนในโครงสร้าง เป็นต้น (Delves-Broughton, 1999)

2.8.1 กลไกการออกฤทธิ์ของแบคเทอริโอซิน

แบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียต่าง ชนิดกันจะมีความสามารถในการยับยั้งหรือการทำลายจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน สำหรับกลไกการออกฤทธิ์ของแบคเทอริโอซินชนิดต่างๆ ตัวอย่างเช่น (E. Sablon, 2000)

2.8.1.1 ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ ซึ่งเป็นส่วนที่มีความแข็งแรงทำหน้าที่ป้องกันสิ่งที่อยู่ในเซลล์ แบคเทอริโอซินจะไปยับยั้งการสร้าง pepidoglycan ซึ่งส่งผลให้หยุดการสร้างผนังเซลล์ เมื่อผนังเซลล์ถูกทำลายหรือสร้างไม่สมบูรณ์แบคทีเรียจะตายได้ แบคเทอริโอซินพวกนี้จึงจัดเป็น bacteriocide

2.8.1.2 รบกวนการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ในการขนส่งสารเข้าออกเซลล์ โดยมีผลต่อ Proton motive force ของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ความสมดุลของ K^+ ของเซลล์เปลี่ยนแปลงไป โดยมีการผ่านเข้าไปในเซลล์มากขึ้นและเกิดการสะสมทำให้แรงดันในเซลล์ไม่สมดุลเซลล์จะแตกและตายในที่สุด นอกจากนี้พบว่าการทำลายแบคทีเรียโดยใช้ไนซิน (nisin) โดยเกิดจากการที่เยื่อหุ้มเซลล์ดูดซับไนซิน (nisin) ไปยังผนังเซลล์ ตามด้วยการทำลายกิจกรรมของ sulphydryl groups ทำให้สูญเสียความสามารถในก ารควบคุมการขนส่งสารเข้าออกเซลล์ ทำให้เซลล์แบคทีเรียถูกทำลาย

2.8.1.3 ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน จะเกิดจากแบคเทอริโอซินที่มีโครงสร้างแบบ ami no glycoside คือมี amino sugar ในโมเลกุลทำให้เกิดพันธะ glycocidic ซึ่งมีความสามารถจับกับ 30S ribosomal subunit ทำให้ไปยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนและลดความสามารถในกา ร ขนส่งรหัสทางพันธุกรรม นอกจากนี้ยังทำให้การอ่านรหัสในการสร้าง mRNA ผิดพลาด เนื่องจากบางตำแหน่งถูกบดบัง ส่งผลให้ ความสามารถในการสร้างโปรตีนที่เป็นเอนไซม์ผิดพลาด เมื่อไม่มีเอนไซม์การทำงานของเซลล์จะผิดปกติไป ในกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน

หลายขั้นตอนที่แบคเทอริโอซินยับยั้งได้นั้น สามารถกลับสู่สภาพเดิมได้เมื่อลดความเข้มข้นลง ดังนั้นแบคเทอริโอซินที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนส่วนใหญ่เป็น bacteriostatic

2.8.1.4 รบกวนกระบวนการเมตาบอลิซึม โดยพบว่ากระบวนการเมตาบอลิซึมสามารถกลับเข้าสู่สภาพเดิมได้เมื่อปริมาณแบคเทอริโอซินลดลงจึงจัดเป็น bacteriostatic

3. จุลินทรีย์ที่พบในอาหาร

3.1 แบคทีเรียก่อโรคที่พบในอาหาร

***Staphylococcus* spp.**

เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีลักษณะรูปร่างค่อนข้างกลม (cocci) การเรียงตัวเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น มักพบในอาหารที่มีนมและเนื้อสัตว์เป็นองค์ประกอบและอาหารที่ผ่านการสัมผัสหรือเคลื่อนย้ายด้วยมือของมนุษย์ รวมทั้งอาหารที่ไม่ได้ทำให้สุกก่อนนำมาบริโภค โดยเฉพาะ *S. aureus* พบว่าสามารถสร้างสารพิษซึ่งขับออกนอกเซลล์ เรียกว่า เอนเทอโรทอกซิน ได้แก่ สารพิษที่ชักนำให้เกิดการหลั่งของเหลวขึ้นภายในลำไส้หรือทางเดินอาหารเป็นผลให้เกิดอาการท้องเดิน ในอดีตโรคอาหารเป็นพิษจำกัดอยู่เฉพาะสปีชีส์เดียว คือ *S. aureus* แต่ในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันว่าเชื้อสายพันธุ์อื่นก็สร้างสารพิษขึ้นด้วย แต่เนื่องจากการตรวจสอบเชื้อชนิดนี้อาศัยสมบัติการสร้างเอนไซม์โคแอกูเลส และเทอร์โมนิวคลีเอส ของแบคทีเรียเป็นสำคัญ และการใช้เทคนิคในการตรวจวิเคราะห์จึงมุ่งไปที่ *S. aureus* เพียงสปีชีส์เดียวหลังจากเทคนิคการตรวจหาเอนเทอโรทอกซินในอาหารได้มีการพัฒนาขึ้น ทำให้สามารถตรวจพบเชื้อสปีชีส์อื่นที่สร้างเอนเทอโรทอกซินด้วยแต่มีโอกาสเกิดขึ้นน้อยกว่า *S. aureus* มาก (สุมณฑา, 2545)

***Salmonella* spp.**

เป็นแบคทีเรียรูปท่อน ติดสีแกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลา ที่มีอยู่รอบเซลล์เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีอากาศ โดยสปีชีส์ที่มักปนเปื้อนในอาหาร ได้แก่ *S. typhi*, *S. paratyphi* A paratyphi B. และ *S. typhimurium* เป็นต้น โดยเชื้อจะสร้างสารพิษชนิด endotoxin ซึ่งจะปล่อยสารพิษออกมา มักพบ *Salmonella* spp. ปนเปื้อนได้ในอาหารหลายชนิด เช่น เนื้อสัตว์ นม ไข่ และผัก การบริโภคอาหารหรือน้ำดื่มที่มีเชื้อปนเปื้อน อาการของโรคขึ้นอยู่กับความต้านทานโรคของแต่ละบุคคล และชนิดของเชื้อว่าเป็นชนิดไหน อาการจะ

แสดงออกหลังจากรับประทานอาหารที่มีเชื้อเข้าไป 12-36 ชั่วโมง มีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง ท้องร่วง อาจมีอาการปวดศีรษะและหนาวสั่น อ่อนเพลีย มีไข้ อาการจะเป็นอยู่ 2-3 วัน จึงทำให้หายจากอาการอาหารเป็นพิษ (สุมณฑา, 2545)

***Listeria* spp.**

เป็นแบคทีเรียติดสีแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ เซลล์มี ขนาดเล็ก เส้นผ่า น ศูนย์กลาง 0.4-0.5 ไมครอน มักเรียงตัวเป็นสายต่อกัน 3-5 เซลล์ หรือมากกว่านั้น แต่ถ้าอายุมากๆ อาจติดสีแกรมลบ เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลารอบตัวที่ 20-25 องศาเซลเซียส แต่ที่ 37 องศาเซลเซียส แฟลกเจลลาที่พบน้อยมากโดยปกติมักเป็นแท่งแฟลกเจลลาที่ขั้วเส้ นเดียว บางครั้งอาจมี 2-4 หรือไม่มี สร้างกรดจากการใช้กลูโคสแต่ไม่สร้างก๊าซ โดย ปกติสร้างเอนไซม์คะตะเลสเป็น พวกต้องการออกซิเจนในการเจริญ เล็กน้อย เติบโตในช่วงอุณหภูมิ 4-38 องศา (วิลาวัณย์ เจริญจระกระกูล, 2539) *L. monocytogenes* เป็นสาเหตุของโรค listeriosis ส่วนใหญ่เกิดจากการบริโภคอาหาร เช่น อาหารที่มีส่วนผสมของน้ำนมดิบ เนยแข็ง เนื้อบด ผักดิบ ที่มีเชื้อปนเปื้อน (Piffaretti *et al*., 2002)

***Clostridium* spp.**

เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เจริญเติบโตได้ดีในสภาวะแวดล้อมที่ไม่มีออกซิเจน โดยมีการสร้างสปอ ร์ทำให้คงทนในสภาพแวดล้อม ได้ดีมาก ในอาหารหมักพบการปนเปื้อนสปอร์ของ *Clostridium botulinum* เชื้อจะเจริญและสร้างสารพิษ ผลิตภัณฑ์อาหารบรรจุกระป๋องหรือในปี๊บ อาจมีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนสปอร์ของเชื้อมากกว่าอาหารอื่นๆ อาหารเหล่านี้จึงจำเป็นต้องได้รับการถนอมอย่างถูกต้องและเคร่งครัดก่อนก ารบรรจุภาชนะปิดสนิทเพื่อการถนอมอาหาร

3.2 เชื้อราที่พบในอาหาร

***Aspergillus* spp.**

เป็นเชื้อราที่มี conidiophores มีลักษณะตั้งตรงขึ้น บริเวณตรงปลายขยายออกมา มีรูปร่างค่อนข้างกลม บริเวณดังกล่าวจะมีโครงสร้างซึ่งเป็นฐานของ conidia โดย conidia มีรูปร่างกลม มีหลายสี เช่น ดำ เขียว น้ำตาล เป็นต้น บริเวณตรงฐานของ conidiophores มีเซลล์พิเศษเรียกว่า foot cells ซึ่งเป็นลักษณะพิเศษที่ใช้ในการสังเกต ส่วนใหญ่จัดเป็น saprophytic mold แต่ก็มี 2-3 สปีชีส์เป็น parasitic mold *Aspergillus* spp. บางชนิดก่อให้เกิดโรคที่เป็นปัญหาในคนและสัตว์ ที่เป็นที่รู้จักดีคือ *A. fumigatus* และ *A. flavus* โดยผลิตอะฟลาทอกซิน (aflatoxin) ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งและคงทนในอาหารแห้ง เช่น ถั่ว กระเทียมและข้าวโพด เป็นต้น จะมีอาการคล้ายกับอาหารเป็นพิษมีอาการอาเจียน ท้องเดินต่อไปจะมีอาการทางสมอง ซึมหมดสติ เนื่องจากสารพิษไปทำลายสมองจะตายภายใน 48-72 ชม. อาจถึงขั้นเสียชีวิตได้ และพบว่า *Aspergillus* sp. เป็นเชื้อที่มีบทบาทสำคัญมากในทางอาหาร เช่น ทำให้ผลไม้มีสีดำ โดยเฉพาะในส้ม เป็นราที่เติบโตได้บนแฮมและเบคอน แต่มีบางสายพันธุ์ที่มีประโยชน์ เช่น เชื้อ *A. oryzae* และ *A. sojiae* ใช้ในการผลิตอาหารหมักบางชนิด เช่น ซีอิ้ว เทมเป้ เชื้อ *A. niger* สามารถสร้างเอนไซม์ บีตา -กาแลกโตซิเดส กลูโคอะไมเลส (Glucoamylase) อะไมเลส (Amylase) และ เพกติเนส ส่วนเชื้อ *A. oryzae* สร้างเอนไซม์แอลฟา -อะไมเลสได้ เป็นต้น (สุมณฑา, 2545)

***Penicillium* spp.**

เป็นเชื้อราที่มี conidiophore ตั้งตรงขึ้นมาจากฐานบริเวณเกือบถึงยอดจะมีการแตกแขนงออกมาในลักษณะคล้ายไม้กวาด (brush-like) เพื่อเป็นฐานรองรับ conidia ที่จะถูกสร้างอยู่บน phialides conidia ไม่มีสีหรืออาจมีสีที่ค่อนข้างสดใส รูปร่างค่อนข้างกลมหรือรูปไข่ จัดเป็นทั้ง parasitic (ก่อให้เกิดโรคเน่าในพืชโดยเฉพาะบริเวณส่วนอ่อน) และ saprophytic molds ไม่มี foot cells จัดเป็นเชื้อราชนิดที่มีผนังกั้น สายราไม่มีสี มีก้านชู ปลายก้านชูมีติ่งรูปขวดหลายๆอันเป็นรูปคล้ายแปรงหรือนิ้วมือ (fingers on hand) โดยพบว่า *P.dongerardii* ที่ปนเปื้อนในผลไม้กระป๋อง จะมีสปอร์ที่ทนความร้อนได้สูง *Penicillium* sp. บางชนิดมีประโยชน์โดยใช้ในการผลิตอาหารหมักบางชนิด เช่น เนยคาเมมเบิร์ท นอกจากนี้ ยังเป็นเชื้อที่ผลิตสารปฏิชีวนะ ได้ เช่น เพนิซิลิน (Panicillin) ในขณะที่ *Penicillium* sp. บางชนิดสร้างสารพิษในอาหารได้ เช่น ซิตรินิน (Citrinin) โอคราทอกซิน เอ (Ochratoxin A) รูบราทอกซิน บี (Rubartoxin B) และไมโครทอกซิน (Mycotoxin) (สุมณฑา, 2545)

***Candida* spp.**

เป็นเซลล์ยีสต์ที่มีรูปร่างกลมหรือรี เซลล์มีขนาดความกว้างและยาว 2-4 ไมโครเมตร ตามลำดับ มีการแตกหน่อแบบ multilateral budding อยู่แบบเดี่ยวหรือเรียงตัวเป็นสาย มีทั้งสายราแท้ (true hyphae) และสายราเทียม (pseudohyphae) โดยพบว่า *C. albicans* ในสภาวะที่เป็นยีสต์มีความสามารถในการก่อโรคได้มากกว่าในสภาวะที่เป็นสาย เมื่อเลี้ยงบนอาหาร Corn meal agar และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จะปรากฏสายราแท้และสายราเทียม มีการแตกหน่อระหว่างเซลล์ที่ต่อกัน *C. albicans* มักก่อให้เกิดโรคบริเวณผิวหนัง และช่องปาก นอกจากนี้มักจะพบ *C. krusei, C. vini, C. lipolytica, C. tropicalis* ในอาหารประเภทหมักดอง โดยพบว่า *C. tropicalis* สามารถใช้เป็น food yeasts ได้เช่นกัน แต่ขณะเดียวกันก่อให้เกิดการเสื่อมเสียของน้ำมันในข้าว (rice oil) ได้ ส่วน *C. vini* มักแยกได้จากเบียร์ โดยมันจะก่อให้เกิดผลเสียเนื่องจากเจริญเป็นแผ่นฟิล์มบนผิวหน้าของน้ำหมัก และพบว่า *C. lusitaniae* หากมีการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์นมมักทำให้นมเปรี้ยวมีกรดสูงขึ้น ส่งผลให้เกิดการเน่าเสียได้ง่ายขึ้น (สุมณฑา, 2545)

***Rhodotorula* spp.**

เซลล์มีรูปร่างกลม (spheroidal) รูปไข่ (ovoidal) หรือทรงยาว (elongate) สืบพันธุ์โดย multilateral budding ในบางสายพันธุ์อาจมีการสร้างเซลล์ซึ่งมีลักษณะคล้าย chlamydospore และ/หรือ pseudo หรือ true mycelium ไม่มีการสร้าง ascospores หรือ ballistospores มีการสร้างสีแดงหรือเหลืองจากเม็ดสี carotenoid เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ malt agar ไม่สามารถใช้ inositol เป็นแหล่งคาร์บอน และขาดคุณสมบัติในการหมักมีหลายสายพันธุ์ที่มีเมือกเนื่องจากมีการสร้างแคปซูล *R. glutinis* ใช้ในการผลิตไขมัน *Rhodotorula* sp. มักพบการปนเปื้อนในอาหารประเภทเนื้อ ผลิตภัณฑ์นม จากรายงานของ Prachyakij (2008) ได้ทำการแยกยีสต์จากตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพจากแหล่งต่างๆ พบว่ามีการปนเปื้อนของ *R. mucilaginosa* มากที่สุด

4. เทคนิคการทำบริสุทธิ์ของสารประกอบโปรตีน

4.1 อัลตราฟิวเตชัน (Ultrafiltration)

เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้แยกสารที่มีมวลโมเลกุลต่ำออกจากสารที่โมเลกุลสูงและเป็นวิธีที่ทำให้สารละลายโมเลกุลใหญ่มีความเข้มข้นขึ้น ภายใต้สภาวะที่ใช้แรงดันเหนือสารละลาย โดยตัวทำละลายและตัวถูกละลายขนาดเล็กๆ ในสารละลายจะถูกดันผ่านเยื่อกึ่งซึมได้ ทำให้ตัวทำละลายและตัวถูกละลายถูกกำจัดออกจากสารโมเลกุลใหญ่อย่างรวดเร็วและทำให้สารละลายโมเลกุลใหญ่มีความเข้มข้นมากขึ้น Holo (1991) ได้เพิ่มความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินที่แยกได้จาก *Lactobacillus acidophilus* LF221 โดยการนำน้ำหมักที่ได้หลังจากแยกเซลล์ออกแล้วมากรองด้วยกระดาษกรองขนาด 10 กิโลดาลตัน สามารถเพิ่มความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินได้ 20 เท่า

4.2 การตกตะกอนโดยใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (Ammoniumsulfate Precipitation)

การตกตะก อนเป็นวิธีหนึ่งที่จะแยกโปรตีนออกมาโดยอาศัยคุณสมบัติในการละลายของโปรตีน สารละลายที่ใช้ในการต กตะกอนอาจเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น แอลกอฮอล์ อีเทอร์ อะซีโตน หรื อสารละลายเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต การเติมเกลือลงไปในปริมาณเล็กน้อยเพื่อทำให้โปรตีนละลายดียิ่งขึ้นเพราะเกลือจะเกาะกับโปรตีนแล้วรวมกับน้ำได้ดี กระบวนการนี้เรียกว่า Salting in ในขณะเดียวกันการเติมเกลือในปริมาณที่ม ากเพื่อให้โปรตีนตกตะกอนเรียกว่า Salting out (Klaenhammer *et al.,* 1993)

การตกตะกอนแบคเทอริโอซินส่วนใหญ่มักใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต เนื่องจากเป็น การเพิ่มการไม่ ละลายระหว่างโปรตีนกับโปรตีน (hydrophobic protein-protein interaction) การมีส่วนที่ละลายน้ำได้และไม่ได้ จะทำให้โปรตีนจำเพาะตกตะกอนในช่วงความเข้มขั้นเกลือในช่วงแคบ เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตมีความสามารถในการละลายสูง (70.6 กรัม/ลิตร) และมีไอออนที่มีประจุ 4 ประจุ/โมเลกุล สารละลายอิ่มตัวมีความหนืดและความหนาแน่นต่ำ ทำให้แยกต ะกอนออกได้ง่ายโดยการหมุนเหวี่ยง การตกตะกอนด้วยวิธีนี้จะต้องทำที่อุณหภูมิต่ำเพื่อป้องกันการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน จากความร้อนที่ถูกปล่อยออกมาในระหว่างการผสมสารละลาย

4.3 ไดอะไลซิส (Dialysis)

ไดอะไลซิสเป็นวิธีการแยกโมเลกุลชนิดต่างๆ ออกจากกันโดยอาศัยความแตกต่างของขนาดโมเลกุล ในการแยกโปรตีนออกจากสารโมเลกุลเล็กๆด้วยถุงไดอะไลซิส (dialysis bag) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น semipermeable membrane ที่มีรูพรุนยอมให้สารโมเลกุ ลเล็กๆ เช่น เกลือ แพร่ผ่านเข้าออกเมมเบรนได้ และโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่กว่าเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนจะคงอยู่ภายในถุงไดอะไลซิส เมมเบรนที่นิยมใช้ ได้แก่ เซลโลเฟน (cellophane) และไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose) นอกจากจะใช้ในการแยกโมเลกุลต่างๆออกจากกันแล้ว วิธีนี้ยังใช้ในการทำให้สารละลายมีความเข้มข้นขึ้น

4.4 โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (Ion-exchange chromatography)

เป็นวิธีที่ใช้แยกสารที่มีประจุโดยอาศั ยหลักของที่ดูดซับแบบผันกลับได้ (reversible adsorption) ไอออนในสารละลายจะแทนที่กับไอออนอื่นที่มีประจุชนิดเดียว กันที่จับกับหมู่ที่มีประจุบนตัวกลางแลกเปลี่ยนไอออนด้วยแรงทางไฟฟ้า (electrostatic force)

4.5 โครมาโทกราฟีแบบเจลฟิวเตชัน (Gel-filtration chromatography)

เป็นวิธีแยกสารให้บริสุทธิ์โดยอาศัยความแตกต่างของมวลโม เลกุล มีข้อดี คือ สามารถแยกสารที่ไม่เสถียรได้ สูญเสียสารน้อย ได้ผลดี ใช้เวลาน้อย วิธีนี้คอลัมน์ถูกบรรจุด้วยเจล โดยเจลจะไม่ทำปฏิกริยากับสารที่กำลังวิเคราะห์และไม่มีประจุ เทคนิคเจลฟิวเตชั่นนิยมใช้ในการกำจัดเกลือออกจากสารละลายโปรตีน ตัวอย่างเช่น เมื่อตกตะกอนโปรตีนโดยใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต การกำจั ดเกลือชนิดนี้ออกจากสารละลายโปรตีนทำได้โดยละลายตะกอนโปรตีนในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมปริมาตรน้อยที่สุด แล้วปล่อยสารละลายนี้ลงในคอลัมน์ที่บรรจุด้วยเจลที่มีรูพรุนขนาดเล็กกว่าโมเลกุลของโปรตีนเมื่อชะล้างคอลั มน์ด้วยบัฟเฟอร์ โปรตีนจะออกจากคอลัมน์ก่อนเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตการกำจัดเกลือชนิดนี้ใช้ Sephadex G-25 medium สามารถกำจัดเกลือได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Crider, 2010)

4.6 เทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC)

การแยกและการวิเคราะห์สารด้ วยวิธีนี้อาศัยหลักของการดูดซับ การแลกเปลี่ยนไอออน และ ขนาด วิธีนี้ใช้คอลัมน์ขนาดเล็กแต่มีความยาว บรรจุด้วยตัวกลางที่ทำด้วยแก้วหรือพลาสติกที่เคลือบด้วยตัวทำละลายอยู่กับที่เป็นชั้นบางๆ ส่วนตัวทำละลายเคลื่อนที่เป็นระบบตัวทำละลายที่ถูกดันให้เข้าสู่คอลัมน์ที่บรรจุด้วยตัวกลางอย่างแน่น สารละลายที่ต้องการวิเคราะห์ถูกผ่านไปในคอลัมน์ แล้วผ่านตัวทำละลายเคลื่อนที่ด้วยแรงดันสูง ซึ่งทำให้ลดเวลาการแยกและการวิเคราะห์สารอย่างมาก การตรวจสอบสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ทำได้โดยอาศัย การวัดการดูดกลืนแส งในช่วงอัลตราไวโอเลตดรรชนีหักเห (refractive index) หรือการวัดฟลูออเรศเซนซ์ ข้อดีข องเทคนิค HPLC คือสามารถแยกสารได้ภายในเวลาน้อยกว่า 1 ชม. มีประสิทธิภาพสูงสามารถตรวจสอบปริมาณสารที่น้อยกว่า picomole ได้ แต่ข้อเสียคือราคาค่อนข้างสูง

4.7 Sodium Dodecyl Sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

เป็นวิธี ที่ดีที่สุดวิธีหนึ่งในการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ นอกจากนี้ยังใช้ในการพิสูจน์ความบริสุทธิ์ของสาร โดยอาศัยหลักที่ว่าสารที่มีประจุไฟฟ้าจะเคลื่อนที่ไปในสนามไฟฟ้าโดยเคลื่อนที่ไปยังขั้วไฟฟ้าที่ มีประจุตรงข้ามกัน และโมเลกุลขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าโมเลกุลขนาดให ญ่ที่มีประจุ เท่ากัน โดยโซเดียมโดดิซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate : SDS) ซึ่งเป็นสารละลาย ชนิดหนึ่งที่มีประจุลบจะจับกับโปรตีนตรงบริเวณที่เป็นไฮโดรโฟบิค (Hydrophobic) ทำให้โปรตีนคลายการขดม้วนออกเป็นสายยาวที่มีรูปร่างเป็นแท่งและทำให้โมเลกุลของโปรตีนแยกออกจา กการรวมตัวกันกับโปรตีนอื่นๆ ทำให้โปรตีนมีประจุลบ เมื่อให้สนามไฟฟ้าโปรตีนแต่ละชนิดจะเคลื่อนที่เข้าหาขั้วบวก ทำให้โปรตีนแยกออกจากกันตามความแตกต่างของขนาดของโมเลกุลหรือน้ำหนักโมเลกุล

วิธีนี้ใช้ในการหาน้ำหนักโมเลกุลโดยประมาณ เป็นวิธีที่ให้ผลเร็วมีประสิทธิภาพในการแยกสูง โปรตีนที่แยกออกจากกันสามารถหาตำแหน่งได้โดยการย้อมสี ถ้าโปตีนมีความเข้มข้นประมาณ 0.1 ไมโครกรัม สามารถให้แถบที่ชัดเมื่อย้อมด้วยโคแมสซีบลู (Coomassie Brilliant Blue) ถ้าความเข้มข้นของโปรตีนต่ำกว่า 10 นาโนกรัม ต้องใช้การย้อมด้วยวิธีการย้อมด้วยซิลเวอร์ (silver staining)

4.8 แมสสเปโทรเมตรี (Mass Spectrometry)

เป็นเทคนิคการตรวจสอบโครงสร้างและมวลโมเลกุลของสารประกอบโดยอาศัยหลักการทำให้โมเลกุลของสารแตกตัวเป็นไอออนและไอออนที่เกิดจะถูก วัดตามอัตรา ส่วนของมวลต่อประจุของไอออนนั้นๆ การวิเคราะห์ด้วยเทคนิ คแมสสเปกโทรเมตรี สารตัวอย่างจะสูญเสียไปแต่ข้อดีของเทคนิค คือ มีความไว (Sensitivity) ในการวัดสูงทำให้ใช้สารตัวอย่างปริมาณน้อยมาก (พิมพ์จิต, 2548)

วัตถุประสงค์

1. แยกและคัดเลือกแลคติกแอสิดแบคทีเรียจากอาหารหมักที่ผลิตสารกลุ่มเพปไทด์หรือสารโมเลกุลเล็กอื่นๆ
2. ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคและทำให้อาหารเน่าเสียของสารกลุ่มเพปไทด์หรือสารโมเลกุลเล็กอื่นๆ
3. ศึกษาสมบัติบางประการของสารสารกลุ่มเพปไทด์หรือสารโมเลกุลเล็กอื่นๆ ที่คัดเลือกได้
4. เทียบเคียงสายพันธุ์แลคติกแอสิดแบคทีเรียจากอาหารหมักที่คัดเลือกได้

ขอบเขตการวิจัย

สุ่มเก็บตัวอย่างอาหารหมักทั้งพืชและเนื้อสัตว์เพื่ อคัดเลือกแลคติกแอสิดแบคทีเรีย จากนั้นนำแบคทีเรียที่แยกได้มาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคโดยกระบวนการคัดว่าเป็นสารโมเลกุลเล็กหรือสารกลุ่มเพปไทด์ ศึกษาสมบัติของสารและหาค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimal Bactericidal Concentration (MBC) ของสารต้านจุลินทรีย์ และเทียบเคียงสายพันธุ์แลคติกแอสิดแบคทีเรียจากอาหารหมักซึ่งคัดเลือกได้ที่ผลิตส ารกลุ่มเป้าหมาย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลที่ได้จากการวิจัยสามารถคัดเลือกแลคติกแอสิดแบคทีเรียจากอาหารหมักที่อาจผลิตสารกลุ่มเพปไทด์หรือสารโมเลกุลเล็กที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ ก่อโรค ทราบชนิดของแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ สามารถนำไปสู่การศึกษาต่อเพื่อพิจารณาความเป็นไปได้ในการนำไปประยุกต์ใช้โดยเฉพาะกับอาหาร

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุและอุปกรณ์

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)	**บริษัทผู้ผลิต**
Cooked Meat Medium	Difco
de Man Rogasa Sharp Agar (MRS agar)	Merck
de Man Rogasa Sharp Broth (MRS broth)	Merck
Lactose Broth	Difco
Phenol Red Broth Base	Difco
Plate Count Agar (PCA)	Merck
Potato Dextrose Agar (PDA)	Merck
Trypticase soy agar (TSA)	Merck
Trypticase soy broth (TSB)	Merck
Sabouraud dextrose agar (SDA)	Merck
sabouraud dextrose broth (SDB)	Difco

2. สารเคมี

Acetic acid (glacial)	Merck
Absolute ethanol	Merck
Amygdalin	Fluka
Bromocresol purple	LABCHEM
Catalase	Sigma
Citric acid	Merck
D(-)Arabinose	Himedia
D(+)Cellobiose	Fluka

2. สารเคมี (ต่อ)	**บริษัทผู้ผลิต**
D-Fructose	Univar
D-Glucose	Univar
D-Maltose	Labchem
D(-)Ribose	Labchem
D-Sorbitol	BD
Ethanol	Merck
Ethyl acetate	Merck
Ferrous sulfate heptahydrate ($FeSO_4.7H_2O$)	Merck
Folin–Ciocalteau reagent	Merck
Galactose	Fluka
Gallic acid	Sigma
Glacial acetic acid	Merck
Gamma aminobutyric acid	Merck
Hydrochloric acid	Labscan
Hydrogen peroxide	Merck
L(+)Rhamnose	Himedia
L-ascobic acid (Vitamin C)	Sigma
Indole-3-butyric acid	Fluka
n-butanol	Merck
Mannitol	Merck
Methanol	Merck
Ninhydrin	Merck
Peptone	Difco
Phenol	Merck
Pronase	Fluka
Proteinase K	Novagen
Raffinose	Difco

2. สารเคมี (ต่อ)	**บริษัทผู้ผลิต**
Sodium acetate	Merck
Sodium bicarbonate	Merck
Sodium chloride	Merck
Sodium hydroxide	Merck
Sucrose	Merck
Sulfuric acid	Merck
TLC plate silica gel plate (60 F254, 0.25 มิลลิเมตร)	Merck
Trehalose	Fluka

3. เครื่องมือและอุปกรณ์

ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)	Heraeus
ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow carbinet)	Microflow
ตู้อบไอร้อน (hot air oven)	Venticell
หม้อนึ่งความดัน (autoclave)	Tomy
เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge)	Harrier
เตาแม่เหล็ก (stirring heating plate)	stuart
เครื่องชั่ง (balance)	Mettle toledo
เครื่องวัดพีเอช	Mettle toledo
กล้องจุลทรรศน์	Olympus
API 50 CH	BioMrieux
Filter paper	Whatman No.1
Micropipette	Eppendorf
Syring-diven filter unit (0.22 และ 0.45 ไมโครเมตร)	Millipore
Syring (5 และ 10มิลลิลิตร)	Nipro
Spectrophotometer	Thermo Spectronic
Vortex mixer	Scientifc
Water bath	Julabo

วิธีการทดลอง

1. การแยกแลคติกแอสิดแบคทีเรียจากอาหารหมัก

1.1 การเก็บตัวอย่าง

สุ่มเก็บตัวอย่างอาหารหมักซึ่งผลิตจากพืชและเนื้อสัตว์ชนิดต่าง ๆ ที่เป็นอาหารหมักของไทย ได้แก่ แหนม , ปลาส้ม, ไข่ปลาส้ม, หน่อไม้ดอง, ปลาแป้งแดง, ไส้กรอกอีสาน, หนางเนื้อวัวหมัก และ หอยดอง โดยเก็บตัวอย่างจากตลาดสดและศูนย์การค้าในภาคใต้ รวมทั้งหมด 51 ตัวอย่าง

1.2 การแยกแลคติกแอสิดแบคทีเรียจากอาหารหมัก

ชั่งตัวอย่างอาหาร 25 กรัม เจือจางในสารละลายน้ำเกลือปราศจากเชื้อ 0.85 % (0.85% normal saline dilution) ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ใส่ลงในถุงพลาสติกจากนั้นนำไปตีปั่นผสมให้เข้ากันดีโดยใช้เครื่อง stomacher นาน 2 นาที ใช้ปิเปตต์ดูด แต่ละตัวอย่างปริมา ตรละ 1 มิลลิลิตร ทำการ pour plate และ 0.1 มิลลิลิตร สำหรับการ spread plate ใส่ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ de Man Rogosa and Sharp (MRS) agar ที่เติม Bromcresol purple 0.004% และ Sodium azide 0.02% นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C 18-24 ชั่วโมง กรณีที่ตัวอย่างเป็นอาหารเหลวสามารถนำมา streak โดยตรงบนอาหาร MRS agar ที่เติม Bromcresol purple 0.004% และ Sodium azide 0.02% รวมทั้งการดูดตัวอย่างมา 0.1 มิลลิลิตร สำหรับการ spread plate คัดเลือกโคโลนีซึ่งมีสีเหลืองล้อมรอบโคโลนี ตรวจสอบความบริสุทธิโดยย้อมสีแบคทีเรียเพื่อดูการติดสีแกรม รูปร่างและการเรียงตัว ซึ่งแลคติกแอสิดแบคทีเรียจะติดสีแกรมบวก นำแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่บริสุทธิ์แล้วมาทดสอบการสร้างเอนไซม์ catalase โดยการหยด 3% ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ลงบนสไลด์ 1 หยด แล้วเขี่ยแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่เป็นโค โลนีเดี่ยวที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันจากอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ลงไป 1 loop อ่านผลทันที ถ้ามีฟองอากาศเกิดขึ้นแสดงว่าให้ผล catalase เป็นบวก และไม่มีฟองอากาศจะให้ผล catalase เป็นลบ ซึ่งแลคติกแอสิดแบคทีเรียจะให้ผล catalase เป็นลบ (Alexsson, 1993) เก็บ stock culture ของแลคติกแอสิดแบคทีเรี ยที่คัดแยกได้โดยการ stab ลงบนอาหาร MRS agar slant เก็บที่อุณหภูมิ 4°C และทำการถ่ายเชื้อทุก 2 สัปดาห์ และเก็บเชื้อไว้ในสารละลายกรีเซอรอลที่มีความเข้มข้น 20% ที่อุณหภูมิ -80°C

2. คัดเลือกเชื้อที่มีการเจริญได้ดี

ถ่ายแลคติกแอสิดแบคทีเรีย อายุ 24 ชั่วโมง 1 loopful จากหลอดอาหาร MRS agar ลงในหลอดอาหาร MRS broth ปริมาตร 5 มิลลิตร เชื้อละ 3 หลอด บ่มที่อุณหภูมิ 30ºC เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำมาวัดการเจริญโดยการวัดความขุ่นที่มีความยาว คลื่น 660 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยใช้อาหารชนิดเดียวกันเป็น blank คัดเลือกเชื้อที่มีการเจริญได้ดีมากโดยมีค่า OD_{660nm} > 1.0 เพื่อนำไปคัดเลือกต่อไป

3. การคัดเลือกเชื้อที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

3.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรค

3.1.1 แบคทีเรีย

แบคทีเรียก่อโรคหรือที่ทำให้อาหารเน่าเสียที่นำมาทดสอบจำนวน 5 ไอโซเลท จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม .สงขลานครินทร์ ได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC25923 และ *Salmonella* Typhi PSSCMI0034, *Clostridium perfringens*, *Shigella sonneii* และ *Listeria monocytogenes* ส่วนแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่ใช้เพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบคัดเลือกได้ตามที่กล่าวมาแล้ว

3.1.2 การเตรียมน้ำเลี้ยงแลคติกแอสิดแบคทีเรีย

เตรียมแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่ คัดเลือกได้จากตัวอย่างอาหารหมัก โดยเลี้ยงในอาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้ออยู่ในช่วง log phase ซึ่งเชื้อจะสร้างสารปฐมภูมิ (primary metabolite) ที่มีโอกาสได้สารแบคเทอริโอซิน นำมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งโดยนำแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร MRS broth ปั่นแยกที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที โดยแยกเอาเฉพาะส่วนใส (culture superna tant) นำส่วนใสที่ได้ปรับ pH เป็น 6.5 ด้วย 1N NaOH แล้วทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านแผ่นกรองขนาดรูพรุน 0.2 และ 0.45 ไมโครเมตร

3.1.3 การเตรียมแบคทีเรียก่อโรค

ในเบื้องต้นการทดสอบใช้เฉพาะ *S. aureus* ATCC25923 และ *S.* Typhi PSSCMI0034 ซึ่งเป็นเชื้อที่มีโอกาสปนเปื้อนในอาหารได้สูง เช่น แหนม ในการทดลองเลี้ยงเชื้อในอาหาร Tryptic soy broth (TSB) บ่มที่อุณหภูมิ 35ºC เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อเจริญก่อนที่จะนำมาทดสอบ

3.1.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียโดยใช้วิธี Agar well diffusion assay

นำเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้มาปรับความขุ่นให้ได้ 0.5 McFarland standard (1.5×10^{8} cell/ml) โดยใช้น้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อและเจือจางให้ได้ระดับความเข้มข้น 10^{6} cell/ml เป็นเชื้อตั้งต้น จากนั้นใช้ cotton swab จุ่มเชื้อตั้งต้นแล้วบิดให้หมาด swab ลงบนผิวหน้าของอา หาร Tryptic soy agar (TSA) ให้ทั่ว โดยอาหารเลี้ยงแต่ละ plate มีปริมาตรอาหาร 22 ml ทิ้งไว้ให้แห้งแล้วทำการเจาะหลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 4 มิลลิเมตร หยดสารส่วนใส (culture supernatant) ที่ได้จากแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่เตรียมไว้หลุมละ 140 ไมโครลิตร ซึ่งเติมหลุมพอดี บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดขนาดวงใสของการยับยั้งที่เกิดขึ้นโดยใช้ Vernier caliper เพื่อดูความสามารถในการยับยั้ง และเปรียบเทียบกันระหว่างการทดสอบกับส่วนใสที่เป็นชุดควบคุม ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยกำหนดให้

ชุดควบคุมทางลบ (negative control) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ (TSA) + MRS broth pH 6.5

ชุดควบคุมทางบวก (positive control) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ (TSA) + culture supernatant ที่ไม่ปรับ pH

3.2 เชื้อราและยีสต์

เชื้อราและยีสต์ ที่นำมาทดสอบจำนวน 5 ไอโซเลท จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม .สงขลานครินทร์ ได้แก่ *Candida albicans* ATCC10231, *Saccharomyces cerevisiae*, *Penicillium* sp., *Rhodotorula* sp. และ *Asper gillus* sp.

3.2.1 การเตรียมเชื้อรา

ใช้เชื้อรา *Aspergillus* sp. และ *Penicillium* sp. เลี้ยงบนอาหาร Potato dex trose agar (PDA) slant บ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 3 วัน เพื่อให้เชื้อสร้างสปอร์แล้วนำมาเตรียม spore suspention โดยเติม sterile 0.85% normal saline solution (NSS) ลงในอาหาร PDA slant 5 มิลลิลิตร ใช้เข็มเขี่ย spore รา แล้วนำไป vortex จากนั้นจึงใช้ Dropper หรือ Loop หยด spore suspension หยดลงบน Haemacytometer ข้างละ 1 หยด จากนั้นใช้ Cover slip ปิดทับกดเบาๆ นับสปอร์ราแล้วนำมาคำนวณ โดยใช้สูตร 4B x 10^6 cell (โดย B คือ ค่าเฉลี่ยจำนวนสปอร์ราที่นับได้ใน 10 ช่อง) ปรับให้ได้ความเข้มข้นที่ 10^5 spore/ml

3.2.2 การเตรียมเชื้อยีสต์

ใช้เชื้อยีสต์ *Rhodotorula* sp. และ *C. albican* ATCC10231 และ *S. cerevisiae* เลี้ยงในอาหาร Sabouraud Dextrose agar (SDB) บ่มที่อุณหภูมิ 35°C สำหรับเชื้อ *C. albican* ATCC10231 และ 30°C สำหรับเชื้อ *Rhodotorula* sp. และ *S. cerevisiae* เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำยีสต์ที่เลี้ยงไว้มาปรับความขุ่นให้ได้ 0.5 McFarland standard (1.5×10^8 cell/ml) โดยใช้น้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อและเจือจางให้ได้ระดับความเข้มข้น 10^4 cell/ml เป็นเชื้อตั้งต้น

3.2.3 ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราและยีสต์

การทดสอบฤทธิ์ต้าน เชื้อราและยีสต์ โดยหยดสารส่วนใส (supernatant) ที่ได้จากแลคติกแอสิดแบคทีเรีย (ข้อ 3.1.2) ผสมสารทดสอบกับอาหาร PDA โดยเติมสารทดสอบ 2,3 และ 4% ในอาหาร PDA ที่ sterile แล้วเท plate แล้วนำเชื้อทดสอบที่เตรียมไว้ข้างต้น (3.2.1 และ 3.2.2) spread ลงบนผิวหน้าอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 35°C สำหรับ *C. albican* ATCC10231 และ 30°C สำหรับ *Rhodotorula* sp. และ *S. cerevisiae* เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูการเจริญของเชื้อบนผิวหน้าอาหาร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยกำหนดให้

ชุดควบคุมทางลบ (negative control) คือ อาหาร PDA + 2,3 และ 4%MRS broth

ชุดควบคุมทางบวก (positive control) คือ อาหาร PDA + 2-4% supernatant ที่ไม่ปรับ pH

นำสารตัวอย่าง (Freeze dried sample) ของแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ที่มีความเข้มข้น 10X ของน้ำเลี้ยงเชื้อ มาทดสอบเช่นเดียวกับข้างบน

4. ศึกษาการเจริญของเชื้อที่คัดเลือกได้และการสร้างสารต้านจุลินทรีย์

เลี้ยงแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ โดยเติม 1% ของเชื้อในอาหาร MRS broth 115 ml ในขวด serum bottom (120 ml) บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 และ 35 ชั่วโมง เพื่อศึกษาการเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร และค่า pH นำตัวอย่างไปหมุนเหวี่ยงจากนั้นนำ culture supernatant ที่เวลาต่างๆ ไปปรับเป็น pH 6.5 เพื่อนำไปทำให้อยู่ ในรูปผงแห้ง (Freeze dried) และทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (ข้อ 3.1.4)

5. ผลของเอนไซม์ พีเอช และอุณหภูมิต่าง ๆต่อความทนของสารต้านจุลินทรีย์

5.1 ศึกษาผลของเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ

นำสารตัวอย่าง (Freeze dried sample ของน้ำเลี้ยงเชื้อ) ความเข้มข้น 10 เท่า ปรับ pH เป็น 7.0 สำหรับทดสอบด้วยเอ็นไซม์ catalase และปรับ pH เป็น 7.8 สำหรับทดสอบด้วยเอ็นไซม์ pronase E โดยใช้ความเข้มข้นสุดท้ายของเอ็นไซม์แต่ละชนิดเท่ากับ 0.1 mg/ml ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านแ ผ่นกรองขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร นำสารละลายส่วนใส (supernatant) บ่มที่อุณหภูมิ 37ºC เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สำหรับสารตัวอย่างที่เติมเอนไซม์ pronaseE และ catalase บ่มที่อุณหภูมิ 25ºC เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทำการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยใช้วิธี Agar well diffusion assay (ข้อ 3.2.1) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเอ็นไซม์

5.2 ศึกษาผลของอุณหภูมิ

นำสารตัวอย่าง (Freeze dried sample ของน้ำเลี้ยงเชื้อ) ความเข้มข้น 10 เท่า ปริมาตร 10 ml ปรับ pH เป็น 6.5 นำไปให้ความร้อนความร้อนที่อุณหภูมิต่าง ๆกัน คือ 63, 80 และ 100ºC โดยที่แต่ละอุณหภูมิทดสอบที่เวลา 10, 20 และ 30 นาที และที่อุณหภูมิ 121ºC 15 นาที ตัวอย่างถูกทำให้เย็นก่อนนำไปทดสอบฤทธิ์ต้าน แบคทีเรียโดยใช้วิธี Agar well diffusion assay (ข้อ 3.2.1) กำหนดให้ ชุดควบคุม คือ สารตัวอย่าง (Freeze dried Sample) pH 6.5 ของแลคติกแอสิดแบคทีเรียไอโซเลท N2 แต่ไม่ผ่านความร้อน

5.3 ศึกษาผลของ pH

นำสารตัวอย่าง (Freeze dried sample ของน้ำเลี้ยงเชื้อ) ความเข้มข้น 10 เท่า ปริมาตร 10 ml ปรับ pH ให้มีความแตกต่างกัน คือ 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 โดยใช้ 1M HCl หรือ 1M NaOH ก่อนทำการทดสอบฤทธิ์ต้าน แบคทีเรียโดยใช้วิธี Agar well diffusion assay (ข้อ 3.14) กำหนดให้ชุดควบคุม คือ สารตัวอย่าง (Freeze dried Sample) ของแลคติกแอสิดแบคทีเรียไอโซเลท N2 ที่มี pH 5.2

6. วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสารต้านจุลินทรีย์โดยใช้เทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสารต้านจุลินทรีย์ในตัวอย่าง (Freeze dried sample) ของเชื้อไอโซเลท N2 โดยใช้เทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), (Laemmli, 1970)

6.1 การเตรียมตัวอย่าง

สารตัวอย่าง (Freeze dried sample) ของเชื้อไอโซเลท N2 pH 6.5 ปรับความเข้มข้นเป็น 10 เท่า ด้วย 0.05 mM Tris-HCl pH 6.8 ก่อนนำไป Dialysis ด้วย 0.05 mM Tris-HCl pH 6.8 และทำให้เข้มข้นโดยใช้ CM-cellulose จากนั้นผสมตัวอย่างกับสารละลายบัฟเฟอร์ (4X Sample buffer; 0.2 M Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 40% glycerol, 4% β-mercap toethanol, 0.04% bromophenol blue) ในอัตรส่วน 3:1 ต้มสารละลายโปรตีนตั วอย่างในน้ำเดือดเป็นเวลา 2 นาที ก่อนนำไปใช้

6.2 การเตรียมเจล (polyacrylamide gel)

ประกอบชุดแผ่นแก้วสำหรับเตรียมเจล เตรียมสารละลายของส่วน 12% separating gel (6 มิลลิลิตร) (ภาคผนวก ข) ผสมให้เข้ากันเทลงในชุดแผ่นแก้วที่เตรียมไว้ ค่อยๆหยดน้ำกลั่นให้คลุมผิวเจล ทิ้งไว้ ให้เจลแข็งตัวและเตรียมสารละลายของส่วน 3% stacking gel (ภาคผนวก ข) เทน้ำกลั่นที่คลุมผิวเจลออกและซับให้แห้งเติมสารละลายของส่วน stacking gel ที่เตรียมไว้แล้วค่อยๆสอด comb ลงในแผ่นกระจกเพื่ อให้เกิดช่องสำหรับเติมตัวอย่าง ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวแล้วดึง comb ออก

6.2.3 วิธีการ run gel electrophoresis

นำเจล (polyacrylamide gel) ที่เตรียมไว้ใส่ลงใน chamber เติมสารละลายอิเล็กโทรบัฟเฟอร์ ให้ท่วมผิวเจล ค่อยๆเติมสารละลายโปรตีนตัวอย่างที่เตรียมไว้ลงในช่องเจล จากนั้นต่อกระแสไฟฟ้ากับ chamber โดยใช้กระแสไฟฟ้า 15 มิลลิแอมป์ 45 นาที สังเกตเมื่อตัวอย่างเคลื่อนที่มาถึงส่วนปลายของ separating gel ปิดกระแสไฟฟ้าแล้วนำแผ่นเจลออกจาก chamber นำแผ่นเจลใส่ในภาชนะเติมสีย้อม (staining solution) ให้ท่วมแผ่นเจล ทำการเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือทิ้งไว้ข้ามคืน แล้ วเทสีย้อมออก จากนั้นนำแผ่นเจลแช่ใน destaining solution I ทำการเขย่าเป็นเวลา 15 นาที แล้วแช่ต่อใน destaining solution II สังเกตแถบสีน้ำเงินของโปรตีนที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบขนาดของโปรตีนตัวอย่างกับโปรตีนมาตรฐาน (protein marker) ของบริษัท GE Healthcare: phosphorylase b (94 kDa), ovalbumin (43 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), trypsin inhibitor (20 kD), α-lactalbumin (14 kDa)

7. การเทียบเคียงชนิดของแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

การเทียบเคียงชนิดของแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตสารต้านจุลินทรีย์นอกเหนือจากกรดอินทรีย์ซึ่งคัดเลือกจากข้อ 3 ในระดับสปีชีส์ (Species) ด้วยการทดสอบดังนี้

7.1 การศึกษาทางสัณฐานวิทยา

โดยอาศัยลักษณะการติดสีแกรม การจัดเรียงตัวของเซลล์ รูปร่างและลัก ษณะทางสรีรวิทยา ทดสอบทางชีวเคมี และตรวจสอบชนิดของเชื้อตามวิธีของ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 2 (Kandler and Weiss, 1986)

7.2 การทดสอบความสามารถในการหมักน้ำตาลและการเกิดก๊าซ

ถ่ายแลคติกแอสิดแบคทีเรียอายุ 24 ชั่วโมง จำนวน 1 loop ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับทดสอบการใช้น้ำตาล (phenol red broth base) โดยใช้น้ำตาลความเข้มข้น 1% จำนวน 16 ชนิด ได้แก่ amygdalin, arabinose, cellobiose, esculin, fructose, galactose, glucose, lactose, maltose, mannitol, raffinose, rhamnose, ribose, sorbitol, sucrose และ trehalose บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง บัน ทึกผลการใช้คาร์โบไฮเดรตโดยดูการเปลี่ยนสีในอาหารจากสีม่วงเป็นสีเหลืองและดูการสร้างก๊าซในหลอดดักก๊าซ ถ้ามีก๊าซจัดเป็นกลุ่ม heterofermentative ถ้าไม่มีก๊าซหรือมีก๊าซเล็กน้อยจัดเป็นกลุ่ม homofermentative

7.3 การบ่งชี้ชนิดโดยใช้ชุดทดสอบทางการค้า (Commercial test kit)

การบ่งชี้ชนิดของแลคติกแอสิดแบคทีเรียโดยใช้ ชุดจำแนกแบคทีเรียชนิดสำเร็จรูป API 50 CH (BioMerieux, France) ประกอบด้วย API 50 CHL medium เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ร่วมกับชุดทดสอบ API 50 CH strip ในการศึกษากระบวนการหมักคาร์โบไฮเดรต 49 ชนิด ของแลคติกแอสิดแบคทีเรีย ทำการทดสอบได้โดยการถ่ายแลคติกแอสิดแบคทีเรียอายุ 24 ชั่วโมง ลงในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 3 มิลลิลิตร ปรับความขุ่นมากกว่า 2 McFarland ในอาหาร API 50 CHL medium จากนั้นถ่ายเชื้อที่เตรียมไว้ลงใน API 50 CH strip ช่องละ 120 ไมโครลิตร โดยพยายามไม่ให้มีฟองอากาศเกิดขึ้น กำหนดให้ช่องแรกของ API 50 CH strip คือ control (อาหาร basal medium ที่ไม่มีแหล่งคาร์บอน) บ่มที่อุณหภูมิ 30°C อ่านผลการทดสอบที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เนื่องจากแลคติกแอสิดแบคทีเรียจะมีการใช้น้ำตาลและผลิตกรดออกมามีผลทำให้พีเอชในอาหารเ ลี้ยงเชื้อลดลง สังเกตการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์ในอาหารจากม่วงเป็นสีเหลือง สำหรับช่องที่ 25 ของ API 50 CH strip คือ Esculin ถ้าเชื้อสามารถย่อย

Esculin ได้อาหารจะเปลี่ยนเป็นสีดำ นำผลการทดสอบที่ได้มาเทียบเคียงชนิดของแลคติกแอสิดแบคทีเรียโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ API Web Stand Alone V.5.0

7.4 การบ่งชี้ชนิดโดยใช้ 16S rRNA gene

การบ่งชี้ชนิดของเชื้อโดยใช้ 16S rRNA gene โดยส่งวิเคราะห์ที่โครงการพัฒนาวิชาการ KU-VECTOR ภาควิชาจุลชีววิทยาคณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เริ่มด้วยการสกัดดีเอ็นเอจากแลคติกแอสิดแบคทีเรีย โดยเขี่ยเชื้อจากอาหารแข็งใส่ใน TE buffer 400 µl แล้วเติม lysozyme (50 mg/ml) 8 µl ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมเอนไซม์ proteinase K (20 mg/ml) 4 µl, 10% SDS 20 µl และ RNase (100 mg/ml) 4 µl ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที แล้วเติม 5M NaCl 70 µl ผสมให้เข้ากันเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ จากนั้นเติม 10% CTAB (10% CTAB/0.7M NaCl) 55 µl บ่มที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม chloroform ปริมาตร 1 เท่าของสารละลายและกลับหลอดไปมา ปั่นเหวี่ยงที่ 12000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ถ่ายสารละลายส่วนใสลงในหลอดใหม่แล้วทำขั้นตอนนี้ทำซ้ำอีกรอบ จากนั้นเติม phenol/chloroform ปริมาตร 1 เท่าของสารละลายและกลับหลอดไปมา ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ถ่ายสารละลายส่วนใสลงในหลอดใหม่แล้วเติม isopropanol และกลับหลอดไปมา ปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปริมาตร 1 ml ปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำอีกรอบ เทส่วนใสทิ้งเก็บตะกอนดีเอ็นเอ ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง ละลายตะกอน DNA ด้วยน้ำหรือ TE 20 µl สังเคราะห์ดีเอ็นเอเป้าหมาย (PCR product) โดยใช้เทคนิคเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (Polymerase chain reaction, PCR) ด้วยเครื่อง Thermalcycler PCR โดยใช้ดีเอ็นเอจากแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่เตรียมเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ ปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย นิวคลีโอไทด์ (2 mM dNTP) 5 µl, แมกนีเซียมคลอไรด์ (25 mM $MgCl_2$) 5 µl, ดีเอ็นเอแม่แบบ (≈ 50 ng/µl) 10 µl, เอนไซม์ *Tag* Polymerase 0.25 µl, สารละลายบัฟเฟอร์ (10x buffer) 5µl และไพรเมอร์ FW:520:5'CAGCMGCCGCGGTAATWC3', 900:5'CGTCAATTCMTTTGGTT 3',750: 5'TACCAGGGTATCTAATCC3', RV: 1389; 5'ACGGGCGGTGTGTACAAG3') ชนิดละ 2.5 µl ปรับปริมาตรเป็น 50 ไมโครลิตร ด้วยน้ำดีไอออไนซ์ปลอดเชื้อผสมให้เข้ากันก่อนนำเข้าเครื่อง Thermalcycler PCR และใช้โปรแกรมในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ โดยใช้สภาวะดังนี้ ในช่วงปฏิกิริยา Denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C 3 นาที จำนวน 1 รอบ แล้วเข้าสู่ช่วงเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยทำปฏิกิริยาจำนวน 35 รอบ ในแต่ละรอบจะทำปฏิกิริยา Denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C 30 วินาที Annealing ที่อุณหภูมิ 55°C 30 วินาที และ Extension ที่อุณหภูมิ 72°C 2 นาที หลังจากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 72°C 5 นาที เพื่อให้ทำปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์

จากนั้นนำ PCR Product วิเคราะห์หาลำดับเบสของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Automated DNA Sequencing นำลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลจากเว็บไซต์ของ National Center for Biotechnology Information (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) และสร้าง Phylogene tic tree ของแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่แยกได้ โดยใช้โปรแกรม MEGA 4

8. การสกัดสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

นำน้ำเลี้ยงเชื้อแลคติกแอสิดแบคทีเรีย ที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์มาทำการสกัดแยกสารต้านจุลชีพด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate โดยนำ Freeze dried sample ความเข้มข้น 10 เท่า 5 กรัม ละลายในน้ำ 200 มิลลิลิตร และปรับ pH เป็น 6.5 ด้วย 1N NaOH นำมาสกัดโดยใช้ ethyl acetate 100 มิลลิลิตร ในกรวยแยกรอจนชั้นของน้ำและ ethyl acetate แยกออกจากกันอย่างสมบูรณ์ ในขั้นตอน การสกัดอาจเกิดฟองขึ้นระหว่างชั้นของน้ำและ ethyl acetate กำจัดโดยการเติม NaCl เล็กน้อยและเขย่าเบาๆ เมื่ อชั้นของน้ำและ ethyl acetate แยกออกจากกันอย่างสมบูรณ์ ไขชั้นน้ำออกทางด้านล่างของกรวยแยก ส่วนชั้นของ ethyl acetate เทออกทางด้านบนเพื่อป้องกันการปนเปื้อน เก็ บชั้นของ ethyl acetate ใส่ฟลาสก์เป็นส่วนที่ 1 นำชั้นน้ำที่ไขออกมาสกัดด้วยethyl acetate 100 มิลลิลิตร อีกครั้ง รอจนชั้นของน้ำและ ethyl acetate แยกออกจากกันอย่างสมบูรณ์ เก็บชั้นของ ethyl acetate ใส่ฟลาสก์เป็นส่วนที่ 2 นำชั้นน้ำที่ไขออกมาสกัดด้วย ethyl acetate 100 มิลลิลิตร อีกครั้งรอจนชั้นของน้ำและ ethyl acetate แยกออกจากกันอย่างสมบูรณ์เก็บชั้นน้ำส่วนนี้ไว้เป็นชั้นน้ำส่วนที่ 1 ส่วนชั้นของ ethyl acetate เก็บใส่ฟลาสก์เป็นส่วนที่ 3 นำชั้นของ ethyl acetate ที่เก็บใส่ฟลาสก์ส่วนที่ 1, 2 และ 3 มารวมกันในกรวยแยกเขย่าให้เข้ากันและวางทิ้งไว้เพื่อให้เกิดการแยกชั้นอย่างสมบูรณ์ ไขชั้นน้ำออกมานำไปรวมกับชั้นน้ำ (ชั้นน้ำส่วนที่ 1) ที่เก็บไว้ ส่วนชั้นของ ethyl acetate เก็บใส่ฟลาสก์เติม sodium sulfate anhydrous เพื่อเอาน้ำที่เหลืออยู่ออกจากนั้นกรองเอา sodium sulfate anhy drous (แผนผังที่ 1, ภาคผนวก ข) โดยใช้กรวยกรองที่มีชั้นสำลีที่ผ่านการล้างด้วย ethyl acetate นำสารละลายที่ได้ระเหยเอา ethyl acetate ออกจะได้สารสกัดนำไปใช้ในการทดลองต่อไป และส่วนของชั้นน้ำเก็บในรูปผงแห้ง (Freeze dried) แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (ข้อ 3.1.4)

9. การหาค่า Minimal inhibitory concentration (MIC) Minimal bactericidal concentration (MBC) และ Minimum fungicidal concentration (MFC) ของสารสกัดต้านจุลินทรีย์

9.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

จุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบจำนวน 8 isolates จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม .สงขลานครินทร์ ได้แก่ *S. aureus* ATCC25923, *S.* Typhi PSSCMI0034, *C. perfringens*, *L. monocytogenes*, *S. sonneii*, *Rhodotorula* sp., *C. albicans* ATCC10231 และ *S. cerevisiae*

9.2 การทดสอบหาค่า MIC ต่อเชื้อแบคทีเรียและยีสต์

โดยนำแบคทีเรียและยีสต์มาปรับความขุ่นให้ได้ 0.5 McFarland standard แล้วเจือจางให้ได้ระดับความเข้มข้น 10^6 cell/ml สำหรับ แบคทีเรีย และเจือจางให้ได้ระดับความเข้มข้น 10^4 cell/ml สำหรับ ยีสต์ เป็นเชื้อตั้งต้น ในการทดสอบ ใช้ยา vancomycin และ gentamicin เป็นยามาตรฐานสำหรับแบคทีเรีย และใช้ยา amphotericin B สำหรับ ยีสต์เพื่อใช้ควบคุมในการทดสอบ สำหรับสารสกัดหยาบจะปรับความเข้มข้น 10 เท่า จาก stock solution แล้วเจือจางแบบ serial 2-fold dilution ด้วย 10% DMSO (Dimethyl sulfoxide) ทั้งหมด 9 ความเข้มข้น ดูดสารลงใน 96-well plate หลุมละ 20 ไมโครลิตร เติมอาหาร Mueller Hinton Broth (MHB) / Sabouraud Dextrose Broth (SDB) หลุมละ 80 ไมโครลิตร แล้วเติมเชื้อหลุมละ 100 ไมโครลิตร แต่ละความเข้มข้นทำการทดลอง 3 ซ้ำ สำหรับแบคทีเรียบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เติมสี resazurin (1:30) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร บ่มต่อจนครบ 24 ชั่วโมง และบ่มที่อุณหภูมิ 35°C สำหรับ *C. albicans* ATCC10231 และ 30°C สำหรับ *Rhodotorula* sp และ *S. cerevisiae* เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมสี resazurin (1:30) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร แล้วอ่านผลการทดสอบ โดยค่า MIC คือ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกั ดที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ (สี resazurin ยังคงเป็นสีน้ำเงินหรือม่วง)

โดยกำหนดให้ Growth control คือ อาหาร MHB/SDB + เชื้อทดสอบ + 10% DMSO แทนสารสกัดและ Media control คือ อาหาร MHB/SDB/Sabouraud Dextrose Broth (SDB)

9.3 การหาค่า MBC และ MFC ของสารต้านจุลินทรีย์ที่แยกได้

ใช้ sterile loop จุ่มในหลุมที่ให้ผลการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (สี resazurin ยังคงเป็นสีน้ำเงินหรือม่วง) ลงบนผิวหน้าของอาหาร Tryptic soy agar (TSA) บ่มที่อุณหภูมิ 35°C 24 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรียและ streak ลงบนผิวหน้าของอาหาร Sabouraud Dextrose agar (SDA) สำหรับยีสต์ บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดอ่านผลการทดสอบ ความเข้มข้นที่ไม่มีการเจริญของจุลินทรีย์บนอาหารแข็ง ให้ผลการทดสอบเป็นค่า MBC หรือ MFC

10. การใช้เทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC) เพื่อศึกษาคุณสมบัติของสารต้านจุลินทรีย์

10.1 การเตรียมสารตัวอย่าง (Freeze dried sample)

เตรียมโดยนำแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร MRS broth ปั่นแยกที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที โดยแยกเอาเฉพาะส่วนใส (culture supernatant) นำส่วนใสที่ได้ปรับ pH เป็น 6.5 ด้วย 1N NaOH เก็บในรูปผงแห้ง (Freeze dried) ก่อนนำไปใช้ทดสอบปรับความเข้มข้นของสารตัวอย่าง (Freeze dried sample) ที่มีความเข้มข้น 10 เท่า ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อแล้วกรองผ่านแผ่นกรองขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร

10.2 การแยกสารต้านจุลินทรีย์จาก Freeze dried sample

หยด 3 ไมโครลิตร ของสารตัวอย่าง (Freeze dried sample) ความเข้มข้น 10 เท่า ลงบนแผ่น TLC ที่เคลือบด้วยสาร Silica gel นำแผ่น TLC ใส่ในถัง (tank) ที่เติม n-butanol : acetic acid : water (4:1:1) เมื่อสารผสมเคลื่อนที่ขึ้นมาเกือบถึงขอบของแผ่น TLC นำแผ่น TLC ออกจากถัง (tank) ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง ส่องผ่านใต้แสงยูวีที่ความยาวเคลื่อน 365 และ 254 ก่อนนำไปสเปรย์ด้วยสาร ninhydrin (ninhydrin 1.5 กรัม, n-butanol 100 มิลลิลิตร และ glacial acetic acid 3 มิลลิลิตร) อบที่อุณหภูมิ 100°C 10 นาที หากมีสารกลุ่มเพปไทด์จะเกิดสีของสารประกอบเชิงซ้อนขึ้น สีที่เป็น positive ได้ 2 สี คือ สีน้ำเงินหรือม่วง คำนวณหาค่า retardation factor (R_f) (Masanobu and Ken'ichi., 2003)

การคำนวณหาค่า Retardation factor (R_f)

$$\text{Retardation factor } (R_f) = \frac{\text{ระยะทางที่ตัวถูกละลายเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$

10.3 การแยกสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

สำหรับส่วนของสารสกัดของเชื้อไอโซเลท N2 หยด 10 µl ของสารสกัดลงบนแผ่น TLC นำแผ่น TLC ใส่ใน tank ที่เติม ethyl acetate:chloroform (1:9 v/v) เมื่อสารผสมเคลื่อนที่ขึ้นมาเกือบถึงขอบของแผ่น TLC นำแผ่น TLC ออกจาก tank ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง ส่องผ่านใต้แสงยูวีที่ความยาวเคลื่อน 254 nm spots ตำแหน่งที่เกิดขึ้น คำนวณหาค่า retardation factor (R_f) ขูดแผ่น TLC บริเวณ spots ที่เกิดขึ้นละลายด้วย 10% DMSO ก่อนนำไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง *S.* Typhi PSSCMI0034 นอกจากนี้นำบริเวณ spots ทุกจุดที่เกิดขึ้นละลายด้วย ethyl acetate ก่อนนำไปวิเคราะห์หาชนิดของสารโดยใช้เทคนิค Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) ดังวิธีการทดลองข้อ 10.1

11. ตรวจหาชนิดของสารสกัดต้านจุลินทรีย์โดยใช้เทคนิคGas chromatography mass spectrometry (GC-MS)

วิเคราะห์หาชนิดของสารสกัดจากตัวอย่างโดยใช้เทคนิค Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) นำสารสกัดละลายใน ethyl acetate ฉีดเข้าเครื่อง GC-MS โดยใช้สภาวะในการทดลองดังนี้ คอลัมน์ที่ใช้ คือ HP-5MS ความยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.25 มิลลิตร และความหนาของฟิลล์ 0.25 ไมโครเมตร โดยใช้อุณหภูมิของหัวฉีดเท่ากับ 250°C และก๊าซ helium เป็นตัวพา สำหรับอุณหภูมิที่ใช้ คือ อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 50°C 1 นาที แล้วเพิ่มขึ้นด้วยอัตรา 30°C ต่อนาที จนถึง 280°C และเพิ่มขึ้นด้วยอัตตรา 15°C ต่อนาที จนถึง 310°C เป็นเวลา 5 นาที สำหรับ mass range ของเครื่อง mass spectrometer อยู่ในช่วง 30-550 amu และเก็บบันทึกข้อมูลระบุสารประกอบด้วยคอมพิวเตอร์ที่มี Standard library spectra พร้อมโปรแกรมค้นหาเพื่อใช้เทียบเคียง mass spectrum กับ GC-MS database ชื่อ Wiley 7n.L ส่งวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการทดสอบอาหาร บริษัทห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด (สาขาสงขลา)

บทที่ 3

ผลการทดลอง

1.การแยกแลคติกแอสิดแบคทีเรียจากอาหารหมัก

จากอาหารหมักของไทยชนิดต่างๆ จำนวน 51 ตัวอย่าง สามารถแยกแลคติกแอสิดแบคทีเรียได้ 320 ไอโซเลท (ตารางที่ 3-1) พบว่าตัวอย่าง แหนม สามารถแยก แลคติกแอสิดแบคทีเรียได้มากที่สุด คือ 8.44 ไอโซเลท/ตัวอย่าง หน่อไม้ดอง 7.60 ไอโซเลท/ตัวอย่าง และหอยดอง 6.80 ไอโซเลท/ตัวอย่าง

ตารางที่ 3-1 จำนวนไอโซเลทของแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่สามารถแยกได้จากอาหารหมักของไทย

อาหารหมัก	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลท	จำนวนไอโซเลท/ตัวอย่าง
Nham (แหนม)	16	135	8.44
Plasom (ปลาส้ม)	11	52	4.73
Plapangdang (ปลาแป้งแดง)	7	40	5.71
Nhang (หนาง)	2	9	4.50
Hoy Dong (หอยดอง)	5	34	6.80
Isan sausage (ไส้กรอกอีสาน)	2	7	3.50
Spawn plasom (ไข่ปลาส้ม)	1	4	4.00
Nowmaidong (หน่อไม้ดอง)	3	23	7.60
Kung som (กุ้งส้ม)	4	16	4.00
รวม	51	320	

2. คัดเลือกเชื้อที่มีการเจริญได้ดี

จากการแยกแลคติกแอสิดแบคทีเรียจากอาหารหมักของไทยชนิดต่างๆ 51 ตัวอย่าง พบว่าประมาณ 47% (ตารางที่ 3-2) ของเชื้อที่แยกได้มีความสามารถในการ เจริญระดับดีเยี่ยม โดยพิจารณาจากการโตเร็วในอาหาร MRS ที่มีค่า OD_{660} เกิน 1.5 นำไปคัดเลือกต่อเพื่อหาเชื้อที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคได้ดี ขณะที่เชื้อ 52.81% มีการเจริญในระดับดีมาก

ตารางที่ 3-2 การเจริญของ แลคติกแอสิดแบคทีเรียที่คัดแยกจากอาหารหมักชนิดต่างๆ เมื่อเลี้ยงในอาหาร MRS broth เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

การเจริญ (OD_{660nm})	ระดับการเจริญ	จำนวนไอโซเลท	เปอร์เซ็นต์
> 1.5	เจริญดีเยี่ยม	151	47.19
> 1.0-1.5	เจริญดีมาก	169	52.81
ทั้งหมด		320	100

3. การคัดเลือกเชื้อที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

3.1 การยับยั้งแบคทีเรีย

จากการนำ แลคติกแอสิดแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จำนวน 151 ไอโซเลท (OD_{660nm} > 1.5) มาทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคในอาหารโดยวิธี agar well diffusion โดยใช้เชื้อก่อโรค 2 ชนิด คือ *S.* Typhi PSSCMI0034 และ *S. aureus* ATCC 25923 พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซ ลล์ที่ไม่ผ่านการปรับ pH จำนวน 76 ไอโซเลท (50.33%) สามารถยับยั้ง *S.* Typhi PSSCMI0034 (ตารางที่ 3-3) และมีเพียง 34 ไอโซเลท (22.52%) สามารถยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923 ได้ (ตารางที่ 3-4) โดยพบว่าไอโซเลท NN13 มีฤทธิ์ยับยั้งได้ ดีที่สุดโดยสามารถยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923 และ *S.* Typhi PSSCMI0034 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของการยับยั้ง คือ 19.4 และ 24.3 มิลลิเมตร ตามลำดับ (รูปที่ 3-1) กรณีที่นำน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ปรับ pH เป็น 6.5 และกรองผ่านแผ่นกรองขนาดรูพรุน 0.22 และ 0.45 ไมโครเมตร พบว่ามีแลคติกแอสิดแบคทีเรีย จำนวน 5 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท N2, YA031, NCB3, NCB15 และ NNA7 สามารถยับ ยั้ง *S.* Typhi PSSCMI0034 หรือ *S. aureus* ATCC 25923 ได้ (ตารางที่ 3-5) และพบว่ามีเพียงไอโซเลท NCB3 และ NNA7 ที่สามารถยับ ยั้งได้ทั้งเชื้อ *S.* Typhi PSSCMI0034 และ *S. aureus* ATCC25923 น้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านแผ่นกรองขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร ของไอโซเลท NCB3 สามารถยับยั้ง *S.* Typhi PSSCMI0034 ได้โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของการยับยั้ง คือ 15.50 มิลลิเมตร (ตารางที่ 3-5) และพบว่ามีเพียงไอโซเลท N2, YA031 และ NCB3 ซึ่งกรองผ่านแผ่นกรองขนาดรูพรุน 0.22 ไมโครเมตร สามารถยับยั้ง *S.* Typhi PSSCMI0034 ได้โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของการยับยั้ง คือ 18.50, 18.50 และ 14.87 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 3-5) จากผลการทดลองแสดงว่าสภาพความเป็นกรดของน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ (เฉลี่ย pH 3.83±0.32) มีความสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ดีแต่มีความแตกต่างกันเพราะไอโซเลท NN13 (pH 3.6) ให้ผลการยับยั้งดีที่สุด แต่กรณีของไอโซเลท N2, YA031 และ NCB3 นอกจากสภาพความเป็นกรดแล้วพบว่ายังมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆด้วยที่ไม่ใช่กรด (pH ถูกปรับเป็น 6.5) ที่ยับยั้ง *S.* Typhi PSSCMI0034 และน่าจะเป็นสารที่มีขนาดโมเลกุลเล็กและอยู่ในรูปสารละลายหรือคอลลอยด์จึงผ่านการกรองที่ใช้ขนาดรูพรุน 0.22 และ 0.45 ไมโครเมตรได้ (ตารางที่ 3-5 และรูปที่ 3-2)

ตารางที่ 3-3 ฤทธิ์ต้าน *S.* Typhi PSSCMI0034 ของน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์แลคติกแอสิดแบคทีเรียที่ไม่ผ่านการปรับ pH

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของการยับยั้ง (มิลลิเมตร)	(++++)	(+++)	(++)	(+)	(-)
จำนวนไอโซเลท	7	15	13	41	75
เปอร์เซ็นต์	4.64	9.93	8.61	27.15	49.67

หมายเหตุ (++++) : ดีมาก, ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของการยับยั้งมากกว่า 21 มิลลิเมตร

(+++) : ดี, ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของการยับยั้ง 18.0 – 20.0 มิลลิเมตร

(++) : ปานกลาง, ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของการยับยั้ง 14.0 – 17.0 มิลลิเมตร

(+) : น้อย, ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของการยับยั้ง 10.0 – 13.0 มิลลิเมตร

(-) : ไม่สามาถรยับยั้งเชื้อก่อโรคได้

ตารางที่ 3-4 ฤทธิ์ต้าน *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ของน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์แลคติกแอสิดแบคทีเรียที่ไม่ผ่านการปรับ pH

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของการยับยั้ง (มิลลิเมตร)	(++++)	(+++)	(++)	(+)	(-)
จำนวนไอโซเลท	-	4	13	17	117
เปอร์เซ็นต์	-	2.65	8.61	11.26	77.48

หมายเหตุ (++++) : ดีมาก, ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของการยับยั้งมากกว่า 21 มิลลิเมตร

(+++) : ดี, ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของการยับยั้ง 18.0 – 20.0 มิลลิเมตร

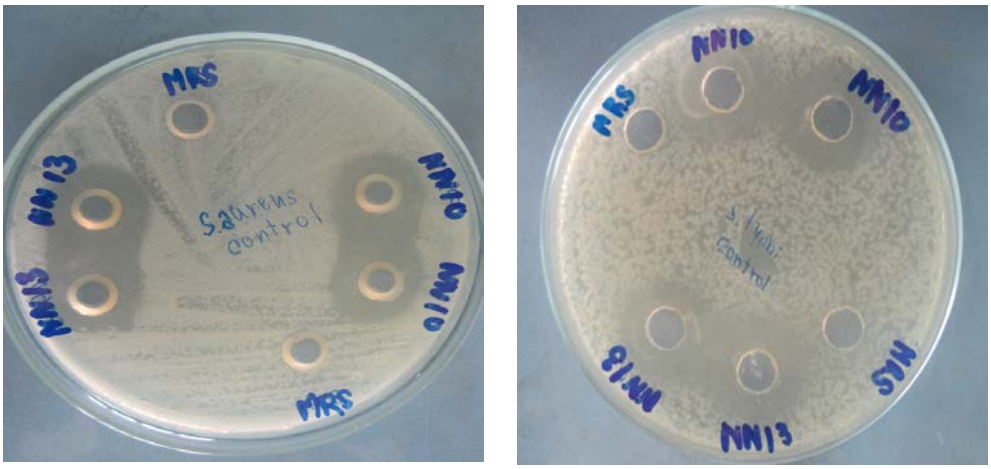
(++) : ปานกลาง, ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของการยับยั้ง 14.0 – 17.0 มิลลิเมตร

(+) : น้อย, ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของการยับยั้ง 10.0 – 13.0 มิลลิเมตร

(-) : ไม่สามาถรยับยั้งเชื้อก่อโรคได้

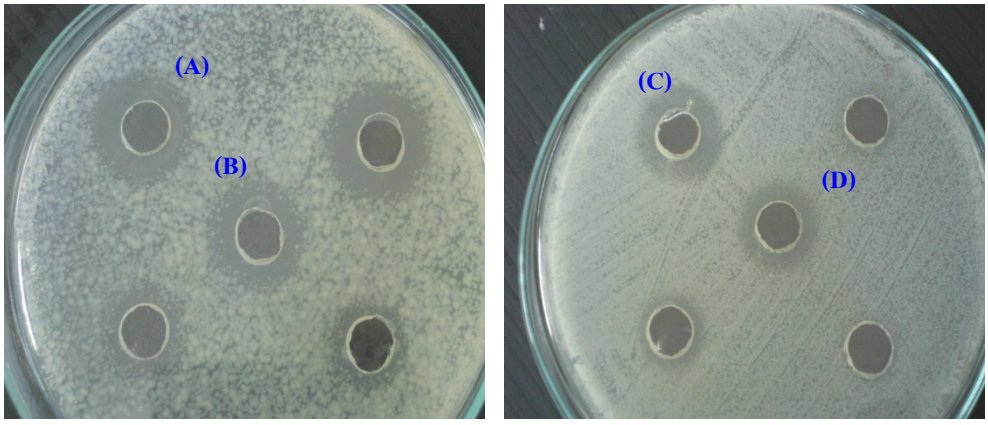
ตารางที่ 3-5 ฤทธิ์ต้าน *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *S.* Typhi PSSCMI0034 ของไอโซเลทที่คัดแยกได้โดยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ปรับ pH เป็น 6.5

ไอโซเลท	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของการยับยั้ง (มิลลิเมตร)			
	S. typhi		*S.aureus*	
	แผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร	แผ่นกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร	แผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร	แผ่นกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร
NNA7	18.75	-	14.00	-
NCB3	15.50	14.87	-	12.00
N2	19.00	18.50	-	-
YA031	-	18.50	-	-
NCB15	18.00	-	-	-



(a) (b)

รูปที่ 3-1 ฤทธิ์ต้าน *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Salmonella* Typhi. PSSCMI0034 (a: 19.4 และ b: 24.3 มิลลิเมตร) จากน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของไอโซเลท NN13 ที่ไม่มีการปรับ pH (3.6)



a (ก่อนปรับ pH) b (หลังปรับ pH)

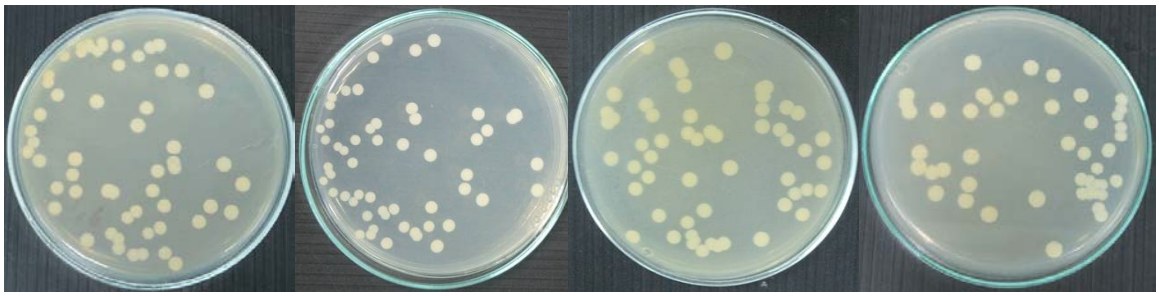
รูปที่ 3-2 ฤทธิ์ต้าน *Salmonella* Typhi. PSSCMI0034 จากน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ก่อนและหลังปรับ pH เป็น 6.5 และกรองผ่านแผ่นกรองขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร ตามลำดับ โดยไอโซเลท N2 (a, 21.6: c, 19.0 มิลลิเมตร) และ YA031 (b, 20.5: d, 18.5 มิลลิเมตร)

3.2 การยับยั้งเชื้อราและยีสต์

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราและยีสต์ที่พบในอาหาร โดยใช้ *C. albicans* ATCC10231, *Rhodotorula* sp., *Aspergillus* sp. และ *Penicillium* sp. เป็นเชื้อทดสอบ ดังวิธีการทดลองที่ 3.2.3 โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ที่ผ่านการปรับ pH เป็น 6.5 ของแลคติกแอสิดแบคทีเรียไอโซเลท N2 และ NCB3 มาทดสอบพบว่าไม่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ นอกจากนี้ได้นำสารตัวอย่าง (Freeze dried Sample) ความเข้มข้น 10 เท่า ของแลคติกแอสิดแบคทีเรียไอโซเลท N2 ปรับ pH เป็น 6.5 เพื่อยับยั้งเชื้อราและยีสต์ ดังวิธีการทดลองที่ 3.2.3 พบว่าสามารถยับ ยั้ง *Aspergillus* sp. *C. albicans* ATCC10231 และ *Rhodotorula* sp. ได้เล็กน้อยเมื่อเทียบกับชุดควบคุม (รูปที่ 3-3, 3-4 และ 3-5) กรณีของไอโซเลท NCB3 ไม่ได้ศึกษาในรูปแบบสารตัวอย่าง (Freeze dried Sample) เนื่องจากผลที่ ได้จากการทดสอบน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ที่ผ่านการปรับ pH เป็น 6.5 ไม่พบการยับยั้งเลยเมื่อเทียบกับไอโซเลท N2 ซึ่งกรณีของไอโซเลท N2 มีการยับยั้งบ้าง แต่ในรูป (Freeze dried Sample) ความเข้มข้น 10 เท่า ก็ยังคงยับยั้งเพียงเล็กน้อย

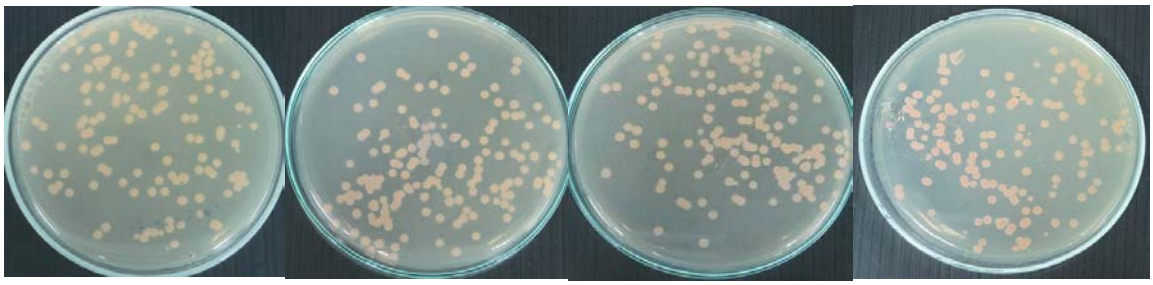
(a) **(b)** **(c)** **(d)**

รูปที่ 3-3 ฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Aspergillus* sp. จากสารตัวอย่าง (Freeze dried Sample) ความเข้มข้น 10 เท่า ของไอโซเลท N2 โดยกรองผ่านแผ่นกรองขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร (a; 4% 10xMRS, b; 4% 10xFDS ที่ไม่ปรับ pH, c-d; 3 และ 4% 10xFDS pH 6.5)



(a) (b) (c) (d)

รูปที่ 3-4 ฤทธิ์ต้าน *Candida albicans* ATCC 10231 จากสารตัวอย่าง (Freeze dried Sample) ความเข้มข้น 10 เท่า ของเชื้อไอโซเลท N2 โดยกรองผ่านแผ่นกรองขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร (a; 4%10xMRS, b; 4% 10xFDS ที่ไม่ปรับ pH, c-d; 3 และ 4% 10xFDS pH 6.5)

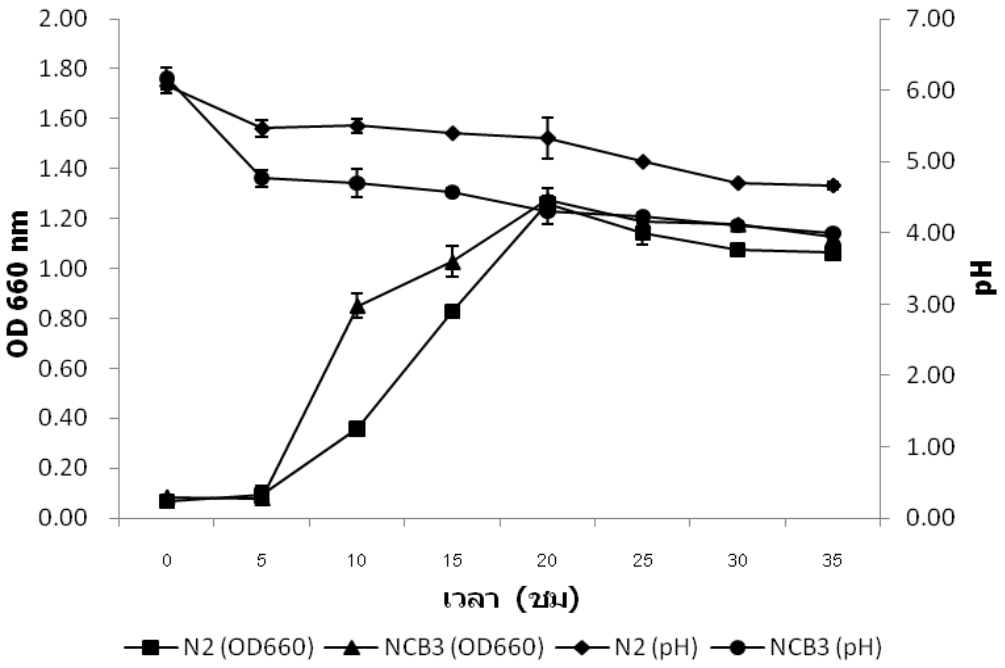


(a) (b) (c) (d)

รูปที่ 3-5 ฤทธิ์ต้าน *Rhodotorula* sp. จากสารตัวอย่าง (Freeze dried Sample) ความเข้มข้น 10 เท่า ของเชื้อไอโซเลท N2 โดยกรองผ่านแผ่นกรองขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร (a; 4%10xMRS, b; 4% 10xFDS ที่ไม่ปรับ pH, c-d; 3 และ 4% 10xFDS pH 6.5)

4. การเจริญของเชื้อที่คัดเลือกได้และการสร้างสารต้านจุลินทรีย์

จากการศึกษาการเจริญของ แลคติกแอสิดแบคทีเรียไอโซเลท N2 และ NCB3 ในอาหาร MRS broth เป็นเวลา 35 ชั่วโมง และวัดการเจริญจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร พร้อมติดตามการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชทุกๆ 5 ชั่วโมง และกิจกรรมการยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ พบว่าไอโซเลท N2 และ NCB3 เข้าสู่ช่วง log phase ในชั่วโมงที่ 5 ส่วน log phase อยู่ในช่วง 5-20 ชั่วโมง โดยมีค่า OD_{660} ก่อนเข้าสู้ช่วง stationary phase ประมาณ 1.3 และเข้าสู่ช่วง stationary phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 20-35 และค่าพีเอ ชมีแนวโน้มลด ลงเรื่อย ๆตลอดระยะเวลาการบ่มเชื้อ ในกรณีของไอโซเลท N2 ค่าพีเอชลดลงจาก 5.6 เป็น 4.7 และค่าพีเอชของไอโซเลท NCB3 ลดลงจาก 5.8 เป็น 4.0 เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยง (รูปที่ 3-6)



รูปที่ 3-6 การเจริญและค่าพีเอชของแลคติกแอสิดแบคทีเรีย N2 และ NCB3 ที่เลี้ยงในอาหาร MRS broth

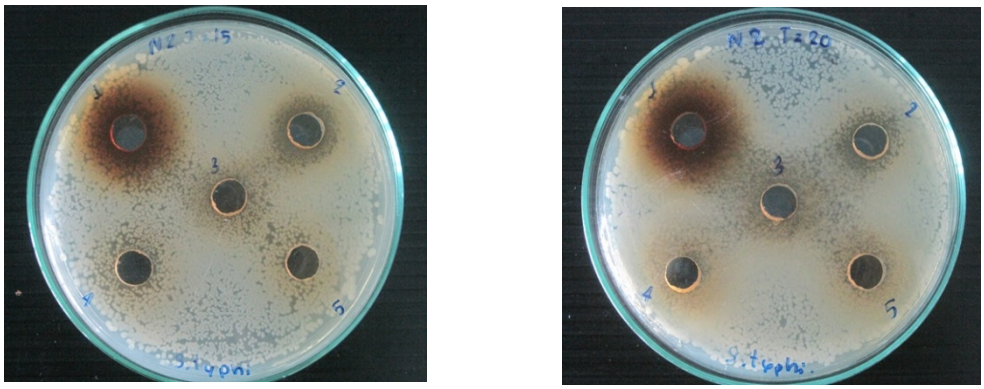
สำหรับการสร้างสารต้านจุลินทรีย์จากการนำ culture supernatant ที่เวลาต่าง ๆ ปรับเป็น pH 6.5 และทำให้อยู่ในรูปผงแห้ง (Freeze dried) ก่อนนำไปทดสอบการยับยั้งการเจริญของ *S.* Typhi PSSCMI0034 และ *S. aureus* ATCC25923 ดังข้อ 3.1.4 พบว่าไอโซเลท N2 สามารถยับยั้ง *S.* Typhi PSSCMI0034 ได้ในช่วงชั่วโมงที่ 15-20 โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง

ของการยับยั้ง คือ 12.4 และ 14.3 มิลลิเมตร ตามลำดับ แต่หลังจากนั้นมีการยับยั้งน้อยลงจนไม่เกิดการยับยั้งที่ชั่วโมง 35

5. ผลของเอนไซม์ พีเอช และอุณหภูมิต่าง ๆต่อความทนของสารต้านจุลินทรีย์

5.1 ผลของเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ

จากการศึกษาผลของเอนไซม์ต่อความคงตัวของสารในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ของไอโซเลท N2 และ NCB3 พบว่าเมื่อนำสารตัวอย่าง (Freeze dried sample) ของไอโซเลท N2 มา treat ด้วยเอนไซม์ pronase E และ catalase ก่อนนำไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคพบว่าไม่เกิดการยับยั้งเชื้อทดสอบเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้ treat ด้วยเอนไซม์ แสดงว่าสารที่ได้จากไอโซเลท N2 ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ย่ อยโปรตีนและ catalase แสดงว่าสารที่ยับยั้งเชื้อทดสอบเป็นสารกลุ่มโปรตีน และมี H_2O_2 ซึ่งพบว่าไอโซเลท N2 สามารถยับยั้ง *S.* Typhi PSSCMI0034 ได้ในช่วงชั่วโมงที่ 15-20 (รูปที่ 3-7)

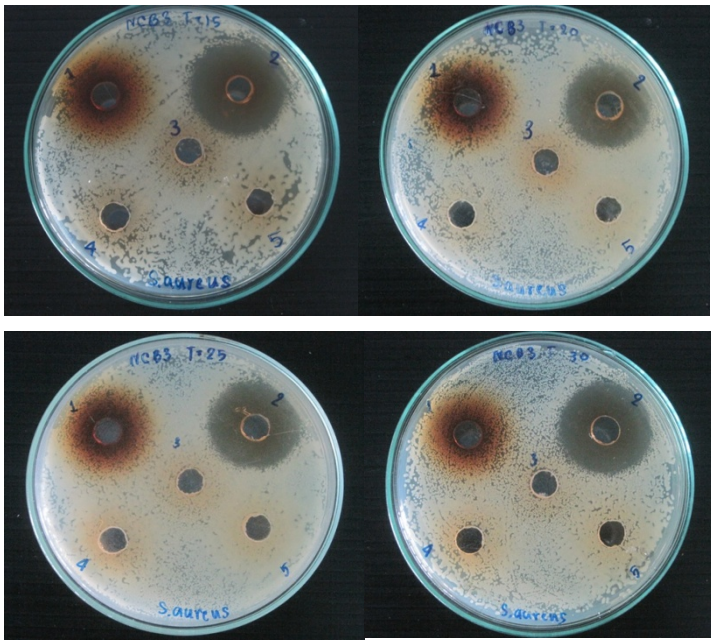


(a) (b)

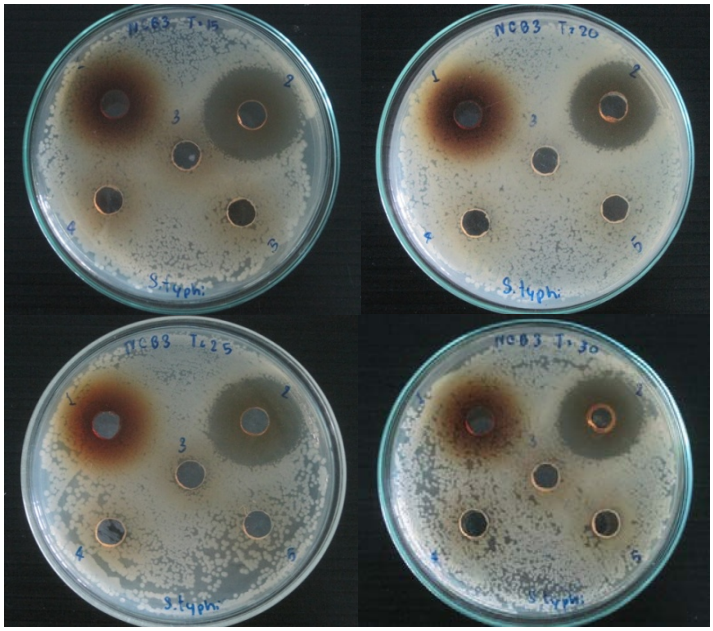
รูปที่ 3-7 ผลของเอนไซม์ต่อฤทธิ์ต้าน *S.* Typhi PSSCMI0034 ในช่วงชั่วโมงที่ 15 (a) และ 20 (b) ของ Freeze dried sample ที่ได้จากไอโซเลท N2 (1; 10xMRS, 2; 10xFDS (12 มิลลิเมตร), 3; 10xFDS pH 6.5 (14 มิลลิเมตร), 4; 10xFDS pH7.0 + Catalase, 5; 10xFDS pH7.8+ Pronase)

สำหรับเชื้อไอโซเลท NCB3 มา treat ด้วยเอนไซม์พบว่า ไม่เกิดการยับยั้งเชื้อทดสอบเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้ treat ด้วยเอนไซม์ และพบว่าสารตัวอย่าง (Freeze dried sample) pH 6.5 ไม่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้เช่นกัน

(a)



(b)



รูปที่ 3-8 ผลของเอนไซม์ต่อฤทธิ์ต้าน *S.* Typhi PSSCMI0034 (a) และ *S. aureus* ATCC 25923 (b) ของ Freeze dried sample ที่ได้จากไอโซเลท NCB3 (1; 10xMRS, 2; 10xFDS, 3;10xFDS pH 6.5, 4; 10xFDS pH7.0 + Catalase, 5; 10xFDS pH7.8 + Pronase)

5.2 ผลของอุณหภูมิ

จากการนำสารตัวอย่าง (Freeze dried Sample) แลคติกแอสิดแบคทีเรียไอโซเลท N2 ปรับ pH เป็น 6.5 และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 63, 80, 100 และ 121ºC เป็นเวลาต่างๆ กัน ก่อนนำไปทดสอบการยับยั้งการเจริญของ *S.* Typhi PSSCMI0034 โดยวิธี agar well diffusion assay เปรียบเทียบกับสารตัวอย่าง (Freeze dried Sample) pH 6.5 ที่ไม่ได้ผ่านความร้อน (ชุดควบคุม) พบว่าสารตัวอย่าง (Freeze dried Sample) แลคติกแอสิดแบคทีเรียไอโซเลท N2 สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 63ºC และมีฤทธิ์โนก ารยับยั้งการเจริญของ *S.* Typhi PSSCMI0034 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของการยับยั้ง คือ 14.17, 11.83 และ 11.67 มิลลิเมตร เมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 63ºC เป็นเวลา 10,20 และ 30 นาที ตามลำดับ (ตารางที่ 3-6) แต่เมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิมากกว่า 63ºC คือ 80ºC พบว่าสูญเสียความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *S.* Typhi PSSCMI0034

5.3 ผลของ pH

จากการนำสารตัวอย่าง (Freeze dried Sample) แลคติกแอสิดแบคทีเรียไอโซเลท N2 ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 2-10 ก่อนนำไปทดสอบการยับยั้งการเจริญของ *S.* Typhi PSSCMI0034 โดยวิธี agar well diffusion assay เปรียบเทียบกับสารตัวอย่าง (Freeze dried Sample) ที่ไม่ได้ผ่านการปรับ pH พบว่าสารตัวอย่าง (Freeze dried Sample) แลคติกแอสิดแบคทีเรียไอโซเลท N2 มีความคงตัวดีในช่วง pH 2-6 และมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญข อง *S.* Typhi PSSCMI0034 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของการยับยั้งอยู่ในช่วง 16.00-16.75 มิลลิเมตร แต่เมื่อระดับ pH 7 ขึ้นไป พบว่าสารตัวอย่าง (Freeze dried Sample) ของแลคติกแอสิดแบคทีเรียไอโซเลท N2 สูญเสียความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *S.* Typhi PSSCMI0034 (ตารางที่ 3-7)

ตารางที่ 3-6 ผลของอุณหภูมิต่อฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารตัวอย่าง (Freeze dried Sample) ความเข้มข้น 10 เท่า ที่ได้จากแลคติกแอสิดแบคทีเรียไอโซเลท N2 ในการยับยั้งการเจริญของ *S.* Typhi PSSCMI0034 เมื่อทดสอบโดยวิธี agar well diffusion assay

ชุดทดสอบ (อุณหภูมิ/เวลา)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของการยับยั้ง (มิลลิเมตร)
Control	14.25
63 ๐C 10 min	14.17
63 ๐C 20 min	11.83
63 ๐C 30 min	11.67
80 ๐C 10 min	0
80 ๐C 20 min	0
80 ๐C 30 min	0
100 ๐C 10 min	0
100 ๐C 20 min	0
100 ๐C 30 min	0
121 ๐C 15 min	0

Control = สารตัวอย่าง (Freeze dried Sample) ของแลคติกแอสิดแบคทีเรียไอโซเลท N2 pH 6.5 ไม่ผ่านการให้ความร้อน

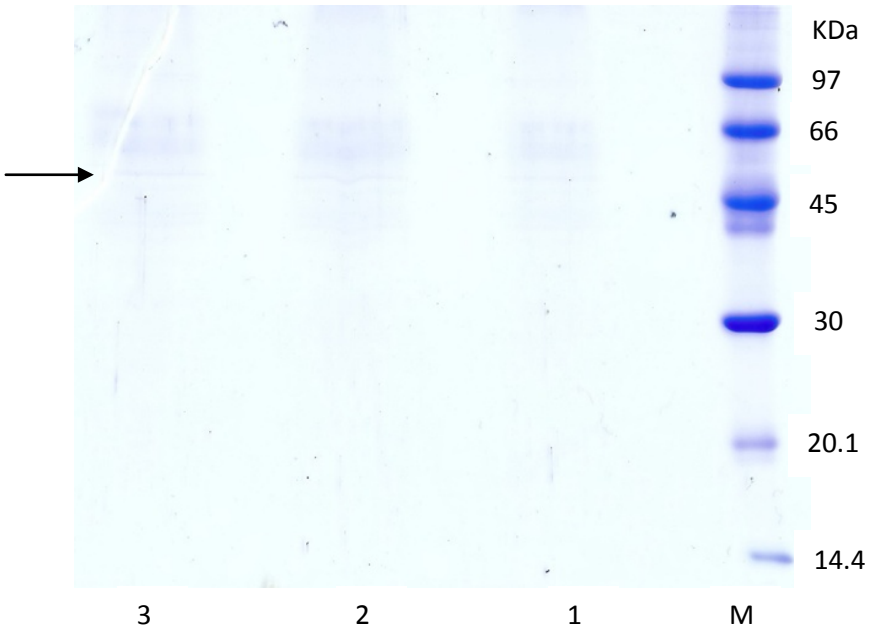
ตารางที่ 3-7 ผลของpH ต่อฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารตัวอ ย่าง (Freeze dried Sample) ที่มีความเข้มข้น 10 เท่า ที่ได้จากแลคติกแอสิดแบคทีเรียไอโซเลท N2 ในการยับยั้งการเจริญของ *S.* Typhi PSSCMI0034 เมื่อทดสอบโดยวิธี agar well diffusion assay

pH	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของการยับยั้ง (มิลลิเมตร)
Control	16.75
2	16.00
3	16.20
4	16.20
5	16.70
6	16.5
7	0
8	0
9	0
10	0

Control = สารตัวอย่าง (Freeze dried Sample) ของแลคติกแอสิดแบคทีเรียไอโซเลท N2 pH 5.2

6. เทคนิค Sodium Dodecyl Sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

จากการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสารตัวอย่าง (Freeze dried sample) ของ *L. namurensis* N2 โดยใช้เทคนิค SDS-PAGE พบว่าสารจากตัวอย่างมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 47 KDa เมื่อเทียบกับ Low Molecular Weight marker ดังแสดงในรูปที่ 3-9



รูปที่ 3-9 ผลการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสารตัวอย่าง (Freeze dried sample) ความเข้มข้น 10 เท่า ของ *Lactobacillus namurensis* N2 โดยใช้เทคนิค SDS-PAGE แถบที่: M, Low Molecular Weight markers; 1, 2 และ 3 สารตัวอย่าง (Freeze dried sample) ละลายด้วย 50 mM Tris-HCl pH 6.8

7. การเทียบเคียงชนิดของแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

7.1 การเทียบเคียงแบบวิธีดั้งเดิมและการบ่งชี้ชนิดโดยใช้ชุดทดสอบทางการค้า

นำแลคติกแอสิดแบคทีเรียไอโซเลท N2 ที่แยกได้จากแหนม และไอโซเลท NCB3 ที่แยกได้จากปลาส้ม เทียบเคียงลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมี พบว่า แลคติกแอสิดแบคทีเรียไอโซเลท N2 ติดสีแกรมบวก รูปร่างแท่ง ทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลสให้ผลลบ และเมื่อบ่งชี้ชนิดของเชื้อที่คัดเลือกได้ตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 2 (Kandler and Weiss, 1986) ดังแสดงผลในตารางที่ (3-8) จากการนำแลคติกแอสิดแบคทีเรียไอโซเลท N2 ที่แยกได้จากแหนม โดยทดสอบการใช้น้ำตาล 16 ชนิด เป็นแหล่งพลังงาน สามารถใช้น้ำตาลได้ 6 ชนิด ได้แก่ Fructose, Galactose, Glucose, Maltose, Mannitol และ Ribose มีความใกล้เคียง กับ *Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens* และเมื่อจัดจำแนกในระดับสปีชีส์โดยใช้ชุดจำแนก แลคติกแอสิดแบคทีเรียชนิดสำเร็จรูป API 50 CH (BioMerieux, France) ทดสอบการใช้น้ำตาล 49 ชนิด พบว่าไอโซเลท N2 สามารถใช้น้ำตาลได้ 11 ชนิด ได้แก่ D-Ribose, β-Methyl-xyloside, D-Galactose, D-Glucose, D-Fructose, Mannitol, *N*-Acetyl glucosamine, Esculine, D-Maltose, D-Melibiose และ Gluconate ดังแสดงในตารางที่ 3-9 พบว่าไอโซเลท N2 ถูกจัดจำแนกเป็น *Lactobacillus acidifarinae* โดยมีระดับความเหมือน (% identity) 98.5 ขณะที่กรณีของ ไอโซเลท NCB3 ทั้งสองวิธีตามที่กล่าวมา สอดคล้องกับ *Lactobacillus farciminis* โดยมีระดับความเหมือน (% identity) 99.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3-10

ตารางที่ 3-8 การเทียบเคียงโดยวิธีการแบบดั้งเดิมตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 2 (1986)

Characteristic	Isolates			
	N2	*Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens*	NCB3	*Lactobacillus farciminis*
Shape	rod	rod	rod	rod
Gram Stain	+	+	+	+
Catalase test	-	-	-	-
Growth at 15/45°C	+/-	+/-	+/-	+/-
10% NaCl	+	ND	+	+
Amygdalin	-	-	+	+
Arabinose	-	-	-	-
Cellobiose	-	-	+	+
Esculin	-	-	+	+
Fructose	+	-	+	+
Galactose	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+
Lactose	-	-	+	+
Maltose	+	+	+	+
Mannitol	+	+	-	-
Raffinose	-	-	-	-
Rhamnos	-	-	-	-
Ribose	+	+	-	-
Sorbitol	-	-	+	+
Sucrose	-	-	+	+
Trehalose	-	-	+	+

เครื่องหมาย : + = เจริญและผลิตกรด, - = ไม่เจริญ

ND: not determined

ตารางที่ 3-9 การเทียบเคียงแลคติกแอสิดแบคทีเรียโดยใช้ API 50 CH

Active ingredients	Isolates		Active ingredients	Isolates		Active ingredients	Isolates	
	N2	NCB3		N2	NCB3		N2	NCB3
Control	-	-	Inositol	-	-	D-Raffinose	-	+
Glycerol	-	-	D-Sorbitol	-	-	Amidon	-	-
Erythritol	-	-	α-Methyl-D-mannoside	-	-	Glycogen	-	-
D-Arabinose	-	-	α-Methyl-D-glucoside	-	+	Xylitol	-	-
L-Arabinose	-	-	*N*-Acetyl glucosamine	+	+	β-Gentiobiose	-	-
D-Ribose	+	-	Amygdalin	-	-	D-Turanose	-	+
D-Xylose	-	-	Arbutin	-	+	D-Lyxose	-	-
L-Xylose	-	-	Esculine	+	+	D-Tagatose	-	+
D-Adonitol	-	-	Salicine	-	+	D-Fucose	-	-
β-Methyl-xyloside	+	+	D-Cellobiose	-	+	L-Fucose	-	-
D-Galactose	+	+	D-Maltose	+	+	D-Arabitol	-	-
D-Glucose	+	+	D-Lactose	-	+	L-Arabitol	-	-
D-Fructose	+	+	D-Melibiose	+	-	Gluconate	+	-
D-Mannose	-	+	D-Saccharose (sucrose)	-	+	2-keto-gluconate	-	-
L-Sorbose	-	-	D-Trehalose	-	+	5-keto-gluconate	-	-
L-Rhamnose	-	-	Inulin	-	-			
Dulcitol	-	-	D-Melezitose	-	-			

เครื่องหมาย: + = เจริญและผลิตกรด, - = ไม่เจริญ

ตารางที่ 3-10 เปอร์เซ็นต์บ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียแลกติกโดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CH

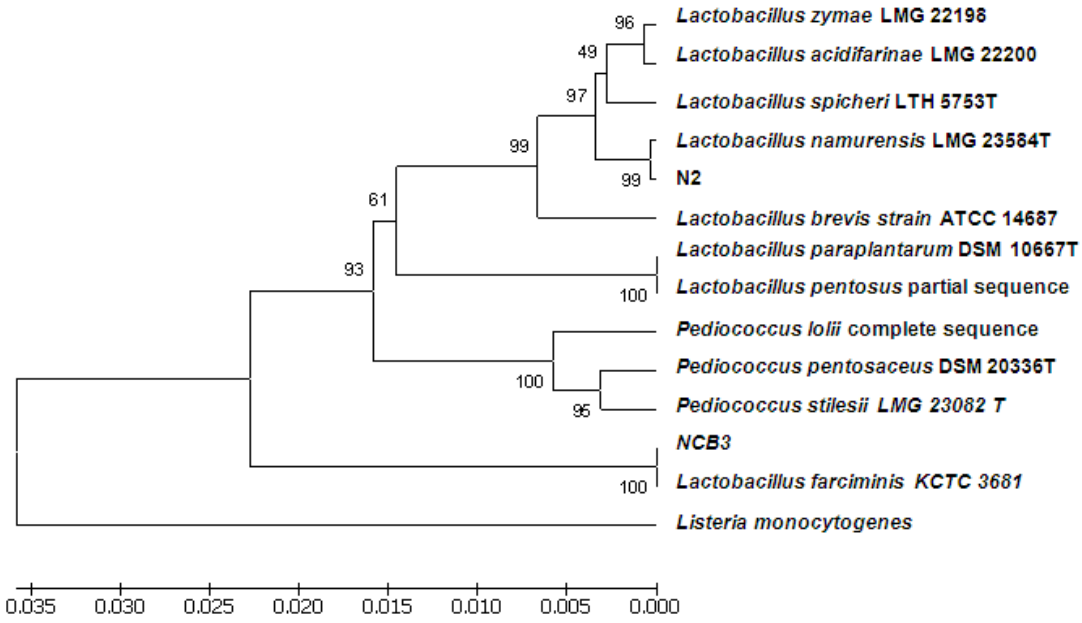
Isolates	Specific for bacteria	% similarity
N2	*Lactobacillus acidifarinae*	98.5
NCBC3	*Lactobacillus farciminis*	99.7

7.2 การบ่งชี้ชนิดโดยใช้ 16S rRNA gene

จากการศึกษาลักษณะทางด้านพันธุศาสตร์โมเลกุลโดยใช้ 16S rRNA gene พบว่าไอโซเลท N2 จัดอยู่ในสกุล *Lactobacillus namurensis* strain Ln-15 มีค่า % Similarity เท่ากับ 100% (ตารางที 3-11) ซึ่งตรงกับ Accession number คือ HM130541 และไอโซเลท NCB3 จัดอยู่ในสกุล *Lactobacillus farciminis* strain NBRC 107150 มีค่า %Similarity เท่ากับ 100% (ตารางที 3-11) ซึ่งตรงกับ Accession number คือ AB626064 และรูปที่ 3-10 เป็นแผนภูมิต้นไม้ของ ไอโซเลท N2 และ NCB3 โดยมี out group คือ *Listeria monocytogenes*

ตารางที่ 3-11 การเทียบเคียงสายพันธุ์แลคติกแอสิดแบคทีเรียไอโซเลท N2 และไอโซเลท NCB3 โดยใช้ 16S rDNA sequence analysis

Sample Name	Closets sequence	% Similarity	Accession number
N2	*Lactobacillus namurensis* strain Ln-15 Length=1476 Score = 1620 bits (1796), Expect = 0.0, Gaps = 0/898 (0%) Strand=Plus/Plus	898/898 (100%)	HM130541
NCB3	*Lactobacillus farciminis strain* NBRC 107150 Length=1492 Score = 1792 bits (1986), Expect = 0.0, Gaps = 0/993 (0%) Strand=Plus/Plus	993/993 (100%)	AB626064



รูปที่ 3-10 แผนภูมิต้นไม้ (Phylogenic tree) จากลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของแลคติกแอสิดแบคทีเรียไอโซเลท N2 และไอโซเลท NCB3

8. การหาค่า MIC, MBC และ MFC ของสารสกัดต้านจุลินทรีย์

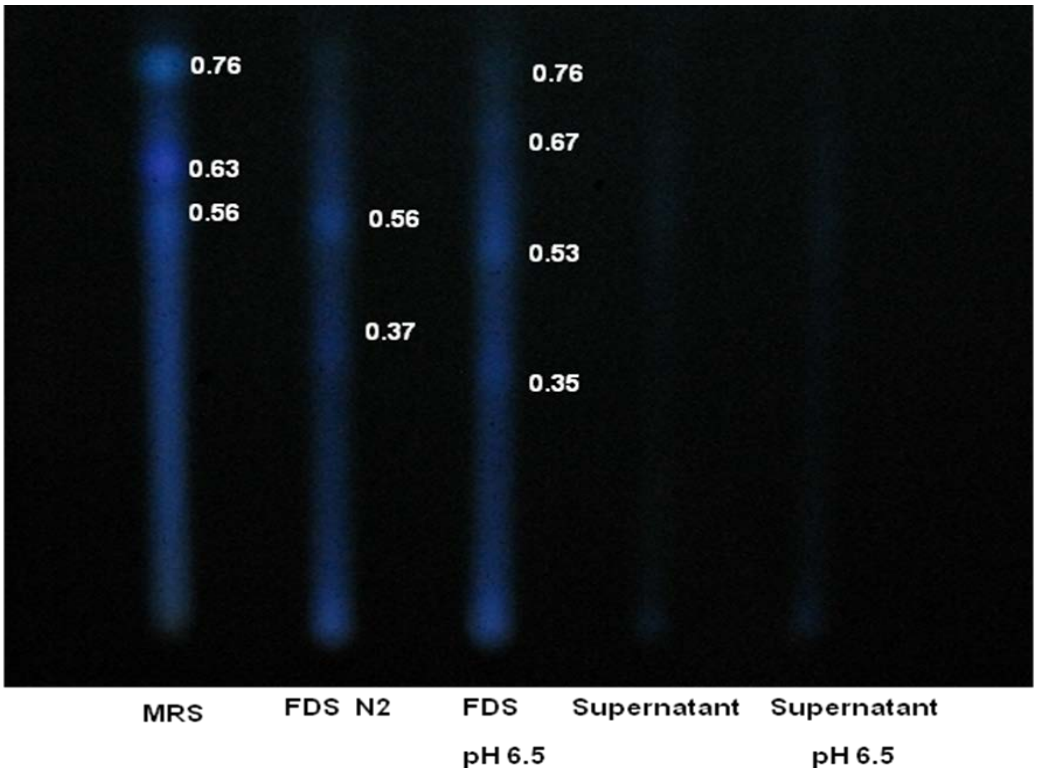
จากตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ ของแลคติกแอสิดแบคทีเรีย ไอโซเลท N2 1 ลิตร สกัดด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate ได้สารสกัด 0.508 g เมื่อนำมาทดสอบหาค่า Minimal inhibitory concentration (MIC), Minimal bactericidal concentration (MBC) และ Minimal fungicidal concentration (MFC) ของสารสกัด จากต ารางที่ 3-12 พบว่าค่า MIC ของสารสกัดต่อการยับยั้ง *C. perfringens*, *L. monocytogenes* มีค่าเท่ากับ 79 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร และมีค่าค่า MIC ของสารสกัดต่อการยับยั้ง *S. sonneii* และ *S.* Typhi PSSCMI0034 เท่ากับ 635 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร สำหรับค่า MIC ของสารสกัดต่อการยับยั้ง *Rhodotorula* sp. และ *C. albican* มีค่าเท่ากับ 2.54 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า MIC ของสารสกัดต่อการยับยั้ง *S. cerevisiae* เท่ากับ 0.159 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับค่า MBC ของสารสกัดต่อ *C. perfringen, S. sonneii* และ *S.* Typhi PSSCMI0034 เท่ากับ 1.27 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า MBC ของสารสกัดต่อ *Rhodotorula* sp. และ *C. albican* มีค่าเท่ากับ 2.54 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าเท่ากับ MIC ส่วนค่า MBC ของสารสกัดต่อ *L. monocytogenes* และ *S. cerevisiae* มีค่าเท่ากับ 79 และ 635 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับยาปฏิชีวนะ ที่ใช้เป็นชุด ควบคุมทางบวกพบว่ามีความสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคดีกว่าสารสกัดหยาบ

ตารางที่ 3-12 ค่า MIC, MBC และ MFC ของสารสกัดหยาบของ *L. namurensis* N2

Test microorganisms		MIC (mg/ml)	MBC/MFC (mg/ml)	Standard antibiotics (MIC/MBC or MFC)		
				Van (µg/ml)	Gen (µg/ml)	Amp (µg/ml)
Bacteria	*C. perfringens*	0.079	1.27	0.5/2		
	L. monocytogenes	0.079	0.079	0.5/1		
	S. sonnei	0.635	1.27		0.5/1	
	S. Typhi	0.635	1.27		1/2	
Yeast	*S. cerevisiae*	0.159	0.635			0.125/4
	Rhodotorula sp.	2.54	2.54			0.25/2
	C. albican	2.54	2.54			0.25/2

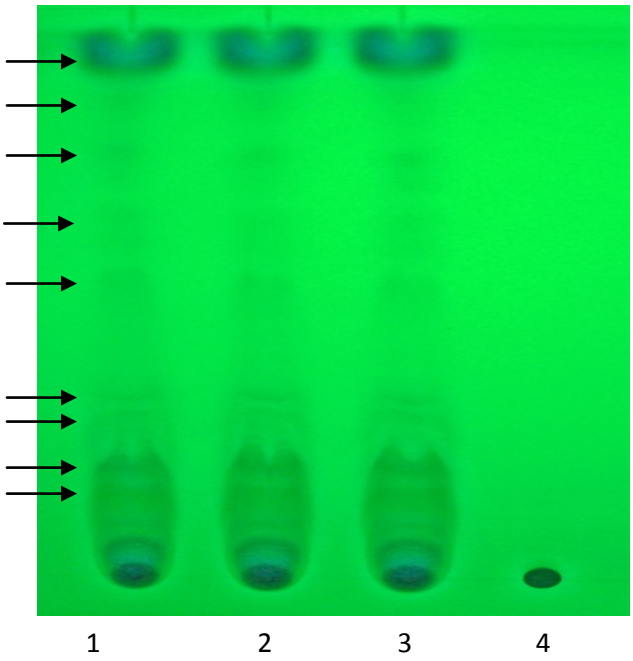
9. ผลของสารต้านจุลินทรีย์ที่ศึกษาโดยใช้เทคนิค TLC

จากการทดสอบความสามารถในการผลิตสาร ต้านจุลินทรีย์ของ *L. namurensis* N2 โดยใช้เทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC) พบว่าสารตัวอย่าง (Freeze dried sample) pH ของแลคติกแอสิดแบคทีเรีย ไอโซเลท N2 มีค่า retardation factor (R_f) เท่ากับ 0.37 และ 0.56 ในขณะที่สารตัวอย่าง (Freeze dried sample) pH 6.5 มีค่า retardation factor (R_f) เท่ากับ 0.35, 0.53, 0.67 และ 0.76 (รูปที่ 3-11) บ่งชี้ได้ว่าในสารตัวอย่าง (Freeze dried sample) มีองค์ประกอบของสารที่แตกต่างกัน



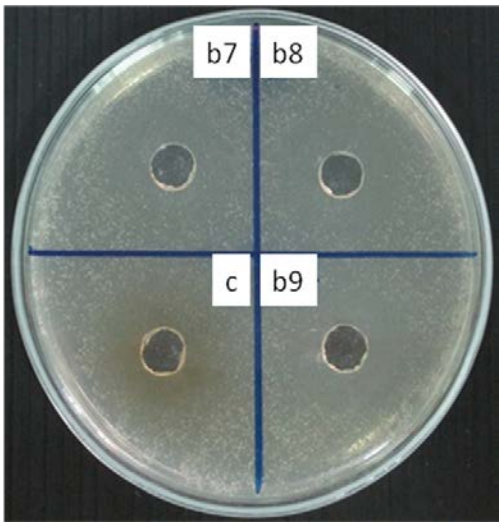
รูปที่ 3-11 ลักษณะของแถบบนแผ่น Thin Layer Chromatography (TLC) ซึ่งทดสอบการสร้างสารสารต้านจุลินทรีย์แถบที่ 1; MRS, 2; 10xFDS, 3; 10xFDS pH 6.5, 4; supernatant pH 5.2, 5; supernatant pH 6.5

จากการนำสารสกัด ด้วย ethyl acetate ของเชื้อแลคติกแอสิดแบคทีเรียไอโซเลท N2 ทดสอบความสามารถในการผลิตสารต้านจุลินทรีย์ โดยใช้เทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC) พบว่าสารสกัด ถูกแยกเป็น 9 จุด โดยมีค่า retardation factor (R_f) เท่ากับ 0.09, 0.14, 0.29, 0.33, 0.49, 0.59, 0.71, 0.82 และ 0.92 (รูปที่ 3-12)



รูปที่ 3-12 ลักษณะของแถบบนแผ่น Thin Layer Chromatography (TLC) ซึ่งทดสอบความสามารถในการผลิตสารต้านจุลินทรีย์ (แถวที่ 1, 2 และ 3; สารสกัดของเชื้อแลคติกแอสิดแบคทีเรียไอโซเลท N2, 4; สารสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth)

จากการนำบริเวณ spots ที่เกิดขึ้นละลาย ละลายด้วย 10% DMSO ก่อนนำไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง *S.* Typhi PSSCMI0034 (ข้อ 3.1.4) พบว่าสารสกัดจุดที่ 7, 8 และ 9 โดยมีค่า retardation factor (R_f) เท่ากับ 0.71, 0.82 และ 0.92 ตามลำดับ สามารถยับยั้งได้ทั้ง *S.* Typhi PSSCMI0034 โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของการยับยั้ง คือ 14.00, 17.25 และ 16.25 มิลลิเมตร ตามลำดับ (รูปที่ 3-13)

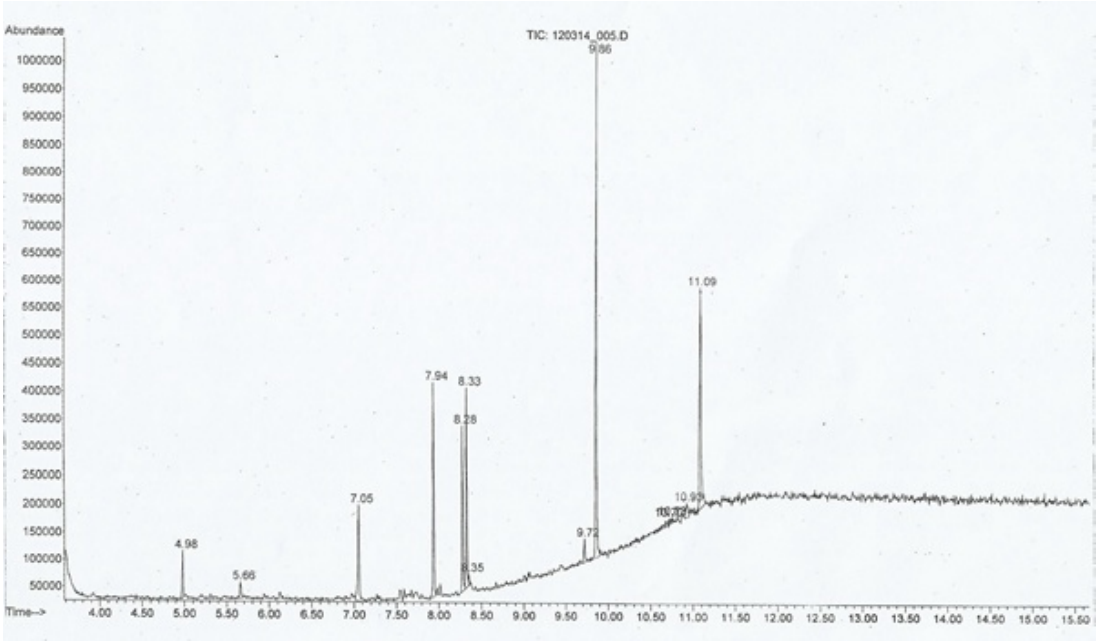


รูปที่ 3-13 ฤทธิ์ต้าน *S.* Typhi PSSCMI0034 ของสารที่แยกได้บนแผ่น TLC (c; สารสกัดของแลคติกแอสิดแบคทีเรียไอโซเลท N2, b7, b8 และ b9; สารสกัดจุดที่ 7, 8 และ 9 ตามลำดับ)

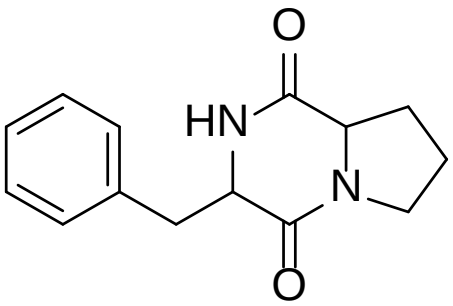
10. ตรวจหาชนิดและปริมาณของสารตัวอย่าง

10.1 เทคนิค Gas chromatography mass spectrometry (GC-MS)

จากการนำสารสกัด ด้วย ethyl acetate ของ *L. namurensis* N2 ตรวจหาชนิดของสารสกัดจากตัวอย่างโดยใช้เครื่อง GC-MS สามารถตรวจพบสาร 6 ชนิด แสดง peak retention time ที่เวลา 498, 7.05, 7.94, 8.28, 8.33, 9.86 และ 11.09 นาที (รูปที่ 3-14) โดยพบว่าปริมาณสารที่มากที่สุดแสดงค่า retention time ที่เวลา 9.86 นาที และให้ผลการวิเคราะห์บ่งชี้ชนิดของสารคือ pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4dione,hexahydro-3-(phenylmethyl) โดยมีโครงสร้างของสารดังแสดงในรูปที่ 3-15

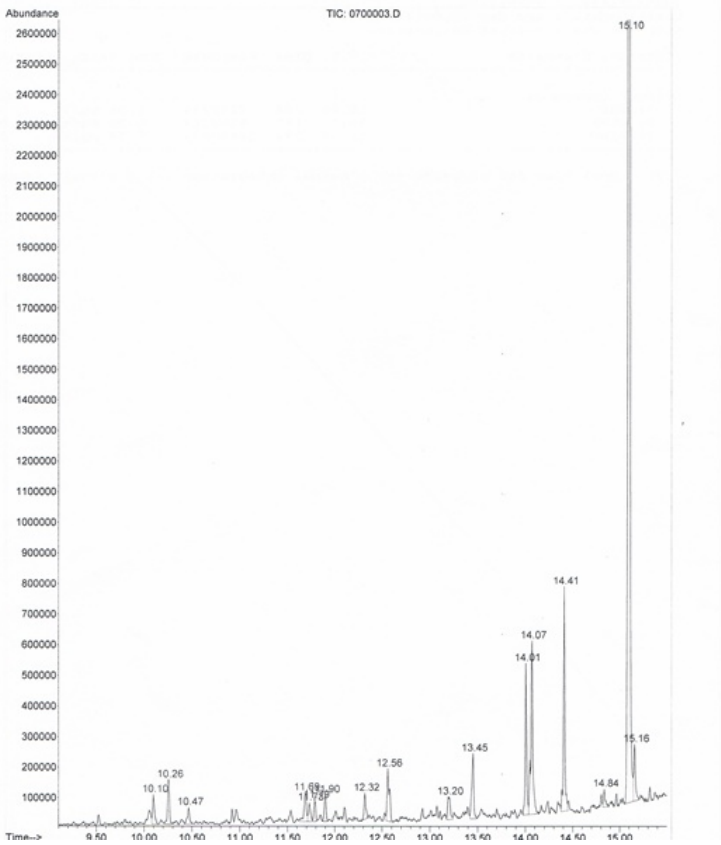


รูปที่ 3-14 โครมาโตแกรมของสารสกัดด้วย ethyl acetate ของ *Lactobacillus namurensis* N2 จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS

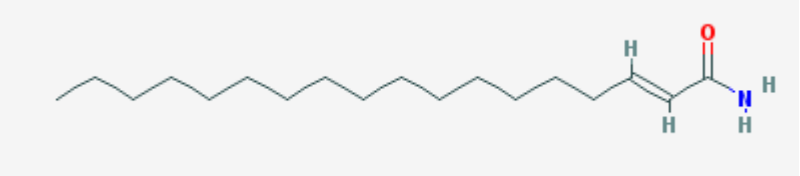


รูปที่ 3-15 โครงสร้างของสาร pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione,hexahydro-3(phenylmethyl)

จากการนำสา รสกัดด้วย ethyl acetate ของ *L. namurensis* N2 มาแยกโดยใช้เทคนิค TLC แล้วนำบริเวณ spots ที่เกิดขึ้นทั้ง 9 จุด ละลายด้วย ethyl acetate ก่อนนำไปวิเคราะห์หาชนิดของสารโดยใช้เครื่อง GC-MS สามารถวิเคราะห์ผลได้เพียงตำแหน่งเดียวคือ บริเวณ spots จุดที่ 9 โดยพบว่าบริเวณ spots จุดที่ 9 มีปริมาณสารที่มากที่สุดแสดงค่า retention time ที่เวลา 15.10 นาที ดังแสดงในรูปที่ 3-16 และให้ผลการวิเคราะห์บ่งชี้ชนิดของสารคือ Octadecenamide โดยมีโครง สร้างของสารดังแสดงใน รูปที่ 3-17 ซึ่งเป็นบริเวณ spots จุดที่ 9 ซึ่งสามารถยับยั้ง *S.* Typhi PSSCMI0034 (รูปที่ 3-13)



รูปที่ 3-16 โครมาโตแกรมของสารสกัดด้วย ethyl acetate ของ *L. namurensis* N2 ที่ผ่านการแยกชนิดของสารโดยใช้เทคนิค TLC ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS



รูปที่ 3-17 โครงสร้างของสาร Octadecenamide

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

1. การแยกแลคติกแอสิดแบคทีเรียจากอาหารหมัก

การแยกแลคติกแอสิดแบคทีเรียจากอาหารหมักของไทยชนิดต่างๆจำนวน 51 ตัวอย่าง สามารถแยกแลคติกแอสิดแบคทีเรียได้ 320 ไอโซเลท (ตารางที่ 3-1) พบว่าตัวอย่างแหนมสามารถแยกแลคติกแอสิดแบคทีเรียได้มากที่สุด คือ 8.44 ไอโซเลท/ตัวอย่าง ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากอายุการหมักของผลิตภัณฑ์ที่เก็บมาประเภทของอาหารหมักที่มีแหล่งอาหารต่างกันและจำนวนของตัวอย่าง ต่อผลิตภัณฑ์แม้ว่ามีการแสดงเป็นค่าเฉลี่ยต่อตัวอย่าง อย่างไรก็ตามทุกตัวอย่างของอาหารหมักยังคงมีแลคติกแอสิดแบคทีเรียอยู่

2. การคัดเลือกเชื้อที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

จากการที่ น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์แลคติกแอสิดแบคทีเรียมีความสามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ATCC 25923 และ *S.* Typhi PSSCMI0034 ได้ดีเป็นจำนวนไม่สูงมากประมาณ 15% สำหรับ *S.* Typhi PSSCMI0034 และ 3% สำหรับ *S. aureus* ATCC 25923 (ตารางที่ 3-3 และ 3-4) แสดงว่าเชื้อก่อโรคทั้งสองต้าน ต่อความเป็นกรดได้ดี โดยจากการศึกษาพบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ที่ไม่ผ่านการปรับ pH ของไอโซเลท NN13 สามารถยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923 และ *S.* Typhi PSSCMI0034 ได้ดีที่สุด (รูปที่ 3-1) อาจเป็นผลมาจากกรดอินทรีย์ที่แลคติกแอสิดแบคทีเรีย ผลิตขึ้น สูงมาก เช่น กรดแลคติก ซึ่งมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร ดังรายงาน เช่น แบคทีเรีย *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus cereus* (ศศิธร, 2548) *Staphylococcus aureus* PSSCMI 0004, *Salmonella* sp. PSSCMI 0002 และ *Vibrio parahaemolyticus* VP4 (Kantachote and Charernjiratrakul, 2008) แต่กรณีของเชื้อไอโซเลท N2, YA031 และ NCB3 นอกจากสภาพความเป็นกรดแล้วพบว่ายังมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆด้วยที่ไม่ใช่กรด (pH ถูกปรับเป็น 6.5) ที่ยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923 และ *S.* Typhi PSSCMI0034 ซึ่งน่าจะเป็นสารที่มีขนาดโมเลกุลเล็กและอยู่ในรูปสารละลายหรือคอลลอยด์จึงผ่านการกรองที่ใช้ขนาดรูพรุน 0.22 และ 0.45 ไมโครเมตรได้ (ตารางที่ 3-5 และรูปที่ 3-2) (Thermo Fisher Scientific, 2008) นอกจากนี้พบว่าขนาดของรูพรุนมีผลต่อฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ จากตารางที่ 3-5 พบว่า น้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านแผ่นกรองขนาดรูพรุน 0.22 ไมโครเมตร ของไอโซเลท NCB3 สามารถยับยั้ง *S.* Typhi PSSCMI0034 แต่ไม่สามารถ

ยับยั้งเชื้อดังก ล่าวได้เมื่อผ่านแผ่นกรองขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร อาจเป็นผลมาจากเมื่อผ่านแผ่นกรองรูพรุนขนาดใหญ่มีการรวมตัวของสารแล้วทำให้ฤทธิ์อ่อนลง (antagonistic reacti on) ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อลดลงแต่เมื่อผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดรูพรุนเล็กลง คือ 0.22 ไมโครเมตร ซึ่งมีขนาดเล็กลงอาจทำให้สารที่ผ่านมาได้อยู่ในรูปอิสระส่งผลให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อเกิดขึ้นได้ดี แต่ไอโซเลท N2 และ NCB3 ซึ่งนำไปทดสอบการยับยั้งการเจริญของยีสต์และราโดยการปรับ pH เป็น 6.5 พบว่าไม่ยับยั้ง (ไม่ได้แสดงผลการทดลอง) และเมื่อทำให้อยู่ในรูปความเข้มข้น 10 เท่า (Freeze dried sample) ของไอโซเลท N2 ก็พบการยับยั้งเพียงเล็กน้อยกว่าเท่านั้น แสดงว่าไอโซเลท N2 ไม่มีการผลิตสารต้านเชื้อราและยีสต์

3. การเจริญและการสร้างสารต้านจุลินทรีย์ของเชื้อที่คัดเลือกได้

จากการศึกษาการเจริญของแลคติกแอสิดแบคทีเรี ยไอโซเลท N2 และ NCB3 พบว่าทั้ง 2 ไอโซเลท เจริญอยู่ในช่วง log phase ในช่วง 5-20 ชั่วโมง และเข้าสู่ช่วง stationary phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 20-35 (รูปที่ 3-6) พบว่าทั้ง 2 ไอโซเลท มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *S.* Typhi PSSCMI0034 ได้ในชั่วโมงที่ 15 และ 20 แต่เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 30 สูญเสียฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อไป ซึ่งสาเหตุอาจเป็นเพราะสารต้านแบคทีเรียที่เชื้อผลิตขึ้นมาเป็นสารปฐมภูมิ (primary metabolite) ไม่ใช่สารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ซึ่งจะสร้างในช่วง stationary phase ดังนั้นแสดงว่าสารที่ไอโซเลท N2 สร้างขึ้นเป็นสารปฐมภูมิ ซึ่งอาจเป็ นแบคเทอริโอซินไม่ใช่สารปฏิชีวนะ ซึ่งคล้ายกับ การศึกษาของ Sathe et al.(2007) พบว่า *Lb. plantarum* CUK501 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ (512-1280 AU/ml) ในช่วง 18-24 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงการเพาะเลี้ยงเชื้อในระย ะสุดท้ายของ log phase (late log phase) และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อมากกว่า 48 ชั่วโมง ซึ่งสิ้นสุดระยะ stationary phase พบว่าฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบลดลง

4. ผลของเอนไซม์ พีเอช และอุณหภูมิต่าง ๆต่อความทนของสารต้านจุลินทรีย์

4.1 ผลของเอนไซม์

จากการศึกษาผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่อความคงตัวของสาร ที่ผลิตจาก เชื้อไอโซเลท N2 และ NCB3 พบว่าสารตัวอย่าง (Freeze dried sample) จากเชื้อ ไอโซเลท N2 เมื่อผ่านการ treat ด้วยเอนไซม์ ย่อยโปรตีน ทำให้สูญเสียฤทธิ์ใน การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค เนื่องจากสารที่ได้จากเชื้อไอโซเลท N2 ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนและ catalase แสดงว่าสารจากเชื้อไอโซเลท N2 ที่ยับยั้งเชื้อทดสอบเป็นสารกลุ่มโปรตีน และมี Hydrogen peroxide (H_2O_2) ร่วมด้วยแต่ไม่น่าจะมาก เพราะ H_2O_2 ถูกสร้างได้น้อยในสภาพไม่มีอากาศ (Kantachote and Charernjiratrakul, 2008) จากการศึกษาของ Garneau *et al*., 2002 พบว่ามีแลคติกแอสิดแบคทีเรียบางสายพันธุ์ เช่น *Lc. lactis* subsp*. lactis*, *Lb. casei* sub sp. *Pseudoplantarum*, *Pedicococcus pentosaceous* ที่สามารถผลิตสารเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ได้ ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่เชื้อไอโซเลท N2 ผลิตสารเพปไทด์ที่ต้านแบคทีเรีย สำหรับเชื้อไอโซเลท NCB3 เมื่อผ่านการ treat ด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน พบว่าไม่เกิดการยับยั้งเชื้อทดสอบเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้ treat ด้วยเอนไซม์ และพบว่าสารตัวอย่าง (Freeze dried sample) pH 6.5 ไม่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้เช่นกัน ซึ่งทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าฤทธิ์ยับยั้งส่วนใหญ่ของเชื้อนี้มาจากกรดอินทรีย์ที่เชื้อสร้าง

4.2 ผลของอุณหภูมิ

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของสารที่ผลิตจาก เชื้อไอโซเลท N2 พบว่าสามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 63ºC เป็นเวลา 10, 20 และ 30 นาที ตามลำดับ (ตารางที่ 3-6) และมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *S.* Typhi PSSCMI0034แต่เมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิมากกว่า 63ºC คือ 80ºC พบว่าสูญเสียความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *S.* Typhi PSSCMI0034 ดังนั้นการใช้สารต้าน *S.* Typhi PSSCMI0034 ไอโซเลท N2 กับผลิตภัณฑ์อาหารเป็นไปได้โดยการ pasteurization ที่อุณหภูมิ 63ºC และจากรายงานของ Siripoke *et al*., 2007 ศึกษาสมบัติเบื้องต้นของแบคทีริโอซินที่ผลิตจาก *Lactococcus lactis* subsp*. lactis* FFL17-2 พบว่าสามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100 ºC ได้นาน 10 นาที แต่ถ้าใช้เวลามากกว่า 10 นาที ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อทดสอบค่อยๆ ลดลงและถ้าใช้อุณหภูมิ 121 ºC 15 นาที

สูญเสียความสามารถในการยับยั้งเชื้อ แบคทีเรียทดสอบ อย่างสมบูรณ์ เนื่องจากสารกลุ่มแบคเทอริโอซินที่สร้างโดยแลคติกแอสิดแบคทีเรียมีหลายกลุ่มและไอโซเลท N2 น่าจะสร้างแบคเทอริโอซิน class III ซึ่งเป็นพวกที่ไม่ทนความร้อน (heat labile protein) สำหรับแบคเทอริโอซิน class III มีโครงสร้างเป็นเพปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุล >30 kDa ตัวอย่างแบคเทอริโอซินกลุ่มนี้ เช่น helveticin I สร้างโดย *Lactobacillus helveticus* และ Enterolysin สร้างโดย *Enterococcus faecium* (Todorov *et al*., 2005, Zacharof and Lovit, 2012)

4.3 ผลของ pH

จากการนำสารที่ผลิตจากเชื้อไอโซเลท N2 มาศึกษาผลของ pH ต่อความคงตัวของสาร พบว่าสารต้านแบคทีเรียของแลคติกแอสิดแบคทีเรียไอโซเลท N2 มีความคงตัวดีในช่วง pH 2-6 และมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *S.* Typhi PSSCMI0034 แต่เมื่อระดับ pH 7 ขึ้นไป พบว่าสารตัวอย่าง (Freeze dried Sample) ของแลคติกแอสิดแบคทีเรียไอโซเลท N2 สูญเสียความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *S.* Typhi PSSCMI0034 (ตารางที่ 3-7) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสารต้านแบคทีเรียเป็นสารกลุ่มแบคเทอริโอซินซึ่งเป็นโปรตีน ดังนั้น pH จึงมีผลต่อการทำงานคือการยับยั้ง ซึ่งผลการทดลองนี้คล้ายกับของ Garneau *et al*., 2002 ที่พบว่า pH มีผลอย่างมากต่อการเปลี่ยนแปลงของสาร antimicrobial compound ที่ผลิตจาก *Lc. lactis* subsp. *diacetylactis* และจากการศึกษาของ Siripoke *et al*., 2007 พบว่า *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* FFL17-2 ซึ่งแยกจากปลาส้มมีฤทธิ์ต้านจุลลินทรีย์ได้ดีในช่วง pH 5-7 โดยสามารถ ยับยั้ง *S. aureus*, *B. cereus* และ *L. monocytogenes* ได้มากที่สุดที่ pH 5

5. การเทียบเคียงชนิดของแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

จากการนำแลคติกแอสิดแบคทีเรียไอโซเลท N2 ที่แยกได้จากแหนม บ่งชี้ชนิดของเชื้อที่คัดเลือกได้ เบื้องต้นตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 2 (Kandler and Weiss, 1986) และเมื่อจัดจำแนกในระดับสปีชีส์โดยใช้ชุดจำแนก แลคติกแอสิดแบคทีเรียชนิดสำเร็จรูป API 50 CH (BioMerieux, France) พบว่าไอโซเลท N2 มีความใกล้เคียงกับ *Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens* และ *Lactobacillus acidifarinae* (% identity) 98.5 ตามลำดับ แต่ จากการศึกษาลักษณะทางด้านพันธุ ศาสตร์โมเลกุลโดยใช้ 16S rRNA gene พบว่าไอโซเลท N2 จัดอยู่ในสกุล *Lactobacillus namurensis* strain Ln-15 (100% identity) ซึ่งอาจเป็นเชื้อสายพันธุ์ใหม่จากการศึกษาของ Scheirlinck *et al*., 2007 ซึ่งศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของ แลคติกแอสิดแบคทีเรีย ที่แยกจากตัวอย่างแป้งหมัก พบเชื้อสายพันธุ์ใหม่ คือ *Lactobacillus namurensis* ที่มีความใกล้เคียงกับ *Lactobacillus zymae, Lactobacillus acidifarinae* (ซึ่งกรณีใกล้เคียงกับการใช้ชุดทดสอบที่มีความเหมือน 98.5%) และ *Lactobacillus spicheri* ดังนั้นไอโซเลท N2 จึงจัดเป็น *L. namurensis* เพราะมีความเหมือน 100% ตามที่กล่าวมา

สำหรับแลคติกแอสิดแบคทีเรียไอโซเลท NCB3 ที่แยกได้จากปลาส้มพบว่าถูกจัดอยู่ในสกุล *Lactobacillus farciminis* strain NBRC 107150 โดยไม่มีปัญหาในการเทียบเคียง เพราะผลการทดสอบแบบดั้งเดิมและการใช้ 16S rRNA gene ให้ผลตรงกันโด ยมีความเหมือนอยู่ที่ 99.7% และ 100% ซึ่งเป็นปกติที่เชื้อชนิด (species) เดียวกันย่อมมีความแตกต่างกันบ้าง จากการศึกษาของ Halami *et al*., 2000 พบว่า *L. farciminis* MD ที่แยกได้จากอาหารหมักประเภทเห็ด มีความไวต่อสารแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อสายพันธุ์ *Lactobacilli*, *Leuconostoc* และ P*ediococci* และพบว่า *L. farciminis* MD มีความไวต่อยาปฏิชีวนะ ได้แก่ ampicillin, cefazoline, chloramphenicol และ nitrofurantoin ที่ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัม โดยมีขนาดเส้ นผ่านศูนย์กลางของการยับยั้งเท่ากับ 30 มิลลิเมตร จากคุณสมบัติของ *L. farciminis* MD ที่มีความไวต่ อสารแบคเทอริโอซินและยาปฏิชีวนะ จึงสามารถนำมาใช้เป็น ตัวบ่งชี้การผลิตแบคเทอริโอซินได้

6. ผลของสารต้านจุลินทรีย์ของเชื้อ *L. namurensis* N2

จากการนำสารตัวอย่าง (Freeze dried sample) pH 6.5 และสารสกัดด้วย ethyl acetate ของ *L. namurensis* N2 ทดสอบความสามารถในการผลิตสารต้านจุลินทรีย์โดยใช้เทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC) บ่งชี้ได้ว่าสารที่ผลิตจาก *L. namurensis* N2 มีหลายชนิดแตกต่างกันโดยเมื่อพิจารณาจากค่า retardation factor (R_f) พบว่ามีความแตกต่างกัน ทั้งนี้การแยกของสารขึ้นกับชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการแยกกับความมีขั้วและไม่มีขั้วของสารต้านจุลินทรีย์ ซึ่งส่งผลต่อประสิทธิภาพในการแยกของสาร

จากการนำสารสกัดด้วย ethyl acetate ของ *L. namurensis* N2 ตรวจหาชนิดของสารสกัดจากตัวอย่างโดยใช้เครื่อง GC-MS สามารถตรวจพบสารหลากหลายชนิดโดยพบว่าปริมาณสารที่สามารถตรวจพบได้มากที่สุดโดยการวิเคราะห์บ่งชี้ชนิดของสารคือ pyrrolo[1,2-a] pyrazine-1,4dione,hexahydro-3-(phenylmethyl) มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 244.289 ซึ่งสอดคล้องกับ การศึกษาของ Hairong *et al*., 2009 พบว่า *Cladosporium* sp. F14 สามารถผลิตสารปฏิชีวนะและสารต้านเชื้อราได้ภายใต้สภาวะที่มีสารอาหารที่แตกต่างกัน โดยพบว่าเมื่อเติม glucose หรือ xylose ช่วย เพิ่มประสิทธิภาพการผลิตสารปฏิชีวนะและสารต้านเชื้อราได้ เมื่อนำสารสกัดจาก *Cladosporium* sp. F14 วิเคราะห์โดยใช้เครื่อง GC-MS พบว่ามีสารต้านจุลินทรีย์หลายชนิด ได้แก่ Methanephrine, cis-1-Chloro-9-octadecene, Nitrobicyclo [10.4.0] hexadecane-1-ol-13-one, 13-Bromotetradecanoic acid, 2-Phenazinol, 6-amino, Morphinan-2,4-diol-6-one,N-formyl-, Pyrrolo [1,2-a] pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(phenylmethyl). โดยมีงานวิจัย พบว่าสารในกลุ่ม Pyrrolo [1,2-*b*] pyridazine มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์และยับยั้งการสร้างเอนไซม์ (Florea *et al*., 2008) นอกจากนี้ พบว่าสารในกลุ่ม phenylacetic acid, pyrrolidine carboximidamide, pyrrolopyrazines, tetra methyl pyrazine และ phenolic compounds มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและเชื้อรา (fungistatic) โดยจับกับ ergosterol ของเชื้อรา ทำให้เกิดรูพรุนบนผนังเซลล์ ส่งผลให้เกิดการสูญเสียความสามารถในการผ่านเข้าออกของสาร (permeability) และทำให้เซลล์ตายในที่สุด (Kim *et al*., 2004; Somers *et al*., 2005; Chaudhary *et al*., 2006; Kumar *et al*., 2008; Farzaliev *et al*., 2009; Roy *et al*., 2010)

จากการนำสารสกัดด้วย ethyl acetate ของ *L. namurensis* N2 มาแยกโดยใช้เทคนิคTLC แล้วนำบริเวณ spots ที่เกิดขึ้น ไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งและพบว่าสามารถยับยั้ง *S.* Typhi PSSCMI0034 มาละลายด้วย ethyl acetate ก่อนนำไปวิเคราะห์หาชนิดของสารโดยใช้เครื่อง GC-MS สามารถวิเคราะห์ผลได้เพียงตำแหน่งเดียว ดังแสดงในรูปที่ 3-14 และให้ผลการวิเคราะห์บ่งชี้ชนิดของสารคือ Octadecenamide มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 281.477 จากการศึกษาของ Kaneshiro *et al*.,1994 พบว่า *Bacillus megaterium* NRRL B3437 สามารถผลิตสาร stetra

decenamide, 9(Z)-Octadecenamide, hexadecenamide และtetradecanamide จาก oleic acid ได้ และจากการศึกษาของ Imelouane *et al*., 2010 พบว่าน้ำมันหอมระเหย ที่ได้จากต้น สมุนไพร herba-alba มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์โดยจะเข้าไปทำลายเยื่อหุ้มเซลล์และโครงสร้างของเซลล์ (Sikkema *et al*.,1995) พบว่าสารสกัดที่ได้สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคทั้งแกรมบวก (*S. pneumonia*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *L. monocytogenes*.) และแกรมลบ (*N. meningitides*, *H. influezae*, *E. cloacae*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumonia*, *Proteus mirabilis*, *Pantoea* sp.) และจากการ วิเคาระห์องค์ประกอบของ น้ำมันหอมระเหย โดยใช้ เครื่อง GC/FID และ GC-MS พบว่ามีสาร 9-Octadecenamide เป็นส่วนประกอบอยู่ด้วย

จากการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสารโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE สารตัวอย่าง (Freeze dried sample) ของ *L. namurensis* N2 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 47 KD ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มแบคเทอริโอซิน class III สำหรับแบคเทอริโอซิน class III มีโครงสร้างเป็นเพปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุล >30 kDa ตัวอย่างแบคเทอริโอซินกลุ่มนี้ เช่น helveticin I สร้างโดย *Lactobacillus helveticus* และ Enterolysin สร้างโดย *Enterococcus faecium* (Todorov *et al*., 2005, Zacharof and Lovit, 2012)

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. สามารถคัดเลือกแลคติกแอสิดแบคทีเรียได้ 320 ไอโซเลท จากอาหารหมักของไทยชนิดต่างๆ จำนวน 51 ตัวอย่าง พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ที่ไม่ผ่านการปรับ pH ของแลคติกแอสิดแบคทีเรียจำนวน 76 ไอโซเลท สามารถยับยั้ง *S.* Typhi PSSCMI0034 และ 34 ไอโซเลท สามารถยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923 ได้ และเมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ปรับ pH เป็น 6.5 และกรองผ่านแผ่นกรองขนาดรูพรุน 0.22 และ0.45 ไมโครเมตร พบว่ามีแลคติกแอสิดแบคทีเรียเพียง 5 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท N2, YA031, NCB3, NCB15 และ NNA7 สามารถยับยั้ง *S.* Typhi PSSCMI0034 หรือ *S. aureus* ATCC 25923 ได้

2. จากการศึกษาการเจริญของแลคติกแอสิดแบคทีเรียไอโซเลท N2 และ NCB3 พบว่าทั้ง 2 ไอโซเลท เจริญอยู่ในช่วง log phase ในช่วง 5-20 ชั่วโมง และเข้าสู่ช่วง stationary phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 20-35 และพบว่าทั้ง 2 ไอโซเลท มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *S.* Typhi PSSCMI0034 ได้ในชั่วโมงที่ 15-20 (late log phase)

3. เมื่อนำสารตัวอย่าง (Freeze dried sample) ของไอโซเลท N2 มา treat ด้วยเอนไซม์ pronase E และ catalase พบว่าไม่เกิดการยับยั้งเชื้อทดสอบแสดงว่าสารที่ได้จากเชื้อ ไอโซเลท N2 เป็นสารกลุ่มโปรตีนและมี H_2O_2 ร่วมด้วย

4. พบว่าสารตัวอย่าง (Freeze dried sample) ของไอโซเลท N2 มีความคงตัวดีในช่วง pH 2-6 และสามารถทนความร้อนที่ อุณหภูมิ 63ºC เป็นเวลา 10, 20 และ 30 นาที ตามลำดับ และมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *S.* Typhi PSSCMI0034 ในช่วง pH และอุณหภูมิดังกล่าว

5. จากการศึกษาลักษณะทางด้านพันธุศาสตร์โมเลกุลโดยใช้ 16S rRNA gene พบว่าไอโซเลท N2 จัดอยู่ในสกุล *Lactobacillus namurensis* strain Ln-15 และไอโซเลท NCB3 จัดอยู่ในสกุล *Lactobacillus farciminis* strain NBRC 107150

6. จากการนำสารสกัด ด้วย ethyl acetate ของ *L. namurensis* N2 ตรวจหาชนิดของสารสกัดจากตัวอย่างโดยใช้เครื่อง GC-MS ที่พบมากที่สุดคือ pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4dione, hexahydro-3-(phenylmethyl) และเมื่อนำ สารสกัด ด้วย ethyl acetate ของ *L. namurensis* N2 มาแยกโดยใช้เทคนิค TLC แล้วนำไปทดสอบการยับยั้งเชื้อพบว่า มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *S.* Typhi PSSCMI0034 เมื่อนำไปวิเคราะห์หาชนิดของสารโดยใช้เครื่อง GC-MS ให้ผลการวิเคราะห์บ่งชี้ชนิดของสารคือ Octadecenamide

7. จากการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสารโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE สารตัวอย่าง (Freeze dried sample) ของ *L. namurensis* N2 มีน้ำหนักโมเลกุ ลประมาณ 47 KDa และรวมถึงคุณสมบัติอื่น ๆที่กล่าวมาในข้อ 3 และ 4 กล่าวได้ว่าเป็นสาร แบคเทอริโอซิน ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มแบคเทอริโอซิน class III

ข้อเสนอแนะ

1. ศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับชนิดของแบคเทอริโอซินที่ได้จาก *L. namurensis* N2

2. จากการศึกษาพบว่า *L. namurensis* N2 ที่แยกได้จากแหนม สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *S.* Typhi PSSCMI0034 ที่ก่อโรคในอาหารได้และมีความคงตัวดีในช่วง pH 2-6 และสามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 63ºC จึงเป็นที่ น่าสนใจที่จะนำไปใช้เป็ นกล้าเชื้อในการผลิตอาหารหมัก เช่น แหนม และสามารถประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์อาหารแช่แข็งรวมถึงอาหารที่ต้องผ่านกระบวนการ pasteurization ได้

รายการเอกสารอ้างอิง

ทัศนียา สุรพันธพิศิษฐ์. การถนอมรักษาเนื้อสัตว์ในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์. กรุงเทพมหานคร : สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.2552.

นิภา โชคสัจะวาที แหนมระวังเชื้อก่อโรค หนังสือพิมพ์ ASTVผู้จัดการ. (มิถุนายน 2552)

ปิ่นมณี ขวัญเมือง. 2547. แบคทีเรียกรดแลคติกใน ผลิตภัณฑ์อาหารหมักดอง . วารสารครุศาสตร์ อุตสาหกรรม. 3(1).

เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์ . 2536 . การถนอมรักษาเนื้อสัตว์ในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ . กรุงเทพมหานคร : สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

วิลาวัณย์ เจริญจิ ระตระกูล . 2539 . จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญด้านอาหาร . 257 หน้า . กรุงเทพมหานคร. โอเดียนสโตร์. กรุงเทพมหานคร.

สุพรรษา อุไรพันธ์. 2550. บทบาทของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ศิรินุช ด้วงสุข. 2550. การคัดเลือกแบคทีเรียที่ยับยั้งเชื้อราที่ปนเปื้อนบนแผ่นยางพารา. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ศศิธร ศิริลุน. 2548. จลนพลศาสตร์ของการหมักลูกยอและฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพของผลิตภัณฑ์ที่ได้. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์-เภสัชกรร มหาวิทยาลัย เชียงใหม่ เชียงใหม่.

อรวินทร์ เลาหรัชตนันท์ . 2532. สารกันเสียในอาหารจากแบคทีเรียกลุ่มสร้างกรดแลกติก ว . อาหาร. 99(3): 202-206.

Alexsson, L.T. 1998. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects. 1-72.

Al-Zereini, W. 2006. Natural products from marine bacteria. (Unpublished doctoral disser tation). University of Kaiserslautern, Germany.

Axelsson, L. 2004. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, 3th Ed. pp 1-66.

Broberg, A., Strom, K., Sjogren, J. and Schnurer, J. 2002. *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 Produces the Antifungal Cyclic Dipeptides Cyclo (L-Phe-L-Pro) and Cyclo (L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-Phenyllactic Acid. American Society for Microbiology. 68(9): 4322-4327.

Bergey's Kandler, O. and Weiss, N. 1986. Genus Lactobacillus. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Edited by P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe and J. G.Holt. Baltimore: Williams and Wilkins. vol. 2, pp 1209-1234.

Chaudhary P, Kumar R, Verma AK, Singh D, Yadav V, Chillar AK, Sharma GL and Cha ndra R. 2006. Synthesis and antimicrobial activity of N-alkyl and N-aryl pipera zine derivatives. Bioorganic and Medicinal Chemistry. 14(6): 1819-1826.

Choi, H-J., Cheigh, C.-I., Kim, S-B., and Pyun, Y.-R. 2000. Production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactic subsp. Lactic* A164 isolated from Kimchi. Jour nal of Applied Microbiology. 88: 563-571.

Clare, D. A. and Swaisgood, H. E. 2000. Bioactive milk peptides: A prospectus. Journal of Dairy Science. 83(6): 1187–1195.

Cleeveland J. Montville, T. J., Nes I.F. and Chikindas M.L. 2001. Bacteriocins safe na tural antimicrobial for food preservation. International Journal of Food Micro biology. 71: 1-20.

CLSI. 2002a. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Ap proved standard M7-A4.

CLSI. 2002b. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility test for yeast. Approved standard. M27-A2.

CLSI. 2002c. Clinical Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi: Approved standard. M38-A.

Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa. Daeschel, M.A. 1998. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservative. Journal of Food Technology. 24: 164-16.

Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. Nature Reviews Microbiology. 3(10): 777–788

Deegan L.H., Cotter P.D., Colin H. and Ross P. 2006. Bacteriocins biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. International Dairy Journal. 16: 1058-1071.

Dickson, J. S. 1992. Acetic acid action on breef tissue surfaces contaminated with *Salmonella typhimurium*. Journal of Food Science. 57: 297-301.

Drummond, A. J. and Waigh, R. D. 2000. The development of microbiological method

for phytochemical screening. Recent Research Development in Phytochemistry. 4: 143-152.

Duangjitcharoen, Y., Kantachote, D., Ongsakul, M., Poosaran, N. and Chaiyasut, C. 2009. Potential use of probiotic *Lactobacillus plantarum* SS2 isolated from a fermented plant beverage: safety assessment and persistence in the murine gastrointestinal tract. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 25(2): 315-321.

Farzaliev VM, Abbasova MT, Ashurova AA, Babaeva GB, Ladokhina NP and Kerimova YM. 2009. Synthesis of N,N′- bis(alkyloxymethyl)piperazines and examination of their antimicrobial properties. Russian Journal of Applied Chemistry. 82(5): 928-930.

Fuller, R. 1989. Probiotics in human and animals. Journal of Applied Bacteriology. 66: 1430-1434.

Garneau, S., Martin, N. I. and Vederas, J. C. 2002. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. Biochimie. 84(5-6): 577-592.

Gilland, S.E. and Speck, M.L. 1997. Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and food borne pathogens in associative cultures. Journal of Food Protection. 40: 820-823.

Hairong Xiong, Shuhua Qi, Ying Xu, Li Miao and Pei-Yuan Qian. 2009. Antibiotic and antifouling compound production by the marine-derived fungus *Cladosporium* sp. F14. Journal of Hydro-environment Research. 2: 264-270.

Halami, P.M., Chandrashekar, A. and Nand, K. 2000. *Lactobacillus farciminis* MD, a newer strain with potential for bacteriocin and antibiotic assay. Applied Microbio logy. 30: 197-202.

Hill L., Ross, R. P. and O'Sullivan, C. 2002. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. Biochimie. 84(5-6): 593-604.

Imelouane, B., Bachiri, A. El., Ankit, M., Khedid, K., Wathelet, J.P. and Amhamdi, H. 2010. Essential oil composition and antimicrobial activity of Artemisia herba-alba asso grown in morocco. Banat's Journal of Biotechnology. 1(2): 49-55.

Kaneshiro T., Vesonder R.F., Peterson R.E., Weisleder D. and Bagby M.O. 1994. 9(Z)-Octadecenamide and Fatty Amides by Bacillus megaterium (8-3437) Conversion of Oleic Acid. Journal of the American Oil Chemists Society. 71: 491-494.

Kantachote, D. and Charernjiratrakul, W. 2008a. Effects of initial air removal methods on microorganisms and characteristics of fermented plant beverages. Pakistan Journal of Biological Sciences. 11(2): 173-180.

Kantachote, D., and Charernjiratrakul, W. 2008b. Selection of lactic acid bacteria for fermented plant beverages to use as inoculants for improving the quality of the finished product. Pakistan Journal of Biological Sciences. 11(22): 2545-2552.

Kantachote, D., Charernjiratrakul, W., and Umsakul, K. 2008. Antibacterial activities of fermented plant beverages collected in southern Thailand. Journal of Biological Science. 8(8): 1280-1288.

Kantachote, D. Kowpong, K., Charernjiratrakul, W. and Pengnoo, A. 2009. Microbial succession in a fermenting of wild forest noni (*Morinda coreia* Ham) fruit plus molasses and its role in producing a liquid fertilizer. Electronic Journal of Biotechnology. 12(3): 1-12.

Kim Y, Jeong-Yong C, Ju-Hee K, Jae-Hak M, Jeong-HC, Young-Cheol K and Keun-Hyung P. 2004. Identification and antimicrobial activity of phenyl acetic acid produced by *Bacillus licheniformis* isolated from fermented soybean chungkook-jang. Current Microbiology. 48: 312-317.

Kumar CS, Vinayak K, Chandra JN, Thimmegowda NR, Prasad SB, Sadashiva CT and Rangappa KS. 2008. Synthesis and antimicrobial studies of novel 1-benzhydryl-piperazine sulfonamide and carboxamide derivatives. Journal of Enzyme Inhibi tion and Medicinal Chemistry. 23(4): 462-469.

Magnusson, J., Strom, K., Roos, S., Sjogren, J., and Schnurer, J. 2003. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Letters. 219(1): 129-135.

Masanobu Nishikawa* and Ken'ichi Ogawa. 2003. Antimicrobial Activity of a Chelatable Poly (Arginyl-Histidine) Produced by the Ergot Fungus Verticillium kibiense. Ame rican Society for Microbiology. 48(1): 229-235.

Nes, I. F., Yoon, S.-S., & Diep, D. B. (2007). Ribosomally synthesiszed antimicrobial peptides (bacteriocins) in lactic acid bacteria: A review. Food Science and Bio technology. 16, 675-690.

Ouwehand, A.C. and Vesterlund, S. 2004. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. S. Salminen, A. Von Wright, A. Ouwehand. Lactic Acid Bacteria Microb iological and Functional Aspects. Marcel Dekker. Inc, New York. 375-395.

Paul Ross R., Morgan, S., and Hill S. 2002. Preservation and Fermentation past present and future. International Journal of Food Microbiology. 79: 3-16.

Roy S, Rao K, Bhuvaneshwari C, Giri A and Mangamoori LN. 2010. Phytochemical analysis of Andrographis paniculata extract and it's antimicrobial activity. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 26: 85-91.

Scheirlinck, I., R. Van der Meulen, A. Van Schoor, I. Cleenwerck, G. Huys, P. Vandam me, L. De Vuyst, and M. Vancanneyt. 2007. *Lactobacillus namurensis* sp. nov., isolated from a traditional Belgian sourdough. International Journal of Systemati cand Evolutionary Microbiology. 57: 223–227.

Sikkema, J.; de Bont and J. A. M; Poolman. B. 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. Microbiological Reviews. 59. 201-222.

Sjogren, J., Magnusson, J., Broberg, A., Schnurer, J. and Kenne, L. 2003. Antifungal 3-Hydroxy Fatty Acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14. Applied and Eviron mental Microbiology. 69: 7554-7557.

Somers E, Ptacek D, Gysegom P, Srinivasan M and Vanderleyden J. 2005. *Azospiri llum brasilense* produces the auxin-like phenylacetic acid by using the key enzy me for indole-3-aceticacid biosynthesis. Applied and Evironmental Microbiology. 71(4): 1803-1810.

Thermo Fisher Scientific. Membranes filter and transfer buffer. 2008. http:// www.pierce net.com/ products. (accessed 25/8/10).

Todorov, S. D. and Dicks, L.M.T. 2005. *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against Gramnegative bacteria. Enzyme and Micro bial Technology Journal. 36: 318-326.

Todorov, S. D. and Dicks, L.M.T. 2004. Influence of Growth conditions on the produc tion of a bacteriocin by *Lactococcus lactis* subp.lactis ST34BR, a strain isolated from barley beer. Journal of Basic Microbiology. 44: 305-316.

Todorov, S. D. and Dicks, L.M.T. 2005. Effect on Growth medium on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST194BZ, a strain isolated from boza. Journal of Food Technology and Biotechnology. 43: 165-173.

Zacharof, M. P. and Lovittb, R. W. 2012. Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria A Review Article. Apcbees Procedia Journal. 2: 50-56.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ

de Man Rogosa and Sharpe agar (MRS agar, Merck)

Agar	14.0	กรัม
di-Ammonium hydrogen citrate	2.0	กรัม
di-Potassium hydrogen phosphate	2.0	กรัม
D(+)Glucose	20.0	กรัม
Magnesium sulfate	0.2	กรัม
Manganeses sulfate	0.04	กรัม
Peptone from casein	10.0	กรัม
Yeast extract	4.0	กรัม
Meat extract	8.0	กรัม
Sodium citrate	5.0	กรัม
Tween 80	1.0	กรัม

เตรียมโดยละลายอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS 68.2 กรัม ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร และนำไปตั้งไฟจนส่วนผสมเข้ากัน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 1.5 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

de Man Rogosa and Sharpe broth (MRS broth, Merck)

D(+)Glucose	20.0	กรัม
di-Ammonium hydrogen citrate	2.0	กรัม
di-Potassium hydrogen phosphate	2.0	กรัม
Meat extract	8.0	กรัม
Magnesium sulfate	0.2	กรัม
Manganeses sulfate	0.04	กรัม
Peptone from casein	10.0	กรัม
Sodium citrate	5.0	กรัม
Tween 80	1.0	กรัม
Yeast extract	4.0	กรัม

เตรียมโดยละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth 52.2 กรัม ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 1.5 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

Potato Dextrose Agar (PDA, Merck)

Agar	15.0	กรัม
Glucose	20.0	กรัม
Potato extracts	4.0	กรัม

เตรียมโดยละลายอาหาร PDA 39 กรัม ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 1.5 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

Plate Count Agar (PCA, Merck)

Agar	15.0	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
Tryptone	5.0	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม

เตรียมโดยละลายอาหาร 22.5 กรัม ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 1.5 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

Tryptic soy agar (TSA, Merck)

Pancreatic Digest of casein	15 กรัม
Enzymatic Digest of Soybean Meal	5 กรัม
NaCl	5 กรัม
Agar	15 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 1.5 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

Tryptic soy broth (TSB, Merck)

Pancreatic Digest of casein	17 กรัม
Enzymatic Digest of Soybean Meal	3 กรัม
Dextrose	2.5 กรัม
NaCl	5 กรัม
Dipotassium phosphate	2.5 กรัม

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นำไปเข้า autoclave ที่ความดัน 15 ปอนด์/ตร.นิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

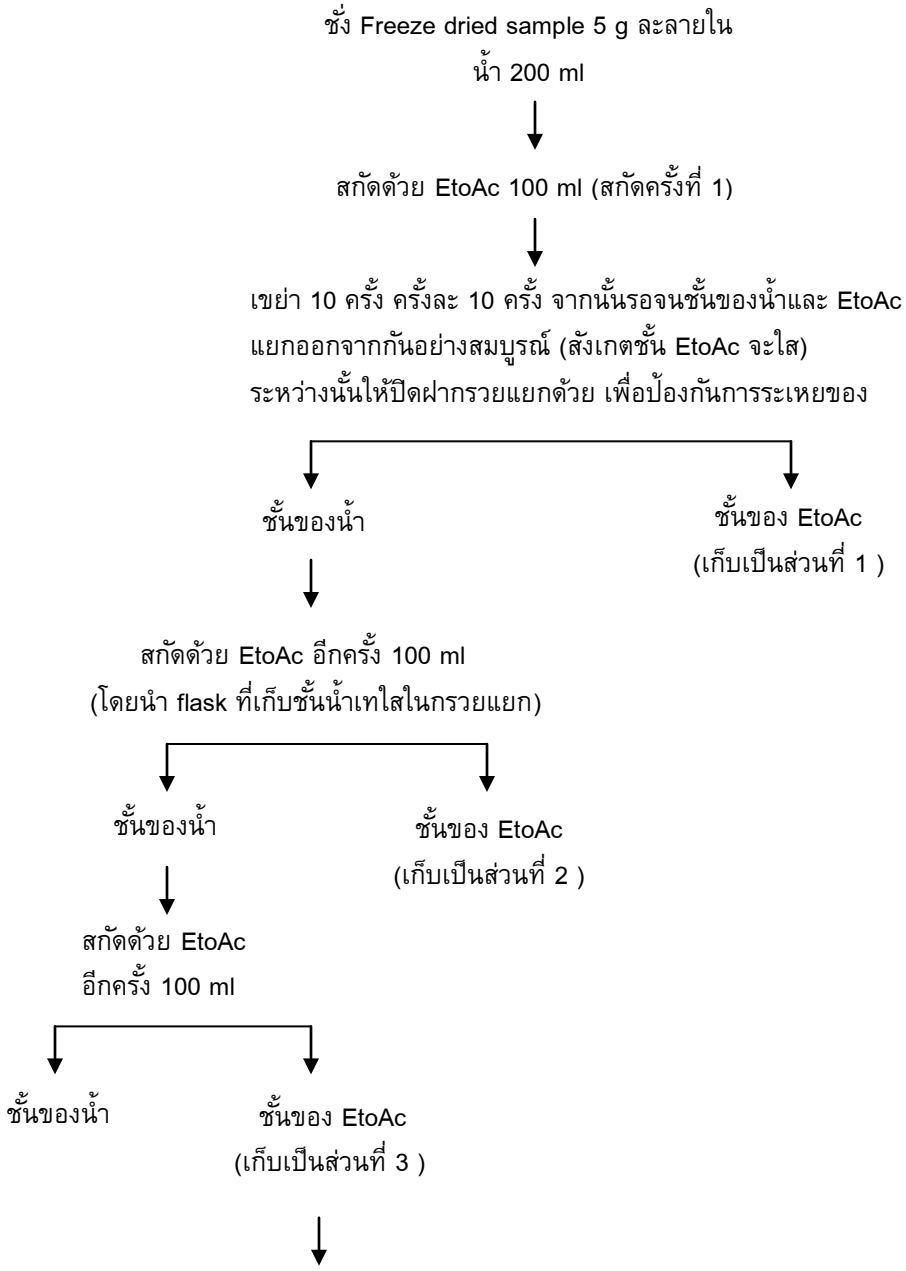
ภาคผนวก ข

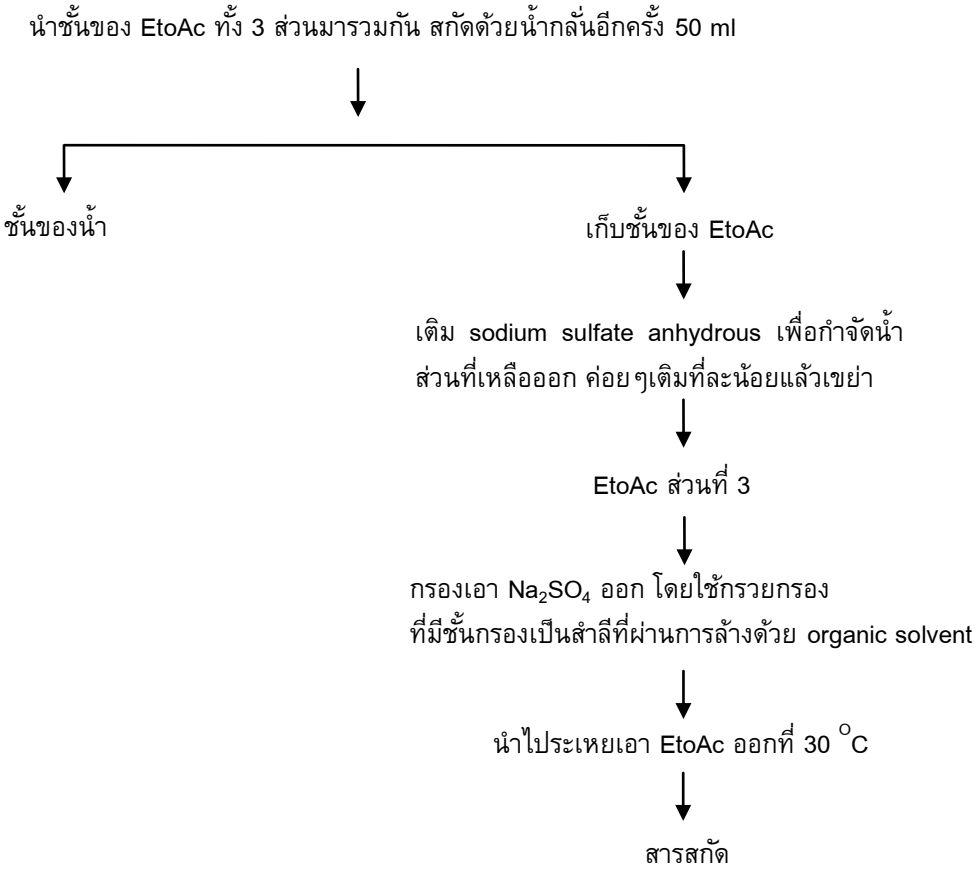
ตารางที่ 13 แสดงส่วนประกอบเจล (polyacrylamide gel)

ส่วนประกอบ	3% Stacking gel (5 ml)	12% Separating gel (6 ml)
30 % Acrylamide-0.8% bis	0.5 ml	2.4 ml
0.5M Tris-HCl pH 6.8	1.25 ml	-
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	-	1.50 ml
0.2 M EDTA	50 µl	60 µl
10% Sodium Dodecyl Sulfate	50 µl	60 µl
10% ammonium persulfate	50 µl	60 µl
TEMED	5 µl	6 µl
Distilled water	3.10 ml	1.92 ml

แผนภูมิแสดงขั้นตอนการสกัดสารตัวอย่างด้วย EtoAc

<u>ขั้นตอนการสกัด</u>




นำชั้นของ EtoAc ทั้ง 3 ส่วนมารวมกัน สกัดด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง 50 ml
ชั้นของน้ำ
เก็บชั้นของ EtoAc
เติม sodium sulfate anhydrous เพื่อกำจัดน้ำ
ส่วนที่เหลือออก ค่อยๆเติมที่ละน้อยแล้วเขย่า
EtoAc ส่วนที่ 3
กรองเอา Na_2SO_4 ออก โดยใช้กรวยกรอง
ที่มีชั้นกรองเป็นสำลีที่ผ่านการล้างด้วย organic solvent
นำไประเหยเอา EtoAc ออกที่ 30 ^{O}C
สารสกัด

ผลการจัดจำแนกแลคติกแอสิดแบคทีเรีย

ผลการจัดจำแนก แลคติกแอสิดแบคทีเรีย โดยวิธี partial 16S rDNA sequencing electropheogram จากหน่วยโครงการพัฒนาวิชาการ KU-VECTOR ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ของไอโซเลท N2 และ NCB3

Lactobacillus namurensis strain Ln-15

Length = 1476

Score = 1620 bits (1796), Expect = 0.0

Identities = 898/898 (100%), Gaps = 0/898 (0%)

Strand=Plus/Plus

Accession number HM130541

Report of Microbial Identification by partial 16S rDNA sequence analysis
Sample Name : N2

---

898 bp Identification
Homology Search with BLASTn program from NCBI database

Sequences producing significant alignments:		SCORE	E VALUE
HM130541	Lactobacillus namurensis strain Ln-15	1620	0.0
AB626072	Lactobacillus namurensis strain: NBRC 107158	1615	0.0
AM259119	Lactobacillus namurensis strain LMG 23584T	1615	0.0
AM259118	Lactobacillus namurensis strain LMG 23583T	1615	0.0
AB626069	Lactobacillus spicheri strain: NBRC 107155	1579	0.0

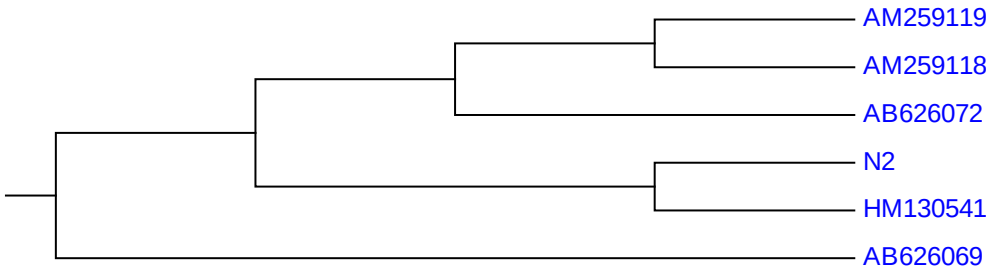
BLASTN 2.2.25+
Reference:
Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

RID: 3R7SE6DM012

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS,environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)
14,409,272 sequences; 37,064,856,589 total letters

Query= Length=898
>N2 CONTIG
GGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTGAAGAAGAACGGGTGTCAGAGTAACTGTTGAC
ATCGTGACGGTATTCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
CGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTA
AGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGGAACTTGA
GTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGA
ACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTAGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGG
TAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTG
GAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACG
ACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGG
TTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTCTGCCAATCTTAGA
GATAAGACGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTG
TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCAT
TCAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC
AAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAG
TCGCAAAGTCGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGATTGCAGG

Alignment and Phylogenic tree by MEGA 4
Unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA)



>gi|296788341|gb|HM130541.1| Lactobacillus namurensis strain Ln-15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=1476

 Score = 1620 bits (1796), Expect = 0.0
 Identities = 898/898 (100%), Gaps = 0/898 (0%)
 Strand=Plus/Plus

```
Query  1     GGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTGAAGAAGAACGGGTGTCAGAGTAACTGTTGAC  60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  411   GGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTGAAGAAGAACGGGTGTCAGAGTAACTGTTGAC  470

Query  61    ATCGTGACGGTATTCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA  120
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  471   ATCGTGACGGTATTCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA  530

Query  121   CGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTA  180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  531   CGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTA  590

Query  181   AGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGGAACTTGA  240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  591   AGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGGAACTTGA  650
```

```
Query  241   GTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGA  300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  651   GTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGA  710

Query  301   ACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTAGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGG  360
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  711   ACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTAGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGG  770

Query  361   TAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTG  420
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  771   TAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTG  830

Query  421   GAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACG  480
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  831   GAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACG  890

Query  481   ACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGG  540
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  891   ACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGG  950

Query  541   TTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTCTGCCAATCTTAGA  600
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  951   TTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTCTGCCAATCTTAGA  1010

Query  601   GATAAGACGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTG  660
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1011  GATAAGACGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTG  1070

Query  661   TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCAT  720
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1071  TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCAT  1130

Query  721   TCAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC  780
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1131  TCAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC  1190

Query  781   AAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAG  840
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1191  AAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAG  1250

Query  841   TCGCAAAGTCGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGATTGCAGG  898
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1251  TCGCAAAGTCGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGATTGCAGG  1308
```

>gi|329025386|dbj|AB626072.1| Lactobacillus namurensis gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 107158
Length=1491

Score = 1615 bits (1790), Expect = 0.0
Identities = 897/898 (99%), Gaps = 0/898 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query  1     GGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTGAAGAAGAACGGGTGTCAGAGTAACTGTTGAC  60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  413   GGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTGAAGAAGAACGGGTGTCAGAGTAACTGTTGAC  472

Query  61    ATCGTGACGGTATTCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA  120
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  473   ATCGTGACGGTATTCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA  532
```

```
Query  121   CGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTA  180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  533   CGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTA  592

Query  181   AGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGGAACTTGA  240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  593   AGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGGAACTTGA  652

Query  241   GTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGA  300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  653   GTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGA  712

Query  301   ACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTAGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGG  360
             |||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  713   ACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTAGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGG  772

Query  361   TAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTG  420
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  773   TAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTG  832

Query  421   GAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACG  480
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  833   GAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACG  892

Query  481   ACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGG  540
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  893   ACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGG  952

Query  541   TTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTCTGCCAATCTTAGA  600
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  953   TTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTCTGCCAATCTTAGA  1012

Query  601   GATAAGACGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTG  660
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1013  GATAAGACGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTG  1072

Query  661   TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCAT  720
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1073  TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCAT  1132

Query  721   TCAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC  780
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1133  TCAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC  1192

Query  781   AAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAG  840
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1193  AAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAG  1252

Query  841   TCGCAAAGTCGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGATTGCAGG  898
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1253  TCGCAAAGTCGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGATTGCAGG  1310
```

>gi|116054477|emb|AM259119.1| Lactobacillus namurensis partial 16S rRNA gene, type strain LMG 23584T
Length=1518

 Score = 1615 bits (1790), Expect = 0.0
 Identities = 897/898 (99%), Gaps = 0/898 (0%)
 Strand=Plus/Plus

```
Query  1     GGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTGAAGAAGAACGGGTGTCAGAGTAACTGTTGAC  60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  413   GGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTGAAGAAGAACGGGTGTCAGAGTAACTGTTGAC  472

Query  61    ATCGTGACGGTATTCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA  120
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  473   ATCGTGACGGTATTCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA  532

Query  121   CGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTA  180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  533   CGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTA  592

Query  181   AGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGGAACTTGA  240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  593   AGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGGAACTTGA  652

Query  241   GTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGA  300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  653   GTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGA  712

Query  301   ACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTAGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGG  360
             |||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  713   ACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTAGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGG  772

Query  361   TAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTG  420
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  773   TAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTG  832

Query  421   GAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACG  480
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  833   GAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACG  892

Query  481   ACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGG  540
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  893   ACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGG  952

Query  541   TTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTCTGCCAATCTTAGA  600
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  953   TTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTCTGCCAATCTTAGA  1012

Query  601   GATAAGACGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTG  660
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1013  GATAAGACGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTG  1072

Query  661   TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCAT  720
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1073  TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCAT  1132

Query  721   TCAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC  780
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1133  TCAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC  1192
```

```
Query  781   AAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAG  840
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1193  AAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAG  1252

Query  841   TCGCAAAGTCGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGATTGCAGG  898
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1253  TCGCAAAGTCGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGATTGCAGG  1310
>gi|116054476|emb|AM259118.1|  Lactobacillus namurensis partial 16S rRNA gene,
type strain LMG 23583T


Length=1518
Score = 1615 bits (1790),  Expect = 0.0
Identities = 897/898 (99%), Gaps = 0/898 (0%)
Strand=Plus/Plus
Query  1     GGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTGAAGAAGAACGGGTGTCAGAGTAACTGTTGAC  60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  413   GGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTGAAGAAGAACGGGTGTCAGAGTAACTGTTGAC  472

Query  61    ATCGTGACGGTATTCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA  120
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  473   ATCGTGACGGTATTCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA  532

Query  121   CGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTA  180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  533   CGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTA  592

Query  181   AGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGGAACTTGA  240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  593   AGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGGAACTTGA  652

Query  241   GTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGA  300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  653   GTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGA  712

Query  301   ACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTAGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGG  360
             |||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  713   ACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTAGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGG  772

Query  361   TAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTG  420
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  773   TAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTG  832

Query  421   GAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACG  480
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  833   GAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACG  892

Query  481   ACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGG  540
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  893   ACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGG  952

Query  541   TTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTCTGCCAATCTTAGA  600
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  953   TTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTCTGCCAATCTTAGA  1012

Query  601   GATAAGACGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTG  660
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1013  GATAAGACGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTG  1072
```

```
Query  661   TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCAT  720
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1073  TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCAT  1132

Query  721   TCAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC  780
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1133  TCAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC  1192

Query  781   AAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAG  840
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1193  AAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAG  1252

Query  841   TCGCAAAGTCGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGATTGCAGG  898
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1253  TCGCAAAGTCGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGATTGCAGG  1310
```

>gi|329025383|dbj|AB626069.1| Lactobacillus spicheri gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 107155
Length=1491

```
 Score = 1579 bits (1750),  Expect = 0.0
 Identities = 889/898 (99%), Gaps = 0/898 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1     GGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTGAAGAAGAACGGGTGTCAGAGTAACTGTTGAC  60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  413   GGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTGAAGAAGAACGGGTGTCAGAGTAACTGTTGAC  472

Query  61    ATCGTGACGGTATTCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA  120
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  473   ATCGTGACGGTATTCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA  532

Query  121   CGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTA  180
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||
Sbjct  533   CGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTA  592

Query  181   AGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGGAACTTGA  240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  ||||||
Sbjct  593   AGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAGACTTGA  652

Query  241   GTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGA  300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  653   GTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGA  712

Query  301   ACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTAGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGG  360
             |||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  713   ACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTAGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGG  772

Query  361   TAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTG  420
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||
Sbjct  773   TAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTG  832

Query  421   GAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACG  480
             |||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  833   GAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACG  892
```

```
Query  481   ACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGG  540
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  893   ACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGG  952

Query  541   TTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTCTGCCAATCTTAGA  600
              |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||
Sbjct  953   TTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTCTGCCAATCTAAGA  1012

Query  601   GATAAGACGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTG  660
              ||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1013  GATTAGACGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTG  1072

Query  661   TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCAT  720
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1073  TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCAT  1132

Query  721   TCAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC  780
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1133  TCAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC  1192

Query  781   AAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAG  840
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1193  AAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAG  1252

Query  841   TCGCAAAGTCGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGATTGCAGG  898
              |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||
Sbjct  1253  TCGCAAAGTCGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGG  1310
```

```
LOCUS       HM130541               1476 bp    DNA     linear   BCT 30-MAY-2010
DEFINITION  Lactobacillus namurensis strain Ln-15 16S ribosomal RNA gene,
            partial sequence.
ACCESSION   HM130541
VERSION     HM130541.1  GI:296788341
KEYWORDS    .
SOURCE      Lactobacillus namurensis
  ORGANISM  Lactobacillus namurensis
            Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales; Lactobacillaceae;
            Lactobacillus.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1476)
  AUTHORS   Sheng,H.-Y., Guo,Y.-P., Chang,Y. and Zhang,M.
  TITLE     The biodiversity of lactic acid bacteria from the traditional
            fermented vegetable
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1476)
  AUTHORS   Sheng,H.-Y., Guo,Y.-P., Chang,Y. and Zhang,M.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (16-APR-2010) College of Life Science, Anhui Agriculture
            University, Changjiang West Road, Hefei, Anhui 230036, China
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1476
                     /organism="Lactobacillus namurensis"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="Ln-15"
                     /db_xref="taxon:380393"
     rRNA            <1..>1476
                     /product="16S ribosomal RNA"
```

```
ORIGIN
        1 gtaggcagct ggcggctgcc tatacatgca agtcgaacga gttcccgttg attgacgtgc
       61 ttgcactgat ttcaacattg gaacgagtgg cgaactggtg agtaacacgt ggaaaacctg
      121 cccagaagca ggggataaca cttggaaaca ggtgctaata ccgtataaca acaaaaaccg
      181 catggttttt gtttgaaagg tggcttcggc tatcacttct ggatggttcc gcggcgcatt
      241 agcttgttgg tggggtaacg gctcaccaag gcgatgatgc gtagccgacc tgagagggta
      301 atcggccaca ttgggactga gacacggccc agactcctac gggaggcagc agtagggaat
      361 cttccacaat ggacgcaagt ctgatggagc aatgccgcgt gagtgaagaa gggtttcggc
      421 tcgtaaaact ctgttgttga agaagaacgg gtgtcagagt aactgttgac atcgtgacgg
      481 tattcaacca gaaagccacg gctaactacg tgccagcagc cgcggtaata cgtaggtggc
      541 aagcgttgtc cggatttatt gggcgtaaag cgagcgcagg cggtttctta agtctgatgt
      601 gaaagccttc ggcttaaccg aagaagtgca tcggaaactg gggaacttga gtgcagaaga
      661 ggacagtgga actccatgtg tagcggtgga atgcgtagat atatggaaga acaccagtgg
      721 cgaaggcggc tgtctagtct gcaactgacg ctgaggctcg aaagcatggg tagcgaacag
      781 gattagatac cctggtagtc catgccgtaa acgatgagtg ctaggtgttg gagggtttcc
      841 gcccttcagt gccgcagcta acgcattaag cactccgcct ggggagtacg accgcaaggt
      901 tgaaactcaa aggaattgac gggggcccgc acaagcggtg gagcatgtgg tttaattcga
      961 agctacgcga agaaccttac caggtcttga catcttctgc caatcttaga gataagacgt
     1021 tcccttcggg gacagaatga caggtggtgc atggttgtcg tcagctcgtg tcgtgagatg
     1081 ttgggttaag tcccgcaacg agcgcaaccc ttattatcag ttgccagcat tcagttgggc
     1141 actctggtga gactgccggt gacaaaccgg aggaaggtgg ggatgacgtc aaatcatcat
     1201 gccccttatg acctgggcta cacacgtgct acaatggacg gtacaacgag tcgcaaagtc
     1261 gcgaggctaa gctaatctct taaagccgtt ctcagttcgg attgcaggct gcaactcgcc
     1321 tacatgaagt tggaatcgct agtaatcgcg gatcagcatg ccgcggtgaa tacgttcccg
     1381 ggccttgtac acaccgcccg tcacaccatg agagtttgta acacccaaag ccggtgaggt
     1441 aacctttgga gccagccgtc taaggtgaca gattgt

LOCUS       AB626072               1491 bp    DNA     linear   BCT 16-APR-2011
DEFINITION  Lactobacillus namurensis gene for 16S rRNA, partial sequence,
            strain: NBRC 107158.
ACCESSION   AB626072
VERSION     AB626072.1  GI:329025386
KEYWORDS    .
SOURCE      Lactobacillus namurensis
  ORGANISM  Lactobacillus namurensis
            Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales; Lactobacillaceae;
            Lactobacillus.
REFERENCE   1
  AUTHORS   Miyashita,M.
  TITLE     NITE Biological Resource Center (NBRC)
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1491)
  AUTHORS   Miyashita,M. and Nakagawa,Y.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (15-APR-2011) Contact:Mika Miyashita National Institute
            of Technology and Evaluation, NITE Biological Resource Center
            (NBRC); Kazusakamatari, Kisarazu, Chiba 292-0818, Japan URL
            :http://www.nbrc.nite.go.jp/
COMMENT     Please visit our web site
            http://www.nbrc.nite.go.jp/.
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1491
                     /organism="Lactobacillus namurensis"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="NBRC 107158"
                     /db_xref="NBRC:107158"
                     /db_xref="taxon:380393"
                     /note="type strain of Lactobacillus namurensis"
     rRNA            <1..>1491
                     /product="16S ribosomal RNA"
```

```
ORIGIN
        1 gacgaacgct ggcggcatgc ctaatacatg caagtcgaac gagttcccgt tgattgacgt
       61 gcttgcactg atttcaacat tggaacgagt ggcgaactgg tgagtaacac gtggaaaacc
      121 tgcccagaag caggggataa cacttggaaa caggtgctaa taccgtataa caacaaaaac
      181 cgcatggttt ttgtttgaaa ggtggcttcg gctatcactt ctggatggtt ccgcggcgca
      241 ttagcttgtt ggtggggtaa cggctcacca aggcgatgat gcgtagccga cctgagaggg
      301 taatcggcca cattgggact gagacacggc ccagactcct acgggaggca gcagtaggga
      361 atcttccaca atggacgcaa gtctgatgga gcaatgccgc gtgagtgaag aagggtttcg
      421 gctcgtaaaa ctctgttgtt gaagaagaac gggtgtcaga gtaactgttg acatcgtgac
      481 ggtattcaac cagaaagcca cggctaacta cgtgccagca gccgcggtaa tacgtaggtg
      541 gcaagcgttg tccggattta ttgggcgtaa agcgagcgca ggcggtttct taagtctgat
      601 gtgaaagcct tcggcttaac cgaagaagtg catcggaaac tggggaactt gagtgcagaa
      661 gaggacagtg gaactccatg tgtagcggtg gaatgcgtag atatatggaa gaacaccagt
      721 ggcgaaggcg gctgtctagt ctgtaactga cgctgaggct cgaaagcatg ggtagcgaac
      781 aggattagat accctggtag tccatgccgt aaacgatgag tgctaggtgt tggagggttt
      841 ccgcccttca gtgccgcagc taacgcatta agcactccgc ctggggagta cgaccgcaag
      901 gttgaaactc aaaggaattg acgggggccc gcacaagcgg tggagcatgt ggtttaattc
      961 gaagctacgc gaagaacctt accaggtctt gacatcttct gccaatctta gagataagac
     1021 gttcccttcg gggacagaat gacaggtggt gcatggttgt cgtcagctcg tgtcgtgaga
     1081 tgttgggtta agtcccgcaa cgagcgcaac ccttattatc agttgccagc attcagttgg
     1141 gcactctggt gagactgccg gtgacaaacc ggaggaaggt ggggatgacg tcaaatcatc
     1201 atgcccctta tgacctgggc tacacacgtg ctacaatgga cggtacaacg agtcgcaaag
     1261 tcgcgaggct aagctaatct cttaaagccg ttctcagttc ggattgcagg ctgcaactcg
     1321 cctacatgaa gttggaatcg ctagtaatcg cggatcagca tgccgcggtg aatacgttcc
     1381 cgggccttgt acacaccgcc cgtcacacca tgagagtttg taacacccaa agccggtgag
     1441 gtaacctttt ggagccagcc gtctaaggtg ggacagatga ttagggtgaa g
```

```
LOCUS       AM259119               1518 bp    DNA     linear   BCT 02-FEB-2007
DEFINITION  Lactobacillus namurensis partial 16S rRNA gene, type strain LMG
            23584T.
ACCESSION   AM259119
VERSION     AM259119.1  GI:116054477
KEYWORDS    16S ribosomal RNA; 16S rRNA gene.
SOURCE      Lactobacillus namurensis
  ORGANISM  Lactobacillus namurensis
            Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales; Lactobacillaceae;
            Lactobacillus.
REFERENCE   1
  AUTHORS   Scheirlinck,I., Van der Meulen,R., Van Schoor,A., Cleenwerck,I.,
            Huys,G., Vandamme,P., De Vuyst,L. and Vancanneyt,M.
  TITLE     Lactobacillus namurensis sp. nov., isolated from a traditional
            Belgian sourdough
  JOURNAL   Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57 (PT 2), 223-227 (2007)
   PUBMED   17267954
REFERENCE   2  (bases 1 to 1518)
  AUTHORS   Scheirlinck,I.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (11-APR-2006) Scheirlinck I., Laboratory of Microbiology,
            University Ghent, 9000, Ghent, BELGIUM
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1518
                     /organism="Lactobacillus namurensis"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="type strain: LMG 23584 = R-30099"
                     /isolate="Nx9 = D09ME01T02-009"
                     /isolation_source="sourdough"
                     /db_xref="taxon:380393"
                     /country="Belgium:Namur"
```

```
     gene            <1..>1518
                     /gene="16S rRNA"
     rRNA            <1..>1518
                     /gene="16S rRNA"
                     /product="16S ribosomal RNA"
ORIGIN
        1 gacgaacgct ggcggcatgc ctaatacatg caagtcgaac gagttcccgt tgattgacgt
       61 gcttgcactg atttcaacat tggaacgagt ggcgaactgg tgagtaacac gtggaaaacc
      121 tgcccagaag caggggataa cacttggaaa caggtgctaa taccgtataa caacaaaaac
      181 cgcatggttt ttgtttgaaa ggtggcttcg gctatcactt ctggatggtt ccgcggcgca
      241 ttagcttgtt ggtggggtaa cggctcacca aggcgatgat gcgtagccga cctgagaggg
      301 taatcggcca cattgggact gagacacggc ccagactcct acgggaggca gcagtaggga
      361 atcttccaca atggacgcaa gtctgatgga gcaatgccgc gtgagtgaag aagggtttcg
      421 gctcgtaaaa ctctgttgtt gaagaagaac gggtgtcaga gtaactgttg acatcgtgac
      481 ggtattcaac cagaaagcca cggctaacta cgtgccagca gccgcggtaa tacgtaggtg
      541 gcaagcgttg tccggattta ttgggcgtaa agcgagcgca ggcggtttct taagtctgat
      601 gtgaaagcct tcggcttaac cgaagaagtg catcggaaac tggggaactt gagtgcagaa
      661 gaggacagtg gaactccatg tgtagcggtg gaatgcgtag atatatggaa gaacaccagt
      721 ggcgaaggcg gctgtctagt ctgtaactga cgctgaggct cgaaagcatg ggtagcgaac
      781 aggattagat accctggtag tccatgccgt aaacgatgag tgctaggtgt tggagggttt
      841 ccgcccttca gtgccgcagc taacgcatta agcactccgc ctggggagta cgaccgcaag
      901 gttgaaactc aaaggaattg acgggggccc gcacaagcgg tggagcatgt ggtttaattc
      961 gaagctacgc gaagaacctt accaggtctt gacatcttct gccaatctta gagataagac
     1021 gttcccttcg gggacagaat gacaggtggt gcatggttgt cgtcagctcg tgtcgtgaga
     1081 tgttgggtta agtcccgcaa cgagcgcaac ccttattatc agttgccagc attcagttgg
     1141 gcactctggt gagactgccg gtgacaaacc ggaggaaggt ggggatgacg tcaaatcatc
     1201 atgcccctta tgacctgggc tacacacgtg ctacaatgga cggtacaacg agtcgcaaag
     1261 tcgcgaggct aagctaatct cttaaagccg ttctcagttc ggattgcagg ctgcaactcg
     1321 cctacatgaa gttggaatcg ctagtaatcg cggatcagca tgccgcggtg aatacgttcc
     1381 cgggccttgt acacaccgcc cgtcacacca tgagagtttg taacacccaa agccggtgag
     1441 gtaacctttt ggagccagcc gtctaaggtg ggacagatga ttagggtgaa gtcgtaacaa
     1501 ggtagccgta ggagaacc


LOCUS       AM259118               1518 bp    DNA     linear   BCT 02-FEB-2007
DEFINITION  Lactobacillus namurensis partial 16S rRNA gene, type strain LMG
            23583T.
ACCESSION   AM259118
VERSION     AM259118.1  GI:116054476
KEYWORDS    16S ribosomal RNA; 16S rRNA gene.
SOURCE      Lactobacillus namurensis
  ORGANISM  Lactobacillus namurensis
            Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales; Lactobacillaceae;
            Lactobacillus.
REFERENCE   1
  AUTHORS   Scheirlinck,I., Van der Meulen,R., Van Schoor,A., Huys,G.,
            Vandamme,P., Swings,J., De Vuyst,L. and Vancanneyt,M.
  TITLE     Lactobacillus namurensis sp. nov., from a traditional Belgian
            sourdough
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1518)
  AUTHORS   Scheirlinck,I.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (11-APR-2006) Scheirlinck I., Laboratory of Microbiology,
            University Ghent, 9000, Ghent, BELGIUM
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1518
                     /organism="Lactobacillus namurensis"
                     /mol_type="genomic DNA"
```

```
                     /strain="type strain: LMG 23583 = R-27965"
                     /isolate="N24 = D09ME01T01-024"
                     /isolation_source="sourdough"
                     /db_xref="taxon:380393"
                     /country="Belgium:Namur"
     gene            <1..>1518
                     /gene="16S rRNA"
     rRNA            <1..>1518
                     /gene="16S rRNA"
                     /product="16S ribosomal RNA"
ORIGIN
        1 gacgaacgct ggcggcatgc ctaatacatg caagtcgaac gagttcccgt tgattgacgt
       61 gcttgcactg atttcaacat tggaacgagt ggcgaactgg tgagtaacac gtggaaaacc
      121 tgcccagaag caggggataa cacttggaaa caggtgctaa taccgtataa caacaaaaac
      181 cgcatggttt ttgtttgaaa ggtggcttcg gctatcactt ctggatggtt ccgcggcgca
      241 ttagcttgtt ggtggggtaa cggctcacca aggcgatgat gcgtagccga cctgagaggg
      301 taatcggcca cattgggact gagacacggc ccagactcct acgggaggca gcagtaggga
      361 atcttccaca atggacgcaa gtctgatgga gcaatgccgc gtgagtgaag aagggtttcg
      421 gctcgtaaaa ctctgttgtt gaagaagaac gggtgtcaga gtaactgttg acatcgtgac
      481 ggtattcaac cagaaagcca cggctaacta cgtgccagca gccgcggtaa tacgtaggtg
      541 gcaagcgttg tccggattta ttgggcgtaa agcgagcgca ggcggtttct taagtctgat
      601 gtgaaagcct tcggcttaac cgaagaagtg catcggaaac tggggaactt gagtgcagaa
      661 gaggacagtg gaactccatg tgtagcggtg gaatgcgtag atatatggaa gaacaccagt
      721 ggcgaaggcg gctgtctagt ctgtaactga cgctgaggct cgaaagcatg ggtagcgaac
      781 aggattagat accctggtag tccatgccgt aaacgatgag tgctaggtgt tggagggttt
      841 ccgcccttca gtgccgcagc taacgcatta agcactccgc ctggggagta cgaccgcaag
      901 gttgaaactc aaaggaattg acgggggccc gcacaagcgg tggagcatgt ggtttaattc
      961 gaagctacgc gaagaacctt accaggtctt gacatcttct gccaatctta gagataagac
     1021 gttcccttcg gggacagaat gacaggtggt gcatggttgt cgtcagctcg tgtcgtgaga
     1081 tgttgggtta agtcccgcaa cgagcgcaac ccttattatc agttgccagc attcagttgg
     1141 gcactctggt gagactgccg gtgacaaacc ggaggaaggt ggggatgacg tcaaatcatc
     1201 atgcccctta tgacctgggc tacacacgtg ctacaatgga cggtacaacg agtcgcaaag
     1261 tcgcgaggct aagctaatct cttaaagccg ttctcagttc ggattgcagg ctgcaactcg
     1321 cctacatgaa gttggaatcg ctagtaatcg cggatcagca tgccgcggtg aatacgttcc
     1381 cgggccttgt acacaccgcc cgtcacacca tgagagtttg taacacccaa agccggtgag
     1441 gtaacctttt ggagccagcc gtctaaggtg ggacagatga ttagggtgaa gtcgtaacaa
     1501 ggtagccgta ggagaacc


LOCUS       AB626069                1491 bp    DNA     linear   BCT 16-APR-2011
DEFINITION  Lactobacillus spicheri gene for 16S rRNA, partial sequence, strain:
            NBRC 107155.
ACCESSION   AB626069
VERSION     AB626069.1  GI:329025383
KEYWORDS    .
SOURCE      Lactobacillus spicheri
  ORGANISM  Lactobacillus spicheri
            Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales; Lactobacillaceae;
            Lactobacillus.
REFERENCE   1
  AUTHORS   Miyashita,M.
  TITLE     NITE Biological Resource Center (NBRC)
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1491)
  AUTHORS   Miyashita,M. and Nakagawa,Y.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (15-APR-2011) Contact:Mika Miyashita National Institute
            of Technology and Evaluation, NITE Biological Resource Center
            (NBRC); Kazusakamatari, Kisarazu, Chiba 292-0818, Japan URL
```

```
            :http://www.nbrc.nite.go.jp/
COMMENT     Please visit our web site
            http://www.nbrc.nite.go.jp/.
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1491
                     /organism="Lactobacillus spicheri"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="NBRC 107155"
                     /db_xref="NBRC:107155"
                     /db_xref="taxon:216463"
                     /note="type strain of Lactobacillus spicheri"
     rRNA            <1..>1491
                     /product="16S ribosomal RNA"
ORIGIN
        1 gacgaacgct ggcggcatgc ctaatacatg caagtcgaac gagttcncgt tgattgacgt
       61 gcttgcactg atttcaacat tggaacgagt ggcgaactgg tgagtaacac gtgggaaatc
      121 tgcccagaag caggggataa cacttggaaa caggtgctaa taccgtataa caacaaaatc
      181 cgcatggatt ttgtttgaaa ggtggtttcg gctatcactt ctggatgatc ccgcggcgta
      241 ttagttagtt ggtagggtaa tggcttacca agacgatgat acgtagccga cctgagaggg
      301 taatcggcca cattgggact gagacacggc ccagactcct acgggaggca gcagtaggga
      361 atcttccaca atggacgaaa gtctgatgga gcaatgccgc gtgagtgaag aagggtttcg
      421 gctcgtaaaa ctctgttgtt gaagaagaac gggtgtcaga gtaactgttg acatcgtgac
      481 ggtattcaac cagaaagcca cggctaacta cgtgccagca gccgcggtaa tacgtaggtg
      541 gcaagcgttg tccggattta ttgggcgtaa agcgagcgca ggcggttttt taagtctgat
      601 gtgaaagcct tcggcttaac cgaagaagtg catcggaaac tgggagactt gagtgcagaa
      661 gaggacagtg gaactccatg tgtagcggtg gaatgcgtag atatatggaa gaacaccagt
      721 ggcgaaggcg gctgtctagt ctgtaactga cgctgaggct cgaaagcatg ggtagcgaac
      781 aggattagat accctggtag tccatgccgt aaacgatgag tgctaagtgt tggagggttt
      841 ccgcccttca gtgctgcagc taacgcatta agcactccgc ctggggagta cgaccgcaag
      901 gttgaaactc aaaggaattg acgggggccc gcacaagcgg tggagcatgt ggtttaattc
      961 gaagctacgc gaagaacctt accaggtctt gacatcttct gccaatctaa gagattagac
     1021 gttcccttcg gggacagaat gacaggtggt gcatggttgt cgtcagctcg tgtcgtgaga
     1081 tgttgggtta agtcccgcaa cgagcgcaac ccttattatc agttgccagc attcagttgg
     1141 gcactctggt gagactgccg gtgacaaacc ggaggaaggt ggggatgacg tcaaatcatc
     1201 atgcccctta tgacctgggc tacacacgtg ctacaatgga cggtacaacg agtcgcaaag
     1261 tcgcgaggct aagctaatct cttaaagccg ttctcagttc ggattgtagg ctgcaactcg
     1321 cctacatgaa gttggaatcg ctagtaatcg cggatcagca tgccgcggtg aatacgttcc
     1381 cgggccttgt acacaccgcc cgtcacacca tgagagtttg taacacccaa agccggtgag
     1441 ataaccttcg ggagtcagcc gtctaaggtg ggacagatga ttagggtgaa
```

Lactobacillus farciminis strain NBRC 107150

Length=1492

Score = **1792 bits (1986)** bits, Expect = **0.0**

Identities = **993/993 (100%)**, Gaps = **0/993 (0%)**

Strand = **Plus/Plus**

Report of Microbial Identification by partial 16S rDNA sequence analysis
Sample Name : NCB3

---

993 bp Identification
Homology Search with BLASTn program from NCBI database

Sequences producing significant alignments:		SCORE	E VALUE
AB626064	Lactobacillus farciminis strain: NBRC 107150	1792	0.0
AM275437	Uncultured bacterium clone AP07K.42	1792	0.0
DQ056424	Uncultured Lactobacillus sp. clone Al2-6c	1792	0.0
DQ056421	Lactobacillus farciminis strain Al2-3i	1792	0.0
AJ417499	Lactobacillus farciminis strain DSM 20185	1792	0.0

BLASTN 2.2.25+
Reference:
Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

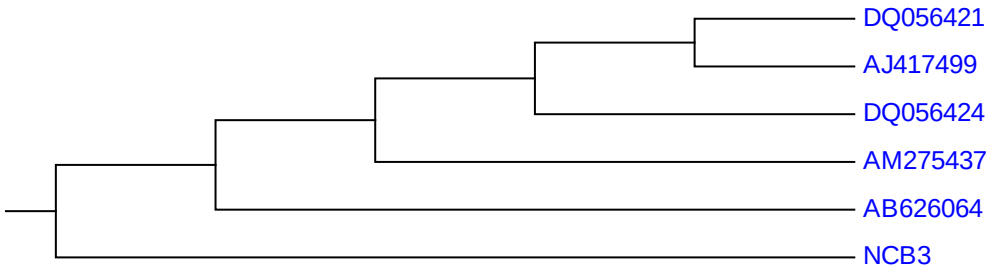
RID: 4M39A50E014

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS,environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)
14,469,546 sequences; 37,160,998,122 total letters

Query= NCB3 Length=993
>NCB3
AAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTGAAGAAGAACATGCGTGAGAGTAACTGTTC
ACGTACTGACGGTATTCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA
TACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGAATGTAGGCGGTTTAT
TAAGTTTGAAGTGAAAGCCCTCGGCTCAACCGAGGAAGTGCTTCGAAAACTGGTAAACTT
GAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAA
GAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGATTCGAAAGCATG
GGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGT
TGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTA
CGATCGCAAGATTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGT
GGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACCATGACAAACTAA
GAGATTAGTCTTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCG
TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGC
ATTCAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACG
TCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAACG
TGTTGCGAACTCGCGAGGGCAAGCAAATCACTTAAAACCGATCTCAGTTCGGATTGCAGG

CTGCAACTCGCCTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTG
AATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT

Alignment and Phylogenic tree by MEGA 4
Unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA)



>gi|329025378|dbj|AB626064.1| Lactobacillus farciminis gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 107150
Length=1492

Score = 1792 bits (1986), Expect = 0.0
Identities = 993/993 (100%), Gaps = 0/993 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query  1     AAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTGAAGAAGAACATGCGTGAGAGTAACTGTTC  60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  410   AAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTGAAGAAGAACATGCGTGAGAGTAACTGTTC  469

Query  61    ACGTACTGACGGTATTCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA  120
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  470   ACGTACTGACGGTATTCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA  529

Query  121   TACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGAATGTAGGCGGTTTAT  180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  530   TACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGAATGTAGGCGGTTTAT  589

Query  181   TAAGTTTGAAGTGAAAGCCCTCGGCTCAACCGAGGAAGTGCTTCGAAAACTGGTAAACTT  240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  590   TAAGTTTGAAGTGAAAGCCCTCGGCTCAACCGAGGAAGTGCTTCGAAAACTGGTAAACTT  649

Query  241   GAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAA  300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  650   GAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAA  709

Query  301   GAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGATTCGAAAGCATG  360
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  710   GAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGATTCGAAAGCATG  769

Query  361   GGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGT  420
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  770   GGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGT  829

Query  421   TGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTA  480
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  830   TGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTA  889
```

```
Query  481   CGATCGCAAGATTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGT  540
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  890   CGATCGCAAGATTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGT  949

Query  541   GGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACCATGACAAACTAA  600
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  950   GGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACCATGACAAACTAA  1009

Query  601   GAGATTAGTCTTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCG  660
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1010  GAGATTAGTCTTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCG  1069

Query  661   TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGC  720
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1070  TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGC  1129

Query  721   ATTCAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACG  780
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1130  ATTCAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACG  1189

Query  781   TCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAACG  840
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1190  TCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAACG  1249

Query  841   TGTTGCGAACTCGCGAGGGCAAGCAAATCACTTAAAACCGATCTCAGTTCGGATTGCAGG  900
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1250  TGTTGCGAACTCGCGAGGGCAAGCAAATCACTTAAAACCGATCTCAGTTCGGATTGCAGG  1309

Query  901   CTGCAACTCGCCTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTG  960
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1310  CTGCAACTCGCCTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTG  1369

Query  961   AATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT  993
             |||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1370  AATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT  1402
```

>gi|148473733|emb|AM275437.2| Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone AP07K.42
Length=1519

```
 Score = 1792 bits (1986),  Expect = 0.0
 Identities = 993/993 (100%), Gaps = 0/993 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1     AAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTGAAGAAGAACATGCGTGAGAGTAACTGTTC  60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  410   AAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTGAAGAAGAACATGCGTGAGAGTAACTGTTC  469

Query  61    ACGTACTGACGGTATTCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA  120
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  470   ACGTACTGACGGTATTCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA  529

Query  121   TACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGAATGTAGGCGGTTTAT  180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  530   TACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGAATGTAGGCGGTTTAT  589

Query  181   TAAGTTTGAAGTGAAAGCCCTCGGCTCAACCGAGGAAGTGCTTCGAAAACTGGTAAACTT  240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  590   TAAGTTTGAAGTGAAAGCCCTCGGCTCAACCGAGGAAGTGCTTCGAAAACTGGTAAACTT  649
```

```
Query  241   GAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAA  300
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  650   GAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAA  709

Query  301   GAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGATTCGAAAGCATG  360
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  710   GAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGATTCGAAAGCATG  769

Query  361   GGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGT  420
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  770   GGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGT  829

Query  421   TGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTA  480
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  830   TGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTA  889

Query  481   CGATCGCAAGATTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGT  540
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  890   CGATCGCAAGATTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGT  949

Query  541   GGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACCATGACAAACTAA  600
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  950   GGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACCATGACAAACTAA  1009

Query  601   GAGATTAGTCTTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCG  660
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1010  GAGATTAGTCTTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCG  1069

Query  661   TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGC  720
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1070  TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGC  1129

Query  721   ATTCAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACG  780
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1130  ATTCAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACG  1189

Query  781   TCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAACG  840
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1190  TCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAACG  1249

Query  841   TGTTGCGAACTCGCGAGGGCAAGCAAATCACTTAAAACCGATCTCAGTTCGGATTGCAGG  900
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1250  TGTTGCGAACTCGCGAGGGCAAGCAAATCACTTAAAACCGATCTCAGTTCGGATTGCAGG  1309

Query  901   CTGCAACTCGCCTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTG  960
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1310  CTGCAACTCGCCTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTG  1369

Query  961   AATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT  993
              |||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1370  AATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT  1402
```

>gi|66866681|gb|DQ056424.1| Uncultured Lactobacillus sp. clone Al2-6c 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=1450

Score = 1792 bits (1986), Expect = 0.0
Identities = 993/993 (100%), Gaps = 0/993 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query  1     AAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTGAAGAAGAACATGCGTGAGAGTAACTGTTC  60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  371   AAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTGAAGAAGAACATGCGTGAGAGTAACTGTTC  430

Query  61    ACGTACTGACGGTATTCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA  120
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  431   ACGTACTGACGGTATTCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA  490

Query  121   TACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGAATGTAGGCGGTTTAT  180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  491   TACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGAATGTAGGCGGTTTAT  550

Query  181   TAAGTTTGAAGTGAAAGCCCTCGGCTCAACCGAGGAAGTGCTTCGAAAACTGGTAAACTT  240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  551   TAAGTTTGAAGTGAAAGCCCTCGGCTCAACCGAGGAAGTGCTTCGAAAACTGGTAAACTT  610

Query  241   GAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAA  300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  611   GAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAA  670

Query  301   GAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGATTCGAAAGCATG  360
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  671   GAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGATTCGAAAGCATG  730

Query  361   GGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGT  420
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  731   GGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGT  790

Query  421   TGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTA  480
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  791   TGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTA  850

Query  481   CGATCGCAAGATTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGT  540
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  851   CGATCGCAAGATTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGT  910

Query  541   GGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACCATGACAAACTAA  600
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  911   GGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACCATGACAAACTAA  970

Query  601   GAGATTAGTCTTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCG  660
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  971   GAGATTAGTCTTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCG  1030

Query  661   TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGC  720
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1031  TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGC  1090

Query  721   ATTCAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACG  780
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1091  ATTCAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACG  1150
```

```
Query  781   TCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAACG  840
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1151  TCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAACG  1210

Query  841   TGTTGCGAACTCGCGAGGGCAAGCAAATCACTTAAAACCGATCTCAGTTCGGATTGCAGG  900
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1211  TGTTGCGAACTCGCGAGGGCAAGCAAATCACTTAAAACCGATCTCAGTTCGGATTGCAGG  1270

Query  901   CTGCAACTCGCCTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTG  960
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1271  CTGCAACTCGCCTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTG  1330

Query  961   AATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT  993
             |||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1331  AATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT  1363
```

>gi|66866678|gb|DQ056421.1| Lactobacillus farciminis strain Al2-3i 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=1450

```
 Score = 1792 bits (1986),  Expect = 0.0
 Identities = 993/993 (100%), Gaps = 0/993 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1     AAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTGAAGAAGAACATGCGTGAGAGTAACTGTTC  60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  371   AAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTGAAGAAGAACATGCGTGAGAGTAACTGTTC  430

Query  61    ACGTACTGACGGTATTCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA  120
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  431   ACGTACTGACGGTATTCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA  490

Query  121   TACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGAATGTAGGCGGTTTAT  180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  491   TACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGAATGTAGGCGGTTTAT  550

Query  181   TAAGTTTGAAGTGAAAGCCCTCGGCTCAACCGAGGAAGTGCTTCGAAAACTGGTAAACTT  240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  551   TAAGTTTGAAGTGAAAGCCCTCGGCTCAACCGAGGAAGTGCTTCGAAAACTGGTAAACTT  610

Query  241   GAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAA  300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  611   GAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAA  670

Query  301   GAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGATTCGAAAGCATG  360
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  671   GAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGATTCGAAAGCATG  730

Query  361   GGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGT  420
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  731   GGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGT  790

Query  421   TGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTA  480
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  791   TGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTA  850

Query  481   CGATCGCAAGATTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGT  540
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  851   CGATCGCAAGATTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGT  910
```

```
Query  541   GGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACCATGACAAACTAA  600
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  911   GGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACCATGACAAACTAA  970

Query  601   GAGATTAGTCTTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCG  660
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  971   GAGATTAGTCTTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCG  1030

Query  661   TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGC  720
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1031  TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGC  1090

Query  721   ATTCAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACG  780
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1091  ATTCAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACG  1150

Query  781   TCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAACG  840
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1151  TCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAACG  1210

Query  841   TGTTGCGAACTCGCGAGGGCAAGCAAATCACTTAAAACCGATCTCAGTTCGGATTGCAGG  900
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1211  TGTTGCGAACTCGCGAGGGCAAGCAAATCACTTAAAACCGATCTCAGTTCGGATTGCAGG  1270

Query  901   CTGCAACTCGCCTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTG  960
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1271  CTGCAACTCGCCTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTG  1330

Query  961   AATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT  993
              |||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1331  AATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT  1363
```

>gi|16549054|emb|AJ417499.1| Lactobacillus farciminis 16S rRNA gene, strain DSM 20185
Length=1563

```
 Score = 1792 bits (1986),  Expect = 0.0
 Identities = 993/993 (100%), Gaps = 0/993 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1     AAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTGAAGAAGAACATGCGTGAGAGTAACTGTTC  60
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  430   AAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTGAAGAAGAACATGCGTGAGAGTAACTGTTC  489

Query  61    ACGTACTGACGGTATTCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA  120
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  490   ACGTACTGACGGTATTCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA  549

Query  121   TACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGAATGTAGGCGGTTTAT  180
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  550   TACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGAATGTAGGCGGTTTAT  609

Query  181   TAAGTTTGAAGTGAAAGCCCTCGGCTCAACCGAGGAAGTGCTTCGAAAACTGGTAAACTT  240
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  610   TAAGTTTGAAGTGAAAGCCCTCGGCTCAACCGAGGAAGTGCTTCGAAAACTGGTAAACTT  669

Query  241   GAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAA  300
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
```

```
Sbjct  670   GAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAA  729

Query  301   GAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGATTCGAAAGCATG  360
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  730   GAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGATTCGAAAGCATG  789

Query  361   GGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGT  420
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  790   GGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGT  849

Query  421   TGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTA  480
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  850   TGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTA  909

Query  481   CGATCGCAAGATTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGT  540
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  910   CGATCGCAAGATTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGT  969

Query  541   GGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACCATGACAAACTAA  600
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  970   GGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACCATGACAAACTAA  1029

Query  601   GAGATTAGTCTTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCG  660
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1030  GAGATTAGTCTTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCG  1089

Query  661   TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGC  720
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1090  TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGC  1149

Query  721   ATTCAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACG  780
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1150  ATTCAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACG  1209

Query  781   TCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAACG  840
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1210  TCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAACG  1269

Query  841   TGTTGCGAACTCGCGAGGGCAAGCAAATCACTTAAAACCGATCTCAGTTCGGATTGCAGG  900
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1270  TGTTGCGAACTCGCGAGGGCAAGCAAATCACTTAAAACCGATCTCAGTTCGGATTGCAGG  1329

Query  901   CTGCAACTCGCCTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTG  960
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1330  CTGCAACTCGCCTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTG  1389

Query  961   AATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT  993
              |||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1390  AATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT  1422
```

```
LOCUS       AB626064                1492 bp    DNA     linear   BCT 16-APR-2011
DEFINITION  Lactobacillus farciminis gene for 16S rRNA, partial sequence,
            strain: NBRC 107150.
ACCESSION   AB626064
VERSION     AB626064.1  GI:329025378
KEYWORDS    .
SOURCE      Lactobacillus farciminis
  ORGANISM  Lactobacillus farciminis
            Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales; Lactobacillaceae;
            Lactobacillus.
REFERENCE   1
  AUTHORS   Miyashita,M.
  TITLE     NITE Biological Resource Center (NBRC)
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1492)
  AUTHORS   Miyashita,M. and Nakagawa,Y.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (15-APR-2011) Contact:Mika Miyashita National Institute
            of Technology and Evaluation, NITE Biological Resource Center
            (NBRC); Kazusakamatari, Kisarazu, Chiba 292-0818, Japan URL
            :http://www.nbrc.nite.go.jp/
COMMENT     Please visit our web site
            http://www.nbrc.nite.go.jp/.
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1492
                     /organism="Lactobacillus farciminis"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="NBRC 107150"
                     /db_xref="NBRC:107150"
                     /db_xref="taxon:1612"
                     /note="type strain of Lactobacillus farciminis"
     rRNA            <1..>1492
                     /product="16S ribosomal RNA"
ORIGIN
        1 gacgaacgct ggcggcatgc ctaatacatg caagtcgaac gaaccatcct gaagattgaa
       61 gcttgcttca tgattcagac cttggtgagt ggcggacggg tgagtaacac gtgggtaacc
      121 tgcccaaaag tgggggataa catttggaaa caagtgctaa taccgcataa caactacttt
      181 cacatgatcg tagcttgaaa gatggctctg ctatcgcttt tggatggacc cgcggcgtat
      241 tagctagttg gtgaggtaat agctcaccaa ggcaatgata cgtagccgac ctgagagggt
      301 aatcggccac attgggactg agacacggcc caaactccta cgggaggcag cagtagggaa
      361 tcttccacaa tgggcgaaag cctgatggag caatgccgcg tgagtgaaga aggttttcgg
      421 atcgtaaaac tctgttgttg aagaagaaca tgcgtgagag taactgttca cgtactgacg
      481 gtattcaacc agaaagccac ggctaactac gtgccagcag ccgcggtaat acgtaggtgg
      541 caagcgttgt ccggatttat tgggcgtaaa gagaatgtag gcggtttatt aagtttgaag
      601 tgaaagccct cggctcaacc gaggaagtgc ttcgaaaact ggtaaacttg agtgcagaag
      661 aggaaagtgg aactccatgt gtagcggtgg aatgcgtaga tatatggaag aacaccagtg
      721 gcgaaggcgg ctttctggtc tgtaactgac gctgagattc gaaagcatgg gtagcaaaca
      781 ggattagata ccctggtagt ccatgccgta aacgatgagt gctaagtgtt ggagggtttc
      841 cgcccttcag tgctgcagct aacgcattaa gcactccgcc tggggagtac gatcgcaaga
      901 ttgaaactca aaggaattga cgggggcccg cacaagcggt ggagcatgtg gtttaattcg
      961 aagcaacgcg aagaacctta ccaggtcttg acataccatg acaaactaag agattagtct
     1021 ttcccttcgg ggacatggat acaggtggtg catggttgtc gtcagctcgt gtcgtgagat
     1081 gttgggttaa gtcccgcaac gagcgcaacc cttattatca gttgccagca ttcagttggg
     1141 cactctggtg agactgccgg tgacaaaccg gaggaaggtg gggacgacgt caaatcatca
     1201 tgcccccttat gacctgggct acacacgtgc tacaatggtc ggtacaacgt gttgcgaact
     1261 cgcgagggca agcaaatcac ttaaaaccga tctcagttcg gattgcaggc tgcaactcgc
     1321 ctgcatgaag ctggaatcgc tagtaatcgc ggatcagcat gccgcggtga atacgttccc
     1381 gggccttgta cacaccgccc gtcacaccat gagagtttgt aacacccaaa gtcggtgggg
     1441 taacccttcg gggaactagc cgcctaaggt gggacaaatg attagggtga ag
```

```
LOCUS       AM275437               1519 bp    DNA     linear   ENV 22-JUL-2008
DEFINITION  Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone AP07K.42.
ACCESSION   AM275437
VERSION     AM275437.2  GI:148473733
KEYWORDS    ENV; 16S ribosomal RNA; 16S rRNA gene.
SOURCE      uncultured bacterium
  ORGANISM  uncultured bacterium
            Bacteria; environmental samples.
REFERENCE   1
  AUTHORS   Kassinen,A., Krogius-Kurikka,L., Makivuokko,H., Rinttila,T.,
            Paulin,L., Corander,J., Malinen,E., Apajalahti,J. and Palva,A.
  TITLE     The fecal microbiota of irritable bowel syndrome patients differs
            significantly from that of healthy subjects
  JOURNAL   Gastroenterology 133 (1), 24-33 (2007)
   PUBMED   17631127
REFERENCE   2  (bases 1 to 1519)
  AUTHORS   Krogius-Kurikka,L.K.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (31-MAY-2006) Krogius-Kurikka L.K., Basic Veterinary
            Sciences, University of Helsinki, P.O. Box 66, 00014 University of
            Helsinki, FINLAND
  REMARK    revised by Kassinen A.H. [20-SEP-2006]
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1519
                     /organism="uncultured bacterium"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /isolation_source="human faecal sample"
                     /db_xref="taxon:77133"
                     /clone="AP07K.42"
                     /clone_lib="AP07K"
                     /environmental_sample
                     /country="Finland"
     gene            <1..>1519
                     /gene="16S rRNA"
     rRNA            <1..>1519
                     /gene="16S rRNA"
                     /product="16S ribosomal RNA"
ORIGIN
        1 gacgaacgct ggcggcatgc ctaatacatg caagtcgaac gaaccaaact gaagattgat
       61 gcttgcatca tgattcagac cttggtgagt ggcggacggg tgagtaacac gtgggtaacc
      121 tgcccaaaag tgggggataa catttggaaa caagtgctaa taccgcataa caactacttt
      181 cacatgatcg tagcttgaaa gatggctctg ctatcgcttt tggatggacc cgcggcgtat
      241 tagctagttg gtgaggtaat agctcaccaa ggcaatgata cgtagccgac ctgagagggt
      301 aatcggccac attgggactg agacacggcc caaactccta cgggaggcag cagtagggaa
      361 tcttccacaa tgggcgaaag cctgatggag caatgccgcg tgagtgaaga aggttttcgg
      421 atcgtaaaac tctgttgttg aagaagaaca tgcgtgagag taactgttca cgtactgacg
      481 gtattcaacc agaaagccac ggctaactac gtgccagcag ccgcggtaat acgtaggtgg
      541 caagcgttgt ccggatttat tgggcgtaaa gagaatgtag gcggtttatt aagtttgaag
      601 tgaaagccct cggctcaacc gaggaagtgc ttcgaaaact ggtaaacttg agtgcagaag
      661 aggaaagtgg aactccatgt gtagcggtgg aatgcgtaga tatatggaag aacaccagtg
      721 gcgaaggcgg ctttctggtc tgtaactgac gctgagattc gaaagcatgg gtagcaaaca
      781 ggattagata ccctggtagt ccatgccgta aacgatgagt gctaagtgtt ggagggtttc
      841 cgcccttcag tgctgcagct aacgcattaa gcactccgcc tggggagtac gatcgcaaga
      901 ttgaaactca aaggaattga cgggggcccg cacaagcggt ggagcatgtg gtttaattcg
      961 aagcaacgcg aagaacctta ccaggtcttg acataccatg acaaactaag agattagtct
     1021 ttcccttcgg ggacatggat acaggtggtg catggttgtc gtcagctcgt gtcgtgagat
     1081 gttgggttaa gtcccgcaac gagcgcaacc cttattatca gttgccagca ttcagttggg
     1141 cactctggtg agactgccgg tgacaaaccg gaggaaggtg gggacgacgt caaatcatca
     1201 tgcccccttat gacctgggct acacacgtgc tacaatggtc ggtacaacgt gttgcgaact
     1261 cgcgagggca agcaaatcac ttaaaaccga tctcagttcg gattgcaggc tgcaactcgc
```

```
     1321 ctgcatgaag ctggaatcgc tagtaatcgc ggatcagcat gccgcggtga atacgttccc
     1381 gggccttgta cacaccgccc gtcacaccat gagagtttgt aacacccaaa gtcggtgggg
     1441 taaccccttcg gggaactagc cgcctaaggt gggacaaatg attagggtga agtcgtaaca
     1501 aggtagccgt aggagaacc
```

```
LOCUS       DQ056424               1450 bp    DNA     linear   ENV 20-JUN-2006
DEFINITION  Uncultured Lactobacillus sp. clone Al2-6c 16S ribosomal RNA gene,
            partial sequence.
ACCESSION   DQ056424
VERSION     DQ056424.1  GI:66866681
KEYWORDS    ENV.
SOURCE      uncultured Lactobacillus sp.
  ORGANISM  uncultured Lactobacillus sp.
            Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales; Lactobacillaceae;
            Lactobacillus; environmental samples.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1450)
  AUTHORS   Wang,X., Haruta,S., Wang,P., Ishii,M., Igarashi,Y. and Cui,Z.
  TITLE     Diversity of a stable enrichment culture which is useful for silage
            inoculant and its succession in alfalfa silage
  JOURNAL   FEMS Microbiol. Ecol. 57 (1), 106-115 (2006)
   PUBMED   16819954
REFERENCE   2  (bases 1 to 1450)
  AUTHORS   Wang,X., Cui,Z., Haruta,S., Ishii,M. and Igarashi,Y.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (11-MAY-2005) College of Agronomy and Biotechnology,
            China Agricultural University, Yuanmingyuan-xilu 2, Beijing 100094,
            China
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1450
                     /organism="uncultured Lactobacillus sp."
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /db_xref="taxon:153152"
                     /clone="Al2-6c"
                     /environmental_sample
     rRNA            <1..>1450
                     /product="16S ribosomal RNA"
ORIGIN
        1 cgaaccatcc tgaagattga agcttgcttc atgattcaga ccttggtgag tggcggacgg
       61 gtgagtaaca cgtgggtaac ctgcccaaaa gtgggggata acatttggaa acaagtgcta
      121 ataccgcata acaactactt tcacatgatc gtagcttgaa agatggctct gctatcgctt
      181 ttggatggac ccgcggcgta ttagctagtt ggtgaggtaa tagctcacca aggcaatgat
      241 acgtagccga cctgagaggg taatcggcca cattgggact gagacacggc ccaaactcct
      301 acgggaggca gcagtaggga atcttccaca atgggcgaaa gcctgatgga gcaatgccgc
      361 gtgagtgaag aaggttttcg gatcgtaaaa ctctgttgtt gaagaagaac atgcgtgaga
      421 gtaactgttc acgtactgac ggtattcaac cagaaagcca cggctaacta cgtgccagca
      481 gccgcggtaa tacgtaggtg gcaagcgttg tccggattta ttgggcgtaa agagaatgta
      541 ggcggtttat taagtttgaa gtgaaagccc tcggctcaac cgaggaagtg cttcgaaaac
      601 tggtaaactt gagtgcagaa gaggaaagtg gaactccatg tgtagcggtg gaatgcgtag
      661 atatatggaa gaacaccagt ggcgaaggcg gctttctggt ctgtaactga cgctgagatt
      721 cgaaagcatg ggtagcaaac aggattagat accctggtag tccatgccgt aaacgatgag
      781 tgctaagtgt tggagggttt ccgccttca gtgctgcagc taacgcatta agcactccgc
      841 ctggggagta cgatcgcaag attgaaactc aaaggaattg acgggggccc gcacaagcgg
      901 tggagcatgt ggtttaattc gaagcaacgc gaagaacctt accaggtctt gacataccat
      961 gacaaactaa gagattagtc tttcccttcg gggacatgga tacaggtggt gcatggttgt
     1021 cgtcagctcg tgtcgtgaga tgttgggtta agtcccgcaa cgagcgcaac ccttattatc
     1081 agttgccagc attcagttgg gcactctggt gagactgccg gtgacaaacc ggaggaaggt
     1141 ggggacgacg tcaaatcatc atgcccctta tgacctgggc tacacacgtg ctacaatggt
     1201 cggtacaacg tgttgcgaac tcgcgagggc aagcaaatca cttaaaaccg atctcagttc
```

```
     1261 ggattgcagg ctgcaactcg cctgcatgaa gctggaatcg ctagtaatcg cggatcagca
     1321 tgccgcggtg aatacgttcc cgggccttgt acacaccgcc cgtcacacca tgagagtttg
     1381 taacacccaa agtcggtggg gtaacccttc ggggaactag ccgcctaagg tgggacaaat
     1441 gattagggtg
```

```
LOCUS       DQ056421               1450 bp    DNA     linear   BCT 20-JUN-2006
DEFINITION  Lactobacillus farciminis strain Al2-3i 16S ribosomal RNA gene,
            partial sequence.
ACCESSION   DQ056421
VERSION     DQ056421.1  GI:66866678
KEYWORDS    .
SOURCE      Lactobacillus farciminis
  ORGANISM  Lactobacillus farciminis
            Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales; Lactobacillaceae;
            Lactobacillus.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1450)
  AUTHORS   Wang,X., Haruta,S., Wang,P., Ishii,M., Igarashi,Y. and Cui,Z.
  TITLE     Diversity of a stable enrichment culture which is useful for silage
            inoculant and its succession in alfalfa silage
  JOURNAL   FEMS Microbiol. Ecol. 57 (1), 106-115 (2006)
   PUBMED   16819954
REFERENCE   2  (bases 1 to 1450)
  AUTHORS   Wang,X., Cui,Z., Haruta,S., Ishii,M. and Igarashi,Y.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (11-MAY-2005) College of Agronomy and Biotechnology,
            China Agricultural University, Yuanmingyuan-xilu 2, Beijing 100094,
            China
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1450
                     /organism="Lactobacillus farciminis"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="Al2-3i"
                     /db_xref="taxon:1612"
     rRNA            <1..>1450
                     /product="16S ribosomal RNA"
ORIGIN
        1 cgaaccatcc tgaagattga agcttgcttc atgattcaga ccttggtgag tggcggacgg
       61 gtgagtaaca cgtgggtaac ctgcccaaaa gtgggggata acatttggaa acaagtgcta
      121 ataccgcata acaactactt tcacatgatc gtagcttgaa agatggctct gctatcgctt
      181 ttggatggac ccgcggcgta ttagctagtt ggtgaggtaa tagctcacca aggcaatgat
      241 acgtagccga cctgagaggg taatcggcca cattgggact gagacacggc ccaaactcct
      301 acgggaggca gcagtaggga atcttccaca atgggcgaaa gcctgatgga gcaatgccgc
      361 gtgagtgaag aaggttttcg gatcgtaaaa ctctgttgtt gaagaagaac atgcgtgaga
      421 gtaactgttc acgtactgac ggtattcaac cagaaagcca cggctaacta cgtgccagca
      481 gccgcggtaa tacgtaggtg gcaagcgttg tccggattta ttgggcgtaa agagaatgta
      541 ggcggtttat taagtttgaa gtgaaagccc tcggctcaac cgaggaagtg cttcgaaaac
      601 tggtaaactt gagtgcagaa gaggaaagtg gaactccatg tgtagcggtg gaatgcgtag
      661 atatatggaa gaacaccagt ggcgaaggcg gctttctggt ctgtaactga cgctgagatt
      721 cgaaagcatg ggtagcaaac aggattagat accctggtag tccatgccgt aaacgatgag
      781 tgctaagtgt tggagggttt ccgcccttca gtgctgcagc taacgcatta agcactccgc
      841 ctggggagta cgatcgcaag attgaaactc aaaggaattg acgggggccc gcacaagcgg
      901 tggagcatgt ggtttaattc gaagcaacgc gaagaacctt accaggtctt gacataccat
      961 gacaaactaa gagattagtc tttcccttcg gggacatgga tacaggtggt gcatggttgt
     1021 cgtcagctcg tgtcgtgaga tgttgggtta agtcccgcaa cgagcgcaac ccttattatc
     1081 agttgccagc attcagttgg gcactctggt gagactgccg gtgacaaacc ggaggaaggt
     1141 ggggacgacg tcaaatcatc atgcccctta tgacctgggc tacacacgtg ctacaatggt
     1201 cggtacaacg tgttgcgaac tcgcgagggc aagcaaatca cttaaaaccg atctcagttc
     1261 ggattgcagg ctgcaactcg cctgcatgaa gctggaatcg ctagtaatcg cggatcagca
```

```
     1321 tgccgcggtg aatacgttcc cgggccttgt acacaccgcc cgtcacacca tgagagtttg
     1381 taacacccaa agtcggtggg gtaacccttc ggggaactag ccgcctaagg tgggacaaat
     1441 gattagggtg
```

```
LOCUS       AJ417499               1563 bp    DNA     linear   BCT 29-OCT-2001
DEFINITION  Lactobacillus farciminis 16S rRNA gene, strain DSM 20185.
ACCESSION   AJ417499
VERSION     AJ417499.1  GI:16549054
KEYWORDS    16S ribosomal RNA; 16S rRNA gene.
SOURCE      Lactobacillus farciminis
  ORGANISM  Lactobacillus farciminis
            Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales; Lactobacillaceae;
            Lactobacillus.
REFERENCE   1
  AUTHORS   Ehrmann,M.A., Mueller,M.R.A. and Vogel,R.F.
  TITLE     Lactobacillus mindensis sp. nov., The molecular analysis of
            sourdough revealed a new species
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1563)
  AUTHORS   Ehrmann,M.A.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (24-OCT-2001) Ehrmann M.A., Lehrstuhl fuer Technische
            Mikrobiologie, Technische Universitaet Muenchen, Weihenstephaner
            Steig 16, 85350 Freising, GERMANY
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1563
                     /organism="Lactobacillus farciminis"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="DSM 20185"
                     /db_xref="taxon:1612"
     gene            1..1563
                     /gene="16S rRNA"
     rRNA            1..1563
                     /gene="16S rRNA"
                     /product="16S ribosomal RNA"
     primer_bind     1..21
     primer_bind     complement(1547..1563)
ORIGIN
        1 agagtttgat ymtggctcag gacgaacgct ggcggcatgc ctaatacatg caagtcgaac
       61 gaaccatcct gaagattgaa gcttgcttca tgattcagac cttggtgagt ggcggacggg
      121 tgagtaacac gtgggtaacc tgcccaaaag tgggggataa catttggaaa caagtgctaa
      181 taccgcataa caactacttt cacatgatcg tagcttgaaa gatggctctg ctatcgcttt
      241 tggatggacc cgcggcgtat tagctagttg gtgaggtaat agctcaccaa ggcaatgata
      301 cgtagccgac ctgagagggt aatcggccac attgggactg agacacggcc caaactccta
      361 cgggaggcag cagtagggaa tcttccacaa tgggcgaaag cctgatggag caatgccgcg
      421 tgagtgaaga aggttttcgg atcgtaaaac tctgttgttg aagaagaaca tgcgtgagag
      481 taactgttca cgtactgacg gtattcaacc agaaagccac ggctaactac gtgccagcag
      541 ccgcggtaat acgtaggtgg caagcgttgt ccggatttat tgggcgtaaa gagaatgtag
      601 gcggtttatt aagtttgaag tgaaagccct cggctcaacc gaggaagtgc ttcgaaaact
      661 ggtaaacttg agtgcagaag aggaaagtgg aactccatgt gtagcggtgg aatgcgtaga
      721 tatatggaag aacaccagtg gcgaaggcgg ctttctggtc tgtaactgac gctgagattc
      781 gaaagcatgg gtagcaaaca ggattagata ccctggtagt ccatgccgta aacgatgagt
      841 gctaagtgtt ggagggtttc cgcccttcag tgctgcagct aacgcattaa gcactccgcc
      901 tggggagtac gatcgcaaga ttgaaactca aaggaattga cgggggcccg cacaagcggt
      961 ggagcatgtg gtttaattcg aagcaacgcg aagaacctta ccaggtcttg acataccatg
     1021 acaaactaag agattagtct ttcccttcgg ggacatggat acaggtggtg catggttgtc
     1081 gtcagctcgt gtcgtgagat gttgggttaa gtcccgcaac gagcgcaacc cttattatca
     1141 gttgccagca ttcagttggg cactctggtg agactgccgg tgacaaaccg gaggaaggtg
```

```
1201 gggacgacgt caaatcatca tgccccttat gacctgggct acacacgtgc tacaatggtc
1261 ggtacaacgt gttgcgaact cgcgagggca agcaaatcac ttaaaaccga tctcagttcg
1321 gattgcaggc tgcaactcgc ctgcatgaag ctggaatcgc tagtaatcgc ggatcagcat
1381 gccgcggtga atacgttccc gggccttgta cacaccgccc gtcacaccat gagagtttgt
1441 aacacccaaa gtcggtgggg taaccttcg gggaactagc cgcctaaggt gggacaaatg
1501 attagggtga agtcgtaaca aggtagccgt aggagaacct gcggctggat cacctccttt
1561 ntg
```

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวนิขจิตร คลองดี

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5210220037

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จ
วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2551

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

- ทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ ประจำปีงบประมาณ 2553
- ทุนผู้ช่วยสอน (พ.ศ. 2553) ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

นิขจิตร คลองดี, ดวงพร คันธโชติ และ วิลาลัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2554. กิจกรรมการต้านแบคทีเรียของสารที่ผลิตโดยแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่แยกจากอาหารหมักของไทย . การประชุมนำเสนอผลงาน วิจัยบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 21. มหาวิทยาลัยรังสิต , 26 พฤษภาคม 2554. หน้า 927-932.