ประสิทธิภาพของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Streptococcus thermophilus* ในการผลิตสารคล้ายแบคเทอริโอซินเพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค

Efficiency of bacteria strain *Streptococcus thermophilus* for producing bacteriocin-like substance to inhibit the pathogenic bacteria growth

ณัฐวุฒิ มีศิลป์[1*], ณัฐวุฒิ สร้อยพิมาย[1], วรพงษ์ ครูสอนดี[1], รัตนชัย เทศสันเทียะ[1]

Nutthawut meesilp[1*], Nattawut sroiphimai[1], Woraphong khrusondi[1]

Rattanachai thetsanthia[1]

[1] สาขาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และศิลปศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000

[1] Department of Applied Biology, Faculty of Science and Liberal Art, Rajamangala University of Technology Isan, Muang Nakhon Ratchasima, Thailand 30000

*Corresponding author. E-mail: nutthawut.me@rmuti.ac.th

บทคัดย่อ

แบคเทอริโอซินเป็นสารที่สร้างจากเชื้อจุลินทรีย์โดยเฉพาะแบคทีเรียกรดแลคติค (lactic acid bacteria) สารนี้สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหารของมนุษย์บางชนิด เช่น *Salmonella typhimurium* และ *Staphylococcus aureus* เป็นต้น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติคสายพันธุ์ *S. thermophilus* ที่พบในผลิตภัณฑ์นมหมักทางการค้า ในการสร้างสารคล้ายแบคเทอริโอซินยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคสายพันธุ์ดังกล่าว โดยนำผลิตภัณฑ์นมหมักที่ถูกผลิตด้วยแบคทีเรีย *S. thermophilus* มาเพาะเลี้ยงด้วยอาหารแข็ง deMan Rogosa Sharp (MRS) จากนั้นนำแบคทีเรียบริสุทธิ์มาเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว MRS (MRS broth) และน้ำนม UHT เพื่อตรวจสอบลักษณะการเจริญและการสร้างสารคล้ายแบคเทอริโอซินยับยั้งแบคทีเรีย *S. typhimurium* และ *S. aureus* ด้วยวิธี Agar well diffusion ผลการทดลองพบว่า *S. thermophilus* ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว MRS มีการเจริญของแบคทีเรีย (log 10.0 cfu/ml) สูงกว่าน้ำนม UHT (log 9.0 cfu/ml) ที่ 24 ชั่วโมง หลังการเพาะเลี้ยงแต่พบค่ากรด-ด่างมีการเปลี่ยนแปลงลดลงอย่างรวดเร็วโดยมีค่าเป็นกรดสูงเท่ากับ 4.0 เมื่อ *S. thermophilus* เจริญในน้ำนม UHT สำหรับการสร้างสารคล้ายแบคเทอริโอซินจาก *S. thermophilus* ที่ถูกเพาะเลี้ยงด้วยน้ำนม UHT (2 ชั่วโมง) เกิดขึ้นได้เร็วกว่าในอาหารเหลว MRS (10 ชั่วโมง) ซึ่งสารนี้สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค *S. aureus* โดยเฉลี่ยได้มากกว่า *S. typhimurium* โดยพบค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงสุดของสารคือ 200 AU/ml

คำสำคัญ: แบคเทอริโอซิน, แบคทีเรียกรดแลคติค, *Streptococcus thermophilus, Staphylococcus aureus, Salmonella typhimurium*

Received 24-08-2018
Revised 12-11-2018
Accepted 15-11-2018

ABSTRACT

Bacteriocin is synthesized from microorganisms, especially lactic acid bacteria. This substance can inhibit some foodbone pathogenic bacteria in human such as *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. Thus, this research was aims to estimate the ability of lactic acid bacteria strain *S. thermophilus* found in commercial fermented milk product to construct bacteriocin-like substance for inhibiting pathogenic bacteria growth. Fermented milk produced with *S. thermophilus* was cultured the bacteria with deMan Rogosa Sharp (MRS) medium. Pure culture was established its growth and bacteriocin-like substance using MRS broth and UHT milk. The activity of this substance to inhibit pathogenic bacteria *S. typhimurium* and *S. aureus* was measured by agar well diffusion method. The results stated that *S. thermophilus* cultured with MRS broth higher grew (log 10.0 cfu/ml) than UHT milk (log 9.0 cfu/ml) at 24 hours after incubation. On the other hand, pH value was rapidly decreased as high acid pH 4.0 when *S. thermophilus* was cultured with UHT milk for 24 hours after incubation. Bacteriocin-like substance produced by *S. thermophilus* in UHT milk (2 hours) was rapidly detected more than MRS broth (10 hours). Average activity of this substance to inhibit *S. aureus* was higher than *S. typhimurium* by showing the highest activity as 200 AU/ml.

Keywords: Bacteriocin, Lactic acid bacteria, *Streptococcus thermophilus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*

1. บทนำ

ปัจจุบันผู้บริโภคให้ความสนใจในอาหารที่ผลิตจากธรรมชาติและผลิตภัณฑ์ที่ปราศจากสารเคมีที่ใช้ถนอมอาหารหรือเพื่อปรับปรุงรสชาติ กลิ่นสี ของผลิตภัณฑ์ให้ดีขึ้น โดยเฉพาะสารเคมีที่ใช้ในการถนอมอาหาร ได้แก่ สารในกลุ่มกรดอินทรีย์ เช่น อะซิติค แลคติค เบนโซอิค เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ และกรดซอลบิคยังสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์แบคทีเรียได้เป็นอย่างดี [1] ดังนั้นจึงทำให้เกิดความสนใจที่จะคิดค้นหาสารกันเสียจากธรรมชาติแทนการใช้สารเคมีในการถนอมอาหาร การใช้เชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ที่สามารถผลิตสารซึ่งมีคุณสมบัติในการถนอมอาหารไม่ให้เน่าเสียกำลังเป็นที่นิยม เพราะนอกจากจะลดอันตรายที่จะเกิดขึ้นกับผู้บริโภคแล้วยังรักษาคุณภาพและคงคุณค่าทางโภชนาการของอาหารได้อย่างครบถ้วนอีกด้วย [2]

แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) เป็นสารในกลุ่มของเปปไทด์ (peptide) ที่มีกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในสายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงกันสารนี้ถูกสร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติค ซึ่งมีคุณสมบัติในการทนทานต่ออุณหภูมิสูง และออกฤทธิ์ในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่างที่กว้าง ลักษณะทั่วไปของสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์นี้เป็นสารที่ปราศจากสี กลิ่นและรสชาติ สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการถนอมได้เป็นอย่างดี [3] แบคทีเรียแกรมบวกที่เป็นสาเหตุของโรคทางเดินอาหารบางชนิดเป็นจุลินทรีย์ที่มีความไวต่อการถูกยับยั้งการเจริญด้วย

สารแบคเทอริโอซิน ได้แก่ *Listeria monocytogenes, S. aureus, Bacillus cereus, Clostridium perfringens* และ *C. botulinum* เป็นต้น [4, 5] ปัจจุบันมีการใช้นิซิน (nisin) ซึ่งเป็นสารแบคเทอริโอซินที่ออกฤทธิ์แบบกว้าง (broad spectrum) โดยได้รับการอนุญาตให้ใช้เป็นสารถนอมอาหาร ซึ่งนิซินถูกสร้างจากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Lactococcus lactis* ส่วนใหญ่สารนี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งการงอกของสปอร์ (spore germination) รวมทั้งสารพิษบูโทรินัม (botulinal toxin) ของแบคทีเรีย *C. botulinum* [6, 7] แบคทีเรียกรดแลคติคพบได้ทั่วไปในธรรมชาติและมีปริมาณมากในน้ำนม เนื้อสด และพืช ซึ่งมีบทบาทอย่างมากในการแปรรูปอาหารหมักดองโดยสามารถยับยั้งการเจริญ หรือทำลายจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดอาหารเน่าเสียรวมทั้งก่อโรค นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแลคติคยังถูกนำมาประยุกต์ใช้สำหรับการผลิตอาหารสุขภาพ ซึ่งเป็นที่ต้องการสำหรับผู้บริโภค เช่น ผลิตภัณฑ์ นมหมักต่าง ๆ ได้แก่ ชีส (cheese) บัตเตอร์มิลล์ (buttermilk) และโยเกิร์ต (yogurt) เป็นต้น [7]

S. thermophilus เป็นแบคทีเรียกรดแลคติคที่ถูกใช้เป็นหัวเชื้อร่วมกับแบคทีเรีย *L. lactis* สำหรับการผลิตโยเกิร์ต ซึ่งมีรายงานการวิจัยในการผลิตสารแบคเทอริโอซินในปริมาณน้อยจากแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าว ดังนั้นจึงได้มุ่งเน้นการคัดเลือกสายพันธุ์

ที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินชนิดใหม่ ๆ และมีปริมาณสูงเพื่อใช้เป็นวัตถุกันเสียในอาหาร และผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ [8, 9]

S. aureus เป็นแบคทีเรียก่อโรคเกี่ยวกับอาหาร จัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก (gram positive bacteria) [10] และยังเป็นสาเหตุสำคัญในการก่อให้เกิดโรคเต้านมอักเสบในวัวที่ส่งผลกระทบอย่างมากในอุตสาหกรรมนม [11, 12] สารพิษที่ถูกสร้างจากแบคทีเรีย *S. aureus* สามารถก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารที่สำคัญในมนุษย์และสารพิษนี้ยังมีความทนทานต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีน (protease) ในทางเดินอาหาร รวมทั้งสามารถอยู่รอดจากการทำลายด้วยอุณหภูมิสูงในกระบวนการพลาสเจอร์ไลส์ (pasteurization) ได้ด้วย [13]

S. typhimurium เป็นแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญอีกสายพันธุ์ถูกจัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ (gram negative bacteria) สามารถอยู่รอดในสภาวะที่เป็นกรดสูงในกระเพาะอาหารที่มีค่าต่ำกว่า 3.0 [14] ดังนั้นจึงเป็นสาเหตุที่สำคัญในการก่อโรคเกี่ยวกับทางเดินอาหารมนุษย์ได้เช่นกัน [15]

ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาลักษณะการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ *S. thermophilus* และการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างที่เกิดขึ้นระหว่างการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว MRS และน้ำนม UHT ในระยะเวลาต่าง ๆ รวมทั้งการสร้างสารคล้ายแบคเทอริโอซินเพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหาร ได้แก่ *S. aureus* และ *S. typhimurium*

2. วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *S. thermophilus*

นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมหมักทางการค้าที่บนฉลากติดบรรจุภัณฑ์ระบุประกอบด้วยแบคทีเรียจำนวน 2 สายพันธุ์ คือ *Lactobacillus bulgaricus* และ *S. thermophilus* ปริมาตร 25 มิลลิลิตร มาผสมในสารละลาย Peptone water 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 225 มิลลิลิตร แล้วทำให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องตีปั่นไฟฟ้าเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นแบ่งสารละลายปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วยสารละลายเกลือ (normal saline solution) 0.85 เปอร์เซ็นต์ แล้วเพาะเลี้ยงแบคทีเรียด้วยอาหารแข็ง

MRS นำบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำโคโลนีแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหารแข็ง MRS มาทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดิม จากนั้นทำการศึกษาลักษณะเบื้องต้นบางประการของแบคทีเรียที่เจริญด้วยการย้อมสีเซลล์แบคทีเรีย (gram straining) ตามวิธีมาตรฐานและศึกษาลักษณะรูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100x

2.2 การศึกษาลักษณะการเจริญของแบคทีเรีย *S. thermophilus*

2.2.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

นำแบคทีเรีย *S. thermophilus* ที่คัดเลือกไว้มาเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว MRS บ่มแบบไม่เขย่าที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้น ปรับค่าความขุ่นของแบคทีเรียให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 (10^8 cfu/ml) ด้วยเครื่อง Spectrophotometer (OD_{600}) เพื่อเตรียมใช้เป็นกล้าเชื้อแบคทีเรีย *S. thermophilus* ในการทดลองต่อไป

2.2.2 การเจริญของแบคทีเรีย *S. thermophilus*

นำกล้าเชื้อแบคทีเรีย *S. thermophilus* ที่เตรียมไว้มาเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว MRS และน้ำนม UHT นำบ่มแบบไม่เขย่าที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างทุก ๆ 2 ชั่วโมง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาเจือจางในสารละลายเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ แล้วตรวจสอบปริมาณแบคทีเรีย *S. thermophilus* ด้วยการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MRS ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนโคโลนีแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วนำมาสร้างเป็นกราฟการเจริญของแบคทีเรีย *S. thermophilus* ในหน่วย log cfu/ml

2.2.3 การเปลี่ยนแปลงค่ากรด-ด่างระหว่างการเจริญของแบคทีเรีย *S. thermophilus*

ค่าความเป็นกรด-ด่างที่มีการเปลี่ยนแปลงระหว่างการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *S. thermophilus* ในอาหารเหลว MRS และน้ำนม UHT ถูกตรวจสอบด้วยเครื่องวัดค่ากรด-ด่าง (pH meter) ในทุก ๆ 2 ชั่วโมง จนครบระยะเวลา 24 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

2.3 การตรวจกิจกรรมสารคล้ายแบคเทอริโอซินในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค

2.3.1 การเตรียมแบคทีเรีย *S. thermophilus* และสารคล้ายแบคเทอริโอซิน

ย้ายกล้าเชื้อแบคทีเรีย *S. thermophilus* ที่เตรียมไว้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS และน้ำนม UHT นำบ่มแบบไม่เขย่าที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและเก็บตัวอย่างทุก ๆ 2 ชั่วโมง มาตรวจสอบจนครบระยะเวลา 24 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *S. thermophilus* โดยนำตัวอย่างของเหลวจากการเพาะเลี้ยงเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาปั่นแยกเซลล์แบคทีเรียด้วยความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำส่วนใส (cell-free supernatant) มาปรับค่ากรด-ด่างให้มีค่าเท่ากับ 7.0 จากนั้นจึงนำตัวอย่างสารคล้ายแบคเทอริโอซินมาเจือจางให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ 1x, 2x, 4x, 6x, 8x และ 10x ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ [16]

2.3.2 การทดสอบกิจกรรมยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคบางชนิด

ทดสอบกิจกรรมของตัวอย่างสารด้วยวิธี Agar well diffusion จำนวน 3 ซ้ำ โดยนำแบคทีเรีย

ก่อโรคแกรมบวก *S. aureus* และแกรมลบ *S. typhimurium* มาทำเป็นสารแขวนลอยในสารละลายเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ แล้วปรับค่าความขุ่นของสารแขวนลอยเซลล์แบคทีเรียให้มีค่าเท่ากับ McFarland scale 0.5 จากนั้นเกลี่ยสารแขวนลอยแบคทีเรียก่อโรคแต่ละชนิดลงบนอาหารแข็ง Muller Hinton (ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อน้ำปริมาตร 1 ลิตร ได้แก่ Beef extract 2.0 กรัม; Casein hydrolysate 17.5 กรัม; Starch 1.5 กรัม; Agar 15.0 กรัม) ด้วยวิธี Swab plate technique จากนั้นนำสารคล้ายแบคเทอริโอซินที่ได้เตรียมให้มีความเจือจางระดับต่าง ๆ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร มาเติมลงในหลุม (well) บนอาหารแข็ง Muller Hinton ที่มีการเกลี่ยเชื้อแบคทีเรียก่อโรคไว้นำบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วิเคราะห์กิจกรรมของสารคล้ายแบคเทอริโอซินในการยับยั้งการเจริญแบคทีเรียก่อโรคด้วยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่ไม่มีการเจริญของแบคทีเรียรอบ ๆ หลุมที่ใส่สาร (clear zone) ในแต่ละความเจือจาง จากนั้นนำค่าความเจือจางสูงสุดที่ยังพบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคแต่ละชนิดมาคำนวณหาประสิทธิภาพของสารคล้ายแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรีย *S. thermophilus* ในหน่วย Arbitrary Unit (AU)/ml [16]

2.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำในแต่ละการทดลอง แล้วนำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี LSD test

3. ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

3.1 การคัดเลือกแบคทีเรีย *S. thermophilus*

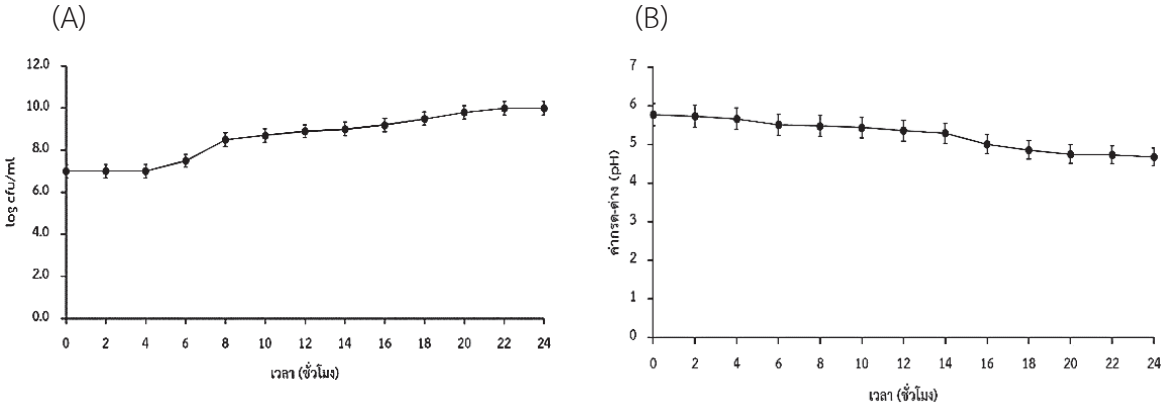
ผลิตภัณฑ์นมหมักทางการค้ามีแบคทีเรียกรดแลคติคที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ด้วยอาหารแข็ง MRS มีปริมาณเชื้อ 9.5 log cfu/ml ซึ่งประกอบด้วยโคโลนีของแบคทีเรียที่มีลักษณะเดียวกันทั้งหมดบนอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว ซึ่งเป็นโคโลนีสีขาวขุ่น ขนาดกลางขอบเรียบ และเกิดบริเวณใสรอบ ๆ โคโลนี เนื่องจากเกิดการย่อยสลายแคลเซียมที่เป็นส่วนประกอบในอาหารแข็ง MRS จากนั้นนำโคโลนีแบคทีเรียที่มีลักษณะเดียวกันจำนวน 4-5 โคโลนีมาย้อมสีเซลล์ พบว่าแบคทีเรียทั้งหมดติดสีม่วงของ Crystal violet ซึ่งเป็นลักษณะของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก โดยโคโลนีเหล่านี้มีรูปร่างของเซลล์เป็นแบบกลมเรียงตัวเป็นเส้นสาย (streptococci character) หรือเป็นคู่เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100x ซึ่งเป็นลักษณะเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ *S. thermophilus* นอกจากนี้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียด้วยอาหารแข็ง MRS ครั้งนี้เป็นสภาวะปกติที่ไม่มีการกำจัดออกซิเจนออกให้หมดจึงเหมาะสมและพบแต่การเจริญของแบคทีเรีย *S. thermophilus* เท่านั้น โดยแบคทีเรียกรดแลคติคสายพันธุ์นี้จะสามารถใช้สารประกอบอินทรีย์ เป็นแหล่งพลังงานในการเจริญได้ (chemoorganotrophic) ไม่สร้างสปอร์ทนทานต่อความเป็นกรดชอบอุณหภูมิปานกลาง (15-45 °C) และเจริญได้ในอากาศแบบไม่แท้จริง (facultative aerobic)

[17, 18] ซึ่งลักษณะรูปร่างเซลล์และการเจริญของแบคทีเรียดังกล่าวมีความแตกต่างกับแบคทีเรียอีกสายพันธุ์ *L. bulgaricus* ที่มีรูปร่างของเซลล์เป็นแบบท่อน (rod shape) และต้องเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะปราศจากออกซิเจน (anaerobic condition) จึงจะสามารถเจริญบนอาหารแข็ง MRS ได้ [19]

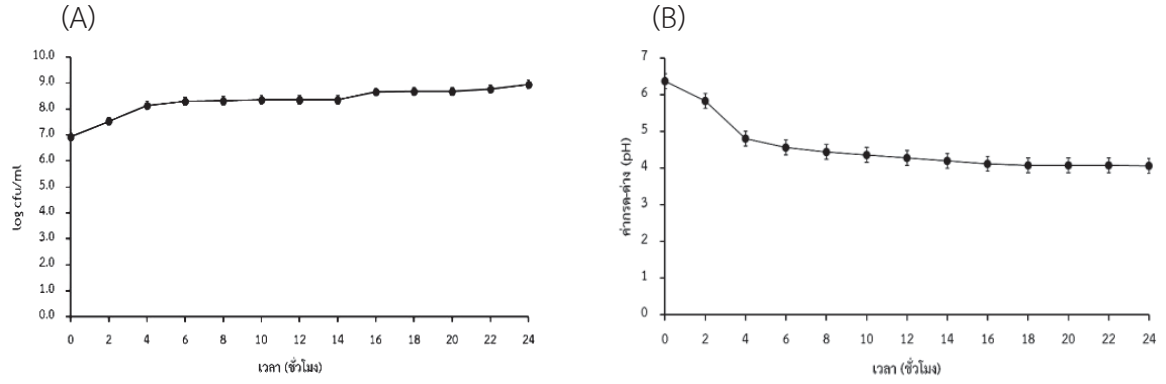
3.2 ลักษณะการเจริญของแบคทีเรีย *S. thermophilus* และการเปลี่ยนแปลงค่ากรด-ด่าง

เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *S. thermophilus* ด้วยอาหารเหลว MRS สามารถตรวจพบปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้นในชั่วโมงที่ 0 ปริมาณ 7.0 log cfu/ml โดยปริมาณแบคทีเรียในช่วง 0-6 ชั่วโมงมีการเปลี่ยนแปลงน้อย ซึ่งเป็นช่วงที่แบคทีเรียมีการปรับตัวเข้ากับสภาพอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ หลังจากนั้นแบคทีเรียจึงมีการเพิ่มปริมาณอย่างทวีคูณ 8.5 log cfu/ml (exponential phase) ซึ่งเริ่มพบได้ในชั่วโมงที่ 8 เป็นต้นไป และมีการเพิ่มปริมาณขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะกำหนดที่พบปริมาณแบคทีเรียสูงสุด 10.0 log cfu/ml สำหรับการเปลี่ยนแปลงค่ากรด-ด่างระหว่างการเจริญของแบคทีเรีย *S. thermophilus* มีแนวโน้มลดต่ำลง อย่างต่อเนื่องทำให้อยู่ในสภาวะที่เป็นกรดและมีค่าความเป็นกรดต่ำสุดเท่ากับ 4.8 ซึ่งพบได้ในชั่วโมงที่ 24 โดยในสภาวะนี้แบคทีเรีย *S. thermophilus* ยังสามารถเพิ่มปริมาณและรอดชีวิตต่อไปได้ซึ่งเป็นลักษณะของแบคทีเรียทนกรด (acid tolerant) และเมื่อมีปริมาณแบคทีเรียสูงขึ้นตามระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงส่งผลให้มีการสะสมกรดปริมาณสูงและมีความรุนแรงมากขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS (ภาพที่ 1)

ในขณะเดียวกันเมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *S. thermophilus* ด้วยน้ำนม UHT พบว่าแบคทีเรียมีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วกว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารเหลว MRS ทำให้แบคทีเรียเข้าสู่สภาวะการเจริญแบบทวีคูณ 7.5-8.0 log cfu/ml ในชั่วโมงที่ 2-4 หลังการเพาะเลี้ยงเชื้อ และมีปริมาณแบคทีเรียเพิ่มเรื่อย ๆ จนมีปริมาณสูงสุด 9.0 log cfu/ml ใน ชั่วโมงที่ 24 ซึ่งผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า *S. thermophilus* สามารถเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนที่มีอยู่ในปริมาณสูงในน้ำนมเป็นกรดอะมิโนที่จำเป็นสำหรับการเจริญของแบคทีเรียโดยเป็นผลมาจากเอนไซม์ Glutamate dehydrogenase ที่มีบทบาทอย่างมากในการช่วยให้แบคทีเรียสายพันธุ์นี้ปรับสภาพเข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่เมื่อถูกเพาะเลี้ยงด้วยน้ำนม โดยส่งผลให้มีการเจริญที่รวดเร็วและสามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างต่อเนื่อง [20] ในทำนองเดียวกันค่ากรด-ด่างในน้ำนม UHT มีการเปลี่ยนแปลงสู่สภาวะที่เป็นกรดอย่างรวดเร็วได้เช่นเดียวกับปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 2 และ 4 ในการทดลองพบว่ามีแนวโน้ม การเปลี่ยนแปลงของค่ากรด-ด่างที่ลดลงต่อเนื่องอย่างชัดเจนจนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *S. thermophilus* ซึ่งตรวจพบค่าความเป็นกรดต่ำสุดเท่ากับ 4.0 (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 1 การเจริญของแบคทีเรีย *S. thermophilus* (A) และการเปลี่ยนแปลงค่ากรด-ด่าง (B) เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว MRS



ภาพที่ 2 การเจริญของแบคทีเรีย *S. thermophilus* (A) และการเปลี่ยนแปลงค่ากรด-ด่าง (B) เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยน้ำนม UHT

จากการทดลองพบว่าปริมาณแบคทีเรีย *S. thermophilus* ที่เพิ่มขึ้นไม่ว่าจะมีการเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารเหลว MRS หรือน้ำนม UHT ซึ่งมีส่วนสำคัญทำให้มีการลดลงของค่ากรด-ด่างโดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อมีการเลี้ยงแบคทีเรีย *S. thermophilus* ด้วยน้ำนม UHT ที่มีการสะสมกรดแลคติคในปริมาณสูงซึ่งมีผลทำให้เกิดการตกตะกอนของโปรตีนในน้ำนมส่งผลให้มีลักษณะทางกายภาพที่หนืด และเกิดเป็นลิ่มของน้ำนม (curd) ได้อย่างรวดเร็วลักษณะการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเป็นผลมาจากแบคทีเรียกรดแลคติคเจริญในน้ำนมที่มีองค์ประกอบของน้ำตาลแลคโตสปริมาณสูง โดยทั่วไปน้ำตาลประเภทต่าง ๆ ถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ ฟรุกโตส กลูโคส แลคโตส แมนโนส และซูโคส เป็นต้น ซึ่งมีความสำคัญต่อการเจริญของแบคทีเรีย *S. thermophilus* และการหมักให้เกิดกรด แต่มีรายงานการวิจัยที่ไม่พบการเจริญของแบคทีเรีย เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยแหล่งคาร์บอน ได้แก่ อะราบิโนส เดกซ์ทริน กลีเซอรอล อินูลิน แมนนิทอล แรมโนส ซาลิซิน ซอร์บิทอล แป้ง และไซโลส ในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่มีค่าเป็นด่างเท่ากับ 9.6 [21] แบคทีเรีย *S. thermophilus* จัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียที่ต้องการสารอาหารที่จำเป็นในการเจริญ (fastidious) เช่น น้ำนมที่ประกอบด้วยสารอาหารต่างๆ ในปริมาณสูงโดยเฉพาะโปรตีน และจัดเป็นแบคทีเรีย

โปรไบโอติค (probiotic bacteria) ที่ย่อยน้ำตาลแลคโตสในน้ำนมทำให้เหมาะสมสำหรับการบริโภคของผู้แพ้น้ำตาลชนิดนี้ นอกจากนี้ยังสามารถสร้างสารบางชนิดที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้ [17, 21]

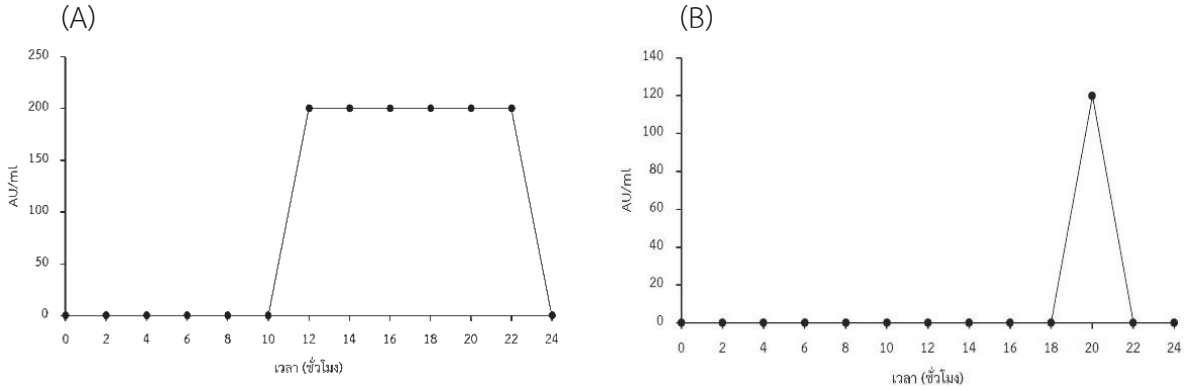
3.3 กิจกรรมของสารคล้ายแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรีย *S. thermophilus*

สารคล้ายแบคเทอริโอซินเป็นส่วนที่มีความสำคัญในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 2 ชนิด *S. aureus* และ *S. typhimurium* ซึ่งสารเหล่านี้ได้มาจากส่วนใสที่ถูกปั่นแยกได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *S. thermophilus* (cell-free supernatant) ด้วยอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีการเก็บตัวอย่างทุก ๆ 2 ชั่วโมงมาตรวจสอบ ซึ่งสามารถสังเกตกิจกรรมของสารคล้ายแบคเทอริโอซินได้จากการเกิดบริเวณใสบนอาหารแข็ง Muller Hinton ที่มีแบคทีเรียก่อโรคเจริญอยู่โดยเริ่มปรากฏและสามารถวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่เกิดจากการถูกยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *S. aureus* จากตัวอย่างส่วนใสที่เก็บได้จากอาหารเหลว MRS ในชั่วโมงที่ 12 เป็นต้นไปจนถึงชั่วโมงที่ 22 โดยพบค่ากิจกรรมการยับยั้งจากความเจือจางของสาร 10x ซึ่งเป็นความเจือจางสูงสุดที่ยังพบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคซึ่งมีค่าเท่ากับ 200 AU/ml (ภาพที่ 3) แต่พบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *S. typhimurium* ได้ในชั่วโมงที่ 20 ของการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *S. thermophilus* เท่านั้นมีค่าเท่ากับ 120 AU/ml ซึ่งเป็นค่ากิจกรรมการยับยั้งที่ต่ำกว่าค่าที่พบในแบคทีเรียก่อโรค *S. aureus* (ภาพที่ 3)

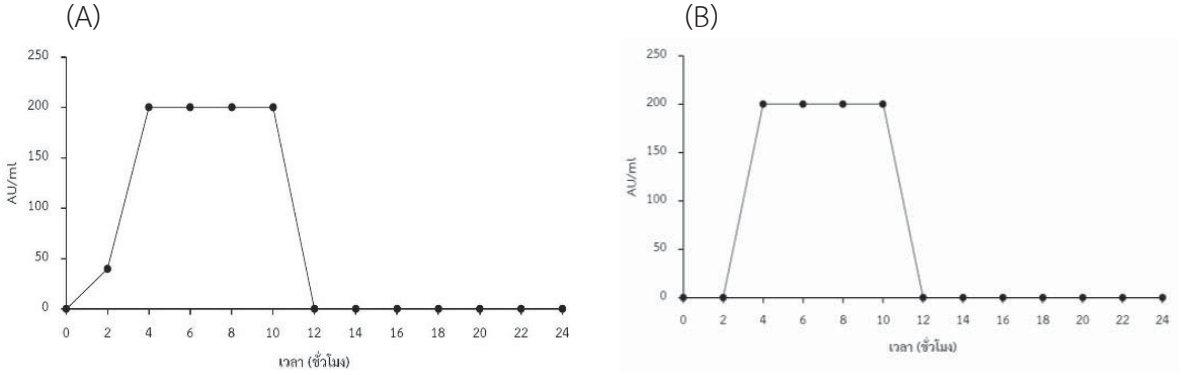
สำหรับการสร้างสารคล้ายแบคเทอริโอซินเมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *S. thermophilus* ด้วยน้ำนม UHT มีกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *S. aureus* ที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ซึ่งเริ่มพบได้ในชั่วโมงที่ 2 ของการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *S.thermophilus* โดยมีค่าเท่ากับ 40 AU/ml ซึ่งคำนวณได้จากความเจือจางของสาร 2x (ภาพที่ 4) หลังจากนั้นพบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* เพิ่มสูงขึ้นเป็น 200 AU/ml ซึ่งคำนวณได้จากสารละลายส่วนใสที่มีความเจือจาง 10x โดยพบในช่วง 4-10 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *S. thermophilus* สำหรับการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *S. typhimurium* ที่เป็นแบคทีเรียแกรมลบจะเริ่มถูกยับยั้ง การเจริญด้วยสารคล้ายแบคเทอริโอซินในชั่วโมงที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *S. thermophilus* โดยมีค่ากิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 200 AU/ml และยังคงอยู่จนถึงชั่วโมงที่ 10 (ภาพที่ 4)

การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *S. thermophilus* เพื่อให้สร้างสารคล้ายแบคเทอริโอซินด้วยน้ำนม UHT ซึ่งเกิดขึ้นได้รวดเร็วกว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารเหลว MRS โดยมีค่ากิจกรรมการถูก ยับยั้งในแบคทีเรียก่อโรคแกรมบวก *S. aureus* ได้มากกว่าแกรมลบ *S. typhimurium* ที่มีองค์ประกอบโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ช่วยปกป้องจากการถูกทำลายรวมทั้งเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้แบคทีเรียแกรมลบมีความทนทานและถูกยับยั้ง การเจริญได้น้อยจากสารแบคเทอริโอซินที่สร้างโดยแบคทีเรียแกรมบวก [22] จากรายงานการวิจัยพบว่าการสร้างสารแบคเทอริโอซินชนิดต่าง ๆ จากแบคทีเรีย *S. thermophilus* ST113 ซึ่งมีการสร้างสารประเภทแบคเทอริโอซินชนิดเทอร์โมฟิลิน (thermophilins) [23] จะถูกสร้างได้เมื่อมีค่ากรด-ด่างอยู่ในช่วง 5.2-6.0 แต่จะมีการผลิตสารได้มากที่ค่ากรด-ด่างช่วง 5.5-6.0 [24, 25] มีเพียงสารแบคเทอริโอซินไม่กี่ชนิดที่พบได้ในค่ากรด-ด่างต่ำกว่า 5.0 ส่วนใหญ่สารแบคเทอริโอซินพบได้มากในช่วงที่มีการเจริญแบบทวีคูณของแบคทีเรีย ซึ่งจะเกิดขึ้น

ระหว่างที่มีการผลิตและการสะสมกรดแลคติคในสภาวะการเพาะเลี้ยง ดังนั้นแบคทีเรีย *S. thermophilus* สามารถนำมาใช้เป็นหัวเชื้อเดี่ยวที่สำคัญหรือใช้ร่วมกับแบคทีเรียกรดแลคติคชนิดอื่น ๆ ในการผลิตนมหมัก เช่น โยเกิร์ต เพื่อให้มีรสชาติที่ดีมากขึ้น [25, 26]



ภาพที่ 3 กิจกรรมของสารคล้ายแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรีย *S. thermophilus* เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว MRS ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *S. aureus* (A) และ *S. typhimurium* (B)



ภาพที่ 4 กิจกรรมของสารคล้ายแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรีย *S. thermophilus* เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยน้ำนม UHT ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *S. aureus* (A) *S. typhimurium* (B)

4. สรุปผลการวิจัย

การเจริญของแบคทีเรีย *S. thermophilus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS มีปริมาณสุดท้ายสูงกว่าในน้ำนม UHT แต่แบคทีเรียเข้าสู่การเจริญแบบทวีคูณอย่างรวดเร็วและมีการเปลี่ยนแปลงค่ากรด-ด่างเป็นกรดที่มีค่าต่ำสุดจะพบได้ในน้ำนม UHT สำหรับการสร้างสารคล้ายแบคเทอริโอซินที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *S. thermophilus* ด้วยอาหารเหลว MRS หรือ น้ำนม UHT มีกิจกรรม ของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค *S. aureus* และ *S. typhimurium* ได้ แต่อย่างไรก็ตามสารนี้มีกิจกรรมยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค *S. aureus* ที่มากกว่า *S. typhimurium* โดยแสดงค่ากิจกรรมการยับยั้ง การเจริญของแบคทีเรียก่อโรคเริ่มต้น 40 AU/ml ที่ความเจือจาง 2x และมีค่าสูงสุด 200 AU/ml ที่คำนวณได้จากความเจือจางสูงสุด 10x ซึ่งผลการทดสอบแสดงถึงปริมาณของสารคล้ายแบคเทอริโอซินที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *S. thermophilus* มีปริมาณสูงและมีระยะเวลาเหมาะสม ดังนั้นสภาวะดังกล่าวในการ

สร้างสารยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคให้ได้กิจกรรมสูง สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตนมหมักประเภทต่าง ๆ ในระดับครัวเรือนจนถึงระดับอุตสาหกรรมซึ่งเกิดจากการใช้หัวเชื้อแบคทีเรียจากผลิตภัณฑ์นมหมักทางการค้าที่ประกอบด้วยแบคทีเรียกรดแลคติคสายพันธุ์ *S. thermophilus* ซึ่งทำให้ได้สารที่มีประโยชน์ต่าง ๆ และมีประสิทธิภาพมากที่สุด

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากโครงการ Senior project 2018 ของสาขาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และศิลปศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน จังหวัดนครราชสีมา

6. เอกสารอ้างอิง

[1] Brul S., Coote P. Preservative agents in foods mode of action and microbial resistance mechanisms. Int J Food Microbiol 1999; 50:1-17.

[2] อัจฉรา ดลวิทยาคุณ, จักรกฤษณ์ เคลือบวัง. การออกแบบรายการอาหารแลกเปลี่ยนสำหรับโรคเบาหวานโดยใช้เทคนิคการค้นหาแบบท้องถิ่นดัดแปร. วารสารวิจัย มทร. กรุงเทพ 2017; 11(1):1-7.

[3] Perez RH., Zendo T., Sonomoto K. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. Microb Cell Fact 2014; 13:1-13.

[4] Jack RW., Tagg JR., Ray B. Bacteriocins of gram-positive bacteria. Microbiol Rev 1995; 59(2):171-200.

[5] Ivanova I., Miteva V., Stefanova TS., et al. Characterization of a bacteriocin produced by *Steptococcus thermophilus* 81. Int J Food Microbiol 1998; 42:147-158.

[6] Choi MH., Park YH. Selective control of *Lactobacilli* in kimchi with nisin. Lett Appl Microbiol 1998; 30:173-177.

[7] Davies EA., Milne CF., Bevis HE., et al. Thomas LV., Delves-Broughton J. Effective use of nisin to control lactic acid bacterial spoilage in vacuum packed bologna-type sausage. J Food Prot 1999; 62:1004-1010.

[8] Jimenez LH., Guillouard I., Guedon E., et al. Physiology of *Streptococcus thermophilus* during the late stage of milk fermentation with special regard to sulfur amino acid metabolism. Proteomics 2008; 8:4273-4286.

[9] Rossi F., Marzotto M., Cremonese S., et al. Diversity of *Streptococcus thermophilus* in bacteriocin production; inhibitory spectrum and occurrence of thermophilin genes. Food Microbiol 2013; 35:27-33.

[10] Gutiérre D., Delgado S., Vázquez-Sánchez D., et al. Incidence of *Staphylococcus aureus* and analysis of associated bacterial communities on food industry surfaces. Appl Environ Microbiol 2012; 78(24):8547-8554.

[11] Hennekinne JA., Buyser ML., Dragacci S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. FEMS Microbiol Rev 2012; 36:815-836.

[12] Jørgensen HJ., Mork T., Caugant DA., et al. Genetic variation among *Staphylococcus aureus* strains from Norwegian bulk milk. Appl Environ Microbiol 2005; 71:8352-8361.

[13] Balaban N., Rasooly A. Staphylococcal enterotoxins. Int J Food Microbiol 2000; 61:1-10.

[14] Park YK., Bearson B., Bang SH., et al. Internal pH crisis, lysine decarboxylase and acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. Mol Microbiol 1996; 20:605-611.

[15] Baik HS., Bearson S., Dendar S., et al. The acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* provides protection against organic acids. Microbiol 1996; 142:3195-3200.

[16] Batdorj B., Dalgalarrondo M., Choiset Y., et al. Purification and characterization of two bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Mongolian airag. J Appl Microbiol 2006; 101:837-848.

[17] Sturino JM., Klaenhammer TR. Bacteriophage defense systems and strategies for lactic acid bacteria. Adv Appl Microbiol 2004; 56:331-78.

[18] Hardie JM., Whiley RA. Recent developments in streptococcal taxonomy: their relation to infections. Rev Med Microbiol 1994; 5:151-162.

[19] Fonseca F., Marin M., Morris GJ. Stabilization of frozen *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in glycerol suspensions: freezing kinetics and storage temperature effects. Appl Environ Microbiol 2006; 72(10): 6474-6482.

[20] Lu WW., Wang Y., Wang T., et al. The global regulator CodY in *Streptococcus thermophilus* controls the metabolic network for escalating growth in the milk environment. Appl Environ Microbiol 2015; 81:2349-2358.

[21] Kolars JC., Levittt MD., Aouji M., et al. Yogurt: an autodigesting source of lactose. N Engl J Med 1984; 310:1-3.

[22] Prudêncio CV., Santos MT., Vanetti MCD. Strategies for the use of bacteriocins in gram-negative bacteria: relevance in food microbiology. J Food Sci Technol 2015; 52(9):5408-5417.

[23] Somkuti GA., Renye JA. Effect of a BlpC-based quorum sensing induction peptide on bacteriocin production in *Streptococcus thermophilus*. J Food Res 2015; 4:88-96.

[24] Chinachoti N., Matsusaki H., Sonomoto K., et al. Utilization of xylose as an alternative carbon source for nisin Z

production by *Lactococcus lactis* IO-1. J Fac Agr Kyushu U 1997; 42:171-181.

[25] Simova ED., Beshkova DM., Dimitrov ZP., et al. *In vitro* and *in situ* bacteriocin activity of lactic acid bacteria from Bulgarian dairy products and methods for making of *Lactobacillus* protective fermented milks with bacteriocin inhibitory substance. Bulg J Agric Sc 2008; 014:28-42.

[26] Beshkova D., Simova E., Frengova G., et al. Production of flavor compounds by yogurt starter cultures. J Ind Microbiol Biotechnol 1998; 20: 180-186.